

동충하초 자실체를 이용한 발효 쌍화탕의 급성독성 실험

이지혜, 엄영란, 이재훈, 마진열
한국한의학연구원 신한방제제연구센터

ABSTRACT

Acute Toxicity Study on *Ssanghwa-tang* Extract Fermented with *Paecilomyces Japonica* in Mice

Ji-Hye Lee, Young-Ran Um, Jae-Hoon Lee, Jin-Yeul Ma
Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : This study was carried out to investigate the acute toxicity and safety of *Ssanghwa-tang* extract fermented with *Paecilomyces japonica*.

Methods : To evaluate the acute toxicity and safety, 0(control group), 1250, 2500 and 5000 mg/kg of *Ssanghwa-tang* and fermented *Ssanghwa-tang* extracts were orally administered to 35 male and 35 female ICR mice. After single administration, we observed number of death, general toxicity, changes of body weight, and autopsy.

Results : Compared with the control group, we could not find any toxic alteration in all treated groups (1250, 2500 and 5000 mg/kg).

Conclusions : LD₅₀ of *Ssanghwa-tang* and fermented *Ssanghwa-tang* extracts might be over 5000 mg/kg and it is very safe to ICR mice.

-
- Corresponding author : Jin-Yeul Ma, Ph.D
 - Korea Institute of Oriental Medicine(KIOM), 461-24 JeonMinDong, Yuseung-Gu, Daejeon 305-811, Korea
 - Tel : +82-42-868-9466 Fax : +82-42-868-9573 E-mail : jyema@kiom.re.kr
 - 접수 : 2011/ 05/ 20 수정 : 2011/ 05/ 27 채택 : 2011/ 06/ 13

Key word : *Ssanghwa-tang*, Fermentation, Acute toxicity, *Paecilomyces japonica*, LD₅₀

I. 서 론

쌍화탕은 黃芪建中湯에서 飴糖을 감하고 四物湯을 합방한 처방으로, 백작약, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 계피, 감초, 생강, 대추로 구성되어 있으며, 補陰血 하며 兼하여 陽氣를 溫陽하는 작용이 있어 雙和라 칭하였으며, 氣血의 부족이나 不調로 인한 여러 질환에 응용되고 있다¹⁾. 최근 생체이용률 및 체내 흡수율을 증가시키는 발효에 대한 관심이 높아짐에 따라 한약재를 발효하여 유효성분의 약효 및 흡수율 증진과 기호성 개선에 활용하고자 하는 연구가 시도되고 있다. 서 등²⁾은 금은화를 유산균 발효하여 인플루엔자 바이러스 A형에 대한 저해 효과를 보고하였고, 함 등³⁾은 유산균으로 발효한 오가피가 항당뇨 활성을 증가시킨 것을 보고하였으며, 손⁴⁾은 버섯 균사체로 발효시킨 복령과 후박에서 항산화 및 항암효과가 증가됨을 보고하였고, 이 등⁵⁾은 동충하초 균사체로 발효한 한방추출물이 항암 및 항산화에 효과가 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 임상에서 뿐 아니라 기호식품 및 건강기능성 식품으로까지 널리 이용되고 있는 쌍화탕의 생체 이용률을 증가시키기 위하여 동충하초 자실체에서 분리한 균주를 이용하여 고체발효 하였다. 동충하초는 버섯의 균사체가 곤충의 유충, 번데기 및 성충 등에 침입하여 이를 기주로 성장하는 공충기생균(Ento.mopathogenic fungi)의 일종으로, 중국의 3대 보약 중의 하나로 알려

져 왔다. 동충하초는 자양강장, 정력증강, 항피로, 운동능력 향상, 노화방지, 수명연장 등 기초대사활성 증강 작용 및 다양한 생리활성을 가지고 있어, 건강기능성 소재로 널리 이용되고 있으며, 최근 식품 및 한약재의 발효원으로 이용되고 있다⁶⁻⁸⁾. 하지만 동충하초 균주를 이용하여 고체 발효한 쌍화탕의 사용례가 보고되지 않았기에, 발효물의 안전성을 검증하고자 급성독성 실험을 실시하였다. 본 실험은 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호 의약품등의 독성시험방법의 “의약품등의 독성시험기준”(2005년 10월 25일)에 의한 한계용량을 단회 투여하는 급성독성 시험을 암·수 ICR 마우스를 이용하여 실시였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 시험물질

1) 약 재

실험에 사용한 쌍화탕의 처방 내용은 Table 1과 같으며, 백작약, 황기, 당귀, 천궁, 대추는 영천현대약업사(경북 영천시 완산동 925-15)에서, 숙지황은 진영(경북 영천시 대전동 596-1)에서, 계피는 풍산제약(경북 안동시 수하동 311-1)에서, 감초는 류수(경북 영천시 금노동 377-26)에서, 생강은 농협에서 각각 생산자 및 재배지역이 명확한 한약재를 구입하였다. 실험에 사용된 약재는 추출수율의 향상을 위하여 잘게 분쇄한 후 사용되었다.

Table 1. The Prescription of *Ssanghwa-tang*

Herb	Scientific Name		Dose(g)
芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i>	<i>Paeoniae Radix</i>	468.5
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i>	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	187.5
黃芪	<i>Astragalus membranaceus</i>	<i>Astragali Radix</i>	187.5
當歸	<i>Angelica gigas</i>	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	187.5
川芎	<i>Cnidium officinale</i>	<i>Cnidii Rhizoma</i>	187.5
桂皮	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Cinnamomi Cortex</i>	140.5
甘草	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	140.5
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	74.5
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i>	<i>Ziziphi Fructus</i>	100.0
Total weight			1674.0

2) 고체 발효

쌍화탕 처방을 고체발효하기 위하여 액체 종균을 생산한 방법은 다음과 같다. 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco 사) 평판배지에서 4℃에서 보존하면서 30일 간격으로 계대배양하였고, 균사 생장을 위해 PDA 평판배지를 이용하여 항온 배양기(HST-301M-3D)에서 25℃, 20일간 배양하였다. 이후 균사를 채취 하여 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco 사) 액체 배지에 접종하고 25℃, 120rpm에서 7일간 진탕배양(HST-201M-SLI)하여 액체 종균을 생산하였다. 고체 발효는 한방처방에 액체 종균 현탁액을 각각 10%(v/v) 수준으로 접종하여 생육온도 25℃, 상대습도 80%를 유지하면서 30일간 실시하였다. 고체 발효 시 발효조건을 잡기 위하여 다양한 조건과 발효기간을 설정하여 시험발효를 실시하여 관찰한 결과(data not shown), 위에서 서술한 방법을 발효조건으로 하였을 때 가장 만족스러운 결과를 얻어 위와 같은 조건으로 연구를 진행하였다.

3) 시험물질 추출

쌍화탕 및 동충하초 자실체로 발효시킨 쌍화탕은 건조감량의 무게를 고려하여 각 한 침 분량씩 칭량하여 1000 ml의 생수(화이트, 경남 산청군 삼장면 덕교리 800)에 1시간동안 침적시킨 다음 180분간 전탕추출법(한국, 대용약탕기)에 의한 시험

물질 추출을 실시하였다. 시험물질은 동결건조기(한국, 일신 FD5512)를 사용하여 분말 형태로 조제하여 실험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

실험구역은 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시하였으며, 암·수 ICR 마우스(오리엔트 바이오, 경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1) 4주령을 사용하였다. 동물입수 시, 외관을 육안으로 검사한 후, 일주일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시켰다. 순화 기간 중, 일반 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 암·수 35마리씩 선정하여 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시하여 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 실험동물윤리위원회의 심의를 거쳤으며, 순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수는 시간당 12~16회, 조명은 12시간 명암주기(점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150~300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 그리고 실험동물용 고형사료(PMI nutrition, USA)와 물은 자유 섭취 조건으로 하였다.

3. 실험군 및 한약재투여

투여 용량은 경구투여 한계용량⁹⁾ 5000 mg/kg를

기준으로 하여 공비 0.5로 각각 3개 군을 설정하였으며, 대조군을 포함하여 암·수 ICR 마우스를 각각 7개의 용량군으로 나누었다(Table 2). 투여 경로는 한방 입상에서 가장 널리 이용되고 있는 경구투여법을 이용하였으며, 각 용량군의 한약재

는 투여 직전에 3차 증류수에 희석하여 실험에 공시하였으며 동물을 하룻밤 절식시킨 후 배부 피부 고정법으로 고정하고 경구투여용 금속제 존테와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구 투여 하였다.

Table 2. Experimental Groups

Group	Animal Number	Number of Animal	Sex	Volume(ml/kg)	Dose(mg/kg/day)
CON*	1~5	5	Male	10	0
SWT ₁ [†]	6~10	5	Male	10	1250
SWT ₂	11~15	5	Male	10	2500
SWT ₃	16~20	5	Male	10	5000
SDT ₁ [‡]	21~25	5	Male	10	1250
SDT ₂	26~30	5	Male	10	2500
SDT ₃	31~35	5	Male	10	5000
CON	36~40	5	Female	10	0
SWT ₁	41~45	5	Female	10	1250
SWT ₂	46~50	5	Female	10	2500
SWT ₃	51~55	5	Female	10	5000
SDT ₁	56~60	5	Female	10	1250
SDT ₂	61~65	5	Female	10	2500
SDT ₃	66~70	5	Female	10	5000

* : Control group

[†] : Extraction of *Ssanghwa-tang* Medication Group

[‡] : Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* Medication Group

4. 임상증상 및 부검

임상 증상은 투여 직후부터 6시간 동안 매시간 관찰하였으며, 그 후 14일(1일 1회) 동안 일반증상 관찰법에 의하여 관찰하였다¹⁰⁾. 모든 동물에 대하여 투여 전 그리고 투여 후 1, 3, 7, 14일에 체중변화를 측정하였으며 실험 종료 후, CO₂ gas로 마취하여 후대정맥을 통한 방혈을 실시한 후, 모든 장기에 대한 육안적 병변을 관찰하였다.

5. 통계학적 방법

실험결과는 SPSS package program(version 12.0)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 각 군

의 평균치간의 차이에 대한 유의성은 one-way ANOVA(analysis of variance)와 Duncan's multiple comparison test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 치사율 및 LD₅₀

Table 3과 같이 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물을 경구로 단회 투여한 시험물질 투여군과 3차 증류수를 단회 경구 투여한 대조군의 암·수 ICR 마우스를 14일 동안 관찰한

결과 사망동물은 관찰되지 않았다.

까지 경구 투여하여도 사망을 관찰할 수 없어 LD₅₀

따라서 본 실험의 경우 한계용량(5000 mg/kg/day)

값은 5000 mg 이상으로 산출된다.

Table 3. Mortality of Male and Female ICR Mice Treated with *Ssanghwa-tang* and Fermented *Ssanghwa-tang* Extracts

Sex	Group	Days after treatment														LD ₅₀ (mg/kg)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	CON	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5000 mg/kg
	SWT ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SWT ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SWT ₃	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SDT ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SDT ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SDT ₃	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Female	CON	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5000 mg/kg
	SWT ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SWT ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SWT ₃	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SDT ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SDT ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	SDT ₃	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

CON: Control group, SWT₁: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SWT₂: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SWT₃: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, SDT₁: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SDT₂: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SDT₃: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

* : Values are expressed as No. Dead/No. animal.

2. 임상 증상

Table 4와 같이 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물을 경구로 단회 투여한 시험물질 투여군과 대조군의 암·수 ICR 마우스를 14일 동안 관찰한 결과 보행장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어들음, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등 시험물질 투여와 관련된 어떠한 임상증상의 이상소견도 관찰되지 않았다.

1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물을 경구로 단회 투여한 시험물질 투여군 및 대조군의 체중 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 경구 투여 후 시험물질 투여군과 대조군 모두 개시체중에 비하여 체중이 증가하였으며, 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 14일 모두 대조군과 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물 투여군 간의 유의적인 체중 변화의 차이는 관찰할 수 없었으며, 쌍화탕 추출물 투여군과 발효쌍화탕추출물 투여군 간의 유의적인 체중변화 차이 또한 관찰할 수 없었다.

3. 체중 변화

Table 4. Clinical Signs of Male and Female ICR Mice Treated with *Ssanghwa-tang* and Fermented *Ssanghwa-tang* Extracts

Variable	Sex	Male							Female						
	Group	C	SWT ₁	SWT ₂	SWT ₃	SDT ₁	SDT ₂	SDT ₃	C	SWT ₁	SWT ₂	SWT ₃	SDT ₁	SDT ₂	SDT ₃
	No. of animal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ataxia		0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Bizarre Behavior		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Crouching		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Diarrhea		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Edema		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Gasping		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Grooming		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Jumping		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Lacrimation		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Lethargy		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Nausea		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Nasal Discharge		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Paralysis		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Salivation		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

CON: Control group, SWT₁: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SWT₂: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SWT₃: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, SDT₁: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SDT₂: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SDT₃: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

* : Values are expressed as No. abnormal/No. animal.

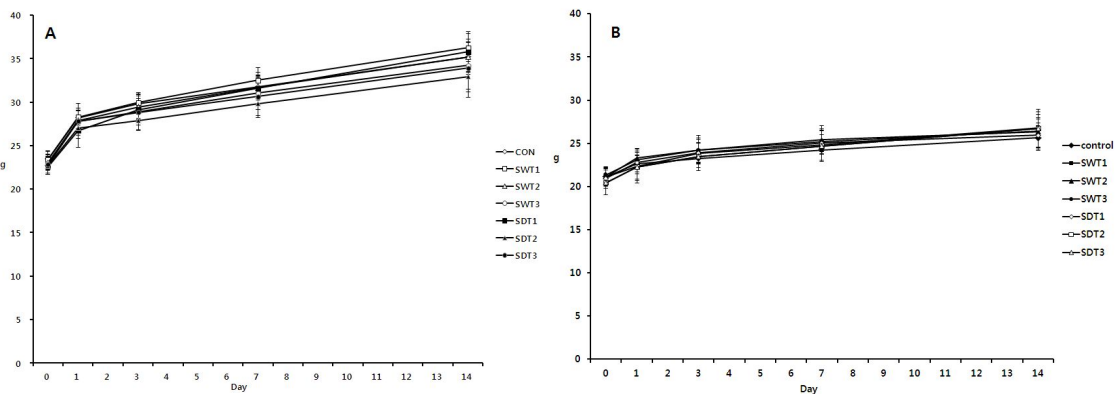


Fig. 1. Means of body weights of male(A) and female(B) ICR mice treated with *ssanghwa-tang* and fermented *ssanghwa-tang* extracts.

CON: Control group, SWT₁: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SWT₂: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SWT₃: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, SDT₁: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SDT₂: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SDT₃: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

4. 부검 소견

실험 종료 시, 모든 실험동물을 부검하여 주요 내부 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과 Table 5와 같이 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 쌍화탕 및 발효

쌍화탕 추출물 투여군과 대조군 모두에서 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 부신, 비장, 위, 대장 맹장 등의 주요 내부 장기에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변도 발견되지 않았다.

Table 5. Autopsy Finding of Male and Female ICR Mice Orally Treated with *Ssanghwa-tang* and Fermented *Ssanghwa-tang* Extracts

Variable	Sex	Male							Female						
	Group	C	SWT ₁	SWT ₂	SWT ₃	SDT ₁	SDT ₂	SDT ₃	C	SWT ₁	SWT ₂	SWT ₃	SDT ₁	SDT ₂	SDT ₃
	Dose (mg/kg)	0	1250	2500	5000	1250	2500	5000	0	1250	2500	5000	1250	2500	5000
	No. of animal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Heart		0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Lung		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Thymus		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Liver		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Spleen		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Kidney		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Adrenal gland		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Intestines		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

CON: Control group, SWT₁: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SWT₂: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SWT₃: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group, SDT₁: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Medication Group, SDT₂: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Medication Group, SDT₃: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Medication Group.

* : Values are expressed as No. abnormal/No. animal.

IV. 고 찰

쌍화탕은 현재 약제로서 뿐 아니라 기호식품 및 건강식품으로도 널리 이용되고 있는 한방처방으로 항 피로효과^{11,12)}, 간 기능 개선효과¹³⁾, 항 염증효과^{14,15)}, 진통 및 항 경련효과^{15,16)}, 성호르몬 분비 증가 효과¹⁷⁾ 등에 대한 기초 실험연구와 임상연구가 다양하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 약리성분을 강화하기 위하여 동충하초 자실체를 이용하여 고체 발효 한 쌍화탕을 제조하였으며, 효능검증 이전에 안전성에 대한 자료를 마련하기 위하여 실험

동물에 대한 급성 독성실험을 실시하였다. 투여경로는 한방에서 가장 널리 이용되고 있는 경구투여법을 사용하였으며, 투여용량은 단회 경구투여 최고용량인 5000 mg/kg⁹⁾을 고농도로 설정하였다. 즉, 쌍화탕 및 고체발효쌍화탕 추출물은 동결 건조하여 0(control), 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량으로 암·수 ICR 마우스에 단회 경구투여 하였고, 이후 14일 간 치사율, 체중, 임상증상 및 부검 후 내부 장기의 이상 병변 유무에 대한 육안적 소견을 관찰하였다. 쌍화탕 및 고체발효쌍화탕 추출물에 대한 급성독성 시험을 실시한 결과 0, 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량으로 투여한 모든 암·수 ICR 마우스에 대하여 사

망이 관찰되지 않았다. 또한 시험기간 동안 각 농도의 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물을 투여한 시험물질 투여군과 대조군에서 경구 투여 후 1, 3, 7, 14일의 체중에서 유의한 차이가 나타나지 않았고, 전 시험기간 동안 특이한 임상증상이 나타나지 않았으며, 부검조건에서도 내부 장기에 대한 어떠한 육안적 이상병변도 관찰되지 않았다. 본 실험에서는 단회투여 독성시험의 경우, 육안적 이상소견이 관찰된 장기 및 조직에 대하여 병리조직학적 검사가 포함되어야 한다는 “의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청고시 제 2005-60호, 2005. 10.21)”에 따라 모든 실험동물에서 이상소견이 관찰되지 않았기에 조직검사는 시행하지 않았으나, 단회경구투여 독성시험의 저독성 기준인 2000 mg/kg을 훨씬 상회하는 5000 mg/kg 용량에서 실험동물에 독성이 나타나지 않았기에 쌍화탕 및 발효 쌍화탕은 급성독성이 없는 안전한 물질로 생각된다. 이와 같은 결과는 이전에 실시된 유산균을 이용해 발효한 쌍화탕의 급성독성 실험결과¹⁾와 같으며, 암·수 ICR 마우스에 있어 쌍화탕 및 동충하초 발효쌍화탕의 LD₅₀은 5000 mg/kg을 상회할 것으로 생각되어 고체발효로 인한 급성독성이 발생하지 않는 것으로 사료되나, 추후 실험적 연구를 통하여 포괄적인 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 발효쌍화탕의 급성독성을 실험적으로 평가하고자 ICR 마우스에 시험물질을 투여한 후 임상증상 및 부검소견, 치사율과 체중변화 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시험기간 중 모든 실험동물에서 사망동물이 관찰되지 않아, LD₅₀ 값은 5000 mg/kg 이상으로 사료된다.
2. 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물 투여로 인한 체

중변화 및 임상증상의 이상소견은 관찰되지 않았다.

4. 실험 종료 시, 모든 동물의 장기에 대하여 육안적 병변을 관찰하였으나 이상 병변은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 동충하초 자실체에서 분리된 균주를 이용한 고체발효 쌍화탕은 실험동물에 대하여 급성 독성이 없는 한의약물로서 그 효능구명을 통한 활용이 기대된다.

감사의 말씀

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 P09020의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. 이지혜, 엄영란, 심기석, 전원경, 이재훈, 마진열. 마우스를 이용한 발효쌍화탕의 급성독성 실험. 대한한방내과학회지. 2009;30(4):780-7.
2. 서상숙, 정승기 발효 금은화의 인플루엔자 바이러스 A형에 대한 저해효과. 대한한방내과학회지. 2009;30(3):465-80.
3. 함성호, 임병탁, 유가화, 가선오, 박병현. 발효에 의한 오가피의 항당뇨 활성 촉진. 동의생리병리학회지. 2008;22(2):340-5.
4. 손미예. 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 및 항암효과. 식품산업과 영양. 2007;12(2):51-7.
5. 이형범, 김혜자, 정명수, 조화은, 최윤희, 임규상, 이기남. 송이버섯과 동충하초 균사체를 혼합 배양한 한방추출물의 발효에 의한 생리활성. 대한본초학회지. 2008;23(1):1-8.
6. 차윌석, 조배식, 박세영. 동충하초 추출물과 균

- 사체의 성분분석에 관한 연구. *Journal of life Science*. 2004;14(5):727-31.
7. 조화은, 김혜자, 최윤희, 이기남, 정명수. 동충하초 균사체를 이용한 법체 유허의 항산화활성 및 항염증 효과. *동의생리병리학회지*. 2009;23(2):360-7.
 8. 김기철, 김혜자, 조화은, 최윤희, 이기남, 정명수. 동충하초 균사체를 이용한 법체 유허이 STZ 유발 당뇨병의 혈당 및 지질대사에 미치는 영항. *동의생리병리학회지*. 2009;23(1):144-9.
 9. 조수인, 김형우, 이근진. 동백 발효 추출물 단기 투여의 활성에 대한 연구. *대한본초학회지*. 2006; 21(2):55-62.
 10. Hayes AW. *Hayes Toxicology*. New York: Raven press, 1984:17-9.
 11. 한대회, 이철완. 쌍화탕·팔물탕·육미지황탕 및 보중익기탕 전탕액의 운동부하조건에 따른 근육피로회복. *대한한의학회지*. 1975;9:185-202.
 12. 박원경, 박순달. 쌍화탕이 백서의 운동부하후 항피로와 Monoamine 함량 변화에 미치는 영항. *대구한의대학교 제한동의학술원 논문집*. 1995;1(1):130-45.
 13. 조태영, 심창구, 이민화, 김신근. 쌍화탕이 슬 포브로모프탈레인의 간클리어란스에 미치는 영항. *약제학회지*. 1987;17(2):89-93.
 14. 김일혁, 황규진. 쌍화탕의 항염증작용에 관한 연구. *생약학회지*. 1981;12(3):131-5.
 15. 정지창, 박대규. 쌍화탕의 중추억제 및 항염증 작용에 관한 연구. *약제학회지*. 1986;16(1):24-30.
 16. 한대석, 이형규, 조희재. 쌍화탕의 진통 및 항 경련효과에 관한 연구. *생약학회지*. 1983;14(2):60-3.
 17. 김용복, 권강범, 박준수, 박관하, 김복량, 이호 섭 등. 구기쌍화탕 전탕액이 웅성 백서의 성행 동 및 성호르몬에 미치는 영항. *대한동의병리 학회지*. 1999;13(1):152-7.