

# MD약침의 정제법별 항산화 활성 및 성분의 함량 비교

이광영\* · 배혜윤\* · 이인희<sup>†</sup> · 최강민\*  
메디그린한방병원\*, FL원외탕전원<sup>†</sup>

## Comparison of Antioxidant Activity and Compounds by Purification Method of MD Pharmacopuncture

Kwang Young Lee, K.M.D.\*, Hye Yoon Bae, K.M.D.\*, In Hee Lee, Ph.D.<sup>†</sup>, Gang Min Choi, K.M.D.\*  
Medigreen Korean Medicine Hospital\*, FL Herbal Dispensary<sup>†</sup>

RECEIVED September 17, 2024

REVISED September 30, 2024

ACCEPTED October 4, 2024

### CORRESPONDING TO

Gang Min Choi, Medigreen Korean  
Medicine Hospital, 201  
Beonyeong-ro, Seobuk-gu,  
Cheonan 31156, Korea

TEL 1522-2357

FAX (041) 565-7545

E-mail ih0915@hanmail.net

Copyright © 2024 The Society of  
Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** MD pharmacopuncture are medicine developed for immune-related treatments, consisting of wild ginseng, *Cordyceps militaris*, and *Amomum xanthoides*. Due to the characteristics of the active ingredients of each herbal medicine, they are prepared using an extraction and purification method. We attempted to confirm standardization and efficacy for the proper development of MD pharmacopuncture.

**Methods** Method validation was carried out to establish a method for analyzing the compounds of MD pharmacopuncture. To justify the purification process, the content of index compounds by high performance liquid chromatography and antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and ferric reducing antioxidant power were measured and compared for each purification step. To measure the activity of MD pharmacopuncture, they were compared with wild ginseng pharmacopuncture prepared with wild ginseng using antioxidant activities.

**Results** The index compounds of MD pharmacopuncture were selected as cordycepin and ginsenoside Rg<sub>1</sub>. As purification was further carried out, the content of index compounds and activity increased, confirming the need for a purification process. Comparing the activity of wild ginseng pharmacopuncture and MD pharmacopuncture, it was confirmed that the activity of MD pharmacopuncture was higher at most concentrations.

**Conclusions** When developing a new herbal medicine prescription, research based on the three major elements of medicine—stability, safety, and efficacy—is needed to scientifically and standardize herbal medicine. (*J Korean Med Rehabil* 2024;34(4):1-10)

**Keywords** Standardization, High pressure liquid chromatography, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Antioxidants

## 서론»»»»

약침은 경혈점에 약물을 주입하는 의료행위로 경락 이론과 기미론을 혼합한 치료법으로 한의학에서 발생된 한방 의료 기술이다<sup>1)</sup>. 봉약침, 산삼약침, 팔강약침,

자하거약침 등 다양한 약침들을 임상적으로 67.5%의 한의사가 이미 처방하고 있다고 예상된다<sup>2)</sup>. 약침에 대한 개발, 효능, 임상 등 다양한 방면에서 활발히 연구가 진행되고 있으나<sup>3,4)</sup>, 약으로서의 가치를 인정받기 위한 성분분석에 따른 표준화 또는 약효를 높이기 위한 추출법 등에 대한 연구는 부족한 실정이다.

MD약침은 다양한 효능 실험을 거쳐 찾아낸 조합의 약침이다. 면역증가를 목적으로 산양산삼(*Panax ginseng*), 동충하초(*Cordyceps militaris*), 사인(*Amomum villosum*)으로 구성되어 있으며 추출 방식은 증류 추출이 아닌 추출정제방식을 사용하여 알칼로이드, 페놀화합물, 테르페노이드, 글리코사이드 등 high performance liquid chromatography (HPLC)로 분석이 가능하고 생리활성이 명백한 성분들을 다량 함유할 수 있다.

산양산삼은 신진대사의 조절<sup>5)</sup>, 항체 생산 촉진<sup>6)</sup> 등의 약효가 있으며 인삼보다 우수하다고 알려져 있지만<sup>7)</sup>, 자연 상태에서의 산삼은 고가이기에 산림에 파종하여 배양한 산양산삼이 주로 사용되고 있다. 산양산삼을 이용한 약침에 대한 연구로는 약침 조제 시의 독성 및 진세노사이드를 이용한 표준화 연구<sup>8)</sup>, 면역 관련된 사이토카인 또는 케모카인들에게 미치는 영향을 확인한 연구<sup>9)</sup>, 암세포에 대한 항암 효능 연구<sup>10,11)</sup> 등이 있다. 산양산삼의 가장 대표적인 약리 활성 물질은 진세노사이드로 임상적으로 natural killer 세포의 활성도가 높아지고<sup>12)</sup>, 식세포작용, 총 림프구 수, 보조 T세포 수의 증가<sup>13)</sup> 등 다양한 면역관련 효능이 알려져 있다. 동충하초는 항산화<sup>14)</sup>, 혈당조절<sup>15)</sup>, 항암<sup>16,17)</sup>, 면역조절<sup>18)</sup> 등 다양한 약리적 기능이 확인되어 있으며 동충하초를 이용한 약침은 항산화<sup>19)</sup>, 항암<sup>20)</sup>, 천식<sup>21)</sup>, 신장질환<sup>22)</sup>에 처방하면 효능이 있다고 보고되어 있다. 산양산삼과 동충하초는 공통적으로 대식세포의 기능을 조절하여 면역을 이용한 항암효능을 보인다는 보고가 있으며<sup>23)</sup>, 사인은 면역적으로 간섬유증에 대한 개선 효과가 있을 뿐 아니라<sup>24)</sup> 산화질소(nitric oxide) 형성을 억제하여 세포 사멸을 예방하는 효능이 있어 당뇨병 진행 예방으로도 효능이 있기에<sup>25)</sup>, 이들이 조합된 처방은 면역적으로 충분한 가치가 있을 것으로 기대하였다.

이러한 각각의 한약재들의 조합이 합리적으로 약효를 발휘하도록 하기 위하여 본 연구에서는 추출 정제법을 비교하여 최적의 방법을 찾으려 하였다.

약침은 추출법에 따라 다양한 효능과 유효성분의 차이가 있을 수 있다. 약침의 한약재에 대한 추출법은 크게 증류 추출과 추출정제방식으로 나눌 수 있으며, 약재에 따라 차이가 있을 수 있지만, 이에 본 연구에서는 MD약침의 표준화 및 효능 정도를 측정하는 연구를 진행하는 과정에서 정제공정의 정도에 따른 효능 및 지표

물질의 함량을 정량적으로 비교하여 MD약침의 적절한 정제법을 모색하려 하였다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 시약 및 기기

정제공정별 활성 비교를 위한 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)은 Alfa Aesar (미국)에서 구입하였으며 2,2-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium persulfate, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 2, 4, 6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, trolox, gallic acid, quercetin은 Sigma-Aldrich (미국)에서 구입하였다. 동결건조기는 일신바이오베이스(양주)의 Lyoph-Pride03를 사용하였고 감압농축기는 Eyela (일본)의 N-2110를 사용하였다. Microplate reader는 Biotek (미국)의 Epoch2를 사용하였으며 HPLC는 Shimadzu (일본)의 LC-20A, CBM-20A, LC-20AT, SIL-20AC, CTO-20AC, DGU-20A5R, SPD-M20A, LC-PDA 모델을 사용하였다. 정량분석 실험에 사용된 cordycepin과 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 표준품은 모두 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며 이동상으로 사용된 acetonitrile (ACN)과 water는 HPLC grade로 Honeywell (미국)의 제품을 사용하였다.

### 2. MD약침과 면역약침의 조제

산양산삼, 동충하초, 사인은 모두 한퐁어(포천)에서 구입하여 자체적 약재의 검증 후 조제하였다. MD약침의 조제로 산양산삼, 동충하초, 사인을 각각 33.33 g씩 동일한 비율로 칭량하였고, 용매는 70% 주정 1 L로 총량의 10배수로 전탕하였다. 2시간 환류 추출 후 각 추출물들은 3 μm 필터 필터페이퍼를 이용하여 여과 후 감압농축 하였다. 여액을 1 L의 80% 주정으로 녹이고 2시간 교반한 후 냉침하였다. 1 μm 필터페이퍼를 이용하여 여과 후 다시 감압농축 하였다. 90% 주정으로 녹이고 2시간 교반한 후 냉침하고 1 μm 필터페이퍼로 여과하였다. 전탕 감압농축 후 증류수에 녹이고 여과한 뒤 동결건조하였다. 위 과정 중 1차(70% 전탕상태), 2차(90% 정제

상태), 최종(동결건조 직전) 별로 각각 10 mL 씩 채취 후 각각 동결건조하였다. 면역약침은 산양산삼만으로 100 g을 칭량하여 70% 주정 1 L로 전탕하였으며, 모든 공정 과정은 MD약침과 동일하였다<sup>26)</sup>.

### 3. 정제공정별 활성 측정

DPPH 활성은 ethanol (EtOH)에 녹인 0.2 mM 의 DPPH 용액과 검액을 동량으로 혼합한 후 30분간 실온에서 반응시켰다. 흡광도를 측정하기 위하여 517 nm micro-plate reader를 사용하였다<sup>27)</sup>. ABTS 활성은 7.4 mM 농도의 ABTS 용액을 암소에서 12시간 방치하여 생성된 ABTS<sup>+</sup> 이온용액 190  $\mu$ L와 검액 10  $\mu$ L를 혼합하여 측정하였다. 암소에서 2시간 반응시킨 후 750 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다<sup>28)</sup>. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)는 철이온의 환원력을 측정하기 위한 항산화 활성 기법이다<sup>29)</sup>. 300 mM acetate buffer와 HCl 40 mM를 혼합한 용액과 10 mM TPTZ 용액, 20 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 10:1:1로 혼합하여 190  $\mu$ L와 검액 10  $\mu$ L를 혼합하고 30분간 방치 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 활성 측정은 대표적인 항산화제인 trolox를 표준물질로 대비하였으며, 500, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu$ g/mL의 농도를 사용하였다. 측정치로 표준곡선을 그리고 검액의 흡광도 값을 대입하여 계산하였고, 표준곡선의 R<sup>2</sup>값은 0.95 이상을 유효값으로 설정하였다.

### 4. Method validation

MD약침의 지표성분 및 분석법을 확립하기 위하여 식품의약품안전처의 ‘의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인’에 따라 직선성, 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성, 정확성을 측정하였다<sup>19)</sup>. MD약침의 지표성분은 대표적으로 분석법이 확립되어 있는 동충하초의 cordycepin과 산양산삼의 ginsenoside Rg<sub>1</sub>으로 하였다. Cordycepin은 기율기 조건없이 5% methanol (MeOH)에 1% formic acid를 첨가하여 260 nm에서 측정하였다. 컬럼오븐은 35 °C, 사용된 컬럼은 agilent (미국)의 C<sub>18</sub> ODS 25 cm×I.D 5.0  $\mu$ m 이고 유속은 1 mL/min으로 유지하였다. Ginsenoside

Rg<sub>1</sub>은 20% ACN을 이동상으로 기율기 조건없이 203 nm에서 측정하였다. 컬럼 및 컬럼오븐, 유속은 cordycepin과 동일하였다.

#### 1) 직선성, 검출한계, 정량한계

선정된 각각의 지표성분의 직선성을 확인하기 위하여 cordycepin 표준품은 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ g/mL 농도로 희석하여 준비하고 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 표준품은 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL 농도로 준비하였다. HPLC를 분석하고 농도와 면적 값을 이용하여 표준곡선으로 검량선을 구해 직선성의 상관계수(R<sup>2</sup>)를 확인하였다. LOD와 LOQ는 표준편차와 검량선의 기율기에 근거하는 방법으로 구하였다. 분석은 3회 반복 시행하였다.

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

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

$\sigma$ : y절편의 표준편차, S: 검량선의 기율기

#### 2) 정밀성, 정확성

1.25, 5, 20  $\mu$ g/mL 농도의 cordycepin 표준품과 25, 100, 400  $\mu$ g/mL 의 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 표준품을 준비하였다. 시간차를 두어 3회 측정하여 정밀성과 정확성을 구하였다. 측정치로 상대표준편차 (%; relative standard deviation, RSD)를 구해 정밀성을 측정하였고, 회수율(%)을 구하여 정확성을 평가하였다.

#### 3) 공정별 지표성분의 함량분석

표준화 과정대로 정해진 분석법으로 각 공정별 샘플을 분석하였고, 직선성에서 얻은 방정식에 면적 값을 대입하여 함량을 측정하였다.

### 5. MD약침과 면역약침의 활성 비교

공정별 측정방법과 동일하게 DPPH, ABTS, FRAP의 기법으로 MD약침과 면역약침의 활성도를 비교 측정하였다. 모든 약침은 동결건조 상태의 원료전처리 단계에서 비교하였으며 농도는 동일하게 2.0, 1.0, 0.5 mg/mL로 하였다. 공정별 측정방법과 동일한 방법으로 진행하였다.

## 6. 통계

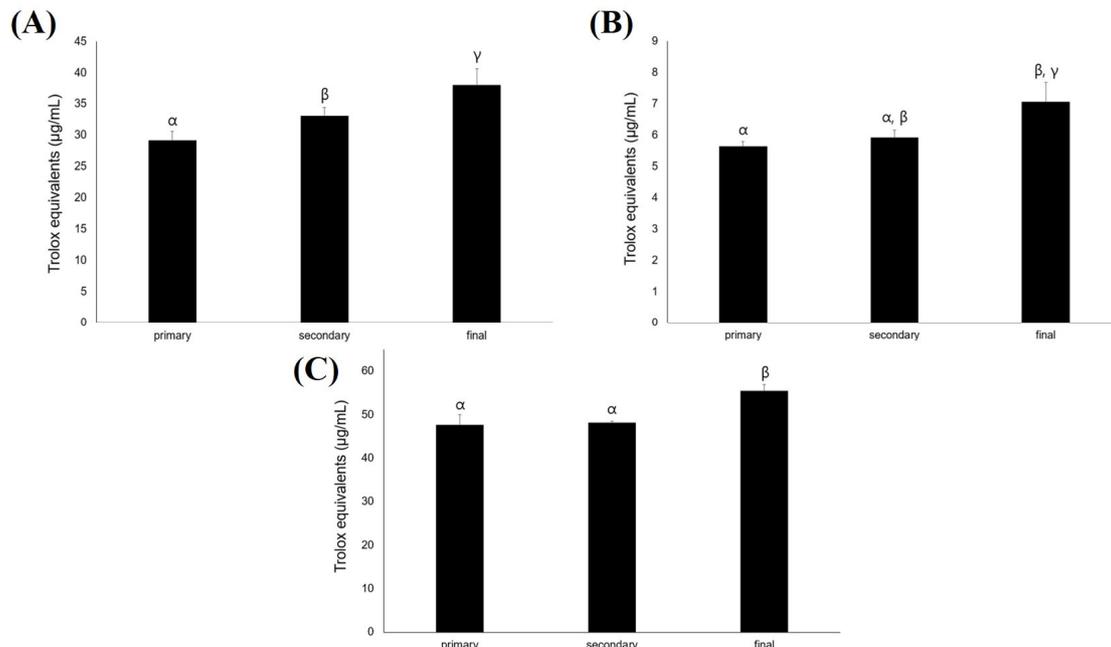
모든 실험결과는 동일조건으로 3회 반복실험하여 평균±표준편차로 표현하였다. 정제과정별 활성측정 결과의 통계적 유의성 검증은 SPSS statistics 22 프로그램 (IBM Corp.)을 사용하여 one way analysis of variance와 post-hoc Tukey honestly significant difference로 p값을 구하였고, 0.01 미만으로 유의한 것으로 판정하여 명확한 차이를 두었다. 각 농도별 MD약침과 면역약침의 활성 비교는 student t-test법으로 p값을 구하였고 신뢰수준 95% ( $p < 0.05$ )에서 검증하였다.

## 결과»»»»

### 1. 정제과정별 활성 측정

약침의 조제과정에서 정제정도에 따른 활성차이를 확

인하기 위하여 각 공정별로 항산화 활성을 측정하였다. Trolox에 대한 DPPH 활성 표준곡선의  $R^2$ 값은 99.86%로 유효하였고, 1차 정제는  $29.24 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$ , 2차 정제는  $33.14 \pm 1.25 \mu\text{g/mL}$ , 최종정제는  $38.05 \pm 2.59 \mu\text{g/mL}$ 의 trolox와 동일한 효능을 보였다(Fig. 1A). ABTS에 대한 활성 표준곡선의  $R^2$ 값은 99.91%으로 직선성을 보였고, 1차 정제는  $5.64 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$ , 2차 정제는  $5.92 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ , 3차 최종정제는  $7.06 \pm 0.62 \mu\text{g/mL}$ 의 trolox와 동일한 효능을 보였다(Fig. 1B). FRAP에 대한 활성 표준곡선의  $R^2$ 값은 99.95%로 유효하였고, 1차 정제는  $47.69 \pm 2.26 \mu\text{g/mL}$ , 2차 정제는  $48.12 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$ , 최종정제는  $55.46 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$ 의 trolox와 동일한 효능을 보였다(Fig. 1C). ABTS에서는 정제단계를 진행할수록 활성이 높아지는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았고 DPPH, FRAP 기법에서는 통계적으로 최종 정제과정에서의 활성이 가장 높게 나타났다.



**Fig. 1.** Antioxidant activity of MD pharmacopuncture by purification stage. (A) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, (B) 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (C) ferric reducing antioxidant power. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Statistically significant differences between bars are indicated with different Greek alphabet characters; same alphabet characters imply no significant difference between bars ( $p < 0.01$ ). SD: standard deviation.

## 2. Method validation

### 1) 직선성, 검출한계, 정량한계

Cordycepin과 ginsenoside Rg<sub>1</sub>을 농도별로 측정하고 표준곡선을 그렸을 때, 두가지 물질 모두 R<sup>2</sup>의 값이 100.00%의 직선으로 표현되었다. 검출한계는 각각 0.53, 0.10 µg/mL이었으며 정량한계는 1.60, 0.31 µg/mL로 낮은 농도까지 정량이 가능한 성분으로 확인되었다(Table I).

### 2) 정밀성, 정확성

Cordycepin의 상대표준편차(RSD)는 1.25, 5.00, 20.00 µg/mL 에서 각각 1.49, 0.24, 0.66%이고, 회수율은 107.17, 98.00, 98.65%였다. Ginsenoside Rg<sub>1</sub>의 상대표준편차는 25.00, 100.00, 400.00 µg/mL에서 각각 0.60, 0.28, 0.06%이고, 회수율은 98.72, 99.74, 99.89%였다(Table II).

## 3. 공정별 지표성분의 함량분석

분석법 확립을 위한 method validation을 통해 cordycepin과 ginsenoside Rg<sub>1</sub>은 지표물질로서 적합하다고 판

단되어 해당 물질들을 이용하여 공정별 지표성분의 함량을 분석하였다. Cordycepin은 1, 2차, 최종정제 샘플별로 각각 0.49±0.01, 0.51±0.02, 0.55±0.01 mg/g의 함량을 보였다(Fig. 2A). Ginsenoside Rg<sub>1</sub>은 각각 4.88±0.08, 5.01±0.07, 5.12±0.04 mg/g의 함량을 보여 정제과정을 거칠수록 모든 지표성분의 함량이 정제단계 의존적, 유의적으로 높아짐을 확인하였다(Fig. 2B).

## 4. MD약침과 면역약침의 활성비교

MD약침과 면역약침의 인체내 활성도를 비교하기 위하여 항산화 활성을 측정하였다. DPPH에서 MD약침은 2.00, 1.00, 0.50 mg/mL 에서 각각 68.03±1.52, 38.05±2.56, 22.51±4.19 µg/mL 의 trolox와 동일한 활성을 보였으며, 면역약침은 19.60±1.76, 6.98±1.72, 4.56±1.61 µg/mL의 활성을 보였다(Fig. 3A). ABTS에서 MD약침은 2.00, 1.00, 0.50 mg/mL에서 각각 12.03±0.40, 7.06±0.62, 3.30±0.70 µg/mL 의 trolox와 동일한 활성을 보였으며, 면역약침은 4.89±0.74, 2.03±0.69, 1.57±0.55 µg/mL의 활성을 보였다(Fig. 3B). FRAP에서 MD약침은 2.00, 1.00, 0.50 mg/mL에서 각각 55.46±0.36, 31.50±0.63, 12.02±0.18

**Table I.** Measures of Linearity, Regression Equation, Correlation Coefficient (R<sup>2</sup>), LOD and LOQ by HPLC

Components	Regression equation* (n=3)	R <sup>2</sup> (%)	LOD <sup>†</sup> (µg/mL)	LOQ <sup>‡</sup> (µg/mL)
Cordycepin	y=44192.14x+7053.25	100	0.53	1.60
Ginsenoside Rg <sub>1</sub>	y=1071.75x+662.08	100	0.10	0.31

LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantitation, HPLC: high performance liquid chromatography.

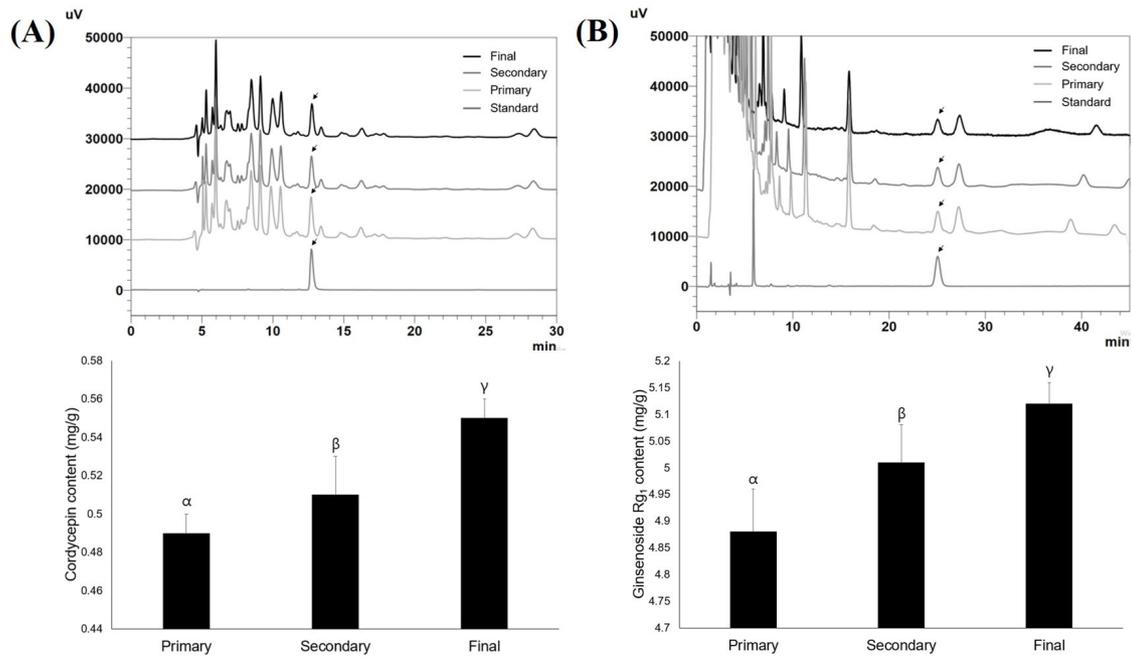
\*y: peak area, x: amount (µg/mL), <sup>†</sup>3.3×(standard deviation of the response/slope of the calibration curve), <sup>‡</sup>10×(standard deviation of the response/slope of the calibration curve).

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

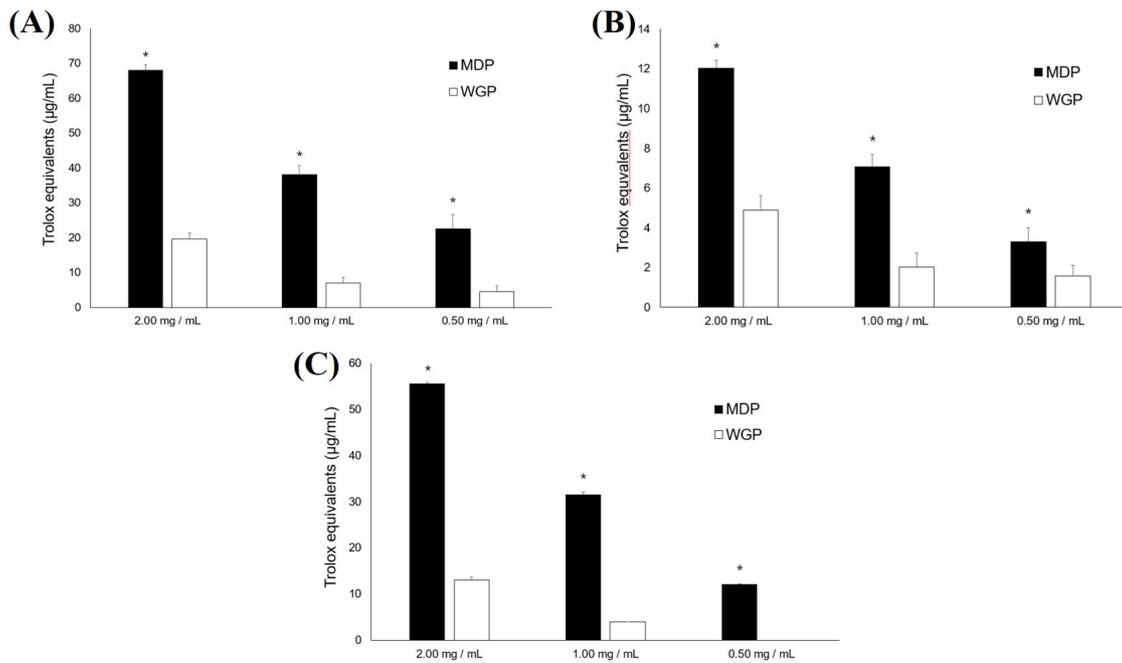
Component	Spiked amount (µg/mL)	Measured amount (µg/mL, n=3)	Relative standard deviation* (%)	Recovery <sup>†</sup> (%)
Cordycepin	1.25	1.34±0.02	1.49	107.17
	5.00	4.65±0.01	0.24	98.00
	20.00	19.73±0.13	0.66	98.65
Ginsenoside Rg <sub>1</sub>	25.00	24.68±0.15	0.60	98.72
	100.00	99.74±0.28	0.28	99.74
	400	399.54±0.24	0.06	99.89

HPLC: high performance liquid chromatography.

\* (standard deviation/mean)×100, <sup>†</sup>(original amount/amount spiked)×100%.



**Fig. 2.** High performance liquid chromatography analysis and index compound content of MD pharmacopuncture by purification stage. (A) Cordycepin, (B) ginsenoside Rg<sub>1</sub>. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Statistically significant differences between bars are indicated with different Greek alphabet characters; same alphabet characters imply no significant difference between bars ( $p < 0.01$ ). SD: standard deviation.



**Fig. 3.** Comparison the activity of MD pharmacopuncture (MDP) and wild ginseng pharmacopuncture (WGP). (A) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, (B) 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (C) ferric reducing antioxidant power. Statistically significant value compared MDP with WGP by student t-test ( $*p < 0.05$ ).

$\mu\text{g/mL}$ 의 trolox와 동일한 활성을 보였으며, 면역약침은  $13.06 \pm 0.54$ ,  $4.00 \pm 0.00$ ,  $0.00 \pm 0.00$   $\mu\text{g/mL}$ 의 활성을 보였다(Fig. 3C). 모든 기법에서 각각의 약침 모두 농도 의존적인 활성도를 보였으며, 모든 농도에서 MD약침이 면역약침보다 통계적으로 유의하게 높은 활성을 보였다.

## 고찰»»»»»

증류 약침은 한약재를 정제수로 환류 추출하면서 발생하는 증기를 포집하여 액화시킨 약침으로 물이 수증기로 변화될 때 같이 증발될 수 있는 성분만을 담아낼 수 있는 방법이다. 이에 주로 향기 성분 또는 휘발성이 있는 성분들이 추출된다. 추출정제 약침은 한약재를 여러 가지 용매를 이용하여 추출한 후 약침에 불필요한 성분을 제거하기 위하여 주정의 함량을 바꾸어 가며 용출되는 성분을 걸러내는 약침으로 용해성을 이용하여 분리하는 방식이다. 정제공정이 많을수록 조제비용이 증가할 수 있지만 정제의 정도에 따라 효능에 차이가 있을 수 있다. 하지만 유효성분이 방향성물질이 아닌 경우에는 증류 추출 방식보다 추출 정제 방식이 더 유리하다<sup>26,30</sup>. 본 연구의 MD약침은 산양산삼, 동충하초, 사인으로 구성되어 있으며 각 약재들의 이미 알려져 있는 유효성분 또는 지표성분들이 대부분 향기성분이 아니기에 추출정제법으로 약침을 조제하였다<sup>31-33</sup>. 추출 정제법으로 MD약침을 조제하며 몇 번의 정제단계를 거쳤는가에 따라 활성 및 성분의 함량을 비교 측정하였다. 최초 추출 상태를 1차, 80%, 90% 주정 처리를 2차, 최종 정제수 치환 상태를 3차 정제로 하였을 때 정제단계를 거칠수록 모든 지표성분과 활성이 높아지는 것을 확인하였다(Figs. 1, 2). 대부분의 한약재는 식물성 약재가 많기 때문에 다량의 전분을 함유하고 있다. 전분은 한약에서는 불필요한 무효성분이며<sup>34</sup> 이 전분을 안전하고 효율적으로 제거하는 방법은 주정을 이용한 알코올 수침법이 적합하다. 정제 과정을 단계별로 거치면서 전분이 제거되기에 필요 성분 및 활성이 높아지는 것은 당연하다.

한약에 대한 유효성, 안전성, 안정성에 대한 연구는 지속적으로 요구되고 있다<sup>35</sup>. 이에 따라 적합한 방법으

로 지표성분을 설정하고 해당 지표성분을 이용한 한약에 대한 품질관리 및 안정성시험은 필수적이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 method validation으로서 직선성, 정밀성, 정확성을 통해 LOD와 LOQ를 구하였으며 모두 HPLC 상으로 정량이 가능한 MD약침의 지표성분을 cordycepin과 ginsenoside Rg<sub>1</sub>으로 선정하였다. Cordycepin은 동충하초의 지표성분으로서 이미 기존 연구에서<sup>19,20</sup> 사용된 적이 있는 물질이며 nuclear factor erythroid 2-related factor와 adenosine monophosphate-activated protein kinase를 통해 세포노화를 억제<sup>36</sup>, 아데노신의 유도체로서 아데노신과 함께 glycogen synthase kinase-3 beta 활성을 조절하여 Wnt/ $\beta$  카데닌 경로를 자극하고 그로 인해 조직을 빠르게 재형성시키는 효능이 있다고 하였다<sup>9,37</sup>. Ginsenoside Rg<sub>1</sub> 역시 이전 연구와 대한약전에서 지표성분으로 이미 사용된 적이 있는 성분이며<sup>8,25</sup> 급성 궤양성 대장염 완화<sup>38</sup>, toll-like receptor 4 / nuclear factor kappa B / nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 경로로 심근세포 사멸 및 염증을 억제<sup>39</sup>, 간 보호 효과<sup>40</sup> 등 다양한 활성 효능을 보이는 물질로 cordycepin과 더불어 지표 물질로서 손색이 없다.

본 연구에서의 활성 측정 방법은 DPPH, ABTS, FRAP 3가지 기법을 사용하였다. ABTS 기법은 free radical이 제거되는 능력을 측정한다는 점에서 DPPH 기법과 동일하지만 친수성과 소수성 모두에 적용이 가능하다는 점에서 차이가 있다<sup>41</sup>. FRAP는 free radical 중에서 철이온을 환원시키는 정도를 확인할 수 있는 방법으로 다른 활성 측정법과 차이가 있다<sup>42</sup>.

MD약침은 주로 면역관련에서 처방되는 약침이며 구성 약재 중에 산양산삼을 포함하고 있어 대중적으로 면역질환에 많이 사용되고 있으며 산양산삼 단미로 처방되었고 동일하게 추출정제방식으로 조제된 면역약침과 활성을 비교를 하였다. 기존 연구에서 면역약침은 2.00 mg/mL 농도에서 trolox와 비교하였을 때, DPPH는  $15.32 \pm 1.08$   $\mu\text{g/mL}$ 의 활성을 보였으며<sup>25</sup> 본 연구의 면역약침은 동일 농도에서 동일한 trolox와 비교하였을 때, DPPH는  $19.60 \pm 1.76$   $\mu\text{g/mL}$ 의 활성을 보였다(Fig. 3A). DPPH 실험 기법상 활성 수치가 극소량으로 나오기 때문에 일정량은 차이가 있을 수 있으나 결과값이 통도 의존적이었으며 MD약침과의 비교는 통계적으로 유의하였기에

본 실험은 정당하였다. 면역약침에서 항산화 효능을 보이는 주된 성분은 ginsenoside들이며 이들은 분명한 항산화 효능을 보이기는 하지만, 타 식물성 한약재들에 비하여 높은 항산화능을 보이지는 않는다. 이에 반해 동충하초는 항산화능이 높은 편이므로<sup>43)</sup> 면역약침과 MD약침의 항산화력 비교는 MD약침이 높은 것은 당연하며 항산화외의 세포기전 차원에서의 활성이 추가적으로 요구되어 진다.

MD약침은 면역과 관련이 있는 다양한 질환과 보양을 목적으로 이미 임상적으로 사용되고 있으며 환자의 만족도가 높은 편이다. 아무리 환자가 의료진에 대한 믿음이 있다고 하여도 약을 처방받는 환자들도 수준이 높아짐에 따라 이러한 한약에 대하여 유효성분, 효능 차이 등에 대한 근거를 요구한다. 이에 따라 한방처방도 체계적인 한약재의 조합, 근거를 갖춘 한약의 조제가 필요해지고 있다. 약에 3대 요소인 유효성, 안전성, 안정성에 입각하여 한약을 조제하여야 하며 그 근거를 제시할 수 있는 연구적 시도들은 우리 한약의 발전에 크게 이바지할 수 있을 것이다.

## 결론»»»»

약침의 조제법을 정립하기 위하여 정제의 정도에 따라 약침의 활성 및 지표성분의 함량을 비교하고 면역질환에 주로 처방되는 산삼단미로 된 면역약침과 MD약침의 활성도를 비교하였다.

- 1) 정제과정별로 비교한 ABTS 활성에서는 1차와 2차 정제의 차이, 2차와 3차 최종 정제의 차이가 통계적으로 유의적이지는 않았지만, 정제를 거듭할수록 활성이 높아지는 경향을 보였다.
- 2) 정제과정별로 비교한 DPPH, FRAP 활성 측정기법에서는 3차 최종 정제 > 2차 정제 > 1차 정제 순으로 활성이 높았다.
- 3) 정제과정별 지표성분 함량분석에서는 cordycepin과 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 모두 정제를 거듭할수록 유의적으로 함량이 높아졌다.
- 4) MD 약침은 산삼단미로 처방된 면역약침보다 DPPH,

ABTS, FRAP 모든 기법에서 현저히 높은 활성을 보였다.

위 결과로 유효성분들이 줄어들지 않는 선에서의 정제과정은 약효를 올리는 데에 도움이 된다는 것을 확인하였으며, MD 약침은 면역과 관련된 다양한 질환에서 좋은 효능을 보일수 있을 것으로 기대한다.

## References»»»»

1. Korean Pharmacopuncture Institute Science Committee. Pharmacopunctureology. 2nd ed. Seoul:Elsevier Korea. 2011:3-241.
2. Park JK, Kim KH. A survey on uncovered services in national health insurance of traditional Korean medicine institution. Journal of Society of Preventive Korean Medicine. 2017;21(3):43-50.
3. Lee JY, Han YJ, Kim JH, Kim YJ, Kwon KR. Type analysis of pharmacopuncture papers published in the Journal of Korean Institute of Pharmacopuncture. Journal of Pharmacopuncture. 2006;9(3):147-54.
4. Baik SI, Ahn JC, Kim YJ, Kim HS, Kwon KR. Type analysis of pharmacopuncture papers published in the Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion. Journal of Acupuncture Research. 2006;23(6):19-27.
5. Ha TY, Lee JH. Bacteriological and immunological studies on Panax ginseng. The Korean Journal of Immunology. 1979;1(1):45-52.
6. Liou CJ, Li ML, Tseng J. Intraperitoneal injection of ginseng extract enhances both immunoglobulin and cytokine production in mice. The American Journal of Chinese Medicine. 2004;32(1):75-88.
7. Choi JH. The mystery of ginseng. Seoul:Gyumunsa. 1984:13-4.
8. Baek SH, Lee IH, Kim MJ, Kim EJ, Ha IH, Lee JH, Lee JW. Component analysis and toxicity study of combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture. The Journal of Internal Korean Medicine. 2015;36(2):189-99.
9. Kim YJ, Lee JM, Lee E. Immunomodulatory activity of cultivated wild ginseng pharmacopuncture. Korean Journal of Acupuncture. 2010;27(1):31-47.
10. Min BI, Kim HH, Seo IB, Kwon KR. Antitumor effects and protective effects against doxorubicin-induced testicular toxicity of cultivated wild ginseng extract in the B16/F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice. Journal of

- Pharmacopuncture. 2007;10(1):85-100.
11. Kim K, Choi YS, Joo JC, Moon G. A case report for lung cancer patient showing remission treated with cultivated wild ginseng pharmacopuncture. *Journal of Pharmacopuncture*. 2011;14(4):33-8.
  12. Scaglione F, Cattaneo G, Alessandria M, Cogo R. Efficacy and safety of the standardised ginseng extract G115 for potentiating vaccination against the influenza syndrome and protection against the common cold [corrected]. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 1996;22(2):65-72.
  13. Scaglione F, Ferrara F, Dugnani S, Falchi M, Santoro G, Fraschini F. Immunomodulatory effects of two extracts of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 1990;16(10):537-42.
  14. Wu L, Sun H, Hao Y, Zheng X, Song Q, Dai S, Zhu Z. Chemical structure and inhibition on  $\alpha$ -glucosidase of the polysaccharides from *Cordyceps militaris* with different developmental stages. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;148:722-36.
  15. Kong XR, Zhu ZY, Zhang XJ, Zhu YM. Effects of *Cordyceps* polysaccharides on pasting properties and in vitro starch digestibility of wheat starch. *Food Hydrocolloids*. 2020;102:105604.
  16. Xiong Y, Zhang S, Xu L, Song B, Huang G, Lu J, Guan S. Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from *Cordyceps militaris*. *Journal of Surgical Research*. 2013;185(2):912-22.
  17. Yang CH, Kao YH, Huang KS, Wang CY, Lin LW. *Cordyceps militaris* and mycelial fermentation induced apoptosis and autophagy of human glioblastoma cells. *Cell Death & Disease*. 2012;3(11):e431.
  18. Yamaguchi T, Takizawa F, Fischer U, Dijkstra JM. Along the axis between type 1 and type 2 immunity; principles conserved in evolution from fish to mammals. *Biology*. 2015;4(4):814-59.
  19. Lee DY, Kim WS, Lee HS, Yi YW, Jo JH, Lee IH. Study on antioxidant activity and standardization of FDY003. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2019;40(6):1112-21.
  20. Lee IH, Lee DY. FDY003 inhibits colon cancer in a Colo205 xenograft mouse model by decreasing oxidative stress. *Pharmacognosy Magazine*. 2019;15(65):675-81.
  21. Kim JH, Cho MR, Ryu CR, Chae WS. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia (CMM) oral administration and herbal acupuncture at BL13, LU4 on asthma induced by ovalbumin in rats. *Journal of Acupuncture Research*. 2002;19(2):39-50.
  22. Kim JH, Yoon DH, Na CS, Cho MR, Yoon YC, Chae WS. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia (CMM) oral administration and herbal acupuncture at Shinsu (BL23), Tae-gye (K3) on expression of aquaporin-2 protein water channels in the kidney and the renal function in rats with renal failure by uninephrectomy. *Journal of Acupuncture Research*. 2005;22(1):61-75.
  23. Jiang YX, Chen Y, Yang Y, Chen XX, Zhang DD. Screening five qi-tonifying herbs on M2 phenotype macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019:9549315.
  24. Kim HG, Han JM, Lee JS, Lee JS, Son CG. Ethyl acetate fraction of *Amomum xanthioides* improves bile duct ligation-induced liver fibrosis of rat model via modulation of pro-fibrogenic cytokines. *Scientific Reports*. 2015;5:14531.
  25. Kwon KB, Kim JH, Lee YR, Lee HY, Jeong YJ, Rho HW, Ryu DG, Park JW, Park BH. *Amomum xanthioides* extract prevents cytokine-induced cell death of RINm5F cells through the inhibition of nitric oxide formation. *Life Sciences*. 2003;73(2):181-91.
  26. Lee DY, Choi BS, Lee IH, Kim JH, Gwon PS. Comparison of index compounds content and anti-oxidative activity of wild ginseng pharmacopuncture by extraction methods. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2018;39(3):313-22.
  27. Kim JS, Kim KL. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Artemisia capillaris* extract. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*. 2015;13(6):805-12.
  28. Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2001;73(2):239-44.
  29. Ryu HJ, Jung CJ, Beik GY. Antioxidant activities of flower, berry and leaf of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2020;52(4):342-9.
  30. Lee JH, Kim MJ, Lee JW, Kim MR, Lee IH, Kim EJ. Comparison of the ingredient quantities, and antioxidant and anti-inflammatory activities of Hwangryunhaedok decoction pharmacopuncture by preparation type. *The Acupuncture*. 2014;31(4):45-55.
  31. Wang CQ, Yi LW, Zhao L, Zhou YZ, Guo F, Huo YS, Zhao DQ, Xu F, Wang X, Cai SQ. 177 saponins, including 11 new compounds in wild ginseng tentatively identified via HPLC-IT-TOF-MSn, and differences among wild ginseng, ginseng under forest, and cultivated ginseng. *Molecules*. 2021;26(11):3371.
  32. Jędrejko KJ, Lazur J, Muszyńska B. *Cordyceps militaris*: an overview of its chemical constituents in relation to biological activity. *Foods*. 2021;10(11):2634.
  33. Gao C, Zhu M, Xu W, Wang Y, Xiong L, Sun D, Sun M, Lin Y, Li H, Chen L. Chemical constituents from

- the stems and leaves of *Amomum villosum* Lour. and their anti-inflammatory and antioxidant activities. *Bioorganic Chemistry*. 2023;131:106281.
34. Jiang Z, Zhou Y, Lu F, Han Z, Wang T. Effects of different levels of supplementary alpha-amylase on digestive enzyme activities and pancreatic amylase mRNA expression of young broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2008;21(1):97-102.
  35. Lee DH, Kim HH, Cho HJ, Yu YB, Kang HC, Kim JL, Lee JJ, Park HJ. Cordycepin-enriched WIB801C from *Cordyceps militaris* Inhibits collagen-induced [Ca(2+)]i mobilization via cAMP-dependent phosphorylation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in human platelets. *Biomolecules & Therapeutics*. 2014;22(3):223-31.
  36. Wang Z, Chen Z, Jiang Z, Luo P, Liu L, Huang Y, Wang H, Wang Y, Long L, Tan X, Liu D, Jin T, Wang Y, Wang Y, Liao F, Zhang C, Chen L, Gan Y, Liu Y, Yang F, Huang C, Miao H, Chen J, Cheng T, Fu X, Shi C. Cordycepin prevents radiation ulcer by inhibiting cell senescence via NRF2 and AMPK in rodents. *Nature Communications*. 2019;10(1):2538.
  37. Kim J, Shin JY, Choi YH, Lee SY, Jin MH, Kim CD, Kang NG, Lee S. Adenosine and cordycepin accelerate tissue remodeling process through adenosine receptor mediated Wnt/ $\beta$ -catenin pathway stimulation by regulating GSK3b activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5571.
  38. Cheng H, Liu J, Zhang D, Wang J, Tan Y, Feng W, Peng C. Ginsenoside Rg1 alleviates acute ulcerative colitis by modulating gut microbiota and microbial tryptophan metabolism. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:817600.
  39. Luo M, Yan D, Sun Q, Tao J, Xu L, Sun H, Zhao H. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF-kB/NLRP3 pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2020;121(4):2994-3004.
  40. Gao Y, Chu S, Zhang Z, Chen N. Hepatoprotective effects of ginsenoside Rg1 - a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2017;206:178-83.
  41. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2005;37(2):233-40.
  42. Ha HJ, Lee CB. Antioxidant and anti-inflammation activity of red cabbage extract. *The Korean Journal of Culinary Research*. 2014;20(2):16-26.
  43. Gao Q, Zhang D, Ding W, Zhai W, Gu C, Guo S. Effects of exogenous lanthanum nitrate on the active substance content and antioxidant activity of caterpillar medicinal mushroom *Cordyceps militaris* (ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2023;25(6):41-54.