약학회지 제 46 권 제 5 호 358~363 (2002)
*Yakhak Hoeji* Vol. 46, No. 5

藥學會誌

# 한방 소갈약 추출물 및 복합물에 의한 *In vivo* 및 *In vitro* 지질과산화 저해효과

이경태 · 박동영 · 박희준*# · 정현주* · 박건영** · 최종원***
경희대학교 약학대학, *상지대학교 응용식물과학부,
**부산대학교 식품영양학과, ***경성대학교 약학대학
(Received August 22, 2002; Revised September 19, 2002)

# *In vivo* and *In vitro* Anti-lipid Peroxidative Effect of the Extract Complex of Korean Anti-thirst Drugs

Kyung-Tae Lee, Dong-Young Park, Hee-Juhn Park*#, Hyun-Ju Jung*,
Kun-Young Park** and Jongwon Choi***
*College of Pharmacy, Kyung-Hee University Seoul 130-701, Korea*
**Division of Applied Plant Sciences, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea*
***Department of Food & Nutrition, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea*
****College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan, 608-736, Korea*

**Abstract** — In Oriental medicine, the prescriptions composed of several herb medicines have been used. It is still unclear how the sum of several extracts of anti-thirst drugs represents the anti-lipid peroxidative action. Three anti-thirst herb medicines, *Kalopanax pictus* (K), *Pueraria thunbergiana* (P) and *Rhus verniciflua* (R), were extracted with MeOH and $H_2O$, respectively, and the former one was fractionated into the resultant EtOAc extract. Each extract was reconstituted to give KPR311, KPR131 and KPR113 where, for example, KPR311 represents the complex of K-P-R {3:1:1 (w/w/w)} of the three extracts. The order of the inhibitory effect in bromobenzene-induced lipid peroxidation in rats was as follows: EtOAc extract>$H_2O$ extract>MeOH extract. Extract complexes were found to be more potent than the extracts of individual crude drugs. The KPR131 of EtOAc extract was found to be the most potent among the tested samples. These anti-lipid peroxidative effects were also supported by the decrease of aniline hydroxylase activity and aminopyrine N-demethylase activity, on the other hand by the increase of epoxide hydrolase activity. All the tested samples were assayed *in vitro* antioxidative effects such as DPPH assay, ADP/NADPH/$Fe^{3+}$ assay and ascorbic acid/$Fe^{2+}$ assay. The EtOAc extracts also showed the most significant antioxidative effects. These results suggest that the sum of anti-thirst drugs could reflect the effects of respective crude drugs.

**Keywords** □ Anti-thirst, lipid peroxidation, mixture, DPPH

한방에서는 소갈약이라 하여 약용되어 온 생약들이 다수 사용되고 있는데 이들은 생약의 처방에서도 사용 빈도가 높다. 소갈약으로 기록된 것 중에는 갈근, 황기, 오미자, 감초, 백삼, 길경, 사삼 등 많은데 이들은 당뇨병에 사용되는 용도와 중첩되는 경우가 많으며,[1] 이러한 소갈약은 한방에서 보기약으로 사용되고 허증에 처방되는 경우가 많다. 이러한 약리 작용을 목적으로 하는 소갈약에는 활성 성분이 불분명한 경우가 많은데 그 이유는 여러가지 성분이 복합적으로 작용하기 때문으로 추정된다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-730-0564 (팩스) 033-730-0564
(E-mail) hjpark@mail.sangji.ac.kr

저자들은 이러한 소갈약 중에서 해동피 {음나무(*Kalopanax pictus*, Araliaceae) 수피},[2] 갈화{칡(*Pueraria thunbergiana*, Leguminosae)의 꽃},[3] 옻나무 목부{옻나무(*Rhus verniciflua*, Anacardiaceae)}[4]에 대한 항돌연변이 효과를 지속적으로 연구하여 추출물이 분리한 물질보다 우수하거나 또는 동등한 항돌연변이 효과를 보고 하였다. 또한, *in vivo* 지질과산화 저해 실험에서도 이들은 유효한 결과를 보였으며 지질과산화 저해효과를 나타내는 성분과 분획들이 항돌연변이 실험에서도 비교적 유사한 결과가 얻어졌다.[2-4] 그러므로, 항돌연변이 효과와 지질과산화 저해효과의 상관성을 보임으로서 지질과산화 효과와 항발암과의 관련성이 있는 것으로 추정된다.

해동피의 성분으로서 Kalopanaxsaponin A, kalopanaxsaponin

I, sapindoside C, syringin, coniferylaldehyde 4-O-glucoside, liriodendrin 등이 알려져 있고, 갈화의 성분으로서 Tectorigenin, glycitein, tectoridin, glycitin 등이 알려져 있고, 또한 옻나무 목부의 성분으로서 garbanzol, sulfuretin, fisetin, fustin, mollisacasidin이 알려져 있다. 많은 성분이 활성물질 이외에도 배당체로 존재하며 이들은 장내의 흡수 단계에서 장내 미생물에 의해 가수분해될 수 있는 가능성을 가진다.[5,6] 그 뿐 아니라 apoptosis를 유도하는 특성을 가지거나[7] 이의 신호전달에 있어서 활성화된 마크로파지에서 NO 생성을 저해하는 특성을 나타내는 화합물들이[8] 공존하기 때문에 복잡한 활성성분들이 생약의 항산화에 따른 효과와 관련된 효과를 설명할 수 있으리라 추정된다.

본 연구에서는 통상적인 알코올에 의한 추출과 그 추출물의 에틸아세테이트 분획물, 물 추출물을 조제하여 브로모벤젠으로 유발한 흰쥐의 지질과산화 저해 효과를 관찰하였다. 또한 *in vitro* model에서의 활성을 관찰하여 서로 비교하였다.

## 실험방법

**식물재료 및 시약** – 옻나무는 강원도 원주군 일대에 자생하는 것을 건조하여 껍질을 벗기고 난 목부를 세절하여 사용하였다(# natchem-18). 해동피(# natchem-19) 와 갈화(# natchem-20)는 원주시 천일약업사에서 시판하는 것을 감정한 후 그대로 사용하였다. 이상의 표본은 상지대 응용식물과학부 천연물분석 실험실에 보관 중이다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ADP, NADPH, TBA(2-thiobarbituric acid)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

**추출** – 상기 3종의 생약을 메탄올로 5시간씩 3회 온침하고 이를 여과하여 진공 농축기에서 농축하였고 이를 계속하여 냉동건조기로 건조하여 분말상의 추출물을 각각 얻었다. 이의 일부를 각각 물에 현탁시키고 클로로포름으로 분배추출하였고 남은 수층을 에틸아세테이트로 분배추출하여 이를 감압하에서 농축하였고 계속하여 동결건조하여 분말상의 에틸아세테이트 추출물을 각각 얻었다. 물 추출물을 얻기 위하여 3종의 생약에 대하여 각각 따로 물로서 5시간씩 3회 추출하고 감압농축한 후 동결건조하였다.

**시료의 조제** – 해동피(K), 갈화(P), 옻나무 목부(R)의 메탄올 추출물을 500 mg씩 각각 따로 용기에 담았으며 에틸아세테이트 추출물에 대하여도 이들을 500 mg씩 각각 따로 용기에 담았다. 메탄올 추출물 K, P, R을 3:1:1, 1:3:1, 1:1:3의 중량비율로 조제한 혼합물 역시 500 mg씩 따로 용기에 담았으며 이들을 각각 KPR311, KPR131, KPR113의 용어를 사용한다. 에틸아세테이트 추출물에 대하여도 동일하게 조제하여 KPR311, KPR131, KPR113의 시료를 조제하여 500 mg씩 각각 따로 용기에 담았다. 예를 들면 KPR311이라고 하면 해동피, 갈화, 옻나무 목부의 추출물이 3:1:1의 중량비율로 된 혼합물임을 의미한다.

상기와 같이 조제한 시료를 10% tween 80에 용해한 후 생리식염수로 희석하여 사용하였다. 투여용량은 *in vivo* 실험에서는 100 mg/kg의 용량으로 투여하여 그 결과를 상호 비교하였다.

### *In vivo* 실험

**실험동물 및 검액의 투여** – 실험동물은 한국 실험동물개발로부터 분양 받아 동물사의 일정한 조건(온도: 20±2°C, 습도: 40-60%, 명암: 12 h light/dark cycle) 하에서 2주 가량 충분하게 적응시켜 사육한 체중 20-50 g의 ICR계 웅성 생쥐 및 체중 130-150 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 실험시간 전 24시간동안 물만을 주고 절식하였다. 이 때 효소활성의 일중변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

각 검액 100 mg/kg의 용량으로 1일 1회 7일간 경구투여 하였다. 검액의 투여 후 1일 1회 이틀간 브로모벤젠(BB) 480 mg/kg 복강투여하여 지질과산화를 유발하였다. 실험동물은 BB의 마지막 투여 후 25시간 절식하였다.

**간 조직 중의 지질과산화물 함량 측정** – Ohkawa 등의[9] 방법에 준하여 간 조직 1 g당 9배량의 생리식염수를 가해 마쇄시키고 이 마쇄액에 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 실온에서 냉각시켜 n-BuOH : pyridine(15 : 1)을 첨가하여 15분간 원심분리시킨 후 홍색의 n-BuOH : pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1 g당 malondialdehyde nmole로 표시하였다.

**간 효소활성의 측정** – Aminopyrine N-demethylase의 활성을 측정하기 위하여 Nash등의 방법을[10] 약간 변경하여 반응액 2 ml 중 0.1M $Na^+/K^+$ phosphate buffer(pH 7.5)에 2 mM aminopyrine HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl, 1 mM semicarbizide 및 0.5 ml 효소액을 가해 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 15% $ZnSO_4$와 포화 $Ba(OH)_2$를 가하여 반응을 종료시키고 5분간 방치후 10분간 원심분리하여 여기서 얻은 상등액 5 ml에 발색의 목적으로 Nash reagent를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 원심분리하여 상등액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선에 준하여 활성도를 산정한다.

Aniline hydroxylase의 활성을 측정하기 위하여 Bidlack 등의[11] 방법에 준하여 반응액 2 ml중 10 mM $MgCl_2$와 150 mM KCl이 함유된 50 mM Tris. HCl 완충액(pH 7.4)에 기질인 1 mM aniline HCl, 0.5 mM NADPH 및 0.5 ml 효소액을 가하여 이액을 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 반응을 종료시킬 목적으로 20% trichloroacetic acid를 가한 후 10분간 원심분리한다. 상등

액에 발색의 목적으로 10% $Na_2CO_3$와 0.2N-NaOH(2% phenol 함유)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정한다.

Epoxide hydrolase의 활성은 Habig의 방법[12] trans-stilbene oxide(TSO)의 감소하는 속도를 229 nm에서 흡광도를 측정함으로써 측정하였다.

### *In vitro* 실험

**DPPH법에 의한 free radical 소거효과** – 0.05 M $Na_2CO_3$(pH 10.2) 900 μl를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험군으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 대신 에탄올을 사용하였으며 대조군으로는 시료대신 물을 사용하였을 때를 100%로 하여 DPPH radical 소거 정도를 %로 구하였다.

**흰쥐 간마이크로좀에서 지질과산화 측정** – 흰쥐 간을 이용한 지질과산화 측정의 효소적 및 비효소적 방법은 Kiso 등의[13] 방법을 일부 수정하여 사용하였다.

**Ascorbic acid/$Fe^{2+}$ 유도 지질과산화법(비효소적 방법)** – 100 mM KCl 390 μl, Tris-HCl(45 mM, pH 8.0) 390 μl, 시료용액 50 μl, 마이크로좀 분획(20 μg/ml) 50 μl에 ascorbic acid(10 mM)와 $FeSO_4$(0.5 mM)를 10 μl를 가한 후 37°C에서 20분간 방치하였다. 4°C에서 반응을 정지시킨 후 반응물에 2% SDS 400 (l, 20% acetic aid 완충액(pH 3.5) 750 μl, 0.8% TBA(2-thiobarbituric acid) 750 μl를 가하여 95°C에서 1시간 가열한 후 n-butanol/pyridine(15 : 1) 2 ml를 가하여 잘 흔들어준 뒤 1520 g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조실험에서는 시료대신 증류수를 첨가하여 이 때의 흡광도를 100%로 하여 저해정도를 %로 나타내었다.

**ADP/NADPH/$Fe^{3+}$ 유도 지질과산화법(효소적 방법)** – 100 mM KCl 390 μl, 45 mM Tris-HCl(pH 8) 390 μl, 시료 50 μl, 마이크로좀(20 mg/ml) 50 μl에 20 mM ADP 50 μl, 1 mM NADPH 50 μl, 2 mM $FeCl_3$ 10 μl를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 비효소적 방법과 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

## 실험결과

브로모벤젠을 투여한 흰쥐에서 간의 malondialdehyde(MDA)는 20.9±1.47 (nmol/g of tissue) 에서 54.6±2.39으로 유의성 있는 증가를 보임으로서 지질과산화가 일어남을 확인하였으며(Table I), 또한 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의

**Table I** – Effect of several extracts on lipid peroxide production and the activities of aniline hydrolase (A.H.), aminopyrine N-demethylas e (A.D.) and epoxide hydrolase (E.H.)

| Treatment | | MDA[1] | A.H.[2] | A.D.[3] | E.H.[4] |
|---|---|---|---|---|---|
| Normal | | $20.9 \pm 1.47^{n}$ | $0.57 \pm 0.10^{c}$ | $4.62 \pm 0.33^{j}$ | $14.7 \pm 0.29^{a}$ |
| BB | | $54.6 \pm 2.39^{a}$ | $1.13 \pm 0.13^{a}$ | $6.54 \pm 0.47^{a}$ | $4.14 \pm 0.27^{n}$ |
| Ascorbic acid | | $22.6 \pm 1.24^{n}$ | $0.69 \pm 0.11^{c,d,e}$ | $4.82 \pm 0.23^{h,i,j}$ | $11.5 \pm 0.30^{b}$ |
| | $H_2O$ ext. | $40.2 \pm 3.11^{c,d,e,f}$ | $0.87 \pm 0.11^{b,c}$ | $5.86 \pm 0.23^{b,c}$ | $7.89 \pm 0.25^{k,l}$ |
| *K. pictus* (K) | MeOH ext. | $47.9 \pm 2.96^{b}$ | $0.94 \pm 0.08^{a,b}$ | $6.14 \pm 0.39^{a,b}$ | $7.52 \pm 0.31^{l,m}$ |
| | EtOAc ext. | $31.6 \pm 2.71^{j,k,l}$ | $0.81 \pm 1.10^{b,c,d}$ | $5.46 \pm 0.41^{c,d,e,f}$ | $9.13 \pm 0.23^{f,g}$ |
| | $H_2O$ ext. | $37.9 \pm 1.96^{d,e,f,g}$ | $0.75 \pm 0.11^{b,c,d,e}$ | $5.23 \pm 0.28^{e,f,g,h}$ | $8.75 \pm 0.24^{g,h,i}$ |
| *P. thunb.* (P) | MeOH ext. | $41.7 \pm 2.43^{c,d}$ | $0,73 \pm 0.12^{c,d,e}$ | $5.16 \pm 0.30^{f,g,h,i}$ | $8.11 \pm 0.36^{j,k}$ |
| | EtOAc ext. | $29.4 \pm 3.17^{l,m}$ | $0.69 \pm 0.09^{c,d,e}$ | $4.87 \pm 0.27^{c,d,e,f}$ | $9.30 \pm 0.23^{f,g}$ |
| | $H_2O$ ext. | $35.3 \pm 1.83^{g,h,i,j}$ | $0.75 \pm 0.18^{b,c,d,e}$ | $5.77 \pm 0.26^{b,c,d}$ | $9.81 \pm 0.22^{e}$ |
| *R. vern.* (R) | MeOH ext. | $36.6 \pm 1.99^{f,g,h,i}$ | $0.78 \pm 0.13^{c,d,e}$ | $5.49 \pm 0.32^{c,d,e,f}$ | $9.94 \pm 0.17^{d,e}$ |
| | EtOAc ext. | $33.2 \pm 2.10^{i,j,k,l}$ | $0.70 \pm 0.15^{c,d,e}$ | $5.67 \pm 0.30^{b,c,d,e}$ | $10.6 \pm 0.26^{c}$ |
| | $H_2O$ ext. | $40.6 \pm 1.49^{c,d,e}$ | $0.63 \pm 0.11^{d,e}$ | $4.69 \pm 0.21^{i,j}$ | $7.42 \pm 0.35^{l,m}$ |
| KPR311[5] | MeOH ext. | $43.2 \pm 2.47^{c}$ | $0.85 \pm 0.13^{b,c,d,e}$ | $5.83 \pm 0.20^{b,c,d}$ | $9.80 \pm 0.32^{e}$ |
| | EtOAc ext. | $34.7 \pm 2.15^{g,h,i,j}$ | $0.77 \pm 0.10$ | $5.62 \pm 0.19^{c,d,e,f,g}$ | $9.91 \pm 0.23^{e}$ |
| | $H_2O$ ext. | $36.2 \pm 2.44^{g,h,i}$ | $0.72 \pm 0.12^{c,d,e}$ | $5.40 \pm 0.14^{c,d,e,f,g}$ | $7.13 \pm 0.22^{m}$ |
| KPR131 | MeOH ext. | $33.7 \pm 2.97^{h,i,j,k}$ | $0.70 \pm 0.17^{c,d,e}$ | $5.27 \pm 0.27^{e,f,g,h}$ | $8.43 \pm 0.26^{i,j}$ |
| | EtOAc ext. | $27.6 \pm 1.87^{m}$ | $0.64 \pm 0.07^{d,e}$ | $4.93 \pm 0.21^{g,h,i,j}$ | $10.0 \pm 0.27^{d,e}$ |
| | $H_2O$ ext. | $37.2 \pm 2.40^{e,f,g,h}$ | $0.79 \pm 0.15^{b,c,d}$ | $5.54 \pm 0.30^{c,d,e,f}$ | $8.92 \pm 0.23^{f,g,h}$ |
| KPR113 | MeOH ext. | $35.6 \pm 2.93^{g,h,i}$ | $0.77 \pm 0.10^{b,c,d,e}$ | $5.37 \pm 0.19^{d,e,f,}g$ | $9.31 \pm 0.20^{f}$ |
| | EtOAc ext. | $31.0 \pm 2.06^{k,l,m}$ | $0.74 \pm 0.16^{b,c,d,e}$ | $5.39 \pm 0.24^{c,d,e,f,g}$ | $10.4 \pm 0.26^{c,d}$ |

Unit: [1]nmoles/g of tissue, [2]p-aminophenol nmol/mg protein/min, [3]Unit HCHO nmol/mg protein/min, [4]nmol/g of tissue; [5]KRR311 is the mixture K-P-R=3:1:1 (w/w/w); The means with the same superscript letters (a-n) are not significantly different at 0.05 probabitlity level in each column by Duncans new multiple range test.

활성도 각각 0.57±0.10 및 4.62±0.33에서 1.13±0.13과 6.54±0.47로 증가되었으나 epoxide hydrolase의 활성은 상대적으로 14.7±0.29에서 4.14±0.27로 유의성 있는 감소를 보였다. 해동피, 갈화 및 옻나무 목부 각 추출물, 그리고 이들의 비율적 혼합물의 경구투여(100 mg/ml)는 브로모벤젠에 의해 유발된 지질과산화의 증가 그리고 이의 해독에 관계하는 효소의 활성이 전체적으로 정상흰쥐군으로 변화하고 있음을 관찰하였다. 이들 처리군의 모든 투여군에서 유의적인 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 각 생약의 처리에서는 메탄올 추출물의 처리가 가장 효과가 강하였으며, 분획하여 얻어진 에틸아세테이트 분획의 추출물이 가장 효과가 강하게 나타났다. 한편, 물 추출물은 이들 두 용매 추출물의 활성 크기의 중간에 보였다. 혼합물의 효과는 KPR-131에서 그 활성이 가장 크게 나타났으며 이 효과는 단일 생약 투여군보다 더 강한 활성을 보였다. 특히 에틸아세테이트 분획 KPR131(KPRE131)이 가장 나은 지질과산화 저해효과를 나타내었다.

간의 microsomal enzyme으로서 P450 효소에 속하는 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase 효소활성들이 단일 및 혼합 생약들 처리에서 감소하였다. 브로모벤젠으로 감소된 epoxide hydrolase의 활성은 이들 생약 추출물의 투여로 다시 증가하였다. 시험에 사용된 세 가지 생약 중에서는 옻나무 목부가 가장 강한 효소활성 정상화효과를 나타내었다. 이러한 생약의 처리에 따른 epoxide hydrolase 효소활성의 증가는 MDA 생성 감소, aniline hydrolase및 aminopyrine N-demethylase 활성의 감소경향과 어느 정도 일치하여 나타났다. 단, epoxide hydrolase의 활성 증가는 옻나무 목부가 가장 강하게 나타났으며 혼합물의 투여에서도 이 생약의 배합이 많은 경우에 더욱 강하게 나타났다. 그러나, 이 효소의 활성의 경우에도 분획의 효과가 가장 현저하였고 혼합에 의한 효과는 유의성이 관찰되지 않았다.

활성산소 소거와 관련된 DPPH 법에 의한 *in vitro* 검색에서는 주로 천연의 페놀성 화합물에서 유의성 있는 저해작용이 많이 관찰되고 있다. 본 실험에서는 물 추출물과 메탄올 추출물의 비교에서 옻나무 목부> 갈화> 해동피 순으로 효과가 나타났으며(Table II), *in vivo* assay에서와 달리 각 생약간의 효과가 뚜렷하였다. 혼합물의 투여에서는 옻나무 목부의 추출물의 비율이 높아질수록 더욱 강한 활성산소 소거효과를 나타내었다. 또한 분획에 의한 효과의 변동이 *in vivo* assay에서와 달리 유의성 있는 저해효과를 보였다. 이 경우에 해동피, 갈화, 옻나무 목부는 에틸아세테이트로 분획할 경우 추출물보다 활성이 크게 관찰된다. 효소적 및 비효소적 방법에 의한 지질과산화를 저해하는 효과에서는 DPPH assay에서와 아주 유사한 패턴을 나타내었다. 여기서 세 생약의 경우는 효소적 지질과산화 저해효과가 DPPH assay 결과와 유사하게 나타나고 갈화의 경우는 비효소적 방법의 경우도 DPPH assay의 경우와 유사하게 관찰되었다. 그러나 분획물의 경우는 이 *in vitro* 검색계에서 가장 높은 활성을 보임으로써 서로 일치하는 패턴의 저해경향을 나타내었다. 또한 옻나무 추출물과 그 분획은 *in vitro* 검색에서 가장 유력한 활성을 나타내었다.

**Table II** – *In vitro* antioxidant effect of various extracts and their mixtures

| Treatment | | $IC_{50}$ (μg/ml) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | DPPH | Ascorbic acid/$Fe^{2+}$ | ADP/NADPH /$Fe^{3+}$ |
| *K. pictus* (K) | $H_2O$ ext. | 20.3[1)] | 26.3 | 65.8 |
| | MeOH ext. | 22.1 | 31.2 | 109.4 |
| | EtOAc ext. | 2.3 | 1.7 | 2.8 |
| *P. thunb.* (P) | $H_2O$ ext. | 18.9 | 26.7 | 21.2 |
| | MeOH ext. | 31.3 | 23.3 | 50.1 |
| | EtOAc ext. | 8.3 | 6.3 | 5.6 |
| *R. vern.* (R) | $H_2O$ ext. | 3.7 | 6.8 | 4.6 |
| | MeOH ext. | 3.7 | 0.9 | 4.5 |
| | EtOAc ext. | 0.8 | 1.1 | 1.2 |
| KPR311 | $H_2O$ ext. | 11.6 | 22.4 | 59.2 |
| | MeOH ext. | 8.6 | 8.21 | 11.4 |
| | EtOAc ext. | 1.6 | 0.2 | 5.6 |
| KPR131 | $H_2O$ ext. | 12.5 | 23.3 | 8.9 |
| | MeOH ext. | 9.2 | 8.24 | 7.7 |
| | EtOAc ext. | 2.0 | 0.1 | 3.4 |
| KPR113 | $H_2O$ ext. | 7.4 | 13.7 | 4.2 |
| | MeOH ext. | 4.5 | 3.4 | 5.9 |
| | EtOAc ext. | 0.8 | 0.3 | 2.5 |
| Caffeic acid | | 10.5 | 0.5 | 0.8 |

The values represent the mean of three independent experiments.

## 고 찰

지질과산화는 생체에서 자연적으로 발생될 수 있는 superoxide anion radical ( $\cdot O_2^-$)로부터 유래하는 각종의 free radical에 의해 세포막의 다가 불포화지방산을 과산화시키는 현상을 지칭한다. 이러한 불포화지방산이 과산화 과정을 통해 분해되어 MDA를 생성하므로 이를 지표로 지질과산화를 측정하는 수단으로 한다. 또한, 다양한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시키는 superoxide anion radical은 cyclo-oxigenase, NADPH oxidase, xanthine oxidase, lipoxigenase, cytochrome P450 등과 같은 효소의 활성화에 의해 나타난다.[14-16)] 일반적으로 면역적 증가의 경우에 이와 같은 효소의 활성이 크게 나타난다.[17,18)] 그러므로, 천연물에 의한 지질과산화의 저해정도를 측정하는 것은 노화방지제의 개발과 관련하여 매우 중요하다고 할 수가 있다.

본 연구에 사용된 식물재료의 추출물이 모두 MDA를 감소시키

는 것은 노화의 저지에 관련이 있음을 시사하는 바 비록 3종의 생약에서 관찰된 사실이지만 저자들의 그 동안의 연구[2-4,5-7,19] 및 각종 보고서에 의하면 한방 소갈약이 노화방지와 밀접한 관련이 있음을 시사해 주고 있다. 또한 에틸아세테이트 분획의 효과가 가장 큰 것으로 나타난 것은 3종 생약에서 일치하는 현상이었으므로 한방의 소갈약은 극성을 갖는 분획에서 나타나는 성분들이 유효활성 물질일 가능성이 큰 것으로 제시된다. 일반적으로 생약의 복용은 물로 추출하여 복용하는 것이 전통적인 복용법인 바 물 추출물, 그리고 알코올 중 하나인 메탄올 추출물의 효과를 비교하였을 때 물 추출물에서 뚜렷한 효과를 나타내는 것은 극성용매로 활성물질이 이동함도 잘 알 수가 있다. *In vivo* 효과가 *in vitro* 검색에 의한 지질과산화 효과와 크게 다르게 나타났는데 이는 직접적인 hepatic microsomal enzyme의 저해 뿐 아니라 생체의 다른 인자, 즉 신호전달과 같은 요소에 의해서도 지배 받고 있는 경우를 예상할 수가 있다. 특히, 사포닌의 경우는 *in vitro* 검색에서는 효과가 없고(데이터 미제시) *in vivo* assay에서는 효과가 유의성 있게 나타났는데[20] 이러한 활성차이의 관찰은 다른 기전에 의해서 활성을 나타냄을 제시하고 있다. 이러한 다른 기전에 의해서 지질과산화를 저해하리라 생각되는 세 생약을 배합하였을 때 활성이 서로 비슷하게 관찰되었다. 그러므로, 소갈약의 복합물은 단일 생약의 활성을 크게 변화시키지 않는 것으로 나타났다. 단지 여기서 알 수 있는 사실은 KPRE131이 가장 강한 효과를 나타내는 사실도 한약의 복합처방 구성에 대한 앞으로의 연구가 필요함을 잘 보여주고 있다.

브로모벤젠은 Phase I 효소를 활성화시키며 이러한 과정에서 브로모벤젠 3,4-oxide를 생성시킨다. 이 중간체는 epoxide hydrolase에 의해 브로모벤젠 3,4-diol로 대사되어 직접 배설되거나 glutathione과 결합한 후 배설되기도 한다. 그러므로 브로모벤젠은 Phase I 효소계의 활성을 크게 증가시키며, 또한 epoxde hydrolase의 활성을 감소시킴이 Table II에 나타나 있다. 브로모벤젠으로 증가된 hepatic P450 효소계의 활성이 생약 시료의 투여에 의해 감소되는 현상은 MDA의 경우와 유사한 경향을 보여주고 있다. 이러한 사실은 소갈약들이 Phase I 효소계에 직접적/간접적인 작용에 의해서 나타남을 알 수가 있다. *In vitro* 지질과산화 저해효과에서도 사포닌을 유효성분으로 하는 해동피와 갈화의 경우는 효과가 약하며, 상대적으로 옻나무 목부는 효과가 강하게 나타나는 실험결과로부터 실험동물에서의 P450에 대한 활성의 억제는 서로 다른 기전에 의해 일어남을 제시해 주고 있다.

Table II에 나타낸 바와 같이 직접적인 활성산소 소거효과의 패턴이 *in vivo* 및 *in vitro* 지질과산화 저해효과와 매우 유사하게 나타나는 사실은 소갈약의 *in vitro* 지질과산화 저해효과가 직접적인 활성산소 소거효과에 기인하고 있음도 잘 알 수가 있다. 또 세가지 생약의 에틸아세테이트 분획의 지질과산화 억제에서 가장 유의성 있는 효과를 보였으며 이는 대조약물로 사용된 caffeic acid의 활성과 아주 유사하게 나타남으로써, 성분중 페놀성 화합물들이 이 실험계에서 작용하고 있음을 제시해 주고 있다.

본 연구결과에서 소갈약의 활성 검색에서 분획에 의한 효과가 활성물질의 검출에 있어 매우 중요하며 생약의 병용에 의해서 활성은 감소하지 않으며 오히려 증가시킬 수 있음을 추가적으로 제시할 수 있다. 또한 소갈약의 활성검색에서 필수적으로 동물실험에 의한 결과가 노화방지와 관련하여 매우 중요하다고 할 수가 있다. 한방 소갈약의 경우에 항당뇨, 강장, 강정 효과를 나타내는 경우가 많기 때문에 그 유효성분이 주로 수용성 물질에서 나타난다는 사실에 의해서 이들 유효성분들이 많이 함유되는 쪽의 추출공정의 개발을 유도한다면 각종의 유기화학적 방법을 이용하는 공법이 생약의 산업화를 위해 동원되어야 할 중요한 것으로 추론된다. 이러한 것은 전통적으로 생약의 채집, 가공, 추출 및 방제의 방법에서 많이 예견되고 있는 사실이기 때문에 이에 관한 연구와 고찰이 필요하리라 생각된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제번호: 2000-2-20900-012-3)의 지원으로 수행되었음.

## 문 헌

1) 지형준, 이상인: 대한약전외 한약(생약) 규격집 주해서, 한국메디컬인덱스스사, 서울 (1988).
2) Lee, K. T., Shon, I. C., Park, H. J., Kim, D. W., Jung, G. O. and Park, K. Y.: Essential Moiety for Antimutagenic and Cytotoxic Activity of Hederagenin Monodesmosides Isolated from the Stem Bark of *Kalopanax pictus*. *Planta Med*. **66**, 329 (2000).
3) Park, K. Y., Jung, G. O., Choi, J. W., Lee, K. T. and Park, H. J. : Potent Antimutagenic and Their Anti-Lipid Peroxidative Effect of Kaikasaponin III and Tectorigenin from the Flower of *Pueraria thunbergiana*. *Arch. Pharm. Res.* **25**(3), 320 (2002).
4) Park, H. J., Kwon, S. H., Kim, G. T., Lee, K. T., Jung, G. O. and Choi, J. W. : The pharmaceutical society of Korea, Anticarcinogenic effect of the heartwood of *Rhus verniciflua* and its active principles. *The Spring Convention of the Pharmaceutical Society of Korea* 188 (2000).
5) Kim, D. H., Kim, E. A., Han, M. J., Park, H. J., and Choi, J. W. : Metabolism of kalopanaxsaponin K by human intestinal bacteria and antitrheumatoidal arthritis activity of their metabolites. *Biol. Pharm. Bull.* **25**(1), 68 (2002).
6) Kim, D. H., Lee, K. T., Bae, E. A., Han, M. J. and Park, H. J. : Metabolism of Liriodendrin and Syringin by Human Intestinal Bacteria and their relation to *in vitro* Cytotoxicity. *Arch. Pharm. Res.* **22**(1), 30 (1999).

7) Lee, K. T., Sohn, I. C., Kim, Y. K., Choi, J. H., Choi, J. W., Park, H. J., Itoh, Y. and Miyamoto, K. I. : Tectorigenin, an Isoflavone of *Pueraria thunbergiana* Benth, Induces Differentiation and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **24**(10), 1117 (2001).

8) Xiong, Q. B., Tezuka, T., Kaneko T., Li, H., Tran, L.Q., Hase, K., Namba, T. and Kadota, S.: Inhibition of nitric oxide by phenylpropanoids in activated macrophage. *Eur. J. Pharmacol.* **400**, 137 (2000).

9) Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).

10) Nash, T. : The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. *J. Biol. Chem.* **55**, 416 (1953).

11) Bidlack, W. R., and Lowery, G. L. : Multiple drug metabolism: P-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 311 (1982).

12) Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130 (1974).

13) Kiso, Y., Tohkin, M., Hikio, H., Hattori, M., Sakamoto, T. and Namba, Y. : Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin. *Planta Med.* **50**, 298 (1984).

14) Schaffner, F. : Hepatic drug metabolism and adverse hepatic drug reactions. *Vet. Pathol.* **12**, 145 (1975).

15) Singh, A. and Rao, A. R.: Effects of arecoline on phase I and phase II drug metabolizing system enzymes, sulfhydryl content and lipid peroxidation in mouse liver, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **30**, 763 (1993).

16) Morgan, E. T. : Regulation of cytochrome P450 durig inflammation and infection. *Drug Metab. Rev.* **29**, 1129 (1997).

17) Halliwell, B. : Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organism. *Cell Biol. Int. Rep.* **2**, 112 (1978).

18) Deneke, S. M. and Fanburg, B. L. : Normobaric oxygen toxicity of the lung. *New Engl. J. Med.* **303**, 76 (1980).

19) Lee, K. T., Sohn, I. C., Kim, D. H., Choi, J. W., Kwon, S. H. and Park, H. J. : Hypoglycemic and hypolipidemic effects of tectorigenin and kaikasaponin III in the streptozotocin-induced diabetic rat and their antioxidant activity *in vitro*. *Arch. Pharm. Res.* **23**(5), 461 (2000).

20) Choi, J. W., Han, Y. N., Lee, K. T., Park, K. Y., Kwak, T. S., Kwon, S. H., and Park, H. J. : Anti-lipid peroxidative principles from the stem bark of *Kalopanax pictus Nakai*, *Arch. Pharm. Res.* **24**, 536 (2001).