

삼출건비탕 전탕액과 시판 한약제제의 비교 연구

김은순, 서창섭, 김예지, 신현규
한국한의학연구원, 한약기초연구그룹

ABSTRACT

Comparative Study on Chemical Composition and Biological Activities of Samchulkunbi-tang Decoction and Commercial Herbal Medicine

Ohn Soon Kim, Chang-Seob Seo, Yeji Kim, Hyeun-Kyoo Shin
Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : The purpose of this study was to investigate the differences of chemical composition or biological activities between decoction and commercial herbal medicines of Samchulkunbi-tang (Shenzhujianpi-tang, SKT).

Methods : The extracts of SKT from decoction (SKT1) and two different commercial extractive granules (SKT2 and SKT3) were prepared. The index components of SKTs were analyzed with HPLC. The antioxidant activities of SKTs were studied by measuring free radical scavenging activities on ABTS and DPPH. The anti-inflammatory effects were determined by measuring NO, PGE₂ and IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Results : The contents of 7 components were 1.40-6.08 mg/g in SKT1, not detected-4.75 mg/g in SKT2, 0.03-1.46 mg/g in SKT3. The scavenging activities on ABTS and DPPH of herbal formulas were increased in dose-dependent manner (SKT1>SKT2>SKT3). SKT1 significantly inhibited PGE₂

-
- 교신저자 : 신현규
 - 대전시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원
 - Tel : 042-868-9464 Fax : 042-864-2120 E-mail : hkshin@kiom.re.kr
 - 접수 : 2012/ 09/ 28 수정 : 2012/ 11/ 30 채택 : 2012/ 12/ 12

and IL-6 production and SKT3 slightly inhibited PGE₂ production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. SKT2 showed no inhibitory effects on production of inflammatory mediators such as PGE₂ and IL-6.

Conclusions : These results demonstrate that the decoction of SKT has more strong anti-oxidant and anti-inflammatory effects than that of commercial herbal medicines consistent with the contents of index components.

Key word : Samchulkunbi-tang, index components, anti-oxidant effect, anti-inflammatory effect

1. 서 론

參朮健脾湯은 健脾養胃하고 運化飲食하는 효능으로¹⁾, 脾胃를 補하는 것과 食傷을 消導하는 作用을 兼하면서 腹痛을 치료하는 효능도 포함된 方劑이다²⁾. 따라서 본 處方은 慢性胃炎(chronic gastritis), 胃潰瘍(gastric ulcers), 胃下垂症(gastroptosis)등에 수반되는 식욕부진이나 소화불량을 치료하는 데 임상적으로 이용된다. 현재까지의 삼출건비탕의 효능에 대한 실험적 연구결과를 살펴보면, 실험동물에서의 위장관 보호효과^{3,4)} 및 면역기능 강화효과⁵⁾가 보고되어 있으며, 대식세포를 이용한 염증세포모델에서의 항염증효과⁶⁾가 보고되어 있다.

한약처방은 고문헌과 오랜 세월 동안 검증된 안전성과 약효를 바탕으로 현재까지 이용되고 있다. 현대 사회의 다양하고 복잡한 만성 질환의 예방과 치료에 서양 의학적 접근이 한계를 드러내면서 한의학 및 한방관련산업에 대한 관심과 소비도 증가하고 있는 추세이다⁷⁾. 한약처방의 경우, 현대화와 대중화를 위해 제형의 변화, 포장법의 향상, 관련제품의 개발 등 여러 가지 발전방안이 제기되고 있다⁸⁾. 한약제제는 한약을 한방원리에 따라 배합하여 제조한 의약품의 의미하는 것으로(약사법 제2조 5항), 보다 간편하게 한약처방을 이용할 수

있도록 추출액을 제조하여 여러 제약회사에 의해 일반 의약품으로 공급되고 있다⁹⁾. 한약제제는 제조 방법의 차이에 따라 성분 함량 및 효능의 차이를 나타내는 것으로 보고되어 있지만^{10,11)}. 동의보감 등 기성 한의서에 수재된 한약처방에 해당하는 한약제제의 경우 그 출전을 기재하여 품목허가를 신청할 수 있으며, 이는 안전성, 유효성의 검증 없이 한약제제를 생산·판매할 수 있다는 것을 의미한다¹²⁾. 이에 본 연구에서는 한약제제의 품질향상 및 저변 확대를 위한 근거를 제시하고자 삼출건비탕을 선정하여 전탕액 추출물과 2종의 시판 한약제제간의 구성 성분 및 생리 활성을 비교 분석하여 그 결과를 보고하였다.

II. 재료 및 방법

1. 처방 구성 및 추출 방법

본 실험에 사용된 삼출건비탕은 본 연구실에서 제조한 1종(SK1)과 시판 한약제제 2종(SK2, SK3)을 구입하여 사용하였다. Table 1에는 한 첩에 해당하는 삼출건비탕의 구성 한약재의 양과 시판 한약제제의 제품정보에 표시된 1회 용량의 구성 한약재의 양 혹은 각각의 한약재에 해당하는 추출물의 양을 나타냈다. 삼출건비탕 추출물의 제조를

위하여 Omniherb(Yeongcheon, Korea)와 HMAX(Jecheon, Korea)에서 구성 한약재를 각각 구입하여 이재현 교수(Dongguk University, Gyeongju, Korea)와 서영배 교수(Daejeon University, Daejeon, Korea) 2인의 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본(2008-KE06-1~2008-KE06-14)은 한국한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다. 배합한 약재에 10배의 물을 가한 후 100°C에서 2시간 동안 무압 환류 추출법(추출기: 경서메디텍 COSMOS660)을 이용하여 추출하였다. 추출액은 약전표준체를 사용하여 거르고 동결건조기(일신 동결건조기, PVTFD100R)를 사용하여 처방 추출물 2.45 kg(수율 24.5%)을 얻었다(Table 1).

Table 1. Compositions of three kinds of Samchulkunbi-tang

Latin name	Herb dose (g)		Ex dose (g)	
	SKT1 ^{a)}	SKT2 ^{b)}	SKT3 ^{c)}	
Ginseng Radix	3.75	2.7	0.65	1.33
Atractylodis Rhizoma	3.75	2.7	1.00	1.33
Hoelen	3.75	2.7	0.05	0.27
Magnoliae Cortex	3.75	2.7	0.22	0.67
Citri Pericarpium	3.75	2.7	0.86	1.33
Crataegi Fructus	3.75	2.7	0.95	1.33
Ponciri Fructus	3.00	2.0	0.58	1.00
Paeoniae Radix	3.00	2.0	0.54	1.00
Amomi Semen	1.875	1.3	0.16	0.33
Massa Medicata Fermentata	1.875	1.3	0.65	0.67
Hordei Fructus Germinatus	1.875	1.3	0.33	0.67
Glycyrrhizae Radix	1.875	1.3	0.35	0.67
Zingiberis Rhizoma Crudus	3.75	4.7	0.26	0.47
Zizyphi Fructus	3.75	9.3	4.15	4.17
Total (g)	43.5	38.4	10.75	15.91
Yield (%)	24.5			
Dosage (g)	10.66	10.75		15.91

Samchulkunbi-tang from decoction^{a)}, manufacturer A^{b)}, manufacturer B^{c)}.

^{a)}Composition of a paper of herbal medicine

^{b,c)}Composition of one dosage of herbal medicine outlined by the manufacturer

2. 구성 표준물질 분석

1) 시약 및 기기

표준물질인 paeoniflorin, liquiritin, naringin, hesperidin 및 glycyrrhizin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하였으며, albiflorin과 poncirin은 ChromaDex(Irvine, CA, USA)로부터 구입하였다. 각 표준물질의 순도는 hesperidin(92.0%)을 제외한 6종 모두 98.0% 이상이었다. 시료전처리 및 HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile 및 water는 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, acetic acid는 Merck KGaA(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 함량분석을 위한 HPLC는 LC-20A 시스템(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)은 LC-20AT pump, DGU-20A₃ on-line degasser, CTO-20A column oven, SIL-20AC auto-sampler 및 SPD-M20A PDA detector로 구성되어 있다. 분석 data는 LC solution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다.

2) 표준용액의 조제 및 검량선 작성

Albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, naringin, hesperidin, poncirin 및 glycyrrhizin의 7종의 표준품에 대한 표준용액은 메탄올로 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다. 검량선은 albiflorin과 glycyrrhizin 0.78-50.00 mg/mL, paeoniflorin, naringin, hesperidin 및 poncirin 0.78-100.00 mg/mL 및 liquiritin 0.39-50.00 mg/mL의 농도범위에서 표준용액을 이용하여 검량선을 작성하였다.

3) HPLC 분석

HPLC 분석을 위하여 본 연구원에서 제조한 시료와 시판 한약제제 2종의 시료를 각각 200 mg씩 정확히 측정 후 물을 넣어 20 mL로 맞춘 후 0.2 µm membrane 여과(Woongki Science, Seoul, Korea) 후 검액으로 하였다. 삼출건비탕 내 주요성분인 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, naringin, hesperidin, poncirin 및 glycyrrhizin의 분리를 위하여 Gminin C₁₈(5 µm, 4.6×150 mm, Phenomenex, Torrance, CA,

USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘러주었으며 주입량은 10 µL였다. 이동상은 1.0% acetic acid가 함유된 water (A)와 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile (B)을 사용하여 기울기 용매조건(0-40 분, 5-70% B, 40-45분, 70-100% B, 45-50분, 100% B)으로 흘러주었으며, 검출파장은 230 nm, 254 nm 및 280 nm에서 검출하였다.

3. 효능 분석

효능분석을 위하여 본 연구원에서 제조한 시료와 시판 한약제제 2종 시료를 각각 100 mg씩 정확히 측정된 후 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)를 넣어 1 mL로 맞춘 후 0.2 µm membrane 여과(Woongki Science, Seoul, Korea)하여 실험에 이용하였다.

1) 항산화 효능 분석

(1) ABTS 라디칼 소거능 측정

3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다¹³⁾. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 暗室에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성 시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 PBS로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS⁺용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader(Benchmark Plus, Bio-Rad, USA)를 사용하여 743 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 용매인 PBS를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타냈다. 활성비교를 위하여 양성대조군으로 vitamin C를 사용하였다.

(2) DPPH 라디칼 소거능 측정

1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma Chemical Co.) 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 96 well plate에 이용하여 실시하였다¹⁴⁾. 96 well plate에 0.15 mM

의 DPPH 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처방 추출물의 항산화능은 용매인 DMSO를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. 활성비교를 위하여 양성대조군으로 vitamin C를 사용하였다.

2) 항염증 효능 분석

(1) 세포배양 시약 및 기기

Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(PS), PBS는 Gibco(USA) 제품, Cell counting kit-8(CCK-8)은 Dojindo 제품(Japan), lipopolysaccharide(LPS), indomethacin, NG-methyl-L-arginine(L-NMMA)은 Sigma(USA) 제품, Griess reagent는 Promega(USA) 제품, PGE₂ EIA kit는 Cayman(USA) 제품, IL-6 ELISA kit는 Invitrogen(USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

(2) RAW 264.7 세포주 배양

생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 5.5% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지로 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 배양에 사용된 모든 시약은 Gibco Laboratories(Grand Island, NY) 제품을 사용하였다.

(3) 세포 독성 측정

시료의 세포 독성을 알아보기 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8; Dojindo, Japan)을 제조사의 사용법에 따라 사용하였다. 96 well plate에 분주한 RAW 264.7 세포(3×10³ cells/well)에 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. CCK-8 용액 10 µL를 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율(% of control)을 계산하였다.

(4) Nitric oxide(NO), prostaglandin E₂(PGE₂), interleukin-6(IL-6) 생성량 측정

48 well plate에 분주한 RAW 264.7 세포(2.5×10^5 cells/well)에 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하고, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각각의 해당 kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상등액 내에 존재하는 NO, PGE₂, IL-6 양을 측정하였다. LPS군과의 비교를 통해 상대적인 비율(% of LPS)을 계산하였다.

4) 통계처리

실험값은 mean \pm S.E.M.으로 표시하였다. 실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA검정을 적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test를 이용하여 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

삼출건비탕은 인삼, 백출, 복령, 후박, 진피, 산사육, 지실, 작약, 사인, 신곡, 맥아, 감초, 생강, 대추로 구성된 처방으로, 실험에 사용된 전탕액 추출물(SKT1)과 2 가지 종류의 시판 한약제제(SKT2, SKT3)를 구성하고 있는 처방 한약제는 동일하나 각 한약제의 용량 및 1회 용량은 다소 차이가 있다(Table 1). 시판 한약제제는 각각의 약재를 추출한 단미엑스제를 혼합·제조하여 공급되는 한약제제로 시판 한약제제 A(SKT2)의 경우 단미엑스제의 양과 그에 해당하는 한약제의 양까지 각각 표시하고 있으나, 시판 한약제제 B(SKT3)는 구성 단미엑스제의 양만을 표시하고 있다. 따라서 실험에 사용한 3가지 삼출건비탕의 제조에 사용된 각각의 한약제의 양을 정확하게 확인할 수 없었으며, 추출 방법 또한 다소 차이가 있을 것으로 여겨졌다. 이에 실험에 사용한 세 가지 삼출건비탕의 비교 분석을 위하여 동일한 시료 양을 기준으로 구성 성분 함량 및 생리 활성을 분석하였다.

삼출건비탕의 구성 약재 중 작약의 주요성분인 알비플로린(albiflorin)과 페오니플로린(paeoniflorin),

감초의 주요성분인 리퀴리틴(liquiritin)과 글리시리진(glycyrrhizin), 지실의 주요성분인 나린진(naringin)과 폰시린(poncirin) 및 진피의 주요성분인 헤스페리딘(hesperidin)을 분석대상으로 1.0% acetic acid가 함유된 water와 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile을 기율기 용매 조건으로 하여 35분 이내에 분리하였다. PDA(photodiode array) 검출 파장은 230 nm에서 albiflorin과 paeoniflorin, 254 nm에서 glycyrrhizin 및 280 nm에서 naringin, hesperidin, poncirin 및 liquiritin을 각각 검출하였다. 검액에서의 peak는 주요 성분 peak의 retention time과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였으며, 7종의 성분은 8.774, 9.657, 11.495, 13.465, 13.977, 19.127 및 30.295분에 각각 검출되었다(Fig. 1). 삼출건비탕의 함량분석을 위한 검량선은 상관계수 값이 0.9999이상으로 1에 가까운 아주 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 7종 성분의 검출한계와 정량한계는 0.05-0.20 mg/mL과 0.15-0.65 mg/mL로 각각 나타났다(data not shown). 7종 성분의 피크 면적과 머무름 시간에 대한 재현성은 상대표준편차가 1.5%와 0.1% 이내로 양호한 재현성을 나타내었다.

3가지 삼출건비탕의 7종의 지표 성분에 대한 HPLC 분석 결과(Fig. 1), 전탕액 추출물, 시판 한약제제 A 및 B에서 7종의 성분이 1.40-6.80 mg/g, ND-4.75 mg/g 및 0.03-1.46 mg/g으로 각각 나타났다(Table 2). 알비플로린은 시판 한약제제 A에서 1.83 mg/g의 함량으로 전탕액 추출물(1.40 mg/g)과 시판 한약제제 B(0.11 mg/g)에 비해 높게 검출되었다. 페오니플로린은 전탕액 추출물과 시판 한약제제 A에서 각각 5.60, 4.75 mg/g으로 비슷한 함량으로 검출되었으나 시판 한약제제 B에서는 1.46 mg/g으로 상대적으로 적은 양이 검출되었다. 그 외 리퀴리틴, 나린진, 헤스페리딘, 폰크린과 글리시리진은 시판 한약제제 추출물에서는 모두 1.00 mg/g 이하의 함량으로 검출된 데 비해, 전탕액 추출물에서는 1.60, 5.00, 6.80, 5.45, 2.80 mg/g으로 비교적 높은 함량으로 검출되었다.

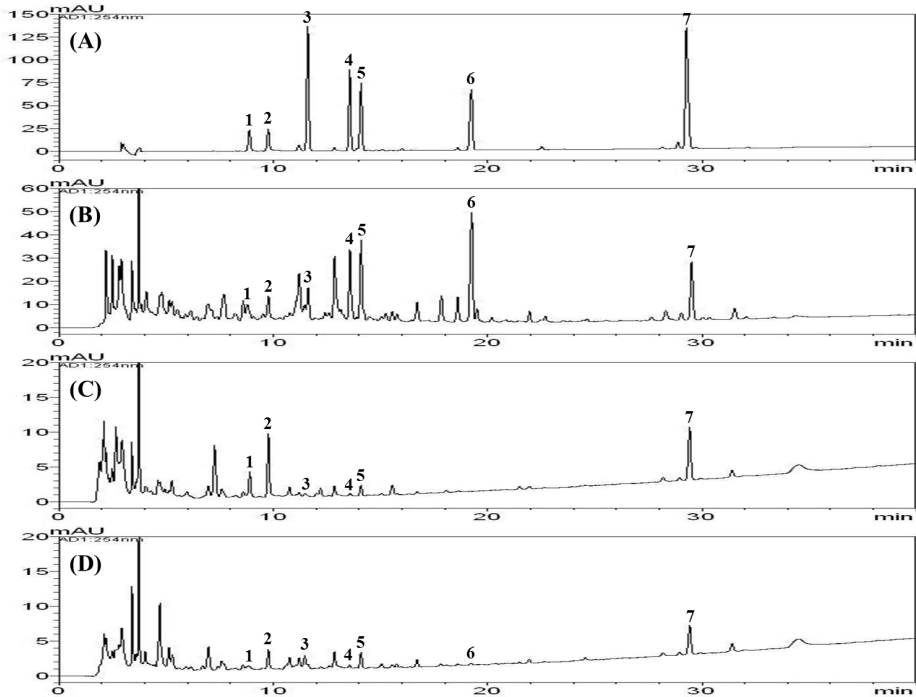


Fig. 1. HPLC chromatogram of a standard mixture (A), Samchulkunbi-tang from decoction (B), manufacturer A (C) and manufacturer B (D). Albiflorin (1), paeoniflorin (2), liquiritin (3), naringin (4), hesperidin (5), poncirin (6), and glycyrrhizin (7).

Table 2. Analytical results (mg/g) of the 7 compounds in Samchulkunbi-tang

Compound	SKT1 ^{a)}			SKT2 ^{b)}			SKT3 ^{c)}		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Albiflorin	1.40	0.01	0.61	1.83	0.02	1.13	0.11	0.00	2.55
Paeoniflorin	5.60	0.02	0.42	4.75	0.04	0.90	1.46	0.02	1.48
Liquiritin	1.60	0.01	0.50	0.03	0.00	3.31	0.09	0.00	4.37
Naringin	5.00	0.01	0.17	0.04	0.00	3.38	0.09	0.00	3.16
Hesperidin	6.80	0.01	0.10	0.29	0.00	1.10	0.43	0.01	1.49
Poncirin	5.45	0.01	0.13	ND ^{d)}	-	-	0.03	0.00	1.97
Glycyrrhizin	2.80	0.01	0.20	0.79	0.01	1.66	0.44	0.01	1.96

Samchulkunbi-tang from decoction^{a)}, manufacturer A^{b)}, manufacturer B^{c)}

^{d)}ND : Not detected

한의학에서 위장관 질환의 치료에 주로 사용되는 삼출건비탕의 지표 성분들의 관련 효능에 대한 연구를 살펴보면, 알비플로린과 페오니플로린은 항

산화 효과를 통해 항암제의 부작용을 억제하고, 염증반응을 저해하여 위암세포의 사멸을 돕는다는 연구결과가 있으며^{15,16)}, 글리시리진과 나린진의 위케

양 억제 효과¹⁷⁻¹⁹⁾ 및 폰시린과 헤스페리딘의 위장관 질환의 보호효과가 보고되어 있다^{20,21)}. 위장관 질환의 예방과 치료에는 항산화^{22,23)} 및 항염증 효능²⁴⁾이 중요하게 작용하는데, 앞서 언급한 직접적인 위장관 질환의 효과에 대한 연구 결과에 덧붙여, 각각의 지표물질에 대한 항산화, 항염증 효과는 다양한 연구에 통해 보고되어 있다²⁵⁻²⁸⁾. 따라서 처방의 구성 성분과 효능간의 상관관계를 알아보고자 항산화 및 항염증 효능을 분석하였다.

3가지 삼출건비탕 시료의 항산화능은 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성을 통해 확인하였다. ABTS 라디칼의 소거활성을 비교한 결과 각 시료에 의해 농도의존적으로 라디칼 소거활성이 증가하였고, 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값은 각각 양성대조군 vitamin C: 4.57±0.01 µg/mL, 전탕액 추출물: 42.38±1.00 µg/mL, 시판 한약제제 A: 233.23±1.08 µg/mL, 시판 한약제제 B: 317.40±2.63 µg/mL로 측정되었다(Fig. 2). DPPH 라디칼의 소거활성 역시 추출물의 농도가 증가함에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 보였으며, 추출물의 농도 500 µg/mL에서 전탕액 추출물: 85.28%, 시판 한약제제 A: 44.32%, 시판 한약제제 B: 30.05%의 라디칼 소거활성을 보였다(Fig. 3).

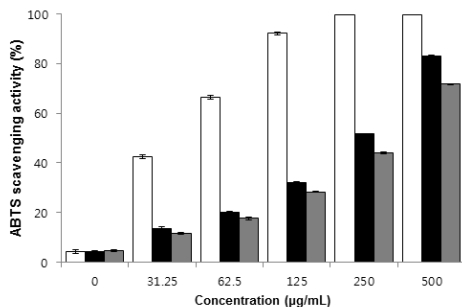


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of extracts from 3 different Samchulkunbi-tang(SKT).

SKT from decoction(SKT1), manufacturer A(SKT2) and manufacturer B(SKT3). The values are expressed as the mean±SEM of three experiments.

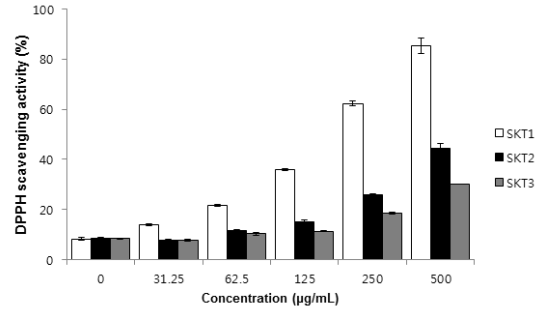


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of extracts from 3 different Samchulkunbi-tang(SKT).

SKT from decoction(SKT1), manufacturer A(SKT2) and manufacturer B(SKT3). The values are expressed as the mean±SEM of three experiments.

생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용한 염증세포 모델을 이용하여 3가지 삼출건비탕 추출물의 항염증 효능을 비교 분석하였다. LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 대식세포는 NO, PGE₂, IL-6와 같은 염증 매개 물질을 분비하게 된다²⁹⁾. 3가지 삼출건비탕의 항염증 효능을 비교하고자, 각 시료를 농도별로 처리한 후 각 염증 매개 물질의 분비량 변화를 측정하였다. 기존의 삼출건비탕의 항염증 효능 연구결과⁶⁾와 동일하게 전탕액 추출물 시료는 NO(Fig. 4)를 제외한 PGE₂(Fig. 5)와 IL-6(Fig. 6)의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 시판 한약제제 A를 처리한 대식세포에서는 모든 염증매개물질의 유의한 변화가 관찰되지 않았으나, 시판 한약제제 B를 처리한 경우, PGE₂ 생성을 농도 의존적으로 억제하여 최고 농도인 1000 µg/mL에서는 25% 까지 억제효과를 나타냈다. 하지만 NO와 IL-6의 억제 효능은 관찰되지 않았다.

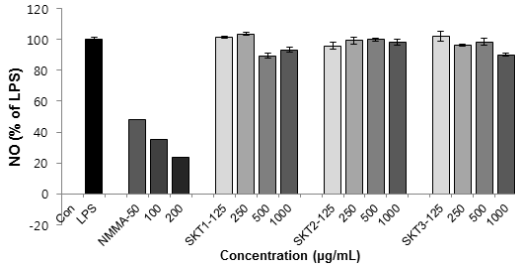


Fig. 4. Effects of 3 different Samchulkunbi-tang (SKT) on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells.

The cells were stimulated with LPS(1 µg/mL) in the presence and absence of SKT extract(125, 250, 500, 1000 µg/mL) for 24 h. Extracts of SKT from decoction(SKT1), manufacturer A(SKT2) and manufacturer B(SKT3) were used. The amount of NO in the medium was measured using a Griess reagent. Data were presented as the means±S.E.M.

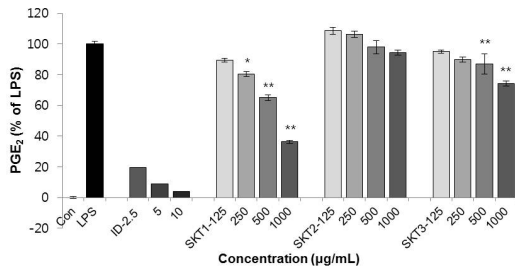


Fig. 5. Effects of 3 different Samchulkunbi-tang (SKT) on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells.

The cells were stimulated with LPS(1 µg/mL) in the presence or absence of SKT extract(125, 250, 500, 1000 µg/mL) for 24 h. Extracts of SKT from decoction (SKT1), manufacturer A(SKT2) and manufacturer B (SKT3) were used.. The amount of PGE₂ in the medium was measured using a PGE₂ EIA kit Data were presented as the means±S.E.M. * P<0.05 compared with the LPS group; ** P<0.01 compared with the LPS group.

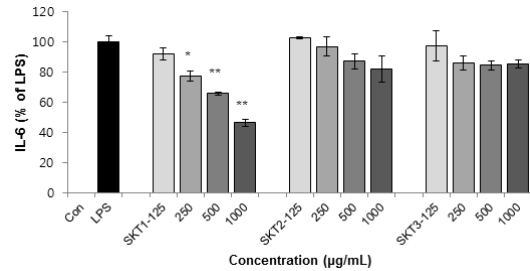


Fig. 6. Effects of 3 different Samchulkunbi-tang (SKT) on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells.

The cells were stimulated with LPS(1 µg/mL) in the presence or absence of SKT extract(125, 250, 500, 1000 µg/mL) for 24 h. Extracts of SKT from decoction(SKT1), manufacturer A(SKT2) and manufacturer B(SKT3) were used. The amount of IL-6 in the medium was measured using a IL-6 ELISA kit. Data were presented as the means±S.E.M. * P<0.05 compared with the LPS group; ** P<0.01 compared with the LPS group.

동일한 양을 기준으로 구성 성분과 생리 활성을 비교 분석한 결과를 종합하면, 삼출건비탕 전탕액 추출물의 구성 성분 함량이 가장 높게 검출되었으며, 항산화 효능과 항염증 효능 역시 전탕액 추출물을 처리한 군에서 높게 관찰되었다. 따라서 구성 성분 함량과 생리 활성은 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있다. 1회 용량을 고려하여 성분 및 효능을 비교한다면, 전탕액의 경우 1첩을 1회 용량으로 간주하였을 때 10.66 g을 섭취하여야 하며, 시판 한약제제 A와 B의 경우 각각 10.75 g, 15.91 g을 1회 용량으로 제시하고 있어(Table 1), 각각의 1회 용량을 복용하였을 때 전탕액 추출물이 시판 한약제제를 복용했을 때 보다 더 강한 항산화·항염증효능을 나타낼 것으로 여겨진다.

전탕액 추출물과 시판 한약제제간의 이러한 차이는 아마도 추출방법의 차이에서 기인할 것으로 여겨진다. 즉, 처방의 구성 한약재를 모두 혼합하여 추출한 전탕액 추출물과 각각의 한약재 추출물을 혼합한 시판 한약제제의 지표물질 함량 및 효능 간에는 유의적인 차이가 있음을 알 수 있었다.

이는 전탕액 추출물과 단미혼합제제의 효능을 비교한 기존의 연구 결과에서도 비슷한 양상으로 관찰되었다. 결막염에 응용되는 사간탕의 효능을 비교한 결과, 전탕액 추출물 투여군이 단미혼합제제 투여군 보다 더 유의적 효과가 있음을 보고하였고³⁰⁾, 삼황사심탕이 혈압 및 혈청에 미치는 영향을 비교한 결과 역시 전탕액 추출물 투여군에서 단미혼합제제 투여군보다 우수한 효과가 있다는 연구 결과를 보고하였다³¹⁾.

이상의 결과를 종합해보았을 때, 본 연구를 통해 삼출건비탕의 경우 전탕액 추출물이 단미혼합제제인 시판 한약제제보다 치료 성분 함량이 더 많았으며, 항산화·항염증 효능이 더 우수한 것으로 확인되었다.

IV. 결 론

삼출건비탕의 전탕액 추출물(SKT1)과 시판 중인 한약제제 2종(SKT2, SKT3)을 이용하여 그 구성 성분 및 효능을 연구한 결론은 다음과 같다.

1. 3가지 삼출건비탕의 7종의 지표 성분에 대한 HPLC 분석 결과, SKT2에서 가장 많은 함량을 나타낸 알비플로빈을 제외한, 페오니플로빈, 리퀴리틴, 나린진, 헤스페리딘, 폰시린, 글리시리진은 시판 한약제제에 비해 전탕액 추출물에서 높은 함량으로 측정되었다.
2. ABTS와 DPPH 라디칼의 소거활성을 비교한 결과, 3가지 삼출건비탕 모두 농도의존적인 활성을 나타냈으나, 시판 한약제제에 비해 전탕액 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타냈다.
3. 3가지 삼출건비탕의 항염증 효능을 비교한 결과, 전탕액 추출물은 LPS 처리에 의해 증가된 PGE₂와 IL-6 생성을 농도의존적으로 억제하였으나, 시판 한약제제의 경우 한 종류(SKT3)에서만 유의적인 PGE₂ 억제 효능을 확인하였다.

이상의 결과로 삼출건비탕 전탕액 추출물이 시판 한약제제에 비해 치료 성분 함량이 더 높았으며, 항산화·항염증 효과 역시 더 우수한 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 표준한방처방 EBM 구축사업(K12030)의 지원으로 진행되었습니다.

참고문헌

1. 허준. 원본 동의보감. 신증판. 서울:남산당. 2007:431.
2. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 개정판. 서울:의성당. 2004:158.
3. Kim T, Ko S, Baik T. An experimental study on the effect of Samchulgunbitang affecting gastro-intestine and central nervous system. J Korean Oriental Inten Med. 1997;18(1):1-14.
4. Kim SW, Lee TH. Effect of Samchulkunbitang on gastric secretion and intestinal transport in the rat. Korean J Orient Med Pathol. 1998;3:84-90.
5. Lee S, Kim J. Effects of Samchulkunbitang on the immunosuppression induced by methotrexate in rats. J Korean Oriental Pediatr. 1998;12(1):257-76.
6. Lee J, Ha H, Jung D, Lee H, Lee N, Lee J, Huang D, Shin H. Anti-inflammatory effects of Sam-chul-kun-bi-tang. J Korean Oriental Med. 2010;31(3):47-54.
7. Kim KJ. Functions and prospects of oriental health related industries in 21st century. J Korean Oriental Med. 1998;19(1):430-43.
8. Han K, Kwon D, Lee SG, Park SK, Kim C,

- Kim YK. The present state of Korean herbal preparation production and possible improvement plan. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*. 2006;14(1):30-41.
9. Han B, Hwang G. A study on amendment of approval specifications for traditional Korean medicines. *Kor J Oriental Preventive Medical Society*. 2001;5(2):57-75.
 10. Kim EJ, Park HJ, Kim HJ, Kim JH, Ann JY, Lee JH, Kim YK. A monitoring study of marker contents in the Hwangnyeonhaedok-tang ex preparations on the market. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*. 2008;16(1):95-107.
 11. Kim JH, Seo CS, Shin HK. The comparative study on decoctions of Ssanghwa-tang(Shuanghe-tang) extracted by different extraction conditions. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*. 2010;18(2):125-34.
 12. Eom S, Kim S, Kim K, Park S, Eo W, Choi W. A proposal for research process of botanical drug based clinical traditional Korean medicine -historical evidence-based medicine II-. *J Ori Med Classic*. 2010;23(4):63-102.
 13. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*. 1999;26:1231-7.
 14. Dietz BM, Kang YH, Liu G, Eggler AL, Yao P, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, Mesecar AD, van Breemen RB, and Bolton JL. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:1296-305.
 15. Xu W, Zhou L, Ma X, Chen Y, Qin B, Zhai X, You S. Therapeutic effects of combination of paeoniflorin and albiflorin from *Paeonia radix* on radiation and chemotherapy-induced myelosuppression in mice and rabbits. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(8):2031-7.
 16. Wu H, Li W, Wang T, Shu Y, Liu P. Paeoniflorin suppress NF-kappaB activation through modulation of I kappaB alpha and enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Biomed Pharmacother*. 2008;62(9):659-66.
 17. Yano S, Harada M, Watanabe K, Nakamaru K, Hatakeyama Y, Shibata S, Takahashi K, Mori T, Hirabayashi K, Takeda M. Antiulcer activities of glycyrrhetic acid derivatives in experimental gastric lesion models. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*. 1989;37(9):2500-4.
 18. Martín MJ, Marhuenda E, Pérez-Guerrero C, Franco JM. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*. 1994;49(3):144-50.
 19. Parmar NS. The gastric anti-ulcer activity of naringenin, a specific histidine decarboxylase inhibitor. *Int J Tissue React*. 1983;5(4):415-20.
 20. Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, Seo EK, Lee KT. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:2345-51.
 21. Lee JH, Lee SH, Kim YS, Jeong CS. Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* on potential gastric disease. *Phytother Res*. 2009;23(12):1748-53.
 22. Otamiri T, Sjö Dahl R. Oxygen radicals: their role in selected gastrointestinal disorders. *Dig Dis*. 1991;9(3):133-41.

23. Smith SM, Kvietys PR. Gastric ulcers: role of oxygen radicals. *Crit Care Med*. 1988;16(9):892-8.
24. Spiller RC. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(4):641-61.
25. Wilmsen PK, Spada DS, Salvador M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem*. 2005;53:4757-61.
26. Raza SS, Khan MM, Ahmad A, Ashafaq M, Khuwaja G, Tabassum R, Javed H, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Res*. 2011;1420:93-105.
27. Schröfelbauer B, Raffetseder J, Hauner M, Wolkerstorfer A, Ernst W, Szolar OH. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. *Biochem J*. 2009;421:473-82.
28. Lee CH, Jeong TS, Choi YK, Hyun BH, Oh GT, Kim EH, Kim JR, Han JI, Bok SH. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(3):681-8.
29. Huang ST, Chen CT, Chieng KT, Huang SH, Chiang BH, Wang LF, Kuo HS, Lin CM. Inhibitory effects of a rice hull constituent on tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2, and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1042:387-95.
30. Kang KH, Chae BY. The effect of Sagan-tang applied to conjunctivitis on hepatic damage in rats. *Kyunghee Univ Oriental Med J*. 1985;8(1):185-94.
31. Lee SD, Bai HS, Koo BH. The effects of Samhwangasimtang on the blood pressure and serum in S.H.R. *Kyunghee Univ Oriental Med J*. 1984;7(1):181-91.