갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액의 성분 및 생리활성 비교 연구

김정옥# · 김세진# · 김종범 · 남원희 · 이지범 · 이화동*

한약진흥재단

Comparison of Ingredient and Efficacy of *Galgeun-tang* (*Gegen-tang*) Mix Extract Powder and Decoction

Jung Ok Kim#, Se Jin Kim#, Jong Beom Kim, Won Hee Nam, Ji Beom Lee, Hwa Dong Lee*

National Development Institute of Korean Medicine(NIKOM)

Galgeun-tang (GGT) is a traditional herbal medicine generally used to treat cold, fever, headache, migraine and convulsion. To investigate the difference of ingredient and efficacy of GGT according to production method, mix extract powder and decoction, the quantities of index components, antioxidant and anti-inflammatory effects of two kinds of GGT formulation were compared. The contents of ten index components were simultaneously analyzed with HPLC. A HPLC method was developed and validated for the simultaneous determination. The GGT mix extract powder contained higher puerarin and daidzin content than the decoction, while the GGT decoction contained higher cinnamic acid and glycyrrhizic acid content than the mix extract powder. But ingredient of GGT mix extract powder and decoction was statistically very similar (r=0.8335). GGT decoction showed higher antioxidant effect than GGT mix extract powder, but the difference was low. The patterns of productions for NO, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β and IL-6 were decreased along the increasing dose of GGT formulation in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. The inhibitory effects on NO, iNOS, COX-2, IL-1β and IL-6 in Raw 264.7 cell were very similar to each other. The results obtained in this study could be used as fundamental data for verifying the equivalence and effectiveness of the herbal medicines.

keywords : Galgeun-tang, Simultaneous determination, Antioxidant effect, Anti-inflammatory effect

서 론

건강에 대한 관심의 증대와 고령화 등으로 인하여 다양한 질병의 치료와 예방의 목적으로 전통적인 한약제제에 대한 관심이 증가하고 있다. 이에 따라 합성의약품보다는 한약제제에 대한 수요가 증가하고 있으며, 이러한 한약제제는 예로부터 축적된 경험을 바탕으로 다양한 질병의 치료와 예방을 목적으로 사용되어져 왔다[1].

최근 들어 한약제제의 제형을 다양화하려는 연구가 활발해지면서 표준화가 용이하고 복용, 휴대 및 보관이 편리한 연조엑스제, 과립제, 정제 등의 제형으로 개발 및 변화가 시도되고 있다. 한약제제는 사용되는 한약재의 종류에 따라 유효성분의 함량이 달라지며, 동일한 약재라 하여도 제조방법에 따라 동일한 품질과 약효를 나타내지 못하는 경우가 많으며, 한약재 및 한약제제에 대한 다양한 연구를 통해서도 추출압력, 추출시간, 추출온도 및 건조방법 등에 따라서 수율 및 유효성분의 차이가 크게 나타나는 것으로 보고되고 있다[2-6]. 그러므로 한약제제의 제조에는 전통적으로 사용되는 처방의 유효성분과 효능이 그대로 보존되도록 품질의 균일화와 제품의 유효성 확보를 위한 품질관리가 매우 중요하다.

전통적으로 한약 처방은 질병의 치료 및 예방에 사용함에 있어 한약재의 효능을 증진시키거나 독성 또는 부작용을 줄이기 위하여 복합물의 형태로 대부분 제조되어 사용되고 있다[7], 즉, 한약 처방을 구성하는 한약재를 분량대로 칭량한 다음 모두 혼합하여 정제수를 가하여 끓이는 방법으로 제조되어 왔다. 한편 건강보험용의 혼합단미엑스제는 대한민국약전외한약(생약)규격집(KHP)[8]의 의약품 각조 제3부에 의거하여 한약 처방을 구성하는 각각의 한약재를 개별로 추출, 여과, 농축, 건조 후 단미엑스제를 제조한 다음, 비율별로 혼합하여 제조되어진다. 개별 한약재로부터 단미엑스제를 제조한 다음 혼합하는 방법은 표준화가 용이한 장점이 있는 반면, 구성 한약재를 모두 혼합하여 끓이는 전통적인 복합 추출방식으로 제조한 제제와 성분 및 효능의 차이가 발생할 수 있으나 이에 대한 연구는 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 전통적으로 감기나 두통, 해열 및 진경 등

* 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 : 2018/11/16 ·Revised : 2018/12/28 ·Accepted : 2019/01/25

ⓒ 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.2019.02.33.1.39

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

#These authors contributed equally to this work.

에 사용되고 있는 한약 처방인 갈근탕[9]에 대하여 이들 2가지 방법으로 갈근탕 제제를 제조하여 지표성분 및 생리활성에 대한 비교분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재

실험에 사용된 갈근탕의 구성 한약재는 ㈜휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 구입하여 전문가 감별 후 사용하였다. 각각의 구성 한약재들의 표본은 한약진흥재단 한의기술R&D2팀의 한약재보관실에 보관하였다.

2) 시약 및 기기

시료 전처리 및 HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 methanol은 액체크로마토그래피용(Merck, Darmstadt, Germany)으로 구입하였고, phosphoric acid는 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 표준물질로 사용한 puerarin, albiflorin, paeoniflorin, daidzin, liquiritin 및 6-gingerol은 식품의약품안전처로부터 분양받았으며, ephedrine, cinnamic acid, cinnamaldehyde 및 glycyrrhizic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 각 표준물질의 순도는 95% 이상이었다. 기기분석을 위한 HPLC는 Waters (Mildford, MA, USA)의 2998 PDA 및 e2695 separation module을 사용하였다. 세포배양을 위해 Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Penicillin-streptomycin, Phosphate buffered saline (PBS)는 Hyclone (Logan. UT, USA), Lipopolysaccharide (LPS), Griess reagent, Ethanol, Chloroform, 2,2-diphenyl-1-picrylhygrazyl (DPPH)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), MTS reagent와 Agarose는 Promega (Madison, WI, USA), TNF-α와 IL-1β, IL-6 에 대한 Enzyme-Linked Immunosorbent (ELISA) assay kit는 R&D System (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 분석을 위해 사용한 1차 항체인 iNOS는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), β-actin과 2차 항체인 goat anti-Mouse IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Total RNA extraction을 위해 사용한 RNAiso는 TaKaRa (Shiga, Japan)에서, cDNA 합성과 PCR에 사용한 모든 시약은 iNtRON (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2. 갈근탕 제제 및 검액의 조제

갈근탕 혼합단미엑스제는 KHP[8]의 의약품각조 제3부의 갈근탕 혼합단미엑스산의 제법에 따라 구성 한약재 각각을 한약재 중량의 10배에 해당하는 정제수를 넣고 100℃에서 3시간 추출한 다음 여과, 농축하여 건조엑스(dried extract)를 얻은 후, 건조엑스 80%, lactose 17%, polyvinyl pyrrolidone 2%, SiO_2 1%의 비율로 혼합하여 산제의 제법에 따라 제조한 각각의 단미엑스제를 비율별로 혼합하여 제조하였다. 갈근탕 혼합단미엑스제의 구성 한약재, 건조엑스 수율, 각 단미엑스제의 혼합비율은 Table 1과 같다. 갈근탕 전탕액은 식약처「한약(생약)제제 등의 품목허가·신고에 관한 규정」[10]의 "표준탕액"의 제법에 따라 갈근탕 처방 구성 한약재를 칭량하여 모두 혼합한 다음, 약탕기(Kyungseo E&P Co., Incheon, Korea)에 한약재 총량의 10배량의 물을 넣고 100℃에서 3시간 추출하여 여과, 농축한 후 건조하여 제조하였다(건조엑스의 수득률 15.5% (w/w)). 제조된 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액은 건조엑스를 기준으로 0.5 g을 정확히 칭량한 후 50% methanol에 녹여 초음파 추출한 다음 여과하여 50% methanol로 50 mL로 정용 후 검액으로 사용하였다.

Table 1. Composition of Galgeun-tang

Herbal medicine	Amount (g)	Dried extract (g)	Extract Powder (g)	Source
Puerariae Radix	3.75	1.065	1.331	Geochang, Gyeongnam
Ephedrae Herba	2.50	0.250	0.313	Neimenggu, China
Paeoniae Radix	1.88	0.320	0.400	Uiseong, Gyeongbuk
Cinnamomi Ramulus	1.25	0.025	0.031	Vietnam
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	1.00	0.169	0.211	Kyrgyzstan
Zingiberis Rhizoma Crudus	0.50	0.018	0.022	Seosan, Chungnam
Zizyphi Fructus	0.67	0.244	0.305	Miryang, Gyeongnam
Total amount	11.55	2.091	2.613	

3. 갈근탕 제제의 성분분석

1) 표준용액의 조제

갈근탕의 지표성분인 ephedrine, puerarin, albiflorin, paeoniflorin, daidzin, liquiritin, 6-gingerol, cinnamic acid, cinnamaldehyde 및 glycyrrhizic acid 표준물질은 각각 무게를 정확히 칭량하여 methanol에 녹인 후 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

2) HPLC 분석조건

갈근탕의 지표성분의 동시분석을 위하여 고정상은 YMC사의 YMC-Triart C18 (5 μm, 4.6×250 mm, Kyoto, Japan) 칼럼을 사용하였고, 이동상은 0.05% H_3PO_4이 함유된 물과 0.05% H_3PO_4이 함유된 acetonitrile을 사용하여 시간에 따라 조성을 변화시키는 기울기 용리를 사용하였다(Table 2).

Table 2. HPLC analytical conditions

Instrument	Waters Alliance HPLC-PDA system		
Wavelength	UV 210, 230 and 280 nm		
Column	YMC-Triart C18 (5 μm, 4.6×250 mm)		
Oven Temperature	30℃		
Injection Volume	10 μL		
Mobile Phase	A : 0.05% H_3PO_4 in H_2O, B : 0.05% H_3PO_4 in Acetonitrile		
	Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
	0	90	10
	10	85	15
	20	85	15
	50	50	50
	60	20	80
Flow rate	1.0 mL/min		

3) 분석법 밸리데이션

HPLC-PDA를 사용한 갈근탕의 지표성분 동시분석법을 확립하고 이를 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인[11]에 따라 분석법 밸리데이션을 실시하였다. Ephedrine, puerarin, albiflorin, paeoniflorin, daidzin, liquiritin, cinnamic acid, glycyrrhizic acid 및 6-gingerol 표준액을 사용하여 특이성(specificity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 직선성(linearity), 범위(range), 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)을 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)

직선성 및 범위의 확인을 위하여 농도구간별 각각의 표준액을 제조하고 이를 확립된 동시분석법을 이용하여 검량선을 작성하였으며, 검량선으로부터 직선식의 상관계수(correlation coefficient, R^2)를 구하였다.

(3) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계 및 정량한계는 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, 혼합 표준용액을 50% methanol을 사용하여 직선성이 확인된 구간의 저, 중, 고 3가지 농도로 희석한 다음 갈근탕 시료에 혼합한 후 3회 반복 분석하여 첨가된 표준물질의 회수율로 확인하였다.

(5) 정밀성(precision)

정밀성은 동일한 시료를 확립된 방법에 따라 반복 측정하였을 때 각각의 측정값들의 오차를 측정하는 반복 정밀성으로 확인하였다. 즉, 각 표준용액을 직선성이 확인된 농도 범위내의 3가지 농도의 혼합 표준용액을 제조한 후, 전 조작을 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 갈근탕 제제를 확립된 동시분석법으로 분석하고 면적 대비법으로 함량을 산출하였다.

4. 갈근탕 제제의 효능평가

1) 시료 조제

효능평가를 위하여 갈근탕 제제는 각각 100 mg을 정확히 칭량한 후 50% DMSO를 넣어 1 mL로 맞춘 후 0.2 μm membrane 여과 후 시료로 사용하였다.

2) 항산화 평가

(1) DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능 측정은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[12]. 각 시료를 1,000 μg/mL에서 2배수 희석법으로 희석하여 96 well plate에 100 μL를 주입하고 0.2 mM DPPH 50 μL를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 30분 동안 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 희석 용매인 정제수를 대조군으로 하고, 활성비교를 위하여 양성대조군으로 Butylated hydroxyanisole (BHA)를 사용하였다.

(2) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다[13]. 표준물질로는 tannic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였다. 플라보노이드 함량은 Singleton VL 등의 방법[14]을 변형하여 측정하였고, 표준물질로 quercetin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 검량선을 작성하였다.

3) 항염증평가

(1) 세포독성평가

세포독성을 확인하기 위해 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고, 갈근탕을 제제별 2배수 희석법으로 희석하여 농도별로 처리하였다. 24시간 배양 후, MTS reagent를 20 μL씩 첨가하고 4시간 반응 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 농도범위에서 유효농도를 설정하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 RAW 264.7 (Mouse macrophage cell line) 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 세포 배양을 위해 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성 저해활성 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 12 well plate에 최종농도가 5×10^4 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 0.1 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.

(3) IL-1β, IL-6, TNF-α 분비량 측정

RAW 264.7 세포주를 12 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 갈근탕 제제를 50, 100, 200 μg/mL로 2시간 전처리를 하였다. 이 후 LPS를 100 ng/mL로 처리한 후 24시간 배양하고 배양 상층액을 취해 각 실험에 사용하였다. 사이토카인 분비 측정을 위해 ELISA kit를 사용하였고, 제조사의 방법에 따라 세포배양액 내 존재하는 IL-1β, IL-6, TNF-α의 양을 측정하였다. 양성 대조군으로 dexamethasone을 사용하였다.

(4) RT-PCR assay

RNA 분리를 위해 RAW 264.7 세포는 12 well plate에 5×10^4 cells/mL세포로 분주한 다음, 세포에 갈근탕 제제를 50, 100, 200 μg/mL씩 처리한 후, LPS로 처리하고 RNAiso reagent를 이용해 제조사의 방법에 따라 total RNA를 취하였다. Total RNA는 Maxime RT PreMix Kit (iNtRON, Seongnam, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 유전자 증폭을 위해 특정 primer를 넣고 각 primer에 따른 PCR 조건에 따라 실시하였다. 이때 iNOS (F: 5'-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3', R: 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3')와 IL-6 (F: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG -3', R: 5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3')는 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초 동안 40 cycle로 반응시켰고, COX-2 (F: 5'-GAGGCCACTGATACCTATTG-3', R: 5'-ACAAAGAAGGGTTCCCAATT-3')는 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 30초 동안 40 cycle로 반응시켰으며, TNF-α (F: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTC-3', R: 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3')와 IL-1β (F:5'-TCATTACACAGGACAGGTAT-3', R: 5'-CATTAGACAACTGCACTACA-3')은 94℃에서 30초, 55℃에서 20초, 72℃에서 30초 동안 35 cycle로, GAPDH (F: 5'-CAACTCCCACTCTTCCACCT-3', R: 5'-CTTGCTCAGTGTCCTTGCTG-3')는 94℃에서 20초, 60℃에서 20초, 72℃에서 20초 동안 30 cycle로 반응시켰다. 각 DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동시킨 후 UV 검출기로 확인하였다.

(5) Immunoblot assay

갈근탕 제제를 50, 100, 200 μg/mL씩 처리한 RAW 264.7 세포를 PBS로 세 번 세척한 후 protease & phosphatase inhibitor cocktail을 함유한 lysis buffer로 부유시킨 후 10분 동안 ice에 방치시킨 다음, 4℃에서 16,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 따로 분리한 후 BCA protein assay kit (Thermo, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였고, 20~30 μg의 lysate를 8~12% gel을 사용하여 SDS-PAGE system으로 분리하였다. 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Millipore, Eschborn, Germany)에 100 V로 1시간 transfer한 후, blocking을 5% BSA가 함유된 1×PBS-T (1×PBS + 0.1% Tween-20) 용액으로 상온에서 1시간 실시하였다. iNOS, COX-2 및 β-actin primary antibody는 4℃에서 overnight 반응시킨 후, 1×PBS-T로 세 번 세척하고, secondary antibody는 실온에서 2시간 반응시킨 후 1×PBS-T로 세 번 세척하고 ECL 기질로 발색시킨 후 ChemiDoc-It Imaging System (UVP, Upland, CA, USA)로 감광하였다.

4) 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는 one way ANOVA test를 실시한 후 Turkey test로 사후 검증하였다. $P<0.05$ 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 갈근탕 제제의 성분분석

1) 분석조건 확립

HPLC-PDA를 이용하여 갈근탕의 구성약재 중 마황의 ephedrine, 갈근의 puerarin 및 daidzin, 작약의 albiflorin 및 paeoniflorin, 감초의 liquilitin 및 glycyrrhizic acid, 계지의 cinnamic acid 및 cinnamaldehyde, 생강의 6-gingerol 10종의 성분에 대하여 동시분석 조건을 설정하였다. 10종 성분의 동시분석을 위하여 0.05% H_3PO_4이 포함된 물과 acetonitrile을 기울기 용리조건으로 하여 기존의 분석법[8]을 참고하여 최대흡수파장을 검토한 결과, ephedrine 및 6-gingerol은 210 nm, puerarin, daidzin, albiflorin, paeoniflorin, liquilitin 및 glycyrrhizic acid는 230 nm, cinnamic acid 및 cinnamaldehyde는 280 nm를 최적분석파장으로 설정하였다. 또한 표준용액과 검액의 크로마토그램을 비교하여 각 성분이 다른 성분들의 간섭없이 선택적으로 분리되었음을 확인하였으며, 표준품 peak의 retention time과 UV 흡수파장을 비교하여 특이성을 확보하였다(Fig. 1).

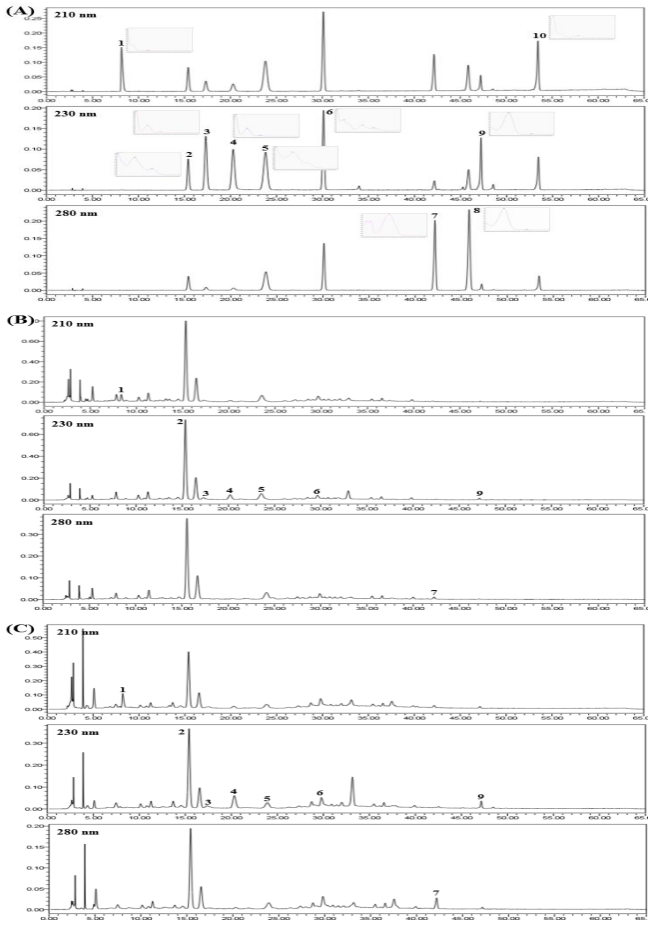

Fig. 1. HPLC chromatogram of a standard mixture (A), Galgeun-tang mix extract powder (B) and Galgeun-tang decoction (C). Ephedrine (1), puerarin (2), albiflorin (3), paeoniflorin (4), daidzin (5), liquilitin (6), cinnamic acid (7), cinnamaldehyde (8), glycyrrhizic acid (9) and 6-gingerol (10).

2) 분석법 밸리데이션

(1) 직선성, 검출한계 및 정량한계

확립된 동시분석법을 이용하여 농도에 따른 피크 면적비로 9종의 지표성분에 대한 검량선을 작성한 결과 상관계수(R^2) 값이 0.999 이상으로 1.0에 가까운 직선성을 나타내었다. 또한 이들 9종

지표성분에 대한 검출한계는 0.370~3.676 μg/mL로 나타났으며, 정량한계는 0.234~11.139 μg/mL로 나타났다(Table 3).

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

Components	Linear range (μg/mL)	Regression equation*	R2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Ephedrine	12.5 ~ 200	y=19,380x-8,541.8	0.9999	2.056	6.230
Puerarin	25 ~ 400	y=28,773x-15,373	1.0000	3.676	11.139
Albiflorin	6.25 ~ 100	y=11,442x-3,896.9	1.0000	0.807	2.447
Paeoniflorin	12.5 ~ 200	y=11,983x-8,095.7	0.9999	2.372	7.187
Daidzin	12.5 ~ 200	y=25,930x-16,608	1.0000	1.766	5.352
Liquilitin	6.25 ~ 100	y=26,391x-5,834.2	1.0000	0.778	2.359
Cinnamic acid	0.625 ~ 10	y=67,617x-2,182.2	1.0000	0.077	0.234
Glycyrrhizic acid	12.5 ~ 200	y=3,040.2x-1,649.8	0.9998	3.649	11.057
6-Gingerol	0.625 ~ 10	y=22,176x-5,303.3	0.9994	0.370	1.122

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

(2) 정확성

갈근탕 시료에 표준용액을 각각 저, 중, 고 3가지 농도로 첨가한 뒤 회수율을 측정한 결과, Table 4와 같이 87.740~96.909% (상대표준편차 0.035~2.982%)의 우수한 회수율을 나타내었다.

Table 4. Accuracy of marker components

Peak	Spiked concentration (μg/mL)	Measured concentration (μg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Ephedrine	80	70.420±0.025	88.024±0.031	0.035
	100	87.740±0.132	87.740±0.132	0.151
	120	108.584±0.901	90.487±0.751	0.830
Puerarin	160	147.785±0.259	92.366±0.162	0.175
	200	185.456±1.291	92.728±0.645	0.696
	240	231.211±2.528	96.338±1.053	1.093
Albiflorin	40	35.166±0.075	87.914±0.189	0.215
	50	44.213±0.252	88.426±0.504	0.570
	60	55.324±0.424	92.207±0.706	0.766
Paeoniflorin	80	72.701±0.118	90.877±0.148	0.162
	100	91.042±0.617	91.042±0.617	0.678
	120	113.551±1.069	94.626±0.891	0.941
Daidzin	80	73.670±0.272	92.087±0.340	0.369
	100	91.411±0.408	91.411±0.408	0.446
	120	113.590±0.911	94.659±0.759	0.802
Liquilitin	40	38.764±0.039	96.909±0.097	0.100
	50	47.745±0.140	95.489±0.279	0.292
	60	58.724±1.751	97.873±2.919	2.982
Cinnamic acid	4	3.612±0.008	90.305±0.198	0.220
	5	4.555±0.050	91.107±0.995	1.092
	6	5.704±0.036	95.068±0.596	0.627
Glycyrrhizic acid	80	76.243±0.956	95.303±1.195	1.254
	100	91.613±2.239	91.613±2.239	2.444
	120	111.038±3.137	92.531±2.614	2.825
6-Gingerol	4	3.732±0.102	93.296±2.546	2.729
	5	4.698±0.122	93.966±2.447	2.605
	6	5.697±0.047	94.943±0.789	0.831

Values are means of 3 replicates.

(3) 정밀성

분석오차를 의미하는 정밀성을 확인하기 위하여 실험일내 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시한 결과 상대표준편차(%RSD)는 2.901% 이내로 우수한 결과를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Precision of marker components

Components	Concentration (μg/mL)	Intra-day			Inter-day		
		Mean ±SD	RSD (%)	Accuracy (%)	Mean ±SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Ephedrine	12.5	12.907 ±0.065	0.500	103.25	12.735 ±0.369	2.901	98.666
	50	49.946 ±0.468	0.938	99.89	49.616 ±0.292	0.589	99.338
	200	200.332 ±0.215	0.108	100.14	199.270 ±0.939	0.471	99.470
Puerarin	25	25.633 ±0.148	0.579	102.534	25.295 ±0.606	2.396	98.682
	100	99.980 ±0.409	0.409	99.980	99.245 ±0.655	0.660	99.265
	400	401.728 ±1.319	0.328	100.432	398.739 ±2.698	0.677	99.256
Albiflorin	6.25	6.408 ±0.022	0.342	102.521	6.348 ±0.129	2.036	99.060
	25	25.236 ±0.073	0.291	100.946	24.911 ±0.295	1.185	98.711
	100	100.800 ±0.619	0.614	100.800	99.984 ±0.738	0.738	99.191
Paeoniflorin	12.5	12.839 ±0.061	0.477	102.710	12.691 ±0.243	1.915	98.849
	50	50.098 ±0.212	0.423	100.197	49.684 ±0.395	0.794	99.174
	200	201.073 ±0.724	0.360	100.537	199.383 ±1.475	0.740	99.159
Daidzin	12.5	12.816 ±0.074	0.581	102.529	12.736 ±0.242	1.899	99.377
	50	49.759 ±0.280	0.562	99.518	49.588 ±0.157	0.316	99.656
	200	200.568 ±0.442	0.221	100.284	199.165 ±1.216	0.611	99.301
Liquilitin	6.25	6.265 ±0.035	0.562	100.233	6.347 ±0.085	1.342	101.313
	25	24.811 ±0.111	0.445	99.245	24.998 ±0.375	1.502	100.752
	100	100.439 ±0.823	0.820	100.439	100.450 ±1.051	1.047	100.011
Cinnam acid	0.625	0.629 ±0.005	0.831	100.719	0.631 ±0.004	0.653	100.271
	2.5	2.522 ±0.002	0.060	100.878	2.483 ±0.036	1.456	98.448
	10	9.990 ±0.058	0.579	99.903	9.929 ±0.055	0.552	99.393
Glycyrrhizic acid	12.5	12.731 ±0.142	1.115	101.849	12.576 ±0.150	1.192	98.786
	50	49.438 ±0.095	0.192	98.877	49.803 ±1.031	2.070	100.738
	200	200.200 ±0.580	0.289	100.100	200.831 ±1.480	0.737	100.315
6-Gingerol	0.625	0.684 ±0.007	1.028	109.39	0.683 ±0.003	0.484	99.825
	2.5	2.450 ±0.086	3.511	97.99	2.470 ±0.020	0.823	100.824
	10	10.012 ±0.074	0.741	100.12	9.850 ±0.144	1.465	98.379

Values are means of 3 replicates.

3) 지표성분 동시분석

확립된 분석법을 이용하여 갈근탕 제제의 ephedrine, puerarin, albiflorin, paeoniflorin, daidzin, liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizic acid 및 6-gingerol을 동시 분석한 결과 cinnamaldehyde는 검액에서 검출되지 않았으며, 6-gingerol은 정량한계 이하로 확인되었다. 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액은 cinnamaldehyde 및 6-gingerol을 제외한 8종의 성분이 각각 0.217~36.756 mg/g 및 0.555~19.393 mg/g을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Table 6). 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액의 성분함량을 비교한 결과 혼합단미엑스제는 전탕액보다

puerarin 및 daidzin 함량이 약 2배 높았으나, cinnamic acid 및 glycyrrhizic acid 함량은 전탕액보다 2배 이상 낮은 것으로 확인되었다. 하지만 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액의 동등성 평가를 위하여 지표성분 함량으로 산출한 상관계수(pearson correlation coefficient, r)는 0.8335로 확인되어 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 통계적으로 매우 유사한 것으로 확인되었다.

Table 6. Contents of marker components in the Galgeun-tang by HPLC

Components	Galguen-tang mix extract powder (A, mg/g)*		Galguen-tang decoction (B, mg/g)		Ratio (A/B)
	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	
Ephedrine	3.987±0.056	1.408	6.292±0.150	2.384	0.634
Puerarin	36.756±0.427	1.162	19.383±0.387	1.997	1.896
Albiflorin	3.489±0.082	2.342	2.463±0.072	2.924	1.417
Paeoniflorin	8.332±0.132	1.588	11.373±0.197	1.730	0.733
Daidzin	7.120±0.061	0.852	3.357±0.123	3.658	2.121
Liquilitin	1.990±0.058	2.921	2.512±0.045	1.804	0.792
Cinnamic acid	0.217±0.003	1.291	0.555±0.011	1.898	0.391
Glycyrrhizic acid	5.545±0.129	2.318	12.913±0.267	2.065	0.429
6-Gingerol	<LOQ	-	<LOQ	-	-

*Sample weight (g) is determined on dry extract basis. Values are means of 3 replicates.

2. 갈근탕 제제의 효능평가

1) 항산화 효능 평가

DPPH 라디칼 소거능을 통해 항산화능을 확인하였고 항산화 물질인 polyphenol과 flavonoid 함량을 비교하였다. DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 갈근탕 제제의 EDA50 (50% of electron donating ability) 값은 혼합단미엑스제 235.18μg/mg, 전탕액 166.03 μg/mg으로 대조군인 BHA 16.74 μg/mg보다 항산화 활성이 매우 낮았으며, 갈근탕 제제간의 비교에서는 전탕액이 혼합단미엑스제보다 다소 높은 효과를 나타내었다(Fig. 2). 또한 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 분석한 결과 혼합단미엑스제는 46.18±1.04 μg/mg와 83.89±3.37 μg/mg, 전탕액은 50.31±1.18 μg/mg와 92.78±1.73 μg/mg으로 갈근탕 혼합단미엑스제가 전탕액보다 함량이 다소 낮았지만, 큰 차이를 나타내지는 않았다(Table 7).

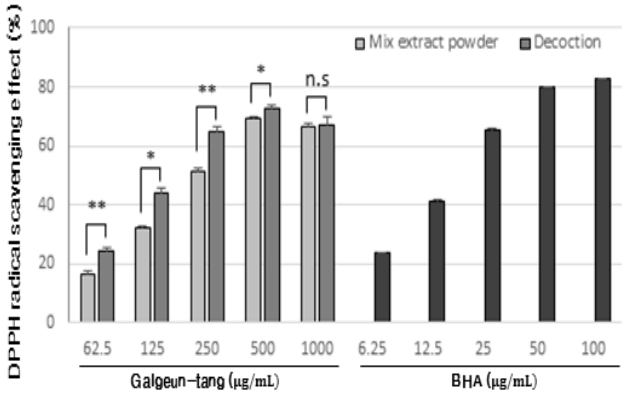

Fig. 2. DPPH free radical scavenging effect according to Galgeun-tang. Data was expressed as the mean±SEM of three experiments. *p<0.05 and **p<0.01 significantly different from Galgeun-tang mix extract powder and decoction, n.s.: not significant.

Table 7. Content of Total Pholyphenol and Flavonoid in Galgeun-tang

	Galguen-tang mix extract powder	Galguen-tang decoction
Total polyphenol (μg/mL)	46.18±1.04	50.31±1.18
Flavonoid (μg/mL)	83.89±3.37	92.78±1.73

2) 항염증 효능 평가

(1) 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액의 세포독성 평가

RAW 264.7 cell에 대한 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액의 독성을 확인한 결과, 두 시료에서 모두 500 μg/mL 이하의 농도에서 독성이 나타나지 않아 500 μg/mL 이하의 농도에서 유효활성을 나타내는 낮은 농도를 실험농도로 결정하여 실험을 진행하였다(Fig. 3). 세포독성에 있어서 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 유사한 것으로 확인되었다.

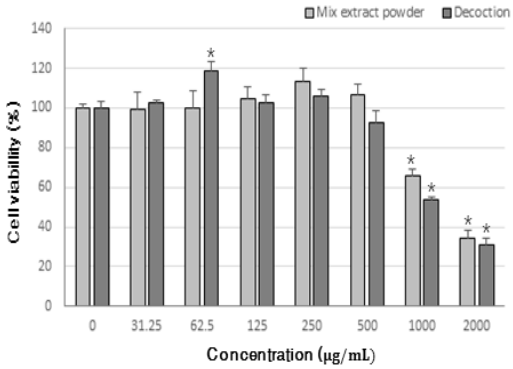

Fig. 3. Effect of Galgeun-tang Formulation on RAW 264.7 cell viability. The macrophages were treated with various concentration (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/mL) of Galgeun-tang Formulation for 24 hrs. Cell viability was measured using MTT assay. *Significantly different from the values of blank control (p<0.05).

(2) NO생성과 iNOS 및 COX-2 발현 억제능 비교

대식세포에서 TLR과 반응하는 LPS는 iNOS 및 COX-2의 발현을 유도하고 NO의 합성을 촉진한다. 이에 RAW 264.7 cell에 갈근탕 제제를 처리하고 LPS를 처리하여 갈근탕 제제가 NO 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 농도의존적으로 NO의 생성을 억제하였다. 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액은 50 μg/mL에서 각각 71.88% 및 66.37%의 NO 생성을 나타내어 전탕액의 NO 생성 억제능이 다소 높았으나, 100 및 200 μg/mL에서는 유사한 효능을 나타내었다. 또한 NO 생성과 유사한 양상으로 NO 합성효소인 iNOS 및 COX-2의 mRNA와 단백질 발현에서도 농도의존적인 감소양상을 보였다(Fig. 4B). NO 생성과 iNOS 및 COX-2 발현에 있어 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 4C).

(3) 염증성 사이토카인의 유전자 발현과 생성 억제능 비교

항염증 사이토카인 중 대표 사이토카인인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6에 대한 유전자 발현과 생성 억제 효과를 확인하였다(Fig. 5). RAW 264.7 cell에 LPS 처리 후, 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액은 모두 농도의존적으로 사이토카인 분비를 억제시키는 것으로 나타났다. 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액 200 μg/mL의 처리로

TNF-α의 분비가 감소하였고, 혼합단미엑스제가 전탕액보다 TNF-α 분비 억제능이 높음을 확인하였다. 유전자 발현에 있어서는 50 μg/mL에서도 갈근탕 제제는 TNF-α발현 억제 효과를 나타내었고, 분비양상과 유사하게 전탕액보다 혼합단미엑스제의 TNF-α발현 억제능이 우수함을 확인하였다(Fig. 5A, 5D). IL-1β의 경우 사이토카인 분비에 있어서 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 50 μg/mL의 농도에서 33%의 낮은 분비량을 나타내며 강한 사이토카인 억제능을 확인하였고, 유전자 발현능에 있어서도 동일한 양상이 나타났다(Fig. 5B, 5E). IL-6의 경우 사이토카인 분비에 있어서 IL-1β과 동일하게 50 μg/mL의 농도에서 37%의 낮은 분비량을 나타내며 강한 사이토카인 억제능을 확인하였고, 유전자 발현능에 있어서도 모두 실험 최저 농도인 50 μg/mL에서 대조군인 DEX와 유사한 억제능을 나타냄을 확인하였다(Fig. 5C, 5F). 사이토카인 생성과 유전자 발현 억제능에 있어서 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 TNF-α를 제외한 IL-6와 IL-1β에서 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

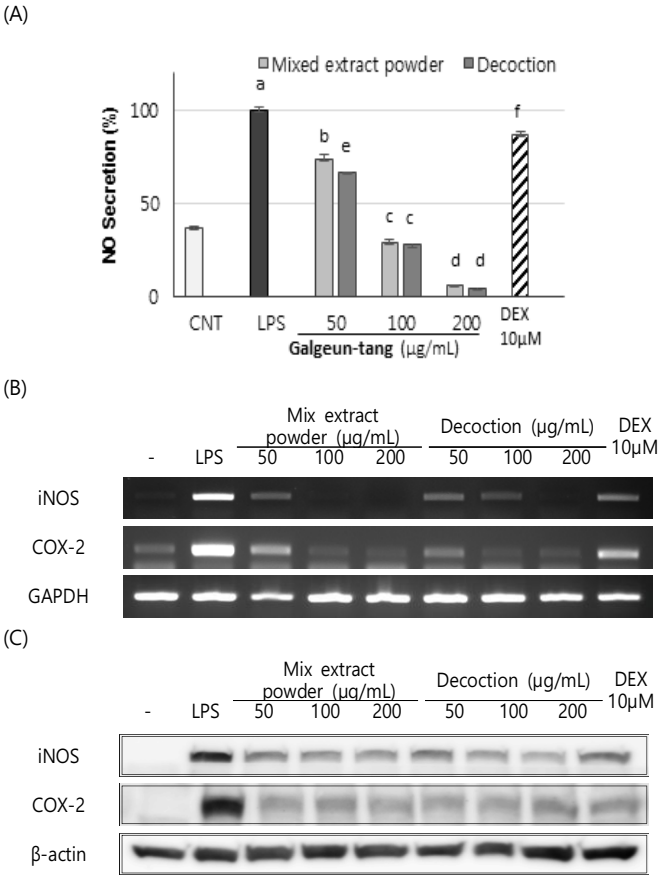

Fig. 4. Inhibition of NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells by Galgeun-tang. (A) Cells (5×10^5 cells/mL) were treated with various concentrations (50, 100, 200 μg/mL) of Galgeun-tang mix extract powder and decoction for 1 hr, and then incubated with LPS (0.1 μg/mL) for 24 hrs. Dexamethasone (DEX) were pre-treated for 1 hr with 10μM before being induced inflammation with LPS. Means with different superscript letters are significantly different $p<0.05$. The culture supernatant was analyzed nitrite production. The cells were analyzed by (B) RT-PCR and (C) immunoblot for mRNA and protein of iNOS. For RT-PCR, the cells were pretreated with Galgeun-tang for 1 hr, and treated with LPS for 4 hrs. For immunoblot of iNOS, the cells were pretreated with Galgeun-tang (50, 100, 200 μg/mL) for 1 hr and treated with LPS for 24 hrs.

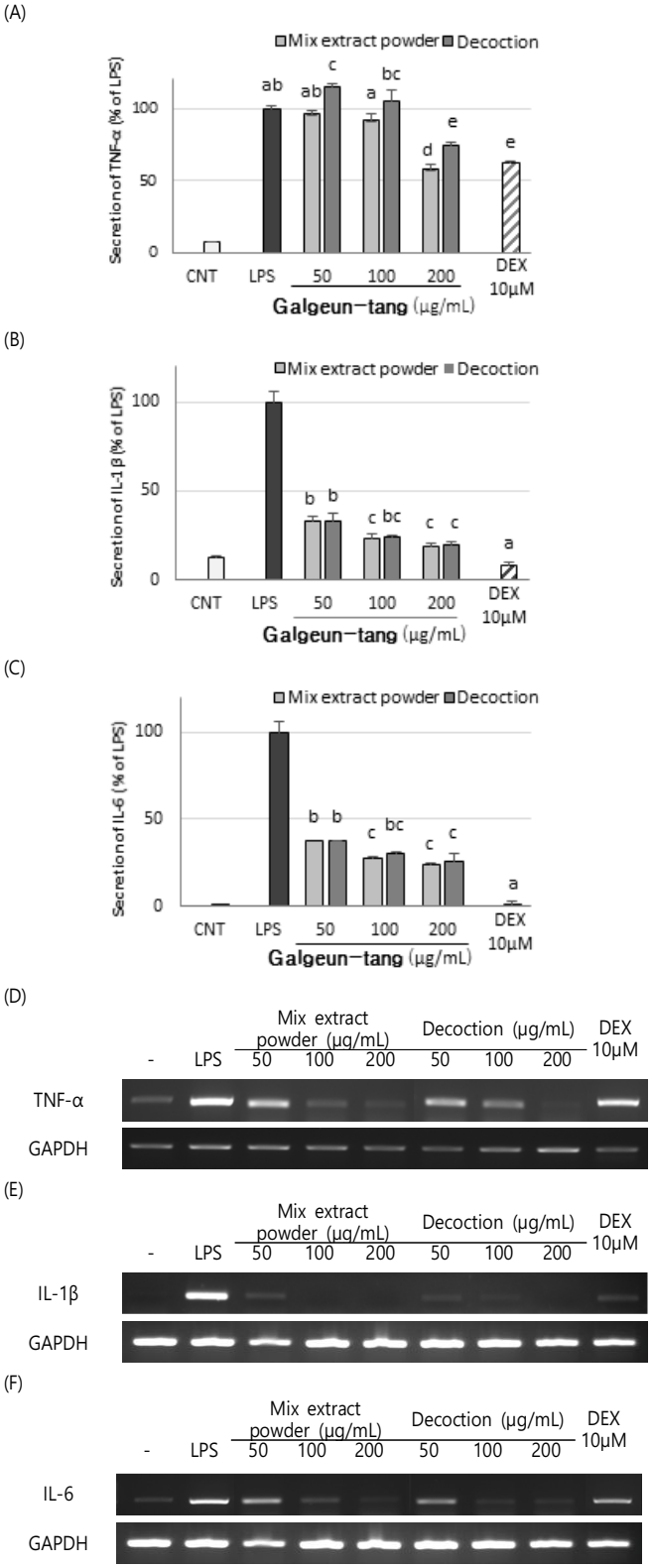

Fig. 5. Inhibition of inflammatory cytokine in RAW264.7 with Galgeun-tang. There were decreased (A) the secretion of cytokine, (D) the expression of mRNA of TNF-α and (B, C) the secretion of cytokine, (E, F) the expression of mRNA of IL-6, IL-1β. The cell was pretreated with Galgeun-tang (50, 100, 200 μg/mL) and DEX (dexamethasone 10μM) for 1 hr before being induced inflammation with LPS for (D) 2 hr, (A, E, F) 6 hrs and (B, C) 24 hrs. Means with different superscript letters are significantly different $p<0.05$.

고 찰

전통적으로 한약 처방은 복합물의 형태로 추출하여 제조되는 반면, 건강보험용의 혼합단미엑스제는 대한민국약전외한약(생약)규격집(KHP)[8]에 의거하여 한약 처방을 구성하는 각각의 한약재를 개별로 추출, 여과, 농축, 건조 후 단미엑스제를 제조한 다음, 이를 비율별로 혼합하여 제조되고 있다. 구성 한약재를 모두 혼합하여 끓이는 전통적인 복합 추출방식으로 제조한 제제와 혼합방식으로 제조된 혼합단미엑스제는 성분 및 효능에 있어 차이가 발생할 수 있다. Kim 등[15]은 복합추출 및 단미엑스 혼합방식으로 제조한 갈근탕 제제의 폴리페놀 및 DPPH 라디칼 소거활성을 비교분석한 결과를 보고하였으나, 성분분석 및 다양한 생리활성에 대한 비교분석 연구는 보고된 바 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 한방에서 해열, 감기, 두통, 편두통 및 진경 등에 가장 빈번하게 사용[16]되고 있는 대표적인 처방인 갈근탕에 대하여 이들 2가지 방식으로 갈근탕 제제를 제조하여 지표성분 함량, 항산화 및 항염증 활성에 대한 비교분석을 실시하였다.

Choi 등[17]에 의하면 전통한의서에 의한 탕액 조제 시 다양한 화학반응이 수반되어 각 생약재가 함유하고 있는 유효성분의 함량이 감소하거나 부분적인 화학 관능기의 변화 또는 전혀 새로운 유효성분이 생성된다는 사실이 임상학적 측면에서 고려되어야 한다고 하였다. Lee[18]는 인삼 탕액 제조 시 오미자에 의한 진세노사이드 조성의 변화에 대하여 보고하였는데, 유기산이 다량 함유된 열매류 생약인 오미자를 함께 추출하였을 때 인삼 유효성분의 조성뿐만 아니라 오미자의 성분에도 큰 변화가 수반되었음을 보고하였다. 갈근탕은 7종의 한약재로 구성되어 있으며, 각각의 한약재가 포함하는 생리활성성분 또한 매우 다양하여 열을 이용하여 추출하는 과정에서 화합물의 변화가 발생할 수 있다. 이에 갈근탕의 성분분석을 통한 혼합단미엑스제와 전탕액의 성분의 비교분석을 위하여 ephedrine, puerarin, albiflorin, paeoniflorin, daidzin, liquiritin, 6-gingerol, cinnamic acid, cinnamaldehyde 및 glycyrrhizic acid 10종 성분의 동시분석법을 확립하였다. 또한 확립된 동시분석법은 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정밀성의 측정을 통하여 분석법의 신뢰성을 검증하였다. 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액의 성분분석 결과 cinnamaldehyde는 검출되지 않았으며, 6-gingerol은 정량한계 이하로 나타났다. 정량이 가능한 8종 지표성분의 분석 결과 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액에서 각각 0.217~36.756 mg/g 및 0.555~19.393 mg/g으로 확인되었다. 두 제제간의 성분함량을 비교한 결과 puerarin 및 daidzin 함량은 혼합단미엑스제에서 약 2배 높았고, cinnamic acid 및 glycyrrhizic acid 함량은 전탕액에서 2배 이상 높은 것으로 나타나, 복합추출에 따른 지표성분의 변화를 확인할 수 있었다. 하지만 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액의 동등성 평가를 위하여 지표성분 함량으로 산출한 상관계수(pearson correlation coefficient, r)는 0.8335로 확인되어 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 통계적으로 매우 유사한 것으로 확인되었다.

갈근탕의 면역질환에 대한 연구는 많이 보고되어져 왔고[19], 특히 피부, 기관지 등의 염증성 질환에 효과가 있음이 보고되었다[20-22]. 갈근탕의 이미 밝혀진 항산화, 항염증 효능을 이용하여 혼합단미엑스제와 전탕액의 생물학적 활성에 대한 비교분석을 실시하였다. 갈근탕 혼합단미엑스제 및 전탕액의 항산화 효능을 비교하기 위하여 DPPH 라디칼 소거활성과 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과 전탕액과 혼합단미엑스제의 항산화 활성은 대조군에 비하여 매우 낮았으며, 전탕액에서 혼합단미엑스제보다 다소 높은 결과를 나타내었으나 그 차이는 크지 않았다. Kim 등[15]은 전통적인 방법에 의하여 제조한 복합갈근탕과 개별적으로 약재를 끓인 후 혼합하여 제조한 단미혼합갈근탕의 DPPH 라디칼소거활성을 측정한 결과 100 μg/ml 농도에서 복합갈근탕 15.0%, 단미혼합갈근탕 16.2%, ascorbic acid 92.3%로 대조군에 비하여 갈근탕 제제의 항산화 활성은 매우 낮았으나 그 차이는 없는 것으로 보고하여 본 연구 결과와는 다소 상이하였다.

갈근탕 제제의 항염증 효능의 비교를 위하여 RAW 264.7 cell에서 실시한 세포독성 평가 결과 혼합단미엑스제 및 전탕액은 모두 500 μg/mL 농도에서 독성을 나타내지 않았으며, 시료간의 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다. RAW 264.7 cell에 갈근탕 제제 및 LPS를 처리한 결과 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 농도의존적으로 NO의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하였으며, 두 시료간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 병원균에 의해 유발되어지는 전염증성 반응은 마크로파지의 분화를 유도하여 IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 사이토카인을 생성해 적응면역반응의 활성을 돕도록 유도한다. 하지만 이러한 염증반응의 조절되지 못하면 사이토카인이 과발생되어 심각한 질병을 유발시키게 된다[23]. 갈근탕은 TNF-α를 제외한 NO와 IL-1β, IL-6에서 실험 최저 농도인 50 μg/mL에서 억제율을 나타내며 강한 항염증성 물질임을 증명하였다. 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액 모두 항염증성 사이토카인 분비 억제양상에 있어 농도의존적으로 강한 억제율을 나타내었으며, 두 제제간의 유의적인 차이는 없음을 확인하였다. 이러한 결과는 삼출건비탕[24], 사간탕[25] 및 삼황사심탕[26] 전탕액 및 단미혼합제제의 효능을 비교한 기존 연구 결과에서 전탕액이 단미혼합제제보다 우수한 생리활성을 나타낸 것과는 상이하였다. 한약 처방은 다수의 한약재로 구성된 복합물로 제조방법에 따른 다양한 화학반응뿐만 아니라 이를 구성하고 있는 한약재의 특성으로 인하여 처방마다 제조방법에 따른 성분 및 효능에 대한 결과가 상이하게 나타나는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과, 갈근탕 혼합단미엑스제와 전탕액은 지표성분의 함량에 다소 차이가 있지만 통계적으로는 유사하였으며, 항산화 및 항염증 활성에 있어 DPPH 라디칼 소거능 및 TNF-α 분비 억제능을 제외한 항목에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다. 이는 한약처방을 토대로 하는 제제에 대하여 진행되고 있는 탕액과의 동등성 및 약효의 유효성 연구를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 '한약제제와 전탕액의 품질 비교평가 연구(K18242)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Kim NM, Kim DH. Quality change of cinnamon extract prepared with various drying methods. Korean J Food & Nutr. 2000;13:152-7.
6. 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(3):204-9.
7. Bansky D, Barolet R. Chinese Herbal Medicine Formulas and Strategies. Eastland Press, Seattle; 1990. p. 7-8.
8. Korea Food and Drug Administration. The Korean Herbal Pharmacopoeia 11th ed; 2016.
9. Yang TK, Kim YB, Chae BY. An Experimental study on the anti-allergic effects, anti-inflammatory action, anti-pyretic action and analgesic action of Galgeun-tang, Gamigalgeun-tang and Geomahwanggalgeun-tang. J Orient Med Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology. 2002;15(1):76-95.
10. Korea Food and Drug Administration. Regulation on Approval and Notification of Herbal (crude) Medicinal Preparations, Etc. KFDA Notification No. 2016-112; 2016.
11. Korea Food and Drug Administration. Analytical method guideline about validation of drug and etc; 2015.
12. Blois MS. Antioxidant determinations by the use a stable free radical. Nature. 1958;26:1199-200.
13. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 1999;64(4):555-9.
14. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16(3):144-58.
15. Kim SD, Um YR, Yang MC, Yun NY, Jung SW, Lee JH, Ma JY. Equivalence of mixed and individual preparation of Galgeun-tang in terms of polyphenol contents and DPPH radical scavenging activity. Yakhak Hoeji. 2011;55(1):45-8.
16. Yun YG. East Medical Traditional Medical Formulae and prescription Commentary. Seoul: Euiseongdang. 1998. p. 145.
17. Choi SM, Kim BW. Theoretical chemical reaction of herb medicine. J Pharmacopunct. 2002;5(2):116-9.
18. Lee SM, The change of ginsenosides composition from decocted ginseng with citric acid and Schisandrae Fructus. Kor. J. Pharmacogn. 2014;45(2):121-6.
19. Lee JK, Kim JH, Shin HK. Systematic Studies on Galgeun-tang (gegen-tang, kakkon-to) for Establishment of Evidence Based Medicine. Kor J Oriental Med Prescrip. 2011;19(1):103-11.
20. Ha HK, Lee JK, Lee MY, Lim HS, Shin HK. Galgeun-tang, an Herbal Formula, Ameliorates Atopic Dermatitis Responses in Dust Mite Extract-treated. NC/Nga Mice. J Korean Med. 2013;34(4):1-11.
21. Kim YJ, Kim OS, Seo CS, Lim HS, Yoo SR, Jeon WY, Jin SE, Shin IS, Kim JH, Shin NR, Kim SS, Lee MY, Jeong SJ, Ha HK, Sin HK. Study on Comparison of Ingredient Quantities and Biological Activities of Galgeun-tnag according to Extraction Solvant. Kor. J. Oriental Phys & Path. 2012;26(6):908-14.
22. Shin NR, Kim C, Seo CS, Ko JW, Cho YK, Shin HK, Kim JS. Galgeun-tang Attenuates Cigarette Smoke and Lipopolysaccharide Induced Pulmonary Inflammation via Iκ-Bα/NF-κB Signaling. molecules. 2018;23(10):2489-99
23. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development homeostasis and disease. Nature. 2013;496(7446):445-55.
24. Kim OS, Seo CS Seo, Kim YJ, Shin HK Shin. Comparative study on chemical composition and biological activities of Samchulkunbi-tang decoction and commercial herbal medicine. Formula Science. 2012;20(2):1-11.
25. Kang KH, Chae BY. The effect of Sagan-tang applied to conjunctivitis on hepatic damage in rats. Kyunghee Univ Oriental Med J. 1985;8(1):185-94.
26. Lee SD, Bai HS, Koo BH. The effects of Samhwangsasimtang on the blood pressure and serum in S.H.R. Kyunghee Univ Oriental Med J. 1984;7(1):181-91.