

## 갈근 및 녹차추출물의 아질산염 소거작용 및 간독성 보호효과

윤이란 · 최유정 · 허정호 · 최철웅<sup>1</sup> · 성태종<sup>1</sup> · 김윤근<sup>2</sup> · 김종수<sup>3\*</sup>

경상남도축산진흥연구소, <sup>1</sup>한국국제대학교, <sup>2</sup>산청군농업기술센터, <sup>3</sup>경상대학교 수의과대학

(접수 2010. 4. 8, 게재승인 2010. 9. 16)

### Nitrite scavenging activity and protective effect of the *Puerariae Radix* and green tea extract on lead acetate and cadmium-induced liver damage in mice

I-Ran Yun, You-Jeong Choi, Jung-Ho Heo, Chul-Yung Choi<sup>1</sup>,  
Tae-Jong Seoung<sup>1</sup>, Yun-Geun Kim<sup>2</sup>, Jong-Shu Kim<sup>3\*</sup>

Gyeongam Livestock Promotion Research Institute, Jinju 660-985, Korea

<sup>1</sup>International of Korea University, Jinju 660-759, Korea

<sup>2</sup>Sancheong-gun Agricultural technology center, 666-805, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, and institute of animal Science,  
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received 8 April 2010, accepted in revised from 16 September 2010)

#### Abstract

This study was designed to evaluate the nitrite scavenging activity and protective effect of the *Puerariae Radix* and green tea extract on lead acetate and cadmium-induced liver damage in mice. The quantitative analytical method for major antioxidants, isoflavones, puerarin, catechine and caffeine in galgun (*Puerariae Radix*) and green tea extract were established by HPLC. Contents of isoflavones, such as daidzin, genistin, daidzein and genistein were 4.23g/100g, 0.13g/100g, 0.07g/100g, and 0.03g/100g, and puerarin contents was 8.99g/100g, respectively. The total catechins and caffeine contents of green tea extract were 49.24g/100g and 6.53g/100g. The nitrite scavenging ability of galgun extract (pH 1.2, 100mg/ml) was 98.07% and it was higher than those of other extracts. It was the highest at the pH 1.2 and more than 64% in 25~100mg green tea extract, and was dependent on pH and concentration of the samples. The hepatoprotective effects of an aqueous extract from the root of galgun and standard puerarin were evaluated against lead acetate and cadmium-induced liver damage in mice. Galgun extract and standard at a dose of 100mg/kg and 10mg/kg, 50mg/kg were administered orally once daily for successive 5 days and then a lead acetate and cadmium were orally at 3 hrs after the every day administration of galgun. The substantially elevated serum enzymatic activities of alanine and aspartate aminotransferase were due to lead acetate and cadmium treatment was dose dependently restored to the near normal level. In addition, galgun extract also significantly prevented the elevation of hepatic malon-dialdehyde formation in the liver of lead acetate and cadmium intoxicated mice in a dose-dependent manner. The results of this study clearly indicated that

\*Corresponding author: Jong-Shu Kim, Tel. +82-55-751-5821,  
Fax. +82-55-751-5803, E-mail. jskim@gnu.ac.kr

green tea and galgun extracts had nitrite scavenging ability and galgun extract had potent hepato-protective effects against lead acetate and cadmium-induced hepatic damage in mice and standard puerarin was also showed similar to the results of the galgun extracts.

**Key words :** *Puerariae Radix*, Catechins, Lead, Cadmium, Isoflavones, Puerarin, Nitrite scavenging effect

## 서 론

아질산염은 식육가공품 제조시 풍미 향상과 육색, 조직감을 부여하고 지방산 패취 발생억제와 대표적인 식중독 원인균인 *Clostridium botulinum*균의 발육을 억제하는데 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 아질산염을 다량 섭취하게 되면 혈액의 hemoglobin을 methemoglobin으로 산화시켜 methemoglobin증을 일으키며, 제2급 및 제3급 아민류와 반응하여 발암성 nitrosamine을 생성하기도 한다(Fiddler 등, 1972; Massey 등, 2006). 아질산염이 가지는 다양한 기능을 대체할 수 있는 물질이 마땅치 않아 부득이 육제품에 아질산염의 사용을 허용은 하되 잔류량을 규제하고 있는 실정이며, 이를 대체할 천연물질을 개발하고자 노력하고 있다. 녹차추출물은 아질산염 소거작용이 우수하다고 보고되어 있으며(이, 1999), 천연물질인 찻을 사용한 갈근추출물과 함께 육가공품에 첨가할 경우 아질산 잔류량을 감소시키고 nitrosamine 생성을 억제시키는 효과가 기대된다.

한편 찻(*Pueraria thunbergiana* Bentham)의 뿌리를 건조한 갈근(葛根)의 활성성분과 약리작용 관계에 대한 연구 보고가 있다(Oh 등, 1990). 갈근의 사포닌 성분은 간에 면역학적 손상을 주었을 때 간보호 작용을 나타내고(Arao 등, 1997), alanine aminotransferase 활성을 저하시키며(Arao 등, 1998), daidzin은 aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH-2)의 저해에 의한 알코올 흡수의 선택적 저해를 보인다(Keung과 Vallee, 1998). 또한 갈근의 성분인 daidzein, puerarin은 항염증효과가 있다(Lee 등, 1994). 납(Pb)은 생태계내에서 다양한 형태로 존재하면서 미량으로 독성을 유발시키는 물질로 체내 축적시 심각한 기능 장애를 유발시키는 물질이다(Yum 등, 1995). 체내에 축적되는 납의 대부분은 뼈에 분포하고 간, 신장, 폐 등에 존재하며, 혈액에서는 대부분 적혈구와 결합한다(Bartrop 등, 1971; Smith 등, 1992; Fonia 등, 1995). 카드뮴(Cd)은 출생시에는 존재하지 않으나 살아가는 동안 공기 중의 분진에 함유된 Cd이 호흡기를 통하여 흡수되는 경로와 음식물에 함

유된 Cd이 소화기를 통하여 체내에 유입되면 쉽게 배설되지 않으며, 생물학적 반감기도 16년 이상으로 나이가 들어갈수록 Cd의 체내 축적은 증가하게 된다(Webb, 1972). Cd 중독 시 Cd은 조직의 형태를 변화시켜 간독성(Anderson과 Anderson, 1988), 빈혈(Liu 등, 1999), 생식선 손상(Lafuente 등, 2000), 골장애(Oda 등, 2001)와 신장독성(Garrett 등, 2002)등이 보고되고 있다. 중금속 중독시 대표적으로 사용되고 있는 해독제는 meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) (Maiorino 등, 1993)과 자연 유래 천연 물질인 green tea (Chung과 Roh, 2000), chitosan (Kim과 Roh, 2002) 등이 있다.

찻의 주요한 성분인 catechin과 puerarin에 대한 것은 많이 연구되어져 왔으나 찻을 볶음처리한 갈근추출물이 아질산염 소거작용과 간 독성 보호 작용에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서, 이 연구에서는 찻과 녹차를 이용한 추출물의 아질산염 소거 효과를 실험하기 위하여 경상남도 산청, 지리산 지역에 자생하는 찻을 이용하여 아질산염 소거작용을 녹차와 비교 분석하였고, 이를 위한 전 단계로 갈근의 항산화성분인 isoflavones류와 puerarin 함유량을 분석하였으며, 녹차의 항산화성분인 catechin류와 caffeine 함유량을 분석하였다. 또한 납과 카드뮴으로 유발된 생쥐의 간장 독성에 대한 볶음갈근추출물과 표준 puerarin의 간 독성 완화 효과를 측정하여, 경남지역 식물자원의 이용가능성을 확인하고 육가공 제품의 안전성 확보 및 소비량을 증가시켜 육가공 산업의 발전에 기여하고자 이 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

갈근(*Puerariae Radix*)은 지리산에서 채취한 것으로 경상남도 산청군농업기술센터에서 제공받았으며, 표준 puerarin은 sigma사에서, 녹차는 시중에 판매하는 설록다원(제주도)의 설록차(중작: 증제차)를 구입하여 사용하였다.

**갈근과 녹차추출물의 제조**

갈근은 음건 후 볶음장치를 사용하여 180°C에서 30분간 가열한 뒤 100 mesh체로 통과시켰다. 볶음갈근 5g당 정제수 100mg를 가해 99°C에서 5시간 환류 냉각하면서 6회 반복 추출하여 얻어진 용액을 합하고 Filter paper (Whatman No. 4, 150mm)로 여과한 뒤 70°C에서 50°C로 rotary vaccum evaporator로 농축, 동결건조하여 4°C 보관하여 실험에 사용하였다. 녹차는 5g당 정제수 100mg를 가해 85°C에서 3시간 환류 냉각하면서 4회 반복 추출하여 얻어진 용액을 합하고 filter paper (Whatman No. 4, 150mm)로 여과한 뒤 동결건조하여 4°C 보관하여 실험에 사용하였다.

**시약**

갈근 분석에 사용된 daidzin은 Fluka (USA)사 제품을 genistin, daidzein, genistein, puerarin은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였다. 녹차의 성분분석에 사용된 epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG)는 Fluka (USA)사 제품을, gallic acid, epigallocatechin (EGC), catechin, caffeine, epicatechin (EC), gallo-catechin gallate (GCG), catechin gallate (CG)는 모두

Sigma (USA)사 제품을 사용하였다. 추출과 분석에 사용되는 methanol, acetonitrile, acetic acid, ethyl acetate는 HPLC grade로 J. T. Baker (USA)사 제품을 사용하였고 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다.

**양산화성분 분석**

**Puerarin 분석 :** Puerarin은 칩의 대표적인 isoflavonoid로 알려져 있으며, 볶음처리한 칩추출물 중의 puerarin 분석은 Capcellpak C<sub>18</sub> UG120 (4.6×150mm, 5µm)을 이용하여 25% methanol를 용매로 UV-detector 254nm를 사용하였다(Table 1).

**Isoflavones 분석 :** 분석기기는 Shiseido사의 Nano-space SI-2 system (Tokyo, Japan)을 사용하였다. 갈근 중 isoflavones 분석은 소(2004)의 방법에 따라 HPLC dual column system (back flush mode)을 이용하여 분석하였다. Capcell pak MF ph-1 (2.0×10mm, 5µm)을 이용하여 isoflavones을 흡착시키고 drain 시킨 후 gradient로 이동상을 MF 칼럼의 역방향(back flush mode)으로 흘려 분석칼럼인 Capcellpak C<sub>18</sub> MG (3.0×75mm, 5µm)을 이동시켜 UV-detector 254nm에서 분석하였다(Table 2).

**카테킨류 분석 :** 동결건조한 녹차추출물을 0.02g 취한 뒤 ethyl acetate와 DW 1 : 1 혼합액을 5ml 첨가한 후 3,000rpm으로 5분간 원심분리 후 물 층만 취해 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

카테킨류의 함량은 HPLC법으로 동시 분리·정량하였다. Catechins 분석은 Agilent사의 Agilent 1100 series를 이용하였으며, Symmetry C<sub>18</sub> (4.6×150mm, 5µm)를 이용하여 gradient mode로 UV-detector 280nm

**Table 1.** Analytical condition of puerarin by HPLC

Column	Capcellpak C <sub>18</sub> UG120, 4.6×150mm, 5µm, Shiseido
Detector	UV254nm
Injection vol.	10µl
Oven temp.	30°C
Flow rate	1.0mg/min
Mobile phase	25% Methanol

**Table 2.** Analytical condition of isoflavones by HPLC

Column	Preseparate column (Capcellpak MF ph-1, 2.0×10mm, 5µm, Shiseido) Analytical column (Capcellpak C <sub>18</sub> MG, 3.0×75mm, 5µm, Shiseido)		
Detector	UV 254nm		
Oven temp	30°C		
Flow rate	0.5ml/min		
Injection vol.	30µl		
Valve program	Valve position B→A (Time: 0-0.4min, Flow rate: 0.5ml/min, A: 100%) Valve position A→B (A, B gradient program)		
Mobile phase	A: 1% acetic acid, B: 50% acetonitrile		
Gradient	Time (min)	A%	B%
Program	Init	100.0	0.0
	0.4	100.0	0.0
	0.5	80.0	20.0
	11.0	65.0	35.0
	30.0	30.0	70.0
	30.1	100.0	0.0
	35.0	100.0	0.0

**Table 3.** Analytical condition of Catechins by HPLC

Column	Symmetry C <sub>18</sub> , 4.6 × 150mm, 5μm, Waters			
Detector	UV 280nm			
Oven temp	30°C			
Flow rate	1ml/min			
Injection vol	10μl			
Mobile phase	A: DW, B: MeOH, C: 1% HCOOH			
Gradient	Time (min)	A%	B%	C%
Program	Init	70	20	10
	18	60	30	10
	20	30	60	10

**Table 4.** Analytical condition of caffeine by HPLC

Column	Capcellpak C <sub>18</sub> MG 4.6 × 150mm, 5μm, Shiseido
Detector	UV280nm
Injection vol.	10μl
Oven temp.	30°C
Flow rate	1.0ml/min
Mobile phase	MeOH/0.4% phosphoric acid (22:78)

에서 분석하였다(Table 3).

**Caffeine 분석 :** Caffeine 분석을 위한 표준원액(stock solution)은 caffeine 표준시약 100mg을 ethylacetate를 가해 완전히 녹인 후 1000μg/ml 농도로 만들었고, 표준원액(stock solution)을 methanol로 희석하여 100μg/ml로 만들어 표준용액(working solution)으로 사용하였다. 표준용액(working solution)을 2.5μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml로 희석하여 시험에 사용하였다. 녹차추출물의 caffeine 분석은 Capcellpak C<sub>18</sub> MG120 (4.6 × 150mm, 5μm)을 이용하여 이동상 MeOH : 0.4% phosphoric acid=22:78로 UV-detector 280nm에서 분석하였다(Table 4).

### 아질산염 소거능의 측정

갈근과 녹차추출물의 아질산염 소거능은 Kato (1987)등의 방법으로 측정하였다. 1mM 아질산나트륨 용액 1ml에 갈근추출물 각 25mg, 100mg의 시료를, 녹차추출물 각 25mg, 100mg의 시료를 가하고 여기에 0.1N 염산(pH 1.2) 및 0.2M 구연산완충용액(pH 3.0, pH 4.2, pH 6.0)을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2, 6.0으로 조정하여 반응용액의 부피를 10ml로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 각각 1ml씩 취하고 여기에 2% 초산 5ml, Griess 시약(30% acetic acid로 각각 조제한 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 동량 혼합한 것, 사용직전에 조제) 0.4ml를 가하여 잘 혼합시켜 15분간

실온에서 방치시킨 후 분광광도계를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 공시험은 Griess 시약 대신 증류수를 0.4ml 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 갈근추출물과 녹차추출물의 첨가전과 후의 아질산염 백분율(%)로 표시하였다.

$$N(\%) = \frac{A-C}{B} \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료를 첨가하여

1시간 방치시킨 후의 흡광도

B : NaNO<sub>2</sub> 용액의 흡광도

C : 시료자체의 흡광도

### 실험동물 및 처리

실험에 사용한 실험동물은 4주령의 ICR계 웅성 mouse(체중 25~35g)를 샘타코로부터 분양 받았다. 생쥐는 온도 23 ± 2°C, 상대습도 45 ± 5%로 유지하고 리카보네이트로 제작된 사육케이지(40 × 25 × 17cm)에 수용하고 사료(제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취시켜 10일 동안 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

시험군은 체중에 따라 난괴법(randomized block design)에 의해 5마리씩 9군으로 분류하였으며, Saline만 공급한 대조군, 납(10mg/kg/BW), 카드뮴(10mg/kg/BW)를 각각 경구투여군, 납(10mg/kg/BW)과 갈근추출물 동결건조분말 180mg/kg/BW 투여군, 카드뮴(10mg/kg/BW)과 갈근추출물 동결건조분말 180mg/kg/BW 투여군, 납(10mg/kg/BW)과 puerarin을 각각 10, 50mg/kg 투여군, 카드뮴(10mg/kg/BW)과 puerarin 10, 50mg/kg 투여군 그리고 대조군과 양성 대조군을 제외한 각 처리군에서는 갈근 추출물과 표준 puerarin

을 투여한 3시간 후 Cd와 Pb를 투여하였다. 처리군 모두 5일 동안 경구투여 하였고, 18시간 절식시킨 뒤에 에테르 마취 후 혈액과 간을 채취하였다.

### 혈액내 Alanine aminotransferase (ALT)와 Aspartate aminotransferase (AST) 활성도 측정

쥐에서 납과 카드뮴 처리로 인한 간 손상 여부는 혈청 ALT와 AST의 농도를 측정함으로써 간세포 손상 정도를 확인하였다. ALT와 AST의 농도는 Reitman-Frankel 방법에 준하여 조제된 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. 각 처리군 생쥐의 심장에서부터 혈액을 채취 후 혈청을 분리하여 ALT와 AST의 기질액과 37°C에서 30분 동안 반응시켜 pyruvate를 생성시킨 후, 발색액을 넣고, 20분 후 0.4 N-NaOH를 섞어서 동정색이 발색되면 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 간의 지질과산화(lipid peroxidation) 측정

카드뮴 및 납에 의하여 유도된 지질과산화에 대한 puerarin과 갈근추출물의 간 손상 방지효과를 확인하기 위해 간 100mg을 10ml의 완충액 Tris-HCl buffer에 넣은 후 균질화 시킨 다음 과산화 지질의 분해 생성물인 malondialdehyde (MDA)와 수합한 간세포를 0.5ml 취해 2-thiobarbituric acid (TBA)와 trichloroacetic acid (TCA)가 포함된 0.25M HCl용액을 첨가하여 100°C에서 20분간 가열하고, 4,000g으로 5분간 원심분리 시킨 상등액 중 TBA pigment를 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량표준 곡선에 준하여 과산화지질 함량을 간조직 1mg 당 생성된 MDA 함량으로 나타내었다.

### 통계 분석

실험 결과의 유의성 검정은 SAS program을 사용하여 실시하였고  $P < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test 방법을 사용하여 통계 처리를 하였다. 실험 결과는 평균±표준편차로 나타냈다.

## 결과 및 고찰

### 갈근 추출물 중 isoflavones 함량

갈근추출물의 isoflavones 함량은 4.46g/100g로 나타났다. Isoflavones 성분 중 daidzin 함량이 4.23g/100g로

서 가장 높았고, genistin 0.13g/100g, daidzein 0.07g/100g, 그리고 genistein 0.03g/100g 순으로 나타났다. Isoflavones 함량 중 daidzin이 다른 성분에 비해서 월등히 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다(Table 5).

### 갈근 추출물 중 puerarin 분석치

갈근추출물 중 puerarin 함량은 8.99g/100g로 나타났다. 소(2004)의 결과로 보면 국내산(*Pueraria thunbergiana*)의 puerarin 함량이 고창지역 10.84g/100g, 기타 지역이 1.60~6.02g/100g이었던 것으로 보아 본 실험에서 비교적 높은 함량을 나타냈다. Puerarin은 철의 지표성분으로 말초의 혈액순환을 촉진하고, 관상동맥을 확장하여 혈류량을 증가시키면서 혈전을 용해하여 심장의 운동 능력을 향진하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. Oh 등(1990) 등은 칩뿌리에서 puerarin 함량뿐 아니라 이를 분리하여 천연 항산화 작용이 있다고 보고하였다.

### Gallic acid 및 카테킨류 분석 결과

Fig. 1은 녹차열수추출물의 HPLC에 의한 gallic acid 및 7종류의 catechins 표준물질 chromatogram의 peak이며, 녹차열수추출물의 gallic acid 및 catechins 함량은 Table 6에서 나타난 바와 같이 gallic acid은 0.37g/100g, catechin류의 함량은 epigallocatechin gallate (EGCG) 25.50g/100g, gallocatechin gallate (GCG) 8.57g/100g, epicatechin (EC) 7.11g/100g, epigallocatechin (EGC) 2.85g/100g, catechin 2.61g/100g, epicatechin gallate (ECG) 1.49g/100g, catechin gallate (CG) 0.74g/100g으로 나타났다. 이 중 EGCG는 녹차의 대표적인 catechin류의 성분으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, catechin류 총함량은 49.23g/100g이었다. Catechin류 함량 중 EGCG가 25.50g/100g (51.30%)으로 가장 높은 함량을 보였는데 이러한 결과는 Lin 등(1996)이 녹차가 중앙세포 증식억제 효과성분 중

**Table 5.** Content of isoflavones in galgun (*Puerariae Radix*) extract with water

Compounds	Unit: g/100g
Daidzin	4.23 ± 0.06*
Genistin	0.13 ± 0.00
Daidzein	0.07 ± 0.00
Genistein	0.03 ± 0.00
Total	4.46 ± 0.06

\*Mean ± SD (n=6)

catechin류가 가장 지배적이었다고 한 결과와 Lee 등 (1998)이 녹차, 우롱차 및 홍차에서 분석한 결과와 유사하게 나타났지만 전체함량에서 차지하는 비율은 이 실험의 결과가 Lee의 결과(5.09%)에 비하여 월등히 높았는데 이러한 차이점은 녹차를 수확하는 시기의 차이에서 온 것으로 판단되며, 이러한 결과로 판단할 수 있는 것은 녹차는 수확시기에 따라서 품질에 큰 차이가 난다는 확인할 수 있었다.

### Caffeine 분석치

녹차열수추출물 중 caffeine 함량은  $6.53 \pm 1.02\text{g}/100\text{g}$ 이었으며 박과 임(2002)의 엽위별 caffeine 함량 3.67%, 일반포장에서 성장하는 차나무잎의 caffeine 함량 2.3~3.2%에 비해 높은 함량을 보였다.

### 갈근추출물 및 녹차추출물의 아질산염 소거능

갈근 열수추출물의 아질산염 소거능 실험결과

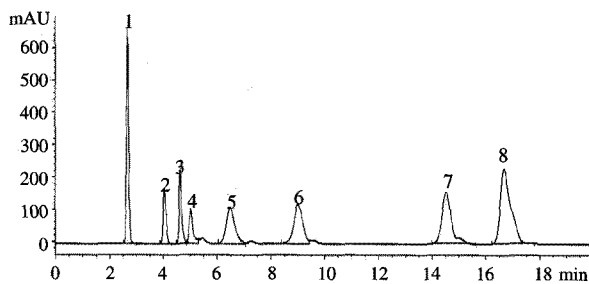


Fig. 1. HPLC Chromatogram of total catechin standard. Peak 1: gallic acid, 2: epigallocatechin (EGC), 3: catechin, 4: epigallocatechin gallate (EGCG), 5: epicatechin (EC), 6: gallo-catechin gallate (GCG), 7: epicatechin gallate (ECG), 8: catechin gallate (CG).

Table 7과 같다. 갈근 열수추출물의 농도별 아질산염 분해작용을 측정해 본 결과, 추출물 농도가 100mg일 때 pH 1.2에서 98.07%, pH 3.0에서 90.84%의 우수한 아질산염 소거능을 보였으나 pH 4.2에서는 42.08%로 급격한 감소를 보였다. 추출물의 농도가 25mg에서는 pH 1.2에서 76.43%, pH 3.0에서 66.38%의 아질산염 소거능을 보였으나 pH 4.2에서는 37.81%로 급격한 감소를 보였는데, pH에 따른 아질산염 소거능은 pH가 낮을수록, 추출물의 농도가 높을수록 아질산염 소거능이 우수한 것으로 나타나 농도와 pH에 따른 유의성이 인정되었다( $P < 0.05$ ).

녹차 열수추출물의 아질산염 소거능을 검토하기 위하여 각 pH 별 아질산염 소거능을 측정한 결과 pH가 낮고 농도가 증가할 수록 아질산염 소거능이 높게 나타났다(Table 8). 아질산염 소거능은 pH 1.2 반응용액에서 녹차추출물의 농도가 증가할수록 뛰어났으며 100mg/ml에서 녹차추출물이 95.71%로 가장 높게 나타났다. 김 등(2002)은 3mg/ml 농도의 녹차 열수추출물이 pH 1.2에서 96.7%의 높은 소거작용을 나타낸다고 보고하였다. 본 실험에서 녹차 열수추출물의 아질산염 소거능이 김 등(2002)의 결과에 비해 낮게 나타난 것은 녹차 열수추출물의 추출방법 및 녹차의 연도별, 채취 장소에 따른 개체 차이로 보여지며, pH 1.2에서 가장 높은 소거능을 나타내고, pH가 증가할수록 소거능이 급격히 떨어진다는 결과는 일치하였다.

갈근과 녹차의 아질산염 소거능은 각각 100mg/ml 농도에서 우수하게 나타났으므로, 100mg/ml 농도의 녹차와 갈근추출물의 아질산염 소거능을 비교하면, 녹차추출물은 25mg/ml, 100mg/ml, pH 4.2, 6.0 조건하에서는 갈근 추출물 보다 소거능이 뛰어났으나, pH가 낮

Table 6. Contents of gallic acid and catechins in green tea extracted with hot water

Samples	Gallic acid	Compound						Total	
		Catechins (Unit: g/100g)							
		EGC	Catechin	EGCG	EC	GCG	ECG	CG	
Green tea	$0.37 \pm 0.02$	$2.85 \pm 0.10$	$2.61 \pm 0.08$	$25.50 \pm 0.85$	$7.11 \pm 0.24$	$8.57 \pm 0.30$	$1.49 \pm 0.05$	$0.74 \pm 0.03$	$49.23 \pm 1.63$

\*Mean  $\pm$  SD (n=4)

Table 7. Nitric scavenging ability of galgun (*Puerariae Radix*) extract (Unit: %)

Concentration (mg/ml)	pH			
	1.2	3.0	4.2	6.0
25	$76.43 \pm 0.40^{Ab}$	$66.38 \pm 0.13^{Bb}$	$37.81 \pm 0.03^{Cb}$	$0.00 \pm 0.26^{Db}$
100	$98.07 \pm 0.04^{Aa}$	$90.84 \pm 0.23^{Ba}$	$42.08 \pm 0.33^{Ca}$	$23.73 \pm 0.04^{Da}$

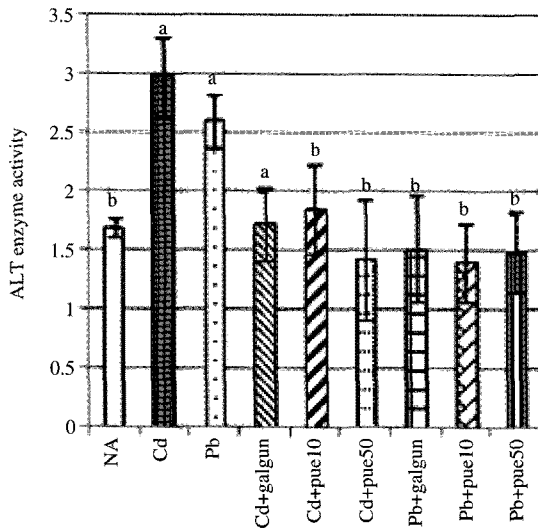
A,B,C,D Means in the same row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

a,b Means in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

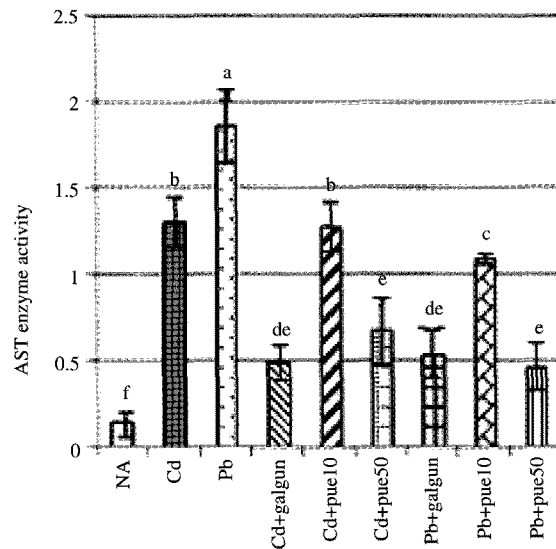
**Table 8.** Nitric scavenging ability of green tea extract (Unit: %)

Concentration (mg/ml)	pH			
	1.2	3.0	4.2	6.0
25	63.82 ± 0.14 <sup>Ab</sup>	44.51 ± 0.12 <sup>Cb</sup>	59.13 ± 0.06 <sup>Bb</sup>	18.46 ± 0.30 <sup>Db</sup>
100	95.71 ± 0.17 <sup>Aa</sup>	81.63 ± 0.07 <sup>Ba</sup>	77.83 ± 0.04 <sup>Ca</sup>	42.72 ± 0.24 <sup>Da</sup>

<sup>A,B,C,D</sup>Means in the same row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )  
<sup>a,b</sup>Means in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )



**Fig. 2.** Change of ALT activity of liver in mice pretreated with *Puerariae Radix* extract. The values represent mean ± SD of 5 mice per each group in the same condition. <sup>a,b</sup>Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). \*NA: control group, Pb: lead, Cd: cadmium, galgun: galgun extract, Pue: puerarin standard. Each value represents the mean ± SD of five mice. Method of treatment is referred to the material and methods.



**Fig. 3.** Change of AST activity of liver in mice pretreated with *Puerariae Radix* extract. The values represent mean ± SD of 5 mice per each group in the same condition. <sup>a,b,c,d,e,f</sup>Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). \*NA: control group, Pb: lead, Cd: cadmium, galgun: galgun extract, Pue: puerarin standard. Each value represents the mean ± SD of five mice. Method of treatment is referred to the material and methods.

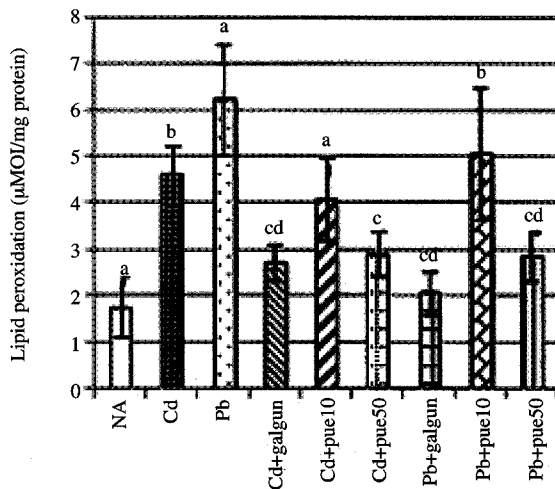
을수록 갈근 추출물이 소거능이 뛰어남을 보아 아질산염 소거 작용 목적으로 첨가하는 기질의 종류와 pH의 조건에 따라 아질산염의 소거능력에 차이가 있으므로 첨가하는 기질의 최적의 조건을 고려하여야 하겠다. 이러한 결과로 볼 때 갈근 및 녹차 추출물이 아질산염 소거효과가 큰 것으로 보아 인체의 안전한 천연물로서 식육가공품 제조시 풍미 향상과 육색, 조직감을 부여하고 지방 산패취 발생억제와 대표적인 식중독 원인균 *Clostridium botulinum*균의 발육을 억제하는데 첨가되는 아질산염과 또는 아질산염 소거작용 목적으로 첨가하는 ascorbic acid의 대체물질로서의 이용가능성이 기대되며 또한 이용 할 시 각각의 pH를 고려하여 첨가하면 아질산염 및 ascorbic acid 첨가로 인하여 발생할 것으로 예상되는 부작용을 줄일 수 있는 효과도 기대되므로 국민 건강상의 위해 감소와 식품 산업의 안전성 제고를 위하여 갈근추출물과 녹차추출물을 아질산

염 소거작용 목적으로 첨가하여도 가능할 것으로 판단된다.

**열정 중의 간 기능 지표요소 ALT 및 AST 활성도 변화**

간장에 어떤 상해가 가해지면 ALT와 AST의 농도는 현저히 증가하여 혈중으로도 유출이 쉬운 혈행 구조를 가지고 있으므로 손상된 간으로부터 혈액에 방출되는 간의 효소 활성도 측정은 간 손상 연구에 있어서 가장 유용한 방법 중의 하나며, 특히 혈청 중 ALT, AST는 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내게 된다(Clissold, 1986; Lee, 2004). 따라서 혈청 ALT, AST의 측정으로 간 기능을 측정할 수 있다.

Fig. 2와 Fig. 3은 납(10mg/kg) 및 카드뮴(10mg/kg) 투여한 군과 갈근추출물 동결건조분말 180mg/kg 및



**Fig. 4.** Change of MDA values of liver in mice pretreated with *Puerariae Radix* extract. The values represent mean  $\pm$  SD of 5 mice per each group in the same condition. <sup>a,b,c,d</sup> Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). \*NA: control group, Pb: lead, Cd: cadmium, galgun: galgun extract, Pue: puerarin standard. Each value represents the mean  $\pm$  SD of five mice. Method of treatment is referred to the material and methods.

puerarin을 각각 10, 50mg/kg 투여 3시간 후 납(10mg/kg) 및 카드뮴(10mg/kg)을 투여하여 간 기능 지표 효소 ALT와 AST의 활성도를 측정하는 것이다.

양성 대조군인 카드뮴과 납 단독 처리군의 ALT 농도는 각각 2.97U/l, 2.60U/l로서 음성 대조군 1.68U/l 보다 유의성 있게 증가하여 간장이 손상되었다는 것을 알 수 있었고, 카드뮴과 갈근, 카드뮴과 puerarin 10, 50mg/kg 처리군의 ALT 농도는 1.72 U/l, 1.85 U/l, 1.42 U/l로 각각 나타났고, 납과 갈근, 납과 puerarin 10, 50mg/kg 처리군의 ALT 농도는 1.52 U/l과 1.40, 1.49 U/l로 나타나 카드뮴 2.97 U/l과 납 2.60 U/l 단독 처리군인 양성 대조군 보다 유의성 있게 감소한 것으로 보아 갈근 및 puerarin이 카드뮴과 납으로 인한 간 손상을 예방할 수 있을 것으로 추측된다. 카드뮴과 납에 각각 갈근 추출물 및 puerarin투여한 처리군의 ALT 농도는 카드뮴과 갈근을 처리한군을 제외하고는 음성대조군의 ALT 농도 수준까지 감소되었고 음성, 양성 대조군을 제외한 각 처리군의 ALT 농도는 카드뮴과 갈근을 처리한군을 제외하고는 차이가 없었다.

Fig. 3은 카드뮴과 납 단독 처리군과 갈근 추출물 및 puerarin 10, 50mg/kg 투여 3시간 후 카드뮴과 납을 투여한 각 처리군의 AST 농도의 변화를 표시한 것이다. 카드뮴과 납 단독 처리군의 AST 농도는 각각 1.30 U/l,

1.86U/l로서 음성 대조군 0.14U/l 보다 현저히 증가하여( $P < 0.05$ ) 카드뮴과 납 투여로 인하여 간장이 심하게 손상되었다는 것을 추측할 수 있고, 카드뮴과 갈근, 카드뮴과 puerarin(10, 50mg/kg) 처리군의 AST 농도는 0.49 U/l과 1.28, 0.67 U/l로 나타났고, 납과 갈근, 납과 puerarin (10, 50mg/kg) 처리군의 AST 농도는 0.54U/l과 1.09, 0.47 U/l로 나타나 카드뮴 1.30U/l과 납 1.86 U/l 단독 처리군인 양성 대조군 보다 유의성 있게 감소한 것으로 보아 갈근 및 puerarin이 카드뮴과 납으로 인한 간 손상을 보호할 수 있을 것으로 추측되거나 음성 대조군 보다 증가하였고 카드뮴과 puerarin 10mg/kg 처리군(1.28 U/l)은 카드뮴 단독 처리군과 같은 활성도를 나타내어 puerarin 10mg/kg은 간 손상 예방 효과가 없을 것으로 판단되어 카드뮴으로 인한 간 손상을 예방하고자 할 때는 puerarin을 50mg/kg 이상 투여하여야 간 손상을 예방할 수 있을 것이라고 추측된다. 이러한 결과는 현 등(2003)과 한 등(1995)이 사염화탄소로 유발시킨 간 손상에서 갈근이 간 손상을 예방하여 ALT와 AST의 활성을 대조군의 수준으로 감소시켰다는 보고와 일치하였다. 간 손상을 유발시킨 물질이 상이하여도 유사한 결과가 도래한 것은 간 손상물질에 따라 정확한 기전은 약간의 차이가 있을지 몰라도 일반적으로 간 손상 물질로 인하여 간 상피세포 핵이 농축, 붕괴, 괴사 단계를 거쳐 괴사부위에 보상적으로 세망세포의 증식으로 인하여 간 섬유화 및 간 경변 증상으로 나타남으로 비록 간 손상을 유발시킨 물질이 상이하여도 간 손상으로 인한 간 지표인 각종 효소들은 증가하는 것으로 판단된다.

#### 간 지질 과산화(lipid peroxidation) 농도 변화

지질과산화(lipid peroxidation; LPO)는 식물 및 동물에서 잘 정립된 세포 상해기전이다. 세포막의 인지질은 유리 라디칼의 공격에 의해서 lipid peroxi-radical을 거쳐 lipid endoperoxide radical 및 lipid endoperoxide로 된 후 분해되어 MDA를 생성하게 되므로, MDA는 지질과산화의 정도를 측정하는 지표가 되며, 지질과산화는 산화적 스트레스의 지표로서 널리 사용되고 있다 (Jaeschke와 Bait, 2006). 생체내에서 과산화지질은 세포의 구성 성분인 단백질, RNA 및 DNA 등과 작용하여 미토콘드리아 등의 기능 이상과 생화학적 결손을 일으키며 이로 인해서 질병과 노화를 촉진시키는 물질로 주목받고 있다. 특히 생체막에서 과산화지질이 잘



형성되며 생체막의 주요 구성성분인 다가불포화지방산이 유리 라디칼로 형성된 과산화지질에 의해 지방조성이 변화되기 때문에 생체막의 기능이 저하되고, 유동성을 감소시켜서 막의 주요 기능인 물질수송 및 투과성이 감소됨으로써, 항상성 유지에 지장을 초래하게 된다(Levine 등, 1990). 따라서 Cd와 Pb로 유도한 간장 손상에서의 지질과산화를 측정하여, 간세포의 손상 정도를 확인하였다.

간세포 손상 정도의 측정은 일반적으로 간 상해시 혈중으로 유리되는 각종 효소를 측정함으로써 파악할 수 있지만 산화 스트레스(oxidative stress)에 의한 간독성은 자유 유리기로 인한 MDA를 측정함으로써 간 손상 정도를 파악할 수 있다는 Miyazawa 등(1990)의 연구 결과에 따라 카드뮴과 납 투여로 인한 지질과산화 산물인 MDA 수준 예방 효과를 갈근 및 녹차 추출물의 효과를 측정할 결과 양성 대조군인 카드뮴 및 납 단독 처리군의 MDA ( $\mu\text{mole/mg protein}$ )는 각각 4.60, 6.25로 나타나 음성 대조군인 1.74 보다 유의성 있게 증가하였고, 카드뮴과 갈근, 카드뮴과 puerarin 10, 50mg/kg 처리군의 MDA 농도는 2.73과 4.09, 2.93으로 나타났고, 납과 갈근, 납과 puerarin 10, 50mg/kg 처리군의 MDA 농도는 2.06과 5.07, 2.86으로 나타나 음성 대조군 보다는 증가 하였으나 카드뮴과 납에 puerarin 10mg/kg 처리한 두 군을 제외하고는 카드뮴 4.60과 납 6.25 단독 처리군인 양성 대조군 보다 유의성 있게 감소하였고, 또한 카드뮴과 갈근 추출물, 카드뮴과 puerarin 10, 50mg/kg 처리군과 납에 갈근 추출물 및 puerarin 10, 50mg/kg 투여한 6 처리군 사이에서는 카드뮴과 납에 puerarin을 각 10mg/kg씩 투여한 두 처리군만 제외하고 간 손상 예방 효과가 나타났다. 이와 같이 카드뮴과 납으로 유도된 간장 내의 과산화물이 갈근 추출물을 투여함으로써 과산화물의 형성이 현저하게 억제되는 것으로 보아 갈근 추출물의 성분이 자유 유리기의 과산화 작용을 강하게 억제해 줌으로써 간 손상 예방에 효과를 미친 것으로 생각된다. 간 손상 예방 또는 치료제들이 대부분 항산화제로 알려져 있는데(Chopra, 1972; McLean, 1967) 이들의 약리효과는 자유 유리기를 탐식함으로써 효과를 나타내는 것으로 미루어 볼 때 갈근 추출물 역시 산화적 스트레스로 인하여 생성된 자유 유리기를 탐식함으로써 MDA 농도를 감소시켰을 것으로 판단된다. 이상의 혈청내 간 손상 관련 효소 활성 및 간 손상으로 인한 지질과산화 산물인 MDA 생성 감소의 결과와 간 손상 지표인 ALT와

AST 결과가 부합되므로 갈근 추출물과 puerarin이 카드뮴과 납 유도 간 손상을 예방 할 수 있는 효과가 있음을 알 수 있다. 다만 puerarin 10mg/kg은 카드뮴과 납으로 인한 간 손상을 예방 할 수 없는 것으로 나타났으므로 카드뮴과 납으로 인한 간 손상을 예방하고자 할 때는 puerarin을 50mg/kg 이상 투여 하여야 간 손상을 예방 할 수 있을 것이라고 추측된다.

한 등(1995)은 칩 카테킨을 이용하여 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 간기능에 미치는 효과를 실험하였고, 칩 카테킨을 투여한 rat는 ALT, AST의 수치를 감소시키며, 특히 과산화지질의 형성을 방지해서 간기능을 회복시킨다고 보고하였다. 본 실험은 mouse를 실험동물로 사용하였으나 rat를 사용한 한 등(1995)의 결과와 유사하였다. 갈근 추출물은 강력한 항산화제인 polyphenolic 물질인 카테킨류와 유용성 성분인 puerarin이 동시에 작용해 puerarin 10mg/kg 단독 처리군보다 높은 간 보호 효과를 나타낸 것으로 보인다.

## 결 론

칩과 녹차를 이용한 추출물의 아질산염 대체 효과를 실험하기 위한 전단계로 갈근의 항산화성분인 isoflavones류와 puerarin 함유량을 분석하였고, 녹차의 항산화성분인 catechin류와 caffeine 함유량을 분석하였다. HPLC dual column system(back flush mode)을 이용한 갈근추출물의 isoflavones류 중 daidzin 함량이 4.23g/100g으로서 가장 높았고, genistin 0.13g/100g, Daidzein 0.07g/100g, genistein 0.03g/100g이었다. Isoflavones의 총함량은 4.46g/100g이었으며, puerarin은 8.99g/100g이었다. 녹차열수추출물의 항산화제인 gallic acid 함량은 0.38g/100g이며, catechin류 중 EGCG 25.50g/100g으로 가장 높았고, GCG 8.57g/100g, EC 7.11g/100g, EGC 2.85g/100g, catechin 2.61g/100g, ECG 1.49g/100g, CG 0.74g/100g로 나타났으며, catechin의 총 함량은 49.24g/100g이었고, Caffeine 함량은 6.53g/100g이었다. 갈근과 녹차추출물의 아질산염 소거능을 측정할 결과 농도가 증가할수록, pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 갈근추출물의 아질산염 소거능은 pH 1.2, 100mg/ml 농도에서 98.07%로 가장 높았고 녹차추출물의 아질산염 소거능도 갈근 추출물과 같은 경향을 보였다. 카드뮴 과 납 단독 처리군에서 간 손상 지표인 ALT, AST와 간 손상으로 인한 지질과

산화 산물인 MDA 농도는 음성 대조군 보다 현저히 증가 하였으나 갈근추출물 및 puerarin(10, 50mg/kg)을 투여한 군에서는 카드뮴 및 납의로 인하 간장 손상 지표들을 현저하게 감소시켰다( $P < 0.05$ ). 갈근추출물은 카드뮴보다 납에 의한 산화스트레스 방지 효과가 크며, 산화 스트레스는 puerarin 농도에 따라 유의적으로 감소하였다. 이상의 결과를 통해 갈근 및 녹차추출물이 아질산염 소거능이 우수한 것으로 판단되며, 카드뮴과 납으로 유도된 간장 손상의 지표인 aminotransferases 활성 감소와 과산화지질의 형성을 방지해서 간 손상을 예방하는 효과가 있는 것으로 판단되므로 갈근 및 녹차 추출물이 아질산염 소거제 대체물질 및 간 손상 예방 물질로서의 이용 가능성이 기대된다.

## 참 고 문 헌

- 박장현, 임근철. 2002. 가루차용 차엽의 생육 및 성분. 한국약용작물학회지 10(5): 379-383.
- 소경아. 2004. HPLC Dual Column System을 이용한 칩 중 isoflavones 분석 및 estrogen 활성 연구. 건국대학교 농화학 석사학위논문.
- 이수정. 1999. 천연성분의 첨가가 염건조기의 인공소화시 N-nitrosamine의 생성과 돌연변이 성에 미치는 영향. 경성대학교 박사학위논문.
- 한석현, 김종배, 민상기, 이치호. 1995. 사염화탄소를 투여한 흰쥐에 있어서의 간 기능에 미치는 칩 카테킨의 효과. 한국영양식량학회지 24(5): 713-719.
- 현동환, 정선영, 정상신, 하기태, 김철호, 김동욱, 김준기, 최달영. 2003. CC14로 유발된 백서의 간손상에 대한 갈근의 간 보호작용 연구. 동의생리병리학회지 17(2): 297-307.
- Anderson HR, Anderson O. 1988. Effect of cadmium on hepatic lipid peroxidation in mice. Pharmacol Toxicol 63: 173-177.
- Arao T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T, Funakoshi T, Kojima S. 1997. Preventive effects of saponins from puerariae radix (the root of *Pueraria lobata* Ohwi) on *in vitro* immunological injury of rat primary hepatocyte cultures. Biol Pharm Bull 20(9): 988-991.
- Arao T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T. 1998. Preventive effects of saponins from the *Pueraria lobata* root on *in vitro* immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures. Planta Med 64(5): 413-416.
- Barltrop D, Barrett AJ, Dingle JT. 1971. Subcellular distribution of lead in the rat. J Lab Clin Med 77(5): 705-712.
- Chopra P. 1972. Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Lab Invest 26: 49-53.
- Chung KA, Roh YB. 2000. Histological study on the effects of the green tea in rat liver toxicated by lead. Kor J Electron Microscopy 30(2): 165-172.
- Clissold SP. 1986. Paracetamol and phenacetin. Drugs 4: 46-59.
- Fiddler W, Piotrowski EG, Pensabene JW, Doerr RC, Wasserman AE. 1972. Effect of sodium nitrite concentration on N-nitrosodimethylamine formation in frankfurters. J Food Sci 37(5): 668-670.
- Fonia O, Weizman R, Zisman E, Ashkenazi R, Gavish M. 1995. Down-regulation of hepatic peripheral-type benzodiazepine receptors caused by acute lead intoxication. Eur J Pharmacol 293(4): 335-339.
- Garrett SH, Phillips V, Somji S, Sens MA, Dutta R, Park S, Kim D, Sens DA. 2002. Transient induction of metallothionein isoform 3 (MT-3), *c-fos*, *c-jun* and *c-myc* in human proximal tubule cells exposed to cadmium. Toxicol Lett 126(1): 69-80.
- Jaeschke H, Bajt ML. 2006. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. Toxicol Sci 89: 31-41.
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agric Biol Chem 51(5): 1333-1338.
- Keung WM, Vallee BL. 1998. Daidzin and its antidiabetic analogs inhibit serotonin and dopamine metabolism in isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 95(5): 2198-2203.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK, Lee IG, Lee SH, Kim DG. 2002. Antioxidative and nitrite scavenging activity of Pine needle and Green tea extracts. Korean J Food Sci Animal Resour 22(1): 13-19.
- Kim YH, Roh YB. 2002. Effects of chitosan on the rat nephrotoxicity induced by lead. Kor J Electron Microscopy 32(3): 205-211.
- Lafuente A, Márquez N, Pérez-Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI. 2000. Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. Food Chem Toxicol 38(10): 913-923.
- Lee SJ, Baek HJ, Lee CH, Kim HP. 1994. Antiinflammatory activity of isoflavonoids from *Pueraria radix* and biochanin A derivatives. Arch Pharm Res 17(1): 31-35.
- Lee WM. 2004. Acetaminophen and the US Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. Hepatology 40: 6-9.
- Lee YJ, Ahn MS, Hong KH. 1998. A study on the content of general compounds, amino acid, vitamins, catechins, alkaloids in green, olong and black tea. J Fd Hyg Safety 13(4): 377-382.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climet I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 186: 464-478.
- Lin YL, Juan IM, Chen YI, Liang YC, Lin JK. 1996. Com-

- position of Polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells, *J Agric Food Chem.* 44: 1387-1364 .
- Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD. 1999. Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl<sub>2</sub> exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 159(2): 98-108.
- Maiorino RM, Aposhian MM, Xu ZF, Li Y, Polt RL, Aposhian HV. 1993. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. XV. The meso-2,3-dimercaptosuccinic acid-cysteine (1:2) mixed disulfide, a major urinary metabolite of DMSA in the human, increases the urinary excretion of lead in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 267(3): 1221-1226.
- Massey RC, Crews C, Davies R, McWeeny DJ. 2006. A study of the competitive nitrosations of pyrrolidine, ascorbic acid, cysteine and p-cresol in a protein-based model system. *J Sci Food Agric* 29(9): 815-821.
- McLean AE. 1967. Effect of diet and vitamin E on liver injury due to carbon tetrachloride. *Br J Exp Pathol* 48(6): 632-638.
- Oda N, Sogawa CA, Sogawa N, Onodera K, Furuta H, Yamamoto T. 2001. Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. *Toxicol Lett* 123(2-3): 143-150.
- Oh MJ, Lee KS, Son HY, Kim SY. 1990. Antioxidative components of pueraria root. *J Agricul Sci* 17(1): 52-64.
- Smith DR, Osterloh JD, Niemeyer S, Flegal AR. 1992. Stable isotope labeling of lead compartments in rats with ultralow lead concentrations. *Environ Res* 57(2): 190-207.
- Webb M. 1972. Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem Pharmacol* 21(20): 2767-1771.
- Yum KS, Park KH, Yang NK, Ahn LT, Ko JS. 1995. Ultrastructural influence of heavy metallic agents on the proximal convoluted tubule of mice. *J Soonchunhyang Med* 1(2): 719-733.