

加味淸上補下湯 熱水抽出物과 알코올抽出物の 指標物質 및 패턴의 比較分析

민정기, 정희재, 이형구, 정승기

경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실, 경희대학교 한의과대학 생리학교실

Comparison and Analysis of Several Main Components between Hot Water Extract and Alcohol Extract of Gamichungsangbohatang.

Jung-ki Min, Hee-jae Jung, Hyung-koo Rhee, Sung-ki Jung

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Objectives : To find out more pharmacologically efficient way of extraction of herbal decoction, Gamichungsangbohatang (GMCSBHT).

Methods : Several main components of GMCSBHT was compared and analysed between hot water extract of GMCSBHT and Alcohol(70% ethanol) extract of GMCSBHT via HPLC method.

Results : Hot water extract of GMCSBHT showed relatively more component content than ethanol extract of GMCSBHT. Also weighted mean of main components of hot water extraction of GMCSBHT was higher than that of alcohol extract of GMCSBHT. But from chromatographic pattern analysis of matching ratio and similarity ratio showed that these two forms of extracts might have different chemical composition, and 3D PDA plot of alcohol extract of GMCSBHT showed high peaks near UV 190~220nm which was invisible in hot water extract of GMCSBHT.

Conclusion : Alcohol extract of GMCSBHT may have some special components which do not exist in hot water extract of GMCSBHT.

Key Words: Gamichungsangbohatang, GMCSBHT, extract, main components, HPLC

1. 緒 論

淸上補下湯은 기관지 천식 등 호흡기 질환에 빈용¹하는 처방으로 龔廷賢²의 壽世保元 哮喘門에 나오는 淸上補下丸에서 유래한다. 淸上補下丸은 조선시대에 黃度淵의 醫宗損益³ 및 方藥合編⁴에 언급되고 있으며 최근 국내에서는 이를 淸上補下湯으로 용량변경하여

실험 연구⁵⁻⁹ 및 임상 연구^{1,10,11}로 발표된 바 있다. 이 중에는 淸上補下湯을 이용하여 천식염증이 유발된 쥐의 기도 단면에서 염증양상이 유효하게 감소한다는 연구결과도 발표된 바 있다⁹. 이제까지 진행된 임상 시험 연구는 주로 약재를 열탕하여 액체상태 그대로 복용시키는 방법이었는데 이러한 전통적인 탕제는 휴대 및 복용상 불편함, 품질의 균일성과 안정성의 미흡 등의 문제를 안고 있는 것이 사실이다. 그래서 최근에는 일정한 공정에 의해 균질하며 복용이 편리한 제형상의 변화를 추구하는 경향이 나타나고 있다.

· 접수 : 2006. 2. 15. · 채택 : 2006. 2. 24.
· 교신저자 : 정승기, 서울시 동대문구 회기동 1
경희의료원 한방5내과 의사실
(Tel. 02-958-9147, Fax. 02-958-9148
E-mail : jskes@unitel.co.kr)

加味淸上補下湯은 淸上補下湯에 熟地黃, 山藥, 山茱萸를 증량한 처방인데, 최근의 임상연구에서는 열수추출에 의한 加味淸上補下湯 엑기스 과립제제를 이용하여 기관지 천식 환자에 대한 엑기스제제의 유효성이 입증되고 있다¹²⁻⁵.

엑기스제제는 가공과정에서 추출 방법에 따라 그 성분 및 함량이 달라질 수 있으므로 보다 적절한 약효를 위하여 추출방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 예비단계로서 加味淸上補下湯을 구성하는 몇가지 약재로부터 알려진 주요한 유효성분을 대상으로 열수추출과 에탄올 추출물간의 차이를 연구하고자 하였다. High performance liquid chromatography(HPLC)방법을 통하여 加味淸上補下湯의 열수추출물과 에탄올 추출물에 대해 수종의 지표물질 용량 비교 및 지표물질들의 성분패턴 비교분석을 시행하여 양 제형간의 차이에 대하여 일정한 결론을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 재료: 加味淸上補下湯 구성한약재는 주로 국산 한약재로 옴니허부닷컴에서 구입하였고, 중국산은 주식회사 경신(서울, 한국)으로부터 구입하여 사용하였다(Table 1 참조).

2) 시약

(1) 추출용매 : 3차 증류수는 자체 초순수제조 장치(모델명: 103S All-glass, High-Q. Inc., USA)를 이용하여 사용하였다.

(2) 분석용매 : Acetonitrile, methanol, water (4L, HPLC grade)등의 3종과 acetic acid(2.5L, HPLC grade)는 미국의 J. T. Baker사 제품을 구입하여 사용하였다.

(3) 표준물질 : Alisol B acetate, schizandrin, baicalein, wogonin, loganin, paeonol, paeoniflorin 등 이상 7종 등은 일본의 Wako Pure chemicals로부터 구입하여 사용하였다.

Table 1. Contents of Gamichungsangboha-tang

Herb	Scientific Name	Dose (per one pack)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata (Korea)	8 g
山 藥	Discoreae Rhizoma (Korea)	6 g
山茱萸	Corni Fructus (Korea)	6 g
白茯苓	Poria (Korea)	4 g
牡丹皮	Moutan Cortex (Korea)	4 g
澤 瀉	Alismatis Rhizoma (Korea)	4 g
五味子	Schizandrae Fructus (Korea)	3 g
枳實	Ponciri Fructus	3 g
麥門冬	Liriodis Tuber	3 g
天門冬	Asparagi Radix	3 g
貝母	Fritillariae Roylei Bulbus	3 g
桔梗	Platycodi Radix	3 g
黃連	Coptidis Rhizoma	3 g
杏仁	Ariminiaceae Semen	3 g
半夏	Pinelliae Rhizoma	3 g
瓜蒌仁	Tricosanthis Semen	3 g
黃芩	Scutellariae Radix	3 g
甘草	Glycyrrizae Radix	2 g
Total amount		67 g

3) 기기

(1) HPLC

HPLC의 기기는 Waters 사(USA)의 Waters Breeze System을 사용하였다. 이때 사용한 software는 Waters Empower System(Version 5.00)을 사용하였다.

2. 方法

1) 加味淸上補下湯의 추출 방법

(1) 加味淸上補下湯의 구성한약재의 분쇄

加味淸上補下湯의 구성한약재인 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 白茯苓, 牡丹皮, 澤瀉, 五味子, 枳實, 麥門冬, 天門冬, 貝母, 桔梗, 黃連, 杏仁, 半夏, 瓜蒌仁, 黃芩, 甘草를 각각 섞은 후 분쇄기로 분쇄하여 18호체(φ 1mm)를 통과시킨 것을 검체로 사용하였다.

(2) 加味清上補下湯의 추출

가) 알코올추출물의 제조 : 분쇄된 加味清上補下湯 구성한약재 335g을 정밀히 달아 3L짜리 삼각 플라스크에 넣고 80% EtOH 1500ml를 넣어서 실온에서 약 5일간 침지하여 감압여과(Watmann No. 2)하였다.

나) 열수추출물의 제조 : 다쇄된 加味清上補下湯 구성한약재 335g을 정밀히 달아 5L짜리 둥근평저플라스크에 넣고 3차 증류수 3000ml를 넣어서 100℃에서 약 3시간 동안 환류추출하여 감압여과하였다.

(3) 지표물질의 표준액 조제 및 검량선 작성

加味清上補下湯의 지표물질 분석은 加味清上補下湯을 구성하고 있는 구성한약재 중 동시분석이 가능한 山茱萸(loganin), 牡丹皮(paeonol, paeoniflorin 등), 五味子(schizandrin), 枳實(poncirin), 黃連(berberine), 黃芩(baicalin, baicalein, wogonin 등), 杏仁(amygdalin), 甘草(glycyrrhizic acid) 등의 지표물질을 서로 합하여 다성분 동시분석을 실시하였다. 한편, 물리화학적 특성으로 다성분 동시분석이 불가능한 熟地黃(5-HMF), 山藥(allantoin), 澤瀉(alisol B acetate), 半夏(homogentisic acid)등은 개별적으로 분석하였다.

(4) 加味清上補下湯의 검액 조제

다성분 동시분석이 가능한 山茱萸(loganin), 牡丹皮(paeonol, paeoniflorin 등), 五味子(schizandrin), 枳實(poncirin), 黃連(berberine), 黃芩(baicalin, baicalein, wogonin 등), 杏仁(amygdalin), 甘草(glycyrrhizic acid) 등의 몇몇 구성한약재를 분석하기 위해 加味清上補下湯의 알코올 및 열수추출물 중 각각 건조엑스 1.0g씩을 정밀히 취해 50mL falcon tube에 넣고 75% ethanol 수용액 10mL을 첨가하였고, 다성분 동시분석이 불가능한 熟地黃(5-HMF), 山藥(allantoin), 澤瀉(alisol B acetate), 半夏(homogentisic acid)등의 한약재를 분석하기 위해 알코올 및 열수추출물 중 각각 건조엑스 1.0g씩을 정밀히 취해 50mL falcon tube에 넣고 물리화학적 성질에 따라 methanol 및 3차 증류수 10mL을 첨가하였고, 상층액을 취하여 HPLC를 이

용하여 함량을 분석하였다.

2) 지표물질의 함량 공식 및 패턴 분석 공식

(1) 지표물질의 함량 공식

$$\begin{aligned} \text{지표물질 함량(g)} &= \\ &\{ \text{표준품의 양(mg)} \times \text{표준품의 순도} \} \\ &\times (\text{검액의 피크면적} / \text{표준액의 피크면적}) \times 1 \\ &/ (\text{검액의 희석농도 비율} \times \text{검액 양}) \end{aligned}$$

(2) 패턴분석에 적용된 공식들¹⁶⁻²⁰

- 산술 평균(Simple mean) :

$$M_s = \sum R_i / n, \quad R_i = Sp_{(i)} / St_{(i)}$$

- 가중 평균(Weighted mean) :

$$M_w = \sum (R_i / W_i)$$

- 유사도(Similarity, %) :

$$\sum_{k=1}^n (N_k \times W_k)$$

III. 結 果

1. 加味清上補下湯의 각 지표물질에 대한 표준액의 검량선 작성

加味清上補下湯의 각 구성한약재 중 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 牡丹皮, 澤瀉, 五味子, 枳實, 黃連, 杏仁, 半夏, 黃芩, 甘草에 대하여 각각 지표물질에 대한 검량선을 작성하였다. HPLC 분석하여 선형회귀분석을 실시한 결과, 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다(Fig.1-12).

1) 熟地黃의 지표물질인 5-HMF의 calibration curve 위의 결과로부터, 熟地黃의 지표물질인 5-HMF의 직선의 회귀방정식은 $Y=88336110.0X-143138.8$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99973을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

2) 山藥의 지표물질인 allantoin의 calibration curve 위의 결과로부터, 山藥의 지표물질인 allantoin의 직선의 회귀방정식은 $Y=19826710.0X+174385.5$ 를 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99956을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

3) 山茱萸의 지표물질인 loganin의 calibration curve 위의 결과로부터, 山茱萸의 지표물질인 loganin의

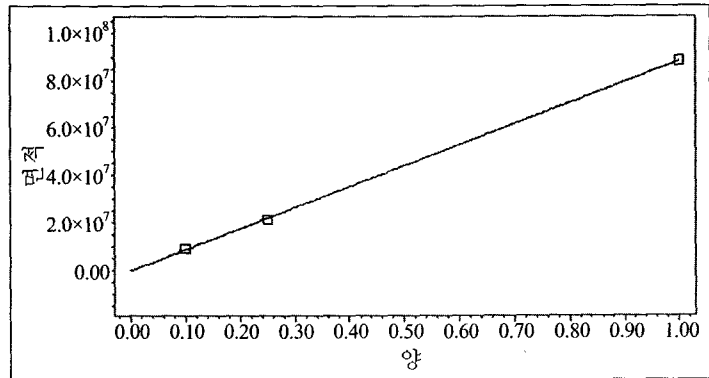


Fig. 1. The calibration curve of the standard material, 5-HMF of Rehmanniae Radix Preparata.

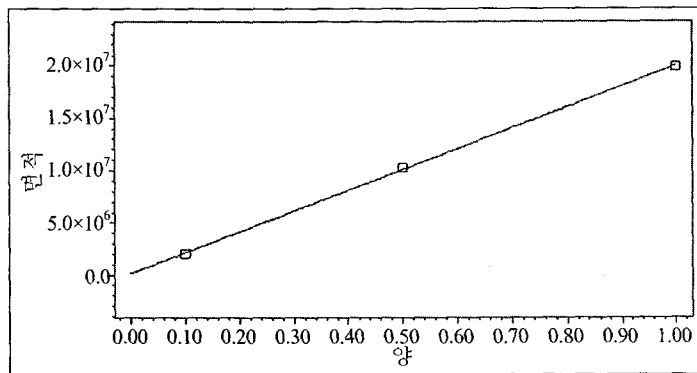


Fig. 2. The calibration curve of the standard material, allantoin of Discoreae Rhizoma.

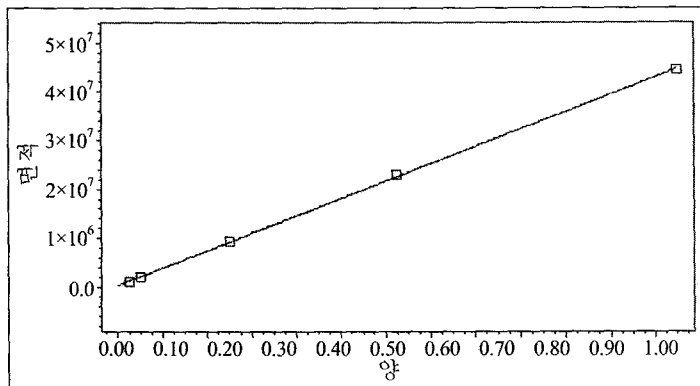


Fig. 3. The calibration curve of the standard material, loganin of Corni Fructus.

직선의 회귀방정식은 $Y=17730920.0X+43477.4$ 를 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99973을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

4) 牡丹皮의 지표물질인 paeoniflorin의 calibration curve

위의 결과로부터, 牡丹皮의 지표물질인 paeoniflorin

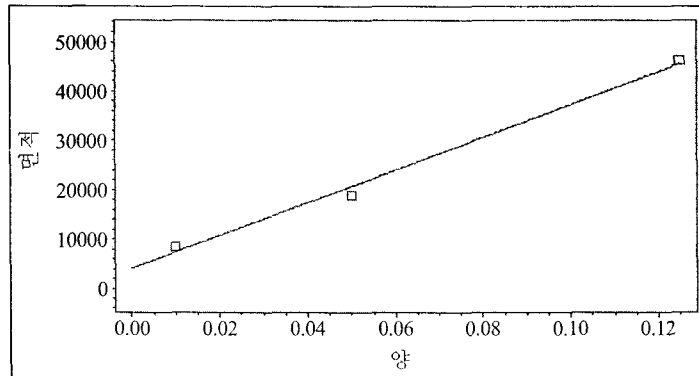


Fig. 4. The calibration curve of the standard material, paeoniflorin of Moutan Cortex.

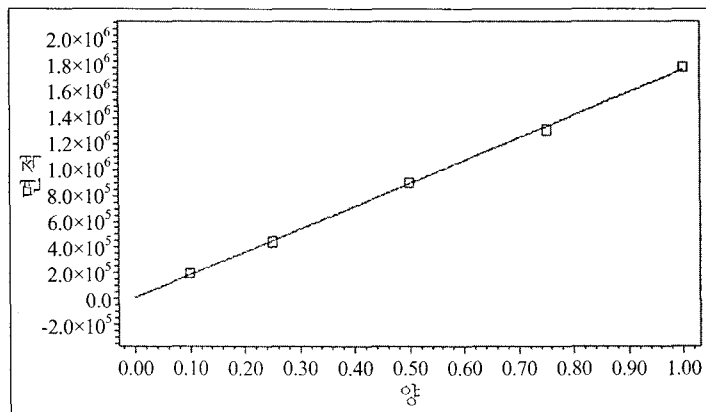


Fig. 5. The calibration curve of the standard material, alisol B acetate of Alismatis Rhizoma.

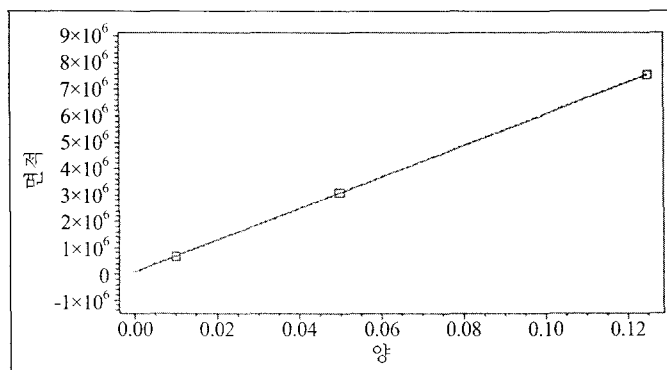


Fig. 6. The calibration curve of the standard material, schizandrin of Schizandrae Fructus.

의 직선의 회귀방정식은 $Y=3314849.0X+41038.6$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99376을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

5) 澤瀉의 지표물질인 alisol B acetate의 calibration curve

위의 결과로부터, 澤瀉의 지표물질인 alisol B ace-

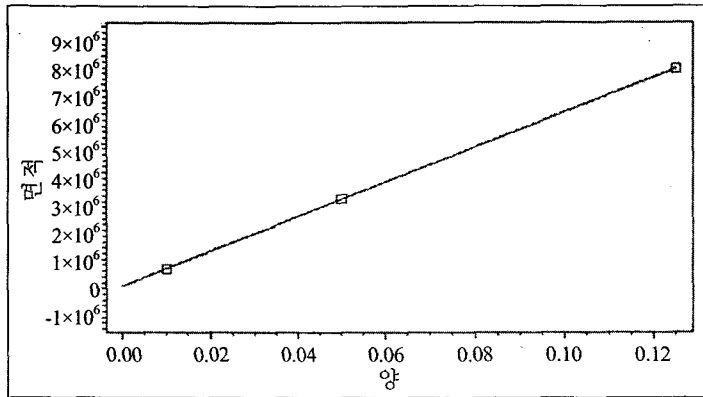


Fig. 7. The calibration curve of the standard material, poncirin of Ponciri Fructus.

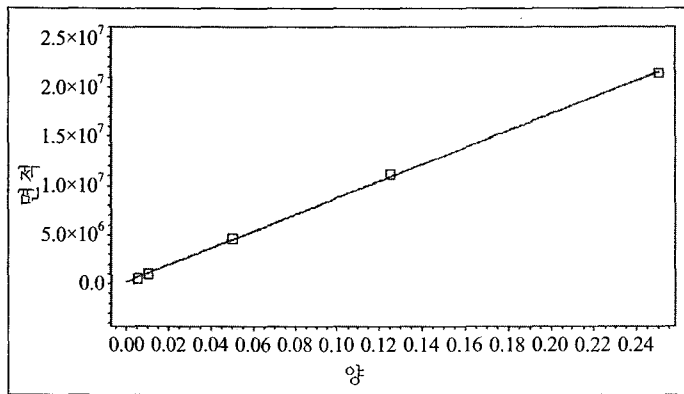


Fig. 8. The calibration curve of the standard material, berberine of Coptidis Rhizoma.

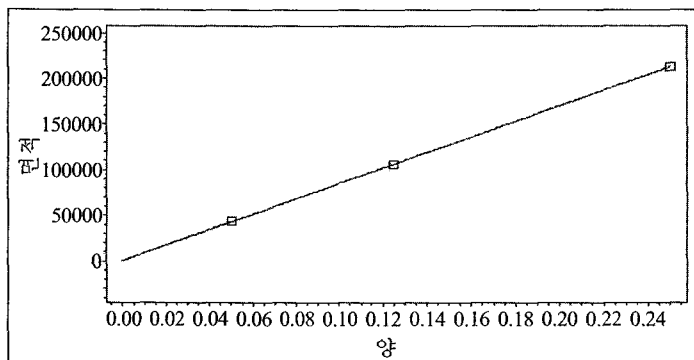


Fig. 9. The calibration curve of the standard material, amygdalin of Arimniaceae Semen.

tate의 직선의 회귀방정식은 $Y=32816010.0X+139936.1$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99874을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

6) 五味子の 지표물질인 schizandrin의 calibration curve

위의 결과로부터, 五味子の 지표물질인 schizandrin

의 직선의 회귀방정식은 $Y=59807520.0X+85701.6$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99996을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

7) 枳實의 지표물질인 poncirin의 calibration curve

위의 결과로부터, 枳實의 지표물질인 poncirin의 직선의 회귀방정식은 $Y=7796187.0X+23048.2$ 를 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99939를 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

8) 黃連의 지표물질인 berberine의 calibration curve

위의 결과로부터, 黃連의 지표물질인 berberine의 직선의 회귀방정식은 $Y=85089930.0X+237074.6$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99953을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

9) 杏仁의 지표물질인 amygdalin의 calibration curve

위의 결과로부터, 杏仁의 지표물질인 amygdalin의 직선의 회귀방정식은 $Y=849349.8X+463.3$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99996을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

10) 半夏의 지표물질인 homogentisic acid의 calibration curve

위의 결과로부터, 半夏의 지표물질인 homogentisic acid의 직선의 회귀방정식은 $Y=1777069.0X+7385.6$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99920을 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

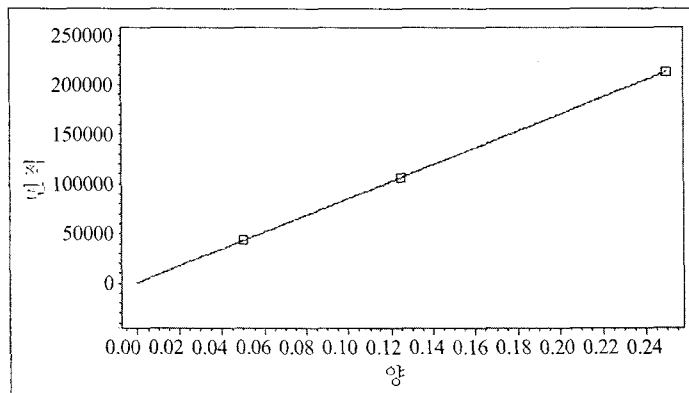


Fig. 10. The calibration curve of the standard material, homogentisic acid of Pinelliae Rhizoma.

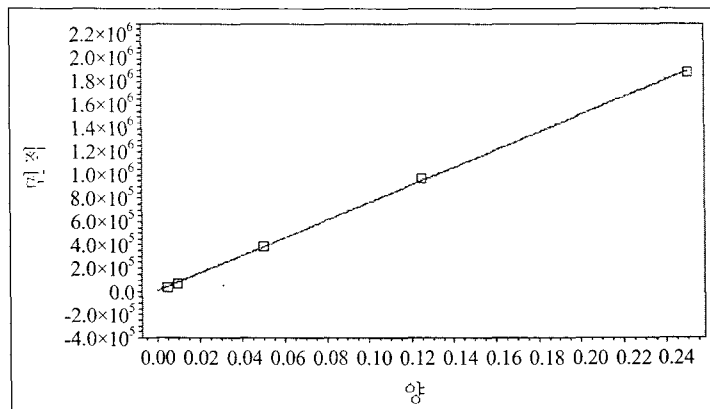


Fig. 11. The calibration curve of the standard material, baicalein of Scutellariae Radix.

11) 黃芩의 지표물질인 baicalein의 calibration curve
위의 결과로부터, 黃芩의 지표물질인 baicalein의

직선의 회귀방정식은 $Y=75616370.0X+60544.5$ 를 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99960를 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

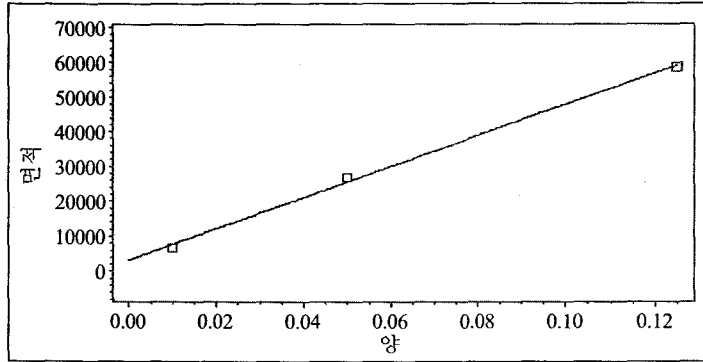


Fig. 12. The calibration curve of the standard material, glycyrrhizic acid of Glycyrrizae Radix.

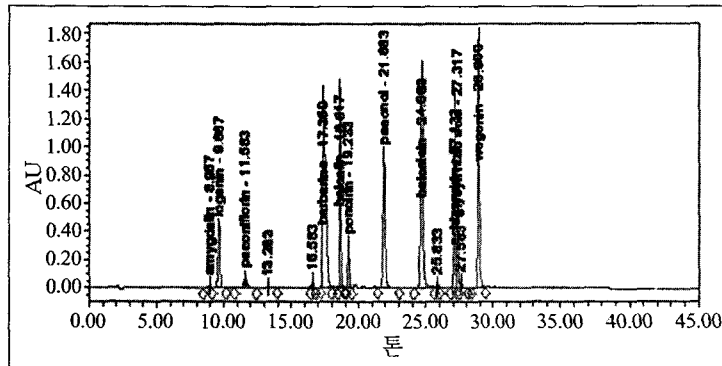


Fig. 13. The HPLC-UV chromatogram of some standard materials of oriental medicines consisting of Gamichung sangboha-tang(1.0mg/mL) at UV 254nm.

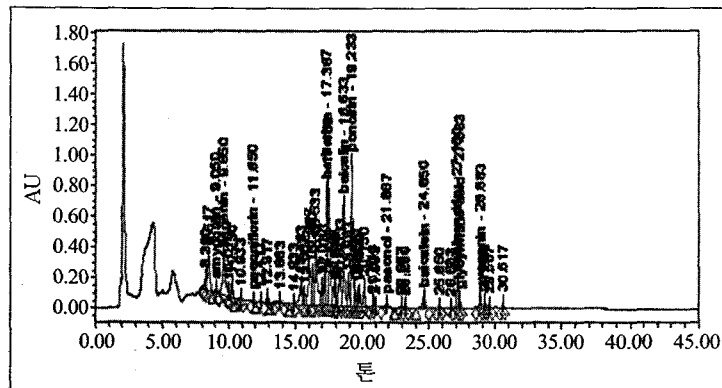


Fig. 14. The HPLC-UV chromatogram of Gamichungsangboha-tang hot water extract (0.1g/mL) at UV 254nm.

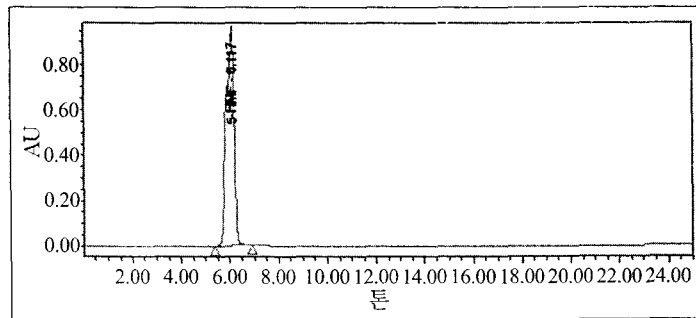


Fig. 15. The HPLC-UV chromatogram of 5-HMF, standard material of Rehmanniae Radix Preparata consisting of Gamichungsangboha-tang(0.25mg/mL) at UV 254nm.

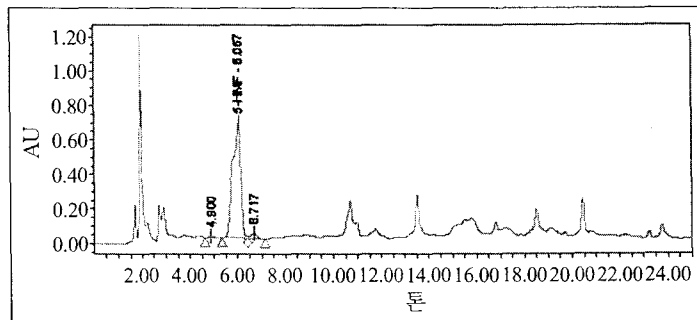


Fig. 16. The HPLC-UV chromatogram of Rehmanniae Radix Preparata consisting of Gamichungsangboha-tang hot water extract (0.1g/mL) at UV 254nm.

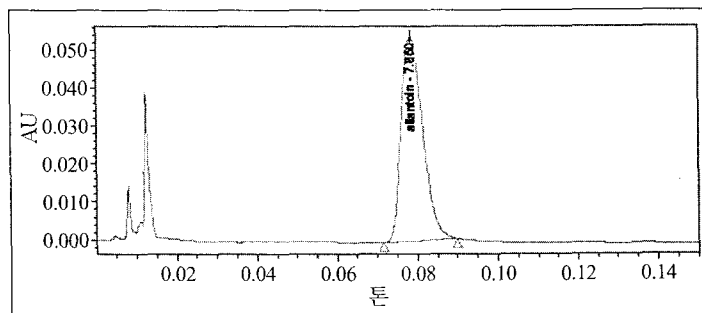


Fig. 17. The HPLC-UV chromatogram of allantoin, standard material of Discoreae Rhizoma consisting of Gamichungsangboha-tang(0.1g/mL) at UV 210nm.

12)甘草의 지표물질인 glycyrrhizic acid의 calibration curve

위의 결과로부터,甘草의 지표물질인 glycyrrhizic acid의 직선의 회귀방정식은 $Y=4462940.0X+32386.8$ 을 나타냈고, 이때의 R^2 값은 0.99767를 나타내어서 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다.

2. 加味清上補下湯의 각 지표물질에 대한 HPLC 정량분석.

- 1) 다성분 동시분석이 가능한 山茱萸, 牡丹皮, 五味子, 枳實, 黃連, 黃芩, 甘草 등의 지표물질인 loganin, paeoniflorin, paeonol, schizandrin, poncirin, berberine, amygdalin, baicalein, baicalin,

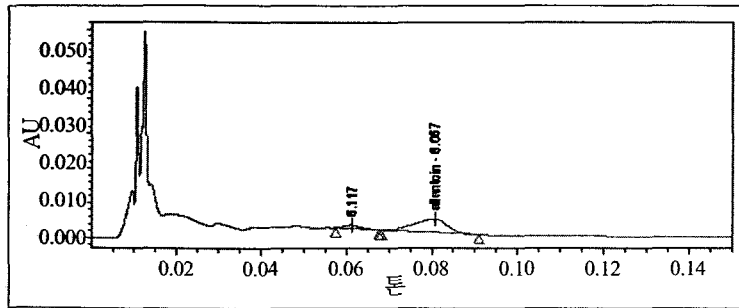


Fig. 18. The HPLC-UV chromatogram of Discoreae Rhizoma consisting of Gamichungsangboha-tang hot water extract (0.1g/mL) at UV 210nm.

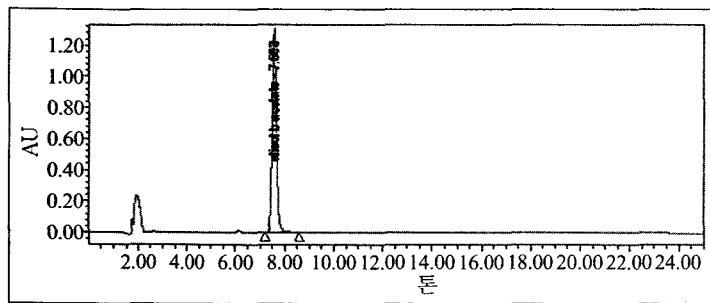


Fig. 19. The HPLC-UV chromatogram of alisol B acetate, standard material of Alismatis Rhizoma consisting of Gamichungsangboha-tang(0.25g/mL) at UV 203nm.

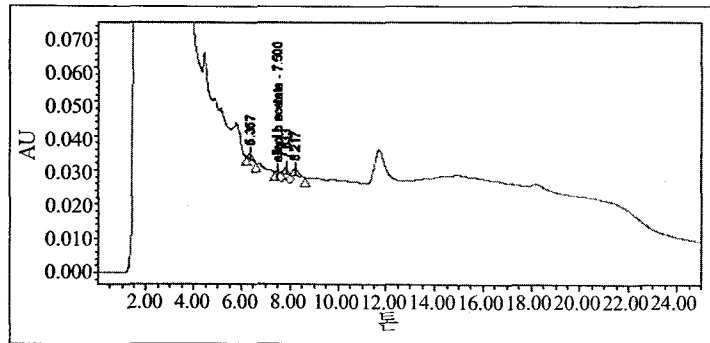


Fig. 20. The HPLC-UV chromatogram of Alismatis Rhizoma consisting of Gamichungsangboha-tang hot water extract (0.1g/mL) at UV 203nm.

wogonin, glycyrrhizic acid의 표준물질(Fig.13) 및 시료(Fig.14)에 대한 HPLC chromatogram.
 2) 다성분 동시분석이 불가능한 한약재인 熟地黃, 山藥, 澤瀉, 半夏의 지표물질인 5-HMF, allantoin, alisol B acetate, homogentisic acid의 개별 분석시 표준물질(Fig. 15, Fig. 17, Fig. 19, Fig.

21) 및 시료(Fig. 16, Fig. 18, Fig. 20, Fig. 22)의 HPLC chromatogram.
 (1) 熟地黃 (Fig. 15, 16.)
 (2) 山藥 (Fig. 17, 18)

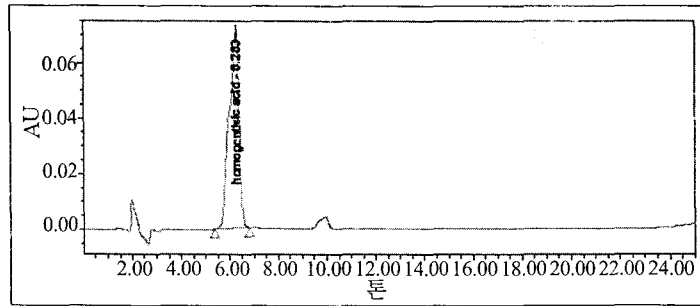


Fig. 21. The HPLC-UV chromatogram of homogentisic acid, standard material of Pinelliae Rhizoma consisting of Gamichungsangboha-tang(1.0g/mL) at UV 254nm.

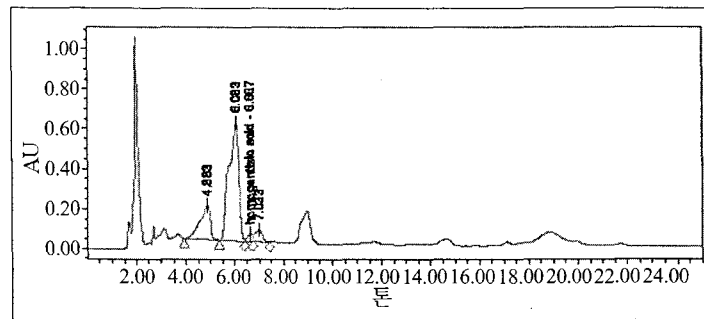


Fig. 22. The HPLC-UV chromatogram of Pinelliae Rhizoma consisting of Gamichungsangboha-tang hot water extract (0.1g/mL) at UV 254nm.

Table 2. The Results of Quantitative Analysis of Standard Materials of Each Extracts of Gamichungsangboha-tang

Oriental medicines	Standard materials	Hot water ex.	Alcoholic ex.
熟地黄	5-HMF	1.84±0.01(0.18±0.001%)	1.81±0.06(0.18±0.006%)
山藥	allantoin	5.00±0.14(0.50±0.014%)	5.08±0.91(0.51±0.09%)
山茱萸	loganin	3.37±0.26(0.34±0.03%)	2.78±0.04(0.28±0.00%)
澤瀉	alisol B acetate	0.006±0.003(0.001±0.000%)	0.015±0.001(0.002±0.000%)
牡丹皮	paeonol	0.04±0.00(0.004±0.000%)	0.05±0.00(0.005±0.000%)
	paeoniflorin	1.02±0.06(0.01±0.00%)	0.94±0.09(0.09±0.01%)
五味子	schizandrin	0.25±0.01(0.03±0.00%)	0.22±0.00(0.02±0.00%)
枳實	poncirin	9.53±0.02(0.95±0.00%)	8.77±0.12(0.88±0.01%)
黃連	berberine	1.17±0.30(0.12±0.03%)	1.17±0.36(0.12±0.04%)
半夏	homogentisic acid	3.11±0.07(0.31±0.0007%)	3.09±0.23(0.31±0.023%)
杏仁	amygdalin	24.68±2.54(2.47±0.03%)	23.30±1.40(2.33±0.14%)
	baicalin	1.42±0.02(0.14±0.00%)	1.30±0.03(0.13±0.00%)
	baicalcin	0.12±0.00(0.01±0.00%)	0.15±0.00(0.01±0.00%)
黃芩	wogonin	0.09±0.00(0.01±0.00%)	0.09±0.00(0.01±0.00%)
	glycyrrhizic acid	1.37±0.01(0.14±0.00%)	1.17±0.00(0.12±0.00%)

The amount(g) of the standard material = [(the quantitative amount(mg) of standard material × the purity of standard material) × AT/AS × 1/(the dilution concentration rate of test sample × the amount of test sample)]/n (n=3). Where AT is the peak-area of test sample containing standard material, and AS is the peak-area of standard material.

(3) 澤瀉

(Fig. 19, 20)

(4) 半夏

(Fig. 21, 22)

3) 加味淸上補下湯의 각 추출물에 대한 지표물질의 함량비교 결과(Table 2).

HPLC를 통해 얻은 표준물질 및 시료의 chromatogram들(Fig. 13-22)에 의거하여 열수추출물 및 에탄올추출물에 함유된 각 약물의 지표물질의 함량을 계산하여 수치화하였다.

3. 加味淸上補下湯의 chromatographic pattern 분석

다음은 pattern 비교분석을 위해 작성된 加味淸上補下湯의 2D HPLC-PDAD chromatogram(Fig. 23, 24) 및 3D HPLC-PDAD chromatogram(Fig. 25, 26), 그리고 2D HPLC-PDAD chromatogram(Fig. 23, 24)을

토대로 수치화하여 분석된 열수추출물 및 알코올추출물의 지표성분 패턴비교(Table 3)이다.

3D HPLC-PDAD chromatogram(Fig. 25, 26)에서는 알코올추출물(Fig. 26)이 열수추출물(Fig. 25)보다 저파장(UV 190 ~220nm 부근)에서 매우 큰 피크들이 나타났다.

물질의 함량을 가미한 가중평균(Mw)의 결과를 보면, 열수추출물보다 알코올추출물이 0.908±0.016으로 함량이 다소 낮게 나왔다(Table 3).

유사도와 matching ratio는 각각 98.4±0.6%와 100.00±0.00%를 나타내 두 추출물 사이의 차이는 별로 없었다(Table 3).

IV. 考察

한약재 단미제에 대한 성분분석은 한국, 북한, 중국,

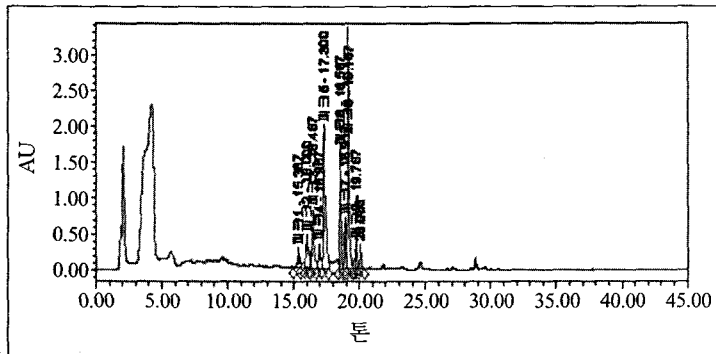


Fig. 23. The 2D HPLC-PDAD chromatogram of Gamichungsangboha-tang hot water extract (0.1g/mL) at UV 280nm.

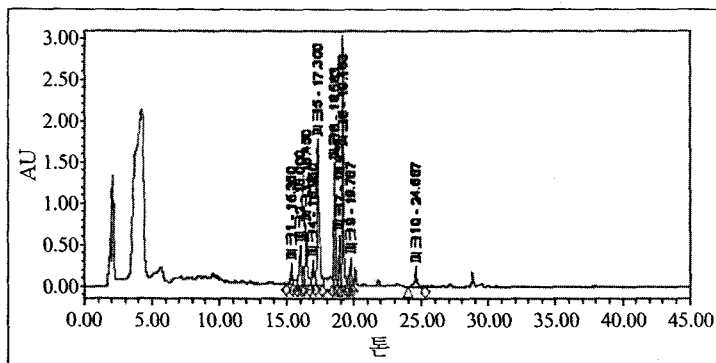


Fig. 24. The 2D HPLC-PDAD chromatogram of Gamichungsangboha-tang alcoholic extract (0.1g/mL) at UV 280nm.

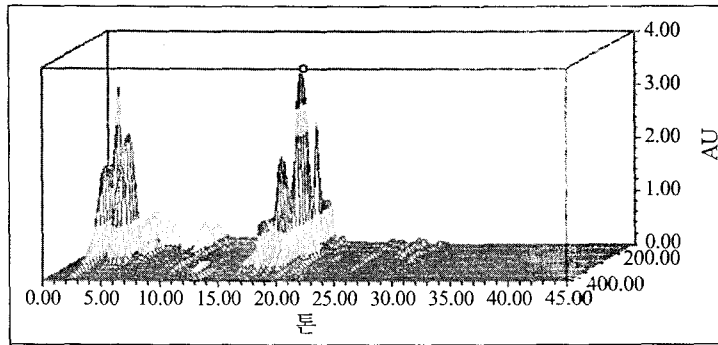


Fig. 25. The 3D HPLC-PDAD chromatogram of Gamichungsangboha-tang hot water extract (0.1g/mL) at UV 280nm.

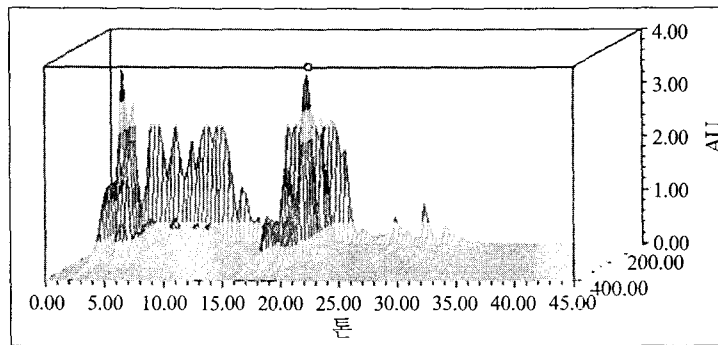


Fig. 26. The 3D HPLC-PDAD chromatogram of Gamichungsangboha-tang alcoholic extract (0.1g/mL) at UV 280nm.

Table 3. The Results of the Chromatographic Pattern Recognition Analysis of Hot Water Extract and Alcoholic Extract of Gamichungsangboha-Tang

Decoction	Simple Mean (Ms) ^a	Weighted Mean (Mw) ^b	Similarity (%) ^c	Matching ratio (%) ^d
Hot water ex	1.000±0.000	1.000±0.000	100.00±0.00	100.00±0.00
Alcoholic ex.	0.901±0.015	0.908±0.016	98.40±0.60	100.00±0.00

일본 등에서 상세하게 이루어진 바 있다²¹⁻⁵. 복합처방에 대한 분석은 우리나라의 경우 국가적인 차원에서 이루어지지 못하고 있으며 각 처방을 제조하는 회사의 기준에 따라 이루어지고 있는 상황이다. 금번 연구는 복합처방인 加味清上補下湯에 대하여 본격적인 성분함량에 대한 기준을 정하기에 앞서 두 가지 추출방법의 차이에 따른 성분함량 및 패턴의 차이를 관찰, 보다 바람직한 추출방법을 모색하기 위하여 이루어졌다.

단미제에 대한 추출방법에 따른 비교분석은 국내 외에 여러건 이루어져왔다. 박 등²⁶은 柴胡에서 sai-

kosaponin a와 d 추출 효율이 50% 알코올-냉침에서 제일 양호한 것으로 보고하였으며, 김 등²⁷은 肉桂를 70% 에탄올로 2시간 환류추출하는 것이 cinnamaldehyde가 가장 잘 추출되며 또한 가장 우수한 혈관 확장효과를 나타낸다는 사실을 실험을 통해 보고하였다. Li 등²⁸은 노루궁뎅이버섯에서 sterol 성분이 물 추출보다 에탄올 추출시 더 많이 추출된다고 보고하였으며, Bergeron 등²⁹은 골무꽃(Skullcap)의 경우 열수추출과 70% 에탄올 추출 중 flavonoid 성분이 어느 한쪽으로 뚜렷하게 많이 추출되지는 않았다고 보고하였고, Volpert 등은 프로폴리스를 물추출했을 경

우 에탄올추출보다 항산화능이 더 뛰어나다고 보고했으며, Gong 등은 黃蓮에서 열수추출이 50% 에탄올추출보다 주요한 알칼로이드 성분이 더 많이 추출되었다고 보고했으며, Zhang 등은 板藍根이 알코올추출물에서 indigotin과 indirubin 이 더 많이 추출되었다고 보고하였다. 이처럼 단일 식물에서 물추출방법과 알코올추출방법에 의해 나타난 성분분석의 결과는 각 약재마다 차이가 있게 나타났다.

복합처방의 경우 박 등은 加味瓜蒌薤白白酒湯에 대하여 각 구성약재별로 물추출과 에탄올추출을 시행해 모든 약재에서 에탄올추출이 더 우수한 성분추출결과를 보였다고 보고하였다. 처방을 구성하고 있는 개별 약재에 대한 주요 지표물질을 물추출 및 알코올추출 등 추출방법에 따른 효능을 평가하는 것도 의미가 있다고 할 수 있겠으나 한의학적 특성상 질병 치료에 복합처방을 이용하고 있어 방제를 구성하는 약재간의 배합에 의해 일정한 효과를 나타낼 수 있기 때문에 복합처방 전체를 하나의 단위로 하여 추출, 비교하는 방법도 바람직할 것으로 생각된다. 실제로 김 등은 陳皮가 들어간 수종의 방제를 구성하여 陳皮 유효성분의 추출효율을 살펴보았는데, 각 방제마다 각기 다른 추출효율을 나타내었다.

본 연구에서는 加味淸上補下湯을 하나의 단위로 설정, 구성약재를 혼합한 상태에서 물추출 및 에탄올추출을 시행하여 추출된 성분을 비교분석 하였다.

加味淸上補下湯은 補陰之劑의 代表方인 六味地黃湯에 淸肺火癰痿腎熱痰咳喘시키는 天門冬, 淸心肺火止渴시키는 麥門冬을 加하고, 開提除肺中風寒載藥上行시키는 桔梗, 散肺氣分寒下氣除喘咳痰시키는 杏仁을 加하고, 斂肺歸腎久嗽止渴하는 五味子를 加하고, 淸上中焦火熱濕熱시키는 黃芩, 大瀉心火實熱하는 黃連을 加하고, 淸心肺熱痰시키는 貝母를 加하고, 除胸膈氣墜下氣行氣利五臟하는 枳實을 加하고, 主散濕脾痰시키는 半夏, 入肺除痰淸火降氣하는 瓜蒌仁을 加하고, 緩中氣不足시키는 甘草를 加하였다. 이러한 복합처방인 加味淸上補下湯은 그 성분구성이 매우 복잡할 수밖에 없으며 이를 모두 알아내기도 불가능하다. 따라서 몇가지 유효성분을 지정하여 이의 함량을 판

찰하는 방법을 통해 약의 품질을 평가하는 방법을 사용해야하는 실정이다.

금번 연구에서 분석된 지표물질은 熟地黃의 5-HMF, 山藥의 allantoin, 山茱萸의 loganin, 牡丹皮의 paeoniflorin 및 paenol, 澤瀉의 alisol B acetate, 五味子の schizandrin, 枳實的 poncirin, 黃連의 berberine, 黃芩의 baicalin 및 baicalein, wogonin, 杏仁의 amygdalin, 甘草의 glycyrrhizic acid이었다. 함량분석의 과정에서 이상의 지표물질 중 熟地黃의 5-HMF, 山藥의 allantoin, 澤瀉의 alisol B acetate, 半夏의 homogentisic acid 등은 동시다성분 분석이 불가능 하여 개별적으로 실험하였고 나머지 성분들은 동시다성분 분석을 시행하였다.

熟地黃의 5-HMF는 地黃의 숙성과정에서 생성되는 물질로 1蒸에서 9蒸까지 점점 증가되는 것으로 알려져 있다. 또한 5-HMF는 生地黃 및 乾地黃에서는 거의 존재하지 않는 것으로 알려져 있다.

山藥의 allantoin은 choline, arginine과 함께 山藥의 주요 생리활성물질로 약리학적인 실험상에서 항암 및 진통작용을 나타내는 성분이다.

山茱萸의 loganin은 morroniside, gallic acid와 함께 山茱萸의 주요한 성분으로 약리작용은 많이 알려져 있지만 간보호 및 항콜레스테롤 작용이 보고되어 있다.

牡丹皮의 paeoniflorin은 혈액응고저해, apoptosis 유도작용, 항고지혈작용 등이 보고되고 있으며 역시 牡丹皮의 paeonol은 동맥경화 억제효과, 혈소판 응집 억제효과, antiseptic activity, 진통효과, 비만세포로부터 히스타민 유리 억제효과 및 TNF-a 생성저해효과 등이 보고되고 있다.

澤瀉의 alisol B acetate는 다른 성분들과 함께 실험적으로 유도된 알레르기 모델에서 항알러지효과를 나타냈고 당질코르티코이드와 비슷한 구조로써 실험적으로 혈관평활근 세포 및 백혈병세포의 apoptosis를 촉진시킨다고 보고되어 있다.

五味子の schizandrin은 약리학적인 실험에서 항노화, 호흡흥분작용, 혈관확장작용, 중추신경 흥분 및 억제작용, 간보호작용 등 여러 효과가 보고되어 있다.

枳實의 poncirin은 hesperidin, rhoifolin, naringin, neohesperidin 등과 함께 枳實의 flavonoid 성분인데, 인간의 장내세균에 의해 poncirin이 대사된 물질인 ponciretin이 *helicobacter pylori*를 억제한다는 보고가 있다.

黃蓮의 berberine은 항균, 항바이러스, 해독, 해열, 소염면역증강, 항부정맥, 강심, 혈압강하, 혈소판응집 억제, 혈당강하 등의 여러 작용을 가지고 있다.

杏仁의 amygdalin은 진해, 면역증강, 혈당강하, 사하, 항암, pepsin 활성억제, 살충, 항균작용 등이 알려져 있으며 amygdalin의 복용방법에 따른 여러 독성작용 및 이를 없애는 가공방법 등이 알려져 있다.

半夏의 성분으로 알려진 homogentisic acid는半夏 특유의 아린맛을 내는 성분으로 약리활성에 대한 특별한 보고는 알려진 바 없다.

黃芩은 많은 flavonoid들을 함유하는데 여기에 baicalin, baicalein, wogonin 등이 포함된다. baicalin은 黃芩에서 가장 풍부한 성분으로 항알레르기, 항염증, 항HIV, 항암, 항산화, 활성산소억제, SARS 관련 coronavirus 억제 등의 작용을 가지고 있는 것으로 보고되었으며, baicalein은 항HIV, 항암, 항산화, 활성산소억제 작용을, wogonin은 respiratory syncytial virus 억제, B형간염 바이러스 억제, 항암, 항독성, 활성산소억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

甘草의 glycyrrhizic acid, 즉 glycyrrhizin은 일종의 terpenoidal saponin인데 부신피질호르몬 유사작용 및 소염, 항알레르기, 항바이러스, 해독, 진해, 거담 작용이 있다고 알려져 있으며, 최근에는 in vitro 상에서 SARS 관련 바이러스 전사 억제 및 AIDS 바이러스 복제 억제 효과 연구가 이루어지고 있다.

그러나 상기에서 언급한 처방을 구성하고 있는 각 약재들의 지표물질들과 加味清上補下湯 복합처방을 열수 추출하였을 경우와 알코올 추출하였을 경우 각 구성 약재에서 나타난 지표물질에 어떤 차이가 있는지를 비교 관찰하였다.

加味清上補下湯의 열수 추출물과 알코올 추출물에 대한 각 구성 한약재의 지표물질의 함량 분석결과, 山藥의 allantoin, 澤瀉의 alisol B acetate, 牡丹皮의

paconol, 黃芩의 baicalein이 에탄올 추출물에서 더 높게 나왔고 나머지 11가지 성분은 열수 추출물이 더 높게 나오거나 거의 동등하게 추출되었다(Table 2). 같은 성분간에 추출방법에 따른 차이는 크게 나지 않았으나 澤瀉의 alisol B acetate는 알코올 추출물이 물추출물보다 2배이상 더 높게 나타났다(Table 2).

패턴분석에서 물질의 함량을 가미한 가중평균(Mw)의 결과를 보면, 열수추출물보다 알콜추출물이 0.908 ± 0.016으로 함량이 다소 낮게 나왔다.(Table 3). 앞서 성분함량에 대한 분석결과와 비교해 볼 때 전반적으로 加味清上補下湯은 열수추출에서 지표물질들이 다량 추출된다고 볼 수 있다.

이에 반해 유사도와 matching ratio는 각각 98.4 ± 0.6%와 100.00 ± 0.00%를 나타내 두 추출물 사이의 차이는 별로 없었다(Table 3).

이러한 분석결과를 토대로 Fig. 26을 볼 때 3D PDA plot에서 알코올 추출물이 열수 추출물보다 저파장(UV 190 ~ 220nm 부근)에서 매우 큰 피크들이 있는 것은 알코올 추출물에만 들어 있는 특정성분일 가능성이 있다.

앞서 언급한 함량분석(Table 2) 결과 및 가중평균치 결과에서 비록 열수추출물이 알코올 추출물보다 더 많은 유효성분을 나타내었으나, matching ratio 및 유사도, 그리고 3D PDA plot(Fig. 26.)으로 보아 두가지 추출물은 서로 다른 화학조성을 갖는다는 것을 볼 수 있다. 따라서 加味清上補下湯은 열수추출 방법이 알코올 추출방법에 비해 더 우수하다고 단정지을 수 없을 것이다. 향후 알코올 추출물의 3D PDA plot (Fig. 26.)에서의 UV 190~220nm 부근에 나타난 peak를 더 밝혀내는 연구 및 열수추출과 알코올 추출방법에 의한 in vitro, in vivo 비교연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

加味清上補下湯의 열수 추출물과 알코올 추출물에 대한 각 구성 한약재의 지표물질의 분석 결과와 chromatographic pattern 분석 결과를 통해 다음과 같

은 결론을 얻었다.

1. 加味淸上補下湯의 열수 추출물과 알코올 추출물에 대한 각 구성 한약재의 지표물질을 분석 한 결과, baicalein, allantoin, alisol B acetate, paeonol의 일부의 성분을 제외한 대부분의 경우에서 열수 추출물의 함량이 알코올 추출물보다 다소 높게 나왔다.
2. 페턴분석 상 물질의 함량을 가미한 가중평균(Mw)의 결과에서, 열수추출물보다 알코올추출물이 0.908 ±0.016으로 함량이 다소 낮게 나왔다.
3. 유사도와 matching ratio는 각각 98.4±0.6%와 100.00±0.00%를 나타내었다.
4. 3D PDA plot에서 알코올 추출물이 저파장(UV 190~220nm 부근)에서 열수추출물에서 나타나지 않는 매우 큰 피크들이 나타났다.
5. 알코올 추출물과 열수 추출물은 서로 다른 화학 조성을 갖고 있음을 보여주었다.

參考文獻

1. 정승기, 황우석, 주창엽, 이재성, 조일현, 정희재. 淸上補下湯의 기관지천식환자에 대한 임상적 효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):151-60.
2. 龔廷賢. 壽世保元. 北京: 人民衛生出版社. 1993: 166-70.
3. 黃度淵, 醫宗損益(下). 서울: 여강출판사; 1994, p. 134.
4. 黃度淵 原著, 辛民教, 永林社編輯部 共編著. 新增方藥合編. 서울: 永林社. 2002:150
5. 정승기. 加味淸上補下湯이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한한의학회지. 1991;12(1): 118-38.
6. 권혁성, 정희재, 이형구, 정승기. 淸上補下湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1999;22(1):203-15.
7. 김영우, 정희재, 이형구, 정승기. 정천탕과 淸上補下湯이 asthma model 내의 cytokine에 미치는

영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(3):367-77.

8. 이동생, 정희재, 정승기, 이형구. 淸上補下湯의 抗酸化 效果, Interleukin-4 抑制 및 cDNA chip을 이용한 遺傳子發顯에 미치는 影響 대한한의학회지. 2003;24(2):148-58.
9. Roh GS, Seo SW, Yeo S, Lee JM, Choi JW, Kim E, Shin Y, Cho C, Bae H, Jung SK, Kwack K. Efficacy of a traditional Korean medicine, Chung-Sang-Bo-Ha-Tang, in a murine model of chronic asthma. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(2):427-36.
10. 황우석, 최준용, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 淸上補下湯치료중단이 기관지 천식환자에게 미치는 영향, 대한한의학회지. 2003;24(3):184-91.
11. 최준용, 황우석, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 기관지천식환자의 허실변증에 따른 淸上補下湯의 임상효과, 대한한방내과학회 추계학술대회 논문집. 2003:91-9.
12. 정승기, 정희재, 이재성, 이건영, 정승연, 이형구, 최준용. 加味淸上補下湯액기스제의 기관지천식환자의 증증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지. 2004;25(2):110-8.
13. 최준용, 이재성, 정승연, 이건영, 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 虛實辨證과 加味淸上補下湯의 임상효과. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):379-87.
14. 이건영, 정승연, 최준용, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 加味淸上補下湯 액기스제 치료중단 후 천식환자의 임상증상 변화 관찰. 대한한방내과학회 추계학술대회논문집. 2004;56-64.
15. 정승연, 이재성, 최준용, 이건영, 정희재, 이형구, 배현수, 정승기. 천식 완해기 유지치료로서 AF-365의 임상적 효과. 대한한방내과학회지. 2005; 26(1):1-11.
16. Park MK, Cho JH, Kim NY, Park JH. Chromatographic pattern recognition for the analysis of complex mixtures, *Anal. Chim. Acta*, 1993;284(1):73-8.
17. Lea RE, Bramston-Cook R, Tschlda J. Pattern

- recognition for identification and quantitation of complex mixtures in chromatography. *Anal. Chem.* 1983;55(4):626-9.
18. 박만기, 약품 분석의 진보-8. pattern 인식법에 의한 생약의 분석. 서울: 대한약학회; 1998, p. 152-66.
 19. 張文生 叶正良 岳洪水 宋曉濤. 丹參藥材指紋圖譜研究. 中藥材. 2001;24(7):478-80.
 20. 표준 한약 개발연구(한의학적 이론에 근거한 한약의 품질관리 기준 선정에 관한 연구)-대조한약의 품목별 성분패턴연구. 서울: 보건복지부; 2002, p.221-432.
 21. 식품의약품안전청. 대한약전 제8개정. 서울: 식품의약품안전청고시 제 2002-15호. 2002.
 22. 식품의약품안전청. 대한약전외한약(생약)규격집. 서울: 식품의약품안전청고시 제 2004-17. 2004.
 23. 조선민주주의인민공화국 보건부 약전위원회. 조선민주주의인민공화국 약전(제5판). 평양: 의과학출판사. 1996.
 24. 일본약국방해설서 편집위원회. 일본약국방해설서(제14개정). 동경: 광천서림. 2001.
 25. 국가약전위원회. 중화인민공화국약전(2000년판 1부). 북경: 화학공업출판사. 2000.
 26. 박주홍, 이상인. 시호의 추출방법에 따른 성분비교와 제형변화에 관한 연구. 경희대 논문집. 1997; 20(1):116-26
 27. 김윤경, 이상인, 안규석, 김호철. 육계의 전탕방법이 성분유출과 약효에 미치는 영향-제형개변에 관한 연구. 경희대논문집. 2000;23(1):185-207.
 28. Li JL, Lu L, Dai CC, Chen K, Qiu JY. A comparative study on sterols of ethanol extract and water extract from *Herichium erinaceus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2001;26(12):831-4.
 29. Bergeron C, Gafner S, Clausen E, Carrier DJ. Comparison of the chemical composition of extracts from *Scutellaria lateriflora* using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction versus standard hot water or 70% ethanol extraction. *J Agric Food Chem.* 2005;53(8):3076-80.
 30. Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Z Naturforsch [C].* 1993;48(11-12):851-7.