大韓本草學會誌 제28권 제4호(2013년 7월)
Kor. J. Herbology 2013 ; 28(4) : 17-23

ISSN 1229-1765
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2013.28.4.17.

梔子의 부위별 Geniposide정량 및 항산화효능비교

김승택[1#], 이장천[2], 이부균[2], 이금산[3], 류지효[4], 이영철[1*]

1 : 상지대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 부산대학교 한의학전문대학원, 3 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실,
4 : 영남대학교 의과대학 생화학 · 분자생물학교실, 노인성혈관질환연구센터

Comparison of geniposide quantification and antioxidant effect among the various parts of *Gardeniae fructus*

Seung-Taik Kim[1#], Jang-Cheon Lee[2], Boo-Kyun Lee[2], Keum-San Lee[3],
Ji-Hyo Lyu[4], Young-Cheol Lee[1*]

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Sangji University Wonju 220-702, Republic of Korea
2 : Devision of Pharmacology and Basic Korean Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Pusan 609-735, Republic of Korea
3 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea
4 : Department of Biochemistry & Molecular Biology, Aging-Associated Vascular Disease Research Center, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu 705-802, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The objective of the paper was to study cutting method of *Gardeniae frutus*, that tends to show symptom of separations in a packing, in accordance with the comparison experiment of quantification and antioxidant effect proceed with the intact *Gardeniae fructus*(Gf), seed of Gardeniae fructus (Gs) and the pericarp of *Gardeniae fructus* (Gp) separately.

Methods : The Gf, Gs, and Gp were extracted using 80% MeOH, followed by quantizing geniposide contained in each group. A MTT assay was conducted and ROS generation and NO production were measured for comparing its antioxidant effect.

Results : As a result of quantizing geniposide contained in the Gf, Gp, and Gs, respectively, the geniposide content was shown to be the highest in the Gs. MTT assay showed that no cytotoxicity was observed in the groups treated with Gf, Gp, and Gs, respectively, at a dose of 500 μg/ml. The ROS generation was shown to have more significantly decreased in the group pretreated with Gf 500 μg/ml than in the group treated with LPS. The NO level was shown to have more significantly decreased in the group pretreated with Gp 500 μg/ml than in the group treated with LPS.

Conclusion : As the geniposide content and antioxidant effect of Gf varies according to its each part, it is recommended that Gf should be distributed as an intact form other than segregation in packing.

Key words : *Gardeniae fructus*, seed of *Gardeniae fructus* (Gs), pericarp of Gardeniae fructus (Gp), antioxidant effect, ROS, NO

*교신저자 : 이영철, 강원도 원주시 우산동 상지대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 033-730-0672 · E-mail : lyc072@sangji.ac.kr
#제1저자 : 김승택, 강원도 원주시 우산동 상지대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 033-730-0672 · E-mail : hello-noja@hanmail.net
· 접수 : 2013년 6월 19일 · 수정 : 2013년 7월 20일 · 채택 : 2013년 7월 23일

서 론

梔子는 치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis (꼭두서니과 ; Rubiaceae)의 잘 익은 열매로서 그대로 또는 끓는 물에 데치거나 쪄서 건조한 것[1,2]으로, 性味는 寒苦하고 心肝肺胃三焦經에 歸經하며 瀉火除煩 淸熱利尿 凉血解毒하는 效能으로 熱病心煩 黃疸尿赤 血淋澁痛 血熱吐衄 目赤腫痛 火毒瘡瘍의 치료에 응용하거나 捻挫傷痛에는 外敷하여 응용[3]하는 주요한 淸熱瀉火藥이다. 이 약물의 가공은 한약재표준제조공정지침[4]에 '원반 절단기를 이용, 7~10 mm 두께로 절단' 하도록 기술되어 있어 '포장내 분리현상' 이 두드러진 韓藥材 중의 하나이기도 하다. 즉, 약물의 용해도 증강 또는 조제와 제제의 편리성에 치우친 나머지 포제 본래의 목적인 '효력의 극대화' 를 무시하는 경향이 종종 발생하고 있다. 그 대표적인 예로 개별 포장 안에서 韓藥材의 부위별 분리 현상(이하, 포장내 분리현상)을 들 수 있다. 이러한 현상은 果實 및 種子가 약용부위인 韓藥材의 사용에서 쉽게 찾아 볼 수 있다. 대부분의 껍질이 단단한 果實 및 種子類 韓藥材는 용출에 불리하다는 이유로 적당히 파쇄한 채 포장되는데, 이를 이동 및 보관할 때 果皮 또는 種皮가 내용물과 분리되어 포장 안에서 고르게 분포하지 않는 상태가 된다.

포제는 약물의 독성 및 부작용의 감소, 약성의 변화, 치료효과의 증강, 약물 작용범위의 변화, 약물의 용해도 증가, 조제와 제제의 편리성, 품질의 지속성 확보와 저장 용이성 등의 목적으로 수행[1]되는 것이 일반적이다. 김 등[5]이 桂枝의 부위별 정량을 통하여 桂枝의 皮層을 가능한 한 많이 남기는 飮片切除法을 도입해야 함을 보고한 것과, 何 등[6]이 梔子의 채취시기별 지표물질의 정량을 통하여 미성숙 과실을 채취하는 것이 지표물질의 최대 함유량을 유지할 수 있다고 보고하는 등의 최근 연구는 이화학적으로 효율적인 포제법을 찾기 위한 노력의 일환이다. 이에 본 연구에서도 梔子의 주요 지표물질[1]인 Geniposide의 부위별 정량을 飮片 규격을 제시하기 위한 기초 자료로 설정하였다.

한편, 지표물질이 곧 한방 효능과 직결되지 않음을 고려하여 성분함량과 더불어 효능을 개괄적으로 비교할 필요성이 제기되었다. 이에 본 연구에서는 암, 퇴행성 질환, 심혈관계 질환 등과 같은 다양한 염증성 질환의 직、간접적 원인이 되고 있는 reactive oxygen species (ROS)[7,8]와 관절염, 천식, inflammatory bowel diseases 등과 같은 급성 혹은 만성 염증성 질환이 발생의 원인이 되는 염증매개물중 대표적인 nitric oxide (NO)를 비교 측정하였다. 치자의 항염증과 관련하여 Hong 등[9]은 치자 성분인 crocetin이 LPS로 유도된 염증에서 NO, iNOS, COX-2 생성 및 발현을 억제하는 것으로 보고하였고, Peng 등[10]은 치자 추물물의 성분류가 NO 생성을 억제하는 것으로 보고하였으며, Fu 등[11]은 치자의 주요 성분인 geniposide가 in vivo에서 항염증 효과가 있음을 보고하였다.

이러한 정황을 반영하여 여기에서는 梔子를 全梔子 (Gf), 果皮만 취한 것 (Gp), 種仁만 취한 것 (Gs)의 3가지로 나누어 주요 지표물질[1]인 Geniposide를 정량함과 동시에 부위별로 항산화효능을 비교하여 '포장내 분리현상' 이 임상응용에 적당치 않음을 증명하고 梔子의 효능을 일반화 할 수 있는 飮片 형태를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 재료

曬乾한 양질의 梔子(Kwangmyongdang herb medicine Co., Korea)를 구입하여 同定하고 일부분을 보관(Voucher No. 201106-GJ-H)하였다. 입수한 재료를 全梔子 (Gf), 果皮만 취한 것 (Gp), 種仁만 취한 것 (Gs)의 3가지로 나누어 시료로 사용하였다 (Fig. 1A-C).

2) 기기 및 시약

추출 및 검액 제조에는 Analytical grinder (IKA A10, Germany), Standard test sieve #18 (Daihan science C8.20031, Korea), Sonicator (Hwashin Tech Powersonic 420, Korea) 등이 사용되었고, Geniposide (98% 이상, Wako, Japan)를 지표성분으로 설정하였다(Fig. 2). 또한 추출 및 기기분석에는 methanol (HPLC-grade, J.T.Baker), acetonitrile (HPLC-grade, Fisher, USA), water (HPLC-grade, J.T.Baker, USA), acetic acid (HPLC-grade, J.T.Baker, USA) 등이 사용되었다.

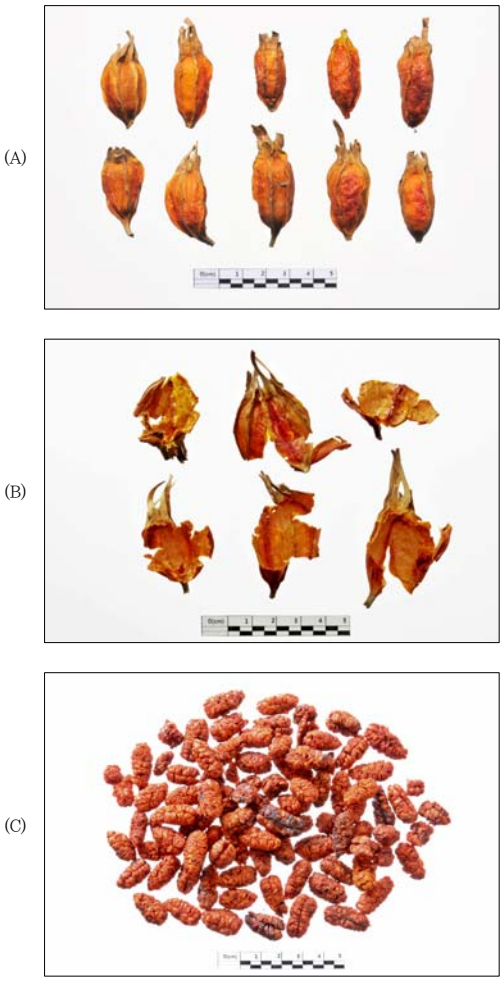

Fig. 1. Shapes of material, Gardeniae Fructus.
(A) Gf : Dried fruit of *Gardenia jasminoides*, (B) Gp : Pericarp of *G. jasminoides*, (C) Gs : Seed of *G. jasminoides*

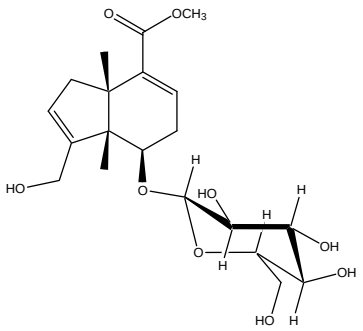

Fig. 2. The chemical structure of Geniposide.

2. 방법

1) 梔子의 부위별 정량 실험

(1) 시료 준비

Gf, Gp, Gs 각각의 성분 함량을 비교하기 위해 analytical grinder를 이용하여 분쇄 후 200 mg씩 칭량하였다.

(2) 검액 준비

정밀하게 칭량한 분말시료 100 mg에 80% MeOH 10 mL를 가한 후 2시간 동안 초음파추출하였다. 추출액을 1 mL 취하여 0.45 μm syringe filter (Advantec, Japan)로 여과하고 여액을 10배 희석하여 검액으로 사용하였다.

(3) 분석조건

Degasser, solvent delivery pump, autosampler, UV detector 등으로 구성된 SMART LC 800 (GL Science, Japan)을 사용하여 지표물질을 분석하였고, 분석된 데이터는 EZChrom Elite (Agilent, 3.3.2 SP1, USA)을 통해 처리하였다. 컬럼은 Inertsil ODS-4 (2.1 mm × 150 mm, 3 μm, GL Science, Japan)을 사용하였고, 컬럼의 온도는 40℃로 설정되었다. 이동상은 1% acetic acid가 포함된 water(A)와 1% acetic acid가 포함된 acetonitrile (B)로 구성한 후, isocrati elution ((A) : (B) = 70 : 30)으로 용리하였다. 유속은 500 μL/min, 검출 파장은 254 nm으로 설정하였고, 시료는 1 μL를 주입하였다.

(4) 검량선 작성 및 LOD, LOQ 설정

지표성분인 Geniposide를 칭량하여 HPLC-water에 녹인 후 표준용액으로 사용한 후 농도별로 검량선을 작성하고 상관계수(correlation coefficient, r^2)의 값을 통하여 직선성을 판단하였다. 검출한계 (limit of detection, LOD)와 정량한계 (limit of quantification, LOQ)는 각각 신호 대 잡음비 (signal-to-noise ratio, S/N ratio)가 각각 3, 10인 값으로 설정하였다.

2) 梔子의 부위별 항산화효능비교 실험

(1) 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, TLR4-specific Escherichia coli LPS는 Alexis Biochemical (San Diego, CA, USA)로부터 구입하여 본 연구에 사용하였다. 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy- H2DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 또한, L-glutamine이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Hyclone (Logan, UT, USA)으로부터 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하여 세포배양에 사용하였다.

(2) 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cells는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 분양받았다. L-glutamine (200 mg/L)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 10 % heat-inactivated FBS 및 100 U/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin를 첨가하여 5 % CO_2가 공급되는 37 ℃의 incubator에서 세포를 배양시켰다.

(3) 세포 생존율 측정 (MTT assay)

全梔子 (Gf), 梔子果皮 (Gp), 그리고 梔子仁 (Gs)의 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay[11]를 실시하였다. Gf, Gp, 그리고 Gs를 RAW 264.7 cells에 각 각 20 시간동안 전 처리한 후, MTT 시약 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 2.0 mg/ml)을 세포에 처리하고 4 시간동안 배양하였다. MTT 시약을 제거하고 DMSO를 이용하여 형성된 formazan crystal을 녹여낸 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며, 모든 실험은 독립적으로 총 3회 실시하였다.

(4) Intracellular reactive oxygen species (ROS) 측정

Carboxy-H_2DCFDA (5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate)를 이용하여 intracellular ROS 생산 정도를 확인하였다. RAW 264.7 cells에 Gf, Gp, 그리고 Gs를 각각 20 시간 동안 전 처리한 후, LPS (100 ng/ml)를 처리하여 배양하였다. 반응 후 carboxy-H_2DCFDA 100 μM을 처리하고 30 분간 배양하였다. 반응이 끝나면 상등액을 제거한 후 phosphate buffed saline (PBS)를 이용하여 세포를 모아 BD FACSCanto Ⅱ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)에서 형광을 측정하였다.

(5) Nitric oxide 생성 측정

Nitric oxide (NO) production은 NO의 stable conversion product인 nitrite (NO_2^-) 생성 정도를 Griess법으로 측정하였다. RAW 264.7 cells에 Gf, Gp, 그리고 Gs를 각 각 20 시간 동안 전 처리한 후, LPS (100 ng/ml)을 처리하여 배양시켰다. 반응 후 세포 배양 상등액 과 Griess reagent (0.1 % N-(1)-naphthyl-ethylenediamine, 1.0 % sulfanilamide, 2.5 % phosphoric acid)를 동량으로 혼합한 뒤, 상온에서 암조건으로 5 분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성 정도는 대조군에 대한 fold-induction으로 나타내었으며, 모든 실험은

독립적으로 총 3회 실시하였다.

(6) 통계 처리

모든 실험은 독립적으로 총 3회를 실시한 후, 그 결과를 평균 (mean) ± 표준편차 (SEM)로 표기하였다. Student *t-test*를 이용하여 대조군과 실험군의 유의성을 평가하였으며, *P* value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성이 있다고 평가하였다.

결 과

1. 梔子의 부위별 정량분석 결과

1) 지표 성분 Geniposide의 직선성, LOD 및 LOQ 확인

검량선을 통해 직선성을 확인할 결과, 직선성 농도 범위는 65-1000 μg/mL에서 상관계수(r^2)가 0.9997로 좋은 직선성을 보였다 (Fig. 3). 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)는 각각 5.9 ng/mL, 19.8 ng/mL로 나타났다 (Table 1).

2) 梔子의 부위에 따른 지표물질 함량 차이 비교

梔子의 지표물질인 Geniposide는 retension time 약 3분대에 검출되었고, 시료를 분석한 결과에서도 주변 성분과의 간섭이 없이 약 3분대에 검출되었다 (Fig. 4).

梔子의 부위별 Geniposide 함량을 살펴보면, 梔子仁 (Gs)에서의 함량이 113.76 mg/g으로 가장 높게 나타났고, 全梔子 (Gf)가 64.00 mg/g, 梔子果皮 (Gp)가 19.95 mg/g으로 가장 낮게 나타났다 (Table 2).

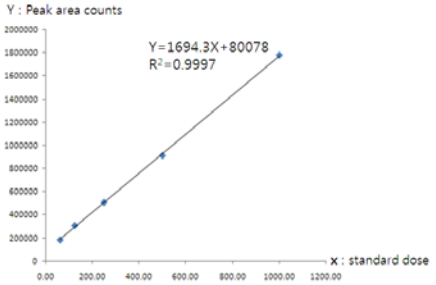

Fig. 3. Calibration curve of geniposide
Equations obtained from the calibration curves were y=1694.3x+80078 (r^2=0.9997) for standard samples. The peak areas for geniposide and the internal standard in samples were measured in the HPLC chromatographs.

Table 1. Linear regression, correlation coefficients (r2), LOD and LOQ for the reference compound.

Compound	Linear equation	Correlation coefficient (r^2)	Linear range (μg/mL)	LOD[a] (ng/mL)	LOQ[b] (ng/mL)
Geniposide	y=1694.3x+80078	0.9997	65-1000	5.9	19.8

[a]Limit of Detection, [b]Limit of Quantification

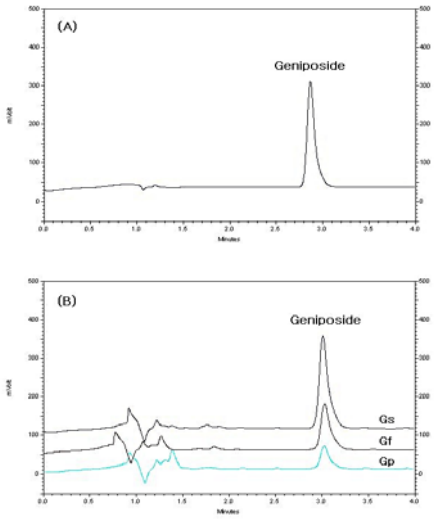

Fig. 4. Chromatograms of standard compound, Geniposide (A) and the extracts of *Gardenia jasminoides* (B).
Gs : Seed of *G. jasminoides*, Gf : Fruit of *G. jasminoides*, Gp : Pericarp. of *G. jasminoides*

Table 2. The content of Geniposide in different part of *Gardenia jasminoides*.

Sample	Content (mg/g)	RSD[a] (%)
Gs	113.76	1.89
Gf	64.00	5.49
Gp	19.95	2.51

[a] (Standard deviation/Mean)×100
Gs : Seed of *Gardenia jasminoides*, Gf : Fruit of *Gardenia jasminoides*, Gp : Pericarpum of *Gardenia jasminoides*

2. 梔子의 부위별 항산화효능비교실험 결과

1) 全梔子, 梔子果皮, 그리고 梔子仁이 세포생존율에 미치는 영향

全梔子 (Gf), 梔子果皮 (Gp), 그리고 梔子仁 (Gs)이 세포생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cells에 Gf, Gp, 그리고 Gs 200 μg/ml과 500 μg/ml을 각각 20 시간 동안 처리한 후, LPS 100 ng/ml을 처리하여 세포 생존율을 확인하였다. 본 실험에 적용한 Gf, Gp, 그리고 Gs의 최대 농도인 500 μg/ml 단독 처리군 모두에서 梔子 비처리군 (대조군)에 비해서 유의적인 세포 생존율 감소는 확인할 수 없었다 (Fig. 5, columns 1, 2, 3, and 4). 그러나 LPS 처리군에서는 유의적인 생존율 감소가 확인되었으나 (column 5), Gf, Gp, 그리고 Gs 전처리군에서는 LPS 처리군에 비해서 유의적인 세포 생존율 감소는 나타나지 않았다 (columns 6, 7, 8, 9, 10, and 11). 따라서 본 실험에서는 全梔子, 梔子果皮, 그리고 梔子仁의 세포 독성은 확인할 수 없었다.

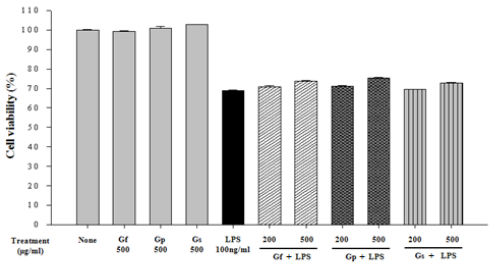

Fig. 5. Effect of *Gardenia jasminoides* on the cell viability. Cytotoxicity of *G. jasminoides* on RAW 264.7 cells was measured by MTT assay. Cells were treated with various concentration of the parts of *G. jasminoides* for 20 h and LPS (100 ng/ml) prior to MTT assay. Data represent the mean ± SEM of three independent determines.
Gf : Fruit of *G. jasminoides*, Gp : Pericarpum of *G. jasminoides*, Gs : Seed of *G. jasminoides*

2) 梔子 全梔子, 果皮, 그리고 種仁이 intracellular ROS generation에 미치는 영향

全梔子 (Gf), 梔子果皮 (Gp), 그리고 梔子仁 (Gs)이 intracellular ROS generation에 미치는 영향을 확인하기 위하여 carboxy-H_2DCFDA을 이용하였다. RAW 264.7 cells에 Gf, Gp, 그리고 Gs를 각 각 20 시간 동안 전 처리한 후, LPS (100 ng/ml)을 처리하여 incubation시킨 후, carboxy-H2DCFDA를 처리하여 flow cytometry를 이용하여 형광을 측정하였다. 梔子 비처리군 (대조군)에 비해서 본 실험에 적용한 Gf, Gp, 그리고 Gs의 최대 농도인 500 μg/ml 단독처리군 모두에서 유의적인 ROS 증가는 확인할 수 없었으나 (Fig. 6. control 2.7 %; Gf 2.3 %; Gp 2.2 %; Gs 3.7 %), LPS에 의해서 ROS는 확연히 증가하였다 (43 %). Gf 500 μg/ml 전처리군에서는 LPS 단독처리군에 비해서 확연한 ROS generation 감소가 나타났다. (35 %). 그러나 Gp 및 Gs 전처리군에서는 오히려 LPS 단독처리군보다 ROS generation 증가를 확인할 수 있었다.

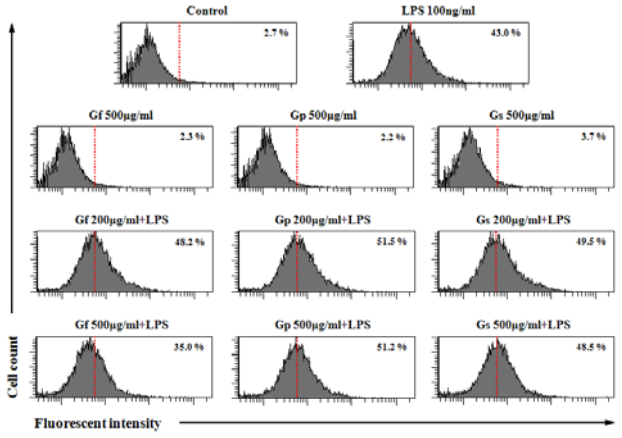

Fig. 6. Effect of *Gardenia jasminoides* on the intracellular ROS generation in RAW 264.7 cells. Cells were treated with various concentration of the parts of *G. jasminoides* for 20 h and LPS (100 ng/ml). ROS generation were measured by flow cytometric analysis of carboxy-H2DCFDA- loaded cells.
Gf : Fruit of *G. jasminoides*, Gp : Pericarpum of *G. jasminoides*, Gs : Seed of *G. jasminoides*

3) 全梔子, 梔子果皮, 그리고 梔子仁이 Nitric oxide production에 미치는 영향

全梔子 (Gf), 梔子果皮 (Gp), 그리고 梔子仁 (Gs)이 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향을 확인하였다. RAW 264.7 cells에 Gf, Gp, 그리고 Gs 200 μg/ml과 500 μg/ml을 각 각 20 시간 동안 처리한 후, LPS 100 ng/ml을 처리하여 NO 생성 정도를 측정하였다. 梔子 비처리군 (대조군)에 비해서 본 실험에 적용한 Gf, Gp, 그리고 Gs의 최대 농도인 500 μg/ml 단독처리군 모두에서 대조군과 유사한 수준의 NO 생성이 확인되었으나 (Fig. 7. Gf 1.08 배; Gp 1.09 배; Gs 1.11 배), LPS에 의해서 NO 생성은 유의적으로 증가하였다 (6.39 배). Gp 500 μg/ml 전처리군에서는 LPS 단독처리군에 비해서 유의적인 NO 생성 감소가 나타났다. (6.15 배). 그러나 Gf 및 Gs 전처리군에서는 오히려 LPS 단독처리군보다 NO 생성이 증가되었다.

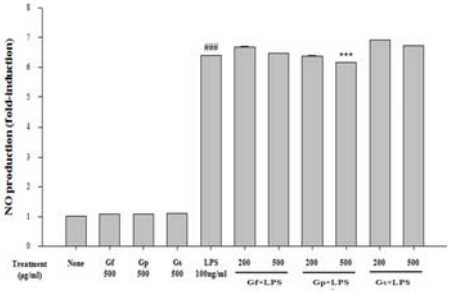

Fig. 7. Effect of *Gardenia jasminoides* on the nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with various concentration of the parts of *G. jasminoides* for 20 h and LPS (100 ng/ml). Data represent the mean ± SEM of three independent determines. ### $P < 0.005$ compared with the control value (column 1), *** $P < 0.005$ in comparison of column 5 (LPS treatment group), respectively.
Gf : Fruit of *G. jasminoides*, Gp : Pericarpum of *G. jasminoides*, Gs : Seed of *G. jasminoides*

고 찰

梔子 추출물은 피부미백효과, monoamine oxidase (MAO) 억제 및 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다[12, 13]. 또한 최근에는 梔子의 다양한 활성 성분이 분리되었다[14]. 이렇게 梔子는 한방관련 분야를 넘어 새로운 영역에서도 활발하게 연구가 진행되고 있는 품목이다. 그러나 처방에 응용되는 대다수의 유통 梔子는 포장내분리현상이 두드러진 품목이기도 하다. 그러나 막연히 湯煎하기 전에 果皮와 種仁을 고루 섞어 넣어야 한다는 인식이 있을 뿐, 실험적으로 梔子의 부위에 따른 지표물질함량이나 효능차이에 대해선 국내에 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 梔子의 부위별 지표물질 정량과 항산화 효능을 비교실험하여 梔子의 飮片 규격을 제시하고자 하였다.

梔子에 대한 지표물질은 대한약전에 Geniposide로 설정되어 있고[1], 선행 연구에서도 梔子에 대한 지표물질로 Geniposide로 설정하여 지역별로 수집된 약재에 대한 함량 기준이 보고[15]되어 본 연구에서도 梔子에 대한 지표물질을 Geniposide로 설정하여 분석을 진행하였다.

梔子를 부위별로 全梔子 (Gf), 梔子仁 (Gs), 梔子果皮

(Gp)로 분류하고 각각 이들 부위에 함유된 Geniposide 함량 분석을 진행하였다. Gs의 경우 Geniposide 함량이 113.76 mg/g으로 Gf에서의 함량인 64 mg/g보다 약 2배 정도 높은 것으로 나타났고, Gp는 19.95 mg/g으로 Gf보다 Geniposide 함량이 약 3배 정도 적은 것으로 나타났다. 따라서 Geniposide는 梔子의 각 부위에 고루 분포하는 것이 아니라 梔子仁 부위에 많이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 앞의 지표물질 정량과 더불어, Gf, Gs, Gp가 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하고, 항산화효능을 비교하였다.

본 실험에 적용한 Gf, Gp, 그리고 Gs의 최대 농도인 500 μg/ml 단독 처리군 모두에서 梔子 비처리군 (대조군)에 비해서 유의적인 세포 생존율 감소는 확인할 수 없었다. 또한 LPS처리군에서는 유의적인 생존율 감소가 확인되었으나, Gf, Gp, 그리고 Gs 전처리군에서는 LPS처리군에 비해서 유의적인 세포 생존율 감소는 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에서는 全梔子, 梔子 果皮, 그리고 梔子 種仁의 세포 독성은 확인할 수 없었다.

梔子 비처리군 (대조군)에 비해서 본 실험에 적용한 Gf, Gp, 그리고 Gs의 최대 농도인 500 μg/ml 단독처리군 모두에서 유의적인 ROS 증가는 확인할 수 없었으나, LPS에 의해서 ROS는 확연히 증가하였다. Gf 500 μg/ml 전처리군에서는 LPS 단독처리군에 비해서 확연한 ROS generation 감소가 나타났다. 그러나 Gp 및 Gs 전처리군에서는 오히려 LPS 단독처리군보다 ROS generation 증가를 확인할 수 있었다.

이전 연구에서는 梔子 methanol 추출물의 nitrite 소거 효과를 확인[14]하였으나 부위별 효과차이는 보고된 바가 없었다. 따라서 본 연구에서는 각 부위별로 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 梔子 비처리군 (대조군)에 비해서 본 실험에 적용한 Gf, Gp, 그리고 Gs의 최대 농도인 500 μg/ml 단독처리군 모두에서 대조군과 유사한 수준의 NO 생성이 확인되었으나, LPS에 의해서 NO 생성은 유의적으로 증가하였다. Gp 500 μg/ml 전처리군에서는 LPS 단독처리군에 비해서 유의적인 NO 생성 감소가 나타났다. 그러나 Intracellular ROS generation 실험에서 ROS 생성 감소 효과가 나타났던 Gf 전처리군과 Gs 전처리군에서는 오히려 LPS 단독처리군보다 NO 생성이 증가되었다.

요약하면 부위별 지표물질이 梔子仁 (Gs)에 가장 많이 함유되었음에도 불구하고 ROS generation은 全梔子에서, NO generation은 梔子果皮에서 효능이 다른 시료에 비해 유의적으로 감소하였다. 이와 같이 梔子의 부위별 지표물질함량과 효능이 균일하지 않음을 알 수 있었다.

현재 梔子는 포장되기 전에 미리 절단 가공되어 시중에 유통되고 있다. 그러나 유통 중에 果皮와 種仁 부분이 포장내에서 분리되어 약재 사용에 있어서는 果皮, 種仁의 양이 일정하지 않은 문제점이 있다. 이는 현재의 飮片규격이 약재의 품질관리 차원에서도, 일정한 품질의 약재 사용에도 문제가 발생할 수 있으리라 예상할 수 있다. 더 나아가 실제 임상응용에 있어서도 균일한 약효를 발휘할 수 없는 문제점에 봉착할 수 있다. 다행히 梔子의 果皮는 비교적 잘 부스러지므로 梔子는 포장내분리현상을 방지할 수 있는 全梔子의 형태로 유통되는 것이 가장 적당할 것으로 사료된다.

결 론

포장내분리현상이 두드러진 梔子의 飮片 규격에 대한 연구를 위해 梔子를 부위별로 全梔子 (Gf), 梔子仁 (Gs), 梔子果皮 (Gp)로 분리하여 지표물질정량과 항산화효능비교실험을 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Gf, Gp, Gs에 함유된 Geniposide 정량 결과 Gs에서 가장 높게 정량되었다.
2. MTT assay 결과 Gf, Gp, Gs의 500 μg/ml 단독처리군에서 세포독성은 확인할 수 없었다.
3. Gf 500 μg/ml 전처리군에서는 LPS 단독처리군에 비해서 확연한 ROS generation 감소가 나타났다. 그러나 Gp 및 Gs 전처리군에서는 오히려 LPS 단독처리군보다 ROS generation 증가를 확인할 수 있었다.
4. Gp 500 μg/ml 전처리군에서는 LPS 단독처리군에 비해서 유의적인 NO 생성 감소가 나타났다. Gf 전처리군과 Gs 전처리군에서는 오히려 LPS 단독처리군보다 NO 생성이 증가되었다.
5. 부위별 지표물질이 梔子仁 (Gs)에 가장 많이 함유되었음에도 불구하고 ROS generation은 全梔子에서, NO generation은 梔子果皮에서 효능이 다른 시료에 비해 유의적으로 높았다.

이와 같이 梔子의 부위별 지표물질함량과 효능이 균일하지 않으므로 梔子는 포장내분리 현상을 방지할 수 있는 全梔子의 형태로 유통되는 것이 가장 바람직할 것으로 사료된다.

Reference

1. Korea Food and Drug Administration(KFDA). The Korean Pharmacopoeia 9th ed[Internet]. The KFDA Notification 2007-89. 2007[cited 2011 Oct 8] : 979-980. Available from : http : //kfda.go.kr/index.kfda?mid=92&pageNo=1&seq=3461&cmd=v
2. Ju YS. Ungok boncho-hak[Un-gok Herbology]. Seoul : Seolimjae. 2002 : 247-51.
3. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools. Boncho-hak[Herbology]. Seoul : Younglimsa. 2004 : 207-8.
4. KFDA. Standard of First Processing in Herbal Medicines(I). KFDA 11-1470000-001652-14. 2008 : 83.
5. Kim YS, Lee GS, Kim JH, Choi GY, Jeong SI, Cho SI, Ju YS, Kim HJ. A Study of cutting methods by comparing the contents of Cinnamic acid and Cinnamaldehyde in different parts of Cinnamomi Ramulus. Kor J Herbology. 2011 ; 26(2) : 11-5.
6. He GZ, Zhou M, Tang LY, MA LM, XU HH. Studies on the Accumulation of Major Active Compounds from *Gardenia jasminoides* Fruits in Different Ripening

Stages. Nat Prod Res Dev. 2010 ; 22 : 678-82.
7. Lee SW. Functional foods and immunotherapy. Food World. 2001 ; 8 : 44-5.
8. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 2010 ; 49 : 1603-16.
9. Hong YJ, Yang KS. Anti-inflammatory activities of crocetin derivatives from processed Gardenia jasminoides. Arch Pharm Res. 2013 : [Epub ahead of print]
10. Peng K, Yang L, Zhao S, Chen L, Zhao F, Qiu F. Chemical constituents from the fruit of Gardenia jasminoides and their inhibitory effects on nitric oxide production. Bioorg Med Chem Lett. 2013 ; 23(4) : 1127-31.
11. Fu Y, Liu B, Liu J, Liu Z, Liang D, Li F, Li D, Cao Y, Zhang X, Zhang N, Yang Z. Geniposide, from Gardenia jasminoides Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models. Int Immunopharmacol. 2012 ; 14(4) : 792-8.
12. Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Park CW, Han YH. Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. Kor J Biotechnol Bioeng. 2004 ; 19 : 437-40.
13. Hwang KH, Park TK. Inhibitory activity of the fruit extract of *Gardenia jasminoides* on monoamine oxidase. Kor J Pharmacogn. 2007 ; 38 : 108-12.
14. Yang HJ, Park M, Lee HS. Antioxidative activities and components of *Gardenia jasminoides*. Kor J Food Sci Technol. 2011 ; 43 : 51-7.
15. Zheng MS, Cai XF, Choi IS, Kim YH, Kang JS, Bae KH. Standardization of Geniposide Content of Gardeniae Fructus. Kor J Medicinal Crop Sci. 2004 ; 12(3) : 262-5.