

## 고온고압증기멸균이 우황청심원에 미치는 영향

조창영<sup>†</sup> · 이인희\* · 이재웅\* · 김은지\* · 이진호\*<sup>†</sup> · 김민정\*  
자생한방병원 한방재활의학과<sup>†</sup>, 자생의료재단 척추관절연구소\*

### The Effects of High Temperature High Pressure Steam Sterilization on *Woohwangchungsimwon*

Chang-Young Cho, M.S.<sup>†</sup>, In-Hee Lee, M.S.\* , Jae-Woong Lee, M.S.\* , Eun-Jee Kim, M.S.\* ,  
Jin-Ho Lee, M.S.\*<sup>†</sup>, Min-Jeong Kim, B.S.\*

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Jaseng Hospital of Korean Medicine<sup>†</sup>, Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation\*

**Objectives** To check marker content for appropriate quality control of *Woohwangchungsimwon* sterilized to ensure microbiological safety and to observe antioxidant activity for any changes in efficacy.

**Methods** To measure any effects of sterilization on the effective compounds, 8 ingredients of *Woohwangchungsimwon* were screened for any changes in marker content using HPLC-DAD. Using the colorimetric method on the microplate reader any changes in total phenolic compound and flavonoid levels were observed. Antioxidant activity was measured using the DPPH, ABTS, and FRAP.

**Results** Of the ingredients of *Woohwangchungsimwon*, 8 were subject to quantitative analysis before and after sterilization, 21.6 mg and 1.93 mg of Glycyrrhizin was found in *Glycyrrhiza uralensis Fischer* pre and post sterilization, respectively. Decursin found in *Angelica gigas Nakai* increased from 0.16 mg to 0.29 mg after sterilization. Bilirubin found in *Gallstone of Bostaurusvar. domesticus* increased from 0.24 mg to 0.33 mg. Cinnamic acid found in *Cinnamomum cassia Blume* increased from 0.02 mg to 0.05 mg. Ginsenoside Rb1 found in *Panax ginseng C. A. Meyer* decreased from 0.02 mg to 0.14 mg. Paeoniflorin found in *Paeonia lactiflora Pallas* increased from 1.05 mg to 1.13 mg. Amygdalin found in *Armeniaca Amarum Semen* increased from 2.68 mg to 2.83 mg. L-muscone found in *Musk* increased from 0.63 mg to 0.76 mg. As for total phenolic compound and total flavonoid content, there was a 1.22 and 4.15-fold increase. DPPH and ABTS increased by 20.45% and 20.69%, respectively. FRAP activity was 2.78 times more active post stabilization.

**Conclusions** This study confirmed that high temperature high pressure steam sterilization, a method used to ensure microbiological safety of *Woohwangchungsimwon*, does not affect marker content; in other words, does not affect quality of the *Woohwangchungsimwon*. It could also be seen that total phenolic compound and flavonoid content increased after sterilization. An antioxidant activity test showed that there was significantly increased activity of antioxidants. (J Korean Med Rehab 2015;25(1):45-52)

This research was supported by a grant from Jaseng Medical Foundation in 2014.

RECEIVED November 11, 2014  
ACCEPTED December 10, 2014

CORRESPONDING TO  
Min-Jeong Kim, Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation, 858 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-896, Korea

TEL (02) 3218-2251  
FAX (02) 3218-2244  
E-mail lkompje@jaseng.co.kr

Copyright © 2015 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Key words** *Woohwangchungsimwon*, HPLC, DPPH, ABTS, FRAP, Sterilization

## 서론»»»»

우황청심원은 宋代 陳師文 등의 太平惠民和劑局方<sup>1)</sup>에 처음 수록되었으며 五臟六腑에 문제가 생겨 발병한 中風에 사용되는 대표적인 처방이다<sup>2)</sup>. 우황청심원은 심박수 감소와 혈관확장<sup>3)</sup>, 혈관계질환<sup>4)</sup>, 진통, 항경련, 저산소 뇌장애 보호<sup>5)</sup> 효과 등이 있다고 보고되어 있다. 우황청심원은 최근 中風환자나 연하장애가 있는 환자에게 복용을 편리하게 하고 소화흡수작용을 촉진시키기 위해 懸濁液 제제로 생산되기도<sup>6)</sup> 하지만 한의학계에서는 전통적인 방법으로 丸劑로 처방되는 경우가 많다. 丸劑의 경우 일부가 열공정을 거쳐 제조되는 경우도 있으나, 가열공정을 거치지 않는 경우는 미생물존재가 불가피하다고 볼 수 있으며 특히 우황의 경우 牛科(Bovidae)에 속하는 소(*Bostaurus* Linne var. *domesticus* Gmelin)의 담낭 중에 생긴 결석으로 미생물오염에 쉽게 노출되어 있는 편이다<sup>7)</sup>.

생약의 미생물허용한도 및 멸균과 관련한 최근의 연구를 살펴보면 대한약전의 일반시험법(제2012-60호, 식품의약품안전청) 미생물한도시험 적용범위 및 한도기준(제 3 조 관련)에는 세균  $10^5$  cfu/ml (g), 진균  $10^2$  cfu/ml (g)으로 기준이 설정되어 있으며 한약재의 미생물검출수준에 관한 연구에서 한약재의 미생물허용한도에 대한 의견을 제시하였다<sup>8)</sup>. 미생물에 의한 한약재의 부패나 변질을 방지하기 위해 미생물을 사멸시키기 위한 극한조건의 멸균법을 진행하였을 때 성분 및 품질 저하에 대한 우려로 멸균법에 따른 황백, 작약, 행인의 지표성분 함량에 미치는 영향에 관한 연구<sup>9)</sup>가 있었으며 이 외에도 단일 약재의 멸균에 대한 연구로는 멸균 후 목단피의 유효성분 함량에 관한 연구<sup>10)</sup>, 멸균 후 황금의 유효성분 함량에 관한 연구<sup>11)</sup>가 진행된 바 있다.

우황청심원에 대한 기존 연구를 살펴보면 우황청심원의 효능을 검증하는 연구와 變方牛黃清心元의 임상적 고찰<sup>12)</sup>, 새로운 劑型의 牛黃清心元간의 비교<sup>13)</sup>, 麝香 대체 물질이 함유된 牛黃清心元과 기존 牛黃清心元의 효능을 비교하는 연구가 주를 이루었으며<sup>14)</sup> 그 외 牛黃清心元에 대한 독성연구와 牛黃清心元 특정 성분의 분류 및 정량법 개발에 대한 연구<sup>15)</sup>는 보고되었으나 丸劑로 조제된 우황청심원의 멸균 및 그에 따른 영향에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

이에 본 논문에서는 향상된 품질수준을 확보한 우황청

심원을 공급함으로써 국민의 건강 증진과 한약제제에 대한 신뢰도 향상에 기여하기 위해 우황청심원 멸균의 필요성과 멸균 후 우황청심원의 유효성을 검증하고자 우황청심원 지표물질의 함량 분석과 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)를 이용한 항산화활성을 통하여 본 연구를 진행하였다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 우황청심원은 대한약전 외 의약품에 제시되어 있는 원방우황청심원 제법의 약재들을 그린명품제약에서 구입하여 사용하였다(Table 1).

#### 2) 시약

본 연구에서는 대한약전 외 의약품에 제시되어 있는 유효성분 분석에 대한 8종 약재의 표준품으로 Glycyrrhizin, Bilirubin, Ginsenoside Rb1은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), Cinnamic acid, Paeoniflorin은 Sigma Aldrich chemical company, Inc. (Milwaukee, WI), Decursin, Amygdalin은 Korea Food & Drug Administration (Cheongju, Korea), L-muscone은 PhytoLab GmbH & Co.KG (Vstenbergsgreuth, Germany)에서 각각 구입하였고, 97.8%이상의 순도를 사용하였다. 정량분석에 사용된 Water, Acetonitrile, Methanol은 HPLC grade (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)용, Acetic acid는 JUNSEI Chemical (JAPAN), Chloroform은 Burdick & Jackson (USA)을 사용하였다. Folin-Ciocalteu reagent, Gallic acid, Quercetin, DPPH, ABTS, Potassium persulfate, Ferric chloride, TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Sodium Acetate은 Sigma chemical co., (St. Louis Mo, USA), NaOH는 SAMCHUN (Korea),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Diethyleneglycol은 JUNSEI (Japan)제품을 사용하였다.

### 3) 기기

본 실험에 사용된 기기 중 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)는 Waters사의 Waters 600s controller, Waters™ 626 pump, Waters temperature control

module, Waters In-Line degasser, Waters™ 717plus autosampler, Waters™ 996 photodiode array detector (PDA), GC (Gas Chromatograph)기기는 Agilent 7890A (G3440A), FID Detector, Headspace G1888 (G1888A), ELISA reader는 TECAN Austria GmbH (Austria), Autoclave는 JEIO TECH CO., LD (Korea)를 사용하였다.

**Table I.** The Composition of *Woohwangchungsimwon*

Herb name	Pharmacognostic name	Amount (mg)
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	263
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	188
人參	<i>Ginseng Radix</i>	94
蒲黃	<i>Typhae Pollen</i>	94
神麩	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	94
大豆黃卷	<i>Glycine semen</i>	66
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	66
阿膠	<i>Asini Gelantium</i>	66
芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	56
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	56
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	56
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	56
防風	<i>Ledebourielae Radix</i>	56
白朮	<i>Atractylodis macrocephalae</i>	56
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	47
桔梗	<i>Platycody Radix</i>	47
杏仁	<i>Armeniaca amarum Semen</i>	47
茯苓	<i>Poria Sclerotium</i>	47
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	47
牛黃	<i>Bovis Calculus</i>	45
羚羊角	<i>Saigae Tataricae Cornu</i>	38
麝香	<i>Moschu</i>	38
龍腦	<i>Borneolum Syntheticum</i>	38
白蘞	<i>Ampelopsis Radix</i>	28
乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	28
Total		1,717

**Table II.** HPLC Condition for Quantitative Analysis

Compound	Wave length (nm)	Mobile phase (%)	Inj.* (μl)	
			Std <sup>†</sup>	Spl <sup>‡</sup>
Glycyrrhizin	254	Acetonitrile (65) : Water (35)	5	10
Decursin	203	Acetonitrile (80) : Water (20)	20	20
Bilirubin	436	Methanol (90) : Water (9.8) : Acetic acid (0.2)	10	10
Cinnamic acid	280	Acetonitrile (70) : Water (30)	10	10
Ginsenoside Rb1	203	Acetonitrile (70) : Water (30)	100	100
Paeoniflorin	230	Acetonitrile (85) : Water (15)	20	20
Amygdalin	214	Acetonitrile (90) : Water (10)	20	20

\*Inj.: injection volume, <sup>†</sup>Std: standard, <sup>‡</sup>Spl: sample.

## 2. 방법

### 1) 시료조제

대한약전 외 의약품에 제시되어 있는 원방우황청심원 제법에 따라 우황청심원을 조제하였고, 조제한 우황청심원을 멸균 전과 멸균 후(121°C, 15분)로 나누어 시료로 사용하였다.

### 2) 함량 분석

#### (1) HPLC 분석

8종의 표준물질 Glycyrrhizin, Decursin, Cinnamic acid, Ginsenoside Rb1, Paeoniflorin, Amygdalin은 Methanol에 녹여 0.4 mg/ml 농도로 조제하고, Bilirubin, L-muscone은 Chloroform에 녹여 1 mg/ml의 농도로 조제하여 4°C에서 보관하여 사용하였다. 각 물질에 대한 분석은 대한약전의 분석법 등을 기초로 하여 분석조건을 설정하였다. 사향을 제외한 7가지 약재는 HPLC를 사용하였고, Column은 TC-C18(2) (5 μm, 4.6 I.D.×250 mm, Agilent), Column temperature는 30°C, Flow rate는 1.0 ml/min을 유지하였다. Mobile phase, Injection Volume, UV는 각 물질 조건에 따라 측정하였다(Table II). 사향은 GC를 사용하였고, Column은 HP-5 (0.25 μm, 30 m

I.D. × 0.32 mm, Agilent), Injector, Detector temperature 210°C, Oven temperature 140°C, Flow rate 1 ml/min, Carrier gas N, Injection Volume 1 μl로 측정하였다.

(2) Total phenolic compound 함량

총 페놀화합물 함량은 Folin-Ciocalteu 분석법으로 측정하였다<sup>16,17</sup>. 시료 50 μl을 취해 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 L에 20 g) 1 ml와 잘 혼합하고 2분간 반응한 후, 50% Folin 시약 (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma) 50 μl를 넣어 다시 30분간 반응시킨 후 ELISA reader 750 nm에서 측정하였다. 총 페놀화합물 함량은 Gallic acid의 표준 곡선에 기초하여 계산하였다.

(3) Total flavonoid 함량

시료 100 μl를 Diethyleneglycol 1 ml와 혼합하고, 1N NaOH 100 μl를 첨가하였다. 충분히 혼합한 시료는 37°C (water bath)에서 1시간동안 반응시킨 후, ELISA reader로 415 μl에서 측정하였다. 총 플라보노이드는 Quercetin의 표준 곡선에 기초하여 계산하였다<sup>18</sup>.

3) 항산화 활성 측정

(1) DPPH radical 소거능

시료 용액 100 μl와 에탄올에 용해시킨 DPPH 500 ppm 100 μl을 넣어주고 37°C에서 30분간 반응 시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료별 DPPH radical 소거능을 비교하기 위해 전자공여능을 아래 공식에 대입하였다<sup>19</sup>.

Electron Donating Ability (EDA, 전자공여능) (%)

$$= \frac{(\text{음성대조군 흡광도} - \text{시료의 흡광도})}{\text{음성대조군의 흡광도}} \times 100$$

(2) ABTS radical 소거능

7.4 mM ABTS와 2.6 mM Potassium persulfate를 동량 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS 형성 시킨 후 750 nm에서 흡광도 값이 1.1 ± 0.02가 되도록 Methanol로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 190 μl에 sample 10 μl를 가하여 2시간 동안 암상태에서 방치한 다음 750 nm 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 라디칼의 제거활성 (%)으로 나타냈으며 양성대조군인 표준물질로는 Trolox을 사용하였다<sup>20</sup>.

Free radical scavenging effect (%)

$$= [1 - (\text{Abs sample} / \text{Abs blank})] \times 100$$

(3) FRAP assay

300 mM Acetate buffer [(3.1 g C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O and 16 ml Acetic acid) pH3.6]과 10 mM TPTZ (2, 4, 6-tri-pyridyl-s-triazine) solution in 40 mM HCl, 그리고 20 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O solution을 준비한다. 위 3개 용액을 사용 직전에 25 ml Acetate buffer, 2.5 ml TPTZ solution, 2.5 ml FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O으로 섞고(10 : 1 : 1 비율) 37°C에서 사용 직전까지 보관한다. FRAP 용액 190 μl에 sample 10 μl을 넣고 30분 동안 암상태에서 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준물질로는 Trolox을 사용하며(25 and 600 mM)mM Trolox equivalents (TE)/g로 값을 계산한다<sup>21,22</sup>.

3. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 시행하였다. 실험결과는 각각 (평균 ± 표준편차)로 나타냈으며, 통계 분석은 paired t test로 행하였으며 p값이 0.05보다 작을 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결과»»»»

1. 성분함량에 미치는 영향

1) 8종 지표성분 함량

대한약전상 선정되어 있는 우황청심원의 분석조건인 감초, 당귀, 우황, 육계, 인삼, 작약, 행인, 사향 총 8종에 대한 멸균 전, 후 지표성분을 분석한 결과 감초 중 Glycyrrhizin의 멸균 전 함량은 21.6 mg이었고, 멸균 후 함량은 1.93 mg이었다. 당귀 중 Decursin은 0.16 mg, 0.29 mg, 우황 중 Bilirubin은 0.24 mg, 0.33 mg, 육계 중 Cinnamic acid는 0.02 mg, 0.05 mg, 인삼 중 Ginsenoside Rb1은 0.02 mg, 0.14 mg, 작약 중 Paeoniflorin은 1.05 mg, 1.13 mg, 행인 중 Amygdalin은 2.68 mg, 2.83 mg, 사향 중 L-musccone은 0.63 mg, 0.76 mg이 함유되어 있었다(Table III).

2) Total phenolic compound 함량

총 페놀함량 측정을 위해, 표준시약으로 사용된 Gallic acid 함량(X)과 760 nm에서의 흡광도(Y) 간의 회귀방정

**Table III.** The Content of *Woohwangchungsimwon* according to Sterilizing Before and After

Compound	Content (mg)	
	Before	After
Glycyrrhizin	2.16±0.03	1.93±0.07
Decursin	0.15±0.01	0.29±0.02
Bilirubin	0.24±0.01	0.33
Cinnamic acid	0.02	0.05
Ginsenoside Rb1	0.02	0.14
Paeoniflorin	1.05±0.01	1.13±0.02
Amygdalin	2.68±0.02	2.83±0.02
L-muscone	0.63±0.01	0.76±0.01

The results are the mean±S.D. from three replication.

**Table IV.** Total Phenolic Compound Content, Total Flavonoid Content of *Woohwangchungsimwon* according to Sterilizing Before and After

	Total phenolic (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
Before	6.95±0.17	19.89±0.38
After	8.51±0.16	22.11±0.46

The results are the mean±S.D. from three replication.

식은  $Y=0.0034X-0.0654$  이었다. Gallic acid의 함량이 증가함에 따라 흡광도도 유의적으로( $R^2=0.996$ ) 증가하였다. 우황청심원의 총 페놀함량은 멸균 전 6.95±0.17 mg/g, 멸균 후 8.51±0.16 mg/g로 나타났으며 페놀 함량은 멸균 후가 멸균 전에 비해 약 1.22배 높았다(Table IV).

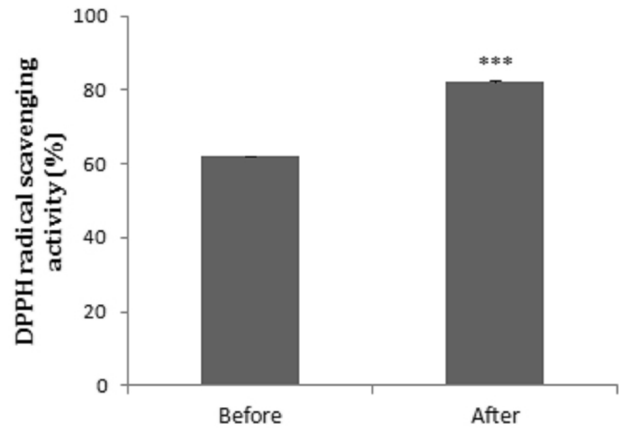
### 3) Total flavonoid 함량

총 플라보노이드 측정을 위해, 표준시약으로 사용된 Quercetin 함량(X)과 415 nm에서의 흡광도(Y) 간의 회귀 방정식은  $Y=0.0006X+0.0577$  이었다. Quercetin의 함량이 증가함에 따라 흡광도도 유의적으로( $r^2=0.999$ ) 증가하였다. 우황청심원의 총 플라보노이드 함량은 멸균 전 19.89±0.38 mg/g, 멸균 후 22.11±0.46 mg/g로 나타났으며 멸균 후가 멸균 전에 비해 1.11배 정도 플라보노이드 함량이 높았다(Table IV).

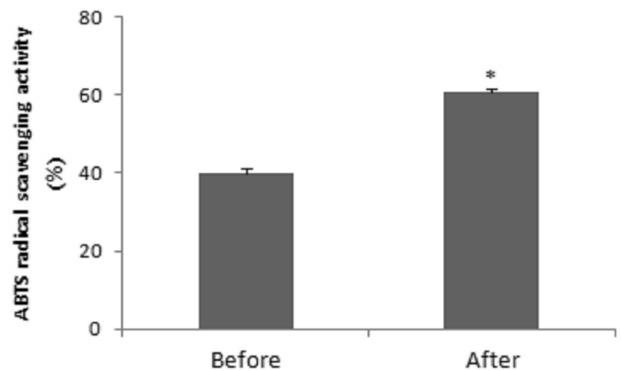
## 2. 항산화 활성에 미치는 영향

### 1) DPPH radical 소거능

우황청심원을 500 ppm의 DPPH 용액을 이용하여 전



**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activities of *Woohwangchungsimwon* according to sterilizing before and after. The results are the mean±S.D. from three replication. Different letters indicate a significant difference by paired t-test at  $p<0.05$ .

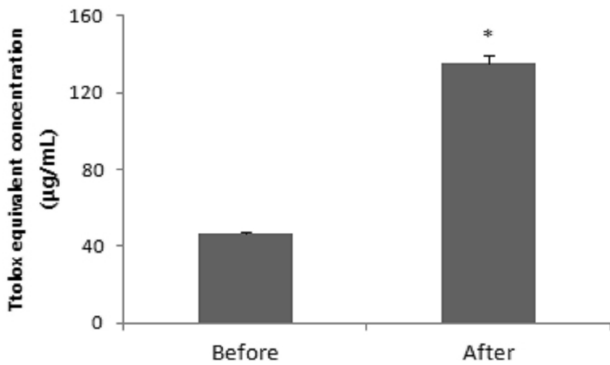


**Fig. 2.** ABTS value of *woohwangchungsim-won* according to sterilizing before and after. The results are the mean±S.D. from three replication. Different letters indicate a significant difference by paired t-test at  $p<0.05$ .

자공여능을 측정해 본 결과 멸균 전 62.08±0.05%, 멸균 후 82.34±0.13%의 전자공여능을 값을 얻었다. 이를 통해 멸균 후의 우황청심원이 멸균 전에 비해 전자공여능이 우수한 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

### 2) ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거법을 이용하여 우황청심원의 멸균 전, 후에 대한 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 2). 이때 사용된 양성대조군인 표준물질로는 Trolox의 linearity는  $R^2=0.997$ 이상의 값을 보였다. 그 결과, 멸균 전 40.06±1.83%, 멸균 후 60.75±1.37%으로 멸균 후의 ABTS값이 유의적으로 증가함을 확인 할 수 있었다.



**Fig. 3.** FRAP value of *Woohwangchungsimwon* according to sterilizing before and after. The results are the mean±S.D. from three replication. Different letters indicate a significant difference by paired t-test at  $p < 0.05$ .

### 3) FRAP assay

FRAP법을 이용하여 우황청심원의 멸균 전, 후에 대한 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 3). 이때 사용된 양성대조군인 표준물질로는 Trolox의 linearity는  $R^2=0.997$  이상의 값을 보였다. 그 결과, Trolox에 대입하면 멸균 전  $46.59 \pm 1.95 \mu\text{g/ml}$ , 멸균 후  $135.26 \pm 7.85 \mu\text{g/ml}$  으로 멸균 후의 FRAP값이 유의적으로 증가함을 확인 할 수 있었다.

## 고찰

미생물허용한도에 관한 최근의 연구 중 2006년 한국한의학연구원 연구에서는 한약재의 미생물 존재에 대한 문제를 제기하고 3개 지역의 약업사에서 미생물 오염이 용이한 한약재 18종과 시간이 경과할수록 약의 성질이 좋아진다는 육진약(六陳藥)에 속하는 한약재 6종을 구입하고 한약제제 중 육미지황환을 제조한 뒤 미생물오염을 모니터링하는 방법으로 연구를 진행하였다. 이 결과 전체적으로 진균의 오염률이 높았으며 특히 육진약의 경우 총 세균의 오염율은 17.7%, 총 진균의 오염율은 41.2%로 나타나, 향후 한약재에 대한 지속적인 미생물오염도 모니터링의 필요성을 강조하였다<sup>23)</sup>. 멸균법에 관한 연구를 살펴보면 황백, 작약, 행인<sup>9)</sup>, 목단피<sup>10)</sup>, 황금<sup>11)</sup>을 대상으로 하여 건열 멸균법, 알코올 가스 멸균법, 방사선 조사 멸균법을 적용한 후 해당 생약의 지표물질 함량에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 건열 멸균법은 진균을 효과적으로

제거하고 지표성분도 변화하지 않으나 외부 관능(색, 형태)의 변화를 초래하기 때문에 생약의 멸균법으로는 적당하지 않으며 방사선조사 멸균법은 세균 및 진균을 효과적으로 제거하고 지표성분 함량 및 외부 관능의 변화도 초래하지 않아 적당한 방법으로 추천하였다. 알코올 가스 멸균법은 진균을 효과적으로 제거하므로 진균 제거를 위한 멸균법으로 적당한 것으로 나타났다. 방사선 조사 혹은 알코올 가스 멸균법이 효과적인 것으로 나타났으나 모든 생약의 미생물학적 품질 보증을 위한 실용화를 위해서는 다른 생약에 대한 추가적인 연구에 대한 필요성을 강조하였다.

우황청심원은 宋代 陳師文 등의 太平惠民和劑局方에 처음 수록되었으며 五臟六腑에 문제가 생겨 발병한 中風에 사용되는 대표적인 처방이다. 우황청심원은 심박수 감소와 혈관확장, 혈관계질환, 진통, 항경련, 저산소 뇌장애 보호 효과 등이 있다고 보고 되어있다. 우황청심원은 최근 中風환자나 연하장애가 있는 환자에게 복용을 편리하게 하고 소화흡수작용을 촉진시키기 위해 懸濁液 제제로 생산되기도 한다.

본 연구에서 고혈압, 협심증, 조현증, 신경과민증, 신경성불안증 등 다양한 분야에서 손쉽게 이용되는 우황청심원의 멸균의 필요성을 확인하기 위하여 고온고압증기법을 통해 멸균한 우황청심원에서 감초, 인삼, 육계, 작약, 당귀, 행인, 우황, 사향의 8종에 대한 지표물질의 함량을 분석하였으며 우황청심원의 유효성 변화를 확인하기 위하여 동맥경화나 뇌, 심장혈관계 장애, 노화와 발암 등에 의해 발생하는 활성산소에 대한 소거 능력으로 항산화활성을 확인하였다.

함량분석은 대한약전에 명시되어 있는 조건을 본 실험실에 적합하게 변경하여 실험을 진행하였으며, 그 조건에 따라 감초를 제외한 7가지 당귀, 우황, 육계, 인삼, 작약, 행인, 사향의 경우 지표물질 함량이 멸균 전 각각  $0.15 \pm 0.01$ ,  $0.24 \pm 0.01$ ,  $0.02$ ,  $0.02$ ,  $1.05 \pm 0.01$ ,  $2.68 \pm 0.02$ ,  $0.63 \pm 0.01$  mg에서 멸균 후 각각  $0.29 \pm 0.02$ ,  $0.33$ ,  $0.05$ ,  $0.14$ ,  $1.13 \pm 0.02$ ,  $2.83 \pm 0.02$ ,  $0.76 \pm 0.01$  mg으로 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었고, 감초의 경우에는 멸균 전  $2.16 \pm 0.03$  mg에서 멸균 후  $1.93 \pm 0.07$  mg으로 소량 감소하였으나 유의적이지는 못하였다. 총 페놀화합물과 총 플라보노이드 함량에서도 멸균 전  $6.95 \pm 0.17$ ,  $19.89 \pm 0.38$  mg/g에서 멸균 후  $8.51 \pm 0.16$ ,  $22.11 \pm 0.46$

mg/g으로 각각 1.22배, 1.11배 높았다. 이러한 결과는 고온고압증기 멸균에 의하여 높은 온도와 압력을 통해 지표물질이 더 추출되었거나, 각각의 약재들 속 물질들이 합성을 통해 지표물질이 생성된 것으로 사료된다. 본 가설을 증명하듯 항산화 활성에서도 멸균 후 활성이 높아졌다. 안정한 프리 라디칼이 전자를 공여할 수 있는 다른 항산화 물질과 반응하게 되면 본래의 자색에서 무색으로 변하게 되고, 흡광도를 감소시키는 원리를 이용한<sup>24,25)</sup> DPPH의 경우 멸균 전  $62.08 \pm 0.05\%$ 에서 멸균 후  $82.34 \pm 0.13\%$ 으로 활성이 20.26% 증가하였다. Potassium persulfate와 화학 반응하여 형성된 청록색의 ABTS radical cation이 항산화 물질에 의해 소거되어 ABTS radical 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용한<sup>21)</sup> ABTS의 경우 멸균 전  $40.06 \pm 1.83\%$ 에서 멸균 후  $60.75 \pm 1.37\%$ 으로 활성이 20.69% 증가하였다. Radical 소거화성을 측정하는 방법과는 달리 낮은 pH에서 환원제에 의해 Ferric tripyridyl-triazine (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ)복합체가 Ferrous tripyridyltriazine (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한<sup>21,22)</sup> FRAP의 경우 멸균 전  $46.59 \pm 1.95 \mu\text{g/ml}$ 에서 멸균 후  $135.26 \pm 7.85 \mu\text{g/ml}$ 으로 활성이 34.44% 증가하였다.

## 결론»»»»

우황청심원의 품질수준을 확보하고, 국민의 건강 증진과 한약제제에 대한 신뢰도 향상에 기여하기 위해 우황청심원 멸균의 필요성과 멸균 후 우황청심원의 유효성을 검증하고자 우황청심원 지표물질의 함량 분석과 DPPH, FRAP, ABTS를 이용한 항산화활성을 실험을 진행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 당귀, 우황, 육계, 인삼, 작약, 행인, 사향의 경우 지표물질의 함량이 유의적으로 증가하였고, 감초의 경우 소량 감소하였으나 유의적이지는 못하였다.
  2. 총 페놀화합물과 총 플라보노이드 함량에서 멸균 후 각각 1.22배, 4.15배 높았다.
  3. DPPH 소거능은 멸균 후 20.45% 활성이 증가하였다.
  4. ABTS 소거능은 멸균 후 20.69% 활성이 증가하였다.
  5. PRAP 환원능은 멸균 후 2.78배 활성이 증가하였다.
- 위 결과에 따라 우황청심원의 미생물학적 안전성을 위하여 고온고압증기법으로 멸균을 하였을 때 품질관리를

위한 지표물질의 함량분석에는 문제가 없음을 확인하였으며, 그 밖의 총 페놀화합물과 총 플라보노이드의 함량이 멸균 후 증가되었고, 유효성 검증을 위한 항산화 활성 실험에서도 유의적으로 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

## 참고문헌»»»»

1. 陳師文 등, 太平惠民和劑局方, 旋風出版社, 1987:81.
2. 김영석, 중풍(뇌졸중):중풍학술대회논문집, 1995:1-56.
3. Choi CM, Sun JJ, Kim SM, Jung JH, Lee SY, Choi WW, Hong JW, Park SW, Jung WS, Moon SK, Park JM, Ko CN, Cho KH, Kim YS, Bae HS, The Effect of *Uhwangchungsimwon* on Heart Rats Variability of Healthy Subjects, Korean J. Orient.Int. Med, 2007;28(4):717-26.
4. Hwang SR, Jeong SH, Shin GC, Lee WC, The Effect of *Woohwangcheongsim-won* on Circulatory Disturbance in Diabetes, Korean Journal of Oriental Medicine, 2002; 23(2):164-79.
5. 남상경, 牛黃清心元과 蘇合香元의 效能에 關한 研究, 경희대학교, 1990.
6. 안일희, 문병순, 김세길, 신민교. 原方牛黃清心元 현탁액(SU-3)에 대한 임상시험 보고. 최신의학. 대한본초학회지, 1990;33(2):109-16.
7. 식품의약품안전청, 대한약전 및 대한약전의 한약(생약) 규격집, 서울.
8. Lee JH, Jeon WK, Ko BS, Chun JM, Lee AY, Kim HK, A monitoring for the establishment of microbial limit of herbal medicin(1), Korean Journal of Oriental Medicine, 2006;12(1):49-57.
9. Jeong CS, Cho SY, Lee YS, Effect of Sterilizing Methods on the Content of Index Constituents of Herbal Medicines, Archives of Pharmacal Research, 2006;50(6):415-20.
10. Lee YS, Shin WS, Cho SY, Ze KR, Lee HM, Jeong CS. Effects of Sterilization for Quality Control on the Content of Paeonol in Moutan Radicies Bark. Archives of Pharmacal Research. 2005;49(2):180-4.
11. Choon Sik Jeong, Effects of Sterilization for Quality Control and Content of baicalin in *Scutellariae Radix*. Korean Journal of Pharmacognosy, 2005;36(3):220-3.
12. 안일희, 김세길, 변방우황청심원(變方牛黃清心元) 환제(丸劑) 및 현탁액(懸濁液)에 대(對)한 임상적(臨床的) 고찰(考察), 대한한방내과학회지, 1991;12(1):1-18.
13. Kwack SJ, Kim HS, Chun SA, Lim SY, Park HS, Hong CY, Han HS, Choi BC, Lee BM, Comparative Acute Toxicity Studies on Woo Whang Chung Shim Won Suspension and Pill in Mice, Korean Journal of Toxicol, 1996;12(2):295-303.
14. Cho TS, Lee SM, Lee EB, Cho SL, Kim YK, Shin DH,, Park DK, Pharmacological Actions of New Woohwang-

- chungsimwon Pill on Cerebral Ischemia and Central Nervous System, Archives of Pharmacal Research, 1997; 41(26):817-28.
15. Lee JW, Baek KM, Baek YD, Im EY, Chang WS Cheon WH, Chung IK, The Latest Research Trends on Woohwangchungsim-won : A Review in Korean Article, Korean J. Orient. Med, 2010;31(4):775-91.
  16. S. Martinez, L. Valek, J. Piljac, M. Metikoš-Huković, Determination of wine antioxidant capacity by derivative potentiometric titration with electrogenerated chlorine, European food research and technology, 2004;220(5-6): 658-61.
  17. Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adom, and R.H. Liu, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidative activity, Journal of agricultural and food chemistry, 2002;50(10):3010-4.
  18. Hui-Jeon Jeon, Hyeon-Son Choi, OK-Hwan Lee, You-Jin Jeon, Boo-Yong Lee, Inhibition of Reactive Oxygen Species (ROS) and Nitric Oxide (NO) by Gelidium elegans Using Alternative Drying and Extraction Conditions in 3T3-L1 and RAW 264.7 Cells, Preventive Nutrition and Food Science, 2012;17(2):122-8.
  19. Chang, S.-T., Wu, J.-H., Wang, S.-Y., Kang, P.-L., Yang, N.-S., & Shyur, L.-F. Antioxidant activity of extracts from Acaciac on fusa bark and hear twood, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001;49:3420-4.
  20. Arnao. Marino B, Cano. Antonio, Acosta. Manuel, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, Food Chemistry, 2001;73(2):239-4.
  21. Benzie. I.F.F., Strain. J.J., The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 1996;239(1):70-6.
  22. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, Methods in Enzymology, 1999;299(1):15-27.
  23. 이주현, 전원경, 고병섭, 천진미, 이아영, 김호경. 한약재의 미생물허용한도 설정을 위한 모니터링. 한국한의학회지. 2006;12(1):49-57.
  24. Hye-Ryun Lee, Bo-RA Jung, Joo-Young Park, In-Wook Hwang, Suk-Kyung Kim, Jong-Uck Choi, Sang-Han Lee, Shin-Kyo Chung, Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of Grape Juice Products in the Korean Market, Korean Journal Food Preserv, 2008;15(3):445-9.
  25. Meenakshi. Selvaraju, Umayaparvathi. Shanmugam, Arumugam. Muthuvel, Balasubramanian. Thangavel, In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012; 1(1):66-70.