

## 메밀의 항산화 및 카드뮴 방어 효능에 관한 연구

김 남 경 · 정 재 형 · 장 경 진\* · 고 인 영\* · 최 신 욱 · 윤 창 순<sup>†</sup>

(주)래디안, \*춘천 바이오 산업 진흥원  
(2005년 5월 24일 접수, 2005년 6월 16일 채택)

### Studies on the Antioxidative Effect of the Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Extract and its Protective Role against Cadmium-mediated Stress

Nam-Kyoung Kim, Jae-Hyung Jung, Kyung Jin Jang\*, In Young Ko\*, Shin Wook Choi, and Chang-Soon Yoon<sup>†</sup>

Radiant Inc., 198-53, Hupyung-dong, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-957, Korea

\*Chuncheon Bioindustry Foundation

(Received May 24, 2005; Accepted June 16, 2005)

**요약:** 본 연구에서는 춘천 지역에서 재배되고 있는 메밀의 부위별(종피, 종자, 줄기) 추출물을 이용하여 MTT assay, 항산화 효능(수퍼옥사이드 라디칼, 하이드록실 라디칼 소거능), rutin과 phytic acid에 대한 함량 측정, 대표적인 중금속 중의 하나인 카드뮴에 대한 세포 수준에서 방어 효능을 평가하였고, 이들 자료를 토대로 주된 식품재료로 쓰이고 있는 메밀을 기능성 화장품의 소재로써 개발할 수 있는 가능성을 조사하여 보았다. HaCaT 세포와 B16F10 세포를 이용한 세포 독성 실험에서는 각 추출물 100 µg/mL의 농도 범위에서는 독성이 없는 것으로 나타났다. 수퍼옥사이드 라디칼에 대한 소거능은 종피 > 줄기 > 종자 추출물 순이었으며, 종피나 줄기는 거의 비슷한 수준의 효능을 보여 주었으며, 항산화 효능에 관여하는 주요 물질중의 하나인 rutin은 줄기 부위에 가장 많이 함유하고 있었다. 하이드록실 라디칼에 대한 소거능은 각 추출물 모두 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 중금속에 대한 chelate 물질로 알려진 phytic acid는 rutin처럼 줄기 부위에 높은 농도로 함유되어 있었다. 카드뮴에 대한 독성은 HaCaT 세포에서 50 µM의 농도일 때 50% 정도의 치사율을 보였으며, 카드뮴을 추출물과 같이 처리하였을 때는 카드뮴의 독성에 대해 약 10% 정도 방어 효과를 나타냈다. Confocal laser scanning microscope를 이용하여 카드뮴에 의한 세포내 활성산소종의 생성을 확인하였고, 생성된 활성 산소 중에 대한 방어 효능은 줄기추출물에서 가장 우수한 것을 확인하였다.

**Abstract:** In the present study, the Chuncheon buckwheat extracts prepared from its seed coats, seeds, and stems were used to determine anti-oxidative effects, the content of rutin and phytic acid, and the protective role against cadmium at the cellular level. Furthermore, it was evaluated whether the buckwheat, mainly known as a healthy food source, might be applicable to functional cosmetics. Up to 100 µg/mL of the extract was not toxic in HaCaT and B16F10 cell lines using MTT assay. The anti-oxidative capacity of superoxide radicals was shown in seed coats extracts > stem extracts = seed extracts. Although its content of rutin, known as one of effective anti-oxidants, mainly exists in the stem, any extract did not eliminate hydroxyl radicals. Phytic acid, known as a heavy metal-chelate agent, was highly concentrated in the stem. The Chuncheon buckwheat extract had 10% protective effect against the treatment of 50 µM cadmium at which 50% of HaCaT cells survived. Confocal laser scanning microscope revealed the intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) by cadmium treatment. Finally, we identified that the stem extract had the most protective effect on the elimination of ROS.

**Keywords:** buckwheat extracts, anti-oxidants, rutin, phytic acid, cadmium

## 1. 서 론

현재 화장품산업은 특정 효능을 갖고 있는 물질을 함유하고 있는 제품을 선호하는 소비자의 요구에 따라 전

문적이고 고도의 기술을 요하는 첨단산업으로 정착함에 따라 새로운 원료 개발의 요구가 높아지고 있다.

최근 경제수준의 향상과 더불어 well-being 바람을 타고 화장품에 들어가는 유효성분도 화학 물질뿐만 아니라 생약을 포함한 식물성 원료에서부터 해양원료에 이르기 까지 다양한 종류의 천연소재를 이용한 화장품의 개발이

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: csyoon0311@hanmail.net)

이루어지고 있는 추세이다. 그 중에서도 식물성 천연물을 이용하여 생리활성을 조절하는 물질들을 찾거나 항산화 효과, 항암, 항균 효능 등 기능성을 탐색하는 연구가 여러 곳에서 활발히 진행되고 있다[1].

우리나라에 자생하거나 재배하고 있는 식물자원 중의 하나인 메밀은 막국수 등 잘 알려진 식품들의 원재료로 많이 쓰이고 있고, 비타민 B1, B2, C, E를 비롯하여 다른 곡물에 비해 필수 아미노산이 풍부하며, 모세 혈관 강화 작용이나 항산화에 관여하는 물질인 rutin을 약 5~8% 함유하고 있으며, 재배가 쉬우며, 매우 쉽게 구할 수 있는 곡물에 속한다[2-5]. 따라서 식품성분이나 약효 등이 좋은 것으로 이미 알려져 있고 주위에서 흔히 접할 수 있는 곡물류 중에서 기능성 화장품 소재로서 높은 효능을 갖는 종을 찾아 화장품 원료로 개발하는 것도 의미가 있을 것으로 여겨진다.

한편, 산업화의 급속한 발달과 인구의 도시 집중화에 따른 자동차의 증가 등 여러 가지 원인으로 인해 대기 중으로 배출되어 축적되는 중금속(카드뮴, 납 등)의 농도는 심각한 수준으로 증가하고 있다[6]. 그 중 카드뮴은 식물에는 백화현상이나 흑반증을 일으키고, 사람을 비롯한 동물에 있어서는 돌연변이 유발과 피부나 체내 기관의 발암인자로서 작용하는 것으로 알려져 있다[7]. 특히 자동차 배기 가스 등에 의해 발생된 카드뮴은 대부분 대기를 통해서 이동하기 때문에, 대기 중에 광범위하게 퍼져 있는 카드뮴과의 수시 접촉에 의한 피부질환이나 호흡기 질환에 걸릴 가능성에 항상 노출되어 있기 때문에 그 위험도가 더 크게 인식되어 지고 있다.

폐상피세포를 이용하여 담배연기나 카드뮴이 함유된 음식물을 섭취했을 때 진행되는 세포의 apoptosis에 대한 연구, 콩에 카드뮴을 처리했을 때 생성되는 산화단백질과 지질과산화에 대한 연구, 카드뮴과 쌀이나 밀 종자내의 구성 단백질과 결합 양상 및 안정성에 대한 연구, 실내 공기나 도시 환경에 있어서 카드뮴의 역할에 관한 연구, 밀기울이 수은, 카드뮴 및 납과의 결합 능력에 관한 연구 등의 보고가 있었지만[8-11], 세포 수준에 있어서의 카드뮴에 의한 피부 손상과 방어에 대한 연구보고는 아직 없는 실정이다.

카드뮴과의 결합력이 좋은 식물종류로 밀, 밀기울이나 호밀 같은 것이 널리 알려져 있는 것처럼[12], 카드뮴과의 결합력이 좋은 식물성 천연물을 탐색하여 카드뮴으로부터 피부를 보호할 수 있는 기능성 소재를 개발하여 화장품 원료로 사용할 필요가 있을 것으로 여겨지며, 특히 본 연구를 통하여 그러한 가능성을 제시하여 보고자 한다.

메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench)은 원산지가 동북아시아 북부 및 중앙아시아 북부로 알려져 있는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 일년생 식물로서 생육기간

이 짧고 척박한 땅에서도 잘 자라므로 오랫동안 구황 작물로 이용되어 왔다. 메밀은 다른 작물에 비해 단백질 함량이 높으며, 칼슘, 철, 인 등의 mineral과 필수아미노산인 glutamic acid, leucine, valine 등이 많이 함유되어 있으며, 뇌출혈 예방이나 변비, 이노작용, 고혈압에 좋은 효과가 있는 것으로 알려져 있다[13,14].

메밀은 flavonoids나 phenolic acid 같은 phenolic substance를 고농도 함유하는 것으로 밝혀져 있다. 주요 flavonoid 성분으로는 rutin을 비롯하여 quercetin, isoquercetin 등 10여 가지의 flavonoid 유도체가 알려져 있으며, 이들은 자외선을 흡수하거나 superoxide, hydroxyl 그리고 peroxy radical 같은 활성 산소종을 소거하는 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. Chlorogenic acid와 hyperoside 등도 항산화 작용을 하는 것으로 보고되었으며, 그 외에도 메밀에서 추출된 여러 가지 물질이 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 항산화 효능을 가지고 있을 뿐만 아니라 중금속에 대한 chelate agent로 알려진 phytic acid도 메밀의 각 부위에 비교적 다량 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다[15,16]. 여러 연구자들에 의해, 이들 표준물질들을 이용하여 항산화, 혈압저하, 혈관 수축 작용 등 생체 조절기능이 일부 밝혀지긴 하였지만, 아직까지 메밀에서 직접 추출한 물질을 이용한 항산화 효능이나 인체 생리 활성에 대한 연구는 이루어지지 않고 있는 상태이다.

우리나라에서 생산되는 메밀은 재배지역에 따라 성분 함량에 차이가 있음이 이미 밝혀졌으며, 강원도 영서 북부지역(춘천, 인제, 양구, 홍천)에서 재배한 메밀이 타 지역에서 생산한 메밀에 비하여 여러 가지 성분의 함량, 영양적 가치가 높다고 보고되어 있다[2,13].

특히 춘천 지역에서 재배된 메밀은 전국 제일의 품질로 인정받고 있고, 막국수 등의 식품 원재료로 다양하게 사용되고 있으며, 특히 항산화능이 높은 것으로 밝혀져 있어 식용 이외에도 기능성 화장품의 첨가제로서 유용하게 쓰일 가능성이 매우 높다고 여겨진다. 따라서 지역 특산물로 육성중인 메밀의 추출물을 이용하여 피부 생리 활성에 대한 효능을 탐색함으로써, 메밀에 대한 우수한 기능성을 확인하고, 이에 따른 화장품 소재 및 건강 보조 식품 등의 부가가치가 높은 산업적인 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다[13].

본 연구에서는 메밀 추출물들이 생체에 관련된 일부 생리적 기능에 대한 활성을 규명하기 위하여 메밀 부위별 추출물의 활성 산소 종(reactive oxygen species: ROS)에 대한 항산화능을 EPR (electron paramagnetic resonance) 기기를 이용하여 측정하였다. 또한 이들 추출물들의 세포에 대한 독성을 MTT assay로 탐색하였으며, 대기 중의 중금속에 대한 방어 효능을 세포수준에서 확인하였고, 이

들 얻어진 결과를 통하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시료준비

본 실험에 사용한 메밀은 강원도 춘천시 동내면 위치한 춘천 향토 막국수 협의회 영농 조합 법인으로부터 공급받아 사용하였다. 메밀의 종자, 종피와 줄기를 나누어 말린 후, 분쇄기를 이용하여 분말로 만들고 에탄올, 메탄올, 열수 추출을 하여 각기 필요한 실험에 사용하였다.

### 2.2. 세포배양 및 시약

HaCaT 세포는 강원대학교 자연과학대학 생화학과 김병철 교수로부터, B16F10 세포는 한국 세포 주 은행(Korean Cell Line Bank: KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum, penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 units/mL)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. 배지는 3~4일 간격으로 교체하여 주었으며, 배양 용기에 90% 이상 자라게 되면 계대 배양하여 주며 사용하였다. 실험에 사용한 시약들은 Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Merck (USA), Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% 용액)는 Daejung (Korea), FeCl<sub>2</sub>, 5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide (DMPO), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), Xanthin, Xanthin oxidase, Catalase, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma, USA, 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA)는 Molecular Probe (USA)에서 구입하여 사용하였다.

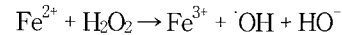
### 2.3. 활성산소종에 대한 메밀 추출물의 항산화능 측정

#### 2.3.1. 수퍼옥사이드 라디칼에 대한 항산화 효과

Xanthin/xanthin oxidase 방법으로 수퍼옥사이드 라디칼을 발생시키고, 메밀 추출물과 대조군으로 사용한 quercetin에 의한 수퍼옥사이드 라디칼의 제거 속도를 DMPO spin trap을 이용한 EPR로 측정하였으며, 이 반응에서 함께 생성되는 금속이온과 과산화수소를 제거하기 위해 DTPA와 catalase를 첨가하여 주었다. 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4) 185 μL에 DTPA 2 μL, DMPO 2 μL, xanthin 8 μL와 catalase 1 μL를 혼합한 후, xanthin oxidase 2 μL를 넣어 최종 부피가 200 μL가 되도록 하였다. Xanthin oxidase를 첨가하면 즉시 수퍼옥사이드 라디칼이 생성되기 시작하는데, 이들을 EPR을 이용하여 그 신호의 세기를 측정하였다[18,19].

#### 2.3.2. 하이드록실 라디칼에 대한 항산화 효과

하이드록실 라디칼은 Fenton 반응에 의해서 생성되는데, 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4) 185 μL에 전이금속 이온을 제거하기 위해 EDTA 5 μL를 넣고, DMPO 2 μL와 FeSO<sub>4</sub>를 4 μL를 혼합한 후, 마지막으로 과산화수소 4 μL를 넣어 최종부피가 200 μL가 되도록 하였고, 생성되어진 하이드록실 라디칼들을 EPR을 이용하여 신호의 세기를 측정하였다[18,19].



### 2.4. 세포에 대한 독성 평가

96 well plate에 well당 1 × 10<sup>5</sup>/mL 및 4 × 10<sup>4</sup>/mL의 HaCaT 세포와 B16F10 세포가 들어있는 부유액 100 μL를 넣고 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 적당한 농도(10 μg/mL ~ 500 μg/mL)로 희석되어진 메밀추출물이 첨가된 serum-free 배지로 교체한 후 24 h 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 각 well에 첨가하고, 4 h 동안 항온기에서 반응시킨 후, MTT 시약이 함유된 배지를 제거하였다. 각 well에 100 μL acid iso-propanol (0.04 N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30 min간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광 값을 측정하였다[20].

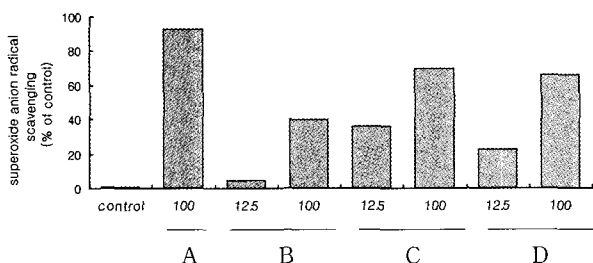
### 2.5. Rutin 및 Phytic Acid (PA) 함량 측정

#### 2.5.1. Rutin

메밀의 부위별로 분말을 만들어 준 후, 분말 2 g에 메탄올 50 mL씩 넣고, 80°C에서 1 h 동안 reflux 방법을 이용하여 추출하였다. 상온에서 식힌 후 여과하였고, 여과된 용액에 다시 메탄올을 첨가하여 정확히 50 mL로 맞추어 주고 다시 여과한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. Rutin 표준시약은 메탄올을 이용하여 녹인 후, 10 ~ 1000 ppm으로 희석하여 사용하였다.

#### 2.5.2. PA

메밀 부위별 분말 1 g을 0.01 N HCl 10 mL에 넣고 잘 혼합하여, 상온에서 24 h 반응시킨 후에 여과하여 주었다. 여과된 용액을 0.01 N HCl로 2 ~ 50배 희석한 뒤, 희석한 용액 750 μL에 0.06% FeCl<sub>3</sub>와 0.3% sulfosalicylic acid가 포함되어 있는 wade reagent 250 μL를 넣고 상온에서 7 min간 반응시킨 후, 500 nm에서 흡광 값을 측정하였다.



**Figure 1.** The effect of the buckwheat extracts on superoxide radical elimination (A: Quercetin, B: Seeds, C: Seed coats, D: Stems).

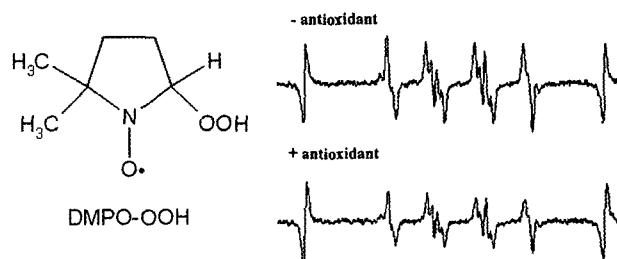
## 2.6. Cadmium (Cd)의 독성에 대한 메밀추출물의 방어 효과

### 2.6.1. Cd의 세포에 대한 독성 평가

96 well plate에 well당  $1 \times 10^5$ /mL의 HaCaT 세포가 들어있는 부유액 100  $\mu$ L씩을 넣고 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 적당한 농도로 희석된 Cd, PA와 메밀추출물이 첨가된 serum-free 배지로 교체한 후 24 h 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 각 well에 첨가하고, 4 h 동안 항온기에서 반응시킨 후, MTT 시약이 함유된 배지를 제거하였다. 각 well에 100  $\mu$ L acid iso-propanol (0.04 N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30 min간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광값을 측정하였다.

### 2.6.2. Confocal Laser Microscope (CLM)을 이용한 산화적 스트레스의 분석

Kim 등[18]과 Ohashi 등[21]에 의한 방법을 일부 변형하여 사용하였다. HaCaT 세포를 배양한 후, cover glass가 들어 있는 6-well plate에 well당  $1 \times 10^5$  cell/mL개의 세포 부유액을 넣어 주고, well 내에서 세포가 전체 면적의 80~90% 정도 자랄 때까지 배양하였다. 배양된 세포에 Cd를 최종농도 50  $\mu$ M이 되도록 처리하여 주고, 30 min, 1 h, 2 h 동안 반응시켜 주었다. 시간별로 반응이 끝난 후, 최종농도 5  $\mu$ M로 희석된 H<sub>2</sub>DCFDA를 15 min간 처리하여 주었다. PBS로 4~5번 세척하여 준 후, well로부터 cover glass를 분리하여 고정화 단계 없이 live cell chamber로 옮긴 후, CLM을 이용하여 관찰하였다. PA와 메밀추출물도 같은 방법으로 처리해 주고 관찰하였으며, DCF의 녹색형광 이미지는 488 nm의 여기 파장과 510 nm band pass filter와 530 nm band pass filter를 이용하여 얻었다.



**Figure 2.** Structure and EPR signal of DMPO-OOH ·.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 활성산소종에 대한 메밀 추출물의 항산화능 측정

#### 3.1.1. 수퍼옥사이드 라디칼(Superoxide Radical)에 대한 항산화 효과

메밀의 각 부위별 추출물의 항산화 효과는 Figure 1에 서처럼 수퍼옥사이드 라디칼 제거에 의한 DMPO-OOH · 라디칼의 EPR 신호세기의 감소를 측정하였으며, 아래 수식에 의하여 추출물을 넣지 않은 대조군의 값을 기준으로 상대적인 신호세기의 감소율로 나타내었다. Xanthin oxidase를 첨가하면 즉시 수퍼옥사이드 라디칼이 생성되기 시작하고, 이를 EPR을 이용하여 그 신호를 탐지하게 되는데, 신호의 세기는 반응이 시작된 후 1 min경에 최대가 되기 때문에 2 min경에 측정된 신호 크기를 대조군으로 하여 추출물에 의한 항산화 효과를 측정하였다[1,18].

$$100 - \left( \frac{E_{EPR}}{C_{EPR}} \times 100 \right) \quad \begin{array}{l} E_{EPR} : \text{추출물첨가시 EPR 신호세기} \\ C_{EPR} : \text{대조군 EPR 신호 세기} \end{array}$$

메밀 각 부위별 추출물의 수퍼옥사이드 라디칼 소거능에 대한 측정 실험 결과, 비교적 높은 항산화 효과를 나타냈으며, 종피 > 줄기 > 종자 순으로 항산화 효과가 좋은 것으로 나타났다(Figure 2). 표준 항산화제인 quercetin을 대조군으로 사용하여 측정하였을 때, 100  $\mu$ g/mL quercetin은 약 95% 이상 소거능을 보였고, 이에 비해 메밀 종피 추출물은 같은 농도에서 약 75% 정도의 소거능을 보였으며, 이는 quercetin 대비 약 78% 정도의 소거능을 나타내는 것으로 판단되며, 메밀 줄기 추출물 역시 70% 정도로 측정되어 종피와 거의 같은 수준의 효능을 갖는 것으로 평가되었다. 메밀 추출물을 저농도(12.5  $\mu$ g/mL)로 처리해 주었을 때에는 종피에서 약 40% 정도의 소거능을 보였으며, 이는 종자를 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리했을 때의 소거능과 거의 비슷한 수준임을 알 수 있었다. 단일물질인 quercetin과 crude한 추출물인 메밀 시료들의 수퍼옥사이드 라디칼에 대한 소거능을 비교하여 보면 이들이 매우 우수한 항산화 효능을 가지고 있는 것으로 사료된다.

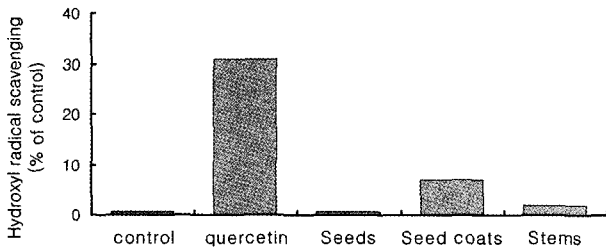


Figure 3. The effect of the buckwheat extracts on hydroxyl radical elimination (quercetin conc: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , extracts conc: 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

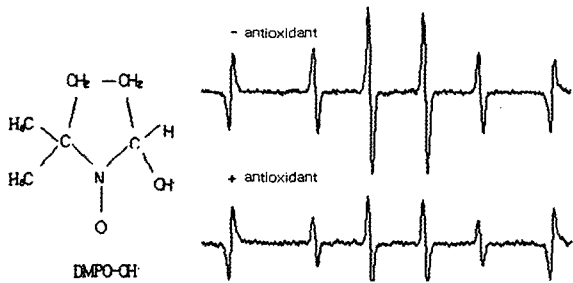


Figure 4. Structure and EPR signal of DMPO-OH·.

메밀 추출물이 생체 내에서 일어나는 산화적 스트레스에 의해 생성되는 수퍼옥사이드 라디칼을 대부분 소거하는 것으로 보아 이들 활성산소종으로 인해 야기될 수 있는 염증, 세포자살, 세포괴사 등 여러 가지 부작용에 대한 방어 효능을 메밀이 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 메밀에는 항산화제로 잘 알려져 있는 ascorbic acid (vitamin C)와 tocopherol 동족체( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) 등이 함유되어 있는 것으로 보고 되어져 있는데[13], 국내산 메밀의 vitamin C의 함량은 3~7 mg% 내외이며, tocopherol 동족체 중 가장 강력한 항산화 능력을 나타내는  $\alpha$ -form의 함량은 0.2~0.4 mg/100 g 내외인 것으로 밝혀졌다. 따라서 메밀은 우수한 항산화 물질인 ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, rutin과 phytic acid 등을 많이 함유하고 있는 것으로 보았을 때, 이들이 개별적으로 혹은 서로 결합하여 synergy 효과 또는 길항작용을 통해 보다 강한 항산화 효능을 보이는 것으로 판단된다.

### 3.1.2. 하이드록실 라디칼에 대한 항산화 효과

하이드록실 라디칼은 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )와 2가의 철염( $\text{Fe}^{2+}$ )을 첨가하여 주는 Fenton 반응에 의해 생성된다. 하이드록실 라디칼은 수퍼옥사이드 라디칼과 마찬가지로 불안정하기 때문에 DMPO로 반응시켜 Figure 4에서 보는 바와 같이 DMPO-OH· 라디칼을 생성시켜 준 후, EPR 신호의 세기의 감소를 측정하였으며, 수퍼옥사이드 라디칼 측정에 사용한 같은 식을 이용하여 그 값을 산출하였다. EPR을 이용한 메밀 추출물의 하이드록실 라디칼 소거능

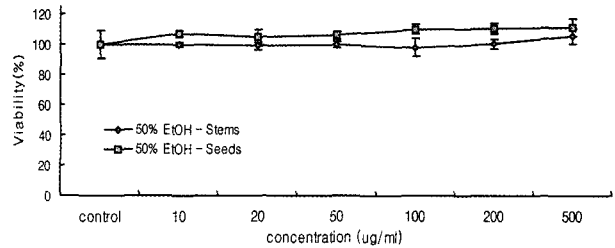


Figure 5. The effect of the buckwheat ethanol extracts on the viability of HaCaT cell lines.

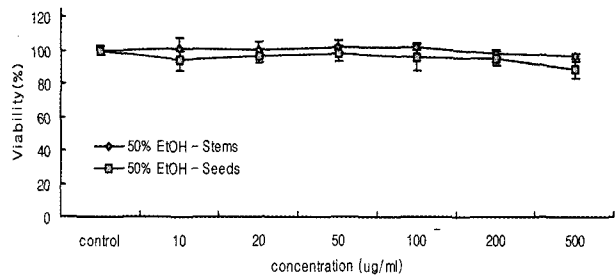


Figure 6. The effect of the buckwheat ethanol extracts on the viability of B16F10 cell lines.

측정 결과 메밀 추출물들의 하이드록실 라디칼에 대한 항산화 효과는 대단히 약한 것으로 나타났다(Figure 3). 양성 대조군인 quercetin은 약 30% 정도의 하이드록실 라디칼 소거능을 보였지만, 메밀 추출물은 5% 이하의 낮은 소거능을 보였는데, 종피 추출물이 아주 미약하지만 효능이 있는 것으로 측정되었으나 대조군 대비 전체적인 측정치로 비교했을 때 항산화 효과는 없는 것으로 평가되었다.

### 3.2. 세포에 대한 독성 평가

HaCaT 세포와 B16F10 melanoma 세포에 메밀 종자와 줄기의 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 후, 농도 증가에 따른 세포 독성에 미치는 효과를 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하였을 때, 10~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위 내에서는 2종의 세포에서 모두 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 200  $\mu\text{g}$ ~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 높은 농도로 처리하여 주었을 때에 HaCaT 세포의 증식에는 영향이 없었지만(Figure 5), B16F10 melanoma 세포에 있어서는 줄기 추출물에서는 독성을 보이지 않았지만 종자 추출물에서는 유의할 수준은 아닌 것으로 판단되는 5% 미만의 세포 증식을 억제하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 6).

### 3.3. 메밀의 Rutin 및 PA 함량 측정

#### 3.3.1. Rutin

메밀 추출물속에 포함되어 있는 rutin의 함량을 측정하

**Table 1.** The Content of Rutin in the Buckwheat Extracts

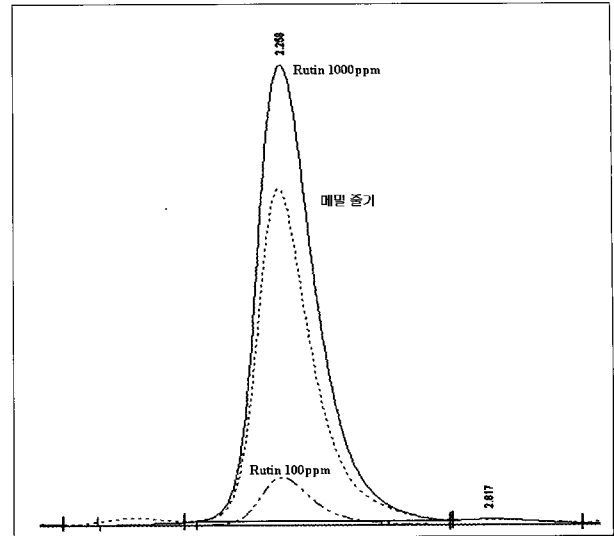
Buckwheat extract	Rutin content (mg/100g)
Seed coats	12
Seeds	34
Stems	1,827

**Table 2.** Determination of Phytic acid Content in the Buckwheat Extracts

Buckwheat extract	phytic acid ( $\mu\text{M}$ )	% dry basis
Seed coats	30.36 $\pm$ 5.21	0.02
Seeds	270.07 $\pm$ 56.42	0.178
Stems	1,070 $\pm$ 170.9	0.706

결과 줄기 > 종자 > 종피의 순으로 줄기 추출물 속에 상당히 많은 양의 rutin이 함유되어 있었으며, 메밀 종자나 종피 추출물의 rutin 함량은 줄기에 비해서는 크게 차이가 나지만(Table 1), 대부분의 메밀 종자나 종피에 함유되어 있는 rutin 함량과 비교하여 보면 비교적 높은 양을 함유하고 있는 것으로 확인되었다[13-15]. 이것을 rutin 표준물을 이용하여 정량하여 보면 줄기 부분에 존재하는 rutin의 함량은 종자에 존재하는 rutin의 함량에 비해 50 배 이상인 것으로 나타났다(Figure 7).

Eeckhout 등[22]과 Quettier-Deleu 등[23]에 의해, rutin은 메밀의 항산화 작용에 관여하는 주요 성분 중의 하나로써 잎과 줄기 부위에 다량 함유되어 있으며, 메밀 추출물을 HPLC로 분획하여 성분을 분석하여 보면 rutin 이외에도 hyperin, quercetin, protocatechin acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde 등의 항산화 물질이 포함되어 있었으며, 특히 rutin은 superoxide 라디칼, hydrogen peroxide와 hypochlorous acid 같은 활성산소종에 대해 높은 소거능을 나타내는 것으로 보고되어져 있다. 본 연구에서의 결과를 보면 메밀 종피 부위의 rutin 함량이 줄기 부위에 비해 상대적으로 소량이었지만, superoxide 라디칼 소거능이 큰 것으로 측정되었다. 메밀의 저장 상태, 도정 과정 및 시료의 추출방법에 따라 rutin 등 함유물질들의 함량이 조금씩 차이가 난다는 보고도 있었지만[13,14], 메밀의 저장 상태나 도정과정, 그리고 실험실내의 추출방법에는 큰 차이가 없다고 판단되었고, 세 차례에 걸친 반복 실험의 결과이므로, 종피 부위의 rutin 함량이 다른 부위에 비해 상대적으로 적으면서도 소거능이 우수하게 나타난 것은, 메밀 종피 부위에 함유되어 있는 rutin의 활발한 항산화 작용뿐만 아니라 hyperin, quercetin, protocatechin acid같은 rutin 이외의 항산화 물질이 줄기 부위 보다는 종피 부위에서 활성이 더 강하게 작용하여 복잡한 상승효과를 나타내기 때문인 것으로 추정할 수 있다.

**Figure 7.** HPLC analysis of the buckwheat extracts including rutin.

### 3.3.2. Phytic Acid

PA는 영양학적으로 중요한 물질이며, 자유 라디칼의 생성 억제능이나 소거능, prandial glucose absorption의 지연, 콜레스테롤 수치 저하와 납이나 Cd 같은 중금속과의 결합으로 인한 활성 저해 등, 인체 내의 여러 가지 방어기작에 관여하는 것으로 알려져 있다[24,25]. 특히 PA와 Cd의 결합에 관한 연구가 많이 보고되고 있는데, PA와 Cd를 같이 쥐에 투여했을 때 Cd만 투여한 대조군에 비해 장기 내에 축적되는 Cd의 함량이 뚜렷하게 저하되었고[26], PA가 다량 함유된 것으로 알려진 통밀이나 밀기울(3 ~ 6 g/kg)과 Cd를 함께 투여한 쥐의 장기에 축적되는 Cd의 함량은, PA가 적은 양이 함유되어 있는 밀의 배유부분(0.2 ~ 0.7 g/kg)과 Cd를 함께 투여한 대조군과 비교하여 보았을 때, 매우 낮게 측정되는 것으로 보고되었다. 금속이온과 PA의 binding affinity는 Cu > Zn > Cd > Mn > Mg > Co > Ni의 순이며, Cu나 Cd의 경우 PA와 결합하게 되면 거의 95% 정도 활성이 저해되는 것으로 밝혀졌다.

메밀의 각 부위에 대한 PA의 함량은 rutin 함량과 마찬가지로 줄기 > 종자 > 종피 순이었으며 줄기 부분에 존재하는 PA의 함량은 종피에 존재하는 PA 함량에 비해 약 35배(%dry basis) 이상으로 높게 측정되었다(Table 2). 곡물류 중 비교적 PA의 함량이 높은 것으로 알려진 호밀, triticale, 밀과 보리 등에서 0.35 ~ 0.38% 정도의 PA가 함유되어 있는 것에 비해 메밀 줄기의 PA 함량은 거의 배에 가까운 수준임을 알 수 있었다. 그러나 메밀이나 쌀 같은 곡물류는 도정 과정이나 저장 상태 또는 성장 시기에 따라 PA 등 구성성분들의 함량이 약간씩 변할 수

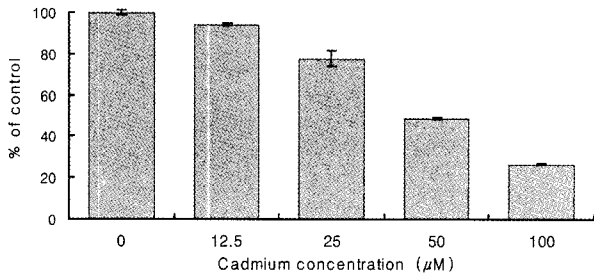


Figure 8. Toxicity of cadmium in HaCaT cell lines.

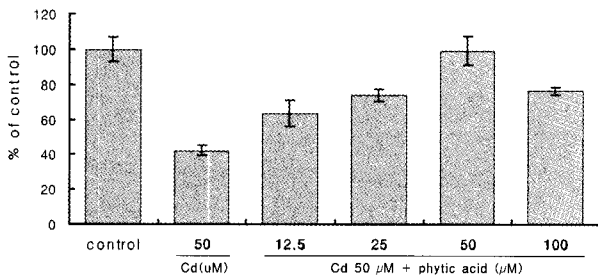


Figure 9. Protective effect of phytic acid on cadmium mediating toxicity.

있음이 보고되어 있기 때문에 줄기를 제외한 종자부위에 대한 PA의 함량은 약간의 차이가 있을 것으로 사료된다. PA가 곡물류 중에 비교적 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있기 때문에 메밀에 함유되어 있는 PA의 함량을 측정할 필요가 있었으며, 부위별 PA의 함유 정도에 따른 Cd와의 상호관계를 세포독성 측정 및 CLM을 통해 확인하여 보았다.

### 3.4. 카드뮴에 대한 메밀추출물의 독성 방어 효과

#### 3.4.1. 세포에 대한 Cd의 독성과 추출물의 영향

세포에 대한 Cd의 독성 및 Cd에 대한 PA와 추출물의 방어 효능을 확인하기 위하여 HaCaT 세포에 Cd, PA와 추출물을 처리하여 준 후, MTT assay를 이용하여 평가하였다. Cd의 농도가 증가할수록 세포에 대해 독성을 보이는 것으로 나타났으며, Cd 50 µM의 농도에서 약 50% 정도의 세포가 사멸하는 것을 볼 수 있었다(Figure 8). Cd의 독성에 대한 PA의 방어 효능을 확인하기 위해 PA를 Cd와 함께 세포에 처리하여 주었으며, 세포에 대한 Cd의 독성이 PA에 의해 방어되는 효과를 볼 수 있었다. PA 50 µM의 농도에서 Cd의 독성을 거의 100% 정도 감소시켜 주었으나, 50 µM 보다 높은 농도에서는 PA 자체의 독성이 나타나는 것으로 관찰되었다(Figure 9). Cd의 독성에 대한 메밀 추출물의 방어 효능을 확인하기 위해 메밀 각 부위 중에서 다른 부위에 비해 상대적으로 PA를 많이 함유하고 있는 줄기 부위를 열수를 이용하여 추출

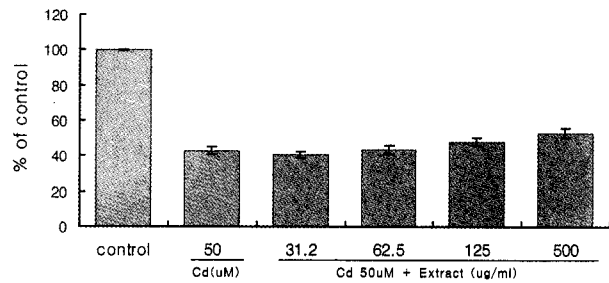
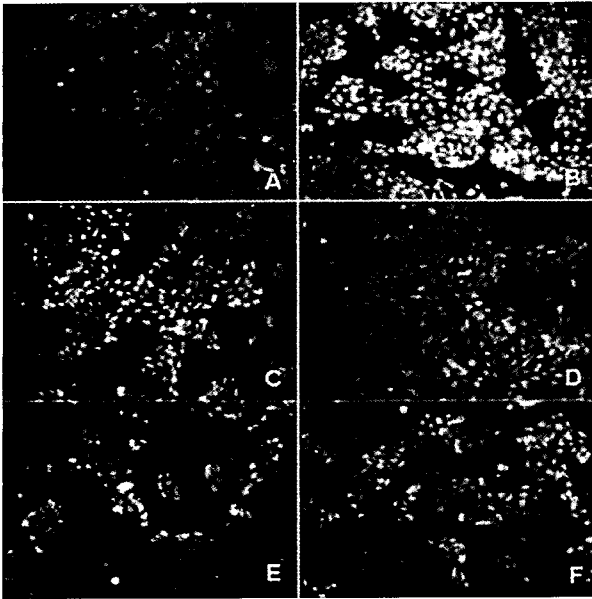


Figure 10. Protective effect of buckwheat extracts on cadmium mediating toxicity.

한 후, Cd와 함께 처리하여 주었다. 100 µg/mL 농도의 추출물은 Cd에 대한 방어효능을 보여주지 못하였으나, 500 µg/mL의 고농도 추출물을 처리하여 주면 대조군인 Cd 대비 약 10% 정도 Cd에 의한 독성을 방어하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 10). 또한 메밀 줄기의 열수 추출물에 함유되어 있는 PA의 양을 정량적으로 측정하여 보면 약 500 µg/mL의 추출물 내에서 약 50 µM의 PA가 함유되어 있었다. 그러나 여러 가지 종류의 물질들이 다양하게 함유되어 있는 crude한 추출물을 처리했을 경우에는 추출물 내에 포함된 PA의 농도가 비교적 높더라도 같이 섞여 있는 다양한 성분들과의 상호관계에 의해서 정제된 순수한 PA만을 처리하여 주었을 때와는 어느 정도 차이가 나는 방어효과를 보이는 것으로 여겨진다. 그러나 미약하지만 추출물만으로도 Cd에 대한 독성 방어 효능을 확인할 수 있었던 것은 의미가 있었으며, 추출물을 고농도로 농축하거나, HPLC 등의 방법으로 추출물을 분획 후 분리하여 사용하는 등, 다양한 방법을 사용한 실험을 통하여 Cd에 대한 방어 효과에 대한 기작을 보다 정확히 규명할 필요가 있을 것이라고 여겨진다.

산업화의 급속한 발달과 인구의 도시 집중화에 의한 자동차의 생산 및 사용이 증가하게 되고, 이에 따라 자동차를 통해 배출되는 배기가스가 많아지게 되면서, 인체에 해로운 중금속 등이 함유된 배기가스가 대기 오염의 85% 이상을 차지하게 되면서 우리의 일상생활과 건강에 나쁜 영향을 주고 있다. 자동차 연료로 사용되고 있는 석유와 같은 화석연료를 연소시킬 때 많은 양의 Cd가 분자나 작은 입자로 분해되어 대기 중으로 유출되고, 대기 중에 유입된 Cd 입자들은 다른 유해 물질보다 우선적으로 광범위하게 확산되는 것으로 보고되고 있다[6,11]. 전술한 바와 같이 Cd의 chelating 물질로 알려진 PA는 밀이나 호밀 같은 곡물류에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 것처럼, 메밀 부위별 추출물에서도 일정한 양의 PA가 함유되어 있었고, 이에 따라 메밀이 직·간접적으로 Cd의 독성에 대해 방어하는 효능을 사람유래 피부 세포주인 HaCaT 세포를 사용하여 확인 할 수 있었는데, 이는 메밀



**Figure 11.** Identification of cadmium-mediated intracellular generation reactive oxygen species and its elimination by confocal laser microscope (A: PBS, B: Cd, C: PA, D: extract, E: Cd + PA, F: Cd + extract).

이 Cd에 의한 독성을 방어할 수 있는 효능을 갖고 있음을 시사하고 있는 것으로 여겨진다.

메밀이 PA의 작용에 의한 방어 효능이외에도, Cd의 독성에 대해 방어효능을 나타낼 수 있는 또 다른 가능성은 메밀에는 Cd와 결합하는 능력이 우수한 필수아미노산들이 풍부하게 함유되어 있다는 사실이다. He 등[8]은 쌀과 밀의 성분분석 결과 Cd와 결합력이 뛰어난 아미노산들은 glutamic acid > cysteine > valine > isoleucine > leucine > tyrosine 등으로 보고하였고, Shim 등[13]은 메밀에 함유되어 있는 필수 아미노산의 함량은 glutamic acid > arginine > leucine > valine의 순으로 구성되어 있음을 보고하였다.

#### 3.4.2. 세포내 손상에 대한 Cd와 추출물의 영향

Cd가 세포표면 뿐만 아니라 세포내에도 유입되어 산화적 스트레스에 의한 활성산소종(reactive oxygen species)을 생성하고, 메밀 추출물이 이들을 방어하는 효능이 있는가를, DCF를 이용한 형광물질 발생의 강도를 가지고 측정하였다. Reduced 또는 acetylated된 형태의 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)은 세포 내에 있는 esterase와 세포 내에 생성되는 ROS들의 산화작용에 의해 아세테이트 그룹이 제거되면 형광물질(FITC)을 방출하는 원리를 이용하였다[21].

HaCaT 세포의 증식을 50% 정도 억제시키는 농도인 50  $\mu$ M의 Cd와 PA, 그리고 500  $\mu$ g/mL의 메밀 추출물을,

그리고 음성대조군으로 PBS만을 각각 HaCaT 세포에 처리하고 1 h 배양 후, H<sub>2</sub>DCFDA를 이들 세포에 반응시키고, 녹색형광물질의 발현 강도를 confocal laser microscope를 이용하여 측정하였다. Figure 11에서 보는 것처럼 Cd만 처리한 세포(Figure 11-B)와 대조군으로 PBS만 처리한 세포(Figure 11-A)와 비교하였을 때, Cd만 처리한 세포에서는 형광물질이 강하게 발생하는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 Cd의 독성에 의한 ROS의 증가로 인해 DCF가 활성화되어 형광물질을 강하게 내기 때문인 것으로 추정할 수 있다. 그러나 PA만을 처리한 세포의 경우에는(Figure 11-C), PBS만 처리한 대조군과 별 차이가 없는 것을 볼 수 있었으며, 약하게 형광을 띄는 부위가 일부 관찰되는 것은 PA 자체가 DCF를 일부 산화시킴으로 인한 것으로 여겨진다. Cd와 PA를 함께 처리하여 준 세포도(Figure 11-E) PBS만 처리한 대조군과 거의 비슷한 수준이었으며, Cd와 메밀추출물을 함께 처리한 세포에서도 대조군과 같은 양상을 보여 주었다(Figure 11-F). 이 실험에 사용한 carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA는 ROS에 의한 세포내의 산화작용에 의해서만 형광물질을 발생하므로, Cd를 처리한 세포내에서 관찰된 강한 형광물질은 Cd에 의한 세포내의 손상으로 ROS가 대량 생성되었음을 의미한다. 따라서 Cd가 세포내에서도 손상을 입히는 것을 확인할 수 있었으며, 상대적으로 PA나 메밀추출물은 세포내에서도 Cd에 대한 방어효능을 갖고 있는 것을 알 수 있었다.

## 4. 결 론

대표적인 구황작물의 하나인 메밀은 우리나라 어느 곳에서든 재배가 가능하지만 기후 풍토가 적합하여야 우수한 성분을 갖는 메밀을 수확할 수 있다. 메밀은 비교적 기온이 낮고 고도가 높은 지방이 원산지로 알려져 있으며, 그에 알맞은 기후 조건을 갖는 곳이 함경도, 평안도, 강원도 영서지방이며 특히 춘천지역의 메밀은 우수한 품질을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 메밀은 식품재료에 필요한 많은 영양성분을 갖고 있으며, rutin이나 PA같은 항산화 물질이나 중금속에 대한 chelate 물질들을 다량 함유하고 있음이 밝혀져 있다.

본 연구에서는 다양한 식품재료로 쓰이고 있으면서도 여러 가지 유의할만한 성분들을 많이 가지고 있는 춘천지역의 메밀을 이용하여 기능성 화장품의 소재로써 개발할 수 있는 가능성을 확인하기 위하여, 메밀의 부위별(종피, 종자, 줄기) 추출물을 이용한 MTT assay에 의한 세포생존을 측정, 항산화 효능(superoxide 라디칼, hydroxyl 라디칼 소거능), rutin과 PA에 대한 함량 측정, 대표적인 중금속 중의 하나인 Cd에 대한 세포 수준에서 방어 효능



을 평가하였다.

HaCaT 세포와 B16F10 세포를 이용한 세포 독성 실험에서는 종자와 줄기의 에탄올 추출물 100 µg/mL의 농도 범위에서는 독성이 없는 것으로 나타났으며, 200 µg ~ 500 µg/mL의 농도에서는 종자추출물이 B16F10에서 약간의 독성을 보여주었으나, 유의할만한 수준은 아닌 것으로 판단되므로, 에탄올이나 열수를 이용한 메밀 추출물들이 일정 농도 수준에서는 피부세포에 독성이 없는 것을 확인하였다.

Superoxide 라디칼에 대한 소거능은 종피 > 줄기 > 종자 추출물 순이었으며, 종피나 줄기는 거의 비슷한 수준의 항산화 효능을 보여 주었으며, 항산화 효능에 관여하는 주요 물질중의 하나인 rutin은 줄기 부위에 가장 많이 함유하고 있었다. 그러나 종피와 줄기에서 측정된 rutin의 함량과 항산화 효능의 차이는, 메밀은 저장하기 어려운 곡물류에 속하기 때문에 종피가 포함된 종자나 줄기의 저장 상태에 따라 함유성분의 일부 차이가 있을 수 있고, 항산화 효능을 갖는 다른 물질들과의 상호 작용 등 여러 가지 원인에 의한 것으로 여겨지기 때문에 크게 고려할 문제가 아닌 것으로 판단되며, hydroxyl 라디칼에 대한 소거능은 각 추출물 모두 거의 없는 것을 확인할 수 있었다.

중금속에 대한 chelate 물질로 알려진 PA는 rutin처럼 줄기 부위에 높은 농도로 함유되어 있었다. HaCaT 세포에 대한 Cd의 독성은 Cd 50 µM의 농도일 때 50% 정도의 치사율을 보였으며, Cd와 PA를 같이 처리하면 Cd의 독성을 100% 정도 방어하는 것을 볼 수 있었으며, Cd를 메밀 줄기추출물과 같이 처리하였을 때는 Cd의 독성에 대해 약 10% 정도의 유의할만한 수준의 방어 효과를 보여 주었다. Cd에 의한 세포내 산화적 스트레스에 의한 활성산소종의 생성을 H.DCFDA를 처리한 후 confocal laser microscope를 이용하여 발색되는 fluorescein의 형광세기를 확인하였는데, PA와 Cd를 같이 처리하여 준 세포의 경우, PBS만 처리하여 준 대조군과 같은 수준의 형광세기가 관찰되었으며, Cd와 메밀 줄기 추출물을 같이 처리한 경우에도 역시 대조군처럼 fluorescein이 발생되지 않는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 실험 결과를 보면, 메밀의 줄기 추출물에 다량의 rutin과 PA가 함유되어 있었고, 사람 유래 피부세포에는 독성을 나타내지 않았으며, superoxide 라디칼에 대한 강력한 항산화 효능을 보였으며, Cd에 의한 세포 독성을 감소시켜 주는 효능도 유의할 만한 수준이었으며, 세포내의 산화적 스트레스에도 우수한 방어 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 메밀 줄기 추출물을 이용한 피부 관련 기능성 화장품 소재에 대한 개발 가능성이 아주 높을 것으로 여겨진다.

## 감사의 글

본 연구는 춘천시 벤처 기업 촉진 지구 사업비의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

## 참고 문헌

1. S. W. Choi, C. S. Kim, M. S. Choi, B. H. Kim, H. S. Kim, and D. S. Choi, The study for antioxidative effects of *Acanthopanax sessiliflorus* extract as a new cosmetics ingredients using electron paramagnetic resonance, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **31**(1), 73 (2005).
2. Y. S. Choi, T. H. Shim, J. R. Kim, S. W. Kim, E. H. Cheong, and S. Y. Lee, Studies on compositional characteristics and quantitative determination of buckwheat flour in commercial products of Kangwondo *Makkuksoo* (buckwheat noodle) and buckwheat flour, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**(5), 963 (1999).
3. M. Watanabe, Y. Ohshita, and T. Tsushida, Anti-oxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1039 (1997).
4. B. D. Oomah and G. Mazza, Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1746 (1996).
5. S. Kreft, B. Strukelj, A. Gaberscik, and I. Kreft, Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method, *J. Experiment. Botany*, **53**(375), 1801 (2002).
6. R. M. Harrison and C. R. Williams, Airborne cadmium, lead and zinc at rural and urban sites in north-west England, *Atmosphe. Environ.*, **16**, 2669 (1982).
7. R. R. Yaaqub, T. D. Davies, T. D. Jickells, and J. M. Miller, Trace elements in daily collected aerosols at a site in south-esstern England, *Atmosphe. Environ.*, **25**, 985 (1991).
8. M. C. He, J. W. C. Wong, and J.-R. Yang, The patterns of Cd-binding proteins in rice and wheat seed and their stability, *J. Environ. Sci. Health*, **A37**(4), 541 (2002).
9. S. H. Oh, B. H. Lee, and S. C. Lim, Cadmium induces apoptotic cell death in WI38 cells via caspase-

- dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway, *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 1845 (2004).
10. M. Fojtova, J. Fulneckova, J. Fajkus, and A Kovaril, Recovery of tobacco cells from cadmium stress is accompanied by DNA repair and increased telomerase activity, *J. Experiment. Botany*, **53**(378), 2152 (2002).
  11. G. J. K. Komarnicki, Lead and cadmium in indoor air and the urban environment, *Environ. Pollu.*, **136**, 47 (2005).
  12. S. Ou, K. Gao, and Y Li, An *in vitro* study of wheat bran binding capacity for Hg, Cd, and Pb, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4714 (1999).
  13. T. H. Shim, H. H. Lee, S. Y. Lee, and Y. S. Choi, Composition of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivars from Korea, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(6), 1259 (1998).
  14. Y. S. Kim, S. H. Chung, H. J. Suh, S. T. Chung, and J. S. Cho, Rutin and mineral contents on improved kinds of korean buckwheat at growing stage, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**(6), 759 (1994).
  15. T. Hinneburg and R. H. H. Neubert, Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3 (2005).
  16. K. Azuma, M. Nakayama, M. Koshioka, K. Ipposushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H. Ito, and H. Higashio, Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L., *J. Agri. Food Chem.*, **47**, 3963 (1999).
  17. G. A. Jackl, W. A. Rambeck, and W. E. Kollmer, Retention of cadmium in organs of the rat after a single dose of labeled cadmium-3-phytate. *Biol. Trace Elem. Res.*, **7**, 69 (1985).
  18. C. S. Kim, J. H. Jung, N. K. Kim, S. H. Han, and S. W. Choi, Identification of ozone-induced skin damage and screening of antioxidant for ozone, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **30**(1), 39 (2004).
  19. N. E. Polyakov, A. I. Kruppa, T. V. Leshina, T. A. Konovalova, and L. D. Kisper, Carotenoids as antioxidants: spin trapping EPR and optical study, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**(1), 43 (2001).
  20. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
  21. T. Ohashi, A. Mizutani, A. Murakami, S. Kojo, T. Ishii, and S. Taketani, Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species, *FEBS Lett.*, **511**, 21 (2002).
  22. W. Eeckhout and M. De Paepe, Total phosphorous, phytate-phosphorous and phytase activity in plant feedstuffs, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **47**, 19 (1994).
  23. C. Quettier-Deleu, B. Gressier, J. Vasseur, T. Dine, C. Brunet, M. Luyck, M. Cazin, J. C. Cazin, F. Bailleul, and F. Trotin, Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour, *J. Ethnopharmacol.*, **72**, 35 (2000).
  24. J. Pallauf and G. Rimbach, Nutritional significance of phytic acid and phytase, *Arch. Anim. Nutr.*, **50**, 301 (1997).
  25. C. J. Martin and W. J. Evans, Phytic acid-enhanced metal ion exchange reactions: the effect on carboxypeptidase A, *J. Inorgan. Biochem.*, **35**, 267 (1989).
  26. A. Moberg Wing, The effects of whole wheat, wheat bran and zinc in the diet on the absorption and accumulation of cadmium in rats. *Br. J. Nutr.*, **69**, 199 (1993).