

## 참당귀근 성분이 간의 약물대사효소에 미치는 효과

신국현,\* 한정미,<sup>1</sup> 이인란<sup>1</sup>

서울대학교 천연물과학연구소, <sup>1</sup>이화여자대학교 약학대학

### Effect of the Constituents of Angelicae gigantis Radix on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes

Kuk Hyun Shin,\* Jung Mee Han<sup>1</sup> and Ihn Ran Lee<sup>1</sup>

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea; and  
<sup>1</sup>College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul, 120-750, Korea

**Abstract** - The ether soluble fraction of the roots of Angelicae gigantis Radix caused a significant prolongation of hexobarbital(HB) induced sleeping time in mice. Through systematic fractionation of the ether fraction monitored by bioassays, two pyranocoumarins, decursinol angelate and decursin were isolated as active principles. Decursin, as a main component, exhibited significant prolongation of HB-induced hypnosis as well as significant inhibition of hepatic microsomal drug metabolizing enzyme(DME) activities at relatively high dose which indicated that it is a weak DME inhibitor.

**Key words** - Angelicae gigantis Radix; hepatic DME; hexobarbital hypnosis; decursinol angelate; decursin.

의약품, 발암물질, 살충제, 천연물성분, 식품첨가물 등 여러 가지 외인성 이물질들은 주로 간의 mitochondria에 존재하는 약물대사효소에 의하여 대사되나 약물대사효소를 억제 또는 유도 함으로서 다른 약물이나 이물질들의 대사에 변동을 초래하여 약효나 독성에 지대한 영향을 미칠수 있다는 사실이 많은 연구자들에 의하여 증명된바 있다.<sup>1-4)</sup>

저자들은 이미 상용생약 150여종의 메탄올 추출물이 간의 약물대사효소에 미치는 효과에 대하여 HB 수면시간을 지표로 검색을 실시한 결과 약 30%의 생약이 간의 효소활성에 변동을 초래한다는 사실을 확인 한바 있으며<sup>5-7)</sup> 특히 Angelica 속 식물에서 강력한 활성이 인정되어 활성물질을 추적한 결과 furanocoumarin 성분들이 약물대사효 억제 또는 유도성분임을 구명 보고 한 바 있다.<sup>8-10)</sup> 본 검색과

정에서 Angelica 속 식물의 하나인 참당귀 추출물에서도 강력한 수면작용 변동 효과가 있음을 확인 한바 있으므로<sup>5)</sup> 그 유효성분을 추적하였으며 주성분의 하나인 decursin에 간 효소계에 대한 억제효과가 있음을 구명하였다.

#### 재료 및 방법

**실험재료** - 본실험에 사용한 참당귀근은 경동시장에서 구입하였으며 식물학적으로 확인한 후 사용하였다. 증거표본은 서울대학교 천연물과학연구소 표본실에 보관하였다.

**시약 및 기기** - NADP, glucose 6-phosphate, nicotinamide, semicarbazide 등은 Sigma Co., Ltd.에서 구입 하였으며 hexobarbital은 Wako 제품을, 성분추출 및 분리용 용매와 시약 및 기타 시약들은 일급 또는 특급시약을 사용하였다. SKF-

\*교신저자 : Fax 02-762-8322

525A는 Smith Kline & French Lab. U.S.A.로부터 기증받았다.

원심분리기는 Sorvall RT-6000 refrigerated centrifuge, RC-5B superspeed centrifuge 및 65-B ultracentrifuge를 사용하였고 Dubnoff metabolic shaking incubator 및 Gilford 2600 UV-Vis spectrophotometer 등을 사용하였다. 성분분석 기기로서 Mitamura Ricken melting point determining apparatus, Varian FT-80A (80 MHz) NMR spectrometer, 및 Hewlett Packard 5985B GC/MS system 등을 사용하였다.

**실험동물 및 시료의 처치**- 동일 온도와 습도의 조건에서 사육하여 적응시킨 체중 20-25 g의 dd계 웅성 mouse 또는 체중 150-200 g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 사용하였으며 실험기간중 고형사료 및 물을 충분히 공급하였다. 시료는 일정량씩을 0.5% CMC액에 현탁시켜서 투여하였다.

**활성성분의 분리**- 건조한 참당귀 근을 분쇄한후 ether로 일주일간씩 5회 냉침하고 여과하여 여액을 합하여 농축하였다. 잔유물을 다시 methanol로 3회 추출하여 여과하고 여액을 농축하였다. Ether 및 methanol 추출물을 합한후 물로 현탁하여 ether로 수회 추출하고 수층을 다시 ethyl acetate, *n*-butanol 등으로 계통분획 하였다. 이와같이 하여 얻은 각 분획물들의 간의 효소계에 미치는 작용의 강도를 HB 수면시간을 지표로 측정하여 비교하였으며 활성을 나타낸 ether 분획물을 silica gel column에 걸쳐 *n*-hexane: ethylacetate=1:0-15:1로 gradient elution을 실시하여 순차적으로 용출되는 물질들을 methanol로 재결정하여 순수 분리하였다.

**Compound 1**- 백색 침상결정 (methanol): mp, 103-104 °C: MS(EI, 70 eV)  $m/z$ (rel. int.): 328( $M^+$ , 0.2), 228(19.6), 213(100), 83(13.5).  $^1H$ -NMR(80MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.23(1H, d,  $J=9.5$ , H-3), 7.57(1H, d,  $J=9.5$ , H-4), 6.79(1H, s, H-5), 7.15(1H, s, H-8), 5.13(1H, t,  $J=5.0$ , H-3'), 3.06(2H, dd,  $J=17.4$ , 4.8, H-4'), 1.40(3H, s, gem  $CH_3$ -2'), 1.38(3H, s, gem  $CH_3$ -2'), 6.10(1H, qq,  $J=7.2$ , 1.4, H-3''), 1.84(3H, d,  $J=1.4$ , CH-2''), 1.89(3H, d,  $J=7.2$ , H-4'').

**Compound 2**- 백색 판상결정 (methanol): mp,

110-111 °C: MS(EI, 70 eV)  $m/z$ (rel. int.): 328( $M^+$ , 0.2), 228(21.0), 213(100), 83(34.3).  $^1H$ -NMR(80MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.23(1H, d,  $J=9.5$ , H-3), 7.58(1H, d,  $J=9.5$ , H-4), 6.80(1H, s, H-5), 7.15(1H, s, H-8), 5.08(1H, t,  $J=4.8$ , H-3'), 3.03(2H, dd,  $J=17.5$ , 4.8, H-4'), 1.38(3H, s, gem  $CH_3$ -2'), 1.36(3H, s, gem  $CH_3$ -2'), 5.66(1H, m, H-2'') 2.14(3H, d,  $J=1.2$ ,  $CH_3$ -3'), 1.88(3H, d,  $J=1.3$ , H-4'').

**동물실험 및 생화학적 실험**- HB 수면시간 및 혈중 HB 농도의 측정은 전보<sup>9)</sup>에 준하여 실시하였고, aminopyrine N-demethylase활성의 측정은 Mazel<sup>11)</sup> 및 Nash<sup>12)</sup>의 방법, HB hydroxylase활성의 측정은 Cooper 및 Brodie 등의 방법,<sup>13)</sup> aniline hydroxylase 활성의 측정은 Imai 및 Sato의 방법,<sup>14)</sup> cytochrome P-450 함량의 측정은 Omura 및 Sato 등의 방법<sup>15)</sup>에 준하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

**유효성분의 분리 및 구조**- 계통분획에 의하여 얻은 각 분획물들이 HB 수면시간에 미치는 효과를 측정한 결과 Table I에 표시한바와 같이 대조군이 18.4분의 평균수면시간을 보인 반면 ether 분획물 투여군에서는 87.3분으로서 374.4%의 수면연장 효과를 나타내어 ether 분획에 유효성분이 존재할 것으로 추정하고 성분 분리를 시도하여 순차적으로 2개의 성분을 순수분리 하였으며 용출되는 순서에 따라 decursinol angelate(compound 1) 및 decursin(compound 2)임을 NMR 및 mass spectral data와 문헌치와 비교하여 확인하였다.<sup>16,17)</sup>

**Table I.** Effects of various fractions on hexobarbital-induced hypnosis in mice

Treatment <sup>a</sup>	Dose (mg/kg, i.p.)	Hypnosis (min.)	% of control
Control	0.5% CMC	18.4±1.1	100
Ether fr.	250	87.3±6.6*	474.4
BuOH fr.	250	17.3±1.9	94.0
H <sub>2</sub> O fr.	250	16.8±1.1	91.3

Data represent mean±S.E. <sup>a</sup>A single treatment 30 min. before injection of HB-Na(70 mg/kg, i.p.). Significantly different from the control: \*P<0.001. N.S.: Not significant.

**Decursin 및 decursinol angelate가 HB 수면시간에 미치는 효과** - Decursin 및 decursinol angelate는 pyranocoumarin의 일종으로서 참당귀의 특이성분임이 보고되었다.<sup>16,17)</sup> 전보에서<sup>9)</sup> 천연 coumarin 유도체가 간의 약물대사효소계에 미치는 효과에 대한 검색 과정에서 decursin을 30 mg/kg 복강내 투여시 수면시간에 유의성있는 변동을 초래하지 않음을 입증한바 있으나 이를 좀더 정량적으로 검토할 목적으로 decursin을 50-200 mg/kg 범위에서 용량별로 투여하고 30분 후 HB-Na 70 mg/kg씩 복강내 투여하여 수면시간을 측정할결과 Table II에서 보는바와 같이 뚜렷한 용량 반응을 나타내어 투여량의 증가에 따라 유의성있는 수면시간의 증가를 보였으며 200 mg/kg 투여군에서는 274%의 현저한 수면연장효과를 나타냄을 확인하였다. 한편 decursin의 구조 이성체로 알려진 decursinol angelate는 side chain의 결합 위치만이 다르므로 그 생물활성에 차이를 나타낼 가능성이 있으므로 이를 검토하기 위하여 100 mg/kg을 mouse에 일회 투여하고 hexobarbital 수면시간에 미치

는 효과를 측정 비교한 결과 decursinol angelate 투여군이 동일 투여량에서 약 4배의 수면시간 증가를 나타내어 간 효소에 대한 작용이 decursin에 비하여 강할 것으로 추정된다. 한편 대표적인 약물대사효소 억제물질로 알려진 SKF-525A<sup>18)</sup>의 수면시간에 미치는 효과와 참당귀의 주성분인 decursin의 그것과 비교한 결과 SKF-525A 30 mg/kg 투여 시에 비하여 거의 2배 약한 작용을 나타내어 비교적 약한 약물대사효소 억제물질임을 알 수 있다(Table III). 일반적으로 중추신경 억제물질은 barbiturate 수면시간을 증가시킨다는 사실이 입증된바 있으나<sup>18)</sup> HB는 간에서 대사되며<sup>13)</sup> 간의 효소활성이 억제되어도 HB의 대사가 억제되어 혈중농도가 높아져서 수면시간이 증가될 것이므로 단지 수면시간이 증가되는 사실만가지고 중추신경 억제효과로 단정 할수 없다. Decursin에 의하여 HB 수면시간이 대조군에 비하여 증가되는 것이 효소억제에 기인하는가를 검토하기 위하여 decursin 투여후 HB의 혈중농도를 측정하여 대조군의 그것과 비교하여 보았다. Table III에서 보는 바와 같이 decursin 투여후 30분만에 HB 수면시간이 증가되는 시점에서 채혈하여 혈중 HB 농도를 측정한 결과 대조군에 비하여 약 66%의 유의성 있는 혈중농도의 높은 값을 보여 효소 억제가 하나의 원인임을 알았다.

**Decursin이 간의 약물대사효소계에 미치는 효과** - 순수분리한 decursin이 HB 수면시간을 증가시키는 효과를 나타냄이 입증되었으므로 이현상을 좀더 체계적으로 구명하기위하여 직접적으로 간의 약물대사효소계에 미치는 효과를 검토하였다. 즉 mouse에 decursin을 200 mg/kg씩 단일회 복강내 투여하고 30분 후에 간을 적출하고 microsomal 효소원을 얻어 aminopyrine N-demethylase, HB hydroxylase, aniline hydroxylase

**Table II.** Effect of decursin and decursinol angelate on HB-induced hypnosis in mice

Treatment <sup>a</sup>	Dose (mg/kg, i.p.)	Hypnosis (min)	% of control
Control	0.5 CMC	23.0±1.5	100
Decursin	50	28.5±2.6	124.0
	100	32.4±2.5*	140.8
	150	52.8±3.1***	229.5
	200	86.0±2.8***	373.9
Decursinol angelate	100	60.6±1.9***	263.5

<sup>a</sup>A single treatment 30 min before injection of HB-Na(70 mg/kg, i.p.). Data represent mean±S.E. Significantly different from the control: \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

**Table III.** Effects of decursin on HB-induced hypnosis and HB concentration in serum of mice

Treatment <sup>a</sup>	Dose (mg/kg, i.p.)	HB hypnosis (min)	% of control	HB conc. (µg/ml serum)	% of control
Control	0.5% CMC	28.8±1.5 <sup>b</sup>	100	76.1±6.5 <sup>b</sup>	100
SKF	30	146.0±1.9***	506.9	163.9±4.6**	215.4
Decursin	200	86.2±1.6***	299.3	126.2±6.7**	165.8

<sup>a</sup>A single treatment 30 min. before injection of HB-Na(70 mg/kg, i.p. for HB-hypnosis or 100 mg/kg, i.p. for HB conc. in Serum). <sup>b</sup>Data represent mean±S.E. Significantly different from the control: \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

**Table IV.** Effects of a single treatment of decursin on DME activities and microsomal Cytochrome P-450 concentration in mice

Treatment <sup>a</sup>	Dose (mg/kg. i.p.)	Aminopyrine N-demethylase ( $\mu$ moles/g-prot./30min.)	Aniline hydroxylase ( $\mu$ moles/g-prot./30min.)	HB hydroxylase ( $\mu$ moles/g-prot./1hr.)	Cyt.P-450 (nmoles/mg-prot.)
Control	0.5% CMC	14.84 $\pm$ 0.30	6.32 $\pm$ 0.37	22.8 $\pm$ 0.72	1.28 $\pm$ 0.12
SKF	30	7.83 $\pm$ 0.68*** (52.8) <sup>b</sup>	4.45 $\pm$ 0.02** (70.4)	9.30 $\pm$ 1.44** (40.8)	0.78 $\pm$ 0.14* (60.9)
Decursin	200	10.80 $\pm$ 0.18*** (72.8)	5.60 $\pm$ 0.11* (88.6)	14.69 $\pm$ 1.50** (64.4)	1.08 $\pm$ 0.07* (84.4)

<sup>a</sup>A single treatment 30 min. before the enzyme assay. <sup>b</sup>Figures in parentheses indicate percent of control. Mouse livers isolated 30 min. after sample treatment were homogenized and various enzyme activities were estimated. Data represent mean $\pm$ S.E. Significantly different from the control: \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

**Table V.** Inhibitory potency of decursin on DME *in vitro*

IC <sub>50</sub> values (M $\times$ 10 <sup>-4</sup> ) <sup>a</sup>		
Aminopyrine N-demethylase	HB hydroxylase	Aniline hydroxylase
6.7	1.4	62.0

Rat microsomal enzymes were incubated in the presence or absence of the inhibitor. <sup>a</sup>The concentrations causing 50% inhibition of enzyme activities were calculated from regression equations obtained by plots of initial velocity vs. the concentrations of the inhibitor.

활성 및 cytochrome P-450 함량을 측정된 결과 Table IV에 표시한 바와 같이 대조약물인 SKF-525A에 비하여는 약하나 3종의 효소활성과 cytochrome P-450 함량의 유의성있는 감소를 초래하여 약물대사효소 억제작용이 있으며 이는 microsomal cytochrome P-450의 감소에 기인함을 알았다. 그 효소 억제 강도를 정량적으로 검토하기 위하여 *in vitro*에서 decursin 농도에 대한 비반응속도(대조군의 효소반응속도에 대한 inhibitor 존재 하에서의 반응속도의 비)를 대조하여 얻은 50% 억제농도(IC<sub>50</sub>)를 비교한 결과 Table V에서 보는 바와 같이 10<sup>-3</sup>-10<sup>-4</sup> M level로서 10<sup>-5</sup> M level인 SKF-525A이나 furanocoumarin성분에 비하여 약한 억제 강도를 나타낸다는 사실을 알았다. 한편 간 효소 억제물질인 SKF-525A나 강력한 효소 억제물질로 구명된 바 있는 furanocoumarin 성분들은 연속투여시 간의 약물대사효소 유도효과를 나타

내어 효소 활성의 증가와 cytochrome P-450함량의 증가를 초래한다는 사실<sup>10,19)</sup>이 증명된바 있으므로 decursin에서도 동일한 작용이 발현되는가를 구명하기 위하여 연속 투여시 간의 효소계에 미치는 효과를 검토 한 결과 효소유도 효과가 없음을 알았다(실험결과 생략). 이상의 실험결과에 의하여 decursin에 간효소 억제효과가 있음이 증명되었으나 HB 수면시간을 증가시킨다는 사실에 비추어 중추 신경 억제작용의 가능성을 배제할 수 없으며 앞으로 검토해야 할 과제로 생각된다.

## 인용문헌

1. Conney, A. H. (1967) Pharmacological implication of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19: 317-366.
2. Wattenberg, L. W., Page, M. A. and Leong, J. L. (1968) Induction of increased benzpyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds. *Cancer Res.* 28: 934-937.
3. Kato, R., Chiesara, E. and Vassanelli, P. (1964) Further studies on the inhibition and stimulation of microsomal drug metabolizing enzymes of rat liver by various compounds. *Biochem. Pharmacol.* 13: 69-83.
4. Neter, K. J. (1980) Inhibition of oxidative drug metabolism in microsomes. *Pharm. Ther.* 10: 515-535.
5. Woo, W. S., Shin, K. H., Kim, I. C. and Lee, C. K. (1978) A survey of the response of Korean medicinal plants on drug metabolism. *Arch.*

- Pharm. Res.* 1: 13-19.
6. Woo, W. S. and Shin, K. H. (1979) A further survey of the action of some medicinal plants on drug metabolism. *Arch. Pharm. Res.* 2: 115-119.
  7. Woo, W. S., Shin, K. H. and Ryu, K. S. (1980) A survey of the action of Korean *Angelica* plants on drug metabolism. *Arch. Pharm. Res.* 3: 79-84.
  8. Woo, W.S., Lee, C.K. and Shin, K.H. (1982) Isolation of drug metabolism modifiers from roots of *Angelica koreana*. *Planta Med.* 45: 234-237.
  9. Woo, W. S., Shin, K. H. and Lee, C. K. (1983) Effect of naturally occurring coumarins on the activity of drug metabolizing enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1800-1803.
  10. Shin, K. H. and Woo, W. S. (1986) Inhibition of hepatic microsomal drug metabolizing enzyme by imperatorin. *Arch. Pharm. Res.* 9: 81-86.
  11. Mazel, P. (1972) Experiments illustrating drug metabolism *in vitro*. In *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. B. LaDu, H. G. Mandel and E.L. Way(eds.), 546-582. Williams and Wilkins, Baltimore.
  12. Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421.
  13. Cooper, J. R. and Brodie, B. B. (1955) The enzymatic metabolism of hexobarbital. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 114: 409-417.
  14. Imai, Y., Ito, A. and Sato, R. (1966) Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* 60: 417-428.
  15. Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
  16. Konoshima, M., Chi, H. J. and Hata, K. (1968) Coumarins from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* 16: 1139-1140.
  17. Ryu, K. S., Hong, N. D., Kim, N. J. and Kong, Y. Y. (1990) Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai. Isolation of decursinol angelate and assay of decursinol angelate and decursin. *Kor. J. Pharmacogn.* 21: 64-68.
  18. Axelrod, J., Reichenthal, J. and Brodie, B. B. (1954) Mechanism of the potentiating action of  $\beta$ -diethylaminoethyl diphenylpropyl acetate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 110: 49-54.
  19. Shin, K. H., Kim, O. N. and Woo, W. S. (1988) Effect of the constituents of *Angelicae dahuricae* Radix on hepatic drug metabolizing enzyme activity. *Kor. J. Pharmacogn.* 19: 19-27.

(1996년 10월 19일 접수)