

## 해조류 곰피로부터 분리한 Phloroglucinol이 흰쥐의 아세트아미노펜 대사효소활성에 미치는 영향

박종철<sup>†</sup> · 허종문 · 박주권 · 김현주 · 전순실\* · 최재수\*\* · 최종원\*\*\*

순천대학교 헌약자원학과, \*식품영양학과

\*\*부경대학교 식품생명과학과

\*\*\*경성대학교 약학과

### Effects of Phloroglucinol Isolated from *Ecklonia stolonifera* on the Acetaminophen-Metabolizing Enzyme System in Rat

Jong Cheol Park<sup>†</sup>, Jong Moon Hur, Ju Gwon Park, Hyun Joo Kim, Soon Sil Chun\*,  
Jae Sue Choi\*\* and Jong Won Choi\*\*\*

Dept. of Oriental Medicine Resources and \*Dept. of Food and Nutrition.

Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

\*\*Dept. of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*\*\*College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

#### Abstract

Phloroglucinol isolated from *Ecklonia stolonifera* prevented the acetaminophen (800 mg/kg, i.p.)-induced rats as evidenced by the decreased formation of lipid peroxide. The activities of cytochrome P-450, aninopyrine N-demethylase and aniline hydroxylase were not changed by the treatment with phenolic compound as compared with acetaminophen-treated rats. The glutathione S-transferase activity was decreased by the treatment of acetaminophen. This enzyme activity was restored in liver of pretreated-rats given by phloroglucinol. Pretreatment of this compound marked the liver protective activities as recovering the decreased glutathione level and glutathione reductase activity in rats treated with acetaminophen. But  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase activity was not changed. The results suggest that the acetaminophen-induced hepatic lipid peroxidation may be reduced by enhancing the activity of glutathione S-transferase.

**Key words:** *Ecklonia stolonifera*, phloroglucinol, acetaminophen-treated rat, lipid peroxide, glutathione S-transferase, glutathione reductase

#### 서 론

해열·진통제로 사용되는 의약품인 acetaminophen은 간장에서 대사되어 신장으로 배설된다(1). Acetaminophen은 다른 해열·진통제에 비하여 위장 출혈을 일으키지 않는 이점이 있으나 과량 투여시 사람과 동물에서 치명적인 간독성과 신장괴사를 유발하는 것으로 보고되고 있다(2). 이러한 독성의 생성은 간 microsomal분획의 cytochrome P-450과 관련되어 일어나는 산화과정에서 조직의 macromolecule과 공유결합하는 화학적으로 반응성이 큰 aryl기를 지닌 중간대사를 형성하여, 이 화합물에 의하여 hepatic glutathione의 농도가 적어도 50%정도 결핍되었을 때 간조직의 괴사를 유발하므로서 독성을 발현하는 것으로 사사되고 있다(3,4).

해조류에는 육상생물과는 다른 새로운 약효물질이 기대됨에 따라 이 분야의 연구에 관심이 높아지고 있다. 본 연구자들은 해조류 활성의 계속적 연구(5)로서 곰피에서 분리한 페놀성 화합물인 phloroglucinol를 흰쥐에 경구 투여한 후 과량의 acetaminophen 투여로 독성을 유발한 간장증 지질과산화의 생성과 acetaminophen 대사효소활성에 미치는 영향을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

실험에 사용한 phloroglucinol은 곰피(*Ecklonia stolonifera*)에서 분리하여 이용하였다. 즉 건조한 곰피(3.5 kg)를 메탄올로 3회 추출하여 메탄올 추출물 550 g을 얻었으

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

며, 이 추출물은 dichloromethane(90 g), ethyl acetate(20 g), n-butanol(15 g)과 물(250 g) 분획으로 각각 용매 분획하였다. 그중 ethyl acetate분획물은 silica gel column chromatography(용출용매, CHCl<sub>3</sub>-MeOH=50:1→5:1)와 Sephadex LH-20 column chromatography(용출용매: MeOH)를 이용하여 폐놀성화합물을 분리하였다. 이 화합물은 IR, <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR 등의 분광학적 분석에 의하여 phloroglucinol로 동정하였으며 문현의 data와 일치하였다(6).

#### 동물 및 치료

실험동물로는 한국실험동물개발로부터 분양받은 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 대학 동물사에서 1주일동안 적응시킨 후 일정한 조건(온도: 20±2°C, 습도: 60%, 명암: 12시간 light/dark cycle)에서 사육한 체중 150~200 g의 흰쥐를 사용하였다. 곰피에서 분리한 phloroglucinol 10 또는 20 mg/kg을 1% tween 80(0.5 mL)에 용해하여 하루에 한번씩 경구로 7일 또는 10일간 각각 투여하였으며, 양성대조군으로는 methionine을 사용하였다. 마지막 투여일에 acetaminophen(800 mg/kg)을 1% tween 80에 혼탁시켜 복강내 0.2 mL 투여하였으며, 대조군은 동일량의 1% tween 80을 투여하였다. 실험동물은 실험전 24시간 물만 주고 절식시켰다.

#### 효소원의 조제

실험동물을 탄산가스로 마취하고 복부정중선을 따라 절개하고 복부대동맥에서 혈액을 취취하여 실혈사시킨 후, 간장을 생리식염수로 관류하여 혈액을 제거한 간을 적출하여 여지로 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 평량한 다음 조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 혈 및 미마쇄 부분을 제거한 상등액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 cytosolic fraction과 microsomal fraction을 분리하였다. Cytosolic fraction은 glutathione S-transferase, glutathione reductase 및  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase 활성의 효소원으로, microsomal fraction은 cytochrome P-450, aminopyrine N-demethylase 및 aniline hydroxylase 활성측정에 사용하였다. 이상의 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4°C이하에서 행하였다.

#### 간조직중 지질파산화의 함량

간조직을 생리식염수에 10%로 균질액 0.4 mL에 8.1% sodium sulfate 1.5 mL, 20% acetate buffer(pH 3.5) 1.5 mL 및 0.8% thiobarbituric acid 1.5 mL를 가하여 95°C에서 1시간 반응시킨 후 냉각시켰다. 5.0 mL의 n-butanol-pyridine(15:1)을 가하여 추출한 다음 n-butanol-pyri-

dine층을 532 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선에 준하여 malondialdehyde 양을 산정하였다(7).

#### Cytochrome P-450의 활성

시험관에 1 mM EDTA, 20% glycerol, 0.5% sodium cholate 및 0.4% Triton N-101이 함유된 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 microsomal suspension(1 mg protein/mL)을 첨가한 후 sodium dithionite를 넣고 혼합한 다음 탄산가스를 1분간 bubbling시켰다. Bubbling<sup>o</sup> 끝난 후 파장 400~500 nm에서 흡광도를 측정하고 450~490 nm에서 흡광도의 차이를 cytochrome P-450 CO complex에 의한 흡광량 흡광계수 91 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 이용하여 산정하였다(8).

#### Aminopyrine N-demethylase의 활성

반응액 2 mL 중 0.1 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffer(pH 7.5)에 2.0 mM aminopyrine, 0.5 mM NADPH 및 효소액(300~400 µg 단백질)을 가해 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 15% ZnSO<sub>4</sub>와 포화 Ba(OH)<sub>2</sub>를 가하여 반응을 종료시켰다. 1,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액 1 mL에 Nash시액 5.0 mL를 가하여 60°C에서 30분간 발색시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다(9).

#### Aniline hydroxylase의 활성

반응액 2 mL 중 0.1 M Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffer(pH 7.5)에 1 mM aniline HCl과 0.5 mM NADPH 및 효소액(300~400 µg 단백질)을 가해 37°C에서 20분간 반응시켰다 반응을 종료시킬 목적으로 20% TCA를 가한 후 원심분리하여 상정액에 발색의 목적으로 0.5 mL의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2% phenol 치액 함유)을 가해 실온에서 30분간 방치후 640 nm에서 흡광도를 측정하였다(10).

#### Glutathione S-transferase의 활성

반응액 3.5 mL에 0.1 mM potassium phosphate(pH 6.5)에 1 mM glutathione, 1 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene 및 0.1 mL 효소액을 가하여 25°C에서 2분간 반응시켰다. 이때 생성되는 thioether를 340 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 흡광계수 9.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 이용하여 효소의 활성도를 산정하였다(11).

#### 간조직중 glutathione의 정량

10% 간조직 1 mL에 1 mM EDTA가 함유된 5% trichloroacetic acid를 가하여 원심분리한 후 상등액 0.5 mL를 취하였다. 0.5 mL ninhydrin시약을 가한 후 10분간 가열하여 냉수에 냉각하고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이곳에서 non-protein-SH에서 cysteine를 제한값을 glutathione의 양으로 하였다(12).

### $\gamma$ -Glutamylcystein synthetase의 활성

반응액 3.5 mL중 0.1 M tris HCl buffer(pH 8.0), 8.9 mM L-glutamic acid, 0.94 mM EDTA, 3.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.35 mM ATP와 효소액(100~300  $\mu$ g 단백질)을 가하여 37°C에서 10분 반응시킨 후 600 nm에서 효소의 활성을 측정하였다(13).

### Glutathione reductase의 활성

반응액 3.0 mL중 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.9), 0.94 mM EDTA, 4.6 mM oxidized glutathione, 0.16 mM NADPH 및 효소액(400~600  $\mu$ g 단백질)을 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 340 nm에서 NADPH의 감소되는 양을 측정하였다(14).

### 단백질 정량 및 통계처리

Bovine serum albumin(Sigma, Fr. IV)을 표준품으로 통계처리는 Duncan's multiple range test로 하였다(15).

### 결과 및 고찰

곰피는 갈조식물문의 미역과에 속하며, 저조선보다 깊은 해저의 바위 위에 붙어서 생육한다. 뿌리는 가는줄기를 가지고 사방으로 길게 뻗어나며, 다수 얹겨서 큰 군락을 이룬다. 우리나라 동해의 특산이며 남해에도 분포하는 곰피는 식용 해조류이다(16).

Acetaminophen은 간질환 환자나 과량 사용할 때에 간독성을 나타내는 물질로 알려져 있는데(17,18) 상용량의 투여에서는 간 microsomal UDP glucuronyl transferase와 cytosolic sulfotransferase가 주대사효소계로 알려져 있으며 과량 투여 시는 GST에 의해 해독되고 있는 점(19,20)을 감안하여 볼 때 본 실험에서는 흰쥐의 glutathione의 대사계에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였다. 즉 간장에서의 약물대사효소계에 acetaminophen을 상용량보다 과량 투여 시 증가되는 지질과산화의 생성에 대해 해조류 곰피에서 분리한 폐놀성 화합물인 phloroglucinol 전처리가 간독성 흰쥐의 acetaminophen 대사효소활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

Phloroglucinol을 10 mg/kg과 20 mg/kg을 흰쥐에 경구투여로 각각 7일과 10일 전처리하고 acetaminophen(800 mg/kg)을 복강내로 주사한 후 간조직중 지질과산화의 함량을 관찰하였다(Table 1) 생리식염수를 투여한 대조군에서의 지질과산화의 함량이 acetaminophen을 투여하므로 약 2배로 현저히 증가되던 것이 phloroglucinol 10 mg/kg의 7일간 전처리에서는 별다른 영향이 없었으나, 20 mg/kg의 7일간 전처리에서는 acetaminophen을 단독으로 투여한 군보다 26% 감소되었다. Acetamin-

ophen에 의한 간조직중 지질과산화의 생성이 감소되는 약리기전을 추구할 목적으로 acetaminophen의 phase I microsomal 효소계를 관찰하였다(Table 2) Cytochrome P-450의 경우 대조군에 비하여 acetaminophen을 단독투여하므로 약 170% 활성이 증가되었으나 화합물을 전처리하고 acetaminophen을 투여하여도 acetaminophen의 단독 투여군과 활성의 변동은 관찰할 수 없었다. 그리고 aminopyrine N-demethylase 및 aniline hydroxylase의 활성 변동도 cytochrome P-450의 활성과 유사한 양상을 보였다 흰쥐에 phloroglucinol을 경구투여하고 acetaminophen을 복강주사한 후 간 cytosol glutathione S-transferase의 활성을 측정하였다(Table 3). Acetaminophen을 주사한 군은 대조군보다 약 38%의 현저한 활성의 감소를 나타내었다. 화합물 20 mg/kg의 10일간의 전처리군에서는 대조군의 수준에는 미치지 않으나 효소의 활성이 acetaminophen 단독 투여군보다 현저히 증가되었다. Glutathione 농도에서는 acetaminophen 주사군은 3.00  $\mu$ mole/g of tissue로 대조군 5.23  $\mu$ mole/g of tissue 보다 현저히 감소되었으나 곰피성분을 10 mg/kg을 7일, 10일간 및 20 mg/kg 7일간 전처리한 군에서는 acetaminophen 단독 투여군과 별다른 영향이 없었으나, 20 mg/kg을 10일간 투여한 군에서는 acetaminophen의 단독투여군에 비하여 통계적으로 유의성 있게 증가되는 경향을 관찰할 수 있었다(Table 4). 이러한 glutathione 변동의 기전을 알아보기 위하여 곰피에서 분리한 phloroglucinol을 실험동물에 투여한 다음 acetaminophen을 복강내에 주사한 후 glutathione의 생성에 효소인 glutathione reductase 및  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase의 활성을 관찰하였다(21,22) (Table 5). Glutathione reductase 활성은 acetaminophen 투여군에서 대조군보다 약 49% 감소되었다.

Table 1 Effect of phloroglucinol isolated from *Ecklonia stolonifera* on the hepatic lipid peroxidation content in acetaminophen-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Day	Content
			MDA nmole/g of tissue
Control	0		16.92 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>
ACP	800		27.11 $\pm$ 1.40 <sup>b</sup>
PHG	10	7	26.43 $\pm$ 2.41 <sup>b</sup>
PHG	10	10	23.62 $\pm$ 2.23 <sup>c</sup>
PHG	20	7	20.24 $\pm$ 2.19 <sup>d</sup>
PHG	20	10	20.11 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>
MET	10	7	19.53 $\pm$ 2.17 <sup>d</sup>
MET	20	10	18.73 $\pm$ 1.20 <sup>ad</sup>

Rats were orally administered with phloroglucinol (PHG) or methionine (MET) as a reference compound daily for seven or ten days, and then acetaminophen (ACP, i.p., once a day). Rats were decapitated 24 hr after the injection of ACP treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean $\pm$ S.D. for five experiments. Values followed by the different letter are significantly different from control ( $p<0.05$ ).

Table 2. Effect of phloroglucinol *Ecklonia stolonifera* on the hepatic microsomal metabolism cytochrome P-450, aminopyrine N-demethylase and aniline hydroxylase activities in acetaminophen-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Day	P-450 <sup>1)</sup>	AD <sup>2)</sup>	AH <sup>3)</sup>
Control	0		0.47±0.01 <sup>a</sup>	0.49±0.02 <sup>a</sup>	3.84±0.21 <sup>a</sup>
ACP	800		0.79±0.02 <sup>b</sup>	1.26±0.08 <sup>b</sup>	6.09±0.33 <sup>b</sup>
PHG	10	7	0.78±0.03 <sup>b</sup>	1.23±0.10 <sup>b</sup>	6.05±0.23 <sup>b</sup>
PHG	10	10	0.81±0.01 <sup>b</sup>	1.22±0.06 <sup>b</sup>	6.06±0.27 <sup>b</sup>
PHG	20	7	0.82±0.02 <sup>b</sup>	1.21±0.11 <sup>b</sup>	6.02±0.18 <sup>b</sup>
PHG	20	10	0.77±0.02 <sup>b</sup>	1.19±0.09 <sup>b</sup>	5.99±0.20 <sup>b</sup>
MET	10	7	0.78±0.02 <sup>b</sup>	1.18±0.09 <sup>b</sup>	6.02±0.26 <sup>b</sup>
MET	20	10	0.79±0.02 <sup>b</sup>	1.16±0.06 <sup>b</sup>	6.04±0.20 <sup>b</sup>

Rats were orally administered with phloroglucinol (PHG) or methionine (MET) as a reference compound daily for seven or ten days and then acetaminophen (ACP, i.p., once a day). Rats were decapitated 24 hr after the injection of ACP treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Values followed by the different letter are significantly different from control ( $p<0.05$ ).

<sup>1)</sup>Cytochrome P-450 activity. n mole/mg protein.

<sup>2)</sup>Aminopyrine N-demethylase activity. HCHO n mole/mg protein/min.

<sup>3)</sup>Aniline hydroxylase activity. p-aminophenol n mole/mg protein/min.

Table 3. Effect of phloroglucinol *Ecklonia stolonifera* on the hepatic glutathione S-transferase activity in acetaminophen-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Day	Activity
			Conjugated 1,2-dinitro-4-nitrobenzene n mole/mg protein/min
Control	0		196.91±10.13 <sup>a</sup>
ACP	800		122.01±7.40 <sup>b</sup>
PHG	10	7	122.43±6.80 <sup>b</sup>
PHG	10	10	136.32±5.06 <sup>c</sup>
PHG	20	7	138.32±6.19 <sup>c,d</sup>
PHG	20	10	149.34±9.91 <sup>e</sup>
MET	10	7	139.42±7.64 <sup>c,d</sup>
MET	20	10	153.21±6.70 <sup>e</sup>

Rats were orally administered with phloroglucinol (PHG) or methionine (MET) as a reference compound daily for seven or ten days, and then acetaminophen (ACP, i.p., once a day). Rats were decapitated 24 hr after the injection of ACP treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Values followed by the different letter are significantly different from control ( $p<0.05$ ).

Table 4. Effect of phloroglucinol *Ecklonia stolonifera* on the hepatic glutathione content in acetaminophen-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Day	Activity
			μmole/g of tissue
Control	0		5.23±0.19 <sup>a</sup>
ACP	800		3.00±0.14 <sup>b</sup>
PHG	10	7	2.98±0.14 <sup>b</sup>
PHG	10	10	3.11±0.11 <sup>b,c</sup>
PHG	20	7	3.21±0.12 <sup>c,d</sup>
PHG	20	10	3.31±0.11 <sup>d</sup>
MET	10	7	3.26±0.07 <sup>c,d</sup>
MET	20	10	3.51±0.12 <sup>e</sup>

Rats were orally administered with phloroglucinol (PHG) or methionine (MET) as a reference compound daily for seven or ten days, and then acetaminophen (ACP, i.p., once a day). Rats were decapitated 24 hr after the injection of ACP treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for five experiments. Values followed by the different letter are significantly different from control ( $p<0.05$ ).

Table 5. Effect of phloroglucinol *Ecklonia stolonifera* on the hepatic glutathione reductase and γ-glutamylcysteine synthetase activities in acetaminophen-treated rats

Group	Dose (mg/kg)	Day	GR <sup>1)</sup>	γ-GT <sup>2)</sup>
Control	0		28.64±2.54 <sup>b,a4)</sup>	18.50±0.64 <sup>ns5)</sup>
ACP	800		14.52±1.29 <sup>b</sup>	18.33±0.58
PHG	10	7	14.74±1.25 <sup>b</sup>	18.40±0.64
PHG	10	10	16.63±0.58 <sup>c,d</sup>	18.61±0.65
PHG	20	7	16.81±0.74 <sup>d</sup>	17.94±0.69
PHG	20	10	18.44±0.73 <sup>c,e</sup>	18.03±0.70
MET	10	7	16.62±0.64 <sup>d</sup>	18.71±0.71
MET	20	10	19.10±0.67 <sup>e</sup>	18.90±0.77

Rats were orally administered with phloroglucinol (PHG) or methionine (MET) as a reference compound daily for seven or ten days, and then acetaminophen (ACP, i.p., once a day). Rats were decapitated 24 hr after the injection of ACP treatment. The assay procedure was described in the experimental methods.

<sup>1)</sup>Glutathione reductase activity. glutathione nmole/mg protein/min

<sup>2)</sup>γ-Glutamylcysteine synthetase activity: Pi nmole/mg protein/min

<sup>3)</sup>Values are mean±S.D. for five experiments.

<sup>4)</sup>Values followed by the different letter are significantly different from control ( $p<0.05$ )

<sup>5)</sup>ns: Not significant.

곰피 성분 20 mg/kg으로 10일 전처리한 군은 acetaminophen 단독 투여군보다 약 27% 증가되었다. γ-Glutamylcysteine synthetase의 활성에서 추출물의 투여는 영향을 미치지 못하였다. Phloroglucinol의 LD<sub>50</sub>은 생쥐의 복강 투여에서 4,050 mg/kg, 경구 투여에서는 4,550 mg/kg로 알려져 있다.(23).

따라서 acetaminophen의 투여로 현저히 억제되었던 glutathione S-transferase 활성이 곰피 성분의 전처리로 증가되는 현상은 간조직 중 glutathione의 함량 변동에 의하여 나타나는 것으로 생각되며, glutathione의 함량의 조절은 glutathione reductase의 활성변동에 의하여 조절되고

있는 것으로 사료된다. 그러므로 곰피에서 분리한 폐놀성 화합물인 phloroglucinol은 acetaminophen 투여로 증가되던 지질파산화 함량을 감소시키며, glutathione S-transferase의 활성을 증가시켜 acetaminophen의 대사를 촉진하는 것으로 추정된다.

## 요 약

실험동물에서 곰피로부터 분리한 phloroglucinol은 acetaminophen의 투여로 현저히 증가된 간조직에 있어서 지질파산화의 함량을 억제하였다. Acetaminophen 투여에 따른 간 cytochrome P-450, aminopyrine N-demethylase 및 aniline hydroxylase 활성변동은 관찰할 수 없었다. 곰피 성분 투여군은 glutathione S-transferase의 활성에서는 대조군의 수준에는 미치지 않으나 효소의 활성이 acetaminophen 단독 투여군보다 현저히 증가되었다. 그리고 간조직중 glutathione의 함량은 phloroglucinol을 전처리군에서 acetaminophen 단독 투여군보다 증가되었다. Glutathione reductase 활성에서는 acetaminophen 투여군은 대조군보다 활성이 감소되었으며, 성분으로 전처리한 군은 acetaminophen 단독 투여군보다 증가되었다. 따라서 곰피에서 분리한 폐놀성화합물인 phloroglucinol은 acetaminophen 투여로 증가되던 지질파산화 함량을 감소시키며, acetaminophen 대사효소활성에서는 glutathione S-transferase의 활성이 증가되어 acetaminophen의 대사를 촉진시키는 것으로 추정된다.

## 감사의 글

이 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(해양수산과학)지원에 의한 결과의 일부입니다.

## 문 헌

- Metz, U., Graben, N., Maruhn, D. and Bock, K.D. : Urinary enzyme excretion after a single dose of phenacetin and paracetamol during antidiuresis and during water diuresis. *Clin. Chem. Acta*, **160**, 151-155 (1986)
- Mitchell, J.R., Thorgeirsson, S.S., Potter, W.Z., Jollow, D.J. and Kaiser, H. : Acetaminophen-induced hepatic injury: protective role glutathione in man and rationale for therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**, 676-684 (1974)
- Donatus, I.A. and Vermeulen, N.P. : Cytotoxic and cytoprotective activities of curcumin. Effect on paracetamol-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and glutathione depletion in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1869-1875 (1990)
- Hong, R.W., Rounds, J.D., Helton, W.S., Robinson, M.K. and Wilmore, D.W. : Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Ann. Surg.*, **215**, 114-119 (1992)
- Park, J.C., Jang, Y.I., Do, M.S., Kim, S.H. and Choi, J.W. : Effect of methanolic extract of *Pachymeropsis elliptica* on lipids component of hyperlipidemic rats. *J. Korean*

- Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 958-962 (1996)
- Lee, J.H., Park, J.C. and Choi, J.S. : The antioxidant activity of *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.*, **19**, 223-227 (1996)
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaku, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358 (1979)
- Omura, K. and Sato, R. : The carbon monooxide binding pigments of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378 (1964)
- Nash, R. : The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentisch reaction. *J. Biol. Chem.*, **55**, 412-416 (1953)
- Bidlack, R. and Lowery, G.L. : Multiple drug metabolism; p-Nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 311-317 (1982)
- Pagha, E.D. and Valentine, W.N.V. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169 (1967)
- Ellman, G.L. and Lysco, H. : Disulfide and sulphydryl compounds in TCA extract of human blood and plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 518-527 (1967)
- Pabist, M.J., Habig, W.H. and Jakoby, W.B. : Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7140-7147 (1974)
- Meister, A. and Richman, P.G. : Regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1422-1426 (1975)
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- Hakwon World Encyclopedia*. Hakwon publication, Seoul, Vol 3, p.119 (1997)
- Martin, U., Temple, R.M., Winney, R.J. and Prescott, L.F. : The disposition of paracetamol and the accumulation of its glucuronide and sulphate conjugates during multiple dosing in patients with chronic renal failure. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **41**, 43-46 (1991)
- Wynne, H.A., Cope, L.H., Herd, B., Rawlins, M.D., James, O.F. and Woodhouse, K.W. : The association of age and fatality with paracetamol conjugation in man. *Age Ageing*, **19**, 419-424 (1990)
- Yeung, J.H., Chiu, L.C. and Ooi, V.E. : Effect of polysaccharide peptide on glutathione and protection against paracetamol-induced hepatotoxicity in the rat. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, **16**, 723-729 (1994)
- Yonamine, M., Amiya, Y., Yokomakura, T., Koyama, T., Nagamine, T. and Nakamishi, H. : Acetaminophen-derived activation of liver microsomal glutathione S-transferase of rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**, 175-181 (1996)
- Cohen, S.M., Olin, K.L., Feuer, W.J., Hjelmeland, L., Keen, C.L. and Morse, L.S. : Low glutathione reductase and peroxidase activity in age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.*, **78**, 791-794 (1994)
- Jochheim, C.M. and Baillie, T.A. : Selective and irreversible inhibition of glutathione reductase *in vitro* by carbamate thioester conjugates of methyl isocyanate. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 1197-1206 (1994)
- Sweat, D.V. : *Registry of toxic effects of chemical substances*. National Institute for Occupational Safety and Health Publication, Vol.4, p.3327-3328 (1987)