

한약재 물 추출물의 아세틸콜린에스테라제 활성 억제 검색

이형철 · 황상구 · 이영찬 · 김대근 · 박영준 · 김태은¹ · 김명동¹ · 전병훈*

원광대학교 한의과대학 병리학교실, ¹: 상지대학교 한의과대학 생리학교실

Screening of the Acetylcholinesterase Inhibitors from Water Extracts of the Medicinal Plants

Hyung Chul Lee, Sang-Gu Hwang, Young Chan Lee, Dae Gun Kim, Young Jun Park, Tae Eun Kim¹, Mounng Dong Kim¹, Byung Hun Jeon*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, ¹: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Sangji University

Over the past decade there has been a resurgence of interest in botanical products for their medicinal uses. This present study was designed to screen medicinal plants for the treatment of brain diseases such as Alzheimer's disease or aging. We tested the effects of the water extracts from 41 species medicinal plants on acetylcholinesterase (AChE) inhibition and antioxidant activity *in vitro*. Among them, *Euodia rutaecarpa*, *Rubus coreanus*, *Achyranthes japonica*, *Morus alba*, *Salvia miltiorrhiza*, *Liriope platyphylla*, and *Rheum palmatum* showed relatively AChE inhibition potency over 80%. Among the 7 medicinal plants investigated, *E. rutaecarpa* showed an 25%, 65%, and 93% inhibitions on AChE activity at 2.5, 12.5, and 25 $\mu\text{g/ml}$ of the extract, respectively and was found to be one of most potent AChE inhibitor. The water extracts from 4 species (*E. rutaecarpa*, *R. coreanus*, *A. japonica*, and *M. alba*) were tested on their antioxidant capacities using radical scavenging effect against ABTS^{•+}. Among the 4 medicinal plants investigated, both *R. coreanus* and *E. rutaecarpa* showed significant antioxidant capacity. Therefore, *E. rutaecarpa* and *R. coreanus* are expected to ameliorate the clinical symptoms in Alzheimer's disease due to significant AChE inhibition and radical scavenging effect.

Key words : Brain disease, acetylcholinesterase inhibitor, antioxidant capacity, medicinal plant.

서 론

전 세계적으로 사람의 평균 수명이 고령화되는 현상은 과학과 의학의 발전에 힘입어 최근 10년 동안에 급격히 증가하고 있으며, 이로 인해 암과 더불어 뇌 질환 환자의 증가가 최근 사회적인 문제로 강력히 대두되고 있다. 미국에서는 노인성 치매 환자 수가 400만 명 이상으로 제 4위의 사망률을 차지하고 있으며¹⁾, 2040년에는 약 9백만 명이 이를 것으로 추정하고 있다²⁾. 이와 같이 노령인구가 증가됨에 따라 고등정신기능 및 인격의 황폐화를 나타내는 퇴행성 뇌 질환인 치매는 근래에 들어 급격히 증가하는 추세에 있으므로 많은 연구와 투자를 하여야 할 것이다. 치매질환은 환자 자신의 생존능력과 인격뿐만 아니라 보호자의 정신적 고통과 더불어 경제적 피해와 사회적 문제를 발생시키므로 이를 예방하고 치료할 수 있는 의약품의 개발이 시

급히 요구되는 분야로 발전하였다. 우리나라에서도 생활수준의 향상과 보건복지 정책의 발전 등으로 남녀 모두에게 있어서 평균수명이 증가하는 추세를 보이고 있다. 그 결과 치매를 포함한 뇌 질환 환자가 증가되고 있어 서구사회와 마찬가지로 사회적인 문제로 크게 대두될 것이므로 한약재를 포함하여 천연물을 이용한 치료제의 개발이 이루어져야할 뿐만 아니라 연구를 통해 가능하리라고 본다. 치매는 정신 기능의 전반적인 장애 질환으로 발병 원인은 다양하다^{3,4)}. 치매의 주요 발병 원인이 알츠하이머씨병(Alzheimer's disease)이라는 것이 알려지면서 선진국에서는 그 치료를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다⁵⁾. Alzheimer's disease(AD)는 중추신경계의 퇴행성 질병으로 기억력 감퇴, 인식능력 및 지능 퇴화 등의 증상을 나타내며, 병리적인 소견은 노인반(senile plaque), 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle), amyloid성 혈관이 발견된다⁶⁾. 또한 AD는 뇌에서 acetylcholine 생성속도의 감소와 관련이 있다고 밝혀져 있으며⁷⁾, 그러한 시냅스기능을 회복하기 위해서는 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 가수분해를 억제시키는

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
E-mail : omdjbh@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6843
· 접수: 2001/12/21 · 수정: 2002/02/26 · 채택: 2002/03/18

방법이 효과가 있음을 증명하였다⁸⁹⁾. 현재까지 치매를 개선할 수 있는 방법은 탁월한 acetylcholinesterase(AChE)의 기능을 방해하는 저해제의 사용으로 ACh의 분해를 억제시켜 손실된 ACh를 보존시키는 것이다. AChE(EC 3.1.1.7)는 신경조직에 많이 존재하는 효소로서 두 개의 polypeptide 사슬로 구성되어 있고 활성자리는 anionic site와 esteratic site로 이루어진 분자량 약 260,000 dalton의 단백질이다(Fig. 1). AChE는 신경전달물질인 ACh를 acetate와 choline으로 가수분해시키는 역할을 한다. 최근 AD의 치료제로는 Tacrine, Velnacrine, Aricept 등이 사용되고 있으며, 이들은 AChE inhibitor로서 acetylcholine neurotransmitter system에 작용한다고 알려져 있다¹⁰⁾. AChE inhibitor의 사용은 손상된 인식능력을 향상시키며 집중력을 높이는 데 효과적이지만¹¹⁾ 아직까지 AD를 치료할 수 있는 실질적인 치료제는 없는 상태이고 단지 개선하는 효과만을 나타낸다. 따라서 AD의 치료제를 개발하기 위해 AChE inhibitor^{12,13)}, 항산화제¹⁴⁾, 혹은 neuronal NOS inhibitor¹⁵⁾ 등에 효과가 탁월한 물질 탐색이 활발히 이루어지고 있는 동시에 AD 발병기전을 밝히는데 많은 연구가 진행되고 있다. 한의학에서 치매는 言語, 感情, 行動面에서 비정상적인 증상이 나타나는 健忘, 呆病, 癡狂, 虛勞 등의 범주에 속하며, 心脾虛, 肝腎不足, 髓海不足 등의 원인으로 발생하므로 益氣健脾, 化痰宣竅, 活血行氣 등의 치료법이 활용된다¹⁶⁻²¹⁾. 본 연구에서는 한약재로부터 AChE의 활성을 저해시키는 약재를 선별하여 알츠하이머씨 병을 개선시킬 수 있는 후보 한약재를 제시하는 동시에 생리활성물질의 분리가 가능한 한약재의 자료를 탐색하고자 한다.

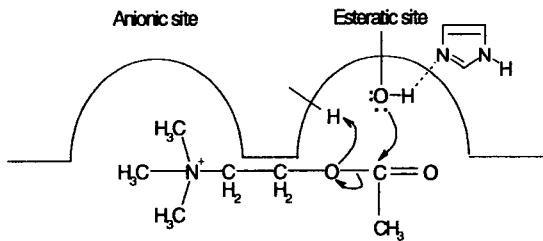


Fig. 1. Structure of acetylcholinesterase

재료 및 방법

1. 한약재의 물 추출물 제조

본 실험에 사용한 한약재는 서울 경동시장에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 병리학교실의 전병훈교수가 감별한 후 사용하였으며, 현재 표준시료는 원광대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되어 있다. 선별된 41 종의 한약재는 각각 100 g 씩을 분쇄한 후 플라스크에 넣고 증류수 1,000 ml로 3시간 동안 가온 추출하였다. 추출물은 3M 여과지를 사용하여 여과하였으며, 이 여과액은 회전농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 시료는 -70°C에 보관하여 결빙시킨 후 동결건조기를 사용하여 얻어진 건조된 분말을 일정농도(1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml)로 증류수에 용해하여 실험에 사용하였다.

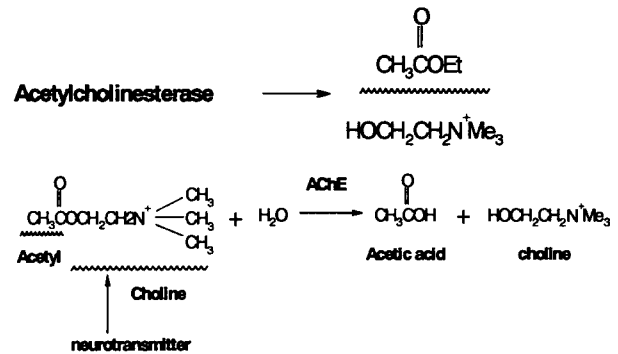
2. 뇌 조직의 균질액 제조

흰쥐(Sprague-Dawley rat)의 두부를 절단하여 뇌를 적출한 다음 50 mM Tris buffer(pH 7.4)를 이용하여 조직을 균질화하였다. 이 균질액은 4°C에서 1,000 × g로 10분 동안 원심분리하였으며, 얻어진 상층액을 효소액으로 사용하였다.

3. Acetylcholinesterase(AChE) 활성 억제 측정

AChE의 효소활성은 Ellman 방법²²⁾에 따라 수행하였다. Acetylthiocholine(ATCh)를 기질로 사용하였으며 AChE에 의해 생성되는 thiocholine을 DTNB(5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid)와 반응시켜 그 결과 생성되는 5-thio-2-nitrobenzoate를 412 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 정량하였다. 반응속도는 60초 동안의 초기속도를 측정하였으며, 억제 활성은 inhibition rate (%) = 100 - [(ΔAsamp/ΔAcon) × 100] 으로 계산하였다.

AChE



ATCh

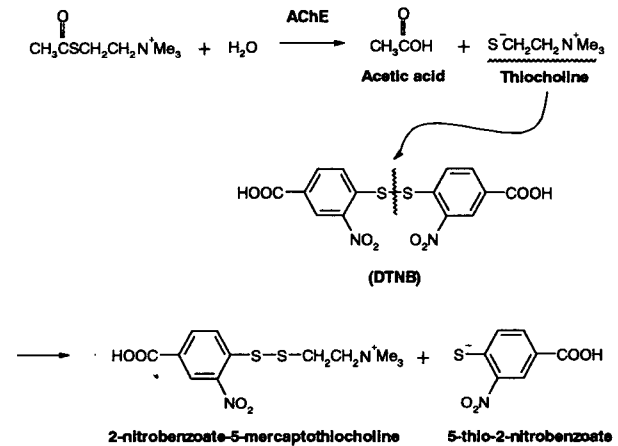


Fig. 2. Colorimetric method of acetylcholinesterase activity

4. 항산화활성 측정

항산화활성 측정은 Rice-Evans와 Miller의 방법²³⁾에 따라 total antioxidant status kit(Randox Lab)를 사용하여 측정하였다. 즉 시료 20 μg/20 μl과 20 mM phosphate buffer(pH 7.4) 및 2.5 μM metamyoglobin 등이 포함된 반응액 980 μl를 처리한 다음 734 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 표준물질은 비타민 E 유사체인 Trolox를 사용하였으며, 항산화활성은 mM Trolox equivalent (mMTE)로 나타내었다.

결과 및 고찰

오늘날 서구 및 우리 나라에서는 노령인구의 비율이 증가함에 따라 암과 같은 고질병과 더불어 퇴행성 뇌 질환인 치매환자의 비율이 급격히 증가하고 있다. 그 중 치매는 노인성 치매 (Alzheimer's disease)와 혈관성 치매가 다수를 차지하고 있는 실정이다. 예로부터 치매를 치료하기 위한 한의학적 연구는 三和散²⁴⁾, 七福飲²⁵⁾ 및 定志丸²⁶⁾의 처방을 활용한 연구가 보고되었을 뿐 체계적인 연구는 아직까지 미비한 상태이다.

Table 1. AChE inhibition activity by the hot water extracts of traditional medicines

Herbal Name	Scientific name	Inhibition activity (%)
Fructus Euodiae	<i>Euodia rutaecarpa</i>	93
Fructus Rubi	<i>Rubus coreanus</i>	88
Radix Achyranthis	<i>Achyranthes japonica</i>	87
Fructus Mori	<i>Morus alba</i>	87
Radix Salviae Miltiorrhizae	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	85
Tuber Lirioepis	<i>Liriope platyphylla</i>	83
Rhizoma Rhei	<i>Rheum palmatum</i>	80
Flos Loniceræ	<i>Lonicera japonica</i>	79
Cortex Hibisci	<i>Hibiscus syriacus</i>	79
Fructus Mume Immaturus Praeparatum	<i>Prunus mume</i>	78
Tuber Dioscorea	<i>Dioscorea batatas</i>	75
Radix Rehmanniae	<i>Rehmannia glutinosa</i> var. <i>purpurea</i>	75
Fructus Gardeniae	<i>Gardenia jasminoides</i>	74
Semen Glycine Nigrae	<i>Glycine max</i>	74
Radix Polygoni Multiflori	<i>Polygonum multiflorum</i>	73
Ramulus et Uncus Uncariae	<i>Uncaria sinensis</i>	72
Tuber Pinelliae	<i>Pinellia ternata</i>	72
Radix Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	71
Tuber Aconiti Koreani	<i>Aconitum koreanum</i>	70
Herba Artemisiae Capillaris	<i>Artemisia capillaris</i>	69
Cortex Cinnamomi	<i>Cinnamomum cassia</i>	69
Folium Artemisiae Asiaticae	<i>Artemisia asiatica</i>	68
Radix Araliae Cordatae	<i>Aralia cordata</i>	65
Herba Menthae	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	65
Hoelen Cum	<i>Pachyma hoelen</i>	65
Radix Euphorbiae	<i>Euphorbia pekinensis</i>	64
Cortex Fraxini	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	64
Herba Ephedrae	<i>Ephedra sinica</i>	64
Rhizoma Cimicifugae	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	63
Herba Taraxaci	<i>Taraxacum platycarpum</i>	62
Rhizoma Cyperi	<i>Cyperus rotundus</i>	61
Tuber Cremastrae	<i>Cremastra variabilis</i>	60
Rhizoma Cnidii	<i>Cnidium officinale</i>	59
Radix Sophorae Subprostratae	<i>Sophora subprostrata</i>	59
Lignum Sappan	<i>Caesalpinia sappan</i>	58
Radix Asparagi	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	57
Radix Scutellariae	<i>Scutellaria baicalensis</i>	56
Radix Phlomis	<i>Phlomis umbrosa</i>	55
Rhizoma Cibotii	<i>Cibotium barometz</i>	54
Ramus Loranthis	<i>Loranthus parasiticus</i>	50
Radix Bupleuri	<i>Bupleurum falcatum</i>	50

Data are shown as mean from three independent experiments, and each medicinal extract was tested at the 25 μ g. The value was expressed as percentage of control without inhibitor, as 100% activation.

현재 치매 치료제를 개발하기 위한 연구방향은 AChE inhibitor의 연구가 가장 활발히 진행되고 있으며, 그 외에도 β -amyloid의 침착 억제제, 항산화제, 자유라디칼 제거제 등이 여러 각도로 제시되고 있다. 그러므로 AChE 활성을 억제 하는데 효과가 탁월한 한약재의 탐색은 Alzheimer's disease를 포함한 치매의 치료효과를 높일 수 있는 새로운 한방처방을 개발하는데 필요할 뿐만 아니라 새로운 AChE inhibitor를 찾아내는데 중요한 자료가 될 것이다.

따라서 본 연구에서는 뇌 질환 환자에 자주 사용되거나 AChE inhibitor로서의 효과가 있을 것으로 판단되는 41종의 한약재를 선정하여 본 실험에 사용하였다. AChE 활성 억제 효과는 한약재 물 추출물의 최종농도 25 μ g/ml에서 Ellman 등²²⁾의 방법으로 비교 조사하였다. 오수유(*E. rutaecarpa*), 복분자(*R. coreanus*), 우슬(*A. japonica*), 흑상심(*M. alba*), 단삼(*S. miltiorrhiza*), 맥문동(*L. platyphylla*), 대황(*R. palmatum*)은 대조군과 비교하여 AChE에 대해 80% 이상의 활성 억제효과를 나타내었으며, 금은화(*L. japonica*), 목근(*H. syriacus*), 오매(*P. mume*) 등의 25종은 79~60% 정도의 활성 억제를 나타내어 AChE 활성 억제작용에 비교적 우수한 한약재로 확인되었다(Table 1).

AChE의 활성 억제가 탁월한 7종의 한약재는 농도별(2.5 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml)로 제조하여 AChE에 대한 활성 억제를 비교 측정한 결과, 오수유(*E. rutaecarpa*) 및 복분자(*R. coreanus*)는 25 μ g/ml에서 각각 93%와 88%, 12.5 μ g/ml에서 65%와 44%, 2.5 μ g/ml에서 25%와 18%의 활성억제를 나타내어 다른 한약재에 비해 낮은 농도에서도 강한 활성 억제효과를 나타냄을 확인되었다. 그 외에 5종(우슬, 흑상심, 단삼, 맥문동, 대황)의 한약재 물 추출물에서는 25 μ g/ml에서 88~80%, 12.5 μ g/ml에서 49~37%, 2.5 μ g/ml에서 18~11%의 활성 억제효과를 나타내었으며, 이들 5종의 한약재 추출물들은 상호간에 유사한 AChE 활성 억제 수준을 나타내었다(Fig. 3).

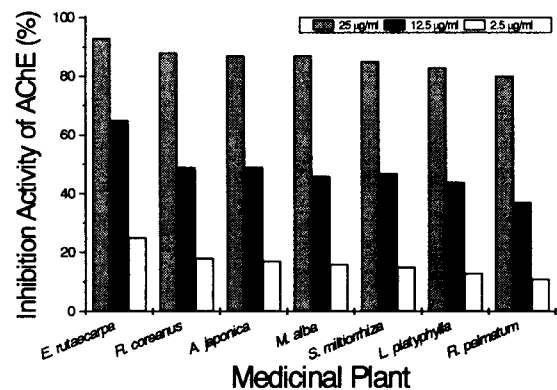


Fig. 3. AChE inhibition activity of selected 7 traditional medicines at various concentrations. Each medicinal extract was tested at the various concentrations (2.5, 12.5, and 25 μ g/ml). Data are shown as mean from two independent experiments and the values were expressed as percentage of control, as 100% activation.

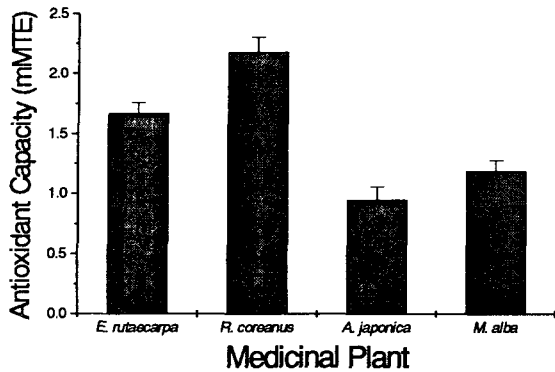


Fig. 4. Antioxidant capacity of 4 traditional medicines against $ABTS^{\cdot+}$ *in vitro*. The assay of antioxidant activity against $ABTS^{\cdot+}$ was described in Materials and Methods. Each medicinal extract was tested at the $20\mu\text{g}/\text{ml}$. The values were expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

AChE의 활성 억제에 높은 우수유, 복분자, 우슬 및 흑상심은 항산화 활성을 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 측정된 결과 복분자, 우수유, 흑상심, 우슬의 순으로 강한 활성을 나타내었는데, 복분자는 2.18 mMTE, 우수유는 1.67 mMTE로 비교적 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4). 그러므로 우수유 및 복분자는 활성 억제물질의 분리를 통한 과학적인 검증의 연구가 계속 필요하며, 그 결과에 따라서 퇴행성 뇌질환 치료제에 첨가하여 기능을 향상시키는데 사용할 수 있는 좋은 한약재로 판단된다. 또한 5종(우슬, 흑상심, 단삼, 맥문동, 대황)의 한약재도 비교적 우수한 AChE 활성 억제 효과가 있으므로 항산화 효과 및 NOS 억제효과가 탁월하다면 복합처방에서 보조 한약재로 활용될 가능성이 높을 것으로 판단된다. 이 등²⁷⁾은 101종의 생약으로부터 메탄올 추출하여 억제활성을 측정된 결과 소목, 천궁, 황련, 마황, 비파, 치자, 맥문동, 금은화, 목단피, 죽여, 적하수오, 하고초, 대황, 단삼, 조구등 등의 추출물에서 88% 이상의 억제활성이 확인되었으며 $0.1\text{ mg}/\text{ml}$ 의 농도에서 황련, 적하수오, 대황이 가장 강력한 억제활성이 있으며 우수유, 복분자, 우슬 등은 비교적 우수한 활성억제효과가 있다고 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서는 대황이 79%의 AChE 활성 억제를 나타내어 상대적으로 낮은 수준을 나타내었으며, 우수유, 복분자, 우슬, 단삼 등의 한약재는 오히려 높은 수준을 나타내어 본 연구 결과와는 약간의 차이를 보였다. 이는 가온추출 과정에서 활성물질이 변질되거나 용매에 따라 추출되는 물질의 농도 및 종류가 달라지므로 한약재의 추출 용매에 따라 AChE의 활성억제가 차이를 보이는 것으로 판단된다. 한방에서 이용되는 한약재 추출방법은 열수 추출방법이 사용되므로 열수 추출물이 AChE에 강한 활성 억제효과 있다면 한방처방에서 실질적인 효과가 있을 것으로 판단된다. 그러므로 우수유 및 복분자는 Alzheimer's disease를 포함한 치매 치료용 한방처방에 활용 가치가 높을 것으로 판단되며 우슬, 흑상심, 단삼, 맥문동, 대황 등도 AChE 활성 억제율이 비교적 우수하므로 항산화 및 NOS 억제효과가 탁월하다면 한방처방에서 보조제로 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

결론

의약품으로 활용하기 위한 식물자원에 대한 관심은 지난 10년 동안 활기를 갖게되었다. 본 연구는 노화나 알츠하이머씨병과 같은 퇴행성 뇌 질환의 치료가 가능한 후보 한약재를 탐색하였다. 41종의 한약재 물 추출물로부터 *in vitro*에서 AChE 활성 억제 및 항산화 활성을 조사하였다. 우수유, 복분자, 우슬, 흑상심, 단삼, 맥문동, 대황은 80%이상의 AChE 활성 억제효과가 관찰되었다. 7종의 한약재 중 우수유는 2.5, 12.5 및 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 25%, 65% 및 93%의 AChE 활성 억제가 관찰되어 가장 높은 AChE 억제제로 확인되었다. 4종(우수유, 복분자, 우슬, 흑상심)의 한약재 물 추출물로부터 $ABTS^{\cdot+}$ 라디칼 소거효과에 대한 항산화 활성을 측정된 결과, 4종의 한약재중 우수유와 복분자가 탁월한 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 우수유와 복분자는 탁월한 AChE 활성 억제 및 라디칼 소거효과가 확인되어 알츠하이머씨병과 같은 퇴행성 뇌질환을 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구의 일부는 2001년도 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(PJ9-PG1-01CO04-0002)과 2001년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Evans, D.A., Funkenstein, H.H., Alpert, M.S., Scherr, P.A., Cook, N.R., Chown, M.J., Herbert, L.E., Hennekens, C.H., and Taylor, J.O. Prevalence of Alzheimer's disease in community population of older persons. *JAMA* 262, 2551-2556, 1989.
- National Institute on Aging. Progress Report on Alzheimer's disease (NIH Publication 95-3994). U.S. Government Printing Office, Washington, DC. 1995.
- Khachaturian, Z.S. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 42, 1097-1105, 1985.
- Jorm, A., Korten, A., and Henderson, A. The prevalence of dementia: A quantitative integration of the literature. *Acta Psychiat. Scand.* 76, 564-479, 1987.
- Rossor, M.N. Neurotransmitters and C.N.S. disease dementia. *Lancet* 2, 1200-1204, 1982.
- Duyckaerts, C., Colle, M.A., Delatour, B., and Hauw, J.J. Alzheimer's disease: lesions and their progression. *Rev. Neurol.* 155, 17-27, 1999.
- Elble, R., Giavobini, E., and Scarsella, G.F. Cholinesterase in cerebrospinal fluid. A longitudinal study in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 44, 403-407, 1987.
- Coyel, J.T., Price, D.L., and Long, M.R. Alzheimer's disease;

- A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219, 1184-1189, 1983.
9. Talesa, V.N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Aging Dev.* 122, 1961-1969, 2001.
 10. Holscher, C. Possible causes of Alzheimer's disease: Amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiol. Disease* 5, 129-141, 1998.
 11. Parnetti, L., Senin, U., and Mecocci, P. Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease. The way forward. *Drug* 53, 752-768, 1997.
 12. Peng, F.C. Acetylcholinesterase inhibition by territrein B derivatives. *J. Nat. Pro.* 58, 857-862, 1995.
 13. Hwang, S.Y., Chang, Y.P., Byun, S.J., Jeon, M.H., and Kim, Y.C. An acetylcholinesterase inhibitor isolated from *Corydalis Tuber* and its mode of action. *Kor. J. Pharmacogn.* 27, 91-95, 1996.
 14. O'Neill, M., Hicks, C., Ward, M., and Panetta, J.A. Neuroprotective effects of the antioxidant LY231617 and NO synthase inhibitors in global cerebral ischaemia. *Brain Res.* 760, 170-178, 1997.
 15. Handy, R.L.C., Harb, H.L., Wallace, P., Gaffen, Z., Whitehead, K.J., and Moore, P.K. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) *in vitro*: Antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol.* 119, 423-431, 1996.
 16. 方藥中 主編. 實用中醫內科學. 上海科學技術出版社, pp. 378-380, 1986.
 17. 龔廷賢. 增補 萬病回春. 一中社, pp. 229-230, 1994.
 18. 謝觀. 東洋醫學大辭典. 高文社, p. 302, 378, 1980.
 19. 李挺. 編註 醫學入門(全五卷中二). 大星文化社, pp.180-182, 1984.
 20. 孫思邈. 備急千金要方(卷四十). 杏林出版社, pp. 12-13, 1976.
 21. 袁立人. 中醫老年病學. 上海中醫學院出版社, p. 142, 308, 1992.
 22. Ellman, G.L., Coutney, K.D., Andres, V.Jr., and Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95, 1961.
 23. Rice-Evans, C., and Miller, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Meth. Enzymol.* 234, 279-293, 1994.
 24. 徐榮波, 申鉉喆, 尹哲浩, 鄭智天, 申億燮. 三和散이 腦組織의 acetylcholine esterase 및 monoamine oxidase 活性에 미치는 影響. *韓方成人病學會誌*, 3, 78-92, 1997.
 25. 손정석, 류영수. 七福飲이 노화 백서 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향. *東醫神經精神科學會誌*, 8, 25-37, 1997.
 26. 崔龍垓, 成彊慶, 文炳淳. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究. *大韓韓醫學會誌*, 19, 392-409, 1998.
 27. Lee, B.H., Choi, B.W., Ryu, G.S., Lee, E.S., Kang, K.J., Hwang, D.Y., and Hong, N.D. Screening of the acetylcholinesterase inhibitors from medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 28, 167-173, 1997.