

두개천골 약침의 항산화 활성 및 표준화 연구

박수호* · 박진호* · 장은하* · 이호성[†] · 이대연[†] · 조주휘[†] · 이영우[†] · 이인희[†] · 황의형^{‡,§}

본수호 한의원*, FL 원외탕전원[†], 부산대학교 한의학전문대학원 임상의학 3교실[†], 부산대학교한방병원 한방재활의학과[§]

Study on Antioxidant Activity and Standardization of Craniosacral Pharmacopuncture

Soo-Ho Park, K.M.D.*, Jin-Ho Park, K.M.D.*, Eun-Ha Jang, K.M.D.*, Ho-Sung Lee, K.M.D.[†], Dae-Yeon Lee, K.M.D.[†], Ju-Hwi Jo[†], Young-Woo Lee[†], In-Hee Lee, Ph.D.[†], Eui-Hyoung Hwang, K.M.D.^{‡,§}

Bone-sooho Korean Medicine Clinic*, FL Herbal Dispensary[†], Third Division of Clinical Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University[†], Department of Korean Medicine Rehabilitation, Pusan National University Korean Medicine Hospital[§]

RECEIVED December 26, 2023

REVISED December 29, 2023

ACCEPTED January 5, 2024

CORRESPONDING TO

Eui-Hyoung Hwang, Third Division of Clinical Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 20 Geumo-ro, Mulgeum-eup, Yangsan 50612, Korea

TEL (055) 360-5951

FAX (055) 360-5559

E-mail taichi@pusan.ac.kr

Copyright © 2024 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives The craniosacral therapy is closely related to the herbal meridians, so we try to explore, compare and develop pharmacopuncture that can have a synergistic effect.

Methods The craniosacral pharmacopuncture, *Hominis placenta* pharmacopuncture, jungseongohyeol pharmacopuncture, bamboo salt pharmacopuncture 1.8%, bamboo salt pharmacopuncture 3.0%, and normal saline, which are used with craniosacral therapy in clinical practice, were all made and prepared by ourselves. In order to compare antioxidant activity, 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ferric reducing antioxidant powder, total flavonoids, total phenolics methods were all measured. Method validation such as specificity, linearity, precision, and accuracy were performed for craniosacral pharmacopuncture.

Results In all antioxidant methods, craniosacral pharmacopuncture showed the highest activity and followed by a *Hominis placenta* pharmacopuncture. The rest of the pharmacopunctures were measured to have low antioxidant activity. Nodakenin and glycyrrhizin were suitable as index compounds of craniosacral pharmacopuncture and they contained $0.82 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ and $2.56 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ respectively.

Conclusions Craniosacral pharmacopuncture has the highest activity in all antioxidant activity experiments, which will help activate craniosacral therapy and quality control is possible through standardized research. Such research will contribute to the development of the oriental medicine industry. (*J Korean Med Rehabil* 2024;34(1):1-10)

Key words Craniosacral pharmacopuncture, High performance liquid chromatography, Antioxidants, Craniosacral therapy

서론»»»»

두개천골 추나는 두개천골계 고유의 리듬을 촉진하여 비정상적인 리듬을 진단하고, 두개골과 두개골융합 및

경막계의 뇌척수액의 정상리듬의 균형을 조정해주는 치료행위라고 정의하고 있다¹⁾. 두개골에 외부에서 압력을 가하였을 때, 중추신경계와 자율신경계를 활성화시키고 자연치유력을 증가시켜 신경계, 근골격계, 혈관계, 림프

계, 내분비계, 호흡기계 등에 기능을 증진시키는 기법이 다. 이는 두개골 사이에 봉합되는 부분을 관절로써 인식하고 움직임을 통제하므로²⁾ 뇌와 척수를 둘러싸고 있는 경막, 뇌척수액의 생산 조절과 관련된 구조물들에 영향을 주기 때문이다³⁾. 이러한 두개천골 요법은 한의학의 경락과도 상호보완관계에 있다는 보고⁴⁾가 있다. 약침은 한약재들의 유효성분을 여러 가지 방법으로 추출하여 해당질환에 적합한 경혈 또는 통증부위에 주입하는 치료법으로 경혈의 치료 효과 및 약제의 약리작용이 복합적으로 나타난다⁵⁾. 한의학의 경락에서 비롯되어 상용화된 약침은 적합한 도움을 줄 수 있는 처방의 약리효과와 함께 두개천골 추나치료를 접목시킨다면 높은 시너지 (synergy) 효과가 있을 것으로 기대되는데, 한의계 일부에서는 두개천골 추나와 함께 자하거약침, 죽염약침, 중성어혈약침 등 다양한 약침들을 적용하고 있다.

본 연구의 두개천골 약침(craniosacral pharmacopuncture, CSP)은 사물탕, 이진탕, 자하거 처방에 보완할 수 있는 약제를 추가하였다. 사물탕은 월경불순, 갱년기 장애 등에 주로 사용되며⁶⁾, 허혈성 뇌질환⁷⁾, 항경련⁸⁾, 면역강화⁹⁾ 등의 연구들이 보고되어 있어 주로 혈액순환이나 혈(血)을 보(補)하는 처방이다. 이진탕은 담음(痰飲)을 제거하는 데에 사용되는 처방이다^{10,11)}. 소화기 질환¹²⁾, 역류성 식도염¹³⁾ 등의 연구들이 보고되어 있으며 최근 장내미생물 조절을 통해 지방간 및 당뇨병을 개선하고¹⁴⁾ 만성 폐쇄성 폐질환에도 효능¹⁵⁾이 있다고 하였다. 자하거는 월경통¹⁶⁾, 골다공증¹⁷⁾, 골관절염¹⁸⁾ 등에 사용되며 특히 만성피로 같은 허로(虛勞)증에 다빈도로 처방된다^{19,20)}. 이들 조합에 의한 CSP는 이진탕으로 노폐물을 제거하고, 림프순환을 촉진시키며, 사물탕으로 혈을 보하고, 더불어 자하거로 양분을 공급한다는 측면에서 두개천골 추나 기법에 매우 어울리는 처방이라 할 수 있다.

약제의 약리작용은 어떤 약제별 조합인가도 중요한 부분이지만, 어떤 추출법에 따라 추출하였는지에 따라 전혀 다른 효능을 보일 수도 있다²¹⁾. 이처럼 생리활성을 가지는 천연재료의 활용을 위해서는 천연물 소재의 특징에 어울리는 추출공정이 매우 중요하다²²⁾. CSP는 일반적인 약침의 추출법인 증류추출 기법이 아닌 추출정제 기법을 사용하였다²³⁾. 물을 용매로 열을 가하고 발생하는 증기를 포집하는 증류 추출법으로는 위와 같은 유효성분들이 추출될 수 없다. 추출정제 기법은 약제의 특

성에 따라 최대한 유효성분들을 추출하고, 불필요한 성분같은 무효성분들은 모두 제거를 하는 기법이다.

본 연구에서는 두개천골 요법과 시너지 효과를 볼 수 있는 약침을 개발함에 있어 그에 대한 효능 정도를 다양한 항산화능 측정기법을 통해 확인하려 하였고, 아울러 선정된 약침을 약으로써의 근거 확립을 위하여 표준화 공정의 일환으로 분석법 밸리데이션을 수행하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법»»»»

1. 시료 및 기기

항산화 실험에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)은 Alfa Aesar (MA, USA)에서 구입하였으며 2,2-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium persulfate, $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, 2, 4, 6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, trolox, gallic acid, quercetin은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하였다. 동결건조기는 일신바이오베이스(Lyoph-Pride03; 양주)를 사용하였고 감압농축기는 Eyela (N-2110; Japan)를 사용하였다. Microplate reader는 Biotek (Epoch2; USA)을 사용하였으며 HPLC는 Shimadzu (Japan)의 LC-20A, CBM-20A, LC-20AT, SIL-20AC, CTO-20AC, DGU-20A5R, SPD-M20A, LC-PDA 모델을 사용하였다. 정량분석 실험에 사용된 glycyrrhizin, nodakenin 표준품은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 이동상으로 사용된 acetonitrile (ACN)과 water는 HPLC grade로 Honeywell (NJ, USA)의 제품을 사용하였고, formic acid는 Junsei Chemical (Japan)에서 구입하였다.

2. 약침의 조제

본 연구에 사용된 숙지황, 당귀, 천궁, 백작약, 진피, 복령, 감초, 어성초, 자하거는 모두 한퐁어(포천)에서 구입하였으며 식품의약품안전처에서 인증한 우수한약 제조 및 품질 관리 기준이 적용된 한약재를 사용하였다. CSP의 구성약재 중 자하거를 제외한 모든 약제를 총 300

g으로 3 L의 70% 주정으로 3시간 환류추출 하였다. 여과한 후 감압농축기로 농축시킨 여액을 1 L의 80% 주정으로 녹여내고 1시간 동안 교반한 후 냉침여과하였다. 동일한 과정으로 90% 주정 처리한 후 전량 감압농축 후 증류수에 녹이고, 여과한 뒤 동결건조하였다. 동결건조된 분말에 자하거 가수분해물과 증류수를 첨가하고 제균 여과 및 고온고압증기멸균 후 검체로 사용하였다. 자하거 약침(*Hominis placenta pharmacopuncture*, HP)은 자하거 가수분해물을 제균 여과 후 약침용 바이알에 옮겨 담고 고온고압 증기멸균 하였다. 중성어혈약침(*jungseongohyeol pharmacopuncture*, JP)은 일반적인 증류약침과 동일하게 환류추출장치에 증기를 포집할 수 있게끔 냉각기를 연결하여 증류된 약액을 받고 여과 후 멸균하였다. 죽염약침(*bamboo salt pharmacopuncture*, BP)은 1.8%, 3%로 죽염을 증류수에 녹이고 제균 여과 및 고온고압증기멸균 하였다.

3. 항산화 활성 측정

1) DPPH, ABTS, ferric reducing antioxidant powder (FRAP)

DPPH 활성을 측정하기 위하여 EtOH로 녹인 0.2 mM의 DPPH 용액과 검액을 동량으로 혼합한 후 30분간 실온에서 반응시켰다. 517 nm의 microplate reader로 흡광도를 측정하였다²⁴⁾. ABTS 활성을 측정하기 위하여 7.4 mM 농도의 ABTS 용액을 암소에서 12시간 방치하여 ABTS⁺ 이온을 만들어 사용하였다. ABTS⁺ 이온이 형성되어 있는 용액 190 µL와 검액 10 µL를 혼합하고, 10분간 방치한 후 750 nm 파장의 흡광도를 측정하였다²⁵⁾. 철이온에 대한 환원력을 측정하기 위하여 FRAP를 시행하였다. pH 3.6, 300 mM acetate buffer와 HCl 40 mM를 혼합한 용액과 10 mM TPTZ 용액, 20 mM FeCl₃ · 6H₂O를 10:1:1로 혼합하였다. 혼합된 용액 190 µL와 검액 10 µL를 혼합하고 4분간 방치 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다²⁶⁾. 3가지 항산화 활성 측정 모두 trolox를 표준물질로 대비하였으며, 500, 100, 50, 10, 5, 1 ppm의 농도를 사용하였다. 측정치로 표준곡선을 그리고 검액의 흡광도 값을 대입하여 계산하였고, 표준곡선의 R²값은 0.95 이상을 유효값으로 하였다.

2) 총 플라보노이드 화합물(total flavonoids, TF), 총 페놀화합물(total phenolics, TP) 측정

TF 함량을 측정하기 위하여 각 검액 100 µL와 diethyleneglycol 1 mL를 혼합한 뒤 증류수로 1 N NaOH 100 µL를 첨가하였다. 충분히 혼합한 후 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 415 nm microplate reader로 흡광도를 측정하였다²⁷⁾. 각 검체에 함유되어 있는 총 페놀 함량은 비색법에 따라 측정하였다²⁸⁾. 각 검체 50 µL와 2% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 혼합한 뒤 50% folin-cioaltau's phenol reagent 50 µL를 첨가하고 빛을 차단한 상태로 1시간 동안 반응시켰다. 750 nm 파장에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

TF는 대표적인 flavonoid인 quercetin을 표준물질로 하였으며, TP는 gallic acid를 표준물질로 하였다. 표준물질은 모두 100, 50, 10, 5, 1 ppm의 농도로 희석하였고 표준곡선을 그려 검액의 흡광도 값을 대입하여 계산하였다. 표준곡선의 R² 값은 0.95 이상을 유효값으로 설정하였다.

4. 분석법 벨리데이션

당귀의 nodakenin, 감초의 glycyrrhizin을 표준물질로 CSP의 표준화를 위해 식품의약품안전처의 '의약품 등 시험방법 벨리데이션 가이드라인'에 따라 특이성, 직선성, 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성, 정확성을 평가하였다²⁹⁾. CSP의 지표성분으로 선정된 nodakenin은 ACN (A)과 water (B)를 사용하여 (A)/(B)=10/90 (10분)→30/70 (25분)→50/50 (40분)의 기울기 조건으로 330 nm에서 측정하였다. 컬럼오븐은 35 °C, 사용된 컬럼은 C18 ODS 25 cm×I.D 5.0 µm이고 유속은 1 mL/min으로 유지하였다³⁰⁾. Glycyrrhizin은 35% ACN에 0.1% phosphoric acid를 첨가한 이동상으로 기울기 조건없이 245 nm에서 측정하였다. 사용컬럼 및 컬럼오븐, 유속은 nodakenin과 동일하였다³¹⁾.

1) 특이성

CSP가 함유하고 있는 nodakenin과 glycyrrhizin의 peak 머무름 시간(retention time, RT)과 해당 peak의 흡수 spectrum을 각각의 표준품들과 비교하여 일치도를 확인하였다.

2) 직선성, LOD, LOQ

Nodakenin 표준품 0.26, 0.52, 1.04, 2.08, 4.16 µg/mL 농도와 glycyrrhizin 표준품 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00 µg/mL 농도를 각각 증류수에 녹이고 각 농도별로 3회씩 반복 측정하였다. 검량선의 직선성 상관계수(R²)를 구하여 직선성을 평가하였다. LOD, LOQ는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 산정하였다.

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

σ: y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기

3) 정밀성, 정확성

Nodakenin 0.52, 1.04, 2.08 µg/mL 표준품과 glycyrrhizin 2.00, 4.00, 8.00 µg/mL 표준품을 증류수에 녹여 준비하고 각 농도별 3회씩 반복 측정하였다. 상대표준편차(relative standard deviation, RSD; %)를 계산하고 반복성을 측정하여 정밀성을 평가하였고, 회수율(%)을 구하여 정확성을 평가하였다.

5. 통계

본 연구의 항산화 활성 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 두었으며, 평균±표준편차로 표현하였다.

결과»»»»

1. 항산화 활성

두개천골 요법에서 효능정도를 확인하기 위하여 두개천골 요법과 함께 다빈도로 사용되는 약침들의 항산화 활성을 측정하였다.

ABTS 측정결과 CSP, HP, JP, BP 1.8%, BP 3.0%, nor-

mal saline (N.S)는 각각 199.10±1.31, 180.81±2.52, 36.34±2.21, 16.09±1.35, 11.98±1.84, 0.00±0.00 ppm의 trolox와 동일한 효능을 보였다(Fig. 1A). DPPH 측정결과 86.55±0.65, 28.19±0.76, 3.01±0.44, 2.71±1.16, 7.19±0.73 ppm의 trolox와 동일한 효능을 보였다(Fig. 1B). FRAP 측정결과 327.66±2.76, 2.96±0.16, 0.00±0.00, 0.00±0.00, 0.35±0.27, 0.00±0.00 ppm의 trolox와 동일한 효능을 보였다(Fig. 1C). TF에서는 273.68±5.66, 14.10±0.24, 13.26±0.64, 12.82±0.20, 12.42±0.50, 13.26±0.96 ppm에 해당하는 quercetin 만큼의 플라보노이드 함량을 보였다(Fig. 1D). TP에서는 37.33±0.14, 14.62±0.89, 1.53±0.16, 1.45±0.07, 1.30±0.16, 1.38±0.14 ppm에 해당하는 gallic acid 만큼의 페놀화합물 함량을 보였다(Fig. 1E). 각 측정법에서 표준물질로 사용된 trolox, quercetin, gallic acid를 농도별로 측정하여 표준곡선을 그렸을 때 R²값이 ABTS, DPPH, FRAP, TP는 1.00, TF는 0.99로 모두 0.95 이상을 보여 모두 유효값으로 인정하였다. 통계적으로 활성을 비교하였을 때, ABTS에서는 BP 1.8%와 BP 3.0%가 차이가 없었고, DPPH에서는 JP와 BP 1.8%가 차이가 없었으며, FRAP와 TF에서는 CSP를 제외한 모든 약침이 동일한 정도의 효능을 보였다. TP에서는 CSP와 HP를 제외한 모든 약침에서 동일한 정도의 효능을 보였다.

2. 분석법 밸리데이션

1) 특이성

Nodakenin과 glycyrrhizin은 각각 19.85, 12.27 min의 RT를 보였다. 해당 peak의 RT값에서 표준품과 검체의 흡수 스펙트럼을 확인한 결과 모두 같은 패턴의 스펙트럼을 보여 동일한 물질로 간주하였다(Fig. 2A, B).

2) CSP의 지표물질 함량측정

밸리데이션을 통하여 지표물질로서 적합함을 확인한 nodakenin과 glycyrrhizin의 표준곡선에 CSP의 면적값을 대입하여 함량을 측정하였다. Nodakenin은 0.82±0.01 µg/mL, glycyrrhizin은 2.56±0.01 µg/mL이 함유되어 있었다(Fig. 2A, B).

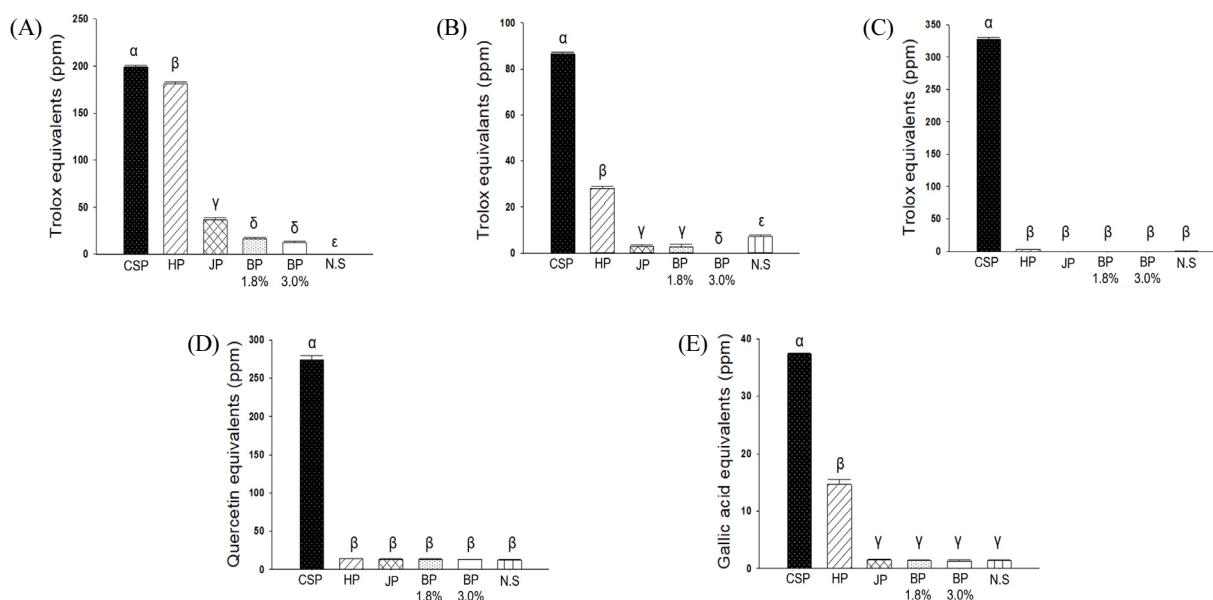


Fig. 1. Comparison of antioxidant activities of pharmacopunctures. (A) ABTS free radical scavenging, (B) DPPH free radical scavenging, (C) FRAP, (D) TF, (E) TP. Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments. Statistically significant differences between bars are indicated with different Greek alphabet characters; same alphabet characters imply no significant difference between bars ($p < 0.01$). ABTS: 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, FRAP: ferric reducing antioxidant powder, TF: total flavonoids, TP: total phenolics, CSP: craniosacral pharmacopuncture, HP: *Hominis placenta* pharmacopuncture, JP: jungseongohhyeol pharmacopuncture, BP: bamboo salt pharmacopuncture, N.S: normal saline.

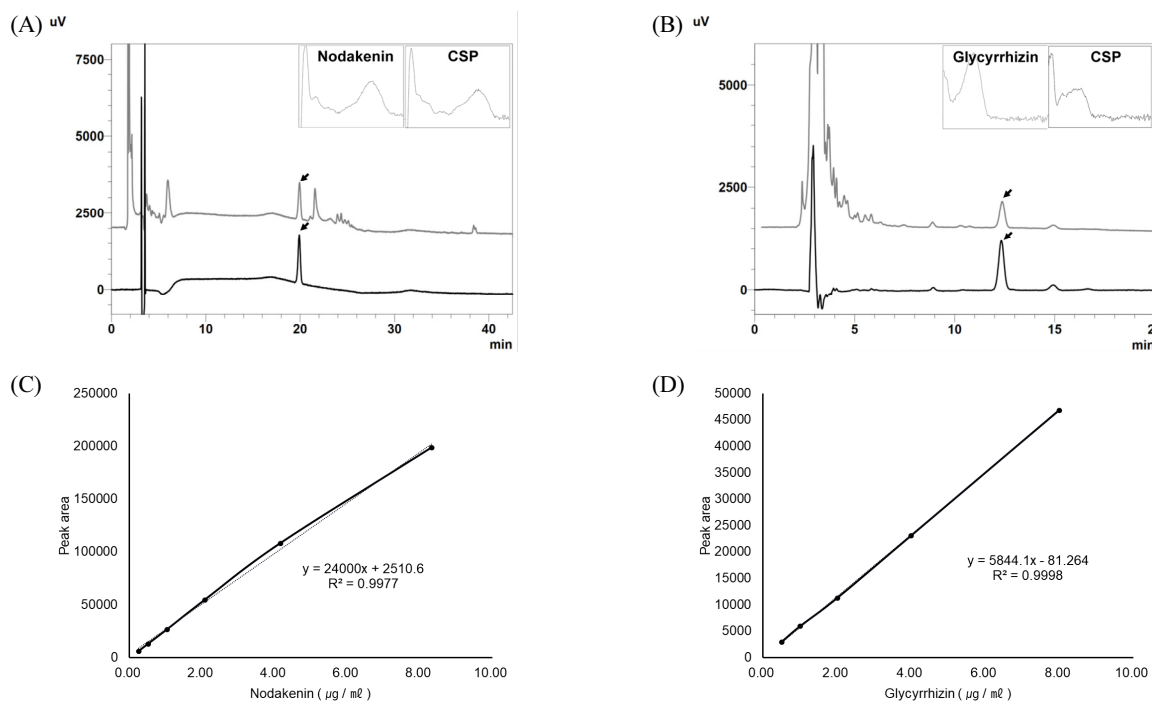


Fig. 2. Analysis of index compounds of CSP by HPLC. (A) HPLC chromatogram and wave length spectrum of nodakenin and CSP, (B) HPLC chromatogram and wave length spectrum of glycyrrhizin and CSP. (C) Calibration curve of nodakenin, (D) calibration curve of glycyrrhizin, gray line represents the CSP chromatogram while black line represents the standard chromatogram. CSP: craniosacral pharmacopuncture.

Table I. The Linearity, Regression Equation, Correlation Coefficient (R^2), and LOD and LOQ for Measurement of Standard Components by HPLC-PDA

Components	Regression equation* (n=3)	R^2	LOD [†] (μg/mL)	LOQ [‡] (μg/mL)
Nodakenin	$y=24000x+2510.6$	0.9977	0.043	0.129
Glycyrrhizin	$y=5903.2x-230.18$	0.9999	0.054	0.164

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

*y: peak area, x: amount (μg/mL), [†]LOD: $3.3 \times (\text{SD of the response/slope of the calibration curve})$, [‡]LOQ: $10 \times (\text{SD of the response/slope of the calibration curve})$.

Table II. Analytical Results of Accuracy and Precision Test for Standard Materials by HPLC

Components	Spiked amount (μg/mL)	Measured amount (μg/mL, n=3)	RSD* (%)	Recovery [†] (%)
Nodakenin	0.50	0.52±0.85	0.74	102.84
	1.00	1.04±0.62	0.54	98.85
	2.00	2.08±0.14	0.13	99.90
Glycyrrhizin	2.00	2.00±2.20	2.04	99.89
	4.00	4.00±0.33	0.29	100.86
	8.00	8.00±0.50	0.45	100.17

HPLC: high performance liquid chromatography.

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

3) 직선성, LOQ, LOD

Nodakenin과 glycyrrhizin은 농도별로 측정하고 표준 곡선을 그렸을 때, R^2 값이 1.00 높은 직선성을 보였다 (Fig. 3A, B). Y절편의 표준편차와 기울기로 계산한 결과 nodakenin의 LOD는 0.043 μg/mL 이었으며 LOQ는 0.129 μg/mL 였다. Glycyrrhizin의 LOD는 0.054 μg/mL, LOQ는 0.164 μg/mL 였다(Table I).

4) 정밀성과 정확성

Nodakenin의 상대표준편차(RSD)는 0.50, 1.00, 2.00 μg/mL 농도에서 각각 0.74, 0.54, 0.13%이고, 회수율은 102.84, 98.85, 99.90%이었다. Glycyrrhizin의 RSD는 2.00, 4.00, 8.00 μg/mL 농도에서 각각 2.04, 0.29, 0.45% 였으며, 회수율은 99.89, 100.86, 100.17%로 모든 수치가 5% 이내로 측정되어 안정적인 지표물질로 확인되었다(Table II).

고찰»»»»

두개천골 추나는 한의학적 관점에서 도인추나와 유사성이 많으며 한약, 침 등 다양한 한방치료와 접목하면 다양한 전신 질환에 적용이 가능하다³²⁾. 이에 본 연구에서는 한방산업 소재인 약침과 접목을 통해 두개천골 추나의 시너지 효과를 보고자 했다. 최근 한방산업은 근거를 중시하는 시대적 흐름에 맞춰 한약도 약의 3대 요소인 유효성, 안전성, 안정성과 관련된 요구가 많아지고 있다³³⁾. 이에 두개천골 약침을 선정 또는 개발하는데 있어 유효성과 품질관리의 기틀을 마련하기 위한 분석법 밸리데이션을 확립하는 데에 목적을 두었다.

한약재는 천연재료로서 다양한 활성물질을 함유하고 있기에 온도, 압력 같은 물리적 차이나 용매, 염도, pH 등 화학적 차이^{34,35)}에 의해 추출되는 물질에 현저히 차이가 있을 수 있어 추출되는 방법은 매우 중요한 부분이라 할 수 있다. 한약재의 구성물질 중 생리활성을 보이는 유효성분들은 화학 구조적으로 alkaloids, phenolics, flavonoids, terpenoids, glycosides나 그들의 유도체인 경우가 대부분이다. 이 화합물들은 공통적으로 물 또는 주정 같은 용매를 이용하여 열 또는 초음파 등과 같은 물리적 충격을 주었을 때 잘 추출되어 해당용매에 용해되어 있는 상태로 존재한다³⁶⁾. 일반적으로 많이 사용되는 약침들은 대부분 증류기법으로 추출한 약침들이다. 증류추출은 향료를 제조할 때 보편적으로 사용되는 추출 기법이다. 화학적으로 향기의 성분을 추출할 수는 있지만, 그 외에 실질적인 유효성분들을 추출하기에는 적합하지 않다. 한약은 단일성분이 아니라 다양한 유효성분들의 시너지를 이용한 효과를 기대하는 치료법이지만, 증류추출 한 경우는 대부분의 유효성분들이 추출될 수

없기에 치료효과를 기대하기는 어렵다³⁷⁾. 이에 CSP는 최초추출에서부터 향기성분을 뽑아내는 증류추출이 아닌 추출 후 불필요한 성분들을 하나하나 제거해나가는 기법인 추출정제 기법을 사용하였다.

CSP의 지표물질은 nodakenin과 glycyrrhizin으로 선정하였다. Nodakenin은 인지 기능과 해마 신경 발생 향상³⁸⁾, 알레르기 염증 억제³⁹⁾ 등의 효능을 가지고 있으며, glycyrrhizin은 허혈성 뇌손상을 약화시키고⁴⁰⁾, 자가면역 뇌척수염에 효능이 있다는 점⁴¹⁾에서 효능물질이자 지표물질로서 선정이 가능하였으며, 이러한 유효성분들을 함유하고 있는 CSP는 두개천골 주사와 함께 병용 사용하면 시너지 효능을 기대할 수 있다.

본 연구에서 두개천골 요법에 적합한 약침을 선정하기 위한 비교실험기법으로 다양한 항산화 활성기법을 사용하였다. 약침의 활성도를 측정하기 위하여 다양한 기법들의 항산화활성이 사용된다⁴²⁾.

ABTS 측정법은 라디칼 소거능 측정이라는 부분은 DPPH와 동일하지만 친수성과 소수성 모두에 적용이 가능하다는 점에서 차이가 있다^{43,44)}. FRAP는 철이온을 환원시키는 정도를 확인할 수 있는 방법으로 다른 항산화 활성 측정법과 기전상 차이가 있다⁴⁵⁾. TF나 TP의 함량은 전자공여능 등과 비례하여 높을수록 항산화 활성이 향상된다는 보고⁴⁶⁾에 따라 항산화 효능을 검증하는 지표로 사용되었다. 더욱이 페놀화합물에 존재하는 phenolic hydroxyl (OH)기는 단백질에 결합하여 다양한 생리작용을 가지는 것으로 보고되어 있다⁴⁷⁾. 측정결과 CSP는 모든 기법에서 유의성 있게 가장 높은 활성도를 보였으며, ABTS, DPPH, TP에서는 CSP보다는 낮지만 HP도 활성을 보였다. 이외의 약침들은 모두 현저히 낮은 활성도를 보였다(Fig. 1). 이는 추출법에 의하여 추출되는 생리활성성분들 및 함량의 차이에 의한 것으로 사료된다.

최근 요구되고 있는 안전한 양질의 약을 환자들에게 공급하기 위해서는 품질관리가 필수적으로 필요하다. 조제시마다 동일한 처방에 대한 약을 동일하게 하기 위하여 해당 약의 지표성분의 함량을 측정해야 하고 그를 위하여 분석법 밸리데이션이 필요하다. 항산화활성을 통해 선정된 CSP를 nodakenin과 glycyrrhizin을 지표성분으로 분석법 밸리데이션을 수행하였다. 직선성은 R²값이 모두 1.00이었고 정량한계, 검출한계가 5.00 µg/mL 보다 낮았으며 정확성에서 ±5% 이하의 편차를 보여(Fig. 2,

Tables I, II) nodakenin과 glycyrrhizin은 CSP의 지표물질로서 확정하였다. 이러한 한약의 표준화적 연구는 비록 천연물질로 이루어져 있지만, 좀 더 체계적인 한약조제의 기틀이 될 것이며 한방산업 발전에 발판이 될 수 있다.

한방산업이 발전됨에 따라 안전하며, 효능에 대한 근거가 있는 양질의 약이 필요하고 그를 위하여 한약의 과학화, 표준화는 필수적이다. 본 연구에서는 CSP를 두개천골 요법과 함께 사용하기 위하여 근거를 확립하고 표준화하려는 시도적 연구를 수행하였다. 하지만, 아직까지는 모니터링 차원의 연구일 뿐이었으며, 구체적이고 깊이 있는 추출법, 성분들에 대한 효능 기전 등 다양한 연구가 지속적으로 수행되어야만 한다. 이러한 시도들이 단순히 CSP뿐 아니라 한방업계 전체의 발전에 이바지될 수 있기를 기원한다.

결론»»»»

두개천골 요법을 할 때 병행처치 할 약침을 다양한 항산화 활성기법으로 비교 탐색하였고, 해당 약침의 표준화를 위하여 분석법 밸리데이션을 진행하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ABTS 기법에서 CSP>HP>JP>BP 1.8%, BP 3.0% 순으로 통계적으로 높은 활성을 보였고, N.S는 활성을 보이지 않았다. 타 약침에 비하여 CSP와 HP가 높은 활성을 보였다.
2. DPPH 기법에서 CSP>HP>N.S>JP, BP 1.8% 순으로 통계적으로 높은 활성을 보였고, BP 3.0%는 활성을 보이지 않았다. 타 약침에 비해 CSP가 월등히 높은 활성을 보였다.
3. FRAP 기법에서 CSP>HP, N.S, JP, BP 1.8%, BP 3.0% 순으로 통계적으로 높은 활성을 보였으나 CSP를 제외한 나머지는 거의 활성을 보이지 않았다.
4. TF 기법에서 CSP>HP, N.S, JP, BP 1.8%, BP 3.0% 순으로 통계적으로 높은 활성을 보였으나 CSP를 제외한 나머지는 매우 낮은 활성을 보였다.
5. TP 기법에서 CSP>HP>JP, BP 1.8%, BP 3.0%, N.S 순으로 통계적으로 높은 활성을 보였고 타 약침에

비하여 CSP와 HP가 높은 활성을 보였다.

6. CSP와 nodakenin, glycyrrhizin 표준품은 동일한 흡수과장 spectrum을 보여 특이성을 확인하였고, R²값이 모두 1.00으로 높은 직선성을 보였다. Nodakenin의 LOD는 0.043 µg/mL, LOQ는 0.129 µg/mL였고, glycyrrhizin의 LOD는 0.054 µg/mL, LOQ는 0.164 µg/mL였다. 회수율은 모두 5% 이내로 nodakenin과 glycyrrhizin은 CSP의 지표물질로 적합하였다.

이러한 결과로 보아, 두개천골 약침을 안전하고 효용성 있게 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 이는 항산화 활성과 약침의 표준화 위주로 결과를 본 것이므로, 차후 한의학 임상 현장에서의 본 약침들을 사용한 후향적 차트 리뷰 등의 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

References>>>>

1. Korean Society of Chuna Manual Medicine for Spine & Nerves. Chuna manual medicine. 2.5th ed. Seoul:Korean Society of Chuna Manual Medicine for Spine & Nerves. 2017:103.
2. Greenman PE. Greenman's principles of manual medicine. 4th ed. Seoul:Youngmoonsa. 2007:175.
3. Beauregard M, Lévesque J. Functional magnetic resonance imaging investigation of the effects of neurofeedback training on the neural bases of selective attention and response inhibition in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*. 2006;31(1):3-20.
4. Soh KS, Park JH, Shin YJ, Kim HJ, Lee MJ. A research on the physiological mechanism of craniosacral therapy. *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine*. 2009;19(1):103-12.
5. Yook TH. Clinical observation about the extent of improvement of low back pain patient through medi-acupuncture therapy. *Journal of Korean Medical Science*. 1995;16(1):184-97.
6. Lee HY, Ha HK, Jung DY, Lee NH, Shin HK. Immuno stimulatory activities of Samul-tang, Sagunja-tang, Pamul-tang and Sipjeondaebotang in vitro. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2010;21(4):41-51.
7. Kang SS. Recommended prescription of herbs. Seoul: Daesung Culture Press. 1993:122-3.
8. Li R, Qin L, Wang Y. Experimental study on preventive effect of traditional Chinese medicine replenishing recipe on acute oxygen toxicity caused by hyperbaric oxygen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1998;18(10):623-5.
9. Park HR, Kim SH, Yee ST, Byun MW, Jo SK. Effect of a herb mixture (HIM-I) on the protection of the hematopoietic-immune system and self-renewal tissues against radiation damage. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2005;34(5):605-12.
10. Kim BS, Lim HY, Kim DW, Choi BH, Hur JI, Kim DJ, Cho CK, Byun JS, Oh JH. Three cases report of functional dyspepsia patients who were administered by LJTG (Ljintang-Gamibang). *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2005;26(3):641-51.
11. Han SY, Yoon SH. Effect of Yijin-tang on gastric motility between normal intact and partial pyloric obstructed rats. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2009;30(1):107-18.
12. Choi JW, Lee CH, Ko BM, Lee KG. Effects of Yijin-tang extract on the immunoreactive cells of gastrin, histamine and somatostatin in rats stomach. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2001;15(4):554-9.
13. Hwang GY, Kim DJ, Byun JS. Effects of Yijin-tang-gamibang extracts on reflux esophagitis. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2009;23(5):1073-9.
14. Lee JE, Lee SM, Jung J. Integrated omics analysis unraveled the microbiome-mediated effects of Yijin-Tang on hepatosteatosis and insulin resistance in obese mouse. *Phytomedicine*. 2020;79:153354.
15. Rho J, Seo CS, Hong EJ, Baek EB, Jung E, Park S, Lee MY, Kwun HJ. Yijin-Tang attenuates cigarette smoke and lipopolysaccharide-induced chronic obstructive pulmonary disease in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022;2022:7902920.
16. Kang WC, Cho JH, Lee YW, Son CG, Cho CK, Yoo HS. Effect of hominis placenta herbal acupuncture (HPA) on menstrual cramps. *Journal of Pharmacopuncture*. 2005;8(1):45-9.
17. Seo TB, Han IS, Yoon JH, Seol IC, Kim YS, Jo HK, An JJ, Hong KE, Seo YB, Kim DH, Park SK, Yang DC, Namgung U. Growth-promoting activity of hominis placenta extract on regenerating sciatic nerve. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2006;27(1):50-8.
18. Kim JK, Kim TH, Park SW, Kim HY, Kim SH, Lee SY, Lee SM. Protective effects of human placenta extract on cartilage degradation in experimental osteoarthritis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010;33(6):1004-10.
19. Song KC, Seo JY, Cho MU, Song SB, Choi BS, Ryu WH, Kim DR, Jeon YH. Case report of patients diagnosed with spinal stenosis treated by hominis placenta

- megadose pharmacopuncture combined with Korean medicine treatment. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2018;32(2):141-7.
20. Shin H, Lee JH, Kang HW. A systematic review of placenta pharmacopuncture for neuropsychiatric diseases in practice. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2022;33(2):157-80.
 21. Shin YB, Lee HJ, Kim JS, Lee YK. Analgesic effects of taxus cuspidata pharmacopuncture using different extraction methods on the formalin-induced pain model. *The Acupuncture*. 2016;33(3):17-28.
 22. Cho YJ, Lee SK, Ahn YH, Pyee JH. Development of ultrasonication-assisted extraction process for manufacturing extracts with high content of pinosylvin from pine leaves. *Journal of Korean Society of Agricultural Engineers*. 2003;28(4):325-34.
 23. Lee DY, Choi BS, Lee IH, Kim JH, Gwon PS. Comparison of index compounds content and antioxidative activity of wild ginseng pharmacopuncture by extraction methods. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2018;39(3):313-22.
 24. Kim JS, Kim KL. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of artemisiae capillaris extract. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*. 2015;13(6):805-12.
 25. Lee KW, Cho HK, Yoo HR, Seol IC, Kim YS. The effects of an extract of fermented artemisiae iwayomogii herba, curcumae longae, crataegi fructus and salviae miltiorrhizae radix on anti-inflammation associated with dyslipidemia and anti-oxidation in RAW264.7 and HUVEC cells. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2018;39(4):480-94.
 26. Song SY, Kim MK, Ha HY. Optimal extraction conditions of phenolic compounds, flavonoids and chlorogenic acid of lonicera japonica flos. *International Journal of Advanced Engineering and Technology*. 2018;11(1):1-5.
 27. Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh SH. Standard food analysis. Seoul:Jigu Publishing Co. 2002:381-2.
 28. Do HJ, Lee JH, Ha IH, Chung HJ, Lee JW, Kim MJ, Kim EJ, Lee IH. Comparison of index compound content and anti-inflammatory activity of eucommiae cortex by various drying methods. *J Korean Med Rehabil*. 2017;27(1):19-25.
 29. 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.
 30. Zhang P, Yang XW. Biotransformation of nodakenin and simultaneous quantification of nodakenin and its aglycone in incubated system of human intestinal bacteria by HPLC method. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2009;11(4):371-9.
 31. Basar N, Talukdar AD, Nahar L, Stafford A, Kushiev H, Kan A, Sarker SD. A simple semi-preparative reversed-phase HPLC/PDA method for separation and quantification of glycyrrhizin in nine samples of glycyrrhiza glabra root collected from different geographical origins. *Phytochemical Analysis*. 2014;25(5):399-404.
 32. Jung TG, Lee IS. The study on oriental-medical understanding about clinical application of craniosacral techniques (CST). *J Korean Med Rehabil*. 2008;18(4):85-101.
 33. Man SC, Durairajan SSK, Kum WF, Lu JH, Huang JD, Cheng CF, Chung V, Xu M, Li M. Systematic review on the efficacy and safety of herbal medicines for alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008;14(2):209-23.
 34. Jang GY, Kim HY, Lee SH, Kang YR, Hwang IG, Woo KS, Kang TS, Lee JS, Jeong HS. Effects of heat treatment and extraction method on antioxidant activity of several medicinal plants. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2012;41(7):914-20.
 35. Koh W, Lee J, Ha IH, Chung HJ, Lee IH, Lee JW, Kim EJ, Gang BG, Jeon SH, Cho Y, Kim MJ. Salt-water processing-dependent change in anti-oxidative and anti-inflammatory effects of cortex eucommiae. *J Korean Med Rehabil*. 2017;27(2):29-38.
 36. Bae MJ, Kim EN, Choi HK, Byun MS, Chung KH, Yoon JA, An JH. Quality characteristics and antioxidant activities of strawberries according to various extraction methods. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2019;48(7):728-38.
 37. Gao Q, Jeon SJ, Jung HA, Lee HE, Park SJ, Lee Y, Lee Y, Ko SY, Kim B, Choi JS, Ryu JH. Nodakenin enhances cognitive function and adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurochemical Research*. 2015;40(7):1438-47.
 38. Lee NY, Chung KS, Jin JS, Lee YC, An HJ. The inhibitory effect of nodakenin on mast-cell-mediated allergic inflammation via downregulation of NF- κ B and caspase-1 activation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017;118(11):3993-4001.
 39. Zhu K, Zhu X, Liu S, Yu J, Wu S, Hei M. Glycyrrhizin attenuates hypoxic-ischemic brain damage by inhibiting ferroptosis and neuroinflammation in neonatal rats via the HMGB1/GPX4 pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022:8438528.
 40. Li J, Shi J, Sun Y, Zheng F. Glycyrrhizin, a potential drug for autoimmune encephalomyelitis by inhibiting high-mobility group box 1. *DNA and Cell Biology*. 2018;37(12):941-6.
 41. Sun Y, Chen H, Dai J, Wan Z, Xiong P, Xu Y, Han Z, Chai W, Gong F, Zheng F. Glycyrrhizin protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis by

- inhibiting high-mobility group box 1 (HMGB1) expression and neuronal HMGB1 release. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1518.
42. Lee IH, Chung HJ, Shin JS, Ha IH, Kim MR, Koh W, Lee J. Influence of boiling duration of GCSB-5 on index compound content and antioxidative and anti-inflammatory activity. *Pharmacognosy Magazine*. 2017;13(51):418-24.
43. 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.
44. Ku KM, Kim HS, Kim BS, Kang YH. Antioxidant activities and antioxidant constituents of pepper leaves from various cultivars and correlation between antioxidant activities and antioxidant constituents. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2009;52(2):70-6.
45. Ha HJ, Lee CB. Antioxidant and anti-inflammatory activities of redcabbage extract. *Culinary Science & Hospitality Research*. 2014;20(2):16-26.
46. Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 1996; 28(2):232-9.
47. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 1997;2(4):152-9.