

## 추출용매에 따른 ACTS002의 항산화 활성 및 지표성분의 함량 비교

이대연<sup>1,2</sup>, 심선형<sup>2</sup>, 김완수<sup>2</sup>, 이영우<sup>1</sup>, 이인희<sup>1</sup>

<sup>1</sup>㈜ 더 포레, <sup>2</sup>포레스트 요양병원

### Comparison between the Antioxidant Activity and the Index Content of ACTS002 according to the Extraction Solvent

Dae-yeon Lee<sup>1,2</sup>, Sun-hyung Sim<sup>2</sup>, Wan-su Kim<sup>2</sup>, Young-woo Yi<sup>1</sup>, In-hee Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Fore, <sup>2</sup>Forest Hospital

#### ABSTRACT

**Objectives:** *Samul-tang* is commonly used to alleviate the side effects of chemotherapy. This study aimed to establish an efficient method of extracting ACTS002 based on *Samul-tang* using the yield, high-performance liquid chromatography (HPLC), and antioxidant assay.

**Methods:** ACTS002 was extracted from each extraction solvent, and the contents of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF), paeoniflorin, and ferulic acid were quantitatively analyzed and compared using HPLC. Moreover, the antioxidant activities of ACTS002 were measured using total flavonoids, total phenolic compounds, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), and Ferric reducing/antioxidant power (FRAP).

**Results:** All of the components were set as the index contents because they were easy to process. The antioxidant activity of total flavonoids was the highest in 70% ethyl alcohol extracts, and total phenolic compounds were the highest in 50% ethyl alcohol extracts. In DPPH, 50% ethyl alcohol extracts showed the highest activity, and in ABTS 70% ethyl alcohol extracts were the highest. In FRAP, 70% ethyl alcohol extracts showed the highest activity.

**Conclusions:** ACTS002 can control quality by setting 5-HMF, paeoniflorin, and ferulic acid as the index contents. The antioxidant activity measurement was relatively high in the 50% and 70% ethyl alcohol extracts. Our results can predict the possibility of a pharmacological activity and the standardization of ACTS002.

**Key words:** ACTS002, yield, HPLC, antioxidant

## 1. 서 론

지난 수십년 간 과학기술의 발전과 더불어 암치료법은 화학요법, 수술요법, 방사선요법 등 다양하게 개발되고 발전되어 왔다. 하지만 인구의 노령화

와 산업화로 인한 환경오염 및 잘못된 식이 습관 등으로 인해 암의 발생은 계속 증가되고 있으며 이에 따라 조혈, 소화, 면역체통의 생리적 기능을 방해하는 항암치료의 부작용도 증가되고 있다<sup>1-3</sup>. 이러한 문제점을 해결하기 위해 부작용이 적은 천연물을 이용하여 항암치료의 부작용을 억제하려는 노력이 증가하고 있다<sup>4</sup>. 항암치료의 부작용에 대한 대표적인 처방이 사물탕이다. 사물탕은 혈허증을 치료하는데 주로 처방되며<sup>5</sup> 가감 및 가미를 통하여

· 투고일: 2019.04.13, 심사일: 2019.07.01, 게재확정일: 2019.07.01

· 교신저자: 이인희 서울시 송파구 오금로 19길 6 201호

(주) 더 포레

TEL: 010-5014-0908 FAX: 070-6929-3399

E-mail: ih0915@hanmail.net

환자에 따라 다르게 처방된다. 최근 연구동향으로는 항 스트레스 및 혈전효과<sup>6</sup>, 방사선 장애에 대한 방호효과<sup>7</sup>, 항암효과<sup>8</sup>, 자궁, 심장, 간장, 비장 등의 면역기능 증진<sup>9</sup>에 대한 것들이 있다.

사물탕 처방 약재 중 지황(地黃, *Rehmannia glutinosa* Liboschitz)은 현삼과에 속하는 다년생 초본으로 수처법에 따라 생지황, 건지황으로 나누며 특히 증숙하여 구중구포한 것을 숙지황이라 한다<sup>10</sup>. 지황에는 stigmasterol, campesterol, sitosterol, catalpol, manninotriose 등 다양한 성분들이 함유되어 있으며<sup>11</sup> 숙지황의 경우에는 증숙하는 과정에서 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF)가 생성되고 iridoid 배당체들이 분해되어 약리활성이 바뀐다. 숙지황은 보혈의 효능이 있으며 생리불순, 발육부진, 치매 등에 처방된다<sup>12</sup>. 백작약(白芍藥, *Paeonia lactiflora* Pallas)은 미나리아재비과에 속한 다년생 초본으로 작약의 뿌리를 건조한 것이다. 가공방법에 따라 박백작, 천백작, 항백작 등으로 분류할 수 있다<sup>13</sup>. 백작약은 monoterpene glucoside계열인 paeoniflorin 및 albiflorin, 탄닌, 페놀산 등이 지표성분 및 유효성분으로서 알려져 있다<sup>14</sup>. 전통적으로 진통, 복통, 진경, 고혈압, 부인약 및 염증 치료제로 처방되어 왔으며 항혈전 작용<sup>15</sup>, 항산화 작용<sup>16</sup>, 항고지혈 작용<sup>17</sup> 등이 보고되어 있다. 천궁(川芎, *Cnidium officinale* Makino)은 미나리아재비과에 속하는 다년생 초본으로 뿌리나 근경을 건조한 후 얇게 세절하여 사용된다<sup>18</sup>. 천궁에 대한 효능 연구는 최근 항혈관형성<sup>19</sup>, 항산화 활성<sup>20</sup>, 뇌질환 관련 효능<sup>21</sup> 등이 진행되어 있고 성분적으로는 sedanic acid, safrol 같은 정유성분이 많이 알려져 있다. 그 중 ligustilide가 함유량이 가장 높으며<sup>20,22</sup> 항진균작용이 보고되어 있다<sup>23</sup>. 당귀(當歸, *Angelica gigas* Nakai)는 미나리아재비과에 속하는 다년생 초본으로 뿌리를 사용한다<sup>24</sup>. 유효성분으로는  $\beta$ -sisterol,  $\alpha$ -pinene, limonene, nodakenetin, nodakenin, umbelliferone, decursin, decursinol, angelate 등이 보고되어 있으며<sup>25</sup> 면역기능 활성, 항염증, 항산화, 항종양, 항균, 조혈 작용증진, 혈액순환계 개

선 등의 효능들이 연구되어 있다<sup>26</sup>.

본 연구에서는 사물탕을 기반으로 가미되어진 처방(ACTS002)을 이용하여 생리활성을 확인하고자 하였으며 동일한 처방이라도 추출법에 따라 유효성은 충분히 차이가 있을 수 있기 때문에<sup>27</sup> 그에 대한 추출용매별 효능 및 지표성분을 비교하여 효율적인 추출법을 정립하고 표준화의 기틀을 마련하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

5-HMF, Paeoniflorin, Ferulic acid, Quercetin, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Gallic acid, ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid(Trolox), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS), Potassium persulfate, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 SIGMA-ALDRICH사(미국, 뉴저지), Methyl alcohol(MeOH), Acetonitrile(ACN), Sodium Hydroxide(NaOH)는 Honeywell사(미국, 뉴저지), Ethyl alcohol anhydrous(EtOH), Acetic acid, Diethylene glycol, Sodium carbonate anhydrous( $Na_2CO_3$ ), Methyl alcohol(MeOH)은 대정화금사(한국, 시흥), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)은 ALFA AESAR사(미국, 메사추세츠), Hydrochloric acid(HCl)는 삼전순약공업(한국, 평택)에서 구입하여 사용하였다. 감압농축기는 EYELA사(일본, 도쿄)의 N-2110, 동결건조기는 일신바이오베이스사(한국, 양주)의 Lyoph-Pride03, High performance liquid chromatography(HPLC)는 Shimadzu사(일본, 교토)의 LC-20A, CBM-20A, LC-20AT, SIL-20AC, CTO-20AC, DGU-20A5R, SPD-M20A, LC-PDA, Incubator는 제이오텍사(한국, 대전)의 IB-01E, Microplate reader는 Biotek사(미국, 버몬트)의 EPOCH2 기기를 사용하였다.

### 2. 약재

그린명품제약(한국, 남양주)에서 모든 약재를 구

입하였으며 판매사의 감별위원회에서 검증받았다.

### 3. 추출물 제조

ACTS002의 구성 약재인 숙지황, 백작약, 천궁, 당귀를 각각 분말화하고, 각 약재 분말을 1 : 1 : 1 : 1의 비율로 총 20 g을 칭량하여 준비하였다. 약재 총량의 10배인 200 ml의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정을 가하여 각각 3시간 이상 환류 추출하였다. 추출 후 증류수 추출물은 여과하여 냉동실에 예비동결 하였고, 주정 추출물은 각각 여과하여 감압농축한 후 200 ml의 증류수로 녹여내어 냉동실에 예비동결 하였다. 예비동결 후 약 140시간 동안 동결건조 하였고, 완료된 동결건조 분말을 실험 직전까지 냉동 보관하였다.

### 4. 수 율

ACTS002의 추출용매별 수율을 확인하기 위해 보관용기 5개의 무게를 각각 측정하여 준비하였다. 동결건조가 완료된 분말을 보관용기에 담고 각각의 무게를 다시 측정하여 측정된 무게 차이의 비로 수율을 확인하였다.

### 5. 정량분석

#### 1) 5-HMF

분석물질인 ACTS002의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 동결건조 분말을 각각 1.034, 1.024, 1.046, 1.010, 1.018 mg/ml의 농도로 70% MeOH에 녹였으며, 5-HMF 표준품은 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 µg/ml의 농도로 MeOH에 녹여 준비하였다. 분석조건은 5% ACN을 유속 1 ml/min으로 하였고, 컬럼은 Agilent사의 C<sub>18</sub> ODS 25 cm \* I.D 5.0 µm(미국, 캘리포니아)를 사용하였으며 25 °C를 유지하였다. 분석파장은 280 nm으로 표준품의 분석결과를 표준곡선으로 그린 후, 표준곡선의 방정식에 표준품의 peak와 Retention time(RT) 값이 같은 분석물질의 peak 면적 값을 대입하여 결과 값을 구하였다. 같은 조건으로 3번씩 반복하여 분

석하고, 결과 값의 표준편차를 계산하여 오차범위를 구하였다.

#### 2) Paeoniflorin

분석물질인 ACTS002의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 동결건조 분말을 5-HMF 분석과 동일한 농도로 준비하였다. Paeoniflorin 표준품은 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 50% MeOH에 녹여 준비하였다. 이동상은 Water (A)와 ACN (B)를 사용하여 (A)/(B)=90/10(0분)→(A)/(B)=90/10(15분)→(A)/(B)=80/20(30분)→(A)/(B)=65/35(45분)→(A)/(B)=0/100(46분)→(A)/(B)=0/100(56분)→(A)/(B)=90/10(57분)→(A)/(B)=90/10(72분)의 기울기 용매조건으로 흘러주었다. 유속은 1 ml/min, 컬럼은 Agilent사의 C<sub>18</sub> ODS 25 cm \* I.D 5.0 µm, 컬럼온도는 35 °C, 주입량은 20 µl, 파장은 230 nm의 조건으로 분석하였다. Paeoniflorin의 결과 값과 오차범위는 5-HMF 분석과 동일한 방법으로 구하였다.

#### 3) Ferulic acid

Ferulic acid 표준품은 0.27, 0.54, 1.08, 2.16, 4.32 µg/ml의 농도로 70% EtOH에 녹여 준비하였다. 이동상은 1% Acetic acid(80%) (A)와 1% Acetic acid가 첨가된 ACN(20%) (B)를 사용하여 (A)/(B)=85/15(0분)→(A)/(B)=85/15(20분)→(A)/(B)=0/100(30분)→(A)/(B)=0/100(40분)→(A)/(B)=85/15(45분)→(A)/(B)=85/15(60분)의 기울기 용매조건으로 흘러주었다. 유속은 1 ml/min, 컬럼은 Agilent사의 C<sub>18</sub> ODS 25 cm \* I.D 5.0 µm, 컬럼온도는 35 °C, 주입량은 20 µl, 파장은 280 nm의 조건으로 분석하였다.

### 6. 항산화 활성

#### 1) Total flavonoids

총 플라보노이드 함량은 Davis 변법<sup>28</sup>을 응용하여 측정하였다. 검액인 ACTS002의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 동결건조 분말을 모두 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 희석하여 준비하였

다. 검액 100  $\mu$ l와 Diethyleneglycol 1 ml를 혼합하고, 혼합액에 증류수를 이용하여 제조한 1N NaOH 100  $\mu$ l를 첨가하여 Vortex로 충분히 혼합한 후 35  $^{\circ}$ C Incubator에서 1시간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 Quercetin을 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125.00, 250.00, 500.00, 1000.00  $\mu$ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였고, 각각의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그렸다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 총 플라보노이드 함량을 계산하였다. 표준곡선의  $R^2$  값은 0.95 이상을 유효 값으로 설정하였다.

### 2) Total phenolic compounds

총 페놀화합물 함량은 Kim 등의 방법<sup>29</sup>을 응용하여 측정하였다. 검액인 ACTS002의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 동결건조 분말은 총 플라보노이드 함량 측정과 동일한 농도로 준비하였다. 검액 50  $\mu$ l와 증류수를 이용하여 제조한 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 ml를 혼합한 후 2분간 반응시켰다. 혼합액에 50% Folin & Ciocalteu's phenol reagent 50  $\mu$ l를 첨가하여 Vortex로 충분히 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 Gallic acid를 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125.00, 250.00  $\mu$ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였고, 각각의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그렸다. 총 페놀화합물 함량은 총 플라보노이드 함량 측정과 동일한 방법으로 계산하였다.

### 3) DPPH

DPPH 라디칼 소거 활성은 안정한 자유 라디칼인 DPPH를 이용하여 검액과의 반응에 의하여 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 측정하여 간접적으로 항산화 활성을 측정하는 방법이다. 검액인 ACTS002의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 동결건조 분말은 총 플라보노이드 함량 측정과 동일한 농도로 준비하였다. 검액 100  $\mu$ l와 EtOH을 이용하여 0.5 mg/ml의 농도로 제조한

DPPH 용액 100  $\mu$ l를 혼합한 후 35  $^{\circ}$ C Incubator에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 식을 이용하여 전자공여능을 계산하였다.

Electron Donating Ability(EDA)(%)

$$= \frac{[(\text{음성대조군의 흡광도} - \text{검액의 흡광도}) / \text{음성대조군의 흡광도}] \times 100}{}$$

### 4) ABTS

ABTS 라디칼 소거 활성은 Trolox와 비교하여 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 소거하는 상대적인 항산화력을 측정하는 방법이다. 검액인 ACTS002의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 동결건조 분말은 총 플라보노이드 함량 측정과 동일한 농도로 준비하였다. 증류수를 이용하여 제조한 7.4 mM ABTS와 EtOH를 이용하여 제조한 2.6 mM Potassium persulfate를 동량 혼합한 후 암상태의 실온에서 12시간 반응시켜 ABTS<sup>+</sup>를 형성시켰다. Microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하여 값이 1.1 $\pm$ 0.02가 되도록 MeOH로 희석하였다. 희석액 190  $\mu$ l와 검액 10  $\mu$ l를 Vortex로 충분히 혼합한 후 암상태의 실온에서 2시간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 Trolox를 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125.00, 250.00, 500.00  $\mu$ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였고, 각각의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그렸다. ABTS 라디칼 소거 활성은 총 플라보노이드 함량 측정과 동일한 방법으로 계산하였다.

### 5) Ferric reducing antioxidant power(FRAP)

FRAP는 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ)으로 환원될 때 흡광도 변화를 측정하여 항산화력을 측정하는 방법이다. 검액인 ACTS002의 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 동결건조 분말은 총 플라보노이드 함량 측정과 동일한 농도로 준비하였다. 증류수를 이용하여 제조한 300 mM Acetate buffer, 40 mM HCl을 이용하여 제조한 10 mM TPTZ와 증

류수를 이용하여 제조한 20 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 용액을 준비하여 10 : 1 : 1 비율로 혼합한 후 35 °C Incubator에서 사용 직전까지 보관하였다. 혼합액 190 µl와 검액 10 µl를 Vortex로 충분히 혼합한 후 암상태의 실온에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 Trolox를 ABTS 라디칼 소거 활성 측정과 동일한 농도로 사용하였고, 각각의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그렸다. FRAP 활성은 총 플라보노이드 함량 측정과 동일한 방법으로 계산하였다.

### 7. 통계

본 연구 결과의 통계적 유의성 검증은 IBM SPSS Statistics 22 프로그램을 사용하여 ANOVA two-sided 및 Student t-test법으로 p값을 구하였고, p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다.

## III. 결 과

### 1. 수 율

ACTS002의 추출용매별 수득량은 증류수 6.5 g, 30% 주정 7.5 g, 50% 주정 7.2 g, 70% 주정 6.7 g, 100% 주정 3.8 g이었다. 각각의 수율을 계산하면 32.5, 37.5, 36.0, 33.5, 19.0%으로 100% 주정 추출물을 제외하고는 비슷한 정도를 나타내었다(Fig. 1).

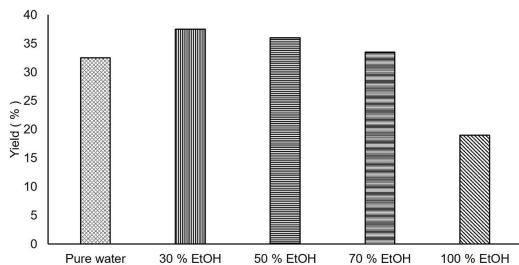


Fig. 1. Comparison of yield by the extraction solvents.

EtOH : Ethyl alcohol

The yield was calculated by freeze drying after extraction.

## 2. 정량분석

### 1) 5-HMF

숙지황의 지표성분인 5-HMF는 분석결과 표준곡선의 R<sup>2</sup> 값이 1.000으로 높은 직선성을 보였으며, 표준품과 분석물질이 동일 시간대에서 peak를 나타내었다(Fig. 2 (A)). 증류수 추출물의 경우 1.55±0.00 µg/g의 함량을 보였으며, 주정 추출물은 주정의 함량에 따라 각각 30%는 1.31±0.00 µg/g, 50%는 1.37±0.00 µg/g, 70%는 1.37±0.01 µg/g, 100%는 2.64±0.00 µg/g의 값으로 100% 주정 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었다(Fig. 2 (B)).

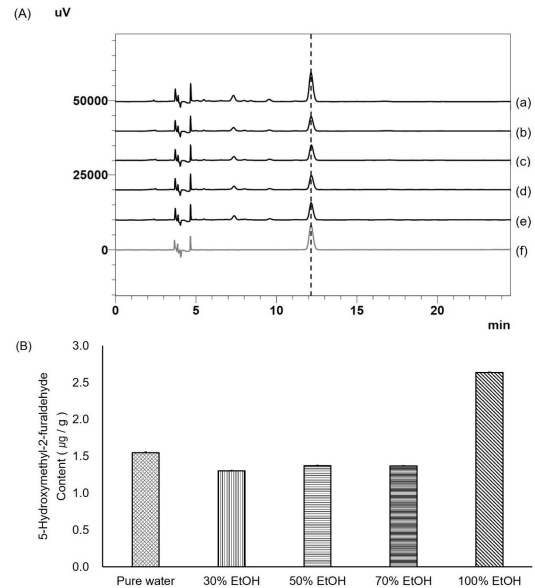


Fig. 2. Analysis of 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde content in ACTS002 by high performance liquid chromatography.

EtOH : Ethyl alcohol

(A) high performance liquid chromatography chromatogram of 100% EtOH (a), 70% EtOH (b), 50% EtOH (c), 30% EtOH (d), pure water (e) extraction of ACTS002 and 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde standard (f).

(B) comparison of 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde content of each extraction solvents.

2) Paeoniflorin

백작약의 지표성분인 Paeoniflorin은 분석결과 표준곡선의 R<sup>2</sup> 값이 0.991로 높은 직선성을 보였으며, 표준품과 분석물질이 동일 시간대에서 peak를 나타내었다(Fig. 3 (A)). 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 각각의 성분함량은 6.62±0.01, 7.56±0.10, 7.04±0.01, 8.26±0.01, 16.03±0.60 µg/g의 값으로 100% 주정 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었다(Fig. 3 (B)).

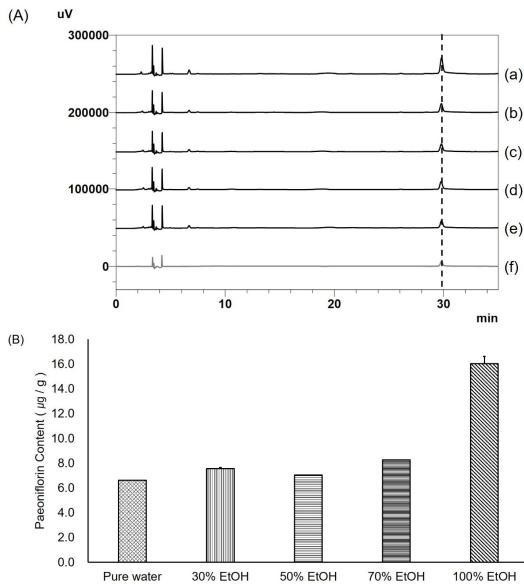


Fig. 3. Analysis of paeoniflorin content in ACTS002 by high performance liquid chromatography.

EtOH : Ethyl alcohol

(A) high performance liquid chromatography chromatogram of 100% EtOH (a), 70% EtOH (b), 50% EtOH (c), 30% EtOH (d), pure water (e) extraction of ACTS002 and paeoniflorin standard (f).

(B) comparison of paeoniflorin content of each extraction Solvents.

3) Ferulic acid

천궁의 지표성분인 Ferulic acid는 분석결과 표준곡선의 R<sup>2</sup> 값이 1.000으로 높은 직선성을 보였으며,

표준품과 분석물질이 동일 시간대에서 peak를 나타내었다(Fig. 4 (A)). 증류수, 30%, 50%, 70%, 100% 주정 추출물 각각의 성분함량은 0.36±0.00, 0.47±0.00, 0.43±0.00, 0.51±0.00, 1.20±0.00 µg/g의 값으로 100% 주정 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었다(Fig. 4 (B)).

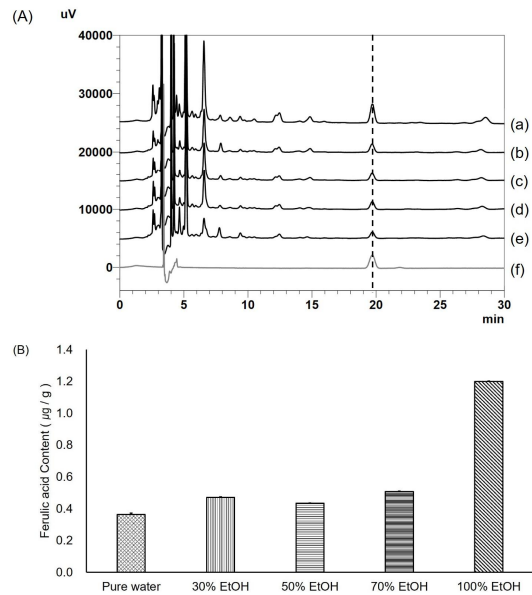


Fig. 4. Analysis of ferulic acid content in ACTS002 by high performance liquid chromatography.

EtOH : Ethyl alcohol

(A) high performance liquid chromatography chromatogram of 100% EtOH (a), 70% EtOH (b), 50% EtOH (c), 30% EtOH (d), pure water (e) extraction of ACTS002 and ferulic acid standard (f).

(B) comparison of ferulic acid content of each extraction Solvents.

3. 항산화 활성

1) Total flavonoids

Quercetin 표준곡선의 R<sup>2</sup> 값은 0.99를 나타내어 직선성을 보이므로 유효 값으로 인정하였다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 계산한 결과 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도별로 증류수 8.56±1.92, 31.89±1.92,

79.67±0.00, 30% 주정 18.56±1.92, 48.56±3.85, 106.33±0.00, 50% 주정 18.56±1.92, 53.00±0.00, 110.78±1.92, 70% 주정 21.89±1.92, 58.56±3.85, 124.11±1.92, 100% 주정 9.67±3.33, 36.33±0.00, 84.11±1.92의 값을 나타내었다 (Fig. 5 (A)). 총 플라보노이드 측정치가 가장 높은 것은 70% 주정 추출물이고, 가장 낮은 것은 증류수 추출물이었다.

#### 2) Total phenolic compounds

Gallic acid 표준곡선의 R<sup>2</sup> 값은 0.99를 나타내어 직선성을 보이므로 유효 값으로 인정하였다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 계산한 결과 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도별로 증류수 6.88±1.65, 16.04±0.36, 33.96±0.95, 30% 주정 10.42±1.80, 22.71±0.36, 48.13±0.00, 50% 주정 11.67±1.30, 24.58±0.95, 48.54±0.36, 70% 주정 11.46±1.44, 23.75±0.63, 50.83±0.36, 100% 주정 8.54±1.30, 17.50±1.08, 38.54±0.36의 값을 나타내었다 (Fig. 5 (B)). Gallic acid에 대비한 총 페놀화합물 함량은 50% 주정 추출물이 가장 높았고, 증류수 추출물이 가장 낮았다.

#### 3) DPPH

음성대조군과 검액의 흡광도 값을 전자공여능식에 대입하여 계산한 결과 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도별로 증류수 13.36±1.60, 28.67±1.43, 71.90±0.37, 30% 주정 3.20±1.01, 27.06±0.59, 76.85±0.24, 50% 주정 9.97±1.36, 37.91±1.04, 84.43±0.27, 70% 주정 2.04±1.24, 29.70±0.45, 74.34±0.40, 100% 주정 -9.85±1.80, 13.17±0.94, 46.34±0.99의 값을 나타내었다 (Fig. 5 (C)). 전자공

여능이 가장 높은 것은 50% 주정 추출물이고, 가장 낮은 것은 100% 주정 추출물이었다.

#### 4) ABTS

Trolox 표준곡선의 R<sup>2</sup> 값은 0.97을 나타내어 직선성을 보이므로 유효 값으로 인정하였다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 계산한 결과 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도별로 증류수 1.57±1.57, 33.74±0.43, 89.10±3.15, 30% 주정 7.51±2.89, 40.55±5.00, 109.97±1.81, 50% 주정 7.51±1.33, 45.04±2.72, 118.23±0.50, 70% 주정 9.25±5.19, 50.84±3.90, 129.10±1.81, 100% 주정 3.45±2.39, 31.42±3.38, 84.17±3.79의 값을 나타내었다 (Fig. 5 (D)). ABTS 라디칼 소거 활성은 70% 주정 추출물이 가장 높았고, 100% 주정 추출물이 가장 낮았다.

#### 5) FRAP

Trolox 표준곡선의 R<sup>2</sup> 값은 0.98을 나타내어 직선성을 보이므로 유효 값으로 인정하였다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 계산한 결과 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도별로 증류수 17.36±0.98, 36.72±0.21, 76.30±0.56, 30% 주정 22.26±0.56, 46.30±1.29, 91.12±0.86, 50% 주정 22.18±0.25, 46.72±0.37, 96.72±1.28, 70% 주정 22.75±0.33, 48.85±0.00, 96.30±0.37, 100% 주정 16.87±0.25, 36.79±0.12, 75.23±0.43의 값을 나타내었다 (Fig. 5 (E)). FRAP 활성이 가장 높은 것은 70% 주정 추출물이고, 가장 낮은 것은 100% 주정 추출물이었다.

추출용매에 따른 ACTS002의 항산화 활성 및 지표성분의 함량 비교

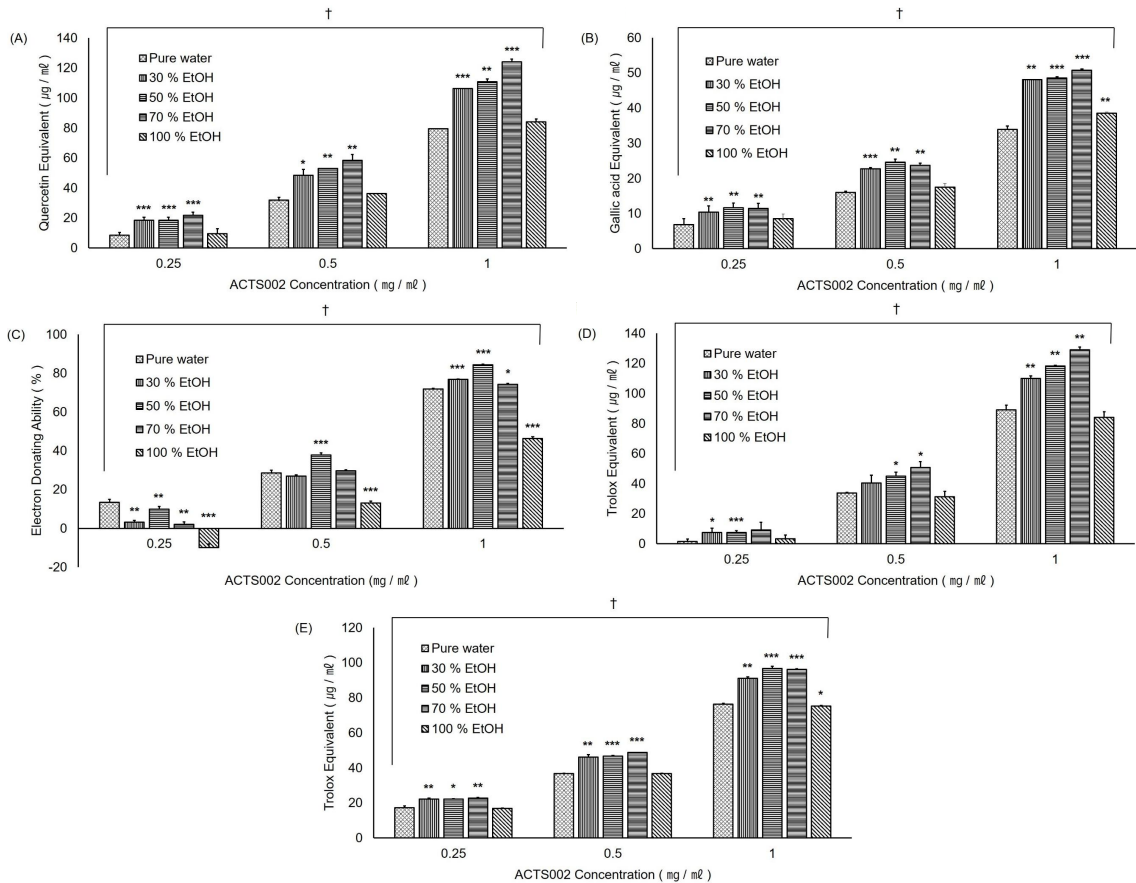


Fig. 5. Antioxidative activities of ACTS002.

EtOH : Ethyl alcohol

(A) total flavonoids, (B) total phenolic compounds, (C) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, (D) 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, (E) ferric reducing antioxidant power

Antioxidant experiments were expressed as equivalents for each control group (Mean±SD).

Statistically significant value increased with concentration in ANOVA two-sided test († : p<0.05).

Statistically significant value compared with Pure water group by Student t-test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

#### IV. 고찰

한방에서 가장 많이 사용되는 제형은 탕약이다<sup>30</sup>. 전통적으로 주수상반 등 알코올이 첨가되어 열을 가하는 방법들이 있지만 대부분은 그냥 물을 이용한 열수추출이다. 열수추출은 유기용매를 사용하지 않기 때문에 안전하며 이 때문에 보편적으로 사용

되고 있다. 하지만 한약재의 종류에 따라 적합한 유기용매를 사용하면 물에서 추출되지 않는 유효성분을 더 추출할 수 있으며<sup>31</sup> 반대로 물에서 추출되는 무효물질들의 양을 줄일 수도 있다. 이에 본 연구에서는 ACTS002의 효율적인 추출법을 정립하기 위하여 추출용매에 따른 수율을 계산하였고, 5-HMF, Paoniflorin, Ferulic acid를 정량분석 하



였으며, Total flavonoids, Total phenolic compounds, DPPH, ABTS, FRAP를 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.

추출용매별로 수율에서 차이를 보였다. 100% 주정 추출물을 제외한 나머지는 수율이 유의적인 차이가 있지는 않았으나 100% 주정 추출물은 수율이 19%로 가장 낮게 나타났다. 최 등은 사물탕을 약재별로 물과 주정으로 추출한 경우 숙지황만 수율의 차이를 보이고 나머지 백작약, 천궁, 당귀는 수율의 차이를 보이지 않는다고 보고하였다<sup>32</sup>. 추출용매에 따라 수율의 차이가 있는 것으로 보아 숙지황에 비극성 성분보다 극성 성분이 다량 포함되어 있는 것으로 보여지며, 본 연구의 수율의 차이도 숙지황 및 배합된 약재의 영향이 있을 것으로 사료된다.

5-HMF 정량분석 결과 100% 주정, 증류수 추출물 순으로 함량이 높지만, ACTS002의 총량 20 g 기준으로 총 함량을 계산했을 때 증류수 추출물이 10.075 µg/6.5 g, 100% 주정 추출물이 10.032 µg/3.8 g으로 비슷한 함량을 보였다. 이 결과는 5-HMF의 추출 함량에는 차이가 없고, 이외의 성분들에 차이가 있는 것으로 보여진다. 김 등은 숙지황에 5-HMF가 0.84 mg/g이 함유되어 있다고 하였다<sup>33</sup>. 본 연구에서 이보다 훨씬 적은 양의 5-HMF가 추출되었지만 지표성분으로서 분석하기에는 무리가 없는 충분한 양이었으며, 추출용매와 추출시간 등의 차이에 의해 이러한 결과가 보여진 것으로 사료된다. Paeoniflorin 정량분석 결과 100% 주정, 70% 주정 추출물 순으로 g당 함량이 높지만 약 2배 정도 차이를 보였고, 증류수 추출물이 g당 함량이 가장 낮았다. ACTS002의 총량 20 g 기준으로 총 함량을 계산했을 때 100% 주정 추출물이 60.914 µg/3.8 g, 증류수 추출물이 43.03 µg/6.5 g이었다. 이 결과는 Paeoniflorin의 추출은 비극성 용매에서 용이한 것으로 보여진다. 다만, 증류수와 주정을 혼합한 추출물은 비극성 용매의 비율이 높아질수록 Paeoniflorin의 함량이 비례하여 증가하지 않았다. 사물탕에서는

Paeoniflorin이 19.4±0.41 µg/g이 함유되어 있다는 연구 결과가 있다<sup>34</sup>. 본 연구에서의 함량을 비교했을 때 비슷한 정도로 올바르게 추출되었음을 확인할 수 있었다. Ferulic acid 정량분석 결과 Paeoniflorin과 동일하게 비극성 용매에서 추출이 용이한 것으로 보여지고, 증류수와 주정을 혼합한 추출물은 비극성 용매의 비율이 높아질수록 Ferulic acid의 함량이 비례하여 증가하지 않았다. 총 세 가지의 정량분석을 통하여 100% 주정으로 추출했을 때 지표성분의 함량이 높은 것으로 나타났다.

총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 70% 주정, 50% 주정 추출물 순으로 함량이 높았고, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 총 페놀화합물 함량을 측정한 결과 50% 주정, 70% 주정 추출물 순으로 함량이 높았고, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 50% 주정, 30% 주정 추출물 순으로 활성이 높았고, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 당귀, 천궁, 백작약을 동일 무게 비율로 혼합하여 열수추출한 생약복합물 HIM-1은 100, 200, 400 µg/ml의 농도에서 각각 24.3, 43.4, 72.5%의 전자공여능을 나타냈다는 연구 결과가 있다<sup>35</sup>. 생약복합물 HIM-1은 ACTS002의 증류수 추출물보다 높은 전자공여능을 나타내는데, 이는 약재의 총량 및 추출 시간, 배합조건 등의 차이에서 나타나는 결과로 보여진다. ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 70% 주정, 50% 주정 추출물 순으로 활성이 높았고, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. FRAP를 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과 70% 주정, 50% 주정 추출물 순으로 활성이 높았고, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

페놀류와 플라보노이드류는 식물에 함유되어 있는 페놀성 화합물로 항산화, 항균, 항알러지 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으므로<sup>36</sup>, 항산화 활성을 측정하는데 이용되고 있다. DPPH 라디칼 소거 활성은 비교적 안정한 자유 라디칼인 DPPH가

환원되면서 흡광도가 변화하는 원리를 이용한 방법으로, 천연물 추출물의 항산화 활성을 측정하는데 많이 이용되고 있다<sup>37</sup>. ABTS 라디칼 소거 활성은 ABTS<sup>+</sup>가 환원되면 투명색으로 가까워지면서 흡광도가 변화하는 원리를 이용한 방법이다. FRAP는 낮은 pH에서 Fe<sup>3+</sup>가 환원되면서 흡광도가 변화하는 원리를 이용한 방법으로, 주로 혈청의 항산화력 측정에 사용되며 간단하고 단시간 내에 측정이 가능하지만 다른 방법에 비해 정확도가 상대적으로 떨어진다. 이러한 기법으로 항산화 활성을 비교한 결과 50% 주정과 70% 주정으로 추출했을 때 항산화 활성이 상대적으로 높은 것을 확인하였다. 항산화 활성은 생리활성의 정도를 예측할 수 있는 활성물질의 확인시험으로 위와 같은 결과를 보았을 때 ACTS002는 농도 의존적인 생리활성을 가진다. 본 연구에서는 ACTS002를 50%와 70% 주정으로 추출하는 것이 유효성 면에서 가장 효율적인 것을 확인할 수 있었다. 또한 이렇게 추출하였을 때 해당 약재들의 지표성분을 분석하기에 문제가 없음을 확인할 수 있었다.

ACTS002의 유효물질 및 그에 해당하는 분획의 연구 등을 추가로 진행하여 유효성을 더 높힐 필요가 있다. 또 본 연구에서 진행된 항산화 활성은 세포실험 또는 동물실험 차원에서의 실험이 아니므로 임상적용하기에 한계가 있다. 이에 추가적으로 세포실험과 동물실험을 진행하여 세부적인 효능과 그에 해당하는 기전에 대한 연구가 필요하다. 추가적인 연구들이 지속적으로 진행된다면 ACTS002는 한방산업에서 검증된 약이 될 수 있을 것이며 이러한 움직임으로 우리 전통적인 한약이 표준화, 과학화로 나아가게 되기를 기원한다.

### 참고문헌

1. Kim SH. Clinical Comparison with Drug Sensitivities by the Human Tumor Clonogenic Assay. *J Korean Cancer Assoc* 1989;21(1):11-8.
2. Park CG, Lim DK, Kook YH, Cha CR, Paik CG. In Vitro Chemosensitivity of Doxorubicin on Human Cancer Cell Lines. *J Korean Cancer Assoc* 1990;22(1):61-6.
3. Willson JKV, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, Weese JL. Cell Culture of Human Colon Adenomas and Carcinomas. *Cancer Res* 1987;47(10):2704-13.
4. Yang GH, Jeong HW, Choi JH. Effects of Naetakcheonkeumsan and It's Gamypang on the Lymphocytes and Cancer cells. *The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology* 2000;13(1):44-59.
5. Kim JH, Lee JK, Seo CS, Ha HK, Lee HY, Jung DY, et al. Analysis of Studies on Samul-tang for Fundamental Establishment of Evidence Based Medicine. *J Physiol & Pathol Korean Med* 2009;23(4):779-88.
6. Cho BW, Lee KS, Song BK. Effects of A Constituent Herbs of Samul-tang on Antithrombosis and Antistress. *J Oriental Gynecol* 1999;12(2):41-74.
7. Kim SH, Oh H, Lee SE, Jo SK, Byun MW. Effect of Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang on the Survival of Jejunal Crypt Cells and Hematopoietic Cells in Irradiated Mice. *Korean J Food Sci Technol* 1998;30(4):888-94.
8. Lee YC, Jeon BH. Study on the Anticancer Effect of Samultang and Sagoonjatang with Semen Tigllii Extract on Human Cancer Cell Lines and Sarcoma 180. *J of Oriental Med Pathol* 1994;9(1):79-100.
9. Seo CS, Ha HK, Jung DY, Lee HY, Shin HK. Evaluation of the Immune-Stimulating Activity of Samul-tang, a Traditional Korean Herbal Medicine, Standardized by HPLC-PDA. *The Journal of Korean Oriental Medicine* 2011;32(3):25-34.

10. Lee CK, Seo JM. Changes of the Constituents in the Rehmanniae Radix Preparata during Processing. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33(10):1748-52.
11. Kim NY, Jang HK, Yang KH, Lee KJ, Kim MR. Antioxidant Activities and Quality Characteristics of Jelly Added Rehmannia Radix Preparata Concentrate. *J East Asian Soc Dietary Life* 2011;21(6):814-22.
12. Song DS, Woo KS, Seong NS, Kim KY, Jeong HS, Lee HB. Changes in Quality of Rehmanniae radix Preparata with Heating Conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007;36(6):773-8.
13. Park SG, Lee MJ, Jung HJ, Lee HS, Kim H, Na ST, et al. Preventive Effects of Peony Root Extracts on Oxidative Stress, Thrombosis and Atherosclerosis. *J Korean Oriental Med* 2009;30(2):88-103.
14. Tanaka T, Kataoka M, Tsuboi N, Kouno I. New Monoterpene Glycoside Esters and Phenolic Constituents of Paeoniae Radix, and Increase of Water Solubility of Proanthocyanidins in the Presence of Paeoniflorin. *Chem Pharm Bull* 2000;48(2):201-7.
15. Kang SS, Kim JS, Kim EM, Yun-Choi HS. Platelet Anti-Aggregation of Paeony Root. *Kor J Pharmacogn* 1991;22(4):215-8.
16. Kim YE, Lee YC, Kim HK, Kim CJ. Antioxidative Effect of Ethanol Fraction for Several Korean Medicinal Plant Hot Water Extracts. *Korean J Food & Nutr* 1997;10(2):141-4.
17. Ro HS, Ko WK, Yang HO, Park KK, Cho YH, Lee YE, et al. Isolation of Hyperlipidemic Substances from Methanol Extract of Paeonia Radix. *J Kor Pharm Sci* 1999;29(1):55-60.
18. Oh YJ, Seo HR, Choi YM, Jung DS. Evaluation of Antioxidant Activity of the Extracts from the Aerial parts of Cnidium officinale Makino. *Korean J Medicinal Crop Sci* 2010;18(6):373-8.
19. Kwak DH, Kim JK, Kim JY, Jeong HY, Keum KS, Han SH, et al. Anti-angiogenic activities of Cnidium officinale Makino and Tabanus bovinus. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 81(3):373-9.
20. Lee JH, Choi HS, Chung MS, Lee MS. Volatile Flavor Components and Free Radical Scavenging Activity of Cnidium officinale. *Korean J Food Sci Technol* 2002;34(2):330-8.
21. Kim JM, Son D, Lee P, Lee KJ, Kim H, Kim SY. Ethyl Acetate Soluble Fraction of Cnidium officinale MAKINO Inhibits Neuronal Cell Death by Reduction of Excessive Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Treated Rat Hippocampal Slice Cultures and Microglia Cells. *J Pharmacol Sci* 2003;92(1):74-8.
22. Choi HS, Lee Kim MS, Sawamura M. Constituents of the essential oil of cnidium officinale Makino, a Korean medicinal plant. *Flavour Fragr J* 2002;17(1):49-53.
23. Lee EJ. Control of Citrus Blue Mold and Chili Pepper Anthracnose by Ligustilide, an Antifungal Compound from Cnidium officinale Makino. *MS Thesis, Seoul National University* 2004.
24. Kim HS, Joung SW. Effective Components and Nitrite Scavenging Ability of Root and Leaves a Angelica gigas Nakai. *Korean J Food Cookery Sci* 2006;22(6):957-65.
25. Kim MS, Oh YJ. An Investigative Analysis of Preference and Uses for the Angelica gigas Nakai- Focused on the consumer in the Seoul and Kyunggido Area-. *J East Asian Soc Dietary Life* 2009;19(5):783-90.
26. Liu SP, Dong WG, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Protective effect of angelica sinensis polysaccharide

- on experimental immunological colon injury in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9(12):2786-90.
27. Lee DY, Choi BS, Lee IH, Kim JH, Gwon PS. Comparison of Index Compounds Content and Antioxidative Activity of Wild Ginseng Pharmacopuncture by Extraction Methods. *J Int Korean Med* 2018;39(3):313-22.
28. Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh SH. Standard food analysis. Seoul: Jigu-moonwha Sa: 2002, p. 381-2.
29. Kim NM, Sung HS, Kim WJ. Effect of Solvents and Some Extraction Conditions on Antioxidant Activity in Cinnamon Extracts. *Korean J Food Sci Technol* 1993;25(3):204-9.
30. Kim YH, Kim SH, Chang HJ, Park JK, Jeong MY, Park YS. Survey on the Preference Formula for the Improvement of Oriental Herbal Medicine Insurance. *Kor J Herbology* 2009;24(4):17-23.
31. Jin SE, Seo CS, Ha HK, Lim HS, Kim YJ, Jeon WY, et al. Comparative Study on Biological Activities and Ingredient Contents of Different Solvent Extracts of *Samchulkunbi-tang*. *Kor J Pharmacogr* 2012;43(4):328-37.
32. Choi MA, Kim ML, Park CS. The Antibacterial and Antioxidative Activities of Samultang Ingredient Extracts. *Korean J Food Cookery SCI* 2008; 24(1):52-8.
33. Kim IR, Hwang KH, Joo HJ, Ma JY. The studies about cutting, processing and decocting methods of oriental medicinal plants II : Rehmanniae Radix Preparata. *Korean J Ori Med* 1998;4(1):115-27.
34. Lim EM, Jang JB, Lee KS, Song BK. Experimental studies on Samultang and herbal compositions in Samultang. *Journal of KyungHee Oriental Medicine Colleg* 1998;21(1):409-32.
35. Park HR, Kim SH, Yee ST, Byun MW, Jo SK. Effect of a Herb Mixture (HIM-1) on the Protection of the Hematopoietic-Immune System and Self-renewal Tissues against Radiation Damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005; 4(5):605-12.
36. Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, et al. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem* 1999;47(10): 3963-9.
37. Lee JM, Chung H, Chang PS, Lee JH. Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry* 2006;103(2):662-9.