

흑연전극을 사용한 전압전류법을 이용하여 스킨로션 중 루틴성분의 정량분석

강 명 규 · 원 보 령 · 이 동 국 · 이 수 영 · 박 수 남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2009년 12월 5일 접수, 2009년 12월 11일 수정, 2009년 12월 13일 채택)

Quantitative Analysis of Skin Lotion Containing Rutin by Voltammetric Method Using Graphite Electrode

Myung Kyu Kang, Bo Ryoung Won, Dong-Kuk Lee, Suw Young Ly, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology,
172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received December 5, 2009; Revised December 11, 2009; Accepted December 13, 2009)

요약: 스킨로션에 함유된 루틴을 정량하기 위하여 사각파형 전압전류법에서 흑연을 작업 전극으로 사용하여 연구하였다. 루틴을 정량하기 위한 최적 분석 조건을 찾았고 이 조건에서 1.00 ~ 8.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에 대한 루틴의 검량선을 나타내었다. 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 루틴 농도에서 15번 반복 측정한 상대 표준편차는 0.08이었으며, 최소 분석 검출 한계는 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 이 결과들을 바탕으로 화장품에 함유되어 있는 활성성분을 정량하는데 사용가능한 것으로 사료된다.

Abstract: We studied square-wave stripping voltammetry (SWV) to analyze quantitatively rutin contained in transparent skin-lotion using graphite electrode. The optimum analytical conditions for quantitative analysis of rutin were determined and the linear range was obtained of 1 ~ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The relative standard deviation of fifteen times repetition measurement for 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of rutin was 0.080 and the detection limit was 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. We considered that this study could be used for quantitative analysis of active components contained in cosmetics.

Keywords: graphite, cosmetic, rutin, square-wave voltammetry, quantitative analysis

1. 서 론

플라보노이드는 Figure 1의 구조를 바탕으로 하는 폴리페놀 화합물의 한 유형으로 과일, 야채와 같은 식물에 널리 분포하고 있는 물질이다. 자연적으로 생성되는 항산화제인 플라보노이드는 대부분 약학적 활성과 항노화 성질, 특히 미백과 주름개선에 매우 우수한 효능이 있기 때문에 지난 10년 이상 동안 많은 관심을 받았다[1]. 이러한 플라보노이드의 산화/환원 능력을 평가하기 위한 많은 방법들이 개발되었다[2-5]. 플라보노이드의 효과를 평가하기 위한 대부분의 방법들은 산소의 일반적인 변형

에 의해 인체에 발생될 수 있는 산화철을 포함하는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS), free radicals 그리고 유/무기 사이의 과산화 등을 기초로 한다. 그러나 산소의 변형에 의해 유발되는 것들에 대한 실험 외에도 사각파형 전압전류법(square-wave voltammetry, SWV)과 순환 전압전류법(cyclic voltammetry, CV)에 의해 플라보노이드와 그 배당체 추출물의 전기화학적 특성을 연구하는 것 또한 가장 널리 사용되는 기술 중의 하나이다 [6-12]. 전기화학적 전압전류 검출 시스템은 대응 전극(counter electrode)과 작업 전극(working electrode) 사이에 공급되는 전압에 따른 전류의 변화를 측정하여 분석 시료에 대한 정보를 얻어내는 전기화학적 분석 방법의 일종으로 오랫동안 유효한 이온과 그 종들의 분석을

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

위한 강력한 기술로 인식되었다. 더욱이 저가의 장비와 빠른 반응을 유도하기 때문에 용이하고 정확성과 재현성이 뛰어나 분석화학의 거의 모든 분야에 폭넓게 응용이 가능하다[13-15]. 이러한 응용은 물분석(폐수, 음용수 등), 도금, 식품, 제약 등에서 자리를 잡아가고 있다. 특히 사각파형 전압전류법은 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 혹은 그 이하의 농도까지 유독 중금속을 분석함으로써 극미량 분석에 효과적인 방법으로 증명되고 있다. 이 방법은 X-ray fluorescence, emission spectroscopy 등 보다 감도가 좋은 것으로 나타나고 있으며 미량의 유기성분 및 nitrate, nitrite, cyanide, sulfide, chloride 등의 음이온 측정에도 유용하게 이용되고 있다[16-20].

운향과 식물인 *Ruta graveolens*에서 처음으로 발견된 루틴[21]은 아스파라거스, 감귤류 과일의 껍질 등의 식물에서 발견되는 감귤류 플라보노이드 배당체로 Rutoside, quercetin-3-rutinoside 그리고 sophorin이라고도 불린다. 루틴은 혈관 보호를 위한 약물로 사용되고 수많은 종합비타민 제조와 식물성 치료약의 성분이다. 이처럼 다양하게 사용되는 루틴은 혈소판의 뭉침을 막고 혈액을 묽게 하여 체내의 혈액순환을 향상시키고 항산화, 항염증 효능 및 알데히드기를 가지고 있는 환원효소의 활성을 저해한다[22-26].

본 연구에서는 루틴을 흑연 전극을 사용하여 검출할 수 있는 최적조건을 찾고 루틴의 함량 차이가 있는 스킨로션을 제조하여 사각파형 전압전류법에 의해 루틴을 정량 분석했다. 이 결과들을 통하여 이미 알고 있는 루틴의 효능이 화장품에서는 얼마만큼의 효능을 나타내는지 간접적으로 확인하고자 한다. 또한 화장품 분야에서도 전압전류법 응용의 가능성 여부를 확인하는데 중점을 두었으며, 본 연구를 통하여 화장품 특정 성분의 정량분석에 응용이 가능할 것으로 사료된다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

이 연구에서 사용된 전압전류 시스템은 전기화학적 장치(VAC-2, D Tron Co. Ltd., Korea)를 이용하여 전극으로 사용된 흑연(DongA Pencil Co. Ltd., Korea)을 사용하여 실험하였다. 전해질로 사용한 인산암모늄은 Sigma (USA) 제품으로 0.1 M로 제조하여 사용하였고, 스킨로션의 제조에 사용한 부틸렌 글리콜(1,3-butylene glycol, 1,3-BG), 시트르산(citric acid), EDTA-2Na, Na-citrate는 풀무원 건강생활(Pulmuone Health & Living Co.

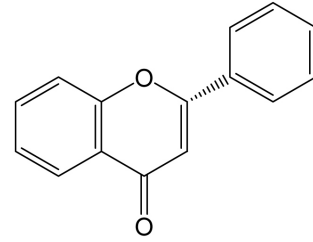


Figure 1. Typical flavonoid structure.

Ltd., Korea)로부터 공급받았으며, 계면활성제로 사용한 POE (40) hydrogenated castor oil (HCO-40)은 Nikkol (Japan)에서 구입하였다. 루틴(rutin, quercetin-3-rutinoside)은 Sigma (USA)로부터, 에탄올(EtOH)은 Aldrich (USA)로부터 구입하였다.

모든 시약은 시판 특급 시약을 사용하였으며 정제 없이 구입한 그대로 사용하였다. 실험에서 사용된 물은 Millipore Q (Millipore Co., USA)를 이용하여 18.3 $\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$ 로 통과시킨 정제수(DW)를 사용하였다.

2.2. 실험방법

실험을 시작하기 전에, 루틴은 50 % 에탄올을 사용하여 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 제조하고 사각파형 전압전류법(square wave voltammetry, SWV)을 이용하여 진폭(amplitude), 진동수(frequency), 전압의 시작(initial E) 및 증가량(increment E) 그리고 석출시간(deposition time) 등에 변화를 주어 루틴의 전류가 최대로 검출되는 최적조건을 찾았다. 최적조건 확인 후, 루틴의 농도 증가에 따른 SWV를 측정하여 각 농도에서 피크의 높이를 계산하여 루틴의 농도에 따라 검출되는 전류에 관한 검량선을 작성하였다. 그리고 같은 조건 하에서 루틴의 전류가 검출되는 최소 농도범위를 확인하였다.

실험과정은 0.1 M 인산암모늄 용액 10 mL와 교반막대를 바이알에 넣고 3개의 전극으로는 흑연을 장치했다. 그리고 확인된 최적조건을 유지시킨 후, 루틴의 농도를 증가시키면서 전류를 측정하였고 루틴의 전류가 검출되는 최소 농도범위는 50 % 루틴 용액을 1/10로 희석시키면서 피크가 검출되지 않은 농도까지 측정하였다.

2.3. 응용 실험

2.3.1. 스킨로션 제조

투명 스킨 제조에 사용된 구성성분과 조성을 Table 1에 나타내었다. 먼저, 증류수(DW), 부틸렌 글리콜(1,3-butylene glycol), 시트르산(citric acid), EDTA-2Na,

Table 1. Components and Formulations of Transparent Skins by Rutin Concentrations

Component	Content (w/w%)				
	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form.5
Distilled water (DW)	84.309	84.305	84.300	84.295	84.290
1,3-Butylene glycol (1,3-BG)	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
Citric acid	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
EDTA-2Na	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040
Na-citrate	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030
에탄올	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000
HCO-40	0.600	0.600	0.600	0.600	0.600
50 % 에탄올	6.000	6.000	6.000	6.000	6.000
Rutin	0.001	0.005	0.010	0.015	0.020

Na-citrate 등을 비커에 넣는다(Component 1, C-1). 그리고 계면활성제인 POE (40) hydrogenated castor oil (HCO-40)과 에탄올을 바이알에 넣고 마개를 닫는다(Component 2, C-2). 루틴을 용해시킬 용매로 50 % 에탄올(5 ± 1 mg/mL)로 루틴 농도를 설정하고(Component 3, C-3)[27], 준비된 모든 성분들은 40 °C에서 균일하게 용해시키고 C-1을 균질기(X1030D, Ingenieurbüro CAT M Zipperer GmbH, Germany)를 이용하여 9,000 rpm으로 균일하게 섞어준 후, C-2와 C-3를 혼합시킨 성분들을 C-1에 첨가하여 3 min 동안 3,000 rpm으로 균질기를 유지시켰다.

모든 실험은 23 ± 1 °C에서 수행하였으며 제조된 모든 샘플은 동일한 온도에서 보관하였다. 본 연구에서 사용되는 모든 % 단위는 w/w%이다.

2.3.2. 스킨로션에 함유된 루틴의 사각파형 전압전류법에 의한 정량

루틴의 농도가 다른 5가지 스킨로션 제조 후, 앞에서와 동일한 방법으로 0.1 M 인산암모늄 용액 10 mL와 교반 막대를 바이알에 넣고 준비한다. 전극으로는 동일하게 흑연전극을 사용하였으며 루틴의 전류가 최대로 검출되는 최적조건으로 맞추어 놓았다. 먼저 루틴 0.001 % 함유하는 스킨로션을 0.1 mL 넣고 SWV를 측정하였고 순차적으로 높은 농도의 스킨로션을 측정하였다. 이때 다른 농도의 루틴을 함유하는 스킨로션의 SWV 측정 시에는 새로운 바이알에서 측정하였고 흑연전극 또한 교체하여 사용하였다.

2.4. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수

준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 루틴을 검출하기 위한 최적조건 확인

본 연구에서는 사각파형 전압전류법(square wave voltammetry, SWV)을 이용하여 루틴의 전류가 최대로 검출되는 최적조건을 찾기 위해서 진폭(amplitude), 진동수(frequency), 전압의 시작(initial E) 및 증가량(increment E) 그리고 석출시간(deposition time) 등에 변화를 주어 각 조건에서 루틴의 전류가 최대로 검출되는 부분을 확인하였다(Figure 2). 진폭은 0.01 ~ 10 V (Figure 2(A)), 진동수는 5 ~ 40 Hz (Figure 2(B)), 전압의 시작점은 -1.3 ~ -0.5 V (Figure 2(C)), 전압의 증가량은 0.005 ~ 0.040 V (Figure 2(D)) 그리고 산란시간은 150 ~ 1350 s (Figure 2(E))로 변화를 주었고 각각 0.09 V, 35 Hz, -0.6 V, 0.01 V, 1200 s에서 루틴의 전류가 최대로 검출되었다.

3.2. 검량선 작성 및 검출한계 측정

루틴의 전류가 최대로 검출되는 최적조건을 일정하게 유지시키고 루틴의 농도를 0 ~ 8 µg/mL로 1 µg/mL씩 증가시키면서 SWV를 측정하였다(Figure 3(A)). SWV 측정 결과, 육안으로도 확인할 수 있듯이 루틴의 농도가 증가할수록 피크가 더 높아짐을 확인할 수 있었고 더 확실한 결과를 나타내기 위하여 피크의 높이를 측정하였고 이를 통해서 검량선을 작성하였다(Figure 3(B)). 측정된 루틴은 거의 직선상에서 나타남을 확인할 수 있었고, 검량선의 y절편도 거의 0에 가까워서 SWV의 측정에 신뢰성이 있음을 보여준다.

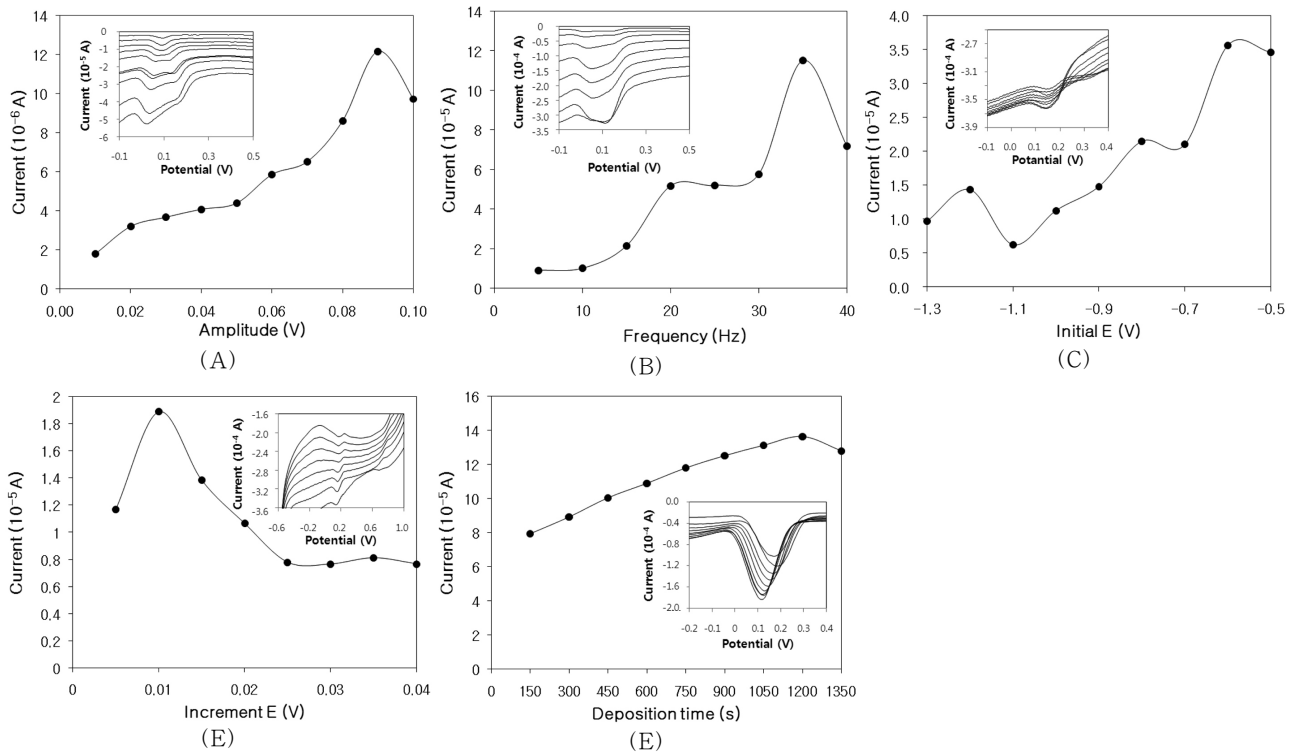


Figure 2. Measurement of SWV on respective factors to confirm optimum conditions that the current of rutin was detected by graphite electrodes (concentration of rutin solution = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (A) Amplitude: 0.01 ~ 0.10 V (increment by 0.01 V), (B) frequency: 5 ~ 40 Hz (increment by 5 Hz), (C) initial E: -1.3 ~ -0.5 V (increment by 0.1 V), (D) increment E: 0.005 ~ 0.040 V (increment by 0.005 V), (E) deposition time: 150 ~ 1350 s (increment by 150 s).

또한 흑연을 전극으로 사용하여 루틴의 검출한계를 확인하기 위하여 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 측정을 하였다. Figure 3(C)는 루틴의 농도를 0 ~ 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 증가시키면서 SWV를 측정하였다. 이때 측정된 피크들은 Figure 3(B) 검량선의 직선식에 대하여 미세한 차이를 보이나 거의 일치함을 확인할 수 있었다. 그러나 루틴의 농도를 희석하여 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 증가시켜서 측정하였을 경우에는 피크의 높이를 측정할 수 없었다. 이 결과로부터 흑연 전극을 사용하여 SWV를 측정하였을 경우, 루틴의 전류에 대한 검출한계 농도는 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 임을 확인할 수 있었다.

3.3. 스킨로션에 함유된 루틴의 정량

Table 1과 같이 루틴의 함량에 차이를 두고 5종류의 스킨로션을 제조하였고 각각의 스킨로션의 SWV를 측정하여 루틴의 전류를 확인하였다. 이 결과들은 Table 2에서 확인할 수 있듯이 루틴의 함량이 0.001 %에서 0.020 %로 증가할수록 루틴의 전류가 일정하게 증가함

을 나타낸다. 그리고 제조된 스킨로션에 함유된 루틴을 정량하기 위하여 측정된 루틴의 전류값을 Figure 3(B)의 검량선 직선식에 대입하여 각각의 스킨로션에 함유된 루틴의 농도를 구하였다. 이때 스킨로션에 함유된 루틴의 농도는 예상했던 농도보다 약 2.5배 정도 더 큰 농도로 나타났다(Table 2, Figure 4).

4. 결 론

물에 대한 용해도가 매우 낮지만 혈관 보호 및 항산화, 항염증 효능을 가지는 루틴은 화장품에 널리 사용되고 있는 물질로 효능의 간접적인 평가 및 정량을 하기 위한 유효성분으로 선택하였다. 효능의 평가 및 정량을 하기 위한 방법에는 여러 가지 방법들이 있지만 그 중에서 저가의 장비와 빠른 반응을 유도하여 정확성과 재현성이 뛰어나 분석화학의 거의 모든 분야에 폭넓게 응용이 되고 있는 전압전류법(voltammetry)을 사용하였다. 특히 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 극미량 분석에서도 효과적인 사각과

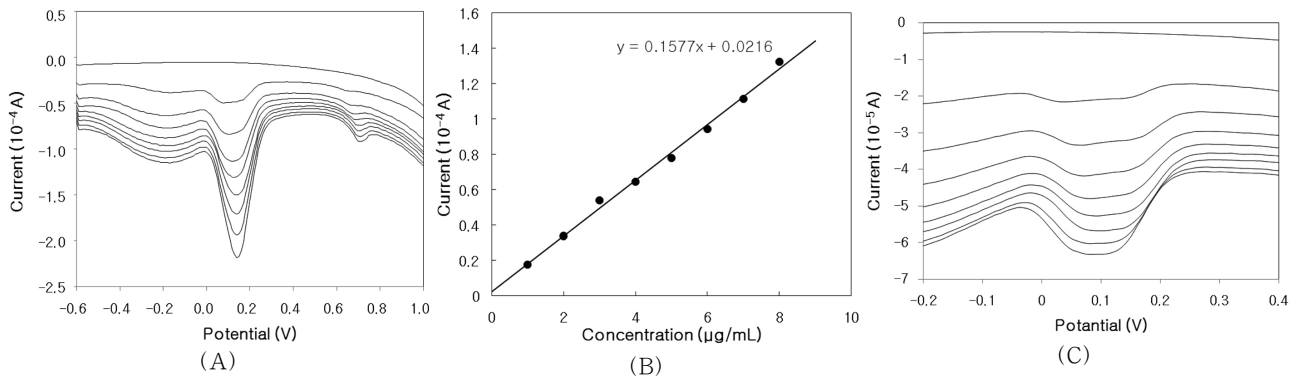


Figure 3. Measurement of SWV through increment of rutin concentration, (A) Rutin concentration: 0 ~ 8 µg/mL (increment by 1 µg/mL), (B) metage line both concentration of rutin and current-detecting, (C) detection limit of rutin (rutin concentration: 0.01 ~ 0.08 µg/mL).

Table 2. Measurement of SWV on Skin-lotion Containing Rutin and Comparison with Expectation and Experiment Concentrations

Rutin content (in emulsion, %)	Current (10 ⁻⁵ A)	Concentration (µg/mL)	
		Expectation	Experiment
0.001	0.4203	1	2.53
0.005	2.3140	5	14.54
0.010	4.1280	10	26.04
0.015	6.5050	15	41.09
0.020	8.0040	20	50.62

형 전압전류법(square wave voltammetry, SWV)은 감도가 우수하며 유기성분 및 음이온 측정에도 유용하기에 선택하였다.

먼저 전극으로 흑연 전극을 사용하여 루틴을 검출할 수 있는 최적조건이 진폭(amplitude)은 0.09 V, 진동수(frequency)는 35 Hz, 전압의 시작점(initial E)은 -0.6 V, 전압의 증가량(increment E)은 0.01 V 그리고 산란 시간(deposition time)은 1200 s임을 확인하였다. 루틴을 검출할 수 있는 최적조건들은 뒤이어 행해진 모든 실험에서 모두 적용되었다. 루틴의 농도를 0 ~ 8 µg/mL로 1 µg/mL씩 증가시키면서 SWV를 측정하였고 측정된 결과들의 검량선을 작성하였다. 이 검량선의 직선식은 루틴을 정량할 때의 지표로 사용하였다. 루틴의 함량이 0.001 ~ 0.020 %인 스킨로션 5종류를 제조하였고 제조된 스킨로션의 SWV를 측정하였다. 이 결과들은 검량선의 직선식을 참고하여 농도를 계산하였고 예상농도와 비교를 하였고 실험농도가 예상농도보다 약 2.5배 정도 더 크게 나타남을 확인하였다. 이것은 스킨로션의 입자크기

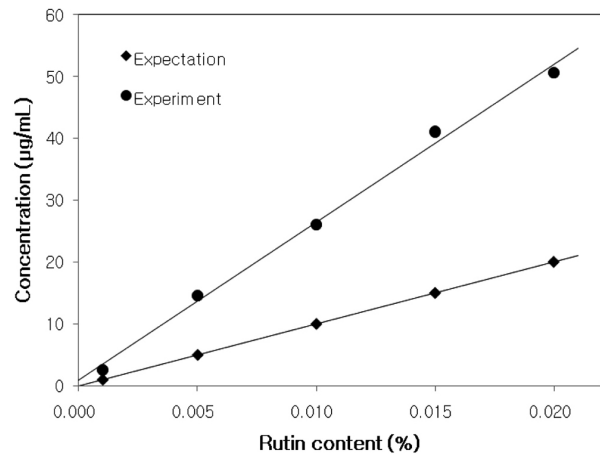


Figure 4. Confirmation of rutin concentration through quantitative analysis of skin-lotion containing rutin.

가 50 % 에탄올에 녹였을 때보다 작고 넓은 표면적을 갖음으로써 더 큰 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

이 연구를 통해서 사각파형 전압전류법(square wave voltammetry, SWV) 시스템의 화장품의 간접적인 효능 평가 및 유효성분 정량의 가능성을 보았고, 기존에 많이 사용하고 있는 백금, 수은, 나노튜브, DNA 등과 같은 전극을 이용한 실험 뿐만 아니라 동물을 이용한 *ex vivo* 실험을 통하여 제조된 화장품의 효능을 더 정확하게 측정할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Remesy, and L. M. J. Jimenez, Dietary polyphenols and the

- prevention of diseases, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 287 (2005).
2. L. M. Magalhães, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. F. C. Lima, Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chim. Acta*, **613**, 1 (2008).
 3. S. Milardović, D. Iveković, and B. S. Grabarić, A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical, *Bioelectrochemistry*, **68**, 175 (2006).
 4. L. Barros, S. Falcão, P. Baptista, C. Freire, M. Vilas-Boas, and I. C. F. R. Ferreira, Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays, *Food Chem.*, **111**, 61 (2008).
 5. J. Wang, N. Zhou, Z. Zhu, J. Huang, and G. Li, Detection of flavonoids and assay for their antioxidant activity based on enlargement of gold nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 1199 (2007).
 6. M. S. Cosio, S. Buratti, S. Mannino, and S. Benedetti, Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herbs extracts from the *Labiata* family, *Food Chem.*, **97**, 725 (2006).
 7. S. Chevion, M.A. Roberts, and M. Chevion, The use of cyclic voltammetry for evaluation of antioxidant capacity, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 860 (2000).
 8. H. Hotta, H. Sakamoto, S. Nagano, T. Osakai, and Y. Tsujino, Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1526**, 159 (2001).
 9. E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov, and A. V. Shevchuk, Study of antioxidant properties by voltammetry, *J. Electroanal. Chem.*, **518**, 56 (2002).
 10. P. A. Kilmartin and C. F. Hsu, Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry, *Food Chem.*, **82**, 501 (2003).
 11. W. R. Sousa, C. Rocha, C. L. Cardoso, D. H. S. Silva, and M. V. B. Zanoni, Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods, *J. Food Comp. Anal.*, **17**(5), 619 (2004).
 12. M. D. S. Raymundo, M. M. D. S. Paula, C. Franco, and R. Fett, Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques, *LWT-Food Science and Technology*, **40**(7), 1133 (2007).
 13. B. Nigovic and N. Kujundzic, Electrochemical behavior of iron (III) complexes with aminohydroxamic acids, *Polyhedron*, **21**(16), 1661 (2002).
 14. P. L. Buldini, S. Cavalli, A. Mevoli, and J. L. Sharma, Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey, *Food Chem.*, **73**(4), 487 (2001).
 15. S. M. Chen, Preparation, characterization, and electrocatalytic oxidation properties of iron, cobalt, nickel, and indium hexacyanoferrate, *J. Electroanal. Chem.*, **521**(1-2), 29 (2002).
 16. J. J. O'Dea, J. Osteryoung, and R. A. Osteryoung, Theory of square wave voltammetry for kinetic systems, *Anal. Chem.*, **53**(4), 695 (1981).
 17. J. Wang, S. Bollo, J. L. L. Paz, E. Sahlin, and B. Mukherjee, Ultratrace measurements of nucleic acids by baseline-corrected adsorptive stripping square-wave voltammetry, *Anal. Chem.*, **71**, 1910 (1999).
 18. L. Codognoto, S. A. S. Machado, and L. A. Avaca, Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations, *Diamond and Related Materials*, **11**, 1670 (2002).
 19. M. P. A. Carracedo, R. A. G. Carra, and A. S. Misiego, A voltammetric and potentiometric study of copper in animal cerebrospinal fluids, *Electroanalysis*, **14**, 433 (2002).
 20. S. Michalkiewics, M. Tutaj, M. Kaczor, and J. Malyszko, Electrochemical behavior of tocopherols on microelectrodes in acetic acid medium, *Electroanalysis*, **14**, 297 (2002).
 21. A. Weiss, Uebar das rutin, *Pharm. Zentralblatt*, **13**, 903 (1842).
 22. J. Q. Griffith, J. F. Couch, and M. A. Lindauer, Effect of rutin on increased capillary fragility in man, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **55**, 228 (1944).
 23. K. Iwata, S. Miwa, T. Inayama, H. Sasaki, K. Soeda, and T. Sugahara, Effects of kangra buckwheat on spontaneously hypertensive rats, *The*

- Journal of Kagawa Nutrition College*, **21**, 55 (1990).
24. Y. Matsubara, H. Kumamoto, Y. Iizuka, T. Murakami, K. Okamoto, H. Miyake, and K. Yokoi, Structure and hypotensive effect of flavonoid glucosides in *Citrus unshiupeelings*, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 909 (1985).
 25. N. Yildizogle-Ari, V. M. Altan, O. Altinkurt, and Y. Ozturk, Pharmacological effects of rutin, *Phytotherapy Research*, **5**, 19 (1991).
 26. I. B. Afanas'ev, E. A. Ostrakhovitch, E. V. Mikhal'chik, G. A. Ibragimova, and L. G. Korkina, Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals, *Biochemical Pharmacology*, **61**, 677 (2001).
 27. S. Nicoli, G. Dall'Asta, P. Colombo, and P. Santi, Transdermal delivery of rutin, 30th Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Master, Glasgow, **27** (2003).