

## 폴리페놀 및 DPPH 라디칼 소거활성 관점에서의 복합갈근탕 및 단미혼합갈근탕의 동등성

김동선<sup>†</sup> · 엄영란<sup>†</sup> · 양민철 · 윤나영 · 정상원 · 이재훈 · 마진열<sup>#</sup>

한국한의학연구원 신한방제제연구센터

(Received October 13, 2010; Revised December 17, 2010; Accepted December 20, 2010)

### Equivalence of Mixed and Individual Preparation of Galgeun-tang in terms of Polyphenol Contents and DPPH Radical Scavenging Activity

Dong-Seon Kim<sup>†</sup>, Young Ran Um<sup>†</sup>, Min Chul Yang, Na Young Yun,  
Sang Won Jung, Jae Hoon Lee and Jin Yeul Ma<sup>#</sup>

Herbal Medicine Improvement Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** — Traditional medicines usually use combinational formula that are prepared by mixing different varieties of medicinal herbs and boiling them in water to yield a decoction. In recent years a modified method has been proposed and practiced wherein the individual herbs are boiled with water separately and later these extracts are mixed together for use. We attempted to evaluate their equivalence in terms of its polyphenol contents and DPPH radical scavenging activity. The polyphenol contents as well as the DPPH radical scavenging activities were very similar to each other.

**Keywords** □ galgeun-tang, decoction, preparation, oriental medicine, herbal medicine

전통적으로 한약은 처방시료를 모두 혼합한 후 함께 끓이는 방법으로 제조되어왔다. 현대에 이르러 비위생적인 환경과 제조하는 사람에 따라 끓이는 시간과 사용되는 물의 양이 일정치 않으므로 효능에 차이가 있을 수 있다는 점이 제시되면서 GMP 공장에서 원료 및 제품의 과학적 품질관리에 의하여 제조하여 한의원에 공급하거나 제품으로 유통하고 있다. 이러한 제조방법으로는 전통적인 방법에 따라 한약재를 모두 섞어 함께 끓이는 복합전탕방법과 개별한약을 끓여 제조된 탕액, 탕액의 농축물 또는 건조분말을 제조하여 한의원에서 처방에 따라 혼합하여 사용할 수 있도록 하는 단미전탕혼합방법이 사용되고 있다. 후자의 방법은 개별 한약에 대한 오염원을 분별하기 쉽고, 또한 개별 한약재의 대표 기능성분에 의한 표준화를 통하여 전체 복합물의 표준화가 용이하다는 장점을 갖는다. 하지만 복합적으로 끓이는 경우와 엄밀히 다른 환경일 수 있으므로 효능 및 안전성에 있어서 동등성이 있는지에 대한 문제점이 제기되고 있다. 저자 등은 가

장 빈번히 처방되어 사용되고 있는 대표 한약처방중의 하나인 갈근탕(葛根湯)에 대하여 이들 2가지 방법에 의하여 제조된 탕액들에 대하여 항산화활성을 통하여 동등성을 평가해보고자 하였다. 갈근탕은 갈근, 건강, 마황, 대조, 계피, 작약, 감초로 구성된 약제로 약 2천여년 전부터 사용되어져 왔으며<sup>1)</sup> 현재에도 그 처방이 거의 변함없이 매우 상용화되고 있는 탕제 중 하나이다. 상한론(傷寒論)<sup>2)</sup>에서는 갈근탕을 “태양병으로 항배가 경직되면서 땀이 없고 오풍하는 것은 갈근탕으로 주로 치료할 수 있다”라고 서술하였으며 갈근탕의 효능에 대한 연구로는 감기증상의 완화, 면역력 향상, 해열 등의 효과가 보고된 바 있다.<sup>3)</sup> 갈근탕의 주성분인 갈근(*Puerariae Radix*) 또한 예로부터 식용으로 다양하게 응용되어져 왔으며 두통, 구갈, 복통, 감기, 발열 등에 활용되며 설사를 멈추게 하는데 탁월한 효과가 있다고 알려져 있으며<sup>4)</sup> 갈근의 효능에 대한 연구로는 항산화효과,<sup>5)</sup> 알코올성 간 손상 보호효과<sup>6)</sup> 등이 있다.

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-868-9466 (팩스) 042-868-9573  
(E-mail) jyma@kiom.re.kr

<sup>†</sup>Co-first author: 김동선 · 엄영란은 공동 제1저자로 본 논문에 기여한 부분이 동등함.

### 실험방법

#### 기기 및 시약

항산화 활성 측정에 사용된 기기는 HITACHI사의 Spectropho-

Table I – The herbal compositions of Galgeun-tangs

Herb	Weight (g)	Maker	Country of origin
Puerariae Radix	8	Yeongcheon hyundae	Korea
Ephedrae Herba	4	Pungsan Parmaceutical Co.	China
Zingiberis Rhizoma	1	Yeongcheon hyundae	Korea
Ziziphi Fructus	4	Yeongcheon hyundae	Korea
Cinnamomi Cortex	3	Pungsan Parmaceutical Co.	Vietnam
Paeniae Radix	3	Yeongcheon hyundae	Korea
Glycyrrhizae Radix	2	Taekyung Parmaceutical Co.	China

tometer(U-2900, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)는 Wako사(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 대조군으로 사용된 L-(+)-ascorbic acid는 대정화금주식회사(Siheung, Korea)에서 구입하였다. 그 외의 다른 모든 시약은 Junsei사(Tokyo, Japan)의 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

#### 복합갈근탕 및 단미혼합갈근탕의 조제

전통적인 방법에 의한 복합갈근탕은 금궤요략(金匱略) 및 상한론(傷寒論)<sup>7)</sup>을 기본으로 하여 갈근, 건강, 마황, 대조, 계피, 작약, 감초로 구성(Table I)된 약재 1첩에 생수((주)무학, 화이트, Masan, Korea) 1l를 넣어 1시간 침적시킨 후 대용약탕기((주)대웅, DWP 5000w, Seoul, Korea)를 이용하여 3~4시간 열수추출한 후 106 µm mesh의 test sieve(Retsch GmbH, Haan, Germany)로 여과하여 최종 volume이 100 ml가 되게 하였다.

단미혼합갈근탕은 복합갈근탕과 동일한 구성약재들 각각 25 g씩을 정밀히 달아, 생수 1l를 넣고 갈근탕과 같은 방법으로 탕전한 후 얻어진 각각의 탕액을 갈근탕과 동일 비율로 혼합하여 100 ml가 되게 제조하였다. 일일에 갈근탕과 단미혼합갈근탕을 1 batch씩 제조하여 4일에 걸쳐 각 4 batch를 제조하였다. 각 탕제 시료는 동결건조 한 후 분말을 정밀하게 달아 100% ethanol에 용해시켜 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

#### 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법<sup>8)</sup>을 응용하여 측정하였다. 각 탕제 추출물 시료 1 mg을 증류수 1 ml에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 ml에 2배로 희석한 Folin 시약 2 ml를 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 2 ml의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 서서히 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 방치한 다음 UV/Visible spectrophotometer(HITACHI, U-2900, Tokyo, Japan)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물의 함량은 tannic acid를 이용하여 작성된 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

#### 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical의 소거활성 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH) 라디칼의 소거활

성은 Blois의 방법<sup>9)</sup>에 따라 각 시료의 DPPH radical에 대한 환원력을 측정하였다.

DPPH 시약 2 mg을 정밀하게 칭량한 후 ethanol 15 ml에 녹인 용액 1.2 ml에 다시 ethanol 3 ml와 DMSO 0.5 ml를 혼합한다. 그리고 시료 50 µl와 제조한 DPPH 용액을 혼합한 후 10분간 상온에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94~0.97이 되도록 조정하였다.

#### DPPH radical scavenging effect (%)

$$= \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

#### 통계학적 분석

제조방법들에 따른 갈근탕들의 수율, 총 폴리페놀함량 및 DPPH 라디칼소거활성의 통계적 동등성 검정을 위하여 4개의 시료들을 제조하여 분석에 사용하였고, t-검정을 실시하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 복합갈근탕과 단미혼합갈근탕의 수율

각각 다른 날에 4 batches의 복합갈근탕과 단미혼합탕을 제조한 후 추출수율을 비교하였다(Table II).

복합갈근탕의 경우 20.6%로 단미혼합갈근탕의 21.1% 보다 0.5%로 낮게 나타났으나 역시 유의적이 차이는 없었다.

복합갈근탕의 수율을 100%로 기준할 경우, 단미혼합갈근탕은 각각 95.9%로서 ±5% 범위로 수율에 있어서 동등하다고 할 수 있다.

Table II – The extraction yields of mixed and individual preparation of Galgeun-tangs

Decoction	Yield (%)
Mixed preparation	20.6±0.2
Individual preparation	21.1±0.4

Data are mean±SD values of quadruplicate determination. The results shown are representative of four independent experiments. Mixed preparation and individual preparation were not significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

**Table III** – Total polyphenol contents of mixed and individual preparation of Galgeun-tangs

Decoction	Total polyphenols (µg/mg)
Mixed preparation	145.3±5.2
Individual preparation	149.3±13.4

Data are mean±SD values of quadruplicate determination. The results shown are representative of four independent experiments. Mixed preparation and individual preparation were not significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

**Table IV** – Scavenging effects of mixed and individual preparation of Galgeun-tangs

Decoction	Scavenging effect (%)		
	500 µg/ml	250 µg/ml	100 µg/ml
L-(+)-ascorbic acid	96.6±0.0	95.9±0.0	92.3±0.0
Mixed preparation	25.6±1.5	18.4±1.8	15.0±1.2
Individual preparation	28.5±1.4	20.4±1.0	16.2±1.2

L-(+)-ascorbic acid was used as a positive control. Data are mean±SD values of quadruplicate determination. The results shown are representative of four independent experiments. Mixed preparation and individual preparation were not significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

**복합갈근탕과 단미혼합갈근탕의 총 폴리페놀 함량**

일반적으로 폴리페놀의 수산기들은 항산화, 항균, 항염 등 다양한 생리활성에 중요한 기능기로 작용한다.<sup>10)</sup> 따라서 총 폴리페놀 함량을 비교하여 전통적인 방법에 의한 복합갈근탕과 단미혼합갈근탕의 생리활성에 대한 동등성을 추정하고자 하였다.

각 4 batches의 갈근탕들에 대한 총 폴리페놀 함량은 복합갈근탕이 145.3 µg/mg, 단미혼합갈근탕이 149.3 µg/mg 로 거의 동일하게 나타났으며 유의적( $p < 0.05$ )인 차이 또한 없었다(Table III).

**DPPH를 이용한 복합갈근탕과 단미혼합갈근탕의 항산화 활성 측정**

각각 4 batches의 복합갈근탕들과 단미혼합갈근탕에 대하여 500, 250, 100 µg/ml 농도에서 DPPH free radical 소거활성을 평가하였다.

단미혼합탕의 라디칼 소거활성이 3가지 농도에서 각각 28.5%, 20.4%, 16.2%로 갈근탕의 25.6%, 18.4%, 15.0% 보다 조금 높게 나타났으나  $p < 0.05$  수준에서 유의적인 차이는 없었다(Table IV).

본 연구결과로부터 단미혼합갈근탕은 수율, 폴리페놀함량 및 항산화활성에 있어서 복합갈근탕과 거의 동일하였으므로 두가지 제조방법에 따른 약리효과에 있어서도 큰 차이가 없을 것으로 사료된다.

**결 론**

처방 구성약재를 한꺼번에 넣고 달이는 전통적인 방법에 의한 복합탕과 현대에 이르러 구성 한약재를 개별적으로 달인 후 합

하는 단미혼합탕이 동등한지에 대하여 알아보기 위하여, 갈근탕에 대하여 두가지 방법에 의하여 제조한 후 수율, 폴리페놀함량 및 DPPH 라디칼소거활성을 비교 하였다.

수율에 있어서는 복합갈근탕이 20.6%, 단미혼합갈근탕 21.1%로, 총 폴리페놀 함량은 복합갈근탕이 145.3 µg/mg, 단미혼합갈근탕이 149.3 µg/mg 로, 항산화 활성에 있어서는 500 µg/ml 농도에서 복합갈근탕이 25.6%, 단미혼합갈근탕의 라디칼소거활성이 28.5%로 모두 서로 거의 동일하게 나타났다.

이상의 결과로부터 개별적으로 약재를 끓인 후 혼합하여 제조하는 방법이 기존의 혼합에 의한 전통적인 방법에 의하여 제조된 한약에 비하여 폴리페놀 함량 및 라디칼소거활성에 있어서 동등함이 인정 되었으므로, 다른 생리활성 또한 유사할 가능성이 높을 것으로 사료된다. 그러나 한약은 복합성분으로 그 효능이 복합적으로 작용하므로 보다 정확한 동등성을 비교하기 위해서는 직접적으로 항균, 항염, 면역 등 추가적으로 다양한 생리활성을 평가하여 그 동등성을 판단해야 하겠다.

**감사의 말씀**

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원(K10050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

- 1) Kwon, C. H. : Effect of Gal Geun Tang upon stress resistance of rat. *Kor. J. Pharmacog.* **5**, 217 (1974).
- 2) Chai, I. S. : Sang Han Ron Yeok Jeong. Gomoonsa, Seoul p. 329 (2000).
- 3) Chang, Q, Sun, L., Zhao, R. H, Chow, M. S. and Zuo, Z. : Simultaneous determination of ten active components in traditional chinese medicinal products containing both Gegen (*Pueraria lobata*) and Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) by high-performance liquid chromatography. *Phytochem.* **19**, 368 (2008).
- 4) Lee, H. O., Kim, C. H., Lim, J. A., Lee, M. H. and Baek, S. W. : Antimicrobial effect of *Puerariae thunbergiana* extracts against oral microorganism. *Korean Soc. of Dental Hygiene Sci.* **4**, 45 (2004).
- 5) Park, C. H., Lim, S. S. and Lee, D. U. : Structure-activity relationships of components from the roots of *Pueraria thunbergiana* having aldose reductase inhibitory and antioxidative activity. *Bull. Korean Chem. Soc.* **28**, 493 (2007).
- 6) Kim, M. J., Lee, J. S., Ha, O. M., Jang, J. Y. and Cho, S. Y. : Effects of *Pueraria thunbergiana* (bentham) water extracts on hepatic alcohol metabolic enzyme system in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 92 (2002).
- 7) 안창균 : 상용한방해설집, 기화제약주식회사, 진주 p. 420

- (1999).
- 8) Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. G. and Lee, I. S. : Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 233 (2005).
- 9) Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* **181**, 1199 (1958).
- 10) Middleton, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. : The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673 (2000).