

추출 방법에 따른 甘桔湯加味方の 抗炎症, 鎮痛, 解熱, 抗酸化 및 Histamine 투과 억제효과

진형준, 김남재*, 최혁재*, 정희재, 정승기

경희대학교 한의과대학 폐계내과학 교실, *경희의료원 한방병원 한약물연구소

Anti-inflammatory Effects, Analgesic Effects, Antipyretic Effects, Anti-oxidative Effects, and Histamine Permeation Inhibition Effects of Modified *Gamgil-tang* per Extraction Method

Hyung-joon Jin, Nam-jae Kim*, Hyuck-jai Choi*, Hee-jae Jung, Sung-ki Jung

Department of Oriental Medicine, Graduate School of Kyung Hee University,

*Research institute of Korean Herbal Medicine, Hospital of Korean Medicine, Kyung Hee University.

ABSTRACT

Objectives : Modified *Gamgil-tang* is a prescription commonly used for respiratory diseases. This thesis was carried out to check the treatment effects and diversity of drug formulation by comparing extraction method of ethanol and water of modified *Gamgil-tang*.

Methods : All experiments were carried out with water and 50% ethanol extraction for comparison. *In vivo* experiment, hyaluronidase inhibitory effects and trypsin inhibitory effects were tested to measure the anti-inflammatory effects activity. Scavenging effects of DPPH free radical, xanthine oxidase inhibitory effects and inhibition on TBA-RS formation were experimented to measure anti-oxidative effects. With the *in vivo* experiment, ICR group mice and SD group rats were used as experimental animals. An anti-inflammatory effects experiment were carried out to measure the action on carrageenin-induced hind paw edema; analgesic effects were measured using writhing syndrome induced by 0.7% acetic acid in mice; antipyretic effect was measured using endotoxin, and inhibitory effects of increase vascular permeability induced by 0.5% histamine were measured.

Results : For extraction of glycyrrhizin contents, ethanol extract was extracted 2 times of that of water extract. Anti-inflammatory effects showed high in ethanol extract. Anti-oxidative effects measured high in ethanol extract. No significant result was found in inhibition on TBA-RS formation. Analgesic effects were found to be similar in water and ethanol extract. Antipyretic effects were found to be stronger in water extract. Inhibitory effects of increase vascular permeability induced by 0.5% histamine showed stronger in ethanol extract.

Conclusion : By measuring anti-inflammatory effects, analgesic effects, antipyretic effects, anti-oxidative effects, and histamine permeation inhibition effects both in water extract and ethanol extract after adding agents such as *Mentha Herba*, *Gardeniae Fructus*, and propolis to existing *Gamgil-Tang*, ethanol extract was found to be more effective in anti-inflammatory effects, analgesic effects, anti-oxidative effects, and histamine permeation inhibition effects. The converse was found for antipyretic effect.

Key words : *Gamgil-tang*, anti-inflammatory, analgesic, anti-oxidative, histamine

· 교신저자: 정승기 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148
E-mail: jskes@unitel.co.kr

I. 서론

우리가 일상생활에서 경험하는 질환 중 가장 흔한 것이 호흡기 질환이며 특히 급성 상기도 질환인 感冒는 걸려보지 않은 사람이 없을 정도이다. 대부분 感冒는 자연치유율이 높으나 신체적으로 허약한 상태에서는 지속적인 증상과 타질환의 합병증의 유발성이 높다¹.

우리나라 2004년도 건강보험통계에 의하면 외래 다빈도 질환중 1. 급성편도선염, 2. 급성기관지염, 3. 다발성 및 상세불명 급성 상기도질환, 5. 급성인두염, 7. 급성비인두염(감기) 등이 차지하고 있다². 그리고 임상관련 논문에서 이³는 감기로 진단된 한방병원 내원한 환자 72명의 주증상은 咳嗽, 咯痰, 咽痛 및 咽痒으로 대부분 風熱型 感冒(84.7%)라고 보고 하였다. 한⁴도 小青龍湯을 이용한 感冒임상시험에서 주 증상이 咽喉痛이 제일 많았으며, 콧물 기침, 재채기 순으로 호소한다고 보고 하였다. 이처럼 최근에는 咽喉증상과 관련된 感氣가 늘어나고 있으므로 이러한 증상에 대처할 治方을 개발 및 연구하여야 할 것으로 생각된다.

傷寒論에서 少陰病 二三日 咽痛者에 桔梗과 甘草가 主藥인 甘桔湯으로 치료한다고 되어 있으며, 方藥合編에 少陰客寒 咽痛에 甘桔湯(甘草 桔梗)으로, 東醫寶鑑에서는 風熱咽喉腫痛 或 喉痺에 必用 方甘桔湯(桔梗 甘草 荊芥 防風 黃芩 薄荷)으로 治療한다고 하였다.

이에 저자는 甘桔湯에 發散風熱하고 利咽喉하는 작용이 있는 薄荷⁵와 清熱瀉火작용으로 咽痛 치료에 효과적인 梔子⁵와 현재 염증에 많이 사용되고 있는 propolis, menthol⁹을 가하여, 甘桔湯加味方을 구성하였다.

또한 한약물이 갖고 있는 유효성분을 보다 많이 추출하여 치료의 효능을 높이기 위하여 물뿐만 아니라 에탄올을 이용하여 甘桔湯加味方을 추출하여 消炎, 鎮痛, 抗酸化 및 histamine 투과 억제 효과 등과 관련된 다양한 실험을 시행하여 유의한 결과

를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

桔梗, 甘草, 薄荷, 梔子, 멘톨은 경희한약(문막, 한국)에서 구입하여 대한약전 해당 항목에 적합한 것을 엄선하여 사용하였으며, 프로폴리스(고형분 38%)는 하치노다카라코리아(서울, 한국)에서 구입하여 식품공전에 적합한 것을 사용하였다(Table 1).

Table 1. Contents of Modified *Gamgil-Tang*

Herb	Scientific Name	Dose
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	20g
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	5g
薄 荷	<i>Mentha Herba</i>	5g
梔 子	<i>Gardeniae Fructus</i>	8g
Propolis	<i>Propolis</i>	2.0ml
Menthol	<i>Menthol</i>	4g

2) 검액의 조제

桔梗 200g, 甘草 50g, 薄荷 50g을 취하여 잘 혼합한 후 round bottom flask에 옮기고 각각 물 1,500 ml과 50% 에탄올 1,500ml를 가하여 2시간 환류추출한 다음 여과하였다. 각각 여액을 rotary evaporator로 감압농축하여 얻은 점조성 추출물을 동결건조하여 加味甘桔湯 물추출 건조분말 117.0g(수율 39.0%, 이하 S-I)과 50% 에탄올추출 건조물 117.9g(수율 39.3%, 이하 S-II)을 각각 얻었다.

한편 조절한 梔子 100g을 round bottom flask에 옮기고 80% 에탄올 500ml를 가하여 2시간 동안 환류추출한 다음 여과하였다. 여액을 rotary evaporator로 감압농축하여 얻은 점조성 추출물을 동결건조하여 梔子 추출물 25.8g(수율 25.8%)을 얻었다.

加味甘桔湯 추출물 S-I 및 S-II 각각 12g에 梔子 추출물 1.0g, 프로폴리스 2.0ml 및 멘톨 2.0g을 가하여 잘 혼합한 후 甘桔湯加味方 물 추출물 조합을 Sample-I, 50% 에탄올 추출물 조합을 Sample-II로 하였으며, 각각 필요로 하는 농도로 희석하여 검액으로 사용하였다.

3) 시약 및 기구

Xanthine, xanthine oxidase, bovine serum albumin, NBT(Nitroblue Tetrazolium), CuCl_2 , trypsin, trichloroacetic acid, Trizma Base, hyaluronic acid-K, hyaluronidase, DMAB reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), TBA, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 1,1,3,3-tetraethoxypropane는 Sigma Co. (미국), mannitol, Sucrose, EDTA-2Na, sodium bicarbonate, phenol, sodium hydroxide, dimethyl sulfoxide는 Yakuri Pure Chemicals Co.(일본), glycyrrhizin는 Wako Pure Chemical Co. Ltd(일본), sodium carbonate, sodium ascorbate, casein은 Junsei Chemicals Co.(일본), HPLC용 H_2O , AcOH, acetonitrile은 J. T. Baker Co.(미국) 등을 사용하였다.

기구로는 감압농축기(EYELA Co., Model NE-1, 일본), 동결건조기(EYELA Co., Model FD-1, 일본), HPLC system(Waters Co, Alliance 2690 Separation Module, Column heater, Photodiode array detector 996, Millennium 32 Workstation, 미국), 분광광도계(Shimadzu Co, UV-160A, 일본), 원심분리기(Vision Scientific Co., VS-6000CFN, 한국), 직장체온측정기(Shibaura Electric Co. LTD, MGA-III 219, 일본), Plethysmometer(UGO BASILE, Co. Italy) 등을 사용하였다.

4) 동 물

(주)샘타코(오산, 한국)에서 구입한 25g 전후의 ICR계 웅성 생쥐 및 250g 전후의 SD계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 물은 상수를 사용하여 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 2주간 순응시킨 후 사용하였다. 특별히 명시하지 않는 한 실험은 $24 \pm 2^\circ\text{C}$,

습도 60%의 항온, 항습장치가 되어 있는 실험실내에서 실시하였다.

2. 방법

1) 지표성분 Glycyrrhizin 함량측정

지표성분 Glycyrrhizin 함량측정은 加味甘桔湯(桔梗, 甘草, 薄荷) 추출물인 S-I과 S-II를 이용하였다. S-I 및 S-II 중 glycyrrhizin의 정량은 Kitagawa 등의 방법¹⁰에 준하여 HPLC법을 이용하여 측정하였다. 따로 glycyrrhizin 표준품 약 25 mg을 정밀하게 달아 묽은 에탄올을 넣어 100ml로 하여 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 20 μ l씩을 가지고 다음 조건으로 HPLC법에 따라 시험하여 표준액의 검량선으로부터 glycyrrhizin 량을 산출하였다. HPLC 조건은 다음과 같다.

검출기 : Waters PhotodiodeTM Array Detector 996(측정과장 254nm), 칼럼 : Nucleosil C₁₈ column(4.0 × 250 mm), 칼럼온도 : 실온, 이동상 : 물 · 아세토니트릴 · 초산 혼합액(620 : 380 : 5), 유속 : 1.5ml/min

2) *In vitro*

(1) 抗炎症 활성도 측정

① Hyaluronidase 저해 활성도 측정

Hyaluronidase 저해활성은 각 검액을 일정 농도가 되도록 조제하여 각각 0.1ml씩 시험관에 취하고 hyaluronidase 용액(from bovine testis, 7900units in 0.1M acetate buffer soln., pH 5.0) 0.05ml를 가하고 잘 혼합한 후 37 $^\circ\text{C}$ 에서 20분간 incubation한 다음 activator로서 12.5mM CaCl_2 0.1ml를 가하고 잘 혼합한 다음 다시 20분간 incubation하였다. 기질로서 0.12% hyaluronic acid-K 용액 0.25ml를 가한 다음 다시 40분간 incubation하고 0.4N NaOH 0.1ml 및 postassium borate 용액 (boric acid 49.44g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액에 KOH 22.5g을 가하여 용해한 용액) 0.1ml를 가하여 3분 동안 끓는 수욕상에서 가열하였다. 흐르는 물에 식인 후 발색제로서 DMAB 시약(*p*-dimethylaminobenzaldehyde 10g을

빙초산 : 10N HCl (7:1)용액 100ml에 녹인 용액을 다시 빙초산으로 10배 희석함) 3.0ml를 가하여 37°C에서 20분간 incubation 한 다음 585nm에서 흡광도를 측정 계산하여 50% 저해농도(IC₅₀)로 나타내었다.

② Trypsin 저해 활성도 측정

Trypsin 20µg/ml 및 시료를 각각 1/15M phosphate buffer(pH7.6)에 용해시킨 용액을 각각 40µl씩 취하여 37°C에서 20분간 incubation 하고, 5% trichloroacetic acid 1ml씩 가하여 반응을 종결시키고 0.05M HCl 40µl를 가한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 각 상등액 0.5ml씩을 취하고 0.5M NaOH 1ml씩 가한 후 phenol 시약 0.3ml씩을 가한 다음 37°C 수욕 중에서 15분간 incubation 하고 다시 원심분리하여 얻은 상등액을 660nm에서 흡광도를 측정 계산하여 50% 저해농도(IC₅₀)로 나타내었다.

(2) 抗酸化 측정

① DPPH free radical 소거활성도 측정

Sample-I 및 Sample-II을 메탄올로 실험에 필요로 하는 농도로 희석하여 각 농도당 4ml씩 시험관에 옮기고, 여기에 1×10⁻⁴M DPPH의 에탄올 용액 1ml를 가한 다음 잘 혼합한 후 실온에서 30분간 방치하고 520nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH를 환원시키는 정도로부터 抗酸化 활성을 구했다.

② Xanthine oxidase 저해활성도 측정

0.05M sodium carbonate buffer 0.48ml에 3mM xanthine, 3mM EDTA, 0.15% BSA 및 0.75mM NBT를 각각 0.02ml 씩 가하여 잘 혼합하였다. 여기에 필요로 한 농도로 증류수로 희석한 검액 0.02ml씩 각각 가한 후 실온에서 10분간 방치한 다음 xanthine oxidase 6mU를 넣어 25°C에서 20분간 가온하여 반응시키고 6mM CuCl₂ 0.02ml를 넣어 반응을 종결시킨 뒤 560nm에서 흡광도를 측정하여 비교관찰하였다.

③ 지질과산화 형성억제작용 측정

흰쥐에 20% 사염화탄소 1.0ml/100g을 경구투여

한 후 12시간 동안 절식시킨 다음 복부를 절개하여 간문맥에 polyethylene tube를 삽입하여 4°C로 냉각된 생리식염수액으로 세척한 후 간을 적출하였다. 적출한 간조직 5g에 16배 용량의 A용액(0.21M Mannitol, 0.1M EDTA-2Na, 0.07M Sucrose, 0.01M Trizma base) 80ml를 가한 다음 homogenizer로 균질화하였다. 균질액을 다시 3,000rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 liver homogenate로 하여 실험에 사용하였다. Homogenate 1ml에 10% SDS 0.4ml를 가하여 30분간 37°C에서 incubation한 뒤, 흐르는 물로 식힌 다음 1% phosphate buffer 3ml와 0.6% TBA 1ml를 가하였다. 45분간 100°C 수욕상에서 가열하여 발색시킨 다음 흐르는 물로 식히고 n-butanol 4ml를 가하여 혼합한 뒤, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 정량용 검액으로 사용하였다. MDA 측정을 위한 검량선은 1,1,3,3-tetraethoxypropane으로 검액을 만들어 535nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

3) *In vivo*

(1) Carrageenin 유발 부종에 대한 抗炎症작용 측정

흰쥐 1군을 6마리로 하여 정상 후지족의 용적을 Plethysmometer를 이용하여 측정한 후에 1% carrageenin 0.1ml/rat를 후지 족척에 피하주사하여 부종을 야기시켰다. 기염제 carrageenin 주사 1시간 후에 Sample-I 및 Sample-II 각각 1.0g/kg 및 2.0g/kg을 경구투여하고 1시간 간격으로 5시간 동안 경시적으로 후지족의 용적을 측정하여 부종증가율을 아래의 식으로부터 산출하여 비교관찰하였다. 양성대조약물로 aspirin 400mg/kg을 경구투여 하였다.

$$\text{부종증가율}(\%) = \frac{(V_t - V_n)}{V_n} \times 100$$

V_n : 기염제 주사전의 정상족의 용적

V_t : 기염제 주사후의 부종족의 용적

추출 방법에 따른 甘桔湯加味方的 抗炎症, 鎮痛, 解熱, 抗酸化 및 Histamine 투과 억제효과

(2) 초산법에 의한 鎮痛효과 측정

생쥐 1군을 5마리로 하여 Sample-I 및 Sample-II 각각 1.0g/kg 및 2.0g/kg을 경구투여 하고 30분 후에 0.7% 초산생리식염수액 0.1ml/10g의 농도로 복강내로 투여한 다음 10분 후 부터 10분간의 생쥐에서 나타나는 writhing syndrome의 빈도를 측정하였다. 양성대조약물로 aspirin 400mg/kg을 경구투여 비교관찰하였다.

(3) 解熱작용 측정

흰쥐 6마리를 1군으로 하여 발열물질로는 endotoxin (*E. coli* 026:BC, lipopolysaccharide) 50µg/kg을 꼬리정맥으로 주사하여 발열시켰다. 체온 측정은 직장체온측정기를 사용하여 측정하였으며, 실험 전 흰쥐의 체온을 두 차례 측정하고, 발열물질을 투여한 다음 검액을 각각 경구투여하고 1시간 간격으로 5시간 동안 경시적으로 직장체온을 측정하였다. Sample-I 및 Sample-II 각각 1.0g/kg 및 2.0g/kg을 각각 경구투여하였고, 양성대조약물로 aspirin 400mg/kg을 경구투여하여 비교관찰하였다.

(4) Histamine에 의한 혈관투과성 항진에 대한 억제 효과 측정

생쥐 1군을 7마리로 하여 0.5% histamine 50mg/kg을 생쥐 복강내에 주사하고 30분 후에 4% pontamine sky blue 400mg/kg을 꼬리정맥내에 주사하였다. 색소투여 20분 후에 생쥐를 방혈치사시킨 후에 상법에 따라 개복하고 복강에 누출된 색소를 증류수 10ml로 세척하였다. 세정액을 3,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액 중의 색소량을 분광광도계를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 pontamine sky blue 량을 산출하며 아래의 식으로부터 혈관투과성 항진억제 효과를 산출하였다. Sample-I 및 Sample-II 각각 1.0g/kg 및 2.0g/kg을 histamine액 투여 30분 전에

투여하였으며, 양성대조약물로 aspirin 400mg/kg을 경구투여하여 비교관찰하였다.

$$\text{혈관투과성 항진억제효과}(\%) = \frac{(\text{검액 처치군의 색소누출량} - \text{대조군의 색소누출량})}{(\text{대조군의 색소누출량} - \text{histamine 비처리 정상군의 색소누출량})} \times 100$$

III. 결 과

1. 加味甘桔湯 중 glycyrrhizin 함량 비교 결과

Glycyrrhizin 표준품의 peak가 Rt 14.6분에서 나타남을 관찰할 수 있었으며, S-I 및 S-II 각각에서도 표준품과 동일한 위치에서 glycyrrhizin의 peak가 검출되었다(Table 2). 그리고 glycyrrhizin 표준품의 검량선으로부터 S-I 및 S-II의 glycyrrhizin 함량을 측정한 바 50% 에탄올로 추출한 S-II가 물로 추출한 S-I에 비하여 약 2배 더 추출됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

Table 2. Contents of Glycyrrhizin from *Gami Gamgil-Tang* Extracted by Water and 50% Ethanol

Samples	Contents(%)	
	Glycyrrhizin	Remark
S-I	0.34±0.022	-
S-II	0.64±0.029	191.1

Each data represents mean±SE of 3 experiments.
 S-I : *Gami Gamgil-Tang* was extracted with distilled water
 S-II : *Gami Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

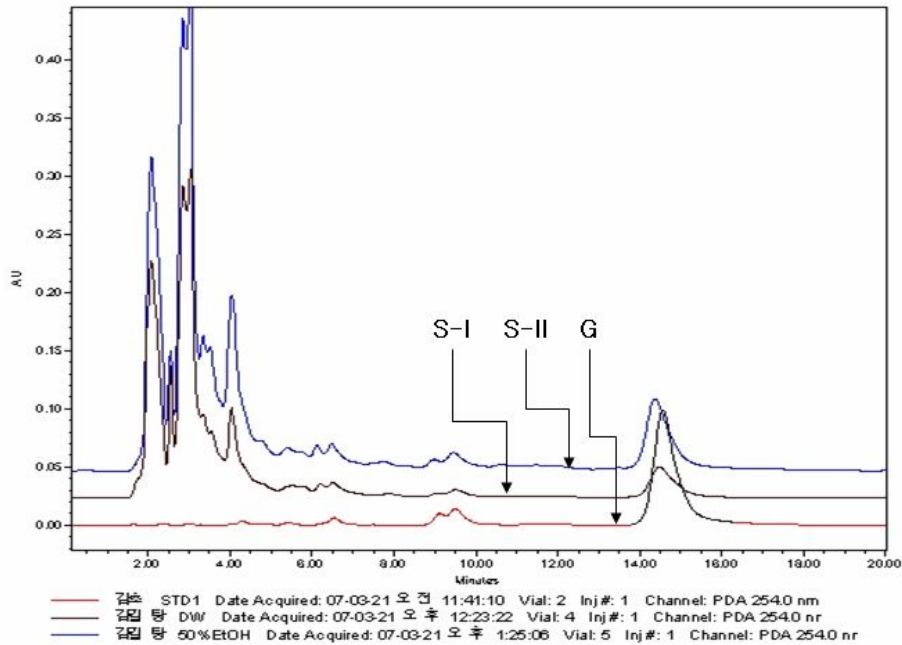


Fig. 1. HPLC chromatogram of *Gami Gamgil-Tang*

S-I : *Gami Gamgil-Tang* was extracted with distilled water

S-II : *Gami Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

G : Glycyrrhizin standard

Detector : Waters Photodiode™ Array detector 996 (253 nm).

Column : Nucleosil C18 column (4.0x250 nm),

Mobile phase : H₂O:CH₃CN:AcOH (620:380:5), Flow rate : 1.5 ml/min

2. In vitro

1) 抗炎症 효과

Hyaluronidase 저해활성은 甘桔湯加味方の 50% 에탄올추출물 Sample-II가 물추출물 Sample-I에 비하여 양호한 항염증활성을 나타냄을 알 수 있었다(Table 3).

2) 抗酸化 효과

지질과산화물 형성 저해작용을 제외한 DPPH 소거활성, xanthine oxidase 저해활성 실험에서 甘桔湯加味方の 항산화활성이 인정되고, 甘桔湯加味方 50% 에탄올 추출물 Sample-II 물 추출물 Sample-I에 비하여 양호한 결과를 관찰할 수 있었다(Table 4).

Table 3. Inhibitory Effects on Trypsin and Hyaluronidase of Modified *Gamgil-Tang* in vitro

Groups	Activities (IC ₅₀ , mg/ml) ^{a)}	
	Sample-I	Sample-II
Inhibition on hyaluronidase	144.6	63.8
Inhibition on trypsin	92.5	68.5

Each data represents mean of 3 experiments.

a) : Concentration required for 50% inhibition.

Sample-I : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with distilled water

Sample-II : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

Table 4. Inhibitory Effects on Superoxide Anion Radical Generation, TBA-RS Formation in Rat Liver Homogenate, and Scavenging Effect of 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) Radical of Modified *Gamgil-Tang* in vitro

Groups	Activities(mg/ml)	
	Sample-I	Sample-II
DPPH scavenging effect	0.169 ^{a)}	0.131
Inhibition on xanthine oxidase	0.105 ^{b)}	0.091
Inhibition on TBA-Rs formation	>100 ^{b)}	>100

Each data represents mean of 3 experiments.

a) : ED₅₀. : Concentration required for 50% effect.

b) : IC₅₀. : Concentration required for 50% inhibition.

Sample-I : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with distilled water

Sample-II : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

3. in vivo

1) Carrageenin 유발 급성부종에 대한 抗炎症 효과
생리식염수만을 투여한 대조군에서는 지속적인 부종증가율을 보였다. 한편 Sample-I 2.0g/kg 투여군은 대조군에 비하여 p<0.001과 p<0.01의 유의한 부종증가억제효과를 관찰할 수 있었고, 반면에 저농도 1.0g/kg 투여군에서는 별다른 영향을 미치지 못하였다.

Sample-II 2.0g/kg 투여군은 대조군에 비하여 p<0.001과 p<0.01의 유의한 부종증가억제효과를 보였으나, 저농도 1.0g/kg 투여군에서는 1시간과 2시간에서 다소 억제시키는 경향을 보이나 통계적으로 유의성은 없었다. Aspirin 400mg/kg 투여군에서는 투여후 대조군에 비해 지속적인 유의한 부종증가억제효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

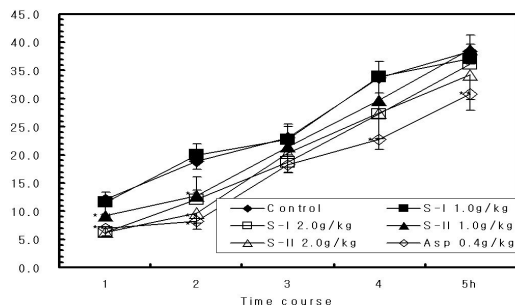


Fig. 2. Antiinflammatory effect of modified *Gamgil-Tang* on carrageenin-induced Hind Paw Edema in Rats

Each bar represents standard error of 6 rats.

Sample-I : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with distilled water

Sample-II : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

* : Statistically significant compared with control data(** : p<0.01 and *** : p<0.001)

2) 초산법에 의한 鎮痛효과

초산법을 이용하여 진통효과를 평가한 결과 대조군의 writhing syndrome의 빈도에 비하여 Sample-I 및 Sample-II 2.0g/kg 투여군에서는 각각 대조군에 비하여 유의한(p<0.05) 억제효과가 관찰되었다. 그러나 Sample-I 및 Sample-II 1.0g/kg 투여군에서는 다소 억제시키는 경향을 보이나 유의성은 없었다. Aspirin 400mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 유의한(p<0.001) 억제효과를 보였다 (Table 5).

3) 解熱효과

대조군은 정상군에 비하여 유의한 체온상승을 보였으며, 38.0°C 정도의 높은 직장체온을 나타내어 발열됨을 알 수 있었다. Sample-I 2.0g/kg 투여군은 검액투여 1, 2, 3시간 및 5시간에서 대조군에 비하여 유의한 체온상승억제효과를 관찰할 수 있었으며, 1.0g/kg 투여군은 검액투여 1시간과 2시간에서 유의한 체온상승억제효과를 보였다. 양성대조 약물 aspirin 400mg/kg 투여군에서는 전실험 기간 동안 유의한 체온상승억제효과를 관찰할 수 있었

다. 효과가 유지되는 것으로 보이나 aspirin처럼 전시
 Sample I, II군 모두 고농도에서 체온 상승 억제 간동안 유지되지는 않았다(Fig. 3).

Table 5. Analgesic Effect of Modified *Gamgil-Tang* on the Writhing Syndrome Induced by 0.7% Acetic Acid in Mice

Groups	Dose(g/kg, p.o.)	No. of animals	Number of writhing syndrome(10min)	Inhibition(%)
Control	-	5	66.8±3.52 ^{a)}	-
Sample-I	1.0	5	60.0±3.06	10.9
Sample-I	2.0	5	58.2±2.19*	12.9
Sample-II	1.0	5	60.2±2.16	9.9
Sample-II	2.0	5	57.6±2.54*	13.8
Aspirin	0.4	5	42.2±2.22***	36.8

a) : Mean±Standard error of 5 mice.

Sample-I : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with distilled water

Sample-II : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

* : Statistically significant compared with control data(* : p<0.05 and ***: p<0.001)

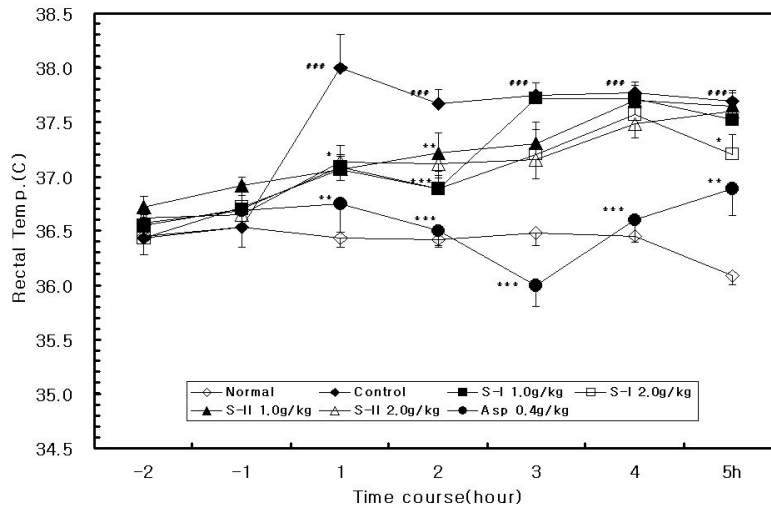


Fig. 3. Antipyretic effect of modified *Gamgil-Tang* on endotoxin-induced Febrile Rats

Each bar represents standard error of 6 rats.

Sample-I : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with distilled water

Sample-II : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

: Statistically significant compared with normal data(###:p<0.001)

* : Statistically significant compared with control data(* : p<0.05, ** : p<0.01 and *** : p<0.001)

4) Histamine에 의한 혈관투과성 항진에 대한 억제효과

대조군의 생쥐의 복강내 색소삼출량은 정상군에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였다.

Sample-I 2.0g/kg 투여군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.01) 색소삼출량 억제효과를 나타내었고, 1.0g/kg 투여군은 다소 억제시키는 경향을 보이나 통계적인 유의성은 없었다. Sample-II 1.0g/kg 및 2.0g/kg 투여군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.001)

색소삼출량 억제효과를 나타내며 검액의 농도의존적임을 알 수 있었다. 양성대조군 aspirin 400mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.001) 색소삼출량 억제효과가 관찰되었다(Table 6).

Table 6. Effect of Modified *Gamgil-Tang* on the Increase Vascular Permeability Induced by 0.5% Histamine in Mice

Groups	Dose(g/kg, p.o.)	No. of animals	Leakage of Dye(μ g/mouse)	Therapeutic value(%)
Normal	-	7	27.1 \pm 2.57 ^{a)}	-
Control	-	7	56.3 \pm 3.76 ^{###}	107.8
Sample-I	1.0	7	49.2 \pm 2.90	24.4
Sample-I	2.0	7	38.6 \pm 3.84 ^{**}	60.8
Sample-II	1.0	7	39.1 \pm 2.03 ^{***}	58.8
Sample-II	2.0	7	30.9 \pm 3.40 ^{***}	87.0
Aspirin	0.4	7	28.6 \pm 1.94 ^{***}	94.7

a) : Mean \pm Standard error of 7 mice.

Sample-I : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with distilled water

Sample-II : Modified *Gamgil-Tang* was extracted with 50% ethanol

: Statistically significant compared with normal data(###:p<0.001)

* : Statistically significant compared with control data(** : p<0.01 and *** : p<0.001)

The therapeutic values are % of protection that is calculated as 100(values of histamine control-values of sample)/(values of histamine control-values of normal)

IV. 고 찰

감기는 임상에서 가장 흔히 관찰되는 호흡기 질환으로 韓醫學에서는 感冒라고 표현하며 기침, 咳嗽, 咽痛, 發熱, 鼻涕 등의 증상을 나타낸다. 지난 수 세기 동안 한방, 양방을 막론하고 감기의 치료를 위해 수많은 연구가 이루어지고 있으나, 여전히 외래 진료의 큰 비중을 차지하고 있다.

감기 치료의 기본적인 처방중의 하나인 甘桔湯은 『醫方集解』에서는 甘草 二兩, 桔梗 一兩으로 구성되어 “治少陰咽痛喉痺, 肺癰吐膿, 乾欬無痰, 火鬱在肺¹¹⁾”한다고 기록되어 있으며, 『方藥合編』에서는 甘草 一錢五分, 桔梗 三錢五分으로 구성되어 “治少陰客寒, 咽痛”으로 기록되어 있고, 『東醫寶鑑』에서는 甘草 一兩, 桔梗 三兩으로 구성되어 口

辛, 咽喉痛, 傷寒咽痛, 癰疫의 治으로 수록되어 있다.

桔梗은 宣肺利咽, 祛痰排膿의 효능이 있어서, 咳嗽痰多, 胸悶不暢, 咽痛音啞, 肺癰吐膿, 瘡瘍膿成不潰를 치료한다⁵⁾.

桔梗의 함유성분으로는 inulin 및 fructo-oligosaccharide등 탄수화물이 전체 추출물의 95% 이상을 차지하고 있으며 이 외에 platycodigenin, polygalacic acid 등 oleanane 계 triterpene 을 aglycone으로 한 200 여종의 사포닌 중들이 1-4% 정도 함유되어 있다고 알려져 있으며 이들 사포닌 성분들은 桔梗 추출물이 보여주는 다양한 약리활성의 활성성분으로 주목받고 있다¹²⁾. 桔梗 및 桔梗 사포닌의 약리효능으로는 알레르기성 염증반응 억제효과에 의한 喘息억제¹³⁾, cytokines 발현 억제에

의한 면역조절효과¹⁴, 전자공여작용에 의한 항산화 효과¹²등이 있다.

甘草는 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥의 효능이 있어서 脾胃虛弱, 腹痛便溏, 肺痿咳嗽, 咽喉腫痛등을 치료⁵하며, 그람 양성균에 대한 항균활성¹⁵이 있고, 에탄올 추출 시 항산화활성이 상승하며 열과 pH에 비교적 안정하다^{16,17}.

薄荷는 宣散風熱, 清頭目, 透疹하는 효능이 있어서 感冒風熱, 頭痛, 目赤, 喉痺, 口瘡, 風疹, 胸脇脹悶등을 치료⁵하며, superoxide 라디칼, DPPH 라디칼 소거작용 및 저밀도단백질의 산화에 대한 저해활성 등 항산화효과¹⁸를 발휘하며, flavonoid glycoside 성분에 의한 항알러지효과¹⁹를 나타낸다.

梔子是 清熱, 瀉火, 涼血의 효능이 있어서, 熱病虛煩不眠, 黃疸, 淋病, 消渴, 目赤, 咽痛, 吐血, 血痢, 尿血, 熱毒瘡瘍, 扭傷腫痛등을 치료⁵하며, 생리활성 연구로는 에탄올 추출물이 *Escherichia coli*, 및 *Bacillus cereus* 균에 대한 항균효과²⁰를 나타내며, 항산화 효과가 있는 페놀 화합물을 평균 2.19mg/100g을 함유²¹하고 있다.

프로폴리스는 韓醫學 本草名으로 蜜蠟, 白蠟과 露蜂房에 해당된다. 露蜂房은 祛風, 攻毒, 殺蟲, 止痛의 효과가 있으며, 齧齒牙痛, 瘡瘍腫毒, 乳癰, 瘰癧, 皮膚頑癬, 鵝掌風등을 치료한다⁵. 프로폴리스는 그람양성균에 대한 항균효과²²가 있고, 운동 상태에서 발생하는 활성산소를 지속적으로 억제시킴으로써 항산화효과²³를 나타내며 에탄올 추출시 항염증⁷등의 효과가 보고 되고 있다.

따라서 甘草, 桔梗, 薄荷, 梔子, 프로폴리스, 멘들로 구성된 甘桔湯加味方은 소염, 진통, 해열, 항산화 및 histamine 투과 억제에 유효할 것으로 판단되어, *in vitro*에서 항염증 활성도 측정을 위해 hyaluronidase 저해 활성도 및 trypsin 저해 활성도 실험을 시행하였고, 항산화 작용 측정을 위해 DPPH free radical 소거활성도, xanthine oxidase 저해활성도 및 지질과산화 형성 실험을 하였고, 실험 동물을 이용한 *in vivo*에서 carrageenin 유발 급

성부종을 통한 항염증 실험, 초산법을 이용한 진통 실험, 해열 실험을 시행하였고, histamine에 의한 혈관 투과성 실험을 시행하였다.

항염증 관련 실험에서 hyaluronidase 저해활성은 Sample-I과 Sample-II 각각 IC₅₀이 144.6mg/ml과 63.8mg/ml이었고, trypsin 저해활성은 각각 92.5mg/ml과 68.5mg/ml로 항염증활성을 관찰할 수 있었다.

Carrageenin으로 유발된 급성부종에 대한 항염증 실험에서는 Sample-I 2.0g/kg 투여군은 검액 투여 1시간과 2시간에서 각각 대조군에 비하여 유의한(1시간:p<0.001, 2시간:p<0.01) 부종증가억제효과를 관찰할 수 있었고, Sample-II 2.0g/kg 투여군은 검액 투여 1시간과 2시간에서 각각 대조군에 비하여 유의한(1시간:p<0.001, 2시간:p<0.01) 부종증가억제효과를 보였다.

전체적으로 Sample-II 2.0g 투여군이 Sample-I 보다 염증억제효과가 높은 것으로 관찰되어 일시적인 염증과 관련된 호흡기질환에 응용할 수 있을 것으로 보인다.

초산법에 의한 진통작용에서는 Sample-I 및 Sample-II 2.0g/kg 경구투여군에서 각각 대조군에 비하여 유의한(p<0.05) 억제효과가 관찰되었고, Sample-I 및 Sample-II 1.0g/kg 간의 차이는 유의하게 나타나지 않았다.

진통 효과가 있는 한약재로는 細辛, 蟾酥, 厚朴, 知母, 麻黃, 胡椒등이 있으며 특히 麻黃은 aminopyrine과 유사한 정도의 진통억제 작용을 보이며, 露蜂房도 역시 유의성 있는 진통효과를 보인다²⁴. 이번 甘桔湯加味方의 진통효과로 咽痛, 咽喉 불편감등에 효과가 있을 것으로 생각된다.

해열 작용에서 Sample-I 2.0g/kg 투여군은 검액 투여 1, 2, 3시간 및 5시간에서 대조군에 비하여 유의한 체온상승억제효과를 관찰할 수 있었으며, Sample-II 2.0g/kg 투여군은 검액투여 1, 2시간 및 3시간에서 각각 대조군에 비하여 유의한 체온상승억제효과를 보였다. 두 경우 모두 1.0g/kg 투여군과 비교했을때 용량 의존적인 해열 효과를 나타냈다.

甘桔湯加味方の 해열작용이 확인됨으로써 感氣 초기의 發熱상태뿐만 아니라 지속적인 微熱이 있는 咽喉질환에도 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

항산화 효과측정 실험에서 Sample-II가 Sample-I 보다 DPPH에 대한 소거활성, xanthine oxidase 저해활성등 항산화 작용이 더 높은 것으로 관찰되었다.

흰쥐 적출 간균질화물을 이용한 지질과산화물 형성에 대한 甘桔湯加味方の 지질과산화물 형성저해효는 각각 IC₅₀이 100mg/ml 이상으로 측정되었으며, 유효성이 없는 것으로 나타났다.

Histamine에 의한 혈관투과성 항진억제효과는 Sample-I 2.0g/kg 투여군은 대조군에 비하여 유의한(p<0.01) 색소삼출량 억제효과를 나타내었고, 저농도 1.0g/kg 투여군은 다소 억제시키는 경향을 보이나 통계적으로 유의성은 없었다. Sample-II 1.0g/kg 및 2.0g/kg 투여군은 모두 대조군에 비하여 유의한(p<0.001) 색소삼출량 억제효과를 나타내며 점액의 농도의존적임을 알 수 있었고, Sample-II가 Sample-I 보다 저농도에서 유의한 억제효과를 보였다.

기존의 연구에서 histamine에 의한 혈관투과성 항진억제효과가 유의한 것으로 보고된 약제로는 麻黃, 木瓜, 細辛, 蓮子肉, 蜈蚣, 吳茱萸, 知母, 梔子, 蕁癩, 紅花, 胡椒, 豨薟, 露蜂房²⁴등으로서, 甘桔湯加味方の 추가약물인 梔子和 露蜂房이 포함되어 있다. Histamine은 기관지를 수축시켜 호흡곤란을 유발^{25,26}하기 때문에 甘桔湯加味方の histamine에 의한 혈관투과성 항진억제효과를 천식환자에게 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면, 甘桔湯加味方は 甘草와 桔梗으로 구성된 甘桔湯에 薄荷, 梔子, 프로폴리스, 멘톨을 가미한 처방으로서 甘桔湯의 少陰客寒, 咽痛, 肺熱로 의한 口辛, 咽痛, 癰疽과, 肺癰의 치료효능에 항염증, 진통, 해열, 항산화, histamine 투과 억제 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 甘桔湯加味方は 風熱性 호흡기 계통의 질환뿐만 아니라,

allergy성 질환에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구는 기존의 상용되던 한약 처방에 薄荷, 梔子, 프로폴리스와 같은 약제를 첨가하여, 새로운 치료효과를 확인하였다는데, 그 의의를 둘 수 있을 것이다. 앞으로도 이러한 새로운 약물의 개발과 약제구성에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

V. 결론

甘桔湯加味方の 물 추출 및 에탄올 추출물을 이용하여 ICR계 웅성 생쥐 및 SD계 웅성 흰쥐를 대상으로 소염, 진통, 해열, 항산화 및 histamine 투과 억제 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 甘桔湯加味方 추출물의 *In vitro*에서의 hyaluronidase 저해 활성도, trypsin 저해 활성도를 측정한 결과 50% 에탄올추출물이 물추출물에 비하여 양호한 항염증활성을 나타냄을 알 수 있었다.
2. *In vitro*에서 DPPH free radical 소거활성도, xanthine oxidase 저해활성도를 측정한 결과 에탄올추출물이 물추출물보다 양호한 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다.
3. *In vitro*에서의 지질과산화 형성 억제 작용은 유의한 결과를 나타내지 않았다.
4. *In vivo*에서 carrageenin 유발 급성부종에 대한 작용을 측정한 결과 물추출물 2.0g/kg과 에탄올추출물 2.0g/kg에서만 유의한 부종억제를 보였으며, 에탄올추출물이 물추출물보다 더 우수한 부종억제 효과를 보였다.
5. *In vivo*에서 초산법을 이용한 진통효과 실험에서 물추출물 2.0g/kg과 에탄올추출물 2.0g/kg에서만 유의한 진통효과를 보였고, 물추출물과 에탄올추출물의 진통효과는 비슷한 양상이었다.
6. 해열효과는 물추출물 1.0g/kg과 2.0g/kg 모두에

서 유의한 체온상승 억제효과를 보였고, 에탄올 추출물 1.0g/kg과 2.0g/kg 모두에서도 유의한 체온상승 억제효과를 보였다. 물추출물이 에탄올 추출물보다 더 우수한 해열효과를 보였다.

7. Histamine에 의한 혈관투과성 항진에 대한 억제 효과는 물추출물 2.0g/kg과 에탄올추출물 1.0g/kg 및 2.0g/kg에서 유의한 색소삼출량 억제 효과를 보였고, 물추출물보다 에탄올추출물보다 우수한 억제효과를 보였다.

참고문헌

1. 전국 한의과대학 폐계내과학교실편. 동의폐계내과학. 서울: 도서출판국진; 2004, p. 136, 139.
2. 건강보험공단, 건강보험심사평가원. 2004 건강보험통계. 서울; 2005, p. 496.
3. 이형구. 감기에 대한 임상적 관찰. 제3차 대한한의학회 학술 세미나 논문집. 1999:3-17.
4. 한영주, 배한호, 이정은, 임도희, 박양춘. 감모에 대한 소청롱탕의 효과-무작위배정, 이중맹검, 위양대조군 연구. 대한한방내과학회 추계학술대회 논문집. 2004:166-73.
5. 康秉秀의. 本草學. 서울: 永林社; 1998, p. 142-4, 167-8.
6. 김희재, 황보식, 이수원. 국산 프로폴리스의 항산화 효과에 관한 연구. 한국축산식품학회지. 2002;22(1):77-80.
7. Kim, K. T., Yeo, E. J., Han, Y. S., Nah, S. Y., Paik, H. D. Antimicrobial, Anti-inflammatory, and Anti-oxidative effects of Water- and Ethanol-extracted Brazilian Propolis. Food Science and Biotechnology. 2005;14(4):474-8.
8. 차용호, 방극승. 국내에서 수집한 프로폴리스의 품질 특성에 관하여. 한국양봉학회지. 2001;16(1):27-36.
9. Shin, T. Y., Kim, D. K. Antiallergic activity of *Menthae herba*. Kor. J. Pharmacogn. 1998; 29(3):248-53
10. Kitagawa, I., Chen, W. Z., Taniyama, T., Harada, E., Hori, K., Kobayashi, M. and Ren, J. Quantitative determination of constituents in various Licorice roots by means of High Performance Liquid Chromatography, *Yakugaku Zasshi*. 1998;118:519-28.
11. 汪詡庵. 醫方集解. 臺北. 文光圖書有限公司. 中華民國75年, p. 304.
12. 손미예, 서종권, 김행자, 성낙주. 장생 도라지의 화학성분과 생리활성. 한국식품영양과학회지. 2001;30(4):717-20.
13. 김성수. 길경에 의한 알레르기 천식 효과에 대한 연구. 본초학회지. 2004;19(2):61-70.
14. 박상현, 정희재, 정승기, 이형구. 마행감석탕과 길경이 인간기관지 상피세포의 Cytokines에 미치는 영향. 경희의학. 2001;17(2):230-41.
15. 김수정, 신재윤, 박운문, 정구민, 이종화, 권대혁. 감초의 에탄올 추출물의 항균활성 및 안정성 조사. 한국식품과학회지. 2006;38(2):241-8.
16. 김수정, 권대혁, 이종화. 감초의 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 안정성 조사. 한국식품과학회지. 2006;38(4):584-8.
17. 성기천. 감초 추출물의 약리적 특성 및 분석. 한국유화학회지. 2006;23(3):215-22.
18. 이승은, 한희선, 장인복, 김금숙, 성낙술. 薄荷의 in vivo 생리활성. 한국약용작물학회지. 2005; 13(6):261-7.
19. Inoue T, Sugimoto Y, Masuda H, Kamei C. Antiallergic effect of flavoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. Biol. Pharm. Bull. 2002;25:256-9.
20. 류응주, 조성환. 梔子추출물의 항균특성 및 안전성 검사. 농업생명과학연구. 2004;38(4):11-9.
21. 김정균, 강영미, 엄광식, 고영민, 김태영. 천연한약재(목통,삼릉,치자)추출물의 항산화 효과 및 항균활성효과. 농업생명과학연구. 2003;37(4):69-75.

22. 손영록. 프로폴리스 추출물의 항균 활성에 대한 연구. 한국식품위생안전성학회지. 2003;18(4):189-94.
23. 조현철, 김종규, 한주희, 김진표, 안창식, 홍용. 프로폴리스 섭취 시 농도와 기간이 운동에 따른 활성산소와 과산화물 생성억제 및 피로물질에 미치는 영향. 운동영양학회지. 2006;10(1):27-35.
24. 박중은, 최혁재, 정석희, 김남재, 김동현. 빈용 한약재의 진통 소염활성. 생약학회지. 2001;32(4):257-68.
25. 최인선, 정성훈, 정대호, 이우진, 한의령. 천식에 서 외부 저항 부하와 기관지 수축 유발에 의한 호흡곤란 인지능 측정 비교 연구. 천식 및 알레르기 학회지. 2007;27(2):111-7.
26. 홍수중, 전진경, 김봉성, 심정연, 조상현, 민경업. 아토피 소아에서 아토피지표 및 기도과민성과 IgE-매개성 호흡기구 히스타민 유리능과의 관련성. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2000;10(4):299-307.