

감귤과피로부터 분리한 Hesperidin^o] 흰쥐의 지방과 Cadmium 대사 및 항산화능에 미치는 영향*

김호정 · 배계현 · 이혜진 · 은종방** · 김미경

이화여자대학교 식품영양학과, 전남대학교 식품공학과**

Effect of Hesperidin Extracted from Tangerine Peel on Cd and Lipid Metabolism, and Antioxidative Capacity in Rats

Kim, Ho Jung · Bae, Kye Hyun · Lee, Hye Jin · Eun, Jong Bang** · Kim, Mi Kyung

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

Department of Food Science and Technology, ** Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of hesperidin extracted from tangerine peel on Cadmium(Cd) and lipid metabolism, lipid peroxide formation, and antioxidative enzyme activities in rats. Forty-eight male Sprague-Dawley rats weighing 158.3 ± 3.5 g were blocked into eight groups according to body weight. Rats were raised for three weeks with diets containing 0 or 0.04%(w/w) cadmium chloride and 1%(w/w) extracted hesperidin from tangerine peel, commercial hesperidin or naringin. Food intake, weight gain and food efficiency ratio were significantly lower in the Cd-administered groups. The Cd concentrations in blood and liver and the Cd excretions in urine and feces were significantly higher in the Cd-administered groups. Among the Cd groups, blood Cd concentrations were decreased, fecal Cd excretions were increased, and Cd retention ratios were decreased by feeding flavonoid diets. Plasma total lipid concentrations were significantly lower in the extracted hesperidin group, plasma triglyceride concentrations were significantly lower in the extracted hesperidin and naringin groups. Plasma HDL-cholesterol concentrations and HDL : total cholesterol ratios were increased by feeding flavonoids. Among the Cd groups, liver total lipid concentrations were decreased by feeding flavonoids. Fecal total lipid, fecal cholesterol, and fecal triglyceride excretions were significantly higher in the naringin group, and they were increased by feeding flavonoids among Cd groups. Thiobarbituric acid reactive substance concentrations in plasma and liver were higher in Cd groups, and were significantly decreased by feeding flavonoids. The activities of erythrocyte catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase showed a tendency to increase by feeding Cd. Among the Cd groups, erythrocyte glutathione peroxidase activities were significantly decreased by feeding flavonoids. The activities of liver catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were not significantly affected by administering Cd or flavonoids. In conclusion, all flavonoids that were used in this experiment inhibited lipid peroxide formation in plasma and liver, but this effect was not caused by the increase in the activities of antioxidative enzymes. (Korean J Nutrition 32(2) : 137~149, 1999)

KEY WORDS : hesperidin · naringin · Cd metabolism · lipid metabolism · antioxidative capacity.

서 론

과학기술의 발달로 인간은 물질적인 풍요와 생활의 편리함, 풍족한 식생활을 영위하며 평균 수명도 증가하고 있다. 그러나 각종 공해와 식품오염, 영양과잉, 활동부족, stress 등으로 인한 비만, 심순환계 질환과 암의 발병률이 증가되

채택일 : 1999년 1월 5일

*This research was supported by the '97 grant from the Ministry of Health and Welfare

고 이들이 주요 사인으로 대두되고 있다.^{1,2)} 이제 단순히 오래사는 것이 아니라 건강하고 행복한 삶을 누리는 것이 사람들의 주된 관심사가 되고 있으며 그로 인해 이들 만성 퇴행성 질환들의 병인을 조사하고 이 질환들을 예방할 수 있는 물질을 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 만성 퇴행성 질환들의 발병이 자유기(free radical)에 의한 산화적 손상과 관련이 있다는 연구들이 차츰 늘어가고 있고,^{3,4)} 최근 오염문제가 심각해지는 카드뮴, 납 등의 중금속이 체내 축적시 산화촉진제로 작용하여 자유기의 생성을 촉진하고, 자신이 electrophiles로 작용하여 우리몸의 세포

와 각 기관 조직의 손상은 물론 노화 촉진제, 더 나아가 발암 물질로도 작용할 수 있다.⁵⁾⁶⁾ 그러므로 공해를 줄여 중금속의 체내 유입을 예방하는 것도 시급한 과제인 반면, 이미 체내로 유입된 중금속을 효과적으로 몸밖으로 배출하고, 제독하는 일도 중요하다.⁵⁾⁶⁾ 그리고 심순환계 질환은 총열량 섭취 및 총지질 섭취 과잉, 그리고 콜레스테롤 섭취 과잉 등으로 혈중 지질의 함량이 높은 개체들에서 더 높은 발병률을 보이는 경향이 있으므로, 지질의 흡수율을 낮춰주고 혈중 지질 수준의 증가를 막는 것 또한 심순환계 질환의 발병률을 낮추는데 기여할 것으로 생각된다.⁷⁾⁸⁾ 이에 더하여 자유기 형성에 의한 체내의 산화적 손상을 억제하는 항산화능을 증진시키는 물질이 있다면 이는 심순환계 질환과 암 등 만성질환의 발병률을 낮추는데 크게 기여할 것으로 사료된다.⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾

우리몸에는 이런 자유기로부터 세포막과 세포내 물질들을 보호하는 여러 항산화 물질들과 효소체계들이 있다. 그 중 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-px) 등을 주된 항산화 효소들로서 이들은 과산화물 생성과정의 시작물질인 superoxide anion radical을 제거하고 hydroxyl radical의 생성을 막아서 세포를 과산화적 손상으로부터 보호한다⁵⁾¹¹⁾¹²⁾. 그리고 이런 효소들 이외에 vitamin A, C, E, β-carotene 등의 항산화 vitamin들과 Se등의 무기질, 그리고 flavonoids 등의 항산화 물질들이 체내에서 자유기(free radical)의 생성과 전파를 억제하는 데 참여한다¹³⁾²⁵⁾.

이 가운데 flavonoids가 최근 안전한 항산화물질로서 큰 관심을 끌고 있다. Flavonoids는 과일, 야채, 견과류, 식물의 뿌리, 줄기, 껍질, 채, 커피, 포도주 등에 널리 분포되어 있는 천연의 저분자 물질로 자연에 약 4000종이나 있는 것으로 알려져 있다²⁵⁾²⁶⁾. Flavonoids는 polyphenolic substances로 이 기본 구조에 붙어있는 기능기의 차이로 크게 flavones, flavonols, flavanones, flavanols, anthocyanins, catechins, isoflavones 등으로 나누어지며, 이런 구조가 그들의 생화학적 활성에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다²⁷⁾. Flavonoids는 담황색, 노란색을 띠는 색소화합물로서 자연에서 유리상태(aglycone)로 존재하기도 하나 대개는 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당과 결합된 배당체(glycoside) 형태로 존재한다²⁷⁾. 그런데 이들의 식품내 함량에 대한 연구는 아직 부족하여 한 사람당 하루 섭취량이 23mg²⁸⁾에서 1g²⁷⁾²⁹⁾내지 몇g³⁰⁾까지로 다양하게 추정되고 있으며 다량 섭취시에도 특별한 부작용이 없는 것으로 알려져 있다.

Flavonoids의 종류와 함량은 그 식물의 종류와 자라난

토양, 환경 등에 따라 매우 다르다고 밝혀지고 있으며³¹⁾, 이들의 생체내에서의 흡수 및 대사는 그 기본 구조와 glycosylation, acylation 등이 이루어진 정도, 그리고 다른 phenolic 물질들과의 conjugation 여부, 분자의 크기, 중합된 정도, 용해도 등에 따라 결정된다고 한다³²⁾. 최근 국내에서는 우리나라에서 자란 우리나라 고유 식물중 내의 flavonoids에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다³³⁾³⁶⁾. 특히 우리나라 고유 과실류인 감귤과 유자 과피내의 flavonoids의 종류 및 함량 조사에서 hesperidin과 naringin이 주된 flavonoids로 밝혀졌고³⁷⁾³⁸⁾, 감귤 과피내의 hesperidin은 혈압강하 효과가 있으며³⁹⁾, naringin은 항균 작용이 있는 등⁴⁰⁾ 이들의 생리활성이 보고되고 있다.

이밖에도 flavonoids의 여러 생리활성이 활발히 연구되고 있다. 우선 항산화 기능과, 산화촉진인자인 금속이온과 쳐염을 형성하는 기능으로 인해 free radical이나 electrophiles, 지질 과산화물 생성에 의한 세포, 조직, 기관의 손상 억제, 노화 방지, 심순환계 질환 예방효과, 항암효과까지도 밝혀지는 것으로 밝혀지고 있다⁴¹⁾⁴⁸⁾. 그리고 혈중 cholesterol을 낮추고 HDL cholesterol을 높이는 등 심순환계 질환 예방 및 개선 효과도 보고되고 있다⁴⁹⁾⁵²⁾. 한편, 면역에 미치는 flavonoids의 효과는 biphasic하여 만성염증이나 알레르기 및 자가면역 등에 있어서는 면역기능을 억제하는 효과가 있는 반면에 정상적이고 바람직한 면역 기능은 강화시켜 건강을 증진시킨다²⁷⁾⁵³⁾⁵⁵⁾. 이 이외에도 항균성⁴⁰⁾⁵⁶⁾, 항돌연변이성⁵⁷⁾, 암의 전이억제⁵⁸⁾ 등 flavonoids의 생리활성은 실로 다양하다.

Flavonoids의 항산화능과 관련된 생리활성을 뒷받침하는 역학조사와 *in vitro* 연구는 비교적 많이 행해져 왔다. 즉 flavonoids가 함유되어 있는 야채, 과일 등 식물성 식품의 섭취가 많을수록 심순환계 질환에 의한 사망률과⁵⁹⁾⁶²⁾ 암으로 인한 사망률이 낮다는 여러 역학조사 결과가 있다⁶³⁾⁶⁵⁾. 한편, *in vitro* 연구에서는 flavonoids가 free radicals 생성 억제⁴²⁾⁴⁵⁾⁶⁶⁾, lipid peroxidation 억제⁴²⁾⁴⁵⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾, LDL(low density lipoprotein)산화 억제⁶⁸⁾⁶⁹⁾, platelet aggregation 억제 역할을 한다는 것이⁷⁰⁾ 밝혀지고 있다. 또한 *in vitro* 연구에서 flavonoids가 중금속류를 chelating하여 금속들이 산화촉진제로 작용하지 못하도록 붙잡고 또한 스스로가 항산화제로 작용하여 이미 생성된 free radicals을 없애는 radical scavenger로 작용한다는 것이 밝혀지고 있다⁴²⁾⁴⁴⁾. 그런데 이러한 flavonoids의 항산화 작용에 대한 체계적인 *in vivo* 연구는 아직 많이 부족한 형편이다.

본 연구자들은 폐기되고 있는 우리나라 감귤과피내의 flavonoids의 종류 및 함량 조사와 더불어 기능성 식품소재

를 탐색하기 위하여 감귤과피로부터 flavonoids의 다량 추출 방법을 모색하고 그 영양생리효과를 검증하고 있다. 이에 본 연구에서는 우리나라 감귤과피에서 추출한 hesperidin과 시판되는 hesperidin과 naringin을 식이에 혼합하여 섭취시킬 때 카드뮴을 식이에 첨가해서 산화적 stress를 가한 조건과 산화적 stress를 가하지 않은 정상조건에서 이 flavonoids들이 과산화 지질 생성과 항산화 효소체계에 어떠한 영향을 미치는지 조사하여 보고자 하였다. 아울러 이 flavonoids들이 흰쥐의 지방 및 Cd 대사에 미치는 영향에 대해서도 알아 보았다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

생후 4주된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 48마리를 구입하여 실험시작 전 1주일간 고형 배합 사료(삼양사료)로 적응시켰다. 적응기간 후 체중이 158.3 ± 3.5 g된 쥐들을 체중에 따라 난파법(randomized complete block design)에 의해 Cd 공급여부와 flavonoids 급원과 종류에 따라서 8군으로 분류하여 한 군당 6마리씩 3주간 사육하였다. Flavonoids는 식이의 1% 수준으로 공급하였고, Cadmium

은 cadmium chloride(CdCl_2)를 식이에 혼합하여 공급하였으며, 그 수준은 식이무게의 0.04%인 400ppm(Cd로는 245ppm)이었다. 실험동물은 한 마리씩 분리하여 stainless steel cage에서 사육하였고 식이와 물은 제한없이 먹게 하였다.

제주산 감귤과피로부터의 hesperidin 추출은 Ikan의 방법⁷¹⁾을 변형한 온종방의 방법⁷²⁾으로 추출하였다. 과피를 건조분말을 petroleum ether로 1시간 동안 40°C에서 환류추출한 후 여과하여 실온에서 건조시켰다. 건조된 powder를 추출수기에 옮겨서 MeOH로 3시간 동안 환류추출하고 여과한 후 MeOH로 재 세척여과 하였다. 여과로 얻어진 filtrate를 syrup상태까지 농축시키고 acetic acid로 침전시켜 결정을 얻었고, 이 결정을 membrane filter(0.45μm)로 여과하고 37°C dry oven에서 건조시켜 acetic acid를 제거하여 분말화된 crude hesperidin(순도, 약 80%)을 얻었다.

본 실험에서 사용한 식이의 구성은 Table 1과 같다. 중금속의 오염을 막기 위해 쥐장과 물병을 0.4% EDTA로 처리하였고 물은 증류수로 공급하였다.

식이 섭취량은 일주일에 3회 일정한 시간에 측정하였고, 체중은 일주일에 1회 같은 시간에 측정하였다. 이상에서 측정한 식이 섭취량과 체중을 이용하여 실험 전 기간의 체중

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	(g per Kg diet)							
	Groups ¹⁾	C	C Cd	EH	EH Cd	H	H Cd	N
Corn Starch	698	697.6	688	687.6	688	687.6	688	687.6
Casein	150	150	150	150	150	150	150	150
Corn oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Hesperidin	-	-	10	10	-	-	-	-
Hesperidin	-	-	-	-	10	10	-	-
Naringin	-	-	-	-	-	-	10	10
Salt mixture ²⁾	40	40	40	40	40	40	40	40
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10	10	10	10	10	10
Choline chloride	2	2	2	2	2	2	2	2
Cadmium(0.04% CdCl_2 of diet)	-	+	-	+	-	+	-	+

1) C : Control group(none flavonoid – none cadmium)

C Cd : none flavonoid – cadmium group

EH : Hesperidin extracted from tangerine peel – none cadmium group

EH Cd : Hesperidin extracted from tangerine peel – cadmium group

H : Hesperidin purchased from Sigma Chemical Co – none cadmium group

H Cd : Hesperidin purchased from Sigma Chemical Co – cadmium group

N : Naringin purchased from Sigma Chemical Co – none cadmium group

N Cd : Naringin purchased from Sigma Chemical Co – cadmium group

2) Salt mixture(g/Kg mixture) : Calcium phosphate, dibasic($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 500, Sodium chloride(NaCl) 74, Potassium citrate, monohydrate($\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 220, Potassium sulfate(K_2SO_4) 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(KIO_3) 0.01, Sodium selenite($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.01, Chromium potassium sulfate($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1000 gram

3) Vitamin mixture(mg/Kg mixture) : ThiamineHCl 600, Riboflavin 600, PyridoxineHCl 700, Nicotinic acid(Nicotinamide is equivalent) 3000, D-Calcium Pantothenate 1600, Folic acid 200, D-Biotin 20, Cyannocobalamin(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 -Tocopherol 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 1000 gram

증가량을 같은 기간에 섭취한 식이량으로 나누어 식이효율 (food efficiency ratio, F.E.R.)을 산출하였다.

2. 뇨, 변, 혈액의 채취

Cadmium(Cd) 공급군들의 Cd 보유율 측정을 위해 실험 종료전 7일 동안 10,000ppm CdCl₂용액(Cd로는 6,125 ppm) 0.2 ml를 하루에 한 번 일정한 시각에 tube feeding 하였다. 이 기간 동안 식이로의 Cd 공급을 중단하였으며, tube feeding으로 인한 stress를 고려하여 Cd 비공급 군에게도 털이온 증류수를 tube feeding 하였다.

Cadmium을 tube feeding한지 3일째로부터 뇌와 변을 채취하였다. 뇌와 변을 채취시 식이에 의해 시료의 성분이 오염되는 것을 방지하기 위하여 식이그릇을 대사장에 넣어 주지 않았고, 털이온 증류수는 제한 없이 공급하였다. 첫날에는 오전 8시부터 오후 8시까지, 둘째날에는 오후 8시부터 그 다음날 오전 8시까지 실험 동물을 대사장(metabolic cage)에 옮겨 뇌와 변을 채취하였고 이와 같이 채취한 뇌와 변을 1일간의 뇌와 변 배설량으로 간주하였다. 이 과정을 연속 2회 반복하여 2일간의 뇌와 변을 수거하여 분석에 이용하였다. 뇌와 변을 채취하지 않는 동안에는 원래의 사육장에 넣어 식이를 공급하였다. 채취한 뇌는 원심 분리하여 상층액만 냉동 보관하였다가 Cd 분석에 이용하였다. 변은 젖은 상태로 냉동 보관하였다가 110°C drying oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 지방 및 Cd 분석에 이용하였다. 그리고 Cd 경구 투여량과 뇌와 변으로의 Cd 배설량을 가지고 Cd 보유율을 계산하였다.

실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 sodium citrate 용액으로 내부를 coating시킨 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 혈액의 일부는 -70°C 냉동고에 보관하였다가 Cd 농도를 측정하였고, 나머지 혈액은 원심분리(Sorvall, RT 6000B)하여 red blood cell(RBC)과 혈장을 분리하고 혈장은 혈장내 지질 및 과산화물양의 측정을 위해 -70°C 냉동고에 보관하였다. RBC는 ice cold 생리식염수를 첨가하여 원심분리하는 세척과정을 세차례 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°C 냉동고에 보관하였다. 혈액 채취 후 즉시 간을 떼어 ice cold 생리식염수에 넣어 세척한 다음 즉시 -70°C 냉동고에 보관하여 지질 및 Cd 농도, 항산화 효소의 활성과 과산화물의 양을 측정하였다.

3. 생화학적 분석

1) 혈액, 뇨, 변 및 간 조직내 Cd 농도

혈액과 뇨의 Cd 농도는 Zinterhofer법⁷³⁾을 이용하여 측정하였다. 그리고 냉동 보관하였던 변과 -70°C 냉동고에서 보관하였던 간 1g 씩을 110°C drying oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 550°C muffle furnace에서 24시간 동안 회화시킨 후 이를 농질산 1 ml로 녹이고 1 N HCl 15ml로 희석하여 Yeager법⁷⁴⁾에 의하여 파장 228.8nm에서 AAS로 Cd 농도를 측정하였다.

2) 혈장, 간, 변 내 지방 농도

혈장의 총지방 농도는 Frings법⁷⁵⁾에 의하여 파장 540 nm에서 spectrophotometer(Spectronic 301, Milton Roy)로 비색정량 하였다. 혈장의 총 cholesterol은 cholesterol esterase를 이용한 분석 kit(영동제약)를 사용하여 파장 500nm에서 Spectrophotometer로 비색정량하였고, HDL-cholesterol은 cholesterol esterase를 이용한 분석 kit(영동제약)로 파장 500nm에서 비색정량하였다. 한편 중성지방은 lipoprotein lipase를 이용한 분석 kit(영동제약)로 파장 546nm에서 비색정량하였다.

간과 변의 총지방 농도는 Bligh & Dyer법⁷⁶⁾을 이용하여 측정하였고, 간과 변의 cholesterol 농도는 위에서 추출한 총지방을 methanol에 녹인 후, cholesterol esterase를 이용한 분석 kit(영동제약)로 파장 500nm에서 비색정량하였고, 간과 변의 중성지방 농도는 위에서 추출한 총지방을 methanol에 녹인 후 lipoprotein lipase를 이용한 분석 kit(영동제약)로 파장 546nm에서 비색정량 하였다.

3) 혈장과 간의 Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) 농도

혈장의 TBARS 함량은 Yagi⁷⁷⁾의 방법을 이용하여 측정하였는데 1,1,4,4-tetramethoxypropane을 표준용액으로 하여 TBARS양을 luminescence spectrometer(Perkin Elmer, LS50)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 정량하였다. 그리고 간의 TBARS는 Buckingham법을⁷⁸⁾ 이용하여 spectrophotometer로 532nm에서 비색정량하였다.

4) 적혈구와 간의 항산화계 효소 활성

항산화계 효소 활성은 앞에서 언급한 대로 준비된 적혈구 혼탁액과 간에서 측정하였다. 적혈구 catalase 활성은 Johansson과 Hakan Borg법⁷⁹⁾에 의하여 spectrophotometer로 550nm에서 흡광도를 측정한 후 formaldehyde를

표준용액으로 하여 얇은 표준 곡선으로부터 분당 활성을 계산하였다.

적혈구 SOD의 활성은 Folcher 등의 방법³⁰⁾과 Winterbourn 등의 방법³¹⁾을 변형하여 측정하였다. Xanthine과 cytochrome C(Fe^{++})가 들어있는 phosphate buffer(pH 7.8) 2ml를 25°C로 유지하면서 여기에 효소시료 50μl를 가지고 사용 직전에 제조된 xanthine oxidase 용액 50μl를 첨가하여 cytochrome C(Fe^{++})의 환원을 50% 방해하는 SOD양을 1 Unit으로 하여 분당 활성 정도를 나타내었다. 이때 이 1Unit을 흔히 'Macord and Fridovich Unit'이라 한다.³²⁾

적혈구 GSH-px 활성은 Paglia 등의 방법³³⁾과 Flohe 등의 방법³⁴⁾을 이용하여 측정하였다. GSH-px의 활성을 spectrophotometer로 340nm에서 측정하여 Unit단위로 나타내었다. 1Unit은 1μM의 NADPH가 산화되어 사라지는 양이다.

간 catalase 활성은 Johansson과 Hakan Borg법³⁵⁾에 의해 측정하였고, 간 SOD 활성은 Folcher 등의 방법³⁰⁾과 Winterbourn 등의 방법³¹⁾을 변형하여 측정하였다.

간 GSH-px 활성은 앞서 10,000×g로 원심분리하여 SOD 활성을 측정하기 위하여 사용하고 남은 상등액을 다시 105,000×g, 4°C에서 50분간 원심분리시켜서 얇은 상층액을 효소원으로 이용하여 측정하였다³⁵⁾. 측정 방법은 적혈구에서 와 동일하나 간의 경우에는 t-butyl hydroperoxide 대신 H_2O_2 를 사용하였고 catalase의 작용을 억제하기 위하여 1mM sodium azide를 첨가하였다. 그리고 각 효소원의 단백질량은 Lowry법³⁶⁾으로 분석하였다.

4. 통계처리

본 연구의 모든 분석 결과는 실험군당 평균과 표준 오차를 계산하였고, $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검정하였다. 또한 각 실험인자(A : 식이 Cd 공급 유무, B : 식이 flavonoids 공급 유무)의 영향과 이들의 상호작용(A*B : Cd과 flavonoids의 상호작용)에 의한 영향은 $\alpha=0.05$ 수준에서 이원배치 분산분석(two-way analysis of variance)으로 유의성을 검정하였다.

실험결과

1. 실험동물의 성장

실험 동물의 하루 평균 식이 섭취량, 3주간의 체중 증가량과 이로부터 계산한 식이 효율을 Table 2에 제시하였다.

우선 식이 섭취량을 살펴보면 Cd 비공급군들중에서는 대조군(C)보다 flavonoids 군들의 식이섭취량이 약간 증가한 경향을 볼 수 있었고 Cd 공급군들의 식이섭취량은 Cd 비공급군들의 식이섭취량에 비해 유의적으로 낮았다. 3주간의 체중증가량을 살펴보면 각군간에 큰 차이를 보여 Cd 공급군들이 Cd 비공급군들에 비하여 현저하게 낮았으며 Cd 비공급군들중에서는 flavonoids를 공급받은 세군의 체중증가가 대조군(C)에 비해 더 커서 유의적인 차이를 보였다. 그러나 Cd공급군들간에는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 식이효율은 Cd 공급군들이 Cd 비공급군들보다 낮았고, Cd 비공급군들간에는 유의적인 차이가 나지 않았으며 Cd

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

Groups	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/3 weeks)	Food efficiency ratio
C	^a 13.50±0.75 ^b ²⁾	85.82±5.69 ^b	0.303±0.010 ^a
EH	15.10±0.88 ^{ab}	100.08±7.48 ^{ab}	0.315±0.012 ^a
H	15.95±0.66 ^a	110.33±6.01 ^a	0.329±0.006 ^a
N	15.33±0.38 ^{ab}	107.32±5.25 ^a	0.333±0.008 ^a
CCd	9.80±0.70 ^{cd}	5.55±5.18 ^c	0.018±0.027 ^{bc}
EHCd	10.30±0.40 ^c	12.28±4.96 ^c	0.053±0.022 ^b
HCd	8.10±0.50 ^d	~ 1.93±4.78 ^c	-0.020±0.029 ^c
NCd	8.67±0.49 ^{cd}	4.62±7.72 ^c	0.014±0.042 ^{bc}
Significant factor ³⁾	A, A*B	A	A

1) Mean±Standard Error(n=6)

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated based on 2-way ANOVA

A : Effect of Cd was significant at $\alpha=0.05$

B : Effect of Flavonoids was significant at $\alpha=0.05$

A*B : Interaction of Cd and Flavonoids was significant at $\alpha=0.05$

Table 3. Cadmium concentrations in blood and liver

Groups	Blood Cd (μ g/100 ml)	Liver Cd (μ g/g wet wt)
C	^a 0.06±0.02 ^{cd}	0.30±0.11 ^b
EH	0.05±0.01 ^d	0.28±0.17 ^b
H	0.07±0.01 ^d	0.08±0.04 ^b
N	0.05±0.01 ^d	0.14±0.07 ^b
CCd	55.24±4.72 ^a	47.08±2.11 ^a
EHCd	40.53±5.05 ^b	48.66±3.02 ^a
HCd	43.40±2.60 ^b	49.64±2.37 ^a
NCd	46.40±2.35 ^b	45.50±3.72 ^a
Significant factor ³⁾	A	A

1) Mean±Standard Error(n=6)

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2)

공급군들간에도 큰 차이가 나타나지 않았지만 HCd군이 가장 낮았다.

2. 카드뮴 대사

1) 혈액과 간의 Cd 농도

혈액과 간의 Cd 농도는 Table 3에 나타난 바와 같이 Cd 공급의 영향을 받아 Cd 공급군들이 비공급군들에 비해 유의적으로 높았다. 간의 Cd 농도는 Cd 공급군들간에 차이가 없었으나, 혈액내 Cd 농도는 Cd 공급군들 중 flavonoids를 첨가한 군들이 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

Table 4. Urinary and fecal Cd excretions, and Cd retention ratio

Groups	Urinary Cd ($\mu\text{g}/\text{day}$)	Fecal Cd ($\mu\text{g}/\text{day}$)	Cd retention ratio ^{④)} (%)
C	¹⁾ $0.17 \pm 0.11^{\text{b2)}$	$0.66 \pm 0.09^{\text{d}}$	-
EH	$0.16 \pm 0.11^{\text{b}}$	$0.51 \pm 0.09^{\text{d}}$	-
H	$0.02 \pm 0.01^{\text{b}}$	$0.58 \pm 0.14^{\text{d}}$	-
N	$0.07 \pm 0.04^{\text{b}}$	$0.91 \pm 0.10^{\text{d}}$	-
CCd	$19.34 \pm 2.08^{\text{a}}$	$845.95 \pm 21.50^{\text{c}}$	$31.1 \pm 1.65^{\text{a}}$
EHCd	$18.06 \pm 1.27^{\text{a}}$	$1035.06 \pm 21.61^{\text{a}}$	$16.1 \pm 1.72^{\text{c}}$
HCd	$18.39 \pm 2.74^{\text{a}}$	$932.15 \pm 38.91^{\text{b}}$	$24.2 \pm 2.94^{\text{b}}$
NCd	$17.91 \pm 2.35^{\text{a}}$	$955.79 \pm 48.20^{\text{b}}$	$22.9 \pm 9.33^{\text{b}}$
Significant factor ^{③)}	A	A, B, A*B	B

1) Mean \pm Standard Error($n=6$)

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2)

4) Cd retention ratio(%)

$$\frac{\text{tube administered Cd}(\mu\text{g}/\text{day}) - (\text{urinary Cd excretion}(\mu\text{g}/\text{day}) + \text{fecal Cd excretion}(\mu\text{g}/\text{day}))}{\text{tube administered Cd}(\mu\text{g}/\text{day})} \times 100$$

2) 뇌와 변의 Cd 배설량과 Cd 보유율

뇌와 변으로의 Cd 배설량과 Cd 보유율은 Table 4와 같았다. 뇌를 통한 Cd 배설량은 Cd 공급의 영향만 나타나 Cd 공급군들이 비공급군들에 비해 유의적으로 높았으나 Cd 공급군들간에 차이는 없었다. 반면 변을 통한 Cd 배설량은 Cd 공급 유무, flavonoids의 종류와 이들의 상호작용의 영향을 받아 Cd 공급군들이 Cd 비공급군들에 비하여 유의적으로 높았고 Cd 공급군들 중에는 flavonoids 군들이 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 높았고, 특히 EHCd 군이 가장 높았다. Cd 보유율은 변을 통한 Cd 배설량의 영향을 크게 받기 때문에 flavonoids 군들이 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 낮은 Cd 보유율을 나타내었으며 특히 EHCd 군이 가장 낮은 Cd 보유율을 나타내었다.

3. 지방 대사

1) 혈장내 총지방과 중성지방, cholesterol 농도

혈장내 총지방과 중성지방, cholesterol 농도는 Table 5와 같았다. 혈장내 총지방과 중성지방의 경우 Cd 공급 유무의 영향을 받아 감귤과피에서 추출한 hesperidin 공급군을 제외하고는 Cd 공급군들이 비공급군들 보다 낮게 나타났다. 혈장내 중성지방 농도는 Cd 공급군들이 비공급군들 보다 낮았고, Cd 비공급군들 중에서는 추출한 hesperidin과 구입한 naringin을 공급한 군들은 대조군보다 유의적으로 낮은 농도를 나타내었다. 그리고 Cd 공급군들 중에서는 flavonoids를 첨가한 군들과 대조군(CCd) 간에 큰 차이를 보이지 않았다.

혈장내 total cholesterol 농도의 경우 HCd군과 NCd군의 농도가 다른 군들에 비해 다소 낮았을 뿐 나머지 군들에서는 큰 차이가 나타나지 않았다. 한편 혈장내 HDL-cho-

Table 5. Plasma total lipid, triglyceride and cholesterol concentrations

Groups	Plasma total lipid (mg/100ml)	Plasma TG (mg/100mg)	Plasma total cholesterol (mg/100ml)	Plasma HDL-cholesterol (mg/100ml)	HDL : total cholesterol ratio
C	¹⁾ $243.26 \pm 10.01^{\text{b2)}$	$64.73 \pm 6.10^{\text{a}}$	$75.12 \pm 5.34^{\text{ab}}$	$27.40 \pm 2.42^{\text{cd}}$	$0.37 \pm 0.02^{\text{b}}$
EH	$215.81 \pm 5.96^{\text{c}}$	$34.56 \pm 5.52^{\text{c}}$	$74.54 \pm 7.40^{\text{ab}}$	$28.07 \pm 2.62^{\text{cd}}$	$0.39 \pm 0.03^{\text{b}}$
H	$319.88 \pm 7.35^{\text{a}}$	$60.36 \pm 5.80^{\text{a}}$	$73.87 \pm 6.50^{\text{ab}}$	$36.61 \pm 5.49^{\text{b}}$	$0.51 \pm 0.03^{\text{a}}$
N	$248.21 \pm 6.86^{\text{b}}$	$46.54 \pm 4.08^{\text{b}}$	$79.06 \pm 9.08^{\text{a}}$	$43.94 \pm 5.20^{\text{a}}$	$0.56 \pm 0.03^{\text{a}}$
CCd	$202.22 \pm 9.97^{\text{cd}}$	$34.18 \pm 4.31^{\text{c}}$	$69.93 \pm 6.58^{\text{ab}}$	$22.28 \pm 4.77^{\text{d}}$	$0.33 \pm 0.04^{\text{b}}$
EHCd	$206.38 \pm 14.74^{\text{cd}}$	$28.74 \pm 4.07^{\text{c}}$	$72.30 \pm 5.93^{\text{ab}}$	$28.84 \pm 3.56^{\text{c}}$	$0.41 \pm 0.03^{\text{b}}$
HCd	$188.92 \pm 7.19^{\text{d}}$	$30.55 \pm 3.82^{\text{c}}$	$56.42 \pm 5.99^{\text{b}}$	$28.07 \pm 6.73^{\text{cd}}$	$0.50 \pm 0.02^{\text{a}}$
NCd	$189.47 \pm 8.16^{\text{d}}$	$33.70 \pm 5.22^{\text{c}}$	$56.20 \pm 5.04^{\text{b}}$	$29.75 \pm 4.13^{\text{c}}$	$0.53 \pm 0.04^{\text{a}}$
Significant factor ^{③)}	A	A, B, A*B	A	A, B	B

1) Mean \pm Standard Error($n=6$)

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2)

lesterol 농도의 경우 Cd 비공급군들 중에서는 구입한 hesperidin과 naringin군에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 농도를 나타내었고, Cd 공급군들에서는 flavonoids를 첨가한 군들이 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 높은 농도를 나타내었다. 그리고 HDL : total cholesterol ratio의 경우 구입한 hesperidin 군들(H군, HCd군)과 naringin 군들(N군, NCd군)이 대조군들(C군, CCd군)에 비해 유의적으로 높은 ratio를 나타내었다.

2) 간의 총지방과 cholesterol, 중성지방 농도

간의 지질 분석 결과는 Table 6과 같았다. 간의 총지방의 경우 추출한 hesperidin군을 제외하고 Cd 공급군들이 Cd 비공급군들에 비해 높은 농도를 나타내었다. 또한 Cd 비공급군들 간에는 차이가 없었으나 Cd 공급군들에서는 flavonoids를 첨가한 군들이 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 낮았으며 특히 추출한 hesperidin군의 농도는 매우

낮아 대조군의 농도에 절반에도 미치지 않았다. 한편, 간의 cholesterol 농도와 중성지방 농도의 경우 Cd 공급의 영향만 나타나 대체로 Cd 공급군들이 비공급군들에 비해 낮았으며 다만 간의 cholesterol의 경우 Cd 공급군에서 NCd군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. Cd 비공급군들에서는 군들간에 큰 차이가 없었으나 H군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타내었다.

3) 변의 무게와 총지방, cholesterol 및 중성지방 배설량

변의 무게 및 변의 총지방, cholesterol 및 중성지방 배설량은 Table 7과 같다. 변의 무게는 각 군간에 큰 차이를 보이지 않았으나 EH군이 가장 낮았고, N군과 EHcd군이 가장 높았다. 변의 총지방 배설량과 cholesterol 배설량은 같은 경향을 나타내었는데 Cd 비공급군들에서는 naringin 군이 대조군(C)에 비해 월등하게 많았고 나머지 군들은 별 효과가 없었다. 그리고 Cd 공급군들에서는 flavonoids를 첨가한 군들이 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 배설량이 높았고 특히 추출한 hesperidin군의 배설량이 매우 높았다. 마지막으로 변의 중성지방 배설량의 경우 Cd 공급군들이 비공급군들보다 높았고, Cd 비공급군들 중에서는 naringin군만 대조군(C)에 비해 유의적으로 높았고, Cd 공급군들 중에서는 추출하거나 구입한 hesperidin군들이 대조군(CCd)보다 유의적으로 높은 배설량을 나타냈다.

4. 항산화능

1) 혈장과 간의 지질과산화물 함량

혈장과 간의 지질과산화물 함량(Thiobarbituric Acid Reactive Substances : TBARS concentrations)은 Table 8과 같았다. 혈장의 지질과산화물의 경우 flavonoids 공급군들이 각각의 대조군들보다 유의적으로 낮은 수치를 나타내었으나, flavonoids의 종류에 따른 차이는 나타나지 않았다.

Table 6. Liver total lipid, cholesterol and triglyceride concentrations (mg/g wet wt)

Groups	Liver total lipid	Liver cholesterol	Liver triglyceride
C	¹⁾ 27.08±1.27 ^{c2)}	2.50±0.25 ^{ab}	4.39±0.33 ^b
EH	26.98±2.49 ^c	2.50±0.23 ^{ab}	4.34±0.71 ^b
H	23.63±3.63 ^c	2.74±0.17 ^a	5.10±0.63 ^a
N	24.17±2.94 ^c	2.78±0.12 ^a	5.04±0.76 ^{ab}
CCd	53.70±4.25 ^a	1.95±0.14 ⁱ	1.98±0.77 ^d
EHCd	23.75±3.10 ^c	2.06±0.13 ^{bc}	2.11±0.55 ^d
HCd	43.70±3.93 ^b	1.83±0.08 ^c	1.94±0.19 ^d
NCd	40.28±3.73 ^b	2.44±0.12 ^{ab}	2.73±0.41 ^c
Significant factor ³⁾	A, B, A*B	A	A

1) Mean±Standard Error(n=6)

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2)

Table 7. Fecal weight, and fecal total lipid, cholesterol and triglyceride excretions

Groups	Fecal weight (g dry wt/day)	Fecal total lipid (mg/day)	Fecal cholesterol (mg/day)	Fecal triglyceride (mg/day)
C	¹⁾ 0.31±0.05 ^{ab2)}	27.32±4.02 ^{de}	1.63±0.09 ^{cd}	1.61±0.11 ^{de}
EH	0.24±0.02 ^b	21.55±1.53 ^f	1.24±0.04 ^e	1.48±0.07 ^a
H	0.29±0.07 ^{ab}	23.43±3.20 ^{ef}	1.73±0.08 ^{bc}	1.71±0.15 ^d
N	0.44±0.06 ^a	46.89±6.22 ^{ab}	3.17±0.11 ^a	2.53±0.20 ^{ab}
CCd	0.31±0.05 ^{ab}	29.46±3.71 ^d	0.90±0.07 ^f	2.34±0.15 ^c
EHCd	0.39±0.04 ^a	51.10±3.84 ^a	1.83±0.06 ^b	2.62±0.10 ^a
HCd	0.33±0.04 ^{ab}	40.36±3.31 ^c	1.26±0.05 ^e	2.63±0.16 ^a
NCd	0.33±0.01 ^{ab}	44.58±5.61 ^{bc}	1.46±0.06 ^d	2.45±0.10 ^{bc}
Significant factor ³⁾	A, B, A*B	A, B	A, B	A, B

1) Mean±Standard Error(n=6)

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2)

Table 8. TBARS concentrations in plasma and liver

Groups	Plasma TBARS (nmol/ml plasma)	Liver TBARS (nmol/g wet liver)
C	^b 2.98±0.07 ^{bcd}	9.38±0.21 ^a
EH	2.52±0.14 ^c	7.85±0.30 ^c
H	2.53±0.13 ^c	6.95±0.21 ^d
N	2.36±0.09 ^c	7.17±0.21 ^d
CCd	3.81±0.18 ^a	9.92±0.28 ^a
EHCd	2.63±0.15 ^{bcd}	8.65±0.14 ^b
HCd	2.70±0.13 ^{bcd}	8.52±0.22 ^{bcd}
NCd	2.68±0.13 ^{bcd}	7.98±0.24 ^{bcd}
Significant factor ³⁾	A, B, A*B	A, B

1) Mean±Standard Error(n=6)

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA (See Table 2)

Table 9. Antioxidative enzyme activities of erythrocytes

Groups	Catalase ⁴⁾ (n mole formaldehyde/mg protein/min)	Superoxide Dismutase ⁵⁾ (unit/mg protein/min)	Glutathione Peroxidase ⁶⁾ (unit/mg protein/min)
C	^b 234.30±14.04 ^{bcd}	12.24±0.53 ^{bcd}	27.23±1.07 ^d
EH	239.40±12.63 ^b	12.00±0.63 ^d	26.53±1.84 ^d
H	238.09±13.13 ^b	12.06±0.47 ^{cd}	24.78±0.95 ^d
N	236.98±13.28 ^b	12.08±0.55 ^{cd}	22.70±1.17 ^d
CCd	251.69±14.39 ^a	12.88±0.60 ^a	54.75±2.23 ^a
EHCd	244.18±12.74 ^{ab}	12.63±0.57 ^{ab}	38.99±1.36 ^b
HCd	248.94±13.69 ^a	12.59±0.54 ^{ab}	34.02±1.19 ^c
NCd	242.57±13.33 ^{ab}	12.44±0.48 ^{bc}	42.64±1.61 ^b
Significant factor ³⁾	A	A, B	A, B, A*B

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

3) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2)

4) Catalase activities are expressed as n moles formaldehyde utilized as standard per mg protein per minute

5) Superoxide dismutase activities are expressed as units per mg protein per minute(1 unit is defined by the inhibition of cytochrome C reduction by 50%)

6) Glutathione peroxidase activities are expressed as units per mg protein per minute(1 unit is defined by disappearance of 1 μ mole NADPH)

다. 한편 간의 지질과 산화물의 경우 flavonoids 공급군들이 각각의 대조군들보다 유의적으로 낮은 수치를 나타내었고, flavonoids 군들간에 차이가 있어 추출한 hesperidin 군이 다소 높았다.

2) 적혈구의 항산화계 효소 활성

적혈구에 존재하는 항산화계 효소들의 활성은 Table 9와

Table 10. Antioxidative enzyme activities of liver

Groups	Catalase ⁵⁾ (n mole formaldehyde/mg protein/min)	Superoxide Dismutase ⁶⁾ (unit/mg protein/min)	Glutathione Peroxidase ⁷⁾ (unit/mg protein/min)
C	^b 705.16±43.39 ^{NS2)}	18.72±0.65 ^{bcd}	43.89±1.40 ^{NS}
EH	703.86±51.41	20.34±0.78 ^a	43.15±1.10
H	720.32±52.95	17.89±0.69 ^b	43.40±1.72
N	716.74±40.19	19.08±0.61 ^{ab}	44.27±1.42
CCd	701.10±32.91	20.64±0.73 ^a	45.67±1.23
EHCd	704.42±44.23	18.83±0.85 ^{ab}	44.62±1.35
HCd	634.85±35.63	19.55±0.59 ^{ab}	45.75±1.69
NCd	667.76±41.34	19.60±0.97 ^{ab}	45.82±1.33
Significant factor ⁴⁾			A

1) Mean±Standard Error

2) Not significant at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of dietary factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2)

5) Catalase activities are expressed as n moles formaldehyde utilized as standard per mg protein per minute

6) Superoxide dismutase activities are expressed as units per mg protein per minute(1 unit is defined by the inhibition of cytochrome C reduction by 50%)

7) Glutathione peroxidase activities are expressed as units per mg protein per minute(1 unit is defined by disappearance of 1 μ mole NADPH)

같았다. 적혈구의 Catalase 활성과 SOD 활성의 경우 flavonoids 공급여부보다는 Cd 공급의 영향을 받아 Cd 공급군들이 비공급군들보다 증가하는 경향을 나타내었고, flavonoids 종류는 크게 영향을 주지 않았다. GSH-px의 경우 Cd 공급군들의 GSH-px 활성이 Cd 비공급군들 보다 증가하였으나, Cd 비공급군들에서는 flavonoids 공급여부가 GSH-px 활성에 영향을 별로 주지 않은 반면, Cd 공급군들에서는 flavonoids를 첨가한 군들이 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 GSH-px 활성이 감소하였고 그 중 추출하거나 구입한 hesperidin 군들에서 더욱 낮았다.

3) 간의 항산화계 효소 활성

간에 존재하는 항산화계 효소들의 활성은 Table 10과 같았다. 간의 항산화계 효소들의 활성은 적혈구의 효소들의 활성과는 다소 다른 결과를 나타내었다. 간의 Catalase 활성과 GSH-px 활성은 유사한 경향을 나타내어 flavonoids 공급여부나 Cd의 공급여부에 관계 없이 모두 비슷하였다. 그리고 간의 SOD 활성도 Cd 공급군, 비공급군에서 모두 flavonoids 군들이 각각의 대조군과 큰 차이가 없었다.

고 찰

실험 동물의 식이 섭취량, 체중 증가량과 식이 효율을 살펴보았을 때 식이를 통한 flavonoids 공급 여부보다는 중금속인 Cadmium의 공급여부가 식이섭취량, 체중증가량, 식이효율 모두에 큰 영향을 주는 것을 알 수 있었다. Cadmium을 공급했을 때 식이섭취량이 유의적으로 감소하였고 체중 증가량의 감소는 더욱 두드러져서 식이효율을 감소시킴을 알 수 있었다. 그리고 Cd 비공급군들에서는 flavonoids를 첨가한 군들이 대조군(C)에 비해 식이 섭취량과 체중 증가량이 약간 증가하는 경향을 보였다. 체중 증가를 성장의 지표로 볼 때 Cd 공급은 성장기에 있는 이를 실험동물들의 성장을 선행 연구들에서와 같이 크게 감소시킬 수 있었다.⁸⁷⁾⁸⁸⁾

Flavonoids는 hydroxy1 치환기의 위치와 고리계(ring system)의 전자적 성질에 따라 전이금속에 대한 좋은 ligand가 될 수 있어 Cu, Zn, Fe이온 등에 강한 친화력을 갖고 있다고⁴²⁾⁸⁹⁾ 한다. 본 연구에서 Cd 첨가군에서, Cd 대사의 주요기관인 간에서의 Cd 농도는 차이가 없었으나 혈액의 Cd 농도는 flavonoids군들에서 낮았고 flavonoids군들의 변으로의 Cd 배설량이 증가한 것으로 볼 때 hesperidin과 naringin은 Cd과 결합하여 Cd의 흡수를 저해하고 변으로의 Cd 배설을 증가시킨 것으로 생각되며, 이러한 경향은 flavonoids의 일종인 catechins이 풍부한 녹차를 섭취하였을 때 변을 통한 Cd 배설을 증가시켜 Cd 독성을 완화시켰다는 결과와도 일치하는 것이다⁵⁾. 특히 EHCD군이 변을 통한 Cd 배설량이 가장 높아서, 감귤에서 추출한 hesperidin의 Cd 흡수 저해효과가 탁월함을 볼 수 있었다.

본 실험에서 Cd 비공급군에서, 추출한 hesperidin 공급군의 혈장내 총지방 농도가 대조군(C)에 비해 유의적으로 감소하였고, 추출한 hesperidin 공급군과 naringin 공급군의 혈장내 중성지방 농도도 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며 특히 추출한 hesperidin의 감소효과는 매우 커다. 이러한 결과는 hesperidin을 식이에 첨가시켜 normolipidemic한 흰쥐와 hyperlipidemic한 흰쥐에서 혈장 총지방과 중성지방이 유의적으로 감소했다는 Monforte 등의 연구와⁴⁹⁾ catechin류의 flavonoid가 풍부한 녹차의 물 추출물을 식이에 첨가하였을 때 혈장내 중성지방 농도가 저하되었다는 Muramatsu 등의 연구와⁵⁰⁾ 일치한다. 혈장내 HDL-cholesterol 농도의 경우 Cd 비공급군들 중 구입한 hesperidin과 naringin군들이 대조군(C)에 비해 유의적으로 높았고 특히 naringin군의 증가효과가 매우 커다. 그리고

Cd 공급군들에서 flavonoids를 첨가한 군들이 대조군(CCd)에 비해 HDL-cholesterol 농도가 유의적으로 증가하였다. HDL : total cholesterol ratio의 경우에는 Cd 공급여부에 관계없이 대조군들에 비해 구입한 hesperidin과 naringin 공급군들이 유의적으로 높았다. HDL-cholesterol의 농도와 HDL : total cholesterol ratio의 증가는 혈액순환계 질환 발병 위험의 감소를 의미하는 것으로 이번 실험에서 flavonoids를 공급시 혈장 total cholesterol 농도에서는 큰 저하효과를 보이지 않았으나 HDL-cholesterol 농도가 증가하였고 HDL : total cholesterol ratio의 증가효과도 커다. 이러한 HDL-cholesterol 농도의 증가효과는 hesperidin을 식이에 첨가시켜 normolipidemic한 흰쥐와 hyperlipidemic한 흰쥐에서 유의적으로 HDL cholesterol 농도를 증가시켰다는 Monforte 등의 연구와⁴⁹⁾ epicatechin gallate를 경구투여시 혈장내 HDL-cholesterol 농도를 증가시켰다는 Matsuda 등의 연구와⁵²⁾ 일치하고, 녹차를 매일 다량으로 음용한 사람들의 혈중 HDL-cholesterol 농도가 유의적으로 높았다는 역학조사의 결과와도 일치하는 것이다⁹⁰⁾. 이상의 결과에서 추출한 hesperidin은 혈장내 총지방과 중성지방 농도를 유의적으로 감소시켰고, 구입한 hesperidin과 naringin은 혈장내 HDL-cholesterol 농도와 HDL : total cholesterol ratio를 유의적으로 증가시켰음을 볼 수 있었다. Flavonoids를 비롯한 polyphenol 물질들은 reverse-cholesterol transport를 촉진시키거나, 장에서의 cholesterol 흡수를 감소시키거나 담즙산 분비를 증가시킴으로써 hypocholesterolemic 효과를 발휘한다고 알려져 있다⁹¹⁾⁹²⁾. 이 중 본 실험에서는 장에서의 cholesterol 흡수를 감소시키는 기전에 의해 hypocholesterolemic 효과를 발휘한 것으로 생각된다.

간내 총지방 수준의 경우 Cd 공급군들에서 flavonoids군들이 모두 대조군(CCd)에 비해 유의적으로 감소하였다. 그리고 Cd 공급군들의 변으로의 총지방, 중성지방, cholesterol 배설량을 보면 flavonoids군들이 높았다. 그리고 Cd 비공급군들에서는 naringin군의 변으로의 총지방과 cholesterol, 중성지방 배설량이 모두 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 식품내 polyphenols이 지방대사에 미치는 영향에 대하여는 광범위하게 연구되지는 않았지만 soluble polyphenols과 condensed tannins이 변으로의 지방 배설을 증가시켰다는 보고가 있으며 확실한 기전에 대하여는 알려져 있지 않다⁹¹⁾⁹²⁾. 본 연구에서 flavonoids 첨가군들에서 혈장과 간내 지방수준이 낮았던 것도 변으로의 지방 배설량이 높았던 것이 가능한 이유 중 하나로 생각된다.

본 연구의 지질과산화를 결과를 보면, 혈장과 간의 지질

과산화물 모두 Cd 공급군들이 비공급군들에 비해 높은 경향을 나타냈다. 이는 중금속인 Cd이 산화 촉진제로 작용하여 free radicals의 형성을 촉진하고 다시 이 free radicals이 지방을 산화시켜 지질과산화물 함량이 증가된 것으로 사료된다. 그리고 Cd 공급유무에 관계없이 flavonoids를 첨가한 군들에서 각각의 대조군들보다 지질과산화물을 함량이 유의적으로 낮았다. 다양한 종류의 flavonoids가 지질과산화물의 형성을 억제하는 효과에 대하여 많은 *in vitro* 연구들이 행해졌으며⁴¹⁻⁴³⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁹³⁾ flavonoids가 유의적으로 지질과산화물의 형성을 억제했다는 본 연구와 유사한 결과들을 보고하였다. Flavonoids가 이런 효과를 발휘하는 가능한 기전으로는 크게 금속이온의 chelating제로서의 작용, free radical scavenger로서의 작용, 항산화계 효소를 통한 영향의 세가지를 생각해 볼 수 있겠다.

우선 산화촉진제(prooxidant)로 작용하여 free radicals의 생성을 촉진시키는 “free” 상태의 금속이온들을 flavonoids가 chelating함으로 지질과산화물 생성을 억제하는 기전을 생각해 볼 수 있다⁴¹⁻⁴³⁾. 본 실험에서 flavonoids군들의 변을 통한 Cd 배설량이 유의적으로 높았고, Cd 보유율이 유의적으로 낮았으며 혈액내 Cd 농도도 유의적으로 낮았음을 볼 때 가능한 기전의 하나로 생각된다. 다음으로는 flavonoids가 이미 생성된 free radicals을 직접 없애는 free radical scavenger로 작용 함으로써 free radicals에 의해 촉발되는 지질과산화물 형성을 억제한다는 기전이다⁴¹⁻⁴³⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁹³⁻⁹⁶⁾. 본 실험에서 flavonoids군들의 혈장과 간의 지질과산화물 함량이 각각의 대조군보다 유의적으로 낮았음을 볼 때 이 기전에 의한 효과도 배제할 수 없으나 본 실험만으로는 이러한 free radical scavenger로서의 효과의 정도를 정확히 밝힐 수는 없었다. 그러나 많은 *in vitro* 연구들에서 flavonoids의 이러한 작용이 밝혀지고 있다⁴¹⁻⁴³⁾⁶⁵⁾⁶⁷⁾⁹³⁻⁹⁵⁾.

마지막으로, flavonoids가 항산화계 효소들에 영향을 미치는 기전이다. 본 실험에서는 flavonoids가 이를 항산화계 효소들에 영향을 미치는지 알아보고자 적혈구와 간의 효소들을 살펴보았다. 생체내에는 해로운 free radicals로부터 세포막과 세포내 물질들을 보호하는 항산화 효소들이 있으며 이들 중 가장 중요한 것으로 catalase, SOD, GSH-px 등이 있다⁵⁾⁷⁾¹²⁾⁹⁶⁾. 우선 SOD는 free radicals 생성 과정의 초기에 생성되는 물질이며 다른 free radicals의 생성 및 lipid peroxidation 과정을 단계적으로 촉발시키는 superoxide anion radical을 환원시켜 H₂O₂로 만들어 주는 효소이다⁵⁾⁷⁾. 이 H₂O₂는 homolytic fission에 의해 분해되어 가장 강력한 free radical이면서 혐생할 수 있는 hydroxyl radical(HO[·])을 생성하기 때문에 hydroxyl

radical의 형성을 미리 막는 예방과정이 매우 중요한데 이런 예방과정을 catalase와 GSH-px가 담당한다⁵⁾. 즉 SOD의 작용으로 생성된 H₂O₂에 catalase가 작용하여 한분자의 O₂와 두분자의 물을 생성하거나 환원형 Glutathione(GSH)이 반응하여 산화형 Glutathione(GSSG)으로 되면서 두 분자의 물을 생성하게 된다. 그리고 GSH-px는 이외에도 기타 과산화물(ROOH)과 GSH로부터 GSSG, alcohol(ROH) 및 물을 생성하는 반응을 촉매함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소독을 해독한다⁵⁾.

본 실험에서 적혈구 내 항산화 효소들의 활성을 살펴보면 대체로 Cd 공급여부에 따라서 그 활성이 달라졌을 뿐 flavonoids 공급에 따른 효과는 크게 나타나지 않고 있다. 즉, Cd 공급군들의 경우 Cd 비공급군들에 비해 항산화 효소들의 활성이 다소 높았다. 이는 Cd공급으로 free radicals 형성이 증가됨에 따라 생체내에서 이들 free radicals을 없애기 위해 항산화 효소들의 활성이 증가된 것으로 생각된다. Flavonoids가 적혈구내 효소활성에 영향을 주지 않았던 것은 hesperidin과 naringin을 공급했을 때 효소들의 활성에 별 영향이 없었다는 손 등의 연구와 유사하였다⁹⁷⁾. 한편, 간의 항산화 효소 활성의 경우 Cd 공급여부나 flavonoids 공급여부에 관계 없이 SOD 활성이나 Catalase, GSH-px 활성에 별다른 차이를 보이지 않았고, 손 등의 연구결과도 이와 유사하였다⁹⁷⁾.

Flavonoids 공급에 의하여 적혈구와 간내 항산화 효소들의 활성에 크게 영향을 받지 않았음에도 적혈구와 간의 지질과산화물 함량이 flavonoids 공급군들에서 현저히 감소한 것으로 미루어서 flavonoids는 본 실험동물의 생체내에서 항산화 작용을 했음을 알 수 있고, 이를 항산화 작용의 주된 기전이 항산화 효소들의 활성을 증진시키는 것이었다는 Cd을 비롯한 금속이온을 chelating함으로써 산화촉진제로의 작용을 억제하였거나 또는 flavonoids가 직접 free radical scavenger로 작용하였을 것으로 추정된다.

결 론

본 실험에서는 우리나라 감귤과피에서 추출한 hesperidin과 시판되는 hesperidin, naringin을 식이에 혼합하여 섭취시킬 때 카드뮴을 식이에 첨가해서 산화적 stress를 가한 조건과 산화적 stress를 가지지 않은 정상조건에서 이 flavonoids들이 혼취의 과산화지질 생성과 항산화 효소체계에 어떠한 영향을 미치는지 비교하여 보고 아울러 지방 및 Cd 대사에 미치는 영향에 대해서도 알아보고자 하였다.

Cd 공급군들의 경우 Cd 비공급군들보다 식이 섭취량과

체중 증가량이 유의적으로 감소하였고 이로인해 식이효율도 유의적으로 감소하였다. 혈액과 간의 Cd 농도와 뇨와변을 통한 Cd 배설량은 Cd 공급군들이 비공급군들보다 높았다. Cd 공급군들 중에서는 flavonoids를 첨가한 군들 대조군에 비해 혈액내 Cd 농도가 낮았고, 변을 통한 Cd 배설량이 높아서 Cd 보유율이 감소하였다. 그중에서도 감귤에서 추출한 hesperidin군의 대변을 통한 Cd 배설효과가 현저하였다.

지방대사를 살펴보면 flavonoids는 혈중 중성지방, cholesterol의 수준과 간내 총지방 수준을 저하시켰고 혈중 HDL-cholesterol 수준을 증가시켰다. 특히 감귤과피로부터 추출한 hesperidin은 혈중 중성지방 저하 효과가 컸으며 구입한 hesperidin과 naringin은 혈중 콜레스테롤 저하와 혈중 HDL-cholesterol 상승 효과가 현저하였다. 그리고 flavonoids는 변으로의 총지방, cholesterol, 중성지방의 배설량을 증가시키는 효과가 있었는데 특히 Cd 공급군들 중 감귤과피로부터 추출한 hesperidin군과 Cd 비공급군들 중 구입한 naringin군의 배설량이 가장 컸다.

흰쥐의 항산화능에 미친 flavonoids의 영향을 살펴보기 위해 혈장과 간의 지질과산화물 함량과 적혈구와 간의 항산화 효소들의 활성을 측정하였다. 그 결과 혈장과 간의 지질과산화물 모두 Cd 공급군들이 비공급군들에 비해 높은 경향을 나타냈고, Cd 공급여부에 관계없이 flavonoids를 첨가한 군들이 각각의 대조군들보다 유의적으로 낮았다. 적혈구 항산화 효소들의 활성을 살펴보면 대체로 Cd 공급여부에 따라서 그 활성이 달라졌을 뿐 flavonoids 공급에 따른 효과는 크게 나타나지 않았다. 즉 Cd 공급군들의 항산화 효소활성이 Cd 비공급군들에 비해 증가된 경향을 나타내었다. 그러나 간의 항산화 효소 활성의 경우 Cd공급여부나 flavonoids 공급여부에 관계없이 큰 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과들로 미루어 flavonoids는 변으로의 Cd 배설량을 증가시켜 Cd 보유율을 낮추었고 혈액내 Cd 농도를 저하시켰다. 그리고 지방대사에 미치는 영향을 보면 변으로의 지방배설량을 증가시킴으로써 혈액과 간내 지방 수준을 낮추었다. 또한 혈장과 간의 지질과산화물의 생성을 억제하였는데 이 효과는 항산화 효소들의 활성을 증진시키는 것을 통하여보다는 금속이온을 chelating 하거나, free radicals을 scavenging 하였기 때문으로 생각된다. 그리고 본 *in vivo* 실험에서 flavonoids가 지질과산화물의 형성을 억제하는 항산화 작용을 보였고 특히 우리나라 감귤과피에서 추출한 hesperidin의 항산화 능력이 밝혀져서 폐기되는 감귤과피로부터 생리활성을 지닌 기능성 식품소재 개발의 가능성이 제시되었다. 앞으로 flavonoids의 명확한 항산화

기전과 flavonoids가 지닌 다양한 생리활성들을 규명하는 연구들이 계속 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Literature cited

- 1) Annual report on the cause of death statistics. National statistical office, Republic of Korea, 1996
- 2) WHO. 1990 World health statistics. Annual, 1991
- 3) Barry H. Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* 344 : 721-724, 1994
- 4) Earl RS, Cynthia NO. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J Biolog Chem* 266 : 2005-2008, 1991
- 5) Yi SJ, Kim MJ, Youn HH. Effects of Korean Green Tea, Oolong Tea and Black Tea Beverage on the Removal of Cadmium and Antioxidative Detoxification in Cadmium Administered Rats. The 3rd International Symposium on Green Tea, Seoul, Korea, pp.21-38, 1995
- 6) Kim MK, Chung HS. Effect on Dietary Fibers Isolated from Tangerine Peels on Lipid and Cadmium Metabolism in the Rat. *Korean J Nutrition* 30(3) : 229-243, 1997
- 7) Manninen V, Tenkanen L, Kostinen P, Huttunen TK, Manttari M, Heinonen OP, Frick HM. Joint effects of serum triglyceride and LDL-cholesterol and HDL-cholesterol concentration on coronary heart disease risk in the helsinki heart study. *Circulation* 85 : 37-45, 1992
- 8) Rifkind BM. Diet, plasma cholesterol and coronary heart disease. *J Nutr* 116 : 1578-1580, 1986
- 9) Harman D. Free radical theory of aging. *Mutation Res* 275 : 257, 1992
- 10) Joseph T, Josiane C, Pierre C. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25(2) : 383-385, 1986
- 11) Casarett, Doull *Toxicology*, fifth Edition McGraw-Hill, 1996
- 12) Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *J Nutr* 122 : 625-626, 1992
- 13) Sies H, Krinsky NI. Antioxidant vitamins and β -Carotene in disease prevention. *Am J Clin Nutr* 62 : 1299-1340, 1995
- 14) Gerber M, Astre C, Segala C, Pujol H. Oxidant-antioxidant status alterations in cancer patients : relationship to tumor progression. *J Nutr* 126 : 1201-1207, 1996
- 15) Schwartz JL. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants : their effects on tumor cell growth. *J Nutr* 126 : 1221-1227, 1996
- 16) Martin KR, Failla MI, Smith JC. β -Carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant-induced damage. *J Nutr* 126 : 2098-2106, 1996
- 17) Gershoff SN. Vitamin C : New roles, new requirements? *Nutr Review* 51 : 313-326, 1993
- 18) Chew BP. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *J Nutr* 125 : 1804-1808, 1995
- 19) Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 53 : 201, 1991
- 20) Duell PB. Prevention of atherosclerosis with dietary antioxidants : fact or fiction? *J Nutr* 126 : 1067-1071, 1996
- 21) Harman D. Nutritional implications of the free radical theory of aging. *J Am College Nutr* 1 : 27, 1982
- 22) Cozzi R, Ricordi R, Aglitti T, Gatta V, Salvia R. Ascorbic acid and beta-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis* 18(1) : 223-228, 1997
- 23) Nyandieka HS, Wakhisi J. The impact of vitamin A, C, E and selenium compound on prevention of liver cancer in rats. *East African Medical J* 70(3) : 151-153, 1993
- 24) Sarkar A, Bishayee A, Chatterjee M. Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in ex-

- perimental hepatocarcinogenesis. *Cancer Biochem Biophysics* 15(2) : 111-125, 1995
- 25) Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40 : 2379-2383, 1992
 - 26) Alexander B, Spers GM. Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek horseradish, red radish, and red cabbage tissues. *J Agric Food Chem* 33(2) : 226-228, 1985
 - 27) Middleton E. Some biological properties of plant flavonoids. *Ann Aller* 61 : 523-57, 1988
 - 28) 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
 - 29) Kuhnau J. The flavonoids : a class of semi-essential food components : their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24 : 117-120, 1976
 - 30) Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. *Methods Plant Biochem* 1 : 197-235, 1989
 - 31) Alexander B, Cooper P L, Sapers GM. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion(*Allium cepa L.*) tissue. *J Agric Food Chem* 32 : 274-276, 1984
 - 32) Laura B. Polyphenols : Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Reviews* 56(11) : 317-333, 1998
 - 33) Park JC, Chun SS, Young HS, Kim SH. Studies on the Chemical Components and Biological Activities of Edible Plants in Korea(II). *J Korean Soc Food Nutr* 22(5) : 581-585, 1993
 - 34) Park JC, Kim SH. Flavonoid Analysis from the Leaves of *Eucommia ulmoides*. *J Korean Soc Food Nutr* 24(6) : 901-905, 1995
 - 35) Ham SS, Choi KP, Choi YS, Lee SY. Studies on Antimutagenic and Lipotropic Action of Flavonoids of Buckwheats. *J Korean Soc Food Nutr* 23(4) : 698-703, 1994
 - 36) Park JC, Ha JO, Park KY. Antimutagenic Effect of Flavonoids Isolated from *Oenanthe javanica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25(4) : 588-592, 1996
 - 37) 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(2) : 371-377, 1996
 - 38) 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. 5-16, 1997
 - 39) Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, Purification and Hypotensive Effects of Bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J Korean Soc Food Nutr* 21(2) : 136-142, 1992
 - 40) Han SS, You IJ. Studies on Antimicrobial Activities and Safety of Natural Naringin in Korea. *Kor J Mycol* 16(1) : 33-40, 1988
 - 41) Lee Y, Howard LR, Villalon B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper(*Capsicum annuum*) cultivars. *J Food Sci* 60(3) : 473-476, 1995
 - 42) Isabelle M, Gerard L, Pascale C, Odile S, Nicole P, Pierre B, Pierre C, Josiane C. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 45(1) : 13-19, 1993
 - 43) Isabelle M, Gerard L, Pierre C, Josiane C. Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Meth Enzymol* 234 : 437-443, 1994
 - 44) Igor BA, Anatolii ID, Aleksander VB, Vladimir AK, Alla IP. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38(11) : 1763-1769, 1989
 - 45) Kana I, Tojiro T, Yoko T, Nobuji N, Junji T. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Bioch Biophys Acta* 1234 : 99-104, 1995
 - 46) Michael DL, Bradley AC, Gurmeet K, Edward AS, Peter JW. Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Commun* 201(2) : 589-595, 1994
 - 47) Miranda JL, Patricia JE, Michele AM, Hoult JRS, Barry H. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem Pharmacol* 42(9) : 1673-1681, 1991
 - 48) Marie HS, Joel L, Marie C, Canivenc L, Patrick R, Marc S. Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activites in human and rat liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 130 : 73-78, 1995
 - 49) Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, Lo Curto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid : hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* 50(9) : 595-599, 1995
 - 50) Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 32 : 613-622, 1986
 - 51) Muramatsu K, Sugiyama K, Amano S, Nakashima J, Saeki S. Effect of green tea on cholesterol metabolism in rats. *Proceeding Int Symp Tea Sci*, 220-224, 1991
 - 52) Matsuda H, Chisaka T, Kubomura Y, Yamahara J, Sawada I, Fujimura H, Kimura H. Effect of crude drugs and experimental hypercholesterolemia. I. Tea and its active principles. *J Ethnopharmacology* 17 : 213-218, 1986
 - 53) Tatsuyoshi N, Noriko NT, Kohji T, Takeshi N, Tamotsu S. Dietary flavonoids as potential natural biological response modifiers affecting the autoimmune system. *J Food Sci* 60(4) : 653-656, 1995
 - 54) Kei N, Kazue I. Environmental and physiological influences on human natural killer cell activity in relation to good health practices. *Jpn J Cancer Res* 83 : 798-805, 1992
 - 55) Jan T, Richard L, Eman H, William B, Theoharis CH. Quercetin-induced expression of rat mast cell protease II and accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 46(12) : 2315-2326, 1993
 - 56) Chikao N, Nobuyasu E, Shinkichi T, Akihisa M, Koju K, Masako F. Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agric Biol Chem* 51(1) : 139-143, 1987
 - 57) Chung HY, Yokozawa T. Studies on antioxidative and antimutagenic mechanisms of epicatechin 3-O-gallate isolated from green tea. The 3rd International Symposium on Green Tea. Seoul, Korea, pp.65-81, 1995
 - 58) Middleton E, Kandaswami C. Potential Health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol November* 115-119, 1994
 - 59) Renaud S, Loegeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339 : 1523-1526, 1992
 - 60) Michael GLH, Edith JMF, Peter CHH, Martijn BK, Daan K. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342 : 1007-1011, 1993
 - 61) Michael GLH, Edith JMF, Daan K. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet* 349 : 699, 1997
 - 62) Michael GLH, Daan KCA, Henry B, Ratko B, Flaminio F, Martijn BK. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155(27) : 381-386, 1995
 - 63) Walter CW, Frank S, Greg D, Elsabet H, Anna FL. Mediterranean diet pyramid : a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 61(suppl) : 1402S-1406S, 1995
 - 64) Alessandra T, Carlo LV. Fruit and vegetable consumption and cancer risk in a Mediterranean population. *Am J Clin Nutr* 61(suppl) : 1374S-1377S, 1995
 - 65) Lawrence HK, Elizabeth BL, Walter CW. Health implication of Medi-

- terranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods dairy products. *Am J Clin Nutr* 61(suppl) : 1407S-1415S, 1995
- 66) Maridonneau PI, Braquet P, Garay RP. Heterogenous effect of flavonoids on K⁺ loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radical in human red cells. *Pharmacol Res Commun* 18 : 61-72, 1986
- 67) 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. *Photodermat Photoimmunol Photomed* 8 : 200-205, 1991
- 68) 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
- 69) Catherine VW, Sara MR, Hoult JRS, Wendy J, David SL. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 39 : 1743-1759, 1990
- 70) Anna P, Milena B, Marco S, Nadia P, Gian FM, Claudio G. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Res* 78 : 151-160, 1995
- 71) Ikan JR. Flavonoid, Ch 1. Acetogenin, In Natural Products(Ed. 2), Academic press, New York, pp.1-22, 1991
- 72) Eun JB. Speculation on methods of pectin and hesperidin extraction from Korean citrus peel. Development and functional evaluation of bioflavonoids and dietary fibers from Korean fruits. Report on '97 research project supported by a grant from the Ministry of health and welfare, Republic of Korea, pp.42-46, 1998
- 73) Zinterhofer LJM, Jatlow PI, Fappiano A. Atomic absorption determination of lead in blood and urine in the presence of EDTA. *J Lab Clin Med* 78 : 664-674, 1971
- 74) Yeager DW, Cholak J, Henderson EW. Determination of lead in biological and related material by atomic absorption spectrophotometry. *Environ Sci Technol* 5 : 1020-1022, 1971
- 75) Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfuric-phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Nutr* 53 : 89, 1970
- 76) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911-917, 1959
- 77) Yagi K. Assay for blood plasma or serum. "Method in enzymology", Academic press, 105 : 328-331, 1984
- 78) 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
- 79) Johansson LH, Hankan BLA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochem* 174 : 331-336, 1988
- 80) Folcher L, Becker R, Brigelius R, Lengfelder E, Otting F. Convenient assays for superoxide dismutase. "CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine", 287-288, 1992
- 81) Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 35 : 337-341, 1975
- 82) Macord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein(hemocuprein). *J Biol Chem* 244(22) : 6049-6055, 1969
- 83) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70(1) : 158-169, 1967
- 84) Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. "Methods in enzymology", Academic Press Inc, 105 : 114-126, 1984
- 85) Lawrence B. *Biochem Biophys Res Com* 71 : 952-958, 1976
- 86) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 87) Kim MK, Paek JE. Effect of dietary fibers in rice and barley on lipid and cadmium metabolism in the rat. *Korean J Nutrition* 30(3) : 252-265, 1997
- 88) Kim MK, Chung HS. Effect of dietary fibers in isolated from tangerine peels on lipid and cadmium metabolism in the rat. *Korean J Nutrition* 30(3) : 229-243, 1997
- 89) Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* 32 : 1141-1148, 1983
- 90) Kei N, Kenji S, Kazue I. Preventive effects of drinking green tea on cardiovascular disease and cancer. The 3rd International Symposium on Green Tea, 13-20, 1995
- 91) Regerat F, Remesy C, Tixier O. Effects of condensed tannins and pectin on cecal fermentations and lipid metabolism in the rat. *Bull Liaison Groupe Polyphenols* 16 : 201-204, 1992
- 92) Tebib K, Bitri L, Besancon P, Rouanet JM. Polymeric grape seed tannins prevent plasma cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats. *Food Chem* 49 : 403-406, 1994
- 93) Jadwiga R, Ryszard JG. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37 : 837-841, 1988
- 94) Jose LR, Salvador M, Miguel P, Maria JA. Antioxidant activity of flavonoids from Sideritis javalambreensis. *Phytochem* 31 : 1947-1950, 1992
- 95) Rafat HS, Josiane C, Pierre C. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem* 26 : 2489-2491, 1987
- 96) Britton C, Helmut S, Alberto B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 : 527-605, 1979
- 97) Sohn JS, Kim MK. Effects of hesperidin and naringin on antioxidative capacity in the rat. *Korean J Nutrition* 31(4) : 687-696, 1998