

소청룡탕 제조방법에 따른 성분 및 생리활성 비교

백가연[#] · 김세진[#] · 김종범 · 이정현 · 문성옥 · 이화동^{*}
한약진흥재단

Comparison of Marker Components and Biological Activities of Socheongryong-tang by Different Extract Methods

Ka Yeon Baek[#], Se Jin Kim[#], Jong Beom Kim, Jeong Hyeon Lee,
Sung Ok Moon, and Hwa Dong Lee^{*}

National Development Institute of Korean Medicine (NIKOM), 94, Hwarang-ro(Gapje-dong),
Gyengsan-si, Republic of Korea

Abstract – Socheongryong-tang (SCRT) was one of the major traditional herbal medicines widely used in the treatment of respiratory disease. SCRT is being commercially produced in the form of mix extracts powder and soft-dry extract by different extract methods in the Korean Herbal Pharmacopeia (KHP). In this study, the contents of marker components and biological activities of the SCRT mix extract powder were compared with those of the SCRT decoction. To analyze the marker components of SCRT, nine marker from eight herbal preparations were chosen. And the method using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detector method was established for the simultaneous analysis. Method validation was accomplished by linearity, precision test, and recovery test. The contents of nine marker components in this extract was ascertained by ratio. The biological activities were examined the effect of SCRT on anti-oxidation and pro-inflammation mediated by LPS-stimulation. We confirmed that both of SCRT mix extract powder and decoction have the similar contents on total polyphenol and flavonoid and inhibited the secretion of nitric oxide (NO), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and the expression of iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α . These results suggest that SCRT mix extract powder and decoction have a significant correlation.

Keywords – Socheongryong-tang (SCRT), Equivalence evaluation, Simultaneous determination, Antioxidant effect, Anti-inflammatory effect

과거부터 현재까지 전통의학은 건강관리에 큰 역할을 하고 있다. 현대 의학의 큰 발달에도 불구하고 전통의학은 여전히 많은 나라에서 질병 치료에 이용되고 있으며 또한 현대의학의 많은 약들이 전통의학에 기반을 두고 만들어지고 있다.^{1,2)}

소청룡탕(小青龍湯)은 한국, 일본, 중국에서 잘 알려진 호흡기 질환 치료제로, 마황(Ephedrae Herba), 작약(Paeoniae Radix), 세신(Asari Radix et Rhizoma), 건강(Zingiberis Rhizoma), 감초(Glycyrrhizae Radix), 계지(Cinnamomi Ramulus), 반하(Pinelliae Tuber), 오미자(Schisandrae Fructus)의 8가지 한약재로 이루어져 있다. 소청룡탕은 주로 알레르

기비염, 알레르기천식, 감기 등에 주로 사용되어 왔으며 그 외에도 결막염, 습진, 수포, 신염 등에도 사용한다고 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 최근 들어 소청룡탕이 항히스타민작용을 한다고 밝혀진 바 있으며 또한 기관지 평활근의 확장 작용을 한다는 것이 밝혀졌다.⁶⁻⁸⁾ 현재 요양급여 56종 한방처방 투약일수 기준 2위와 요양급여비용 4위,²⁾ 그리고 한방의료기관 급여 56종 혼합 엑스산제 구비율 2위에 해당하는 처방³⁾으로 한방의료기관에서 높은 빈도로 이용되는 처방이라고 할 수 있다.

한약제제는 사용되는 한약재의 종류에 따라 유효성분의 함량이 달라지며, 동일한 약재라 하여도 제조방법에 따라 동일한 품질과 약효를 나타내지 못하는 경우가 많다. 또한 한약제제에 대한 다양한 연구를 통해 추출온도, 추출압력, 추출시간, 건조방법 등에 따라서 수율 및 유효성분의 차이가 매우 크게 나타나는 것으로 보고되고 있다.⁹⁻¹³⁾ 한약제제

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}교신저자(E-mail): herb@nikom.or.kr
(Tel): +82-53-810-0332

의 제조방법으로는 전통적인 방법에 따라 다양한 한약재를 모두 섞어 함께 끓이는 복합전탕방법(이하 전탕액)과 한약재를 각각 추출하여 그 추출액, 또는 건조분말을 정해진 비율로 섞어서 제조하는 단미혼합방법(이하 혼합제제)이 사용되고 있고 그 형태에 따라 연조엑스 또는 건조엑스 등으로 분류된다.¹⁴⁾ 이러한 조제법의 차이에 의해 화학적 구성물질이나 그에 따른 효능적 측면에서 상당한 차이가 있을 것으로 추측한다. 최 등¹⁵⁾에 의하면 전통한의학에 의한 탕액 조제시 다양한 화학반응이 수반되어 각 생약재가 함유하고 있는 유효성분의 함량이 감소하거나 부분적인 화학관능기의 변화 또는 전혀 새로운 유효성분이 생성된다는 사실이 임상학적 측면에서 고려되어진다고 하였다.

이에 본 연구에서는 소청룡탕의 혼합제제 및 전탕액에 대하여 성분 비교 및 생리활성의 동등성을 비교하기 위하여 HPLC-PDA(High performance liquid chromatography-photo diode assay)를 이용하여 ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin의 지표성분 9종에 대한 동시분석법을 확립하고, 라디칼 소거능과 폴리페놀, 플라보노이드를 이용한 항산화효과 및 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 대식세포의 nitric oxide(NO) 분비 및 사이토카인 분비 억제능 확인을 이용한 항염증 실험을 통해 생리활성에 대한 비교 분석으로 한약제제의 품질향상을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

한약재

실험에 사용된 소청룡탕의 구성 한약재 중 감초(甘草), 건강(乾薑), 반하(半夏), 오미자(五味子) 및 작약(芍藥)은 (주)휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 구입하였고, 계지(桂枝), 마황(馬黃) 및 세신(細辛)은 (주)음니허브(Daegu, Korea)에서 구

입하여 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 한약진흥재단 한의기술R&D2팀의 한약재보관실에 보관하였다.

시약 및 기기

시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 아세토니트릴과 메탄올은 액체크로마토그래피용(J.T. Baker, USA)으로 구입하였고, phosphoric acid는 Junsei(Japan)에서 구입하여 사용하였다. 표준물질로 사용한 ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol 및 shizandrin은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였고, asarini은 Chemfaces Biochemical Co., Ltd.(China)에서 구입하여 사용하였다. 각 표준물질의 순도는 95% 이상이었다. 기기분석을 위한 HPLC는 Waters(USA)의 2998 PDA 및 e2695 separation module을 사용하였다.

소청룡탕 제제 및 검액의 조제

소청룡탕 혼합제제는 Korean Herbal Pharmacopeia (KHP)¹⁴⁾의 의약품각조 제3부의 소청룡탕 혼합단미엑스산의 제법에 따라 Table I과 같이 구성약재를 각각 중량별로 칭량한 뒤 약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 추출하였다. 추출액은 여과 후 농축하여 분무건조기(KL-8, Seogang Engineering Co., Korea)로 건조한 다음 건조엑스(dried extract)를 얻은 후, 건조엑스 80%, lactose 17%, polyvinyl pyrrolidone 2%, SiO₂ 1%의 비율로 혼합하여 각각의 단미엑스제(extract powder)를 비율별로 혼합하여 사용하였다. 소청룡탕 전탕액은 소청룡탕 처방 구성 한약재를 칭량하여 모두 혼합한 다음 약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 추출하여 추출액은 여과, 농축한 후 건조하여 사용하였다(건조엑스의 수득률 16.1%(w/w)). 제조된 소청룡탕 혼합단미엑스제 및 전탕액은 건조엑스를 기준으로 0.8 g을 칭량한 후 50% 메탄올 40 mL에 녹여 30분간 초음파 추출한 다음 0.45 µm PTFE membrane filter로 여과하여 50% 메탄올로 50 mL로 정용 후 검액으로 사용하였다.

Table I. Composition of Socheongryong-tang

Herbal medicine	Amount (g)	Dried extract (g)	Extract Powder (g)	Source
Herba Ephedrae	1.88	0.188	0.235	Neimenggu, China
Radix Paeoniae	1.88	0.320	0.400	Uisung, Gyeongbuk
Rhizoma Pinelliae	1.88	0.288	0.360	Uiseong, Gyeongbuk
Fructus Schisandrae	1.88	0.338	0.423	Samcheok, Gangwon
Ramulus Cinnamomi	1.25	0.025	0.031	Vietnam
Herba Asari	1.25	0.108	0.134	China
Radix Glycyrrhizae	1.25	0.211	0.264	Kyrgyzstan
Rhizoma Zingiberis	1.25	0.175	0.219	China
Total amount	12.52	1.653	2.066	

소청룡탕 제제의 성분분석

표준용액의 조제

Ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin 표준물질은 각각 무게를 정확히 칭량하여 메탄올에 녹인 후 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 순차적으로 희석하여 표준 용액으로 사용하였다.

HPLC 분석조건

소청룡탕의 지표성분의 동시분석을 위하여 고정상은 YMC사의 YMC-Triart C18(5 μm, 4.6×250 mm, USA) 칼럼을 사용하였고, 이동상은 0.05% phosphoric acid가 함유된 물과 0.05% phosphoric acid가 함유된 아세토니트릴을 사용하여 시간에 따라 조성을 변화시키는 기울기 용리를 사용하였다(Table II).

분석법 밸리데이션

HPLC-PDA를 사용한 소청룡탕의 지표성분 동시분석법을 확립하고 이를 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인¹⁶⁾에 따라 분석법 밸리데이션을 실시하였다. ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin 표준액을 사용하여 특이성(specificity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 직선성(linearity), 범위(range), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 측정하여 분석법의 타당성을 확보하였다.

특이성(Specificity) - 분석법이 성분에 대하여 특이적이고 식별성을 가진 방법임을 검증하기 위해 피크가 명확하게 분리됨을 확인하였고, photo diode array(PDA)로 성분의 단일

Table II. HPLC analytical conditions

Instrument	Waters Alliance HPLC-PDA system		
Wavelength	UV 210, 230 and 280 nm		
Column	YMC-Triart C18 (5 μm, 4.6×250 mm)		
Oven temperature	25°C		
Injection volume	10 μL		
Mobile phase	A : 0.05% H ₃ PO ₄ in H ₂ O,		
	B : 0.05% H ₃ PO ₄ in Acetonitrile		
	Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
	0	90	10
	10	85	15
	45	70	30
	70	30	70
	75	90	10
	80	90	10
	0	90	10
Flow rate	1.0 mL/min		

성 여부도 확인하였다.

직선성(Linearity) 및 범위(Range) - Ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin는 0.625~250 μg/mL의 농도로 표준액을 제조하고 이를 확립된 동시분석법을 이용하여 검량선을 작성하였으며, 검량선으로부터 직선식의 상관 계수(correlation coefficient, R²)를 구하여 직선성과 범위를 확인하였다.

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) - 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 각 표준물질의 표준 편차(SD, σ)를 검량선의 기울기(slope, s)로 나눈 값으로 계산하였다.

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S, LOQ = 10 \times \sigma/S$$

정확성(Accuracy) - 정확성은 회수율 시험법(recovery test)으로 측정하였으며, 대조시료에 ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin는 2~75 μg/mL를 첨가한 후 회수율로 확인하였다.

정밀성(Precision) - 정밀성은 동일한 시료를 확립된 방법에 따라 반복 측정하였을 때 각각의 측정값들의 오차를 측정하는 반복 정밀성으로 확인하였다. 즉, 표준용액을 직선성이 확인된 농도 범위내의 3가지 농도의 혼합 표준용액으로 제조한 후, 6회 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시하여 얻은 결과의 상대표준편차(%RSD, relative standard deviation)로 확인하였다.

지표성분 동시분석

각각의 표준액과 소청룡탕 제제를 확립된 동시분석법으로 분석하고 면적 대비법으로 함량을 산출하였다.

소청룡탕 제제의 항산화 활성 측정

DPPH Radical 소거활성 측정

DPPH(1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich, USA) radical 소거능 측정은 Biosis의 방법을 변형하여 측정하였다.¹⁷⁾ 각 시료를 1000 μg/mL에서 2배수 희석법으로 희석하여 96 well plate에 100 μL를 주입하고 0.2 mM DPPH 50 μL를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 30분 동안 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 희석 용매인 정제수를 대조군으로 하고, 활성비교를 위하여 양성대조군으로 Butylated hydroxyanisole(BHA)를 사용하였다.

$$DPPH \text{ 라디칼 소거활성}(\%) = (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent(Sigma Aldrich,

USA)가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다.¹⁸⁾ 표준물질로는 tannic acid(Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였다. 플라보노이드 함량은 Singleton VL 등의 방법¹⁹⁾을 변형하여 측정하였고, 표준물질로 quercetin(Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였다.

소청룡탕 제제의 항염증 활성 측정

세포독성평가

세포독성을 확인하기 위해 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, Promega, USA) assay를 실시하였다. RAW 264.7(Mouse macrophage cell line) 세포를 96 well plate에 5×10^4 cell/well로 분주하고, 소청룡탕을 제제별 2배 수 희석법으로 희석하여 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, MTS reagent를 20 μ L씩 첨가하고 4시간 반응 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 농도범위에서 유효농도를 설정하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, USA) 에서 구입하였고, 세포 배양을 위해 10% FBS(fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

Nitric oxide(NO) 생성 저해활성 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 12 well plate에 최종농도가 1×10^5 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 시료를 농도별로 처리하고 1시간 뒤에 100 ng/mL의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액의 상층액을 얻은 후 Griess 시약과 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 백분율로 나타내었다. 양성 대조군으로 dexamethasone(DEX) 10 μ M을 사용하였다.

IL-1 β , IL-6, TNF- α 분비량 측정

RAW 264.7 세포주를 12 well plate에 1×10^5 cell/well로 분주하고 소청룡탕 제제를 50, 100, 200 μ g/mL로 2시간 전 처리를 하였다. 이 후 LPS를 100 ng/mL로 처리한 후 24시간 동안 배양하고 배양 상층액을 취해 각 실험에 사용하였다. 사이토카인 분비 측정은 ELISA(enzyme immunosorbent assay) kit(R&D system)를 사용하였고, 제조사의 방법에 세포배양액 내 존재하는 Interleukin(IL)-1 β , Interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor(TNF)- α 의 양을 microplate reader(Tecan Infinite M200)를 이용하여 흡광도로 측정하였다. 양성 대조군으로 dexamethasone(DEX) 10 μ M을 사용하였다.

Reverse Transcription(RT)-Polymerase Chain Reaction (PCR)

RNA 분리를 위해 RAW 264.7 세포는 12 well plate에 1×10^5 cells/mL세포로 분주한 다음, 세포에 소청룡탕 제제를 50, 100, 200 μ g/mL씩 처리한 후, LPS를 100 ng/mL로 처리하고 RNAiso reagent를 이용해 제조사의 방법에 따라 total RNA를 취하였다. Total RNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNiRON, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 유전자 증폭을 위해 특정 primer를 넣고 각 primer에 따른 PCR 조건에 따라 실시하였다. 이때 iNOS(F: 5'-CCTCCTCCACCC TACCAAGT-3', R: 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3')와 IL-6(F: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG -3', R: 5'-GGAAATTGGGTAGGAAGGA-3')는 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 40 cycle로 반응시켰고, COX-2(F: 5'-GAGGCCACTGATACCTATTG-3', R: 5'-ACAAAGAAGGGTCCCAATT-3')는 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 40 cycle로 반응시켰으며, TNF- α (F: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTC-3', R: 5'-ACATTGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3')와 IL-1 β (F:5'-TCATTACACAGGACAGGTAT-3',R:5'-CATTAGACAAC TGCCTACA-3')은 94°C에서 30초, 55°C에서 20초, 72°C에서 30초 동안 35 cycle로, GAPDH(F: 5'-CAACTCCCCTCTCCACCT-3', R: 5'-CTTGCTCAGTGTCTTGCTG-3')는 94°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초 동안 30 cycle로 반응시켰다. 각 DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동시킨 후 UV 검출기로 확인하였다.

Western Blot 분석

소청룡탕 제제를 50, 100, 200 μ g/mL씩 처리한 RAW264.7 세포를 PBS로 세 번 세척한 후 protease & phosphatase inhibitor cocktail을 함유한 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5% Glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 2 mM DTT)로 부유시킨 후 10 분 동안 ice 에 방치시킨 다음, 4°C에서 16,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 따로 분리한 후 BCA Protein Assay Kit(Thermo, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였고, 20~30 μ g의 lysate를 8~12% gel을 사용하여 SDS(sodium dodecyl sulfated) - PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) system 으로 분리하였다. 이를 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Millipore, Germany)에 100 V로 1시간 동안 transfer한 후, blocking을 5% BSA가 함유된 1 \times PBS-T (1 \times PBS + 0.1% Tween-20) 용액으로 상온에서 1시간 동안 실시하였다. iNOS, COX-2 및 β -actin primary antibody는 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 1 \times PBS-T로 세 번 세척하고, secondary antibody는 실온에서 2시간동안 반응시킨 후 1 \times PBS-T로 세 번 세척하고 ECL 기질로 발색시킨 후 ChemiDoc-It Imaging System(UVP, Canada)로 감광하였다.

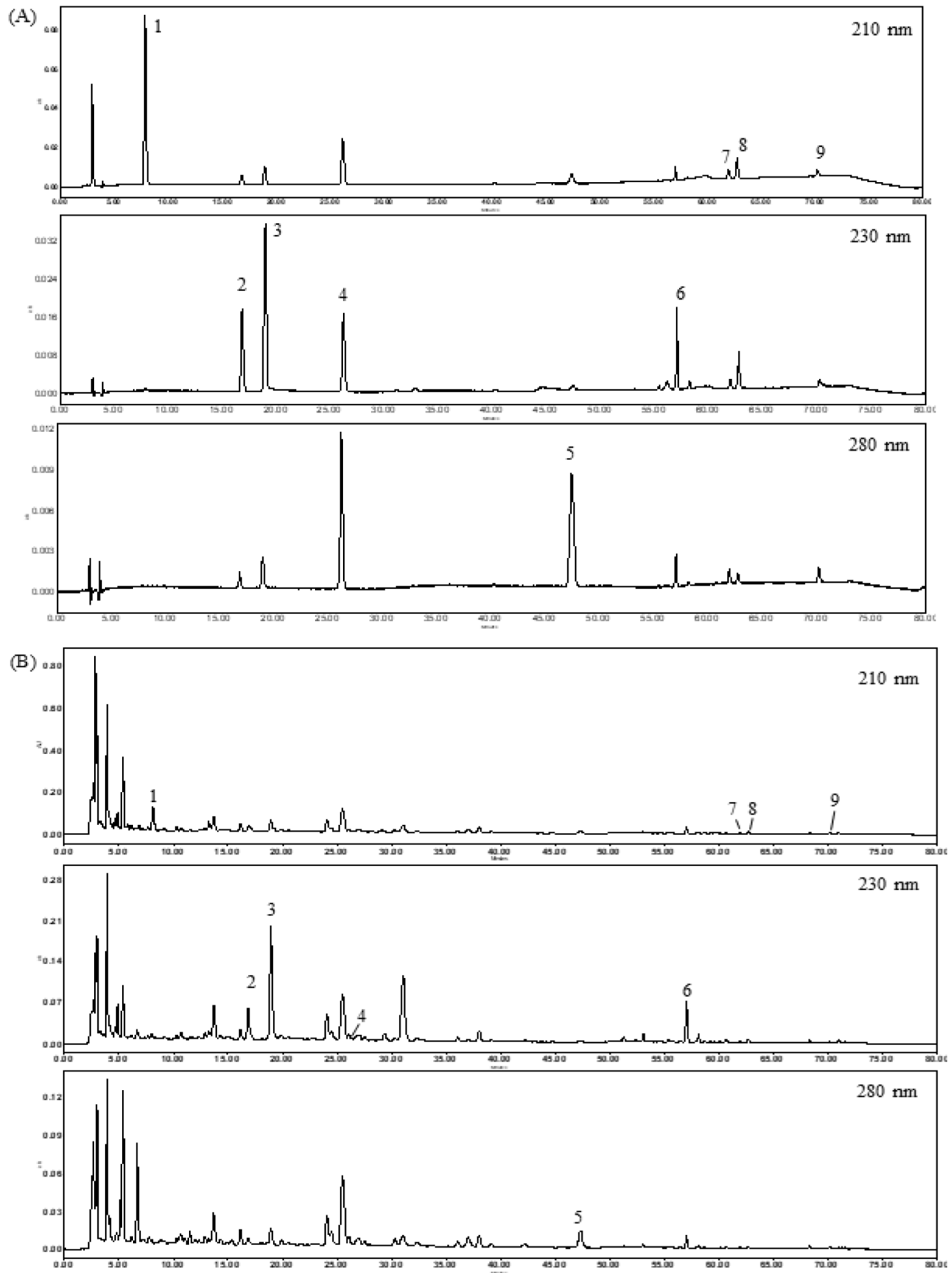


Fig. 1. HPLC chromatogram of a standard mixture (A) and Socheongryong-tang mix extract powder (B). ephedrine (1), albiflorin (2), paeoniflorin (3), liquiritin (4), cinnamic acid (5), glycyrrhizic acid (6), 6-gingerol (7), schizandrin (8), asarinin (9)

통계처리

모든 실험결과는 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test 및 T-test를 시행하였다.

결 과

소청룡탕 제제의 성분분석

분석조건 확립

HPLC-PDA를 이용하여 소청룡탕의 구성약재 중 마황의 ephedrine, 작약의 albiflorin, paeoniflorin, 감초의 liquiritin, glycyrrhizic acid, 계지의 cinnamic acid, 건강의 6-gingerol, 오미자의 schizandrin 및 세신의 asarinin 9종의 성분에 대하여 동시분석 조건을 설정하였다. 9종 성분의 동시분석을 위하여 0.05% phosphoric acid가 포함된 water와 acetonitrile을 기울기 용매조건으로 하여 최적의 분석조건을 설정하였다. 검액에서의 각 성분의 peak는 표준용액에서의 표준품 peak의 retention time과 UV 흡수파장을 비교하여 확인하였으며, ephedrine, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin은 210 nm, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin 및 glycyrrhizic acid은 230 nm, cinnamic acid는 280 nm에서 최적흡수파장으로 설정하였다(Fig. 1).

분석법 밸리데이션

직선성, 검출한계 및 정량한계 - 확립된 동시분석법을 이용하여 농도에 따른 피크 면적비로 지표성분 9종에 대한 검량선을 작성한 결과 상관계수(R^2) 값이 0.999 이상으로 1.0에 가까운 직선성을 나타내었다. 또한 이들 9종 지표성분에 대한 검출한계는 0.054~2.338 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 정량한계는 0.163~7.084 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Table III).

정확성 - 소청룡탕 시료에 표준용액을 각각 저농도, 중농

도 및 고농도로 첨가한 뒤 회수율을 측정된 결과, Table IV와 같이 83.999~109.481%(상대표준편차도 0.591~3.543%)로 우수한 회수율을 나타내었다.

정밀성 - 분석오차를 의미하는 정밀성을 확인하기 위하여 실험일내 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시한 결과 상대표준편차(%RSD)는 4.365% 이내로 우수한 결과를 나타내었다(Table V).

지표성분 동시분석

확립된 분석법을 이용하여 소청룡탕의 지표성분인 ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin를 동시 분석하였다. 9종 지표성분 모두 다른 성분들의 peak에 간섭을 받지 않고 완전하게 분리되어 검출되었다. 소청룡탕 혼합제제는 ephedrine 4.483 mg/g, albiflorin 5.444 mg/g, paeoniflorin 21.054 mg/g, liquiritin 0.219 mg/g, cinnamic acid 0.228 mg/g, glycyrrhizic acid 14.793 mg/g, 6-gingerol 0.124 mg/g, shizandrin 0.242 mg/g 및 asarinin 0.144 mg/g을 함유하였고, 소청룡탕 전탕액은 ephedrine 4.642 mg/g, albiflorin 0.726 mg/g, paeoniflorin 15.922 mg/g, liquiritin 1.270 mg/g, cinnamic acid 0.306 mg/g, glycyrrhizic acid 9.617 mg/g, 6-gingerol 0.320 mg/g, shizandrin 0.278 mg/g 및 asarinin 0.334 mg/g을 함유한 것으로 나타났다(Table VI). 소청룡탕 혼합제제는 전탕액보다 albiflorin, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid의 함량이 더 높게 나타났고 특히 albiflorin의 함량은 전탕액보다 약 7배 높은 함량으로 확인되었으나, liquiritin 함량은 전탕액보다 약 6배 가량 낮은 것으로 확인되었다. 소청룡탕 혼합제제와 전탕액의 동등성 평가를 위하여 산출한 상관계수는 0.9919로 확인되어 지표성분 함량으로 비교한 소청룡탕 혼합제제와 전탕액은 통계적으로 매우 유사한 것으로 확인되었다.

Table III. Regression equation, correlation coefficient, LOD, and LOQ

Compound	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression equation*	R^2 (n=5)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Ephedrine	12.5~200	$y=19288x-5356.4$	1.0000	0.809	2.453
Albiflorin	6.25~100	$y=9590.6x+3729.6$	0.9999	1.362	4.126
Paeoniflorin	15.625~250	$y=8390.8x+5660.9$	1.0000	2.338	7.084
Liquiritin	3.125~50	$y=22964x-1329.9$	1.0000	0.201	0.609
Cinnamic acid	0.625~10	$y=81165x-3653.4$	1.0000	0.057	0.172
Glycyrrhizic acid	15.625~10	$y=2734x-1591.2$	1.0000	1.457	4.416
6-gingerol	0.625~10	$y=20138x-1633.1$	1.0000	0.078	0.235
Shizandrin	0.625~10	$y=54555x-1670.9$	1.0000	0.054	0.163
Asarinin	0.625~10	$y=14805x+241.24$	0.9998	0.210	0.637

*y : peak area, x : concentration ($\mu\text{g/mL}$)

Table IV. Accuracy of marker components

Peak	Spiked concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)	SD	RSD (%)	Recovery (%)
Ephedrine	40	35.312	0.324	0.917	88.281
	50	47.017	0.320	0.682	94.034
	60	60.863	1.158	1.903	101.438
Albiflorin	20	17.750	0.235	1.322	88.749
	25	24.218	0.270	1.116	96.873
	30	30.998	0.670	2.161	103.328
Paeoniflorin	50	42.628	0.446	1.045	85.256
	62.5	60.436	0.611	1.011	96.698
	75	77.303	1.908	2.468	103.070
Liquiritin	10	8.400	0.054	0.644	83.999
	12.5	10.732	0.094	0.880	85.860
	15	14.236	0.228	1.600	94.904
Cinnamic acid	2	1.861	0.014	0.730	93.048
	2.5	2.391	0.024	1.023	95.658
	3	3.224	0.068	2.100	107.483
Glycyrrhizic acid	50	43.484	0.621	1.429	86.968
	62.5	60.621	0.395	0.652	96.994
	75	78.717	1.927	2.447	104.957
6-gingerol	2	1.883	0.067	3.543	94.128
	2.5	2.440	0.023	0.962	97.589
	3	3.284	0.115	3.503	109.481
Shizandrin	2	1.859	0.021	1.148	92.970
	2.5	2.476	0.015	0.591	99.057
	3	3.198	0.077	2.417	106.586
Asarinin	2	1.946	0.043	2.229	97.315
	2.5	2.521	0.033	1.306	100.828
	3	3.114	0.102	3.270	103.785

Values are means of 3 replicates.

**소청룡탕 제제의 효능평가
항산화 효능 평가**

DPPH 라디칼 소거능을 통해 항산화능을 확인하였고 항산화 물질인 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 비교하였다. 라디칼 소거능은 소청룡탕 혼합제제와 전탕액의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였고, 소청룡탕 혼합제제의 EDA50(50% of electron donating ability) 값은 77.53 µg/mg 이고, 전탕액은 201.82 µg/mg로 대조군인 Butylated hydroxyanisole(BHA) 10.45 µg/mg보다 7.42배, 19.31배 낮은 효과를 나타냈다(Fig. 2). 또한 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량에 있어 혼합제제는 40.82±10.35 µg/mg와 35.74±0.63 µg/mg, 전탕액은 27.26±7.73 µg/mg와 46.63±0.62 µg/mg으로 측정되었다(Table VII). 라디칼 소거능과 폴리페놀 함량에 있어서 소청룡탕 혼합제제가 전탕액보다 비교적 높은 값을 나타내지만, 플라보노이드 함량에 있어서 전탕액이 비교적 높은

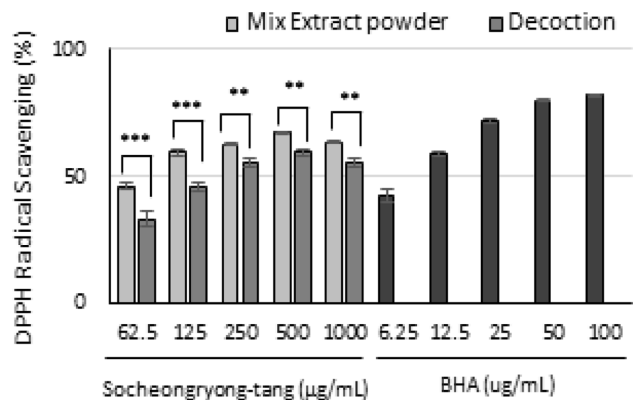


Fig. 2. DPPH free radical scavenging effect according to formulation of Socheongryong-tang. Data was expressed as the mean±SEM of three experiments. ***p*<0.01 and ****p*<0.001 significantly different from Socheongryong-tang mix extract powder and decoction.

Table V. Precision of marker components

Components	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day				Inter-day			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)	Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Ephedrine	12.5	12.667	0.054	0.423	101.336	12.666	0.044	0.348	101.327
	50	49.860	0.180	0.361	99.720	49.844	0.173	0.347	99.687
	200	199.916	1.125	0.563	99.958	200.941	2.688	1.338	100.470
Albiflorin	6.25	6.042	0.047	0.783	96.670	6.014	0.035	0.574	96.226
	25	25.064	0.218	0.868	100.254	25.360	0.315	1.243	101.442
	100	99.721	0.830	0.832	99.721	100.665	1.141	1.133	100.665
Paeoniflorin	15.625	15.392	0.106	0.691	98.508	15.357	0.035	0.225	98.285
	62.5	62.342	0.491	0.787	99.747	63.094	0.697	1.105	100.950
	250	249.542	1.797	0.720	99.817	251.674	2.400	0.953	100.670
Liquiritin	3.125	3.133	0.033	1.066	100.267	3.137	0.004	0.112	100.385
	12.5	12.455	0.058	0.463	99.638	12.501	0.058	0.463	100.011
	50	49.970	0.295	0.590	99.939	50.299	0.485	0.965	100.598
Cinnamic acid	0.625	0.643	0.003	0.477	102.893	0.641	0.002	0.361	102.505
	2.5	2.494	0.011	0.427	99.752	2.493	0.006	0.221	99.736
	10	10.011	0.029	0.291	100.107	10.070	0.149	1.482	100.702
Glycyrrhizic acid	15.625	16.030	0.048	0.301	102.592	15.785	0.217	1.378	101.024
	62.5	62.104	0.344	0.553	99.366	62.341	0.429	0.688	99.746
	250	249.921	1.539	0.616	99.968	251.466	3.413	1.357	100.586
6-gingerol	0.625	0.647	0.011	1.752	103.537	0.622	0.027	4.365	99.518
	2.5	2.505	0.029	1.168	100.194	2.513	0.031	1.214	100.504
	10	9.997	0.054	0.537	99.974	9.972	0.030	0.298	99.720
Shizandrin	0.625	0.640	0.006	0.966	102.451	0.629	0.019	3.024	102.451
	2.5	2.490	0.028	1.142	99.607	2.504	0.016	0.639	99.607
	10	9.996	0.046	0.457	99.964	10.037	0.121	1.206	99.964
Asarinin	0.625	0.582	0.009	1.511	93.115	0.619	0.019	2.995	99.031
	2.5	2.498	0.038	1.508	99.912	2.498	0.007	0.274	99.906
	10	9.958	0.087	0.869	99.575	10.037	0.121	1.206	100.375

Values are means of 3 replicates.

Table VI. Contents of marker components in the Socheongryong-tang by HPLC

Peak	Socheongryong-tang mix extract powder (A, mg/g)*			Socheongryong-tang decoction (B, mg/g)			Ratio (A/B)
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	
Ephedrine	4.483	0.010	0.219	4.642	0.066	1.414	0.966
Albiflorin	5.444	0.027	0.497	0.726	0.001	0.141	7.499
Paeoniflorin	21.054	0.199	0.943	15.922	0.155	0.976	1.322
Liquiritin	0.219	0.002	0.956	1.270	0.018	1.406	0.172
Cinnamic acid	0.228	0.001	0.470	0.306	0.003	1.083	0.745
Glycyrrhizic acid	14.793	0.198	1.341	9.617	0.081	0.846	1.538
6-gingerol	0.124	0.001	0.502	0.320	0.006	1.814	0.388
Shizandrin	0.242	0.004	1.664	0.278	0.002	0.662	0.871
Asarinin	0.144	0.003	2.033	0.334	0.007	2.157	0.431

*Sample weight (g) is determined on dry extract basis.
Values are means of 3 replicates.

Table VII. Content of Total Polyphenol and Flavonoid in Socheongryong-tang Formulation

	Socheongryong-tang mix extract powder	Socheongryong-tang decoction
Total polyphenol (µg/mg)	40.82 ± 10.35	27.26 ± 7.73
Flavonoid (µg/mg)	35.74 ± 0.63	46.63 ± 0.62

값을 나타내는 것으로 확인되었다.

항염증 효능 평가

소청룡탕 혼합제제와 전탕액의 세포독성 평가

RAW 264.7 cell에 대한 소청룡탕 혼합제제와 전탕액의 독성을 확인한 결과, 두 시료에서 1000 µg/mL 이하의 농도에서 80%이상의 세포생존율을 나타냈고, 따라서 1000 µg/mL 이하의 농도에서 유효활성을 나타내는 실험농도를 결정하여 실험에 진행하였다(Fig. 3).

NO생성과 iNOS, COX-2 발현 억제능 비교

RAW 264.7 cell에 약물을 처리하고 LPS를 처리하여 약물의 NO 생성과 iNOS, COX-2 발현의 억제능을 확인하였다. 소청룡탕 50 µg/mL에서 혼합제제는 76.03%, 전탕액은 76.72%의 생성억제능이 나타났고, 100 µg/mL에서는 86.77%, 86.31%의 생성 억제능이 나타나 동등함을 확인하였으며, 200 µg/mL에서는 혼합제제가 88.55%, 전탕액은 97.14%로 전탕액이 비교적 높은 효능을 나타내는 것으로 확인하였다. iNOS와 COX-2 유전자 발현에 있어서 NO 생성과 유사한 양상으로 농도의존적으로 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4). NO생성과 iNOS 발현에 있어 혼합제제와 전탕액의 동등함을 확인하였다.

염증성 사이토카인의 유전자 발현과 생성 억제능 비교

항염증 사이토카인 중 대표 사이토카인인 TNF-α와 IL-1β, IL-6에 대한 유전자 발현과 생성 억제 효과를 확인하였다(Fig. 5). RAW 264.7 cell에 LPS 처리 후, 소청룡탕 혼합

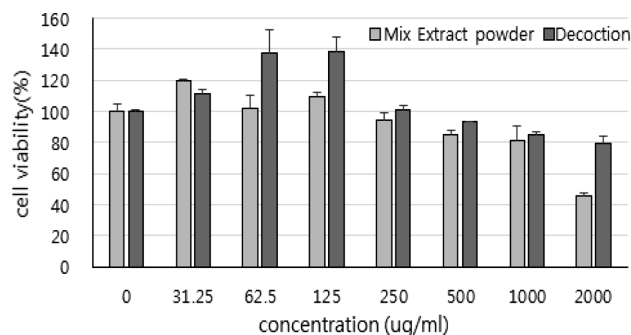


Fig. 3. Effect of Socheongryong-tang Formulation on RAW 264.7 cell viability. The macrophages were treated with various concentration (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) of Socheongryong-tang Formulation for 24 hrs. Cell viability was measured using MTT assay.

제제와 전탕액 모두 농도의존적으로 사이토카인 생성을 감소시키는 경향이 나타났다. TNF-α는 소청룡탕 혼합제제와 전탕액 모두 200 µg/mL이하에서 사이토카인 생성이 감소하였고, 전탕액이 혼합제제보다 TNF-α의 생성 억제능이 높음을 확인하였으며, 유전자 발현에 있어서 50 µg/mL에서도 TNF-α 발현 억제를 나타냈고, 분비양상과 유사하게 전탕액에서 혼합제제보다 비교적 높은 억제능이 나타났다(Fig. 5(A), (D)). IL-1β의 경우 소청룡탕 혼합제제와 전탕액은 농도의존적으로 분비량이 감소하였으며, 전탕액은 50 µg/mL에서 33%의 분비억제가 나타남을 확인하였고, 유전자 발현 억제능에 있어서도 동일한 양상이 나타났다(Fig. 5(B), (E)). IL-6 생성 억제능의 경우 소청룡탕 혼합제제와 전탕액은 50 µg/mL에서 약 67% 감소시켰으며, 유전자 발현 억제능에 있어서도 모두 실험 최저 농도인 50 µg/mL에서 대조군인 DEX와 유사하게 유전자 발현을 감소시켰음을 확인하였다(Fig. 5(C), (F)). 사이토카인 생성 억제능에서는 IL-1β를 제외한 TNF-α와 IL-6의 생성 억제능에서 동등성을 확인하였고, 유전자 발현 억제능에 있어서 TNF-α를 제외한 IL-6와 IL-1β에서 효능의 동등성을 확인하였다.

고 찰

소청룡탕(小青龍湯)은 한국, 일본, 중국에서 잘 알려진 호흡기 질환 치료제로, 주로 알레르기비염, 알레르기천식, 감기 등에 주로 사용되어 왔으며 그 외에도 결막염, 습진, 수포, 신염 등에도 사용한다고 알려져 있다.²⁰⁻²⁶⁾ 본 연구에서는 한약제제의 효과적인 품질관리 및 품질향상을 위한 기초자료로 활용하고자 소청룡탕 혼합제제 및 전탕액에 대하여 동시분석법을 통한 성분분석, 항산화 활성 및 대식세포를 이용한 NO 생성 저해활성에 대한 비교실험을 실시하였다.

소청룡탕 제제의 성분분석을 위하여 ephedrine, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, schizandrin 및 asarinin 9종의 지표성분에 대하여 동시분석을 실시하였다. 확립된 분석법의 검증을 위하여 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정밀성을 측정하였으며, 분석법에 대한 유효성을 확인하였다.

지표성분의 동시분석 결과 소청룡탕 혼합제제에서 9종의 지표성분은 0.124~21.054 mg/g의 함량값을 나타냈고 전탕액에서는 0.278~15.922 mg/g의 값을 나타냈으며, 소청룡탕 혼합단미엑스제는 전탕액보다 albiflorin, paeoniflorin 및

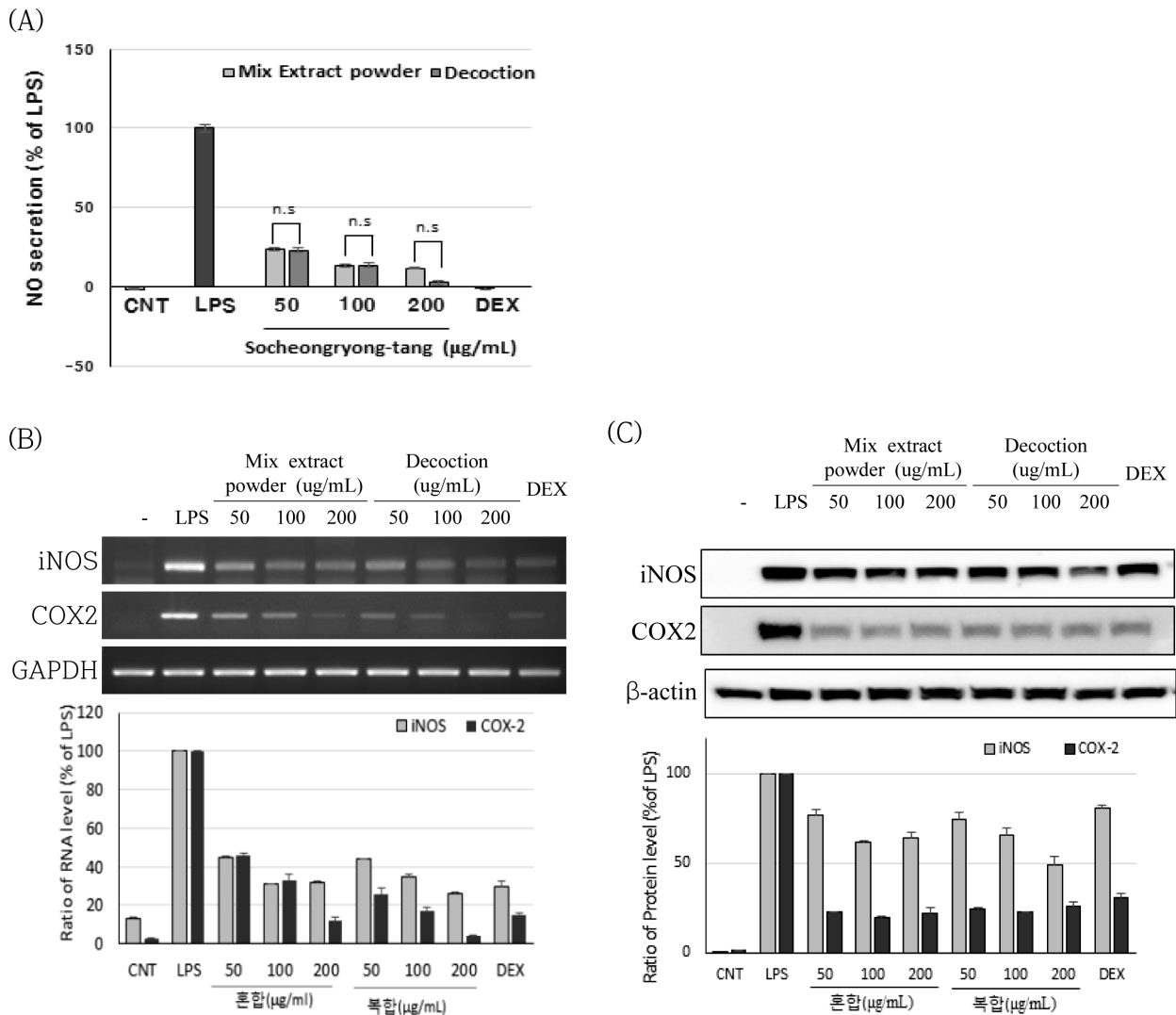


Fig. 4. Inhibition of NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells by Socheongryong-tang. (A) Cells (5×10^5 cells/mL) were treated with various concentrations (50, 100, 200 µg/mL) of Socheongryong-tang mix extract powder and decoction for 1 hr, and then incubated with LPS (0.1 µg/mL) for 24 hrs. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ significantly different from Socheongryong-tang mix extract powder and decoction, n.s.: not significant. The culture supernatant was analyzed nitrite production. The cells were analyzed by (B) RT-PCR and (C) immunoblot for mRNA and protein of iNOS. For RT-PCR, the cells were pretreated with Socheongryong-tang for 1 hrs, and treated with LPS for 4 hrs. For immunoblot of iNOS, the cells were pretreated with Socheongryong-tang (50, 100, 200 µg/mL) for 1 hrs and treated with LPS for 24 hrs.

glycyrrhizic acid의 함량이 더 높게 나타났다. 하지만 소청룡탕 혼합제제와 전탕액의 동등성 평가를 위하여 지표성분 함량으로 산출한 상관계수(pearson correlation coefficient, r)는 0.9919로 확인되어 소청룡탕 혼합제제와 전탕액은 통계적으로 매우 유사한 것으로 확인되었다.

소청룡탕 제제의 효능평가를 위해 DPPH 라디칼 소거능, 폴리페놀 및 플로보노이드 함량의 측정 결과 DPPH 라디칼 소거능과 폴리페놀 함량은 혼합제제의 활성이 다소 높은 반면, 플로보노이드 함량은 복합제제에서 다소 높은 경향을 나타냈다. 폴리페놀은 폐놀계 화합물의 총칭으로 플라보노

이드, 안토시아닌, 탄닌, 카테킨, 이소플라빈 등을 포함하며, 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로 노란색 내지는 담황색을 나타내는 폐놀계 화합물로 이들의 함량이 증가할수록 자유라디칼 소거능과 유의적인 상관관계를 갖는다고 보고되어져 있다.^{27,28)} 본 결과에서 폴리페놀 함량이 높은 혼합단미엑스제에서 높은 라디칼 소거능이 나타남은 이들의 유의적인 상관관계를 나타내는 것으로 사료된다.

LPS는 그람음성균 외벽의 중요한 구성성분으로 이로 유발되어지는 전염증성 반응은 마크로파지의 분화를 유도하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 사이토카인을 생성해 적응

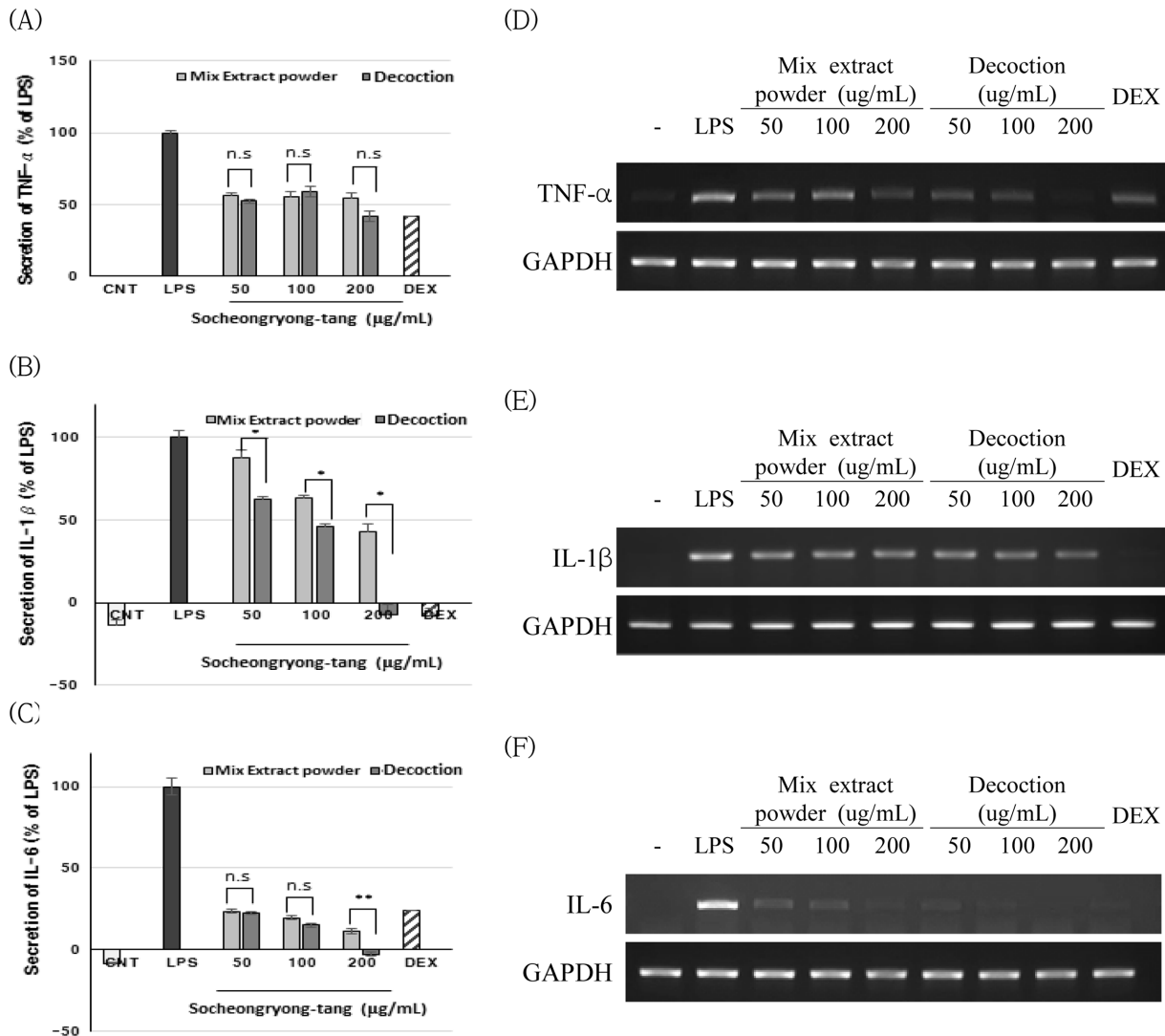


Fig. 5. Inhibition of inflammatory cytokine in RAW264.7 with Socheongryong-tang. There were decreased (A-C) the secretion of cytokine, (D-F) the expression of mRNA of TNF- α , IL-1 β , IL-6. The cell was pretreated with Socheongryong-tang for 1hrs before being induced inflammation with LPS for (D) 2 hrs, (A, E, F) 6 hrs and (B, C) 24 hrs. * p <0.05 and ** p <0.01 significantly different from Socheongryong-tang mix extract powder and decoction, n.s.: not significant.

면역반응의 활성을 돕도록 유도한다. 하지만 이러한 염증반응이 조절되지 못하면 사이토인이 과발생되어 심각한 질병을 유발시키게 된다.^{29,30} 항염증 활성의 측정을 위해 Raw 264.7 세포에서 NO 생성, ELISA(TNF- α , IL-6, IL-1 β), RT-PCR(TNF- α , iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 β), Western blot (iNOS, COX-2)의 분석을 통해 소청룡탕 혼합제제 및 전탕액의 항염증 활성을 측정하였다. NO의 생성은 iNOS와 COX-2의 발현과 긴밀한 작용에 의해 작용한다는 것은 많은 연구결과에 의해 보고되었다.^{31,32} 소청룡탕 혼합단미엑스제와 전탕액 모두 NO 생성과 iNOS 발현에 있어서 매우 높은 억제능을 가짐을 확인 할 수 있었고, 또한 COX-2의 유전자 발현에 있어 강한 억제능이 있음을 확인하였다. 단

백질 발현에 있어서 또한, 대조군인 DEX와 비교하여 그보다 더 높은 억제능을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 이 모두 농도의존적으로 감소하는 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 염증반응에 의해 분비되는 사이토카인 중 TNF- α 와 IL-1 β 의 과분비는 퇴행성 질환과 연관되는 사이토카인으로 뇌졸중이나 파킨슨, 알츠하이머 등에서 많은 보고가 되고 있다.³³ 소청룡탕의 결과 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성 및 발현 억제능이 비록 대조군인 DEX보다 낮지만, 농도의존적으로 이들 사이토카인의 생성과 발현의 억제를 나타내는 것을 확인하였고, 복합제제가 비교적 높은 억제능이 나타남을 확인하였다. 소청룡탕의 IL-6의 발현과 생성 억제능은 대조군보다 더 높은 효과를 나타냈고, 혼합단미엑스제와 복합

제제가 유사함을 확인하였다. 항염증 확인 결과 전탕액이 다소 높은 활성을 보이거나 혼합제제와 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

한약제제는 제조사마다 사용하는 원료뿐만 아니라 추출, 건조, 제형화 등의 제조방식에 차이가 있어 탕액과의 동등성, 제제의 품질에 대한 논란이 빈번하게 제기되고 있는 실정이다. 본 연구의 결과는 한약제제에 대한 소비자 및 한의사의 불신해소를 위하여 진행되고 있는 탕액과의 동등성 및 약효의 유효성 연구뿐만 아니라 한약제제의 품질향상을 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서는 소청룡탕 혼합제제 및 전탕액의 화학적(지표성분 함량 및 성분프로파일), 생물학적(항산화 활성, 세포독성, 항염증 항비만 활성) 동등성을 조사하였다. 이를 위해 소청룡탕 제제의 동시분석법을 제시하고, 벨리데이션을 통해 분석법을 검증한 결과 상관계수 0.9919로 통계적으로 매우 유사한 것으로 확인되었다. 또한, 라디칼 소거능과 폴리페놀은 혼합제제가, 플라보노이드 및 IL-1 β 일부 농도에서는 전탕액이 높은 값을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다. 본 연구결과 동시분석법에 따라 소청룡탕 제제의 효율적인 품질관리법을 제시하였고, 혼합제제와 전탕액의 유사성을 생물학적 활성을 통하여 증명한 것으로 한약제제의 품질향상을 위한 품질관리법 개발 및 제형개발 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘한약제제와 전탕액의 품질 비교 평가 연구(K18242)’에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Hwang, M. W., Lee, H. J., Song, H. J. and Kim, B. J. (2013) Involvement of MAPKs and PLC pathways in modulation of pacemaking activity by So-Cheong-Ryong-Tang in interstitial cells of Cajal from murine small intestine. *Sci. World J.* 536350.
- Bai, D. (1993) Traditional chinese medicines and new drug development. *Pure Appl. Chem.* 65: 1103-1112.
- Jung, S., Cho, S. J., Moon, K. I., Kim, H. W., Kim, B. Y. and Cho, S. I. (2008) Effects of Socheongryong-Tang on immunoglobulin production in asthmatic mice. *Kor. J. Herbol.* 23: 23-28.
- Zuo, Y., Zhu, Z., Huang, Y., Tao, J. and Li, Z. (2002) Science of prescriptions. Nanjing : Library of Traditional Chinese Medicine 44-46.
- Ko, E., Rho, S., Cho, C., Choi, H., Ko, S., Lee, Y., Hong, M. C., Shin, M. K., Jung, S. G. and Bae, H. (2004) So-Cheong-Ryong-Tang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 739-743.
- Sakaguchi, M., Iizuka, A., Yuzurihara, M., Ishige, A., Komatsu, Y., Matsumiya, T., and Takeda, H. (1996) Pharmacological characteristics of Shoseiryu-to, an antiallergic Kampo medicine without effects on histamine H1 receptors and muscarinic cholinergic system in the brain. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 18: 41-47.
- Kao, S. T., Lin, C. S., Hsieh, C. C., Hsieh, W. T. and Lin, J. G. (2001) Effects of xiao-qing-long-tang (XQLT) on bronchoconstriction and airway eosinophil infiltration in ovalbumin-sensitized guinea pigs: *in vivo* and *in vitro* studies. *Allergy* 56: 1164-1171.
- Kao, S. T., Wang, S. D., Wang, J. Y., Yu, C. K. and Lei, H. Y. (2000) The effect of Chinese herbal medicine, xiao-qing-long tang (XQLT), on allergen-induced bronchial inflammation in mite-sensitized mice. *Allergy* 55: 1127-1133.
- Park, H. M., Choi, K. H., Jung, J. Y. and Lee, S. D. (2006) Metal exposure through consumption of herbal medicine, and estimation of health risk among Korean population. *Kor. J. Env. Health* 32: 186-191.
- Lim, J. W., Kim, J. W., Chung, S. Y., Cho, S. H., Oh, M. S. and Hwang, W. W. (2000) The Antioxidative and Neuroprotective Effect of Guibi-tang (Guipitang) and Guibi-tang gamibang (Guipitang jiaawei-jiang) on PC12 cells. *J. Oriental Neuropsychiatry* 20: 1-19.
- Yoo, D. Y., Lim, D. W. and Jeong, J. H. (1998) Bibliographical study on Kwibitang applied in gynecological diseases. *Korean J. Orien. Gynecol.* 11: 165-177.
- Huh, J. (1980) Donguibogam, 98. Namsandang publisher, Seoul.
- Park, S. D., Park, H. J. and Ju, W. S. (2001) Study on antioxidant activities of Guibitang and its component groups. *Kor. J. Herbol.* 16: 11-28.
- Korea Food and Drug Administration. The Korean Herbal Pharmacopoeia 11th ed. 2016.
- 최성모, 김병우 (2002) 한약조제시 예상되는 화학반응. *대한약침학회지* 5: 116-119.
- Korea Food and Drug Administration. Analytical method guideline about validation of drug and etc. 2015.
- Biosis, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 26: 1199-1200.
- Zhishen, J., Mengcheng T. and Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic -phosphotungstic acid

- reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**: 144-158.
20. Zheng, L. and Dong, D. (2011) Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of nine active components in 'Da-Chai-Hu-Tang' *Chinese Medicine* **2**: 20-28.
 21. Lim, C. Y., Kim, H. W., Kim, B. Y. and Cho, S. I. (2015) Genome wide expression analysis of the effect of Socheon-gryong Tang in asthma model of mice. *J. Trad. Chinese Med.* **35**: 168-174.
 22. Lee, M. Y., Seo, C. S., Kim, J. Y. and Shin, H. K. (2015) Evaluation of a water extract of So-Cheong-Ryong-Tang for acute toxicity and genotoxicity using *in vitro* and *in vivo* tests. *BMC Compl. Altern. Med.* **15**: 1-8.
 23. Yim, N. H., Kim, A., Jung, Y. P., Kim, T., Ma, C. J. and Ma, J. Y. (2015) Fermented So-Cheong-Ryong-Tang (FCY) induces apoptosis via the activation of caspases and the regulation of MAPK signaling pathways in cancer cells. *BMC Compl. Altern. Med.* **15**: 1-11.
 24. Kim, H. W., Lim, C. Y., Kim, B. Y. and Cho, S. I. (2014) So-Cheong-Ryong-Tang, a herbal medicine, modulates inflammatory cell infiltration and prevents airway remodeling via regulation of interleukin-17 and GM-CSF in allergic asthma in mice. *Pharmac. Magazine* **10**: 506-511.
 25. Park, C., Hong, S. H., Kim, G. Y. and Choi, Y. H. (2015) So-Cheong-Ryong-Tang induces apoptosis through activation of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways, and inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway in non-small-cell lung cancer A549 cells. *BMC Compl. Altern. Med.* **15**: 1-13.
 26. Lee, M. K., Lee, K. Y., Park, J. and Sung, S. H. (2010) Simultaneous determination of paeoniflorin, trans-cinnamic acid, schisandrin and glycyrrhizin in So-Cheong-Ryong-Tang by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Nat. Prod. Sci.* **16**: 26-31.
 27. Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. (2012) Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 337-342.
 28. Lee, M. Y., Yoo, M. S., Whang, Y. J., Jin, Y. J., Hong, M. H. and Pyo, Y. H. (2012) Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 540-544.
 29. 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.
 30. Wynn, T. A., Chawla, A. and Pollard, J. W. (2013) Macrophage biology in development homeostasis and disease. *Nature* **496**: 445-455.
 31. Cianchi, F., Perna, F. and Masini, E. (2005) iNOS/COX-2 pathway interaction: A good molecular target for cancer treatment. *Current Enzyme Inhibition* **1**: 97-105.
 32. Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S. and Salvenimi, D. (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological Reviews* **57**: 217-252.
 33. Park, H. Y., Choi, Y. H. and Choi, E. A. (2011) Anti-inflammatory effects of sarijang in lipopolysaccharide-activated BV2 microglial cells. *Cancer Prev. Res.* **16**: 348-357.
- (2018. 11. 28 접수; 2018. 12. 13 심사;
2018. 12. 17 게재확정)