



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 2월
석사학위 논문

삼황사심탕 제제의 제조법 변화에 따른 함유성분 및 활성 변화연구

조선대학교 대학원

식품의약학과

김진승

삼황사심탕 제제의 제조법 변화에 따른 함유성분 및 활성 변화연구

**A Study on changes in ingredients and activity
according to the manufacturing methods of
Sam-Hwang-Sa-Sim-tang formulation**

2023년 2월 24일

조선대학교 대학원

식품의약학과

김진승

삼황사심탕 제제의 제조법 변화에 따른 함유성분 및 활성 변화연구

**A Study on changes in ingredients and activity
according to the manufacturing methods of
Sam-Hwang-Sa-Sim-tang formulation**

지도교수 이동성

이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함

2022년 10월

조선대학교 대학원

식품의약학과

김진승

김진승의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	우은란 (인)
위원	조선대학교 교수	이원재 (인)
위원	조선대학교 부교수	이동성 (인)

2022년 12월

조선대학교 대학원

목차

Contents	i
Abstract.....	ii
1. 서론	1
1.1. 황련	3
1.2. 황금	6
1.3. 대황	9
2. 재료 및 방법	12
2.1. 실험재료	12
2.2. HPLC 분석조건	12
2.3. 표준용액의 조제	14
2.4. 삼황사심탕 개별추출혼합제 및 탕제의 검액 제조	14
2.5. BV2세포 배양 및 세포독성 측정과 Nitric oxide 측정	15
2.6. BV microglia cell에서 LPS로 유도된 Nitric oxide 측정방법	15
2.7. HT22 세포배양 및 뇌 세포 보호활성 측정	16
2.8. 통계처리	16
3. 결과	17
3.1. 분석조건의 확립	17
3.2. 제조방법 별 Chromatogram 및 UV-Spectrum	19
3.3. 제조방법 별 함량분석결과	35
3.4. 항염증 및 뇌세포 보호 활성 확인	40
4. 고찰 및 결론	44
5. 참고문헌	47

Abstract

A Study on changes in ingredients and activity according to the manufacturing methods of Sam-Hwang-Sa-Sim-tang formulation

Kim Jinseung

Advisor: Prof. Lee, Dong-Sung

Dept. of Food and Drug

Graduate School of Chosun University

Objective : A study on the content and activity change according to the manufacturing method of Samhwangsa-tang is conducted and compared.

Methods : The content test of Baicaline, Berberine, and Sennoside A in Samhwangsatang was analyzed using HPLC equipment of LC-2030C 3D (SHIMADZU; KYOTO, JAPAN). YMC-Pack ODS-A Column(250 X 4.6 mmI.D, S-5 μ m, 12nm, YMC KOERA co., Ltd., Seongnam, Korea) was used to separate the surface components. The column temperature was maintained at 25 degrees, and the measured wavelength was set at 230 nm. In the HPLC analysis, Lee Dong-sang prepared A-0.05% PA in water and B-0.05% PA in ACN, set the flow rate to 1.0 mL/min, and analyzed according to the gradient condition. Additionally, BV2 cells, which are microglial cells, and hippocampus-derived HT22 cell lines were used for in vitro experiments. Nitric oxide activity was measured for MTT assay and lipopolysaccharide-induced inflammatory reactions for each extract concentration.

Results : As a result of the analysis experiment with each extract, the content of Berberine was higher in Formulation-1: Samhwangsasintang mixture after extracting individual medicinal herbs and Formulation-3: Samhwangsasintang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient. The content of Baicalin and SennosideA were higher in Formulation-2: Samhwangsasintang extracts and Formulation-4: Samhwangsasintang extracts+excipient. As a result of the MTT assay for BV2 cell lines, it was confirmed that Formulation-1,2 was up to 100 μ g/ml, and Formulation-3,4 was not cytotoxic up to 400 μ g/ml. And in Formulation-1, 4, NO generation was significantly suppressed. It was confirmed that *C. japonica* did not exhibit cytotoxicity up to 100 μ g/ml, and *R. undulatum* and *S. baicalensis* up to 400 μ g/ml. It was confirmed that the generation of NO was suppressed in *S. baicalensis*. In HT22 cell lines, it was confirmed that the *S. baicalensis* extract exhibited a brain cell protection effect.

Conclusion : Since herbal medicines have different contents of indicator components between

extracts, it cannot be judged that each extract has higher efficacy. The efficacy of an herbal medicine prescribed not only by one or more may be related by the content of the active ingredient but also by the proportion of the components. It should be produced according to the situation of pharmaceutical companies, and further research is needed on Samhwangsa-tang and other products.

Key words : Samhwang Sashimtang, Baicalin, Berberine, Sennoside A, MTT assay, Nitric oxide activity, High performance liquid chromatography.

1. 서론

삼황사심탕(三黃瀉心湯)은 문헌 상으로는 한나라 시대의 장중경(張仲景)의 저서《金匱要略》1)에 처음 기재되었으며 대황(大黃), 황금(黃芩), 황련(黃連)으로 구성되어 혈(血)에 있는 화기(火氣)를 내리고 혈열(血熱)에 의한 상부출혈, 발반(發斑), 심하비(心下痞), 불면, 구건 등에 사용되어 왔으며 현대의학적 질환으로는 위궤양, 위장염, 고혈압, 위출혈 2,3)에 응용된다. 삼황사심탕(三黃瀉心湯)에 대한 연구로서 실험을 통하여 밝혀진 효능은 국내에서 보고된 바로는 혈관벽을 이완하거나 혈압을 낮추는 효과가 있음이 증명된 바가 있다 4,5). 외국에서는 물로 추출한 삼황사심탕(三黃瀉心湯)을 직접적으로 정맥투여를 했을 경우에 lipopolysaccharides(LPS)로 유도된 저혈압 모델에서 혈압이 하강하는 것을 치료 또는 보호해주는 효과가 있었고 6,7), Thromboxane A2 analogue 로 유도한 고혈압모델에서는 혈압을 낮추는 효과가 증명되었다 8). 또한 삼황사심탕(三黃瀉心湯) 물 추출물은 lipopolysaccharides(LPS)를 처리한 human aortic smooth muscle cell 의 염증 반응을 조절하는 것으로 보고되었다 9).

삼황사심탕(三黃瀉心湯)의 구성성분인 황련은 *Coptis japonica* Makino (Ranunculaceae, 미나리아재비과)의 뿌리줄기로 미고(味苦), 성한(性寒)하며 심위실열(心胃實熱)을 청열사화(淸熱瀉火)하는 효능으로 소곡선기(消穀善飢), 구건구갈(口乾口渴) 증상을 치료하고, 황금은 *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae, 꿀풀과)의 뿌리로 미고(味苦), 성한(性寒)하여 청열조습(淸熱燥濕), 사화해독(瀉火解毒)의 효능으로 청폐화(淸肺火)한다 10). 대황 *Rheum undulatum* (Polygonaceae, 마디풀과)의 여러해살이풀로 채액 및 담즙 분비를 항진시키고, 이뇨작용이 있으며, 한방에서는 사하약(瀉下藥), 고혈압약(高血壓藥), 해열(解熱), 소염(消炎), 진통제 등에 사용된다 11).

현대사회에서 제약사들을 통해 삼황사심탕(三黃瀉心湯)이 유통되고 있다. 실제 조사한 결과 시중에 한약제제를 기반으로한 일반의약품의 경우 여러 약재를 혼합하여 제조한 혼합 추출물을 사용하지만, 한의원에서는 개별 약재 추출 후 혼합제를 사용하기도 한다.

본 연구에서는 한약제제의 제조법 변화에 따른 함유성분 및 활성 변화연구를 진행하는데, 삼황사심탕을 이용하였다. 삼황사심탕 내에 함유되어 있는 황련, 황금, 대황의 지표성분을 각각 선정하여, HPLC 를 이용한 분석을 진행하였으며, 이를 바탕으로 개별 약재 추출 후 혼합제와 삼황사심탕 추출물 간의 함유성분 변화를 비교하였다.

심번(心煩)이 있고 잠을 못 자면 아교(阿膠), 계자황(鷄子黃)을 배합하며, 위(胃)에 열(熱)이 쌓여 생긴 치통(齒痛)에는 승마(升麻), 석고(石膏), 목단피(牡丹皮), 생지황(生地黃)을 같이 사용하며, 양혈지혈(涼血止血)에는 황금(黃芩), 대황(大黃)을 같이 사용한다. 마지막으로 옹종창독(癰腫瘡毒), 정창독(疔瘡毒)이 안으로 들어갔을 때 나타나는 눈, 귀의 종통(腫痛) 등에 사용한다. 또한 황련은 사화해독(瀉火解毒) 작용이 있어 모든 악창(惡瘡)의 화독(火毒)을 풀며, 양증(陽症)의 창옹(瘡癰)을 치료하고 내복(內服) 뿐만 아니라 외용(外用)으로 써도 효과가 있는데 흔히 황금(黃芩), 치자(梔子) 등을 배합하여 사용한다. 이 외에도 소화(消化)가 항진(亢進)되어 쉽게 배고프고, 위화(胃火)가 왕성하며, 번갈(煩渴)로 물을 많이 마시는 소갈병(消渴病)에 사용한다. 흔히 천화분(天花粉), 석곡(石斛), 지황(地黃) 등 청열생진약(淸熱生進藥)을 배합하여 쓴다 14).



Figure 1. 황련(*Coptis japonica* Makino) [대한민국 약전(KP) 발취]

1.2. 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)

황금의 성상은 뿌리로 원뿔모양이며 비틀어져 굽어 있고, 길이는 8~25cm, 지름은 1~3 cm 이다. 바깥면은 진한 노락색 또는 황갈색이고, 흑모양의 가는 뿌리 자국이 드문게 있다. 위쪽에는 비틀어져 굽어있는 불규칙한 그물무늬 또는 세로주름이 있으며 비교적 거칠다. 질은 단단하고 취약하며 절단하기 쉽다. 중심부는 적갈색이고 자른 면은 노란색이다. 햇수가 오래된 것은 뿌리의 가운데가 비어있거나 썩어 있고, 적갈색 또는 어두운 갈색을 나타낸다 (Figure 2). 황금은 냄새가 거의 없고 맛은 약간 쓰다 12). 한방에서는 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 마른 뿌리를 약재로 사용하며 성미(性味)는 쓰고 차다. 귀경(歸經)은 담(膽), 폐(肺), 위(胃), 대장경(大腸經)이다. 황금의 임상응용(臨床應用)으로는 습열(濕熱)로 생긴 여러 가지 질병(疾病)을 치료하는데 쓰인다. 예로 습온병(濕溫病), 황달(黃疸), 이질(痢疾), 열림(熱淋), 옹종창독(癰腫瘡毒)등이다. 황금의 쓰고 찬 성질은 조습설열(燥濕泄熱)을 능히 하며, 담열(痰熱)을 치고, 적체(積滯)를 통하게 하며, 비습(肥濕)을 마르게 하고 심열(心熱)을 치고, 방광(膀胱)을 돕고, 소변(小便)이 나가게 하며, 사열(查閱)을 제거한다. 이로써 습열(濕熱)로 오는 여러 가지 병에 쓰인다. 만약 습열(濕熱)로써 열(熱)이 나고 땀이 나며, 가슴속이 답답하고 피곤하고 설태(舌苔)가 니(膩)한 습온병(濕溫病)에 황금을 쓰면 조습청열(燥濕清熱)하고 행기조중(行氣調中)하는데 보통 통초(通草), 활석(滑石), 백구인등의 삼리화습약(渗利化濕藥)을 배합하여 사용한다 15). 만약 습열(濕熱)로 인한 발황(發黃)에는 인진(茵陳), 치자(梔子) 등을 함께 써 청간이담(淸澗利膽)작용의 효과를 보며, 만약 습열(濕熱)이 위장(胃腸)을 침범하여 사리(瀉痢)가 생기면 흔히 황련(黃蓮)을 함께 사용한다. 습열(濕熱)이 하초(下焦)를 침범하여 소변삽통(小便澀痛)이 생기면 목통(木通), 생지황(生地黃)을 배합하고, 옹종창독(癰腫瘡毒)을 치료하려면 흔히 연교(連翹), 백지(白芷), 천화분(天花粉)을 배합하여 사용한다. 또한 상한소양증(傷寒少陽症) 혹은 폐열해수(肺熱咳嗽)에 사용한다. 황금은 기(氣)가 얇고 맛이 쓰며 리(裏)와 표(表)에 다 간다. 이 때문에 폐열(肺熱)을 치고 근육의 열(熱)을 풀어줄 수 있어 만약에 폐열(肺熱)이 막혀 생긴 전신 발열, 해수(咳嗽), 담(痰)이 점조(粘稠)한 때 이 약은

청사폐열(淸瀉肺熱) 및 담(痰)이 나오게 하는 데 단종(單種)을 쓰거나 천남성(天南星), 반하(半夏) 등을 배합하여 쓰고, 만약 사기(邪氣)가 소양(少陽)에 들어가 한열왕래(寒熱往來), 입이 쓰고 목이 마르고 어지럼증이 있을 때 황금을 쓰는데 시호(柴胡)와 배합하여 소양병증(少陽病證)을 치료한다. 또한 내열(內熱)이 항진(亢進)되어 혈열망행(血熱妄行)이 생긴 각종 출혈, 예를 들면 변혈(便血), 객혈(咯血), 토혈(吐血), 육혈, 혈붕(血崩) 등에 사용한다. 황금(黃芩)은 청열(淸熱)하고 지혈(止血)하는 두 가지 작용이 있어 단독으로 쓸 수 있고 또한 황금초탄(黃芩抄炭)하여 쓸 수도 있으며, 삼칠(三七), 생지황(生地黃), 백모근(白茅根) 등을 배합하여 사용한다. 마지막으로 태동불안(胎動不安)에 쓰는데 황금(黃芩)은 청열안태작용(淸熱安胎作用)이 있어 흔히 당귀(當歸), 백출(白朮) 등을 배합하여 쓴다 16).



Figure 2. 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi) [대한민국 약전(KP) 발취]

1.3. 대황(*Rheum undulatum*)

대황의 성상은 뿌리 및 뿌리줄기로 원기둥모양 또는 달걀모양, 긴 달걀모양이며, 때로 가로 및 세로로 잘려서 다듬어져 있다. 지름 4~10 cm, 길이 5~15cm 이다. 바깥 쪽은 껍질이 거의 벗겨져있고, 피부의 대부분이 제거된 것은 바깥면이 연한 갈색 ~ 황갈색이고 질은 치밀하고 단단하며 흰색의 가는 그물눈 모양을 보이고 있다. 코르크층이 남아있는 것은 바깥면이 흑적색 또는 어두운 갈색을 띠고 주름이 있으며, 질은 거칠면서 무르다. 대황의 횡단면은 섬유성이 아니며, 갈색 또는 연한 회갈색이고, 흑갈색에 흰색, 연한 갈색이 뒤섞여 있는 복잡한 무늬를 가지고 있으며, 이러한 무늬는 형성층 부근에서 때로 방사상을 이루기도하며 안쪽의 조직은 불규칙하게 흩어져 있거나 고리모양으로 배열되어 있다(Figure 3). 대황의 횡단면을 현미경으로 볼 때 장엽대황(掌葉大黃)은 뿌리줄기의 피부와 코르크층이 대부분 제거되어 있기도 하지만 부분적으로 남아있는 경우도 있다. 도관은 중앙을 향하여 배열되어 있고 드물고 성글하다. 수부는 주로 유세포로 되어있으며 넓고 다수의 이형유관속이 흩어져 있거나 하나의 울타리 속에 있다. 이형유관속은 중앙에는 사부가 있고 형성층이 고리모양이며 형성층 근처에서 점액강이 보일 때도 있다. 유세포에는 대형의 옥살산칼슘 집정도 들어있고 전분립이 많이 들어 있다. 또한 대황은 맛은 떫고 쓰며 특유한 냄새가 있다. 이를 씹으면 가는 모래를 씹는 느낌이 나고 침을 노랗게 물들인다 12). 한방에서의 약재부위는 당대황(唐大荒, *R. tanguticum* Macim, ex Reg.), 장엽대황(掌葉大黃, *Rheum palatum* L.) 혹은 약용대황(藥用大黃, *R. Officinale* Baill.)줄기, 뿌리를 말린 것을 사용하며 성미(性味)는 쓰고 차다. 귀경(歸經)은 대장(大腸), 간(肝), 비(脾), 위(胃), 심경(心經)이다. 대황의 임상응용(臨床應用)으로는 온열병(溫熱病)으로 위장에 실열적체(實熱積滯) 혹은 위장(胃腸)에 적체(積滯)된 대변이 통하지 않을 때 변비복통(便秘腹痛), 고열(高熱), 신혼섬어(神昏纖語) 등에 사용하며 양명부실증(陽明腑實證)에도 사용한다. 대황은 대단히 쓰고 차며, 기미(氣味)가 심히 탁(濁)하고 중(重)하여, 곧바로 아래로 향하여 능히 결열(結熱)을 공하(攻下)시키고 적체(積滯)를 통과시므로 사열통변약(瀉熱通便藥)으로 흔히 쓰는 약이다. 경증(輕症)에는 단종(單種)을 쓰며 중증(重症)에는 지실(枳實),

망초(芒硝), 후박(厚朴)을 배합하여 사용하므로 공하력(攻下力)을 높여준다. 대황은 또한 한적변비(寒積便秘)도 치료하는데 건강(乾薑), 부자(附子)등 온리약(溫裏藥)을 배합하여 사용한다. 또한 혈열(血熱)이 항진(亢進)되어 생긴 육혈, 토혈(吐血), 화사상염(火邪上炎)에 의한 목적종통(目赤腫痛), 인후종통(咽喉腫痛), 치은종통 등에 사용한다. 대황은 능히 간(肝), 심(心)의 화(火)를 치고 양혈청열(涼血清熱)하고 사화해독(瀉火解毒)하며 열(熱)을 아래로 제거할 수 있다. 황금(黃芩), 황련(黃連) 등 약을 배합하여 사용한다. 대황(大黃)과 고반(枯礬)을 잘게 분말(粉末)로 하여 구강에 도포(塗布)하면 구창(口瘡)을 치료 할 수 있다. 마지막으로 어혈증(瘀血證)에 쓰는데 부녀(婦女)의 산후(産後), 어혈경폐(瘀血經閉)의 징가적취, 오로불하(惡露不下) 넘어져 다친데 등에 사용한다 17). 대황(大黃)은 대체로 혈분(血分) 또는 기분(氣分)에 들어가 활혈거어(活血祛瘀)하므로 어혈증(瘀血證)을 치료하는데 흔히 쓰는 약이며, 새로 생긴 어혈(瘀血)은 물론 오래된 어혈증(瘀血證)에도 사용한다. 홍화(紅花), 도인(桃仁), 당귀(當歸)를 배합하여 사용한다. 이 외에도 대황은 임증(淋證), 황달(黃疸) 등 습열증(濕熱證)에 쓰는데, 그것은 대황이 대단히 노랑고 쓰고 차며 설(泄)하기 때문에 능히 청설습열(清泄濕熱) 작용을 한다. 또한 외용약으로 창양종독(瘡瘍腫毒), 물과 불에 의한 화상에 바른다 18).



Figure 3. 대황(*Rheum undulatum*) [대한민국 약전(KP) 발취]

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

HPLC 분석을 위해 지표성분인 Baicalin, Berberine(이상 Chem Faces; Wuhan, Hubei, China) 순도 98% 이상과 Sennoside A(MedChemExpress; Monmouth Junction, NJ, USA) 순도99.44%를 구입하여 사용하였다. 분석에 사용된 용매의 경우 HPLC GRADE의 Acetonitrile과 Methanol은 Fisher Scientific Korea Ltd.(서울, 대한민국)에서 구매하였고, Phosphoric Acid은 (DUKSAN; 안산, 대한민국)에서 구매하여 사용하였다. 삼황사심탕의 원료인 황금, 황련, 대황의 경우 한약제제 전문 제약사인 한풍제약(완주, 대한민국)에서 대한민국약전(KP)의 입고시험에 적합한 원료를 구입하여 사용하였다.

2.2. HPLC 분석조건

삼황사심탕의 Baicalin, Berberine, Sennoside A의 지표성분에 대한 함량 시험은 LC-2030C 3D(SHIMADZU; KYOTO, JAPAN)의 HPLC 장비를 사용하여 분석하였다(Figure 4). YMC-Pack ODS-A Column(250 X 4.6 mm I.D, S-5 μ m, 12nm, YMC KOERA Co., Ltd, 성남, 대한민국)을 사용하여 지표성분을 분리하였다. Column 온도는 25도를 유지하였고, 측정파장은 230nm로 설정하였다. HPLC 분석에서 이동상은 A-0.05%PA in water, B-0.05% PA in ACN의 조제하여 유속 1.0mL/min으로 설정하였고 Gradient 조건 [Table 1]를 따라 분석을 하였다.



Figure 4. HPLC : LC-2030C 3D(SHIMADZU; KYOTO, JAPAN)

2.3. 표준용액의 조제

Baicaline, Berberine, Sennoside A 3종의 지표성분의 무게를 정확하게 채취하여 50mg/L의 농도로 하여 Methanol에 녹여 30분간 초음파추출을 하였다. 조제된 표준품 stock solution은 4°C에 보관하여 분석 시 사용하였다.

2.4. 삼황사심탕 개별추출혼합제 및 탕제의 검액 제조

삼황사심탕 개별추출혼합제를 만들기 위해 황련, 황금, 대황을 각각 50g 씩 칭량하여 500mL의 1차 증류수를 둥근바닥 플라스크에 넣고 히팅맨틀(MS-DM; ㈜미성과학기기, 서울, 대한민국)을 이용하여 2시간 동안 100°C에서 환류추출하였다. 추출액을 여과하고 여액을 60°C이하에서 감압농축하여 각각 원료의 연조엑스를 취하였다. 각각의 원료에 대한 연조엑스를 동결건조하여 개별추출물을 제조하였다. 개별추출물은 황련추출물 30mg, 황금추출물 30mg, 대황추출물 40mg(비율 3:3:4)을 넣어 100mg으로하여 개별추출혼합제를 사용하였다. 삼황사심탕 개별추출혼합제를 만든 후 시중에 유통되는 삼황사심탕을 만들기 위해 개별추출혼합제 48mg : 유당수화물 82mg : 옥수수전분 192mg을 넣어 320mg으로하여 개별추출혼합제의 삼황사심탕(부형제 포함)을 조제하였다. 삼황사심탕의 탕제를 만들기 위해 황련과 황금, 대황을 30g : 30g : 40g (3:3:4)을 각각 칭량하여 총 약재량을 100g으로 하였고 1000mL의 1차 증류수를 추가로 넣어 히팅맨틀(MS-DM; ㈜미성과학기기, 서울, 대한민국)을 이용해서 100°C에서 2시간동안 환류추출하였다. 추출액을 여과하고 여액을 60°C이하에서 감압농축하여 연조엑스를 취하였다. 이 연조엑스를 동결건조하여 만든 삼황사심탕제를 사용하였다. 삼황사심탕 탕제를 만든 후 시중에 유통되는 삼황사심탕을 만들기 위해 탕제 48mg : 유당수화물 82mg : 옥수수전분 192mg을 넣어 320mg으로하여 탕제의 삼황사심탕(부형제 포함)을 조제하였다.

이렇게 얻어진 4 가지의 제제에 대하여 분석을 하기위해 각각 20mg 을 채취하여 10mL 용량 플라스크에 넣어 50%MeOH 로 혼합 후, 0.45 μ m sydinge filter (BioFact, 대전, 대한민국)로 검액을 여과하여 사용하였다.

2.5. BV2세포 배양 및 세포독성 측정과 Nitric oxide 측정

세포에 대한 세포독성 및 실험 진행 시 처리 농도를 결정하고, 삼황사심탕 개별추출혼합물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay 를 사용하였다. 간단히 기술하면 먼저 48 well plate 에 5×10^5 cells/well 로 동일하게 분주하고 12 시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 새로운 배지를 넣어준 후 DMSO 에 녹인 추출물을 다양한 농도로 첨가하였다. DMSO 의 처리 농도는 배지 대비 0.1% 이하가 되도록 하였다. 이를 다시 48 시간 배양한 후에 배지를 제거하고 MTT 시약(5 mg/ml)을 넣고, 1 시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하였다. 형성된 formazan 의 각 well 에 DMSO 200 μ l 를 첨가한 후 orbital shaker 를 이용하여 녹이고, 30 분 후 540nm 에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3 회 반복 실시하여 평균값을 구하였다. Control 의 흡광도 값을 기준으로 하여 세포 생존율을 비교하였다.

2.6. BV2 microglia cell 에서 LPS 로 유도된 nitric oxide 측정방법

배양된 세포를 5×10^5 cells/well 수준으로 48 well plate에 분주한 다음 12시간 동안 배양하고, 12시간 후 medium을 제거한 후 RPMI-1640 media로 희석된 각 농도별 시료 처리 후 LPS (0.5 μ g/mL)를 처리하여 24시간 후 세포에서 media로 분비되어 나온 nitric oxide의 양을 Griess 시약(0.1% (w/v)N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v)phosphoric acid)을 사용하여 반응하였다. 반응 후 ELISA micro plate reader를 사용하여 570nm에서 측정 하였다.

2.7. HT22 세포배양 및 뇌 세포 보호활성 측정

글루타메이트로 독성을 유발한 생쥐 해마 유래 HT22 세포주에 대한 보호활성 측정은 HT22 세포 (2×10^5 cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 μ g/ml)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37 °C에서 24시간 배양한 다음, 삼황사심탕 개별추출혼합제 시료 용액 (100, 300 μ g/ml)과 10 mM 글루타메이트를 처리한 후 16시간 동안 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였으며, 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였고, 양성대조약물로는 NAC(N-Acetyl Cysteine) (1mM)를 사용하였다. 또한, 모든 실험치는 대조군에 대한 세포보호율을 평균치로 표시 하였으며, 각각 3회 반복 실험치를 이용하여 계산하였다.

2.8. 통계처리

본 실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 각 실험군간의 결과는 평균치와 표준오차로 나타냈으며, 각 실험군간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다.

3. 결 과

3.1. 분석조건의 확립

황금과 황련, 대황의 지표성분인 Baicalin, Berberine, Sennoside A 등 총 3 종의 성분에 대한 분석을 실시하기 위해 컬럼의 선정, 이동상의 기울기 용리 조건과 용매의 종류, UV 검출파장을 최적화하여 분석을 진행하였다(Figure 5).

컬럼은 YMC Pack ODS-A 5 μ m 250 x 4.6mm 12nm 와 CAPCELL PAC ODS-250 x 4.6mm 와 비교하였고, 이동상 A 용매로 0.05%PA(Phosphoric acid) in water 를 사용하였고 B 용매로 0.05%PA(Phosphoric acid) in Acetonitrile 를 사용하여 다양한 분석 조건을 탐색하여 분리도가 적합한 YMC Pack ODS-A 5um 250 x 4.6mm 12nm 로 선정하여 분리능을 향상시켰다. 이동상에 Phosphoric acid 첨가함으로써 peak 별 대칭성(symmetry)을 향상시키는 것으로 최적화된 분석조건을 결정하였다.

Operating condition				
UV Absorbance				240nm
Column temp.				25°C
Injection vol.				10 μ l
Mobile phase A				0.05% PA in Water
Mobile phase B				0.05% PA in Acetonitrile

Gradient profile	Time (min)	%A	%B	Flow(ml/min)
	0	86	14	1.0
	15	75	25	1.0
	30	50	50	1.0
	35	30	70	1.0
	40	86	14	1.0
	45	86	14	1.0

Figure 5. HPLC conditions for the analysis of various extracts for each formulation of Samhwangsasimtang

3.2. 제조방법별 Chromatogram 및 UV Spectrum

먼저 황련의 주성분으로 알려진 Berberine 과 황금의 주성분으로 알려진 Baicalin 의 UV-spectrum 과 HPLC Chromatogram 을 비교해 보았다.

Berberine 은 황련(*Coptis chinensis*)과 황백(*Phellodendron amurense*)의 주성분인 알칼로이드로서 항염증 활성 등 다양한 약리학적 효능을 가지고 있다 19). 특히 berberine 은 강한 항염증 활성을 가지고 있는데 그 기작으로는 세포질 내에서 활성 산소종의 생산과 MAPK 신호 전달을 억제함으로써 전염증성 반응을 저해하는 것으로 알려져 있다. 또한 berberine 은 다양한 종양 세포의 세포 사멸을 촉진하며, 종양 세포의 분화를 유도하고, 암세포의 성장을 억제하고, 종양 세포의 전이를 억제하며 Bcl-2 계열 단백질의 발현을 조절하고 미토콘드리아의 막 전위를 변화시키는 등 몇몇 세포 신호전달 경로를 억제하는 활성을 지니고 있다 19). 특히 berberine 은 암과 염증 발생 사이에 중요한 역할을 하는 전사인자인 NF- κ B 와 activator protein-의 결합을 방해하여 염증반응을 억제하는 효능이 보고되었다 19,20). 최근에 보고된 바로는 berberine 이 활성산소종의 억제와 TIMP-2 및 TIMP-1 의 발현 조절에 의한 MMP9 와 MMP-2 의 감소로 항주름 및 항산화에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다 21). Berberine 의 UV-spectrum 과 HPLC Chromatogram 을 비교한 결과 표준품 분석 시 R.T 는 26.854 였고, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)의 R.T 는 27.638 이고, 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)의 R.T 는 27.692, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient)의 R.T 는 27.735, 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)의 R.T 는 27.737, 황련추출물의 R.T 는 26.845 를 나타내었고 모두 R.T 0.5 이내에 들어왔으며 추출물 안에서 동일한 성분임을 확인하였다 (Figure 6-12).

Baicalin 은 (baicalin, 5,6-Dihydroxy-4-oxo-2-phenyl-4H-1-benzopyran-7-yl- β -Dglucopyranosiduronic acid)은 황금에 가장 많이 함유되어 있는 성분이다 22). 황금의 성분의 활성 연구로는 플라보노이드(flavonoid) 계열의 화합물인

바이칼린(baicalin), 바이칼레인 (baicalein), 우고닌 (wogonin)과 오록시린(oroxylin)A 에 관한 연구가 많은 비중을 차지하고 있으며 그 외에도 기타성분에 관한 연구가 진행되어 왔다. 그 중 주성분인 바이칼린은 플라본(flavone)골격에 글루쿠론산(glucuronic acid)이 결합한 형태의 화합물로, 주된 생리활성으로는 항암 효과 (anti-cancer activity) 23-26), 항염증 및 항알러지 작용 (anti-inflammatory and anti-allergic) 27-31), 항산화 효과 (anti-oxidative activity) 32-38), anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 29-31), 항비만 효과 39-41) 등에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있다. Baicalin 의 항산화 작용은 방향성 운동 및 백혈구의 이동을 유도하고 백혈구세포로부터 여러가지 면역 매개물질들을 분비시키며, 혈관신생에도 역할을 하는 등 많은 기능을 하는 것으로 알려진 다양한 케모카인(chemokine)에 바이칼린이 결합함으로써 생물학적 기능을 제한하고 활성산소의 형성을 억제하는 과정을 통해 이루어진다 27). 플라보노이드 계열 화합물인 바이칼린은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 및 수산화기 (hydroxyl radical)에 의해 발생하는 산화적 DNA 손상과 세포사멸을 억제하는 세포 손상 억제효과가 나타나 강력한 항산화 효과를 보인다 36). 바이칼린은 세포의 산화적 손상 및 라디칼의 지속적인 축적에 의해 진행되는 노화에 대한 억제효과 33)를 보이며, 이러한 항산화 효과에서 나타나는 항염증 효과 27) 및 비만세포에서 분비되는 히스타민 작용을 억제시킴으로써 항알레르기 효과를 나타낸다 30). 또한, 바이칼린은 지방세포형성유도 factor 및 지방세포형성경로를 조절함으로써 지방세포형성 및 비만을 억제한다 42). 일부 전립선 암 세포주에 대해서 독성을 보이는 억제 효과로 방광암 세포의 증식을 억제하는 항암효과 24), 암세포의 사멸 유도효과 25)를 보인 것을 통해 종양세포의 성장과 전이를 억제한다는 것이 확인된 바 있다 27). Baicalin 의 UV-spectrum 과 HPLC Chromatogram 을 비교한 결과 표준품 분석 시 R.T 는 26.854 였고, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)의 R.T 는 26.857 이고, 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)의 R.T 는 26.851, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual

medicinal herbs+excipient)의 R.T 는 26.899, 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)의 R.T 는 26.860, 황금추출물의 R.T 는 26.845 를 나타내었고 모두 R.T 0.5 이내에 들어왔으며 UV-spectrum 또한 일치하여 추출물 안에서 동일한 성분임을 확인하였다 (Figure 6-12).

다음으로 대황의 주성분으로 알려진 SennosideA 의 UV-spectrum 과 HPLC Chromatogram 의 UV-spectrum 과 HPLC Chromatogram 을 비교해 보았다. 대황의 지표성분인 sennoside A 43)는 Miyamoto 등 44)이 분리하고 이후, Oshio 등이 신주대황에서 sennoside D 그리고 장엽대황에서 sennoside E 를 분리 보고하였다. 45-46) Sennoside 는 경구투여를 통해 위, 소장에서는 흡수되지 않고 대장으로 이행된 후 대장 내의 세균에 의해 rhein anthrone 을 생성하고 장연동 운동의 촉진, 점액분비 촉진, 수분 및 Na 흡수저해에 의해 사하작용을 하는 것으로 알려져 있으며 47) 현재의 품질관리 함량 기준은 Sennoside A 만 설정되어 있다. SennosideA 의 UV-spectrum 과 HPLC Chromatogram 을 비교한 결과 표준품 분석 시 R.T 는 35.292 였고, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)의 R.T 는 35.481 이고, 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)의 R.T 는 35.481, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient)의 R.T 는 35.592, 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)의 R.T 는 35.642, 황련추출물의 R.T 는 35.435 를 나타내어 모두 R.T 0.5 이내에 들어왔으며 UV-spectrum 또한 일치하여 SennosideA 가 함유되어 있으며, 각 추출물 안에서 동일한 성분임을 확인하였다 (Figure 13-18).

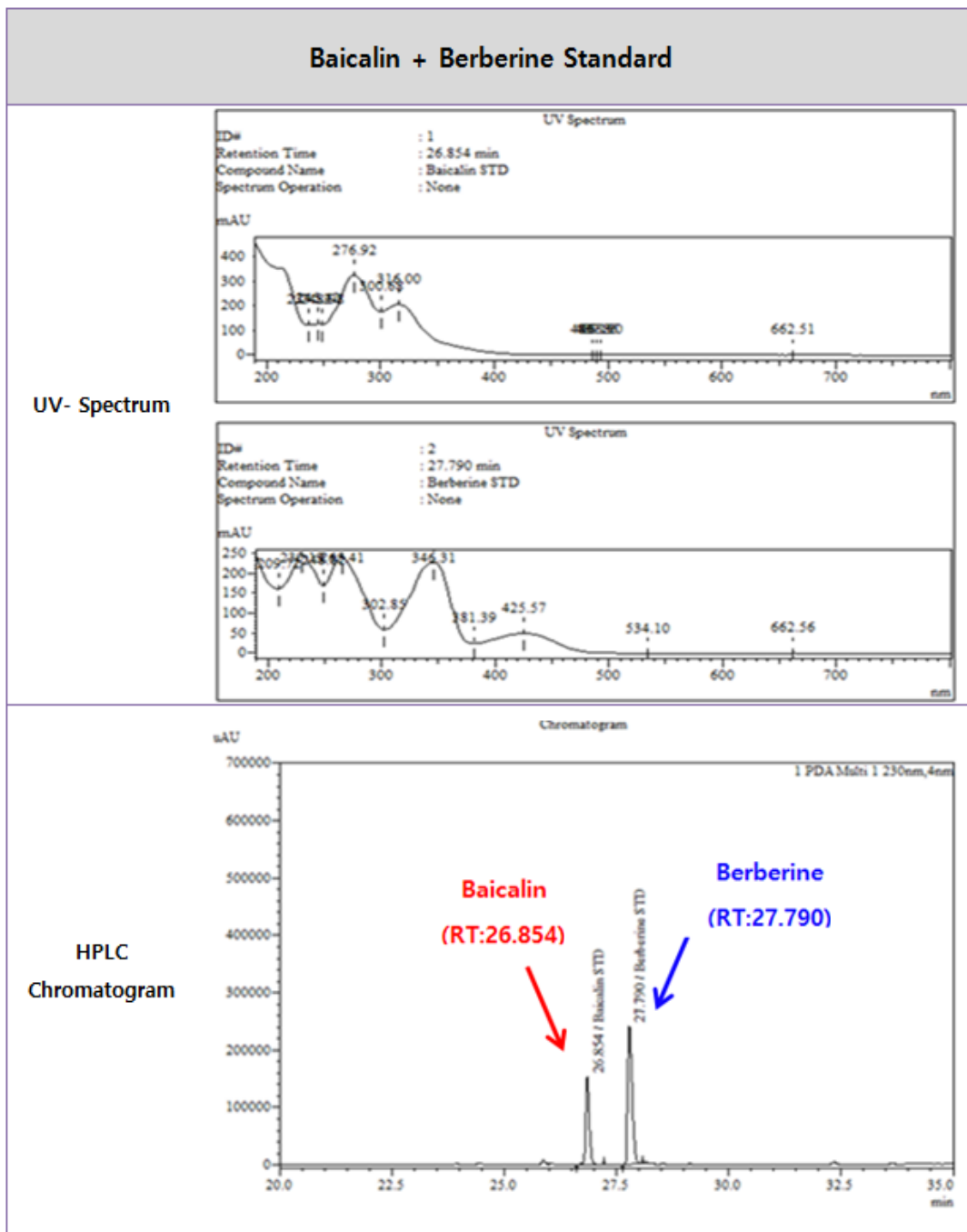


Figure 6. HPLC chromatogram and UV spectrum of berberine and baicalin as standards.

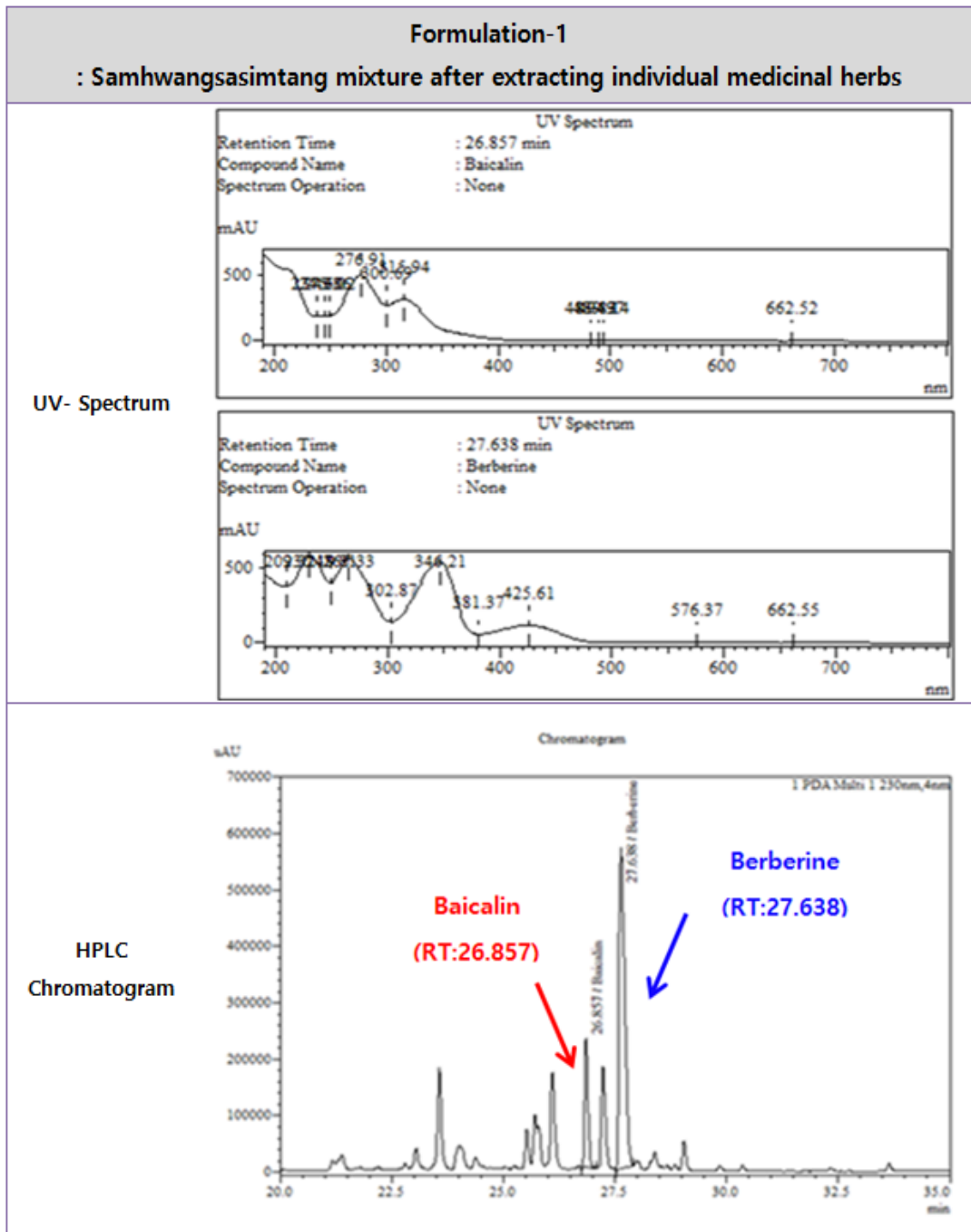


Figure 7. HPLC chromatogram and UV spectrum of berberine and baicalin in Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs

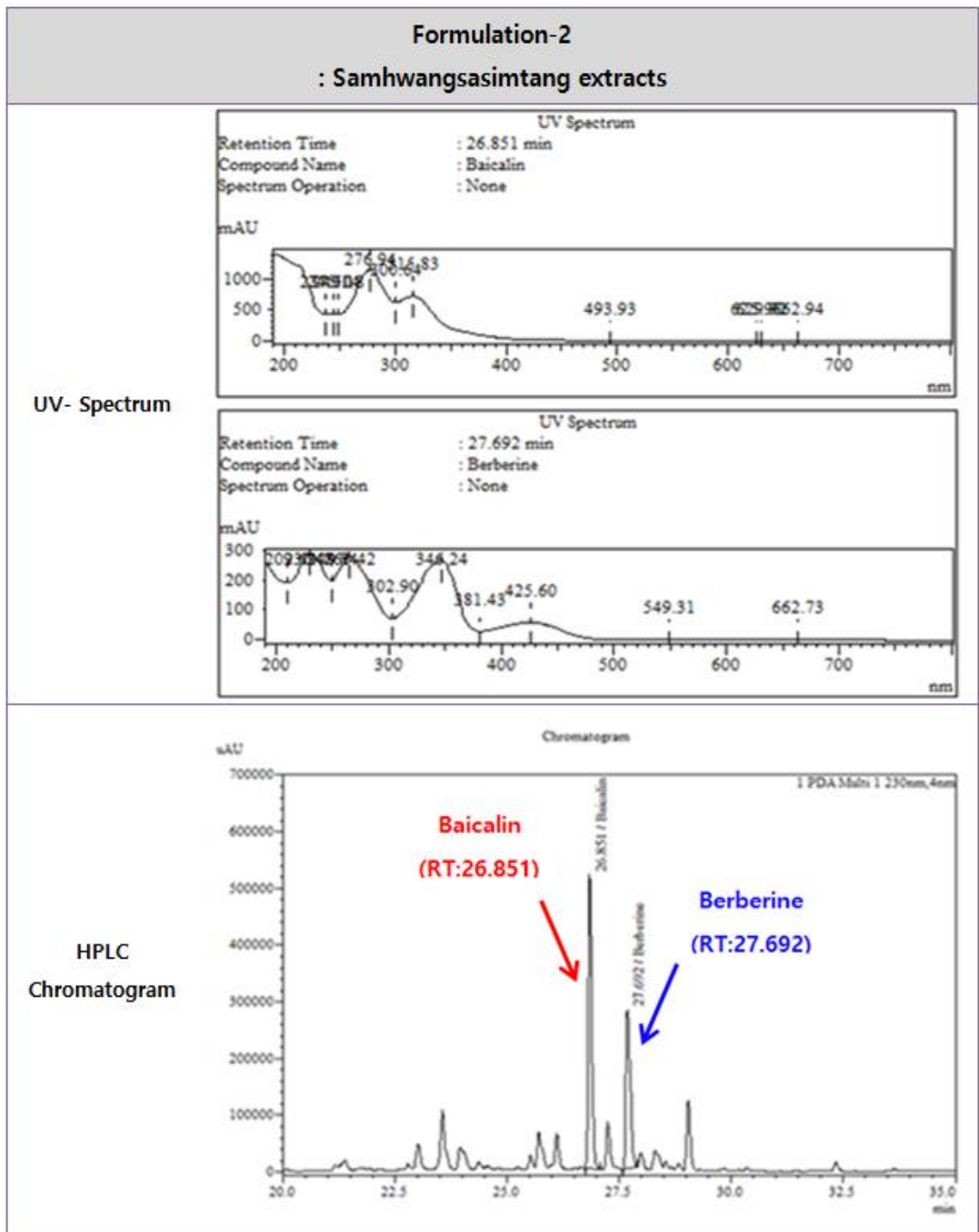


Figure 8. HPLC chromatogram and UV spectrum of berberine and baicalin in Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts

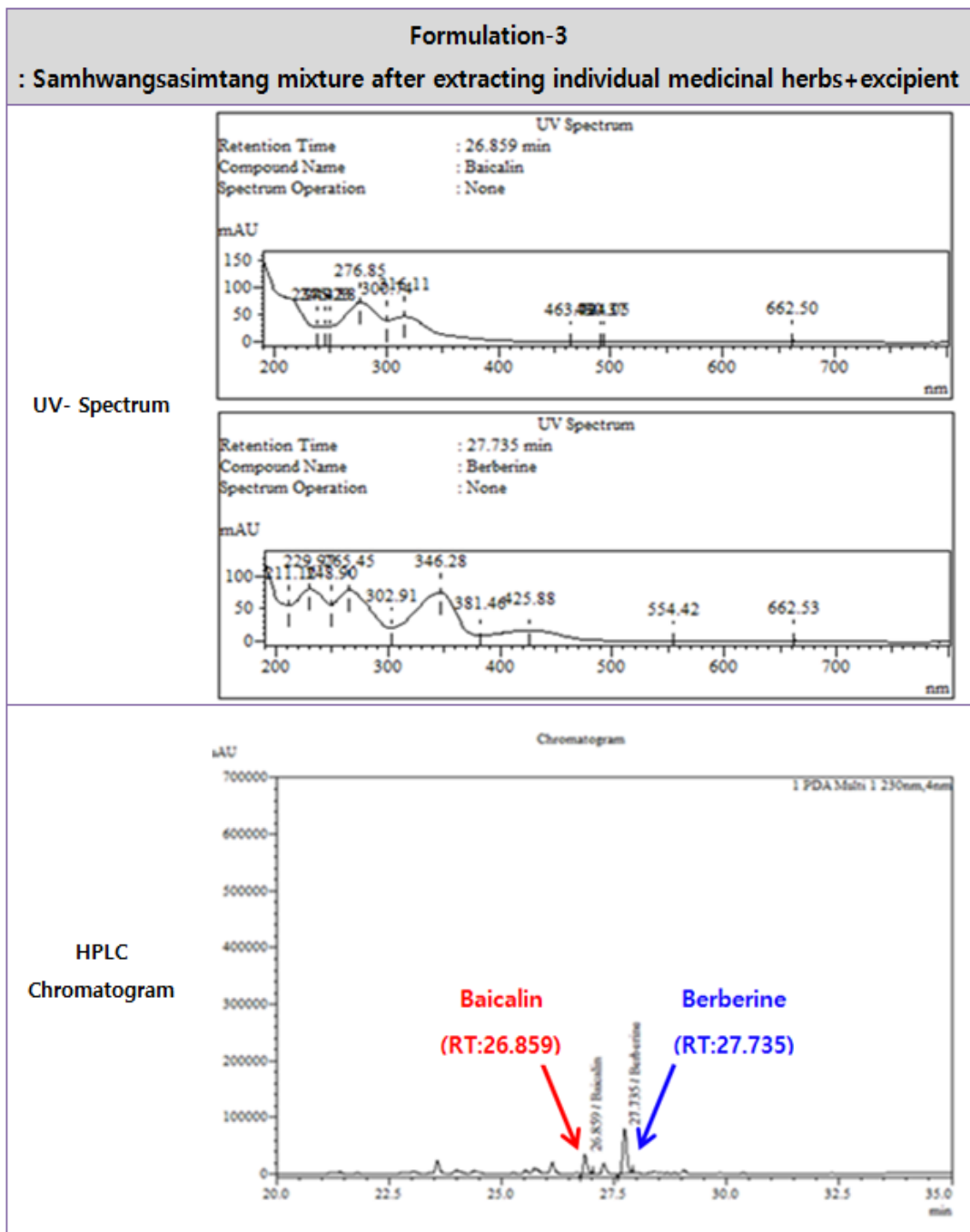


Figure 9. HPLC chromatogram and UV spectrum of berberine and baicalin in Formulation-3: Samhwangsasintang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient

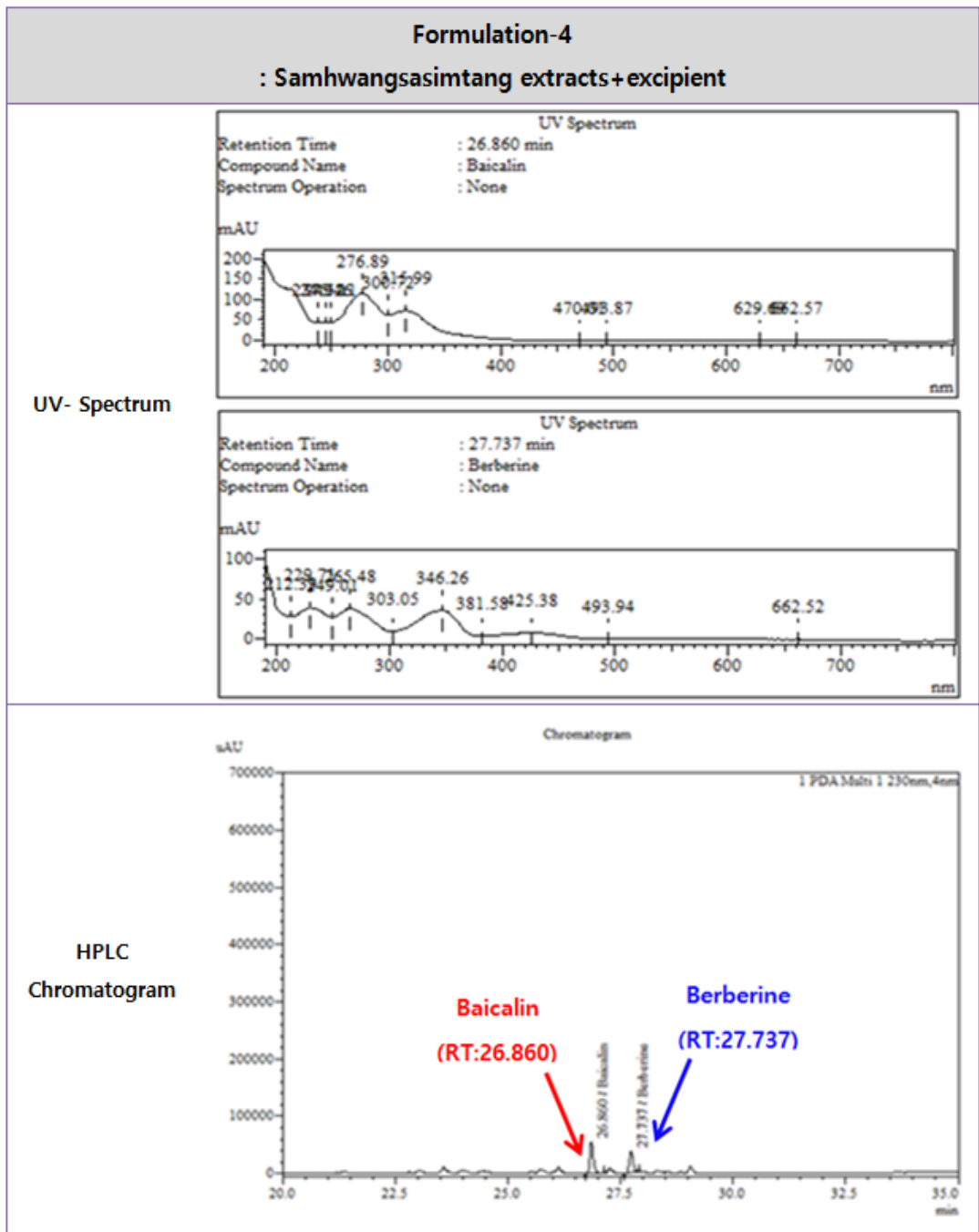


Figure 10. HPLC chromatogram and UV spectrum of berberine and baicalin in Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient

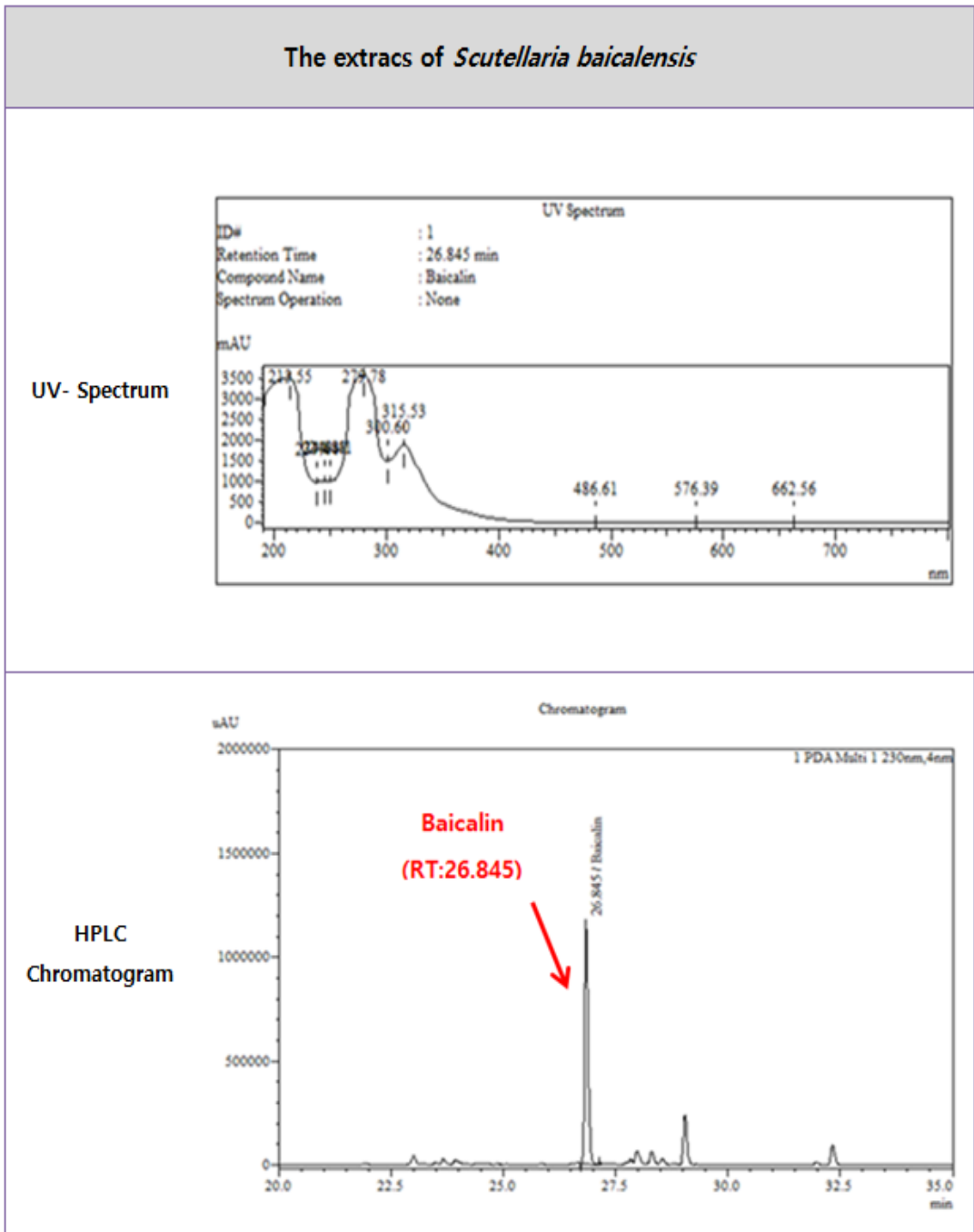


Figure 11. HPLC chromatogram and UV spectrum of berberine and baicalin in the extracts of *Scutellaria baicalensis*

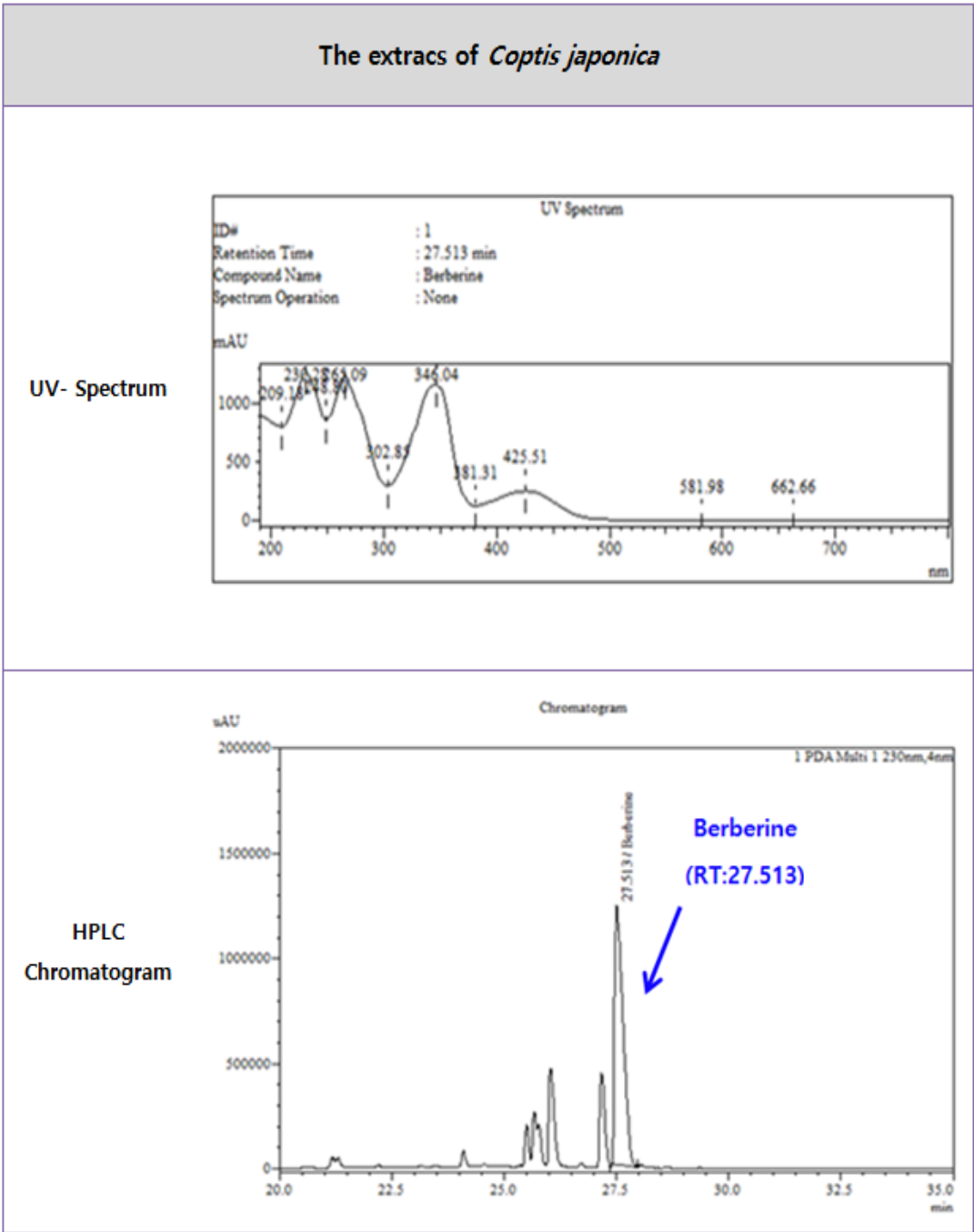


Figure 12. HPLC chromatogram and UV spectrum of berberine and baicalin in the extracts of *Coptis japonica*

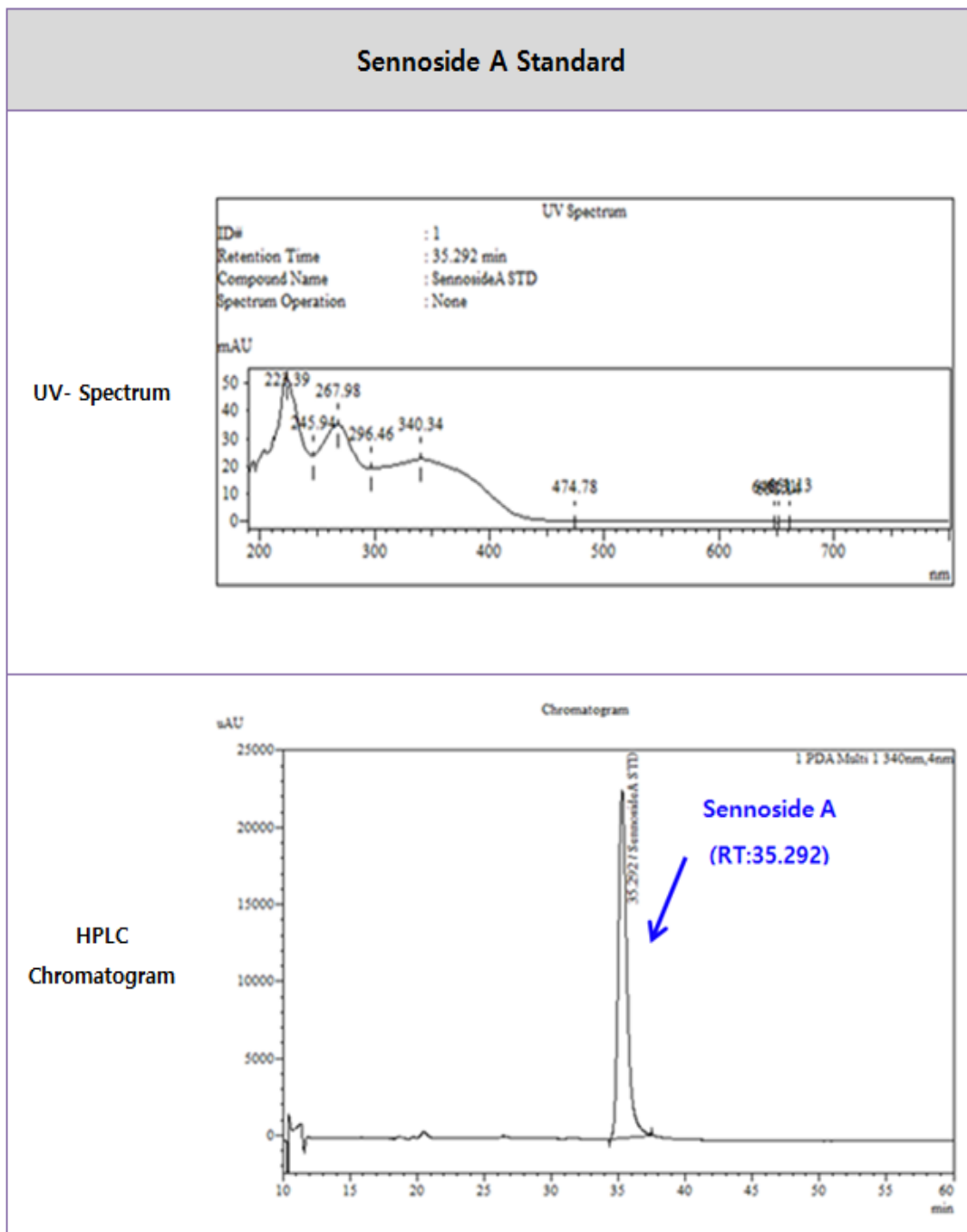


Figure 13. HPLC chromatogram and UV spectrum of Sennoside A as a standard

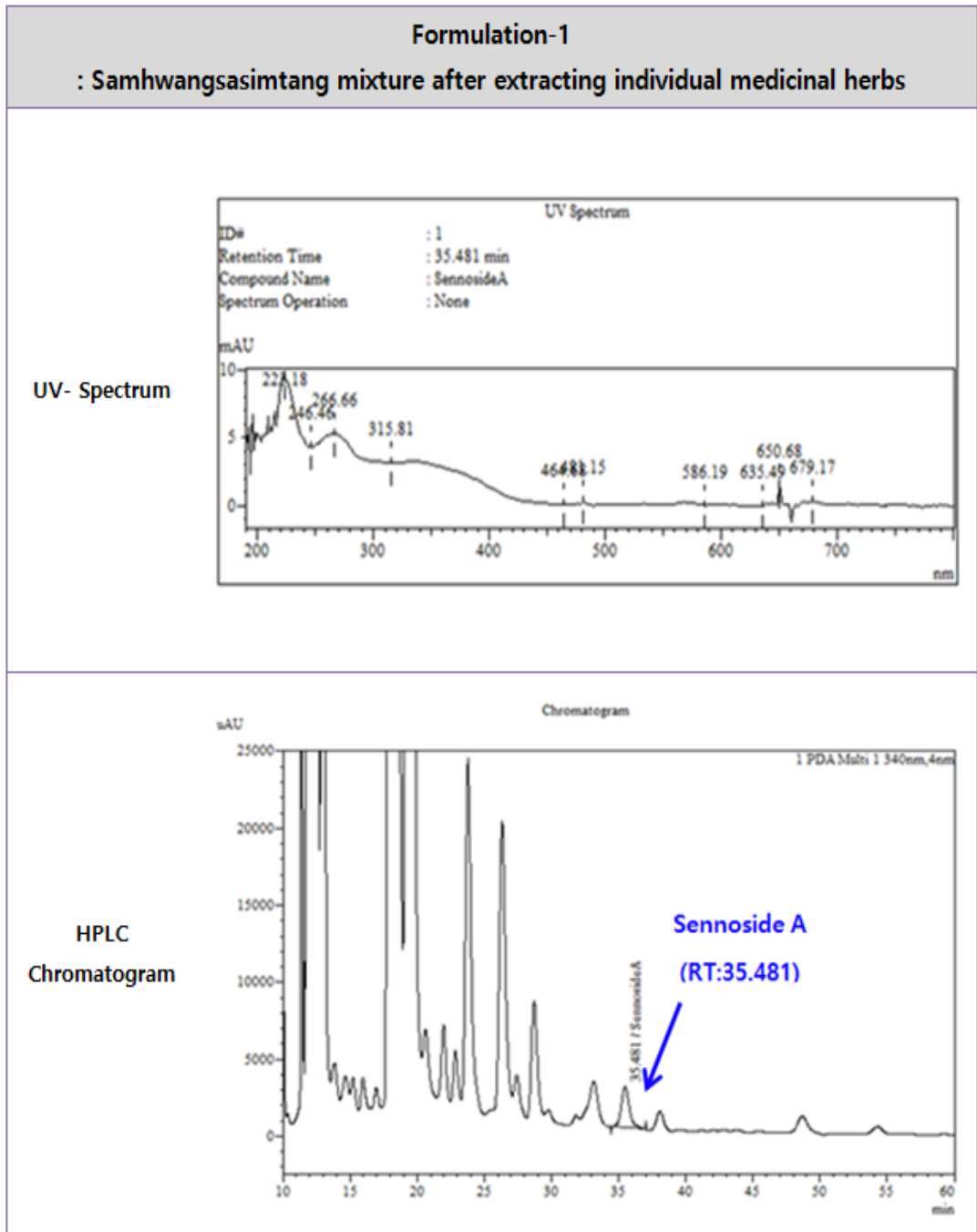


Figure 14. HPLC chromatogram and UV spectrum of Sennoside A in Formulation-1: Samhwangsasintang mixture after extracting individual medicinal herbs

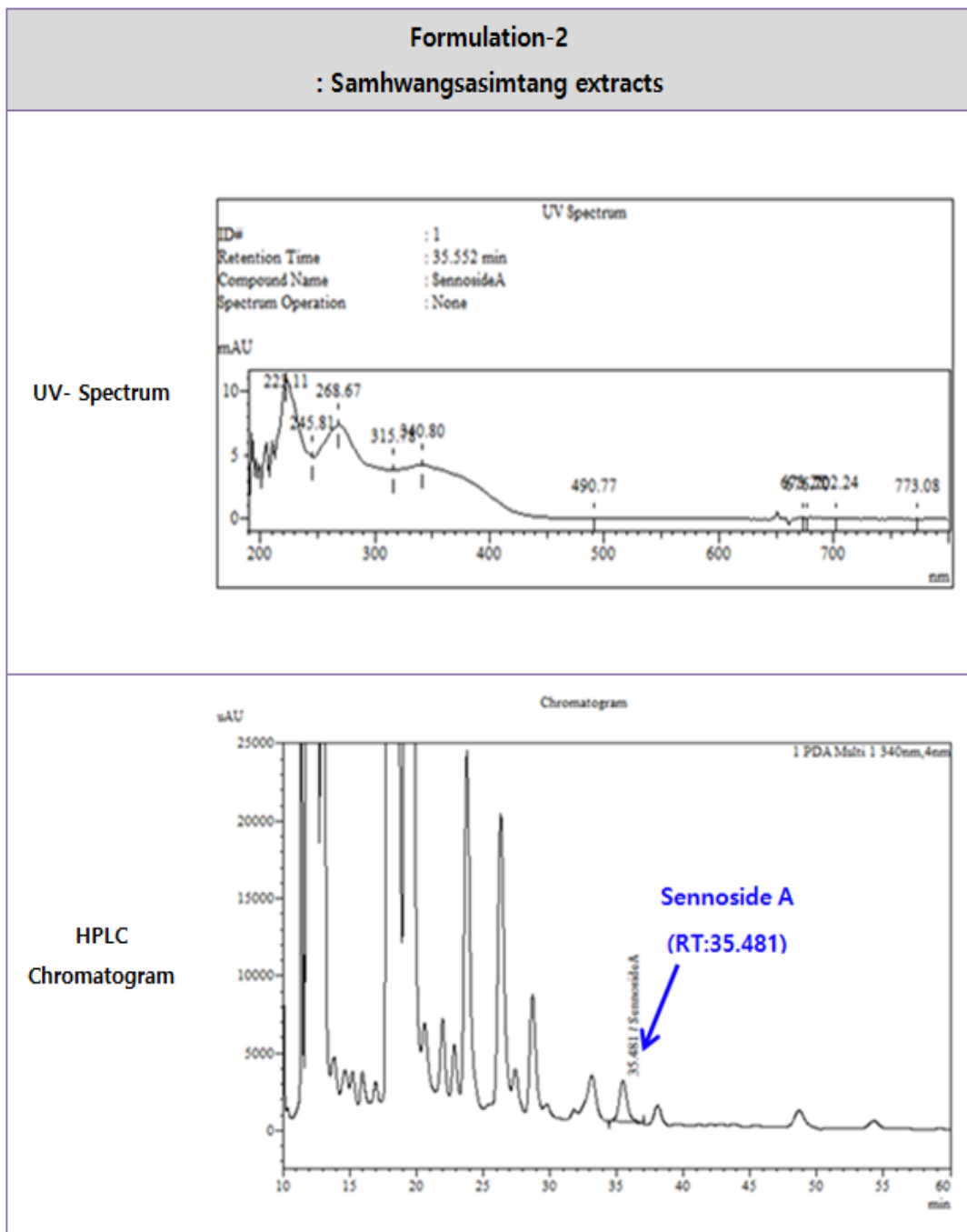


Figure 15. HPLC chromatogram and UV spectrum of Sennoside A in Formulation-2: Samhwangasimtang extracts

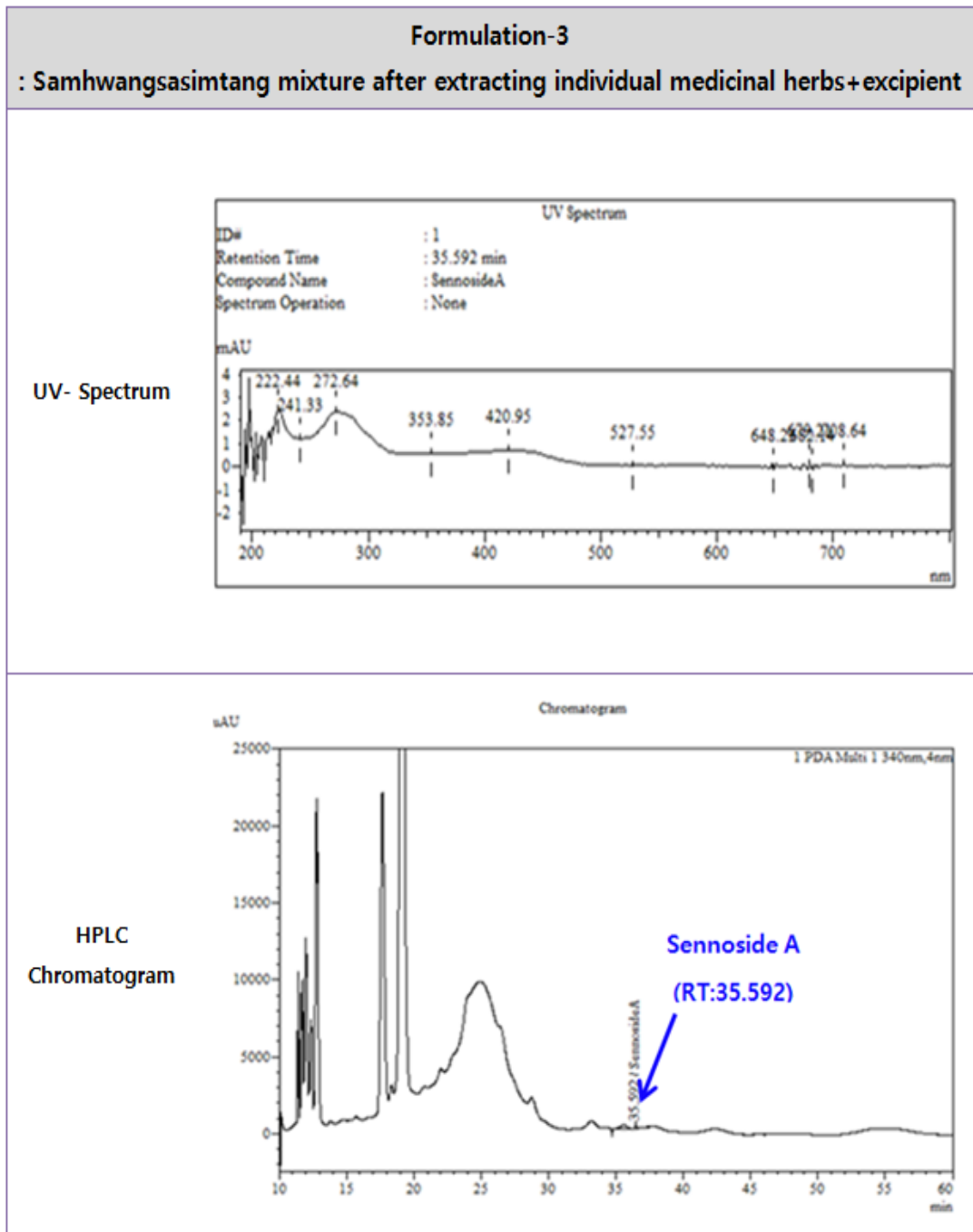


Figure 16. HPLC chromatogram and UV spectrum of Sennoside A in Formulation-3: Samhwangsasintang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient

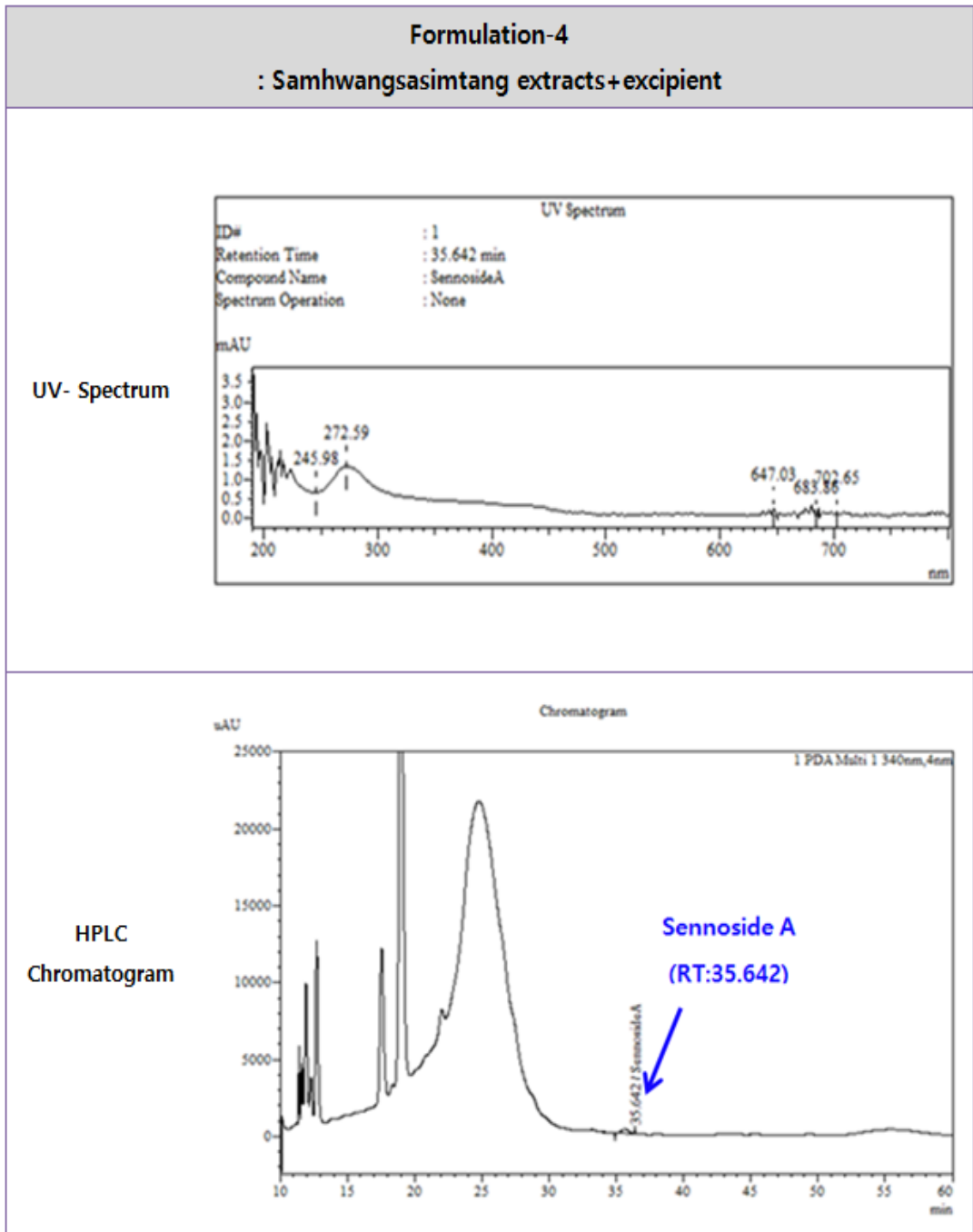


Figure 17. HPLC chromatogram and UV spectrum of Sennoside A in Formulation-4: Samhwangasimtang extracts+excipient

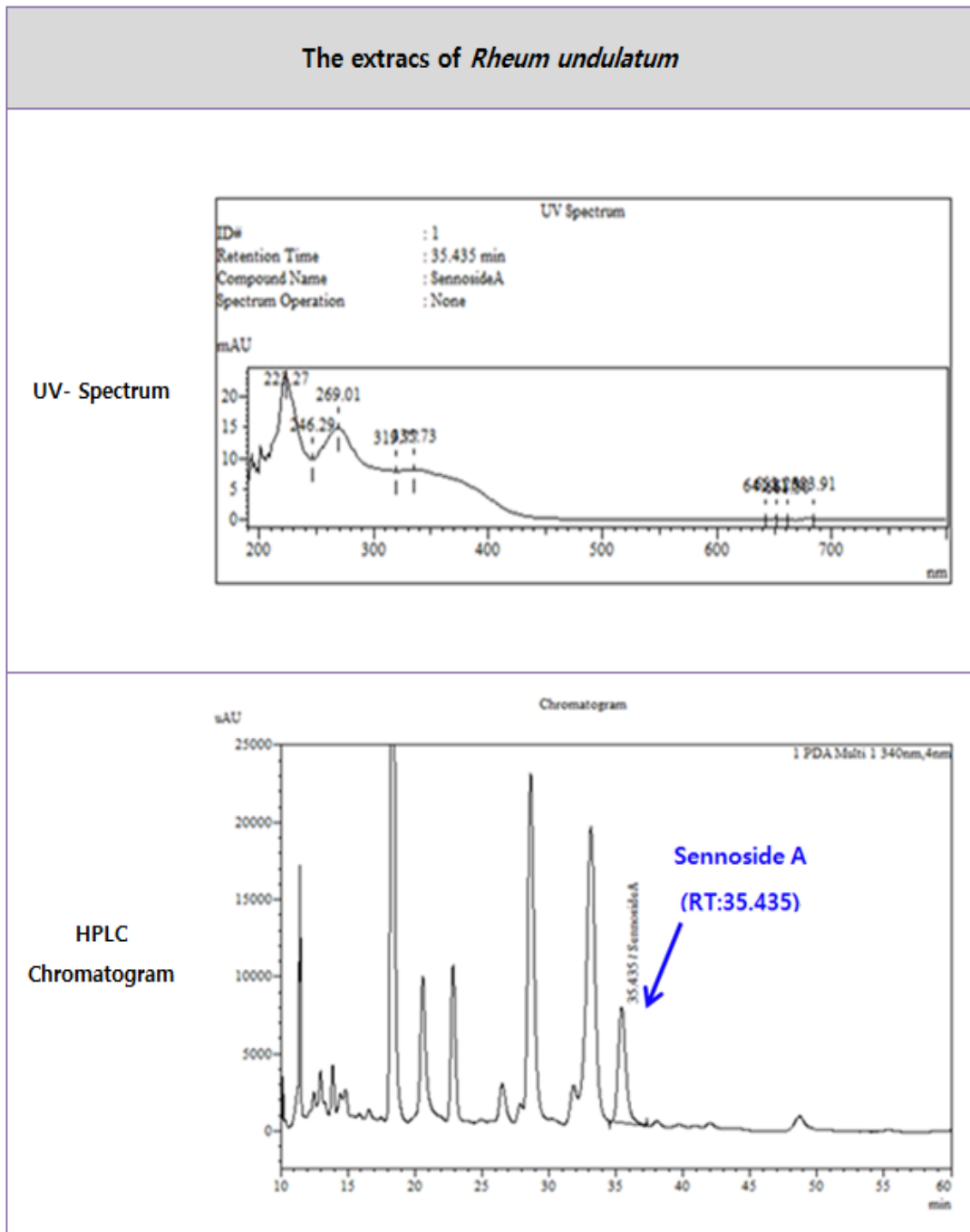


Figure 18. HPLC chromatogram and UV spectrum of Sennoside A in the extracts of *Rheum undulatum*

3.3. 제조방법 별 함량 분석결과

제조방법 별 함량의 Peak Area와 함량 계산 값을 확인하여 샘플의 비교를 진행하였다.

Berberine 의 경우 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)의 Peak Area 는 5053248, 함량은 75.53mg/g 이고, 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)의 Peak Area 는 1947338, 함량은 28.19mg/g, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient)의 Peak Area 는 462012, 함량은 6.40mg/g, 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)의 Peak Area 는 215061, 함량은 3.13mg/g, 황련추출물의 Peak Area 는 16228454, 함량은 224.86mg/g 을 나타내었다. Berberine 의 한번에 측량하여 추출한 삼황사심탕 추출물과 삼황사심탕 추출물 + 부형제 보다 개별 약재추출 후 혼합제와 삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 + 부형제의 함량이 더 높은 것으로 나타났다.

Baicalin 의 경우 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)의 Peak Area 는 1202770, 함량은 37.68mg/g 이고, 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)의 Peak Area 는 2775132, 함량은 86.50mg/g, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient)의 Peak Area 는 174767, 함량은 5.21mg/g, 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4:

Samhwangsasimtang extracts+excipient)의 Peak Area 는 282850, 함량은 8.44mg/g, 황금추출물의 Peak Area 는 6267748, 함량은 171.48mg/g 을 나타내었다. 개별 약재추출 후 혼합제와 삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 + 부형제보다 한번에 측량하여 추출한 삼황사심탕 추출물과 삼황사심탕 추출물 + 부형제의 함량이 더 높은 것으로 나타났다.

SenosideA 의 경우 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)의 Peak Area 는 113227, 함량은 2.94mg/g 이고, 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)의 Peak Area 는 147846, 함량은 3.82mg/g, 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient)의 Peak Area 는 7208, 함량은 0.18mg/g, 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)의 Peak Area 는 9951, 함량은 0.26mg/g, 대황추출물의 Peak Area 는 301565, 함량은 7.10mg/g 을 나타내었다. SenosideA 는 개별 약재추출 후 혼합제와 삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 + 부형제보다 한번에 측량하여 추출한 삼황사심탕 추출물과 삼황사심탕 추출물 + 부형제의 함량이 더 높은 것으로 나타났다.

Compound	Sample Name	Peak Area	Content
Baicalin	개별 약재추출 후 혼합제	1202770	37.68 mg/g
	삼황사심탕 추출물	2775132	86.50 mg/g
	삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 + 부형제	174767	5.21 mg/g
	삼황사심탕 추출물 + 부형제	282850	8.44 mg/g
	황금추출물	6267748	171.48 mg/g

Table 1. The average content of the Baicalin in the Samhwangsasimtang extract

Compound	Sample Name	Peak Area	Content
Berberine	개별 약재추출 후 혼합제	5053248	73.53 mg/g
	삼황사심탕 추출물	1947338	28.19 mg/g
	삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 + 부형제	462012	6.40 mg/g
	삼황사심탕 추출물 + 부형제	215061	3.13 mg/g
	향련추출물	16228454	224.86 mg/g

Table 2. The average content of the Berberine in the Samhwangsasimtang extract

Compound	Sample Name	Peak Area	Content
Sennoside A	개별 약재추출 후 혼합제	113227	2.94 mg/g
	삼황사심탕 추출물	147846	3.82 mg/g
	삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 + 부형제	7208	0.18 mg/g
	삼황사심탕 추출물 + 부형제	9951	0.26 mg/g
	<u>대황추출물</u>	301565	7.10 mg/g

Table 3. The average content of the Sennoside A in the Samhwangsasimtang extract

3.4. 항염증 및 뇌세포 보호 활성 확인

삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 (Formulation-1), 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2), 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3), 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4)의 염증 억제 활성을 검토하기 위해서, 먼저 BV2 세포 독성 평가를 진행하였다. 각 추출물을 농도별로 24 시간 동안 처리한 뒤에 MTT assay를 통해 세포 독성 평가를 진행한 결과, Formulation-1,2는 100 µg/ml까지, Formulation-3,4는 400 µg/ml까지 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다 (Figure 17A). 그 다음, Formulation-1~4이 LPS 유도에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 BV2 세포에 Formulation-1~4을 2 시간 동안 처리한 뒤 LPS (0.5 µg/ml)를 24시간 동안 처리하였다. 그 결과 Formulation-1, 4에서는 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다 (Figure 17B). 다음으로, 삼황사심탕 구성의 개별추출물 (*C. japonica*, *R. undulatum*, *S. baicalensis*)의 염증 억제 활성을 검토하기 위해서, 먼저 BV2 세포 독성 평가를 진행하였다. 각 추출물을 농도별로 24 시간 동안 처리 한 뒤에 MTT assay를 통해 세포 독성 평가를 진행한 결과, *C. japonica*는 100 µg/ml까지, *R. undulatum*, *S. baicalensis* 는 400 µg/ml까지 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다 (Figure 18A). 그 다음, *C. japonica*, *R. undulatum*, 및 *S. baicalensis* 이 LPS 유도에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 BV2 세포에 각 추출물을 2 시간 동안 처리한 뒤 LPS (0.5 µg/ml)를 24시간 동안 처리하였다. 그 결과 *S. baicalensis*에서 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다 (Figure 18B).

Formulation-1~4와 *C. japonica*, *R. undulatum*, 및 *S. baicalensis* 추출물의 뇌세포 보호효과를 확인하기 위해서, 생쥐의 해마세포인 HT22세포에서 각 추출물을 농도별로 2 시간 동안 처리 한 뒤에 glutamate (GA, 10 mM)를 16 시간 동안 처리하였고 그 후 MTT assay로 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, *S. baicalensis* 추출물이 뇌세포 보호 효과가 나타나는 것을 확인하였다 (Figure 19).

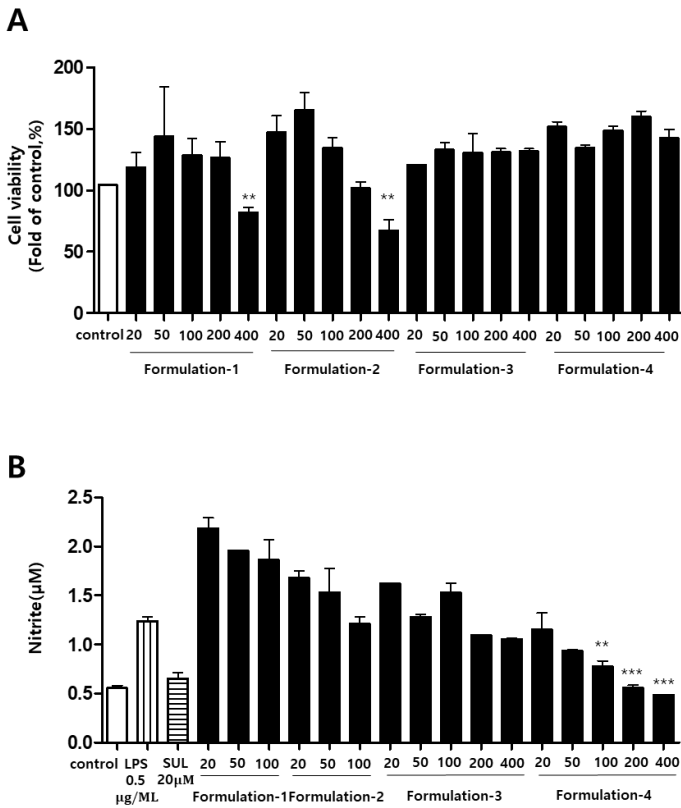


Figure 17. Effects of *Sam-Hwang-Sa-Sim-tang* Formulation-1~4 on cell viability (A) and nitrite production (B) in the BV2 cells. (A): The cells were incubated for 24 h with various concentrations of these extracts. Data are presented as the mean values \pm S.D. of two independent experiments. Each value represents the mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to control. (B): The cells were treated with these extracts at the indicated concentrations for 2 h and then stimulated with LPS (0.5 μ g/mL) for 24 hours. Data are presented as mean values \pm S.D. two independent experiments. Sulfuretin was used as a positive control. Each value represents the mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 as compared with LPS only.

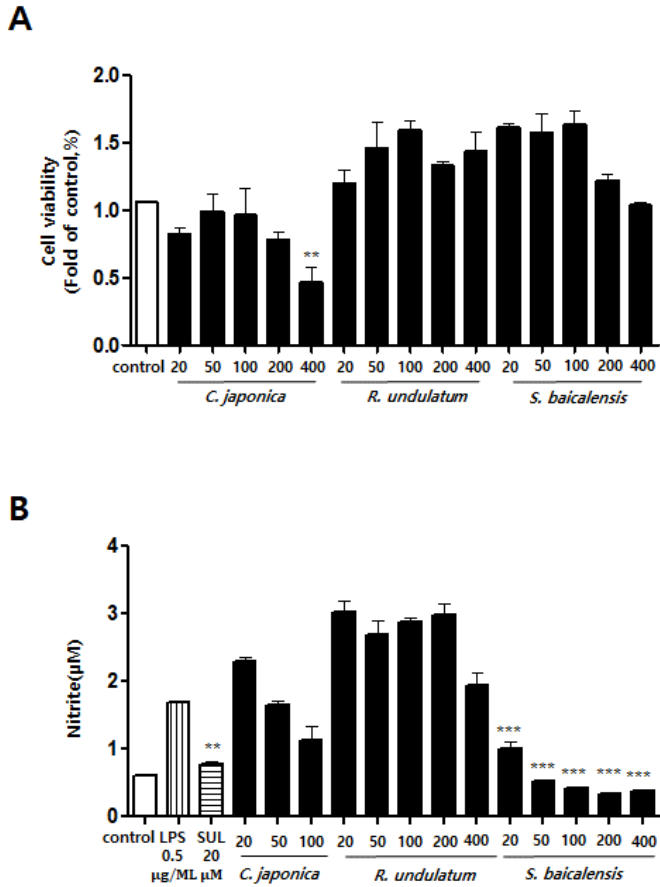


Figure 18. Effects of *Sam-Hwang-Sa-Sim-tang* extracts *C. japonica*, *R. undulatum*, and *S. baicalensis* extracts on cell viability (A) and nitrite production (B) in the BV2 cells. (A): The cells were incubated for 24 h with various concentrations of these extracts. Data are presented as the mean values \pm S.D. of two independent experiments. Each value represents the mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared to control. (B): The cell were treated with these extracts at the indicated concentrations for 2 h and then stimulated with LPS (0.5 μ g/mL) for 24 h. Data are presented as mean values \pm S.D. two independent experiments. Sulfuretin was used as a positive control. Each value represents the mean \pm SD. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ as compared with LPS only.

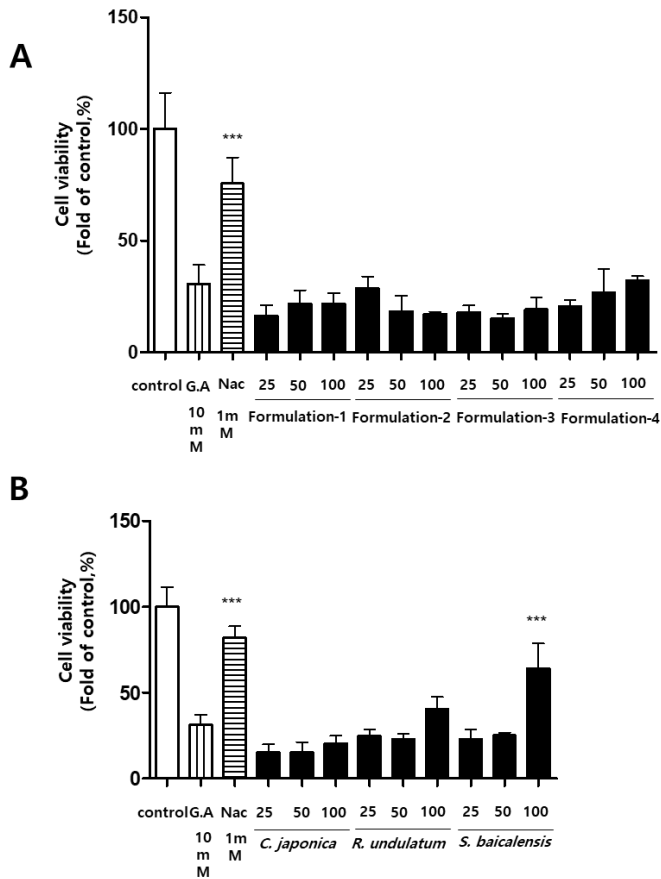


Figure 19. Cytoprotective effect of *Sam-Hwang-Sa-Sim-tang* extracts Formulation-1~4 (A) and *C. japonica*, *R. undulatum*, and *S. baicalensis* (B) extracts on glutamate-induced neurotoxicity in HT22 cells. The cells were treated with various concentrations of these extracts for 2 h and then incubated for 16 h with glutamate (10 mM). Cell viability was determined by MTT assay as described in the Materials and methods. Each value represents the mean \pm SD of three experiments. N-Acetyl Cysteine (NAC, 1 mM) was used as a positive control. *** $p < 0.001$ as compared with glutamate treated only.

4. 고찰 및 결론

본 논문에서는 삼황사심탕의 황련, 황금, 대황의 추출방법에 따라 지표성분을 비교하였다. 이를 바탕으로 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)와 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts), 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient), 삼황사심탕 추출물+부형제(Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)의 추출방법에 따라 추출물의 지표성분 함량에 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

대한민국 약전에 고시된 삼황사심탕 연,건조엑스에 따라 황련 : 황금 : 대황 (3 : 3 : 4) 비율로 조제하였으며 시중에 판매되고 있는 제품과 같이 부형제를 넣어서도 비교하였다.

추출방법에 따라 Berberine 성분의 함량은 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)와 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)가 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)와 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient) 보다 낮게 측정되었는데 이러한 결과는 혼합 추출물에 따른 특성이 열수추출 과정에서 삼주, 백출 (큰꽃삼주), 북창출 배합이 감초 성분의 추출률에 미치는 영향을 연구한 논문 48), 작약, 계지, 감초의 비율 변화가 각 약재의 화학적 성분 추출률에 미치는 영향을 연구한 논문 49)에서 서술한 바와 같이, 혼합 추출로 상대 약재의 비율이 증가함에 따라서 개별 약재에서 용매로 유효성분에 대한 질량이동이 저해되었고 각 성분들의 상호작용에 의해 용해도가 감소한다는 해석으로 설명할 수 있다. 또한 Berberine 은 삼황사심탕 추출물에서 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제보다 유의성 있게 감소하였는데,

이러한 연구 결과는 충분한 추출시간 하에서 약재들이 혼합되고 추출됨에 따라 성분이 원활하게 상호 작용이 발생하였기 때문인 것으로 사료된다 49).

Baicalin 과 SennosideA 의 경우에는 삼황사심탕 추출물(Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)과 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)가 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)와 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient) 보다 높게 측정되었는데 이는 황련, 황금 배합 전후의 주요 화학 성분의 함량변화에 대한 연구 50)에 따르면 특정 비율에서의 혼합 추출에 의한 성분 간 상호작용이 baicalin 과 SennosideA 의 추출을 증가시킬 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 각각의 추출물을 통한 분석실험 진행 결과 삼황사심탕 개별 약재추출 후 혼합제 (Formulation-1: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs)와 삼황사심탕 개별 약재추출후 혼합제+부형제 (Formulation-3: Samhwangsasimtang mixture after extracting individual medicinal herbs+excipient)에서는 Berberine 의 함량이 높았으며, 삼황사심탕 추출물 (Formulation-2: Samhwangsasimtang extracts)과 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4: Samhwangsasimtang extracts+excipient)에서는 Baicalin 과 SennosideA 의 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 이는 추출물 간의 지표성분 함량이 다르기 때문에 어떤 추출물이 효능이 더 높다고 판단하기에는 어렵다고 사료된다. IN vitro 내에서 항염증 및 뇌세포 보호 활성 평가 결과, 삼황사심탕의 각각의 추출물 및 부형제의 조합에서 삼황사심탕 추출물+부형제 (Formulation-4)와 *S. baicalensis* 추출물의 항염증 활성이 가장 우수하였으며, 뇌세포 보호 효과 또한 *S. baicalensis* 추출물에서 나타났다.

종합하면, 한약 제품을 다루는 제약회사에서는 여러가지 상황을 고려하여 해당 제약회사 실정에 맞게 생산하는 것이 유리하다고 판단된다. 또한, 단일약재가 아닌 복수 약재의 혼합으로 처방되는 한약의 효능은 효능 평가 상 단순히 함량 의존적으로 나타나지 않을 가능성도 있고 유효성분의 함량뿐만 아니라 구성비에 의해서도 나타날 수 있기에 51) 이 부분에 대해서는 삼황사심탕 및 여러 한약 처방에 맞게 생산된 제품에 대하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

5. 참고문헌

1. Kim JB. A treatise on Essential prescriptions of the Golden coffer (Gum-Gye-Yo-Rak-Byun-Suk). Hanyunmoonhwasa. 2003 : 449-50.
2. Lin WC, Tan TW. The role of gastric muscle relaxation in cytoprotection induced by san-huang-xie-xin-tang in rats. J Ethnopharmacol. 1994 ; 44(3) : 171-9.
3. Chung MH, Han SK. Effect of composite preparation of crude drugs on experimentally induced hyperlipidemia in rats - Sam Whang Sasim Tang and Whang Ryun Haedok Tang. Kor J Pharmacogn. 1996 ; 27(4) : 397-407.
4. Kim EJ, Kim HY, Lee JY, Lee JK, Kim SJ, Choi KM, Kang DA. Effect of Samhwangsasim-tang, Samigangap-tang and Bangtan-tang on blood pressure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Korean J Herbol. 2011 ; 26(1) : 75-80.
5. Kim JB, Kwon OK, Son CW, Shin HM. Vasodilatory effects of Samhwangsasim-tang on vascular smooth muscle. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2004 ; 8(5) : 1382-6.
6. Lo YC, Tsai PL, Huang YB, Shen KP, Tsai YH, Wu YC, Lai YH, Chen IJ. San-Huang-Xie-Xin-Tang reduces lipopolysaccharide-induced hypotension and inflammatory mediators. J Ethnopharmacol. 2005 ; 96(1-2) : 99-106.
7. Lo YC, Lin YL, Yu KL, Lai YH, Wu YC, Ann LM, Chen IJ. San-Huang-Xie-Xin-Tang attenuates inflammatory responses in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. J Ethnopharmacol. 2005 ; 101(1-3) : 68-74.
8. Tsai HH, Chen IJ, Lo YC. Effects of San-Huang-Xie-Xin-Tang on U46619-induced increase in pulmonary arterial blood pressure. J Ethnopharmacol. 2008 ; 117(3) : 457-62.

9. Wang YS, Lin RT, Cheng HY, Yang SF, ChouWW, Juo SH. Anti-atherogenic effect of San-Huang-Xie-Xin-Tang, a traditional Chinese medicine, in cultured human aortic smooth muscle cells. *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 133(2) : 442-7.
10. Bei QH. A collection of traditional Chinese medicine herb pair [中药药对大全]. Beijing : China Press of Traditional Chinese Medicine. 1996 : 111-2.
11. Dong Joo Jeun, Yun Yeop Cha, Eun Lee. "Inflammatory Effect of Rheum undulatum L.." *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine* 21.1 2011: 35-46.
12. Ministry of Food and Drug Safety. Korean Pharmacopoeia. 11(2022)
13. Choi SK, herbal medicine. Seoul : Shinkwang : P83.
14. Choi SK, herbal medicine. Seoul : Shinkwang : P84.
15. Choi SK, herbal medicine. Seoul : Shinkwang : P81.
16. Choi SK, herbal medicine. Seoul : Shinkwang : P82.
17. Choi SK, herbal medicine. Seoul : Shinkwang : P115.
18. Choi SK, herbal medicine. Seoul : Shinkwang : P116.
19. Zou K, Li Z, Zhang Y, Zhang HY, Li B, Zhu WL, Shi JY, Jia Q, Li YM (2017) Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. *Acta Pharmacol Sin* 38: 157–167.
20. Li JY, Wang XB, Luo JG, Kong LY (2015) Seasonal variation of alkaloid contents and anti-inflammatory activity of *Rhizoma coptidis* based on fingerprints combined with chemometrics methods. *J Chromatogr Sci* 53: 1131–1139.
21. Jang YA, Lee JT (2018) Anti-wrinkle effect of berberine by inhibition of MMP-2 and MMP-9 activity in fibroblasts. *J Appl Biol Chem* 61: 9–15.

22. YL, L., D. ZK, L. RJ, C. KS, C. IJ, W. JR and W. BN (2010) "Baicalin, a flavonoid from scutellaria baicalensis georgi, activates large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels via cyclic nucleotide-dependent protein kinases in mesenteric artery" *Phytomedicine*, 17(10), 760-770.
23. Li-Weber, M. (2009), "New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of scutellaria and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin" *Cancer Treatment Reviews*, 35(1), 57-68.
24. Chan, F. L., H. L. Choi, Z. Y. Chen, P. S. F. Chan and Y. Huang (2000), "Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin", *Cancer Letters*, 160(2), 219-228.
25. Ikemoto, S., K. Sugimura, N. Yoshida, R. Yasumoto, S. Wada, K. Yamamoto and T. Kishimoto (2000), "Antitumor effects of scutellariae radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines", *Urology*, 55(6), 951- 955.
26. Li-Weber, M. (2009), "New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of scutellaria and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin", *Cancer Treatment Reviews*, 35(1), 57-68.
27. Li, B. Q., T. Fu, W. H. Gong, N. Dunlop, H. Kung, Y. Yan, J. Kang and J. M. Wang (2000), "The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines", *Immunopharmacology*, 49(3), 295-306.
28. S, F., S. C, T. X and R. Y (2012) "Anti-inflammatory effects of active constituents extracted from chinese medicinal herbs against *Propionibacterium acnes*" *Natural product research*, 26(18), 1746-1749.
29. Shen, Y. C., W. F. Chiou, Y. C. Chou and C. F. Chen (2003), "Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human

- leukocytes", *European Journal of Pharmacology*, 465(1-2), 171-181.
30. Ma, C., Z. Ma, Q. Fu and S. Ma (2014), "Anti-asthmatic effects of baicalin in a mouse model of allergic asthma", *Phytotherapy Research : PTR*, 28(2), 231-237.
 31. Kim, D. S., E. J. Son, M. Kim, Y. M. Heo, J. B. Nam, J. Y. Ro and S. S. Woo (2010), "Antiallergic herbal composition from scutellaria baicalensis and phyllostachys edulis" *Planta Medica*, 76(7), 678-682.
 32. 김나영 (2014), "황금추출물의 항산화화 멜라닌생성 저해 효과", *대한피부미용학회*, 12(1), 41-47
 33. 서창섭, 김운순, 신현규 (2013), "방풍통성산의 동시분석 및 항산화 효능 연구", *대한한의학 방제학회지*, 21(2), 133-143.
 34. Gao, Z., K. Huang and H. Xu (2001), "Protective effects of flavonoids in the roots of scutellaria baicalensis georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells", *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 43(2), 173-178.
 35. Gao, Z., K. Huang, X. Yang and H. Xu (1999), "Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of scutellaria baicalensis georgi", *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1472(3), 643-650.
 36. Jung, H. A., M. J. Jung, J. Y. Kim, H. Y. Chung and J. S. Choi (2003), "Inhibitory activity of flavonoids from prunus davidiana and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation", *Archives of Pharmacal Research*, 26(10), 809-815.
 37. Lim, B. O., B. P. Yu, S. C. Kim and D. K. Park (1999), "The antioxidative effect of ganhuangenin against lipid peroxidation", *Phytotherapy Research : PTR*, 13(6),

479-483.

38. Shieh, D. E., L. T. Liu and C. C. Lin (2000), "Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin", *Anticancer Research*, 20(5A), 2861-2865.
39. Guo, H. X., D. H. Liu, Y. Ma, J. F. Liu, Y. Wang, Z. Y. Du, X. Wang, J. K. Shen and H. L. Peng (2009), "Long-term baicalin administration ameliorates metabolic disorders and hepatic steatosis in rats given a high-fat diet", *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(11), 1505-1512.
40. Lee, H., R. Kang, Y. Hahn, Y. Yang, S. S. Kim, S. H. Cho, S. I. Chung and Y. Yoon (2009), "Antiobesity effect of baicalin involves the modulations of proadipogenic and antiadipogenic regulators of the adipogenesis pathway", *Phytotherapy Research : PTR*, 23(11), 1615-1623.
41. YL, L., D. ZK, L. RJ, C. KS, C. IJ, W. JR and W. BN (2010) "Baicalin, a flavonoid from scutellaria baicalensis georgi, activates large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels via cyclic nucleotide-dependent protein kinases in mesenteric artery" *Phytomedicine*, 17(10), 760-770.
42. 은재순, 서은실, 소준노, 오석홍 (1994), "Baicalin 이 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 영향", *약학회지*, 38(3), 238-249.
43. KFDA. (2008) *Korean Pharmacopoeia*. Ed. 9, Shinil Books company, Seoul.
44. Miyamoto, M., Imai, S., Shinohara, M., Fujioka, S. and Goto, M. (1967) Studies on the purgative substances. I. Isolation of sennoiside A, one of the most active principles from Rhu-barb. *Yakugaku zasshi. J. Pharm. Soc. Japan* 87(9): 1040- 1043.
45. Oshio, H., Imai, S., Fujioka, S., Sugawara, T., Miyamoto, M. and Tsukui, M. (1972)

- Rhubarbs. II. Isolation of sennoside E, a new purgative compound. Chem. Pharm. Bull. 20(3): 621- 622.
46. Oshio, H. (1978) Investigation of rhubarbs. IV. Isolation of sennoside D, citreorosein and laccaic acid D. Shoyakugaku Zasshi 32(1): 19-23.
47. Kim JH, Ha WR, Park JH, Lee G, Choi G, Lee SH, Kim YS. Influence of herbal combinations on the extraction efficiencies of chemical compounds from *Cinnamomum cassia* , *Paeonia lactiflora* , and *Glycyrrhiza uralensis* , the herbal components of Gyeji-tang, evaluated by HPLC method. J Pharm Biomed Anal. 2016 ; 10(129) : 50.
48. Kim JH. Chemical influences of the rhizomes of *Atractylodes japonica* , *A. macrocephala* , or *A. chinensis* on the extraction efficiencies of chemical compounds in the roots and rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis* during hot-water extraction. Kor. J. Herbology. 2019 ; 34(5) : 39-47.
49. Lei YL, Sun L, Yan H, Wang WP, Formation rules of baicalin-berberine complex. Chinese Traditional Patent Medicine. 2018 ; 40(3) : 577-82.
50. Zhang ZW, Zhang NN, Li YM. Content change of main chemical composition before and after compatibility of *Scutellaria baicalensis* and *Coptis chinensis* . Zhongguo Shi Yan Fang Ji Xue Za Zhi. 2012 ; 18(24) : 58.
51. Caesar LS, Cech NJ. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. The Royal Society of Chemistry. 2019 ; 36 : 869-88.