대한한방내과학회지 제30권 1호(2009년 3월)
Korean J. Orient.Int. Med. 2009:30(1)94-106

元氣生脈散의 추출물별 항산화작용과 쥐의 운동피로 회복효과

김유승, 류봉하, 김진성
경희대학교 한의과대학 비계내과학 교실

Effect of *Wongisaengmaek-san* Extract on Antioxidative and Anti-Fatigue Activity

Yoo-seung Kim, Bong-ha Ryu, Jin-sung Kim
3rd Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-hee University

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to evaluate the effect of *Wongisaengmaek-san* (extracted with water or 50% ethanol) on antioxidative activity and recovery of fatigue induced by weight-loaded forced swimming exercise.

Methods : Antioxidant activity of *Wongisaengmaek-san* was evaluated in terms of total amount of polyphenol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydroxyl (DPPH) radical scavenging activity and xanthine oxidase inhibition. The anti-fatigue effect of *Wongisaengmaek-san* was investigated using an acute weight-loaded forced swimming test by monitoring swimming test times and blood biochemical parameters creatinine, BUN, lactic acid dehydrogenase (LDH), free fatty acid (FFA) and lactic acid (LA).

Results :

1. 50% EE (ethanol extract) had 2.3 times higher amount of total polyphenol compared to water extract.
2. It was identified that 50% ethanol extract showed enhancement of xanthine oxidase inhibition and DPPH scavenging effect in vitro.
3. According to anti-fatigue effect in the scale of 5% weight loaded mouse swimming test, both water and 50% ethanol extract showed significant improvement of swimming time elongation respectively, and 50% ethanol extract induced a more positive result.
4. After swimming for 1% weight-loaded mouse, water extract and 50% ethanol showed significant anti-fatigue effect with manifestation of blood sampling among both of the intervention; 50% ethanol extract showed a greater result.

Conclusions : 50% ethanol extract of *Wongisaengmaek-san* has more effective antioxidant activity and anti-fatigue than water extract.

Key words : *Wongisaengmaek-san*, Antioxidant, Anti-Fatigue

Ⅰ. 緖 論

元氣生脈散은 人蔘, 麥門冬, 五味子의 세 종류의 약물로 구성된 李東垣의 生脈散[1]에 피로개선과 항산화작용이 확인된 茶葉과 大蒜을 가미하여 제제약 형태로 개발된 처방이며, 慶熙醫療院 處方解說集에서 만성피로, 원기허약, 쇠약체질, 수험생의 체력유지와 집중력 향상, 땀을 많이 흘리는 체질, 口渴 해소 및 감기가 잘 걸리는 증상 등에 선용될 수 있는 것[2]으로 기재되어 있다.

補氣藥으로 대표되는 生脈散에 관한 다양한 실험적 접근이 시행되었는데, 신 등의 실험[3]에서 심혈관계에 미치는 혈관 이완작용 및 국소뇌혈류량 증가를 보였고, Chen 등[4]은 임상상 심부전 환자에

· 교신저자: 류봉하 서울특별시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방 3내과
TEL: 02-958-9137 FAX: 02-958-9136
E-mail: rbongh@khu.ac.kr

게 기존 치료와 生脈散을 병용하여 유의한 치료 효과 상승을 보고하여 심혈관계에 긍정적인 효과가 있음을 증명하였으며, 김 등[5]은 실험적으로 뇌교종세포의 고사 유도에 대한 cisplatin과 生脈散의 병용투여가 효과적임을 보고하였다. Ichikawa[6], Nishida[7], Li[8] 및 김[9]은 생맥산이 다양한 경로에서 항산화 작용에 따른 심혈관계와 대뇌 세포보호작용 및 항암제 사용에서의 세포보호효과가 있음을 보여주었다. 박[10]과 김[11] 등은 흰 쥐의 운동피로 회복에 生脈散이 유의한 효과가 있다고 보고하였으며, 김[12], 채[13] 등은 生脈散 원방에 약제를 가미하여 항피로 효과를 확인하였고, 장 등[14]은 生脈散이 운동지속 시간의 연장 및 혈장 삼투질 농도의 상승을 억제하는 효과가 있고 혈청 중 Na^+을 안정적으로 감소시켜 暑病예방에 효과를 미친다고 보고하고 있다. 이에 生脈散의 효능은 현대적 의미로 심혈관계 보호 및 치료효과, 항산화 및 항피로 작용 등으로 재해석되고 있음을 알 수 있었다.

가미된 약재 중 茶葉에 대하여 Graham[15], Nakayama[16], Cabrera[17] 및 김 등[18]은 각각 항산화 효과와 더불어 항피로효과가 있음을 보였고, Borek[19], 성[20] 및 윤[21] 등은 大蒜의 항산화작용을 증명하여, 生脈散에 가미할 경우 항산화 및 항피로 작용을 상승시킬 것으로 예상된다.

이에 저자는 제형 개발의 일환으로 처방 조성을 변형한 元氣生脈散의 내용 및 효과를 객관적으로 규명하기 위하여, 물과 에탄올의 두 용매로 추출한 제제 각각의 항산화능력 평가항목으로써 총 polyphenol함량, DPPH법에 의한 전자공여능 및 Xanthine oxidase 저해활성을 측정하였고, 항피로 효과를 규명하기 위하여 쥐에 원기생맥산 제제를 경구투여한 후 강제유영부하시험을 통한 피로현상과 이에 관련된 요소인 혈중 creatinine, lactic acid dehydrogenase, free fatty acid 및 lactic acid 함량에 대하여 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 동 물

본 실험에 사용한 동물은 (주)샘타코의 ICR계 체중 18~24g의 웅성생쥐 및 체중 200g 전후의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였고, 사료는 고형사료(삼양유지사료(주))로 사육하였으며, 물은 충분히 공급하면서 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 실험은 특별히 명시하지 않는 한 24±2℃에서 실시하였다.

2) 실험재료

본 실험에 사용한 한약재는 경희의료원 한방병원에서 구입하여 대한약전 또는 대한약전 외 한약(생약)규격집에 적합한 것만을 사용하였으며 처방내용은 다음과 같다. 한편, 인삼은 습윤시킨 후 건조하였고, 대산은 생마늘을 autoclave에서 90분간 찐 다음 건조 후 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Wongisaengmaek-san*

Herb	Scientific Name	Dose(g)
人 蔘	Ginseng Radix	9g
麥門冬	Liriopis Tuber	9g
五味子	Schizandrae Frctus	9g
茶 葉	Camellia sinensis	6g
大 蒜	Allium sativum	6g
Total Amount		39g

3) 검액의 조제

상기 처방 390.0g을 환류플라스크에 옮기고 정제수 또는 50% 에탄올 각각 1,500mL를 넣어 수욕상에서 2시간 가열환류추출한 다음 온수에 여과하였다. 여액을 Rotary Evaporator 중에서 감압농축하여 고형분이 30%가 되도록 한 후 동결건조기로 건조하여 각각 물추출 건조분말 137g(수율 35.1%, 이하 WE)과 50% 에탄올 추출 건조분말 129g(수율 33.1%, 이하 EE)을 얻어 본 실험에 필요로 하는 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 方 法

1) 항산화작용 평가

(1) 추출물의 polyphenol 정량

원기생맥산 중 Total polyphenol 함량은 Gao 등의 Folin-Ciocalteu 비색법[22]을 이용하여 측정하였다. 즉, WE 및 EE 각각 10mg/mL의 농도도 증류수에 용해한 검액 0.1mL를 취하고 증류수 8.4mL를 가한 다음 잘 혼합한 뒤, Folin-Ciocalteu 시약 0.5mL를 가하여 혼합한 다음 8분 후에 20% Na_2CO_3 용액 1mL를 가한 후 실온에서 1시간 동안 방치한 뒤 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품 gallic acid를 이용하여 검량선을 구하여 검액의 총 폴리페놀 함량을 산출하여 비교 관찰하였다.

(2) DPPH Free Radical 소거작용

한약재 추출물의 전자공여능은 안정한 free radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (이하 DPPH)을 이용한 Blois 법[23]에 준하였다. 즉, 각 추출물을 메탄올로 실험에 필요한 농도로 희석하여 각 농도당 4 mL 씩 시험관에 옮기고, 여기에 1×10^{-4}M DPPH의 메탄올 용액 1 mL을 가한 다음 잘 혼합한 후 실온에서 30분간 방치하고 520 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH를 환원시키는 정도로부터 항산화 활성을 구했다.

(3) Xanthine oxidase 저해활성

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 NBT(Nitro blue tetrazolium)법[24]에 준하였다. 즉, 0.05 M sodium carbonate buffer 0.48 mL에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.15 % BSA 및 0.75 mM NBT를 각각 0.02 mL 씩 가하여 잘 혼합하였다. 여기에 증류수에 필요한 농도로 희석한 검액 0.02 mL 씩 각각 가한 후 실온에서 10분간 방치한 다음 xanthine oxidase 6mU 를 넣어 25 ℃에서 20 분간 가온하여 반응시키고 6 mM $CuCl_2$ 0.02 mL를 넣어 반응을 종결시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid 농도를 흡광도 560 nm에서 측정하여 비교 관찰하였다.

2) 항피로작용 평가

(1) 중량부하 강제유영법

Moriura.T 등[25]의 weight-loaded forced swimming test를 개량하여 실시하였다. 25×40×17cm 의 투명한 플라스틱 용기에 증류수를 15 cm 까지 채우고 25± 1℃ 항온수조에 넣어 일정한 온도를 유지하면서 동일시간에 7 개의 수영조에서 7 마리 생쥐의 수영시간을 동시에 측정하였다. 수영실험은 체중을 달고 체중에 5 %의 납줄을 달아 목의 배면부위에 고정하고 생리식염수를 투여한 대조군과 시료를 용량별로 투여한 실험군 모두 경구투여 30 분이 경과한 시점에서 동시에 수영을 시켰으며, 수영종료는 코가 수면 아래로 잠길 정도의 수영이 5 초간 진행되어 가라앉게 될 때를 수영가능시간으로 종료하였다. 검액은 WE 및 EE 각각 1,100mg/kg 및 2,200mg/kg을 각각 4일간 1일 1회 전투여한 후 비교 관찰하였으며, 각 7마리의 쥐들을 아래 5군으로 무작위로 나누었다.

① NS 투여 후 강제유영군 (Control)

② 원기생맥산 물추출 건조분말 1,100mg/kg 경구투여군 (Water Extract of *Wongisaengmaek-san* 1,100mg/kg, WE-L)

③ 원기생맥산 물추출 건조분말 2,200mg/kg 경구투여군 (Water Extract of *Wongisaengmaek-san* 2,200mg/kg, WE-H)

④ 원기생맥산 50% 에탄올 추출 건조분말 1,100mg/kg 경구투여군 (50% Ethanol Extract of *Wongisaengmaek-san* 1,100mg/kg, EE-L)

⑤ 원기생맥산 50% 에탄올 추출 건조분말 2,200mg/kg 경구투여군 (50% Ethanol Extract of *Wongisaengmaek-san* 2,200mg/kg, EE-H)

(2) 근육피로에 대한 회복작용

Moriura.T 등[25]의 weight-loaded forced swimming test를 개량하여 실시하였다. 지름 35 cm, 높이 35 cm의 플라스틱 용기에 증류수를 높이 25 cm 까지 채우고 수온을 25±1 ℃로 일정하게 유지하면서 6 개의 수영조에서 6 마리의 흰 쥐를 동일하게 3 시간씩 수영을 시켰다. 수영실험은 4일간 시료를 투

여한 후, 흰 쥐의 체중을 달고 체중의 1 %에 상응하는 납줄을 목에 달고 마지막 시료의 경구투여 1시간이 지난 시점에서 강제 유영을 시킨 뒤 유영 3시간째 유영을 종료시킨 후 즉시 혈당을 측정한 후 마취없이 심장천자하여 채혈하였다. 검액은 WE 및 EE 각각 1,100mg/kg 및 2,200mg/kg을 각각 4일간 1일 1회 전투여한 후 비교 관찰하였으며, 각 6마리의 쥐들을 아래의 6군으로 무작위로 나누었다.

① 정상군 (Normal)

②-⑥은 2-(1) 실험의 ①-⑤과 동일.

채혈후 sst-tube 와 Naf-tube에 각각 혈액을 분주한 뒤 4 ℃ 3000 rpm에서 각각 5 분, 15 분간 원심분리하여 혈청을 얻은 뒤 Creatinine, BUN, Lactic acid dehydrogenase (LDH), Free fatty acid (FFA) 와 Lactic acid (LA)을 다음 방법에 준하여 측정하였다.

혈청을 분리하여 Creatinine 함량은 Jaffe법[26], BUN 측정은 Urease-Indophenol법[27], LDH 효소활성은 UV-Rate법[28]을 이용하여 Asan Pharm. Co.의 kit을 사용하여 Prime Automatic Clinical Chemistry Analyzer로 측정하였다. 그리고 혈청중 free fatty acid 측정은 효소법[29], lactic acid 측정은 효소적측색법[30]에 준하여 측정하였다.

3. 통계처리

실험 결과의 통계적 유의성은 Student t-test법으로 검정하여 p값을 구하였다. 모든 test에서 유의수준을 $P < 0.05$로 하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 항산화작용 평가

1) 총 Polyphenol 함량

에탄올 추출물 EE군에서 물 추출물 WE에 비해 약 2.3배 total polyphenol 함량의 증가가 있었다 (Table 2).

Table 2. Contents of Total polyphenol from *Wongisaengmaek-san*.

Sample		Total polyphenol (mg/mg)
Wongisaengmaek-san	WE	0.039
	EE	0.088

WE : Water Extract of *Wongisaengmaek-san*
EE : 50% Ethanol Extract of *Wongisaengmaek-san*

2) DPPH free radical 소거활성

항산화활성을 평가하고자 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성을 평가하여 그 결과를 EC50으로 나타내었다. 50% 에탄올 추출물 EE군은 양성대조군 vitamin C의 소거활성에는 미치지 못하나, 물추출물군 보다 양호한 결과를 나타내었다(Table 3).

3) Xanthine oxidase 저해활성

항산화활성을 평가하고자 NBT법에 따라 xanthine oxidase 저해활성을 평가하여 그 결과를 IC50으로 나타내었다. 그 결과 양성대조군 vitamin C의 저해활성에는 미치지 못하나 50% 에탄올 추출에서 물추출물보다 양호한 항산화활성을 관찰할 수 있었다(Table 3).

Table 3. Inhibitory effects of *Wongisaengmaek-san* on superoxide anion radical generation and scavenging effects of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

Groups	EC_{50}(mg/mL)	IC_{50}(mg/mL)
	DPPH[a)]	NBT[b)]
WE	0.075	0.044
EE	0.049	0.035
Positive control	0.002[c)]	0.012[c)]

WE : Water Extract of *Wongisaengmaek-san*
EE : 50% Ethanol Extract of *Wongisaengmaek-san*
a) : Concentration required for a 50% reduction in absorbance of DPPH radical at 520 nm
b) : Concentration required for a 50% reduction in absorbance of nitro blue tetrazolium(NBT) at 560 nm
c) : Positive control is Vitamin C

2. 항피로작용 평가

1) 중량부하 생쥐의 유영시간 연장에 미치는 효과

체중에 5%의 납줄을 목의 배면부위에 고정한 생쥐의 대조군 유영시간은 301.9±15.5 초로 측정되었다. 이에 대하여 이에 대하여 WE-H, EE-L, EE-H군에서 대조군에 비해 $p<0.05$의 유의한 유영시간 연장효과를 얻을 수 있었다(Table 4).

Table 4. Anti-fatigue activity of *Wongisaengmaek-san* on the duration of swimming in 5% body weight ratio loaded mice.

Groups	Dose (mg/kg.P.O)	No. of Animals	Swimming duration (sec)	Increasing rate (%)	p value
Control	-	7	301.9±15.5[a)]	-	-
WE-L	1,100	7	345.6±16.7	14.5	0.15
WE-H	2,200	7	360.6±15.2	19.5	0.01†
EE-L	1,100	7	394.6±29.7	30.7	0.01†
EE-H	2,200	7	403.3±41.0	33.6	0.03†

WE: Water Extract of Wongisaengmaek-san
EE: 50% Ethanol Extract of Wongisaengmaek-san
a) : Mean ± SD.
† : Statistically significance compared with normal data by Student t-test ($p<0.05$)

2) 근육피로에 대한 회복효과

흰쥐 체중의 1 %에 상응하는 납줄을 목에 달고 3시간동안 강제 유영시켜 피로를 유발시킨 뒤 혈중의 creatinine 함량, blood urea nitrogen(BUN) 함량, lactic dehydrogenase (LDH) 효소활성도, lactic acid 함량, free fatty acid(FFA) 함량에 미치는 검액의 효과를 검토하였다.

(1) 혈청 중 creatinine 함량에 미치는 효과

정상군의 혈청 중 creatinine 함량에 비하여 중량부하 대조군의 혈청 중 함량은 $p<0.05$의 유의한 증가를 나타내었다.

검액 WE-L군, WE-H군 및 EE-L군, EE-H군 모두 대조군에 비하여 혈청 내 creatinine 상승을 다소 억제시키는 경향을 보이나, 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 5).

Table 5. Effects of *Wongisaengmaek-san* on serum creatinine levels of forced swimming rats with 1% of the body weight attached to the neck for 3 hours.

Groups	Dose (mg/kg.P.O)	No. of Animals	Serum creatinine levels (mg/dL)	Therapeutic effect(%)	p value
Normal	-	6	0.57±0.026[a)]	-	-
Control	-	6	0.72±0.050	27.1	0.014*
WE-L	1,100	6	0.60±0.053	-78.3	0.10
WE-H	2,200	6	0.57±0.065	-98.9	0.07
EE-L	1,100	6	0.61±0.045	-68.5	0.12
EE-H	2,200	6	0.60±0.041	-79.3	0.07

WE: Water Extract of *Wongisaengmaek-san*
EE: 50% Ethanol Extract of *Wongisaengmaek-san*
a) : Mean ± SD.
* : Statistically significance compared with normal data by Student t-test ($p<0.05$)
Therapeutic effect is % of protection that is calculated as 100 (value of sample - value of control)/(value of control - value of normal)

(2) 혈청 중 BUN 함량에 미치는 효과

정상군의 혈청 중 BUN 함량에 비하여 중량부하 대조군은 BUN 함량에서 $p<0.05$의 유의한 증가를 나타내었다.

검액 WE-H군, EE-L군, EE-H군은 대조군에 비하여 각각 $p<0.05$의 유의한 상승억제효과를 나타내었다(Table 6).

(3) 혈청 중 LDH 효소활성도에 미치는 효과

정상군의 혈청 중 lactic dehydrogenase(LDH) 효소활성도는 중량부하 대조군에 비하여 $p<0.01$의 유의한 증가를 나타내었다. 검액 WE-H군, EE-L군, EE2-H군은 대조군에 비하여 $p<0.05$의 유의한 LDH 상승억제효과를 보였다(Table 7).

Table 6. Effects *of Wongisaengmaek-san* on blood urea nitrogen(BUN) levels of forced swimming rats with 1% of the body weight attached to the neck for 3 hours.

Groups	Dose(mg/kg.P.O)	No. of Animals	BUN levels(mg/dL)	Therapeutic effect(%)	p value
Normal	-	6	10.6±0.64[a)]	-	-
Control	-	6	22.3±1.47	111.0	0.001*
WE-L	1,100	6	21.2±1.32	-9.1	0.57
WE-H	2,200	6	18.4±1.13	-33.4	0.04†
EE-L	1,100	6	17.7±0.65	-39.1	0.01†
EE-H	2,200	6	17.5±0.78	-40.8	0.01†

WE: Water Extract of *Wongisaengmaek-san*
EE: 50% Ethanol Extract of *Wongisaengmaek-san*
a) : Mean ± SD
* : Statistically significance compared with normal data by Student t-test ($p<0.05$)
† : Statistically significance compared with control data by Student t-test ($p<0.05$)
Therapeutic effect is % of protection that is calculated as 100 (value of sample - value of control)/(value of control - value of normal)

Table 7. Effects of *Wongisaengmaek-San* on serum lactic dehydrogenase (LDH) activity levels of forced swimming rats with 1% of the body weight attached to the neck for 3 hours.

Groups	Dose(mg/kg.P.O)	No. of Animals	BUN levels(mg/dL)	Therapeutic effect(%)	p value
Normal	-	6	10.6±0.64[a)]	-	-
Control	-	6	22.3±1.47	111.0	0.001*
WE-L	1,100	6	21.2±1.32	-9.1	0.57
WE-H	2,200	6	18.4±1.13	-33.4	0.04†
EE-L	1,100	6	17.7±0.65	-39.1	0.01†
EE-H	2,200	6	17.5±0.78	-40.8	0.01†

WE: Water Extract of *Wongisaengmaek-san*
EE: 50% Ethanol Extract of *Wongisaengmaek-san*
a) : Mean ± SD
* : Statistically significance compared with normal data by Student t-test ($p<0.05$)
† : Statistically significance compared with control data by Student t-test ($p<0.05$)
Therapeutic effect is % of protection that is calculated as 100 (value of sample - value of control)/(value of control - value of normal)

(4) 혈청 중 lactic acid 함량에 미치는 효과

정상군의 혈청 중 lactic acid 함량에 비하여 중량부하 대조군 함량에서 $p<0.01$의 유의한 증가를 나타내었다. 검액 WE-L군은 $p<0.05$의 유의성을

보였고, WE-H군과 EE-L군은 p<0.01의 유의성을 보였으며, EE-H군은 p<0.001의 유의한 상승억제효과가 관찰되었다(Table 8).

(5) 혈청 중 FFA함량에 미치는 효과

정상군의 혈청 중 FFA 함량에 비하여 중량부하 대조군에서 p<0.001의 유의한 증가를 나타내었다. 검액 WE-H군과 EE-H군은 대조군에 비하여 p<0.001의 유의한 FFA 상승억제효과를 보였고, EE-L군은 대조군에 비하여 p<0.01의 유의한 상승억제효과를 보였다(Table 9).

Table 8. Effects of *Wongisaengmaek-san* on serum lactic acid levels of forced swimming rats with 1% of the body weight attached to the neck for 3 hours.

Groups	Dose(mg/kg.P.O)	No. of Animals	Lactic acid(mg/dL)	Therapeutic effect(%)	p value
Normal	-	6	15.2±1.85[a)]	-	-
Control	-	6	27.7±2.56	82.5	0.001[*]
WE-L	1,100	6	19.6±2.18	-64.4	0.03[†]
WE-H	2,200	6	16.8±0.90	-87.4	0.001[‡]
EE-L	1,100	6	16.4±1.12	-90.3	0.001[‡]
EE-H	2,200	6	14.9±1.63	-102.1	0.00[§]

WE: Water Extract of Wongisaengmaek-san
EE: 50% Ethanol Extract of Wongisaengmaek-san
a) : Mean ± SD.
* : Statistically significance compared with normal data by Student t-test (p<0.01)
† ‡ § : Statistically significance compared with control data by Student t-test
(† : p<0.05, ‡ : p<0.01 and § : p<0.001)
Therapeutic effect is % of protection that is calculated as 100 (value of sample - value of control)/(value of control - value of normal)

Table 9. Effects of *Wongisaengmaek-san* on serum free fatic acid(FFA) levels of forced swimming rats with 1% of the body weight attached to the neck for 3 hours.

Groups	Dose(mg/kg.P.O)	No. of Animals	FFA(μEq/L)	Therapeutic effect(%)	p value
Normal	-	6	643.0±68.3[a)]	-	-
Control	-	6	1898.0±31.5	195.2	0.00[*]
WE-L	1,100	6	1861.0±134.0	-2.9	0.77
WE-H	2,200	6	1619.5±51.3	-22.2	0.00[‡]
EE-L	1,100	6	1656.8±59.12	-19.2	0.002[†]
EE-H	2,200	6	1589.5±64.2	-24.6	0.00[‡]

WE: Water Extract of Wongisaengmaek-san
EE: 50% Ethanol Extract of Wongisaengmaek-san
a) : Mean ± SD.
* : Statistically significance compared with normal data by Student t-test (p<0.001)
† ‡ : Statistically significance compared with control data by Student t-test († : p<0.01 and ‡ : p<0.001)
Therapeutic effect is % of protection that is calculated as 100 (value of sample - value of control)/(value of control - value of normal)

Ⅳ. 考 察

生脈散은 東垣十書의 內外傷辨惑論[1]에 "以人蔘之甘 補氣 麥門冬 苦寒 瀉熱 補水之源 五味子之酸

淸肅燥金 名曰生脈散"으로 처음 언급된 이래 氣短, 倦怠, 口渴, 汗出 등 제반 氣虛證 및 虛弱人의 暑病에 선용되어 瀉熱生津함을 목표로 한 대표적인 처방이며, 이 때 生脈의 脈을 元氣라 일컬었다. 李[31]는 醫學入門에서 生津止渴하며 氣力을 湧出시켜 補五臟한다 하였고, 이 가운데 인삼은 大補元氣 固脫生津 安神하고, 麥門冬은 養陰潤肺, 淸心除煩, 益胃生津하며, 五味子는 收斂止咳藥으로 斂肺 滋腎生津 收汗 澁精하는 효능이 있다[32].

人蔘은 포제법 중 열을 가하여 쪄서 얻은 紅蔘과 가열온도를 높여 쪄서 얻은 가공인삼에서 人蔘 saponin인 ginsenoside류를 비롯한 함유성분의 물리화학적 전환 및 비극성 saponin의 함량 증가와 극성 saponin의 함량 감소를 통하여 人蔘보다 더 강한 약리활성이나 새로운 활성을 발현함이 보고되었다[33]. 따라서 본 연구에서 사용한 人蔘은 고압증기 멸균기 중에서 1시간 동안 쪄서 얻은 포제인삼을 사용하였다. 人蔘의 약리작용으로는 신경계의 흥분, 하수체 - 부신피질계의 흥분, 강심, 고지혈증 방지 및 피로회복 등 다양하게 연구 보고되었다[34]. 麥門冬은 백합과 소엽맥문동의 덩이뿌리로 다량의 포도당과 점액질로 혈당 조절작용, 간장 glycogen 증가 및 항균작용 등에 효과가 있으며[35], 추출물이 신경보호효과와 기억력 증진에 기여한다는 보고가 있다[36]. 五味子는 glucose와 fructose 위주의 유리당과 K, Ca 등의 무기질, glutamic acid를 위주로 한 아미노산이 함유되어 있는데[37], 실험적으로 Vitmin C 등의 양성대조군의 70%에 달하는 양호한 총산화능력을 보였다[38]. 茶葉(Camellia sinensis)은 차나무(Thea sinensis L., 차나무과 Theaceae)의 여린 잎으로 味苦甘 性凉 하여 淸凉, 除煩渴, 化痰, 消食, 利尿, 解毒의 효능이 있으며, 성질이 순하여 기호식품으로 일상에서 접할 수 있는 본초이다. 주요 성분으로 caffeine, theophylline, xanthine 등 alkaloid와 catechin, epicatechin 등의 polyphenol 화합물등이 있으며[15], Nakayama[16]는 catechin을 포함한 polyphenol 화합물 구조들이 H_2O_2에 의한 cytotoxicity를 억제하는 효과가 있다고 하였고, 지질 과산화 초기 단계에서 singlet oxygen과 유리기 제거 역할로 flavonoid가 효과적이라고 보고하였으며, catechin은 당뇨병 예방, 항염증, 항바이러스, 항세균효과에 대하여 동물실험 및 임상에서 효과가 있었다[17]. 大蒜은 백합과의 식물 마늘(Allium sativum L., 백합과 Liliaceae)의 鱗莖을 건조한 것으로, 항산화, 항피로, 고혈압, 해독작용, 항바이러스작용 및 항혈전작용 등의 연구가 보고되었다[19, 39-41]. 마늘은 맛이나 냄새는 물론 기능성 변화를 위하여 찌거나 굽는 등 여러 가지 포제법이 적용되고 있으며, 특히 마늘을 찌거나 가열에 의해서 총 polyphenol과 flavonoid 함량이 증가되는 등 활성이 변화됨이 밝혀졌다[42]. 따라서 본 연구에서 사용한 大蒜은 쪄서 건조한 것을 사용하였다.

Ichikawa[6], Nishida[7], Li[8] 및 김[9]은 생맥산의 항산화작용을 통하여 세포보호효과가 있음을 보여주었고, 박[10]과 김[11] 은 흰쥐의 운동피로 회복에 生脈散이 유의한 효과가 있다고 보고하였는데, 오미자 50%에탄올 추출액에서 물 추출물보다 더 높은 항산화 효과를 보인 실험[43]에 비추어 용매의 변화에 따른 추출물에서 효과 상승을 기대할 수 있었다.

이에 원기생맥산은 麥門冬, 五味子, 人蔘, 茶葉 및 大蒜으로 구성하고, 人蔘과 大蒜은 각각 고압증기멸균기에서 쪄서 건조한 것을 사용하였다. 元氣生脈散의 생리활성을 평가하고자 추출용매를 물과 50% 에탄올을 사용하여 각각 얻은 검체 물추출물 WE와 50% 에탄올 추출물 EE에 대하여 total polyphenol 함량, in vitro에서 항산화활성 및 in vivo에서 항피로효과를 고찰한 바 다음과 같다.

천연물에 함유된 tannin, flavonoid 등 polyphenol계 화합물들은 여러가지 식품에 널리 분포되어 있으며, 환원력이 강한 특성으로 전자를 공여하여 각종 radical에 대한 소거작용이 있고[44], 이는 페놀성 화합물 함량과 정의 상관관계가 있다는 사실들이 보고되면서, 페놀성 화합물의 함량은 천연물을 이용한 추출물이 갖는 잠재적인 항산화성을 검증하

는 일차적인 실험자료가 될 수 있어[45], 본 검체 중의 총 polyphenol 함량을 측정하여 비교하였다. 그 결과 50% 에탄올 추출물은 물 추출물에 비하여 2.3배의 증가가 인정되어, epicatechin 등의 tannin과 phenol성 화합물의 용출이 물보다 에탄올의 유기용매에서 더 양호하게 추출됨을 알 수 있었으며, 앞서 서술한 오미자 50% 에탄올 추출액에서 가장 고함량의 polyphenol이 추출된 김 등[43]의 실험과 동일한 결과를 보였다.

더불어 항산화활성을 평가하는 지표로서 DPPH radical 소거활성과 xanthine oxidase 저해효과를 검증하였다. 전자공여 작용은 활성 radical에 전자를 공여하여 인체의 노화 억제 작용과 식품중의 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있으며, 비교적 안정한 free radical인 DPPH가 cysteine, glutathione과 같은 황함유 아미노산과 아스코르브산, 방향족 아민 등의 물질과 만날 때 유리기가 소거되어 탈색되는 특징을 이용하여 항산화능을 측정한다. 생체내 유리기 생성계의 하나인 XOD는 purine, pyrimidine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서, 생체 내에는 주로 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 요산을 생성하는 반응의 촉매로 작용하는 과정에서 유리기를 생성한다[46]. Laughlin 등은 운동 후 골격근에서 XOD 함량이 증가됨을 보고 하였다[47]. 이에 원기생맥산에서 DPPH radical 소거활성과 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과 전반적으로 50% 에탄올 추출물에서 물추출물보다 양호한 항산화 활성을 확인할 수 있었다.

항피로효과를 평가하는 방법으로는 강제유영법이 널리 이용되고 있다. 수영운동시 물에 들어가면, 비중과 열전도성이 공기와 다르기 때문에 체온이 저하하고 열생산이 증가함으로써 많은 열량이 소비되며, 근육운동의 대부분은 골격근에서 이루어지고, 근육의 피로는 과도한 운동으로 일시에 다량의 에너지 소모와 근육에 대사산물의 축적, 그리고 그로 인한 혈액순환과 체온의 변화 등을 발생시키는 것으로 알려져 있다[48].

따라서 元氣生脈散의 항피로효과를 평가하고자 중량부하에 의한 강제유영시간 연장 및 강제유영 흰 쥐에서 혈액학적 지표에 미치는 효과를 비교하였다. 수영시간에서는 50% 에탄올 추출물 고농도 투여군 EE-H 및 물 추출물 고농도 투여군 WE-H에서 비처치 대조군에 비하여 각각 33.6%와 19.5%의 유의한 유영시간 연장효과가 인정되었으며, EE-H군이 WE-H군에 비하여 더 높은 효과를 보이고, 고농도 처치군에서 저농도 처치군보다 더 긴 연장 효과를 나타내었다.

Prolonged exercise model의 근육피로모델을 이용하여 강제유영 후 혈액 중 생화학적인 지표에 대한 변화를 元氣生脈散의 각 추출물별 및 농도별로 경구투여하고 각각의 항피로효과를 평가하였다. 실험동물을 강제유영 시키는 경우 혈청 lactic acid 함량 및 free fatty acid의 증가가 인정되어지고, 이러한 변화는 항피로효과를 지닌 약물에 의하여 개선됨을 보고한 바 있다[25].

혈청중 creatinine은 주로 근육 내에서 생성되는데, 근육 운동시에 근수축의 직접적인 에너지원인 ATP의 소모로 결핍된 ATP 보충과정에서 creatinine phosphate가 CPK에 의해 creatinine으로 분해되면서 에너지를 발생시킨다[49]. 이러한 일련의 과정의 결과로 운동시 혈청중의 creatinine의 농도가 증가하게 된다. 본 실험에서도 creatinine 함량은 강제유영을 시키지 않은 정상군에 비하여 중량 부하시킨 대조군에서 약 27%의 혈중 creatinine 함량 증가를 보였고, 이에 대하여 WE군과 EE군 모두에서 각각 대조군에 비하여 다소 억제시키는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다.

근육은 산소를 이용하여 당분해 작용을 하기 때문에 평소 산소가 충분한 상태에서는 유산소성 당분해 작용이 일어난다. 그러나 운동이 격렬하여 산소가 부족한 상태에서는 무산소성 당분해 작용이 일어나는데 이 때는 조직과 혈액 중에 pyruvate가

과량으로 존재하게 되며, 이 pyruvate는 산소공급의 부족으로 Lactate dehydrogenase(LDH)에 의하여 재산화하여 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)와 Lactic acid로 환원된다[49]. 이에 따라 혈청 LDH 활성도는 운동 후 상승하는 결과를 보이는데, 이는 골격근의 부담이 증가하는 것으로 근손상의 지표가 된다. LDH 효소활성도는 중량 부하 강제유영 대조군에서 비처치 정상군에 비하여 약 90%의 활성이 증가하여 근피로를 시사하였고, WE-H군과 EE-H군에서 각각 62.5%와 83.3%의 유의한 개선효과가 인정되었으며, EE-L군보다 EE-H군에서 더 높은 효과를 보여 50% 에탄올 추출물의 효과는 용량의존적으로 나타났다.

Lactic acid 는 혐기성 해당반응의 종말대사물로 pyruvate가 환원되어 생성된 물질이며, 주로 골격근, 적혈구, 뇌, 피부, 장관에 존재한다. 혈액 중 lactic acid의 농도는 운동이나 식사로 증가하는 것으로 알려져 있으며, 근육피로가 회복되는 과정에서 lactic acid 함량이 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[50]. Lactic acid 함량은 중량 부하하여 강제유영시킨 대조군은 비처치 정상군에 비하여 약 83%의 증가가 인정되었고, 검액 물 추출물과 50% 에탄올 추출물에서 각각 87.4%와 102.1%의 유의한 개선효과가 인정되었으며, 물 추출물 및 50% 에탄올 추출물 모두 검액에 대하여 용량의존적으로 나타났다.

지방은 에너지 생산 속도가 느리지만 많은 ATP를 생산할 수 있으며, 주로 triglyceride의 형태로 골격근 섬유나 지방세포에 저장되어 있다. 조직의 triglyceride는 글리세롤과 free fatty acid(FFA)로 분해되며 이 중 FFA가 주로 ATP생산을 담당하고 있다[29]. FFA는 총 지방산의 4~5%에 지나지 않을 정도로 대부분의 지방에 비하여 적은 비율을 차지하지만 전환이 빨라 말초조직의 중요한 에너지원이 되는데, 운동, 기아, 한랭, 공포 등의 stress에 의하여 민감하게 증가되며, 본 실험에서도 free fatty acid 함량은 중량 부하 강제유영시킨 대조군에서 비처치 정상군에 비하여 약 195%의 증가가 인정되었고, 실험군에서는 물 추출물과 50% 에탄올 추출물 처치군에서 대조군보다 각각 22.2%와 24.6%의 유의한 개선효과가 인정되었으며, 50% 에탄올 추출물은 검액의 용량의존적으로 나타내었다.

따라서 補氣藥의 대표적인 처방인 元氣生脈散에 대한 일련의 실험결과로 미루어 보아 물과 50% 에탄올 추출물 모두 항산화 및 항피로 작용이 있음이 확인되었다. 그 중 물 추출물보다는 50%에탄올 추출물에서 더 양호한 효능을 보인 것은 추출물 중의 총 polyphenol 함량과의 상관성에 기인하는 것으로 사료되고, 항피로작용 중 creatinine 변화에 元氣生脈散이 일정한 효과가 있었으나 유의하지 못했던 것은 元氣生脈散의 작용이 운동피로시의 원인 중 에너지원이 되는 물질의 공급부족을 채워주는 작용보다 산소부족으로 발생한 혐기성 대사산물의 축적을 방지하는 데에 더 효과가 있기 때문일 것으로 사료된다. 이에 따라 元氣生脈散 50% 에탄올 추출물은 임상영역에서 노화, 퇴행성 질환, 피로에 응용될 수 있을 것으로 판단되며, 아울러 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

生脈散의 구성약물 人蔘, 五味子, 麥門冬에 茶葉과 大蒜을 加味한 元氣生脈散을 물 및 50% 에탄올로 추출하여 얻은 검체에 대한 in vitro에서 총 polyphenol 함량과 DPPH 소거활성과 xanthine oxidase 저해활성을 통한 항산화 작용 및 in vivo에서 중량부하 흰 쥐의 유영시간 및 중량부하 강제유영시킨 흰 쥐에서의 항피로효과를 검토한 바는 다음과 같다.

1. 총 polyphenol 함량은 50% 에탄올 추출물이 물 추출물에 비하여 2.3배 높았다.
2. DPPH 소거활성, xanthine oxidase 저해효과 각각 50% 에탄올 추출물이 물 추출물에 비하여

증가가 인정되었다.

3. 5% 체중 부하 생쥐의 유영시간을 지표로 한 항피로효과는 물 추출물과 50% 에탄올 추출물이 각각 유의한 유영시간 연장효과가 인정되었고, 50% 에탄올 추출물에서 더 양호한 결과를 얻을 수 있었다.
4. 1% 체중 부하 흰쥐의 강제유영 후 혈액 지표로 한 항피로 효과는 물 추출물과 50% 에탄올 추출물이 각각 유의한 개선효과가 인정되었으며, 두 검체 사이에서는 50% 에탄올 추출물에서 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

결론적으로, 元氣生脈散은 물 추출물과 50% 에탄올 추출물에서 유의한 항산화 및 항피로효과가 인정되었고, 이러한 결과를 바탕으로 추출용매의 다양화를 통해 항노화와 항피로의 임상활용에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

參考文獻

1. 李東垣. (國譯) 內外傷辨惑論 蘭室秘藏. 서울: 대성문화사; 1995.
2. 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 약사심의위원회. 慶熙韓方處方集 부록. 서울: 경희대학교 한의과대학 부속한방병원; 2008, p. 5.
3. 申大澈, 金瑩均. 生脈散이 心血關係 및 局所腦血流量에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(1):153-66.
4. Chen J, Wu G, Li S, Yu T, Xie Y, Zhou L, et al. Shengmai (a traditional Chinese herbal medicine) for heart failure. Cochrane Database Syst Rev. 2007;17(4):CD005052.
5. 김승모, 윤종민, 이계승, 이용운, 나헌식, 유봉선 등. 생맥산의 뇌교종세포의 고사유도에 대한 연구. 대한한방내과학회지. 2003;24(4):870-81.
6. Ichikawa H, Wang X, Konishi T. Role of component herbs in antioxidant activity of shengmai san--a traditional Chinese medicine formula preventing cerebral oxidative damage in rat. Am J Chin Med. 2003;31(4):509-21.
7. Nishida H, Ichikawa H, Konishi T. Shengmai-san enhances antioxidant potential in C2C12 myoblasts through the induction of intracellular glutathione peroxidase. J Pharmacol Sci. 2007;105(4):342-52.
8. Li NS, Xiong XM, Liu LY. [Protective effects of shenmai injection on DPPH free radical-induced injuries in isolated hearts in rabbits]. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2003;28(3):247-50.
9. 김현경, 윤상협, 류봉하, 김진성. 生脈散의 방사선 보호효과 : 생쥐 소낭세포 재생과 Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2006;27(2):316-26.
10. 박동일, 장은진. 生脈散이 흰 위의 運動 疲勞回復에 미치는 影響. Korean J. Life Science. 1999;9(1):92-8
11. 김석, 박명득, 손낙원, 김성수. 생맥산 투여가 흰 쥐 근육 glycogen 함량 및 산소활성에 미치는 영향에 대한 조직학적 연구. 대한한의학회지. 1990;11(1):156-64.
12. 김지용. 가미생맥산이 흰 쥐의 운동피로 회복에 미치는 영향. 동의대학교대학원 석사학위논문. 1998.
13. 채기헌, 임형호. 生脈散加五加皮가 抗疲勞에 미치는 영향-生脈散과 生脈散加五加皮의 比較 硏究-. 대한추나의학회지. 2002;3(1):1-14.
14. 장주익, 김광호. 生脈散이 暑病豫防效果에 미치는 실험적 연구. 경희 한의대 논문집. 1991;14:243-54.
15. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Prev Med. 1992;21(3):334-50.
16. Nakayama T. Suppression of hydroperoxide

-induced cytotoxicity by polyphenols. Cancer Res. 1994;54(7 Suppl):1991s-3s.
17. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial effects of green tea-a review. J Am Coll Nutr. 2006;25(2):79-99.
18. 김미지, 이순재. 녹차가 유산소 운동 후 흰 쥐 간조직의 항산화 작용 및 근피로회복에 미치는 영향. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2002;31(6):1058-64.
19. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. J Nutr. 2001;131(3s):1010S-5S.
20. 성낙주. 흑마늘의 이화학적 성분 및 항산화활성. 식품저장과 가공산업. 2008;7(1):45-53.
21. 윤군애. 운동으로 유발된 산화스트레스와 마늘의 항산화 작용. 한국영양학회지. 2007;40(8):701-7.
22. Gao X, Ohlander M, Jeppsson N, Bjork L, Trajkovski V. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) during maturation. J Agric Food Chem. 2000;48(5):1485-90.
23. Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181:1198-200.
24. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in Eucalyptus rostrata Phytochemistry. 1993;33(3):557-61.
25. Moriura T, Matsuda H, Kubo M. Pharmacological study on Agkistrodon blomhoffii blomhoffii BOIE. V. anti-fatigue effect of the 50% ethanol extract in acute weight-loaded forced swimming-treated rats. Biol Pharm Bull. 1996;19(1):62-6.
26. Junge W, Wilke B, Halabi A, Klein G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe method. Clin Chim Acta. 2004;344(1-2):137-48.
27. Fawcett JK, Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. J Clin Pathol. 1960;13:156-9.
28. Wroblewski F, Ladue JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc Soc Exp Biol Med. 1955;90(1):210-3.
29. 金井泉, 金井正光, 고문사편집부 역. 임상검사법제요. 서울: 고문사; 1984, p. 413-4, 746-53.
30. Marbach EP, Weil MH. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. Clin Chem. 1967;13(4):314-25.
31. 李梴. 醫學入門. 서울: 한성사; 1984, p.347-8, 493.
32. 전국한의과대학본초학교실. 본초학. 서울: 영림사; 1999, p. 531-3, 588-9, 622-3.
33. Kwon SW, Han SB, Park IH, Kim JM, Park MK, Park JH. Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. J Chromatogr A. 2001;921(2):335-9.
34. 동의학연구소. 본초학. 서울: 여강출판사; 1994. p. 345-6, 367, 390-1.
35. 이경순, 안덕균, 신민교, 김창민 외. 완역 중약대사전. 서울: 도서출판 정담; 1998, p. 1237-48, 1648-57.
36. Kim SJ, Lee K. Extracts of Liriopsis tuber protect AMPA induced brain damage and improve memory with the activation of insulin receptor and ERK I/II. Phytother Res. 2008;22(11):1450-7.
37. 김좌숙. 오미자의 이화학적 특성 및 항산화활

성. 한국식품영양학회지. 2008;21(1):35-42.
38. 김은영, 백인희, 김정현, 김성란, 류미라. 항산화 활성을 나타내는 약용식물 소재탐색. Korean J Food Sci Technol. 2004;36(2):333-8.
39. Ried K, Frank OR, Stocks NP, Fakler P, Sullivan T. Effect of garlic on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. BMC Cardiovasc Disord. 2008;8:13.
40. Morihara N, Nishihama T, Ushijima M, Ide N, Takeda H, Hayama M. Garlic as an anti-fatigue agent. Mol Nutr Food Res. 2007 ;51(11):1329-34.
41. Tattelman E. Health effects of garlic. Am Fam Physician. 2005;72(1):103-6.
42. 최덕주, 이수정, 강민정, 조희숙, 성낙주, 신정혜. 흑마늘의 이화학적 특성. 한국식품영양과학회지. 2008;35(4):465-71.
43. 김현구, 나경민, 예수향, 한호석. 오미자 추출물의 추출특성 및 항산화 효과. Korean J Food Culutre. 2004;19(5):484-90.
44. Samaniego Sanchez C, Troncoso Gonzalez AM, Garcia-Parrilla MC, Quesada Granados JJ, Lopez Garcia de la Serrana H, Lopez Martinez MC. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. Anal Chim Acta. 2007;593(1) :103-7.
45. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. Varietal differences in the phenlic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. J Agric Food Chem. 1996;44:37-41.
46. Duke EJ, Joyce P, Ryan JP. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. Biochem J. 1973;131(2) :187-90.
47. Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. J Appl Physiol. 1990;68(6) :2337-43.
48. 金完熙. 新生理學總論. 서울: 경희대학교 한방생리학교실; 1988, p. 14, 59.
49. Jack H, David I. 운동과 스포츠 생리학. 서울: 대한미디어; 2001, p. 119-23.
50. Bermeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis. New York: Verlag Chemie Weinheim Academic Press Inc.; 1974.