

## ICR 마우스를 이용한 자음강화탕 및 자음강화탕 발효물의 단회투여 독성시험

이지혜, 광동훈, 황윤환, 박화용, 마진열  
한국한의학연구원

### Single Oral Dose Toxicity Study of *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and Fermented *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) in ICR Mice

Ji-hye Lee, Dong-hoon Kwak, Yoon-hwan Hwang, Hwa-yong Park, Jin-yeul Ma  
Korea Institute of Oriental Medicine

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study aimed to evaluate the single oral dose toxicity of *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and fermented *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) with *Lactobacillus acidophyllus* in male and female ICR mice.

**Methods :** In this single oral toxicity study, non-fermented and fermented *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) were administered to male and female ICR mice as an oral dose of 500, 1000 and 2000 mg/kg. After single administration, body weight changes, general behavior, adverse effects and mortality were determined for 14 days. Serum chemistry, organ weights and necropsy findings were evaluated at the end of the experiment.

**Results :** There were no mortality or signs of toxicity for 14 days. There were also no significant differences in body weights, organ weights, or serum chemistry values between treatment and control groups.

**Conclusions :** These results indicate that the 50% lethal dose of *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) fermented with *Lactobacillus acidophyllus* may be over 2000 mg/kg. This finding can be expected to provide scientific evidence for the safety of *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) fermented with *Lactobacillus acidophyllus*.

**Key words :** *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*), fermentation, acute toxicity, safety, LD<sub>50</sub>

## 1. 서 론

자음강화탕은 龔의 《萬病回春·虛勞門》에 수록된 처방으로, 血虛陰虛로 인한 火動에 기본방인 知栢四物湯에 天靑을 去하고 맥문동 생지황을 加하여 滋陰清肺作用을 강화시키고 백출, 진피, 감초

를 加하여 理氣健脾시킴으로써 滋陰之劑의 厚重한 滋味를 잘 흡수 할 수 있도록 하였다<sup>1</sup>. 임상에서는 급만성 기관지염, 상기도염, 폐결핵, 기타 기관지 천식 등에 유용하게 활용되고 있으며<sup>2</sup>, 현재 과립 제가 국내의 의료보험 수재 처방에 포함되어 있다. 자음강화탕에 관한 실험적 연구로는, 조 등<sup>3</sup>과 정 등<sup>4</sup>의 실험적으로 손상된 폐에 대한 효능 연구, 김 등<sup>5</sup>의 알레르기성 염증반응억제 효과에 대한 연구 및 정 등<sup>6</sup>의 면역 활성화에 대한 비교 연구 등이 있다.

· 교신저자: 마진열 대전시 유성구 전민동 461-24번지  
한국한의학연구원 신한방제제연구센터  
TEL: 042-868-9466 FAX: 042-868-9573  
E-mail: jyma@kiom.re.kr

자음강화탕은 전통 한방처방으로 배당체 형태의 생약성분이 다량 함유되어 있다. 많은 배당체 성분이 비배당체로 전환되어야 약리효과를 나타내는데, 예로 숙지황의 aucubin, 감초의 glycyrrhizin, 작약의 paeoniflorin 등은 식물이나 동물조직의  $\beta$ -glucosidase의 작용으로 비배당체로 전환되어야 흡수되어 약리효과를 나타낼 수 있다<sup>7</sup>. 발효한약은 전통 한약을 미생물이 잘 이용할 수 있게 찌거나 삶은 다음, 공기 중의 미생물 또는 유산균과 같은 순수 분리 미생물을 이용하여 발효한 한약재를 말한다. 발효한약은 약효성분의 체내 흡수율 및 생체 이용률을 증가시키는 가공방법으로 고부가가치의 새로운 한약제품을 개발 할 수 있는 가공방법으로 주목받고 있다<sup>8</sup>. 본 연구에서는 자음강화탕 열수추출물을 *Lactobacillus acidophilus*를 이용하여 자음강화탕을 발효하였다. *L. acidophilus*는 당류를 발효하여 젖산을 생성하는 세균의 일종으로 사람 및 모든 포유류와 그 밖의 동물의 장에 존재하며 토착 우점 균종으로<sup>9</sup> 혈중 또는 림프절 내에서 항 내생성력의 상승과 면역 조절 기능, 발암 물질과 발암 촉진 물질은 생산하는 장내 유해 미생물의 억제와 대사활동의 변화 유도, 결장의 생리 화학적 환경 변화 및 숙주에 대한 생리적 조절에 의한 항암효과 등과 다양한 건강 증진 작용이 보고되고 있다<sup>10</sup>. 주로 우유를 이용하여 유산균 발효음료 제조에 이용되었으나, 최근 다양한 형태의 건강 기능식품 수요가 증가하면서 다양한 식품소재를 이용하여 발효하거나 첨가하여 기능성 강화 및 관능적 품질을 향상시키고자 하는 시도가 이루어지고 있다<sup>11</sup>. 본 연구에서는 자음강화탕의 효능을 강화하기 위하여 특정 유산균으로 발효하였으며, 발효물은 이전에 연구 및 개발되지 않아, 사용례가 없는 물질로 규정하

고 그 안전성에 대한 연구를 실시하였다. 안전성에 대한 연구는 식품의약품 안전청 고시 제 2009-116호 의약품 등의 독성시험방법<sup>12</sup>에 따라 단회투여 급성 독성시험을 실시하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 시험물질

실험에 사용한 처방 내용은 Table 1과 같으며, 백작약, 당귀, 맥문동, 백출, 진피, 대조, 지모는 영천현대약업사에서, 숙지황은 진영제약에서, 생지황은 본초원에서, 황백과 감초는 허브팜에서, 생각은 북대전농협에서 제조업소 및 재배지역이 명확한 한약재를 각각 구입하였다.

처방구성에 따른 각 한약재들은 중량의 10배에 달하는 생수(화이트, muhak, Korea)에 1시간동안 침적시킨 다음 180분간 전탕추출법(cosmos-660, Gyeongseo extractor, Korea)에 의한 열수 추출을 실시하였다. 자음강화탕 발효물 제조 방법은 다음과 같다. 열수 추출한 자음강화탕은 pH를 7로 조정 후, 121 °C 1.5 기압에서 15분간 가압멸균하고, 상온까지 냉각시켜 유산균을 접종하였다. 유산균의 접종은 1%(v/v)로 하였으며 37 °C의 항온배양기에서 48시간동안 통기 배양으로 액체 발효를 실시하였다. 발효에 사용한 유산균 *Lactobacillus acidophilus*(KFRI 162)는 한국식품연구원(Korea Food Research Institute: KFRI) 식품미생물 유전자은행에서 분양받았다. 시료는 동결건조기(FD5512, IlshinBioBase, Korea)를 이용하여 분말 형태로 조제 후 실험에 사용하였다. 발효 전 후의 자음강화탕의 수율은 각 39.10 %, 39.74 % 였으며, 발효 후 pH가 3.72로 감소하였다.

Table 1. The Prescription of *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*).

No.	Herb	Scientific name	Drug name	Dose (g)
1	芍藥	<i>Paeonia Latiflora</i> Pall.	<i>Paeoniae Radix</i>	260
2	當歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	240
3	熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i> Makino	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	200
4	麥門冬	<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang	<i>Liriope Tuber</i>	200
5	白朮	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	200
6	生地黃	<i>Rhemannia glutinosa</i> (Gaertner) Lidoschitz	<i>Rhemanniae Radix</i>	160
7	陳皮	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	<i>Citri Unshius Pericarpium</i>	140
8	知母	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	100
9	黃柏	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	<i>Phellodendri Cortex</i>	100
10	甘草	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Glycyrrhizae Radix Rhizoma</i>	100
11	生薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	74.5
12	大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill. var. <i>inermis</i> Rehder	<i>Zizyphi Fructus</i>	100

## 2. 실험동물 및 사육환경

단회투여 독성 실험은 암·수 ICR 마우스(SamTako, Korea)를 대상으로 수행되었다. 실험 실시 전 일주일간의 순화과정을 거친 후 실험을 수행하였으며, 일반증상에 이상이 없음을 확인한 동물을 암 수 각 35마리를 선정하여 polycarbonate cage에 5마리씩 수용하여 본 실험에 사용하였다. 본 실험은 한국한의학연구원 동물실에서 실시되었으며, 실험동물윤리위원회의 심의를 거쳤다. 순화 및 실험실시 동안 온도 23±3 °C, 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. 실험동물용 고형 사료(PMI nutrition, USA)와 물은 자유 섭취 조건으로 하였다.

## 3. 실험군 및 한약재투여

5주령 암·수 ICR 마우스에 대한 단회투여 경구독성을 평가하기 위하여 실험군은 대조군을 포함하여 총 7개 군으로 설정하였으며, 군당 5마리의 실험동물로 구성하였다. 한계용량은 OECD guide line<sup>13</sup> 및 식품의약품안전청 고시<sup>12</sup>을 참조하여 2000 mg/kg로 설정하였으며, 한계용량을 기준으로 공비 0.5로 하여 2000, 1000, 500 mg/kg으로 투여량을 설

정하여 용량의존적인 반응을 보고자 하였다. 본 연구에서는 대조군과 비교하여 시험물질 투여로 인한 급성독성 여부를 관찰 하였고, 자음강화탕과 자음강화탕 발효물을 투여한 시험물질 투여군 간의 체중 및 임상증상 등을 비교함으로써, 발효로 인한 독성증상 여부를 관찰하였다. 투여 경로는 한방 임상에서 주로 적용되고 있는 경구투여법을 이용하였으며, 경구투여용 일회용 존데와 주사관을 이용하여 배부 피부 고정법으로 몸체를 고정한 후 위 내에 경구 투여 하였다. 각 용량군의 한약재는 투여 직전에 멸균생리식염수로 희석하여 실험에 사용 하였다. 실험물질에 의한 독성을 평가하기 위하여 실험물질 투여 전 동물을 하룻밤 절식시켰으며, 투여 후 6시간 후 식이를 공급하였다.

## 4. 임상증상 및 부검

임상 증상은 투여 직후부터 6시간 동안 매시간 관찰하였으며, 그 후 14일(1일 1회) 동안 일반증상 관찰법에 의하여 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행이상 등에 대한 일반증상을 관찰하였다<sup>14</sup>. 모든 실험동물의 체중은 모든 동물에 대하여 투여 전과 투여 후 1, 3, 7, 14일에 일정한 시간에 측정하였다. 실험동물을 희생하기 전날 밤 18시간 절식시킨 후 부검하였으며, 마취제

는 Avertin(2,2,2-tribromoethanol, Aldrich, Milwaukee, WI, USA)을 사용하였다. 개복 후 복대정맥에서 혈액을 채취하였으며, 혈액 채취 및 방혈 후, 주요 내부 장기의 병변을 육안적으로 관찰하였고, 간, 심장, 신장, 폐, 비장을 적출하여 생리식염수로 3회 이상 세척 후 수분을 제거하고 무게를 측정하였다.

5. 혈액생화학적 분석

혈액 생화학적 분석은 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic-pyruvic transaminase), ALP(alkaline phosphatase), Urea, Creatinine을 자동 생화학분석기 XL-200(MS Korea Co., Ltd, Korea)을 이용하여 측정하였다. 분석 시 사용한 시료는 부검 시 복대정맥에서 채취한 혈액을 30분 이상 방치하여 응고시킨 다음 원심분리시켜 얻은 혈청을 사용하였다.

6. 통계학적 방법

실험결과는 SPSS package program(version 12.0)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 각 군의 평균치간의 차이에 대한 유의성은 one-way ANOVA (analysis of variance)와 Tukey HSD에 의하여  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 임상 증상 및 LD<sub>50</sub>

시험물질 투여 후 14일간 실험동물을 관찰한 결과(Table 2, 3), control group과 비교하여 보행장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등 시험 물질 투여와 관련된 어떠한 임상증상의 이상소견도 관찰되지 않았다. 또한 모든 실험군에서 사망이 관찰되지 않았으므로, LD<sub>50</sub> 값은 2000 mg/kg 이상으로 산출된다.

Table 2. Number of Death of Male and Female ICR Mice Treated with *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and Fermented *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) Extracts.

Sex	Group	No. of animal	Days after treatment														LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	CON	5	0 *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>2000 mg/kg
	JT <sub>1</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	JT <sub>2</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	JT <sub>3</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	FJT <sub>1</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	FJT <sub>2</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	FJT <sub>3</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Female	CON	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>2000 mg/kg
	JT <sub>1</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	JT <sub>2</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	JT <sub>3</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	FJT <sub>1</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	FJT <sub>2</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	FJT <sub>3</sub>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

CON : control group, JT<sub>1</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, JT<sub>2</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, JT<sub>3</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>1</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>2</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>3</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group

\* : Values are expressed as number of death.

Table 3. Clinical Signs of Male and Female ICR Mice Treated with *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and Fermented *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) Extracts.

Variable	Sex	Male						Female							
	Groups	CON	JT <sub>1</sub>	JT <sub>2</sub>	JT <sub>3</sub>	FJT <sub>1</sub>	FJT <sub>2</sub>	FJT <sub>3</sub>	CON	JT <sub>1</sub>	JT <sub>2</sub>	JT <sub>3</sub>	FJT <sub>1</sub>	FJT <sub>2</sub>	FJT <sub>3</sub>
	No. of animal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ataxia		0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bizarre Behavior		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crouching		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarrhea		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gaspings		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grooming		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jumping		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lethargy		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nausea		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nasal Discharge		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paralysis		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CON : control group, JT<sub>1</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, JT<sub>2</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, JT<sub>3</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>1</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>2</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>3</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group

\* : Values are expressed as number of abnormal animal.

## 2. 체중 변화

시험기간 동안 시험물질 투여군과 대조군의 체중 변화를 측정된 결과(Table 4), 모든 동물에서 개시체중에 비하여 체중의 증가가 관찰되었다. 투

여 전과 투여 후 1, 3, 7, 14일 모두 대조군과 시험군 간의 유의적인 체중변화의 차이는 관찰되지 않았으며, 자음강화탕 발효 전·후 추출물 투여군 간의 유의적인 체중변화 차이 또한 관찰되지 않았다.

Table 4. Means of Body Weights of Male (A) and Female (B) ICR Mice Treated with *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and Fermented *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) Extracts. The data are presented as mean±SD.

Sex	Groups	No. of animal	Body weight (g)				
			Days after treatment				
			0	1	3	7	14
Male	CON	5	20.01±0.82	24.79±0.81	27.66±1.59	31.31±2.46	33.04±3.13
	JT <sub>1</sub>	5	20.67±0.43	25.06±0.67	28.26±0.73	31.85±1.72	33.06±1.70
	JT <sub>2</sub>	5	19.96±0.76	24.58±0.73	27.09±1.52	29.55±2.28	31.04±2.25
	JT <sub>3</sub>	5	20.29±0.68	23.77±1.92	27.22±1.42	31.57±1.27	33.71±1.26
	FJT <sub>1</sub>	5	20.74±0.78	25.04±1.04	27.38±1.85	30.86±1.96	31.55±1.80
	FJT <sub>2</sub>	5	20.61±0.72	24.12±2.68	26.48±2.47	29.32±1.87	30.80±1.24
	FJT <sub>3</sub>	5	22.07±0.60	24.58±3.48	28.44±0.94	31.03±1.28	32.30±1.96
	Female	CON	5	18.56±1.02	21.57±0.66	22.60±1.03	23.14±1.19
JT <sub>1</sub>		5	18.84±1.36	21.85±1.42	23.03±1.54	23.80±1.71	23.93±1.60
JT <sub>2</sub>		5	18.79±1.21	21.55±1.48	23.27±1.46	24.48±2.04	24.54±1.04
JT <sub>3</sub>		5	18.58±0.47	22.05±0.44	24.01±0.84	25.42±1.28	26.61±1.62
FJT <sub>1</sub>		5	18.15±0.71	20.90±1.01	22.48±1.31	23.06±1.39	23.75±1.31
FJT <sub>2</sub>		5	18.38±0.86	21.25±0.99	22.56±1.34	23.15±1.48	23.76±1.66
FJT <sub>3</sub>		5	18.81±0.96	21.52±0.86	23.06±1.17	23.69±1.48	24.00±1.28

CON : control group, JT<sub>1</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, JT<sub>2</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, JT<sub>3</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>1</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>2</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>3</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group.

### 3. 부검 소견 및 장기무게 측정

실험 종료 시, 모든 실험동물을 부검하여 주요 내부 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과(Table 5), 모든 동물에서 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 부신, 비장, 위, 대장 맹장 등의 주요 내부 장기에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변도 발견되지 않았다. 특히 독성으로 인한 무게의 변화가 고려되는 주요 5대 장기의 무게를 측정된 결과(Table 6), 독성으로 인

한 장기무게의 변화는 관찰되지 않았다.

### 4. 혈액 생화학적 분석

혈액생화학적 분석을 실시한 결과는 Table 7과 같다. GOT, GPT, UREA, creatinine 항목을 측정 한 결과 모든 실험군의 혈액학적 검사 결과 수치가 정상범위안에 있었으며, 비정상적인 증가나 감소는 관찰되지 않았다.

Table 5. Autopsy Finding of Male and Female ICR Mice Orally Treated with *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and Fermented *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) Extracts.

Variable	Sex		Male						Female						
	Group	CON	JT <sub>1</sub>	JT <sub>2</sub>	JT <sub>3</sub>	FJT <sub>1</sub>	FJT <sub>2</sub>	FJT <sub>3</sub>	CON	JT <sub>1</sub>	JT <sub>2</sub>	JT <sub>3</sub>	FJT <sub>1</sub>	FJT <sub>2</sub>	FJT <sub>3</sub>
	Dose (mg/kg)	0	500	1000	2000	500	1000	2000	0	500	1000	2000	500	1000	2000
	No. of animal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Heart		0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thymus		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adrenal gland		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intestines		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CON : control group, JT<sub>1</sub> : extraction of *Jaemganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, JT<sub>2</sub> : extraction of *Jaemganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, JT<sub>3</sub> : extraction of *Jaemganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>1</sub> : extraction of ferment *Jaemganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>2</sub> : extraction of ferment *Jaemganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>3</sub> : extraction of ferment *Jaemganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group

\* : Values are expressed as number of abnormal animal.

Table 6. Organ Body Index of Male and Female ICR Mice Orally Treated with *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and Fermented *Jaemganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) Extracts.

Sex	Groups	No. of animal	Organ Body Index (%)					
			Liver	Kidney-L	Kidney-R	Spleen	Heart	Lung
Male	CON	5	5.56±0.54	0.78±0.02	0.77±0.05	0.35±0.02	0.48±0.06	0.65±0.07
	JT <sub>1</sub>	5	4.91±0.44	0.73±0.06	0.71±0.06	0.34±0.02	0.44±0.03	0.58±0.04
	JT <sub>2</sub>	5	5.34±0.47	0.75±0.08	0.69±0.11	0.32±0.04	0.47±0.02	0.68±0.06
	JT <sub>3</sub>	5	5.46±0.42	0.79±0.11	0.75±0.11	0.39±0.05	0.46±0.04	0.62±0.04
	FJT <sub>1</sub>	5	4.00±2.00	0.76±0.06	0.78±0.02	0.41±0.07	0.46±0.02	0.61±0.05
	FJT <sub>2</sub>	5	5.13±0.18	0.76±0.15	0.73±0.07	0.35±0.07	0.46±0.03	0.61±0.07
	FJT <sub>3</sub>	5	5.13±0.48	0.74±0.02	0.75±0.02	0.33±0.03	0.47±0.07	0.72±0.05
Female	CON	5	3.75±0.07	0.57±0.07	0.55±0.05	0.44±0.06	0.43±0.02	0.67±0.04
	JT <sub>1</sub>	5	4.07±0.19	0.62±0.03	0.61±0.03	0.39±0.05	0.47±0.03	0.68±0.06
	JT <sub>2</sub>	5	4.14±0.35	0.57±0.06	0.59±0.07	0.44±0.09	0.47±0.06	0.69±0.03
	JT <sub>3</sub>	5	4.09±0.28	0.60±0.08	0.57±0.05	0.41±0.08	0.48±0.05	0.71±0.07
	FJT <sub>1</sub>	5	3.74±0.16	0.57±0.03	0.57±0.03	0.44±0.02	0.46±0.06	0.70±0.04
	FJT <sub>2</sub>	5	4.04±0.48	0.53±0.05	0.55±0.04	0.43±0.07	0.43±0.02	0.70±0.07
	FJT <sub>3</sub>	5	4.17±0.59	0.65±0.08	0.58±0.09	0.57±0.24	0.50±0.02	0.75±0.02

CON : control group, JT<sub>1</sub> : extraction of *Jaemganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, JT<sub>2</sub> : extraction of *Jaemganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, JT<sub>3</sub> : extraction of *Jaemganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>1</sub> : extraction of ferment *Jaemganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>2</sub> : extraction of ferment *Jaemganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>3</sub> : extraction of ferment *Jaemganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group. The data are presented as mean±SD.

Organ body index = organ weight (g) / body weight (g) × 100

Table 7. Levels of Serum Chemistry Analysis in Male and Female ICR Mice Orally Treated with *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) and Fermented *Jaeumganghwa-tang* (*Ziyinjianghuo-tang*) Extracts.

Sex	Groups	No. of animal	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALKALINE PHOSPHATASE (IU/L)	UREA (mg/dl)	CREATININE (mg/dl)
Male	CON	5	39.60±12.52	17.60±5.37	113.60±42.95	14.88±4.57	0.72±0.18
	JT <sub>1</sub>	5	59.20±25.20	25.60±11.52	132.00±29.12	20.72±6.74	0.96±0.22
	JT <sub>2</sub>	5	44.00±16.00	20.00±8.00	132.80±15.34	19.04±5.23	0.80±0.00
	JT <sub>3</sub>	5	45.60±5.37	21.20±9.76	99.20±31.67	14.92±5.91	0.72±0.33
	FJT <sub>1</sub>	5	64.00±26.08	19.20±5.93	120.80±47.95	17.72±4.10	0.80±0.00
	FJT <sub>2</sub>	5	43.20±8.67	16.80±3.35	108.40±42.53	15.04±3.22	0.76±0.09
	FJT <sub>3</sub>	5	59.00±21.51	26.00±14.79	148.00±27.13	21.30±1.83	0.90±0.20
Female	CON	5	64.80±24.23	19.20±9.96	140.00±18.55	12.08±3.85	0.80±0.00
	JT <sub>1</sub>	5	67.20±14.81	15.20±5.22	119.20±24.72	10.24±3.00	0.72±0.18
	JT <sub>2</sub>	5	66.40±16.64	20.00±8.00	112.00±14.97	10.96±3.72	0.80±0.00
	JT <sub>3</sub>	5	71.20±15.59	16.00±2.83	96.00±42.24	11.68±4.30	0.80±0.00
	FJT <sub>1</sub>	5	80.80±37.03	13.60±2.19	128.00±26.53	11.84±4.46	0.88±0.18
	FJT <sub>2</sub>	5	107.20±63.96	42.40±57.31	120.80±49.19	10.88±4.34	0.80±0.00
	FJT <sub>3</sub>	5	78.40±25.08	14.40±4.56	148.00±19.60	13.52±5.09	0.80±0.00

CON : control group, JT<sub>1</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, JT<sub>2</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, JT<sub>3</sub> : extraction of *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>1</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 500 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>2</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 1000 mg/kg (day) medication group, FJT<sub>3</sub> : extraction of ferment *Jaeumganghwa-tang* 2000 mg/kg (day) medication group

The data are presented as mean±SD.

#### IV. 고찰

자음강화탕은 백작약, 당귀, 숙지황, 맥문동, 백출, 생지황, 진피, 지모, 황백, 감초, 생강, 대조로 구성된 한방처방으로, 陰虛火動, 發熱咳嗽, 吐痰喘急, 盜汗口乾, 咯唾血, 將成勞瘵 등에 사용한다고 기록되었으며, 항염증, 해열, 진통, 항경련, 면역활성에 대한 이화학적 연구가 보고되었다. 한약의 형태는 탕제, 환제, 산제, 고제였으나 최근 한약 및 한약재에 미생물을 배양하여 얻은 부산물도 새로운 제형으로 추가되었다. 발효한약은 약효성분의 체내 흡수율과 생체이용률을 증가시켜 약리적 기능성뿐만 아니라 한약의 제형 개량과 포제 방법을 향상시키고, 이를 통해 한약의 새로운 수요를 창출하고

고부가가치의 한약제품을 개발할 수 있어 한의학계에서 관심을 받고 있다<sup>15,16</sup>. 박 등<sup>17</sup>에 따르면 당귀를 청국균속 미생물로 발효 시 nodakenin과 decursin 함량이 유의하게 감소하였으며, 음 등<sup>18</sup>은 쌍화탕을 *Lactobacillus. sp* 발효 시 간독성이 개선됨을 보고하였고, Chung 등<sup>19</sup>은 한약재 복합물을 유산균 발효한 결과 아토피 증상 개선효과가 있음을 보고하였다. 한약을 구성하는 배당체, 다당체의 약효성분은 그 자체로 쉽게 흡수되지 않으나, 장내 세균에 의해 당 가수분해반응, 메틸화반응, 수산화반응이 일어나 흡수되기 쉬운 형태로 전환되는 것으로 알려져 있다<sup>20</sup>. 본 연구에서는 대표적인 장내 유산균의 일종으로 식품 발효원으로 사용되는 *Lactobacillus acidophilus*를 이용하여 발효한약을 제조하였으며, 그 결과 발효 전 7 이었던 pH가 3.72로 감소되었



다. 이는 균주의 산 생성능력을 보여주는 것으로 발효가 진행되었음을 알 수 있다. 자음강화탕은 실제 임상에서 사용되는 한약처방이나, 발효물은 사용례가 없는 물질로, 효능평가 이전에 그 안전성에 대한 연구가 반드시 선행되어야 한다. 이에 본 연구에서는 자음강화탕 발효물의 안전성에 대한 연구를 위해 발효이전의 탕제 및 발효물의 실험동물에 대한 단회투여 독성실험을 실시하였다. 본 시험물질은 경구용 제제로 임상에서 사용되므로, 투여 경로는 경구로 하였으며 용량은 0(control), 2000, 1000, 500 mg/kg 으로 설정하였다. 시험 관찰기간은 14일로 설정하였으며 실험기간동안 사망율, 체중, 임상증상을 관찰하였고, 실험종료 후 부검하여 내부 장기의 이상 병변 유무에 대한 육안적 소견 관찰, 주요 내부장기의 무게, 혈액 생화학 검사를 실시하였다. 실험물질의 급성독성에 대한 OECD guideline에 따르면, 2000 mg/kg의 용량에서 사망개체가 없는 투여물질은 무독성으로 간주하고 있다. 본 실험에서는 모든 투여 용량에서 사망개체가 없어 LD<sub>50</sub>은 2000 mg/kg 이상으로 산출된다. 또한 유의성 있는 체중 및 장기무게의 변화가 관찰되지 않았고, 혈액생화학적 검사 결과 유의성 있는 이상이 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 자음강화탕 발효물의 안전성에 대한 자료를 제시하는 것으로 사료되나, 그 활용을 위해서는 GLP 인증기관에서의 포괄적인 연구가 수행되어 안전성 및 활용에 대한 바탕자료가 마련되어야 할 것이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 자음강화탕 및 자음강화탕 발효물 0, 500, 1000, 2000 mg/kg의 용량을 ICR 마우스에 단회투여 하여 독성시험을 실시한 결과, 14일 동안 임상증상, 치사율, 부검소견, 체중변화, 장기중량 변화, 혈액 생화학적 검사 등에서 독성이 관찰되지 않았다. 따라서 자음강화탕 및 자음강화탕 발효물에 대한 반수치사량은 2000 mg/kg 이상으로

산출된다.

## 감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K12050의 지원을 받아 수행되었음.

## 참고문헌

1. 공정현. 만병회춘. 서울: 행림서원; 1975, p. 204-5.
2. 조기호. 한방처방의 동서의학적 해석방법론. 서울: 고려의학; 1999, p. 430.
3. 조연봉, 이형구. 자음강화탕의 해열진통항경련및 O3로 중독된 백서 폐손상에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1986;9:475-86.
4. 정희재, 오태환, 정승기, 이형구. 자음강화탕 및 자음강화탕가미방이 실험적폐손상과 지혈에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1992;15:373-835.
5. 김유경, 김홍준, 김우성, 박형진, 문구, 김동웅, 등. 자음강화탕의 알레르기성 염증반응억제효과. 대한한방내과학회지 2004;25(2):174-82.
6. 정다영, 하혜경, 이호영, 이진아, 이준경, 황대선, 등. 대표적인 보습지제의 면역 활성화 비교 연구: 육미지황탕, 자음강화탕, 쌍화탕. 대한한의학회지 2010;31(5):112-23.
7. 김동현. 성분대사연구. 최신고려인삼연구 2007;1:71-88.
8. Choi YK, Sul JU, Park SK, Yu SN, Kim SH, Rhee MS, et al. Research Trends of Fermented Medicinal Herbs - Based on Their Clinical Efficacy and Safety Assessment. *Journal of life Science* 2012;22(12):1729-39.
9. Kim EA, Baick SC, Chung WHA. Study on growth inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by lactic acid bacteria. *J Anim Sci* 2002;44:491-8.

10. White JA, Hart RJ, Fry JC. An Evaluation of the Waters Pico-Tagssystem for the amino-acid analysis of food materials. *J Autom Chem* 1986;8(4):170-7.
11. 김종대. 보중익기탕의 마우스 경구 단회 투여 독성시험. 대한예방의학회지 2011;15(2):21-38.
12. 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준: 식품의약품안전청 고시2009-116호. 서울: 식품의약품안전청; 2009.
13. OECD/OCDE. OECD guidelines for the testing of chemicals No. 425 Acute oral toxicity. 2008.
14. Hayes AW. Hayes Toxicology. New York: Raven press; 1984, p. 17-9.
15. 정용준, 한동오, 최보희, 박 철, 이혜정, 김성훈, 등. 발효 한약추출물 HP-1이 알코올을 투여한 쥐의 알코올 대사에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2007;21(2):387-91.
16. 강동희, 김현수. 유산발효에 의한 발효한약의 기능분석. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2011; 39(3):259-65.
17. 박진한, 정지욱, 권기태, 서민준, 서은경, 박용기, 등. 4종의 발효균주가 당귀의 Nodakenin과 Decursin의 함량에 미치는 변화. 대한본초학회지 2010;25(4):7-10.
18. Eum HA, Lee JH, Yang MC, Shim KS, Lee JH, MA JY. Protective Effect of Ssanghai-Tang Fermented by *Lactobacillus Fermentum* Against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity in Rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011;8(3):312-21.
19. Chung TH, Kang TJ, Cho WK, Im GY, Lee GS, Yang MC, et al. Effectiveness of the Novel Herbal Medicine, KIOM-MA, and Its Bioconversion Product, KIOM-MA128, on the Treatment of Atopic Dermatitis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:762918.
20. Kobashi K, Akao T. Relation of Intestinal Bacteria to Pharmacological Effects of Glycosides. *Biosci Microflora* 1997;16:1-7.
21. 식품의약품안전청. 의약품 임상시험계획 승인 지침: 식품의약품안전청고시 제2010-63호. 서울: 식품의약품안전청; 2010.