

염수초 포제법에 따른 두충의 항산화 및 항염증 활성 변화 비교연구

고원일 · 이진호* · 하인혁* · 정화진* · 이인희* · 이재웅* · 김은지* · 강병구 · 전세환
조용규 · 김민정*
자생한방병원 한방재활의학과, 자생의료재단 자생척추관절연구소*

Salt-water Processing-dependent Change in Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of *Cortex Eucommiae*

Wonil Koh, K.M.D., Jinho Lee, K.M.D.*, In-Hyuk Ha, K.M.D.*, Hwa-Jin Chung, Ph.D.*,
In-Hee Lee, Ph.D.*, Jae-Woong Lee, M.S.*, Eun Jee Kim, M.S.*, Byeong-Gu Gang, K.M.D.,
Se Hwan Jeon, K.M.D., Yongkyu Cho, K.M.D., Min-Jeong Kim, B.S.*

Department of Korean Medicine Rehabilitation, Jaseng Hospital of Korean Medicine, Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation*

Objectives The present study aimed to investigate the change in marker compounds, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of salt-water processed *Cortex Eucommiae*.

Methods To evaluate the influence of processing on anti-oxidant effect of *Cortex Eucommiae*, changes in total phenol, total flavonoid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radical scavenging, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) between processed and raw *Cortex Eucommiae* were assessed. In addition, nitrite assay was conducted to determine the influence of processing on anti-inflammatory effect of *Cortex Eucommiae*. Cell viability was also examined as to elucidate whether processing affects cytotoxicity of *Cortex Eucommiae*. Finally, high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was conducted to monitor changes in pinoreosinol diglucoside amount of processed and raw *Cortex Eucommiae*.

Results Salt-water processed *Cortex Eucommiae* showed higher total phenol and flavonoid amount, compared to raw *Cortex Eucommiae*. Furthermore, anti-oxidative activity of processed *Cortex Eucommiae* was improved as discovered in DPPH, ABTS, and FRAP assays. Anti-inflammatory effect of *Cortex Eucommiae* was also enhanced following salt-water processing, as evidenced in nitrite assay. HPLC analysis found that the amount of pinoreosinol diglucoside, widely known as the marker compound of *Cortex Eucommiae*, increases through salt-water processing. All experiments were performed with non-toxic concentration of *Cortex Eucommiae*; processing did not affect the cytotoxicity of *Cortex Eucommiae* up to the currently adopted concentration.

Conclusions The present results support that salt-water processing of *Cortex Eucommiae* is beneficial in terms of marker compound amount, anti-oxidative, and anti-inflammatory activities. Additional investigations are needed to standardize the processing method of *Cortex Eucommiae*. (**J Korean Med Rehabil 2017;27(2):29-38**)

RECEIVED March 22, 2017
ACCEPTED April 5, 2017

CORRESPONDING TO
Min-Jeong Kim, Jaseng Spine and
Joint Research Institute, Jaseng
Medical Foundation, 858 Eonju-ro,
Gangnam-gu, Seoul 06017, Korea

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

Copyright © 2017 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Cortex Eucommiae*, Anti-oxidative, Anti-inflammatory, Salt-water processing

서론»»»»

포제란 약재의 질과 치료효능을 높이고, 독성과 부작용을 낮추기 위한 목적으로 가공처리하는 행위를 통틀어 이르는 개념이다¹⁾. 구체적으로 택(擇), 거(去), 파(破), 착(捉), 참(斬), 단(段), 치(治), 저(咀), 부차(父且) 등 물리적 가공과 온(溫), 번(燻), 소(燒), 자(炙), 오(熬), 픽(熯) 등 불을 이용한 가공, 자(煮), 전(煎), 증(蒸), 취(淬), 찬(爇), 비(沸) 등 물을 이용한 가공이 있으며, 이 과정에서 각종 보료(輔料)가 이용되기도 한다²⁾. 개별 약재의 포제법은 역사적 경험을 통해 용출을 원활하게 하거나, 독성을 낮추고 약리적 효과를 높이는 방향으로 분화, 발전했다고 볼 수 있다. 현대에 이르러서는 이러한 경험적 포제지식을 과학적 연구방법론으로 입증, 정립하려는 시도가 이루어지고 있다^{3,4)}.

두충나무(*Eucommia ulmoides* Oliver)는 낙엽교목으로, 두충과(Eucommiaceae family)의 유일한 구성원이다. 동아시아에서는 전통적으로 두충나무의 각종 부위를 사용해왔는데, 이 중 두충나무의 수피를 두충(杜仲, *Cortex Eucommiae*)이라고 부르며 약용 목적으로 사용하였다. 두충은 요슬통(腰膝痛)을 치료하며 강근골(強筋骨)하고 안태(安胎)하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 현대적 연구에 따르면, 두충은 심혈관계보호⁶⁾, 신경계보호⁷⁾, 항산화⁸⁾ 및 항염증⁹⁾ 효능을 갖는다. 특히, 난소제거백서(OVX mouse model)를 이용한 실험에서 두충은 난소제거로 인해 유발된 골밀도의 감소와 골조직의 변화를 효과적으로 억제한 것으로 드러났으며¹⁰⁾, 조골세포(osteoblast)의 증식과 분화를 촉진하는 등^{11,12)} 두충의 골보호 효과 또한 지속적으로 규명되고 있다. 두충이 함유하는 천연화합물은 주로 lignan, iridoids, phenolics, terpenoid, flavonoid 계열에 속하며, 이들이 두충의 약리활성을 나타내는 것으로 파악되고, 또 지표물질로 쓰이고 있다¹³⁾.

전통적으로 두충은 초탄법(炒炭法), 염자법(鹽炙法), 염수반윤증법(鹽水半潤蒸法) 등의 방법을 통해 포제한다¹⁴⁾. 두충의 염수초(鹽水炒) 조건은 2.5% 농도 염수, 135°C, 30분에서 최적화되는 것으로 나타났고, 이 이상의 온도나 시간에서는 pinosresinol diglucoside의 함량이 감소하는 것으로 밝혀졌다¹⁵⁾. 또, 두충을 청초(淸炒) 하였을 때, geniposidic acid와 geniposide는 180°C, 5분, chlorogenic acid와 pinosresinol glucoside는 160°C, 5분, lir-

iodendrin은 160°C, 15분 조건에서 각각 최고치로 검출된다고 보고되었다¹⁶⁾. 현대적 연구는 위와 같이 전통적 포제법을 지표물질 및 유효성분의 함량변화라는 측면에서 해석하고 있다. 반면, 포제에 따른 두충의 생리활성 변화에 대한 보고는 많지 않은 실정으므로, 이에 본 연구는 두충의 염수초 포제법과 이에 따른 성분함량, 항산화 및 항염증 활성 변화를 규명하기 위해 진행되었다.

재료 및 방법»»»»

1. 실험재료

그린명품계약(남양주, 한국)에서 판매하는 두충을 구입하여 본 연구에 사용하였다. 해당 품목은 판매사의 감별위원회에서 검증 받았다.

2. 기기 및 시약

본 연구에 사용된 시약 중 항산화시험에 사용된 folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, quercetin, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, 2,4,6-tripyridyl s triazine (TPTZ), (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2 carboxylic acid (Trolox), iron (III) chloride hexahydrate (FeCl₃ · 6H₂O), sodium acetate trihydrate, ascorbic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였고, Na₂CO₃, diethyleneglycol, acetic acid는 Junsei (Tokyo, Japan), NaOH는 Samchun (Pyeongtaek, Korea), HCl는 SK chemicals (Seoul, Korea)에서 각각 구입하였다. 항염증시험에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotics (AA)는 Gibco (Gaithersburg, USA)에서 구입하였고, 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), lipopolysaccharide (LPS, E. coli 0111:B4), sulfanilamide, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium nitrite, diclofenac sodium은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 함량시험에 사용된 wa-

ter, acetonitrile (ACN)은 HPLC grade용으로 JT Baker (Phillipsburg, USA)에서 구입하였고, formic acid는 Junsei (Tokyo, Japan), 두충의 지표물질인 pinoresinol diglucoside는 순도 98.00%로 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 기기 중 Freeze dryer는 FD8512 (Ilshinbiobase, Korea), ELISA reader는 sunrise (Tecan, Austria), HPLC는 LCMS-2020 (Shimadzu, Japan)를 사용하였다.

3. 두충의 포제 및 추출

포제하지 않은 두충의 코르크 부분을 제거하고 적당한 크기로 자른 후 소금과 알코올을 혼합한 물에 약 30분 가량 담근다. 30분 후 70% 정도 건조 될 때까지 볶는다.

포제 전, 후 두충 각각 20 g을 10배수의 정제수를 넣어 105°C에서 3시간 환류 추출 후 3 μM paper filter로 여과하고 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

4. 항산화실험

1) Total phenol

포제 전, 후 두충 추출물에 함유되어 있는 총 페놀 함량은 도 등의 방법¹⁷⁾에 따라 측정하였다. 각 추출물 50 μL을 취해 2% Na₂CO₃용액 1 mL과 혼합한 뒤 50% folin-ciocalteu's phenol reagent 50 μL를 추가하여 암소에서 1시간동안 반응시킨 후 ELISA reader로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 이용하여 표준곡선을 작성하였고, 건조 시료 중량 당 mg gallic acid equivalent (mg GAE/g)로 나타내었다.

2) Total flavonoid

포제 전, 후 두충 추출물에 함유되어 있는 총 플라보노이드의 함량은 도 등의 방법¹⁷⁾에 따라 측정하였다. 각 추출물 100 μL를 diethyleneglycol 1 mL과 혼합하고, 1 N NaOH 100 μL를 첨가하였다. 혼합한 시료는 37°C 에서 1시간 반응시킨 후, ELISA reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 이용하여 표준곡선을 작성하였고, 건조 시료 중량 당 mg quercetin equivalent (mg QE/g)로 나타내었다.

3) DPPH free radical scavenging

포제 전, 후 두충 추출물의 라디칼 소거활성은 안정한 라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 측정하였다¹⁸⁾. 각 추출물 100 μL와 ethanol에 용해시킨 DPPH 500 ppm 100 μL을 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 암소에서 반응 시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid를 표준물질로 이용하여 표준곡선을 작성하였고, 건조 시료 중량 당 mg ascorbic acid equivalent (mg AAE/g)로 나타내었다.

4) ABTS free radical scavenging

ABTS 라디칼 소거활성을 이용한 시료의 항산화력 측정은 Arnao 등의 방법¹⁹⁾을 일부 변경하여 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 동량으로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 방치하여 ABTS를 형성 시킨 후 750 nm에서 흡광도 값이 1.1±0.02가 되도록 methanol로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 190 μL에 각 추출물 10 μL를 가하여 2시간 동안 암소에서 방치한 다음 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 표준물질로 이용하여 표준곡선을 작성하였고, 건조 시료 중량 당 mg trolox equivalent (mg TE/g)로 나타내었다.

5) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) 활성

Fe³⁺을 Fe²⁺로 환원시키는 포제 전, 후 두충 추출물의 환원력을 평가하기 위해 Bemzie²⁰⁾, Kim²¹⁾ 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl로 용해시킨 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O용액을 사용직전에 각각 10:1:1 비율로 섞고 37°C에서 보관한다. FRAP 용액 190 μL에 각 추출물 10 μL을 넣고 30분 동안 암소에서 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정한다. Trolox를 표준물질로 이용하여 표준곡선을 작성하였고, 건조 시료 중량 당 mg trolox equivalent (mg TE/g)로 나타내었다.

5. 항염증실험

1) 세포 배양

RAW 264.7 cell은 한국세포주은행 (KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 10% FBS와 1% AA가 포함된

DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂조건에서 2~3일에 한번씩 계대 배양하였다.

2) Nitrite assay

RAW 264.7 cell은 2×10⁵ cell/mL농도로 24 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 포제 전, 후 두층 추출물을 62.5, 125, 250, 500 μg/mL 농도로 처리하고 40분 후 1 μg/mL의 LPS를 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 20시간 배양하였다. 배양 후 각 well에서 상층액 100 μL를 96 well에 옮겨 담고 griess reagent 180 μL를 첨가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 생성은 sodium nitrite로 작성한 표준곡선에 대입하여 계산하였고, nitrite 생성에 대한 포제 전, 후 두층 추출물의 억제 효과는 LPS 단독 처리군과 비교하였다.

3) MTT assay

포제 전, 후 추출물에 대한 세포독성을 확인하기 위해 nitrite assay 후 각 well에 최종농도 500 μg/mL로 MTT 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 4시간 배양하였다 배양 후 배지를 모두 제거하고 DMSO 1 mL을 첨가하여 formazan을 모두 용해시켰다. 96 well plate에 200 μL씩 옮겨 담아 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존률은 LPS 단독 처리군과 비교하였다.

6. 함량실험

분석에 사용한 column은 TC-C18 250×4.6 mm, 3.5 μm (Agilent, USA)이고, column temperature는 35°C, injection volume은 10 μL, flow rate는 1.0 mL/min을 유지하였다. 0.1% formic acid를 포함한 물 (A)과 0.1% formic acid를 포함한 ACN (B)을 mobile phase로 사용하여, gradient 조건(5% B, 0.01 min → 20% B, 20 min → 20% B, 25 min → 5% B, 30 min)에 따라 분석하였다.

7. 통계

실험결과는 3회 반복 측정된 후 평균±표준편차로 나타냈으며, 통계적인 평가는 independent t-test로 검정하였다. p값이 0.05보다 작을 때 유의한 것으로 평가하였다.

결과»»»»

1. 항산화실험

1) Total phenol

포제 전, 후 두층 추출물에 존재하는 총 페놀 함량을

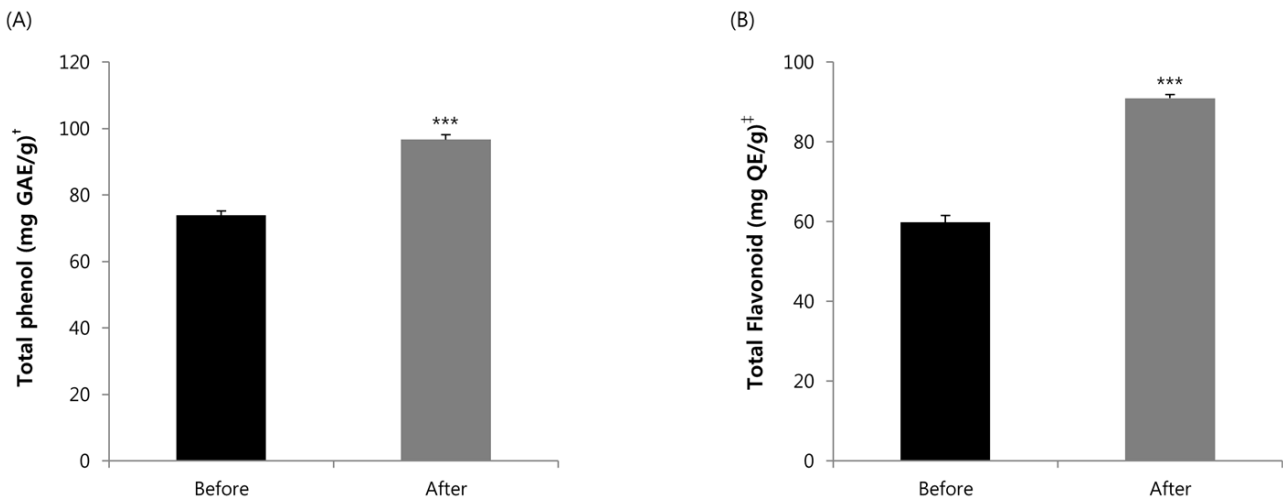


Fig. 1. Processing-dependent changes in (A) total phenol, (B) total flavonoid contents of *Cortex Eucommiae* water extracts. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments.

Before, raw *Cortex Eucommiae*; After, processed *Cortex Eucommiae*.

*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 indicating statistically significant difference. [†]mg gallic acid equivalent per g dry weight, [‡]mg quercetin equivalent per g dry weight.

gallic acid로 측정된 결과, 포제 전 73.9 ± 1.28 mg GAE/g, 포제 후 96.7 ± 1.40 mg GAE/g이었다. 포제 전과 비교하여 포제 후 총 페놀 함량이 유의하게 증가하였다($p < 0.001$) (Fig. 1A).

2) Total flavonoid

포제 전, 후 두충 추출물에 존재하는 총 플라보노이드 함량을 quercetin로 측정된 결과, 포제 전 59.8 ± 1.67 mg QE/g, 포제 후 90.9 ± 0.96 mg QE/g이었다. 포제 전과 비교하여 포제 후 총 플라보노이드 함량이 유의하게 증가하였다($p < 0.001$) (Fig. 1B).

3) DPPH free radical scavenging

포제 전, 후 두충 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을

ascorbic acid로 측정 한 결과, 포제 전 14.6 ± 0.82 mg AAE/g, 포제 후 20.7 ± 0.46 mg AAE/g이었다. 포제 전과 비교하여 포제 후 DPPH 라디칼 소거활성이 유의하게 증가하였다($p < 0.001$) (Fig. 2A).

4) ABTS free radical scavenging

포제 전, 후 두충 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 trolox로 측정된 결과, 포제 전 30.2 ± 0.33 mg TE/g, 포제 후 44.1 ± 0.69 mg TE/g이었다. 포제 전과 비교하여 포제 후 ABTS 라디칼 소거활성이 유의하게 증가하였다($p < 0.001$) (Fig. 2B).

5) Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

포제 전, 후 두충 추출물의 환원력을 trolox로 측정된

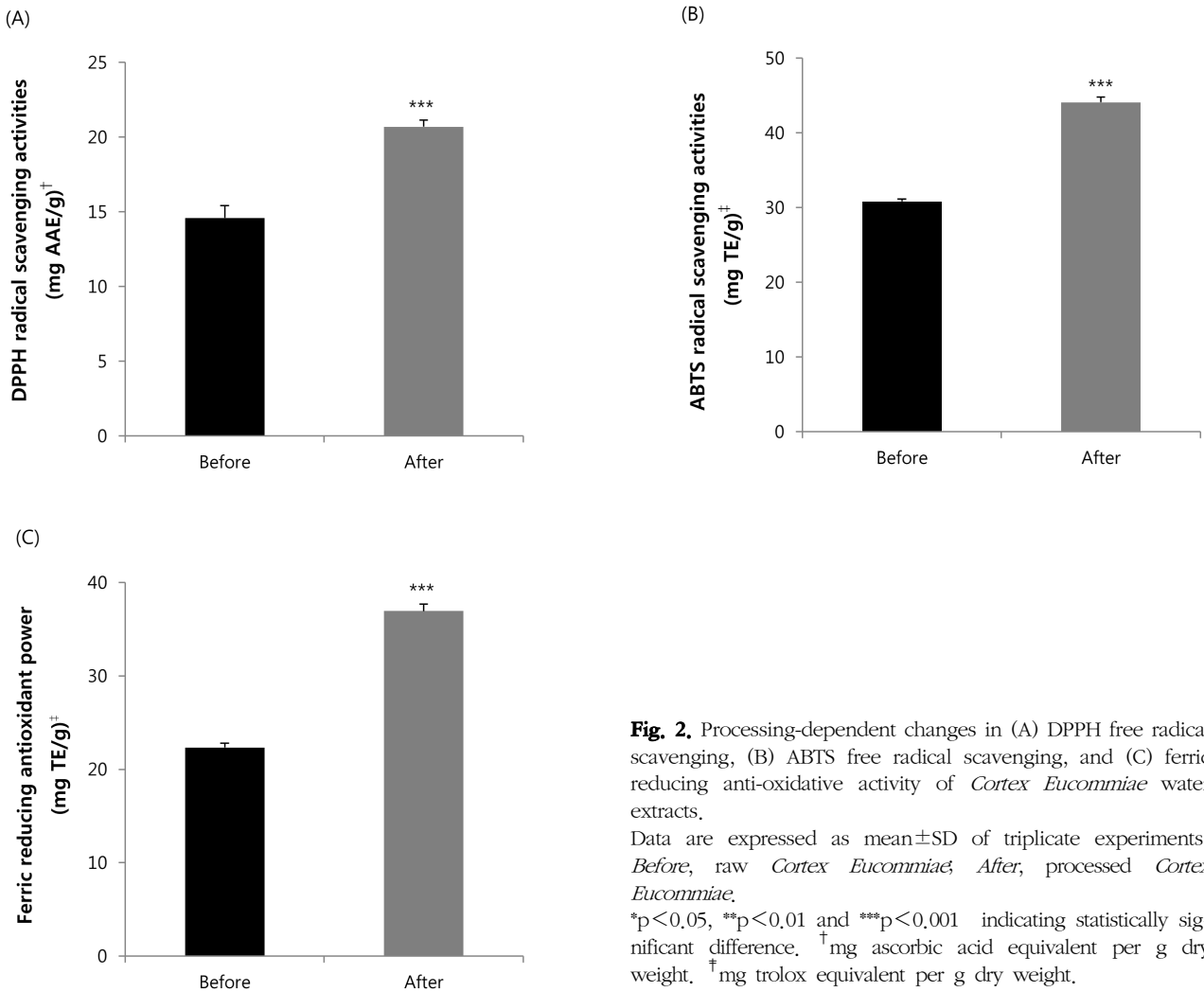


Fig. 2. Processing-dependent changes in (A) DPPH free radical scavenging, (B) ABTS free radical scavenging, and (C) ferric reducing anti-oxidative activity of *Cortex Eucommiae* water extracts. Data are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. Before, raw *Cortex Eucommiae*; After, processed *Cortex Eucommiae*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicating statistically significant difference. [†]mg ascorbic acid equivalent per g dry weight. [‡]mg trolox equivalent per g dry weight.

결과, 포제 전 22.4 ± 0.46 mg TE/g, 포제 후 37.0 ± 0.73 mg TE/g이었다. 포제 전과 비교하여 포제 후 환원력이 유의하게 증가하였다($p < 0.001$) (Fig. 2C).

2. 항염증실험

1) Nitrite assay

RAW 264.7 cell에서 포제 전, 후 두충 추출물의 NO 생성량을 측정된 결과, LPS 무처리군($5.9 \pm 0.26 \mu\text{M}$)에 비해 LPS 단독 처리한 군($44.3 \pm 2.09 \mu\text{M}$)에서 NO 생성량이 증가하였다. 두충 추출물 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 포제 전 NO 생성량은 41.1 ± 2.15 , 38.2 ± 1.83 , 34.0 ± 2.05 , $26.8 \pm 2.05 \mu\text{M}$, 포제 후 39.2 ± 2.33 , 35.3 ± 1.46 , 28.3 ± 1.85 , $18.5 \pm 1.04 \mu\text{M}$ 로 LPS 단독 처리군 보다 NO 생성량이 농도 의존적으로 억제되었고, 포제 전보다 포제 후 NO 생성량이 억제되는 것을 확인하였다. 대조약(양성 대조군) diclofenac 50 $\mu\text{g/mL}$ 과 포제 후 두충 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 을 LPS 단독 처리군과 비교했을 때 각각 50.6%, 58.2% 억제를 나타냈다(Fig. 3A).

2) MTT assay

RAW 264.7 cell에서 포제 전, 후 두충 추출물의 세포 독성을 확인한 결과, 62.5, 120, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 모든

농도에서 100% 이상의 세포 생존률을 보여 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(Fig. 3B).

3. 함량실험

두충의 주요성분인 pinoresinol diglucoside에 대한 포제 전, 후의 함량을 비교한 결과, 포제 전 4.6 ± 0.07 mg/g, 포제 후 8.2 ± 0.14 mg/g으로 포제 후 pinoresinol diglucoside의 함량이 증가하였다(Fig. 4, 5).

고찰»»»»

두충은 신농본초경의 저작 이래 전통적으로 쓰여온 약재이다. 골다공증 등에 대한 두충의 효과가 과학적으로 규명됨에 따라¹⁰⁾, 향후 근골격계 질환에 대한 응용이 더욱 기대되고 있다. 본 연구에서는 두충의 포제 방법에 따른 총 페놀, 플라보노이드 함량과 DPPH, ABTS 및 FRAP assay를 통한 항산화 활성, NO assay를 통한 항염증 활성 pinoresinol diglucoside 함량을 비교하였다. 이를 통해 염수초 포제에 대한 근거를 제시하고 포제법 규격화에 대한 기초자료로 활용하고자 한다.

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대

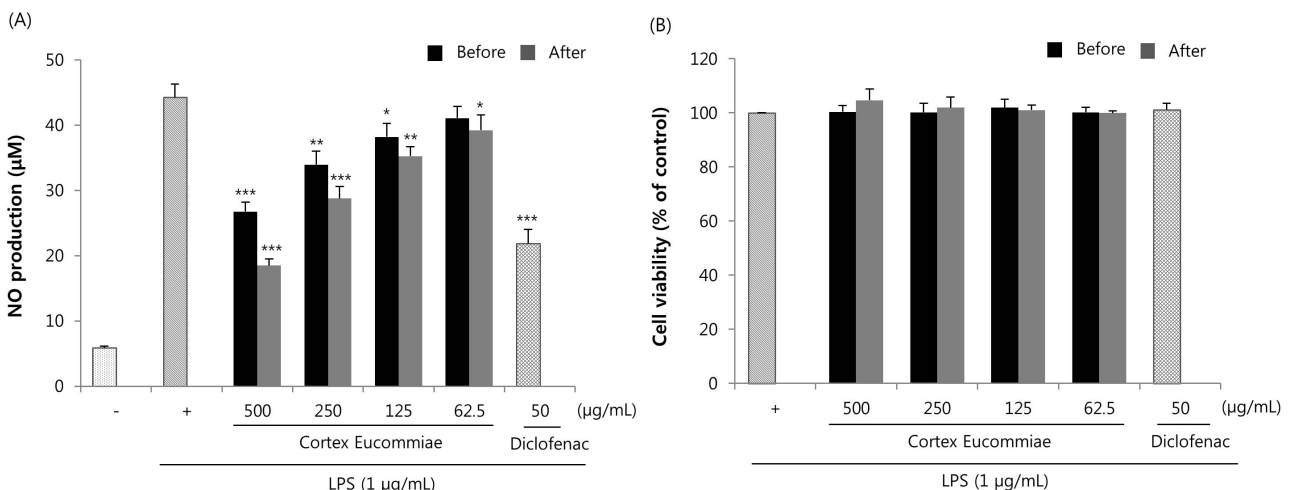


Fig. 3. Effect of *Cortex Eucommiae* water extract on (A) LPS-stimulated NO production and (B) cell viability in RAW 264.7 cells. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Diclofenac was used as the positive control.

Before, raw *Cortex Eucommiae*; After, processed *Cortex Eucommiae*.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicating statistically significant difference.

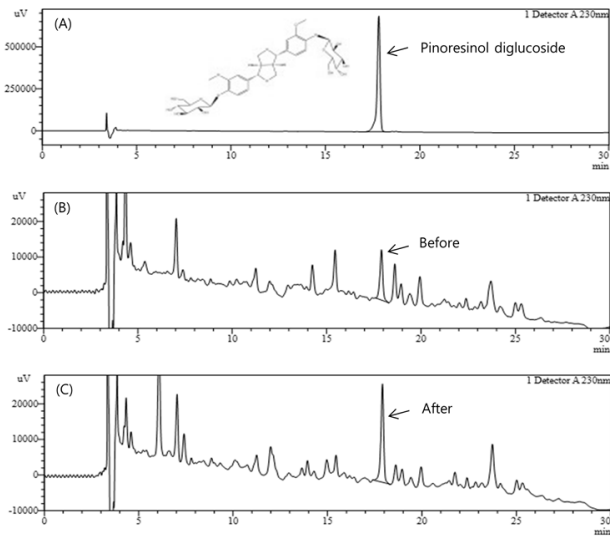


Fig. 4. HPLC chromatogram on pinoresinol diglucoside, the index compound, in raw and processed *Cortex Eucommiae* extract. (A) the standard, (B) raw *Cortex Eucommiae*, and (C) processed *Cortex Eucommiae*.

사산물의 하나로 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지는 방향족 화합물을 총칭하며 catechin, resveratrol, lignan, flavonoid 등의 다양한 구조와 분자량을 가진다. 폴리페놀에 존재하는 다수의 hydroxyl group (-OH)은 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화, 항암, 항고혈압 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다²²⁻²⁴). 포제에 따른 두층 추출물에 함유된 총 페놀 함량을 건조 시료 중량 당 gallic acid 등량값(mg GAE/g)으로 나타낼 때, 포제 후 두층 추출물이 약 1.3배 높은 페놀을 함유하고 있었다($p < 0.001$) (Fig. 1A). 플라보노이드는 식물체에 널리 분포되어 있는 색소이며, 가장 중요한 페놀류의 화합물로 diphenylpropanes (C6-C3-C6)의 기본 골격 구조를 가지고 있다. 항균, 항암, 항염증, 항알레르기 등 다양한 생리활성 기능이 인체의 질병 원인이 되는 산화작용을 억제하는 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다^{25,26}). 포제에 따른 두층 추출물에 함유된 총 플라보노이드 함량을 건조 시료 중량 당 quercetin 등량값(mg QE/g)으로 나타낼 때, 포제 후 두층 추출물이 약 1.5배 높은 플라보노이드를 함유하고 있었다($p < 0.001$) (Fig. 1B). 사초법으로 포제한 권백과 염자로 포제한 진피 모두 포제 후 총 페놀 함량이 증가한 것으로 보고하였고, 청초와 주정 전처리에 따른 오미자 물 추출물의 항산화 활성을 비교한 결과, 청초와 주정 전

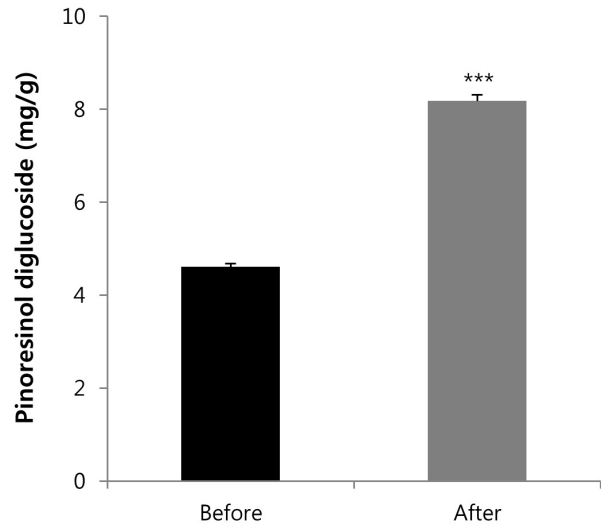


Fig. 5. Processing-dependent change in pinoresinol diglucoside amount in *Cortex Eucommiae* extract.

Data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. Before, raw *Cortex Eucommiae*; After, processed *Cortex Eucommiae*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicating statistically significant difference.

처리를 한 오미자에서 모두 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 증가한 것을 통해 본 실험과 유사한 결과를 확인할 수 있었다²⁷⁻²⁹). 인체 내의 free radical은 지질, 단백질 등과 결합하여 생체의 노화를 일으키는 물질이며, 특히 DPPH는 짙은 자색을 띄는 radical을 갖는 물질 중에서 비교적 안정한 화합물이다. DPPH radical 소거활성은 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 자색이 탈색되는 정도를 측정하는 방법이다. 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 지표로 사용되고 또한 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 지표로도 이용되고 있다³⁰⁻³²). 포제에 따른 두층 추출물의 DPPH radical 소거활성을 건조 시료 중량 당 ascorbic acid 등량값(mg AAE/g)으로 나타낼 때, 포제 전과 비교하여 포제 후 두층 추출물이 약 1.4배 높은 DPPH radical 소거활성이 있었다($p < 0.001$) (Fig. 2A). ABTS radical 소거활성은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 청록색의 ABTS radical cation이 시료 내의 항산화 물질로부터 수소를 제공 받아 안정한 물질로 변화됨에 따라 탈색되는 성질을 이용한 방법이다. ABTS는 지용성 및 수용성 물질의 소거활성을 모두 측정할 수 있고, DPPH와 달리 pH 변화에 민감하게 작용되지 않는 항산화 측정 방

법이다. DPPH radical은 free radical, ABTS radical은 cation radical이므로 추출물의 특성에 따라 다를 수 있으므로 두 종류의 radical 소거활성을 모두 분석할 필요가 있다^{33,34}. 포제에 따른 두층 추출물의 ABTS radical 소거활성을 건조 시료 중량 당 trolox 등량값(mg TE/g)으로 나타낼 때, 포제 전과 비교하여 포제 후 두층 추출물이 약 1.5배 높은 ABTS radical 소거활성이 있었다($p < 0.001$) (Fig. 2B). 환원력은 항산화 활성에 관계된 중요한 인자로서 시료 중에 항산화제와 같은 환원력을 가진 성분이 존재하게 되면 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}) 복합체를 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}) 상태로 환원시키고 이때 발생하는 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 평가하는 방법이다. 흡광도 수치가 높을수록 높은 환원력을 나타내는 것을 의미하며, radical의 소거활성을 측정하는 DPPH, ABTS 실험방법과는 다른 메커니즘의 항산화 측정법이다³⁵⁻³⁷. 포제에 따른 두층 추출물의 FRAP assay를 통한 환원력을 건조 시료 중량 당 trolox 등량값(mg TE/g)으로 나타낼 때, 포제 전과 비교하여 포제 후 두층 추출물이 약 1.7배 높은 환원력이 있었다($p < 0.001$) (Fig. 2C). 기존 연구들과 같은 맥락에서, 본 연구의 DPPH, ABTS 및 FRAP 실험결과 역시 포제가 항산화 활성에도 영향을 준다는 점을 뒷받침한다.

대식세포에서 생성되는 NO는 활성산소 중 하나로 nitro oxide synthase에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성된다. 세포 독성, 조직 손상 및 염증 뿐만 아니라 세포 내 항상성 유지, 혈압 및 신경전달 기능 조절 등 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다³⁸⁻⁴⁰. RAW 264.7 cell에 LPS로 자극하여 생성되는 NO에 대해 포제 전, 후 두층 추출물의 효과를 확인하기 위해 griess reagent와 세포배양액을 반응시켜 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과, LPS 단독 처리한 군 대비 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 포제 전 두층 추출물은 7.2, 13.8, 23.3, 39.5%, 포제 후 두층 추출물은 11.5, 20.3, 35.0, 58.2%, 양성대조군으로 사용한 diclofenac 50 $\mu\text{g/mL}$ 은 50.6% 억제율을 보였다. 포제 전, 후 두층 추출물 모두 농도 의존적으로 유의한 차이가 있었고, 포제 전보다 포제 후 두층 추출물에서 NO 생성 억제율이 높은 것을 확인하였다. Diclofenac 50 $\mu\text{g/mL}$ 과 포제 후 두층 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유사한 NO 생성 억제율을 확인하였다(Fig. 3A). MTT assay는 탈수소 효소작용에 의해

노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 자주색 또는 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 세포 독성 및 생존률을 확인하는 방법이다⁴¹. 포제 전, 후 두층 추출물의 처리 농도별 세포독성을 측정한 결과, 최고 농도 500 $\mu\text{g/mL}$ 까지 100% 이상의 세포생존률을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 3B).

두층의 주요성분 중 하나인 pinoresinol diglucoside는 두층의 껍질에 다량 함유되어 있으며, 항고혈압, 항산화 등 다양한 생리활성 기능을 가지고 있다^{42,43}. 포제에 따른 두층 추출물 중 pinoresinol diglucoside 함량은 포제 후 약 1.8배 유의하게 증가하였다($p < 0.001$) (Fig. 5). 두층의 지표성분을 geniposide로 설정하여 염두층, 강두층 및 두층초전의 함량을 비교한 연구에서 포제법에 따라 geniposide의 함량 차이가 있음을 보고하였고, 포제에 따른 두층의 지표성분 함량을 분석한 연구에 따르면 두층은 포제 온도와 시간이 증가함에 따라 pinorecinol diglucoside의 함량이 감소한다고 보고하였다^{15,44,45}. 이러한 결과는 포제법에 따라 성분 함량 변화에 차이가 있는 것으로 사료된다.

본 연구 결과를 종합해 볼 때, 염수초로 포제한 두층 추출물은 항산화, 항염증 효능 및 주요성분인 pinoresinol diglucoside 함량이 증가하는 것으로 확인하였고, 항후 약리학적 효능 변화 등 추가 연구를 통해 염수초법에 대한 정당성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

결론»»»»

본 연구에서는 두층을 염수초법으로 포제하여 total phenol, total flavonoid 함량과 DPPH, ABTS, FRAP assay를 통한 항산화활성, NO assay를 통한 항염증활성 및 두층의 주요성분인 pinoresinol diglucoside의 함량을 비교한 결과, 포제 후 각 활성과 함량이 증가한 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 활용하여 두층의 포제법을 연구, 정립시킬 수 있을 것으로 사료된다.

References>>>>

1. Kang BS, Seo BI, Choi HY. Processing of herbal materials and clinical applications. Seoul, Yeong-lim-sa, 2003;15.
2. Kim SC, Ha HK, Kim KW. Study on processing through pre-Han literatures. Journal of Oriental Medical Classics, 2011;24:157-74.
3. Oh JH, Shin JS, Ahn ES, Lee SJ, Lee JC, Im JH, Hong SK, Hong JK, Lee YJ. Modern investigation of herbal processings. The Korean Society of Pharmaceutics, 2009; 39(4):275-97.
4. Kyung Hee University. Study on processing of materials in standardization, 550~599. Korea Institute of Oriental Medicine, 1998;1(1):551-600.
5. Ahn DK. Healing power of *Eucommia ulmoides*. Seoul: Yeollin Chaekdeul; 1993.
6. Luo LF, Wu WH, Zhou YJ, Yan J, Yang GP, Ouyang DS. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats. J Ethnopharmacol, 2010;129(2):238-43.
7. Kwon SH, Lee HK, Kim JA, Hong SI, Kim SY, Jo TH, Park YI, Lee CK, Kim YB, Lee SY. Neuroprotective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. Bark on amyloid beta 25-35-induced learning and memory impairments in mice. Neurosci Lett, 2011;487(1):123-7.
8. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci, 2004; 74(17):2157-84.
9. Kim MC, Kim DS, Kim SJ, Park J, Kim HL, Kim SY, Ahn KS, Jang HJ, Lee SG, Lee KM. *Eucommiae* cortex inhibits TNF- α and IL-6 through the suppression of caspase-1 in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. Am J Chinese Med, 2012;40(01):135-49.
10. Zhang R, Liu Z, Li C, Hu S, Liu L, Wang J, Mei Q. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. Bone, 2009;45(3):553-9.
11. Dawei W, Xiaoyan G, Famei L, Zhiming J. Effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts on the proliferation of osteoblast-like cells UMR106. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2000;16(4):24-39.
12. Lin J, Li Y, Li W, Chen H. Effects of calcium phosphate cement/*eucommia ulmoides* extracts compound on cell proliferation and adhesion of MC3T3E1 osteoblasts in vitro. Journal of Zhejiang University Medical sciences, 2008;37(1):78-82.
13. He X, Wang J, Li M, Hao D, Yang Y, Zhang C, He R, Tao R. *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. J Ethnopharmacol, 2014;151(1): 78-92.
14. Ahn DK, Kim HC. Processing and herbagology. Seoul: Il-choong-sa; 1997.
15. Chen XY, Luo LI, Ren GC, Qu GY, Dong LS. Determination of pinorensinol diglucoside in processed *Eucommia ulmoides* and crude *Eucommia ulmoides* [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008;5:035.
16. Seo CS, Kim JH, Shin HK, Kim BS. Analysis of *Eucommia ulmoides* marker components and processing-dependent change. Korean Journal of Pharmacognosy, 2015;46(2):123-32.
17. Do HJ, Lee JH, Ha IH, Chung HJ, Lee JW, Kim MJ, Kim EJ, Lee IH. Comparison of Index Compound Content and Anti-inflammatory Activity of *Eucommiae* Cortex by Various Drying Methods. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine, 2017;27(1):19-25.
18. Cho CY, Lee IH, Lee JW, Kim EJ, Lee JH, Kim MJ. The Effects of High Temperature High Pressure Steam Sterilization on *Woohwangchungsimwon*. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine, 2015;25(1):45-52.
19. Arnao M B, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chem, 2001;73(2):239-44.
20. Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem, 1996;239(1):70-6.
21. Kim SM, Kim DY, Park HR, Seo JH, Yeom BM, Jin YJ, Pyo YH. Screening the Antioxidant Components and Antioxidant Activity of Extracts Derived from Five Varieties of Edible Spring Flowers. Korean Journal of Food Science and Technology, 2014;46(1):13-8.
22. Hwang SJ, Park SJ, Kim JD. Component analysis and antioxidant activity of *Oenanthe javanica* extracts. Korean Journal of Food Science and Technology, 2013;45(2): 227-34.
23. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Korean Society of Food Science and Nutrition, 2000;29(6):1127-32.
24. Choi CW, Oh MS. Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Components of *Mahwangbujaseshin-tang*. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine, 2014;24(4):15-28.
25. Wolfe KL, Liu RH. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. J Agr Food Chem, 2008;56(18):8404-11.
26. Park JS, Han I. Effect of Extraction Solvent on the Physiological Properties of Korean Pear Peel (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka). Korean Journal of Food Science and Technology, 2015;47(2):254-60.
27. Lee BC, Sim GS, Kim JH, Kim JH, Pyo HB. Effect of the

- Processed *Selaginella tamariscina* on Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 2006;32(2):69-74.
28. Cha BC. Changes in the Constituents and Antioxidant Activity in Accordance with the Processing Conditions of *Citrus unshiu* Markovich. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2015;46(1):23-30.
 29. Nam HH, Kim HJ, Choi NJ, Roh SS, Choo BK. Anti-oxidative activity of *Schisandra chinensis* extract, following stir-frying processing and pre-treatment with ethanol. *Korean Journal of Organic Agriculture*. 2015;23(4):987-97.
 30. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH. Biological Activities of Hot Water Extracts from *Euonymus alatus* Leaf. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2007;39(5):569-74.
 31. Choi JH, Lee SH, Park YH, Lee SG, Jung YT, Lee IS, Park JH, Kim HJ. Antioxidant and Alcohol Degradation Activities of Extracts from *Acer tegmentosum* Maxim. *Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2013; 42(3):378-83.
 32. Kang KM, No HK, Park CS, Youn KS, Hong JH, Lee SH. Antioxidative Activity of *Kalopanax pictus* Shoot Extracted Using Different Extraction Methods. *Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2012;41(12):1686-92.
 33. Jeong SH, Kim JH, Oh JH, Lee HJ. Quality and Antioxidant Activity of Granules Containing Herbal Medicine Extracts. *Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2015;44(9):1311-6.
 34. Kim HS, Kang YH. Antioxidant Activity of Ethanol Extracts of Non-Edible Parts (stalk, stem, leaf, seed) from Oriental Melon. *Korean Journal of Plant Resources*. 2010;23(5):451-7.
 35. Joo SY. Antioxidant Activities of Medicinal Plant Extracts. *Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2013; 42(4):512-9.
 36. Ha HJ, Lee CB. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of Red Cabbage Extract. *Culinary Science and Hospitality Research*. 2014;20(2):16-26.
 37. Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH. Vitamin C, Total Polyphenol, Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of Several Fruit Peels. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2012;44(5):540-4.
 38. Kim HS, Kang JS. Preparation and Characteristics of Bread by Medicinal Herb Composites with Immunostimulating Activity. *Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2008;37(1):109-16.
 39. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-16.
 40. Jordan ML, Rominski B, Hignet S, Hoffman RA. Nitric Oxide Inhibits the T-cell Receptor-Mediated Ca^{2+} Second Messenger System. *Surg Forum*. 1992;43:434-6.
 41. Hansen J, Bross P. A Cellular Viability Assay to Monitor Drug Toxicity. *Methods Mol Biol*. 2010;648(-):303-12.
 42. Kim SH, Kim IC. Antioxidative Properties and Whitening Effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizoma*. *The East Asian Society of Dietary Life*. 2008;18(4):618-23.
 43. Takeshi D, Sansei N, Yoshihisa N. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and *Siberian ginseng*. *Acta Pharmacol Sin*. 2001;22:1057-70.
 44. Kim HC, Ministry of Health and Welfare. Standardization of herbal material processings. Ministry of Health and Welfare; 2001.
 45. Seo CS, Kim JH, Shin HK, Kim BS. Quantitative Determination of the Six Marker Compounds in *Eucommiae Cortex* by Processing Method. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2015;46(2):123-32.