

전통 한약 탕제 투여에 의한 혈장 및 간 조직의 항산화력 증강 효과

홍성길 · 이미영 · 윤유식 · 강봉주 · 김대원 · 조동욱
한국 한의학 연구원 노화양생팀

Reinforcement of Antioxidative Potentials by Korean Traditional Prescriptions on Mouse Plasma and Liver

Seong-Gil Hong, Yoo-Sik Yoon, Mi-Young Lee, Bong-Joo Kang,
Dae-Won Kim and Dong-Wuk Cho

Aging and Regimen Research Team, Korea Institute of Oriental Medicine

Abstract

Yungmijihwangang-Won, Yollyunggobon-Dan and Palmi-Hwan, Korea traditional prescriptions composed of oriental medical herbs, have been used successfully to improve human health and regimen. This study was designed to examine the mechanism of healthful effects of the Korea traditional prescriptions through its antioxidative potentials. Using *in vitro* antioxidative activity assay system such as DPPH radical quenching assay, superoxide anion radical scavenging assay and inhibition of TBARS production, three Korea traditional prescriptions were observed to have nearly the same antioxidative potentials as ascorbic acid, a well-known strong water-soluble antioxidant. Moreover, we observed reinforced antioxidative effects of these drugs in liver from mouse fed these drugs with 4 weeks. When liver homogenate was incubated with 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride(AAPH), as a free radical initiator, we observed that oxidative damages were decreased and antioxidative potentials were increased in liver homogenate treated these drugs. However, enzymatic antioxidative system as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase was not affected by drug administration.

Key words : antioxidant, medical herb, korea traditional prescription, oxidative stress, liver

서 론

산소는 유기 호흡을 하는 생물에게 있어서 필수적인 존재이지만 에너지 대사 과정에서 불완전하게 환원되어질 때 발생하는 활성 산소(Reactive Oxygen Species, ROS)는 세포내의 거대 분자를 변성, 파괴하여 세포의 항상성을 파괴시켜, 세포를 사멸시키고 이런 과정의 축적이 노화 및 다양한 퇴행성 질병의 원인으로 받아들여지고 있다⁽¹⁾. 이런 활성 산소는 에너지 대사 과정뿐만 아니라 xanthine oxidase와 같은 oxidase의 작용이나 cytochrome P450과 같은 약물 대사 효소의 반응상에서도 발생한다. 생체는 활성 산소의 파괴적 행동을 막기 위해 방어 체계로는 superoxide dismutase, catalase등의 효소적 방어 체계와 uric acid,

vitamin E등의 비효소적 방어 체계로 구분되는 항산화 방어 시스템을 보유하고 있다. 그러나 순간적으로 과량의 활성 산소가 발생하거나 만성적으로 활성 산소가 발생하는 등, 활성 산소와 항산화 방어체간의 균형이 무너지면 세포는 손상을 받게 되며, 이의 누적이 노화 및 각종 질병을 유발한다⁽²⁻⁷⁾.

현재까지 활성 산소의 독성을 억제하기 위해서 체내의 항산화 방어 체계를 강화시키는 방법이 고안되어지고 있으나 소화기관에서의 흡수, 조직으로의 분배 등의 문제로 인한 난점을 완전히 극복하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 시도중 특히, 체내의 항산화 방어체의 근간을 이루는 superoxide dismutase(SOD)를 이용하는 방법이 응용되고 있으나 경구 복용시 위장관에서 파괴되거나 소화관에서 흡수가 난해해 큰 이득을 보지 못하고 있으며, liposome에 포집하여 혈관 주사하는 방법이 개발되어 몇몇 증상에 대해서 효과를 보고 있으나 아직까지 미미한 실정이다. 따라서, SOD와 유사하게 높은 항산화 활성을 가지면서 소화관에

Corresponding author : Dong-Wuk Cho, Aging and Regimen Research Team, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11, Chungarm Bldg. Chungdam-Dong, Kangnam-Gu, Seoul 135-100, Korea

서의 흡수가 쉬운 SOD 유사물질(SOD-like substance)의 개발이 절실한 실정이다⁽⁸⁻¹⁰⁾.

이런 면을 바탕으로 본 연구에서는 우리가 쉽게 접할 수 있는 전통 한약 탕제중 육미지황원, 팔미환 및 연령고본단을 이용하여 항산화력을 측정하고 이들을 흰쥐에게 투여하였을 때, 뇌와 간 조직의 항산화력 증강 효과를 관찰하여, 한의학 전통 탕제의 효능에 대한 기본적 자료로서 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

한약재의 조제

육미지황원, 팔미환 및 연령고본단의 구성은 동의보감 처방에 따랐으며, 그 구성성분은 Table 1과 같다. 이 구성 비율에 따라 각기 총 400 g의 약재를 준비 한 후, 증류수에 담그어 overnight 한 후, 약탕기에서 30 분간 boiling 한 후, 다시 재탕으로 2시간동안 boiling 하였다. 그후, mesh로 걸러낸 후, rotary evaporator로 농축한 뒤, 원심 분리하여 상정 액을 수거한다. 이 상정액을 여과 한 후 동결 건조기를 이용하여 분말화시키고, -20°C에서 보관하였고, 각 분말을 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 10 mg/mL의 농도로 용해하여 실험에 사용하였다.

항산화력의 측정

한약 처방 및 단미재의 항산화력의 측정은 DPPH radical quenching assay⁽¹¹⁾와 SOD 유사 활성 측정⁽¹²⁾ 및 지질과산화 반응 억제 효과를 이용하여 검증하였다.

DPPH(diphenylpicryl hydrazyl)는 파란색을 띠는 안정한 free radical 형태로서 존재하며, 항산화제 또는 환원제에 의해서 전자 또는 수소 원자를 받아들임으로서 diphenylpicryl hydrazine의 형태로 전환되면서 탈색되는 특징을 가지고 있기 때문에 시료중의 항산화제의 활성을 측정하는 대표적인 물질로서 사용된다. 이와 같은 원리를 이용하여, 탕제 시료를 DPPH solution (16 mg DPPH/100 mL EtOH : Na-phosphate buffer(pH 5.6), 1 : 1, v/v)에 첨가한 후 초기 흡광도를 517 nm에서 측정하고, 5분간 실온에서 반응시킨 후 탈색 정도를 측정하여 탕제 시료의 항산화력을 측정하였다.

Pyrogallol은 알칼리 pH에서 자동 산화하면서 superoxide anion radical(SAR)을 발생하며, 이것이 pyrogallol의 산화를 더욱 촉진하게 되는데 이 SAR을 소거함으로써 pyrogallol의 자동 산화를 억제시키는 능력을 측정하여 SOD 유사 활성을 측정하였다. 즉, 탕제 시료를 Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 첨가하고 여기에

Table 1. Components of prescriptions

Prescriptions	Component	Weight (g)
육미지황원 六味地黃元 (YJ)	Rehmanniae Preparata rhizoma	30
	Corni fructus	15
	Dioscorea tuber	15
	Alismatis rhizoma	11.25
	Paeoniae cortex	11.25
팔미환 八味丸 (PM)	Rehmanniae Preparata rhizoma	30
	Corni fructus	15
	Dioscorea tuber	15
	Alismatis rhizoma	11.25
	Paeoniae cortex	11.25
연령고본단 延齡固本丹 (YG)	Hoelen	11.25
	Spissus Cinnamomi cortex	3.75
	Aconiti tuber	3.75
	Cuscutae semen	15
	Cistanchis herba	15
	Asparagi radix	7.5
	Liriopsis tuber	7.5
	Rehmanniae rhizoma preparata	7.5
	Dioscorea tuber	7.5
	Achyranthis radix	7.5
	Eucommiae cortex	7.5
Morindae radix	7.5	
Lycii fructus	7.5	
Corni fructus	7.5	
Hoelen	7.5	
Schisandrae fructus	7.5	
Ginseng radix	7.5	
Saussureae radix	7.5	
Thujae semen	7.5	
Rubi fructus	7.5	
Plantaginis semen	7.5	
Radix Lycii cortex	7.5	
Acori Gramineae rhizoma	7.5	
Zanthoxyli pericarpium	7.5	
Polygalae radix	7.5	
Glycyrrhizae radix	7.5	
Alismatis rhizoma	7.5	

pyrogallol을 첨가 한 후 5분 동안 440 nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였다. SAR scavenging activity는 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 탕제의 농도로 결정하였다.

지질과산화 억제 활성의 측정은 linoleic acid sodium salt(30 mg/10 mL) 50 µL에 각 농도의 시료 20 µL 및 100 mM 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 30 µL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 shaking incubation을 행한 다음, 1.2% thiobarbituric acid 100 µL와 8.1% sodium dodecyl sulfate 20 µL, acetic acid glacial 30 µL를 첨가하고, 85°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 malondialdehyde-thiobarbituric acid conjugate dye를 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 하였다.

실험 동물의 사육 및 투여

대한실험동물센터(주)로부터 4주령의 ICR mouse를 분양 받아 실험에 사용하였다. 실험 동물은 1주간 적응시킨 후 4주동안 각 당제를 500 mg/Kg의 비율로 경구로 투여하였으며, 실험 기간동안 사료와 음료는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

시료 투여가 종료된 실험 동물은 ether로 마취시킨 후 심장으로부터 혈액을 채취하였고, 즉시 간 조직을 적출 하여 PBS에 2회 washing하여 혈액 성분을 제거하고 -70°C에 실험전까지 보관하였다. 채취한 혈액은 항응고제가 첨가된 시험관에서 혈장을 분리하였고, 간 조직은 무게를 측정된 뒤 9배의 PBS(containing 0.5% Triton X-100)를 첨가하여 마쇄하여 10% 조직 균질액을 제조하여 실험에 사용하였다.

혈장 총항산화력 측정

혈장의 총항산화력(total antioxidant status)의 측정은 Randox(U.K.)사의 Total Antioxidant Status 측정용 Kit를 이용하여 측정하였다.

산화제의 처리 및 산화적 손상의 측정

각 조직 균질액에 최종 농도가 10 mM이 되게 AAPH를 첨가한 후 shaking 하며 37°C에서 2시간동안 반응하였다. 또한, 당제 비투여군의 조직은 AAPH 처리군(AAPH)과 AAPH 비처리군(CON)으로 구분하여 동일 조건에서 반응하였다. 이후 이 시료에서 아래와 같이 산화적 손상 및 항산화 효소의 활성을 측정하였다.

지질과산화의 측정은 Yagi 등⁽¹³⁾의 방법을 변형하여 행하였고, 단백질 분해도의 측정은 Davies 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다.

조직내 glutathione의 측정은 Hissen 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 환원형 glutathione(GSH)와 산화형 glutathione(GSSG)을 분리하여 측정된 후 이들간의 비를 구하였다.

체내 항산화 효소의 측정

간 조직내의 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)는 pyrogallol의 자동 산화 억제 방법에 의해서 측정하였고, catalase(CAT) 활성 측정은 Aebi의 방법⁽¹⁶⁾에 따라 행하였다. 또한, glutathione peroxidase(GPx) 및 glutathione reductase(GR)의 활성은 GSSG를 GSH로 환원시킴과 동시에 산화되는 NADPH의 양을 정량함으로써 간접적으로 측정하였다⁽¹⁷⁾.

통계 처리

각 실험 결과는 평균±표준편차의 형태로 나타내었

Table 2. Free radical scavenging concentration(SC₅₀) of each Korean traditional prescription with various free radical sources

Drugs	DPPH radical (µg/mL)	Superoxide anion (µg/mL)	Peroxyl radical (µg/mL)
YJ	477.6	242.8	52.4
PM	397.2	277.9	142.4
YG	528.0	273.5	108.5
Vitamin C	137.5	68.7	83.2

으며, 통계처리는 student t-test를 통해서 행한 후, 유의적 차이가 있는 군에 한해서 나타내었다.

결과 및 고찰

시료의 항산화력 비교

당제 추출물의 항산화제 측정을 위해서 전자 공여능, SOD 유사 활성, 지질과산화 억제 활성 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다.

DPPH radical을 이용한 전자 공여능, SOD 유사 활성 및 지질과산화 억제 능력을 측정된 방법은 항산화제의 screening에 많이 이용되고 있으며, 이를 이용하여 3개 당제의 항산화력을 측정된 결과 육미지황원, 연령고본단, 팔미환의 3개 당제는 모두 대표적 수용성 항산화제인 vitamin C에 비해 전체적으로 낮은 활성을 보였지만, 육미지황원의 경우 지방산을 산화시키는 peroxy radical에 대한 소거능은 vitamin C에 비해 유사한 값을 보였으며, 이는 세포막의 지방산에 대해 효율적인 방어를 할 수 있거나 또는 peroxy radical에 대해 비교적 높은 친화성을 가진 것으로 추측된다. 그러나 vitamin C가 체내에서 세포내에 쉽게 흡수될 수 있고, 항산화 체계에 유기적으로 참여할 수 있는 능력이 있어 *in vitro*에서 측정된 항산화력이 vitamin C와 유사하다고 하여 실제 생체내에서 높은 항산화력을 보여준다고 생각할 수는 없다. 따라서, 본 실험에서는 이들 당제를 실험용 동물에게 투여한 후 산화적 손상으로부터 생체 보호 능력을 측정하였다.

당제 투여에 의한 항산화력 증강 효과

당제를 투여한 실험 동물로부터 혈장을 분리하여 이곳에서 총항산화력(total antioxidant status)을 측정된 결과는 Fig. 1과 같이 당제 투여군의 총항산화력은 연령고본단, 팔미환, 육미지황원 투여군이 대조군에 비하여 각각 18.5%, 8.9%, 25.0%를 증가하였으며, 모두 통계적 유의성을 나타내었다(p<0.01). 혈장의 항산화력은 체내 항산화력을 대표하는 값으로 생각될 수 있으며,

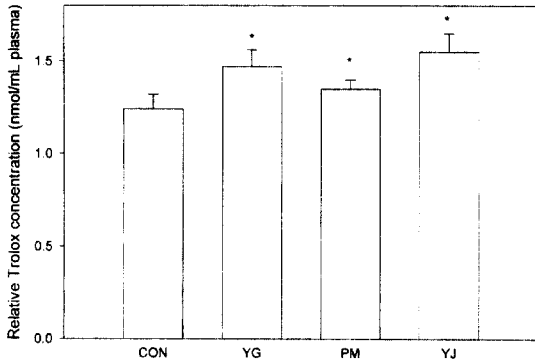


Fig. 1. Plasma total antioxidant status in mouse plasma after tretement of Korea traditional prescriptions during 4 weeks(Trolox is water-soluble vitamin E analogue). *p<0.05 compared with CON group

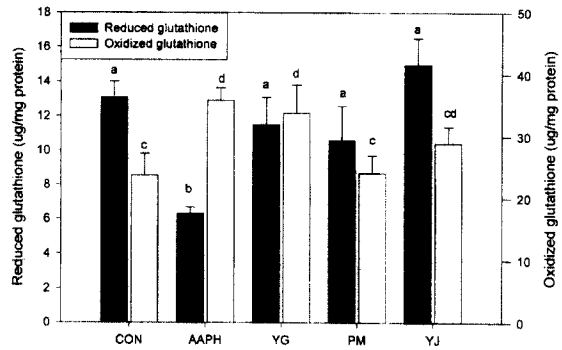


Fig. 2. Change of reduced glutathione and oxidized glutathione after AAPH treatment in Korea traditional prescriptions treated mouse liver homogenate. Means with same alphabets are not significantly different at p<0.05.

따라서 혈장 총항산화력의 증가는 당제 투여에 의해서 체내 항산화력이 보강되었음을 의미한다고 할 수 있다. 이것은 catechine과 같은 polyphenol류 항산화제를 포함한 녹차를 투여하였을 경우 혈장 항산화력이 약 20% 가량 증가한다는 보고⁽¹⁸⁾와 일치하는 결과로 당제 투여가 체내의 항산화력을 증강시킨다는 것을 나타낸다.

조직에서 glutathione은 자체적으로 항산화제로 이용되거나 또는 다른 항산화제의 환원 상태 유지에 관여하고 또한 GPx와 같은 항산화 효소의 cofactor로서 작용하여, 조직내에서 수용성 항산화 방어 체계의 근간을 이루는 중요한 물질이라 할 수 있다. 또한, 세포내에서 환원형 glutathione과 산화형 glutathione의 비율은 세포내의 산화적 스트레스와 세포내 환원력을 나타내는 지표로 사용된다. 당제를 투여한 조직에 free radical initiator인 AAPH를 처리하였을 때 이들 glutathione의 변화를 관찰한 결과(Fig. 2) 당제를 투여하지 않은 조직 균질액(AAPH)에서 AAPH 비처리군(CON)에 비교하여 산화형 glutathione (GSSG)의 급속한 증가와 환원형 glutathione(GSH)의 감소가 나타났으며, 이것은 환

원형 glutathione과 산화형 glutathione 비율의 급격한 감소로 나타났다(p<0.01). 당제를 투여한 실험 동물에게서 적출한 장기를 같은 조건의 AAPH로 처리하였을 때, 이러한 산화형 및 환원형 glutathione의 변화는 모두 유의적으로(p<0.05) 억제되어 전통 당제의 투여가 산화적 환경하에서 간 조직의 방어 능력을 크게 향상시킨 것으로 생각된다. 이러한 변화는 특히, 육미지황원을 투여한 군에서 가장 현저하게 나타났으며, 이것은 당제의 항산화력 측정 및 당제를 투여한 실험 동물의 혈장의 총항산화력 측정 결과와도 일치하였다.

Glutathione과 같은 비효소적 방어제와 협조 하에 체내 항산화 방어 체계를 이루는 효소적 방어제는 SOD, CAT, GPx와 GR이 대표적이다. AAPH로 유발된 산화적 환경으로 처리된 간 조직에서 이들 효소의 활성 변화와 당제 투여의 효과는 Table 3과 같은 결과를 보였다. SOD를 비롯한 항산화 효소들은 free radical을 분해하여 안정한 물질로서 만드는 활성을 보이거나 고반응성의 free radical과 가장 근접한 장소에 위치하고 있기 때문에 다른 세포 구성분에 비하여 free radical에 의하여 손상 받을 위험성도 높다^(19,20). 본 실험에서도

Table 3. Change of antioxidative enzyme activity in Korean traditional prescriptions treated mouse liver homogenate after AAPH treatment

Enzyme activity (unit/mg protein)	Superoxide dismutase	Catalase	Glutathione Peroxidase	Glutathione Reductase
CON	4.77 ± 0.51 ^a	11.35 ± 0.45 ^a	3.27 ± 0.37 ^a	1.47 ± 0.22 ^a
AAPH	2.08 ± 0.35 ^b	6.48 ± 0.14 ^b	3.01 ± 0.15 ^a	1.08 ± 0.29 ^a
YG	3.14 ± 0.08 ^c	8.9 ± 0.91 ^c	3.42 ± 0.54 ^a	1.54 ± 0.18 ^a
PM	3.08 ± 0.17 ^c	9.50 ± 1.55 ^{bc}	3.08 ± 0.71 ^a	1.30 ± 0.14 ^a
YJ	3.92 ± 0.23 ^d	8.04 ± 0.50 ^c	3.65 ± 0.32 ^a	1.15 ± 0.17 ^a

Means with same alphabets are significantly not different at p<0.05. CON group dose not treat AAPH.

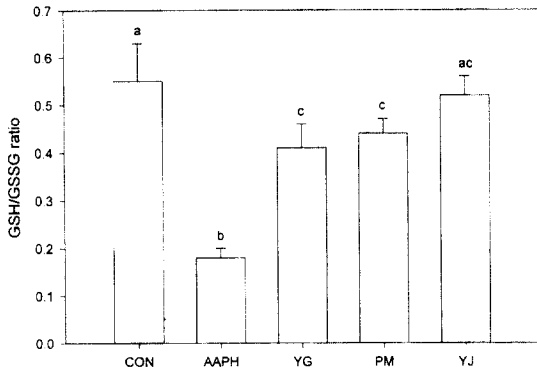


Fig. 3. Change of reduced glutathione and oxidized glutathione ratio after AAPH treatment in Korea traditional prescriptions treated mouse liver homogenate. Means with same alphabets are not significantly different at $p < 0.05$.

간 조직의 균질액에 AAPH를 처리하였을 때 SOD와 CAT의 활성이 각각 56.4% 및 42.9% 감소하여 이 두 효소가 손상 받고 있음을 볼 수 있었다. 탕제를 투여한 조직에서 이들 효소 활성의 감소는 유의적($p < 0.05$)으로 억제되었다. 그러나 GPx와 GR의 경우는 AAPH 처리에 의해서 유의적인 활성의 감소가 나타나지 않았으며, 탕제 투여에 의한 유의적인 변화도 관찰할 수 없었다.

체내의 효소적 방어계와 비효소적 방어계는 상호간의 긴밀한 협조아래 free radical의 독성으로부터 세포 구성분을 보호하는 역할을 한다. 따라서, 탕제 투여에 의해서 비효소적 방어계의 대표적 물질인 glutathione과 효소적 방어계의 SOD, CAT의 활성 보호 역할은 이들 탕제의 음용이 조직의 항산화 방어 체계를 강화하여 산화적 손상으로부터 생체를 보호할 수 있는 역할을 수행하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 추측된다.

산화적 손상으로부터 간 조직의 보호

Fig. 4는 간 조직에서 조직의 균질액에 peroxy radical initiator인 AAPH를 처리한 후 산화적 손상의 지표로 사용되는 지질과산화물과 단백질 분해도를 측정된 결과이다. Fig. 1에서와 같이 3개 탕제에서 혈장 항산화력이 모두 증가한 것과는 달리 YG, PM 처리군은 지질과산화물이나 단백질 분해도에서 AAPH 단독 처리군에 비하여 낮은 값을 보였으나 유의적인 억제 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 YJ의 경우 단백질 분해도와 지질과산화물의 생성을 모두 유의적으로 억제하였다($p < 0.05$).

본 연구 결과 AAPH를 처리하였을 때 3가지 전통

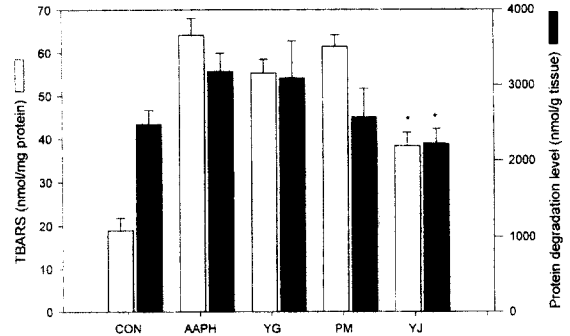


Fig. 4. Protecting effects of Korea traditional prescriptions supplement against AAPH-induced TBARS formation and protein degradation in mouse liver homogenate. * $p < 0.05$ compared with AAPH group

탕제를 투여 받은 실험 동물의 간 조직에서 효소 및 비효소적 방어계의 감소가 완화되었다. 그러나 팔미환, 연령고본단의 경우 체내 항산화 방어력을 증강시키는 경향을 보이긴 하였으나 AAPH 처리로 나타나는 산화적 손상을 효과적으로 억제하지는 못하였다. 그러나 본 실험에서 사용된 AAPH의 처리로 발생된 고농도의 free radical 발생 확률이 낮을 것으로 생각되는바, 팔미환과 연령고본단은 체내 항산화력을 증강시키는 데 도움을 줄 것으로 생각된다. 또한, 육미지황원의 경우는 조직의 항산화력을 효과적으로 증진시켰으며, 이를 바탕으로 산화적 손상을 효과적으로 억제하였다. 따라서, 한의학에서 보익제(補益製)로 사용되는 이 3개 탕제는 모두 생체내 항산화 방어력을 증대시켜 산화적 손상으로부터 생체를 보호할 수 있을 것으로 추측된다.

요 약

인체에 대해서 유익한 작용을 하며 실생활에서 쉽게 접할수 있는 3개의 보익제를 동의보감으로부터 선정하여 효능을 과학적으로 검증하기 위한 자료로서 항산화력을 조사하였다. 동의보감의 처방에 따라서 약재를 혼합한 후 열수 추출한 물질의 항산화력을 전자공여능, SOD 유사 활성 및 지질과산화 억제능을 이용하여 조사한 결과 대표적 항산화제인 vitamin C에 비하여 낮은 활성을 보였으나 모두 항산화력을 나타내었다. 이 3개 탕제를 흰쥐에게 4주간 투여한 뒤 혈장에서 총항산화력이 대조군에 비하여 증가하였다. 또한, 탕제 투여한 흰쥐의 간 조직을 적출 하여 활성 산소 발생제인 2,2'-azobis(amidinopropane)dihydrochloride

(AAPH)를 처리한 결과 조직내의 대표적 비효소 항산화제인 환원형 glutathione의 감소가 억제되었으며, 산화형과 환원형의 비율 또한 증가하여 당제 투여에 의해 간 조직 및 혈장의 항산화력이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과 산화적 손상의 지표로 사용되는 지질 과산화(TBARS)와 단백질 분해도 역시 당제 투여군이 비투여군에 비하여 감소하였다. 따라서, 보약제로 사용되는 3개 당제는 체내 항산화력을 증강시켜 노화 및 다양한 질병의 원인이 되는 산화적 손상으로부터 체내를 보호할 수 있을 것으로 추측된다.

문 헌

1. Bulkeley, G.B. The role of oxygen radicals in human disease process. *Surgery* 94: 407-411 (1983)
2. Shaw, S. and Jayatileke, E. The role of cellular oxidase and catalytic iron in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury. *Life Sci.* 50: 2045-2052 (1992)
3. John, N.C.G. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41: 1819-1828 (1995)
4. Gary, W.P. and Cynthia, D.L. The role of oxidative stress in HIV diseases. *Free Radical Biol. Med.* 19: 523-528 (1992)
5. Fridovich, I. Biological effects of superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11 (1986)
6. Marino, M., Coassin, M. and Roveri, A. Microsomal lipid peroxidation: Effects of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids* 24: 721-726 (1989)
7. Becman, K.B. and Ames, B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-571 (1998)
8. Yoshikawa, T., Naito, Y. and Kondo, M. Antioxidants in the Therapy and Preventive Medicine. p. 171. Plenum Press. New York, USA (1990)
9. Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidants. *Free radical Res. Commun.* 9: 1-32 (1990)
10. Halliwell, B. Free radicals and antioxidant: A personal view. *Nutr. Review.* 52: 253-265 (1994)
11. Tomohiro, N., Kitatani, F. and Yagi, A. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish. *Biol. Biotech. Biochem.* 58: 1780-1782 (1994)
12. Murklund, S. and Marlund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *J. Biochem.* 47: 469-474 (1974)
13. Yagi, K. A simple fluoremetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216 (1976)
14. Davies, K.J.A. and Glodberg, A.L. Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cell. *Biol. Chem.* 262: 8227-8235 (1987)
15. Hissin, P.J. and Hilf, R. A fluolemetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214-226 (1976)
16. Aebi, H. Catalase. pp. 673-684 In *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer, H.U. (ed). Vol 2. Academic Press. New York, USA (1974)
17. Tanikuchi Naoki. Protocol of reactive oxygen study, Sulin-Sha Press. 116-119 (1994)
18. Pietta, P., Simouetti, P., Gardana, C., Brusamolino, A., Motrazzini, P. and Borloradelli, E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 895-899 (1998)
19. Ribeire, C. and Sinaceur, J. Liver superoxide dismutase and catalase during ethanol inhalation and withdrawal. *Pharm. Biochem. Behavior* 18: 263-266 (1983)
20. Schislr, N. and Sin, S.M. Effects of ethanol *in vivo* on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Radical. Biology & Medicine* 7: 117-123 (1989)

(1999년 4월 28일 접수)