한국환경농학회지 제18권 제3호(1999)
Korean Journal of Environmental Agriculture
Vol. 18, No. 3, pp. 221~228

초식동물 쓸개즙 추출물의 천연항산화 성분; 생물학적인 기능 및 특성규명

심재한* · 박명우 · 임계택[1)]
전남대학교 농화학과, [1)]전남대학교 생물공학연구소 생물방어물질 그룹

Natural Antioxidant Activity of Ethanol Extracted from Bovine Bile ; Biological Effects and Characterization

Jae-Han Shim, Myung-Woo Park, Kye-Taek Lim[1)] *(Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University ;[1)]Biodefensive Substance Group, Institute of Biotechnology, Chonnam National University)*

ABSTRACT : This study was carried out to extract the natural antioxidants from Bovine bile and to investigate their effects on various antioxidant activities. It also characterized the patterns of antioxidants by GC/FID and GC/MS. The antioxidative activities and chemical structure of the antioxidant were elucidated by examining the effects of biological activity and the analysis of GC/MS. The antioxidant materials extracted from bovine bile were isolated and purified by silica gel column chromatography and TLC. It was confirmed that there were effects of antioxidants such as Xanthine Oxidase(XO) and Glutathione-S-Transferase(GSH-T) on antioxidative activities. When they were compared with BHT, bile extracts showed the relative effects of 51.2% on the antioxidant activity, the inhibition effects of 48.3% on XO activity, and the synergism effects of 85.7% on the GSH-T activity. According to the results of investigation at neuron cell of mouse, the rate of cell activity in the treatment of 6mM glutathione was 96%, While it in the treatment of 140mg of bile extract was 78%. Based on the TLC analysis of EtOAc extracts from the Bovine bile, the antioxidant activity appeared at R_f value, 0.72. These results suggested that the antioxidant may be coprostan 3-ol.

Key words : Antioxidant, Bile acid.

서 론

노화의 원인 중에 하나로 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H_2O_2 등의 활성산소에 의해 야기되는 프리라디칼 반응은 지질을 포함한 세포의 주요 거대 분자에 파괴 효과를 나타내며 반응성이 강하고, 세포 구성물질이나 세포막과 반응하여 이상대사를 초래한다고 알려져 있다[1,2]. 오래전부터 많은 학자들은 생명체에 활성을 줄 수 있는 Phenol계, Amine계, Flavonoid계 등의 합성항산화제를 개발해 왔지만 이들의 유해성과 안전성 문제가 거론되면서 논란의 대상이 되고 있다. 예를들면, Phenol계의 합성 항산화제(BHA, BHT등)가 과산화 방지를 위해 사용되었는데 이들을 단용 또는 혼용으로 일정수준 이상 섭취시 심각한 여러 질병을 유발 시킬수 있는 것으로 알려져있고[3)] 이취가 있고 고온에 불안정하며, 기형발생인자 및 발암물질이 될 수도 있다. 합성 항산화제에 대한 이러한 유해성이 거론되면서 규격이 엄격해지고, 안전성 등에 의문이 제기되면서 안전성이 확보된 천연 항산화물질을 찾고자하는 노력이 다방면에서 활발히 이루어지고 있다[4,5)]. 한편, 국내에서는 냉이[6)], 솔잎과 쑥[7)], 갓과 겨자[8)], 산사 및 가자[9)], 음양곽[10)]등과 같은 식물들로부터 항산화 성분에 관한 연구는 많이 이루어졌으나 동물 성분으로부터의 연구는 드문 형편이다. 소의 쓸개즙이 Gallate(3,4,5-trihydroxy benzoic acid)라는 성분이 들어있는 정도는 알려져 있지만 어떤 성분이 인체에 어떤 약리작용을 하는지는 알려져 있지 않다. 특히, 쓸개즙은 포유동물에서 cholesterol 생합성에 의해 생성되는 물질로서 이의 대사과정 및 기능성에 대한 연구가 의약학적으로 중요한 의의를 지니는것으로 알려졌다.

따라서, 본 실험에서는 bovine bile에서 항산화 활성을 가진 물질을 분리하고 이 물질의 다양한 항산화성 역가측정과 mouse에서 척수신경세포의 살아있는 세포수를 조사하여

그 생물학적 효과를 검증하고 그 기능성 물질의 패턴을 확인하기 위하여 실시 하였다.

재료 및 방법

재료

Bovine bile은 도축장에서 구입하고 ethanol (1:1 V/V)을 가하여 실온에서 수개월 침지 후 여과하고 감압농축하여 사용하였다.

시약

Xanthine, Xanthine oxidase(XO), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), Linoleic acid, 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), Glutathione, Hypoxanthine, Buthylated hydroxy toluene(BHT), 와 bile acid 표준품(9종)등은 Sigma (USA), Silica gel 60은 MERCK (Germany)에서 구입하였고, 그밖의 일반적인 시약은 특급을 사용하였다.

추출물의 분리, 정제

Bovine bile ethanol 추출물을 NaOH로 pH 10-12로 조정한 후 110℃에서 10시간 동안 가수분해하고 다시 pH를 1-2로 산성화시킨 다음 극성이 다른 여러용매(MeOH, Ethylacetate, Chloroform, Hexane)로 추출 분획하여 1, 1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 추출물을 분리, 정제하기 위해 silica gel column chromatography를 실시하고 DPPH용액으로 각 용출 분획의 항산화 활성을 측정하였다.

Thiocyanate에 의한 항산화력 측정

Bovine bile 추출물과 합성 항산화제인 BHT와의 비교를 통해 Thiocyanate 방법으로 다음과 같이 측정하였다[11]. 각 sample solution에 linoleic acid를 가하고, pH 7.4, 0.2 M phosphate buffer, 그리고 distilled water를 첨가하여, 24시간, 37℃ 암조건에서 반응 시켰다. 각 sample solution에 75% EtOH, NH_4SCN, Ferrous chloride regent를 가하고 3분 후 500 ㎚에서 흡광도를 측정함으로서 항산화력을 조사하였다.

Superoxide와 Hydroxyl radical의 소거력 측정

Beyer등의 방법[12]에 따라 Xanthine 0.5㎖ 및 pH 7.5, 50 mM phosphate buffer 0.3㎖을 혼합하고 분획의 농도를 달리해 가하고 buffer에 50배 희석한 Xanthine oxidase를 첨가하여 293 nm에서 3분간 흡광도 증가를 측정하였다. 또한, Hydroxyl radical의 측정은 Okezie의 방법[13]에 따라 532nm에서 측정하였다.

Glutathione-S-Transferase(GSH-T)의 활성 측정

Phosphate buffer (0.25M, pH 6.5)와 2% triton X-100, 그리고 sample의 농도를 달리해 microsome(10㎎/㎖)을 첨가하고 잘 섞은 액을 가용화 MS라 한다.

GSH-T활성 측정은 Habig등의 방법[14]에 따라 0.25M phosphate buffer (pH 6.5), 증류수, 가용화 MS, 20mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)용액을 시험관(10㎖)에 넣고 340 nm에서 1분간 변화된 흡광도의 양을 효소활성(μmol/mg/min)으로 하였다.

Mouse의 Neuron Cell에 대한 생존율 측정

Mouse(*Balb /C*)의 척수신경세포를 절취하여 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻고 myeline을 잘게 세절하고 0.25% trypsin과 2㎎/㎖ DNase를 첨가하여 37℃ incubator에서 15분간 배양하였다. 그 후 trypsin용액을 제거하고 PBS를 가하여 상등액을 없애고 10% Fetal Bovine Serum(FBS)를 Minimum Essential Media (MEM)에 첨가하여 원심분리 하였다. Single Cells로 된 것을 확인한 후 96 multiwell에 균일하게 분주했다. Mouse의 척수신경세포를 5% FBS가 포함된 MEM, 5% CO_2, 37℃에서 1일정도 배양한 후 bovine bile에서 추출된 각각의 분획을 일정 농도와 시간으로 배양액에 첨가하여 배양하였다. 배양 후 살아있는 세포 배지액에 MTT를 첨가하여 3 시간 정도 배양한 후 배양액을 버리고 일정량의 isopropanol을 첨가한 후 microelisa reader로 570㎚ 파장에서 측정하였다.

Bovine bile 추출물의 특성규명

TLC 분석을 통하여 항산화 물질을 분리, 확인하기 위하여 실시하였다. 위치확인 후 각 분획을 추출하여 항산화 활성분획을 screening 하기위하여 DPPH용액의 발색을 이용하여 분획을 찾았다. GC/FID분석을 위해서 TLC분석에서 항산화활성이 확인된 물질(R_f=0.72, 5~10㎍)을 가지고 internal standard로써 5α-cholestane을 첨가하고 TRI-SIL TBT(trimethylsilyl), pyridine를 부가한 후 TMS화하여 GC/FID 및 GC/MS 분석용 시료로 하였다[15,16].

결과 및 고찰

Bovine bile의 활성물질 추출

Bovine bile에서 항산화물질의 추출은 conjugate 되어있는 bile성분을 알카리 가수분해를 통해 화학결합을 끊고 다시 산성화를 시켜서 여러극성이다른 용매(methanol, ethylacetate, chloroform, hexane)로 추출을 실시하였다.[17] DPPH법에 의한 항산화력 측정은 radical에 의한 발색 정도로 항산화력의 유무를 육안으로 판단했다. 추출 용매에 따른 발색의 변화를 본 결과, 극성이 큰 methanol 추출물과 ethylacetate 추출물이 거의 동일한 변화로 항산화력이 크게 나타났다.

또한, 여기에서 methanol과 ethylacetate 추출물을 TLC로

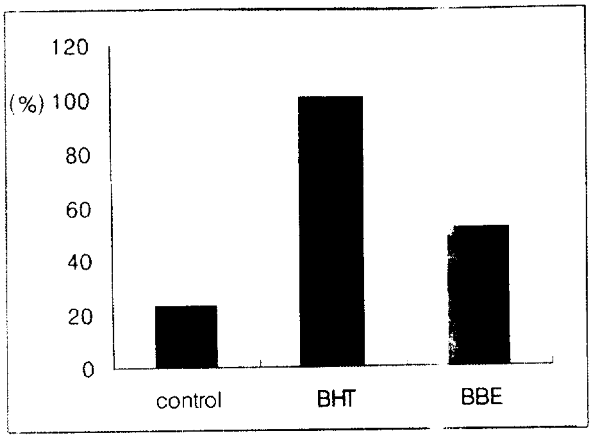

Fig. 1. Antioxidative activity measurement by Thiocyanate method

분리한 결과 methanol추출물이 항산화 물질외의 물질을 다량함유하는 것으로 보여 ethylacetate 추출물을 항산화 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다(결과 생략).

DPPH에 의한 항산화력 측정

Ethylacetate 추출물에 대하여 silica gel column chromatography를 실시하고 활성이 비교적 높은 (methanol:chloroform =1:9)분획과 인공항산화제인 BHT와의 DPPH에의한 항산화력을 측정하였다. 광학활성이 0.448와 0.862으로 항산화력이 BHT(100%)에 비해 약 50%정도의 수준으로 나타났다. 환원성 항산화제의 경우는 유지의 자동산화 과정중에 생성되는 ROO·, R·, RO· 등에 수소 또는 전자를 주는 수소(전자)공여능 즉, 환원력이 중요한 작용을 하지만 항산화제의 일반적인 작용을 수소공여능 만으로 설명할 수 없으며 오히려 환원제에 의해서 radical 반응이 연쇄적으로 유발되는 경우도 보고되어 있다[18].

Thiocyanate에 의한 항산화력 측정

Thiocynate 방법[11]에 의한 항산화력 측정은 인공 항산화제인 BHT (100%)와 비교를 실시한 결과, BBE가 51.2%로 BHT의 절반수준의 항산화력이 나타났다. (Fig. 1) 이 결과는 DPPH에 의한 측정과 비교하여 화학적인 분석인 thiocyanate 방법에의한 항산화 측정결과가 아주 흡사하게 나타났다. 이것은 phenol계 항산화제에 있어서 DPPH와 thiocyanate방법에 대해 민감하다는 보고와 일치하는 결과를 보였다.

Superoxide와 Hydroxyl radical의 소거력 측정

산화적인 대사에서 Xanthine/Xanthine oxidase 반응계에서 측정되는 superoxide anion radical에 대한 소거효과는 어떤 물질에의해 반응계 자체가 억제될경우, 즉 xanthine oxidase(XO)의 활성이 저해되는 경우 그 물질의 실제라디칼 소거효과보다 높은 활성으로 나타나게된다. BHT과 bovine

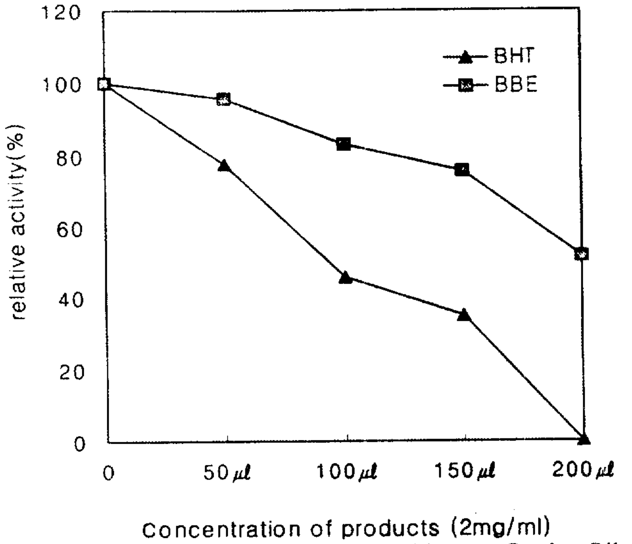

Fig. 2. Inhibitory effects of xanthine oxidase on Bovine Bile Extract(BBE)

bile추출물(BBE)의 농도를 달리해 산화 효소인 XO의 저해 활성 효과를 측정한 결과 상대활성이 동일농도에서 BHT가 100% 저해 했을때와 비교하여 BBE가 48.3%로 거의 절반 정도 수준의 저해효과만이 나타났다 (Fig. 2).

한편, Hatano 등[19]은 효소의 저해활성과 라디칼소거능 간의 상관관계는 찾을 수 없었지만 XO를 강하게 저해하는 탄닌 및 관련 물질들이 라디칼 소거능도 공유한다고 보고한 바 있다. 또한 Iio 등[20]과 홍 등[6]은 XO의 저해는 단백질과의 비특이적인 결합에 따라 활성이 달라진다고 보고를 했는데 본 실험에서는 BBE가 갖는 높은 단백질 함량과의 비특이적 결합에의해 이와 같은 결과가 나온것으로 생각된다. 또한, BBE의 hydroxyl radical의 저해측정은 ascorbic acid와 비교했을때 아주 낮은 저해능을 나타내 hydroxyl radical의 저해에는 BBE가 크게 관여하지 않는것으로 나타났다. 이 두가지의 결과 즉, xanthine oxidase와 hydroxyl radical 저해측정을 봤을때 BBE의 저해활성이 대부분 radical에 대한 소거활성이아니라 xanthine oxidase의 저해에 의해 radical 형성자체가 억제됨으로써 나타나는 현상임을 확인하였다.

Glutathione S-Transferase(GSH-T)의 활성도 측정

Xenobiotics의 생체내 전달메카니즘에 따른 해독작용에 관여하는 glutathione-S-transferase (GSH-T)는 매우 다양한 친전자성 기질인 CDNB가 기질로 이용되며, 또한 소수성 치환체(hydrophobic substituents)를 함유한 이 전달효소는 소수성 물질 bilirubin, steroid 등의 기질들과 결합하여 용해화(solubilization), 해독 그리고 분해대사를 수행한다. Mouse의 간에서 분리한 microsome에 BBE의 양을 달리한 투여를 실시했는데 GSH activity(μM/mg/min)를 측정했을 때 200μl 투여한 시험구에서 24.7의 활성을 나타내었다. BBE는 BHT에서의 37.8보다는 활성이 적지만 상대활성이 85.7%로 이에

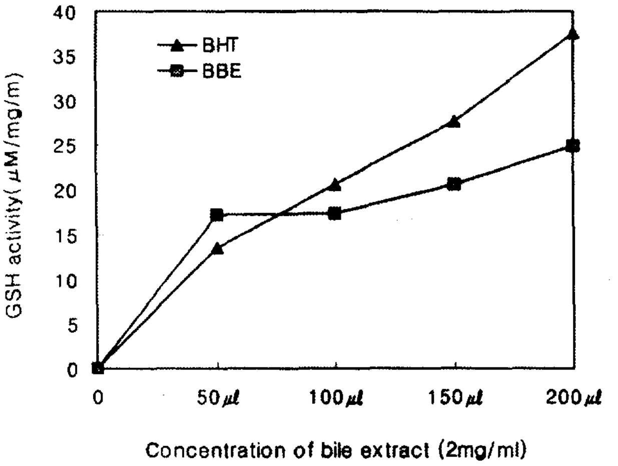

Fig. 3. The activity of Glutathione S-Transferase in liver microsome with Bovine Bile Extract(BBE)

못지않는 활성이 나타난 것으로 보이며 또한 시료의 농도 증가에 따른 활성증가에서는 저농도에서 오히려 BHT보다 높은 활성이 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 BBE가 세포내 환원에 관여하는 효소인 GSH-T의 전자방출을 감소시키므로 BBE의 농도증가에따라 GSH-T의 활성이 증가하는것으로 생각되었다.

Mouse의 Neuron Cell에 대한 생존율 측정

배양된 mouse의 신경척수세포에서 XO의 농도에 따른 투여-반응관계에서 배양액에 3시간 동안 XO를 노출시킨 후 농도증가에 따른 세포의 숫적 생존율을 MTT assay에 의하여 측정한 결과 10mU/㎖의 처리에서는 대조군에 비하여 생존율이 84%로 나타났으며 20, 30 그리고 40mU/㎖에서는 각각 68, 48, 30%로 나타났다(Fig. 4). 이 결과로 XO의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 세포생존율의 저해를 관찰할 수 있었는데 mouse의 신경척수세포에 내재하는 xanthine(분자상의 산소를 수소(전자)수용체로 이용)을 기질로 하여 산화하는 반응을 촉매 함으로써 나타난 결과로 추측된다.

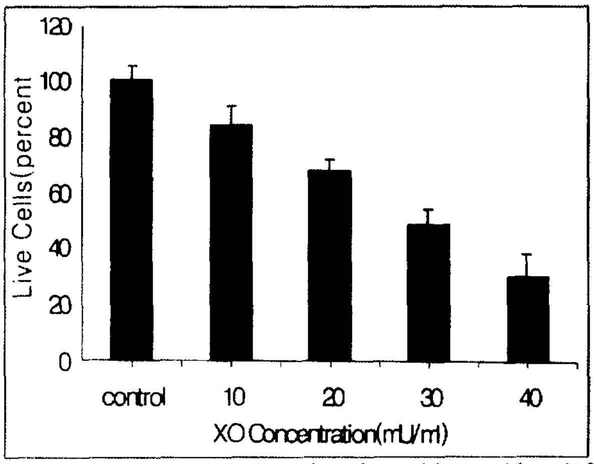

Fig. 4. Dose-response relationship of xanthine oxidase(XO) concentrations on in cultured mouse dorsal root ganglion(DRG) neurons. Cytotoxicity was measured by measures by MTT assay in DRG neuron cultures. The results indicate the mean ± SEM(n=6).

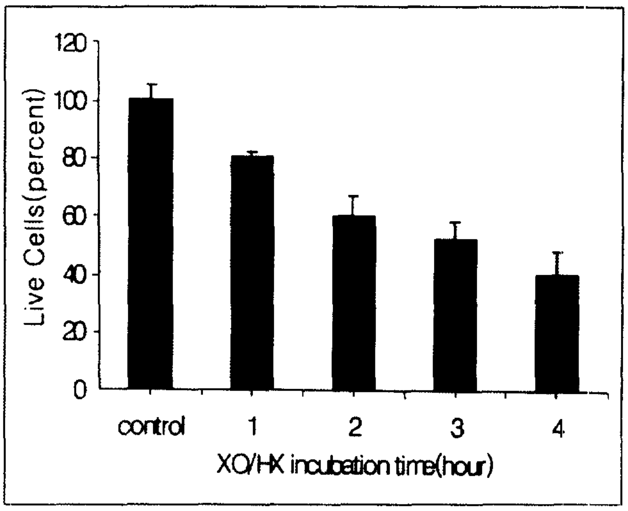

Fig. 5. Time-response relationship of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) on cultured mouse dorsal root ganglion(DRG) neurons. Cytotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse DRG neurons. Cultured cells were exposed to 30mU/mL xanthine oxidase(X) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 3 hours. The results indicate the mean ± SEM(n=6).

30 mU/㎖ XO와 0.1 mM HX의 신경척수세포에서의 작용을 배양시간 증가에 따라 조사했는데 1시간 배양에서 약 80%의 생존율이 나타났고 2시간 배양에서 60%의 생존율, 그리고 3과 4시간 배양에서는 52%. 40%로 각각 낮은 세포생존율을 보였다(Fig. 5).

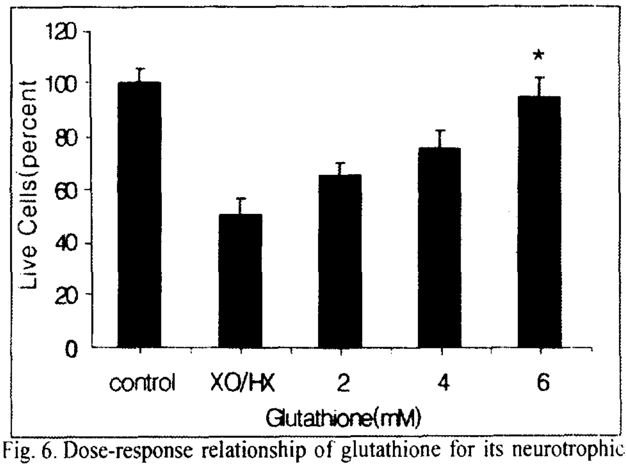

Fig. 6. Dose-response relationship of glutathione for its neurotrophic effect on oxidant-induced neurotoxicity by MTT assay. Cultured mouse dorsal rott ganglion(DRG) neurons were preincubated with glutathione for 2 hour before exposure to 30mU/mL xanthine oxidase(XO) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 3 hours. Cultured cells were exposed to 2, 4 and 6mM glutathione for 2 hours, respectively. The results indicate the mean ± SEM(n=6). *$p \leq 0.05$

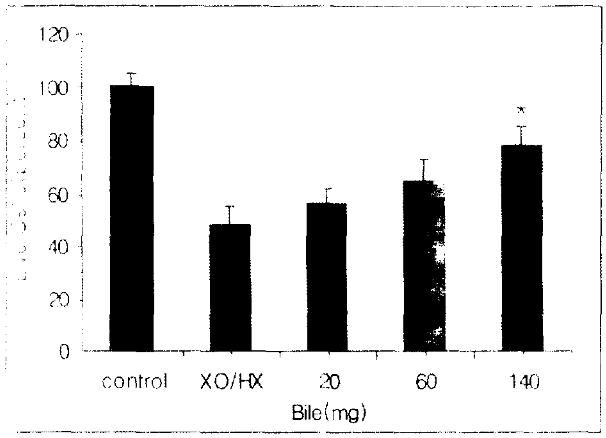

Fig. 7. Dose-response relationship of Bovine Bile Extract(BBE) for its neuroprotective effect on oxidant-mediated neurotoxicity by MTT assay. Cultured mouse dorsal root ganglion(DRG) neurons were preincubated with bile extract for 2 hours before exposed to 30mU xanthine oxidase(XO) and 0.1mM hypoxanthine(HX) for 3 hours. Cultured cells were treated with 20, 60 and 140mg of bile extract for 2 hours, respectively, and its effect was compared with that of 6mM glutathione(GSH). The results indicate the mean±SEM(n=6). $^*p \leq 0.05$

이러한 결과로써 XO와 HX농도가 일정할 때에는 배양시간이 증가함에 따라 세포수의 생존율이 현저하게 감소함을 알 수 있는데 XO가 HX를 기질로 하여 산화반응을 촉진시킴으로써 유리 라디칼 생성증대 및 세포생존율 감소를 유발하는 것으로 생각되었고 XO의 농도와 배양시간이 세포수의 생존율에 관여하는 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다.

항산화 물질인 glutathione이 신경세포의 생육에 미치는 영향을 조사 하였다(Fig. 6). 대조군은 XO와 HX 및 glutathione을 처리하지 않은 것으로 신경세포의 생육은 극히 정상이었다. 그러나 XO와 HX를 각각 30 mU/㎖, 0.1 mM을 처리하였을 때 약 52% 생육저해 효과가 나타났으나 이러한 실험구에 glutathione을 함께 첨가함에 따라서 glutathione의 양이 2~6mM로 증가함에따라 세포 생존율이 증가함을 관찰하였고 glutathione 투여가 6mM일 때 거의 90% 이상의 생존율이 나타났음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 XO, HX가 세포생육저해에 막대한 영향을 끼침을 시사하고 항산화 물질인 glutathione의 XO, HX의 효과를 감소시켜 세포생존율을 증가시킴을 나타내준 결과로 생각된다.

Mouse의 척수신경세포에 bile추출물의 양을 달리한 첨가와 항산화 물질인 6mM glutathione과의 비교를 실시했는데 배양된 mouse의 척수신경세포에 2시간동안 BBE를 preincubation 시키고 30mU/㎖ XO와 0.1mM HX를 3시간동안 노출시켰을 때 30%의 세포의 숫적생존율이 나타났고 배양된 세포에 20mg과 60mg의 bile을 처리했을 때 각각 56%와 65%의 생존율이 나타났다. 또한 140mg의 bile 처리에서는

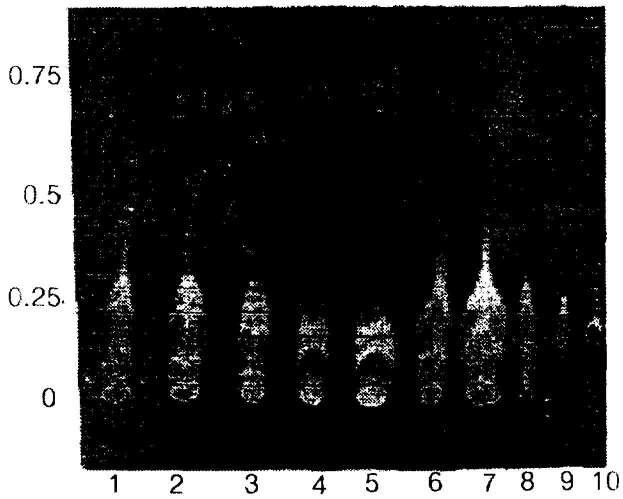

Fig. 8. Pictures of TLC analysis by solvent system ($CHCl_3$:CH_3OH:CH_3CN = 44:5:4) at room temperature under UV lamp

78%로 나타났다. 따라서 BBE의 91.4㎍/㎖은 glutathione 1 ㎍/㎖에 상응되는 항산화력을 가지고 있다는것을 의미하며 이러한 결과는 $P \leq 0.05$ 수준에서 유의성을 보여주었다.

이러한 세포생존율은 BBE 처리가 신경세포에 손상을 주는 활성산소를 저해[21]한다는 것을 시사해주고 있고 XO/HX는 mouse의 척수신경세포의 생존율을 저해하는데 BBE가 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 또한, Bovine bile 추출물 첨가량의 증가에 따라 점차적으로 hydroxyl radical에 의한 mouse 척수신경세포의 손상이 보호되어 살아있는 세포수가 증가하는 것을 보여주었다. 따라서 이는 BBE가 신경세포에 있어서 radical의 손상에 의해 야기되는 여러 질병의 예방에 유용하게 사용될수 있는 가능성을 제시해준다.

위와 같은 결과로 부터 여러 요인에 의해 발생되는 산소자유기가 과산화반응(peroxidation)의 사슬을 활성화시켜 그 결과 효소나 신경세포에 손상을 주어서 효소의 억제나 세포의 생존력을 감소시키고 bovine bile추출물이 방어에 효과적으로 작용하는 것으로 보여지고 합성항산화제 보다 활성이 떨어지지만 BBE가 조추출물이고 합성항산화제의 유해성 문제를 감안할 때 천연에서 추출한 물질이란 점에서 앞으로 더욱더 연구검토하는데 있어서 그 의의가 크다고 볼 수 있을 것이다.

Bovine bile 추출물의 특성규명

TLC 분석

Bovine bile 추출물의 항산화력을 나타내는 원인물질을 동정하기 위하여 TLC 분석을 실시한 결과 전개조건이 chloroform : methanol : acetonitrile의 비가 각각 44 : 5 : 4의 용매조건하에서 그림 9 에서 보는바와 같이 R_f값이 0.21, 0.3, 0.72로 세개의 spot이 나타났다. 이 spot을 모아 DPPH screening을 실시한 결과 2, 3, 4, 5번 분획의 R_f값이

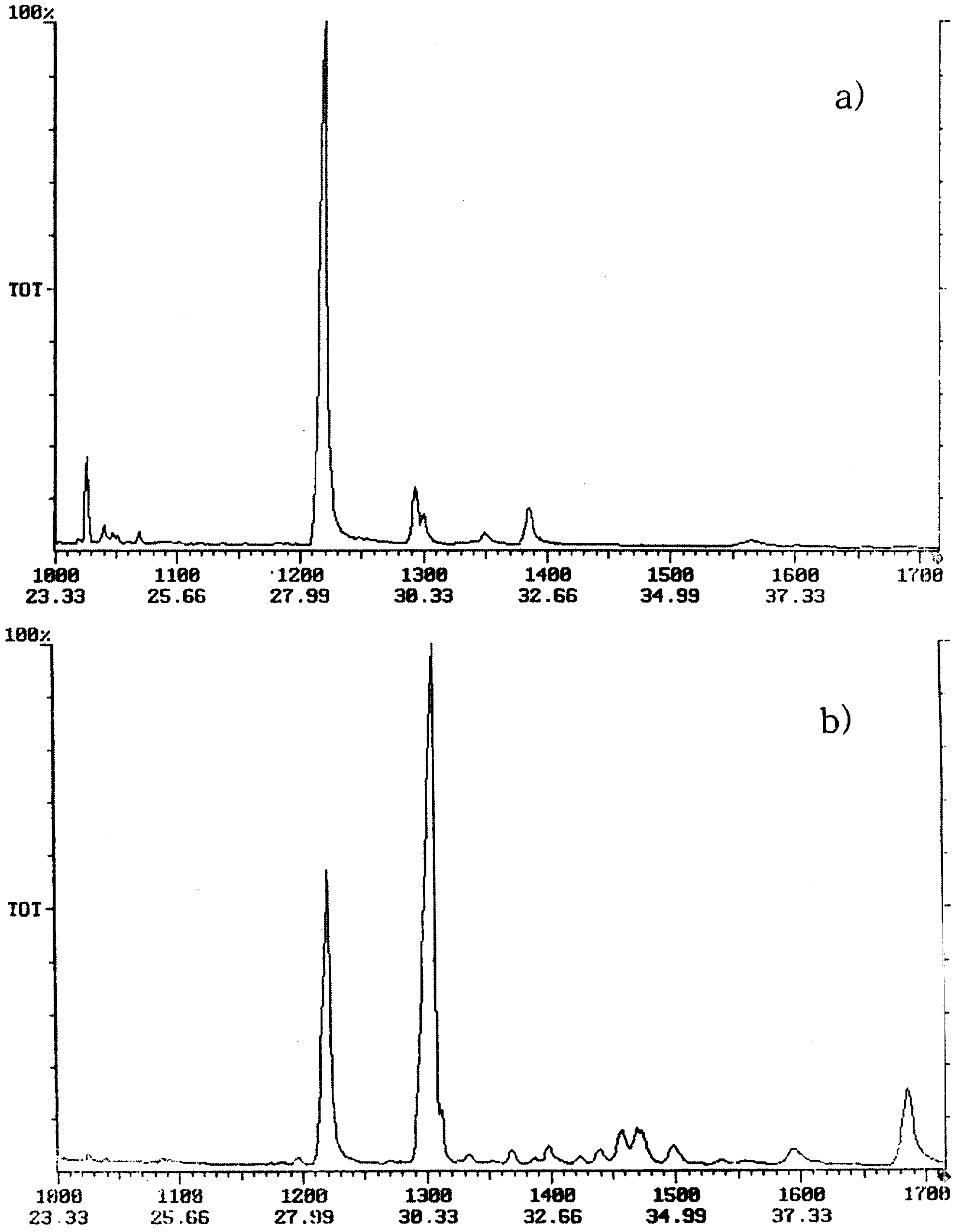

Fig. 9. Total ion chromatogram of bile extract

(a) NON-TMS

(b) TMS derivatives

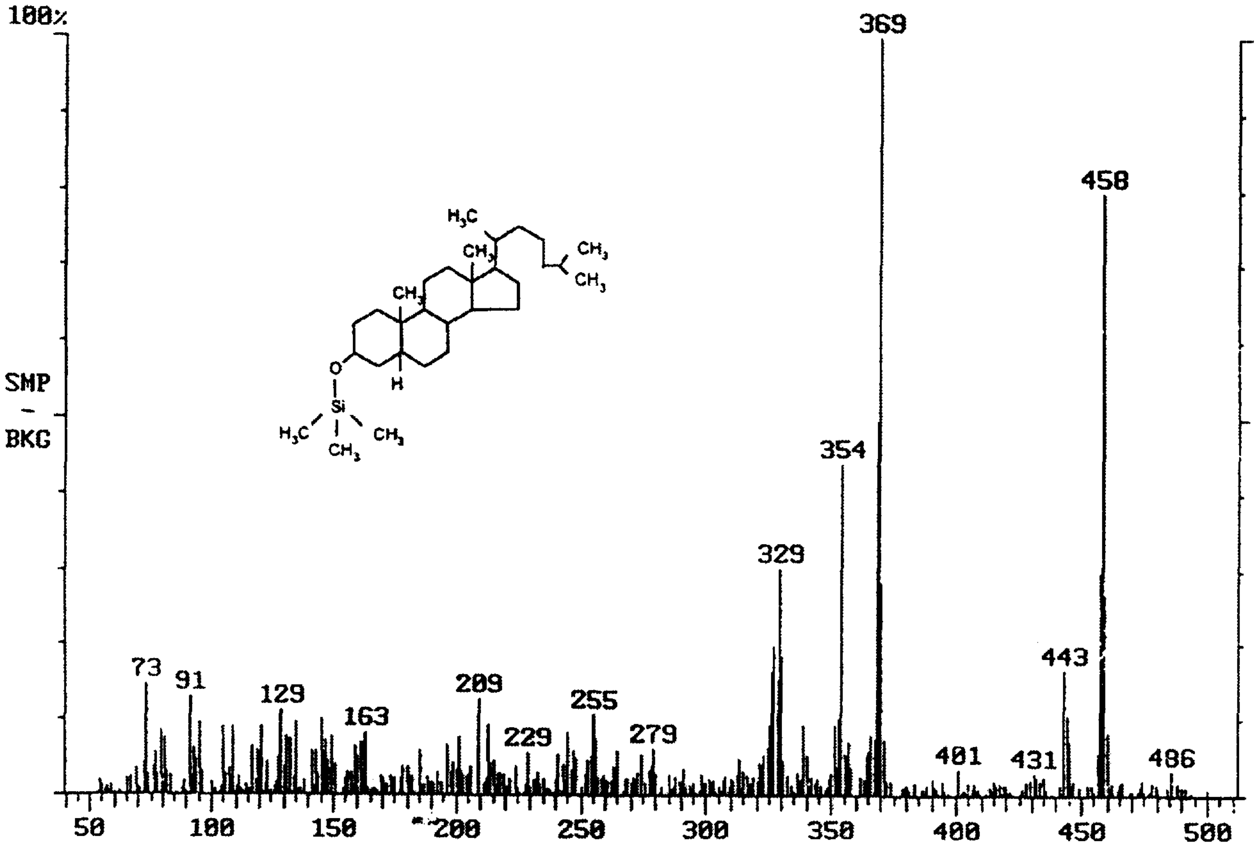

Fig. 10. Mass spectrum of antioxidant substance produced by Bovine bile extract

0.72에서 가장 항산화 활성이 높게 나타났다(Fig 8).

GC/FID 및 GC/MS 분석

TLC에서의 항산화성 활성이 가장높은 분획인 R_f값이 0.72인 spot을 가지고 GC/FID분석을 실시하고 bile acid의 여러 authentic시료와 비교해본 결과 polar한 성격을 지닌 성분인 coprostan 3-ol 과 비슷한 retention time을 갖는 성분으로 생각되었다[16].

이의 확인을 위한 위 peak의 GC/MS 측정한 결과를 Fig. 9(a)에 나타냈다. Total ion chromatogram이 28분에서 main peak가 나타났고 이 분획을 TMS 유도체화하여 분석한 결과 Fig. 9(b)에서 보는 바와 같이 main peak가 30분대로 이동하여 나타났다. 이 peak를 EI-mass spectrum으로 확인해보니 minor peak는 Fig.9(a)와 동일한 것으로 확인되었고 main peak는 -Si-(CH3)3가 붙은 총분자량이 458인 물질로 나타나 잠정적으로 Coprostan 3-ol로 추정하였다(Fig. 10). 앞으로 이 물질의 확인 및 다른 추출물의 항산화력 유무, 그리고 다른 생리적 효과에관한 연구도 곁들어져야 할것이다.

요 약

본 연구에서는 Bovine bile에서 항산화 물질분획을 분리하고 이에 따른 항산화 효소들의 여러 활성효과를 측정하였으며 GC/FID에 의한 항산화성 물질의 패턴을 확인하였다. 항산화력은 Butylated hydroxy toluene(BHT)에 비해 Bovine bile의 EtOAc추출물(BBE)이 51.2%로 나타났고 xanthine oxidase를 측정 48.3%의 저해효과를 보였으며 glutatione-S-transferase의 활성은 85.7%의 활성이 나타났다. MTT방법에 의한 세포생존율의 조사에서는 6mM glutathione 투여에서 95%라는 생존율과 비교하여 20mg, 60mg의 BBE를 처리했을 때 각각 56%와 65%, 140mg처리에서는 78%의 세포생존율이 나타났다. Bovine bile EtOAc추출물을 TLC로 분석한 결과 Rf값이 0.72에서 항산화 활성이 나타났고 이 분획을 methylation과 trimethysilyl(TMS) 유도체화를 시켜서 Gas Chromatography(FID)와 mass spectrum을 통한 성분 분석을 하고 bile acid의 구성분과 비교하여 계통분석을 실시한 결과 Coprostan-3ol로 추정되었다.

감사의 말

본 연구는 1996년 한국학술진흥재단(자유공모)연구비 지원으로 이루어진 결과로서 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ames, B.N., Shigenaga M.K. and Hagen T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 90, 7915.
2. Packer, L. (1995). Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. Oxidants and Antioxidants, p.1
3. Branen, A.L. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59.
4. Addis, P.B. and Hassel, C.A. (1992). Safety issues with antioxidants in foods. In Food Safety Assessment; Finley, J. W., Robinson, S F., Armstrong, D. J., Eds.; ACS Symposium Series 484; American Chemical Society: Washington, D.C., Chap. 30 : 347-376.
5. Chan, K.M., Decker, E.A. and Means, W.J. (1993). Extraction and activity of Carnosine, a naturally occuring antioxidant in Beef Muscle. *J. Food Science.* 58 : 1-4.
6. Jung-Il Hong, Mee-Hyang Kweon, Kyung-Soo Ra, Ha-Chin Sung, Han-Chul Yang (1995). Free radical scavenging activities and inhibitory effects on xanthine oxidase by ethanol extract from capsella bursa-pastoris. J. Korean. Agric. Chem. Soc. 38(6) : 590-595
7. Yoon Han kang, Yong Kon Park, Sang Ryong Oh and Kwang Deog Moon (1995). Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 27(6) : 978-984
8. Yong-Bong Han, Mi-Ra Kim, Byung-Hoon han and Yong-Nam Han (1987). Studies on antioxidant component of mustard leaf and seed. Kor. J. Pharmacogr. 18(1) : 41-49
9. Jeong-Sook Kim, Gee-Dong Lee, Joong-Ho Kwon and Hyung-sig Yoon (1993). Antioxidative effectiveness of ether extract in crataegus pinnatifida bunge and terminalia chebula Rets. J. Korean. Agric. Chem.Soc. 36(3) : 203-207
10. Seung-Yeol Kim, Jin-Hwan Kim and Seung-Kyeom Kim (1992). Isolation and characterization of antioxidant components in epimedium koreanum NAKAI extract. Korean J. Food Sci. Technol. 24, 535-540.
11. Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. and Sakata, K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1780-1783.
12. Beyer, W.F. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 244, 6049.
13. Barry, H. and Okezie, I.A. (1993). : DNA and free radicals. Ellis Horwood, p.1
14. Habig, W.H., Pabest, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferase; The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
15. Story, J.S. and Furumoto, E.J. (1991). Bile acid analysis : methods and problems. Euro. J. Cancer Prevention. 1, 29-30.
16. Batta, A.K., Aggarwal, S.K., Stephen Tint. G., Manju, B. and Gerald, B. (1995). Capillary gas liquid chromatography of 6-hydroxylated bile acids. J. *Chromatography A.* 704, 228-233.
17. Eneroth, P. and Sj vall, J. (1980). Extraction and chromatography of bile acids. Capter 5, 121-168.
18. Mahoney, J.R. and Graf, E. (1986). Role of α-tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model system. *J. Food Sci.* 51, 1293
19. Hatano, T., Yasuhara, T., Fukuda, T., Noro, T. and Okuda, T. (1989). Phenolic constituents of Licorce. Ⅰ. Structures of licopyanocoumarin, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. Chem. Pharm. Bull. 37, 3005.
20. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N. and Fukumoto, M. 1985) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol Chem.* 49, 2173.
21. Kye-Taek Lim, and Jae-Han Shim (1997). Antioxidative Effects of Ethanol Extracts from Rhus Verniaiflua Stokes(RVS) on Mouse Whole Brain Cells. *Korean. J. Food Sci. Technol. 29* : 1248-125