응용약물학회지, The Journal of Applied Pharmacology, 8, 32-37(2000)

대두 (*Glycine max* (L.) Merrill.)에서 추출한 DDMP 사포닌의 활성산소종 제거 작용

조수진[1] · 백희준[1] · 이상선[1] · 정일민[2] · 하지희[3] · 강주섭[3] · 고현철[3] · 신인철[3] · 이창호[3]*
[1]한양대학교 식품영양학과, [2]건국대학교, 식량자원학과, [3]한양대학교 의과대학 약리학교실

Studies on the ROS (Reactive Oxygen Species)-Scavenging Activities of DDMP saponins Isolated from *Glycine max* (L.) Merrill

Soo Jin Cho[1], Hee Jun Baik[1], Sang Sun Lee[1], Ill Min Chung[2], Ji Hee Ha[3], Ju Seop Kang[3], Hyun Chul Koh[3], In Chul Shin[3], Chang Ho Lee[3]*

[1]Department of Food and Nutrition, Hanyang University, 133-791, Seoul, Korea.
[2]Konkuk University, Department of Crop Science, 143-701, Seoul, Korea.
[3]Department of Pharmacology, Hanyang University, College of Medicine, Seoul 133-791, Korea

(Received March 9, 1999; accepted March 21, 2000)

Abstract – Recently new soybean saponins with DDMP (2,5-dihydroxy-6-methyl-2,3,- dihydro-4H-pyran-4-one) moiety have been isolated from legumes. The purpose of this study is to characterize ROS scavenging activities of DDMP saponins (αg, βg saponin) isolated from *Glycine max* (L.) Merrill. The scavenging activity on · OH was examined in terms of lipid peroxidation in the rat liver homogenates and the same activity on O_2^- was also determined in the xanthine-xanthine oxidase system, respectively. Up to 0.25 mg DDMP saponins (αg and βg saponins) did not cause any significant effects on the prevention of lipid peroxidation as compared with the control group. In terms of superoxide scavenging activities, 0.25 and 0.5 mg αg saponin inhibits only 2.6% and 5.5% ($p<0.05$) of the control group, respectively. However, αg saponin dose-dependently ($p<0.01$, $r=0.955$) inhibits the formation of superoxide radical upto 21.3% of the control group with a maximal dose of 0.5 mg ($p<0.01$), equivalent to 0.17 units of superoxide dismutase activity.

Key words □ DDMP saponin αg, βg saponin, · OH radical, O_2^-radical, antioxidant

여러 역학적 연구에서 대부분의 만성질환의 발생과 관계된 중요한 환경적 요인으로 식이와 생활습관을 들고 있으며, 그의 한 예로서 서양인보다 콩 섭취가 많은 동양인들에게서 유방암과 결장암의 발생률이 낮고, 또한 육류 대신 대두를 원료로 한 대용육류를 자주 섭취하는 채식주의자들에게서도 이러한 질환들이 낮다고 보고하고 있다 (Nair 등, 1984). 여러 만성질환의 예방을 위해 식물성 식품의 섭취를 권장하고 있으며 이러한 식물성 식품에서 다양한 생리학적 활성을 가지는 여러 식물화학성분들 (phytochemicals)이 밝혀지고 연구되어지고 있다.

최근 들어 미국 국립 암 연구소(National Cancer Institute, NCI)에서도 이러한 식품소재 중 항암물질의 탐색을 시행한 결과 암을 예방할 수 있는 물질로 단백 분해 효소 저해제(protease inhibitor), phytic acid, phytosterol, saponin 및 isoflavones들이 제시되었고 대두에는 이러한 물질들이 많이 함유되어 있다고 발표하였다. 단백 분해 효소 저해제와 phytic acid는 혈중 콜레스테롤을 낮추는 작용이 있으며 (Anderson 등, 1995), phytosterol은 호르몬과 유사한 작용과 항암작용이 보고되었고(Adlercreutz 등, 1995), isoflavones(대표적으로 genistein과 daidzein)은 항산화작용과 항암 및 항종양작용이 보고 되었다(Peterson, 1995; Cai 등, 1996; Rao 등, 1997).

대두 사포닌(Soybean Saponin)은 steroid 나 triterpenoid 형태의 aglycone에 하나 또는 둘 이상(mono- 또는 bidesmosidic)의 당 부분이 붙은 배당체 (glycoside)이다. 대두 사포닌의 aglycone은 Oleanene-Sapogenols(강 등, 1996)로써 soyasapogenol A, B, C, D 및 E의 형태가 존재하며, 사포닌의 구조규명으로 지금까지 soyasaponin I, II, III(Kitagawa 등, 1988), IV, V, A1(Kitagawa 등, 1985a), A2(Kitagawa 등, 1985b), A3 과 acetyl-soyasa-ponin A1~

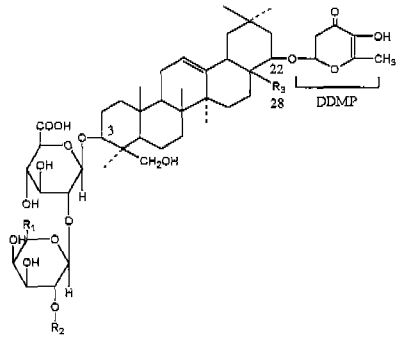
*To whom correspondence should be addressed.

A6(Kubo 등, 1984; Taniyama 등, 1988)등 13 여종의 구조가 밝혀져 있다.

현재까지 대두의 조 사포닌(crude saponin)의 생리활성으로는 항혈전작용(Kubo 등, 1984), 지질산화억제작용, 과산화지질상승의 억제작용, 간손상 억제효과(Ohminami 등, 1981; Ohminami 등, 1984), 항종양작용(Konoshima 등, 1992), 세포 돌연변이 억제효과(전 등, 1999), HIV 감염저해효과(Nakashhima 등, 1989), 항암효과(Koratkar 등, 1997; Sung 등, 1996) 등이 보고되고 있다.

1992년 Kudou 등(Kudou 등, 1992)과 Massiot 등(Massiot 등, 1992)은 13여종의 soyasaponin과는 다른 특이한 구조를 가진 대두 사포닌 (soyasaponin)을 대두로부터 처음 분리·정제하였다. 최근들어 분리 동정된 이 DDMP soyasaponin은 Fig. 1 에서와 같이 aglycone의 C-22 hydroxyl 위치에 특정한 DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl- 4H-pyran-4-one) 구조가 acetal 결합을 하고 있다. soyasaponin V, I, II, III, 그리고 IV에 이 DDMP 부분이 존재하는 사포닌들이 분리되어 각각 soyasaponin αg, βg, βa, γg 및 γa로 명명되어졌다(Kodou 등, 1993).

순수한 대두 사포닌이 분리되고 구조가 규명됨에 따라 생리활성과 화학구조사이의 관련성에 관한 연구가 활발히 진행중이다. 대두 사포닌의 항산화효과는 이들 사포닌에 결합되어있는 radical 제거활성이 강한 DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl- *4H*-pyran- 4-one)에 기인한 것으로 밝혀졌다(Daveby 등, 1998). DDMP 사포닌이 ESR (Electron Spin Resonance)을 이용한 연구에서 superoxide dismutase와 같은 작용을 한다는 보고가 있으며, C-28 위치의 aldehyde group도 유사한 작용을 한다고 보고되고 있다. 그러나 그 활성도에 대해서는 많은 차이를 보이고 있고(Yoshiki 등, 1995; Okubo 등, 1996), 그 외에 다른 항산화기전에 대해서는 아직 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 실험은 대두에서 추출한 DDMP 사포닌 중 soyasaponin αg와 βg의 항산화효과를 규명할 목적으로 *in vitro*에서 여러 활성산소종의 제거능을 조사하였다.



	R_1	R_2	R_3
soyasaponin αg	CH_2OH	β-D-Glc	CH_3
soyasaponin αa	H	β-D-Glc	CH_3
soyasaponin βg	CH_2OH	α-L-Rha	CH_3
soyasaponin βa	H	α-L-Rha	CH_3
soyasaponin γg	CH_2OH	H	CH_3
soyasaponin γa	H	H	CH_3

Fig. 1. Structure and nomenclature of DDMP saponins.

실험방법

시료

Kudou 등 (1993) 와 Daveby 등 (1998)의 방법에 의하여, 대두로부터 추출한 순수 DDMP 사포닌을 사용하였다. 특히, 시료로 사용된 DDMP 사포닌 중 soyasaponin βg의 경우에는 순도검사를 실시하였고 GC-MS를 통해 soyasaponin βg의 구조를 확인한 후, 본 실험에 이용하였다.

실험동물

실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley종 웅성 흰쥐로 삼육동물센터에서 생후 약 5주령된 쥐를 구입하였고, 실험에 사용하기 전까지 명암주기가 자연채광이고, 온도가 25°C로 유지된 사육장에서 사육하였다. 사육기간동안 물과 사료 (고형배합사료)는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

효소원 제조

흰쥐는 단두 처리한 후 차가운 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 관류 시킨후 간을 적출하였다. 적출한 간조직에 1.15% KCl(Sigma)을 가하여 10%(w/v) 균질액을 만든 후 8,000 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 원심분리에서 얻어진 상층액에 2 mM $FeCl_3$ 과 soyasaponin αg, βg를 각각 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 및 0.25 mg 또는 0.2와 20 mM Vitamin E(α-tocopherol acetate, Kanto chemical, Japan) 되도록 가하고 37°C 교반용 항온수조에서 20분간 배양한 후 malondialdehyde와 superoxide dismutase 활성 측정(pyrogallol 법)을 위한 시료로 사용하였다.

Malondialdehyde 정량

Thiobarbituric acid를 이용한 Aust의 방법(Mitra 등, 1999)을 응용하여 간조직 내의 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 측정하였다. 즉, 준비한 시료 100 μl에 15% trichloroacetic acid(Sigma), 0.38% thiobarbituric acid(TBA, Sigma), 0.05% butylated hydroxytoluene(BHT, Sigma), 및 0.25 N HCl(Kanto, Japan)을 포함하는 용액 1 ml을 가하여 과산화지질유도 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 화합물은 80°C의 수욕조상에서 15분간 열탕가열한 후, 4°C에서 냉각하고 15,000 × g에서 원

심분리했으며 그 결과 얻어진 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정(Beckman DU® 650 spectrophoto-meter, U.S.A.)하여 정량하였다.

간 조직에서 superoxide dismutase 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD)에 의해 pyrogallol의 자동산화가 억제되는 원리를 이용한 Marklund 등의 방법(Marklund 등, 1974)으로 측정하였다. 즉, pyrogallol의 자동산화 과정 첫 단계에서 나타나는 황갈색의 흡광도를 측정하기 위해서, 준비한 시료 100 μl를 phosphate buffer (PB, pH 7.4)로 10배(v/v) 희석한 후, 22,000×g로 초고속 원심 분리(Beckman OptimaTM TL ultracen-trifuge, U.S.A.)하였다. 그 결과 얻어진 상층액 100 μl에 1시간이상 공기를 포화시킨 50 mM Tris-Acetate Buffer(pH 8.20) 9.8 ml과 20 mM pyrogallol 100 μl(Sigma)를 가하여 420 nm에서 흡광도의 변화를 3분간 측정하였다.

Xanthine-xanthine oxidase system에서 superoxide dismutase의 활성 측정

DDMP saponin 자체의 superoxide($O2^{-}$)를 제거능력을 알아보기 위하여 xanthine-xanthine oxidase system에서 Sun 등의 방법(Sun 등, 1988)에 준하여 측정하였다. 0.1 mM xanthine, 0.1 mM EDTA, bovine serum albumin, 25 μM NBT및 40 mM Na_2CO_3(pH 10.2)를 함유하는 SOD reagent 2.45 ml에 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 및 0.25 mg DDMP saponin(in phosphate buffer saline)을 함유하고 있는 용액 500 μl와 xanthine oxidase 50 μl를 가한 후, 25°C 항온수조에서 20분간 반응시키면 NBT의 환원으로 formazan이 생성되고 이 반응을 $CuCl_2$ 0.8 mM로 정지시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하고 blank와 비교하여 저해율(%)을 계산하였다.

통계처리

모든 군의 결과치는 평균치±표준편차로 표기하고 이들에 대한 통계적 처리는 Duncan's new multiple range test를 사용하여 통계적 차이를 검증하였다. DDMP 사포닌의 SOD 유사작용은 student's *t*-test를 시행하였으며 superoxide radical의 제거와 DDMP 사포닌의 농도증가간의 상관관계는 Pearson correlation coefficient를 구하였다.

실험결과

DDMP saponins

DDMP saponin류의 구조 및 명명법은 Fig. 1과 같다.

Hydroxyl radical (·OH)의 제거 작용

DDMP 사포닌의 ·OH radical 제거능을 알아보기 위하여 흰쥐 간 균질액에 $FeCl_3$가 2 mM 되도록 첨가하여 ·OH radical 발생을 유도 한 후, Vitamin E와 DDMP 사포닌의 항산화능을 비교한 결과가 Fig. 2 및 Fig. 3 과 같이

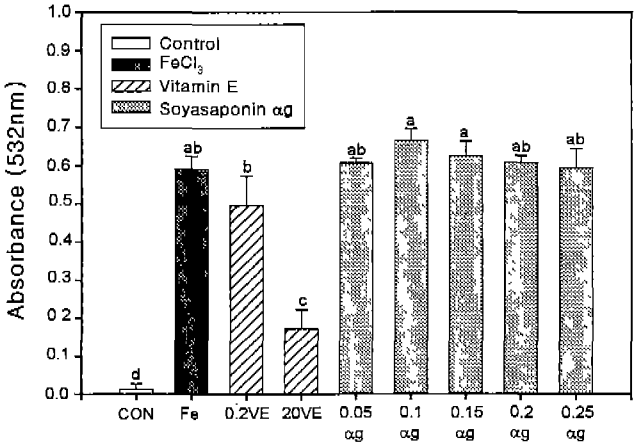


Fig. 2. Effects of soyasaponin αg concentration on MDA levels. CON: control, Fe: 2 mM $FeCl_3$ treatment, 0.2VE: 0.2 mM Vitamin E+$FeCl_3$ treatment. 20VE: 20 mM Vitamin E+FeCl3 treatment, 0.05 *α* g: 0.05 mg αg+$FeCl_3$ treatment, 0.1 *α* g: 0.1 mg *α* g+FeCl3 treatment, 0.15 αg: 0.15 mg αg+ $FeCl_3$ treatment, 0.2αg: 0.2 mg αg+ $FeCl_3$ treatment, 0.25 αg: 0.25 mg αg+$FeCl_3$ treatment. Values having the same superscript (a, b, c, d) are not significantly different each other ($p<0.05$) by Duncan's new multiple range test.

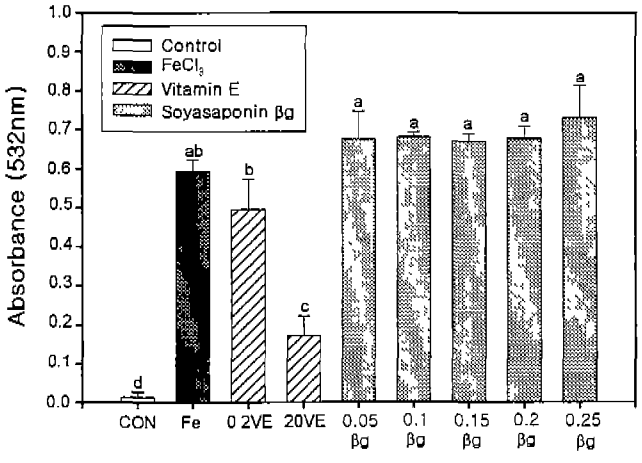


Fig. 3. Effects of soyaponin βg concentration on MDA levels. CON: control, Fe: $FeCl_3$ treatment, 0.2VE: 0.2 mM Vitamin E+$FeCl_3$ treatment, 20VE: 20 mM Vitamin E+$FeCl_3$ treatment, 0.05 βg: 0.05 mg βg+$FeCl_3$ treatment, 0.1 βg: 0.1 mg. βg+ $FeCl_3$ treatment, 0.15 βg: 0.15 mg βg+$FeCl_3$ treatment, 0.2 βg: 0.2 mg βg+$FeCl_3$ treatment, 0.25 *β* g: 0.25 mg βg+$FeCl_3$ treatment. Values having the same superscript (a, b, c, d) are not significantly different each other ($p<0.05$) by Duncan's new multiple range test.

관찰되었다. 대조군의 흡광도는 0.013±0.014이였고, $FeCl_3$로 반응시킨 군에서는 0.59±0.033(대조치의 45배, $p<0.05$, $p<0.001$)으로 증가함을 보인 반면, Vitamin E를 0.2 mM과 20 mM 수준으로 첨가했을 때 각각 0.49±0.08, 0.17±0.05로 $FeCl_3$군보다 MDA 값이 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$, $p<0.001$). Soyasaponin αg와 βg의 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 및 0.25 mg등의 농도별 투여군들 모두에서 어떠한 유의적인 결과치도 나타나지 않았다.

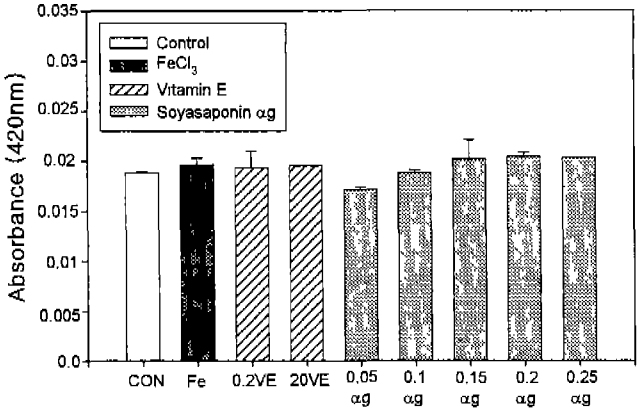


Fig. 4. Effects of soyasaponin αg concentration on SOD activity. CON: control, Fe: $FeCl_3$ treatment, 0.2VE: 0.2 mM Vitamin E+$FeCl_3$ treatment, 20VE: 20 mM Vitamin E+$FeCl_3$ treatment, 0.05 αg: 0.05 mg αg+$FeCl_3$ treatment, 0.1 αg: 0.1 mg. αg+$FeCl_3$ treatment, 0.15 αg: 0.15 mg αg+$FeCl_3$ treatment, 0.2 αg: 0.2 mg αg+$FeCl_3$ treatment, 0.25 αg: 0.25 mg αg+$FeCl_3$ treatment.

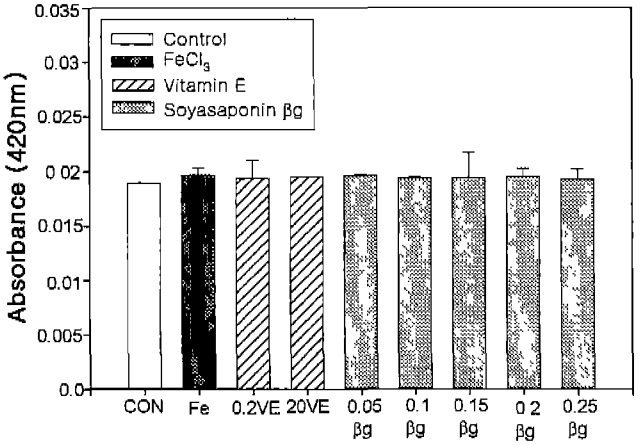


Fig. 5. Effects of soyasaponin βg concentration on SOD activity. CON: control, Fe: $FeCl_3$ treatment, 0.2VE: 0.2 mM Vitamin E+$FeCl_3$ treatment, 20VE: 20 mM Vitamin E+$FeCl_3$ treatment, 0.05 βg: 0.05 mg βg+$FeCl_3$ treatment, 0.1 βg: 0.1 mg. βg+$FeCl_3$ treatment, 0.15 βg: 0.15 mg βg+$FeCl_3$ treatment, 0.2 βg: 0.2 mg βg+$FeCl_3$ treatment, 0.25 βg: 0.25 mg βg+$FeCl_3$ treatment.

Superoxide radical (O_2^-)의 제거작용

Liver homogenate에서 Superoxide Dismutase의 활성

DDMP 사포닌의 O_2^- radical 제거능을 알아보기 위하여 흰쥐의 간 균질액에서 superoxide dismutase 활성을 pyrogallol법으로 측정한 결과 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. $FeCl_3$만으로 반응시킨 군, $FeCl_3$와 0.2 또는 20 mM Vitamin E군 그리고, soyasaponin αg와 βg의 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 및 0.25 mg등의 농도별 투여군 사이에 어떠한 유의적인 차이나 경향도 보이지 않았다.

Xanthine-xanthine oxidase system에서 superoxide dismutase의 활성

Xanthine-xanthine oxidase system에 의해서 생성된 superoxide 제거정도를 %저해율로 계산하여 그 제거능을 조사한 실험결과 Fig. 6 과 같다. Soyasaponin αg 0.25과 0.5 mg에서 각각 2.6과 5.5%($p<0.05$)이고, Soyasaponin βg 0.15, 0.25 그리고 0.5 mg의 농도에서 각각 8.0, 11.7 및 21.3%($p<0.01$)로 관찰되었으며, DDMP 사포닌의 농도증가와 저해율 증가간에는 유의적인 양의 상관관계가 있었다 (αg: $p<0.05$, $r=0.827$, βg: $p<0.01$, $r=0.955$). 표준품 superoxide dismutase를 이용하여 DDMP 사포닌의 superoxide radical 제거능을 unit로 환산한 결과 0.5 mg soyasaponin βg는 약 0.17 unit의 SOD 활성을 나타내었다.

고 찰

대두에서 분리 정제된 사포닌의 항산화 작용 연구로서 soyasaponin αg 및 βg의 활성산소종 제거능을 측정하였다. 여러 활성 산소종 중에서 hydroxyl radical(·OH)은 식작용, 내인성 생체 분자의 생합성, 및 지질과산화물의 분해과정 중에 생성되는 활성이 매우 큰 자유 radical로써,

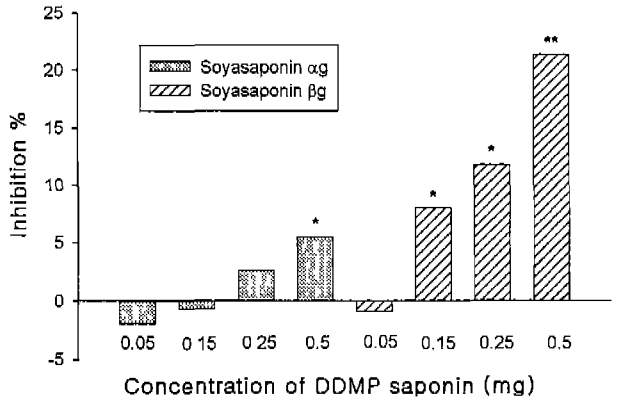


Fig. 6. Superoxide radical inhibition by DDMP saponin. Significantly different from blank at $p<0.05$* and $p<0.01$** by student *t*-test.

수소이온의 제거, 추가, 및 전자 전달 등의 반응에 의하여 단백질, DNA 및, 지질 등의 생체분자를 무차별적으로 심각하게 손상시킨다. Superoxide(O_2^-) radical은 hydroxyl radical에 비하여 반응성이 적으며 superoxide dismutase에 의하여 과산화수소 (H_2O_2)로 전환되며, 생성된 과산화수소는 catalase에 의하여 물과 산소로 분해된다(Gutteridge, 1986). 따라서, 이들 효소들은 superoxide radical과 과산화수소 증가에 따른 조직손상을 방어하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 본 실험에 사용된 Ferric ion(Fe^{3+})은 hydroxyl radical의 생성, lipid peroxides의 분해 (Braughler 등, 1987), 및 perferryl species의 형성 등과 같은 다양한 기전을 통하여 지질 과산화를 촉진한다.

산화적 스트레스(예컨대, 지질 과산화 등) 억제기능을 가진 물질로 알려진 vitamin C, E, β-carotene 및 superoxide dismutase 등은 peroxyl radical을 제거함으로써 과산화반응을 중지시킨다(Paller 등, 1984; Wasil 등, 1987). 이와 관련하여, 본 실험에서도 Vitamin E는 hydroxyl radical에 의하여 매개되는 지질과산화 반응을 효과적으로 저해하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 Vitamin E가 발암물질에 의한 지질 과산화물 생성을 효율적으로 억제함을 보여준 연구에서도 관찰되었다(최 등, 1997).

Soyasaponin의 hydroxyl radical 제거능과 관련하여, 분리 정제된 soyasaponin I, II, III 및 IV는 지질 과산화를 억제하는 것으로 보고되었으나(Kinjo 등, 1998), 본 실험 결과에 의하면, soyasaponin αg와 βg는 hydroxyl radical 제거능은 갖지 못하며, 연속된 지질과산화 반응에 대한 억제효과도 없는 것으로 사료된다.

Soyasaponin αg 및 βg의 superoxide radical 제거능과 관련하여, pyrogallol의 자동산화 정도를 지표로 하여 흰쥐의 간 균질액에 존재하는 SOD 활성에 대한 영향을 측정한 결과 의미있는 결과를 관찰할 수 없었다. 그러나, xanthine-xanthine oxidase 계를 이용한 측정결과에 의하면, 제거되어지는 superoxide radical 량은 soyasaponin βg의 농도에 의존적으로 증가하였으며, 이러한 효과는 soyasaponin αg에서는 관찰되지 않았다. Soyasaponin βg의 SOD활성 정도는 여러 보고들간에 차이가 있는바, Yoshiki등이 보고한 βg의 SOD활성은 본 연구결과의 1/100 정도, electron spin resonance와 chemilumine-scence법에 의한 연구에서는 100배 정도의 활성이 보고되었다 (Okubo등, 1996; Yoshiki등, 1995). 이는 시료추출 및 실험방법의 차이에 기인되는 것으로 사료된다. Soyasaponin의 superoxide 제거능은 maltol기와 aldehyde기에 의해서 나타나며, aldehyde기에 의해서 더 큰 활성을 나타내는 것으로 보고하였다(Yoshiki등, 1995). Maltol은 DDMP 구조의 하나로써 DDMP사포닌의 저장, 추출, 및 열처리 과정에서 soyasaponin I 과 maltol로 분리되며, 비교적 안정하고, DNA 사슬을 파괴하거나, Fe(III)를 환원시키는 능력이 없다. 또한, 이것은 대두를 조리할 때 생성되며, 대두 조리식품의 달콤한 향을 제공한다(Yoshiki등, 1996; Hiramoto 등, 1997; Kudou등, 1993). 한편, DDMP 구조와 상관없이, 여러 종류의 soyasaponin 처치에 의하여 H_2O_2로 손상된 세포의 생존율이 증가되는 것이 관찰되었다(Yoshikoshi 등, 1996). 이는 soyasaponin의 catalase 활성에 기인하는 것으로 생각된다.

그러므로, 대두 섭취의 항산화 효과를 보다 자세히 규명하기 위하여 대두 crude saponin 및 분리 정제된 대두 사포닌의 *in vivo*에서의 작용기전 등에 관한 연구가 향후 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

Adlercreutz, C.H.T., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Hockerstedt, K.A. V., Watanabe, S., Hamalainen, E.K., Markkanen, M.H., Makela, T.H., Wahala, K.T., Hase, T.A. and Fotsis, T. (1995). Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr.* **125**, 757S-770S.

Anderson, R.L. and Wolf, W.J. (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* **125**, 581S-588S.

Braughler, J.M., Chase, R.L. and Pregenzer, J.F. (1987). Oxidation of ferrous iron during peroxidation of various lipid substances. *Biochem. Biophys. Acta.* **921**, 457-467.

Cai, Q. and Wei, H. (1996). Effect of dietary genistein on antioxidant activities in SENCAR mice. *Nutr. Cancer.* **25**, 1-7.

Daveby, Y.D., Aman, P., Betz, J.M. and Musser, S.M. (1998). Effect of storage and extraction on ratio of soyasaponin I to 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methy-4-pyrone-conjugated soyasaponin I in dehulled peas(Pisum sativum L). *J. Sci. Food Agric.* **78**, 141-146.

Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* **58**, 61-97.

Gutteridge, J.M.C. (1986). Antioxidant properties of the proteins ceruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synocial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim. Biophy. Acta* **869**, 19-127.

Hiramoto, K., Nasuhara, A., Michikoshi, K., Kato, T. and Kikugawa, K. (1997). DNA strand- breaking activity and mutagenicity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methy-4H-pyran-4-one(DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine. *Mutat. Res.* **395**, 47-56.

Kinjo, J., Imagire, M., Udayama, M., Arao, T. and Nohara, T. (1998). Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins Ⅰ-Ⅳ having soya- sapogenol B as aglycone. *Planta Med.* **64**, 233-236.

Kitagawa, I., Saito, M., Taniyama, T. and Yoshikawa, M. (1985a). Saponin and Sapogenol. XXXIX. Structure of Soyasaponin A1, a Bisdesmoside of Soyasapo- genol A, from Soybean, the seeds of *Glycine max Merrill. Chem.*

Pharm. Bull. **33**, 1069-1076.

Kitagawa, I., Saito, M., Taniyama, T. and Yoshikawa, M. (1985b). Saponin and Sapogenol. XXXVIII. Structure of Soyasaponi A2, a Bisdesmoside Soyasapogenol A, from soybean, the Seeds of *Glycine max Merrill. Chem. Pharm. Bull.* **33**, 598-608.

Kitagawa, I., Wang, H.K., Taniyama, T. and Yosikawa, M. (1988). Saponin and Sapogenol XLI. Reinvestigation of the Structures of Soyasapogenols A, B. and E, Oleanene-Sapogenols from Soybean. Structures of Soyasaponins I, II, and III. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 153-161.

Konoshima, T., Kokumai, M. and Kozuka, M. (1992). Anti-Tumor-Promotion Activities of Afromosin and Soyasaponin I Isolated from *Wistaria Brachybotrys. J. Nat. Prod.* **55**, 1776-1778.

Koratkar, R. and Rao, A.V. (1997). Effect of Soya Bean Saponins on Azoxymethane-Induced Preneoplastic Lesions in the Colon of Mice. *Nutr. Cancer.* **27**, 206-209.

Kubo, M., Matsuda, H., Tani, T., Namba, K., Arichi, S. and Kitagawa, I. (1984). Effects of Soyasaponin on Expermental Disseminated Intravascular Coagulation I. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1467-1471.

Kudou, S., Tonomura, M., Tsukamoto, C., Shimoyamada, M., Uchida, T. and Okubo, K. (1992). Isolation and Structural Elucidation of the Major Genuine Soybean Saponin. *Biosci. Biotech. Biodhem.* **56**, 142-143.

Kudou, S., Tonomura, M., Tsukamoto, C., Uchida, T., Salabe, T., Tamura, N. and Okubo, K. (1993). Isolation and Structural Elucidation of DDMP-Conjugated Soyasaponins as Genuine Saponins from Soybean Seeds. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 546-550.

Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.

Massiot, G., Lavaud, C., Benkhaled, M. and Men-Olivier, L. (1992). Soyasaponin VI, A New Maltol Conjugate from Alfafa and Soybean. *J. Nat. Prod.* **55**, 1339-1342.

Mitra, S.K. and Venkataranganna, R. (1999). Antioxidant activity of AO-8, a Herbal formulation in vitro and in vivo experimental models. Phytotherapy Res. 13, 300-303.

Nair, P.N., Turjuman, N.T., Kessie, G.K., Calkins, B., Goodman, G.T., Davitvitz, H. and Nimmagadda, G. (1984). Diet, nutrition intake and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**, 927-932.

Nakashima, H., Okubo, K., Honda, Y., Tamura, T., Matsuda, S. and Yamamoto N. (1989). *AIDS* **3**, 655-658.

Ohminami, H., Okuda, H., Hamai, T., Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Arich, S. and Hayashi, T. (1981). 肝障害に及ぼす大豆サポニンの作用. 榮養と食糧. **34**, 105-108.

Okubo, K., Yoshiki, Y. (1996). Oxygen-Radical-Scavenging Activity of DDMP- Conjugated Saponins and Physiological Role in Leguminous Plant. *Adv. Exp. Med. Biol.* **405**, 141-154.

Ominami, H., Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S., Yoshikawa, M. and Kitagawa, I. (1984). Effcts of Soyasaponins on Liver Injury Induced by Highly Peroxidized Fat in Rats. *Planta Med.* 440-441.

Paller, M.S., Hoidal, J.R. and Ferris, T.F. (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest.* **74**, 1156-1164.

Peterson, G. (1995). Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J. Nutr.* **125**, 784S-789S.

Rao, C.V., Wang, C.X., Simi, B., Lubet, R., Kelloff, G., Steele, V. and Reddy, B.S. (1997). Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res.* **57**, 3717-3722.

Sun, M., Oberley, L.W. and Li, Y. (1988). A simple method for clincal assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* **34**, 497-500.

Sung, M.K., Kendall, C.W.C. and Rao, A.V. (1996). Effect of Soybean Saponin and Gypsophila Saponin on Mor-phology of Colon Carcinoma Cells in Culture. *Fd. Chem. Toxicol.* **33**, 357-366.

Wasil, M., Halliwell, B., Grootreld, M., Moorhouse, C.P., Hutchison, D.C. and Baum, H. (1987). The specificity of thiourea, dimethylthiourea and dimethylsulphoxide as scavengers of hydroxyl radical. *Biochem. J.* **243**, 867-870.

Yoshiki, Y. and Okubo, K. (1995) Oxygen radical scavenging activity of (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-*4H*-pyran-4-one) conjugated saponin in soybean seed. Biosci. *Biotech. Biochem.* **59**: 1556-1560.

Yoshiki, Y., Okubo, K. and Igarashi, K. (1996). Chemiluminescence of oxygen radical scavengers such as DDMP saponins in the presence of radicals and aldehyde. *Adv. Exp. Med. Biol.* **405**, 231-239.

Yoshiki, Y., Okubo, K., Nagoya, I., Sakabe, T. and Tamura, N.A. (1995). Saponin conjugated with 2,3-dihydro-2,5,-dihydroxy-6-methyl-*4H*-pyran-4-one from Dolichos Lablab. *Phytochemistry* **38**, 229-231.

Yoshikoshi, M., Yoshiki, Y., Okubo, K., Seto, J. and Sasaki, Y. (1996). Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. *Planta Med.* **62**, 252-255.

강삼식 (1996). 사포닌(트리테르페노이드), 서울대학교 출판부

전혜숭 and 성미경. (1999). 대두 사포닌이 Aflatoxin B1으로 유도된 세포돌연변이에 미치는 영향에 관한 연구. *한국영양학회지* **32**, 110-117.

최혜미, 김지원, 김숙희. (1997). 비타민 E가 쥐간세포의 암화과정에서 태반형 glutathione S-transferase(GST-P) 양성병소와 항산화효소계에 미치는 영향. *한국영양학회지* 30, 803-812.