

牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝의 산화억제 효과 비교 연구

박재상^{#1}, 성낙술², 이영종^{*1}

1: 경원대학교 한의과대학 본초학교실, 2: 농촌진흥청 작물과학원

Comparative Study on the Anti-Oxidative Effects of *Achyranthis Japonicae Radix*, *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix*

Jae-Sang Park^{#1}, Nak-Sul Seong², Young-Jong Lee^{*1}

1: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

2: National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was intended to compare genetic differences and anti-oxidative effects of *Achyranthis Japonicae Radix*, *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix*.

Methods : The genetic differences of *Achyranthis Japonicae Radix*, *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* were observed with RAPD analysis. Anti-oxidative effects of *Japonicae Radix*, *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* were investigated.

Results : 1. As the result of RAPD analysis, *Achyranthis Japonicae Radix* was found to be genetically similar with *Achyranthis Bidentatae Radix*.
2. There was a little difference in the DPPH free radical scavenging activity, lipid peroxidation inhibiting activity, SOD activity of *Achyranthis Japonicae Radix*, *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix*. Generally, *Achyranthis Japonicae Radix* was found to have stronger effect than the others.

Conclusions : *Achyranthis Japonicae Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* were genetically similar. *Achyranthis Japonicae Radix*, *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* all exhibited anti-oxidative action.

Key Words : *Achyranthis japonicae Radix*, *Achyranthis bidentatae Radix*, *Cyathulae Radix*
anti-oxidative effect

* 교신저자 : 이영종. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel: 031-750-5415 · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr
제1저자 : 박재상, 경원대학교 한의과대학 본초학교실
· 접수 : 2007년 11월 12일 · 수정 : 2007년 12월 11일 · 채택 : 2007년 12월 21일

서 론

牛膝은 神農本草經¹⁾ 上品에 “牛膝, 味苦酸. 主寒濕痿痺, 四肢拘攣, 膝痛不可屈伸, 逐血氣傷, 熱, 火爛, 墮胎. 久服輕身耐老. 一名百倍 生川谷.”이라고 처음 기재되었으며, 임상에서 散瘀血, 消癰腫의 효능이 있어 淋病尿血, 經閉, 癥瘕, 難産, 胞衣不下, 跌打損傷 등의 症을 치료하고, 補肝腎, 強筋骨의 효능이 있어 腰膝骨痛, 四肢拘攣, 痿痺 등의 症을 치료하는데 사용되고 있다²⁾.

牛膝의 기원으로 대한약전³⁾에는 비름과(Amarantaceae)에 속하는 쇠무릎 *Achyranthes japonica* Nakai의 뿌리로, 일본약국방⁴⁾은 같은 과에 속하는 쇠무릎 *Achyranthes fauriei* Leveille et Vaniot 또는 *A. bidentata* Blume의 뿌리로 되어 있으며, 중국약전⁵⁾은 牛膝과 川牛膝로 구분되어 있는데, 牛膝은 *A. bidentata* Blume, 川牛膝은 같은 과의 *Cyathula officinalis* Kuan을 기원식물로 하고 있다. 북한약전⁶⁾은 쇠무릎 *A. japonica* Nakai, 대만약전⁷⁾은 懷牛膝 *A. bidentata* Blume를 기원식물로 하고 있다.

중국에서는 牛膝을 懷牛膝과 川牛膝로 나누어 懷牛膝은 肝腎을 補益하고 筋骨을 강장시키는 효능이 우수하고, 川牛膝은 活血祛瘀하여 關節을 通利하는 효능이 우수하다고 알려져 있다²⁾.

懷牛膝의 성분으로는 triterpenoid saponin, glucuronic acid, galactose, galacturonic acid, arabinose, rhamnose, glutamic acid, aspartic acid, serin, ecdysterone, inokosterone, rubrosterone 등이 함유되어 있으며, 川牛膝의 성분으로는 β -ecdysterone과 미량원소인 티타늄 등이 함유되어 있다^{8,9)}. 懷牛膝의 약리작용으로는 진통작용, 소염작용, 이담작용, 자궁 흥분작용, 降혈당작용, 降콜레스테롤 작용, 면역기능 조절작용, 항노화작용 등이 보고되었고, 川牛膝의 약리작용으로는 자궁 이완작용, 이담작용, 降콜레스테롤 작용, 면역기능 조절작용 등이 보고되었으며^{8,9)}, Han 등¹⁰⁾은 懷牛膝의 소염작용을, Lu 등¹¹⁾은 懷牛膝의 진통과 소염작용을, Yu 등¹²⁾과 Xiang 등¹³⁾은 懷牛膝의 항암과 면역작용을 보고하였고, Chen 등¹⁴⁾은 川牛膝의 항암작용을 보고하였다.

인체 내에서 다양한 경로에 의하여 유발되는 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 생체막의 손상, 고분자 단백질 및 DNA의 변형과 기능상실 등으로 인한

다양한 퇴행성 질환이 유발될 수 있는데¹⁵⁾, 牛膝이 임상에서 퇴행성 질환에 반응되는 점에 비추어 항산화 효과가 있을 것으로 사료되나, 아직 懷牛膝과 川牛膝의 항산화 효능을 비교한 연구는 보고되지 않았다.

이에 저자는 牛膝(쇠무릎)과 중국산인 懷牛膝 및 川牛膝이 함께 사용되는 점에 착안하여, 이들의 Random amplification of polymorphic DNA(RAPD) 분석을 통하여 유전적 차이를 관찰하고, 산화반응 억제효과를 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

실험에 사용된 牛膝(쇠무릎 *A. japonica* Nakai. 이하 AJR로 표현)은 경동시장에서 국산 재배품을, 중국산 懷牛膝 *A. bidentata* Blume(이하 ABR로 표현)과 川牛膝 *C. officinalis* Kuan (이하 CR로 표현)은 중국 安國시장에서 구입하여 기원의 眞僞와 품질의 優劣을 暎園大學校 韓醫科大學 本草學教室에서 판정하였다.

2. 방법

1) RAPD(random amplification of polymorphic DNA)분석

(1) DNA 추출

시료의 genomic DNA는 마쇄한 약제분말 50-100mg으로부터 Accuprep GMO DNA extraction kit(Bionner, Korea)을 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA의 농도를 측정 후 -20°C에 보관하여 사용하였다.

(2) PCR(polymerase chain reaction)법

PCR 반응용액은 10× reaction buffer, 2.5mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 10pM primer(Bioneer, Korea. Table.1), 1U polymerase, 50ng DNA를 혼합하여 총 20 μ l로 조성하였다. PCR(Takara, Japan)은 TP600을 이용하여 94°C에서 5분간 predenature 한 후 94°C에서 20초 denaturation, 33°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 45회 반복하였고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension 하였다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 100bp DNA ladder(GibcoBRL)와 함께 전기 영동하여 EtBr로 염

색한 후 관찰하여 결과를 얻었다.

Table 1. Nucleotide Sequence of Primer

Number	Sequence	Number	Sequence
N-8001	5'-CAG GCC CTT C-3'	N-8004	5'-TCG GCG ATA G-3'
N-8002	5'-CAA TCG CCG T-3'	N-8005	5'-GAA ACG GGT G-3'
N-8003	5'-AGG GGT CTT G-3'	N-8006	5'-AGC CAG CGA A-3'

2) 약물 추출

(1) 전탕 추출

牛膝, 懷牛膝, 川牛膝 100g 씩에 각각 1L의 증류수를 가하고 약탕기(웅진약탕기, 한국)를 이용하여 3시간 동안 끓인 다음 여과지로 여과한 후 감압증류장치를 이용하여 수분을 제거하여 분말로 만들었다.

(2) 저온 침출

牛膝, 懷牛膝, 川牛膝의 분말 100g 씩에 각각 1L의 증류수를 가하고 진탕 배양기(Jeiotec, 한국)를 이용하여 실온(22-24℃) 또는 37℃에서 3시간 동안 저온 침출 하였다. 진탕 후 여과지로 여과한 다음 감압증류장치를 이용하여 수분을 제거하고 분말로 만들었다.

(3) 용매 추출

牛膝, 懷牛膝, 川牛膝의 분말 100g 씩에 각각 1L의 용매 (100% MeOH, 80% MeOH, 50% MeOH, 100% EtOH, 80% EtOH, 50% EtOH)를 가하고 환류 냉각 장치를 이용하여 70℃에서 3시간 동안 추출한 다음 여과지로 여과한 후 감압증류장치를 이용하여 수분을 제거하고 분말로 만들었다.

3) 분획

실제 임상에서 사용되는 전탕액의 분말과 각 용매 추출물의 DPPH 소거능을 비교 분석한 결과 선택된 80% EtOH 추출물을 아래와 같은 방법으로 분획하였다. 각 약제의 전탕액 분말과 80% EtOH 추출분말 20g에 증류수 400ml를 넣고 극성이 다른 용매 (n-hexan, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol)를 이용하여 단계적으로 분획하였다. 극성에 의해 얻어진 분획물은 감압증류장치를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

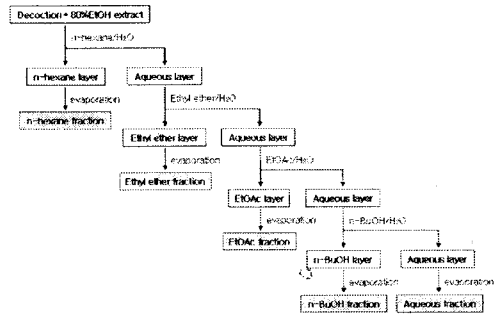


Fig. 1. Procedure of various solvent fractions from decoction extract and 80% EtOH extracts from AJR, CR, ABR

4) 산화반응 억제효과 측정

(1) DPPH 소거능 측정

추출방법에 따른 약제의 효과를 검증하기 위한 최적의 추출 방법 선택과 선택된 추출물의 최적의 분획물을 선택하기 위해 DPPH 소거능을 측정 하였다. 추출 분말 또는 분획 분말 희석액 (10%, 5%, 1%) 4ml에 1.5x10⁻⁴M DPPH/MeOH 1ml을 넣고 잘 흔들어 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후 흡광도 517nm에서 측정하였다.

대조군의
흡광도-추출
DPPH 소거능(%) = ($\frac{\text{물의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}$) x 100

(2) TBA법¹⁶⁾에 의한 지질과산화물 억제 효과를 측정

Linoleic acid 0.052ml에 99%의 ethanol 4ml와 50mM phosphate buffer(pH7.0) 4ml를 혼합한 후 분획물을 농도별로 1ml씩 첨가하였다. 여기에 최종 volume이 10ml이 되도록 증류수 0.948ml를 가하여 40℃에서 10일간 자동산화 반응하였다. 이렇게 제조한 반응액 200μl를 clean test tube에 넣고, 8.1% sodium dodesyl sulfate (SDS) solution 225μl를 가하여 5초 동안 vortex mixer로 혼합 하였다. 여기에 20% acetic acid 1.5ml를 가하고 증류수 75μl를 더한 후 5초 동안 vortex mixer 로 혼합 하였다. 1.2% thiobarbiture acid solution을 1ml 가하고 clean dry marble로 덮은 후 water bath에서 30분간 가열하였다. 이 후 실온에서 30분간 방치하고 3,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \left(\frac{\text{대조군 과산화물가} - \text{추출물 과산화물가}}{\text{대조군 과산화물가}} \right) \times 100$$

(3) SOD 활성도 측정

분획물 희석액 1ml에 60uM PMS/phosphate buffer(pH 7.4) 1ml과 486uM NADH phosphate buffer 1ml, 그리고 150uM NBT/phosphate buffer 1ml을 혼합하여 실온에서 5분간 방치한 후 흡광도 560nm에서 측정하였다.

$$\text{SOD활성도(\%)} = \left(\frac{\text{대조군 산화물 O.D 값} - \text{추출물 산화물 O.D 값}}{\text{대조군 산화물 O.D 값}} \right) \times 100$$

(4) 총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 Folin-Denis 법¹⁷⁾을 응용하여 측정하였다. 각 추출물과 n-BuOH 분획물 1mg을 증류수 1ml에 녹여서 10배 희석액 2ml에 2배로 희석한 Folin 시약 2ml을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 실온에서 방치한 후 2ml의 10% Na₂CO₃를 가하였다. 이 혼합액을 실온에서 1시간동안 방치한 후 ELISA reader (Sunrise. TEKAN. Austria)를 이용해서 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 총페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 구하였다.

5) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 ANOVA multi t-test (JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 실험군을 대조군 및 정상군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. RAPD 분석

牛膝, 川牛膝 및 懷牛膝의 전탕액을 RAPD법을 이용하여 분석하여 유전적 차이점을 관찰하였다. 아래의 primer에 의해 분석한 결과, A primer에서는 1kbp 부근에 牛膝과 川牛膝에서, 600bp 부근에 牛膝과 懷牛膝에서 동일한 양상의 밴드가 나타났다. C

primer에서는 500bp와 200bp 부근에 牛膝과 懷牛膝에서 같은 양상의 밴드가 나타났다. D primer에서는 800bp, 500bp 300bp 부근에 川牛膝과 懷牛膝에서 같은 양상의 밴드가 나타났다. E primer에서는 800bp, 500bp 200bp 부근에 牛膝과 懷牛膝에서같은 양상의 밴드가 나타났다(Fig. 2).

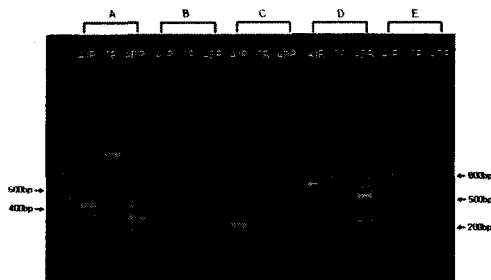


Fig. 2. RAPD profiles obtained from AJR, CR, ABR

AJR ; Achyranthis Japonicae Radix, CR ; Cyathulae Radix, AR ; Achyranthis Bidentatae Radix (M : 100bp DNA ladder, A : CAG GCC CTT C and CAA TCG CCG T, B : CAG GCC CTT C and AGG GGT CTT G, C : CAG GCC CTT C and TCG GCG ATA G, D : CAG GCC CTT C and GAA ACG GGT G, E : CAG GCC CTT C and AGC CAG CGA A)

2. 추출방법에 따른 수율 및 DPPH 소거능 측정

최적의 추출방법을 선택하기위해 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝을 9가지 방법(전탕, 37℃ 水浸, 실온 水浸, 100% EtOH, 80% EtOH, 50% EtOH, 100% MeOH, 80% MeOH, 50% MeOH)으로 추출 한 후, DPPH 소거능을 측정하였다(Table 2).

Table 2. Scavenging Activity of Achyranthis Japonicae Radix, Cyathulae Radix and Achyranthis Bidentatae Radix on DPPH Free Radical

Extracts	%	AJR	CR	ABR
decoction	10	49.5±0.9	24.9±0.9	32.5±0.6
	5	68.0±0.6	38.7±1.3	40.0±0.5
	1	56.4±0.9	35.3±0.3	40.1±1.1
37℃ Water	10	61.8±2.0	49.3±0.6	15.6±0.7
	5	67.2±0.6	36.3±0.6	27.1±1.9
	1	35.0±12.0	13.0±2.5	46.3±1.2
Room Temperature Water	10	54.9±0.2	46.3±2.2	24.2±1.4
	5	53.1±1.4	52.4±1.4	25.8±0.8
	1	31.5±1.5	7.5±0.5	45.0±0.2
100% EtOH	10	77.9±1.0	38.4±0.7	51.7±0.5
	5	79.0±0.1	51.0±0.2	41.0±0.7
	1	47.6±1.1	35.2±0.1	19.3±2.5

80%	10	76.9±1.8	26.6±2.1	46.5±1.3
	5	79.6±0.9	46.2±0.6	38.9±2.5
	1	56.3±0.3	39.1±0.7	20.4±2.1
50%	10	75.8±0.6	37.8±1.3	54.9±0.7
	5	79.1±0.4	39.5±0.2	38.5±0.9
	1	53.5±0.6	22.9±1.1	15.9±0.8
100%	10	73.9±0.1	9.0±5.4	32.1±1.6
	5	74.1±0.3	38.3±0.3	30.1±0.2
	1	48.3±1.1	30.9±0.9	28.0±0.3
80%	10	75.7±0.4	47.1±0.5	39.9±0.5
	5	77.6±0.3	47.8±0.5	22.4±0.5
	1	54.6±0.7	27.8±1.1	32.4±0.4
50%	10	79.4±0.2	46.7±0.4	49.2±2.0
	5	82.6±0.4	46.7±0.7	41.1±0.8
	1	49.1±0.4	25.0±0.4	38.2±0.1

The extracts of *Achyranthis Japonicae Radix*, *Cyathulae Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. The values are the mean ± SD of three independent experiments.

1) 牛膝

牛膝의 수율은 실온 水浸에서 46%로 나타났고, 용매 추출물 50% EtOH에서 30%의 수율을 나타내었다. DPPH 소거능은 전탕액이나 水浸보다 용매추출액에서 더 높게 나타났다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Yield of Various Extracts from *Achyranthis Japonicae Radix*

	Dec	37℃	RT	100%	80%	50%	100%	80%	50%
Yield(%)				EtOH	EtOH	EtOH	MeOH	MeOH	MeOH
/	24%	24%	46%	10%	26%	30%	14%	24%	28%
(50g)									

The values are the percentage of the yield of the extracts from *Achyranthis Japonicae Radix* under various conditions. RT ; room temperature

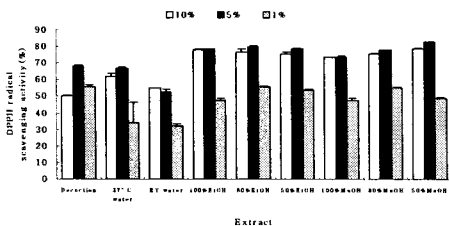


Fig. 3. Scavenging activity of various extract from *Achyranthis japonicae radix* on DPPH free radical.

The extracts from *Achyranthis Japonicae Radix* were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments. RT ; room

temperature

2) 川牛膝

川牛膝의 수율은 실온 水浸液에서 42%, 80% EtOH에서 34%를 나타내었고, DPPH 소거능은 37℃, 실온, 100%EtOH, 80%EtOH, 80%MeOH, 50% MeOH에서 비교적 높게 나타났다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Yield of Various Extracts from *Cyathulae Radix*

	Dec	37℃	RT	100%	80%	50%	100%	80%	50%
Yield(%)				EtOH	EtOH	EtOH	MeOH	MeOH	MeOH
(50g)	20%	34%	42%	10%	34%	40%	14%	30%	32%

The values are the percentage of the yield of the extracts from *Cyathulae Radix* under various conditions. RT ; room temperature

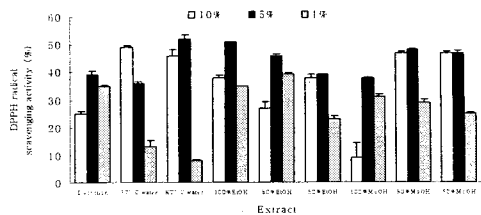


Fig. 4. Scavenging activity of various extract from *Cyathulae radix* on DPPH free radical.

The extracts from *Cyathulae Radix* were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments. RT ; room temperature

3) 懷牛膝

懷牛膝의 수율은 37℃ 水浸과 실온 水浸에서 각각 46%와 36%, 용매 추출 중에는 80% MeOH에서 44%, 50%MeOH에서 42%의 수율을 나타내었고, DPPH 소거능은 100%EtOH, 50% EtOH, 50%MeOH에서 가장 높게 나타났다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Yield of Various Extracts from *Achyranthis Bidentatae Radix*

	Dec	37℃	RT	100%	80%	50%	100%	80%	50%
Yield(%)				EtOH	EtOH	EtOH	MeOH	MeOH	MeOH
(50g)	20%	46%	36%	10%	34%	32%	22%	44%	42%

The values are the percentage of the yield of the extracts from *Achyranthis Bidentatae Radix* under various conditions. RT : room temperature

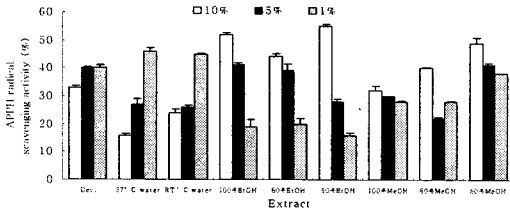


Fig. 5. Scavenging activity of various extract from *Achyranthes bidentatae radix* on DPPH free radical.

The extracts of *Achyranthis Bidentatae Radix* were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments. RT : room temperature

3. 분획에 따른 수율 및 DPPH 소거능

牛膝, 川牛膝, 懷牛膝의 전탕액, 37°C 水浸액, 실온 水浸액, 용매(100% EtOH, 80% EtOH, 50% EtOH, 100% MeOH, 80% MeOH, 50% MeOH) 추출물의 수율과 DPPH 소거능을 측정된 결과를 바탕으로 임상에서 실제로 활용되는 전탕액과 수율 및 DPPH 소거능이 대체적으로 양호하게 나타난 80% EtOH 추출물을 선택하여 각각 분획하였다(Table 6).

Table 6. Scavenging Activity of Various Fractions of Decoction or 80% EtOH Extracts from *Achyranthis Japonicae Radix*, *Cyathulae Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* on DPPH Free Radical

Fraction	%	Decoction			80% EtOH		
		AJR	CR	ABR	AJR	CR	ABR
Total ex.	10	54.4±0.3	72.5±5.6	37.1±0.1	75.5±0.7	28.0±0.9	44.2±0.6
	5	74.2±0.4	64.4±3.2	44.7±0.3	81.9±0.1	46.8±1.3	36.1±0.5
	1	60.8±0.1	37.8±1.4	44.2±0.1	50.1±1.8	40.2±0.3	22.9±1.1
Hexane	10	34.6±4.7	42.6±1.9	34.9±2.3	42.7±3.5	34.6±3.0	23.2±1.0
	5	36.4±5.3	48.9±0.1	41.1±0.2	37.1±4.3	22.3±8.6	14.7±2.9
	1	30.7±2.9	36.3±3.7	36.7±2.4	36.6±1.7	22.0±2.3	16.2±1.1
Ethyl ether	10	65.6±1.4	71.1±0.7	68.8±0.3	70.1±1.5	60.7±0.3	55.5±2.4
	5	71.4±0.5	61.1±2.3	44.2±0.1	76.7±0.7	48.9±1.4	47.1±0.4
	1	43.9±1.2	46.1±6.1	30.5±4.3	48.2±0.7	33.2±5.6	24.5±0.7
EtOAc	10	68.6±2.0	71.2±0.4	69.4±0.4	75.3±1.4	60.3±1.2	59.7±0.7
	5	76.3±2.2	73.0±0.4	48.5±0.4	82.6±0.5	49.1±1.4	49.2±3.9
	1	37.8±1.0	42.9±1.9	34.0±3.7	66.5±0.8	34.9±1.3	28.8±0.5
n-BuOH	10	84.3±0.4	75.2±0.8	67.9±0.6	79.0±2.5	60.1±4.0	53.7±8.8
	5	78.9±1.5	65.7±2.7	42.8±0.2	87.1±0.7	62.3±0.1	51.3±6.4
	1	48.2±1.2	36.1±2.2	38.9±1.8	69.5±2.2	30.7±5.0	27.6±0.2

Aqueo us	10	73.7±3.3	76.7±0.7	75.8±0.2	81.3±0.6	49.5±1.4	45.7±4.4
	5	75.8±0.4	68.8±1.4	55.2±1.2	76.4±2.3	40.0±1.3	26.5±2.8
1	43.0±2.2	42.3±1.2	41.4±3.2	43.7±0.3	23.1±7.2	2.9±1.7	

Various fractions of decoction and 80% EtOH extracts from *Achyranthis Japonicae Radix*, *Cyathulae Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. The values are the mean ± SD of three independent experiments.

1) 牛膝 전탕액

牛膝 전탕액을 극성이 다른 용매(n-hexan, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol, H2O)를 이용하여 단계적으로 분획 한 후 DPPH 소거능을 측정된 결과 ethyl acetate, n-butanol 층에서 높은 DPPH 소거능을 보였다(Table 7, Fig. 6).

Table 7. Yield of Various Fractions of *Achyranthis Japonicae Radix* Decoction

	n-Hexane	Ethyl ether	EtOAc	n-BuOH	Aqueous
Yield(%)					
1/ (20g)	25%	5%	5%	10%	70%

The values are the percentage of the yield of various fractions of *Achyranthis Japonicae Radix* decoction extract.

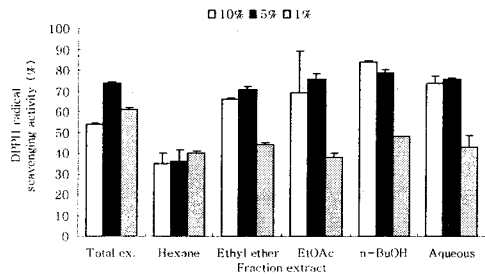


Fig. 6. Scavenging activity of various fractions of *Achyranthis Japonicae Radix* decoction on DPPH free radical.

The fraction extracts of *Achyranthis Japonicae Radix* decoction were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments.

2) 川牛膝 전탕액

川牛膝 전탕액을 극성이 다른 용매(n-hexan, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol, H2O)를 이용하여 단계적으로 분획 한 후 DPPH 소거능을 측정

한 결과 ethyl acetate, n-butanol, aqueous 층에서 가장 높은 DPPH 소거율을 나타내었다(Table 8 Fig. 7).

Table 8. Yield of Various Fractions of Cyathulae Radix Decoction

	n-Hexane	Ethyl ether	EtOAc	n-BuOH	Aqueous
Yield(%) / (20g)	2.5%	5%	5%	10%	85%

The values are the percentage of the yield of various fractions of Cyathulae Radix decoction extract.

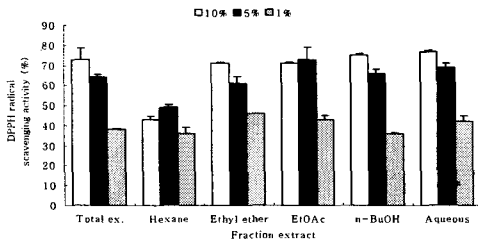


Fig. 7. Scavenging activity of various fractions of Cyathulae Radix decoction on DPPH free radical.

The fraction extracts of Cyathulae Radix decoction were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments.

3) 懷牛膝 전탕액

懷牛膝 전탕액을 극성이 다른 용매(n-hexan, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol, H2O)를 이용하여 단계적으로 분획 한 후 DPPH 소거능을 측정 한 결과 ethyl ether, ethyl acetate, n-butanol, aqueous 층에서 높은 DPPH 소거능을 보였다(Table 9, Fig. 8).

Table 9. Yield of Various Fractions of Achyranthis Bidentatae Radix Decoction

	n-Hexane	Ethyl ether	EtOAc	n-BuOH	Aqueous
Yield(%) / (20g)	0.5%	5%	5%	12.5%	80%

The values are the percentage of the yield of various fractions of Achyranthis Bidentatae Radix decoction extract

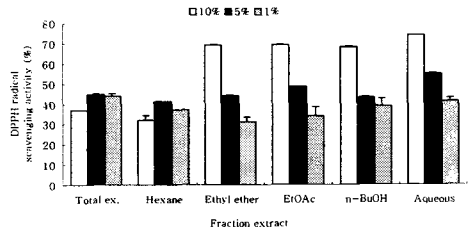


Fig. 8. Scavenging activity of various fractions of Achyranthis Bidentatae Radix decoction on DPPH free radical.

The fraction extracts of Achyranthis Bidentatae Radix decoction were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments.

4) 牛膝의 80% EtOH 추출물

牛膝의 80% EtOH 추출물을 극성이 다른 용매(n-hexan, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol, H2O)를 이용하여 단계적으로 분획 한 후 DPPH 소거능을 측정한 결과 total ex., ethyl acetate, n-butanol 층에서 높은 DPPH 소거능을 보였다(Table 10, Fig. 9).

Table 10. Yield of Various Fractions of 80%EtOH Extract from Achyranthis Japonicae Radix

	n-Hexane	Ethyl ether	EtOAc	n-BuOH	Aqueous
Yield(%) / (20g)	5%	5%	5%	10%	55%

The values are the percentage of the yield of various fractions of 80% EtOH extract from Achyranthis Japonicae Radix.

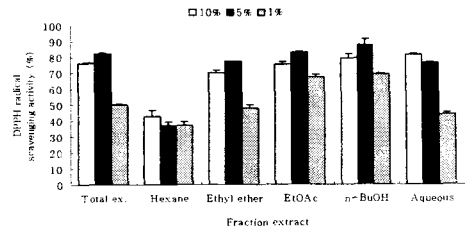


Fig. 9. Scavenging activity of various fractions of 80%EtOH extract from Achyranthis Japonicae Radix on DPPH free radical.

The fraction of Achyranthis Japonicae Radix 80%EtOH extract were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm.

Values are the means ± SD of three independent experiments.

5) 川牛膝의 80% EtOH 추출물

川牛膝의 80% EtOH 추출물 극성이 다른 용매 (n-hexan, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol, H₂O)를 이용하여 단계적으로 분획 한 후 DPPH 소거능을 측정한 결과 ethyl ether, ethyl acetate, n-butanol 층에서 가장 높은 DPPH 소거능을 나타내었다(Table 11, Fig. 10).

Table 11. Yield of Various Fractions of 80%EtOH Extract from Cyathulae Radix

	n-Hexane	Ethyl ether	EtOAc	n-BuOH	Aqueous
Yield(%)/ (20g)	5%	5%	5%	12.5%	65%

The values are the percentage of the yield of various fractions of 80% EtOH extract from Cyathulae Radix.

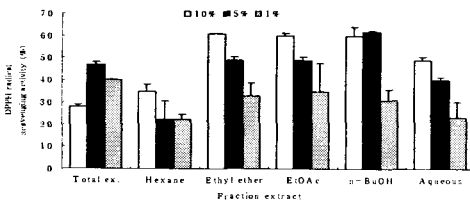


Fig. 10. Scavenging activity of various fractions of 80%EtOH extract from Cyathulae Radix on DPPH free radical.

The fraction extracts of Cyathulae Radix 80% EtOH were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments.

6) 懷牛膝의 80% EtOH 추출물

懷牛膝의 80% EtOH 추출물을 극성이 다른 용매 (n-hexan, ethyl acetate, ethyl ether, n-butanol, H₂O)를 이용하여 단계적으로 분획 한 후 DPPH 소거능을 측정한 결과 ethyl ether, ethyl acetate, n-butanol 층에서 가장 높은 DPPH 소거능을 나타내었다(Table 12, Fig. 11).

Table 12. Yield of Various Fractions of 80%EtOH Extract from Achyranthis Bidentatae Radix

	n-Hexane	Ethyl ether	EtOAc	n-BuOH	Aqueous
Yield(%)/ (20g)	7.5%	5%	5%	12.5%	70%

The values are the percentage of the yield of various fractions of 80% EtOH Extract from Achyranthis Bidentatae Radix.

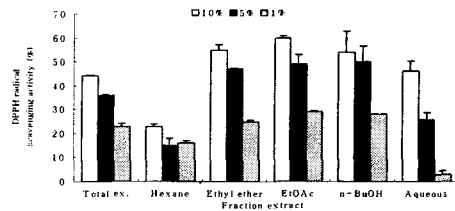


Fig. 11. Scavenging activity of various fractions of 80%EtOH extract from Achyranthis Bidentatae Radix on DPPH free radical.

The fraction extracts from Achyranthis Bidentatae Radix 80%EtOH were reacted with DPPH for 30 minutes at room temperature and the scavenging activity was measured in the absorbance at 517nm. Values are the means ± SD of three independent experiments.

4. 산화반응 억제효과

1) TBA법에 의한 지질과산화물 생성 억제도

牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝의 전탕액과 80% EtOH 추출물에서 total extract와 n-BuOH 분획물을 10%와 1%로 희석하여 linoleic acid의 지질과산화물 생성을 억제하는 효과를 측정하였다(Table 13).

Table 13. Inhibitory Effects of AJR, CR, ABR Against Linoleic Acid Peroxidation

		%	Decoction ex.	80% EtOH ex.
Total ex.	AJR	10	75.2±3.8	65.1±0.7
		1	37.3±5.9	49.5±6.5
	CR	10	66.8±11.0	64.1±8.1
		1	36.7±1.8	54.1±6.8
	ABR	10	72.3±5.0	68.2±22.0
		1	41.0±3.4	48.7±11.0
n-BuOH fraction	AJR	10	68.2±9.1	73.0±3.5
		1	44.7±3.5	51.4±8.7
	CR	10	71.2±5.5	61.8±5.2
		1	54.9±3.1	50.6±8.1
	ABR	10	63.1±7.2	48.9±5.2
		1	45.8±8.7	56.0±2.1

Antioxidative activity against lipid acid peroxidation of the decoction and the 80% EtOH extract of Achyranthis Japonicae Radix, Cyathulae Radix and Achyranthis Bidentatae Radix was measured by TBA (2-thiobarbituric acid) method using linoleic acid.

AJR ; Achyranthis Japonicae Radix

CR ; Cyathulae Radix

ABR ; Achyranthis Bidentatae Radix

Values are the means ± SD of three independent experiments.

(1) Decoction extract

牛膝, 川牛膝, 懷牛膝의 전탕액 및 전탕액의 n-BuOH 분획물을 10%와 1%로 희석하여 linoleic acid의 지질과산화물 생성을 억제하는 효과를 측정 한 결과, 10%에서 1%에 비하여 전체적으로 높은 억제 효과를 보였으며, 전탕액의 10% total extract에서는 牛膝이 가장 높았고, 1% total extract에서는 懷牛膝에서 가장 높게 나타났으며, 전탕액의 n-BuOH 분획물은 10%, 1%에서는 모두 川牛膝이 가장 높은 억제 효과를 보였다(Fig. 12).

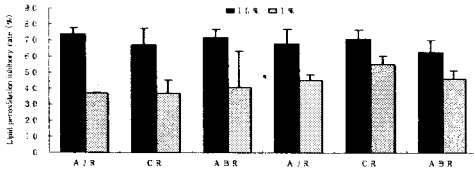


Fig. 12. Inhibitory effects of decoction of AJR, CR, ABR against linoleic acid peroxidation.

Antioxidative activity against lipid acid peroxidation of the decoction of Achyranthis Japonicae Radix, Cyathulae Radix and Achyranthis Bidentatae Radix was measured by TBA(2-thiobarbituric acid) method using linoleic acid.

AJR : Achyranthis Japonicae Radix

CR : Cyathulae Radix

ABR : Achyranthis Bidentatae Radix

Values are the means ± SD of three independent experiments.

(2) 80% EtOH extract

牛膝, 川牛膝, 懷牛膝의 80% EtOH 추출물과 80% EtOH 추출물의 n-BuOH 분획물을 10%, 1%로 희석하여 linoleic acid의 지질과산화물 생성 억제 효과를 비교한 결과, 10%에서 1%에 비하여 전체적으로 높은 억제 효과를 보였으며, 각 약물 간에는 total extract는 10%와 1% 모두 비슷한 정도였고, n-BuOH fraction은 10%에서 牛膝이 가장 높았고 1%에서는 懷牛膝이 가장 높은 억제 효과를 보였다(Fig. 13).

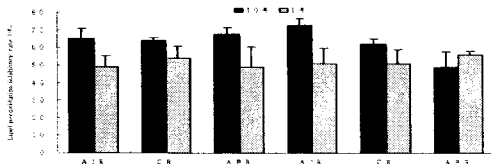


Fig. 13. Inhibitory effects of 80% EtOH extract from AJR, CR, ABR against lipid acid peroxidation.

Antioxidative activity against lipid acid peroxidation of the 80% EtOH extract of Achyranthis Japonicae Radix, Cyathulae Radix and Achyranthis Bidentatae Radix was measured by TBA(2-thiobarbituric acid) method using linoleic acid.

AJR : Achyranthis Japonicae Radix

CR : Cyathulae Radix

ABR : Achyranthis Bidentatae Radix

Values are the means ± SD of three independent experiments.

2) SOD 활성도

牛膝, 川牛膝, 懷牛膝의 전탕액과 80% EtOH 추출물에서 total extract와 n-BuOH 분획물을 10%와 1%로 희석하여 SOD 활성도를 측정하였다(Table 14).

Table 14. Effects of AJR, CR, ABR on SOD Activity

	%	Decoction ex.	80% EtOH ex.
Total ex.	AJR 10	32.6±3.9	37.8±2.3
	AJR 1	7.7±3.2	18.5±1.0
	CR 10	26.8±2.2	39.0±3.0
	CR 1	7.4±2.1	20.3±0.6
	ABR 10	18.7±4.1	17.5±2.1
	ABR 1	4.4±2.3	3.7±1.4
n-BuOH fraction	AJR 10	41.2±1.0	43.8±2.2
	AJR 1	16.8±1.0	30.8±2.3
	CR 10	43.5±4.8	46.5±0.5
	CR 1	17.5±2.4	33.8±0.6
	ABR 10	44.3±8.7	40.8±4.1
	ABR 1	19.6±5.8	8.3±0.6

Superoxide dismutase was assayed in observance at 560nm.

AJR : Achyranthis Japonicae Radix

CR : Cyathulae Radix

ABR : Achyranthis Bidentatae Radix

Values are the means ± SD of three independent experiments.

(1) Decoction extract

牛膝, 川牛膝, 懷牛膝의 전탕액 및 전탕액의 n-BuOH 분획물의 SOD 활성도를 측정하여 비교한 결과, 각 약물의 10%, 1% 모두 total extract 보다 n-BuOH 분획물에서 높은 활성도를 보였다. 각 약물간의 비교중 total extract는 10%에서 牛膝, 川牛膝, 懷牛膝 순으로 높은 활성도를 보였고 1%에서도 牛膝, 川牛膝, 懷牛膝 순으로 높은 활성도를 보였다. 그리고 n-BuOH fraction은 10%와 1% 모두 懷牛膝, 川牛膝, 牛膝 순으로 높은 활성도를 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig.14).

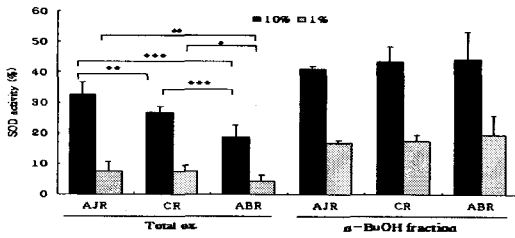


Fig. 14. Effects of decoction of AJR, CR, ABR on SOD activity
Superoxide dismutase was assayed in observance at 560nm.
AJR : Achyranthis Japonicae Radix
CR : Cyathulae Radix
ABR : Achyranthis Bidentatae Radix
Values represent the means \pm SD of three independent experiments. ***: P<0.001, compared to 10% group ###: P<0.001 compared to 1% group

(2) 80% EtOH extract

牛膝, 川牛膝, 懷牛膝의 80% EtOH 추출물과, 80% EtOH 추출물의 n-BuOH 분획물의 SOD 활성도를 측정하여 비교한 결과 각 약물의 10%, 1% 모두 total extract 보다 n-BuOH 분획물에서 높은 활성도를 보였다. 각 약물간의 비교에서는 total extract는 10%에서 懷牛膝보다 牛膝, 川牛膝에서 높은 활성도를 보였고 1%에서도 懷牛膝보다 牛膝과 川牛膝에서 높은 활성도를 보였다. 그리고 n-BuOH fraction은 10%와 1% 모두 川牛膝, 牛膝, 懷牛膝 순으로 높은 활성도를 보였다(Fig.15).

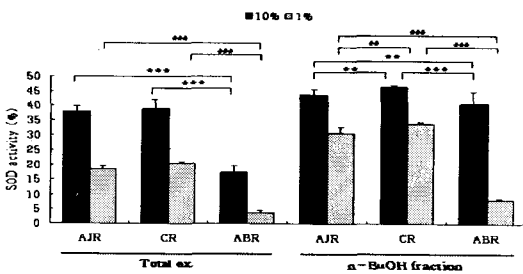


Fig. 15. Effects of total extract and n-BuOH fraction of 80% EtOH extract on SOD activity
Superoxide dismutase was assayed in observance at 560nm.
AJR : Achyranthis Japonicae Radix
CR : Cyathulae Radix
ABR : Achyranthis Bidentatae Radix
Values represent the means \pm SD of three independent experiments.
***: P<0.001, **: P<0.01 compared to 10% group
###: P<0.001, #: P<0.01 compared to 1% group

3) 총페놀 함량

牛膝, 川牛膝, 懷牛膝의 전탕액, 전탕액의 n-BuOH 분획물, 80% EtOH 추출물, 80% EtOH 추출물의 n-BuOH 분획물의 총페놀함량을 각각 측정하였다(Table 15).

Table 15. Volume of Phenolic Compound in Total Extract and n-BuOH Fractions of Decoction and 80%EtOH Extract from AJR, CR and ABR

		Decoction ex.	80% EtOH ex.
Total ex.	AJR	205.2 \pm 44.0	190.1 \pm 6.7
	CR	195.4 \pm 14.8	144.9 \pm 3.6
	ABR	189.4 \pm 11.3	102.5 \pm 1.5
n-BuOH fraction	AJR	177.7 \pm 15.6	183.6 \pm 12.1
	CR	154.4 \pm 4.3	156.3 \pm 5.4
	ABR	165.7 \pm 4.5	169.5 \pm 10.3

Total Phenolic compounds were assayed by Folin-Denis' method.

AJR : Achyranthis Japonicae Radix

CR : Cyathulae Radix

ABR : Achyranthis Bidentatae Radix

Values are the means \pm SD of three independent experiments.

(1) Decoction extract

각 약물 전탕액 및 전탕액의 n-BuOH 분획물의 페놀성 물질의 총 함량을 측정 비교한 결과, 전체적으로 total extract에 비해 n-BuOH fraction에서 총페놀 함량이 높게 나타났다. 약제에 따른 총페놀 함량은 total extract 와 n-BuOH fraction 모두 牛膝이 높게 나타났고 분획 후 조금씩 낮게 나타났다(Fig.16).

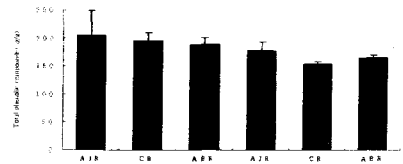


Fig. 16. Volume of phenolic compound in decoction of AJR, CR, ABR and n-BuOH fraction of AJR, CR, ABR.
Total Phenolic compounds were assayed by Folin-Denis' method.
AJR : Achyranthis Japonicae Radix
CR : Cyathulae Radix
ABR : Achyranthis Bidentatae Radix
Values are the means \pm SD of three independent experiments.

(2) 80% EtOH extract

각 약물의 80% EtOH 추출물과 80% EtOH 추출

물의 n-BuOH 분획물의 페놀성 물질의 총 함량을 측정 비교한 결과, 전체적으로 total extract에서는 牛膝, 川牛膝, 懷牛膝 순으로 높게 나타났고, n-BuOH fraction에서는 牛膝, 懷牛膝, 川牛膝 순으로 높게 나타났다(Fig.17).

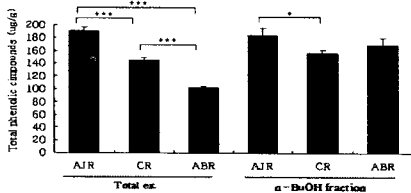


Fig. 17. Volume of phenolic compound in total extract and n-BuOH fraction of 80% EtOH extract from AJR, CR, ABR
Total Phenolic compounds were assayed by Folin-Denis' method.
AJR : Achyranthis Japonicae Radix
CR : Cyathulae Radix
ABR : Achyranthis Bidentatae Radix
Values represent the mean ± SD of three independent experiments.
(*** : p<0.001, * : p<0.05)

고찰

牛膝의 기원으로 대한약전³⁾에는 비름과(Amarantaceae)에 속하는 쇠무릎Achyranthes japonica Nakai의 뿌리로, 일본약국방⁴⁾은 같은 과에 속하는 쇠무릎 Achyranthes fauriei Leveille et Vaniot 또는 A. bidentata Blume의 뿌리로 되어 있는데, 일본약국방⁴⁾의 Achyranthes fauriei Leveille et Vaniot 는 한국에는 분포하지 않고 일본의 혼슈, 시코쿠, 큐우슈우 등지에 분포하며¹⁷⁾, 한국에 분포하고 있는 쇠무릎 Achyranthes japonica Nakai¹⁸⁾와는 다른 식물이다. 韓國植物名考¹⁹⁾에도 Achyranthes japonica Nakai 는 Achyranthes fauriei var. japonica (Miq.) Hiyama 로 되어 있고, 原色牧野和漢藥草大圖鑑¹⁷⁾에 Achyranthes japonica Nakai 의 뿌리는 소형이기 때문에 일본시장에서는 주로 Achyranthes fauriei Leveille et Vaniot 의 뿌리가 유통된다고 한 것으로 보아도 Achyranthes fauriei Leveille et Vaniot 와 쇠무릎 Achyranthes japonica Nakai¹⁸⁾가 서로 다른 식물임을 알 수 있다.

이처럼 牛膝의 기원식물로 쇠무릎(牛膝)과 懷牛膝 및 川牛膝이 각각 쓰이고 있으므로 이들의 효능을

검증할 필요가 있다고 사료된다. 이들 기원식물에 대해서, Zheng 등²⁰⁾은 한국산 쇠무릎과 중국산 懷牛膝을 RAPD 분석으로 근연성을 비교하여 매우 유사하다고 하였으며, Li 등²¹⁾은 懷牛膝에서 파골세포(osteoclast)의 형성을 억제하는 oleanolic acid glycosides를 분리하였고, Meng 등²²⁾은 회우슬로부터 phytoesterone 인 achyranthesterone A를 분리하였고, Okuzumi 등²³⁾은 川牛膝로부터 ecdysteroidal constituents인 cyasterone의 구조를 밝혔으며, Han 등¹⁰⁾, Lu 등¹¹⁾은 懷牛膝의 진통과 소염작용을 보고하였고, Chen 등¹⁴⁾은 川牛膝의 CoPS3 성분이 항암 효과가 있다고 보고하였다. 이밖에 懷牛膝의 polysaccharides 성분의 약리작용에 대한 연구로 Li 등²⁴⁾은 면역효과를, Gao 등²⁵⁾은 골형성에 유효함을 보고하였고, Yu 등¹²⁾과 Xiang 등²⁶⁾은 항암과 면역작용을, Tian 등²⁷⁾은 항바이러스 작용을 보고하였다. 이처럼 懷牛膝과 川牛膝의 진통, 소염, 항암과 면역작용 등이 보고되었지만, 牛膝의 기원식물인 쇠무릎(牛膝), 懷牛膝 및 川牛膝의 항산화 효능을 비교한 연구는 아직 보고되지 않았다.

이에 저자는 祛瘀止痛, 活血通經, 補益肝腎의 효능을 지닌 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝의 유전적 차이를 RAPD법을 이용하여 관찰하고, 이 세 약물의 항산화반응 억제효과를 비교 분석하였다.

먼저 세 약물 간의 유전적 차이를 관찰하기 위하여 각 약물의 전탕액을 RAPD법을 이용하여 분석하였다. RAPD는 거의 무한정의 nearly-neutral marker를 생산하는 방법으로 중간 유연관계 분석에 유용하게 사용되고 있다²⁸⁾. 분석 결과, Zheng 등²⁰⁾의 결과와 마찬가지로 牛膝과 懷牛膝에서 유사한 양상의 밴드를 보여, 牛膝과 懷牛膝이 유전적으로 매우 유사한 것으로 사료되었다.

牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝을 여러 가지 방법으로 추출하고 그 추출물을 여러 용매를 이용하여 분획하여 수율과 DPPH 소거능을 비교한 결과, 세 가지 약물 모두에 가장 적절한 추출방법으로 80% EtOH을, 그리고 가장 적절한 분획으로 n-BuOH fraction을 선택하였다. 또한 임상에서 실질적으로 이용되는 전탕액을 실험에 포함하였다. 따라서 본 실험에서는 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝 각각의 80% EtOH 추출물의 total extract, 80% EtOH 추출물의 n-BuOH 분획물, 전탕액의 total extract, 전탕액의 n-BuOH 분획물이 사용되었다.

牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝의 산화반응 억제작용을 비교하기 위하여 DPPH 자유 라디칼 소거능, TBA

법, SOD 활성도 및 총 페놀 함량을 측정하였다.

DPPH는 안정한 자유 라디칼로서, 그 비공유전자로 인해 517nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내며, 전자 또는 수소를 받으면 517nm 부근에서 흡광도가 감소한다. 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다.

TBA법은 지질 과산화를 측정하는 대표적인 방법으로, 생성된 MDA를 thiobarbituric acid와 산성 조건하에서 반응시켜 함께 가열한 후 532nm에서 그 흡광도를 측정하는 방법이다²⁹⁾.

Superoxide dismutases(SODs)는 superoxide radical(O₂⁻)는 항산화 효소들 중에서도 가장 널리 연구된 것으로, superoxide radical(O₂⁻)을 과산화수소(H₂O₂)와 산소(O₂)로 전환시킴으로써 superoxide의 독성을 제거하는 금속이온 의존성 효소(metalloenzyme)로 알려져 있다³⁰⁾.

실험결과, 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝에 비하여 높은 산화 반응 억제효능을 보였다.

페놀계 항산화제들은 연쇄 반응에서 alkylperoxy radical이나 alkylradical에 수소를 공여함으로써 그 radical을 제거하여 산화를 억제한다³¹⁾. 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝 추출물의 총 페놀 함량을 측정한 결과, 懷牛膝과 川牛膝에 비해 牛膝의 총페놀함량이 더 높은 것으로 나타나, DPPH 소거능, TBA법, SOD 활성도와 부합되는 결과를 나타내었다. 따라서 牛膝의 항산화 활성이 懷牛膝 및 川牛膝에 비해 양호할 것으로 추측되었다.

이상의 결과를 종합하면, 牛膝과 懷牛膝은 유전적으로 유사한 특성을 보이며, 肝腎을 補益하는 작용이 큰 牛膝과 懷牛膝, 그리고 活血 작용이 큰 川牛膝 모두 항산화작용을 갖고 있었으며, 특히 牛膝은 懷牛膝과 川牛膝에 비하여 페놀함량이 크고 항산화작용이 우수하였다. 그러나 in vitro 만으로는 항산화 효과를 입증하기 어려우므로 in vivo 실험을 통해 항산화 효능을 입증할 필요가 있다고 사료된다.

결론

牛膝, 川牛膝 및 懷牛膝의 유전적 차이를 RAPD법을 이용하여 관찰하고, 이 세 약물의 산화반응 억제효과를 비교 분석한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. RAPD 분석 결과, 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝 중 牛膝과 懷牛膝이 유전적으로 가까운 것으로 나타났다

2. 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝의 DPPH 소거능, 지질 과산화 생성 억제능, SOD 활성도는 추출방법이나 분획에 따라 다소 차이가 있었으나 전반적으로 牛膝에서 가장 높았고, 총페놀함량 역시 懷牛膝과 川牛膝에 비해 牛膝에서 더 높게 나타났다

이상의 결과에서 牛膝, 懷牛膝 및 川牛膝 모두 산화반응 억제효과가 있으므로 항산화 작용이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 孫星衍, 孫馮翼 輯. 神農本草經. 北京:科學技術出版社. 1999:13.
2. 전국한의학대학 공동교재편찬위원회 편저. 본초학. 서울:영림사. 2004:468-469.
3. 식품의약품안전청 고시 제2002-73. 대한약전 제8개정. 2002:1441.
4. 日本藥局方解説書 編纂委. 日本藥局方 第14改定. 東京:廣川書店. 2001:383-385.
5. 中華人民共和國衛生部藥典委員會編. 中華人民共和國 藥典 2005年版 1部. 北京:化學工業出版社. 2005:28,154.
6. 조선민주주의 인민공화국 보건부 약전위원회. 조선민주주의 인민공화국 약전 제5판. 평양:의학과학출판사. 1996:232.
7. 行政院 衛生署 編. 中華民國中藥典範 1985年版. 臺北:達昌印刷有限公司. 1985:532-535.
8. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1999:(2)830-835,858-860.
9. 高本鈞. 新編中藥大辭典 上. 臺北:新文豐出版公司. 1981:35-36,178-181.
10. Han SB, Lee CW, Yoon YD, Lee JH, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, Lee K, Park SK, Kim HM. Prevention of arthritic inflammation using an oriental herbal combination BDX-1 isolated from *Achyranthes bidentata* and *Atractylodes japonica*. Arch Pharm Res. 2005;28(8):902-8.
11. Lu T, Mao C, Zhang L, Xu W. The

research on analgesic and anti-inflammatory action of different processed products of *Achyranthes bidentata*. *Zhong Yao Cai*. 1997;20(10):507-9.

12. Yu S, Zhang Y. Effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides (ABP) on antitumor activity and immune function of S180-bearing mice. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 1995;17(4):275-8.

13. Xiang DB, Li XY. Antitumor activity and immuno-potentiating actions of *Achyranthes bidentata* polysaccharides. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1993 ;14(6):556-61.

14. Chen XM, Tian GY. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydr Res*. 2003;338(11):1235-41.

15. Sozmen EY, Tanyakin T, Onat T, Kufay F, erlacin S. Ethanol-induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. *Eur J Clin Chen Clin Biochem*. 1994;32:741-744.

16. Fumie Betsui, Norie Tanaka-Nishikawa, Koichiro Shimomura. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin Plant Biotechnology. 2004;21(5):387-391.

17. 三橋博 監修. 原色牧野和漢藥草大圖鑑. 東京:北隆館. 1988:54-55.

18. 이창복. 대한식물도감. 서울:향문사. 1982:322.

19. 李愚喆. 韓國植物名考. 서울:아카데미서적. 1996:283.

20. Zheng XZ, Guo BL, Yan YN. Study on the genetey relationship between Chinese and Korean medicinal materials of niuxi with the method of RAPD. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2002;27(6):421-3.

21. Li JX, Hareyama T, Tezuka Y, Zhang Y, Miyahara T, Kadota S. Five new oleanolic acid glycosides from *Achyranthes bidentata* with inhibitory activity on osteoclast formation. *Planta Med*. 2005;71(7):673-9.

22. Meng DL, Li X, Wang JH, Li W. A new phytosterone from *Achyranthes bidentata* Bl. *J*

Asian Nat Prod Res. 2005;7(2):181-4.

23. Okuzumi K, Hara N, Uekusa H, Fujimoto Y. Structure elucidation of cyasterone stereoisomers isolated from *Cyathula officinalis*. *Org Biomol Chem*. 2005;3(7):1227-32.

24. Li ZK, Li DD. The immunomodulatory effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides. *Yao Xue Xue Bao*. 1997;32(12):881-7.

25. Gao XY, Wang DW, Li FM. Determination of ecdysterone in *Achyranthes bidentata* Bl and its activity promoting proliferation of osteoblast-like cells. *Yao Xue Xue Bao*. 2000;35(11):868-70.

26. Xiang DB, Li XY. Effects of *Achyranthes bidentata* polysaccharides on interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production from mouse peritoneal macrophages. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1993;14(4):332-6.

27. Tian GY, Li ST, Song ML, Zheng MS, Li W. Synthesis of *Achyranthes bidentata* polysaccharide sulfate and its antiviral activity. *Yao Xue Xue Bao*. 1995;30(2):107-11.

28. Innis MA, DH Gelfand and JJ Sninsky. "PCR protocols". Academic Press. USA. 1990.

29. Halliwell B and Gutteridge JCM. in "Free Radicals in Biology and Medicine". Clarendon Press, Oxford. 1989;2:228-233.

30. Bannister. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem (CRC critical reviews in biochemistry)*. 1987;22(2):111-80.

31. Labuza TP. Kinetics of Lipid Oxidation in Foods. *CRC critical Rev. Food Technol*. 1973:335.