

황련해독탕을 함유하는 정제 개발과 성분함량 및 약리효과 평가

이지범[#], 최혜민, 김종범, 김정옥, 문성옥, 이화동^{*}

한약진흥재단, 한약제제팀

Evaluation on Pharmacological Effects and Compound Contents of Hwangryunhaedok-tang formulation for Tablet

Ji-Beom Lee[#], Hye-Min Choi, Jong-Bum Kim, Jung-Ok Kim
Sung-Ok Moon, Hwa-Dong Lee^{*}

Korean Medicine Preparation Team
National Development Institute of Korean Medicine (NIKOM), Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Hwangryunhaedok-tang (HRHDT) is one of the well-known prescription herbal drugs of Korean herbal medicine, which has been widely used for the treatment of various bacterial and inflammatory diseases. This study was conducted in order to develop the tablet formulations of HRHDT and compare its efficacy with the other commercial formulations.

Methods : Corresponding herbal medicines comprising of HRHDT were extracted with water for 3 hr at 95~100°C and then vacuum dried. Subsequently, some pharmaceutical excipients such as microcrystalline cellulose, croscarmellose sodium, magnesium stearate, etc were used to prepare the HRHDT tablets. The contents with characterizing components of HRHDT tablet was compared with the HRHDT decoction. The contents of characterizing components were analyzed with HPLC. Furthermore, we investigated the anti-inflammatory and anti-oxidative abilities of two different commercial HRHDT granules (HJP-1 and HJP-2) and were compared with that of the formulated HRHDT tablets. The anti-oxidant properties of HRHDT were studied using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, contents of total flavonoid and polyphenol. In addition, based on this result the anti-inflammatory effects have verified by mechanism from LPS-treated Raw264.7 macrophages.

Results : The results demonstrated that HRHDT tablets showed more anti-inflammatory and anti-oxidative effects than HJP-1, HJP-2. Moreover, it showed more superior effects in terms of dose, usability and stability than the granules.

Conclusion : Hence, we concluded that in order to improve the quality and efficacy of the Korean herbal medicine, it is necessary to develop appropriate methods and establish standardized techniques for the development of good formulations.

Key words : Hwangryunhaedok-tang, Tablets, Formulation, Anti-oxidative, Anti-inflammatory

I. 서 론

한약은 수천 년에 걸쳐 한의학 치료에 사용되어 왔으며, 우리나라 국민 건강 유지에 기여하는 바가 매우 크다고 할 수

있다. 더욱이 동의보감의 유네스코 세계기록유산 등재 등 전통의학 지식분야에 있어 외국에 비해 상대적 우위를 점하고 있고, 국제경쟁력 확보가 가능한 분야임에도 불구하고 연구개발 기반이 취약하여 일본, 중국, 인도 및 미국 등에 비해 한약

*Corresponding author : Hwa-Dong Lee, Korean Medicine Preparation Team, NIKOM, Korea.
· Tel : +82-53-810-0332 · E-mail : herb@nikom.or.kr

#First author : Ji-Beom Lee, Korean Medicine Preparation Team, NIKOM, Korea.
· Tel : +82-53-810-0359 · E-mail : pirof@nikom.or.kr

· Received : 8 December 2017 · Revised : 4 February 2018 · Accepted : 15 March 2018

제제 등의 상품화, 실용화, 과학화가 미흡한 실정이다.

국내 한약제제 성장의 큰 걸림돌 중 하나는 전통의학인 한의학의 고유 특성으로 인한 비교 및 분석이 용이하지 않은 점이다. 또한 한의약산업에 있어 한방의료기관이 절반에 달하는 비중을 차지하고 있음에도 불구하고, 한약제제 소비는 매우 낮은 실정이며, 한의원 조제약은 전통적인 탕제, 환제 중심에서 탈피하지 못하고 있고, 한약제제 제약회사에서도 건강보험공단미혼합엑스산을 제조하고 있으나 복용상의 불편함 및 원료 한약재와 한약제제의 품질과 효능에 대한 불신이 한약제제 성장의 감소를 초래한다고 할 수 있다.

그리하여 액상 형태로 되어있어 체내 흡수가 용이한 전통적인 한약탕제가 가지는 장점에도 불구하고, 함량의 표준화가 어렵고, 오래 보관할 수 없으며, 맛과 향이 강하여 다양한 계층에 대한 복용순응도가 낮은 단점을 해결하고자 과립제, 정제 그리고 캡슐제 등의 여러 형태의 현대적인 제형으로 제형개발 연구를 하고자 한다.

본 연구에서 사용된 한약처방인 황련해독탕(黃連解毒湯)은 삼초의 열을 내리는 처방으로 실열화독(實熱火毒), 삼초열성증(三焦熱盛證)의 모든 증상에 처방되며¹⁾, 구성약재로 치자(梔子), 황금(黃芩), 황련(黃連), 황백(黃柏)으로 구성되어있다²⁾. 구성약재들의 약리효과 보고는 다음과 같다. 먼저 치자는 항산화³⁾, 멜라닌 생성저해⁴⁾ 등의 약리효과가 보고되었으며, 황금은 항산화⁵⁾, 항염증⁶⁾, 고혈압질환⁷⁾ 아토피⁸⁾ 등의 약리효과, 황련은 항산화⁹⁾, 항염증¹⁰⁾, 심혈관질환^{11,12)}, 항당뇨¹³⁾ 등의 약리효과가, 황백은 심혈관질환¹⁴⁾, 항비만¹⁵⁾, 항당뇨¹⁶⁾ 등의 약리효과가 알려져 있다. 황련해독탕 약리작용에 대한 연구로 아토피염^{17,18)}, 항염증^{19,20)}, 고혈압²¹⁾, 고지혈²²⁾, 소염작용²³⁾ 등의 개선효과에 대한 연구가 알려져 있으며, 특히 항염증에 대한 연구로 김 등¹⁹⁾은 LPS로 활성화된 대식세포에서 열수 추출된 황련해독탕이 염증매개물질인 Cox-2, TNF- α 그리고 NF- κ B 등의 활성을 억제하는 것을 보고하였다. 또한, 기 등¹⁸⁾의 황련해독탕 연구에서는 PMA와 A23187로 활성화된 RPMCs의 전 염증성 사이토카인과 히스타민 억제 뿐 만아니라 가려움 유발물질로 유도된 마우스의 가려움증 완화 및 DNFB로 유도된 아토피 피부염 유사 마우스 모델에서 아토피 피부염 증상 개선 효과에 대하여 보고하였으며, 최 등²⁰⁾의 연구에서는 LPS로 유도된 염증 마우스 모델에서 황련해독탕이 염증성 사이토카인인 IL-6와 IFN- γ 를 억제한다고 보고하였다.

또한, 시판 한약제제의 품질 불신과 관련하여 황련해독탕 시판제제와 전탕액에 대한 화학적 동등성 연구²⁴⁻²⁶⁾ 또는 약리 연구가 보고된 바 있으나, 현대적인 제형으로의 제형개선 연구는 전무한 실정이다. 이에 본 연구는 황련해독탕 전탕액을 이용하여 보관이 용이하고, 복용순응도가 높은 현대적인 제형인 정제로의 제형개발을 실시하였고, 전탕액과 개발된 황련해독탕 정제의 성분프로파일 분석을 통하여 동등성을 평가하였으며, 항산화, 항염증 활성평가를 통하여 개발된 황련해독탕 정제와 2종의 일본 시판제품간(HJP-1, HJP-2)의 약효 동등성을 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재

본 연구에 사용된 황련해독탕(HRHDT)의 구성 한약재인 치자(*Gardenia jasminoides* Ellis), 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi), 황련(*Coptis chinensis* Franchet) 및 황백(*Phellodendron amurense* Ruprecht) 은 (주)휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 각각 구입하여 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 한약진흥재단 한약제제팀의 한약재보관실에 보관하였다.

2) Cell line

실험에서 사용된 대식세포는 마우스의 대식세포인(mouse macrophage line) RAW 264.7 세포로서 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 첨가제 및 시약

정제 제조를 위한 첨가물인 Prosolv, Avicel 101, Ludipress, Croscamellose sodium, Aerosil® 200 및 Magnesium Stearate는 (주)화원약품 (seoul, Korea)에 구입하여 사용하였다. 성분프로파일 분석을 위해 5종의 표준물질인 baicalin은 식품의약품안전처 (Osong, Korea)로부터, baicalin, berberin, geniposide는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서, palmatine은 Avachem scientific(San Antonio, TX, USA)에서 각각 구입하였으며, 각 표준물질의 순도는 95.0% 이상이었다. 시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 methanol은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였고, formic acid는 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 약리 활성 평가를 위해 Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Penicillin-streptomycin, Phosphate buffered saline (PBS)는 Hyclone (USA)제품, lipopolysaccharide (LPS), Griess reagent, Ethanol, Chloroform, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma (USA) 제품, MTS 시약 및 Agarose는 Promega (USA) 제품, TNF- α , IL-6 Enzyme Linked Immunosorbent (ELISA) assay kit를 R&D System (USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) HRHDT 전탕액 및 단미엑스산 제조

(1) HRHDT 전탕액 제조

HRHDT 전탕액은 Table 1과 같이 구성약재를 중량별로 칭량한 뒤 혼합하여 약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100℃에서 3시간 동안 추출하였다(Hanmoru, Korea). 추출액은 filter paper (Advantec No.4, Japan)로 감압·여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan)를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 진공건조기(Hanmoru, Korea)를 이용하여 건조한 뒤 건조엑스를 얻었다. 진공건조 건조엑스의 수율은 16.5%였다.

Table 1. Composition of Hwangryunhaedok-tang

Name	Amount(g)	Source
Gardenia Fruit	1.56	Guangxi, China
Scatellaria Roof	1.56	Heilongjiang, China
Phelodendron Batk	1.56	Jecheon, Chungbuk
Coptis Rhuzome	1.56	Northeast, China
Total amount	6.24	

(2) HRHDT 단미엑스산 제조

HRHDT 단미엑스산은 구성약재인 치자, 황금, 황련 및 황백을 각각 칭량한 후, 약재별 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고, 100℃에서 3시간 동안 개별 추출하였다(Hanmoru, Korea). 추출액은 filter paper (Advantec No.4, Japan)로 감압·여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 진공건조기(Hanmoru, Korea)로 진공건조 하여 단미엑스산을 얻었다. 건조된 각각의 단미엑스는 대한민국약전의한약(생약)규격집(KHP) 기준에 따라 혼합하여 사용하였다.

2) HRHDT 정제의 제조 및 물성평가

(1) HRHDT 정제 혼합물 배합 및 물성평가

HRHDT 정제의 제조에 앞서 Table 2의 배합비율대로 HRHDT 단미엑스와 각각의 첨가제들을 혼합하여 HRHDT F1, F2 및 F3를 제조하였다. HRHDT의 단미엑스는 40 mesh sieve로 체과하여 입도를 균일화 시켰으며, 여기에 부형제로서 미결정셀룰로오스와 이산화규소가 혼합된 Prosolve, 미결정셀룰로오스인 Avicel101 및 Ludipress를, 봉해제로서 Croscarmellose sodium을, 유동성 개선 부형제로 Aerosil® 200를 각각 칭량한 후 플라스틱 백에서 10분간 균일하게 혼합하였다. 이후에 활택제로서 Magnesium Stearate를 추가하여 5분간 균일하게 혼합하여 혼합물을 제조하였다. 혼합물의 물성평가를 위해 겉보기 밀도 (Bulk density)와 탭 밀도 (Tap density)를 측정하였다. 겉보기 밀도는 혼합물을 메스실린더에 넣어 부피를 측정하였고, 탭 밀도는 혼합물이 들어있는 메스실린더를 200회 tapping 한 후 측정하여 아래의 수식에 의해 값을 구하였다.

$$\text{Bulk density } (\rho_{\text{bulk}}) = \frac{\text{Mass of sample } (M)}{\text{Untapped volume } (V_0)}$$

$$\text{Tapped density } (\rho_{\text{tapped}}) = \frac{\text{Sample weight } (M)}{\text{Final tapped volume } (V_f)}$$

겉보기밀도와 탭밀도의 측정값은 다음의 수식을 사용하여 Hausner ration 값을 구하여 흐름성을 평가하였다²⁷⁾.

$$\text{Hausner ratio} = \frac{\rho_{\text{tapped}}}{\rho_{\text{bulk}}}$$

Table 2. Pre-formulation of Hwangryunhaedok-tang tablets

Ingredients	F1		F2		F3	
	Ratio (%)	Weigh(mg)	Ratio (%)	Weigh(mg)	Ratio (%)	Weigh(mg)
HWHDT powder	80.0	584.0	80.0	584.0	80.0	584.0
Prosolve	12.0	87.6	-	-	-	-
Ludipress	-	-	13.0	94.9	5.0	36.5
Avicel 101	-	-	-	-	10.0	73.0
Croscarmellose Sodium	4.0	29.2	3.0	21.9	3.0	21.9
Aerosil® 200	2.0	14.6	2.0	14.6	1.0	7.3
Magnesium stearate	2.0	14.6	2.0	14.6	1.0	7.3
	100.0	730.0	100.0	730.0	100.0	730.0

(2) HRHDT 정제 제조 및 물성평가

Table 2 구성 비율에 따라 혼합된 각각의 HRHDT 혼합물은 직접타정법을 통해 타정하였다. 혼합물은 단발타정기 (TRB 16, Erweka, Heusenstamm, Germany)를 사용하여 추가적인 다른 과정 없이 바로 타정하였고, 데시케이터에 보관 후 본 실험에 사용하였다. HRHDT 정제의 무게, 지름, 두께 및 경도는 hardness tester (TBH 325, Erweka, Heusenstamm, Germany)로 측정되었으며, 이때 모든 물성평가는 3회 측정값의 평균으로 계산되었다. 봉해도 시험은 disintegration tester (Disintegration 3100, DISTEK, NJ, USA)를 사용하여 37 ± 0.5 °C의 정제수에서 시험하였다. 봉해시간은 검체의 잔여물이 유리관 안에 존재하지 않거나 남아있더라도 원형을 나타내지 않는 연질의 물질이 존재할 때까지의 시간으로 하였다. 정제의 마손도는 10개의 정제를 friability tester (TAR 120, Erweka, Heusenstamm, Germany)에서 25 rpm으로 4분 동안 회전시킨 후, 손실된 무게를 측정하여 다음의 수식으로 계산하였다.

$$\% \text{ Friability} = \frac{\text{Initial weight of tablets} - \text{Final weight of tablets}}{\text{Initial weight of tablets}} \times 100$$

3) HRHDT 전탕액과 정제의 동등성 분석

(1) 표준용액 및 검액의 조제

표준용액의 제조를 위해 5종의 표준물질은 각각의 무게를 정확히 칭량하여 methanol에 녹여, 모두 1.0 mg/ml의 농도로 조제한 후 4℃에 보관하였다. HPLC 분석을 위하여 HRHDT 전탕액 시료 및 HRHDT 정제를 5.28 mg/ml로 정확히 조제한 후 0.2 μm membrane filter 여과 후 검액으로 사용하였다.

(2) HPLC 분석조건

HRHDT 주요성분인 geniposide, baicalin, baicalein, palmatine 및 berberine의 분리를 위하여 YMC C18 (5μm, 4.6×250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼 온도는 35℃로 유지하였다. 이동상은 1.0 ml/min으로 흘러주었으며 시료 주입량은 10 μl이었다. 이동상은 (A) 0.1% formic acid가 함유된 H₂O와 (B) 0.1% formica acid가 함유된 acetonitrile를 사용하였고, Table 3과 같이 흘러주었다. 검출파장은 254 nm에서 확인하였다.

Table 3. Gradient elution condition of mobile phase

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	85	15
15	78	22
30	78	22
50	75	25
70	30	70
71	2	98
75	2	98
77	85	15
90	85	15

(A) H₂O with 0.1% formic acid,

(B) acetonitrile with 0.1% formic acid

4) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264,7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포 배양을 위해 항생제 및 항균제인 1% Penicillin-streptomycin, 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 배양액으로 하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

5) 세포독성평가

RAW 264.7 세포에 대한 독성정도를 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay를 수행하였다. 먼저, RAW 264.7 세포 (5×10³ cell/96well)에 각각의 HRHDT 제제를 200 및 500 µg/ml 농도별로 처리하여 24시간 배양 후, 20 µl의 MTS 시약을 첨가한 다음 1시간 동안 반응하고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 시료를 처리하지 않은 대조군과 약물 처리군의 비율로 계산하였다.

$$\text{Cell viability(\%)} = 100 \times \frac{\text{treated sample}}{\text{Non - treated sample(CON)}}$$

6) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

HRHDT 제제들의 염증억제효과를 확인하기 위해 세포배양액 내 Nitric oxide (NO)의 양을 측정하였다. RAW264.7 세포 (5×10⁴ cell/12well)에 각각의 HRHDT 제제를 200, 500 µg/ml로 2시간 동안 전처리 하였다. 이후 LPS (1 µg/ml)를 처리한 후, 24시간 배양하고 Griess assay 방법으로 NO의 농도를 측정하였다(28). 즉, 세포배양액 100 µl에 동량의 Griess reagent (Sigma, USA)를 넣고 교반기에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Tecan Infinite M200, Unterschbergstrasse, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite의 standard curve와 비교하여 계산하였다.

7) 효소 결합면역측정법 (ELISA)에 따른 사이토카인 측정

먼저 RAW 264,7 세포 (5×10⁴ cell/12well)에 각각의

HRHDT 제제를 200 및 500 µg/ml로 2시간 동안 전처리를 하였다. 이후 LPS (1 µg/ml)를 처리하여 24시간 배양한 후 세포배양액으로부터 TNF-α와 IL-6의 농도를 ELISA kit (R&D System, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 사이토카인의 농도는 TNF-α와 IL-6의 standard curve와 비교하여 계산하였다.

8) DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거활성은 Shahidi DPPH 방법²⁶⁾을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 100, 500 및 1000 µg/ml에 0.01 mM의 DPPH 용액을 가하여 25℃에서 30분간 반응시킨 후, 516 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 계산식으로 산출하였다. DPPH radical 소거활성은 시료용액의 무첨가군에 대한 시료첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었으며, 대조군으로는 Butylated hydroxyanisole (BHA) 0.1 mg/ml 를 사용하여 비교하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{treated}}{\text{non-treated}}\right) \times 100$$

9) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 하였다²⁸⁾. 총 폴리페놀 함량은 표준물질로 gallic acid (Sigma, USA)를 이용하여 검량선을 작성하여 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 Singleton VL 등²⁹⁾의 방법을 일부 변경하여 측정하였다. 표준물질로 quercetin (Sigma, USA)를 이용하여 총 플라보노이드 함량 검량선을 작성하였다.

3. 통계분석

모든 실험결과는 mean ± SEM (n=3)로 나타내었으며, 유의성 검사는 SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 one way ANOVA test를 실시한 후 Tukey test로 사후 검증하였다. p < 0.05 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. HRHDT 정제 제조

1) HRHDT 혼합물의 물성평가

Table 2의 배합비율로 혼합한 HRHDT 혼합물 F1, F2 및 F3의 기초 물성을 측정된 값은 Table 4에 나타내었다. 각 HRHDT 혼합물의 흐름성은 겔보기 밀도, 탭 밀도를 측정하여 Hausner ratio에 의해 평가되었다. Hausner ratio는 Excellent (1.00~1.11), Good (1.12~1.18), Fair (1.19~1.25), Passable (1.26~1.34), poor (1.35~1.45), very poor (1.46~1.59) 및 very very poor (>1.60)의 총 7개의 등급으로 나누어 흐

를성을 평가하였다. HRHDT F1, F2 그리고 F3 혼합물의 Hausner ration 값은 각각 1.16, 1.12 그리고 1.08로써 HRHDT F3의 흐름성이 Excellent로 가장 좋았음을 확인하였고, F1, F2 그리고 F3 모두 타정하기에 적합한 흐름성을 보유하고 있었다.

Table 4. Flow characteristics of Hwangryunhaedok-tang tablets

Parameters	F1	F2	F3
Bulk Density	0.745 g/cm ³	0.695 g/cm ³	0.725 g/cm ³
Tapped Density	0.865 g/cm ³	0.779 g/cm ³	0.783 g/cm ³
Hausner ratio	1.16	1.12	1.08
Flow character	Good	Good	Excellent

2) HRHDT 정제의 물성평가

HRHDT 정제 F1, F2 그리고 F3을 타정하여 각 정제의 물성을 평가한 값을 Table 5에 나타내었다. HRHDT F1의 경우 흐름성은 좋았으나, 실제 타정한 결과 정제의 경도가 매우 낮아 마손도와 봉해도시험의 진행에 부적합 하였다. HRHDT F2와 F3은 각각 4 및 7 KP의 경도를 나타내었고, 마손도 측정결과 각각 0.5 및 0.2%의 우수한 결과를 보여주었다. 하지만, 봉해도 시험 결과 HRHDT F2는 완전히 봉해되기까지 30분 이상의 시간이 소요되어 대한민국약전 일반시험법내 나정의 봉해도 기준에 부적합 하였고, F3의 경우 30분 이내에 봉해되어 기준 적합함을 확인하였다. 이후 실험에서 HRHDT F3를 시제품으로 제조하여 사용하였다.

Table 5. Post-compression parameters of the Hwangryunhaedok-tang tablets

Parameters	F1	F2	F3
Weight variation (mg)	725±11.6	733±10.2	731±9.4
Diameter (mm)	18.08±0.03	18.16±0.03	18.10±0.01
Thickness (mm)	5.70±0.01	5.61±0.14	5.74±0.02
Hardness (KP)	F	4	7
Friability (%)	F	0.5±0.1	0.2±0.05
Disintegration (min)	F	39	29

2. HRHDT 정제의 성분 분석

1) 분석조건 확립

HRHDT 전탕액 및 정제의 성분분석을 위해 HRHDT 구성 약재의 주요성분으로 7개의 성분을 분리하여 선정하였다. 7개의 주요 peak는 치자의 geniposide, 황련 유래의 Peak A, 황련·황백의 palmatine, berberine 및 황금의 baicalin, baicalein 그리고 황금 유래의 Peak B이며, 이들의 동시분석을 위해 이동상은 water와 acetonitrile을 시간대별로 구성 비율을 달리하였다. PDA 검출기 파장 254 nm에서 geniposide, Peak A, baicalin, palmatine, berberine, Peak B 및 baicalein 순으로 각각 검출되었으며, 다른 성분들의 피크에 간섭 없이 분리됨을 확인하였다. 검액은 설정된 동시분석 조건에서 분석을 실시하였으며, 검액에서의 피크는 주요성분 피크의 retention time과 UV 스펙트럼이 일치함을 확인한 후 각 성분에 대한 peak area를 분석하였다 (Fig. 1).

2) 동등성 분석

HRHDT 전탕액과 HRHDT F3를 설정된 HPLC-PDA를 이용하여 동시분석을 실시하고 7종 성분에 대한 peak area를 분석하여 Table 6에 나타내었다. Peak area를 바탕으로 동등상관계수를 분석한 결과 HRHDT 전탕액과 HRHDT F3에서 geniposide, Peak A, baicalin, palmatine, berberine, Peak B 및 baicalein 7종 성분이 각각 다음과 같이 나타났으며, 동등상관계수 0.9722로 전탕액과 HRHDT F3이 97% 이상 동일함을 확인하였다.

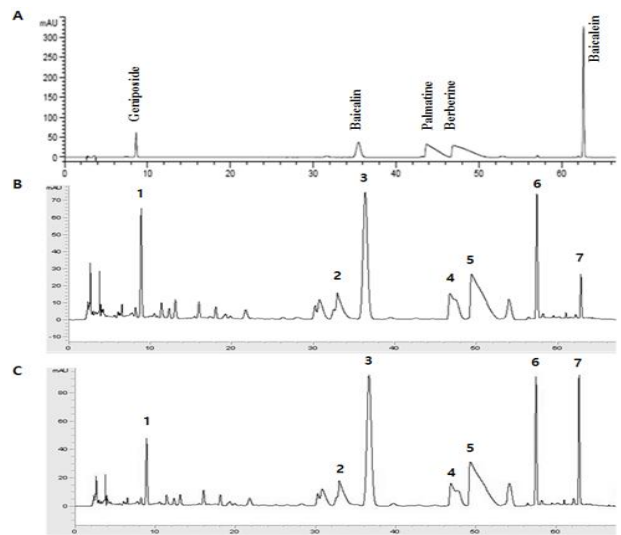


Fig. 1. HPLC chromatogram of a standard mixture A, Hwangryunhaedok-tang decoction B, and HRHDT F3 C. Geniposide (1), Peak A (2), Bicalin (3), Palmatine (4), Berberine (5), Peak B (6), and Baicalein (7).

Table 6. Analytical Results of the 7 Compounds in Hwangryunhaedok-tang

Peak	Decoctions	Decoctions			HRHDT F3			
		Mean	STDV	RSD	Mean	STDV	RSD	
1	Geniposide	720.990	1.428	0.198	530.186	5.052	0.953	
2	Peak A	846.076	27.944	3.303	943.750	5.496	0.582	
3	Baicalin	2780.105	7.056	0.254	3464.381	29.571	0.854	
4	Palmatine	983.238	3.853	0.392	1033.573	15.582	1.508	
5	Berberine	2592.204	7.617	0.294	3260.920	25.144	0.771	
6	Peak B	878.971	1.639	0.186	1076.226	7.039	0.654	
7	Baicalein	254.010	1.071	0.421	876.091	8.316	0.949	
Correlation coefficient		0.9722						

3. HRHDT 정제의 약리활성 비교분석

1) 세포독성

HRHDT F3과 2종의 일본 시판제품 HJP-1, HJP-2의 대식세포 (Raw 264.7) cell line에 대한 세포독성을 알아보기 위해 MTS assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. HRHDT F3, HJP-1 및 HJP-2을 200 및 500 µg/ml의 농도로 처리하여 세포의 생존율을 측정한 결과, 세 그룹 모두 200 및 500 µg/ml의 농도에서 모두 95% 이상의 생존율을 보여주었다 (Fig. 2). 따라서 이후 실험에서는 이 결과를 바탕

으로 세포생존에 영향을 주지 않는 범위 내에서 모든 실험을 수행하였다.

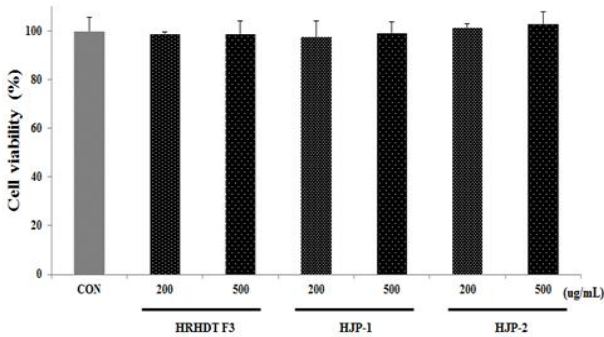


Fig. 2. Effects of Hwangryunhaedok-tang products on cell viability in RAW 264.7 cell. Cell viability was determined using MTS assay. Each value represents the mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis was performed using the *t*-test. $p < 0.05$.

2) Nitric oxide (NO) 생성 억제에 대한 효과

Nitric oxide (NO)는 염증반응을 조절할 수 있는 인자 중 하나로 생체 내 고농도의 NO 생성은 체내 세포파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직상해 등을 초래할 수 있다³¹⁾. LPS는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 독소로 RAW 264.7 cell과 같은 대식세포에 작용하여 여러 종류의 염증 cytokine의 유발과 함께 NO의 생성을 촉진시킨다³⁰⁾. 따라서 HRHDT 제품들의 NO 생성 저해 실험은 LAW 264.7 cell에 LPS를 처리하여 실험하였다. HRHDT F3과 2종의 일본 시판제품 HJP-1, HJP-2의 항염증 효과를 확인하기 위해 LAW 264.7 cell에 각각 200, 500 µg/ml 농도로 2시간 전 처리한 후, LPS를 24시간 처리하여 세포로부터 생성되는 NO 생성량을 Griess assay방법으로 측정하였다 (Fig. 3). 그 결과 세 그룹 모두 200 µg/ml에서 LPS 단독 처리그룹과 그 차이를 보이지 않았으나, 500 µg/ml에서 약 80%이상 NO 생성량이 감소됨을 확인하였다. 또한 500 µg/ml에서 NO 생성량 감소에 대한 세 그룹간의 유의적인 차이도 보이지 않았다.

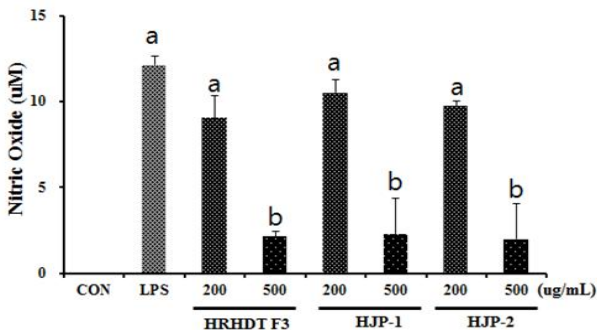


Fig. 3. Effects of Hwangryunhaedok-tang products on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Raw 264.7 cells were pre-treated with or without different concentrations of HRHDT F3, HJP-1 and HJP-2 for 2 hr, and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 24 hr. The NO concentration in the medium were determined by griess assay. Each value represents the mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $p < 0.05$. Statistically significant differences were observed between a, b and c.

3) TNF-α 및 IL-6 Protein 발현 억제에 대한 효과

대식세포는 여러 가지 외부 스트레스에 의해 숙주의 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시 TNF-α 및 IL-6 등의 전염증 cytokine으로 생산하여 감염초기 생체 방에 중요한 역할을 한다. 특히 TNF-α는 대식세포 또는 단핵세포에서 분화와 성장, IL-6는 면역반응에 중요 작용한다³³⁻³⁷⁾. 본 연구에서 LPS를 RAW 264.7 cell에 처리하여 TNF-α 및 IL-6의 생성을 유도함을 확인하였고, HRHDT F3와 2종의 일본 시판제품인 HJP-1, HJP-2를 농도 200, 500 µg/ml 처리시 TNF-α의 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 보았다 (Fig. 4). 마찬가지로 IL-6의 생성 역시 세 그룹 모두 200, 500 µg/ml에서 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하였다 (Fig. 5).

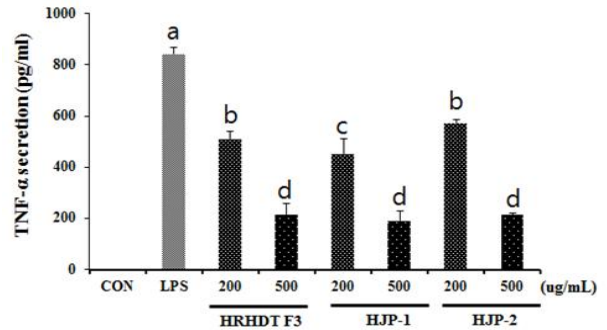


Fig. 4. Effects of Hwangryunhaedok-tang products on LPS-induced TNF-α production in RAW 264.7 cells. Raw 264.7 cells were pre-treated different concentrations of HRHDT F3, HJP-1 and HJP-2 for 2 hr, and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 24 hr. The TNF-α concentration in the medium were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each value represents the mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $p < 0.05$. Statistically significant differences were observed between a, b and c.

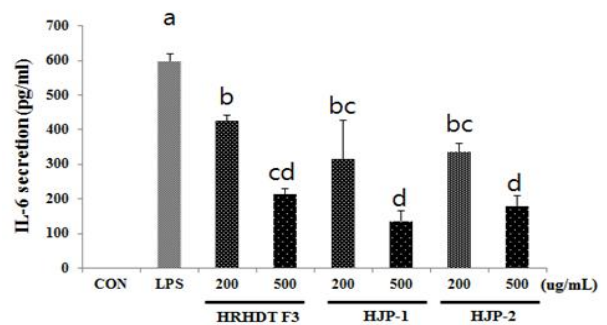


Fig. 5. Effects of Hwangryunhaedok-tang products on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells. Raw 264.7 cells were pre-treated different concentrations of HRHDT F3, HJP-1 and HJP-2 for 2 hr, and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 24 hr. The IL-6 concentration in the medium were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each value represents the mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $p < 0.05$. Statistically significant differences were observed between a, b and c.

4) DPPH radical 소거활성 측정

HRHDT F3와 2종의 일본 시판제품 HJP-1과 HJP-2의

항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH radical 소거활성을 확인하였다 (Fig. 6). HRHDT F3은 100, 500 및 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 18, 30 및 47%로 농도 의존적인 항산화 효능을 확인하였다. 또한 HJP-1, HJP-2 역시 100, 500 및 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 HJP-1은 18, 31 및 41%, HJP-2는 16, 36 및 51%로 농도 의존적으로 효과를 보였다. 더욱이 세 그룹 모두 농도 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 강력한 항산화제로 알려진 BHA보다 높은 효과를 보임을 확인하였다. 그리고 100, 500 및 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 HRHDT F3, HJP-1 및 HJP-2간의 통계적으로 유의적인 DPPH radical 소거활성의 차이는 확인되지 않았다.

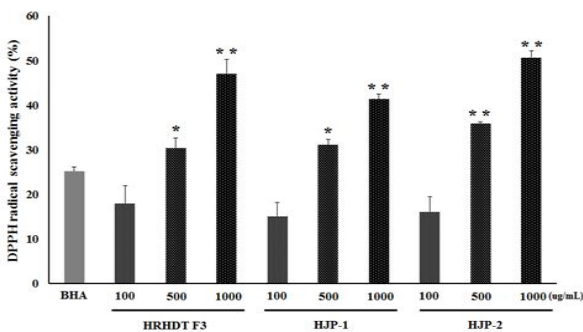


Fig. 6. Effects of DPPH radical scavenging activity on the three kinds of Hwangryunhaedok-tang products. DPPH (1 mL, 0.135 mM) has prepared in mixed methanol with 1.0 mL of aqueous extract ranging from 100, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Each value represents the mean \pm SEM (n=3). Statistical analysis was performed using the *t*-test, $p < 0.05$. * represents $P < 0.05$ compared to the BHA.

5) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

HRHDT F3와 2종의 일본 시판제품 HJP-1과 HJP-2의 항산화물질의 함량을 확인하기 위하여 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려진 폴리페놀 화합물과 플라보노이드의 함량을 측정된 결과 Table 7과 같다. HRHDT F3, HJP-1 및 HJP-2의 플라보노이드 함량은 각각 21.92, 20.30 및 24.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 세 그룹간의 차이를 보이지 않으나, 폴리페놀 함량은 HJP-2가 31.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았으며, HJP-1이 19.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 가장 낮음을 확인하였다.

Table 7. Total polyphenol and total flavonoids contents on the three kinds of Hwangryunhaedok-tang products.

Decoction	Total polyphenols ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Total flavonoids ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
HRHDT F3	24.65 \pm 0.32	21.92 \pm 1.09
HJP-1	19.41 \pm 0.39	20.30 \pm 0.51
HJP-2	31.20 \pm 0.02	24.23 \pm 0.24

Each value represents the mean \pm SEM (n=3).

IV. 고찰

황련해독탕은 삼초의 열을 내리는 처방으로 실열화독, 삼초 열성증의 모든 증상을 치료하는 대표적인 처방으로 아토피염^{15,16}, 항염증^{17,18}, 고혈압¹⁹, 고지혈²⁰ 등의 개선효과에 대한

약리연구와 황련해독탕 시판제제와 전탕액에 대한 화학적 동등성 연구²⁴⁻²⁶가 보고되었다. 시중 유통되고 있는 황련해독탕 한약제제는 처방에 따라 구성약제를 배합하여 추출한 전탕액과, 이 전탕액을 가공하여 제형화한 산제 또는 과립제가 대부분이다. 일반적으로 전탕액은 특유의 향과 쓴맛으로 인해 젊은 소비자층에게 기피되거나 전체 복용순용도가 떨어지며, 보관과 휴대가 용이하지 못하다는 단점이 있다. 더욱이 전탕액을 제형화한 산제 또는 과립제에 함유된 부형제 양이 전체 중량의 40 ~ 60%를 차지하고 있어 불필요한 1회 복용량을 높이고 있고, 가루형태의 제제특성 때문에 복용 편리성이 떨어져 소비자들에게 기피되어 지고 있다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 부형제 함량을 줄여 1회 복용량을 낮추고, 소비자들이 선호하는 현대적인 제형인 정제로의 제형화 연구를 수행하여, 전탕액과의 동등성 확보를 위한 성분분석과 시판되고 있는 2종의 일본제품과의 약효 동등성을 확인하기 위한 항산화, 항염증 실험을 실시하였다.

황련해독탕은 대한민국약전외한약(생약)규격집 의약품각조 3부에 수록된 황련해독탕 혼합단미엑스산의 구성약제 비율로 제조하여 각 구성 단미엑스산 기준에 따라 건조엑스를 혼합하여 사용하였다. 일반적으로 시중 판매되고 있는 한약제제의 부형제로 유당과 전분이 많이 사용되어 왔으며, 40 ~ 60%로 높은 함유량을 보이고 있다. 이에 부형제의 함유량을 20% 이하로 낮추고, 쉽게 흡윤되는 한약재 건조엑스의 특성을 고려하여, 부형제로 미결정셀룰로오스 계열과 유당이 함유된 Ludipress 그리고 결합제로 PVP-K30 등을 이용하여 황련해독탕 정제를 제조하였다. 타정에 앞서 배합된 황련해독탕 F1, F2 및 F3 혼합물의 겔보기 밀도 및 탭 밀도를 바탕으로 한 Hausner ratio에 의해 흐름성을 판정하고, 단발 타정기로 타정한 뒤, 경도, 마손도 및 붕해도 등을 실험하여 황련해독탕 정제의 물성을 평가하였다. 황련해독탕 F1, F2 그리고 F3 혼합물의 흐름성은 타정하기 적합하였으며, 특히 F3의 흐름성이 1.08 (Excellent)로 가장 좋았다. 정제의 물성평가에 있어서 F1은 결합력이 떨어져 경도를 측정할 수 없었고, F2 및 F3은 경우 각각 4와 7 KP의 경도를 나타내어 두 정제에 대한 붕해도를 측정하였다. 그 결과 F2은 39분, F3은 29분으로 대한민국약전내 붕해도시험 중 나정의 붕해기준에 적합한 F3를 최종 배합비율로 선택하여 시제품을 제조하였다.

황련해독탕 정제(HRHDT F3)와 전탕액간의 동등성 확보를 위해 구성약제의 주요성분인 geniposide, Peak A, baicalin, palmatine, berberine, Peak B 및 baicalein에 대하여 동시 분석을 실시하였다. 그 결과 전탕액과 황련해독탕 정제(HRHDT F3) 모두 7종의 성분이 검출 되었으며, 동등상관계수가 0.9722로 전탕액과 황련해독탕 정제(HRHDT F3)가 97% 이상 동등함을 확인하였다.

본 연구에서는 앞의 성분분석과 더불어 황련해독탕 정제(HRHDT F3)와 2종의 일본 시판제품인 HJP-1과 HJP-2의 항산화 및 항염증 효능실험을 통해 약효동등성을 확인하였다. 황련해독탕 정제(HRHDT F3)와 HJP-1 및 HJP-2의 항산화 활성을 비교하기 위하여 DPPH radical 소거활성과 항산화 물질인 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 그 결과

DPPH radical 소거활성은 황련해독탕 정제(HRHDT F3)와 HJP-1 및 HJP-2 모두 농도 의존적으로 항산화 효과가 높아짐을 확인하였고, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량에 있어 HJP-1 > HRHDT F3 > HJP-2 순으로 높게 측정되었다. 항염증 효능실험은 대표적인 면역세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증매개물질인 Nitric oxide (NO)의 생성과 염증관련 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 발현정도를 측정하여 평가하였다. NO는 염증반응을 조절할 수 있는 인자 중 하나로 생체 내 고농도 생성시 체내 세포파괴, shock에 의한 혈관확장 및 염증유발에 의한 조직상해 등을 초래할 수 있다³¹⁾. LPS는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 독소로 RAW 264.7 cell과 같은 대식세포에 작용하여 여러 종류의 염증 cytokine의 유발과 함께 NO의 생성을 촉진시킨다³⁰⁾. 김 등¹⁹⁾의 연구결과에 따르면 황련해독탕은 대식세포에서 LPS로 인한 NO와 TNF- α 생성을 억제한다고 보고하였고, 기 등¹⁸⁾의 연구결과에서는 LPS 유도된 염증 마우스 모델에서 염증성 cytokine인 IL-6와 IFN- γ 의 발현을 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서 역시 황련해독탕 정제(HRHDT F3)와 2종의 일본 시판제제 HJP-1과 HJP-2의 NO 생성 억제능은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 80% 이상의 억제를 보였으며, 세 그룹에 대한 유의적인 차이는 나타나지 않았다. TNF- α 와 IL-6의 합성과 분비에 있어 황련해독탕 정제(HRHDT F3)와 HJP-1 및 HP-2의 비교실험 결과 TNF- α 와 IL-6의 합성과 분비를 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하였고, IL-6의 발현 억제에 있어 HJP-1이 가장 좋음을 확인하였다.

이상의 결과로부터 황련해독탕(HRHDT)을 기존 시판제제들보다 부형제의 함유량을 감소시켜 1회 복용량을 줄이고, 복용 편의성이 높은 현대적인 제형인 정제로 제형을 개발 하였다. 더욱이 황련해독탕(HRHDT) 정제와 전탕액간의 성분분석과 2종의 일본 시판제제인 HJP-1와 HJP-2와의 항산화, 항염증 실험을 통하여 구성약제의 동등성과 약효에 대한 동등성을 확보 하였다. 이는 황련해독탕 정제가 전탕액과 동일한 성분임을 나타내며, 2종의 일본 시판제제와의 약효 비교에 있어 차이가 없음을 말한다. 따라서 본 연구의 결과물이 향후, 한약제제 전탕액의 제형개선 연구에 도움이 될 것이라 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 황련해독탕(HRHDT)을 현대적 제형인 정제로 제형 개발하였고, 전탕액과 정제간의 성분분석을 통하여 화학적 동등성과 시판제제 2종(HJP1 및 HJP-2)과의 항산화 및 항염증 효능 비교실험을 통한 약리활성에 대하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황련해독탕(HRHDT)을 기존 40~60%의 부형제 함유량에서 20%로 줄여 1회 복용량을 최소화 하고, 복용순도와 휴대성을 높인 정제로 개발하였다.
2. 개발된 황련해독탕 정제(HRHDT F3)는 전탕액과의 화

학적 동등성 평가를 위해 7종의 성분에 대하여 비교분석한 결과 동등상관계수 0.9722로서 동등성이 97% 이상임을 확인하였다.

3. 황련해독탕 정제(HRHDT F3)와 2종의 일본 시판제제 HJP-1와 HJP-2간의 항산화 및 항염증에 대한 약리 효능 비교시험 결과 서로 간에 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

따라서 황련해독탕(HRHDT) 전탕액과 화학적으로 동등하며, 우수한 일본 제품들과의 품질의 차이가 없는 황련해독탕 정제(HRHDT F3)를 개발하였으며, 향후 이를 바탕으로 다양한 처방에 대하여 정제와 캡슐제 같은 현대적인 제형개발로 한약제제 제품에 대한 우수성 및 품질향상을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Tang, S.L, Tang, M. The clinical research of huanglianjiadu-tang. Practical Clinical J Integrated Traditional Chinese and Western Med. 2010;10:90-92.
2. 葛洪. 肘後備急方. 人民衛生出版社. 上海. 34-37, 1996.
3. Han YN, Oh HK, Hwang KH, Lee MS. Antioxidant components of gardenia fruit. Journal of life science. 1994;25(3):226-232.
4. Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Park CW, Han YH. Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. Korean journal of biotechnology and bioengineering. 2004;19(6):437-440.
5. Lee MJ, Oh JS, Park JW, Kim JK, Choi DY, Kim CH. Antioxidant activity of extract from scutellaria baicalensis georgi. Journal of life science. 2000; 10(3):236-240.
6. Park HJ, Kim SM, Kwon HJ, Lee HT, Kim BW, Kim TH, Kim MM. Anti-inflammatory effect of scutellaria baicalensis hot water extracts containing baicalin on modulation of the immune system in raw264.7 cells. Journal of Life Science. 2014;24(3):219-226.
7. Yun JS, Chung BH, Kim NY, Seong NS, Kee HY, Lee JH, Kim JD. Screening of 94 plant species showing ACE inhibitory activity. Korean journal of medicinal crop science. 2003;11(3):246-251.
8. Yun H. Scutellaria baicalensis extract inhibit development of atopic dermatitis in NC/Nga mouse. Ms degree. Daegu University, Gyeongbuk. 2005.
9. Kim YJ, Lee MJ, Park JW, Kim JK, Choi DY, Kim CH. Antioxidant activity of water-extract from coptis chinensis Franch. Journal of life science. 2000;10(3):241-246.
10. Yoon KR, Kim YJ, Lee E, Lee JM. Anti inflammatory

- effect of coptidis rhizoma yoon. *Kor. J. Herbology*. 2009;24(3) : 79-86.
11. Lau C, Yao X, Chen Z, Ko W, Huang Y. Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovasc. Drug Rev.* 2001; 19(3):234-44.
 12. Liang K, Ting C, Yin S, Chen Y, Lin S, Liao J. Berberine suppresses MEK/ERK-dependent Egr-1 signaling pathway and inhibits vascular smooth muscle cell regrowth after in vitro mechanical injury. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(6): 806-17.
 13. Hui H, Tang G, Go V. Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. *Chin Med.* 2009;4:11.
 14. Kim EC, Kim SH, Bae K, Kim HS, Gelinsky M, Kim TJ. The anti-angiogenic potential of a phellodendron amurense hot water extract in vitro and ex vivo. *Journal of life science.* 2015;25(6):693-702.
 15. Ahn KH, Lee SC, Kweon MS, Oh SO, Kim WK, Sohn MS, Ahn CB, Jong S. Adipocyte differentiation inhibitor isolated from the barks of phellodendron amurense. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2003;35(3) :503-509.
 16. Kim SH, Shin EJ, Hyun CK. Enhancing effect of extracts of phellodendri cortex on glucose uptake in normal and insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Kor. J. Pharmacogn.* 2005;36(4):291-298.
 17. Ko MJ, Baek JH. A Clinical study on the effect of hwangryunhaedok-tang on atopic dermatitis. *The journal of Korean oriental pediatrics.* 2012;26(4) :51-60.
 18. Ki HP, Jang SI, Yun YG. Ameliorative effects of hwangnyeonhaedok-tang on atopic dermatitis. *Herbal Formula Science.* 2013;21(1):80-90.
 19. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of hwangnyeonhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Kor. J. Herbology.* 2009;24: 39-47.
 20. Choi YY, Kim MH, Lee TH, Yang WM. Evaluation of efficacy evaluation of hwangryunhaedok-tang and gungangbujja-tang on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation mouse model. *Herbal Formula Science* 2012;20(2):83-92.
 21. Kawashima K, Haruo N, Kogure K. Effect of oren-gedoku-to on cerebral vascular accident. *Pharma Medica.* 1988;6:33-36.
 22. Fujiwara M, Iwasaki K, Toki-shakuyaku-san and oren-gedoku-to improve the disruption of spatial cognition induced by cerebral ischemia and central cholinergic dysfunction in rats. *Phytotherapy Research.* 1993;7:60-62.
 23. Mizukawa H, Yoshida K, Honmura A, Uchiyama Y, Kaku H, Nakajima S, Haruki E. The effect of oregedokuto on experimentally-inflamed rats. *American Journal of Chinese Medicine.* 1993;21 :71-78.
 24. Jee EH, Kim HJ, Jeong SH, Moon JH, Jang YP. Assessment of quality variance among commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang by simultaneous analysis of characterizing compounds. *Kor. J. Pharmacog.* 2010;41: 161-165.
 25. Kim DR, Kwak GS, Jeong SM, Lee SC, Ha JU. Comparison of the antioxidative abilities of commercial gal geun tang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2003;32:728-732.
 26. Kim YJ, Kim OS, Seo CS, Shin HK. Comparison of the ingredient quantities and biological activities of hwangryunhaedok-tang (hwanglianjiedu-tang) decoction and commercial extractive Granules. *Kor. J. Pharmacogn.* 2013;44(1):22~29.
 27. Chavanpatil MD, Jain P, Chaudhari S, Shear R, Vavia PR. Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastroretentive drug delivery system for ofloxacin. *Int J Pharm* 2006;316:86-92.
 28. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144-58.
 29. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999;64(4):555-9.
 30. Green LC, Wagner DA, Glogowski J. Analysis of nitrate, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126: 131-138.
 31. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1996;211 :24-32.
 32. Kook YB. Effect of hwangryunhaedok-tang on blood pressure and renal functions in spontaneously hypertensive rats. *Herbal Formula Science.* 2002; 10(1):113-129.
 33. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response to candida albicans. *J Microbiol Biotechnol.* 2000;10:8-15.
 34. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* 1990;144:1425-1431.
 35. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1996;211 :24-32.

36. Corbett JA, and Mac Daniel ML. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* 1995;181:559-568.
37. M CC, Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine.* 1994;6:399-406.