

## 치자 엑스의 가수분해에 의한 피부투과 및 항염효과

양재현<sup>†</sup> · 이남희

우석대학교 약학과

(2004년 2월 28일 접수 · 2004년 4월 15일 승인)

### Skin Permeation and Anti-inflammatory Effects of Hydrolyzed Products of Gardeniae Fructus Extracts

Jae-Heon Yang<sup>†</sup> and Nam-Hee Lee

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 490, Korea

(Received February 28, 2004 · Accepted April 15, 2004)

**ABSTRACT**—Geniposide and its related iridoid compounds have been used in traditional herbal medicine for the treatment of Jaundice hepatic diseases and various inflammations. For the purpose to increase transdermal absorption, the hydrolyzed products of Gardeniae Fructus were identified and assayed of active ingredients and investigated transdermal absorption and anti-inflammatory effects. Geniposide was hydrolyzed to genipin by  $\beta$ -glucosidase and it was suggested that genipin was more suitable form than geniposide for transdermal absorption by its lipophilic property. Using Franz type diffusion cell and the skin of hairless mouse, the permeation rate of hydrolyzed products and their emulsion preparation were determined. Genipin have more increased absorption ratio through the skin of hairless mouse than geniposide. Also, the emulsion of hydrolyzed products of extracts showed higher permeability than that of nonhydrolyzed preparations. After 9 hours 280.85  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of genipin was absorbed and 193.52  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in case of geniposide. The Js of geniposide and genipin were  $26.27 \pm 4.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$  and  $40.35 \pm 5.04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$  respectively. After carrageenan injection, the swelling was increased rapidly to 24 hr and maintained as a plateau. But emulsion group were reached about 2.5 mL and the swelling decreased successively from 24 hr to 72 hr. The anti-inflammation effects of extracts and hydrolyzed products emulsion were increased with significant difference with control group after 24 hr, 48 hr and 72 hr. In carrageenan induced edema, inhibition of swelling was increased in case of hydrolyzed product emulsion compare with nonhydrolyzed group at 24 hr, 48 hr and 72 hr after swelling. In histological study, the anti-inflammatory effects of hydrolyzed products were remarkable at 48 hr and 72 hr compare with nonhydrolyzed. Hydrolyzed products of Gardeniae Fructus extracts containing genipin would be a suitable preparation to increase the transdermal absorption and anti-inflammatory effects.

**Key words**—Gardeniae Fructus, Geniposide, Hydrolyzed products, Skin permeation

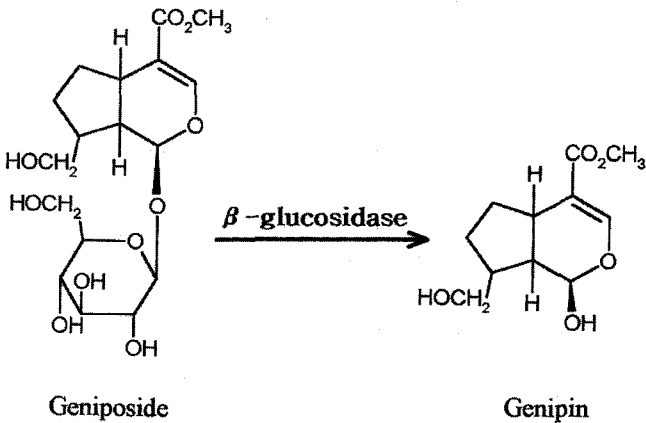
치자(Gardeniae Fructus)는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로서 담즙분비 촉진작용, 해열작용, 소염작용, 이뇨작용 등을 나타냄으로써 한방에서 황달, 간질환 및 소염제로 사용되어 왔다.<sup>1)</sup> 치자의 전제 및 에탄올 엑스는 다양한 실험동물에 경구 및 복강투여 할 때 혈압강하 작용을 나타내며 위액분비 억제 효과도 보고되어 왔다.<sup>2)</sup> 주성분으로는 iridoid glycoside인 geniposide와 gardenoside를 비롯하여 crocin, genipiodisic acid, shanzhiside, genipin 등을 함유하고 있다.<sup>3)</sup> Han 등<sup>4)</sup>은 치자의 항산화 활성성분에 대한 연구에서 geniposide와 crocin을 확인하였고 또한 Mi,<sup>5)</sup> Chang,<sup>6)</sup> Tsai<sup>7)</sup> 및 Sung 등<sup>8)</sup>

은 합성교차결합제인 epoxy compound 및 glutaraldehyde와 천연 교차결합성분인 genipin을 돼지 심낭조직에 적용시켜 그 결합능력과 독성을 비교 관찰하였다. Liu,<sup>9)</sup> Oshima<sup>10)</sup> 등은 치자 중에서 고속액체크로마토그래피에 의하여 geniposide 및 genipin 등을 분리 동정하였으며, Paik 등<sup>11)</sup>은 치자의 성분에 관한 연구에서 pH, 온도, 빛 등 물리적 조건에 따른 치자 성분의 안정성을 실험하였다. 치자의 주성분인 geniposide는 장내 세균의 작용으로 가수분해를 받아 비당체인 genipin으로 전환되며 지용성이 커지고 장내 흡수율이 증가됨으로써 생체이용률이 높아지게 된다.<sup>12)</sup>(Scheme I) 최근에는 치자분말 및 엑스를 카타플라스마 등 피부외용제로 사용하기 위한 연구 및 제품개발이 진행되었고 그 결과 수종의 제품들이 소염치료제로 허가되어 판매되고 있다.

경피치료시스템(transdermal therapeutic system)은 약물을

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Tel : 063)290-1570, E-mail : jhyang@core.woosuk.ac.kr



Scheme 1—Molecular structure of geniposide and genipin.

피부를 통하여 투여하고자 하는 부위에 직접 적용하거나 약물의 유효 혈중 농도를 장시간 유지할 수 있도록 고안된 약물 전달 체계이다. 이러한 경피치료시스템은 환자의 순응도를 높이고 투여농도의 편차를 줄일 수 있으며 지속적인 적용이 용이하여 반감기가 짧은 약물에 적용하는 경우가 많다. 또한 간 초회통과를 피할 수 있고 투여용량의 조절이 용이한 장점이 있다. 이러한 제제들은 심혈관계 약물, 항히스타민제 뿐 아니라 소염진통제에서 다양한 연구가 진행되고 있다. 피부를 통한 흡수 과정에서 지용성이 큰 약물들은 지질 이중층을 통하여 흡수되며 일부 수용성 약물은 피부 부속기관을 통한 흡수 경로를 통하게 되지만 피부 부속기관을 통한 투과는 지질이중층을 통한 경로에 비하여 매우 느리며 따라서 치료 유효농도에 도달하는 데에는 장시간이 소요되는 문제점이 있다.<sup>13)</sup>

피부 투과성을 개선하기 위하여 온도를 상승시키거나<sup>14)</sup> ultrasound 등 물리적 촉진제<sup>15)</sup> 또는 피부의 물리화학적 성질을 바꿈으로써 약물의 투과속도를 개선시키는 피부투과 촉진제<sup>16)</sup> 등이 이용되고 있다. 이러한 피부투과촉진제는 대부분 지방사슬구조를 가지고 있으며 측쇄부분의 탄소수가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 또한 피부투과 촉진제의 친유성이 높을수록 투과효과가 커지게 되며<sup>18)</sup> 이는 피부의 특성에 기인한 것으로 보인다.

이에 저자는 치자엑스 중 주성분인 geniposide를 가수분해효소로써 genipin으로 전환하여 지용성을 증가시킴으로써 피부투과를 촉진시키고 항염효과를 높이기 위하여, 치자엑스를  $\beta$ -glucosidase를 사용하여 가수분해 시키고 이를 emulsion으로 제조한 다음 이 가수분해물의 분리동정 실험, 피부투과 실험, 항염효과 등을 비교관찰 함으로써 소염치료효과를 높일 수 있는 경피흡수 제제개발을 위한 연구에 착수하였으며 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실험 방법

### 시약

치자(Gardeniae Fructus)는 시중에서 구입하여 사용하였고 geniposide(Sigma Chem. Co., U.S.A), genipin (Wako Chem. Co., Japan) 및  $\beta$ -glucosidase (Sigma Chem. Co., U.S.A)는 표준품을 사용하였으며 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 기기

Skin permeation tester (FCDV-15, Lab Fine, Korea), HPLC (M920, Youngin Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu UV-1201, Japan), plethysmometer (Ugo Basile, Varese, Italy), light microscoph (Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan), rotary tissue processor and tissue embedding console system (Tissue-Tek®, Sakura, Japan), haemocytometer (Superior Marienfeeld, Germany).

### 실험동물

Hairless mouse (웅성,  $25 \pm 5$  g, Charles River Lab., USA) 와 S.D계 랫트(웅성,  $200 \pm 20$  g, 대한실험동물센터, Korea) 를 분양 받아 사용하였다.

### 치자 엑스 및 가수분해물 제조

치자 100 g을 조절로 하여 정제수 1000 mL를 넣고 100 °C에서 1시간 가열한 후 여과하고 추출액을 감압농축 후 동결 건조하여 치자엑스분말 (이하 GEX)로 하였다. 치자가수분해물 (이하 GHP)의 제조는 치자엑스분말 일정량을 취해 물에 현탁시키고  $\beta$ -glucosidase를 농도별 (100, 250, 500, 1,000  $\mu$ g/mL)로 첨가하여, 각각의 온도별 (20°C, 37°C, 50°C)로 GHP를 제조하였다.

### 치자함유 Emulsion의 제조

GEX 0.5 g을 증류수 70 mL에 넣어 흔들어주고, 글리세린과 프로필렌글리콜을 각각 3.0 g씩 가하고 균일하게 혼합한 다음 CMC-Na 0.5 g을 가하여 수상으로 하였고, 따로 linoleic acid 20.0 g에 Tween 80 2.0 g 및 Span 20 1.0 g을 가하고 (HLB 14.55) 혼합하여 유상으로 하였다. 수상에 유상을 소량씩 가하면서 균등히 혼합하여 emulsion을 제조 하였으며, GHP emulsion의 제조는 같은 방법으로 GEX 대신 GHP를 가하여 제조하였다(Table I).

### 주성분의 확인 및 정량

치자 중에 함유되어 있는 geniposide 및 genipin의 확인,

**Table I—Formulation of Emulsions of Gardeniae Fructus Extracts and Hydrolyzed Products**

GEX	0.5	—
GHP	—	0.5
Glycerin	3.0	3.0
Propylene glycol	10.0	10.0
CMC-Na	0.5	0.5
Tween 80	2.0	2.0
Span 20	1.0	1.0
Linoleic acid	20.0	20.0
Dist. water	q.s	q.s
Total	100.0	100.0

정량을 위하여 HPLC 법<sup>19)</sup>을 응용하였다. 고정상으로는  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 3.9×300 mm를 사용하였고, 이동상으로는 아세토니트릴:물 (15 : 85 v/v%)의 혼합액을 사용하였다. 검출기는 UV detector로, 파장은 240 nm, 유속은 1.2 ml/min이었고, 얻어진 chromatogram의 면적을 측정하여 계산하였다.

**유수분배계수 측정**

Geniposide 및 genipin의 유수 분배계수 실험은 Higuchi 등<sup>20)</sup>의 방법에 의하여 실험하였다. 수상용매로써는 0.1 M 인산염완충액 (pH 6.8)을 사용하였고 유상용매로는 n-octanol, n-hexane, benzene, chloroform, carbontetrachloride 등 5종을 사용하였다. Geniposide 및 genipin 표준품 10.0 mg을 수상용매 10 ml 및 유상용매 10 ml가 들어있는 분액 플라스크 내에 넣고, 실온에서 2시간 동안 진탕시킨 다음 평형에 도달시킨 후 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 수층을 분취하여 240 nm에서 흡광도를 측정하고 다음 식에 의하여 유수분배계수 (K<sub>o/w</sub>)를 산출하였다.

$$K_{o/w} = \frac{A_s - A_w}{A_w}$$

A<sub>s</sub> 및 A<sub>w</sub>는 평행에 도달하기 전 및 후의 수층에서의 흡광도를 나타낸다.

**피부투과실험**

GEX 및 GHP emulsion에 함유되어 있는 geniposide 및 genipin의 피부 투과량을 측정하기 위하여 무모마우스 및 Franz 형 확산셀(area : 1.77 cm<sup>2</sup>, effective vol. : 12 ml)을 이용하였다. 무모마우스는 등피부를 직경 2.0 cm로 절개하고 피하지방 및 모세 혈관을 조심스럽게 제거한 후 사용하였다. 시험액은 pH 7.4 완충용액 (10% propylene glycol 함유)을 사용하였다. Franz 형 확산셀에 무모마우스 피부를 장착하고

emulsion시료를 도포한 후 각 시간마다 시험액에서 100  $\mu$ L 씩을 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 피부투과 파라미터들을 구하였다.<sup>14)</sup>

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

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

J<sub>s</sub>는 평형 상태에서의 투과 속도 ( $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/hr)이고, A는 투과가 일어나는 피부의 면적(cm<sup>2</sup>), (dQ/dt)<sub>ss</sub>는 평형 상태에서의 단위 시간당 피부를 통과하는 약물의 양( $\mu$ g/hr), C는 제제중의 약물 농도( $\mu$ g/mL)이고, K는 약물의 분배계수(피부/기체), h는 피부의 두께(cm), D는 피부를 통한 약물의 확산계수(cm<sup>2</sup>/hr)이며, T<sub>L</sub>은 lag time(hr)이다.

**Carrageenan 유발 족부종 억제실험**

실험동물로서 체중 200±20 g의 SD계 랫트를 사용하여 실험하였다. 부종생성을 위하여 1%  $\lambda$ -carrageenan(Type IV) 용액 0.1 ml를 대조군과 실험군 랫트의 발바닥에 주사하고 1.5, 3, 6, 9, 12, 24, 48 및 72시간 후에 족부종측정기를 사용하여 족용적을 측정하고 다음의 식을 이용하여 족부종률(% swelling)과 족부종억제율(% inhibition)을 산출하였다.<sup>21,22)</sup>

$$Swelling (\%) = \frac{V - V_i}{V_i} \times 100$$

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

V는 carrageenan 주사 후 일정시간 후의 발의 부피이며, V<sub>i</sub>는 주사한 직후의 발의 부피, V<sub>d</sub>는 실험군의 족부종률이며, V<sub>c</sub>는 대조군의 족부종률이다.

Carrageenan 용액을 랫트의 뒤쪽 발바닥에 주사한 후 대조군은 아무런 처치를 하지 아니하였고 실험군에서는 각각 제조된 GEX 및 GHP emulsion을 1 g씩 도포하였다.

**병리조직 검사**

병리조직검사는 좌측 뒷 발바닥에 carrageenan 용액으로 염증을 유발 시킨 후 환부에 GEX 및 GHP emulsion을 도포시킨 다음 일정시간 후 좌측 대퇴부의 피부를 제거하고 대퇴이두근 (biceps femoris)과 근육주위의 결합조직 (connective

tissue) 및 지방조직 (fat tissue)을 가능한 한 포함하여 1.5 × 1.5 cm의 크기로 적출하였다. 적출 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정시킨 후 4 μm로 박절한 다음 hematoxylin 및 eosine solution을 사용하여 H&E stain 방법으로 염색 관찰하였다.

병리조직학적 소견은 모세혈관의 출혈 및 충혈과 염증세포의 침윤이 없는 경우를 음성반응으로 판정하였고(-), 모세혈관의 출혈 및 충혈, 염증세포의 침윤 정도에 따라서 양성 반응을 slight to mild(+), moderate(++), severe(+++)로 등급화 하여 판정하였다.<sup>15)</sup>

### 결과 및 고찰

#### 주성분 함량

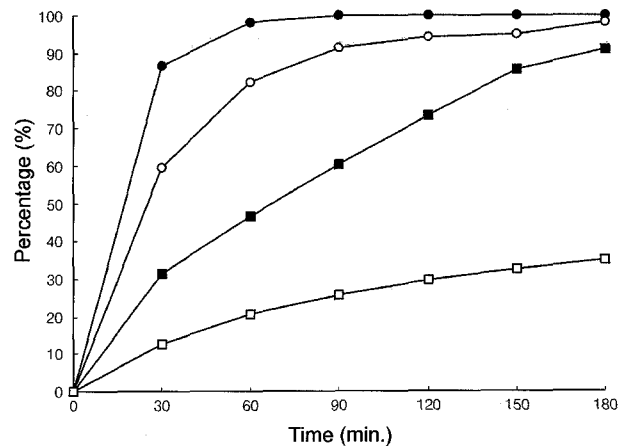
Geniposide 및 genipin 표준품의 50% 에탄올 용액을 HPLC에 주입하였을 때 8.7분에서 geniposide peak가 나타났고, 14.1분에 genipin의 peak가 나타남으로써 두 성분의 분리 정량이 가능하였다(Figure 1). 치지엑스에서도 주성분인 geniposide는 8.7 분에 피크가 확인되었고, 가수분해물에서는 genipin의 피크가 나타남으로써, 두 성분의 동시 정량이 가능하였다. GEX 중 geniposide의 함량은 19.3%로써 비교적 높은 수치를 나타내었으나, 가수분해물은 genipin은 0.8%로써 아주 낮은 수치를 보여주었다(Table II).

#### 엑스의 가수분해

GEX 중에 함유되어 있는 geniposide를 β-glucosidase로써 가수분해 시키기 위하여 각 농도별로 50°C에서 180분 동안 반응시킨 결과, 100 μg/mL 농도에서 약 30%의 가수분해율을 나타내었고 250 μg/mL에서는 90%로 높아졌으며, 1000

**Table II—Concentration of Main Ingredient from Gardeniae Fructus Extracts and Hydrolyzed Products**

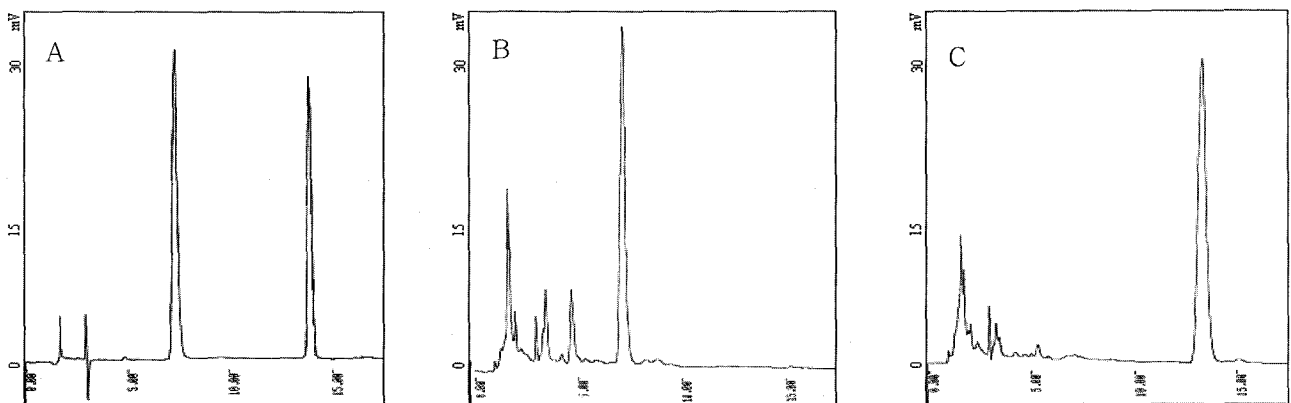
Samples	concentration (%)	
	GEX	GHP
Geniposide	19.3 ± 0.16	1.2 ± 0.04
Genipin	0.8 ± 0.02	18.7 ± 0.13



**Figure 2—Effect of β-glucosidase concentration on hydrolysis reaction of Gardeniae Fructus Extracts at 50°C.**

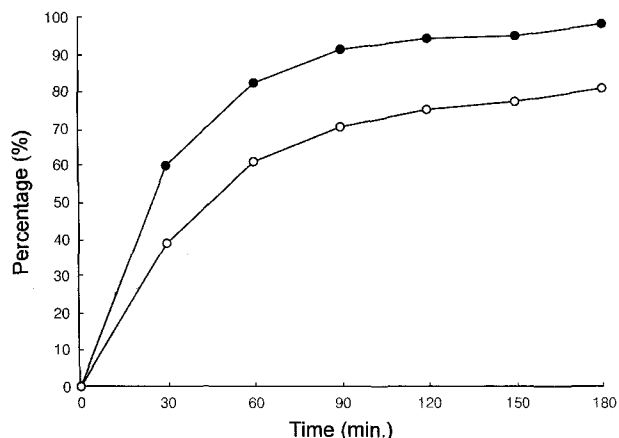
Key ●; 1000 μg/mL, ○; 500 μg/mL, ■; 250 μg/mL, □; 100 μg/mL

μg/mL에서는 120분에서 99% 이상의 전환율을 보여주었다(Figure 2). 온도에 따른 영향을 관찰하기 위하여 β-glucosidase를 1,000 μg/mL로 고정하고 37 및 50°C에서 가수분해율을 측정 한 결과 37°C에서는 3시간 후에 약 80%의 가수분해율을 나타내었고, 50°C의 경우에는 2시간 후에 98% 이상의 가수분해율을 보여주었다(Figure 3). 따라서 본 실험에서는 GHP를 제조할 때 50°C의 반응 조건에서 1,000 μg/mL 농도의 β-glucosidase를 이용하여 GEX를 가수분해 시킨 후



**Figure 1—Chromatogram of geniposide and genipin.**

A; Geniposide and genipin chromatogram of standard, B; Geniposide chromatogram of Gardeniae Fructus extracts, C; Genipin chromatogram of hydrolyzed product



**Figure 3**—Effects of temperature on hydrolysis of geniposide ( $\beta$ -glucosidase 1,000  $\mu$ g/mL). Key  $\bullet$ ; 50°C,  $\circ$ ; 37°C

emulsion을 제조하였다. GEX 100 mg을 물 90 mL에 녹이고  $\beta$ -glucosidase 용액(1,000  $\mu$ g/mL) 10 mL를 넣고 50°C에서 120분 동안 방치하여 가수분해 한 후 geniposide와 genipin의 함량을 측정된 결과 geniposide의 함량은 1.2%에 불과하였고, genipin의 양은 18.7%로 증가함으로써  $\beta$ -glucosidase 처리에 의해서 대부분의 geniposide가 genipin으로 전환되는 것으로 확인되었다(Table II). Kim<sup>12)</sup> 등의 연구에서도 황금 중 주성분인 baicalin을  $\beta$ -glucosidase를 이용하여 baicalein으로 가수분해 시킨 결과 우수한 전환율을 나타내었다고 보고한 바 있다. 생약성분이 배당체 화합물의 경우에는 장내 세균들이 당을 에너지원으로 이용하기 위하여 당의 분리가 일어나며 이러한 대사반응은 장관 내 흡수에 큰 영향을 미칠 수 있다. 천연물 중 glucose, galactose, rhamnose 등을 포함하는 glycoside들은 위나 소장에서 흡수되기 어려우나, 장내 세균의 가수분해를 받아 비당체로 전환되어 비로소 흡수되게 된다. Baicalin의 경우 장내세균에 의해서 baicalein으로 전환되어 흡수가 훨씬 용이하며 흡수된 후에는 간에서 다시 글루쿠론산 포함체를 형성하여 baicalin으로 전환되어 고지혈증 치료효과를 나타내게 된다. 또한 hesperidine과 narigin은 진피에 다량 함유된 flavonone rhamnoglucoside로써 경구투여 시 대장균에 의하여 비당체로 전환됨으로써 유의한 항염증 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup> 치자 중에 함유되어 있는 배당체 성분인 geniposide도 비당체인 genipin으로 전환될 경우 지용성을 증가시켜 항염효과를 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

**유수분배계수**

Geniposide와 그 가수분해물인 genipin의 유수분배계수를 비교한 결과 n-octanol에서 geniposide는  $0.13 \pm 0.01$ 이었으나 genipin은  $4.59 \pm 0.45$ 로 무려 35배로 증가하였으며, chloro-

**Table III**—Comparison of Lipid-water Partition Coefficient of Geniposide and Genipin in various Organic Solvents

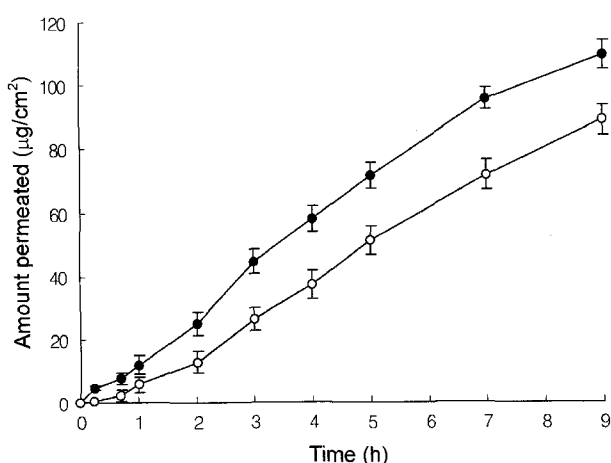
Solvent	Geniposide	Genipin
n-Octanol	$0.13 \pm 0.01$	$4.59 \pm 0.45$
n-Hexane	$0.04 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.07$
Benzene	$0.05 \pm 0.01$	$0.11 \pm 0.02$
Chloroform	$0.07 \pm 0.05$	$0.64 \pm 0.10$
Carbon tetrachloride	$0.03 \pm 0.01$	$0.13 \pm 0.09$

form에서는 geniposide  $0.07 \pm 0.05$  이었으나, genipin은  $0.64 \pm 0.10$ 로서 9배 정도 증가하였다. n-octanol은 생체막과 가장 유사한 용매로써 다른 용매에 비하여 n-octanol과 친화력이 큰 것은 피부투과에 크게 작용할 것으로 기대된다 (Table III).

Kim<sup>12)</sup> 등의 연구에서도 baicalein이 baicalin 보다 n-octanol에 대한 유수분배계수가 약 4배 정도 높았으며 이는 우수한 소장흡수로 나타났다. n-octanol과 chloroform에서의 유수분배계수의 상승이 두드러졌으며 다른 유기용매에서의 유수분배계수 증가는 미약하였다.

**피부투과**

피부투과실험은 GEX의 투과량을 geniposide의 양으로 측정하고, GHP는 genipin의 양으로 측정하였는데, 9시간 후 GEX 중 geniposide의 투과량은  $89 \pm 4.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었으나, GHP 중 genipin의 투과량은  $109 \pm 4.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 나타나 피부투과율이 약 20% 증가 되었으며, 이는 가수분해로 인하여 당이 제거되면서 지용성이 증가되었을 뿐 아니라 분자량 감소에 의한 확산계수의 증가에도 영향을 받았을 것으로 사료된다(Figure 4).

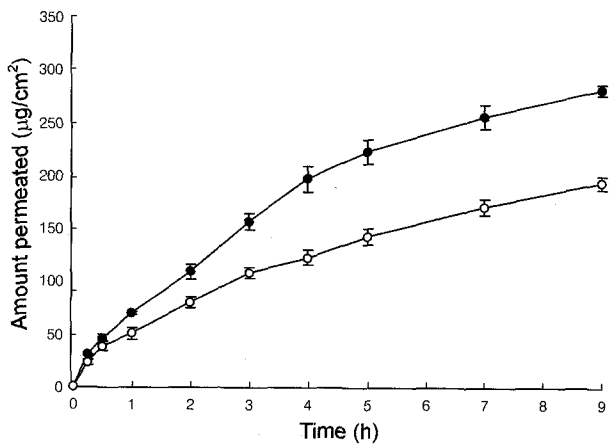


**Figure 4**—Skin permeation profiles of Gardeniae Fructus Extracts and hydrolyzed product. Key  $\bullet$ ; Hydrolyzed products (genipin),  $\circ$ ; Extracts (geniposide)

GEX와 GHP를 이용하여 제조한 emulsion에서 geniposide와 genipin의 피부투과량은 9시간후 GEX에서  $193 \pm 6.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 인 반면 GHP에서는  $280 \pm 12.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 나타나 genipin이 geniposide 보다 약 45% 증가된 피부투과도를 나타내었다(Figure 5).

GEX와 GHP의 피부투과율은 emulsion으로 제제화 함으로써 크게 향상 되었으며 이는 emulsion제조 시 사용된 계면 활성제와 피부투과 촉진제의 영향으로 사료된다.

GEX와 GHP의 피부투과계수를 비교해 보면 단위시간당 피부투과율이 GEX에서  $11.13 \pm 1.67 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 인데 비하여 GHP에서는  $13.32 \pm 1.92 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로 나타나 약 12% 증가되었고, lag time은 각각 1.03 및 0.71시간으로 나타났다(Table IV). 한편 GEX 및 GHP emulsion 에서는 GEX의 단위시간당 피부투과율이  $26.27 \pm 4.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 인 반면,



**Figure 5**—Profiles of Gardeniae Fructus Extracts emulsion and hydrolyzed product emulsion.  
Key ●; Hydrolyzed products emulsion (genipin), ○; Extracts emulsion (geniposide)

**Table IV**—Permeation Parameters of Extracts and Hydrolyzed Products through Excise Hairless Mouse Skin

Preparation	Parameters		
	Cumulative amount for 7 hr ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ )	$T_L$ (hr)
GEX	$72.63 \pm 4.72$	$11.13 \pm 1.67$	$1.03 \pm 0.28$
GHP	$95.62 \pm 3.37$	$13.32 \pm 1.92$	$0.71 \pm 0.17$

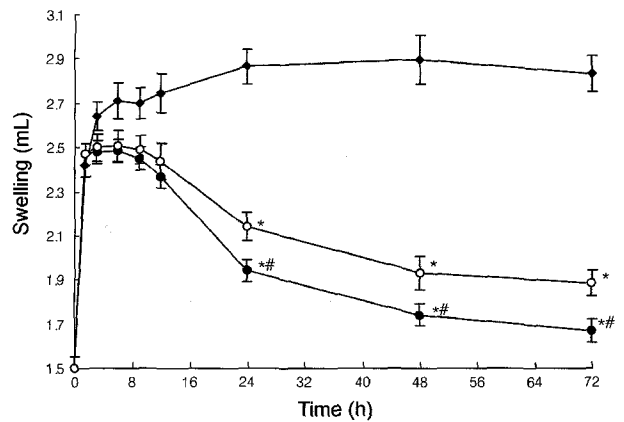
**Table V**—Permeation Parameters of Extracts and Hydrolyzed Products Emulsion through Excised Hairless Mouse Skin

Preparation	Parameters		
	Cumulative amount for 7 hr ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$J_s$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ )	$T_L$ (hr)
GEX	$170.76 \pm 7.29$	$26.27 \pm 4.11$	$0.52 \pm 0.04$
GHP	$255.29 \pm 11.37$	$40.35 \pm 5.04$	$0.35 \pm 0.28$

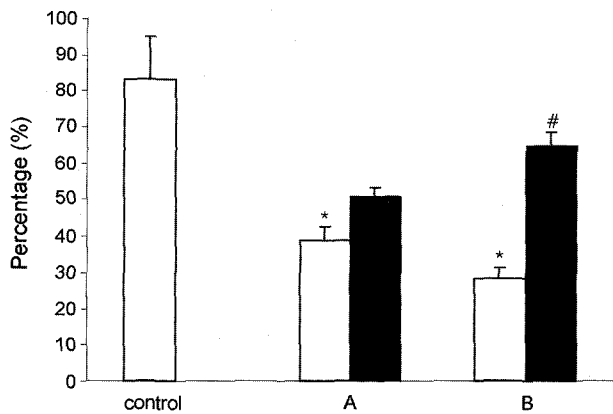
GHP에서는  $40.35 \pm 5.04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로 나타나 약 53% 증가되었고, lag time은 각각 0.52 및 0.35시간으로 나타났다(Table V). GEX 및 GHP를 emulsion으로 제제화 함으로써 단위시간당 피부투과율은 각각 236 및 302%로 크게 향상됨을 알 수 있었다.

**카라기난 유발 부종억제**

랫트 발바닥에 카라기난을 주사한 후 부종의 생성은 투여 3시간까지 급격히 증가하였으며, 24시간부터 72시간까지는 일정한 범위 내에서 유지되었는데 투여 24시간 후 대조군에서는 2.98 ml가 증가한 반면, GEX emulsion 에서는 2.14 ml, GHP emulsion 에서는 1.93 ml로 현저하게 감소되었고,



**Figure 6**—Variation of swelling ratio following carrageenan-induced paw edema.  
\*significantly different from control group ( $P < 0.05$ )  
#significantly different from Ext. emulsion ( $P < 0.05$ )  
Key ●; Hydrolyzed product emulsion, ○; Extract emulsion, ◆; control group



**Figure 7**—The comparison of swelling ratio and swelling inhibition ratio following carrageenan-induced paw edema after 24 hours.  
\*significantly different from control ( $P < 0.01$ )  
#significantly different from group A ( $P < 0.01$ )  
Key □; swelling ratio, ■; swelling inhibition ratio  
A; Extract. emulsion, B; Hydrolyzed Product emulsion

투여 72시간 후에도 대조군에서는 2.82 ml 증가를 유지하였는데, GEX emulsion에서는 1.89 ml, GHP emulsion에서는 1.66 ml로 계속 감소되었다(Figure 6). 24시간 후의 족부종율과 부종억제율을 비교해보면, 대조군에서는 약 83%의 부종율을 나타낸 반면 GEX emulsion에서는 약 40%, GHP emulsion에서는 약 27%로 낮아졌으며, 이 수치를 근거로 하여 부종억제율을 비교해 보면 GEX emulsion이 49.8%인 반면 GHP emulsion에서는 62.8%로 나타나 13% 정도 높은 성적을 보여주었다(Figure 7). 이 결과는 GEX 중 geniposide가 genipin으로 전환됨으로써 흡수가 증가된 경피 흡수실험 결과와 일치되며, Kim<sup>12)</sup> 등의 생약성분 중 가수분해로 인한 생체이용률 증가에 관한 논문내용과도 일치된다.

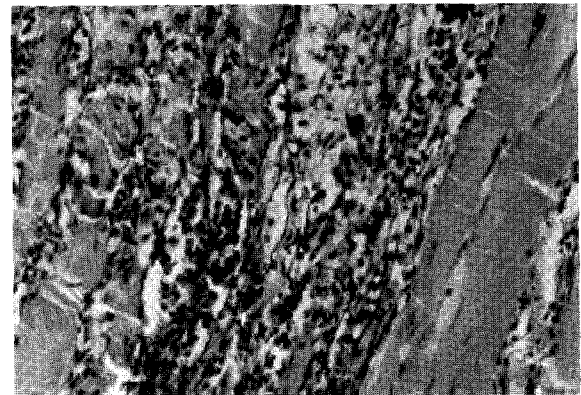
**병리조직 검사**

Carrageenan을 랫트의 뒤쪽 발바닥에 주입하여 랫트를 마취시키고 대퇴부를 절개한 후 저직의 변화를 관찰한 결과 대조군에서는 24시간 후에 모세혈관의 출혈과 충혈 및 염증세포의 침윤이 심한 경우가 83%로 나타났고, 염증세포로는 주로 호중성 백혈구의 침윤이 관찰되었으며, 48시간 후에는 심한 경우가 67%로 나타났고 염증세포로는 호중구가 감소하면서 림프구 및 단핵구 침윤이 관찰되었으며, 72시간 후에는 심한 경우가 33%로 나타났고 근섬유들 사이에 약간의 부종과 근외막(epimysium)의 결합조직(connective tissue)이 증식(proliferation)되면서, 염증세포로는 호중구가 많이 감소

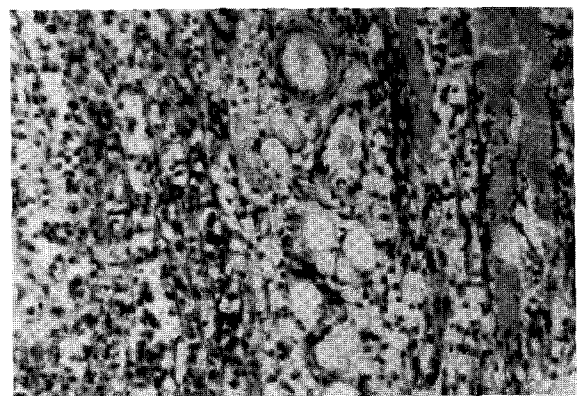
하고 림프구 및 단핵구 침윤이 관찰되었다(Table VI, Figure 8, 9, 10). GEX emulsion 투여군 에서는 carrageenan 주입 후 24시간에서 모세혈관의 출혈과 충혈 및 염증세포의 침윤이 심한 경우가 67%로 나타났고, 염증세포로는 호중성 백혈



**Figure 8**—Severe hemorrhage and hyperemia, and infiltration of lymphocytic inflammatory cells in epimysium. 24 hours post in control group. H&E stain x200.



**Figure 9**—Severe infiltration of neutrophil & leukocyte in muscle fiber. 48 hours post in control group. H&E stain x200.

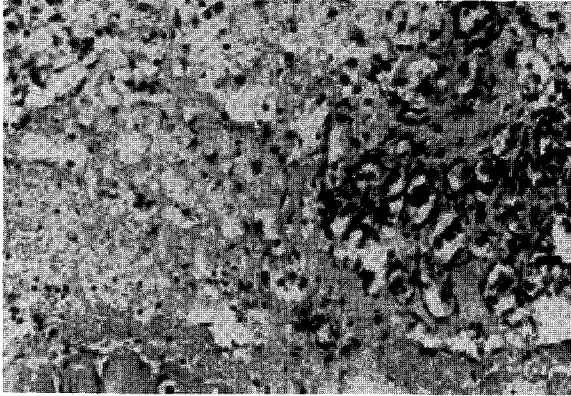


**Figure 10**—Severe infiltration of mononuclear inflammatory cells in epimysium. 72 hours post in control group. H&E stain x200.

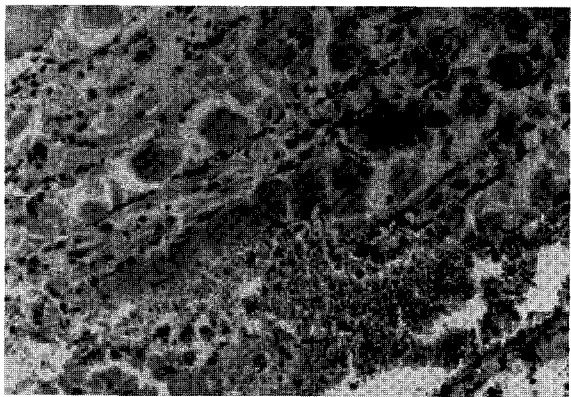
**Table VI**—Hemorrhage and Hyperemia in Capillary and Infiltration of Inflammation Cells Change in Each Group

Group	Time (h)	Histological Change (%)			
		-	+	++	+++
Control	0	0	0	0	100
	24	0	0	17	83
	48	0	0	33	67
	72	0	0	67	33
GEX.	0	0	0	0	100
	24	0	0	33	67
	48	0	17	50	33
	72	0	33	67	0
GHP	0	0	0	0	100
	24	0	17	50	33
	48	0	67	33	0
	72	17	66	17	0

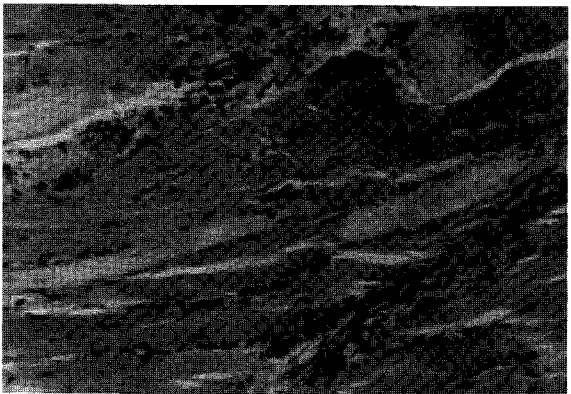
- : 0%  
 + : Slight to mild  
 ++ : Moderate  
 +++ : Severe



**Figure 11**—Moderate infiltration of histiocyte and inflammatory cells in epimysium. 24 hours post in GHP emulsion group. H&E stain  $\times 200$ .



**Figure 12**—Moderate infiltration of histiocyte and hemorrhage. 48 hours post in GHP emulsion group. H&E stain  $\times 200$ .



**Figure 13**—Mild infiltration of inflammatory cells in epimysium. 72 hours post in GHP emulsion group. H&E stain  $\times 200$ .

구가 관찰되었으며, 48시간 후에는 심한 경우가 33%로 나타났고, 염증세포로는 호중성 백혈구가 감소하였고 림프구 및 단핵구 침윤이 관찰되었으며, 72시간 후에는 심한 경우가 나타나지 않았고, 염증세포로는 호중성 백혈구는 많이 감

소하고 림프구 및 단핵구의 침윤이 관찰되었다(Table VI). GHP emulsion 투여군에서는 carrageenan 주입 후 24시간에서 모세혈관의 출혈과 충혈 및 염증세포의 침윤이 심한경우가 33%로 나타났고, 염증세포로는 근외막에서 중등도의 림프구 및 염증세포의 침윤이 관찰되었으며, 48시간 후에는 심한 경우가 나타나지 않았고, 염증세포로는 호중구가 감소되고 림프구 및 단핵구의 침윤이 증가되기 시작하였으며, 72시간 후에는 근외막에서 중등도의 염증세포의 침윤이 관찰되었으나 호중성 백혈구는 많이 감소되고 림파구 및 단핵구의 증가가 뚜렷이 나타났다(Table VI, Figure 11, 12, 13). Carrageenan 유발 염증억제 실험에서 GEX 및 GHP emulsion 모두 부종을 억제하는 효과와 함께 빠른 조직 수복 양상을 나타냄으로써 우수한 항염효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 그중에서 GHP emulsion이 GEX emulsion에 비하여 염증 발현 후 회복 시간을 24시간 정도 단축시킴으로써 더 우수한 효과를 발휘할 수 있을 것으로 기대되며 이는 가수분해물인 genipin의 빠른 흡수로 인한 신속한 약효발현으로 사료된다

## 결 론

치자엑스 중 주성분을  $\beta$ -glucosidase로 가수분해하여 피부 투과를 촉진하고 항염효과를 높이고자 치자엑스 및 그 가수분해물로서 emulsion제제를 제조한 후 피부투과도 측정, carrageenan 유발 부종억제실험 및 병리조직검사를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

치자의 주성분인 geniposide의 가수분해율은  $\beta$ -glucosidase의 농도와 온도에 비례하여 증가하였으며, 50°C에서 양호한 가수분해율을 나타내었다.

가수분해물인 genipin은 배당체인 geniposide에 비하여 높은 피부투과율을 나타내었으며, 가수분해물을 함유한 emulsion제제도 엑스제제에 비하여 피부 투과도가 증가하였다.

Carrageenan 유발 족부종억제 실험에서 엑스제제 및 가수분해물제제 모두 대조군에 비하여 우수한 부종억제 효과를 보였으나, 가수분해물 제제가 엑스제제에 비하여 더 좋은 성적을 보여주었고, 염증의 조직학적 소견에서도 족부종억제율과 유사한 효과를 나타내었다. 이상의 실험결과 치자엑스를  $\beta$ -glucosidase로 가수분해하여 투여할 경우 배당체인 geniposide가 지용성이 높은 genipin으로 전환되어 피부투과도를 촉진시키고 항염효과를 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

- 1) 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).
- 2) 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), 219-222 (1982).
  - 3) 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).
  - 4) Y.N. Han, H.K. Oh, K.H. Hwang and M. S. Lee, Antioxidant components of gardenia Fruits, *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**(3), 226-232 (1994).
  - 5) 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).
  - 6) Y. Chang, C.C. Tsai, H.C. Liang and H.W. Sung, *In vivo* evaluation of cellular and acellular bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent(genipin), *J. Biomater. Sci.*, **12**(8), 851-852 (2001).
  - 7) 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).
  - 8) H.W. Sung, C.N. Chen, R.N. Huang, J.C. Hsu and W. H. Chang, *In vitro* surface characterization of a biological patch fixed with naturally occurring crosslinking agent, *Biomaterials*, **21**(13), 1353-1362 (2000).
  - 9) 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).
  - 10) 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).
  - 11) 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).
  - 12) M.J. Kim, N.S. Kim and J.H. Yang, Improvement of hydrolysis and bioavailability of coprecipitated products of coptidis Rhizoma and scutellariae Radix by  $\beta$ -glucuronidase, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **33**(2), 91-97 (2003).
  - 13) A.C. Williams and B.W. Barry, Skin absorption enhancers, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.* **9**(3), 305-353 (1992).
  - 14) B.W. Barry, Dermatological Formulations, *Marcel Dekker*, New York, pp.49-94 (1983).
  - 15) T.Y. Kim, Transdermal delivery of triamcinolone acetonide gel by ultrasound, *Thesis of Ph.D Woo Suk Univ.*, (2002)
  - 16) C.K. Shim, Y.B. Chung and Y.S. Kang, Drug delivery system, Hanlimwon Inc. p.114 (1993).
  - 17) K. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Effect and mode of action of aliphatic esters on the *in vitro* skin permeation of nicorandil, *Int. J. Pharm.*, **43**, 31-40 (1988).
  - 18) H. Sasaki, M. Kojima, J. Nakamura and J. Shibasaki, Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal penetration of phenolsulfophthalcin and indomethacin from aqueous vehicle, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(3), 797-799 (1990).
  - 19) T.H. Tsai, H. Westly, T.F. Lee and C.F. Chen, Identification and determination of geniposide, genipin, gardenoside, and geniposidic acid from herbs by HPLC/photodiode-array detection, *J. Liquid Chromatography*, **17**(10), 2199-2205 (1994).
  - 20) T. Higuchi and K.A. Connors, Phase solubility technics, *Adv. Anal. Chem. Instr.*, 117-212 (1965).
  - 21) K.F. Swingle, T.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).
  - 22) 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).