

黃芪의 재배 년수에 따른 면역 및 항산화 활성 연구

정 철

Studies on Immunomodulatory and Antioxidant Activities of Astragali membranacei Radix according to the Cultivated Years

Chul Jung

ABSTRACT

Purpose: Contents of astragaloside I, II and IV, cytotoxicity, anticancer activity, immunomodulatory activity and antioxidant capacity were to be compared as a function of the cultivated years as one, three, five and seven years.

Method: Major components of Astragali membranacei Radix were separated as astragaloside I, astragaloside II, astragaloside IV by HPLC analysis. Cytotoxicity and anticancer activities were measured by MTT and SRB assay. For immunomodulatory activity, the secretion of IL-6 and TNF- α , NK cell activation and macrophage activation were observed as well as kinetics of responding to human T cells by a microphysiometer.

In vitro antioxidant activities were measured by several radical scavenging activities of superoxide anion radical, DPPH, LDL and linoleic acid. For in vivo activity, the activation of SOD, GSH-px, catalase, ALDH and ADH was measured as well the relative weight of liver.

Result :

1. For HPLC analysis, the contents of all of astragaloside I, astragaloside II, astragaloside IV were in order of three, five, one and seven years.
2. The cytotoxicity of normal human lung cell line, HEL299 showed lower than 18% in adding 0.25 mg/ml, and 28.9% in adding 1.0 mg/ml of water extract of seven year root. For methanol extracts, three year root showed highest cytotoxicity as 35.2 % and there was no difference between the cultivated years.

3. For anticancer activities, methanol extracts of one and three year roots showed relatively high inhibition of human stomach cancer cells, AGS, breast cancer cells, MCF-7, lung cancer cells, A549 and liver cancer cell, Hep3B as well as high selectivities.
4. The water extract of seven year root could yield high secretion of IL-6 from both human B and T cells while the methanol extracts of three and five year roots secreted high amounts of IL-6 and TNF- α from both B and T cells.
5. As a result of in vitro antioxidant activities, both water and methanol extracts from five and seven year roots showed high activities for superoxide anion radical scavenging activity, inhibiting linoleic acid peroxide and contents of total phenols.
6. For in vivo tests, Mn-SOD and GSH-px activities and weight of liver were better in adding seven year root. For ALDH activity one year root was better and for ADH activity five year root. Overall speaking, seven year root showed relatively better antioxidant activities.

Conclusion: There was difference of the contents of astragaloside I, astragaloside II, astragaloside IV according to cultivation year. Methanol extract showed better activities of anticancer and immune activation rather than water extract. Interestingly enough, for methanol extracts, overall activities were improved as the cultivation year increased. There might be further investigation required for the clinical uses of the results as several biological activities varied according to the cultivated year of *Astragali membranacei Radix*.

Key words: *Astragali membranacei Radix*, cultivated year, HPLC, MTT, SRB, astragaloside, immunomodulatory activity, anticancer, antioxidant, Cytokine, Natural Killer cell, Nitric Oxide, cytosensor, superoxide anion radical, DPPH, LDL, Linoleic acid, total contents of phenol, SOD, glutathione peroxidase GSH-px, Catalase, ALDH, ADH, relative liver weight

1. 緒 論

黃芪(*Astragali membranacei Radix*)는 콩과(Leguminosae)에 속한 다년생초본인 황기 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge 의 뿌리를 건조한 것이다.¹⁻⁶⁾ 동속식물인 蒙古黃芪 *Astragalus mongholicus* Bunge, 烏拉特黃芪 *Astragalus hoanchy* Franch., 華黃芪 *Astragalus chinesis* L., 直立黃芪 *Astragalus adsurgens* Pall. 등의 뿌리도 사용되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 우리나라에서는 주로 강원도 정선, 충청북도 제천, 경기도 포천에서 재배되고 있다.⁷⁾

黃芪는 神農本草經⁸⁾ 上品에 최초로 “黃芪味甘微溫 主癰疽 久敗瘡 排膿止痛 大

風癩疾 五痔鼠瘻 補虛 小兒百病 一名載滲 生山谷 一名白本 生蜀群 白水漢中 二月十日 採陰乾”이라고 수재되었다. 性味는 甘 溫하며, 肺 脾經에 歸經하여,¹⁻⁶⁾ 補氣 升陽 益衛固表 托瘡生肌 利水消腫의 효능으로 自汗盜汗 瘡癰內陷 膿成不潰 少氣賴言 食少便溏 久瀉脫肛 子宮下垂 崩漏便血 등의 치료에 상용되는 대표적인 補氣藥이다.^{1,2,4-6)}

약효연구로 김 등⁹⁾과 Jiao 등¹⁰⁾은 黃芪 메탄올추출물의 용량에 따라 생쥐의 면역력이 증강함을, Li 등¹¹⁾은 LDL과LCAT의 활성을 증가시킴으로써 지방대사를 조절함을, Cui R 등¹²⁾ 등은 암세포의 성장 억제 효과를, Tang W 등¹³⁾은 황기의 주성분인 polysaccharide가 항종양 효과가 있음을 각각 보고하였다.

성분으로 Kitagawa 등¹⁴⁻¹⁷⁾은 astragaloside I~VIII, astragalussaponin I~III, acetylastragaloside I, soyasaponin I 등의 saponin을 연구하였고, Ma 등¹⁸⁾은 Astragali mongholic Radix의 계절과 재배 년수에 따른 성분 변화를 비교하여 보고한 바 있다.

일반적으로 黃芪의 경우 재배 년수에 따른 효능의 차이가 있다고 생각되고 있으며, 중국의 경우도 黃芪는 3-4년 이상 재배된 것을 유통시키는 것으로 보고되어 있다.¹⁹⁾ 그러나 최근 우리나라에서는 대개 1-3년 정도 재배된 黃芪가 유통되고 있으므로 재배 년수에 따른 주요 성분의 변화 및 효능 비교 연구를 통하여 한의학 임상에 부합되는 黃芪가 재배 유통되어야 한다고 생각한다.

그러므로, 이 연구에서는 黃芪의 주요 성분인 astragaloside I, II, IV의 재배 년수에 따른 함량의 변화를 비교 분석하였다. 또한 黃芪의 益衛固表 補氣升陽 등 補氣의 효능은 노화 방지의 활성과 유사하므로,²⁰⁾ 재배 년수에 따른 항산화 활성에 차이가 있는 지를 분석한 결과 유의성이 있어 보고하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

황기(A. membranaceus)의 1년근, 3년근, 5년근, 7년근은 강원도 농업기술원 고랭지 농업시험장(강원도 태백)에 보유하고 있는 것으로 농촌진흥청 작물과학원 인삼약초과에서 동정한 후 사용하였으며, 시료의 일부를 보관하였다.

2. 시료의 제조

1) 메탄올추출물 제조

메탄올추출물의 제조에는 Accelerated Solvent Extractor(ASE: 가속용매추출장치)를 이용하였으며, 건조시료 중량의 7배량의 메탄올을 50℃의 온도에서 1500 psi의 추출압력으로 5분씩 3회 반복하여 1차 추출액을 얻었다. 다시 건조시료 중량의 5배량의 100% 메탄올을 넣고, 환류냉각추출장치를 이용하여 50℃에서 2시간 추출하고 여과하여 2차 추출액을 얻었다. 그 후 1차 추출액과 2차 추출액을 혼합하여 감압농축장치를 이용하여 용매를 제거하고 얻은 추출물을 시료로 사용하였다. (총수율: 1년근, 11%; 3년근, 10%; 5년근, 10%; 7년근, 11%)

2) 물추출물 제조

건조시료 중량의 10배량의 증류수를 가해 상온에서 24시간 진탕 추출하고 여과하여 1차 추출액을 얻었다. 다시 건조시료에 10배량의 증류수를 가해 상온에서 24시간 진탕추출하여 2차 추출액을 얻었다. 1차 추출액과 2차 추출액을 혼합하여 동결건조기에서 건조하여 얻은 추출물을 시료로 사용하였다. (총수율: 1년근, 17%; 3년근, 18%; 5년근, 16%; 7년근, 18%)

3. 실험 방법

1) Astragaloide I, II, IV의 함량 분석

(1) 시약 및 기기

표준시약인 astragaloide I, II, IV는 ChromaDex(USA)제품을 사용하였다.

분석기기로 HPLC는 Agilent 1100 series(HP, USA)를 사용하였으며, 검출기는 ELSD2000ES(Allech, USA), 컬럼은 YAC-pack ODS-AM (4.6 × 150 mm, 5 μm)을 사용하였다.

(2) 시료 조제 및 astragaloide I, II, IV의 함량 분석

분쇄된 黃芪 0.5 g과 18 ml의 MeOH을 sample vial에 넣고 25~30℃에서 30분간 초음파 추출하였다. 추출액은 냉각한 후 여과지로 농축 플라스크에 여과하였다. 이러한 과정을 총 3회 반복 실시한 후 최종 남아 있는 시료 잔류물은 15 ml씩 3회에 걸쳐 MeOH를 사용하여 세척하여 여과하였다. 여과된 총 추출액은 40℃에서 감압 농축하였다. 농축물은 MeOH로 녹여낸 후 10 ml volumetric flask에 회수하여 정확하게 부피 정용하였고, 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 표준시약 각각의 검량선을 작성하여 직선성을 확인한 후 시료의 얻어진 값에 회석배수를 곱하여 최종 함량을 산출하였다. (Table 1)

Table 1. The condition of HPLC analysis

HPLC System	Agilent 1100 series (HP, USA)
Column	YAC-pack ODS-AM (4.6 × 250 mm, 5 μm), 25°C
Mobile Phase	A: water, B: acetonitrile 0-10min : 30% → 42% B 10-20min : 42% → 70% B
Flow rate	1.0 ml/min (Injection Vol. : 20 μl)
Detector	UV 203 nm ELSD2000ES (Alltech, USA) Evaporating temp. : 101.5°C Neubulizing gas flow : 2.8 L/min Gain : 2

2) 항산화 실험

(1) in vitro 항산화 실험

① Superoxide anion radical 소거능

Nishikimi의 방법³⁰⁾에 의해 실험하였다. 즉 100, 50, 10 μg/ml 농도의 각 시료 0.5 ml을 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 0.1 ml, 100 μM PMS 0.2 ml, 500 μM NBT 0.2 ml 및 500 μM NADH 0.4 ml를 가해 560 nm에서 흡광도 측정하였으며, 결과는 소거능(%)으로 나타내었다.

② α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능

Bloi의 방법³¹⁾에 준해 1.5×10⁻⁴ M DPPH 용액 2.97 ml를 일정농도의 시료 0.03 ml와 함께 혼합하고 3분 후 517 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군에 대한 소거능(%)을 산출하였다.

③ Low density lipoprotein (LDL) 산화저해능

Miller의 방법³²⁾을 변형하여 실험하였다. 즉 50~100 μg의 protein을 함유하도록 조제한 human LDL을 일정 농도의 시료 0.02 ml, 10 mM phosphate-buffered saline(PBS) 0.115 ml, 0.25 mM CuSO₄ 0.04 ml와 함께 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 이 반응액에 20% TCA 1 ml를 가해 반응을 중단시킨 후 0.05 N NaOH에 녹인 0.67% TBA 1 ml를 가하고 95°C에서 15분간 가열한 후 냉각하였다. 이 반응액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 분리된 상등액 중에 함유된 malondialdehyde(MDA)의 양을 540 nm에서 측

정하였으며, 대조군에 대한 저해율(%)로서 결과를 나타내었다.

④ Linoleic acid 과산화저해능

Haraguchi의 방법³³⁾에 따라 에탄올에 녹인 2.51% linoleic acid 0.4 ml, 0.04 M phosphate buffer (pH 7.0) 0.8 ml, 증류수 0.77 ml 그리고 시료 0.03 ml로 반응액을 만든 후, 40℃의 암소에서 반응시켰다. 24시간 후 이 반응액 0.1 ml을 취해 75% ethanol 2.7 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml, 3.5% HCl에 녹인 0.02 M ferrous chloride 0.1 ml와 혼합한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 산화정도를 관찰하였으며, 결과는 대조군에 대한 저해율(%)로서 나타내었다.

⑤ 총페놀 함량

항산화 활성에 영향을 미치는 페놀화합물의 양을 비교하기 위해 Kim 등의 방법³⁴⁾에 준하여 일정 농도의 추출물 0.1 ml와 2% Na₂CO₃ 2 ml을 혼합하고 2분 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.1 ml를 첨가하였다. 상온에서 30분간 방치한 후 750 nm에서 측정된 흡광도를 tannic acid를 표준물질로 사용한 검량선식($r=0.9973$)에 대입하여 총페놀 함량을 산출하였다.

$$\text{총페놀량} : y = (x - 0.0646878) / 0.0235234$$

(2) in vivo 항산화 실험

① 실험동물

생후 4주된 체중 130-140 g의 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐를 8마리씩 난괴법에 따라 배정하여 1주일간 예비 사육하였다. 그 후 정상군, 대조군, 양성대조군(silymarin 1 g/kg body weight/day) 및 재배 년수 별 黃芪 메탄올추출물 투여군(methanol ext. 1 g/kg body weight/day)으로 나누어 2주간 사육하였다. 산화적 스트레스는 매일 40% 에탄올(40% ethanol 10ml/kg body weight/day)을 경구 투여하여 유발하였다. 매일 각 동물들의 체중 변화를 기록하였으며, 사육 환경은 온도 22 ± 2℃, 습도 55%, 명암 주기 12시간으로 유지하였고, 고형사료와 물은 자유롭게 섭취토록 하였다.

② 장기 적출 및 효소액 조제

간장 및 신장은 0.9%의 식염수로 관류한 후 적출하여 세척하고 여과지로 닦은 다음 중량을 기록하였고, -70℃의 냉동고에 보관하면서 조직 균질액 및 효소액 조제에 사용하였다. (Fig. 1)

③ 간장 중 superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

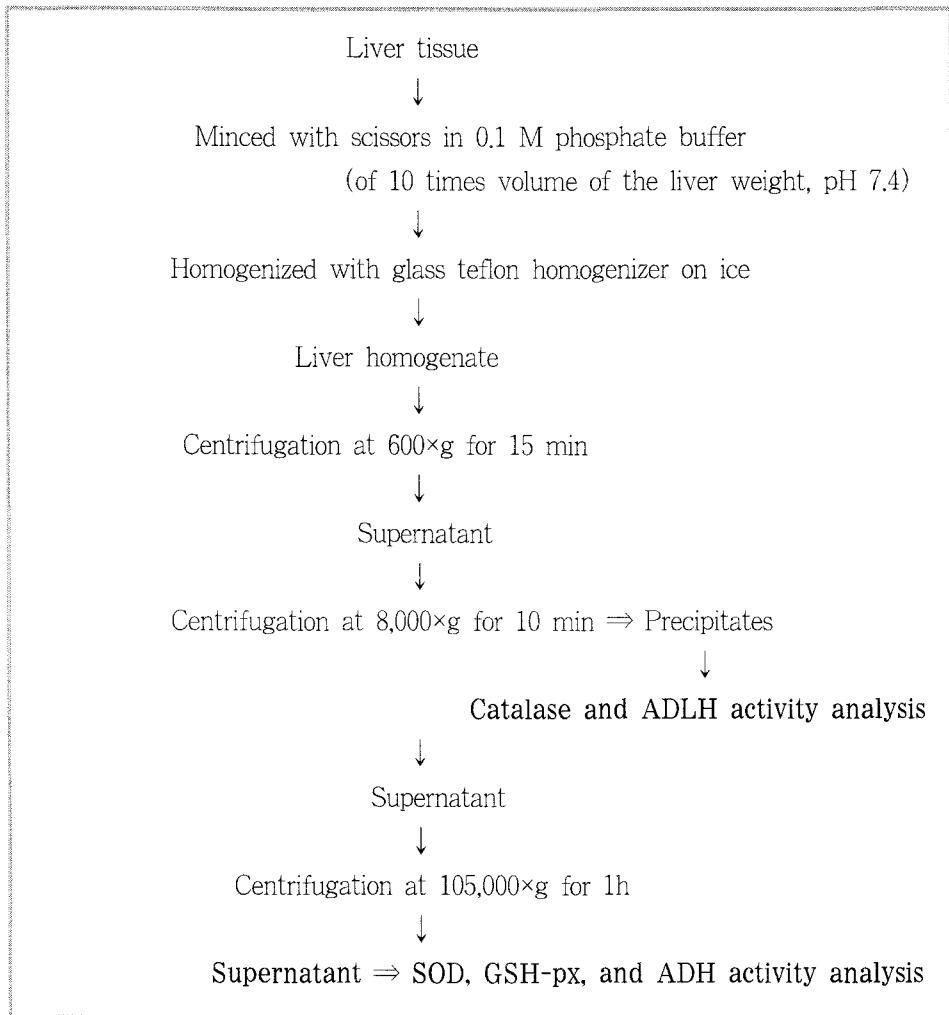


Fig. 1. Preparation of tissue homogenate and enzyme solution.

SOD 활성 (unit/mg protein)은 Oh과 Flohe^{35,36)}에 의해 75 mM sodium xanthine 50 μ l와 10 mM hydroxylamine hydrochloride 50 μ l, 원심 분리한 조직 상등액 500 μ l, 그리고 증류수 200 μ l를 혼합한 후 37°C에서 10분간 예비 배양하였다. 여기에 xanthine oxidase (0.1 U/ml) 200 μ l를 가하고 다시 37°C에서 20분간 배양한 다음 1% sulfanilamide 1 ml, 0.02% N-(1-naphthyl)ethylenediamine 1 ml를 가한 후 실온에서 20분간 방치한 후

540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 SOD standard에 대하여 동일한 과정을 행한 후 검량선을 얻었으며, 이 검량선으로부터 총 SOD값을 구한 후 이 값에서 Mn-SOD의 값을 뺀 것을 Cu, Zn-SOD로 하였다. 또한 Mn-SOD 활성은 반응액 중에서 증류수 대신에 4 mM KCN을 가하는 것만을 달리하여 Cu, Zn-SOD와 같은 실험과정에 의해 분석하였고, 얻어진 흡광도를 SOD standard 검량선에 대입하여 활성(unit/mg protein)을 나타내었다.

④ 간장 중 glutathione peroxidase (GSH-px) 활성 측정

Glutathione peroxidase의 활성 (Uk/mg protein)은 Flohe'의 방법³⁷⁾에 따라 다음과 같이 측정하였다. 1×10^{-3} M Sodium azide와 1 mM EDTA를 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 500 μ L, 효소액 100 μ L, glutathione reductase (2.768 U/ml) 100 μ L, 1×10^{-2} M glutathione 100 μ L를 혼합, 37°C에서 10분 동안 예비 배양한 후 이 반응액에 0.1% NaHCO₃에 녹인 1.5×10^{-3} M NADPH 100 μ L를 가해 1분간 그리고 1.5×10^{-3} M H₂O₂ 100 μ L를 가한 후 다시 1분간 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 흡광도와 NADPH의 molecular extinction coefficient ($E=6.22 \times 10^6$ cm)로부터 효소액과 blank의 1분간의 NADPH 농도의 변화 (Δ [NADPH]/min)를 산출하고, 이 효소액의 수치에서 blank의 수치와 glutathione peroxidase와 관련 없는 인자에 의해 나타나는 Δ [NADPH]/min를 빼준 값을 다음의 식에 대입하여 glutathione peroxidase의 활성 (Uk/mg protein)을 산출하였다.

$$Uk = 0.868(\Delta[NADPH]/[GSH0]) \times t \times (Vi/Vs)$$

Vi/Vs : 희석배수, Vi : incubation volume,

Vs : initial sample volume, GSH0 : glutathione의 초기 농도

⑤ 간장 중 Catalase 활성 측정

Catalase 활성 (k/mg protein)은 Abei 의 방법³⁸⁾에 따라 0.1 ml의 원심 분리한 상등액, 기질인 10.5 mM H₂O₂ 그리고 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 함하여 3 ml이 되게 한 후 25°C에서 30초 동안 반응시켰으며, 이 반응액을 240 nm에서 H₂O₂의 흡광도 변화로 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성(k/mg protein)은 1분간 1 μ M H₂O₂를 분해시키는 데 요구되는 효소량으로 나타내었다.

⑥ 간장 중 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성 측정

Kathryn 등의 방법³⁹⁾에 따라 liver mitochondria 분획에 일정량의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)를 가하여 혼합한 후 0.1 ml을 취해 buffer 0.9 ml로 희석한 후 반응액 1 mM NAD, 0.2 mM 4-methyl pyrazole, 1 mM magnesium chloride가 함유된 50 mM sodium pyrophosphate (pH 8.8) 1 ml, 0.2% rotenone 0.5 ml 및 400 μ g protein에 해당하는 효소액을 가해 혼합하였다. 이 반응액을 30°C water bath에서 20분간 incubation한 후 340 nm에서 1분간 흡광도 측정하고 5 mM acetaldehyde 0.1 ml을 가하여 반응을 시작한 후 340 nm에서 1분간 흡광도를 측정하였다. 결과는 340 nm에서 흡광계수인 6200M⁻¹cm⁻¹에 근거하여 분 당 생성된 NADH (nM NADH/min/mg protein)의 nanomole로 표기하였다.

⑦ 간장 중 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성 측정

Gergel & Cederbaum 의 방법⁴⁰⁾을 변형하여, 0.2 M ethanol 0.1 ml, 0.5 M semicarbazide 0.02 ml, 0.1 M NAD (0.01 M HCl용액) 0.02 ml 및 0.1 M Tris buffer (pH 8.5) 2.0 ml를 30°C에서 10분간 예비배양한 후, 효소액 0.1 ml을 가하고 340 nm에서 1분간 흡광도 변화 기록하였으며 결과(μ M/min/mg protein)는 extinction coefficient (ϵ_{340} , 6220 M⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 산출하였다.

⑧ 단백질 함량 측정

조직의 단백질 함량은 Bradford 의 방법⁴¹⁾에 준해 10~100 μ g의 단백질을 함유하는 원심분리 후의 효소액과 단백질시약을 혼합, 595 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였으며, 검량선 작성을 위해 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하였다.

⑨ 상대 간장 중량 측정

사육실험 종료 후 실험동물을 희생 시, 동물의 최종 체중을 측정하여 기록하고, 마취한 후 개복하여 혈액을 먼저 채취하였다. 그 후 0.9%의 생리식염수로 간장 내에 관류하여 남아 있는 혈액을 제거한 후 간장을 적출하고, 적출된 간장은 0.9% 생리식염수에 3회 세척한 후 여과지로 물기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 적출된 간장의 중량을 총 체중에 대해 백분율로서 나타냄으로써 상대간장 중량을 산출하였다.

⑩ 통계분석

in vivo 항산화실험의 유의성은 SAS program을 이용하여, p<0.05의 수준에서 one way ANOVA test 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

III. 실험 결과

1. Astragaloide I, II, IV의 함량 분석

1) Astragaloide I, II, IV의 검량선

Astragaloide I의 검량선은 직선으로, 직선의 방정식은 $y=12.144x^{1.3652}$ ($R^2=0.997$)으로 직선성을 나타내었다. (Fig. 2)

Astragaloide II의 검량선은 직선으로, 직선의 방정식은 $y=36.68x-51.339$ ($R^2=0.999$)으로 직선성을 나타내었다. (Fig. 3)

Astragaloide IV의 검량선은 직선으로, 직선의 방정식은 $y=288.23x-32.854$ ($R^2=0.996$)으로 직선성을 나타내었다. (Fig. 4)

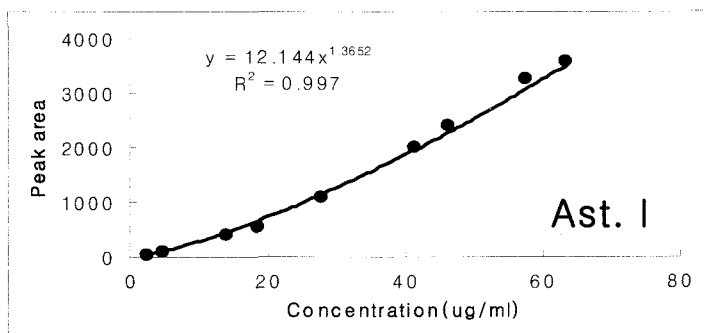


Fig. 2. HPLC chromatogram of astragaloide I.

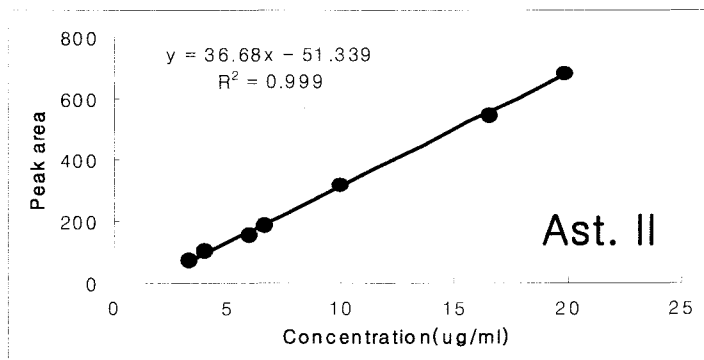


Fig. 3. HPLC chromatogram of astragaloide II.

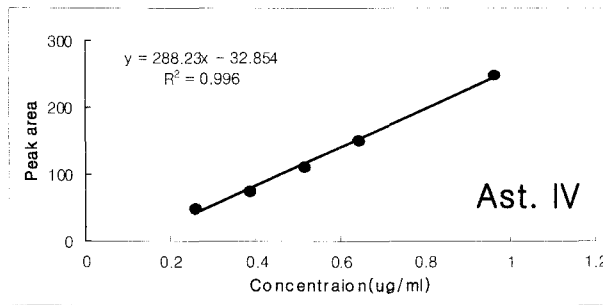


Fig. 4. HPLC chromatogram of astragaloside IV.

2) Astragaloside I, II, IV의 함량 분석

Astragaloside I은 3년근 67.8 mg/100g > 5년근 63.5 > 1년근 39.8 > 7년근 13.6 순으로 함량이 높았다. Astragaloside II 의 경우는 3년근 21.4 mg/100g > 5년근 12.6 > 1년근 8.8 순으로 높았으며, 7년근에서는 검출되지 않았다. Astragaloside IV 는 3년근과 5년근에서만 0.7 mg/100g이 나왔고 1년근, 7년근에서는 검출되지 않았다. (Table 2, Fig. 5, 6)

Table 2. The contents of astragaloside I, II, and IV from Astragali membranacei Radix according to different cultivated years

Year	Astragaloside I	Astragaloside II	Astragaloside IV
	(mg/100g)		
1st	39.8	8.8	-
3rd	67.8	21.4	0.7
5th	63.5	12.6	0.7
7th	13.6	-	-

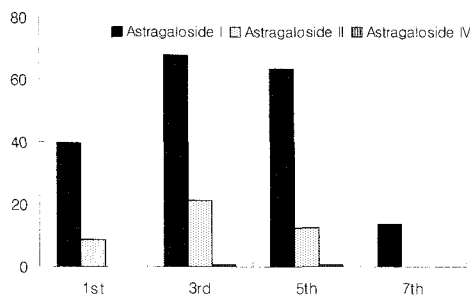


Fig. 5. The contents of astragaloside I, II, and IV from Astragali membranacei Radix according to different cultivated years.

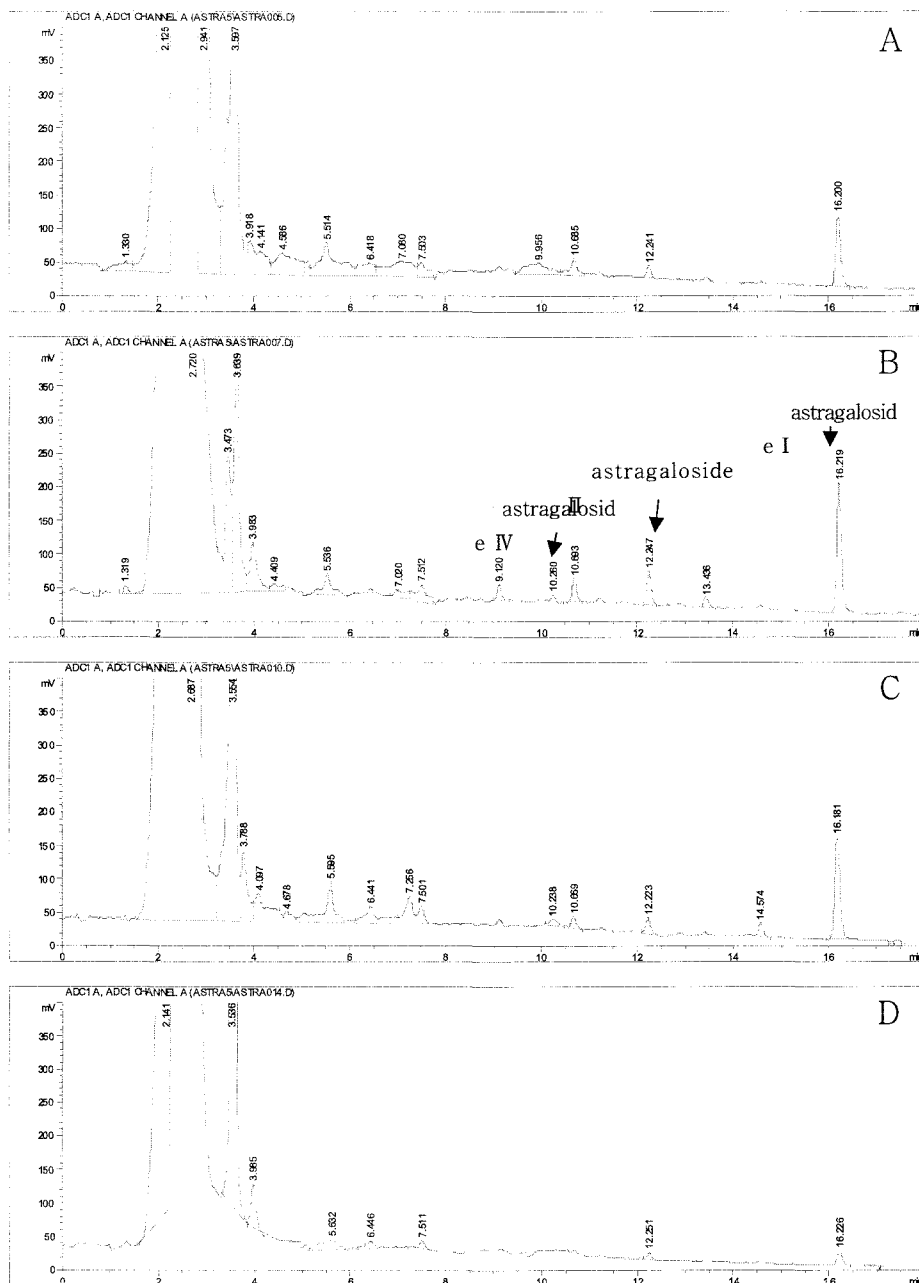


Fig. 6. HPLC profiles of MeOH extracts from *Astragali membranacei* Radix according to different cultivated years. (A, one year; B, three years; C, five years; D, seven years.)

2. 항산화 활성

1) in vitro 항산화 활성

(1) Superoxide anion radical 소거능

Superoxide 소거능 실험 중 메탄올추출물 10ppm 에서는 1년근 8.36±0.21%, 3년근 11.59±0.27%, 5년근 13.08±0.46, 7년근 17.78±0.88%로 대조군인 ascorbic acid의 -0.37±0.52%보다 높은 소거능을 보였다. 50ppm에서도 1년근 16.07±0.06%, 3년근 16.29±0.05%, 5년근 17.32±0.28%, 7년근 13.73±0.52%로 대조군인 ascorbic acid 의 6.25±0.3% 보다 높은 소거능을 보였다. 물과 메탄올추출물 모두에서 100ppm에서는 대조군보다 현저하게 낮은 소거능을 보여 효과가 없었으며, 높은 농도보다는 낮은 농도에서 ascorbic acid 보다 높은 소거능을 보였다. 년근별로는 10ppm에서 재배 년수에 따라 좋은 소거능을 보였다. 50ppm, 100ppm 에서는 재배년수에 따라 증가하다가 5년근을 정점으로 감소하였다. 비교적 재배년수가 높을 수록 높은 활성이 나타났다. (Table 3, Fig. 7)

Table 3. Scavenging activity on superoxide radical of water and methanol extract from Astragali membranacei Radix(%)

Year		Concentration(ppm)		
		10	50	100
1st	Water	6.63±0.23	7.63±1.00	9.33±0.63
	MeOH	8.36±0.21	16.07±0.06	14.09±0.28
3rd	Water	8.64±0.78	11.01±0.37	13.76±0.46
	MeOH	11.59±0.27	16.29±0.05	14.39±4.36
5th	Water	9.89±0.01	13.93±0.06	17.68±0.26
	MeOH	13.08±0.46	17.32±0.28	20.31±0.05
7th	Water	14.08±0.47	15.22±0.44	17.47±0.76
	MeOH	17.78±0.88	13.73±0.52	17.28±0.02
Ascorbic Acid	Water	-0.37±0.52	6.25±0.30	59.78±7.27
	MeOH	-0.37±0.52	6.25±0.30	59.78±7.27

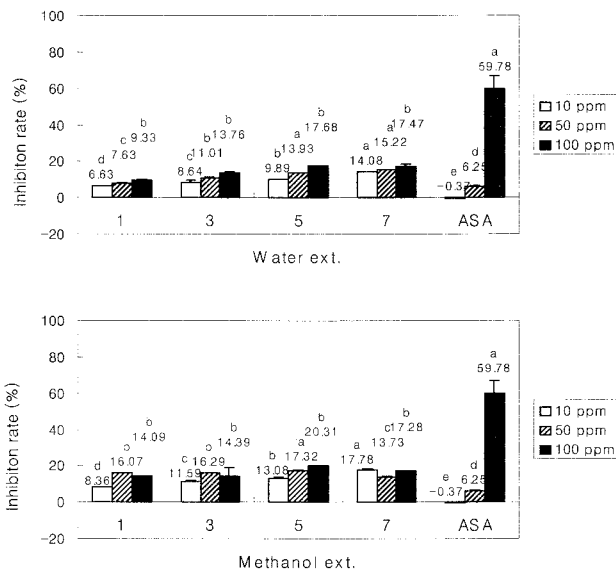


Fig. 7. Scavenging activity on superoxide radical of water and methanolex-tract from *Astragali membranacei Radix*. (ASA: Ascorbic acid)

(2) α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 소거능

Table 4. Scavenging activity on DPPH radical of water and methanolextract from *Astragali membranacei Radix*(%)

Year		Concentration(ppm)		
		10	50	100
1st	Water	0.30±0.25	2.24±0.06	1.76±0.01
	MeOH	5.50±0.23	4.02±0.23	5.38±0.06
3rd	Water	0.33±0.11	2.72±0.08	3.05±0.16
	MeOH	5.76±0.00	4.17±0.03	6.39±0.11
5th	Water	0.46±0.14	3.34±0.01	3.11±0.01
	MeOH	6.17±0.02	2.64±0.21	5.31±0.13
7th	Water	0.66±0.01	3.33±0.00	2.80±0.01
	MeOH	5.12±0.16	7.62±6.85	4.96±0.01
Tocopherol	Water	23.7±0.42	89.61±0.02	91.56±0.01
	MeOH	23.7±0.42	89.61±0.02	91.56±0.01

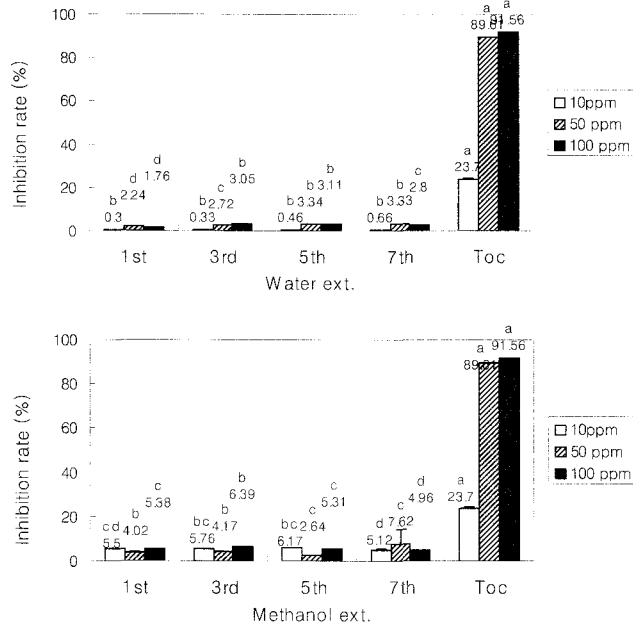


Fig. 8. Scavenging activity on DPPH radical of water and methanolextract from *Astragali membranacei Radix*. (TOC; Tocopherol)

물추출물 10ppm, 50ppm, 100ppm에서 모두 대조군인 tocopherol보다 현저하게 낮은 DPPH 소거능을 보였다. 메탄올추출물에서도 10ppm, 50ppm, 100ppm에서도 현저하게 낮은 소거능을 보였다. 또한 재배 년수 간에 유의한 차이는 없었다.(Table 4, Fig. 8)

(3) Low density lipoprotein (LDL) 산화저해능

물추출물에서는 1ppm에서 1년근 $-220.6 \pm 15.6\%$, 3년근 $-210.4 \pm 8.3\%$, 5년근 $-197.8 \pm 13.7\%$, 7년근 $-193.0 \pm 28.3\%$ 로 대조군인 tocopherol의 $30.2 \pm 1.4\%$ 보다 현저하게 적게 나타나 의미가 없었다. 10ppm 에서도 대조군인 tocopherol의 $52.3 \pm 7.5\%$ 보다 현저하게 적게 나타났다.

메탄올추출물에서도 1ppm에서 1년근 $0.3 \pm 11.2\%$, 3년근 $3.6 \pm 1.5\%$, 5년근 $8.8 \pm 1.5\%$, 7년근 $12.1 \pm 0.5\%$ 로 대조군인 tocopherol의 $30.2 \pm 1.4\%$ 보다 현저히 낮은 LDL 산화저해능을 보였다. 10ppm 에서도 대조군인 tocopherol의 $52.3 \pm 7.5\%$ 보다 낮은 LDL 산화저해능을 보여 LDL산화저해에는 효과가 없는 것으로 나타났다. (Table 5, Fig. 9)

Table 5. Inhibitory activity on LDL oxidation of water and methanolextract from *Astragali membranacei Radix*(%)

Year		Concentration(ppm)	
		1	10
1st	Water	-220.6±11.2	-168.4±11.3
	MeOH	0.3±11.2	12.4±1.3
3rd	Water	-210.4±8.3	-207.6±3.9
	MeOH	3.6±1.5	30.3±3.0
5th	Water	-197.8±13.7	-169.9±13.7
	MeOH	8.8±1.5	37.9±3.0
7th	Water	-193.0±28.3	-186.2±14.3
	MeOH	12.1±0.5	33.6±0.8
Tocopherol	Water	30.2±7.5	52.3±1.4
	MeOH	30.2±1.4	52.3±7.5

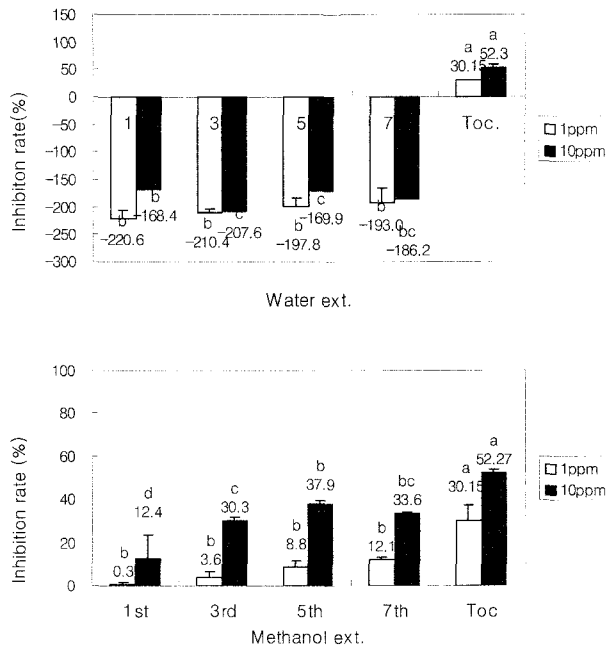


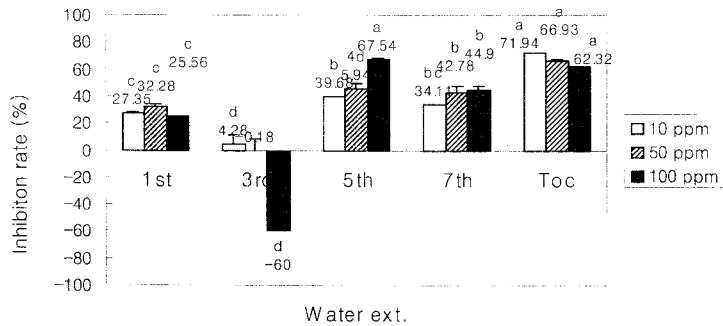
Fig. 9. Inhibitory activity on LDL oxidation of water and methanolextract from *Astragali membranacei Radix*. (TOC; Tocopherol)

(4) Linoleic acid 과산화저해능

물추출물에서는 10ppm, 50ppm 에서는 대조군인 tocopherol보다 낮은 linoleic acid 과산화저해능을 보였으며, 100ppm 에서는 5년근이 대조군인 토코페롤 62.32±0.14% 보다 높은 저해능을 보였다. 물추출물은 5년근만 linoleic acid 과산화저해능을 보였고, 메탄올추출물에서는 50ppm에서는 5년근 79.27±0.72% >1년근 77.84±2.21% >3년근 75.03±3.54% >7년근 66.93±0.79%순(대조군 66.93±0.79%)으로, 100ppm 에서는 7년근 82.19±0.46% >5년근 82.01±0.2% >1년근 81.37±0.42% >3년근 80.83±0.04% 순으로 대조군 62.32±0.14%보다 현저한 linoleic acid 과산화저해능을 보였다. (Table 6, Fig. 10)

Table 6. Inhibitory activity on linoleic acid oxidation of water and methanol extract from Astragali membranacei Radix (%)

Year		Concentration(ppm)		
		10	50	100
1st	Water	27.35±0.90	32.28±1.68	25.56±0.05
	MeOH	34.09±2.14	77.84±2.21	81.37±0.42
3rd	Water	4.28±6.68	-0.18±8.25	-60.00±3.39
	MeOH	29.87±0.69	75.03±3.54	80.83±0.04
5th	Water	39.68±0.35	45.94±3.50	67.54±1.1
	MeOH	45.43±1.19	79.27±0.72	82.01±0.2
7th	Water	34.11±0.06	42.78±5.23	44.90±3.02
	MeOH	36.12±1.73	74.43±0.06	82.19±0.46
Tocopherol	Water	71.94±0.66	66.93±0.79	62.32±0.14
	MeOH	71.94±0.66	66.93±0.79	62.32±0.14



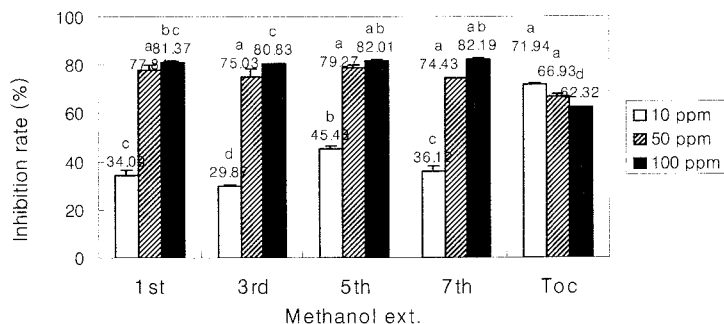


Fig. 10. Inhibitory activity on linoleic acid oxidation of water and methanol extract from *Astragali membranacei Radix*. (TOC; tocopherol)

(5) 총페놀 함량

총페놀 함량은 물추출물에서 1년근 0.15±0.01%, 3년근 0.24±0.00%, 5년근 0.39±0.04%, 7년근 0.39±0.02%로 재배년수가 증가하면서 총페놀량이 증가하였다.

메탄올 추출물에서는 1년근 0.27±0.02%, 3년근 0.49±0.04%, 5년근 0.59±0.04%, 7년근 0.30±0.01%로 5년근이 제일 높은 페놀함량이 높게 나왔으며 7년근에서 현저히 감소하였다.(Table 7, Fig. 11)

Table 7. Total phenol content of water and methanol extract from *Astragali membranacei Radix*

Year		Total phenol content(%)
1st	Water	0.15±0.01
	MeOH	0.27±0.02
3rd	Water	0.24±0.00
	MeOH	0.49±0.04
5th	Water	0.39±0.04
	MeOH	0.59±0.04
7th	Water	0.39±0.02
	MeOH	0.30±0.01

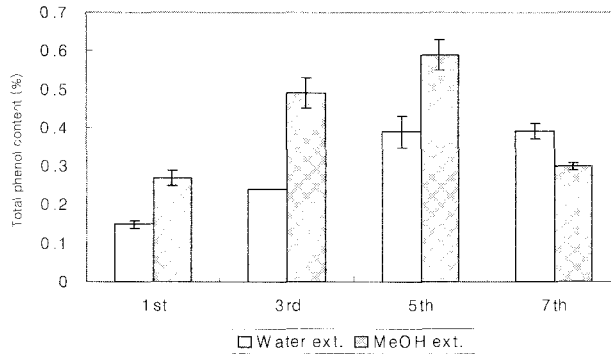


Fig. 11. Total phenol content of water and methanol extract from *Astragali membranacei* Radix.

2) in vivo 항산화 실험

(1) 간장 중 superoxide dismutase (SOD) 활성

간장 중 Mn-SOD 활성에서 3년근은 2.46 ± 0.30 u/mg protein, 7년근은 2.48 ± 0.61 u/mg protein으로 silymarin군의 2.59 ± 0.50 u/mg protein 과 동일한 수준으로 낮은 Mn-SOD 활성을 나타내었다. Cu, Zn-SOD 활성에서는 모두 유의성이 없었다. (Table 8, Fig 12)

Table 8. Superoxide dismutase activity in rat liver administrated with silymarin and *Astragali membranacei* Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks

Group	Mn-SOD activity (u/mg protein)	Cu,Zn-SOD activity (u/mg protein)
Normal	2.56 ± 0.57	0.02 ± 0.01
Control	3.08 ± 0.66	0.03 ± 0.01
Silymarin	2.59 ± 0.5	0.02 ± 0.01
1st	3.33 ± 0.79	0.03 ± 0.01
3rd	2.46 ± 0.30	0.03 ± 0.01
5th	2.97 ± 0.18	0.02 ± 0.01
7th	2.48 ± 0.61	0.03 ± 0.01

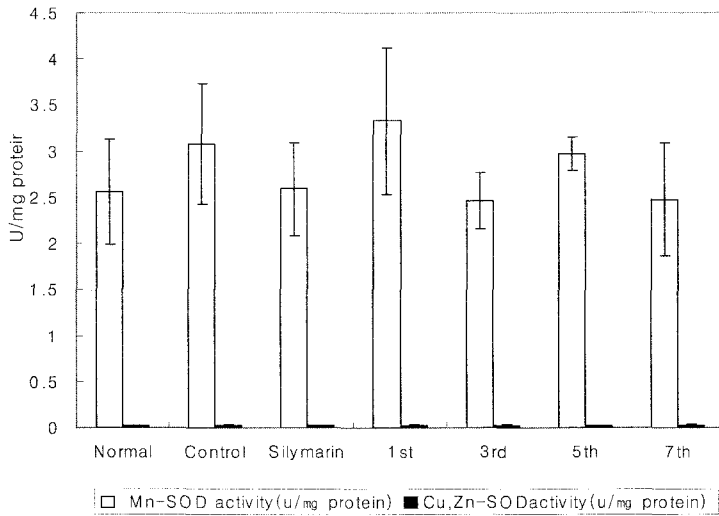


Fig. 12. Superoxide dismutase activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks.

(2) 간장 중 glutathione peroxidase (GSH-px) 활성

Table 9. Glutathione peroxidase activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks

Group	Glutathione peroxidase activity (u/mg protein)	Duncan's test (p<0.05)
Normal	0.65±0.15	a
Control	0.57±0.15	ab
Silymarin	0.2±0.08	c
1st	0.56±0.11	ab
3rd	0.51±0.12	ab
5th	0.51±0.11	ab
7th	0.42±0.22	b

GSH-Px의 활성에서 3년근 0.51 ± 0.12 u/mg protein, 5년근 0.51 ± 0.11 u/mg protein, 7년근 0.42 ± 0.22 u/mg protein 로 대조군의 0.57 ± 0.15 u/mg protein보다 낮은 활성을 나타내고 있었다. (Table 9, Fig. 13)

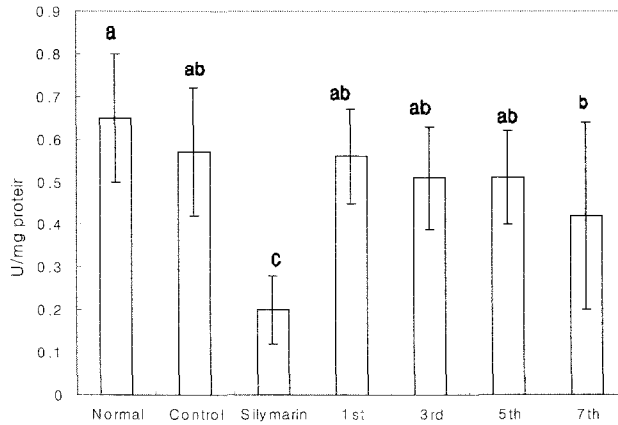


Fig. 13. Glutathione peroxidase activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract. (1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks.

(3) 간장 중 Catalase 활성

Table 10. Catalase activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks

Group	Catalase activity (k/mg protein)	Duncan's test (p<0.05)
Normal	0.016 ± 0.000	ab
Control	0.013 ± 0.010	bc
Silymarin	0.010 ± 0.000	c
1st	0.014 ± 0.000	bc
3rd	0.012 ± 0.000	bc
5th	0.013 ± 0.000	bc
7th	0.020 ± 0.000	a

항산화효소인 catalase의 활성에서는 모든 group에서 유의성이 없었다. (Table 10, Fig. 14)

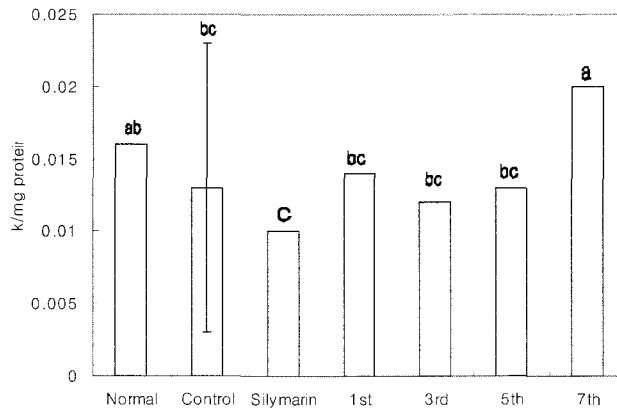


Fig. 14. Catalase activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks.

(4) 간장 중 aldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성

Table 11. ALDH activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks

Group	ALDH activity ($\mu\text{M NADH}/\text{mg protein}/\text{m}$)	Duncan's test ($p < 0.05$)
Normal	6.42 ± 1.13	ab
Control	3.63 ± 1.55	c
Silymarin	5.57 ± 2.06	abc
1st	7.15 ± 2.46	a
3rd	4.49 ± 1.3	bc
5th	4.27 ± 1.18	bc
7th	4.32 ± 1.68	b

黃芪와 알콜을 병행 투여하였을 때, 흰쥐에서 나타나는 ALDH의 활성변화를 관찰한 결과 1년근은 $7.15 \pm 2.46 \mu\text{M NADH/mg protein/m}$ 으로 대조군의 $3.63 \pm 1.55 \mu\text{M NADH/mg protein/m}$ 및 silymarin의 $5.57 \pm 2.06 \mu\text{M NADH/mg protein/m}$ 보다 유의하게 높은 활성을 나타내었다.(Table 11, Fig. 15)

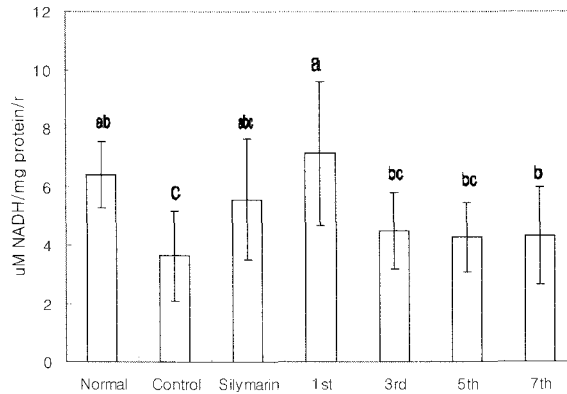


Fig. 15. ALDH activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks.

(5) 간장 중 alcohol dehydrogenase(ADH) 활성

Table 12. ADH activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks

Group	ADH activity (nM NADH/mg protein/m)	Duncan's test (p<0.05)
Normal	419.82±292.61	b
Control	582.05±288.23	b
Silymarin	550.59±251.34	b
1st	638.25±464.53	b
3rd	512.65±311.42	b
5th	1146.45±533.17	a
7th	620.55±326.47	b

5년근만 1146.45±533.17 nM NADH/mg protein/m 로 유의적인 활성 증가를 보였고, 나머지는 1년근 638.25±464.53 nM NADH/mg protein/m, 3년근 512.65±311.42 nM NADH/mg protein/m, 7년근 620±326.47 nM NADH/mg protein/m로 평균값에서 다소 차이가 있었으나 유의성이 없었다.(Table 12, Fig. 16)

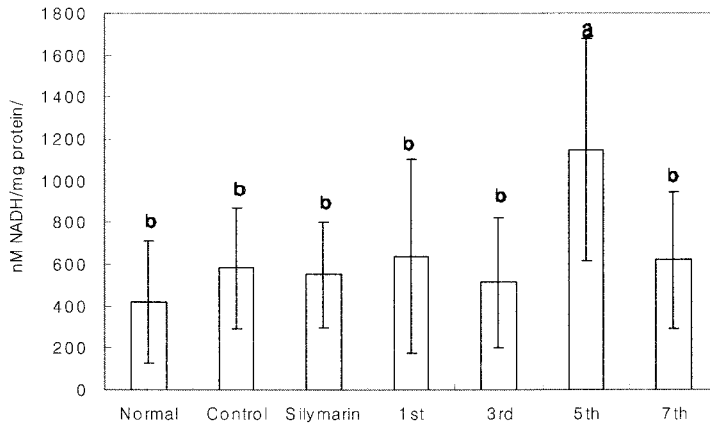


Fig. 16. ADH activity in rat liver administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks.

(6) 상대간장 중량

Table 13. Relative liver weight of rat administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10ml/kg body weight/day) for 2 weeks

Group	Relative liver weight(%)	Duncan's test (p<0.05)
Normal	3.37±0.09	ab
Control	3.43±0.20	a
Silymarin	3.28±0.08	abc
1st	3.29±0.11	abc
3rd	3.23±0.12	bc
5th	3.40±0.24	ab
7th	3.16±0.10	c

대조군의 $3.43 \pm 0.20\%$ 와 비교하여 1년근 $3.29 \pm 0.11\%$, 3년근 $3.23 \pm 0.12\%$, 5년근 $3.40 \pm 0.24\%$, 7년근 $3.16 \pm 0.10\%$ 로 모두 낮은 경향이 나타났으나 유의성은 없었다.(Table 13, Fig. 17)

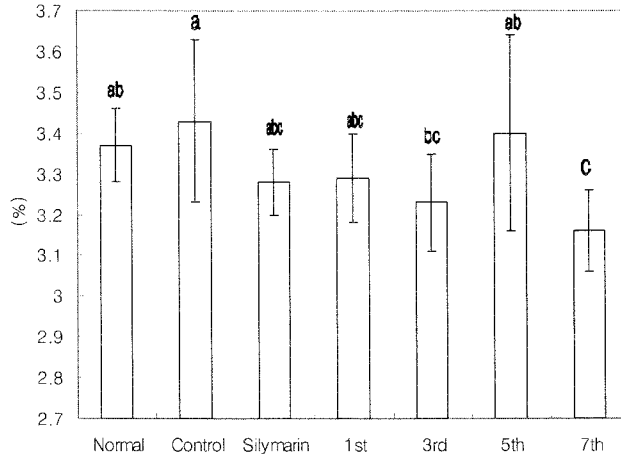


Fig. 17. Relative liver weight of rat administrated with silymarin and Astragali membranacei Radix methanol extract(1 g/kg body weight/day) treated with 40% ethanol(10 ml/kg body weight/day) for 2 weeks.

IV. 考 察

黃芪는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본인 황기 *A. membranaceus*를 봄과 가을에 채취하여 뿌리를曬乾한 것이다.¹⁻⁶⁾ 中國에서는 동속식물인 蒙古黃芪 *Astragalus mongholicus* Bunge, 烏拉特黃芪 *Astragalus hoantchy* Franch., 華黃芪 *Astragalus chinesis* L., 直立黃芪 *Astragalus adsurgens* Pall. 등이流通되고 있다.⁴⁻⁶⁾

黃芪는 <神農本草經>⁸⁾의 上品에 “黃芪味甘微溫 主癰疽 久敗瘡 排膿止痛 大風癩疾 五痔鼠瘻 補虛 小兒百病 一名載滲 生山谷 一名白本 生蜀群 白水漢中 二月十日採陰乾”하여 최초로 기재되어 있으며, 補虛와 癰疽의 治療藥으로 사용하였다.

漢代의 <名醫別錄>⁴²⁾에서는 “婦人子藏 風邪氣 逐五藏間惡血 補丈夫虛損 五勞羸瘦 止渴 洩痢 益氣 利陰氣 生白水者冷 補氣莖葉療渴 及 筋攣癰腫疔瘡 一名載滲 生山谷 一名白本 生蜀群 白水漢中 二月十日 採陰乾”이라 하여 補氣升陽와 托毒排膿

의 효능과 채취 시기 등에 대해 기재하고 있다. 明代의 <景岳全書>²⁾에는 “生用微涼 可治癰疽, 蜜炙性溫 能補虛損.” 이라 하여 生用과 炙用함의 효능이 다름을 최초로 언급하였다. 清代의 <本草備要>⁴³⁾에서는 “生用則 固表 無汗能發 有汗能止 溫分實腠理 補肺氣瀉陰火 解肌熱 利水 炙用則 補中益氣 內傷勞倦 脾虛泄瀉 氣虛血脫 崩帶 一切氣衰血虛之證 補氣健脾 生血生肌 排膿內托 溫三焦” 라 하여 生用時 固表하고 炙用時 補中한다고 하였으며, 이후 나누어 사용하고 있다.

黃芪는 味는 甘하고 性은 溫하며 肺, 脾經에 작용하며,¹⁻⁶⁾ 生用하면 益胃固表, 利水消腫, 托瘡生肌하는 효능이 있으며 炙用하면 補中益氣의 효능을 지닌 補氣藥의 대표적인 약물이다.^{1,2,4-6)}

임상에서는 生用으로는 表虛不固로 인한 自汗盜汗, 氣血不足으로 인한 瘡癰內陷, 膿成不潰 등에, 炙用하여 脾肺氣虛로 인한 少氣賴言과 食少便溏, 中氣下陷으로 인한 久瀉脫肛, 子宮下垂, 崩漏便血 등에 응용된다.^{1,2,6)} 현대 임상에서는 呼吸器感染, 小兒哮喘, 多汗症, 腦血管疾患, 胃下垂, 脫肛, 糖尿病, 慢性腎炎, 腫瘍 등에 이용되고 있다.^{2,4-6)}

黃芪의 주성분은 astragaloside I~VIII, astragalussaponin I, II, III, acetylastragaloside I, soyasaponin I 등의 saponin과 formononetin, calycosin, kumatakenin, L-3-hydroxy-9-methoxypterocarpan 등의 flavonoid, asparanide, canavamine, prolin 등 19종 이상의 아미노산을 함유하고 있으며, Cu, Zn, Fe, Mn 등 19종의 무기염류, β -sitosterol, linoleic acid, follic acid 등 미량 원소가 포함되어 있다.⁴⁴⁾

黃芪의 분류 연구로는 5S-rRNA spacer domain에 의한 DNA 배열⁴⁵⁾과 RAPD 분석⁴⁶⁾에 의해서 유전자를 분석하여 종을 분류하였다.

효능 연구로는 黃芪의 flavonoid가 쥐에서 心筋虛血-再灌流에 의한 free radical의 생성⁴⁷⁾과 쥐에서 저산소로 유발된 고혈압의 치료,⁴⁸⁾ 그리고 심근 경색 후의 심근의 angiotensin II와 hydroxyproline에 대해 효과가 있다⁴⁹⁾고 보고 하였다. 또한 黃芪의 saponin은 심장의 수축력을 감소시키고, oxygen free radical 상해를 방지해 심장 보호 효과를 향상시킨다고 하였으며,⁵⁰⁾ Na-K ATPase에 영향을 주어 심근의 수축작용이 있다는 보고 하였다.⁵¹⁾

면역 활성화에 관한 연구로는 methotrexate를 처치한 마우스의 비장 세포에 대한 항기의 免疫調節效果,⁵²⁾ in vivo 상태에서 抗體生成,⁵³⁾ 黃芪의 polysaccharide가 나이는 생쥐에 있어 IgM 항체를 생성,⁵⁴⁾ Zinc Chloride에 의해 유발된 세포 매개성 면역 독성에 대한 효과,⁵⁵⁾ 黃芪 외용약에 의한 면역 기능 조절 효과 등을 보고 하였다.⁵⁶⁾ 항암연구로는 쥐의 화학적 간암 발병에 대한 효과,¹²⁾ 임상적으로는 악성

종양 환자에 있어서 화학요법의 독성을 감소시킨다⁵⁷⁾고 보고 하였다. 항산화 연구로는 黃芪 추출물이 구리에 의해서 유발된 쥐의 뇌 균질물의 지질과산화와 단백질 산화는 억제하는 효과⁵⁸⁾와 黃芪의 flavonoid의 free radical과의 작용에 대한 연구⁵⁹⁾가 보고 되었다.

이상과 같이 黃芪는 성분과 분류, 효능에 대한 연구, 면역에 대한 실험, 항산화 연구를 중심으로 연구되어 왔다.

중국 蒙古黃芪 *A. mongholicus*의 경우¹⁹⁾의 경우3년근 이상은 되어야 약효를 나타낸다고 하여 3년 이후의 채취를 권하고 있으나 우리나라의 경우 대부분 1-2년근이 유통되고 있는 실정이다.

그러므로, 임상에서 우수한 치료 효과를 얻기 위하여서는 치료 목적에 맞게 적정기간동안 재배된 黃芪의 사용이 매우 중요하리라고 생각되며, 이와 관련되어 黃芪의 성분 및 면역, 항암, 항산화 등 약리활성 연구가 필요하다.

黃芪 1년근, 3년근, 5년근, 7년근을 메탄올 추출하여 HPLC로 astragaloside I ~VIII 중 astragaloside I, astragaloside II, astragaloside IV의 성분을분석하였다.

항산화 활성 실험은 in vitro 에서는 Superoxide anion radical 소거능, a,a-diphenyl-b-picrylhydrazyl(DPPH) 소거능, low density lipoprotein(LDL) 산화저해, Linoleic acid 과산화저해, 총페놀 함량 등을 측정하였고, in vivo에서는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px), Catalase, aldehyde dehydrogenase (ALDH), alcohol dehydrogenase (ADH) 등의 활성과 상대 간장 중량을 측정하여 항산화 효능을 관찰하고자 하였다.

黃芪의 주요성분인 astragaloside I ~VIII 중 astragaloside I, astragaloside II, astragaloside IV의 성분을 HPLC로 분석한 결과 3년근 黃芪에서 astragaloside I, astragaloside II, astragaloside IV 모두 높게 나왔으며 5년근>1년근>7년근의 순으로 함량이 높게 나왔다.

다양한 경로에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 생체막의 손상, 고분자 단백질 및 DNA의 변형과 기능상실 등으로 인한 다양한 퇴행성 질환이 유발될 수 있다.⁶⁴⁾ 이로 인해 유발되는 건강문제를 해결할 수 있는 물질로 항산화제에 대한 관심이 집중되고 있다. 따라서 항산화제는 인류가 현재 관심을 집중하는 기능성 혹은 생리활성물질의 하나로서 식품의 변질을 방지하고 인체에서의 노화 방지, 성인병 예방 등의 기능을 할 수 있는 물질이다.^{65,66)} 기존의 항산화제로 BHA (butylated hydroxy anisole), BHT (butylated hydroxy toluene), PG (propyl gallate) 등과 같은 합성 항산화제와 토코페롤과 같은 천연

항산화제가 개발되어 이용되고 있으나 합성 항산화제인 BHA, BHT는 우수한 효과를 지니지만 독성이 문제가 되어 사용이 기피되고 있으며 토코페롤은 가격이 높은 단점을 가지고 있어 이들을 대체할 수 있는 효과적이고도 안전한 항산화제의 개발이 요구(67-68)되어 황기가 항산화제로써 유용성이 있는지를 연구하였다.

Superoxide anion radical 소거능을 분석한 결과, 물추출물과 메탄올추출물 100ppm에서 ascorbic acid보다 현저하게 낮은 소거능을 보여 효과가 없었으며, 10ppm에서는 7년근 $17.78 \pm 0.88\%$, 5년근 $13.08 \pm 0.46\%$ 로 ascorbic acid 보다 높은 소거능을 보였다. superoxide anion radical 소거 작용이 높다는 얘기는 산화적 스트레스에 의해 야기되는 암, Alzheimer성 치매 등의 질병을 예방 또는 치료하기 위한 소거제 사용에는 적합하다는 의미이다. 비교적 재배년수에 따라 활성의 증가가 나타났다.

DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) radical 소거능에서는 물추출물과 메탄올추출물 모두 현저하게 낮은 소거능을 보여 유효성이 없었으며 재배년수에 따라 서로 별다른 유의성이 없었다.

LDL(low density lipoprotein)은 내막하에 들어가 산화성LDL(oxidized LDL)로 변형되며, macrophage와 oxidized LDL이 결합하면 지방반(fatty streak)을 형성하여 동맥경화증으로 진행된다.(63) 이러한 저밀도지단백의 산화에 대한 저해효과를 실험한 결과 물추출물과 메탄올추출물에서 대조군인 토코페롤보다 현저하게 적게 나타나 의미가 없었다. α -토코페롤과 비교할 때 모든 년근의 활성이 낮은 것이어서 黃芪는 LDL의 산화에 대해서는 효과적인 저해작용을 못하는 것을 알 수 있었다.

Linoleic acid 산화에 대한 저해효과는 물추출물에서는 5년근만 Linoleic acid 과산화저해능을 보였고, 메탄올추출물에서는 50ppm에서는 5년근>1년근>3년근>7년근순으로, 100ppm에서는 7년근>5년근>1년근>3년근 순으로 대조군보다 현저한 Linoleic acid 과산화저해능을 보여 linoleic acid 산화에 대한 저해효과는 5년근이 다른 년근에 비해 우수하였다.

항산화활성에 정적인 상관성을 나타내는 페놀성분의 함량 차이를 비교하기 위해 메탄올 및 물추출물의 총페놀 함량을 분석한 결과 대체적으로 메탄올추출물이 물추출물보다 총페놀 함량이 높았으며 물추출물에서는 재배년수가 증가하면 총페놀 함량이 증가하였다. 메탄올 추출물에서는 5년근이 제일 높은 페놀함량이 높게 나타났으나 7년근에서 현저히 감소하였다.

In vivo 항산화 실험 중 SOD(Superoxide dismutase)는 아연(Zn) 및 구리(Cu)를 함유하고 있는 효소로 superoxide radical($\cdot O_2^-$)을 제거하는 역할을 하여 활성 산소로부터 생체를 보호하는데 기여한다.(63) 알코올의 투여로 다량 생성되는 radical

들은 생체 내에서 항산화효소인 Mn-SOD의 활성을 증가시키며, radical을 적절히 제거할 수 있는 항산화물질이 존재하면 그 활성은 증가하지 않는다. 그러므로 2주간 알콜 투여로 유발된 산화적 스트레스에 대해 메탄올추출물이 나타내는 항산화 효소에 대한 영향을 분석한 결과 3년근, 7년근 > 5년근 > 1년근의 순으로 Mn-SOD의 활성을 정상수준으로 회복시킴으로서 항산화작용을 나타냈다. Cu, Zn-SOD에서는 모두 유의성이 없었다.

항산화효소인 glutathione peroxidase(GSH-px)는 활성산소의 일종인 과산화수소를 기질로 하여 산화시켜 제거하는 기능을 갖고 있으며 과산화 지질을 환원시켜 제거함으로써 활성산소의 공격으로부터 생체를 보호하는 방어기능을 담당하고 있다.63) 실험결과 양성대조군보다는 높으나 7년근 > 5년근, 3년근 > 1년근 순으로 GSH-px activity를 정상수준으로 회복시키는 효과가 크게 나타났다.

항산화효소인 catalase(CAT)는 중심에 철을 함유하고 있으며 생화학적 반응을 통해 활성 산소의 일종인 과산화수소를 분해하는 효소이다.63) Catalase(CAT)의 활성에 대한 메탄올추출물의 영향을 실험한 결과 양성대조군에 비해서 높고 음성대조군과 비슷해 유의성이 없었다.

ALDH는 알콜 분해로부터 생성된 아세트알데히드를 무독화시키는 효소이며, 만성 알콜의 투여로 활성이 감소되면 알콜에 의한 독성이 증가하게 된다.63) 黃芪와 알콜을 병행 투여하였을 때, 흰쥐에서 나타나는 ALDH의 활성변화를 관찰한 결과 黃芪를 투여하지 않은 군에서는 예상대로 ALDH의 활성이 유의적으로 감소하였고, 이에 비해 黃芪 추출물 투여군에서는 모두 유의적인 활성 증가가 관찰되었다. 1년근 > 3년근 > 7년근 > 5년근 순으로 활성이 높게 나타났으며 그 중 1년근은 정상군과 양성대조군보다도 매우 높은 수준을 나타내 높은 알콜 분해효과가 확인되었다.

생체 내에서 알콜이 분해되는 데 기여하는 효소인 ADH는 5년근 추출물을 투여한 실험군에서 유의적인 활성증가가 관찰되어 알콜의 빠른 분해에 기여하는 효과가 매우 높을 것으로 판단된다. 5년근 투여군 외의 다른 실험군에서는 평균값에서 다소 차이가 나타났으나 유의성이 없이 모두 동일한 수준인 것으로 확인되었다.

일반적으로 만성적인 알콜 섭취는 체중에 대한 간장의 상대중량을 증가시키는 것으로 알려져 있고 항산화물질은 알콜에 의한 이러한 부작용을 감소시킴으로서 정상 수준의 상대간장중량을 유지시킨다. 이러한 점에 착안하여 메탄올추출물이 알콜과 함께 투여되었을 때, 상대간장 중량에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비해 음성대조군이 유의적으로 상대간장중량의 증가가 관찰되었다. 반면에 Silymarin과 알콜을 병행투여한 양성대조군에서는 정상군보다도 낮은 값이 나타났

다. 메탄올추출물 투여군에서는 7년근 > 3년근 > 1년근 > 5년근의 순으로 낮은 값을 나타내었으며 모두 음성대조군보다 낮은 수준이었다. 재배년수별로 다소 차이가 있으나 ADH 및 ALDH의 활성 증가를 통해 알콜에 의한 지방의 생성을 효과적으로 막아주며 알콜 분해를 촉진시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

결론적으로 in vitro 항산화활성을 검정한 결과 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 소거능과 Low density lipoprotein (LDL) 산화저해능에서는 항산화 효과가 없었으며 Superoxide anion radical 소거능, Linoleic acid 과산화저해능, 총페놀 함량 등에서는 물추출물과 메탄올추출물에서 모두 7년근과 5년근이 우수한 항산화 효능을 보였다.

in vivo 실험에서 간장 중 superoxide dismutase (SOD) 활성 중 Mn-SOD의 활성, glutathione peroxidase (GSH-px) 활성, 상대간장 중량 등은 7년근이 우수한 항산화 효과를 보였다. aldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성은 1년근이 가장 높게 나타났으며, alcohol dehydrogenase (ADH) 활성은 5년근이 제일 높게 나타났다. 전반적인 결과를 볼 때 7년근이 비교적 우수한 항산화 작용을 나타낸 것으로 판단된다.

향후 추출물 방법에 대한 연구에 있어서 물 추출에 의한 것보다는 메탄올 같은 극성이 높은 용매에서 활성이 높게 나타나 효과적이었으며, 이외에 다른 다양한 용매를 사용한 실험으로 앞으로의 韓藥材 연구에 있어서 다각적인 접근이 가능하며 이들의 활용이 가능한 면역 활성 증진에 대한 효과적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

항산화 실험에서 Superoxide anion radical 소거능, Linoleic acid 과산화저해능, superoxide dismutase (SOD) 활성 중 Mn-SOD의 활성, glutathione peroxidase (GSH-px) 활성, 상대간장 등에서 우수한 활성을 보인 7년근은 대조군보다도 우수한 효과가 있으나 천연 항산화제로서 효과적이고 안전한지에 대한 연구가 더욱 더 진행되어야 할 것 같다.

V. 結 論

黃芪의 재배년수별 추출물의 성분분석, 면역 활성, 항암 활성, 항산화 활성을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HPLC로 분석한 결과 astragaloside I, astragaloside II, astragaloside IV 모두 3년 > 5년근 > 1년근 > 7년근의 순으로 함량이 높게 나왔다.

2. 인간 정상 폐세포인 HEL299에서는 0.25 mg/ml의 농도에서 모두 18%이하의 비교적 낮은 세포독성을 나타내었으나, 고농도인 1.0 mg/ml에서는 물추출물의 경우 7년근 $28.9 \pm 3.0\%$, 메탄올 추출물의 경우 3년근 $35.2 \pm 4.1\%$ 로 가장 높은 세포 독성이 나타났으며 재배 년수에 따른 차이는 없었다.
3. 위암 세포 AGS(stomach adenocarcinoma, human)에서는 저농도의 경우 선택적 사멸도는 높게 나왔으나 생육억제율이 50%이하로 낮게 나왔다. 3년근 메탄올추출물이 생육억제율 $75.2 \pm 6.8\%$, 선택적 사멸도 2.1 ± 0.1 로 가장 높게 나타났다.
4. 유방암 세포 MCF-7(breast adenocarcinoma, pleural effusion, human)에서는 3년근 메탄올추출물이 $84.9 \pm 7.7\%$ 의 생육억제율, 2.4 ± 0.2 로 선택적 사멸도가 가장 높게 나타났다.
5. 폐암 세포 A549(Lung carcinoma, human)에서는 3년근 물추출물 생육억제율 $64.0 \pm 7.0\%$, 선택적 사멸도 2.1 ± 0.2 , 1년근 메탄올추출물 생육억제율 $72.2 \pm 7.4\%$, 선택적 사멸도 2.2 ± 0.1 로 높게 나타났다.
6. 간암세포 Hep3B (hepatocellular carcinoma, human)에서는 3년근 물추출물 $63.1 \pm 6.1\%$, 선택적 사멸도 2.0 ± 0.2 , 1년근 메탄올 추출물 생육억제율 $72.4 \pm 7.8\%$, 선택적 사멸도 2.2 ± 0.1 이 비교적 높은 활성이 나타났다.
7. 위암세포 AGS, 유방암세포 MCF7, 폐암세포 A549, 간암세포 Hep3B 등의 항암 실험에서는 대체적으로 1년근, 3년근 메탄올추출물이 상대적으로 높은 생육 억제와 선택적 사멸도를 보였고, 물추출물에서는 3년근만이 비교적 높은 생육 억제와 선택적 사멸도가 나타났다.
8. 면역 실험에서는 물추출물에서는 7년근이 T cell과 B cell 모두에서 IL-6의 분비가 많았고, 3년근 5년근 메탄올추출물은 T cell과 B cell에서 모두 IL-6와 TNF- α 가 높게 분비 되었다.
9. Superoxide radical의 소거능에서는 100 ppm에서는 대조군보다 현저하게 낮은 소거능을 보여 효과가 없었으며, 10 ppm에서 7년근 $17.78 \pm 0.88\%$, 5년근 $13.08 \pm 0.46\%$ 로 ascorbic acid 보다 높은 소거능을 보였다. 재배년수에 따라 활성의 증가가 나타났다.
10. linoleic acid 산화에 대한 저해효과는 물추출물에서는 5년근 $79.27 \pm 0.72\%$, 메탄올추출물 50 ppm에서 5년근 $82.01 \pm 0.2\%$, 100 ppm 에서 7년근, 5년근 82% 으로 전체적으로 5년근이 다른 년근에 비해 우수하였다.
11. 총페놀 함량을 분석한 결과 물추출물에서는 재배년수가 증가하면 총페놀량 함량이 증가하였으나, 메탄올추출물에서는 5년근까지 증가하다가 7년근에서 현

저히 감소하였다.

12. in vitro 항산화활성을 검정한 결과 Superoxide anion radical 소거능, Linoleic acid 과산화저해능, 총페놀 함량 등에서는 물추출물과 메탄올추출물에서 모두 7년근과 5년근이 우수한 항산화 효능을 보였다.
13. Mn-SOD의 활성을 측정한 결과 3년근, 7년근이 높은 활성이 나타났다.
14. glutathione peroxidase(GSH-px)는 7년근 0.42 ± 0.22 u/mg protein > 5년근, 3년근 0.51 > 1년근 0.56 순으로 나타났다.
15. aldehyde dehydrogenase(ALDH)는 1년근 > 3년근 > 7년근 > 5년근 순으로 활성이 높게 나타났다. 1년근 黃芪 추출물은 정상군과 양성대조군보다도 매우 높은 수준의 알콜 분해효과가 확인되었다.
16. alcohol dehydrogenase(ADH)는 5년근이 가장 높게 나타났고 다른 년근에서는 유의성이 없이 모두 동일한 수준으로 나타났다.
17. in vivo 실험에서는 간장 중 superoxide dismutase (SOD) 활성 중 Mn-SOD의 활성, glutathione peroxidase (GSH-px) 활성, 상대간장 중량 등에서는 7년근, aldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성에서는 1년근, alcohol dehydrogenase (ADH) 활성은 5년근이 제일 높게 나타났다. 전반적인 결과를 볼 때 7년근이 비교적 우수한 항산화 작용을 나타낸 것으로 판단된다.

향후 추출물 방법에 대한 연구에 있어서 극성이 높은 용매에서 활성이 높게 나타나 다양한 용매를 사용한 실험으로 다각적인 접근이 가능하며, 이들의 활용이 가능한 천연 활성 증진에 대한 효과적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

항산화 실험에서 우수한 활성을 보인 7년근이 천연 항산화제로서 효과적이고 안전한지에 대한 연구가 더욱 더 진행되어야 할 것 같다.

VI. 參考 文獻

1. 韓醫科大學 本草學 編輯委員會: 本草學, 서울, 永林社, 2004, pp579-581
2. 徐富一, 崔湖榮: 臨床韓方本草學, 서울, 永林社, 2004, PP773-778
3. 安德均: 韓國本草圖鑑, 서울, 敎學社, 1998, p.690
4. 國家中醫藥管理局 『中華本草』 編委會: 中華本草, 上海, 上海科學技術出版社, 1996, (4), pp.339-356.
5. 王本祥 編著: 現代中藥藥理學, 天津, 天津科學技術出版社, 1997, pp.1175-1180.

6. 肖培根: 新編中藥志, 化學工業出版社, 2000; pp876-89
7. 農林部: 主要 10代 作物 主產地, 서울, 2001, p5
8. 作者未詳: 神農本草經, 서울, 翰林社, 1976, 卷一, p.26.
9. 김정훈, 박정숙, 채병숙, 강태욱, 박찬봉, 안영근: 황기의 메탄올추출물의 용량에 따른 면역생물학적 연구. 약학회지, 1996; 40(3): 326-334
10. Jiao Y, Wen J, Yu X.: Influence of flavonoid of Astragali membranacei Radix's stem and leaves on the function of cell mediated immunity in mice, Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 1999, Jun:19(6):356-358.
11. Li N, Li J, Xin G. Effect of Astragalus Angelica Mixture on lipoprotein lipase and lecithin cholesterol acyltransferase of nephrotic rats, Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 1999 Aug;19(8):484-486.
12. Cui R, He J, Wang B, Zhang F, Chen G, Yin S, Shen H., Suppressive effect of Astragali membranacei Radix Bunge on chemical Hepatocarcinogenesis in rats. Molecular Carcinogenesis Unit, International Agency for Research on Cancer (IARC),France.Cancer Chemother Pharmacol 2003 Jan;51(1):75-80.
13. Tang W, Eisenbrand chinese drugs of Plant origin, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1992, p192
14. Kitagawa. I., Wang, H. K., Takagi, A., Fuchida, M., Miura, I. and Yoshikawa, M. : Saponin and Sapogenol. XXXIV. Chemical Constituents of Astragali Radix, the Root of Astragali membranacei Radix BUNGE(1). Cycloastragenol, the 9,19-Cyclolanostane-type Aglycone of Astragalosides, and the Artifact Aglycone Astragenol. Chem. Pharm. Bull. 31(2), 689-697 (1983)
15. Kitagawa. I., Wang, H. K., and Yoshikawa, M. :Saponin and Sapogenol. XXXVII. Chemical Constituents of Astragali Radix, the Root of Astragali membranacei Radix Bunge(4). Astragalosides VII and VIII. Chem. Pharm. Bull. 31(2), 716-722 (1983)
16. Kitagawa. I., Wang, H. K., Saito, M., Takagi, A., and Yoshikawa, M. : Saponin and Sapogenol. XXXVI. Chemical Constituents of Astragali Radix, the Root of Astragali membranacei Radix Bunge(2) Astragalosides I, II, IV, and Acetylastragaloside I and Isoastragalosides I and II. Chem.
17. Kitagawa. I., Wang, H. K., Saito, M. and Yoshikawa, M. : Saponin and

- Sapogenol. XXXVI. Chemical Constituents of Astragali Radix, the Root of Astragali membranacei Radix Bunge(3). Astragalosides III, V, and VI. Chem. Pharm. Bull. 31(2), 709-715 (1983)
18. Ma XQ, Shi Q, Duan JA, Dong TT, Tsim Kw. Chemical analysis of Radix Astragali(Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. J Agric Food Chem. 2002 Aug, 14:50(17), 4861-4866.
 19. 冉懋雄: 現代中藥栽培樣式與加工手冊, 中國醫藥出版社, 1999: p39
 20. 金護哲: 韓藥藥理學. 서울, 集文堂, 2001, pp415-429
 21. Michael C. A., Domnic, A. S. and Ahne, M. "Feasibility of drug Screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay", Cancer Res. 48 589-601, (1998)
 22. Monks, A., Scudiero, D. Skehan, P. Shoemaker, R. Paull, K. Vistica, D. Hose, C. Langley, J. Cronise, P. Vaigro-Wolff, A. Gray-Goodrich, M. Campbell, H. Mayo, J. and Boyr, M. "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines", J. Natl. Cancer Inst. 83, 757 (1991)
 23. Doll, R. and Peto, R. "The causes of Cancer, Quantitative estimates of avoidable risks of Cancer in the United States today", J. Natl. Cancer Inst. 66(6), 1192 (1981).
 24. Doyle, A., Griffiths, J. B. and Newell, D. G. "Cell & Tissue Culture, Laboratory Procedures", Wiley, (1993).
 25. Rubinstein, L. V., and Shoemaker. R. H. "Comparison of in vitro anticancer drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines". J. Natl. Cancer Inst., 82, 1113-1118 (1990)
 26. Philip, S., and Ritsa, S. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening". J. Natl. Cancer Inst., 82, 1107-1112 (1990)29.
 27. Chung, W. T., Lee, S. H., Cha, M. S., Sung, N. S., Hwang, B., Lee, H. Y., "Biological Activities in roots of Glycyrrhiza uralensis Fisch", Kor. J. Medicinal Crop Sci. 9(1), 45-54 (2001)
 28. Yueran Z., Rui, S. You, L. Chunyi, G. and Zhigang, T. "Expression of

- leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300, 247-252, (2003)
29. Longchuan C. and Armen, H. T. "Identification of Distinct Signalling Pathways for Somatostatin Receptors SSTR1 and SSTR2 as Revealed by Microphysiometry", *Cell. Signal*, 11(7), 499-505 (1999)
 30. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46:849-854.
 31. Bloi MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
 32. Miller CP, Jirkovsky I, Hayhurst DA, Adelman SJ (1996) In vitro antioxidant effects of estrogens with a hindered 3-OH function on the copper-induced oxidation of low density lipoprotein. *Steroids* 61:305-308.
 33. Haraguchi H, Hashimoto K and Yagi A (1992) Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J. Agric. Food Chem.* 40 : 1349-1351.
 34. Kim NM, Sung HS, Kim WJ (1993) Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25:204-209.
 35. Oh, MH, Chung, HY, Yong, HS, Kim, KW, Chung, HY, Oura, H, and Yokozawa, T (1992) Effects of ginsenoside Rb2 on the antioxidants in SAM-R/1 mice. *Korean Biochem. J.* 25:492-497.
 36. Flohe', L and Ötting, F (1984) Superoxide dismutase assays. In *Methods in Enzymology*, Vol. 105, Packer, L. (ed.), Academic Press, pp. 93-105.
 37. Flohe', L (1989) Determination of glutathione peroxidase. In *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol. III, Miguel, J., Quintanilha, A. T., Weber, H. (eds.), CRC Press, pp. 283-284.
 38. Abei, H. (1984) Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*, Vol. 5, Packer, L. (ed.), Academic Press, pp. 121-126.
 39. Kathryn G, Zalman A and Brian RS (1996) The regulation of alcohol consumption in rats : the role of alcohol-metabolizing enzymes-catalase

- and aldehyde dehydrogenase. Alcohol 13:347-353
40. Gergel D and Cederbaum AI (1996) Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S nitrosylation and the release of zinc. Biochemistry 35:16186-16194.
 41. Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
 42. 安德均 外: 完譯 中藥大辭典, 서울, 정담출판사, pp5010-5019
 43. 서부일, 변성희 편역: 國譯本草備要, 서울, 一中社, 2000, pp55-59
 44. 沈映君: 中藥藥理學, 人民衛生出版社, 1998; pp880-884
 45. Ma, X.Q., Duan, J.A., ect., Species identification of Radix Astragali (Huangqi) by DNA sequence of its 5S-rRNA spacer domain, Phytochemistry, 2000;54(4):363-368
 46. Na, Ho&hyphen, Jeong, ect., Molecular Discrimination of Medicinal Astragali Radix by RAPD Analysis, Immunopharmacology and immunotoxicology, 2004;26(2):265-272
 47. Ying, M. et al. Effect of Total Flavonoids of Radix Astragali(TFA) on Free Radical(FR)Production by Myocardial Ischemia-Reperfusion in Rats, China Journal of Chinese Materia Medica, 1996;21(5):304-305
 48. Ling, Chen Xial et al. Therapeutic Effect of Radix Astragali on Hypoxia Pulmonary Hypertension in Rats, China Journal of Chinese Materia Medica, 1997;22(7):432-433
 49. Yunshen, H., Zhenshan, H., ect., Effects of radix astragali on myocardial angiotensin II and hydroxyproline after myocardial infarction, Journal-Hebei Medical University, 2000;.21(6):331
 50. Chu L, Shi X, Xi S. Experimental studies on improving heart preservation effect of Astragalus saponins. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 1999 Aug;19(8):481-483
 51. Wang Q. Inotropic action of Astragali membranacei Radix Bge. saponins and its possible mechanism. Chung-Kuo Chung Yao Tsa Chin-China, Journal of Chinese Materia Medica , 1992;17(9):557-559333
 52. Lee, Y.S. Han, O.K., ect., Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen

- cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 2003;84(2/3):193-198
53. Kajimura, K., Takagi, Y., ect., Pharmacological Quality of Astragali Radix; The Effect on Antibody Production in vitro, *Natural Medicines*, 1997;51(1):45-49
 54. Kajimura, K., Takagi, Y., ect., Polysaccharide of Astragali Radix Enhances IgM Antibody Production in Aged Mice, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 1997;20 (11):1178-1182
 55. Chae, Byeong Suk, Shin, Tae Yong, Effects of Astragali Radix extract on the Cell Mediated Immunotoxicity of Zinc Chloride, *Journal-Pharmaceutical Society of Korea*, 1999;43(1):98-103
 56. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi , Extracorporeal experimental study on immuno-modulatory activity of Astragalus membranaceus extract, Wang RT, Shan BE, Li QX. Department of Immunology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang, 2002 Jun;22(6):453-6
 57. Duan P, Wang ZM. Clinical study on effect of Astragalus in efficacy enhancing and toxicity reduction of chemotherapy in patients of malignant tumor, Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610016.
 58. Toda, Shizuo, Yase, Yoshiro, ect., Inhibitory effects of Astragali Radix, crude drug in Oriental medicines on lipid peroxidation and protein oxidative modification of mouse brain homogenate by copper, *phytotherapy research : PTR*, 2000;14(4): 294-296
 59. Chang W. Choi, Sei C, Kim, Soon S. Hwang, Bong K. Choi, Hye J. Ahn, Min Y. Lee, Sang H. Park, Soo K. Kim. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *PLANT SCIENCE* 2002. pp1161-1168.
 60. Cedilia K. Limdbolum "IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 929-936, (2002)
 61. Jun feng, Ci, Y. X. Gao, C. M. and Li, Y. Z. "Voltammetric behavior of living cells *T. shanghaiensis* and its bioanalytical application", *Bio-electrochemistry and Bioenergetics*, 44, 89-93 (1997)

62. Ci, Y. X., Zhang, C. Y. and feng, Jun "Photoelectric behavior of mammalina cells and its bioanalytical applications", *Bioelectrochemistry and Bio-energetics*, 45, 247-251 (1998)
63. Evance, CR, Halliwell, B and Lunt: *Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and food additives*. Portland Press, 1995, pp. 1-31.
64. Farag RS, Badei AZMA, Hewedi FM and El-Baroty: GSA Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *JAOCS* 1989;66:792-799.
65. Frei B.: *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press. San Diego. 1994, pp20-55.
66. Choe SY and Yang KH: Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxy toluene (BHT), and butylated hydroxy anisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* 1982;14:283-288.
67. Branen, A.L.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butlyated hydroxytoluene. *JAOCS*, 1975;52:59
68. Fujimoto, K. and Kaneda, T.: Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractimation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida* Bull. Jap. Soc. Sci Fish., 1990;46:1125