

SJ004의 추출용매별 항산화 활성 및 표준화 연구

이대연*† · 조주희† · 김완수† · 이호성*† · 이영우† · 박상인† · 안건상§ · 이인희*†

(*)더포레*, (†)포레스트한방병원†, (‡)포레힐요양병원‡, (§)무척바른한방병원§

Antioxidant Activity and Standardization of Extraction Solvents of SJ004

Dae-Yeon Lee, K.M.D.*†, Ju-Hwi Jo, B.A.†, Wan-Su Kim, B.A.†, Ho-Sung Lee, K.M.D.*†, Young-Woo Yi, B.A.†, Sang-In Park, K.M.D.†, Keon-Sang An, K.M.D.§, In-Hee Lee, Ph.D.*†
The Fore*, Forest Hospital†, ForestHeal Hospital‡, Spinekneebarun Hospital§

Objectives SJ004 is a natural herbal medicine that contains *Acyranthes japonica* Nakai and *Eucommia ulmoides* Oliver traditionally used for joint and spinal diseases. This study aimed to establish an efficient method of extracting SJ004 to standardize using the yield, high-performance liquid chromatography (HPLC), and antioxidant assay.

Methods SJ004 was extracted with distilled water, 70% and 100% of ethyl alcohol (EtOH). The method validation of 20-hydroxyecdysone and pinoresinol diglucoside was determined by HPLC-photo diode array and the content of SJ004 was calculated. The antioxidant activity of each extract was compared and measured using total flavonoids, total phenolic compounds, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and ferric reducing antioxidant power according to the standard protocol.

Results The yield was highest in pure water extract and lowest in 100% EtOH. But, the content of marker compounds indicating 20-hydroxyecdysone and pinoresinol diglucoside was highest in 100% EtOH extract. In the physiological activity measurement using antioxidant activity, 100% ethanol extract was highest. The limit of detection indicating 20-hydroxyecdysone and pinoresinol diglucoside were analyzed 0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1616 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the limit of quantification were analyzed 1.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively.

Conclusions The experimental results showed that the extraction conditions have a significant effect on content of marker compounds and antioxidant activity. As a result of method validation, SJ004 was standardized by 20-hydroxyecdysone and pinoresinol diglucoside. (**J Korean Med Rehabil 2020;30(2):67-75**)

RECEIVED March 17, 2020
REVISED March 30, 2020
ACCEPTED April 3, 2020

CORRESPONDING TO

In-Hee Lee, The Fore, No. 702, 87, Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul 05542, Korea

TEL (070) 5213-7114
FAX (02) 6929-3399
E-mail ih0915@hanmail.net

Copyright © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words SJ004, Antioxidants, High pressure liquid chromatography, Ecdysterone

서론»»»»

국내 다빈도 만성질환 중 하나인 관절염은 대부분 염증 매개로 인해 발생한다. 이러한 염증 유발 매개 인자에 대한 유전자 발현 및 활성 저해 방법은 다양한 염증성 질환을 예방하거나 통증을 억제할 수 있는 치료 원리 및 방법이 될 수 있다^{1,2)}. 또한 통증 및 염증 완화에는 비스

테로이드계 소염 진통제(non steroidal anti inflammatory drug, NSAIDS)가 주로 사용되는 반면 소화불량, 위장 출혈 및 심혈관계 이상반응 등의 부작용이 보고되고 있다³⁾. 따라서 비교적 부작용이 적은 단미 한약재나 한약재들을 조합하여 새로운 진통 및 항염증제의 가능성을 찾기 위한 연구가 진행되고 있다⁴⁻⁶⁾. SJ004는 우슬(*Achyranthis Radix*)과 두충(*Eucommiae Cortex*)을 1 : 1 비율로 혼합

추출한 한약 원료로 오래전부터 두 한약재는 척추 및 관절질환에 주로 사용되었다. 우슬은 비름과에 속하는 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai)의 뿌리줄기를 건조한 것으로 oleanolic acid계 saponin, steroid계열의 β -sitosterol 등을 함유하고 있다⁷⁾. 약리 작용으로 항염증⁸⁾, 항종양⁹⁾, 항균효과¹⁰⁾를 나타내고, 최근 연구에서 Choi 등¹¹⁾은 발효 우슬, 당귀, 두충을 포함한 추출복합물이 염증을 억제하여 통증을 감소시키고, 관절염을 개선했다고 보고하고 있다. 두충은 두충나무과(*Eucommiaceae*)에 속하는 두충(*Eucommia ulmoides* Oliver)의 줄기 껍질로서 주피를 제거해서 사용하며 수피와 잎을 자르면 흰색의 가는 섬유질의 고무질이 나오는 특징이 있고, Lignan계 화합물인 pinoresinol diglucoside, iridoid계열의 aucubin 등 flavonoid, phenol류같은 화합물을 함유한다¹²⁾. 약리작용으로 혈압 강하¹³⁾, 간 보호¹⁴⁾, 항산화¹⁵⁾, 항보체 효과¹⁶⁾가 보고되고 있다. 한의학에서 우슬과 두충은 대방풍탕, 독활기생탕 등의 처방에 같이 사용한 한약재로서 우슬과 두충 등 단일 약재를 사용할 때보다 복합으로 사용하였을 때 항산화, 진통, 골관절염 등에 더 높은 효능을 보인다는 보고가 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 최근 Kwon 등²⁰⁾은 우슬을 주원료로 복합 조성물의 기능성을 평가한 결과 우슬 단일 조성물 대비 혼합 조성물에서 항산화 활성, 총 페놀 함량, xanthine oxidase 억제능 및 항균 활성이 모두 우수하다고 보고했으며, Park 등²¹⁾은 두충, 보골지 단일 성분 대비 혼합하여 물을 추출하였을 때 파골세포의 분화를 강력히 억제한다고 보고했다.

이에 본 연구에서는 관절 및 척추질환에 우수한 조합인 우슬과 두충 혼합 처방(SJ004)의 추출 용매별 효능과 최적의 추출법을 확인하여 표준화의 기틀을 정립하고자 하였다. 다양한 활성 성분을 함유하고 있는 한약재의 경우 추출할 때의 물리적 또는 화학적인 차이에 의하여 생리 활성, 효능의 범위, 활성 성분의 함량, 수율 등의 차이가 있을 수 있다. 물리적으로는 온도, 압력, 초음파 사용 유무 등의 조건이 있을 수 있고, 화학적으로는 용매, 염도, pH 등의 차이가 있을 수 있다^{22,23)}. 한방의료기관에서 가장 많이 처방하는 탕약 및 환제 등은 복용하기 때문에 추출 용매의 선정에 있어 한계가 있다. 인체에 무해한 용매를 사용하기 위하여 주로 물을 사용하며, 정제를 하는 경우에도 휘발성이 강하고 독성이 거의 없는 주정을 주로 사용한다. 이에 추출 용매를 물과

주정의 비율을 조절하며 비교하였다.

재료 및 방법 >>>>

1. 시약 및 기기

20-hydroxyecdysone, pinoresinol diglucoside 표준품은 식품의약품안전처(Cheongju, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Acetonitrile (ACN)과 water는 이동상으로 사용되며, high-performance liquid chromatography (HPLC) grade로 Honeywell International, Inc. (Charlotte, NC, USA)의 제품을 사용하였고, formic acid는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 항산화 실험에 사용된 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium persulfate, acetic acid, 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, trolox, gallic acid는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 동결건조기는 Lyoph-Pride03 모델(Ilsinbiobase Co., Yangju, Korea)을, 감압 농축기는 N2110 모델(Eyela Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. Micro plate reader는 EPOCH2 모델(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)을 사용하였으며 HPLC는 LC-20A, CBM-20A, LC-20AT, SIL-20AC, CTO-20AC, DGU-20A5R, SPD-M20A, LC-PDA 모델(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하였다.

2. SJ004의 조제

본 연구에 사용한 두충과 우슬은 녹원제약(Seoul, Korea)에서 구입하였으며 식품의약품안전처에서 인증한 우수 한약 제조 및 품질 관리 기준이 적용된 한약재를 사용하였다. SJ004의 구성 약재인 두충, 우슬을 분쇄기를 이용하여 각각 분말화한 후 1 : 1 비율로 총 30 g을 칭량하여 준비하였다. 용매는 100%, 70% 주정, 증류수를 약재 총량의 5배수로 준비하였고 각각 1시간동안 환류추출하였다. 추출 후 각 추출물들은 1 μ m 필터페이퍼를 사용하여 여과하였다. 각 여과액을 감압농축하여 증류수 150 mL로 녹이고 용기에 담아 냉동실에 보관하여 예비동결하였다. 약 69시간동안 동결건조한 후 분말을 샘플로 사용하였으며 실험 시작 직전까지 -20°C 냉동고

에 보관하였다.

3. 분석법 밸리데이션

증류수, 70% 주정, 100% 주정으로 추출한 각각의 샘플은 10.14, 10.08, 10.68 mg/mL의 농도로 희석하여 준비하였다. 우슬의 지표성분인 20-hydroxyecdysone은 C₁₈ ODS (25 cm * I.D 5.0 μm; Agilent Technologies, Inc., Charlotte, NC, USA) 컬럼을 이용하였으며, 이동상은 0.08% formic acid의 물과 ACN을 17 : 3 비율로 혼합한 용액을 기울기 조건 없이 1 mL/min으로 유지하였다. 다 파장 검출기를 이용하여 분석한 후 245 nm으로 추출하여 확인하였다. 두층의 지표성분인 pinoresinol diglucoside는 C₁₈ ODS 컬럼을 이용하였으며, 이동상은 0.1% formic acid의 물(A)과 ACN (B)를 기울기 조건으로 하여 5% (B)로 시작하여 20분까지 20% (B), 25분까지 20% (B), 30분까지 5% (B)로 하여 1 mL/min으로 유지하였다. 검출기의 파장은 230 nm으로 분석하였다.

1) 직선성, 정량한계, 검출한계

20-hydroxyecdysone 표준품을 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 ppm 농도별로 희석하여 준비하고 pinoresinol diglucoside 표준품은 3.3125, 6.625, 13.25, 26.5, 53, 106 ppm 농도별로 희석하여 준비하였다. HPLC를 분석하여 표준곡선을 그려 검량선을 구해 직선성의 상관계수(R²값)를 확인하였다. Limit of detection (LOD)와 limit of quantitation (LOQ)는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 구하였으며 식은 아래와 같다. 모든 분석은 3회 반복 시행하였다.

$$LOD=3.3 \times \sigma / S$$

$$LOQ=10 \times \sigma / S$$

σ: y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기

2) 일내, 일간 정밀성 및 회수율

20-hydroxyecdysone 표준품을 1.25, 5, 20 ppm 농도별로 희석하여 준비하고 pinoresinol diglucoside 표준품을 3.3125, 13.25, 53 ppm 농도별로 희석하여 준비한 일내분석과 일간분석에서 정밀성과 정확성을 측정하였다. 일내분석은 하루 동안 표준품을 3회 반복하여 분석하

였으며, 일간분석은 일내분석의 과정을 3일동안 반복하여 분석하였다. HPLC를 분석하여 상대표준편차(%; relative standard deviation, RSD)를 구해 정밀성을 측정하였고, 회수율(%)을 구하여 정확성을 평가하였다.

3) 지표성분 함량 분석

직선성에서 얻은 검량선의 방정식에 샘플의 HPLC 크로마토그램에서 얻은 피크면적 값을 대입하여 함량 값을 구하였다.

4. 항산화능 측정

1) 총 페놀 화합물

총 페놀 화합물은 Kim 등²⁴⁾의 방법을 응용하여 측정하였다. SJ004의 100% 주정, 70% 주정, 증류수 추출물 동결건조 분말을 모두 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL의 농도의 메탄올로 희석하여 준비하였다. 검액 50 μL와 증류수를 이용하여 제조한 2% Na₂CO₃ 1 mL를 혼합한 후 2분간 반응시켰다. 혼합액에 50% Folin & Ciocalteu's phenol reagent 50 μL를 첨가하여 vortex로 충분히 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μg/mL의 농도로 희석하여 사용하였고, 각각의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그렸다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 총 페놀 화합물을 계산하였다. 표준곡선의 R²값은 0.95 이상을 유효값으로 설정하였다.

2) ABTS free radical 소거능

ABTS free radical 소거능은 Arnao 등²⁵⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 증류수를 이용하여 제조한 7.4 mM ABTS와 에탄올을 이용하여 제조한 potassium persulfate를 동량 혼합한 후 암상태의 실온에서 12시간 반응시켜 ABTS⁺를 형성시켰다. Micro plate reader로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 값이 0.7±0.02가 되도록 메탄올로 희석하였다. 희석액 190 μL에 검액 10 μL를 가하여 vortex로 충분히 혼합한 후 암상태의 실온에서 2시간동안 반응시켰다. Micro plate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 trolox를 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μg/mL의 농도로 희석

하여 사용하였고, 각각의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그렸다. ABTS 라디칼 소거 활성은 총 페놀 함량 측정과 동일한 방법으로 계산하였다.

3) Fe²⁺ chelate 활성 측정

Fe²⁺ chelate 활성은 Benzi법을 변형한 방법²⁶⁾에 따라 측정하였다. 증류수를 이용하여 제조한 acetate buffer, 40 mM HCl을 이용하여 제조한 10 mM TPTZ와 증류수를 이용하여 제조한 20 mM FeCl₃ · 6H₂O 용액을 준비하여 10 : 1 : 1 비율로 혼합한 후 35°C incubator에서 사용 직전까지 보관하였다. 혼합액 190 µL와 검액 10 µL를 vortex로 충분히 혼합한 후 암상태의 실온에서 30분간 반응시켰다. Micro plate reader를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 trolox를 3.9, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL의 농도로 희석하여 사용하였고, 각각의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그렸다. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) 활성은 총 페놀 함량 측정과 동일한 방법으로 계산하였다.

5. 통계

본 연구의 모든 실험결과는 같은 조건으로 3회 반복 실험을 통해 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 결과 값을 내었다. 다군 간의 차이는 신뢰수준 95% (p<0.05)에서 검증하였다. 본 연구의 통계는 IBM SPSS Statistics 22 프로그램(IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하였고, 통계기법은 analysis of variance paired

t-test법으로 구하였다.

결과»»»»

1. 수율

SJ004의 추출 용매별 수득량은 100% 주정 3.11 g, 70% 주정 7.12 g, 증류수 8.24 g이었다. 각각의 수율을 계산하면 10.35%, 23.73%, 27.45%로 증류수 추출물의 수율이 가장 높았다.

2. 분석법 밸리데이션

1) 직선성, 검출한계, 정량한계

20-hydroxyecdysone과 pinoresinol diglucoside를 농도별로 분석하고 표준곡선을 그린 결과 R²값은 모두 1.000으로 직선을 형성하였고, 동일한 시간대 머무름 시간이 형성되는 peak로 인정하였다(Fig. 1). y절편의 표준편차와 기울기 값을 이용해 계산한 결과 20-hydroxyecdysone과 pinoresinol diglucoside의 LOD는 각각 0.33, 0.16 µg/mL 이었고, LOQ는 각각 1.01, 0.49 µg/mL로 계산되었다(Table 1).

2) 정밀성과 정확성

20-hydroxyecdysone의 RSD (%)는 1.25, 5, 20 ppm의 농도별로 일내 정밀성(intra-day)에서 각각 3.89, 0.12, 0.14%

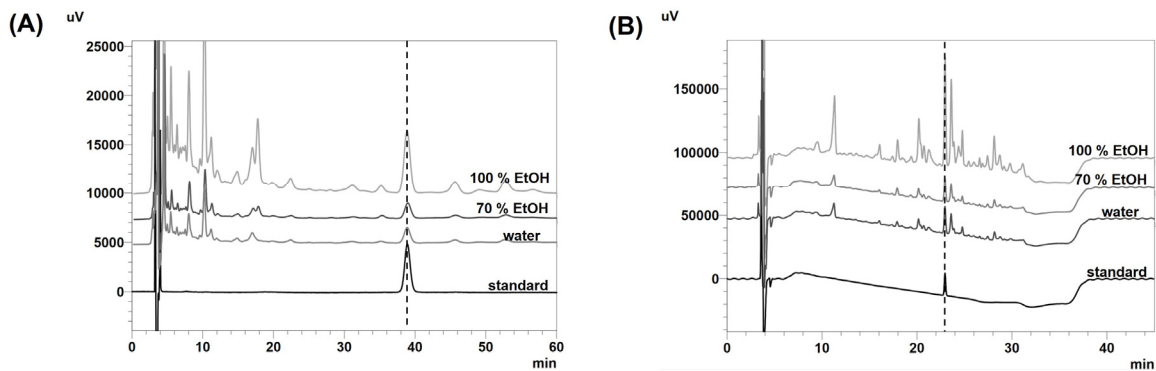


Fig. 1. Analysis of marker compounds of SJ004 by HPLC chromatogram. (A) HPLC chromatogram of 20-hydroxyecdysone and SJ004 by extracts, (B) HPLC chromatogram of pinoresinol diglucoside and SJ004 by extracts. R² value of all the standard curves was 0.999 for linearity. HPLC: high-performance liquid chromatography, EtOH: ethyl alcohol.

를 보였으며, 회수율(%)은 각각 99.56±3.88, 100.14±0.12, 99.99±0.14%를 보였다(Table II). 일간 정밀성(inter-day)에서 RSD (%)는 각각 2.32±1.55, 0.89±0.87, 0.19±0.07%를 보였으며, 회수율(%)은 각각 99.44±1.50, 100.18±0.47, 99.99±0.02%를 보였다(Table III). Pinorensinol diglucoside의 RSD (%)는 3.3125, 13.25, 53 ppm의 농도별로 일내 정밀성(intra-day)에서 각각 0.20, 0.43, 0.03%를 보였으며, 회수율(%)은 각각 98.73±0.20, 100.40±0.43, 99.98±0.03%를 보였다(Table II). 일간 정밀성(inter-day)에서 RSD (%)는 각각 0.57±0.49, 0.30±0.20, 0.18±0.26%를 보였으며, 회수율(%)은 각각 99.92±1.04, 100.03±0.32, 100.00±0.02%를 보였다(Table III).

3. 지표성분 함량 분석

직선성에서 얻은 검량선의 방정식에 증류수, 70% 주정, 100% 주정으로 추출한 각 샘플의 피크면적 값을 대입하여 계산한 결과 20-hydroxyecdysone은 각각 0.692±0.002, 0.674±0.002, 2.682±0.011 mg/g의 함량을 보였으며, pi-

norensinol diglucoside는 각각 1.771±0.004, 1.575±0.012, 6.821±0.015 mg/g의 함량을 보였다(Table IV).

4. 항산화 효능 결과

1) 총 페놀 화합물 함량

Gallic acid 표준곡선의 R²값은 0.99를 나타내어 직선성을 보이므로 유효값으로 인정하였다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 계산한 결과 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL의 농도별로 100% 주정추출물 30.93±0.58, 52.93±1.53, 90.93±1.53 µg/mL, 70% 주정 추출물 26.93±1.53, 39.27±2.08, 69.6±2.65 µg/mL, 증류수 24.93±2.51, 35.27±2.08, 56.27±1.53 µg/mL의 값을 나타내었다(Fig. 2A).

2) ABTS free radical 소거능

Trolox 표준곡선의 R²값은 0.99을 나타내어 직선성을 보이므로 유효값으로 인정하였다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 계산한 결과 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL의 농도별로 100% 주정 추출물은 16.33±9.83, 36.93±9.34,

Table I. Measures of Linearity, Regression Equation, Correlation Coefficient (R²), LOD and LOQ by HPLC-PDA

Components	Regression equation* (n=3)	R ²	LOD [†] (µg/mL)	LOQ [‡] (µg/mL)
20-hydroxyecdysone	y = 14,007,686.899 × - 1,906.557	1.000	0.33	1.01
Pinorensinol diglucoside	y = 13,622,625.131 × +3,058.625	1.000	0.16	0.49

*y: peak area, x: amount (µg/mL), [†]3.3×(SD of the response/slope of the calibration curve), [‡]10×(SD of the response/slope of the calibration curve).

LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantitation, HPLC-PDA: high-performance liquid chromatography-photo diode array, SD: standard deviation.

Table II. Measures of Accuracy and Precision Intra-day Test for Standard Materials by HPLC-PDA

Components	Spiked amount (µg/mL)	Measured amount (µg/mL, n=3)	RSD* (%)	Recovery [†] (%)
20-hydroxyecdysone	1.25	1.24±0.05	3.89	99.56±3.88
	5	5.01±0.01	0.12	100.14±0.12
	20	20.00±0.03	0.14	99.99±0.14
Pinorensinol diglucoside	3.3125	3.27±0.01	0.20	98.73±0.20
	13.25	13.30±0.06	0.43	100.40±0.43
	53	52.99±0.02	0.03	99.98±0.03

*(standard deviation/mean)×100, [†][(amount found - original amount)/amount spiked]×100%.

HPLC-PDA: high-performance liquid chromatography-photo diode array, RSD: relative standard deviation

Table III Measures of Accuracy and Precision Inter-day Test by HPLC-PDA

Measurement		20-hydroxyecdysone (µg/mL)			Pinoresinol diglucoside (µg/mL)		
		1.25	5	20	3.3125	13.25	53
RSD* (%)	Day 1	3.89	0.12	0.14	0.20	0.43	0.03
	Day 2	2.27	1.83	0.16	1.13	0.07	0.48
	Day 3	0.79	0.72	0.28	0.38	0.40	0.02
	Mean	2.32	0.89	0.19	0.57	0.30	0.18
	SD	1.55	0.87	0.07	0.49	0.20	0.26
Recovery [†] (%)	Day 1	99.56	100.14	99.99	98.73	100.40	99.98
	Day 2	100.87	99.73	100.01	100.61	99.81	100.01
	Day 3	97.88	100.66	99.97	100.42	99.87	100.01
	Mean	99.44	100.18	99.99	99.92	100.03	100.00
	SD	1.50	0.47	0.02	1.04	0.32	0.02

*(SD/mean)×100, [†][(amount found - original amount)/amount spiked]×100%.

HPLC-PDA: high-performance liquid chromatography-photo diode array, RSD: relative standard deviation, SD: standard deviation.

Table IV. Analysis of Marker Compounds of SJ004 by Extraction Solvents

Measurement	20-hydroxyecdysone			Pinoresinol diglucoside		
	Water	70% EtOH	100% EtOH	Water	70% EtOH	100% EtOH
Contents (mg/g)	0.692±0.002	0.674±0.002	2.682±0.011	1.771±0.004	1.575±0.012	6.821±0.015

EtOH: ethyl alcohol.

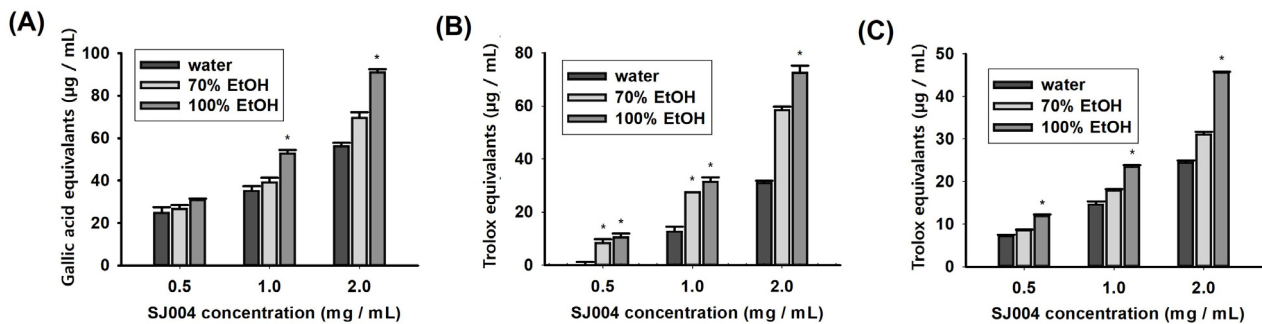


Fig. 2. Antioxidative activities of SJ004 by solvent extraction. (A) total phenolic compounds, (B) ABTS free radical scavening, (C) ferric reducing antioxidant power. ABTS: 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), EtOH: ethyl alcohol. Statistically significant value indicated difference (*p<0.05).

76.10±6.59 µg/mL, 70% 주정추출물은 12.40±6.76, 31.81±7.22, 63.71±9.01 µg/mL, 증류수는 4.95±8.19, 16.33±6.19, 34.61 ±6.10 µg/mL의 값을 나타내었다(Fig. 2B).

3) Fe²⁺ chelate 활성 측정

Trolox 표준곡선의 R²값은 0.99을 나타내어 직선성을 보이므로 유효값으로 인정하였다. 검액의 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 계산한 결과 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL의

농도별로 100% 주정 추출물은 11.97±0.28, 23.45±0.42, 47.53±0.28 µg/mL, 70% 주정 추출물 8.55±0.16, 17.90±0.32, 31.05±0.64 µg/mL, 증류수 7.25±0.28, 14.66±0.70, 24.47±0.48 µg/mL의 값을 나타내었다(Fig. 2C).

고찰»»»»

국내에서도 매우 다양한 종류의 한약재가 적추 및 관절질환에 처방되고 있으며 한약재의 수 및 배합비율에 따라 수많은 처방이 존재한다²⁷⁾. 본 연구에서는 환자에게 처방하여 효능을 보였던 조합을 사용하였으며, 어떤 용매로 추출하였을 때 가장 효율적인 지를 확인하고자 하였다. 추출 수율은 추출 온도, 시간, 압력 등 여러 조건에 따라 달라질 수 있는데 본 실험에서 진행한 SJ004의 추출방식에서는 증류수 추출이 가장 높은 수율을 보였고 100% 주정 추출이 가장 낮은 수율을 보였지만, 지표성분의 함량은 100% 주정 추출물이 2.682 mg/g의 값으로 가장 높게 추출되었다²⁸⁾. 이는 용매를 물로 추출하거나 장시간 고온으로 끓였을 때에는 전분이 다량으로 검출된다는 보고와 동일하게 전분같은 무효 물질들이 더 많이 추출된 것으로 생각된다²⁹⁾.

항산화 활성에서는 총 페놀 화합물, ABTS, FRAP 각각 100% 주정 추출물이 70% 주정, 증류수 추출물보다 높은 활성을 보였다. 이는 Na 등³⁰⁾의 보고와 같이 증류수 추출보다 에탄올을 추출했을 때의 폴리페놀 함량이 증가한 것은 일치하였으나, Lee 등³¹⁾의 홍삼을 에탄올 추출 조건으로 끓였을 때 페놀성 화합물이 EtOH 농도 80% 이상 추출했을 때 감소하였다는 연구와 다른 경향을 보였다. 한약재의 종류에 따라 적합한 추출방법과 전처리를 적용함으로써 높은 항산화 활성을 가진 추출물을 얻는 것이 가능할 것이라 판단된다.

밸리데이션 결과 표준곡선의 직선성은 상관계수가 모두 1.000으로 나타났으며, 정량한계와 검출한계 모두 5 µg/mL보다 낮아 정상적인 범위에서 분석이 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 우슬의 20-hydroxyecdysone, 두충의 pinoresinol diglucoside 각각 정확성은 ±5% 이내의 편차를 보여 지표물질로서 손색이 없음을 확인하였다. 이 두 가지 지표물질들은 대한약전에 등재되어 있는 만큼 SJ004의 지표물질로 선정하기에 적합하였다.

SJ004는 한방의료기관에서 다양한 제형으로 탕약, 캡슐, 약침이 모두 가능하다. 선정된 용매에서 유효성을 더 높이기 위하여 용매 및 open column 등의 분획 연구가 더 필요하다. 본 연구에서 진행한 항산화 활성은 생리활성의 정도를 측정하기 위함이지 구체적인 세포실험 또는 동물실험이 아니기에 임상 적용에는 한계를 보인다. 하

지만 활성산소에 대해서는 최근 여러 매체를 통해 알려진 바로 폐, 심장혈관 계통, 콩팥, 간, 혈액, 피부, 눈 등 다양한 부위에서 질병 및 부상이 나타나는데 항산화 기능을 가진 한약재 추출물이 염증 및 통증을 감소시킨다는 연구들이 보고되고 있기 때문에 항염증 및 항통증에 대한 근거가 될 수 있었다³²⁻³⁴⁾. 이처럼 지속적인 세포실험 및 동물실험의 진행을 통해 해당 물질의 기전을 규명하여 효능에 대한 정확한 근거를 갖출 필요가 있다. 한방의료기관에서 조제 시마다 동일한 약을 만들기 위해 지표물질의 분석법 및 타당성을 확인하고 유효성을 확인하기 위한 연구를 지속해서 보완하는 작업을 시행하는 것은 SJ004의 가치를 높여줄 뿐 아니라, 한약이 표준화, 과학화로 나아가는 발걸음이 될 것이다.

결론»»»»

본 연구는 SJ004 (두충, 우슬 복합 추출물)를 추출할 때 효능이 높고 표준화가 가능한 효율적인 추출 용매를 설정하는 것을 목표로 하였다.

1. SJ004는 추출 용매에 따라 최종 수율이 증류수 (27.45%), 70% 주정(23.73%), 100% 주정(10.35%)의 순으로 낮게 나타났다. 조제 수율을 고려하였을 때 100% 주정은 수율이 낮아 추출 용매로 선정하기에 무리가 있었다.
2. 분석법 밸리데이션에서 20-hydroxyecdysone과 pinoresinol diglucoside는 검출한계 및 정량한계가 성분 분석적인 품질관리에 적합하여 지표성분으로 타당하였다. 증류수, 70% 주정, 100% 주정의 SJ004 추출물은 각각 20-hydroxyecdysone이 0.692±0.002, 0.674±0.002, 2.682±0.011 mg/g, pinoresinol diglucoside는 1.771±0.004, 1.575±0.012, 6.821±0.015 mg/g를 함유하고 있었다.
3. SJ004의 항산화능은 모든 검출법에서 농도 의존적이었으며 증류수 추출물, 70% 주정 추출물, 100% 주정 추출물 순으로 높게 나타났다.

효율적인 추출용매를 선정하기 위하여 확인한 수율, 항산화능, 지표성분 밸리데이션에서 기대되는 생리활성은 100% 주정 추출물이 가장 우수하지만, 조제적인 측면에서 수율을 고려하면 70% 주정 추출물이 가장 효율적이었다.

References>>>>

1. Uhm WS, Yun JE, Park YW, Kim HR, Nam JJ, Lee HS, Kim TH, Jun JB, Yoo DH, Bae SC. The prevalence of self-reported arthritis and its epidemiologic characteristics in Korea. *Journal of the Korean Rheumatism Association*. 2004;11(2):116-25.
2. Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends in Molecular Medicine*. 2003; 9(12):549-57.
3. Sánchez-Borges M. NSAID hypersensitivity(respiratory, cutaneous, and generalized anaphylactic symptoms). *Medical Clinics of North America*. 2010;94(4):853-64.
4. Ju MS, Jeong HU, Kim HG, Park GH, Youn YS, Kim YO, Kim SY, Oh MS. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of geranii herba. *Korean Journal of Herbology*. 2010;25(3):97-101.
5. Kim SN, Lee EJ, Lee HJ, Nam GS, Kim HS, Hwang SW, Hwang SY. Effect on inflammatory-cytokines production inhibition and analgesic activity of perilla frutescens extracts. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2006;20(2):414-9.
6. Park MJ, Lee KY, Park KH, Chung AK, Shin DH. The clinical study on the effect of sulgwanjul-bang no.1 on osteoarthritis of knee joint. *Korean Journal of Acupuncture Research*. 2004;21(3):249-64.
7. Vetrichevan T, Jegadeesan M. Effect of alcohol extract of achyranthes aspera linn. on acute and subacute inflammation. *Phytotherapy Research*. 2003;17(1):77-9.
8. Chakraborty A, Brantner A, Mukainaka T, Nobukuni Y, Kuchide M, Konoshima T, Tokuda H, Nishino H. Cancer chemopreventive activity of achyranthes aspera leaves on epstein-barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2002;177(1):1-5.
9. Han DS. *Pharmacognosy*. 2th ed. Seoul:Dongmyeong Publishers. 2014:182-4.
10. Jung SM, Choi SI, Park SM, Heo TR. Antimicrobial effect of achyranthes japonica Nakai extracts against clostridium difficile. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2007;39(5):564-8.
11. Choi DH, Lee SJ, Jeong HC, Kim KM, Kwon MY, Lee SH, Sohn JH. Anti-osteoarthritis and anti-arthrodyndia effects of a mixture of fermented achyranthes japonica Nakai, Angelica gigas Nakai, and Eucommia ulmoides Oliver extracts on monosodium iodoacetate-induced arthritis in rats. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2019;48(11):1179-85.
12. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Sook OM, Bu YM. *Medicinal herbology*. 1st ed. Seoul:Younglim Publishers. 2012:572-4.
13. Luo LF, Wu WH, Zhou YZ, Yan J, Yang GP, Ouyang DS. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;129(2):238-43.
14. Youn Y, Baek HI, Jin HY, Jeong DY, Shen L, Joo JC, Park SJ. Randomized double-blind human trial to evaluate efficacy and safety of Rhus verniciflua stokes (Lacca Sinica Exsiccata) and Eucommia ulmoides Oliver (Eucommiae Cortex) extract combination (ILF-RE) on improvement of liver function. *Korean Journal of Herbology*. 2020;35(1):45-55.
15. Kim SH, Kim IC. Antioxidative properties and whitening effects of the Eucommiae cortex, Salviae miltiorrhizae radix, Aurantii nobilis pericarpium and Cnidii rhizome. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*. 2008;18(4):618-23.
16. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 1995;27(1):80-5.
17. Jeon WJ, Shin GJ, Lee WC. An experimental studies on the alleviation effects of Daebangpoongtang(大防風湯) in LPS-induced arthritis. *Journal of Oriental Medicine Drug R&D Center*. 2000;9(9):35-49.
18. Je YM, Yoo DY. Effects of Dokhwalgisaengtang-gami water extract on osteoclast differentiation and osteoblast function in RANKL-induced RAW 264.7 cell. *Journal of Korean Obstetrics & Gynecology*. 2013;26(2):1-16.
19. Park H, Kim YH. Study on the anti-inflammatory activity and mechanism of medicinal plants used in the treatment of arthritis. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 2016;48(3):176-82.
20. Kwon SS, Choi SK, Kuen JD, Lee JW, Cheol SS, Choi HL, Oh YS, Seong ES. Functional assessment of complex composition based on Achyranthes japonica Nakai. *Korean Journal of Food Engineering Progress*. 2019; 23(2):104-11.
21. Park JS, Park GY, Choi HG, Kim SJ, Kim JH, Park MC, Kim YK, Han SY, Jo EH. Inhibitory effects of water extracts of eucommiae cortex and psoraleae semen alone and in combination on osteoclast differentiation and bone. *Journal of Acupuncture Research*. 2017;34(2):1-18.
22. Jang GY, Kim HY, Lee SH, Kang YR, Hwang IG, Woo KS, Kang TS, Lee JS, Jeong HS. Effects of heat treatment and extraction method on antioxidant activity of several medicinal plants. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2012;41(7):914-20.
23. Koh WI, Lee JH, Ha IH, Chung HJ, Lee IH, Lee JW, Kim EJ, Gang BG, Jeon SH, Cho YK, Kim MJ. Salt-wa-

- ter processing-dependent change in anti-oxidative and anti-inflammatory effects of cortex eucommiae. *J Korean Med Rehabil.* 2017;27(2):29-38.
24. Kim YH, Sung HS, Kim WJ. Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 1993;25(3):204-9.
 25. Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Journal of Food Chemistry.* 2001;73(2):239-44.
 26. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry.* 1996;239(1):70-6.
 27. Ahn JY, Kee JY, Kim JH, Park HJ, Kim HJ, Lee JH, Kim YK. A review of anti-osteoporosis effects of herbal extracts in Korean journals. *Korean Journal of Oriental Medicinal Prescription.* 2008;16(2):47-71.
 28. Yu HE, Dela Paz LMM, Bae YJ, Lee DH, Park JS, Kwak HS, Kim HK, Lee JS. Screening and extraction condition of anti-aging bioactive substances from medicinal plants. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition.* 2005;34(8):1136-42.
 29. Lee IH, Chung HJ, Shin JS, Ha IH, Kim MR, Koh W, Lee JH. Influence of boiling duration of GCSB-5 on index compound content and antioxidative and anti-inflammatory activity. *Pharmacognosy Magazine.* 2017;13(51):418-24.
 30. Na GM, Han HS, Ye SH, Kim HK. Physiological activity of medicinal plant extracts. *Korean Journal of Food Preservation.* 2004;11(3):388-93.
 31. Lee JW, Lee SK, Do JH, Yang JW. Determination of total phenolic compounds from Korean red ginseng and their extraction condition. *Journal of Ginseng Research.* 2000;24(2):64-7.
 32. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology.* 1993; 23(1):21-48.
 33. Lee JS, Lee MK, Kim YK, Kim KE, Hyun KY. Attenuant effects of *Hovenia dulcis* extract on inflammatory orofacial pain in rats. *The Korean Journal of Academia-Industrial Cooperation Society.* 2014;15(8):5088-94.
 34. Choi KB, Nam KW, Kim GY, Sim KC, Kim EJ. Effect of swimming exercise and *Achyranthe radix* extracts on inflammatory and pain responses in rheumatoid arthritis rats. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine.* 2009;23(1):113-20.