

계지홍삼탕의 항산화 및 지구력 효과에 대한 연구

도재호 · 이성계 · 이종원 · 이은옥[#] · 김성훈[#]

한국인삼연구소 연구원 인삼제품개발부, [#]경희대학교 동서의학대학원
(2000년 8월 21일 접수)

Study on Antioxidant and Staminal Activities of Kejihongsamatang

Jae-Ho Do, Seong-Ke Lee, Jong-Won Lee, Eun-Ok Lee[#] and Sung-Hoon Kim[#]

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

[#]Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea
(Received August 21, 2000)

Abstract : KJHST (Kejihongsamatang) is a modified oriental prescription that consists of five herbs such as Ginseng Radix rubra Koreana, Atractylodis Rhizoma, Zingiberis Rhizoma, Cinnamomi Ramulus and Glycyrrhizae Radix. For the evaluation of antioxidant and staminal activities of KJHST (Kejihongsamatang), the study was done in comparison of Ginseng Radix rubra (GR). For the antioxidant study, KJHST inhibited hemolysis of erythrocyte and decolorized the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical in a dose dependent manner more effectively than GR alone *in vitro*. KJHST and GR significantly suppressed the time course (1hr~6 hr)-level of MDA (malondialdehyde) following AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino-propane) dihydrochloride) treatment *in vivo* as compared with control data with no statistical difference. From the evaluation of stamina by swimming test GR and KJHST significantly increased the swimming time in a time and dose dependent manner as compared with control data, while GR was more effective than KJHST in 2 weeks after treatment, though KJHST was more effective than GR at low dose (25 m/kg) 4 weeks after treatment. From the results it can be concluded GR and KJHST had antioxidant and staminal activities.

Key words : KJHST, antioxidant, staminal, swimming test.

서 론

홍삼은 인삼을 증기로 찌어 수치를 한 것으로, 生用하는 인삼이 氣涼한 반면, 熟用하는 홍삼은 氣溫한 것으로 분류되고 있어 홍삼은 인삼보다 따뜻하여 補하는 효과가 강한 것으로 인식되고 있으며,^{1,2)} 실험적으로도 항산화, 항암, 항혈전, 항피로 등 다양한 효능이 있음이 보고¹⁾되었지만 약물간의 상호작용을 중시하는 방제학적 이론을 고려하면 홍삼 단독만의 유효한 제품개발에는 어려운 점이 있다.

桂枝人參湯은 장중경의 상한잡병론에서 “太陽病 外證未除 而數下之 遂協熱而利 利下不止 心下痞硬 表裏不解”라 하여 주로 노약자 등 위장이 허냉하여 나타나는 위장질환에 자주 활용되고 있다.³⁾ 계지인삼탕은 인삼, 백출, 건강, 감초 등 補

氣助陽하는 한약과 解肌和解하는 계지 등으로 구성되어 補氣溫中하는 효능이 있는 보약 처방인데,⁴⁾ 補하는 효능이 있는 한약과 한방처방이 延年益壽하는 약으로 抗老化作用이 많다는 보고⁵⁾와 고려홍삼을 한방처방에 배합하여 보다 효과적이었다는 보고⁶⁾를 바탕으로 고려인삼을 補氣助陽의 효능이 더욱 강한 고려홍삼으로 대체한 계지홍삼탕의 효능을 단독 고려홍삼과 비교 검토할 필요성이 제기되었다. 이는 고려홍삼을 다른 처방에 배합할 경우 상승적으로 효능이 증대되는 처방을 개발하여 고려홍삼의 활용범위를 단순한 건강식품외에 한방치료까지 확대하는 일환이다. 이에 저자는 우선 계지홍삼탕의 항산화 및 지구력 효과를 실험적으로 입증하고자 고려홍삼과 계지홍삼탕을 시료로 항산화작용으로 적혈구막 내성, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 scavenging activity, AAPH(2,2'-azobis(2-aminodinopropane)로 유도된 MDA(malondialdehyde) 등을 측정하였고, 수영법에 의해 지구력을 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-201-2179; (팩스) 031-205-1074
(E-mail) sungkim7@khu.ac.kr

재료 및 방법

1. 재 료

(1) 동물

동물은 자웅 구분 없이 4주령의 Splague Dawley계 흰쥐, ICR 생쥐를 한국화학연구소에서 공급 받아 실험당일 까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2°C를 계속 유지하고 2주일간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(2) 약물

고려홍삼(GR)은 고려인삼학회에서 고려홍삼정 500 g과 고려홍삼 강장보관 액기스 500 g을 공급받았고, 계지홍삼방(KJHST)은 아래의 구성으로 조합하였다(Table 1).

1. 방 법

(1) 계지홍삼탕의 제조

계지홍삼탕 10첩 분량(210 g)을 2,000 ml round flask에 물 1000 ml을 소형추출기에 가한 후 4시간 동안 환류시킨 후 이 용액을 여과하고 rotary vaccum evaporator(Büchi 461)에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 round flask에 넣고 -84°C deep freezer(SANYO, Japan)에서 1시간동안 방치하고 freeze dryer(EYELA, Japan)로 4시간을 동결 건조하여 50.05 g(수득율; 23.8%, 수분함량; 11.85%)의 건조 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

(2) 적혈구막의 활성산소에 대한 내성 측정

Zhang등의 방법⁷⁾에 따라 8주가 된 흰쥐의 혈액을 heparin 처리된 tube로 채혈하여 혈장은 취해서 버리고 적혈구층을 10mM potassium phosphate buffered saline(pH7.4, PBS) 용액을 첨가하여 원심 분리(3,000 rpm, 10분)하였다. 3회 반복하여 적혈구를 세척한 다음 10 mM potassium phosphate buffered saline(pH7.4, PBS)용액으로 20% RBC용액을 만들었다. 이 용액 1 ml에 50 mM AAPH용액 1 ml과 계지홍삼탕(0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/ml) 0.1 ml을 첨가하여 37°C에서 3 시간 incubation하였다. 각 농도별 시료수는 5개를 하였다. Incubation후 계지홍삼탕 상층액을 50 μ l 취하여 2 ml

saline 용액에 넣은 것을 A용액이라 하고, AAPH만 처리된 상층액 50 μ l을 취하여 2 ml 증류수에 넣은 것을 대조군 B용액이라 하였다. 각각의 두 용액을 잘 혼합한 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 상층액을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 [A용액의 흡광도/B용액의 흡광도]×100을 %hemolysis value로 계산하였다.

(3) DPPH에 의한 free radical scavenging activity 측정

Blois등⁸⁾의 방법을 이용하여 free radical인 0.5 mM DPPH 1 ml에 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) 1 ml과 계지홍삼탕(0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/ml)을 0.1 ml을 넣고 잘 혼합하였다. 혼합액을 37°C암실에서 15분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 샘플은 5개씩 처리하였다.

(4) 혈청 MDA 반응성 물질 측정

Rat 10마리를 1군으로 하여 실험군은 계지홍삼탕을 25 mg/ml, 50 mg/ml로 경구투여하고 대조군은 생리식염수를 경구투여한 후 1시간 후에 AAPH를 50 mg/kg으로 복강 주사하였으며 AAPH처리 후 1, 3, 6시간 후에 심장에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. Yagi등⁹⁾의 방법에 따라 혈청 100 μ l에 1/12N H₂SO₄ 4 ml과 10% phosphotungstic acid 0.5 ml을 첨가후 잘 혼합하여 실온에서 5분간 방치후 4000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전물에 1/12N H₂SO₄ 2 ml과 10% phosphotungstic acid 0.3 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 다시 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전물에 증류수 4 ml과 TBA reagent 1 ml을 첨가하여 호일로 싸서 95°C에서 1시간 방치한 후 흐르는 물에서 식힌다. n-butanol 5 ml을 첨가후 강하게 혼합하여 4000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 excitation 515 nm, emission 553 nm에서 측정하였다.

(5) 홍삼복합제의 유평법에 의한 지구력 평가

Rat 10마리를 1군으로 하여 실험군은 계지홍삼탕을, 대조군은 생리식염수를 1일 25 mg/kg과 50 mg/kg으로 경구투여 하면서 1주일에 5분간 2회씩 자유 수영을 시켰으며 2주와 4주에 각각 체중을 측정한 직후에 항온기를 부착한 수조(액온 22±2°C, 규격 90×50×100 cm)에 넣고, 유평하는 시간을 기점으로 하여 기진하여 두부가 물속에 가라앉아 막대기의 타격에도 두부가 7초 이상 가라앉아 수면 위로 떠오르지 못하는 순간을 판정점으로 하였다. 수영직후에 심장에서 채혈하여 glucose는 Hexokinase법에 의한 자동생화학분석기(Express 550, Ciba-Corning Co.)를 사용하여 측정하고 LDH는 Chemical analyzer(EXPRESS-550)으로 자동 측정하였다.

(6) 통계처리

Data는 SAS program을 이용하여 통계처리 하였고 모든 data는 평균±SE(standard error)로 표시하였으며 각 측정인

Table 1. Prescription of Kejihongsamtang (KJHST)

韓 藥	生 藥 名	用 量(g)
고려홍삼	Ginseng Radix rubra Koreana	3
백출	Atractylodis Rhizoma	3
건강	Zingiberis Rhizoma	3
계지	Cinnamomi Ramulus	6
감초	Glycyrrhizae Radix	6
총량		2

자들의 그룹간의 유의적인 차이는 GLM procedure를 이용하여 p value < 0.05에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 적혈구막 내성에 대한 효과

적혈구막에 대한 활성산소에 대한 내성측정은 활성산소 유도제인 AAPH를 적혈구에 처리했을 경우 발생하는 산화적 적혈구용혈은 적혈구 생리막에 대한 손상정도를 측정하는 지표가 된다. 즉 AAPH가 적혈구에 가해지면 적혈구막에 있는 지질과 단백질의 산화를 유도하여 용혈현상을 나타낸다.⁷⁾ Fig. 1에서와 같이 AAPH대조군에 대한 적혈구 용혈율은 GR군(고려홍삼군)의 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml의 농도에서 15.35%, 14.5%, 14.05% 및 11.05%로 나타났으나, KJHST군(계지홍삼군)은 같은 농도에서 13.4%, 11.99%, 9.91%, 8.18%로 GR군에 비해 hemolysis가 적게 나타났으며 두 그룹간 적혈구의 활성산소에 대한 내성은 고려홍삼과 계지홍삼군이 농도의존적으로 감소하였지만 계지홍삼 투여군이 더욱 효과적이었다.

2. DPPH에 대한 scavenging activity

DPPH에 의한 free radical scavenging activity의 측정은 안정성인 free radical인 DPPH를 이용하여 1958년의 Blois⁸⁾가 자연유래 항산화제의 활성을 측정하면서 자주 활용되고 있는 방법인데, 양성대조군인 BHT(butylated hydroxytoluene)의 효과보다는 미흡하지만 대조군에 비해 GR군에서는 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml의 농도에서 각각 8.26%, 8.40%, 8.77%, 11.40% 등으로, KJHST군에서는 같은 농도에서 각각 7.6%, 10.18%, 14.4%, 21.72% 등으로 농도의존적이나 약한 scavenging activity 효과를 나타냈으며 그룹간 비교에서는

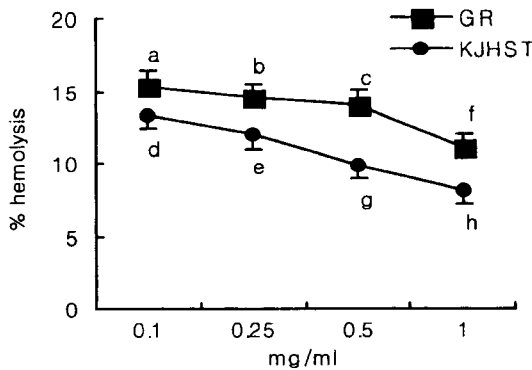


Fig. 1. Effect of GR and KJHST on hemolysis of RBC Five sample were treated at each concentration. The different superscripts mean statistical significance ($p < 0.05$) between groups by Anova test.

Table 2. Effect of GR and KJHST on free radical scavenging activity by DPPH method

Group	Dose conc. mg/ml	% activity
BHT	0.5	100
GR	0.1 ^a	8.26 ± 0.03 ^f
	0.25	8.40 ± 0.14 ^f
	0.5	8.77 ± 0.02 ^e
	1	11.40 ± 0.07 ^c
KJHST	0.1	7.60 ± 0.24 ^b
	0.25	10.18 ± 0.01 ^d
	0.5	14.40 ± 0.28 ^b
	1	21.72 ± 0.20 ^a

^aFive samples were treated at each concentration. The different superscripts of mean ± SE indicate statistical significance ($p < 0.05$) between groups by Anova test. The swimming time was measured until just drowning following swimming in chamber after oral treatment of GR and KJHST for 2 weeks and 4 weeks.

KJHST군이 0.25 mg/ml부터 1 mg/ml의 농도까지 GR군 보다 유의한 증가 효과를 보였다(Table 2).

3. AAPH로 유발된 MDA량에 미치는 영향

계지홍삼탕을 25 mg/kg과 50 mg/kg을 경구투여하고 1시간 후에 자유유리기 유도제인 AAPH를 50 mg/kg로 복강주사하고 1시간, 3시간, 6시간별로 TBA반응성 물질인 MDA를 측정하였는데, 정상군에 비해 대조군에서는 유의성있게 증가되었는데, GR군은 25 mg/kg과 50 mg/kg의 두 용량에서 대조군에 비해 유의한 감소효과를 보였으며, 3시간후에 peak에 이르렀고 점차 감소하는 경향을 보였는데, KJHST군도 대조군에 비해 유의한 감소효과를 보였는데 25 mg/kg보다 50

Table 3. Effect of GR and KJHST on level of Malondialdehyde in AAPH-treated rats

Group (n=10)	Dose (mg/kg)	Time 1* (pmol/ml)	Time 3**	Time 6***
Normal		2.58 ± 0.05 ^d	2.58 ± 0.05 ^c	2.58 ± 0.05 ^b
Control		3.29 ± 0.05 ^a	3.12 ± 0.04 ^a	3.19 ± 0.08 ^a
GR	25	2.83 ± 0.10 ^{bc}	2.85 ± 0.06 ^b	2.63 ± 0.06 ^b
	50	2.79 ± 0.10 ^{cd}	2.90 ± 0.13 ^b	2.81 ± 0.11 ^b
KJHST	25	3.02 ± 0.06 ^{bc}	3.11 ± 0.07 ^a	2.73 ± 0.10 ^b
	50	2.92 ± 0.05 ^{bc}	2.80 ± 0.04 ^b	2.75 ± 0.05 ^b

Data represent mean ± SE. Each group contains 10 rats. MDA was measured at 515 nm excitation and 553 nm emission by spectrofluorometer following i.p. injection of AAPH and oral treatment of GR and KJHST.

The different superscripts mean statistical significance ($p < 0.05$) between groups by Anova test. * : 1 hour after treatment of AAPH ** : 3 hour after treatment of AAPH, *** : 6 hour after treatment of AAPH.

Table 4. Effect of GR and KJHST on Swimming

Timeoup (n=10)	Dose (mg/kg)	2 weeks	4weeks
		Swimming time sec	
Control		403.2 ± 40.7 ^b	643.0 ± 14.1 ^b
GR	25	496.4 ± 37.1 ^{ab}	662.5 ± 32.1 ^b
	50	518.6 ± 26.4 ^a	703.8 ± 28.2 ^{bc}
KJHST	25	446.6 ± 22.6 ^{ab}	713.8 ± 42.6 ^a
	50	455.6 ± 26.4 ^{ab}	637.8 ± 44.2 ^b

Data represent mean ± SE. Each group contains 10 rats. The different superscripts mean statistical significance ($p < 0.05$) between groups by Anova test.

mg/kg의 고용량에서 농도의존적으로 시간이 경과함에 따라 감소하는 효과를 보였지만 GR군과 KJHST군의 두그룹간의 비교에서는 APPH처리후 1시간과 3시간에서 일부 유의한 변화가 있었지만 전반적으로 현저한차이는 없었다(Table 3).

4. 수영법에 의한 지구력에 미치는 영향

시료 투여후 2주에는 GR군과 KJHST군은 모두 저농도와 고농도에서 대조군보다 유의한 증가를 보였지만 GR군은 용량과 시간에 비례하여 유의한 증가를 보였으며, KJHST군은 역시 시간에 비례하여 수영시간이 증가되었지만 GR군에 비해 시료투여후 2주에는 도리어 효과가 약했으나, 4주후에는 저용량(25 mg/kg)에서 더 유효했지만, 고용량에서는 도리어 GR군 보다 약하였는데 이 결과는 고려홍삼군과 계지홍삼탕군이 모두 지구력을 증가시키지만 고려홍삼에 다른 약제를 첨가한다고 반드시 지구력이 증가하는 것은 아닐 수 있다는 것을 시사하고 있으며, 편차가 비교적 컸다는 점에서 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다(Table 4).

감사의 글

이 연구는 고려인삼학회 1999년도 자유공모과제에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

요 약

계지인삼탕중 고려인삼을 보기조양 효능이 더 강한 고려홍삼으로 바꾼 계지홍삼탕을 시료로 항산화작용과 지구력효과를 비교검토 하였다. 항산화작용중 AAPH에 의한 적혈구 용혈작용은 고려홍삼과 계지홍삼탕이 유효하게 억제되었으나, DPPH에 대한 유리산소 소거율은 BHT보다는 약하였지만 농도의존적으로 유의성 있게 감소되었고, *in vivo*에서 AAPH처리후 시간경과(1시간, 3시간, 6시간)에 따른 MDA제거율도 두 실험군에서 대조군에 비해 시간과 농도에 비례하여 유의하게 감소하였지만 6시간후에는 두 실험군간에 통계적 편차는 없었다. 수영법에 의한 지구력 측정에서는 두 실험군이 대조군에 비해 유의한 증가를 보였지만 시료 투여후 2주에는 고려홍삼이 보다 유효했고, 4주째는 계지홍삼탕이 저농도(25 mg/kg)에서만 유효했다. 이상의 결과로 보아 고려홍삼과 계지홍삼탕은 항산화 및 지구력 증진 효과가 있는 것으로 사료되지만 지속적인 보완 연구가 필요하다고 사료된다.

인용문헌

1. 한국인삼연구위원회:최신고려인삼(성분 및 효능편), 천일인쇄사, 66-70, 88, 99, 109-110 (1996).
2. 江蘇中醫學院編:中藥大辭典 상편, 상무인서관, 29-33 (1978).
3. 張仲景:傷寒雜病論, 행림출판사, 196 (1981).
4. 木下繁太郎:臨床醫の漢方, 醫齒藥出版社, 127 (1982).
5. 劉占文:中醫養生學, 상해중의학원 출판사, 452-472 (1988).
6. 김완기 등편:고려삼의 임상효과(임상실험효과연구 제1집), 171-182, 한국담배인삼공사 (1993).
7. Zhang, A. Q., Zhu Q. Y., Luk, Y. S.: Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sciences* 61, 383-394 (1997).
8. Blois, M. S.: Antioxidant determination by use of stable free radical. *Scienc*, 181, 1199-1200 (1958).
9. Yagi K: A simple fluorometric assay for lipidperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 15, 212-216 (1976).