

구미강활탕의 성분 분석 및 LDL 산화억제 효능 연구

김온순·서창섭·신현규*

한국한의학연구원 한약연구본부 한약방제연구그룹

Simultaneous Determination of *Gumiganghwal-tang* and Its Anti-atherosclerotic Effect

Ohn Soon Kim, Chang-Seob Seo & Hyeun-Kyoo Shin*

Herbal Medicine Formulation Research Group, Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine

Abstract

Objective: The purpose of this study was to establish the simultaneous analysis for six compounds in *Gumiganghwal-tang* (GMGHT, *Jiuweiqianghuo-tang*) and to investigate the anti-atherosclerotic effects of GMGHT *in vitro*

Methods: The column for separation of six compounds was used Luna C₁₈ column and maintained at 40°C. The mobile phase for gradient elution consisted of two solvent systems, 1.0% acetic acid in water and 1.0% acetic acid in acetonitrile. The analysis was carried out at a flow rate of 1.0 mL/min with photodiode array (PDA) detection at 254, 280, and 320 nm. The injection volume was 10 µL. The antioxidant activities of GMGHT 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), relative electrophoretic mobility (REM), and fragmentation of apolipoprotein B (ApoB)-100.

Results: Calibration curves were acquired with $r^2 \geq 0.9998$. The contents of liquiritin, ferulic acid, baicalin, baicalein, glycyrrhizin, and wogonin in GMGHT were 1.784, 1.693, 37.899, 0.258, 1.869, and 0.034 mg/g, respectively. The GMGHT 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 µg/mL and 128.49 µg/mL. Furthermore, GMGHT reduced the oxidation properties of LDL induced by CuSO₄.

· 접수: 2013년 8월 8일 · 수정접수: 2013년 12월 16일 · 채택: 2013년 12월 18일

* 교신저자: 신현규, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약연구본부 한약방제연구그룹
전화: +82-42-868-9464, 팩스: +82-42-864-2120, 전자우편: hkshin@kiom.re.kr

Conclusion: HPLC-PDA is considered as an available and convenient method for quality control and standardization of GMGH and GMGHT has potentials on anti-atherosclerosis by anti-oxidative effect and suppressive effect on LDL oxidation.

Key words: *Gumiganghwat-tang* (Jiuweiqianghuo-tang), simultaneous analysis, ABTS, DPPH, LDL oxidation inhibition, anti-atherosclerosis

I. 서론

한약처방은 일반적으로 다양한 생약들로 구성되어 있으며, 이러한 구성 생약들 또한 수많은 성분들로 이루어져 있어 복합적인 효과를 나타낸다. 한약처방은 예로부터 우리나라를 비롯하여 중국 및 일본 등 동양에서 다양한 질병들의 치료와 예방의 목적으로 사용되어져 왔다.^{1,2)} 또한 한약처방은 합성의약품이나 양약에 비하여 비교적 부작용이 적어 오늘날에도 관심과 수요가 증가하고 있다.^{3,4)} 이러한 한약처방 중 하나인 구미강활탕(九味羌活湯)은 사계절을 막론하고 감모풍한(感冒風寒)으로 두통이 있고 골절이 아프며, 발열오한에 사용해진 처방으로^{5,6)}, 현재 건강보험 한약제제 56종 중 전체 처방투약 일수의 6.1%, 총약제비의 7.0%를 차지하고 있는 한방 임상에서 중요한 처방 중 하나이다⁷⁾.

구미강활탕은 해표작용(解表作用)과 제습작용(除濕作用)을 통하여 병인을 다스리는 처방으로 강활(羌活), 방풍(防風), 천궁(川芎), 백지(白芷),蒼출(蒼朮), 황금(黃芩), 생지황(生地黃), 세신(細辛) 및 감초(甘草) 등 9종의 생약으로 구성되어 있다. 다양한 연구보고를 통해 세포 및 실험동물 수준에서의 항염증효과^{8,9,10)} 및 해열 및 진통 효과¹¹⁾를 확인하였으며, 이에 대한 임상증례가 보고되어 있다¹²⁾. 또한 급성독성에 대한 안정성 연구를 통해 신뢰성 있는 독성 및 안전성 자료가 확보되어 있다^{12,13)}.

본 연구에서는 구미강활탕의 품질관리를 위하여 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin, 천궁의 ferulic acid 및 황금의 baicalin, baicalein 및 wogonin 등 6종 성분에 대하여 광다이오드 어레이 (photodiode array, PDA)가 결합된 고성능 액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 동시 정량을 실시하였다. 또한 본 처방에 대하여 항산화 효과와 LDL 산화 억제 효과를 분석하여 동맥경화질환의 예방 및 치료의 적용 가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

본 실험에 사용된 구미강활탕의 구성 한약재는 (주)옵니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본 (2008-KE16-1 ~ 2008-KE16-9)은 한국한의학연구원 한약방제연구그룹에 보관하였다.

2) 시약 및 기기

표준물질인 baicalin, baicalein, ferulic acid, glycyrrhizin, liquiritin 및 wogonin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)

로부터 구입하였으며, 각 표준물질의 순도는 98% 이상이었다. 표준물질의 구조는 Fig. 1과 같다. 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 methanol, acetonitrile 및 water는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, acetic acid는 특급시약으로 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

함량분석을 위한 HPLC는 LC-20A 시스템 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하였고, 시스템은 pump (LC-20AT), on-line degasser (DGU-20A₃), column oven (CTO-20A), auto-sampler (SIL-20AC) 및 PDA detector (SPD-M20A)로 구성되어 있다. 분석 data는 LCsolution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다.

2. 방법

1) 표준액의 조제

Liquiritin, ferulic acid, baicalin, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin 등 6종의 표준용액에 대하여 메탄올을 이용하여 모두 1,000 ug/mL의 농도로 제조하였다.

2) 구미강활탕 추출물 및 검액의 조제

구미강활탕의 구성한약재를 Table 1과 같이 무게 비율로 배합한 시료 약 3.5 kg을 추출기 (Cosmos 660, Inchon, Korea)에 넣고, 물을 시료의 10배 (35 L)로 첨가하여 100°C에서 2시간 전탕한 후 동결건조 하여 22.8%의 수율로 추출물 796.6 g을 얻었다. 동결 건조된 추출물 500 mg을 정확히 측정 후 물을 넣어 25 mL로 맞춘 후 0.2 um membrane 여과 (Woongki Science, Seoul, Korea)하여 검액으로 하였다. 구미강활

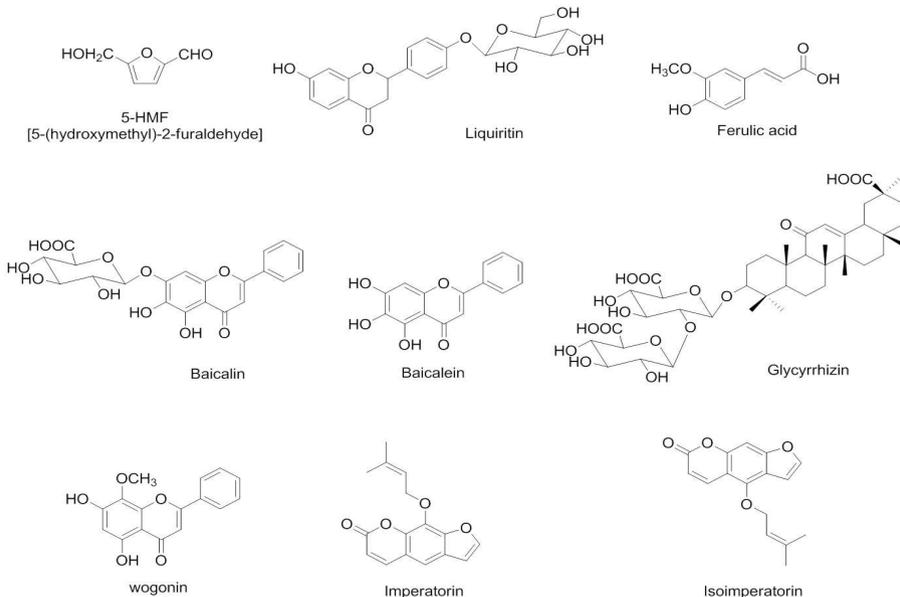


Figure 1. Chemical structures of nine marker compounds in Gumiganghwal-tang.

Table 1. Composition of *Gumiganghwal-tang*.

Herbs	Latin name	Amount (g)	Supplier	Source
강활 (羌活)	<i>Osterici Radix</i>	5.625	HMAX	China
방풍 (防風)	<i>Saposhnikovia Radix</i>	5.625	HMAX	China
천궁 (川芎)	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4.5	Omnierb	Yeongcheon, Korea
백지 (白芷)	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	4.5	Omnierb	Yeongcheon, Korea
창출 (蒼朮)	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4.5	HMAX	China
황금 (黃芩)	<i>Scutellariae Radix</i>	4.5	HMAX	Jeongseon, Korea
생지황 (生地黃)	<i>Rehmanniae Radix Crudus</i>	4.5	Omnierb	Kunwi, Korea
세신 (細辛)	<i>Asiasari Radix</i>	1.875	HMAX	China
감초 (甘草)	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	1.875	HMAX	China
Total		37.5		

탕의 구성 생약 중 황금의 baicalin의 정량을 위하여 검액 5 mL을 취하여 물을 넣어 20 mL로 한 뒤 정량분석을 실시하였다.

3) HPLC 분석조건

구미강활탕 내 주요 구성 성분의 함량을 분석하기 위하여 사용된 칼럼은 Luna C₁₈ (5 μm, 4.6 × 250 mm, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘려주었으며 주입량은 10 μL였다. 이동상은 1.0% acetic acid가 함유된 water (A)와 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile (B)을 사용하여 0-40분 5-70% B, 40-45분 70-100% B, 45-50분 100% B, 50-55분 100-5% B, 55-70분 5% B로 흘려주었으며 검출파장은 glycyrrhizin은 254 nm, liquiritin, baicalin, baicalin 및 wogonin은 280 nm 및 ferulic acid는 320 nm에서 검출하였다.

4) 항산화능 측정

(1) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS⁺· cation decolorization assay 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다.¹⁴⁾ 7 mM

ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺·를 형성 시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS⁺·용액과 시료를 혼합하여 실온에서 5분 간 반응시킨 후, microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 항산화능은 시료를 녹인 용매인 PBS를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. 활성비교를 위하여 vitamin C를 사용하였다.

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

(2) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 96 well plate을 이용하여 실시하였다.¹⁵⁾ 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.

$$\text{DPPH radical scavenging}$$

$$\text{activity} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

5) 저밀도지단백 (low-density lipoprotein; LDL) 산화 억제 활성 측정

(1) Cu²⁺에 의한 LDL의 산화

반응은 LDL (Biomedical Technologies, Stoughton, MA, USA) 100 ug과 시료를 혼합한 후 25 uM CuSO₄를 첨가함으로써 시작하였고, 37°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 반응 후 thiobarbituric acid reacting substance (TBARS)의 형성,¹⁶⁾ relative electrophoretic mobility (REM)¹⁷⁾ 및 apolipoprotein B (ApoB)-100의 fragmentation¹⁸⁾을 측정하였다.

(2) TBARS 측정

산화 반응이 끝난 LDL 50 ug을 취하여 TBARS Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 malondialdehyde (MDA) 표준곡선에 대입시켜 MDA 양으로 환산하였다.

(3) REM 측정

산화 반응이 끝난 LDL 10 ug을 0.8% agarose gel에 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.

(4) ApoB-100 분절화 측정

산화 반응이 끝난 LDL 20 ug을 6% SDS-PAGE에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid 및 1 mM EDTA)에서 100 V로 6시간 동안 전기영동 한 후, Coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 관찰하였다.

3. 통계처리

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

III. 결과

1. HPLC 동시분석

1) 분석조건 확립

HPLC-PDA를 이용하여 구미강활탕을 구성하는 9종의 생약 중 천궁의 ferulic acid, 백지의 imperatorin과 isoimperatorin, 황금의 baicalin, baicalein 및 wogonin, 생지황의 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (5-HMF) 및 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 등 9종의 성분에 대하여 동시 분석조건을 설정하였다. 물-아세트나이트릴 또는 물-메탄올 등과 같은 이동상과 꼬리 끌림 현상을 줄이기 위하여 초산을 첨가하여 최적의 분석조건을 탐색하였다. 그 결과 1.0% 초산이 각각 함유된 물과 아세트나이트릴을 이용하여 기울기용리를 사용하여 9종의 성분을 양호하게 분리하였다. 따라서 확립된 용매조건을 이용하여 본 처방을 분석한 결과 liquiritin, ferulic acid, baicalin, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin 등 6종의 성분만이 검출이 되었다. 확립된 HPLC-PDA 분석법에서 이들 6종의 성분들은 35분 이내에 분리능 등 1.6 이상으로 양호하게 검출되었으며, 용량인자, 분리인자 및 이론단수 등 시스템 적합성도 양호하게 나타났다(Table 2). 검액에서의 peak는 주요 성분 peak의 retention time과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였으며, liquiritin, ferulic acid, baicalin, baicalein, glycy-

Table 2. System Suitability of the Six Marker Compounds.

Compound	Capacity factor (k')	Separation factor (α)	Number of theoretical plates (N)	Resolution(R_s)
Liquiritin	5.04	1.05	30925	1.61
Ferulic acid	5.31	1.05	16163	1.61
Baicalin	7.01	1.32	31896	8.96
Baicalein	9.35	1.11	29602	4.96
Glycyrrhizin	10.33	1.08	83598	4.47
Wogonin	11.13	1.08	57600	4.47

rrhizin 및 wogonin 등 6종의 성분은 16.891분, 17.649분, 22.373분, 28.916분, 31.656분 및 33.911분에 각각 검출되었다(Fig 2).

2) 구미강활탕의 함량분석

Liquiritin, ferulic acid, baicalin, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin 등 6종 성분의 peak

면적에 대한 검량선 작성 결과 검량선의 상관계수 (r^2)가 모두 0.9998이상으로 1에 가까운 양호한 직선성을 나타내었다(Table 3).

확립된 분석법을 이용하여 구미강활탕의 주요 성분인 liquiritin, ferulic acid, baicalin, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin을 동시정량한 결과 1.784, 1.693, 37.899, 0.258, 1.869, and 0.034 mg/g으로 각각 검출되었다(Table 4).

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

Compound	Linear range (ug/mL)	Regression equation ^a	Correlation coefficient (r^2)
Liquiritin	0.78-100.00	$y = 14375.57x + 5543.30$	0.9999
Ferulic acid	1.56-200.00	$y = 54164.43x - 8363-81$	1.0000
Baicalin	2.00-800.00	$y = 37166.21x - 60426.69$	0.9998
Baicalein	0.39-50.00	$y = 23303.79x - 9442.11$	1.0000
Glycyrrhizin	1.56-200.00	$y = 7777.91x + 1423.05$	1.0000
Wogonin	0.39-50.00	$y = 29690.14x + 10600.53$	0.9999

^ay: peak area (mAU) of compounds; x: concentration (ug/mL) of compounds.

Table 4. Contents of Six Compounds in the *Gumiganghwal-tang* by HPLC-PDA (n=3).

Compound	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Liquiritin	1.784	0.007	0.391
Ferulic acid	1.693	0.001	0.033
Baicalin	37.899	0.267	0.704
Baicalein	0.258	0.007	2.699
Glycyrrhizin	1.869	0.001	0.061
Wogonin	0.034	0.000	0.850

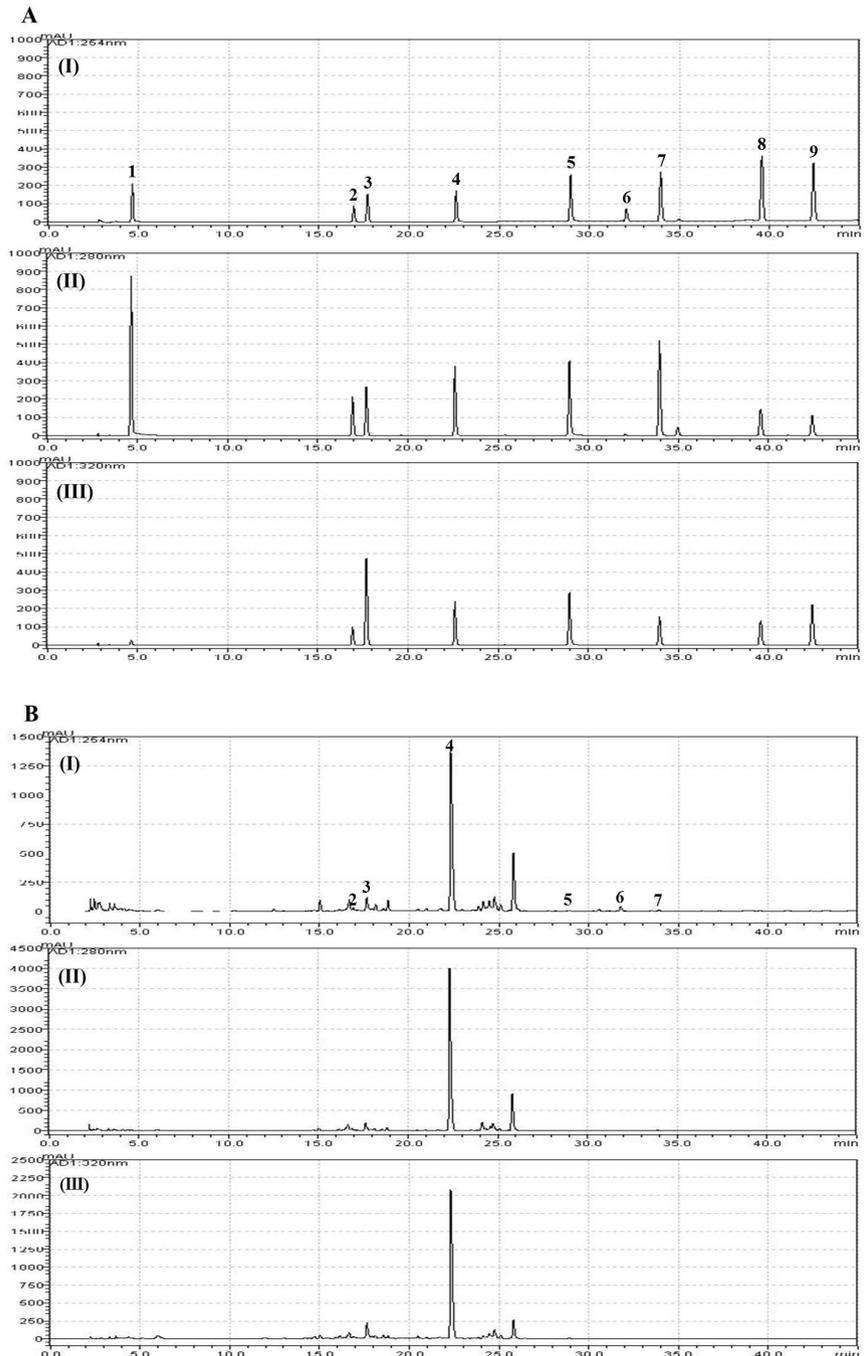


Figure 2. HPLC chromatogram of the standard mixture (A) and *Gumiganghwal-tang* sample (B) at 254 nm (I), 280 nm (II), and 320 nm (III).

5-HMF (1), liquiritin (2), ferulic acid (3), baicalin (4), baicalein (5), glycyrrhizin (6), wogonin (7), imperatorin (8), and isoimperatorin (9).

2. LDL 산화억제 효능 연구

1) 항산화 활성

구미강활탕의 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. 구미강활탕 추출물 25, 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도에서 각각 16.01, 27.79, 51.81, 79.51 및 99.45%의 라디칼 소거활성을 나타

냈으며, 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양 (RC₅₀)은 72.51 µg/mL로 관찰되었다. 양성대조군인 vitamin C의 RC₅₀ 값은 2.31 µg/mL로 관찰되었다(Table 5). DPPH 라디칼의 소거활성 또한 ABTS 라디칼의 소거활성과 유사하게 농도의존적인 증가를 나타냈다. 추출물 25, 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도에서 각각 2.55, 15.79, 35.60, 68.34 및 88.31%의 라디칼 소거활성을 나타냈으며, RC₅₀는 128.49 µg/mL로 관찰되었다. 양성대조군인 vitamin C의 DPPH 라디칼에 대한 RC₅₀ 값은 7.44 µg/mL로 관찰되었다(Table 6).

Table 5. Scavenging Effects of *Gumiganghwal-tang* on ABTS^{•+}.

Herbal formulas	Concentration (µg/mL)	Scavenging effect (%)	RC50 ^a (µg/mL)
GMGHT	25	16.01 ± 1.06	72.51 ± 1.88
	50	27.79 ± 1.44	
	100	51.81 ± 2.75	
	200	79.51 ± 0.74	
	400	99.45 ± 0.10	
Vitamin C	2.5	40.61 ± 1.44	2.31 ± 0.05
	5	75.86 ± 1.06	
	10	99.78 ± 0.06	

^aConcentration required for 50% reduction of ABTS^{•+} at 5 min reaction.

Table 6. Scavenging Effects of *Gumiganghwal-tang* on DPPH

Herbal formulas	Concentration (µg/mL)	Scavenging effect (%)	RC50 ^a (µg/mL)
GMGHT	25	2.55 ± 1.21	128.49 ± 9.76
	50	15.79 ± 2.55	
	100	35.60 ± 2.66	
	200	68.34 ± 4.94	
	400	88.31 ± 1.43	
Vitamin C	5	24.27 ± 1.40	7.44 ± 0.27
	10	58.79 ± 1.98	
	20	90.04 ± 0.36	

^aConcentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min reaction.

2) LDL 산화 억제 활성

LDL 산화 억제 활성을 검색하고자 Cu^{2+} 에 의해 LDL 산화를 유도하고, 추출물을 처리하여 LDL 산화 정도를 비교 분석하였다. TBARS assay 결과 구미강활탕 추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 저해효과를 나타냈으며, IC_{50} 값이 55.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 계산되었다(Fig. 3). Fig. 4는 Cu^{2+} 에 의해 유도된 산화 LDL의 전기적 이동차

(REM)에 대한 구미강활탕의 효과를 나타내고 있다. 구미강활탕을 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였을 때 산화 LDL의 REM이 각각 42.93, 73.66, 82.93, 85.85% 감소되었다. 산화 반응을 유도한 LDL에서는 apoB-100가 거의 분절되어 온전한 단백질 band를 관찰 할 수 없었지만, 구미강활탕 추출물과 함께 산화 반응을 유도한 LDL의 apoB-100은 농도 의존적으로 분절화가 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5).

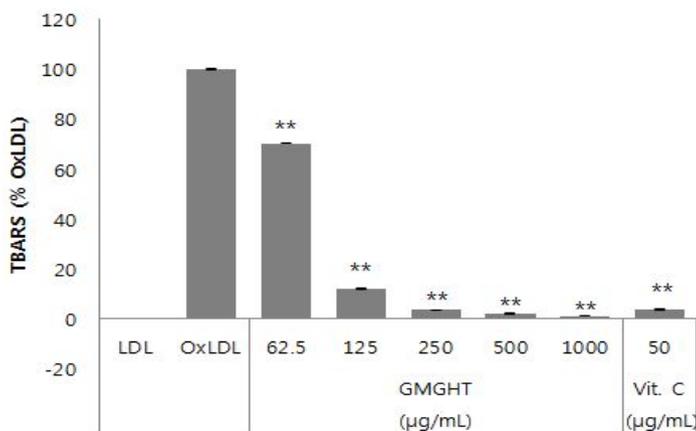


Figure 3. Effects of *Gumiganghwal-tang* on Cu^{2+} -induced lipid peroxidation in LDLs.

Indicated concentrations of GMGHT or vitamin C (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LDLs were incubated with CuSO_4 for 6 hr at 37°C. The quantitative data were presented as mean \pm S.E.M. of triplicate experiments. **p < 0.01 vs. oxLDL group.

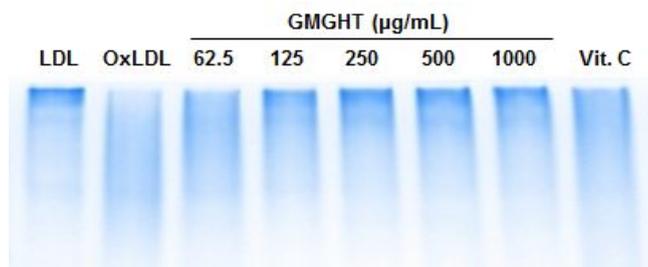


Figure 5. Effects of *Gumiganghwal-tang* on Cu^{2+} -mediated ApoB fragmentation in LDLs.

Indicated concentrations of GMGHT or vitamin C (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LDLs were incubated with CuSO_4 for 6 hr at 37°C. LDLs were loaded onto 6% SDS-PAGE for electrophoresis. The stained gel is representative of two independent experiments.

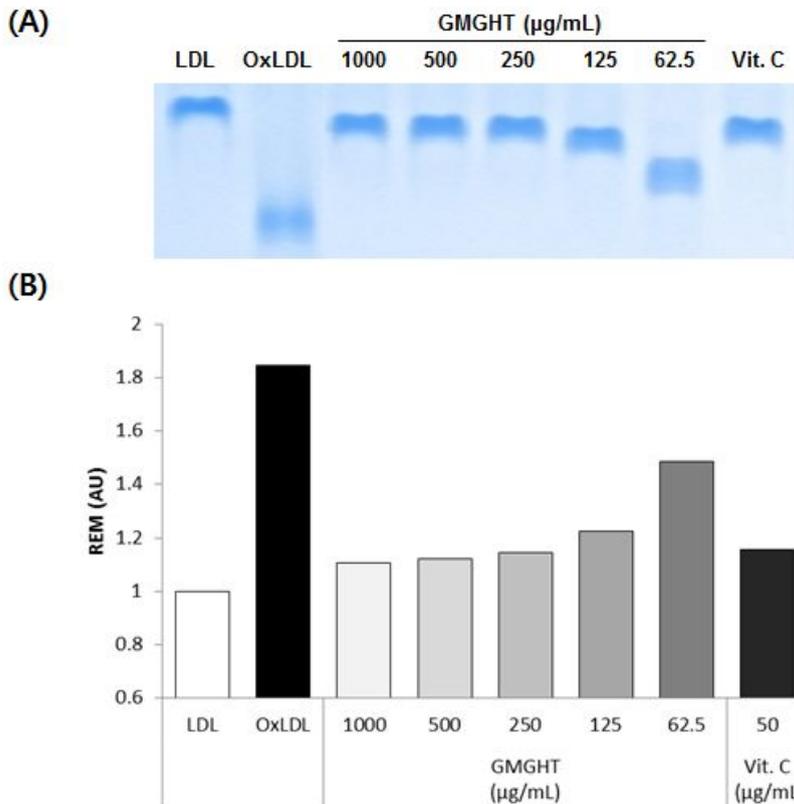


Figure 4. Effects of *Gumiganghwal-tang* on electrophoretic mobility of Cu^{2+} -induced oxidized LDLs. Indicated concentrations of GMGHT or vitamin C (50 $\mu\text{g/mL}$) and LDLs were incubated with CuSO_4 for 6 h at 37°C . The electrophoretic mobility of LDLs were detected by agarose gel electrophoresis. (A) The stained gel is representative of two independent experiments. (B) Relative electrophoretic mobility (REM) indicated the distances moved from the origin were calculated and presented.

IV. 고찰

총 9종의 생약으로 구성된 한약 처방인 구미강활탕의 품질개선 및 표준화방법에의 응용 가능성을 목적으로 본 연구에서는 총 9종의 성분에 대하여 HPLC-PDA를 이용하여 동시분석을 실시하여, liquiritin, ferulic acid, baicalin, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin 등 6종의 성분에 대해서 정량적인 결과를 도출하였다. 구미강활탕을 구성하고 있는 생약 및 지표 성분의 항산화 및

LDL 산화 억제 효능은 많은 연구를 통해 알려져 왔다^{19,20,21}. LDL은 혈장단백질 (plasma protein) 중 밀도가 1.025에서 1.058에 해당하는 지단백 (lipoprotein)으로서, 세포 내·외에서 생성되는 산화적 스트레스에 의해 변형되어 산화 LDL (oxLDL)을 형성한다. 이러한 산화 LDL은 대식세포의 탐식 작용에 의해 세포 내로 유입되어 거품세포를 형성하게 된다. 거품세포는 대식세포의 염증 반응 및 평활근 세포의 분화·증식 및 혈관내피세포의 변화를 유도하여 플라크를 생

성함으로써 동맥경화를 유발하게 된다^{22,23)}. 동맥경화 초기 발병 및 진행에 있어 주요 기전으로 알려진 산화 LDL의 형성을 억제하는 효능을 평가하여 구미강활탕의 새로운 응용가능성을 검토하고자 하였다. 구미강활탕은 농도의존적인 항산화효과와 더불어, Cu²⁺에 의한 LDL 산화를 억제하여 oxLDL의 형성을 억제하는 효과를 관찰하였다.

V. 결론

본 연구에 의해 확립된 HPLC-PDA 동시정량법은 한약처방인 구미강활탕의 품질관리를 위한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 구미강활탕의 우수한 항산화활성 및 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 (K13 030)’에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Jiang WY. Therapeutic wisdom on traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26:558-563.
- Liu S, Yi LZ, Liang YZ. Chinese medicine and separation science. *J Sep Sci.* 2008;31:2113-2137.
- Liang YZ, Zie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B.* 2004; 812:53-70.
- Normile D. The new face of traditional Chinese medicine. *Science.* 2003;299:188-190.
- 허준. 동의보감. 서울:민중서원, 1993:669.
- 한의학대학 방제학교수 공편저. 방제학. 서울:영림사. 1999:74-75.
- 보건복지가족부. 2008년도 한방 의료 이용 실태 조사. 2008:319.
- Moon YH, Go JJ, Park J. Anti-inflammatory and analgesic activities of Gumiganghwaltang. *Kor J Pharmacogn.* 1999;30:18-24.
- Lee JA, Ha HK, Jung DY, Lee HY, Lee JK, Huang DS, Shin HK. Comparative study of 25 herbal formulas on anti-inflammatory effect. *J Orient Obstetrics & Gynecol.* 2010;23:101-111.
- Kim SJ, Jeong HJ, Moon PD, Lee KM, Lee HB, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK, Yang DC, Hong SH, Kim HM. Anti-inflammatory activity of Gumiganghwaltang through the inhibition of nuclear factor-κB activation in peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:233-237.
- Heo SC, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. Experimental study on the effects of Kumi-kanghal-tang. *K H M.* 1998;14:174-183.
- Shin IS, Kim JH, Ha HK, Seo CS, Lee MY, Lee HY, Lee JK, Lee NH, Lee JA, Lee SL, Huh JI, Shin HK. Acute toxicity study on Gumiganghwaltang (Jiuweiqianghuo-tang) in Sprague-Dawley rats. *Korean J Orient Med Prescription.* 2010;18:79-85.
- Park H, Hwang YH, Jang D, Ha JH, Jung K, Ma JY. Acute toxicity study on Gumiganghwaltang and fermented Gumiganghwaltang extracts. *Formula Sci.* 2012;20:93-102.
- 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;26:1231-1237.
15. 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; 71:109-114.
 16. 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;208:10-11.
 17. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res*. 1992;33:123-130.
 18. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 1992;13:341-390.
 19. Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol Med* 1997;23:302-13.
 20. Belinky PA, Aviram M, Fuhrman B, Rosenblat M, Vaya J. The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation. *Atherosclerosis* 1998;137:49-61.
 21. Yang B, Liang RX, Zhou XN, Gao W, Huang LQ. Relationship between antioxidant activities and contents of active ingredients in *Radix Scutellaria*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2008;33(16):2019-22.
 22. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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; 89:2462-2478.
 23. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res*. 2009;50:S376-381.