응용약물학회지, The Journal of Applied Pharmacology, 9, 51-54(2001)

# 섬수(Bufonis Venenum) 추출물의 약리작용

김영훈* · 정성학 · 김종호 · 최재묵 · 지준환 · 강재구 · 박종구 · 김제학 · 조희재
제일제당 종합기술원

# Pharmacological Effects of Extract of Bufonis Venenum

**Young Hoon KIM, Seong Hak JEONG, Jong Ho KIM, Jae Mook CHOI, Joon Hwan JI, Jae Koo KANG, Jong Koo PARK, Je Hak KIM and Hi Jae CHO**

*Institute of Science and Technology, Cheil Jedang Corp., 522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea*

(Received December 21, 2000; accepted March 10, 2001)

**Abstract** – Bufonis Venenum is a toad venom and its main components are bufadienolides, namely resibufogenin, bufalin and cinobufagin. The desensitizing effect of Bufonis Venenum is useful for the treatment of the premature ejaculation in Chinese medicine. But, minor components of Bufonis Venenum cause problems such as topical burning, pain, and erectile dysfunction. To clarify and eliminate the components responsible for these side effects, we prepared two extracts of Bufonis Venenum with either 70% ethanol or ethylacetate and tested their pharmacological effects. The extract of Bufonis Venenum with 70% ethanol produced pain response in rat hind paw, and exhibited contraction of rabbit corpus cavernosal muscle in vitro. On the other hand, the ethylacetate extract did not cause pain and smooth muscle contraction. The desensitizing effect of the ethylacetate extract was similar to that of the 70% ethanol extract. In conclusion, these results show that the extract of Bufonis Venenum with ethylacetate does not have the components causing side effects and deserve further study for therapeutic potential in premature ejaculation in men.

**Key words** □ Bufonis Venenum, Pain, Local desensitizing effect, Corpus cavernosal muscle contraction

섬수(Bufonis Venenum)는 두꺼비(*Bufo bufo gargarizans* Cantor) 및 근연종의 독선분비물(toad venom)을 모은 것으로서, 디기탈리스 배당체와 같은 심장수축력(cardiotonic) 강화작용이 있어 강심이뇨제로 사용되고 있다. 강심작용을 나타내는 성분은 bufalin을 비롯한 resibufogenin, cinobu-fagin 등의 bufadienolide 이다(大韓藥典, 日本藥局方解說書). 또한 이 bufadienolides는 강력한 국소마취작용을 갖는데(中藥大辭典) 이러한 특성을 이용하여 중국황실에서는 조루증 의 예방과 치료를 위한 비방으로 사용하기도 하였다.

한편, 국내에서도 섬수를 주원료로 한 국소마취도포제제인 에스에스크림(제일제당)이 조루증의 예방 및 치료제로서 판매되고 있다. 그 효과는 bufadienolides 류가 과도한 지각신경의 기능을 저하 또는 마비시키는 것에 기인하는 것으로 알려져 있으며, 기존 조루증치료제로 발매되고 있는 lidocaine 연고나 스프레이 제제에 비하여 작용시간의 연장 및 성만족감의 증가등의 우수한 효과가 확인되었다 (Xin 등, 1995). 그러나 섬수에는 bufadienolide 이외의 성분으로 epinephrine, serotonin, bufotenin 등의 성분이 포함되어 있어(Chen 등, 1967), 동통유발 및 평활근 수축에 의한 발기부전을 야기할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 에스에스크림은 이러한 부작용을 최소화하기 위하여 섬수의 70% 에탄올 추출물에 인삼, 당귀, 사상자, 산초, 육종용, 계피, 세신, 정향등의 생약추출물을 혼합하여 개발되었다(Xin등, 1996a, 1996b)

한편 섬수를 적절한 방법으로 추출하여 섬수의 조루증에 유효한 성분만을 남기고 동통유발 등을 일으키는 성분이 포함되지 않도록 한다면 보다 우수한 조루증 치료제를 개발할 수 있을 것으로 생각된다. 이에 섬수를 70% 에탄올로 추출한 분획과 에틸아세테이트로 추출한 분획을 함유하는 제제를 만들어 랫드 발바닥 통증 유발시험, 토끼 각막반사를 이용한 국소마취작용 평가, 토끼 음경해면체 평활근 수축반응 시험을 통하여 동통유발 정도, 국소마비작용, 평활근 수축작용 등의 약리작용을 평가하여 비교하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

실험동물은 온도 23±3°C, 습도 50±10%, 환기횟수 12~13회/h의 환경에서 사육하였고, 사료와 음수는 자유롭게 섭취시켰다. 시험에 사용한 SD계 랫드(SPF, 웅성, 180~200 g)와 NewZealand White Rabbit(웅성, 2.5~3.2 kg)은 샘타코 BIOKOREA(한국)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 실험동물은 검역과 1주일 이상의 순화기간을 거친 후, 정상인 동물만을 사용하였다.

### 시험 물질

시험에 사용된 섬수 추출물은 다음과 같이 제조하여 사용하였다.

**Extract A(섬수의 70% 에탄올 추출물)**

섬수분말 50 g에 70% 에탄올 500 ml을 가하여 환류냉각기 하에서 3 시간 열탕추출한 후, 추출액을 여과하고 여액을 감압 농축하여 얻은 엑스(25 g)를 사용하였다.

**Extract B(섬수의 에틸아세테이트 추출물)**

섬수분말 50 g에 에틸아세테이트 500 ml를 가하여 환류냉각기 하에서 3 시간 열탕추출한 후, 추출액을 여과하고 여액을 감압 농축하여 얻은 엑스(5.1 g)를 사용하였다.

**Extract C(섬수의 에틸아세테이트 추출물의 잔사)**

섬수 분말 50 g을 에틸아세테이트로 추출한 후 남은잔사에 메탄올 500 ml를 가하고 가열하여 녹인다음 여과하고, 여액을 감압 농축하여 얻은 엑스(12.7 g)를 사용하였다.

SS 크림중에 섬수엑스는 완제 1 g 당 70% 에탄올 엑스로서 10 mg이 처방되어 있으며 이를 생약섬수로 환산하면 20 mg에 상당하는 양이다. 이를 근거로 위의 3 종류의 섬수 추출물로부터 생약섬수로서 1g에 해당하는 양의 Extract A, B, C 분말을(각각 0.5 g, 0.1 g, 0.25 g) 취하여 기제(propyleneglycol : poloxamer(3 : 7) 혼합액) 50 ml에 녹여 균일하게 혼합한 액상시료를 시험물질로 사용하였다.

### 사용 약물

L-phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride와 phentolamine hydrochloride는 Sigma chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.) 제품을 사용하였다. Vehicle은 에스에스크림의 기제인 propyleneglycol : poloxamer(3 : 7) 혼합액을 사용하였다.

### 시험 방법

#### 랫드 발바닥 통증유발 시험

랫드는 순화기간 동안 매일 30분씩 관찰 cage(30×30×15 cm)에 넣어 시험환경에 적응시킨 후 사용하였다. 각 시험물질 10 μl를 Hamilton 주사기로 취한 후 26G 주사바늘을 통하여 랫드의 좌측 후지 발바닥에 피하로 주사하면(intraplantar injection), 랫드는 lifting, licking등의 통증으로 인한 행동을 나타내며, 이러한 통증반응 행동을 취할때의 지속시간을 초단위로 측정하였다. 각 시험물질을 주사한 후 30분 동안의 통증반응 행동시간을 합산하여 각 시료의 통증유발 정도를 평가 하였다.

#### 토끼에서의 국소마취작용 및 안점막 자극성 평가

시험개시 전에 토끼의 각막반사 및 좌우 안구의 상태를 검안하여 건강한 토끼를 시험에 사용하였다. 토끼를 무마취하에서 보정장치로 구속한 후, 각 동물의 하안검을 안구로부터 멀리 당겨 컵 모양을 만들고, 이 결막낭에 시험물질 0.1 ml을 점안(instillation)하여 약 1분간 눈을 감은 상태로 유지시켜 검체의 손실을 막았다. 점안 후 5, 10, 20 그리고 30분에 각막을 자극모(돼지털; 선단으로 천평 저울에 누를 때 0.3 g이 되도록 한다)로 10회 자극하고 이 때 일어나는 각막반사 횟수를 측정하였다.

이러한 각막반사의 억제를 지표로 표면마취에 의한 마취작용을 평가한 후, 안점막 자극시험법(의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1998-116호)에 따라 점안 후 3일까지 유루, 충혈, 혼탁도, 부종 및 눈감음의 유무 등을 관찰하여 안점막에 대한 국소자극성 여부도 확인하였다.

#### 토끼 음경해면체 평활근에서의 작용

##### 토끼 음경해면체 평활근의 준비

토끼의 후두부를 강타하여 혼절시킨 후 경부와 서혜부의 털을 clipper로 제거하고 총경동맥을 절단하여 방혈 치사시켰다. 즉시 음경을 적출하여 산소 혼합가스 (95% $O_2$, 5% $CO_2$)가 지속적으로 공급되는 저온의 Tyrode 용액 (NaCl 145 mM, KCl 5.3 mM, $CaCl_2$ 3 mM, $NaHCO_3$ 7.1 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, $NaH_2PO_4$ 0.6 mM, Glucose 11.4 mM)에 넣고 음경해면체 주위의 결제조직 및 근육 등을 제거하였다. 흰색의 tunica albuginea에 surgical blade를 이용하여 절개선을 만든 후 조심스럽게 박리하여 순수한 음경해면체 조직만을 분리하고, 2×2×5 mm 크기로 만들어 Tyrode 용액이 들어있는 20 ml organ bath(95% $O_2$, 5% $CO_2$, 37°C)에 고정하였다. 음경해면체 평활근의 운동성은 Force displacement transducer(FT03E, Grass Quincy, USA)에 연결하여 polygraph(Polygraph 7H, Grass)로 기록하였다.

##### 음경해면체 평활근에 대한 작용

초기 장력을 0.5 g씩 30분 간격으로 증가시켜 초기 resting tension을 2 g으로 유지 안정시킨 다음 phenylephrine($5\times10^{-6}$M)을 적용하여 수축정도를 관찰하고, 3회 이상 씻어 안정상태로 회복시킨 후, 다시 PHE 수축정도를 반복하여 관찰하여 수축정도가 이전 수축의 10% 이내일 때 약물 반응시험을 시작하였다. 약물 반응시험에는 PHE와

acetylcholine($1 \times 10^{-5}$M)에 수축과 이완을 보이는 절편만을 사용하였다. 안정상태에 도달된 해면체 평활근에 vehicle 또는 extract 제제 원액 100 μl를 organ bath에 적용하고 해면체 평활근의 운동변화를 각각 관찰하였다, 또한, 수축유발물질의 규명을 위하여 α-blocker인 phentolamine($1 \times 10^{-5}$ M)을 전처치하고 5분 후에 Extract A 100 μl를 organ bath에 적용하여 평활근의 운동변화를 관찰하였다. 토끼 음경해면체 평활근에 대한 수축/이완 정도는 phenylephrine ($5 \times 10^{-5}$M)에 의한 수축(100%)에 대한 %로 나타내었다.

### 통계 처리

모든 data는 mean±SD로 나타내었으며 처치군 간의 비교는 Students *t*-test로 검정하여 $p<0.05$인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정 하였다.

## 결 과

### 랫드 발바닥 통증유발 시험

70% 에탄올 섬수엑스(Extract A)는 통증을 유발하였으나, 새로운 섬수 정제법에 따라 ethylacetate로 추출한 섬수엑스(Extract B)는 통증을 거의 일으키지 않았다. 반면, ethylacetate로 추출한 후의 잔사(Extract C)를 투여한 경우 강한 통증반응을 유발하였다(Table I).

### 토끼 각막반사를 이용한 국소 마취작용 및 국소자극성 평가

Extract A 및 Extract B 제제 모두 토끼의 각막반사를 억제하는 강한 표면(국소)마취작용을 나타내었으며, 그 정도는 동등한 수준이었다(Table II). 한편, 두 제제는 모두 점안 직후 유루, 눈감음 등의 자극반응을 보였으나 3분 이내에 회복되었으며, 이후 3일까지 안점막자극 시험법(의약품 등의 독성 시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1998-116호)에 의한 충혈, 혼탁도, 부종 유무 등을 관찰하였으나 어떠한 자극성도 확인할 수 없었다.

**Table I.** Lifting and licking response induced by intraplantar injection of Bufonis Venenum extracts to the hind paw of rats

| Treatment | Duration of lifting and licking response (sec)[a)] |
|---|---|
| Vehicle (*n*=5) | 0 |
| Extract A (*n*=5) | 23.8 ± 28.2*[a)] |
| Extract B (*n*=5) | 1.4 ± 2.5 |
| Extract C (*n*=5) | 73.8 ± 25.5* |

Extract A; Extracts of Bufonis Venenum with 70% EtOH
Extract B; Extracts of Bufonis Venenum with ethylacetate
Extract C; Remnants of Bufonis Venenum after extraction with ethylacetate
*$p<0.05$ vs Extract B treated group
[a)]This response was examined for 30 minutes.

**Table II.** Effect of Bufonis Venenum extracts on the corneal reflex in rabbits

| Treatment | Number of corneal reflex [a)] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 20 | 30 [b)] |
| Vehicle (*n=3*) | 9.7 ± 0.6[a)] | 9.0 ± 1.0 | 8.3 ± 1.5 | 9.0 ± 1.0 |
| Extract A(*n=3*) | 0.3 ± 0.5 | 0.0 ± 0.0 | 0.3 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 |
| Extract B(*n=3*) | 0.3 ± 0.6 | 0.7 ± 1.2 | 1.3 ± 0.6 | 3.0 ± 1.0 |

[a)]No. of corneal reflex/Ten times of corneal pick
[b)]Time (min) after instillation of samples

**Table III.** Effect of Bufonis Venenum extracts on the basal tension of rabbit corpus cavernosal muscle

| Treatment | % Contraction[a)] |
|---|---|
| Vehicle (*n=3*) | -3.4 ± 3.2 |
| Extract A (*n=3*) | 21.4 ± 13.7* |
| Extract B (*n=3*) | 7.0 ± 14.1 |
| Phentolamine + Extract A (*n=3*) | -15.1 ± 2.8 |

[a)]contraction % to phenylephrine-induced contraction
*$p<0.05$ vs vehicle treated group

### 토끼 음경해면체 평활근에서의 섬수엑스의 작용

안정상태에서 vehicle은 토끼음경해면체 평활근에 이완 또는 수축을 일으키지 않았으며 Extract A 제제는 21.4% 정도의 수축을 야기하였다(Table III). 이는 vehicle 처치군과 통계적으로 차이가 있는 반응으로 α-blocker 인 phentolamine의 전처치에 의하여 차단되었다. 한편, Extract B 제제는 이러한 수축야기 작용이 미약하였다.

## 고 찰

섬수는 bufalin, resibufogenin, cinobufagin 등의 bufadienolides가 주성분을 이루고 있는 두꺼비 독으로 한방제제에 강심약으로 많이 사용되어 왔다. 현재까지 섬수 엑스 또는 그 성분들은 강심, 국소마취, 호흡흥분, 중추흥분, 항종양, 이뇨 등의 약리작용을 나타낸다고 보고되어 있다(須賀俊郎, 1973; 中藥大辭典). 특히 국소마취작용은 조루증치료제의 주요 작용기전으로 생각되고 있다(Xin 등, 1996). 그러나, 섬수에는 국소마취 작용을 일으키는 성분이외에 다른 성분들도 포함되어 있으므로 에스에스크림을 사용한 극히 일부의 환자에서 나타나는 작열감, 동통등의 부작용은 주성분 이외의 기타 성분에 기인할 가능성이 있다. 이에 본 시험에서는 섬수엑스의 추출 방법을 달리하여 제조하고 그 효과를 랫드 발바닥 통증 유발시험, 토끼 각막반사를 이용한 국소마취작용 평가, 토끼 음경해면체 평활근 수축반응 시험을 통하여 확인하였다. 통증유발시험 결과 70% 에탄올로

추출한 섬수엑스(Extract A)에는 통증유발물질이 포함되어 있으나 ethylacetate로 추출한 경우(Extract B)에는 통증물질이 제거되는 것으로 보인다(Table I). 실제 ethylacetate로 추출한 후의 잔사(Extract C)가 강한 통증을 유발하는 결과가 이 사실을 입증하고 있으며, 이러한 통증 유발물질은 ethylacetate에는 추출되지 않으나 70% 알코올에는 추출되는 극성 성분으로 사료된다. 한편, Extract A나 Extract B는 모두 토끼각막반사로 평가한 국소마취작용에는 차이가 없어(Table II), 추출 방법에 따른 국소마취 약효를 나타내는 주성분(bufosteroide류)의 손실이 없음을 알 수 있었다.

또한, 발기부전 유발에 대한 가능성의 평가방법으로 토끼음경해면체 평활근에 대한 수축 여부를 관찰한 바, Extract A는 수축을 야기 시켰으나, Extract B는 수축을 야기하지 않았다. 따라서 70% 에탄올로 추출한 섬수 엑스에는 음경해면체 평활근을 수축시키는 물질이 포함되어 있는 것으로 보인다. 이러한 Extract A에 의한 수축반응은 α-blocker인 phentolamine의 전처치에 의하여 차단되어, 음경평활근 수축 야기물질은 α-adrenergic stimulator(e.g. norepinephrine, epinephrine등)인 것으로 사료된다.

결론적으로, ethylacetate로 추출한 섬수엑스는 70% 에탄올로 추출한 섬수엑스와 유사한 국소마취작용을 가지면서 랫드에서의 통증유발과 토끼음경해면체 평활근 수축유발은 감소시켜 부작용이 개선된 섬수추출물 분획임을 확인하였고, 이러한 국소마취작용은 그대로 유지하면서 통증유발등의 부작용이 감소된 섬수정제추출물을 이용한다면, 보다 개선된 조루증 치료제를 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

Chen, K. K. and Kovarikova, A. (1967) Pharmacology and toxicology of toad venom. *J. Pharm. Sci.* **56**, 1535-1541.

Xin, Z. C., Choi, Y. J., Choi, Y. D., Ryu, J. K., Seong, D. H. and Choi, H. K. (1995) Local anesthetic effect of SS-cream in patients with remature ejaculation. *J. Kor. Androl.* **13**, 149-155.

Xin, Z. C., Choi, Y. D., Hah, G. H. and Choi, H. K. (1996a) Studies for the surface desensitizing activity of SS-cream on the rabbit cornea. *Korean J. Urol.* **37**, 872-876.

Xin, Z. C., Choi, Y. D. and Choi, H. K. (1996b) The effect of SS-cream and its individual components on rabbit corpus cavernosal muscles, *Yonsei Medical journal* **37**, 312-318.

대한약전 (1997) 제7개정, 741-742. 대한민국보건복지부.

완역中藥大辭典 (1997) 도서출판 鼎談, 2376-2381.

의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청고시 제 1998-116호.

須賀俊郎 (1973) 代射 **10**, 762.

日本藥局方解說書 (1996) 제13개정, D602-D608. 廣川書店.