

림포사이트의 증식과 대식세포의 활성화에 관한 린나린과 아세틸 린나린의 비교 연구

한신하 · 신지혜 · 소명아 · 한혜란 · 김민준 · 임동술 · 김경제[#]

삼육대학교 약학과

(Received August 19, 2003; Revised August 22, 2003)

Comparison of Linarin and Its Acetylated linarin for the Cytotoxicity on the Proliferation of Lymphocytes and Activation of Macrophages

Shinha Han, Jee-hae Shin, Myung-a So, Hye-ran Han, Min-joon Kim, Dongsool Yim and Kyungiae Kim[#]

Department of Pharmacy, Sahmyook University, 26-21 Gongreung-Dong, Seoul 139-742 South Korea

Abstract — Linarin is a main compound from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. However, the biological mechanisms of these activities are unclear. Because of this wide diversity of effects, it is believed that they may be exerted through pluripotent effectors of linarin. In our previous screening study, the effects of linarin on the mouse macrophages cell line, RAW 264.7 cells, were investigated. It was found that linarin could stimulate macrophages activation by the production of tumor necrosis factor (TNF). The linarin (6.25~12.5 µg/ml) inhibited the production of NO in LPS-activated RAW 264.7 cells and linarin became an useful candidates for the development of new drug to treat endotoxemia and inflammation accompanied by the overproduction of NO. However, linarin-treated total lymphocyte showed cytotoxicity in a dose dependent manner between 20 µg/ml and 40 µg/ml. In this study, linarin derivative (acetylated linarin) was synthesized in order to obtain less-cytotoxicity of linarin and evaluated for their *in vitro* cytotoxic activity against mouse total lymphocyte. There was no cytotoxic activity in a dose dependent manner (20~40 µg/ml) of acetylated linarin whereas linarin showed. The production of NO, however, was not the case by this modified linarin. The cell morphological change was not significantly changed in response to acetylated linarin alone and these effects were potentiated by the addition of LPS. These results suggest that acetylated linarin may be developed to be a promising new drug candidate without cytotoxicity on the basis of its activity of macrophage activation.

Keywords □ *Chrysanthemum zawadskii*, macrophage activation, linarin, acetylated linarin

구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herb)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 전초의 생약명은 선모초,¹⁾ 구절초²⁾라 하며 학명이 *Chrysanthemum zawadskii* Herich var. *latiloum* Kitamura (구절초), *Chrysanthemum sibiricum* Fisch var. *latiloum* Komar (넓은잎구절초), *Chrysanthemum leiphyllum* Nkai(사홍구절초) 등이며 변종으로 *Chrysanthemum zawadskii* Herb ssp. *acutiloum* (바위구절초)등을 구절초라 한다. 구절초는 전국 각처의 고원지에서 자생하며 세계적으로는 중국, 러시아, 몽골, 일본 등에서 자라며 민간에서는 전초와 꽃 이삭을 폐렴, 기관지염, 기침, 감기, 인두염, 방광질환, 부인병, 냉증, 위장병, 고혈압 등에 사용되어

왔다.³⁻⁵⁾ 이 식물의 성분은 이에 의해 linarin이 함유되어 있음이 밝혀졌고, 꽃 이삭과 전초에 정유가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

Linarin은 acacetin-7-β-rhamnoglucoside로 acaciin이라 알려져 있다. 서양에서 linarin을 함유한 식물들의 주요한 용도로는 진통, 소염, 항염작용 등이 보고되었다.⁷⁾ Linarin의 생리활성은 Martinez-Vazquez 등에 의해 writhing test, hot plate test 등에 의한 진통작용과 yeast를 이용한 해열작용 실험,¹⁴⁾ carrageenan을 사용한 항 염증작용이, Houghton등에 의해 *in vitro* 상에서 CCl₄, galactosamine으로 독성을 유발했을 때 간 보호 작용이 있음이 알려져 있다.¹⁵⁾ 우리나라에서 구절초가 옛날부터 민간에서 냉, 대하 등 주로 부인병 질환⁸⁾으로 사용한다는 보고가 주종을 이루었고, 간혹 위장병약, 감기약으로 사용한다는 보고가 드물게 있었다. 구절초의 생리활성 가운데 감기약으로 사용한다는 보고

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3399-3656 (팩스) 02-979-0711
(E-mail) kimkj@syu.ac.kr

를 확인하기 위해 해열, 진통 그리고 소염작용을 아울러 안전성의 평가를 위해 간 보호 작용을 *in vivo* 실험을 한 결과 해열, 진통, 소염작용, 간 보호 작용이 비교약물에 비해 뛰어남이 입증된 것을 참고 하였다.⁸⁾

Linarin이 murine macrophage 계열의 RAW 264.7 세포주의 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 NO의 생성이 6.25 µg/ml부터는 급격히 감소하는 현상을 볼 수 있었고 i-NOS에 의한 NO의 생성과 염증반응이 더 활발히 일어나는데 linarin이 NO의 생성을 저해하는 효과로 linarin이 염증치료제로의 가능성이 있음이 보고되었다.⁹⁾

그런데 linarin은 저농도군(2.5, 5 µg/ml)에서는 대식세포 활성화 효과가 뛰어남에 비해 농도가 20 µg/ml 이상이 되면 cytotoxicity를 보이기 때문에 세포에 치명적인 영향을 미쳐 안전한 치료제로 개발하기 위해서 cytotoxicity를 낮추는 방안으로 linarin을 acetylation하였고 acetylated linarin이라는 물질을 얻었다. 이것을 mouse의 비장세포에 농도별로 처리하여 cell의 proliferation효과를 비교하였고, macrophage cell line을 이용해 macrophage의 활성을 *in vitro* 실험에서 관찰하였다.

실험 방법

실험재료

구절초 3 kg을 경동 약령시장에서 구입하여 사용하였고, 표본은 삼육대학교 생약표본실에(표본번호 He-232305) 보관하고 있다.

실험동물

실험 쥐는 mouse(BALB/c-♂)계의 체중 20±2 g인 것을 사용하였고, 실험동물은 대한실험동물(주)에서 구입하였다. 사육 온도는 25±2°C였고 고형사료와 물을 공급하였다.

약 및 기구

추출용 용매는 1급시약(methanol)을 linarin재결정에는 pyridine을 사용하였고 linarin acetylation에는 acetic anhydride를 사용하였다. PBS(phosphate buffered saline), ACK Lysing buffer, LPS (lipopolysaccharide: *Escherichia coli* 0111: B4, Sigma), ConA(Concanavalin A, Sigma), Trypan blue(Gibco BRL, grand land), FBS(Fatal bovine serum: Gibco BRL, grand land), DMSO(Dimethyl Sulfoxide, Sigma, Chemical Co. St. Louis, U.S.A.), XTT reagent(Tetrazolin salt, Sigma), Acetic anhydride (CH₃CO)₂O, pyridine C₅H₅N(Duksan pharmaceutical, Co. LTD)을 사용하였다. Rotary Vacuum Evaporator(TOKYO RIKAKISAI, Co. LTD), Centrifuge(Eppendorf), ELISA reader(Molecular Device), Micrometer(Olympus/Japan), Aspirator(TOKYO RIKAKISAI, Co. LTD)을 사용하였다.

Linarin 분리

구절초의 MeOH 추출 - 구절초 3 kg을 환류 냉각장치가 부착된 추출용기를 이용하여 MeOH로 수욕상 60°C에서 4시간씩 3회 추출하였다. 그 다음 여과기를 이용하여 구절초를 제거하고 MeOH 추출여액을 수일간 방치하였다. 그 후 다시 여과하여 감압농축 시켰다. 둥근 flask에 MeOH 추출여액 1/2 가량 채운 후 수욕상 온도를 60~70°C로 맞춘 후(MeOH의 끓는점 보다 낮은 온도) evaporation시켜 methanol을 최대한 날려 보내는 방법으로 감압 농축 시켰다. 이때 bumping 되면 순수한 methanol만 증류되지 않을 뿐더러 우리가 얻고자 하는 linarin이 소실되므로 감압조절을 잘하고 MeOH 여액이 끓어오른다 싶으면 즉시 감압하였다.

Linarin의 분리 및 정제 - Methanol 농축 추출액을 수일간 방치한 후 methanol의 제거를 위해 vehenor 깔대기를 이용하여 감압여과 시켜서 여과지 위에 진녹색 침전물을 얻었다. 얻은 침전물에서 먼지와 불순물과 염복소의 제거를 위해 과량의 methanol로 10회 감압여과를 반복하였다. 얻어진 침전물을 pyridine과 MeOH로 수회 재결정하여 linarin 7.2 g을 얻었고 ¹H-NMR을 측정하여 비교하고 아울러 표준품과 TLC에서 동일한 R_f를 가짐을 확인하여 동일물질로 동정하였다.

Linarin의 기기분석 결과

성상은 미 황색 결정으로 m.p.: 272~274°C, ¹H-NMR(DMSO-d): δ8.03 (2H, d, J=8 Hz and 2'-H and 6'-H), 7.13(2H, d, J=8 Hz, 3'-H and 5'-H), 6.90(1H, δ, 3-H), 6.60(1H, d, J=2 Hz, 8-H), 6.43(1H, d, J=2 Hz, 6-H), 5.30~4.90(1H, br, s, w=15 Hz, 1"-glucose), 4.63(1H, s, 1"-H rhamnose), 3.87(3H, s, OMe), 3.80~3.30(9H, sugar protons), 그리고 1.12(3H, d, J=6 Hz, rhamnose C-Me)이다(Fig. 1).

Linarin의 acetylation

Linarin을 60 ml의 pyridine에 녹인 후 acetic anhydride 60 ml를 가하고 overnight 시킨 후 얼음을 넣어 결정이 떨어지도록 한

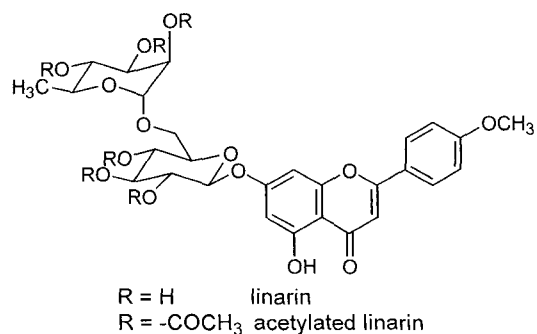


Fig. 1 - Structure of linarin and acetylated linarin.

다. Dry oven에 건조 시켜서 acetylated linarin분말을 얻었다.

Acetylation linarin의 기기분석 결과

성분의 확인을 위해 서울대학교 천연물 연구소의 HPLC기기를 사용해 acetylation된 linarin임을 확인하였다(Fig. 1). H-NMR: δ 1.15 (3H, d, $J=6$ Hz, CH_3 of rhamnose), 1.90-2.09 (18H, each all s, 6x OAc), 2.44 (3H, s, c5-OAc), 3.88 (3H, s, -OMe), 4.72 (1H, anomeric H of rhamnose), 5.24 (1H, d, $J=7$ Hz, anomeric H of glucose), 6.64 (1H, s, H-3), 6.98 (2H, d, $J=2$ Hz, H-8), 70.3 (2H, d, $J=9$ Hz, H-3' & H-5'), 2H, d, $J=9$ Hz H-2' & H-6'.

Linarin과 acetylated linarin의 mouse 비장세포에서의 증식 비교

Mouse(BALB/c-♂)의 비장을 갈아 single cell로 만든 후 4°C 에서 1200 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고, 세포현탁액(cell suspension)에서 적혈구들을 제거하기 위해 저장액인 ACK lysing buffer를 3 ml 넣고 원심분리 한 후 상등액을 제거하였다. PBS(or RPMI 1640)를 10 ml 첨가하여 원심분리하고 상등액을 제거한 후, cell pellet을 vortexing하고, PBS를 10 ml 첨가, 혼합한 후 세포 계수를 준비하였다. Spleen cell 수를 1×10^6 cells/ml이 되도록 하고 완전 배지(RPMI-10)를 첨가하였다. 이렇게 cell수를 맞춘 후 처리군으로 media only, LPS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) only, LPS/linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS/acetylated linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ConA(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) only, ConA/linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ConA/acetylated linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 단계별 농도로 처리해 96 well에 각 well마다 200 μl 씩 넣고 37°C , 5.5% CO_2 incubator에서 3일 동안 culture한 후 XTT reagent를 각 well에 50 μl 씩 취하고 3시간 동안 incubation한 후 490 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

Nitrite oxide assay

본 실험에 사용한 세포주는 RAW(Murine macrophage cell line 264.7: American Type Culture Collection) cell line을 사용하였다. RAW 264.7세포주를 2×10^5 cells/96 well에 넣어 culture하였다. 처리군은 media only, LPS(10 ng/ml) only, LPS/linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS/linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS/acetylated linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 별로 준비하였고 한 group당 6 well을 사용하였으며 한 well당 200 μl 씩 넣었다. Set up한 96 well를 incubation(37°C , 5.5% CO_2)한 상태로 overnight했다. Overnight한 96 well에서 표면에 있는 상등액을 100 μl 씩 덜어서 new plate에 옮겨 담았다. 또한 NaNO_2 standard를 이용해 standard를 만들었다. 이렇게 준비한 NaNO_2 standard를 new plate에 100 μl 씩 넣고 동량의

Griess reagents(100 μl)를 넣은 후 상온에서 10분 동안 방치한 후 ELISA reader로 540 nm에서 측정하였다. 이는 NO가 매우 불안정하여 NO^2 로 즉시 변환되므로 NO^2 를 정량하는 방법으로서 sodium nitrite를 NO^2 표준품으로 하여 검량선을 작성하였다.

Cell staining

Linarin과 acetylated linarin이 macrophage morphology에 어떤 영향을 주는지 알아 보기위해 chamber slide에 RAW cells을 1000 cells/well 밀도로 하고 LPS(100 ng/ml), LPS/linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS/acetylated linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), media 48시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하였고 처리한 세포들을 Diff-quick Solution을 사용해서 염색 고정하였다.

결과 및 고찰

Linarin과 acetylated linarin가 각 비장세포의 LPS의 증식반응에 미치는 영향

LPS/linarin(2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 total lymphocyte의 수가 증가하는 경향을 보여주었고 고농도(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)부터는 cytotoxicity 보임을 확인하였으며 acetylated linarin을 total lymphocyte에 투여해 비교해 본 결과 저 농도(2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 linarin보다 조금 높은 생리활성을 나타내었고, 고농도에서도 lymphocyte증식에 영향을 주는 뚜렷한 결과를 얻었다(Fig. 2).

Linarin과 acetylated linarin가 각 비장세포의 ConA의 증식반응에 미치는 영향

ConA/linarin(2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 total lymphocyte를 증식시키는 데 영향을 주었지만 linarin의 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터는

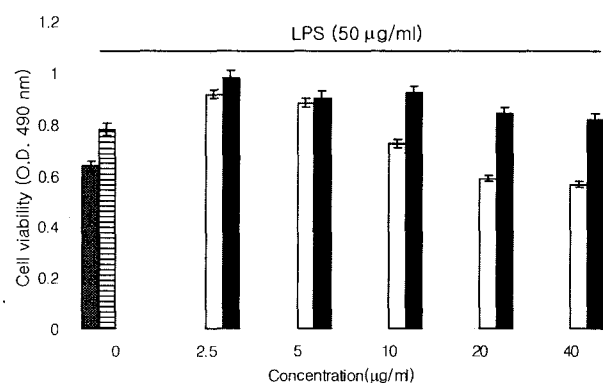


Fig. 2 - Proliferation assay of linarin or acetylated linarin (2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) by LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimulated spleen cells. Cells were incubated 8 wells per each group for 3 days at 37°C and 5.5% CO_2 . After adding 50 μl XTT labeling mixture and incubate for 3 hrs at 37°C and 5.5% CO_2 . Measure absorbance using an ELISA reader at 490 nm.

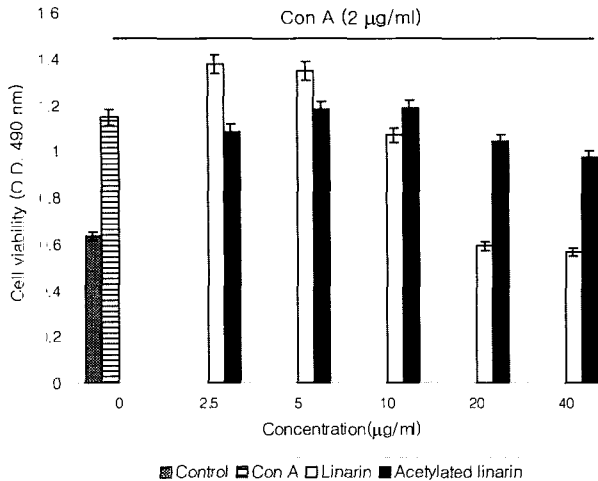


Fig. 3 – Proliferation assay of linarin or acetylated linarin (2.5, 5, 10, 20, 40 µg/ml) by Con A (2 µg/ml) stimulated spleen cells. Cells were incubated 8 wells per each group for 3 days at 37°C and 5.5% CO₂. After adding 50 µl XTT labeling mixture and incubate for 3 hrs at 37°C and 5.5% CO₂. Measure absorbance using an ELISA reader at 490 nm.

lymphocyte의 수가 감소하는 경향을 보이며 linarin의 농도 20, 40 µg/ml에서는 현저하게 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다. Acetylated linarin을 mouse에 처리한 경우 저 농도(2.5, 5 µg/ml)에서는 linarin 보다 낮은 생리활성을 나타내지만, 고농도 (20 µg/ml)에서도 lymphocyte를 증식 시키는 영향을 주어 linarin과 비교하여 고농도에서는 cytotoxicity가 없는 것을 확인하였다(Fig. 3).

Linarin과 acetylated linarin이 macrophage 계열의 RAW 264.7 세포주에서의 NO의 생산에 미치는 영향

Macrophage 계열의 RAW 264.7 세포주에 NO의 생산을 유도하기 위하여 LPS(10 ng/ml)를 이용해 활성화시켰다. LPS/linarin (1.6, 3.1, 6.25, 12.5, 25 µg/ml), LPS/acetylated linarin(1.6, 3.1, 6.25, 12.5, 25 µg/ml)을 단계 희석하여 처리했다. Linarin의 경우 NO의 생성이 6.25 µg/ml부터는 급격히 감소하는 현상을 볼 수 있다. 그러나 acetylated linarin의 경우 linarin과 달리 NO 생성의 저해에 영향을 주지 않는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4).

Linarin과 acetylated linarin이 macrophage 계열의 RAW 264.7 세포주의 morphology에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에 아무것도 처리하지 않은(Fig. 5a) 군의 경우 cell의 형태학상 변화가 없으며 둥근 형태를 나타내었다. 그러나 LPS/linarin(2.5, 5, 10, 20, 40 µg/ml)를 처리한 군들을 보면 탈선화된 것을 볼 수 있는데 고농도로 갈수록 활성정도가 저하됨을 알 수 있었고, LPS/linarin(20, 40 µg/ml)의 경우 생존 세포를 확인하기 어려웠다(data not shown). 그러나 acetylated linarin의 경우 농도 의존적으로 cell의 형태학상의 큰 변화를 볼

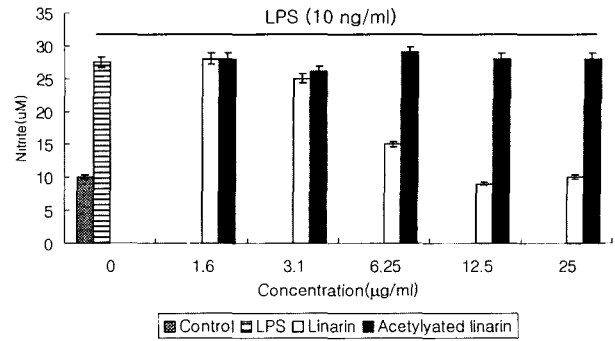


Fig. 4 – Inhibitory effects of linarin on NO production in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cultures were incubated with 10 ng/ml of LPS in the presence of different linarin concentrations (1.6, 3.1, 6.25, 12.5, 25 µg/ml) or acetylated linarin concentrations (1.6, 3.1, 6.25, 12.5, 25 µg/ml). 6 wells per group were used and 200 µl of the cells were added to each well. The plates were then incubated overnight and 100 µl from the surface of each well was transferred into a new plate. The accumulated nitrite concentration were measured overnight after stimulation used a Griess reagent for 10 min at room temperature and read using an ELISA reader at 540-nm. NO production was determined by the accumulation of nitrite using the method reported Stuehr and Nathan (1989). The results are reported as a mean ± S.D. of three independent experiments.

수 있었다. 특히 acetylated linarin 고농도의 경우(40 µg/ml) 크게 활성화 된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5h).

국내에 자생하는 약용자원식물의 하나인 구절초의 주성분인 linarin은 이미 연구 보고된 논문을 통해 linarin이 i-NOS에 의한 NO의 생성을 저해하는 염증억제작용을 나타낼 뿐 아니라,⁹⁾ Octadecanoylphorbol 13-acetate(TPA)를 이용한 귀 부종실험, Arachidonic acid를 이용한 귀 부종실험,¹¹⁾ carrageenan에 의한 족 부종실험 등의 연구를 수행함으로써 소염효과¹²⁾가 있음을 알 수 있었고, 사염화탄소로 간 장애를 유발한 실험에서 항간독성 작용¹³⁾을, yeast를 이용한 발열 실험에서 해열 작용을 나타낸 것으로 linarin이 해열,¹⁴⁾ 진통, 소염작용, 간 보호 작용이 있음을 확인하였으나⁸⁾ 이 물질의 세포독성이 있어 단일 물질의 투여나 신약으로서의 개발에는 제한 사항이 있는 단점이 있었다. 따라서 linarin의 구조변경을 통한 유도체를 시도하였으며 그 중 acetylated linarin인 linarin 유도체를 얻게 되었고, HPLC, NMR을 사용하여 그 구조의 변화를 확인하였으며, 여러 가지 면역세포의 활성실험을 통하여 linarin의 유도체인 acetylated linarin은 세포독성이 확인하게 줄어들었음을 확인할 수 있었고, macrophage cell line인 RAW 264.7 cell에서는 linarin에 비하여 NO의 생성에는 영향을 주지 않았으나 형태학상으로는 농도에 비례하여 대식세포의 활성화에 영향을 주는 것을 형태학상의 변화를 통하여 볼 수 있었다. 이 실험을 토대로 하여 세포독성을 제거된 acetylated

문 헌

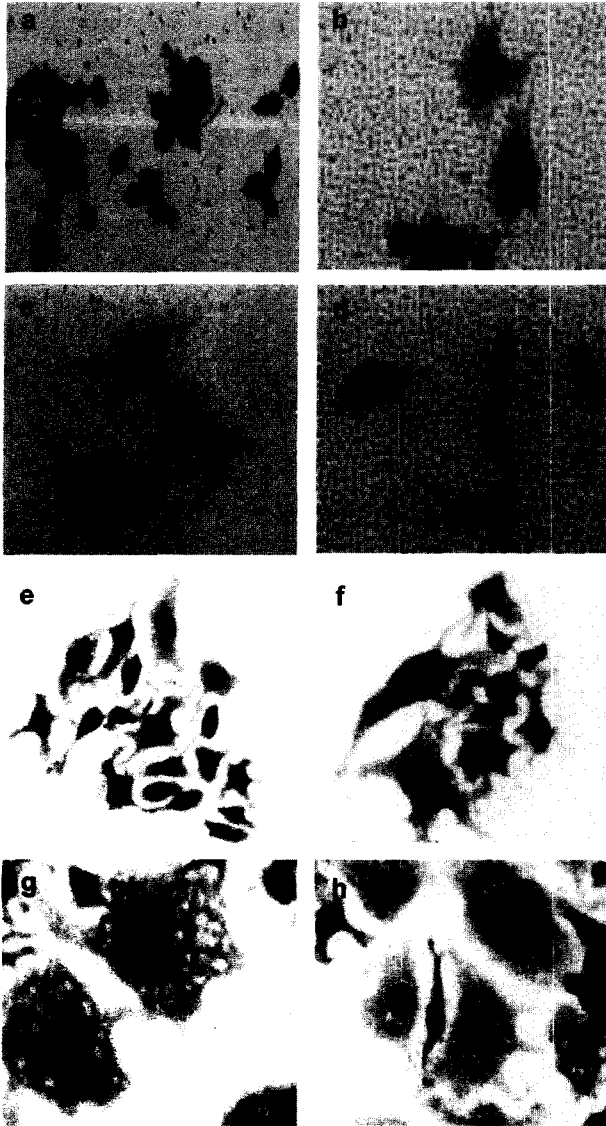


Fig. 5 - Macrophage morphological changes in response to linarin or acetylated linarin. RAW cells were cultured on coverslips in the presence of different concentration of medium (a), LPS (100 ng/ml; data not shown), LPS/linarin (2.5 μ g/ml; b), LPS/linarin (5 μ g/ml; c), LPS/linarin (10 μ g/ml; d), LPS/acetylated linarin (2.5 μ g/ml; e), LPS/acetylated linarin (5 μ g/ml; f), LPS/acetylated linarin (10 μ g/ml; g) and LPS/acetylated linarin (40 μ g/ml; h) for 48 hrs. The cells were fixed and stained in Diff-quick. Observed under the light microscope at $\times 400$.

linarin이 면역반응에 미치는 영향에 대해 더 구체적으로 알아 보아야 할 것이다.

- 1) 김태정 등 : 한국의 자원식물 IV, 서울대학교 출판부 p. 256 (1996).
- 2) 육창수 : 생약도감, 도서출판 경원 p. 528 (1997).
- 3) 임록재 : 조선약용식물지 (Flora Media Coreana) vol. 2 농업출판사 p. 186 (1998).
- 4) 원도희 등 : 약용식물도감, 식품의약품안전 본부 p. 72 (1997).
- 5) 이명영 등 : 동의학사전, 도서출판 까치 (서울) p. 116 (1970).
- 6) Youngchoo, L. : Studies on the constituents of Chrysanthemum sibiricum Fsch. *J. Pharm Soc. Kor.* **11**, 7 (1967).
- 7) 김창민 등 : 완역 중약대사전, 도서출판 정담 p. 632, 4553, 5126 (1997).
- 8) 김영윤, 이숙연, 임동술 : 구절초에서 분리한 linarin의 생리활성. *약학회지* **45**, 604 (2001).
- 9) Han, S., Sung, K. H., Lee, S. Y., Lee, C. K., Yim, D. S., Ha, N. J. and Kim, K. : The effect of linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophages cell line RAW264.7. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 170 (2002).
- 10) Stuehr, D. J. and Nathan, C. F. : Nitric oxide, a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**, 1543 (1989).
- 11) Rao, T. S., Currie, J. I., Shaffer, A. E. and Isalolson, P. C. : Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and Tetradeacylphorbol acetate (TPA) induced dermal inflammation. *Inflammation* **17**, 723 (1993).
- 12) Winter, C. A., Risley E. A. and Nuss, G. W. : Carragenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **111**, 544 (1962).
- 13) Zhang, B. H., Gong, D. Z. and Mei, M. H. : Protection of regenerating liver after partial hepatectomy from carbon tetrachloride hepatotoxicity in rat. Role of hepatic stimulator substance. *J. Gastroenterol. Hepato.* **14**, 1010 (1999).
- 14) Niemegeers, C. J. E., Lenaerts, E. M. and Janssen, P. A. J. : The antipyretic effect of suprofen in rats with yeast induced fever. *Arzneim Forsch (Drug Res.)* **25**, 1519 (1975).
- 15) Houghton, P. J. and Hikino, H. : Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of Buddleja Species. *Planta Med.* **55**, 123 (1989).