

Original Article

반하사심탕 전탕액의 보관 온도 및 기간에 따른 안정성 및 유효성 연구

진성은¹, 김온순², 서창섭¹, 신현규¹, 정수진^{2,3}

¹한국한의학연구원 K-herb연구단, ²한의약융합연구부, ³한국과학기술연합대학원대학교, 한의생명과학전공

Comparative study on stability and efficacy of *Banhasasim-tang* decoction depending on the preservation temperature and periods

Seong Eun Jin¹, Ohn Soon Kim², Chang-Seob Seo¹, Hyeun-Kyoo Shin¹, Soo-Jin Jeong^{2,3}

¹K-herb Research Center, ²KM Convergence Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Republic of Korea

³Korean Medicine Life Science, University of Science & Technology, Daejeon 34113, Republic of Korea

Objectives: *Banhasasim-tang* (BHSST) has been used for the treatment of the digestive and gastric diseases in Korea. This study aimed to investigate the stability and biological activities of BHSST decoction depending on the preservation temperature and periods.

Methods: BHSST decoction was preserved at room temperatures (R/T, 23±1°C) or refrigeration (4°C) for 0, 30, 60 and 90 days. To evaluate the stability of BHSST decoction, pH and sugar content were estimated. In addition, high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed to determine marker compounds of BHSST decoction. To evaluate anti-inflammatory effect, nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) productions were measured in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Antioxidant activity was examined using the assays for 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities.

Results: There was no change in pH and sugar content depending on the preservation temperature and periods of BHSST decoction. Among the major components of BHSST, contents of liquiritin, baicalein and wogonin was reduced time-dependently both at R/T and 4°C. Inhibitory effects of BHSST decoction on NO and PGE₂ productions were slightly decreased in a time-dependent manner by 90 days of preservation. In addition, BHSST decoction maintained ABTS and DPPH radical scavenging activities by 60 days while significantly reducing the activities in 90 days of preservation at R/T. By contrast, BHSST decoction had no significant change of ABTS and DPPH radical scavenging activities by 90 days at 4°C.

Conclusions: Our results suggest that the stability and efficacy of BHSST decoction are maintained for 60 days at 4°C rather than R/T.

Key Words : *Banhasasim-tang* decoction; preservation temperature; preservation period; anti-inflammation; anti-oxidation

서론

한약의 수요가 지속적으로 증가함에 따라 한약의 효능 (efficacy)과 안전성 (safety) 및 표준화와 관련

된 안정성 (stability)에 대한 과학적 연구가 요구되고 있다¹⁻²⁾. 한약은 환제나 분말, 건조엑스 및 탕약 등의 형태로 사용되어 왔으며, 그 중 다양한 물질들이 액상형태로 추출된 탕약이 가장 많이 사용된다.

• Received : 27 January 2016

• Revised : 14 March 2016

• Accepted : 17 March 2016

• Correspondence to : 정수진 (Soo-Jin Jeong)

대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한의약융합연구부

Tel : +82-42-868-9651, Fax : +82-42-864-2120, E-mail : sjjeong@kiom.re.kr

일반적으로 임상에서는 탕약을 2~4주 이내에 실온이나 저온에서 보관하도록 권장하고 있지만³⁾, 실제로 탕약의 안정성이 어떤 조건에서 얼마 동안 유지되는지에 대한 근거 및 관련 연구는 부족하다. 따라서 탕약의 보관 방법 및 기간에 따른 성분 함량 및 약효 변화에 대한 연구가 필요하다.

반하사심탕 (半夏瀉心湯, *Banhasasim-tang*, *Hange-shashin-to*, *Ban xia xie xin tang*)은 상한론 (傷寒論)⁴⁾과 금궤요략 (金匱要略)⁵⁾에 수록된 처방으로 소화기 질환의 증상인 심하비 (心下痞)를 치료하는 데 사용되며, 화위강역 (和胃降逆), 개결제비 (開結除痞), 진토 (鎮吐), 해열 (解熱), 소염 (消炎) 및 진통 (鎮痛) 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 실험 연구로는 진정, 진통, 항부종 및 위액분비 억제⁷⁾, 총산도 억제⁸⁾, 항위궤양⁹⁻¹¹⁾ 및 위 운동능 촉진¹²⁾ 등의 효과가 있다고 보고되었으며, 임상 연구로는 급성위장염, 소화불량증, 위산과다 및 위십이지장궤양에 효과가 있는 것으로 보고되었다¹³⁾.

본 연구에서는 반하사심탕 전탕액의 안정성 및 유효성을 확인함으로써 유효기한 설정을 위한 과학적 근거를 제공하기 위하여 반하사심탕 전탕액의 보관 온도 및 기간에 따른 성분 함량 및 약리 활성 변화를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

반하사심탕을 구성하는 8종의 생약은 광명당 제약 (Ulsan, Korea)에서 규격품을 구입하여 본초학 전문가로부터 감정 후 실험에 사용하였다. 각 구성 생약의 표본 (2012-KE38-1~KE38-8)은 한국한의학연구원 K-herb연구단에 보관하였다.

2. 시약 및 기기

표준품인 liquiritin, baicalin, glycyrrhizin 및 wogonin은 Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였으며, liquiritigenin, wogonoside

및 baicalein은 Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, China), Tauto Biotech (Shanghai, China) 및 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하였다 (Fig. 1). 이들 표준품의 순도는 모두 98.0% 이상이었다. Water, acetonitrile 및 methanol은 HPLC급으로 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하였다. Trifluoroacetic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 특급시약을 구입하여 사용하였다. 함량분석을 위한 고성능 액체 크로마토그래피 (high-performance liquid chromatography, HPLC)는 solvent delivery unit (LC-20AT), online degasser (DGU-20A₃), column oven (CTO-20A), auto sample injector (SIL-20AC) 및 photodiode array (PDA) detector (SPD-M20A)로 구성된 Shimadzu Prominence LC-20A series HPLC system (Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 분석 데이터 수집과 처리는 LC solution software (version 1.24, Kyoto, Japan)를 이용하였다. 당도와 pH는 Atago사의 Pal-a 디지털 굴절계 (Tokyo, Japan)와 Metrohm사의 692 pH/Ion meter (Herisau, Switzerland)를 각각 사용하여 측정하였다. 전탕과 포장은 경서기계산업의 초고속 진공저온 농축 추출기 (Cosmos 660, Incheon, Korea)와 자유조절 롤 포장기 (MH 205 Tower, Kyungseo machine, Korea)를 이용하였다.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 및 phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며, lipopolysaccharide (LPS), N^G-methyl-L-arginine (l-NMMA), indomethacin, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 및 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Cell Counting Kit-8 (CCK-8), Griess reagent 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit은 각각 Dojindo (Kumamoto, Japan), Promega Corporation (Madison, WI, USA) 및 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) 제품을 사용하였다.

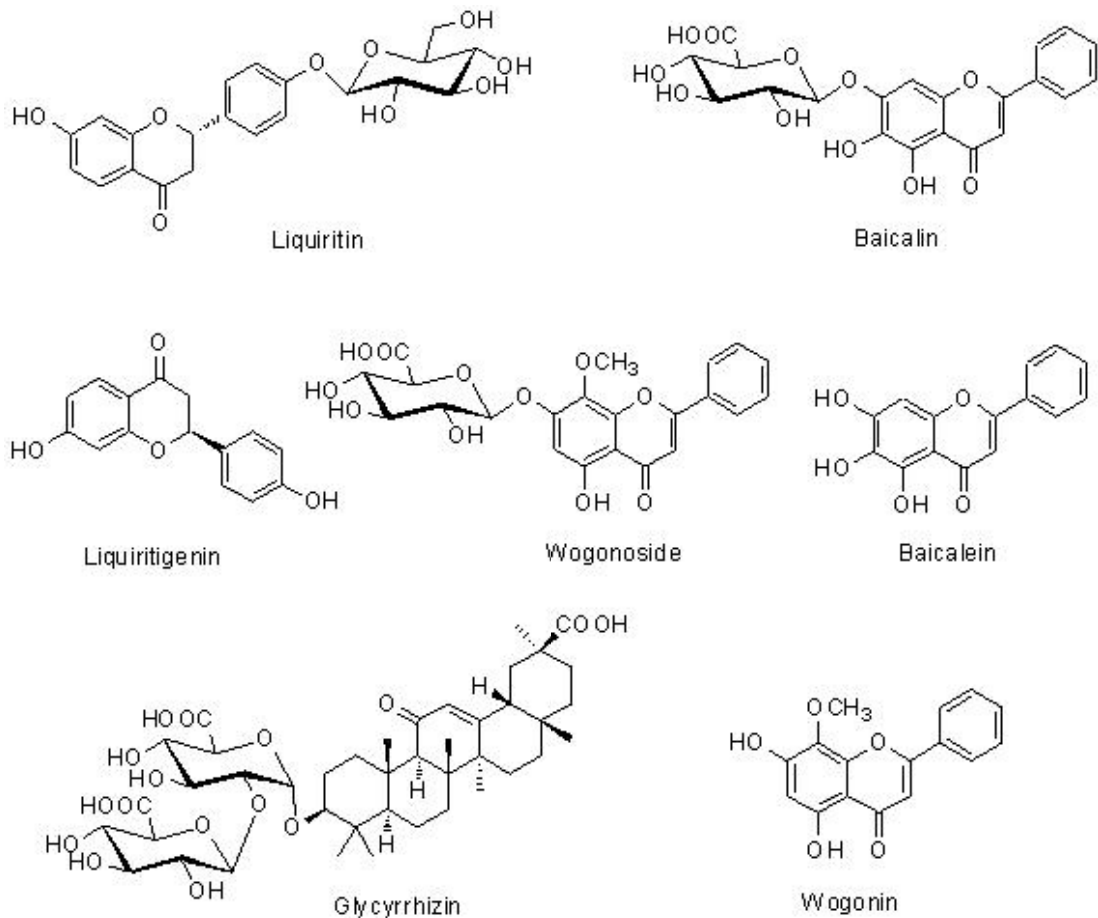


Fig. 1. Chemical structure of *Banhasasim-tang*.

3. 추출물 조제 및 보관

반하사심탕을 구성하는 8종의 생약을 Table 1의 비율로 배합 (약 750g; 37.5g×20)하여 약 10배수의 물을 넣어 초고속 진공 저온 농축 추출기를 이용하여 추출하였다. 위와 같은 방법으로 4개의 lot로 나누어 추출물을 조제 한 후 상온 (23±1°C)과 냉장 (4°C)에 보관하였다.

4. pH 및 당도 측정

조제된 반하사심탕 전탕액을 보관 방법 및 보관 기간에 따라 pH와 당도를 측정하였다.

5. HPLC/Sisudomyeong 분석

Shimadzu Prominence LC-20A series HPLC system을 이용하여 반하사심탕의 주요 성분인 liquiritin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin 등 7종에 대하여 함량 분석을 실시하였다. 이들 성분들은 Phenomenex사의 Gemini C₁₈ 칼럼 (250×4.6mm, 5μm, Torrance, CA, USA)을 이용하여 40°C에서 분리하였다. 이동상은 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid가 함유된 물 (A)과 acetonitrile (B)을 이용하여 다음과 같은 기울기 용매 조건으로 흘려주었다; 10-60% B (0-30분),

60-100% B (30-40분), 100% B (40-45분), 100-10% B (45-50분) 및 10% B (50-60분). 유속은 1.0 mL/min으로 흘려주었으며 주입량은 10 µL였다. 함량분석을 위해 조제된 전탕액 1 mL을 정확히 취하여 물을 이용하여 10 mL로 한 후 HPLC 주입 전에 0.2 µm syringe filter (PALL Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA)로 여과하여 검액으로 하였다.

6. 항염증 효능 평가

1) 세포 배양

RAW 264.7 대식세포 (mouse macrophage cell line)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양 받았으며, DMEM 배지에 5.5% FBS, penicillin (100 U/mL) 및 streptomycin (100 µg/mL)을 첨가하여 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) 세포 독성 평가

반하사심탕 전탕액의 상온 및 냉장 보관 기간에 따른 세포 독성을 확인하기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 96 well plate에 3×10³ cells/well씩 분주하여 18시간 동안 배양하였다. 이후 추출물을 농도별 (62.5-1000 µg/mL)로 처리하여 24시간 동안 배양하고, Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojinho, Kumamoto, Japan) 용액을 10 µL씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. Cell proliferation을 확인하기 위하

여 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과 비교하여 상대적인 세포 생존율 (% of control)을 계산하였으며, 이후의 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도를 기준으로 진행하였다.

3) RAW 264.7 대식세포에서의 NO 및 PGE₂ 분비량 측정

RAW 264.7 대식세포를 48 well plate에 2.5×10⁵ cells/well씩 분주하여 18시간 배양한 후 추출물을 농도별 (125-500 µg/mL)로 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 이후 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 20시간 동안 배양하고 상등액 내에 존재하는 nitrite 및 PGE₂의 분비량을 각각 Griess reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 및 ELISA kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI)을 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 양성 대조군으로 각각 1-NMMA 및 indomethacin을 사용하였다.

7. 항산화 활성 평가

1) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 라디칼을 이용한 항산화 활성 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하

Table 1. Composition of *Banhasasim-tang*

Herbal medicine	Scientific name	Amount (g)	Origin
Pinelliae Tuber	<i>Pinellia ternata</i>	7.500	China
Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i>	5.625	Gurye, Korea
Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i>	5.625	Yeongju, Korea
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	5.625	China
Zingiberis Rhizoma	<i>Zingiber officinale</i>	3.750	Tae'an, Korea
Coptidis Rhizoma	<i>Coptis japonica</i>	1.875	China
Zingiberis Rhizoma Crudus	<i>Zingiber officinale</i>	3.750	Ulsan, Korea
Zizyphi Fructus	<i>Zizyphus jujuba</i>	3.750	Yeongcheon, Korea
Total amount		37.50	

였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성 시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 PBS로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS⁺ 용액과 처방 추출물을 농도별 (50, 100, 200, 400 µg/mL)로 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA)를 사용하여 743 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값을 계산하여 처방 추출물의 라디칼 소거 활성을 비교하였다.

2) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Chemical Co.) 라디칼을 이용한 항산화 활성 측정은 96 well plate을 이용하여 실시하였다. 96 well plate에 0.15 mM의 DPPH 용액과 처방 추출물을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS와 마찬가지로 RC₅₀값을 계산하여 처방 추출물의 항산화 활성을 비교하였다.

8. 통계처리

실험값은 mean ± SEM으로 표시하였다. 대조군과 LPS 처리군 간의 비교를 위해 ANOVA 검정을 실시한 후 Dunnet's multiple comparison test를 이용

하여 모든 그룹간의 차이를 비교하였으며, p-value 가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. pH 및 당도 측정

반하사심탕 전탕액의 최초 pH는 4.70으로 나타났으며, 보관 방법 및 기간에 따른 pH를 측정한 결과 상온에서는 4.60-4.70, 냉장에서는 4.69-4.71로 나타났다 (Table 2). 당도는 최초 3.13 브릭스로 측정되었으며, 보관 방법 및 기간에 따른 당도 측정 결과 상온과 냉장 모두 2.77-3.13으로 나타났다 (Table 2).

2. 반하사심탕 중 주요 성분의 함량 분석

설정된 HPLC 분석법은 반하사심탕의 7가지 주요 성분의 함량 분석에 적용되었다. Liquiritin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin 등 7가지 주요성분에 대한 검량선 작성 결과 상관계수가 0.9998 이상으로 양호한 직선성을 나타냈으며, 이들 성분의 머무름 시간은 15.20, 19.36, 21.38, 22.25, 25.83, 27.18 및 30.49 분 이었다 (Fig. 2). 설정된 분석법을 이용하여 상온에서 보관 기간에 따른 반하사심탕에서 liquiritin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin의 함량 분석 결과 3.18-3.74,

Table 2. pH and sugar content of *Banhasasim-tang* by preservation temperature and periods

Storage method	Lot	pH				Sugar content (Brix)			
		0*	30	60	90	0*	30	60	90
Room temperature	1	4.70	4.65	4.63	4.61	3.13	3.10	2.90	2.87
	2	4.70	4.65	4.62	4.61	3.13	3.10	2.93	2.77
	3	4.70	4.65	4.62	4.60	3.13	3.10	2.90	2.83
	4	4.70	4.65	4.62	4.60	3.13	3.07	2.90	2.87
Refrigeration	1	4.70	4.71	4.70	4.70	3.13	2.87	2.90	2.87
	2	4.70	4.71	4.71	4.70	3.13	2.83	2.87	2.90
	3	4.70	4.70	4.70	4.70	3.13	2.77	2.87	2.87
	4	4.70	4.70	4.70	4.69	3.13	2.93	2.87	2.87

*day

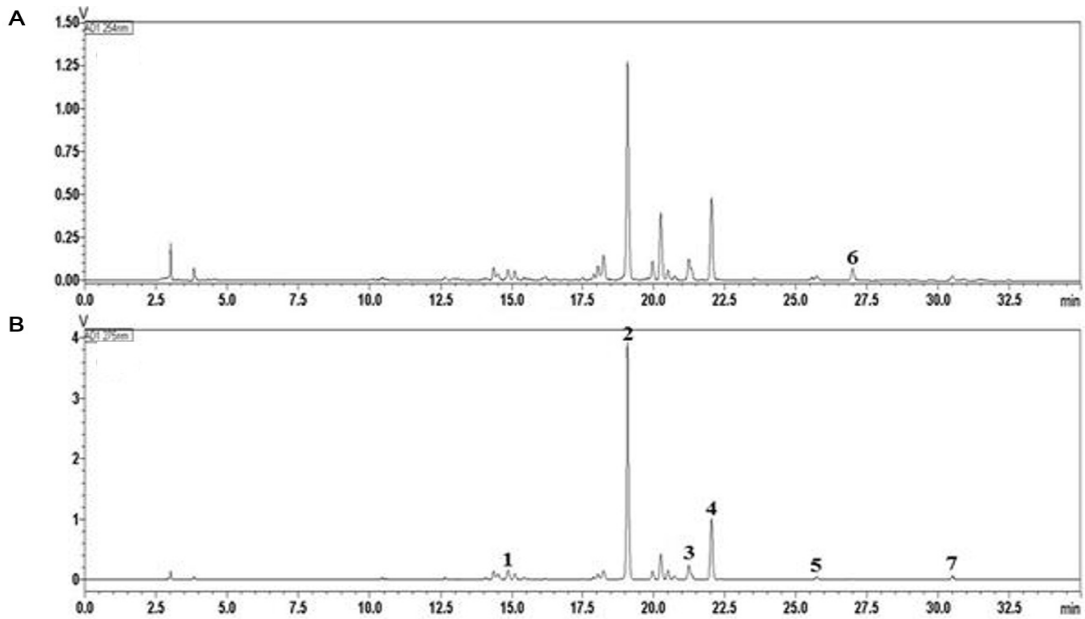


Fig. 2. Typical HPLC chromatogram of *Banhasasim-tang* decoction at wavelength 254 (A) and 275 (B) nm. Liquiritin (1), baicalin (2), liquiritigenin (3), wogonoside (4), baicalein (5), glycyrrhizin (6), and wogonin (7).

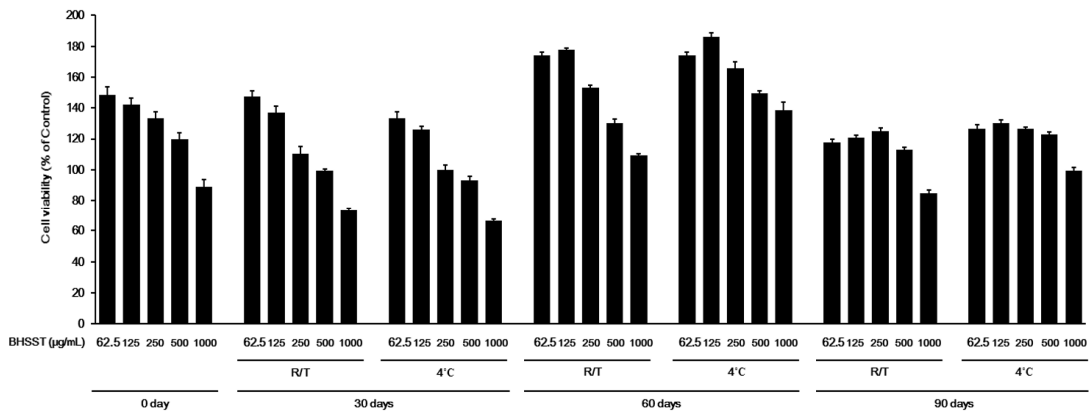


Fig. 3. Cytotoxicity of *Banhasasim-tang* stored with different preservation conditions and periods in RAW 264.7 macrophages. BHSST: *Banhasasim-tang*.

47.51-52.62, 3.69-3.97, 14.38-15.77, 0.04-0.80, 5.26-5.99 및 0.03-0.77 mg/mL로 나타났으며 (Table 3), 냉장에서는 3.28-3.77, 45.80-55.63, 3.68-3.95, 10.78-16.60, 0.12-0.80, 5.37-5.99 및 0.14-0.77 mg/mL으로 나타났다 (Table 4).

3. 세포 독성

RAW 264.7 대식세포에서 반하사심탕의 세포 독성을 확인한 결과, 상온 및 냉장 보관한 경우 모두 90일까지 500 µg/mL 이하의 농도에서 세포 독성이

Table 3. Content of the seven marker compounds in *Banhasasim-tang* by preservation periods in room temperature

Lot	Compound	Content (mg/g)											
		0*			30			60			90		
		Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
1	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.50	0.03	0.79	3.32	0.12	3.51	3.18	0.06	1.75
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	51.52	0.05	0.10	50.39	0.12	0.24	51.34	1.24	2.41
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.94	0.04	0.91	3.90	0.01	0.16	3.70	0.02	0.61
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	15.15	0.06	0.39	14.70	0.03	0.22	15.77	0.03	0.22
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.12	0.00	3.94	0.06	0.00	3.08	0.05	0.00	8.34
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.97	0.08	1.35	5.38	0.02	0.42	5.32	0.08	1.50
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.62	0.01	2.36	0.11	0.00	0.90	0.03	0.00	7.04
2	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.46	0.01	0.36	3.47	0.08	2.42	3.18	0.13	4.03
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	52.13	0.04	0.08	49.66	0.04	0.07	47.51	0.35	0.74
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.94	0.00	0.04	3.89	0.05	1.28	3.69	0.01	0.36
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	15.30	0.05	0.30	14.53	0.01	0.08	14.60	0.03	0.21
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.14	0.00	1.82	0.05	0.00	7.22	0.05	0.01	16.27
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.93	0.07	1.18	5.57	0.03	0.63	5.28	0.05	0.88
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.58	0.02	2.70	0.22	0.00	0.01	0.06	0.00	1.71
3	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.51	0.01	0.23	3.43	0.04	1.05	3.24	0.02	0.54
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	52.62	0.14	0.26	49.55	0.08	0.17	51.12	0.87	1.70
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.95	0.00	0.12	3.97	0.06	1.46	3.70	0.04	1.11
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	15.57	0.07	0.44	14.44	0.09	0.61	15.45	0.02	0.11
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.14	0.00	1.10	0.06	0.00	6.43	0.04	0.00	8.17
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.94	0.06	0.98	5.52	0.05	0.97	5.36	0.02	0.38
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.59	0.01	2.22	0.19	0.00	0.79	0.06	0.00	0.19
4	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.48	0.02	0.66	3.42	0.04	1.26	3.26	0.12	3.71
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	49.84	0.06	0.12	49.50	0.23	0.46	51.36	0.97	1.89
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.93	0.01	0.26	3.90	0.01	0.34	3.79	0.03	0.82
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	14.95	0.01	0.09	14.38	0.04	0.29	15.60	0.04	0.23
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.15	0.00	0.40	0.05	0.00	1.43	0.05	0.00	3.87
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.99	0.06	1.04	5.46	0.02	0.46	5.26	0.08	1.43
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.60	0.02	2.75	0.18	0.00	1.41	0.10	0.00	0.08

*day

나타나지 않았다 (Fig. 3).

4. 항염증 효능

반하사심탕 전탕액의 상온 및 냉장 보관 기간에 따른 항염증 효능을 비교 평가하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하여 자극을 유도하고, 보관 온도 및 기간별 전탕액 추출물의 NO 및

PGE₂ 생성에 대한 억제 효과를 검색하였다. LPS 처리군은 대조군과 비교하여 NO 및 PGE₂ 생성을 증가시킨 반면 (p<0.01), 양성 대조군으로 사용한 l-NMMA (100 μM) 및 indomethacin (2.5 ng/mL)에 의해 NO 및 PGE₂ 생성이 유의적으로 억제되었다 (p<0.01). 반하사심탕을 상온 및 냉장 보관한 경우 모두 90일까지 125 μg/mL 이상의 농도에서 NO 및 PGE₂ 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다

Table 4. Content of the seven marker compounds in *Banhasasim-tang* by preservation periods in refrigeration

Lot	Compound	Content (mg/g)											
		0*			30			60			90		
		Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
1	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.69	0.02	0.58	3.71	0.01	0.34	3.48	0.01	0.41
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	49.00	0.08	0.17	46.95	0.05	0.11	55.63	0.73	1.32
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.92	0.02	0.39	3.94	0.01	0.32	3.68	0.04	1.11
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	12.96	0.05	0.36	11.35	0.00	0.03	16.60	0.10	0.63
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.68	0.02	2.78	0.14	0.01	3.91	0.39	0.00	0.76
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.99	0.03	0.44	5.72	0.04	0.76	5.49	0.04	0.79
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.61	0.00	0.21	0.66	0.01	1.21	0.37	0.00	0.06
2	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.67	0.01	0.31	3.69	0.01	0.40	3.28	0.01	0.38
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	48.56	0.10	0.21	47.06	0.08	0.17	54.82	0.80	1.45
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.94	0.02	0.48	3.80	0.01	0.38	3.74	0.02	0.51
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	12.43	0.04	0.32	12.29	0.00	0.02	15.50	0.01	0.09
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.66	0.01	2.18	0.12	0.00	3.41	0.25	0.01	3.68
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.97	0.02	0.28	5.66	0.04	0.71	5.39	0.03	0.47
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.69	0.00	0.27	0.56	0.00	0.35	0.16	0.00	1.06
3	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.76	0.01	0.34	3.71	0.04	1.06	3.30	0.05	1.66
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	49.81	0.06	0.11	45.80	0.36	0.78	54.94	0.28	0.52
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.95	0.02	0.44	3.94	0.03	0.87	3.68	0.06	1.70
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	13.23	0.04	0.29	10.78	0.02	0.21	15.74	0.02	0.13
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.73	0.02	2.20	0.12	0.00	3.37	0.24	0.02	7.91
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.99	0.06	0.94	5.65	0.05	0.81	5.42	0.02	0.36
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.73	0.00	0.39	0.57	0.00	0.53	0.14	0.00	0.63
4	Liquiritin	3.74	0.01	0.19	3.68	0.01	0.28	3.77	0.10	2.64	3.32	0.07	1.99
	Baicalin	51.82	0.22	0.43	46.90	0.06	0.13	46.62	0.05	0.11	55.42	0.33	0.60
	Liquiritigenin	3.94	0.01	0.29	3.94	0.01	0.31	3.84	0.12	3.22	3.74	0.03	0.93
	Wogonoside	14.42	0.05	0.35	11.96	0.04	0.31	11.52	0.01	0.06	15.93	0.02	0.11
	Baicalein	0.80	0.00	0.63	0.66	0.02	2.46	0.14	0.00	1.29	0.26	0.00	1.40
	Glycyrrhizin	5.61	0.06	1.06	5.99	0.02	0.25	5.66	0.06	1.07	5.37	0.07	1.21
	Wogonin	0.77	0.00	0.32	0.73	0.00	0.35	0.60	0.00	0.24	0.17	0.00	0.32

*day

(Fig. 4, $p < 0.05$). 한편, 반하사심탕 125, 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리군 간에는 NO 및 PGE₂ 생성 억제에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

5. 항산화 활성

반하사심탕 전탕액의 상온 및 냉장 보관 기간에 따른 항산화 활성을 비교 평가하기 위하여 ABTS와

DPPH 라디칼 소거 활성을 비교 분석하였다. 그 결과, 상온 보관의 경우는 0개월 시료에 비해 보관 기간이 증가함에 따라 라디칼 소거 활성이 감소되었다. 0, 30, 60 및 90일 동안 상온 보관된 반하사심탕의 ABTS 라디칼 RC₅₀ 값은 122.97, 125.80, 136.74 및 157.92 $\mu\text{g/mL}$, DPPH 라디칼 RC₅₀ 값은 165.44, 190.97, 205.13 및 265.66 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다. 특히 90일 상온 보관 시료의 경우 제조 시점 (0개월)

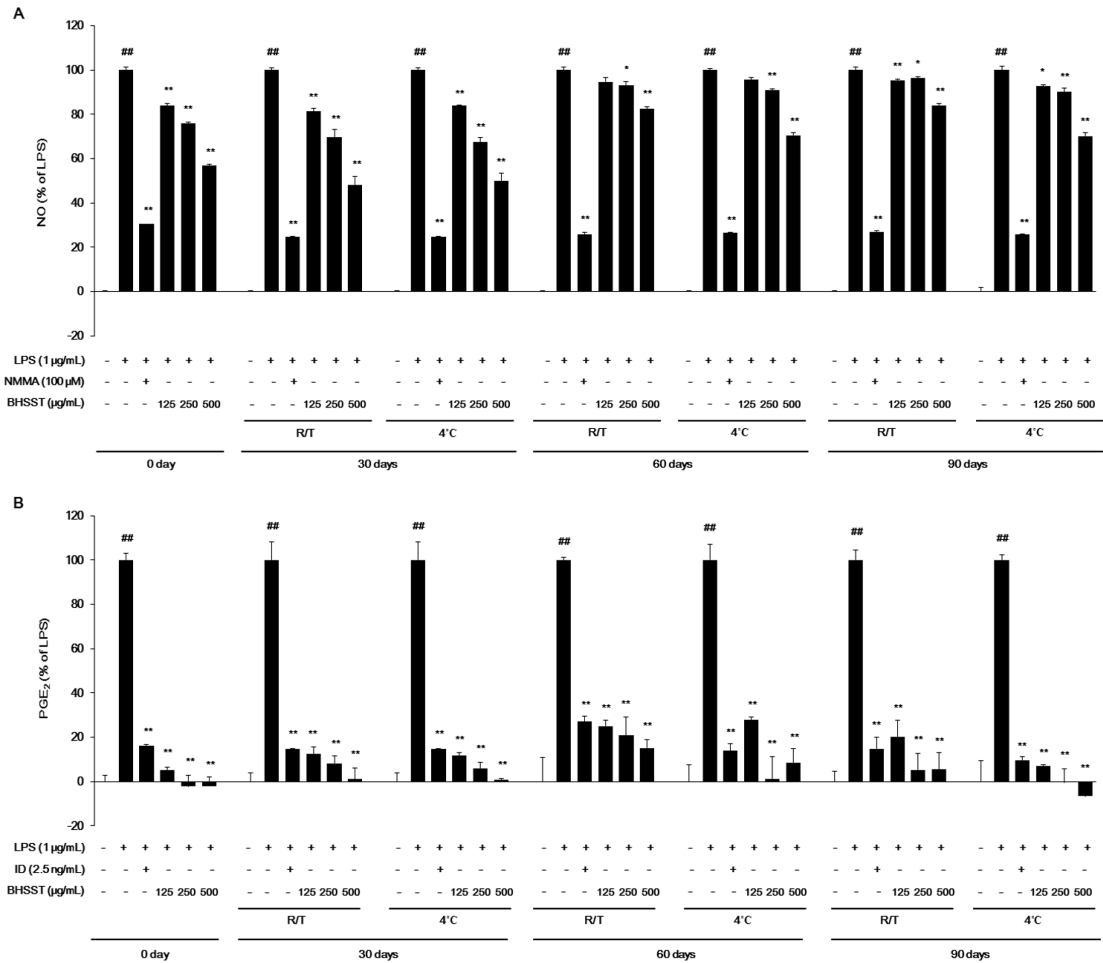


Fig. 4. Effect of *Banhasasim-tang* stored with different preservation conditions and periods on LPS-induced NO (A) and PGE₂ (B) production in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with *Banhasasim-tang* for 4 h and then co-stimulated with LPS (1 µg/mL) for 20 h. The levels of NO and PGE₂ released into the culture supernatant were measured using Griess reagent and ELISA kit, respectively. The data are presented as the means ± SEM (n = 3). ##p<0.01 versus vehicle-treated control group; *p<0.05 and **p<0.01 versus LPS-treated group. BHSST: *Banhasasim-tang*, ID: indomethacin.

에 비해 ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성이 유의적으로 감소함을 알 수 있었다. 냉장 보관 전탕액의 경우 90일까지 두 라디칼 모두 RC₅₀ 값의 유의적인 변화가 없었다 (Fig. 5).

고찰

한약의 안정성 및 유효성에 대한 과학적 근거 마

련은 한약에 대한 복약지도 마련과 신뢰도 향상을 위해 중요하며, 한약의 표준화에 대한 기초적인 자료가 될 수 있다. 그러나 현재까지 한약의 보관 및 유통기한 설정에 대한 명확한 기준은 없으며, 이에 대한 연구 또한 부족한 실정이다. 특히 한방병원 또는 한의원에서 처방되는 한약의 대부분은 끓여서 제공하는 탕제의 형태이므로 한약처방 전탕액의 보관 기간 설정에 대한 연구가 무엇보다 시급하다.

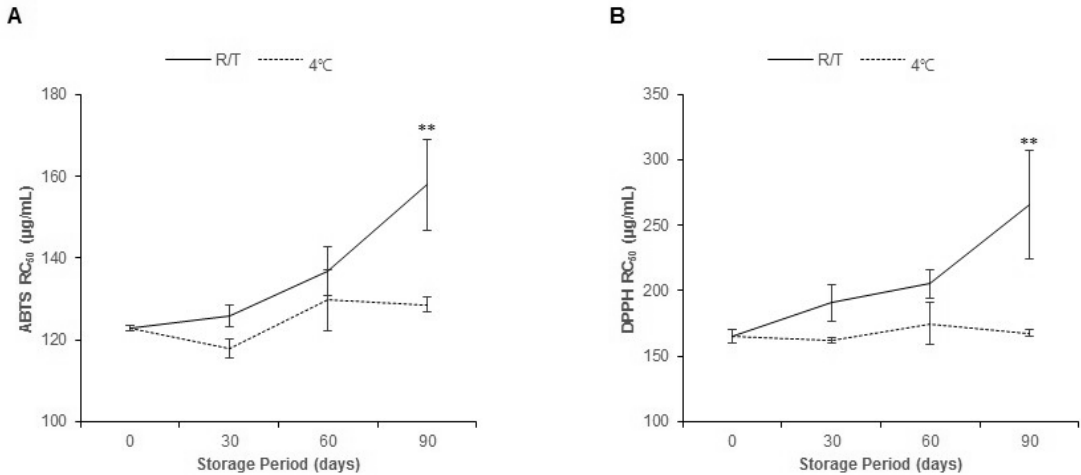


Fig. 5. Effect of *Banhasasim-tang* stored with different preservation conditions and periods on ABTS (A) and DPPH (B) radical scavenging activity. ABTS or DPPH radical solution was added to a 96-well plate containing of several concentrations (50, 100, 200, 400 μ g/mL) of *Banhasasim-tang*. After 30 min of incubation, the absorbance (ABTS; 734 nm, DPPH; 517nm) was measured using a microplate reader. RC50 is concentration of the sample which is required to scavenge 50% of radicals. The data are presented as the means \pm SEM (n = 3). ** p <0.01 versus 0 days.

이와 관련하여 식품의약품안전처에서는 장기보존 시험 및 한약 구성 생약의 주요 성분 에 대한 함량 변화를 근거로 유통기한에 대해 연구한 바 있다¹⁴⁻¹⁶. 최근 본 연구팀의 광향정기산을 이용한 연구를 비롯하여¹⁷, 보중익기탕, 쌍화탕 및 평위산 등의 보관기간에 따른 주요 성분 및 약리학적 효능 변화에 대한 연구가 보고된 바 있다¹⁸⁻²¹. 본 연구팀의 광향정기산 전탕액 보관에 관한 연구에서는 전탕액 파우치를 실온에서 각각 0, 1, 2 및 3개월간 보관 후 개봉하여 항염증 및 항산화 효능에 대한 평가를 실시하였다¹⁷. 그러나 실제 전탕액의 보관은 실온뿐만 아니라 냉장에서 보관하는 빈도가 더 높은 것으로 판단되어, 본 연구에서는 반하사심탕의 보관 온도를 실온과 냉장의 두 가지 조건으로 설정하였으며, 안정성에 대한 실험을 추가하였다.

반하사심탕 전탕액의 보관 방법 및 기간에 따른 성분 변화를 분석한 결과 상온 및 냉장에서 90일까지 보관했을 때, 저장 온도 및 기간에 따른 탕액의 pH와 당도는 변화가 없는 것으로 나타났다. 그러나 지표 성분 7종의 함량을 비교한 결과, 상온에 보관

하는 기간이 길어짐에 따라 liquiritin, baicalein 및 wogonin의 함량은 감소하는 경향이 나타났다. 또한 30일 이상 냉장 보관한 결과 baicalein과 wogonin의 함량이 감소하였으며, 냉장에서 90일까지 보관한 경우 liquiritin의 함량 역시 감소하는 것으로 나타났다.

반하사심탕은 소화기 질환에 다빈도로 처방되는 한약 처방이다. 특히 역류성 식도염 (reflux esophagitis)으로 인한 식도의 점막 자극에 의한 염증이나 아스피린 장기 복용, 심한 스트레스, 담즙산 역류 및 prostaglandin 합성 억제 등에 의한 급·만성위염 등에 적용된다. 이와 같은 사실에 근거하여 본 연구에서는 반하사심탕 전탕액의 항염증 효능 측정을 통하여, 전탕액의 보관 조건에 따른 변화를 비교 분석하였다.

적절한 농도의 NO는 조직 손상 및 감염성 병원체의 침입 등으로부터 인체를 보호하기 위한 면역 조절 및 신경 전달 등에서 중요한 역할을 하지만, NO가 만성적으로 과잉 생성되면 류마티스 관절염, 동맥경화증, 위염 및 천식 등 염증성 질환을 유발할 수 있다²². 또 다른 중요한 염증 인자 중 하나인

PGE₂ 역시 혈관의 투과성을 높이기 때문에 염증 과정에서 발열 및 통증 등을 유발할 수 있다²³⁾. 따라서 활성화된 대식세포에서 NO 및 PGE₂의 과잉 생성을 막는 것은 염증 반응을 조절하는 데 중요하다.

본 연구에서 LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 대식세포에 반하사심탕 추출물을 처리하였을 때, 90일 보관 시까지 NO 및 PGE₂ 생성 억제 효능이 유의적으로 지속되었다. 그러나 30일 보관과 비교하여 60일과 90일 보관 시에는 NO 및 PGE₂ 억제 효능이 낮은 것으로 관찰되었다. 상온과 냉장 보관에 따른 항염증 효능은 차이가 없었다.

산화적 스트레스는 생체 내 단백질, 지질, DNA 및 당질 등 거대분자를 불활성화시키고 세포 구조를 붕괴시켜 세포를 사멸시키는 염증 반응에 관여한다²⁴⁻²⁵⁾. 이러한 염증 반응 시 대식세포와 같은 염증 관련 세포에서 면역 반응으로 인해 reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen species (RNS)가 생성되고, 반복되는 조직의 손상이나 재생에 의해 염증 반응이 지속되면 ROS와 RNS가 과다 형성되어 만성 염증성 질환이 유발된다²⁶⁻²⁷⁾. 즉 세포가 적정 수준의 항산화 물질로부터 지속적으로 보호받지 못하면 free radical에 의한 산화적 스트레스에 의해 질병을 초래하게 된다²⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 반하사심탕 전탕액의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성 측정을 통한 항산화 활성을 평가하여 전탕액의 보관 조건에 따른 변화를 비교 분석하였다.

반하사심탕 전탕액의 상온 보관은 90일 보관 시 항산화 활성의 유의적인 감소를 나타내었다. 반면에 냉장 보관의 경우는 90일 보관 시까지 활성이 유지되었다. 이상의 결과를 종합하였을 때, 전탕액을 90일까지 상온에 보관한 경우 항산화 활성이 전탕한 날에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 보아 전탕액을 상온에서 보관할 때는 60일 이내에 복용하는 것이 안전할 것으로 사료된다.

이전 연구에서 반하사심탕의 지표 성분 liquiritin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, glycyrrhizin 및 wogonin은 항염증²⁹⁻³³⁾ 및 항산화 효능³⁴⁻³⁷⁾이 있다고 보고된 바 있다. 따라서 비록

liquiritin, baicalein 및 wogonin의 함량이 보관 기간이 길어짐에 따라 감소하지만, 지표 성분 중 함량이 가장 높은 baicalin을 비롯한 liquiritigenin, wogonoside 및 glycyrrhizin에 의해 반하사심탕 전탕액의 항염증 활성은 유지되는 것으로 판단된다.

본 연구와 관련하여, 한약을 장기간 복용하는 경우 탕액보다도 안정성이 확보된 제형을 고려할 필요가 있는 것으로 생각되며, 보다 정확한 평가를 위해서는 한약의 제형에 따른 다양한 조건에서의 연구가 요구된다.

결론

본 연구에서 상온 및 냉장 보관 기간에 따른 반하사심탕 전탕액의 성분 함량 변화, 항염증 및 항산화 효능을 비교함으로써 유통기한을 예측한 결과, 상온 및 냉장에서 60일까지 보관해도 약효의 손실이 없는 것으로 판단되었다. 그러나 상온에서 90일 동안 보관한 경우 항산화 효능이 감소하는 것으로 보아 전탕액의 장기 보관 시 상온보다는 냉장 보관하는 것이 더 안전할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Jang IS, Yang CS, Lee SD, Han CH. A review of herbal medicine products associated with toxic events in Korea. *J Korean Oriental Med.* 2007;28(1):1-10.
2. Man SC, Durairajan SS, Kum WF, Lu JH, Huang JD, Cheng CF, et al. Systematic review on the efficacy and safety of herbal medicines for Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2008;14(2):209-23.
3. Son JY, Shin JW, Son CG. Stability study for herbal drug according to storage conditions and periods. *J Korean Oriental Med.* 2009;30(2): 127-32.
4. Jang JK, Shang HL. Seoul:DS print. 1984:188,

- 201-2, 205-6.
5. Jang JK. Geumgweyolag. Seoul:DS print. 1984:360, 415.
 6. Choi DY, Kim JK, Shang HL. interpretation. Seoul:Dae Sung book. 1995:228-230.
 7. Park CS. An experimental studies on the effect of Banhasasimtang [master dissertation]. Kyung Hee Univ.; 1988.
 8. Ryu BH, Park DW, Chang IK, Ryu KW. The experimental comparative studies on the effects of Banhasasimtang, Saengkangsasimtang, Gamchosasimtang and Banhasasimtang insurance medicine. Kyung Hee Univ Oriental Med J. 1989;12:1-17.
 9. Lee KG, Cui X, Lim JP. Effect of the Concurrent Administration of Banhasasim-tang with Cimetidine on Gastric Ulcer in Rats. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2002;16(3):572-6.
 10. Cho NS. Effects of BanhaSasim-Tang Extract and BanhaSasim-Tang added Rubra Bolus Extract on the Experimental Gastric Ulcer in Rats [master dissertation]. Wonkwang Univ.; 1984.
 11. Ogata Y. Effect of Hange-Shashin-To (a traditional herbal medicine) on gastric mucin in relation with ethanol-induced injury in rat. Japanese Pharmacol Ther. 1993;21(6):109-13.
 12. Hanawa T. Oriental medicine treatment LESSON. Seoul;Korea Medical Book Publisher. 2001:113.
 13. Sisudomyeong. Oriental medicine treatment interpretation. Daegu: Tong Yang Total Communication Education Publishing. 1982: 502-3.
 14. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). MFDS Notification No. 2013-253. 2013.
 15. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). MFDS Notification No. 2013-123. 2013.
 16. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). MFDS Notification No. 2009-101. 2009.
 17. Jin SE, Kim OS, Shin HK, Jeong SJ. Comparative study on biological activities of Gwakhyanjeonggi-san decoction according to the preservation periods. J Korean Med. 2014; 35(3):60-9.
 18. Seo CS, Kim JH, Kim SS, Lim SH, Shin HK. Evaluation of shelf-life of Bojungikgi-tang by long-term storage test. Korean J Pharmacogn. 2013;44(2):200-8.
 19. Seo CS, Kim JH, Lim SH, Shin HK. Establishment of shelf-life of Ssanghwa-tang by long-term storage test. Korean J Pharmacogn. 2012;43(3):257-64.
 20. Seo CS, Kim JH, Lim SH, Shin HK. Estimation of shelf-life by long-term storage test of Pyungwi-san. Korean J Oriental Med Prescription. 2011;19(1):183-94.
 21. Ha H, Shin IS, Lim HS, Jeon WY, Kim JH, Seo CS, et al. Changes in anti-inflammatory effect of Pyungwi-san decoction according to the preservation temperature and period. Korean J Oriental Med Prescription. 2012; 20(2):29-35.
 22. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 2003;24(1):25-9.
 23. Abul KA, Andrew HL, Shiv P. Cellular & molecular immunology, 6th edition. Seoul:Epublic. 2008;271-96.
 24. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med. 1991;91(3C): 31S-38S.
 25. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature.

- 2000;408(6809):239-47.
26. Brüne B, Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl.* 2003;(84):S22-4.
 27. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008;11(1):1-15.
 28. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology.* 2009;10(6): 773-81.
 29. Fan GW, Zhang Y, Jiang X, Zhu Y, Wang B, Su L, et al. Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via estrogen receptor and NF- κ B-dependent pathways. *Inflammation.* 2013;36(6): 1584-91.
 30. Yu JY, Ha JY, Kim KM, Jung YS, Jung JC, Oh S. Anti-Inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. *Molecules.* 2015;20(7):13041-54.
 31. Lee W, Ku SK, Bae JS. Anti-inflammatory effects of baicalin, baicalein, and wogonin in vitro and in vivo. *Inflammation.* 2015;38(1): 110-25.
 32. Yang YZ, Tang YZ, Liu YH. Wogonoside displays anti-inflammatory effects through modulating inflammatory mediator expression using RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2013;148(1):271-6.
 33. Racková L, Jancinová V, Petříková M, Drábíková K, Nosál R, Stefek M, et al. Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin. *Nat Prod Res.* 2007;21(14): 1234-41.
 34. Li XL, Zhou AG, Zhang L, Chen WJ. Antioxidant status and immune activity of glycyrrhizin in allergic rhinitis mice. *Int J Mol Sci.* 2011;12(2):905-16.
 35. Woźniak D, Dryś A, Matkowski A. Antiradical and antioxidant activity of flavones from *Scutellariae baicalensis radix*. *Nat Prod Res.* 2015;29(16):1567-70.
 36. Sun YX, Tang Y, Wu AL, Liu T, Dai XL, Zheng QS, et al. Neuroprotective effect of liquiritin against focal cerebral ischemia/reperfusion in mice via its antioxidant and antiapoptosis properties. *J Asian Nat Prod Res.* 2010;12(12):1051-60.
 37. Choi EM, Suh KS, Lee YS. Liquiritigenin restores osteoblast damage through regulating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Phytother Res.* 2014;28(6):880-6.