



Original Article / 원저

## 방풍통성산의 동시분석 및 항산화 효능 연구

서창섭 · 김온순 · 신현규\*

한국한의학연구원 한약방제연구그룹

## Simultaneous Analysis of *Bangpungdongseong-san* and Its Antioxidant Effect

Chang-Seob Seo · Ohn Soon Kim · Hyeun-Kyoo Shin\*

Herbal Medicine Formulation Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : We carry out the simultaneous quantification for quality control of four components in *Bangpungdongseong-san* (BPTSS) sample. In addition, we assessed the antioxidant effects of BPTSS sample.

**Methods** : The used column for separation and analysis of four compounds was Luna C18 column and column oven temperature was maintained at 40°C. The mobile phase for simultaneous determination consisted of two solvent systems, 1.0% acetic acid in water and 1.0% acetic acid in acetonitrile. High performance liquid chromatography-photodiode array (HPLC-PDA) method for analysis was performed at a flow rate of 1.0 mL/min with PDA detection at 254 and 280 nm. The injection volume was 10  $\mu$  L. The antioxidant activities of BPTSS were evaluated by measuring free radical scavenging activities on 2,2'-Azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The inhibitory effects on low-density lipoprotein (LDL) oxidation were evaluated by the formation of thiobarbituric acid relative substances (TBARS) and relative electrophoretic mobility (REM).

© 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.ompak.okdanche.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Results** : Calibration curves were acquired with  $r^2 \geq 0.9999$ . The values of limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.06–0.29  $\mu$  g/mL and 0.20–0.98  $\mu$  g/mL, respectively. The amounts of geniposide, liquiritin, baicalin, and glycyrrhizin in BPTSS were 5.06, 7.33, 27.56, and 7.81 mg/g, respectively. The BPTSS showed the radical scavenging activity in a dose-dependent manner. The concentration required for 50% reduction (RC50) against ABTS and DPPH radicals were 72.51  $\mu$  g/mL and 128.49  $\mu$  g/mL. Furthermore, GMGHT reduced the oxidation properties of LDL induced by CuSO<sub>4</sub>.

**Conclusions** : The established HPLC-PDA method will be helpful to improve quality control of BPTSS. In addition, BPTSS has potentials as therapeutic agent on anti-atherosclerosis.

**Keyword** : Bangpungtongseong-san, Simultaneous Analysis, Antioxidant Effect, HPLC-PDA, Low-Density Lipoprotein

## I. 서 론

현대 사회는 식생활의 서구화와 생활습관의 변화에 의한 뇌혈관 또는 심장질환 등과 같은 만성질환이 큰 문제로 대두되고 있는 가운데 우리나라에서도 동맥경화로 인한 순환기계 질환이 날로 증가하고 있는 추세로 효과적인 치료와 예방이 필요한 실정이다. 동맥경화 유발의 가장 중요한 인자로 알려진 저밀도지단백 (low-density lipoprotein; LDL)은 간이나 장의 콜레스테롤을 조직으로 운반하는 혈장단백질 중 밀도가 1.025에서 1.058에 해당하는 지단백 (lipoprotein)으로 소수성 triglyceride cholesteryl ester로 이루어져 있으며, 중심부는 극성인 phospholipid와 free cholesterol로 둘러싸여 있다<sup>1)</sup>. 이러한 LDL은 세포 내·외에서 생성되는 산화적 스트레스에 의해 변형되어 산화 LDL (oxLDL)을 형성한다<sup>2)</sup>. 산화적 스트레스에 의해 생성된 산화 LDL은 monocyte를 자극시켜 세포 표면에 부착하여 발현하게 되며<sup>3)</sup>, 대식세포의 탐식작용에 의해 세포 내로 유입되어 거품세포를 형성하게 된다<sup>4)</sup>. 거품세포는 혈관내피세포에 염증을 일으켜 플라크를 생성함으로써 동맥경화를 유발하게 된다<sup>5,6)</sup>. 이와 같이 LDL 산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 중요한 역할을 하므로 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 항산화제에 의한 LDL의 산화를

방지해야 한다<sup>7)</sup>.

방풍통성산(防風通聖散)은 金代 (1172, 劉完素) 『宣明論方』에 처음 수록된 處方으로 滑石, 甘草, 石膏, 黃芩, 桔梗, 防風, 川芎, 當歸, 芍藥, 大黃, 麻黃, 薄荷, 連翹, 芒硝, 荊芥, 白朮, 山梔子 및 生薑 등 18종의 생약으로 구성되어 있다<sup>8)</sup>. 주로 風熱로 인한 疏風解表하고 瀉熱通便하는 효능을 가지고 있으며, 風熱의 壅城으로 表裏가 함께 實한證을 치료하는 대표적인 方劑이다<sup>9)</sup>. 오늘날 방풍통성산은 3T3-L1 세포를 이용한 비만효과<sup>10)</sup>, 관절염에 대한 연구<sup>11)</sup>, 항알러지 효과<sup>12)</sup> 등 다양한 생리활성 연구가 보도되었다. 이러한 여러 생리활성 중 방풍통성산을 이용한 비만 치료 효과를 확인하는 임상적 연구<sup>13-15)</sup>,가 많이 보고되었다. 또한 급성 독성, 13주 반복투여독성 시험을 통해 본 처방의 안전성을 입증하였다<sup>16,17)</sup>. 현재 본 처방은 한방의료기관에 구비된 비급여 제제 중 네 번째로 많은 구비율을 보이고 있으며<sup>18,19)</sup>, 비만과 다이어트에 대한 관심의 증가로 비만 치료제 시장에서도 큰 폭의 상승세를 보이고 있는 처방 중 하나이다<sup>19)</sup>.

본 연구에서는 방풍통성산의 품질관리를 위하여 치자의 geniposide, 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 및 황금의 baicalin 등 4종 성분에 대하여 광다이오드 어레이 (photodiode array, PDA) 검출기가 결합된 고성능액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 동시분석을 실시하였다. 또한 본 처방에 대하여 항산화 효과와 LDL 산화 억제 효과를 통한 동맥경화질환의 예방 및 치료의 적용 가능성을 검토하였다.

\*교신저자 : H. K. Shin, Korea Institute of Oriental Medicine,  
1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, Daejeon.  
· Tel : 042-868-9464 · Fax : 042-864-2120  
· Email : hkshin@kiom.re.kr

· 접수 2013/11/27 · 수정 2013/12/7 · 채택 2013/12/10

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 방풍통성산의 구성 생약인 滑石 (*Talcum*), 甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*), 石膏 (*Gypsum*), 黃芩 (*Scutellaria baicalensis*), 桔梗 (*Platycodon grandiflorum*), 防風 (*Ledebouriella seseloides*), 川芎 (*Cnidium officinale*), 當歸 (*Angelica gigas*), 芍藥 (*Paeonia lactiflora*), 大黃 (*Rheum undulatum*), 麻黃 (*Ephedra sinica*), 薄荷 (*Mentha pulegium*), 連翹 (*Forsythia koreana*), 芒硝 (*Natrii sulfas*), 荊芥 (*Schizonepeta tenuifolia*), 白朮 (*Atractylodes japonica*), 山梔子 (*Gardenia jasminoides*) 및 生薑 (*Zingiber officinale*) 등 18종은 (주)음니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 규격품을 구입하여 사용하였다. 이들 생약의 기원은 동국대학교 이재현 교수 (Gyeongju, Korea)의 감별을 받은 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본 (2008-KE23-1 ~ 2008-KE23-18)은 한국한의학연구원 한약방제연구그룹에 보관하였다.

### 2. 시약 및 기기

Geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin 4종 (Fig. 1)의 표준품은 모두 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였으며, 각 표준품의 순도는 98% 이상이었다. 2,2'-Azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC 분석을 위한 메탄올, 아세트나이트릴 및 물은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 초산과 개미산은 특급 시약으로 Junsei (Tokyo, Japan)와 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

함량분석을 위한 HPLC는 펌프 (LC-20AT), on-line 탈기장치 (DGU-20A<sub>3</sub>), 칼럼오븐 (CTO-20A), 자동 시료주입기 (SIL-20AC) 및 PDA 검출기 (SPD-M20A) 등으로 구성된 LC-20A 시스템 (Shimadzu Co., Kyoto,

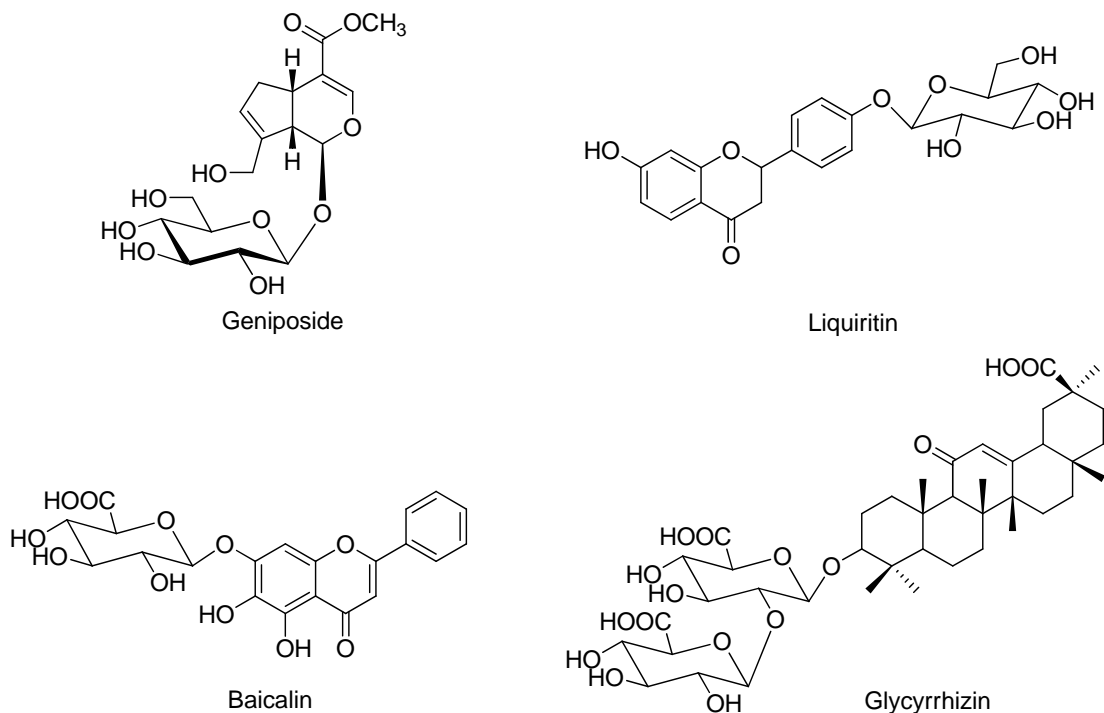


Figure 1. Chemical structures of four marker compounds in *Bangpungdongseong-san*.

Table 1. Composition of Bangpungdongseong-san

Scientific name	Latin name	Amount (g)	Supplier	Source
Talcum	Talcum	6.375	HMAX	China
Glycyrrhiza uralensis	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	4.5	HMAX	China
Gypsum	Gypsum Fibrosum	2.625	HMAX	China
Scutellaria baicalensis	Scutellariae Radix	2.625	HMAX	Jeongseon, Korea
Platycodon grandiflorum	Platycodi Radix	2.625	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Ledebouriella seseloides	Saposhnikoviae Radix	1.6875	HMAX	China
Cnidium officinale	Cnidii Rhizoma	1.6875	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Angelica gigas	Angelicae Gigantis Radix	1.6875	Omnierb	Pyeongchang, Korea
Paeonia lactiflora	Paeoniae Radix	1.6875	Omnierb	Hwasun, Korea
Rheum undulatum	Rhei Rhizoma	1.6875	HMAX	China
Ephedra sinica	Ephedrae Herba	1.6875	HMAX	China
Mentha pulegium	Menthae Herba	1.6875	Omnierb	China
Forsythia koreana	Forsythiae Fructus	1.6875	HMAX	China
Natrii sulfas	Natrii Sulfas	1.6875	HMAX	China
Schizonepeta tenuifolia	Schizonepetae Spica	1.3125	Omnierb	China
Atractylodes japonica	Atractylodis Rhizoma Alba	1.31	HMAX	China
Gardenia jasminoides	Gardeniae Fructus	1.3	Omnierb	Muju, Korea
Zingiber officinale	Zingiberis Rhizoma Crudus	6.25	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Total		44.125		

Japan)을 사용하였으며, 데이터 분석은 LCsolution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다. 또한 4종 성분의 피크 확인을 위해 electrospray ionization (ESI) source가 장착된 liquid chromatography ion trap time-of-flight mass spectrometry (LC-IT-OF-MS, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 데이터 처리는 LCMS solution (Version 3.60.361) 사용하였다. 항산화능 측정을 위한 microplate spectrophotometer (Benchmark Plus)는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)사로부터 구입하였다. 저밀도지단백 (low-density lipoprotein; LDL) 산화 억제 활성 측정을 위한 LDL과 TBARS Assay Kit는 Biomedical Technologies (Stoughton, MA, USA)와 BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)으로부터 각각 구입하여 사용하였다.

### 3. 표준액의 조제

Geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin

4종의 표준품에 대한 표준용액은 메탄올을 이용하여 모두 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 냉장 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다.

### 4. 방풍통성산 추출물 및 검액의 조제

방풍통성산의 구성 한약재를 Table 1과 같이 무게 비율로 배합한 시료 약 7.0 kg을 추출기 (Cosmos 660, Incheon, Korea)에 넣고, 물을 시료의 10배 (70 L)로 첨가하여 100℃에서 2시간 전탕한 후 동결건조하여 추출물 1240.8 g을 얻었다 (수율 : 17.7%). 동결건조된 방풍통성산 시료 200 mg을 정확히 측정 후 20 mL의 증류수를 넣어 녹인 후 0.2 μm membrane 여과 (Woongki Science, Seoul, Korea)하여 검액으로 하였다. 또한 방풍통성산의 구성 생약 중 황금의 baicalin의 정량을 위하여 검액 4 mL을 취하여 물을 넣어 10 mL로 한 뒤 정량분석을 실시하였다.

## 5. HPLC 분석조건

방풍통성산 내 주요 구성 성분의 함량을 분석하기 위하여 사용된 칼럼은 Phenomenex사의 Luna C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 × 250 mm, Torrance, CA, USA) 칼럼을 40°C로 유지하여 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘려주었으며 주입량은 10 μL를 주입하였다. 이동상은 1.0% 초산이 함유된 물 (A)과 1.0% 초산이 함유된 아세트나이트릴 (B)을 사용하여 0-40분 5-70% B, 40-45분 70-100% B, 45-50분 100% B 및 50-55분 100-5% B로 흘려준 뒤 15분 동안 재평형시켰다. 검출파장은 geniposide와 glycyrrhizin은 254 nm, liquiritin과 baicalin은 280 nm에서 검출하였다.

## 6. IT-TOF-MS 분석 조건

방풍통성산 내 주요 성분인 geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin의 피크 및 분자량 확인을 위하여 Shimadzu사의 LC-IT-TOF MS를 사용하여 확인하였다. LC-IT-TOF MS 분석 조건은 positive ion mode에서 검출하였으며, 스캔 범위는 m/z 100-1000의 범위에서 분자량을 검출하였다. 또한 4.5 kV의 capillary voltage, 200°C의 heat block temperature 및 1.5 L/min의 nebulizing gas 조건하에 주요 성분의 피크를 확인하였다.

## 7. 검량선 작성

4종의 표준품에 대한 검량선은 geniposide와 liquiritin 0.39 - 50.00 μg/mL, baicalin 1.56 - 200.00 μg/mL 및 glycyrrhizin 0.78 - 100.00 μg/mL의 농도 범위에서 피크 면적과 농도에 대해서 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선은 상관계수 (r<sup>2</sup>)를 구하여 직선성을 판단하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 신호 (signal; S) 대 잡음 (noise; N) 비를 이용하여 각각 3과 10을 기준으로 정하였다.

## 8. 항산화능 측정

### (1) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS<sup>+</sup>· cation decolorization assay 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다.<sup>20)</sup> 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실

온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup>·를 형성시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS<sup>+</sup>· 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, microplate reader를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 항산화능은 시료를 녹인 용매인 PBS를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. 활성비교를 위하여 vitamin C를 사용하였다.

$$\begin{aligned} \text{ABTS radical scavenging activity} \\ = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100 \end{aligned}$$

### (2) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 96 well plate을 이용하여 실시하였다.<sup>21)</sup> 96 well plate에 0.15 mM의 DPPH 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 항산화능은 시료를 녹인 용매인 DMSO를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. 활성비교를 위하여 vitamin C를 사용하였다.

$$\begin{aligned} \text{DPPH radical scavenging activity} \\ = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100 \end{aligned}$$

## 9. LDL 산화 억제 활성 측정

### (1) Cu<sup>2+</sup>에 의한 LDL의 산화

반응은 LDL 100 μg과 시료를 혼합한 후 25 μM CuSO<sub>4</sub>를 첨가함으로써 시작하였고, 37°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 반응 후 thiobarbituric acid reacting substance (TBARS)의 형성<sup>22)</sup> 과 relative electrophoretic mobility (REM)<sup>23)</sup>을 측정하였다.

### (2) TBARS 측정

산화 반응이 끝난 LDL 50 μg을 취하여 TBARS Assay Kit를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 malondialdehyde (MDA) 표준곡선에 대입시켜 MDA 양으로 환산하였다.

### (3) REM 측정

산화 반응이 끝난 LDL 10 μg을 0.8% agarose gel

에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid 및 1 mM EDTA)에서 100 V로 30분 동안 전기영동 한 후, Coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 이동 거리를 측정하였다.

### 10. 통계처리

실험값은 mean ± S.E.M.으로 표시하였다. 실험 결과에 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

### 1. HPLC 분석조건의 확립

HPLC-PDA를 이용하여 방풍통성산을 구성하는 18종의 생약 중 치자의 geniposide, 황금의 baicalin 및 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 등 4종의 성분에 대하여 동시 분석조건을 설정하였다. 4종 성분의 분리를 위한 칼럼으로 Phenomenex Luna C<sub>18</sub>, Waters SunFire C<sub>18</sub> 및 OptimaPak C<sub>18</sub> 칼럼, 칼럼 오븐의 온도는 30, 35 및 40°C 그리고 이동상으로서 초산이 첨가된 물-아세트나이트릴 또는 물-메탄올 등을 이용하여 최적의 분석조건을 탐색하였다. 그 결과 40°C의 칼럼 오븐 온도, Luna C<sub>18</sub> 칼럼 및 1.0% 초산이 각각 함유된 물과 아세트나이트릴로 결정하였다. 설정된 최적의 HPLC-PDA 분석법을 이용하여 4종의 성분들을 35분 이내에 분리능 5.79이상으로 양호한 분리가 이루어졌으며, 용량인자 3.71-9.58, 분리인자 1.29-1.47 및 이론단수 8988-28049 등 시스템 적합성도 양호하게 나타났다 (Table 2). 검액에서 각 성분의 peak는 표준용액에서의 표준품 peak의 retention time과 UV 흡수 파장 및 동시주입을 통해 비교 확인하였으며, geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin 등 4종의 성분은 14.1분, 17.3분, 22.5분 및 31.7분에 각각 검출되었다 (Fig 2).

Table 2. System Suitability of the Four Marker Compounds

Compound	Capacity factor (k')	Separation factor (α)	Number of theoretical plates (N)	Resolution (Rs)
Geniposide	3.71	1.29	10380	5.79
Liquiritin	4.78	1.29	15637	5.79
Baicalin	6.52	1.36	8988	6.91
Glycyrrhizin	9.58	1.47	28049	10.75

### 2. IT-TOF-MS를 이용한 주요성분 확인

방풍통성산의 주요 성분인 geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin을 IT-TOF-MS를 이용하여 성분을 확인하였다. 치자의 주요 성분으로 알려진 geniposide의 경우 원 분자량 *m/z* 388, 1369에 Na가 첨가된 *m/z* 411, 1235에서 분자이온 피크가 검출되었다 (Fig. 3A). 감초의 주요 성분인 liquiritin과 glycyrrhizin은 [M+Na]<sup>+</sup>와 [M+H]<sup>+</sup>의 형태로 *m/z* 441, 1154와 *m/z* 823, 4117에서 각각 검출되었다 (Fig. 3B and 3D). Flavonoid glycoside인 liquiritin은 in-source collision에 의한 glucose의 이탈로 *m/z* 257, 0793에서 fragment 피크가 확인되었으며, terpenoid saponin glucoside인 glycyrrhizin은 in-source collision에 의해 한 분자의 glucuronic acid의 이탈로 인한 *m/z* 647, 3757과 두 분자의 glucuronic acid와 H<sub>2</sub>O의 이탈로 *m/z* 453, 3327에서 fragment 피크를 확인하였다. 또한 황금의 baicalin은 [M+H]<sup>+</sup>의 형태로 *m/z* 447, 0886에서 높은 감도로 분자이온 피크가 검출되었으며, fragment로 glucuronic acid가 이탈한 *m/z* 271, 0553이 검출되었다 (Fig. 3C).

### 3. 검량선, 검출한계 및 정량한계

확립된 HPLC-PDA 분석법을 이용하여 농도에 따른 피크 면적대비로 geniposide, liquiritin, baicalin 및 glycyrrhizin 등 4종의 성분에 대한 검량선을 작성한 결과 상관계수 값이 0.9999 이상으로 1.0에 가까운 매우 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 이들 4종 성분에 대한 검출한계는 0.06-0.29 μg/mL로 나타났으며, 정량한계는 0.20-0.98 μg/mL로 나타났다 (Table 3).

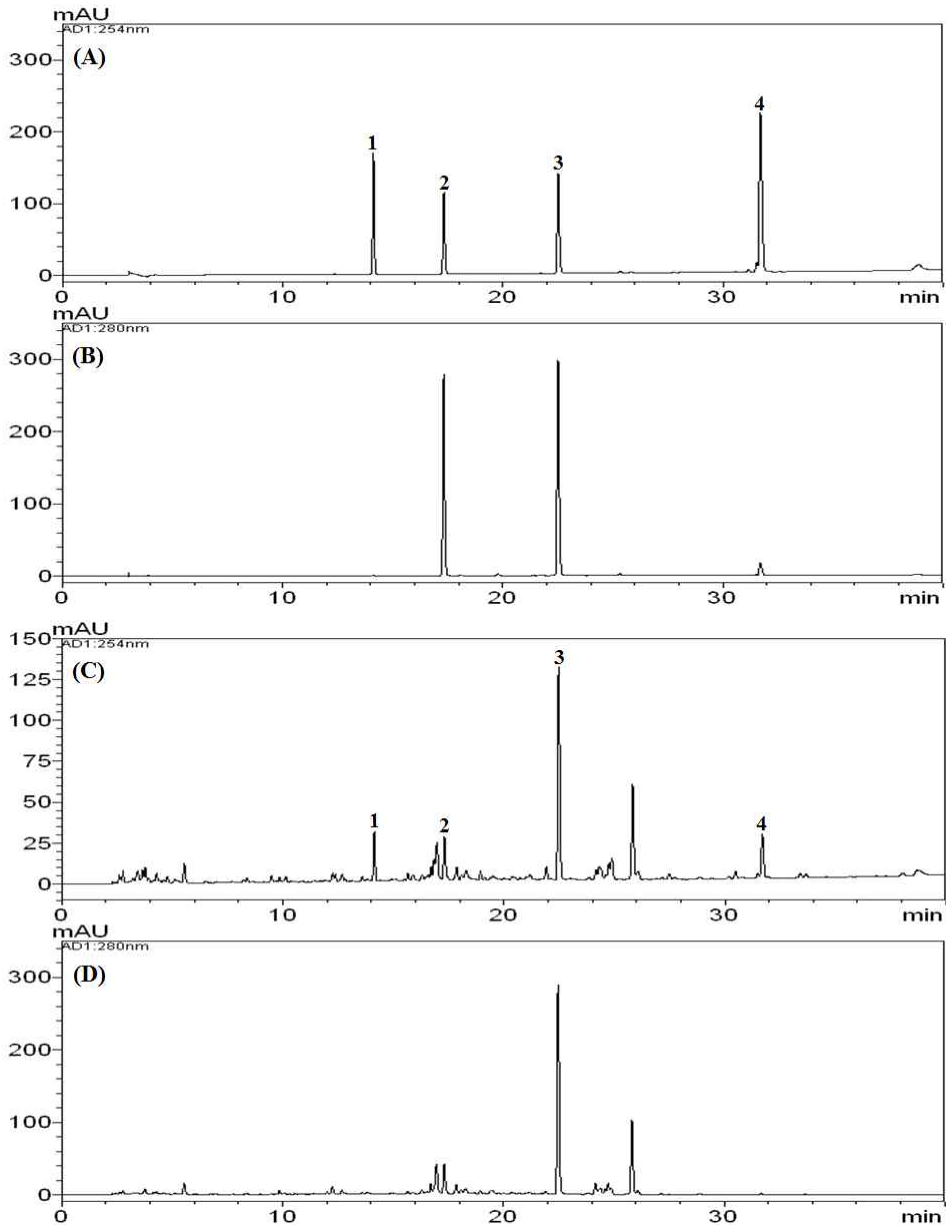


Figure 2. HPLC chromatogram of the standard mixture (A and B) and *Bangpungdongseong-san* sample (C and D) at wavelength 254 nm (A and C) and 280 nm (B and D). Geniposide (1), liquiritin (2), baicalin (3), and glycyrrhizin (4).

#### 4. 방풍통성산의 함량분석

확립된 분석법을 이용하여 방풍통성산 추출물에 대하여 다음과 같이 동시분석을 실시하였다. 그 중 치자의 geniposide, 황금의 baicalin 및 감초의 liquiritin

과 glycyrrhizin 등 4종에 대하여 방풍통성산 추출물을 동시 분석한 결과 5.06–27.56 mg/g으로 검출되었다 (Table 4).

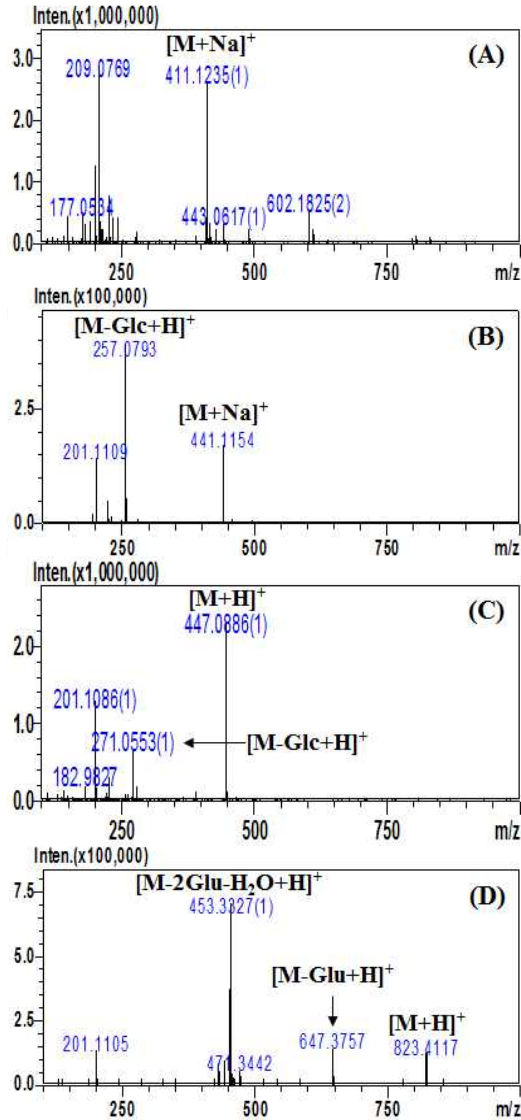


Figure 3. MS spectrum of four reference standards. Geniposide (A), liquiritin (B), baicalin (C), and glycyrrhizin (D).

Table 4. Contents of Four Compounds in the Bangpung-tongseong-san by HPLC-PDA (n=3)

Compound	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Geniposide	5.06	0.02	0.31
Liquiritin	7.33	0.01	0.20
Baicalin	27.56	0.20	0.74
Glycyrrhizin	7.81	0.02	0.20

### 5. 항동맥경화 효능 검색

#### (1) 항산화 활성

방풍통성산의 항산화 활성을 평가하고자 추출물을 농도별로 조제한 후 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. ABTS 라디칼의 소거활성을 비교한 결과 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보였다. 방풍통성산 추출물 6.25, 12.5, 25, 50 및 100  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 13.98, 26, 46.76, 77.99 및 99.17%의 라디칼 소거활성을 나타냈으며, 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양 ( $RC_{50}$ )은 28.86  $\mu$ g/mL로 관찰되었다. 양성대조군인 vitamin C의  $RC_{50}$  값은 3.22  $\mu$ g/mL로 관찰되었다 (Table. 5). DPPH 라디칼의 소거활성 또한 ABTS 라디칼의 소거활성과 유사하게 농도의존적인 증가를 나타냈다. 추출물 25, 50, 100, 200 및 400  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 2.5, 22.63, 51.25, 79.45 및 82.53%의 라디칼 소거활성을 나타냈으며,  $RC_{50}$ 는 113.63  $\mu$ g/mL로 관찰되었다. 양성대조군인 vitamin C의 DPPH 라디칼에 대한  $RC_{50}$  값은 8.79  $\mu$ g/mL로 관찰되었다 (Table. 6).

Table 3. Linear Range, Regression Equation, Correlation Coefficient, LOD, and LOQ for Four Compounds (n=3)

Compound	Linear range ( $\mu$ g/mL)	Regression equation*	Correlation coefficient ( $r^2$ )	LOD ( $\mu$ g/mL)	LOQ ( $\mu$ g/mL)
Geniposide	0.39-50.00	$y = 7534.72x - 537.35$	1.0000	0.20	0.65
Liquiritin	0.39-50.00	$y = 12712.19x - 846.46$	1.0000	0.15	0.49
Baicalin	1.56-200.00	$y = 33975.29x - 14091.63$	1.0000	0.06	0.20
Glycyrrhizin	0.78-100.00	$y = 7127.81x - 1847.86$	0.9999	0.29	0.98

\* y: peak area (mAU) of compounds; x: concentration ( $\mu$ g/mL) of compounds.



Table 5. Scavenging Effects of *Bangpungtongseong-san* on ABTS<sup>+</sup>

Herbal formulas	Concentration (μg/mL)	Scavenging effect (%) <sup>*</sup>	RC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>†</sup>
BPTSS	6.25	13.98 ± 1.66	28.86 ± 1.08
	12.5	26.00 ± 3.64	
	25	46.76 ± 7.17	
	50	77.99 ± 0.19	
	100	99.17 ± 0.58	
Vitamin C	1.25	20.69 ± 0.13	3.22 ± 0.02
	2.5	39.33 ± 0.19	
	5	76.51 ± 0.52	

\* Data are represented as mean ± SEM.

† Concentration required for 50% reduction of ABTS<sup>+</sup> at 5 min reaction.

Table 6. Scavenging Effects of *Bangpungtongseong-san* on DPPH

Herbal formulas	Concentration (μg/mL)	Scavenging effect (%) <sup>*</sup>	RC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>†</sup>
BPTSS	25	2.50 ± 0.42	113.63 ± 1.64
	50	22.69 ± 0.63	
	100	51.25 ± 0.98	
	200	79.45 ± 0.68	
	400	82.53 ± 0.90	
Vitamin C	5	23.58 ± 1.09	8.79 ± 0.25
	10	58.56 ± 1.87	
	20	90.04 ± 0.36	

\* Data are represented as mean ± SEM.

† Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min reaction.

## (2) LDL 산화 억제 활성

LDL 산화 억제 활성을 검색하고자 Cu<sup>2+</sup>에 의해 LDL 산화를 유도하고, 추출물을 처리하여 LDL 산화 정도를 비교 분석하였다. TBARS assay 결과 방풍통성산 추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 저해효과를 나타냈으며, IC<sub>50</sub> 값이 70.19 μg/mL으로 계산되었다 (Fig. 4). Fig. 5는 Cu<sup>2+</sup>에 의해 유도된 산화 LDL의 전기적 이동차 (REM)에 대한 방풍통성산의 효과를 나타내고 있다. 방풍통성산을 62.5, 125 및 250 μg/mL 농도로 처리하였을 때 산화 LDL의 REM이 각각 44.34, 63.67 및 70% 감소되었다.

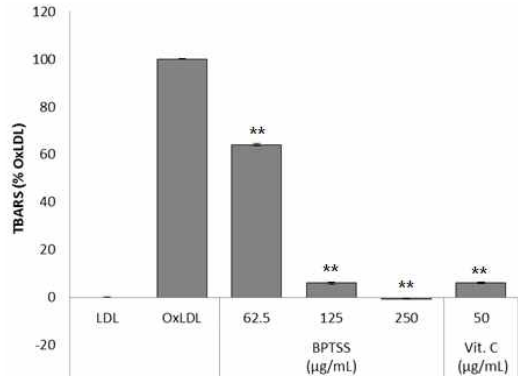


Figure 4. Effects of *Bangpungtongseong-san* on Cu<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in LDLs.

Indicated concentrations of BPTSS or vitamin C (50 μg/mL) and LDLs were incubated with CuSO<sub>4</sub> for 6 hr at 37°C. The quantitative data were presented as mean ± S.E.M. of triplicate experiments. \*\*p < 0.01 vs. oxLDL group.

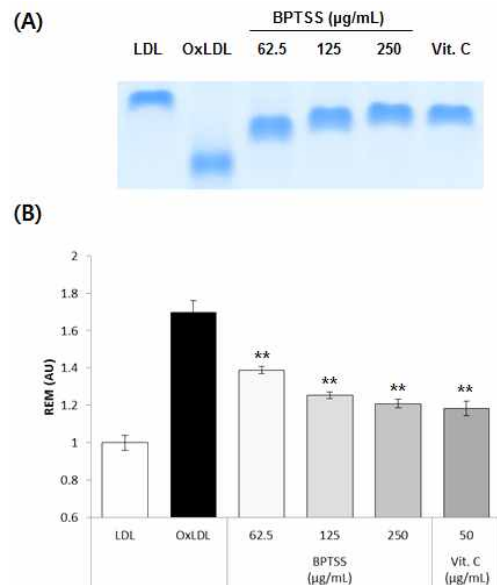


Figure 5. Effects of *Bangpungtongseong-san* on electrophoretic mobility of Cu<sup>2+</sup>-induced oxidized LDLs.

Indicated concentrations of BPTSS or vitamin C (50 μg/mL) and LDLs were incubated with CuSO<sub>4</sub> for 6 h at 37°C. The electrophoretic mobility of LDLs were detected by agarose gel electrophoresis. (A) The stained gel is representative of three independent experiments. (B) Relative electrophoretic mobility (REM) indicated the distances moved from the origin were calculated and presented. \*\*p < 0.01 vs. oxLDL group.

## IV. 결 론

본 연구에 의해 확립된 HPLC-PDA 분석법을 이용하여 방풍통성산을 구성하는 18종의 생약 중 치자의 geniposide, 황금의 baicalin 및 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 등 4종의 성분에 대하여 함량분석과 본 처방의 항동맥경화 효능을 평가하였다. 동시 분석 결과 방풍통성산의 구성 생약 중 황금의 baicalin이 27.56 mg/g으로 다른 성분에 비해 많이 함유되어 있음을 확인하였다. 또한 방풍통성산의 ABTS와 DPPH 라디칼 제거를 통한 항산화 활성은 용량이 높을수록 높은 활성을 나타내었으며, LDL 산화 억제 활성 역시 고농도로 처리할 경우 LDL의 REM이 더 감소됨을 알 수 있었다. 이상의 결과들로 본 연구에 의해 확립된 HPLC-PDA 동시정량법은 한약처방인 방풍통성산의 품질관리를 위한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 사료되며, 방풍통성산의 우수한 항산화활성과 LDL의 산화 억제활성을 통해 산화적 스트레스에 의한 동맥경화질환의 초기단계를 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '한약처방의 과학적 근거 기반 구축사업 (K13030)' 에 의해 수행 되었으며, 질량분석기를 이용한 주요성분의 피크 확인을 해 주신 중앙대학교 한상범 교수님께 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Yang KS, Jeon CM. Effect of Taraxacum coreanum Nakai on low density lipoprotein oxidation. Kor J Pharmacogn, 1996;27(3):267-73.
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature, 2000;407(6801): 233-41.
3. Liao L, Starzyk RM, Granger DN. Molecular deter-

- minants of oxidized low-density lipoprotein-induced leukocyte adhesion and microvascular dysfunction. Arterioscler Thomb Vasc Biol, 1997;17(3):437-44.
4. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis : The road ahead. Cell, 2001;104(4):503-16.
5. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation, 1994;89(5): 2462-78.
6. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. J Lipid Res, 2009;50: S376-81.
7. Choe M, Kim HS. Effects of Korean wheat on LDL oxidation and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. J Korean Soc Food Sci Nutr, 2002;31(1): 104-8.
8. Park YS. Herbal Pharmacological Commentary. Seoul :Academy Press, 2002:578-85.
9. Herbal formulation Professors of Korean Medicie. Herbal formulation. Seoul:Younglimsa, 2003:263.
10. Cha MK, Lee JY, Kim DG, Lee KT. Effects of *Bangpoongtongsungsan* on adipose tissue and hyperlipidemia of 3T3-L1 induced rats. J Korean Orient Pediatrics, 2006;20(2):177-96.
11. Eom KJ. Effects of Bangpungdongseong-san on the adjuvant-induced arthritis in rats. Master' s thesis of Semyoung University, 2012.
12. Kim HJ, Kim YB, Park OS, Kim KS, Cha JH. The effect of Bangpungdongseong-san on model of allergic rhinitis. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2006;19(1):21-30.
13. Shin DH, Cho GH, Lee H, Moon MK, Kang DG, Yun YG, et al. Clinical study of *Bangpoongtongsungsan* on body weight change in subjects with obesity. Korean J Orient Med Prescription, 2008; 16(2):133-44.
14. Choi EM, Ryu EK. Effects of Bang-Pung-Tong-Seoung-San on obese patients. J Korean Med



- Obes Res. 2001;1(1):57-62.
15. Lee JE, Song YK, Lim HH, Randomized, double blind, placebo-controlled study of Bofu-tsusho-san on obese patients. *J Korean Med Obes Res.* 2010;10(1):1-16.
  16. Shin IS, Kim JH, Ha HK, Seo CS, Lee MY, Huh JI, et al. Acute toxicity study on Bangpungdongseong-san (Fangfengtongsheng-san) in Sprague-Dawley rats. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2010;23(1):111-7.
  17. Lee MY, Shin IS, Seo CS, Kim JH, Han SR, Shin HK. Subchronic oral toxicity studies of the traditional herbal formula Bangpungdongseong-san in Crl:CD (SD) rats. *J Ethnopharmacol.* 2012;144(3):720-5.
  18. Bak YH, Huang DS, Shin HK. The analysis of herbal medicine preparations equipped in traditional Korean medical clinics. *Korean J Orient Med Prescrip.* 2010;18(1):43-56.
  19. Kim JH, Lee JK, Shin HK. Analysis of studies on Bangpungdongseong-san (Fangfengtongsheng-san) to establish the fundament for evidence based medicine (EBM). *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2011;24(1):1-15.
  20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* 1999(9-10);26: 1231-7.
  21. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2000;71(1-2):109-14.
  22. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem.* 1993;208(1):10-5.
  23. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res.* 1992;33(1):123-30.