

## 황금작약탕(黃芩芍藥湯)을 함유하는 정제 개발과 성분분석 및 약리효능 평가

김세진 · 이지범 · 최혜민 · 이하영 · 김민주 · 이미화 · 김정옥 · 이화동\*  
한약진흥재단

### Evaluation on Pharmacological Effects and Component Analysis of Hwanggeumjakyak-tang Formulation for Tablet

Se-Jin Kim, Ji-Beom Lee, Hye-Min Choi, Ha-Yeong Lee, Min-Ju Kim, Mi-Hwa Lee,  
Jung-Ok Kim, and Hwa-Dong Lee\*

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

**Abstract** – Hwanggeumjakyak-tang (HJT) composed of *Scatellaria baicalensis* Georgi, *Paeonia Lactiflora* and *Glycyrrhizae uralensis* Fischer is a traditional Korean herbal medicine widely used for acute enteritis. In order to develop the tablet formulation of HJT, evaluation of the flow properties, thickness, diameter, hardness, friability and disintegration was carried out on four HJT granules according to mixed content of seven additives. Simultaneous analysis used HPLC method was performed of HJT tablet and was determined of the seven marker components; Albiflorin, Paeoniflorin, Liquiritin, Baicalin, Baicalein, Glycyrrhizic acid and Wogonin. The biological activities were examined the effect of HJT on anti-oxidation and pro-inflammation mediated by LPS-stimulation. We confirmed that both of HJT-Decoction (HJT-D) and HJT-Formulation (HJT-F) have the similar contents on total polyphenol and flavonoid and inhibited the secretion of nitro oxide (NO), interleukin (IL)-1 $\beta$ , interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and the expression of nitric oxide synthase (iNOS), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . Therefore, the developed formulation for tablet of HJT would provide chemically and biologically the same effect compared with decoction of HJT.

**Keywords** – Hwanggeumjakyak-tang, Tablets, Flow properties, Simultaneous analysis, Anti-inflammation

한약제제는 한방원리에 따라 한약재를 원료로 배합하여 제조한 의약품이다. 대체의학에 대한 투자와 연구 수요가 전세계적으로 확대됨으로써 한약에 대한 관심이 증가함에 따라 안정성과 보관, 섭취 등에 있어 한약의 한계를 개선하기 위한 연구가 요구되고 있고, 일반적으로 환제, 산제, 과립제, 정제, 연조엑스제 등과 그 외에도 특수적인 발포제, 캡슐제 등의 여러가지 현대적 제형 연구가 이루어지고 있으며, 이와 더불어 이들 약제들의 함량 표준화에 대한 요구가 지속되고 있다.<sup>1-3)</sup> 중약의 경우 중약외용제, 비강투여제, 적환제, 당제, 서방제, 외용침부제, 경피제제, 점안액제, 구강붕해정, 환제 등 현대적 제형에 대해 비교적 많은 연구와

더불어 전통중약의 세계화를 위한 부작용에 대한 연구도 많이 이루어지고 있는 반면, 국내에는 정제와 연조엑스제에 대한 건강보험 등의 적용을 통해 다양한 제형의 한약제제 개발을 촉진하고 있으나 한약에 대한 관심과 선호도에 비해 연구가 부족하고 시대 분위기를 따라가지 못하고 있다는 지적을 받고 있다.<sup>4)</sup>

황금작약탕은 중국 고서인 상한론에 처음 기록된 이래로 1,700년 동안 사용해 왔고, 동의보감에 따르면 급성, 만성 장염, 급성 이질 등에 사용하여 왔다고 알려져 있다.<sup>5)</sup> 황금작약탕은 3가지 구성 약재, 즉 황금과 작약, 감초로 구성되어 있다. 황금(*Scatellaria baicalensis* Georgi)은 NO, iNOS, COX2, PGE<sub>2</sub>, NF- $\kappa$ B, 염증성 사이토카인 생성, MAPK 신호분자의 발현 등을 억제함으로써 항염증 효과가 있고, 작약(*Paeonia Lactiflora*)은 toll-like receptor(TLR) 매개성 염

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

증효과를 가지고 있으며, 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)의 생물 활성 성분인 triterpenes, flavonoid, polysaccharide 중에서 3가지의 triterpenes과 13가지의 flavonoid가 TNF- $\alpha$ 와 MMPs, PGEs, 자유 라디칼의 감소를 유도해 항염증 효과가 있음을 보고하였다.<sup>6-9)</sup> 또한 이들로 구성된 황금작약탕의 항균효과와 항염증효과 등에 대한 효능연구가 보고되었다. 병원감염을 일으키는 가장 흔한 균으로 알려진 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 중에서 항생제 내성을 가진 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)의 치료에 있어 후보 물질이 될 수 있음을 검증하였고,<sup>5)</sup> lpolysaccharide(LPS)로 자극된 RAW264.7 세포주에서 NO와 여러종류의 염증성 사이토카인(cytokine)의 생성 및 항염증 기전에 대한 연구를 보고한 바 있다.<sup>6)</sup>

이와 같이 한약에 대한 약리효과에 대한 연구는 많이 이루어졌으나, 현대적인 제형으로의 제형개선 연구는 매우 적으며, 일부 제제연구는 전탕액과 시판제제와의 약리적, 화학적 동등성 연구가 대부분이다.<sup>10-13)</sup> 이에 본 연구는 황금작약탕의 정제로 제형변화를 실시하여 보관이 용이하고, 복약순응도가 높은 현대적인 제형에 대한 연구를 실시하였고, 동시분석법 확립을 통해 개선된 황금작약탕 정제의 품질관리 방법을 확보하였으며, 항산화, 항염증 실험을 통하여 약효 동등성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 실험에 사용된 황금작약탕의 구성 한약재인 황금, 작약, 감초는 (주)휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 구입하여 전문가의 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 약재들의 표본은 한약진흥재단 한약제제팀의 한약재보관실에 보관하였다.

**시약 및 기기** - 정제 제조를 위한 첨가물은 microcrystalline cellulose(Avicel 101 and Ludipress)와 magnesium stearate, VIVASOL, SiO<sub>2</sub>, lactose, starch로 (주)화원약품(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 동시분석을 위한 7가지 표준품인 baicalin, baicalein, liquiritin 및 glycyrrhizic acid는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, albiflorin과 paeoniflorin은 ChemFace(Wuhan, China)에서, wogonin은 식품의약품안전처(Osong, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 각 표준물질은 95.0% 이상의 순도를 가

진 제품으로 사용하였다. 시료 전처리와 HPLC 분석에 사용한 methanol, acetonitrile은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. HPLC system은 Dionex-300 system(DIONEX, CA, USA)를 사용하였고, YMC C18(5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼으로 분리하였다.

세포배양을 위해 fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), penicillin-streptomycin, phosphate buffered saline(PBS)는 Hyclone(USA), lipopolysaccharide(LPS), Griess reagent, ethanol, chloroform, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)은 Sigma-Aldrich(USA), MTS reagent와 agarose는 Promega(USA), TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ , IL-6에 대한 Enzyme-Linked Immunosorbent assay(ELISA) kit는 R&D System(USA)에서 구입하여 사용하였다.

단백질 분석을 위해 사용한 1차 항체인 iNOS는 BD Bioscience(USA),  $\beta$ -actin과 2차 항체인 goat anti-Mouse IgG-HRP는 Santa Cruze(USA)에서 구입하였다. Total RNA extraction을 위해 사용한 RNAiso는 TaKaRa(Japan)에서, cDNA 합성과 PCR에 사용한 모든 시약은 Intron(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

**황금작약탕 전탕액 및 단미엑스산 제조** - 황금작약탕 전탕액(이하 HJT-D)은 Table I과 같이 각 약재별로 칭량한 뒤 혼합하여 약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 동안 추출한 뒤 진공건조하였다.

단미엑스산은 구성약재 별로 각각 칭량한 후 각 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 동안 개별 추출한 후 적정 농도로 농축한 뒤, 진공건조하여 단미건조엑스산을 얻었다. 건조된 각각의 단미건조엑스산을 대한민국의약전의 한약(생약) 규격집(KHP, The Korean Herbal Pharmacopoeia) 기준에 따라 혼합하여 사용하였다.

**황금작약탕 정제 제조** - 황금작약탕 정제(이하 HJT-F) 조제에 앞서 황금작약탕 단미건조엑스와 첨가제들을 Table II의 비율에 따라 혼합하였다. 황금작약탕 단미건조엑스제와 첨가제들은 40 mesh sieve로 체과하여 입도를 균일화시켰으며, 각각의 배합비율에 따라 칭량한 후 플라스틱 백에서 혼합하였다. 첨가제로 사용된 부형제로는 미결정셀룰로오스인 Avicel 101 및 Ludipress와 이산화규소(SiO<sub>2</sub>)가 혼합된 Prosolve를, 붕해제로는 Croscamellose sodium을, 유동성 개선제로는 Aerosil® 200을 사용하였다. 그런 다음 혼합물에

**Table I.** Composition of Hwanggeumjackyak-Tang (HJT)

Name	Amount (g)	Source
<i>Scatellaria baicalensis</i> Georgi	2.50	Heilongjiang, China
<i>Paeonia Lactiflora</i>	2.50	Anhui, China
<i>Glycyrrhizae uralensis</i> Fischer	1.25	Xinjiang, China
Total amount	6.25	

**Table II.** Composition contents of pre-formulation of HJT

Ingredients	F1		F2		F3		F4	
	Ratio (%)	Weight (mg)	Ratio (%)	Weight (mg)	Ratio (%)	Weight (mg)	Ratio (%)	Weight (mg)
HGJYT powder	85.0	1343	85	1343	85	1343	85	1343
Avicel 101	6.0	95	6.0	95	-	-	-	-
Lactose			-	-	12	190	6.0	0.095
Ludipress			6.0	95	-	-	-	-
Starch	6.0	95	-	-	-	-	6.0	0.095
Vivasol	2.0	31	2.0	31	2.0	31	2.0	0.031
SiO <sub>2</sub>	0.5	8	0.5	8	0.5	8	0.5	0.008
Magnesium stearate	0.5	8	0.5	8	0.5	8	0.5	0.008
	100.0	1580	100	1580	100.0	1580	100.0	1580

다시 Magnesium stearate(M.g.)를 칭량하여 플라스틱 백에서 다시 균일하게 혼합한 뒤 정제 제조에 사용되었다. HJT-F는 혼합된 황금작약탕 단미건조엑스제와 첨가제들을 직접 타정법을 통해 제조하였다. 혼합물들을 단발타정기(TRB 16, Ereweka, Germany)를 사용하여 추가적인 과정 없이 바로 타정하였다. 제조 후 정제는 데시케이터에 보관하였다.

**물성평가** - 황금작약탕 단미건조엑스제와 첨가제들의 혼합물의 물성평가를 위해 겉보기 밀도(Bulk density)와 탭 밀도(Tap density)를 측정하였고 이를 이용하여 흐름성을 평가하였다. 겉보기 밀도는 혼합물을 메스실린더에 넣어 부피측정으로, 탭 밀도는 혼합물이 들어있는 메스실린더를 200회 tapping한 후 측정하여 아래의 수식에 의해 값을 구하였고 그 측정값으로 Hausner ration 값을 구하여 흐름성을 평가하였다.

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

$$\text{Tapped density}(\rho_{\text{tapped}}) = \frac{\text{Sample weight}(M)}{\text{Final tapped volume}(V_0)}$$

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

HJT-F의 물성평가는 정제의 무게, 지름, 두께, 경도는 Hardness Tester(TBH 325, Ereweka, Germany)로 측정되었으며, 이때 모든 평가는 3회 측정값의 평균으로 계산되었다. 붕해도 시험은 Disintegration Tester(Disintegration 3100, DISTEK, USA)를 사용하여 37±0.5°C의 정제수에서 시험하였고, 붕해시간은 검체의 잔여물이 유리관 안에 존재하지 않거나 남아있더라도 원형을 나타내지 않는 연질의 물질이 존재할 때까지의 시간으로 하였다. 마손도는 10개의 정제를 Friability Tester(TAR 120, Ereweka, Germany)에서 25 rpm으로 4분동안 회전시킨 후, 손실된 무게를 측정하여 다음의

수식으로 계산하였다.

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

**동시 분석** - 7종의 표준물질은 methanol(이하 MeOH)에 1 mg/mL의 농도로 조제하여 4°C에 보관하였고, 각 표준물질을 혼합하여 100 µg/mL 농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. HJT-D 시료 및 HJT-F를 393 mg으로 측정한 후 50% MeOH을 첨가하여 10 mL로 맞추어 0.2 µm membrane에 여과 후 검액으로 사용하였다. 분석을 위하여 유속은 1.0 mL/min으로 흘려주었고 주입량은 10 µL였다. 이동상은 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(A)가 함유된 H<sub>2</sub>O와 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>가 함유된 Acetonitrile(B)를 사용하여 단계적 또는 농도기울기적으로 흘려주었고 검출 파장은 230 nm에서 검출하였다. 농도 기울기조건은 (A)/(B)=85/15(0 min) → (A)/(B)=80/20(20 min) → (A)/(B)=70/30(32 min) → (A)/(B)=60/40(55 min) → (A)/(B)=40/60(75 min) → (A)/(B)=10/90(76 min) → (A)/(B)=10/90(80 min)으로 흘려주었다.

**시료 조제** - 효능 실험을 위하여 HJT-D과 HJT-F는 100 mg으로 정확히 측정된 후 50% DMSO에 넣어 1 mL로 맞추어 0.2 µm membrane 여과 후 사용하였다.

**DPPH Radical 소거능 측정** - DPPH(1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich, USA) radical 소거능 측정엔 Biosis의 방법을 변형하여 측정하였다.<sup>14)</sup> 각 시료를 100, 200, 500, 1000 µg/mL로 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.

**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.<sup>15)</sup> 표준물질로는 tannic acid(Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였다. 플라보노이드 함량은 Singleton VL 등의 방법<sup>16)</sup>을 변형하여 측정하였고, 표준물질로 quercetin(Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였다.

**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 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^3$  cell/well로 분주하고, HJT-D와 HJT-F를 2배수 희석법으로 희석하여 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, MTS reagent를 20  $\mu$ 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(Mouse macrophage cell line) 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하였고, 세포 배양을 위해 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

**NO 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  분비량 측정** - RAW 264.7 세포주를 12 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well로 분주하고 HJT-D와 HJT-F를 50, 100, 200  $\mu$ g/mL로 2시간 전처리를 하였다. 이후 LPS를 100 ng/mL로 처리한 후 24시간 동안 배양하고 배양 상층액을 취해 각 실험에 사용하고 세포는 cell extraction을 위하여 사용하였다. NO 측정을 위해서 배양액 100  $\mu$ L에 동량의 Griess reagent(Sigma, USA)를 넣고 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Tecan Infinite M200)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 standard curve와 비교해 계산하였다. 사이토카인 분비 측정을 위해 ELISA kit를 사용하였고, 제조사의 방법에 따라 그 양을 측정하였다. 양성 대조군으로 Dexamethasone을 사용하였다.

**Immunoblot Assay** - HJT-D와 HJT-F2로 처리한 RAW 264.7 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 10분 동안 ice에 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  $\mu$ g의 lysate를 8-12% gel을 사용하여 SDS-PAGE system으로 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,  $\beta$ -actin 등 primary antibody는 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 1 $\times$ PBS-T로 세 번 세척하고, secondary antibody는 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 1 $\times$ PBS-T로 세 번 세척하고 ECL 기질로 발색시킨 후 ChemiDoc-It Imaging System(UVP, Canada)로 감광하였다.

**RT-PCR Assay** - RNA 분리를 위해 RAW 264.7 세포는 12 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/mL 세포로 분주한 다음, 세포에 HJT-D와 HJT-F를 50, 100, 200  $\mu$ g/mL씩 처리한 후, LPS로 처리하고 RNAiso reagent를 이용해 제조사의 방법에 따라 total RNA를 취하였다. Total RNA는 Maxime RT PreMix Kit(iNtRON, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 유전자 증폭을 위해 특정 primer를 넣고 각 primer에 따른 PCR 조건에 따라 실시하였다. 이때 iNOS(F: 5'-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3', R: 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3')와 IL-6(F: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', R: 5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-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- $\alpha$ (F: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTC-3', R: 5'-ACATTGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3')는 94°C에서 1분, 55°C에서 20초, 72°C에서 30초 동안 35 cycle로, GAPDH(F: 5'-CAACTCCACTCTCCACCT-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.

**통계처리** - 모든 실험결과는 「평균 $\pm$ 표준편차」로 나타내었으며, 유의성 검사는 one way ANOVA test를 실시한 후 Turkey test로 사후 검증하였다. P<0.05 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

**황금작약탕 정제 제조 및 물성평가** - 황금작약탕(HJT) 정제 제조를 위하여 Table II의 비율로 배합한 혼합물들의 기초 물성을 측정된 값을 Table III에 나타냈다. 각 HJT 혼합물의 흐름성을 길보기 밀도, 탭 밀도를 측정하여 Hausner ratio에 의해 평가하였다. 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), Very very poor(>1.60)의 총 7개 등급으로 나누어 흐름성을 평가하였고, HJT-F1, F2, F3 및 F4 혼합물의 Hausner ratio 값은 각

**Table III.** Flow characteristics of HJT tablets

Parameter	F1	F2	F3	F4
Bulk density	0.745	0.712	0.695	0.748
Tapped Density	0.865	0.726	0.813	0.935
Hausner ratio	1.16	1.02	1.17	1.25
Flow character	Good	Excellent	Good	Fair

**Table IV.** Post-compression parameters of the HJT tablets

Parameter	F1	F2	F3	F4
Weight variation (mg)	790	790	790	790
Diameter (mm)	13.9	13.9	13.9	13.9
Thickness (mm)	7.05	6.93	7.05	6.94
Hardness (KP)	17.61	19.93	14.93	14.76
Friability (%)	0.15	0.14	0.42	0.30
Disintegration (min)	< 20	< 17	< 20	< 22

각 1.16, 1.02, 1.07, 1.25로 확인하였고, 그 중 HJT-F2의 흐름성이 Excellent로 가장 좋은 것으로 나타났다. 4가지 혼합물을 대상으로 타정한 각 정제의 물성평가 결과는 Table IV와 같이 나타났다. HJT-F1과 F2는 경도는 17.61, 19.93 KP로 15이상의 값을 보였고, 마손도 역시 0.15, 0.14%로 나타나 좋은 결과를 보였다. 상대적으로 HJT-F3과 F4는 14.93, 14.76 KP의 경도값을 나타냈으며, 마손도는 0.42, 0.30%를 나타내며, F1과 F2에 비해 낮은 결과를 보였다. 붕해도 결과에서 HJT-F2는 완전히 붕해되기까지 17분 이내의 시간이 소요되었지만, 나머지 HJT-F1, F3, F4는 20분 이상의 시간이 소요되는 것을 확인하여 흐름성뿐만 아니라 경도와 마손도, 붕해도에서 모두 뛰어난 결과를 보인 HJT-F2를 이후 실험의 시제품으로 사용하였다.

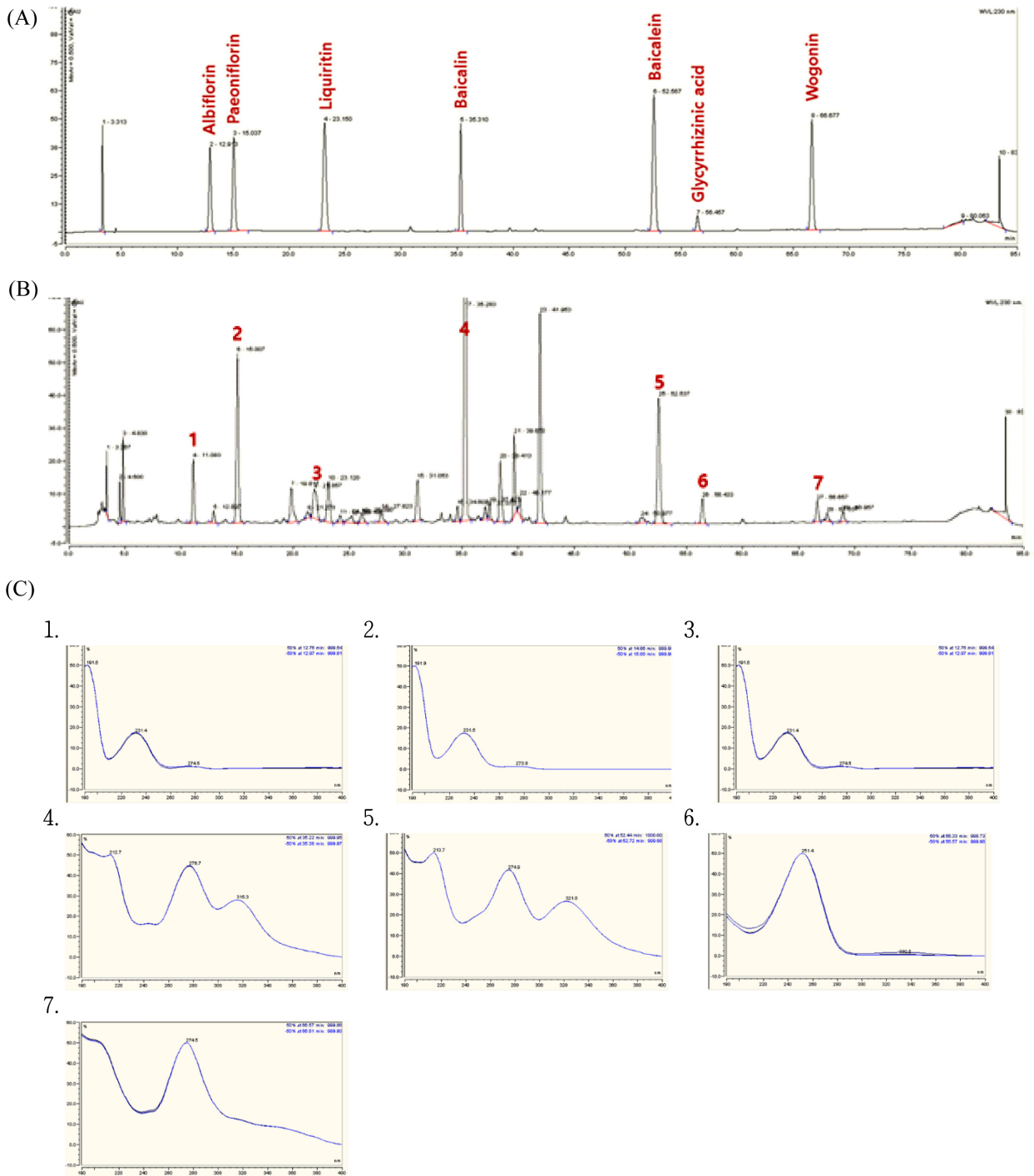
**황금작약탕 분석조건 확립** - HPLC-PDA를 이용하여 용매의 구성 및 검출 파장에 대한 분석 조건을 검토하여 HJT-F2를 구성하는 3종의 한약재 중 황금의 baicalin, baicalein 및 wogonin, 작약의 paeoniflorin, albiflorin 및 감초의 glycyrrhizic acid, liquiritin 등 7종 표준물질에 대한 동시분석법을 확립하였다(Fig. 1). 이동상인 water와 acetonitrile에 0.05% phosphoric acid를 첨가함으로써 분리능을 높였다. 각 표준물질의 최대 UV spectrum 탐색 결과, 최대 UV 흡수 파장이 paeoniflorin, albiflorin, liquiritin은 230 nm, glycyrrhizic acid는 250 nm, baicalin, baicalein, wogonin은 275 nm로 측정되었으며 전반적으로 가장 적절한 230 nm로 검출기 파장을 설정하였다. HJT-F2에 대한 본 연구의 동시분석법을 적용하여 분석한 결과, HJT-F에서 표준물질 피크가 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, baicalin, baicalein, glycyrrhizic acid 및 wogonin의 순으로 검출되었다. HJT-F와 표준액 7종 피크의 UV spectrum 탐색 결과, 모두 동일 스펙트럼으로 각

기 다른 성분들의 피크에 간섭 없이 분리되었다.

**황금작약탕 전탕액과 정제의 항산화 효과 평가** - DPPH 라디칼 소거능을 통해 항산화능을 확인하였고 항산화 물질인 polyphenol과 flavonoid 함량을 비교하였다. 라디칼 소거능은 HJT-D과 HJT-F2의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였고, 시료농도 1000 µg/mL에서 HJT-D은 89.4%, HJT-F2은 95.2%로 대조군인 Butylated hydroxyanisole (BHA) 100 µg/mL과 유사한 값을 나타냈다(Fig. 2). 또한 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량에 있어 HJT-D은 304.70±3.52 µg/mg와 635.45±17.17 µg/mg, HJT-F2는 310.10±6.25 µg/mg와 822.80±39.48 µg/mg으로 측정되었다(Table V).

**황금작약탕 전탕액과 정제의 세포독성 평가** - RAW 264.7 cell에 대한 HJT-D와 HJT-F2의 독성을 확인한 결과, 두 시료에서 모두 1000 µg/mL 농도에서 독성이 나타나지 않았고, 따라서 1000 µg/mL 이하의 농도에서 유효활성을 나타내는 낮은 농도를 실험농도로 결정하여 실험에 진행하였다(Fig. 3).

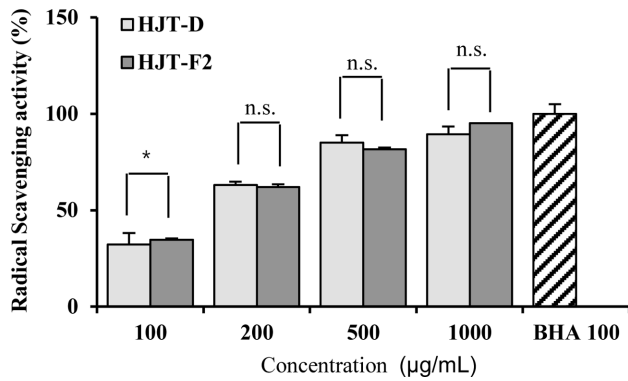
**NO 생성과 iNOS 발현 억제능 비교** - 대식세포에서 TLR과 반응하는 LPS는 iNOS 발현을 유도하고 NO의 합성을 촉진하므로 RAW 264.7 cell에 약물을 처리하고 LPS를 처리하여 약물의 농도의존적으로 NO 생성과 iNOS 발현의 억제능을 확인하였다. Fig. 3(A)에서 나타나는 것과 같이 HJT-D와 HJT-F2는 농도의존적으로 NO의 생성은 감소하였고, 200 µg/mL에서 HJT-D은 81.7%, HJT-F2는 81.4%의 감소를 보였으며, 이것은 DEX가 33%의 억제력을 나타낸 것보다 높은 수치였다. 또한 NO 생성과 유사한 양상으로 NO 합성 효소인 iNOS의 mRNA와 단백질 발현에서도 농도의존적인 감소양상을 보였다(Fig. 4(B)). NO생성과 iNOS 발현에 있어 HJT-D와 HJT-F2는 동등함을 확인하였다.



**Fig. 1.** Simultaneous analysis used HPLC method. (A) Standard mixture and (B) HJT-F2 are HPLC chromatogram. (C) Identification of components used to compare with UV spectrum of standard mixture and HJT-F2; 1. Albiflorin, 2. Paeoniflorin, 3. Liquiritin, 4. Baicalin, 5. Baicalein, 6. Glycyrrhizic acid, 7. Wogonin

**염증성 사이토카인의 유전자 발현과 생성 억제능 비교** - 항염증 사이토카인 중 대표 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ , IL-6에 대한 유전자 발현과 생성 억제 효과를 확인하였다 (Fig. 5). RAW 264.7 cell에 LPS 처리 후, HJT-D와 HJT-F2

모두 농도의존적으로 사이토카인 분비를 감소시키는 경향이 나타났다. TNF- $\alpha$ 는 HJT-D의 경우 100  $\mu$ g/mL에서 사이토카인의 분비가 급격히 감소하고 HJT-F2는 50  $\mu$ g/mL에서 사이토카인 분비가 급격히 감소하였다(Fig. 5A). 유전자 발

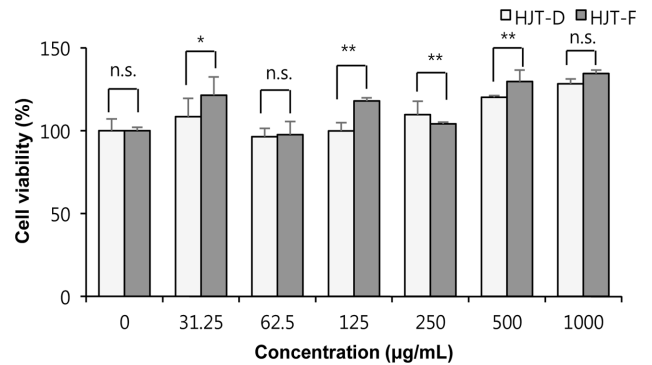


**Fig. 2.** DPPH free radical scavenging effect according to formulation of HJT. Data was expressed as the mean ± SEM of three experiments. \*: significantly different from HJT-D and HJT-F2,  $p < 0.05$ . n.s.: not significant.

**Table V.** Content of Total Polyphenol and Flavonoid in HJT Formulation

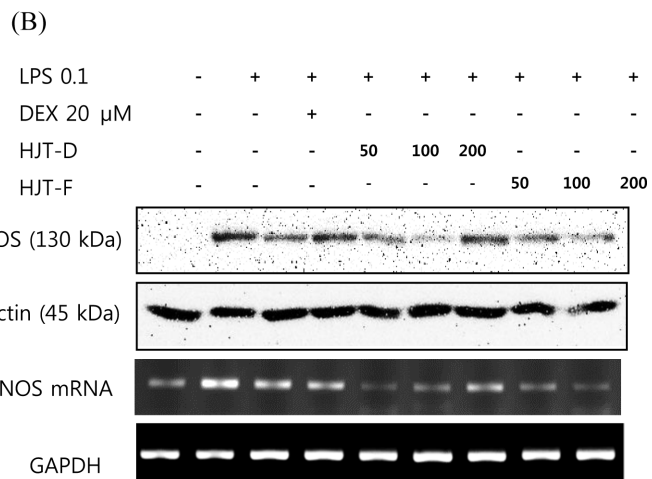
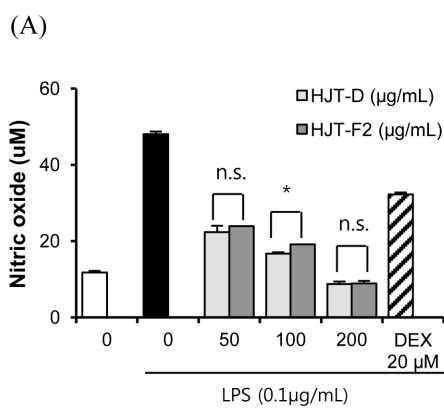
Formulation	Polyphenol (µg/mg)	Flavonoid (µg/mg)
HJT-D	304.70 ± 3.52	635.45 ± 17.17
HJT-F2	310.10 ± 6.25	822.80 ± 39.48

현 역시 HJT-F2가 HJT-D과 비교하여 더 낮은 농도에서 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 5B). IL-1β의 경우 HJT-D은 200 µg/mL에서 사이토카인 분비 억제를 나타내는 반면, HJT-F2는 100 µg/mL에서 사이토카인 분비 억제를 보이고 200 µg/

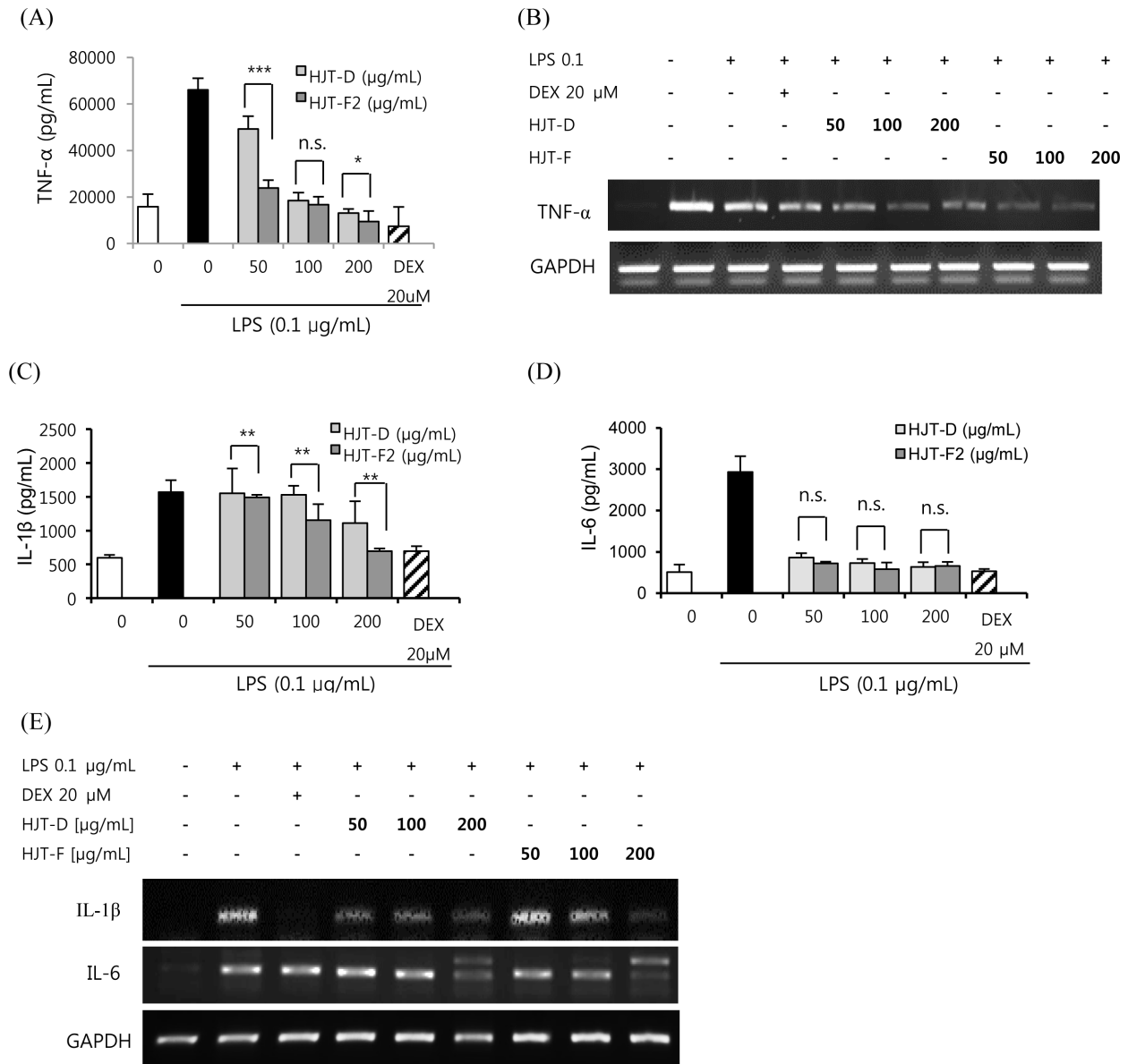


**Fig. 3.** Effect of HJT-D and HJT-F on RAW 264.7 cell viability. The macrophages were treated with various concentration (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) of HJT-D and HJT-F for 24 hrs. Cell viability was measured using MTT assay. \*: significantly different from HJT-D and HJT-F2,  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ . n.s.: not significant.

mL에서 대조군인 DEX와 유사하게 강한 억제능이 나타났다. IL-1β의 유전자 발현 확인결과 200 µg/mL에서 강한 억제능이 나타났고, HJT-D가 HJT-F2보다 더 낮은 농도에서 유전자 발현 억제능이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 5D, E). IL-6의 경우 사이토카인 분비에 있어서 HJT-D과 HJT-F2 모두 실험 최저 농도인 50 µg/mL에서 대조군인 DEX와 유사하게 강한 억제능이 나타나고, 유전자 발현은 200 µg/mL에서 강한 억제능이 나타남을 확인하였다(Fig. 5C, E).



**Fig. 4.** Inhibition of NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells by HJT-D and F. (A) Cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were treated with various concentrations (50, 100, 200 µg/mL) of HJT-D and F for 1 hr, and then incubated with LPS (0.1 µg/mL) for 24 hrs. The culture supernatant was analyzed nitrite production. Data was expressed as the mean ± SEM of three experiments. \*: significantly different from HJT-D and HJT-F2,  $p < 0.05$ . n.s.: not significant. (B) The cells were analyzed by Immunoblot assay and RT-PCR for protein and mRNA of iNOS. For immunoblot of iNOS, the cells were pretreated with HJT-D and HJT-F (50, 100, 200 µg/mL) for 1 hrs and treated with LPS for 24 hrs. For RT-PCR, the cells were pretreated with HJT-D and HJT-F for 1 hrs, and treated with LPS for 4 hrs.



**Fig. 5.** Inhibition of inflammatory cytokine in RAW264.7 with HJT-D and HJT-F. There were decreased (A) the secretion of cytokine, (B) the expression of mRNA of TNF-α and (C, D) the secretion of cytokine, the expression of mRNA of IL-1β, IL-6. The cell was pretreated with HJT-D, HJT-F for 1hrs before being induced inflammation with LPS for (B) 2hrs, (A, E) 6hrs and (C, D) 24hrs. \*: significantly different from HJT-D and HJT-F2,  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ . n.s.: not significant.

### 고찰

한약제제는 처방에 따른 구성약재를 배합, 추출하는 방법에 따라 전탕액과 이를 가공, 건조하여 산제 또는 과립제로 만들거나, 최근 대한민국의약품(생약) 규정집 의약품 각 조 3부에 수록된 각 처방의 구성약재 비율로 제조하여 각 구성 단미엑스산 기준에 따라 건조엑스를 혼합한 혼합단미엑스제로 정제, 연조엑스제 등 여러 제형의 변화를 시도하고 있다<sup>3)</sup>. 제조방법에 따라 성분 함량과 효능의 동등성에

대한 연구들이 이루어지고 그 결과 함량과 효능의 차이가 있음을 보고하고 있다.<sup>4,12,13,17)</sup> 또한 한약제제에 대한 인식 조사 결과 부형제와 복용량으로 인한 문제와 약효에 대한 불신이 있음을 보고하였다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는 이러한 문제를 해결하고자 부형제의 함량을 줄이고 순도도가 높은 제형의 개발과 품질확보 및 효능의 동등성을 확인하고자 하였다. 제형 개발을 위해서 겔보기 밀도, 탭 밀도 등을 측정하여 흐름성을 판정하고 타정한 정제를 이용하여 경도, 미손도, 붕해도 등의 확인을 통해 물



성평가를 한 결과, Hausner ratio 값이 HJT-F1과 F2는 1.16, 1.02로 F3와 F4의 1.17, 1.25보다 비교적 흐름성이 좋았고 그 중 F2는 Excellent였으며, 물성평가에 있어서 HJT-F2가 높은 경도와 가장 빠른 붕해도를 나타내어 최종적 선택이 되었다. 결합제로 사용한 미결정셀룰로오스인 Avicel 101은 Battista & Smith에 의해 1955년에 처음 발견되었고 1964년 이후 약 50년 이상 제약산업에서 direct compression으로 주로 사용되어 온 결합제<sup>18)</sup>로 wood에서 유래된 cellulose chain의 구조적 특성과 높은 입자 안 공극을 가짐으로 인한 swelling과 붕해도에 영향을 미치는 것<sup>18)</sup>으로 이를 첨가한 HJT-F1과 HJT-F2가 상대적으로 높은 경도값을 가지고, 흐름성이 좋은 것으로 사료된다.

제제연구를 통해 제형의 변화를 가져온 황금작약탕의 품질검사를 위해 7종 표준물질에 대해 HPLC-DAD를 통한 최적의 동시분석법을 확립하고자 하였다. HJT-F2의 동시분석법을 적용하여 HJT-F2의 7가지 생리활성 물질인 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, baicalin, baicalein, glycyrrhizic acid 및 wogonin을 시료 내 다른 성분에 영향을 받지 않으면서 동시에 효과적으로 분석이 가능함을 보여주었다. 이는 제형 개발한 HJT-F2에 대하여 기존의 표준물질들에 대한 개별적인 분석법보다 효율적인 품질관리방안에 대한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

생물학적 동등성을 확인하기 위해 항산화, 항염증 효능 평가를 진행하였다. 인체는 다양한 항산화 효소와 산화물질을 제거 혹은 중화시키는 방어 시스템을 갖추고 있지만 세균이나 외부 침입으로 유해한 환경 등에 노출되었을 때 방어시스템이 무너져 불균형이 발생하고 과도한 산화를 일으켜 질병의 직간접적인 요인이 될 수 있다.<sup>19-20)</sup> 황금의 flavonoid는 항암효과, 신경보호 효과, Cytochrome P4501A1/1B1의 유전자 조절 등을 한다는 보고가 있으며 항산화와 관련된 많은 연구들이 이루어져 있다.<sup>21-24)</sup> HJT-D와 HJT-F2의 라디칼 소거능은 시료 1000 µg/mL에서 HJT-D는 89.4%, HJT-F2는 95.2%으로 높은 효능을 나타냈고, HJT-F2의 효능이 다소 높은 편으로 확인되었다. 이는 폐놀계 화합물의 총칭으로 불리는 폴리페놀의 함량은 HJT-D와 HJT-F2에서 유사한 값을 나타냈으나 폴리페놀의 성분 중 하나인 flavonoid의 함량이 HJT-F2가 HJT-D보다 1.3배 높은 값을 나타낸 것에 영향을 받은 것으로 사료된다.<sup>25,26)</sup> Kim 등의 보고<sup>6)</sup>에 따르면 황금작약탕 물 추출물은 LPS에 의해 유도된 NO, PGE2, IL-6의 생성 및 iNOS, COX-2의 발현을 강하게 억제하는 효과를 가지고 있다. 이와 동일하게 HJT-D 및 HJT-F2의 항염증 효능을 확인한 결과 NO 분비가 대조군으로 사용한 Dexamethasone보다 높은 억제효능을 나타냈으며, IL-6 분비 또한 Dexamethasone보다 높은 효과를 나타냄을 확인하였다. TNF-α와 IL-1β 분비와 발현 억제능을 살펴본 결과 실험최고농도인 200 µg/mL에서 HJT-F2는

Dexamethasone과 유사한 효능을 나타내는 것으로 확인되었다.

갈근탕, 삼출건비탕, 오적산 및 황련해독탕 등 시판 한약 제제의 검증에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으며, 그 결과 시판제제의 성분함량과 효능이 전탕액에 미치지 못하거나 시판제제 간에 차이가 나는 것으로 확인되었다.<sup>12-13,27-28)</sup> 한약제제는 제조사마다 사용하는 원료, 추출법, 제형화 등의 제조방식의 차이가 있어 전탕액과의 동등성 및 제제의 품질에 대한 논란이 빈번하게 제기되어 왔다. 본 연구 결과, 한약제제에 대한 제조방법의 연구와 표준화 연구, 품질관리 등의 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

1. 부형제의 함량을 줄이고 순응도가 높은 제형 개발을 위하여 겔보기 밀도, 탭 밀도 등을 측정하여 흐름성을 판정하고, 경도, 마손도, 붕해도 등의 확인을 통해 물성평가를 하여 높은 경도와 가장 빠른 붕해도를 나타낸 제형을 선정하였다.
2. 황금작약탕 정제의 품질검사를 위해 HPLC-DAD를 통한 황금작약탕의 7가지 생리활성물질인 albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, baicalin, baicalein, glycyrrhizic acid, wogonin의 동시분석법을 확립하였다.
3. 항산화 실험결과 HJT-D와 HJT-F2 모두 높은 효능을 나타냈고, HJT-F2의 라디칼 소거능과 flavonoid 함량이 비교적 높았지만 유의적 차이는 보이지 않았다.
4. 항염증 실험에서 NO와 IL-6 분비 및 발현이 Dexamethasone과 비교하여 높은 효능을 나타냈고, TNF-α와 IL-1β의 분비 및 발현에서는 Dexamethasone과 비교하여 미미한 효능이지만 농도의존적 억제효능을 나타냈다. 황금작약탕 전탕액과 개발제형의 효능비교 결과, 일부 활성평가와 실험농도에서의 개발제형의 효능이 비교적 높게 나타났으나, 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 보건복지부 한의약산업육성 기반구축사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Pharmaceutical Affaris Law. Korea ministry of government legislation. Retrieved Nov. 2. (2013) From <http://www.law.go.kr/main.html>.
2. Park, S. J., Kim, S. H., Kim, K. S., Kim, H. S., Lee, AY, Kim, H. K. and Kim, Y. K. (2014) A quantitative analysis of marker compounds in single herb extracts by the standard of

- KHP. *Kor. J. Herbology* **29**: 35-42.
3. Lee, J. B. (2016) Evaluation on pharmacological effects and compound contents of Hwangryunhaedok-tang formulation for tablet. *Ph. D. Thesis*, 1-74, *Yeungnam Univ.*
  4. Choi, S. I., Ahn, E. J. and Lee, M. Y. (2016) Research trend for the formulation of traditional Chinese medicine. *Kor Herb. Med. Inf.* **4**: 11-19.
  5. Kim, E., Choi, C., Kim, I., Lee, H. and Song, Y. (2013) Anti-bacterial effect of Huanggeumjakyak-tang against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *J. Korean Med. Rehab.* **23**: 15-26.
  6. Kim, M. R., Kang, O. H., Kim, S. B., Kang, H. J., Kim, J. E., Hwang, H. C., Kim, I. W. and Kwon, D. Y. (2013) The study of anti-inflammatory effect of Hwanggeumjakyak-tang extract in RAW 264.7 macrophage. *Kor. J. Herbology* **28**: 43-50.
  7. Kim, E. H., Shim, B., Kang, S., Jeong, G., Lee, J. S., Yu, Y. B. and Chun, M. (2009) Anti-inflammatory effects of Scutellaria baicalensis extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J. Ethnopharmacol.* **126**: 320-321.
  8. Zhang, T., Zhu, Q., Shao, Y., Wang, K. and Wu, Y. (2017) Paeoniflorin prevents TLR2/4-mediated inflammation in type 2 diabetic nephropathy. *BioScience Trends* **11**: 308-318.
  9. Yang, R., Yuan, B. C., Ma, Y. S., Zhou, S. and Liu, Y. (2017) The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. *Pharm. Biol.* **55**: 5-18.
  10. Jee, E. H., Kim, H. J., Jeong, S. H., Moon, J. H. and Jang, Y. P. (2010) Assessment of quality variance among commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang by simultaneous analysis of characterizing compounds. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 161-165.
  11. Eom, S. K., Kim, S. H., Kim, K. S., Park, S. J., Eo, W. K. and Choi, W. C. (2010) A proposal for research process of botanical drug based clinical traditional Korean medicine-historical evidence-based medicine II. *J. Ori. Med. Classic* **23**: 63-102.
  12. Kim, Y., Kim, O. S., Seo, C. S. and Shin, H. K. (2013) Comparison of the ingredient quantities and biological activities of Hwangryunhaedok-tang (Hwanglianjiadu-tang) decoction and commercial extractive granules. *Kor. J. Pharmacogn.* **44**: 22-29.
  13. Kim, O. S., Seo, C. S., Kim, Y. and Shin, H. K. (2012) Comparative study on chemical composition and biological activities of Samchulkunbi-tang decoction and commercial herbal medicine. *Formula Science* **20**: 1-11.
  14. Biosis, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**: 1199-1200.
  15. 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.
  16. Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**: 144-158.
  17. Kim, E. J., Park, H. J., Kim, H. J., Kim, J. H., Ann, J. Y., Lee, J. H. and Kim, Y. K. (2008) A monitoring study of marker contents in the Hwangnyeonhaedok-tang ex preparations on the market. *Kor. J. Orient. Med. Prescription* **18**: 125-134.
  18. Albers, J., Knop, K. and Kleinebudde, P. (2006) Brand-to-brand and batch-to-batch uniformity of microcrystalline cellulose in direct tableting with a pneumohydraulic tablet press. *Pharm. Ind.* **68**: 1420-1428.
  19. Thoorens, G., Krier, F., Leclercq, B., Carlin, B. and Evrard, B. (2014) Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment-A review. *Int. J. Pharm.* **473**: 64-72.
  20. Kono, Y. and Fredovich, I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* **257**: 5751-5754.
  21. Kim, H. G. and Son, C. G. (2009) Study of Patterns of anti-oxidative-related studies using Herbal Plants. *J. Kor. Oriental Med.* **30**: 42-49.
  22. Himeji, N., Ohtsuki, T., Fukazawa, H., Tanaka, M., Yazaki, S., Ui, S., Nishio, K., Yamamoto, H., Tasaka, K. and Mimura, A. (2007) Difference of growth-inhibitory effect of Scutellaria baicalensis-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Lett.* **245**: 269-274.
  23. Lee, H. H., Yang, L. L., Wang, C. C., Hu, S. Y., Chang, S. F. and Lee, Y. H. (2003) Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate- and glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Res.* **986**: 103-113.
  24. Chan, H. Y., Chen, Z. Y., Tsang, D. S. and Leung, L. K. (2002) Baicalein inhibits DMBA-DNA adduct formation by modulating CYP1A1 and CYP1B1 activities. *Biomed. Pharmacother.* **56**: 269-275.
  25. 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.
  26. 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.
  27. Kim, D. Y., Kwak, G. S., Jeong, S. M., Lee, S. C. and Ha, J. U. (2003) Comparison of the antioxidative abilities of commercial Gal Geun Tang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 728-732.
  28. Cho, S. W., Kim, E. J., Kim, K. H., Cho, H. S., Lee, S. D., Nam, D. W., Lee, J. D. and Kim, K. S. (2010) A study on quality evaluation of *Ojeok-san* extract powder distributed in Korea. *J. Acupunct Res.* **27**: 105-113.

(2018. 11. 28 접수; 2018. 12. 17 심사;  
2018. 12. 18 게재확정)