

## *Leptospermum scoparium*의 케톤체 분획물을 함유한 외용제제의 항균력

김은희 · 황성주 · 박송희\* · 박승룡\*\* · 이계주

충남대학교 약학대학, \*한국화학연구소, \*\*건국대학교

(2000년 1월 31일 접수)

### Topical Formulation and Antimicrobial Activity of Ketonic Fraction from *Leptospermum scoparium*

Eun Hee Kim, Sung-Joo Hwang, Song Hee Park\*, Seung Youg Park\*\* and Gye Ju Rhee

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

\*Korea Reserach Institute of Chemical Technology, Taejeon 300-600, Korea

\*\*College of Science, Kunkook University, Seoul 143-701, Korea

(Received January 31, 2000)

**ABSTRACT**—Gel and cream containing 5% and 10% ketonic fraction (KF) of *Leptospermum scoparium*, respectively were formulated. Antimicrobial activity, stability, anti-inflammatory effect, rheological properties, drug release and acute toxicity for these topical efficacy were evaluated. Gel and cream containing neomycin or gentamycin in combination with KF has potent antimicrobial activity. Gel and cream were physically stable and did not show any creaming for 6 months storage. Gel showed plastic flow with yield value and cream showed pseudoplastic flow with hysteresis loop. The gel and cream containing KF showed higher viscosity than control or commercial one. The viscosity increased as the concentration of KF increased. Both 10% gel and cream showed a significant decrease in swelling when applied to the carrageenan- injected paw, suggesting local antiinflammatory activity. Particularly, 10% gel preparation showed similar antiinflammatory activity when compared with commercially available drugs. Percent of drug released and diffusion coefficient were in the order of 5% gel, 10% gel, 5% cream, and 10% cream, respectively. There were no significant changes of body weight in rats percutaneously administered with 10% cream and gel when compared with control. There were no induced acute toxicity when 10% cream or gel was applied to rats. *Leptospermum scoparium* could be practicaly used in topical preparations.

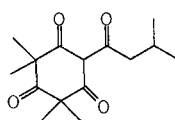
**Keywords**—*Leptospermum scoparium*, Ketonic fraction, Gel, Cream, antiinflammatory activity.

*Leptospermum scoparium*은 정향나무과 (Myrtaceae), *Lep-tospermum*속에 속하는 관목으로 일명 ‘Manuka’ 혹은 ‘New Zealand tea-tree’라고 부르며 습기가 많은 지역에서 잘 자라는 특징이 있고 뉴질랜드에서 자생하는 식물이며, 오래 전 부터 원주민 마오리족에 의하여 피부질환, 상처부위염증, 관 절염, 이질, 요로질환, 감기 등에 사용되어 왔다.<sup>1~3)</sup> 1930 년대 이후부터는 이 식물의 가지와 잎 등을 증류하여 추출 한 기름이 상처 부위의 청결 및 소독에 탁월한 효과가 있으 며 정상 조직에는 손상을 입히지 않는다고 보고되었다. 이 기름의 성분 에 관한 연구는 1940년대부터 시도되었으나<sup>4,5)</sup> 아 직 항균력을 나타내는 단일 성분을 분리하지는 못하였다.

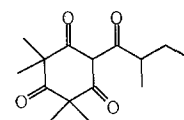
*Leptospermum scoparium*의 essential oil에는 수십 성분이 혼재 되어 있으며, 크게 monoterpenes (pinene, myrcene,

1,8-cineole등), sesquiterpenes과 polyketone 유도체로 아래 그림에 나타낸 flavesone, leptospermone 및 iso-leptosper-mone 등으로 구성되어 있는데, 그 산지에 따라 성분의 분포 에 상당한 차이가 있는 것으로 보고되어 있고,<sup>2,6~8)</sup> 이의 용 용 가능성에 대한 몇몇 보고들<sup>1,9~13)</sup>이 있으나, 실험군주가 지극히 한정적이고, 병용효과나 외용제제의 항균성과 특히 항생제와의 병용에 관한 보고는 아직 없다.

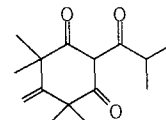
전보<sup>14)</sup>에서 whole oil과 polyketones를 갖고있는 분획 즉 ketonic fraction(KF)으로 그람양성, 음성, 내성균주, 혐기성 균주등 수십종에 대하여 항균력을 screening하여 KF의 항균



(leptospermone)



(iso-leptospermone)



(flavesone)

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Tel : 042) 821-5932, E-mail : girhee@hanbat.chungnam.ac.kr

력이 whole oil 보다 높은 결과를 얻었고, KF가 3가지 성분으로 구성되어 있음을 확인하였으며, 여러 가지 항생제의 병용실험을 실시하여 몇가지 항생제와 상승효과가 있음을 보고하였다.

이 연구에서는 *Leptospermum scoparium* essential oil의 KF를 함유하는 외용제제를 제조하고, 항균력 시험을 agar diffusion 법으로 측정하고 제제의 유동학적 성질, 약물방출, 독성실험 등을 통하여 외용제제로의 상품화에 필요한 기초 자료를 제공하는 동시에 살균성 외용제제로의 개발 가능성을 검토하였다.

**실험방법**

**시약**

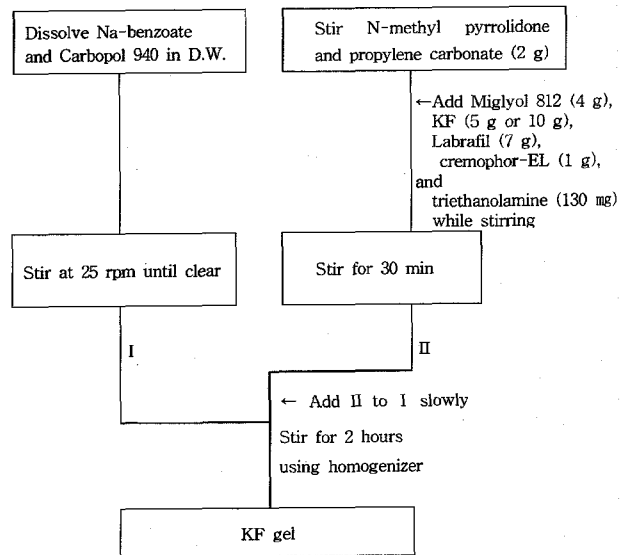
기제 및 유화제는 Tefose®63 (Gattefosse Co., France), Labrafil®M 1944 (Gattefosse), butylated hydroxyanisole (BHA), propylene carbonate를 사용하였고 N-methyl pyrrolidone(NMP) (ISP Technologies, USA), Cremo-phor-EL® (BASF Wyandotte Co., Germany), Barbopol-940 (BF Good Rich Chemical Co.), Miglyol 812 (Huels, Germany), 항생제는 Gentamicin (Sigma Co.), neomycin (Cheil Pharm. Co., Korea)등을 사용하였다.

기기로는 Modified Franz diffusion cell (Fine Corp., Korea), diffusion cell drive system (SDT-S30, Fine Scientific Instruments, Korea), homogenizer (Model X 1030 D, CAT Co., Eberstaadt, Germany), rotary viscometer (Rotovisco®, HAAKE Inc., Saddle Fiver, Germany)를 점도계는 Rheocontroller model RC 20, Roto Visco model RV 20을 사용하였고 기타 Measuring System N% Osc, Circulator F3-C), HPLC system: Pump (Waters™ 600 controller), Rheodyne 7725 injector, UV/Vis detector (Waters™ Tunable Absorbance Dectector), µBondapak™ NH<sub>2</sub> Column (Waters), Autochro data module (Youngin, Korea) 등을 사용하였다.

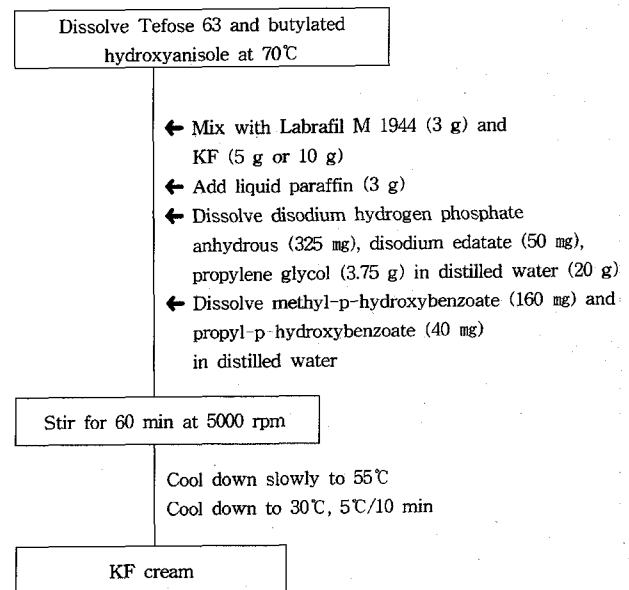
**KF를 함유하는 외용겔제 및 크림제의 제조**

Scheme 1과 같은 조성과 방법으로 KF 5%와 10% 함유 겔을 제조하였고, Scheme II와 같은 조성과 방법으로 KF 5%와 10% 함유 크림을 제조하였다.

따로 KF 10%와 겐타마이신 0.1%를 함유한 혼합겔, KF 10%와 네오마이신 0.5%를 함유한 복합 겔을 Scheme 2와 같은 방법으로 제조하여 각각의 단일 제제와 항균력을 비교하였다.



**Scheme 1**—Preparation of 5% and 10% KF gel.



**Scheme 2**—Preparation of 5% and 10% KF cream.

**안정성 실험**

제조한 5%, 10% KF 겔 및 크림제에 대하여 제조 직후와 2, 4, 6개월 후에 육안 관찰하여 oil층의 분리나 creaming 등의 유무를 살펴보고, 현미경 관찰을 통하여 유화 상태의 균일성을 비교하였다.

**KF와 항생제의 병용효과**

KF 10%와 겐타마이신 0.1%를 함유하는 복합 겔제, KF 10%와 네오마이신 0.5%를 함유하는 복합 겔제의 항균력과, 10% KF겔, 0.1% 겐타마이신겔, 0.5% 네오마이신겔의 각 단

일제제에 대하여 agar diffusion method로 병용효과를 측정하였다. 즉, 위의 5가지 제제 각 1 g을 pH 6.8 phosphate buffered saline(PBS) 용액 1 ml와 혼합한 후 실험하였다.

실험균주는 *Sta. aureus* 285 (1차 검색균주), *Sta. aureus* 694 E (MRSA), *Sta. aureus* 293 (QRS), *Sta. epidermidis* 329 (QRS), *Sta. species* 245 (QRS) 등 5 가지 균주를 Mueller-Hinton broth에서 24 시간 배양한 후 각 균액 2.5 ml씩을 Mueller-Hinton agar 130 ml에 각각 혼합하여 5 가지의 균액배지를 준비하였다.

직경 140 mm, 높이 20 mm의 plate에 균액이 혼합된 Mueller-Hinton agar를 부어 배지의 두께가 4 mm로 일정하게 되도록 굳힌 후 suction으로 직경 4 mm의 구멍을 일정간격으로 뚫어 주었다. 각 구멍에 준비한 검액을 각각 10 µl씩 넣고 3 시간 냉장 정치하여 약물이 배지에 퍼지도록 한 후 37°C에서 24 시간 배양한 후 균주 성장저지 직경을 측정하였다.

**겔제와 크림제의 유동학적 성질**

경피흡수제제로서 겔 혹은 크림제의 적용시 점도와 유동학적 성질은 흡수에 크게 영향을 주므로 유동학적 성질을 측정하여<sup>15)</sup> 흡수와의 상관성을 검토하였다. 5% 및 10% 겔제제와 5% 및 10% 크림제제를 컵의 표시선 까지 채워 흘러 넘치지 않게 한 후 viscometer의 전단속도(%D)를 100 sec<sup>-1</sup>으로 하고 전단시간은 왕복 각각 3 분으로 하고 SV1 sensor system을 사용하여 점도를 측정하였다. 흐름곡선 (rheogram)의 X축은 전단응력(T), Y축은 전단속도(D)로 하여 각 구간마다 점도를 계산(HAAKE: Rotovisco® software version 2.3)하여 최대값, 최소값 및 평균점도(η<sub>mean</sub>), 항복치의 유무, hysteresis loop area를 산출하고, rheogram으로부터 흐름의 양상을 파악하였다.

$$\eta = T/D \text{ [Pa} \cdot \text{S]} \tag{1}$$

η : Viscosity, T : Shear stress, D : Shear rate (S<sup>-1</sup>: Reciprocal second)

$$D = M \cdot \%D \cdot S_D \text{ S}^{-1} \tag{2}$$

D : Shear rate, S<sub>D</sub> : Scale value, M : Shear rate factor, %D : Preset shear rate value at RV20

$$T = A \cdot \%T \cdot S_T \text{ [Pa]} \tag{3}$$

T : Shear stress, S<sub>T</sub> : Scale value, A : Shear rate factor, %T : Preset shear stress value at RV20

**Carrageenan 유발 부종법을 이용한 제제의 항염작용 측정**

Winter 등<sup>18)</sup>의 방법에 의하여 실험하였다. 체중 250±20 g의 웅성 SD계 랫트를 사용한 carrageenan 부종시험법<sup>16,17)</sup>

에 의하여 KF 5% 및 10% 겔제제와 크림제에 대하여 항염증 작용을 시험하였다. 비교 약물로는 케노펜® 겔과 세레스톤-지크림을 사용하였다. 가능한 한 각 군의 평균 무게가 거의 같도록 랫트를 선택하여, 실험 12 시간전부터는 절식시켰고 물은 충분히 공급하였다. 실험 크림제 및 겔제를 50 µg씩 랫트의 발에 집게손가락으로 50번 정도 문질렀고, 대조군의 경우는 KF를 함유하지 않은 겔 및 크림기제만을 동일한 방법으로 발라 주었다. 1% carrageenan을 함유한 생리식염수 0.1 ml를 랫트의 발바닥에 주사하고, 주사 직후와 3시간 경과 후의 발의 부피를 plethysmometer를 사용하여 측정하였다. 다음의 식을 이용하여 족부종용 및 부종억제율을 구하였고, 본 시험에서 얻어진 농도 및 제제에 의한 효과에 대한 통계학적 분석은 Duncan's multiple range test를 이용하여 대조군과의 군간 유의차 및 대조 약물과의 유의차를 검정하였다.

$$\% \text{ swelling} = \frac{V - V_i}{V_i} \times 100 \tag{4}$$

V<sub>i</sub> : 처음 발의 부피,

V : carrageenan 주사 3 시간 후의 발의 부피

% inhibition =

$$\left(1 - \frac{\% \text{swelling of drug - treated group}}{\% \text{swelling of control group}}\right) \times 100$$

**In vitro 약물방출 실험**

제조한 5% 겔 및 크림제, 10% 겔 및 크림제를 각각 1.5 g씩 정밀히 달아 셀룰로오스막(Dialysis tubing, Sigma)에 적용시키고, 이 셀룰로오스막을 modified Franz 확산셀 위에 고정시킨 후 receptor phase로 방출되는 약물의 양을 1, 3, 5, 7, 9, 11 시간째에 200 µl씩 채취하여 HPLC로 분석하였다. 채취된 양은 즉시 동량의 receptor phase로 보충하였다. 이때, receptor phase로는 미리 37°C로 유지시킨 메탄올을 사용하였고, diffusion cell drive system을 이용하여 실험중 온도는 37±0.5°C, rpm은 600으로 일정하게 유지하였다. 방출된 양은 Touitou 등이 보고한 식<sup>18)</sup>으로 계산하였다.

KF 200 mg을 이동상(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH = 1 : 1) 100 ml에 용해시키고(2 mg/ml), 적당량을 취하여 다시 이동상으로 희석하여 50, 100, 150, 200(µg/ml)의 표준용액을 만들어 HPLC를 이용하여 피이크 높이를 측정하여 검량선을 작성하였으며, 분석 조건은 실온에서 µ Bondapak™ NH<sub>2</sub> column, mobile phase는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH(1 : 1), flow rate는 1.2 ml/min, sensitivity는 1.0 AUFS으로 278 nm에서 20 µl inject

하여 측정하였다.

**자료의 분석** - 균일하게 용해된 반고형제에서 일어나는 약물의 방출을 나타내는 Higuchi 식을 이용하여 메탄올 상으로 방출된 약물의 양으로부터 확산계수(D)를 계산하였다.<sup>19)</sup>

$$q = 2C_0 \left( \frac{Dt}{\pi} \right)^{1/2} \quad (6)$$

q는 단위면적당 방출된 약물의 양( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $C_0$ 는 초기약물농도( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), D는 약물의 확산계수( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )이고 t는 시간(hr)이다.

**제제의 급성독성 실험<sup>20,21)</sup>**

이 시험은 의약품 등의 독성시험기준(식약청 고시 제1998-116호)에 준하여 실시하였다. 10% KF 겔과 10% KF 크림을 사용하였고, 대조 물질로는 KF 겔기제와 크림기제를 사용하였다. 시험물질은 모두 냉장 보관하여 시험에 사용하였다. 실험동물은 SD계 랫트(250~300 g)를 사용하였으며 1주일간 순화 사육 후 외견상 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 동물의 사육 환경은 온도 20~23°C, 상대습도 55±5%, 명암 교대시간 12 시간을 유지하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취시켰다.

경피투여시험의 경우 시험물질의 투여 한계를 2.0 g/kg으로 한다는 점<sup>20)</sup>에 근거하여 10% 크림 및 겔제제 모두 2.0 g/kg의 용량으로 실시하였다. 대조군에는 겔기제 및 크림기제를 사용하고 각 군의 랫트의 수는 5마리로 하였다. 시험물질 도포 하루 전에 랫트의 등 부위를 electric clipper (Oster)로 제모한 다음 유성펜으로 적용 부위를 표시하였다. 시험물질 적용 부위의 면적은 경피투여 시험에서 일반적으로 이용되는 체표면적의 10%에 해당하는 면적이었다. 시험물질은 동물의 등부위 피부에 적용한 다음 균일하게 도포하였다.

도포 후 14일간 일반상태, 동물의 폐사여부, 체중변화 등을 관찰하였다. 일반증상 관찰시 도포 당일은 투여 전 1회 및 투여 후 8 시간까지는 수 차례, 투여 익일부터는 1일 2회씩(오전, 오후) 관찰하였다. 체중은 시험물질 도포일, 도포 후 3일, 7일, 10일, 13일에 측정하였고 시험기간 종료 후 모든 동물은 부검을 실시하여 복강 및 흉강 장기를 관찰하였다.

체중변화에 대한 통계학적 분석은 t-test를 이용하여 대조군과의 시험군간 유의차를 검정하였다( $p < 0.05$ ).

**결과 및 고찰**

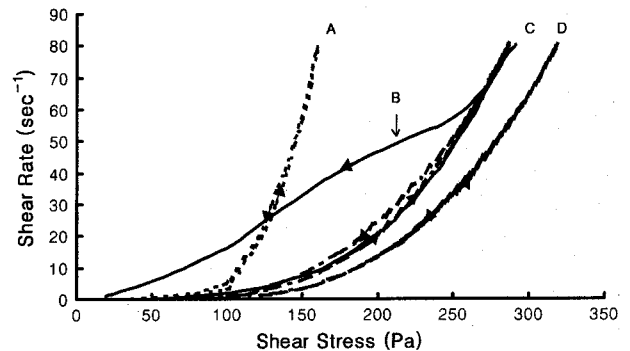
**제제의 안정성**

5% 겔과 10% 겔의 경우 실온, 냉장 조건에서 6개월 동

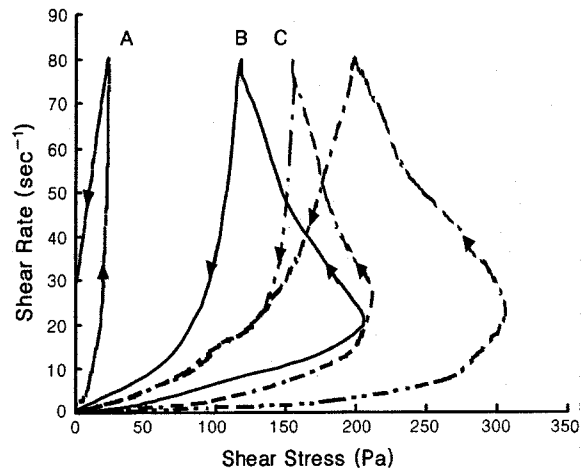
안 관찰한 결과 육안으로나 현미경상으로 안정한 상태를 유지하였다. 5% 크림과 10% 크림의 경우 실온, 냉장 조건에서 6개월간 안정한 상태를 유지하였으며, 온도 40°C 및 습도 75% 조건하의 시료에서는 4개월 이후에 현미경으로 관찰한 결과 내상의 액적이 커지는 현상을 볼 수 있었고, 육안으로는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

**유동학적 성질**

겔기제, 5% 및 10% 겔, 케노펜® 겔의 유동성은 Figure 1에서 나타낸 것처럼 비뉴턴계 중에서 원점을 통과하지 않고 항복치를 갖는 소성흐름을 나타냈으며, 크림기제, 5% 및 10% 크림, 세레스톤-지® 크림의 경우에는 원점을 통과하면서 거의 직선성이 없는 유사소성흐름을 나타내었다. 한편 Figure 2에서 하향곡선이 상향곡선의 좌측으로 옮겨지므로써



**Figure 1**—Rheogram of gel formulation. Right line of each rheogram is up-curve, and left line of each curve is down-curve. A(···); Kenofen® gel, B(—); gel base, C(---); 5% ketonic fraction (KF) gel, D(-· · ·); 10% KF gel.



**Figure 2**—Rheogram of gel formulation. Right line of each rheogram is up-curve, and left line of each curve is down-curve. A(···); Celestone-G® cream, B(—); cream base, C(---); 5% ketonic fraction (KF) cream, D(-· · ·); 10% KF cream.

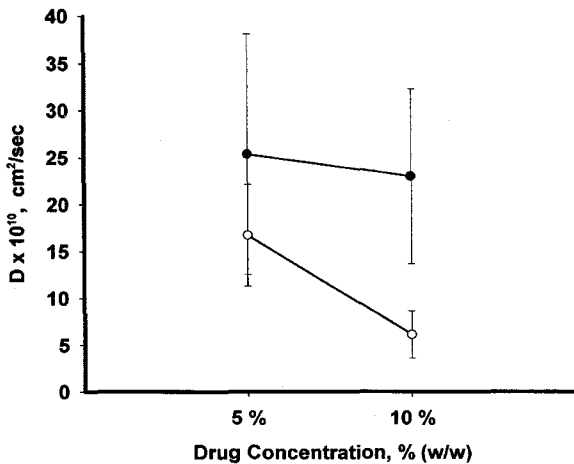


Figure 3—Apparent diffusion coefficients of ketonic fraction (KF) released from 5% and 10% KF gels and creams. ●; 5% and 10% KF gel, ○; 5% and 10% KF cream.

요변성 (thixotropy)이 나타났고, 이력고리를 형성하였다. 이력고리의 면적(hysteresis loop area ; HLA)을 구하여 요변성의 정도를 측정하였다.

모든 경우에 비뉴턴계이였으므로 점성도( $\eta$ ) 대신에 겔보기점성도( $\eta_{app}$ )로 나타내었고,  $\eta$ 의 경우와 마찬가지로 전단응력을 전단속도로 나눈 값으로 나타내었다. 이 때, 직선이 아니므로 상향곡선과 하향곡선의 측정된 각 점에서의 겔보기점성도를 구하여 각 곡선에서의 평균값으로 나타내었다 (Table I). 케노펜<sup>®</sup> 겔과 세레스톤-지<sup>®</sup> 크림에 비하여 KF 겔 및 크림의 평균점도가 높은 경향을 보였다. 또한, 겔 및 크림기제보다 KF의 함량이 많을수록 높은 점도 및 항복치가 나타났다. 겔기제의 경우 이력고리면적이 3820 (Pa/s)으로 요변성이 컸으나, 케노펜<sup>®</sup> 겔, 5% KF 겔, 10% KF 겔은 450(Pa/s) 이하로 요변성이 작았다. 크림의 경우는 대조약물인 세레스톤-지<sup>®</sup> 크림을 제외한 5% KF 크림, 10% 크림, 크림기제 모두 상향곡선의 모양이 부푼 듯한 곡선(bul-ged curve)을 형성하였고, 9000(Pa/s)이상의 HLA를 나타내어 보

Table I—Rheological Properties of Gels (base, 5% KF, 10% KF, Kenofen<sup>®</sup>) and creams (base, 5% KF, 10% KF, Celestone-G<sup>®</sup>)

	Hysteresis loop area (Pa/s)	Apparent viscosity <sup>a</sup> ( $\eta_{app, mean}$ )		
		up-curve	down-curve	
Gel	Kenofen <sup>®</sup>	150	7.90 <sup>b</sup>	7.33 <sup>c</sup>
	Base	3820	11.88	5.64
	5% KF <sup>d</sup>	450	12.48	10.26
	10% KF	260	13.98	11.31
Cream	Celestone-G <sup>®</sup>	1807	1.25	0.24
	Base	10200	10.26	4.60
	5% KF	9240	17.03	9.02
	10% KF	19130	74.49	6.33

<sup>a</sup> $\eta_{app}$  = shear stress/shear rate.

<sup>b</sup>mean value of viscosity was obtained from 100 points of up-curve.

<sup>c</sup>mean value of viscosity was obtained from 100 points of down-curve.

<sup>d</sup>ketonic fraction.

관시의 안정성 및 적용성이 좋을 것으로 생각되었다.

외용제제의 항생물질과의 병용효과

외용제제와 항생물질과의 병용시 항균력에 대한 효과를 Table II에 나타내었다. 즉 실험한 5가지 균주에 대하여 KF와 겐타마이신 혼합제제가 KF나 겐타마이신 단일제제보다 큰 항균력을, KF와 네오마이신 혼합제제가 KF나 네오마이신 단일제제보다 큰 항균력을 나타내었다. 겐타마이신 및 네오마이신 단일제제의 경우 3가지 quinolone resistant strain (QRS)에 대하여 실험농도에서 항균력을 나타내지 않았으나, KF와의 혼합제는 KF 단일제제보다 큰 항균력을 보여 병용효과를 확인할 수 있었다.

Carrageenan 유발 부종법에 의한 제제의 항염작용

다양한 외용제제의 부종억제 실험결과는 Table III과 같았다. 대조군의 족부종율(swelling percent)의 경우는 겔기제와 크림기제 사용결과의 평균값(83.3±10.9%)으로 나타내었다.

Table II—Antimicrobial Activities of KF Gel, Gentamicin (GM) Gel, Neomycin (NM) Gel, KF+GM Combined Gel, and KF+NM Combined Gel by Agar Diffusion Method

Strains	Inhibition diameter (mm)				
	KF <sup>a</sup>	GM <sup>b</sup>	GM + KF <sup>c</sup>	NM <sup>d</sup>	NM + KF <sup>e</sup>
Staphylococcus aureus 285 <sup>f</sup>	19.13 ± 0.05	20.06 ± 0.06	25.78 ± 0.02	17.24 ± 0.06	26.28 ± 0.27
Staphylococcus aureus 694 <sup>g</sup>	19.45 ± 0.06	12.25 ± 0.08	25.35 ± 0.03	10.56 ± 0.06	25.38 ± 0.21
Staphylococcus aureus 293 <sup>h</sup>	21.78 ± 0.08	- <sup>i</sup>	22.67 ± 0.34	-	23.23 ± 0.04
Staphylococcus epidermidis 329 <sup>h</sup>	11.29 ± 0.03	-	13.50 ± 0.03	-	15.36 ± 0.05
Staphylococcus species 245 <sup>h</sup>	11.63 ± 0.35	-	13.76 ± 0.06	-	14.10 ± 0.04

Results indicate mean ± SD from three separate experiments. <sup>a</sup> 10% ketonic fraction gel. <sup>b</sup> 0.1% (w/v) GM gel. <sup>c</sup> combined gel contains 0.1% GM and 10% KF. <sup>d</sup> 0.5% (w/v) NM gel. <sup>e</sup> combined gel contains 0.5% (w/v) NM and 10% KF. <sup>f</sup> gram positive bacteria. <sup>g</sup> methicillin resistant Staphylococcus aureus. <sup>h</sup> quinolone resistant strains. <sup>i</sup> inhibition diameter was not observed.

**Table III—Anti-inflammatory Effects of 10% KF Gel, 10% KF Cream, and Commercial Preparations Applied to the Carrageenan Injected paw**

Material	No. of rats	% Swelling <sup>a</sup>	% inhibition <sup>b</sup>
Control <sup>c</sup> (base)	8	83.3 ± 10.9	-
10% KF <sup>f</sup> cream	8	61.9 ± 8.3 <sup>d</sup>	25.6
10% KF gel	8	43.4 ± 10.1 <sup>e</sup>	47.9
Kenofen <sup>®</sup> gel	8	40.1 ± 3.3 <sup>e</sup>	51.9
Celestone-G <sup>®</sup> cream	8	40.4 ± 2.9 <sup>e</sup>	51.5

Results indicate mean SD from three separate experiments.

<sup>a</sup> % swelling =  $(V - V_i) \times 100 / V_i$

$V_i$  ; initial volume of the hind paw.

$V$  ; volume of the hind paw 3 hours after drug administration.

<sup>b</sup> % inhibition of edema =  $(1 - \frac{\% \text{swelling of drug - treated group}}{\% \text{swelling of control group}})$

<sup>c</sup> mean value of %swelling obtained from cream base and gel base.

<sup>d</sup> significantly different with respect to control. :  $p < 0.05$

<sup>e</sup> significantly different with respect to control. :  $p < 0.01$

<sup>f</sup> ketonic fraction.

10% KF 크림 및 겔제 모두 겔기제(대조군)에 비하여 유의성 있게 항부종 효과가 있음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ). 10% KF 겔(47.9% inhibition)의 경우 케노펜<sup>®</sup> 겔 및 쉐레스톤-지<sup>®</sup> 크림의 부종억제 효과와 거의 비슷한 정도의 부종억제 효과를 보였고(대조군 대비  $p < 0.01$ ), 10% KF 크림의 경우에는 부종억제효과(25.6% inhibition)는 있지만 대조약물 (케노펜<sup>®</sup> 겔 ; 51.9% inhibition, 쉐레스톤-지<sup>®</sup> 크림; 51.5% inhibition) 보다는 낮은 효과를 나타내었다.

**약물방출실험**

검량선을 작성한 후 최소 자승법을 이용하여 계산한 검량선의 회귀 방정식은 아래와 같았다.

$$Y(\text{Peak height}) = 6.095 \cdot X(\text{concentration.}) + 12.75(r=0.9961)$$

KF 함유 외용제제의 *in vitro* 약물 방출 실험을 12 시간

까지 실시한 결과를 Table IV에 나타내었다. 10% KF 겔에 비하여 5% KF 겔이, 10% KF 크림에 비하여 5% KF 크림의 약물 방출율이 크게 나타났다. 또한, 겔제제의 경우 크림제보다 약물방출율이 큰 결과를 보였다.

단위 면적당 방출된 약물량의 경우 10% KF 겔, 5% KF 겔, 10% KF 크림, 5% KF 크림순으로 나타나 5% 함량의 겔제제의 단위 면적당 방출량이 10% 함량의 크림보다 더 많음을 알 수 있었다. Higuchi equation을 이용하여 확산계수를 계산한 결과 5% KF 겔( $2.6 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ), 10% KF 겔( $2.3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ), 5% KF 크림( $1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ), 10% KF 크림( $6.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ) 순으로 나타났다(Table IV).

결국, 5% KF 겔의 약물방출속도가 가장 빨랐고, 10% KF 크림의 약물방출속도가 가장 느린 결과를 보였다.

**외용제의 급성독성**

10% KF 크림 및 겔제제 2000 mg/kg을 도포한 시험군에서 폐사는 관찰되지 않았으며, 피부홍반이나 염증 등 시험물질과 연관된 것으로 판단되는 어떠한 임상증상도 시험물질 투여직후나 2 주간의 관찰기간동안 출현하지 않았다(Table V).

시험기간 중에 측정된 랫트의 체중에 있어서도 투여한 제제의 제형에 관계없이 시험물질을 적용한 시험군에서 시험물질 투여에 따른 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았으며, 정상적인 체중증가를 보였다(Table VI). 즉, 사용농도에 있어서 KF는 급성독성이 없으며, 크림이나 겔 제조 시에 사용된 여러 가지 부형제 또한 급성독성을 일으키지 않는 것으로 판단되었다.

**결 론**

*Leptospermum scoparium*의 추출물인 ketonic fraction

**Table IV—Release Profiles of KF<sup>a</sup> from 5% and 10% KF Gels and Creams**

			Time (hours)						$D^b \times 10^{10}$ ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )
			1	3	5	7	9	12	
release amount ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )	KF gel	5%	0.9 ± 0.1	3.0 ± 1.3	4.6 ± 0.6	6.7 ± 0.9	7.7 ± 0.4	9.7 ± 2.4	26.4 ± 12.8
		10%	1.3 ± 0.3	3.7 ± 1.0	7.9 ± 1.4	11.7 ± 1.1	14.8 ± 2.2	18.5 ± 3.7	22.9 ± 9.3
	KF cream	5%	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.3	2.3 ± 0.5	3.4 ± 0.6	5.3 ± 0.7	7.9 ± 1.3	16.7 ± 5.4
		10%	0.2 ± 0.0	1.5 ± 0.2	3.0 ± 0.7	4.9 ± 1.0	6.5 ± 0.3	9.6 ± 1.9	6.1 ± 2.5
release percent (%)	KF gel	5%	3.8 ± 0.5	12.5 ± 5.2	19.1 ± 2.6	38.0 ± 3.8	32.2 ± 1.8	40.4 ± 9.9	
		10%	2.8 ± 0.7	7.7 ± 2.0	16.6 ± 2.9	24.4 ± 2.2	31.0 ± 4.5	38.7 ± 7.6	
	KF cream	5%	0.7 ± 0.2	4.9 ± 1.1	9.7 ± 2.1	14.4 ± 2.7	22.3 ± 2.9	33.2 ± 5.2	
		10%	0.4 ± 0.0	3.2 ± 0.4	6.4 ± 1.5	10.2 ± 2.1	13.6 ± 0.6	20.0 ± 4.1	

Results indicate mean ± SD from three separate experiments. <sup>a</sup>ketonic fraction.

<sup>b</sup> $q=2Co(Dt/\pi)^{1/2}$  (Higuchi equation),  $q$ ; released drug amount per unit area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $Co$ ; original drug concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $D$ ; apparent drug diffusion coefficient ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ ),  $t$ ; time (hours).

**Table V**—Mortalities and Redness in the Rats Percutaneously Administered with 10% KF<sup>a</sup> Cream and Gel

Drug	Dose (mg/kg)	No. of animals	No. of death		Lethality (%)	Redness
			Days after administration			
			0	1-14		
cream base	2000	5	0	0	0	<sup>b</sup>
KF cream	2000	5	0	0	0	-
gel base	2000	5	0	0	0	-
KF gel	2000	5	0	0	0	-

<sup>a</sup>ketonic fraction.

<sup>b</sup>skin redness was not observed during 14 days.

**Table VI**—Body Weight Changes in the Rats Percutaneously Administered with 10% KF<sup>a</sup> Cream and Gel

Drug	Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after administration			
			0	3	7	13
cream base	2000	5	278.8 ± 10.9	285.0 ± 11.1	303.0 ± 8.1	332.0 ± 15.2
KF cream <sup>b</sup>	2000	5	280.4 ± 13.4	286.2 ± 13.8	304.6 ± 21.2	330.0 ± 25.0
gel base	2000	5	330.8 ± 16.1	338.0 ± 14.9	360.4 ± 15.7	382.6 ± 17.7
KF gel <sup>c</sup>	2000	5	304.4 ± 3.0	314.4 ± 4.3	332.2 ± 11.5	359.4 ± 13.3

Results indicate mean ± SD from three separate experiments.

<sup>a</sup>ketonic fraction. <sup>b</sup>no significant significance with respect to control (cream base).

<sup>c</sup>no significant difference with respect to control (gel base).

(KF)을 5% 및 10% 함유하는 외용 젤 및 크림제를 제조하고, 제제의 항균성, 병용효과, 안정성, 유동학적 성질, 항부종효과, 약물방출속도 및 급성 독성실험 등을 시험하여 다음의 결론을 얻었다.

제조한 외용크림 및 겔제제는 실온에서 6개월 저장할 때, 육안 및 현미경상 매우 안정한 상태를 유지하였다.

*Staphylococcus aureus* 2855, *Staphylococcus aureus* 694 E(MRSA), *Staphylococcus aureus* 293(QRS), *Sta. epidermidis* 329(QRS), *Sta. species* 245(QRS) 등 5가지 균주에 대한 항생물질과의 병용에서, 겐타마이신, 네오마이신 단일제제에 비하여 각 항생제와 KF의 병용제제의 항균력이 상승효과가 있었고, 제제의 유동학적 성질은 겔제제가 소성흐름을, 크림제제가 유사소성흐름을 나타내었고, KF의 함량이 증가함에 따라 점도가 커졌으며, 겔의 경우는 HLA가 현저히 감소하였다.

제제의 항부종효과는 겔과 크림이 대조군에 비하여 유의성 있게 부종을 억제하였으며, 특히 크림제의 부종억제율이 컸다. 제제로부터 약물의 방출은 겔제제가 크림제보다 빨랐고, KF 10% 함유 겔보다 5% 함유 겔의 방출율이 양호하였다. 실험기간 중 어떠한 급성독성의 임상적 이상증상이 없었으며, 체중 증가율도 대조군과 유의성 있는 차이가 없었다.

이상의 실험결과에서, *Leptospermum scoparium* 추출물 중 KF를 함유한 외용제제의 항균력이나 항염증 효과가 우

수하였으며, 급성독성이 없고 겔의 경우 방출율이 양호하였으며, 특히 겐타마이신이나 네오마이신과의 병용에서 상승작용을 나타내어서, KF가 항염증 외용제제 개발의 가능성이 크다고 생각된다.

## 문 헌

- 1) R. C. Cooper and R. C. Cambie, *New Zealand's economic native plants*, Auckland, Oxford University Press, pp. 137-153 (1991).
- 2) N. B. Perry, N. J. Brennan, J. W. Klink, W. Harris, M. H. Douglas, J. A. McGimpsey, B. M. Smallfield and R. E. Anderson, Essential oil from New Zealand Manuka and Kanuka, *Chemotaxonomy of Leptospermum Phytochemistry*, 8, 1485-1494 (1997).
- 3) S. G. Brooker, R. C. Cambie and R. C. Cooper, *New Zealand medicinal plants*, Auckland. Heinemann, pp. 69-73 (1987).
- 4) L. H. Briggs, A. R. Penfold and W. F. Short, *Leptospermone*. Part I, *J. Chem. Soc.*, 67, 1193-1195 (1945).
- 5) B. F. Cain, The water soluble phenolics of bark extracts of *Leptospermum scoparium* forst, *New Zealand Journal of Science*, 6, 264-268 (1963).
- 6) I. Boase and T. Williams, Crop & food research and maori in the food industry, *The food technologist*, 24-26 (1994).
- 7) N. B. Perry, M. H. Douglas and N. G. Porter, Essential oils and extracts from New Zealand, *Perfumer & Flavorist*, 18, 25-30 (1993).

- 8) N. G. Porter and A. L. Wilkins, Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*, *Phytochemistry*, **50**, 407-415 (1999).
- 9) N. Atkinson and H. E. Brice, Antibacterial substances produced by flowering plants, *Austral. J. Exp. Biol.*, **33**, 547-554 (1955).
- 10) M. Douglas, J. McGimpsey and N. Perry, Essential oils in New Zealand, *Horticulture in New Zealand*, **5**, 22-25 (1994).
- 11) D. Joulain, Investigating new essential oil, Rationale, Result and limitations, *Perfumer & Flavorist*, **21**, 1-10 (1996).
- 12) M. C. Recio, J. L. Rias and A. Villar, A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phytother. Res.*, **3**, 117-121 (1988).
- 13) S. Shapiro, A. Meier and B. Guggenheim, The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria, *Oral microbial Immunology*, **9**, 202-208 (1994).
- 14) E. H. Kim and G. J. Rhee, Activities of ketonic fraction from *Leptospermum scoparium* alone and synergism in combination with some antibiotics against various bacterial strains and fungi, *Yakhak Hoeji*, **43**, 716-728 (1999).
- 15) G. J. Rhee and W. L. Lah, Studies on the rheological properties on the some marketing emulsion base ointments, *Seoul Natl. Univ. J.*, **24**, 24-31 (1974).
- 16) C. A. Winter, E. A. Risley and G. W. Nuss, Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544-547 (1962).
- 17) D. J. Schrier, S. Moniot, M. I. Gluckman and R. B. Gilbertsen, The topical anti-inflammatory effects of a topical preparation of meclofenamic acid on carrageenan-induced footpad swelling in mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 57-59 (1987).
- 18) E. Touitou, and L. Abed, Effect of propylene glycol, Azone and n-decylmethyl sulfoxide on skin permeation kinetics of 5-fluorouracil, *Int. J. Pharm.*, **27**, 89-98 (1985).
- 19) W. I. Higuchi, Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 802-804 (1962).
- 20) A. W. Hayes, *Principles and methods of toxicology*. 3rd ed., Raven press. New York, USA (1989).
- 21) T. Glinsukon, V. Sittunnaithum, C. Toskulkao, T. Buranawuti and V. Tangkrisanavinont, Acute toxicity of capsaicin in several animal species, *Toxicol.*, **18**, 215-220 (1980).