pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 4, pp. 461~465 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

추출용매에 따른 브로콜리의 항산화와 항염증에 대한 효과

장민우 · 하배진*
신라대학교 의생명과학대학 생명공학과

Effects of Broccoli on Anti-inflammation and Anti-oxidation According to Extraction Solvent

Min-woo Jang and Bae-jin Ha*
Department of Biotechnology, College of Medical Life Science, Silla University, 140 Baegyang-daero 700beon-gil, Sasang-gu, Busan, Korea
(Received September 20, 2012/Revised October 25, 2012/Accepted December 3, 2012)

ABSTRACT - Broccoli has a functional substance, sulforaphane that has effects of anticancer, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory. Sulforaphane, one of the hydrolysis products of glucoraphanin in broccoli, cabbage and kale, was contributed to the role of antioxidant. Broccoli contains a number of bioactive compounds including glucosinolates, S-methyl cysteine sulfoxide and many antioxidants. The ethanol extract (BE), hexane extract (BH), propylene glycol extract (BP) and butylenesglycol extract (BB) of broccoli were used to investigate the antioxidation and anti-inflammatory effects of sulforaphane extracts from broccoli. The high scavenging abilities of DPPH, O_2^- were observed. Also sulforaphane extracts from broccoli showed the inhibition effect on NO rate. These results demonstrated that sulforaphane extracts from broccoli could be useful as an antioxidation and anti-inflammatory functional ingredient.

Key words: *Antioxidation*, *Anti-inflammatory*, *Broccoli*, *Sulforaphane*, *Propionibacterium acne* (*P. acne*)

여드름은 testosterone의 분비로 인하여 피지분비 증가, 모낭벽의 각화, 세균증식 등에 의해서 발생되는 염증성 질환으로 청소년기에 특히 많이 발생된다[1]. 여드름은 여러 가지 형태의 병변을 갖는 것을 특징으로 하며 비염증성과 염증성이 있다. 비염증성 병변인 면포(comedo)는 모낭상피의 각화로 인하여 각질과 피지가 정체되어 생성된 것으로 개방면포(black head)와 폐쇄면포(white head)가 있다. 염증성 병변으로는 표재성인 것과 심재성인 것이 있으며 많은 병변들이 비염증성 병변에서 기원한다. 심재성 병변은 치유된 후에도 흔히 영구 반흔을 남기며 표재성 병변도 반흔을 남길 수 있다[2].

여드름의 주요 병원체인 여드름균(*Propionibacterium acne*)는 피부 내에 존재하는 혐기성 상재균으로써 피부 모낭 내에서 성장하는 지방 친화성 미생물이다[3].

*P. acne*는 염증성 여드름 형성의 주요 원인으로, 과잉 생성된 피지에서 colony를 형성하고 lipase를 분비하여 모낭피지선에서 중성지방을 지방산으로 분해하는 과정을 통해 염증 반응을 일으킨다.

여드름의 치료에는 Tretinoin, Tazatorene, Azelaic Acid, Isotretinoin 등의 국소 레티노이드제와 항생제 등을 사용하지만 부작용을 나타내는 단점이 있다[4,5]. 이러한 부작용을 완화하기 위하여 천연물에서 *P. acne*를 저해한다고 알려져 있는 sulforaphane (S-methylsulfinylbutyl isotio-cyanate)은 항산화[6], 항암[7], 항균[8] 등의 효과가 알려져 있다. 브로콜리(*Brassica oleracea var. italic*)는 양배추, 콜리플라워, 갓 등과 함께 십자화과 다년생 식물로 분류되며 십자화과 식물에는 α-carotene, β-carotene, α-tocopherol, γ-tocopherol, 각종 비타민류와 sulforaphane 등의 생리활성 물질을 함유하고 있다[9]. 특히 포유동물에 의해 섭취된 채소류의 sulforaphane은 다른 기능성 isothiocyanato들의 경우와 같이 glutathione S-transferase에 의해 glutathione과 결합되어 isothiocyanate-glutathione을 형성하게 된다. 이렇게 동물의 mercapturic acid 대사 경로를 거쳐, ITC-cysteine-glycine, ITC-cyteine, ITC-N-acetylcysteine 등으로 분해되며 여러 약리작용을 일으키고 배출되는 것으로 알려져 있다[10].

따라서 우리는 천연물인 브로콜리의 sulforaphane을 이

*Correspondence to: Bae-jin Ha, 140 Baegyang-daero 700beon-gil, Sasang-gu, Busan, Korea
Tel: 82-51-999-5466, Fax: 82-51-999-5636
E-mail: bjha@silla.ac.kr

용하여 여드름에 효과를 가지는 화장품 또는 의약품으로의 개발함에 이바지하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 실험

실험 재료

본 실험에 사용된 브로콜리는 부산 사상 E마트에서 구입해서 사용하였고, 프로폴리스 는 (주)아마란스화장품에서 제공받아 실험하였다. 시료 추출을 위해서 Ethanol (E) hexane (H), Butylene glycol (B), Propylene glycol (P)을 추출용매로 사용하였다. 4가지 용매를 브로콜리와 양배추 각각 100 g에 용매 1 L를 evaporator에서 60°C 에서 6시간 환류 냉각하여 추출 하였다. 추출액을 여과지를 사용하여 여과하고, 여과액을 회전농축기를 이용하여 60°C에서 농축하여 사용하였다(Fig. 1).

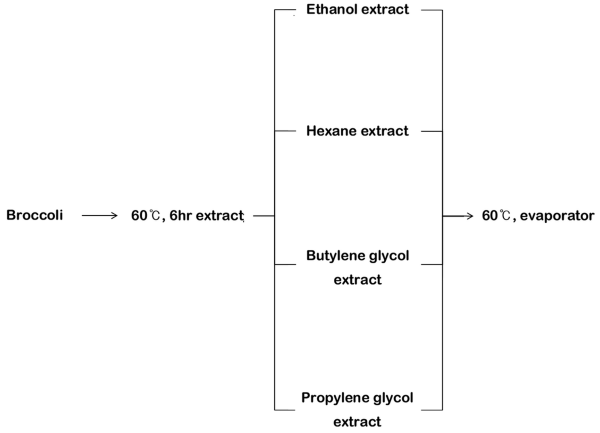

Fig. 1. Procedure for extraction of Broccoli by Liebig condenser. BB: broccoli butylene glycol extract. BE: broccoli ethanol extract. BP: broccoli propylene glycol extract. BH: broccoli hexane extract.

균주 및 세포배양

RAW 264.7을 DMEM (Dulbecco's modified Egale's medium) 배지로 5% CO_2, 37°C에서 배양하였으며, 배지는 2~3일 간격으로 교체하고 배양용기의 90%이상 자라게 되면 계대배양하여 실험에 사용하였다..

*P. acne*의 생육배지로 neutrient broth를 사용하였으며, 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 항균성 실험에 사용한 고체배지는 각 배지의 agar를 사용하였다.

Diphenyl picrylhydrazyl scavenging activity

프리라디칼 소거활성 실험은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma) 을 사용하는 방법[11]으로, 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 에 시료 각각의 농도별로 에탄올에 녹여 혼합하고, 37°C 에서 10분간 반응시킨 후 UVIKON-XS (Bio-Tek instruments)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide radical scavenging activity

2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) 1 mM와 esterase (600 unit/ml)를 혼합한 뒤 37°C 에서 20 min 간 반응시켜 2',7'-dichloro- dihydrofluorescein (DCFH) solution을 만든 후 DCF 측정법을[12] 사용하여서 평가하였다. 96 well plate에 농도별 각 시료를 넣고 50 mM 칼륨인산- 완충용액을 넣은 뒤 20 mM menadion 와 칼륨인산완충용액으로 100배 희석한 DCFH solution을 넣고 5분간 반응하여 Synergy HT (BioTek)로 485/530 nm 에서 fluorescence를 5분 간격으로 30분간 측정하였다.

Nitric oxide assay

RAW 264.7 세포를 FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cell/ml로 조절한 후 96well plate에 접종한 후

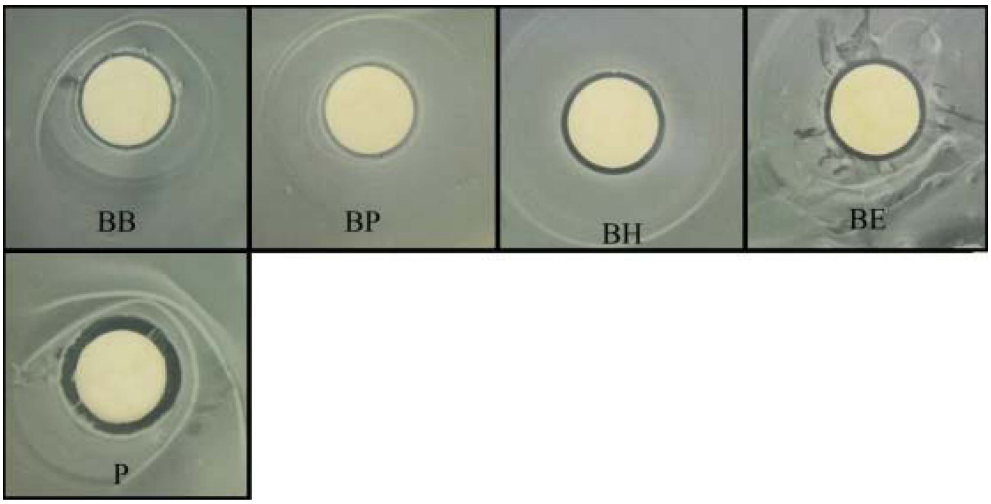

Fig. 2. Anti-microbial activities of broccoli in *Propionibacterium acnes*. BB: broccoli butylene glycol extract. BE: broccoli ethanol extract. BP: broccoli propylene glycol extract. BH: broccoli hexane extract.

24시간 배양하였다. 배양 후 시료의 최종농도가 각각 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/ml의 농도가 되도록 세포에 처리하고 염증반응 유도인자인 Lipopolysaccharide (LPS)를 1 μg/ml의 농도로 동시에 처리하여 24시간 배양 후 배지를 이용하여 Nitric oxide (NO)의 생성 정도를 측정하였다. 96 well plate에 세포배양액과 Griess 시약을 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광값을 측정하였다.

Paper disk diffusion

Agar diffusion법에 의한 항균활성 검증 항균효능을 평가하기 위해 본 실험에서는 paper disk diffusion 방법을[13] 사용하였다. stock되어 있는 균주를 백금이를 이용하여 agar plate에 streaking하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 생성된 colony 하나를 백금이를 이용하여 Broth배지에 접종하고 24시간 동안 250rpm, 37°C 진탕배양기에서 전 배양하였다. 멸균한 agar plate에 배양한 균 현탁액을 준비해서 이를 배양 액체 배지로 희석하여 660 nm에서 흡광도 1.0의 농도로 준비하여 도말하였다. 도말 한 고체배지에 멸균된 10 mm의 paper disk를 올려놓은 후 100 μg/ml의 농도로 희석되어진 시료를 disk에 loading하였다. 10분간 정치하여 시료가 모두 배지에 확산되어 흡수된 후, 균의 생장 최적 온도인 37°C에서 배양하였다.

통계 처리

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 $p < 0.05$로 하였고, SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)통계 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA, t-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

Diphenyl picrylhydrazyl scavenging activity

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 radical 전자의 비편재화에 의해 안정한 구조의 radical로 존재한다. DPPH는 517 nm에서 최대 흡수를 나타내며, 환원되면 517 nm에서 흡수가 없어진다. 따라서 DPPH의 환원정도는 환원제의 환원력에 달려있다[14,15]. DPPH결과는 Table 1에 나타내었으며 서로 다른 4가지의 용매로 추출한 결과, 활성이 가장 높은 추출물은 propylene glycol이고 그 다음 butylene glycol, ethanol과 hexane은 비슷한 활성을 나타내었다. 각 용매별로 가장 높은 활성을 나타낸 농도는 propylene glycol은 500 μg/ml, butylene clycol은 1000 μg/ml, ethanol은 500 μg/ml 그리고 hexane은 1000 μg/ml에서 가장 높은 환원력을 나타내었으며 이 중 propylene glycol로 추출한 브로콜리가 표준물질인 Vitamin C와 가장 근접한 소거능을 나타내었음을 확인할 수 있었다. Schwarz등[16]의 연구에 따르면 propylene glycol용매의 추출물이 수성 용매의 추출물 보다 높은 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었으며 본 연구에서의 결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

Superoxide radical scavenging activity

활성산소는 생물학적 반응에서 세포내 효소 또는 대부분의 전자 운반과정에서 만들어지며 안정되지 못하여 강한 활성을 가진다. 활성산소는 분자나 이온과 다르게 1개 이상의 짝 없는 전자를 갖는 화학물질로서 여러 가지 물질대사를 영위하는데 이용되지만 자외선, 생화학적 반응 등으로 $^1O_2$, $\cdot O_2^-$, OH^-, hydrogen peroxide 등 free radical의 생산이 과잉되면 생체에 대하여 독성을 나타내어 여러 가지 질환의 발생기전에 관여한다고 한다[17,18,19]. 서로 다른 4가지 용매에 따른 superoxide radical 소거 실험 결과는 Table 2와 같다. Butylene glycol 추출 샘플을 제외한 ethanol, propylene glycol, hexane 용매에서 250 μg/ml 농도에서 유의성 있는 superoxide radical 소거능을 나타내었지만, ehtanol 500 μg/ml와 hexane 125 μg/ml에서 표준물질인 vitamin C와 가장 유사한 소거능을 나타내었고 propylene glycol에서 추출한 broccoli의 활성은 ehanol, hexane에 비해 약간 떨어지는 결과를 확인할 수 있었다. Koul[20]등의 연구결과에 따르면 propylene glycol과 물을 희석하여 추출하였을 때 ascorbic acid보다 항산화 활성이 좋게 나타나 본 연구결과와 다르지만 추출물이 *Mussaenda frondosa* root과 브로콜리로 다르므로 항산화 활성이 다르게 나타난

Table 1. Effects of broccoli on DPPH activity. Vitamin C was used as a positive control. BB: broccoli butylene glycol extract. BE: broccoli ethanol extract. BP: broccoli propylene glycol extract. BH: broccoli hexane extract. a, b, c, d, e, f, g, h are different group by one-way ANOVA with post-hoc test

	DPPH scavenging activity (%)			
Group	concentration			
	1000 μg/ml	500 μg/ml	250 μg/ml	125 μg/ml
BB	91.39 ± 0.75^{g}	91.76 ± 0.63^{g}	91.44 ± 0.46^{g}	$89.84 \pm 0.84^{e,f}$
BE	$88.62 \pm 0.83^{d,e}$	$87.53 \pm 1.02^{c,d}$	$87.63 \pm 0.68^{c,d}$	83.54 ± 0.98^{a}
BP	91.90 ± 1.26^{g}	92.19 ± 1^{g}	91.53 ± 0.81^{g}	$90.85 \pm 0.67^{f,g}$
BH	88.5 ± 1.2^{d}	$87.89 \pm 0.86^{c,d}$	$86.82 \pm 0.73^{b,c}$	85.68 ± 0.57^{b}
Vitamin C	95.18 ± 0.07^{h}	95.10 ± 0^{h}	95.26 ± 0.07^{h}	95.06 ± 0.14^{h}

Table 2. Effects of broccoli on superoxide radical scavenging activity. Vitamin C was used as a positive control. BB: broccoli butylene glycol extract. BE: broccoli ethanol extract. BP: broccoli propylene glycol extract. BH: broccoli hexane extract. a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m are different group by one-way ANOVA with post-hoc test

Superoxide radical scavenging activity (%)				
Group	concentration			
	1000 μg/ml	500 μg/ml	250 μg/ml	125 μg/ml
BB	33.26 ± 0.13^{a}	40.77 ± 0.48^{b}	60.53 ± 0.48^{c}	65.72 ± 0.44^{e}
BE	71.19 ± 0.51^{i}	72.91 ± 0.28^{k}	$70.85 \pm 0.53^{h,i}$	$70.7 \pm 0.53^{h,i}$
BP	$69.78 \pm 0.47^{g,h}$	69.55 ± 0.52^{g}	$71.78 \pm 0.48^{i,j}$	67.02 ± 0.2^{f}
BH	63.91 ± 0.39^{d}	69.46 ± 0.52^{g}	$71.72 \pm 0.62^{i,j}$	$72.63 \pm 2.05^{j,k}$
Vitamin C	74.72 ± 0.75^{m}	$74.4 \pm 0.72^{l,m}$	$73.41 \pm 0.92^{k,l}$	73.26 ± 0.62^{k}

Table 3. Effects of broccoli on NO production of LPS-induced RAW264.7 macrophages. BE: Raw 264.7 + broccoli ethanol extract + LPS (1 μg/ml), BH: Raw 264.7 + broccoli hexane extract + LPS(1 μg/ml), BB: Raw 264.7 + broccoli butylene glycol extract + LPS(1 μg/ml), BP: Raw 264.7 + broccoli propylene glycol extract + LPS(1 μg/ml), Propolis was used as a positive control, LPS-: Normal Raw 264.7, LPS+: Raw 264.7 + LPS(1 μg/ml)

Group	Nitric oxide assay (μM)				
	concentration				
	1000 μl/ml	500 μl/ml	250 μl/ml	125 μl/ml	62.5 μl/ml
BE	$14.46 \pm 0.31^{**}$	$14.7 \pm 0.23^{**}$	15.52 ± 0.33	16.18 ± 0.2	$18.21 \pm 0.4^{**}$
BH	$12.28 \pm 0.35^{***}$	$13.83 \pm 0.05^{*}$	$15.13 \pm 0.31^{*}$	$15.5 \pm 0.43^{*}$	15.5 ± 0.39
BB	$11.57 \pm 0.39^{***}$	$11.89 \pm 0.64^{**}$	$13.01 \pm 0.27^{**}$	$13.04 \pm 0.23^{***}$	$13.04 \pm 0.2^{***}$
BP	$11.3 \pm 0.48^{***}$	$13.6 \pm 0.34^{**}$	$14.11 \pm 0.38^{**}$	$14.35 \pm 0.43^{**}$	$14.83 \pm 0.22^{**}$
Propolis	$12.33 \pm 0.36^{***}$	$12.59 \pm 0.31^{***}$	$13.54 \pm 0.13^{**}$	$13.99 \pm 0.12^{*}$	$14.34 \pm 0.36^{**}$
LPS-			$10.29 \pm 0.32^{***}$		
LPS+			16.36 ± 0.51		

All the values were expreassed as means ± S. D.(n = 3)
$^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$ and $^{*}p < 0.05$ signifficantly different from the value of LPS+ in student's

걸로 생각되어진다.

Nitric Oxide assay

대식세포의 경우 LPS와 cytokine에 의해 자극을 받으면 iNOS를 통해 L-arginine으로부터 합성되어진 NO는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역기능 등이 있지만, 과량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상뿐만 아니라 염증반응을 일으킨다[21,22].

본 연구에 사용된 브로콜리 샘플에 대한 nitric oxide scavenging 측정 결과를 Table 3에 나타냈다. 그 결과 4가지 용매 모두 농도 의존적으로 nitric oxide를 소거하였으며 활성이 가장 높은 용매 순으로 정렬을 하면 butylene glycol, propylene glycol, hexane, propolis, ethanol 순으로 나타났으며 butylene glycol과 propylene glycol 1000 μg/ml 에서 11.57 ± 0.39, 11.3 ± 0.48 μM로 항염 활성에 효과가 있다고 알려진 propolis보다 뛰어난 활성을 나타내었다($p < 0.05$). 그리고 hexane 1000 μg/ml의 농도에서도 propolis보다 뛰어난 활성을 나타내었다. 따라서 화장품에 첨가되어지는 butylene glycol과 propylene glycol 용매로 추출한 브로콜리 샘플이 일반적으로 추출되어지는 용매인 hexane과 ethanol 용매의 추출물에 비하여 높은 nitric oxide 소거 활성을 나타냄을 확인하였다.

Paper disk diffusion

Paper disk diffusion test에서는 broth 배지에 *P. acne* 를 배양한 후 filter에 추출샘플을 흡수시켜 항균활성을 확인하였다. 그 결과 ethanol과 hexane 그룹에서 표준물질로 사용된 propolis와 육안으로 비슷한 *P. acne* 저해 활성을 나타내었으며 propylene glycol와 butylene glycol 그룹에서도 *P. acne*저해 활성을 나타내었다. Haristoy등[23]과 Johansson 등[24]의 연구 결과에 따르면 sulforaphane이 *Helicobacter pylori*의 성장을 저해 시킨다고 발표를 하였고, Aires등[25]은 그람 음성균과 양성균에 대한 성장억제 효과가 있다고 발표하였으다. 따라서 브로콜리 추출물에 함유되어있는 sulforaphane이 *P. acne* 균의 항균활성을 나타내었을 것으로 사료되어진다.

요 약

본 실험에서는 여드름 치료에 사용되던 국소 레티노이드제와 항생제를 대용 할 수 있고 화장품에 사용되는 원료로 추출하여 항여드름 치료제 또는 화장품 원료를 개발하기

위해 실험한 결과 broccoli proplyeneglycol 그룹에서 DPPH, superoxide radical, nitric oxide assay 에서 모두 vitamin C 에 가까운 활성을 나타내었고 paper disk diffusion test에서는 broccoli ethanol과 broccoli hexane 그룹에서 *P. acne* 의 저해 활성을 나타낸 것으로 보아 항여드름 치료제 또는 화장품 원료로써의 유용 가치가 있다고 사료 되어진다.

참고문헌

1. Lee, S. H. and Park, T. H.: Current Review of Acne. *ASMAK.,* **6**, 57-64 (1996).
2. Whang, K. U.: Treatment of Acne. *JKMA.*, **49**, 63-69 (2006).
3. Lee, E. J., Bae, S. Y., Nam, K. W. and Lee, Y. H.: Antibacterial and Anti-inflammatory Effects of Medicinal Plants Against Acne-inducing Bacteria. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea,* **36**, 57-63 (2010).
4. Suh, D. H.: Pharmacologic Treatment of Acne. *JKMA.*, **53**, 623-629 (2010).
5. Choi, E. H., Hwang, S. M., Suh, D. H., Sung, K. J. and Lee, S. H.: The Efficacy and Safety of Isotretinoin in Korean Patients with Mild to Moderate Acne. *Korean J. Dematol.,* **38**, 1309-1314 (2000).
6. FAHEY, J. W. and TALALAY, P.: Antioxidant Functions of Sulforaphane: a Potent Inducer of Phase II Detoxication Enzymes. *Food Chem. Toxicol.,* **37**, 973-979 (1999).
7. Matusheski, N. V., Swarup, R., Juvik, J. A., Mithen, R., Bennett, M. and Jeffery, E. H.: Epithiospecifier Protein from Broccoli (Brassica oleracea L.ssp. italica) Inhibits Formation of the Anticancer AgentSulforaphane. *J. Agric. Food Chem.,* **54**, 2069-76 (2006).
8. Moon, J. K., Kim, J. R., Ahn, Y. J. and Shibamoto, T.: Analysis and Anti-Helicobacter Activity of Sulforaphaneand Related Compounds Present in Broccoli (Brassica oleracea L.) Sprouts. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 6672-7 (2010).
9. Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, B. P., Jeffery, E. H., Kushad, M., Wallig, M. A., Juvik, J. A.: Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassicaoleracea*. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1576-81 (1999).
10. Amy, V. G., Ahmed, A., Julie, A. S., James, R. B., Paul, F., Clare A., Moira, A. T., Christopher, J. H., David, A. B., and Richard, F. M.: Glutathione s-transferase M1 polymorphosm and metabolism of sulforaphane from standard and high glucosinolate broccoli. *Am. J. Clin. Nutrit.*, **82**, 1283-91 (2005).
11. Fugita, Y., Urea, I., Morimoto, Y., Nakajima, M., Hatano, C. and Okuda, T.: Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. III. Inhibition mechanism of tannins isolated from medicinal plants and related compounds on autoxidation of methyl linoleate. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, **108**, 528-537 (1998).
12. Kang, H. S., Chung, H. Y., Son, K. H., Kang, S. S. and Choi, J. S.: Scavenging effect of korean medicinal plants on the peroxynitrite and total ROS. *Nat. Prod. Sci.*, **9**, 73-79 (2003).
13. Kim, J.I., Jang, H. S., Kim, J. S. and Sohn, H. Y.: Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of Dioscorea batatas Decne. *JMB.,* **37**, 133-139 (2009).
14. Lee, H. J.: DPPH Radical Scavenging Effect and in vitro Lipid Peroxidation Inhibition by Portulaca oleracea. *KSBB.,* **18**, 165-169 (2003).
15. Wang, L. F.: A theoretical investigation on DPPH radical-Scavenging mechanism of edaravone. *BMCL.*, **13**, 3789-3792 (2003).
16. Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, Marina I., Hopia, A., Huynh-Ba. T., Lambelet, T., McPhail, D., Skibsted, L. H. and Tijburg. L.: Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.,* **212**, 319-328 (2001).
17. Bulkley, G. B.: The role of oxygen free radicals in human disease processes. *ASPS,* **94**, 407-11 (1983).
18. Dormandy, T. L.: An approach to free radicals. *The lancet,* **322**, 1010-1014 (1983).
19. Halliwell, B.: Oxidants and human disease: somenew concepts. *J. FASEB,* **1**, 358-364 (1987).
20. Koul, S. and Chaudhary, A.: Radical Scavenging and Antistress Activity(s) of Mussaenda Frondosa Roots (RUBIACEAE). *PhOL.,* **1**, 1091-1097 (2011).
21. Förstermann, U. and Kleinert, H.: Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.,* **352**, 51-64 (1995).
22. Chunga, H. T., Paea, H. O., Choi, B. M., Billiarb, T. R. and Kimb, Y. M.: NitricOxide as a Bioregulator of Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **282**, 1075-1079 (2001).
23. Haristoy, X., Fahey J. W., Scholtus, I. and Lozniewski, A.: Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on Helicobacter pylori. *Planta medica,* **74**, 747-750 (2008).
24. Johansson, N. L., Pavia, C. S. and Chiao, J. W.: Growth inhibition of a spectrum of bacterial and fungal pathogens by sulforaphane, an isothiocyanate product found in broccoli and other cruciferous vegetables. *Planta medica,* **71**, 326-330 (2005).
25. Aires, A., Mota, V. R., Saavedra, M. J., Rosa, E. A. S. and Bennett, R. N.: The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *JAM.,* **106**, 2086-2095 (2009).