

2006 年 8月

碩士學位 論文

모과 에탄올 추출물이 흰쥐의
항산화계에 미치는 영향

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

李 有 美

모과 에탄올 추출물이 흰쥐의
항산화계에 미치는 영향

*Effects of Chaenomeles sinensis Koehne Ethanol
Extract on the Antioxidative System in Rats*

2006年 8月 25日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

李 有 美

모과 에탄올 추출물이 흰쥐의
항산화계에 미치는 영향

指導教授 李 明 烈

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함

2006年 04月 日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

李 有 美

李有美의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 木浦大學校 農學博士 _____ 印

委員 朝鮮大學校 理學博士 _____ 印

委員 朝鮮大學校 藥學博士 _____ 印

2006年 05月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

<i>ABSTRACT</i>	viii
제 1 장 서 론	1
제 2 장 재료 및 방법	4
제 1 절 실험재료	4
제 2 절 성분분석	4
1. 일반성분	4
2. 유리당	5
3. 아미노산	6
4. 지방산	7
5. 비타민 A 와 비타민 E	8
6. 유기산	9
7. 양·음이온	10
8. 무기질	12
제 3 절 시약, 기기 및 시료 추출	13
1. 시약 및 실험기기	13
가. 시약	13
나. 실험기기	14
2. 시료추출	15
가. 모과 에탄올 추출	15
나. 다용매 분획	15
제 4 절 항산화 활성	17

1. 항산화물질의 함량 측정	17
가. 총 flavonoid 함량	17
나. 총 polyphenol 함량	17
2. <i>In vitro</i> 에서 항산화활성 측정	18
가. DPPH radical 소거 활성	18
나. Rancimat에 의한 항산화지수(antioxidant index, AI) 측정	18
다. 지질과산화 억제효과	19
3. <i>In vivo</i> 에서 항산화 효능 실험	20
가. 실험동물 사육	20
나. 실험설계 및 실험식이	20
다. 실험동물 처치	22
라. 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성 측정	23
마. 간 조직 중 효소활성 측정	23
(1) 효소원 조제	23
(2) XO 활성	24
(3) SOD 활성	24
(4) Catalase 활성	24
(5) GSH-Px 활성	25
(6) TBARS 함량	26
(7) GSH 함량	26
(8) 단백질 함량	27
바. 통계처리	27
제 3 장 실험결과 및 고찰	28
제 1 절 성분분석	28
1. 일반성분	28
2. 유리당 함량	29

3. 구성아미노산 함량	30
4. 지방산 조성	32
5. 비타민 A 및 E 함량	34
6. 유기산 함량	35
7. 양·음이온 함량	36
8. 무기질 함량	38
제 2 절 항산화 효능	39
1. 80% 에탄올 추출 수율 및 용매별 분획물의 수율	39
2. 항산화 물질의 함량 측정	40
가. 총 flavonoid 함량	40
나. 총 polyphenol 함량	42
3. <i>In vitro</i> 에서 항산화 활성	43
가. DPPH radical 소거작용	43
나. Rancimat에 의한 항산화지수	45
다. 지질과산화 억제효과	47
4. <i>In vivo</i> 에서 항산화 효능	49
가. 체중증가율, 간무게 및 식이효율	49
나. 혈청 ALT, AST 및 ALP 활성	53
다. 간조직의 항산화효소 활성	57
(1) XO 활성	57
(2) SOD, catalase 및 GSH-Px 활성	59
라. 간조직의 과산화지질 함량	64
마. 간조직의 GSH 함량	66
제 4 장 요 약	68
제 5 장 참 고 문 헌	70

LIST OF TABLES

Table 1. Operating condition of Ion Chromatography for free sugars	5
Table 2. Operating condition of Amino Acid Autoanalyzer for amino acids ·	6
Table 3. Operating condition of Gas Chromatography for fatty acids	7
Table 4. Operating condition of High Performace Liquid Chromatography for vitamin A and E	8
Table 5. Operating condition of Ion Chromatography for organic acids	9
Table 6. Operating condition of Ion Chromatography for cations	10
Table 7. Operating condition of Ion Chromatography for anions	11
Table 8. Operating condition of atomic absorption spectrophotometer for minerals	12
Table 9. Composition of experimental diet	21
Table 10. Experimental design	22
Table 11. Proximate compositions of <i>Chaenomeles Sinensis</i> Koehne(CS)	28
Table 12. Contents of free sugars in CS	29
Table 13. Contents of total amino acids in CS	31
Table 14. Composition of fatty acids of CS	33
Table 15. Contents of vitamin A and E in CS	34
Table 16. Contents of organic acids in CS	35
Table 17. Contents of cations in CS	36
Table 18. Contents of anions in CS	37
Table 19. Contents of minerals in CS	38
Table 20. Yield of CS ethanol extract and its solvent fraction from dried CS	39
Table 21. Scavenging effects of CS ethanol extract fractions on DPPH	

radical	44
Table 22. Antioxidative activities of CS ethanol extract fractions on soybean oil	46
Table 23. Inhibitory rates of CS ethanol extract fractions on lipid peroxidation	48
Table 24. Changes in body weight gain of rats fed normal diet containing the CS ethanol extract for 4 weeks	50
Table 25. Liver weight of rats fed experimental diet with CS extract for 4 weeks	51

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Procedure for extraction and fractionation of <i>Chaenomeles Sinensis</i> Koehne(CS) by various solvents.	16
Fig. 2. Total flavonoid contents in solvent fractions from 80% ethanol extract of CS by various solvents.	41
Fig. 3. Total polyphenol contents in solvent fractions from 80% ethanol extract of CS by various solvents.	42
Fig. 4. FER in alcohol and/or CS administered rats.	52
Fig. 5. Activity of ALT in the serum of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	54
Fig. 6. Activity of AST in the serum of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	55
Fig. 7. Activity of ALP in the serum of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	56
Fig. 8. Activity of XO in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	58
Fig. 9. Activity of SOD in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	61
Fig. 10. Activity of catalase in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	62
Fig. 11. Activity of GSH-Px in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	63
Fig. 12. Content of TBARS in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.	65

Fig. 13. Content of GSH in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract. 67

ABSTRACT

Effects of Chaenomeles sinensis Koehne Ethanol Extract on the Antioxidative System in Rats

Lee, Yu-Mi

Advisor : Prof. Lee, Myung-Yul, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

This study was performed to investigate the effect of ethanol extract of *Chaenomeles sinensis* Koehne(CS) on antioxidant activities system in rats.

The results obtained were as follows :

1. Physicochemical components of dried CS were investigated. CS contained 20.57% of moisture, 16.06% of crude protein, 1.40% of crude lipid, 11.03% of ash, and 50.94% of carbohydrate. The contents of vitamin A and vitamin E were 0.040 mg/100g, and 0.275 mg/100g, respectively. Predominant minerals were K, Ca, Mg and Fe. The results of amino acid analysis showed that glutamic acid, aspartic acid, lysine, leucine, valine and alanine were the most abundant amino acids in sample. Organic acids including malic acid, citric acid, oxalic acid, succinic acid and formic acid were detected. The major fatty acids were palmitic acid

and linoleic acid.

2. This study was also investigated on the antioxidative activity of 80% ethanol extracts from CS. The extraction yields of 80% ethanol extract was 29.33 g/100g. The extract was further fractionated subsequently by n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water. n-hexane fraction showed the highest total flavonoid and polyphenol contents. *In vitro*, antioxidative activities were examined by DPPH, Rancimat test, and thiobarbituric acid(TBA) value, in comparison with commercial antioxidant. Antioxidant index of the n-hexane fraction of CS ethanol extract was the highest among fractions.
3. The effects of an ethanol extract of CS on the ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver were also investigated. Sprague-Dawley rats weighing 135~155g, were divided into 6 groups; normal group(ND), alcohol(35%, 10 mL/kg) treated group(ET), CS ethanol extract 200 mg/kg treated group(ND-CSL), CS ethanol extract 400 mg/kg treated group(ND-CSH), CS ethanol extract 200 mg/kg and alcohol treated group(ET-CSL), and CS ethanol extract 400 mg/kg and alcohol treated group(ET-CSH).
 - ① There were no differences between the ND group and the ET group in the body weight gain and feed efficiency.
 - ② There were increases in the activities of serum alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), and alkaline phosphatase(ALP) in the ET group. On the other hand, the administration of CS decreased ALT, AST and ALP activities in

serum. These effects of CS within ET groups were dose-dependent.

- ③ It was also observed that the hepatic activities of superoxide dismutase(SOD), catalase, GSH-Px and xanthine oxidase(XO) that were increased by alcohol were also markedly decreased in the CS administered groups as compared with the ET group. These effects of CS within ET groups were dose-dependent. There were no differences in the activities of liver SOD, catalase, GSH-Px and XO between normal diet groups(ND, ET, ND-CSL, ND-CSH, ET-CSL, ET-CSH) The TBARS contents were increased by the ET group, on the other hand, the administration of CS reduced TBARS value in liver. In addition, the content of glutathione(GSH) in liver was decreased by alcohol administration, however, increased after administering CS.

In conclusion, the administration of alcohol develops the hyperoxidation of liver lipid through the increase of activity of enzyme related to the lipid peroxidation, however, decreased after administering CS. Thus, CS may have a protective effect on ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver.

제 1 장 서 론

우리나라는 지속적인 경제성장과 소득증대에 따라 생활양식이 편리해지고 식생활의 변화로 인해 감염성 질환은 줄어들고 각종 만성 퇴행성 질환이 증가하는 추세로 노화는 물론 뇌 혈관계 질환, 심장병, 고혈압 및 당뇨병 등의 순환계 질환과 암으로 인한 사망률이 점점 증가하고 있다(1,2). 노화 및 각종 만성 질환의 주요 원인 중 하나는 세포의 산화적 손상이며(3), 이런 과정에서 생성되는 유해활성 물질들은 체내 지질, 단백질, 그리고 핵산과 같은 물질의 손상을 유발한다. 체내에서는 이러한 유해 radical을 제거하기 위해 항산화 기전이 존재하는데, 항산화 효소에 의한 효소적 방법과 식이를 통하여 공급되는 항산화 비타민이나 항산화제에 의한 비효소적 방법이 있다(4).

생체내 이러한 방어 기구로서 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화 효소와 함께 vitamin C, vitamin E, glutathione, ubiquinone, uric acid 등과 같은 항산화물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다(5). 이처럼 보통의 경우 인체는 산화촉진물질(pro-oxidants)과 산화억제물질(anti-oxidants)이 균형을 이루는 항상성을 유지하고 있지만, 항산화 체계가 약화되거나 산화적 스트레스가 가해지면 증가되는 유해한 활성 산소에 대항하기에는 역부족 상태에 놓이게 된다(6). 산소는 생명 유지에 절대적으로 필요하지만 안정한 분자 상태인 산소가 체내 효소계, 환원 대사, 화학약품, 공해물질, 광화학 반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 superoxide radical($O_2 \cdot$), hydroxyl radical(HO), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen(1O_2)과 같은 반응성이 매우 큰 활성 산소(active oxygen)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다(5). 따라서 이러한 활성 산소를 조절할 수 있는 물질로써의 항산화제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서 식품의 가공 또는 저장 중 발생하는 산화를 방지하

기 위한 수단으로 가장 많이 사용되는 천연 항산화제인 vitamin E(tocopherol)는 효과가 비교적 낮은 편이고(7), 합성 항산화제인 BHA와 BHT는 효과는 우수하나 변이원성과 독성이 지적되어 소비자들의 거부반응으로 인해 그 사용이 감소되고 있는 추세이다(8). 이러한 문제점이 야기되면서 천연으로부터 항산화 물질을 찾고자 많은 연구가 진행되고 있다.

모과나무(*Chaenomeles sinensis* Koehne)는 높이가 10 m에 달하며 꽃은 5월에 피며 열매는 원형 또는 타원형이고 지름은 8~15 cm로서 목질이 발달하며 9월에 황색으로 익고 향기가 좋다(9). 일반적으로 한국에서 모과라 함은 *Chaenomeles sinensis* Koehne의 성숙과실을 일컬으며 중국이 원산지로서 고려 이전에 들어와 재배되고 있는 장미과에 속한 과실이다. 한국, 일본 등지에 분포하며 일본에서는 *C. lagenaria*의 성숙과실의 건조한 것을 모과라 하며 *C. japonica*를 화목과라 칭하고 있다(10). 우리나라에서는 전남, 충남, 경기도 등 중부 이남지역에서 많이 난다.

모과의 효능으로는 감기나 기관지염의 기침, 가래의 완화제로 많이 알려져 있고 특히 루머티즘, 폐렴 등에 좋다고 알려져 있다(11). 이외에도 모과는 향기가 좋아서 방향제로도 많이 이용되고 있다. 그러나 모과는 이러한 약리적 기능에도 불구하고 일반 과실에 비해 수분이 적고 떫은맛이 강하고, 석세포 및 목질이 발달하여 육질이 거칠기 때문에 식용하기에는 어려움이 있다.

모과에 관한 연구를 보면, 김 등(12)은 *in vitro* 에서 모과의 정미성분으로 생각되는 polyphenol 성분, amino acid, 유기산 및 당의 종류를 검색하고 함량을 측정하였으며, 정 등(13)은 모과의 휘발성과 비휘발성 flavor 성분을 보고하였다. 그 밖에 모과·사과 혼합 청징음료 제조에 관한 연구(14), 모과 주류의 생리가능성에 관한 연구(15) 등으로 모과의 가공에 관한 연구가 있을 뿐 모과의 동물실험을 통한 생체 내 항산화 효능에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 모과의 항산화 활성을 평가하기 위하여 용매 추출과 분획을 통해 총 flavonoid와 polyphenol의 함량을 분석하고, *in vitro* 에서 모과

에탄올 추출물 분획물에 대한 DPPH radical 소거능, Rancimat test, 지질과산화 억제 효과 등을 측정하여 기존의 합성 항산화제와 비교하고자 한다. 그리고 *in vivo* 에서 4주간 알코올과 모과 에탄올 추출물을 경구 투여 후 항산화 효소인 catalase, GSH-Px, SOD 활성과 glutathione 및 과산화지질 함량을 측정하여 간 보호와 관련된 항산화력을 검토하고자 한다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 실험재료

모과(*Chaenomeles sinensis* Koehne)는 2005년 10월 시중에서 판매되었던 황색 과피를 갖는 것을 실험재료로 사용하였다. 구입한 모과는 표면의 먼지와 이물질, 끈적이는 콜로이드성 물질 등을 중성세제로 제거한 후 흐르는 물로 깨끗이 씻고 물기를 잘 닦아 없앤 후 음건하였다. 건조된 모과는 blender(Braun, MR 350 CA)로 조분쇄하여 시료로 사용하였다.

제 2 절 성분분석

1. 일반성분

모과의 일반성분은 Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)방법(16)에 준하여, 수분은 105°C 상압가열건조법, 조단백질은 micro-kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법 및 조회분은 회화법으로 분석하였고, 탄수화물 함량은 100에서 수분, 조단백질, 조지방 및 조회분량을 제외한 값으로 하였다. 측정치는 3회 반복하여 측정한 수치의 평균값으로 하였다.

2. 유리당

유리당 분석은 Gancedo 등의 방법(17)에 준하여 실시하였다. 시료 1 g에 80% ethanol 50 mL를 가하여 heating mantle에서 75°C로 5시간 가열한 다음 Whatman filter paper(No. 2)로 여과하고 여액을 rotary vacuum evaporator에서 감압·농축 후 10 mL로 정용하여 Ion Chromatography(DX-600, Dionex, USA)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating condition of Ion Chromatography for free sugars

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dionex, USA)
Column	Carbo Pac TM - PA10 analytical(4 × 250 mm)
Guard	Carbo Pac TM - PA10(4 × 50 mm)
Eluent A	200 mM NaOH/1 L
Eluent B	18 mM NaOH/1 L
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	20 µL
Detection	ED 50 intergrated amperometry

3. 아미노산

구성 아미노산의 분석은 분해관에 시료 0.5 g과 6 N HCl 3 mL를 취하여 탈기하고 121°C에서 24시간 가수분해한 다음 여액을 rotary vacuum evaporator로 감압·농축하여 sodium buffer(4종) 10 mL로 정용하였다(18). 용액 1 mL를 취하고 membrane filter(0.2 μM)로 여과한 다음 아미노산자동분석기(Biochrom 20, Phamacia UK)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Operating condition of Amino Acid Autoanalyzer for amino acids

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	Biochrom 20(Phamacia UK)
Buffer solution	Sodium buffer(4종, Phamacia)
Reagent	Ninhydrin(Phamacia)
Inj. volume	20 μL

4. 지방산

지방산 분석은 시료 5 g에 20 mL methanol과 10 mL diethylester를 가하여 교반하면서 침출시킨 후 100 mL로 정용하여 얻은 지질 분획물을 10 mL 취하여 용매를 완전히 제거한 후 Wungaarden의 방법(19)에 따라 BF₃-methanol을 이용하여 methyl ester로 조제한 후 분석용 시료로 하였다. 즉, 지방질 시료에 0.5 N methanolic sodium hydroxide 2 mL를 가하고 5분간 환류가열 하였다. 그 후 14% BF₃-methanol 2 mL를 가해 2분간, 또 n-hexane 4 mL를 가해 2~3분간 가열하고, 여기에 sodium chloride 포화용액을 충분히 가하여 방치한 후, 상층에서 일부를 취하여 무수 Na₂SO₄로 수분을 제거한 후 Gas Chromatography(GS, Shimadzu Co., Japan)로 분석하였다. 분석조건은 Table 3과 같다.

Table 3. Operating condition of Gas Chromatography for fatty acids

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	GC-10A(SHIMADZU, JAPAN)
Column	SP TM -2560 capillary column(100 mm length × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness)
Column temp	170°C(5 min) to 250°C(10 min) at 4°C/ min
Injector temp	230°C
Detector temp	FID 270°C
Inj. volume	2 μL
Split ratio	1 : 50

5. 비타민 A 와 비타민 E

모과의 vitamin A와 vitamin E 분석은 먼저 시료 0.5 g, vitamin C 0.1 g 및 ethanol 5 mL를 취하여 80°C에서 10분간 가열한 후 50% KOH용액 0.25 mL을 첨가하고 20분간 가열한 다음 증류수 24 mL와 5 mL hexane을 가하여 1,150 ×g에서 20분간 원심분리 하였다. 상정액을 분리 후 40 mL hexane을 가하고 원심분리하여 상정액을 분리한 다음 증류수를 가해 10분간 방치 후 하층을 제거하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 전 용액을 합하여 무수 Na₂SO₄로 탈수하고 rotary vacuum evaporator로 hexane을 3 mL까지 감압·농축한 후 High Performance Liquid Chromatography(HPLC, LC-10AVP, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며 분석조건은 Table 4와 같다.

Table 4. Operating condition of High Performance Liquid Chromatography for vitamin A and E

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	LC-10AVP(Shimadzu, Japan)
Column	Shim-pack GLC-ODS(M) 25 cm
Eluent	acetonitrile : isopropanol = 95 : 5
Flow rate	1 mL/min
Inj. volume	10 μL
Detection	Retinol : UV254(SPD-10A, Shimadzu, Japan) Tocopherol : RF-10A(Spectrofluorometric Detector) EX(290 nm), EM(330 nm)

6. 유기산

마쇄한 시료 1 g에 증류수 50 mL를 가하여 80°C 수조에서 4시간 가열한 다음 Whatman filter paper (No. 2)로 여과하고, 여액을 rotary vacuum evaporator로 감압·농축한 후 증류수로 10 mL로 정용하여 Ion Chromatography(DX-600, Dionex, USA)로 유기산을 분석하였으며, 분석조건은 Table 5와 같다.

Table 5. Operating condition of Ion Chromatography for organic acids

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dionex, USA)
Column	IonPac ICE-AS6 analytical
Eluent	0.4 mM heptafluorobutyric acid/1 L
Reagent	5.0 mM tetrabutylammonium hydroxide/4 L
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	50 μ L
Detection	surpressed conductivity, AMMS-ICE II

7. 양 · 음이온

건조된 시료 5 g을 증발접시에 취하여 회화로에서 24시간 회화한 후 30분간 방냉시키고 HCl : 증류수 = 0.5 : 3.5인 용액 4 mL와 증류수 10 mL를 가하여 가온하면서 용해하였다. 상기 용액을 증류수로 100 mL로 정용하여 Ion Chromatography (DX-600, Dionex, USA)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 6, 7과 같다.

Table 6. Operating condition of Ion Chromatography for cations

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600 IC system
Column	IonPac CS-12A(4 × 250 mm)
Guard	IonPac CG-12A(4 × 50 mm)
Eluent	22 mN Sulfuric acid/1 L
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	20 µL
Detection	surpressed conductivity, CSRS-ultra 4-mm
Analytical Time	25 min/1 sample

Table 7. Operating condition of Ion Chromatography for anions

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600 IC system
Column	IonPac AS14 Analytical, 4-mm
Guard	IonPac AG14 Guard, 4-mm
Eluent	3.5 Mm Na ₂ CO ₃ + 1mM NaHCO ₃ /1 L
Flow rate	1.2 mL/min
Inj. volume	20 uL
Detection	Suppressed Conductivity, ASRS-ULTRA 4-mm
Analytical Time	15 min/1 sample

8. 무기질

무기 성분 분석은 식품공전(20)의 건식분해법과 $H_2SO_4 \cdot HNO_3$ 를 이용한 습식분해법에 따라 분해하였으며, 시료 0.5 g, 20% $AgNO_3$ 10 mL 및 60% $HClO_4$ 3 mL를 취하여 투명해 질 때까지 가열한 후 0.5 M $AgNO_3$ 로 50 mL로 정용하였다. 분석항목별 표준용액을 혼합 후 다른 vial에 8 mL씩 취하여 표준용액으로 하였고, 0.5 M $AgNO_3$ 를 대조군으로 하여 원자흡수분광광도계(AA-6501GS, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 8과 같다.

Table 8. Operating condition of atomic absorption spectrophotometer for minerals

<i>Item</i>		<i>Condition</i>							
Instrument		AA-6501GS(Shimadzu, Japan)							
Lamp	Item	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Cu	Na	Zn
Wave length(nm)		422.7	248.3	766.5	285.2	279.5	324.8	330.2	213.9
Current(mA)		10	12	10	8	10	6	10	8
Slit Width(nm)		0.5	0.2	0.5	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5
Lighting Mode		BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	Non-BGC	BGC-D2

제 3 절 시약, 기기 및 시료 추출

1. 시약 및 실험기기

가. 시약

본 실험에 사용된 시약은 특급 및 일급 시약으로 xanthine oxidase, xanthine, cytochrome C, glutathione reductase, reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione(GSSG) reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH), nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), glycine, sodium pyrophosphate, semicarbazide hydrochloride, sodium azide, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH), α -1-antitrypsin, perchloric acid, sulfosalicylic acid(SSA), bovine serum albumin, potassium ferricyanide(KCN), ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), Tris-HCl, sucrose, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid(DTNB), sodium phosphate(monobasic, dibasic), phenol reagent, NaNO_2 , 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, sulfanylic acid, naphthylamine, linoleic acid, tannic acid, rutin(Sigma, USA) diethylenen glycol, dimethyl sulfoxide(DMSO), Folin-Ciocalteu, ethanol, n-hexane, chloroform, ethylacetate, heptane 및 n-butanol은 HPLC grade로 Tedia사(Tedia Co., USA) trichloroacetic acid(TCA)는 Aldrich(Sigma-Aldrich Co., USA)사 및 유지(soybean oil)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

나. 실험 기기

- Centrifuge : Eppendorf 5810R, Germany
- Evaporator : Eyela, Rotary vacuum evaporator, Japan
- Spectrophotometer : Shimadzu UV-1601PC, Kyoto, Japan
- Deep freezer : MDF-U52V Sanyo, Japan
- Ultra Turax : IKA MT-25 Janke & Kunkel, Germany
- Shaking water bath : JEIO-TEK SWBO3, Korea
- Rancimat 679 : Metrohm Ltd., CH-9101 Herisau, Switzerland
- Freeze Dryer : ED 8512. Ilshin, Korea.
- Ultrasonic processor : VCX-750, USA

2. 시료 추출

가. 모과 에탄올 추출

생리활성 물질은 건조 시료 100 g을 80% 에탄올 500 mL에 넣어 65°C에서 환류 냉각기를 부착하여 3시간씩 3회 추출한 후 Whatman filter paper(No. 2)로 여과하였다. 여액을 40°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 용매를 제거하고 감압·농축한 후 시료의 산화방지를 위해 -70°C에 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

나. 다용매 분획

80% 모과 에탄올 추출물을 Fig. 1과 같이 separating funnel에 의한 용매별 분획으로 n-hexane, chloroform, ethylacetate 및 n-butanol로 연속 추출(21)한 후 각 분획물을 rotary vacuum evaporator로 감압·농축하여 Table 9와 같이 수율을 계산하고 항산화 활성 측정용 시료로 사용하였다.

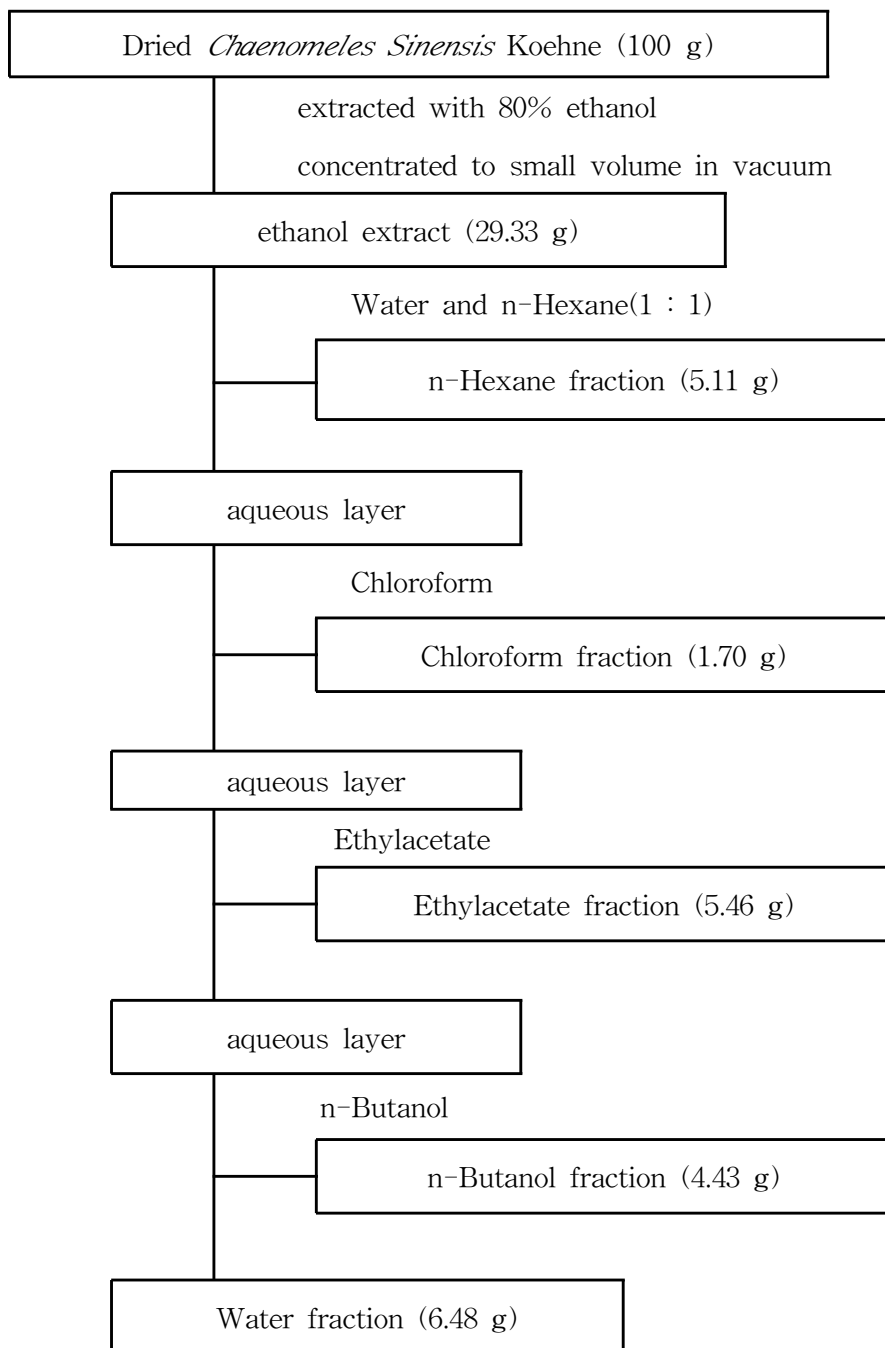


Fig. 1. Procedure for extraction and fractionation of Chaenomeles Sinensis Koehne(CS) by various solvents.

제 4 절 항산화 활성

1. 항산화 물질의 함량 측정

가. 총 *flavonoid* 함량

용매별 분획물의 총 flavonoid 함량 측정법은 Davis법을 변형한 방법(22)에 따라 측정하였다. 모과 분획물 400 μ L에 90% diethylene glycol 4mL을 첨가하고, 다시 1N NaOH를 40 μ L을 넣고 37 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간 동안 incubation한 후 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 시약으로는 rutin(Sigma, USA)을 사용하였다. Rutin을 이용한 표준곡선은 rutin 0.01 g을 증류수 10 mL에 녹이고 최종농도가 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 및 1.0 mg/mL용액이 되도록 조제하여 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 420 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

나. 총 *polyphenol* 함량

용매별 분획물의 총 polyphenol 함량은 AOAC법(23)에 의하여 측정하였다. 즉, 모과추출물 및 용매별 분획물 1 mL를 취하여 2%(w/v) Na₂CO₃ 용액 1 mL을 가하여 3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 가하여 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid 0.01 g을 증류수 10 mL에 녹이고 최종농도가 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 및 1.0 mg/mL용액이 되도록 조제하여 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

2. *In vitro* 에서 항산화 활성 측정

가. *DPPH radical* 소거 활성

Chen 등(24)의 방법에 따라, dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 μ L를 대조군으로 하고, DMSO에 녹여 희석한 시료 100 μ L에 200 μ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl/ethanol(DPPH) 1,900 μ L를 가한 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(Molecular Devices, SpectraMAX 340pc, USA). 대조군에 대해 시료를 넣었을 때의 흡광도의 감소 정도를 측정하여 저해율(inhibition rate, %)을 구하였다. 대조군의 흡광도를 100%로 하여 시료를 첨가하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도(RC₅₀)를 계산하였다.

나. *Rancimat*에 의한 항산화지수(*antioxidant index, AI*) 측정

각 분획물에 포함된 용매를 완전히 제거한 후 각 분획물의 함량이 600 ppm이 되도록 soybean oil(Sigma Co., USA)에 첨가하고, 초음파(Ultrasonic processor, UCX-750, USA)를 이용하여 시료 추출물과 유지가 잘 혼합되도록 하였다. Rancimat의 측정 조건은 시료 3.0 g을 반응용기(reaction vessel)에 취하고 증류수 70 mL을 측정용기(measuring vessel)에 넣은 후 110°C에서 air flow rate 20 L/h로 하여 산화안정성을 비교하였다(25). 항산화지수(antioxidant index, AI)는 분획물을 첨가한 실험군의 유도시간을 분획물을 첨가하지 않은 대조군의 유도시간으로 나눈 값을 구하였고, 모든 측정치는 3회 반복 실험하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다. 기존의 상업용 항산화제인 BHT를 유지에 대해 첨가하여 양성 대조군으로 비교 실험하였다.

다. 지질과산화 억제효과(*thiobarbituric acid value*)

Ottolenghi(26)의 방법에 따라 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 에탄올을 4 : 1로 혼합한 용액에 linoleic acid를 0.03 M이 되도록 첨가하였다. 이 지질 용액 2.5 mL에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 2.4 mL 및 0.1% 분획물 0.1 mL씩 첨가하여 반응액을 조제한 후 반응액 2.0 mL에 35% trichloroacetic acid(TCA) 1.0 mL와 0.75% thiobarbituric acid(TBA) 2.0 mL을 가한 다음 vortex mixer로 진탕하여 95°C 수욕 상에서 40분간 반응하였다. 이 반응액을 실온까지 냉각시켜 glacial acetic acid 1.0 mL, chloroform 2.0 mL를 가하고 진탕시킨 후 3,000 rpm 에서 5분 동안 원심 분리하여 532 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다. TBA값은 분획물 첨가구의 흡광도와 대조군의 흡광도로부터 산출하였으며 지질과산화 반응을 50% 억제시키는 농도를 IC₅₀으로 하였다.

$$\text{지질과산화 억제활성(\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100$$

A_{control} : 대조군(분획물 미첨가)의 흡광도

A_{sample} : 실험군(분획물 첨가)의 흡광도

A_{blank} : 대조군(증류수 첨가)의 흡광도

3. *In vivo* 에서 항산화 효능 실험

가. 실험동물 사육

실험동물은 Sprague Dawley계 5주령 웅성 흰쥐 36마리를 조선대학교 실험동물센터에서 1주일 동안 기본식으로 적응시킨 후 평균 체중 153~155 g인 것을 난괴법(randomized block design)에 따라 각 처리 당 6마리씩 6군으로 나누어 플라스틱 케이지에 1마리씩 분리 사육하였으며, 물과 식이는 제한 없이 공급하였다. 사육실 온도는 $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고, 조명은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 실험기간 중 동물의 상태를 관찰하면서 체중은 1주일 간격으로 측정하였고, 최종 체중에서 실험개시 전의 체중을 감하여 체중증가도로 표시하였다. 식이섭취량도 체중측정과 동일한 시기에 측정하였으며, 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율(feed efficiency ratio, FER)을 구하였다.

나. 실험설계 및 실험식이

기본 식이의 조성은 AIN-93 정제사료 조성(27)에 의거하여 Table 9와 같다. 실험군은 Table 10과 같이 정상군(ND), Fujji 등(28)의 방법에 준하여 조제된 35% 알코올 투여군(ET), 저용량 모과 에탄올 추출물 투여군(ND-CSL), 고용량 모과 에탄올 추출물 투여군(ND-CSH), 알코올과 저용량 모과 에탄올 추출물 병합 투여군(ET-CSL), 알코올과 고용량 모과 에탄올 추출물 병합 투여군(ET-CSH)을 나누어 실시하였다.

Table 9. Composition of experimental diet

(g/kg)

<i>Diet composition</i>	<i>Basal diet</i>
Casein	140
L-methionine	3
Beef tallow	100
Choline chloride	2
Cellulose	50
Corn starch	560
Sucrose	100
Cholic acid	2
Vitamin mixture(AIN 93) ¹⁾	10
Mineral mixture (AIN 93) ²⁾	35

¹⁾ Vitamin Mix(AIN-93-VX)(g/kg mixture) : Nicotinic acid 3,000, Ca pantothenate 1,600, Pyridoxin HCl 700, Thiamin HCl 600, Riboflavin 600, Folic acid 200, Biotin 20, Vitamin B₁₂(cyanocobalamin)(0.1% in manitol) 2,500, Vitamin E(all-rac-tocopheryl acetate)(500 IU/g) 15,000, Vitamin D₃(cholecalciferol)(400,000 IU/g) 800, Vitamin K(phyloquinone) 75, Powdered sucrose 974.665

²⁾ Mineral Mix(AIN-93-MX)(g/kg mixture) : Potassium phosphate monobasic(22.76% P, 28.73% K) 250.00, Potassium citrate, Tripotassium monohydrate(36.16% K) 28.00, Sodium sulfate(39.34%, 60.66% Cl) 74.00, Potassium sulfate(44.87%, 18.39% S) 46.60, Magnesium oxide(60.32% Mg) 24.00, Ferric citrate(16.5% Fe) 6.06, Zinc citrate(52.14% Zn) 1.65, Sodium meta-silicate H₂O(9.88% Si) 1.45, Manganous carbonate(44.79% Mn) 0.63, Cupric carbonate(57.47% Cu) 0.30, Chromium potassium sulfate 2H₂O(10.42% Cr) 0.275, Boric acid(17.5% B) 0.0815, Sodium fluoride (42.25% F) 0.0635, Nickle carbonate(45% Ni) 0.0318, Lithium chloride(16.83% Li) 0.0174, Sodium selenate anhydrous(41.79% Se) 0.01025, Potassium iodate(59.3% I) 0.010, Ammonium paramolybdate · H₂O(54.34% Mo) 0.00795, Ammonium vanadate(43.55% V) 0.0066, Powdered sucrose 209.806

다. 실험동물 처치

실험동물은 처치 전 18시간 동안 절식시킨 후 CO₂로 가볍게 마취한 다음 개복하여 복부 대동맥에서 채혈하여 실온에서 1시간 이상 방치 후 4,500 ×g 에서 20분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 혈청 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 및 alkaline phosphatase(ALP)활성 측정에 사용하였다. 그리고 간을 적출하여 0.9% 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 여지로 수분을 제거한 후 효소 활성 저하를 예방하기 위해 급속 동결하여 -70℃의 deep freezer에 보관하면서 효소 활성 및 항산화 활성 능력 측정을 위해 사용하였다.

Table 10. Experimental design

<i>Groups</i>	<i>Diet composition</i>
ND	Basal diet ¹⁾
ET	Basal diet + EtOH ²⁾
ND-CSL	Basal diet + CSL ³⁾
ND-CSH	Basal diet + CSH ⁴⁾
ET-CSL	Basal diet + EtOH + CSL
ET-CSH	Basal diet + EtOH + CSH

¹⁾ See the table 9.

²⁾ EtOH : 35% alcohol 10 mL/kg of b.w./day

³⁾ CSL : CS ethanol extract 200 mg/kg of b.w./day

⁴⁾ CSH : CS ethanol extract 400 mg/kg of b.w./day

라. 혈청 중 *ALT*, *AST* 및 *ALP* 활성 측정

혈청의 aminotransferase 활성은 Reitman과 Frankel(29)의 방법에 의하여 조제된 kit 시약(신양화학, 서울, 한국)을 사용하여 *ALT* 및 *AST* 활성을 측정하였고 단위는 혈청 mL당 karmen unit로 표시하였다. *ALP* 활성은 조제된 kit 시약(영동제약, 서울, 한국)을 사용하여 측정하였고 단위는 king armstrong unit로 표시하였다.

마. 간 조직 중 효소활성 측정

(1) 효소원 조제

간 조직 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하고 병냉하에서 ultra turax homogenizer(Janke & Kunkel, Germany)로 10,000 ×g에서 2분간 마쇄하였다. 마쇄액의 일부는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량 측정에 사용하였고, 나머지는 4°C, 600 ×g에서 10분간 원심분리 하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상정액을 15,000 ×g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상정액은 *XO*, *SOD*, *catalase*, *GSH-Px* 활성 측정 및 단백질 함량 측정을 위해 사용하였다. 또한 간 조직 0.1 g에 5%(W/V) sulfosalicylic acid(SSA) 2 mL를 가하고 마쇄 후 10,000 ×g에서 10분간 원심분리 하여 상정액을 glutathione(*GSH*) 함량 측정에 사용하였다.

(2) Xanthin oxidase(XO) 활성

간 조직의 XO 활성은 Downey(30)의 방법에 의하여 측정하였다. 50 mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.8 mL에 10 mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) 0.03 mL, 5 mM xanthine 0.03 mL을 가하여 혼합한 다음 25°C에서 3분간 방치하고 효소원 0.1 mL를 가하여 290 nm에서 3분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 요산의 흡광계수를 $10.03 \text{ L} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 로 간주해 계산하였으며, 효소량 mU/g protein 을 1 unit로 표시하였다.

(3) Superoxide dismutase(SOD) 활성

Crapo 등(31)의 방법에 의하여 xanthine, XO 및 cytochrome c를 이용하여 측정하였다. 즉 시험관에 100 mM phosphate buffer (pH 7.8) 2.3 mL에 0.5 mM xanthine 0.3 mL와 0.1 mM cytochrome C 0.3 mL를 가하고 혼합하여 흡광도의 증가 속도가 매분 당 0.02가 되도록 XO용액을 첨가한 후 550 nm에서 1분간 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 상기 조건에서 효소원을 가하여 증가되는 흡광도를 측정하였고, cytochrome c 환원속도를 50% 억제하는 효소량 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ 을 1 unit로 표시하였다.

(4) Catalase 활성

Catalase 활성은 Aebi(32)의 방법에 의하여 소모되어지는 H_2O_2 양으로 측정하였다. 25 mM H_2O_2 를 포함한 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 3.0 mL에 효소원 10 μL 를 가하여 혼합한 후 240 nm에서 60초간 변화되는 흡광도를 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 mM의 H_2O_2 를 분해시키는 효소량 (decreased $\text{H}_2\text{O}_2 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$)을 1 unit로 표시하였다.

(5) Glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성

Flohe 등(33)의 방법에 의하여 GSH-Px 활성을 측정하였다. 10 mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.5 mL에 3 mM glutathione(GSH), 20 mM NaN₃, glutathione reductase 0.72 U, NADPH 0.45 mM과 효소원을 넣고 0.45 mM H₂O₂를 가하여 340 nm에서 3분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 비효소적 반응은 상기와 같은 조건에서 단지 0.45 mM H₂O₂를 가하지 않고 흡광도의 변화를 측정하였으며, 효소 활성은 비효소적 반응에 의한 흡광도 변화를 제한 값을 다음 식에 의해서 계산하여 효소량 (decreased NADPH μM/min/mg protein)을 1 unit로 표시하였다.

$$A = 0.868([NADPH] / [GSH]_0 t)(V_i / V_s)$$

A : 효소 활성도

[NADPH] : NADPH 함량 변화

[GSH]₀ : GSH의 처음 함량

t : 반응시간

V_i : 반응액 용량

V_s : 효소액 용량

(6) Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량

TBARS 함량은 Buege와 Aust의 방법(34)에 의하여 측정하였다. TBA 시약 (0.375% TBA in 0.25 N HCl) 1.0 mL에 BHT를 최종함량이 0.01%가 되게 가하고 균질액 1.0 mL를 가하여 잘 혼합한 후 98°C로 15분간 가열하였다. 즉시 냉각시켜 1,500 ×g로 15분간 원심분리하고 535 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다. Malondialdehyde(MDA)의 몰 흡광계수 $1.56 \times 10^2 \text{ L} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다.

(7) Glutathione(GSH) 함량

GSH 함량은 Tietze의 방법(35)으로 측정하였다. 시험관에 working buffer 700 μL , 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid(DTNB) 100 μL , 시료액 20 μL 및 증류수 180 μL 를 가하여 30°C에서 3분간 방치한 후 GSSG 5 μL 를 첨가하고 412 nm에서 1분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. GSH함량은 GSH표준액 1, 2, 3 및 4 μM 을 상기와 같은 방법으로 측정하여 계산하였다.

(8) 단백질 함량

단백질 함량은 Lowry 등의 방법(36)에 의하여 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 측정하였다. 간세포 획분 20 μL 를 취하고, 여기에 1.0% SDS 용액 16 μL 를 혼합하고, 증류수로 최종 부피가 124 μL 가 되도록 희석한다. 희석된 용액 15 및 20 μL 를 취해 증류수로 80 및 85 μL 넣고 희석시켰다. 여기에 반응시약(0.5% copper sulfate solution : 1.0% sodium tartrate solution : 2.0% sodium carbonate solution = 0.5 : 0.5 : 49, v/v/v)을 1.0 mL 씩 첨가하여 10초간 혼합 후 실온에서 20분간 방치시켰다. 이후 발색시약인 1 N Folin 시약 0.1 mL씩 첨가하여 5초간 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 다음, 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 단백질 함량을 정량 하였다.

바. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 12.0.1(Statistical package for the social science)P/C package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석(one-way ANOVA)를 실시하였으며, 사후검정은 Tukey(T)-test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은 $\alpha < 0.05$ 수준에서 이루어 졌다.

제 3 장 실험결과 및 고찰

제 1 절 성분분석

1. 일반성분

모과의 일반성분 함량은 Table 11과 같다. 일반 성분은 동결 건조한 모과를 기준으로 수분함량은 20.57%, 조단백 16.06%, 조회분 11.03% 및 탄수화물 50.94%를 함유하는 것으로 나타났다. 모과 생과를 그대로 분석한 정 등(13)에 의하면, 모과의 수분 함량은 71.03%, 조단백 1.30%, 조지방 1.40%, 조회분 11.03%를 함유하였으며, 같은 장미과에 속하는 매실 추출물의 경우는 수분 함량이 90.1%, 조단백 0.8%, 조지방 0.5%, 조회분 0.6%, 탄수화물 8.0% 함유하고 있는 것으로 보고되었다(37).

Table 11. Proximate compositions of CS

(g/100g, dry basis)

<i>Items</i>	<i>Contents</i>
Moisture	20.57
Crude protein	16.06
Crude fat	1.40
Crud ash	11.03
Carbohydrate	50.94

2. 유리당 함량

모과에 함유된 유리당 함량은 Table 12와 같다. Manitol은 1,707.16 mg/L로 가장 많은 함량이 검출되었고, glucose가 880.84 mg/L 검출되었다. 그 다음으로는 mannose, fructose, ribose, galactose 순으로 소량 검출되었다. Lesinka 등 (38)의 연구에 의하면 모과의 당 성분 중 당알코올인 sorbitol과 mannitol이 가장 많이 검출되었고, 유리당으로는 glucose, fructose, sucrose 순으로 검출되어 본 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 또한 같은 장미과인 사과의 유리당은 주로 fructose, glucose, sucrose 순(39)이었으며, maltose(40)와 galactose(41)는 소량 함유하였다. 매실 추출물의 경우는 glucose, fructose, sucrose 순으로 검출되었다(37).

Table 12. Contents of free sugars in CS

Free sugar	Content
Manitol	1,707.16
Fructose	40.50
Arabinose	N.D. ¹⁾
Galactose	1.56
Glucose	880.84
Mannose	143.94
Ribose	5.95

¹⁾N.D. : not detected

3. 구성아미노산 함량

모과의 아미노산 조성은 Table 13과 같다. 총 16종의 아미노산이 검출되었으며, 총 아미노산 함량은 13,743.19 mg%였다. 구성 아미노산의 경우 glutamic acid 함량이 1,926.12 mg%로 가장 높았고, 다음으로 lysine, aspartic acid, leucine, valine, alanine 순으로 검출되었다. 필수아미노산 함량은 lysine, leucine, valine, arginine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine 순으로 검출되었으며, 총 아미노산에 대한 필수아미노산의 비율은 50.78%였다. 정등(13)의 모과의 비휘발성 flavor 성분에 함유된 아미노산 분석 결과는 valine이 가장 많이 검출되었고, asparagine, aspartic acid, serine 순으로 검출되었다고 보고하였다.

Table 13. Contents of total amino acids in CS

(mg/100g)

<i>Amino acids</i>	<i>Content</i>
Aspartic acid	1,227.40
Threonine	640.27
Serine	553.48
Glutamic acid	1,926.12
Proline	138.15
Glycine	814.73
Alanine	1,087.48
Valine	1,199.06
Methionine	581.82
Isoleucine	674.81
Leucine	1,200.84
Tyrosine	577.39
Phenylalanine	569.42
Histidine	440.13
Lysine	1,243.34
Arginine	868.75
Total A.A.	13,743.19
Total E.A.A.	6,978.31
E.A.A. %	50.78

4. 지방산 조성

모과의 지방산 조성은 Table 14와 같다. 포화지방산량은 palmitic acid(C16:0)가 15.33%로 가장 높았고, palmitoleic acid(C16:1) 7.69%, heptadecanoic acid (C17:0) 5.66%, caprylic acid methyl ester(C8:0) 4.53%, stearic acid(C18:0) 2.44%순이었다. 불포화지방산은 linoleic acid(C18:2n6c)가 38.66%로 가장 많았으며, 그 외에 linolenic acid(C18:3n3)와 cis-8,11,14-eicosatienoic acid(C20:3n6)가 각각 13.12%와 12.10% 검출되었다. 같은 장미과에 속하는 매실 추출물의 경우는 불포화지방산은 linolenic acid(C18:3n3)와 linoleic acid(C18:2n6c) 함량이 가장 높았으며, 포화지방산으로는 palmitic acid(C16:0)함량이 가장 높게 나타나 본 연구 결과와 거의 유사한 경향이었다(37).

Table 14. Composition of fatty acids of CS

<i>Fatty acid</i>	<i>Composition (%)</i>
Butyric Acid Methyl Ester(C4:0)	0.00
Caproic Acid Methyl Ester(C6:0)	0.00
Caprylic Acid Methyl Ester(C8:0)	4.53
Capric acid(C10:0)	0.00
Undecanoic acid(C11:0)	0.00
Myristic acid(C14:0)	0.00
Pentadecanoic acid(C15:0)	0.00
Palmitic acid(C16:0)	15.33
Heptadecanoic acid(C17:0)	5.66
Stearic acid(C18:0)	2.44
Arachidic acid(C20:0)	0.00
Heneicosanoic acid(C21:0)	0.00
Behenic acid (C22:0)	0.00
Tricosanoic acid(C23:0)	0.00
Lignoceric acid(C24:0)	0.00
<i>Saturates</i>	<i>27.96</i>
Myristoleic acid(C14:1)	0.00
cis-10-Pentadecenoic acid(C15:1)	0.00
Palmitoleic acid(C16:1)	7.69
cis-10-Heptadecenoic acid(C17:1)	0.00
Elaidic acid(C18:1n9t)	0.00
Oleic acid(C18:1n9c)	0.00
cis-11-Eicosenoic acid(C20:1)	0.00
Erucic acid(C22:1n9)	0.00
Nervonic acid (C24:1)	0.00
<i>Monoenes</i>	<i>7.69</i>
Linolelaidic acid(C18:2n6t)	0.00
Linoleic acid(C18:2n6c)	38.66
cis-11,14-Eicosadienoic acid(C20:2)	0.00
cis-13.16-Docosadienoic acid(C22:2)	0.00
r-Linolenic acid(C18:3n6)	0.00
Linolenic acid(C18:3n3)	13.12
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid(C20:3n6)	12.10
cis-11,14-Eicosatienoic acid(C20:3n3)	0.00
Arachidonic acid(C20:4n6)	0.00
EPA(C20:5n3)	0.00
DHA(C22:6n3)	0.00
<i>Polyenes</i>	<i>63.88</i>
<i>Total</i>	<i>100.00</i>

5. 비타민 A 및 E 함량

모과의 비타민 A와 비타민 E 함량은 Table 15와 같다. 비타민 A 함량은 0.040 mg%였고, 비타민 E 함량은 0.275 mg%였다. 정 등(13)의 연구에 의하면 모과의 vitamin A는 28.8 mg%로 함유되어 있는 것으로 보고하였는데, 본 연구 결과보다 훨씬 많은 양의 비타민 A가 검출되었다.

Table 15. Contents of vitamin A and E in CS

(mg/100g)

<i>Vitamin</i>	<i>Content</i>
A	0.040
E	0.275

6. 유기산 함량

모과의 유기산 함량은 Table 16과 같다. Malic acid가 65,606.0 mg/L로 가장 많았고, 그 다음으로 citric acid는 57,602.2 mg/L였으며, oxalic acid 2,528.3 mg/L, succinic acid는 41.3 mg/L, formic acid는 8.0 mg/L였다. 모과 유기산의 주된 성분은 citric acid와 malic acid였다는 김 등(39)의 연구와도 일치하는 경향을 보였다.

Table 16. Contents of organic acids in CS

(mg/L)

<i>Organic Acid</i>	<i>Content</i>
Oxalic acid	2,528.3
Malic acid	65,606.0
Formic acid	8.0
Succinic acid	41.3
Citric acid	57,602.2

7. 양 · 음이온의 함량

모과의 양 · 음이온 함량을 나타낸 결과는 다음과 같다. 양이온의 경우 Table 17과 같이 potassium(K^+)이 1,035.98 mg/L로 가장 많았으며, 다음으로 sodium(Na^+)이 56.12 mg/L로 많았다. 음이온의 경우 Table 18과 같이 bromine(Br^-)이 9,588.38 mg/L로 가장 높았고, fluoride(F^-) 1,397.63 mg/L, nitrate(NO_3^-) 334.50 mg/L순으로 높았으며, nitrite(NO_2^-)는 검출되지 않았다.

Table 17. Contents of cations in CS

		(mg/L)
<i>Cation</i>	<i>Content</i>	
Lithium(Li^+)	3.32	
Sodium(Na^+)	56.12	
Ammonium(NH_4^+)	N.D. ¹⁾	
Potassium(K^+)	1,035.98	
Magnesium(Mg^{2+})	0.04	
Calcium(Ca^{2+})	0.46	

¹⁾N.D. : not detected

Table 18. Contents of anions in CS

(mg/L)

<i>Anion</i>	<i>Content</i>
Fluoride(F ⁻)	1,397.63
Bromine(Br ⁻)	9,588.38
Chloride(Cl ⁻)	153.38
Nitrite(NO ₂ ⁻)	N.D. ¹⁾
Nitrate(NO ₃ ⁻)	334.50
Phosphate(PO ₄ ³⁻)	N.D.
Sulfate(SO ₄ ²⁻)	177.30

¹⁾N.D. : not detected

8. 무기질 함량

모과의 무기질 함량은 Table 19와 같다. 모과에서 총 8종의 무기질 성분이 검출되었으며, 이 중 K 함량이 가장 높았고 Ca, Mg 순으로 검출되었다. 정 등 (13)에 의하면 생과육 모과의 경우 무기질 함량이 Ca, P, Mg, Fe 순으로 검출되었는데, 본 연구와 마찬가지로 Ca과 Mg 함량이 높게 검출되었다. 같은 장미과에 속하는 매실 추출물의 경우도 K 함량이 제일 많았고, 다음으로는 Ca, P, Mg, Na, Zn, Fe 순으로 검출되어 본 분석 결과와 거의 유사하였다.

Table 19. Contents of minerals in CS

(mg/100g)

<i>Mineral</i>	<i>Content</i>
Ca	118.89
Fe	10.30
K	2,268.60
Mg	64.25
Mn	0.63
Cu	0.12
Na	25.71
Zn	1.71

제 2 절 항산화 효능

1. 80% 에탄올 추출 수율 및 용매별 분획물의 수율

모과의 항산화효과를 검토하기 위해 냉동 건조하여 마쇄한 시료를 80% 에탄올로 추출한 추출수율을 계산하였는데 29.33%로 측정되었다. 이를 용매별로 분획한 후 80% 에탄올로 추출물에 대한 추출수율을 측정한 결과는 Table 20과 같다. 80% 에탄올 추출물의 용매별 분획물의 추출수율을 보면 water 분획이 22.09%로 가장 높았으며 ethylacetate, n-hexane, n-butanol, chloroform 순이었다.

Table 20. Yield of Chaenomeles Sinensis Koehne(CS) ethanol extract and its solvent fraction from dried CS

<i>Fraction</i>	<i>Yield(g/100g)</i>	<i>Yield(%)</i>
Ethanol ext.	29.33	-
Hexane	5.11	17.42
Chloroform	1.70	5.80
Ethylacetate	5.46	18.62
Butanol	4.43	15.10
Water	6.48	22.09

2. 항산화 물질의 함량 측정

가. 총 *flavonoid* 함량

모과 에탄올 추출물 분획물의 총 flavonoid 함량을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 모과 80% 에탄올 추출물의 총 flavonoid 함량은 0.331 ± 0.021 mg/mL이었으며, 이를 통한 각 분획물의 총 flavonoid 함량은 n-hexane 분획물이 0.653 ± 0.046 mg/mL로 가장 많이 검출되었고, 다음으로는 ethylacetate 분획물이 0.326 ± 0.032 mg/mL로 chloroform 분획물 0.301 ± 0.012 mg/mL와 비슷한 결과가 나왔다. Water 분획물에서는 가장 적은 flavonoid가 검출되었다.

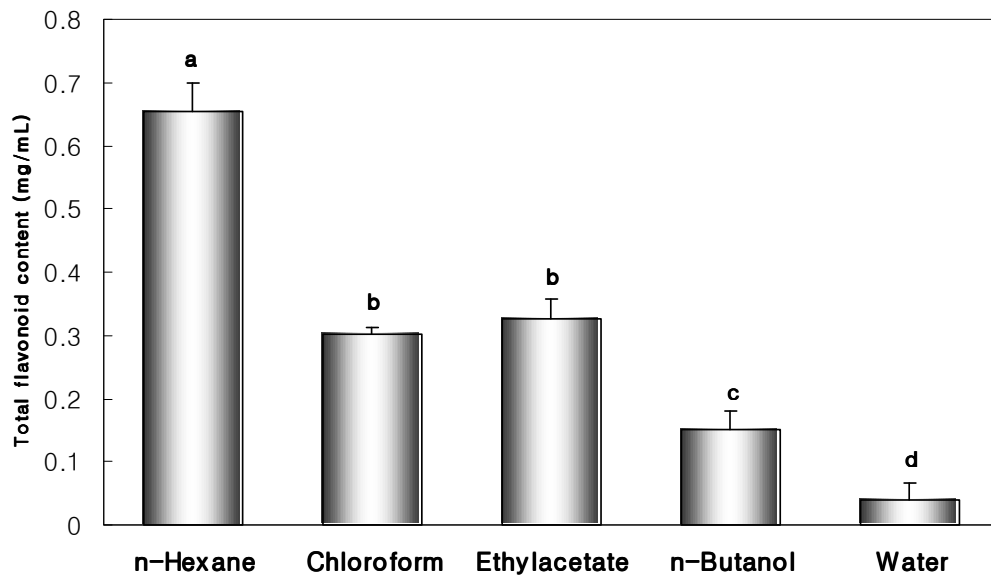


Fig. 2. Total flavonoid contents in solvent fractions from 80% ethanol extract of CS by various solvents.

^{a-d}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

나. 총 polyphenol 함량

Polyphenol 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물로서 일반적으로 항산화 작용이 강한 것으로 알려져 있다. 모과 에탄올 추출물의 총 polyphenol 함량은 0.279 mg/mL로 이를 분획 후 측정된 결과 n-hexane 분획물이 0.712 mg/mL으로 총 polyphenol 함량이 가장 높았으며 ethylacetate, n-butanol, chloroform, water 순이었다.

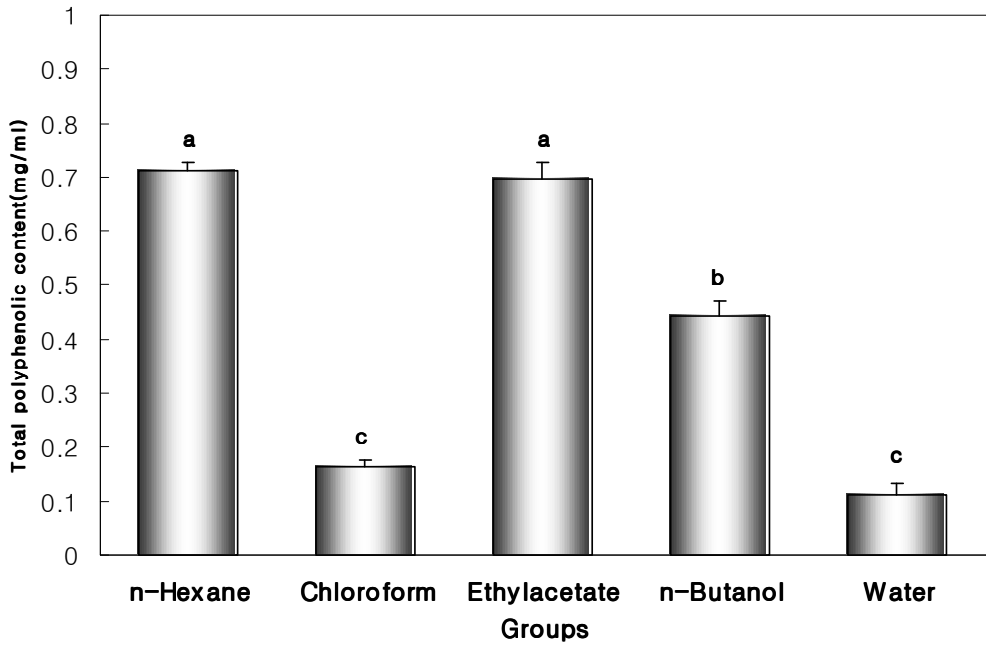


Fig. 3. Total polyphenol contents in solvent fractions from 80% ethanol extract of CS by various solvents.

^{a-c}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

3. *In vitro* 에서 항산화 활성

가. DPPH radical 소거작용

모과 에탄올 추출물 분획물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Table 21과 같다.

항산화 물질로 알려진 flavonoid와 polyphenol이 본 연구 결과 모과 에탄올 추출물을 다량 함유하고 있어 항산화력이 있다고 판단되어 DPPH radical 소거능을 측정하였다. DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수 전자 때문에 518 nm에서 강한 흡수 band를 보이나 phenolic 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 따라서 흡수 band도 사라지게 되고 안정된 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하므로 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 옅어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다.

DPPH radical 소거활성은 n-hexane > ethylacetate > n-butanol > chloroform > water 분획물 순으로 나타났다. n-hexane 분획물의 DPPH radical 소거활성이 51.4 µg/mL로 가장 강한 항산화 활성을 나타내었는데, 양성 대조군인 합성 항산화제 BHT의 RC₅₀는 36.5 µg/mL으로 유사한 전자 공여능을 나타냈다. 따라서 n-hexane 분획물의 전자공여능이 높은 것은 모과에 함유하고 있는 항산화 물질이 n-hexane 분획물에 잘 용해되는 것으로 추정된다.

Table 21. Scavenging effects of CS ethanol extract fractions on DPPH radical

Fraction	50% Reduction(μg) ¹⁾
Control	0
n-Hexane	51.4
Chloroform	55.4
Ethylacetate	54.9
n-Butanol	55.3
Water	58.9
BHT	36.5

¹⁾ Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min.

나. *Rancimat*에 의한 항산화지수(*antioxidant index, AI*) 측정

지질 산패도를 측정하는 *Rancimat*(Metrohm model 679, Herisan, Switzerland)에 의한 항산화지수를 측정한 결과는 Table 22와 같다. 항산화지수는 DPPH radical 소거작용에서 나타난 결과와 마찬가지로 n-hexane 분획물이 1.57로 가장 높게 나타났으며, ethylacetate 분획물이 1.47, n-butanol 분획물이 1.33, chloroform 분획물이 1.09, 및 water 분획물이 1.02로 시료를 미첨가한 대조군의 항산화지수 1.00보다 높은 활성을 나타냈으며, 특히 n-hexane 분획물의 활성이 가장 높아 기존 합성 항산화제인 BHT와 유사한 수치를 나타냈다. 본 실험에서 모과 에탄올 추출물의 전 분획물에서 대조군보다 높은 항산화 활성을 나타냈는데, 이는 모과 에탄올 추출물에 항산화 활성을 나타내는 물질인 polyphenol과 flavonoid를 다량 함유하고 있기 때문인 것으로 사료된다.

Table 22. Antioxidative activities of CS ethanol extract fractions on soybean oil

<i>Fraction</i> ¹⁾	<i>IP</i> ²⁾	<i>AI</i> ³⁾
Control	6.12	1.00
n-Hexane	9.59	1.57
Chloroform	6.69	1.09
Ethylacetate	9.01	1.47
n-Butanol	8.12	1.33
Water	6.23	1.02
BHT	10.87	1.78

¹⁾ Fractions were separated by separatory funnel.

²⁾ Induction period(IP) of oil was determined by Rancimat's test at 110°C.

³⁾ Antioxidant index(AI) was expressed as IP of oil containing various fraction/IP of soybean oil.

다. 지질과산화 억제작용

모과 에탄올 추출물 분획물의 지질과산화 억제작용을 측정한 결과는 Table 23과 같다.

각 분획물의 지질과산화 억제율은 n-hexane 분획물이 62.5%, chloroform 분획물 60.0%, n-butanol 분획물 40.6%, ethylacetate 분획물 30.7%, water 분획물이 12.6%순으로 DPPH free radical 소거활성과 Rancimat을 이용한 항산화지수와 동일하게 n-hexane 분획물에서 지질과산화 억제율이 가장 높게 나타났다. 양성 대조군로 사용한 BHT의 지질과산화 억제율보다는 낮게 나타났다. 이 결과는 모과에 다량 함유된 phenol의 OH기가 DPPH용액에 존재하는 free radical과 linoleic acid의 산화로 인해 생성되는 free radical에 작용하는 차이 때문으로 생각된다(42).

Table 23. Inhibitory rates of CS ethanol extract fractions on lipid peroxidation.

<i>Fraction</i>	<i>Inhibition of lipid peroxidation(%)</i>
Control	0.0
n-Hexane	62.5
Chloroform	60.0
Ethylacetate	30.7
n-Butanol	40.6
Water	12.6
BHT	75.3

4. *In vivo* 에서 항산화 효능

가. 체중증가율, 간무게 및 식이효율

모과 에탄올 추출물과 알코올을 4주간 경구 투여하여 측정된 흰쥐의 체중증가율, 체중 당 간 무게의 비율, 식이효율은 Table 24, 25 및 Fig 4와 같다.

실험기간 4주간의 체중증가량은 ET군은 163.50 ± 11.70 g으로 ND군 177.50 ± 4.36 g에 비하여 감소하였으나 유의차가 없었다. 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군은 ET군과 유의적인 차이가 없었다. 정상 식이를 급여한 ND군에 비해 알코올을 투여한 ET군이 감소되었으나 유의차는 없었고, 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 저용량 투여한 ET-CSL군은 ET군에 비해 체중 당 간무게의 비율이 증가하였으며, 고용량 투여한 ET-CSH군은 ET군에 비해 오히려 감소하였으나 유의차는 없었다. 식이효율은 ET군이 0.172 ± 0.014 로 ND군 0.201 ± 0.012 에 비하여 유의하게 저하되었으나, 알코올과 모과 에탄올 추출물을 단독(ND-CSL군과 ND-CSH군) 혹은 병합(ET-CSL군과 ET-CSH군) 투여한 군들은 ND군과 비슷한 식이효율을 나타내었다. 이는 알코올과 모과 에탄올 추출물 병합 투여 시 알코올 투여로 인한 식이섭취의 감소효과를 완화시킴을 알 수 있었다. 이러한 결과는 쥐에게 7% 알코올을 음용수에 첨가시켜 섭취시킨 결과 체중이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다고 한 Rothwell과 Stock(43)의 연구 결과와 다량의 알코올을 만성적으로 섭취한 환자를 대상으로 한 실험에서 알코올 섭취 시 식이 섭취량의 감소와 여러 영양소의 흡수장애로 체중감소를 초래 했다는 Liber와 Decarli(44)의 보고와 일치하지는 않았으나 본 연구결과로 에탄올 투여 시 체중증가율이 억제되었다.

Table 24. Changes in weight gain of rats fed normal diet containing the CS ethanol extract for 4 weeks

Groups ¹⁾	Initial weight (g)	Final weight (g)	Total weight gain (g)	Weight gain (g/day)
ND	154.00±2.93 ^{2,3)NS}	331.50±5.33 ^{NS}	177.50±4.36 ^{NS}	6.34±0.16 ^{NS}
ET	153.67±2.11	317.17±12.79	163.50±11.70	5.84±0.41
ND-CSL	154.33±2.67	330.17±8.05	175.83±8.65	6.28±0.31
ND-CSH	153.17±3.03	332.17±10.93	179.00±8.98	6.39±0.32
ET-CSL	153.17±6.24	316.00±7.50	162.83±8.76	5.81±0.31
ET-CSH	153.67±6.12	310.00±8.91	156.33±9.51	5.58±0.34

¹⁾Abbreviation : See the legend of Table 10.

²⁾NS : no significantly different among groups.

³⁾Values are mean ± S. E of 6 rats per each group.

Table 25. Liver weight of rats fed experimental diet with CS extract for 4 weeks.

<i>Groups</i>	<i>Liver Wight (g)</i>	<i>Liver/BW (%)</i>
ND	9.29±0.26 ^{2,3)NS}	2.81±0.09 ^{NS}
ET	8.67±0.37	2.75±0.10
ND-CSL	9.05±0.54	2.76±0.21
ND-CSH	9.31±0.39	2.74±0.10
ET-CSL	8.83±0.39	2.79±0.10
ET-CSH	8.84±0.33	2.74±0.49

¹⁾Abbreviation : See the legend of Table 10.

²⁾NS : no significantly different among groups.

³⁾Values are mean ± S. E of 6 rats per each group.

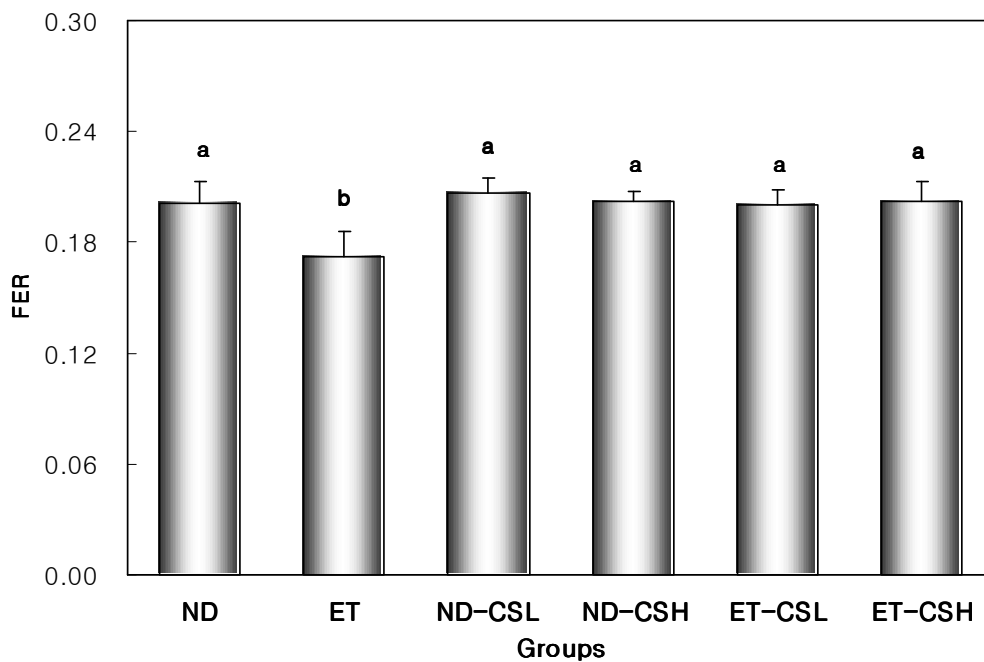


Fig. 4. FER(feed efficiency ratio) in alcohol and/or CS administered rats.

Abbreviations: FER(feed efficiency ratio) : the total amount of weight increased/the total intake of food. See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

나. 혈청 ALT, AST 및 ALP 활성

혈청 ALT와 AST 활성은 간세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 간조직 손상 시 혈중으로 다량 유출된다(45). 따라서 흰쥐에게 알코올과 모과 에탄올 추출물을 4주간 투여 후 혈청 ALT, AST 및 ALP 활성 변화를 관찰하였는데, 그 결과는 Fig 5~7과 같다.

혈청 ALT 활성은 모과 에탄올 추출물 단독 투여한 ND-CSL군과 ND-CSH군은 ND군과 비교 시 차이가 없었으나, 알코올만을 단독 투여한 ET군은 ND군과 ND-CSL군, ND-CSH군에 비해 증가 하였다.(Fig 5) 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군은 ET군에 비하여 혈청 ALT 활성이 유의하게 감소하였으며, 모과 에탄올 추출물 투여 용량이 증가할수록 낮아지는 경향을 볼 수 있었다.

혈청 AST 활성은 Fig. 6에 나타난 바와 같이 ET군은 ND군과 ND-CSL군, ND-CSH군에 비해 유의하게 증가되었고, ET-CSL군과 ET-CSH군은 ET군에 비해 유의하게 감소되었다.

혈청 ALP 활성은 Fig. 7과 같이 ET군은 ND군에 비해 유의적으로 증가되었으며, ET-CSL군과 ET-CSH군은 ET군에 비해 모과 에탄올 추출물 투여 용량이 증가할수록 감소되어 농도 의존적으로 저하됨을 알 수 있었다. 특히 고용량 투여한 ET-CSH군은 정상식이를 급여한 ND군과 유사한 혈청 ALP 활성을 나타내었다.

간조직 손상의 지표로 이용되고 있는(46) 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성은 ND군에 비하여 알코올을 단독 투여한 ET군의 활성이 증가한 결과로 안 등(47)의 연구 결과와 일치하였으며, 이 결과는 알코올이 간의 대사과정에 작용하여 대사 이상을 초래함으로써 간세포 손상이 증가되었음을 알 수 있으며, 알코올에 의한 간세포 손상이 모과 에탄올 추출물 투여로 점차 회복되어 가는 것으로 생각되어진다.

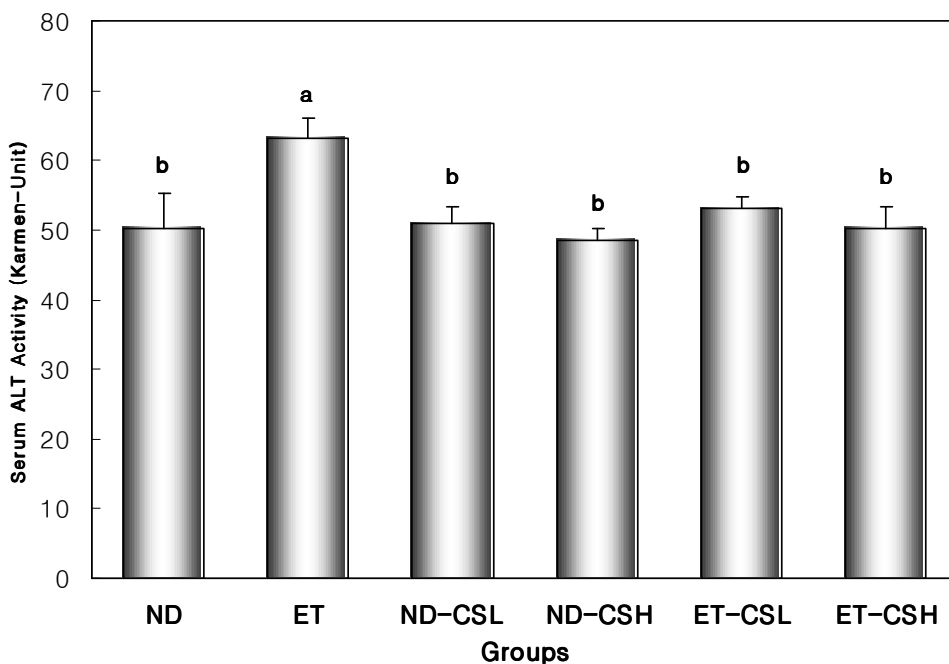


Fig. 5. Activity of ALT in the serum of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations: See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E. of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

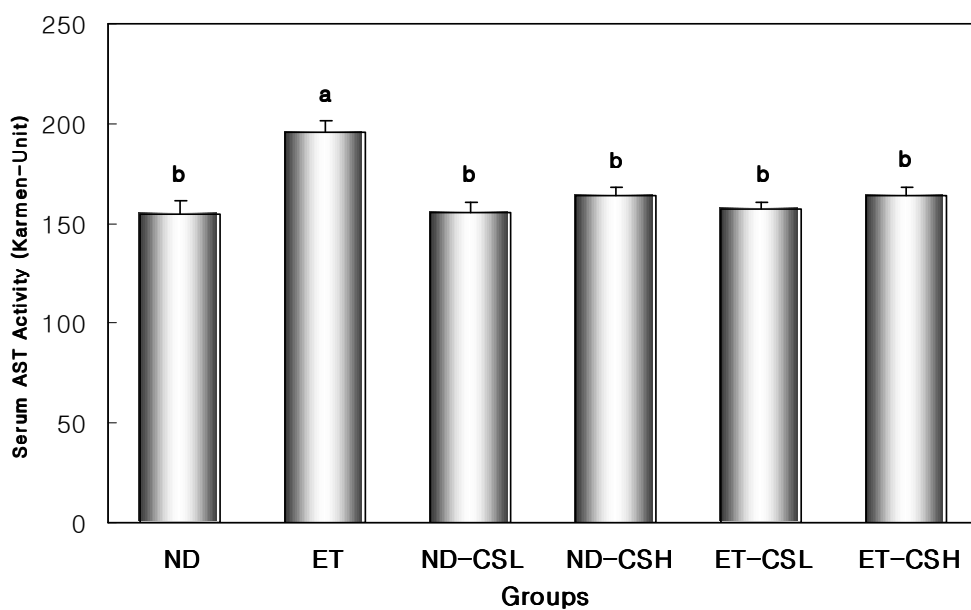


Fig. 6. Activity of AST in the serum of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations: See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E. of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

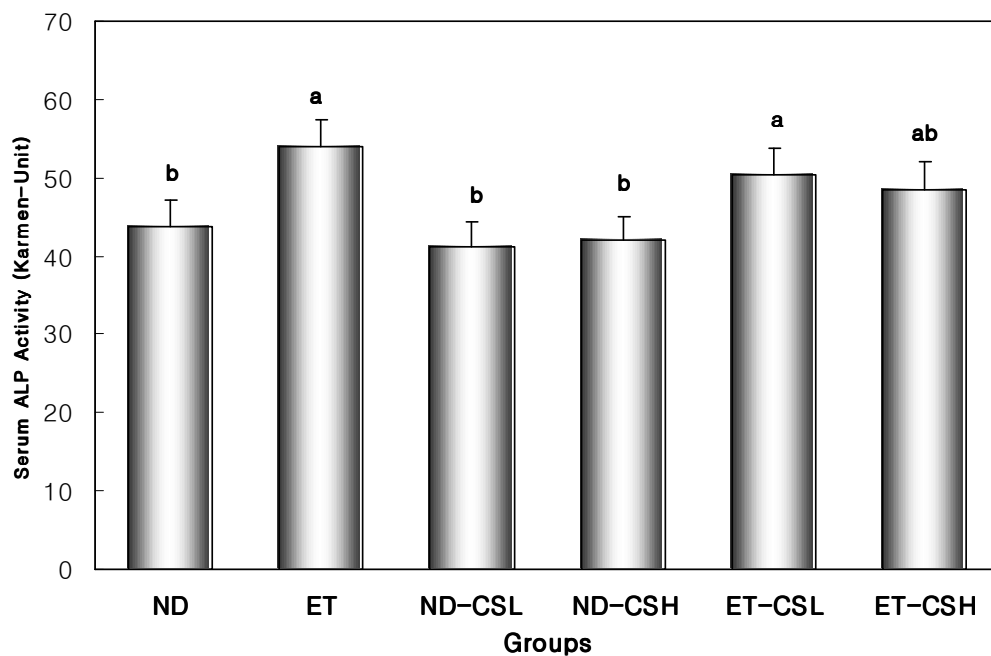


Fig. 7. Activity of ALP in the serum of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations: See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E. of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

다. 간조직의 항산화효소 활성

(1) XO 활성

Xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소로 알려진 XO 활성을 간조직에서 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. XO는 purine, pyrimidine, aldehyde 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체 내에서는 주로 purine의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로 전환시키고, 또 다시 xanthine을 uric acid로 전환시켜 요산을 생성하는 반응을 촉매하는 작용을 하는데 그 과정에서 라디칼이 생성된다. 또한 XO는 생체내에서 퓨린대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthin으로부터 요산을 형성하며, 요산이 혈장내 증가되면 골절에 축적되므로 통증을 동반하는 통풍을 일으키는 효소로 잘 알려져 있다(48,49). 간조직의 XO 활성은 알코올을 단독 투여한 ET군이 32.46 ± 2.26 unit/mg protein로 ND군의 20.78 ± 1.66 unit/mg protein에 비해 유의하게 증가되었다. 이는 알코올을 실험동물에 만성적으로 투여 시 XO 활성이 증가된다는 보고와 일치하였다(50). ET-CSL군의 24.66 ± 1.05 unit/mg protein과 ET-CSH군의 23.01 ± 2.01 unit/mg protein은 ET군에 비해 XO 활성이 농도 의존적으로 저하되는 경향을 보였으나, 모과 에탄올 추출물 투여 용량에 따른 유의차는 없었다. 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군의 간조직 XO 활성은 정상식을 급여한 ND군과 비슷한 경향이였다. 이는 알코올을 실험동물에 만성적으로 섭취시킬 때 XO 활성의 증가로 oxygen free radical이 생성되었으며, 모과 에탄올 추출물 투여 후 free radical의 생성을 감소시킨 것으로 생각된다.

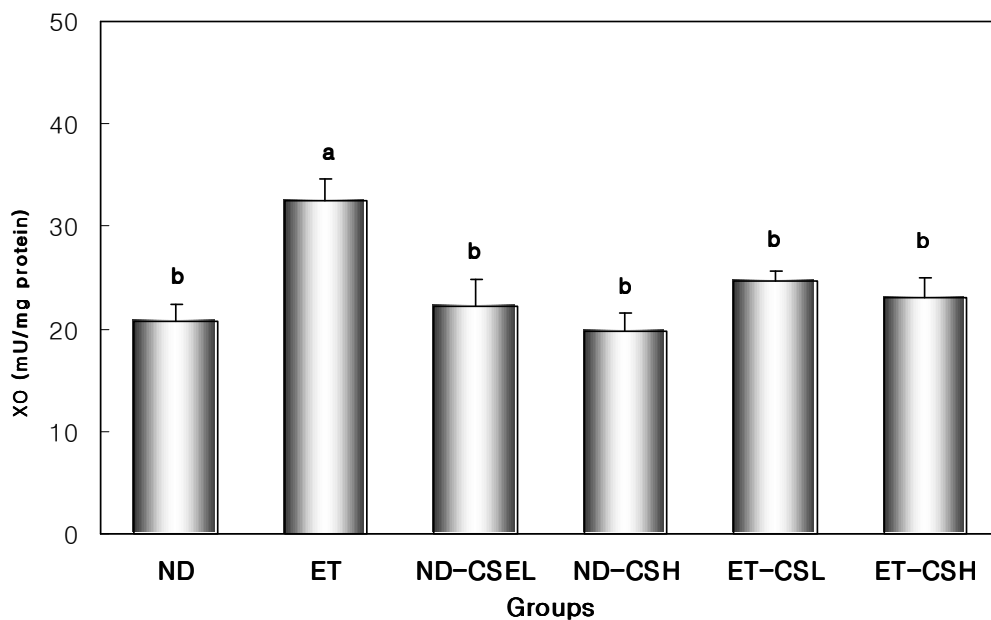


Fig. 8. Activity of XO in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations : See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E. of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

(2) 간조직의 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성

생체내 유리기 해독에 관여하는 효소인 SOD, catalase 및 GSH-pX 활성을 간 조직에서 측정한 결과는 Fig. 9~11와 같다.

SOD는 superoxide anion radical(O_2^-)을 보다 반응성이 약한 과산화수소(H_2O_2)로 전환시켜 이때 생성된 H_2O_2 는 GSH-Px, catalase 등의 작용에 의해 H_2O 로 무독화 됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호하게 되는 superoxide anion radical(O_2^-) 소거효소이다(51,52). 간조직의 SOD 활성은 ET군이 90.23 ± 4.32 unit/mg protein로 ND군 62.52 ± 5.16 unit/mg protein에 비하여 유의하게 증가되었는데, 이는 알코올 투여로 증가된 superoxide anion radical(O_2^-)를 소거하려는 생리 적응 현상으로 생각되어진다(Fig. 9). ET군에 비해 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군의 SOD 활성이 농도 의존적으로 감소되었으며, 특히 고용량 투여 시 유의하게 저하되었다.

조직의 catalase는 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라, 이들 활성산소에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있다고 알려져 있다(53). Catalase는 세포내 소포체에서 합성되며, 골지체로 이동 부착되어 세포내 peroxisome에 존재한다. 체내에서 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생성된 H_2O_2 를 분해 및 소거하여 무독화 시키는 효소로 H_2O_2 의 농도가 높을 때 주로 작용하며 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감하게 반응하는 것으로 보고되어있다. 간 조직의 catalase 활성은 알코올을 단독 투여한 ET군이 375.01 ± 23.47 unit/mg protein로 ND군 242.23 ± 10.21 unit/mg protein에 비해 유의하게 증가되었으며(Fig. 10), 이는 SOD의 작용에 의해 생성된 H_2O_2 를 분해하기 위해 catalase의 활성이 증가된 것으로 생각된다(54). 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군의 310.00 ± 26.25 unit/mg protein와 ET-CSH군의 260.45 ± 27.16 unit/mg protein는 ET군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.

GSH-Px는 H_2O_2 와 환원형 GSH의 반응에 관여하여 산화형 GSSG를 생성하며 이 GSSG는 GSSG reductase의 도움으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원되는데 catalase와 기능이 비슷하다(55,56). 또한 GSH-Px는 간조직의 H_2O_2 농도가 낮을 때에도 작용을 하며, Se를 함유하는 항산화 효소로 vitamin E와 함께 H_2O_2 를 제거함으로써 세포막의 손실을 방어한다. 간조직의 GSH-Px 활성은 ET군이 136.85 ± 6.37 unit/mg protein로 ND군인 93.21 ± 5.63 unit/mg protein에 비하여 유의하게 증가되었다(Fig. 11). 간조직의 GSH-Px 활성은 ET군들 간에도 유의차를 보여 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군의 102.03 ± 7.48 unit/mg protein와 ET-CSH군의 92.60 ± 5.58 unit/mg protein는 ET군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. ND군들간에도 유의차를 보여 모과 에탄올 추출물의 투여 용량을 증가할수록 간조직의 GSH-Px 활성은 농도 의존적으로 유의하게 저하시켰다. 이러한 결과는 일반적으로 만성 알코올 투여시 GSH-Px 활성이 증가 된다는 고 등(57)의 연구와 같다. 따라서 이 실험에서 간조직 내 생성된 H_2O_2 가 모과 에탄올 추출물을 병합 투여로 감소되는 것으로 확인되었으며, 이는 모과 에탄올 추출물이 체내 산화적 손상을 예방하는 항산화 효과가 있을 것이라 사료된다.

이와 같이 모과에는 항산화 비타민으로 알려진 vitamin E 함량이 본 연구에서 높게 검출되었으며, 생리 활성물질인 polyphenol 함량도 본 연구에서는 높게 검출되었는데, 이는 항산화력이 뛰어난 것으로 알려진 연잎의 polyphenol 함량과 비슷한 수치를 나타냈다(58). 따라서 모과 내 이러한 물질이 항산화 작용을 도와 간 조직 항산화 관련 효소 활성에 영향을 미친 것으로 사료된다.

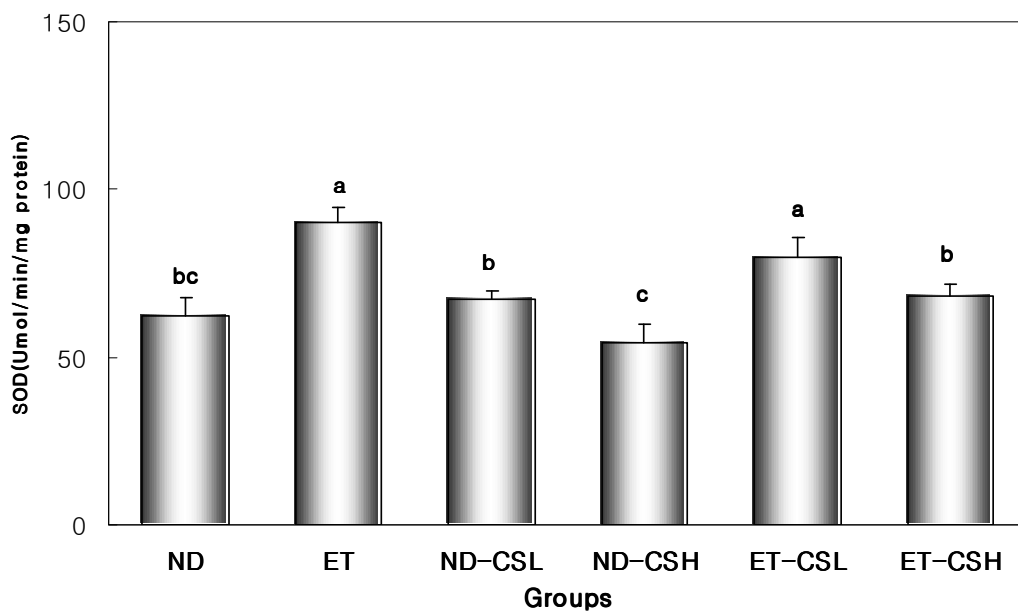


Fig. 9. Activity of SOD in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations : See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E. of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

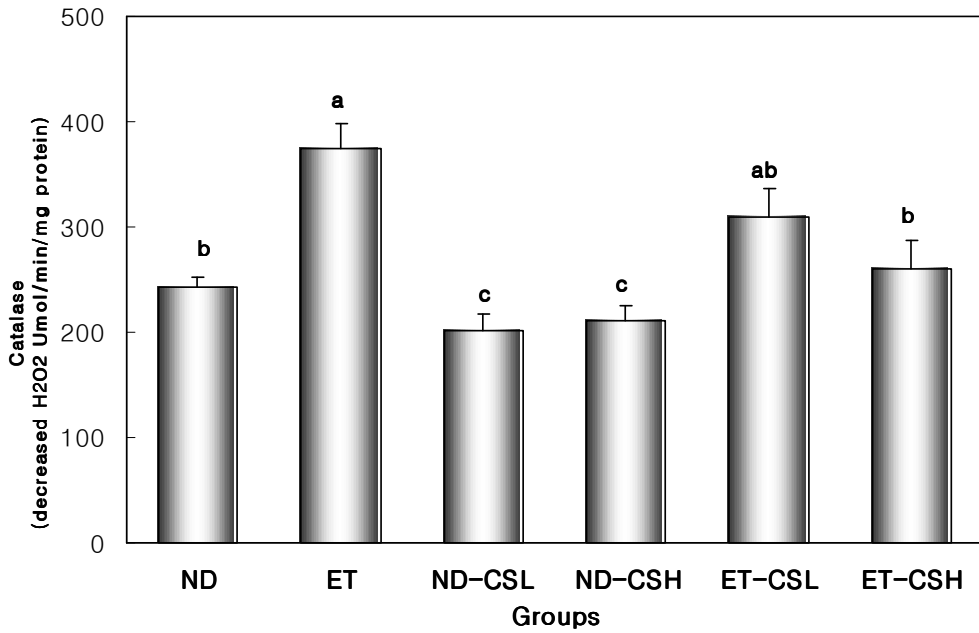


Fig. 10. Activity of catalase in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations: See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

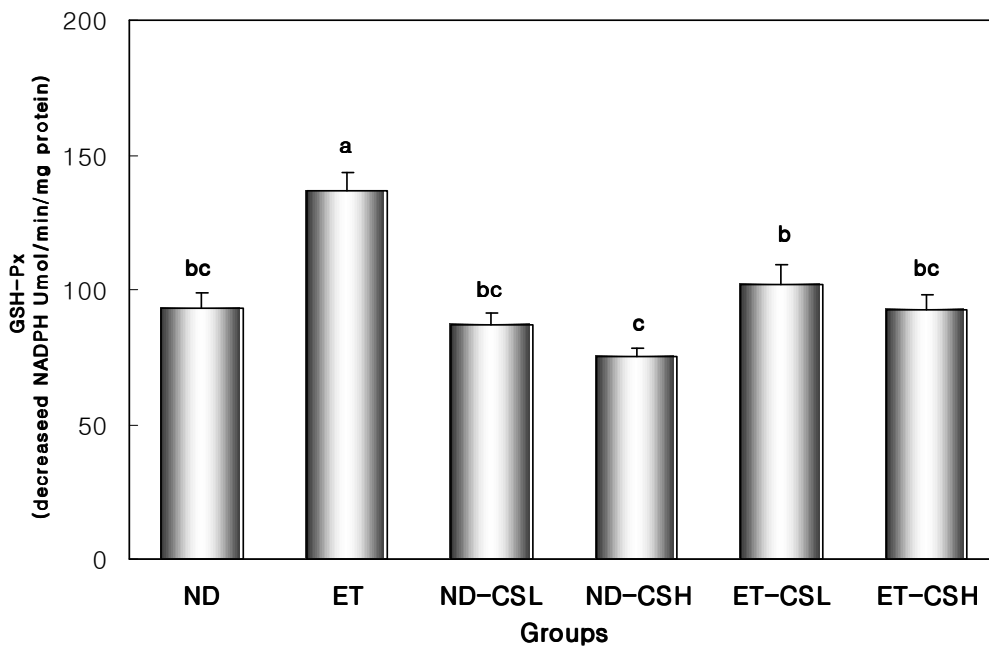


Fig. 11. Activity of GSH-Px in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations: See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

라. 간조직의 과산화지질 함량

지질과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물의 간 손상 기전으로 세포내 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어능력의 감소로 인해 발생한다(59). 이는 생체내 대사이상을 초래하고 DNA를 손상하여 발암, 돌연변이, 유전자의 소실 및 노화의 기전으로 알려져 있다(60). 따라서 알코올에 의해 초래된 간조직 손상 정도를 알아보기 위해 흰쥐에게 모과 에탄올 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg과 같이 농도를 달리 하여 알코올과 경구 투여 후 간조직의 TBARS 함량을 관찰한 결과는 Fig. 12와 같다.

ET군의 간조직 TBARS 함량은 7.23 ± 0.47 Um/g으로 ND군 5.01 ± 0.12 Um/g에 비하여 유의하게 증가되었다. 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군의 6.25 ± 0.36 Um/g과 ET-CSH군의 5.60 ± 0.42 Um/g은 간조직의 과산화지질 함량이 ET군에 비해 농도 의존적으로 감소하였다. ND군들 간에는 차이가 없었다. 지질과산화 반응은 손상된 간 독성 발생의 중요한 기전으로(61), 급성 혹은 만성적인 알코올 투여가 간 조직 중 지질과산화물량을 증가시킨다는 보고(62)와 같이 ET군이 ND군에 비하여 높은 수치를 나타냈다. 이는 알코올의 분해산물인 acetaldehyde가 cytosolic xanthine oxidase와 작용하여 부산물로 생성된 O_2^- 양이 증가되고 이 물질이 세포막의 불포화지질과 결합하여 생성된 결과로 추정된다. 이와 같이 알코올 섭취 시 지질과산화가 촉진된다는 조 등(63)의 보고와 일치하였다.

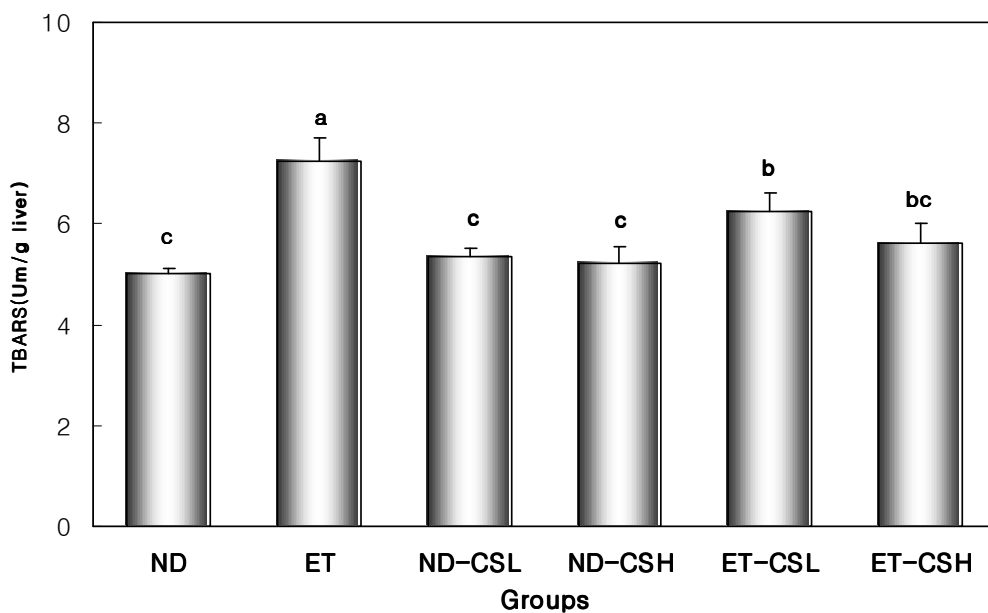


Fig. 12. Content of TBARS in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations: See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

마. 간 조직 중 GSH 함량

알코올과 모과 에탄올 추출물을 4주간 경구투여 후 간 조직의 GSH 함량 변화를 측정한 결과는 Fig. 13과 같다.

알코올을 단독 투여한 ET군은 정상식이만을 급여한 ND군에 비해 간 조직의 GSH 함량이 유의하게 감소하였다. ET군들 간에도 유의차가 보여 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군의 간조직의 GSH 함량이 ET군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 증가되었으며, 특히 고용량 투여한 ET-CSH군은 ND군과 GSH 함량이 유사한 경향이였다. 알코올은 epinephrine, corticosteroide, glucagon 등의 호르몬 분비를 촉진하여 간으로부터 GSH의 유출을 증가시키므로 조직 내 GSH 감소가 일어나며, 이차적으로는 free radical에 의한 지질과산화 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(64). Speisky 등(65)의 연구에 의하면 간 조직 중에서 GSH 고갈이 가능한 기전으로는 항산화 작용으로 소모 되는 것 이외에도 알코올 대사산물인 acetaldehyde와 GSH가 결합한다고 설명하였다. 본 실험결과 알코올 투여로 간 조직의 GSH 함량은 감소되고, GSH-Px 활성은 증가되었는데 간 손상 시 GSH-Px 활성이 증가하여 GSH의 방출이 많아지므로 조직의 GSH 함량이 감소한다는 Lee 등(66)의 보고와 일치하였다. 그리고 알코올 단독 투여한 ET군보다 알코올과 모과 에탄올 추출물 병합 투여한 ET-CSH군의 GSH 함량이 증가된 것은 모과 에탄올 추출물 투여가 알코올에 의해 생성된 H_2O_2 등의 free radical(40)를 소거하기 위해 GSH-Px 활성이 저하되고 GSH 소모량도 줄어들어 나타난 결과로 사료되어진다(67-69).

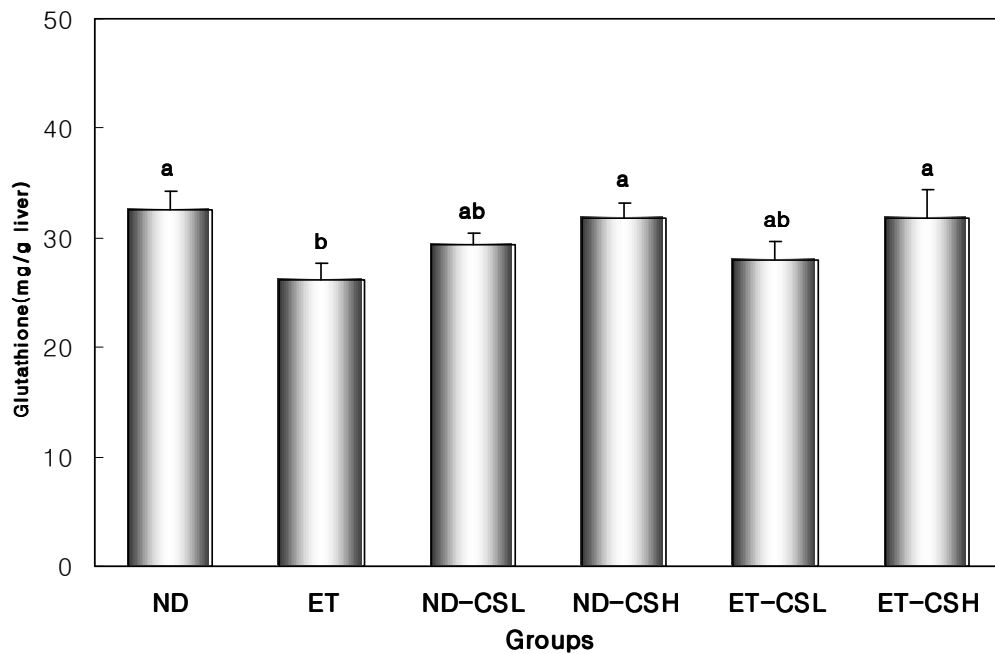


Fig. 13. Content of GSH in the liver of rats administered alcohol and/or CS ethanol extract.

Abbreviations: See the legend of Table 10.

Values are mean \pm S. E of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Tukey(T)-test.

제 4 장 요약

모과 에탄올 추출물이 체내 항산화계에 미치는 효과를 구명하기 위하여 모과의 일반 성분 분석과 모과 80% 에탄올 추출물 분획물별 항산화력을 측정 한 후, *in vitro* 와 *in vivo* 에서 항산화 능력을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 본 실험에 사용된 모과는 동결 건조한 것으로 일반성분 함량은 수분 20.57%, 조단백 16.06%, 조회분 11.03%, 및 탄수화물은 50.94%였다. Vitamin A 함량은 0.040 mg/100g, vitamin E는 0.275 mg/100g, 무기질은 K, Ca, Mg 순으로 나타났다. 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, lysine, leucine, 지방산은 palmitic acid, linoleic acid, 유기산은 malic acid, citric acid, oxalic acid, succinic acid, formic acid 순으로 검출되었다.
2. 80% ethanol로 추출하여 농축한 모과농축물의 수율은 29.33 g/100g이었으며, 이를 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol, water로 계통 분획한 수율은 water 분획물이 10.86%로 가장 높았고 그 다음으로 ethylacetate 분획물이 8.38%였다. 이 분획물을 통해 총 flavonoid와 총 polyphenol 함량을 측정한 결과 n-hexane 분획물에 가장 많이 함유된 것으로 나타났다. 따라서 *in vitro* 에서 모과 분획물별 항산화 효과를 측정하기 위해 DPPH radical에 대한 자유기 소거능, Rancimat으로 측정한 항산화지수, 지질과산화물 생성 억제에 관한 실험을 실시하였다. 그 결과 n-hexane 분획물이 가장 항산화력이 우수하였다.
3. *In vivo* 에서 모과 에탄올 추출물이 알코올 투여로 유도된 간조직 손상의 보호효과를 측정한 결과는
 - ① 4주간의 체중 증가율과 체중에 대한 간 무게 비율은 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, ET군이 다른 실험군에 비해 다소 낮은 경향이였다. 식

이효율은 ET군이 ND군에 비하여 유의하게 감소되었으나 알코올과 모과 에탄올 추출물을 단독 혹은 병합투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군은 ND군의 식이효율과 비슷한 수치를 나타내었다.

- ② 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성은 알코올 투여한 ET군이 실험군들에 비해 유의적으로 증가하였고, 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군은 ET군에 비해 농도 의존적으로 저하되었다.
- ③ 간조직의 XO, SOD, catalase 및 GSH-Px 활성은 알코올을 단독 투여한 ET군이 알코올과 모과 에탄올 추출물을 병합 투여한 ET-CSL군과 ET-CSH군에 비해 증가하였으며, 모과 에탄올 추출물 투여 용량이 증가할수록 이들 효소의 활성도 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 ET-CSL군과 ET-CSH군은 ND군과는 비슷한 활성을 나타냈다.
- ④ 간조직 중 과산화지질 함량은 ET-CSL군과 ET-CSH군이 ET군에 비해 유의적으로 감소하였지만, ND군과는 비슷한 수치를 나타내었다. 간 조직의 GSH 함량은 ET군이 ND군에 비해 유의하게 감소되었으며, 알코올 투여로 감소된 GSH 함량은 모과 에탄올 추출물 투여로 ND군에 근접하도록 증가시켰다.

이상의 결과 모과는 항산화 비타민인 vitamin E 함량이 높고, 모과 에탄올 추출물 분획물에도 항산화 물질인 polyphenol과 flavonoid 함량이 높게 나타났다. *in vitro* 연구에서 모과 에탄올 추출물 각 분획별 항산화력은 극성이 높은 n-hexane에서 가장 우수하게 관찰되었으며, *in vivo* 연구에서는 모과 에탄올 추출물은 알코올 투여로 증가된 항산화 작용을 하는 유리기 해독계 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성은 억제시키고, GSH 함량은 증가시키고 지질 과산화물 함량을 저하시켰다. 따라서 모과는 항산화제로서의 활용성과 알코올 투여로 손상된 간조직의 보호에 도움을 줄 수 있을 것이라는 가능성을 제시해 주었다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. 경제기획원 조사 통계국. 2000. 2000년 사망원인의 통계 연보.
2. Annual report on the cause of death statistics. 1996. National Statistical Office. Republic of Korea.
3. Lee OH. 2004. Effects of Supplementation of *Puerariae Radix* Ethanol Extract on the Antioxidative Defense System in Rats. *J Korean Nutr Society* 37(10): 872-880.
4. Shin SH. 2003. Effect of Dried Powders or Ethanol Extracts of Garlic Flesh and Peel on Antioxidative Capacity in 16-month-old Rats. MS Thesis. Ewha Womans University.
5. 이기열, 이양자. 1992. 고급영양학. 신광출판부. p284-285
6. Sun. Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biol Med* 8: 583-599.
7. Corl MM. 1977. Antioxidant activity of tocopherol and ascorbyl palmitate and their mode of action. *JAACS* 51: 321-325.
8. Barene AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluen. *JAACS* 52: 59-63.
9. 박종희, 이정규. 2000. 상용 약용식물도감. 신일상사. 133: 8-15
10. 難波恒雄, 原色和漢藥圖鑑(上). 1980. 保育社. 大阪. p195
11. Lee CB. 1982. Forest Economics-mokchogangmok, Korean plant map. Hyangmunsa, Seoul. p29
12. Kim YS, Lee SW, Lee KR, Kim SK, Cho SY, Lee JH. 1971. Studies on tasty constituents in various foodstuffs. Part 1. Tasty constituents of chinese quince. *Korean J Food Sci Technol* 3: 163-167
13. Chung TY, Cho DS, Song JC. 1988. Nonvolatile/volatile flavor

- components in chinese quince fruits, *Chaenomeles sinensis* koehne. *Korean J Food Sci Technol* 20: 293-302
14. Song JC, Cho EK, Park HJ. 2002. Studies on manufacture of mixed beverage drinks using chinese quince and apple. *Food Engineering Progress* 6: 38-45
 15. Lee DH, Kim JH, Kim NM, Choi JS, Lee JS. 2002. Physiological functionality of chinese quince wine and liquors. *Korean J Biotechnol Bioeng* 17: 266-270
 16. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis (16th Edition). Association of official analytical chemists. Washington, D.C.
 17. Gancedo M, Luh BS. 1986. HPLC analysis of organic acids and sugars in tomato juice. *J Food Sci* 51: 571-573
 18. Waters Associates. 1990. Analysis of amino acid in Waters. PICO. TAG system, Young-in Scientific Co. Ltd., Seoul. Korea. p41-46
 19. Wungaarden DV. 1967. Modified rapid preparation fatty acid esters from liquid for gas chromatographic analysis. *Analytical Chem* 39: 848-850
 20. KFDA. 2002. Korean Food Code (a separate volume). Munsyungsa. Seoul. Korea. p3-29
 21. 우원식. 1997. 천연물 화학 연구. 서울. 서울대학교 출판부. p14-15.
 22. Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH. 2002. Standard food analysis. Jigu-moonwha Sa. p381-382.
 23. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. CD. p8-15
 24. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragment found in the digests of a soybean protein. *J Agri Food Chem* 46: 49-53

25. Esquivel MM, Ribeiro MA, BernardoGil MG. 1999. Supercritical extraction of savory oil : study of antioxidant activity and extract characterization. *J Supercritical Fluids* 14: 129-138.
26. Ottolenghi, A. 1959. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch Biochem Biophys* 79: 355-461.
27. PG Reeves, FH Nielson, GC Fahey Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition adhoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951
28. Fujji H, Ohmachi T, Sagami I, Watanabe M. 1985. Liver microsomal drug metabolism in ethanol-treated hamsters. *Biochem Pharmacol* 34: 3881-3884.
29. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic determination and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 56-63.
30. Downey JM, Miura Y, Eddy LJ, Chambers DE, Mellert T, Hearse DJ, Yellon DM. 1987. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 19: 1053-1060.
31. Crapo JD, McCord JM, Fridovich I. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase. In *Methods Enzymol.* ed. Fleischer S and Packer L., Academic press. New York. 53: 382-393.
32. Aebi H. 1974. Catalase, in *Methods of Enzymetic Analysis*, Bergmeyer HU, Bergmeyer, J and Grabi, M., eds. 3rd ed., Verlag chemie 2: 673-684.
33. Flohe L, Wolfngng A, Gunzler WA. 1984. Assay of glutathione peroxidase. In *Methods in enzymatic analysis*. Packer L, ed., Academic Press, New

York. P14-121

34. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. Dacker L, ed., Academic Press, New York. Vol 52, p302-310.
35. Tietze F. 1969. Enzymatic methods for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 27: 502-522.
36. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
37. Ha MH, Cho SH. 2005. Physicochemical Characteristics of *Prunus mume* Extract. *J. Agriculture & Life Sciences* 39(1): 1-6
38. Lesinska E, Przybylski R, Eskin N, N. A. M. 1998. Some volatile and nonvolatile flavor components of the dwarf quince (*Chaenomeles japonica*). *J Food Sci* 53: 854-856
39. Elkin ER, Heuser JR, Chin H. 1988. Detection of adulteration in selected fruit juices. In: Adulteration of Fruit Juice Beverages, Nagy S, Attaway JA, Rhodes ME (eds). Marcel Dekker, New York, NY, USA. p317-341.
40. Lee CY, Shallenberger R, Wittum M. 1970. Free sugars in fruits and vegetables. New York food and Life Sciences Bulletin New York State Agricultural Experiment Station, Feneva, NY, USA. No.1.
41. Sharkasi T. 1979. Dilution and solids adulteration of apple juice. M.S. Thesis, Washington State University, Pullman, WA, USA.
42. Packer, L., Glazer, A.N. 1990. Oxygen radicals in biological systems. In Methods in Enzymology. *Oxygen radicals in biological systems*, Academic Press, London 186: 343.
43. Rothwell NJ, Stock MJ. 1984. Influence of alcohol and sucrose consumption

- on energy balance and brown fat activity in the rat. *Metabolism* 33: 768-771.
44. Shaw S, Lieber CS. 1983. Nutrition and alcohol. A clinical perspective, In : Weininger J. Briggs GM, eds. Nutrition Update John Wiley & Sons, New York, 1: 79-104.
 45. Lee WC, Kim AJ, Kim SY. 2000. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Sci Ind* 36: 2-14
 46. Lim SS, Kim MH, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuriense* on liver function body lipid and bile acid of hyperlipidemic rat. *J Korean Nutr Society* 30: 797-802.
 47. Ahn YT, Bae JS, Kim YH, Lim KS, Huh CS. 2005. Effects of fermented milk intake on hepatic antioxidative systems in alcohol treated rats. *Korean J Food Sci Technol* 37: 631-635.
 48. Cotran RS, Kurma V, Collin T. 1999. Cellular pathology. I In Robbins pathologic Basis of Disease. 6th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia p1-29.
 49. Yoon CG, Lee MK, Lee SL. 1998. Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl₄ treated rats. *Kor J Gernotol* 8: 35-42.
 50. Oei HH, Stroo WE, Burton KP, Schaffer SW. 1982. Xanthin oxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38: 453-461.
 51. McCord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte(hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
 52. Dolphin, D Forman, A Berg, DC Fajce J, Felton RH. 1971. Compounds I of

- catalase and horseradish peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 614.
53. Johansson LH, Borg LA. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue sample. *Anal Biochem* 174: 331-336.
 54. Park MH, Son GM, Bae MJ. 1995. Effect of platycodi radix and platycodi radix saponin on liver lipid in rats on fed high fat diet. *Korean J Food Nutr* 8: 222-229.
 55. Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
 56. Folch L, Gunzler WA. 1984. Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology*. Ed. by Loxensterin, Academic Press Inc. New York. 105: 114-126.
 57. Ko MS, Shin KM, Lee MY. 2002. Effects of *Hijikia fusiforme* ethanol extract on antioxidative enzymes in ethanol-induced hepatotoxicity of rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 87-91.
 58. Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2006. Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 182-186
 59. Harman D, Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slater TF. 1984. Free radicals and the origination evolution and present status of the free radical theory of aging. In *Free radicals in molecular biology, aging and disease*. Raven Press, New York. p27
 60. Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
 61. Lieber, 1991. C.S. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol*

Clin Exp Res 15: 573-592.

62. Vina, J Estrella, JM Guerro, C Romero, FJ. 1980. Effects of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem J* 188: 549-552.
63. Cho SY, Lee MK, Park EM, Jang JY, Kim MJ. 1997 Effect of methionine levels on brain lipid peroxidation in ethanol-treated rats of selenium deficiency. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 109-115.
64. Aykac G, Uysal M, Yalcin S, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. 1985. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicol* 36: 71-76.
65. Speisky H, Kera Y, Penttila KE, Israel Y, Lindros KO. 1988. Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 224-228.
66. Lee JS, Kim ES, Kim SW. 1999. Effects of extract of *Pueraria radix* on peroxidation in ethanol-administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 28: 901-906.
67. Oh SI, Kim CI, Chun HJ, Park SC. 1998. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* 128: 758-763.
68. Lieber CS. 1980. Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute alcohol administration. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 17-21.
69. Park PS, Lee BR, Lee MY. 1994. Effects of onion juice on ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 750-756.