

황련해독탕 전탕액과 시판제제의 성분 및 효능 비교

김예지 · 김은순 · 서창섭 · 신현규*

한국한의학연구원, 한약기초연구그룹

Comparison of the Ingredient Quantities and Biological Activities of *Hwangryunhaedok-tang* (*Hwanglianjiedu-tang*) Decoction and Commercial Extractive Granules

Yeji Kim, Ohn Soon Kim, Chang-Seob Seo and Hyeun-Kyoo Shin*

Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine

Abstract – This study was to investigate the quality of commercial *Hwangryunhaedok-tang* (*Hwanglianjiedu-tang*, HHT) extractive granules by comparing with HHT decoction. The contents of index components and the anti-inflammatory and anti-oxidative abilities of two different commercial HHT granules (HHT-2 and HHT-3) were compared with those of the HHT decoction (HHT-1). The contents were analyzed with HPLC. The anti-inflammatory effects were determined by measuring NO, PGE₂ and IL-6 in RAW 264.7 cell. We compared the anti-oxidative effects through ABTS radical scavenging activities. The range of contents of 7 ingredients was 0.42-36.54 mg/g in HHT-1, not detected-12.30 mg/g in HHT-2, not detected-18.79 mg/g in HHT-3. Although HHT-1, HHT-2, HHT-3 had the inhibitory effects on the production of NO, PGE₂ and the scavenging activities on ABTS, HHT-1 showed stronger effects than HHT-2, HHT-3 (HHT-1 > HHT-3 > HHT-2). HHT-1 inhibited the production of IL-6, while HHT-2, HHT-3 showed no inhibitory effects. It is necessary to find appropriate methods for extracting HHT and to establish standardized processes, in order to improve the quality of commercial traditional herbal formula.

Key words – *Hwangryunhaedok-tang* (*Hwanglianjiedu-tang*), Index components, Antioxidant effect, Anti-inflammatory effect

황련해독탕은 淸熱瀉火解毒의 대표적인 처방으로 황련, 황금, 황백, 치자로 구성되어있다. 三焦의 火熱을 下行시키고, 瀉火解毒하여 實熱火毒, 三焦熱盛의 모든 증에 사용된다. 임상에서 고혈압, 뇌출혈, 치매, 심혈관 질환, 피부질환 등 한의적으로 熱證에 속하는 환자에게 처방된다.¹⁾ 세포 및 동물 실험을 통해서 알레르기성 접촉피부염,²⁾ 천식,³⁾ 케양성 대장염⁴⁾ 모델의 염증을 완화시킨다고 보고되었다.

오랜 임상 경험을 통해 안전성과 다양한 효능이 입증된 한약 처방이 한의원에서 조제하는 전탕액에서 벗어나 현대화, 대중화를 위하여 제형의 변화, 관련제품의 개발 등 여러 가지 발전방안과 연구가 진행되고 있다.⁵⁾ 한약 처방 현대화, 대중화의 가장 두드러진 결과물로, 현재 여러 제형으로 개발된 한약 처방들이 제품화되어 약국에 공급되고, 간편하게 이용되고 있다. 그러나 한약제제 제품 생산 및 공급에만 그치고, 품질 균일화나 제품의 유효성 보장을 위한 관

리를 소홀히 한다면 시판 한약제제 산업뿐만 아니라 한의 학의 위상과 발전을 저해하는 큰 걸림돌이 될 수 있다. 한 약 산업의 발전과 국제 시장 진출을 위해서는 한약제제에 함유된 성분의 종류와 함량의 균일성 및 약효의 유효성 확보가 필수적이다.⁶⁾ 그러나 한약제제에 대한 품질관리 기준 및 시험법이 확립되어 있지 않아 품질관리가 어렵고,⁵⁾ 기성 한의서에 있는 한방처방에 대해서는 안전성, 유효성 자료도 면제되는 정책에 의해 한약제제에 대한 연구가 소홀한 실정이다.⁷⁾ 한약 처방은 주로 전탕액 형태로 사용되는데 이에 대한 안전성 및 효과는 임상을 통해 평가되었고, 많은 실험을 통해 유효성분과 효능이 입증되었다. 그러므로 한약 처방 제품 개발 시, 전통적으로 사용된 형태의 처방의 유효성분과 효능을 어떻게 보존할 것인지, 혹은 어떻게 더 우수한 제품을 만들 수 있는지에 대한 연구의 선행이 중요한 사항이다.⁸⁾ 시판되고 있는 한약제제 제품들의 성분 함량이나 효능에 대한 비교 실험은 몇몇 진행되었지만,^{6,9)} 전통제제인 전탕액과 비교하여 시판제제에 대한 평가나 검증을 실시한

*교신저자 (E-mail): hkshin@kiom.re.kr
(Tel): +82-42-868-9464

연구는 거의 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 사용빈도가 비교적 높고, 이미 효능 연구가 많이 이루어진 황련해독탕을 선택하여 전탕액과 2종 시판제제에 대하여 성분 분석 및 효능 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

성분 분석

실험재료 - 본 실험에 사용된 황련해독탕은 한국한의학연구원에서 제조한 1종과 시판제제 2종을 구입하여 실험에 사용하였다. 한국한의학에서 제조된 황련해독탕의 구성 한약재(Table I)는 Omniherb (Yeongcheon, Korea)와 HMAX (Jecheon, Korea)에서 각각 구입하여 이제현 교수(Dongguk University, Gyeongju, Korea)와 서영배 교수(Daejeon University, Daejeon, Korea) 2인의 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본(2008-KE20-1~2008-KE20-4)은 한국한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

시약 및 기기 - 7종의 표준물질인 geniposide, baicalin, baicalein, wogonin, coptisine, palmatine 및 berberine은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였으며, 각 표준물질의 순도는 모두 98.0% 이상이었다. 시료전처리 및 HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile 및 water는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. Sodium dodecyl sulfate (SDS)와 인산은 MP Biomedicals (Solon, OH, USA)와 대정화금(Daejeon, Korea)에서 각각 구입하여 사용하였다. 함량분석을 위한 HPLC는 LC-20AT pump, DGU-20A₃ on-line degasser, CTO-20A column oven, SIL-20AC auto-sampler 및 SPD-M20A PDA detector로 구성된 LC-20A 시스템(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 분석 data는 LC solution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다.

표준용액의 조제 및 검량선 작성 - 7종의 표준품에 대한 표준용액은 메탄올을 이용하여 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하였다. 검량선은 geniposide 7.81-500.00 µg/

mL, baicalin 7.81-250.00 µg/mL, baicalein 3.91-250.00 µg/mL, wogonin, coptisine 및 berberine 0.78-50.00 µg/mL 및 palmatine 4.69-300.00 µg/mL의 농도범위에서 표준용액을 이용하여 작성하였다.

황련해독탕 추출물 및 검액의 조제 - 한국한의학연구원에서 제조한 황련해독탕은 Table I과 같이 구성 한약재를 무게 비율로 배합하여 물을 시료의 10배로 각각 첨가하여 2시간 전탕 한 후 동결건조 하여 물 추출물 1.7 kg (수율 17.1%)을 얻었다. HPLC 분석을 위하여 본 연구원에서 제조한 시료(200 mg)와 시판제제 2종(각각 400 mg)을 정확히 측정 한 후 물을 넣어 20 mL로 맞추은 후 0.2 µm membrane 여과(Woongki Science, Seoul, Korea) 후 검액으로 하였다.

HPLC 분석조건 - 황련해독탕 내 주요성분인 geniposide, baicalin, baicalein, wogonin, coptisine, palmatine 및 berberine의 분리를 위하여 Gminin C₁₈(5 µm, 4.6×150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼 온도는 35°C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘려주었으며 주입량은 10 µL였다. 이동상은 0.2% SDS와 인산(200 µL/L)이 함유된 10.0% acetonitrile (A)과 acetonitrile (B)을 사용하여 기울기 용매조건 (A)/(B) = 90/10 (0 min) → (A)/(B) = 60/40 (20 min) → (A)/(B) = 50/50 (40 min) → (A)/(B) = 0/100 (50 min) → (A)/(B) = 90/10 (55 min; hold for 15 min)으로 흘려주었으며, 검출파장은 240 nm와 277 nm에서 검출하였다.

효능실험

시약 - Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Penicillin-streptomycin (PS), phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco (USA) 제품, Cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo 제품 (Japan), LPS, indomethacin, NG-methyl-L-arginine (L-NMMA)은 Sigma (USA) 제품, Griess reagent는 Promega (USA) 제품, PGE₂ EIA kit는 Cayman (USA) 제품, IL-6 ELISA kit은 Invitrogen (USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

Table I. Composition of *Hwangryunhaedok-tang* (HHT)

Latin name	Herb dose (g)		Extract dose (g)	
	HHT-1 ^{a)}	HHT-2 ^{b)}	HHT-3 ^{c)}	
Coptidis Rhizoma	3.75	3.3	0.59	0.59
Scutellariae Radix	3.75	3.3	1.49	1.49
Phellodendri Cortex	3.75	3.3	0.73	0.73
Gardeniae Fructus	3.75	3.3	1.16	1.16
Total (g)	15.0	13.2	3.97	3.97
Yield (%)	17.1			
Dosage (g)	2.57	3.97		3.97

^{a)}HHT Decoction, ^{b)}HHT extract granule from manufacturer A, ^{c)}HHT extract granule from manufacturer B

시료 조제 - 효능 실험을 위하여 본 연구원에서 제조한 시료와 시판제제 2종(각각 100 mg)을 정확히 측정 후 PBS를 넣어 1 mL로 맞춘 후 0.2 μ m membrane 여과 후 사용하였다.

세포배양 - RAW 264.7 (Mouse Macrophage cell line) 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포를 5.5% FBS, 1% PS가 첨가된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

세포독성 측정 - 96 well plate에 3×10³ cells/well씩 분주한 RAW 264.7 세포에 3종 황련해독탕 시료를 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후 CCK-8 용액 10 μ l씩 넣어주고 4시간 동안 배양한 후, microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후의 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도를 기준으로 실험하였다.

Nitrite (NO), PGE₂, IL-6 측정 - 48 well plate에 2.5×10⁵ cells/well로 분주한 RAW 274.7 세포에 LPS (1 μ g/mL)를 처리하고 시료를 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 취하여 각각 실험을 진행하였다. Griess reagent를 사용하여 제조사의 방법에 따라 NO 양을 측정하였다. 양성대조군으로 NOS inhibitor인 L-NMMA를 사용하였다. EIA kit을 사용하여 제조사의 방법에 따라 PGE₂ 양을 측정하였다. 양성대조군으로 indomethacin을 사용하였다. ELISA kit을 사용하여 제조사의 방법에 따라 IL-6 양을 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거능 측정 - 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay 방법¹⁰⁾을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성 시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 PBS로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS⁺용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 743 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 vitamin C를 사용하였다.

통계처리

실험값은 mean \pm S.E.M.으로 표시하였다. 실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA검정을 적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test를 이용하여 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

황련해독탕 전탕액과 시판제제의 성분 분석

분석조건의 확립 - 황련해독탕의 구성 약재 중 치자의 주요성분인 geniposide, 황금의 주요성분인 baicalin, baicalein 및 wogonin 및 황련과 황백의 주요성분인 coptisine, palmatine 및 berberine을 분석 대상으로 기율기 용매 조건으로 하여 40분 이내에 분리하였다. PDA 검출 파장은 240 nm에서 geniposide, coptisine, palmatine 및 berberine, 277 nm에서 baicalin, baicalein 및 wogonin을 각각 검출하였다. 검액에서의 peak는 주요 성분 peak의 retention time과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였으며, geniposide, baicalin, baicalein, wogonin, coptisine, palmatine 및 berberine 등 7종의 성분은 5.31, 13.28, 21.97, 28.21, 32.50, 34.14 및 34.99분에 각각 검출되었다(Fig. 1).

함량 분석 - 연구원제조 황련해독탕 전탕액 (HHT-1)과 2종의 시판제제(HHT-2, HHT-3)를 설정된 HPLC-PDA를 이용하여 동시분석을 실시하고 7종 성분에 대한 함량을 분석하였다. 함량 분석 결과 HHT-1, HHT-2, HHT-3에서 7종의

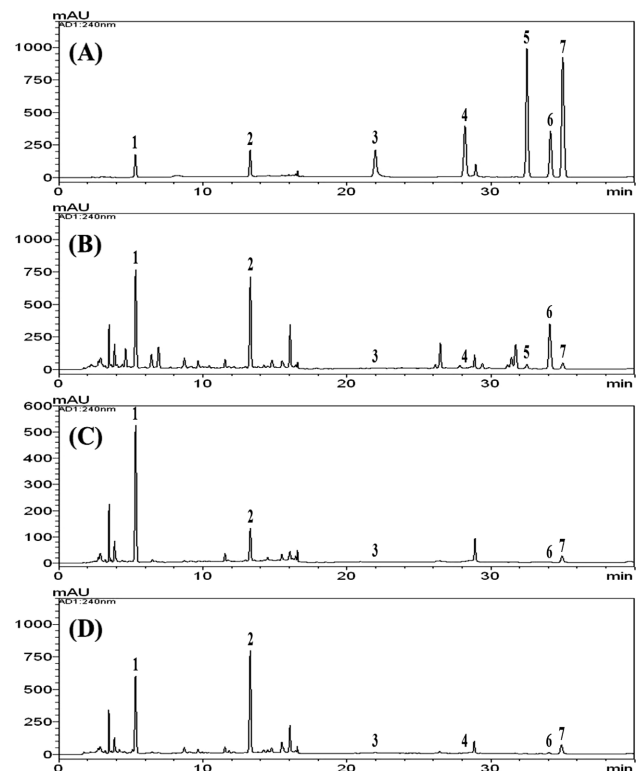


Fig. 1. HPLC chromatogram of a standard mixture (A), *Hwangryunhaedok-tang* (HHT) decoction (B), HHT extract granule from manufacturer A (C), and HHT extract granule from manufacturer B (D). geniposide (1), baicalin (2), baicalein (3), wogonin (4), coptisine (5), palmatine (6), and berberine (7).

Table II. Analytical Results (mg/g) of the 7 Compounds in *Hwangryunhaedok-tang* (HHT)

Compound	HHT-1 ^{a)}			HHT-2 ^{b)}			HHT-3 ^{c)}		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Geniposide	36.54	0.03	0.07	12.30	0.03	0.25	14.19	0.08	0.55
Baicalin	30.24	0.07	0.24	2.92	0.01	0.30	18.79	0.03	0.14
Baicalein	1.38	0.03	2.40	<LOQ	-	-	0.25	0.01	2.72
Wogonin	0.42	0.00	0.39	ND ^{d)}	-	-	<LOQ	-	-
Coptisine	0.97	0.00	0.23	ND	-	-	ND	-	-
Palmitine	10.34	0.05	0.46	<LOQ	-	-	0.17	0.00	0.30
Berberine	1.35	0.00	0.16	0.33	0.01	2.03	0.91	0.01	0.64

^{a)}HHT Decoction, ^{b)}HHT extract granule from manufacturer A, ^{c)}HHT extract granule from manufacturer B, ^{d)}Not detect

성분이 0.42-36.54 mg/g, ND-12.30 mg/g 및 ND-18.79 mg/g 으로 각각 나타났다(Table II).

황련해독탕 전탕액과 시판제제의 효능 실험

RAW 264.7 세포에 대한 독성 – RAW 264.7 세포에 대한 황련해독탕 전탕액(HHT-1)과 2종 시판제제(HHT-2, HHT-3)의 독성을 관찰하였다. HHT-2, 3은 1000 µg/mL까지 세포 독성이 나타나지 않은 반면, HHT-1은 1000 µg/mL 농도에서 약간의 독성을 나타냈다. 따라서, 모든 실험을 세포생존에 영향을 주지 않는 500 µg/mL 범위 내에서 수행하였다(Fig. 2).

Nitrite (NO) 에 대한 효과 – LPS를 처리하여 염증반응을 유발시킨 RAW 264.7 세포에 각각의 약물을 처리하여 NO 생성량을 측정하였다. 세 약물 모두 농도의존적으로 NO 생성을 감소시키는 효과를 나타냈다. 세 약물의 효과를 IC₅₀ (the half maximal inhibitory concentration) 값으로 비교한

결과, HHT-1: 264.1 µg/mL > HHT-3: 414.6 µg/mL > HHT-2: 648.5 µg/mL 순으로 억제효과를 나타냈다(Fig. 3A).

PGE₂에 대한 효과 – RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후, PGE₂ 생성이 증가되었고, HHT-1, HHT-2, HHT-3 모두 PGE₂ 생성을 크게 감소시켰다. 특히 1000 µg/mL 부터 125 µg/mL 농도까지 세 약물 모두 95% 이상의 억제율을 보였다(Data not shown). 100 µg/mL 이하 농도에서 효과를 관찰한 결과, HHT-1 > HHT-3 > HHT-2 순으로 억제효능이 나타났다. HHT-1은 12.5 µg/mL 농도에서도 80%의 억제율을 보여 뛰어난 효과를 나타냈다(Fig. 3B).

IL-6에 대한 효과 – LPS를 처리한 후, RAW 264.7 세포에서 IL-6의 분비가 확연히 증가되었다. 3가지 시료를 처리한 후, HHT-1 500 µg/mL 농도에서만 IL-6의 생성이 유의성 있게 감소되었고, 다른 시료들은 억제효과를 나타내지 않았다(Fig. 4).

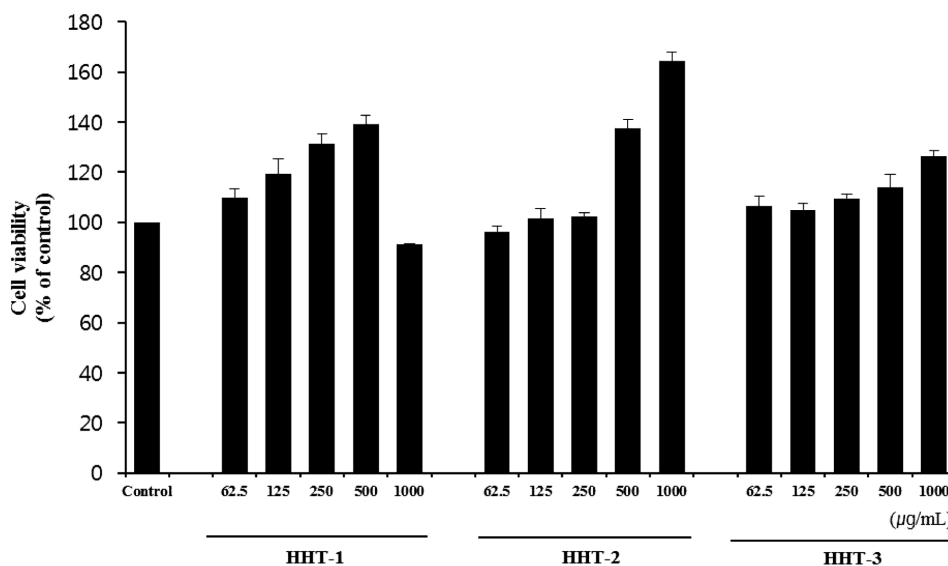


Fig. 2. Effects of HHT-1, HHT-2 and HHT-3 on the viability of RAW 264.7 cell. Cells were incubated with the indicated concentrations of HHT extracts for 24 h. Cell viability was determined by CCK-8 assay.

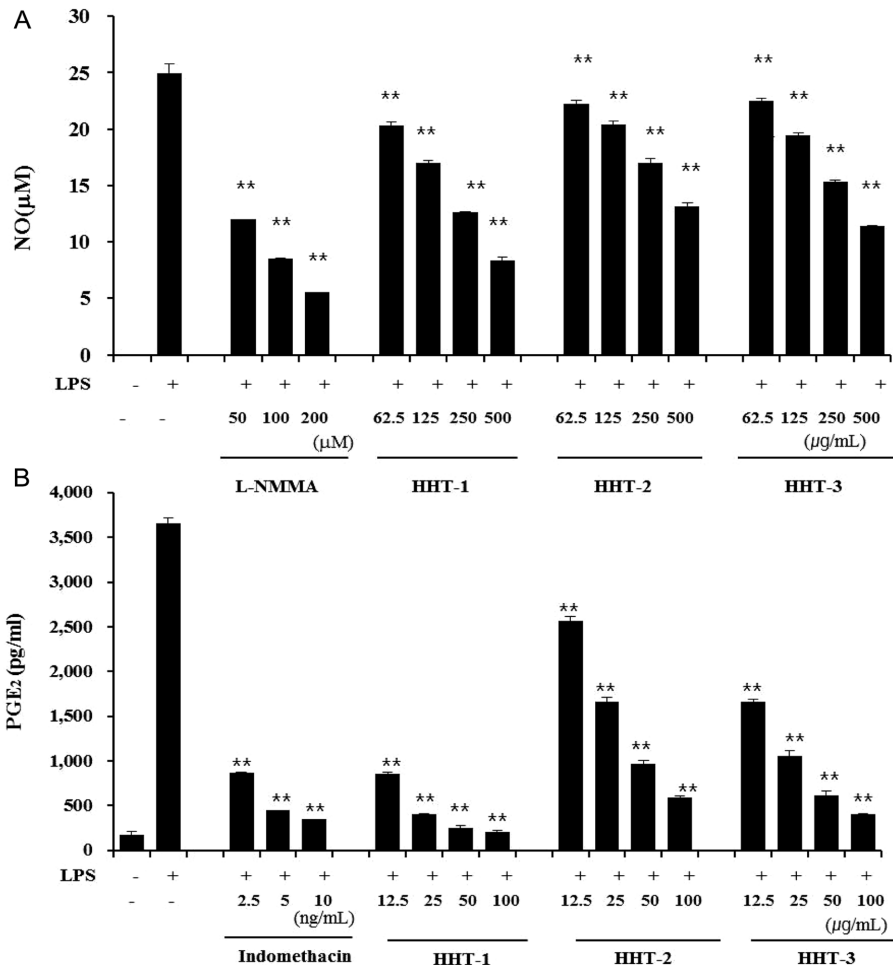


Fig. 3. Effects of HHT-1, HHT-2 and HHT-3 on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 cell. NO (A), PGE₂ (B) in cell culture media were measured as described in Materials and Methods. Data were presented as mean ± S.E.M. **: P<0.01 compared with the LPS group.

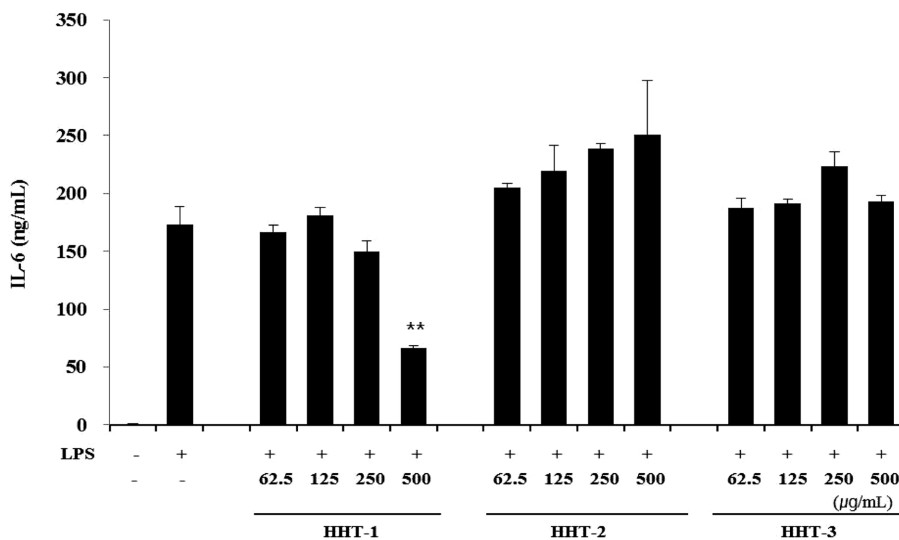


Fig. 4. Effects of HHT-1, HHT-2 and HHT-3 on the production of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cell. IL-6 in cell culture media were measured as described in Materials and Methods. Data were presented as mean ± S.E.M. **: P<0.01 compared with the LPS group.

Table III. Scavenging Effects of HHTs on ABTS⁺

Herbal formulas	Concentration (μg/mL)	Scavenging effect (%)	RC ₅₀ ^{a)} (μg/mL)
HHT-1 ^{b)}	15.6	39.20±0.29	27.67±0.11
	31.25	61.41±0.04	
	62.5	91.40±0.27	
HHT-2 ^{c)}	62.5	38.87±0.15	90.90±1.01
	125	64.43±0.78	
	250	93.32±0.43	
HHT-3 ^{d)}	62.5	44.44±0.07	79.77±0.11
	125	70.97±0.21	
	250	99.30±0.04	
Vitamin C	2.5	31.37±0.06	4.57±0.01
	10	99.79±0.04	

^{a)}Concentration required for 50% reduction of ABTS⁺ at 30 min reaction, ^{b)}HHT Decoction, ^{c)}HHT extract granule from manufacturer A, ^{d)}HHT extract granule from manufacturer B

ABTS 라디칼 소거활성 - 3종 시료의 황산화능을 비교하고자 농도별로 조제한 후 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하였다. 3시료 모두 농도가 증가함에 따라 점차적으로 ABTS 라디칼의 소거활성을 증가시켰다. RC₅₀ 값은 각각 HHT-1; 27.7±0.1, HHT-2; 90.9±1.0, HHT-3; 79.8±0.1로 측정되었다 (Table III).

고 찰

본 연구에서는 황련해독탕 전탕액 물 추출물과 2종 시판 제제를 비교하기 위하여 성분 분석 및 항산화, 항염증 실험을 실시하였다. 황련해독탕제제에 대한 함량분석 비교 논문이 보고되어 있어, 성분 설정은 참고문헌¹¹⁾을 토대로 geniposide, baicalin, baicalein, wogonin, coptisine, palmatine 및 berberine 등 7종 성분으로 선정하고, 분석하였다. 그 결과, 연구원제조 전탕액 물 추출물(HHT-1)에서는 7가지 주요 성분이 모두 검출된 반면, 2종의 시판제제에서 HHT-2는 4가지 성분이, HHT-3는 2가지 성분이 검출되지 않거나 정량한계 이하로 검출되었다. 검출된 성분의 함량을 비교해보면 모든 성분에서 2종 시판제제의 함량이 전탕액 물 추출물에 크게 미치지 못하였다.

황련해독탕은 청열해독의 대표적인 처방으로 임상에서 주로 급성 전염성 질병, 감염성 질병에 사용된다. 이로 인해 황련해독탕의 항균, 항염증 방면에 대한 연구가 많이 실시되었다. Zhao¹²⁾는 동물 실험에서 황련해독탕이 TAB (typhoid, paratyphoid A, paratyphoid B) vaccine을 투여한 발열 토끼의 체온을 크게 낮추고, mouse 귀 부종을 확연히 억제하는 것을 관찰하였다. 또한 황련해독탕은 LPS로 인한 NO, PGE₂의 생성 및 iNOS, COX-2, NF-κB의 발현을 억제하였다.¹³⁾ 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 생성되

는 염증매개물질들에 대한 억제실험을 실시하여 3종 황련해독탕의 항염 효능을 비교해 보았다. LPS는 그람음성균 (Gram-negative bacteria) 외부벽의 중요한 구성성분으로 숙주의 세포를 자극하여 염증매개물질인 NO, PGE₂와 전염성 cytokine 등의 분비를 촉진한다.¹⁴⁾ 적당량의 NO는 침입한 병원균들을 없애는 역할을 하지만, 염증상태에서 대량 분비되면 염증물질의 생성을 돕고, 혈관투과성을 높이는 등 염증을 심화시키는 역할을 한다.^{15,16)} PGE₂는 잘 알려진 염증 매개물질로 발열을 일으키고, 혈관투과성을 증가시키고, 염증세포의 주화성운동을 강화하는 등 여러 작용에 관여한다.¹⁶⁾ 또한, Th1 세포 분화와 Th17 세포의 expansion을 촉진하여 대식세포를 활성화시키고, 염증성 cytokine과 chemokine의 분비를 유도하여 염증작용에 관여한다고 밝혀졌다.¹⁷⁾ 3종 황련해독탕의 NO 억제효과 실험에서 3종 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰지만 억제능은 다소 차이를 보였다. 전탕액 물 추출물이 가장 높은 억제효과를 보였고, 그 다음은 HHT-2, HHT-3 순서로 나타났다. PGE₂ 억제 실험 결과, 3종 시료 모두 100 μg/mL 농도까지 85% 이상의 억제능을 보여 탁월한 효능을 증명하였다. 시료를 더 낮은 농도로 처리하여 효능을 비교해보니 NO에 대한 결과와 마찬가지로 HHT-1 > HHT-3 > HHT-2 순서로 나타났다. 전염성 cytokine 중, IL-6는 염증 초기에 작용하여, 발열 및 B세포, T세포를 활성화시키고, 단핵세포를 자극하여 monocyte chemoattractant protein (MCP)-1의 분비를 증가시키는 등 염증의 확산에 관여한다.¹⁸⁾ 많은 연구를 통해 IL-6 knockout mice에서 TNF-α와 IL-1의 생성이 현저히 감소된다고 보고되었다.¹⁹⁾ IL-6에 대한 3종 시료의 효능을 관찰한 실험에서는 HHT-1의 최고농도에서만 유의성 있는 억제효과가 나타났고, HHT-2, HHT-3는 효과를 보이지 않았다.

황련해독탕의 주요 성분 중 baicalin, baicalein, wogonin은 항산화능이 탁월하다고 알려진 flavonoid계 물질로 여러 실험을 통해 산화 억제효과가 있다고 밝혀졌다.^{20,21)} 이에 ABTS 라디칼 소거활성 실험을 통해 항산화능을 측정하여 3종 황련해독탕의 효능을 비교해보았다. ABTS 항산화 실험은 ABTS 라디칼이 소거되면서 탈색 현상이 일어나는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 항산화능을 측정하는 방법²²⁾으로, 수용액과 유기용액 모두에 용해되기 때문에 친수성, 친유성 성분 모두 측정가능하다. 또한, 측정 파장은 730 nm 이상이기 때문에 측정 샘플 자체의 색이 결과에 영향을 주지 않는다.²³⁾ 3종 시료의 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하여 RC₅₀ 값으로 비교한 결과, HHT-1이 가장 높은 소거활성을 나타냈고, HHT-3, HHT-2의 순서로 관찰되었다.

본 연구 성분 분석 및 효능 결과에서 3종 황련해독탕의 효능 차이와 검출된 성분들의 함량에 높은 상관관계가 존재하는 것을 관찰할 수 있었다. 성분 함량, 항염증, 항산화 효능 모두에서 HHT-1 > HHT-3 > HHT-2의 순서로 나타났

다. 이전의 연구들을 살펴보면 황련과 황백의 주요 성분인 Berberine이 LPS로 활성화된 대식세포에서의 TNF- α 생성을 감소시키고, iNOS, COX-2 발현을 억제하며,^{24,25)} 황금 추출물(baicalin, baicalein, wogonin)이 LPS가 유도한 iNOS, COX-2, PGE₂, IL-6, TNF- α 등의 발현, 생성을 억제한다고 보고되었다.^{26,27)} 또한, baicalin, baicalein, wogonin은 ABTS, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 등의 라디칼을 제거하는 작용이 있다고 밝혀졌다.²⁰⁾ 이와 같이, 황련해독탕 주요 성분 자체가 항염증, 항산화 효과가 있기 때문에 추출된 성분 종류와 함량의 차이가 황련해독탕의 효능에 영향을 주고, 둘 사이에 높은 상관관계가 나타난 것으로 생각된다.

본 실험에서 사용한 2가지 시판제제 중 HHT-2는 한약제의 양과 그에 해당하는 단미엑스제의 양 모두 표시되어 있으나, HHT-3은 단미엑스제의 양만 표시되어 있어서 시판제제 제조에 사용된 각각의 한약제 양을 정확히 확인할 수 없었다. 이에 3가지 황련해독탕 비교를 위하여 동일한 시료 양으로 성분 함량 및 효능을 실험하였다. 실험 결과, 시판제제들의 성분 함량이나 효능이 전탕액에 미치지 못하고, 시판제제 사이에서도 같은 처방임에도 편차가 나타나는 문제점을 관찰하였다. 전탕액 추출물에 사용된 한약제 양(3.75 g)이 시판제제 HHT-2에 기재된 양(3.3 g)보다 다소 많으나, 함량 및 효능 분석 결과에서 차이가 크게 나타나 이를 한약제 양의 차이로만 보기는 어려울 것으로 사료된다. 시판제제의 경우 부형제가 포함되어 있을 수 있지만 그 양을 정확하게 알 수 없기 때문에 1회 용량을 고려하여 성분 및 효능을 비교해보면, 전탕액의 경우 1첩을 1회 용량으로 간주하였을 때 2.57 g을 섭취하여야 하며, 2가지 시판제제는 3.97 g을 1회 용량으로 제시하고 있어(Table I), 각각 1회 용량을 복용하였을 때 전탕액 추출물이 시판 한약제제를 복용했을 때 보다 더 뛰어난 항염증, 항산화 효능을 나타낼 것으로 여겨진다.

2007년 식약청 보고서의 한약제제 제조업체 실태조사 중 제조과정 비교에서 추출 전 생약의 처리부터 성분에 큰 영향을 미치는 중요과정인 추출과정 중 여러 항목에서도 큰 차이를 보인다고 밝혀졌다.²⁸⁾ 추출에서 압력, 추출시간 및 온도 등은 추출되는 성분의 종류와 함량에 영향을 주는 중요 단계이다. 최적의 추출조건 설정을 위한 연구들을 보면, 가압조건과 무압조건에서 전탕한 쌍화탕의 성분 분석실험에서 특정 성분의 함량차이가 나타났고, 전탕 시간에 따른 추출 수율도 확연한 차이를 보였다.²⁹⁾ 또한, 전탕시간에 따른 치자 유효성분 함량 변화를 관찰한 실험에서 geniposides는 큰 변화를 보이지 않은 반면, crocin-1은 전탕시간이 길수록 함량이 점점 감소하는 경향을 나타냈다.³⁰⁾

추출과정이 성분함량에 미치는 영향에 대한 연구들과 본 연구 결과를 고려해보면, 전탕액과의 성분 함량 및 효능 차이를 줄이고, 균일한 품질의 한약제제 공급을 위해 대책마

련이 필요하고 최적의 제조 방법을 연구하고, 표준화시키는 일이 선행되어야 한다고 사료된다.

결 론

1. 전탕액은 황련해독탕의 7가지 주요성분이 모두 검출된 반면, 시판제제 HHT-2는 4가지 성분이, HHT-3는 2가지 성분이 정량한계 이하로 검출되거나 검출되지 않았다.
2. 항염증 실험에서 3종 황련해독탕 모두 NO, PGE₂ 억제 효능을 보였으나, 시판제제보다 전탕액이 높은 효능을 보였고, IL-6에 대해서는 전탕액만이 효과를 나타냈다.
3. 항산화 실험에서 3종 황련해독탕 모두 ABTS 라디칼 소거능을 보였으나, 시판제제의 효능이 전탕액에 미치지 못하였다.

시판한약제제와 전탕액의 성분 함량과 효능을 비교한 결과, 전탕액의 함량, 효능이 시판제제보다 더 높게 나타났고, 시판제제 간에도 편차가 있어 품질에 차이를 보였다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘표준한방처방 EBM구축사업 (K12031)’에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Tang, S. L. and Tang, M. (2010) The clinical research of Huanglianjiadu-tang. *Practical Clinical J Integrated Traditional Chinese and Western Med.* **10**: 90-92.
2. Kim, B. A., Kim, M. S., Kang, B. M., Byeon, S. H., Park, H. I., Park, J. H., Jung, J. W., Ahn, E. M., Jung, H. A., Jang, J. H., Bae, W., Lee, H. Y., Choi, P. N. and Park, C. I. (2008) Inhibitory studies of Hwangryunhaedok-tang on development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Kor. J. Herbology* **23**: 59-65.
3. Choi, J. M. and Kim, H. T. (2006) Effects of Hwangryun-Hae-Dok-tang on TNF- α and IL-4 stimulated TARC, eotaxin, RANTES in the human bronchial epithelial A549 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* **20**: 1649-1653.
4. An, J. H., Choi, E. Y., Lee, S. H., Park, I. S. and Lim, S. W. (2006) Effects of Hwangryunhaedoktang on DSS-induced Colitis. *J. Korean Oriental Med.* **27**: 182-195.
5. Han, K., Kwon, D. Y., Lee, S. G., Park, S. K., Kim, C. and Kim, Y. K. (2006) The present state of korean herbal preparation production and possible improvement plan. *Korean J. Oriental Med. Prescrip.* **14**: 30-41.
6. Jee, E. H., Kim, H. J., Jeong, S. H., Moon, J. H. and Jang, Y. P. (2010) Assessment of quality variance among commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang by simultaneous analysis of

- characterizing compounds. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 161-165.
7. Eom, S., Kim, S., Kim, K., Park, S., Eo, W. and Choi, W. (2010) A proposal for research process of botanical drug based clinical traditional Korean medicine-historical evidence-based medicine II-. *J. Ori. Med. Classic* **23**: 63-102.
 8. Wang, H., Di, L., Zhao, X., Wang, H., Tao, J. and Cai, B. (2011) Discussion on the extraction process design of traditional chinese medicine preparation. *World Sci and Technol/ Modernization Trad Chinese Med and Materia Medica* **13**: 232-239.
 9. Kim, D. R., Kwak, G. S., Jeong, S. M., Lee, S. C. and Ha, J. U. (2003) Comparison of the antioxidative abilities of commercial gal geun tang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 728-732.
 10. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
 11. Jee, E. H., Kim, H. J., Jeong S. H., Moon J. H. and Jang Y. P. (2010) Assessment of the quality variance among commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang by simultaneous analysis of characterizing compounds. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 161-165
 12. Zhao, B. S., Liu, Y. G. and Wang, X. L. (2009) The experimental study of Huanglianjiadu decoction on relieving fever and anti-inflammatory effects. *Chinese J. Exp. Trad. Med. Formulae* **15**: 55-57.
 13. Kim, D. H., Park, S. J., Jung, J. Y., Kim, S. C. and Byun, S. H. (2009) Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of hwangnyeonhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Kor. J. Herbology.* **24**: 39-47.
 14. Chen, Q., Chen, T., Li, W., Zhang, W., Zhu, J., Li, Y., Huang, Y., Shen, Y. and Yu, C. (2012) Mycoepoxydiene inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through the of TRAF6 polyubiquitination. *PLoS ONE.* **7**: 1-10.
 15. McCann, S. M., Mastronardi, C., Laurentiis, A. D. and Rettori, V. (2005) The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann. NY Acad. Sci.* **1057**: 64-84.
 16. Zhou, Y., Wang, H., Yang, R., Huang, H., Sun, Y., Shen, Y., Lei, H. and Gao, H. (2012) Effects of litchi chinensis fruit isolates on prostaglandin E₂ and nitric oxide production in J774 murine macrophage cells. *BMC Complement Altern Med.* **12**: 1-8.
 17. Sakata, D., Yao, C. and Narumiya, S. (2010) Prostaglandin E₂, an Immunoactivator. *J Pharmacol Sci.* **112**: 1-5.
 18. Yu, M., Zheng, X., Witschi, H. and Pinkerton, K. E. (2002) The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants. *Toxicol. Sci.* **68**: 488-497.
 19. Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G., De Benedetti, F., Poli, V. and Ciliberto, G. (1998) Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* **187**: 461-468.
 20. Huang, W. H., Lee, A. R. and Yang, C. H. (2006) Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxy-flavonoids of scutellaria baicalensis GEORGI. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 2371-2380.
 21. Garcia, N. A. S. and Jeong, H. J. (2009) Baicalein and baicalin from the radix of scutellaria baicalensis georgi inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity. *Korean J. Plant Res.* **22**: 489-497.
 22. Lee, S. G., Yu, M. H., Lee, S. P. and Lee, I. S. (2008) Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 269-275.
 23. Arnao, M. B. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Tech.* **11**: 419-421.
 24. Kim, K. W., Ha, K. T., Park, C. S., Jin, U. H., Chang, H. W., Lee, I. S. and Kim, C. H. (2007) Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. *Vascul Pharmacol.* **47**: 99-107.
 25. Lee, D. U., Kang, Y. J., Park, M. K., Lee, Y. S., Seo, H. G., Kim, T. S., Kim, C. H. and Chang, K. C. (2003) Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-2, TNF-alpha, iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. *Life Sci.* **73**: 1401-1412.
 26. Yoon, S. B., Lee, Y. J., Park, S. K., Kim, H. C., Bae, H., Kim, H. M., Ko, S. G., Choi, H. Y., Oh, M. S. and Park, W. (2009) Anti-inflammatory effects of scutellaria baicalensis water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **125**: 286-290.
 27. Kim, E. H., Shim, B., Kang, S., Jeong, G., Lee, J. S., Yu, Y. B. and Chun, M. (2009) Anti-inflammatory effects of scutellaria baicalensis extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J. Ethnopharmacol.* **126**: 320-331.
 28. Kim, E. J., Park, H. J., Kim, H. J., Kim, J. H., Ann, J. Y., Lee, J. H. and Kim, Y. K. (2008) A monitoring study of marker contents in the Hwangnyeonhaedok-tang ex preparations on the market. *Korean J. Oriental Med. Prescrip.* **16**: 95-107.
 29. Kim, J. H., Seo, C. S. and Shin, H. K. (2010) The comparative study on decoctions of Ssanghwa-tang (Shuanghe-tang) extracted by different extraction conditions. *Korean J. Oriental Med. Prescrip.* **18**: 125-134.
 30. Bi, Z., Guo, J., Zhang, S. and Li, P. (2011) Study on the variation of the main constituents in Gardeniae Fructus after compatibility with Scutellariae Radix. *Pharm. Clini. Res.* **19**: 29-31.
- (2012. 12. 4 접수; 2012. 12. 14 심사; 2013. 1. 11 게재확정)