

## 지구자의 Glutathione S-transferase 활성과 알코올 분해효과

차배천<sup>#</sup> · 이은희 · 이은 · 박행호\*

상지대학교 생명자원과학대학 생명산업학과, <sup>1</sup>(주)한얼식품

(Received June 11, 2004; Revised June 21, 2004)

### Activity of Glutathione S-transferase and Effect of Alcohol Decomposition on the Fruit of *Hovenia dulcis* Thunb

Bae Cheon Cha<sup>#</sup>, Eun Hee Lee, Eun Lee and Hang Ho Park\*

Department of Bio-industry and technology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

\*Hanoel Food CO., LTD., Wonju 220-912, Korea

**Abstract** — For the determination of glutathione S-transferase activity, a new method was established by using HPLC system. Moreover, amount of enzyme for a optimum reaction was determined by a comparative study with a variety concentration of enzyme. Using a established method, activity of glutathione S-transferase that is alcohol metabolizing enzyme was investigated on the fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. As the result of experiment, EtOH and H<sub>2</sub>O extracts of the fruit of *Hovenia dulcis* Thunb showed visible a synergistic effect of glutathione S-transferase activity. On a continuous experiment, EtOH and H<sub>2</sub>O extracts of the fruit of *Hovenia dulcis* Thunb showed alcohol decomposition activity on the *in vivo* test using rat. These results suggest that the fruit of *Hovenia dulcis* Thunb may be useful in the prevention of hangover.

**Keywords** □ glutathione S-transferase activity, alcohol decomposition, HPLC, hangover, *Hovenia dulcis* thunb, fruit

우리 나라에서는 1980년대 이후 경제성장과 함께 알코올의 소비량이 급격히 증가하였다. 우리 나라의 알코올 섭취량은 통계에 의하면 1996년에 성인 1인당 1일 평균 맥주로 6병이었으나, 최근 우리 나라 알코올의 소비량은 세계에서 2위이고 특히 독주의 소비량은 세계 1위를 차지할 정도로 알코올의 소비량이 급증하고 있는 실정이다.<sup>1)</sup>

알코올은 뇌의 중추신경에 작용하여 기분을 좋게 하고, 피로움을 잊을 수 있어 고대에는 알코올이 모든 약물의 기본 부형제로 이용되었고, 그 후에는 주술과 제사 등에 사용되다, 최근에는 사교에 큰 몫을 담당하여 그 사용 범위가 점차 확장되었다. 일부 사람들은 사교를 넘어 알코올이 모든 것을 해결할 수 있는 것처럼 알코올 섭취를 남용하기도 하여 알코올리즘이 되는 경우도 전체 인구의 약 22%에 달한다고 1984년 서울의대 정신과학 교실에서 발표하였다.<sup>2)</sup>

음주 후에 알코올은 그 자체로도 독성을 나타낼 뿐 아니라 체내에서 대사 과정 중 인체에 해로운 물질로 전환되어, 이들이 뇌

와 간을 포함한 소화기관에 가장 유해한 물질로 작용함으로 나타내는 현상을 숙취 즉 hangover라고 한다. 취할 때까지 술을 마신 사람들이 경험하는 빈번히 나타나면서도 유쾌하지 못한 신체적, 정신적 증상 또는 현상인 이 숙취의 대표적인 증상으로는 메스꺼움, 구토, 현기증, 갈증, 무기력함, 두통 및 근육통과 같은 다양한 증상을 보인다.<sup>3-8)</sup>

최근 음주에 따라 발생하는 이들 숙취 현상을 해소하기 위한 다양한 약물과 식품을 이용한 숙취해소제의 개발 연구, 예를 들면 콩나물에 들어 있는 아미노산인 아스파라긴산을 이용한 제품<sup>9)</sup>과 생약인 오리나무, 지구자나무 및 갈화 등 알코올 분해한다는 효과가 민간적으로 전해내려 오는 생약을 이용한 알코올 대사 연구가 이루어져왔지만 아직 현저한 효과를 나타내는 제품은 많지 않다. 또한 알코올을 섭취한 후 간에서 알코올의 해독 및 분해를 촉진시키는 물질에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나, 아직까지 알코올의 분해속도를 촉진시키는 약제는 발견되지 않고 있다.

따라서 본 연구는 기존에 연구 개발되어 진 숙취해소제보다 보다 우수한 효과를 나타내는 알코올 해독 및 알코올 분해 작용을 나타내는 물질을 생약재료부터 탐색하기 위한 연구의 일환으로 현재 알코올 해독 및 알코올 분해 효과가 있는 것으로 알려진 지구자나무(*Hovenia dulcis* Thunb)의 다양한 부위 중 가장 효

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 033-730-0554 (팩스) 033-730-0503  
(E-mail) bccha@sangji.ac.kr

과가 좋은 것으로 알려진 열매 부위인 지구자에 대하여 간에서 약물의 해독에 관여하고 있는 glutathione S-transferase(GST)<sup>10</sup>의 활성을 HPLC로 분석하는 새로운 활성 분석법에 의해 지구자의 알코올 해독 효과를 검토하고 동시에 흰쥐를 사용한 *in vivo* 실험을 통해서 알코올 분해능을 검토하였다.

## 실험방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 지구자는 강원도 원주시 소재 (주)한얼식품에서 제공한 지구자나무의 열매 부위만 채취한 후 음건하고 세절하여 사용하였다. 이 식물들의 표본은 상지대학교 생명산업학과 응용천연물표본실에 보관중이다.

### 실험기기 및 시약

효소 반응을 위한 GST, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), 완충용액용 시약 및 환원형 glutathione(GSH)와 혈중 알코올 농도 분석을 위한 EtOH kit는 Sigma사 제품을 사용하였다. 기타 시약은 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였고, HPLC용 용매는 Burdick & Jackson사의 HPLC용 용매를 사용하고 추출 용매는 1급 시약을 사용하여 실험하였다. HPLC는 Varina ProStar polaris 200 LC를 사용하였고, pump는 ProStar 210, autosampler는 ProStar 400, Detector는 ProStar 320 UV-VIS 검출기를 사용하였다.

### 추출 및 분획

음건한 지구자 181 g을 추출용기에 넣고 증류수 500 ml로 3회 환류 추출하여 얻어지는 용액을 여과 후 농축하여 H<sub>2</sub>O 엑스(6.4 g)를 얻었다. 계속하여 지구자 152 g을 추출용기에 넣고 95% EtOH 용액 500 ml로 3회 환류 추출하여 얻어지는 용액을 여과 후 농축하여 EtOH 엑스(3.7 g)를 얻었다.

### GST 활성반응

GST 활성은 환원형 GSH를 포함물질로 하고 CDNБ을 기질로 하는 포합 반응을 기초로 하여 실시하였다.<sup>11</sup> GST 활성 상승의 기준이 되는 GSH와 기질인 CDNБ의 포합체인 dinitrophenylglutathione(DNP-SG)을 확인하기 위하여 다음과 같이 반응시킨 후 반응물에 대하여 HPLC 분석을 검토하였다. 5 ml의 반응용 용기에 200 mM potassium phosphate 500  $\mu$ l와 GST 용액 10  $\mu$ l 넣고 대조군에는 증류수 290  $\mu$ l와 glutathione용액 100  $\mu$ l를 가한다. 반면 실험군은 증류수 289  $\mu$ l와 glutathione용액 100  $\mu$ l와 시료 1  $\mu$ l를 가한다. 이들 대조군과 실험군을 25°C에서 2분간 preincubation 시킨 후, 각각의 용기에 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 100  $\mu$ l를 가한 후 25°C에서 1분간 반응 시킨 후

20% TCA 100  $\mu$ l를 가하여 효소반응을 종결 시킨 후 원심분리하고 상등액을 HPLC로 분석하였다.

### HPLC 분석법

HPLC 분석은 Zang & Wong<sup>12</sup>의 CDNБ 분석 조건을 기초로 하여 역상 HPLC용 column(Nova-pak C18 : 4.6 mm×150 mm, 5  $\mu$ m)을 사용하였고, 이동상은 H<sub>2</sub>O:MeOH 및 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:MeOH을 5:5에서 7:3 비율과 까지 변화 또는 gradient를 사용하여 최적의 용매 조건을 검토하였다. 주입용량은 20  $\mu$ l로 하고, 용매 이동 속도는 0.8 ml/min으로 하였으며, 검출은 UV 340 nm에서 실시하였다. 또한 내부표준물질은 CDNБ와 DNP-SG와 겹치지 않는 화합물을 검토하였다.

### 최적 반응을 위한 효소량의 검토

상기 실험에서 확립된 HPLC 분석법과 GST 효소 반응을 이용하여 GST 활성 증가 반응을 명확히 파악할 수 있는 최적 반응을 확립하기 위하여 효소를 2.5  $\mu$ g/ml(0.25 unit)에서 25  $\mu$ g/ml(2.5 unit)까지 양을 변화시켜 활성 증가 반응을 검토하여 효소의 최적 농도를 확정하였다.

### 지구자 H<sub>2</sub>O 엑스 및 EtOH 엑스의 GST 활성 측정

지구자 H<sub>2</sub>O 엑스와 EtOH 엑스를 DMSO 1 ml에 녹인 후 최종농도가 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml가 되도록 시료를 가한 후 GST 반응 및 HPLC 분석에 의해 지구자 엑스의 GST 활성 상승 효과를 실시하였다. 활성치는 대조군의 DNP-SG 피크의 면적을 내부 표준물질의 피크 면적 대비율을 0으로 하고, 실험군의 DNP-SG 피크의 면적을 내부 표준물질의 피크 면적 대비율 수치를 대조군 수치와 비율로 계산하여 GST 활성을 50% 상승하는 농도를 내삽에 의해 구하고, 이를 EC<sub>50</sub> 값으로 하였다.

### 지구자 H<sub>2</sub>O 엑스 및 EtOH 엑스의 알코올 분해 활성 측정

실험동물은 체중 160~180 g 내외의 건강한 Sprague-Dawley 종의 수컷 흰쥐를 시중에서 구입한 동물사료(삼양유지사제품)로 1주일간 적응시켜 실험에 사용하였다. 실험 16시간 전에 절식시킨 후 대조군은 50% 알코올 5 ml/kg를, 실험군은 50% 알코올 5 ml/kg와 지구자의 H<sub>2</sub>O 또는 EtOH 엑스 100 및 200 mg을 준 대에 의해 경구 투여한 후 매 1, 2 및 4시간째에 심장 천자법에 의해 각 개체당 1.5 ml 정도의 채혈하여 kit에 의해 혈액을 분석하였다. 실험결과는 mean±S.D.으로 표시하였으며 유의성 검정은 Duncan의 다중검중에 의하여 계산하였다.

## 실험결과 및 고찰

지구자는 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 교목인 지구자나

무 일명 헛개나무의 열매로서 은은한 향기가 있고 단맛이 있어 음식 맛을 돋구며, 본초강목에서는 지구자의 생즙이 술독을 풀고 구역질을 멎게 하는 효능을 가진 것으로 기록되어 있으며 그 외에도 빈혈, 구갈, 건위, 사지마비, 류마티즘 및 대소변 불통의 치료에 쓰이는 것으로 알려져 있다.<sup>13,14)</sup> 최근 지구자나무가 주독에 효능이 있다는 고서에 근거하여 지구자나무의 생리활성 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되어 사염화탄소와 D-galactosamine 유발에 의한 간보호 연구<sup>15,16)</sup>와 항산화 및 항미생물 작용 연구,<sup>17)</sup> 알코올성 근이완 억제작용<sup>18)</sup> 및 헛개나무의 생리활성<sup>19)</sup>에 대한 연구가 보고되어져 있다.

그러나, 이들 연구들은 주로 지구자나무의 수피를 주 대상으로 연구되어졌으며, 열매인 지구자를 대상으로 한 연구<sup>19)</sup>에서도 기존에 알려진 UV법에 의한 GST 활성을 측정된 연구를 제외하고는 보다 정확한 지구자의 알코올 해독에 관여하는 GST 활성이나 *in vivo*에서의 알코올 분해 효과에 대한 연구는 미약하다.

본 연구는 HPLC를 사용한 새로운 GST 활성 검색 측정법을 개발하여 이를 이용한 지구자 엑스의 GST 활성 상승효과를 확인하고, *in vivo* 실험에서 혈중 알코올 분해 효과를 입증하였다.

#### HPLC 분석법 확립

지금까지 보고되어진 문헌에 따르면 알코올 해독 효과 측정은 GST 효소와 기질인 CDNB와 포함물질인 환원형 GSH를 사용한 효소반응 후 최종적으로 생성된 포함체인 DNP-SG의 양을 측정하는 방법으로 생성된 포함체가 파장 340 nm에서 최대 흡광도를 나타내므로 이를 UV를 사용하여 흡광도를 측정하여 GST의 활성을 비교하는 것이 일반적인 방법으로 알려져 있다.<sup>20-23)</sup> 이 흡광도 수치는 시료가 활성을 증가시키는지 아니면 억제시키는가를 판단하는데 중요한 수치로서, 이 수치가 증가되면 GST 활성이 증가된 것으로 판단하는 중요한 지표이다. 따라서 포함체가 가지는 340 nm에서는 효소반응에 사용되는 시약뿐만 아니라 시료들도 이 파장 범위에서 흡광도를 나타내면 간섭 효과에 의해 활성 판단에 방해될 수 있다. 그러나, 이전의 본 연구실의 연구<sup>24)</sup>에서 GST 효소 활성 생약을 탐색하는 과정에서 생약 자체가 340 nm에서 흡광도를 나타내는 생약이 존재한다는 것이 밝혀졌다. 따라서 340 nm에서 생약이나 다른 시약의 방해 없이 포함체만의 변화를 정확히 측정할 수 있는 새로운 GST 활성 측정법이 필요하였고, 연구 결과 포함체 피크만을 정확히 분리하여 이의 면적 변화로 활성을 측정하는 HPLC법을 다음과 같이 새롭게 확립하였다.

즉 CDNB를 기질로 하는 GSH와의 포함 반응을 기초로 하여 GST를 이용하여 효소 반응을 시킨 후 생성된 포함체 DNP-SG에 대하여 HPLC 분석법을 검토한 결과 CDNB와 DNP-SG의 분석을 위한 이동상은 0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  : MeOH의 비율을 0~2분까지 6:4, 2~3분까지 7:3, 3~20분까지는 3:7의 gradient가

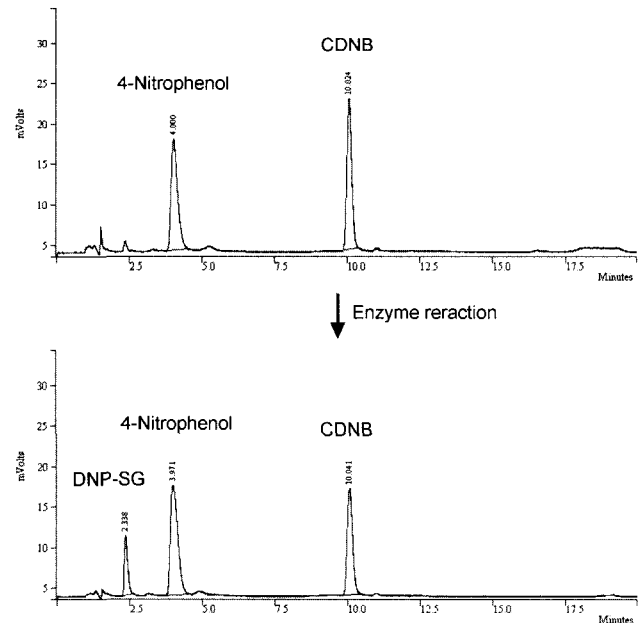


Fig. 1 - HPLC chromatogram of CDNB, DNP-SG and 4-nitrophenol by enzyme reaction.

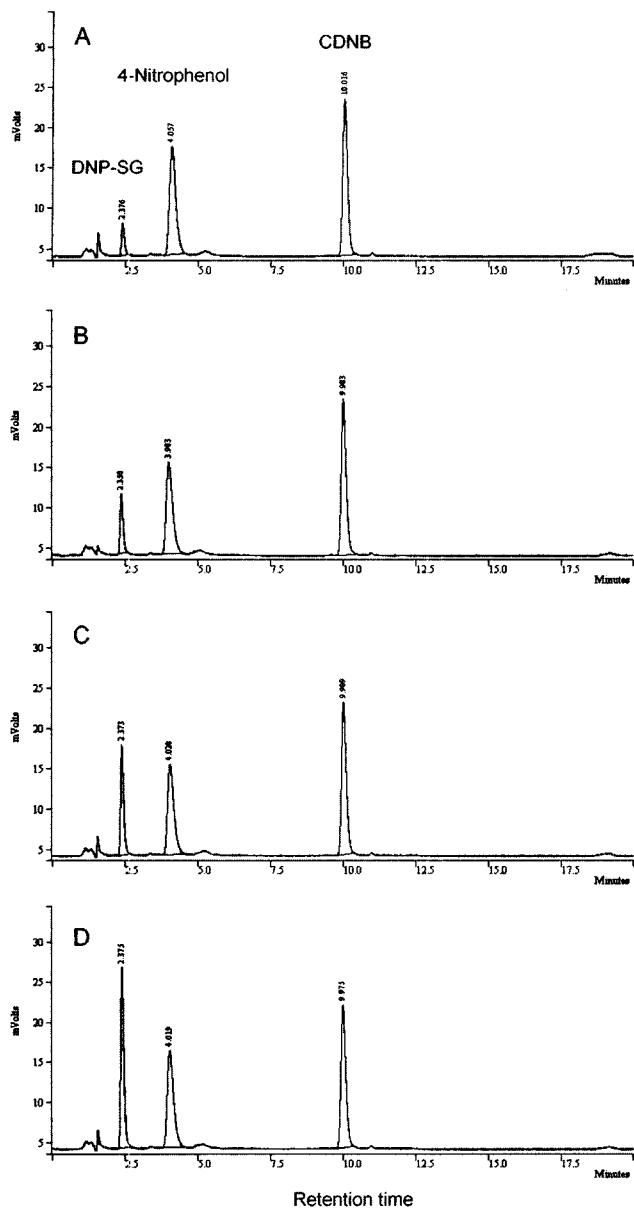
최적의 용매 조건을 보였다. 또한 내부표준물질은 CDNB와 포함체인 DNP-SG가 겹치지 않는 화합물을 검토한 결과 p-nitrophenol이 가장 적합하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 것과 같이 내부표준물질 피크는 retention time이 4.0 min, 포함체 DNP-SG는 피크는 2.4 min 에서, 기질인 CDNB의 피크는 10.0 min에서 확인할 수 있었다.

#### 최적 반응을 위한 효소량

확립된 HPLC 분석법과 효소 반응을 이용하여 CDNB와 GSH와의 포함 반응을 활성화시켜 포함체 DNP-SG의 생성을 촉진하는 GST 효소의 활성 증가 여부를 명확히 파악할 수 있는 최적 반응을 확립하기 위하여 효소의 양을 변화시킨 효소반응을 검토한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 효소 활성 효과를 가장 명확히 파악할 수 있는 효소의 최적 농도는  $5 \mu\text{g/ml}$  (0.5 unit)로 확정하였다.

#### 지구자 $\text{H}_2\text{O}$ 엑스 및 EtOH 엑스의 GST 활성

지구자  $\text{H}_2\text{O}$  엑스와 EtOH 엑스에 대하여 시료의 최종농도가 0~5 mg/ml 범위의 7개 농도에서 GST 반응 및 HPLC 분석에 의해 지구자 엑스의 GST 활성 상승  $\text{EC}_{50}$ 를 구한 결과, Table I에 나타난 것과 같이 비교물질인 silymarin의 2.3 mg/ml 보다는 약하나 지구자의 EtOH 엑스가  $\text{H}_2\text{O}$  엑스보다는 GST 활성이 우수한 보문<sup>19)</sup>과 동일하게 지구자의  $\text{H}_2\text{O}$  엑스는 3.3 mg/ml에서, EtOH 엑스 2.9 mg/ml에서  $\text{EC}_{50}$ 를 보임으로서 지구자는 GST의 활성을 증가시키는 효과가 있음이 입증되었다. 이는 GST가 다



**Fig. 2** – HPLC chromatogram of DNP-SG on the various concentration of GST (A : 2.5 µg/ml, B : 5 µg/ml, C : 12.5 µg/ml, D : 25 µg/ml).

소 hydrophilic한 nucleophile의 탄소 원자를 가진 물질간의 포합 반응을 매개시켜 해독작용을 나타낸다는 기전<sup>25)</sup>에 의거할 때 지

**Table I** – Glutathione S-transferase activity of H<sub>2</sub>O ext. and 95 % EtOH ext. of *Hovenia dulcis* Thunb

Sample	EC <sub>50</sub> (mg/ml)
Silymarin	2.3
H <sub>2</sub> O ext.	3.3
95 % EtOH ext.	2.9

구자의 H<sub>2</sub>O과 EtOH 엑스가 이 GST의 포합 반응을 활성화시킴을 시사하고 있다.

**지구자 H<sub>2</sub>O 엑스 및 EtOH 엑스의 알코올 분해 활성**

흰쥐를 사용하여 50% 알코올에 지구자 엑스를 혼합하여 경구 투여한 후 채혈하여 kit에 의해 혈액을 분석한 결과 Table II에 나타낸 것과 같이 지구자의 H<sub>2</sub>O 엑스와 EtOH 엑스는 유의성은 인정되지 않았으나 혈중의 알코올 농도를 감소시킴에 의해 지구자 엑스는 혈중 알코올을 분해시키는 효과가 있음이 확인되었다. 이는 최근에 헛개나무 과병의 물과 메탄올 엑스가 혈중 알콜 농도를 저하시키는 실험결과<sup>26)</sup>와 유사한 경향을 보였다.

**결 론**

천연자원으로부터 음주 후 발생하는 숙취를 해소하기 위한 기능성 물질 개발 연구의 일환으로 민간에서 숙취 해소 효과가 있는 것으로 알려진 지구자에 대하여 숙취 해소 효과의 작용 기전으로 생각되어지는 간 해독에 관여하는 GST 활성효과와 흰쥐를 사용한 *in vivo*에서의 혈중 알코올 분해 작용에 대하여 검토한 결과 다음과 같은 지견을 얻었다.

1. GST의 활성 증가에 따른 해독 효과를 확인하기 위하여 기존에 널리 알려진 UV 측정법 대신에 시료나 시약의 간섭없이 GST 활성을 측정할 수 있는 HPLC 분석법을 새롭게 확립하였고, 동시에 GST 활성 실험에 적합한 GST 농도를 결정하였다.
2. 지구자에 대한 GST 활성 실험 결과 지구자의 H<sub>2</sub>O 및 EtOH 엑스가 GST를 활성화하였고, 이는 지구자가 알코올 해독 효과를 가지고 있음을 시사하고 있다.
3. 지구자에 대한 *in vivo* 실험에서도 지구자의 H<sub>2</sub>O 및 EtOH 엑스가 혈중의 알코올 농도를 낮추는 효과가 있으므로 지구자가 알코올 분해 효과가 있음이 판명되었다.

**Table II** – Alcohol decompositive activity of H<sub>2</sub>O ext. and 95 % EtOH ext. of *Hovenia dulcis* Thunb

Sample	Time (hr.)		
	1	2	4
Control	0.195±0.018	0.147±0.027	0.083±0.017
H <sub>2</sub> O ext. (100 mg/kg)	0.187±0.014	0.109±0.034	0.075±0.009
H <sub>2</sub> O ext. (200 mg/kg)	0.190±0.005	0.115±0.018	0.081±0.005
95% EtOH ext. (100 mg/kg)	0.177±0.009	0.105±0.033	0.071±0.005
95% EtOH ext. (200 mg/kg)	0.185±0.015	0.109±0.008	0.072±0.011

Data represent the means±S.D. of 10 rats. Values are alcohol concentration in blood (%).

이상의 실험결과 본 연구의 재료로 사용한 지구자는 숙취해소에 작용하는 기전의 하나인 GST 활성화 및 알코올 분해 효과를 가짐으로서 숙취해소용 기능성 물질로 개발 및 활용이 가능하리라 사료된다.

## 문 헌

- 1) Park, S. M., Kang, B. K. and Chung, T. H. : The effect of mildronate on serum alcohol concentration and hangover syndrome. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 168 (1998).
- 2) 이정균 : 알코올 및 알코올 중독, 정신의학 18장, 일조각, 서울 p. 390 (1989).
- 3) Kim, C. I. : Cause and effect of hangover. *Food Industry and Nutrition.* **4**, 26 (1999).
- 4) Kim, D. J., Kim, W., Yoon, S. J., Choi, B. M., Kim, J. S., Go, H. J., Kim, Y. K. and Jeong, J. S. : Effects of alcohol hangover on cytokine production in healthy subjects. *Alcohol.* **31**, 167 (2003).
- 5) Devaney, M., Graham, D. and Greeley, J. : Circadian variation of the acute and delayed response to alcohol: investigation of core body temperature variations in humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **75**, 881 (2003).
- 6) Swift, R. and Davidson, D. : Alcohol hangover, mechanisms and mediators. *Alcohol Health Res. World.* **22**, 54 (1998).
- 7) Trevisan, L. A., Boutros, N., Petrakis, I. L. and Krystal, J. H. : Complications of alcohol withdrawal, Pathophysiological insights. *Alcohol Health Res. World.* **22**, 61 (1998).
- 8) Lieber, C. S. : Medical disorders of alcoholism. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1058 (1995).
- 9) Park, S. C., Han, J. G., Han, J. A. and Park, Y. C. : Aspartate decrease lipid peroxidation and protein carbonylation in liver of chronic ethanol-fed rats. *Korean J. Biochem.* **21**, 145 (1994).
- 10) Armstrong, R. N. : Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 2 (1997).
- 11) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130 (1974).
- 12) Zang, K. and Wong, P. : Inhibition of the efflux of glutathione S-conjugates by plant polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1631 (1996).
- 13) Jungyakdesajon : Sohakkyan, Sanghae Science Publ. Co., Sanghae, p. 413 (1985).
- 14) Kim, T. J. : Korean resources plants, Seoul National University Press, Seoul, Korea, p. 72 (1996).
- 15) Kim, O. K. : Protective effects of extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 1260 (2001).
- 16) Hase, K., Ohsugi, M., Xiong, Q., Basnet, P., Kadota, S. and Namba, T. : Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 381 (1997).
- 17) Cho, J. Y., Moon, J. H. and Park, K. H. : Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 1403 (2000).
- 18) Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueda, T., Yoshizumi, S. and Ninomiya, K. : Bioactive constituents of chinese natural medicines. III. Absolute stereo structures of new dihydroflavonoids, Hovenitins I, II and III, Isolated from *Hovenia dulcis* Thunb : Inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi.* **117**, 108 (1997).
- 19) Lee, M. K., Kim, Y. G., An, S. W., Kim, M. H., Lee, J. H. and Lee, H. Y. : Biological activities of *Hovenia dulcis* Thunb. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **7**, 185 (1999).
- 20) Stoelting, M. S. and Tjeerdema, R. S. : Glutathione-dependent biotransformation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in arterial and venous blood of the striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquat. Toxicol.* **50**, 177 (2000).
- 21) Song, M. R., Choe, S. N. and Park, K. H. : Glutathione S-transferase activity and its changes to chemical pollution in edible shells and fishes. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 206 (1998).
- 22) Chang, M., Zhang, F., Shen, L., Pauss, N., Alam, I., Breemen, R. B. van, Blond, S. Y. and Bolton, J. L. : Inhibition of glutathione S-transferase activity by the quinoid metabolites of equine estrogens. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 758 (1998).
- 23) Ishikawa, T., Kobayashi, K., Sogame, Y. and Hayashi, K. : Evidence for leukotriene C4 transport mediated by an ATP-dependent glutathione S-conjugate carrier in rat heart and liver plasma membranes. *FEBS Lett.* **259**, 95 (1989).
- 24) Cha, B. C., Lee, E. H. and Cho, J. Y. : Glutathione S-transferase activity and hyaluronidase inhibitory effect of medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**, in press (2004).
- 25) Igarashi, T. and Kitagawa, H. : Glutathione S-transferase, Tokuseiseigaku I, Chichin Shokan, Tokyo p. 298 (1989).
- 26) Na, C. S., Chung, N. C., Yang, K. H., Kim, S. H., Chung, H. S. and Dong, M. S. : Hepatoprotective and blood alcohol lowering effects of fruit peduncle extract of *Hovenia dulcis* var. *Koreana* in the *in vitro* and *in vivo* animal models. *Yakhak Hoeji* **48**, 34 (2004).