

荊芥連翹湯 加減方の 발포정 제형 변화에 따른 약리학적 안정성 연구

조남준^{1#}, 강성구^{1#}, 김지영¹, 한효상^{2*}, 김기광^{1*}

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Investigation of Pharmacological Stability of Hyeonggaeyeongyotang Gagambang by Formulation Changes for Foaming Tablet

Nam Joon Cho^{1#}, Seong Gu Gang^{1#}, Ji Young Kim¹, Hyo Sang Han^{2*}, Kee Kwang Kim^{1*}

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

2 : Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

ABSTRACT

Objectives : Natural extracts have been extensively studied to replace single agent drugs that cause a variety of side effects. However, studies of changes to the formulation of natural extracts has not been nearly proceed. We aimed to investigate whether pharmacological stability of hyeonggaeyeongyotang gagambang (HYT) is altered by formulation changes for foaming tablet.

Methods : In this study, we performed freeze - drying of HYT, which is known to have antioxidant and anti - inflammatory properties, and then changed the formulation by foaming.

Results : As a result, the foaming reaction appeared normally when HYT foamed tablets were put into water, and almost all of the substances were dissolved in the aqueous solution. In addition, we confirmed using high-performance liquid chromatograph that the geniposide used as an indicator material of HYT was stable in most of the formulations. It was confirmed that the change of HYT formulation did not affect the antioxidant efficacy by the 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid assay. Moreover, quantitative real-time PCR confirmed that the inhibitory effect of HYT on IL-1 β mRNA expression induced by lipopolysaccharides treatment in murine macrophage RAW 264.7 cells was similar in the solution of foaming tablet.

Conclusions : These results suggest that the materials with various pharmacological effects can be stably maintained even when the formulation is changed by the foaming action of HYT. Our results are expected to provide important basic knowledge on formulation changes using various natural extracts.

Key words : Hyeonggaeyeongyotang Gagambang, Foaming tablet, Antioxidant effect, Anti-inflammatory effect, RAW 264.7 cell

*Corresponding author : Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Health and Welfare, Joongbu University, Geumsan 32713, Republic of Korea.

· Tel : +82-41-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

Kee Kwang Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-821-5485 · E-mail : kimkk@cnu.ac.kr

#First author : Nam Joon Cho, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-7525 · Fax : +82-42-822-7548 · E-mail : skawns119@naver.com

Seong Gu Gang, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-7525 · Fax : +82-42-822-7548 · E-mail : barunmiso@hanmail.net

· Received : 29 May 2018 · Revised : 14 June 2018 · Accepted : 25 September 2018

I. 서론

다양한 질환들의 치료를 위해 개발된 단일 물질로 구성되어 있는 약의 경우 임상 시험을 통해 증명한 약리 효능을 바탕으로 환자들에게 적용되게 된다. 하지만 이러한 약들은 대부분은 부작용을 동반하게 된다. 대표적인 염증 질환 치료를 위해 사용되는 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)는 cyclooxygenase-1 (COX-1), COX-2의 선택적 inhibitor로 작용하여 염증 반응의 신호 분자로 작용하게 되는 prostaglandin의 생성을 억제한다¹⁾. 하지만 이러한 작용은 peptic ulcer disease, acute kidney injury 등의 부작용을 유발하게 된다^{2,3)}. 선택적인 inhibitor 혹은 activator로 작용하는 대부분 약은 결국 다양한 부작용을 유발하기 때문에 최근에는 천연 추출물에 대한 관심이 증가하고 있다. 다양한 천연 추출물들은 염증 반응의 완화, 비만 억제, 피부 보습 및 암에 억제와 같이 여러 질환의 치료에 응용되어 연구되고 있다. 또한, 일반적으로 부작용이 적기 때문에 유아부터 어른까지 쉽게 적용할 수 있다.

발포정은 NaHCO₃를 주성분으로 하며 물과 만나게 될 경우 물과 CO₂로 분해된 뒤 최종적으로 물 밖으로 CO₂가 빠져나가는 작용이 나타난다. 알약 자체의 크기가 큰 약의 경우 삼키기 힘들며, 특히 유아에게 적용하기 어려움을 가진다. 이러한 경우 알약의 제형을 발포정으로 정제하기도 하며, 다량의 물과 함께 복용해야 하는 약 또한 발포정으로 정제한다. 현재 발포정은 비타민제에 적용되어 많은 제품이 판매되고 있으며, 소화제, loratadine을 성분으로 하는 알레르기성 질환 치료제, 골다공증 치료를 위한 alendronic acid를 성분으로 하는 치료제에 적용되어지고 있다. 복용해야 하는 양을 고체로 제형 변화를 줄 경우 알약의 크기가 매우 커지거나, 수용액 상태로 마실 때 약리 효능이 더 좋아지는 천연 추출물들은 발포정으로 제제를 가공하는 것이 매우 적합하다. 하지만 아직까지 천연 추출물을 발포정으로 적용시키는 연구는 거의 진행되고 있지 않다.

荊芥連翹湯은明代 龔廷賢의《萬病回春》⁴⁾에 최초로 수록되어 淸熱, 祛濕, 和血, 解毒 작용으로 風熱이 上發하여 頭上諸症을 야기시킨 것을 다스리는 대표적인 방제이며, lipopolysaccharides (LPS)로 염증 반응을 유도시킨 RAW 264.7 세포에 형개연교당을 처리할 경우 interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) mRNA 발현이 억제되며, Inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-1 (COX-2)의 단백질 발현 또한 감소된다는 보고가 있다⁵⁾.

우리는 이전 연구를 통해 荊芥, 桔梗, 防風, 黃芩, 白茯苓, 枳殼, 甘草, 川芎, 白芍藥, 梔子, 當歸로 구성된 荊芥連翹湯 加減方이 항균 효능, 항산화 효능을 보유하고 있으며, LPS로 염증 반응을 유도시킨 RAW 264.7 세포에 荊芥連翹湯 加減方을 처리할 경우 NF- κ B 활성 및 IL-1 β mRNA 발현을 억제하는 항염증 효능이 있음을 규명하였다⁶⁾. 이번 연구를 통해 荊芥連翹湯 加減方을 동결건조 시킨 뒤 발포정으로 제제를 변화시킬 경우 荊芥連翹湯 加減方의 약리 효능이 잘 유지되는지 확인함으로써, 다양한 천연 추출물을 발포정으로 적용할 수 있는 가능성을 알아보았다. 荊芥連翹湯 加減方을 동결건조 시켜 분말을 얻은 뒤, 분말을 이용해 발포정을 조제하였다. 荊芥連翹湯 加減方, 증류수에 희석한 동결건조 용액, 그리고 증류수에 발포

반응을 통해 녹인 발포정 용액을 이용해 각각 항산화 효능과 항염증 효능을 확인하였다. 이는 다양한 천연 추출물을 이용한 발포정 제제의 조제에 중요한 연구 결과로 사용될 수 있다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

재음생 주식회사에서 실험에 사용된 荊芥, 桔梗, 防風, 黃芩, 白茯苓, 枳殼, 甘草, 川芎, 白芍藥, 梔子, 當歸를 구매하였으며, 진위와 품질의 우열은 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 geniposide (SIGMA, USA), acetonitrile (SIGMA, USA), ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, SIGMA, USA) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, WELGENE, Korea), FBS (Fetal bovine serum, Gibco, USA), 100 U/ml, Penicillin-Streptomycin (WELGENE, Korea), PBS (Phosphate-buffered saline, Corning, USA), LPS (SIGMA, USA), Hybrid-R RNA purification kit (GeneAll, Korea), Qubit RNA Assay Kit (Molecular probes, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea), eCube 2X Prime Q-master Mix (GENETBIO, Korea)가 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 vacuum evaporator (Kyungseo, Korea), freeze dryer (Cuddon, New Zealand), rotary tablet press machine (KeumSung, Korea), CO₂ incubator (Thermo Fisher, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA)가 사용되었다.

2. 방법

1) 荊芥連翹湯 加減方 조제

환류 추출기에 960 g으로 각각 중량을 측정된 荊芥, 桔梗, 防風, 黃芩, 白茯苓, 地殼, 甘草, 川芎, 白芍藥, 梔子, 當歸를 넣고 증류수 40 l와 함께 110°C에서 4 시간 동안 추출하였다. 추출한 액상을 vacuum evaporator를 이용하여 4 시간동안 농축하여 荊芥連翹湯 加減方을 조제하였다.

2) 荊芥連翹湯 加減方の 제형 변화

荊芥連翹湯 加減方 3,060 g을 freeze dryer로 동결건조를 하여 건조한 분말을 얻을 수 있었으며 이때 얻어진 동결건조 분말의 무게는 990 g, 수율은 32%였다. 동결건조 분말에 table 2.에 기술한 재료들을 배합하여 발포정 분말 가루를 준비한 뒤 rotary tablet press machine을 이용해 발포정을 조제하였다.

Table 1. The composition of Hyeonggaeyeongyotang Gagambang.

Herbal Name	Amount (g)	Scientific Name
荊芥	960	Schizonepetae Herba
桔梗	960	Platycodi Radix
防風	960	Ledebouriellae Radix
黃芩	960	Scutellariae Radix
白茯苓	960	Poria cocos Wolf
地殼	960	Aurantii Fructus
甘草	960	Glycyrrhizae radix
川芎	960	Cnidii Rhizoma
白芍藥	960	Paeoniae Radix Alba
梔子	960	Gardeniae Fructus
當歸	960	Angelicae gigantis Radix

Table 2. The composition of foaming tablet of Hyeonggaeyeongyotang Gagambang

Herbal Name	Ratio (%)	Amount (g)
HYT powder	11.91	500.0
Citric acid	42.88	1,801.1
Potassium Bicarbonate	22.30	936.6
Potassium carbonate	3.00	126.0
D-maltitol	12.00	504.0
Sucralose	0.12	5.0
Enzymatically Modified Stevia	0.60	25.2
Acesulfame Potassium	0.20	8.4
Flavor Powder	2.00	84.0
Food dye	0.03	1.3
Food Starch Modified	0.20	8.4
Lactic acid bacteria	2.38	100.0
Bacillus	2.38	100.0
	100.00	4200.0

3) 荊芥連翹湯 加減方 발포정 용해도 측정

荊芥連翹湯 加減方 발포정 1 정을 증류수에 넣고 실온에서 녹여 최종 부피를 50 ml로 맞추어 주었다. 완전히 용해가 완료된 용액을 1000 g에서 5 분간 centrifuge 후 상층액을 제거하였다. 이후 insoluble한 침전물을 50℃에서 overnight 건조를 한 뒤 무게를 측정하였으며, 미리 측정한 발포정의 무게에서 insoluble 침전물의 무게를 감해주어 발포정의 soluble fraction을 계산하였다.

4) High-performance liquid chromatograph

Agilent 1260 Infinity LC를 이용하여 荊芥連翹湯 加減方의 제형별 geniposide 함유량을 측정하였다. 분리는 Agilent Eclipse Plus C18 column (3.5 μM, 4.6 × 150 mm)을 이용해 진행되었다. 이동상은 증류수 (A)와 acetonitrile (B)를 이용하였으며, gradient elution은 다음과 같이 진행하였다: 10%

B로 0-1 분, 10%-50%로 1-25 분, 90% B로 25-35 분. Column 온도는 30℃로 유지하였으며, injection 부피는 10 μl 이고, flow rate는 0.8 ml/분이다. 240 nm의 UV 파장을 이용해 geniposide 함량을 확인하였다.

5) 세포 배양

RAW 264.7 세포는 ATCC에서 구매한 뒤 10% (v/v) FBS와 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin을 포함하는 DMEM media를 이용해 배양하였으며, CO₂ incubator에서 37℃와 5% CO₂ 환경을 유지해 주었다.

6) 항산화 효능 평가

항산화 효능은 ABTS assay를 이용해 확인하였으며, 실험 방법은 다음과 같다. ABTS 7 mM, potassium persulfate 2.4 mM을 1:1 부피 비로 혼합 후 24 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 용액을 96 well plate의 well에 80 μl를 넣고 microplate reader로 650 nm 흡광도를 측정하였을 때 0.7로 측정이 될 때까지 증류수로 희석해주어 ABTS working solution을 제작하였다. ABTS working solution 80 μl와 증류수 20 μl 혹은 시료 20 μl를 96 well plate에 혼합한 후 5 분간 반응시켜주었으며 반응 후의 650 nm 흡광도를 측정하였다. 시료의 흡광도를 보정해주기 위해 시료 20 μl와 증류수 80 μl를 혼합시켜준 뒤 650 nm 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 다음 식으로 계산하였다.

ABTS radical scavenging activity(%)

$$= \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleblank}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

7) quantitative real-time PCR

6 well plate에 RAW 264.7 세포를 1.5 X 10⁵ cells/well로 분주 후 24 시간동안 배양하였다. 荊芥連翹湯 加減方, 동결건조 용액, 발포정 용액을 0.5 mg/ml 농도로 세포에 3 시간동안 처리 후 LPS를 1 μg/ml 농도로 배양액에 추가한 뒤 6 시간동안 반응시켰다. 이후 RAW 264.7 세포의 배양액을 제거한 후 eCube Tissue RNA Mini Kit를 이용해 RNA를 추출한 뒤 The Qubit 2.0 Fluorometer를 이용해 정량하였다. Random hexamer (100 pmol/μl) 1 μl, dNTP mix (10 mM) 1 μl에 RNA (500 ng) 8 μl를 넣고 65℃ water bath에서 5 분간 반응시킨 후, RNase inhibitor 1 μl, M-MLV RT reaction buffer 4 μl, M-MLV reverse transcriptase 1 μl, DEPC-treated water 4 μl를 추가하고 50℃ water bath에서 1 시간 동안 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 1/5로 희석한 뒤 cDNA 5 μl와 2X Prime Q-mater Mix 10μl, 증류수 2 μl, forward primer (10 pmol/μl) 1.5 μl, reverse primer 1.5 μl를 섞고, AriaMx를 이용해 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 수행하였다. 실험에 사용한 primer의 염기 서열은 다음과 같다: IL-1β, 5'-AGG TCA AAG GTT TGG AAG CA-3', 5'-TGA AGC AGC TAT GGC AAC TG-3';

β -actin, 5'-ATCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG',
5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG-3'.

8) 자료 분석 및 통계처리

대조군에 대한 실험군의 유의성을 student's t-test로 계산해서 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 荊芥連翹湯 加減方 발포정의 용해도

荊芥連翹湯 加減方を 이용해 조제한 발포정이 물에 쉽게 용해되는지 확인하기 위하여 증류수 50 ml에 荊芥連翹湯 加減方 발포정 1 정을 용해했다. 증류수와 발포정을 혼합하자마자 발포 작용이 나타났으며, 荊芥連翹湯 加減方 발포정이 98% 이상으로 수용액에 효과적으로 용해되었다. 이를 통해 荊芥連翹湯 加減方이 발포정으로 제형 변화가 된 것을 확인하여 다음 실험을 진행하였다.

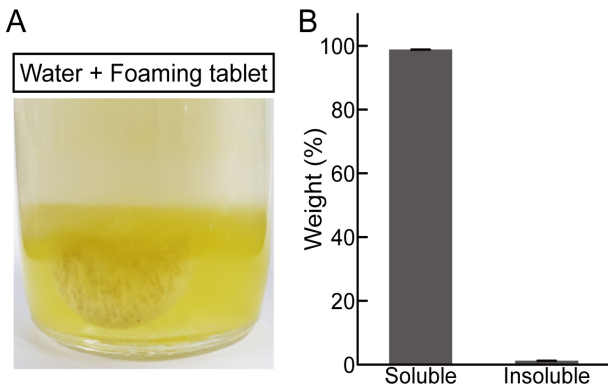


Fig 1. Foaming reaction of foaming tablet of Hyeonggaeyeongyotang Gagambang (HYT). (A) Representative image of foaming reaction. (B) Fractions of soluble or insoluble weights via total weights of foaming tablet.

2. 荊芥連翹湯 加減方の 제형 변화에 따른 geniposide 농도 변화

Geniposide는 항염증 효능과 같은 다양한 약리효능이 있음이 알려져 있다⁷⁾. 荊芥連翹湯 加減方の 제형이 변함에 따라 나타나는 geniposide의 농도 변화를 확인하기 위하여 荊芥連翹湯 加減方과 동결건조 후 얻은 가루를 증류수로 다시 희석한 동결건조 용액, 그리고 증류수에 녹인 발포정 용액을 동일한 농도로 희석 후 High-performance liquid chromatograph (HPLC)를 진행하였다. 荊芥連翹湯 加減方の 농도는 동결건조를 통해 확인한 수율을 이용해 계산하였으며, 발포정 용액의 농도는 발포정에 포함된 荊芥連翹湯 加減方の 동결건조 분말의 함유량을 바탕으로 계산하였다. 그 결과 荊芥連翹湯 加減方에 함유되어있는 geniposide의 농도 기준으로 동결건조 후에는 약 85.1%, 발포정 조제 후에는 약 77.0% 정도로 geniposide의 농도가 유지되었다.

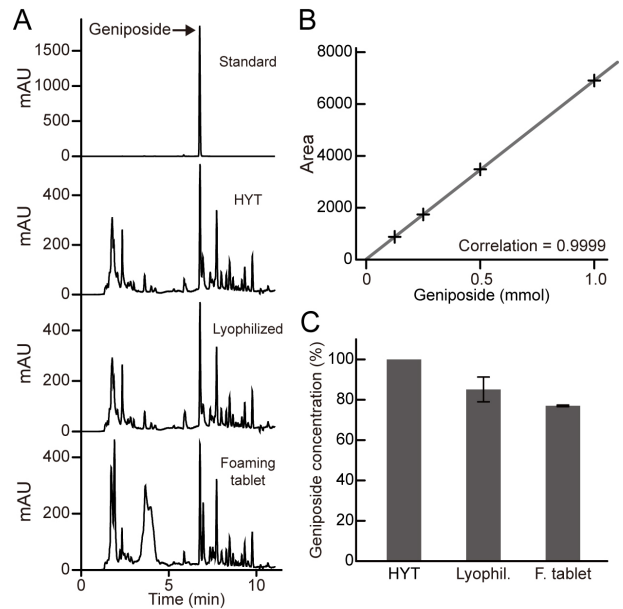


Fig 2. Geniposide concentrations of HYT, lyophilized solution, and foaming tablet solution. (A) HPLC chromatograms at 240 nm. Arrow is represent geniposide peak. (B) Calibration curve of geniposide. (C) Ratio of geniposide content in HYT, lyophilized solution, and foaming tablet solution. geniposide concentrations were calculated using geniposide peak areas of HPLC via calibration curve. Lyophil., lyophilized. F. tablet, foaming tablet.

3. 제형 변화에 따른 荊芥連翹湯 加減方の 항산화 효능

荊芥連翹湯 加減方, 동결건조 용액, 발포정 용액이 보유하고 있는 항산화 효능을 확인하기 위하여 ABTS assay를 진행하였으며 항산화 효능에 대해 잘 알려진 resveratrol을 양성 대조군으로 사용하였다⁸⁾. Resveratrol은 농도의존적으로 ABTS radical을 소거하였으며, 荊芥連翹湯 加減方, 동결건조 용액, 발포정 용액 또한 농도의존적으로 ABTS radical을 소거하였다. 특히 1 mg/ml 농도에서 荊芥連翹湯 加減方은 73.9%, 동결건조 용액은 70.1%, 발포정 용액은 61.8%로 荊芥連翹湯 加減方の 제형이 변화하여도 항산화 효능이 잘 보존됨을 확인할 수 있었다.

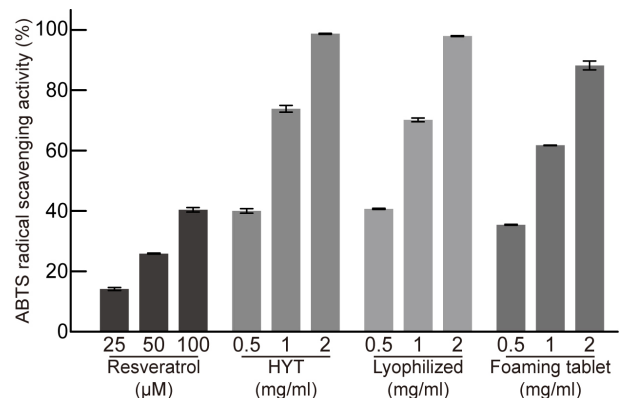


Fig 3. Antioxidant effects of resveratrol, HYT, lyophilized solution, and foaming tablet solution. ABTS radical scavenging activity was confirmed using ABTS assay.

4. 제형 변화에 따른 荊芥連翹湯 加減方의 IL-1 β mRNA 발현 조절 효능

이전 연구를 통해 우리는 荊芥連翹湯 加減方이 IL-1 β mRNA 발현량을 조절함을 확인하였다⁵⁾. 荊芥連翹湯 加減方의 제형을 변화시켜도 geniposide의 농도가 대부분 유지되고 있었으며, 항산화 효능 또한 유사하게 재현되고 있음을 확인하였기 때문에 RAW 264.7 세포의 IL-1 β 발현 조절 효능 또한 荊芥連翹湯 加減方의 제형이 변화되어도 유지되는지 확인하고자 하였다. 이전 연구를 통해 RAW 264.7 세포에 적정 처리 농도임을 확인한 0.5 mg/ml의 荊芥連翹湯 加減方, 동결건조 용액, 발포정 용액을 3 시간 처리한 RAW 264.7 세포에 LPS를 6 시간 처리한 뒤 qRT-PCR을 진행하여 IL-1 β mRNA 발현량을 확인하였다. 그 결과 LPS 처리에 의해 촉진되어지는 IL-1 β 의 mRNA 발현량이 荊芥連翹湯 加減方, 동결건조 용액, 발포정 용액 처리에 의해 억제되었으며, LPS만 처리한 그룹과 비교하여 荊芥連翹湯 加減方은 50.2%, 동결건조 용액은 50.0%, 발포정 용액은 52.8%로 RAW 264.7 세포의 IL-1 β mRNA 발현량이 유사하게 억제되었다.

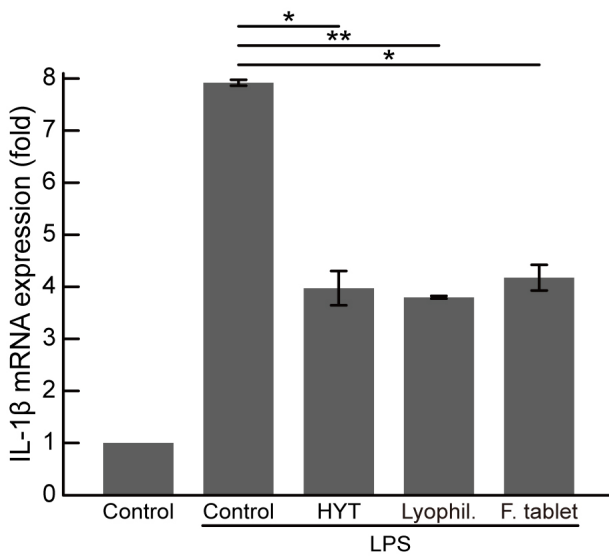


Fig 4. Regulation of IL-1 β mRNA expression by treatments of 0.5 mg/ml HTY, lyophilized solution, and foaming tablet solution in RAW 264.7 cells. Lyophil., lyophilized, F. tablet, foaming tablet. *p < 0.05, **p < 0.01 versus LPS group.

IV. 고 찰

荊芥連翹湯 加減方 구성 약물 중 荊芥, 防風은 散風熱하여 消腫하고, 當歸, 川芎은 和血行血하여 諸經의 血凝氣聚를 散하며, 白芍藥은 除風止痛하고, 白茯苓은 利水滲濕하며, 黃芩, 梔子是 小陽火를 瀉하고, 桔梗, 枳殼은 胸膈을 利하게 하고 快氣宣通하며, 甘草는 諸藥을 和하고 急迫을 緩和하는 역할을 한다⁹⁾.

이번 연구를 통해 荊芥連翹湯 加減方을 발포정으로 제형 변화를 주는 연구를 진행하였다. HPLC를 통해 geniposide 함유량이 제형 변화 후에도 대부분 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 또한 荊芥連翹湯 加減方의 항산화 효능 및 LPS가 처

리된 RAW 264.7 세포의 IL-1 β mRNA 발현량 억제 효능 또한 제형 변화 후에도 유지됨을 확인하였다.

약리 효능을 가지는 다양한 천연 추출물들은 구강 투여를 하는 일반적인 약의 제형 형태인 알약과 다르게 대부분 액체 상태로 보관하기 때문에 소지의 불편함, 저장을 위한 공간 활용의 어려움 등 다양한 단점을 보유하고 있다. 발포정은 알약 형태로 보관할 수 있을 뿐 아니라 섭취 전 물에 쉽게 녹일 수 있기 때문에, 일반적으로 액체 상태로 섭취하게 되는 천연 추출물에 적용하기 매우 적합한 제형 형태이다. 이번 연구에서 항염증 치료에 사용되는 대표적인 한약재인 荊芥連翹湯 加減方을 발포정으로 조제해보았고 그 결과 荊芥連翹湯 加減方 발포정은 물에 쉽게 용해될 뿐 아니라 여러 가지 약리 효능도 잘 유지됨을 확인할 수 있었다. 이 연구 결과를 통해 荊芥連翹湯 加減方 뿐 아니라 다양한 천연 추출물에도 발포정으로 제형 변화를 유도할 수 있으며, 약리 효능도 유지할 수 있을 것으로 추측할 수 있다. 이번 연구 결과는 다양한 질환을 치료하기 위해 적용되는 많은 종류의 추출물을 새로운 방식으로 가공할 수 있는 방향을 제시해주는 의미를 가진다.

활성산소는 세포의 산화적 스트레스를 유도하여 각종 질환의 원인으로 작용하며, 염증성 사이토카인 발현을 촉진하는 신호 물질로 작용하여 염증성 질환을 유도한다¹⁰⁾. 이러한 활성산소를 제거하는 작용은 동물 뿐 아니라 산소를 이용해 광합성을 진행하는 식물에서도 활발하게 나타난다¹¹⁾. 식물을 이용해 얻을 수 있는 추출물에는 대부분 다양한 종류의 항산화 물질이 포함되어 있어 질환의 예방 및 치료에 응용되고 있다. 이번 연구에서 荊芥連翹湯 加減方을 발포정으로 제형의 변화를 준 것은 항산화 효능을 거의 변화시키지 못하였다. 이를 통해 다양한 식물 추출물에 발포정으로의 제형 변화를 유도하여도 항산화 효능에 큰 영향을 주지 않을 것으로 추측할 수 있다. 荊芥連翹湯 加減方은 염증 질환을 치료하기 위해 적용되고 있기 때문에 발포정 제형 변화가 약리 효능에 미치는 영향을 확인해보았고 그 결과 살아있는 동물 세포인 RAW 264.7에 제형 변화를 준 荊芥連翹湯 加減方을 처리하여도 잘 알려진 염증 억제 효능이 유사하게 재현되는 것을 확인하였다.

Geniposide는 치자나무의 지표 물질로 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포의 NF- κ B 활성을 억제함으로써 inflammatory cytokine들의 발현을 억제하는 기능이 알려져 있다^{7,12)}. Geniposide는 특히 water soluble 물질이기 때문에 섭취를 위한 일반적인 추출법인 열수 추출 방법에서 쉽게 추출될 수 있다¹³⁾. 荊芥連翹湯 加減方의 제형 변화에 따른 성분들의 안정성을 판단하기 위한 지표 물질로 geniposide를 사용하였다. 그 결과 제형 변화에 따라 geniposide 농도의 대부분은 안정적으로 유지되었다. Geniposide를 제외하고 荊芥連翹湯 加減方에 포함되어있는 다양한 물질들이 제형 변화에 의해 나타나는 변화는 확인하지 못하였다. 하지만 항산화 효능 및 세포 처리를 통해 확인한 IL-1 β mRNA 발현 억제 효능이 제형 변화에 의해서도 유사하게 재현되었기 때문에 geniposide 외 다른 다양한 약리 물질들도 안정적으로 유지될 가능성을 가진다.

다양한 천연 추출물은 각각만의 지표물질들이 포함되어 있으며, 단일 물질 뿐 아니라 다양한 물질들이 같이 세포에 작용하여 여러 약리 효능들을 나타낸다. 천연 추출물에 포함된 다양한 성분들이 발포정으로 제형 변화를 주었을 때 荊芥連翹湯

加減方に 함유된 geniposide와 같이 물질이 안정적으로 유지되는지는 추가적인 연구가 필요하다. 하지만 발포정으로 제형을 변화시키는 것은 천연 추출물들이 가지고 있는 단점들을 보완할 수 있기 때문에, 이번 연구 결과는 천연 추출물의 제제 변화 및 상품화에 중요한 의미를 가질 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 荊芥連翹湯 加減方を 발포정으로 제형을 변화시켰으며, 만들어진 시료를 이용해 geniposide의 농도 변화, 항산화 효능, RAW 264.7 세포의 IL-1 β mRNA 발현량에 미치는 영향을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 荊芥連翹湯 加減方の 제형을 변화시켜도 geniposide가 안정적으로 유지됨을 HPLC를 통해 확인하였다.
2. ABTS assay를 통해 荊芥連翹湯 加減方, 동결건조 용액, 발포정 용액 모두 유사한 항산화 효능이 있음을 확인하였다.
3. RAW 264.7 세포에 0.5 mg/ml 농도의 荊芥連翹湯 加減方, 동결건조 용액, 발포정 용액을 처리한 경우 LPS에 의해 촉진되는 IL-1 β 의 mRNA 발현량을 감소시켰으며, 이러한 효과는 모든 제형에서 유사하였다.

이상의 실험 결과는 다양한 종류의 천연 추출물을 새로운 방식으로 가공할 수 있는 방향을 제시해주는 의미를 가진다.

감사의 글

이 논문은 중소기업청 첫걸음기술개발사업 (과제번호 C0514836)의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

References

1. Rao P, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 2008 ; 11(2) : 81-110.
2. Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet.* 2002 ; 359(9300) : 14-22.
3. Winkelmayer WC, Waikar SS, Mogun H, Solomon DH. Nonselective and cyclooxygenase-2-selective NSAIDs and acute kidney injury. *Am J Med.* 2008 ; 121(12) : 1092-8.
4. Kong JH Jeungbomanbyeonghoechun hagwon, Seoul : Iljungsang 1994 : 12-4.
5. Kim MJ, Lee JR, Kim SC, Jee SY. Inhibitory Effect of Hyeonggaeyeongyo-tang Water Extract on production of Nitric Oxide, IL-6 and Expression of iNOS, COX-2 in LPS - Activated Raw 264.7 Cells. *Korean J. physiology & pathology.* 2007 ; 21(2) : 491-7.
6. Gang SG, Cho NJ, Kim JY, Han HS, Kim KK. Investigation of Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities of the Hyeonggaeyeongyotang Gagambang. *Kor. J. Herbol.* 2018 ; 33(4) : 35-41.
7. Shi Q, Cao J, Fang L, Zhao H, Liu Z, Ran J, Zheng X, Li X, Zhou Y, Ge D, Zhang H, Wang L, Ran Y, Fu J. Geniposide suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and inflammatory cytokine by downregulating NF- κ B, MAPK and AP-1 signaling pathways in macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2014 ; 20(2) : 298-306.
8. Jagdeo J, Adams L, Lev-Tov H, Sieminska J, Michl J, Brody N. Dose-dependent antioxidant function of resveratrol demonstrated via modulation of reactive oxygen species in normal human skin fibroblasts in vitro. *J Drugs Dermatol.* 2010 ; 9(12) : 1523-6.
9. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY,. *Boncho-Hak.* Seoul:Young-Lim Press. 2007 : 157, 163, 207, 216, 345, 393, 447, 496, 583, 629, 634.
10. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010 ; 11(12) : 1136-42.
11. Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Send to C R Biol.* 2008 ; 331(6) : 433-41.
12. Sung YY, Lee AY, Kim HK. The Gardenia jasminoides extract and its constituent, geniposide, elicit anti-allergic effects on atopic dermatitis by inhibiting histamine in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol.* 2014 ; 156 : 33-40.
13. Park JE, Lee JY, Kim HG, Hahn TR, Paik YS. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of Gardenia jasminoides. *J Agric Food Chem.* 2002 ; 50(22) : 6511-4.