

황기의 산지별 및 연근별 isoflavonoids의 함량분석

임경란 · 김미진 · 정택규 · 윤경섭*

(주)사임당화장품 기술연구소

Analysis of Isoflavonoid Contents in *Astragalus membranaceus* Bunge Cultivated in Different Areas and at Various Ages

Kyung-ran Im, Mi-Jin Kim, Teak-Kyu Jung, and Kyung-Sup Yoon*

R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., Daejeon 301-803, Korea

Abstract This study was carried out to obtain the basic information for isoflavonoid contents that can be used to index *Astragalus membranaceus* B. cultivated in the Republic of Korea and China. Isoflavonoid contents in *Astragalus membranaceus* B. which were cultivated in various areas (Jecheon, Jeongseon, Yeongju, and Taebaek in Korea, and China) and ages (1-year-old, 3-years-old) were determined. Calycosin and formononetin as major constituents were determined by HPLC method in *Astragalus membranaceus* B. The results show that there were no statistically significant differences for the average contents of isoflavonoids among 1-year-old and 3-years-old. However, isoflavonoid contents were significant differences according to the cultivation areas. HPLC analysis showed that the calycosin content of 1-year-old at Jeongseon was the highest level of $0.090 \pm 0.002\%$ and that of 1-year-old at Yeongju was the lowest level of $0.010 \pm 0.001\%$. The highest level of formononetin content was $0.050 \pm 0.001\%$ of 1-year-old at China, while the lowest level was $0.020 \pm 0.001\%$ of 1-year-old at Yeongju. These results strongly suggest that contents of isoflavonoid in *Astragalus membranaceus* B. might be quite different with respect to the cultivation areas.

Keywords: *Astragalus membranaceus* B., isoflavonoid, calycosin, formononetin, cultivation

서 론

황기 (*Astragali Radix*; *Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과 (Leguminosae)에 속하는 다년생 초본식물인 단너삼의 뿌리로 한국, 중국, 몽고 등의 아시아 지역과 유럽 및 아프리카의 일부지역에 널리 분포하며, 우리나라에서는 주로 강원도 정선과 태백, 경상북도 영주, 충청북도 제천 등에서 재배되고 있다 [1-3]. 한방에서는 이노, 강장, 혈압강하 등의 목적으로 사용되며 약리실험에서도 세포성 및 체액성 면역증강효과, 항산화효과, 항노화효과, 항염작용, 강장작용, 이노작용, 항종양작용, 항바이러스작용 등이 있는 것으로 밝혀졌다 [4-10]. 황기는 오래전부터 인체를 보하는 약재로서

한방에서는 황기건중탕 (黃沂建中湯), 십전대보탕 (十全大補湯), 황기계지오물탕 (黃耆桂枝五物湯), 방기황기탕 (防己黃耆湯) 등의 많은 한방 처방에서 황기를 인삼 다음의 보기약으로서 사용하던 재료로 인체에 대한 안전성이 이미 확인된 바 있다 [11].

이러한 황기의 주요성분으로는 triterpenoids, isoflavonoids, polysaccharides 등이 알려져 있으며 그밖에 다양한 성분들이 포함되어 있는 것으로 보고된 바 있다 [12]. 황기에 포함된 triterpenoids 성분은 astragalosides와 같은 saponin류의 배당체가 주로 포함되어 있는 것으로 알려져 있다 [13]. 또한, isoflavonoids 성분은 formononetin과 calycosin이 대표적이며 두 성분의 배당체, 그리고 (6 R, 11 R) 3-hydroxy-9, 10-dimethoxypterocarpan-3-O-D-glucoside와 7',2'-dihydroxy-3', 4'-dimethoxyiso flavan-7-O-D-glucoside의 6가지 성분이 주요성분으로 보고된 바 있다 [14-19]. Isoflavonoids 성분은 식물성유사호르몬 (phytoestrogen)의 일종으로 에스트로젠

*Corresponding author

Tel: +82-42-255-5856, Fax: +82-42-255-4670

e-mail: ksyoonjh@hanmail.net

과 구조적 유사성을 가지며, 작용도 유사하여 여성호르몬의 천연 대체물질로서 알려져 있고, 특히 이들은 항산화효과, 미백 및 주름개선 등의 노화방지 효과를 가지고 있으며, 천연 물에서 추출되어 화장품 원료로서 응용되어지고 있다 [20-24]. 본 연구소의 선행연구에서는 황기의 대표적인 isoflavonoids 성분인 formononetin과 calycosin을 추출 정제한 후 항노화 효과 및 보습효과를 측정하여 기능성화장품의 천연소재로서의 이용 가능성을 확인한 바 있다.

일반적으로 황기는 재배 연수에 따라 유통되고 있으며, 황기의 연근별 활성에 대한 연구가 많이 이루어진 반면, 국내에서 재배하는 황기의 산지별 및 연근별 성분의 변화에 대한 자세한 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 황기를 산지별 및 연근별로 나누어 지표성분의 함량변화에 대해서 조사하였다.

황기의 지표성분으로는 주요 활성성분이면서 함량이 비교적 높은 isoflavonoids인 calycosin과 formononetin으로 선정하였다.

재료 및 방법

실험 재료

황기는 산지별로 제천산, 정선산, 영주산, 태백산의 국내산 황기 4종과 중국산 황기 1종에 대하여 1년 근, 3년 근을 거피 및 절단된 상태로 (주)농림생약에서 구입하여 사용하였다. 황기의 추출과정 및 효소처리에 사용된 ethyl alcohol (EtOH) 및 ethyl acetate (EtOAc)는 시약급을 구입하여 그대로 사용하였고, HPLC 분석용 용매로는 acetonitrile (ACN)과 water를 HPLC grade로 Fisher사에서 구입하여 사용하였다. 황기추출물에 포함된 생리활성성분 중 formononetin 표준품은 Fluka (47752, USA)에서 구입하여 사용하였으며, calycosin 표준품은 자체적으로 분리·동정하여 사용하였다. 기기로는 HPLC (Agilent Technologies 1200 series, UV detector, USA), 회전식 증발 건조기 (Eyela, Japan)가 사용되었다. ¹H-NMR (400 MHz)와 ¹³C-NMR (100 MHz) 분석은 Unity Plus 300 spectrometer (Varian Unity PLUS, USA)가 사용되었고, FAB-MS (Fast atom bombardment Mass. JEOL, JMS-700, Japan)를 이용하여 측정하였다.

황기의 최적 당분해효소 결정

황기의 최적 당분해효소를 결정하기 위하여 제천산 1년 근 황기 80% EtOH수용액 추출물을 가지고 상업적으로 판매되어 사용하고 있는 Viscozyme L (100 FBG/g, Novo Nordisk Co., Denmark), Celluclast 1.5 LFG (700 EGU/g, Novo Nordisk Co., Denmark), Pectinex 100 L (5,000 FDU/mL, Novo Nordisk Co., Denmark)을 이용하여 효소처리를 실시하였다.

Viscozyme L은 arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase 등을 포함한 탄수화물 분해효소이며, Celluclast 1.5 LFG는 셀룰로오스 분해효소이다. 또한, Pectinex 100 L은 pectintranseliminase, polygalacturonase, pectinesterase를 주성분으로 하는 펙틴 분해효소이다. 이 효소를 추출물의 1% 농도로 처리한 후 50°C에서 12시간 동안 교반하였다. 여기에 증류수 100 mL을 가하고 추출 용액과 동량의 EtOAc를 가하여 분획·농축하여 calycosin, formononetin의 함량을 측정하고, 이들의 함량이 높은 것을 당분해효소로 선정하여 산지별 및 연근별 황기의 효소 처리 시 사용하였다.

황기의 추출 및 효소처리

황기는 산지별 및 연근별로 구분하여 추출하였으며, 추출용매는 황기의 배당체 성분까지 추출되어지고 농축이 용이한 80% EtOH수용액을 사용하였다 [18-19]. 산지별 5종 황기의 1년 근 및 3년 근을 각각 60 g씩 정량하여 추출기에 넣은 후, 80% EtOH수용액으로 4시간씩 2회 반복 환류 냉각 추출하였다. 추출여액을 와트만 2번 여과지로 여과하고 회전식 증발 건조기로 감압 농축하여 황기추출물을 얻었다. 이들 추출물을 10% EtOH수용액 400 mL에 다시 용해시키고 상업적으로 판매되어 사용하고 있는 Viscozyme L을 가하여 50°C에서 12시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 와트만 2번 여과지로 여과하고 회전식 증발 건조기로 감압 농축하여 황기 효소처리 분말을 얻었다. 황기의 추출 및 효소처리 실험은 3회 반복 실험하여 재현성을 확인하였다.

지표성분의 분리

황기의 대표적인 isoflavonoids인 calycosin은 현재 시판되고 있지 않으므로 본 연구에서 자체 분리 동정하였다. 황기 80% EtOH추출물 500 mg 사용하여 1차 ODS-A column chromatography (2.5 cm × 20 cm)를 실행하였다. 이때, 이동상 용매는 60%, 80% EtOH수용액을 각각 500 mL씩 이용하여 용출시킨 후 UV detector를 사용하여 2개의 분획으로 분취하였다. Fr.1 (200 mg)을 두 번째 ODS-A column chromatography (2.5 cm × 20 cm)를 60%, 80% EtOH수용액을 각각 500 mL씩 이용하여 5개의 분획으로 나누었다. 80% EtOH수용액 초반부의 Fr.3을 농축하여 90% 이상의 단일화합물을 얻었다. 이것을 소량의 HPLC용 MeOH로 용해 후, 뚜껑이 없는 test tube에 담아 3~4일간 4°C에서 결정화하여 화합물 10 mg을 얻었다. 분리된 화합물은 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 FAB-MS spectra를 각각 측정하였으며, spectral data를 문헌치 [26]와 비교하여 이 화합물을 calycosin으로 동정하였다.

지표성분 정량분석

황기의 calycosin, formononetin의 정량분석은 고속액체크

로마토그래피 (HPLC)법을 행하였다.

HPLC 분석 조건으로 칼럼은 YMC-Pack Pro C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 검출기는 UV detector 260 nm로 하였다. 유속은 0.8 mL/min이며, 이동상은 용매 A (0.1% CH₃COOH을 함유한 ACN)와 용매 B (0.1% CH₃COOH을 함유한 Water) 기울기용리로 하여 Table 1의 조건에 따라 실시하였다. 지표성분의 정량은 표준물질을 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005 mg/mL로 제조하고 HPLC에서 나타난 peak area의 2회 반복 평균값을 취한 후 표준품의 양과 peak area 사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다.

Table 1. Condition for HPLC analysis

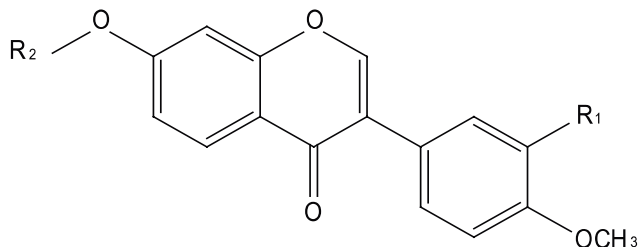
Time (min)	Solvent A ^{a)}	Solvent B ^{b)}
0	10	90
5	25	75
20	40	60
30	90	10
40	10	90
45	10	90

a) Solvent A : 0.1% CH₃COOH in ACN.
 b) Solvent B : 0.1% CH₃COOH in H₂O.

결과 및 고찰

지표성분에 대한 검량선 standard curve

Calycosin 및 formononetin 검량선의 상관관계는 0.999 이상으로 매우 양호하였다. Calycosin의 정량곡선은 $y = 40805.997x + 11.836$, $r = 0.99980$ 이었으며, formononetin의 정량곡선은 $y = 26738.867x - 7.840$, $r = 0.99965$ 이었다. 여기서 y는 peak area 값이며 x는 함량 (mg/mL)이다. Calycosin 및 formononetin 그리고 이들 배당체의 화학구조를 Fig. 1에 나타내었다.



Calycosin [R₁ : OH, R₂ : H].
 Calycosin 7-O-β-D-glucoside [R₁ : OH, R₂ : glucosyl].
 Formononetin [R₁ : H, R₂ : H].
 Formononetin 7-O-β-D-glucoside [R₁ : H, R₂ : glucosyl].

Fig. 1. The isoflavonoids of *Astragalus membranaceus* B.

황기의 최적 당분해효소 선정

배당체 형태의 isoflavonoids를 무배당체의 형태의

isoflavonoids로 전환시키는 방법들이 보고되어 있지만 [26], 이는 수율이 낮고 산업적으로 이용하기 어려운 단점이 있다. 따라서 경제성이 있는 다양한 종류의 당분해효소 등을 이용하여 최적의 분해효소를 선정하고자 하였다. 제천산 1년 근 황기의 효소별 지표성분의 함량을 Table 2에 나타내었으며, 그 결과 황기의 주요 활성 isoflavonoids 무배당체 성분인 calycosin과 formononetin 함량이 효소처리 시 5배 이상 증가함을 알 수 있었다. Viscozyme L > Celluclast 1.5 LFG > Pectinex 100 L 순으로 황기의 배당체 성분을 무배당체로 전환시키는 것을 확인하였고, 산지별 및 연근별 황기의 효소처리 시 Viscozyme L을 사용하였다.

Table 2. The contents of major isoflavonoids of *Astragalus membranaceus* B. extracts hydrolyzed with various combined enzymes.

Combined Enzymes	Amount of dry contents (g/60 g)	Contents (%)	
		Calycosin	Formononetin
Non	0.53 ± 0.01	0.651 ± 0.001	0.618 ± 0.011
Viscozyme L	0.22 ± 0.00	5.752 ± 0.018	2.953 ± 0.155
Pectinex 100 L	0.45 ± 0.02	3.290 ± 0.107	1.961 ± 0.167
Celluclast 1.5 LFG	0.32 ± 0.01	4.492 ± 0.200	2.275 ± 0.207

산지별 및 연근별 황기추출물 지표성분의 함량비교

황기의 연근별 및 산지별 추출물의 고형분 양과 황기의 대표적인 isoflavonoids인 calycosin 및 formononetin의 함량을 Table 3에 나타내었다.

Table 3. The contents of major isoflavonoids of *Astragalus membranaceus* B. by HPLC.

Areas	Years	Amount of dry contents (g/60 g)	Contents (%)	
			Calycosin	Formononetin
Jecheon	1	13.82 ± 0.12	0.056 ± 0.002	0.049 ± 0.010
	3	11.04 ± 0.58	0.044 ± 0.011	0.036 ± 0.009
Jeongseon	1	18.95 ± 0.97	0.090 ± 0.002	0.048 ± 0.002
	3	14.21 ± 0.66	0.034 ± 0.001	0.033 ± 0.000
Yeongju	1	22.93 ± 0.80	0.010 ± 0.001	0.020 ± 0.001
	3	12.68 ± 1.01	0.022 ± 0.000	0.024 ± 0.004
Taeback	1	12.46 ± 0.94	0.025 ± 0.000	0.021 ± 0.001
	3	11.63 ± 0.37	0.040 ± 0.001	0.026 ± 0.003
China	1	37.98 ± 0.61	0.087 ± 0.001	0.050 ± 0.001
	3	20.15 ± 0.55	0.009 ± 0.001	0.013 ± 0.002

전체 고형분의 양은 산지별로는 중국산 > 영주산 ≥ 정선산 ≥ 제천산 ≥ 태백산으로 상대적으로 중국산의 고형분의 양이 월등히 많았으며, 5종의 산지별 황기는 3년 근보다는 1년 근의 고형분의 양이 많음을 알 수 있었다.

황기의 주성분인 calycosin 및 formononetin은 각각 Rt 19.4 min, 26.5 min에서 peak가 나타남을 확인하였다. Calycosin 함량 평균은 1년 근이 0.054 ± 0.036%, 3년 근이 0.030 ± 0.014%로 1년 근의 calycosin 함량이 높았으며, 정선산 및 중국산의 calycosin 함량이 상대적으로 높았다.

Formononetin의 함량 평균은 1년 근이 $0.038 \pm 0.016\%$, 3년 근이 $0.026 \pm 0.009\%$ 로 1년 근 formononetin의 함량이 높았으며, 제천산 및 중국산의 formononetin 함량이 상대적으로 높았다. 또한 산지별, 연근별 황기 모두 formononetin보다 calycosin 함량이 많음을 알 수 있었다.

효소처리 후의 지표성분의 함량비교

황기의 isoflavonoids은 대부분 배당체 형태로 존재하고 있다. 그러므로 당분해효소를 이용하여 배당체 형태의 calycosin 7-O- β -D-glucoside, formononetin 7-O- β -D-glucoside를 무배당체 형태의 calycosin과 formononetin으로 전환하여 지표성분의 함량을 비교하고, 당성분의 함량을 미루어 짐작할 수 있었다. 황기 효소처리 분말의 calycosin 및 formononetin 함량을 Table 4에 나타내었으며, HPLC 크로마토그램은 Fig. 2에 나타내었다.

Table 4. The contents of major isoflavonoids of *Astragalus membranaceus* B. extracts hydrolized with Viscozyme L.

Areas	Years	Amount of dry contents (g/60 g)	Contents (%)	
			Calycosin	Formononetin
Jecheon	1	13.53 ± 0.67	0.118 ± 0.010	0.079 ± 0.001
	3	10.02 ± 0.38	0.194 ± 0.023	0.066 ± 0.006
Jeongseon	1	17.46 ± 0.90	0.096 ± 0.000	0.053 ± 0.001
	3	10.80 ± 0.34	0.076 ± 0.006	0.040 ± 0.000
Yeongju	1	19.26 ± 0.68	0.043 ± 0.008	0.024 ± 0.001
	3	12.12 ± 0.27	0.074 ± 0.006	0.031 ± 0.001
Taeback	1	10.53 ± 0.37	0.061 ± 0.004	0.047 ± 0.001
	3	10.08 ± 1.00	0.161 ± 0.009	0.052 ± 0.001
China	1	36.88 ± 0.68	0.095 ± 0.007	0.106 ± 0.001
	3	18.56 ± 0.66	0.061 ± 0.016	0.030 ± 0.006

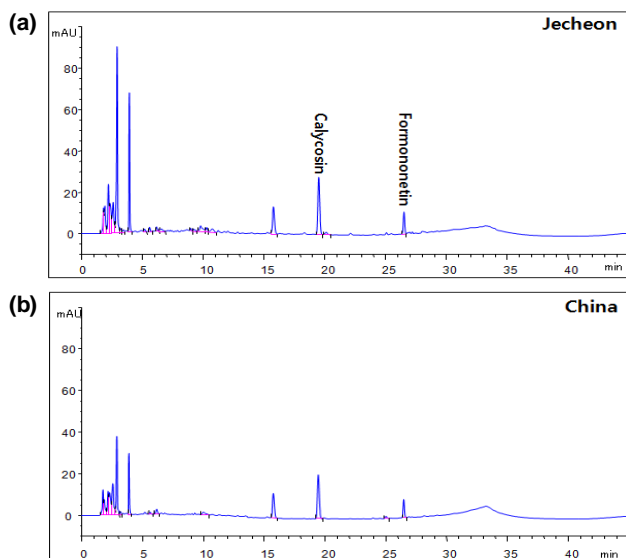


Fig. 2. HPLC chromatogram of *Astragalus membranaceus* B. root extract cultivated in Jechon and China (1-year-old, hydrolized with Viscozyme L).

황기추출물의 효소처리 후 전체 고형분의 양이 조금씩 감소함을 알 수 있었는데 이는 효소처리 하는 과정에서 전분과 단백질 등의 침전으로 인한 것으로 사료된다.

효소처리 후의 calycosin의 함량 평균은 1년 근이 $0.083 \pm 0.030\%$, 3년 근이 $0.113 \pm 0.060\%$ 로 3년 근의 함량이 높았고, 제천산 및 중국산의 함량이 상대적으로 높았다. 효소처리를 하지 않았을 경우에는 1년 근의 calycosin 함량이 3년 근보다 높았지만 효소처리 후 3년 근이 1년 근보다 높아짐을 확인할 수 있었다. 이 결과로 보아 1년 근보다 3년 근에 calycosin 배당체가 많이 함유되어 있음을 짐작할 수 있었다. 제천산, 영주산, 태백산 황기는 1년 근 및 3년 근 모두 효소처리 후 calycosin 함량이 2~3배 정도 증가한 반면, 정선산 1년 근 및 중국산 1년 근의 경우는 효소처리 후에도 함량 변화가 미미한 것으로 보아 calycosin 배당체 함량이 낮음을 알 수 있었다.

효소처리 후의 formononetin 함량 변화를 살펴보면 제천산, 태백산 및 중국산은 약 2배 정도 증가하였으며, 정선산, 영주산은 1년 근과 3년 근 모두 함량 변화가 미미하였다.

산지별 황기 중에서는 제천산 황기가 calycosin, formononetin 및 이들의 배당체 모두 상대적으로 함량이 높았으며, 정선산 및 중국산 황기는 calycosin, formononetin의 배당체가 상대적으로 적게 함유되어 있음을 알 수 있었고, 특히, 제천산 황기의 경우 Fig. 2에서 보는 바와 같이 calycosin 및 formononetin의 isoflavonoids 함량도 높지만 Rt 5.0 min 이내에서 상당수의 peak가 다른 산지의 황기보다 높게 나타남을 알 수 있었다.

전반적으로 황기에는 formononetin보다 calycosin이, formononetin 배당체보다 calycosin 배당체가 많이 함유되어 있음을 알 수 있었으며, 1년 근보다는 3년 근에 배당체 성분이 많이 함유되어 있음을 미루어 짐작할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 산지별 및 연근별 황기의 isoflavonoids 함량만 본다면 제천산이 상대적으로 우수하였으며, 고형분 함량을 고려한다면 중국산 황기가 상대적으로 우수하다고 할 수 있겠다.

요 약

황기는 국내에서 생산되는 3대 약재의 하나이며 인삼 다음으로 사용량이 많은 약재로서 황기의 성분 연구는 비교적 많이 이루어져 있는 실정이다. 그러나 황기의 주성분에 대한 표준화가 현재 정확히 마련되지 않은 현 실정을 감안하여 황기의 연근별 및 산지별 isoflavonoids의 함량 분석에 대한 연구를 진행하였다.

산지별 5종 황기 (제천, 정선, 영주, 태백, 중국)의 1년 근 및 3년 근 80% EtOH수용액 추출물을 가지고 calycosin과 formononetin 함량을 측정하였으며, 또한 cellulase, β -glucanase 및 xylanase가 주성분인 Viscozyme L을 가하여 효소처리한 후, calycosin과 formononetin의 함량을 측정

하고 아울러 이들의 배당체 함량도 예측하였다.

추출물의 전체 고형분의 양은 산지별로는 중국산 > 영주산 ≥ 정선산 ≥ 제천산 ≥ 태백산으로 상대적으로 중국산의 고형분의 양이 월등히 많았다. 또한 5종의 산지별 황기는 3년 근보다는 1년 근의 고형분의 양이 많음을 알 수 있었다.

Calycosin 함량은 효소처리 전에는 3년 근보다 1년 근에서 높았으며, 정선산 ≥ 중국산 > 제천산 > 태백산 > 영주산 순이었다. 효소처리 후에는 1년 근보다는 3년 근에서 높은 함량을 나타내었고, 제천산 > 정선산 ≥ 중국산 > 태백산 > 영주산으로, 이는 제천산의 경우 calycosin 배당체 성분이 많이 함유되어 있음을 짐작할 수 있었다. 정선산 및 중국산 1년 근의 경우는 효소처리 후에도 calycosin 함량 변화가 미미한 것으로 보아 calycosin 배당체 함량이 낮음을 알 수 있었다. Formononetin 함량은 효소처리 전-후 모두 전반적으로 calycosin에 비해 낮았으며, 정선산과 영주산은 효소처리 후에도 formononetin 함량 변화가 미미한 것으로 보아 formononetin 배당체 함량이 낮음을 알 수 있었다.

산지별로 isoflavonoids의 함량을 보면 제천산이 가장 높았으며, 고형분 함량을 고려한다면 중국산이 상대적으로 높음을 알 수 있었고, 연근별로 isoflavonoids의 함량을 보면 재배 연수가 오래됐다고 해서 이들의 함량이 월등히 높아지는 않았다.

지표성분의 결정에 따라 달라질 수 있으나, 본 연구의 지표성분인 isoflavonoids 함량은 산지별로 상당한 차이를 보임으로 황기를 건강기능식품이나 화장품 원료로 이용할 경우 산지 및 연근의 선택이 중요할 수 있음을 시사하였다.

접수 : 2010년 1월 4일, 게재승인 : 2010년 6월 14일

REFERENCES

1. Yin, Y., S. I. Heo, M. J. Jung, and M. H. Wang (2009) Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. *Kor. J. Pharmacogn.* 40: 1-5.
2. Kim, J. S. and C. S. Kim (1997) A study on the constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* (II). *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 75-79.
3. Min, S. H. and B. R. Lee (2008) Effect of *Astragalus membranaceus* powder on yeast bread baking quality. *Korean J. Food Culture.* 23: 228-234.
4. Xie, Z. F., Z. C. Lou, and X. K. Huang (1994) Classified dictionary of traditional Chinese medicine. p. 374, New World Press, Beijing.
5. Rios, J. L. and P. G. Waterman (1997) A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. *Phytother. Res.* 11: 411-418.
6. Hikino, H., S. Funayama, and K. Endo (1976) Hypotensive principles of *Astragalus* and *Hedysarum* roots. *Planta Med.* 30: 297-302.
7. Tomoda, M., N. Shimizu, N. Ohara, R. Gonda, S. Ishii, and H. Otsuki (1992) A reticuloendothelial system activation Glycan from roots of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry.* 31: 63-66.
8. Zang, Y. D., Y. L. Wang, J. P. Shen, and D. X. Li (1984) Hypotensive and antiinflammatory effects of *Astragalus saponin* 1. *Acta. Pharm. Sin.* 19: 333-337.
9. Li, C. Y. and H. I. Rhee (2004) Antioxidant activity of *Astragalus membranaceus* extract. *J. Agric. Sci.* 15: 103-110.
10. Baek, N. I., Y. S. Kim, J. S. Kyung, and K. H. Park (1996) Isolation of anti-hepatotoxic agent from the root of *Astragalus membranaceus*. *Kor. J. Pharmacogn.* 27: 111-116.
11. Lee, H. Y., H. K. Ha, D. Y. Jung, J. Y. Choi, N. H. Lee, J. Y. Ma, Y. B. Yu, and H. K. Shin (2008) Study on pharmacological activity of sipjeondaebotang by difference in component ratio between *Astragali Radix* and *Cinnamomi cortex*. *J. Korean oriental medical society.* 29: 156-166.
12. Lin, L. Z., X. G. He, M. Lindermajer, G. Nolan, J. Yang, M. Cleary, S. X. Qiu, and G. A. Cordell (2000) Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *J. Chromatogr. A.* 876: 87-95.
13. Hirotoni, M., Y. Zhou, H. Lui, and T. Furuya (1994) Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry.* 36: 665-670.
14. T. Wu, T., S. W. Annie Bligh, L. H. Gu, Z. T. Wang, H. P. Liu, X. M. Cheng, C. J. Branford-White, and Z. B. Hu (2005) Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial *Radix astragali* by HPLC-UV. *Fitoterapia.* 76: 157-165.
15. Xiao, H. B., M. Krucker, K. Albert, and X. M. Liang (2004) Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 1032: 117-124.
16. Ma, X., T. Zhang, Y. Wei, P. Tu, Y. Chen, and Y. Ito (2002) Preparative isolation and purification of calycosin from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) hsiao by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* 962: 243-247.
17. Zheng, H. Z., Z. H. Dong, and Q. She (1998) Modern study of traditional Chinese medicine. p. 3886, Xue Yuan Press, Beijing.
18. Yu, D., Y. Duan, Y. Bao, C. Wei, and L. An (2005) Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect

- PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Journal of ethnopharmacology*. 98: 89-94.
19. El-Sebakhy, N. A., A. M. Asaad, R. M. Abdallah, S. M. Toaima, M. S. Abdel-Kader, and F. R. Stermitz (1994) Antimicrobial isoflavans from *Astragalus* species. *Phytochemistry*. 36: 1387-1389.
 20. Kim, M. J., K. R. Lim, T. K. Jung, and K.-S. Yoon (2007) Anti-aging effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 33: 33-40.
 21. Jung, T. K., M. J. Kim, K. R. Lim, and K.-S. Yoon (2006) Moisturizing and anti-oxidation effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 32: 193-200.
 22. Kim, M. J., J. Y. Kim, S.-W. Choi, J. T. Hong, and K.-S. Yoon (2004) Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius*) seed extract (I). *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 30: 15-22.
 23. Kim, M. J., J. Y. Kim, T. K. Jung, S.-W. Choi, and K.-S. Yoon (2006) Skin anti-aging effect of *Forsyria viridissima* L. extract. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 444-450.
 24. Fan, Y., D. Z. Wu, Y. Q. Gong, J. Y. Zhou, and Z. B. Hu (2003) Effects of calycosin on the impairment of barrier function induced by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 14: 33-40.
 25. Kim, H. J., Y. C. Bae, R. W. Choi, S.-W. Choi, S. H. Cho, S. H. Cho, Y. S. Choi, and W. J. Lee (2002) Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. *Calcified Tissue International*. 71: 88-94.
 26. Kao, C. (1992) Production of isoflavonoid. *Japan patent* 1992190720.