大韓韓方內科學會誌 : 第19卷 第2號
K.I.M.S. Vol 19, No. 2, 1998

白何首烏의 抗酸化活性과 amino acid의 分布에 관한 實驗的 硏究

한기선 · 신길조 · 이원철 · 이종형*

Ⅰ. 緖 論

여러 가지 難治性 病態 生理現狀이나 自家毒性 現狀을 일으키는 과정에서 free radical이 關與한다는 比較的 새로운 學說이 說得力 있게 받아들여지고 있으며, 老化를 비롯한 癌, 高血壓 等의 成人病이 free radical 및 膜脂肪質의 過酸化와 直接的인 關聯이 있다는 報告에 根據하여 free radical의 生成 및 脂質 過酸化를 抑制하는 天然 藥物에 對한 硏究가 國內外에서 活發히 進行되고 있다[1,2]

白何首烏는 性은 微溫無毒하고 味는 苦甘하며 澁하고 補肝腎, 强筋骨, 益精血, 安心神 等의 效能으로 久服時 壯筋骨, 黑毛髮, 延年不老하는 滋養强壯의 要藥으로 記錄되어 있다[3-10]. 지금까지 報告된 白何首烏에 關한 實驗的 硏究로는 免役 抑制 沮害作用, 細胞性 및 體液性 免役反應 增加 效果, interleukin과 lymphocyte 增加 效果, 마우스 急性 毒性 및 亞急性 毒性에 미치는 影響 등이 보고된 바 있으며[11-14], 最近에는 李[15]가 總抽出物 및 알카로이드분획의 部分的인 抗酸化活性을 報告 했을 뿐, 國內外的으로 活性에 關한 硏究가 미흡하다. 成分 硏究로는 지금까지 25種의 steroidal glycosides가 報告되어 있다[16-20].

한편 free radical이 炎症發現에 關與하는 酵素와도 密接한 關係가 있다는 사실에 근거하여 白何首烏의 消炎 效果에 대한 硏究의 必要性도 있다. 또한, 現在 유통과정상 自然産의 供給이 쉽지 않고, 栽培産은 栽培面積과 生産量의 증가로 供給이 圓滑함에 따라 栽培産을 주로 使用하고 있는데, 自然産과 栽培産에서 이러한 抗酸化活性이 어떤 差異를 나타내는지를 檢討할 필요가 있다.

그러므로 臨床에서 補養劑로 活用되고 있는 自然産 白何首烏와 栽培産 白何首烏가 抗酸化活性에 미치는 影響을 觀察하고자 脂質過酸化의 抑制作用, free radical 生成酵素인 aldehyde oxidase와 xanthine oxidase의 活性 抑制效果 및 炎症誘發에 關與하는 酵素인 5-lipoxygenase 活性 抑制作用을 檢討하고 나아가 白何首烏의 amino acid에 대한 定性 및 定量分析을 通하여 自然産과 栽培産의 比較를 試圖하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

白何首烏(*Cynanchum wilfordi*)의 뿌리를 市中에서 購入 精選한 후 細切하여 使用하였다.

* 동국대학교 한의과대학 내과학교실

2) 試藥

① 5-Lipoxygenase assay 용

Arachidonic acid solution(24mM)

: 10.00㎎ arachidonic acid(Sigma) +1.37㎖ methanol

Ca-Ionophore solution

: 10.47㎎ Ca-Ionophore(Sigma)+1.0㎖DMSO p.a.(Merck)

Histopaque 1077(Sigma)

Lonapalene (Prof. Dr. G. Wurm, University of Berlin, Germany)

NDGA-solution

: 1.21mg NDGA(Sigma) + 1.0㎖ methanol

PGB_2-solution

: 0.40mg PGB_2(Sigma) + 10.0㎖ methanol

Acetonitlile, methanol, tetrahydrofuran: HPLC quality

Isotonic PBS(Phosphate Buffered Saline) solution:

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1.00 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.15 g
KH_2PO_4	0.20 g
H_2O bidistilled	ad 1000.00 ㎖

Hypertonic PBS solution:

NaCl	24.00 g
KCl	0.60 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	3.00 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.45 g
KH_2PO_4	0.60 g
H_2O bidistilled	ad 1000.00 ㎖

EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) solution :

Na_2-EDTA $\cdot 2H_2O$	2.87 g
NaCl	0.21 g
H_2O bidistilled	ad 1000.00 ㎖

$CaCl_2$ solution:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.147 g
NaCl	0.800 g
H_2O bidistilled	ad 1000.00 ㎖

Inhibitor solution:

Methanol	100 ㎖
Acetonitrile	100 ㎖
NDGA-solution	0.4 ㎖(1.21mg/㎖ MeOH)
PGB_2-solution	0.3 ㎖

② Antioxidative activity assay 용

Malondialdehyde(MDA), sodium dodesyl sulfate, xanthine oxidase, xanthine sodium salt, N-methylnicotinic acid amide(NMN), 2-thiobarbituric acid(TBA), bovine serum albumin은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 모두 국산 특급품을 사용하였다.

3) 動物

實驗動物은 외관상 건강한 250g 내외의 수컷 Sprague-Dawley계 rat를 사용하였으며 實驗前 16시간 동안 물만 주고 絶食시켜 사용하였다. 소의 血液은 屠殺場에서 직접 採取한 新鮮한 血液을 사용하였다.

4) 機器

HPLC(Pump: Kontron 420, Detection: Kontron Uvikon 735LC/Kontron HPLC Detector 430, Injection system: Rheodyne), Refrigerated centriguge (Hanil supra 22K), Ultracentrifuge(Dupont Sorval OTD 65B), Spectrophotometer (Shimadzu 2021), Rotary evaporator (Eyela NE), Freezer dryer (WKfLO5), Cell counter(Sysmex microcellcounter CC-130), RP18-Extraction column (Baker), Incubator(Heraeus B 5060 EK/CO2), Centrifuge(Hettich Roto Silenta III, Do Pont Sorvall RC-5, Heraeus Megafuge 1.0R), Automatic Amino Acid

Analyzer(Waters Pico Tag System)

2. 方法

1) 白何首烏 抽出物의 製造

白何首烏(自然産 및 栽培産)의 뿌리 각 100g을 粉末로 만들어 500㎖의 증류플라스크에 넣고 methanol 300㎖를 가한 다음, 80℃에서 2時間 加溫하면서 각각 3회 反復 抽出하였으며, 抽出液을 모아 濾過한 후, 濾液을 rotary evaporator를 이용하여 濃縮한 다음, freezer dryer로 完全乾燥 시켰다. 抽出物은 自然産에서 35.2g, 栽培産에서는 14.5g이 얻어졌다(Fig. 1).

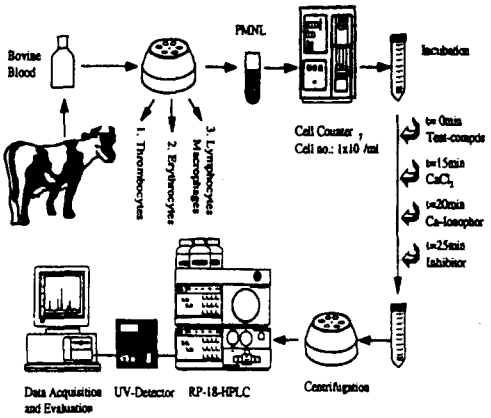
Roots of *Cynanchum wilfordi*(100g)
↓ extracted with hot methanol, filtered
Methanol solutions
↓ thoroughly evaporated *in vacuo*
Methanol extracts

Fig. 1. Preparation of the total extracts of both roots of *Cynanchum wilfordi*

2) 5-Lipoxygenase activity의 測定

① Granulocyte의 分離

도살장에서 구입한 신선한 소 血液 1ℓ에 EDTA 100㎖를 가한다. 200x*g*에서 20분간 遠心分離한 다음, 上層의 platelet-rich plasma를 吸入器를 이용하여 주의 깊게 除去하였다. 얻어진 erythrocyte를 蒸溜水 400ml로 약하게 진탕하면서 세척하였다. 30초 후에 200ml의 hypertonic PBS용액을 加하고 混液을 485x*g*에서 10분간 遠心分離하였다. 얻어진 pellet을 少量의 isotonic PBS용액으로 다시 현탁시키고 485x*g*에서 10분간 원심분리하였다. 이 때, 얻어진 cell을 25ml의 isotonic PBS溶液으로 다시 현탁시킨 다음, 10ml의 Histopaque 1077에 조심스럽게 混合하였다. 이 混合物을 675x*g*에서 45분간 遠心分離하여 lymphocyte와 monocyte를 제거하였다. 남아 있는 erythrocyte를 pellet으로부터 除去하고 20㎖의 isotonic PBS용액으로 세척한 다음, 100x*g*에서 20분간 遠心分離하였다. 이상의 全體 過程은 室溫에서 수행하였다(Fig. 2).



PMNL: polymorphonuclear leukocyte

Fig. 2. Schematic representation of the 5-lipoxygenase test system.

② Cell counting

정제된 granulocyte를 30㎖의 isotonic PBS용액으로 현탁시켰다. 이중 0.1㎖를 취하고 isotonic PBS용액을 가하여 전체가 10.0㎖가 되도록 하였다(granulocyte suspension).

이 현탁액으로부터

(a) 0.1㎖를 취하여 isotonic PBS용액으로 25.00㎖가 되게 한다.

(b) 0.2㎖를 취하여 isotonic PBS용액으로 25.00㎖가 되게 한다(대조용).

細胞 培養을 위한 granulocyte suspension의 量은 isotonic PBS용액으로 稀釋시켜 1㎖에 10^7개의 세포가 들어 있는 濃度로 製造하며 다음 公式으로 計算하였다.

$$A(㎖) = 30 \times (5Z-1)$$

A : 배양할 granulocyte suspension의 양(㎖)
Z : (a)에서 측정된 세포수

③ 細胞 培養

2.4㎖의 granulocyte suspension에 DMSO (대조용) 10㎕나 測定試料 溶液(isotonic PBS 溶液으로 稀釋) 10㎕를 넣고 37℃에서 15분간 shaking water bath상에서 培養하였다. 여기에 $CaCl_2$ 0.6㎖를 가하고 5분 후에 Ca-Ionophore 용액 3㎕를 가하면서 37℃에서 총 10분간 培養시켰다. 培養이 시작된 時點에서 25분 후에 酵素 反應을 中止시키기 위하여 NDGA를 含有한 methanol-acetonitrile 1:1 溶液 3.0㎖를 가하고 HPLC를 위한 內部 標準物質로 prostaglandin B_2(PGB_2) 0.3μM을 加하였다. 全體 培養混液을 ice bath에 20분간 넣어 둔 다음, 0℃에서 15분간 (4000x*g*) 遠心分離하였다(Table Ⅰ).

Tabie Ⅰ. Incubation Procedures and Sample Preparation

Time(min.)	Addition
0	10㎕ DMSO(control) or 10㎕ test samples
15	0.6㎖ CaCl2 solution
20	3㎕ Ca-Ionophore solution
25	3.0㎖ inhibitor solution

④ 역상 HPLC분석

(1) RP18-extraction column을 5㎖ methanol로 2회 세척하고 다시 물 5㎖로 세척한다.
(2) 배양액을 물 5㎖로 희석하여 위의 column에 통과시킨다.
(3) column을 물 5㎖로 2회 세척한다.
(4) methanol 1㎖로 3회 전개시킨다.
(5) column을 통과한 용액을 물 3㎖로 희석하고, 이중에서 2㎖를 HPLC에 주입하여 chromatogram을 얻는다.

3) Aldehyde oxidase 酵素源의 調製

Aldehyde oxidase의 酵素源은 Rajagopalan 등의 방법[21]을 應用하여 제조하였다. 흰쥐를 개복한 후, 腹部大動脈으로부터 血液을 채취하고 0.9% saline으로 貫流시킨 肝臟을 摘出하여 saline에 씻은 다음 濾紙로 乾燥시켰다. 肝組織 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 氷冷下에서 homogenizer로 磨碎하였다. 이 磨碎均質液을 600x*g*에서 10분간 遠心分離하여 核 및 未磨碎部分을 除去한 上澄液을 얻고 이것을 다시 1시간 동안 超遠心分離하여 cytosol fraction을 분리하였다. 이 fraction을 aldehyde oxidase 酵素活性 測定을 위한 酵素源으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0-4 ℃에서 행하였다(Fig. 3).

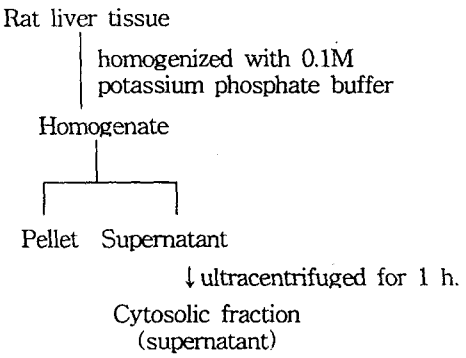


Fig. 3. Preparation of enzyme source

4) Aldehyde oxidase 活性 測定

Rajagopalan등의 방법[21]에 의해 potassium phosphate buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 N-methylnicotinic acid amide(NMN) 1.5 mM과 酵素液을 添加해 37℃에서 20분간 反應시킨 다음, 20% trichloroacetic acid를 가해 反應을 終了시켰다. 生成된 6-pyridone을 波長 300nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 activity를 算定하였다. 酵素의 活性度는 6-pyridone의 量을 nmole로 나타내었다.

5) Xanthine oxidase (Type O) 活性 測定

酵素의 精製는 Nelson등의 방법[22]을 이용하였다. 酵素活性 測定은 Stripe등의 방법[23]에

준해 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 xanthine 60μM 및 酵素源을 添加하여 37℃에서 5분간 反應시킨 다음, 20% TCA(tricarboxylic acid)를 가하여 蛋白質을 除去시키고 遠心分離하였다. 이때 生成되어진 uric acid를 波長 292nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性度를 算定하였다. 한편 xanthine dehydrogenase (Type D)의 活性은 Type O의 活性 測定 反應液에 coenzyme인 NAD^+ 100mM을 添加해 同一하게 反應시킨 다음, 測定하여 나온 活性度 (Total Type: Type D+O) 에서 Type O의 活性을 뺀 값으로 算定하였다. 酵素의 活性度는 1분당 1mg의 蛋白質이 生成시킨 uric acid 量을 nmole로 나타내었다. 한편 xanthine oxidase의 型轉換比 算出은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase의 反應에서 얻어진 酵素의 活性度를 이용하여 xanthine dehydrogenase (Type D)에서 xanthine oxidase (Type O)로의 型轉換 比率을 O/O+D의 比로 算出하였다.

6) 過酸化脂質 含量 測定

Ohkawa등의 방법[24]에 따라 腦, 腎臟, 肝臟의 組織 磨碎均質液 一定量에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% 2-thiobarbituric acid(TBA) 溶液을 가해 95 ℃에서 1시간 反應시키고 室溫으로 冷却하였다. 生成된 紅色의 TBA reactive substance를 n-butanol:pyridine 15:1의 混液으로 이행시켜 波長 532nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 定量하였다. 過酸化脂質의 含量은 組織 1g當 malondialdehyde (MDA)의 量을 nmole로 나타내었다.

7) Amino acid의 定性 및 定量

適當量의 抽出物을 蒸溜水에 1/1000로 稀釋한 다음, 10μℓ의 試料를 취해 vial에 넣고 乾燥시켰다. 完全 乾燥 후, PITC(phenylisothiocyanate)로 誘導體化 反應을 시킨 다음, 200μℓ의 溶媒 (solvent A)에 녹였다. 이 溶液을 microfilter 한 후, HPLC의 autosampler에 넣어 injection 하였다. HPLC의 condition은 다음과 같다.

column : Pico Tag 8.5x300mm, Oner Temp.: 46℃, Pump: Waters 510, Injector: Waters 712 WISP, Photodiode array detector: Waters 990(254nm), Solvent A: 1.4mM NaOAc+0.1% TEA+6% CH_3CH(adjusted pH 6.3), Solvent B: 60% CH_3CN, Elution: Linear gradient of solvent B (0-100%), Flow rate: 1.0㎖/min, Run time: 25min, Equilibration time: 10min, Injection volume: standard 4μℓ /samples 10μℓ.

8) 總窒素의 定量

무수시료 1g을 Kjeldahl플라스크에 넣고 分解觸媒(황산 마그네슘과 황산구리를 9:1로 혼합) 10g과 진한 황산 20㎖를 가한 다음, 색깔이 靑色 또는 黃綠色이 될 때까지 加熱한다. 冷却한 分解液에 물 200㎖를 加한다. 3-4방울의 지시약(methylred 0.2% ethanol용액과 methylene blue 0.1% ethanol용액을 동량혼합)을 가한 0.1N 황산 25㎖를 삼각플라스크에 넣고 Kjeidahl蒸溜裝置를 설치한다. 여기에 80㎖의 NaOH를 재빨리 가하고 입자형 아연을 3개 넣는다. 약 150㎖의 蒸溜液을 받은 다음, 加熱을 中止한다. 암모니아로 중화되지 않고 남아있는 여분의 황산을 定量하기 위하여 0.1N NaOH(표준용액)로 적정하고, 동시에 25㎖의 0.1N 황산(표준용액)을 취하여 바탕시험을 한다. 試料의 總窒素 및 粗蛋白質 含量은 다음 공식에 의해 산출한다.

시료의 질소함량(mg) = 1.400 x (b - a) x f
조단백질의 함량(mg) = 질소함량 x 6.25

a : 0.1N NaOH(농도계수 f)의 적정값(㎖)
b : 바탕 시험에서 소비된 0.1N NaOH의 ㎖수

9) Data의 分析

抗酸化活性 測定時의 蛋白質 定量은 Lowry 등의 方法[25]에 따라 bovine serum albumin을 標準品으로 使用하여 定量하였으며 實驗結果의 有意性 檢證은 Student's *t*-test를 利用하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 5-Lipoxygenase 活性抑制效果 比較

5-Lipoxygenase에 의한 arachidonic acid의 代謝産物중에서 炎症發現에 가장 중요한 LTB_4 (leucotriene B_4)의 抑制效果를 對照群과 比較했을 때, 白何首烏 自然産은 1.0mg/㎖투여시, 7.75±0.56%의 抑制 效果를 나타낸 데 비하여, 栽培産은 同量에서 1.08±0.12%를 보임으로써 自然産이 栽培産보다 7배 이상 效果가 强한 것으로 나타났다(Fig. 4). Fig. 5는 HPLC로 3회 測定된 chromatogram중 하나를 대표적으로 比較하여 나타낸 그림이다.

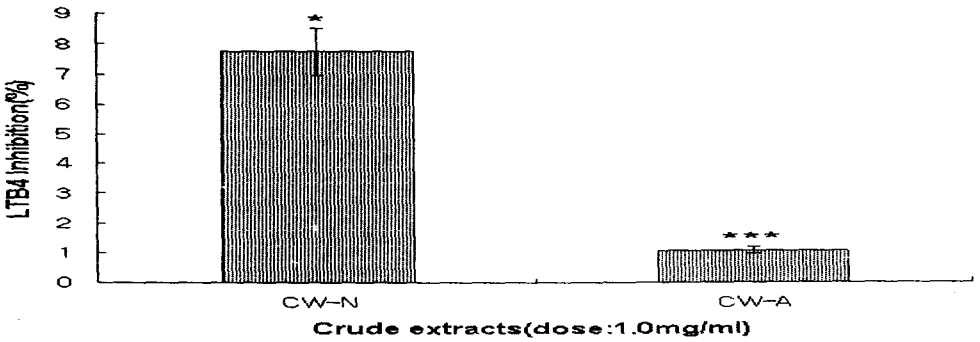
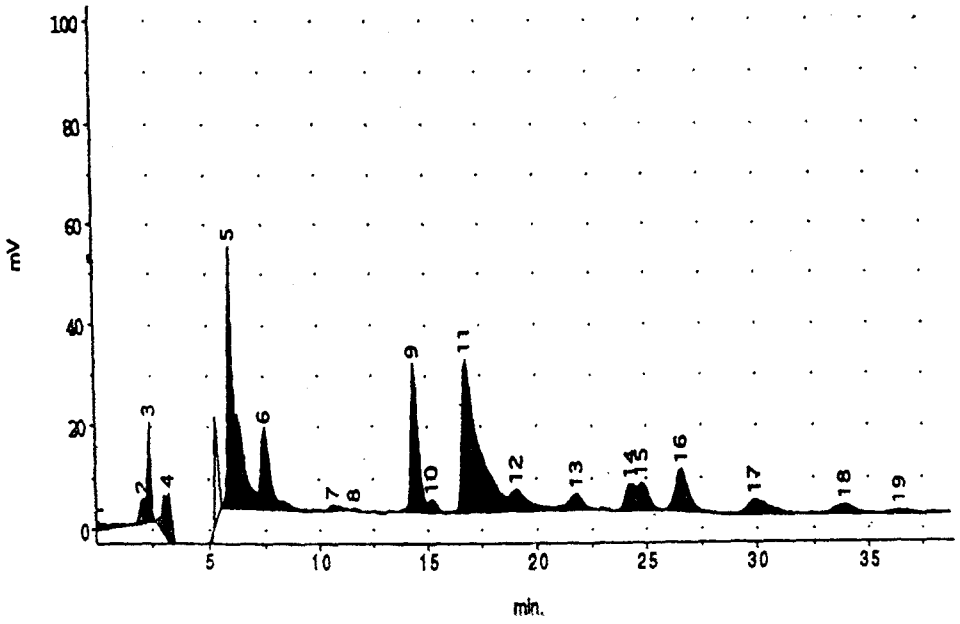


Fig. 4. Inhibition on 5-lipoxygenase activity in bovine PMNL (polymorphonuclear leukocyte) of wilding(CW-N) and cultivating(CW-A) roots of *Cynanchum wilfordi*.
Significantly different from control. (* : $p<0.05$, *** : $p<0.001$)



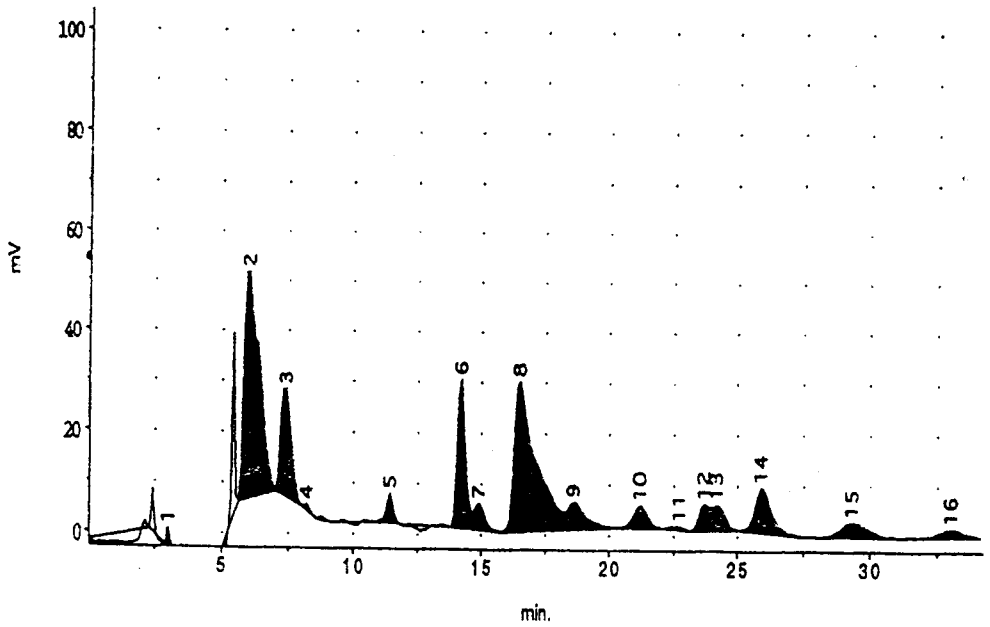


Fig. 5. Comparison of HPLC chromatograms of the wilding(upper) and cultivating(below) roots of *Cynanchum wilfordi*.
PGB_2(14.4 mim.): peak 9(CW-N), peak 6(CW-A)
LTB_4(26.3 mim.): peak 16(CW-N), peak 14(CW-A)

2. Aldehyde oxidase 活性抑制效果 比較

白何首烏 自然産과 栽培産이 rat의 肝 aldehyde oxidase의 酵素活性에 미치는 影響을 檢討한 結果, 두 抽出物의 用量을 增加시키면서 투여했을 때, 모두 酵素活性이 用量 依存的으로 抑制됨을 觀察할 수 있었다. 0.05mg/㎖와 0.1mg/㎖의 濃度에서는 自然産과 栽培産 모두 對照群1.27nmoles에 비해 큰 抑制 效果를 나타내지 않았으나 0.5mg/㎖와 1.0mg/㎖에서는 有意性 있는 抑制를 보였으며 특히, 自然産 抽出物이 각각 1.12nmoles와 0.80nmoles로 큰 減少를 나타내었다. 그리고 전반적으로 自然産이 栽培産보다, 특히 높은 用量에서 보다 强한 酵素活性 抑制 效果를 나타내었다(Table II, Fig. 6).

Table II. Inhibitory Effects of the Wilding and Cultivating root of Cynanchum wilfordi on Hepatic Aldehyde Oxidase Activity in Rat Liver.

Dose of extract (mg/㎖)	6-pyridone nmoles/mg protein/min.	
	wilding root	cultivating root
0(control)	1.27 ± 0.10	1.27 ± 0.05
0.05	1.24 ± 0.08	1.25 ± 0.10
0.1	1.21 ± 0.09	1.22 ± 0.08
0.5	1.12 ± 0.04*	1.20 ± 0.08
1.0	0.80 ± 0.05**	0.95 ± 0.06*

Significantly different from control.
(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)

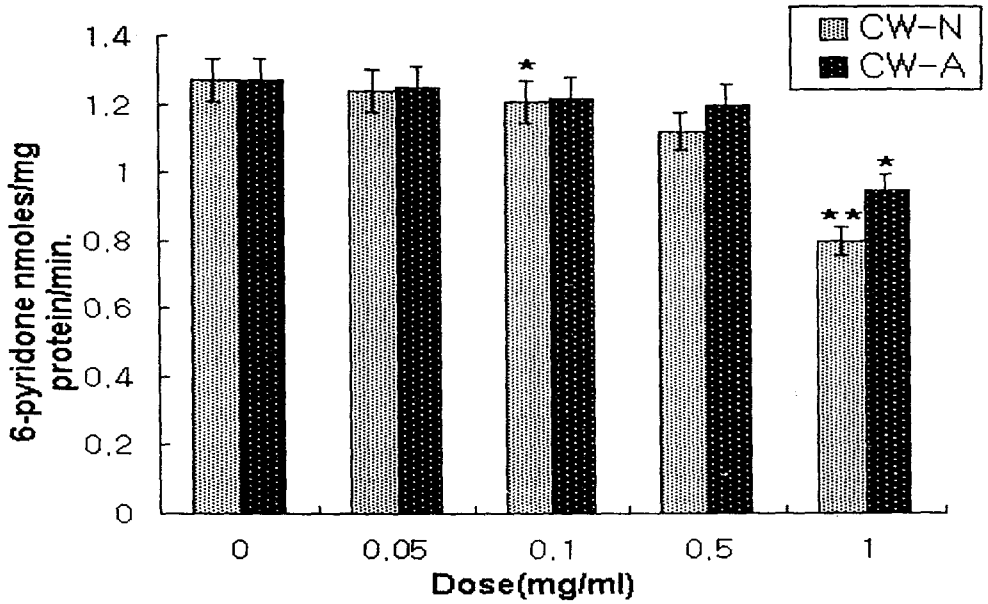


Fig. 6. Inhibitory effects of the wilding (CW-N)and cultivating root(CW-A) of *Cynanchum wilfordi* on hepatic aldehyde oxidase activity in rat liver. Significantly different from control. (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)

3. Xanthine oxidase 活性抑制效果 比較

自然産과 栽培産 抽出物에 의한 肝 xanthine oxidase活性 變化를 보면, Type O (oxidase)는 自然産의 경우, 1.0mg/㎖의 濃度에서 對照群0.38 nmoles에 비하여 13.2% 減少하였으며 栽培産은 같은 濃度에서 對照群 0.37nmoles에 비하여 13.5%의 減少를 보여 주었다. 두 抽出物에 있어서 xanthine oxidase型 轉換比는 自然産이 13.7%, 栽培産이 14.2%로 對照群에 비하여 큰 減少를 나타내지 않았다.

Type D+O(dehydrogenase+oxidase)의 경우에도 두 抽出物 모두 對照群에 비하여 큰 變化를 보이지 않았다(Table Ⅲ, Table Ⅳ).

Table Ⅲ. Effect of the Wilding root of Cynanchum wilfordi on the Hepatic Xanthine Oxidase Activity.

Dose (mg/㎖)	Specific Activity#		Type Conversion ratio (%)
	Type O	Type D+O	
0(control)	0.38±0.02	2.90±0.13	13.1
0.05	0.39±0.02	2.92±0.11	13.4
0.1	0.39±0.03	2.93±0.18	13.3
0.5	0.36±0.03	2.89±0.21	12.5
1.0	0.33±0.03	2.92±0.16	11.3

Values are mean±S.E. for 3 separate experiments.
: uric acid nmoles/mg protein/min.

Table IV. Effect of the Cultivating Product Cynanchum wilfordi on the Hepatic Xanthine Oxidase Activity.

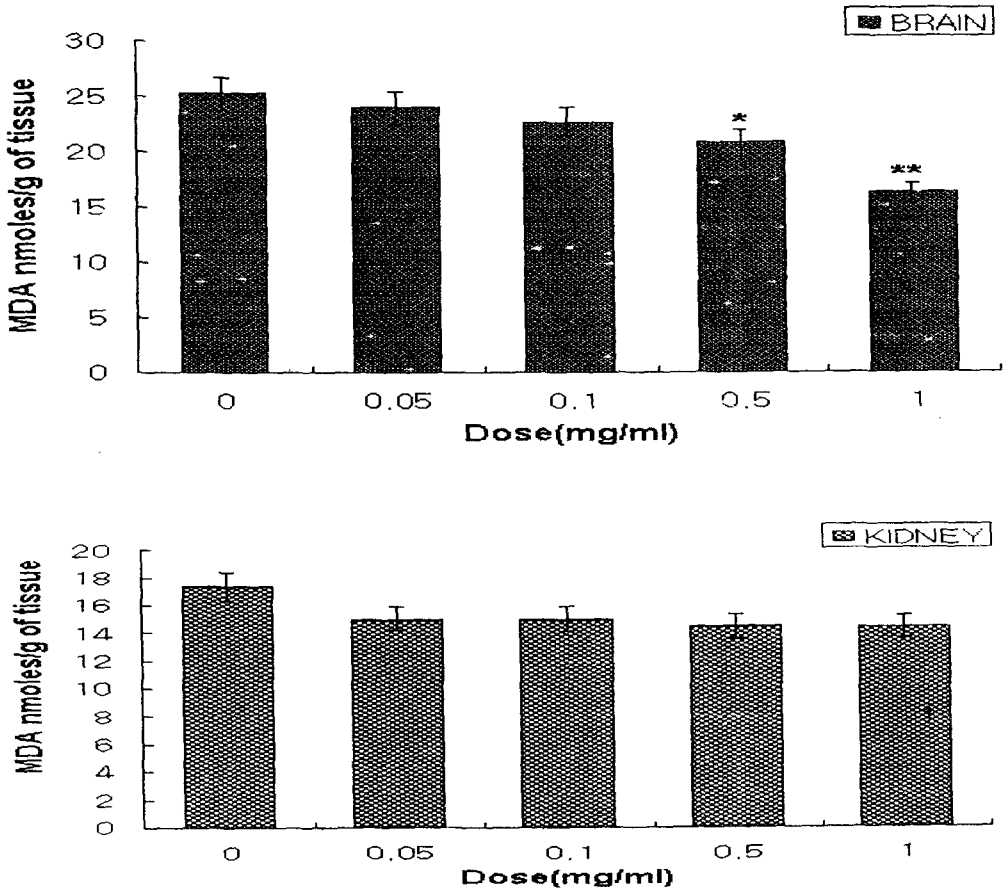
Dose (mg/mℓ)	Specific Activity#		Type Conversion ratio (%)
	Type O	TypeD+O	
0(control)	0.37±0.03	2.92±0.13	12.7
0.05	0.40±0.03	2.93±0.11	13.7
0.1	0.38±0.02	2.91±0.18	13.1
0.5	0.35±0.00	2.88±0.21	12.2
1.0	0.32±0.03	2.93±0.16	10.9

Values are mean±S.E. for 3 separate experiments.
: uric acid nmoles/mg protein/min.

4. 脂質過酸化 抑制效果

(1) 自然産의 腦, 腎臟 및 肝臟에서의 用量別 脂質過酸化 抑制效果 比較

自然産의 각 臟器別 過酸化脂質 生成 抑制效果는 抽出物의 濃度를 0.05mg/mℓ, 0.1mg/mℓ, 0.5mg/mℓ, 1.0mg/mℓ로 增加시킴에 따라 比例的으로 增加함으로써 用量 依存的인 경향을 보여주었다. 각 臟器중의 脂質過酸化 抑制 效果를 比較해 보면, 가장 높은 濃度인 1mg/mℓ에서 腦중의 過酸化脂質 減少値가 16.20nmoles로 對照群에 비하여 35.9%로 가장 높았으며 다음으로는 腎臟이 14.42nmoles로 16.9%, 그리고 肝臟에서는 15.39nmoles로 15.6%의 가장 낮은 抑制率을 나타내었다(Table V, Fig. 7).



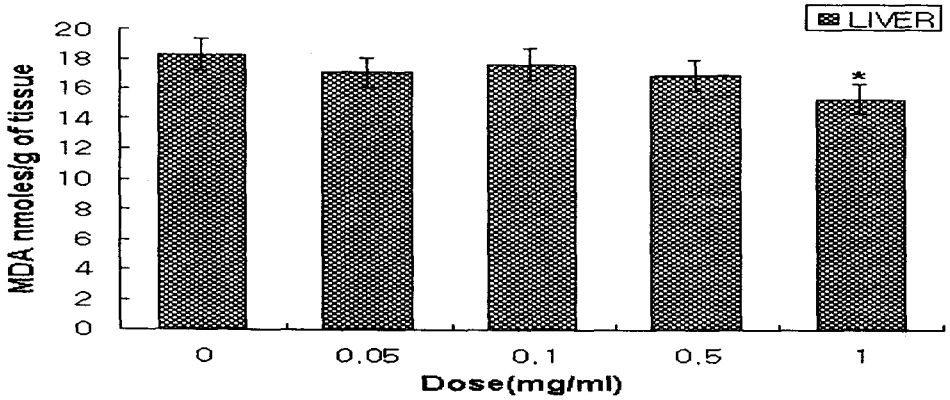


Fig. 7. Comparison of the inhibitory effection lipid peroxidation of the wilding root of *Cynanchum wilfordi* in rat brain, kidney, and liver.
Significantly different from control.
(* : p<0.05, ** : p<0.01)

Table V. Inhibitory Effect of the Extracts of Wilding Product of Cynanchum wilfordi on Lipid Peroxidation in Rat Brain, Kidney, and Liver in vitro.

Dose of extracts (mg/mℓ)	MDA nmoles/g of tissue		
	brain	kidney	liver
0	25.27±1.88	17.35±1.18	18.24±1.48
0.05	23.97±1.67	15.04±1.21	17.10±1.56
0.1	22.68±1.74	14.98±0.84	17.67±1.18
0.5	20.73±0.91*	14.46±1.02	16.95±1.12
1.0	16.20±0.68**	14.42±1.02	15.39±1.17*

Significantly different from control.
(* :p<0.05, ** :p<0.01)

(2) 栽培産의 腦, 腎臟 및 肝臟에서의 用量別 脂質過酸化 抑制效果 比較

栽培産의 脂質過酸化 抑制效果를 濃度를 달리하여 0.05mg/mℓ - 1.0mg/mℓ로 각 臟器別로 比較해 보면, 腦의 過酸化脂質의 量은 對照群에 비해 67.6%의 매우 높은 減少率을 보여 주었다. 이는 栽培産이 自然産보다 약 2倍에 가까운 脂質過酸化 抑制效果를 나타내는 것으로 특히, 腦에서 栽培産의 效果가 현저함을 알 수 있다. 그리고 腎臟의 경우는 27.6%, 그리고 肝臟에서는 11.7%의 減少率을 보임으로써 腦의 過酸化脂質이 가장 크게 減少하였으며 肝臟의 過酸化脂質의 減少率이 가장 낮게 나타났다(Table VI, Fig. 8).

Table VI. Inhibitory Effect of the Extracts of Cultivating root of Cynanchum wilfordi on Lipid peroxidation in Rat Brain, Kidney, and Liver in vitro.

Dose of extracts (mg/mℓ)	MDA nmoles/g of tissue		
	brain	kidney	liver
0	22.38±1.23	15.42±1.23	16.79±1.15
0.05	22.30±1.14	14.89±1.17	16.30±1.20
0.1	21.72±1.20	14.36±0.98	15.80±1.53
0.5	13.82±1.05**	11.70±1.05*	15.31±0.92
1.0	7.24±1.08***	11.17±0.94*	14.82±0.56

Significantly different from control.
(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p< 0.001)

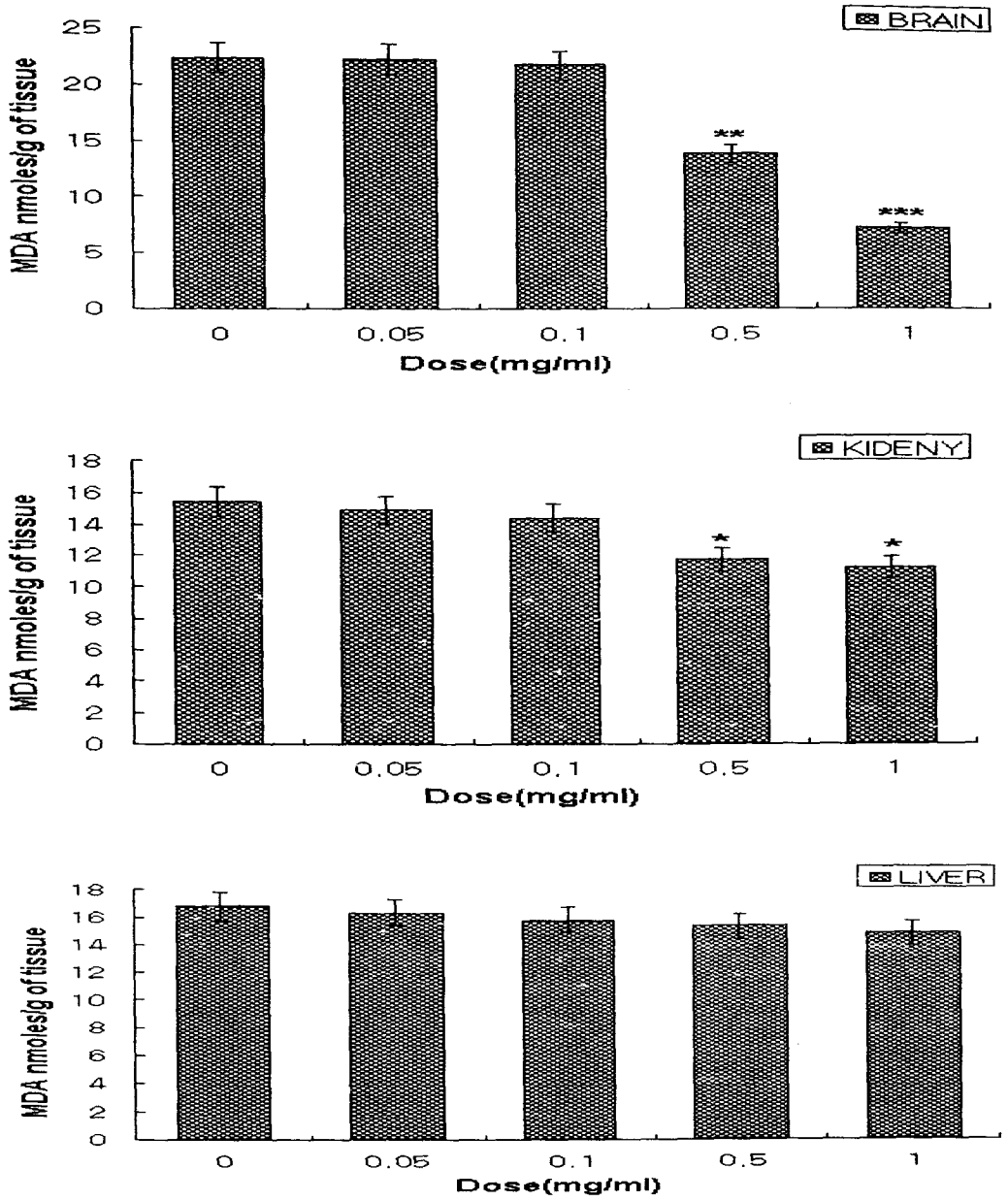


Fig. 8. Comparison of the lipid inhibitory effection peroxidation of the cultivating root of Cynanchum wilfordi in rat brain, kidney, and liver. Significantly different from control.

(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)

(3) 自然産 및 栽培産의 각 臟器別 脂質過酸化 反應 抑制效果 比較

腦, 腎臟 및 肝臟에서의 自然産 및 栽培産의 脂質過酸化 反應 抑制 效果를 比較하여 보면, 腦의 경우, 낮은 濃度인 0.05mg/㎖와 0.1mg/㎖에서는 抑制效果가 비슷하였으나 높은 濃度인 0.5mg/㎖와 1.0mg/㎖에서는 栽培産이 自然産보다 큰 抑制效果를 보여주었다(Fig. 9). 腎臟에서는 낮은 濃度에서 自然産이 效果가 强하였으나 높은 濃度에서는 栽培産이 强하게 나타났다(Fig. 10). 그러나 肝臟의 경우, 이들과는 달리 1.0mg/㎖의 濃度에서 自然産이 栽培産보다 더 强한 抑制效果를 나타내었다(Fig. 11).

4. Amino acid의 定性 및 定量分析

自然産과 栽培産은 amino acid의 含量에서도 큰 차이를 보여주었다. 自然界에 存在하는 총 20種의 amino acid의 種類 및 含量을 相互 比較해 보면, 全般的으로 栽培産이 自然産보다 amino acid의 種類 및 量이 더 많은 것으로 分析되었다(Table. Ⅶ, Table Ⅷ).

즉, 栽培産은 모두 15種의 amino acid을 含有하고 있는데 비하여 自然産에는 8종밖에 含有되어 있지 않았다. 이러한 結果는 總窒素 含量의 比較 試驗과 一致하고 있다. 한편, 栽培産이 10種의 必須 amino acid중에서 5種(threonine, methionine, tryptophan, histidine, arginine)을 含有하고 있으나 自然産은 tryptophan과 arginine 2種만을 含有하고 있었다. 그러나 栽培産의 必須 amino acid 가운데 가장 많은 tryptophane이 全體 含量의 약 7%를 차지하는데 반하여 自然産의 tryptophan含量은 약 26%를 含有하여 全體 含有 amino acid 중에서 두번째를 차지하고 있다.

自然産의 HPLC chromatogram (Fig. 12) 및 栽培産의 HPLC chromatogram (Fig. 13)을 20種 amino acid의 chromatogram (Fig. 14)과 比較하여 나타내었다.

Table Ⅶ. Amino acid Composition of the Wilding Product of Cynanchum wilfordi

Amino acid	amount(pmol)	mol %
Cya	3.85	0.95
Asx	14.15	3.50
Glx	0.00	0.00
Ser	0.00	0.00
Gly	0.00	0.00
His*	0.00	0.00
Arg*	97.90	24.19
Thr*	0.00	0.00
Ala	20.75	5.13
Pro	109.91	27.16
Tyr	52.97	13.09
Val*	0.00	0.00
Met*	0.00	0.00
Ile*	0.00	0.00
Leu*	0.00	0.00
Phe*	0.00	0.00
Trp*	105.17	25.99
Lys*	0.00	0.00
TOTAL	404.70	100.00

Cya: cysteic acid, Asx: asparagine+aspartic acid, Glx: glutamine+glutamic acid, Ser: serine, Gly: glycine, His: histidine, Arg: arginine, Thr: threonine, Ala: alanine, Pro: proline, Tyr: tyrosine, Val: valine, Met: methionine, Ile: isoleucine, Leu: leucine, Phe: phenylalanin, Trp: tryptophane, Lys: lysine

* : essential amino acid

Table Ⅷ. Amino acid Composition of the Cultivating root of Cynanchum wilfordi

Amino acid	amount(pmol)	mol %
Cya	36.15	1.90
Asx	69.82	3.67
Glx	37.86	1.99
Ser	2.78	0.15
Gly	20.95	1.10
His*	33.22	1.75
Arg*	893.02	47.00
Thr*	96.07	5.06
Ala	64.08	3.37
Pro	365.08	19.21
Tyr	133.81	7.04
Val*	0.00	0.00
Met*	15.51	0.82
Ile*	0.00	0.00
Leu*	0.00	0.00
Phe*	0.00	0.00
Trp*	131.85	6.94
Lys*	0.00	0.00
TOTAL	1900.20	100.00

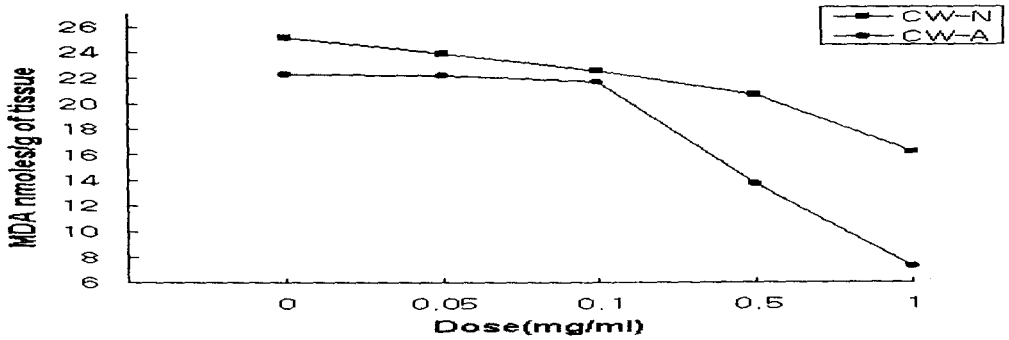


Fig. 9. Comparison of the lipid inhibitory effection peroxidation of the wilding and cultivating root of *Cynanchum wilfordi* in rat brain.

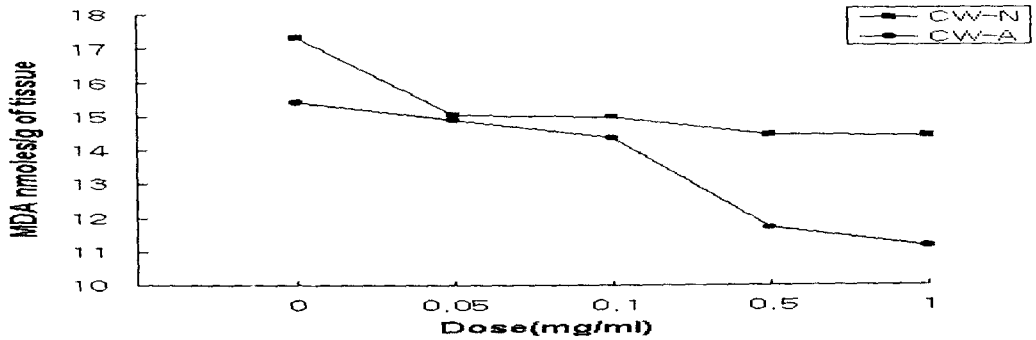


Fig. 10. Comparison of the lipid inhibitory effection peroxidation of the wilding and cultivating root of *Cynanchum wilfordi* in rat kidney.

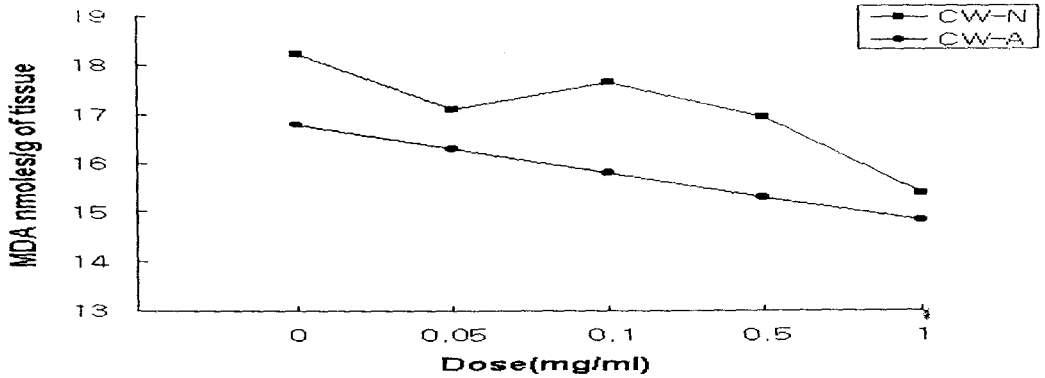


Fig. 11. Comparison of the lipid inhibitory effection peroxidation of the wilding and cultivating root of *Cynanchum wilfordi* in rat liver.

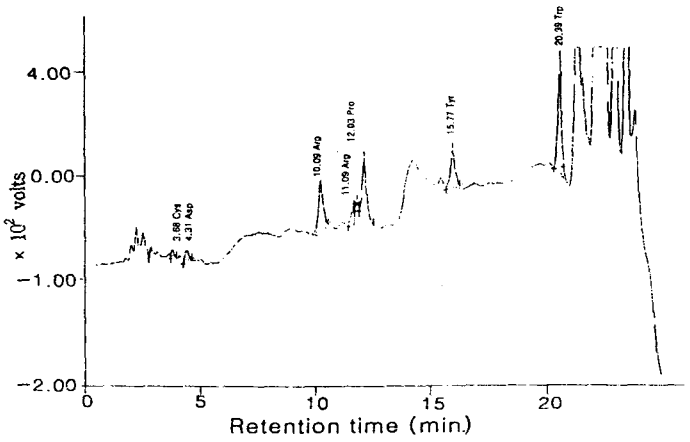


Fig. 12. HPLC chromatogram of the amino acid analysis of the wilding root of *Cynanchum wilfordi*

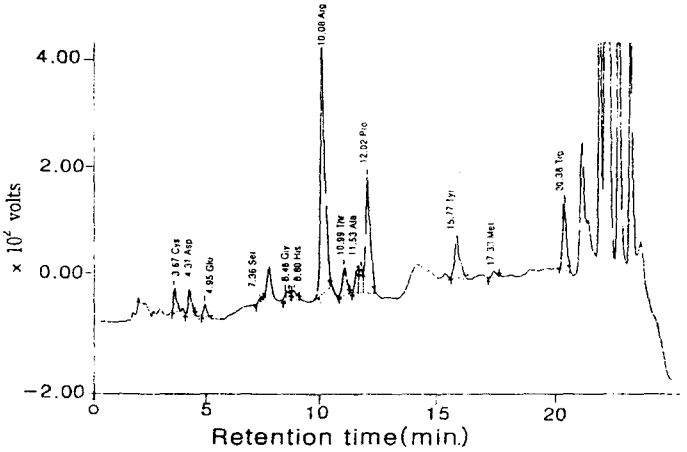


Fig. 13. HPLC chromatogram of the amino acid analysis of the cultivating root of *Cynanchum wilfordi*

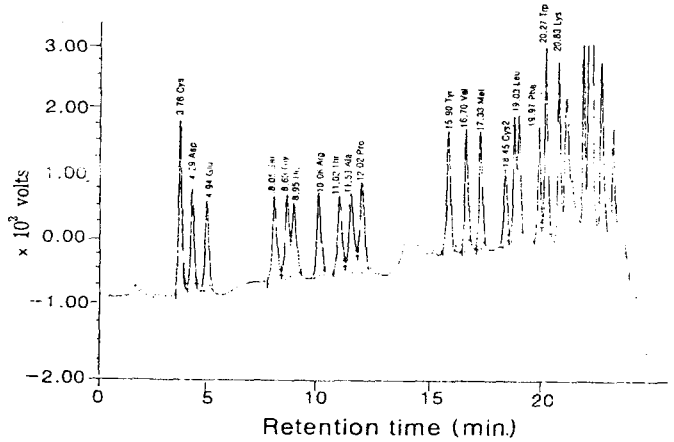


Fig. 14. HPLC chromatogram of 20 kinds of natural amino acids as standards.

5. 總窒素의 含量 比較

自然産과 栽培産에 amino acid외의 窒素化合物이 어느 정도 含有되어 있는지를 알기 위하여 總窒素量 및 粗蛋白質의 含量을 測定한 結果, 栽培産이 自然産보다 19.2%가 더 많은 것으로 測定되었다(Table IX).

Table IX. Contents of Total Nitrogen and Crude Protein

	Total Nitrogen(mg/g)	Crude Protein(mg/g)
CW-N	5.78	7.15
CW-A	36.09	44.67

Ⅳ. 考 察

老化는 動物의 發育, 成長, 成熟과 老化의 生物學的 過程에서 形態的 機能的 衰退, 豫備力과 適應力의 低下로 死亡에 歸着되는 普遍的인 生理現狀이다.[2] 老化의 原因과 機轉을 說明하는 理論중 가장 有力視되는 假說인 free radical說이 최근의 老化硏究나 老化抑制物質 開發硏究에 널리 應用되고 있다[26]. Free radical說이란 生體內에서 生化學的 反應에 의하여 生成되는 superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen 등의 活性酸素種(reactive oxygen species)이 脂質過酸化 또는 蛋白酸化를 誘發시키고 그 結果 生成되는 많은 反應産物이 細胞나 組織에 蓄積되거나 그 機能을 弱化시킴으로서 老化가 進行된다고 하는 理論[1]으로 최근 이들 radical은 癌, heart stroke, 狹心症 및 肺氣腫 등을 包含한 많은 一般的인 疾患의 發生과 惡化에 關與하는 것으로 報告되고 있다[27].

白何首烏는 蘿摩科(*Asclepiadaceae*)에 屬한 多年生 草本인 은조롱의 塊根으로 性味는 微溫無毒, 苦甘, 澁하고 肝, 腎 2經으로 歸經하는데 補肝腎, 强筋骨, 益精血, 安心神 등의 效能으로 久服時 壯筋骨, 黑毛髮, 延年不老하는 滋養强壯의 要藥으로 臨床的으로 久病虛弱, 貧血, 鬚髮早白, 腰膝痠軟, 性神經衰弱, 陰虛久瘧, 潰瘍久不收口 等의 症에 多用하며, 氣血久虛를 治療하는 何人飮과 烏鬚髮 補腎元하고 氣血不足 腎虛無子를 治療하는 七補美髯丹 및 癩風 瘋風 諸皮膚痛을 治療하는 何首烏散 등의 構成藥物에 속한다[3-10]. 近來에는 自然産의 供給이 쉽지 않음에 따라 주로 栽培産의 使用이 普遍化되고 있는 時點에서 아직까지 自然産과 栽培産에 대한 藥理活性 이나 品質比較는 試圖되지 않았다. 이에 著者는 抗酸化作用에 관한 硏究가 주로 腎虛에 關聯[28,29]하여 많이 이루어지고 있는 點과 諸 文獻[3,6,8,10]에 記載된 '黑毛髮, 延年不老' 등의 表現이 一種의 老化抑制 天然藥物 硏究의 可能性을 提示하는 含蓄的인 意味로 推論하고, 老化와 成人病 및 各種 疾患에 關聯된 free radical 生成酵素인 aldehyde oxidase와 xanthine oxidase 및 free radical 뿐만 아니라 炎症 誘發과도 關聯되는 酵素인 5-lipoxygenase에 대하여 一定한 抑制效果가 있을 것으로 보고 본 實驗을 試圖하였으며 아울러 amino acid의 定性 定量分析을 試圖하여 有意性 있는 結果를 얻게 되었다.

5-lipoxygenase는 生化學的 代謝過程을 통하여 arachidonic acid를 leucotrienes로 變化시키는 初期段階를 觸媒하는 役割을 한다[30]. 5-lipoxygenase는 주로 炎症性 細胞라고 불리워지는 neutrophils, monocytes, eosinophils, macropharges, mast cell 등에서 抑制活性을 나타낸다[31]. 炎症物質인 leucotriene의 生合成 過程은 radical에 의한 酸化反應이므로 5-lipoxygenase의 抑制效果는 바로 radical의 消去와 直接的인 關聯이 있다고 할 수 있다. 이러한 事實을 根據로 하여 白何首烏 抽出物에 依한 5-lipoxygenase 活性抑制效果를 알아보기 위해 소의 血液에서 抽出한 酵素源(顆粒白血球;granulocyte)으로 試驗管內(*in vitro*) 實驗을 通하여 5-lipoxygenase

에 依한 arachidonic acid의 代謝産物 중에서 炎症發現에 가장 중요한 LTB_4[31](leucotriene B_4)의 抑制活性을 對照群과 比較하였다. 그 結果, 白何首烏 自然産은 1.0mg/mℓ투여시, 7.75±0.56%의 酵素活性 抑制效果를 나타낸 데 比해, 栽培産은 同量에서 1.08±0.12%를 보임으로써 自然産이 栽培産보다 7倍 以上 有意性있는 抑制效果가 觀察되었다. 以上의 實驗結果를 살펴볼 때 白何首烏는 radical 除去에 의한 老化, 成人病의 豫防 治療 뿐만 아니라 消炎作用도 認定되며 특히 自然産이 栽培産보다 더 有用할 것으로 思料된다.

aldehyde oxidase는 細胞質 分劃에 存在하는 molybden함유 flavoprotein酵素로서 pyridoxal 등의 外因性 物質과 內因性 物質을 代謝시키는 反應을 觸媒하는 氣質 非特異性 酸化酵素이다[32]. 이 酵素가 觸媒하는 酸化反應이 進行되는 過程에 分子狀態의 酸素에 基質의 電子를 傳達하는 生化學的 反應으로 superoxide anion을 生成하는 機能을 遂行하게 된다[33]. 본 실험에서는 白何首烏 自然産과 栽培産이 rat의 肝 aldehyde oxidase의 酵素活性에 미치는 影響을 檢討한 結果, 두 抽出物의 用量을 增加시키면서 투여했을 때, 모두 酵素活性이 用量 依存的으로 抑制됨을 觀察할 수 있었다. 특히, 自然産 抽出物이 각각 1.12nmoles와 0.80nmoles로 큰 減少를 나타내었으며, 全般的으로 自然産이 栽培産보다, 특히 높은 用量에서 보다 强한 酵素活性 抑制 效果를 나타내었다.

xanthine oxidase는 生體내 널리 分布되어 주로 purine鹽基의 終末代謝過程, 즉 hypoxanthine을 xanthine으로 酸化하고 다시 이것을 最終産物인 uric acid로 代謝하는 過程을 率速觸媒하는 것으로 알려져 있으며 活性酸素의 生成에 生化學的 酸化反應을 觸媒하는 重要한 酵素이다[30,34]. 그리고 이 효소는 aldehyde oxidase와 化學的 性狀 및 機能이 類似하다. 正常過程에서 xanthine oxidase는 電子 受容體로 NAD+를 利用하는 xanthine dehydrogenase(Type D) 形態로 存在하나 病態生理 條件이 附與될 때에는 酸素를 電子 受容體로 利用하여 活性酸素를 生成시키는 xanthine oxidase(Type O) 形態로 轉換되며 xanthine dehydrogenase (Type D)로 부터 xanthine oxidase (Type O)로 型轉換이 이루어져야만 活性酸素의 生成에 參與할 수 있다[35,36]. 病態生理 條件이 附與될 때 型轉換이 急進的으로 促進되며 實驗動物(rat)의 나이에 따라 xanthine oxidase의 活性 및 型轉換이 增加된다는 허 등[37]의 實驗報告로 미루어 볼 때 xanthine oxidase의 活性 및 型轉換에 對한 抑制는 老化를 抑制시키는 것과 關聯性이 强할 것으로 생각된다. 그러나 본 實驗의 白何首烏 自然産과 栽培産의 抽出物은 xanthine oxidase活性과 型轉換比의 減少에서는 有意性 있는 變化를 보이지 않았다.

過酸化脂質은 不飽和脂肪酸을 包含한 脂質이 酸素radical과 反應하여 生成되는 peroxide 構造를 가진 物質을 指稱하는 것으로 生體內의 脂質成分이 變化하여 free radical이 生成되고 여기에 活性化된 酸素가 作用하여 peroxy radical이 生成되며 이때 다른 脂質成分과의 連鎖反應에 의하여 過酸化脂質이 生成된다[38].이러한 過酸化脂質은 生體膜에 損傷을 입히고 細胞機能을 低下시키며 壞死와 關聯하여 여러가지 疾病을 惹起시키는 것으로 알려져 있다[39].

본 實驗에서는 白何首烏 抽出物의 脂質過酸化 抑制效果를 觀察하기 위하여 rat의 肝臟, 腦 및 腎臟組織을 取하여 自然産 및 栽培産 抽出物의 脂質過酸化 抑制作用을 組織 1g當 malondialdehyde의 量을 測定하여 對照群과 *in vitro*에서 觀察한 結果, 自然産과 栽培産 모두 腦, 腎臟 및 肝臟에서 모두 過酸化脂質 生成을 抑制함을 알수 있었다. 各 臟器別로는 腦에서의 過酸化脂質 減少値가 가장 높았고 다음으로 腎臟과 肝臟의 順으로 抑制效果를 나타내었는데 특히 抑制效果가 가장 높았던 腦의 경우 自然産이 對照群에 比하여 35.9%의 減少率을, 栽培産이 67.6%의 減少率을 나타내어 栽培産이 自然産보다 약 2倍의 顯著한 脂質過酸化 抑制效果가 있음을 알수 있다. 이러한 結果는

加齡에 따라 血中 過酸化脂質의 含量이 比例하여 增加한다는 Yagi[40] 의 報告와 rat의 腦에서 生成되는 過酸化脂質의 含量이 加齡에 따라 增加한다는 Yoshikawa[41] 의 報告와 聯關지어 볼 때 白何首烏를 老人性 痴呆, 健忘 등의 治療에도 活用할 수 있을 것으로 생각되며 특히 栽培産이 有用할 것으로 思料된다. Amino acid는 蛋白質의 構成成分으로서 鹽基性을 띤 아미노기(-NH_2)와 酸性을 띤 카르복실기(-COOH)를 含有하는 有機物을 意味하며 이들은 組織을 構成하고 에너지원으로 使用되며 脂肪이나 炭水化物로 變換 되기도 한다[42]. 본 實驗의 定性 定量分析 結果에서 栽培産은 20種의 천연amino acid 중에서 15種을 含有하고 있는데 比하여 自然産에는 8種 밖에 含有되어 있지 않았다. 이러한 結果는 總窒素 含量의 比較 實驗과도 一致하고 있다. 한편, 人體가 20個의 amino acid중 體內 生合成이 不可能하여 飮食物의 攝取를 통해서만 供給이 可能한 必須amino acid[43]에 있어서 栽培産은 5種(threonine, methionine, tryptophan, histidine, arginine)을 含有하고 있으나, 自然産은 tryptophan과 arginine 2種 만을 含有하고 있다. 栽培産이 自然産보다 amino acid 含量 및 種類가 많은 것은 栽培時 肥料 등의 營養分을 供給하기 때문인 것으로 推定된다. 그러나 이러한 結果는 食品 蛋白質의 質的인 差異의 決定 基準인 全體 amino acid의 含有와 有用性의 基準인 必須amino acid의 含有에 있어서[43]栽培産이 훨씬 優位에 있음을 나타내는 것으로 補의 槪念下에서 栽培産이 自然産에 比하여 有用할 것으로 思料된다.

V. 結 論

白何首烏 自然産 및 栽培産의 抗酸化活性과 amino acid의 分布 比較를 위하여 5-Lipoxygenase 活性抑制效果, aldehyde oxidased와 xanthine axidase의 活性抑制效果, 脂質過酸化의 抑制效果 測定 및 amino acid의 定性, 定量分析을 通하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 5-Lipoxygenase 活性 抑制效果는 白何首烏 自然産과 栽培産에서 모두 有意性있는 抑制效果를 나타냈으며 특히 自然産이 栽培産에 比하여 7倍 以上 效果가 强한 것으로 나타났다.

2. Rat의 肝 aldehyde oxidase 活性 抑制效果에 있어서 白何首烏 抽出物의 用量을 增加시키면서 投與時 自然産과 栽培産 모두 有意性있는用量依存的 抑制效果를 보였고, 全般的으로 自然産이 栽培産보다 높은 用量에서 强한 抑制效果가 나타났다.

3. Rat의 肝 xanthine oxidase 活性 抑制效果에서 Type O는 自然産 및 栽培産 모두 1.0mg/㎖의 濃度에서 對照群에 比하여 약간 減少하였으나 有意性은 없었고, Type D+O와 xanthine oxidasc型轉換比의 경우에서도 有意性있는 變化를 보이지 않았다.

4. 過酸化脂質 生成 抑制效果는 自然産 및 栽培産 모두 抽出物의 濃度가 增加함에 따라 有意性있는 用量依存的 抑制效果를 보였다.

5. 各 臟器別 過酸化脂質 生成 抑制效果는 腦에서 가장 强한 抑制效果를 보였고, 그 다음으로 腎臟과 肝臟 順으로 나타났다. 腦와 腎臟의 경우 높은 濃度에서 栽培産이 自然産보다 强한 抑制效果를 나타내었으며 肝臟의 경우는 自然産이 栽培産보다 더 强한 抑制效果가 나타났다.

6. Amino acid의 種類 및 含量 分析 相互

比較에서 栽培産이 自然産에 比하여 Amino acid의 種類와 量이 더 많은 것으로 分析되었으며, 總窒素 含量의 比較에서도 栽培産이 自然産보다 많은 것으로 分析되었다.

參 考 文 獻

1. Fridovich, I. : The biology of oxygen radicals, *Science* 201:875, 1987.
2. 서순규 : 성인병·노인병학, 서울, 고려의학, pp. 30-37, 1995.
3. 辛民敎 : 臨床本草學, 서울, 영림사, p. 221, 1991.
4. 生藥學硏究會 著 : 現代生藥學, 서울, 학창사, p. 446, 1994.
5. 金在佶·肖培根 : 東洋天然藥物 原色圖鑑, 서울, 영림사, p. 27, 1995.
6. 申佶求 : 申氏本草學各論, 서울, 수문사, pp. 119-120, 1988.
7. 江蘇新醫學院 編 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p. 1136, 1987.
8. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 남산당, p. 735, 1980.
9. 中國醫學科學院藥物硏究所 : 中藥志, 北京, 人民衛生出版社, p. 328, 1979.
10. 李尙仁 : 本草學, 서울, 수서원, pp. 125-127, 1981.
11. Gu, L., Gong, S., Jao, J., Liu, C., Chang, L. and Zhong Y. : China Zhong Yao Tangbao 1:690, 1986.
12. 姜錫峯외 : 白何首烏와 黃精이 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 서울, 慶熙大論文集 Vol. 9, pp.367-376, 1986.
13. Zhu, L., Chang, P. and Gong, S : China Zhongguo Mianyixue Zazhi 4:291, 1988.
14. 정은진 : 白首烏엑스의 마우스 急性 毒性 및 흰쥐 亞急性 毒性에 미치는 影響, 서울, 生藥學會誌 24, 166, 1993.
15. 이동웅 : 은조롱의 조알칼로이드 분획의 항산화효과, 서울, 동국논집 14, 83, 1995.
16. Sasaki, T., Hayashi, K. and Mitsuhashi,M. : On the Structure of kidjolanin and the position of the esterlinkage of penupogenin, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 20:628, 1972.
17. Mitsuhashi, H., Nomura, T. and Hirano, M. : Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants, XIX. Components of *Metaplexis japonica* Makino, IV, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 14:717, 1960.
18. Warashina, T. and Noro, T. : Steroidal glycosides from the root of *Cynanchum caudatum* M., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 43:977, 1995.
19. Warashina, T. and Noro, T. : Steroidal glycosides from roots of *Cynanchum caudatum* M. II, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 43:1734, 1995.
20. Warashina, T. and Noro, T. : Steroidal glycosides from roots of *Cynanchum caudatum* M. III, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 44:358, 1996.
21. Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. : *J. Biological Chemistry* 237:922, 1962.
22. Nelson, C. A. et al. : *J. Biological Chemistry* 243:5368, 1968.
23. Stripe, F. and Della, C. E. : *J. Biological Chemistry* 244:3855, 1969.
24. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : *Analytical Biochemistry* 95:351, 1979.
25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biological Chemistry* 193:265, 1951.
26. 김만욱외 : 天然 老化抑制物質 開發 1次年度 年次報告書, 韓國人蔘煙草硏究院, 1991.
27. Marx, J. L. : Oxygen free radicals

linked to many diseases, *Science*, 235:529, 1987.
28. 王其飛, 王瑞廷 編著: 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, pp.340-342, 1989.
29. 梁曉春 外 : 腎虛, 衰老與自由基的關係以及補腎藥對自由基的影響, 中西醫結合雜誌 10(8):511-512, 1990.
30. 박인원 역 : Stryer생화학, 서울, 서울외국서적, p. 1043, 1994
31. Muller, K. : 5-lipoxygenase and 12-lipoxygenase: Attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs. *Arch. pham.* 327:3-19, 1994.
32. I Bell, R. R., Blanchard, C. A. and Haskell, B. E. : Metabolism of vitamine b6 in the 1-strain mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 147:602, 1971.
33. Badwey, J. A., Robinson, J. M. and Karnovsky, M. L.: Superoxide production by an unusual aldehyde oxydase in guinea pig granurocytes. Characterization and cytochemical localization, *J. Biol. Chem.*, 258(7):3479-3486, 1981.
34. Fridovich, I. and McCord, J. M. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244:6049-6055, 1969.
35. Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in virto of the enzyme activity from dehydrogenase(Type D) to oxidase(Type O). *J. Biol. Chem.*,244, 3855-3863, 1969.
36. Battelli, M. G. : Enzymatic conversion of rat liver xanthine oxidase from dehydrogenase to xanthine. FEBS Letters.113:47-51, 1980.
37. 허 근, 신억섭, 박종민 : 지질과산화 반응과 Free Radical 생성계 효소 활성에 미치는 Testosterone의 영향, 약학회지 38(2):166-173, 1994.
38. 김세권 : 생화학, 서울, 청문각, pp. 158-159, 1996.
39. 이귀녕, 이종순 : 임상병리화일, 서울, 의학문화사, p. 138, 1986.
40. Yagi, K. : Lipid peroxides and diseases. *Chem. and Phys. of Lipid*, 45:337, 1987.
41. Yoshikawa, M. and Hirai, S. : Lipid peroxide formation in the brain of aging rats, *J. Gerontol.*, 22:162-5, 1967.
42. 이경준 : 수목생리학, 서울, 서울대학교출판부, p. 131, 1993.
43. 이광웅 외 : 생물학(생명의 과학), 서울, 을유문화사, p. 82, 804, 1993.

ABSTRACT

Study on the Antioxidative Effects and Amino Acid Contents of the Roots of Cynanchum Wilfori

Kisun Han · Giljo Shin · Wonchul Lee · Jonghyung Lee
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine
Dongguk University

The aim of the presents study is to investigate and compare the antioxidative effects and qualities of the cultivating root of *Cynanchum Wilfori*, which is increasingly used in recent days, with those of the wilding root, which has mainly been used in the past in oriental medicine for a tonic and also for prevention and treatment of various geriatric diseases including aging progress. For comparison of their antioxidative effects, the activities of the total extracts on lipid peroxidation and the activity of aldehyde oxidase(EC 1.2.3.1) as well as xanthine oxidase(EC 1.2.3.2) were investigated *in vitro*.

In addition, their inhibitory effects on the activity of 5-lipoxygenase, which is known to induce inflammation and concerned with free radicals, were also determined in vitro. Furthermore, the amino acid contents of both roots were analyzed in order to compare their qualities.

The results are as follows:

1. The wilding root inhibited significantly the activity of 5-lipoxygenase, showing five times more portent than the cultivating root.
2. Both of the wilding root and the cultivating root inhibited aldehyde oxidase activity in a dose-dependant manner. The wilding root was more effective than the other.
3. Both of the wilding root and the cultivating root dose-dependently suppressed lipid peroxidation in rat brain, kidney, and liver.
4. The anti-peroxidative effects of both roots appeared to be most strong in brain and least in liver. In particular, the cultivating root exhibited a significant inhibition on brain lipid peroxidation.
5. The cultivating root contained 15 amino acids including five essential amino acids in contrast with the less contents in the wilding root.

---

*Key word : antioxidative effects, lipid peroxidation, aldehyde oxidase, xanthine oxidase, amino acid, roots of *Cynanchum wilfori*