

황금 및 생강 복합 수용성겔 제제의 항산화 활성 및 피부염 치료효과

양재현* · 김대근 · 윤미영 · 안재규

우석대학교 약학대학

(2006년 7월 8일 접수 · 2006년 7월 28일 승인)

Antioxidative Activity and Therapeutic Effect of the Hydrogel Preparations of *Scutellariae Radix* and *Zingiberis Rhizoma* on Dermatitis

Jae-Heon Yang[†], Dae-Keun Kim, Mi-Young Yun and Jae-Kyu Ahn

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanjugun 565-701, Korea

(Received July 8, 2006 · Accepted July 28, 2006)

ABSTRACT – This study was performed to investigate the effects of treatment for dermatitis using the herbal gel preparations. *Scutellariae Radix* (SR) and *Zingiberis Rhizoma* (ZR) were used for the purpose of herbal preparations. Baicalin, baicalein are the ingredients of SR, having biological effects like anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-bacterial and anti-allergic action. 6-Gingerol is one of the ingredients of ZR having biological effects like anti-inflammatory and analgesic action. The three types of hydrogels (SRE, SRH, SZH) were formulated with Carbopol 940, Labrasol, Triethanolamine etc. Baicalin was hydrolysed to baicalein by β -glucuronidase for the purpose to increase rate of skin permeation. Content of ingredients by HPLC determination, rate of skin permeation using Franz type diffusion cell, anti-oxidative activity for the free radical, hydroxyl radical, superoxide, anti-inflammatory by using carrageenan injection, efficacy on the dermatitis induced by 2,4-dinitro-chlorobenzene (DNCB) were experimented. Baicalein showed higher permeability than baicalin, so it is considered that baicalein was more suitable form than baicalin for transdermal absorption by its lipophilic property. In the anti-oxidative experiments, SZH gel was the most effective scavenging activity than the other gels in all experiments. In anti-inflammatory test, SRH and SZH gel more decreased edma rapidly than SRE gel. In case of using SZH gel, treatment period for the dermatitis was more declined than that of other gel groups. These results suggests that the SZH hydrogel could be suitable preparations for the treatment of dermatitis.

Key words – Baicalin, Baicalein, Skin permeation, Dermatitis

황금(*Scutellaria Radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본식물인 속씨은 풀(*Scutellaria baicalensis* GEORGI)의 주피를 벗긴 뿌리로 한방에서는 청열, 해독의 목적으로 사용되어 왔다. 약리작용으로는 담즙배설 촉진, 항균, 이노, 완하, 죽상동맥경화 방지, 위액분비 억제, 진정, 혈압강하 작용 등이 보고되어 있다.¹⁻³⁾ 황금에 관한 연구로서 Kimura 등⁴⁾은 황금의 고지혈증과 지방분해에 대한 효과를, Jun 등⁵⁾은 황금추출물의 접촉성 피부염에 대한 효과에 대하여 보고하였다.

황금의 flavonoid성분 중 하나인 baicalin 및 baicalein (5,6,7-trihydroxyflavone)은 항알러지,⁶⁾ 항박테리아⁷⁾ 및 항바이러스⁸⁾와 같은 다양한 생물학적 활성을 가지며, 그밖에 lipoxygenase의 저해, 마이크로솜의 지질 과산화반응 억제,

산소라디칼 생성의 저해, 그리고 최근 H₂O₂, -OH 및 O₂⁻와 같은 활성 산소종으로 유도된 섬유아세포 손상의 억제 등의 항산화 활성이 보고되어 있다.⁹⁻¹²⁾ Kim 등¹³⁾은 baicalin이 *E. coli*의 β -glucuronidase에 의하여 가수분해되어 baicalein과 α -D-glucuronic acid로 분리된다고 보고하였다.

생강(*Zingiberis Rhizoma*)은 생강과(Zingiberace)의 다년생 초본인 생강(*Zingiber officinale*)의 뿌리줄기로, 한방에서는 소화불량, 구토, 설사에 효과가 있고, 혈액순환을 촉진하며, 항염증 및 진통효과가 있다. 생강에 대한 약리 연구로서 Altman 등¹⁴⁾은 생강추출물이 무릎 골 관절염 환자에게 미치는 영향을 조사한 바 있다. 생강의 매운맛 성분중의 하나인 6-Gingerol은 강력한 Prostaglandin inhibitor로 작용하여 소염 및 살균효과를 나타내며, 항산화 활성도 가지고 있다. 6-Gingerol의 약리활성에 대한 연구로는 Lee 등¹⁵⁾이 Gingerol의 산화방지 효과에 대해 보고한 바 있다.

산소는 체내에서 대사되는 과정 중 생명유지를 위한 작용

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

을 하고 있으나 일부는 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인에 의하여 활성산소라 불리는 Superoxide radical(O_2^-), Hydroxyl radical($-OH$), Hydrogen peroxide(H_2O_2), Singlet oxygen (1O_2) 등을 발생시킨다. 이러한 활성산소들은 몇 가지 효소 반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐 세포 및 조직 중에서 생성되고 있다. 생체 내 과잉의 활성산소가 생성되면 각종염증, 피부노화, 세포괴사, 발암 및 돌연변이 등이 나타나 단백질, 지질, DNA와 같은 세포성분의 파괴 및 진피 결합조직의 손상을 가져온다. 특히 $-OH$ radical은 강력한 산화력을 나타내는 활성산소로 피부염증을 일으키고, 피부노화를 촉진하는 것으로 보고되어 있다.^{16,17)} 또한 자동차매연, 공장 폐수, 농약살포와 같은 환경오염 및 공해로 발생한 합성물질 및 유해물질로 인하여 각종 피부염이 급격히 증가하고 있으며 각종 피부염은 이와 같은 유독물질에 접촉되어 발생하는 것으로 보고되어 있다.⁹⁾

저자는 활성산소에 의한 피부 조직손상을 보호하고, 각종염증 및 피부염질환에 효과적인 생약 복합 치료제의 개발을 목적으로 연구에 착수 하였다. 본 연구에서는 항염, 항균, 항산화 및 항알러지 작용이 보고된 Baicalein을 함유한 황금과 항염, 진통, 항산화작용이 알려진 6-Gingerol을 함유한 생강을 복합하여 수용성겔로 제조한 후, 주성분 정량, 피부투과 및 잔류량 측정, 항염 및 항산화 효과를 측정 비교하였고, DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)로 유발된 피부염에 대한 치료효과를 검토한 결과 유의성 있는 결과를 얻게 되었으므로 이를 보고하고자 한다.

실험 방법

시약

황금(*Scutellariae Radix*)은 익산 보화당 한의원에서 구입, 음건하여 사용하였고 생강(*Zingiberis Rhizoma*)은 전북 봉동 지역 시판품을 구입하여 사용하였다. Baicalin, Baicalein (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 및 6-Gingerol(Wako Chemical Co., Japan)은 표준품을 사용하였다. Carbopol 940은 BASF Co.(Ludwigshafen, Germany), Labrasol은 Gattefosse Co. (Cedex, France)에서 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)과 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 Sigma Co.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기

High Performance Liquid Chromatograph(M930, Youngin Co., Korea), Spectrophotometer(Shimazu UV-1201, Japan), Skin permeation tester(FCDV-15, Lab Fine, Korea), Sur-

face tensionmeter(Model 3010, Yoshida, Co., Japan), Digital Plethysmometer(LE 7500, Panlab S.L., Spain) 등을 사용하였다.

실험동물

Hairless mouse(웅성, 25±5 g, Charles River Lab., U.S.A.), ICR계 마우스(웅성, 25±5 g, Daehan Biolink, Korea) 및 S.D. 계 랫트(웅성, 200±20 g, Daehan Biolink, Korea)를 분양받아 사용하였다. 사육실 온도는 25±1°C, 습도 55±10%를 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 하였다. 고품사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

황금 및 생강 추출물의 제조

황금 및 생강 1 kg을 각각 조절하여 에탄올 400 mL, 증류수 600 mL을 넣고 60°C 수욕상에서 6시간동안 진탕추출하여 여과한후 여액을 감압 농축하여 동결 건조하였다. 황금의 황색 분말(Yield 19.4%)과 생강의 담갈색 분말(Yield 20.1%)을 얻어 시료로 하였다.

수용성겔의 제조

황금 수용성겔(이하 SRE)의 제조는 Yang 등¹⁸⁾의 방법에 따라 실험하였다. 황금 엑스 분말을 정제수에 용해시키고 propylene glycol, labrasol, ethanol을 순차적으로 가하여 혼합한 후 carbopol 940을 넣어 팽윤시키고 triethanolamine을 적가 하여 pH 7.0으로 하여 겔을 제조하였다. 황금 가수분해 수용성겔(이하 SRH)의 제조는 황금 엑스 분말을 정제수에 용해시키고 β-glucuronidase 500 unit를 가하여 50°C에서 2시간 반응시킨 후에 SRE와 동일한 방법으로 제조하였다. 황금 및 생강 복합 수용성겔(이하 SZH)의 제조는 황금엑스를 가수분해시킨 후 생강 엑스를 혼합하여 SRE와 동일한 방법으로 제조하였다(Table I).

주성분의 확인 및 정량

황금엑스 및 수용성겔 중에 함유되어 있는 baicalin 및 baicalein의 함량은 Rhee 등¹⁹⁾의 HPLC방법에 따라 측정하였다. 고정상으로는 μ-Bondapak C₁₈ 3.9×300 mm, Waters[®]을 사용하였고, 이동상으로는 0.5% phosphoric acid : acetonitrile (73 : 27 v/v%)의 혼액을 사용하였다. 검출기는 UV detector로서 파장은 280 nm, 유속은 1.2 mL/min, 감도는 0.05 AUFs 였고 얻어진 피크의 면적을 측정하여 계산하였다.

생강엑스 및 수용성겔 중에 함유되어 있는 6-gingerol의 함량은 Jo 등²⁰⁾의 HPLC방법에 따라 측정하였다. 컬럼은 μ-Bondapak C₁₈ 3.9×300 mm, Waters[®]을 사용하였으며, 이동

Table I-Formulas of Each Hydrogel Preparations

Preparation	SRE Gel	SRH Gel	SZH Gel
SREP	1.0	1.0	1.0
ZREP	-	-	2.0
Carbopol 940	1.0	1.0	1.0
Propylenglycol	20.0	20.0	20.0
Labrasol	10.0	10.0	10.0
Ethanol	10.0	10.0	10.0
Triethanol amine	1.5	1.5	1.5
β-Glucuronidase	-	500 unit	500 unit
Distil. Water	56.5	56.5	54.5
Total	100.0	100.0	100.0

SREP : Scutellariae Radix extract powder
 ZREP : Zingiberis Rhizoma extract powder

상으로는 acetonitrile : water (55 : 45 v/v%)의 혼액을 사용하였다. 검출기는 UV detector로서 파장은 280 nm, 유속은 1.0 mL/min, 감도는 0.05 AUFs였고 얻어진 피크의 면적을 측정하여 계산하였다.

피부투과 실험

수용성젤의 피부투과 실험은 Yang 등²¹⁾의 방법에 따라 실험하였다. SRE, SRH 및 SZH제제를 각각 1.0 g씩을 취하여 hairless mouse 피부에 도포한 후, Franz modified diffusion cell(area : 1.77 cm², effective vol. : 11.5 mL)을 사용하였다. Hairless mouse 피부는 복부를 절개하고 피하지방 및 모세혈관을 조심스럽게 제거한 후 사용하였고, 시험액은 pH 7.4 인산완충용액을 수기 용액으로 하였다. 수용성젤 제제 1.0 g씩을 마우스 피부에 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.²⁶⁾

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

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

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), 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 실험

피부 잔류량 측정은 Min 등²²⁾의 방법에 따라 실험하였다. 피부투과실험 직후에 피부 상에 잔류되어 있는 수용성젤을 제거하고 생리식염수를 사용하여 피부를 충분히 씻어낸 후 수용성젤을 직접 바른 부분의 피부만을 절제하고 냉동고에 보관한 다음 해동시켜 trisbuffer 1 mL을 가하고, sonication 하여 균질화 하였다. 균질 액에 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 baicalin, baicalein 및 6-gingerol의 잔류량을 산출하였다.

항산화 실험

DPPH법-수용성젤의 Free radical 소거 활성 측정은 Park 등²³⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. 측정에는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil(DPPH)을 사용하였다. 실험방법은 0.2 mM DPPH 메탄올 용액 0.5 mL에 시료를 여러 농도로 희석한 용액 1 mL를 가하고 Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 20°C에서 30 min 간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교 표준물질로는 butylated hydroxy anisole(BHA)를 사용하였다. 그 활성의 크기는 DPPH(66.7 μM)의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(Free Radical Scavenging Activity, FSC₅₀, ug/mL)와 DPPH에 대한 전자공여능(Electron Donating Ability, EDA%)로 나타내었다.

$$EDA(\%) = \frac{Control\ ABS - Sample\ ABS}{Control\ ABS} \times 100$$

Sample ABS : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control ABS : 시료 대신 Methanol을 가한 시험액의 흡광도

Hydroxyl radical scavenging activity법-수용성젤의 Hydroxyl radical 소거활성은 Choi 등²⁴⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. 여러 농도의 시료에 1.5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 100 μM L-ascorbic acid, 100 μM CuSO₄, 12 μM cytochrome c를 가하여 3 mL를 조제하고 25°C에서 90분간 반응 시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 같은 농도의 sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 L-ascorbic acid, CuSO₄, cytochrome c를 가하여 조제한 후 위와 같은 조작을 반복하였다. 그리고 각각의 흡광도를 측정하여 -OH소거율(Hydroxyl Radical Scavenging Ability, HRSA%)을 계산하였다.

$$\text{HRSA}(\%) = \frac{\text{Sample ABS} - \text{Control ABS}}{\text{Cytochrome c ABS} - \text{Control ABS}} \times 100$$

Sample ABS : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Cytochrome c ABS : Sodium phosphate buffer에 cytochrome c만 가한 시험액의 흡광도

Control ABS : 시료를 넣지 않은 시험액의 흡광도

*Superoxide quenching activity*법 - 수용성젤의 Superoxide 소거활성은 Choi 등²⁴⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. 시료를 여러 농도로 하고 0.05 M sodium phosphate buffer (pH7.8)에 1.3 μM riboflavin, 13 mM methionine, 75 μM NBT, 0.1 mM EDTA를 가하여 5 mL를 조제한다. 박스 안에 5500 lux 광원으로 20±1°C에서 15분동안 5분 간격으로 위치를 변화 시켜면서 반응시킨 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 같은 농도의 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 7.8)에 riboflavin, methionine, NBT, EDTA를 가하여 조제한 후 같은 조작을 반복하였다. 각각의 흡광도를 측정하여 O₂⁻ 소거활성(Superoxide Quenching Ability, SQA%)을 계산하였다.

$$\text{SQA}(\%) = \left[1 - \frac{\text{Sample ABS}}{\text{Control ABS}} \right] \times 100$$

Sample ABS : 시료를 넣은 시험액의 흡광도

Control ABS : 시료를 넣지 않은 시험액의 흡광도

항염 실험

수용성젤의 항염 실험은 Winter 등²⁵⁾의 방법에 따라 실험하였다. 부종 유발은 랫트의 오른쪽 족 저부에 1% λ-carrageenan과 1% kaolin을 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 하였다. 부종율은 λ-carrageenan주사 직후 및 각 시간대의 발 부피의 변화를 이용하여 다음 식으로 부종율(%), swelling) 및 부종 억제율(%), inhibition)을 산출하였다.²⁶⁾

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

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

V는 6, 12, 24 및 48시간 후의 발 부피이며, V₁는 주사 직후 발 부피, V_c는 대조군의 부종율, V_d는 처치군의 부종율이다.

DNCB로 유발된 피부염 및 치료효과 관찰

마우스의 피부염 유발 및 수용성젤에 의한 치료효과 관찰은 Rees 등²⁷⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene) 1g을 acetone과 olive oil(3:1)혼합용액에 녹이고 100 ml로 하여 피부염 유발용액으로 사용하였다. 마우스의 등 피부를 상처가 나지 않도록 제모한 후 1% DNCB용액 200 μl를 투여하고, 4일 후 0.3% DNCB용액 150 μl를 일주일에 3회씩 2주간 투여한 다음, 피부염이 충분히 유발되어 가피가 벗겨지고 굵은 행동이 심화되면 DNCB 처리를 중단하였다. 수용성젤 1g씩을 염증부위에 매일 2회씩 바르면서 피부염의 형태변화를 임상적 육안 평가법을 이용하여 관찰하고 치료계수를 구하였다.

평가항목은 홍반(erythema), 가려움과 건조피부(Pruritus & Dry skin), 부종과 혈종(Edema & escoriation), 짓무름(Erosion) 그리고 태선화(Lichenification)로 나누었으며, 이 각각의 항목은 없음(0), 약함(1) 중증도(2), 심함(3)으로 채점한 후 채점한 5개 항목을 합한 점수를 비교하였다. 따로 마우스 등피부에 변화양상을 관찰하기 위하여 염증생성 및 치료단계에서 마우스를 에테르로 마취시킨 다음 사진을 촬영하여 치료효과를 관찰하였다.

결과 및 고찰

주성분 함량

Rhee 등¹⁹⁾의 황금 성분의 HPLC분석 방법을 응용하여 파장 280 nm에서 baicalin 및 baicalein의 chromatogram을 작성하였을때, baicalin의 피크는 7.3분이었고 baicalein의 피크는 24.8분 후에 나타났다(Figure 1). 검량선의 작성결과 baicalin은 y=43640x+46600, r²=0.9999이었고 baicalein은 y=39680x-3500, r²=0.9999으로서 200 μg/mL까지 양호한 직선성을 나타내었다.

수용성젤에서의 함량은 SRE에서 baicalin이 0.39%, baicalein이 0.03%이었고, 가수분해시킨 겔인 SRH에서는 baicalin이 0.16%, baicalein이 0.3%이었으며, SZH에서는 baicalin이 0.15%, baicalein이 0.29%로 SRH와 비슷한 함량을 나타내었다(Table II).

Jo 등²⁸⁾의 생강 중의 gingerol 화합물의 HPLC분석방법을 응용하여 파장 280 nm에서 6-gingerol의 chromatogram을 작성하였을때, 7.6분에서 6-gingerol의 peak가 나타났다(Figure 2). 6-gingerol의 피크 면적으로 작성된 검량선의 회귀 직선식은 y=8931.2x+9553.3이었고 상관계수 r²=0.9999로서 250 μg/mL까지 6-gingerol의 직선성이 인정되었다. 생강 엑스중의 6-gingerol 함유량은 48.1±1.86 mg/g로 나타났으며,

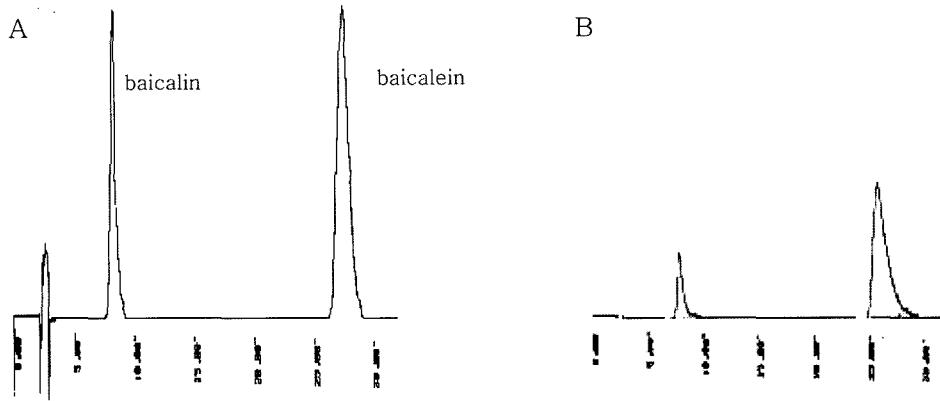


Figure 1—HPLC chromatograms of baicalin and baicalein.

A : Standard chromatogram of baicalin and baicalein, B : chromatogram of baicalin and baicalein in SRH hydrogel

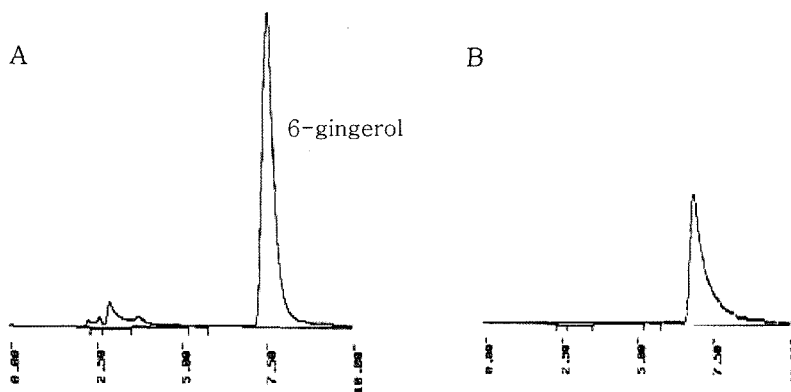


Figure 2—HPLC chromatograms of 6-gingerol.

A : Standard chromatogram of 6-gingerol, B : chromatogram of 6-gingerol in SZH gel

Table II—Comparison of Contents(%) of Baicalin, Baicalein and 6-gingerol in Hydrogel Preparations

	Baicalin	Baicalein	6-Gingerol
SRE Gel	0.39±0.02	0.03±0.00	-
SRH Gel	0.16±0.01	0.30±0.04	-
SZH Gel	0.15±0.01	0.29±0.04	0.11±0.01

Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments.

SZH에서의 함량은 0.11%로 나타났다(Table II).

피부투과

Yang등²¹⁾의 치자 가수분해물 제제의 피부투과 측정법을 응용하여 실험하였을때 수용성겔 제제에서 시간별로 baicalin, baicalein 및 6-gingerol의 투과된 양을 측정한 결과, baicalin의 투과량은 7시간 후 SRE는 7.52±1.29 µg/cm²로서 SRH 및 SZH에 비해 약간 높았으나, 비교적 낮은 투과율을 보여 줌으로써, baicalin은 피부투과가 잘 되지 않음을 알수 있었다(Figure 3).

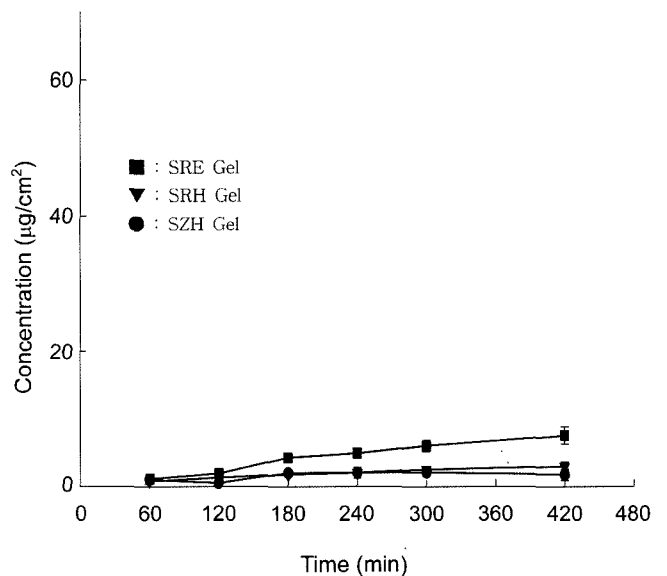


Figure 3—Amount of permeated baicalin in SRE and other hydrogels for 7 hours through excised hairless mouse skin.

Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments.

한편 baicalein의 투과량은 7시간 후 SRH에서 $59.4 \pm 0.82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 가장 높았고, SZH에서도 $54.8 \pm 1.61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 높은 투과량을 보여준 반면, SRE에서는 $8.08 \pm 0.83 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 아주 낮은 투과량을 나타내었다. 단위시간당 baicalein의 투과속도는 SRE에서 $1.15 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 인 반면, SRH에서 $8.49 \pm 0.18 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$, SZH에서 $7.84 \pm 0.23 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 으로 SRE에 비해 약 7배정도 높은 수치를 나타내었다. 따라서 baicalein 제제는 농도 의존적으로 투과됨으로써 baicalin에 비하여 상대적으로 높은 투과율을 나타내었는데, 이는 baicalein이

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

Sample	Parameters			
	Cumulative amount for 7hr ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	T_L (hr)	
SRE Gel	Baicalin	7.52 ± 1.29	1.07 ± 0.18	0.99 ± 0.01
	Baicalein	8.08 ± 0.83	1.15 ± 0.12	0.91 ± 0.13
	6-Gingerol	-	-	-
SRH Gel	Baicalin	2.85 ± 0.69	0.41 ± 0.14	0.88 ± 0.23
	Baicalein	$59.44 \pm 0.82^{**}$	8.49 ± 0.18	0.90 ± 0.03
	6-Gingerol	-	-	-
SZH Gel	Baicalin	3.73 ± 0.83	0.53 ± 0.17	0.74 ± 0.11
	Baicalein	$54.88 \pm 1.61^{**}$	7.84 ± 0.23	0.85 ± 0.09
	6-Gingerol	29.77 ± 1.79	4.96 ± 0.30	1.21 ± 0.07

Each data represents the mean \pm S.D. of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with SRE group data by T test (** $P < 0.01$).

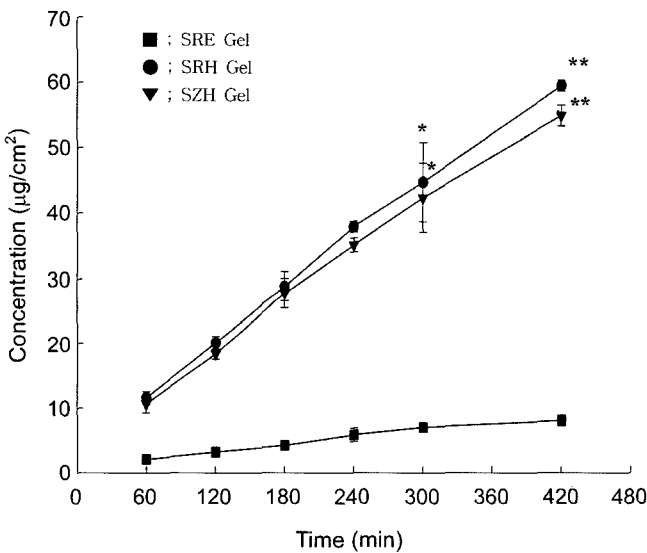


Figure 4—Amount of permeated baicalein in SRE, SRH and SZH hydrogels for 7 hours through excised hairless mouse skin. Each data represents the mean \pm S.D. of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with SRE gel group data by T test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

baicalin에 비해 피부투과가 용이한 형태이기 때문으로 사료된다(Table III, Figure 4).

한편 6-gingerol의 7시간 후 총 투과량은 SZH에서 $29.77 \pm 1.79 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로써 피부투과량은 baicalin에 비해서는 5배정도 높았으나, baicalein에 비하여는 약 54%정도 투과율을 보여주었다(Table III, Figure 5).

피부잔류량

피부 잔류량은 Min등²²⁾의 자근, 치자 복합제제의 경피 흡수 및 치료효과 중 피부잔류량 실험방법을 응용하여 실험하였을때, baicalin의 잔류량은 7시간 후 세 가지 겔에서 모두 14-16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 인 반면, baicalein 및 6-gingerol은 10-12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로써 baicalin의 잔류량이 더 높게 나타났다(Figure 6).

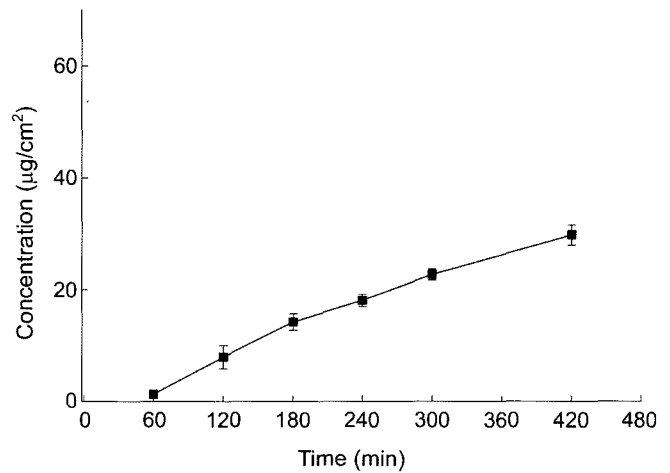


Figure 5—Amount of permeated 6-gingerol in SZH hydrogels for 7 hours through excised hairless mouse skin. Each data represents the mean \pm S.D. of 5 independent experiments.

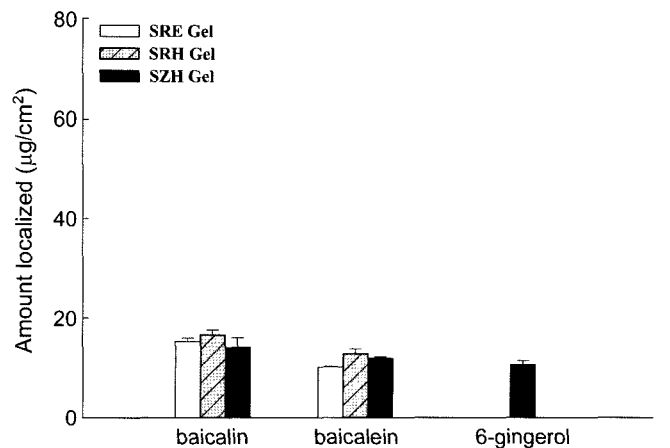


Figure 6—Comparison of residual baicalin, baicalein and 6-gingerol on epidermic tissue after 7 hours under various preparations. Each data represents the mean \pm S.D. of 5 independent experiments.

Table IV—Free Radical Scavenging Activity of Hydrogel Preparations and References Compounds Using DPPH Method

Hydrogel	Scavenging activity (FSC ₅₀ , µg/mL)
SRE gel	7916.67±6.38
SRH gel	6018.10±10.22
SZH gel	5170.45±8.47
BHA	10.25±1.25

Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments.

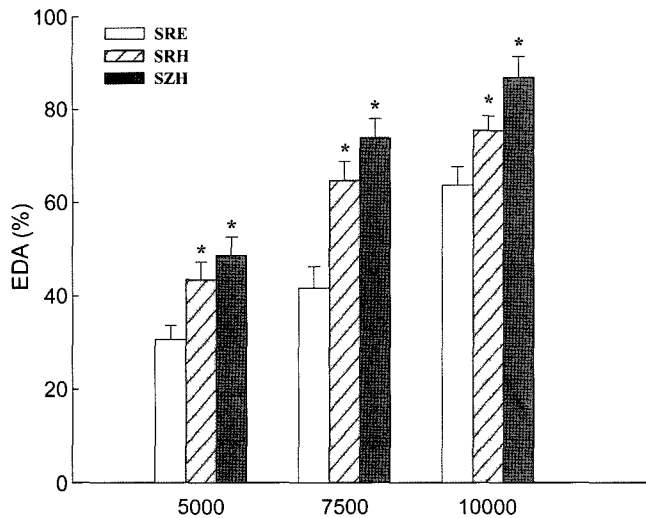


Figure 7—Electron donating ability (%) of hydrogels under various concentration (µg/mL) using DPPH method. Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with SRE gel data by T test (*P<0.05).

항산화 효과

Park 등²³⁾의 황금 중 baicalein 의 항산화 효과에 대한 실험방법을 응용하여 DPPH법으로 실험한 결과, FSC₅₀값이 각 SRE 및 SRH에서 7916.67±6.38, 6018.10±10.22 µg/mL 인 반면, SZH에서는 5170.45±8.47 µg/mL로 나타나 SZH가 다른 겔에 비해 Free radical 소거활성이 더 높은 것으로 나타났다(Table IV). EDA(%) 역시 10,000 µg/mL에서 SZH가 86.94%로 가장 높았고, SRH 75.47%, SRE 63.72%순으로 SZH가 가장 높은 수치를 나타냈다. 이는 baicalein이 baicalin에 비해 전자공여능 능력이 뛰어나고, 6-gingerol 역시 전자공여능이 있는 것으로 보인다(Figure 7).

또한 Choi 등²⁴⁾의 베르베린에 대한 hydroxy peroxide 억제 활성 실험방법을 응용하여, -OH소거활성을 측정 하였을 때, 10,000 µg/mL농도에서 SZH가 71.5±3.7%로 가장 높았고, SRE는 56.03±2.7%, SRH는 36.3±3.9%순으로 나타났다. 따라서, 이로 미루어 -OH소거활성은 baicalin이 baicalein에

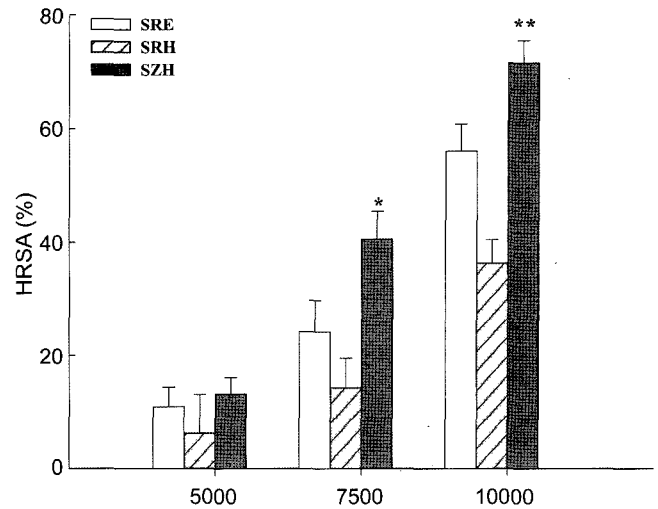


Figure 8—Hydroxyl radical scavenging ability (%) of hydrogels under various concentration (µg/mL). Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with SRH gel data by T test (*P<0.05, **P<0.01).

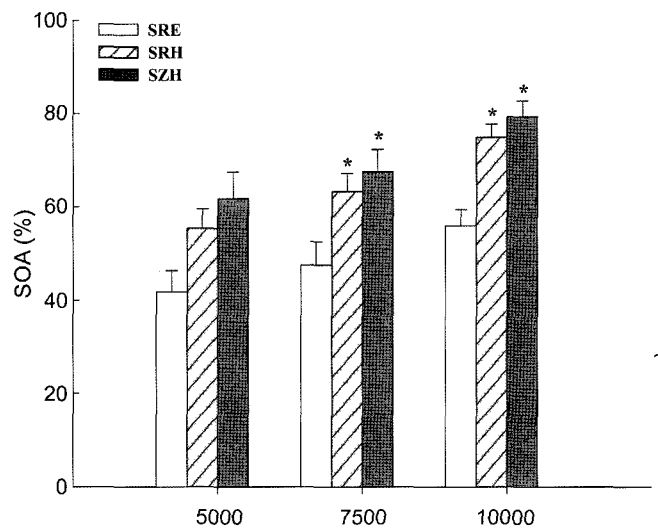


Figure 9—Superoxide quenching ability (%) of hydrogels under various concentration (µg/mL). Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with SRE gel data by T test (*P<0.05).

비해 더 높은 수치를 보여주었으나, 6-gingerol을 함유할 경우 훨씬 높은 -OH 소거활성을 나타내는 것으로 사료된다(Figure 8).

한편, Superoxide 소거활성 실험에서는 10,000 µg/mL농도에서 SZH가 79.42%로 가장 높은 억제율을 보여주었고, SRH 74.92%, SRE 55.96%순으로 나타났으며, 농도에 따른 O₂⁻ 소거활성은 SZH에서 가장 높게 나타났다(Figure 9).

Table V—Inhibitory Effects of Formulations on Swelling of Rat Hind-paw Induced by Carrageenan (1%)

Formulation	Time (hr)				
	0 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr
Control	0.85±0.05	1.99±0.06	1.86±0.11	1.61±0.06	1.16±0.06
SRE	0.89±0.01	1.89±0.09	1.75±0.06	1.49±0.04	1.12±0.04
SRH	0.9±0.04	1.76±0.09	1.62±0.05	1.32±0.08*	1.02±0.02**
SZH	0.88±0.02	1.82±0.05	1.69±0.05*	1.27±0.04**	0.99±0.06**

Each data represents the mean±SD of 5 independent experiments.

Statistically significant value compared with control group data by T test (*P<0.05, **P<0.01).

항염 효과

Winter 등²⁵⁾의 카라지난 유발 염증 치료효과에 대한 실험 방법을 응용하여, 수용성젤제의 부종 및 억제효과를 비교했을 때, 랫트의 족 저부의 부피를 측정된 결과, 대조군에서 1.99 mL이었으며, SRE에서는 1.89 mL로써 약간 감소하였으나, SRH 및 SZH에서는 1.76 mL 및 1.82 mL로 크게 감소되었고 24시간 후에 대조군의 발 부피는 1.61 mL인데 비하여 SRH 및 SZH에서는 각각 1.32, 1.27 mL로 큰 차이가 나타났으며, 48시간까지 그 효과가 지속되었다(Table V).

48시간 후 대조군에 대한 부종 억제율을 비교해보면 SRE에서 29%로 나타난 반면, SRH에서 63%, SZH에서는 66%로써 약 2배 정도 높은 억제율을 보여주었다(Figure 10).

DNCB를 이용한 피부염 유발 및 치료효과

Rees 등²⁷⁾의 DNCB에 의한 피부 감각효과 실험방법을 응용하여 실험하였는데, DNCB로 1차 감각 직후 마우스의 등

피부에는 큰 변화를 찾아볼 수 없었으나, 4일간 방치 후 2차 감각 시킨지 24시간 후부터는 DNCB 도포부위 주변의 털이 매우 거칠고 뺨뺨하고 일어서는 것을 볼 수 있었다. 48시간 후 부터는 감각한 부분의 털이 빠지기 시작하면서, 좁쌀 모양 형태의 검붉은 점들이 일부 나타나기 시작하였다. 1주일 후 감각한 부분의 털이 완전히 빠지면서, 매우 심한 홍반과 혈관확장, 출혈 및 염증이 나타났고, 굵은 행동도 매우 심하게 관찰되었다. 2주후에는 그 증상 더욱 심하게 진행되어 각 겔에서 평가점수가 11점부터 14점 사이로 피부염이 최고조에 달하였다.

DNCB 처리를 중단하고 약물을 도포한지 2일 후부터 관찰한 결과 SRE의 경우에는 대조군과는 큰 차이를 보여 주지는 못하였지만, 출혈 및 짓무름은 조금 개선된 상태였고, SRH 및 SZH에서는 출혈 및 짓무름 뿐만 아니라 홍반과 부종도 조금 줄어들어, 평가항목에서 10.4점을 기록하였다. 하지만 굵은 행동은 여전히 심하였다. 약물 도포후 4일째 부터는 SZH에서 털이 조금씩 나기 시작하더니 짓무름이나 혈종, 부종이 거의 치료된 상태로 진행되었고, 약간의 홍반과 태선화만 관찰되었다. 4일째 SZH 7.4점으로 SRH 9.2, SRE 10.6점에 비해 우수한 성적을 보여주었고, 6일째에는 겔을 도포한 모든 마우스에서 굵은 행동은 거의 사라졌으며, SRE의 경우에는 홍반과 태선화가 여전히 8.2점을 기록했고, SRH의 경우 털이 많이 나기 시작해 털이 없는 부분에 약간의 홍반과 태선화만 눈에 띄어 7점을 기록했다. SZH의 경우에는 모든 항목에서 약함을 보여 5.4점을 기록했고, 털이 상당부분 자라있었다. 특히 시간이 지남에 따라 SZH는 빠른 속도로 치료되는 양상을 보여주었다.

SZH, SRH 및 SRE 모두가 대조군에 비해 우수한 성적을 보여주었는데, 그 중 SZH에서 가장 우수한 성적을 보여주었고, 치료 기간도 가장 단축된 것으로 나타났다. 치료기간은 대조군이 13.6일 정도 걸린 반면, SRE에서 9.8일, SRH에서 7.2일, SZH이 6.2일 걸려 대조군에 비해 모두 우수한 성적을 보여주었으나, SZH의 경우가 치료기간이 제일 짧게 나타났다(Table VI, Figure 11).

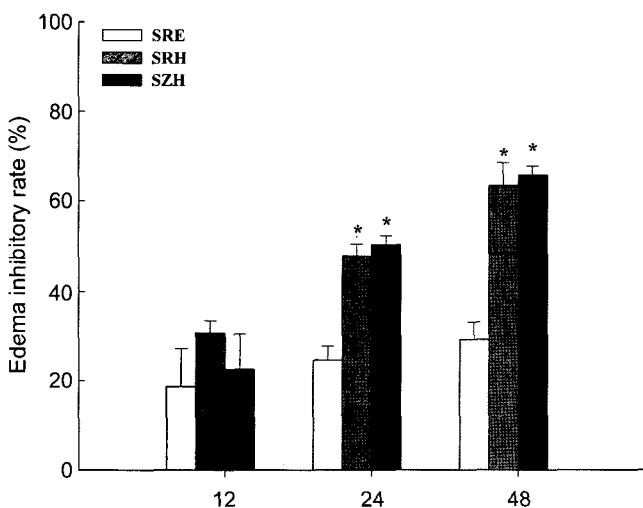


Figure 10—Inhibitory effects of formulations on swelling of rat hind-paw induced by carrageenan (1%).

Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with Control group data by T test (*P<0.05, **P<0.01).

Table VI—The Therapeutic Score of Treatment on Dermatitis under Various Hydrogels after Injury of 2,4-Dinitrochlorobenze (DNCB)

Day	2	4	6	8
Control	13.0±1.2	11.0±1.4	10.0±1	8.8±1.3
SRE	11.8±1.1	10.6±0.5	8.2±0.4	6.2±0.8*
SRH	10.4±0.5	9.2±1.3*	7.0±0.7*	3.6±0.5**
SZH	10.4±0.9	7.4±1.3*	5.4±0.9*	3.2±1.3**

Evaluation items were composed of five items (Erythema, Pruritus, Edema & escoriation, Erosion, Lichenification).

After grading each item at score [severe (3point), serious (2point), weak (1point)], it compared score which unites five item.

Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments.

Statistically significant value compared with control group data by T test (*P<0.05, **P<0.01).

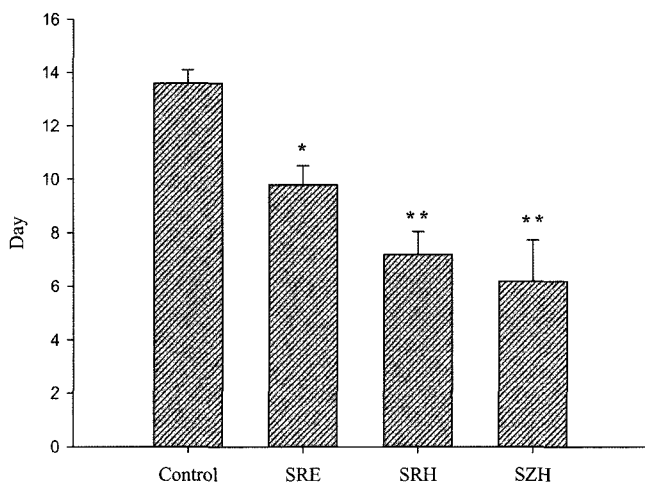


Figure 11—Comparison of therapeutic period of hydrogels to treat dermatitis.

Each data represents the mean±S.D. of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with Control group data by T test (*P<0.05, **P<0.01).

치료 과정 중에 관찰양상을 사진으로 촬영해 치료효과를 확인할 수 있었고, 8일째 되는 날에 대조군, SRE, SRH, SZH를 도포한 마우스의 등 피부를 비교하여 유의성 있는 결과를 눈으로 확인할 수 있었다(Figure 12).

결론

황금의 주성분인 baicalin를 가수분해 시키고 생강의 주성분인 6-gingerol을 함유하는 복합 수용성겔 제제를 제조한 후, 항산화 활성 및 부종억제 효과를 비교 관찰하고, 피부염에 대한 보호 및 치료제로서의 가능성을 검토하기 위하여, 피부투과율 측정, 항산화 활성, 항염 효과, 피부염유발 및 치료 효과 관찰을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

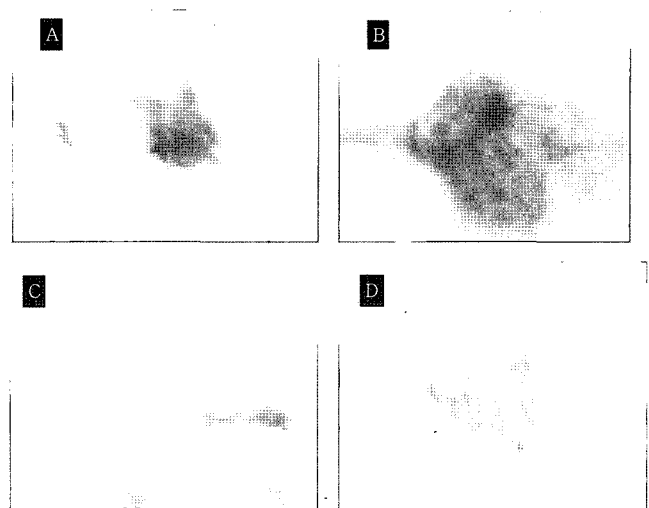


Figure 12—Photograph of mouse skin on dermatitis after 8 days under treatment of various hydrogels.

A : Control, B : SRE gel, C : SRH gel, D : SZH gel

수용성겔 제제의 피부투과율은 SRE에 함유된 baicalin이 저조한 피부투과율을 나타낸 반면, SRH 및 SZH에 함유된 baicalin은 baicalin에 비하여 훨씬 높은 성적을 보여 주었으며 6-gingerol은 완만한 피부투과율을 나타내었다.

수용성겔 제제의 항산화 효과는 SZH 및 SRH는 Free radical 및 Superoxide 소거활성이 SRE에 비하여 훨씬 높게 나타났고, SZH는 SRH에 비하여 -OH 소거활성이 더 높은 것으로 나타남으로써, SZH에서 Hydroxyl radical, Free radical, Superoxide 소거활성이 모두 높게 나타나 항산화능이 가장 좋은 것으로 나타났다.

수용성겔 제제의 항염효과는 SRH 및 SZH에서 SRE에 비하여 약 2.3배 정도의 높은 효과를 나타내었고, SZH는 SRH보다 약간 높았으나 큰 차이를 보여주지는 못하였다.

DNCB에 의한 피부염 유발 후 치료효과를 비교한 결과, 피부염 생성 6일 후에 SZH에서 치료계수가 5.4로 가장 좋은 성적을 보여주었고, SRH는 7, SRE는 8.2순으로 나타났다. 대조군은 15일까지 염증이 지속되었으나, SZH의 경우 피부염 생성 8일 후 거의 완치됨으로써 치료기간도 단축되었으며 치료효과도 우수한것으로 평가되었다.

이상의 결과 황금 가수분해물인 baicalin과 생강의 주성분인 6-gingerol을 함유한 수용성겔은 항산화 활성 및 피부염 치료효과를 높여줌으로써 생약 복합 외용제로써 개발 가치성이 높은 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국

학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(우석대학교 헬스케어기술개발사업단)이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) I.R. Lee and H.S. Park, Antimicrobial activity of Scutellariae Radix Decoction. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**(4), 249-253 (1987).
- 2) Y. Kimura, M. Kubo and T. Tani, Studies on Scutellariae Radix(3), Effects on lipid metabolism in serum, liver and fat cells of rats. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(8), 2308 (1981).
- 3) Y. Kimura, M. Kubo and K. Kusaka, Studies on Scutellariae Radix (5), Effects on ethanol induced hyperlipemia and lipolysis in isolated fat cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(1), 219 (1982).
- 4) Y. Kimura, M. Kubo and T. Tani, Studies on Scutellariae Radix (4), Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(9), 2610 (1981).
- 5) J.H. Jun and Y.H. Kang, The Effects of Scutellaria baicalensis GEORGI on Allergic contact dermatitis induced by DNCB in Mice. Dong Guk University, *D.J. I.O.M.*, Vol.7, No.1, 119-133 (1998).
- 6) N. Natsushita, Y. Kimura, K. Yokoi-Hayashi and H. Okuda, Effects of baicalein isolated from Scutellaria baicalensis Radix on adhesion molecule expression induced by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Planta Med.*, **67**, 331 (2001).
- 7) M. Kubo, Y. Kimura, T. Odani, T. Tani and K. Namba, Studies on Scutellariae Radix. Part: The antibacterial substance, *Planta Med.*, **43**, 194 (1981).
- 8) K. Kitamura, M. Honda, H. Yoshizaki, S. Yamamoto, H. Nakane, M. Fukushima, K. Ono and T. Tokunaga, Baicalein, and inhibitor of HIV 1 production *in vitro*. *Antiviral Res.*, **37**, 131 (1998).
- 9) K. Sekiya and H. Okuda, Selective inhibition of platelet lipoyxygenase by baicalein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 1090 (1982).
- 10) D. Gao, K. Sakurai, M. Katoch, J. Chen and T. Ogiso, Inhibition of microsomal lipid peroxidation by baicalein : A possible formation of an iron-baicalein complex. *Biochem Mol. Biol. Int.*, **39**, 215 (1996).
- 11) M. Yoshino and K. Murakami, Interaction of iron with polyphenolic compounds : Application to antioxidation characterization. *Anal. Biochem.*, **257**, 40 (1998).
- 12) D. Gao, R. Tawa, H. Masaki, Y. Okano and H. Sakurai, Protective effects of baicalein against cell damage by reactive oxygen species. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1383 (1998).
- 13) D.H. Kim, I.S. Jang, H.K. Lee, E.A. Jung and K.Y. Lee, Metabolism of Glycyrrizin and Baicalin by Human Intestinal Bacteria. *Arch. Pharm. Res.*, **19**(4), 292-296 (1996).
- 14) Altman, R. D. and Marcussen K. C., Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, **44**, 2531-2538 (2001).
- 15) I.K. Lee and S.Y. Ahn, The antioxidant activity of gingerol. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **17**(2), 55-59 (1985).
- 16) E. Cadenas, Biochemistry of oxygen toxicity. *Ahn Rev. Biochem.*, **58**, 79 (1989).
- 17) K.J.A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
- 18) J.H. Yang and N.H. Lee, Skin permeation and crosslinking with biological tissue of the hydrolyzed products of gardeniae fructus extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**(1), 7-16 (2005).
- 19) J.S. Rhee, E.R. Woo, N.H. Kim and E.J. Lee, A Study of Qualitative and Quantitative analysis of major ingredients in Scutellariae Radix. *Analytical Sci & Tech.*, **10**(2) (1997).
- 20) K.S. Jo, Analysis of gingerol compounds of raw ginger(*Zingiberis officinale* Roscoe) and its paste by high performance liquid chromatography-mass spectrometry(LC/MS). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **5**(29), 747-751 (2000).
- 21) 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).
- 22) D.H. Min, D.K. Kim, J.P. Lim and J.H. Yang, Transdermal drug delivery & therapeutic effect of the preparations of Lithospermi Radix and Gardeniae Fructus Extracts on the Burn & Wound Healing. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**(4), 255-263 (2005).
- 23) S.N. Park, Antioxidative Properties of Baicalin, Component from Scutellariae baicalensis Georgi and Its Application to Cosmetics (I). *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, Vol. 14, No. 5, August, 657-665 (2003).
- 24) D.S. Choi, S.J. Kim and M.Y. Jung, Inhibitory Activity of Berberine on DNA Strand Cleavage Induced by Hydrogen Peroxide and Cytochrome c. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(2), 452-455 (2001).
- 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) J.L. Rees, P.S. Friedmann and J.N.S. Matthews, The influence of area of application on sensitization by dinitrochlorobezene. *British. Foun. Dermatol.*, **122**, 29-31 (1990).