

복분자 열매의 총 페놀성분의 정량 및 항산화 활성

이종원* · 도재호

한국인삼연초연구원

Determination of Total Phenolic Compounds from the Fruit of *Rubus coreanum* and Antioxidative Activity

Jong-Won Lee* and Jae-Ho Do

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Abstracts

The purpose of this study was to investigate the extraction method of phenolic compounds from *Rubus coreanum* and antioxidative activities. Antioxidative activities of *Rubus coreanum* were tested with ability of donating hydrogen to DPPH, and HPLC, fluorometry which measure the amount of MDA after reacting linoleic acid with H_2O_2 , and LDL with H_2O_2 and $FeCl_2$. The most suitable extraction conditions of the phenolic compounds from *Rubus coreanum* was 3 times with 60% ethanol, and the yield of extract containing 35% moisture was 15.28%. In extraction efficacy of phenolic compounds, 60% ethanol was superior to water as extraction solvent, and extraction efficacy with 60% ethanol did not differ from dissolving by water after evaporation of 60% ethanol extract. 60% ethanol extract of *Rubus coreanum* had an ability of hydrogen donating to DPPH, MDA determination showed the antioxidative effect with inhibition ratio of 77.81% on linoleic acid oxidation by addition of *Rubus coreanum* extract with the concentration of 1,500 ppm. And about 65.74% of LDL oxidation was inhibited by addition of 1,000 ppm.

Key words: phenolic compounds, linoleic acid oxidation, LDL oxidation, antioxidative activity, *Rubus coreanum*

서 론

생약재는 우리나라를 비롯한 동양권에서 오랜동안 질병치료와 예방 목적으로 사용되어 왔으며, 또한 생약재의 2차 대사산물이 생체에 대한 생리활성 효과를 이용한 천연재료로서 경험적으로 가공, 이용되면서 인체에 대한 안전성은 대체적으로 많은 검증 연구가 행해져 오고 있다. 이러한 점에서 생약재들은 기능성 식품의 소재 분야에 광범위하게 활용이 기대되므로, 생약재에 함유된 생리활성 물질을 추출, 가공하는 기능성 식품용 소재 연구가 요구되고 있는 실정이다. Phenol 화합물들은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 플라보노이드, 카테킨류 및 안토시아닌류 등으로 구분된다. 최근 이들 성분들의 생리활성에 관한 연구가 여러 측면에서 활발하게 전개되고 있으며, 항산화 작용, 노화방지, 고지혈증 억제 및 항종양 작용 등이 보고되고 있다(1-3) Polyphenol 화합물을 많이 함유하고 있는 야채 및 과일 등의 식물성 식품의 섭취량이 증가할수록 심혈관계 질환에 의한 사망률이 낮아 진다는 여러 역학조사 결과(4-6)와 합

계 혈중 총 콜레스테롤 농도를 낮추고 HDL-콜레스테롤 농도를 높이는 등의 혈관순환계 질환의 예방 및 개선 효과도 보고되고 있다(7,8). Hong 등(9)은 복분자를 이용한 주류 등을 개발하였고, Jeong 등(10)은 복분자를 첨가한 멸치 발효 액화물 가공식품을 개발하였다. 또한 바이러스 증식억제에 대한 연구 결과 Hepatitis B virus 단백질 합성 억제 효능과 관계가 많은 HBeAg의 배지에 대한 억제효과가 보고되었다(11). 장미과에 속하는 복분자 (*Rubus coreanum*)의 분포는 일본, 중국, 우리나라 제주도를 포함한 남부지방 및 중부지방의 해발 50~1000 m 지역 산기슭 양지에 자생한다(12) 복분자의 용도로는 식용 및 약용 등으로 사용되고 있는데 특히 열매는 식용 및 청량 음료제로 쓰고, 밀원 자원으로도 이용되고 있으며, 한방과 민방에서는 열매를 명안, 태생, 지신, 음위, 강장, 양모 등에 약재로 많이 이용되고 있다(13). Lee 등(14,15)은 복분자 열매의 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin을 분리하였고, 또한 복분자 잎으로부터 4종의 flavonoids 즉, kaempferol, quercetin, sodium salt of quercetin-3-o-β-

* To whom all correspondence should be addressed

D-glucuronide, sodium carboxylate of quercetin 3-o-β-D-glucuronide 그리고 ellagic acid 및 1종의 ellagitannin인 sanguin H-5를 분리하여 그 구조를 밝혔다 그러나 복분자 열매는 가공식품분야에서 많이 이용되고 있는 반면에 연구는 미흡한 편이 있다

따라서 본 연구에서는 복분자의 기능성 연구의 일환으로 페놀 화합물과 항산화활성 중 DPPH에 의한 수소공여능, linoleic acid에 대한 산화방지활성 및 LDL에 대한 항산화활성 중심으로 연구한 결과를 밝혀 기능성 식품소재의 이용성에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

α-Tocopherol, caffeic acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), 2-hydroxy-pyrimidine, linoleic acid, polyethylene glycol, sodium dodecyl sulfate (SDS) 및 caffeic acid 등은 Sigma社(USA) 제품을 구입하여 사용하였고, 복분자 열매는 시중 견재 한약방에서 상등품을 구입하여 60% ethanol로 80°C에서 추출한 후 냉동 건조하여 사용하였다. LDL 분리용 신선혈장(human fresh plasma)은 적십자혈액원의 협조로 연구용으로 구입하여 사용하였다

총 페놀성 화합물 정량

복분자를 대상으로 하여 총 페놀성 화합물의 함량을 비색정량 하고자 Folin-Denis법(16)을 일부 변경하여 사용하였다. 복분자 열매 분말에 약 0.5 g에 추출용매를 25 mL를 가하여 80°C에서 1시간 추출한 뒤 여과하고 5배 희석하여 분석용 시료로 사용하였다. 시료 1 mL와 folin 시약 1 mL을 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤 10% Na₂CO₃용액 1 mL를 가하여 혼합하여 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 조사하였다.

DPPH에 의한 수소공여능

DPPH(α, α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여능(electron donating ability, EDA)은 복분자의 60% alcohol 추출구를 냉동 건조한 후 0.003% 수용액 1 mL와 DPPH 용액(DPPH 12 mg을 100 mL 에탄올에 완전히 용해시킨 후 100 mL 증류수를 가한 액) 4.0 mL 가하여 10초 동안 진탕한 후 517 nm에서 10분간 흡광도의 변화를 측정하였다(17).

Linoleic acid의 산화반응 및 산화방지활성 측정

Tris-HCl buffer(pH 7.4, 30 mm)와 0.2% SDS가 첨가된 1% linoleic acid 수용액에 복분자 추출구를 0~1,500

ppm 농도로 가하고, 30분 후 400 μm H₂O₂를 첨가, 혼합하여 최종 반응물의 용량을 5 mL로 하여 37°C에서 16시간 동안 진탕하며 산화반응시켰다. 1.2 mg의 BHT를 가하여 산화반응을 종결시킨 뒤(18) 산화된 시료 중에 생성된 malondialdehyde(MDA)의 양은 Osawa와 Shibamoto의 방법(19)을 일부 변경하여 다음과 같이 HPLC(Waters, USA)로 분석하였다. 즉, 산화된 시료 1 mL에 0.8 mL urea(6 M)와 0.2 mL HCl(1.2 N)을 가하여 100°C에서 1시간 동안 가열한 후, 이 반응액을 C₁₈-SPE column(J.T Baker, USA)에 통과시키고, 증류수로 세척하여 최종적으로 2 mL로 정용하였다 20 μL를 취하여 RP-HPLC를 이용하여 2-hydroxypyrimidine으로서 MDA를 정량 분석하였다. 이때 HPLC의 조건은 C₁₈ column(μBondapak 18, 0.39×30 cm, 10 μm)과 UV detector(309 nm)를 사용하였으며, mobile phase로 증류수(1 mL/min)를 사용하였다. 이때의 산화저해율은 [(무첨가군의 MDA 생성량 - 첨가군의 MDA 생성량)/무첨가군의 MDA 생성량]×100으로 계산하였다

LDL의 분리

Terpstra와 Pels의 방법(20)에 따라 신선혈장을 사용하여 LDL(Low Density Lipoprotein)을 다음과 같이 분리하였다 즉, 1차로 10°C에서 30분간 원심분리(26,000×g)하여 잔여 혈구와 chylomicron을 제거하였다. 2차로는 KBr을 첨가하여 밀도를 조정한 후 초고속원심분리기(Beckman, USA)로 10°C에서 24시간 원심분리(360,000×g, d=1.210)하여 lipoprotein을 분리하고 이를 density gradient 초고속원심분리(110,000×g, d=1.250, 1.225, 1.100, 1.000)로 10°C에서 24시간 실시하여 최종 LDL을 분리하였다 분리된 LDL은 phosphate gradient 용액(pH 7.0)을 사용하여 4°C에서 3시간 동안 투석하였고, 여기에서 얻어진 LDL은 polyethylene glycol을 사용하여 1 mg protein/mL 이상의 농도로 조정하여 산화실험에 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다.

LDL의 산화반응 및 항산화활성 측정

Linoleic acid의 경우와 같은 방법으로 LDL(1 mg protein/mL) 반응액의 용량을 2.5 mL로 한 후 37°C에서 5시간 진탕하며 산화반응시켰다. 생성된 MDA의 양은 Yagi 방법(21)에 따라 fluorometer(Perkin Elmer, England)로 Ex. 515nm, Em 553 nm에서 측정하였다. Conjugated diene의 측정은 LDL(0.25 mg protein/mL) 반응액에 복분자를 0~100 ppm 농도로 가하고, 40 μm FeCl₂와 20 μm H₂O₂를 가하여 37°C에서 1시간 진탕하며 반응시킨 후 234 nm에서의 흡광도가 0.2~0.8 사이가 되도록 희석하여 측정 비교하였다(22).

결과 및 고찰

추출횟수별 phenolic 화합물 함량 조사

복분자에 60% ethanol을 첨가하여 추출횟수별 총 페놀성 화합물의 함량을 조사한 결과는 Table 1과 같으며 이때 페놀성 화합물의 양은 caffeic acid로 나타내었다 1회 추출했을 때에는 4.05%, 2회에는 0.81%, 3회에는 0.35%, 4회 및 5회에는 각각 0.14%, 0.05%로 조사되었으며, 3회까지 추출했을 때 96.4%가 추출되었기 때문에 추출횟수는 3회가 적당한 것으로 판단된다. 총 페놀성 화합물의 함량 caffeic acid로서 5회 추출시 5.40%으로 조사되었다.

60% ethanol 추출물의 수율 조사

복분자의 60% ethanol로 추출한 시험구의 수율을 조사하기 위하여 복분자의 양에 15배(w/v)의 60% ethanol을 가하여 80°C에서 1시간씩 3회까지 추출하고 60°C 이하에서 농축하여 수율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 복분자는 3회까지 추출했을 때 수율은 1회 4.12%, 2회 3.49%, 3회 2.32%로 총 9.93% 정도였고, 추출물의 수율(dry basis기준) 약 15.28%로 조사되었다.

추출용매에 따른 페놀성 화합물 함량 조사

복분자가 함유하고 있는 총 페놀성 화합물의 함량을 조사하기 위하여 물추출구, 60% ethanol로 추출구, 60% ethanol로 추출하고 농축한 뒤 다시 물로 용해한 시험구(60% EtOH-evap)의 총 페놀성 화합물의 함량을 700 nm에서 흡광도를 비교한 결과는 Table 3과 같다. 물추출구를 100%으로 나타내었을 때, 60% ethanol 추출구는 179%, 60% EtOH-cvap 추출구는 188%로 나타났다 60% EtOH-evap. 추출구가 60% ethanol 추출구보다 약 9%

Table 1. Changes in amount of phenolic compound from *Rubus coreanum* on number of extraction with 60% ethanol as extracting solvent

Number of extraction (No)	Amount (%) (as caffeic acid)	Relative extraction amount (%)
1	4.05	74.9
2	0.81	15.0
3	0.35	6.5
4	0.14	2.6
5	0.05	0.9
Total	5.40	100.0

Table 2. Extraction yield of *Rubus coreanum* with 60% ethanol

Extract yield				Yield of extract contained (% dry basis)
1	2	3	Total	
4.12	3.49	2.32	9.93	15.28

Table 3. Effect of extracting solvents on the amount of phenolic compound

Solvents	Absorbance (700 nm)	Relative extraction efficacy (%)
Water	0.79	100
60% EtOH	1.41	179
60% EtOH-evap ¹⁾	1.48	188

¹⁾Extract dissolved with water after evaporating extract extracted with 60% ethanol.

그리고 물추출구보다 약 88% 높게 추출되었다 60% ethanol 추출구나 60% EtOH-evap. 추출구의 추출효율이 비슷하게 나타났는데 이것은 실제 식품 또는 의약품으로 복분자가 함유된 제품을 제조할 경우 추출, 농축한 뒤 다시 정제수로 녹여서 사용해도 큰 문제가 되지 않는다고 판단된다

입자 크기에 따른 페놀성 화합물 함량 조사

시편되는 복분자 열매의 크기는 대체적으로 약 0.7~0.9 cm 정도이지만, 실제로 구입해보면 많은 양이 분말 상태로 되어 있다. 따라서 복분자의 입자 크기가 추출되는 총 페놀성 화합물의 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 입자의 크기가 0.05~0.1 cm일 때 41.47%, 0.1~0.3 cm일 때 36.79% 그리고 0.7~0.9 cm일 때 21.54%로 0.05~0.1 cm과 비교할 때 약 20%의 수율차이가 있는 것으로 조사되었다. 따라서 입자의 크기가 작으면 작을수록 페놀성 화합물이 많이 추출되기 때문에 복분자 엑기스 제조시에는 분쇄하여 추출하는 것이 좋을 것으로 사료된다

항산화 활성 조사

DPPH에 의한 수소공여 활성

항산화물질의 가장 특징적인 역할이 oxidative free radical 반응을 이용하여 환원성 물질의 분석 시약인 DPPH 방법에 따라 시간 경과에 따른 복분자의 60% ethanol 추출구의 수소공여능을 조사한 결과는 Fig 1과 같다. 반응전의 흡광도가 약 2.0에서 1분 경과한 뒤에는 0.89, 10분이 경과한 뒤에는 0.55로 나타났는데, 이것은 반응초기에 복분자의 항산화물질이 DPPH와 빠르게 반응한다고 판단된다. 이러한 결과는 복분자에 함유되어 있는 페놀성 화합물 및 flavonoids류가 항산화 활성을 나타내는 물질

Table 4. Extraction amount of phenolic compounds from *Rubus coreanum* on particle sizes

Size (cm)	Absorbance (700 nm)	Relative extraction efficacy (%)
0.7 ~0.9	1.37	52.7
0.1 ~0.3	2.34	88.3
0.05~0.1	2.65	100.0

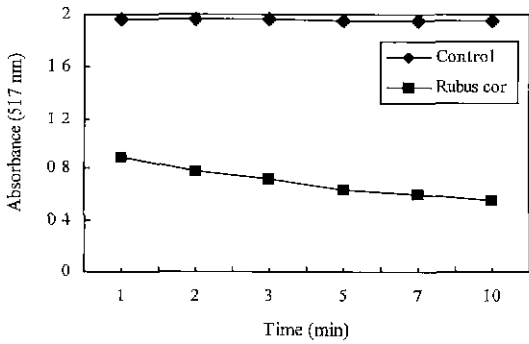


Fig. 1. Change of absorbance by the hydrogen donor ability of *Rubus coreanum*.

로 추정된다(23).

Linoleic acid에 대한 산화방지효과

Linoleic acid를 기질로 하여 FeCl₂(400 μm)와 H₂O₂(200 μm)를 가하여 생성되는 active oxygen인 hydroxyl radical에 의한 산화과정을 유도하였다. 60% ethanol로 추출하여 동결 건조한 복분자 추출물을 농도별(200~1,500 ppm)로 첨가하고 37°C에서 16시간동안 반응시킨 후 HPLC 방법으로 생성된 MDA의 양을 무첨가군과 비교하여 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 이 때의 산화 저해율은 200 ppm 농도에서 약 10.41%, 500 ppm에서 13.25%, 700 ppm에서 44.15%, 1,000 ppm에서 53.55%, 1,500 ppm에서 77.81%로 나타났다. Lee와 Park(24)이 연구한 홍미삼의 linoleic acid에 대한 산화방지효과 결과에서는 1,000 ppm 첨가시 71.8%, 1,500 ppm 첨가시 73.2%로 나타나, 복분자 추출물이 같은 1,000 ppm 농도에서 약 18% 감소하였으나, 1,500 ppm 농도에서는 약 4.6%로 높게 나타났다. Kim 등(25)은 페놀성 화합물은 지방산의 원인물질인 hydroperoxide기, 지질 및 산화생성물과 반응하여 산화를 억제시킨다고 보고하였으며, 또한 페놀성 화합물이 radical 생성 촉진물질인 철 및 구리이온과 쉽게 결합하여 macrophage나 free cells 상태에서 유리기의 형성을 줄이기 때문일

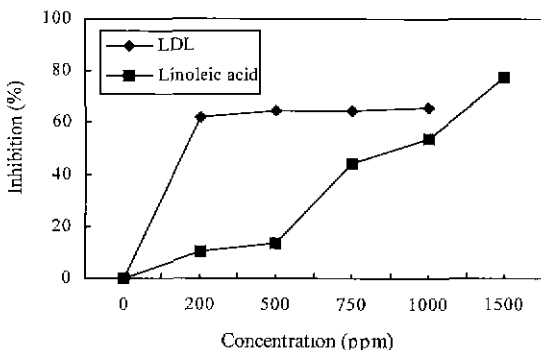


Fig. 2. Inhibitory of the *Rubus coreanum* on lipid peroxidation and LDL oxidation.

수도 있다고 제시하였다.

LDL에 대한 산화방지효과

유해 활성산소류에 의한 LDL의 산화는 LDL 내에 함유되어 있는 고도불포화 지방질의 산화에 의한 것으로 동맥경화의 원인이 되고 있는 것으로 보고되고 있어서 LDL의 산화가 인체에 미치는 중대한 의미를 갖는다(26). 생물학적 산화방지제로서의 α-tocopherol은 이와 같은 LDL 산화과정 중에 산화방지효과가 있음이 보고되고 있다(27) LDL(0.25 mg protein/mL)을 기질로 하여 상기의 방법으로 산화방지 효과에 대한 실험결과는 Fig 2에 나타내었다. 시료농도 200 ppm에서 62.34%, 500 ppm에서 64.52%, 700 ppm에서 64.91%, 1,000 ppm에서 65.74%로 나타났다. 그 결과 1,000 ppm 농도로 첨가시 산화저해율은 약 66%로 가장 우수한 것으로 나타나, 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것으로 나타났다. Lee와 Park(24)이 연구한 홍미삼 추출물의 LDL에 대한 산화방지효과 실험결과를 보면 200 ppm 첨가시 25%로 가장 높은 산화방지효과가 있었으며, 복분자의 추출물은 같은 농도에서 홍미삼 추출물보다 약 37% 정도 더 높은 산화방지효과가 나타났다. 한편 Park 등(28)이 보고한 녹차 열수 추출물이 LDL에 대한 항산화 활성에 의한 LDL은 CuSO₄ 존재 하에서 macrophage와 배양했을 때 산화가 빠르게 일어났고, 50 및 100 μg/mL 농도의 녹차 추출물을 첨가했을 때에는 거의 완전히 산화가 억제되었다. 아직까지 이러한 메카니즘은 잘 알려져 있지 않으나 Steinbrecher 등(29)에 의하면 세포 내에서 LDL의 고도 불포화 지방산이 세포로부터 방출되는 자유기에 의해서 과산화물이 형성된다고 추정하고 있다 그리고 Sparrow와 Olszewski(30) 및 Rankin 등(31)에 의하면 LDL의 산화는 세포내의 lipoxxygenase의 활성에 의하여 일어나며 페놀성 화합물이 lipoxxygenase의 활성을 억제한다고 하였다 따라서 본 연구에 사용된 복분자 60% ethanol 추출물에 함유되어 있는 페놀성 화합물은 다양한 항산화 활성 시스템에서 활성이 있는 것으로 조사되었으며, 이들 물질들을 기능성 신소재로서 활용 가치가 높을 것으로 판단되며, 차후 복분자 열매에 함유되어 있는 페놀성 화합물의 물질들을 분리 및 정제 연구를 진행하고자 한다.

요 약

본 연구의 목적은 복분자 열매의 기능성 연구의 일환으로 페놀 화합물의 추출방법과 DPPH에 의한 수소공여능, linoleic acid의 산화방지활성 및 LDL에 대한 복분자의 항산화활성 등을 중심으로 연구한 결과이다 음양곽에 60% ethanol를 첨가하여 추출회수별 총 페놀성 화합물을 조사한 결과 3회까지 추출했을 때 약 97%가 추출되었기 때문에 추출횟수는 3회가 적당한 것으로 판단되었다. 60% ethanol 추출구의 수율은 3회까지 추출했을 때

약 15%이었다 추출 용매에 따른 페놀성 화합물의 추출 효율은 물 추출구를 100%로 했을 때, 60% ethanol 추출구는 179%, 그리고 60% ethanol 용액으로 추출한 뒤 농축하여 물로 부피를 제조정한 구는 188%로 조사되었다 입자의 크기가 0.05~0.1 cm에서 약 20%로 가장 많이 추출되어 입자 크기가 작으면 작을수록 페놀성 화합물이 많이 추출되었다. 항산화활성 조사에서 DPPH에 의한 수소공여활성은 반응 초기에 강하게 항산화 활성을 나타냈으며, 시간이 경과함에 따라 항산화 활성이 약간씩 증가하였다. Linoleic acid 산화에 대한 산화방지 효과는 1,500 ppm 농도에서 약 78% 산화저해율을 나타냈으며, LDL에 대한 산화방지 효과는 1,000 ppm 농도에서 산화저해율이 약 66%로 나타났다

문 헌

1. Cha, J.Y and Cho, Y.S : Effects of hesperidin, naringin and their aglycones on the vitro assay phosphatidate phosphohydrolase, and on the proliferation in cultured human hepatocytes HepG2 cells *Agri. Chem. Biotech.* **40**, 577-582 (1997)
2. Cha, J.Y. and Cho, Y.S. : Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 1131-1136 (1999)
3. Papadopoulos, G. and Boskou, D . Antioxidant effect of natural phenols on olive oil *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 669-675 (1991)
4. Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Fesken, E.J.M., Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. . Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.*, **155**, 381-386 (1995)
5. Knekt, P., Javinnen, R., Reunanen, A. and Martela, J. Flavonoid in take and coronary mortality in Finland. a cohort study *Br. Med. J.*, **312**, 478-481 (1997)
6. Hertog, M.G.L., Fesken, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. and Kromhout, D. . Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, **342**, 1007-1011 (1993)
7. Basarkar, P.W. and Nath, N. . Cholesterol lowering action of vitamin P-like compounds in rats *Indian J. Exp. Biol.*, **19**, 787-789 (1981)
8. Matsumoto, N., Okushio, K. and Iiara, Y. : Effect of black-tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **44**, 337-342 (1998)
9. Hong, J.S., Kim, J.S., Kim, I.G., Kim, M.G. and Yun, S. . Processing development of Bokbunja-wm. *Annual Research Report of Ministry of Agricultural and Forestry*. Report No. 1A 1199512310103 (1995)
10. Jeong, Y.C., Kang, I.S. and Chai, M.R. : Development of aqueous anchovy food using fermentation. *Annual Research Report of Ministry of Maritime Affairs & Fisheries*, Report No. IB 1199812310002 (1998)
11. Lee, J.H., U, H.J., Kim, Y.C. and Park, H.K. : Study on the effects of herbal medicine on inhibition of HBV replication. *Annual Research Report of Ministry of Health and Welfare*, Report No. LA 1199712310158 (1997)

12. Kim, T.J : *Korean resources plants* Seoul University Republished, Seoul, p.282 (1997)
13. Jeong, J.S. and Sin, M.K . *Encyclopedia of oriental medical* Young Rim Republished, Seoul, p.461 (1996)
14. Lee, M.W . Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* **39**, 200-204 (1995)
15. Lee, Y.A and Lee, M.W. : Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* **6**, 27-30 (1995)
16. Gutfinger, T. . Polyphenols in olive oils *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 966-968 (1958)
17. Blois, M.L . Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**, 1199-1124 (1958)
18. Minott, G. and Aust, S.D. : The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1098-1102 (1987)
19. Osawa, T. and Shibamoto, T. . Analysis of free malonaldehyde formed in lipid peroxidation system via a pyrimidine derivative. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 466-469 (1992)
20. Terpstra, A.H.M. and Pels, A.E : Isolation of plasma lipoproteins by combinations of differential and density gradient ultracentrifugation *Fresenius Anal. Chem.*, **330**, 149-154 (1988)
21. Yagi, K. : Lipid peroxides, free radicals, and diseases. In *Active Oxygens, Lipid Peroxidase, and Antioxidants*. Yagi, K. (ed.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p.39-56 (1993)
22. AOAC . *Official Methods and Recommended Practices of the AOAC* 4th ed, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia (1990)
23. Sun, P., Ye, W., Zheng, G., Wang, Z., Chen, Y., Ogihara, Y.N and Takeda, T. : A flavonol glycoside, epimedol K, from *Epimedum koreanum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **44**, 446-447 (1996)
24. Lee, H.O. and Park, O.J : Antioxidation effects of phenolic acids and ginseng extract in aqueous system. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 434-438 (1998)
25. Kim, S.Y., Kim, J.H. and Kim, S.K . Isolation and characterization of antioxidant components in *Epimedum koreanum* NAKAI extract *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 535-540 (1992)
26. Bowry, V.W and Ingold, K.U. . Vitamin E in human low density lipoprotein. *Biochem. J.*, **288**, 341-344 (1992)
27. Stocker, R.S., Bowry, V.W and Frei, B. . Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 1646-1650 (1991)
28. Park, C.O., Jin, S.H. and Ryu, B.H. : Antioxidant activity of green tea extracts toward human low density lipoprotein *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 850-858 (1996)
29. Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S. and Steinberg, D. . Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3883-3887 (1984)
30. Sparrow, C.P. and Olszewski, J. . Cellular oxidative modification of low density lipoprotein does not require lipoxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 128-132 (1992)
31. Rankin, S.M., Parthasarathy, S. and Steinberg, D. . Evidence for a dominant role of lipoxygenases in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophage *J. Lipid Res.*, **32**, 449-453 (1991)