KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 38, No. 5, pp. 707~711 (2006)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

파프리카 추출물이 quinone reductase 유도활성에 미치는 영향

유미희 · 이효정 · 임효권 · 이승욱 · 이인선*
계명대학교 식품가공학 전공, 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR) 센터

Induction of Quinone Reductase Activity in Hepatoma Cells by Paprika (*Capsicum annuum* L.)

Mi Hee Yu, Hyo Jung Lee, Hyo Gwon Im, Syng-Ook Lee, and In-Seon Lee*
Department of Food Science and Technology, Keimyung University
The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

Abstract Phase 2 enzymes are transcriptionally induced by a wide variety of chemical agents and natural products, and their induction plays a critical role in protection against chemical carcinogens and other toxic xenobiotics. The activity of the methanol extract and fractions of paprika (*Capsicum annuum* L.) was examined in murine Hepa1c1c7 cells for the induction of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) NAD(P)H/quinone reductase (QR). The ethyl acetate (EtOAc) fraction induced QR activity in a dose-dependent manner in the concentration range of 10 to 500 μg/mL with a maximum of a 3.3-fold increase in induction. The EtOAc fraction also showed high QR induction potency in Ah-receptor-defective mutant of Hepa 1c1c7 cells (BP^{r}c1 cells), which indicates that this fraction is a monofunctional inducer of QR. These results suggest that useful cancer chemopreventive materials could be isolated from EtOAc fraction of Paprika.

Key words: paprika (*Capsicum annuum* L.), chemoprevention, quinone reductase, monofunctional inducer, Hepa1c1c7

서 론

최근 식품 및 천연물을 이용한 생리활성 물질의 검색 및 그 작용기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 암을 예방하거나 치료할 수 있는 화학적 암예방법에 관한 연구가 계속적으로 진행되고 있다(1). 우리나라에서는 200여종 이상의 한방 생약제가 암 환자에게 처방되고 있음이 통계적으로 밝혀졌고, 수종의 한약재와 향신료, 채소류, 과일류 등에서 항암 작용이 보고되고 있다(2). 많은 과학자들이 일부 한국에 자생하는 약용식물 및 식용식물 추출물의 항암 효과에 관한 연구를 보고한 바 있으며, 중국이나 일본에서도 각 나라의 자생 식용식물의 항암성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 항암 기작 중 대표적인 것으로 체내 독성물질이나 발암물질을 무독화 시키는 NADP(H):quinone reductase(QR)와 glutathione S-transferase(GST) 및 UDP-glucuronosyltransferase 등의 phase II 효소계의 활성유도와 phase I 효소계인 cytochrome P450 효소활성 억제, glutathion 생성, transformed cell에서 그 함량이 증가되는 polyamine 생성억제 등을 들 수 있다(3). QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II 효소계의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 여러 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화를 막아주고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 한다(4).

QR을 유도하는 활성 성분으로는 polycyclic aromatic hydrocarbons, flavonoids, azo dyes, diphenols, thiocarbamates, isocyanates, 1,2-dithiol-3-thiones 계통의 화합물 등이 밝혀져 있다(5,6). 그러나 QR 유도활성에 대해서 우리나라를 비롯한 동북아시아 지역에서는 주로 약용식물에 국한되어 연구가 되고 있는 경향이며, 각 국에 자생하는 산채류, 채소류 및 과일류에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 거의 없는 실정이다.

파프리카는 가지과(Solanaceae), 고추속(Capsicum), 고추종(Annuum)에 속하는 한해살이 식물로 6개의 아종이 있으며, 파프리카란 말은 어원이 희랍어로, 현재 유럽에서는 모든 고추를 통칭하고 있다(7). 파프리카는 capsanthin, β-cryptoxanthin, zeaxanthin 등의 카로티노이드계 색소를 함유하고 있으며, 비타민 A, B_1 및 C가 풍부한 알칼리성 강장식품으로 알려져 있다(8-10). 현재까지 파프리카는 항산화 작용을 나타내는 여러 가지 성분들의 분리에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며(11-16), 화학적인 암예방 활성에 대한 연구가 보고되어 있으나(17), 대표적인 암예방 효소로 알려진 quinone reductase 유도활성에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 파프리카 추출물 및 분획물을 이용하여 quinone reductase의 유도 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 제조 및 분획

본 실험에 사용된 파프리카는 대형 마트에서 구입한 후, 깨끗이 수세하여 씨와 꼭지를 제거한 후 10배 용량의 80% methanol과 혼합하여 24시간 동안 정치 추출하고, 이를 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 1, Maidstone, England)를 사용하여 2회 여과하고 회전감압 농축기(R-3000, Buchi, Flawil,

*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, 1000 Sindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5538
Fax: 82-53-580-5538
E-mail: inseon@kmu.ac.kr
Received August 24, 2006; accepted October 2, 2006

Switzerland)로 농축하여 동결건조를 한 후 분말화 하여 본 실험의 시료로 사용하였다. 메탄올 추출물을 물에 녹인 후 극성이 서로 다른 용매(*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, water)를 이용하여 순차 분획 후 각각 농축하고 동결건조 함으로써 각 용매에 대한 분획물을 얻었다.

세포주 및 배양

본 실험에 사용한 세포주로는 마우스 유래의 간암 세포주인 Hepa 1c1c7(murine hepatoma cell line), BP^{r}c1(Ah-receptor-defective mutant of hepa 1c1c7 cell line) 으로써, 이는 한국 세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받았으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 5% CO_2가 존재하는 37°C 배양기에서 1주일에 2-3회 계대 배양하였다.

세포내 QR 활성 측정

세포내 QR의 활성은 Benson 등(18)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 배양한 세포를 0.4% trypan blue 염색법으로 세포수를 측정한 후 1×10^4 cells/well의 농도로 96-well microtiter plate의 각 well에 200 μL씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 MEM배지 200 μL에 녹인 농도별 시료를 각 well에 첨가한다. 시료가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척한 다음, 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. 세포를 용해시킨 후 각 well에 50 μL의 2% triton X-100을 첨가한 후 microplate shaker를 이용하여 300 rpm에서 10분간 흔들어 준다. 여기에 반응액 200 μL [증류수를 첨가한 최종 150 mL에 대해 7.5 mL의 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mg의 BSA, 1.0 mL의 1.5% tween-20, 0.1 mL의 7.5 mM FAD, 1.0 mL의 150 mM glucose-6-phosphate, 90 μL의 50 mM NADP, 300 units의 yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg의 MTT 및 150 μL의 50 mM menadione 함유]를 각 well에 첨가하고 5분간 반응시켰다. 반응 후, 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM dicumarol과 5 mM potassium phosphate가 함유된 용액 50 μL를 첨가하여 반응을 중지시키며, microplate reader를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Quinone reductase의 비활성(specific activity)은 환원된 MTT와 crystal violet에 의한 흡광도로 산정하고, QR 유도활성은 시료를 처리하지 않은 대조군의 QR 활성에 대한 시료를 처리한 QR 활성의 비로 나타낸다. 비활성의 계산은 다음과 같다.

비활성 = [absorbance change of MTT/min × 3,345 nmoles/mg of protein]/absorbance of crystal violet

이때 도입된 3,345 nmoles/mg of protein은 crystal violet과 MTT의 흡광계수로부터 계산된 비례상수이다.

Crystal violet 염색

단백질 함량 및 살아있는 세포에 의한 QR의 유도활성만을 측정하기 위한 crystal violet 염색은 Drysdale 등(19)의 방법에 준하여 실시하였다. QR 활성 측정을 위한 앞 실험과 동일하게 96-well plate에 세포를 접종하여 24시간 배양한 후 시료를 처리하고 48시간 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고, PBS로 3회 세척한 다음 2% 에탄올에 녹인 0.2%(w/v) crystal violet에 10분간 담근 후 2분간 흐르는 물에 씻는다. 여기에 50% 에탄올에 녹인 0.5% (w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS)를 200 μL씩 각 well에 첨가하고 37°C의 CO_2 incubator에서 1시간 반응시킨 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법(20)을 응용하여 측정하였다. 즉 메탄올 추출물 및 분획물 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na_2CO_3 2 mL을 넣고 1시간 반응 시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid의 최종농도가 5, 25, 50 μg/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 플라보노이드 함량

시료중의 총 플라보노이드 함량은 Moreno(21) 등의 방법에 의해 측정하였다. 각 분획물 및 추출물 0.1 mL와 80% ethanol 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate 0.1 mL 그리고 80% ethanol 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 quercetin 검량선과 비교하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였다. Quercetin을 이용한 표준곡선은 quercetin의 최종농도가 5, 25, 50 μg/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 415 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

통계처리

이상의 모든 실험 측정치는 3번 반복 실시하여 그 평균값으로 나타내었으며, 실험결과는 SAS program을 이용하여 분산 분석한 후 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

파프리카 분획물의 수득율

파프리카의 메탄올 추출물 5 g을 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol 및 수층의 용매별로 분획하여 hexane 층은 0.0455 g(0.91%), CH_2Cl_2 층은 0.2252 g(4.5%), EtOAc 층은 0.0165 g(0.33%), BuOH 층은 0.3297 g(9.61%)을 얻었고, 나머지 water 층은 3.5210 g(70.42%)의 분획물을 얻었다(Table 1).

파프리카 메탄올 추출물 및 분획물의 QR 유도 활성

마우스 유래 간암세포주인 Hepa 1c1c7 세포주에 대한 파프리카 메탄올 추출물 및 분획물의 QR 유도활성을 비교하기 위해 CD(the concentration required to double the specific activity of QR), IC_{50} 그리고 CI(the ratio between IC_{50} and CD)값을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 각 분획물들의 CD값을 비교해 본 결과, hexane 층과 EtOAc 층이 각각 47, 72 μg/mL로, 가장 낮은 농도

Table 1. Recovery yields of various solvent fractions from methanol extract of paprika

Weight (g) of fraction recovered					
Extract	Fractions				
MeOH	Hexane	CH_2Cl_2	EtOAc	BuOH	Water
5*	0.0455 (0.91)	0.2252 (4.50)	0.0165 (0.33)	0.3297 (9.61)	3.5210 (70.42)

*5 g of powdered methanol extract was dissolved in distilled water and partitioned with hexane, CH_2Cl_2, EtOAc, BuOH in order.
Values in parenthesis indicate recoverd yield (%).

Table 2. Induction of quinone reductase (QR) and cytotoxic effects mediated by a methanol extract of paprika and its fractions in Hepa1c1c7 cells

Sample	CD[1] (mg/mL)	IC_{50}[2] (mg/mL)	CI[3]
MeOH extract fraction	3.443	3.915	1.137
Hexane fraction	0.047	0.608	12.936
CH_2Cl_2 fraction	0.484	0.851	1.758
EtOAc fraction	0.072	1.031	14.319
BuOH fraction	0.429	1.396	3.254
Water fraction	2.767	3.423	1.237

[1]Mean value of the concentration required to double the specific activity of QR.
[2]Mean value of the half-maximal inhibitory concentration of cell viability.
[3]The ratio between IC_{50} and CD.

Table 3. Total phenolics and total flavonoids of a methanol extract of paprika and its fractions

Sample	Total phenolics[1] (mg/g)	Total flavonoids[2] (mg/g)
MeOH extract	18.22 ± 2.04	10.02 ± 0.56
Hexane fraction	6.06 ± 1.27	9.35 ± 2.52
CH_2Cl_2 fraction	12.92 ± 0.95	16.54 ± 0.04
EtOAc fraction	44.90 ± 3.19	53.71 ± 2.53
BuOH fraction	28.22 ± 3.05	50.23 ± 3.39
Water fraction	19.58 ± 0.87	9.90 ± 1.56

[1]Total phenolics is expressed as tannic acid equivalents.
[2]Total flavonoids is expressed as quercetin equivalents.
Each value represents the mean ± SD of 3 independent experiments.

에서 QR 활성을 2배로 증가시키는 것을 알 수 있었다. 세포독성을 나타내는 IC_{50}값은 메탄올 추출물과 water 층에서 높게 나타나 독성이 낮음을 확인하였고, 결과적으로 EtOAc 층의 CI값이 가장 높게 나타나 비교적 독성이 낮으면서 QR 활성을 높여주는 물질은 파프리카의 EtOAc 층에 존재하는 것으로 생각된다. 각 분획물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 살펴보면 QR 활성이 우수하였던 EtOAC 층에서 가장 높게 나타났다(Table 3). 식용식물의 QR 유도활성에 대해서는 최근 수년간 연구가 활성화되면서 sulforaphane(5), brassinin(22) 및 sulforamate(23) 등의 주요 성분들이 분리 확인되었는데, 미국에서는 주로 채소류를 이용하여 연구를 진행하여 몇 가지 새로운 flavonoid 화합물을 분리하였으며, 80종 이상의 천연 또는 합성 flavonoid 화합물에 대한 실험 결과 flavone의 단순한 유도체인 4'-bromoflavone이 강력한 QR inducer로 밝혀지기도 하였다(24). 따라서 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높은 파프리카의 EtOAc 분획물에서 QR 활성성분에 대한 물질규명이 이루어져야 할 것이다.

파프리카 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(25). 파프리카의 메탄올 추출물과 각 분획물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다

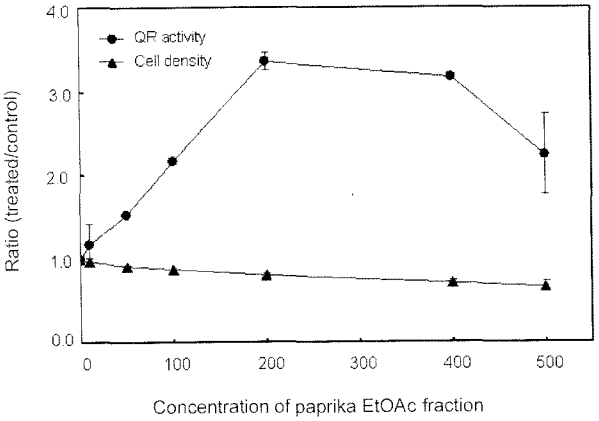

Fig. 1. Induction of quinone reductase (QR) in Hepa1c1c7 cells by a EtOAc fraction from paprika. Cells were treated with the fraction in a concentration range of 10 to 500 μg/mL for 48 h. Each value represents the mean ± standard deviation of 3 independent experiments and is expressed relative to a vehicle control.

(Table 3). 그 결과, 파프리카 EtOAc 분획물의 총 폴리페놀 함량은 44.9 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 53.71 mg/g으로 메탄올 추출물과 각 분획물들 중 가장 높게 나타나 QR 유도활성과 일치하는 결과를 보였다. 국내산 식용식물중의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 분석한 결과를 살펴보면 국내 시판되는 일부 다류의 경우 홍차, 인삼차, 녹차, 한차의 폴리페놀 함량은 각각 101.51, 28.30, 94.90, 95.81 mg/g이고, 플라보노이드 함량은 각각 16.75, 3.29, 6.72, 6.06 mg/g이며(26), 홍화씨, 순 및 꽃의 폴리페놀 함량은 각각 12.34, 5.10, 8.05%(27), 한방아로마 식물인 *Salvia officinalis*, *Matricaria recutita*, *Potentilla fruticosa*의 폴리페놀 함량은 각각 22.6, 7.5, 37.9 mg/g이며, 플라보노이드 함량은 각각 3.5, 7.1, 6.1 mg/g으로 보고되었다(28). 그리고 아르헨티나 여러 지역 propolis의 플라보노이드 함량은 13.3~42.06 mg/g으로 보고되었다(21). 이들 결과들과 비교해 볼 때 파프리카의 EtOAc 분획물은 특히 많은 양의 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 나타났다.

파프리카 EtOAc 분획물의 QR-monofunctional inducer로의 활성

파프리카의 EtOAC 분획물의 QR 유도 활성은 Fig. 1과 같이 농도 의존적으로 그 활성이 증가하였으며, 200 μg/mL의 농도에서 QR 활성은 약 3.3배로 가장 높게 나타났다. 이는 우수한 QR inducer로 알려진 β-naphthoflavone(β-NF)과도 비슷한 활성을 가짐을 알 수 있었다(data not shown).

한편, 여러 항암성분들은 2상 효소계만을 활성화시키는 monofunctional inducer와 1상 효소계를 함께 활성화시키는 bifunctional inducer로 나뉘어진다. Bifunctional inducer는 세포질에 존재하는 Ah 수용체단백질에 결합하여 cytochrome P 450을 포함한 1상 효소계의 유전자에 작용하여 효소합성을 촉진하며, 유도된 1상 효소계에 의해서 대사된 화합물은 monofunctional inducer와 유사한 기작으로 2상 효소계를 활성화시키는 것으로 추정하고 있다. Monofunctional inducer는 Ah 수용체와는 독립적으로 2상 효소계만을 선택적으로 유도하는데, procarcinogen의 bioactivation과는 관련이 없으므로 bifunctional inducer 보다는 항암활성이 더 우수한 것으로 알려져 있다(6,20-30). 2상 효소계만을 활성화시키는 monofunctional inducer와 1상 효소계를 함께 활성화시키는 bifunctional

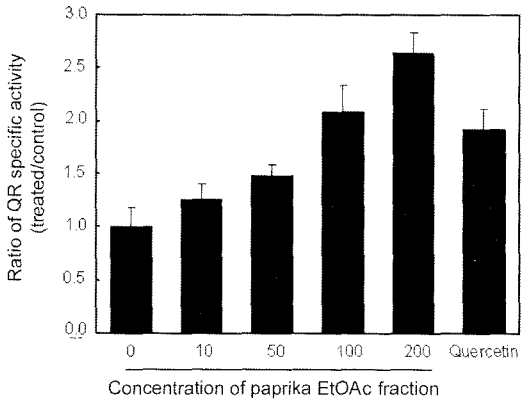

Fig. 2. Quinone reductase (QR) activity of Ah-receptor-defective mutant of Hepa1c1c7 cells (BP^{r}c1) treated with a EtOAc fraction of paprika. Cells were treated with the fraction in a concentration range of 10 to 200 μg/mL for 48 h. Twenty μM quercetin served as a positive control for the monofunctional inducer of QR. Each value represents the mean ± standard deviation of 3 independent experiments.

inducer를 구별하기 위해 1상 효소계의 활성 없이 2상 효소계만을 활성화시키는 Hepa1c1c7 세포의 변이주인 BP^{r}c1 세포주를 이용하여 파프리카 EtAOc 분획물의 QR 유도활성을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. BP^{r}c1 세포주에서는 Hepa1c1c7의 세포주에서와 같이 농도 의존적으로 높은 활성을 보였다. 또한 monofunctional inducer로 알려진 quercetin이 20 μM에서 약 2배의 활성을 보인 반면, 파프리카 EtAOc 분획물은 200 μg/mL의 농도에서 그 활성이 2.5배 이상 증가하는 것을 보여 파프리카 EtAOc 분획물의 항암성분은 monofunctional inducer로 생각된다. 이와 같은 연구 결과들을 바탕으로 현재 파프리카의 EtOAc 층에 존재하는 QR의 유도활성 물질을 분리·정제하여 앞으로 계속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

Phase II 효소계는 자연계에 존재하는 다양한 화학물질과 천연소재들에 의해 유도되며, 이들의 유도는 화학적 발암물질과 그 밖의 여러 가지 독성물질들로부터 생체를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 파프리카의 메탄올 추출물을 제조하고, 이를 각 용매별로 분획하여 Hepa1c1c7 세포주를 이용하여 대표적인 암예방 효소인 quinone reductase의 유도 활성을 조사하였다. 그 중 QR 유도활성이 가장 높았던 EtOAc 분획물은 10-500 μg/mL의 농도로 처리했을 때, 200 μg/mL의 농도에서 QR 활성이 약 3.3배로 가장 높게 나타났으며, 파프리카의 추출물의 총 플리페놀 및 플라보노이드 함량 역시 EtOAc 분획물에서 가장 높게 나타났다. 또한 BP^{r}c1 세포주에서도 농도 의존적으로 높은 QR 유도활성을 보여 파프리카의 EtOAc 분획물의 항암성분은 monofunctional inducer인 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Kang GI. The conception by drugs of medical action and activity. Hiseongchulpansa, Seoul, Korea. pp. 245, 286-302 (1993)
2. Miranda CL, Aponso GLM, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa1c1c7 cells. Cancer Lett. 149: 21-29 (2000)
3. Talalay P, Benson AM. Elvation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants. Adv. Enzyme Regul. 20: 287-300 (1982)
4. Wefers H, Komai T, Talalay P, Sies H. Protection against reactive oxygen species by NAD(P)H: quinone recuctase induced by the dietary antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). FEBS Lett. 169: 63-66 (1984)
5. Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cells cultured in microtiter well: A screening assay for anticaecinogenic enzyme inducers. Anal. Biochem. 169: 328-336 (1988)
6. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 2399-2403 (1992)
7. Jeong CH, Ko WH, Cho JR, Ahn CG, Shim KH. Chemical components of Korean paprika according to cultivars. Korean J. Food Preserv. 13: 43-49 (2006)
8. Biacs PA, Daood HG, Huszka TT, Biacs PK. Carotenoids and carotenoid esters from new cross cultivars of paprika. J. Agric. Food Chem. 41: 1864-1867 (1993)
9. Ittah Y, Kanner J, Granity R. Hydrolysis study of carotenoid pigments paprika by HPLC/photodiode array detection. J. Agric. Food Chem. 41: 899-901 (1993)
10. Fisher C, Kocis JA. Separation of paprika pigments by HPLC. J. Agric. Food Chem. 35: 55-57 (1987)
11. Palevitech D, Craker LE. Nutritional and medicinal importance of red pepper (*Capsicum* spp.). J. Herbs Spices Med. Plants 3: 55-83 (1995)
12. Daood HG, Vinkler M, Markus F, Hebshi EA, Biacs PA. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and variental factors. Food Chem. 55: 365-372 (1996)
13. Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. Pure Appl. Chem. 66: 1003-1010 (1994)
14. Krinsky NI. Carotenoids as antioxidants. Nutrition 17: 815-817 (2001)
15. Matsufuji H, Nakamura H, Chino M, Takeda M. Antioxidant activity of capsantin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). J. Agric. Food Chem. 46: 3468-3472 (1998)
16. Wachtel RE. Capsaicin. Regist. Anest. Pain Med. 24: 361-363 (1999)
17. Maoka T, Mochida K, Kozuka M, Ito Y, Fujiwara Y, Hashimoto K, Enjo F, Ogata M, Nobukuni H, Nishino H. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. Cancer Lett. 172: 103-109 (2001)
18. Benson A, Hunkeler MJ, Talay P. Increase of NAD(P)H:qunone reductase by dietary antioxidants. Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 5216-5220 (1980)
19. Drysdale BE, Zacharchuk CM, Okajima M, Shin HS. Assay of a cytocidal protein excreted by activated marcophages. pp. 549-555. In: Methods in Enaymology. Sabato D, Eberse T (eds). Academic Press, Orlando, FL, USA (1986)
20. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosopho-molybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12: 239-249 (1912)
21. Moreno MIN, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000)
22. Mehta RG, Liu J, Constantinou A, Thomas CF, Hawthorne M,

Gerhuser C, Pezzuto JM, Moon RC, Moriarty RM. Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from cabbage. Carcinogenesis 16: 399-404 (1995)
23. Gerhauser C, You M, Liu J, Moriarty RM, Hawthorne M, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. Cancer Res. 57: 272-278 (1997)
24. Kim SM, Ryu SH, Choi HD, Kim SS, Kim JH, Kim JS. Screening for Korean vegetables with anticarcinogenic enzyme inducing activity using cell culture system. Korean J. Food Sci. Nutr. 27: 277-281 (1998)
25. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. J. Agric. Food Chem. 25: 103-107 (1977)
26. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. The antioxidant activities of the some commercial teas. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 723-727 (2003)
27. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1127-1132 (2000)
28. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85: 231-237 (2004)
29. Talalay P, De Long MJ, Prochaska HJ. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enaymes that protect against chemical carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8261 (1988)
30. Spencer SR, Wilczak CA, Talalay P. Induction of glutathione transferases and NAD(P)H: Quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues. Cancer Res. 50: 7871 (1990)