

陳皮의 저장기간에 따른 항알러지효과 비교

신용욱*

경남과학기술대학교 농학·한약자원학부

Changes in the Anti allergic Effect of Citrus unshii Pericarpium According to Storage Period

Yong-Wook Shin*

Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam national University of Science and Technology,
Jinju 660-758, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The present study was undertaken to determine whether the ethanol extract of Citri Pericarpium (CP, Pericarp of Citrus unshiu Markovich, Rutaceae) is effective against atopic dermatitis according to its storage period.

Methods : To evaluate antiallergic effect of CP and OCP (Old Citri Pericarpium) evaluated in vivo their inhibitory effects against passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction induced by IgE-antigen complex and scratching behaviors by compound 48/80. The Anti-atopic effects were measured by contact dermatitis, prurient animal model and PCA reaction. Contact dermatitis in mice as a model of the Type IV reaction caused by Oxazolone.

Results : The results showed that anti-pruritus effects, analgesic effects of CP was depends on its hesperetin contents. And It also showed that keep longer in storage appeared to be higher in hesperetin contents. Both CP and OCP(Old CP) have a dose-dependent analgesic action in acetic acid induced writhing syndrome. OCP Potently inhibited PCA reaction in mice, although OCP weakly inhibited in long term contact dermatitis model in mice.

Conclusions : These results suggest that the Proportional to the storage period, Citri Pericarpium possesses analgesic effects and anti-allergic effects.

Key words : Citri Pericarpium, anti-allergic effects, Storage Period

서론

陳皮는 운향과(Rutaceae)에 속한 상록 소교목인 귤 (Citrus unshiu Markovich) 및 같은 속 근연식물의 성숙한 과실의 열매껍질을 건조한 것으로 한, 중, 일 3개국에서는 전통적으로 소화불량, 식욕부진, 거담작용으로 기관지염 및 기침에 쓰인다. 또한 건위약으로서 위장 평활근 이완, 위액분비 촉진, 동맥경화 예방, 항알레르기 효과, 항위궤양 작용, 이담, 심장에 대한 작용, 혈관투과성 억제, 항산화작용에 대한 약리작용이 알려져 있다¹⁾. 진피의 주요함유성분인 hesperidin의 함유

량이 4% 이상으로 대한약전²⁾에 기재되어 있으며 hesperidin의 약리작용으로는 lipase 활성, 항궤양치료효과³⁾, 항알레르기작용⁴⁾, 혈압저하효과, 항바이러스작용, 소염작용⁵⁾ 등이 보고된 바 있다. 진피분말이 일본 삼나무에 의한 계절성알레르기 비염 환자들의 호흡기구로 부터의 histamine 분비를 억제하는 것으로 알려졌으며 이는 flavonoid 인 hesperetin 과 nobiletin 이 비만세포의 탈과립을 억제하는 기전에 의한 것으로 밝혀졌다⁶⁾. 한편, 진피는 본초학적인 측면에서 '육진팔신약' 가운데 육진약(六陳藥)에 속하는 약재로 오래 묵힐수록 좋은 약재로 알려져 있다⁷⁾. 육진약이란 낭독(狼毒), 지실(枳

*교신저자 : 신용욱, 경남 진주시 동진로 33번지 경남과학기술대학교 농학·한약자원학부 한약리학교실
· Tel : 055-751-3226 · Fax : 055-751-3229 · E-mail : ywsynn@gntech.ac.kr
· 접수 : 2012년 08월 12일 · 수정 : 2012년 09월 03일 · 채택 : 2012년 09월 06일

實), 진피(陳皮), 반하(半夏), 마황(麻黃), 오수유(吳茱萸) 으로서 오래 보관하면 보관할수록 약효가 우수한 것으로 알려진 약들이다. 주로 독성이 강하거나(낭독, 반하, 마황) 운향과식물(지실, 진피, 오수유)로 구성되어 전해져 온다. 약재의 품질은 관능적 기준과 이화학적 기준으로 구분될 수 있는데 관능적 기준으로는 조각이 크고 색이 선명하고 질이 부드러우며 과피의 기름점이 많아 냄새가 진하며 될 수 있는 한 백색의 내피가 적은 것이 좋다⁸⁾. 또는 진피를 오래저장하면 홍색이 적갈색으로 변하는데 효능은 더 좋은 것으로 알려져 있다⁹⁾.

진피(陳皮) 이화학적 기준으로는 현행공정서의 기준을 따르면 건조감량이 13.5%이하, 회분이 4.0%이하, hesperidin 함량이 4.0%이상으로 중금속 30ppm 이하, 잔류농약은 검출되지 않아야 적합판정을 받는다. 진피의 hesperidin 함량을 수확직후와 보관기간 1~3년을 거친 후를 비교한 결과 수확직후의 hesperidin 의 함량이 4.40%이던 것이 1년 후에는 3.40%, 2년 후에는 3.02% 그리고 3년 후에는 2.65%로 보관기간에 비례하게 감소되는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 따라서 보관기간이 길어질수록 공정서에서 정한 기준에 부적합 하게 된다. 즉, 진피는 오래저장하면 좋다는 전통적인 관능적 품질기준과 이화학적인 기준이 배치되게 된다. 한편, 국내에서 생산되는 진피의 경우 식품가공공장에서 부산물로 수거되는 경우가 많은데 거피하는 과정에 따라 hesperidin 함량의 차이가 날 수 있다. 즉, 식품공장에서 증숙을 거치면서 껍질을 벗긴 경우 건조감량에서 부적합판정이 나지만 진피의 내피가 증숙과정으로 제거되었기 때문에 hesperidin의 함량은 상대적으로 증가한 것으로 보고된 바 있다¹⁰⁾. 종합해보면 진피의 효능은 진피의 내피를 효과적으로 제거하는 데에 달린 것으로 여겨지는데 이러한 방편으로 약재를 오래 보관하는 것으로 사료되어 저장기간을 달리한 진피의 효능을 검토하고자 선행실험으로 알려진 진피의 항알러지 효능으로 비교 하였다.

아토피는 면역학적인 측면에서 살펴보면, 급성병변의 경우 2형 보조 T(Th-2)세포 반응에 의한 IL-4, 5, 10의 증가, 1형 보조 T(Th-1)세포에서 분비되는 interferon(IFN- γ)의 감소, 비만세포의 증가 등이 병의 발생과 상관있으며, 이후 IL-12에 의해 Th-1세포 반응이 활성화되어 병변의 만성화가 진행 된다¹¹⁾. 아토피피부염에서 IFN- γ 와 IL-2를 투여하였을 때 피부염이 호전되었다는 보고는 Th-1/Th-2 불균형이 아토피피부염의 병인에 중요함을 제시해준다^{12,13)}. 아토피피부염의 다른 기전으로 산화적 손상(oxidative damage)을 고려할 수 있다. 급성으로 악화된 아토피피부염 환자에서 정상인에 비해 산화 표지자 들이 증가되어 있음이 밝혀졌고, 이는 치료에 반응하여 감소하는 양상을 보였다^{14,15)}. 또한 중증의 아토피피부염에서 각질층의 산화적 단백질 손상(oxidative protein damage)에 의한 카르보닐 성분(carbonyl moiety)의 증가 및 불포화 지방산 산화에 의한 알데하이드의 생성은 산화작용이 표피 장벽의 손상과 수분 손실을 유발하여 아토피피부염을 악화시킬 수 있다는 것을 보여 준다¹⁶⁾. 반면에 아토피피부염환자에서 병변이 발생하지 않은 곳은 체내의 항산화제인 α -tocopherol이 증가하여 산화적 손상을 억제하였고¹⁷⁾, 이를 복용하였을 때 투여량에 비례하여 병변부위의 아토피 피부염의 임상증상이 호전되었다는 보고도 있다¹⁸⁾. 이와 같은 연구 결과들은 산화적 손상이 아토피 피부염의 병태생리에 중요한 역할을 하며, 항산화 물질의 투여가 아토피 피부염을 호

전시킬 수 있음을 뒷받침한다. 따라서 저장기간을 달리한 약재의 항산화력을 평가하고 이에 따르는 항알러지 효능을 지표로 실험하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 陳皮(CP), 묵은陳皮(OCP)는 대구약령사에서 구입하여 대구한의대학교 본초학교실에서 검정 받은 뒤 사용하였다. 포장지에 기재된 포장일자에 비추어 CP는 포장된지 2년 OCP는 포장된지 10년된 陳皮를 사용하였다. 외견상의 차이로는 CP는 겉껍질은 황적색을 속껍질은 흰색을 띠었고 OCP는 겉은 흑갈색과 속은 연한 갈색을 띠었다.

2) 동물

실험동물은 (주)오리엔트에서 구입한 4주령 ICR 마우스와 7주령 BALB/c 마우스를 clean cage에서 1주간 순응시킨 후 실험에 사용하였으며 물과 고형사료(오리엔트)는 자유롭게 섭취하도록 하였고 온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도($55 \pm 10\%$) 및 명암주기(12시간)는 자동으로 조절되도록 하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약은 fetal bovine serum, dinitrophenol-human serum albumin (DNP-HSA), compound 48/80, Evans Blue 은 Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, U.S.A.), 등을 사용하였다. 실험에 사용되어진 기기로는 Rotary Evaporator (Eyela, Japan), Microscopy(Olympus Imaging, USA), Microtome RM2145 (LEICA, Germany)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 陳皮 에탄올 추출물제조

陳皮(CP), 묵은陳皮(OCP) 각 500g을 80% 에탄올 2L 와 함께 2시간씩 2회 추출한 후 여과지로 여과하여 진공회전증발농축기(rotary vacuum evaporator)에서 감압 농축한 다음 동결 건조하였으며 이때 수율은 각각 10.5%, 9.2% 이었다.

2) 흡수스펙트럼 분석

보관기간에 따른 陳皮의 색도변화를 관찰하기 위하여 각각 데시케이터에서 24시간 건조한 뒤 1g을 정밀히 취하여 온탕 100mL를 넣어 가끔 흔들며 섞으면서 $60 \sim 70^\circ\text{C}$ 에서 30분간 가온한 다음 식히고 여과하였다. 여액 1.0mL를 취하여 물을 넣어 정확히 10mL로 한 다음 흡광광도 측정법¹⁹⁾에 따라 스캔하여 흡수스펙트럼의 패턴을 비교 관찰하였다.

3) 헤스페리딘 정량

약전의 상법에 따라 헤스페리딘을 정량하였다. 즉, 이 약의 가루 약 0.5 g을 정밀하게 달아 메탄올 60 mL를 넣고 2시간 환류추출한 다음 여과한다. 잔류물에 메탄올 30 mL를 넣어 같은 방법으로 조작한다. 여액을 모두 합하여 메탄올을

넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 따로 헤스페리딘 표준품 약 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토 그래프법에 따라 시험하여 검액 및 표준액의 피크면적 A_T 및 A_S를 측정한다.

$$\begin{aligned} & \text{헤스페리딘 (C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}\text{)의 양 (mg)} \\ & = \text{헤스페리딘표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \end{aligned}$$

조작조건

- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)
- 칼 럼 : 안지름 4 ~ 6 mm, 길이 15 ~ 25 cm인 스테인레스강관에 5 ~ 10 μm의 액체크로마토그래프용옥타데실릴실리카겔을 충전한다.
- 칼럼온도 : 상온
- 이동상 : 메탄올·물혼합액(40 : 60)
- 유 량 : 1.0 mL/분

4) 항산화효과 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유기 소거능 측정은 Blois법²⁰⁾에 따라 Test sample을 메탄올에 희석시킨 희석용액 0.2 mL에 4×10⁻⁴ M 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액 0.8 mL를 가하여 10초간 혼합하고, 상온에서 10분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 메탄올 0.2 mL에 DPPH용액 0.8 mL를 가한 후 상온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정한 것으로 하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

5) 초산신전반응 관찰실험

진통효과를 측정하기 위해 Siegmund²¹⁾ 등의 방법에 준하여서 초산으로 유도한 ICR 마우스의 신전반응을 관찰하였다. 즉, 생쥐 5 마리를 한 군으로 하여 검액 CP 와 OCP 각각 200mg/kg 와 500mg/kg 씩 각각 경구투여하고 검액 최종 투여 60분 후, 0.7% 초산을 복강에 주사 하고 10분에서 20 분 사이에 마우스의 신전행동(writhing syndrome) 의 횟수를 측정하였으며 대조약물로는 Aminopyrine을 사용하였다

6) 소양행동 빈도 관찰실험

Compound 48/80 은 oligomeric 화합물로서 N-methyl-p-methoxy phenethyl- amine과 formaldehyde 의 중합체로서 설치류의 비만세포에서 히스타민을 분비시켜 혈관투과성이 증대된다. 따라서 비만세포 탈과립의 현상으로 야기되는 가려움증 발적 등의 증상을 유발하는 동물모델의 작성이 가능하다. 소양행동 실험은 Sugimoto²²⁾ 등의 실험방법을 따랐다. 음성 BALB/c 마우스 5 마리를 한 군으로 하여 검액 CP 와

OCP 각각 200mg/kg 와 500mg/kg 씩 각각 경구투여하고 검액 최종 투여 60분 후, 관찰상자(22×22×24cm)에 10분간 둔 다음 마우스의 등부위 털을 제거하여 compound 48/80을 50μg/μl를 피하주사한 다음 즉시 관찰 상자에 한 마리씩 격리 수용하여 무인조건에서 마우스의 소양행동을 캠코더(SV-K80,samsung)로 등 부위를 뒷발로 긁는 행동을 녹화한 뒤 그 횟수를 한시간에 걸쳐 측정한다.

7) 경피수동형이나필라시스 억제효과

IgE가 관여하는 즉시형 과민반응을 검증하기 위해 Choo²³⁾ 등의 실험법에 따랐다. 즉, ICR Mouse 등에 각각 saline 과 anti-DNP IgE를 피하주사한 다음 48시간 뒤에 생쥐 5 마리를 한 군으로 하여 검액 CP 와 OCP 각각 200mg/kg 와 500mg/kg 씩 각각 경구투여하고 검액 최종 투여 60분 후, DNP-HSA 200μg과 3% Evans Blue를 미정맥으로 투여한 다음 30분 후 치사시킨 다음 피부를 절개한 후 1N KOH를 함유한 0.6N acetone-인산용액으로 절개된 피부를 용해하여 수욕상에서 익일 반응 시킨 다음 상등액을 취하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Oxazolone 유도의 만성 귀부종억제효과 검색

만성 접촉성 피부염모델 작성을 위해 Oxazolone으로 감작시킨 뒤 반복적인 피부에의 도포로 접촉성 피부염을 유도한 뒤 mouse 의 귀두께 변화를 측정함으로써 진피 추출물의 만성접촉성피부염 저해효과를 측정하였다. 실험은 Fujii²⁴⁾의 방법으로 실시하였다. ICR Mouse의 복부 털을 가위로 잘 제거시켜 피부를 노출시킨 다음 Oxazolone (1.5%) 100uL를 잘 도포하여 감작시키고 7일이 지난 다음 mouse의 귀 두께를 측정하고 추출물을 귀에 잘 도포한 다음 30분 지난 후에 다시 acetone: olive oil(4:1)의 용액에 oxazolone을 1%로 용해하여 도포하여 접촉성 피부염을 유발시켰다. 3 일 간격으로 4 회 위와 같은 동일한 피부염 유도를 반복한 뒤 16 일차에 귀 두께를 측정한 뒤 치사시켜 귀두께를 측정하여 실험개시 7 일부터 16 일간의 귀부종을 측정하였다.

9) 통계처리

실험결과는 mean±SD로 표시하였다. Control 값과 시료 처치군과의 유의성은 Student-Newman-Keuls test 와 ANOVA를 적용하여 p 값이 0.05미만 일때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 진피의 물성에 관한 비교

흡수스펙트럼 패턴분석

陳皮저장기간에 따른 색도의 변화를 비교하기 위해 상법 19) 에 따라 200nm에서 600nm 까지 스캔한 흡수스펙트럼 profile 을 Fig. 1에 제시하였다. 자외부인 200nm에서 400nm에서 전 구간 균일하게 묽은 진피의 흡광도가 진피보다 낮음을 관찰할 수 있었으며 280nm 피크를 나타내는 등 흡광도의 패턴은 두 시료 모두 일정함을 알 수 있었다. 외견상 저장기간에 따라 점차적으로 갈색으로 변화하여 진피는 굴

고유의 황적색을 띠던 것에 비해 묵은 진피에서는 흑갈색을 띠었다. 이러한 외견상의 색상의 변화는 흡광도로도 차이를 나타내었다.

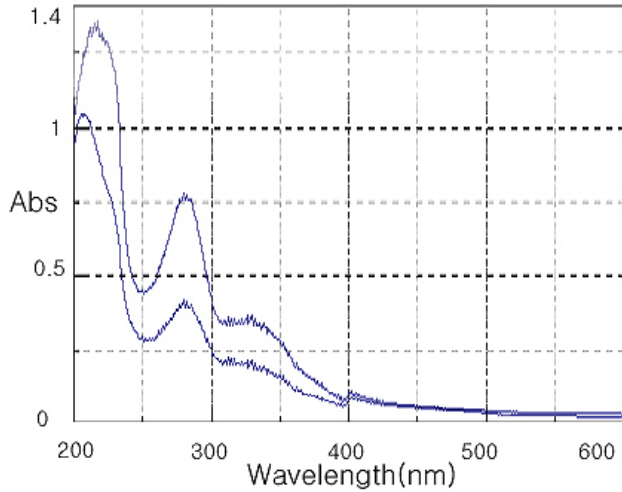


Fig. 1. UV-visible spectrum profiles of MeOH extract of Citri Pericarpium and Old-Citri Pericarpium

헤스페리딘정량

저장기간에 따른 진피 메탄올 추출물을 지표물질인 헤스페리딘의 함량변화를 관찰하였다. 진피와 묵은 진피 모두 7.23분대에서 헤스페리딘 피크를 나타내었으며 정량의 결과는 Table 1에 제시하였다. 진피는 hesperidin 이 6.16%를 나타내었으나 저장기간이 오래되어 갈색이 진한 진피에서는 4.02% 를 나타내어 저장기간에 비례하게 감소됨을 알 수 있었다. 이는 Hwang³⁾ 등의 결과와 일치하는 것이었다.

Table 1. Hesperidin contents in Citri Pericarpium and Old-Citri Pericarpium.

Test sample	Content(%)	IC50(μg/ml)
	Hesperidin	DPPH
Citri Pericarpium	6.16	173.8
Old-Citri Pericarpium	4.02	57.8

항산화효과

보관과정에서의 생물학적 활성의 변화를 검토하고자 진피(CP)와 묵은 진피(OCP)의 80% 에탄올 추출물을 검체로 하여 항산화활성을 비교평가 하여 Table 1에 제시하였다. 항산화활성의 지표로 안정한 프리라디칼인 DPPH 소거효과를 비교하였다. 그 결과 진피와 묵은 진피의 각각의 IC⁵⁰ 이 173.8 μg/ml 와 57.8 μg/ml를 나타내어 묵은 진피의 활성산소 소거능력이 3 배 증가됨을 알 수 있었다.

2. 소양행동억제효과 비교

초산신전반응 억제 효과

진피(CP)와 묵은 진피(OCP)의 소양행동 억제효과가 진통작용에 의한 것인지의 여부를 확인하기 위하여 경구투여한지 세 시간 후에 0.7% 초산용액을 복강에 주입하여 통증을 유발하고 10분 뒤 10분간 신전반응을 확인하였으며 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 대조군의 경우 43.0±3.7회의 신전반

응을 나타내었으며 진피 추출물 200mg/kg투여군의 경우 10.5±2.7회를 나타내어 75.6%의 억제율을 나타내었으며 묵은 진피(OCP) 투여군의 경우 9.8±2.4회를 나타내어 대조군에 비해 77.3% 저해하였다. 즉, 진피와 묵은 진피 모두 초산으로 유도한 통증을 현저히 억제하였으나 상호간의 유의적인 차이는 나타내지 못했다.

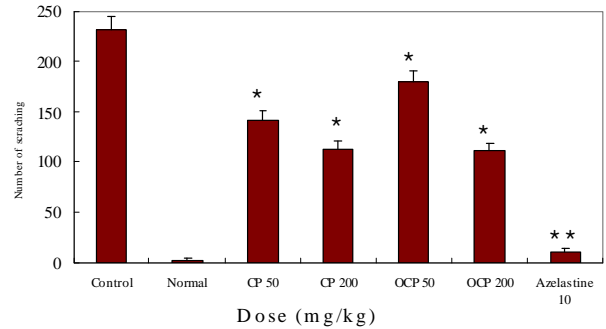


Fig.2. Analgesic effect of 80% EtOH ext. of Citri Pericarpium(CP) and Old-Citri Pericarpium(OCP) on the writhing syndrome induced by 0.7% acetic acid in ICR mice *: Significantly different from the control group (*P<0.05; **P<0.001). Values represent means ± S.E. for five mice.

Compound 48/80 으로 유도한 소양행동에 미치는 효과

진피(CP)와 묵은 진피(OCP)추출액을 각각 50mg/kg 와 200mg/kg로 경구투여 하고 1시간 뒤에 가장 강력한 히스타민 유리 촉진제 중 하나인 compound 48/80을 생쥐의 목덜미에 피내주사한 후 한 시간동안 뒷발로 목덜미를 긁는 횟수를 계수하여 비교하였다(Fig. 3). 대조군에서는 1시간에 230여회 소양행동을 보였으며 진피 200mg/kg 투여군에서는 이를 51.3% 저해한 112±8.3회를 나타내었다. 한편 묵은진피 200mg/kg 투여군에서는 111±7.5회를 나타내어 51.8%의 저해율을 보였다.

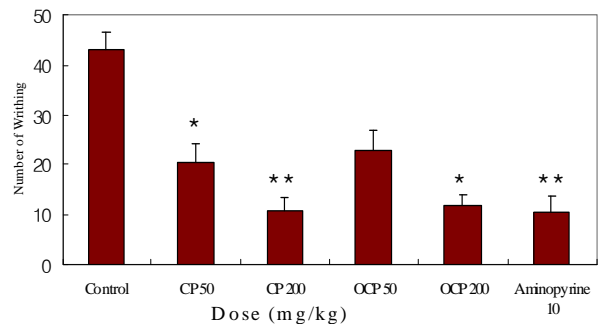


Fig.3. Effect of CP and OCP on scratching behavior in BALB/c mice. Compound 48/80 at a dose of 50ig/kg was injected intradermally into the shaved back skin of mice. Scratching behavior was observed for 60 min *: Significantly different from the control group (*P<0.05; **P<0.001). Values represent means ± S.E. for five mice.

3. 비만세포탈과립작용

경피수동형아나필라시스 억제효과

실험동물로서 IgE에 의한 비만세포 탈과립 억제효과를 측정하기 위해 수행한 경피 수동형 아나필라시스 억제효과 측정

실험에서 꼬리정맥에 3% evans blue 용액을 주입하여 전신에 색소를 분포시킨 후 진피와 묵은 진피 투여로 인해 IgE로 증가된 혈관투과성을 억제한 결과를 Fig. 4에 제시하였다. 진피 투여군은 61.7% 저해한데 비해 묵은 진피 투여군의 경우 혈관투과성을 68.0% 저해하였다. 이는 경피 수동형이나 필라시스 억제 결과가 소양행동의 실험결과와 마찬가지로 즉시형 과민반응에서 묵은 진피가 진피의 항알러지효과 보다 우수하다는 것을 시사한다.

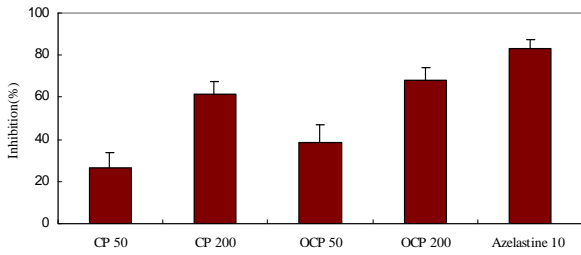


Fig.4. Inhibitory effect of CP and OCP on PCA reaction. Values represent means \pm S.E. for five mice. The male ICR mice were injected intradermally with 10 μ g of anti-DNP IgE into each of two dorsal skin sites that have shaved earlier. Forty-eight hours later each mouse received an injection of 200 μ l of 3% Evans blue PBS containing 200 μ g of DNP-HSA via the tail vein. Test compounds were administration 3h prior to the DNP-HSA injection. Thirty minutes later, the mice were sacrificed and their dorsal skins removed. After extraction with 1ml of 1.0N KOH and 4ml of a mixture of acetone and 0.6N phosphoric acid(13:5), the amount of dye was determined colorimetrically(the absorbance at 620nm).

4. 접촉성피부염억제효과

Oxazolone 으로 유도한 만성접촉성 피부염에 대한 효과

1.5% oxazolone 으로 감작시킨 일주일 후부터 매 3일간 1% oxazolone으로 만성접촉성 피부염을 유도하고 0.05% 및 0.1%의 진피와 묵은진피 80% 에탄올 추출물(CP,OCP)을 피부에 도포하여 얻은 진피와 묵은 진피 추출물의 만성접촉성 피부염 억제효과를 관찰하였다(Fig. 5). 묵은 진피는 진피와는 달리 저농도에서 귀부종 저해율이 높은 현상을 나타내고 있다 즉 진피와 묵은 진피 0.05% 처리군의 경우 16일째 귀 두께 증가분이 0.39mm 로 동일하게 21%의 저해율을 나타내지만 고농도인 0.1% 처리군의 경우 진피는 용량 의존적으로 귀부종을 30% 저해하지만 묵은 진피의 경우 16% 저해하는 현상을 나타낸다.

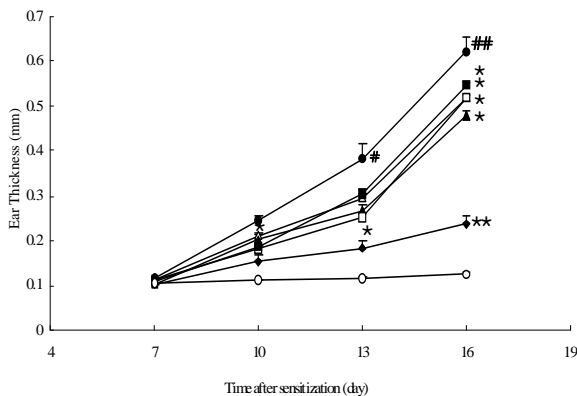


Fig.5. Effects of on the ear thickness of ICR mice induced by oxazolone. ●, oxazolone alone treated control; ○, vehicle alone (normal) control; △, 0.05% Citri Pericarpium (CP); ▲, 0.1% CP; □, 0.05% Old-Citri Pericarpium(OCP) ; ■, 0.1%OCP ; , 0.1% betamethasone. Values represent means \pm S.E.D. for six mice. * Significantly different from the control group (*P<0.05; **P<0.001) # Significantly different from the normal control group (#P<0.05; ##P<0.001).

실험 종료 후 생쥐의 귀 피부를 박리한 후 H&E 염색법을 이용하여 피부 조직을 분석한 결과, Normal군은 epidermis, dermis, baseline이 $\times 100$ 에서 관찰되었고, Oxazolone 으로 피부염을 유발한 Control군은 epidermis가 dermis쪽으로 두 겹게 내려가 현저하게 확장된 피부손상을 나타내는 것으로 보아 발진이 많이 진행된 것을 확인할 수 있었으며 백혈구의 침윤도 관찰되었다. Oxazolone 으로 피부염을 유발한 후 진피를 처리한 군(E)은 Control군(B)에 비해 epidermis의 두께도 현저히 줄었고, 부종이 많이 사라진 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6).

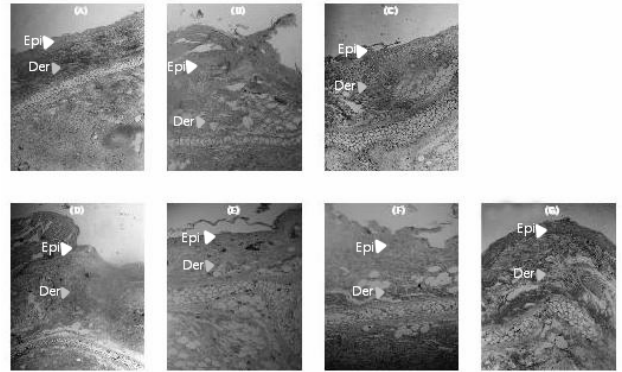


Fig.6. Histopathological pictures of ICR mouse ears after repeated application of oxazolone with or without Citri Pericarpium (CP) and Old - Citri Pericarpium (OCP). Mouse ears were excised 72hr after the last application of oxazolone and stained with hematoxylin-eosin. As a negative control, mouse were only sensitized with 1.5% Oxazolone to abdomen followed by no application to the ear (A). 1% Oxazolone was applied to both sides of the ear every 3 days starting after a 7th day sensitizing period, and vehicle (ethanol) (B), 0.1% Betamethasone (C), 0.05% CP (D), 0.1% CP (E), 0.05% OCP (F) or 0.1% OCP(G) was applied to the ear 30 min before and 3 hr after each application of oxazolone, then mouse ears were excised and fixed in 10%-buffered formalin solution, embedded in paraffin by standard method, cut into 5- μ m sections, stained with hematoxylin- eosin, and then assessed under light microscopy. Closed triangle Epi ; Epidermis, Der; Dermis oori. 2000 ; 17-9.

고찰

진피는 본초학적인 측면에서 ‘六陳八新藥’ 가운데 육진 약(六陳藥)에 속하는 약재로 오래 묵힐수록 좋은 약재로 알려져 있다⁷⁾. 이는 陳皮가 오래될수록 품질이 좋다는 것은 보관 과정에서 백색의 진피의 내피(內皮)가 점차적으로 감소되어 상대적으로 외피(外皮)의 비율이 증가된 것에 기인 한 것으로 여겨진다. 시중에서 판매되는 진피는 대략 1~3년 정도 보관된 약재이나 간혹 약재창고 정리과정에서 재고파악이 안되어 있고 있던 진피가 시중에 유통되기도 하는 데 이를 묵은 진피

라는 의미로 ‘목진피’로 판매되며 일반 진피의 가격의 2~3배에 거래되고 있다. 이번 실험에도 한약재도매상 창고를 정리하는 과정에서 발견된 목은 진피를 구입하여 사용하였다. 일반적으로 陳皮는 값이 저렴하고 저장을 오래해도 문제되지 않기 때문에 한약재 도매상에서는 관례적으로 미리 구입하여 창고에서 저장하는 경우가 많다. 하지만 보관기간이 길어질수록 대한약전에서 정한 지표물질의 함량을 기준으로 보면 부적합한 약재로 판정되게 된다. 이는 陳皮를 오래저장하면 좋다는 전통적인 관능적 품질기준과 이화화적인 기준이 배치되게 된다는 것이다. 이에 착안하여 진피의 저장기간에 따른 항알러지 활성을 비교하였다. 이번 실험결과에서 저장기간이 오래된 진피는 일반적으로 상용하는 진피에 비해 hesperidin은 35% 감소하였으나 추출물에서의 DPPH 소거능, 즉 항산화력은 3배 증가함을 알 수 있다. 진피는 오래될수록 보관과정에서 진피의 흰 속이 감소되는데 이에 따라 항산화력도 증가하고 결과적으로 이를 경구로 투여할 경우 소양행동억제작용, 진통작용, 비만세포 탈과립작용이 증가되는 것으로 볼 수 있다. 위의 내용을 종합하면, 전통적으로 알려진 바와 같이 진피가 오래될수록 효과가 좋다고 하는 것은 정유성분에 의한 소화기능 촉진이나 염증매개성 질환의 증상을 개선하는 것으로 사료된다. 진피의 성분과 그 항알러지 작용에 대해서 Park²⁵⁾ 등은 hesperidin을 경구 투여시 flavanone glycoside인 hesperetin이 생쥐의 경피수동형 아나필라시스(PCA: Passive Cutaneous Anaphylaxis)를 억제시키나, 이를 복강내로 직접 투여할 때는 경피수동형 아나필라시스를 전혀 억제시키지 못한다고 보고한 바 있다. 즉, 진피의 주성분으로 알려진 hesperidin은 사람의 장내세균에 의해 대사가 되면 비당체인 hesperetin으로 생물전환 되게 된다. 이는 흰 쥐에 hesperidin을 경구투여하게 되면 소변으로 hesperetin으로 배설되는 것과 일치하는데 hesperidin과 그 비당체인 hesperetin의 항알러지 효능을 비교한 결과 배당체는 IgE에 의한 비만세포인 RBL-2H3 세포의 histamine 방출을 저해하지 못하였으나 비당체인 hesperetin은 강력히 저해하였으며 in vivo 실험인 경피수동형 아나필라시스도 강력히 저해하여 그 억제력이 임상에서 상용하고 실험에서 양성대조군으로 사용하는 azelastine의 효능과 유사한 것으로 보고되어지고 있다^{17,26)}. 이러한 측면에서는 진피의 항알러지효과는 전구체인 hesperidin에 의한 효과라기보다는 장내세균에 의한 대사로 비당체로 전환되어진 hesperetin에 의한 것으로 여겨진다고 밝힌바 있다. 따라서 위의 실험결과에 비춰보면 목은진피의 PCA 억제효과가 높게 나왔으므로 이는 진피가 오래되면서 진피 내의 hesperidin이 hesperetin으로 분해되어서 생긴 결과가 아닐까 유추할 수 있으나 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

한편, 아토피 피부염은 전 세계적으로 꾸준한 증가추세에 있다. 주로 유, 소아기에 발생빈도가 높으며 만성적으로 재발되어 각질형성세포에서 염증을 유도하는 사이토카인의 분비로 인해 증상이 악화된다. 발생원인으로는 주로 유전적인 소인과 백혈구의 이상 또한 환경, 스트레스, 기후변화 등이 아토피성 피부염이 악화²⁷⁾되는 것으로 알려져 있고 아토피성 피부염의 주증상은 피부건조증과 소양증으로 나뉘는데 이것들은 각질층의 장벽기능이 손상되어 외부의 자극물질이나 항원에 쉽게 반응하는 면역학적 이상반응이 증상 발현에 관여하는 것으로 알

려져 있다²⁸⁾. 아토피 피부염은 주로 전신적 면역 반응의 불균형에 의한 발생으로 보며, 혈액 내 IgE의 농도가 증가되고 호산구증이 나타나는 것이 알레르기성 질환의 초기 증상이다. 아토피 피부염환자에서는 수분증발이 증가되어서 항원의 침투가 용이해지므로 피부의 과민 반응이 더욱 심화되게 되어 세라마이드에 결합하는 매트릭스 구조 단백질에 의해 형성되는 피부장벽을 약화시키게 되므로 감염과 염증에 대한 감수성이 높아지게 된다²⁹⁾. 아토피 피부염의 치료를 위하여 자극을 일으키는 항원을 제거하는 것이 가장 좋은 방법이지만 특이적 항원을 알 수 없는 경우도 많기 때문에 적절한 조치를 취해야 한다. 보습제 사용 외에 일반적으로 피부상태균을 제거하기 위하여 항생제 투여 및 국소적으로는 스테로이드 제제를 사용하는데 장기간 사용시 안전성이 문제된다. T cell의 세포활성을 억제하는 FK506과 같은 칼시뉴린 저해제가 개발됨으로써 초기 사용으로 스테로이드의 용량을 줄이는 효과를 나타낼 수 있는 것으로 보고되었으나³⁰⁾, 역시 장기간 사용에 대한 안전성 확보가 된 것은 아니다. 이에 한약자원에서 아토피성 피부염 치료제 개발을 위해 한약재의 항알러지 활성을 검색하는 과정 중 陳皮의 항알러지작용을 확인한 뒤 전통적으로 임상에서 陳皮를 채취 이후에 바로 약재로 이용하지 않고 2~3년 묵힌 것을 사용하는데 착안하여 저장기간과 항알러지 활성과의 상관성을 검토해보고자 하였다. 한편, 한약재는 약용부위, 저장기간 동안의 온도, 습도 및 한약재의 온도, 습도, 공기, 빛 등과 같은 환경적인 요인에 따라 약효의 저하가 발생하므로 약재의 보관관리가 약효에 미치는 영향이 크다고 불구하고 한약재 저장에 대한 연구는 주로 성분변화를 측정하는 측면만 강조되어왔다. 저장 한약재의 성분변화에 관한 연구는 60일간 저장온도에 따른 당귀의 함량변화 연구³¹⁾ 보관조건에 따른 인삼의 유리당 조성변화³²⁾ 등과 같은 연구가 행해져 왔다. 한편, 전통적으로 본초학에서 한약재 보관에 대한 언급은 ‘六陳八新藥’이라는 원칙으로 소개된다. 이번 실험에 사용한 진피와 마찬가지로 같은 六陳藥인 지실도 지표성분인 poncirin의 함량은 12개월이 경과함에 따라 꾸준히 감소하는 경향을 나타낸다³³⁾고 하였다. 六陳藥으로 분류되지는 않지만 관행적으로 3년씩 묵혀서 판매하는 강화숙(짜주아리숙)에 대한 보관시간에 따른 경시적인 변화도 보고된 바 있다. 즉, 공기와의 접촉이 많으며 저장온도가 높고 저장기간이 길수록 정유의 휘발성 성분의 총 함량이 유의적으로 감소됨을 보고한 바 있다³⁴⁾.

陳皮의 藥能은 크게 理氣健胃, 燥濕化痰로 볼 수 있는데 理氣健胃의 목적일 때는 橘白을 그대로 붙어있는 채로 사용하고 燥濕化痰의 목적으로 사용할 때는 열매 껍질에서 橘白을 제거한 다음에 사용 한다⁷⁾고 알려져 있다. 아토피 피부염과 관련하여 한의학적인 病因病機에 대해서 小兒衛生總微論에서는 風濕熱邪와의 관계를 언급하였으며 中醫臨床大典에서는 급성기에서는 주로 風, 濕, 熱의 挾感의 양상에 따라 증상이 발현된다고 하였다³⁵⁾. 위의 내용을 종합하면 급성기 아토피성 피부염의 증상을 濕熱이라고 보면 이러한 증상의 개선을 위해 陳皮를 사용할 때는 저장기간이 오래될수록 유효한 것으로 볼 수 있다. 반대로 아토피성 피부염중에서도 만성모델에 해당되는 Oxazolone 유도의 피부염 동물모델에서는 목은 진피의 추출물의 피부염억제효과가 진피추출물의 억제 효과에 미치지 못하는 것으로 나타나 이러한 사실을 뒷받침 해주는 것으로

볼 수 있다.

결론

본 연구에서는 陳皮와 묵은 陳皮의 에탄올 추출물로서 알러지 동물모델을 이용하여 陳皮의 저장기간에 따른 항 알러지 효과를 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 저장기간이 오래될수록 hesperidin은 감소하지만 추출물에서의 항산화력은 증가함을 알 수 있다.
2. 진피는 오래될수록 보관과정에서 진피의 흰 속이 감소되면서 경구로 투여시 소양행동억제작용, 진통작용, 비만세포 탈과립작용이 증가되는 것으로 나타났다.
3. 저장기간이 오래될수록 진피의 효과가 좋다고 전해지는 것은 진피의 정유성분에 의한 소화기능 촉진이 아니라 소염작용에 의한 염증매개성 질환의 증상을 개선하는 것으로 판단된다.
4. ‘六陳八新藥’에 속하는 陳皮는 오래될수록 理氣작용보다 化濕작용이 강해진다고 추론할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 진주산업대학교 2009년도 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었으므로 이에 사의를 표합니다.

참고문헌

1. Oriental Pharmacology Committee. Oriental Pharmacology. Seoul : Shinil co, 2006 : 613-6.
2. Pharmacopoeia subcommittee. The Korean Pharmacopoeia 8 ed, Seoul : Moon seong co, 2003 : 1248-9.
3. Borrelli F, Izzo AA. The plant Kingdom as a source of anti ulcer remedies. a review. *Phytother Res*, 2000 ; 14(8) : 581-91.
4. Kim DK, Lee KT, Eun JS, Zee OP, Lim JP, Eum SS, Kim SH, Shin TY. Anti-allergic components from the peels of Citrus unshiu. *Arch Pharm Res*, 1999 ; 22(6) : 642-5.
5. Zhu YP. Chinese Materia Medica: chemistry, Pharmacology and Applications. Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1998 : 367-9.
6. Shokp K., Soichi T. Evaluation of the anti-allergic activity of Citrus unshiu using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen. *Int J Mol Med*, 2006 ; 17(3) : 511-5.
7. Seo BI, Choi HY. Clinical Oriental herbal medicine. Seoul : YoungLim co, 2004 : 466-9.
8. Hwang T.K., Note for commercial herbal medicine

ingredient and pharmacology. Beijing : Chinese medical science and technology press, 1994 : 1137-8.

9. Lu G.F., Traditional discrimination of common chinese herbal Medicine. Beijing : People's military Medical Press, 2005 : 262-5.
10. Hyun JW, Roh SS, Kil KJ, Seo BI, Seo YB. Quilitative certification plan of chenpi. *Journal of the Institute of Oriental Medicine*, Daejeon University, 2004 ; 13 : 197-204.
11. Jang IG, Yang JK, Lee HJ, Yi JY, Kim HO, Kim CW. Clinical improvement and immunohistochemical findings in severe atopic dermatitis treated with interferon gamma. *J Am Acad Dermatol*, 2000 ; 42(6) : 1033-40.
12. Chien CH, Hsieh KH. Interleukin-2 immunotherapy in children. *Pediatrics*, 1990 ; 86(6) : 937-43.
13. Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci*, 2001 ; 69(2) : 223-8.
14. Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, Hiraoka M, Yoshida A, Nishim S, Mayumi M. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci*, 2003 ; 72(22) : 2509-16.
15. Niwa Y, Sumi H, Kawahira K, Terashima T, Nakamura T, Akamatsu H. Protein oxidative damage in the stratum corneum: Evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol*, 2003 ; 149(2) : 248-54.
16. Antille C, Sorg O, Lubbe J, Saurat JH. Decreased oxidative state in non-lesional skin of atopic dermatitis. *Dermatology*, 2002 ; 204(1) : 69-71.
17. Tsourei-Nikita E, Hercogova J, Lotti T, Menchini G. Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. *Int J Dermatol*, 2002 ; 41(3) : 146-50.
18. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 2004 ; 113(5) : 651-7.
19. Shin YW, Kim DH, Kim NJ. Studies on the Processing of Crude Drug(VII)- On the Constituents and Biological Activities of Gardeniae Fructus by Processing-. *Kor J Pharmacogn*, 2003 ; 34(1) : 45-54.
20. Blois MS. Antioxidant determinations by the use

- of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181 : 1199–200.
21. Siegmund E, Cadmus R, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Bio Med*. 1957 ; 95(4) : 729–31.
22. Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N, Kamei C. Effect of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. *Eur J Pharmacol*. 1998 ; 351(1) : 1–5.
23. Choo MK, Park EK, Han MJ, Kim DH. Antiallergic activity of ginseng and its ginsenosides. *Planta Med*. 2003 ; 69(6) : 518–22.
24. Fujii Y, Takeuchi H, Tanaka K, Sakuma S, Ohkubo Y, Mutoh S. Effects of FK506 (tacrolimus hydrate) on chronic oxazolone-induced dermatitis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002 ; 456(1–3) : 115–21.
25. Park SH, Park EK, Kim DH. Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory activity of flavanones from *Citrus unshiu* and *Poncirus trifoliata*. *Planta Med*. 2005 ; 71(1) : 24–7.
26. Lee NK, Choi SH, Park SH, Park EK, Kim DH. Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora. *Pharmacology*. 2004 ; 71(4) : 174–80.
27. Leung DY. Atopic dermatitis: New insight and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 ; 105(5) : 860–76.
28. Cooper KD. Atopic dermatitis: Recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol*. 1994 ; 102(1) : 128–37.
29. Sator PG, Schmidt JB, Honnigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2003 ; 48(3) : 352–8.
30. Kapp A, Papp K, Bingham A, Folster-Holst R, Ortonne JP, Potter PC, Gulliver W, Paul C, Molloy S, Barbier N, Thurston M, de Prost Y. Long-term management of atopic dermatitis in infants with topical pimecrolimus, a nonsteroid anti-inflammatory drug. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 ; 110(2) : 277–84.
31. Choi SH, Kim HJ. Volatile flavor components of *Angelica gigas* Nakai by the storage conditions. *Korean J Food Sci Technol*. 2000 ; 32(3) : 513–8.
32. Chang JK, Kim CS, Nho KB, Cho BG. Effects of storage conditions on weight loss and free sugar composition of fresh Ginseng. *J Ginseng Res*. 2005 ; 29(2) : 113–8.
33. Lee AY, Chun JM, Jang S, Choo BK, Lee HW, Kim HK. Change of Quality in *Poncirus trifoliata* Rafinesque according to Storage Conditions. *J Medicinal Crop Sci* 2008 ; 16(3) : 188–91.
34. Chung MS. Effects of Storage Conditions on Essential Oil of *Artemisia princeps* Pampan, cv. ssajuari (ssajuarissuk). *Korean J Food Cookery Sci* 2010 ; 26(6) : 840–7.
35. Park MC, Kim JM, Hong CH, Hwang CY. A literature study about the comparison of Oriental-Occidental medicine on the Atopic dermatitis. *J Kor Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2002 ; 15(1) : 226–52.