

애엽(艾葉)의 血液凝固抑制成分에 관한 研究

韓 龍 男·梁 賢 玉·韓 秉 勳

서울대학교 生藥研究所

(Received February 14, 1984)

Studies on the Anti-coagulant Component of *Artemisiae Herba*

Yong Nam Han, Hyun Ok Yang and Byung Hoon Han

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110, Korea

Abstract—Anti-coagulant activities of 25 species of medicinal plants which have been related to “blood” in ethnobotany, were evaluated by plasma recalcification time test. Among these, *Artemisiae Herba* showed the strongest activity. Its anti-clotting component was purified by using DEAE-cellulose, Sephadex G-75, and Sephadex LH-20 column chromatography. Its active compound has an average molecular weight of approximately 10^4 and it was turned to be an acidic polysaccharide composed of galacturonic acid and rhamnose (7 : 2) by chemical analysis and spectral data.

노인성 질환의 하나로 크게 문제가 되고 있는 혈전등의 예방과 치료를 위한 생약제제 개발의 일환으로 한방 및 민간에서 혈액질환에 사용하고 있는 생약25종에 대하여 혈장 칼슘 침가 응고 시간 측정법(plasma recalcification time test)¹⁾을 이용하여 혈장응고 억제작용을 검색하였다. 이들 생약 중에서 애엽의 물 추출물이 혈장응고 시간을 현저히 연장시켰기에 그 활성물질을 밝히기 위해 본 연구에 착수하였다.

즉, 애엽의 methanol가용부를 제거한 물 추출물에서 가장 강력한 혈장응고 억제작용을 나타내었으며, Sephadex G-25, ninhydrin반응, Dragendorff반응, anthrone반응들을 통하여 활성물질은 다당류임을 추정하였으며, DEAE-cellulose, Sephadex G-75, LH-20을 통하여 정제한 결과 acidic polysaccharide임을 알 수 있었다. 이 활성물질은 Sephadex G-75에 의하여 평균 분자량이 10,000 정도로 추정되며, 화학적 분석법 및 기기분석에 의하여 uronic acid 53.9%, rhamnose 12.9%, hexosamine 1.3%, 회분 13.2%, 수분 6.0%를 함유하는 acidic polysaccharide임을 밝혔다. 애엽의 생물활성에 대하여는 항균작용, 기관지 확장작용, 모세혈관작용이 보고되어 있으나²⁾, 혈액응고 억제작용과 그 활성물질에 관하여는 아직 보고된 바 없다.

또한, 이미 알려진 애엽의 성분으로는 (-)-thujone, α -amyrin과 그 아세테이트, ferneol, pinenes,³⁾ cineole,⁴⁾ cyclitols,⁵⁾ peroxidase,⁶⁾ iodine,⁷⁾ artemose⁸⁾ 등이 보고되어있으며, 여기서 다당류인 artemose는 조성이 glucose로 본 연구에서 밝힌 혈장 응고 억제 성분과는 다른 다당류이며, 혈장응고 억제작용에 관하여는 보고된 바 없다. heparin은 uronic acid와 N-acetyl-glucosamine이 1 : 1의 sulfated mucopolysaccharide인 반면에 애엽의 활성물질은 아직 완전히 순수분리되지는 못하고 있으나 현재까지의 지견으로서 amino sugar를 미량만 함유하고 uronic acid가 주 성분으로 된 활성물질이어서, heparin과는 전혀 다른 계열의 활성물질로 추정되어 흥미있는 물질

로 생각되어 보고하는 바이다.

實驗方法

기기 및 시약—GLC는 Hewlett-Packard GC(Model 5840A)에서 FID로, IR은 Perkin-Elmer IR (Model 281B)로 KBr disk method로, NMR은 Varian NMR(FT 80A, 80MHz)로 TMS를 표준 물질로하여 δ ppm으로 측정하였다. UV는 Gilford system 2600을 이용하였으며, ion exchange column chromatography용으로는 DEAE-cellulose(0.9meq/g, Brown Co.)를 사용하였으며, gel-filtration column chromatography용으로는 Sephadex G-25, G-75, LH-20(superfine, Pharmacia Co.)를 사용하였다. 당의 각 표준품은 Merck제를, heparin·Na은 Eastman제를 사용하였으며, 기타 다른 시약은 따로 언급이 없는 한 1급을 사용하였다.

생약의 혈장응고 억제작용의 검색—1) 생약선정 : 한방 및 민간에서 어혈, 동경, 파혈, 지혈등 혈역질환에 사용하는 아출, 울금, 사인, 형삼릉, 사간, 석창포, 당귀, 향부자, 목통, 현호색, 도인, 괴화, 백모근, 오가피, 우슬, 익모초, 구맥, 천초, 목단피, 적작약, 측백엽, 홍화, 지유, 대황, 애엽등 25종을 선택하였다.

2) 검역조제 : 선택한 이들 생약들을 분쇄하여 각 5g씩을 H₂O로 boiling water bath에서 reflux하여 4시간 가열 추출하고 최종 50ml로 한것을 검색용 검액으로 하였다.

3) 혈장응고 지연시간 측정 : 각종 생약들의 검색용 검액의 혈장응고 지연시간은 plasma recalcification time¹¹⁾에 의하여 측정하였다. Plasma의 조제는 음성 rat(200g이상)를 ether로 마취시킨 후 3.13% sod. citrate를 0.1volume 사용하여 심장에서 혈액 1 volume을 취하여 가만히 혼합한 후 3,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 혈장(citrated plasma)을 얻었다.

검액 50 μ l 또는 saline 50 μ l를 시험관에 각각 취하고 citrated plasma 100 μ l씩을 가한후 37°C에서 3분동안 preincubation하고, 37°C에서 50mM CaCl₂ 50 μ l를 가한후 shaking하였다. 이때 CaCl₂를 가할때부터 혈장중 fibrin생성이 관찰될 때까지의 시간을 측정하였다. 혈장응고 지연시간 비율(Tr)은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$Tr = \frac{T_s}{T_c} \quad \begin{array}{l} T_s = \text{Clotting time of sample} \\ T_c = \text{Clotting time of control(saline)} \end{array}$$

Sample 50 μ l +
Citrated plasma 100 μ l
↓
preincubation
37°C, 3min
50mM CaCl₂ 50 μ l
↓
37°C
measured plasma clotting time

Scheme 1—Measurement of plasma recalcification time.

애엽 추출물 분획의 혈장응고에 대한 억제 효과 측정 및 단위설정—1) 애엽의 추출물 조제 : i) 애엽을 물로만 추출한 것과, ii) methanol추출물을 물로 현탁시킨것, 그리고 iii) methanol로 추출한 후의 애엽의 잔사를 실온에서 말린후 물로 추출한 것의 혈장응고 억제 작용을 각각 검사하였다.

2) 애엽의 검액원액 조제 : 검액의 원액은 MeOH ex.를 제거한 후 건조한 애엽을 물로 추출하고 60°C 이하에서 감압하게 농축한 후 건조생약 1g당 1ml되게 증류수로 희석하여 애엽검액 원액을 조제하였다.

3) 혈장응고 억제작용의 unit설정 : Tr값이 2일때를 1 unit로 하였다.

Sephadex G-25에 의한 Gel-filtration 1) Sephadex G-25 컬럼 제조 : 0.1M NaCl로 세척하고 탈기하여 사용하였다. (1.8×146cm)

2) 예비시험용 검액 조제 : 에엽(MeOH가용부 제거) 5g/5ml H₂O를 3,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 그 상층액 3.5ml를 column에 apply하였다.

3) 용출 : 용출용매는 0.1M NaCl을 사용하였고, 각 분획은 3ml씩 취하였다. 이 분획 50 μ l를 각각 취하여 혈장응고 시간을 측정하고, 각 분획에 대해 ninhydrin반응, anthrone반응, Dragendorff반응을 실시하였다.

DEAE-cellulose Column Chromatography—1) DEAE-cellulose 컬럼제조 : DEAE-cellulose (0.90meq/g) 40g을 0.5N HCl, 0.5N NaOH로 세척한 후 0.5M NaOAc를 사용하여 Ac⁻ form을 만든 후 물로 세척하여 4×37cm의 컬럼을 만들었다.

2) 활성성분 분리용 검액의 조제 : 에엽(MeOH 가용부 제거) 200g을 boiling water bath에서 2시간동안 0.05M NaOAc 2l로 2회 추출하여, 실온에서 냉각한 후 여과한 용액을 활성성분 분리용 검액으로 하였다.

3) 흡착 및 용출 : 검액을 DEAE-cellulose 컬럼에 apply하고, 처음에는 컬럼을 H₂O 500ml로 세척한 다음, 0.1M NaOAc(pH8) 1l, 0.1M Na₂CO₃(pH11) 1.5l를 사용하여 차례로 용출시켰으며, 각 분획은 30ml씩 취하였다.

Sephadex G-75 Column Chromatography—1) Sephadex G-75 컬럼제조 : 0.1M NaCl로 세척하고 탈기하여 사용하였다. (4.0×136cm)

2) 정제용 검액조제 : DEAE-cellulose 컬럼에서 용출된 active fraction(720ml)을 H₂O 1l로 투석시킨 후 등결 건조하였다. 분말 일부(약 9,000units)를 취하여 0.1N NaCl 30ml에 용해시켜 정제용 검액으로 하였다.

3) 용출 : 0.1M NaCl 약 2l를 사용하였으며, 각 분획은 10ml씩 취하였다.

Sephadex LH-20 Column Chromatography—1) Sephadex LH-20 컬럼제조 : Sephadex LH-20을 10% 초산으로 세척한 후 다시 증류수로 세척하고 탈기한 후 컬럼을 제조하였다. (3.8×86cm)

2) 최종 정제용 검액조제 : Sephadex G-75 컬럼에서 active fraction 약 400ml를 H₂O 10l로 하룻밤 투석시킨 후 등결 건조하고 물에 녹여 5ml로 하였다.

3) 용출 : 증류수를 사용하였으며, 용출액은 7ml씩 취하였다.

중성당의 분석—1) GLC법⁹⁾ : 검체 및 당 표준품을 각각 2mg씩 ampule에 취한 후 0.5N HCl-MeOH을 각각 1ml씩 가하고 용융한 후 65°C에서 16시간 가수분해하였다. 반응 혼합물을 질소기류하에서 건조시키고 pyridine 0.5ml, TMS-imidazole reagent 0.5ml를 가하여 실온에서 30분간 방치하였다. 질소기류하에서 다시 건조하여 heptane 100 μ l로 추출하여 아래와 같은 조건에서 GLC하였다.

column: OV 17(2mm×2m), column temp.: 200°

detector temp.: 260° carrier gas: N₂ gas(10ml/min)

2) Pentose의 정량 : pentose의 정량은 orcinol method¹⁰⁾로 분석하였다.

3) Hexose의 정량 : 검체중의 hexose의 함량은 rhamnose를 표준품으로 하여 anthrone-H₂SO₄법¹¹⁾으로 분석하였다.

Uronic Acid의 분석—1) 검체중 uronic acid의 함량은 heparin(40% uronic acid 함유)을 표준품으로 하여 carbazole법¹²⁾ 및 orcinol법¹³⁾으로 분석하였다.

2) cellulose TLC에 의한 uronic acid의 확인¹⁴⁾: 검체, heparin (glucuronic acid), glucuronolactone등을 각각 4mg씩 ampule에 취한 후 Dowex 50WX2 (H⁺ form)의 0.05N HCl현탁액 (40% Dowex) 200 μ l씩 가하여 질소로 치환한 후 용봉하여 100°C에서 24시간 가수분해하고 methanol 200 μ l을 가해 희석한 후 spot하였다.

solvent: BuOH/AcOH/H₂O(50 : 12 : 25)

plate: cellulose plate

발색제 : 1.5% AgNO₃-NH₃액

Hexosamine의 분석—galactosamine-HCl을 표준품으로 하여 Elson-Morgan법¹⁵⁾으로 분석하였다.

황산의 분석—Na₂SO₄를 표준품으로 하여 benzidine법¹⁶⁾으로 분석하였다.

實驗結果 및 考察

생약의 혈장응고 억제작용의 검색결과—25종 생약의 검색용 검액에 대하여 혈장응고 억제작용을 검색한 결과를 Table I에 표시하였다. 혈장응고 억제작용을 나타낸 생약은 애엽(Tr=47.5), 지유(Tr=70), 대황(Tr=62.5)이었으며, 홍화등 7종은 (Tr=1.0)작용이 없었고, 오가피등 12종 (Tr=0.75)은 오히려 약한 혈액응고 촉진작용을 나타내었으며, 사인, 울금, 아출등(Tr=0.40)은 강한 촉진작용을 나타내었다. 한편, 지유, 대황은 혈장응고 시간 측정시 혈장단백질을 응고 또는 침전시키므로 tannin을 함유할 가능성이 있어, 혈장응고 억제작용성분 연구의 대상에서 제외하였다. (Table I)

애엽의 혈장응고 억제 성분의 용매분획—애엽의 용매분획에 대한 혈장응고 억제 작용은 Table II와 같다. 애엽의 methanol 추출물에는 억제작용이 전혀 나타나지 않았으며, 물 추출물 분획에 작용(580 units/g)이 있는 것으로 보아, 애엽의 혈장응고 억제 성분은 수용성인 물질로 판명되었다. 그러므로 메탄올 가용성 물질을 제거하고 실온에서 건조시킨 애엽을 혈장응고 억제 성분의 분리, 정제를 위한 출발원료로 하였다.

이 원료 애엽의 specific activity는 750 units/g이었다. (Table II)

애엽의 혈장응고 억제작용의 단위 설정—원료 애엽 1g을 물 10ml로 3회 추출하여 60°C이하에서 감압하에 농축하여 1g생약/ml의 농도로 조절한 용액을 원액으로 하고, 이 원액의 희석액에 대하여 혈장응고 억제율을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 애엽의 혈장응고 억제 작용의 단위는 Tr값이 2일때를 1 unit로 설정하고, 각 검액에 대한 unit계산은 아래식에 의하여 환산하였다.

검액 50 μ l의 혈장응고 억제작용의 unit; $U=2^{5.23-n}$ 단 n 는 희석배수

검액 x ml의 총 units; Total units=20 \cdot x \cdot U

Gel 여과법에 의한 혈장응고 억제 성분의 분리—애엽의 혈장응고 억제 성분의 분자크기, 성상등을 파악하기 위하여, Sephadex G-25 컬럼에 의한 gel-filtration을 실시하였다. (Fig. 2) 대부분의 활성은 void volume 부근에서 용출되었으므로 활성성분은 분자량 5,000이상인 것으로 추정되

Table I-Screening for anti-coagulant activity of medicinal plants.

Medicinal plants		$Tr\left(=\frac{T_s}{T_c}\right)^*$
<i>Artemisiae Herba</i>	(애엽)	47.5
<i>Sanguisorbae Radix</i>	(지유)	70.0**
<i>Rhei Rhizoma</i>	(대황)	62.5**
<i>Carthami Flos</i>	(홍화)	1.0
<i>Thujae Folium</i>	(측백엽)	1.0
<i>Moutan Cortex radicus</i>	(목단피)	1.0
<i>Paeoniae Radix rubra</i>	(적작약)	1.0
<i>Rubiae Radix</i>	(천초)	1.0
<i>Leonuri Herba</i>	(익모초)	1.0
<i>Dianthi Herba</i>	(구맥)	1.0
<i>Acanthopanax Cortex</i>	(오가피)	0.75
<i>Achyranthis Radix</i>	(우슬)	0.75
<i>Imperatae Rhizoma alba</i>	(백모근)	07.5
<i>Sophorae Flos</i>	(피화)	0.75
<i>Akebiae Caulis</i>	(목통)	0.75
<i>Persicae Semen</i>	(도인)	0.75
<i>Corydalis Tuber</i>	(현호색)	0.75
<i>Cyperi Rhizoma</i>	(향부자)	0.75
<i>Angelicae gigantis Radix</i>	(당귀)	0.75
<i>Sparganii Rhizoma</i>	(형삼능)	0.75
<i>Belamcandae Rhizoma</i>	(사간)	0.75
<i>Acori graminei Rhizoma</i>	(석창포)	0.75
<i>Amome Semen</i>	(사인)	0.40
<i>Curcumae Rhizoma</i>	(울금)	0.40
<i>Zedoariae Rhizoma</i>	(아출)	0.40

* Tr =Clotting time ratio of sample(T_s) to saline (T_c)

** Protein precipitation

었다. 이 분획은 또한 ninhydrin반응, Dragendorff 반응에 음성이었으므로 peptide, alkaloid는 아닐을 알 수 있었고 anthrone 반응에서는 양성이었으므로 다당류로 예측하였다.

애엽의 혈장응고 억제 성분의 정제—DEAE-cellulose 컬럼에 의한 분리 : 애엽 200g의 물추출물(약 3l)을 DEAE-cellulose 이온교환수지에 통과시키고 실험부에서와 같이 용출시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 활성물질이 0.1N Na_2CO_3 부분에 용출되는 것으로 보아 산성 다당류임을 알 수 있었다.

Table II-Anticoagulant activities of methanol and water-extracts of *Artemisiae Herba*.

Fractions	Specific activity (units/g crude drug)
MeOH extract	0
Water ex. without methanol extraction	580
Water ex. with methanol extraction	750

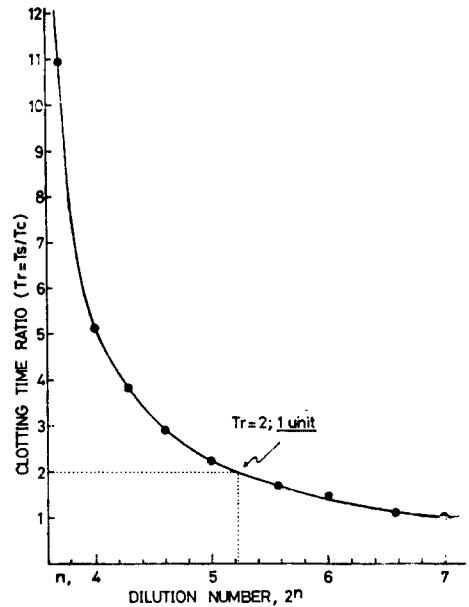


Fig. 1- A dilution curve for determining the anti-coagulant activity of *Artemisiae Herba*.

The water extract obtained from one gram of the dried crude drug was dissolved in water to one ml solution, and then serial dilutions were tested by plasma recalcification time. The anticoagulant activity unit was defined as dilution number when serial dilution made clotting time ratio(Tr) of sample(T_s) to saline(T_c) to be two.

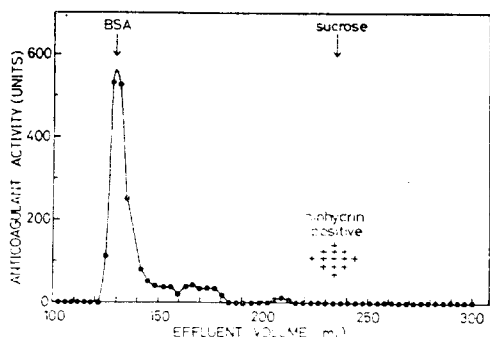


Fig. 2-Gel filtration of *Artemisiae Herba* extracts on a column of Sephadex G-25.

The water extracts (3.5ml) were applied on a column of Sephadex G-25 (1.8×146cm) equilibrated with 0.1M NaCl. Aliquots of each effluent were tested for clotting time and color reactions by ninhydrin, Dragendorff and anthrone reagents. The elution positions of serum bovine albumin (BSA) and sucrose, used as markers, are indicated by arrows.

Fig. 3에서 표시한 활성물질 분획 (720ml, 9.9×10^4 units)을 모아 투석시킨 후 동결건조하였다. Sephadex G-75에 의한 gel-filtration: DEAE-cellulose 컬럼에서 얻은 활성물질 일부 (9,000 units)를 취하여 Sephadex G-75에 의한 gel-filtration을 실시하였다. Fig. 4에서와 같이 활성물질은 분자량 약 30,000~5,000 부근에서 용출되었다. 평균분자량은 약 10,000 부근에서 최

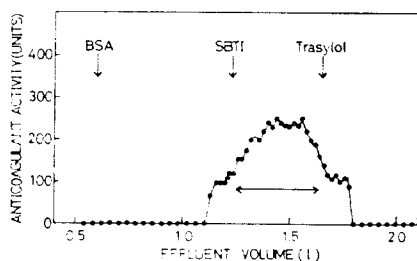


Fig. 4-Purification of anticoagulant component by gel-filtration on a Sephadex G-75 column.

An aliquot (9,000 units) of the lyophilized sample obtained from DEAE-cellulose column was dissolved into 0.1M NaCl 30ml, and gel-filtered on a Sephadex G-75 column (4×136cm) equilibrated with 0.1M NaCl. The fractions indicated by arrow bar were combined, dialyzed and lyophilized. The BSA, soybean trypsin inhibitor (SBTI) and trasylol, used as markers, are indicated by arrows.

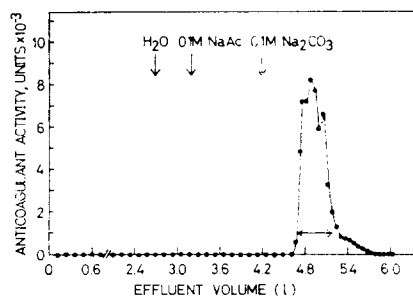


Fig. 3-Purification of anticoagulant component by DEAE-cellulose column chromatography.

The dried drug (200g) freed from methanol-soluble fraction were extracted twice with water 2l for 2hrs on a boiling water bath. And the combined extracts cooled were applied to a column (4×37cm) of DEAE-cellulose (Brown Co., 40g, 0.90 meg/g). DEAE cellulose was used as acetate form by the previous treatment with 0.5M NaOH and 0.5M sod. acetate. The column was washed with water and 0.1M sod. acetate, and then eluted with 0.1M Na_2CO_3 . The fractions indicated by arrow bars were combined, dialyzed and lyophilized.

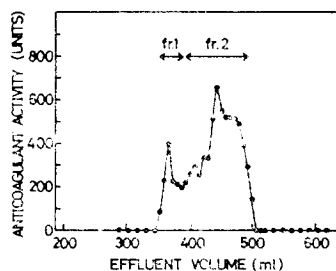


Fig. 5-Gel filtration of purified sample on a Sephadex LH-20 column.

The lyophilized sample obtained from a Sephadex G-75 column was dissolved into 5ml water, and applied to a Sephadex LH-20 column (3.8×86cm) washed with distilled water. Fraction 2, with main activity was lyophilized and used for chemical and spectral analysis.

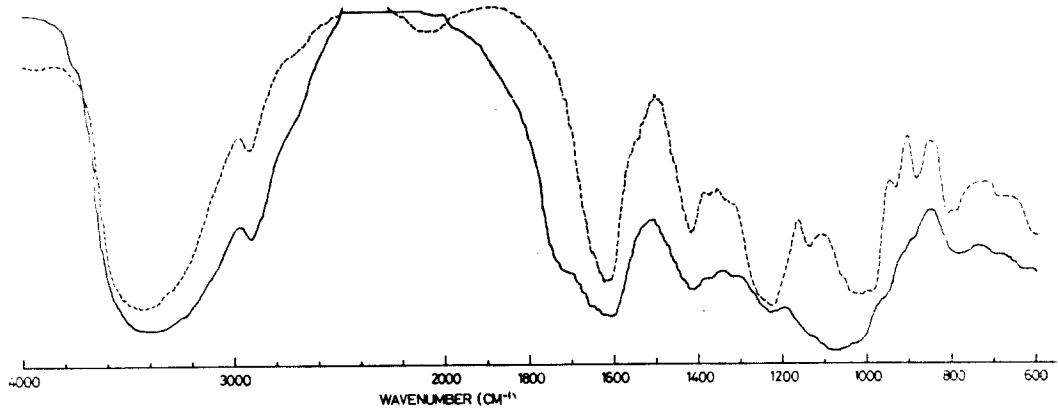


Fig. 6-IR spectra of the purified component andi sodium heparin.
(—) sample, (.....) sod. heparin(Eastman)

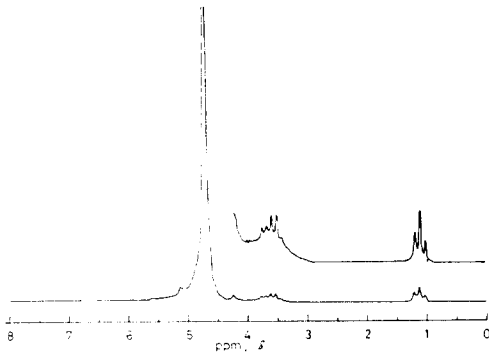


Fig. 7-NMR spectrum of the purified component (solvent; D₂O).

대활성을 나타내었다. Fig. 4에서 표시한 분획 (약 400ml)을 투석한 후 동결건조하였다.

Sephadex LH-20에 의한 Gel-filtration: Sephadex G-75에서 얻은 활성물질 중에 함유되어 있을지도 모르는 무기물, 저 분자성 물질들을 제거하기 위하여 증류수를 용매로 하여 Sephadex LH-20으로 계속 정제하였다. Fig. 5에서와 같이 활성물질은 수개의 peak로 용출되었으며 분획 1, 2를 모아 동결 건조하였다. 분획 1은 물에 난용성이었고, 분획 2에 비해 소량이며 활성도 또한 낮아 분획 2를 최종으로 정제한 검체로 하여 성분분석을 시도하였다. (specific activity: 20,500 units/g)

정제한 활성성분의 기기 분석—정제한 활성성분의 IR 및 NMR spectra를 Fig. 6, 7에 나타내

Table III-Analysis of neutral sugar of the acidic polysaccharide by GLC.

Compound	t_R (min)	
Rhamnose	5.85,	6.50
	7.14,	8.52
Sample	5.81,	6.50
	7.12,	8.50

Table IV-Components of the acidic polysaccharide.

Components	Method	Percentage
Uronic acid	Carbazole (C)	12.9
	Orcinol (O)	53.9
		(C/O=0.24)
Rhamnose	Anthrone-H ₂ SO ₄	12.9
Hexosamine	Elson-Morgan	1.3
SO ₄ ²⁻	Benzidine	0.13
Ash		13.2
H ₂ O		6.0

었다.

IR에서 활성성분은 heparin(Na염)과 극히 유사한 spectrum을 보여주고 있다. $3,400\text{cm}^{-1}$ 에서 알콜성 OH, $3,300\sim 3,000\text{cm}^{-1}$ 에서 COOH의 OH, $1,700\text{cm}^{-1}$ 부근에서 지방산의 COOH, $1,610\text{cm}^{-1}$ 부근에서 COO^- 의 존재를 확인하였다. 또한 $1,230\text{cm}^{-1}$ 에서 SO_4^{2-} 의 S=O 흡수를 약하게나마 관찰할 수 있었다.

NMR ($\delta_{ppm}^{\text{D}_2\text{O}}$)에서는 1.04~1.22에 rhamnose의 6번 탄소의 수소로 추정되는 3개의 peak와 3.45~

3.90에서 수산기가 결합된 탄소의 수소($\begin{array}{c} \text{OD} \\ | \\ \text{---C---} \\ | \\ \text{H} \end{array}$)의 peak를 관찰하였다.

또한 활성물질은 지질, 아미노산이 함유되어 있지 않은 산성 다당류(acidic polysaccharide)임을 알 수 있었다.

정제한 활성성분의 조성 분석—1) GLC에 의한 증성당의 분석: 정제한 검체를 methanolysis한 후 TMS9하여 GLC한 결과를 Table III에 나타내었다. Table III에서와 같이 검체에서 rhamnose를 확인하였다.

2) 활성물질의 성분분석: 활성물질의 조성성분의 분석결과를 Table IV에 요약하였다. 이 물질은 uronic acid를 다량(53.9%) 함유하고 있으며, 그 다음으로는 rhamnose(12.9%)를 함유하고 있고, hexosamine 및 황산은 거의 무시할 수 있을 정도였다. 또한 pentose는 orcinol법에 의하여 전혀 함유되어 있지 않음을 알았다.

3) Uronic acid의 종류: 검체를 0.05N HCl 존재하의 Dowex 50WX2(H^+ form)로 가수분해한 후의 cellulose plate상에서 TLC하여 galacturonic acid로 추정되는 spot를 확인하였다.

結 論

1. 한방에서 “血”과 관련된 약물로 기술된 생약 25종에 대하여 plasma recalcification time test에 의하여 애엽, 지유, 대황이 강력한 혈장응고 억제 생약임을 밝혔다.

2. 애엽의 활성 성분 분리를 시도한 결과 uronic acid와 rhamnose를 주성분으로 하는 분자량 10,000 내외의 산성 polysaccharide임을 밝혔다.

文 獻

1. A.J. Quick, M. Stanley-Brown and F.W. Bancroft, A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am. J. Med. Sci.* **190**, 501 (1935).
2. 岡本友男, 大住伸, 今岡巖, 倉本昌明, 木村彰, *Artemisia vulgaris*의 藥理學的 研究(第1報) 化學的 定性試驗および一般藥理作用について. *日本藥理學雜誌* **60**, 97§ (1964).
3. S.K. Kundu, A. Chatterjee and A.S. Rao, Chemical investigation of *Artemisia vulgaris*. *J. Indian Chem. Soc.* **46**, 584 (1969).
4. S. Kohlmuenger, A search for plants containing cineole in Polish and foreign flora I. *Dissertationes Pharm.* **12**, 143 (1960).
5. R. Scholda, G. Billek and O. Hoffman-Ostenhof, The biosynthesis of cyclitols, III. Formation of methyl ethers of L-inositol form mesoinositol in leaflets of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia dracuncululus*. *Monatsh* **95**, 541 (1964).
6. G.G. Sadvakasova, Study of the peroxidase activity of wormwood with respect to vegetation phases. *Deposited Doc. VINITI* 4933-81, 10 (1981).

7. T.P. Ryukhina, Iodine content in water, soil, and plants of collective farms and state farms in the Kalinin and Torzhok districts of the kalinin Region. *Tr. Kalinisk. Med. Inst.* 10, 24 (1963)
8. H. Ono, Artemose, a polysaccharide obtained from *Artemisia vulgaris*. *Kyushu Mem. Med. Sci.* 3, 27 (1952).
9. V.N. Reinhold, Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins. *Methods in Enzymology* 25, 244 (1972).
10. H.G. Albaum and W.W. Umbreit, *J. Biol. Chem.* 167, 369 (1947).
11. D.L. Morris, Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone reagent. *Science* 107, 254 (1948).
12. T. Bitter and H.M. Muir, *Anal. Biochem* 4, 330 (1962).
13. J.X. Khym and D.G. Doherty, The analysis and separation of glucuronic and galacturonic acids by ion exchange. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 3199 (1952).
14. P. Hoffman, A. Linker and K. Meyer, Uronic acid of chondroitin sulfate B. *Science* 124, 1252 (1956).
15. L.A. Elson and W.T.J. Morgan, A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.* 27, 1824 (1933).
16. C.A. Antonopoulos, A modification for the determination of sulfate in mucopolysaccharides by the benzidine method. *Acta. Chem. Scand.* 16, 1521 (1962).