

煎湯에 의한 黃芩의 成分 移行率에 관한 研究 I

고 병섭* · 주 혜정* · 마 진열** · 박 갑주*** · 안 상우****

Studies on Availability of Components in Extract of *Scutellariae Radix* by Boiling water Method

Byoung-Seob KO and Hye-Jeong Joo

Department of Herbal Medicine, KIOM

Jin-yeul Ma

Department of General Laboratories, KIOM

Kap-Joo Park

Department of Basic Research, KIOM

Sang-Woo Ahn

Department of Clinical Research, KIOM

In order to improve the qualities of boiling extract the availability of standard compounds was investigated in extract of *Scutellariae Radix*. The standard compounds used baicalin(1), baicalein(2), and wogonin(3). The availabilities were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography(HPLC) on C₁₈ column. The extract of RS-4(W/V=10g/100ml) showed the highest availabilities as 7.95% of baicalin(1), 1.04% of baicalein(2), and 0.31% of wogonin(3).

【Key Words】 Availability, Baicalin, Baicalein, wogonin, Glucronide, Aglycon, Baicalinase

I. 서론

한약은 전통적으로 전탕(煎湯)하여 탕제로 복용하는 방법이 대부분을 차지하고 있고, 경우에 따라서는 주(酒)를 사용한다든지, 산(散)이나 환(丸)으로하여 복용하는 방법 등이 있는데, 탕제를 만드는 전래의 전탕법에서는 처방에 따라 수량이나 전탕방법이 자

* 한국한의학연구소 한약연구부 한약제제연구실

** 한국한의학연구소 공동실험실

*** 한국한의학연구소 기초연구부 기초이론연구실

**** 한국한의학연구소 임상연구부 임상연구실

Corresponding author; B-S Ko

세히 기재되어 있다. 醫方類聚의 總論一 千金方에서 論合和을 보면 “問曰 凡 和合湯藥 治諸草石蟲獸 用水升數 消殺之法則云何”라고 하였으며,^{1), 2)} 東醫寶鑑 湯藥篇의 湯液序 例에서 煮藥法을 보면 약재의 양에 대한 수량이 기재되어 있다.^{3), 4)} 또한, 傷寒論에서는 수량과 전탕방법등에 대해 기술하고 있지만 그 기준이 각각의 방제에 따라 다르고,^{5), 6)} 당시의 도량법도 오늘날과는 많은 차이가 있다.

탕제를 만드는 전래의 방법으로는 銀石器(土器)로 된 약탕기를 이용하였는데, 세심한 주의와 복잡한 단계 그리고 인력이 필요하기 때문에 일반가정이나 임상가에서는 전통적인 약탕기를 기피하고 있어 개량된 약탕기가 보급되어 있고, 전탕액을 만들 때 일반적으로 “한약재가 물에 다 잠기고 약재부피에 약2~3배의 물을 넣고 끓이는데, 물이 반량(半量)이 되면 가열을 멈춘다”라는 기준에서 운용되고 있다. 이러한 방법의 기준은 “전래의 한의서에 근거하지 않고도 효과가 있다”라는 경험적인 것으로 과학적인 비교도 없어 그 기준이 불명확하다.

탕제의 유효성은 처방을 구성하는 한약재의 성분에 의해서 좌우되는데, 탕제중에 이행하는 각성분의 비율(移行率)은 열수에 의한 용해도, 팽윤하여진 생약잔사에 의한 보지흡착(保持吸着), 수증기에 의한 휘산, 전탕과정중 분해, 성분상호간의 반응등 각각의 성분 고유의 물리·화학적 특성과 생물학적인 효소의 영향 및 전탕에 사용되어진 장치·방법에 의한 손실로서 그 요인을 크게 나눌수 있다.

한약재는 자연적 조건에서 생산되는 천연물로서 여러성분으로 구성되어 있는데, 일반적으로 비슷한 물리·화학적 특성을 가진 성분들은 未知 혹은 既知의 화합물로 되어 있더라도 제제가공 공정에서 동일한 거동을 나타내며 동등한 비율로서 제제중에 이행된다고 생각되어진다. 제제공정의 효율과 재현성의 문제에서 이러한 이행을⁷⁾은 매우 중요한 변수로 작용하는데, 특히 탕제는 한약재의 양과 물 그리고 온도가 이행율에 많은 영향을 줄 수 있는 인자라고 생각되어 진다.

본연구에서는 전탕법에 대한 기초적 연구로서 한약재의 양과 수량에 대한 상관관계를 비교하기 위해 황금에서 지표성분을 설정하여 환류식 전탕액과 전기식 전탕액의 성분 이행율을 조사하였고, 전탕액을 동결건조한 분말과 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 기기

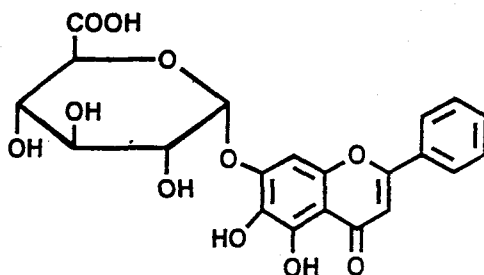
본실험에 사용한 황금(*Scutellariae Radix*)은 금년 3월에 경동시장의 국산한약재 전시장에서 구입한 것(생산지: 봉화)을 사용하였다. 지표성분으로 사용한 표준시약은 baicalin(1), baicalein(2), wogonin(3)을 선정하여 Wako社에서 시판하고 있는 생약시험용을 사용하였다. 박층크로마토그래피(TLC)는 Merck社의 RP₁₈F₂₅₄S(20×20cm, thickness 0.25mm)를 사용하였다. 여과용 필터는 Toyo No. 2와 Nalgene membrane 0.45 μm를 사용하였다. 전기식 약탕기는 대용 DWP 9000T를 사용하였다. pH meter는

Fisher社의 P/N 201400을 사용하였고, 고속액체크로마토그래피(HPLC)는 Thermo社의 제품으로 펌프는 P4000, 검출기는 UV1000, 그리고 자동시료주입기는 AS3500으로 구성된 Spectra System^R을 사용하였다.

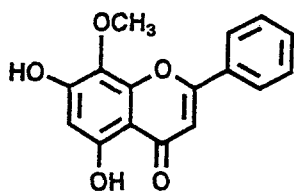
2. 시료의 조제

1) 냉수추출(RS-1); 100mesh로 만든 황금가루10g에 증류수를 100ml넣고 진탕배양기를 이용하여 25℃에서 2시간동안 흔들여 주었다. 원심분리(4000×g, 20분)하여 상등액을 정성여과지 No. 2위에 celite를 깔고 여과하였다. 여과액을 냉장고(4℃)에서 방치 후 침전물을 제거하고, 0.45 μ m membrane 필터로 여과한 후 총부피를 황금 10g당 250ml비율로 하여 시료로 사용하였다.

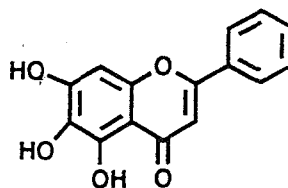
黄芩(*Scutellariae Radix*, 봉화)



Baicalin



Wogonin



Baicalein

2) 환류식 전탕; 환류냉각기가 부착된 플라스크속에 100mesh로 만든 황금가루10g에 대해 증류수를 각각 50ml(RS-2), 70ml(RS-3), 100ml(RS-4), 150ml(RS-5)를 넣고 마그네틱각반기로 저어주면서 서서히 열을 가해서 환류시켰다. 2시간동안 환류하여 전탕액이 약 40℃가 될때까지 방치 후, 원심분리(4000×g, 20분)하여 상등액을 정성여과지

No. 2위에 celite를 깔고 여과하였다. 여과액을 냉장고(4℃)에서 방치후 침전물을 제거하고, 0.45 μ m membrane 필터로 여과한 후 총부피를 황금 10g당 250ml비율로 하여 시료로 사용하였다.

3) 전기식 전탕; 시중에서 시판되고 있는 전기식 약탕기에 잘게 썰은 황금 100g과 증류수 1000ml(RS-6)를 넣고 2시간 전탕한 후, 2시간동안 환류하여 전탕액이 약 40℃가 될 때까지 방치 후, 원심분리(4000 \times g, 20분)하여 상등액을 정성여과지 No. 2위에 celite를 깔고 여과하였다. 여과액을 냉장(4℃)에서 방치후 침전물을 제거하고, 0.45 μ m membrane 필터로 여과한 후 총부피를 황금 10g당 250ml비율로 하여 시료로 사용하였다.

4) 분말시료의 조제(RS-7); 시료로 만들어진 RS-4를 동결건조기에서 수분을 완전히 건조하여 시료로 사용하였다.

3. 정량 및 정성분석

3-1. 표준액의 조제

지표성분으로 선정된 baicalin(1), baicalein(2), wogonin(3)을 각각 1mg씩 정확히 칭량하고 메칠알콜 10ml에 녹여 사용하였다.

3-2. HPLC의 조건

칼 램; Alltech Alphasbond C₁₈ 125A 10U

이동상; MeOH : 0.1M Phosphate buffer(pH 2.3) = 55 : 45

유 속; 1ml/min

온 도; 30℃

검출기; UV 254nm

주입량; 20 μ l

3-3. TLC의 조건

박 층; Merck RP₁₈F₂₅₄S(20 \times 20cm, thickness 0.25mm)

전개용매; MeOH : 0.1M Phosphate buffer(pH 2.3) = 55 : 45

검 출; UV 254nm, 20% H₂SO₄

4. pH측정 및 산·염기에 의한 변화

4-1. pH측정

pH를 측정하기전에 pH보정용 pH 4.0과 pH 7.0 완충용액으로 pH meter를 보정하고 시료를 측정하였고 측정온도는 25℃로 고정하였다.

4-2. 산·염기에 의한 변화

pH meter가 설치된 비이커에 시료 25ml를 넣고 25℃에서 1N HCl과 1N NaOH로 뷰렛을 이용하여 적정하여 색이 변하는 점에서 pH를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

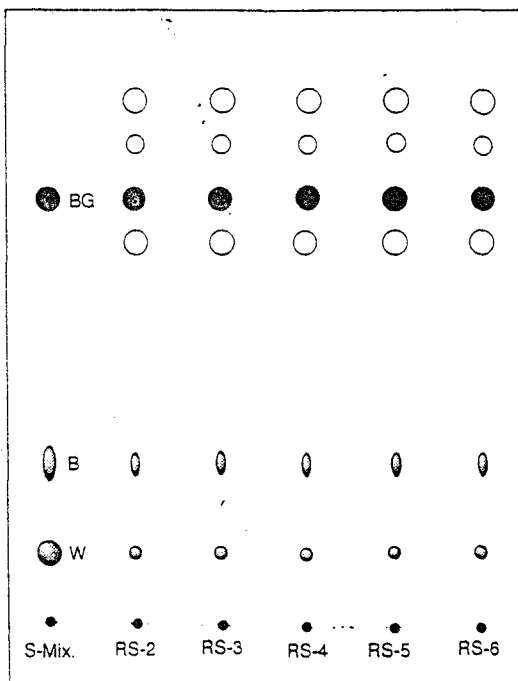
황금중에는 flavonoid유도체인 baicalin(1), baicalein(2), wogonin(3) 등이 있고, 그 밖에 oroxylin-A(4), oroxylin-A-glucronide(5), wogonin glucronide(6) 등도 함유하고 있는데, 가장 많은 양을 함유하고 있는 gluconide인 baicalin(1)과 aglycon구조를 하고 있는 baicalein(2), wogonin(3)을 지표성분으로하여 황금의 성분 이행율을 조사하였다.

Fig 1.은 냉수추출액(RS-1)과 환류식 전탕액(RS-2~RS-5) 그리고 전기식 전탕액(RS-6)의 TLC이고 Fig 2.는 냉수추출액 RS-1의 HPLC와 시간의 경과에 따른 TLC이다. RS-2~RS-6는 UV 254nm에 의해 네개의 스포트가 각각 Rf 0.41, 0.38, 0.12, 0.05에서 나타났다. 지표성분으로 사용되어진 baicalin(1), baicalein(2) 및 wogonin(3)은 UV 254nm에서 Rf가 각각 0.41, 0.12, 0.05로 관측되었다. RS-1은 UV 254nm에서 Rf가 0.45, 0.38, 0.14, 0.08인 네개의 스포트가 관측되었는데, 이들은 지표성분의 Rf와 차이가 있으나 비슷한 위치에 있어서 20% H₂SO₄와 I₂로 발색시킨후 확인한 결과 지표성분인 baicalin(1), baicalein(2) 및 wogonin(3)은 전혀 발색이 되지 않았는데, 20% H₂SO₄에 의해 Rf 0.67 e에서 적자색과 Rf 0.45 d에서 짙은녹색, 그리고 Rf 0.08 a에서 짙은녹색으로 발색되었고, I₂에서 Rf 0.14 b에서 갈색으로 발색되었다. 이들 TLC에 의한 정성분석 실험 결과에서 보면, 냉수에 의해 지표성분들이 추출되지 않았는데, 이 결과는 온도가 성분의 移行率에 영향을 주는 중요한 인자임을 암시하였다.

RS-1의 시간의 경과에 따른 성분변화를 실험한 TLC의 결과는 H. Itokawa⁷⁾가 발표한 결과와 일치하지 않았다. 章⁹⁾이 황금중에는 flavonglucronide의 분해효소 baicalinase가 있다고 발표하였는데, H. Itokawa는 전제(煎劑)의 제조에 의한 성분의 화학적 변동에 대한 연구의 일환으로서 메칠알콜과 냉수에 의한 황금 추출액의 성분변동을 조사하였는데 냉침(冷浸)했을 때 시간이 경과함에 따라 baicalinase의 분해반응에 의해 glucronide화합물 양이 적어지면서 180분 후에는 aglycon화합물만 검출되었지만 메칠알콜추출에서는 효소에 의한 분해 반응이 일어 나지 않았다고 보고하였고, 煎劑에서도 baicalinase의 분해반응이 일어난다고 보고하고 있다. 또한, 황금탕, 황연해독탕, 소시호탕 등의 방제를 메칠알콜로 추출할 때에 물이 존재하면 비교적 용이하게 효소분해반응이 일어난다고 하였다. 효소화학적 측면에서 고찰해 보면 효소반응은 기질과 효소의 양, 온도, pH, 그리고 반응시간에 많은 영향을 받는다. 황금탕 등의 방제를 메칠알콜로 추출할 때에 물이 존재하는 것에서 효소활성이 있는 것은 방제성분간의 화학적 교섭과 알콜계 용매에서 탄소원 대신 알콜을 영양원으로 이용하여 효소반응이 일어난다는 보고와 연관성이 있는 것으로 사료 되지만, 전제를 제조할 경우 일반적으로 용매인 물의 온도가 100℃에서 2시간정도 환류하기 때문에 효소가 활성을 잃어 aglycon화합물의 형성을 저지 할 것으로 생각된다.

RS-1의 시간의 경과에 따른 성분변화 실험에서 TLC의 결과는 특이할 만한 변화가 일어나지 않았다. Fig 2.에서 HPLC의 각 성분 보지시간(Rt)이 2.97, 3.63, 3.93, 6.35, 6.65

로 Area%가 각각 29.8, 40.82, 26.94, 0.24, 2.17로 전탕액 및 지표성분들의 HPLC(Fig 3.)와는 다른 양상을 보여주고 있으며, 주종을 이루는 Rt 2.97, 3.63과 3.93은 식물색소에서 유래한 화합물로 추측되어진다. 이러한 사실은 TLC에 의한 20% H₂SO₄의 발색실험에서 Rf 0.67 e에서 적자색의 형성은 식물색소 유래의 화합물임을 암시해 주고 있다.



BG: Baicalin, B:baicalein, W:wogonin

Fig 1. TLC of Extract of *Scutellaria Radix* by Boiling Water Method

전탕액과 지표성분의 HPLC는 Fig 3.이고, Fig 4.는 검량선을 나타낸 그래프이다. 지표성분인 baicalin(1), baicalein(2) 및 wogonin(3)은 각각 Rt 4.646, 8.620, 12.526이었고, 검량선은 직선상으로 baicalin(1)이 $Y=0.00314x+2.0$ 과 baicalein(2)이 $Y=0.00174x+7.0$ 그리고 wogonin(3)이 $Y=0.00198x+6.0$ 의 관계식을 나타냈다.

추출방법에 의한 이행율의 결과는 Table 1에 정리하였다. 이행율을 계산하기 위해서 황금 1g당 지표성분의 함량을 mg으로 나타냈고, 함량의 계산은 아래의 식으로 계산하였다. X는 평균값을 백분율로 나타낸 수치이다.

$$T(\text{mg}) = Sa(\text{mg/ml}) \times Ac/As \times 1/W(\text{mg/ml})$$

T; 황금 1g에 포함된 지표성분의 함량

Sa; 외부표준물질의 양

C; 검체시료의 면적

S; 외부표준물질의 면적

W; 검체시료의 주입량

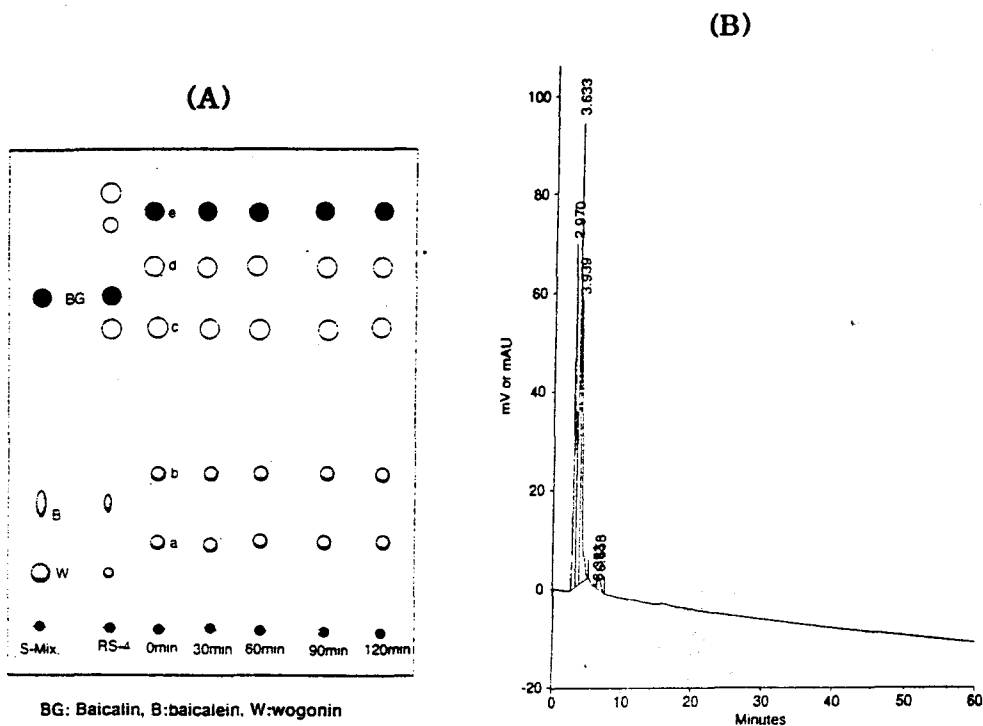


Fig 2. TLC(A) and HPLC(B) of Extract of *Scutellaria Radix* by Cold Water Method

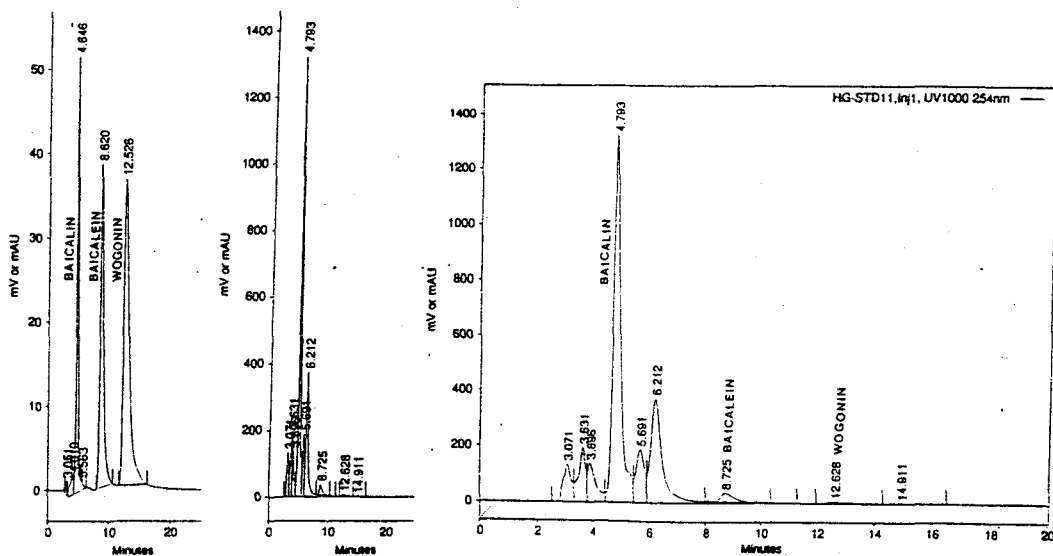


Fig 3. HPLC Chromatogram of Extract of *Scutellaria Radix* by Boiling Water Method

이행울의 결과에서 한약재의 양과 물의 비율이 10g/100ml(RS-4)인 경우에 baicalin(1), baicalein(2), wogonin(3)이 각각 7.95%, 1.04%, 0.31%로 가장 함유량이 많았고,

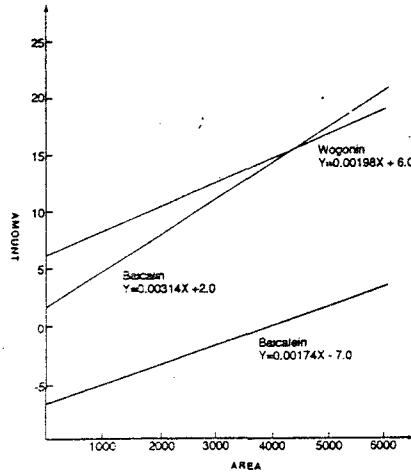


Fig 4. Calibration Curve of Baicalin, Baicalein, and Wogonin

Table 1. Availability of Baicalin, Baicalein, and Wogonin in Extract of *Scutellaria Radix*

<i>Scutellaria Radix</i>		Content(mg/g)						
Compound	Time (n=5)	RS-1	RS-2	RS-3	RS-4	RS-5	RS-6	RS-7
		Baicalin	1	-	25.23	51.25	78.38	47.97
2	-		26.32	51.05	80.58	48.67	55.82	39.53
3	-		24.11	50.39	80.25	49.12	56.91	41.21
4	-		25.51	49.98	79.95	47.82	57.01	40.97
5	-		25.82	50.12	78.30	48.12	55.32	39.91
X(%)	-		2.54	5.06	7.95	4.83	5.62	4.04
Baicalein	1	-	0.97	2.67	10.59	2.39	1.67	1.57
	2	-	1.66	2.46	10.59	2.67	1.52	1.57
	3	-	1.11	2.53	10.12	2.85	1.73	1.62
	4	-	0.92	2.65	9.97	3.01	1.76	1.51
	5	-	0.94	2.58	10.81	2.21	1.69	1.49
	X(%)	-	0.11	0.26	1.04	0.26	0.17	0.16
Wogonin	1	-	0.32	0.71	3.12	0.51	0.45	0.26
	2	-	0.30	0.64	3.12	0.58	0.39	0.26
	3	-	0.35	0.68	3.33	0.49	0.48	0.31
	4	-	0.41	0.59	3.02	0.53	0.51	0.27
	5	-	0.29	0.77	2.97	0.63	0.42	0.29
	X(%)	-	0.03	0.07	0.31	0.06	0.05	0.03

RS-1: 10g/100ml(25°C), RS-2: 10g/50ml, RS-3: 10g/70ml, RS-4: 10g/100ml,

RS-5: 10g/150ml, RS-6: 100g/1000ml(Electric Brewing pot), RS-7 Dried Powder

10g/50ml(RS-2)인 경우에 가장 지표성분의 이행율이 낮았으며, 10g/70ml(RS-3)과 10g/150ml(RS-5)에서는 비슷한 정도의 이행율을 보여 주었다. 그리고, 전기식 전탕액인 RS-6는 RS-3와 RS-5와 비슷한 정도의 이행율을 보이고 있는데, 이는 수증기에 의한 揮散과 사용되어진 전기식전탕기의 손실이라고 생각되어진다. 분말시료 RS-7는 RS-4를 동결건조한 것으로 HPLC에 의한 지표성분의 정량에서 baicalin(1), baicalein(2), wogonin(3)이 각각 4.04%, 0.16%, 0.03%로 RS-4와는 현저한 차이가 있는데, 이 결과는 분말과 전탕액의 현저한 성분의 함량 차이를 보여주는 흥미로운 것으로, 액기스제에서 논란이 되고 있는 약효와도 관계가 있다고 생각되어진다.

Table 2는 pH변화에 따른 영향을 조사한 결과이며 변색하는 점에서 pH를 측정할 값인데, RS-1은 산성일수록 색이 옅어지며(pH 5.19에서는 액이 색깔이 노란색을 띠는 녹색인데 pH 1.93이 되면 옅은 노란색), 알카리성으로 진행할수록 짙은 노란색이 되면서 pH 11.03에서 침전이 발생하였다. RS-2~RS-5에서는 RS-2는 액의 색이 변하는 적정

Table 2. Effects of pH on Extract of *Scutellaria Radix*

Sample	1N HCl		1N NaOH	
	Titre	pH/Color	Titre	pH/Color
SR-1	0.91ml	5.19(yellow & green) ↓ 1.93(light yellow)	0.25ml	5.19 ↓ 8.04(dark yellow)
SR-2	0.90ml	5.56(yellow) ↓ 2.64(light yellow)	0.98ml	5.58 ↓ 8.95(dark yellow)
SR-3	0.50ml	5.50(yellow) ↓ 3.42(light yellow)	0.96ml	5.50 ↓ 9.13(dark yellow)
SR-4	0.56ml	5.56(yellow) ↓ 3.45(light yellow)	0.82ml	5.56 ↓ 8.65(dark yellow)
SR-5	0.62ml	5.60(yellow) ↓ 3.50(light yellow)	1.00ml	5.59 ↓ 8.51(dark yellow)

RS-1: 10g/100ml(25°C), RS-2: 10g/50ml, RS-3: 10g/70ml,
RS-4: 10g/100ml, RS-5: 10g/150ml.

점의 pH변화가 2.64, 8.95로 RS-3~RS-5와 다른 양상을 보이고 있는데, 이는 RS-2의 이행율에 밀접한 관계가 있다고 생각되어진다. RS-2~RS-5는 알카리성으로 진행할수

록 적자색(pH 11.55)으로 변했고, 산성으로 진행할수록 침전(pH 1.92)이 발생하였다. pH에 따른 영향의 결과에서 냉수추출액 RS-1은 전탕액 RS-2~RS-5과는 다른 성분임을 입증해 주고 있으며, 또한 성분의 추출에 있어서 온도가 이행율에 관여하고 있는 간접적 증거를 제시하고 있다고 생각되어 진다.

전탕액을 제조할 때 여러 가지 조건이 물리·화학적 혹은 생물학적으로 관여한다고 생각되어 지는데, 현재 통일된 방법은 없다. 일본약국방¹⁰⁾에서는 1회분의 방제에 물 600ml을 넣고 30~60분간 전탕하여 전탕액이 300ml가 되도록 조제하고 있으나 여기에 대한 논란이 아직도 많이 제기되고 있어, 이러한 문제를 해결하기 위해 지표성분의 개념을 도입하고 있다. 물론, 탕액에서 전성분을 분석하고 비교하는데는 무리이지만 제제의 재현성 및 효율성의 면에서 지표성분의 도입은 어느정도 객관성을 보장할 수 있다고 생각된다. 효능면에서 탕제를 제조하는 것은 매우 중요한 과제로 전래의 도량법과 현재의 도량법의 차이에서 오는 한의서의 해석적인 면에서 약제의 양과 물의 비율, 전탕온도 및 시간을 규격화 시키는 일은 매우 어려운 일이라고 생각되어 지나 보다 양질의 의료를 제공하는 면에서는 중요한 일이라 생각되어 진다.

이상의 실험결과에서 단언하기에는 부족한 점이 있는데, 앞으로 많은 한약제의 개별 실험과 처방에 대한 실험을 통해 효능성, 간편성 그리고 재현성을 확보할 수 있는 전탕의 규격화에 대한 연구가 보다 깊이 병행되어야 한다고 사료된다.

참고문헌

- 1) 世宗大王命撰, 醫方類聚, 朝鮮國集賢殿原撰, 1445, p.總論一 千金方~論合和
- 2) 김례봉, 전순의. 최윤동편찬, 醫方類聚, 여강출판사, 1991, p.8
- 3) 허준, 東醫寶鑑, 1613, p.湯藥篇 湯液序例~煮藥法
- 4) 박인규, 박영규, 한글완역판 동의보감, 학력개발사, 1994, p.1084~1096
- 5) 문요전, 안규석, 김성훈, 엄현섭, 지규용, 김정기, 傷寒論精解, 경희대학교출판부, 1996, p.47~363
- 6) 細谷英吉, 漢方の科學, 東京(日本), 1995, p.73
- 7) 野口衡, 現代東洋醫學, Vol. 3, No. 2, 1982, p.102
- 8) 糸川秀治, 現代東洋醫學, Vol. 8, No. 3, 1987, p.77~81
- 9) 章國鎮, 生藥誌, 34, 1980, p.169
- 10) 原田正敏, 現代東洋醫學, Vol. 8, No. 1, 1987, p.92~99