



Biological Activity and Single Oral Dose Toxicity of Dansam-samultang

In-Chul Lee¹, Bae-Hwan Kim^{2*} and Mee-Kyung Kim^{1*}

¹Center for Senior Industry, Youngdong University, Yeongdong, Korea

²Department of Public Health, Keimyung University, Daegu, Korea

In this study, we investigated the *in vitro* antioxidative effects, antimicrobial activities and single oral dose toxicity of the extracts from Dansam-samultang to evaluate its use as a functional ingredient in cosmetics. In the antioxidative effect, the ethanol extract from Dansam-samultang (DSE) had higher antioxidant values of 92.0% at 1,000 µg/mL than that of water extract from Dansam-samultang (DSW, 86.0%) when evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. The superoxide dismutase-like activity of DSW and DSE were 16.3% and 21.3% at 1,000 µg/mL in concentration, respectively. Xanthine oxidase inhibition activity of the DSE was higher 51.5% than that of the DSW (21.4%). This study was also undertaken to test the *in vitro* antimicrobial activity with the extracts of Dansam-samultang. In general, the DSE showed the significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. In single oral dose toxicity study, *in vivo*, there were no differences between control and treated groups in clinical signs, body weight gains, and gross finding. The results indicated that DSE did not show any toxic effects at 10 mL/kg in mice, and the LD₅₀ of DSE was found to be higher than 10 mL/kg in this experiment. In conclusion, the extracts from Dansam-samultang may act as a natural subsistence for functional cosmetics.

Key words: Dansam-samultang, antioxidative activity, antimicrobial activity, single oral dose toxicity

Received 10 November 2010; Revised version received 29 November 2010; Accepted 30 November 2010

현대에 이르러 천연물에 대한 소비자들의 요구가 높아져 각 분야에 걸쳐 부작용이 적은 천연물의 이용이 증가하고 있으며, 특히 천연물을 이용한 생리활성 효능 및 약리학적 연구가 활성화되고 있다(Min and Hong, 2007).

천연물 유래의 제제들은 전통적으로 다양한 방면에서 신체의 기능을 개선하거나 질병의 완화를 위해서 사용되어 오고 있다. 최근 천연물을 이용한 기능성 식품, 의약품 및 화장품으로의 사용은 아시아뿐만 아니라 전 세계적으로 증가하고 있으며, 현재 많은 연구자들이 천연물 중의 유효성분과 효능에 대해 과학적 검증이 이루어지고 있다.

그러나 천연물을 원료로 사용한 의약품이나 기능성 식품 및 화장품의 경우 그 안전성이나 효력이 엄격하게 관리되지 않는 경우가 빈번하다(Chang et al., 2008).

사물탕(四物湯)은 송대(宋代) 진(陣)의 태평해민화제국방(太平慧敏和劑局方)에 최초로 수록되었으며, 숙지황, 당귀, 백작약, 천궁의 네 가지 한약재로 구성된다. 당귀는 성질이 따스하고 맛이 달고 매우며, 주로 피를 생산하고 심장을 보하고 허한 것을 돕고 체내의 나쁜 피를 축출한다(Kang et al., 2003; Park et al., 2005). 백작약은 성질이 차고 맛은 시며 혈액을 순통하여 속이 급한 것을 완화시키는 작용이 있어 이질과 복통을 치료하는 역할을 한다. 숙지황은 혈액의 내용을 보강하는 역할을 하며, 천궁은 말초 혈액 순환장애를 개선하여 혈액기능을 강화하며 자음보혈, 화중행혈, 조경지통 등의 효능이 있다(Park et al., 2001; Shon et al., 2003). 그러므로 보혈제의 기본처방인 사물탕은 혈액의 내용을 보강하는 숙지황이 주 약부이고, 허열의 소인을 제거하는 당귀와 백작약을 가하여 보혈 작용을 강화시키고, 말초혈액 순환장애를 개선하여 혈액의 기능을 강화시키는 천궁을 배합하는 합방으로 알려져 있다(Park et al., 2001).

*Corresponding author: Mee-Kyung Kim, Center for Senior Industry, Youngdong University, 12-1 Seolgye-ri, Yeongdong-eup, Yeongdong, Chungbuk 370-701, Korea

Tel: +82-43-740-1430

Fax: +82-43-740-1449

E-mail: kim5179@youngdong.ac.kr

Co-corresponding author: Bae-Hwan Kim, Department of Public Health College of Natural Sciences, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldaero, Dalseo-gu, Daegu 704-701, Korea

Tel: +82-53-580-5933

Fax: +82-53-580-5164

E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

Table 1. Composition of Dansam-samultang

Oriental herb name	Botanical name	Weight (g)
Rehmanniae Radix Preparata(숙지황)	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i> Makino	6
Paeoniae Radix(백작약)	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	6
Cnidii Rhizoma(천궁)	<i>Cnidium officinale</i> Makino	6
Angelicae Gigantis Radix (당귀)	<i>Angelica gigas</i> Nakai	6
Salviae Miltiorrhizae Radix(단삼)	<i>Salviamiltiorrhiza</i> Bge	16
Total		40

단삼은 꿀풀과에 속하는 다년생 약용식물로 뿌리를 채취하여 건조시킨 후 약재로 사용하고 있으며(Mok et al., 1995), 그 뿌리는 특이한 냄새가 나며 약간 쓴맛이 난다. 단삼의 주요성분으로 scatellacin, tanshinone, cyptotanshinone, hydroxytanshinone, salviot, vitamin A와 E 등(Lee and Lee, 1992)이 알려져 있고 단삼의 밝혀진 생리활성으로는 항균(Mok et al., 1994), 항산화(Kang et al., 2005), 항암(Kim et al., 1999), 항돌연변이(Ahn et al., 1999), 단삼유래의 간염에의 효과(Hase et al., 1997)가 알려져 있으며, 항혈전 효능에 대한 연구가 보고되고 있다.

단삼 및 사물탕에 대한 최근 연구는 크게 항암작용과 항균, 항염증 작용, 그리고 면역기관에 대한 응용으로 진행되고 있지만 이들의 복합물인 단삼사물탕에 관한 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 실험에서는, 천연물질로서 한방에서 많이 사용되고 있는 단삼사물탕 물추출물과 에탄올추출물을 이용하여 화장품 산업에서의 기능성 소재로서의 적용 가능성을 확인하기 위하여 항산화능 및 항균활성을 검토하고 추출물의 안전성과 독성을 검증하기 위하여 단회경구 급성독성 시험을 함께 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출 제조

본 실험에 사용한 단삼사물탕은 동의보감에 수록된 내용에 준하여 조제하였으며, 시료로 사용된 약재는 경북 영천 소재의 옴니허브(주)에서 구입하여 물로 세척하여 음건 후 사용하였다. 단삼사물탕 물추출물은 숙지황(6g), 백작약(6g), 천궁(6g), 당귀(6g), 단삼(16g)을 구성비(Table 1)로 개량한 다음 시료 중량 대비 10배의 증류수를 가하여 85°C에서 3시간 환류냉각 추출하여 상정액과 침전물을 분리하였으며 동일 조작을 3회 반복 추출하였다. 에탄올추출물은 시료 중량 대비 70% 에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 동안 교반 추출하고, 추출 후 상등액과 침전물을 분리하였으며, 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다(Figure 1). 각 추출물을 여과, 농축하여 동결건조 후 냉동실에 보관하면서 시료로 사용하였다.

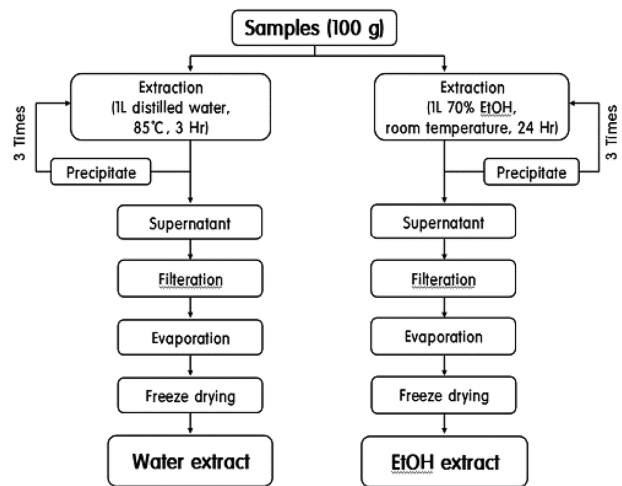


Figure 1. The procedure for extraction from Dansam-samultang.

실험균주 및 배지

항균력 검색 실험에 사용한 공시균주는 피부 상재균으로서 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621 (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917 (*S. epidermidis*) 및 *Escherichia coli* KCTC 1039 (*E. coli*)를 선정하였고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 사용하였다. *S. aureus*의 배양에는 최적배지 tryptic soy broth (DB, USA)를, *S. epidermidis*와 *E. coli*는 nutrient broth (DB, USA)를 각각 사용하였다. 고체배지는 상기배지에 agar를 첨가하여 사용하였다. 균주는 slant에 배양된 각각의 균주를 백금으로 취해 10 mL broth의 균 생육배지에 접종하고 각 균주의 생육적온에서 일정간격으로 계대배양하여 사용하였으며, 균의 활성을 유지하였다.

항산화 효과 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정: DPPH radical에 대한 라디칼 소거활성은 Blois (1958)법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 60 μM DPPH (Sigma, USA) 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정: SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund(1974)법을 이용하였다. 추출물 0.2 mL에 tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 2.6 mL과 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10 분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도로 측정하였다.

Xanthine oxidase 저해활성 측정: Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte의 방법(1969)을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 mL에 넣은 후, 여기에 xanthine oxidase (0.2 U/mL) 10 μ L과 1 mM의 xanthine 20 μ L을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응물에 1 N HCl 1 mL을 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항균활성

항균활성 실험은 disc 방법(Higasi, 2000)에 의하여 실시하였다. 즉, 평판최적배지에 균 100 μ L를 분주하여 멸균 유리병으로 도말한 다음, 멸균된 disc paper (\varnothing 8 mm)를 올리고 시료 50 μ L씩 흡수시켰다. 각 균주별 최적배양조건에서 24시간 동안 배양하여 disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하여 저해활성을 계산하였다. 단삼사물탕 추출물은 0.45 μ m membrane filter로 제균하여 시료로 사용하였고 대조군은 추출용매를 사용하였다.

단회경구독성시험

실험동물 및 사육조건: 본 실험에 사용한 동물은 5주령의 암수 ICR계 마우스(효창사이언스, 대구)를 구입하여 1주일간 검역기간을 거쳐 건강한 동물만 선택하여 실험에 사용하였다. 사육실 환경조건은 온도 23 \pm 3°C, 상대습도 50 \pm 10%, 환기 횟수 15회/시간, 조도 150~300 Lux, 명암주기 12시간(오전 8시~오후 8시)으로 유지하였다. 실험동물은 마우스용 케이지에 5마리씩 각각 암수 분리하여 사용하였으며 실험기간 동안 사료(Purina Korea)와 물은 자유롭게 급식시켰다. 본 연구는 계명대학교 동물실험윤리위원회 원칙에 맞게 수행하였다.

투여용량의 설정: 본 실험에 사용된 시험물질인 단삼사물탕 에탄올추출물은 예비시험을 통해, 용매(10% 에탄올)에 녹일 수 있는 최대 농도인 1%로 녹여 투여할 수 있는 한계액량인 10 mL/kg으로 투여군을 설정하여 암수 각 5마리씩 투여하였으며, 대조군은 용매인 10% 에탄올을 10 mL/kg으로 설정하여 암수 각 5 마리씩 투여하였다. 모든 동물은 투여전 16시간 절식시킨 후, 경구투여용

존테를 이용하여 투여당일 체중을 기준으로 10 mL/kg씩 1회 강제 경구투여하였다. 실험에 사용한 동물의 평균 체중은 수컷은 20.72 \pm 0.65 g, 암컷은 19.83 \pm 0.52 g이었다.

관찰 및 검사항목: 임상증상 및 사망 여부의 관찰은 모든 실험동물에 대하여 투여당일은 투여 후 6시간 동안 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 다음날부터 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 및 사망유무를 관찰하였다. 또한 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 단삼사물탕 에탄올추출물 투여일, 투여 후 1, 3, 7, 14일째에 체중을 측정하였다. 시험 종료시 실험동물을 에테르로 마취시킨 후 개복하여 방혈치사하여 안락사 시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 관찰하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 평균값과 표준오차를 구하였으며 항산화 측정결과의 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA, analysis of variance)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법(Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다. 단회투여독성시험의 경우 최고용량 1개 군만으로 실험하였기 때문에 probit법에 의한 LD₅₀ 산출은 행하지 않았다. 대조군과 시험군간의 체중변화에 있어서는 student's t-test를 이용하여 유의성 여부를 검사하였다.

결 과

단삼사물탕 추출물의 항산화 효과

본 실험에서는 단삼사물탕의 추출물을 농도별(10, 50, 100, 500 및 1,000 μ g/mL)로 DPPH에 대한 라디칼 소거활성을 측정한 결과 물추출물과 에탄올추출물 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 500~1,000 μ g/mL의 농도에서 물추출물은 82.7~86.0%, 에탄올추출물은 80.5~92.0%의 소거능을 나타내었다(Figure 2). SOD 유사활성 측정 결과는 1,000 μ g/mL 농도에서 물추출물 및 에탄올추출물은 각각 16.3% 및 21.3%로 추출물 모두에서 낮은 활성을 나타내었다(Figure 3). 단삼사물탕 물추출물 및 에탄올추출물의 xanthine oxidase 저해 활성을 살펴본 결과 에탄올추출물이 물추출물에 비하여 유의적으로 높은 결과를 나타내었으며, 특히 에탄올추출물 1,000 μ g/mL에서는 51.5%이상의 소거능을 나타내었다(Figure 4). 그 결과 단삼사물탕 에탄올추출물이 물추출물에 비하여 비교적 높은 항산화 효과를 보였으므로 항균 및 단회독성투여는 단삼사물탕 에탄올추출물을 이용하였다.

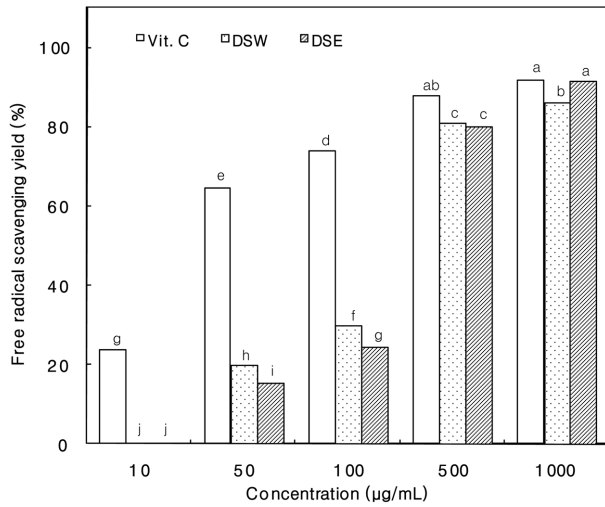


Figure 2. Antioxidative effect of Dansam-samultang extracts on DPPH radical scavenging activity. DSW, Dansam-samultang water extracts; DSE, Dansam-samultang ethanol extracts. The values are means 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $P < 0.05$.

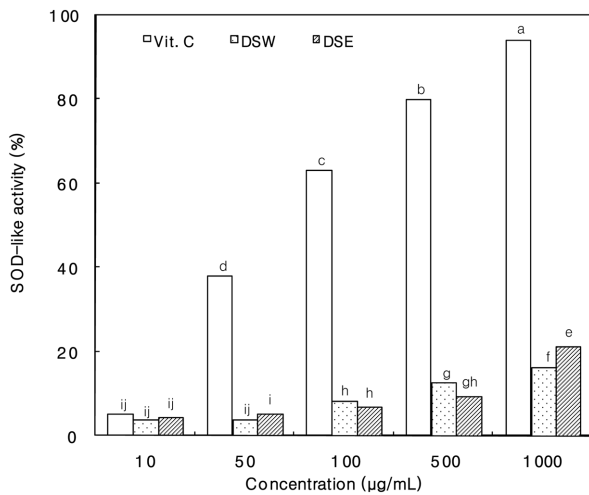


Figure 3. SOD-like activity of Dansam-samultang extracts. DSW, Dansam-samultang water extracts; DSE, Dansam-samultang ethanol extracts. The values are means 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $P < 0.05$.

항균활성

Disc diffusion method에 의하여 단삼사물탕 물추출물과 에탄올추출물의 항균 효과를 검토하기 위하여 피부상재균인 *S. aureus*, *S. epidermidis* 및 *E. coli*에 대한 생육저해환 형성을 관찰한 결과 단삼사물탕 물추출물은 *S. aureus*, *S. epidermidis* 및 *E. coli* 모두에서 항균활성이 나타나지 않았으나(data not shown), 에탄올추출물은 *S. aureus* 및 *E. coli*에 대해서는 추출물 농도 200, 400 µg/mL에서 각각 14.7, 17.3 mm 및 14.7, 18.7 mm의 저해환을 나타내었다(Table 2). *S. epidermidis*균에 대한 항균활성은 농도 의존적으로 높게 나타났으며, 추출물 농도

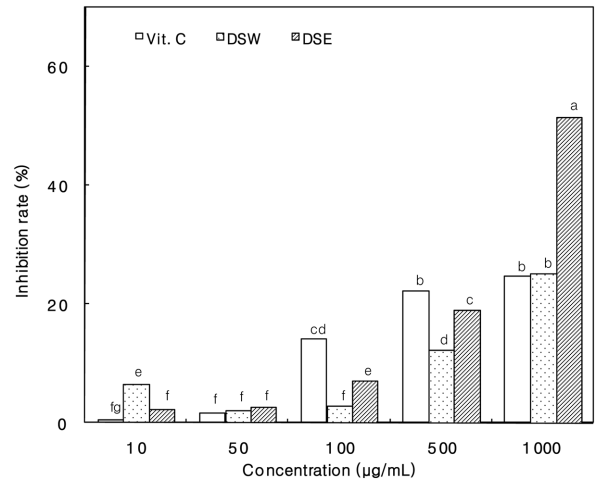


Figure 4. Inhibition rate of Dansam-samultang extracts on xanthine oxidase. DSW, Dansam-samultang water extracts; DSE, Dansam-samultang ethanol extracts. The values are means 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $P < 0.05$.

50~400 µg/mL에서 저해환이 14.0~22.0 mm로 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

단회투여독성의 사망률과 임상증상

단삼사물탕 에탄올추출물을 마우스에 경구투여시 시험기간 동안 시험군의 암수 동물에서 단삼사물탕 에탄올추출물에 기인한 사망은 관찰되지 않았으며(Table 3), 독성증상과 특이할 만한 임상 증상도 나타나지 않았다(Table 4). 따라서 단삼사물탕 에탄올추출물 (1%)을 마우스에 단회 경구투여 하였을 때의 최소 치사량은 암수 모두 10 mL/kg 이상이였다.

단회투여독성의 체중변화 및 부검 소견

시험기간을 통한 암수 동물의 체중 측정 결과 단삼사물탕 에탄올추출물의 투여에 기인한 현저한 체중의 감소 또는 증가 등 유의한 차이가 나타나지 않았다(Table 5). 시험 종료 후 생존동물을 부검한 결과 단삼사물탕 에탄올추출물 투여군과 대조군 모두 내부 장기의 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다(Table 6).

고 찰

소득의 향상과 더불어 생활수준이 높아짐에 따라 천연물 유래 소재의 기능성 식품, 화장품, 의약품에 대한 관심이 증가하고 있다. 또한 자연 지향적이고 환경 친화적인 소비추세에 맞추어, 화장품에 들어가는 유효성분도 화학물질뿐만 아니라 식물 유래의 천연물이 그 유용성을 기반으로 하여 여러 가지 형태로 화장품에 배합되어 사용되고 있으며, 특히 자연주의의 바람을 타고 생약을 포함

Table 2. Antimicrobial activity against three microorganisms by ethanol extracts from Dansam-samultang

Strains	Clear zone on plate (mm) ¹			
	Concentration (μg/mL)			
	50	100	200	400
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	8.0±0.0	8.0±0.0	14.7±0.3	17.3±0.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	14.0±0.4	17.0±0.2	19.0±0.1	22.0±0.2
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	8.0±0.0	8.0±0.0	14.7±0.2	18.7±0.1

¹Diameter.**Table 3.** Mortality of male and female mice orally treated with Dansam-samultang ethanol extract (1%)

Material	Sex	Injected volume (mL/kg)	Hours after treatment						Days after treatment				Final mortality		
			0	1	2	3	4	5	6	1	3	7		14	
Con ¹	Male	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Female	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
DSE ²	Male	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Female	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

¹Con, 10% ethanol.²DSE, ethanol extract from Dansam-samultang (1%). Values are expressed as number of dead animals/total animals (n=5).**Table 4.** Clinical signs of male and female mice orally treated with 10 mL/kg of Dansam-samultang ethanol extract (1%)

Material	Sex	Clinical signs	Hours after treatment						Days after treatment					
			0	1	2	3	4	5	6	1	3	7	14	
Con ¹	Male	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Female	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DSE ²	Male	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Female	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

¹Con, 10% ethanol.²DSE, ethanol extract from Dansam-samultang (1%). Values are expressed as number of animals observed clinical signs (n=5).**Table 5.** Body weights of male and female mice orally treated with 10 mL/kg of Dansam-samultang ethanol extract (1%)

Material	Sex	Number of animals	Days after treatment				
			0	1	3	7	14
Con ¹	Male	5	20.72±0.65	22.98±0.75	27.05±1.08	29.21±1.35	33.54±1.88
	Female	5	19.83±0.52	20.84±0.95	25.09±1.25	28.11±1.54	30.51±2.43
DSE ²	Male	5	21.18±0.65	21.88±0.93	26.72±1.38	28.15±1.61	32.34±1.89
	Female	5	20.21±0.60	20.59±0.72	24.91±1.45	26.95±1.47	29.29±2.10

¹Con, 10% ethanol.²DSE, ethanol extract from Dansam-samultang (1%). Values are expressed as means±SD (g).**Table 6.** Gross findings of necropsy in male and female mice orally treated with 10 mL/kg of Dansam-samultang ethanol extract (1%)

Material	Groups	Observation	Frequency
Con ¹	Male	NGL ³	5/5
	Female	NGL	5/5
DSE ²	Male	NGL	5/5
	Female	NGL	5/5

¹Con, 10% ethanol.²DSE, ethanol extract from Dansam-samultang (1%).³NGL, no gross lesion. Values are expressed as animal numbers.

한 식물성 원료에서 해양원료에 이르기까지 다양한 천연 소재를 이용한 화장품의 개발이 이루어져 천연화장품의 전성시대가 도래하고 있다. 종래에 사용되어진 합성유래의 물질이나 광물성 원료들의 피부 유해론이 제기되면서 전 세계적으로 식물성 물질에 대한 선호도가 증가했기 때문으로 해석되며, 부첨가제로 사용되어 온 천연물들이 기능성 화장품을 비롯하여, 여드름, 항염증 및 피부개선 관련 화장품, 피부보습 및 기타 화장품으로 사용성이 확대되고 있다. 또한 유용성을 가진 천연물에 관한 산업적 이

용과 그 개발에 중점을 두고 많은 연구가 이루어지고 있다(De Philippis and Vinvenzni, 2001; Eom and Kim, 2004).

그러므로 본 연구에서는 생약복합제제중의 하나인 단삼사물탕의 추출물을 이용하여 화장품 산업에서의 기능성 소재로서의 적용 가능성을 확인하기 위하여 항산화효과와 항균활성 검증 및 그 추출물에 대한 안전성을 보기 위해 단회경구 급성독성시험을 실시하였다.

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 자유라디칼로 아스코르빈산, 토코페롤, 방향족 아민류 및 BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 시료의 flavonoids 및 phenol 성 물질 등에 대한 항산화 작용의 지표로 이용되고 있다(Jeong et al., 2005). 자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 폐놀성 화합물의 경우 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다(Torel et al., 1986). 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 해로운 환원산소종(reactive oxygen species: ROS)을 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. Xanthine oxidase는 생체내 퓨린대사에 관여하는 효소로 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요소(urea)를 형성하며 요소가 혈장 내에 증가되면 골절에 촉진되므로 통증을 동반하는 통풍을 유발할 뿐만 아니라, 신장에 침착되어 신장질환을 일으키기도 한다(Storch and Ferber, 1988; Hatano et al., 1989).

본 실험에서는 단삼사물탕 추출물의 항산화 효과를 측정된 결과 농도 1,000 µg/mL에서 에탄올 추출물이 DPPH에 대한 라디칼 소거능이 92.0%, 86.0%의 물 추출물에 비하여 높은 항산화력을 나타내었다. SOD 유사활성은 1,000 µg/mL 농도에서 에탄올추출물은 21.3%, 물추출물은 16.3%의 활성을, xanthine oxidase 저해활성은 에탄올추출물은 51.5%, 물추출물은 24.1%의 저해활성을 나타내었다. 따라서 단삼사물탕은 에탄올추출물이 물추출물에 비하여 높은 항산화력을 나타냄을 알 수 있었다.

이와 같은 항산화효과는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막아주므로 인해 노화방지, 암 및 심장질환 등의 예방 및 지연 효과로 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등의 분야에서 이들 효과를 활용하고 있다. Vitamin C, tocopherol과 같은 항산화제들은 가격이 비싸면서 항산화효과가 제한적이므로 다양하게 이용되는데 한계가 있다. 따라서 본 연구에서는 우리가 사용하거나 식용 또는 약제로 사용되고 있는 천연물 중에서 항산화 물질, 항균물질 등이 다양하게 함유되어 있는 약용식물 및 약재를 사용하여 생리활성을 높이는 천연물질을 화장품, 식품 등에 기능성 소재로 적용할 수 있는 연구의 일환으로 단삼사물탕의 추출물을 이용하여 항산화 효능을 실험하였다. 특히 에탄올추출물에서 DPPH에 대한 라디칼 소

거능이 92%로 높은 항산화 효과를 나타내므로 생체내에서 일어나는 산화적인 스트레스 및 노화의 예방에 유용한 것으로 사료된다.

피부상재균인 *S. aureus*, *S. epidermidis* 및 *E. coli*에 대한 단삼사물탕 에탄올추출물의 항균효과를 측정하기 위하여 균의 생육저해환 형성을 관찰한 결과 에탄올추출물 400 µg/mL 농도에서 *S. aureus*, *S. epidermidis* 및 *E. coli* 균들에 대한 생육저해환은 각각 17.3, 22.0, 18.7 mm를 나타내었으며, 특히 *S. epidermidis*균에 대한 항균활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 단삼사물탕 에탄올추출물은 화장품의 보조 방부제 및 피부상재균주에 대한 항균제로서 사용이 가능할 것으로 사료된다. 이는 Han(2004)의 연구에서와 같이 단삼의 클로로포름 분획물에서 그람 양성 세균인 *S. epidermidis*에 대한 항균력은 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)가 12.5 µg/mL로 높게 측정되었으나, 그람 음성 세균인 *E. coli*에 대해서는 MIC가 100 µg/mL로 항균활성이 측정되지 않았다. Mok et al. (1995)의 연구에서 단삼 추출물은 Gram 양성균에 대하여 우수한 항균 효과를 나타내었고, 특히 *B. subtilis*에 대해서는 MIC가 3.13 µg/mL로 가장 항균 활성이 뛰어났다고 보고하였으며, Choi와 Han(2003)은 단삼을 메탄올로 추출하여 항균성을 측정된 결과에서는 *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*에 대하여 500 µg/mL 농도에서 inhibition zone의 크기가 각각 17, 11, 12 mm의 항균력을 나타내었는데, 이는 추출하는 용매에 따라 항균성 물질의 용해도가 달라지기 때문이라 사료된다. 이러한 것은 다양한 꽃과 잎을 물과 에탄올로 추출하여 항균력을 보고한 Park et al. (2008)의 연구결과에서도 볼 수 있는데, 물추출물보다는 에탄올추출물의 항균력이 더 우수하다는 연구 결과와 유사하다.

오랫동안 사용하여 온 한약재의 경우에도 용매로 추출을 하였을 때 독성이 나타날 수 있으므로 화장품의 기능성 소재로서 적용하기 전에 독성에 대한 안전성을 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 최고 투여용량인 10 mL/kg으로 마우스에 대해 단회경구 독성을 실시한 결과 단삼사물탕 에탄올추출물을 투여한 시험군에서 시험기간 동안 단삼사물탕 에탄올추출물에 의한 사망은 관찰되지 않았고 독성증상과 임상증상에서도 아무런 이상이 발견되지 않았으며 대조군과 비교하여 체중변화나 모든 생존 동물의 부검조건에서도 이상이 관찰되지 않았다. 따라서 단삼사물탕 에탄올추출물을 10 mL/kg 용량까지 단회경구독성시험에서 어떠한 독성 소견도 유발하지 않았으므로, LD₅₀은 최소한 10 mL/kg 이상인 것으로 보인다.

이상의 시험결과 단삼사물탕 에탄올추출물은 *in vitro* 효능 시험에서 1,000 µg/mL의 농도에서 항산화효과와 피부상재균에 대한 항균활성을 나타내었으며, ICR 계통의 마우스에서 단회경구투여시 10 mL/kg의 용량에서 어떠한

독성 영향도 유발하지 않았으므로 화장품의 기능성 소재로서 적용 가능성이 높다고 생각된다.

참고문헌

- Ahn, B.Y., Kim, D.G. and Chio, D.S. (1999) Antimutagenic effect of Tansen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27(3), 197-202.
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 81, 1198-1199.
- Chang, B.Y., Oh, B.R., Sohn, D.H. and Kim, S.Y. (2008) Single Oral Toxicity Study on the Standardized Extract of *Salvia miltiorrhiza*. *Kor. J. Pharmacogn.* 39(4), 352-356.
- Choi, H.Y. and Han, Y.S. (2003) Isolation and identification of antimicrobial compound from Dansam (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32(1), 22-28.
- De Philippis, R. and Vincenzini, M. (2001) Exopolysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22(3), 150-175.
- Eom, J.N. and Kim, J.D. (2004) An empirical study on the oriental herbal cosmetics purchase behaviors in women in the Metropolitan area. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 30(1), 93-102.
- Han, W.S. (2004) Isolation of Antimicrobial Compounds from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12(3), 179-182.
- Hase, K., Kasium, R., Basnet, P., Kadota, S. and Namba T. (1997) Preventive effect of lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza* on experimental hepatitis induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine lipopolysaccharide. *Planta Med.* 63(1), 22-26.
- Hatano, T., Yasuhara, T., Fukida, T., Noro, T. and Okuda, T. (1989) Phenolic constituents of licoricell. Structures of licopyranocoumarin, licoarylcooumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 37(11), 3005-3009.
- Higasi, G.S. (2000) Appraisalment of antioxidative activity from vegetables. *Jpn. J. Food Ind.* 57(1), 56-64.
- Jeong, J.H., Wee, J.J., Shin, J.Y., Cho, J.H. and Jung, D.H. (2005) Antioxidative effect of crude saponin fraction prepared from culture product of basidiomycota cultured with fresh ginseng as substrate. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 37(1), 67-72.
- Kang, H.S., Chung, H.Y., Byun, D.S. and Chio, J.S. (2005) Further isolation of antioxidative (+)-1-hydroxy-pinoreinol-1-O- β -D-glucoside from the rhizome of *Salvia miltiorrhiza* acts on peroxynitrite, total ROS and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Arch. Pharm. Res.* 26(1), 24-27.
- Kang, S.A., Jang, K.H., Ahn, D.K. and Park, S.K. (2003) Differences of hematopoietic effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* extract on cyclophosphamide-induced anemic rats. *Korean J Food Sci Technol.* 35(6), 1204-1208.
- Kim, O.K., Chung, S.Y., Park, M.K., Rheu, H.M. and Yang, J.S. (1999) Anticancer activity of natural products including *Salvia miltiorrhiza*. *J. Appl. Pharmacol.* 7(1), 29-33.
- Lee, Y.J. and Lee, S.Y. (1992) Pharmacognosy, pp. 131-137, Dong Myeung Sa, Seoul, Korea.
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.
- Min, S.K. and Hong, C.H. (2007) Korean Traditional Medicines as Novel Drugs for Neuropsychiatric Disorders. *Korean J. Psychopharmacol.* 18(1), 5-17.
- Mok, J.S., Kim, Y.M., Kim, S.H. and Chang, D.S. (1995) Antimicrobial property of the ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Food Hyg. Safety* 10(1), 23-28.
- Mok, J.S., Park, U.Y., Kim, Y.M. and Chang, D.S. (1994) Effects of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae Radix* (*Salvia miltiorrhiza*) extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(6), 1001-1007.
- Park, H.J., Lee, Y.J. and Keon, S.J. (2005) Pharmacognostical studies on the Dang Gui from Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* 36(2), 141-144.
- Park, R.J., Kim, N.J., Lee, K.T. and Sed, S.H. (2001) Comparative studies on concentration of decursinol in plasma after oral administration of *Angelica Gigantis Radix* extract and combined use of decursin and *Cnidii Rhizoma* extract or *Bupleuri Radix* extract in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 32(1), 72-78.
- Park, U.J., Park, U.S., Im, M.H., Kim, H.J., An, J.S., Cho, J.Y. and Heo, B.G. (2008) Antibiotic activities of flower and leaf extracts from four species of white Lotus. *J. Life Sci. & Nat. Res.* 30(1), 25-34.
- Shon, Y.H., Kim, H.G. and Nam, K.S. (2003) Effect of *Cnidii Rhizoma* water extract on chemopreventive enzymes for hepato carcinoma. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(4), 297-302.
- Stirpe, F. and Corte, E.D. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 244(14), 3855-3861.
- Storch, J. and Ferber, E. (1988) Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 162(2), 262-267.
- Torel, J., Gillard, J. and Gillard, P. (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25(2), 383-385.