

쌍화탕과 발효쌍화탕 분획물의 폴리페놀함량 및 항산화 활성

김동선 · 엄영란*, 양민철, 윤나영, 마진열

한국한의학연구원 신한방제제연구센터

Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Fractions from *Ssangghwa-tang* and Fermented *Ssangghwa-tang*

Dongseon Kim · Young-ran Um*, Minchul Yang, Nayoung Yun, Jinyeul Ma

Center for Herbal Medicine Improvement Research

The aim of this study is to compare antioxidant activity and total polyphenol contents between before and after fermentation of *Ssangghwa-tang* according to solvent partition. *Ssangghwa-tang* was fermented with *Lactobacillus fermentum*. *Ssangghwa-tang* and the fermented *Ssangghwa-tang* were fractioned by solvent partition with ethyl acetate, butanol and water. The *Ssangghwa-tang*s and their solvent fractions were evaluated for total polyphenol contents and DPPH radical scavenging activity. The antioxidant activity as well as the total polyphenol contents were highest in each ethyl acetate fraction and significantly ($p < 0.05$) increased after fermentation.

Keywords : *Ssangghwa-tang*, fermentation, fermented *Ssangghwa-tang*, polyphenol, antioxidant activity

I. 서 론

쌍화탕은 동의보감¹⁾ 및 방약합편²⁾에 기록되어 있는 약재로 백작약(*Paeonia lactiflora*), 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 당귀(*Angelica gigas*), 천궁(*Cnidium officinale*)으로 구성된 四物湯과 백작약(*Paeonia lactiflora*), 황기(*Astragalus membranaceus*), 계피(*Cinnamomum cassia*), 감초(*Glycyrrhiza glabra*), 생강(*Zingiber officinale*), 대추(*Zizyphus jujuba*)로 구성된 皇芪建中湯을 합방한 처방이다. 백작약은 작약 *Paeonia lactiflora* Pall. 또는 동속 근연식물의 뿌리로 진경, 향종양, 면역증강작용 등이 있으며 주성분으로 paeoniflorin과 albiflorin 등이 있다. 숙지황은 지황 *Rehmannia glutinosa* 또는 기타 동속 식물의 뿌리를 포제가공한 것으로 말초혈관 순환장애 개선,

항알러지작용, 골형성촉진작용 등이 알려진 바 있으며 주성분으로 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde가 있다. 당귀는 참당귀 *Angelica gigas* Nakai의 뿌리로 진경, 진통 작용, 향종양작용, 뇌세포 보호작용등을 하며 decursin, decursinol angelate, decursinol 등이 주성분이다. 천궁은 천궁의 뿌리줄기를 그대로 또는 열탕에 담갔다가 건조한 것으로 진경, 혈관확장 및 뇌세포보호작용 등을 하며 함유성분으로는 ligustilide, cnidilide 등이 있다. 황기는 황기 *Astragalus membranaceus* Bunge의 주피를 벗긴 뿌리로 강장작용, 면역증강작용, 항염증작용 등을 하며 주성분으로 formononetin, astraisoflavan 등이 있다. 계피는 계피나무 *Cinnamomum cassia* Blume 또는 기타 동속 근연식물의 수피를 그대로 또는 주피를 다소 제거한 것으로 약리효능으로 혈액순환개선작용, 건위 작용, 향종양작용 등이 있으며 주성분으로는 cinnamaldehyde, cinnamyl acetate, cinnamic acid 등이 있다. 감초는 유럽감초 *Glycyrrhiza glabra* L., 만주감초 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 또는 기타 동속식물의 뿌리와 주출경을 그대로 또는 주피를 제거한 것으로 일반적인

* co-first author : 김동선 · 엄영란은 공동 제1저자로 본 논문에 기여한 부분이 동등함

접수 ▶ 2010년 11월 1일 수정 ▶ 2010년 11월 18일 채택 ▶ 2010년 11월 30일
교신저자 마진열, 대전시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원
Tel 042-868-9466 Fax 042-868-9573 E-mail jyima@kiom.re.kr

약리활성으로는 항염증작용, 진경작용, 항궤양작용 등이 있으며 glycyrrhizin, glycyrrhetic acid 등이 주 성분이다. 생강은 *Zingiber officinale* Roscoe의 신선한 뿌리줄기로 발한작용, 건위작용 등을 하며 6-gingerol, zingiberene 이 함유되어 있다. 대추는 대추나무 *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Mill. 또는 기타 동속 근연식물의 열매로 진정작용, 항알러지작용, 뇌신경세포 기능강화작용등을 하며 oleanolic acid, maslinic acid 등이 주성분이다³⁾. 쌍화탕은 정신과 육체가 피로하고 기혈이 모두 손상되었을 때 주로 처방되며⁴⁾ 현재는 기호식품 및 건강식품으로도 널리 이용되고 있다. 쌍화탕의 효능 연구로는 항염증⁵⁾, 항피로⁶⁾, 간 기능 개선효과⁷⁻⁸⁾ 등이 보고되어 있다.

최근 한의학계에서는 장내 미생물을 이용한 발효한약에 대한 관심이 증가하고 있다⁹⁻¹²⁾. 발효과정을 거친 한약재는 유효성분이 저분자화 및 소수성화 되면서 체내 흡수를 증대시킬 수 있고, 특정 장내세균을 보유하지 않은 개인의 경우에도 정상적으로 동일한 효능을 기대할 수 있다¹³⁻¹⁴⁾.

본 연구에서는 발효에 의한 쌍화탕의 생리활성성분들의 변화를 알아보기 위하여 조추출물 및 용매 분획물에 대하여 폴리페놀 및 항산화활성을 비교 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 쌍화탕과 발효쌍화탕의 조제

쌍화탕은 和劑局方¹⁵⁾을 기본으로 하여, 백작약 468.5 g, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁 각 187.5 g, 계피 140.5 g, 생강 74.5 g, 감초 140.5 g, 대조 100.0 g으로 구성된 약재 50첩을 전탕 추출 (Cosmos-660, Kyungseo, Korea)을 실시하였으며 모든 약재는 영천 현대약업사에서 구입하여 사용하였다. 처방구성에 따른 한약재 1,674 g에 생수((주)무학, 화이트, Korea) 16.74 L를 넣어 1시간 침적한 다음 180분간 열탕 추출한 후 test sieve (106 μ m, Retsch, Germany)로 여과하였다.

쌍화탕의 발효는 1M NaOH로 시험물질의 pH를 8.0으로 조정후, 121°C, 1.5 기압에서 15분간 가압 멸균 후, 상온까지 냉각시켜 유산균을 1%(v/v)로 접종하였고, 37°C의 항온실에서 48시간동안 통기 배양하여 액체 발효하였다. 대조군으로써 쌍화탕은 유산균 접종을

제외한 모든 과정을 동일하게 처리하였다.

유산균은 한국식품연구원(Korea Food Research Institute: KFRI) 식품미생물 유전자은행에서 *L. fermentum* (KFRI 164)을 분양받아 실험에 이용하였다.

2. 쌍화탕, 발효쌍화탕 및 용매분획물의 제조

쌍화탕 및 발효쌍화탕 각 100 mL을 취하여 감압건조하여, 쌍화탕 조추출물 4.513g 및 발효쌍화탕 조추출물 4.483 g을 얻었다.

별도로 쌍화탕 및 발효쌍화탕 각 100 mL을 취하여 에틸아세테이트 100 mL로 각각 2회 분배한 후, 수층을 다시 수포화 부탄올로 2회 추출하고, 각 추출액을 감압 건조하여 쌍화탕 에틸아세테이트 분획물 0.087 g, 부탄올 분획물 0.247 g, 물 분획물 3.996 g을 얻었으며, 발효 쌍화탕 에틸아세테이트 분획물 0.192 g, 부탄올 분획물 0.336 g, 물 분획물 3.516 g 을 얻었다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법¹⁶⁾을 응용하여 측정하였다. 각 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배로 희석한 Folin-Ciocalteu 시약(Sigma, USA) 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 2 mL의 10% Na₂CO₃를 서서히 가하였다. 이 혼합액을 1시간동안 방치한 다음 UV/Visible spectrophotometer (HITACHI, U-2900, Japan)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물의 함량은 tannic acid (Sigma, USA)를 이용하여 작성된 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

4. DPPH 라디칼 소거활성을 통한 항산화활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (Sigma, USA) 라디칼의 소거활성은 Blois의 방법¹⁶⁾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 100 μ L와 제조한 DPPH 용액을 혼합한 후 10분간 상온에서

반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었으며 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94~0.97이 되도록 조정하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 함량

쌍화탕과 발효쌍화탕 그리고 이들 각각에 대하여 에틸아세테이트, 부탄올, 수층으로 용매 분획을 제조하여 총 폴리페놀 함량을 비교 하였다<Table 1>.

<Table 1> Total Polyphenol Contents of *Ssanghwa-tangs* before and after Fermentation.

Fraction	Polyphenol contents (ug/mg) ¹⁾	
	<i>SSanghwa-tang</i>	Fermented <i>SSanghwa-tang</i>
Crude extract	71.33 ± 1.22	77.47 ± 6.84
Ethyl acetate fraction	206.77 ± 40.33	241.33 ± 75.04 ²⁾
Butanol fraction	77.47 ± 3.65	75.37 ± 3.20
Water fraction	67.30 ± 1.10	66.60 ± 1.10

¹⁾ Values are mean ±S.D. of three independent experiments (n=3)

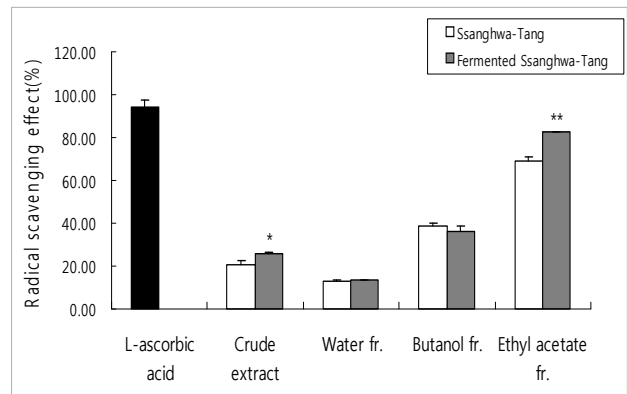
²⁾ * $p < 0.05$

쌍화탕 조추출물은 총 폴리페놀 함량이 발효 전 71.37 µg/mg에서 발효 후 77.47 µg/mg로 증가하였다. 이들을 에틸아세테이트, 부탄올 및 수층으로 용매 분획물을 제조하여, 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과 쌍화탕과 발효쌍화탕 모두 에틸아세테이트 층에서 함량이 높게 나타났으며, 발효 에틸아세테이트 분획물에서 폴리페놀 함량에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가 하였다.

한편 용매 분획물의 수율 (II. 재료 및 방법 참조)에 있어서도 각 탱액의 100 mL에 대한 에틸아세테이트 분획 건조물의 양이 쌍화탕 87 mg, 발효쌍화탕 192 mg으로 발효 후 약 2.2배 증가되었다. 따라서 이들 분획물의 양을 고려한다면 실제적으로 발효쌍화탕의 에틸아세테이트 분획에 있어서 폴리페놀함량은 2.5배 이상 증가한 것으로 볼 수 있다.

2. DPPH 라디칼 소거활성에 의한 항산화 활성

DPPH는 쌍화탕과 발효 쌍화탕의 용매 분획물과 대조군으로 많이 사용되는 L-(+)-ascorbic acid (100 µg/mL)의 항산화 효과를 DPPH radical의 소거 활성을 측정하여 비교하였다<Figure 1>.



<Figure 1> Scavenging effects of solvent fractions from *Ssanghwa-tang* and fermented *Ssanghwa-tang* on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals.

The sample concentrations were 500 µ g/mL L-(+)-ascorbic acid of which concentration was 100 µ g/mL was used as a positive control. Values are mean ±S.E. of three independent experiments (n=3). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

쌍화탕은 조추출물의 DPPH라디칼 소거활성 (20.54%)은 발효 후 (25.51%)로 유의성($p < 0.05$) 있게 증가 하였다. 이들을 에틸아세테이트, 부탄올, 수층으로 용매분획 한 후 활성을 비교한 결과, 에틸아세테이트 분획물에서 둘 다 활성이 높게 나타났고, 발효 전 (69.31%)에 비하여 발효 후 (82.34%)로 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가하였다.

IV. 고찰 및 결론

폴리페놀이란 식물에 널리 분포하는 다양한 화합물의 그룹으로 간단한 저분자로는 phenolic acid, phenylpropanoid, flavonoid 등이 있으며, 고분자로는 lignin, melanin, tannin 등이 있다¹⁸⁾. 이들은 항산화 효과 뿐만 아니라, 항박테리아, 항염, 항알러지, 항균 등 다양한 생리활성을 나타낸다¹⁹⁾.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 짙은 자색을 띠는 매우 안정한 자유라디칼로 페놀성 화합물과 같은 항산화 물질과 결합하면 색이 탈색되는데

이는 다양한 천연소재의 항산화물질을 검색하는데 많이 이용된다. DPPH 라디칼의 소거활성은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 관련되므로 소거활성이 높으면 그만큼 다른 생리활성 또한 높을 것으로 기대할 수 있다.

본 연구에서 쌍화탕 및 발효쌍화탕에서 폴리페놀 함량 및 항산화 활성은 소수성인 에틸아세테이트 분획에서 높게 나타났고, 발효 후 에틸아세테이트 분획물의 양 뿐만 아니라 폴리페놀 함량과 항산화 활성 또한 유의성 있게 증가하였다.

따라서 장내 미생물을 이용한 발효과정을 더욱 최적화할 경우 생리활성 또는 흡수 증대를 통한 효능증가를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 제조된 쌍화탕의 1회 복용량에 해당하는 100 mL 탕액을 건조, 분말 화 하였을 때 약 4.5 g으로 이를 정제 등으로 제형 화 할 경우 부형제들을 가하면 약 7~10 g에 해당하여 복용하기에 불편함이 있다.

따라서 발효와 함께 소수성 분획물을 적절히 활용한 다면 약용량을 감소시킴으로써 간편하고, 현재 액상 형태로 유통되는 쌍화탕을 안정성이 증대된 고상형태의 제형으로의 개발도 가능 할 것으로 사료된다.

V. 감사의 말씀

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의약연구원 기관고유사업 K10050의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 허준. 동의보감. 서울:남산당. 1976.
2. 황도연. 방약합편. 서울:송원문화사. 1978.
3. 생약학교재편찬위원회. 생약학. 서울:동명사. 2009:104-367.
4. 마진열, 박대훈, 박경수, 도경탁, 신현규. 쌍화탕 급성독성에 대한 안전성 연구. 한국한의약연구원 논문집. 2007; 13(1):161-164.
5. 김일혁, 황규진. 雙和湯의 抗炎症作用에 관한 研究. 생약학회지. 1981;12(3):131-135.
6. 손낙원. 쌍화탕이 흰쥐의 간 및 근육 Glycogen함량에 미치는 영향에 대한 조직화학적 연구. 대한본초학회. 1994;9(1):115-125.

7. 안병락, 김신근, 심창구, 정운복. 雙和湯이 四鹽化炭素에 의한 肝障害 Rat에서 Sulfobromophthalein의 體內動態에 미치는 영향. 약학회지. 1984;28:207-215.
8. 조태영, 심창구, 이민화, 김신근. 쌍화탕이 슬포프로모프탈레인의 간클리어란스에 미치는 영향. 한국약제학회. 1987;17:89-93.
9. 박정현, 김호준, 이명중. 비만에서 장내 미생물 군총의 역할과 발효 한약의 활용. 한방비만학회지. 2009;(1):1-14.
10. Bae EA, Han MJ, Kim EJ, Kim DH. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. Arch Pharm Res. 2004;27: 61-67.
11. 함성호, 임병락, 유가화, 가선오, 박병현. 발효에 의한 오가피의 항당뇨 활성 촉진. 동의생리병리학회지. 2008;22(2):340-345.
12. 서성숙, 정승기. 발효 금은화의 인플루엔자 바이러스 A형에 대한 저해효과. 대한한방내과학회지. 2009; 30(3):465-480.
13. 한효상, 박완수, 이영중. 艾葉 발효 추출물의 면역활성에 관한 연구. 대한본초학회지. 2008; 23(3):103-12.
14. 김동현. 한방미생물학, 서울:도서출판 효일. 2000:141.
15. 진사문. 태평해민화제국방. 북경:인민위생출판사. 1985:308.
16. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phospho-lybdc compounds as color reagents. J Biol Chem. 1912;12:239-243.
17. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181:1199-1200.
18. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruomab OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research. 2005;579:200-213.
19. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation heart disease and cancer. Pharmacol. Rev. 2000;52:673-839.