

황기의 저밀도지질단백질 (LDL) 산화에 미치는 영향

김은정 · 양기숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received July 26, 2001; Revised September 20, 2001)

Effect of Astragali Radix on Low Density Lipoprotein Oxidation

Eun Jeong Kim and Ki Sook Yang

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-172, Korea

Abstract — The root of *Astragalus membranaceus* Bunge (Leguminosae), which has been used for the treatment of hypertension, chronic hepatitis, duodenal ulcers, chronic nephritis and promotion of immunity in folk remedies. Several lines of evidence indicate that oxidative modification of low-density lipoprotein (Ox-LDL) may play an important role in atherogenesis. Hence, the role of antioxidants in the prevention of LDL oxidation needs to be determined. To investigate the antioxidant activity, we determined the MeOH ex. and fractions of Astragali Radix on the inhibition of LDL oxidation. The CH₂Cl₂ and EtOAc fractions inhibited the oxidative modification of LDL by a decrease in the lipid peroxide content and the electrophoretic mobility of LDL. Calycosin-7-O-β-D-glucoside which was isolated from EtOAc fraction inhibits the oxidative modification of LDL.

Keywords □ Astragali Radix, low density lipoprotein oxidation, Calycosin-7-O-β-D-glucoside

황기(黃芪 *Astragali Radix*)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본식물인 단너삼의 근경으로 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bunge(Leguminosae)와 기타 다른 *Astragalus*속 식물의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것¹⁻³⁾으로 황기의 처방으로는 황기건중탕(黃芪建中湯), 황기계지오물탕(黃芪桂枝五物湯), 십전대보탕(十全大補湯), 방기황기탕(防己黃芪湯) 등이 있으며,⁴⁾ 민간에서 혈압강하, 강장, 보기(補氣), 이뇨(利尿) 등에 이용되고 있다. 황기의 성분으로는 flavonoid 화합물인 astraisoflavans, formononetin, 2'3'-dihydroxy-7,4'-dimethoxyisoflavone 등과 saponin으로 astragaloside, soyasaponin 등이, 그 외 γ-aminobutyric acid, β-sitosterol, polysaccharides 등⁵⁻⁸⁾이 보고되어 있다.

저밀도지질단백(Low density lipoprotein)의 산화는 동맥경화와 관련이 있다고 알려져 있다.⁹⁻¹¹⁾ 천연물의

LDL대사에 관한 연구로는 Liang 등¹²⁾과 Yang 등¹³⁻¹⁴⁾의 연구가 있으며 본연구에서는 동맥경화에 효과가 있는 천연자원을 개발하기 위하여 황기의 LDL에 대한 항산화효과를 측정하였다. 본 실험에서는 황기의 methanol extract 및 각 분획이 LDL 산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LDL에 각 시료를 농도별로 가하고 Cu²⁺-induced oxidation을 실시 후, TBARS assay와 agarose gel electrophoretic mobility를 측정하였다. 또한 활성분획에서 분리한 5개의 화합물에 대해서도 TBARS assay를 이용한 항산화효과를 측정하였다.

실험방법

실험재료 — 본 실험에 사용한 황기(*Astragali Radix*)는 강원도 정선에서 재배한 5~6년근을 경동시장에서 구입하여 기원을 확인한 후 사용하였으며, 확장표본(SMP 97020)은 본 대학 생약표본실에 보관되어 있다.

시약 및 기기 — Bovine serum albumin, aprotinine

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-710-9578 (팩스) 02-710-9578

등은 미국 Sigma Co. 제품을 사용하였으며, 기타 시약 및 추출용 용매는 분석용 특급이나 일급시약을 사용하였다. TLC plate는 Merck사의 precoated Kieselgel 60F₂₅₄, column chromatography의 충전제로 Merck사의 Kieselgel 60(No. 7734, 9385)을 사용하였다.

기기는 Electrophoresis system(Vision), Ultracentrifuge(Beckman, Optima™ XL-100K), UV/VIS Spectrophotometer(Jasco, V-530), NMR(Bruker, Avance 500, 500 MHz, 11.4 Tesla/Avance 600, 600 MHz, 14.1 Tesla), FT/IR(Jasco, FT/IR-430), Mass spectrometer(Jeol, JMS-AX505WA), GC/MS(Hewlett Packard 6890 GC, Hewlett Packard 5973 MSD) 등을 사용하였다.

추출 및 분획 - 음건하여 세절한 황기(*Astragalus membranaceus*)의 뿌리 6 kg을 80% methanol로 수욕상에서 4시간씩 3회 추출한 뒤 여과하고 여액을 감압 농축하여 80% MeOH 추출물 660 g을 얻었다. 이것을 중류수에 현탁시키고 Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH로 계통적으로 추출하여 hexane 분획 36.3 g, CH₂Cl₂ 분획 37.6 g, EtOAc 분획 18.5 g, BuOH 분획 264.0 g, 물 분획 303.6 g을 얻었다. 상기의 80%MeOH 엑스 및 각 분획층에 대해 항산화 활성을 검토하여 CH₂Cl₂ 및 EtOAc분획에서 활성을 확인하고 column chromatography를 수행하여 활성물질의 분리를 시도하였다. 황기의 80%MeOH Ex.에서 얻은 CH₂Cl₂분획 중 17 g을 silicagel column chromatography(n-hexane→acetone 100:1→0:1)를 실시하여 13개의 소분획을 얻었고, 이중 4번째, 7번째와 10번째 분획에서 화합물 1(250 mg), 화합물 2(35 mg), 화합물 3(40 mg)을 분리하였고, 또한 EtOAc분획 중 8 g을 silicagel column chromatography(CHCl₃→MeOH 20:1→0:1)를 실시하여 16개의 소분획을 얻었으며, 그 중 8, 10번째 분획에서 화합물 4(9 mg), 화합물 5(16 mg)를 분리하였다.

사람 저밀도 지질단백(LDL)의 분리 - 혈액에서 밀도 1.025~1.055 g/ml에 해당하는 lipoprotein을 얻기 위하여 신선한 human plasma에 aprotinin 0.002%, EDTA 0.05%, NaN₃ 0.05%를 섞어 교반한 후 KBr (d=1.006~1.025)를 가하고 1차 원심분리하였다(40,000 rpm, 4°C, 16 hr). 이때 분리된 VLDL을 제거하고 LDL이 포함된 분획을 취한 후 KBr을 가하여 2

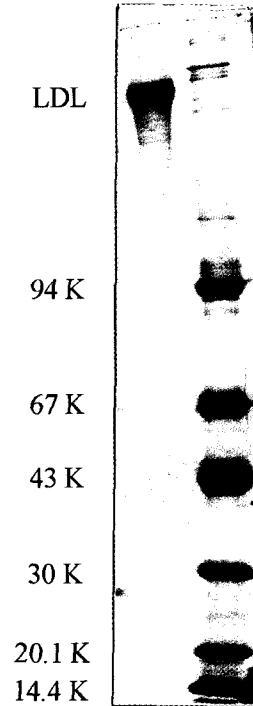


Fig. 1 - SDS-PAGE gel pattern in 10% slab gel.

차 원심분리(40,000 rpm, 4°C, 16hr)하여 LDL을 분리하였다. 분리한 LDL은 pH 7.4 PBS로 투석시킨 후 사용하였다. LDL중 단백질 정량은 Lowry 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하였으며, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하여 순수도를 확인하였다(Fig. 1).

LDL의 산화 - 시험관에 단백질의 함량이 400 µg에 해당하는 LDL(400 µg protein/ml), phosphate buffered saline(pH 7.4)와 시료 및 1 mM CuSO₄ 16 µl를 첨가해 전체부피가 1 ml이 되도록 한 후 잘 섞어 37°C shaking incubator에서 배양시키고 EDTA(1 mM)와 BHT(1 mM) 20 µl를 첨가하여 산화를 중지시켰다.

Relative electrophoretic mobility - 시료가 LDL 산화에 미치는 영향을 보코자 80% MeOH 엑스와 각 분획의 시료를 산화시간 및 농도별로 변화시키면서 agarose gel상의 이동거리를 측정하였다. LDL에 PBS 및 각 시료를 농도별로 첨가한 후 곧바로 CuSO₄를 가하여 시간별로 산화시켰다. 80% MeOH 엑스의 경우는 산화시간을 각각 4, 8, 16, 24시간으로 시간을 달리하여 산화시켰으며, 각 분획들은 산화시간을 4시간으로 하였다. 산화시킨 LDL용액과 순수 LDL용액을

농축하여 sample buffer(1M trisbase 0.26 ml, glycerol 1 ml, 1% bromphenol blue 0.5 ml)에 증류수를 가해 10 ml가 되도록 조제)와 3:1로 섞어 0.7% agarose gel에 점적하고 TBE 완충액(pH 7.4)를 이용하여 14~16 mA의 전력으로 전기영동을 실시하여 이동거리를 측정하였으며, 시료를 첨가하지 않은 Ox-LDL의 이동거리에 대한 상대 이동도를 계산하였다.

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 측정 - LDL에 80% MeOH 엑스와 각 분획 시료를 농도별로 첨가하여 4시간 산화시킨 후 반응시킨 LDL용액에 25% trichloroacetic acid를 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상등액에 1% thiobarbituric acid를 첨가하여 95°C에서 중탕시켜 발색시킨 후 냉각시키고, 생성된 MDA의 양은 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하여 구하였다. 각 시료의 LDL 지질과산화 억제효과를 비교 검토하기 위해서 Cu^{2+} 에 의한 산화로 생성되는 과산화 지질량을 50%억제하는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)를 구하였다.

실험결과 및 고찰

Agarose gel electrophoresis를 이용한 항산화력 측정 - 정상 LDL에 Cu^{2+} 만 가한 경우와 정상 LDL에 시료 및 Cu^{2+} 를 가한 후 시간경과(4, 8, 16, 24 시간)에 따른 이동도를 비교해보았을 때 산화시간이 증가할수록 정상 LDL에 비해 그 이동도가 증가하는

데, 이것은 Cu^{2+} 에 의해 LDL중 apolipoprotein-B의 lysine derivatization이 negative charge를 증가시켜 anode쪽에서의 이동에 기인한다. 또한 황기 MeOH 엑스를 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm의 농도로 LDL에 첨가한 후 Cu^{2+} 로 각 농도별로 4, 8, 16, 24 시간씩 산화시킨 후 각 산화 시간별로 농도차이에 따른 이동도를 측정하였을 때 시료의 농도 증가에 따라 그 이동도의 증가가 억제되었으며, 장시간 산화에도 억제효과가 있음을 보여주었다(Table I). MeOH 엑스의 각 분획을 LDL에 50, 100, 200, 300, 400, 500 ppm의 농도로 가한 후 Cu^{2+} 로 4시간 산화시킨 후 0.7% agarose gel에 loading 한 결과 산화된 LDL에 비해 각 시료를 가한 LDL의 이동도가 감소되어 시료가 항산화작용이 있음을 알 수 있었다. 그 중에서도 EtOAc와 CH_2Cl_2 분획에서 다른 분획보다 좋은 효과를 보여주었다(Table II, Fig. 2).

LDL 지질과산화의 억제 - 지질의 산화정도를 측정하는 방법으로는 생성된 malondialdehyde의 양을 측정하거나 hydroperoxide의 양을 Iodometry에 의한 측정, 불포화지방산(conjugated dien)측정법 등 다양하지만, TBARS를 이용한 MDA 측정법이 널리 이용되고 있다. 황기 80% MeOH 엑스 및 각 분획을 농도별로 LDL에 가하여 Cu^{2+} 로 4시간 산화시킨 후 MDA를 표준시료로 하는 TBARS assay를 실시하여 지질과산화를 50% 억제하는데 필요한 시료량(IC₅₀)을 측정한 결과 EtOAc와 CH_2Cl_2 분획에서 각각 1.3, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 다른 분획에 비해서 효과가 높았다(Table III).

Table I - Effects of Astragali Radix MeOH Ex. on electrophoretic mobility changes by LDL oxidation time

Group (ppm)	REM (%) ^{b)}			
	4hr	8hr	16hr	24hr
Ox-LDL ^{a)}	100	100	100	100
100	87.3 ± 1.3*	93.5 ± 1.1	90.7 ± 3.1	98.4 ± 4.0
200	84.7 ± 1.7*	86.2 ± 0.7*	87.6 ± 2.5	93.8 ± 1.5
400	84.3 ± 1.2*	81.7 ± 1.0*	78.0 ± 1.4*	92.3 ± 8.8
600	78.4 ± 2.1*	81.2 ± 1.2*	77.7 ± 1.0*	78.4 ± 2.9*
800	78.2 ± 2.0*	80.5 ± 1.3*	77.1 ± 2.1*	74.0 ± 1.2*
1000	76.9 ± 1.6*	80.4 ± 1.2*	76.9 ± 2.1*	73.8 ± 1.1*

Each value represents the mean ± S.E.

*Significantly different from the control group (p<0.05)

^{a)}Ox-LDL: Cu^{2+} -induced oxidized LDL

$$REM(\%) = \frac{[\text{Sample}]}{[\text{Ox-LDL}]} \times 100$$

^{b)}REM (relative electrophoretic mobility) regarded as sample added oxidized LDL migration compared with oxidized LDL mobility

Table II - Effects of Astragali Radix fractions on electrophoretic mobility changes by LDL oxidation

Group	REM (%) ^{b)}					
	50	100	200	300	400	500(ppm)
Ox-LDL ^{a)}	100					
Hexane	98.6 ± 1.0	94.5 ± 1.1	89.3 ± 4.2	89.3 ± 8.1	88.0 ± 9.1	88.0 ± 6.5
CH ₂ Cl ₂	96.6 ± 1.6	91.6 ± 4.4	90.0 ± 4.2	88.3 ± 2.6*	86.7 ± 3.9*	86.6 ± 3.1*
EtOAc	98.7 ± 0.9	97.4 ± 0.8	97.0 ± 3.2	83.9 ± 2.8*	74.3 ± 2.6*	73.0 ± 2.5*
BuOH	98.4 ± 0.8	96.9 ± 0.2*	95.4 ± 0.3*	92.4 ± 2.0	92.4 ± 2.4	90.9 ± 4.0
Water	97.9 ± 0.9	94.5 ± 0.8*	94.3 ± 0.8*	93.7 ± 0.9*	93.2 ± 0.8*	93.1 ± 1.0

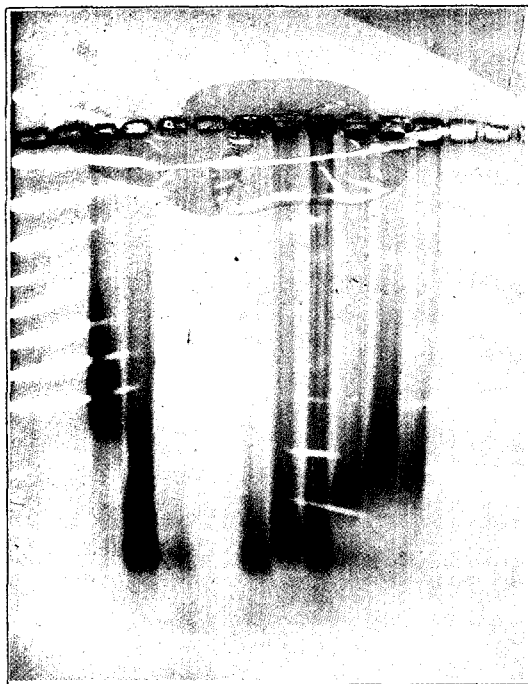
Each value represents the mean ± S.E.

*Significantly different from the control group (p<0.05)

^{a)}Ox-LDL: Cu²⁺-induced oxidized LDL

$$\text{REM}(\%) = \frac{[\text{Sample}]}{[\text{Ox-LDL}]} \times 100$$

^{b)}REM(relative electrophoretic mobility) regarded as sample added oxidized LDL migration compared with oxidized LDL mobility



LDL OX-LDL^{a)} 50 100 200 300 400 500 ppm

Fig. 2 - Effect of EtOAc fr. on electrophoretic mobility changes by LDL oxidation

^{a)}Ox-LDL: Cu²⁺-induced oxidized LDL

화합물의 TBARS 분석 - 황기의 80%MeOH Ex.에서 얻은 CH₂Cl₂분획을 silicagel column chromatography를 실시하여 분리한 화합물 1, 2, 3은 기기분석 결과와 문헌¹⁶⁻¹⁹⁾과의 비교로 각각 β-sitosterol, β-sitosterol 3-O-β-[6-O-palmitoyl]-glucoside, β-sitosteryl

Table III - Efficacies of Astragali Radix on Cu²⁺-induced LDL lipid peroxidation

Group	IC ₅₀ (μg/ml) ^{a)}
MeOH Ex.	35.5
Hexane fr.	3.9
CH ₂ Cl ₂ fr.	2.5
EtOAc fr.	1.3
BuOH fr.	2.6
Water fr.	4.6

^{a)}IC₅₀: Required sample concentration (μg/ml) for 50% inhibition of Cu²⁺-induced LDL (mg protein) lipid peroxidation

3-O-β-D-glucopyranoside로 확인, 동정하였으며, EtOAc 분획에서 silicagel column chromatography를 실시하여 분리한 화합물 4와 5도 기기분석 결과와 문헌²⁰⁻²⁴⁾과의 비교로 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyiso-flavan-7-O-β-D-glucoside, calycosin-7-O-β-D-glucoside로 확인, 동정하였다. 분리한 5가지 화합물에 대해서 이들이 LDL산화에 미치는 효과를 보기위해 LDL에 각 화합물을 농도별로 가하고 Cu²⁺-induced oxidation을 실시 후, TBARS assay를 실시하여 MDA 생성량을 측정하였고, 화합물 1-5는 각각 농도 의존적으로 LDL 산화에 대해 억제작용을 나타냈다. 지질과산화물을 50% 억제하는데 필요한 시료의 μmol농도(IC₅₀)를 구하였을 때, 화합물 5는 11.2 μmol/m로 ascorbic acid의 4.5 μmol/m와 비교했을 때 크게 뒤떨어지지 않는 수준으로 우수하였다(Table IV, V).

정상적인 LDL은 산소라디칼에 의해 쉽게 산화되며,

Table VI – Efficacies of isolated Compounds 1-5 from Astragali Radix on Cu²⁺- induced LDL lipid peroxidation

Group (Ascorbic acid)	MDA (nmol/mg protein)			
	50 (5)	100 (10)	200 (25)	400 ppm (50)
LDL	3.3 ± 0.29			
Ox-LDL	33.8 ± 1.70			
Ascorbic acid	38.6 ± 2.14	6.6 ± 0.99	5.6 ± 1.99*	4.9 ± 0.03**
Compound 1	24.2 ± 2.67	22.3 ± 1.31	20.7 ± 1.77	18.7 ± 0.77
Compound 2	28.1 ± 1.93	24.4 ± 0.46	20.5 ± 1.33	18.2 ± 0.49
Compound 3	28.1 ± 0.88	25.3 ± 2.51	20.4 ± 1.45	18.0 ± 1.83
Compound 4	23.9 ± 0.85	22.4 ± 1.49	17.5 ± 0.63	17.3 ± 0.50
Compound 5	24.1 ± 3.95	4.5 ± 0.31	2.8 ± 0.05	1.7 ± 0.24**

*Significantly different from the control group (p<0.01)

**Significantly different from the control group (p<0.001)

Compound 1 : β-sitosterol

Compound 2 : β-sitosterol 3-O-β-[6'-O-palmitoyl]-glucoside

Compound 3 : β-sitosteryl 3-O-β-D-glucopyranoside

Compound 4 : 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside

Compound 5 : calycosin-7-O-β-D-glucoside

Table V – IC₅₀ of isolated Compounds 1-5 from Astragali Radix on Cu²⁺-induced LDL lipid peroxidation

Group ^{a)}	IC ₅₀ (μmol/ml) ^{b)}
Ascorbic acid	4.5
Compound 1	121.5
Compound 2	48.7
Compound 3	89.8
Compound 4	72.9
Compound 5	11.2

^{a)}Compound 1 : β-sitosterol

Compound 2 : β-sitosterol 3-O-β-[6'-O-palmitoyl]-glucoside

Compound 3 : β-sitosteryl 3-O-β-D-glucopyranoside

Compound 4 : 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside

Compound 5 : calycosin-7-O-β-D-glucoside

^{b)}IC₅₀: Required sample concentration (μmol/ml) for 50% inhibition of Cu²⁺-induced LDL (mg protein) lipid peroxidation

산화된 LDL의 과다한 침착으로 유도된 form cell은 동맥경화의 초기 병변이라고 생각되는 지방반(fatty streak), 섬유판(fibrous plaque)의 형성을 야기시킬 수 있다. 또한 산화LDL은 높은 세포내 화학적 독성을 지니므로서 혈관 내피세포와 평활근세포의 국소적인 손상을 일으켜 atherosclerosis의 병변으로 작용하기도 한다. 이러한 결과들은 oxidized LDL이 동맥경화의 중요한 유발인자임을 말해주며 합성 또는 천연 항산화제의 LDL 산화 저해제로서의 역할과 그들의 동맥경화 예방과 치료 효과에 대해 지대한 관심을 불러 일으켰으며 α-tocopherol, β-carotene, ascorbic acid등을 대

상으로한 다양한 연구가 행해졌다. Jialal²⁵⁻²⁶⁾등의 연구에서는 ascorbic acid와 α-tocopherol의 LDL 산화억제 효과를 비교하였을 때, ascorbic acid의 효과가 더 우수하였으며, 전구체인 β-carotene도 α-tocopherol보다 더 효과적이라고 보고하고 있다. 또한 flavonoid의 섭취가 심혈관계 질환의 위험을 감소시킨다는 연구 결과가 보고되어 있다.²⁷⁾ 본 실험에서 ascorbic acid과 각 분리한 화합물과 효과를 비교하였을 때, isoflavone glycoside인 calycosin-7-O-β-D-glucoside가 다른 화합물에 비해 우수한 효과를 나타냈다. 같은 isoflavone glycoside인 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside도 산화 억제 효과가 있지만, calycosin-7-O-β-D-glucoside에 비해 그 효과가 감소하였다.

결 론

황기가 관상동맥경화 등의 유발인자로 알려진 저밀도 지단백산화에 미치는 효과를 검색한 결과에서, relative elctrophoretic mobility를 측정된 결과 CuSO₄에 의해 산화된 LDL에 비하여 황기 MeOH 엑스 및 분획을 가한 후 산화시킨 LDL의 이동거리가 현저히 감소하였으므로, 황기가 Cu²⁺에 의한 산화로부터 LDL의 보호 효과가 있음을 확인하였고, TBA method를 이용한 항산화력 측정 결과에서도 황기의 EtOAc 분획에서 효과가 우수하였다. 또한 효과가 좋은 CH₂Cl₂ 및 EtOAc 분획에서 분리한 5가지 화합물

중에서 calycosin-7-O-β-D-glucoside의 Cu²⁺에 의한 LDL의 산화 저해 효과가 우수하였다.

사 사

본 연구는 1999년도 숙명여자대학교 확충기반사업 연구비에 의해 수행되었기에 감사의 말씀을 드립니다.

문 헌

- 1) 생약학연구회 : 현대생약학, 학창사, 서울, p. 268 (2000).
- 2) 이상인 : 본초학, 경희대학교 한의과대학 본초학교실, 서울, p. 54 (1981).
- 3) 신재용 편저 : 방약합편 해설, 정보사, 서울, p. 330 (1991).
- 4) 上海科學技術出版社 : 중약대사전, Vol. 1, 소학관, 東京, p. 121 (1985).
- 5) Hirotsani, M., Zhou, Y., Rui, H. and Furuya, T. : Cycloartane Triterpene Glycosides from the Hairy Root Cultures of *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry* **37**(5), 1403 (1994).
- 6) Zhou, Y., Hirotsani, M., Rui, H. and Furuya, T. : Two Triglycosidic Triterpene Astragalosides from the Hairy Root Cultures of *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry* **38**(6), 1407 (1995).
- 7) Kitagawa, I., Wang, H. K., Saito, M. and Yoshikawa, M. : Saponin and Sapogenol. XXXVI. Chemical Constituents of *Astragali Radix*, the Root of *Astragalus membranaceus* BUNGE(3). Astragalosides III, V, and VI. *Chem. Pharm. Bull.* **31**(2), 709 (1983).
- 8) Kitagawa, I., Wang, H. K., and Yoshikawa, M. : Saponin and Sapogenol. XXXVII. Chemical Constituents of *Astragali Radix*, the Root of *Astragalus membranaceus* BUNGE(4). Astragalosides VII and VIII. *Chem. Pharm. Bull.* **31**(2), 716 (1983).
- 9) Esterbauer, H., Schmidt, R. and Hayn, M. : Relationships and among oxidation of low-density lipoprotein, antioxidant protection and atherosclerosis. *Adv. Pharmacol.* **38**, 425 (1997).
- 10) Jialal, I. and Devaraj, S. : Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry* **42**, 498 (1996).
- 11) Witztum, J. L. and Steinberg, D. : Role of oxidized low-density lipoprotein in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **88**, 1785 (1991).
- 12) Liang, J. Y., Marie, T. D. L. and Lester, P. : *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**(2), 360 (1995).
- 13) Yang, K. S. and Kim, H. S. : Effect of Methanol extract of *Arctii Radix* on Low density Lipoprotein Oxidation. *J. Pharm. Sci.* **13**, 97 (1997).
- 14) Yang, K. S. and Sim, J. M. : Effect of *Arctii Fructus* on Low Density lipoprotein Oxidation. *Kor. J. Pharmacog.* **28**(4), 275 (1997).
- 15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 16) 김진숙, 김연태, 김정숙 : 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge) 뿌리의 성분 연구(I). 생약학회지 **27**(4), 336 (1996).
- 17) 강삼식, 김주선, 강윤정, 한혜경 : 음양곽의 성분에 관한 연구(II). 생약학회지 **21**(1), 56 (1990).
- 18) Kim, S. W., Chung, K. C., Son, K. H. and Kang, S. S. : Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Smilax* China. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**(2), 76 (1989).
- 19) Chang, I. M., Yun, H. S. and Kazuo, Y. : Revision of ¹³C-NMR Assignment of β-Sitosterol and β-sitosteryl-3-O-β-D-glucopyranoside Isolated from *Plantago asiatica* Seed. *Kor. J. Pharmacogn.* **12**(1), 12 (1981).
- 20) He, Z. Q. and Findly, J. A. : Constituents of *Astragalus membranaceus*. *J. Nat. Product.* **54**(3), 810 (1996).
- 21) Katsura, E. and Yamagishi, T. : Quantitative Determination of Isoflavonoids in *Astragali Radix* by High Performance Liquid Chromatography, 道衛研究所報 第 37 集, 48 (1987).
- 22) Hatano, T., Takagi, M., Ito, H. and Yoshida, T. : Acylated flavonoid glycosides and accompanying phenolics from Licorice. *Phytochemistry* **47**(2), 289 (1998).
- 23) 김진숙, 김정숙 : 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge) 뿌리의 성분 연구(II). 생약학회지 **28**(2), 75 (1997).
- 24) 백남인, 김영숙, 경중수, 박기현 : 황기의 간기능 보호 성분. 생약학회지 **27**(2), 111 (1996).
- 25) Jialal, I. Vega, G. L. and Grundy, S. M. : Physiological

- levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* **82**(3), 185 (1990).
- 26) Jialal, I., Norkus, E. P., Cristol, L. and Grundy, M. G. : β -Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* **1086**, 134 (1991).
- 27) Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J. L., Duriez, P., Teissier, E. and Cotellet, N. : Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* **29**(9), 900 (2000).