J. Fd Hyg. Safety 12(1), 1 - 8(1997)

엉겅퀴에서 분리 정제한 Silymarin의 사람 Low Density Lipoprotein에 대한 항산화 효과

이백천[1] · 진성현[2] · 조경자[3] · 김동석 · 류병호[4]*†

[1]순천당제약(주), [2]부산광역시 보건환경연구원, [3]경성대학교 가정학과, [4]경성대학교 식품공학과

Antioxidative Effect of Silymarin Purified from Silybum Marianum on Modification of Human Low Density Lipoprotein

Baek-Chen Lee[1], Sung-Hyun Jin[2], Kyung-Ja Cho[3], Dong Suck Kim, and Beung-Ho Ryu[4]*†

[1]*Sun Chon Dang Pharmaceutical Co. Pusan, 604-042, Korea,*

[2]*Public Health and Environment Institute of Pusan, 613-104, Korea*

[3]*Department of Home Management,*

[4]*Department of Food Science and Biotechnology Kyungsung University, Pusan, 608-736, Korea*

ABSTRACT— This study was pcrformed to evaluate the antioxidant activity of silymarin against human low density lipoproteins(LDL) oxidation. Silymarin extracted from *Silybum marianum* was successively purified with solvent fractionation and followed by silica gel column chromatography. The active substances were separated by HPLC and the isolated active substances, silymarin were identified by IR, NMR, GC-MS as silymarin. Silymarin inhibited at the 5 μM Cu^{2+}-mediated oxidation of human low density lipoprotein (LDL) in a dose dependent manner. Silymarin completely inhibited LDL oxidation at 50 μg/m*l* concentration. These findings suggest that silymarin may protect LDL against oxidation in atherosclerotic lessions.

Key words □ Silymarin, low density lipoprotein, antioxidant

플라보노이드(flavonoid)는 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀계 화합물로서 약 4,000여 종류가 있으며 그 중 flavonols, flavones, flavanones, flavanols, anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols 및 chalcones 등이 주요한 플라보노이드로 알려져 있다.[1-3]

플라보노이드는 식물성 성분으로 다양한 구조적 특성을 가지고 있으며 벤젠환(環)의 탄소에 -OH기와 탄소의 2와 3의 위치에 2중결합, 탄소 4번 위치에 카보닐기와 A와 B환에 결합되어 있는 -OH기에 의하여 항산화 활성을 갖는다.[4-6] 플라보노이드의 흡수 및 대사에 대한 쥐를 이용한 실험에서 소화관을 통하여 흡수된다는 사실이 일부 규명되었고, 한편으로는 지질대사의 산화를 억제 한다는 사실도 밝혀졌다.[7,8]

Gugler 등[9]은 플라보노이드를 21~22세의 건강한 사람에게 4 g을 경구투여한 후 폴리페놀 화합물 및 그 유도체를 조사한 결과 혈장과 뇨에서는 검출되지 않았고, 투여량의 53%는 그대로 분변으로 배설되었다고 보고하였다. 인체에서 플라보노이드의 대사에 대한 대부분의 인체에서 생리활성을 나타내는 섭취량은 23~170 mg/day정도라고 보고되었었다.[11,12]

이와 같이 플라보노이드는 생리활성에 뛰어나 우리의 건강을 유지하는데 큰 역할을 한다.[12,13] 현재까지 연구된 플라보노이드는 항균제,[14] 항바이러스제,[15,16] 항염제,[17] 지질의 과산화의 억제[18,19] 및 항돌연변이의 활성[20]을 나타낸다.

플라보노이드는 특히 혈장의 low density lipoprotein (LDL)내의 산화를 억제하여 동맥경화를 예방한다.[14,21] 동맥경화의 원인중의 하나는 LDL이 산화되어 oxidized LDL (Oxid LDL)로 전환되고 궁극적으로 cholesterol esters로 변환 축적되어 동맥부위에 거품세포가 형성되어 발병하게 된다.[21-26]

LDL은 *in vitro*에서 macrophages,[27] 동물의 내피세포,[28] 평활근 세포[29] 및 금속이온의 존재하에서도 Oxid LDL로

† Author to whom correspondence should be addressed.

유도된다.[30,31] Oxid LDL은 세포에 대해 독성이 강한 aldehyde 등 지질의 과산화물을 함유하고 있고, 세포조직에 확산되어 독성을 나타낼뿐만 아니라 내피세포에 염증을 일으키고 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다.[26,32] 따라서 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 LDL의 산화를 방지하는 것이 보다 효과적인 방법으로 사료되고 있다.

이와 같이 LDL의 산화를 억제하는 천연 항산화제로는 비타민 E,[33] carotenoids,[34] catechin,[35] flavonoid,[36] 및 그 유도체 등이 알려져 있다. 특히 그 중에서도 국화과(*Compositae*)에 속하는 엉겅퀴(*Silybum marianum*(L) Gaerth)에 들어있는 silymarin는 flavolignan으로서 간장보호작용[39,40]과 알코올 유도지질 산화의 예방[41] 및 알코올성 간경화[42] 등에 대한 보호효과가 있다고 알려져 왔다.

따라서 본 연구는 엉겅퀴(*Silybum marianum*)에 들어 있는 플라보노이드의 일종인 silymarin를 분리정제하고 항산화 효과를 사람 LDL을 모델로하여 검증하고자 실시하였다.

재료 및 실험방법

재료의 구입

엉겅퀴(*Silybum marianum*(L))는 시중 한의원에서 구입하여 사용하였다.

시약

Diphenyl-picryl-hydrazyl(DPPH), gentamycin, Sodiun thiobarbiturate는 Sigma(미국)에서 구입하였고, silicagel 60는 Merck(미국)에서 구입하였다. Ethyl Acetate 등 용매는 Baker(미국)에서 구입하여 사용하였고 그외 시약은 특급을 사용하였다.

엉겅퀴로부터 Silymarin의 분리 및 정제

엉겅퀴 5 kg을 분쇄한 후 메탄올 1 *l*로서 9시간씩 8회 추출하고 혼합액을 합하여 농축하였다. 농축엑스를 같은 량의 물을 가하여 분해시키고 석유 벤젠을 가하여 탈지한 후 수용성층을 초산 에칠로서 추출, 농축하여 엑스 228 g을 얻었다.

Silica gel을 chromatography용 column(5×50 cm, 동아과학)에 충진한 후 벤젠 : 초산에칠(5:1 v/v), 벤젠 : 초산에칠(1:1 v/v), 초산에칠 및 메탄올의 순서로 용출하고 벤젠 : 초산에칠(1:1 v/v) 및 초산에칠 용출획분을 합하고 여기에 메탄올을 가하여 용해시켜 하룻밤 방치시켜 담황색의 침전을 얻었다. 생성된 침전을 아세톤, 석유에텔로 재결정하여 silymarin의 무색 비늘형의 결정을 얻었다.

Silymarin의 구조확인

I.R. Spectrum은 Perkin Elmer 841(USA), NMR Spectrum은 Brucker AM 300 spectrophotometer(USA)로서 DMSO에 샘플을 녹여 사용하였다. GC/MS는 Hitachi M-80(Japan) GC./MS는 silica capillary column을 사용하여 8°C/min의 온도 상승으로 80°C에서 300°C에서 측정하였다. Silymarin의 표준품은 Sigma(USA)에서 구입하여 정제된 시료와 비교 확인하였다.

Diphenyl-picryl-hydrazyl(DPPH)의 탈색력의 측정

Silymarin의 항산화 활성을 측정하기 위하여 화학적으로 안전한 DPPH의 탈색력의 정도로 항산화효과를 측정하였다. 화학적으로 안전한 자유기인 DPPH의 에탄올용액 100 μM에 항산화제를 첨가하여 30분 동안 반응시켰다. 시료의 자유기 소거활성은 Fridovich의 방법[43]에 의거 517 nm에서 DPPH의 흡광도를 측정하였다.

사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리

사람 LDL 의 분리는 Havel 등의 방법[44]에 따라 실시하였다. 즉 건강한 남자의 혈액 50 m*l*을 1 mg/m*l* EDTA을 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분동안 원심분리(2000×g)한 다음 gentamycin sulfate(1 mg/25m*l*)을 첨가하였다. LDL(d. 1.019~1.063 g/m*l*)은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4로서 염류를 제거하기 위하여 16~20시간 투석하였다.

LDL의 Cu^{2+}에 의한 산화

LDL(100 μg/m*l*)를 1~5 μM $CuSO_4$를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 적당한 농도의 silymarin 및 silybin을 첨가하여 5% CO_2 존재하에서 37°C에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 측정하였다.[45] 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않은 조건에서 배양하였다.

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 100 μg protein/m*l* LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5 m*l*에 20% TCA 1.5 m*l*를 가한 다음 여기에 0.05 M NaOH에 0.67% TBA 1.5 m*l*을 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectro-

photometer(Model 650-10S, USA)로서 510 및 553 nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malonaldehyde (MDA)로 만들어진 MDA의 표준곡선으로 부터 MDA의 nmole로서 나타내었다.[46]

Diene conjugation의 측정

LDL이 Oxid LDL로 되므로서 생성가능한 공액 2중결합의 형성을 234 nm에서 측정하였다. 즉 100 μg protein/m*l*의 LDL을 PBS(pH 7.4)에 녹이고, 5 μM $CuSO_4$ 및 50 μM silymarin의 존재하에서 37°C에서 배양하면서 매 30분 간격으로 측정하였다.[45] 별도로 대조군은 50 μM silymarin를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였다.

단백질의 정량

LDL의 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[47]에 따라 측정하였다.

통계 처리

Data는 ±S.D로 나타내었다.

결과 및 고찰

Silymarin 및 silybin의 정제 및 구조확인

엉겅퀴(*Slybum marianum* L.)에서 추출 정제한 silymarin ($C_{25}H_{22}O_{10}$, mp 250~255°C)은 담황색 침상결정으로 $FeCl_3$, Mg-HCl반응은 양성으로 나타났다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 IR spectrum에서는 3,450 cm^{-1}에 OH-, 1,639 cm^{-1}에서 conjugated carbonyl기 및 1,512 cm^{-1}에서 benzene ring을 나타내어 flavonoid로 추정할 수 있다.[48,49]

Fig. 2는 silymarin의 NMR(DMSO)로서 측정한 것으로 2중공명을 사용한 coupling의 실험결과로서 각 1 singal의 귀속을 조사하였다. ^1H에서는 6.20, 6.45 ppm의 각 ^1H 상당의 2중선(二重線)은 A환(環)의 6, 8위치의 수소에 귀속되며 7.10 ppm(^1H, d, J=2HZ)는 각각 B환(環)의 5', 6', 2' 위치에 수소에 해당하는 것으로 생각된다. 그리고 6.80~7.05 ppm의 미분화에서 ^3H상당의 방향환의 수소에 기본으로 하는 signal이 확인되었다.[48,49] 한편 3.5 ppm(2H, m), 4.27(1H, m), 4.98 ppm(1H, d, J=8HZ)의 signal group은 4.27 ppm를 조사하여도 그 값에서 Conferyl alcohol유래의 -CH(O)-CH(O)-CH_2OH를 기본으로 하는 것으로 추정된다. 3.81 ppm에 methoxy기가 들어있는 ^3H 상당의 일중선(一重線)이 확인되었다.

Silymarin은 2, 3위치에 수소 2H상당의 signal이 인식되었다(Fig. 2, 3). 이에 속하는 표준 silymarin의 NMR해석결과와 유사하였다.[50] Silymarin의 GC/MS spectrum은 m/z: 264, 219, 131, 77 및 69에서 fragment를 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

DPPH의 탈색의 효과

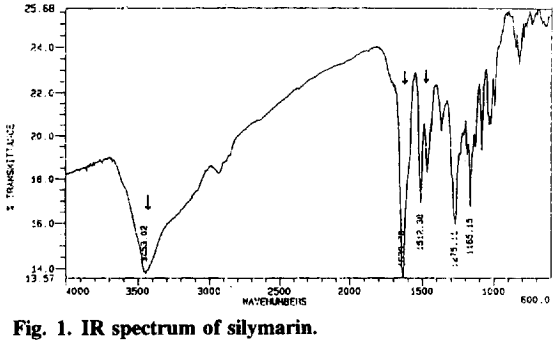

Fig. 1. IR spectrum of silymarin.

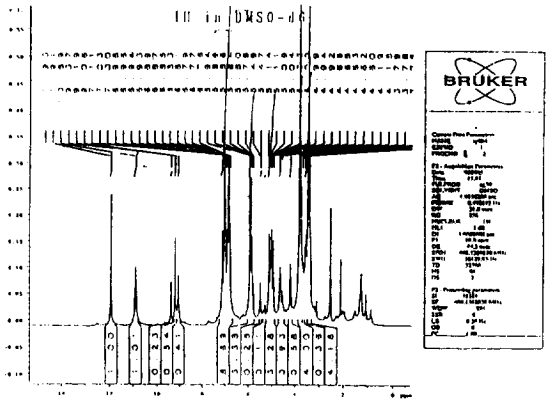

Fig. 2. ^1H-NMR spectrum of silymarin.

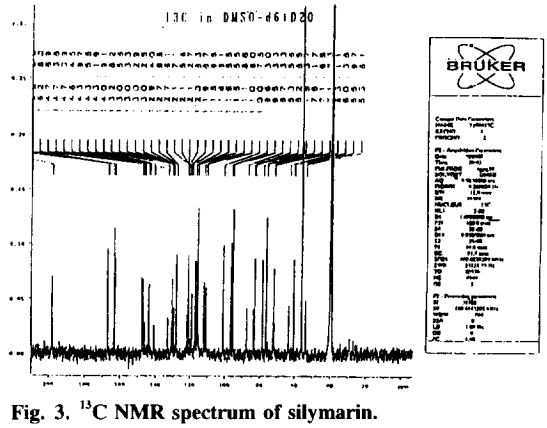

Fig. 3. ^{13}C NMR spectrum of silymarin.

엉겅퀴에서 추출하여 분리 정제한 폴라보노이드인 silymarin을 *l*-α-tocopherol과 비교하여 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 silymarin은 시간에 따른 DPPH의 탈색력은 현저히 높았고, 항산화제로 알려진 dl-α-tocopherol 및 BHT와 비교한 결과 DPPH의 탈색력은 우수하였다. 따라서 silymarin은 유리기의 소거활성이 우수한 것으로 판단된다.

$CuSO_4$ 유도 human LDL의 산화에 대한 silymarin의 항산화 효과

엉겅퀴에서 분리 · 정제한 silymarin의 항산화 효과를 알아보기 위하여 silymarin를 5, 25, 50 μg/ml로 희석하여 1~6 μM $CuSO_4$의 존재하에서 37°C에서 18시간 배양하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 LDL을 산화시키기 위하여 $CuSO_4$를 1, 2, 3, 4, 5 및 6 μM 농도를 첨가한 결과 TBARS의 값은 $CuSO_4$의 용량이 증가할수록 증가하였으나, $CuSO_4$농도가 5 μM일 때 일정한 수치를 나타내었다. 그리고 5 μM $CuSO_4$를 첨가하여 LDL을 산화시킬 때 silymarin을 50 μM 첨가하였을 때 과산화물의 생성 억제가 가장 높게 나타났다. 그러므로 앞으로의 실험에서 사용되는 $CuSO_4$는 5 μM를 첨가하였고, silymarin의 농도는 50 μM로하여 실험하였다.

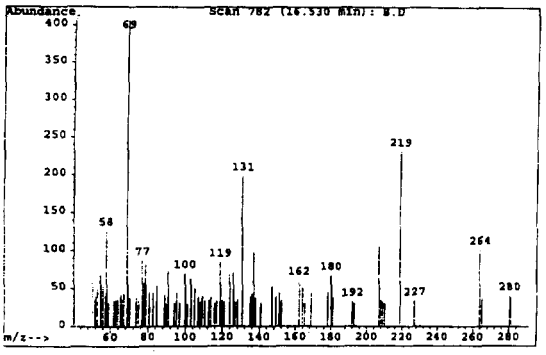

Fig. 4. GC-Mass spectrum of silymarin.

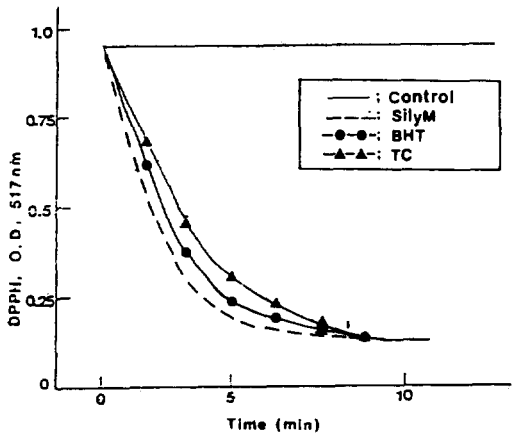

Fig. 5. Time course of DPPH deculonzation by silymarin. Silymarin was added at a final concentration of 50 μM DPPH solution and optical lesity was measured at 517 nm.
Control : without silymarin; TC, dl-α-tocopherol (50 μM); BHT (50 μM), silyM : silymarin (50 μM). Results again represent averages for two seperate experiments.

공액 이중결합 diene의 형성 억제효과

공액 이중결합의 형성은 LDL의 산화과정을 측정하는 하나의 방법으로 본 실험에서는 silymarin의 산화억제 효과를 검정하기 위해 사용하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 LDL를 5 μM $CuSO_4$를 첨가하고 silymarin을 각각 50 μM 첨가하여 37°C에서 배양하는 동안 배양시간에 따라 공액 이중결합이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이때 50 μM 첨가하여 시간경과에 따른 공액 이중결합의 형성이 거의 없었다. Silymarin은 모두 isoflavonoid로서 화학적 구조가 이중결합형성을 억제하는 catechin 및 polyphenol 화합물과 그

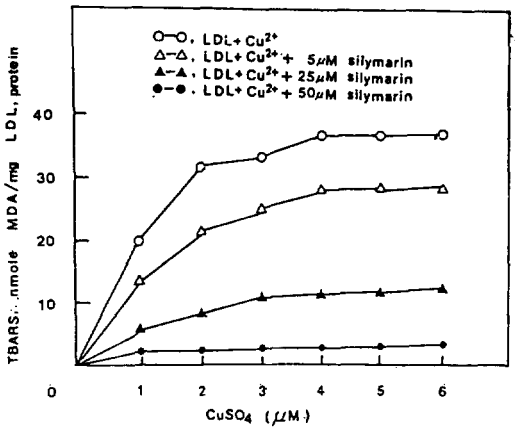

Fig. 6. Antioxidative effect of silymarin on cupric sulfate induced LDL oxidation.
LDL (100 g protein/ml) was incubated for 18hr at 37°C in the presence of different concentration of silymarin. Oxidation was initiated by the addition of 1~6 M $CuSO_4$ in the presence or absence of increasing concentration of silymarin. The lipoperoxide content was determined and expressed as nmol malonaldehyde equivalents/ml. Results again represent averages for two seperate experiments.

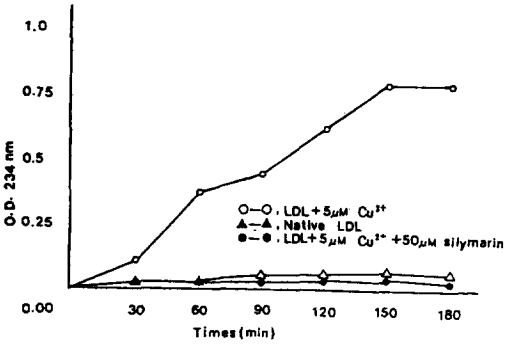

Fig. 7. Antioxidative effect of silymarin on the formation of conjugated dienes observed during the oxidation of LDL.
LDL (100 μg protein/ml) was incubated in the present and absence of 50 μM silymarin. Oxidation was initiated by the addition of 5 μM $CuSO_4$. The formation of conjugated dienes was measured from LDL oxidation. Results again represent averages for two separate experiments.

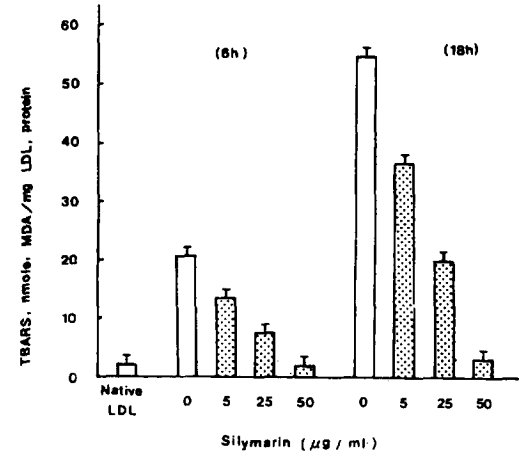

Fig. 8. Antioxidative effect of silymarin(∴) on the copper mediated oxidation of LDL.
LDL (100 μg/ml) was incubated for 6h or 18hr at 37°C in phosphate buffered saline containing 5 μM $CuSO_4$ in the presence or absence of increasing concentration of silymarin. At the end of the incubation periods. TBARS were determined fluorometrically as described in Method. Results are expressed as mean ±SD of triplicate analyses.

구조적 특성이 지방의 비슷하여 에스텔화의 생성을 감소시키는 것으로 볼 수 있었다.

Cu^{2+}유도 LDL산화에 대한 silymarin의 억제효과

LDL의 산화는 여러요인에 의하여 유도되지만 Cu^{2+}유도에 대하여 검토하였다. Silymarin를 각각 5, 25 및 50 μg/ml의 농도로 5 μM Cu^{2+}촉매하에서 18시간 반응 시킨 후 산화 억제효과를 실험한 결과 Fig. 8과 같다.

본 실험에서 native LDL의 TBARS는 1.20±0.23 nmol MDA/mg LDL이였으나 배양 6시간에서는 silymarin을 첨가하지 않고 5 μM $CuSO_4$만 가한 LDL에서는 19.9±0.24 nmol MDA/mg LDL이였다. Silymarin의 경우 첨가농도가 5, 25 및 50 μg/ml일 때 TBARS는 각각 12.40±0.78, 6.37±0.22 및 2.95±0.3 nmol MDA/mg LDL이였다. 이러한 실험결과로 보아 silymarin의 항산화효과는 첨가량이 증가할수록 억제효과가 높아지는 용량 의존형 항산화제로 추정된다.

그리고 같은 조건에서 LDL의 산화를 위해 LDL에 5 μM $CuSO_4$를 첨가하여 silymarin의 항산화능을 알아보기 위하여 18시간 배양하였을 때 silymarin 및 silybin를 첨가하지 않은 대조군에서의 TBARS는 57.28±4.27 nmol MDA/mg LDL이였으나 silymarin를 5 μg/ml첨가시에는 37.6±5.33 nmol MDA/mg LDL이였고, 25 μg/ml첨가시에는 20.0±4.72 nmol MDA/mg LDL이였으나 50 μg/ml를 첨가시에는 4.87 ±1.13 nmol MDA/mg LDL이였다.

본 실험에서 LDL을 silymarin 첨가후 18시간 배양한 후 LDL의 산화 억제효과에 관한 실험에서는 배양 6시간에서 산화 억제력이 좋았으나 첨가농도가 낮은 경우에는 산화 억제효과가 낮아 용량에 따른 차이가 있었다. 그러나 첨가량이 50 μg/ml일때는 6 및 18시간 배양에 따른 항산화능의 차이는 거의 없었다. Jialal[51] 및 Scaccini는 Cu^{2+}의 존재하에서 LDL의 산화를 2~3시간 동안 단시간 배양한 후 TBARS를 측정하여 산화정도를 측정하였으나 본 실험에서는 2~3시간보다 4, 5배 많은 배양시간으로 실험하였다. 이것은 개체에 따라 다르지만 사람의 혈장에서 채취하여 얻은 LDL이 자체에 존재하는 항산화제에 약간의 영향을 받기 때문이다.[52] 비타민 A 및 E와 같은 항산화제가 LDL의 획분에 미량함유 되어 있을 경우 항산화력이 있으며 반대로 담배를 피우는 사람은 혈액에서 산화가 쉽게 일어날 수 있기 때문에[31] 산화에 필요한 18시간 동안 배양하였다. 이와 같이 LDL의 산화는 LDL자체에 항산화제가 극미량들어 있어도 산화가 잘 일어나지 않는다. 따라서 LDL의 산화는 LDL의 농도가 증가하면 산화가 쉽게 일어날 가능성이 많아 본 실험에서는 LDL을 100 mg/ml로 조절하여 실험하였다. 이는 LDL이 저장동안에 LDL의 산화를 최소화 하기 위하여 희석용액도 높은 농도에서 저장해야 한다는 것을 암시하고 있다.

국문요약

본 연구는 지질의 과산화와 사람의 low density lipoprotein(LDL)의 산화에 대한 항산화 효과를 조사하기 위하여 *Silybum marianum*으로부터 silymarin를 정제하여 실험하였다. Silymarin은 유기용매 획분, silica gel 칼럼 크로마토그래피로서 정제하였고, 정제된 물질로 부터 활성물질은 acetic acid : MeOH(60:40 v/v)로서 HPLC로 분리하여 IR, NMR, GC-MS를 이용하여 Silymarin으로 확인하였다. Silymarin은 human LDL의 Cu^{2+}촉매산화에 있어 용량 의존형의 LDL의 산화억제를 나타내었고 50 μM/m*l*의 농도에서 거의 완전히 억제하였다. Silymarin의 50 μM농도에서 conjugated dienes 형성을 거의 억제하였다. 본 실험결과 silymarin이 동맥경화부위에서 LDL의 산화를 방지할 수 있을 것으로 추정된다.

참고문헌

1. Herrmann, K.: Flavonols and flavones in plants. A review. *J. Food Technol.* **11**, 433-448 (1976).
2. Kuhnau, J.: The flavonoids. A class of semi-essential food components Their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet,* **24**, 117 (1976).
3. Pierpoint, W.S.: Flavonoids in the human diet. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure -Activity Relationships, p. 125, Alan R. Liss, New York, NY USA (1986).
4. Ratty, A.K. and Das, N.P.: Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation. Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* **39**, 69 (1988).
5. Hackett, A.M.: The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical, Pharmacological and Structural Activity Relationships, p. 177, Alan R. Liss, New York, NY USA (1986).
6. Cody, V.: Crystal and molecular structure of flavonoids. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine Ⅱ. Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties, p. 29, Alan R. Liss, New York, NY USA (1988).
7. Bravo, L., Abia. R., Eastwood, M.A., and Saura-Calixto, F.: Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Brit. J. Nutr.* **71**, 933 (1994).
8. Das, N.P.: Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of(+)-catechin in Man. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 3435 (1971).
9. Gugler, R., Leschik, M., and Dengler, H.J.: Disposition of quercetin in Man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **9**, 229 (1975).
10. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., and Kromhout, D.: Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer* **20**, 21 (1993).
12. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman. P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen elderly study. *Lancet* **342**, 1007 (1993).
13. Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B.: eds. Plant flavonoids in biology and medicine-Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships. New York: Alan R. Liss (1986).
14. Das, N.P.: ed. Flavonoids in biology and medicine III-Current issues in flavonoids research. Singapore. Singapore University Press (1990).
15. Nonaka, G., Nishioka, L., Nishizawa. M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y.-C., Lee, K.-H., Anti-AIDS agents 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Natl. Prod.* **53**, 587 (1990).
16. Nakane, H., Ono, K.: Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* **29**, 2841 (1990).
17. Middleton, E., Kandaswami, C.: Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1167 (1992).
18. Ho, C.-T., Chen, Q., Shi, H., Zhang, K.-Q., Rosen, R. T.: Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various chinese teas. *Prev. Med.* **21**, 520 (1992).
19. Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J.: Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* April: 85 (1993)
20. Namiki, M.: Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**, 273 (1990).
21. 박춘옥, 류병호. 사람 LDL 수식에 의한 녹차의 항산화활성, 한국식품과학회지, **28**, 5 850 (1996).

21. Steinberg, D., Parthasarathy, S.: Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L. Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *New Engl. J. Med,* **320**, 915 (1989).
22. Jurgens, G., Hoff, H.F., Chisolm, G.M., and Esterbauer, H.: Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation. Characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids.* **45**, 315 (1987).
23. Ross. R.: The pathogenesis of atherosclerosis. perspective for the 1990s, Nature., 362. 801, 1993.2) Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C., Witztum J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.,* **320**, 915(1989).
24. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegl. G.: Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.,* **3**, 77 (1990).
25. Chisolm, G. M.: Cytotoxicity of oxidized lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.,* **2**, 311 (1991).
26. Carpenter K L H., Brabbs CE., Mitchinson, M. J.: Oxygen radicals and atherosclerosis. *Klin Wochenschr.,* **69**, 1039 (1991).
27. Henriksen, T., Mahoney, E. M., Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis.,* **3**, 149 (1983).
28. Henriksen, T., Mahoney, E., Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of low density lipoportein previously incubated with cultured endothelial cells. Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* **78**, 6499 (1981).
29. Morel, D. W., Docorleto, P. E., Chisolm, G. M.: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arterloscerosis* **4**, 357 (1984).
30. Quinn M. T., Parthasarathy S., Fong LG., Steinberg D.: Oxidatively modified low density lipoproteins. A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* **84**, 2995 (1987).
31. Steinbrecher U., Parthasarathy S., Leake D. S., Witztum J. L., Steinberg D.: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* **83**, 3883 (1984).
32. Bruckdorfer K. R.: Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.,* **1**, 529 (1990).
33. Esterbauer H., Puhl H., Dieber-Rotheneder M., Striegl G., Waeg G.: Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.,* **53**, 314S (1991).
34. Esterbauer, H., Streigel, G., Puhl, H., Oberreither, S.: Rotherneder, M., El-Saadani, M., Urgens, G., The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **570**, 254 (1989).
35. Mangiapane, H., Thomson, J., Salter, A., Brown, S., Bell, G.D., and White, D.A.: The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem. Pharmacol.,* **43**, 445 (1992).
36. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R.S., Jessup, W., and Leake, D.S.: Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.,* **39**, 1743 (1990).
37. Salmi H A and Sarna S.: Effect of silymarin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver. *Scand. J. Gastroenterol.,* **17**, 517 (1982).
38. Rauen, H. M and Schriewer, H.: Die Antihepatotoxische Wirkung von parenteral verabreichtem silymarin bei der Leberchadigung der Ratte durch CCl_4. *Arzneimitteforsch,* **23**, 148 (1973).
39. Rauen, H. M. and Schriewer, H.: Die antihepatotoxische Wirkung von Silymarin bei experimentellen Leberschagungen der Ratte durch Tatrachlorkohlen stoff, D-Galaktosamin und Allylalkohol., *Arzneimittelforsch,* **21**, 1194 (1971)
40. Mourelle, M., Murrel, P., Favari, L. and Franco, T.: Prevention of CCl_4-induced cirrhosis by silymarin. *Fund. Clin. Pharmacol.,* **3**, 183 (1989).
41. Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Penttil , K., Glaumann, H. and Lindros, K.O.: Centrilobular expression of ethanolinducible cytochrome P450(IIE1) in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **157**, 55 (1988).
42. Ferenci, P, Dragosics B, Dittrich, H., Frank, H., Benda, L., Lochs, H., Meryn, S., Base, W. and Schneider, B.: Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J. Hepatol* **9**, 105 (1989).
42. 이백천: 엉겅퀴에서 정제한 Silymarin의 항산화 효과. 경성대학교 대학원 박사학위논문(1996).
43. Nikino, N., Kiso, Y., Wagner, H. and Fiebig, M.: Antihepatotoxic actions of flavonolignans from silybum marianum fruits, *Planta Med.,* **50**, 248 (1984).
43. Fridovich, I.: Xanthin oxidase, in Handbook of Method for oxygen radical research. (Green wald, R.A., ed.) 51, CRC *Press, Boca Raton FL* (1985).
44. Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. clin. Invest.* **34**, 1345 (1995).
45. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M.:

Continous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.* **6**, 67 (1989).

46. Yaki, K.: A simple flavorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
47. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
48. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B.: The systematic Identification of Flavonoids, Spriger-Verdag, Berlin. Heidelberg. New York (1970).
49. Geisman, T.A.: The chemistry of Flavonoid compound Pergmon press, 107 (1962).
50. Takemoto, T., Ikegawa, S. and Nomoto, K.: Studies on constituent of *silybum marianum* (L.)., **Yakugagu zasshi**, **95**, 1017 (1975).
51. Jialal, I., Scaccini, C. : Antioxidants and atherosclerosis. Current Pin. Lipidologe, **3**, 324 (1992).
52. Parth asarathy, S., Young, S. G., Witztum, J. L., Pittman. R. C. and Steinberg, D. : Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. J. Clin, Invest., **77**, 641 (1986).