

한약복합추출물 HT008의 제조방법에 따른 항염증 효능 및 성분함량 비교연구

이동현^{1#}, 송정빈¹, 송미경¹, Bhakta Prasad Gaire¹, 박주연², 김애홍², 최호영¹, 김호철^{1*}

1 : 경희대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : (주)뉴메드 한의과학기술연구소

Comparative Study on Anti-inflammatory Effects and Compound Contents of Multi-herbal Extracts HT008 produced by Different Manufacturing Methods

Donghun Lee^{1#}, Jungbin Song¹, Mikyung Song¹, Bhakta Prasad Gaire¹, Juyeon Park², Aihong Jin², Ho-Young Choi¹, Hocheol Kim^{1*}

1 : Dept. of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University
2 : Korea Institute of Science and Technology for Eastern Medicine (KISTEM), NeuMed Inc.

ABSTRACT

Objectives : The biological activities and compound contents of herbal medicine vary depending on manufacturing processes. In this study, we compared anti-inflammatory effects and compound contents of three kinds of multi-herbal extract HT008 produced by different manufacturing processes in order to determine chemical and biological equivalence.

Methods : HT008 was produced by three different manufacturing methods: 1. Freeze dried extract of *Eleutherococcus senticosus*, *Scutellaria baicalensis* and *Angelica sinensis* (HT008 FD), 2. Spray dried extract of *E. senticosus* and *S. baicalensis* combined with reflux extract of *A. sinensis* (HT008 SD), 3. Spray dried extract of *E. senticosus* and *S. baicalensis* combined with supercritical fluid extract of *A. sinensis* (HT008 SF). Anti-inflammatory effects were evaluated using acetic acid induced pain model and λ -carrageenan induced paw edema model. Compound contents were evaluated by HPLC quantitative analysis of standard compounds of HT008, eleutheroside E, baicalin, *z*-ligustilide.

Results : HT008 FD, HT008 SD and HT008 SF significantly decreased acetic acid induced pain index and λ -carrageenan induced paw edema volume compared with that of control group. There was no significant difference in efficacy among the HT008 FD, HT008 SD and HT008 SF. Standard compound contents of HT008 FD, HT008 SD and HT008 SF were quantified within the range of Korean pharmacopoeia or other research.

Conclusions : Three different manufacturing methods of multi-herbal extracts have been developed without noticeable difference in the efficacy or compound contents. The results might be used to establish manufacturing process and industrialization of herbal extracts.

Key words : comparison of efficacy, compound contents, manufacturing methods, HT008, acetic acid, λ -carrageenan, supercritical fluid extraction

서론

최근 들어 한약제형을 간편화하려는 연구가 활발해지면서 표준화가 용이하고 복용과 보관이 편리한 제형으로 과립제,

*교신저자 : 김호철, 서울특별시 동대문구 경희대로 26 130-701
· Tel : 02-961-0419 · E-mail : hckim@khu.ac.kr

#제1저자 : 이동현, 서울특별시 동대문구 경희대로 26 130-701
· Tel : 02-961-0419 · E-mail : allstart2925@naver.com
· 접수 : 2013년 6월 24일 · 수정 : 2013년 7월 8일 · 채택 : 2013년 7월 10일

정제, 캡슐제 등이 선호되고 있다. 전통적인 한약탕제는 흡수가 용이하다는 장점에도 불구하고 표준화가 어려우며 오래 보관할 수 없고 맛과 향이 강하여 복약순응도가 낮기 때문이다¹⁾. 그런데 과립제나 정제 등으로 제형을 간편하게 바꾸기 위해서는 원약재를 액상으로 추출한 후 이를 건조시켜 고품추출물을 제조하여야 한다.

액상추출물로부터 고품추출물을 제조할 때 사용되는 건조 방식으로 분무건조법과 동결건조법 등이 있다²⁾. 동결건조법은 저온 감압상태에서 고체상태의 용매를 액체상태를 거치지 않고 승화시키는 방법으로 휘발성 성분들이 증발되지 않고 그대로 남아있다는 장점이 있으나 비용이 높다는 단점이 있다³⁾. 분무건조법은 건조기 내에서 미립화된 추출액을 열풍과 함께 분무하는 방법으로 건조효율이 높고 제조비용이 낮지만 휘발성 성분이 휘발될 수 있다는 단점이 있다⁴⁾.

제조비용이 낮다는 이점 때문에 산업계에서는 한약 고품추출물을 만들 때 분무건조법이 널리 사용되고 있지만, 일부 한약재 중에는 휘발성이 높은 정유성분 등이 다량 함유되어 있어 효능이 저하될 수 있다^{5,6)}. 예를 들어 계피나 천마 등을 분무건조하면 동결건조에 비해 지표성분이 1/4이하로 줄어든다는 보고가 있으며^{7,8)}, 건조방법에 따라 추출물의 항산화효능, 항유전독성효능 등의 차이가 발생한다는 보고가 있다⁹⁾. 따라서 분무건조법으로 고품추출물을 제조할 때는 한약재에 따라 성분의 특이성이 있기 때문에 유효성분과 효능의 동등성을 확보하는 것이 무엇보다 중요하다.

널리 사용되는 한약재 중 하나인 중국당귀는 추출분말을 제조할 때 분무건조하면 유효성분인 *z*-ligustilide가 휘발되는 한약재 중 하나이다¹⁰⁾. 그래서 당귀가 함유된 복합추출물을 제조하기 위해서는 제조비용이 높은 동결건조나 초임계추출¹¹⁾을 하여야 한다. 그래서 제조비용이 낮으면서 효능과 성분이 동등한 분무건조 추출분말 제조방법을 연구하기 위하여 중국당귀, 가시오가피, 황금으로 구성된 복합추출물인 HT008을 동결건조법과 분무건조법으로 제조하였을 때 성분과 효능의 동등성이 있는지를 비교 관찰하고자 하였다.

HT008 동결건조추출물은 항염효능이 연구되어 있으므로^{12,13)} 중국당귀 중 유효성분의 휘발을 방지하기 위하여 초임계추출을 하거나 주정 환류추출한 후 이를 각각 분무건조한 후 황금과 가시오가피와 배합한 HT008 당귀환류추출 후 분무건조추출물 및 당귀초임계추출 후 분무건조추출물을 지표성분 함량, 항염 및 진통효능을 동결건조 추출물과 각각 비교하였다.

재료 및 방법

1. 시료 제조

HT008의 동결건조 추출물(HT008 FD)은 가시오가피 81.2 kg, 중국당귀 15.8 kg, 황금 3.0 kg 를 10배수의 70% 알코올(주정)로 82±5℃에서 4시간 씩 2회 가온 환류 추출한 후 감압농축하여 농축액을 동결건조하여 분말을 제조하였다. 가시오가피 *Eleutherococcus senticosus*, 중국당귀 *Angelica sinensis*, 황금 *Scutellaria baicalensis*은 각각 경동시장 약수당 약업사에서 구입한 한국 철원산, 중국 감숙성, 중국 감숙성 산으로 경희대학교 한의과대학 본초학교실에서 검증받아

(Voucher No. FE060041, FE012070, FE114022) 사용하였다.

HT008의 당귀환류추출 후 분무건조추출물(HT008 SD)은 중국당귀 15.8 kg을 따로 15배수의 70% 알코올로 82±5℃에서 4시간 가온 환류 추출하고, 나머지 가시오가피 81.2 kg, 황금 3 kg를 10배수의 70% 알코올로 82±5℃에서 4시간 가온 환류 추출한 추출액을 감압농축하여 얻은 농축액을 분무건조하고 중국당귀 환류 추출액과 혼합하여 분말을 제조하였다.

당귀초임계추출 후 분무건조추출물(HT008 SF)은 HT008 구성약재 중 중국당귀 15.8 kg을 액체펌프, 가열장치를 이용하여 가압, 가열시킨 초임계 이산화탄소를 이용하여 중국당귀를 초임계 추출하였다. 초임계 추출시간은 2시간, 사용된 이산화탄소의 유량은 40 L/h, 초임계 추출온도는 45℃, 압력은 25 MPa 조건이다. 초임계 추출한 당귀 잔사와 가시오가피 81.2 kg, 황금 3 kg 을 10배수의 70% 알코올로 82±5℃에서 4시간 씩 2회 가온 환류 추출, 감압농축하여 얻은 농축액을 분무건조하고 당귀 초임계 추출액과 혼합하여 분말을 제조하였다.

2. HPLC를 이용한 지표성분 분석

HPLC system은 Water 1525 binary Pump, Column oven, 2707 autosampler, 2998 PDA detector를 사용하였고 각 성분분리를 위한 컬럼은 Sunfire™ C18, particle size 5 μm, 4.6×250 mm I.D (Waters, Ireland) 을 사용하였다.

각 추출물의 HPLC 패턴 분석 및 구성약재의 지표성분 eleutheroside E (Chromadex, USA), baicalin (Waco, Japan), *z*-ligustilide (Waco, Japan)를 정량하기 위하여 HPLC 이동상으로 1% Phosphoric acid (A)와 Acetonitrile (B)을 사용하여 분석시간 0-60분간 5-50%의 B로 농도구배로 진행 후, 80분까지 이동상B를 70%로 증가시키고 이어 5분간 5%로 유지하였다. 용매 유속은 1 mL/min, 시료 주입량 10 μL, Column oven 온도는 40℃로 유지하였다. 검출파장 205 nm 에서 eleutheroside E, baicalin을 확인하였고, 320 nm 에서 *z*-ligustilide를 확인하였다.

각 지표성분 표준품은 10 mg를 DMSO 1 mL에 녹인 후 20% DMSO/methanol로 10mL 정용하여 stock solution을 만들고, 이를 적절히 희석하여 각각의 표준용액 농도 1-150 μg/mL으로 하여 표준액으로 사용하였다. HT008 추출물은 500 mg를 정확히 칭량하고 85% methanol 50 mL을 넣고 10분간 초음파 추출 및 용해하여 이 용액을 0.45μm syringe filter 로 여과한 용액을 시험용액으로 사용하였다.

3. Acetic acid 유발 생쥐 진통 효과

생후 5주령(체중 25-33 g) 수컷 ICR계 생쥐를 (주)샘타코 (Osan, Korea)에서 공급받아 실험동물로 사용하였다. 실험동물은 온도 22±2℃, 습도 55±10%, 조명 시간 12시간 명암 주기(07:00-19:00) 환경에서 자유롭게 공급된 증류수와 고품사료로 1주일 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. ICR 생쥐를 각 군으로 나누고 0.7% acetic acid를 0.2 mL/10 g 로 복강 내 주사하고, 주사 10분 후부터 10분간의 신전반응

(복벽의 수축과 뒷다리의 신전에 따른 골반의 회전으로 이루어지는 뒤틀림 반응)의 횡수를 계측하였으며 모든 실험동물은 실험이 진행되는 암실에서 3시간 이상 적응시킨 후 실험을 진행하였다. HT008 FD, HT008 SD 및 HT008 SF를 300 mg/kg 농도로 경구투여 하였으며, 대조군은 2차 증류수를, 양성 대조군은 Ibuprofen 100 mg/kg을 각각 경구투여 하였다. 각 시료는 증류수에 녹인 후 실험이 진행되기 30분 전에 1회 경구투여하였다.

4. λ-carrageenan유발 흰쥐 관절부종 억제 효과

생후 3주령(체중 100-120 g) 수컷 Sprague Dawley계 흰쥐를 생쥐와 동일한 환경으로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물에 급성 관절염을 유발하기 위하여 흰쥐의 오른쪽 발바닥에 생리 식염수로 용해시킨 1% λ-carrageenan (Sigma Chemical, USA) 50μl 를 0.5 cc 인슐린 주사기를 사용하여 주입하였다. 부종 측정은 Plethysmometer (7140, UGO, Italy) 를 사용하였으며, 1% λ-carrageenan 투여 전과 투여 후 0.5, 1.5, 3.5 및 5.5시간에 각각 흰쥐 오른발의 부피를 1마리 당 2회 반복 측정하여 평균값으로 정하였다 (Fig. 2). 실험동물은 2차 증류수를 투여한 대조군, Ibuprofen 100 mg/kg를 투여한 양성 대조군 및 HT008을 투여한 실험군으로 나누어, 1% λ-carrageenan 을 주입 30분 전에 존대를 이용하여 경구투여 하였다. 부종율(Edema rate %)은 1% λ-carrageenan 주사 후, 각 시간대의 흰쥐 발 부피 변화를 측정하여 다음 식으로 부종 증가율(%)을 산출하였다.

$$\text{부종 증가율 (\%)} = \frac{V_1 - V}{V} \times 100$$

V는 1% λ-carrageenan을 주사 전 2회 측정된 발의 평균 부피이며, V1는 시료를 경구투여하고 30분 후에 λ-carrageenan 주사 후 0.5, 1.5, 3.5 및 5.5시간에서 2회 반복 측정된 발의 평균 부피이다. 급성 관절염 유발 약물을 주입하기 전에 모든 실험동물은 예비실험과정을 거쳐 측정기구에 적응하도록 하였다. 모든 실험동물은 실험이 진행되는 암실에서 1시간 이상 적응시킨 후 실험을 진행하였다. 시료는 증류수에 녹인 후 실험이 진행되기 30분 전에 1회 경구투여하였다.

5. 통계처리

결과 통계처리는 평균±표준편차로 나타내었으며, 평균치 간에 유의성은 Student's t-test 를 이용한 후 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 제조방법에 따른 HT008 고형추출물의 지표 성분 함량 비교

HT008 각 시료별 HPLC 패턴분석 결과는 Fig. 1과 같으며 구성약재의 지표성분의 최적 검출파장에서 머무름 시간은 각각 eleutheroside E가 22분대, baicalin가 35분대, z-ligustilide

가 65분대이었다.

분석방법에 따라 각 시료를 분석한 결과 eleutheroside E, baicalin, z-ligustilide 각각의 함량은 HT008 FD은 1.70±0.06 mg/g, 31.63±1.17 mg/g, 2.47±0.02 mg/g 이며, HT008 SD 은 1.28±0.04 mg/g, 26.94±0.17 mg/g, 4.18±0.02 mg/g 이고, HT008 SF 는 1.23±0.03 mg/g, 26.93±0.43 mg/g, 4.24±0.03 mg/g이었으며 환류추출과 초임계추출에 따른 z-ligustilide 성분함량의 유의한 차이는 없었다(Table 1).

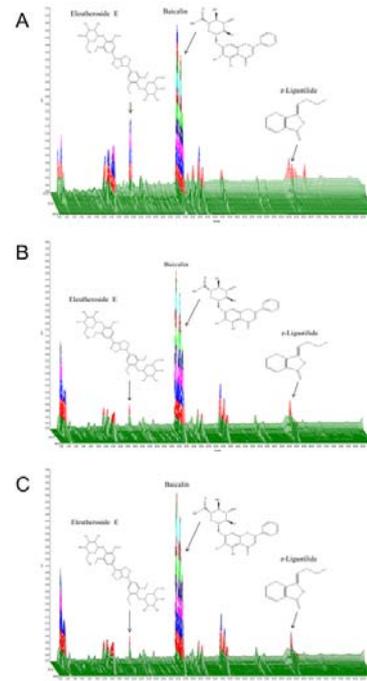


Fig. 1. 3-D HPLC chromatogram of HT008 extract produced by 3 different methods
Separation condition were as follows: column, Sunfire™ C18, (4.6 × 250 mm, 5 μm); mobile phase (A) = water containing 1% Phosphoric acid ;mobile phase (B) = Acetonitrile. Gradient program was as follows: 0-60 min, 5-50% B; 61-80 min, 50-70% B; 81-85 min, 70-5% B. Flow rate was 1 mL/min; temperature was 40 °C; injection volume was 10 μl; detection was at 205 nm (eleutheroside E, baicalin) and 320 nm (ligustilide). Detection was performed by using a photodiode array detector. X-axis is retention time; Y-axis is absorbance unit, and Z-axis is wavelength. A: HP008 FD, B: HT008 SD, C: HT008 SF

Table 1. The contents of standrad compounds in HT008 extract powder

	standard compound (mg/g, n=3)		
	eleutheroside E	baicalin	z-ligustilide
HT008 FD	1.70±0.06	31.63±1.17	2.47±0.02
HT008 SD	1.28±0.04	26.94±0.17	4.18±0.02
HT008 SF	1.23±0.03	26.93±0.43	4.24±0.03

The values are mean±SD

2. Acetic acid 유발 생쥐 통증 억제효과

3가지 제조방법의 HT008을 300 mg/kg 용량으로 경구투여하고 30분 후에 acetic acid를 복강주사하여 신전반응 횡수를 측정된 결과, 2차 증류수를 투여한 대조군은 38.9±3.5회였으며, Ibuprofen 100 mg/kg을 투여한 양성대조군은 18.9±2.5 회로 나타나, 대조군에 비해 유의한 통증억제 효

과가 나타났다. HT008 FD, SD, SF 300 mg/kg 투여군의 경우 각각 26.5±2.5, 27.0±1.4, 25.0±2.9 회로 나타나 3 가지 제조방법 모두에서 대조군 대비 유의한 통증억제 효능이 나타났으며 군간에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

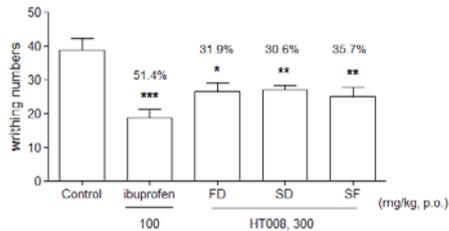


Fig. 2. Numbers of acetic acid-induced writhing reflex in mice. Ibuprofen treatment group was administrated orally at dose of 100 mg/kg. HT008 FD, SD, SF treatment groups were administrated orally at dose of 300 mg/kg. Bars are mean values for 9–10 mice per group±SD. Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

3. λ -carrageenan 유발 흰쥐 부종 억제 효과

1% λ -carrageenan을 흰쥐 오른쪽 발바닥에 주입하고 0.5, 1.5, 3.5, 5.5시간 후 paw edema를 측정된 결과 대조군의 경우 각각 16.5±6.3, 23.4±6.4, 16.0±3.2, 12.4±3.3%의 부종 증가율이 나타났다. 반면 Ibuprofen 100 mg/kg를 경구투여한 양성대조군은 0.5, 1.5, 3.5, 5.5시간 후 각각 8.1±3.7, 9.5±5.8, 5.9±4.5, 2.5±2.8%의 부종 증가율을 보여 매 측정시마다 대조군 대비 유의한 부종 억제 효과가 나타났다.

HT008 FD 300 mg/kg 투여군은 각각 14.1±6.5, 16.0±2.4, 14.4±6.1, 12.1±6.2%의 부종 증가율을 보였고 1.5시간째 대조군 대비 유의하게($p < 0.05$) 부종을 억제하였다. HT008 SD 투여군은 각각 7.9±3.0, 11.8±3.3, 9.8±4.1, 7.1±2.1%의 부종 증가율을 보여 매 측정시마다 대조군 대비 유의한 부종억제 효과($p < 0.05$)가 나타났고 1.5시간째에 대조군 대비 통계적인 유의성이 가장 높았다 ($p < 0.01$). HT008 SF 300 mg/kg 투여군은 각각 8.0±3.7, 14.2±5.9, 13.3±1.6, 8.4±4.1%의 부종 증가율을 보였고 0.5, 1.5, 3.5시간째 대조군 대비 유의하게($p < 0.05$) 부종을 억제하였다 (Fig. 3, Table 2).

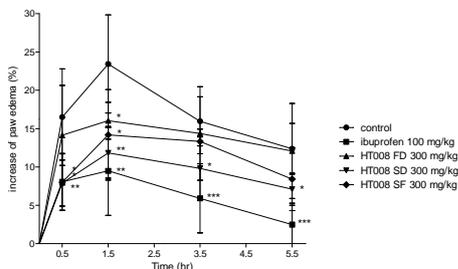


Fig. 3. Paw edema percent of λ -carrageenan-induced rat model. Edema value was measured at 0.5, 1.5, 3.5, and 5.5 hours after 1% λ -carrageenan injection. HT008 FD, SD, SF treatment groups were administrated orally at dose of 300 mg/kg. The values are mean±SD (n=5–9 rats per group). Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

Table 2. Inhibitory effect of HT008 FD, SD, SF treatment on λ -carrageenan-induced paw edema in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Increased percent of paw volume (inhibition %)			
		0.5 h	1.5 h	3.5 h	5.5 h
Control	–	16.5±6.3	23.4±6.4	16.0±3.2	12.4±3.3
Ibuprofen	100	8.1±3.7 (51.1)**	9.5±5.8 (59.5)**	5.9±4.5 (63.0)**	2.5±2.8 (80.0)***
HT008 FD	300	14.1±6.5 (14.3)	16.0±2.4 (31.6)*	14.4±6.1 (9.9)	12.1±6.2 (2.3)
HT008 SD	300	7.9±3.0 (52.2)*	11.8±3.3 (49.5)**	9.8±4.1 (38.5)*	7.1±2.1 (42.6)*
HT008 SF	300	8.0±3.7 (51.5)*	14.2±5.9 (39.5)*	13.3±1.6 (16.5)*	8.4±4.1 (31.9)

The values are mean±SD. Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

고찰

한약건조추출물의 제조방법에 따른 성분함량과 효능을 비교하기 위하여 항염 효능이 알려진 HT008의 동결건조추출물, 당귀환류추출 후 분무건조추출물 및 당귀초임계추출 후 분무건조추출물의 지표성분 함량을 정량하고 효능을 비교 실험하였다. 본 연구는 연구팀의 파악에 의하면 한약복합물의 제조방법에 따른 성분함량과 약리효능을 동시에 비교한 최초의 논문이다.

HT008 FD, SD, SF의 지표성분 eleutheroside E, baicalin, z-ligustilide를 정량한 결과 선행연구에서 HT008을 분무건조하였을 때 중국당귀의 휘발성성분인 z-ligustilide 함량이 약 46% 감소하는데 반해 본 연구에서는 HT008 SD와 HT008 SF의 z-ligustilide 성분함량이 HT008 FD보다 감소하지 않았으며 HT008 SD와 SF 간에는 유의한 차이가 없었다. 이는 중국당귀의 별도 추출을 통해 휘발성 성분손실을 방지할 수 있으며 중국당귀의 환류추출과 초임계추출 간의 성분함량에 유의한 차이가 없음을 의미한다.

지표성분으로 사용한 eleutheroside E, z-ligustilide, baicalin은 가시오갈피, 중국당귀, 황금에 특이적으로 존재하면서 분석이 용이하여 여러 연구에서 지표로 사용되는 성분으로^{14,15,16} 이 중 eleutheroside E와 z-ligustilide는 NF- κ B 신호경로를 조절하여 cyclooxygenase-2 (COX-2), iNOS 발현을 억제하며^{17,18} baicalin은 통증을 조절하는 histone deacetylase 1 발현과 prostaglandin E2 (PGE2) 생성을 억제¹⁹하는 등 3가지 지표성분 모두 관절염의 주요 타겟기전인 항염증, 항산화, 진통 효능을 갖는 유효성분으로 알려져 있다. 본 실험에서 지표성분 함량이 모두 기준범위에 적합하다는 것은 휘발성인 z-ligustilide를 비롯한 효능성분의 손실이 나타나지 않았다는 것이므로 항염증 약리효능을 일정하게 유지시킬 것을 의미한다.

정량한 지표성분 3종의 성분함량을 기준으로 수율과 배합비를 역산하여 대한약전¹⁴에 기재된 지표성분 함량과 비교하였을 때 황금은 원재료 대비하여 baicalin 9.2%가 함유되어 대한약전 기준에 적합하였다. 가시오갈피의 경우 eleutheroside E를 0.029–0.053%가 함유한다는 보고¹⁵와 비교하였을 때 본 연구의 eleutheroside E함량은 0.047%로 적합하였고, 중국당귀의 경우 z-ligustilide를 0.11–0.53% 함유한다는 보고²⁰와 비교하였을 때 z-ligustilide함량은 0.21%로 적합하였다. HT008의 3가지

추출물 모두 구성약재의 각 원물 중 지표성분함량이 보고된 기준범위 내에서 일정한 규격으로 나타났으며 배합비율에 따른 지표성분의 함량 또한 일정한 규격으로 확인되었다.

HT008 FD, SD, SF을 300 mg/kg 용량으로 경구투여한 후 acetic acid를 주사하고 신전반응을 측정된 결과 대조군은 38.9 ± 3.5 회인데 반해 HT008 FD, SD, SF군은 각각 26.5 ± 2.5 , 27.0 ± 1.4 , 25.0 ± 2.9 회로 나타나 3가지 제조방법 모두에서 대조군 대비 유의한 신전반응의 억제 효능이 나타났다. Acetic acid 동물모델은 복강 내 급성염증을 유발하는 모델로 초산이 유발한 염증이 통증유발인자의 유리를 일으켜서 복부의 수축반응 신전반응을 나타나게 하며, 이 신전반응 횟수를 억제하는 시료는 급성염증에서 prostaglandin 생합성을 억제하여 중추성 혹은 말초성 진통 효능을 갖는 것으로 알려져 있다^{21,22)}. 본 연구에서 3가지 HT008 추출물이 모두 acetic acid 모델에서 신전반응을 억제하였던 것은 HT008 FD, SD, SF가 모두 급성염증에서 prostaglandin 생합성을 억제하여 진통효능을 갖는다는 것을 의미한다. 또한 이는 HT008이 염증촉진인자 TNF- α , IL-6, PGE2를 억제하고 항염증인자 prostaglandin D2를 증가시킨다는 이전의 연구와 일관된 결과이다¹²⁾.

λ -carrageenan 동물모델은 골관절염에 따른 부종 억제 효능을 평가할 때 사용되는 대표적인 모델로 비스테로이드성 소염제의 효과를 평가하기 위하여 사용되어 왔다^{23,24)}. λ -carrageenan을 주입한 후 2.5시간 이내의 초기에는 주로 histamine, serotonin, bradykinin의 유리에 의해 급성염증이 초래되고 그 이후에는 prostaglandin이 유리되어 족경골을 중심으로 지속적인 부종을 수반하는 염증반응을 유발한다^{25,26)}. 본 실험에서 HT008 FD, SD, SF을 투여한 후 λ -carrageenan이 유발한 paw edema를 측정된 결과, 3군 모두에서 부종부피를 줄이는 효능이 나타났으며 특히 3군 모두에서 1.5시간째에 대조군 대비 유의한 부종감소 효능이 나타났다. 이는 HT008 FD, SD, SF가 급성염증반응을 억제하여 관절염에 수반되는 부종억제효능을 갖는다는 것을 의미하며 이 효능은 histamine, serotonin, bradykinin의 유리를 차단하여 작용하는 것으로 생각된다.

결론

한약건조추출물의 제조방법에 따른 성분함량과 효능을 비교하기 위하여 항염 효능이 알려진 HT008의 동결건조추출물 (HT008 FD), 당귀환류추출 후 분무건조추출물 (HT008 SD), 당귀초임계추출 후 분무건조추출물 (HT008 SF)을 제조하여 지표성분 함량을 정량하고 효능을 비교 실험한 결과 다음과 같았다.

1. 지표성분 eleutheroside E, baicalin, z-ligustilide을 정량한 결과, 분무건조시 휘발되는 z-ligustilide 함량이 HT008 SD와 HT008 SF에서 동결건조 대비 감소하지 않았으며 HT008 SD와 SF 간에 유의한 차이가 없었다. 이는 중국당귀의 별도 추출을 통해 휘발성 성분손실을 방지할 수 있으며 중국당귀의 환류추출과 초임계추출 간의 성분함량에 유의한 차이가 없음을 의미

한다.

2. HT008 FD, SD, SF을 투여한 후 acetic acid가 유발한 신전반응을 측정된 결과, 3군 모두에서 대조군 대비 유의한 신전반응 억제 효능이 나타났다. 이는 HT008 FD, SD, SF 모두 급성염증에서 진통효능을 갖는다는 것을 의미한다.
3. HT008 FD, SD, SF을 투여한 후 λ -carrageenan이 유발한 신전반응을 측정된 결과, 3군 모두에서 1.5시간째에 대조군 대비 유의한 부종감소 효능이 나타났다. 이는 HT008 FD, SD, SF가 급성염증반응을 억제하여 관절염에 수반되는 부종을 억제하는 효능을 갖는다는 것을 의미한다.

결론적으로 HT008 FD, SD, SF 모두 대조군 대비 유의하게 통증과 관절부종을 억제하였으며 지표성분 함량 기준에 적합하였다. 이를 통해 중국당귀는 환류추출과 초임계추출 간에 성분함량과 약리효능에 유의한 차이가 없다는 것을 알 수 있으며, 휘발성성분을 함유하는 한약재는 별도로 추출하여 배합하는 방법으로 분무건조 시 발생하는 성분손실을 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 2단계 두뇌한국21사업과 교육과학기술부 원천기술개발사업 바이오의료기술개발사업의 연구비지원 (2012M3A9C4048795)에 의해 수행되었음

Reference

1. Yim HJ, Jung IC. The effects of KagamSinKiHwan (KSKH) hot water extract & ultra-fine powder on proinflammatory cytokine of microglia & memory deficit of amnesia mice model. *J Ori Neuropsychiatr*. 2008 ; 19(3) : 85-100.
2. Arun S M. Handbook of Industrial Drying. CRC Press, Boca Raton, 2006 : 20-1.
3. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998 ; 45(3) : 221-9.
4. Mujumdar SA, Huang LX, Chen XD. An overview of the recent advances in spray-drying. *Dairy Sci Technol*. 2010 ; 90 : 211-24.
5. Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J Chromatogr A*. 2004 ; 1043(2) : 323-7.
6. Baritoux O, Richard H, Touche J, Derbesy M. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. *Flav Fragr J*. 1992 ; 7(5) :

- 267-71.
7. Kim NM, Kim DH, Quality change of cinnamon extract prepared with various drying methods. *Kor J Food Nutr.* 2000 ; 13(2) : 152-7.
 8. Choi SR, Jang I, Kim CS, You DH, Kim JY, Kim YG. Changes of components and quality in gastrodiae rhizoma by different dry methods. *Kor J Med Crop Sci.* 2011 ; 19(5) : 354-61.
 9. Kim MJ, Chu WM, Park EJ. Antioxidant and antigenotoxic effects of Shiitake mushrooms affected by different drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012 ; 41(8) : 1041-8.
 10. Li P, Li SP, Lao SC, Fu CM, Kan KK, Wang YT.. Optimization of pressurized liquid extraction for Z-ligustilide, Z-butylidenephthalide and ferulic acid in *Angelica sinensis*. *J Pharm Biomed Anal.* 2006 ; 40(5) : 1073-9.
 11. Xie JJ, Lu J, Qian ZM, Yu Y, Duan JA, Li SP. Optimization and comparison of five methods for extraction of coniferyl ferulate from *Angelica sinensis*. *Molecules.* 2009 ; 14(1) : 555-65.
 12. Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: elevation of prostaglandin D2 levels. *Arthritis Res Ther.* 2007 ; 9(4) : R64.
 13. Lim DW, Kim MY, Song M, Kim J, Lee D, Park J, Bu Y, Kim H. Effect of New Herbal Mixture, HT008 on Arthritis Rat Model. *Kor J herbology.* 2009 ; 24(4) : 197-204.
 14. Korea Food & Drug Administration. *Korean Pharmacopoeia*, 9th edition, 2007.
 15. Song MK, Kim MY, Kim H. Standardization of *Eleutherococcus* species and HPLC Method Validation for Quantitative Analysis. *Kor J Herbology.* 2011 ; 26(1) : 103-10.
 16. Kim KW, Jeong HJ, Chung GY, Sohn HJ, Oh SM, Kim SY, Nam SH, Park JH, Shim YE. Comparison on the Phthalides content of *Cnidil Rhizoma* and *Angelicae Radix* cultivated in Korea and China. *Korean J Plant Res.* 2001 ; 14(1) : 24-31.
 17. Yamazaki T, Matsumura T, Tsukiyama T, Tokiwa T. Anti-inflammatory effect of eleutheroside E from *Acanthopanax senticosus*. *Tiss Cult Res Comm.* 2006 ; 25(3) : 137-45.
 18. Chung JW, Choi RJ, Seo EK, Nam JW, Dong MS, Shin EM, Guo LY, Kim YS. Anti-inflammatory effects of (Z)-ligustilide through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B activation pathways. *Arch Pharm Res.* 2012 ; 35(4) : 723-32.
 19. Cherng CH, Lee KC, Chien CC, Chou KY, Cheng YC, Hsin ST, Lee SO, Shen CH, Tsai RY, Wong CS. Baicalin ameliorates neuropathic pain by suppressing HDAC1 expression in the spinal cord of spinal nerve ligation rats. *J Formos Med Assoc.* 2013 ; pii : S0929-6646 (13) 00134-4.
 20. Lu JL, Zhao J, Duan JA, Yan H, Tang YP, Zhang LB. Quality Evaluation of *Angelica sinensis* by Simultaneous Determination of Ten Compounds Using LC-PDA. *Chromatographia.* 2009 ; 70(3-4) : 455-65.
 21. Je HD. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Cinnamomum cassia* derived-cinnamaldehyde in rodents. *Yakhak Hoeji.* 2012 ; 56(4) : 236-9.
 22. Franzotti EM, Santos CV, Rodrigues HM, Mourão RH, Andrade MR, Antonioli AR. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (*Malva-branca*). *J Ethnopharmacol.* 2000 ; 72(1-2) : 273-7.
 23. Saito H, Nomura Y. Screening methods for drug evaluation 3. *Pharmaceutical Research and Development*. Tokyo, Hirokawa, 1989 : 22.
 24. Lee YS, Park JY, Lim HJ. Peripheral analgesic effects of NSAIDs and expressions of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in Acute arthritic model in rats. *Korean J Anesthesiol.* 2004 ; 47 : 862-9.
 25. Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 ; 369(3) : 294-9.
 26. Park EH, Hwang SE, Kahng JH. Anti-inflammatory activity of *Opuntia ficus-indica*. *Yakhak Hoeji.* 1998 ; 42(6) : 621-6.