J. Korean Soc. Food Nutr.
21 (2), 136 ~ 142 (1992)

한국영양식량학회지

감귤의 Bioflavonoids 분리, 정제 및 혈압강하효과

손흥수 · 김현숙 · 권태봉* · 주진순†

한림대학교 한국영양연구소
*춘천전문대학 식품영양학과

Isolation, Purification and Hypotensive Effect of Bioflavonoids in *Citrus sinensis*

Heung-Soo Son, Hyun-Sook Kim, Tae-Bong Kwon* and Jin-Soon Ju†

Korea Nutrition Institute, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea
**Dept. of Food and Nutrition, Chunchon Junior College, Chunchon 200-702, Korea*

Abstract

The crude bioflavonoids were obtained by methanol and butanol extraction from lyophilized orange (*Citrus sinensis*) peel. And then, its yield was about 0.26% in dry base. Two bioflavonoids were purified by gel filtration and HPLC, and could be identified narirutin and hesperidin through TLC, HPLC, UV spectrum and NMR analysis. The yields of narirutin and hesperidin from a gram of crude bioflavonoids were 42mg and 530mg respectively, and the main fraction of bioflavonoid from orange peel was supposed to be hesperidin. Each component was intravenously injected into Sprague-Dawley rats (1mg/100g body weight) and hesperidin was found to lower their blood pressure significantly ($p < 0.001$).

Key words : bioflavonoid, blood pressure, hypotensive effect

서 론

자연계에 널리 분포하고있는 flavonoids는 담황색 내지는 노란색을 띠고 있는 색소화합물로서, 이들은 자연에서는 유리상태로도 존재하나 대개의 경우 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당류와 결합하여 배당체의 형태로 존재하며 이들 배당체들은 보통 식물조직의 표피에 존재하는 것으로 알려져있다[1]. 한편 식품중에 존재하는 flavonoids는 식품산업의 식품가공면에서 식품의 가열조리시의 색깔변화, 금속과의 복합체형성 및 항산화 효과에 관한 연구보문들이 발표되었다[2~4]. 또한 bioflavonoids의 생물학적 활성, 약리적인 효과 및 의학적 이용에 대해서 여러 연구 보문들이 발표되었다. 즉 bioflavonoids가 antibacterial activity[5,6]와 antiviral effect[7]를 나타내고 있으며 여러종류의 tumor cell의 성장 및 분화를 저해시키는 효과가 있다고 하였으며[8~14] 최근의 연구에서는 quercetin이 세포의 분화에 관여하고 있는 tyrosine protein kinase[15~17], calcium-phospholipid -dependent protein kinase(C-kinase)[18,19], cAMP-indepedent protein kinase[20~24]의 효소활성을 저해한다고 보고되고 있으며, Nose[25]은 bioflavonoids중 quercetin, kaempferol 등이 tumor cell의 핵산합성 및 RNA polymerase Ⅱ에 의한 전사를 저해한다고 하였다. 또한 bioflavonoids가 당뇨병과 galactosemia에 좋은 효과를 나타내며[26] 적혈구 세포 응고를 감소시키며[27~29] rheumatic fever[30~35] 및 혈압강하[36] 에도 좋은 효과를 나타내

†To whom all correspondence should be addressed

었다고 하였다.

근래 국내의 경우 과일 음료가 개발되면서 과일 음료 제조업체 및 공급업자에 의해 부산물로 나오는 감귤류의 껍질의 이용에 대하여 많은 관심이 모아지고 있다[37]. 감귤류 껍질에 많이 함유되어 있는 담황색 또는 노란색을 띠고 있는 색소화합물인 flavonoids는 식품가공산업에서 중요한 위치를 차지하고있다. 즉 제조 및 가열 조리시의 pH변동과 금속과의 복합체 형성에 의한 식품의 색깔변화 및 색깔 안정성과 식품내에서의 산화에 의한 ascorbic acid와 다른 성분의 손실을 억제하여 주는 항산화제의 역할[2-4]과 정량분석 방법[37-40]에 대해서 연구논문들이 발표되었다.

한편 고혈압(Hypertension)에 의해서 유발되는 많은 현대병들은 이미 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 한국인에게 고혈압을 유발시키는 후천적 원인 중 가장 중요한 것은 식사중에 섭취하는 소금의 과잉 섭취라는 사실은 많은 연구를 통해 잘 알려져있다.

특히 장류와 소금 절임류 (김치 또는 채소 절임류 등)를 일상으로 섭취하는 한국인에게서는 소금 섭취를 줄이는 문제는 고혈압의 예방과 치료 측면에 있어서 절실하지만 전통적인 미각때문에 그리 쉬운 문제는 아닌 것이 현 실정이다.

최근 자연에 존재하는 천연화합물 중에서 생리활성 물질을 탐색하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며 bioflavonoids의 여러 생물학적 활성중 혈압강하 효과가 있다는 보고[36]가 발표된 바 있다.

이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 상용할 수 있는 식품 중 감귤과 식품제조 및 가공산업에서 부산물로 나오는 감귤류의 껍질에서 bioflavonoids를 분리, 동정하고 일차적으로 실험 동물인 Sprague-Dawley종의 흰쥐를 대상으로 혈압강하 효과의 정도를 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 재료는 서울 및 춘천시에 소재하는 시장에서 구입한 귤(*Citrus sinensis*)과 제주도 산지에서 생산된 귤을 구입하여 껍질을 벗겨 껍질을 균질화하여 냉동 건조한 후(수분함량, 8~10%) 이를 시료로 사용하였다.

유기용매 추출에 의한 crude bioflavonoids의 조제

이 과정은 두가지 단계로 병행실시 하였다. 시료를 1) MeOH : H_2O (9 : 1)과 2) MeOH : H_2O (1 : 1)로 각각 충분한 추출액으로 채운 후 실온에서 24시간 추출하여 여과한 후, 여과액을 모두 합하여 감압하에서 1/3 가량으로 농축하였다 (거의 methanol 제거). 농축한 액을 동량의 hexane 또는 chloroform으로 처리, 추출하여 지방, terpenes, chlorophylls, xanthophylls 등을 제거하고 이 과정을 여러번 반복 처리하여 거의 bioflavonoids만을 함유한 solvent-extracted aqueous layer를 얻었다. 이와 같은 bioflavonoids가 포함되어 있는 aqueous layer를 감압하에서 가능한 농축하여 냉동건조 하였다. 상기의 시료를 적당량의 증류수로 녹인 후, butanol로 추출하고 농축하여 냉동 건조하였다.

Bioflavonoid glycoside의 농축

상기의 시료를 건조물 중량의 50배 가량의 증류수로 녹인 후 lead subacetate로 포화 시킨 후, 하룻동안 냉장 보관하였다. 생성된 침전물은 제거하고 상층액은 sodium bicarbonate로 포화시킨 후, 1시간 동안 교반시킨후, 생성된 흰색의 lead carbonate의 침전물은 여과하여 제거하고, 여과액은 6N HCl로 pH 5.3으로 조정하고 butanol로 처리하여 crude bioflavonoid glycosides를 얻었다.

Gel filtration

TSK gel HW-40F column (Sephadex G-25 fine, ϕ 5cm×100cm)를 이용하여 fractionation하고 U.V. monitor로 280nm 및 366nm에서 monitor 하였다.

Elution용액은 증류수 (pH 6.0)를 사용하였고 각 peak fraction은 U.V. spectrum 범위에서 scanning하고 표준 bioflavonoid U.V. spectrum과 비교한 후 냉동건조 하였다.

TLC에 의한 bioflavonoids의 분석

Butanol 추출물의 crude bioflavonoids와 gel filtration을 통과한 후 각각의 bioflavonoids의 분획물들을 표준시약을 이용하여 TLC ($CHCl_3$: MeOH : H_2O= 65 : 35 : 10, lower layer)로 비교 분석하였다. TLC는 DC-plastickfolien Kiesegel 60F_{254} (Merck제)를 사용하였다.

HPLC에 의한 bioflavonoids의 분석

Butanol 추출물의 crude bioflavonoids와 HPLC column을 통과한 각각의 bioflavonoids의 분획물들을 표준시약을 이용하여 HPLC로 비교 분석하였다.

HPLC 분석기기는 Waters Associates의 M6000A pumps, model 660 solvent programmer와 WISP sample injector이었고, 검출은 Varian Varichrome variable wavelength spectrophotometer로 하였다. Column은 Whatman Magnum 9 ODS-2 column (9mm ID×50cm)를 사용하였고, 이동상으로는 2.5% acetic acid : MeOH : acetonitrile (35 : 5 : 10)을 사용해서 isocratic elution 시켰다.

UV spectrum 분석

UV spectrum은 Beckman DU-65 spectrophotometer를 이용해서 측정하였다.

Nuclear magnetic resonance(NMR) spectra

^{1}H-NMR(80MHz) 및 ^{13}C-NMR(20MHz) spectrum은 Varian FT-80A spectrometer를 사용하였으며 TMS를 내부 표준물질로 하여 측정하였다.

혈압측정

실험동물로는 동일조건에서 사육한 180~200g 정도의 Sprague-Dawley종의 흰쥐를 성의 구별없이 사용하였으며, 실험동물은 실험시작 전 실험실 조건에서 2주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

혈압측정은 실험동물에 분획물(bioflavonoid)을 5% ethanol-saline 멸균용액에 현탁, 제균하여 체중 100g당 1mg을 정맥주사한 30분 후, 혈압측정전에 온도 조절장치가 부착된 housing holder (Narco, Biosystem)에 40°C 에서 10분간 고정시켜 꼬리정맥을 완전히 확장시킨 후, blood pressure measurement unit (Karl-Kolb, dual channel)를 이용하여 측정하였다. 각 그룹은 5마리씩 정하여 3회 실시한 후, 산술평균하여 나타내었다.

결과 및 고찰

Crude bioflavonoids의 조제

냉동건조한 귤 (*Citrus sinensis*)의 껍질을 마쇄한 후,

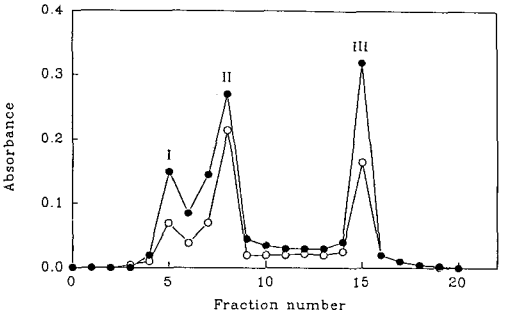


Fig. 1. Ultraviolet absorbance of the fraction obtained from butanol extract by elution with distilled water from Sephadex G-25 fine. All fractions were 10ml volume.
○ — ○ 280nm, ● — ● 366nm

이를 시료로 약 500g (수분함량, 8~10%)을 methanol과 물의 혼합액으로 추출한 methanol 추출물을 약 77.8g을 얻었다. 이를 다시 증류수로 잘 녹인 후 hexane과 butanol로 추출, 농축하여 butanol 추출물 약 10.9g을 얻었으며, 이를 다시 lead subacetate와 butanol로 추출, 농축한 2차 butanol 추출물 약 1.2g을 얻을수 있었다. 이는 최초의 시료대비 약 0.26% (건조중량)에 해당하는 양이었다.

Sephadex G-25 Gel filtration column chromatography에 의한 bioflavonoids의 분획

상기의 시료를 methanol과 물의 혼합액으로 잘 녹인 후 TSK gel HW-40F의 column (Sephadex G-25 fine, Ø5cm×100cm)을 이용하여 분획하고 UV monitor로 280nm 및 366nm에서 monitoring 하였다 (Fig. 1). 이 단계에서 3개의 분획물을 얻을수 있었으며, 이들을 각각 compound Ⅰ (담황색 침상결정, m.p. 236~8°C), compound Ⅱ (미황색 침상결정, m.p. 170~2°C), compound Ⅲ (미황색 침상결정, m.p. 258~262°C)의 결정을 얻을 수 있었다.

TLC에 의한 bioflavonoids의 분석

Butanol 추출물의 crude bioflavonoids와 gel filtration column을 통과한 bioflavonoids 분획물들의 TLC chromatogram은 Fig. 2에 나타난 바와 같으며 또한 각종 검출방법에 의한 결과는 Table 1과 같다.

HPLC에 의한 bioflavonoids의 분석

Butanol 추출물의 crude bioflavonoids 100mg을 취

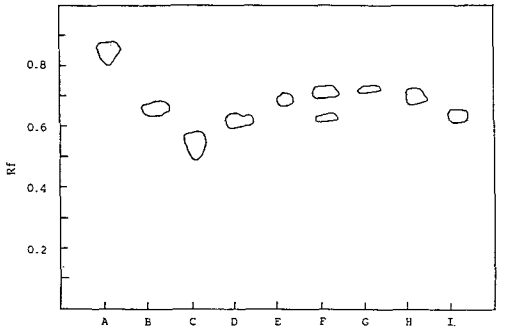


Fig. 2. Silica thin layer chromatogram of the crude bioflavonoid from extract of *Citrus sinensis*. Solvent ; $CHCl_3$: MeOH : H_2O = 65 : 35 : 10, lower layer. Detection ; 50% H_2SO_4.

A : Quercetin B : Naringin C : Rutin
D : Hesperidin E : Narirutin F : Butanol extract
G : Compound Ⅰ obtained by gel filtration
H : Compound Ⅱ obtained by gel filtration
I : Compound Ⅲ obtained by gel filtration

Table 1. Detection of spots on TLC

	UV	NH_3	UV/NH_3	50% H_2SO_4	Rf
Compound Ⅰ	faint yellow	not detected	not detected	yellow	0.72
Compound Ⅱ	faint yellow	brown	light brown	dark yellow	0.69
Compound Ⅲ	-	yellow	grey	bright yellow	0.65

하여 MeOH 15ml에 용해시킨 후 여과하여 불용물을 제거하였다. 이 시료액을 10㎕를 취하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻었고 이로부터 평균 area ratio 값을 얻었다. 이때 얻은 chromatogram은 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 또한 표준물질인 flavonoid glycoside들의 HPLC chromatogram을 Fig. 4에 나타내었다. 이들 HPLC chromatogram을 통해 미지시료중의 compound Ⅱ와 narirutin의 retention time이 4.52 (min)으로 같았으며, compound Ⅲ은 hesperidin의 retention time과 같은 9.88 (min) 이었다. 따라서 compound Ⅱ와 compound Ⅲ의 성분을 알기 위하여 표준물질인 narirutin과 hesperidin을 사용해서 spike test를 실시해 본 결과 각각 동일물질로 사료되었다. 또한 HPLC에서 정량분석한 결과, compound Ⅱ와 compound Ⅲ의 양은 각각 42mg/g과 530mg/g을 얻을수 있었다.

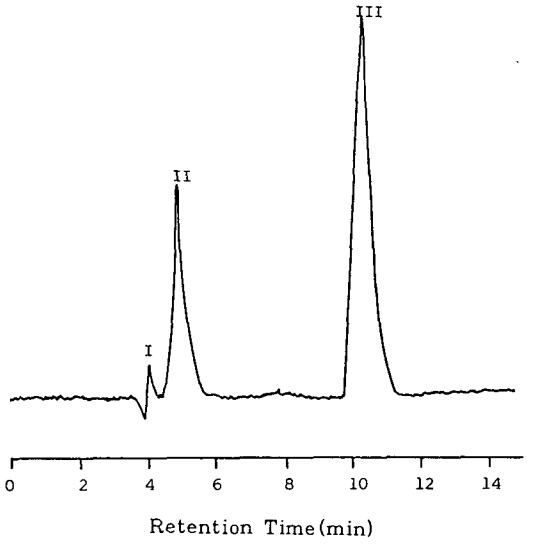


Fig. 3. HPLC chromatogram for butanol extract of *Citrus sinensis*.

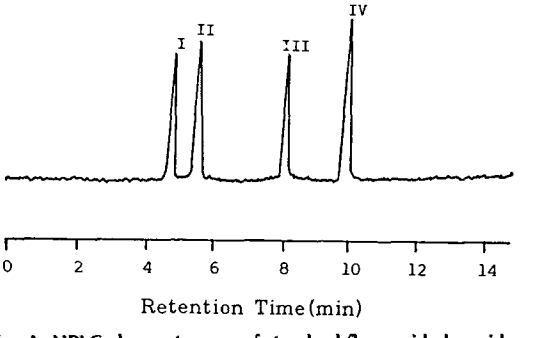


Fig. 4. HPLC chromatogram of standard flavonoid glycosides.
(Ⅰ : narirutin, Ⅱ : naringin, Ⅲ : rutin, Ⅳ : hesperidin)

UV spectra 및 NMR spectra분석

HPLC에 의해 얻은 compound Ⅱ와 compound Ⅲ의 UV spectra와 NMR spectra는 Table 2와 Table 3에 표시되어 있는 바와 같다. 이들 3개의 분획물들, compound Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ을 phenolic 화합물을 검출하는 방법(UV, NH_3 vapor, UV/NH_3 등), 표준물질을 이용한 TLC상에서의 Rf치와 HPLC에서의 retention time, UV spectrum, NMR spectral analysis를 통해 compound Ⅱ는 narirutin, compound Ⅲ는 hesperidin으로 동정할 수 있었고 compound Ⅰ은 확실히 동정할 수 없었지만 추출 및 정제 과정에서 생성된 phenolic 화합물의 부산물인 것으로 추측되었다. HPLC의 정량분석 결과 narirutin과 hesperidin은 crude bioflavonoid의 g당 42mg과 530mg

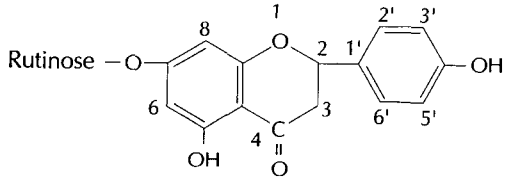
을 얻을 수 있었으며 귤 껍질의 주요 bioflavonoid는 hesperidin인 것으로 판명되었다. 한편 Park 등[37]은 lemon 껍질의 열수 추출물에서 eriocitrin, hesperidin과 4개의 di-C-glycoside 화합물 등의 bioflavonoids 유도체들을 추출, 검토하였고, orange 껍질의 물, chloroform과 methanol 추출물에서는 10개의 bioflavonoids를 검출하였다고 하였다. Lemon과 orange껍질의 주요 bioflavonoid는 모두 hesperidin이었다. 또한 Coffin[38]은 orange juice의 ethyl acetate 추출물에서 hesperidin과 naringin을 검출, 동정하였고 Swift[39]도 orange peel의 benzene 추출물에서 tangeritin, tetra-O-methylscutellarein, nobiletin, sinensetin, 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone 등의 flavonoids들을 검출 보고하였다. 천연물의 품종, 추출 조건 및 추출 용매의 극성(polarity)차이에 의해 추출되는 bioflavonoids가 다름을 알 수 있었지만 주요 bioflavonoid 화합물은 hesperidin이었다.

Table 2. Characteristic UV spectral data(λ max in nm) for the isolated bioflavonoids

Compound	MeOH	NaOAc-MeOH	$AlCl_3$-MeOH
Ⅱ	284(4.24)*	285(4.21)	310(4.12)
	330(2.71)	331(2.69)	387(3.81)
Ⅲ	287(4.29)	273(4.17)	262(4.22)
	317(2.81)	328(2.89)	301(2.79)
	325(3.64)	412(2.72)	334(2.88)

Figures in parentheses donote log ε

Table 3. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectral data for compound Ⅱ



^{1}H-NMR			^{13}C-NMR							
			Aglycone				Glucose		Rhamnose	
H_2	5.29	dd (J=3.12Hz)	C_2	80.4	C_9	164.3	C_1	101.0	C_1	102.0
H_3	3.09	dd (J=12.17Hz)	C_3	43.9	C_{10}	104.9	C_2	74.5	C_2	71.9
H_3	2.68	dd (J=3.17Hz)	C_4	198.3	C'_1	130.7	C_3	77.7	C_3	72.3
H_6	6.14	d (J=2Hz)	C_5	164.7	C'_4	158.8	C_4	71.2	C_4	74.0
H_8	6.14	d (J=2Hz)	C_6	98.0	$C_{2'}$, $_{6'}$	129.0	C_5	77.0	C_5	69.7
$H_{2'}$, $_{6'}$	7.27	d (J=8Hz)	C_7	166.7	$C_{3'}$, $_{5'}$	116.4	C_6	67.4	C_6	17.9
$H_{3'}$, $_{5'}$	6.81	d (J=8Hz)	C_8	97.2						
4.84 (1H, d, J = 7Hz, anomeric)										

$\delta^{CD_3OD}_{ppm}$ (80MHz for ^{1}H and 20MHz for ^{13}C)

었다.

한편 bioflavonoid 성분의 HPLC분석법은 화합물 자체로 분석하지 않고 현재까지는 이들 혼합물을 산 가수분해시켜 얻은 aglycone의 HPLC법을 사용하고 있었으나 bioflavonoid성분이 유리형으로도 존재하지만 배당체의 형태로 존재하는 경우가 많으므로 기존의 검색방법은 매우 불편함이 많았다. 본 연구에서는 bioflavonoid의 구조 차이 및 이에 따른 극성의 차이에 따라 elution solvent와 column을 적절히 사용하면 HPLC상에서 retention time이 차이가 나므로 주요 표준물질인 bioflavonoids를 지표로 하여 HPLC chromatogram상에 나타난 각각의 peak를 확인하고 spike test를 함으로써 HPLC를 이용한 새로운 분석법을 개발할 수 있을 것이라 사료되었다

혈압변화

약물 투여 전과 약물 투여 후의 혈압변화를 Table 4에 나타내었다. Table 4에 나타난 바와 같이 약물 투여 직전인 0시간에서 흰쥐의 정상혈압은 125±2mmHg (mean±S.E.M)이었다. *Compound* Ⅱ를 투여 1시간 후의 혈압은 약간 저하되었으나, 시간의 경과에 따른 혈압강화 효과는 커다란 효과를 나타내지 않은 반면, compound Ⅲ를 투여 1시간 후 15mmHg, 투여 2시간 후에는 21mmHg 정도로 혈압이 저하되는 것을 관찰할 수 있었다.

Table 4. The effect of compounds Ⅱ and Ⅲ on the blood pressure of the rat

Compound	Dose (1mg/100g in body weight)	Time (hrs)	Blood pressure in SD rat (mmHg)
Ⅱ		0	125±2
		1	117±4
		2	121±3
		4	123±2
Ⅲ		0	125±2
		1	110±3
		2	104±2
		4	118±4

Each value represents the mean ±S.E.M. from at least 5 SD rats

요 약

냉동 건조한 귤(*Citrus sinensis*)의 껍질로 부터 methanol과 butanol추출물인 crude bioflavonoids를 건조중량으로 최초 시료대비 약 0.26%의 수율을 얻을수 있었다. 이 crude bioflavonoids를 gel filtration, HPLC를 이용하여 분리, 정제하였고 TLC, HPLC, UV spectrum, NMR spectral analysis를 통해 narirutin과 hesperidin으로 동정할 수 있었다. 또한 HPLC 정량분석 결과, narirutin과 hesperidin은 crude bioflavonoids의 g당 42mg과 530mg을 얻을 수 있었으며 귤 껍질의 주요 bioflavonoid는 hesperidin으로 판명되었다. 한편 실험동물인 Sprague-Dawley종의 흰쥐를 대상으로 혈압 변화를 측정한 결과 귤 껍질의 주요 bioflavonoid성분인 hesperidin은 약물 투여후 유의성있게($p<0.001$) 혈압 저하효과가 있음을 관찰 할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1990년도 태평양 장학문화재단 학술연구조성 지원비에 의해 수행된 결과이며, 연구비를 지원하여 주신 태평양 장학문화재단에 깊은 사의를 표하는 바 입니다.

문 헌

1. Bate-Smith, E. C. : Flavonoid compounds in foods. In "*Advanced in food research*", Academic Press, New York, Vol. **5**, p.261 (1954)
2. Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P. : Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, **25**, 383 (1986)
3. Afanas' Ev, I. B., Dorozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A. and Potapovitch, A. I. : Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharm.*, **38**, 1763 (1989)
4. Arya, S. S., Vidyasagar, K., Gopalan, K. N., Parihar, D. B. and Nath, H. : Comparative antioxygenic properties of citrous bioflavonoids and synthetic antioxidants in foods. *J. Food Sci. Technol.*, **10**, 12 (1973)
5. Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, O. K. and Fukushima, M. : Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 139 (1987)
6. Hardigree, A. A. and Epler, J. L. : Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial systems. *Mutat. Res.*, **58**, 231 (1978)
7. Terezhalmy, G. T., Bottomley, W. K. and Pelleu, G. B. : The use of water-soluble bioflavonoid-ascorbic acid complex in the treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surg.*, **45**, 56 (1978)
8. Wang, H., Shah, V. and Kanks, K. W. : Use of oxidizing dyes in combination with 2-cyanocinnamic acid to enhance hyperthermic cytotoxicity in L929 cells. *Cancer Res.*, **47**, 3341 (1987)
9. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. and Tawata, S. : Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells. *Phytochemistry*, **27**, 1017 (1988)
10. Kim, J. H., Kim, S. H., Alfieri, A. A. and Young, C. W. : Quercetin, an inhibitor of lactate transport and a hyperthermic sensitizer of HeLa cells. *Cancer Res.*, **44**, 102 (1984)
11. Markaverich, B. M., Roberts, P. P., Alejandro, M. A., Johnson, G. A., Middleditch, B. S. and Clark, J. H. : Bioflavonoid interaction with rat uterine type Ⅱ binding sites and cell growth inhibition. *J. Steroid Biochem.*, **30**, 71 (1988)
12. Belt, J. A., Thomas, J. A., Buchsbaum, R. N. and Racker, E. : Inhibition of lactate transport and glycolysis in Ehrlich ascites tumor cells by bioflavonoids. *Biochemistry*, **18**, 3056 (1979)
13. Castillo, M. H., Perkins, E., Campbell, J. H., Doerr, R., Hassett, J. M., Kandaswami, C. and Middleton, E. : The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin. *American J. Surg.*, **158**, 351 (1989)
14. Suolinna, E. M., Buchsbaum, R. N. and Racker, E. : The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res.*, **35**, 1865 (1975)
15. Levy, J., Teuerstein, I., Marbach, M., Radian, S. and Sharoni, Y. : Tyrosine protein kinase activity in DMBA-induced rat mammary tumor : Inhibition by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 1227 (1984)
16. Srivastava, A. K. : Inhibition of phosphorylase kinase

and tyrosine protein kinase activities by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1 (1985)
17. Graziani, Y., Erikson, E. and Erikson, R. L. : The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the rous sarcoma virus transformining gene product *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Biochem.*, **135**, 583 (1983)
18. Mitev, V. I. and Sirakov, L. M. : The difference between cytosol and membrane growth-related protein kinase activities in lactating mouse mammary gland. *Int. J. Biochem.*, **21**, 337 (1989)
19. Mitev, V. I. and Sirakov, L. M. : Insulin action *in vivo* on a growth-related protein kinase in lactating mouse mammary gland *Int. J. Biochem.*, **20**, 97 (1988)
20. Schwartz, B., Fraser, G. M., Levy, J., Sharoni, Y., Guberman, R., Krawiec, J. and Lamprecht, S. A. : Differential distribution of protein kinase along the crypt-to-lumen regions of rat colonic epithelium. *Gut*, **29**, 1213 (1988)
21. Sharoni, Y., Graziani, Y., Karny, N., Feldman, B. and Levy, J. : cAMP-independent protein kinase activity is correlated with growth of rat mammary tumors. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **20**, 277 (1984)
22. Sharoni, Y., Teuerstein, I., Shirman, A., Feldman, B. and Levy, J. : Cyclic changes in rat uterine proliferation during the estrous cycle are preceded by changes in protein kinase activity. *Endocrinology*, **115**, 2297 (1984)
23. Sharoni, Y., Feldman, B., Teuerstein, I. and Levy, J. : Protein kinase activity in the rat mammary gland during pregnancy, lactation and weaning : A correlation with growth but not with progesterone receptor levels. *Endocrinology*, **115**, 1918 (1984)
24. Cochet, C., Feige, J. J., Pirollet, F., Keramid, M. and Chambaz, E. M. : Selective inhibition of a cyclic nucleotide independent protein kinase(G type casein kinase) by quercetin and related polyphenols. *Biochem. Pharm.*, **31**, 1357 (1982)
25. Nose, K. : Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase Ⅱ. *Biochem. Pharm.*, **33**, 3823 (1984)
26. Havsteen, B. : Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharm.*, **32**, 1141 (1983)
27. Landolfi, R., Mower, R. L. and Steiner, M. : Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem. Pharm.*, **33**, 1525 (1984)
28. Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M. : Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochem. Biophys. Acta.*, **799**, 313 (1984)
29. Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak. J. and Swies, J. : On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharm.*, **36**, 317 (1987)
30. Rao, C. N., Rao, V. H. and Sanjeevi, R. : Effect of bioflavonoids on the mechanical and thermal properties of skin and tendon. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **18**, 224 (1981)
31. Rao, C. N. and Rao, V. H. : Effect of bioflavonoids on the urinary excretion of hydroxyproline, hydroxylysyl glycosides and hexosamine in adjuvant arthritis. *Ital. J. Biochem.*, **29**, 89 (1980)
32. Rao, C. N., Rao, V. H. and Steinmann, B. : Influence of bioflavonoids on lysosomal acid hydrolases and lysosomal stability. *Ital. J. Biochem.*, **30**, 46 (1981)
33. Rao, C. N., Rao, V. H. and Steinmann, B.: Influence of bioflavonoids on the collagen metabolism in rats with adjuvant induced arthritis. *Ital. J. Biochem.*, **30**, 54 (1981)
34. Rao, C. N., Rao, V. H. and Steinmann, B. : Influence of bioflavonoids on the metabolism and crosslinking of collagen. *Ital. J. Biochem.*, **30**, 259 (1981)
35. Rao, C. N., Rao, V. H., Verbruggen, L. and Orloff, S. : Effect of bioflavonoids on lysosomal acid hydrolases and lysosomal stability in adjuvant-induced arthritis. *Scand. J. Rhematology*, **9**, 280 (1980)
36. Matsubara, Y., Kumamoto, H., Iizuka, Y., Murakami, T., Okamoto, K., Miyake, H. and Yokoi, K. : Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peelings. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 909 (1985)
37. Park, G. L., Avery, S. M., Byers, J. L. and Nelson, D. B. : Identification of bioflavonoids from citrus. *Food Technol.*, December, p.98(1983)
38. Coffin, D. E. : A method for the isolation and identification of the flavanone glycosides of citrus fruit juices. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 513 (1971)
39. Swift, L. J. : TLC-spectrophotometric analysis for neutral fraction flavones in orange peel juice. *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 99 (1967)
40. Dass, H. C. and Weaver, G. M. : Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. *J. Chromatogr.*, **67**, 105 (1972)

(1991년 10월 21일 접수)