

## 호두 추출물의 항산화 활성과 신피질에서 세포 손상과 지질과산화 방지효과

배계선\* · 황을철 · 권재화 · 김순희 · 최춘환

동아대학교 생명자원과학대학

Received December 29, 2004 / Accepted February 2, 2005

**Antioxidant Activity of Extract from Walnut (*Juglans sinensis* Dode) and Its Protective Effect on Cell Injury and Lipid Peroxidation in Renal Cortical Slices.** Kae Sun Bae\*, Eul Chul Hwang, Chae Hwa Kwon, Soon Hee Kim and Chun Whan Choi. *College of Natural Resource and Life Science, Donga University* – To investigate the antioxidant activity of extract from the raw walnut, *Juglans sinensis* Dode, we prepared five fractions (methanol (MeOH), dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (n-BuOH) and dehydrogen monooxide (H<sub>2</sub>O) fractions) and examined. The effect of walnut extract on the oxidative stress was investigated *in vitro*. The DPPH (2,2-Di (4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity of extract from raw walnut was shown in the following order: EtOAc fraction > n-BuOH fraction > MeOH fraction > CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction > H<sub>2</sub>O layer. The result showed that the highest activity (0.56 µg/ml, IC<sub>50</sub>) was observed in EtOAc fraction, whereas n-BuOH fraction, MeOH fraction, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction and H<sub>2</sub>O layer of IC<sub>50</sub> were 2.34 µg/ml, 3.88 µg/ml, 8.06 µg/ml, and 8.19 µg/ml, respectively. The radical scavenging activity assay of each fraction showed that the antioxidative activity was observed in the following order: EtOAc fraction (74.27 ± 1.56%) > MeOH fraction (60.76 ± 3.4%) > n-BuOH fraction (59.32 ± 0.88%) > H<sub>2</sub>O layer (41.69 ± 2.06%). These results revealed that all fractions, except for CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction, showed high antioxidative activity. Furthermore, the peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) scavenging activity was assayed in each fraction. The result showed that the ONOO<sup>-</sup> scavenging activity of EtOAc fraction, MeOH fraction and n-BuOH fraction from raw walnut was 95.14 ± 0.36%, 90.02 ± 1.19% and 89.41 ± 0.81%, respectively. The *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) treatment *in vitro* increased lactate dehydrogenase release and lipid peroxidation in renal cortical slices. Such changes were completely prevented by addition of MeOH fraction, EtOAc fraction and n-BuOH fraction of walnut. These results indicate that the walnut extract exerts the beneficial effect against *t*-BHP-induced cell injury and its effect may be due to antioxidant action. In addition, it is suggested that walnut extract might be developed as the effective scavenger for the prevention of oxidative stress.

**Key words** – Antioxidant activity, lipid peroxidation, walnut

인체가 섭취하는 산소의 약 95% 이상은 세포의 대사과정에서 생성되는 전자와 결합하여 물로 환원되지만, 2~3%의 일부 산소가 불완전하게 전자를 흡수하려는 반응과정에서 세포의 파괴작용을 초래하는데, 이를 활성산소(free radical, oxygen radical)라고 한다[3].

생체내 산소가 유입되어 세포 내에서 이용될 때, superoxide anion radical ( $\cdot O_2$ ), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl ( $\cdot OH$ ), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), 그리고 지질의 free radical 즉, alkoxyl radical (RO $\cdot$ ), alkoxyl peroxy radical (ROO $\cdot$ )과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 부산물로 생성된다. 또한 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)는 생체 내에서 nitric oxide (NO $\cdot$ )과  $\cdot O_2$ 의 반응으로 생성되는 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)으로 ROS와 함께 활성종(reactive species)에 포함된다. 이들 ROS와 RNS는 세포 내 여러 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산 그리고 DNA를 산화시켜 염증을 유발하고 세포내 여러 조직을 손상시키며, 많은 퇴행성 질환,

즉 암, 노화, 동맥경화, 류마티스 관절염, 그리고 알레르기에 관련되어 있을 것으로 여겨지고 있다[1,20,22]. 특히 생체막이나 지단백질로서 존재하는 지질은 체내에서 발생하는 free radical의 공격을 받아 여러 종류의 과산화물을 형성하는데, 이 과산화물들과 분해산물들은 반응성이 좋아 주변의 생체 분자들의 구조와 기능을 변화시켜 여러가지 만성질환을 초래하게 되는 것으로 알려지고 있다. 이것을 과산화 지질이라 하는데 인체에 대단히 치명적이다. 이는 유전자 구조나 변이를 촉진하며 단백질 손상을 초래함으로써 심혈관계의 성인병을 유발하여 노화를 촉진할뿐 아니라 암 등의 악성 신생질환을 유발하고 폐기종, 백내장등의 질환을 유발한다[6,7,8,9, 18,21].

따라서 활성종에 의해 유발된 많은 질환을 예방할 뿐만 아니라, 그 발암성과 독성이 문제시되고 있는 합성 항산화제를 대체하기 위해, 천연물로부터 강력하면서도 독성이 없는 천연 항산화제를 찾아내는 것이 절실히 요구되었다[10,16]. 그 중에서도 특히 식물로부터 매우 효력있고 안전하며 경제적인 항산화제의 발견을 위한 연구가 끊임없이 계속되고 있다[5,19,24,23]. 최근에는 호두나무 추출물에 대해서도 연구가

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7541, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : ksbae@mail.donga.ac.kr

많이 진행되고 있으며, 항산화 활성 그리고 화합물 분리와 정제에 관련하여 다양한 논문들이 발표되고 있다[4,11,12,13,15].

본 연구에서는 한국에서 자생하는 호두의 분획분에 대해 활성산소의 제거능을 DPPH radical 소거활성법과, 활성산소종 생성억제활성법 그리고 ONOO<sup>-</sup> 소거활성법으로 검색하고, 그것이 세포 상해에 보호 효과가 있는지 확인하였다. 특히 여러가지 신질환이 산화적 스트레스에 의해 유발된다는 보고가 많다. 따라서 토끼 신장에서 tert butylhydroperoxide (tBHP) 에 의한 지질 과산화와 세포 독성에 이들의 보호 효과를 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

한국산 호두(*Juglans sinensis* Dode)는 부산시 좌천동 소재 건재약방에서 구입하였다(2002.01.구입).

#### 시약

DPPH, L-ascorbic acid, DL-penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid), TBA (Thiobarbituric acid), t-BHP (tert-butylhydroperoxide)는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였고, 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DXFH-DA)와 DHR 123 (dihydrorhodamine 123)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였으며, ONOO<sup>-</sup>는 Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)으로부터 구입하여 항산화 활성 실험을 시행하였다. LDH는 LDH-Lq kit (아산제약, 국내)로 측정하였다.

#### 추출 및 분획

호두 열매의 과피를 벗긴 핵과를 깨뜨려 얻은 씨(*Juglans Semen*)를 MeOH로 추출하고 각 용매별 분획과정은 Fig. 1에 나타내었다. 건조한 생호두(약 1122 g)를 마쇄하여 환류 냉각기를 부착한 삼각 플라스크(5 l)에 담은 후 3 l의 MeOH을 넣은 후 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 Whatman NO. 2로 여과하였으며 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 106 g MeOH 농축액을 얻었다. 그 중 MeOH 추출 농축액 약 5 g은 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다.

나머지 약 215 g은 H<sub>2</sub>O : MeOH (9 : 1, v/v)의 혼합용매로 녹인 다음 분액 깔대기에 부어, 동량의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 넣어 세게 흔든 다음 24시간 동안 평형화시켰다. 이후 아래층의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부를 모아 무수 망초(sodium sulfate, anhydrous)로 처리한 다음 농축하였다. 이와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>획분 22.89 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 H<sub>2</sub>O

분획층에 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 획분 15.39 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분 29.38 g과 하층의 H<sub>2</sub>O 획분 32.3 g을 얻었다(Fig. 1). 모든 획분 약 0.1 g은 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다.

#### DPPH (2, 2-Di (4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) free radical 소거작용에 의한 항산화활성 실험

각 분획을 Fujita 등의 방법[2]에 의한 DPPH 라디칼 소거법에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 ethanol (EtOH)에 녹여 2 ml가 되게 하고, 2×10<sup>-4</sup> M DPPH/EtOH 1 ml에 첨가한 후, 30분간 실온에 방치한 후 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 전체 3 ml 내에서 시료의 농도는 100 µg/ml에서 1000 µg/ml까지 되도록 제조하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 농도를 IC<sub>50</sub>으로 나타내었고 흡광도는 microplate reader spectrophotometer VERSAmax (Molecular Devices, CA, USA)로 측정하였다.

#### 활성산소(ROS) 소거 활성 측정

활성산소량을 형광물질 dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 사용하여 fluorescence microplate상에서 직접 측정할 수 있게 되었다. 본 연구에서는 사람의 간세포주인 AC<sub>2</sub>F 세포주를 fluorescence microplate에 배양하여 DCF-DA를 처리한 후 호두박의 추출물을 처리하고 활성산소 변화량을 Em. 485, Ex. 530 nm파장에서 흡광도로 측정하였다.

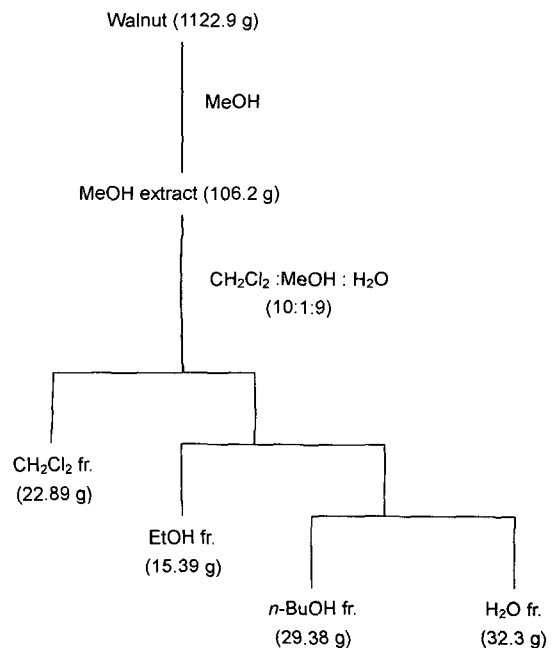


Fig. 1. Assay of methanolic extract from walnut.

**Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) 소거 활성 측정**

ONOO<sup>-</sup> 소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR123)의 산화되는 정도를 측정하여 검색하였다. DHR 123(5 mM)은 dimethylformamide에 녹여서 stock 용액은 질소로 purge하여 -80℃에 보관하고, DHR123용액의 희석은 암실의 얼음 위에서, 사용하기 전에 조제하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid) 100 μM을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장보관하였다. 이 buffer의 용액에 DHR 123용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 그리고 microplate fluorescence reader FL500(Bio-Tek Instruments Inc.)으로 측정하였다. 그리고 ONOO<sup>-</sup>의 바탕용액은 0.3 N NaOH를 사용하였고, 평균값으로 소거율을 계산하였다.

**토끼 신피질 절편 준비**

토끼의 신장을 채취한 뒤 동맥으로 140 mM NaCl, 10 mM KCl과 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>가 포함된 식염수를 주사하여 혈액을 제거한다. Stadie-Riggs microtome을 이용하여 신피질부위를 0.4 mm정도의 두께로 절편을 만든다.

**산화적 세포 손상 유발**

준비된 신피질 절편을 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 5 mM glucose (pH 7.4)을 포함한 Hanks' balanced salt solution (HBSS)에 1 mM tBHP (t-Butylhyperoxide)와 함께 37℃에서 2시간 반응시켰다.

**LDH (Lactate dehydrogenase)의 방출 측정**

배양된 신피질 절편을 2 ml의 증류수에서 분쇄하여 원심분리한 후 얻은 상층액과 배양한 배지를 LDH kit를 사용하여 LDH의 활성을 490 nm에서 흡광도 UV-visible spectrometer (hp8453, Germany)로 측정하였다.

**지질과산화(Lipid peroxidation) 측정**

지질과산화는 조직의 malondialdehyde (MDA)의 양으로 측정하였다. 신피질을 0.16 M KCl 이 포함된 1.15% KCl 완충용액(pH 7.4)으로 분쇄시켜서 1% phosphoric acid 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid 1 ml을 완전히 섞어 100℃의 수조에서 45분간 반응시킨다. 그 후 n-butanol 4 ml을 첨가하여 섞는다. 1,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 UV-visible spectrometer (hp8453, Germany)에서 파장 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**호두박의 추출물의 각 분획별 DPPH radical 소거 활성**

DPPH radical 방법은 다른 항산화 실험계처럼 과도한 산

화조건을 유도할 필요가 없어서 원시료의 열분해에 대한 위험이 작고, 상온에서 radical을 용매에 간단히 용해시키는 것만으로 수행하기 때문에 간편하게 항산화성을 측정할 수 있다.

호두박의 DPPH radical 소거 활성은 EtOAc, n-BuOH, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O분획 순으로 크게 나타났으며 이 결과로서 호두박의 DPPH radical 소거활성을 지닌 성분은 대부분 EtOAc분획에 존재함을 알 수 있었다. 그리고 EtOAc분획의 DPPH radical 소거활성은 대조구인 L-ascorbic acid의 약 2배의 활성을 펼 정도로 강력하게 나타났다(Fig. 2).

**호두박 추출물의 각 분획별 ROS 소거 활성**

생체 내에서 생성되는 활성산소종을 직접적으로 정량 측정하는 방법으로 간세포주(AC<sub>2</sub>F)에서 생성된 활성산소종에 의해 비형광 probe인 DCFH-DA가 강한 형광성을 띄는 DCF로 전환되는 기전을 이용하였다.

호두박 EtOAc분획층의 활성산소종 소거 활성율은 20 μg/ml 농도에서 74.27±1.56%로 매우 높게 나타났으며 분획과정을 통해 MeOH, n-BuOH, H<sub>2</sub>O분획이 각각 60.76±3.45%, 59.32±0.88%, 41.69±2.06%로 높게 측정된 것으로 보아 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>분획을 제외한 모든 분획에서 활성 산소종 억제 활성을 가진 성분이 포함되어 있을 것으로 사료된다(Fig. 3).

본 실험에서도 EtOAc분획층의 활성이 대조구의 약 5배로 가장 높게 나타났으며 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층을 제외한 모든 분획에서 대조군보다 2배 이상의 높은 활성을 나타냄을 알 수 있다.

**호두박 추출물의 각 분획별 Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)소거 활성**

호두박의 MeOH 추출물의 각 분획별 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 측정하기 위해 직접적인 합성 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성방법을 이용하여 측정하였다.

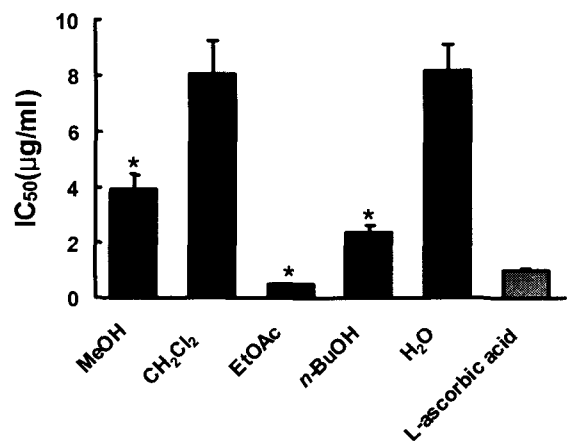


Fig. 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity from walnut.

Data are mean±SE of four experiments. \*p<0.05 compared with control.

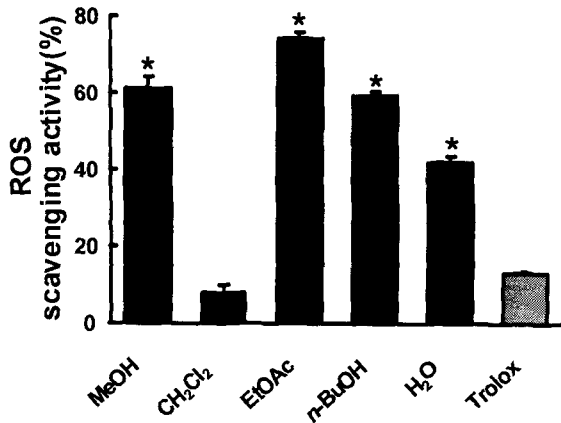


Fig. 3. Measurement of the ROS scavenging activity from raw and roasted walnut. Data are mean ± SE of four experiments. \*p < 0.05 compared with control.

호두박의 EtOAc, MeOH, n-BuOH 분획에서 모두 75% 이상의 강력한 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 나타내었는데 이는 대조군인 penicillamine의 소거 활성이 65.98 ± 1.94%임을 고려해볼 때, 상당히 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 4).

**신피질 절편에서 t-BHP에 의해 유도된 세포 손상에 대한 호두박 추출물의 각 분획별 효과**

LDH (Lactate dehydrogenase, 젖산 탈수소효소)는 세포질내 미토콘드리아에 존재하고 세포가 손상되면 세포외, 즉 배지 중으로 방출된다. 그 정도를 측정하여 세포 손상 정도를 측정할 수 있다.

t-BHP를 처리시 LDH 방출 정도가 5.24 ± 0.70%에서 25.33 ± 3.20%로 증가하였고 호두박 추출물을 각각 0.05% 되도록 첨가하였을 경우 MeOH, EtOAc, n-BuOH 분획에서 무처리군 정도의 수준으로 감소함을 확인하였다(Fig. 5). 따라서 호두박 추출물이 활성산소에 의한 세포손상을 방지함을 알 수 있다.

**신피질 절편에서 t-BHP에 의해 유도된 지질산화에 대한 호두박 추출물의 각 분획별 효과**

지질 산화는 신장에서 산화적 세포 손상의 증거로 알려져 있다. 따라서 그 지질과산화의 부산물인 MDA를 측정하여 호두박 추출물의 효과를 확인하였다.

t-BHP를 처리시 지질 과산화를 1017.72 ± 44.3 pmole MDA/mg protein에서 1681 ± 39.95 pmole MDA/mg protein로 확연히 증가시키고 따라서 지질과산화가 t-BHP에 의한 신장 세포 손상에 중요한 역할을 함을 알 수 있다[14]. 이와는 반대로 호두박 추출물을 각각 0.05% 되도록 함께 처리하였을 경우 MeOH, EtOAc, n-BuOH 분획에서 지질 과산화가 각각 1068.05 ± 104.12, 918.22 ± 79.06, 864.35 ± 43.49 pmole MDA/

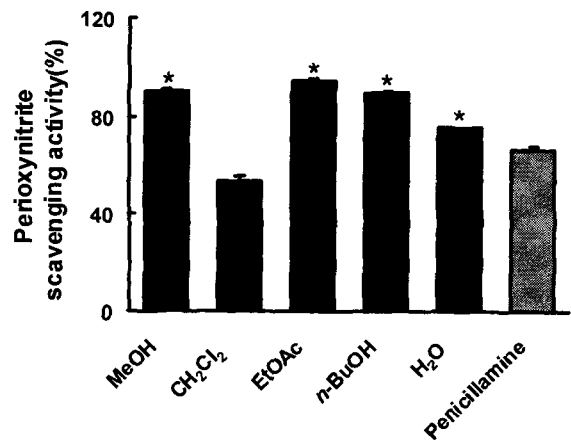


Fig. 4. Measurement of the peroxynitrite scavenging activity from walnut. Data are mean ± SE of four experiments. \*p < 0.05 compared with control.

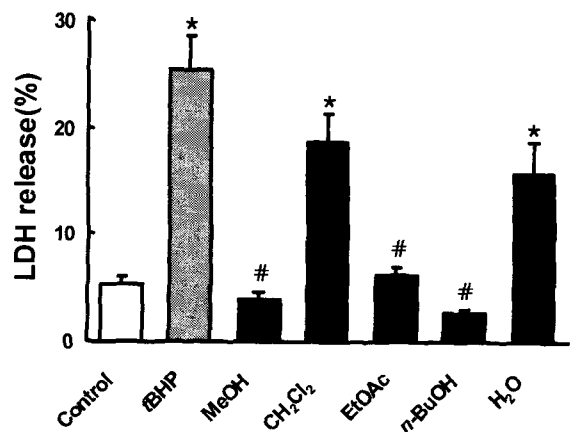


Fig. 5. Effects of Walnut extract on LDH release in renal cortical slices exposed to tBHP. Slices were exposed to 1 mM tBHP for 120 min at 37°C in the presence or absence of each 0.05% Walnut fraction. Data are mean ± SE of four experiments. \*p < 0.05 compared with the control; #p < 0.05 compared with tBHP alone.

mg protein 로 무처리군 정도의 수준으로 감소되는 것을 확인하였고 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획과 H<sub>2</sub>O 분획에서는 그 효과가 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 지질 과산화에 대한 호두박 추출물의 이러한 보호효과는 앞의 항산화활성 측정 결과와 유사하게 나타났다. 따라서 호두박 추출물의 이 효과는 그것의 항산화력 때문에 나타날 것으로 판단된다.

이상의 결과로 호두박 추출물은 강한 항산화 활성을 가지고 있으며 그 중 EtOAc분획에 항산화 활성을 가진 성분이 가장 많이 존재하고 있을 것으로 판단할 수 있고, 이들의 항산화 활성에 의해 산화적 세포 손상과 지질과산화를 방지하는 효과를 보이고 있음을 알 수 있다. 따라서 호두박 추출물

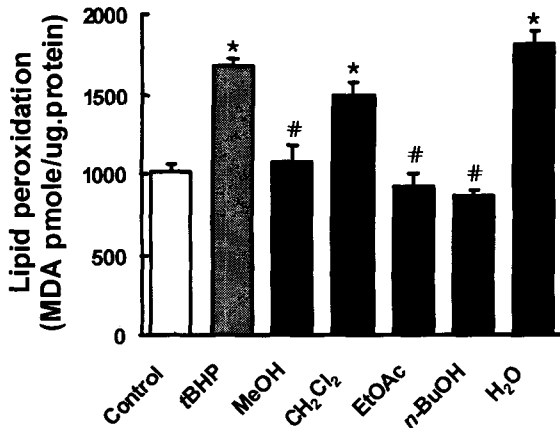


Fig. 6. Effects of Walnut extract on lipid peroxidation in renal cortical slices exposed to tBHP. Slices were exposed to 1 mM tBHP for 120 min at 37°C in the presence or absence of each 0.05% Walnut fraction. Data are mean ± SE of four experiments. \*p < 0.05 compared with the control; #p < 0.05 compared with tBHP alone.

에서 항산화 활성을 가지는 물질을 분리함으로써 다양한 질병을 일으키는 산화적 세포 손상을 방지할 수 있을 것이고 이 보고는 의학적, 약리학적으로도 중요한 자료가 될 것이다.

### 요 약

본 연구에서는 호두박 분획층의 항산화 활성을 검색하기 위해 MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, BuOH 그리고 H<sub>2</sub>O 분획으로 추출하여 수행하였고, 각 분획층의 산화적 세포손상과 지질 과산화의 방지 효과를 *in vitro*에서 확인하였다. 그 결과 호두박의 free radical (DPPH radical) 소거활성은 EtOAc층에서 가장높게 나타났고, 활성산소종 억제율과 peroxynitrite (ONOO) 소거 활성은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 제외한 모든 분획층에서 높게 나타났다. 신피질 절편에 t-BHP의 처리 시 LDH의 방출과 지질과 산화를 증가시켰고 이러한 변화는 호두의 MeOH, EtOAc, n-BuOH 분획에 의해서 완전하게 방지되었다. 이러한 결과는 호두 추출물이 t-BHP에 의한 신장 세포 손상에 효과적이고 이러한 효과는 항산화력에 의한 것으로 추측된다. 또한 이러한 결과는 호두 추출물에서 많은 질병의 원인이 되고 있는 산화적 스트레스를 방지할 수 있는 효과적인 약물 개발의 가능성을 시사한다.

### 감사의 글

이 논문은 2001학년도 동아대학교 학술연구비(연구기초) 지원에 의하여 연구되었음.

### 참고 문헌

- Balavoine, G. G. and Y. V. Genletti. 1999. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants, Part I: convenient assay. *Nitric Oxide*. **3**, 40-54.
- Bondet, V., W. Brand Williams and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *Lebensm.-Wiss. U-Technol.* **30**, 609-615.
- Branen, A. S. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene. *JAOCS*. **1**, 59-62
- Ahn, C. B., C. H. Song, W. H. Kim and Y. K. Kim. 2002. Effects of *Juglans sinensis* Dode extract and antioxidant on mercury chloride induced acute renal failure in rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. **82**, 45-49
- Choi, H. R., J. S. Choi, Y. N. Han, S. J. Bae and H. Y. Chung. 2002. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytother. Res.* **16**, 232-235,
- Dreher, D. and F. Junod. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Canc.* **32A**(1), 3038.
- Gow, Y. Y. and G. J. Flick. 1985. Effect of ascorbyl palmitate on the quality of frying fats for deep frying operations. *JAOCS*, **62**, 1666-1667.
- Griffiths, H. R. and J. Lunec. 1996. The C1q binding activity of IgG is modified *in vitro* by reactive oxygen species: implications for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* **388**, 161-164.
- Han, D., O. S. Yi and H. K. Shin. 1990. Antioxidative effect of ascorbic acid solubilized in oils via reversed micells. *J. Food. Sci.* **55**, 247-249
- Lee, K. S., Z. H. Mbwambo, H. S. Chung, L. Luyengi, E. J. C. Gamez, R. G. Mehta, D. Kinghorn and J. M. Pezzuto. 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **1**, 35-46.
- Lee, K. S., G. Li, S. H. Kim, C. S. Lee, M. H. Woo, S. H. Lee, Y. D. Jhang, and J. K. Son. 2002. Cytotoxic Diarylheptanoids from the Roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1707-1708
- Lee, S. W., K. S. Lee, J. K. Son. 2000. New naphalenyl Glycosides from the Roots of *Juglans mandshurica*. *Planta Med.* **66**, 184-186
- Li, G., M. L. Xu, H. G. Choi, S. H. Lee, Y. D. Jahng, C. S. Lee, D. C. Moon, M. H. Woo and J. K. Son. 2003. Four New Diarylheptanoids from the Roots of *Juglans mandshurica*. **51**(3), 262-264
- Lund, D. M. Müller and J. S. Woods. 1993. Studies on Hg (II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress *in vivo* in rat kidney mitochondria. *Biochemical Pharmacolog.* **45**, 2017-2024.
- Min, B. Y., S. M. Lee., Y. H. Kim, K. H. Bea, Toru Otake, Norio Nakamura and Masao Hattori. 2002. Anti-Human Immunodeficiency Virus-Type 1 Activity of Constituents from *Juglans mandshurica*. *Arch. Pharm. Res.* **25**(4), 441-445
- Moure, A., J. M. Cruz, C. Franco, H. Dominguez, M. J. Nunez and J. C. Parajo, 2001. Natural antioxidant from residual sources, *Food Chem.* **72**, 145-171

17. Nagatsu, A., T. Tenmaru, H. Matsuura, N. Murakami, T. Kobayashi, H. Okuyama and J. Sakakibaba. 1995. Novel antioxidants from roasted perilla seed. *Chem. Pharm. Bull.* **43(5)**, 887-889
18. Nishima, A. 1991. Antioxidant effects of tocopherols and L-ascorbic acid on ethyl eicosapentaenoate and methyl linolate, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1665-1668.
19. Pessuto, J. M. 1996. Plant derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology*. **53**, 121-133
20. Singfh, A. 1989. Chemical and biochemical aspects of activated oxygen: singlet oxygen, superoxide anion, and related species, In Miquel, J., Quintanilha, A. T., and Weber, H. (Eds.). CRC Handbook of free radicals and antioxidants in Biomedicine. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. **1**, 1728.
21. Sohal, R. S. 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process, *Free Radic. Biol. Med.* **33(1)**, 37-44.
22. Squadrito G. L. and W. A. Pryor. 1998. Oxidative chemistry of nitric oxide : the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free. Radic. Biol. Med.* **25**, 392-403.
23. Torel, J., J. Chillard and P. Chillard. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxyradical. *Phytochem.* **25(2)**, 383-385
24. Ulrich Krings, S. Yasser, E. S. harty, A. Bader, E. Zeany, B. Pabel, G. R. Berger.. 2000, Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ. *Food Chem.* **71**, 91-95