

화상 및 창상에 대한 자근·치자 복합제제의 경피 흡수 및 치료효과

민동훈·김대근·임종필·양재현[†]

우석대학교 약학대학

(2005년 6월 3일 접수·2005년 7월 1일 승인)

Transdermal Drug Delivery & Therapeutic Effect of the Preparations of Lithospermi Radix and Gardeniae Fructus Extracts on the Burn & Wound Healing

Dong-Hoon Min, Dae-Keun Kim, Jong-Pil Lim and Jae-Heon Yang[†]

College of pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

(Received June 3, 2005 · Accepted July 1, 2005)

ABSTRACT – Research was undertaken to compare the pharmacological activity of Lithospermi radix (LR) reported as an oriental medicine for classical uses. LR contains naphthoquinone pigments : shikonin, acetylshikonin, isobutylshikonin, etc. LR is used for the treatment of excision wound, burn, eczema, blister, scarlatina and septicemia as antifebrile, antidotic and antiphlogistic. Gardeniae fructus (GF) has been used for the treatment to jaundice, hepatic disease, anti-inflammatory and analgesic effects, and it contains crocin, geniposide and its derivatives. The therapeutic effects of burn and excision wound healing from LR & GF hydrogel with Nano-ATP[®] (GLN) were investigated. To evaluate the therapeutic value of various hydrogels, thermal burn model and excision wound mouse model were used. The burn and wound reduction rate and therapeutic period were measured to calculate the healing extent after 5 experiments. The 2nd degree burn was prepared on hairless mouse back skin and dressing with collagen. The burn and wound reduction rate of GLN hydrogel treated group decreased more rapidly than that of other gel group in animal model. Furthermore therapeutic periods of GLN hydrogel treated group was shorter than that of other gel group. In anti-inflammatory test, GLN hydrogel treated group decreased edema rapidly than that of other gel group. These results suggest that the GLN hydrogel treatment has an therapeutic effect on burn and excision wound healing.

Key words – Shikonin, Geniposide, Skin permeation, Burn, Wound healing

자근(Lithospermi Radix)은 지치과(Boraginaceae)에 속하는 지치(lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc.)의 뿌리로 한방에서는 주로 양혈, 청혈, 해독의 목적으로 사용되어 왔고, 해열약으로 쓰이며 투진(透疹)의 효과가 매우 강하기 때문에 홍역(紅疫)의 발진에 사용되어 왔다. 주 성분은 naphthoquinone계의 색소인 shikonin 및 acetylshikonin의 동족체, lithospermic acid, allantoin, polysaccharide, furylhydroquinone, 시안배당체인 lithospermoside 등 다양한 성분이 밝혀져 있다.¹⁾ 자근의 성분 및 항균력에 관한 연구로서 Yun²⁾ 등은 HPLC를 이용하여 shikonin과 acetylshikonin의 주성분 함량 및 항균력을 실험하여 보고하였으며 Hwang³⁾ 등은 자근으로부터 acetylshikonin의 분리 및 함량 분석 연구에서 HPLC를 이용하여 원료의 품질관리를 위한 실험을

진행하였다. Chung^{4,6)} 등은 자근의 성분에 대한 연구에서 pH, 온도, 금속, 당, 산 등 물리적 조건에 따른 자근 색소의 안정성 실험을 진행하여 그 성분들의 변화정도를 관찰하였고, Yoshizaki⁷⁾ 등은 자근의 약리학적 연구에서 histamine으로 인한 모세혈관 투과성 항진을 억제하는 작용과 자외선 조사 및 열자극으로 인한 국소 피부열 상승 억제 작용, 창상 부의 봉합 촉진 작용 등에 shikonin과 acetylshikonin이 관여하는 것을 규명하여 보고하였다.

치자(Gardeniae Fructus)는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로서 담즙분비 촉진작용을 가지고 있으므로 간질환을 비롯하여 한방에서는 황달, 충혈 및 출혈, 진정, 소염 등의 치료의 목적으로 사용되어 왔다.⁸⁾ 주성분으로는 iridoid glycoside인 geniposide와 gardenoside를 비롯하여 genipin, genipiodisic acid, shanzhiside, crocin 등을 함유하고 있다.⁹⁾ Liu¹⁰⁾와 Oshima 등¹¹⁾은 치자 중에서 고속액체크로마토그래피에 의하여

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 063)290-1570, E-mail : jhyang@woosuk.ac.kr

geniposide 및 genipin 등을 분리 동정하였다. Paik 등¹²⁾은 물리적 조건에 따른 치자 성분의 안정성을 실험하였으며, Han 등¹³⁾은 치자의 항산화 활성성분에 대한 연구에서 geniposide와 crocin의 항산화 작용을 확인하였다. 치자성분 중 genipin은 천연 crosslinking agent로 Mi,¹⁴⁾ Chang,¹⁵⁾ Tsai¹⁶⁾ 및 Sung 등¹⁷⁾은 natural crosslinking agent인 genipin의 결합성을 이용하여 생체조직의 고정에 응용하였다.

피부화상은 심한 부종을 유발하며 혈관의 투과성 증가로 혈관내 정수압이 감소하게 되어 허혈성 손상을 일으키게 될 뿐만 아니라 화상 피부 조직은 부분층 화상과 전층 화상의 경우 식피술을 시행하여야 하는 어려움도 뒤따르게 된다. Cho¹⁸⁾ 등은 화상 및 창상 치료용 외용제 개발에 대한 기초 연구에서 PVA soft hydrogel이 thermal burn rat model, incision & excision wound rat model의 피부에 도포되면 겔화되어 피막을 형성하여 외부로부터의 피부보호 작용을 가지며 또한 형성된 피막으로부터 약물이 방출, 흡수되어 화상이나 창상치료에 도움을 주는 것을 보고하였고, Nam¹⁹⁾ 등은 한방에서 외용시 수렴, 소염 작용이 있는 것으로 알려진 몰약과 TDP(Tending Diacibo Pu)과장을 이용하여 열에 의한 피부조직의 물질 변성을 방지하고 상피 재생 및 치유에 큰 효과가 있음을 확인하였다.

이에 저자는 화상 및 창상 치료에 효과가 있을 것으로 기대되는 생약인 자근과 치자의 복합제에 음이온을 가진 Nano-ATP[®]를 사용하여 히드로겔을 제조하고, 피부투과, 소염진통 작용, 화상 및 창상에 대한 치료 효과 관찰 실험 등을 통하여 효과적인 화상 및 창상을 포함하는 피부질환 치료제를 개발하고자 하였다.

실험 방법

시약

자근(*Lithospermi Radix*)과 치자(*Gardeniae Fructus*)는 익산 보화당 약국에서 구입, 음건하여 사용하였고 shikonin (Wako Chemical Co., Japan)과 geniposide (Sigma Chemical Co., U.S.A)은 표준품을 사용하였고, 카보폴 940은 BASF Co.(Ludwigshafen, Germany)에서, Labrasol[®]은 Gattefosse Co.(Cedex, France)에서 Nano-ATP[®]는 Ameco-Bios Co. (Arcadia, CA, USA)제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

기기

High Performance Liquid Chromatograph (M930, Youngin Co., Korea) Skin permeation tester (FCDV-15,

Lab Fine, Korea), Digital Plethysmometer (LE 7500, Panlab S.L., Spain), Hand scopy (USB microscope M2, Scalar Co., Japan)등을 사용하였다.

실험동물

Hairless mouse (웅성, 25±5 g, Charles River Lab., USA)와 S.D계 랫트 (웅성, 200±20 g, 대한실험동물센터, Korea)를 분양받아 사용하였으며, 사육실 온도는 25±1°C, 습도 55±10%를 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 하였다. 고향 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

히드로겔의 제조

자근 히드로겔 (이하 LR gel)의 제조는 yang 등²⁰⁾의 방법을 응용하여 제조하였는데, 먼저 자근 엑스 분말을 정제수에 용해시키고 프로필렌글리콜, labrosol, 에탄올을 순차적으로 가하여 혼합한 후 카보폴 940을 넣어 팽윤시키고 트리에탄올아민을 적가 하여 pH 7.0으로 하여 gel을 제조하였다. 치자 히드로겔의 제조 (이하 GF gel)는 자근 대신 치자 엑스 분말을 사용하여 LR gel과 동일한 방법으로 제조하였다. 자근과 치자의 복합 겔의 제조 (이하 GLC gel)는 자근과 치자 용액을 혼합한 후 LR gel과 동일한 방법으로 제조하였다. 복합 나노겔의 제조 (이하 GLN gel)는 GLC gel의 제조 방법에 따랐으며 정제수 대신 Nano-ATP[®]를 사용하였다.

주성분의 확인 및 정량

Shikonin 및 acetylshikonin의 함량은 yun 등²¹⁾의 HPLC 방법을 응용하여 정량하였다. 고정상으로는 μ -Bondapak C₁₈ (3.9×300 mm)을 사용하였고, 이동상으로는 acetonitrile : water : acetic acid : 트리에탄올아민 (70 : 30 : 0.3 : 0.3 v/v%)의 혼합액을 사용하였다. 검출기는 UV detector로서 파장은 548 nm, 유속은 1.2 mL/min, 감도는 0.05 AUFs였고 얻어진 피크의 면적을 측정하여 계산하였다.

치자 엑스 분말로 제조한 gel제 중에 함유되어 있는 geniposide의 확인, 정량을 위하여 HPLC를 사용하였으며, 칼럼은 μ -Bondapak C₁₈ (3.9×300 mm)을 사용하였고, 이동상으로는 acetonitrile : water (15 : 85 v/v%)의 혼합액을 사용하였다. 검출기는 UV detector로, 파장은 240 nm, 유속은 1.2 mL/min이었고 얻어진 chromatogram의 면적을 측정하여 계산하였다.

피부투과 실험

피부투과 실험은 Yang 등²²⁾의 피부투과 실험방법에 따라, GF, LR, GLC 및 GLN gel 제제를 각각 1.0 g을 취하여

hairless mouse 피부에 도포한 후 geniposide, shikonin 및 acetylshikonin의 피부투과량을 측정하기 위하여 Franz modified diffusion cell (area : 1.77 cm², effective vol. : 11.5 mL)을 이용하였다. Hairless mouse 피부는 복부를 절개하고 피하지방 및 모세혈관을 조심스럽게 제거한 후 사용하였다. 시험액은 pH 7.4 완충용액을 사용하였다. Franz modified diffusion cell에 hairless mouse 피부를 장착하고 LR, GF, GLC 및 GLN gel 제제를 도포한 후 채취시간마다 시험액 100 µl씩을 채취하고 새로운 시험액을 동량 보충하였다. 시험액은 37±0.2°C를 유지하도록 하였으며 cell 내의 교반속도는 600 rpm으로 고정하였다. 피부의 단위 면적당 통과한 주성분의 양을 시간에 대한 함수로 나타낸 후 다음의 식을 이용하여 투과 파라미터들을 구하였다.²³⁾

$$J_s = \frac{1}{A} \left(\frac{dQ}{dt} \right)_{ss} = \frac{DKC}{h}$$

$$D = \frac{h^2}{6T_L}$$

J_s는 평형 상태에서의 투과 속도 (µg/cm²/hr)이고, A는 투과가 일어나는 피부의 면적(cm²), (dQ/dt)_{ss}는 평형 상태에서의 단위 시간당 피부를 통과하는 약물의 양(µg/hr), C는 제제중의 약물 농도(µg/mL)이고, K는 약물의 분배계수(피부/기제), h는 피부의 두께(cm), D는 피부를 통한 약물의 확산 계수(cm²/hr)이며, T_L은 lag time(hr)이다.

피부 잔류량 시험

피부잔류량 시험은 Lee 등²⁴⁾의 방법에 따라 측정하였는데, 먼저 피부투과실험 직후에 피부상에 잔류되어 있는 겔을 제거하고 생리식염수를 사용하여 피부를 충분히 씻어낸 후 gel을 직접 바른 부분의 피부만을 절제하고 -66°C 냉동 건조기에 보관한 다음 해동시켜 무게를 잰 뒤 tris buffer 1 mL을 가하고, sonication하여 균질화하였다. 균질액에 t-butyl ethyl ether 5 mL를 가하여 원심분리 시킨 후 상정액 1 mL를 취하고, 50°C에서 증발 건조시킨 후 용제에 녹여 HPLC에 주입한 다음 피크면적의 양으로써 geniposide, shikonin 및 acetylshikonin의 잔류량을 산출하였다.

항염 실험

부종 실험은 Winter 등²⁵⁾의 방법을 응용하였다. 부종 유발은 랫트의 오른쪽 족저부에 1% λ-carrageenan과 1% 카울린을 증류수에 녹여 0.1 mL를 주사하여 유발시켰다. 약물 도포는 유발 1시간 전에 오른쪽 족저부에 각각 1회씩 도포하였다. 부종 측정은 plethysmometer를 이용하여 1% λ-

carrageenan과 1% kaolin의 투여 전과 투여 후 6, 12, 24 및 48시간대에서 3회 반복측정 하여 평균값으로 정하였다. 부종율은 λ-carrageenan주사 직후 및 각 시간대의 발 부피의 변화를 이용하여 다음 식으로 부종율(%), swelling) 및 부종 억제율(%), inhibition)을 산출하였다.^{26,27)}

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

$$\text{부종억제율 (\%)} = \left[1 - \frac{V_d}{V_c} \right] \times 100$$

V는 carrageenan 주사 후 6, 12, 24 및 48시간 후의 발의 부피이며, V₁은 주사직후 발의 부피, V_c는 대조군의 부종률이며 V_d는 처치군의 부종률이다.

화상 및 창상 실험

화상 및 창상 실험은 Cho¹⁸⁾ 등의 방법을 응용하였다. 화상 실험은 마우스를 에테르로 마취시키고 털을 깨끗이 제거한 후 등 피부에 100°C의 stainless steel heating pad를 접촉하여 2도 화상을 입혀 thermal burn model을 작성하였다. 약물을 적용하지 않는 군을 대조군으로 하고 약물 처치군은 가피가 탈락될 때까지 매일 1회 LR, GLC 및 GLN gel 제제를 0.1 g씩 적용하고 약물 적용 1시간 후 콜라겐액 0.5 mL를 드레싱하여 외부 공기와의 접촉을 최소화하였다.

창상 실험은 마우스를 에테르로 마취시키고 털을 제거한 후 등 피부에 직경 0.8 cm인 skin punch를 이용하여 등 피부를 punching하여 excision wound model을 작성하였다.²⁶⁾ 약물을 적용하지 않는 군을 대조군으로 하고 약물 처치군은 가피가 탈락될 때까지 매일 1회 LR, GLC 및 GLN gel 제제를 0.1 g씩 적용하고 약물 적용 1시간 후 콜라겐액을 드레싱하였다.

마우스 등 피부의 변화양상을 관찰을 위해서 화상 및 창상의 실험 진행 과정 중 가피 생성 및 완치단계에서 마우스를 에테르로 마취시킨 다음 microhand scopy를 사용하여 50배 확대하여 사진을 촬영하였다.

결과 및 고찰

히드로겔의 제조

Yang 등²⁰⁾의 방법에 따라, 자근 및 치자엑스 분말을 1% 씩 함유하도록 LR, GF, GLC 및 GLN 4종의 겔을 조제하였는데 겔화제로서 카보폴 940을 넣었을 때, 거의 점성이 없었으므로 트리에탄올아민을 가하여 pH 7.0으로 조정하여 점도를 15000~20000 mPa·s로 유지시킨 후 연고용 튜브에

Table I—Formulas of Each Hydrogel Preparations

Preparation	GF Gel	LR Gel	GLC Gel	GLN Gel
GFEP*	1.0	-	1.0	1.0
LREP**	-	1.0	1.0	1.0
Carbopol 940	1.0	1.0	1.0	1.0
Propylen glycol	20.0	20.0	20.0	20.0
Labrasol	10.0	10.0	10.0	10.0
Ethanol	10.0	10.0	10.0	10.0
Triethanol amine	1.5	1.5	1.5	1.5
Distil. Water	56.5	56.5	55.5	50.0
Nano-ATP®	-	-	-	5.5
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

GFEP* : Gardeniae fructus extract powder

LREP** : Lithospermi radix extract powder

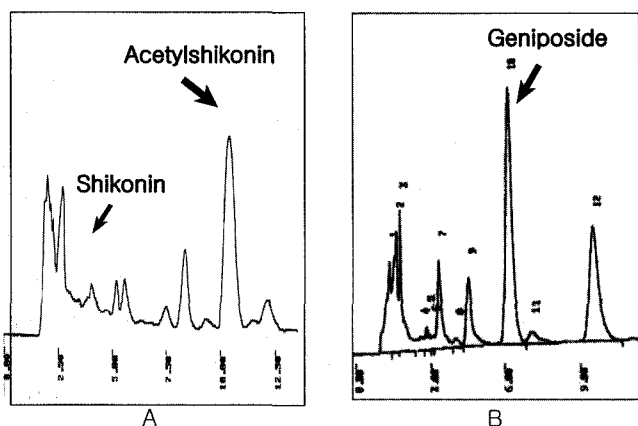


Figure 1—HPLC chromatograms of Acetylshikonin, shikonin and geniposide.

A : LR gel, B : GF gel

20 g씩 충전하여 밀봉하였다(Table I).

주성분 함량

Yun 등²¹⁾의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 파장 548 nm에서 shikonin 및 acetylshikonin의 chromatogram을 작성하여 함량을 산출하였다. Shikonin의 피크는 4.5분이었고 acetylshikonin의 피크는 10.8분 후에 나타났다(Figure 1). 검량선의 작성결과 shikonin의 $y=11812x-5800$, $r^2=0.9999$ 이었고 acetylshikonin은 $y=9891x-2000$, $r^2=0.9999$ 으로서 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 양호한 직선성을 나타내었다. Gel 제제의 shikonin 및 acetylshikonin의 함유량은 각 제제에서 shikonin은 2.9~3.2 mg%이고 acetylshikonin은 15.7~16.3 mg%로 나타났다.

치자 주성분인 geniposide 표준품을 정제수에 녹여 HPLC에 주입하였을때 5.8분에서 geniposide의 peak가 나타났다(Figure 1). Geniposide의 피크 면적으로 작성된 검량선의

Table II—Comparison of Contents(mg%) of Geniposide, Shikonin and Acetylshikonin in Gel Preparations

	Geniposide	Shikonin	Acetylshikonin
GF Gel	291.3	-	-
LR Gel	-	2.9	15.8
GLC Gel	293.2	3.0	15.7
GLN Gel	295.7	3.2	16.3

회귀 직선식은 $y=19627.77x-6132.92$ 이었고 상관계수 $r^2=0.9998$ 로써 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 농도에서는 geniposide의 직선성이 인정되었다. Gel 제제의 geniposide의 함유량은 각 제제에서 291.3~295.7 mg%로 나타났다(Table II).

피부투과

Yang 등²²⁾의 방법에 따라 GF, LR, GLC 및 GLN gel을 hairless mouse 피부에 도포한 후 시간별로 shikonin, acetylshikonin 및 geniposide의 투과된 양을 측정된 결과, shikonin의 투과량은 LR, GLC 및 GLN gel에서 모두 1시간 이후부터 급격히 증가하기 시작하여 3시간 이후부터는 완만한 투과속도를 나타내었으며, 8시간 후 GLN gel이 9.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로써 다른 시료에 비하여 높은 투과율을 나타내었고 LR 및 GLC gel에서는 각각 피부투과율이 8.44, 8.77 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로써 큰 차이를 나타내지는 못하였다. Acetylshikonin의 8시간 후 총 투과량을 비교해보면 GLN gel에서 25.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로써 가장 높은 투과량을 나타내었고, GLC gel 23.55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, LR gel 21.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 순으로 나타났으며, shikonin의 투과량과 비교해 보았을 때 전체적으로 각 제제에서 3배 정도 높은 투과량을 나타내었다. 한편 geniposide의 8시간 후 총 투과량은 GLN 및 GLC gel에서 각각 57.20, 55.90 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 나타내었고 GF gel에서는 45.77 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 비교적 낮게 나타났다.

Shikonin의 단위시간당 피부투과속도를 비교해보면 GLN gel이 1.17, GLC gel은 1.11, LR gel은 1.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로 나타난 반면, acetylshikonin의 단위시간당 피부투과속도는 GLN gel이 3.14, GLC gel은 2.91, LR gel은 2.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로써 shikonin보다 평균적으로 3배 정도 높은 수치를 나타내었다. Geniposide의 단위시간당 피부투과속도는 GLN gel이 7.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로써 가장 높았고 GLC gel 6.89, GF gel 5.72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로써 비교적 높은 투과속도를 보여 주었다.

Shikonin, acetylshikonin 및 geniposide의 lag time을 비교해 보면 geniposide의 경우 GF gel에서 0.78 hr인 반면 GLC gel에서 1.03 hr로써 제제에 따라 큰 차이를 나타내었으나, shikonin은 0.69~0.77 hr, acetylshikonin은 0.81~0.93 hr으로 제제에 따른 차이점이 별로 없었다(Table III).

Table III—Permeation Parameters of Various Gels Through Excised Hairless Mouse Skin

Sample		Parameters		
		Cumulative amount for 8 hr ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	J_s	T_L
GF Gel	Geniposide	45.77 ± 1.30	5.72 ± 0.160	0.78 ± 0.16
	Shikonin	-	-	-
	Acetylshikonin	-	-	-
LR Gel	Geniposide	-	-	-
	Shikonin	8.44 ± 0.15	1.06 ± 0.023	0.75 ± 0.13
	Acetylshikonin	21.26 ± 0.79	2.66 ± 0.097	0.91 ± 0.34
GLC Gel	Geniposide	55.90 ± 1.07	6.89 ± 0.130	1.03 ± 0.18
	Shikonin	8.77 ± 0.16	1.11 ± 0.020	0.77 ± 0.23
	Acetylshikonin	23.55 ± 0.66	2.91 ± 0.081	0.93 ± 0.26
GLN Gel	Geniposide	57.20 ± 1.50	7.15 ± 0.190	1.01 ± 0.21
	Shikonin	9.38 ± 0.18	1.17 ± 0.022	0.69 ± 0.19
	Acetylshikonin	25.15 ± 0.57	3.14 ± 0.070	0.81 ± 0.15

Each data represents the mean \pm SE from 5 experiments.

피부잔류량

Lee 등²⁴⁾의 방법에 따라 hairless mouse의 표피 및 진피에 포함되어 있는 피부잔류량을 측정 한 후 그 결과를 비교해 보면 shikonin의 잔류량은 8시간 후 $3.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었고, acetylshikonin $6.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었으며 geniposide는 $10.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로써 가장 높은 잔류량을 나타내었다. 각 성분들의 잔류량은 피부투과량에 비하여 shikonin은 41.9%, acetylshikonin 26.2%, geniposide 20.9%가 잔류하는 것으로 나타났다(Figure 2).

항염 실험

Winter 등²⁵⁾의 방법에 따라 지근 및 치자 복합 제제의 항염작용을 비교하기 위하여 Carrageenan 유발 족부종에 대한 GLC 및 GLN gel의 발부피 변화를 관찰한 결과 6시간 후

대조군에서 2.04 mL로 나타난 반면, GLC와 GLN gel에서는 각각 2.05 mL와 2.08 mL로써 대조군과 별 차이가 없었다. 12시간 후부터 부종억제 효과가 나타나기 시작하여 24시간 후 대조군의 발 부피는 1.80 mL인데 비하여 GLC 및 GLN에서 1.70, 1.65 mL로써 유의성 있는 차이가 나타났으며, 48시간까지 그 효과가 지속되었다. 시간별 부종율을 비교해 보면 6시간 후 대조군에서 58%인 반면 GLC 및 GLN에서 각각 60%, 59%로 나타나 별 차이가 없었으나 24시간 후에는 대조군은 40%인데 비하여 GLC, GLN은 33%, 26%로 나타났다. 48시간 후 대조군에 대한 부종 억제율은 GLC gel에서 33%로 나타난 반면, GLN gel에서는 59%로써 2배 정도 높은 억제율을 보여주었다(Figure 3).

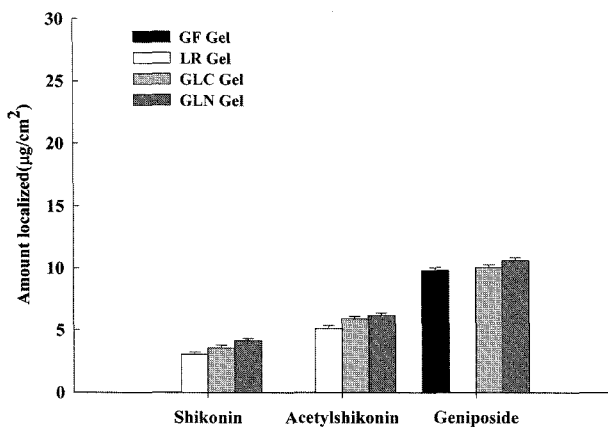


Figure 2—Comparison of Residual Geniposide, Shikonin and Acetylshikonin on Epidermic Tissue after 8 hours under various preparations. Each bar represents the mean \pm SD from 5 experiments.

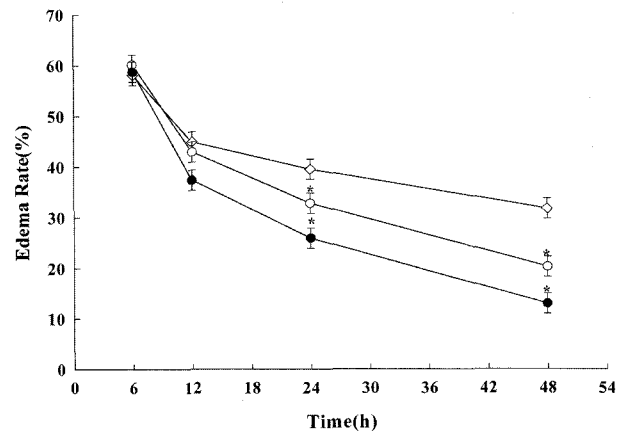


Figure 3—Rate of edema in carrageenan(1%) induced foot edema in rats under formulations. Key : \diamond - ; Control, \circ - ; GLC Gel, \bullet - ; GLN Gel *Significantly different from Control ($P < 0.05$) Each bar represents the mean \pm SD from 5 experiments.

화상 및 창상 실험

Cho 등¹⁸⁾의 방법을 응용하여 thermal burn rat model의 Burn healing 정도를 측정함으로써 Burn grade와 치료계수를 산출하였다. Burn grade는 창상부위의 가로, 세로 길이를 각각 측정하여 상대적인 비율로 표시하였는데 %가 낮을수록 회복이 촉진된 것을 나타낸다. 치료계수는 화상부위에 가피 생성 후 가피가 완전히 탈락하여 새살이 돌아나는데 경과한 날짜를 관찰하여 비교하였다. 대조군에서 7일째 되는 날 Burn grade가 70%이었는데 GLC 25%, GLN 16%를 나타내어 대조군에 비해 약물처리군의 상처 크기가 현저하게 작아짐을 알 수 있었으며 특히 GLN gel의 Burn grade가 가장 낮아 다른 제제들에 비해 상대적으로 회복이 빠른

것을 알 수 있었다(Figure 4). 치료 계수는 대조군이 13일이 소요되었으나, GLC가 9일, GLN이 8일로서 역시 GLN gel의 상처 회복 속도가 가장 빠름을 알 수 있었다(Figure 5).

한편, 창상 실험은 약물을 매일 반복 도포하고 드레싱을 한 후 1, 3, 5 및 7일 후 상처의 크기를 비교하여 치료계수를 구하였다.¹⁸⁾ 상처 크기는 Wound grade로서 창상부위의 가로, 세로 길이를 각각 측정하여 상대적인 %비율로 표시하였으며 %가 낮을수록 회복이 촉진된 것을 나타낸다. 치료계수는 상처부위에 가피 생성 후 가피가 완전히 탈락하여 새살이 돌아나는데 경과한 날짜를 관찰하여 비교하였다.²⁸⁾ 대조군에서 7일째 되는 날 Wound grade가 65%였지만 GLC 25%, GLN 18%를 나타내어 대조군에 비해 약물처리군의

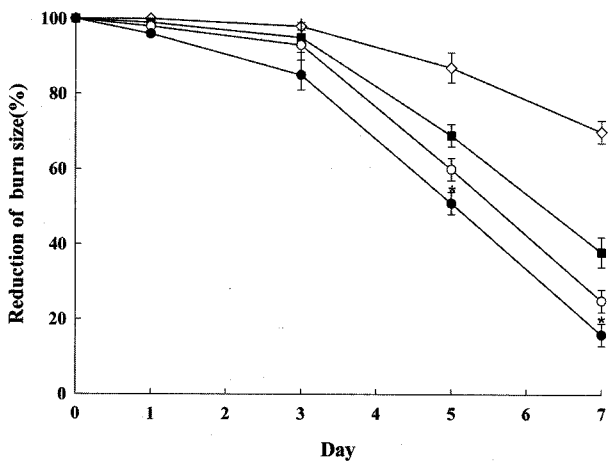


Figure 4—Comparison of reduction rate of GF and LR hydrogels on thermal burn model.
Key : ◇- ; Control, ■- ; LR Gel, ○- ; GLC Gel, ●- ; GLN Gel
*Significantly different from GLC gel (P<0.05)
Each bar represents the mean±SD from 5 experiments.

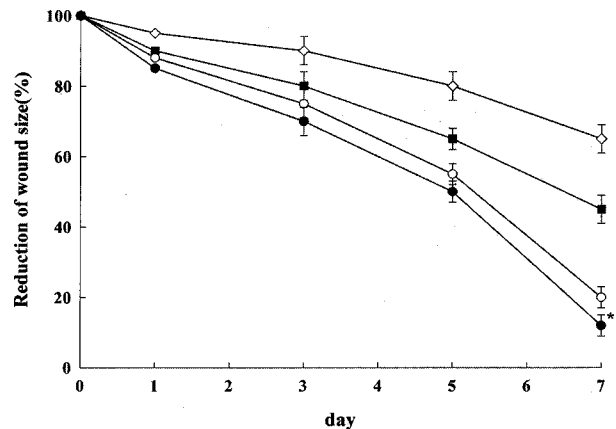


Figure 6—Comparison of reduction rate of GF and LR hydrogels on excision wound model.
Key : ◇- ; Control, ■- ; LR Gel, ○- ; GLC Gel, ●- ; GLN Gel
*Significantly different from GLC gel (P<0.05)
Each bar represents the mean±SD from 5 experiments.

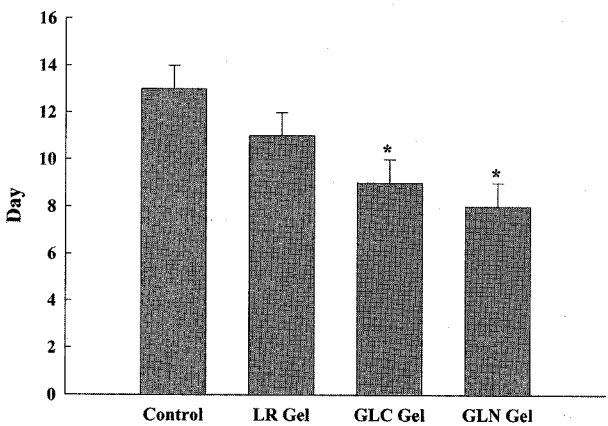


Figure 5—Comparison of Therapeutic period of GF and LR hydrogels to burn healing
*Significantly different from Control (P<0.05)
Each bar represents the mean±SD from 5 experiments.

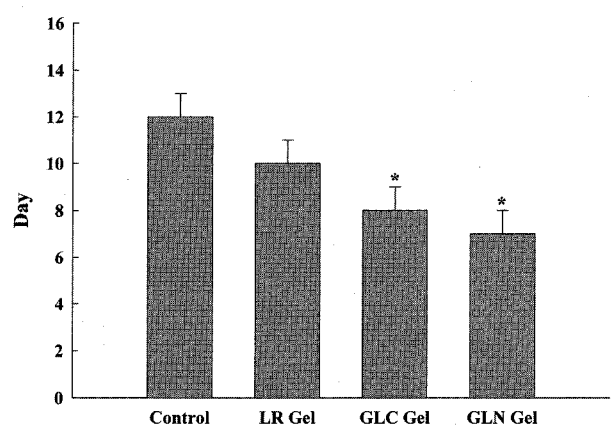


Figure 7—Comparison of Therapeutic period of GF and LR hydrogels to wound healing.
*Significantly different from Control (P<0.05)
Each bar represents the mean±SD from 5 experiments.

상처 크기가 현저하게 작아짐을 알 수 있었으며 특히 GLN gel의 Wound grade가 가장 낮아 다른 제제에 비해 상대적으로 회복이 빠른 것을 알 수 있었다(Figure 6). 치료 계수는 대조군이 12일이 소요되었으나, GLC가 8일, GLN이 7일로서 역시 GLN gel의 상처 회복 속도가 가장 빠름을 알 수 있었다(Figure 7).

화상 생성 및 치료 과정을 microhand scopy로 관찰한 결과 화상을 입힌 직후(A) 괴사된 조직이 검게 나타나고 있지만 약물을 도포하고 4시간이 지나서 화상부위에 혈액순환이 촉진되어 붉은 색이 돌기 시작하고 가피가 생성되기 시작하였다(B). 가피가 생기고 8일 후 새살이 점점 돌아나면서 가피가 점점 작아져서 떨어지고(C), 다시 6일이 지나서 화상부위가 완전히 치유되고 털이 자라나 다른 피부 부위와 다름없이 회복되었다(D)(Figure 8). 창상실험에서는 피부절개 직후(A) 신선한 근육층과 선명한 핏줄을 관찰할 수 있었으며 약물을 도포하고 4시간 후 창상부위에 collagen막이 형성됨을 볼 수 있었다(B). 바깥측에서부터 서서히 새살이 돌기 시작하여 7일이 지난 후 가피가 완전히 탈락되고(C), 다시 7일이 지나자 창상 부위가 완전히 치유되어 다른 부위의 피부와 다름없이 회복되었다(D)(Figure 9).

GLN 겔에 함유되어 있는 Nano ATP®는 미국 John. W. willard 박사가 개발한 음이온수로서 수십에서 수백 나노미터의 작은 입자로 구성되어 있고, -43~-59 mV 정도의 zeta potential을 나타내며 화상 및 창상치료에 유효한 것으로 알려져 있다.²⁹⁾

결 론

한방에서 청혈 및 해열 작용을 가진 자근과 소염 및 진통 작용을 가진 치자엑스를 사용하여 하이드로겔 제제를 제조한 후, 화상 및 창상에 대한 치료효과를 관찰하기 위하여 주성분의 확인과 정량, 피부투과 실험, 피부잔류량 측정, 항염 효과, 화상 및 창상 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

하이드로겔 제제 중 주성분의 함량은 LR, GLC 및 GLN gel에서 shikonin, acetylshikonin의 함량은 각각 2.9~3.2 mg%, 15.7~16.3 mg%이었고, GF, GLC 및 GLN gel에서는 geniposide의 함량이 285.7~295.7 mg%를 유지하였다.

Shikonin 및 acetylshikonin의 투과량은 GLN gel에서 가장 높게 나타났고 geniposide의 피부투과량은 GLC 및 GLN

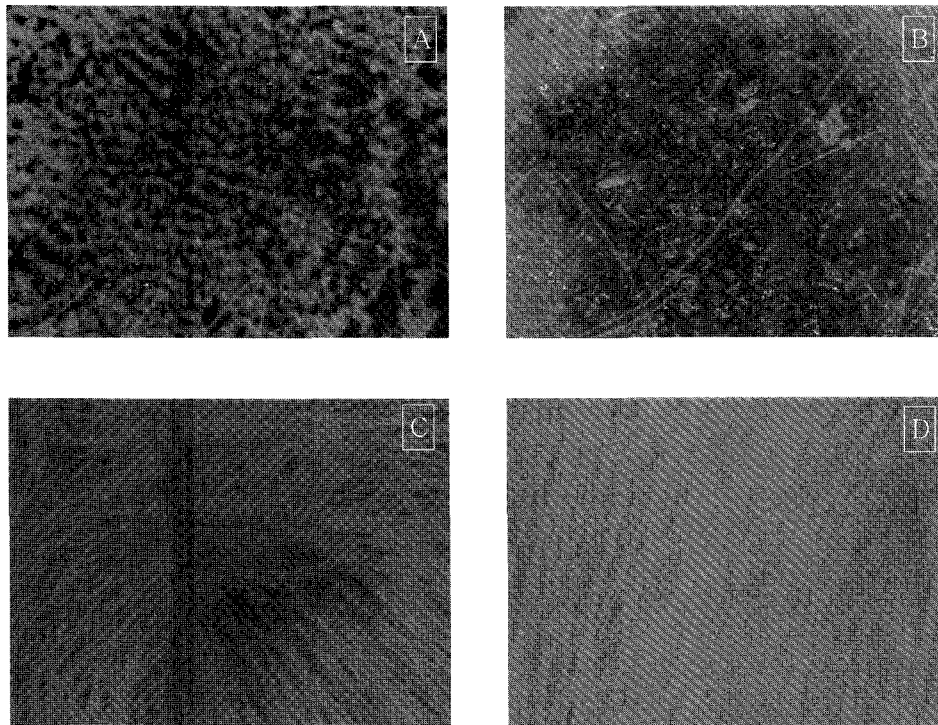


Figure 8—Photomicrographs of the process of burn healing.
 A : Thermal burn model
 B : Thermal burn model of hydrogels treated group after 4 hours
 C : A scrub peels away
 D : Heal a burn

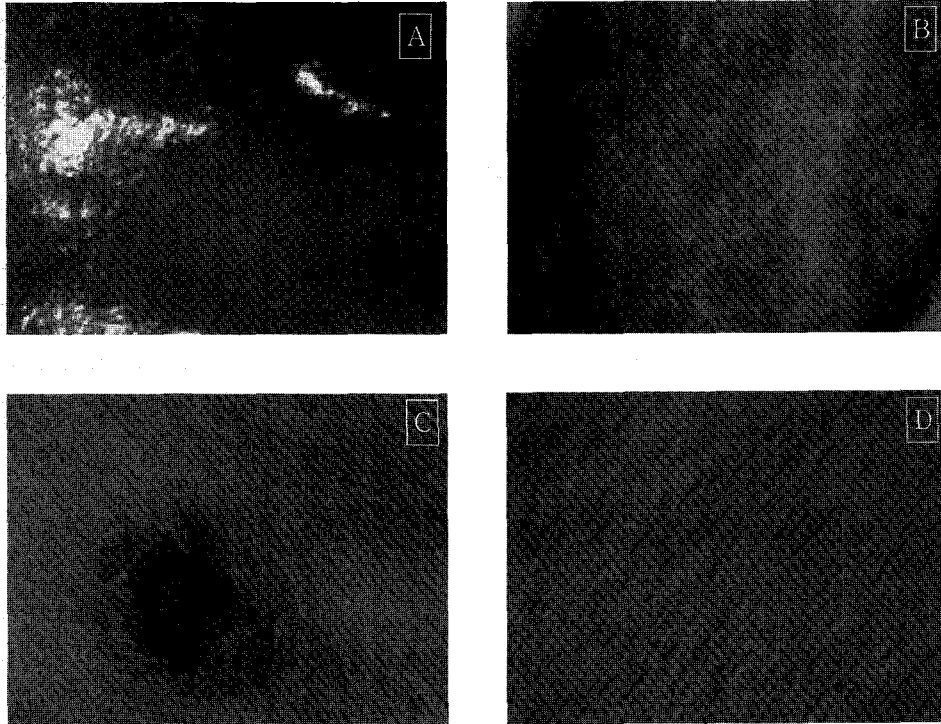


Figure 9—Photomicrographs of the process of wound healing.
 A : Excision wound model
 B : Excision wound model of hydrogels treated group after 4 hours
 C : A scrub peels away
 D : Heal a wound

에서 모두 높게 나타났으며, shikonin 및 acetylshikonin의 8 시간 후 피부잔류량은 각각 $3.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $6.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었고 geniposide는 $10.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 를 유지하였다.

항염효과는 GLC와 GLN gel 모두 대조군에 비하여 양호한 부종억제 효과를 나타내었으며, 그중 GLN gel에서 더욱 우수한 성적을 보여주었다.

화상 및 창상 실험에서 각 제제들이 대조군에 비해 상처 회복이 빠르게 진행되었으며 그 중 GLN gel의 상처 치유력이 다른 제제에 비하여 현저하게 높음을 알 수 있었다.

이상의 결과 자근 및 치자 엑스 복합제제로 GLN 하이드로젤을 제조하여 피부에 도포할 경우 항염 작용, 화상 및 창상의 치료에 효과적인 외용제로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 논문은 2005년도 교육인적자원부 지방연구중심대학 육성사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) X. Chen, L.Y. Oppenheim and O.M.Z. Howard, Cellular pharmacological study of shikonin derivatives. *Phytother. Res.*, **16**, 199-209 (2002).
- 2) K.J. Yun, D.H. Kim, J.H. Ryu and C.S. Yook, Studies on the constituents and their antibacterial effect of the root of Lithospermum erythrorhizon, *Bull K.H. Pharma. Sci.*, **27**, 31-36 (1999).
- 3) S.Y. Hwang, B.Y. Hwang, S.S. Kang, C.M. Kim, J.H. Park, K.H. Bae, K.H. Son, S.H. Lee, S.Y. Chang, S.J. Kang, J.S. Ro and K.S. Lee, Isolation and quantitative analysis of acetylshikonin from lithospermi radix, *Kor. J. Pharmacogn.*, **31**(3), 295-299 (2000).
- 4) M.S. Chung and M.S. Lee, Stability of naphthoquinone pigments isolated from the roots of lithospermum erythrorhizon by various temperatures and metal ions, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(1), 97-100 (1995).
- 5) M.S. Chung and M.S. Lee, Stability of naphthoquinone pigments isolated from the roots of lithospermum erythrorhizon by various sugars and acids, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**(2), 157-161 (1994).
- 6) M.S. Chung and M.S. Lee, Stability of sensory evaluation of naphthoquinone pigments from the roots of lithospermum erythrorhizon, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**(2), 152-156

- (1994).
- 7) F. Yoshizaki, S. Hisamichi, Y. Kondo and S. Nozoe, Studies on shikonin III. New Furylhydroquinone derivates. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4407 (1982).
 - 8) T. Akao, K. Kobashi and M. Aburada, Enzymatic studies on the animal and intestinal bacterial methabolism of geniposide, *Bio. Pharm. Bull.*, **17**, 1573-1576 (1994).
 - 9) Y. Kawata, M. Hattori, T. Akao, K. Kobashi and T. Namba, Formation of nitrogen containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria, *Planta Med.*, **57**, 536-542 (1991).
 - 10) Y. Liu, G.R. Lu and J. Lu, HPLC determination of iridoids in cape jasmine fruit(zhizi), *Zhinggao Zhong Yao Za Zhi.*, **18**(5), 298-299 (1993).
 - 11) T. Oshima, K. Sagara, T. Yoshida, Y.Y. Tong, G.D. Zhang and Y.H. Chen, Determination of geniposide, gardenoside, geniposidic acid and genipin-1-beta-gentiobioside in gardenia jasminoides by high performance liquid chromatography, *J Chromatogr.*, **25**(455), 410-414 (1988).
 - 12) Y. Paik, C. Lee, M. Cho and T. Hahn, Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: effects of pH, temperature and light, *J. Agric. Food Chem.*, **49**(1), 430-432 (2001).
 - 13) Y.N. Han, H.K. Oh, K.H. Hwang and M.S. Lee, Antioxidant components of gardenia Fruit, *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**(3), 226-232 (1994).
 - 14) F.L. Mi, Y.C. Tan, H.C. Liang, R.N. Huang and H.W. Sung, *In vitro* evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin, *J. Biomater Sci. Polym. Ed.*, **12**(8), 835-850 (2001).
 - 15) Y. Chang, C.C. Tsai, H.C. Liang and H.W. Sung, *In vivo* evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent(genipin), *J. Biomater Sci.*, **12**(8), 851-852 (2001).
 - 16) C.C. Tsai, Y. Chang, H.W. Sung, J.C. Hsu and C.N. Chen, Effects of heparin immobilization on the surface characteristics a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an *in vitro* study, *Biomaterials*, **22**(6), 523-533 (2001).
 - 17) H.-W. Sung, R.-N. Huang, L.-L.H. Huang, C.-C. Tsai, C.-T. Chiu, feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomedical Materials Research*, **42**(4), 560-567 (1998).
 - 18) D.H. Cho and Y.H. Shin, Studies on the wound healing by the PVA-soft hydrogel, *Yakhak hoeji*, **48**(1), 55-59 (2004).
 - 19) S.W. Nam, B.K. Lee and H.G. Cho, Acceleration of wound healing on scald burn skin using irradiation of TDP and skin spread of myrrha, *Kor. J. Herbology*, **18**(4), 263-268 (2003).
 - 20) J.H. Yang and N.H. Lee, Skin permeation and crosslinking with biological tissue of the hydrolyzed products of gardeniae fructus extract, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**(1), 7-16 (2005).
 - 21) K.J. Yun, D.H. Kim, J.H. Ryu and C.S. Yook, Studies on the constituents and their antibacterial effect of the root of *Lithospermum erythrorhizon*, *Bull. K.H. Pharma. Sci.*, **27**, 31-36 (1999).
 - 22) J.H. Yang and N.H. Lee, Skin permeation and anti-inflammatory effects of hydrolyzed products of gardeniae fructus extracts, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **34**(2), 115-123 (2004).
 - 23) B.W. Barry, *Dermatological Formulations*, Marcel Dekker, New York, 49-94 (1983).
 - 24) D.U. Lee, C.H. Park, S.I. Kang, E.G. Min, Y.H. Han and C.K. Lee, Isolation of the component transformed into blue pigments by aerobic bacteria in the fruits of gardenia jasminoides, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**(3), 204-208 (1998).
 - 25) C.A. Winter, E.A. Risley and G.W. Nuss, Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drugs, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **111**, 544-547 (1962).
 - 26) K.F. Swingel, I.J. Grant, L.W. Jaques and D.C. Kyam, Interaction of anti-inflammatory drugs in carrageenan-induced foot edema of the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **172**, 423-425 (1974).
 - 27) B.J. Yun, E.S. Park and S.C. Chi, Pharmacokinetic and pharmacological evaluation of topical microemulsion preparation containing piroxicam, *J. Appl. Pharmacology*, **7**, 54-58 (1999).
 - 28) A.R. Cho, Effect of silver sulfadiazine on the skin cell proliferation and wound healing process in hairless mouse 2nd degree burn model, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **32**(2), 113-117 (2002).
 - 29) R.M. Jacobsen, *Aqua vitae*, The story of Dr. John W. Willard and his break through discovery : Catalyst altered water, *Lib. Cong. Catal. USA*, 37-50 (1992).