

Hesperidin과 Naringin이 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향*

손 정 숙 · 김 미 경

이화여자대학교 식품영양학과

Effects of Hesperidin and Naringin on Antioxidative Capacity in the Rat

Sohn, Jung Sook · Kim, Mi Kyung

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate effects of hesperidin and naringin on lipid peroxide formation and antioxidative enzyme activities in rats. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentrations were measured in plasma and liver. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities were measured in erythrocyte and liver. Forty-nine male Sprague-Dawley rats weighing 275.3 ± 3.3 g were blocked into seven groups according to body weight and were raised for four weeks on diets containing 0.25, 0.50, or 1.00%(w/w) hesperidin or naringin. Food intake, weight gain, food efficiency ratio, and weights of liver, kidney, spleen, and epididymal fat pad were not significantly different among groups. In 0.50 and 1.00% naringin groups, plasma TBARS concentrations were significantly decreased with a dose response pattern. In 0.25, 0.50, and 1.00% hesperidin groups, liver TBARS concentrations were significantly decreased without a dose dependent pattern. Antioxidative enzyme activities in erythrocyte and liver were not significantly affected by type and amount of dietary bioflavonoid, but in the 1.00% hesperidin group, catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in liver showed a tendency to increase. In conclusion, naringin inhibited lipid peroxide formation with a dose response pattern in plasma without changing the activities of antioxidative enzymes. Hesperidin administration, regardless of the level in the diet, inhibited lipid peroxide formation in liver. (*Korean J Nutrition* 31(4) : 687~696, 1998)

KEY WORDS : hesperidin · naringin · lipid peroxide formation · antioxidative enzyme activities.

서 론

이십 세기에 들어오면서 인간의 평균수명은 계속 증가하고 있으나, 더욱 풍요로워진 식생활로 인해 뇌혈관 질환, 심장병, 고혈압성 질환 등의 순환기계 질환과 암 등으로 인한 사망률도 크게 높아져¹⁾²⁾ 건강함 몸으로 장

채택일 : 1998년 5월 12일

*This research was supported by the '96 grant from the Ministry of Health and Welfare.

수하기 위한 관심이 증대되고 있다. 이러한 만성 퇴행성 질환들의 발병이 free radical에 의한 산화적 손상(oxidative damage)과 관련이 있다는 연구들³⁾⁴⁾이 많이 보고되고 있다.

그러나 생체 내에는 이런 free radical로부터 세포막과 세포 내 물질을 보호하는 항산화 효소들이 있으며 이들 중 가장 중요한 것은 catalase, superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione peroxidase(GSH-px) 등이다⁵⁾. Catalase, SOD 및 GSH-px는 과산화 과정의 시작물질인 $O_2 \cdot$, H_2O_2 그리고 다른 peroxide들을 제

거함으로써 지질과산화로부터 세포를 보호하는데 관여한다⁶⁾. 이러한 항산화계 효소들 이외에 항산화 물질도 또한 free radical의 작용을 억제시키는데 중요한 역할을 하며, 특히 최근에는 bioflavonoids가 안전한 항산화 물질로서 큰 관심을 끌고 있다.

Bioflavonoids는 담황색, 또는 노란색을 띠고 있는 색소화합물로서 자연에서 유리상태(aglycone)로 존재하기도 하나 대개는 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당과 결합하여 배당체(glycoside)의 형태로 여러 식물에 존재하는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 이와 같이 bioflavonoids는 인간의 식이에 중요한 성분이지만, 식품 내 함량에 대한 연구⁸⁾⁹⁾가 아직 부족하여 하루에 한 사람당 섭취하는 bioflavonoids의 양이 23mg¹⁰⁾에서부터 1g¹¹⁾ 내지 몇 g¹²⁾까지로 다양하게 추정되고 있다.

최근 국내에서는 우리 나라의 고유한 식물 중 내의 bioflavonoids에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다¹³⁻¹⁶⁾. 특히 우리 나라 고유 과일류인 감귤과 유자 과피 내의 flavonoids 함량 조사에서 hesperidin과 naringin이 주된 flavonoids로 밝혀졌고¹⁷⁾¹⁸⁾, 감귤 과피 내의 hesperidin은 혈압강하 효과가 있으며¹⁹⁾, naringin은 항균작용이 있음이 보고되었다²⁰⁾.

Bioflavonoids의 항산화적 활성을 뒷받침하는 역학 조사²¹⁻²⁴⁾와 in vitro 연구²⁵⁻³³⁾는 많이 행하여져 왔다. 소위 French paradox라 일컫는 바와 같이 불란서 인들이

섭취하는 wine 등의 alcohol 섭취 수준이 coronary heart disease(CHD)의 위험을 낮추어 준다²¹⁾²²⁾는 것과 flavonoids²³⁾와 flavonol²⁴⁾의 섭취 수준과 CHD 사망률 사이에는 역관계가 존재한다는 역학 조사 결과들이 발표되었다. In vitro 연구에서는 bioflavonoids가 지질 과산화²⁵⁻²⁸⁾, low density lipoprotein(LDL) 산화²⁹⁾³⁰⁾, 혈소판 응집 반응³¹⁾, 그리고 cyclo-oxygenase와 lipoxygenase의 활성³²⁾³³⁾을 억제한다는 결과들을 보고하였는데, 이러한 bioflavonoids의 항산화 작용에 대한 in vivo 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 산화적 stress를 가하지 않은 정상조건에서, bioflavonoids인 hesperidin과 naringin이 식이 내 0.25, 0.50, 1.00% 수준에서 흰쥐의 체내에서 과산화 지질 생성과 항산화 효소 체계의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

생후 4주된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 49마리를 구입하여 실험 시작 전 1주일간 고형 배합 사료(삼양사료)로 적응시켰다. 적응 기간 후 체중이 275.3±3.3g된 쥐들을 체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 7마리씩 7군으로 분류하여 4주간

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Groups ¹⁾						
	C	LH	MH	HH	LN	MN	HN
Corn Starch	698	695.5	693	688	695.5	693	688
Casein	150	150	150	150	150	150	150
Corn oil	100	100	100	100	100	100	100
Bioflavonoids	-						
Hesperidin		2.5	5	10	-	-	-
Naringin		-	-	-	2.5	5	10
Salt mixture ²⁾	40	40	40	40	40	40	40
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10	10	10	10	10
Choline chloride	2	2	2	2	2	2	2

(g per kg diet)

1) C : Control none flavonoid group LH : Low(0.25%) hesperidin group MH : Medium(0.50%) hesperidin group
 HH : High(1.00%) hesperidin group LN : Low(0.25%) naringin group MN : Medium(0.50%) naringin group
 HN : High(1.00%) naringin group

2) AIN salt mixture(g/kg mixture) : Calcium phosphate, dibasic(CaHPO₄·2H₂O) 500, Sodium chloride(NaCl) 74, Potassium citrate, monohydrate(K₃C₆H₅O₇·H₂O) 220, Potassium sulfate(K₂SO₄) 52, Magnesium oxide(MgO) 24, Manganous carbonate(45-48% Mn) 3.5, Ferric citrate(16-17% Fe) 6, Zinc carbonate(70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate(53-55% Cu) 0.3, Potassium iodate(KIO₃) 0.01, Sodium selenite(Na₂SeO₃·5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate(CrK(SO₄)₂·12H₂O) 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1,000

3) AIN vitamin mixture(mg/kg mixture) : Thiamine.HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine.HCl 700, Nicotinic acid (Nicotinamide is equivalent.) 3,000, D-Calcium Pantothenate 1,600, Folic acid 200, D-Biotin 20, Cyanocobalamin (vitamin B₁₂) 1, Retinyl palmitate or acetate(vitamin A) as stabilized powder to provide 400,000IU vitamin activity or 120,000 retinol equivalents, DL- α -Tocopheryl acetate(vitamin E) as stabilized powder to provide 5,000IU vitamin E activity, Cholecalciferol 2.5(100,000IU, may be in powder form), Menaquinone(vitamin K, Menadione) 5.0, Sucrose finely powdered, to make 1,000g

사육하였다.

실험 동물은 한 마리씩 분리하여 stainless steel cage에서 사육하였고, 식이와 물은 제한 없이 먹게 하였다.

본 실험에서 사용한 식이의 구성은 Table 1과 같았다.

실험식이의 탄수화물 급원으로는 옥수수 전분(corn starch, 신동방)을, 지방 급원으로는 옥수수유(corn oil, 제일제당)를 사용하였으며, 단백질 급원으로는 casein(edible acid casein, Murray Goulburn Co-operative Co., Australia)을 사용하였다. 무기질과 비타민 혼합물은 시약 급을 사용하여 각각 총 식이 무게의 4%, 1% 수준으로 첨가하였고, flavonoid는 hesperidin(Sigma H5254)과 naringin(Sigma N1376)을 각각 식이 무게의 0.25%, 0.5%, 1% 수준으로 식이 내에 섞어 공급하였다.

식이 섭취량은 일주일에 3회 일정한 시각에 측정하였고, 체중은 일주일에 1회 같은 시각에 측정하였다. 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중의 변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 식이 그릇을 빼주었다.

이상에서 측정된 식이 섭취량과 체중을 이용하여 실험 전 기간의 체중 증가량을 같은 기간에 섭취한 식이량으로 나누어 식이 효율(food efficiency ratio, F.E.R.)을 산출하였다.

2. 혈액과 장기의 채취

실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 굶긴 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10ml 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 이때 주사기는 실험동물 희생 전에 3.8% sodium citrate 용액 0.1ml 정도로 coating시켜 사용하였다. 채취된 혈액은 응고되는 것을 방지하기 위하여 EDTA(Ethylene Diamine Tetra Acetate)가 들어있는 polystyrene 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 원심분리기(Sorvall, RT 6000B)로 2,800rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 아래층의 red blood cell(RBC)과 혈장을 분리하고 혈장은 혈장내 과산화물량의 측정을 위해 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

RBC는 냉장온도의 생리식염수를 첨가하여 원심분리기로 2,800rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하는 세척과정을 3차례 반복하여 세척된 RBC를 얻었다. 이 RBC를 cell과 0.9% NaCl buffer의 부피비가 1:1이 되도록 희석하여 50% hematocrit suspension(RBC suspension)을 만든 후 항산화 효소의 활성을 측정하기 전까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

혈액을 취한 후 즉시 간을 떼어 냉장온도의 생리식염

수에 넣어 세척한 다음 무게를 측정하고 바로 -70℃ 냉동고에 보관하여 과산화물량과 효소활성 측정에 사용하였다. 신장과 비장, 부고환지방은 떼어서 무게를 측정하였다.

3. 생화학적 분석

1) 혈장과 간의 Thiobarbituric Acid Reactive Substance(TBARS) 측정

혈장의 TBARS 함량은 Yagi³⁹⁾의 방법을 이용하여 측정하였는데 1,1,4,4-tetramethoxypropane을 표준용액으로 하여 TBARS양을 luminescence spectrometer(Perkin Elmer, LS50)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 정량하였다.

간 TBARS는 Buckingham³⁵⁾법을 변형하여 spectrophotometer(Milton Roy, spectronic 301)로 532nm에서 비색 정량하였다.

2) 적혈구와 간의 항산화계 효소 활성 측정

항산화계 효소중에서 본 실험에서는 superoxide anion을 제거하는 superoxide dismutase(SOD)와 hydroxy radical을 제거하는 catalase와 glutathione peroxidase(GSH-px)의 활성을 앞에서 언급한 대로 준비한 적혈구 현탁액과 간에서 측정하였다.

적혈구 catalase 활성은 Johansson과 Hakan Borg³⁶⁾법에 의하여 spectrophotometer로 550nm에서 흡광도를 측정한 후 formaldehyde를 표준용액으로 하여 얻은 표준 곡선으로부터 분당 활성을 계산하였다.

적혈구 SOD 활성은 Folcher등³⁷⁾과 Winterbourn 등³⁸⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. Xanthine이 xanthine oxidase의 작용을 받아 superoxide(O^{•-})를 생성하고 이 superoxide가 ferricytochrome C(Fe⁺⁺⁺)를 ferrouscytochrome C(Fe⁺⁺)로 환원시키는데 이때 SOD가 존재하면 이 반응이 저해되는 원리를 이용하여 측정하였다. Cytochrome C(Fe⁺⁺⁺)의 환원이 방해되는 정도를 spectrophotometer로 550nm에서 측정하였으며, cytochrome C(Fe⁺⁺⁺)의 환원을 50% 방해하는 SOD량을 1Unit로 하여 분당 활성 정도를 나타내었다.

적혈구 GSH-px 활성은 Paglia등³⁹⁾의 방법과 Flohe 등⁴⁰⁾의 방법을 이용하여 측정하였는데 spectrophotometer로 340nm에서 측정하여 분당 산화된 NADPH의 nmol수로 나타내었다.

간 catalase 활성을 측정하기 위하여 간 0.2g을 20배의 25mM KH₂PO₄-NaOH buffer(pH 7.0)로 균질화시키고 위의 buffer로 60배 희석한 후 ice bath 상태에

서 ultrasonicator(Heat System-Ultrasonics. Inc., Ultrasonic Propessor W-385)로 15초씩 2회 반복하여 sonication한 후 적혈구에서와 같은 방법으로 catalase 활성을 측정하였다.

간 SOD 활성은 간 1g을 10vol.의 phosphate buffer (pH 7.4)로 균질화시킨 후 10,000×g, 4℃에서 20분간 원심분리시켜 얻은 상층액 중 일부를 sonicator(Heat System-Ultrasonics. Inc., Ultrasonic Processor W-385)로 30초씩 2회 ultrasonication시킨 후 0.4배의 chloroform과 ethanol의 부피비가 5 : 3이 되도록 만든 용액을 가하여 2분간 강하게 혼합한 후 20,000×g, 4℃에서 20분간 원심분리시켜 얻은 상층액을 SOD 효소원으로 하여 적혈구에서와 동일한 방법으로 측정하였다.

앞서 10,000×g로 원심분리하여 SOD 활성을 측정하기 위하여 사용하고 남은 상등액은 다시 105,000×g, 4℃에서 50분간 원심분리시키고, 이때 얻은 상층액을 간의 GSH-px 효소원으로 이용하였다⁴¹⁾. 간 GSH-px 활성 측정 방법은 적혈구에서와 동일하나 간의 경우에는 t-butyl hydroperoxide 대신 H₂O₂를 사용하였고 catalase의 작용을 억제하기 위하여 1mM sodium azide를 첨가하였다.

각 효소원의 단백질량은 Lowry법⁴²⁾으로 분석하였다.

4. 자료 처리

본 연구의 모든 분석 결과는 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, α=0.05 수준에서 Duncans multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검정하였다.

실험 결과 및 고찰

1. 실험 동물의 성장

1) 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율

실험 동물의 하루 평균 식이 섭취량, 체중 증가량과 이로부터 계산한 식이 효율을 Table 2에 제시하였다.

하루 평균 식이 섭취량, 체중 증가량과 이로부터 계산한 식이 효율은 실험 군간에 유의적인 차이를 보이지 않아 bioflavonoids 종류 및 식이 내 수준에 의하여 영향을 받지 않았다.

따라서 hesperidin과 naringin을 식이 내에 0.25, 0.50, 1.00% 수준으로 첨가할 경우 흰쥐의 성장에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Bioflavonoids를 동물에게 투여한 다른 연구에서도 이와 유사한 결과를 볼 수 있었는데 Laura 등⁴³⁾의 연구

에서는 식이 내에 catechin과 tannic acid를 2% 수준으로 첨가하여 3주간 스킷 Wistar 종의 흰쥐를 사육한 경우 식이 섭취량과 성장률에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다. 그리고 2% tannic acid 용액을 음료수로 흰쥐와 guinea-pigs에게 공급하면서 18일과 26일 동안 사육한 Moulay 등⁴⁴⁾의 결과와도 일치하였다.

그러나 Santiago의 연구⁴⁵⁾에서는 tannic acid를 2, 5%와 3.0% 수준으로 첨가한 식이로 40~50g의 무게가 나가는 White Leghorn 종의 병아리를 49일간 사육한 경우 식이 섭취량은 증가되었는데도 불구하고 성장이 지연되었다고 보고하였다. 또한 Musha 등의 연구⁴⁶⁾에서는 tannins을 4%와 6% 수준으로 첨가한 식이로 115~125g의 무게가 나가는 스킷 albino 종의 흰쥐를 15일간 사육한 경우 식이 섭취량이 감소되면서 성장이 지연되었다고 보고하였다. 그러므로 flavonoids가 식이 섭취와 성장에 미치는 영향에 대하여 앞으로 더 연구해야 할 필요성이 있다고 사료된다.

2) 장기 무게

실험 동물을 희생시킨 후 측정된 간, 신장, 비장, 부고환지방의 무게는 Table 3과 같았다.

간, 신장, 비장 및 체내 지방 축적의 지표로 사용된 부고환지방의 무게는 bioflavonoids 종류 및 식이내 수준에 의해 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

따라서 본 실험에 사용된 수준의 hesperidin과 naringin은 흰쥐의 전반적인 체중 증가뿐만 아니라 각 조직의 발육과 체내 지방 축적에도 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보였다.

2. 과산화물 대사

1) 혈장과 간의 지질과산화물 함량

혈장과 간의 지질과산화물 함량(TBARS값)을 Table

Table 2. Food intake, body weight gain and food efficiency ratio

Groups	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/4 weeks)	Food efficiency ratio
C	¹⁾ 22.65±0.46 ^{N.S.2)}	121.97±4.90 ^{N.S.}	0.215±0.008 ^{N.S.}
LH	22.61±0.70	121.80±6.58	0.215±0.010
MH	23.09±0.63	118.10±6.45	0.204±0.007
HH	23.30±0.64	122.91±7.38	0.210±0.008
LN	22.04±0.43	107.34±6.88	0.195±0.012
MN	23.15±1.15	111.43±14.03	0.190±0.017
HN	23.10±0.68	112.97±9.66	0.194±0.012

1) Mean ± Standard Error(n=7)

2) Not significant at α=0.05 by Duncan's multiple range test

Table 3. Organ weights

Groups	Liver(g)	Kidney(g)	Spleen(g)	Epididymal fat pad(g)
C	¹⁾ 10.10±0.34 ^{N.S.2)}	2.52±0.09 ^{N.S.}	0.64±0.02 ^{N.S.}	5.30±0.36 ^{N.S.}
LH	10.39±0.39	2.40±0.04	0.61±0.03	4.93±0.50
MH	10.60±0.42	2.57±0.06	0.69±0.04	5.18±0.65
HH	10.45±0.23	2.50±0.05	0.73±0.03	5.78±0.48
LN	10.08±0.46	2.52±0.06	0.62±0.03	4.41±0.43
MN	10.39±0.59	2.47±0.10	0.67±0.03	5.12±0.59
HN	10.40±0.55	2.58±0.10	0.64±0.06	4.93±0.43

1)2) See Table 2

Table 4. TBARS levels in plasma and liver

Groups	Plasma	Liver
C	¹⁾ 32.59±1.40 ^{ab2)}	27.33±0.83 ^{ab}
LH	33.70±1.64 ^a	23.40±1.31 ^c
MH	30.26±0.80 ^{abc}	23.12±1.12 ^c
HH	30.40±0.66 ^{abc}	22.65±0.89 ^c
LN	29.39±1.30 ^{bc}	28.51±1.47 ^a
MN	26.62±2.00 ^c	25.54±1.61 ^{abc}
HN	20.78±1.23 ^d	24.67±0.98 ^{bc}

1) Mean±Standard Error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

4에 제시하였다.

혈장의 지질과산화물 함량은 bioflavonoids의 종류 및 식이 내 수준에 의해 유의적인 차이를 나타내었다. Hesperidin은 식이 내에 0.25, 0.50, 1.00% 수준으로 첨가하였을 경우 혈장의 지질과산화물 함량에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로, 0.50, 1.00%수준에서는 혈장 지질과산화물 수준이 다소 낮아지는 경향이 있었다. Naringin을 0.50, 1.00% 수준으로 식이 내에 첨가한 경우에는 혈장의 지질과산화물 수준이 유의적으로 낮아졌으며, 0.50%보다는 1.00% 수준에서 혈장 지질과산화물 함량은 더 낮아졌다. 이로부터 혈장의 지질과산화물 수준을 낮추는데는 hesperidin보다 naringin이 더 효과적이며, naringin이 식이 내에 0.50% 이상 첨가된 경우에 첨가 수준이 높을수록 혈장 지질과산화물 수준을 더욱 낮추어 준다는 것을 알 수 있었다.

간의 지질과산화물 함량도 bioflavonoids 종류 및 식이 내 수준에 의해 유의적인 차이를 나타내었다. Naringin을 식이 내에 0.25, 0.50, 1.00% 수준으로 첨가하였을 경우 간의 지질과산화물 함량에 유의적인 영향은 미치지 않았으나, 0.50, 1.00% 수준에서는 다소 낮아지는 경향이 있었다. 반면에 hesperidin을 식이 내에

첨가하였을 경우는 간의 지질과산화물 함량이 유의적으로 낮아졌는데, 그 수준을 0.25%에서 0.50, 1.00%로 증가시켜 첨가하여도 간의 지질과산화물 함량이 유의적으로 더 낮아지지는 않았다. 그러므로 간의 지질과산화물 수준을 낮추는데는 hesperidin이 naringin보다 더 효과적이며, hesperidin의 식이 내 첨가 수준에 따른 차이가 없는 것으로 보아 hesperidin은 0.25%의 낮은 섭취 수준에서도 간의 지질과산화물 수준을 낮추는데 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

다양한 종류의 flavonoids가 지질과산화물 형성을 억제하는 영향에 대하여 많은 in vitro 연구들이 행해졌으며²⁵⁾²⁶⁾²⁸⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾ 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다. Nishiyama 등²⁵⁾은 익지 않은 보리 잎으로부터 분리된 isoflavonoid 유도체인 2''-O-glycosyl isovitexin은 농도에 비례하여 지질 산화시 생성되는 carbonyl compounds 생성을 억제한다고 보고하였으며, Santus 등²⁶⁾은 flavone diosmin 90%와 flavanone hesperidin 10%로 구성된 Daflon[®]이 자외선에 의해 유도된 지질과산화와 plasma membrane 손상을 억제하여 TBARS 수준을 낮추어 주었다고 보고하였다. 또한 Jadwiga 등⁴⁷⁾은 quercetin과 myricetin이 흰쥐의 liver microsome에 의한 malondialdehyde(MDA) 형성을 억제한다고 보고했고, Igor 등⁴⁸⁾도 lecithin liposomes와 흰쥐 간의 microsome에 ferrous ion, NADPH와 CCl_4 로 산화적 손상을 가하였을 때 rutin과 quercetin이 농도에 비례하여 MDA 형성을 억제한다고 보고하였다. 특히 Maridonneau-Parini 등²⁸⁾은 erythrocyte에 phenazine methosulfate와 diethyldithiocarbamate로 산화적 손상을 가하였을 때 naringin이 세포막의 지질 과산화를 효과적으로 억제했다고 보고하였는데, 이와 함께 naringin이 plasma에서 과산화지질 형성을 억제하였다는 본 연구로 보아 naringin이 혈중의 지질 과산화를 억제하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

Bioflavonoids가 과산화지질 형성을 억제하는 기전에 대해서는 크게 두 가지로 생각되고 있다.

첫째는 지질 과산화를 증진시키고, hydroxyl radical을 생성시키는 강력한 free-radical 손상의 촉진 요인인 유리 상태의 철과 구리 이온⁴⁹⁾을 bioflavonoids가 chelating함으로써 지질 과산화를 억제시킬 수 있다는 것이다²⁷⁾²⁸⁾⁴⁸⁾. Bioflavonoids와 이러한 금속 이온의 복합체는 안정하므로⁴⁹⁾ 이 기전이 가능할 수 있다.

둘째는 bioflavonoids가 free radical을 직접 scavenging함으로써 지질과산화를 억제시킨다는 것이다²⁸⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾. 즉 bioflavonoids는 자신의 phenolic hydrogen을 free radical에 제공하여 free radical 연쇄 반응을 끊을 수 있다⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁵²⁾.

다른 free radical을 환원시키면서 산화된 flavonoids를 ascorbic acid가 환원시켜 주며⁵³⁾, CuCl₂에 의해 LDL을 산화시킬 때 flavonoids를 medium에 첨가하면 vitamin E가 소비되는 것을 지연시키면서 LDL이 산화되는 것을 억제하였다³⁰⁾고 보고되었다. 그러나 일단 LDL 안의 vitamin E가 소비되고 난 후에는 flavonoids가 LDL 산화를 억제시킬 수 없었다고 보고되었으므로³⁰⁾ flavonoids는 다른 항산화제와 상호작용을 통하여 지질 과산화를 억제할 수 있다고 여겨진다.

Flavonoids의 일반적인 구조는 Fig. 1과 같으며, 숫자는 탄소 위치를 나타낸다. Flavonoids는 polyphenolic substance로서 화학적 구조에 따라 flavonols, flavones, flavanones, catechins, anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols, 그리고 chalcones로 구분된다⁵⁴⁾⁵⁵⁾. 이러한 flavonoids의 화학적 구조는 그들의 생화학적 활성에 영향을 미친다고 보고⁵⁶⁻⁵⁸⁾되어 있으므로 중요하게 여겨진다.

즉 flavonoids가 위 기전들을 통해 지질 과산화를 억제하는 것은 그들의 구조적 특징에 의해 영향을 받는다고 보고되어 왔다⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Flavonoids가 지질 과산화를 효과적으로 억제하기 위해서 요구되는 구조적 조건으로는 C ring의 탄소 3 위치에 hydroxyl group이 존재하여야 하고²⁷⁾⁴⁸⁾⁵⁶⁾ C ring의 탄소 2와 3 사이에 이중 결합

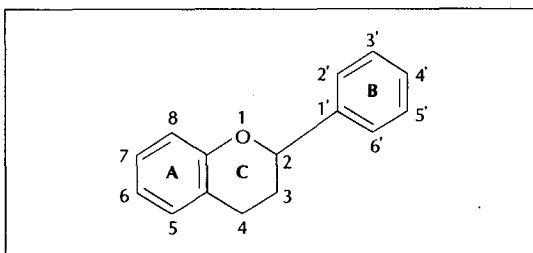


Fig. 1. The generic structure of flavonoids.

이 있어야 하며²⁷⁾⁵⁶⁾ A와 B ring의 hydroxyl group 수가 4개 이상이어야 하고⁵¹⁾ flavonoid glycoside 형태보다 aglycone 형태로 존재하여야 한다는 것⁵⁸⁾ 등이 있다.

그러나 hesperidin과 naringin은 모두 flavanone에 속하며, hesperidin은 탄소 5와 3'에 hydroxyl group이 위치하고 탄소 7과 4' 위치에 각각 rhamnose-glucose와 O-methyl group이 치환되어 있으며 naringin은 탄소 7과 4'에 hydroxyl group이 위치하고 탄소 5 위치에 O-rhamnose-glucose가 치환되어 있어서⁵⁴⁾ 위 조건들을 갖추지 못하였다. 그래서 hesperidin과 naringin은 지질 과산화를 억제하는데 효과적이지 않을 것으로 여겨지나, 본 연구에서 두 flavonoids가 각각 간과 혈장 내의 지질 과산화물 수준을 유의적으로 낮추어 주었다. 그러므로 지질 과산화를 효과적으로 억제하기 위한 구조적 조건들을 갖추지 못한 flavonoids도 지질 과산화를 억제하는 작용을 할 수 있다고 보여지며 위에 제시된 지질 과산화를 억제하는 구조적 요건들 외에 다른 요인이 있을 것으로 사료된다.

동맥경화의 병인론적 증거들에 의해 free radicals과 지질 과산화가 동맥경화의 병인론에서 중요한 역할을 할 것이라는 가능성이 제안되어 왔다³⁾. In vivo에서 지질 과산화는 실제로 일어나며 과산화된 지질은 동맥경화 부위에서 발견된다⁵⁹⁾. 그리고 과산화된 유리 지방산의 정맥내 주사시 endothelial cells에 손상을 주었다고⁶⁰⁾ 보고되었으므로 flavonoids 섭취가 동맥경화의 발병을 억제시킬 수 있는 가능성이 있으나 이 관련성은 아직 더 연구되어야 한다.

본 실험과 상반되는 결과를 제시한 연구도 있는데, Mora 등⁵⁶⁾은 흰쥐 간의 microsomes에서 FeSO₄와 cysteine에 의해 유도된 지질 과산화에 대한 in vitro 연구에서 hesperidin과 naringin 모두 지질과산화를 억제하는데 별 효과가 없었다고 보고했다. 그리고 적혈구에 산화적 손상을 가하였을 때 rutin은 세포막의 지질 과산화를 억제하는 효과가 없었으며 myricetin은 오히려 지질 과산화를 증진시키고 morin은 농도에 따라 지질 과산화를 증진시키기도 하고 억제시키기도 하는 이중적 작용을 하였다는 보고²⁸⁾도 있었다.

그러나 본 연구에서는 hesperidin을 식이에 0.25, 0.50, 1.00% 수준으로 첨가하였을 경우에 모두 간에서의 지질과산화물 형성을 억제하였고, naringin을 식이에 0.50, 1.00% 수준으로 첨가하였을 경우에 혈장에서의 지질과산화물 형성을 억제하였다.

이것으로 조직, flavonoids의 종류와 농도, 산화제, in vitro와 in vivo에 따라서 bioflavonoids의 항산화

효과가 다를 수 있음을 알 수 있었고, 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

2) 적혈구와 간의 항산화계 효소 활성

적혈구와 간에 존재하는 항산화계 효소들의 활성을 Table 5와 Table 6에 각각 나타내었다.

적혈구내 과산화물대사 효소들의 활성은 bioflavonoids의 종류와 식이 첨가 수준에 의해 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러므로 hesperidin과 naringin은 본 실험에 사용된 수준으로 식이에 첨가된 경우에는 적혈구내 항산화계 효소들의 활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

간 내 항산화계 효소들의 활성도 bioflavonoids의 종류와 식이 첨가 수준에 의해 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 catalase는 hesperidin과 naringin이 식이 내에 1.00% 수준으로 첨가된 경우 활성이 다소 높아지는 경향을 보였으며, superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GSH-px)는 hesperidin이 1.00% 수준으로 식이 내에 첨가된 경우 활성이 높아지는 경향을 보였다. 이것은 간의 지질과산화물 수준을 낮추는데 naringin 보다 hesperidin이 더 효과적이라는 결과를 설명하는 요인일 수 있다. 즉, hesperidin이 식이 내에 1.00% 수준으로 첨가된 경우 간 내 항산화계 효소들의 활성을 다소 높여줌으로써 간 내 지질 과산화물 수준을 낮추어 주었을 것으로 사료된다.

생체 내에서는 free radical로부터 세포막과 세포 내 물질을 보호하는 항산화 효소들이 있으며 이들 중 가장

중요한 것은 catalase, SOD 및 GSH-px 등이다⁵⁾. Catalase는 hydrogen peroxide를 제거하는 효소이며, 대부분 조직의 peroxisomes에서 발견되고⁶⁾, SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H₂O₂로 배설시킴으로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 효소이다⁶⁾. 그리고 GSH-px는 생체 내에서 H₂O₂와 환원형 glutathione (GSH)으로부터 산화형 glutathione(GSSG)과 물을 생성하는 반응과 기타 과산화물(ROOH)과 GSH로부터 GSSG, alcohol(ROH) 및 물을 생성하는 반응을 촉매 함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소독을 해독한다⁶⁾.

Julio 등²⁾의 in vitro 연구에서 (-)-epicatechin, luteolin, quercetin, (+)-catechin, delphinidin, kaempferol, apigenin 그리고 naringenin 등의 flavonoids가 glutathione peroxidase 활성에 미치는 영향에 대하여 알아보았는데, 이러한 flavonoids는 GSH-px의 활성은 변화시키지 않으면서 지질과산화를 억제시킨다는 본 실험 결과와 일치하는 결과를 제시하였다. 그러나 bioflavonoids가 cyclo-oxygenase와 lipoxigenase의 활성을 억제시키고³²⁾, xanthine oxidase의 활성도 억제시키는⁴⁷⁾ 등 여러 산화 효소들의 활성에 영향을 미친다는 in vitro 연구 보고들도 있다.

국내에서 in vivo 연구로 이 등⁶³⁾이 한국산 녹차, 우롱차 및 홍차 음료의 중금속 제거 및 해독 작용에 대해 보고했는데, 실험에 사용한 차음료 중 catechin 함량이 가장 높은 녹차가 cadmium 중독으로 인해 활성이 저하된 간 내 항산화계 효소인 SOD와 GSH-px의 활성을 유의적으로 증가시켜 간 조직의 지질과산화물 수준을 낮추어 주는 등 cadmium으로 인한 과산화적 손상을 경감시킨다는 결과를 제시하였다. 즉, 산화적 stress가 가해진 상황에서 flavonoids는 활성이 저하된 항산화계 효소들의 활성을 정상수준으로 증가시켜, 조직의 과산화적 손상을 경감시킬 수 있다고 하였다. 그러나 본 실험에서와 같이, 산화적 stress를 가하지 않은

Table 5. Antioxidative enzyme activities of erythrocyte in rat¹⁾

Groups	Catalase	Superoxide Dismutase	Glutathione Peroxidase
C	²⁾ 363.66±22.10 ^{N.S.3)}	5.29±0.51 ^{N.S.}	148.38±3.65 ^{N.S.}
LH	312.36±30.75	4.88±0.40	147.90±1.83
MH	322.28±10.48	4.98±0.40	146.45±4.23
HH	317.32±21.63	4.66±0.46	152.71±3.52
LN	378.69±27.20	5.03±0.39	155.04±3.09
MN	309.48±18.74	4.62±0.29	146.61±3.80
HN	326.66±16.19	4.76±0.54	143.53±5.30

1) Catalase activities are expressed as nmoles formaldehyde utilized as standard per minute per mg protein. Superoxide dismutase activities are expressed as Units per minute per mg protein(1 Unit is defined by the inhibition of cytochrome C reduction by 50%). Glutathione peroxidase activities are expressed as nmoles NADPH oxidized per minute per mg protein

2) Mean±Standard Error

3) Not significant at α=0.05 by Duncan's multiple range test

Table 6. Antioxidative enzyme activities of liver in rat¹⁾

Groups	Catalase	Superoxide Dismutase	Glutathione Peroxidase
C	²⁾ 744.98±164.35 ^{N.S.3)}	7.89±0.59 ^{N.S.}	393.06±28.61 ^{N.S.}
LH	744.93±155.27	7.30±0.42	378.55±33.90
MH	741.79±94.28	7.10±1.04	396.37±20.95
HH	898.96±133.85	8.95±1.01	420.80±19.96
LN	721.27±108.12	7.86±0.63	393.92±17.23
MN	724.57±164.85	8.19±0.66	399.85±14.86
HN	978.70±267.18	8.39±0.63	372.01±22.50

1)2)3) See Table 5

상황에서는 hesperidin과 naringin 등의 flavonoids가 항산화계 효소들의 활성을 유의적으로 크게 변화시키지 않으면서도 지질과산화물 생성을 억제할 수 있는 것으로 보인다.

그러나 1% hesperidin 군에서 간의 catalase, SOD 및 GSH-px의 활성이 유의적이지는 않지만 다소 증가한 것으로 보아, hesperidin의 섭취 수준을 더 높였을 경우에 간 내 항산화계 효소들의 활성이 현저하게 증가되는지 앞으로 더 연구하여야 할 필요성이 있으며, 또한 산화적 stress가 가해진 상황에서 hesperidin과 naringin이 항산화계 효소들의 활성을 증가시켜 생체를 산화적 손상으로부터 보호할 수 있는지도 함께 연구해야 할 과제이다.

요약 및 결론

Bioflavonoids인 hesperidin과 naringin을 각각 0, 25, 0.50, 1.00% 수준으로 첨가한 식이로 평균 체중이 275.3 ± 3.3 g인 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 49마리를 7군으로 나누어 4주간 사육하였다. 과산화지질로 혈장과 간의 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 농도를 측정하고, 적혈구와 간 내의 항산화 효소계인 catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 활성을 측정하여, 산화적 stress가 가해지지 않은 상황에서 이 두 가지 bioflavonoids가 항산화 효과가 있는지를 알아보았고 그 결과는 다음과 같았다.

하루 평균 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율은 hesperidin과 naringin을 식이 내에 0.25, 0.50, 1.00% 수준으로 첨가한 실험 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그리고 간, 신장, 비장 및 부고환 지방의 무게도 bioflavonoids의 종류 및 식이 내 수준에 의해 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

혈장과 간의 지질과산화물 함량을 측정한 결과, naringin은 0.50, 1.00% 수준으로 식이 내에 첨가된 경우 혈장에서 지질과산화물 수준을 유의적으로 낮추어 주었으며, 0.50%보다는 1.00% 수준에서 혈장 지질과산화물 함량을 더 낮추어 주었다. 그리고 hesperidin은 식이 내 0.25, 0.50, 1.00% 세 수준 모두 간의 지질과산화물 함량을 유의적으로 낮추어 주었으며, 식이 내에 첨가된 수준에 따른 유의적인 차이는 없었다.

적혈구와 간에 존재하는 항산화계 효소들인 catalase, superoxide dismutase 및 glutathione peroxidase의 활성을 측정한 결과 bioflavonoids의 종류 및 식이 내 첨가 수준에 의하여 유의적인 차이를 보이지는

않았으나 hesperidin을 식이 내에 1.00% 수준으로 첨가한 경우 간에서 위의 세 가지 항산화계 효소들의 활성이 모두 높아지는 경향을 보였다.

이상의 결과로 볼 때, naringin은 항산화계 효소들의 활성을 변화시키지 않으면서 혈장에서 지질과산화물 형성을 억제하였고 식이 첨가 수준이 높을수록 그 항산화 효과가 컸으며, 간에서는 hesperidin이 지질과산화물 형성을 억제하며, 0.25%의 낮은 섭취 수준에서도 간 내 지질과산화물 형성을 억제하는데 효과적임을 알 수 있었다.

그리고 본 연구에서 사용한 bioflavonoids인 hesperidin과 naringin은 우리 나라 고유 과실류인 감귤과 유자의 과피에 함유된 flavonoids 중 그 함량이 가장 높으므로 이 두 flavonoids의 생리적 효과가 검증된다면 식품폐기물을 재활용하여 얻는 새로운 기능성 식품의 소재로 이용될 수 있을 것이다.

그러므로 지질과산화물 형성을 억제하는 항산화 물질로서 hesperidin과 naringin의 중요성을 인식하여, 두 bioflavonoids와 심혈관계 질환, 암 등의 현대인의 질병과의 관계에 대한 보다 많은 연구가 행해져야 하겠고, 특히 산화적 stress 상황에서 두 bioflavonoids를 섭취함으로써 얻을 수 있는 생리적 효과에 대해서도 임상 연구 및 동물 실험이 이루어져야 하겠다.

Literature cited

- 1) Annual report on the cause of death statistics. National statistical office, Republic of Korea, 1992
- 2) WHO. 1990 World health statistics. Annual, 1991
- 3) Barry Halliwell. Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* 344 : 721-724, 1994
- 4) Earl R, Stadtman, Cynthia N Oliver. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J Biol Chem* 266 : 2005-2008, 1991
- 5) Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *J Nutr* 122 : 625-626, 1992
- 6) Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological system. *Ann Rev Nutr* 5 : 365-390, 1985
- 7) Singleton VL. Naturally occurring food toxicants : phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Fd Res* 27 : 149-242, 1981
- 8) Michael GL, Hertog, Peter CH Hollman, Martijn B Katan. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Fd Chem* 40 : 2379-2383, 1992
- 9) Michael GL Hertog, Peter CH Hollman, Betty van de

- Putte. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Fd Chem* 41 : 1242-1246, 1993
- 10) Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer* 20 : 21-29, 1993
 - 11) Kuhnu J. The flavonoids : a class of semi-essential food components : their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24 : 117-120, 1976
 - 12) Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. *Methods Plant Biochem* 1 : 197-235, 1989
 - 13) Park JC, Chun SS, Young HS, Kim SH. Studies on the components and biological activities of edible plants in Korea (II) - Isolation and quantitative analysis of flavonoids from the leaves of *Cedrela sinensis* A. Juss. by H-PLC. *J Korean Soc Food Nutr* 22 : 581-585, 1993
 - 14) Chung KH, Yoon KR, Kim JP. Flavonoidal constituent in Korean *Lactuca dentata* Makino. *Korean J Dietary Culture* 9 : 131-136, 1994
 - 15) Ham SS, Choi KP, Choi YS, Lee SY. Studies on antimutagenic and lipotropic action of flavonoids of Buckwheats - Desmutagenic activity of Buckwheat leaf extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 23 : 698-703, 1994
 - 16) Park JC, Ha JO, Park KY. Antimutagenic effect of flavonoids isolated from *Oenanthe javanica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25 : 588-592, 1996
 - 17) Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of Korean Tangerine (*Citrus aurantium* var.). *Korean J Food Sci Technol* 28 : 371-377, 1996
 - 18) Eun JB, Kim MK, Woo HJ, Lee SR, Woo GJ. Development and functional evaluation of bioflavonoids and dietary fibers from Korean fruits. Report on '96 research project supported by a grant from the Ministry of health and welfare, Republic of Korea, pp.5-16, 1997
 - 19) Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, Purification and hypotensive effect of bioflavonoids in citrus *sinensis*. *J Korean Soc Food Nutr* 21 : 136-142, 1992
 - 20) Han SS, You IJ. Studies on antimicrobial activities and safety of natural naringin in Korea. *Kor J Mycol* 16 : 33-40, 1988
 - 21) Eric BR, Rdward LG, Walter CW, Graham AC, Alberto A, Bernard R, Meir JS. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *The Lancet* 338 : 464-468, 1991
 - 22) Renaud S, Loegeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339 : 1523-1526, 1992
 - 23) Michael GL Hertog, Edith JM Feskens, Peter CH Hollman, Martijn B Katan, Daan Kromhout. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342 : 1007-1011, 1993
 - 24) Michael GL Hertog, Edith JM Feskens, Daan Kromhout. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet* 349 : 699, 1997
 - 25) Nishiyama T, Hagiwara Y, Hagiwara H, Shibamoto T. Inhibitory effect of 2'-O-Glycosyl isovitexin and α -tocopherol on genotoxic glyoxal formation in a lipid peroxidation system. *Fd Chem Toxic* 32 : 1047-1051, 1994
 - 26) Santus R, Rerdrix L, Haigle J, Morliere P, Maziere P, Maziere JC, Maziere C, Labrid C. Daflon® as a cellular antioxidant and a membrane-stabilizing agent in human fibroblasts irradiated by ultraviolet A radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 8 : 200-205, 1991
 - 27) Isabelle Morel, Gerard Lescoat. Pascale Cogrel, Odile Sergent, Nicole Padeloup, Pierre Brissot, Pierre Cillard, Josiane Cillard. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte culture. *Biochem Pharmacol* 45 : 13-19, 1993
 - 28) Maridonneau-Parini I, Braquet P, Garay RP. Heterogeneous effect of flavonoids on K⁺ loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radical in human red cells. *Pharmacol Res Comm* 18 : 61-72, 1986
 - 29) Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341 : 454-457, 1993
 - 30) Marta Viana, Coral Barbas, Bartolome Bonet, M Victoria Bonet, Mario Castro, M Victoria Fraile, Emilio Herrera. In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *Atherosclerosis* 123 : 83-91, 1996
 - 31) Anna Petroni, Milena Blasevich, Marco Salami, Nadia Papini, Gian F Monedero, Clandio Galli. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Res* 78 : 151-160, 1995
 - 32) Hsieh RJ, German JB, Kinsella JE. Relative inhibitory potencies of flavonoids on 12-lipoxygenase of fish gill. *Lipids* 23 : 322-326, 1988
 - 33) Miranda J Laughton, Patricia J Evans, Michele A Moroney, JRS Hoult, Barry Halliwell. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem Pharmacol* 42 : 1673-1681, 1991
 - 34) Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In : Method in enzymology. Academic press vol. 105 pp.328-331, 1984
 - 35) Buckingham KW. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J Nutr* 115 : 1425-1435, 1985

- 36) Johansson LH, Hankan Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochem* 174 : 331-336, 1988
- 37) Flohe L, Becker R, Brigelius R, Lengfelder E, Otting F. Convenient assays for superoxide dismutase. In : Miquel J, Quintanilha AT, Weber H. eds. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. pp.287-288, 1992
- 38) Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 35 : 337-341, 1975
- 39) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70(1) : 158-169, 1967
- 40) Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. In : Lowenstein ed. Methods in enzymology. Academic Press Inc. NY vol. 105 pp.114-126, 1984
- 41) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Com* 71 : 952-958, 1976
- 42) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 43) Laura Bravo, Rocia Abia, Martin A Eastwood, Fulgencio Saura-Calixto. Degradation of polyphenols(catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *British J Nutr* 71 : 933-946, 1994
- 44) Moulay L, Phillips H, Hughes RE. The influence of tea and tannic acid on organ weights and faecal composition in rats and in guinea-pigs. *Human Nutr : Fd Sci Nutr* 42F : 125-131, 1988
- 45) Santiago Santidrian, Florencio Marzo. Effect of feeding tannic acid and kidney bean(*Phaseolus vulgaris*) on the intestinal absorption of D-galactose and L-leucine in chickens. *J Sci Food Agric* 47 : 435-442, 1989
- 46) Musha Tamir, Eugenia Alumot. Carob tannins-Growth depression and levels of insoluble nitrogen in the digestive tract of rats. *J Nutr* 100 : 573-580, 1970
- 47) Jadwiga Robak, Ryszard J Gryglewski. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37 : 837-841, 1988
- 48) Igor B Afanas EV Anatolii I Dorozhko, Aleksander V Brodskii, Vladimir A Kostyuk, Alla I Potapovitch. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38 : 1763-1769, 1989
- 49) Halliwell B Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. ed.2, Oxford : Clarenton press, 1989
- 50) Jose Luis Rios, Salvador Manez, Miguel Paya, Maria Jose Alcaraz. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochem* 31 : 1947-1950, 1992
- 51) Rafat Husain S, Josiane Cillard, Pierre Cillard. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem* 26 : 2489-2491, 1987
- 52) Joseph Torel, Josiane Cillard, Pierre Cillard. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem* 25 : 383-385, 1986
- 53) Umeo Takahama. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin : mechanism of antioxidative function. *Phytochem* 24 : 1443-1446, 1985
- 54) Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem* 7 : 66-76, 1996
- 55) William F Hodnick, Emil B Milosavljevic, John H Nelson, Ronald S Pardini. Electrochemistry of flavonoids : Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 37 : 2607-2611, 1988
- 56) Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 40 : 793-797, 1990
- 57) Wolf Bors, Werner Heller, Christa Michel, Manfred Saran. Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 264 : 165-170, 1990
- 58) Kana Ioku, Tojiro Tsushida, Yoko Takei, Nobuji Nakatani, Junji Terao. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1234 : 99-104, 1995
- 59) Glavind J, S Hartmann, J Clemmensen, KE Jessen, H Dam. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. *Acta Pathol Microbiol Scand* 30 : 1-6, 1952
- 60) Yagi K. Increased serum lipid peroxides initiate atherogenesis. *Bioessays* 1 : 58-60, 1984
- 61) Britton Chance, Helmut Sies, Alberto Boveris. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 : 527-605, 1979
- 62) Julio Galvez, Jose Pedro de la Cruz, Antonio Zarzuelo, Sanchez de la Cuesta. Flavonoid inhibition of enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacol* 51 : 127-133, 1995
- 63) Lee SJ, Kim MJ, Yoon YH. Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the removal of cadmium and antioxidative detoxification in cadmium administered rats. Proceedings of the 3rd international symposium on green tea, Republic of Korea, pp.21-38, 1995