

사철쑥과 그늘쑥의 다당류 연구

황은주 · 권학철 · 정철만 · 문형인 · 김선여* · 지옥표 · 이강노#
성균관대학교 약학대학 천연물약품학 연구실, *농촌진흥청 농업과학원 잠사곤충부
(Received May 29, 1999)

Characterization of Polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Artemisia sylvatica*

Eun Ju Hwang, Hak Cheol Kwon, Chil Man Jung, Hyung In Moon,
Sun Yeou Kim*, Ok Pyo Zee and Kang Ro Lee#

Natural Product Laboratory, Department of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University,
Suwon 440-746, Korea,

*Department of Sericulture & Entomology, National Institute of Agricultural Science and
Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

Abstract — Two polysaccharides, ACP-UMF and ACP-ULF, were purified from the aerial part of *Artemisia capillaris* by anion-exchange chromatography, ultrafiltration, and gel filtration chromatography. The polysaccharides appeared to be homogenous from the results of HPLC. The molecular weights of ACP-UMF and ACP-ULF were estimated to be 16305.92 D and 3292.26 D, respectively, by MALDI-TOF MS. The sugar compositions were determined by GC to be arabinose 10.05%, xylose 1.67%, mannose 5.45%, galactose 39.06%, glucose 15.43% for ACP-UMF and arabinose 11.60%, xylose 11.15%, mannose 6.37%, galactose 32.47%, glucose 18.35% for ACP-ULF. A polysaccharide, SP-M, was also purified from *Artemisia sylvatica* in the same manner as in *A. capillaris*. The molecular weight of SP-M was determined to be 2462.52 D by MALDI-TOF MS. SP-M consisted mainly of rhamnose 36.49%, arabinose 29.00%, and glucose 19.38%. Incubation of CCl₄-intoxicated hepatocytes with ACP-UMF reduced the levels of glutamic pyruvic transaminase^c (GPT) and cellular malondialdehyde (MDA) to 62.8% and 23.8%. ACP-ULF also reduced the levels of GPT and MDA to 46.1% and 38.1% and SP-M to 38.8% and 26.3%, respectively.

Key words □ *Artemisia capillaris*, *Artemisia sylvatica*, polysaccharide, liver protective activity.

천연물에서 유래된 다당류는 다양한 생물활성을 나타낸다.¹⁾ 그 중 식물체에서 유래되는 다당류의 활성으로는 항암,²⁾ 면역증강,³⁻⁴⁾ 항보체,⁵⁾ 혈당강하,⁶⁻⁸⁾ 항염증⁹⁾ 및 항바이러스작용¹⁰⁾ 등이 보고되어 있다. 현재 *Lentiscus edodes*(표고버섯)에서 분리된 lentinan¹¹⁾과 *Schizophyllum commune*에서 분리된 schizophyllan¹²⁾은 암의 면역억제제로서 임상에 응용되고 있다.

*Artemisia*속 식물은 국화과에 속하는 다년생 초본으로 세계 각지에 분포하며 우리나라에는 약 20여종이

자생하고 있는 것으로 추정된다. 인진쑥 등 동속 근연 식물은 중약 또는 민간에서 간암, 간경변 및 황달 등 주로 간 관련 질환의 치료에 응용되고 있으며 우리나라에서도 민간에서 간장 질환의 치료에 널리 사용되어 오고 있다. 지금까지 *Artemisia* 속 식물에 대한 연구는 유기용매 분획에 집중되어 활발히 진행되고 있다. 그 중 한 예로서 중국에서 민간에서 해열등의 용도로 사용되어 오던 개똥쑥(*Artemisia annua*)에서 활성 유기성분인 quinghaosu를 분리하여 항말라리아제로 개발하여 큰 각광을 받고 있기도 하다.¹³⁾ 최근의 *Artemisia*속의 다당류 연구로는 애엽(*Artemisia princeps*)에서 분리한 다당류가 항보체활성이 우수하다고

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-7710 (팩스) 0331-292-8800

보고된 바 있으며,¹⁴⁾ 본 저자들은 수 년전부터 *Artemisia* 속의 다당류 연구를 시작하여 인진쑥 및 물쑥의 다당류의 면역활성작용 및 간 보호활성을 연구하였고, 한인진, 제비쑥 및 갯제비쑥에서 수종의 다당체를 분리정제하여 이화학적 성질을 규명한 바 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 예비실험에서 한인진(*Artemisia iwayomogi*), 사철쑥(*Artemisia capillaris*) 및 그늘쑥(*Artemisia sylvatica*)의 다당류 분획이 유기층 분획보다 우수한 간세포 보호효과를 나타내었다. 본 실험은 국내 자생 식물인 사철쑥과 그늘쑥에서 간세포 보호활성을 갖는 다당류의 분리 및 구조동정을 목적으로 하여, 사철쑥으로부터 2종의 다당류(ACP-UMF, ACP-ULF)와 그늘쑥으로부터 1종의 다당류(SP-M)를 분리정제하고 간보호활성을 검색하였으며 이화학적 성질을 규명하였다.

실험방법

실험 재료 - 사철쑥은 1995년 9월초에 경상남도 창녕에서 채집하였고(1.2 kg), 그늘쑥은 1997년 6월에 충청남도 농촌진흥원에서 공급받아(1.5 kg) 완전건조한 지상부를 실험재료로 하였다.

시약 및 기기 - 표준 단당류는 Aldrich의 The Aldrich Library of Chemical Standards 중 Carbohydrate I을 사용하였고, 분자량 측정용 Pullulan kit는 Waters Co.에서 구입하였다. Open column chromatography용 resin은 DEAE Sepharose CL-6B, Sepharose CL-2B, Sephacryl HR S-300 및 Sephadex G series(Pharmacia)를 사용하였다. MPLC는 Flow thru UV monitor & controller(Spectrum)를 사용하였고, HPLC는 Gilson 306 pumps (Gilson), GC는 HP-6890(Hewlett-Packard)를 사용하였다. UV/VIS spectrophotometer는 Novaspec II(Pharmacia)를, RI detector는 Shodex RI-71(Showa Denko)를 사용하였다. MALDI-TOF MS는 Voyager-DETM system (PerSeptive Biosystems Inc.)을 사용하였다.

실험동물 - Wistar rat는 대한실험동물센터에서 무게가 200 ± 15 g 되는 것을 구입하여 사용하였고, Waymouth MB 7521 및 기타 세포배양시약은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다.

다당류의 추출 - 지상부를 세절한 후 상온에서 에탄올로 2회 추출하여 유기층 분획으로 하였으며, 잔사를 건조시킨 후 열탕의 증류수로 2회 추출하여 수층 분

획으로 하였다. 수층 분획을 반 정도로 농축하여 2배량의 에탄올을 가하여 0°C에서 방치하여 생성된 침전물을 여과하여 동결건조하였다. 여기에 증류수를 가하여 가온용해하여 6,000 rpm, 4°C, 2 시간 동안 원심분리한 상등액을 취하여 0.5 μ m membrane filter로 여과하여 사철쑥 다당류 조분획(ACP)으로 하였다. 그늘쑥도 같은 방법으로 처리하여 다당류 조분획(SP)을 얻었다.

사철쑥 다당류의 정제 - Ion-exchange chromatography: ACP 3g을 column(2.5 \times 40 cm, DEAE Sepharose CL-6B)에 적용하여, ACP-U(water elute)와 ACP-B(0.5 M NaCl elute)로 분획하였다.

Ultrafiltration: ACP-U를 분자량 cut-off 100,000, 10,000, 1,000의 membrane으로 순차적으로 filtration하여 ACP-UM 및 ACP-UL로 분획하였다.

Gel-filtration chromatography: ACP-UM과 ACP-UL분획에 대하여 gel-filtration chromatography를 실시하였다. ACP-UM 160 mg을 Sephacryl HR S-300 column(column size 1.1 \times 90 cm)에 적용하고 유출용매는 20 mM phosphate buffer로 하여 ACP-UM1로 분획하였다(Fig. 1). ACP-UM1 100 mg을 증류수에 녹여서 Sephadex G-50 column(column size 1.1 \times 40 cm)에 loading하고 유출용매로는 증류수를 사용하여 ACP-UMF를 얻었다(Fig. 1). ACP-UL 100 mg을 증류수에 녹여서 Sephadex G-50 column(column size 1.1 \times 40 cm)에 loading하고 유출용매는 증류수로 하여 ACP-ULF를 얻었다(Fig. 1). 정제된 다당체의 순도 확인은 HPLC를 이용하여 피크의 대칭성 및 양상으로 순수하다고 판단하였다.

그늘쑥 다당체의 정제 - Ion-exchange chromatography: SP 3g을 DEAE Sepharose CL-6B(2.5 \times 40 cm) column에 loading하고 유출용매를 증류수와 0.5M NaCl로 step-gradient elution하여 SP-U와 SP-B로 나누었다.

Ultrafiltration: SP-U를 분자량 cut-off 10,000, 1,000의 membrane으로 순차적으로 여과하여 SP-1을 얻었다(Fig. 2).

Gel filtration chromatography: SP-1 100 mg을 Sephadex G-25 column(column size 1.1 \times 40 cm)에 loading하고 유출용매는 증류수로 하여 SP-1'으로 분획하였다(Fig. 2). SP-1' 50 mg을 증류수에 녹여서 분자량 cut off 1,000의 membrane으로 24시간 동안 dialysis

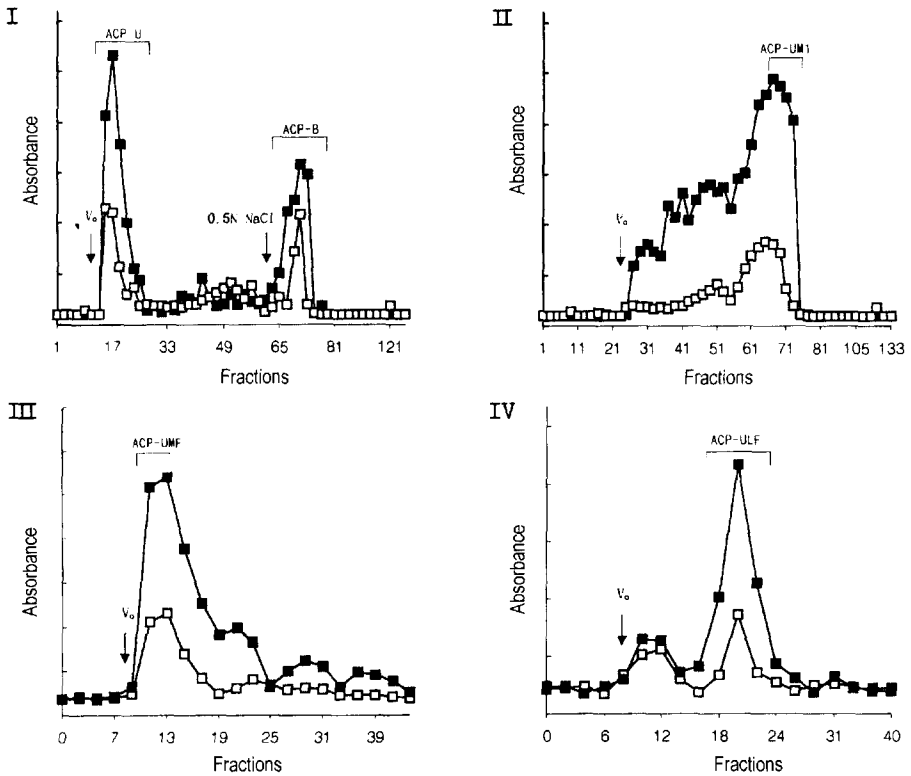


Fig. 1 - Ion-exchange chromatogram of crude polysaccharide fraction (ACP) on DEAE-Sepharose CL-4B (I) and gel filtration chromatograms of subfractions on Sephacryl HR S-300 (II), on Sephadex G-50 (III), and on Sephadex G-25 (IV) -■- Carbohydrate (485 nm); -□- Uronic acid (530 nm). V_0 , void volume.

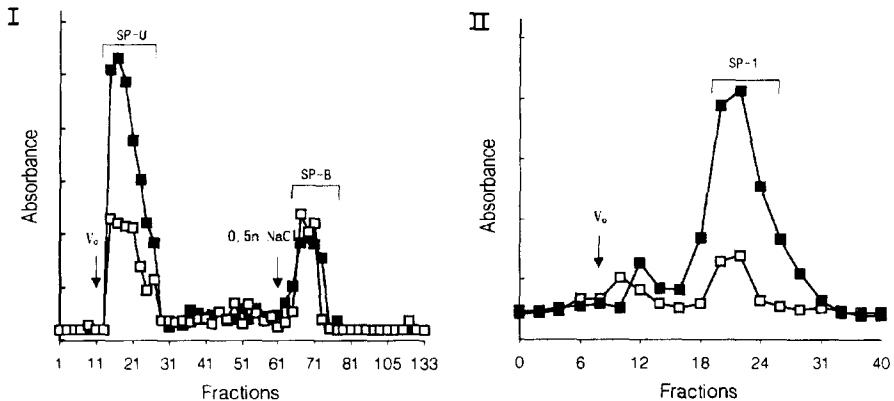


Fig. 2 - Ion-exchange chromatogram of crude polysaccharide fraction (SP) on DEAE-Sepharose CL-4B (I) and gel filtration chromatograms of subfraction on Sephadex G-25 (II). -■- Carbohydrate (485 nm); -□- Uronic acid (530 nm). V_0 , void volume.

하여 SP-M을 얻었다(Fig. 2). SP-M의 순도는 HPLC를 이용하여 다당류의 피크양상을 관찰한 후 순수하다고 판단하였다.

다당류의 이화학적 분석
당함량 분석 - 각 분획 및 분리된 다당류에 대하여 phenol-sulfuric acid assay, uronic acid assay 및

Bradford assay¹⁸⁾를 각각 glucose, glucuronic acid lactone 및 BSA (Bovine Serum Albumin)을 기준물질로 사용하여 수행하였다.

분자량 분석 - HPLC를 이용하여 standard pullulan (5.9 kD~112 kD)으로 검량곡선을 작성하여 분리한 다당류의 개략적인 분자량을 추정후 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) MS를 이용하여 정제된 다당류의 분자량을 확인하였다.

조성당 분석 - 정제된 다당류 각 5 mg에 0.2M HCl 0.4 ml를 가하고 밀봉하여 100°C에서 5시간 동안 가열 후 물을 가하여 반응을 완결한 뒤 동결건조하여 염산을 제거하였다. 물을 소량 가하고 원심분리 후 상등액을 취하여 실험을 진행하였다. 시료를 cellulose TLC에 전개시켜 aniline-phthalate reagent로 발색하여 표품과 비교하여 조성을 분석하였다. Cellulose F TLC plate에 가수분해한 시료와 표준단당류를 [acetic acid : pyridine : water : ethyl acetate = 7 : 36 : 21 : 36]의 혼합용매 포화 chamber에서 전개하였다. 가수분해한 sample과 TLC 분석시 확인된 표준 단당류를 alditol acetate화¹⁹⁾하여 GC를 이용하여 각 구성당의 조성을 확인하였다. (GC분석조건: inj. temp.: 260°C, oven temp.: 180°C 3 min.; 1°C/min.; 220°C, 1 min. column : SP-2330(Supelco), detector : Flame ionization detector).

다당류의 간세포 보호활성 측정

CCl₄에 의한 간세포의 독성유도²⁰⁾ - 일차배양한 흰쥐의 간세포를 사염화탄소로 처리하여 인위적인 간세포 독성을 유발시켰다.

GPT(Glutamic pyruvic transaminase) 활성 측정²¹⁾ - 배양액중의 GPT 활성은 kit를 사용하여 Reitman-Frankel의 방법에 의하여 측정하였다.

과산화 지질 측정²²⁾ - 지질의 과산화 정도는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 하여 Logani법에 의하여 측정하였다. 간세포 현탁액 0.5 ml에 1 ml의 10% trichloroacetic acid(TCA)를 가해 10분 동안 방치한 다음 10000×에서 2분 동안 원심분리하였다. 상등액 1 ml을 취하여 0.5 ml thiobarbituric acid(TBA) (pH 7.0, 0.5%)를 넣고 가열하였다(100°C, 10 min). 상온에 10분동안 방치한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험결과 및 고찰

사철쭉 다당류 조분획(ACP)에 대하여 DEAE-sepharose CL-6B column과 ultrafiltration에 의해 소분획한 후, Sephacryl HR S-300과 Sephadex G-75 또는 Sephadex G-50로 정제하여 2종의 다당류 ACP-UMF 및 ACP-ULF를 분리하였다. ACP-UMF에 대하여 hexose, protein, uronic acid 양을 측정한 결과 중성당 71.9%, protein 0%, uronic acid 27.6% 이었으며, ACP-ULF는 중성당 54.6%, protein 0%, uronic acid 45.4%로 확인되었다. HPLC를 이용한 분자량 분석 결과, ACP-UMF는 약 17,000D, ACP-ULF는 약 5,500D로 추정하였으며 MALDI-TOF MS 분석으로 ACP-UMF는 16305.92D, ACP-ULF는 3292.26D로 확인하였다. ACP-UMF는 GC에 의한 당 조성 분석 결과, arabinose 10.05%, xylose 1.67%, mannose 5.45%, galactose 39.06%, glucose 15.43%로 밝혀졌다. ACP-ULF는 arabinose 11.60%, xylose 11.15%, mannose 6.37%, galactose 32.47%, glucose 18.35%로 확인하였다(Table I).

그늘쭉 다당류 조분획(SP)도 사철쭉 다당류 조분획(ACP)에서와 같은 방법으로 정제하여 1종의 다당류 SP-M을 분리하였다. SP-M은 중성당 73.2%, protein 0%, uronic acid 26.8%였으며, HPLC를 이용한 분자량 추정 결과 약 2,800D 이었으며, MALDI-TOF MS 분석 결과 2462.52D로 결정하였다. SP-M을 GC에 의한 당 조성 분석결과, rhamnose 36.49%, arabinose 29.00%, glucose 19.38%로 밝혀졌다(Table I).

정제된 각 다당류가 사염화탄소에 의하여 유발된 간

Table I - Physicochemical properties of isolated polysaccharides

	ACP-UMF	ACP-ULF	SP-M
Molecular weight*	16305.92	3292.26	2462.52
Neutral sugar (%)	71.9	54.6	73.2
Uronic acid (%)	27.6	45.4	26.8
Protein (%)	-	-	-
Component sugar	(mol %)		
Rhamnose	-	-	36.49
Arabinose	10.05	11.60	29.00
Xylose	1.67	11.15	-
Mannose	5.45	6.37	-
Galactose	39.06	32.47	-
Glucose	15.43	18.35	19.38

* Molecular weight was measured by MALDI-TOF MS (VoyagerTM-DE system)

세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐로부터 분리한 간세포를 24시간 배양한 후에 사염화탄소 10 mM을 처리하여 독성을 유발시키면서 각각의 다당류를 1 μM에서부터 100 μM까지 농도를 변화시켜 가한 다음 1.5시간 더 배양한 후 독성회복정도를 측정하였다. 즉 사염화탄소에 의해 간세포가 독성을 입게 되면 간독성 지표효소인 GPT가 배양액 중으로 유출되어 그 값이 현저히 증가되는데 사철쭉으로부터 분리된 다당류 중 ACP-UMF의 경우 1, 10 및 100 μM의 농도에서 배양액 중의 GPT수치를 감소시켜 정상상태 때의 28.9%, 31.3% 및 62.8%의 수준까지 간세포독성 회복효과를 나타냈다. 또한 ACP-ULF의 경우도 1, 10 및 100 μM의 농도에서 GPT치를 감소시켜 정상상태 때의 23.9%, 42.8% 및 46.1%의 수준까지 간세포독성에 대한 회복효과를 나타냈다. 또한 그늘쭉으로부터 분리된 다당류인 SP-M도 역시 같은 농도에서 정상상태 때의 18.5%, 38.2% 및 38.8%수준까지 간세포 회복효과를 나타냈다(Table II). 사염화탄소에 의해 독성이 유발된 간세포에 있어 사철쭉과 인진쭉으로부터 분리된 다당류가 간세포중의 과산화물형성 저해에 미치는 영향을 Table III에 나타냈다. 사염화탄소는 간의 약물대사 효소인 cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase에 의해 ·CCl₃와 ·CClOO·의 매우 강한 반응

Table II – The effect of polysaccharides on GPT content of CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes

Sample	Conc. (μM)	GPT ^a (IU/L)	Protection ^d (%)
Control ^b	–	34.3 ± 3.1	100.0
Reference ^c	–	127.5 ± 10.4	0.0
ACP-UMF	1	100.5 ± 12.3	28.9
	10	98.3 ± 8.5	31.3
	100	68.9 ± 7.4	62.8
ACP-ULF	1	105.2 ± 11.5	23.9
	10	88.3 ± 9.8	42.8
	100	84.5 ± 5.6	46.1
SP-M	1	110.3 ± 5.7	18.5
	10	91.9 ± 4.1	38.2
	100	91.3 ± 9.9	38.8

^a The activity of GPT in the medium was determined. Each value represents the mean ± SD (n=3)

^b Control is the value for hepatocyte cultures not challenged with 10 mM CCl₄.

^c Reference is the value for untreated hepatocytes challenged with 10mM CCl₄.

^d The protection is calculated as 100×(GPT value of reference minus GPT value of sample)/(GPT value of reference minus GPT value of control).

Table III – The effect of polysaccharides on the MDA content of CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes

Sample	Conc. (μM)	MDA ^a (nmole/mg protein)	Protection ^d (%)
Control ^b	–	0.10 ± 0.02	100.0
Reference ^c	–	0.29 ± 0.10	0.0
ACP-UMF	1	0.37 ± 0.09	–
	10	0.33 ± 0.02	–
	100	0.25 ± 0.10	23.9
ACP-ULF	1	0.37 ± 0.11	–
	10	0.25 ± 0.08	23.3
	100	0.22 ± 0.08	38.1
SP-M	1	0.35 ± 0.07	–
	10	0.26 ± 0.05	15.7
	100	0.24 ± 0.11	26.3

^a The content of MDA in the cells was determined. Each value represents the mean ± SD (n=3).

^b Control is the value for hepatocytes cultures not challenged with 10 mM CCl₄.

^c Reference is the value for untreated hepatocyte challenged with 10 mM CCl₄.

^d The protection is calculated as 100×(MDA value of reference minus MDA value of sample)/(MDA value of reference minus MDA value of control).

성을 가진 자유기(free radical)들로 변화하는데 이들이 세포막의 인지질에 결합함으로써 지질과산화물을 초래한다. 즉 사염화탄소에 의하여 간세포가 독성을 입게 되면 지질과산화물이 형성되어 MDA가 과량 생성된다. 사철쭉으로부터 분리된 다당류 ACP-UMF를 처리하는 경우 저농도에서는 지질과산화 억제효과가 나타나지 않았으나 100 μM의 농도처리시 간세포 중의 과산화물질을 감소시켜 정상상태 때의 23.9%수준까지 회복시켰고 ACP-ULF를 1, 10 및 100 μM농도 처리시 10 μM과 100 μM에서 정상상태 때의 23.3%와 38.1% 수준까지 지질과산화 억제작용을 나타냈다. 또한 그늘쭉으로부터 분리된 다당류 SP-M을 처리시, 10 μM과 100 μM의 농도에서 각각 정상상태 때의 15.7%와 26.3% 수준까지 지질과산화 억제효과를 나타냈다(Table III). 이상의 실험결과로부터 사철쭉과 그늘쭉 추출물로부터 분리된 다당류들이 사염화탄소로 독성을 입은 간세포의 배양액으로 유리된 GPT를 감소시킴으로써 간세포 보호효과를 나타냈음을 알 수 있었다. 또한 사염화탄소로 유도된 지질과산화 억제작용이 있음을 알 수 있었고 특히 그늘쭉보다는 사철쭉으로부터 분리된 다당류가 간세포 보호활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

문헌

- 1) Srivastava, R. and Kulshreshtha, K. K. : Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry* **28**, 2877 (1989).
- 2) Ohno, N., Suzuki, I., Sato, K., Oikawa, S., Miyazaki, T. and Yadomae, T. : Purification and structural characterization of an antitumor β -1,3-glucan isolated from hot water extract of the fruit body of cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 4522 (1985).
- 3) Zhang, Y., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and H. Yamada : Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsacus asperoides*. *Planta Medica* **63**, 393 (1997).
- 4) Gonda, R., Takeda, K., Shimizu, N. and Tomoda, M. : Characterization of a neutral polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the rhizome of *Curcuma longa*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 185 (1992).
- 5) Tomoka, M., Ohara, M., Gonda, R., Shimizu, N., Takada, K., Satoh, Y. and S. Shirai : An acidic polysaccharide having immunological activities from the rhizome of *Cnidium officinale*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3025 (1992).
- 6) Hikino, H., Takahashi, M., Otake, K. and Konno, C. : Isolation and hypoglycemic activity of eleutherans A, B, C, D, E, F, and G: Glycans of *Eleutherococcus senticosus* roots. *J. Nat. Prod.* **49**, 293 (1986).
- 7) Kato, A. and Miura, T. : Hypoglycemic action of the rhizomes of *Polygonatum officinale* in normal and diabetic mice. *Planta Medica* **60**, 201 (1994).
- 8) Medina, F. S., Gamez, M. J., Jimenez, J., Osuna, J. I. and Zarzuelo, A. : Hypoglycemic activity of Juniper Berries. *Planta Medica* **60**, 197 (1994).
- 9) Yamaoka, Y., Kawakita, T., Kaneko, M. and Nomoto, K. : A polysaccharide fraction of *Zizyphi fructus* in augmenting natural killer activity by oral administration. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 936 (1996).
- 10) Marchetti, M., Pisani, S., Pietropaolo, V., Seganti, L., Nicoletti, R., Degener, A. and Orsi, N. : Antiviral effect of a polysaccharide from *Sclerotium glaucanicum* towards herpes simplex virus type 1 infection. *Planta Medica* **62**, 303 (1996).
- 11) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Artai, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes*, an edible mushroom. *Cancer Res.* **30**, 2776 (1970).
- 12) Kikumoto, S., Miyajima, T., Yoshizumi, S., Fujimoto, S. and Kimura, K. : Polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Part I. Formation and some properties of an extracellular polysaccharide. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **44**, 337 (1970).
- 13) Kinghorn, A. D. and Balandrin, M. F. : Human Medicinal Agents from Plants, ACS Symposium Series 534, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 242 (1993).
- 14) Zhao, Q. C., Kiyohara, H. and Yamada, H. : Anti-complementary neutral polysaccharides from leaves of *Artemisia princeps*. *Phytochemistry* **15**, 73 (1994).
- 15) 이강노, 지옥표, 광종환, 김영식, 박호균, 구경아, 윤현주 : *Artemisia*속 생약의 다당류 분획 연구(I) 생약학회지 **24**, 289 (1993).
- 16) Koo, K. A., Kwak, J. H., Lee, K. R., Zee, O. P., Woo, E. R., Park, H. K. and Youn, H. J. : Antitumor and immunomodulating activities of the polysaccharide fractions from *Artemisia selengensis* and *Artemisia iwayomogi*. *Arch. Pharm. Res.* **17**, 371 (1994).
- 17) 송기원, 권학철, 김기탁, 김대근, 광종환, 이강노, 지옥표 : 제비쑥 및 갯제비쑥의 다당류 분획 연구. 성균약연논문집 **8**, 1 (1996).
- 18) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 19) Chaplin, M. F. : Carbohydrate analysis, 2nd ed., Oxford University Press, p. 6, p. 32 (1994).
- 20) Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. : Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Medica* **49**, 222 (1983).
- 21) Reitman, S. and Frankel, S. A. : Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56 (1957).
- 22) Logani, M. K. and Davies, R. E. : Lipid oxidation. *Lipids* **15**, 485 (1979).