

## Caffeine, 철분 및 vitamin E 혼합투여시 rat의 혈액과 간조직내에서 혈액화학성분과 지질 및 단백질 구성성분의 변화

도재철·허린수\*

경상북도 가축위생시험소  
경북대학교 수의과대학\*  
(1996년 9월 11일 접수)

### Changes of the blood chemistry, lipid and protein components in blood and liver tissue of the rat after oral combined administration of caffeine, iron and vitamin E

Jae-cheul Do, Rhin-sou Huh\*

*Kyungpook Veterinary Service Laboratory  
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University\**

(Received Sep 11, 1996)

**Abstract** : This study was conducted to identify the effects of caffeine or combinations of caffeine and iron or vitamin E on the lipid and protein components or blood chemistry levels of the serum as well as the total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of the rat(Sprague-Dawley, female) liver.

Chronic test were conducted to determine those effects. The chronic test was conducted by dividing rats into 5 groups according to the type of drugs and dosages administrated as follows; the control(group A), and group B was given 25mg/kg caffeine orally once daily for 30 days, group C was given 50mg/kg caffeine orally once daily for 30 days, group D was given 25mg/kg caffeine and orally ferric chloride once daily for 30 days and group E was given 25mg/kg caffeine and 25mg/kg vitamin E once daily for 30 days.

The concentrations of glucose, urea nitrogen, uric acid, creatinine, total protein, albumin, A/G ratio, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, free fatty acid, phospholipid as well as the activities of alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) and alkaline phosphatase(ALP) were measured in the serum of each experimental groups. The concentrations of the carbonyl group and malondialdehyde(MDA) and the patterns of the

SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and fatty acid compositions in free fatty acids and phospholipids were analyzed to determine the oxidative damages and metabolic changes on the lipid and protein components in the serum, and total homogenate, mitochondrial and microsomal fractions of the rat liver.

The results obtained from this study were summarized as follows;

1. Body weights of groups B, C, D and E were significantly decreased( $p < 0.01$ ) in comparison with that of the control in the chronic test.

2. The concentrations of serum glucose in groups B(124.5mg/dl), C(130.1mg/dl), D(122.1mg/dl), E(119.3mg/dl) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to that of the control(101.5mg/dl). But, there were no significant differences in the concentrations of urea nitrogen, uric acid, creatinine, total protein, albumin and A/G ratio in comparison to that of the control.

3. The concentrations of total cholesterol and HDL-cholesterol in serum of groups B(69.6, 53.4mg/dl), C(73.0, 56.3mg/dl), D(68.9, 51.1mg/dl) and E(68.2, 51.3mg/dl) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to that of the control(52.6, 38.8mg/dl). On the other hand, the concentrations of triglyceride in serum of groups B(45.0mg/dl), C(40.4mg/dl), D(33.8mg/dl) and E(47.2mg/dl) were significantly lower( $p < 0.01$ ) in comparison to that of the control(66.2mg/dl). There were no significant differences in the activities of ALT, AST and ALP in comparison to that of the control.

4. The concentrations of free fatty acid and phospholipid in serum of groups B(45.7, 154.4mg/dl), C(50.0, 167.2mg/dl), D(52.5, 148.4mg/dl) and E(41.1, 159.2mg/dl) were higher( $p < 0.01$ ) in comparison to that of the control(35.2, 125.3mg/dl). And the concentrations of the carbonyl group and malondialdehyde in serum of group D(1.82, 0.52nM/mg protein) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(1.53nM/mg protein).

5. The concentrations of carbonyl group in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of group D(1.45, 0.94, 1.67nM/mg protein) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(1.16, 0.66, 1.27nM/mg protein). And the concentrations of malondialdehyde in the total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of group D(6.70, 6.10, 1.36nM/mg protein) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(5.17, 3.64, 0.68nM/mg protein).

6. As the analytical results of the fatty acid compositions of free fatty acid in serum, the proportions of stearic acid and arachidonic acid of groups B(16.52, 12.62%), C(17.52, 15.18%), D(19.73, 13.47%) and E(17.62, 13.28%) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(14.75, 7.88%), but the proportions of oleic acid and linoleic acid of groups B(12.97, 32.59%), C(10.88, 31.23%), D(12.37, 30.66%) and E(11.95, 32.41%) were significantly lower( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(16.44, 35.12%). Otherwise, as the results of the fatty acid compositions of phospholipid in serum, the proportions of stearic acid and arachidonic acid of groups B(39.37, 16.39%), C(40.63, 17.83%), D(42.73, 15.39%) and E(39.16, 15.70%) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(37.74, 14.24%), but the proportions of oleic acid and linoleic acid of groups B(4.03,

14.38%), C(3.54, 12.38%), D(4.52, 11.68%) and E(4.29, 13.64%) were significantly lower( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(5.53, 16.14%).

7. As the analytical results of the fatty acid compositions of free fatty acid in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of liver, the proportions of oleic acid of groups B(7.81<sup>\*\*</sup>, 8.73<sup>\*\*</sup>, 6.88%) and C(6.89<sup>\*\*</sup>, 7.75<sup>\*\*</sup>, 6.58%) were lower( $** : p < 0.01$ ) in comparison to the control(8.67, 10.08, 7.81%), but the proportions of arachidonic acid of group C(22.62, 19.79, 23.71%) were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(20.93, 18.47, 22.24%). And the proportions of palmitic acid of group D(25.95<sup>\*\*</sup>, 26.16, 26.34<sup>\*\*</sup>%) were significantly higher( $** : p < 0.01$ ) in comparison to the control(24.43, 25.42, 23.34%). In addition, the proportions of linoleic acid of group D(23.43, 25.02, 23.95%) were also significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(22.17, 23.75, 21.26%). The proportions of stearic acid of group D(19.87, 19.76<sup>\*\*</sup>%) in mitochondrial and microsomal fraction were lower( $** : p < 0.01$ ) in comparison to the control(21.01, 24.18%), and the proportions of stearic acid of group E(16.71<sup>\*</sup>, 19.65<sup>\*\*</sup>%) in mitochondrial and microsomal fraction were significantly lower( $** : p < 0.01$ ,  $* : p < 0.05$ ) in comparison to the control(21.01, 24.18%), and the proportions of linoleic acid of group E(25.04, 29.20, 26.48%) in total homogenate, mitochondria and microsome were significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(22.17, 23.75, 21.26%).

8. As the results of the fatty acid compositions of phospholipid in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of liver, the proportions of palmitic acid of group D (17.58<sup>\*\*</sup>, 18.78<sup>\*</sup>, 18.23<sup>\*\*</sup>%) were significantly higher( $** : p < 0.01$ ,  $* : p < 0.05$ ) in comparison to the control(16.28, 17.22, 16.38%), and the proportions of stearic acid of group D(36.41, 37.23, 39.53%) were also significantly higher( $p < 0.01$ ) in comparison to the control(34.18, 34.16, 36.04%). But the proportions of oleic acid(3.41<sup>\*</sup>, 3.11<sup>\*\*</sup>, 3.12<sup>\*\*</sup>%) and linoleic acid (18.03<sup>\*\*</sup>, 15.79<sup>\*\*</sup>, 14.74<sup>\*\*</sup>%) of group D were significantly lower( $** : p < 0.01$ ,  $* : p < 0.05$ ) in comparison to the control(oleic : 3.63, 3.72, 3.79%, linoleic : 20.03, 18.71, 18.48%).

9. In order to determine the oxidative damages to the protein in serum, mitochondrial and microsomal fraction of the rat liver, the patterns of the SDS-PAGE were identified, but the results of SDS-PAGE were not significantly different between the control and experimental groups.

Key words : caffeine, iron, vitamin E, free fatty acid, phospholipid.

## 서 론

여러 식물조직에 존재하는 alkaloid인 Caffeine(1,3,7-trimethylxanthine)은 커피, 홍차, 코코아, 콜라와 같은 식

품과 음료 등에 함유되어 전세계적으로 널리 이용되고 있으며<sup>1,15,29,31,57</sup> 또한 caffeine은 동물조직에서 adenine과 guanine의 중간 대사산물로 생성되는 물질로서 동물체내에 투여시 다양한 약리작용과 더불어 탄수화물, 지질 및 아미노산 대사에 영향을 미치게 된다<sup>10,31,42,57</sup>.

화학적으로 caffeine은 theophylline, theobromine 등과 함께 purine 유도체의 methylated xanthine으로서 동물의 소화장에서 쉽게 흡수되어 oxidation, demethylation의 대사과정을 거쳐 주요 metabolite인 1-methylxanthine, 1-methyluric acid, 1,7-dimethylxanthine, 7-methylxanthine, 1,3-dimethyluric acid와 unchanged caffeine으로 오줌을 거쳐 배설되게 된다<sup>24,58</sup>. Caffeine은 강력한 중추신경계 흥분제로서 뇌의 운동신경 증추에 작용하여 조건반사와 근육 활동을 향진시킴으로써 피로감을 줄여주고 호흡 및 미주 신경 증추를 자극하며 과량섭취시 strychnine convulsion과 유사한 경련을 유발하며<sup>3,15,31,41</sup>, 신세뇨관에서 혈행의 증가와 수분흡수의 감소로 이뇨작용을 촉진시키는 등<sup>10,25,55,69,70</sup>의 다양한 약리작용을 합과 아울러 theophylline(1, 3-dimethylxanthine)과 caffeine은 강력한 bronchodilator로서 asthma와 neonatal apnoea의 치료제로도 사용된다<sup>31</sup>.

또한 caffeine은 비노기, 신장, 췌장의 cancer와 teratogenic agent로도 작용하며 coronary heart disease, myocardial infarction, arteriosclerosis의 원인물질로 작용한다는 많은 보고<sup>26,32,64</sup>가 있으며, 임신중의 모체와 태아의 장기발생에 형태학적으로 영향을 미치는 물질로도 알려져 있다<sup>5,27,48,60</sup>.

철분은 동물의 호흡작용에서 매우 중요한 hemoglobin과 catalase, peroxidase 등의 주요 구성성분으로서 여러 생명현상에 관여하는 주요 무기질중의 하나이며 또한 free radical 유도체의 강력한 산화제로서 지방질의 과산화작용을 촉진시킨다<sup>22,33</sup>. 이러한 철분이 과량으로 투여되면 항산화제로 작용하는 vitamin E에 산화작용을 일으켜 tocopherylquinone으로 불활성화시켜 vitamin E의 결핍증세를 초래하며 적혈구막 및 세포막 지질에 결합된 다불포화 지방산이 비효소적 과산화작용을 받아 그의 이중결합 부분이 절단되어 짧은 사슬의 thiobarbituric acid(TBA) 반응성 malondialdehyde 등의 지질과산화물이 많이 생성되어<sup>12,30</sup> 축적되며, 세포 또는 세포소기관의 지질 과산화에 의해 mitochondria, microsome 등의 세포소기관 손상, 효소 단백질중 아미노산 잔기의 산화 등을 일으키게 된다<sup>62,67</sup>. 최근에는 노화(aging)와 연관지어 free radical로 인한 과산화지질에 대한 많은 연구가 진행중이며 특히 과산화지질은 불포화지방산을 함유한 지질이 산소와 반응하여 생성되는 과산화물 구조를 가진 물질로서 hydroxyperoxide와 endoperoxide type로 구분하며, 이들이 생성되기 위해서는 산소나 불포화지방산중 어느쪽이라도 활성화 되어야

하는데, 보통 불포화지방산이 활성화 되려면 방사선, 자외선 등의 조사나 증극속 등의 작용에 의해서 free radical이 생성되며, 이것이 다시 보통의 산소(triplet oxygen, <sup>3</sup>O<sub>2</sub>)와 반응하여 peroxy radical이 생성되고 이것이 불포화지방산과 반응하여 hydroxyperoxide가 생성되게 된다. 한편 산소의 활성화 반응, 즉 peroxy radical(O<sub>2</sub>·), hydroxy radical(.OH), singlet oxygen(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 등의 활성산소는 동물이 생존하는 생태계에서 발생하며, 단백질과 지질 및 핵산 등과 쉽게 반응하게 되는데 이 활성산소가 체내 지질중 불포화지방산과 반응하여 과산화지질을 생성하게 된다<sup>72</sup>. 이외에도 생체내 free radical 생성은 mitochondria, microsome 등의 세포소기관과 xanthine oxidase, peroxidase 등 효소계의 정상대사 및 독성화합물 등에 의한 손상시에도 생겨날 수 있다<sup>66</sup>.

동물체는 세포라는 단위로 구성되어 있고 세포는 세포막으로 둘러싸여 있으며 세포막은 지질(주로 phospholipid, glycolipid, cholesterol) 이중층과 단백질로 구성되어 있으므로 세포막 지질성분이 어떤 원인에 의하여 과산화작용을 받게 되면 peroxide가 생성되어 세포막 기능을 원활히 수행할 수 없으므로 기능적, 구조적인 손상을 받아 노화가 촉진되는 것으로 알려져 있다. 따라서 생체내의 lipid peroxidation 과정을 억제하기 위해서는 지방식품의 산화방지에 사용되는 natural antioxidant로 Maillard reaction에서 생성되는 갈변색소성분, indole 및 polyphenol compound와 vitamin C, cobalamine(B<sub>12</sub>), folic acid 및 vitamin E 등이 존재한다<sup>72</sup>.

일반적으로 항산화제는 작용기전에 따라 free radical의 생성을 미리 예방하는 system I과 이미 체내에 생성된 free radical을 포착하여 소거시키는 system II가 있으며, 때로는 효소적 antioxidant와 비효소적인 antioxidant로 구별하기도 한다<sup>74</sup>. 즉, ceruloplasmin, lactoferrin, transferrin, catalase 등은 지질과산화물(LOOH)이나 lipid peroxidation을 유도하는 lipid alkoxyl radical(LO·) 또는 lipid hydroxyl radical(.OH) 등과 같은 free radical의 산생을 막는 system I antioxidant이다. 한편 vitamin E, vitamin C, uric acid 등은 ·OH, LO·, ·O<sub>2</sub>를 포착하여 지질과산화 유도반응을 억제하거나 lipid peroxy radical(LOO·)을 포착하여 지질과산화의 증폭반응을 정지시켜 free radical 소거제로 작용하는 system II antioxidant이다<sup>65,66,73</sup>. 이러한 system II antioxidant는 식이를 통해 보충이 가능하며 생체막에 주로 존재하는 지용성 vitamin인 tocopherol은 세

포막 지질에서 생성되는 free radical(LOO·, LO·, ·OH)을 포착하여 항산화작용을 한다<sup>45,71,74</sup>.

Trang 등<sup>68</sup>은 caffeine의 약리작용에 antioxidant인 vitamin C의 영향을 보기위하여 성인 남자에게 vitamin C 및 caffeine이 첨가된 식이와, caffeine 단독 식이간에 caffeine의 metabolic clearance, renal clearance을 비교하였으나 차이가 없었다고 보고했으며, Gilboe<sup>21</sup>는 rat와 Kasvinsky 등<sup>35</sup>은 소와 토끼에서 caffeine에 의해 유도된 liver glycogen synthase phosphatase activity의 활성촉진 효과에 glucose와 caffeine과의 협동작용은 없었다고 보고하였다. Schlosberg<sup>57</sup>는 rat에 caffeine을 투여한 결과 brain내 tryptophan과 5-hydroxyindoleacetic acid의 함량을 증가시킨다고 보고하였고, Patwardhan 등<sup>51</sup>은 사람에게 caffeine투여시 혈액내 free fatty acid 함량이 증가하였다고 보고하였다. 또한 Peter 등<sup>52</sup>은 male, female rat에 매일 caffeine 185mg/kg을 투여하니 치사율에 대한 감수성은 연령이 증가할수록 높았다고 했으며, Naismith 등<sup>46</sup>(1969년)은 rat에 동결건조된 커피를 54일 동안 급여한 결과 혈액내 cholesterol과 phospholipid 함량이 증가하였으나 triglyceride 함량은 오히려 감소하였으며, sucrose를 추가로 급여하니 triglyceride 함량은 오히려 증가한 반면에 cholesterol과 phospholipid 함량에는 변화가 없었다고 보고하였다. Bellet 등<sup>6</sup>은 개에 caffeine sodium benzoate를 정맥내로 투여한 후 blood clotting parameter와 혈액내 free fatty acid를 조사한 결과 투여 70-90분 사이에 free fatty acid가 증가하였고 투여 4시간째에 가장 증가하였으며, *In vitro* 실험에서 caffeine 투여 2시간 30분에서 4시간 사이에 heparin tolerance time과 plasma의 recalcification time 및 one-stage prothrombin time이 유의성 있게 짧아졌다고 비교분석하는 등<sup>19,56</sup> 지금까지 caffeine에 대한 많은 연구가 행해지고 있다<sup>2,16,17,39,44,54</sup>.

지금까지 caffeine에 대한 동물체내에서의 대사실험은 주로 caffeine을 단독투여하여 혈액내 혈당과 지방성분을 조사한 것에 국한되어 있고, 혈액과 간조직 및 간세포소기관에서 지질 및 단백질 성분의 과산화 정도와 지방산조성을 비교해본 연구가 없고, 아울러 caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여로 인한 상호작용을 조사한 바가 없기에, 본 실험에서는 caffeine을 만성적으로 투여한 후 혈액내에서 혈당, 중성지방 및 기타 지질성분의 농도변화와 지질과산화물의 생성여부를 조사하고, 아울러 혈액과 간조직 그리고 간세포소기관내에서 carbonyl group과 malondialdehyde의 농도변화를 조사하였으며, 혈액과 간조직액

및 mitochondria와 microsome내 유리지방산과 인지질을 구성하고 있는 주요 지방산의 조성변화와 단백질 성분을 비교분석하였다. 그리고 caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여시의 상호작용 및 혈액과 간조직에서 지질 및 단백질 구성성분에 미치는 영향을 종합적으로 관찰해보고자 본 실험을 수행하게 되었다.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 생후 10-12주된 체중 180g내외의 건강한 Sprague-Dawley계 female rat 50마리를 사용하였으며, 실험기간중 시판 실험동물용 고형사료(삼양유지사료) 및 물을 무제한 급여하면서 실험에 사용하였다.

**투여약제 및 사용시약** : 실험동물에 투여된 caffeine과 vitamin E는 Sigma 제품, ferric chloride는 Fluka 제품을 사용하였으며, 지방산표준품(capillary column 분석용), thiobarbituric acid 및 boron trichloride는 Sigma 제품을 사용하였다. Hexane, methanol, propanol 등의 용매는 Merck와 J.T. Baker의 HPLC grade를 사용하였고, 혈청내 total protein, albumin, glucose, triglyceride, HDL-cholesterol, total cholesterol, urea nitrogen, uric acid, creatinine과 aspartate aminotransferase(AST, GOT), alanine aminotransferase(ALT, GPT), alkaline phosphatase(ALP)의 효소활성도 측정은 (주)영동제약(서울시 중구 신당동 288-14) 측정 kit를 이용하였으며, 기타 분석에 사용된 모든 시약은 특급을 사용하였다. 아울러 분석에 이용된 증류수는 18M $\Omega$  이상의 초순수 증류수를 이용하여 분석하였다.

**실험군배치 및 실험동물에 약제투여 방법** :

1) 실험군 배치 : 대조군(A군), caffeine(25mg/kg) 투여군(B군), caffeine(50mg/kg) 투여군(C군), caffeine (25mg/kg)과 ferric chloride(25mg/kg) 동시투여군(D군), caffeine (25mg/kg)과 vitamin E(25mg/kg) 동시투여군(E군)으로 구분하여 각 군별로 rat 10마리씩 총 50마리를 배치하였으며, 실험군에 배치된 rat는 각 실험군별로 명칭기계상사 제품(서울시 구로구 구로 5동 44-7)의 polycarbonate cage (26×42×18cm)에 3내지 4마리씩 넣어 실험동물 사육장내에서 사육 cage를 완전히 임의로 배치하여 실험을 수행하였다.

2) 실험동물에 약제투여 방법 : 모든 실험동물은 실험 개시 15시간 전부터 절식(물만 공급)시킨후 실험에 들어

갔으며 약제투여시간은 매일 일정한 시간에 투여하였다. 실험군별로 투여약제 조제방법으로 대조군(A 군)은 생리식염수를, caffeine 투여군은 caffeine을 생리식염수에 2.5%와 5%의 농도로, 철분도 생리식염수에 2.5% 농도로 용해시킨 다음, 실험군별로 체중을 매일 측정하여 체중 kg당 caffeine을 25mg(B군), 50mg(C군)이 경구투여 되도록 하였으며, caffeine과 ferric chloride 혼합투여군(D군)은 caffeine을 25mg/kg되도록 먼저 투여한 다음, 생리식염수에 2.5% 농도로 희석한 ferric chloride(25mg/kg)를 동시에 경구투여하였다. 또한 caffeine과 vitamin E 혼합투여군(E군)은 caffeine을 25mg/kg 투여한 다음, 동시에 vitamin E를 25mg/kg 경구투여하였다. 한편 모든 투여약제는 쏬데(sonde)를 이용하여 rat의 위내로 강제투여하는 방법을 사용하였다.

#### 분석시료 채취 및 분리 :

1) 혈액 및 간장 채취 : 실험 마지막날인 30일째 실험군별로 상기약제를 마지막으로 투여한 다음, 15시간 경과후 신속히 rat를 diethyl ether에 흡입마취 시킨후 간장을 분리하고, 혈액은 후대정맥에서 채취하여 vacuject tube(녹십자 제품)에 넣은후 혈청을 분리(Hettich Universal 2S, 500g에서 10분)한 다음 -60℃ 초저온 냉동고(Forma Bio-Freezer)에 분석시까지 냉동보관하였다<sup>77</sup>.

2) Total homogenate, mitochondria 및 microsome 분리 : 우선 적출된 간장은 10mM phosphate buffer로 perfusion 시킨 후에 실험재료로 사용하였으며, total homogenate는 10mM phosphate buffer로 10% 균질액(weight/volume)을 만들어 사용하였다. Mitochondria 및 microsome 분리는 Hogeboom<sup>28</sup>의 방법에 따라 우선 sucrose medium(0.25M sucrose, 10mM Tris HCl, 0.5mM EDTA pH 7.2)에 넣어 10% 균질액을 만든 다음, 1,000g에서 15분간 원심분리후 상층액을 취하여 10,000g(Beckman SW 28Ti)에서 15분간 원심분리 후에 침전된 mitochondria 분획을 얻었으며, 남은 상층액을 100,000g(Beckman SW 41Ti)에서 60분간 원심분리하여 microsome 분획을 얻었다.

#### 검사항목 및 분석방법 :

1) 증체량 측정 : 실험기간 30일 동안 실험군별로 매일 체중을 측정하여 매 10일 간격으로 체중변동을 조사하여 증체량을 구하였다.

#### 2) 혈액 화학성분 분석

(1) 혈청내 glucose, creatinine, uric acid, urea nitrogen, to-

tal protein 및 albumin 함량은 측정kit(영동제약)를 이용하여 Schimadzu Model UV-160A UV-Visible Spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 함량을 구하였다.

(2) 혈청내 triglyceride, HDL-cholesterol, total cholesterol은 측정kit(영동제약)를 이용하여 항목별로 흡광도를 측정하여 함량을 구하였다.

(3) 혈청내 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase(ALP)도 측정kit(영동제약)를 이용하여 흡광도를 측정하여 효소의 활성치를 계산하였다.

(4) 혈청내 유리지방산 및 인지질 함량분석은 Hanahan 등<sup>23</sup> 및 허 등<sup>76</sup>의 방법에 따라 혈청내에서 추출한 지질을 N<sub>2</sub>로 용매를 증발시킨후 잔사물에 chilled acetone을 가하여 원심분리 후에 유리지방산과 인지질을 각각 분리한 다음, toluene에 용해시켜 copper reagent를 가하여 구리염을 형성시켜 원심분리후 상층액을 분취하여 발색제인 0.1% sodium diethyldithiocarbamate를 가하여 발색시킨 후 440nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 구하였다.

3) 혈청, 간조직 및 간세포분획내 malondialdehyde 함량 측정 : 혈청과 간균질액 및 간세포분획내 malondialdehyde 함량측정은 Ohkawa 등<sup>50</sup> 및 Slater 등<sup>59</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 일정량의 시료(mg protein에 해당하는 량)에 0.2ml의 8.1% sodium dodecyl sulfate 수용액과 1.5ml의 20% acetic acid(pH 3.5)와 1.5ml의 0.8% thiobarbituric acid 수용액을 첨가한 후 증류수로 총 부피를 4ml 되게 만들어 95℃ shaking waterbath에서 60분간 가온한 뒤 즉시 얼음에 옮겨 식힌 다음, 1ml의 증류수와 5ml의 n-butanol : pyridine(15 : 1, V / V)혼합액을 첨가하여 vortex mixer로 강하게 진탕한 후에 800g(Hettich Universal 2S)에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 532nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

4) 혈청, 간조직 및 간세포분획내 carbonyl group 함량 측정 : 혈청과 간균질액 및 간세포분획내 carbonyl group 함량측정은 Levine 등<sup>38</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 우선 일정량의 시료(mg protein에 해당하는 량)를 eppendorf tube에 취하여 50μl의 10% streptomycin sulfate를 가한 후에 5분간 얼음속에 놓아둔 뒤 100g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 분취하여 동일부피의 20% trichloroacetic acid(TCA)를 가하고 진탕(Vortex - Genie2)한 후 500g에서 5분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질에 0.5ml 10mM 2,4-dinitrophenylhydrazine(in 2N HCl)을

첨가하여 37℃ shaking incubator에서 1시간동안 진탕배양 후, 0.5ml 20% TCA를 첨가하고 500g에서 5분간 원심분리하여 침전된 반응단백질을 분리하였다. 이렇게 회수한 단백질을 0.6ml 6M guanidine hydrochloride(20mM potassium phosphate에 녹인 후 trifluoroacetic acid로 pH 2.3으로 만든 것)을 가하여 37℃ incubator에서 15분간 방치한 후 재용해시켜 10,000g(Hettich Mikro-Rapid)에서 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 368nm에서 흡광도를 측정하여 평균분자흡광계수  $21.0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 곱하여 carbonyl group의 mole 수를 산정하였다.

5) SDS-PAGE를 이용한 혈청, 간조직 및 간세포분획의 단백질 분석 : 혈청, 간세포분획에서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용한 단백질변성 확인실험은 Laemmli<sup>37</sup>와 송 등<sup>61</sup>의 방법을 이용하였다. SDS를 함유하는 Tris buffer(glycerol 10ml, 2-mercaptoethanol 5ml, 20% SDS 11.5ml, 1.5M Tris-HCl 42ml)에 시료를 동량 혼합한 다음 100℃에서 3분간 가열한 후 원심분리하여 SDS-polyacrylamide gel (10% separating gel 및 4% stacking gel)을 이용하여 70V에서 혈청은 1시간, 간세포분획은 15시간동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난후 gel을 0.1% Coomassie brilliant blue(50% methanol과 10% acetic acid의 혼합액에 용해한 수용액)로 혈청은 1시간, 간세포분획은 2시간동안 단백질을 염색한 후 탈색용액(50% methanol과 10% acetic acid의 1:1 혼합액)으로 탈색시켜 각 시료의 구성단백질 상태를 비교 분석하였다.

6) 유리지방산과 인지질내 지방산 조성분석 : 혈청, 간조직 및 간세포분획내에서 분리한<sup>23,76</sup> 유리지방산과 인지질을 screw cap tube에 분취한 후 Miller<sup>40</sup>의 방법에 따라 50% methanol에 용해한 1.2N NaOH를 1ml 가하여 Teflon-lined caps로 꼭 닫은후 100℃ shaking water bath에 30분간 가열한 다음 30분 후에 tube를 끄집어 내어 실온에서 서서히 냉각시킨다. 0.5ml 6M HCl(pH 2)을 가하고 1ml 10% boron trichloride(in methanol, Sigma 완제품)을 가하여 methylation을 촉매시켜 뚜껑을 완전히 닫은 후에 부드럽게 혼합하고 85℃ shaking waterbath에 5분간 방치한 다음 실온에서 완전히 냉각시킨다. 그 다음에 fatty acid methyl ester를 추출하기 위하여 hexane/diethyl ether(1 : 1)를 가하고 3분동안 tube를 회전시키면서 부드럽게 혼합한 후에 상층의 용매층을 다른 tube에 분취한다. 마지막으로 3ml 0.3N NaOH를 용매층에 가한 후 250g

에서 5분간 원심분리 후 상층액을 취하여 Table 1의 조건으로 Hewlett Packard gas chromatography Model 5890 Series II(HP 3396 series II Integrator)를 이용하여 지방산 조성을 분석하였다.

통계처리 : 모든 실험성적은 분산분석을 하여 F 검정결과 유의성(5% 이상)이 나타난 것은 평균치를 구하여 완전 임의배치법에 따른 최소유의차(L.S.D.)검정을 실시하였다<sup>75</sup>.

Table 1. The conditions of gas chromatography for analysis of fatty acid composition

Items	Conditions
NEUMATICS	
Carrier gas	Nitrogen
Column head pressure	25 psi
Split ratio	100:1
Septum purge	5ml/min
COLUMN	
	HP-1 capillary column (Crosslinked Methyl Silicone Gum)
Column ID	0.20mm
Film thickness	0.11µm
Length	25m
Phase ratio	450
DETECTOR	FID(Flame Ionization Detector)
OVEN TEMPERATURE	
Initial temperature	145℃
Program rate	5℃/min
Final temperature	280℃
FID temperature	300℃
Injection port temperature	250℃
INTEGRATOR	
Threshold	-2
Attenuation	2 ↑ 0
Peak width	0.04
Retention time	25 min
Chart speed	1cm/min
INJECTION VOLUME	1µl

## 결 과

**실험동물의 체중변화** : 실험기간 30일동안 실험군별 rat의 체중변동을 매일 측정하여 증체량을 조사한 결과 Fig 1에서 보는 바와 같이, 대조군(A)에 비해 caffeine 투여군인 B, C군이 유의성 있게 감소했으며( $p < 0.01$ ), caffeine과 철분의 혼합투여군인 C군이 가장 많이 감소하였고( $p < 0.01$ ), caffeine과 vitamin E 혼합투여군도 대조군에 비해 유의성 있는 증체량의 감소를 보였다( $p < 0.01$ ).

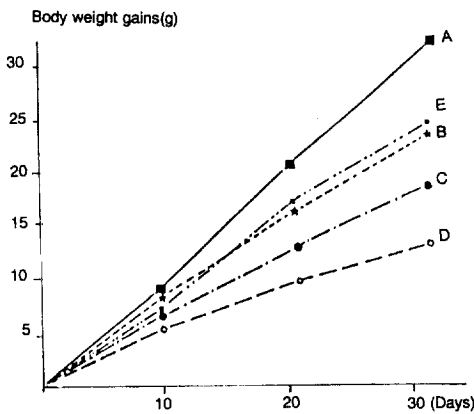


Fig 1. Effects of caffeine, iron and vitamin E on the body weight gains among experimental groups of Sprague-Dawley female rats.

- A: Control group.  
 B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride (25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.  
 E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

**혈액화학적성분의 변화** : 30일 동안 매일 1회 caffeine 및 caffeine과 철분, caffeine과 vitamin E 동시 투여시 혈액내 glucose, urea nitrogen, uric acid 및 creatinine의 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이, glucose 함량은 대조군이 101.5mg/dl인데 반하여 caffeine 투여군인 B군과 C군에서는 함량이 124.5mg/dl,

130.1mg/dl로 glucose의 함량이 증가되었으며( $p < 0.01$ ), caffeine과 철분 또는 vitamin E 투여군인 D군과 E군에서도 122.1mg/dl, 119.3mg/dl로 함량이 증가되었다( $p < 0.01$ ). 그러나 비단백 질소화합물인 urea nitrogen, uric acid, creatinine의 함량은 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.

Table 2. Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of glucose, urea nitrogen, uric acid and creatinine in serum (mg/dl)

Experimental group	Glucose	Uric nitrogen	Uric acid	Creatinine
A	101.5 <sup>a</sup> ± 6.7	24.3 ± 2.2	2.28 ± 0.31	0.85 ± 0.12
B	124.5 <sup>b,c</sup> ± 5.5	25.1 ± 1.3	2.33 ± 0.29	0.85 ± 0.08
C	130.1 <sup>b</sup> ± 4.4	23.8 ± 1.5	2.39 ± 0.46	0.88 ± 0.10
D	122.1 <sup>b,d</sup> ± 6.4	25.5 ± 1.3	2.34 ± 0.64	0.81 ± 0.11
E	119.3 <sup>c,d</sup> ± 5.8	24.6 ± 1.3	2.32 ± 0.38	0.87 ± 0.06

<sup>a,b,c,d</sup> Means with different superscripts within groups are different( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

- A: Control group.  
 B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride (25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.  
 E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

Caffeine 및 caffeine과 철분, caffeine과 vitamin E 동시 투여시 혈액내 triglyceride, total cholesterol 및 HDL-cholesterol의 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 혈액내 HDL-cholesterol 및 total cholesterol 함량이 대조군(38.8, 52.6mg/dl)에 비해 caffeine 투여군인 B군(53.4, 69.6mg/dl), C군(56.3, 73.0mg/dl), caffeine과 철분 혼합투여군인 D군(51.1, 68.9mg/dl) 및 caffeine과 vitamin E 혼합투여군인 E군(51.3, 68.2mg/dl)에서 모두 유의성 있는 함량의 증가를 보였으며( $p < 0.01$ ), 중성 지방인 triglyceride 함량은 반대로 대조군(66.2mg/dl)에 비해 B군(45.0mg/dl), C군(40.4mg/dl), D군(3.8mg/dl), E



군(47.2mg/dl)에서 함량의 감소를 나타내었고( $p < 0.01$ ), caffeine과 철분 동시투여군(D군)이 가장 낮은 함량을 보였다.

**Table 3.** Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of triglyceride, HDL-cholesterol and total cholesterol in serum (mg/dl)

Experimental group	Triglyceride	Total cholesterol	HDL-cholesterol
A	66.2 ± 8.0 <sup>a</sup>	52.6 ± 5.8 <sup>a</sup>	38.8 ± 4.3 <sup>a</sup>
B	45.0 ± 5.7 <sup>b</sup>	69.6 ± 4.6 <sup>b</sup>	53.4 ± 5.6 <sup>b</sup>
C	40.4 ± 4.3 <sup>b,c</sup>	73.0 ± 5.6 <sup>b</sup>	56.3 ± 3.6 <sup>b</sup>
D	33.8 ± 3.9 <sup>c</sup>	68.9 ± 4.1 <sup>b</sup>	51.1 ± 4.3 <sup>b</sup>
E	47.2 ± 5.1 <sup>b</sup>	68.2 ± 3.9 <sup>b</sup>	51.3 ± 3.5 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts within groups are different( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

- A: Control group.  
 B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride (25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.  
 E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

Caffeine, caffeine과 철분 및 caffeine과 vitamin E 투여시 혈청단백질 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 total protein, albumin, globulin 및 albumin/globulin(A/G) ratio 모두 대조군에 비해 유의성 있는 함량의 차이는 인정되지 않았다.

**Table 4.** Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of total protein, albumin, globulin and A/G ratio in serum (g/dl)

Experimental group	Total protein	Albumin	Globulin	A/G ratio (%)
A	7.9 ± 0.6	3.8 ± 0.4	4.1 ± 0.4	0.96 ± 0.15
B	8.0 ± 0.5	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.3	0.95 ± 0.06
C	8.1 ± 0.6	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.5	0.97 ± 0.13
D	7.8 ± 0.5	3.8 ± 0.4	3.8 ± 0.5	0.99 ± 0.13
E	7.7 ± 0.4	3.7 ± 0.3	3.9 ± 0.4	0.95 ± 0.10

The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

- A: Control group.  
 B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride (25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.  
 E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

Caffeine 및 caffeine과 철분, caffeine과 vitamin E를 동시에 30일 동안 rat에 투여한 후 혈청내 aspartate aminotransferase (AST,GOT), alanine aminotransferase(ALT,GPT) 및 alkaline phosphatase(ALP)효소의 활성치에 미치는 영향을 관찰한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 유의성 있는 활성도의 차이를 나타내지는 않았다.

**Table 5.** Effects of caffeine, iron and vitamin E on the activities of aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) and alkaline phosphatase (ALP) in serum (U/L)

Experimental group	Aspartate aminotransferase (AST, GOT)	Alanine aminotransferase (ALT, GPT)	Alkaline phosphatase (ALP)
A	165 ± 33.8	57.6 ± 16.1	41.8 ± 21.4
B	168 ± 17.2	49.2 ± 7.3	36.0 ± 13.8
C	187 ± 12.8	45.0 ± 6.3	39.9 ± 25.6
D	175 ± 14.5	43.0 ± 3.0	39.0 ± 7.3
E	157 ± 28.6	45.2 ± 11.2	42.9 ± 24.8

The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

- A: Control group.  
 B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.  
 D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.  
 E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

혈액내 유리지방산, 인지질, carbonyl group 및 malonaldehyde 함량변화 : Caffeine 및 caffeine과 철분, caffeine과 vitamin E를 rat에게 30일 동안 매일 1회 경구투여

후 혈청내 유리지방산, 인지질, carbonyl group 및 malondialdehyde 함량을 조사한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. 유리지방산과 인지질의 함량은 대조군(35.2, 125.3mg/dl)에 비해 caffeine 투여군인 B군(45.7, 154.4mg/dl), C군(50.0, 167.2mg/dl) 그리고 caffeine과 철분 혼합투여군인 D군(52.5, 148.4mg/dl) 및 caffeine과 vitamin E 혼합투여군인 E군(41.1, 159.2mg/dl)에서 유의성 있는 함량의 증가를 나타내었으며( $p < 0.01$ ), 유리지방산은 D군, 인지질은 C군에서 가장 높게 나타났다. 혈청내 carbonyl group과 지질과산화물인 malondialdehyde의 함량은 대조군(1.53, 0.35nmol/mg protein)에 비해 caffeine투여군인 B군(1.56, 0.36nmol/mg protein), C군(1.57, 0.36nmol/mg protein) 및 caffeine과 vitamin E 투여군인 E군(1.55, 0.37nmol/mg protein)에서는 차이가 없었고, caffeine과 철분 혼합투여군인 D군(1.82, 0.52nmol/mg protein)에서 유의성 있는 함량의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ).

Table 6. Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of free fatty acid, phospholipid, carbonyl group and malondialdehyde in serum

Experimental group	Free fatty acid	Phospholipid (mg/dl)	Carbonyl group (nmol/mg protein)	Malondialdehyde (nmol/mg protein)
A	35.2 <sup>a</sup> ± 3.2	125.3 <sup>a</sup> ± 9.7	1.53 <sup>a</sup> ± 0.07	0.35 <sup>a</sup> ± 0.03
B	45.7 <sup>b,c</sup> ± 4.6	154.4 <sup>b</sup> ± 11.3	1.56 <sup>a</sup> ± 0.05	0.36 <sup>a</sup> ± 0.04
C	50.0 <sup>b</sup> ± 4.6	167.2 <sup>b</sup> ± 16.3	1.57 <sup>a</sup> ± 0.06	0.36 <sup>a</sup> ± 0.04
D	52.5 <sup>b</sup> ± 4.3	148.4 <sup>b</sup> ± 17.6	1.82 <sup>b</sup> ± 0.07	0.52 <sup>b</sup> ± 0.03
E	41.1 <sup>a,c</sup> ± 4.3	159.2 <sup>b</sup> ± 9.4	1.55 <sup>a</sup> ± 0.04	0.37 <sup>a</sup> ± 0.03

<sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts within groups are different( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means ± S.D. obtained of 10 rats.

A: Control group.

B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

간조직내의 carbonyl group 및 malondialdehyde 함량의 변화 : 간의 total homogenate, mitochondria 및 microsome내 carbonyl group의 함량은 Table 7에서 보는 바와 같이 대조군(1.16, 0.66, 1.27nmol/mg protein)에 비해 caffeine과 철분 혼합투여군(1.45, 0.94, 1.67nmol/mg pro-

tein)에서 유의성 있는 함량의 증가를 보였으며( $p < 0.01$ ), caffeine 단독투여군과 caffeine과 vitamin E 혼합투여군에서는 함량의 차이를 보이지 않았다. 또한 지질과산화물인 malondialdehyde함량은 Table 8에서와 같이, 대조군(5.17, 3.64, 0.68nmol/mg protein)과 비교해 볼 때 caffeine과 철분 혼합투여군(6.70, 6.10, 1.36nmol/mg protein)에서 유의성 있는 함량의 증가를 보였으며( $p < 0.01$ ), caffeine 투여군인 B, C군과 caffeine과 vitamin E 혼합투여군인 E군에서는 유의성 있는 함량의 변화를 보이지 않았다.

Table 7. Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of carbonyl group in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of pooled liver (nmol/mg protein)

Experimental group	Total homogenate	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction
A	1.16 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>a</sup>
B	1.17 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.08 <sup>a</sup>
C	1.14 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.07 <sup>a</sup>
D	1.45 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.07 <sup>b</sup>
E	1.14 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.06 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Means with different superscripts within groups are different( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 - 5 tests.

A: Control group.

B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

Table 8. Effects of caffeine, iron and vitamin E on the concentrations of malondialdehyde in total homogenate, mitochondrial and microsomal fraction of pooled liver (nmol/mg protein)

Experimental group	Total homogenate	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction
A	5.17 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.64 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>a</sup>
B	5.47 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.79 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.04 <sup>a</sup>
C	5.58 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.74 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.08 <sup>a</sup>
D	6.70 ± 0.20 <sup>b</sup>	6.10 ± 0.38 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.02 <sup>b</sup>
E	5.11 ± 0.55 <sup>a</sup>	3.57 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.08 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Means with different superscripts within groups are different ( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means  $\pm$  S.D. obtained from 3 - 5 tests.

- A: Control group.
- B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.
- C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.
- D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride (25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.
- E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

혈청내 유리지방산과 인지질의 지방산조성 변화 : 혈청내 유리지방산과 인지질의 지방산조성을 gas chromatography로 비교해본 결과는 Table 9와 10에서 보는 바와 같이, 유리지방산의 지방산조성(Table 9)은 stearic acid(18:0)와 arachidonic acid(20:4)에서 대조군(14.75, 7.88%)에 비해 caffeine 투여군인 B군(16.52, 12.62%), C군(17.52, 15.18%)과 caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여군인 D군(19.73, 13.47%), E군(17.62, 13.28%)에서 조성비율이 증가되었고 ( $p < 0.01$ ), oleic acid(18:1)와 linoleic acid(18:2)는 대조군(16.44, 35.12%)에 비해 caffeine 투여군인 B군(12.97, 32.59%), C군(10.88, 31.23%)에서 비율이 감소되었으며 ( $p < 0.01$ ), caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여군인 D군(12.37, 30.66%)과 E군(11.95, 32.41%)에서도 비율의 감소를 보였다 ( $p < 0.01$ ). 한편 혈청내 인지질의 지방산 조성은(Table 10) 유리지방산과 유사하게 stearic acid와 arachidonic acid에서 대조군(37.74, 14.24%)에 비해 caffeine 투여군인 B군(39.37, 16.39%)과 C군(40.63, 17.83%), caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여군인 D군(42.73, 15.39%)과 E군(39.16, 15.70%)에서 유의성 있는 비율의 증가를 보였으며 ( $p < 0.01$ ), 불포화 지방산인 oleic acid와 linoleic acid는 대조군(5.53, 16.14%)에 비해 B군(4.03, 14.38%), C군(3.54, 12.38%), D군(4.52, 11.68%), E군(4.29, 13.64%)에서 모두 비율의 감소를 보였다 ( $p < 0.01$ ).

Table 9. Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of free fatty acid in pooled serum (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	24.57 <sup>a</sup> $\pm 0.24$	1.24 $\pm 0.09$	14.75 <sup>a</sup> $\pm 0.11$	16.44 <sup>a</sup> $\pm 0.16$	35.12 <sup>a</sup> $\pm 0.26$	N.D	7.88 <sup>a</sup> $\pm 0.04$
B	24.15 <sup>a,b</sup> $\pm 0.21$	1.15 $\pm 0.06$	16.52 <sup>b</sup> $\pm 0.16$	12.97 <sup>b</sup> $\pm 0.08$	32.59 <sup>b</sup> $\pm 0.30$	N.D	12.62 <sup>b</sup> $\pm 0.10$
C	23.84 <sup>a,b</sup> $\pm 0.27$	1.35 $\pm 0.10$	17.52 <sup>c</sup> $\pm 0.09$	10.88 <sup>c</sup> $\pm 0.13$	31.23 <sup>c</sup> $\pm 0.17$	N.D	15.18 <sup>c</sup> $\pm 0.17$
D	22.50 <sup>c</sup> $\pm 0.18$	1.27 $\pm 0.04$	19.73 <sup>d</sup> $\pm 0.10$	12.37 <sup>d</sup> $\pm 0.04$	30.66 <sup>c</sup> $\pm 0.18$	N.D	13.47 <sup>d</sup> $\pm 0.09$
E	23.57 <sup>b</sup> $\pm 0.31$	1.23 $\pm 0.03$	17.62 <sup>c</sup> $\pm 0.18$	11.95 <sup>d</sup> $\pm 0.06$	32.41 <sup>b</sup> $\pm 0.13$	N.D	13.28 <sup>b</sup> $\pm 0.07$

<sup>a,b,c,d</sup> Means with different superscripts within groups are different ( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means  $\pm$  S.D. obtained from 3 tests.

N.D: Not detected.

- A: Control group.
- B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.
- C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.
- D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride (25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.
- E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

37, 16.39%)과 C군(40.63, 17.83%), caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여군인 D군(42.73, 15.39%)과 E군(39.16, 15.70%)에서 유의성 있는 비율의 증가를 보였으며 ( $p < 0.01$ ), 불포화 지방산인 oleic acid와 linoleic acid는 대조군(5.53, 16.14%)에 비해 B군(4.03, 14.38%), C군(3.54, 12.38%), D군(4.52, 11.68%), E군(4.29, 13.64%)에서 모두 비율의 감소를 보였다 ( $p < 0.01$ ).

Table 10. Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of phospholipid in pooled serum (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	26.35 <sup>a,b</sup> $\pm 0.18$	Trace	37.74 <sup>a</sup> $\pm 0.27$	5.53 <sup>a</sup> $\pm 0.11$	16.14 <sup>a</sup> $\pm 0.18$	N.D	14.24 <sup>a</sup> $\pm 0.18$
B	25.83 <sup>a</sup> $\pm 0.44$	Trace	39.37 <sup>b</sup> $\pm 0.18$	4.03 <sup>b</sup> $\pm 0.06$	14.38 <sup>b</sup> $\pm 0.13$	N.D	16.39 <sup>c</sup> $\pm 0.11$
C	25.62 <sup>a</sup> $\pm 0.30$	Trace	40.63 <sup>c</sup> $\pm 0.31$	3.54 <sup>c</sup> $\pm 0.09$	12.38 <sup>c</sup> $\pm 0.18$	N.D	17.83 <sup>d</sup> $\pm 0.24$
D	25.68 <sup>a</sup> $\pm 0.19$	Trace	42.73 <sup>d</sup> $\pm 0.26$	4.52 <sup>d</sup> $\pm 0.03$	11.68 <sup>d</sup> $\pm 0.10$	N.D	15.39 <sup>b</sup> $\pm 0.16$
E	27.21 <sup>b</sup> $\pm 0.16$	Trace	39.16 <sup>b</sup> $\pm 0.40$	4.29 <sup>b</sup> $\pm 0.09$	13.64 <sup>c</sup> $\pm 0.11$	N.D	15.70 <sup>b,c</sup> $\pm 0.30$

<sup>a,b,c,d,e</sup> Means with different superscripts within groups are different ( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means  $\pm$  S.D. obtained from 3 tests.

N.D: Not detected.

- A: Control group.
- B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.
- C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.
- D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.
- E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

간조직내 유리지방산의 지방산조성 변화 : 간의 total homogenate, mitochondria 및 microsome내 유리지방산의 지방산조성을 비교해본 결과는 Table 11에서 Table 13까지 보는 바와 같이 caffeine 투여군(B군, C군)의 total homogenate, mitochondria 분획에서 oleic acid(18:1)의 지방산비율이 대조군(8.67, 10.08%)에 비하여 B군(7.81, 8.73%), C군(6.89, 7.75%)에서 유의성 있는 감소를 보였으며( $p < 0.01$ ) microsome에서는 감소경향을 보였다. Arachidonic acid(20:4)는 C군에서 대조군(20.93, 18.47, 22.24%)에 비하여 total homogenate, mitochondria, microsomal fraction에서 함량비율의 증가(22.62, 19.79, 23.71%)를 보였다( $p < 0.01$ ).

Caffeine과 철분 동시투여군(D군)에서 유리지방산의 지방산조성 변화를 본 결과, total homogenate와 microsomal fraction내에서 palmitic acid(16:0)는 대조군(24.43, 23.34%)에 비해 함량비율이 모두 유의성 있게 증가(25.95, 26.34%)했고( $p < 0.01$ ) mitochondria 분획에서는 증가경향을 보였다. Linoleic acid(18:2)도 total homogenate, mitochondria 및 microsomal fraction내에서 대조군(22.17, 23.75, 21.26%)에 비해 함량비율이 유의성 있게 증가(23.43, 25.02, 23.95%)되었다( $p < 0.01$ ). Stearic acid(18:0)의 비율은 total homogenate와 mitochondria에서 대조군(22.62, 21.01%)에 비하여 감소경향(20.76, 19.87%)을 보였으며, microsome에서도 stearic acid(18:0)는 대조군(24.18%)에 비하여 19.76%로 유의성 있게 감소되었다( $p < 0.01$ ). 한편 oleic acid(18:1)의 함량비율은 mitochondria에서 대조군(10.08%)에 비해 비율이 감소(8.74%)하였으나 microsomal fraction에서는 대조군(7.81%)에 비해 오히려 증가(9.55%)되었다( $p < 0.01$ ).

Caffeine과 vitamin E 동시투여군인 E군에서 total homogenate와 mitochondria 및 microsomal fraction내 유리지방산의 조성변화는 linoleic acid(18:2)에서 대조군(22.17, 23.75, 21.26%)에 비해 함량비율이 증가(25.04, 29.20, 26.48%)되었고( $p < 0.01$ ), stearic acid(18:0)는 mitochondria 및 microsomal fraction에서 대조군(21.01, 24.18%)에 비해 유의성 있는 비율의 감소(16.71, 19.65%)를 보였으며(\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ ), total homogenate에서는 감소경향을 보였다. Total homogenate와 mitochondria에서 palmitic acid는 대조군(24.43, 25.42%)에 비해 감소(23.85, 23.43%)되었으며( $p < 0.01$ ), arachidonic acid는 대조군(20.93, 18.47%)에 비해 오히려 증가(21.67, 20.11%)되었다( $p < 0.01$ ).

Table 11. Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of free fatty acid in pooled liver homogenate (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	24.43 <sup>a</sup> ±0.44	1.18 ±0.04	22.62 ±0.25	8.67 <sup>a</sup> ±0.04	22.17 <sup>a</sup> ±0.24	N.D	20.93 <sup>a</sup> ±0.17
B	24.22 <sup>a,b</sup> ±0.26	1.04 ±0.03	20.23 ±0.18	7.81 <sup>b</sup> ±0.01	22.10 <sup>a</sup> ±0.41	N.D	24.60 <sup>b</sup> ±0.42
C	24.62 <sup>a,b</sup> ±0.30	0.97 ±0.07	22.12 ±0.18	6.89 <sup>c</sup> ±0.06	22.78 <sup>a,b</sup> ±0.21	N.D	22.62 <sup>c</sup> ±0.44
D	25.95 <sup>c</sup> ±0.24	0.94 ±0.06	20.76 ±0.17	8.34 <sup>a</sup> ±0.13	23.43 <sup>b</sup> ±0.31	N.D	20.38 <sup>a</sup> ±0.20
E	23.85 <sup>b</sup> ±0.07	0.96 ±0.03	21.12 ±0.34	7.36 <sup>d</sup> ±0.16	25.04 <sup>c</sup> ±0.18	N.D	21.67 <sup>c</sup> ±0.31

<sup>a,b,c,d</sup> Means with different superscripts within groups are different ( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests.

N.D: Not detected.

A: Control group.

B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

Table 12. Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of free fatty acid in mitochondrial fraction of pooled liver (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	25.42 <sup>a</sup> ±0.26	1.27 ±0.03	21.01 <sup>A</sup> ±0.16	10.08 <sup>a</sup> ±0.06	23.75 <sup>a</sup> ±0.23	N.D	18.47 <sup>a</sup> ±0.18
B	27.66 <sup>b</sup> ±0.34	1.31 ±0.06	21.23 <sup>A</sup> ±0.18	8.73 <sup>b</sup> ±0.09	23.06 <sup>a</sup> ±0.34	N.D	18.01 <sup>a</sup> ±0.13
C	26.25 <sup>a</sup> ±0.17	1.24 ±0.01	20.06 <sup>A</sup> ±0.11	7.75 <sup>c</sup> ±0.16	24.91 <sup>b</sup> ±0.13	N.D	19.79 <sup>b</sup> ±0.13
D	26.16 <sup>a</sup> ±0.21	1.33 ±0.16	19.87 <sup>A</sup> ±0.18	8.74 <sup>b</sup> ±0.09	25.02 <sup>b</sup> ±0.23	N.D	18.88 <sup>a</sup> ±0.13
E	23.43 <sup>c</sup> ±0.10	1.24 ±0.04	16.71 <sup>B</sup> ±0.23	9.31 <sup>d</sup> ±0.13	29.20 <sup>c</sup> ±0.31	N.D	20.11 <sup>c</sup> ±0.35

<sup>A,B</sup> Means with different superscripts within groups are different( $p < 0.05$ ). <sup>a,b,c,d</sup> Means with different superscripts within groups are different( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests.

N.D: Not detected.

A: Control group.

B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

**Table 13.** Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of free fatty acid in microsomal fraction of pooled liver (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	23.34 <sup>a</sup> ±0.48	1.17 ±0.06	24.18 <sup>a</sup> ±0.58	7.81 <sup>a,b</sup> ±0.11	21.26 <sup>a</sup> ±0.34	N.D	22.24 <sup>a</sup> ±0.11
B	25.53 <sup>b</sup> ±0.38	1.07 ±0.03	24.11 <sup>a</sup> ±0.35	6.88 <sup>a,b</sup> ±0.16	20.58 <sup>a</sup> ±0.16	N.D	21.83 <sup>a</sup> ±0.24
C	23.05 <sup>a</sup> ±0.78	1.15 ±0.09	22.32 <sup>b</sup> ±0.57	6.58 <sup>a</sup> ±0.06	23.19 <sup>b</sup> ±0.44	N.D	23.71 <sup>b</sup> ±0.41
D	26.34 <sup>c</sup> ±0.23	1.24 ±0.09	19.76 <sup>c</sup> ±0.34	9.55 <sup>c</sup> ±0.18	23.95 <sup>b</sup> ±0.24	N.D	19.16 <sup>c</sup> ±0.18
E	24.38 <sup>a,b</sup> ±0.17	1.11 ±0.03	19.65 <sup>c</sup> ±0.21	8.44 <sup>b,c</sup> ±0.31	26.48 <sup>c</sup> ±0.17	N.D	19.94 <sup>c</sup> ±0.38

<sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts within groups are different ( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means  $\pm$  S.D. obtained from 3 tests.

N.D: Not detected.

A: Control group.

B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

간조직내 인지질의 지방산 조성변화 : 간조직액과 mitochondria, microsome 분획의 인지질내 주요 지방산의 조성을 비교한 결과는 Table 14, Table 15, Table 16에서 보는 바와 같이 caffeine 투여군에서 total homogenate (Table 14)내 oleic acid(18:1)의 함량비율은 대조군이 3.63%인데 비해 B, C군에서는 3.29, 3.27%로 감소되었으며 ( $p < 0.05$ ), arachidonic acid(20:4)도 대조군(25.88%)에 비해 C군에서 24.63%로 감소되었다( $p < 0.01$ ). Mitochondria 분획(Table 15)에서는 palmitic acid(16:0), oleic acid(18:1) 및 linoleic acid(18:2)의 함량비율이 대조군에서 17.22, 3.72, 18.71%인데 caffeine 투여군인 B군의 비율은 18.32<sup>\*</sup>, 4.01<sup>\*\*</sup>, 19.35<sup>\*\*</sup>로 증가하였으며( $**p < 0.01, p < 0.05$ ), stearic acid(18:0)는 대조군이 34.16%였는데 B군에서는 33.04%로 감소되었으나( $p < 0.01$ ), C군에는 유의성 있는 차이가 없었다. 그리고 microsome분획(Table 16)에서 palmitic acid(16:0)는 대조군(16.38%)에 비해 B군에서 17.28%로 증가했으며( $p < 0.01$ ), oleic acid(18:1)는 대조군(3.79%)에 비해 C군에서 3.22%로 감소

되었고( $p < 0.01$ ), arachidonic acid는 B군에서 대조군(25.31%)에 비해 23.49%로 감소되었다( $p < 0.05$ ).

Caffeine과 철분 혼합투여군인 D군에서 포화지방산인 palmitic acid(16:0)는 total homogenate, mitochondria, microsome fraction에서 대조군(16.28, 17.22, 16.38%)에 비해 비율(17.58<sup>\*\*</sup>, 18.78<sup>\*</sup>, 18.23<sup>\*\*</sup>%)이 유의성 있게 증가되었고( $**p < 0.01, *p < 0.05$ ), stearic acid도 대조군(34.18, 34.16, 36.04%)에 비해 유의성 있는 비율의 증가(36.41, 37.23, 39.53%)를 보였다( $p < 0.01$ ). 그러나 불포화지방산인 oleic acid(18:1)와 linoleic acid(18:2)에서는 반대로 대조군(18:1-3.63, 3.72, 3.79%, 18:2-20.03, 18.71, 18.48%)에 비해 유의성 있는 비율(18:1-3.41<sup>\*</sup>, 3.11<sup>\*\*</sup>, 3.12<sup>\*\*</sup>, 18:2-18.03<sup>\*\*</sup>, 15.79<sup>\*\*</sup>, 14.74<sup>\*\*</sup>%)의 감소를 보였다( $**p < 0.01, *p < 0.05$ ).

Caffeine과 vitamin E 투여군인 E군의 total homogenate와 microsome 분획에서 arachidonic acid(20:4)의 함량비율은 대조군(25.88, 25.31%)과 비교할 때 24.25<sup>\*\*</sup>, 23.97<sup>\*\*</sup>로 유의성 있게 감소되었다( $**p < 0.01, *p < 0.05$ ).

**Table 14.** Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of phospholipid in pooled liver homogenate (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	16.28 <sup>a</sup> ±0.24	Trace	34.18 <sup>a,b</sup> ±0.35	3.63 <sup>A</sup> ±0.11	20.03 <sup>a</sup> ±0.16	N.D	25.88 <sup>a</sup> ±0.17
B	17.34 <sup>b</sup> ±0.09	Trace	33.08 <sup>a</sup> ±0.44	3.29 <sup>B</sup> ±0.04	20.64 <sup>a</sup> ±0.36	N.D	25.65 <sup>a,b</sup> ±0.33
C	16.92 <sup>a,b</sup> ±0.18	Trace	34.93 <sup>b</sup> ±0.10	3.27 <sup>B</sup> ±0.03	20.25 <sup>a</sup> ±0.42	N.D	24.63 <sup>b,c</sup> ±0.24
D	17.58 <sup>b</sup> ±0.17	Trace	36.41 <sup>c</sup> ±0.16	3.41 <sup>B</sup> ±0.11	18.03 <sup>b</sup> ±0.04	N.D	24.57 <sup>b,c</sup> ±0.18
E	16.83 <sup>a,b</sup> ±0.23	Trace	34.41 <sup>b</sup> ±0.35	3.62 <sup>A</sup> ±0.06	20.89 <sup>a</sup> ±0.18	N.D	24.25 <sup>c</sup> ±0.44

<sup>A,B</sup> Means with different superscripts within groups are different ( $p < 0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts within groups are different ( $p < 0.01$ ). The results are expressed as means  $\pm$  S.D. obtained from 3 tests.

N.D: Not detected.

A: Control group.

B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

**Table 15.** Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of phospholipid in mitochondrial fraction of pooled liver (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	17.22 <sup>A</sup> ±0.35	Trace	34.16 <sup>a</sup> ±0.34	3.72 <sup>a</sup> ±0.09	18.71 <sup>b</sup> ±0.18	N.D	26.19 ±0.31
B	18.32 <sup>B,C</sup> ±0.26	Trace	33.04 <sup>b</sup> ±0.18	4.01 <sup>c</sup> ±0.04	19.35 <sup>ab</sup> ±0.16	N.D	25.28 ±0.18
C	17.78 <sup>A,B</sup> ±0.17	Trace	33.64 <sup>a,b</sup> ±0.26	3.31 <sup>a,b</sup> ±0.21	19.83 <sup>a</sup> ±0.21	N.D	25.44 ±0.50
D	18.78 <sup>C</sup> ±0.31	Trace	37.23 <sup>c</sup> ±0.17	3.11 <sup>b</sup> ±0.09	15.79 <sup>c</sup> ±0.16	N.D	25.09 ±0.26
E	17.93 <sup>B</sup> ±0.24	Trace	33.36 <sup>a,b</sup> ±0.20	3.35 <sup>a,b</sup> ±0.10	19.80 <sup>a</sup> ±0.27	N.D	25.56 ±0.34

<sup>A,B,C</sup> Means with different superscripts within groups are different (p < 0.05) <sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts within groups are different (p < 0.01). The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests. N.D: Not detected.

A: Control group.

B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

**Table 16.** Comparison of the effects of caffeine, iron and vitamin E on the major fatty acid compositions of phospholipid in microsomal fraction of pooled liver (%)

Experimental group	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4
A	16.38 <sup>a</sup> ±0.13	Trace	36.04 <sup>a</sup> ±0.25	3.79 <sup>a,b</sup> ±0.04	18.48 <sup>a</sup> ±0.20	N.D	25.31 <sup>A</sup> ±0.33
B	17.28 <sup>b</sup> ±0.18	Trace	36.17 <sup>a</sup> ±0.34	4.18 <sup>a</sup> ±0.09	18.88 <sup>a</sup> ±0.30	N.D	23.49 <sup>B</sup> ±0.27
C	16.21 <sup>a</sup> ±0.17	Trace	35.97 <sup>a</sup> ±0.21	3.22 <sup>c</sup> ±0.06	19.23 <sup>a</sup> ±0.58	N.D	25.37 <sup>A</sup> ±0.44
D	18.23 <sup>c</sup> ±0.26	Trace	39.53 <sup>b</sup> ±0.58	3.12 <sup>c</sup> ±0.04	14.74 <sup>b</sup> ±0.18	N.D	24.38 <sup>B</sup> ±0.17
E	16.78 <sup>a,b</sup> ±0.30	Trace	36.84 <sup>a</sup> ±0.45	3.28 <sup>b,c</sup> ±0.13	19.13 <sup>a</sup> ±0.24	N.D	23.97 <sup>B</sup> ±0.48

<sup>A,B</sup> Means with different superscripts within groups are different (p < 0.05) <sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts within groups are different (p < 0.01). The results are expressed as means ± S.D. obtained from 3 tests. N.D: Not detected.

A: Control group.

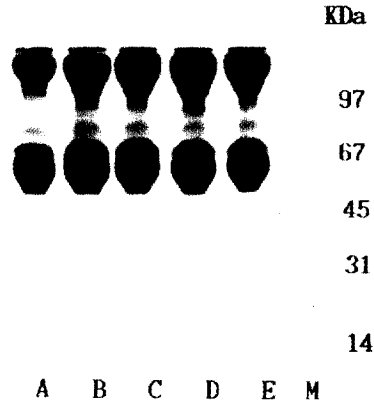
B: Caffeine(25mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

C: Caffeine(50mg/kg body weight) was orally administrated once a day for 30 days.

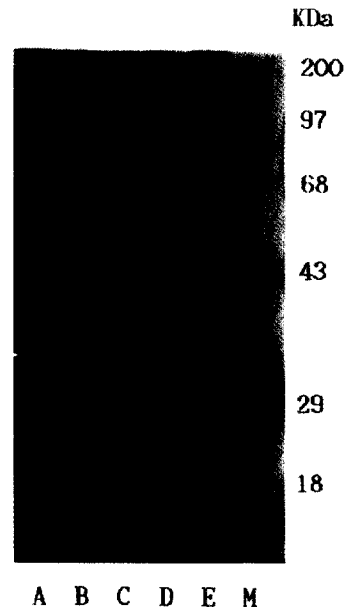
D: Caffeine(25mg/kg body weight) and ferric chloride(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

E: Caffeine(25mg/kg body weight) and vitamin E(25mg/kg body weight) were orally administrated once a day for 30 days.

SDS-PAGE를 이용한 rat의 혈액 및 간조직내의 단백질 분석 : Caffeine 및 caffeine과 철분 또는 caffeine과 vitamin E 동시투여군의 혈청, mitochondria와 microsome 분획의 단백질 전기영동 형태를 비교해본 결과는 Fig 2, Fig 3, Fig 4에서 보는 바와 같이 대조군과 커다란 차이점을 발견할 수 없었다.



**Fig 2.** Comparison of the protein profiles in pooled serum. A: control, B: caffeine(25mg/kg), C: caffeine(50mg/kg), D: caffeine(25mg/kg) & FeCl<sub>3</sub>(25mg/kg), E: caffeine(25mg/kg) & vitamin E(25mg/kg), M: Standard molecular weight marker.



**Fig 3.** Comparison of the protein profiles in mitochondrial fraction of pooled liver. A: control, B: caffeine(25mg/kg), C: caffeine(50mg/kg), D: caffeine(25mg/kg) & FeCl<sub>3</sub>(25mg/kg), E: caffeine(25mg/kg) & vitamin E(25mg/kg), M: Standard molecular weight mark.

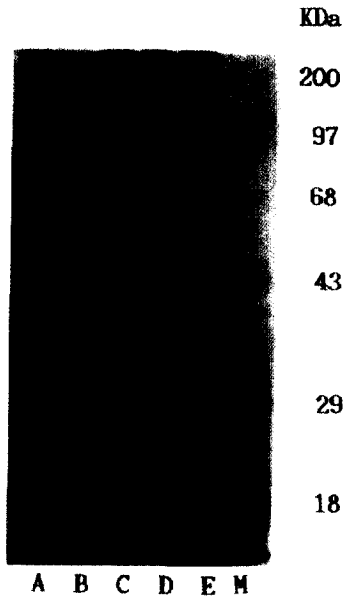


Fig 4. Comparison of the protein profiles in microsomal fraction of pooled liver.

A: control, B: caffeine(25mg/kg), C: caffeine(50mg/kg), D: caffeine(25mg/kg) & FeCl<sub>3</sub>(25mg/kg), E: caffeine(25mg/kg) & vitamin E(25mg/kg), M: Standard molecular weight mark.

## 고찰

동물체내에서 탄수화물과 지질대사에 영향을 미치는 caffeine을 실험동물인 Sprague-Dawley rat(female)에 단독 투여시와 caffeine과 철분 또는 caffeine과 vitamin E를 혼합투여시, 혈액내 일반화학성분과 지질 및 단백질의 과산화물인 malondialdehyde와 carbonyl group의 함량을 분석하고, SDS-PAGE를 이용하여 혈청과 mitochondria 및 microsome 분획의 단백질 구조상의 변화를 관찰함과 아울러 혈청과 간조직내 지방산조성을 비교 분석함으로써 caffeine, 철분 및 vitamin E가 지질 및 단백질 구성성분에 미치는 영향을 확인하기 위하여 본 실험을 수행하게 되었다.

Caffeine과 철분 또는 vitamin E를 30일동안 매일 1회 경구 투여한 후 rat의 증체량을 관찰한 결과(Fig 1), 대조군에 비해 caffeine 투여군에서 증체량이 감소( $p < 0.01$ ) 되었고, caffeine과 철분 동시투여군에서 증체량이 가장 낮았으며 caffeine과 vitamin E 혼합 투여군에서도 대조군에 비해 증체량이 유의성 있게 감소되었다( $p < 0.01$ ). 이는 1987년 Smith 등<sup>60</sup>이 임신 rat에 caffeine을 투여하니 사료섭취량과

증체량이 감소하였고 태아의 장기형성에도 영향을 미쳤다고 보고하였으며 Peters<sup>53</sup>와 Bukowiecki 등<sup>11</sup>이 rat에 caffeine을 투여하니 사료섭취량이 감소하고 parametrial white adipose tissue내 adipocyte수가 감소하고 adipocyte내 triglyceride 함량이 감소되었는데 이는 증체량의 감소와 연관 있다고 보고한 내용과 일치하였으며, caffeine과 철분 동시 투여군에서 증체량이 가장 낮은 것은 caffeine의 lipolysis 작용과 체내 지질에 강력한 산화제인 철분의 oxidative reaction이 복합적으로 작용한 것 때문으로 생각된다.

30일동안 caffeine을 매일 투여한 군에서 혈액성분중 glucose 함량을 분석한 결과(Table 2) 대조군에 비해 glucose 함량이 유의성 있게 높게 나타났다( $p < 0.01$ ). Caffeine과 철분 또는 vitamin E를 동시에 투여한 군에서도 glucose 함량이 유의성 있게 증가되었다( $p < 0.01$ ). 그러나 urea nitrogen, uric acid, creatinine의 함량에는 유의성 있는 함량의 변화가 없었다. 이렇게 caffeine이 투여된 군에서 혈당이 증가하는 것은 Cheraskin 등<sup>13,14</sup>이 사람에게 caffeine을 투여하니 혈당이 2시간 경과시부터 상승하였으며, Oberman 등<sup>49</sup>이 mouse에 caffeine을 1회 투여하니 혈당상승이 180분이상 계속 지속하였다는 보고와 유사한 경향을 보였는데, 이는 체내에 투여된 caffeine이 phosphorylase b를 phosphorylase a로 활성화시켜 glycogen으로부터 glucose 유리를 촉진시킨다는 보고<sup>4,20,34,36,47,63</sup>에서와 같이 caffeine 투여로 인해 cAMP phosphodiesterase 활성이 억제되어 cAMP가 5'AMP로 분해되지 못하여 cAMP가 축적된 결과 때문으로 생각되며, caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여군인 D, E군에서 caffeine 투여군인 B, C군과 유사하게 혈당이 상승하였는데 이와같은 결과는 철분과 vitamin E가 혈당에 직접적인 영향을 미치지 않았기 때문으로 생각된다.

혈청내 total cholesterol과 HDL-cholesterol 함량은(Table 3) caffeine 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 함량증가를 보였고( $p < 0.01$ ), caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여군에서도 caffeine 투여군과 유사한 함량의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 한편 중성지방인 triglyceride 함량은 반대로 caffeine에 의해 함량이 유의성 있게 감소되었으며( $p < 0.01$ ), caffeine과 철분 혼합투여군에서 가장 낮은 함량을 보였다( $p < 0.01$ ). 이는 Akiyanju 등<sup>2</sup>이 rat에 50일동안 coffee가 함유된 사료를 급여했을 때 cholesterol이 대조군에 비하여 높은 함량의 증가를 나타내었다는 보고와, 1969년 Naismith 등<sup>46</sup>이 rat에 coffee를 첨가한 사료를 급여했을 때 caffeine 투여용량이 높을수록 혈청

내 cholesterol 농도가 월등히 증가했다는 보고와 본 실험에서 caffeine이 투여된 군의 cholesterol 함량 증가의 결과가 일치하였으며, caffeine과 철분 또는 vitamin E 투여군에서 철분과 vitamin E는 큰 영향을 미치지 않고 caffeine만이 cholesterol 함량에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이렇게 caffeine이 투여된 군에서 혈청내 cholesterol 함량이 증가하는 것은 caffeine에 의해 혈중에 유리된 free fatty acid가 acetyl-CoA로 대사되어 cholesterol의 주 근원 물질인 mevalonate로 합성<sup>43</sup>되었기 때문에 cholesterol의 함량이 증가한 것으로 생각되며, 실제로 핵을 가진 모든 동물조직 특히 liver, adrenal cortex, skin, intestine, testis 및 aorta에서 cholesterol을 합성할 수가 있으며 세포내 microsome과 cytosol 분획에서 cholesterol 합성이 주로 일어나게 된다. 이렇게 형성된 과잉의 cholesterol은 혈액내 lipoprotein과 결합하여 퇴행성 질환인 동맥경화증(arteriosclerosis)과 관상동맥성 심장병(coronary heart disease) 등을 유발한다는 보고가 있다<sup>43,72</sup>.

한편 중성지방인 triglyceride 함량은 caffeine이 투여된 군에서 유의성 있는 함량의 감소를 보였는데( $p < 0.01$ ), 이는 Akinyanju 등<sup>2</sup>이 rat에게 50일동안 coffee 함유사료를 급여하니 triglyceride 함량이 감소하였다는 보고와, Naismith 등<sup>46</sup>이 rat에 coffee 함유사료를 54일동안 급여시 혈중 triglyceride 함량이 유의성 있게 감소했다는 보고와 일치하였는데 이는 체내에 투여된 caffeine에 의해서 adipose tissue내에 cAMP가 축적됨으로써 저장지방 조직내의 triglyceride로부터 lipolysis가 촉진된 결과로 생각되며, 아울러 caffeine과 철분 동시투여군에서 함량의 감소가 현저했던 것은 철분이 중성지방에 결합되어 있는 다불포화지방산에 peroxidation과 lipolysis를<sup>12,13</sup> 촉매시켰기 때문으로 사료된다.

혈청단백질의 함량(Table 4)은 대조군과 비교할 때 유의성 있는 차이점을 발견할 수 없었으며 또한 혈청내 AST (aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), ALP(alkaline phosphatase)의 효소활성도를 분석한 결과(Table 5)도 대조군에 비해 활성도의 차이가 인정되지 않았다.

혈청내 유리지방산의 함량(Table 6)은 대조군에 비해 caffeine이 투여된 군에서 함량이 증가했으며( $p < 0.01$ ), 인지질의 함량은 전 실험군에서 유의성 있는 함량의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 특히 caffeine과 철분 동시투여군에서는 유리지방산의 함량이 가장 높게 증가되었으며( $p < 0.01$ ), 인지질의 함량은 가장 낮은 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 이외

에 단백질의 손상여부를 확인하기 위하여 carbonyl group을 비교 분석해본 결과 대조군과 유의성 있는 차이점이 없었으며 지질과산화물인 malondialdehyde 함량은 단지 caffeine과 철분 동시투여군에서만 유의성 있는 함량의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 이와같이 혈청내 유리지방산과 인지질의 함량증가는 Akinyanju 등<sup>2</sup>이 50일동안 rat에게 coffee 함유사료를 급여하니 인지질의 함량이 증가했다는 보고와, Naismith 등<sup>46</sup>이 rat에 coffee 함유사료를 54일동안 급여하니 혈청내 인지질의 함량이 증가했다는 보고 그리고 Bellet 등<sup>7,8</sup>이 사람에게 caffeine을 1회 투여하니 혈청내 유리지방산 함량이 투여후 60분부터 180분까지 유의성 있게 증가하였고, Patwardhan 등<sup>51</sup>이 사람에게 caffeine 250mg을 1회 경구투여한 결과, 투여후 4시간까지 혈장 유리지방산의 함량이 증가하였다는 보고, Feinberg 등<sup>18</sup>이 사람에게 coffee를 섭취시키니 혈청내 유리지방산의 함량이 투여 후 3시간 경과시에 유의성 있게 증가했다는 보고와 유사한 결과를 보였다. 이렇게 혈청내 유리지방산과 인지질의 함량이 caffeine 투여군에서 증가하는 것은 caffeine에 의해 cAMP phosphodiesterase 활성이 억제됨으로써 cAMP로부터 5'AMP로 degradation 되는 것을 차단하여 cAMP가 축적됨으로써 lipolysis가 촉진되어 triglyceride로부터 지방산이 유리되는 것에<sup>9,12</sup> 기인하는 것으로 사료된다. 한편 caffeine과 철분 혼합투여군에서 malondialdehyde 함량과 유리지방산의 함량증가가 가장 현저하였고 인지질의 함량증가가 낮은 것은 강력한 산화제인 철분이 체내 불포화지방산과 세포막 인지질에 peroxidation을 촉진시켜<sup>22,33</sup> 지질과산화물인 malondialdehyde 생성이 증가됨으로써 세포막 주성분인 인지질 함량이 caffeine 투여로 인한 증가효과를 둔화시킨 결과 때문으로 생각된다.

간균질액과 간세포소기관인 mitochondria와 microsome 분획에 대한 carbonyl group의 영향을 조사해 본 결과(Table 7) caffeine과 철분 동시투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 함량의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 이렇게 carbonyl group 함량이 증가한 것은 체내에 투여된 철분에 의하여 유도된 free radical에 의하여 단백질의 산화적 손상과 lipid peroxidation의 촉진에<sup>62,67,72</sup> 기인한 것으로 사료된다. 또한 간균질액과 mitochondria와 microsome 분획에서 malondialdehyde 함량의 변화를 조사한 결과(Table 8) caffeine과 철분 혼합투여군에서 유의성 있는 함량의 증가를 보였는데( $p < 0.01$ ), 이는 철분투여나 vitamin E 결핍으로 인해 적혈구막 및 세포막의 주요 구성성분인 인지질에 결합



된 다불포화지방산이 비효소성 과산화작용을 받아 이중결합 부분이 절단되어 TBA(thiobarbituric acid)반응을 나타내는 짧은 사슬의 malondialdehyde가 많이 생성되었기<sup>12,30</sup> 때문으로 사료된다.

혈청내 유리지방산과 인지질의 지방산조성을 gas chromatography로 비교해본 결과 유리지방산의 지방산조성은 (Table 9) stearic acid와 arachidonic acid가 caffeine 투여군인 B, C군과 caffeine과 철분 또는 vitamin E 동시투여군인 D, E군에서 조성비율이 증가했으며( $p < 0.01$ ), oleic acid와 linoleic acid는 B, C군에서 조성비율이 감소되었고( $p < 0.01$ ) D, E군에서도 비율이 감소를 보였다( $p < 0.01$ ). 한편 혈청내 인지질의 지방산 조성은(Table 10) 유리지방산과 유사하게 stearic acid와 arachidonic acid가 B, C군과 D, E군에서 유의성 있는 조성비율의 증가를 보였으며( $p < 0.01$ ), oleic acid와 linoleic acid는 대조군에 비해 B군, C군, D군, E군에서 비율의 감소를 보였다( $p < 0.01$ ).

간균질액과 mitochondria 및 microsome내 유리지방산의 지방산조성을 비교해본 결과(Table 11, 12, 13), caffeine 투여군(B군, C군)에서 total homogenate와 mitochondria내 oleic acid의 지방산 비율이 유의성 있게 감소되었으며( $p < 0.01$ ) microsome에서는 감소경향을 보였다. total homogenate, mitochondria, microsomal fraction에서 arachidonic acid(20:4)는 C군에서 함량비율이 증가되었다( $p < 0.01$ ). Caffeine과 철분 동시투여군(D군)은 total homogenate 및 microsomal fraction내에서 palmitic acid 조성비율이 증가하였고( $p < 0.01$ ) mitochondria에서는 증가경향을 나타내었으며 또한 linoleic acid도 total homogenate, mitochondria, microsomal fraction에서 비율이 증가됨을 알 수 있었으며( $p < 0.01$ ), stearic acid는 total homogenate와 mitochondria에서 감소경향을 보였고 microsome에서 유의성 있게 감소되었다( $p < 0.01$ ). 한편 D군에서 oleic acid의 조성비율은 mitochondrial fraction에서 감소하였으나 microsomal fraction에서는 오히려 증가되었다( $p < 0.01$ ). E군에서 유리지방산의 조성변화는 stearic acid가 mitochondria와 microsome에서 비율의 감소를 나타내었으며(\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ ) total homogenate에서도 감소경향을 보였으며, linoleic acid는 total homogenate, mitochondria, microsome에서 오히려 조성비율이 증가되었다( $p < 0.01$ ).

한편 간균질액과 mitochondria, microsome 분획의 인지질내 주요 지방산의 조성을 비교해본 결과(Table 14, 15,

16), caffeine 단독투여군에서 지방산의 조성비율 변화가 total homogenate와 mitochondria 그리고 microsome에서 서로 일치하지 않았으며, D군에서 palmitic acid는 total homogenate, mitochondria, microsomal fraction에서 조성비율이 유의성 있는 증가를 보였고(\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ ), stearic acid도 유의성 있는 비율의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 그러나 불포화지방산인 oleic acid는 total homogenate, mitochondria와 microsome에서 비율이 감소되었으며(\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ ), linoleic acid도 유의성 있는 비율의 감소를 보였다( $p < 0.01$ ). E군의 total homogenate와 microsome 분획에서 arachidonic acid도 함량비율이 감소되었으며(\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ ) mitochondria에서는 감소경향을 보였다.

지금까지 caffeine 및 caffeine과 철분 또는 vitamin E 투여로 인한 혈액과 간조직내 유리지방산과 인지질의 지방산조성을 비교분석한 연구가 부족한 실정이지만, 본 실험에서의 결과를 분석해 보면 caffeine에 의해 혈액내 총유리지방산과 인지질 함량은 증가하고 이들 지방을 구성하는 지방산의 조성비율이 혈액과 간조직에서 다소 다른 양상을 보이고 있음을 알 수 있는데, 이는 caffeine 자체가 체내 지방조직에 oxidant로 작용하여 유리지방산과 인지질을 구성하는 불포화지방산에 peroxidation과정을 거치는 반응에 기인하는 것이 아니라 지방조직의 triglyceride와 lipoprotein의 lipolysis와 hydrolysis에 의해 유리되는 유리지방산과 인지질의 비율과 혈중에 유리된 유리지방산과 인지질을 간장에서 분해 합성하는 과정에서 혈액과 간장조직의 유리지방산과 인지질을 구성하고 있는 지방산 조성비율의 차이에 기인한 것이라 추정되며, 혈액내 유리지방산과 인지질의 지방산 조성분석에서 linoleic acid의 비율이 현저히 감소하고 arachidonic acid의 비율이 증가한 것은 microsomal chain elongation 또는 desaturase system에 의해 촉매되는  $\omega^6$  series의 linoleic acid가 arachidonic acid로 생합성이<sup>42</sup> 되었기 때문으로 사료된다. 또한 caffeine과 철분 투여군의 혈액과 간조직내 인지질 지방산 조성에서 불포화 지방산인 oleic acid와 linoleic acid의 조성비율이 대조군에 비해 현저히 감소하고 포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid의 비율이 증가하는 것으로 보아 caffeine과 철분 혼합투여군에서 철분이 caffeine의 lipolysis 작용에 하나의 oxidant로 추가작용하여 불포화지방산의 nonenzymatic peroxidation을 가속화시켜<sup>22,33</sup> 포화지방산의 조성비율이 증가하고 있는 것으로서 혈액과 조직중

에서 지질과산화물인 malondialdehyde 함량이 이 군에서 증가한 것은 이를 뒷받침 해주고 있다. 그러나 특이하게 간조직내 유리지방산의 지방산조성을 확인해본 결과, caffeine과 철분 혼합투여군에서 불포화지방산인 linoleic acid의 비율이 증가한 반면 포화지방산인 stearic acid의 비율이 감소한 결과를 보인 것은 adipose tissue에서 lipolysis 과정을 거쳐 다량 생산된 유리지방산과 더불어 혈액내 과량 유리된 glucose에서 생성된 acetyl-CoA가 간장에서의 lipogenesis 과정과 인지질의 합성 및 cholesterol의 합성이<sup>42,43</sup> 활발히 일어난 결과 때문에 혈액과 간조직간에 지방산의 조성비율이 차이가 난 것으로 사료된다.

혈액과 간세포소기관에서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 단백질 손상여부를 관찰한 결과(Fig 2, 3, 4), 실험동물인 rat에 caffeine과 철분 또는 vitamin E 처리군의 혈액과 간세포소기관에서 뚜렷한 단백질의 산화적 손상을 관찰할 수 없었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 caffeine은 동물체내 혈액과 간조직 및 간세포소기관에서 탄수화물과 지질 구성성분에 많은 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었으며 특히 caffeine 투여로 인하여 혈액내 glucose, cholesterol, free fatty acid, phospholipid의 함량을 상승시키고 triglyceride 함량을 감소시키며, caffeine 자체는 혈액과 간조직 및 간세포소기관내 malondialdehyde와 carbonyl group 함량에는 영향을 미치지 않았으나 철분은 malondialdehyde 함량을 증가시켰으며, 철분과 vitamin E는 caffeine의 작용에 직접적인 영향은 미치지 않고 다만 철분이 지질성분에 부가적으로 하나의 oxidant로 작용하고 있음을 관찰할 수 있었다. 본 실험을 통하여 지금까지 연구가 미흡한 혈액과 간조직의 인지질과 유리지방산을 구성하고 있는 지방산조성을 관찰한 결과, caffeine은 혈액 뿐만아니라 탄수화물과 지질 및 단백질 합성과 분해의 주기관인 간장의 지방산성분에도 영향을 미치고 있음을 알 수 있었으며, SDS-PAGE를 통해 단백질 구성성분의 손상을 조사한 결과 동물체내 단백질 구성성분에는 caffeine이 직접적인 영향을 미치지 않고 있음을 확인할 수 있었다.

## 결 론

Caffeine 및 caffeine과 철분 또는 caffeine과 vitamin E를 Sprague-Dawley rat(female)에 경구투여시 혈액과 간조직에서의 지질과 단백질 구성성분에 미치는 영향을 살펴보

기 위하여 대조군(A군), caffeine(25mg/kg, 50mg/kg) 단독투여군(B군, C군), caffeine(25mg/kg)과 철분(25mg/kg) 혼합투여군(D군) 그리고 caffeine(25mg/kg)과 vitamin E(25mg/kg) 혼합투여군(E군)으로 나누어 30일 동안 매일 1회 경구투여 하였다.

혈액내 glucose, urea nitrogen, uric acid, creatinine, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, total protein 및 albumin 함량과 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)와 alkaline phosphatase(ALP)효소의 활성치를 측정하고, 혈액내 free fatty acid와 phospholipid 함량을 비교 분석함과 아울러 혈액과 간조직내 carbonyl group과 malondialdehyde 함량을 분석하였다. 그리고 혈액과 간세포소기관의 구성단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 조사하여 단백질의 산화적 손상여부와 지질과 산화물에 미치는 영향을 조사하였으며, 혈액과 간조직 및 간세포소기관의 유리지방산과 인지질을 구성하고 있는 지방산의 조성을 분석하였다.

1. 증체량 변화: 만성실험군의 증체량은 대조군(A군)에 비해 caffeine 투여군(B, C군), caffeine과 철분 혼합투여군(D군), caffeine과 vitamin E 혼합투여군(E군)에서 유의성 있는 증체량 감소( $p < 0.01$ )를 관찰할 수 있었으며, D군의 증체량이 가장 낮게 나타났다( $p < 0.01$ ).

2. 혈액내 glucose 함량은 A군이 101.5mg/dl 인데 비하여 B군, C군, D군, E군에서 124.5, 130.1, 122.1, 119.3mg/dl로 함량이 증가하였으며( $p < 0.01$ ), urea nitrogen, uric acid, creatinine 함량에는 유의성 있는 차이점이 없었다.

3. Total cholesterol과 HDL-cholesterol 함량은 A군(52.6, 38.8mg/dl)에 비해 B군(69.6, 53.4mg/dl), C군(73.0, 56.3mg/dl), D군(68.9, 51.1mg/dl), E군(68.2, 51.3mg/dl)에서 유의성 있게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), triglyceride 함량은 A군(66.2mg/dl)에 비하여 B군(45.0mg/dl), C군(40.4mg/dl), D군(33.8mg/dl), E군(47.2mg/dl)에서 감소하였다( $p < 0.01$ ). 한편 혈청단백질과 ALT, AST, ALP의 활성도에는 유의성 있는 변화가 없었다.

4. 혈청내 free fatty acid와 phospholipid 함량은 A군(35.2, 125.3mg/dl)에 비해 B군(45.7, 154.4mg/dl), C군(50.0, 167.2mg/dl), D군(52.5, 148.4mg/dl), E군(41.1, 159.2mg/dl)에서 증가를 보였으며( $p < 0.01$ ), carbonyl group과 malondialdehyde 함량은 D군에서 A군(1.53, 0.35nM/

mg protein)에 비해 1.82, 0.52nM/mg protein으로 유의성 있는 함량의 증가를 보였다( $p < 0.01$ ).

5. 간균질액, mitochondria, microsome분획내 carbonyl group 함량은 D군에서 A군(1.16, 0.66, 1.27nM/mg protein)에 비해 1.45, 0.94, 1.67nM/mg protein으로 증가했으며( $p < 0.01$ ). malondialdehyde 함량도 D군에서 A군(5.17, 3.64, 0.68nM/mg protein)에 비해 6.70, 6.10, 1.36nM/mg protein으로 유의성 있는 증가를 보였다( $p < 0.01$ ).

6. 혈청내 유리지방산과 인지질의 지방산조성을 비교해본 결과, 유리지방산의 지방산 조성은 stearic acid(18:0)와 arachidonic acid(20:4)가 A군(14.75, 7.88%)에 비해 B군(16.52, 12.62%), C군(17.52, 15.18%), D군(19.73, 13.47%), E군(17.62, 13.28%)에서 조성비율이 증가했으며( $p < 0.01$ ), oleic acid(18:1)와 linoleic acid(18:2)는 A군(16.44, 35.12%)에 비해 B군(12.97, 32.59%), C군(10.88, 31.23%), D군(12.37, 30.66%)과 E군(11.95, 32.41%)에서 비율의 감소를 보였다( $p < 0.01$ ). 한편 혈청내 인지질의 지방산 조성은 stearic acid와 arachidonic acid가 A군(37.74, 14.24%)에 비해 B군(39.37, 16.39%), C군(40.63, 17.83%), D군(42.73, 15.39%) 및 E군(39.16, 15.70%)에서 유의성 있는 비율의 증가를 보였으며( $p < 0.01$ ), 불포화 지방산인 oleic acid와 linoleic acid는 A군(5.53, 16.14%)에 비해 B군(4.03, 14.38%), C군(3.54, 12.38%), D군(4.52, 11.68%), E군(4.29, 13.64%)에서 모두 조성비율이 감소하였다( $p < 0.01$ ).

7. 간균질액과 mitochondria 및 microsome내 유리지방산의 지방산조성을 비교해본 결과, oleic acid(18:1)의 지방산비율이 A군(8.67, 10.08, 7.81%)에 비하여 B군(7.81<sup>\*</sup>, 8.73<sup>\*\*</sup>, 6.88%), C군(6.89<sup>\*\*</sup>, 7.75<sup>\*\*</sup>, 6.58%)에서 유의성 있는 감소를 보였으며( $**p < 0.01$ ), arachidonic acid(20:4)는 C군에서 A군(20.93, 18.47, 22.24%)에 비하여 함량비율이 증가(22.62, 19.79, 23.71%)하였다( $p < 0.01$ ). D군에서 palmitic acid(16:0)는 A군(24.43, 25.42, 23.34%)에 비해 비율이 모두 증가(25.95<sup>\*\*</sup>, 26.16, 26.34<sup>\*\*</sup>%)했고( $**p < 0.01$ ), linoleic acid(18:2)도 A군(22.17, 23.75, 21.26%)에 비해 비율이 증가(23.43, 25.02, 23.95%) 했다( $p < 0.01$ ). Mitochondria와 microsome의 D군에서 stearic acid(18:0)의 비율은 A군(21.01, 24.18%)에 비하여 감소(19.87, 19.76<sup>\*\*</sup>%)되었으며( $**p < 0.01$ ), E군에서도 stearic acid(18:0)는 mitochondria와 microsome에서 A군(21.01, 24.18%)에 비해 유의성 있게 비율이 감소(16.71<sup>\*</sup>, 19.

65<sup>\*\*</sup>%) 했으며( $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ), linoleic acid(18:2)는 total homogenate, mitochondria, microsome에서 A군(22.17, 23.75, 21.26%)에 비해 오히려 비율이 증가(25.04, 29.20, 26.48%) 하였다( $p < 0.01$ ).

8. 간균질액과 mitochondria, microsome 분획의 인지질내 주요 지방산의 조성을 비교해본 결과 D군에서 palmitic acid(16:0)는 A군(16.28, 17.22, 16.38%)에 비해 조성비율의 유의성 있는 증가(17.58<sup>\*\*</sup>, 18.78<sup>\*</sup>, 18.23<sup>\*\*</sup>%)를 보였고( $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ), stearic acid(18:0)도 A군(34.18, 34.16, 36.04%)에 비해 유의성 있는 비율의 증가(36.41, 37.23, 39.53%)를 보였다( $p < 0.01$ ). 그러나 oleic acid(18:1)와 linoleic acid(18:2)는 A군(18:1-3.63, 3.72, 3.79%, 18:2-20.03, 18.71, 18.48%)에 비해 유의성 있는 비율의 감소(18:1-3.41<sup>\*</sup>, 3.11<sup>\*\*</sup>, 3.12<sup>\*\*</sup>%, 18:2-18.03<sup>\*\*</sup>, 15.79<sup>\*\*</sup>, 14.74<sup>\*\*</sup>%)를 보였다( $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ).

9. SDS-PAGE를 통해 혈액과 간세포소기관의 단백질 손상여부를 관찰한 결과 단백질의 산화적 손상을 관찰할 수 없었다.

## 참 고 문 헌

1. Acheson KJ, Markiewicz BZ, Anantharaman K, et al. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *Am J Clin Nutr*, 33:989-997, 1980.
2. Akinyanju P, Yudkin J. Effect of coffee and tea on serum lipids in the rat. *Nature*, 214:426-427, 1967.
3. Alexander F. An introduction to veterinary pharmacology. 3rd ed. London, Churchill livingstone, 144-147, 1976.
4. Anderson J, Hollifield GH, Owen JA. The effect of caffeine, deoxyribose nucleic acid and insulin on the metabolism of glucose by adipose tissue *in vitro*. *Metabolism*, 15:30-38, 1966.
5. Banner W, Czajka PA. Acute caffeine overdose in the neonate. *Am J Dis Child*, 134:495-498, 1980.
6. Bellet S, Feinberg LJ, Sandberg H, et al. The effect of caffeine on free fatty acids and blood coagulation parameters of dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 159:250-254, 1968.

7. Bellet S, Kershbaum A, Aspe J. The effect of free fatty acids. *Arch Intern Med*, 116:750-752, 1965.
8. Bellet S, Kershbaum A, Finck EM. Response of free fatty acids to coffee and caffeine. *Metabolism*, 17: 702-707, 1968.
9. Blecher MB, Merlino NS, Ro'Ane JT. Control of the metabolism and lipolytic effects of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in adipose tissue by insulin, methyl xanthines, and nicotinic acid. *JBC*, 243:3973-3977, 1968.
10. Boyd EM. The acute oral toxicity in guinea pigs of acetylsalicylic acid, phenacetin, and caffeine, alone and combined. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2:23-32, 1960.
11. Bukowiecki LJ, Lupien J, Follea N. Effects of sucrose, caffeine, and cola beverages on obesity, cold resistance, and adipose tissue cellularity. *Am J Physiol*, 244:R500-R507, 1983.
12. Carpenter MP. The lipid composition of maturing rat testis. *Biochem Biophys Acta*, 231:52-79, 1971.
13. Cheraskin E, Ringsdorf WM, Barrett RA. Effect of caffeine versus placebo supplementation on blood-glucose concentration. *Lancet*, 1:1299-1300, 1967.
14. Cheraskin E, Ringsdorf WM. Blood-glucose levels after caffeine. *Lancet*, 2:689, 1968.
15. Clark WG, Craig brater D, Johnson AR. Goth's medical pharmacology. St. Louis, The C V Mosby Company, 302-307, 1988.
16. Clozel M, Branchaud CL, Tannenbaum GS, et al. Effect of caffeine on thyroid and pituitary function in newborn rats. *Pediatr Res*, 17:592-595, 1983.
17. DeCastro O, Sandberg H, Feinberg LJ, et al. Effects of various routes of caffeine administration on oral and intravenous glucose tolerance tests in dogs. *Metabolism*, 18:163-171, 1969.
18. Feinberg LJ, Sandberg H, DeCastro O, et al. Effects of coffee injection on oral glucose tolerance curves in normal human subjects. *Metabolism*, 17: 916-922, 1968.
19. Gilbert NC, Dey F, Trump R. The effect of the methylated xanthines on the clotting time of the blood. *J Lab Clin Med*, 32:28-33, 1947.
20. Gilboe DP, Nuttall FQ. Stimulation of liver glycogen particle synthase D phosphatase activity by caffeine, AMP, and glucose 6-phosphate. *Arch Biol Biophys*, 219:179-185, 1982.
21. Gilboe DP. The mechanism of caffeine-enhanced glucose stimulation of liver glycogen synthase phosphatase activity. *Biochem Pharmacol*, 35:2097-2105, 1986.
22. Golberg L, Martin LE, Batchelor A. Biochemical changes in the tissues of animals injected with iron. *Biochem J*, 82:291-297, 1962.
23. Hanahan DJ, Dittmer JC, Waraschina EA. A column chromatographic separation of classes of phospholipids. *JBC*, 226:685-700, 1957.
24. Hartley R, Smith LJ, Cookman JR. Improved HPLC method for the simultaneous determination of caffeine and its N-demethylated metabolites in plasma using solid-phase extraction. *J Chromatogram*, 342: 105-117, 1985.
25. Heaney RP, Recker RR. Dietary caffeine and calcium excretion. *Nutritional Review*, 46:232-234, 1988.
26. Heyden S, DeMaria W, Johnston WW, et al. Caffeine effects on cholesterol and development of aortic and coronary atherosclerosis in rabbits. *J Chron Dis*, 21:677-685, 1969.
27. Hoff W. Caffeine in pregnancy. *The Lancet*, 1: 1(8279):1020, 1982.
28. Hogeboom GH. In methods in enzymology. Vol 1. New York, Academic Press, 16-19, 1955.
29. Hooser SB, Beasley VR. Current veterinary therapy - methylxanthine poisoning(chocolate and caffeine toxicosis). Philadelphia, WB Saunders Co, 191-192, 1986.
30. Jacob HS, Lux SE. Degradation of membrane phospholipids and thiols in peroxide hemolysis-studies in vitamin E deficiency. *Blood*, 32:549-568, 1968.
31. James EF. The extra pharmacopoeia. 29th ed. London, The pharmaceutical press, 1521-1524, 1989.
32. Johansson S. Cardiovascular lesions in sprague-daw-

- ley rats induced by long-term treatment with caffeine. *Acta Path Microbiol Scand Sect A*, 89:185-191, 1981.
33. Kaneko JJ. Clinical biochemistry of domestic animals, New York, Academic Press, 256-273, 1989.
  34. Kasvinsky PJ, Fletterick RJ, Madsen NB. Regulation of the dephosphorylation of glycogen phosphorylase a and synthase b by glucose and caffeine in isolated hepatocytes. *Can J Biochem*, 59:387-395, 1981.
  35. Kasvinsky PJ, Schechosky S, Fletterick RJ. Synergistic regulation of phosphorylase a by glucose and caffeine. *JBC*, 253:9102-9106, 1978.
  36. Kuftinec DM, Mayer J. Extreme sensitivity obese hyperglycemic mice to caffeine and coffee. *Metabolism*, 13:1369-1375, 1964.
  37. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 27:680-685, 1970.
  38. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Methods Enzymol*, 186:464-478, 1990.
  39. Lillemoen KD, Magnuson TH, High RC, et al. Caffeine prevents cholesterol gallstone formation. *Surgery*, 106:400-407, 1989.
  40. Lindy Miller. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids as a bacterial identification aid. *Hewlett Packard application note*, 228:1-7, 1984.
  41. Lopes JM, Aubier M, Jardim J, et al. Effect of caffeine on skeletal muscle function before and after fatigue. *J Appl Physiol*, 54:1303-1305, 1983.
  42. Mayers PA. Harper's review of biochemistry. 20th ed. California, Lange Medical publication, 232-236, 1983.
  43. Mayers PA. Harper's review of biochemistry. 20th ed. California, Lange Medical publication, 249-256, 1983.
  44. Mitchell MC, Hoyumpa AM, Schenker S, et al. Inhibition of caffeine elimination by short-term ethanol administration. *J Lab Clin Med*, 101:826-834, 1983.
  45. Murphy ME, Kehrler JP. Lipid peroxidation inhibitory factors in liver and muscle of rat, mouse and chicken. *Arch Biochem Biophys*, 268:585-593, 1989.
  46. Naismith DJ, Akinyanju PA, Yudkin J. Influence of caffeine-containing beverages on the growth, food utilization and plasma lipids of the rat. *J Nutr*, 97:375-381, 1969.
  47. Nehlig A, Daval JL, Boyet S, et al. Comparative effects of acute and chronic administration of caffeine on local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *Europ J Pharmacol*, 129:93-103, 1986.
  48. Nishimura H, Nakai K. Congenital malformations in offspring of mice treated with caffeine. *Proc Soc Exp Biol Med*, 104:140-142, 1960.
  49. Oberman Z, Harell A, Herzberg M, et al. Changes in plasma cortisol, glucose and free fatty acids after caffeine ingestion in obese women. *Isr J Med Sci*, 11:33-36, 1975.
  50. Okawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-358, 1978.
  51. Patwardhan RV, Desmond PV, Johanson RF, et al. Effect of caffeine on plasma free fatty acids, urinary catecholamines, and drug binding. *Clin Pharmacol Ther*, 28:398-403, 1980.
  52. Peter JM, Boyd EM. The influence of sex and age in albino rats given a daily oral dose of caffeine at a high dose level. *Canad J Physiol Pharmacol*, 45:305-311, 1967.
  53. Peter JM. Caffeine toxicity in starved rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 9:390-397, 1966.
  54. Renner E, Wietholtz H, Huguenin P, et al. Caffeine: A model compound for measuring liver function. *Hepatology*, 4:38-46, 1984.
  55. Ruby DR, Lee S. Coffee and hypokalemia. *J Fam Pract*, 26:679-680, 1988.
  56. Scherf D, Schlachman M. The effect of methyl xanthines on the prothrombin time and the coagulation of the blood. *Amer J Med Sci*, 212:83-89, 1946.
  57. Schlosberg AJ. Acute and chronic effects of caffeine

- on brain monoamine levels and endocrine function in the rat. *Arch Int Pharmacodyn*, 267:149-160, 1984.
58. Scott NR, Chakraborty J, Marks V. Determination of the urinary metabolites of caffeine and theophylline by HPLC. *J Chromatogram*, 375:321-329, 1986.
  59. Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reaction in rat liver fraction *in vitro*. *Biochem J*, 123:805-814, 1971.
  60. Smith SE, McElhatton PR, Sullivan FM. Effects of administrating caffeine to pregnant rats either as a single daily dose or as divided doses four times a day. *Food Chem Toxicol*, 25:125-133, 1987.
  61. Song CS, Lee TC. Effect of chemical inactivants on viral polypeptide of newcastle disease virus. *Res Rept RDA(V)*, 30:77-89, 1988.
  62. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *JBC*, 266:2005-2008, 1991.
  63. Steinfelder HJ, Petho-Schramm S. Methylxanthines inhibit glucose transport in rat adipocytes by two independent mechanism. *Biochem Pharmacol*, 40: 1154-1157, 1990.
  64. Takayama S, Kuwabara N. Long-term study on the effect of caffeine in wister rats. *Gann*, 73:365-371, 1982.
  65. Tappel AJ. Biological antioxidant protection against lipid peroxidation damage. *Am J Clin Nutr*, 23:1137-1139, 1970.
  66. Tappel AL. Vitamin E and selenium protection from *in vivo* lipid peroxidation. New York, Ana NY Acad Press, 355:18-31, 1980.
  67. Tappel AT. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc*, 32:1870-1874, 1973.
  68. Trang JM, Blanchard J, Conrad KA, et al. The effect of vitamin C on the pharmacokinetics of caffeine in elderly men. *Am J Clin Nutr*, 35:487-494, 1982.
  69. Whiting SJ, Whitney HL. Effect of dietary caffeine and theophylline on urinary calcium in the rat. *J Nutr*, 117:1224-1228, 1987.
  70. Yeh JK, Aloia JF, Semla HM, et al. Influence of injected caffeine on the metabolism of calcium and the retention and excretion of sodium, potassium, phosphorus, magnesium, zinc and copper in rats. *J Nutr*, 116:273-280, 1986.
  71. Yoshioka T, Motoyama H, Yamasaki F, et al. Protective effect of vitamin E against lipoperoxides in developing rats. *Biol Neonate*, 51:170-176, 1987.
  72. 김세권. 생화학. 서울, 청문각, 149-172, 1993.
  73. 정명희. 산소는 언제나 유익한 것인가. 서울, 의학종설, 1:24-41, 1990.
  74. 정해영. 활성산소, 암, 노화. 서울, 의학종설, 2:25-53, 1991.
  75. 조재영, 장권열. 실험통계분석법. 10판. 서울, 향문사, 104-106, 1986.
  76. 허린수, 김성훈, 모기철, 박항균. 혈청 및 적혈구 막 내 인지질의 직접 비색정량방법. 경북대농학지, 2: 73-79, 1984.
  77. 허린수, 김영홍, 도재철, 최연식. 탈지사료 및 철분 투여가 Rat에 있어서 지질과산화에 미치는 영향. 한국노화학회지, 1:92-97, 1991.