

황기(黃耆)의 간기능 보호 성분

백남인*, 김영숙, 경중수, 박기현

한국인삼연구초연구원

Isolation of Anti-Hepatotoxic Agent from the Root of *Astragalus membranaceus*

Nam-In Baek*, Young Sook Kim, Jong Soo Kyung and Ki Hyun Park

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea

Abstract - The components were isolated from the root of *Astragalus membranaceus* and their structures were characterized as 3,4-methylenedioxy-pyrrolealdehyde, 7-O- β -D-glucopyranosyl 7, 3'-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone and a naphthalene derivative on the basis of spectral and physical methods. 7-O- β -D-glucopyranosyl 7, 3'-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone and the naphthalene compound showed protective effect on CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes.

Key words - *Astragalus membranaceus*: Anti-Hepatotoxic; 3,4-methylenedioxy-pyrrolealdehyde; 7-O- β -D-glucopyranosyl 7,3'-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone; HMBC.

동양의학에서 자양, 강장 효과는 저하된 조직의 기능을 직접적 또는 간접적으로 항진시킴으로서 생체의 항상성(homeostasis)을 유지시키는 작용으로 이해되고 있으며, 따라서 체내 각 조직의 병태에 의한 질병 예방에 중요한 기능을 한다고 볼 수 있다. 그러므로 자양, 강장제가 저하된 간기능을 정상화 또는 촉진시킬 수 있다는 관점에서 전통적으로 간질환과 자양 강장제로 사용되어오는 생약에서 간보호 물질을 개발하고자 하였다.

본 연구에서는 많은 동물을 사용하지 않고 적은 시료량과 많은 종류의 시료를 동시에 검정할 수 있는 *in vitro* 방법으로 collagenase perfusion으로 간세포를 분리하고 배양하면서 CCl₄를 처리하여 유도된 세포독성에 대한 천연물의 억제효과를 검정하는 방법을 사용하였다. 이 검색방법으로 *in vivo* 간보호 물질로 알려진 glycyrrhizin 또는 silybin의 효과를 검정하였을 때 현저한 간세포 보호

효과를 나타내어, 생약시료의 효과를 검정할 수 있는 적절한 *in vitro* 방법임을 제시하였다.¹⁾

한방에서 간질환과 자양강장제로 많이 사용되는 44종 생약을 선별하고, 일차 배양 간세포에서의 CCl₄ 유발 세포독성에 대한 효과를 검정하여²⁾ 수종의 후보생약을 선별하였고, 선별된 각 생약의 *n*-hexane, CHCl₃, ethylacetate, *n*-butanol 및 물분획을 제조하여 간세포 보호효과를 검정하였다.³⁾ 황기의 물분획은 일차 배양 흰쥐 간세포에서 CCl₄ 유발 세포독성을 억제하였고 흰쥐에서 CCl₄ 유발 간장해를 억제하였다.³⁾ 그러므로 *in vitro*, *in vivo* 간보호 효과를 나타낸 황기의 물분획에서 간세포 보호효과를 갖는 물질을 분리하고자 하였다.

황기(*Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라의 중북부 지역에 자생하며, 약용을 목적으로 널리 재배되고 있다.⁴⁾ 한방에서는 그 뿌리를 주로 약재로 사용하고 있으며, 補中益氣, 托毒 등의 효능이 있고, 內傷勞倦 및 모든 氣衰血虛症에 치료효

*교신저자 : Fax 042-861-1949

과가 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 이에 관한 약리효능 연구로는 간장보호작용, 면역촉진작용, 强心作用, 이뇨작용 등이 보고되어 있다.⁵⁾

이 연구에서는 *in vitro*, *in vivo*에서 간세포 보호효과를 나타낸 황기의 수용성 분획으로부터 chromatography 를 이용하여 활성물질을 추적, 분리하였고 그 화학구조와 활성을 구명하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약-이 실험에 사용된 황기는 대전시 한약건재상으로부터 건조품을 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표본은 한국인삼연구소에 보관되어 있다(No 94032). 실험동물은 한국인삼연구소원 동물 사육실에서 일정조건 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5^\circ\text{C}$, 12시간 명암주기)으로 사육한 150-180 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. Fetal bovine serum, William's medium, L-glutamine, trypan blue stain은 GIB CO(Grand Island, NY)에서 구입하였고, collagenase(Type IV), insulin, dexamethasone, antibiotics, dimethyl sulfoxide (DMSO), Hanks' balanced buffured solution(HBSS) 및 세포 배양에 필요한 시약은 cell culture grade의 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO) 제품을 사용하였으며, CCl_4 는 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)에서 구입하였다. 물질 추출 및 분리를 위한 column chromatography 용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70-230 mesh, Merck)을 사용하였고 그 외의 시약은 모두 일급 또는 특급을 사용하였다.

기기-용점은 Fisher-John Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도를 보정하지 않았다. ^1H - (400 MHz) 및 ^{13}C -NMR(100 MHz)은 Bruker ARX 400으로 측정하였고, FAB-MS 및 EI-MS는 VG-VSEQ(EBqQ type) 및 Varian Mat 212MS 로 측정하였다. UV spectrum은 Shimadzu UV-240으로 얻었으며, IR spectra는 Perkin-Elmer Model 599B로 얻었다.

간세포의 분리 및 배양¹⁾-Seglen⁷⁾의 collagenase perfusion 방법을 기초로 하여 흰쥐의 간세포를 분리하여 2×10^5 cell/ml의 세포 현탁액

을 24 well plate(Falcon, Primaria)에 1 ml씩 넣고 5%, $\text{CO}_2/95\%$ air 혼합기체를 공급하면서 일정 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양액은 10% heat-inactivated fetal calf serum, penicillin(100 g/ml), streptomycin (100 $\mu\text{U}/\text{ml}$), 4 mM L-glutamine, 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-7} M insulin이 첨가된 William's E medium을 사용하였다.

간세포 독성 유도 및 시료처리- CCl_4 유도 세포독성에 대한 소분획 또는 단일물질의 억제효과를 검색하기 위해서 간세포가 용기표면에 부착하도록 2시간 배양후 신선한 배지로 교체하고 동시에 소분획 및 단일성분 시료(10 μl , DMSO에 용해)와 CCl_4 (10 μl , DMSO에 용해)을 1 ml 배양액에 첨가하고 90분간 배양하였다.

효소활성 측정-배양이 끝난 후 배양액을 3000 rpm, 4°C 에서 원심분리한 상등액을 이용하여 lactic dehydrogenase(LDH), glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성을 아산제약 Kit을 사용하여 측정하였다.

유효성분의 분리-황기 분말 5 kg을 80% 수용성 MeOH 5 리터로 실온에서 하룻동안 추출하였고, 여과한 후 잔사를 같은 방법으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액 중의 MeOH을 감압 농축하여 제거한 후, *n*-BuOH 1.5 리터로 2회 분배 추출하였고, 수층을 감압 농축하여 910 g의 추출물을 얻었다. 그 중 50 g을 취하여 ODS column chromatography ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}-\text{MeOH} \rightarrow \text{MeOH}$)하여 11개의 소분획을 얻었고, 그중 2번째 소분획으로부터 silica gel column chromatography($\text{CHCl}_3-\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$, *n*-hexane- $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}$)를 반복하여 5.1 mg의 compound 1 을 분리, 정제하였다.

Compound 1 : colorless glass, EI-MS *m/z*: 139 (M^+), ^1H -NMR (400MHz, CD_3OD) 9.54 (1H, s, H-6), 7.35 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-2 or H-5), 6.57 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-2 or H-5), 4.63 (2H, s, H-7), ^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD) 179.34 (C-6), 163.14, 153.55 (C-3, C-4), 124.84 (C-2, C-5), 110.87 (C-7).

또한 위에서 얻어진 8번째 소분획으로부터 silica gel column chromatography (CHCl_3-

MeOH-H₂O)하여 35 mg 의 compound 2를 분리정제하였다.

Compound 2 : white powder (MeOH), mp 209-211 °C. IR(KBr) ν_{\max} 3452, 2985, 1655, 1610, 1554, 1472 cm⁻¹. UV(MeOH) λ_{\max} nm: 208, 265, 295. pos. FAB-MS m/z : 447 (M+1)⁺. ¹H-NMR (400 MHz, *d*₅-Py.) 3.76 (3H, s, OCH₃), 5.79 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1''), 7.03 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.27 (1H, dd, $J=2.2, 8.9$ Hz, H-6), 7.29 (1H, dd, $J=2.1, 8.4$ Hz, H-6'), 7.41 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 7.76 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 8.14 (1H, s, H-2), 8.34 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-5). ¹³C-NMR (100 MHz, *d*₅-Py.) 55.85 (OMe), 62.30 (C-6''), 71.11 (C-4''), 74.71 (C-2''), 78.34 (C-3''), 79.18 (C-5''), 101.72 (C-1''), 104.08 (C-8), 112.27 (C-5'), 115.86 (C-6), 117.68 (C-2'), 119.67 (C-4a), 120.32 (C-6'), 124.92 (C-3), 125.89 (C-1'), 127.70 (C-5), 147.95 (C-3'), 148.69 (C-4'), 153.02 (C-2), 157.71 (C-8a), 162.22 (C-7), 175.47 (C-4).

한편, 처음에 얻어진 수층 추출물 50 g으로부터 silica gel column chromatography (CHCl₃-MeOH-MeOH=10:3:1→7:3:1→6:4:1→6:5:1, CHCl₃-MeOH-H₂O=10:3:1, CHCl₃-MeOH=7:1→5:1)를 반복하여 24 mg의 compound 3를 분리정제하였다.

Compound 3 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃+CD₃OD) 1.94 (2H, m), 2.16 (2H, m), 4.10 (2H, br. t, $J=5.8$ Hz), 4.18 (2H, br. t, $J=4.9$ Hz), 6.20 (1H, d, $J=3.3$ Hz), 6.24 (1H, d, $J=3.4$ Hz), 6.42 (1H, d, $J=3.3$ Hz), 6.98 (1H, d, $J=3.4$ Hz), 7.20 (1H, s), 7.86 (1H, s). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃+CD₃OD) 30.68 (t), 31.07 (t), 71.42 (t), 71.62 (t), 111.29 (d), 111.83 (d), 114.42 (d), 119.21 (d), 136.87 (d), 140.38 (d), 145.25 (s), 147.08 (s), 153.65 (s), 154.48 (s).

결과 및 고찰

황기의 물분획은 일차 배양 간세포와 흰쥐에서 CCl₄ 유발 독성에 대하여 보호작용을 나타내어 이

분획으로부터 일부는 역상(ODS)으로 다른 일부는 순상(silica gel)으로 column chromatography를 반복하여 3종의 화합물(Compound 1, 2, 3)을 각각 분리정제하였다.

Compound 1은 dragendorff 시약에 양성반응을 보였으며, ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD)에 있어서 ³J coupling하고 있는 olefinic proton signal (δ 6.57, 7.35 (both d, $J=3.6$ Hz))이 관측되었고, 또한 aldehyde (δ 9.52, s)와 methylenedioxy group (δ 4.62, s)의 존재가 확인되었다. ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD)에 있어서도, aldehyde (δ 179.34), methylenedioxy (δ 110.87), 2개의 aromatic methine (δ 124.84, 124.84), 산소가 결합하고 있는 2개의 aromatic carbon (δ 153.55, 163.14) signal들이 관측되었으며, 분자량은 EI-MS (m/z : 139 M⁺)로부터 139로 결정되었다. 따라서 위의 결과를 종합하여 compound 1의 구조를 3,4-methylenedioxyproprrole aldehyde로 결정하였다.

Compound 2는 ¹H-NMR (400 MHz, *d*₅-Py.)에 있어서 aromatic에서 유래한 1개의 singlet signal (δ 8.14)과 ³J coupling하고있는 2개의 doublet signal (δ 7.41 ($J=2.2$), 7.76 ($J=2.1$)), ²J coupling하고있는 2개의 doublet signal (δ 7.03 ($J=8.4$), 8.34 ($J=8.9$)) 및 ²J-³J coupling 하고있는 2개의 doublet-doublet signal (δ 7.27 ($J=8.9, 2.2$), 7.29 (8.4, 2.1))이 관측되었다. 또한 당부유래의 signal이 4.2-4.6 ppm에서 관측되었고, anomeric proton signal은 5.79 ppm에서 관측되었으며, methoxyl에서 유래한 singlet methyl signal이 3.76 ppm에서 관측되었다. ¹³C-NMR (100 MHz, *d*₅-Py.)에 있어서도, 모두 22개의 탄소 signal이 관측되었는데, β -D-glucopyranosyl기의 6개의 signal과 methoxyl이 분명한 55.85 ppm의 signal을 제외하면 남은 15개의 signal이 모두 101.72-175.47 ppm 사이에서 관측되어, 이 물질의 UV 흡수 특성과 결부시켜 생각해보면, flavonoid 화합물인 것으로 추정되었다.

¹H-¹H COSY로부터 aromatic에서 유래한 signal들의 coupling하고 있는 상태를 모두 명확하게 결정하였고, 각각의 proton signal들을 동정할 수

있었다. 이 결과로부터 이 flavonoid 화합물은 A 환에는 6번 또는 7번에 1개의 수산기가 결합하고 있고, B 환에는 3번과 4번에 각각 1개씩의 수산기가 결합하고 있는 것으로 밝혀졌으며, 3개의 수산기중의 두곳에 1 분자의 D-glucopyranose와 methoxyl기가 각각 결합하고 있는 것을 알 수가 있었다.

HMQC로부터 수소를 가지고 있는 모든 탄소를 동정하였고, 4급 탄소의 대부분도 ^{13}C -NMR 에 있어서의 chemical shift를 상세히 검토하여 동정하였다. D-glucopyranosyl (δ 62.30 (C-6''), 71.11 (C-4''), 74.71 (C-2''), 78.34 (C-3''), 79.18 (C-5''), 101.72 (C-1'')) 및 methoxyl (δ 55.85), 산소와 결합하고 있는 4개의 aromatic 4급 탄소 (δ 147.95 (C-3'), 148.69 (C-4'), 157.71 (C-8a), 162.22 (C-7)) 및 1개의 methine 탄소 (δ 153.02 (C-2))와, 탄소와 결합하고 있는 3개의 aromatic 4급 탄소 (δ 119.67 (C-4a), 124.92 (C-3), 125.89 (C-1')), 수소를 가지고 있는 6개의 aromatic 탄소 (δ 104.08 (C-8), 112.27 (C-5'), 115.86 (C-6), 117.68 (C-2'), 120.32 (C-6'), 127.70 (C-5)), 그리고 1개의 ketone (δ 175.47)에서 유래한 signal들이 모두 동정되었다. 특히 153.0 ppm에서 관측된 aromatic carbon signal이 doublet인데도 보통보다 저자장에서 관측된 점과, C-4의 ketone이 175.5 ppm과 같이 보통보다 고자장으로 많이 이동하여 관측된 사실로부터 이 화합물은 iso-flavonoid 화합물인 것을 알 수 있었다.⁸⁾

한편 D-glucopyranose와 methoxy의 결합 위치는 HMBC로부터 결정하였다. 즉, 5.79 ppm에서 관측된 anomeric proton signal이 A 환의 수산기가 결합하고있는 탄소인 162.22 ppm의 signal과 원격 coupling하고있는 점으로부터 당은 A 환의 수산기에 결합하고 있는 것으로 판명되었다. 7.

27 ppm에서 doublet-doublet으로 관측된 A 환의 aromatic proton signal이 C-4a와 원격 coupling하고 있는 점으로부터 이 signal이 H-6으로 판명되어 결과적으로 A환의 수산기는 7번에 결합하고 있는 것으로 판명되었다. 또한 3.76 ppm에서 관측된 singlet methyl기가 C-4'와 coupling하고 있는 점으로부터 methoxyl기는 C-4'의 수산기에 결합한 것을 알 수 있었다. 이외에 HMBC 결과로부터 불분명했던 4 급 탄소들을 동정할 수 있었다. 즉, C-3는 C-3/H-2 및 C-3/H-2'로부터, C-1'은 C-1'/H-5'로부터, C-4a는 C-4a/H-6로부터, C-8a는 C-8a/H-5, C-8a/H-2 및 C-8a/H-6로부터, C-3'는 C-3'/H-5'로부터, C-4'는 C-4'/H-2' 및 C-4'/H-6'로부터, C-7은 C-7/H-5 및 C-7/H-6로부터 각각 동정하였다.

D-glucopyranose의 anomeric proton의 coupling constant ($J=7.3$ Hz)로부터 β -결합하고 있는 것으로 판명되었고, 위의 사실들을 종합하여, compound 2의 구조는 7-O- β -D-glucopyranosyl 7,3'-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone으로 결정되었다.

Compound 3는 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)에 있어서 aromatic 유래의 수소 6개의 signal이 관측되었다. 그중 2개는 singlet으로 (δ 7.86, 7.20), 다른 4개는 doublet으로 (δ 6.98, 6.42, 6.24, 6.20) 관측이 되었다. 또한 산소와 결합하고 있는 2개의 methylene proton (δ 4.18, 4.10) 및 관능기가 결합하고 있지 않은 2개의 methylene signal (δ 2.16, 1.94)이 각각 관측되었다. ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)에 있어서도, aromatic 유래의 10 개의 탄소 signal이 관측되었는데, DEPT 측정결과 그중의 6개는 doublet (δ 111.29, 111.83, 114.42, 119.21, 136.87, 140.

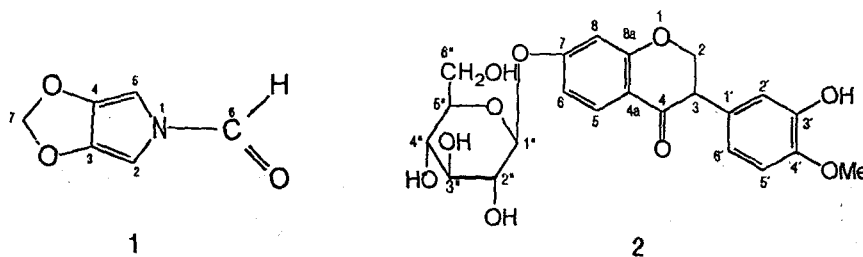


Fig. 1. The structures of some compounds isolated from the root of *Astragalus membranaceus*.

Table I. Effect of compounds isolated from the root of *Astragalus membranaceus* on CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes

Substance	Dose (mg/ml)	LDH(%)		GOT(%)		GPT(%)	
		CCl ₄ (-)	CCl ₄ (+)	CCl ₄ (-)	CCl ₄ (+)	CCl ₄ (-)	CCl ₄ (+)
Control	-	100 ^{a)}	100 ^{b)}	100 ^{c)}	100 ^{d)}	100 ^{e)}	100 ^{f)}
Compound 1	0.1	103±16	104±9	104±6	102±11	104±9	97±6
	0.5	191±17*	92±8	643±14**	139±15	847±30**	392±30**
Compound 2	0.1	150±6*	116±2	98±7	110±13	96±4	62±4*
	0.5	139±11*	97±8	93±9	95±2	105±18	58±17*
Compound 3	0.1	117±12	98±3	101±5	89±6	82±7	59±2*
	0.5	124±12	71±6*	115±10	73±13*	91±13	52±5*
Glycyrrhizin	0.1	104±8	66±17*	83±10	77±11*	95±2	76±8*
	0.5	149±25*	48±5**	88±4	50±3**	89±3	59±5*

Hepatocytes were preincubated for 2 hr, and treated with or without 1.5 mM CCl₄ (10 μl in DMSO) and natural product (10 μl in DMSO) for 1.5 hr in fresh medium (1 ml). LDH, GOT and GPT activities in the medium were determined. Control enzymatic activities in the medium from all experiment: ^{a)} 61-139 W-U, ^{b)} 630-1061 W-U, ^{c)} 28-37 K-U, ^{d)} 72-144 K-U, ^{e)} 15-18 K-U, ^{f)} 32-40 K-U. Significantly different from each control, * P<0.05 ** P<0.001.

38)이었고, 다른 4개는 singlet (δ 145.25, 147.08, 153.65, 154.48)이었는데, chemical shift로부터 2개는 탄소가 결합한 다른 2개는 산소가 결합한 탄소인 것으로 추정할 수 있었다. 또한 산소와 결합하고 있는 2개의 methylene 탄소 (δ 71.42, 71.62) 및 관능기가 결합하고 있지 않은 2개의 methylene 탄소 signal (δ 30.68, 31.07)이 각각 관측되었다. 따라서 위의 결과로부터 compound 3는 naphthalene ring의 2번, 7번 또는 2번, 6번에 산소가 결합하여 있고, 각각의 산소에 탄소 사슬이 결합한 구조를 하고 있을 것으로 추정되었다.

일차 배양 간세포에 1.5 mM CCl₄와 황기 물분획에서 분리한 3종의 단일성분을 0.1, 0.5 mg/ml 농도로 동시처리하고 90분간 배양하여, 간세포로부터 배지로의 LDH, GOT 및 GPT 유리와 정상배양 간세포에 대한 각 단일물질의 영향을 관찰하였다 (Table I). Compound 1은 0.5 mg/ml 농도에서 정상 간세포와 CCl₄를 처리한 간세포, 모두에서 LDH, GOT, GPT 유리를 현저히 증가시키는 간세포 독성을 나타냈다. Compound 2는 CCl₄ 처리에 의한 GPT 유리를 각농도에서 38%, 42% 농도의존적으로 억제하였다. Compound 3은 CCl₄ 처리에 의한 간세포로부터의 LDH, GOT 및 GPT 유리를 농도의존적으로 억제하였으며, 0.5 mg/ml 처리하였을 때 양성 대조물질로 사용한 glycyrrhizin에 비해 LDH 또는 GOT 유리 억제효과는 다소 적었으

나, GPT 유리억제 효과는 유사하였다.

결 론

일차 배양 흰쥐 간세포에서의 CCl₄ 유발 세포 독성과 흰쥐에서 CCl₄ 유발 간장해를 억제한 황기 물분획으로부터 그 유효성분을 추적, 분리하였다. 분리된 3종의 화합물 중에서 Compound 2는 일차 배양 간세포에서 CCl₄ 처리에 의한 GPT 유리를 억제하였고, Compound 3은 CCl₄에 의한 LDH, GOT와 GPT 유리를 억제하였다. Compound 2의 화학구조는 7-O-β-D-glucopyranosyl 7,3'-dihydroxy-4'-methoxy isoflavone으로 동정되었으며, naphthalene 관련 화합물로 추정되는 compound 3은 현재 그 구조를 규명 중이다.

사 사

본 연구는 과학기술처 선도기술개발 사업중 신동 의약과제의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 김영숙, 박기현 (1995) 일차 배양 흰쥐 간세포에서 CCl₄ 유발 세포독성을 이용한 간보호 효과, 검색 방법.

- 생약학회지 26: 51-56.
2. 김영숙, 박기현 (1994) 수종의 전통약제가 일차 배양 흰쥐 간세포에서 CCl₄ 유발 세포독성에 미치는 영향. 생약학회지 25: 388-394.
 3. 김영숙, 경중수, 박기현 (1996) 일차 배양 흰쥐 간세포에서 사염화탄소 유발 세포독성에 대한 수종 용매분획의 억제효과 검색과 *in vivo* 간보호 작용평가. 약학회지 40: 52-58.
 4. 정보섭, 신민교 (1985) 도해 향약(생약) 대사전 (식물편), 662-664. 영림사, 서울.
 5. 相賀徹夫 (1985) 中藥大辭典, 121-126. 上海科學技術出版社 小學館, 東京.
 6. Seglen, P.O. (1976) Methods in Cell Biology. In Prescott, D.M. (ed.), vol. 19, 29-82. Academic press, New York.
 7. Hanawa, F., Tahara, S. and Mizutani J. (1991) Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry* 30: 157-161.

(1996년 4월 6일 접수)