

유칼리나무의 수피로부터 분리한 항산화활성 물질

이인경, 윤봉식, 김종평, 정성현¹, 심규섭¹, 유익동*

생명공학연구소 세포기능제어연구실, ¹한솔기술원 바이오육종연구실

Antioxidative Compounds isolated from the Stem Bark of *Eucalyptus globulus*

In-Kyoung Lee, Bong-Sik Yun, Jong-Pyung Kim, Sung-Hyun Chung¹,
Gyu-Seop Shim¹ and Ick-Dong Yoo*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

¹Hansol Institute of Science and Technology, San 56-1,
Sudong-Myun, Namyangju-Si 472-850, Korea

Abstract—Seven antioxidative compounds were isolated from chloroform and ethyl acetate extracts of the stem bark of *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). They were identified as rhamnazin (1), rhamnetin (2), naringenin (3), eriodictyol (4), quercetin (5), taxifolin (6) and dihydrokaempferol-3-rhamnoside (7) on the basis of various spectroscopic analyses. These compounds inhibited lipid peroxidation with IC₅₀ values of 0.08~30 µg/ml.

Key words—*Eucalyptus globulus*; Myrtaceae; stem bark; rhamnazin; rhamnetin; naringenin; eriodictyol; quercetin; taxifolin; dihydrokaempferol-3-rhamnoside; antioxidative activity.

유칼리나무(*Eucalyptus globulus*)는 Myrtaceae과에 속하는 상록 광엽수로 호주가 원산지이며, 1850년경부터 90여개의 나라에서 재배되기 시작하였다. 유칼리나무는 육성기간이 빠른 장점에 1957년 이후 종이 펄프 생산에 주로 사용되어 왔으며¹⁾ 따라서 유칼리나무의 잎, 수피, 근피등 대량으로 발생하는 부산물로부터 유용한 물질을 탐색하는 연구가 진행되어 왔다. 유칼리나무는 민간에서 천식, 기침, 감기, 치통, 열병, 설사등 다양한 약효¹⁾를 갖는 유용한 식물로 인정되어 이에 대한 성분연구가 이루어졌다. 특히 monoterpene 혹은 sesquiterpene 이 acylphloroglucinol과 축합한 구조를 갖는

euglobals,²⁾ macrocarpals³⁾ 화합물과 tannin 성분의 일종인 eucalbanins 화합물,⁴⁾ polyphenol계 화합물,⁵⁾ terpenoid계 화합물⁶⁾ 등 다수의 생리활성 물질들이 주로 잎으로부터 분리되어 보고되었다. 그러나 수피나 근피로부터의 생리활성 물질탐색 연구는 미흡하다. 본 연구에서는 한솔 기술원에서 제공받은 유칼리나무의 수피에 대하여 쥐 간 microsome의 지질과산화물을 강하게 억제하는 항산화활성 성분을 탐색하였으며 이들의 구조를 UV, NMR 등의 분광학적 방법에 의하여 규명하였다.

재료 및 방법

*교신저자 : Fax 042-860-4595

실험재료 - 호주 George tree farm에서 채취한

8년생 유칼리나무(*Eucalyptus globulus*)의 건조된 수피 6 kg을 한술 기술원으로부터 제공받아 공시 재료로 사용하였다.

기기 및 시약-UV/Vis spectrometer는 Kontron Uvicon 930을, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine 5989A mass spectrometer를 사용하였다. NMR spectrum은 Varian Unity 300 spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane을, 용매로는 $CDCl_3$ 또는 CD_3OD 를 사용하였다. Column chromatography용으로 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck Art. 7734)을, ODS resin은 YMC-gel (ODS-A, 60~230 mesh)을, Sephadex LH-20은 Pharmacia사 제품을 사용하였다. Silica gel TLC 및 역상 TLC에는 각각 Merck사의 pre-coating된 Kieselgel 60F₂₅₄(Merck Art. 5715, 5744)과 ODS(Merck Art. 15389) plate를 사용하였다. 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

추출 및 분리-음건, 세절한 유칼리나무 수피 6 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 80% 메탄올 60 L로 5일간 2회 추출한 후 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획을 실시하였다. 즉, 80% 메탄올 추출물을 감압농축하여 메탄올을 제거하고 물에 현탁된 추출 시료를 비극성용매인 *n*-hexane으로 먼저 추출하고 난 후 물층을 다시 $CHCl_3$, EtOAc, BuOH로 순차적으로 추출하였다. 각 용매추출 분획을 감압 농축하여 건조시킨후 정량적으로 항산화활성을 측정하여 activity-guide fractionation을 하였다. 각 분획중 강한 항산화활성을 나타내는 $CHCl_3$ 층과 EtOAc층을 대상으로 활성물질 분리 정제를 실시하였다. $CHCl_3$ 층을 감압건조한 조시료 7.2 g을 silica gel column 상에서 hexane-EtOAc(1:1)로부터 $CHCl_3$ -MeOH(1:1)까지 용매의 극성을 높여가며 용출시켜 활성분획 Fr. A를 얻었다. 활성분획 Fr. A를 silica gel column chromatography($CHCl_3$ -MeOH=100:1→5:1) 및 MeOH을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 column chromatography를 순차적으로 행한 후 ODS TLC(40% CH_3CN)를 실시하여 Rf 0.4의 화합물 1(1.1 mg)을 얻었다. EtOAc 층에서 얻은 조시료 71.2 g은 silica gel column 상에서 $CHCl_3$ 에서 시작하여 $CHCl_3$ -MeOH=1:1 용매까지 극성을 올리면서 용출시켜 분획하였으며,

이중 2개의 활성 분획 Fr. B-I 과 Fr. B-II를 각각 취하였다. Fr. B-I을 Sephadex LH-20 column (MeOH)을 실시하여 분획하고 이로부터 2개의 활성 분획 Fr. B-I-1과 Fr. B-I-2를 각각 얻었다. Fr. B-I-1를 silica gel TLC($CHCl_3$ -MeOH=10:1)를 행하여 Rf 0.15인 화합물 2(21 mg)와 Rf 0.27인 화합물 3(3.0 mg)을 분리하였으며, Fr. B-I-2로부터는 silica gel TLC 및 ODS TLC(70% MeOH)를 거쳐 Rf 0.65인 화합물 4(2.4 mg)를 분리하였다. Fr. B-II 분획은 silica gel column chromatography를 실시하여 3개의 활성 분획 Fr. B-II-1, Fr. B-II-2, Fr. B-II-3을 얻었다. Fr. B-II-1은 Sephadex LH-20 column, RP(ODS) column chromatography를 통하여 화합물 5(2.2 mg)를 분리하였다. Fr. B-II-2로부터는 Sephadex LH-20 column chromatography(MeOH)를 행하여 화합물 6(12.0 mg)을, Fr. B-II-3으로 부터는 Sephadex LH-20 column, ODS column chromatography(50% MeOH)를 행하여 화합물 7(52 mg)을 각각 분리하였다.

지질과산화 저해활성 측정-쥐 간 microsome은 Hogeboom 등⁷⁾의 방법으로 분리하여 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 현탁하여 사용하였다. 지질과산화 억제 활성은 Ohkawa 등의 방법⁸⁾에 따라 비효소적 방법인 Fe^{2+} /ascorbate 반응계를 이용하여 측정하였다. 마이크로솜 용액(1 mg protein/ml) 10 μ l에 MeOH에 녹인 각 농도의 시료 20 μ l, 500 μ M $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 용액 25 μ l, 100 mM Tris-HCl buffer 0.5 ml, 증류수 0.45 ml을 혼합한 후 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 3 M TCA:2.5 N HCl을 1:1로 섞은 혼합용액 0.3 ml를 가하여 반응을 중지시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상침액 1 ml를 취하였다. 이것을 0.67% TBA용액 0.3 ml와 섞은 후 100°C에서 5분간 가열한 다음 상온으로 냉각하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 지질과산화 억제 활성은 다음 식과 같이 흡광도로부터 산출하였다.

$$\text{저해율(\%)} : \frac{A - C}{A - B} \times 100$$

A: 시료 무첨가구의 흡광도

B: $FeSO_4$ 무첨가구의 흡광도

C: 시료 첨가구의 흡광도

결과 및 고찰

분리한 화합물들의 화학구조를 결정하기 위하여 CD₃OD 또는 CDCl₃를 용매로 ¹H NMR 및 ¹³C NMR spectrum을 측정하였다. 이들 data를 근거로 화합물들의 ¹H, ¹³C NMR signal들의 귀속을 밝혔으며 이를 Table I, II, III에 각각 나타내었다.

Flavonol계 화합물

화합물 1 - 화합물 1은 260, 360 nm에서 UV극대 흡수 peak를 나타내어 flavonol의 전형적인 UV pattern을 나타내었고 EI-MS 측정 결과 *m/z* 330에서 molecular ion peak를 나타내어 본 화합물의 분자량이 330임을 알 수 있었다. ¹H NMR spectrum상의 6.22 및 6.42 ppm에서 관찰된 2개

Table I. ¹H NMR spectral data for 1, 2 and 5 (300 MHz)

No.	1	2	5
6	6.22 (d, 2.1) ^a	6.17 (br. s)	6.19 (d, 1.8)
8	6.42 (d, 2.1)	6.37 (br. s)	6.39 (d, 1.8)
2'	7.71 (d, 2.4)	7.62 (br. s)	7.74 (d, 2.4)
5'	6.95 (d, 8.7)	6.90 (d, 8.1)	6.89 (d, 8.7)
6'	7.64 (dd, 8.7, 2.4)	7.53 (d, 8.1)	7.64 (dd, 8.7, 2.4)
7-OCH ₃	3.80 (s)	3.78 (s)	
5'-OCH ₃	3.95 (s)		

1 and 5 were measured in a mixture of CDCl₃ and CD₃OD and 2 in CD₃OD.

^aProton resonance multiplicity and coupling constants (Hz) are given in parenthesis.

Table II. ¹H NMR spectral data for 3 and 4 (300 MHz)

No.	3	4
2	5.32 (dd, 12.9, 3.0) ^a	5.27 (dd, 12.9, 3.0)
3a	3.08 (dd, 17.1, 12.9)	3.07 (dd, 17.1, 12.9)
3b	2.68 (dd, 17.1, 3.0)	2.71 (dd, 17.1, 3.0)
6	5.87 (d, 2.1)	5.91 (d, 2.1)
8	5.89 (d, 2.1)	5.93 (d, 2.1)
2'	7.30 (d, 8.7)	6.93 (d, 1.5)
3'	6.81 (d, 8.7)	
5'	6.81 (d, 8.7)	6.82 (d, 8.1)
6'	7.30 (d, 8.7)	6.79 (dd, 8.1, 1.5)

3 was measured in CD₃OD and 4 in a mixture of CDCl₃ and CD₃OD.

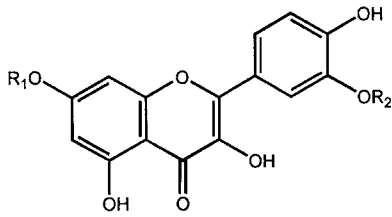
^aProton resonance multiplicity and coupling constants (Hz) are given in parenthesis.

의 aromatic methine proton은 그들의 coupling constant 및 chemical shift로부터 각각 flavonol의 6번과 8번 proton으로 추정되었다. 또한 7.71, 6.95 및 7.64 ppm의 proton들은 그들의 coupling pattern으로부터 1,2,4-trisubstituted benzene으로 사료되었다. 그 외에 3.80 및 3.95 ppm에서 두개의 aromatic methoxy proton들이 관찰되었다. 이같은 부분구조를 근거로 본 화합물은 dimethyl quercetin으로 판명되었다. Methyl기의 치환위치는 여러가지 진단시약을 첨가, UV spectrum을 측정하여 최대 흡수 peak 값의 변화를 관찰하여 결정하였다.⁹⁾ MeOH에서의 Band I은 NaOMe 첨가시 54 nm bathochromic shift하며 AlCl₃ 첨가시 48 nm bathochromic shift한 것이 HCl을 첨가했을 때는 변화하지 않는 것으로 관찰되어 5, 4' 위치에 hydroxy가 존재함을 보여주며 3' 위치에 methoxy가 존재함을 알 수 있었다. 또한 NaOAc/H₃BO₃ 첨가시 Band

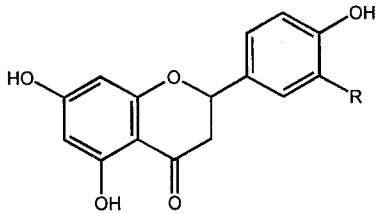
Table III. ¹H (300 MHz) and ¹³C NMR (75 MHz) spectral data for 6 and 7 in CD₃OD

No.	6		7	
	δ _H	δ _H	δ _H	δ _C
2	4.95 (d, 1.4) ^a	5.10 (d, 10.8)		83.7
3	4.52 (d, 11.4)	4.58 (d, 10.8)		78.5
4				195.8
5				164.0
6	5.93 (s)	5.89 (s)		96.2
7				168.5
8	5.98 (s)	5.91 (s)		96.2
9				102.5
10				165.5
1'				128.5
2'	7.00 (s)	7.32 (d, 8.4)		130.0
3'		6.83 (d, 8.4)		116.3
4'				159.6
5'	6.85 (d, 8.1)	6.83 (d, 8.4)		116.3
6'	6.89 (d, 8.1)	7.32 (d, 8.4)		130.0
Sugar				
1''		3.99 (d, 0.6)		102.2
2''		3.51 (dd, 3.6, 0.6)		71.8
3''		3.67 (dd, 3.6, 9.6)		72.0
4''		3.31 (t, 9.6)		73.8
5''		4.26 (dd, 9.6, 6.0)		70.4
6''		1.19 (d, 6.0)		17.5

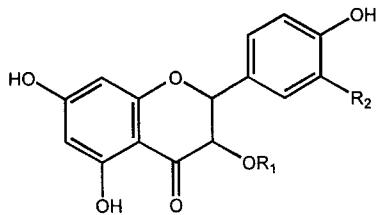
^aProton resonance multiplicity and coupling constants (Hz) are given in parenthesis.



Rhamnazin R₁=CH₃, R₂=CH₃
 Rhamnetin R₁=CH₃, R₂=H
 Quercetin R₁=H, R₂=H



Naringenin R=H
 Eriodictyol R=OH



Taxifolin R₁=H, R₂=OH
 Dihydrokaempferol-3-rhamnoside R₁=Rham, R₂=H

Fig. 1. Structures of compounds.

II의 값이 변화하지 않아 7번 위치에 methoxy가 존재함을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 본 화합물은 3,5,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxy flavonol인 rhamnazin으로 동정되었다.

화합물 2 - 화합물 2는 UV spectrum이 화합물 1과 유사하여 동일한 flavonol 계열의 화합물로 추정되었다. ¹H NMR 측정 결과 화합물 2는 화합물 1과 매우 유사하였으나 aromatic methoxy 영역에서 화합물 1에서는 2개의 methoxy peak가 관찰된 반면 본 화합물에서는 한개의 peak만이 관찰되어 methyl quercetin으로 판명되었다. EI-MS spectrum상에서 *m/z* 316의 분자 이온 peak가 관찰되어 본 화합물이 methyl quercetin임을 뒷받침하였다. Methyl기의 치환위치는 NaOMe 첨가시 46 nm의 bathochromic shift, AlCl₃ 첨가시

62 nm의 bathochromic shift 그리고 AlCl₃/HCl에서 나타나는 hypsochromic shift의 결과로 3,5,4' 위치에 hydroxy기가 존재하며 또한 NaOAc와 NaOAc/H₃BO₃에서 Band II의 UV maximum 값이 변화하지 않는 것으로 관찰되어 7번 위치에 methoxy가 존재함을 확인하였다. 따라서 본 화합물은 3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxy flavonol인 rhamnetin으로 동정되었다.

화합물 5 - 본 화합물의 UV 및 ¹H NMR spectrum이 전술한 화합물 1, 2와 유사하여 flavonol 계열의 화합물임을 알 수 있었다. EI-MS spectrum 측정 결과 *m/z* 302의 분자 이온 peak로부터 분자량이 302임을 알 수 있었으며 또한 ¹H NMR spectrum에서 methoxy signal이 관찰되지 않아 본 화합물을 quercetin으로 동정하였다.

Flavanone계 화합물

화합물 3 - 화합물 3은 300, 340(sh.) nm 부근에서 UV극대흡수피크를 나타내었으며 또한 -33°에서 선광도를 나타내어 flavanone 혹은 flavanonol 계열의 화합물임을 추정할 수 있었다. EI-MS 측정 결과 분자량이 272임을 알 수 있었으며 ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 5.32 ppm에서 산소와 결합한 methine proton이 관찰되었으며 이는 또한 coupling constant로부터 3.08 및 2.68 ppm의 methylene proton과 결합하고 있었다. 그 외에 flavonoid 화합물의 6번, 8번 proton에 기인하는 2개의 proton(5.87, 5.89 ppm) 및 7.30, 6.81 ppm에서 1,4-disubstituted benzene에 기인하는 aromatic proton들이 관찰되었다. 이들 proton NMR data를 flavanone 및 flavanonol 화합물들과 비교, 분석한 결과 본 화합물은 flavanone계열의 대표적 화합물인 naringenin으로 동정할 수 있었다.

화합물 4 - 화합물 4는 UV 및 ¹H NMR spectrum이 화합물 3과 유사하여 flavanone계 화합물로 추정되었다. EI-MS의 분자 이온 피크(*m/z* 288)로부터 본 화합물의 분자량이 288임을 알 수 있었으며 또한 선광도를 측정한 결과 -66°로 나타났다. ¹H NMR spectrum을 해석한 결과 B ring으로부터 기인하는 6.79, 6.82, 6.93 ppm의 proton들이 1,2,4-trisubstituted benzene을 구성하여 본 화합물은 flavanone계열의 화합물인 eriodictyol로

동정할 수 있었다.

Flavanonol계 화합물

화합물 6 - 화합물 6은 290, 335(sh.) nm 부근에서 UV극대흡수 peak를 나타내어 flavanone 혹은 flavanonol 계열의 화합물로 추정되었다. EI-MS 측정 결과 분자량이 304임을 알 수 있었다. 화합물 6의 ^1H NMR spectrum을 해석한 결과 4.95, 4.52 ppm에서 산소와 결합한 2개의 methine proton이 관찰되었으며 이들은 coupling pattern 으로부터 상호간 결합하고 있음을 알 수 있었다. 또한 5.93 및 5.98 ppm에서 flavonoid 화합물의 6번, 8번 proton에 기인하는 2개의 proton이 관찰되었으며 그 외에 6.89, 6.85, 7.00 ppm에서 1,2,4-trisubstituted benzene에 기인하는 aromatic proton들이 관찰되었다. 이들 proton NMR data를 flavanonol 화합물들과 비교, 분석한 결과 본 화합물을 taxifolin으로 동정할 수 있었다. 본 화합물의 선광도는 $+118^\circ$ 이었다.

화합물 7 - 화합물 7의 UV 및 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석한 결과 화합물 6과 매우 유사함을 알 수 있었으며 또한 -20° 에서 선광도를 나타내어 본 화합물 또한 flavanonol계 화합물임을 추정할 수 있었다. ^1H NMR spectrum을 해석한 결과 7.32, 6.83 ppm에서 1,4-disubstituted benzene에 기인하는 aromatic proton들이 관찰되었고 또한 5.89 및 5.91 ppm에서 각각 flavonoid 화합물의 8번과 9번에 기인하는 proton들이 관찰되었다. 그 외에 5.10, 4.58, 3.51, 3.67, 3.31, 4.26 ppm에서 산소와 결합한 proton들이 관찰되었으며 3.99 ppm에서 당의 anomeric proton 및 1.19 ppm에서 methyl proton이 관찰되었다. 당은 ^1H coupling pattern 으로부터 α -rhamnose임을 알 수 있었다. HMBC data의 해석에 의하여 ^{13}C signal들을 귀속한 결과 78.5, 83.7 ppm에서 산소와 결합한 2개의 methine 탄소, 130.3, 116.3, 96.2 (2개) ppm에서 sp^2 methine 탄소, 195.8, 168.5, 164.0, 165.5, 159.6, 128.5, 102.5 ppm에서 sp^2 사급탄소가 관찰되었다. 그 외에 102.2 ppm에서

anomeric 탄소 및 73.8, 72.0, 71.8, 70.4, 17.5 ppm에서 rhamnose의 2번에서 6번 탄소에 기인하는 signal들이 관찰되었다. 또한 3.99 ppm의 anomeric proton 으로부터 flavanonol의 3번 탄소에 long-range coupling이 관찰되어 3번 탄소에 당이 결합하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 ^1H , ^{13}C 및 HMBC data를 이용하여 화학 구조를 해석한 결과 본 화합물은 flavanonol 계열의 화합물인 dihydrokaempferol 3-rhamnoside로 동정되었다.

항산화활성 - 분리 정제된 모든 화합물들에 대한 지질과산화 억제 활성을 천연 항산화제인 vitamin E와 합성 항산화제인 *tert*-butylhydroxy anisol (BHA) 및 probucol과 비교하여 측정하였으며 그 값을 50% 억제 하는 화합물 농도인 IC_{50} 으로 나타내었다(Table IV). 양성 대조구로 사용한 항산화제들과 비교하였을 때 taxifolin (6)은 BHA와는 비슷하고 vit. E와 probucol에 비하여는 훨씬 강한 지질과산화 억제 활성을 나타내었다. Quercetin계 화합물인 rhamnazin (1), rhamnetin (2), quercetin (5) 등은 vit. E나 probucol 보다 3~10배 정도 강한 활성을 나타내었다. Flavonoid 배당체인 dihydrokaempferol-3-rhamnoside (7)는 3.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 IC_{50} 값을 나타내어 vitamin E 보다는 약하지만 비교적 높은 지질과산화 억제 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 *Eucalyptus globulus* 수피 중의 항산화 활성 주성분은 이들 flavonoid 계열의 화합물들임을 알 수 있었다.

결 론

유칼리나무(*Eucalyptus globulus*) 수피의 80% MeOH추출물을 CHCl_3 및 EtOAc로 추출하여 이로부터 7종의 화합물(1~7)을 분리, 정제한 후 UV, MS, NMR 등의 물리화학적 특성조사 및 분광학적 분석을 통하여 그 구조를 규명하였다. 그 결과 이들은 flavonoid 화합물로서 각각 rhamnazin (1), rhamnetin (2), naringenin (3), eriodictyol

Table IV. Antioxidative activity (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{ml}$) of compounds 1~7

1	2	3	4	5	6	7	vit. E	BHA	Probucol
0.3	0.1	>30	0.6	0.3	0.08	3.3	1.0	0.05	0.8

(4), quercetin (5), taxifolin (6), dihydrokaempferol-3-rhamnoside (7)로 동정되었다. 각 화합물들의 쥐 간 microsome에 대한 지질과산화 억제 활성은 0.08~30 µg/ml로 높게 나타났으며, taxifolin은 vitamin E 보다 월등히 높은 항산화 활성을 나타내었다.

인용문헌

- Ghisalberti, E. L. (1996) Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. *Phytochemistry* 41:7-22.
- Takasaki, M., Konoshima, T., Kozuka, M. and Tokuda, H. (1995) Anti-tumor-promoting activities of euglobins from *Eucalyptus* plants. *Biol. Pharm. Bull.* 18:435-438.
- Yosida T., Maruyama T., Nitta A. and Okuda T. (1992) Eucalbanine A, B and C, monomeric and dimeric hydrolyzable tannins from *Eucalyptus alba*. *Chem. Pharm. Bull.* 40(7):1750-1754.
- Nishizawa, M., Emura, M., Kan, Y., Yamada, H., Ogawa, K. and Hamanaka, N. (1992) Macrocyclic terpenoids from *Eucalyptus globulus*: HIV-RTase inhibitors of *Eucalyptus globulus*. *Tetrahedron Lett.* 21:2983-2986.
- Hillis, W. E. and Yazaki, Y. (1973) Wood polyphenols of *Eucalyptus polyanthemos*. *Phytochemistry* 12:2969-2977.
- Santos, G. G., Alves, J. C. N., Rodilla, J. M. L., Duarte, A. P., Lithgow, A. M. and Urones, J. G. (1997) Terpenoids and other constituents of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry* 44:1309-1312.
- Hogeboom, G. H. (1965) General methods for the isolation of liver cell compounds: Fraction of cell components of animal tissue. *Methods of Enzymol.* 1:16-19.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-358.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Springer, New York.

(1998년 5월 25일 접수)