

가미귀비탕 탕액과 시판제제의 성분 및 생리활성 비교

김정옥 · 백가연 · 이화동*

한약진흥재단

Comparison of Marker Components and Biological Activities of *Gamiguibi-tang*(*Jiaweiguipi-tang*) Decoction and Commercial Extract Granules

Jung Ok Kim, Ka Yeon Baek, Hwa Dong Lee*

Traditional Korean Medicine Technology Division, National Development Institute of Korean Medicine

Gamiguibi-tang (GGBT) is a traditional herbal medicine generally used to treat anemia, insomnia, anxiety, and nervousness. GGBT is being commercially produced in the form of extract granule and the quality control methods are specified in the Korean Herbal Pharmacopeia (KHP). However, there is no method to simultaneously analyze compound preparations. In this study, a HPLC method was developed and validated for the simultaneous determination of marker compounds in GGBT. And the contents of marker components and biological activities of the commercial GGBT extract granules (GGBT-2 and GGBT-3) were compared with those of the GGBT decoction (GGBT-1). We confirmed the robustness of simultaneous analytical method by monitoring the contents of the commercial GGBT products and carrying out validation. The marker components of GGBT were geniposide (8.03~12.70 µg/mL), paeoniflorin (2.79~4.25 µg/mL) and glycyrrhizic acid (5.06~6.30 µg/mL). DPPH and ABTS radical scavenging activities were 47.34~63.17% and 21.52~33.61% in the GGBT products concentration of 1,000 µg/mL, respectively. The GGBT products significantly decreased NO, iNOS and COX-2 production in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages in a concentration-dependent manner. The GGBT-2 had higher contents of marker components and biological activities than GGBT-1 and GGBT-3. The research suggest that be used in developing quality control methods for enhancing the quality of herbal medicines.

keywords : Gamiguibitang(GGBT), Simultaneous determination, Antioxidant effect, Anti-inflammatory effect

서론

현대사회는 생활수준의 향상과 식습관의 변화로 건강에 대한 관심이 증가하고 있다. 그 중 한약제제는 예로부터 축적된 경험을 바탕으로 다양한 질병의 치료와 예방을 목적으로 우리나라를 비롯한 중국, 일본, 대만 등에서 많이 사용되어져 왔으며, 건강기능식품, 신약 개발 등의 자원으로 그 사용범위가 매우 넓어지고 있다¹⁾.

귀비탕은宋代嚴²⁾의《濟生方》에 心脾를 傷하여 발생한 健忘, 怔忡, 肢體作痛, 血虛發熱 등을 치료할 목적으로 처음 수제된 후, 明代의 薛³⁾ 등에 의하여 용도에 따라 다양하게 약물을 加減하여 사용하는 加減方이 생기게 되었는데 주로 心神過勞, 營脫失志로 心虛하여, 不眠, 怔忡, 氣困, 不食 등에 활용해왔다. 귀비탕은 東醫寶鑑⁴⁾ 內經篇의 神門에 憂思로 因하여 心脾의 二臟을 勞傷하여 발생한 健忘과 怔忡을 치료한다고 소개되어 있으며, 최근에는

뇌신경계 질환, 심인성 질환에 광범위하게 활용되고 있다^{5,6)}.

가미귀비탕은 薛³⁾의 귀비탕에 치자, 시호 각 一錢을 가미한 처방으로 肝脾鬱怒로 血傷不通한 境遇에 주로 사용한다. 가미귀비탕에 대해서 Kim 등⁷⁾은 가미귀비탕의 불면치료 효과에 대한 연구, Kim 등⁸⁾의 여대생들의 기율과 소화장애에 미치는 영향에 관한 연구, 이 등⁹⁾ 갱년기 증후군 환자의 치료 효과, 노 등¹⁰⁾의 P815세포의 serotonin 대사 과정에 미치는 영향, 임 등²⁾ 귀비탕과 귀비탕 가미방의 항산화 효과 및 6-Hydroxydopamine에 대한 PC12 세포 보호효과 비교연구 등의 심인성질환 및 스트레스성 질환에 대한 연구가 많이 보고되어 있다.

한약제제는 사용되는 한약재의 종류에 따라 유효성분의 함량이 달라지며, 동일한 약재라 하여도 제조방법에 따라 동일한 품질과 약효를 나타내지 못하는 경우가 많다. 또한 한약제제에 대한 다양한 연구를 통해 추출온도, 추출압력, 추출시간, 건조방법 등에 따라

* Corresponding author

Hwa-Dong Lee, National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongsan 38540, Republic of Korea

E-mail : herb@nikom.or.kr Tel : +82-53-810-0245

Received : 2018/07/04 Revised : 2018/09/15 Accepted : 2018/10/24

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2018.10.32.5.333

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

서 수율 및 유효성분의 차이가 매우 크게 나타나는 것으로 보고되고 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 그러므로 한약제제의 제조에는 전통적으로 사용되는 처방의 유효성분과 효능이 그대로 보존되도록 품질의 균일화와 제품의 유효성 확보를 위한 품질관리가 매우 중요하다.

현재 가미귀비탕 제제의 품질관리는 인삼의 ginsenoside Rb1, 치자의 geniposide, 감초의 glycyrrhizic acid 및 목단피의 paeoniflorin에 대하여 개별 분석법¹⁶⁾을 적용하여 이루어지고 있어 경제적, 시간적 손실이 매우 크다. 가미귀비탕의 구성 성분에 대한 분석법 연구로는 양 등¹⁷⁾의 귀비탕의 6종 생리활성 물질에 대한 동시분석법 연구가 보고되었으나, 가미귀비탕의 지표성분에 대한 정량분석 연구는 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 가미귀비탕 제제의 효과적인 품질관리를 위하여 HPLC-PDA를 이용하여 geniposide, glycyrrhizic acid 및 paeoniflorin의 동시분석법을 확립하고, 가미귀비탕 탕액 및 시판제제의 지표성분의 동시분석 및 생리활성에 대한 비교분석을 통하여 한약제제의 품질향상을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재

실험에 사용된 가미귀비탕의 구성 한약재는 (주)휴먼허브 (Gyeongsan, Korea)에서 구입하여 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 한약진흥재단 한약제제팀의 한약재보관실에 보관하였다.

2) 시약 및 기기

시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 아세트니트릴과 메탄올은 액체크로마토그래피용(J.T. Baker, USA)으로 구입하였고, phosphoric acid는 Junsei (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 표준물질로 사용한 geniposide 및 paeoniflorin은 식품의약품안전처로부터 분양받았으며, glycyrrhizic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 각 표준물질의 순도는 95% 이상이었다. 기기분석을 위한 HPLC는 Waters (USA)의 2998 PDA 및 e2695 separation module을 사용하였다.

2. 가미귀비탕 탕액 및 검액의 조제

가미귀비탕 탕액은 KHP¹⁶⁾의 의약품각조 제2부의 가미귀비탕 연건조엑스의 제법에 따라 제조하였다. 즉, Table 1과 같이 구성 약재를 중량별로 칭량한 뒤 약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100°C에서 3시간 추출하였다. 추출액은 여과 후 농축하여 분무건조기(KL-8, Seogang Engineering Co., Korea)로 건조한 다음 표준시료로 사용하였으며(건조엑스의 수득률 21.95%(w/w)), 가미귀비탕 시판제제는 시중 약국 및 한약국에서 유통되고 있는 제품을 구매하여 사용하였다. 가미귀비탕 탕액(GGBT-1) 및 시판제제(GGBT-2 및 GGBT-3)는 정확히 1회량을 칭량한 후 50% 메탄올 40 mL에 녹여 30분간 초음파 추출한 다음 0.45 µm PTFE membrane filter로 여과하여 50% 메탄올로 50 mL로 정용 후 검액으로 사용하였다.

Table 1. Composition of Gamiguibi-tang

Herbal medicine	Amount (g)	Source
Ginseng Radix	1.00	Yeongju, Gyeongbuk
Atractylodis Rhizoma Alba	1.00	Samcheok, Gangwon
Hoelen	1.00	Hubei, China
Longanae Arillus	1.00	Thailand
Astragali Radix	1.00	Neimenggu, China
Angelicae Gigantis Radix	0.67	Pyeongchang, Gangwon
Polygalae Radix	0.67	Shanxi, China
Bupleuri Radix	1.00	Hebei, China
Gardeniae Fructus	0.67	Jiangxi, China
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	0.33	Xingang, China
Aucklandiae Radix	0.33	Yunnan, China
Zizyphi Fructus	0.67	Cheongsong, Gyeongbuk
Zingiberis Rhizoma	0.33	Sichuan, China
Zizyphi Semen	1.00	Shandong, China
Moutan Cortex Radicis	0.67	Anhui, China
Total amount	11.34	

3. 가미귀비탕 제제의 성분분석

1) 표준용액의 조제

Geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid 표준물질은 각각 무게를 정확히 칭량하여 메탄올에 녹인 후 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

2) HPLC 분석조건

가미귀비탕의 지표성분의 동시분석을 위하여 고정상은 YMC사의 YMC-Triart C18 (5 µm, 4.6×250 mm, USA) 칼럼을 사용하였고, 이동상은 0.05% H₃PO₄이 함유된 물과 0.05% H₃PO₄이 함유된 아세트니트릴을 사용하여 시간에 따라 조성을 변화시키는 기울기 용리를 사용하였다(Table 2).

Table 2. HPLC analytical conditions

Instrument	Waters Alliance HPLC-PDA system		
Wavelength	UV 240 nm		
Column	YMC-Triart C18 (5 µm, 4.6×250 mm)		
Oven Temperature	30°C		
Injection Volume	10 µL		
Mobile Phase	A : 0.05% H ₃ PO ₄ in H ₂ O,		
	B : 0.05% H ₃ PO ₄ in Acetonitrile		
	Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
	0	90	10
	25	85	15
	65	55	45
	70	10	90
Flow rate	1.0 mL/min		

3) 분석법 밸리데이션

HPLC-PDA를 사용한 가미귀비탕의 지표성분 동시분석법을 확립하고 이를 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인¹⁸⁾에 따라 분석법 밸리데이션을 실시하였다. Geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid 표준액을 사용하여 특이성(specificity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 직선성(linearity), 범위(range), 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 측정하여 분석법의 타당성을 확보하였다.

(1) 특이성(specificity)

분석법이 성분에 대하여 특이적이고 식별성을 가진 방법임을

검증하기 위해 피크가 명확하게 분리됨을 확인하였고, photo diode array(PDA)로 성분의 단일성 여부도 확인하였다.

(2) 직선성(linearity) 및 범위(range)

Geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid는 12.5~200 µg/mL의 농도로 표준액을 제조하고 이를 확립된 동시분석법을 이용하여 검량선을 작성하였으며, 검량선으로부터 직선식의 상관계수(correlation coefficient, R2)를 구하여 직선성과 범위를 확인하였다.

(3) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 각 표준물질의 표준편차(SD, σ)를 검량선의 기울기(slope, s)로 나눈 값으로 계산하였다.

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

(4) 정확성(accuracy)

정확성은 회수율 시험법(recovery test)으로 측정하였으며, 대조시료에 geniposide 200, 250 및 300 µg/mL, paeoniflorin 40, 50 및 60 µg/mL, glycyrrhizic acid 80, 100 및 120 µg/mL를 첨가 한 후 회수율로 확인하였다.

(5) 정밀성(precision)

정밀성은 동일한 시료를 확립된 방법에 따라 반복 측정하였을 때 각각의 측정값들의 오차를 측정하는 반복 정밀성으로 확인하였다. 즉, 1일 6회 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시하여 얻은 결과의 상대표준편차(%RSD)로 확인하였다.

4) 지표성분 동시분석

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

4. 가미귀비탕 제제의 항산화 활성 측정

1) DPPH radical 소거활성 측정

시료의 α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성은 Blois의 방법¹⁹⁾을 변형하여 96 well plate에 맞게 수정하여 측정하였다. 각 시료용액 100 µL에 517 nm에서 흡광도를 1.00±0.02로 조정된 DPPH 용액 5 mL를 혼합하고 10분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거성(%) = (1 - 시료첨가구 흡광도/무첨가구 흡광도)×100

2) ABTS radical 소거활성 측정

ABTS radical 소거능을 이용한 항산화력 측정은 Re 등²⁰⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+를 형성시킨 후 ethanol로 1:9로 희석하여 사용하였다. 각 시료 50 µL에 희석한 ABTS 용액 100 µL를 가하여 5분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거활성 (%) = (1 - 시료첨가구 흡광도/무첨가구 흡광도)×100

5. 가미귀비탕 제제의 항염증 활성 측정

1) 세포배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포(한국세포주은행, 한국)는 10% FBS와 100 units/mL의 penicillin streptomycin sulfate가 포함된 DMEM 배지를 넣어 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다.

2) 세포독성 평가

가미귀비탕 제제의 RAW 264.7 세포에 대한 독성은 MTT assay에 의해 측정되었다²¹⁾. 즉, RAW 264.7 세포(5×10⁴ cells/mL)를 96-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 well 당 20 µL의 MTT용액을 첨가하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 4시간 반응시킨 다음 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 생존율은 대조군에 대한 흡광도의 차를 백분율로 표시하였다.

3) Nitric oxide (NO) 생성 저해활성 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 12 well plate에 최종농도가 5×10⁴ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 1 µg/mL의 LPS를 처리하고 1시간 뒤에 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액의 상층액을 얻은 후 Griess 시약과 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 백분율로 나타내었다.

4) Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS (phosphate buffer saline)로 세척한 후 100 µL의 lysis buffer를 첨가하여 30분간 용해시킨 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포막 성분을 제거하였다. 총 30 µg protein을 10% SDS-PAGE로 분리하여 이를 PVDF (polyvinylidenedifluoride) membrane에 55V로 90분간 transfer하였다. 그리고 PVDF membrane을 5% skim milk에서 1시간 방치한 뒤 primary antibody에서 4°C에서 overnight하여 준다. 다시 TBST (Tris-buffered saline and tween 20)로 3회 세척한 뒤 secondary antibody를 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 TBST로 3회 세척한 뒤 ECL kit와 반응시켜 LAS 4000 chemiluminescence detection system (Fuji, Tokyo, Japan)을 이용하여 현상 및 정량을 하였다.

6. 통계처리

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

결 과

1. 가미귀비탕 제제의 성분분석

1) 분석조건 확립

HPLC-PDA를 이용하여 가미귀비탕의 구성약재 중 치자의 geniposide, 목단피의 paeoniflorin 및 감초의 glycyrrhizic acid

3종의 성분에 대하여 동시분석 조건을 설정하였다. 3종 성분의 동시분석을 위하여 0.05% phosphoric acid가 포함된 water와 acetonitrile을 기용기 용매조건으로 하여 최적의 분석조건을 설정하였다. 검액에서의 각 성분의 peak는 표준용액에서의 표준품 peak의 retention time과 UV 흡수파장을 비교하여 확인하였으며, geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid는 각각 18.052분, 26.465분 및 62.511분에 검출되었다(Fig. 1).

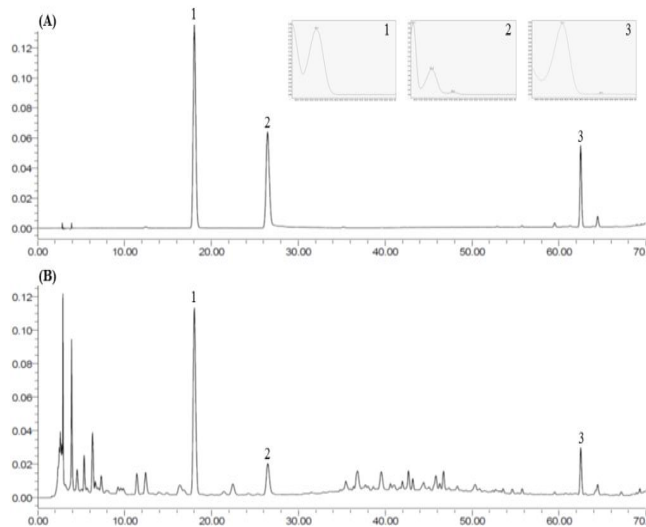


Fig. 1. HPLC chromatogram of a standard mixture (A) and Gamiguibi-tang decoction (B) at 240 nm. Geniposide (1), Paeoniflorin (2), and Glycyrrhizic acid (3).

2) 분석법 밸리데이션

(1) 직선성, 검출한계 및 정량한계

확립된 동시분석법을 이용하여 농도에 따른 피크 면적비로 geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid 3종의 지표성분에 대한 검량선을 작성한 결과 상관계수(R²) 값이 0.999 이상으로 1.0에 가까운 직선성을 나타내었다. 또한 이들 3종 지표성분에 대한 검출한계는 2.14~2.48 µg/mL로 나타났으며, 정량한계는 6.49~7.52 µg/mL로 나타났다(Table 3).

Table 3. Regression equation, correlation coefficient, LOD, and LOQ for compounds

Compound	Regression Equation*	Correlation coefficient (r ² , n=5)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Geniposide	y=14011x-36247	0.9996	2.25	6.82
Paeoniflorin	y=8226.5x-27232	0.9995	2.48	7.52
Glycyrrhizic acid	y=3613.6x-7966.1	0.9997	2.14	6.49

* y : peak area, x : concentration (µg/mL)

(2) 정확성

가미귀비탕 표준시료에 geniposide 200, 250 및 300 µg/mL, paeoniflorin 40, 50 및 60 µg/mL, glycyrrhizic acid 80, 100 및 120 µg/mL를 첨가 한 후 측정된 회수율은 Geniposide 95.32~100.26%, paeoniflorin 93.55~95.75% 및 glycyrrhizic acid 92.05~97.32%였으며, 상대표준편차도 2.21% 이하로 우수한 회수율을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Accuracy of marker compounds in Gamiguibi-tang

Compound	Spiked Conc. (µg/mL)	Accuracy	
		% Recovery	% RSD
Geniposide	200	95.32±0.25	0.26
	250	99.19±1.68	1.69
	300	100.26±1.01	1.00
Paeoniflorin	40	95.28±2.62	2.75
	50	93.55±2.07	2.21
	60	95.75±0.39	0.41
	80	92.05±1.44	1.57
Glycyrrhizic acid	100	94.78±0.91	0.96
	120	97.32±0.69	0.71

Values are means of 3 replicates.

(3) 정밀성

분석오차를 의미하는 정밀성을 확인하기 위하여 1일 6회 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시한 결과 상대표준편차(%RSD)는 1.65% 이내로 우수한 결과를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Precision of marker compounds in Gamiguibi-tang

Compound	Precision (% RSD)			
	Intra-day		Inter-day	
	Retention time (min)	Peak area (AU)	Retention time (min)	Peak area (AU)
Geniposide	0.08	0.90	0.20	0.92
Paeoniflorin	0.08	1.65	0.11	1.13
glycyrrhizic acid	0.02	1.07	0.02	1.37

Values are means of 3 replicates

3) 지표성분 동시분석

확립된 분석법을 이용하여 가미귀비탕의 지표성분인 geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid를 동시분석하였다. 세 성분 모두 다른 성분들의 peak에 간섭을 받지 않고 완전하게 분리되어 검출되었다. 가미귀비탕 탕액 및 시판제제의 분석 결과 geniposide 8.03~12.70 µg/mL, paeoniflorin 2.79~4.25 µg/mL, glycyrrhizic acid 5.06~6.30 µg/mL으로 함유되어 있었으며, GGBT-2는 GGBT-1, GGBT-3에 비해 높은 함량값을 나타냈으며 GGBT-1, GGBT-3는 geniposide를 제외한 paeoniflorin, glycyrrhizic acid에 대해서는 유의한 함량값을 나타내었다. 세 시료 모두 KHP의 기준에 적합하였다(Table 6).

Table 6. Contents of marker compounds in the Gamiguibi-tang by HPLCq

Compound	Criteria (mg/dose)	Content (mg/dose)			%RSD		
		GGBT-1	GGBT-2	GGBT-3	GGBT-1	GGBT-2	GGBT-3
Geniposide	7.7	12.7±0.06 ^b	18.75±0.07 ^c	8.03±0.03 ^a	0.48	0.38	0.39
Paeoniflorin	1.4	2.79±0.03 ^a	4.25±0.02 ^b	2.82±0.01 ^a	1.21	0.54	0.28
Glycyrrhizic acid	1.7	5.57±0.05 ^b	6.30±0.03 ^c	5.06±0.01 ^a	0.85	0.43	0.22

GGBT-1, Gamiguibi-tang decoction; GGBT-2, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer A; GGBT-3, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer B. Values are means of 3 replicates. Dose; a dose at one time. Means with different superscripts in the same row (a-c) are significantly different at p<0.05.

2. 가미귀비탕 제제의 항산화 활성

가미귀비탕 탕액과 시판제제의 항산화 활성을 측정하기 위하여

DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 짙은 자색을 띠는 DPPH radical이 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 정도를 흡광도로 확인¹⁹⁾하여 가미귀비탕 제제의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과, Fig. 2와 같이 1,000 µg/mL의 농도에서 47.34~63.17%의 항산화 활성을 나타내었다. 대조군으로 사용된 vitamin C에 비해 항산화 활성이 다소 낮았으나, 농도 의존적인 DPPH radical 소거능을 보여주었다. 1,000 µg/mL 농도에서 GGBT-2가 유의적으로 높은 DPPH radical 소거활성을 나타내었으나, 다른 농도에서 가미귀비탕 탕액과 시판제제 간의 DPPH radical 소거활성의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

ABTS radical을 이용한 가미귀비탕 제제의 농도별 항산화 활성의 측정결과는 Fig. 3과 같다. 가미귀비탕 제제의 ABTS radical 소거활성은 50 µg/mL의 농도에서 1.74~5.82%, 100 µg/mL 농도에서 2.32~6.41%, 500 µg/mL 농도에서 11.64~20.37% 및 1,000 µg/mL 농도에서 21.52~33.61%의 범위로 활성이 낮은 것으로 나타났다. ABTS radical 소거활성은 GGBT-2에서 다소 높은 활성을 나타내었다.

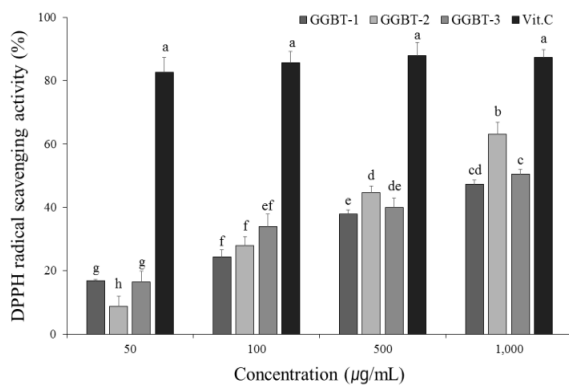


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of Gamiguibi-tang. GGBT-1, Gamiguibi-tang decoction; GGBT-2, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer A; GGBT-3, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer B; Vit. C; positive control. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

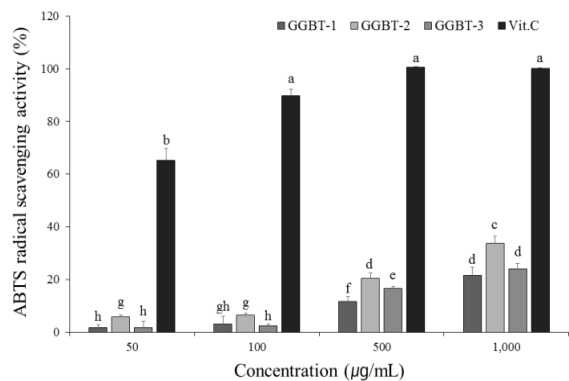


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of Gamiguibi-tang. GGBT-1, Gamiguibi-tang decoction; GGBT-2, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer A; GGBT-3, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer B; Vit.C; positive control. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

3. 가미귀비탕 제제의 항염증 활성

RAW264.7 세포는 LPS에 의해 자극되고, 이렇게 자극된 대식 세포는 염증 매개물질인 NO의 생성이 증가하게 된다²²⁾. LPS에 의해 유발된 RAW264.7 세포의 염증과정에서 NO 생성 저해에 미치는 가미귀비탕의 효과를 평가하기 위하여, 가미귀비탕 제제에 의한 세포 독성을 MTT assay에 의해 확인하였다. 그 결과 가미귀비탕 제제는 25, 50 및 100 µg/mL의 농도에서 높은 생존율을 나타내었으며, 최고 처리 농도인 200 µg/mL 처리군에서 약간의 세포독성을 나타내었다(Data not shown). 따라서 유의적인 세포독성을 보이지 않는 100 µg/mL를 최고 농도로 선정하여 nitric oxide 저해 활성 실험을 진행하였다.

가미귀비탕 제제가 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW264.7 세포에 LPS를 1 µg/ml의 농도로 처리하여 자극시킨 후 가미귀비탕 제제를 25, 50 및 100 µg/mL의 농도로 처리한 다음 24시간 동안 배양하여 NO 농도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 NO의 농도는 LPS를 처리로 급격히 증가하였으나 100 µg/mL 농도의 가미귀비탕 제제가 54.84~62.32%의 NO 생성 저해율을 나타냄을 확인하였다. 가미귀비탕 제제는 농도별로 유의적인 NO 생성 저해활성을 나타내었으며, 시판제제 간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

또한 가미귀비탕 제제의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blot 방법을 이용하여 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량을 조사하였다(Fig. 5). RAW 264.7 cell에서 LPS (1 µg/mL) 처리로 인해 iNOS 단백질의 발현이 증가하였고, 가미귀비탕 제제를 농도별로 처리 하였을 때 농도 의존적으로 iNOS 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 염증반응에서 중요한 역할을 하는 COX-2 단백질 역시 LPS 처리로 인해 그 발현량이 증가하였으며, 가미귀비탕 제제를 농도별로 처리하였을 때 COX-2의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 가미귀비탕 시판제제 GGBT-2는 50 µg/mL의 농도에서 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 50% 정도 억제되어 가미귀비탕 탕액 및 시판제제 GGBT-3보다 다소 높은 활성을 나타내었다.

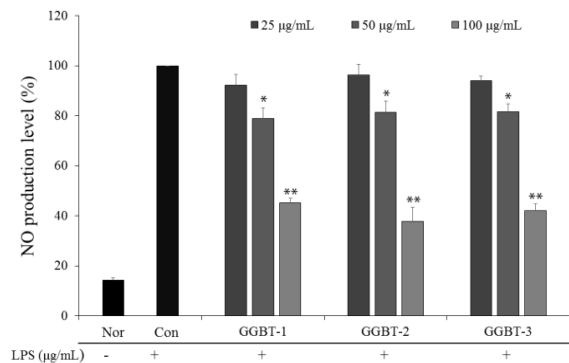


Fig. 4. Effects of Gamiguibi-tang on the production of nitric oxide in Raw 264.7 cell. Raw 264.7 cells were cultured with LPS (1 µg/mL) in the presence or absence of LSA-A for 24 h to determine the level of NO. Nor, LPS not induced group; Con, LPS induced group, GGBT-1, Gamiguibi-tang decoction; GGBT-2, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer A; GGBT-3, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer B. The data represent the mean±SD of three separate experiments (significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

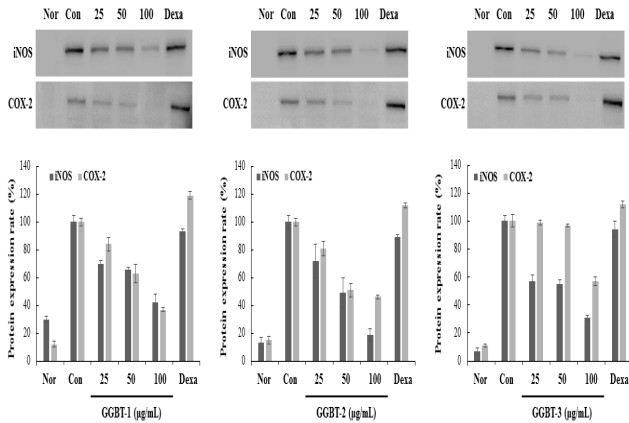


Fig. 5. Effects of Gamiguibi-tang on the protein expression of iNOS and COX-2 in Raw 264.7 cell. Raw264.7 cells were pre-incubated for 24 hr, and the cells were stimulated with lipopolysaccharide (1 µg/mL) in the presence of GGBT sample(25, 50, 100 µg/mL) for 24 hr. Nor, LPS not induced group; Con, LPS induced group; GGBT-1, Gamiguibi-tang decoction; GGBT-2, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer A; GGBT-3, commercial Gamiguibi-tang extract granule from manufacturer B. The data represent the mean±SD of three separate experiments.

고찰

귀비탕은 宋代 嚴²⁾의 《濟生方》에 心脾를 傷하여 발생한 健忘, 怔忡, 肢體作痛, 血虛發熱 등을 치료할 목적으로 처음 수제된 후, 明代의 薛³⁾ 등에 의하여 용도에 따라 다양하게 약물을 加減하여 心神過勞, 營脫失志로 心虛하여, 不眠, 怔忡, 氣因, 不食 등에 활용되어 오고 있다.

가미귀비탕은 薛³⁾의 歸脾湯에 治자, 시호 각 一錢을 가미한 처방으로 肝脾鬱怒로 血傷不通한 境遇에 주로 사용되며, 심인성 질환 및 스트레스성 질환에 대한 연구가 많이 보고^{2,6-10)}되어 있다. 본 연구에서는 한약제제의 효과적인 품질관리 및 품질향상을 위한 기초자료로 활용하고자 가미귀비탕 탕액과 가미귀비탕 시판제제 2종에 대하여 동시분석법을 통한 성분분석, 항산화 활성 및 대식세포를 이용한 NO 생성 저해활성에 대한 비교실험을 실시하였다.

가미귀비탕 제제의 성분분석을 위하여 geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid 3종의 지표성분에 대하여 동시분석을 실시하였다. 확립된 분석법의 검증을 위하여 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정밀성을 측정하였으며, 분석법에 대한 유효성을 확인하였다.

지표성분의 동시분석 결과 가미귀비탕 탕액 및 시판제제에서 geniposide 8.03~12.70 µg/mL, paeoniflorin 2.79~4.25 µg/mL, glycyrrhizic acid 5.06~6.30 µg/mL로 나타났으며, 가미귀비탕 시판제제 GGBT-2에서 다른 시료에 비하여 높은 지표성분 함량값을 나타내었다.

가미귀비탕 탕액 및 시판제제의 항산화 활성의 측정을 위하여 DPPH radical 및 ABTS radical 소거활성을 측정하였다. 가미귀비탕 제제의 DPPH radical 소거능은 1,000 µg/mL의 농도에서 47.34~63.17% 활성을 나타내었으며, 1,000µg/mL의 농도에서 21.52~33.61%의 ABTS radical 소거능을 나타내었다. 가미귀비탕

제제의 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 대조군으로 사용된 vitamin C가 나타내는 활성에 반해 활성이 낮았지만, 가미귀비탕 시판제제 GGBT-2에서 가미귀비탕 탕액 및 시판제제 GGBT-3보다 다소 높은 활성을 나타내었다. 가미귀비탕의 지표성분인 geniposide, paeoniflorin 및 glycyrrhizic acid는 치자, 작약 및 감초의 대표적인 생리활성 물질로 항산화 활성이 우수한 것으로 알려져 있다²⁶⁻²⁸⁾. 가미귀비탕 시판제제 GGBT-2가 가미귀비탕 탕액 및 시판제제 GGBT-3보다 높은 항산화 활성을 나타내는 것은 이들 지표성분의 함량값이 높는데 기인하는 것으로 사료된다.

산화작용은 생체에서 끊임없이 일어나는데 호흡에 산소를 이용하는 생물체로서 산화적 스트레스에 대한 노출은 불가피하다²⁹⁾. 생체에서 활성산소의 반응생성물이 증가됨으로써 동맥경화, 만성 염증성 질환, 암과 같은 성인병 및 노화가 일어나는 것으로 알려져 있다. 염증은 조직의 손상을 비롯한 외부로부터의 자극 등 다양한 감염원에 대한 체내 반응 중 하나로서 국소혈관과 다양한 면역세포가 유기적인 상호작용을 하게 된다^{30,31)}.

체내에서 대식세포는 면역 방어기전에 중요한 역할을 하는 세포로서, lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화되어 염증매개인자인 nitric oxide (NO)나 prostaglandin E2 (PGE2)와 pro-inflammatory cytokine인 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) 등을 분비하여 생체방어에 대비한다^{32,33)}. 이런 물질들은 선천성 및 후천성 면역을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 하지만, 과잉 생산 되었을 때에는 염증과 관련된 다양한 질환의 발병과 진행을 촉진시킨다³⁴⁾.

LPS는 산화적 스트레스를 유발하며 Gram 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포 등을 자극하여 NO와 PGE2의 생성을 증가시킨다고 보고되어 있는데³⁵⁾, 가미귀비탕 제제가 NO의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하여 가미귀비탕 제제가 RAW 264.7 cells의 생존율에 미치는 영향을 분석한 결과 100 µg/mL 이하의 농도에서 모두 세포독성을 유발하지 않음을 확인하였다. 이에 RAW 264.7 cells에 LPS로 염증을 유발하여 가미귀비탕 제제의 NO 생성 억제활성을 측정하기 위한 처리농도는 독성이 없는 것으로 확인된 범위에서 수행하였다. 가미귀비탕 제제는 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해하였으며, 100 µg/mL의 가미귀비탕 제제의 처리는 54.84~62.32%의 NO 생성 저해율을 나타내는 것으로 확인되었다. 가미귀비탕 탕액 및 시판제제 간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다³⁶⁾. 또한, COX는 arachidonic acid를 PGE2로 전환시키는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판을 형성, 위벽보호, 신장 기능 유지 등 정상적인 생체기능에 작용한다. 많은 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며, 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것이다³⁷⁾. 따라서 가미귀비탕 제제의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blot 방법을 이용하여 iNOS와 COX-2 단백질의

발현량을 조사하였다(Fig. 3). RAW 264.7 cell에서 LPS (1 μ g/mL) 처리로 인해 iNOS 단백질의 발현이 증가하였고, 가미귀비탕 제제를 농도별로 처리 하였을 때 농도의존적으로 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 가미귀비탕 시판제제 GGBT-2는 50 μ g/mL의 농도에서 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 50% 정도 억제되어 가미귀비탕 탕액 및 시판제제 GGBT-3보다 다소 높은 활성을 나타내었으며, 이 또한 GGBT-2의 높은 지표성분 함량값에 기인한 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과, 가미귀비탕 탕액과 시판제제의 지표성분 함량, 항산화 활성 및 항염증 활성을 비교 분석한 결과 시판제제 GGBT-2에서 다소 높은 지표성분 함량과 활성을 나타냄을 확인하였다. 한약제제는 제조사마다 사용하는 원료뿐만 아니라 추출, 건조, 제형화 등의 제조방식에 차이가 있어 탕액과의 동등성, 제제의 품질에 대한 논란이 빈번하게 제기되고 있는 실정이다. 본 연구의 결과는 한약제제에 대한 소비자 및 한의사의 불신해소를 위하여 진행되고 있는 탕액과의 동등성 및 약효의 유효성 연구뿐만 아니라 한약제제의 품질향상을 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서는 가미귀비탕 탕액 및 시판제제의 지표성분 및 생리활성을 비교하기 위하여 지표성분 함량, 항산화 및 항염증 활성을 조사해 보았다. 가미귀비탕 제제의 지표성분의 효율적인 분석을 위하여 동시분석법을 제시하고, 밸리데이션을 통해 분석법을 검증하였다. 확립된 동시분석법으로 가미귀비탕 탕액 및 시판제제를 분석한 결과 geniposide 8.03~12.70 μ g/mL, paeoniflorin 2.79~4.25 μ g/mL, glycyrrhizic acid 5.06~6.30 μ g/mL으로 모두 KHP의 기준에 적합하였다. 가미귀비탕 탕액 및 시판제제의 항산화 활성을 측정된 결과 1,000 μ g/mL의 농도에서 47.34~63.17%의 DPPH radical 소거능과 21.52~33.61%의 ABTS radical 소거능을 나타내었다. 가미귀비탕 제제는 농도의존적으로 NO의 생성을 억제하였으며, iNOS 및 COX-2 단백질 발현 정도를 측정된 결과 시판제제 (GGBT-2)에서 다소 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 실험적으로 검증된 동시분석법에 따라 가미귀비탕 제제의 효율적인 품질관리법을 제시하였으며, 가미귀비탕 탕액과 시판제제의 생리활성 비교분석을 통해 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 이는 한약제제의 품질향상을 위한 품질관리법 개발, 제형개발 연구 등에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약산업육성 기반구축사업의 '한약제제 현대화사업(제형개선)'에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Reference

1. Park HM, Choi KH, Jung JY, Lee SD. Metal exposure

through consumption of herbal medicine, and estimation of health risk among Korean population. *Kor J Env Health*. 2006;32(2):186-91.

2. Lim JW, Kim JW, Chung SY, Cho SH, Oh MS, Hwang WW. The Antioxidative and Neuroprotective Effect of Guibi-tang (Guipitang) and Guibi-tang gamibang (Guipitang jiaweiang) on PC12 cells. *J Oriental Neuropsychiatry*. 2009;20(1):1-19.
3. Yoo DY, Lim DW, Jeong JH. Bibliographical study on Kwibitang applied in gynecological diseases. *Korean J Orien Gynecol*. 1998;11(2):165-77.
4. Huh J. Donguibogam, Seoul : Namsandang publisher. 1980. p. 98.
5. Park SD, Park HJ, Ju WS. Study on antioxidant activities of Guibitang and its component groups. *Kor J Herbol*. 2001;16(1):11-28.
6. Lim DW, Kim DH, You DY. Effects of Kamiqubitang (KGT) on immunologic control function. *Korean J Orien Gynecol*. 1999;12(2):253-80.
7. Kim GY, Park JI, Ko H, Kim KT, Shin SM. A Case Report of an Insomnia Patient Treated with Gamiguibi-tang. *J Int Korean Med*. 2016;37(5):822-30.
8. Kim MR, Kim YS, Lee YH, Lim EM. A Study about Effects of Gamiguibi-tang on Stress and Digestive Disorder of Women Students with Oligomenorrhea. *J Korean Obstet Gynecol*. 2013;26(2):104-19.
9. Lee JA, Ban HR, Yang SJ, Park KM, Cho SH. Clinical study on one case of climacteric syndromes induced hysterectomy. *Korean J Oriental Med Prescrip*. 2004;12(1):263-76
10. No DJ, Jung IC. Study on Effect to Serotonin Metabolism of Gamiguibi-tang on P815 Cell. *J Oriental Neuropsychiatry*. 2010;21(1):1-11.
11. Kim EJ, Park HJ, Kim HJ, Kim JH, Ann JY, Lee JH, Kim YK. A monitoring study of marker contents in the Hwangnyeonhaedok-tang ex preparations on the market. *Korean J Oriental Med Prescrip*. 2008;16(1):95-107.
12. Kim JH, Seo CS, Shin HK. The comparative study on decoctions of Ssanghwa-tang (Shuanghe-tang) extracted by different extraction conditions. *Korean J Oriental Med Prescrip*. 2010;18(2):125-34.
13. Bi Z, Guo J, Zhang S, Li P. Study on the variation of the main constituents in Gardeniae Fructus after compatibility with Scutellariae Radix. *Pharm Clini Res*. 2011;19:29-31.
14. Kim NM, Kim DH. Quality change of cinnamon extract prepared with various drying methods. *Korean J Food &*

- Nutr. 2000;13(2):152-7.
15. Kim NM, Sung HS, Kim WJ. Effects of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean J Food Sci Technol.* 1993;25:204-9.
 16. Korea Food and Drug Administration. *The Korean Herbal Pharmacopoeia* 11th ed. 2016.
 17. Hye Jin Yang, Jin Bae Weon, Jin Yeul Ma and Choong Je Ma. Simultaneous Determination of Six Bioactive Components in Guibi-tang by HPLC-DAD. *Kor J Pharmacogn.* 2010;41(4):313-8.
 18. Korea Food and Drug Administration. *Analytical method guideline about validation of drug and etc.* 2015.
 19. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199-200.
 20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7.
 21. Jew SS, Bae ON and Chung JH. Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Raw-264.7 cell line. *J Toxicol Pub Health.* 2003;19(1):33-7.
 22. Yamamoto Y, He YP, Klein TW, Friedman H. Endotoxin induced cytotoxicity of macrophages is due to apoptosis caused by nitric oxide production. *Journal of Endotoxin Research.* 1994;1(3):181-7.
 23. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, and Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol.* 1995;27(1):80-5.
 24. Aoshima H, Tsunoue H, Koda H, and Kiso Y. Aging of whiskey increases 1,1 diphenyl-2picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J Agric Food Chem.* 2004;52(16):52404.
 25. Jeong JW, Lee YC, Jung SW, and Lee KM. Flavor components of citron juice as affected by the extraction method. *Korean J Food Sci Technol.* 1994;26(6):709-12.
 26. Yang HJ, Park MJ, Lee HS. Antioxidative activities and components of *Gardenia jasminoides*. *Korean J Food Sci Technol.* 2011;43(1):51-7.
 27. Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NK, Baek MI. Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol.* 1999;42(2):170-5.
 28. Choi HJ, Lee WJ, Park SH, Song BW, Kim DH, Kim NJ. Studies on the processing of crude drug (IV) - Preparing standardization and regulation of stir-frying *Glycyrrhizia* root (1). *Kor J Pharmacogn.* 2005;36(3):209-19.
 29. Seo HS, Chung BH, Cho YG. Antioxidant and anticancer effects of Agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and Chinese lizardtail (*Saururus chinesis* Baill). *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2008;16:139-43.
 30. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:31-40.
 31. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care.* 2006;12:595-601.
 32. Cho BO, Ryu HW, So Y, Lee CW, Jin CH, Yook HS, Jeong YW, Park JC, Jeong IY. Anti-Inflammatory Effect of Mangostenone F in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages by Suppressing NF- κ B and MAPK Activation. *Biomol Ther.* 2014;22(4):288-94.
 33. Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A and VanDyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharide stimulated signal transduction. *Infect Immun.* 2004;72(4):2312-20.
 34. Hilliquin P, Borderie D, Hervann A, Menkes CJ and Ekindjian OG. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997;40(8):1512-7.
 35. Yoshitake J, Kato K, Yoshioka D, Sueishi Y, Sawa T, Akaike T, Yoshimura T. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol containing endocrine disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: involvement of estrogen receptor-dependent or independent pathways. *Nitric Oxide.* 2008;18(3):223-8.
 36. Noh KH, Jang JH, Min KH, Chinzoring R, Lee MO, Song YS. Suppressive effect of green tea seed coat ethyl acetate fraction on inflammation and its mechanism in RAW 264.7 macrophage cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011;40(5):625-34.
 37. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(5):603-30.