

## 白芷根 成分이 肝의 藥物代謝酵素活性에 미치는 効果\*

申 國 鉉·金 玉 男·禹 源 植

서울대학교 生藥研究所

### Effect of the Constituents of *Angelicae dahuricae* Radix on Hepatic Drug Metabolizing Enzyme Activity

Kuk Hyun Shin, Ok Nam Kim and Won Sick Woo

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110, Korea

**Abstract**—The hexane and ether extracts from the roots of *Angelica dahurica* caused a significant inhibition of hepatic drug-metabolizing enzyme (DME) activity. Through systematic fractionation by SiO<sub>2</sub> column and vacuum liquid chromatography monitoring by bioassays, three furanocoumarins, phellopterin, byakangelicin and *tert*-O-methylbyakangelicin were isolated as active principles. These components have biphasic responses, both inhibitory and inducing effects on DME system. *Tert*-O-methyl byakangelicin was found to have the strongest enzyme inhibitory potency.

**Keywords**—Umbelliferae · *Angelicae dahuricae* Radix · hepatic drug-metabolizing enzyme · phellopterin · byakangelicin · *tert*-O-methyl-byakangelicin

天然藥物인 漢藥이나 傳承藥物로서의 生藥 또는 民間藥은 아직도 古典의인 記載나 繼承된 口傳에 의거하여 또한 有効成分이나 毒性 등이 뚜렷이 밝혀지지 않은 상태에서 治療劑로서 利用되고 있는것이 대부분이다. 한편 藥物, 發癌物質, 食品添加物 및 기타 天然物質에 이르기까지 소위 外因性生體 異物質들은 사람이나 포유동물의 生體內 非特異的인 酵素 특히 肝의 藥物代謝酵素系에 의하여 代謝되어 배설되거나 物質에 따라서는 이와같은 生體內 酵素系에 作用하여 生體異物質 自體 뿐만아니라 다른 藥物이나 異物質의 代謝를 抑制 또는 誘導 함으로서 藥物의 藥效 또는 毒性에 지대한 變動을 초래 한다는 것이 많은 研究者 들의 科學的인 實驗을 통하여

確證된 바 있다.<sup>1-14)</sup> 이와같은 實驗結果 들에 착안하여 著者等은 天然物 成分의 藥效, 肝毒性 및 生體內 藥物相互作用에 관여하는 機轉의 研究 나아가서 天然藥物인 漢方療法の 客觀化를 이루기 위한 目的의 일환으로 우리나라에서 漢方으로 빈번히 처방투약되고 있는 生藥 약 150여종을 선택하여 肝의 藥物代謝酵素系에 미치는 効果에 대하여 年次的으로 檢索한바 約 30%에 달하는 生藥이 肝의 藥物代謝酵素系에 變動을 초래한다는 事實을 確認하였으며<sup>15-19)</sup>, 그 有効成分의 究明을 試圖하고 있다. 따라서 本 研究에서는 檢索 단계에서 그 alcohol 粗抽出物이 肝의 酵素系에 強力한 效果를 나타내는 것으로 豫知된 生藥의 하나인 白芷根(*Angelicae dahuricae* Radix)으로부터 有効成分 究明을 試圖하였으나 數種의 有効成分은 純粹分離하였으며 그 作用의 一端을 究明하였기에 그 結果를 報告한다.

\* Part 11 in the series: "Studies on crude drugs acting on drug-metabolizing enzymes. For part 10 see ref. (27).

## 實驗 方法

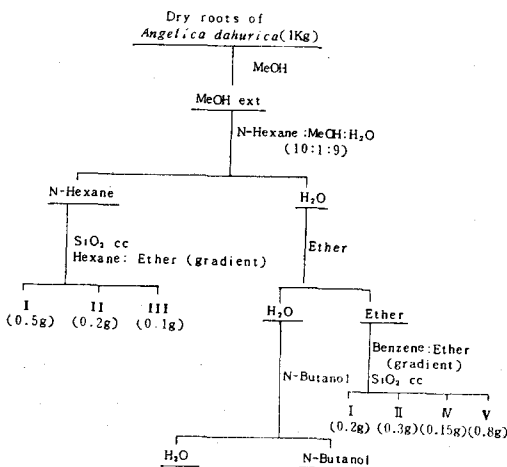
### 1. 材料의 分割 및 有效成分의 分離

市販 白芷根을 구입하여 形態學的으로 감정(本 研究所 池亨浚 교수)한것을 實驗 材料로 하여 methanol(95%)에 담가 一週日씩 5회 冷浸하고 濾過한 다음 濾液을 合하여 減壓濃縮하였다. 이와같이 얻은 methanol 抽出物을 N-hexane:methanol:H<sub>2</sub>O(10:1:9)로 partition한후 Scheme 1.에 따라 ether, N-butanol 등으로 fractionation 하여 各 分割物을 얻고 各 分割物들이 肝의 酵素系에 미치는 作用의 強度를 動物實驗(hexobarbital 睡眠時間) 또는 aminopyrine代謝酵素活性등을 指標로 測定 比較한 後 活性이 뚜렷한 fraction으로부터 有效成分을 추적할 目的으로 silica gel column chromatography 또는 vacuum liquid chromatography (VLC)<sup>20</sup>등을 구사하여 다시 여러개의 subfraction으로 分割한후 各 subfraction에 對하여 活性을 比較하면서 活性이 강한 subfraction을 再 chromatography를 실시하여 活性物質을 순수분리 하였다.

순수분리한 물질은 理化學的 性質을 檢討하면서 Mass, NMR, IR spectrum 등의 해석에 의하여 그 化學構造를 밝혔다.

### 2. 動物實驗

#### 1) Hexobarbital睡眠時間의 測定



Scheme 1. Extraction and fractionation of the roots of *A. dahurica*

肝의 藥物代謝酵素活性의 測定 指標로서 이미 確立되어있는 hexobarbital 睡眠時間 測定法에 의하여 酵素抑制 및 誘導效果를 檢討하였다.<sup>15)</sup> 酵素抑制效果의 測定은 試料(물에 不溶인 경우는 0.5% CMC 현탁액) 一定量을 齧鼠 mouse에 投與後 30分만에 hexobarbital-Na 50 mg/kg씩 腹腔內 投與하고 正向反射가 消失되었다가 回復되는 時間을 睡眠時間으로하여 睡眠延長 여부를 檢討하였고 酵素誘導效果의 測定은 試料를 mouse 에 3日~7日간 연속 投與하고 最終 試料 投與 48時間 만에 hexobarbital-Na 100 mg/kg씩 복강에 投與하여 수면단축여부를 檢討하여 實施하였다.

#### 2) Strychnine死亡率의 測定

Hexobarbital은 肝에서 代謝되지만 腦에 作用하여 中樞神經抑制效果도 아울러 가지고 있으므로 試料에 의한 睡眠時間 延長이 반드시 肝의 酵素抑制에 의해 일어난 現象이라고 단정할 수 없으므로 이를 確認하기 위하여 strychnine死亡率의 증가 여부를 아울러 檢討하였다.

齧鼠 試料를 mouse에 投與하고 30分만에 strychnine nitrate 1.20 mg/kg씩 腹腔內 投與한 다음 30分間 死亡하는 動物數를 測定하여 對照群의 動物數와 比較하였다.

### 3. 酵素活性의 測定

睡眠時間測定에 의한 方法은 간편하나 酵素活性에 對한 間接的인 方法이므로 肝의 酵素系에 直接的으로 미치는 效果를 確立된 酵素活性測定法에 의하여 檢討하였다. Rat 또는 mouse의 肝을 Potter-Elvehjem homogenizer로 homogenization하고 10,000 g로 냉동원심분리하여 얻은 上澄液을 microsomal 酵素源으로하여 酵素活性을 測定하였다.

#### 1) Aminopyrine N-demethylase活性의 測定

LaDu<sup>21)</sup> 및 Nash<sup>22)</sup>등의 方法에 따라 基質 aminopyrine (5 μmoles), cofactor로서 NADP (0.65 μmoles), glucose-6-phosphate (10.0 μmoles), nicotinamide(50 μmoles), MgCl<sub>2</sub>(25 μmoles), semicarbazide(45 μmoles), 酵素源 1 ml와 의 混合액을 37° 30分 incubation(Dubnoff metabolic shaking incubator)하고 生成된 formaldehyde를 Nash法에 의하여 發色시켜 415 nm에서

吸光度를測定하여 aminopyrine N-demethylase 활성을 구하였다.

2) Hexobarbital hydroxylase 활성의測定

Cooper 및 Brodie<sup>23)</sup> 등의 방법에 의하여 基質, hexobarbital Na(0.38 mM), cofactor로서 NADP(0.65 μmoles), nicotinamide(50 μmoles), glucose-6-phosphate(10 μmoles), MgCl<sub>2</sub>(25 μmoles) 및 酵素源 1 ml 混合液을 37°, 1시간 incubation하고 反應液에 存在하는 未反應의 hexobarbital의 量을(245-280 nm)의 吸光度를測定하여 求하고 加해준 hexobarbital과의 差를 酵素活性으로 하였다.

實驗結果 및 考察

1. 有效成分의 分離

白芷根으로부터 藥物代謝酵素 抑制 物質을 추적하기 위하여 Scheme 1.에 따라 有機溶媒로 系統分劃한 分劃物들을 單一回 投與時 aminopyrine N-demethylase 活性에 미치는 效果를 指標로 比較한 結果 Table I에서 보는바와 같이 N-hexane, ether 및 N-butanol fraction에 強力한 酵素抑制 效果를 認知하였으므로 各 fraction으로부터 有效成分의 單離를 試圖하였다.

먼저 N-hexane fraction(6 spots by TLC, hexane : ether=4 : 1)을 silica gel(Merck, Art.

Table I. Effect of a single treatment of the various fractions on aminopyrine N-demethylase activity in mice

Treatment <sup>a)</sup>	Dose (mg/kg, i.p.)	Aminopyrine N-demethylase (μmoles/min/g. prot.)	Percent inhibition (%)
Control	0.5%CMC	0.57±0.06	—
Hexane fr.	100	0.17±0.13*	70.2
Ether fr.	100	0.30±0.02**	47.4
Butanol fr.	100	0.28±0.04**	50.9
H <sub>2</sub> O fr.	100	0.57±0.06	0

<sup>a)</sup>Mice were treated with each fraction 30 min prior to the enzyme assay.

The enzyme assay was performed on 10,000×g supernatant microsomal fraction of mouse liver homogenate. Data are mean±S.E. of triplicate determinations.

Significantly different from the control; \*p<0.05, \*\*<0.01.

Table II. Effect of column chromatographic subfractions from N-hexane extract on hexobarbital-induced hypnosis in mice

Treatment <sup>b)</sup>	Hypnosis <sup>a)</sup> Percent of control (%)	Treatment	Hypnosis <sup>a)</sup> Percent of control (%)
Control	100	Control	100
Subfr. 1	84.5(N.S.)	Subfr.14	369.6(p<0.01)
2	133.2(N.S.)	15	280.0(p<0.01)
3	100.0(N.S.)	16	291.1(p<0.01)
9	190.4(p<0.05)	17	148.4(N.S.)
10	207.6(p<0.05)	20	128.1(N.S.)
12	307.3(p<0.01)	21	148.4(N.S.)
13	407.1(p<0.001)	22	178.7(N.S.)

<sup>a)</sup>The duration of hexobarbital hypnosis at a dose of 50 mg/kg, i.p. was 19.75 min.; <sup>b)</sup>Sample dose; 100 mg/kg, i.p.

Figures in parentheses indicate statistical significance relative to the control values.

7734) column chromatography에 걸쳐(hexane : ether=1 : 0~2 : 1, gradient elution) subfraction 1~22를 얻었다. 각 subfraction에 대해서 hexobarbital睡眠時間을 指標로 檢討한 結果 subfraction 9, 10, 12, 13, 14, 15 및 16 등에서 睡眠延長 効果를 관찰하였으며(Table II), 活性이 있는 subfraction등을 preparative VLC(silica gel for TLC, Merck Art. 7731)에 의하여 nonpolar solvent인 hexane→ether로 preparative elution을 실시하여 subfraction 9 및 10에서 compound I, subfr. 12에서 compound II 및 subfr; 13, 14, 15, 16 등에서 compound III를 순수분리하였다.

이 物質들은 benzene : ether=4 : 1의 용매제에서 TLC를 실시하면 각각 Rf. 0.90(yellow fluorescence), 0.70(yellow fluorescence) 및 0.69(reddish yellow fluorescence)임을 確認하였다.

Compound I은 mp. 108°의 針狀結晶으로서 그 分子量은 MS spectrum에서  $[M^+]=m/z$  270이며  $^1\text{H-NMR}$ 에서 H-3, H-4, H-2' 및 H-3'에 해당하는 두쌍의 doublet로부터 pyrone 및 furan 環의 存在를,  $\delta$ 1.70과 1.80에서 두개의 methyl proton,  $\delta$ 4.90와 5.50에서 methine과 methylene에 기인하는 doublet과 multiplet등의 정보로부터 하나의 prenyl基의 存在를 알수 있으며 기타 IR spectrum등의 정보를 종합하여 compound I은 isoimperatorin임을 추정하고 혼용시험 및 co-TLC로부터 표품인 isoimperatorin과 一致함을 確認하였다.

Compound II는 mp 106°의 白色針狀結晶으로  $[M^+]=m/z$  270이고,  $^1\text{H-NMR}$ 에서 역시 pyrone 및 furan ring에 해당하는 두쌍의 doublet 그리고 하나의 prenyl side chain에 해당하는 signal을 확인하고 표품과의 혼용시험 및 co-TLC에 의하여 imperatorin임을 確認하였다.

Compound III은  $[M^+]=m/z$  300이고 mp 102°의 細柱狀結晶으로서  $^1\text{H-NMR}$ 에서 역시 pyrone 및 furan ring에 해당하는 두쌍의 doublet 그리고 하나의 prenyl side chain에 해당하는 signal들이 관찰되었으며 炭素 5位에 ( $\delta$ 4.16) 하나의 methoxyl기에 해당하는 sharp한 singlet가 관찰되었다.

표품과의 혼용시험 및 co-TLC에 의하여 phel-

lopterin임을 確認하였다.

Hexobarbital수면시간 및 aminopyrine N-demethylase활성을 지표로 活性을 나타낸 ether fraction을 다시 silica gel column chromatography에 걸쳐 benzene : ether용매로 gradient elution을 실시하여 7개의 subfraction을 얻은 후 각 subfr.에 對하여 hexobarbital 睡眠時間에 미치는 效果를 測定 比較한 結果 subfr. 2, 5, 6 및 7 등에서 有意性있는 睡眠延長效果를 관찰할 수 있었다(Table III). 活性이 나타난 subfr.들로부터 VLC에 의하여 benzene→ether→ethylacetate로 preparative elution한 결과 subfr. 2에서 compound I 및 II를, subfr. 5 및 6에서 compound IV를, subfr. 7에서 compound V를 순수분리하였다. compound IV 및 V는 benzene : ether=1 : 1에서 TLC를 실시하면 그 Rf가 각각 0.3(reddish yellow fluorescence) 및 0.07(yellow fluorescence)이었다.

Compound IV는 mp 88°의 UV light에 의해 황갈색 형광을 나타내는 微黃色無定形結晶으로서 MS에 의해 분자량이  $m/z$  348 $[M^+]$ , IR spectrum에서 OH(3,400 $\text{cm}^{-1}$ )에 기인하는 broad한 band가 確認되고  $^1\text{H-NMR}$ 에서 유리상태의 furan 및 pyrone에 기인하는 두쌍의 doublet가 H-3, H-4, H-2' 및 H-3'에서 관찰되고 prenyl side chain의 methine 및 methylene proton에 기인하는 전형적인 ABX system의 multiplet가  $\delta$ 4.14~4.36에서 관찰되었다. 또한 하나의 methyl proton의 sharp한 singlet가  $\delta$ 3.23에서 관찰되며  $\delta$ 4.17에서 炭素 5位의 하나의 methoxyl기에 기인하는 singlet가 확인되었다. 또한 MS spectrum에서 2-hydroxy-3-methoxyisopentyloxy furanocoumarin에서 기인하는 fragment들이 확인되었다. 즉  $\text{Me}_2\text{C}=\text{OMe}^+$ 에 해당되는 강한 peak가  $m/z$  73에 나타난 것으로 methoxyl기가 side chain의 tertiary carbon atom에 존재함을 증명할 수 있다. 이와같은 spectral data를 종합하여 compound IV는 tertiary O-methylbyakangelicin임을 立證하였다.

Compound V는 UV light에서 淡黃色螢光을 나타내는 mp 93°의 淡黃色結晶으로 IR spectrum에서 역시 OH(3,540 $\text{cm}^{-1}$ ) 및 furan(3,100,

**Table III.** Effects of column chromatographic sub-fractions from ether extract on hexobarbital-induced hypnosis in mice

Treatment <sup>a)</sup>	Dose (mg/kg, i.p.)	Hexobarbital hypnosis (min±S.E.)	Percent of control(%)
Control	0.5%CMC	34.5±4.6	—
Subfr. 1	100	53.3±11.7	154.5
2	100	66.7±13.9*	193.3
3	100	28.3±4.2	82.0
4	100	63.7±12.4	184.6
5	100	118.3±20.6**	342.9
6	100	97.6±28.8*	282.9
7	100	128.5±9.8***	372.5

<sup>a)</sup> A single treatment 30 min before injection of hexobarbital-Na(60 mg/kg, i.p.).  
Significantly different from the control;  
\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

3, 120cm<sup>-1</sup>)에 기인하는 band가 확인되었으며 MS에서 분자량이 m/z 334[M<sup>+</sup>]이었다. <sup>1</sup>H-NMR에서도 compound V에서와 유사하게 furan 및 pyrone에 기인하는 두쌍의 doublet, 2,3-dihydroxyisopentyl side chain의 methine 및 methylene proton에 기인하는 multiplet, 炭素 5位の methoxyl기가 確認되었고, 또한 mass spec-

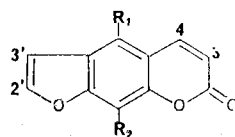
trum에서 2,3-dihydroxyisopentyl furanocoumarin의 fragment들이 관찰되어 compound V는 byakangelicin임을 알았다.

**Compound I:** Mp, 108°; IR<sub>max</sub><sup>KBr</sup>: 1725, 1680, 1590, 1500, 1480, 1380, 1170, 820; MS(m/z): 270[M<sup>+</sup>]; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>), δ6.26[1H, d, J=9.8, H-3], 8.15[1H, d, J=9.8, H-4], 7.1[1H, s, H-8], 6.86[1H, d, J=2.0, H-2'], 7.6[1H, d, J=2.0, H-3'], 4.90[2H, d, J=6.8, H-α], 5.50[1H, tq, J=7 and 1, H-β], 1.70[3H, s, γ-CH<sub>3</sub>], 1.80[3H, s, γ-CH<sub>3</sub>]

**Compound II:** Mp. 106°; IR<sub>max</sub><sup>KBr</sup>: 1718, 1595, 1497, 1380, 1360; MS(m/z): 270[M<sup>+</sup>], 255 (M<sup>+</sup>-Me)<sup>+</sup>, 202, 201, 173, 145; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ6.35[1H, d, J=9.6, H-3], 7.74[1H, d, J=9.4, H-4], 7.34[1H, s, H-5], 6.79[1H, d, J=2.0, H-2'], 7.67[1H, d, J=2.0, H-3'], 4.99[2H, d, J=7 and 1, H-α], 5.60[1H, tq, J=7 and 1, H-β], 1.72[6H, s, 2×γ-CH<sub>3</sub>].

**Compound III:** Mp. 102°; MS(m/z): 300 [M<sup>+</sup>], 232, 217, 202, 189, 174, 1600; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ6.27[1H, d, J=9.9, H-3], 8.11

Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
I. Isoimperatorin		II
II. Imperatorin	II	
III. Phellopterin	OMe	
IV. Tert-O-methyl byakangelicin	OMe	
V. Byakangelicin	OMe	



Structures of furanocoumarins.

[1H, d,  $J=9.8$ , H-4], 6.98[1H, d,  $J=2.4$ , H-2'], 7.6[1H, d,  $J=2.4$ , H-3'], 4.85[1H, d,  $J=7.1$ , H- $\alpha$ ], 5.4~5.7[1H, m, H- $\beta$ ], 1.73[3H, s,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>], 1.52[3H, s,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>], 4.16[3H, s, OCH<sub>3</sub>].

**Compound IV:** Mp. 88°; IR<sub>max</sub><sup>KBr</sup>: 3400 (broad, OH), 3100, 3120, (furan), 1705, 1605, 1590, 1480, 1430, 1350, 1145, 1065, 815; MS ( $m/z$ ): 348[M<sup>+</sup>], 333 [M<sup>+</sup>-Me]<sup>+</sup>, 317 [M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 276[M<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup>, 246[276-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 245 [M<sup>+</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 232 [M<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 217 [232-Me]<sup>+</sup>, 203[231-CO]<sup>+</sup>, 189[217-CO]<sup>+</sup>, 175 [203-CO]<sup>+</sup>, 160[189-CHO]<sup>+</sup>, 89[C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 73 [Me<sub>2</sub>C=OMe]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 6.25[1H, d,  $J=9.8$ , H-3], 8.10[1H, d,  $J=9.8$ , H-4], 7.00[1H, d,  $J=2.4$ , H-2'], 7.60[1H, d,  $J=2.4$ , H-3'], 3.85~4.30[2H, m, H- $\alpha$ ], 4.60 [1H, dd, H- $\beta$ ], 3.23[3H, s, OCH<sub>3</sub>], 1.23 [6H, s, 2 $\times$  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>], 4.15[3H, s, OCH<sub>3</sub>].

**Compound V:** Mp. 93°; IR<sub>max</sub><sup>KBr</sup>: 3540, 3100,

3120, 1710, 1605, 1595, 1490, 1386, 1370, 820; MS( $m/z$ ): 334[M<sup>+</sup>], 319[M<sup>+</sup>-Me]<sup>+</sup>, 245 [M<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 232[M<sup>+</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 217[232-Me]<sup>+</sup>, 203[231-CO]<sup>+</sup>, 189[217-CO]<sup>+</sup>, 175[203-CO]<sup>+</sup>, 160 [189-CHO]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 6.27[1H, d,  $J=9.8$ , H-3], 8.11[1H, d,  $J=9.8$ , H-4], 7.00[1H, d,  $J=2.4$ , H-2'], 7.63 [1H, d,  $J=2.4$ , H-3'], 4.14~4.36[2H, m, H- $\alpha$ ], 4.60[1H, dd, H- $\beta$ ], 1.31[3H, s,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>], 1.27[3H, s,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>], 4.17[3H, s, OCH<sub>3</sub>].

## 2. Furanocoumarin成分들이 藥物代謝酵素系에 미치는 效果

순수분리한 自芷根의 furanocoumarin成分들이 藥物代謝酵素 活性에 미치는 效果를 좀더 體系的으로 檢討하였다.

먼저 分離된 furanocoumarin들을 mouse에 單一回 投與後 30分만에 肝의 aminopyrine N-demethylase活性과 hexobarbital hydroxylase 活性에 미치는 影響을 검토한 結果를 Table IV

**Table IV.** Effect of a single treatment of furanocoumarins on aminopyrine N-demethylase activity in mice

Treatment <sup>a</sup>	Dose(mg/kg, i.p.)	Aminopyrine N-demethylase <sup>b</sup> ( $\mu$ moles/min/g prot.)	Percent inhibition (%)
Control	—	0.62 $\pm$ 0.06	—
Byakangelicin	50	0.52 $\pm$ 0.01	16.1
	100	0.42 $\pm$ 0.16*	32.3
	200	0.26 $\pm$ 0.02**	58.1
Tert-O-Methyl-byakangelicin	50	0.32 $\pm$ 0.06**	48.4
	100	0.16 $\pm$ 0.03**	74.2

<sup>a</sup>) A single treatment 30min prior to the enzyme assay. Data are means $\pm$ SEM of triplicate determinations. Significantly different from the control; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

**Table V.** Effect of a single treatment of furanocoumarins on hexobarbital hydroxylase activity in mice

Treatment <sup>a</sup>	Dose(mg/kg, i.p.)	Hexobarbital hydroxylase ( $\mu$ moles/min/g prot.)	Percent inhibition (%)
control	0.5%CMC	0.70 $\pm$ 0.12	—
Byakangelicin	50	0.30 $\pm$ 0.12*	57.1
Tert-O-Methyl-byakangelicin	50	0.09 $\pm$ 0.007**	87.1

<sup>a</sup>) A single treatment 30min prior to the enzyme assay. Significantly different from the control; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

**Table VI.** Inhibitory potency of coumarins on DME *in vitro*

Compound	IC <sub>50</sub> value(M×10 <sup>-5</sup> )*	
	aminopyrine N-demethylase	hexobarbital hydroxylase
Phellopterin	1.25	4.00
Byakangelicin	7.50	11.12
<i>Tert</i> -O-Methyl byakangelicin	—	—
byakangelicin	1.10	3.75

\* The concentration causing 50% inhibition

및 Table V에 표시하였다. Byakangelicin 및 phellopterin은 100 mg/kg투여로 유의성 있는 aminopyrine N-demethylase 활성억제를 나타내었으며 특히 *tert*-O-methylbyakangelicin은 50mg/kg에서도 강력한 억제효과를 나타내었다. 또한 byakangelicin 및 *tert*-O-methyl byakangelicin은 50 mg/kg 투여로 강력한 hexobarbital hydroxylase 활성 억제를 나타내었다. 본 실험결과에 의하면 같은 투여용량에서 볼때 *tert*-O-methyl byangelicin이 가장 강한 효소 억제효과가 있다는 것을 알수 있으며 phellopterin 및 byakangelicin의 순으로 활성이 감소하였다. 이와같은 현상은 rat의 肝의 microsomal 효소에 대한 *in vitro*에서의 억제강도 비교 실험에서도 일치함이 증명되었는데 Table VI에 표시한 바와같이 furanocoumarin들의 농도에 대한 비반응속도(대조군의

酵素反應速度에 대한 inhibitor 존재하에서의 反應速度의 比)를 plot하여 얻은 50% 억제농도(IC<sub>50</sub>)를 보면 aminopyrine N-demethylase 및 hexobarbital hydroxylase 활성 모두 *tert*-O-methyl byakangelicin이 가장 強하고, phellopterin 및 byakangelicin순으로 그 抑制強度가 減少함을 알았다.

著者は 이미 다른 furanocoumarin들이 肝의 microsomal 효소에 대하여 兩面性을 가지고 있어서 連續投與 때에는 coumarins에 따라서는 효소誘導效果를 나타낸다<sup>24)</sup>는 事實을 입증한바 있으므로 白芷成分에도 이러한 作用이 있는지의 여부를 檢討하기 위하여 furanocoumarin들을 7日間 連續하여 經口投與하고 효소活性에 미치는 效果를 測定한 結果 Table VI에 표시한 바와같이 byakangelicin 및 *tert*-O-methyl byakangelicin 모두가 aminopyrine N-demethylase 및 hexobarbital hydroxylase 활성의 誘導效果를 나타낸다는 事實을 立證하였다.

특히 *tert*-O-methylbyakangelicin에서는 50 mg/kg의 낮은 投與量에서도 강한 효소誘導 效果를 관찰하였고 이는 對照藥物로 사용한 전형적인 효소誘導 藥物로 알려진 phenobarbital과 同一한 投與量에서 類似한 誘導效果를 나타냄을 알았다.

한편 furanocoumarin들의 이와같은 효소억제 및 誘導效果를 뒷받침하는 實驗結果가 hexobarbital 睡眠時間에 미치는 效果에서도 관찰되었는

**Table VII.** Effects of repeated treatments of furanocoumarins on drug metabolizing enzyme activities in mice

Treatments	Dose(mg/kg, i.p.)	Aminopyrine N-demethylase ( $\mu$ moles/min/g prot.)	Hexobarbital hydroxylase ( $\mu$ moles/min/g prot.)
Control	0.5%CMC	0.89±0.09	0.75±0.07
Byakangelicin	50×7days	0.97±0.11 (109.0)	0.67±0.15 (89.3)
	100×7days	1.36±0.20* (152.8)	1.34±0.14** (178.7)
<i>Tert</i> -O-Methyl-byakangelicin	50×7days	1.44±0.22* (161.8)	1.58±0.31** (210.7)
	50×4days	1.89±0.21**(212.4)	1.67±0.15*** (222.7)

<sup>a)</sup> Mice were pretreated with each compound for 4 or 7 daily consecutive oral administrations and 48hr after the last treatment, the enzyme assays were carried out.

Data are means±S.E. of 4 separate determinations.

Figures in parentheses indicate percent of the control.

Significantly different from the control; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Table VIII. Effect of furanocoumarins on HB-induced sleeping time and ST-mortality in mice

Treatments	Dose(mg/kg, i.p.)	Sleeping time <sup>a)</sup> (min±S.E.)	ST-mortality <sup>b)</sup> (No. died/No. used)
Exp. 1 Control	—	21.7± 8.1	2/10
Byakangelicin	50	135.7±24.0*(625.3) <sup>c)</sup>	10/10
Phellopterin	30	181.5± 9.3*(720.2)	8/10
Exp. 2 Control	—	98.2± 2.6	—
Byakangelicin	50×7days	46.5± 9.5* (47.3)	—
Phellopterin	30×3days	81.6± 2.7* (83.1)	—

Exp. 1. : A single treatment 30 min before injection of a) hexobarbital (HB) (50 mg/kg, i.p.) or b) strychnine nitrate (ST) (1.20 mg/kg, i.p.).

Exp. 2. : Repeated treatments 48 hr before injection of HB (100 mg/kg, i.p.), c) percent of the control. Significantly different from the control; \* $p < 0.001$ .

데 Table VIII에 표시한 바와같이 byakangelicin 및 phellopterin을 單一回 投與後 30분만에 hexobarbital 睡眠時間을 현저히 증가시킴을 관찰할 수 있었고 또한 連續投與後 48시간만에는 반대로 睡眠時間을 유의성있게 短縮시킨다는 사실이 立證되었으며 이는 furanocoumarin들의 酵素抑制 및 誘導作用에 기인한다는 것을 나타낸다. 한편 單一回 投與時 strychnine 死亡率도 모두 증가 시켰으므로 수면증가 작용이 酵素抑制에 기인함을 강력히 뒷받침 해주고 있다. Hexobarbital 睡眠時間이 furanocoumarin들에 의하여 현저히 증가한다는 事實은 furanocoumarin들에 中樞神經 抑制作用(진정 작용)도 아울러 가지고 있을 가능성이 있으며 이에 관하여는 앞으로 구체적으로 검토되어야 할 課題라고 생각된다.

한편 白芷에서 분리된 isoimperatorin이나 imperatorin은 이미 研究者가 羌活根에서 分離하여 強力한 藥物代謝酵素 抑制物質임을 밝혔고<sup>25)</sup> 그 作用機轉을 究明 報告한 바 있다.<sup>26)</sup>

## 結 論

白芷根으로부터 肝의 藥物代謝酵素에 變動을 招來하는 成分을 體系的으로 追跡한 結果 N-hexane fraction으로부터 強力한 酵素抑制成分으로서 isoimperatorin, imperatorin 및 phellopterin을 순수분리하였고 ether fraction으로부터는 byakangelicin 및 *tert*-O-methylbyakangelicin을 순수분리 하였다.

Byakangelicin, *tert*-O-methylbyakangelicin 및 phellopterin이 肝의 藥物代謝酵素에 미치는 效果를 具體的으로 檢討한 結果 세 物質 모두가 藥物代謝酵素 抑制 및 誘導活性을 가지고 있음이 입증되었고 이중 *tert*-O-methylbyakangelicin이 가장 강한 作用을 나타내나 成分의 含有量으로 볼때 byakangelicin이 가장 많으므로 白芷의 主作用 物質의 하나는 byakangelicin으로 사료되며 그 外 furanocoumarin들의 複合作用으로 強力한 酵素系 變動을 招來할 것이 인정되므로 白芷를 처방 投藥時 다른 藥物의 代謝를 抑制 또는 誘導하여 藥物의 毒性 및 藥效에 變動을 招來할 可能性이 있다.

감사의 말씀—이 연구의 일부는 1986년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사하는 바이다.

(1988년 1월 20일 접수 : 1988년 2월 29일 수리)

## 文 獻

1. Conney, A.H.: *Pharmacol. Rev.* 19, 317 (1967).
2. Wattenberg, L.W.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 741(1972).
3. Wattenberg, L.W., Page, M.A. and Leong, J.L.: *Cancer Res.* 28, 934(1968).
4. Jori, A., Bianchetti, A. and Prestini, P.E.: *Biochem. Pharmacol.* 18, 2018(1969).
5. Parke, D.V. and Rahman H.: *Biochem. J.* 113, 12p. (1969).
6. Raddon, R.W. and Cohen, A.M.: *Fed. Proc.* 28,



- 418(1969).
7. Graham, P.S., Hellyer, R.O. and A.J.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 759(1970).
  8. Graham, P.S., Hellyer, R.O. and Ryan, A.J.: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 769(1970).
  9. Parke, D.V. and Rahman, H.: *Biochem. J.* **119**, 53p(1970).
  10. Wattenberg, L.W. and Leong, J.L.: *Cancer Res.* **30**, 1922(1970).
  11. Leibman, K.C.: *Chem. Biol. Interactions* **3**, 289 (1971).
  12. Parke, D.V. and Rahman, H.: *Biochem. J.* **123**, 9p(1971).
  13. Witschi, H. and Saint Francois, B.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **23**, 165(1972).
  14. Ariyoshi, T., Arakaki, M., Ideguchi, K., Ishizuka, Y., Nada, K. and Ide, H.: *Xenobiotica* **5**, 33(1975).
  15. Woo, W.S., Shin, K.H., Kim, I.C. and Lee, C.K.: *Arch. Pharm. Res.* **1**, 13(1978).
  16. Woo, W.S., and Shin, K.H.: *Arch. Pharm. Res.* **2**, 61(1979).
  17. Woo, W.S., Shin, K.H., and Ryu, K.S.: *Arch. Pharm. Res.* **3**, 79(1980).
  18. Hwang, E.H., Shin, K.H. and Woo, W.S.: *Ann. Rep. Natur. Prod. Res. Inst.*, **20**, 4(1981).
  19. Han, Y.B., Shin, K.H., and Woo, W.S.: *Arch. Pharm. Res.* **7**, 127(1984).
  20. Pelletier, S.W., Chokshi, H.P. and Desai, H.K.: *J. Natur. Prod.*, **49**, 892(1986).
  21. LaDu, B.N.: *J. Biol. Chem.* **214**, 741(1955).
  22. Nash, T.: *J. Biol. Chem.*, **55**, 416(1953).
  23. Cooper, J.R. and Brodie, B.B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **114**, 409(1955).
  24. Woo, W.S., Shin, K.H. and Lee, C.K.: *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1800(1983).
  25. Woo, W.S., Lee, C.K. and Shin, K.H.: *Planta Medica* **45**, 234(1982).
  26. Shin, K.H. and Woo, W.S.: *Arch. Pharm. Res.* **9**, 81(1986).
  27. Shin, K.H. and Woo, W.S.: *Arch. Pharm. Res.* **11**, in press (1988).