

한방방제의 제제학적 연구(1) - 추출방법에 따른 녹용사군자탕의 비교 -

최혁재 · 김은진 · 김남재* · 김성수¹
경희대학교 동서의학연구소, ¹한의과대학

Studies on Pharmaceutical Quality of Oriental Medicinal Preparations (I) - Studies on Decoction of Nokyong-Sagunja-Tang -

Hyuck Jae Choi, Eun Jin Kim, Nam Jae Kim* and Sung Soo Kim¹

East-West Medical Research Institute and ¹College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-702, Korea

Abstract – Decoction of oriental medicinal preparation is prepared in various manners, and changes of chemical constituents might be occurred depending on the processing techniques. The present study was undertaken to investigate the physio-chemical and pharmacological equivalence between two extraction methods of Nokyong-Sagunja-Tang. Samples were prepared as follows ; Sample-I was prepared by simultaneously extracting Sagunja-Tang and velvet antler in one vessel. Sample-II was prepared by adding velvet antler extract to the water extract of Sagunja-Tang. Both samples showed similar results of physiochemical parameters such as pH, yield, TLC and HPLC chromatogram, and contents of ginsenoside Rb₁ and glycyrrhizin. Also, there were little different between two samples in pharmacological effects such as DPPH free radical scavenging effect, and inhibitory effects on xanthine oxidase, hyaluronidase, trypsin, TBA-Rs formation and hemolysis *in vitro*. And both samples showed no significant difference in antifatigue activities in mice. These results suggest that there might be little difference between two extraction process when velvet antler added to Sagunja-Tang.

Key words – oriental medicinal preparation, velvet antler, Sagunja-Tang, Nokyong-Sagunja-Tang, ginsenoside Rb₁, glycyrrhizin

한방방제는 2종 이상의 한약을 조합하여 이용되고 있고, 湯劑를 비롯하여 丸劑, 散劑, 膏劑, 酒劑 등 다양한 제형이 있다. 그 중 湯劑는 통상 조합된 한약에 물을 넣고 전탕하여 액상의 형태를 복용하는 것으로 한방의료에서 가장 보편적으로 이용하고 있는 제형 중 하나이다.^{1,2)}

탕전법은 傷寒論, 金匱要略 등에 구체적으로 기술되어 있고, 일반적으로 飲片의 한약을 처방에 따라 조제한 후 적당량의 물을 넣고 약한 불로 끓이다가 강한 불로 다려서 온시에 여과하여 액상의 형태를 얻는 방법이다. 탕전은 탕전용기의 종류, 추출용매의 량, 열원, 온도, 전출순서, 여과방법 등이 여러 조건에 의하여 품질뿐만 아니라 약효에 영향을 줄 수 있다. 그리고, 先煎, 溶化, 後下, 再煎, 別煎 등 약효와 관련하여 특수한 탕전법도 있다.^{1,2)}

탕제는 흡수가 잘되어 치료효과가 빠르게 나타나며 가깝

하여 사용하기 편리하고 사용범위가 넓어서 어떠한 질병이나 병증에도 활용할 수 있는 특징이 있다. 반면에 탕제는 조제하는 과정이 복잡하고 품질의 균일성을 확보하기 어렵고, 보관이나 휴대가 불편하여 새로운 제형의 개발이 요구되고 있다.

이러한 배경에 따라 한약물 투약의 다양성 확보와 약물복용 및 조제의 편리성 등을 고려하여 한약의 단미건조엑스제제는 물론 복합건조엑스제제가 개발되어 임상에 널리 활용되고 있다. 이러한 제형의 개발 및 적용은 소비자의 접근성을 높여 주고 치료의 다양성을 확보할 수 있는 긍정적인 측면을 지니고 있다.

따라서 유용성이 높은 한약의 단미엑스제제를 개발하여 임상에 효율적으로 적용하여 치료효과의 향상은 물론 유용성을 높이기 위한 연구의 일환으로 비교적 고가이면서 다양한 약리작용을 지닌 녹용을 선정하였다.

녹용(*Cervus parvum cornu*, Antler)은 梅花鹿 *Cervus nippon*

*교신저자(E-mail) : njkim@khmc.or.kr
(FAX) : 02-958-9531

Temminck 또는 馬鹿 *Cervus elaphus* Linne(사슴과 Cervidae)의 털이 밀생되고 골질화되지 않는 어린 뿔(幼角)을 말하며, 그 중 골질화된 뿔을 鹿角이라 하여 수천 년 동안 우리나라를 비롯하여 동북아시아 지역에서 가장 진귀한 영약으로 널리 이용되고 있다.^{3,4)} 녹용은 매년 급속한 재생과정을 거치며 세포층이 대체되어 낡은 조직이 떨어지고 새로운 조직으로 대체되며, 그 급속한 성장과정은 testosterone같은 호르몬의 작용에 의해 조절되고⁵⁾ 조직 전체적으로 성장과정에서 중요한 역할을 하는 epidermal growth factor receptor (EGFR)이 고르게 분포되어 있는 것으로 알려졌다.⁶⁾ 또한, 본초학적으로 녹용은 壯元陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨 등의 효능이 있어 신경증의 치료, 원기의 회복, 보혈작용, 신장기능의 강화 및 수명의 연장 등의 목적으로 다른 약재와 조합하여 이용되고 있다.⁷⁾

한방의료에서 이용되고 있는 탕제는 2종 이상 수종의 한약을 조합하여 가열 추출하여 얻은 추출액을 말하며, 가열 추출과정에서 각 구성 한약에 함유되어 있는 성분들이 상호작용에 의하여 추출되어 약효를 발현하며, 추출과정에서 물리화학적 변화가 초래할 수 있다. 근래에는 단일 한약을 추출하여 얻은 추출물을 처방에 따라 혼합하여 복용하는 경우가 있다. 따라서 단일 한약의 추출물을 혼합하여 사용하는 경우와 혼합하여 추출하여 얻은 경우에 탕제의 화학적 및 활성의 차이가 있을 수 있으므로 이를 비교분석할 필요가 요청되고 있다. 이런 목적으로 한방의료에서 가장 중요한 약재인 녹용을 선정하여 다음과 같은 실험을 행하고자 하였다.

녹용은 대표적인 補陽藥이므로 補劑의 기본방제인 四君子湯^{1,7,8)}과 조합한 방제(가칭 鹿茸四君子湯)를 선정하여 녹용단미엑스제제를 사군자탕에 첨가하였을 때(녹용 別煎)와 사군자탕에 녹용을 가하여 동시에 탕전하였을 때 두 검체 사이의 pH, 추출률, 지표성분의 함량, TLC 및 HPLC chromatogram 비교, *in vitro*에서 항산화작용과 항염증작용, *in vivo*에서 유행시간 등 항피로작용을 지표로 평가한바 약간의 지견을 얻어 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한 녹용, 백복령, 백출, 감초, 인삼은 경희한약(강원도 문막 소재)에서 구입하여 대한약전 및 대한약전 외 한약(생약)규격집에 적합한 것을 엄선하여 사용하였고, 녹용은 뉴질랜드산을 사용하였다.

시료의 조제 및 pH의 측정 - 녹용사군자탕 합제의 조제는 四君子湯 즉 백복령, 백출, 감초, 인삼과 녹용을 각각 20 g 동량을 round bottom flask에 옮기고 증류수 1L를 가하여 2시간 동안 환류추출하고 온시에 여과하여 pH를 측정하고 감압농축한 다음 동결건조하였다(이하 Sample-I).

또한 사군자탕(백복령, 백출, 감초, 인삼 각각 20 g 총 80 g) 및 녹용 20 g을 각각 round bottom flask에 옮기고 녹용사군자탕 합제의 조제와 동일한 조작으로 추출하여 pH를 측정하고, 동결건조하여 사군자탕 및 녹용 건조엑스를 각각 얻었다. 녹용사군자탕 별전(Sample-II)은 사군자탕 건조엑스분말에 녹용 건조엑스분말을 합하여 균일하게 한 것으로 하였다.

실험동물 - 본 실험에서 사용한 실험동물은 (주)오리엔트 바이오에서 구입한 25 g 전후의 ICR계 웅성 생쥐를 사용하였고, 물은 상수를 사용하여 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 2주간 순응시킨 후 사용하였다. 특별히 명시하지 않는 한 실험은 24±2°C, 습도 60%의 항온, 항습장치가 되어 있는 실험실내에서 실시하였다.

시약 및 기구 - Xanthine, xanthine oxidase, bovine serum albumin, NBT(Nitroblue tetrazolium), CuCl₂, trypsin, trichloroacetic acid, Trizma Base, hyaluronic acid-K, hyaluronidase, *p*-dimethyl aminobenzaldehyde(DMAB), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), TBA, sodium dodecyl sulfate, 1,1,3,3-tetraethoxypropane 등은 Sigma Co.(미국), mannitol, sucrose, EDTA-2Na, sodium bicarbonate, phenol, sodium hydroxide, dimethyl sulfoxide는 Yakuri Pure Chemicals Co.(일본), ginsenoside Rb₁, glycyrrhizin, 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride(AAPH)는 Wako Pure Chemical Co. Ltd(일본), sodium carbonate, sodium ascorbate, casein은 Junsei Chemicals Co.(일본), HPLC용 H₂O, AcOH, acetonitrile은 J.T. Baker Co.(미국), TLC plate는 Merck(독일), 단백질 정량 시약은 Bio-Rad Protein Assay reagent(미국), 혈중 creatinine의 함량 측정 및 LDH의 활성 측정용 kit는 Asan Pharm. Co.(한국) 제품을 사용하여 Prime Automatic Clinical Chemistry Analyzer(BPC Biosed, 이탈리아)로 측정하였다. 기타 분리 및 분석용 시약은 특급시약을 사용하였다.

기기는 감압농축기(EYELA Co., Model NE-1, 일본), 동결건조기(EYELA Co., Model FD-1, 일본), HPLC system (Alliance 2690 Separation Module, Column heater, Photodiode array detector 996, Millennium 32 Workstation, Waters, 미국), 분광광도계(UV-160A, Shimadzu Co. 일본), 원심분리기(VS-6000CFN, Vision Scientific Co., 한국) 등을 사용하였다.

녹용사군자탕의 TLC pattern 분석 - 분석용 검체의 처리를 위해서 녹용의 경우에는 동결건조된 시료 1.0 g에 클로로포름 : 메탄올 혼합액(4:1)을 20 ml 넣고 1시간 동안 환류추출한 다음 감압농축한 뒤, 잔사를 메탄올 2 ml에 녹여 검액으로 사용하였다. Sample I 및 Sample II의 경우에는 각 동결건조된 시료 1.0 g을 증류수 20 ml에 녹여 부탄올 30 ml로 2회 분획한 다음, 부탄올 층을 합하여 감압농축한 뒤, 잔사를 메탄올 2 ml에 녹여 검액으로 사용하였다. 표준품은

로 녹용 분말 1.0 g을 취하여 클로로포름 : 메탄올 혼합액 (4:1) 50 ml를 넣고 1시간 동안 환류추출한 다음 감압농축한 뒤, 잔사를 메탄올 2 ml에 녹여 표준액으로 하였다. 각 검액 5 μ l씩을 TLC plate에 점적하고 클로로포름 : 메탄올 : 20 mM 염화칼슘 혼합액(100:5:0.5)을 전개용매로 하여 약 10 cm 전개한 다음 박층판을 건조시켰다. 발색은 자외선 254 nm 및 아니스알데히드-황산 시약을 분무한 후 105°C에서 15분간 가열하여 각각 표준액과 비교 관찰하였다.⁹⁾

Ginsenoside Rb₁ 정량 - Sample-I과 Sample-II를 각각 1.0 g을 정밀히 취하여 증류수 20 ml에 용해시킨 후, 40°C에서 30분간 초음파로 처리하여 현탁시켰다. 각 시료의 현탁액을 석유에틸 4 ml를 가해 진탕혼합한 후 석유에틸층을 제거하여 수층을 얻었다. 이 조작을 2회 반복한 후 수층을 모아 물포화 *n*-BuOH로 2회 반복 분획추출한 다음 *n*-BuOH층을 모아 물로 세척하고 Sep-pak C₁₈ cartridge로 전처리하였다. *n*-BuOH층을 감압농축한 다음 메탄올 10 ml를 정밀히 가해 녹인 다음 syringe filter로 여과하여 검액으로 하였다. 정량은 Zhang 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 HPLC를 이용하여 측정하였다. 따로 ginsenoside Rb₁ 표준품을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 5 mg/ml의 농도로 하여 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 20 μ l씩을 가지고 다음 조건으로 HPLC법에 따라 시험하여 표준액의 검량선으로부터 ginsenoside Rb₁량을 산출하였다. HPLC 조건은 다음과 같다.

검출기 : Waters Photodiode™ Array Detector 996(측정 파장 203 nm), 칼럼 : Nucleosil C₁₈ column(4.0×250 mm), 칼럼온도 : 40°C, 유속 : 1.5 ml/min, 이동상은 A용액(15% 아세트니트릴)과 B용액(80% 아세트니트릴)을 이용하여 A 100%에서 시작하여 20분 후 90%가 되도록 기울기를 준 후 50분에는 70%가 되도록 B 용액을 gradient 하였다.

Glycyrrhizin의 정량 - 검체 중 glycyrrhizin의 정량은 Kitagawa 등의 방법¹¹⁾에 준하여 HPLC법을 이용하여 측정하였다. 따로 glycyrrhizin 표준품 약 25 mg을 정밀하게 달아 묽은 에탄올을 넣어 100 ml로 하여 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 20 μ l씩을 가지고 다음 조건으로 HPLC법에 따라 시험하여 표준액의 검량선으로부터 glycyrrhizin량을 산출하였다. HPLC 조건은 다음과 같다.

검출기 : Waters Photodiode™ Array Detector 996(측정 파장 254 nm), 칼럼 : Nucleosil C₁₈ column(4.0×250 mm), 칼럼온도 : 실온, 이동상 : 물 · 아세트니트릴 · 초산 혼합액 (620 : 380 : 5), 유속 : 1.5 ml/min.

In vitro에서의 항산화 활성 실험 - Free radical scavenging 작용은 비교적 안정한 free radical인 DPPH(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 Blois의 방법¹²⁾을 이용하였고, 지질과산화형성 저해 활성은 흰쥐 간 homogenate를 이용한 Yokozawa 등¹³⁾의 방법에 준하였다. Xanthine oxidase 저해 활성은 NBT(Nitroblue tetrazolium)을 발색제로 이용한

Elliott의 방법¹⁴⁾을 사용하여 측정하였으며, Hyaluronidase 저해 활성은 발색제로 DMAB(*p*-dimethylaminobenzaldehyde) 시약을 사용한 Kim 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 측정하였고, Trypsin 저해 활성은 Anson¹⁶⁾과 Tsutomu 등의 방법¹⁷⁾에 준하였다. 적혈구막 안정화 작용은 Dai 등¹⁸⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.

중량부하 생쥐의 유평시간 연장에 미치는 작용 - Moriura, T 등¹⁹⁾의 방법을 개량하여 실시하였다. 즉, 25×40×17 cm의 투명한 플라스틱 용기에 증류수를 14 cm까지 채우고 18°C 항온조에 넣어 일정한 온도를 유지하면서 동일시간에 6개의 수영조에서 6마리 생쥐의 수영시간을 동시에 측정하였다. 수영실험은 체중을 칭량하고 체중의 8%에 해당하는 무게의 납줄을 목의 배면부위에 고정된 다음 유평시간을 측정하였다. 수영시간은 생쥐의 코가 수면 아래로 잠길 정도의 수영이 5초간 진행되어 가라앉게 될 때까지로 하였다. 검액 Sample-I 및 Sample-II 1.0 g/kg과 2.0 g/kg을 각각 경구투여하여 비교관찰하였다.

중량부하 흰쥐의 유평실험의 혈액학적 지표에 미치는 작용 - 진술한 방법과 동일하게 플라스틱 용기에 증류수를 채우고 20°C 항온조에 넣어 온도를 유지하면서 6개의 수영조에서 6마리의 생쥐를 동일하게 3시간씩 수영을 시켰다. 수영실험은 4일간 시료를 투여한 후, 생쥐의 체중을 달고 체중의 1%에 해당하는 납줄을 목에 달고 마지막 시료의 경구투여 1시간이 지난 시점에서 강제유영을 시켰다. 유영을 종료시킨 후 즉시 심장채혈하여 혈청을 분리한 뒤, creatinine 함량은 Jaff법,²⁰⁾ LDH 활성은 UV-Rate법²¹⁾을 이용하여 측정용 kit(Asan Pharm. Co.)를 사용하여 Prime automatic clinical chemistry analyzer로 측정하였다. 검액 Sample-I 및 Sample-II 1.0 g/kg과 2.0 g/kg을 각각 경구투여하여 비교관찰하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내었고, 각 군 간의 비교는 Student's *t*-test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 *p* 값이 5% 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

전탕액의 pH 및 추출률 - 사군자탕에 녹용을 가한 녹용 사군자탕(Sample-I)과 사군자탕과 녹용을 각각 추출한 다음 혼합한 녹용사군자탕(Sample-II, 별전)의 pH 및 물 추출률을 검토하여 그 결과를 Table I에 제시하였다. 그 결과 pH는 Sample-I에서는 5.53이고, Sample-II에서는 5.38로 0.15의 차이를 보였으며 사군자탕의 pH는 5.19이었다. 그리고, 물 추출률은 Sample-I 23.9%와 Sample-II 21.5%로 유사한 추출률을 보였다.

TLC pattern 분석 - 녹용과 사군자탕의 합제와 별전 여

Table I. Comparison of pH and yield between two extraction methods of Nokyoung-Sangunja-Tang

Groups	pH	Yield (%)
Sangunja-Tang	5.19±0.015	22.4±2.07
Velvet antler(Nokyong)	6.80±0.056	18.0±0.78
Sample-I	5.53±0.09	23.9±1.00
Sample-II	5.38±0.06	21.5±1.85

Each data represents mean±S.D. of 3 experiments.
 Sample I : Nokyoung-Sangunja-Tang was prepared by incorporative extraction of Sagunja-Tang and velvet antler.
 Sample II : Nokyoung-Sangunja-Tang was prepared by mixture with water extract of Sagunja-Tang and velvet antler respectively.

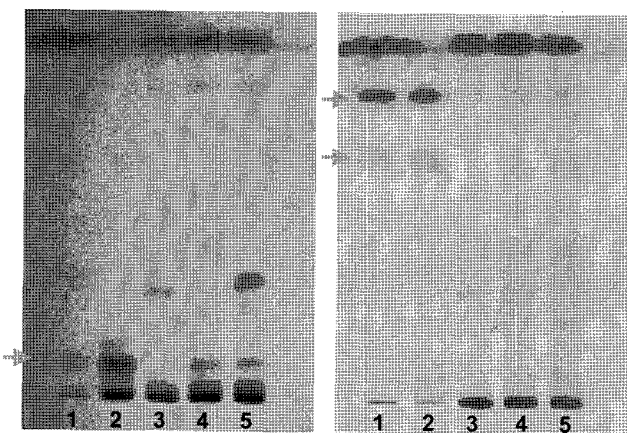


Fig. 1. TLC chromatograms of velvet antler and Nokyoung-Sangunja-Tang.

Adsorbent : Pre-coated TLC plate (Silica gel GF₂₅₄, E. Merck Co.)
 Solvent : CHCl₃:MeOH:20 mM CaCl₂(100:5:0.5)
 Detection : Left, UV 254 nm, Right, Anisaldehyde-H₂SO₄ reagent (105°C, 15 min.)

Lane : 1, Velvet antler std., 2, H₂O Ext. of velvet antler, 3, Sagunja-Tang, 4, Nokyoung-Sangunja-Tang(Incorporative extraction of Sangunja-Tang and velvet antler), 5, Nokyoung-Sangunja-Tang(Mixture with Sagunja-Tang Ex. and velvet antler Ext.)

부가 성분변화에 미치는 영향여부를 비교하기 위하여 TLC를 행하여 TLC chromatogram의 pattern을 분석관찰하였다. Sample-I과 Sample-II, 사군자탕, 녹용 단미 및 녹용표준품의 TLC chromatogram을 Fig. 1에 제시하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 녹용 표준품과 녹용 단미엑스는 같은 pattern을 보였고, 자외선하의 반점 pattern(왼쪽)과 아니스알데히드-황산 시액으로 발색시킨 반점 pattern(오른쪽) 모두 Sample-I과 Sample-II 모두 녹용 표준품에서 보였던 특징적인 반점의 pattern을 동일하게 가지고 있음을 알 수 있었다(UV lamp에서 Rf=0.12부근, 발색에서 Rf=0.67과 0.86의 부근).

Ginsenoside Rb₁ 및 glycyrrhizin 함량 - 녹용의 합제와 별전의 여부가 전출과정에서 타 구성약물의 성분변화에

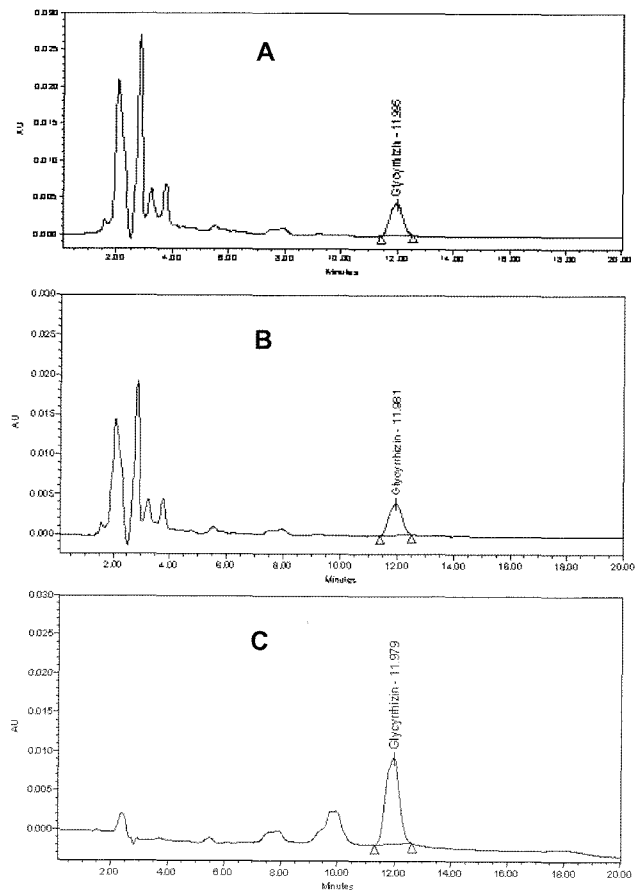


Fig. 2. HPLC chromatograms of glycyrrhizin and Nokyoung-Sangunja-Tang.

A : Nokyoung-Sangunja-Tang (incorporative extraction of Sagunja-Tang and velvet antler), B : Nokyoung-Sangunja-Tang (mixture with Sagunja-Tang Ext. and velvet antler Ext.), C : Glycyrrhizin std.

Detector : Waters Photodiode™ Array detector 996 (253 nm)
 Column : Nucleosil C₁₈ column (4.0×250 nm)
 Mobile phase : H₂O:CH₃CN:AcOH (620:380:5)
 Flow rate : 1.5 ml/min

영향을 주는지 여부를 관찰하고자 HPLC chromatogram과 감초의 지표물질인 glycyrrhizin과 인삼의 지표물질인 ginsenoside Rb₁ 함량을 각각 정량하여 그 결과를 Fig. 2, Fig. 3 및 Table II에 제시하였다.

그 결과 표준품 glycyrrhizin과 Sample-I 및 Sample-II 각각 chromatogram에서 glycyrrhizin의 peak가 Rt 11.9분에서 확인할 수 있었고, 두 검체의 chromatogram profile은 유사하였다(Fig. 2). 그리고, 표준품 ginsenoside Rb₁의 peak가 Rt 51.9분에서 확인할 수 있었고, 두 검체 Sample-I과 Sample-II의 chromatogram profile은 유사하였다(Fig. 3). 그리고, 지표성분 함량은 인삼 유래 ginsenoside Rb₁ 함량은 Sample-II이 높게 검출되었고 감초에서 유래한 glycyrrhizin 함량도 Sample-II가 다소 높게 검출되었으나, 두 검체 사이의 함량

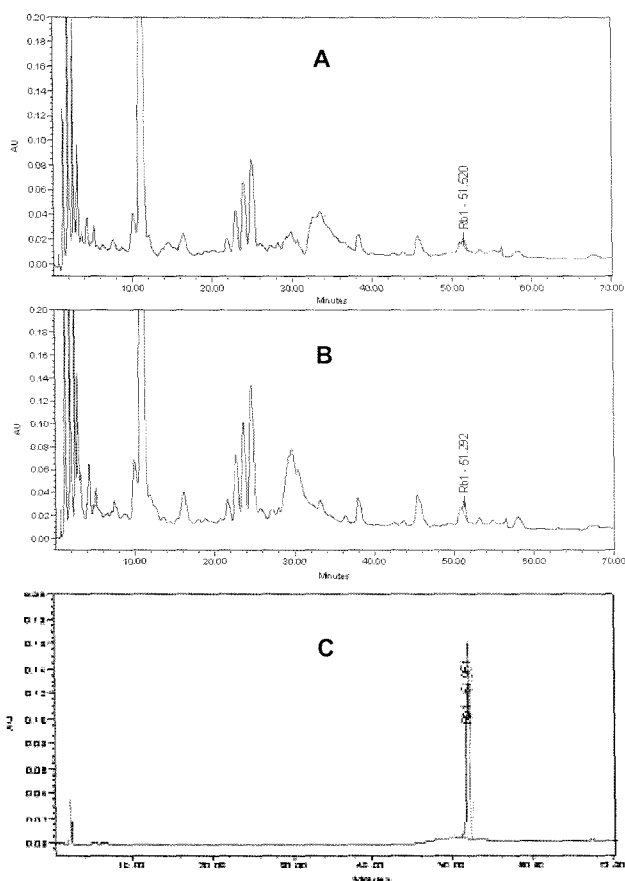


Fig. 3. HPLC chromatograms of ginsenoside Rb₁ and Nokyong-Sagunja-Tang.

A : Nokyong-Sagunja-Tang (incorporative extraction of Sagunja-Tang and velvet antler), B : Nokyong-Sagunja-Tang (mixture with Sagunja-Tang Ext. and velvet antler Ext.), C : Ginsenoside Rb₁ std.

Detector : Waters Photodiode™ Array detector 996 (203 nm)
 Column : Nucleosil C₁₈ column (4.0×250 nm)
 Mobile phase : A soln.; 15% CH₃CN soln., B soln.; 80% CH₃CN soln.
 [Gradient condition; 0 min (A soln. 100%), 20 min (A soln. 90%, B soln. 10%), 50 min (A soln. 70%, B soln. 30%)]
 Flow rate : 1.5 ml/min

Table II. Contents of ginsenoside Rb₁ and glycyrrhizin in Nokyong-Sagunja-Tang

Samples	Contents (%)	
	Ginsenoside Rb ₁	Glycyrrhizin
Sample-I	0.44±0.09	1.57±0.14
Sample-II	0.51±0.06	1.85±0.16

Each data represents mean±S.D. of 3 experiments.
 Sample I : Nokyong-Sagunja-Tang was prepared by incorporative extraction of Sagunja-Tang and velvet antler.
 Sample II : Nokyong-Sagunja-Tang was prepared by mixture with water extract of Sagunja-Tang and velvet antler respectively.

Table III. Inhibitory effects on superoxide anion radical generation, TBA-RS formation in rat liver homogenate, trypsin and hyaluronidase, and scavenging effects of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical of Nokyong-Sagunja-Tang *in vitro*

Samples	Sample-I	Sample-II
	Activities (IC ₅₀ , mg/mL) ^{a)}	
DPPH scavenging effects	0.5	0.5
Inhibition on xanthine oxidase	9.4	>10
Inhibition on TBA-Rs formation	>100	67.4
Inhibition on hyaluronidase	>100	98.3
Inhibition on trypsin	>100	69.3
Inhibition on hemolysis by AAPH	3.7	2.9

Each data represents mean of 3 experiments.

^{a)} : Concentration required for 50% inhibition.

Sample I : Nokyong-Sagunja-Tang was prepared by incorporative extraction of Sagunja-Tang and velvet antler.

Sample II : Nokyong-Sagunja-Tang was prepared by mixture with water extract of Sagunja-Tang and velvet antler respectively.

차이는 보이지 않았다.

In vitro에서의 활성 비교 - 녹용과 다른 한약물의 합제와 별진 추출방법의 차이가 약리활성에 미치는 영향이 있는지 여부를 관찰하기 하고자 *in vitro*에서 DPPH 소거활성, xanthine oxidase 저해활성, 지질과산화물 형성 저해작용, hyaluronidase 저해활성, trypsin 저해활성 및 적혈구막 안정화 작용을 비교 검토하여 Table III에 제시하였다. 그 결과 Table III에 나타난 바와 같이 Sample-I과 Sample-II 사이에 DPPH 소거활성은 유사한 효과를 보였고, xanthine oxidase 저해활성은 Sample-I이 다소 양호한 저해활성을 나타내었다. 반면에 지질과산화 형성저해, hyaluronidase 저해활성, trypsin 저해활성 및 적혈구막 안정화 작용은 Sample-II에서 비교적 더 양호한 활성을 보였다.

중량부하 생쥐의 유영시간연장에 대한 효과 - 체중에 8%의 납줄을 목의 배면부위에 고정된 생쥐의 유영시간에 대한 검역으로 효과를 Table IV에 나타내었다. 그 결과 Sample-I 및 Sample-II 1.0 g/kg 각각 투여군에서 706.8±64.0초와 674.5±61.9초로 대조군의 유영시간 414.0±46.7초에 비하여 각각 p<0.01의 유의한 유영시간 연장효과를 관찰할 수 있었고 각 검역의 용량의존적이었다. 두 검체 사이 항피로효과는 유사하게 나타났다.

중량부하 생쥐의 유영실험의 혈액학적 지표에 대한 효과 - 생쥐 체중의 1%에 상응하는 납줄을 목에 달고 3시간 동안 강제 유영시켜 피로를 유발시킨 뒤 혈중의 creatinine 함량 및 lactic dehydrogenase(LDH) 효소활성도에 미치는 검역의 효과를 Table V에 제시하였다. 우선 혈청 중 creatinine 함량은 정상군이나 중량부하 생쥐의 대조군에서 별다른 차

Table IV. Antifatigue effect of Nokyoung-Sagunja-Tang on the duration of swimming in 8% body weight ratio loaded mice

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	Swimming duration (Sec)	Increment ratio (%)
Control	-	414.0±46.7	-
Sample-I	500	603.8±71.1*	45.9
Sample-I	1,000	706.8±64.0**	69.5
Sample-II	500	588.3±52.4*	42.1
Sample-II	1,000	674.5±61.9**	62.9

Each data represents mean±standard error of 6 mice.

Sample I : Nokyoung-Sagunja-Tang was prepared by incorporative extraction of Sagunja-Tang and velvet antler.

Sample II : Nokyoung-Sagunja-Tang was prepared by mixture with water extract of Sagunja-Tang and velvet antler respectively.

* : Statistically significant compared with control data (*:p<0.05 and **:p<0.01).

Table V. Effect of Nokyoung-Sagunja-Tang on creatinine levels and lactic dehydrogenase (LDH) activity of forced swimming mice with 1% of the body weight attached to the neck for 3 hours.

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	Creatinine levels (mg/dL)	Lactic dehydrogenase (IU/L)
Normal	-	0.83±0.064	416.7±22.3
Control	-	0.86±0.034	1,724.2±199.9###
Sample-I	500	0.82±0.068	1,513.9±112.4
Sample-I	1,000	0.86±0.024	994.2±87.2**
Sample-II	500	0.81±0.038	1,442.5±150.4
Sample-II	1,000	0.85±0.067	988.3±61.9**

Each data represents mean±standard error of 6 mice.

Sample I : Nokyoung-Sagunja-Tang was prepared by incorporative extraction of Sagunja-Tang and velvet antler.

Sample II : Nokyoung-Sagunja-Tang was prepared by mixture of water extract of Sagunja-Tang and velvet antler respectively.

: Statistically significant compared with normal data (###:p<0.001).

* : Statistically significant compared with control data (**:p<0.01).

이가 인정되지 않았으며, 검액 Sample-I 및 Sample-II 처치군에서도 별다른 변화를 나타내지 않았다.

혈청 중 lactic dehydrogenase 효소활성도는 정상군에 비하여 강제 유영시킨 대조군에서는 p<0.001의 유의한 효소활성도의 상승을 나타내었고, 검액 Sample-I 및 Sample-II 각각 1.0 g/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 p<0.01의 유의한 LDH 상승억제효과를 보였고, 저농도 처치군에서는 다소 억제시키는 경향을 보이나 통계적으로 유의차는 인정되

지 않았다. 그리고, 두 검체 사이의 LDH 효소활성도 상승 억제효과는 유사하였다.

고 찰

한약은 일반적으로 증이나 병세에 맞추어 2종 이상의 한약을 조합하여 물로 추출한 액상의 제제를 주로 이용하고 있다. 특히 전탕하는 과정에서 각 처방에 사용한 한약 중에 함유된 성분 상호간 물리화학적 반응을 통하여 상가, 상승 및 길항작용 등 복합적 작용에 의하여 약효가 발현된다.²²⁻²⁴⁾

따라서, 대부분의 한약은 처방된 수종의 한약을 조합하여 물로 추출하는 방식을 이용하고 있으나, 한방의료보험급여 약제를 포함하여 일부 한약은 개별 한약을 추출하여 얻은 단미엑스제제를 처방에 따라 조합하여 투약하고 있다. 그리고, 한방의료에서는 別煎이나 溶化 등의 특수한 탕전방법이 있어 단미엑스로 하거나 단미엑스를 처방에 따라 조합하여 이용하는 방법이 활용되고 있다.

이에 補陽藥으로 널리 이용되고 있는 녹용을 단미엑스제제로 하여 치료상 유용성을 확보하고자 하는 연구의 일환으로 補氣藥의 기본방제인 四君子湯에 녹용을 가하여 한꺼번에 추출한 검체(Sample-I)와 사군자탕을 추출하여 얻은 엑스에 녹용을 별전하여 얻은 엑스를 조합한 검체(Sample-II) 사이의 물리화학적 parameter의 차이는 물론 *in vitro*계에서 항산화 및 항염증활성, *in vivo*계에서 항피로효과를 지표로 하여 실험한 결과를 비교고찰하면 다음과 같다.

전탕액 중의 pH 변화를 검토한 바 Sample-I과 Sample-II은 유사한 pH를 나타내었고, 추출률 역시 두 검체 사이에는 유의한 차이는 인정되지 않았다. 그리고, 천연물의 성분 화학적 정성시험에 일반적으로 이용되고 있는 TLC pattern 분석법을 이용하여 녹용 표준품을 대조로 하여 chromatogram을 비교한 바 Sample-I과 Sample-II 두 검체 사이에서 유사한 TLC chromatogram을 보였다. 그리고, Sample-I과 Sample-II 모두 녹용 표준품의 특징적인 반점을 확인할 수 있었다.

또한, 감초 중 glycyrrhizin 표준품 및 인삼 중 ginsenoside Rb₁의 표준품을 이용한 HPLC chromatogram 비교에서 두 검체 공히 각 표준품의 peak를 확인할 수 있었으며, chromatogram의 profile도 유사하였다. 추출방법에 따라 유효성분 또는 지표성분의 영향을 줄 수 있으므로 인삼 중 ginsenoside Rb₁ 및 감초 중 glycyrrhizin의 함량을 지표로 하여 평가하였다. 그 결과 ginsenoside Rb₁ 함량은 각각 Sample-I 0.44%, Sample-II 0.51%이었고, glycyrrhizin 함량은 Sample-I 1.57%, Sample-II 1.85%를 나타내어 두 지표성분의 함량은 Sample-II가 다소 높았지만 통계적으로 유의있는 변화는 인정되지 않았다.

따라서, 녹용사군자탕에서 사군자탕 4종의 구성약물에 녹

용 1종의 약물을 가미하여 추출하거나, 사군자탕과 녹용을 각각 별도로 추출하여 합한 경우 추출액의 pH, 추출물, TLC 및 HPLC chromatogram과 지표성분의 함량에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

생리활성 평가로 *in vitro*에서 항산화활성과 항염증활성을 지표로 하여 검토하였다. 그 결과 DPPH 소거능과 xanthine oxidase 저해활성 및 지질과산화 생성 억제 활성 등 항산화 활성들을 비교하였을 때 두 검체는 유사한 활성이 인정되었고, 지질과산화 생성 억제활성은 Sample-II가 Sample-I에 비하여 나은 결과를 보임으로써 별도로 녹용을 탕전한 후 다른 방제에 가미하여도 약리활성의 변화는 없는 것으로 사료된다.

그리고, 항염증활성의 지표로 hyaluronidase 및 trypsin 저해활성을 이용하였다.^{25,26)} 그 결과 두 검체 Sample-I과 Sample-II는 유사한 저해활성이 인정되었고, 다소 Sample-II가 다소 양호한 결과를 보였다. 그리고, 녹용의 특징적인 임상효과인 보혈작용과 가장 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되는 적혈구막 안정화작용실험의 결과에서도 Sample-II 처치군이 다소 나은 결과가 인정되었다.

한편, 녹용은 壯元陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨하는 효능이 있어 허로로 몸이 여위어 있는 것과 팔다리와 허리, 등뼈가 시글고 아픈 것을 치료하며 남자가 腎氣가 虛冷하고 다리와 무릎에 힘이 없는 증상 등에 이용되고 있고,^{7,8)} 사군자탕은 脾胃氣虛로 運化力이 부족하여 일어나는 질환에 응용되고 있다.⁸⁾ 따라서 *in vivo*에서 Sample-I과 Sample-II의 약리학적 활성 비교 방법의 하나로서 항피로효과를 평가하고자 중량 부하에 의한 생쥐의 유영시간 연장 및 강제유영을 통한 혈액학적 지표에 미치는 효과를 비교하였다. 생쥐의 유영시간 연장효과는 두 검체 모두 유의한 연장효과가 인정되었고, 두 검체 사이에는 유사한 효과를 나타내었다.

그리고, prolonged exercise model을 택하여 근육피로모델을 이용하여 항피로효과를 검토하였다. 실험동물을 강제유영시키는 경우 혈액 glucose level은 저하되고 과도한 운동으로 인한 에너지소모로 대사산물이 증가하여 혈청 lactic dehydrogenase(LDH) 효소활성도와 lactic acid, creatinine, free fatty acid의 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 즉, 검체를 4일간 경구투여하고 생쥐의 체중에 1% 부하시킨 다음 3시간 동안 강제유영을 시켜 혈청 중의 creatinine 함량 및 lactic dehydrogenase 효소활성도를 측정하여 피로산물 생성정도를 검토하였다.

그 결과 혈청 중 creatinine 함량은 정상군에 비하여 생리 식염수만을 투여하고 강제유영시킨 대조군에서는 별다른 변화를 관찰할 수 없었고, 검체 처치군에서도 별다른 영향을 미치지 않았다. 혈청 중 LDH 효소활성도는 정상군에 비하여 대조군은 유의하게 상승되었고, 검체 Sample-I 및 Sample-II 처치군에서는 유의하게 상승억제효과가 인정되었고, 두

검체 사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았다.

결 론

녹용 제제의 유용성을 평가하기 위한 기초적 연구로서 四君子湯에 鹿茸을 가미한 鹿茸四君子湯의 조제시 구성약물을 합하여 추출한 鹿茸四君子湯(Sample-I)과 四君子湯 및 녹용을 각각 별전한 후 합한 鹿茸四君子湯(Sample-II)을 각각 검체로 하여 물리화학적 및 생물활성을 지표로 하여 평가한 결론은 다음과 같다.

鹿茸四君子湯 검체 Sample-I과 Sample-II은 추출액 중의 pH, 물 추출물, TLC 및 HPLC chromatogram의 profile 등 각 parameter가 유사하였다. 또한 인삼의 지표성분 ginsenoside Rb₁ 및 감초의 지표성분 glycyrrhizin의 함량은 두 검체에서 유사한 결과를 보이나 Sample-II에서 약간 높았다.

In vitro 계에서 DPPH 소거활성, xanthine oxidase 저해활성, 지질과산화 형성저해활성, hyaluronidase 저해활성, trypsin 저해활성 및 적혈구막 안정화작용에 대하여 Sample-I과 Sample-II 두 검체 사이에 차이가 인정되지 않았다.

In vivo 계에서 중량부하된 생쥐의 유영시간 연장과 강제유영 생쥐의 혈액학적 지표에 미치는 효과는 각 검액 공히 유의한 생쥐의 유영시간연장효과 및 혈청 중 LDH 효소활성 상승억제효과가 인정되었으며, Sample-I과 Sample-II 두 검체 사이의 효과는 유사한 것으로 나타났다.

이러한 실험결과를 종합하면 사군자탕에 녹용을 가미하여 동시에 추출하거나, 또는 녹용을 별도로 추출하여 사군자탕에 혼합하여도 두 검체 사이에 유의한 물리화학적 parameter의 변화와 약리활성의 변화를 관찰할 수 없어 녹용엑스제제로 조제하여 임상에 적용함에 있어 다양성 및 유연성의 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 경희의료원의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 이상인 등 공편역 (1992) 방제학, 29, 도서출판 영림사, 서울.
2. 동의학연구소 편저 (1994) 동의학개론, 333, 여강출판사, 서울.
3. 식품의약품안전청 (2005) 대한약전의 한약(생약) 규격집, 99, 식품의약품안전청, 서울.
4. 이상인, 지형준 (1998) 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해, 103, 한국메디칼 인텍스사, 서울.
5. Pathak, N. N., Pattanaik, A. K., Patra, R. C. and Arora, B. M.

- (2001) Mineral composition of antlers of three deer species reared in captivity, *Small Ruminant Research*, **42**: 61-65.
6. Barling, P. M., Lai, A. K. W. and Nicholson, L. F. B. (2005) Distribution of EGF and its receptor in growing red deer antler, *Cell Biology International*, **29**: 229-236.
 7. 전국한의과대학 본초학교실 공편저 (1991) 본초학, 545, 도서출판 영림사, 서울.
 8. 허준 (동의학연구소 譯) (1994) 동의보감(내경편), 18, 2614, 여강출판사, 서울.
 9. Mthing, J. (1996) High-resolution thin-layer chromatography of gangliosides, *J. Chromato. A*, **720**: 3-25.
 10. Li, L., Zhang, J. L., Sheng, Y. X., Ye, G., Guo, H. Z. and Guo, D. A. (2004) Liquid chromatographic method for determination of four active saponins from *Panax notoginseng* in rat urine using solid-phase extraction, *J. Chromato. B*, **808**: 177-183.
 11. Kitagawa, I., Chen, W. Z., Taniyama, T., Harada, E., Hori, K., Kobayashi, M. and Ren, J. (1998) Quantitative determination of constituents in various Licorice roots by means of High Performance Liquid Chromatography, *Yakugaku Zasshi*, **118**: 519-528.
 12. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**: 1199-1200.
 13. Yokozawa, T., Dong, E., Wu, L. Z., Oura, H. and Nishioka, I. (1996) Antioxidant activity of Wen-Pi-Tang *in vitro*, *Natural Medicines*, **50**: 243-246.
 14. Elliott, A. J., Scheiber, S. A., Thomas, C. and Pardini, R. S. (1992) Inhibition of glutathione reductase by flavonoids, *Biochem. Pharmacol.*, **44**: 1603-1608.
 15. Kim, Y. S., Noh, Y. K., Lee, G. I., Kim, Y. K., Lee, K. S. and Min, K. R. (1995) Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity, *Kor. J. Pharmacogn.*, **26**(3): 265-272.
 16. Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.*, **22**: 79-89.
 17. Tsutomu, U., Hiroshi, K. and Zen-ichi, O. (1989) Anti-inflammatory effect of extract from *Phellodendri cortex*, *J. Med. Pharma. Society for Wakan-Yaku*, **6**: 158-164.
 18. Dai, F., Miao, Q., Zhou, B., Yang, L. and Liu, Z. L. (2006) Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells, *Life Sciences*, **78**: 2488-2493.
 19. Moriura, T., Matsuda, H. and Kubo, M. (1995) Pharmacological study on *Agkistrodon blomhoffii* BOIE V. Anti-fatigue effect of the 50% ethanol extract in acute weight-loaded forced swimming-treated rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**(1): 62-66.
 20. Junge, W., Wilke, B., Halabi, A. and Klein, G. (2004) Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffimethod, *Clinica Chimica Acta*, **344**: 137-148.
 21. Wroblewskin, F. and LaDue, J. S. (1955) Lactic dehydrogenase activity in blood, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**: 210-213.
 22. Akahori, A. and Kagawa, K. (1978) Quantities of saikosaponins, baicalin, cinnamic aldehyde and cinnamic acid in decoctions and extracts of Saikokeishi-to. *Shoyakugaku Zasshi*, **32**(1): 24-32.
 23. Noguchi, M., Kubo, M., Hayashi, T. and Ono, M. (1978) Studies on the pharmaceutical quality evaluation of the crude drug preparations used in oriental medicine "Kampoo"(I)-Precipitation reaction of the components of *Cotidis Rhizoma* and these of *Glycyrrhizae Radix* or *Rhei Rhizoma* in decoction solution. *Shoyakugaku Zasshi*, **32**(2): 104-110.
 24. 絲川秀治 (1987) Chemical changes of constituents on the process of producing various chinese medicinal decoction. *現代東洋醫學*, **8**(3): 77-82.
 25. Duran-Reynals (1939) A general permeability increasing from mammalian testis on blood capillary *J. Biol. Med.* **11**: 601-12.
 26. Satosh, M., Andrew, S. M., and Hirohito, K. (2001) Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J. Immunol.* **167**: 6615-6622.
 27. 김기홍 (1980) 검사성적의 임상적 활용. 162, 고문사, 서울.

(2006년 5월 24일 접수)