

## 작약감초탕의 추출용매에 따른 성분 분석 및 항피로 효능 비교

성윤영<sup>#</sup>, 육홍주, 김동선<sup>\*</sup>

한국한의학연구원 한약연구부

### Comparison of Ingredient Quantities and Anti-Fatigue Effects of Jakyakgamcho-Tang according to Extraction Solvent

Yoon-Young Sung<sup>#</sup>, Heung Joo Yuk, Dong-Seon Kim<sup>\*</sup>

Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : Jakyakgamcho-tang has been used as analgesic and spasmolytic for muscle pain. It has reported to anti-diabetes, anti-inflammation, and neuro-protective effects. A clinical study of muscle fatigue and pain improvement effect of Jakyakgamcho-tang has been reported with increasing frequency of clinical use. However, the anti-fatigue effect of Jakyakgamcho-tang in animal model has not been studied. In this study, we compared anti-physical fatigue effects of water and 30% ethanol extract of Jakyakgamcho-tang.

**Methods** : The amounts of components contained in water and 30% ethanol extract of Jakyakgamcho-tang were compared by ultra-performance liquid chromatography. Anti-physical fatigue effects were evaluated using weight-loaded forced swimming test. We also investigated the effects of Jakyakgamcho-tang on the change of fatigue parameters by blood biochemical analysis.

**Results** : The relative amount of components of Jakyakgamcho-tang were about 19-53% higher in the 30% ethanol extract than in the water extract. In the swimming test, 30% ethanol extract showed a significantly greater anti-fatigue effects than conventional water extract of Jakyakgamcho-tang. The 30% ethanol extract of Jakyakgamcho-tang improved the exhausted swimming time (54%), and serum lactate dehydrogenase (48%) and lactic acid (60%) levels compared with water extract of Jakyakgamcho-tang.

**Conclusions** : These results showed that differences in the amounts of components by different extraction were associated with differences of anti-fatigue effect of Jakyakgamcho-tang. Thus, the 30% ethanol extraction method could be applied to dose-reducing formulations of traditional herbal medicines.

**Key words** : Jakyakgamcho-tang, anti-fatigue, extraction solvent, lactic acid, swimming time

## I. 서 론

작약감초탕(芍藥甘草湯, Jakyakgamcho-tang,

Shaoyaoگانcao-Tang in Chinese)은 복통을 치료하는 대표적인 본초인 작약(芍藥, *Paeonia lactiflora* Pallas)과 감초(甘草, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 두 개의 약재로 구성된

\*Corresponding author : Dong-Seon Kim, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Republic of Korea,

· Tel : +82-42-868-9639 · E-mail : dskim@kiom.re.kr

#First author : Yoon-Young Sung, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Republic of Korea,

· Tel : +82-42-868-9543 · E-mail : yysung@kiom.re.kr

· Received : 25 Feb 2020

· Revised : 09 Mar 2020

· Accepted : 25 Mar 2020

처방으로서 상한론(傷寒論)에 수재되어 있으며 한방(韓方)에서는 유간지통(柔肝止痛), 양혈염음(養血斂陰), 평억간양(平抑肝陽) 등의 효능이 있어 갑작스러운 복통이나 사지 근육의 경련에 대한 진통(鎮痛), 진경(鎮痙)제로 사용되어 왔다<sup>1)</sup>. 현대 약리작용으로는 작약감초탕의 항불안(不安), 항염증(炎症), 대장염 개선, 항당뇨(糖尿), 신경 보호 작용, 항혈전(抗血栓) 등을 보고하였다<sup>2,3,4,5)</sup>. 임상 연구에서는 작약감초탕의 운동(運動) 및 근육 피로(疲勞), 통증(痛症) 개선 효과 등이 보고되었다<sup>6,7)</sup>.

의료 현장에서 한의학 처방이 널리 상용화, 보급화 되기 위해서는 기존 탕약 복용의 불편함이나 부형제 첨가 등 복용량 과다로 인한 복용의 어려움에 있어서 개선이 필요하고, 의약품으로서 유효성 및 품질 안정성이 보장된 새로운 제형 개발이 요구되는데, 이를 위해서는 기존 탕액을 현대의약품 형태인 정제, 연조엑스, 캡슐제, 과립제 등의 다양한 제형으로 단순 변환하기에 앞서 탕제 자체에 대한 체계적인 기초연구가 선행되어야 한다. 이미 선행 연구에서 성분 추출에 더욱 적합하고 유용한 용매를 찾기 위해 용매 종류에 따른 성분 변화 및 효능에 관한 연구가 다수 진행되고 있으며, 동일 약재라 하여도 추출 용매에 따라 약재가 함유하고 있는 유효성분과 함량, 효능 결과가 달라짐을 보고하였다<sup>8)</sup>.

따라서 본 연구는 복용 용이성을 증대시킬 수 있는 한약 제형 기술 개발을 위한 목적으로 보형처방으로 사용되고 있는 한약 제제 처방 중 용매별 성분 비교 및 효능 동등성 비교 연구를 통하여 복용량이 감소된 제형 개발을 위한 기반 자료를 확보하고자 하였다. 이에 임상에서 사용빈도가 높은 처방 중 하나인 작약감초탕 물과 30% 에탄올의 두 용매로 추출한 추출물 각각의 운동수행능력 개선 및 항피로 효과를 비교하기 위하여 마우스에 작약감초탕 추출물을 경구 투여한 후 강제유영부하 시험을 통한 운동수행능력 및 피로 개선과 이에 관련된 요소인 혈중 lactate dehydrogenase (LDH), lactate, glucose, free fatty acid (FFA) 함량을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 구성약재

본 실험에 사용된 작약감초탕의 구성 한약재인 작약(국산: 경북 영천) 및 감초(중국산: 내몽고)는 음니허브(Daegu, Korea)에서 각각 구입하였다. 한국한의학연구원 전통의학정보포털(<https://oasis.kiom.re.kr>) 사이트에서 원료 약품 및 분량(작약 15g, 감초 7.5g)을 참고하였고 물 및 30% 에탄올(EtOH)을 각각 추출용매로 하여 1시간 환류추출 한 후 Lee 등의 방법에 의하여 농축·건조하였다<sup>9)</sup>. 작약감초탕 물 추출물의 경우 45.8%의 수율을, 30% 에탄올 추출물은 39.6%의 수율을 각각 나타내었다. UPLC 분석을 위하여 물 추출물과 30% EtOH 추출물에 대하여 20 mg을 정확히 측정 후 DMSO 넣어 2 mL로 맞춘 후 물로 10배 희석하여 0.2 μm membrane

여과 후 검액으로 사용하였다. 이동상으로 사용된 acetonitrile (ACN) 및 water는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다.

### 2. Ultra performance liquid chromatography–Quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC–qTof/MS) 분석

작약감초탕의 지표성분 탐색을 위해 Waters ACQUITY UPLC™ system(Waters Corp.)에 장착된 Q–Tof Premier ESI/MS(Waters MS Technologies, Manchester, UK)를 사용하여 대사체를 탐색하였다. 칼럼은 ACQUITY UPLC® BEH C18(100×2.1 mm, i.d., 1.7 μm, Waters, Wexford, Ireland)을 사용하였다. 칼럼 오븐 온도는 30℃, 유량은 0.4 mL/min으로 설정하였으며, UV검출 파장은 210~500 nm의 각 피크의 λ<sub>max</sub>(max plot) 크로마토그램을 선택하였고, MS를 통한 검출된 피크는 BPI (base peak intensity) 크로마토그램으로 추출하였다. 이동상은 A(물 : 포름산=99.9:0.1, v/v)와 B(아세트 나이트릴 : 포름산=99.9:0.1, v/v)를 사용하였으며, 용매 구배조건은 B를 5%로 시작하여 1분 동안 유지하였고, 12분까지 85%, 13분까지 100%로 증가시켰고 13.3분 까지 유지하였다. 13.4분까지 5%로 급격하게 감소시키고 15분 까지 초기 농도구배 조건으로 안정화하였다(총 15분). 페놀산 유도체의 질량분석은 capillary 전압(2.5 kV), sampling cone 전압(50 V), extraction cone 전압(4.0 V)으로 분석하였다. Ion source와 desolvation 온도는 각각 110, 350℃ 로 설정하였고, desolvation 가스 및 cone 가스 각각 800, 50 L/h로 설정하였다. 질량 스캔 범위는 음이온 모드(negative ion mode)에서 m/z 50~1,500이었으며, 작약감초탕의 개별 대사체들은 라이브러리에 제시된 질량 이온 패턴 분석 결과와 비교하여 동정되었다. 또한 동정된 개별 성분에 대해서는 문헌 치와 비교하여 잠정적으로 비교 동정하였다.

### 3. 피로동물모델에서의 효능평가

#### 1) 실험동물

6주령 ICR 마우스 수컷을 오리엔트바이오(주)(Seongnam, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 실험동물은 기본사료(AIN–76A diet)와 물을 자유롭게 공급하면서 온도(25±2℃), 습도(50±5%) 및 12시간 명암주기의 사육환경에서 1주일 동안 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물실험은 한국한의학연구원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 진행되었다(승인번호: KIOM–19–029).

#### 2) 실험방법

순화된 마우스는 무작위로 작약감초탕 물 추출물(JGT–WE, 400 mg/kg) 투여군, 작약감초탕 30% 에탄올 추출물(JGT–EE, 400 mg/kg) 투여군, 양성대조군 토코페롤(sigma, USA) 투여

군(100 mg/kg) 그리고 대조군(control, 생리식염수)으로 분류하였으며, 각 군은 5마리로 하였다. 작약감초탕과 토코페롤의 투여량은 1일 인체 섭취량을 기준으로 체표면 면적을 기준으로 한 수식을 이용하여 설정하였으며[Animal dose (mg/kg) = Human dose (mg/kg) × conversion factor (12.3)]<sup>10)</sup>, 건조 분말파우더를 생리식염수에 녹여 작약감초탕 400 mg/kg, 토코페롤 100 mg/kg 용량으로 투여하였다. 4일간 시료를 경구 투여 한 후 탈진 수영 운동을 평가하였다.

### 3) 탈진 수영 운동 평가

Moriura T 등의 중량부하 강제수영법(weight-loaded forced swimming test)를 보완하여 다음과 같이 실시하였다<sup>11)</sup>. 탈진 수영 능력을 평가하기 위한 장치로서 지름 17 cm 높이 27 cm 규격의 투명한 플라스틱 용기를 사용하였고, 물을 채운 후 물의 온도는 27℃로 유지했으며, 수면의 높이는 20 cm로 마우스의 꼬리가 용기의 바닥에 닿지 않을 정도로 하였다. 수영실험은 체중의 5%에 해당하는 무게 추를 꼬리에 고정한 다음 대조군과 실험군 모두 경구 투여 1시간이 경과한 시점에서 동시에 수영을 실시하였다. 수영종료는 코가 수면 아래로 5초간 진행될 때를 종료시점으로 적용하였다.

### 4) 혈액의 채취

4일 경구 투여 후 1시간이 경과한 시점에서 강제수영 운동 후 즉시 심장으로부터 채혈하여 수집하였으며, 수집된 혈액은 3,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 다음 -70℃에 보관하였다가 분석하였다.

### 5) 혈액의 생화학 분석

혈청 내 lactate, LDH, glucose, free fatty acid (FFA), creatinine, blood urea nitrogen (BUN) 농도는 생화학분석 기기(AU480 chemistry analyzer, Beckman coulter Inc., Brea, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 4. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 평균 ± 표준편차로 표기하였다. 실험군간 통계적 유의성은 통계프로그램 GraphPad Prism 7.05 (GraphPad Software Inc., USA)를 이용하여 ANOVA로 검정한 후, 사후검증(post-hoc tests)을 실시하였으며 p < 0.05 이하의 수준에서 유의성이 있다고 판정하였다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. 추출 용매별 작약감초탕의 성분 분석

작약감초탕의 구성 약재 중 작약의 주요성분인 oxypaeoniflorin (1), albiflorin (2), paeoniflorin (3), pentagalloylglucose (6), benzoyl paeoniflorin (10), 감초의 주요성분인 liquirtin apioside (4), liquirtin (5), isoliquirtin apioside (7), isoliquirtin (8), liquirtigenin (9), glycyrrhizin (11)을 분석 대상으로 0.1% formic acid가 함유된 이동상 (Water/ACN)을 기울기 용매 조건으로 하여 15분 이내에 분리하였다. PDA 검출 파장은 max plot에서 검출 하였으며, 물 및 30% EtOH 추출물에 대한 주요 성분의 피크는 각각 용리 순서, UV스펙트럼, 질량 값, 이온화 패턴 등을 문헌 치와 비교하여 동정 하였다(Fig. 1A and B).

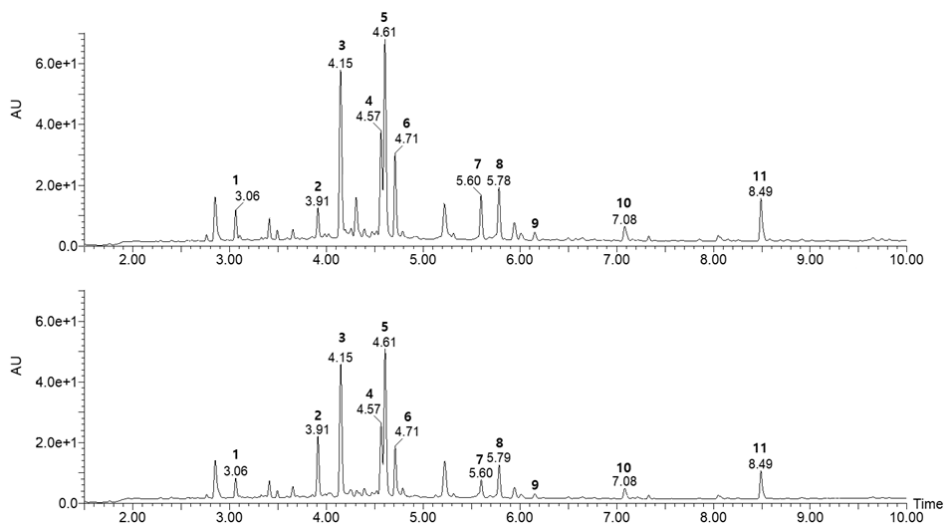


Fig. 1. UPLC-PDA profiles of Jakyakgamcho-tang extracts from the two different extraction solvents examined; (A): 30% EtOH, (B): water. oxypaeoniflorin (1), albiflorin (2), paeoniflorin (3), liquirtin apioside (4), liquirtin (5), pentagalloylglucose (6), isoliquirtin apioside (7), isoliquirtin (8), liquirtigenin (9), benzoyl paeoniflorin (10), glycyrrhizin (11).

작약감초탕 추출물 내 주요성분(1-11)의 상대적인 함량 분석 결과 albiflorin (2) 성분을 제외한 10 종의 성분(1: 20.1%, 3: 19.2%, 4: 33.5%, 5: 25.3%, 6: 37.4%, 7: 53.0%, 8: 37.2%, 9: 43.6%, 10: 36.1%, 11: 34.3%)에서 물 추출물 보다 30% 에탄올 추출물이 19%–53% 수준으로 주요성분의 상대적인 함량이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2).

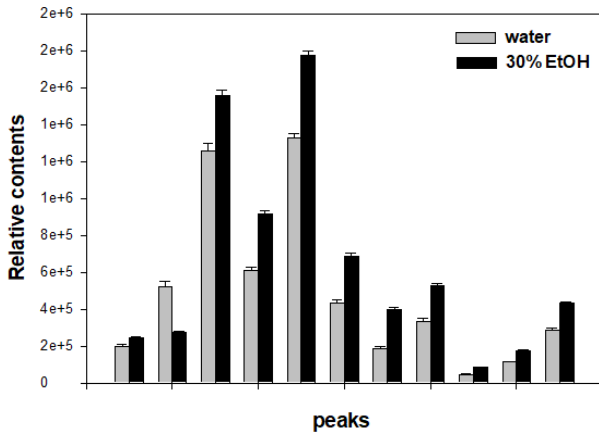


Fig. 2. Comparative change of individual marker peak contents at different extraction solvents. Calculation was based on the area of UPLC analysis. The mean  $\pm$  SD of measurements carried out on three independent samples analyzed three times.

## 2. 작약감초탕에 의한 항피로 효과

### 1) 중량부하 마우스의 유영시간 연장에 미치는 효과

대조군 유영시간은  $10.8 \pm 1.46$  min 으로 측정되었으며 물 추출물 JGT-WE는  $16.25 \pm 5.29$  min, 30% 에탄올 추출물 JGT-EE는  $25.0 \pm 2.52$  min, 양성대조군 토코페롤 투여군은  $28.4 \pm 7.08$  min으로 측정되었다. 작약감초탕 30% 에탄올 추출물(JGT-EE)은 대조군보다 131.5% 수준의 유영시간 증가율을 보였으며( $p < 0.05$ ), 물 추출물(JGT-WE)은 개체별 차이로 인해 대조군과 비교하여 유의성은 없었지만 대조군보다 50.4% 수준의 유영시간 증가율을 보였다. 따라서 작약감초탕 30% 에탄올 추출물 투여군은 물 추출물 투여군보다

수영지속 시간 증가율이 81% (약 2.6배) 증가한 것을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ , Fig. 3). 양성대조군인 토코페롤은 162.9%의 유영시간 증가율을 보였다.

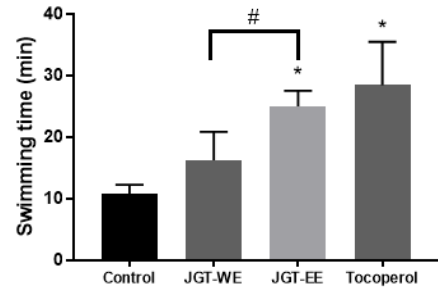


Fig. 3. Effects of Jakyakgamcho-tang on the swimming time to exhaustion of ICR mice. JGT-WE, water extract of Jakyakgamcho-tang; JGT-EE, 30% ethanol extract of Jakyakgamcho-tang. \* $p < 0.05$  compared with the control, # $p < 0.05$  compared with the JGT-WE.

### 2) 피로 관련 인자에 미치는 효과

4일 경구 투여에 따른 작약감초탕의 항피로 효능을 평가하기 위하여 탈진 수영 운동 평가 후 혈액에서 피로물질의 함량을 조사하였다. 피로 누적 시 증가하는 혈중 LDH 농도는 대조군과 비교하여 30% 에탄올 추출물 투여군 JGT-EE 투여 군에서 유의적으로 감소하였으며(control vs JGT-EE,  $1576.71 \pm 113.30 \mu\text{l}$  vs  $559.00 \pm 100.40 \mu\text{l}$ ;  $p < 0.001$ ), 이는 물 추출물 JGT-WE( $1084 \pm 75.00 \mu\text{l}$ )와 비교하여 유의하게 감소한 것을 확인하였다( $p < 0.05$ , Fig. 4A). LDH 감소율은 대조군과 비교하여 물 추출물 31.2%보다 에탄올 추출물에서 64.5%의 높은 감소율을 보여 30% 에탄올 추출물의 LDH 감소 효과가 우수함을 알 수 있었다.

혈중 lactate 농도는 대조군과 비교하여 JGT-EE 투여군에서 유의적으로 감소하여(control vs JGT-EE,  $75.23 \pm 6.01 \text{ mg/dl}$  vs  $31.06 \pm 4.07 \text{ mg/dl}$ ;  $p < 0.01$ ) 감소율은 58.7%였으며, JGT-WE( $77.55 \pm 8.71 \text{ mg/dl}$ )와 비교하여 유의하게 감소한 것을 확인하였다( $p < 0.05$ , Fig. 4B).

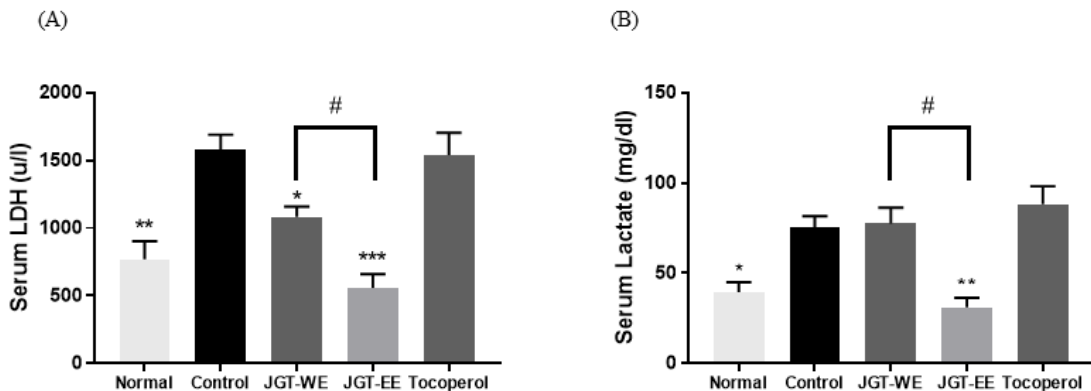


Fig. 4. Effects of Jakyakgamcho-tang on serum LDH and lactate levels in forced swimming ICR mice. (A) Serum levels of LDH, (B) Serum levels of lactate. GT-WE, water extract of Jakyakgamcho-tang; JGT-EE, 30% ethanol extract of Jakyakgamcho-tang. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared with the control; # $p < 0.05$  compared with the JGT-WE.

피로 개선관련 지표인 혈중 glucose의 농도는 30% 에탄올 JGT-EE 투여 군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였으며(control vs JGT-EE,  $157.77 \pm 15.75$  vs  $230.66 \pm 34.16$  mg/dl;  $p < 0.05$ ) 물 추출물 투여군( $213.50 \pm 1.50$  mg/dl)에서는 대조군 및 30% 에탄올 투여 군과 비교하여 유의적이 차이가 없었다(Fig. 5A). 혈중 FFA의 농도는 작약감초탕 물, 30% 에탄올 투여 군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소

하였으며(control vs JGT-WE, or JGT-EE,  $2.08 \pm 0.13$  mEq/l vs  $1.57 \pm 0.08$  mEq/l or  $1.56 \pm 0.05$  mEq/l;  $p < 0.05$ , Fig. 5B), 각각 24.5%, 25.2%의 감소 효과를 보여 두 추출물에서 유사한 효과를 보였다. BUN, creatinine의 혈중 농도는 모든 투여 군에서 통계적 유의성이 관찰되지 않았다 (Fig. 6A and B).

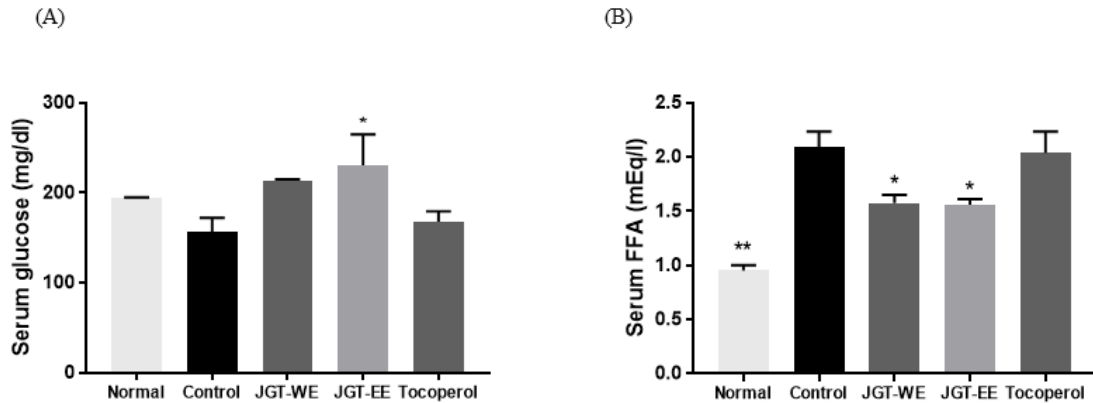


Fig. 5. Effects of Jakyakgamcho-tang on serum glucose and free fatty acid levels in forced swimming ICR mice.. (A) Serum levels of glucose. (B) Serum levels of lactate. GT-WE, water extract of Jakyakgamcho-tang; JGT-EE, 30% ethanol extract of Jakyakgamcho-tang. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with the control.

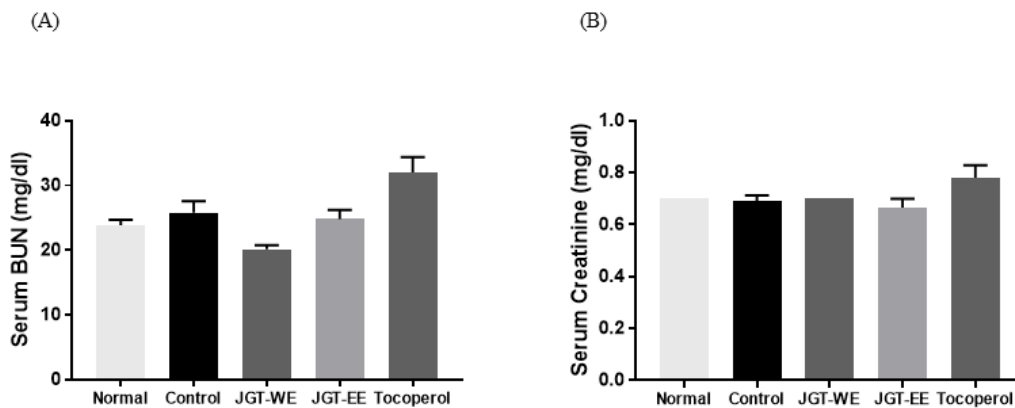


Fig. 6. Effects of Jakyakgamcho-tang on serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels in forced swimming ICR mice. (A) Serum levels of BUN. (B) Serum levels of creatinine. JGT-WE, water extract of Jakyakgamcho-tang; JGT-EE, 30% ethanol extract of Jakyakgamcho-tang.

따라서 수영지속시간 및 탈진수영운동 후 LDH, lactate, glucose, FFA, BUN, creatinine의 혈중 농도를 측정할 결과 작약감초탕 물 추출물보다 30% 에탄올 추출물이 수영지속시간 54%, LDH 48%, lactate 60%의 상대적인 수준으로 피로개선 효과를 보임을 확인할 수 있었다.

#### IV. 고 찰

전통적으로 한약 처방은 한약 처방을 구성하는 여러 한약재를 물로 끓여 전탕액 형태로 복용되었지만, 현재에는 한약처방의 대중화 및 편리성을 위하여 다양한 제형에 대한 연구가 진행되고 있고, 이미 다양한 형태로 제품화되어 공급되고 있다.

그러나 기존에 현장에서 제품화되어 공급되고 있는 한약제제의 경우 많은 복용량으로 인해 복용에 어려움이 있으므로 새로운 제형 개발에 앞서 제형에 혼합된 부형제 감소 및 추출법 최적화 등을 고려한 복용량 감소 기반 연구가 선행되어야 한다. 최근 한약에 따라 유효성분의 추출에 필요한 최적의 용매 및 추출법이 달라진다는 결과들이 다수 보고되었다<sup>12)</sup>. 이에 본 연구에서는 작약감초탕을 대한민국약전 또는 공정서에 수재되어 있는 정제수(물)로 전탕(煎湯)하여 여과하거나 에탄올 용매를 이용하여 추출하였고 두 추출물의 성분 비교 분석과 함께 효능 동등성을 비교 평가하였다.

의약품의 품목허가를 위한 식품의약품안전처의 ‘한약(생약) 제제 비임상시험 가이드라인(2017. 8.)’에 따르면 물 추출물로서 기허가 의약품이 있는 생약을 사용하여 물 또는 30% 이

하까지의 에탄올로 단순 추출하여 제조한 경구용 의약품은 규격이 다른 경우에도 안전성·유효성 측면에서 허가 의약품과 유사 동등한 범위로 인정하여 새로운 조성의 의약품과 동일한 시험자료를 요구하지만, 30%를 초과하는 농도의 에탄올로 추출한 경우는 신약과 동일하게 안전성·유효성에 관한 자료가 요구된다. 따라서 본 연구에서는 향후 개발 한약제제의 허가 용이성을 고려하여 추출용매인 에탄올 농도를 허가 최대농도인 30%로 설정하였다.

4일간 투여에 따른 작약감초탕의 항피로 효능을 평가하기 위하여 운동수행능력 평가 및 혈액에서 피로물질을 조사하였다. 운동 수행시간에 많이 노출된 근육은 glycogen 소모의 증가로 혈중 대사산물을 증대시켜 피로를 유발하게 된다<sup>13)</sup>. 운동 시 무산소성 당 분해 작용에 의해 근육 내 pyruvate가 과량으로 존재하게 되며, pyruvate는 산소공급의 부족으로 LDH에 의해 산화하여 NAD와 lactic acid로 환원되므로 운동 후 혈중 LDH 농도는 상승하게 되고, 근손상을 유발하게 된다<sup>14)</sup>. 운동 중에 축적된 젖산의 농도는 정상치에 비해 0.4% 이상 증가될 때 국소적인 산성증(metabolic acidosis)을 유발하여 근육통을 유발하게 되므로<sup>15)</sup>, 운동 후 젖산 수치의 감소는 근육회복에 매우 중요한 요인이 될 수 있다. 작약감초탕 30% 에탄올 추출물은 혈중 LDH 농도를 정상 군 수준으로 감소시켜 근피로 개선 효과가 있음을 보여주었다. 피로 누적 시 증가하는 혈중 lactate 농도는 대조군과 비교하여 작약감초탕 투여 군에서 유의적으로 감소하였으며, 피로 개선관련 지표인 혈중 glucose의 농도는 작약감초탕 30% 에탄올 투여 군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다. 한편 작약감초탕의 운동수행 능력과 관련한 임상 연구에서는 운동선수를 대상으로 작약감초탕을 24시간 섭취하고 서틀런 테스트를 수행한 결과, 남자농구선수에는 혈중 혈당과 젖산의 유의적인 변화를 보였지만 여성에서는 유의적인 변화가 없음을 보고하였다<sup>6,7)</sup>. 이는 작약감초탕 혼합음료를 이용한 24시간 단기 섭취를 통한 연구로써 30% 에탄올 추출물을 4일간 동물에 투여한 본 연구와는 차이를 보인다.

근섬유나 지방세포에 저장된 triglyceride의 분해로부터 생성된 FFA는 주로 ATP 생산을 통한 주요한 에너지원으로 작용하여 운동 시 민감하게 증가하게 된다<sup>16)</sup>. 본 연구에서 물 추출물과 30% 에탄올 추출물 투여군은 강제수영 운동 직후 혈중 FFA 농도를 유의적으로 감소시켰다. 과도한 운동으로 에너지를 소비하게 되면 대사산물이 증가하여 혈중 BUN, creatinine의 함량 또한 증가하게 되는데<sup>17)</sup> 본 연구의 모든 투여 군에서 통계적 유의성이 관찰되지 않았다. 경옥고 600 mg/kg을 4주간 경구 투여한 마우스와 헛개나무 추출물 200 mg/kg을 10일간 투여한 랫드에서<sup>13,18)</sup> 다른 피로물질과는 달리 BUN, creatinine에서 유의성이 관찰되지 않아 본 연구와 유사한 결과를 보였으며, 실험동물, 피로 유발기간, 약물 투여기간 등 실험 조건에 따라 상이한 결과를 보여 피로회복 효과를 판단하기 위한 명확한 바이오마커로 BUN, creatinine을 적용하기에는 어려움이 있을 것으로 사료된다. 또한 장시간의 지구력 운동을 위해서는 간 세포내 미토콘드리아에서의 유산소성 대사과정을 통한 ATP 생성이 중요한 에너지원으로 작용함을 보고한 바 있으므로<sup>19)</sup>, 추후 동물모델에서의 간 조직에서의

ATP 활성 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이상의 결과로부터 작약감초탕 30% 에탄올 추출물은 운동수행능력 개선 및 피로 개선 효과가 작약감초탕 물 추출물보다 우수함을 알 수 있었다.

본 연구에서 작약감초탕의 성분 분석 결과 구성 약재 중 약의 주요성분인 oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, pentagalloylglucose, benzoyl paeoniflorin, 감초의 주요성분인 liquirtin apioside, liquirtin, isoliquirtin apioside, isoliquirtin, liquirtigenin, glycyrrhizin의 11종을 검출하였으며, 상대적인 함량 분석 결과 albiflorin 성분을 제외한 10종의 성분에서 물 추출물 보다 30% 에탄올 추출물이 19%–53% 수준으로 주요성분의 상대적인 함량이 증가함을 알 수 있었다. 대한민국약전의 표준 지표물질 중 하나인 paeoniflorin의 경우 항고지혈 효과, 허혈성 뇌질환을 개선하는 항염증, 신경손상 통증 경감 효과, 소양 억제 효과, 항우울 등 다양한 효능에 대한 보고가 되어 있으며<sup>20,21,22)</sup>, Davis와 Hong 등은 작약 및 작약의 성분이 운동수행 후 피로회복에 긍정적인 영향을 주었다고 보고하였으며, 명확한 기전을 밝히지는 못했지만 세로토닌(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)의 분비를 활성화 시켜 신체적 정신적 피로 회복에 도움을 줄 수 있다고 보고하였다<sup>23,24)</sup>. HT22 세포를 이용한 연구에서는 작약감초탕의 신경손상보호 및 항산화 작용을 밝힘으로써 작약감초탕이 피로회복에 도움을 줄 수 있음을 보고하였다<sup>5)</sup>. 작약감초탕의 물과 70% 에탄올 추출용매에 의한 두 추출물의 동물모델에서의 진경(鎮靜) 효과를 측정된 결과, 물 추출물 보다 70% 에탄올 추출물의 효과가 우수하였으며<sup>25)</sup>, 물 추출물보다 70% 에탄올 추출물에서 paeoniflorin, benzoic acid, isoliquirtin, glycyrrhizin의 함량이 높아짐을 보고하여 본 연구와 유사하게 물 추출법보다 에탄올 추출법에 의해 작약감초탕의 유효성분 함량들이 증가됨을 알 수 있었다. 본 연구에서 작약감초탕의 피로 개선 효능에 기여하는 유효물질을 밝히지는 못했지만 물 추출물보다 30% 에탄올 추출물 중에 다량 함유되어 있는 유효성분 함량과의 상관성에 기인할 것으로 사료된다. 한편 작약(芍藥) 중 적작약(赤芍藥)과 백작약(白芍藥)은 유사한 효능을 보이지만 일부 연구결과에서는 효능 차이가 있음을 보고한 바, 앞서 작약 및 작약감초탕의 항산화 및 피로 개선, 근 경련 완화 효과에 있어서는 백작약이 효과가 있음을 보고하였다<sup>5,23,24,25)</sup>.

이에 따라 작약감초탕 30% 에탄올 추출물은 복용량 감소 한약 제형에 적용될 수 있으며, 추출용매 변경에 따른 작용기전 및 임상 연구에 대한 추가 심화 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서 작약감초탕(芍藥甘草湯)의 물과 30% 에탄올 추출용매에 따른 두 추출물의 주요성분 함량의 비교 분석과 함께 운동수행능력 및 피로 개선 효과를 조사하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 작약감초탕(芍藥甘草湯) 추출물 내 10종의 성분에서 물 추출물 보다 30% 에탄올 추출물이 19%–53% 수준으로 주요성분의 상대적인 함량이 증가함을 알 수 있었다.
2. 작약감초탕(芍藥甘草湯) 30% 에탄올 추출물은 피로 동물모델에서 물 추출물과 비교하여 강제 수영운동 지속 시간 54% 증가 및 혈중 LDH 48%, lactate 60%로 상대적인 농도가 감소함을 알 수 있었다.

이상의 결과, 30% 에탄올로 추출하여 제조된 작약감초탕(芍藥甘草湯)은 기존의 물 추출 작약감초탕(芍藥甘草湯)과 비교하여 주요성분이 평균적으로 30% 이상 증가하였고, 효능 또한 50% 이상 증가하였으므로 항피로 효능 및 운동 수행능력 관련하여 최소한 기존의 열수 추출 한약제형 대비 30% 이상 복용량 감소를 가져 올 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 논문은 한국한의학연구원 고유 과제인 ‘복용 용이성이 증대된 현장 수요형 한약 제형 기술 개발(KSN1911310)’과 ‘산업수요 해결형 한약 응용기술 개발(KSN2012330)’의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

### References

1. Son SK, Im CK, Kim KJ. Anxiolytic-like effects of Jackyakgamcho-tang using the elevated plus-maze in mice. *J East-West Med*. 2010 ; 35(3) : 107–23.
2. Kim BW. Anti-inflammatory Effect of Jakyakgamcho-tang. *Korean J Orient Int Med*. 2010 ; 31(2) : 365–71.
3. Seo SH, Unno T, Park SE, Kim EJ, Lee YM, Na CS, Son HS. Korean Traditional Medicine (Jakyakgamcho-tang) ameliorates colitis by regulating gut microbiota. *Metabolites*. 2019 ; 9(10) : 226.
4. Kim J, Kim CS, Kim YS, Lee IS, Kim JS. Jakyakgamcho-tang and its major component, paeonia lactiflora, exhibit potent anti-glycation properties. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2016 ; 20(4): 60–4.
5. Kang TH, Baek HY, Kim YC. Protective effect of jakyak-gamcho-tang extract and its constituents against t-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells. *Am J Chin Med*. 2005 ; 33(2) : 181–9.
6. Ha S, Lee HK, Seo DI. Effects of Peony-Licorice mixture supplementation on blood glucose and lactate levels. *Kor J Herbol*. 2012 ; 27(5) : 93–7.
7. Ha S. Effect of Penoy-Licorice mixture supplementation on post-exercise blood glucose and

- lactate in college basketball player. *The Korea Journal of Sports Science*. 2011 ; 20(2) : 993–1001.
8. Kim YJ, Kim OS, Seo CS, Lim HS, Yoo SR, J WY, Jin SE, Shin IS, Kim JH, Shin NR, Kim SS, Lee MY, J SJ, Ha HK, Shin HK. Study on comparison of ingredient quantities and biological activities of Galgeun-tang according to extraction solvent. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2012 ; 269(6) : 908–14.
9. Lee YS, Kim SH, HJ Yuk, DS Kim. *Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze (New Zealand Spinach) prevents obesity and hyperuricemia in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*. 2018 ; 10(8) : 1087.
10. Shin JW, Seol IC, Son CG. Interpretation of animal dose and human equivalent dose for drug development. *The Journal of Korean Oriental Medicine*. 2010 ; 31(3) : 1–7.
11. 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 Phar Bull*. 1996 ; 19(1) : 62–6.
12. Noh D, Choi JG, Hong SS, Oh, MS. Comparison of Anti-inflammatory effects between *Artemisia capillaris* and *Artemisia iwayomogi* by extraction solvents. *Kor J Herbol*. 2018 ; 33(3) : 55–61.
13. Kim YA, Jin SW, Kim SM, Lee GH, Kim SJ, Lee WL, Na MK, Jeong HG. Anti-fatigue effect of Kyung-Ok-Ko. *Kor J Pharmacogn*. 2016 ; 47(3) : 258–63.
14. Kim YS, Ryu BH, Kim JS. Effect of Wongisaengmaek-san extract on antioxidative and anti-fatigue activity. *Korea J Orient Int Med*. 2009 ; 30(1) : 94–106.
15. Astrand P-O, Rodahl K. *Textbook of Work Physiology*. New York : McGraw-Hill. 1986 : 300–3.
16. Bae GS, Park JH. Effects of Yukmijihwang-tang on Maximal Exercise Performance. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2015 ; 29(6) : 498–502.
17. Seo YB, Kim JS, Lee A, Roh SS, Kwon O. Antioxidant and anti-physical fatigue effects of *Polygonati Rhizoma* and steamed *Polygonati Rhizoma*. *Kor J Herbol*. 2016 ; 31(3) : 49–57.
18. Na CS, Kim HK, Kim JB, Roh HJ, Um NN, Noh HJ, Na DS, Dong MS, Hong CY. The effects of *Hovenia dulcis* fruit hot water extracts on anti-fatigue and improvement of the exercise performance in SD rats. *J Pharm Soc Korea*. 2013

- : 57(5) : 348–56.
19. Dai G, Bao T, Xu C, Cooper R, Zhu JS. CoryMax Cs-4 improves steady-state bioenergy status in mouse liver. *J Altern Complement Med*. 2001 ; 7(13) : 231–40.
  20. Zhou J, Wang L, Wnag J, Wang C, Yang Z, Wang C, Zhu Y, Zhang J. Paeoniflorin and albiflorin attenuate neuropathic pain via MAPK Pathway in chronic constriction injury rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016 ; 2016(8082753) : 1–11
  21. Mao QQ, Ip SP, Tsai SH, Che CT. Antidepressant-like Effect of Peony Glycosides in Mice. *J Ethnopharmacol*. 2008 ; 119(2) : 272–5.
  22. Shin YS, Lee SI. A Review Study of Researches on Jakyakgamcho-tang. *Herbal Formula Science*. 2017 ; 25(2) : 271–302.
  23. Davis JM, Alderson NL, Welsh RS. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutr*. 2000 ; 72(2 Suppl) : 573S–8S.
  24. Hong JA, Chung SH, Lee JS, Kim SS, Shin HD, Kim H, Jang MH, Lee TH, Lim BV, Kim YP, Kim CJ. Effects of *paeonia radix* on 5-Hydroxytryptamine synthesis and tryptophan hydroxylase expression in the dorsal raphe of exercised rats. *Biol Pharm Bull*. 2003 ; 26(2) : 166–9.
  25. Kwak D, Lee C, Kong I, Lee JC, Choi D, Na C. Comparison of the spasmolytic effects of Jakyak-Gamcho decoctions derived via different extractants. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015 ; 2015(270380) : 1–8.