

흰쥐의 브로모벤젠대사계에 미치는 어성초의 영향과 페놀성 화합물의 분리

박종철*, 허종문, 박주권, 박성종, 이종호¹, 성낙주¹, 최명락², 송상호², 김문성³, 최종원⁴
순천대학교 한약자원학과, ¹경상대학교 식품영양학과, ²여수대학교 생물공학과, ³동아제약,
⁴경성대학교 약학과

The Effects of *Houttuynia cordata* on the Hepatic Bromobenzene Metabolizing Enzyme System in Rats and Isolation of Phenolic Compounds

Jong-Cheol Park*, Jong-Moon Hur, Ju-Gwon Park, Sung-Jong Park, Jong-Ho Lee¹,
Nak-Ju Sung¹, Myeong-Rak Choi², Sang-Ho Song², Moon-Sung Kim³, and Jong-Won Choi⁴
Department of Oriental Medicine Resources, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Republic of
Korea, ¹Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 600-701,
Republic of Korea, ²Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749,
Republic of Korea, ³Dong-A Pharm. Co., Yongin 449-900, Republic of Korea,
⁴Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Pusan, 608-736, Republic of Korea

Abstract – Effects of *Houttuynia cordata* on the level of lipid peroxide and the enzyme activities of the liver were investigated in bromobenzene-induced rats. Lipid peroxide content in liver was increased by bromobenzene. It was decreased when the methanol extract from the aerial parts of *H. cordata* was treated to the rat. The methanol extract reduced the activities of aminopyrine N-demethylase and aniline hydroxylase that increased by bromobenzene, however did not affect glutathione S-transferase activity. The methanol extract recovered the activity of epoxide hydrolase activity that decreased significantly by bromobenzene. We suggest that under our experimental conditions the extract might play an important play in the prevention of hepatotoxicity by reduction of aminopyrine N-demethylase and aniline hydroxylase activities as well as enhancement of epoxide hydrolase activity. Six phenolic compounds have been isolated from *H. cordata* and identified by means of spectral analysis as protocatechuic acid, quercetin, apigenin, afzelin, hyperoside and quercitrin.

Key words – *Houttuynia cordata*, Saururaceae, protocatechuic acid, flavonoids, bromobenzene-induced lipid peroxidation, hepatic enzyme, aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase, epoxide hydrolase

어성초는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본인 약모밀(*Houttuynia cordata* Thunb.)의 전초를 말한다.¹⁾ 중국과 일본에서는 중약, 십약 등 10여종의 이명이 통용되고 있으며,²⁾ 어성초란 냄새를 맡으면 생선 비린내가 난다고 하여 붙여진 이름이다. 식물학적 특징³⁾을 살펴보면, 그늘지고 습기가 많은 땅에서 잘

자라며, 잎은 호생하고 꽃은 옅은 황색이고 개화기는 5~6월, 결실기는 10월이다. 한방⁴⁾에서는 봄, 가을에 전초를 채취하여 세정한 후 말려서 청열해독, 수종, 중풍, 폐렴, 백대, 습진, 중이염 및 고혈압 등의 치료에 쓰인다.

어성초에 관한 성분연구로는 특유의 비린내 성분으로 알려진 decanoyl acetaldehyde를 비롯하여 정유성분⁵⁻⁶⁾, flavonoid 성분⁷⁾, steroid⁸⁾, alkaloid⁹⁾ 등이 보

*교신저자 : Fax : 061-752-8551

고되어져 있으며, 활성으로는 항돌연변이효과¹⁰⁾, 폐렴 치유기간 단축효과¹¹⁾, herpes simplex virus type 1 과 human immunodeficiency virus type 1 억제활성¹²⁾ 등이 알려져 있다. 어성초 연구의 일환으로 bromobenzene으로 실험동물의 간조직을 손상시킨 후 어성초의 추출물이 bromobenzene 대사체에 미치는 영향을 관찰하였으며, 어성초에서 6종의 페놀성 화합물을 분리하여 동정하였다.

재료 및 방법

식물재료 - 실험에 사용한 어성초는 1996년 10월 전남 보성군 벌교읍에서 채집하여 음건세절하여 시료로 사용하였으며, 순천대 한약자원학과 표본실 (표본번호: 0598)에 보관중이다.

실험동물 - 일정한 조건으로 사육한 Sprague-Dawley계 숫쥐 (200±50 g)를 사용하여 고형사료 및 일정한 조건 (온도: 20±2°C, 습도: 50%, 명암: 12시간 light/dark cycle) 하에서 충분히 적응시킨후 사용하였다. Bromobenzene은 1% tween 80에 460 mg/kg 되게 현탁시켜 12시간 간격으로 2일간 복강주사하여 실험에 사용하였다.¹³⁾ 전처리로 어성초 메타놀추출물 250 또는 500 mg/kg은 각각 1주간 경구투여하였으며, 대조군은 동량의 생리식염수와 1% tween 80을 투여하였다.

효소원의 조제 - 실험동물을 탄산가스로 마취시킨 후 복부정중선을 따라 절개하고, 간을 생리식염수로 관류시켜 조직내 혈액을 제거하고 적출하여 여지로 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 평량한 다음 조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 600g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상정액을 15,000g에서 10분간 원심분리하여 침전물과 상정액을 얻었다. 이 상정액을 105,000g에서 60분간 초원심분리하여 glutathione S-transferase 활성의 효소원으로 사용하였으며, 침전물은 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 현탁하여 epoxide hydrolase, aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4°C 이하에서 행하였다.

간조직중 과산화지질 함량 측정 - 간 조직 1g당 9 배량의 생리식염수를 가해 마쇄하고, 이 마쇄액에

8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml, 20% acetate buffer (pH 3.5), 0.8% thiobarbituric acid 및 실험 재료인 어성초 추출물을 가한후 95°C에서 1시간동안 반응시켰다. 실온에서 냉각시켜 *n*-BuOH-pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리한 후 홍색의 *n*-BuOH-pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1g당 malondialdehyde nmole 수로 표시하였다.¹⁴⁾

효소활성의 측정

1) Aminopyrine N-demethylase의 활성 - 반응액 2 ml중 0.1 M Na⁺/K⁺ phosphate buffer (pH 7.5)에 2 mM aminopyrine · HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 효소액 (30-400 µg의 단백질을 가해 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시켰다. 다음 15% ZnSO₄와 포화 Ba(OH)₂를 가하여 반응을 종료시키고 5분간 방치후 10분간 원심분리하여 여기서 얻은 상정액 5 ml에 발색의 목적으로 Nash reagent를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 원심분리하여 상정액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 mg protein이 생성한 formaldehyde n mole로서 표시하였다.¹⁵⁾

2) Aniline hydroxylase의 활성 - 반응액 2 ml중 10 mM MgCl₂ 와 150 mM KCl이 함유된 50 mM Tris. HCl 완충액 (pH 7.4)에 기질인 1 mM aniline HCl, 0.5 mM NADPH 및 효소액 (30-400 g의 단백질을 가하여 이 액을 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응을 종료시킬 목적으로 20% trichloroacetic acid를 가한 후 10분간 원심분리 하여 상정액에 발색의 목적으로 10% Na₂CO₃와 0.2 N-NaOH (2% phenol 함유)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분간에 mg protein이 생성한 *p*-aminophenol nmole로서 표시하였다.¹⁶⁾

3) Glutathione S-transferase의 활성 - 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)중에 기질인 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 1 mM glutathione을 넣고 일정량의 효소액을 함유한 반응액을 25°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 glutathione-2,4-dinitrobenzene conjugate를 340 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 mole흡광계수

9.6 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene glutathione의 nmole수로 표시하였다.¹⁷⁾

4) Epoxide hydrolase의 활성 - 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 기질로서 trans-stilbene oxide (TSO, 3 mM)와 효소원 (100-200 µg의 단백질을 가하여 반응액이 3 ml되도록 하였다. 이 반응액을 37°C에서 20분간 반응시켰을 때 이때 소실되는 기질 양을 229 nm에서 흡광도가 감소되는 것을 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정하였다. 효소 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 기질인 TSO의 양을 n mole수로 나타내었다.¹⁸⁾

단백질 정량 및 통계처리 - Lowry 등의 방법¹⁹⁾에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, Fr. IV)을 표준품으로, 통계처리는 Duncan's multiple range test 로 하였다.

추출 및 화합물의 분리 - 어성초 지상부 (3.5 kg)를 음건세절하여 먼저 *n*-hexane으로 실온에서 7일간 3회 반복 추출하여 탈지한 후 MeOH을 사용하여 동일한 방법으로 추출하여 엑스 327 g을 얻었다. MeOH 엑스는 10% MeOH로 현탁시켜 계통분획에 의해 CH₂Cl₂ (72 g), EtOAc (40 g), *n*-BuOH (68 g), 물 순으로 분획하였다. 이중 EtOAc 가용부 35 g을 CHCl₃-MeOH-H₂O (5:1:1, 하층), CHCl₃-MeOH-H₂O (25:8:5, 하층), CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:1, 하층) 및 CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10, 하층)의 용출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 E-1~E-11의 fraction으로 나누었다. 이중 E-1 분획은 Sephadex LH-20 으로 재column (용출용매: MeOH)하여 화합물 1 (26 mg)과 2 (46 mg)를, 분획 E-2, E-8에서 재결정으로 각각 화합물 3 (193 mg)과 6 (820 mg)을 얻었다. 그리고 E-7 분획은 silica gel로 재column chromatography (용출용매: CHCl₃-MeOH-H₂O; 7:3:1, 하층)를 실시하여 E-7-1~E-7-3의 소분획을 얻었으며 이중 E-7-1을 재결정하여 화합물 4 (64 mg)를 분리하였다. E-7-2는 다시 silica gel column chromatography [용출용매: CHCl₃-MeOH-H₂O (70:25:10, 하층)]를 실시하여 화합물 5 (47 mg)를 순수히 분리하였다. 기기는 IR spectrum은 Bruker IFS 66 FT-IR spectrophotometer, UV spectrum은 Shimadzu Mps-50L spectrometer, NMR spectrum은 Bruker AM 200 spectrometer를 사용하였다.

화합물 1의 분광학적 특성 (quercetin) - ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ: 7.66 (1H, d, J=2.1 Hz,

H-2'), 7.53 (1H, dd, J=2.1 & 8.5 Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, J=8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, J=2.2 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, J=2.2 Hz, H-6); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50.3 MHz): Table V

화합물 2의 분광학적 특성 (apigenin) - IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3374, 1657, 1607, 1506, 1456, 1365, 1282, 1179; UV λ_{max}^{MeOH} nm 265, 295sh, 335; with NaOMe 274, 323, 391; with NaOAc 273, 300, 375; with NaOAc+H₃BO₃ 265, 301sh, 337; with AlCl₃ 275, 300, 347, 383; with AlCl₃+HCl 275, 298, 339, 380; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ: 7.92 (2H, d, J=8.7 Hz, H-2' & 6'), 6.92 (2H, d, J=8.7 Hz, H-3' & 5'), 6.77 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, d, J=1.9 Hz H-8), 6.18 (1H, d, J=1.9 Hz, H-6); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50.3 MHz): Table V

화합물 3의 분광학적 특성 (protocatechuic acid) - ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ: 7.33 (1H, d, J=2.1 Hz, H-2), 7.28 (1H, dd, J=2.1 & 8.1 Hz, H-6), 6.74 (1H, d, J=8.1 Hz, H-5), ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50.3 MHz) δ: 167.3 (C-7), 150.0 (C-4), 144.7 (C-3), 121.9 (C-1), 121.7 (C-6), 116.6 (C-2), 115.2 (C-5)

화합물 4의 분광학적 특성 (afzelin) - IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3420, 1660, 1614, 1506, 1448, 1362, 1285, 1175, 1063; UV λ_{max}^{MeOH} nm 265, 344; with NaOMe 274, 325, 388; with NaOAc 271, 360; with NaOAc+H₃BO₃ 266, 348; with AlCl₃ 274, 304, 348, 397; with AlCl₃+HCl 275, 301, 342, 396 ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ: 7.74 (2H, d, J=8.6 Hz,

Table I. Effects of *Houttuynia cordata* on the hepatic lipid peroxide in bromobenzene-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Activity*	Percentage
Control	0	22.4 ± 2.55 ^c	
Bromobenzene (BB)	460	60.5 ± 4.00 ^a	100
MeOH ext. + BB	250	47.7 ± 4.59 ^b	79
	500	46.0 ± 4.70 ^b	76

Rats were orally administered by the methanol extract of *H. cordata* daily for one week and then bromobenzene (BB, 460 mg/kg) was i.p. injected four times with 12 h interval for final two days. Rats were decapitated 12 h after the injection of BB treatment. The values are mean ± S.D. of 5 animals. Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0.05).

*unit: malondialdehyde nmole/g of tissue.

Table II. Effects of *Houttuynia cordata* on the hepatic aminopyrine N-demethylase (AD) and aniline hydroxylase (AH) in bromobenzene-treated rats

Group	Dose(mg/kg)	AD activity*	percentage	AH activity**	percentage
Control	0	4.62 ± 0.48 ^c		0.55 ± 0.11 ^b	
Bromobenzene (BB)	460	7.12 ± 0.67 ^a	100	0.92 ± 0.21 ^a	100
MeOH ext. + BB	250	6.22 ± 0.50 ^{a,b}	87	0.77 ± 0.12 ^{a,b}	84
	500	5.58 ± 0.53 ^{b,c}	78	0.64 ± 0.19 ^{a,b}	70

Rats were orally administered by the methanol extract of *H. cordata* daily for one week and then bromobenzene (BB, 460 mg/kg) was i.p. injected four times with 12 h interval for final two days. Rats were decapitated 12 h after the injection of BB treatment. The values are mean ± S.D. of 5 animals. Means sharing the same superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

*unit: *p*-aminophenol nmole/mg protein/min

**unit: HCHO-nmole/mg protein/min

H-2' & 6'), 6.91 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3' & 5'), 6.42 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6), 5.29 (1H, s, anomeric H), 0.78 (3H, d, $J=5.3$ Hz, -CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz)

Table V

화합물 5의 분광학적 특성 (hyperoside) - IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3424, 1657, 1606, 1511, 1464, 1448, 1128, 1080; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm 273, 358; with NaOMe 277, 329, 409; with NaOAc 280, 324sh, 383; with NaOAc + H₃BO₃ 276, 379; with AlCl₃ 278, 440; with AlCl₃+HCl 278, 299sh, 368, 401; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ : 7.65 (1H, dd, $J=2.2$ & 8.4 Hz, H-6'), 7.52 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.36 (1H, d, $J=7.6$ Hz, anomeric H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz): Table V

Table III. Effects of *Houttuynia cordata* on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase in bromobenzene-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Activity*	Percentage
Control	0	276.5 ± 9.52 ^a	
Bromobenzene(BB)	460	286.5 ± 10.57 ^a	100
MeOH ext. + BB	250	289.4 ± 9.23 ^a	101
	500	290.3 ± 8.78 ^a	101

Rats were orally administered by the methanol extract of *H. cordata* daily for one week and then bromobenzene (BB, 460 mg/kg) was i.p. injected four times with 12 h interval for final two days. Rats were decapitated 12 h after the injection of BB treatment. The values are mean ± S.D. of 5 animals. Means sharing the same superscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

*unit: conjugated 1,2-dichloro-4-nitrobenzene.

화합물 6의 분광학적 특성 (quercitrin) - IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3370, 1658, 1607, 1574, 1507, 1452, 1375, 1280, 1169, 1050; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm 259, 304sh, 352; with NaOMe 272, 328, 395; with NaOAc 275, 324sh, 374; with NaOAc+H₃BO₃ 263, 303sh, 369; with AlCl₃ 278, 306sh, 335, 439; with AlCl₃+HCl 273, 304sh, 354, 405; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ : 7.30 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2'), 7.24 (1H, dd, $J=1.9$ & 8.4 Hz, H-6'), 6.66 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-6), 5.25 (1H, s, anomeric H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50.3 MHz); Table V

결과 및 고찰

삼백초과에 속하는 약모밀의 전초인 어성초가 흰취

Table IV. Effects of *Houttuynia cordata* on the hepatic epoxide hydrolase activities in bromobenzene-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Activity*	Percentage
Control	0	10.32 ± 3.70 ^a	
Bromobenzene (BB)	460	5.24 ± 0.63 ^b	100
MeOH ext. + BB	250	7.12 ± 0.87 ^{a,b}	136
	500	8.65 ± 1.22 ^{a,b}	165

Rats were orally administered by the methanol extract of *H. cordata* daily for one week and then bromobenzene (BB, 460 mg/kg) was i.p. injected four times with 12 h interval for final two days. Rats were decapitated 12h after the injection of BB treatment. The values are mean ± S.D. of 5 animals. Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

*unit: TSO nmole/mg protein/min.

Table V. ¹³C-NMR spectral data for compounds 1, 2 and 4-6 in DMSO-d₆.

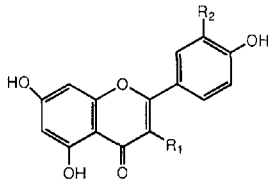
Carbon No..	1	2	4	5	6
2	147.7	163.7	157.3	156.3	157.3
3	135.7	102.6	134.2	133.5	134.3
4	175.8	181.7	177.7	177.4	177.8
5	160.7	161.0	161.3	161.2	161.3
6	98.2	98.7	98.7	98.6	98.8
7	163.9	164.0	164.3	164.2	164.3
8	93.3	93.7	93.8	93.5	93.7
9	156.1	157.3	156.5	156.3	156.5
10	103.0	103.6	104.1	103.9	104.1
1'	121.9	121.1	120.5	122.0	121.2
2'	115.0	128.4	130.6	115.2	115.6
3'	145.0	115.8	115.4	144.8	145.3
4'	146.8	161.4	160.0	148.4	148.5
5'	115.6	115.8	115.4	115.9	115.8
6'	119.9	128.4	130.6	121.1	120.6
1"			101.8	101.8	101.7
2"			70.1	71.2	70.1
3"			70.4	73.2	70.4
4"			71.1	67.9	71.3
5"			70.6	75.8	70.5
6"			17.5	60.1	17.5

의 bromobenzene대사계에 미치는 영향을 검토하였다. Bromobenzene은 xenobiotic성 간독소의 일종이다. Bromobenzene의 대사에서 cytochrome P-450 mono-oxygenase에 의해 bromobenzene 2,3-oxide와 bromobenzene-3,4-oxide로 전환된다. 2,3-oxide는 쉽게 비독성물질인 2-bromophenol로 변한다. 독성물질인 3,4-oxide는 epoxide hydrolase에 의해 독성이 없는 bromobenzene-3,4-dihydrodiol로 대사시키며 또는 glutathione S-transferase에 의하여 bromobenzene glutathione으로 배설되기도 한다.²⁰⁾ 이 때 쉽게 비독성화 되는 것보다 독성이 큰 3,4-oxide가 많이 생성되면 세포손상이 증가된다.

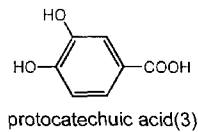
Bromobenzene을 모델약물로 한 흰쥐를 대상으로 간에서 과산화지질의 함량과 간 효소의 활성변화에 대해 어성초를 실험재료로 하여 관찰하였다. 어성초의 메타놀추출물로 전처리하고 bromobenzene투여로 독성을 유발한 흰쥐의 간장중 과산화지질 함량을 bromobenzene 단독투여군과 비교한 바 증가되었던 함량이 감소되었다. 즉 어성초 추출물 250 mg/kg의 경구투여에서는 대조군에 비해 21%, 500 mg/kg 투여군에서는 24%의 함량이 줄었다(Table I).

체내에 투여되어진 약물 또는 독성물질의 대사과정에는 phase 1과 phase 2 반응으로 나눌 수 있다. Bromobenzene을 분해하여 독성물질인 epoxide를 생성시키는 효소계인 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성과 epoxide를 가수분해하여 독성이 없는 dihydrodiol로 대사시키는 효소인 epoxide hydrolase 활성 그리고 epoxide 해독계에서 glutathione의 포함효소인 glutathione S-transferase의 활성변화를 검토하였다. 추출물로 전처리하고 bromobenzene을 투여한 실험군에서 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성의 변동이 관찰되었다. 즉 bromobenzene으로 처리할 때 aminopyrine N-demethylase와 aniline hydroxylase 활성은 대조군에 비해 54%와 67% 각각 증가되었다. 어성초 추출물 250 또는 500 mg/kg으로 전처리하고 bromobenzene을 투여한 흰쥐에서는 이들의 활성이 bromobenzene만으로 독성을 유도한 실험군과 비교할 때 aminopyrine N-demethylase 활성은 각각 13%와 22%, aniline hydroxylase 활성은 16%와 30%로 각각 감소되었다(Table II). 그러나 glutathione의 포함효소인 glutathione S-transferase 활성변동은 나타나지 않으므로 (Table III) bromobenzene이 유도하는 epoxide를 이 효소로 해독시키는 효과는 없는 것으로 사료된다. 다른 해독계로서 epoxide를 가수분해하는 효소인 epoxide hydrolase활성에 어떤 영향을 미치는지 관찰하였다. Bromobenzene 단독 투여로 대조군보다 49% 억제작용이 나타나며, 메타놀 추출물로 250, 500 mg/kg으로 전처리한 군에서는 bromobenzene에 의해 감소된 효소의 농도를 36%, 65% 각각 회복시켰다(Table IV). 이상의 결과로서 어성초 추출물은 bromobenzene 유도 흰쥐에서 지질과산화 억제활성이 있으며, bromobenzene대사계에서 독성물질인 3,4-epoxide를 감소시키는 작용이 있음을 알 수 있다. 이는 epoxide 생성계인 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성감소와 해독계의 일부인 epoxide hydrolase 활성증가의 복합작용인 것으로 사료된다.

어성초를 *n*-hexane으로 탈지한 후 얻은 MeOH 추출물을 계통분획하고, 이중 EtOAc분획물을 silica gel column chromatography를 실시하여 6종의 페놀성 화합물을 분리하였다. 화합물 3는 IR spectrum에서 3374 cm⁻¹ (OH), 1657 cm⁻¹ (α , β -unsaturated ketone), 1607, 1506 cm⁻¹ (aromatic C=C)의 흡수대는 페놀성 화합물임을 추정케 한다. ¹H-NMR spectrum에서 1, 3, 4-trisubstituted benzene ring에 기



	R ₁	R ₂
quercetin(1)	OH	OH
apigenin(2)	H	H
afzelin(4)	O-rha.	H
hyperoside(5)	O-gal.	OH
quercitrin(6)	O-rha.	OH



인하는 δ 7.33 (1H, d, $J=2.1$ Hz), 7.28 (1H, dd, $J=2.1$ & 8.1 Hz), 6.74 (1H, d, $J=8.1$ Hz)에서의 peak가 관측된다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 7개의 singnal이 관측되며, 이중 ketone기에 기인되는 signal (δ 167.3)이 나타난다. 화합물 3은 3, 4-dihydroxybenzoic acid인 protocatechuic acid로 결정하였으며 이는 문헌치²¹⁾와 잘 일치하였다. 화합물 1, 2, 4, 5와 6은 TLC와 분광학 data에서 flavonoid화합물로 추정된다. 그중 화합물 1은 문헌치의 비교에 의해 quercetin으로 동정하였다. 화합물 2를 MeOH 용매로 측정된 UV spectra에서 band I이 335 nm에서 나타나 C-3에 free hydroxyl기가 존재하지 않음을 알 수 있다. Shift reagent에 의한 변화에서 MeOH에 NaOAc 첨가로 C-7위치에 free hydroxyl기, NaOMe에서 C-4'위치에 free hydroxyl기, AlCl_3 용매와 AlCl_3 에 HCl 첨가에서 band I의 무변화로 B-ring에 ortho dihydroxyl기가 존재하지 않는 화합물로 추정하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.92, δ 6.92의 doublet는 flavonoid B-ring에서 ortho coupling하고 있는 H-2, H-6와 H-3, H-5의 signal로, δ 6.47, δ 6.18에서 $J=8.7$ Hz로 meta coupling하는 doublet는 A-ring의 H-8과 H-6으로 귀속시킬 수 있다. δ 6.77에서는 H-3의 proton singnal이 관측된다. 따라서 화합물 2는 flavone화합물인 apigenin으로 동정하였다.²²⁾ 화합물 4, 5, 6은 IR spectrum에서 $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ 의 흡수대 및 MeOH 용매의 UV data에서 flavonol 배당체로 추정된다. 화합물 4의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에

서 B-ring에 기인한 $J=8.6\text{ Hz}$ 로 ortho coupling이 δ 7.74 와 δ 6.91에서 관측되며, A-ring의 meta coupling ($J=1.9$ Hz)하는 proton이 δ 6.42와 δ 6.20에서 doublet로 관측되어 비당체는 kaempferol임을 알 수 있다. 1 mole의 당에 기인하는 anomeric proton signal이 δ 5.29에서 singlet로 관측되며, δ 0.78에서 나타나는 $J=5.3$ Hz의 doublet와 $^{13}\text{C-NMR}$ data [δ 101.8 (C-1), 70.1 (C-2), 70.4 (C-3), 70.6 (C-4), 71.1 (C-5)] 로서 당은 1 몰의 rhamnose임을 알 수 있다. 결합위치는 shift reagent에 의한 UV 분석과 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 kaempferol²²⁾과의 비교에서 C-3 chemical shift의 glycosylation shift로 이 위치에 당이 결합함을 알 수 있다. 따라서 화합물 4은 afzelin로 동정하였다. 화합물 5와 6은 아래 data를 제외하고는 화합물 4와 유사하다. 즉 UV spectra에서 AlCl_3 에 HCl 첨가로서 단파장 이동과 $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 7.65 ~ δ 6.66에서 B-ring ABX타입의 aromatic signal 관측이다. 따라서 화합물 5와 6의 비당체는 quercetin이며, 당은 $^{13}\text{C-NMR}$ data에서 각각 galactopyranose와 rhamnopyranose임을 알 수 있다. 화합물 1의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum과의 비교에서 당의 결합위치는 모두 C-3이므로 화합물 5와 6은 각각 hyperoside와 quercitrin으로 동정하였다. 저자 등의 문헌검색에 의하면 protocatechuic acid와 apigenin은 어성초에서 처음 분리된 화합물이다. 어성초의 bromobenzene대사계에 작용하는 활성물질 연구는 계속중이다.

결 론

어성초의 메타놀 추출물에 대한 흰쥐의 브로모벤젠 대사계에 미치는 영향을 검토하였다. 추출물은 bromobenzene에 의하여 증가된 과산화지질의 함량을 감소시켰다. Bromobenzene을 분해하여 독성물질인 epoxide를 생성시키는 효소계인 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성에서는 bromobenzene에 의해 증가된 활성을 어성초의 추출물이 감소시킴을 관찰하였으나 glutathione S-transferase활성의 변동은 나타내지 않았다. Epoxide hydrolase의 활성변화로는 bromobenzene 단독 투여로 대조군보다 억제작용이 나타났으며, 추출물을 전처리한 군에서는 bromobenzene에 의해 감소된 효소의 epoxide hydrolase능도를 회복시켰다. 따라서 어성초의 추출물은 흰쥐의 bromobenzene 대사계에서 aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase 활성의 감소와 epo-

xide hydrolase 활성의 증가로 epoxide를 감소시키는 것으로 사료된다. 그리고 여성초 지상부의 메타놀 추출물로부터 분획한 EtOAc가용부를 silica gel column chromatography를 실시하여 protocatechuic acid와 quercetin, apigenin, afzelin, hyperoside, quercitrin을 분리, 동정하였다.

참고문헌

1. 송주택 (1993) 식물학대사전. p.56. 한국도서출판중앙회.
2. Shanghai Science and Technological Publisher (1985) "The Dictionary of Chiese Drugs" Vol. 1, Shougakukan, Tokyo, p.507
3. 이창복 (1993) 대한식물도감, p.252. 향문사.
4. 한국자원식물연구소 (1989) 한국식물대보감(상), p.56. 제일출판사.
5. Liu, Y. L., Deng, Z. F. (1979) Investigation of the chemical constituents of the essential oil of *Houttuynia cordata* Thunb. *Acta Botanica Sinica*. 21: 244-249.
6. Tutupali, L. V., Chaubal, M. G. (1975) Saururaceae. V. Composition of essential oil from foliage of *Houttuynia cordata* and chemosystematics of Saururaceae. *J. Nat. Prod.* 38: 92-96.
7. Tagagi, S., Yamaki, M., Masuda, K. and Kuboda, M., (1978) On the constituents of the terrestrial part *Houttuynia cordata*. *Shoyakugaku Zasshi*. 32: 123-125.
8. Pröbstle, A., Lotter, H., Wagner-Redecker, W., Matthiesen, U. and Bauer, R. (1993) Identification of lipophilic constituents with anti-inflammatory activity from *Houttuynia cordata*. *Planta Medica*. 59: A663-A664.
9. Pröbstle, A., Neszmely, A., Jerkovich, G., Wagner, H. and Bauer, R. (1994) Novel pyridine and 1,4-dihydropyridine alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Natural Products Letters*. 4: 235-240.
10. 최영현, 김은영, 박건영, 이숙희, 이원호 (1994) 여성초즙 및 추출물의 항돌연변이 효과. *한국영양식량학회지*. 23: 916-921.
11. 송호준, 신민교 (1987) 여성초추출물이 폐렴유발 생쥐의 면역반응 및 조직변화에 미치는 영향. *생약학회지*. 18: 216-232.
12. Hayashi, K., Kamiya, M. and Hayashi T. (1995) Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta Medica*. 61: 237-241.
13. Zampaglione, N., Jollow, D. J., Mitohell, J. R., Manrick, M. and Gillette, J. R. (1973) Role of detoxifying enzymes in bromobenzene-induced liver necrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187: 218-227.
14. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
15. Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentsch reaction. *J. Biol. Chem.* 55: 412-416.
16. Bidlack, W. R. and Lowry, G. L. (1982) Multiple drug metabolism: p-Nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 31: 311-317.
17. Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) The first step in mercapturate acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
18. Hasegawa, L. S. and Hammock, B. D. (1982) Spectrophotometric assay for mammalian cytosolic epoxide hydrolase using trans-stilbene oxide as the substrate. *Biochem. Pharmacol.* 31: 1979-1984.
19. Lowry, O. H., Rodebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
20. Rush, G. F., Kuo, C. H. and Hook, J. B. (1984) Nephrotoxicity of bromobenzene in mice. *Toxicol. Lett.* 20: 23-29.
21. Scott, K. N. (1972) Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Biologically important aromatic acids. I. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives. *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 8564-8568.
22. Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, K. and Mabry, T. J. (1978) Carbon-13 nmr study of flavonoids-III, Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*. 34: 1389-1397.

(2000년 6월 22일 접수)