

갈근에서 분리한 Daidzin 및 Puerarin의 사람 Low Density Lipoprotein 대한 항산화 효과

박종옥* · 김경순** · 지영애*** · 류병호†

경성대학교 식품공학과, *경성대학교 화학과
명지대학교 화학과, *부산지방식품의약품청

Antioxidant Activity of Daidzin and Puerarin toward Oxidation of Human Low Density Lipoprotein

Chong-Ok Park*, Kyung-Soon Kim**, Young-Ae Ji*** and Beung-Ho Ryu†

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

*Dept. of Chemistry, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

**Dept. of Chemistry, Myongji University, Yongin 449-728, Korea

***Pusan Regional Food and Drug Administration Office, Pusan 608-080, Korea

Abstract

Antioxidative activity of daidzin and puerarin isolated from *Puerariae radix* against oxidation of low density lipoprotein(LDL) was investigated. The concentration of daidzin at 100µg/ml and puerarin at 60µg/ml inhibited Cu²⁺-mediated oxidation of LDL almost completely. The electrophoretic mobility of oxidized LDL by addition of daidzin(100µg/ml) and puerarin(60µg/ml) was faster than that of native LDL, but slower than that of oxidized LDL. The oxidized LDL induced by J774 or macrophage was inhibited strongly in the presence of 100µg/ml daidzin and 60µg/ml puerarin. The formation of conjugated dienes in the oxidized LDL was strongly inhibited by 100µg/ml daidzin and 60µg/ml puerarin.

Key words: daidzin, puerarin, antioxidative effect, low density lipoprotein(LDL)

서 론

갈근(*Puerariae radix*)은 콩과에 속하는 낙엽성 다년생 식물덩굴로 산과 들에 자생하고 있으며 주로 한국, 중국, 대만, 일본 등지에 분포되어 있다.

갈근은 뿌리를 밥이나 죽에 넣어 먹기도 하고 콩깍지, 메밀꽃 및 콩잎 등과 섞어서 미숫가루로 만들어 구황식품(救荒食品)으로 이용되었다는 기록이 있다(1).

갈근의 효과에 관해서 한방에서는 숙취, 감기, 해열, 진통약으로 쓰이며 하혈, 구갈 및 두통을 다스린다고 하였다. 또한 꽃과 뿌리를 함께 달여 마시면 술 중독과 기타 중독에 유효하다고 하였다(2,3).

갈근의 성분으로는 일반성분 이외에도 daidzin, genistein, puerarol, kakkonein 등의 성분이 들어 있다(4). 특히 갈근에 들어 있는 isoflavonoid류인 daidzein, daidzin, puerarin, puerarin-7-xyloside 등 이들 성분은 기원식물,

산지, 채취시기, 부위 및 조제방법에 따라 성분 함량에 큰차이가 있는 것으로 알려져 있다(5-8).

특히 갈근에 들어있는 flavonoid는 새로운 alcohol-dehydrogenase inhibitor와 human mitochondrial dehydrogenase inhibitor로 보고되어 있으며 갈근의 pueraria glycoside는 과산화 지질의 억제효과가 있는 것으로 알려져 있다(9-11).

Flavonoid는 식물계에 널리 분포되어 있는 성분으로 superoxide anion(12,13), hydroxy radical(12) 및 peroxy radical(14,15), 지질의 과산화 억제(16,17) plasma low density lipoprotein(LDL) 항산화효과(18-23)에 대한 연구 보고가 있다. 사람이 식품으로서 매일 플라보노이드를 섭취하고 있으나 대사의 메카니즘에 대하여 잘 알려져 있지 않다. 그러나 옛날부터 오랫동안 식품으로 섭취하였으므로 독성이 없으며 소화관에서 흡수된 후 대사되어 우리의 건강에 중요한 역할을 할 것으로 기

† To whom all correspondence should be addressed

대된다(24-26).

플라보노이드는 식물성 성분으로 다양한 구조적 특성을 가지고 있으며 벤젠환(環)의 탄소에 -OH기와 탄소의 2와 3의 위치에 2중결합, 탄소 4번 위치에 카보닐기와 A와 B환에 결합되어 있는 -OH기에 의하여 항산화 활성을 갖는다(27,28). 체내에 흡수된 플라보노이드는 폴리 페놀기가 절단되어 glycosidic형으로 변하여 생리활성을 갖는 기능성 화합물이다(27,28). Bravo 등(24)은 쥐를 이용한 폴리페놀 화합물의 흡수 및 대사 실험에서 소화관을 통하여 흡수된 후 분해된다는 사실을 일부 규명하였고, 한편으로는 지질대사의 산화를 억제한다는 사실이 밝혀졌다(25). 따라서 본 연구는 같은데 들어 있는 isoflavonoid인 daidzin 및 puerarin를 분리·정제하여 LDL의 항산화 효과에 대하여 실험하였다.

재료 및 방법

재료

갈근(*Puerariae radix*)는 부산 인근 야산에서 채집하여 그늘에서 말린 뒤 사용하였다.

시약 및 기기

Daidzin 및 puerarin의 표준품은 Sigma Co.에서 구입하였다.

Chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(230 mesh, Merck Co. vo. 7734)를 사용하였고, 추출시 사용된 용매는 시약 특급을 사용하였다.

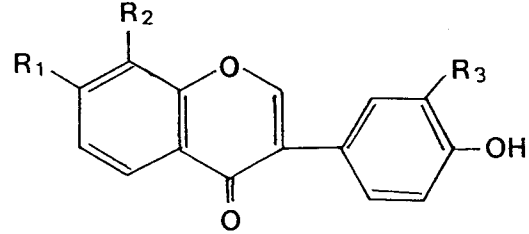
IR spectrum은 Perkin-Elmer 841, NMR spectrum은 Bruker AM 300 spectrometer로서 DMSO-d₆ 용매에 녹여 사용하였다.

추출 및 분리

음건 후 세절한 갈근(1.5kg)을 수욕상에서 환류 냉각기를 부착하여 methanol로서 3회 연속 추출하여 여과하였다. 추출물은 감압농축한 후 10% methanol에 현탁시켜 잔사를 제거한 다음 CHCl₃, ethylacetate, n-butanol 및 수층으로 분획하였다. 이중 n-butanol획분을 silica gel column chromatography로서 CHCl₃-MeOH-H₂O(6 : 2 : 1, 하층), CHCl₃-MeOH-H₂O(60 : 35 : 10, 하층)의 용출용매로 isoflavonoid를 분리하여 화합물 I (daidzin) 및 II (puerarin)를 얻었다(Fig. 1)(29,30).

화합물 I의 특성

m.p. 234~236°C, UV λ_{max} 230, 260nm(MeOH), 240,



Daidzin, R₁=glucose, R₂=OH, R₃=H
Puerarin, R₁=OH, R₂=glucose, R₃=OH

Fig. 1. Structure of isoflavonoids.

304nm(sh). MS(m/z, %) 118, 136, 254(M⁺⁺H)

¹H-NMR(DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 9.54(4'-OH), 8.38(H₂) : 8.036(d, J=1.79 Hz, H 5), 7.396(d, J=8.79 Hz, H 2', H 6'), 7.22(d, J=1.95 Hz, H 8), 7.13(g, H=2.44, 8.79 Hz ; H 6), 6.804(d, J=8.79 Hz, H 3', H 5')

¹³C-NMR(DMSO-d₆, 50.3MHz) δ : 164.0(C-2), 132.6(C-3), 182.2(C-4), 152.1(5), 132.7(C-6), 156.4(C-7), 94.3(C-8), 105.8(C-10), 122.7(C-1'), 128.3(C-2'), 115.0(C-3'), 160.3(C-4'), 114.7(C-5'), 129.3(C-6'), 101.6(C-1''), 73.0(C-2''), 75.4(C-3''), 69.5(C-4''), 75.7(C-5''), 64.3(C-6'').

화합물 II의 특성

m.p: 230~232°C, ¹H-NMR(DMSO-d₆, 300MHz) δ : 10.12(4'-OH), 8.30(d, J=8.79Hz, H 5), 7.13(d, J=8.79 Hz, H 2', H 6'), 7.43(d, J=1.95 Hz, H 8), 8.03(g, J=2.44, 8.79, Hz; H 6), 7.42(d, J=8.79 Hz, H 3', H 5')

¹³C-NMR(DMSO-d₆, 50.3MHz) δ : 163.2(C-2), 132.6(C-3), 182.2(C-4), 152.4(C-5), 132.6(C-6), 157.0(C-7), 94.4(C-8), 152.8(C-9), 105.2(C-10), 123.0(C-1'), 128.3(C-2'), 114.8(C-3'), 161.4(C-4'), 115.2(C-5'), 130.2(C-6'), 101.6(C-1''), 73.0(C-2''), 75.4(C-3''), 69.5(C-4''), 75.7(C-5''), 64.3(C-6'').

LDL의 수식에 대한 항산화 작용

Cell lines

J774 cells은 10% fetal bovine serum, 2mM glutamine, 900 units/ml penicillin 및 0.17mM streptomycin을 함유한 DMEM배지에 배양하였다.

사람 low density lipoprotein(LDL)의 분리

건강한 남자의 혈액 50ml을 1mg/ml EDTA을 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분 동안 원심

분리(2000×g)하여 분리한 다음 gentamycin sulfate (1mg/25ml)을 첨가하였다. LDL(d. 1.019~1.063g/ml)은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01M phosphate buffer, pH 7.4로서 16~20시간 투석하였다(31). 또 LDL의 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 정량하였다(32).

Macrophage의 분리와 배양

Female ICR mice을 CO₂로 질식사시켜 절개한 복부 부위에 차게 만든 Ca²⁺, Mg²⁺이 없는 Dulbecco's phosphate buffered saline을 넣어 세척하여 macrophage을 포집한 후 원심분리한 다음 혈액을 제거하고 세포만 분리하였다. 이 세포는 10% 불활성시킨 fetal bovine serum과 2mmol/L, L-glutamine, 100units/ml penicillin 및 0.17mmol/L streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)배지에서 5% CO₂/air 존재하에서 배양하였다. 배양 24시간 후에 신선한 배지로 교환시킨 다음 5% lipoprotein-deficient serum(LPDS), L-glutamine 함유 DMEM에 LDL 또는 oxidized LDL의 적당한 농도를 첨가하여 실험하였다(33).

LDL의 금속유도에 의한 산화

Copper mediated 산화

LDL(100µg/ml)에 1~5µM CuSO₄를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 적당한 농도의 시료를 첨가하여 5% CO₂ 존재하에서 37°C에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 조사하였다(34). 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않은 조건에서 배양하였다.

Cell-mediated LDL

J774 cells, human monocyte derived macrophages의 배양액에 LDL(100µg/ml)에 daidzin 및 puerarin를 일정 농도별로 첨가한 후 5% CO₂ 존재하에서 37°C로 24시간 동안 배양한 후 LDL의 산화의 정도를 실험하였다(35).

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 100µg LDL 단백질이 함유된 배양 혼합액 0.5ml에 20% TCA 1.5ml를 가한 다음 여기에 0.05M NaOH에 0.67% TBA 1.5ml를 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000

×g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer(Model 650-10S)로서 510 및 553nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malonaldehyde(MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로부터 MDA의 nmole로서 나타내었다(36).

LDL의 전기영동

LDL의 전기영동은 Nile red를 혼합한 LDL를 barbital buffer, pH 8.6으로 만든 agarose gel에 loading하여 75V에서 20분동안 전개하였다. 이를 UV lamp로서 확인하였다(37).

Diene conjugation의 측정

LDL이 Oxid LDL로 되므로서 생성가능한 공액 2중결합의 형성을 234nm에서 측정하였다. 즉 100µg protein/ml의 LDL을 PBS(pH 7.4)에 녹이고, 5µM CuSO₄ 및 50µM silymarin 및 silybin의 존재하에서 37°C에서 배양하면서 매 30분 간격으로 측정하였다(38). 별도로 대조군으로는 50µM silymarin 및 silybin를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였다.

결과 및 고찰

갈근에서 추출한 daidzin 및 puerarin의 Human LDL에 대한 항산화 효과

갈근(*Puerariae radix*)으로부터 추출한 daidzin 및 puerarin의 LDL의 산화에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여 건강한 사람의 혈장에서 분리 정제한 LDL(100 µg/ml)에 CuSO₄를 5µM을 첨가하여 산화시키면서 LDL의 산화억제를 보기 위하여 daidzin 및 puerarin을 각각 20, 40, 60, 80 및 100µg/ml를 첨가하여 37°C에서 18시간동안 TBARS를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 LDL의 산화에 대한 daidzin의 최적 농도는 100µg/ml이었고 puerarin은 60µg/ml 일 때 항산화 효과가 좋았다.

LDL을 산화시키기 위하여 금속 매개 산화는 Cu²⁺ 및 Fe²⁺가 많이 사용되지만 Cu²⁺를 선택하여 실험하였다. 본 실험에서 LDL의 산화를 시키기 위하여 Cu²⁺의 농도가 5µM를 사용하였으며 이는 Esterbauer 등(39) 및 박과 류(23) 등의 연구결과와 같은 농도이었다. 또한 여기에 사용된 LDL의 농도를 100µg/ml LDL protein에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 본 실험에서 항산화제로 첨가한 daidzin의 경우 첨가 농도를 20, 40, 60,

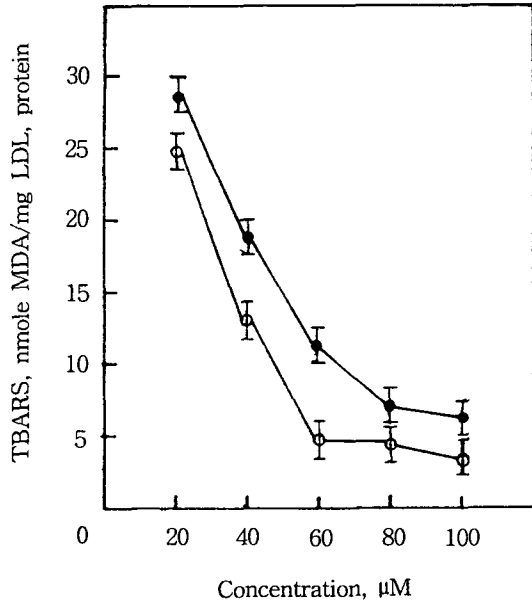


Fig. 2. Antioxidative effect of daidzin (●-●) and puerarin (○-○) on the oxidation of LDL in the presence of 5μM cupric sulfate.

LDL(100μg protein/ml) was incubated for 6 or 18hr at 37°C in the presence of different concentrations of daidzin or puerarin. Oxidation was initiated by the addition of 5μM CuSO₄ in the presence or absence of increasing concentration of daidzin or puerarin. The lipoperoxide content was determined and is expressed as nmol malonaldehyde equivalents/ml. Results are expressed as mean ± SD of triplicate analyses. The significance of difference between daidzin or puerarin treated values was calculated by unpaired *t*-test.

80 및 100μg/ml으로 조절하여 실험한 결과 20, 40μg/ml에서도 항산화 효과가 나타났으나 80 및 100μg/ml에서 더 높은 항산화 효과가 있었다. 또 puerarin의 경우 daidzin과 동일한 농도로 사용하였으나 60 및 80μg/ml일 때 가장 우수하였다. 따라서 LDL의 Cu²⁺ 매개 산화에 있어서 갈근에서 추출한 daidzin과 puerarin이 효과가 있으나 daidzin이 보다 puerarin이 우수한 것

로 나타났다. Esterbauer 등(38)은 Cu²⁺ 매개 LDL의 산화에 있어서 2~2.5시간 정도 배양하여 산화시켰다. 그러나 본 연구에서는 18시간 배양하면서 산화시켰는데 이는 사람의 혈장에서 채취하여 얻은 LDL의 제조에 있어 LDL의 자체에 존재하는 항산화제에 의하여 산화가 영향을 받기 때문이다.

혈장내에 비타민 A 및 E와 같은 항산화제가 LDL의 획득에 미량 함유되어 있을 경우 항산화 효과를 나타낼 수 있으며, 또 담배를 피우는 사람은 혈장의 LDL 획득이 담배를 피우지 않는 사람 보다는 쉽게 산화가 일어날 수 있기 때문에 산화에 필요한 시간은 18시간이 적당하다(39).

LDL의 산화에 따른 electrophoretic mobility

Table 1은 macrophages에 의한 LDL의 산화 억제제를 알아보기 위하여 100μg/ml daidzin 및 80μg/ml puerarin을 첨가하여 실험한 결과이다. 이때 LDL에 daidzin 및 puerarin을 첨가하여 macrophage에 넣어 24시간 동안 배양한 후 LDL의 이동을 조사한 결과 native LDL 및 대조군에는 이동거리가 차이가 있었다. 그러나 daidzin 및 puerarin의 첨가구는 native LDL과 약간 높았으나 LDL의 대조군 보다는 이동거리가 적은 것을 볼 수 있었다.

Cell 유도 산화에 의한 daidzin 및 puerarin의 항산화 효과

사람에게 있어서 지질의 산화 즉 LDL이 산화가 되면 cholesterol 및 cholesteryl ester의 축적으로 동맥경화가 유발된다. Fig. 3는 J774와 human monocyte-derived macrophages로서 LDL를 CuSO₄ 존재하에서 daidzin 및 puerarin을 실험한 결과이다.

본 실험에서 사람의 macrophages로 실험한 결과 항산화제를 첨가하지 않고 5μM CuSO₄을 첨가한 대조군에서는 TBARS가 28.67 ± 1.34nmole MDA/mg LDL protein이었으나 native LDL의 TBARS는 1.32 ± 0.31 nmole MDA/mg LDL protein이었다. 그러나 항산화제인 100μg/ml daidzin 및 60μg/ml puerarin을 각각 첨가

Table 1. Antioxidative effect of daidzin and puerarin on LDL oxidation as assessed by electrophoretic mobility

Incubation condition	Relative electrophoretic mobility	p
Native LDL	1.0	
LDL + macrophages	1.88 ± 0.24	<0.05
LDL + macrophages + daidzin 100μg/ml	1.36 ± 0.10	<0.01
LDL + macrophages + puerarin 60μg/ml	1.23 ± 0.14	<0.01

LDL(100μg/ml) was incubated at 18h in DMEM medium in 35mm dishes containing macrophages in the presence or absence of the daidzin and puerarin. The electrophoretic mobility of LDL was determined in agarose gels as described in Methods. The electrophoretic mobility was measured in mm. The data are presented as mean ± S.E.M. for experiments

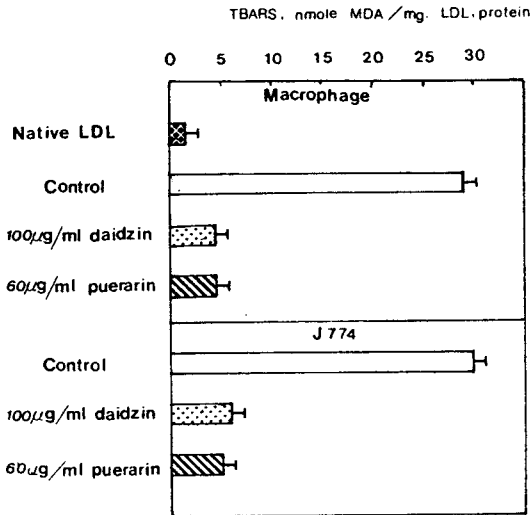


Fig. 3. Antioxidative effect of daidzin and puerarin on cell-induced oxidation of LDL.
 LDL(100µg/ml) was incubated with human monocyte-derived macrophages or J774 cells for 24hr at 37°C in the presence or absence of daidzin or puerarin. The medium was then removed and assayed for TBARS as described in Methods. Results are expressed as means ± SD of triplicate analyses. The significance of the difference between daidzin or puerarin treated and control values was evaluated by *t*-test.

한 경우 각각 4.04 ± 0.13 및 4.09 ± 0.42 nmole MDA/mg LDL protein이었다.

한편 J774에 대한 daidzin 및 puerarin의 항산화효과는 대조군의 LDL의 TBARS는 30.21 ± 1.37 nmole MDA/mg LDL protein이었으나 100µg/ml daidzin 및 60µg/ml puerarin을 각각 첨가하여 실험한 결과 LDL의 TBARS는 각각 2.43 ± 0.21 및 2.28 ± 0.74 nmole MDA/mg LDL protein이었다.

본 실험결과 갈근에서 추출 정제한 daidzin 및 puerarin은 사람 monocyte-유도 macrophage와 J774의 세포에서 거의 비슷한 항산화 효과가 나타났으며, daidzin의 경우 100µg/ml첨가시 거의 완전히 LDL의 산화를 억제하였으나 puerarin의 경우는 60µg/ml첨가시 산화억제 효과가 daidzin 보다는 우수하였다.

공액 diene의 형성의 억제효과

LDL이 산화되면 LDL의 지방산 에스테르가 2중결합을 형성하는데 이를 이용하여 산화의 정도를 측정할 수 있다. Fig. 4는 LDL를 5µM CuSO₄을 첨가한 다음 37°C에서 배양시간에 따른 공액 2중결합의 증가를 볼 수 있

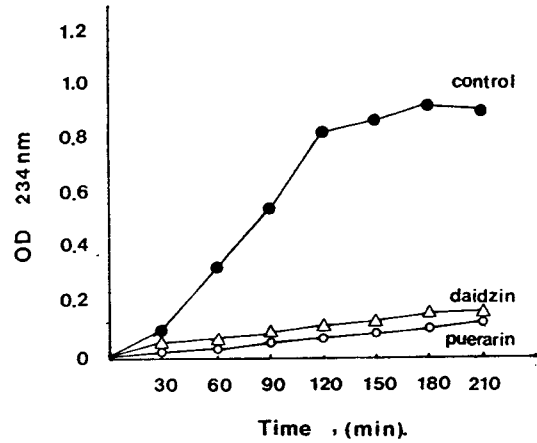


Fig. 4. Antioxidative effect of daidzin and puerarin on the formation of conjugated dienes observed during different times of the LDL oxidation.
 LDL(100µg protein/ml) was incubated in the presence or absence of daidzin and puerarin. Oxidation was initiated by the addition of 5µM CuSO₄.

었다. 이때 100µg/ml daidzin 및 60µg/ml puerarin을 각각 첨가한 결과 시간경과에 따른 공액 diene의 결합의 형성이 억제되었다. 이와 같은 결과는 flavonoid계 화합물의 -OH기가 diene의 형성을 억제하는 구조적 특성이 지방산 에스테르의 생성을 감소시키는 것을 볼 수 있었다.

요 약

갈근(*Puerariae radix*)을 MeOH 추출물에서 silica gel column chromatography를 이용하여 플라보노이드 화합물인 daidzin 및 puerarin를 분리하여 low density lipoprotein의 산화에 대하여 실험하였다. 이들 플라보노이드중 daidzin의 경우 100µg/ml에서 puerarin은 60µg/ml의 농도에서 5µM Cu²⁺ 매개산화 LDL에 대하여 억제 효과가 좋았다. 이때 같은 농도의 daidzin과 puerarin를 첨가한 산화 LDL의 전기영동의 이동거리는 native LDL 보다는 약간 높았으나 oxidized LDL의 대조군 보다는 이동거리가 낮았다. 또 J774 및 macrophages 유도 산화 LDL에 있어서도 100µg daidzin과 60µg/ml puerarin을 첨가 하였을 때 억제효과 나타났다. LDL을 5µM Cu²⁺ 존재하에서 산화시킬 때 동일 농도의 daidzin과 puerarin을 첨가하면 conjugated dienes의 생성이 거의 억제되었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 경성대학교 지원 연구비에 대

하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

문헌

- 정동규 : 천연약품학. 숙명여자대학 출판부, p.348(1976)
- 허준 : 동의보감. 탕액편. 제3권, 남산당, p.1190(1984)
- 이시진 : 본초강목. 권 18. 고문사, p.740(1980)
- 심상용 : 약이 되는 자연식. 창조사, p.142(1983)
- Shibata, S., Murakami, T. and Nishikawa, Y. : Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drug. *Yukagaku Zasshi*, **79**, 759(1959)
- Hayakawa, J., Noda, N., Yamada, S. and Uno, K. : Studies on physical and chemical quality evaluation of crude drug preparation I. Analysis of *Pueraria radix* and species *Puerarie*. *Yudagaku Zasshi*, **104**, 50(1984)
- Inoue, T. and Fujita, M. : Biosynthesis of isoflavon glycoside in pueraria. root. *Chem. Pharm. Bull.*, **322**, 1422(1974)
- Ingham, J. L., Tahara, S. and Dziedzic, S. Z. : A chemical investigation of *Pueraria mirifica* root. *Z. Naturforsch.*, **41**, 403(1986)
- Keung, W. M. : Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Puerariae radix*. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **17**, 1254(1993)
- Keung, W. M. and Vallee, B. B. : Daidzin, a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 1247(1993)
- Xie, C. I., Lin, R. C., Antony, V., Lumeng, L., Li, T. K., Zao, Z. H. and Wang, G. F. : Daidzin, an antioxidant isoflavonoid, decreased blood alcohol levels and shortens sleep time induced by ethanol intoxication. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **18**, 1443(1993)
- Hanasaki, Y., Ogawa, S. and Fukui, S. : The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.*, **16**, 845(1994)
- Robak, J. and Gryglewski, R. J. : Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 837(1988)
- Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P. : Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, **25**, 383(1986)
- Husain, S. R., Cillard, J. and Cillard, P. : Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, **26**, 2489(1987)
- Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P. and Cillard, J. : Antioxidant and iron chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 13(1993)
- Das, N. P. and Ratty, A. K. : Effect of flavonoids on induced non-enzymic lipid peroxidation. In "Plant flavonoids in biology and medicine : Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships" Alan R. Liss, New York, USA, p.243(1986)
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., and Kinsella, J. E. : Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**, 454(1993)
- Havsteen, B. : Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1141(1983)
- Jurgens, G., Hoff, H. F., Chisolm, G. M. and Esterbauer, H. : Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids*, **45**, 315(1987)
- Mangiapanne, H., Thomson, J., Salter, A., Brown, S., Bell, G. D. and White, D. A. : The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 445(1992)
- Negre-Salvayre, A. and Salvayre, R. : Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radical Biol. Med.*, **12**, 101(1992)
- 박종욱, 류병호 : 사람의 low density lipoprotein에 대한 녹차의 항산화 활성. 한국식품과학회지, **28**, 850(1996)
- Bravo, L., Abia, R., Eastwood, M. A. and Saura-Calixto, F. : Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Brit. J. Nutr.*, **71**, 933(1994)
- Das, N. P. : Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in Man. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 3435(1971)
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. : Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determination in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, **20**, 21(1993)
- Pierpoint, W. S. : Flavonoids in the human diet. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships, Alan R. Liss, New York, USA, p.125(1986)
- Ratty, A. K. and Das, N. P. : Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation. Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.*, **39**, 69(1988)
- 박종문 : 은행세포배양으로부터 flavonoglycosides추출, 생물화학공학의 동향 I. 생물화학공학연구심의회 가위원회, p.103(1996)
- Yasuda, T., Momma, N. and Oshawa, K. : A simultaneous determination of daidzein in oriental pharmaceutical decoctions containing *puerariae radix* by ion pair high-performance liquid chromatography. *Yukagaku Zasshi*, **113**, 881(1993)
- Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1341(1955)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- Henriksen, T., Mafoney, E. M. and Steinberg, D. : Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, **3**, 149(1983)
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürens, G. : The

- role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol. Med.*, **13**, 341(1992)
35. Esterbauer, H., Mahoney, E. M. and Steinberg, D. : Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, **3**, 149(1983)
36. Yaki, K. : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212(1976)
37. Greenspan, P. and Gutman, R. L., Detection by Nile red of agarose gel electrophoresed native and modified low density lipoprotein. *Electrophoresis*, **14**, 65(1993)
38. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M. : Continuous monitoring of *in vivo* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.*, **6**, 67(1989)
39. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G. and Weag, G. : Role of vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 314 (1991)

(1996년 11월 25일 접수)