

# 방풍통성산 제제의 성분 및 생리활성 비교 연구

김정옥 · 최혜민 · 이희현 · 문성옥 · 김종범 · 이화동\*

(재)한국한방산업진흥원 한약제제사업단

## Comparative Study of Characterizing Components and Biological Activities of Bangpungtongseong-san Formulation

Jung Ok Kim, Hye Min Choi, Hee Hyun Lee, Sung Ok Moon, Jong Bum Kim, Hwa Dong Lee\*

*Korean Traditional Medicine Agency, Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry*

The purpose of this study was to investigate the quality of two different commercial Bangpungtongseong-san (BTS) extract granules (BTS-2 and BTS-3) by comparing with BTS decoction (BTS-1). The contents of characterizing components and biological activities of two different commercial BTS extract granules were compared with those of the BTS decoction. The contents of characterizing components were analyzed with HPLC. The antioxidative effects were determined by measuring 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and superoxide dismutase (SOD)-like activity. Also, we compared the effects on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The contents of five components except liquiritin and sennoside A were higher in BTS-1. The DPPH radical scavenging and SOD-like activity were higher in BTS-1. BTS-1 significantly inhibited lipid accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and showed stronger effects than BTS-2, BTS-3. In addition BTS-1 showed stronger inhibition effects on ROS production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes than BTS-2, BTS-3. These results indicate that BTS decoction has strong biological activities than commercial BTS extract granules. It is also consistent with the contents of characterizing components.

Key words : Bangpungtongseong-san, characterizing component, antioxidant, 3T3-L1 preadipocyte

### 서 론

현대사회는 의학의 발달과 생활수준의 향상으로 인해 국민의 평균 수명이 연장되고 있는 반면, 각종 환경 유해물질로부터 노출과 인구의 고령화로 인해 당뇨, 고혈압, 비만, 알레르기, 천식 등의 만성질환이 증가하고 있다. 이에 따라 합성의약품보다는 한약제제에 대한 수요가 증가하고 있으며, 이러한 한약제제는 예로부터 축적된 경험을 바탕으로 다양한 질병의 치료와 예방을 목적으로 사용되어져 왔다<sup>1)</sup>. 경험적으로 그 효능이 인정되고 부작용이 적기 때문에 최근 한약제제에 대한 관심과 수요가 증가하고 있으며, 건강기능식품, 천연물 신약 개발 등으로 그 사용 범

위가 넓어지고 있다<sup>2)</sup>.

방풍통성산(防風通聖散)은 금원사대가(金元四大家)의 한 사람인 유완소(劉完素)<sup>3)</sup>의 선명방론(宣明方論)에 처음 수록된 처방으로 일체의 풍열(風熱)과 표리(表裏) 및 삼초(三焦)가 모두 실(實)해서 오는 제증(諸症)을 치료하는 대표적인 처방으로 방풍, 형개, 연교, 마황, 박하, 천궁, 당귀, 작약, 치자, 대황, 망초, 석고, 황금, 길경, 백출, 생강, 감초 및 활석으로 구성되어 있다. 2000년 이후 발표된 비만치료 관련 처방과 본초를 조사한 논문<sup>4)</sup>에 따르면 사상처방(四象處方), 체감의이인탕(體減薏苡仁湯)과 함께 방풍통성산이 비만 치료에도 많이 사용되어지고 있으며, 한방의료기관에 구비된 비급여 제제 중 네 번째로 많은 구비율을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 방풍통성산의 비만에 대한 실험적 연구 또한 여러 차례 수행되어 방풍통성산이 비만생쥐에서 비만유전자에 미치는 영향<sup>6)</sup>, 지방세포에 미치는 영향<sup>7,8)</sup> 및 비만인에 미치는 임상적 연구<sup>9,10)</sup> 등 다양한 연구가 보고되었다.

현재 한방의료기관에서 가장 많이 사용되는 제형인 탕제는

\* To whom correspondence should be addressed at : Hwa Dong Lee,  
Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongsan,  
Gyeongbuk 712-260, Korea  
· E-mail : lee00003@hanmail.net, · Tel : 053-810-0332  
· Received : 2014/03/07 · Revised : 2014/04/28 · Accepted : 2014/05/20

특유의 향과 맛으로 인하여 복용 시 거부감, 휴대나 복용의 불편함, 품질 안정성 등의 문제로 제형화된 제품에 대한 필요성이 증대되고 있는 실정이다. 그러나 한약제제는 사용되는 한약재의 종류에 따라 유효성분의 함량이 달라지며, 동일한 약재라 하여도 제조방법에 따라 동일한 품질과 약효를 나타내지 못하는 경우가 많아 소비자와 한의사로부터 신뢰를 얻지 못하고 있다. 한약제 및 한약제제에 대한 다양한 연구를 통해서도 추출압력, 추출시간, 추출온도 및 건조방법 등에 따라서 수율 및 유효성분의 차이가 크게 나타나는 것으로 보고되고 있다<sup>11-15)</sup>. 그러므로 한약제제의 제조에는 전통적으로 사용되는 처방의 유효성분과 효능이 그대로 보존되도록 품질의 균일화와 제품의 유효성 확보를 위한 품질관리가 매우 중요하다.

이에 본 연구에서는 현재 시중에서 비만 치료용으로 판매되고 있는 대표적인 한약제제인 방풍통성산을 대상으로 탱액 및 2종 시판제제의 성분 및 생리활성을 비교 분석하여 한약제제의 품질향상을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 한약재

실험에 사용된 방풍통성산의 구성 한약재는 ㈜휴먼허브 (Gyeongsan, Korea)에서 각각 구입하여 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 (재)한국한방산업진흥원 한약제제사업단의 한약재보관실에 보관하였다.

#### 2) 시약 및 기기

시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 methanol은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였고, phosphoric acid는 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 표준물질로 사용한 albiflorin, baicalin, sennoside A는 식품의약품안전처(Osong, Korea)로부터, paeoniflorin, liquiritin은 (주)천연물화학(Daejeon, Korea)으로부터 분양받아 사용하였으며, baicalin, glycyrrhizic acid, geniposide는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 각 표준물질의 순도는 95% 이상이었다. 함량분석을 위한 HPLC는 Agilent 1260 infinity HPLC DAD system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다. 생리활성의 측정에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), tris-HCl buffer 및 pyrogallol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Mouse embryonic fibroblast 3T3-L1 (3T3-L1)지방전구 세포는 미국세포주은행(American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin은 WelGene (Deagu, Korea)에서 구입하였다. Insulin, isobutyl methyl xanthine (IBMX), dexamethasone, Oil Red O 염색 시약 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여

사용하였다. 흡광도의 측정에는 Tecan 사의 ELISA reader (Sunrise™, Mannedorf, Switzerland)를 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 방풍통성산 추출물 및 검액의 조제

방풍통성산 탱액은 Table 1과 같이 구성약재를 중량별로 칭량한 뒤 약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100℃에서 3시간 동안 추출하였다. 추출액은 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 방풍통성산 탱액 및 시판제제는 정확히 칭량한 후 정제수에 녹여 10분간 초음파 추출하여 0.2 µm membrane filter 처리 후 분석에 사용하였다.

Table 1. Composition of Bangpungtongseong-san

Name	Amount (g)	Source
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	0.67	Xingang, China
Scutellariae Radix	0.67	Heilongjiang, China
Paeoniae Radix	0.40	Uiseong, Gyeongbuk
Ephedrae Herba	0.40	Neimenggu, China
Angelicae Gigantis Radix	0.40	Bonghwa, Gyeongbuk
Rhei Rhizoma	0.50	Qinghai, China
Gardeniae Fructus	0.40	Jiangxi, China
Zingiberis Rhizoma	0.40	Andong, Gyeongbuk
TALCUM	1.67	Shandong, China
Gypsum Fibrosum	1.00	Hubei, China
Platycodi Radix	0.67	Yeongju, Gyeongbuk
Saposhnikoviae Radix	0.40	Neimenggu, China
Menthae Herba	0.40	Goryeong, Gyeongbuk
Cnidii Rhizoma	0.40	Yeongyang, Gyeongbuk
Forsythiae Fructus	0.40	Uiseong, Gyeongbuk
Natrii Sulfas	0.50	Hebei, China
Schizonepetae Spica	0.40	Hebei, China
Atractylodis Rhizoma Alba	0.67	Samcheok, Gangwon
Total amount	10.35	

#### 2) 표준용액의 조제

7종의 표준물질은 각각 무게를 정확히 칭량하여 모두 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4℃에 보관하였다. 검량선은 geniposide, paeoniflorin 및 sennoside A 1.0~20.0 µg/mL, albiflorin 1.0~10.0 µg/mL, liquiritin 0.5~10.0 µg/mL, baicalin 5.0~100.0 µg/mL 및 glycyrrhizic acid 2.0~50.0 µg/mL의 농도범위에서 표준용액을 이용하여 작성하였다.

#### 3) HPLC 분석조건

방풍통성산의 주요성분을 분석하기 위하여 Kinetex C18 (2.6 µm, 3.0 × 150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 30℃로 유지하였다. 이동상은 (A) 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O, (B) 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in acetonitrile을 사용하였고 유속은 0.2 mL/min의 조건으로 Table 2와 같이 흘려주었다. UV 검출기 파장은 230 nm에서 확인하였으며, 모든 시료는 0.2 µm PTFE syringe filter로 여과한 후 10 µL를 주입하여 분석하였다.

#### 4) DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성은 Blois의 방법<sup>16)</sup>을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 2 mL에 0.2 mM의 DPPH 1 mL을 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH radical 소거활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

5) SOD 유사활성 측정

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정은 알칼리상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색원리를 이용한 Marklund와 Marklund<sup>17)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. 일정농도로 희석된 시료 40 µL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer 120 µL와 7.2 mM pyrogallol 20 µL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 20 µL를 가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

7) 세포배양

실험에 사용된 3T3-L1 지방전구세포는 DMEM 배지에 10% FBS 및 penicillin-streptomycin을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 인큐베이터에서 배양하였다.

8) MTT assay를 이용한 세포 독성 측정

시료의 세포증식과 독성을 측정하기 위해 Green 등의 방법<sup>18)</sup>에 따라 3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 formazan의 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 세포를 1×10<sup>4</sup> cells/well으로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양 후 새로운 배지를 샘플과 함께 처리하여 24시간 후 MTT 시약을 5 mg/mL 농도로 10 µL를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 well에 100 µL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

9) Oil red O 염색을 통한 3T3-L1 지방전구세포의 분화 저해활성 측정

배양 중인 3T3-L1 세포가 confluent 상태가 되면 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 원심분리하여 세포를 모아서 3×10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 6 well에 분주한 후 100% confluency 상태에서 48시간 방치 후 DMEM에 10% FBS와 23 mg/mL IBMX, 5 mg/mL insulin 및 1 mM dexamethasone이 첨가된 배지(MDI)를 처리하여 분화를 48시간 동안 유도하고 그 후 2일 마다 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/mL의 insulin이 첨가된 배지를 교체해주었다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다. 마지막 시료를 처리하고 2일 경과 후 지방세포 분화 및 시료처리가 완료된 세포를 PBS로 세척한 후 10% formaldehyde 용액으로 고정하고 Oil red O 용액을 처리하여 30분간 실온에서 염색하였다. Oil red O 용액을 제거한 후 증류수로 세척하여 건조시킨 다음 위상차 현미경을 이용하여 관찰하고 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용해하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) NBT assay를 이용한 ROS 생성 저해활성 측정

분화과정에 따른 지방세포의 reactive oxygen species (ROS) 생성량을 측정하기 위하여 먼저 24-well에 배양 및 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후 멸균된 PBS를 이용하여 2회 세척, 0.2% nitro blue tetrazolium (NBT) 용액 0.2 mL를 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator 안에서 90분간 반응시킨 뒤 100% acetic acid를 이용하여 이들 dark blue formazan을 모두 용출시켜 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11) 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는 SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다. p<0.05 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

Table 2. Gradient elution condition of mobile phase

Time (min)	Solvent *	
	A (%)	B (%)
0	85	15
40	20	80
41	85	15
50	85	15

\* A: 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O, B: 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in acetonitrile

결 과

1. 방풍통성산 제제의 성분 분석

1) 분석조건의 확립

방풍통성산의 구성약제의 주요성분인 geniposide, albiflorin, paeoniflorin, glycyrrhizic acid, liquiritin, baicalin, sennoside A의 동시분석을 위해 이동상은 water와 acetonitrile을 시간대별로 구성 비율을 달리하였으며, 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하여 분리능을 높였다. PDA 검출기 파장 230 nm에서 geniposide, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, sennoside A, baicalin, glycyrrhizic acid의 순으로 각각 검출되었으며, 다른 성분들의 피크에 간섭 없이 분리됨을 확인하였다(Fig. 1). 검액은 설정된 동시분석 조건에서 분석을 실시하였으며, 검액에서의 피크는 주요성분 피크의 retention time과 UV 스펙트럼이 일치함을 확인한 후 각 성분에 대한 함량을 분석하였다.

2) 함량 분석

시판되고 있는 방풍통성산 제제의 분석결과는 Table 3과 같이 7가지 주요성분이 모두 검출되었지만, 탕액(BTS-1)과 시판제제 2종(BTS-2, BTS-3)의 주요성분의 함량 차이가 매우 큼을 확인할 수 있었다. 방풍통성산 제제의 주요성분은 치자, 작약, 황금 등에서 이행된 성분들이 주를 이루고 있었으며, liquiritin과 sennoside A를 제외한 모든 성분이 BTS-1에서 가장 높은 것으로 나타났다. BTS-2와 BTS-3에서 치자의 geniposide, 작약의 paeoniflorin 및 황금의 baicalin이 0.88~2.53 mg/g, 0.27~2.76 mg/g 및 1.59~17.00 mg/g의 함량을 나타내는데 반하여, BTS-1에서는 3.93 mg/g, 3.37 mg/g 및 23.47 mg/g으로 월등히 높은 함량으로 분석되었다.

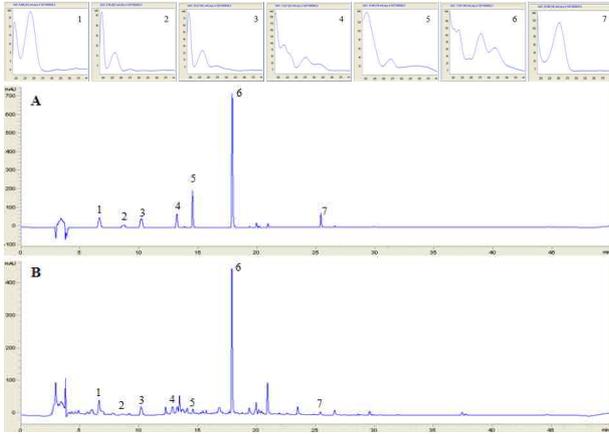


Fig. 1. HPLC chromatogram of Bangpungdongseong-san. A: standard mixture, B: Bangpungdongseong-san decoction. Geniposide (1), albizflorin (2), paeoniflorin (3), liquiritin (4), sennoside A (5), baicalin (6), glycyrrhizic acid (7).

Table 3. Analytical results of repeatability to seven characterizing components in Bangpungdongseong-san

Compounds	BTS-1*		BTS-2		BTS-3	
	Mean (mg/g)	RSD (%)	Mean (mg/g)	RSD (%)	Mean (mg/g)	RSD (%)
Geniposide	3.93±0.07	1.72	0.88±1.45	2.14	2.53±0.02	1.41
Albizflorin	0.78±0.00	1.65	0.31±0.35	0.69	0.99±0.06	1.75
Paeoniflorin	3.37±0.03	1.18	0.27±0.40	1.44	2.76±0.03	1.28
Liquiritin	0.74±0.04	1.93	0.51±0.74	1.26	1.74±0.01	0.70
Sennoside A	0.75±0.00	1.10	0.14±0.19	1.77	1.39±0.02	1.28
Baicalin	23.47±0.17	1.13	1.59±2.52	0.92	17.00±0.20	0.93
Glycyrrhizic acid	3.16±0.03	3.02	0.83±1.39	1.63	4.23±0.30	1.11

\*BTS-1, Bangpungdongseong-san decoction; BTS-2, commercial Bangpungdongseong-san extract granule from manufacturer A; BTS-3, commercial Bangpungdongseong-san extract granule from manufacturer B.

## 2. 방풍통성산 제제의 생리활성 분석

### 1) DPPH radical 소거활성

방풍통성산 제제에 대한 항산화 활성을 비교하고자 BTS-1을 농도별로 조제한 후 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. BTS-1 100 µg/mL의 DPPH radical 소거활성은 81.83%로 대조군으로 사용된 100 µg/mL의 BHA의 82.45%와 유사한 활성을 나타내어 BTS-1이 단일물질이 아닌 점을 감안할 때 높은 항산화 활성을 보유하는 것으로 판단된다. 100 µg/mL 농도의 BTS-1과 시판제제의 항산화 활성을 비교한 결과 BTS-3는 79.11%로 BTS-1의 DPPH radical 소거활성 82.30%와 유사하였으며, BTS-2는 28.73%의 낮은 항산화 활성을 나타내었다(Fig. 2).

### 2) SOD 유사활성

BTS-1의 SOD 유사활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 10, 100 및 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 49.37, 82.65 및 83.36%의 SOD유사활성을 나타내었다. 방풍통성산 제제의 SOD 유사활성을 비교한 결과 Fig. 3과 같이 BTS-1의 활성이 가장 높았으며, 그 다음으로 BTS-3가 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

### 3) 세포독성

방풍통성산 제제가 3T3-L1 지방전구세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 실시하여 분석하였다. 그 결과 Fig. 4에 제시된 바와 같이 BTS-1, BTS-2 및 BTS-3 모두 5~1,000 µ

g/mL의 시료 처리에서 세포독성을 전혀 유발하지 않음을 확인하였다. 이에 3T3-L1 지방전구세포에 대한 방풍통성산 제제의 항산화 및 항비만 활성을 평가하기 위한 처리농도는 독성이 없는 것으로 확인된 농도범위에서 수행하였다.

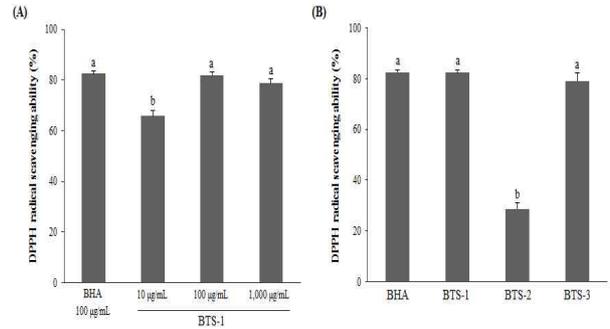


Fig. 2. DPPH radical scavenging ability of Bangpungdongseong-san. Symbols are referred to Table 3. Data express the mean±SD. Different letters indicate significant differences by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). A, treatment with 10, 100 and 1,000 µg/mL of BTS-1; B, treatment with 100 µg/mL of BTS-1, BTS-2 and BTS-3.

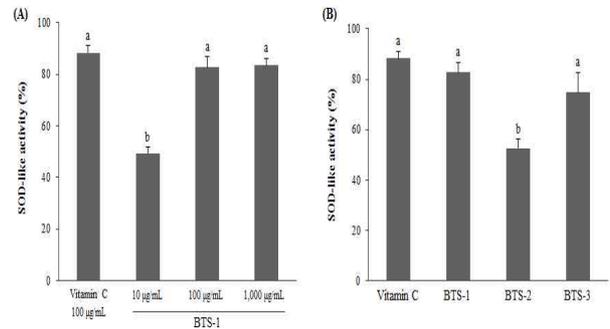


Fig. 3. SOD-like activity of Bangpungdongseong-san. Symbols are referred to Table 3. Data express the mean±SD. Different letters indicate significant differences by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). A, treatment with 10, 100 and 1,000 µg/mL of BTS-1; B, treatment with 100 µg/mL of BTS-1, BTS-2 and BTS-3.

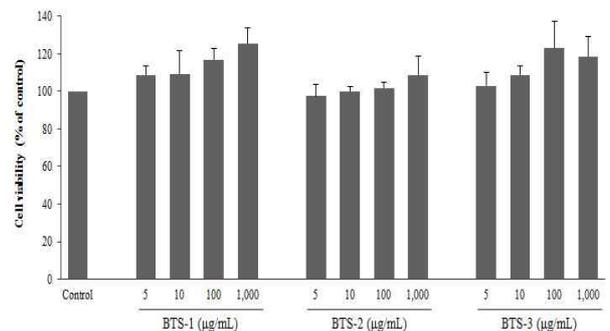
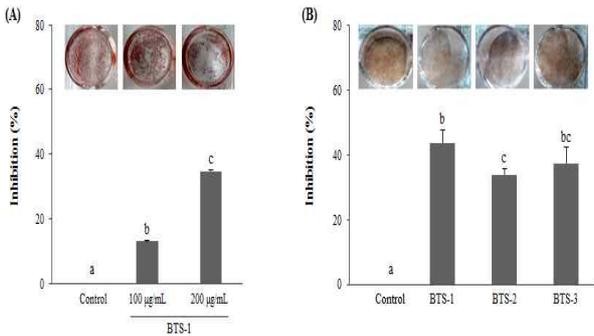


Fig. 4. Effect of Bangpungdongseong-san on viability of 3T3-L1 preadipocytes. Cell were treated with the indicated concentrations of BTS samples for 24 hr and viability was determined by MTT assay. Symbols are referred to Table 3. Data express the mean±SD. There is no significant difference between control and treatment group by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

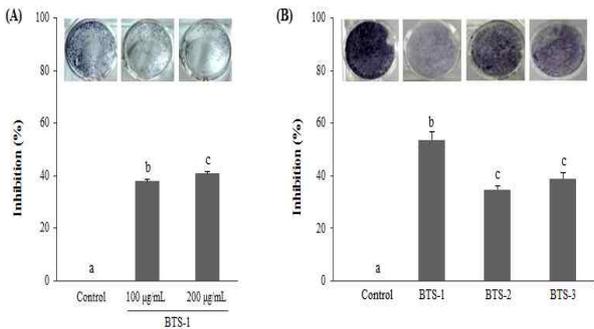
### 4) 3T3-L1 지방전구세포의 분화 저해활성

방풍통성산 제제가 3T3-L1 세포가 지방 전구세포에서 지방

세포로 분화되는 과정에 작용하여 지방 축적을 억제하는지를 확인하기 위해서 Oil Red O 용액을 이용하여 3T3-L1 세포 내에 생성된 지방구를 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. Fig. 5에서와 같이 분화배지만 처리한 대조군에 비해서 BTS-1을 200 µg/mL의 농도로 처리한 시료에서 염색된 지방구 수가 현저히 감소함을 확인하였다. 방풍통성산 제제를 200 µg/mL의 농도로 처리하여 3T3-L1 세포의 분화 저해활성을 비교한 결과 BTS-1 (43.75%), BTS-3 (37.50%) 및 BTS-2 (33.99%)의 순으로 높은 활성을 보여주었다.



**Fig. 5.** Effect of Bangpungdongseong-san on lipid accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. Symbols are referred to Table 3. Data express the mean±SD. Different letters indicate significant differences by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). A, treatment with 100 and 200 µg/mL of BTS-1; B, treatment with 200 µg/mL of BTS-1, BTS-2 and BTS-3.



**Fig. 6.** Effect of Bangpungdongseong-san on ROS production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The intracellular lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. Symbols are referred to Table 3. Data express the mean±SD. Different letters indicate significant differences by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). A, treatment with 100 and 200 µg/mL of BTS-1; B, treatment with 200 µg/mL of BTS-1, BTS-2 and BTS-3.

5) NBT assay를 이용한 ROS 생성 저해활성

3T3-L1 지방전구세포에 분화 유도물질을 처리하여 지방세포로 분화를 시킨 뒤 생성된 ROS 생성량을 측정하기 위하여 NBT assay를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 시료를 처리하지 않고 분화를 시킨 대조군과 비교하였을 때, BTS-1은 100 및 200 µg/mL의 농도에서 37.86 및 40.78%의 ROS 생성 저해활성을 나타내었다. 이에 BTS-1 200 µg/mL의 ROS 생성 저해활성을 시판제제와 비교한 결과, BTS-2 및 BTS-3의 ROS 생성 저해활성은 각각 34.75 및 38.99%로 BTS-1보다 낮은 활성을 가지는 것으로 확

인되었다.

고찰

방풍통성산(防風通聖散)은 유완소(劉完素)<sup>3)</sup>의 선명방론(宣明方論)에 처음 수록된 처방으로 일체의 풍열(風熱)과 표리(表裏) 및 삼초(三焦)가 모두 실(實)해서 오는 제증(諸症)을 치료하는 대표적인 처방이다. 2000년 이후 발표된 비만치료 관련 처방과 본초를 조사한 논문<sup>4)</sup>에 따르면 사상처방(四象處方), 체감의이인탕(體減薏苡仁湯)과 함께 방풍통성산이 자주 처방되는 것으로 분석되었으며, 이와 같은 결과는 방풍통성산이 현대에서는 비만치료제로 많이 사용되고 있음으로 알 수 있다. 본 연구에서는 한약제제 품질향상을 위한 기초자료로 활용하고자 방풍통성산 탱액과 시판되고 있는 방풍통성산 제제 2종에 대하여 성분분석, 항산화 활성 및 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 항비만 활성에 대한 비교 실험을 실시하였다.

방풍통성산 제제의 주요성분에 대한 함량분석을 위하여 구성약재의 주요성분인 geniposide, albiflorin, paeoniflorin, glycyrrhizic acid, liquiritin, baicalin 및 sennoside A에 대하여 동시분석을 실시하였다. 그 결과 방풍통성산 탱액과 시판제제 2종 모두 7종의 성분이 분석되었으나, liquiritin과 sennoside A를 제외한 모든 성분이 탱액에서 가장 높은 것으로 나타났다. 시판제제에서 치자의 geniposide, 작약의 paeoniflorin 및 황금의 baicalin이 0.88~2.53 mg/g, 0.27~2.76 mg/g 및 1.59~17.00 mg/g의 함량을 나타내는데 반하여, 탱액에서는 3.93 mg/g, 3.37 mg/g 및 23.47 mg/g으로 월등히 높은 함량으로 분석되었다.

본 연구에서는 앞의 성분 분석과 더불어 방풍통성산 제제의 항산화 및 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방세포 분화저해 및 ROS 생성저해 활성을 비교하였다.

방풍통성산 탱액과 시판제제의 항산화 활성을 비교하기 위하여 DPPH radical 소거활성과 SOD 유사활성을 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 활성 radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 정도를 측정하는 방법으로 분석하였으며, 이는 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 DPPH의 자색이 환원되어 탈색되는 정도를 통하여 항산화 효능을 알아내는 방법이다<sup>19,20)</sup>. 방풍통성산 탱액과 시판제제 2종의 DPPH radical 소거활성은 방풍통성산 탱액, 시판제제 B, 시판제제 A의 순으로 높게 측정되었다.

생체 내에 존재하는 항산화 효소인 SOD (superoxide dismutase)는 신체의 산화적 손상을 막고 노화를 억제하며 자유라디칼을 근본적으로 제거하는 것으로 알려져 있으며, 현재 항염증제나 피부 노화방지를 위한 화장품 재료 등에 이용되고 있다<sup>21,22)</sup>. 또한 체내에 활성산소가 과다 생성되었을 때에 다른 항산화제보다 자유라디칼의 제거에 우수한 효과를 나타내어<sup>23)</sup> 활성산소와 SOD반응의 특이성은 라디칼의 관련여부의 증명지표로 활용된다<sup>24)</sup>. 방풍통성산 시료의 SOD 유사활성을 측정한 결과 DPPH radical 소거활성의 측정 결과와 마찬가지로 방풍통성산 탱액에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 그 다음으로 시판제제 B에서 높은 활성이 확인되었다. 이러한 결과는 성분분석 결과와

도 유사하였다. 항산화 활성은 페놀산, 플라보노이드 및 폴리페놀 화합물에 의해 기인된다<sup>25</sup>)고 알려져 있는데, 방풍통성산에서 가장 높은 함량을 나타낸 baicalin은 황금에서 추출되는 flavonoid 성분으로 항산화 활성이 매우 우수한 것으로 알려져 있다<sup>26,27</sup>).

식생활의 서구화에 기인하는 생활환경의 변화로 전 세계적으로 증가 추세를 보이고 있는 비만은 대사 장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적되어 나타나며 당뇨병, 고혈압, 고지혈 등에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>28-30</sup>). 지질대사는 주로 간과 지방조직에서 일어나고 지방조직에서는 조직을 구성하는 지방세포에 의해 조절되며, 지방세포가 대사 장애로 인하여 과도하게 분화되거나 에너지가 과잉 공급되면 비만으로 발전하게 된다. 3T3-L1 세포는 지방전구세포로서 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 인슐린이나 그와 유사한 유도물질의 존재 하에서 지방세포(adipocyte cell)로 분화하는 성질을 갖고 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는데 널리 사용되고 있다<sup>31</sup>).

3T3-L1 지방전구세포를 배양한 결과 정상적인 성장이 이루어짐을 확인할 수 있었으며, MTT assay를 실시하여 방풍통성산 탱액 및 시판제제가 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 미치는 영향을 분석한 결과 5~1,000 µg/mL 농도에서 모두 세포독성을 전혀 유발하지 않음을 확인하였다. 이에 3T3-L1 지방전구세포에 대한 방풍통성산 탱액 및 시판제제의 항산화 및 항비만 활성을 평가하기 위한 처리농도는 독성이 없는 것으로 확인된 농도범위에서 수행하였다. 분화유도를 위해 첨가되는 insulin은 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 시 glucose uptake와 중성지방의 합성을 증가시키고, dexamethasone은 지방 분화에 영향을 주는 transcription factor인 C/EBPα의 필수적인 유도물질이다. IBMX는 지방분화세포에 직접적인 영향을 미치는 PPARγ와 transcription factor인 C/EBPα를 활성화시키는 물질로서, 이들은 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 이용된다<sup>32</sup>). 3T3-L1 세포의 분화 저해 효과를 측정하기 위하여 중성지방만을 붉은 색으로 염색하는 Oil Red O 염색법을 통해 3T3-L1 세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정한 결과, 시료를 처리하지 않고 분화를 유도한 경우 세포질 내 lipid droplet이 형성되어 붉게 염색되었으며, 방풍통성산 탱액은 농도 의존적으로 지방세포의 분화를 저해하였다. 또한 방풍통성산 탱액, 시판제제 A 및 시판제제 B를 200 µg/mL 처리하였을 때 43.75, 37.50 및 33.99%의 3T3-L1 세포의 분화 저해활성을 나타내어 방풍통성산 탱액이 시판제제보다 높은 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

ROS는 세포 또는 조직의 손상뿐만 아니라 염증, 노화 관련 변성, 종양의 생성 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>33</sup>). ROS의 과도한 생성과 ROS에 대한 세포 내의 적절한 방어 기전에 문제가 생길 경우, 여러 질환의 병인에 직·간접적으로 관여하게 된다<sup>34,35</sup>). 따라서 방풍통성산 시료가 3T3-L1 지방전구세포 분화과정 중 과도하게 생성되는 ROS의 억제에 미치는 영향을 측정하기 위하여 NBT assay를 이용하였다. 즉, 지방세포 내에 축적된 ROS와 반응한 NBT 용액은 dark blue formazan을 생성하게 되

며, 이를 용출하여 세포내 ROS 생성량을 알 수 있다<sup>36</sup>). 그 결과 방풍통성산 탱액을 처리하지 않은 대조군에 비하여 방풍통성산 탱액을 100 및 200 µg/mL 처리한 군에서 ROS 생성량이 각각 37.86%와 40.78% 정도 감소하는 것으로 나타났으며, 시판제제는 탱액보다는 낮은 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

이상의 실험 결과, 방풍통성산 탱액이 시판제제보다 주요 성분의 함량, 항산화 활성 및 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 항비만 활성에 대한 비교실험 결과에서 모두 높은 우수한 것으로 나타났으며, 시판제제 간에도 큰 차이를 나타냄을 확인하였다. 이는 제조사마다 사용하는 원료뿐만 아니라 추출조건, 건조조건 등 제형화를 위한 제조방식의 차이에서 기인하는 결과라고 사료된다. 제형화된 한약제제에 대한 소비자 및 한의사의 불신 해소뿐만 아니라 한약제제 산업의 발전을 위해서는 탱액과 비교하여 균일한 유효성분과 약효의 유효성이 확보되어야 할 것이다. 이를 위해서 한약제제 원료 및 제품의 품질관리 및 개선 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구는 방풍통성산 탱액 및 시판제제 2종에 대한 주요성분 및 생리활성을 비교하기 위하여 성분분석과 더불어 항산화 활성, 3T3-L1 세포의 분화 중 분화저해 및 ROS 생성저해 활성을 살펴보았다. 방풍통성산 제제의 성분분석 결과 7가지 주요성분이 모두 검출되었지만, liquiritin과 sennoside A를 제외한 모든 성분에서 탱액이 월등히 높은 함량을 나타내었다. DPPH radical 소거활성과 SOD 유사활성은 탱액에서 가장 높게 나타났으며, 시판제제 B에서 가장 낮았다. 방풍통성산 탱액은 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 농도 의존적으로 저해하였으며, 시판제제보다 높은 활성을 나타내었다. 또한 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정 중 생성되는 ROS에 대한 억제효과도 탱액이 시판제제보다 우수한 것으로 확인되었다. 이상의 결과 방풍통성산 탱액이 시판제제보다 주요 성분의 함량이 높고, 생리활성이 우수하였으며, 시판제제 간에도 큰 차이를 나타내어 균일한 품질의 한약제제 제조를 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약산업육성 기반구축사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Park, H.M., Choi, K.H., Jung, J.Y., Lee, S.D. Metal exposure through consumption of herbal medicine, and estimation of health risk among Korean population. *Kor J Env Health* 32: 186-191, 2006.
2. Won, J.B., Jeon, W.K., Ma, J.Y., Ma, C.J. Simultaneous determination of four bioactive constituents in Galgeun

- Tang by HPLC/DAD. *Kor J pharmacogn* 40: 224-228, 2009.
3. Chiang, H.W. A research on LiuWanSu(劉完素)'s medicinal theory. PhD Thesis, Dongguk University. pp 89-90, 2006.
  4. Hwang, M.J., Shin, H.D., Song, M.Y. Literature review of herbal medicines on treatment of obesity since 2000: Mainly about Ephedra Herba. *Journal of Society of Korean Medicine for Obesity Research* 7: 39-54, 2007.
  5. Bak, Y.H., Huang, D.S., Shin, H.K. The analysis of herbal medicine preparations equipped in traditional Korean medical clinics. *The Korean journal of oriental medical prescription* 18: 43-56, 2010.
  6. Hwang, S.J., Song, T.W., Oh, M.S. The Inhibitory Effects of Bangpungdongseoung-san on the obese gene and obese inhibitory about obese-mouse induced by high fat diet. *J Korean Oriental Med* 27: 11-22, 2006.
  7. Lee, S.M., Kim, B.W., Kwon, K.R., Rhim, T.J., Kim, D.H. The effect of Bangpungdongseoung-san extracts on adipocyte metabolism. *Journal of Pharmacopuncture* 11: 163-176, 2008.
  8. Cha, M.K., Lee, J.Y., Kim, D.G., Lee, K.T. Effects of Bangpungdongseoung-san on adipose tissue and hyperlipidemia of 3T3-L1 induced rats. *J Korean Orient Pediatr* 20: 177-196, 2006.
  9. Choi, E.M., Ryu, E.K. Effects of Fangfengdongsheng-san on obese patients. *Journal of society of Korean medicine for obesity research* 1: 57-62, 2001.
  10. Shin, D.H., Cho, G.H., Lee, H., Moon, M.K., Kang, D.G., Yun, Y.G., Park, D.S., Juhng, S.K., Lee, H.S. Clinical study of Bangpungdongseoung-san on body weight change in subjects with obesity. *The Korean Journal of oriental medical prescription* 16: 133-144, 2008.
  11. Kim, E.J., Park, H.J., Kim, H.J., Kim, J.H., Ann, J.Y., Lee, J.H., Kim, Y.K. A monitoring study of marker contents in the Hwangnyeonhaedok-tang ex preparations on the market. *Korean J Oriental Med Prescrip* 16: 95-107, 2008.
  12. Kim, J.H., Seo, C.S., Shin, H.K. The comparative study on decoctions of Ssanghwa-tang (Shuanghe-tang) extracted by different extraction conditions. *Korean J Oriental Med Prescrip* 18: 125-134, 2010.
  13. Bi, Z., Guo, J., Zhang, S., Li, P. Study on the variation of the main constituents in Gardeniae Fructus after compatibility with Scutellariae Radix. *Pharm Clini Res* 19: 29-31, 2011.
  14. Kim, N.M., Kim, D.H. Quality change of cinnamon extract prepared with various drying methods. *Korean J Food & Nutr* 13: 152-157, 2000.
  15. Kim, N.M., Sung, H.S., Kim, W.J. Effects of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean J Food Sci Technol* 25: 204-209, 1993.
  16. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* 181: 1199-1200, 1958.
  17. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Bio chem* 47: 469-474, 1974.
  18. Green, L.M., Reade, J.L., Ware, C.F. Rapid colorimetric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* 70: 257-268, 1984.
  19. Ancerewicz, J., Migliavacca, E., Carrupt, P.A., Testa, B., Brée, F., Zini, R., Tillement, J.P., Labidalle, S., Guyot, D., Chauvet-Monges, A.M., Crevat, A., LeRidant, A. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med* 25: 113-120, 1998.
  20. Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., Lee, J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinusedodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387, 2006.
  21. Bryan, D.M., Murnaghan, J., Jones, K.S., Bowley, S.R. Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increase winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol* 122: 1427-1438, 2000.
  22. Donnelly, J.K., McLellan, K.M., Walker, J.K., Robinson, D.S. Superoxide dismutase in foods. A Review. *Food Chem* 33: 243-270, 1989.
  23. Kim, Y.H., Lee, C.E., Kim, B.S. Study on cytotoxicity test and anti-oxidant activity of herb complex (*Phellinus Linteus*, *Glycyrrhiza uralensis* Fischer and *Centella asiatica*). *J Kor Soc Cosm* 17: 441-446, 2011.
  24. Ko, K.S. A study on antioxidant effect of methanol extract from *Viola mandshurica*. *J Kor Soc Cosm* 18: 1082-1086, 2012.
  25. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R., Moon, K.D. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984, 1995.
  26. Shang, X., He, X., He, X., Li, M., Zhang, R., Fan, P., Zhang, Q., Jia, Z. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol* 128: 279-313, 2010.
  27. Huang, W.H., Lee, A.R., Yang, C.H. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 2371-2380, 2006.

28. Després, J.P., Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881-887, 2006.
29. Jornayvaz, F.R., Samuel, V.T., Shulman, G.I. The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Annu Rev Nutr* 30: 273-290, 2010.
30. Kannel, W.B., Cupples, L.A., Ramaswami, R., Stokes, J. 3rd., Kreger, B.E., Higgins, M. Regional obesity and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *J Clin Epidemiol* 44: 183-190, 1991.
31. Green, H., Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133, 1974.
32. Rubin, C.S., Hirsch, A., Fung, C., Rosen, O.M. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 253: 7570-7578, 1978.
33. Kim, S.S., Son, S.M. Oxidative stress and cell dysfunction in diabetes : Role of ROS produced by mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Korean Diabetes J* 32: 389-398, 2008.
34. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344, 2003.
35. Fridlyand, L.E., Philipson, L.H. Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. *Ann N Y Acad Sci* 1066: 136-151, 2005.
36. Lee, S.Y., Kim, D.H., Woo, W.H. Antioxidant activity of black Panax ginseng. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 115-121, 2011.