

잔나비겉상 엑스의 생쥐 급성독성에 미치는 영향

김영소 · 강종구* · 이종길 · 한성순#

충북대학교 약학대학, *수의과대학

(Received September 23, 1994)

Effect of *Elfvngia applanata* extract on the Acute Toxicity in Mice

Young So Kim, Jong Koo Kang*, Chong Kil Lee and Seong Sun Han*

College of Pharmacy, *College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Abstract—To investigate the acute toxicity of *Elfvngia applanata*(P_{ers}) K_{ARST}, it was extracted with hot water. EA, the aqueous extract from the carpophores of *E. applanata*, was lyophilized and a dark brownish powder was obtained. The acute toxicity of EA was investigated in ICR mice of both sexes. Five groups of mice were administered orally and intraperitoneally with 375, 750, 1,500, 3,000, 6,000 mg/kg (p.o.) and 312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg (i.p.) of EA. Abnormal clinical signs related to EA were not observed and no deaths occurred. LD₅₀ values administered orally and intraperitoneally were evaluated to be over 6,000 mg/kg and over 5,000 mg/kg, respectively. Gross finding of necropsy revealed no evidence of specific toxicity related to EA. There were no significant changes in body weights, serum biochemical values and histopathological changes compared with control group.

Keywords □ *Elfvngia applanata*, Carpophores, Acute toxicity, ICR mice, LD₅₀ values, Gross finding, Body weights, Serum biochemical values, histopathological changes.

잔나비겉상 *Elfvngia applanata*(P_{ers}) K_{ARST}은 다공균과에 속하는 버섯으로 주로 여름에 활엽수 고목, 드물게는 침엽수의 가지위에 자생하는 백색 목재부후균으로써 자실체는 1년생으로 선반 또는 반원형으로 나무에 수평으로 편평하게 발생한다. 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 분포되어 있으며, 향암목적의 민간요법에 이용되고 있다.^{1,2)}

잔나비겉상의 성분 및 약효에 관한 연구로는 triterpenoid계 성분으로 Nishitoba 등³⁾이 methyl ganoderic acid AP, ganoderenic acid F,G,H,I, furanoganoderic acid 등을 분리 보고하였고, Protiva 등⁴⁾은 alnusenone과 friedelin을 분리 보고하였다. Polysaccharide 성분에 관한 연구로는 Misaki 등⁵⁾이 배양균 사체로부터 β -glucan인 ganoderan을 분리하여 혈당강하, 정혈작용 및 향암효과 등이 있음을 보고하였고, Mizuno 등⁶⁾은 배양균사체로부터 분리한 α -

D-glucan과 β -D-glucan의 항암활성에 대하여, Nakashima 등⁷⁾은 polysaccharide가 면역반응에 미치는 효과에 대하여 각각 연구 보고한 바 있다. Kondo 등⁸⁾은 germanium 화합물이 함유되어 있음을 보고하였고, 한 등⁹⁾은 germanium을 비롯한 7종의 무기성분을 검색하였다. Kandfer 등¹⁰⁾은 잔나비겉상에서 분리한 RNA가 생쥐의 비장세포로 하여금 interferon의 특성을 나타내는 물질의 생산을 유도한다는 보고를 하였으며, Nerud 등¹¹⁾은 응유효소를 생성함을 보고한 바 있다. 이외에도 coenzyme Q₉,¹²⁾ steroids,^{4,13,14)} 등이 분리 보고된 바 있다.

이상의 연구결과를 고찰하여 볼 때 잔나비겉상의 안전성에 관한 연구는 찾아볼 수 없었으므로 수침엑스의 마우스에 대한 급성독성을 평가하기 위하여 국립보건안전연구원 독성시험지침서¹⁵⁾에 준하여 실험을 실시하여 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

실험방법

시료엑스의 추출 및 조제—실험재료로써 잔나비결상 *Elfvigina applanata*(P_{ers.}) KARST의 자실체를 청주시내에서 구입, 정확히 감정하여 음건, 세절한 후 300 g을 증류수 3.5 l로 90~100°C의 수욕상에서 8시간 추출하였다. 추출액을 온시 여과하고 잔사를 다시 증류수로 8시간 추출하였다. 2회의 추출액을 합하여 vacuum rotary evaporator로 감압 농축하여 얻은 jelly상의 물질을 동결건조하여 암갈색의 분말엑스(이하 EA라 칭함) 21.1 g을 얻었다.

시험동물 및 사육조건—시험동물은 4~5주령의 ICR 생쥐를 한국 화학연구소 실험동물실로부터 분양받아 온도 23±2°C, 상대습도 55±10%, 환기회수 10~12회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~300 lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화사육 기간 동안에 일반증상을 관찰하여 체중감소가 없는 건강한 동물만을 골라 시험에 사용하였으며 실험동물사료(삼양사료주식회사) 및 수도물을 자유롭게 섭취시켰다.

군분리 및 투여용량의 설정—순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위로 군분리를 실시하였다. 투여 개시시 체중범위는 경구투여용 생쥐는 암컷이 22±2 g이고, 수컷이 23±2 g 이었고, 복강투여용 생쥐는 암컷이 25±2 g이고, 수컷이 32±2 g 이었다. 각 시험당 사용동물수는 암수 각각 30마리로 하였고, 개체식별은 사육상자별 피모색소 표시법을 이용하였다. 투여용량은 예비실험 결과를 토대로 하여 경구투여시험은 6,000 mg/kg(투여액량: 1 ml/30 g b.w.), 복강투여시험은 5,000 mg/kg(투여액량: 0.5 ml/30 g b.w.)을 최고용량으로 설정하고 공비를 0.5로 하여 각각 5개의 용량군을 설정하였다.

시험용액의 조제 및 투여—시험용액은 0.5% carboxy methyl cellulose(CMC) 용액에 EA를 균일하게 현탁되도록 시험당일 투여전에 조제하였으며 용매 대조군에는 모두 0.5% CMC 용액만을 투여하였다. 시험용액의 투여는 경구와 복강투여 경로를 택하여 각 1회 투여하였으며, 경구투여는 생쥐용 존데를 이용하여 투여하였고, 복강투여는 26G×1/2" 주사침이 부착된 1 ml 주사기로 투여하였다.

사망 및 LD₅₀, 임상증상—투여 당일은 투여후 12시간까지 매 시간마다 일반상태를 관찰하고, 투여 다음날 부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

체중변화—모든 시험동물의 체중은 투여직전과, 투여 7일후 및 부검직전인 투여 14일 후 등 3회 측정하였다.

부검—시험 종료후 생쥐를 에틸로 가볍게 마취하고 복강을 절개하여 방혈 치사시킨 다음 내부장기의 이상유무를 육안으로 상세히 검사하였다.

혈액생화학적 검사—부검전 약 12시간 동안 절식시킨 후, 에틸로 마취시켜 후대정맥에서 채혈하고 이 혈액을 3000 r.p.m에서 10분 원심분리하여 혈청을 분리하고 total protein, creatinine, SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, bilirubin direct, albumin, creatinine, BUN, uric acid, calcium, phosphorus, glucose 및 triglyceride의 양을 Chemistry autoanalyzer(Hitachi 7150)로 측정하였다.

병리조직학적 검사—육안으로 이상이 있는 장기를 10% 중성 완충포르말린액에 고정한 후 파라핀 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 그 소견을 관찰하였다.

통계학적 분석—LD₅₀의 산출은 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 computer program pharmacologic system version 4.1¹⁶⁾로 계산하였다. 체중변화의 유의성은 one-way ANOVA에서 유의차가 인정되는 F치가 관찰될 때 대조군과 각 용량군을 비교하기 위하여 Dunnett's t-test로 검정하였고, 발생병변의 빈도는 X²(chi-square)로 검정하였다. 또한 혈액생화학적 검사 결과의 유의성은 student's t-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

사망 및 LD₅₀—EA를 생쥐에 경구투여할 때 투여가능한 최고용량인 6,000 mg/kg(투여액량 1 ml/30 g b.w.)과 복강투여할 때 최고용량인 5,000 mg/kg(투여액량 0.5 ml/30 g b.w.)에서도 사망한 예는 전혀 관찰되지 않았고, 시험기간 동안 암수 모두에서 사망에는 전혀 관찰되지 않아 LD₅₀의 산정은 불가능하였다(Table I, II).

Table I—Mortality of male and female ICR mice administered orally with EA

Sex	Dose (mg/kg B.W.)	Hours after treatment							Days after treatment							Final Mortality		
		1	2	3	4	5	6	12	1	2	3	4	5	12		13	14
Male	6,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0(Control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	6,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0(Control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

LD₅₀(mg/kg)>6,000EA: Extract of *Elfvvingia applanata*

Table II—Mortality of male and female ICR mice administered intraperitoneally with EA

Sex	Dose (mg/kg B.W.)	Hours after treatment							Days after treatment							Final Mortality		
		1	2	3	4	5	6	12	1	2	3	4	5	12		13	14
Male	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0(Control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0(Control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

LD₅₀(mg/kg)>5,000EA: Extract of *Elfvvingia applanata*

임상증상—EA를 생쥐에 경구투여할 때 6,000 mg/kg, 3,000 mg/kg 투여군에서 투여 1~2일 동안 연한 흑변이 나타났고, 복강투여시 5,000 mg/kg, 2,500 mg/kg 투여군에서 투여 직후 운동량 감소 등의 소견이 관찰되었지만 그외에 시험기간을 통하여 본 시험용액에 의하여 유발되었다고 생각되는 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

체중변화—EA를 생쥐에 경구 및 복강투여시, 시험기간 동안 각각 5개 용량으로 투여한 처치군에서의 체중변화는 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나

타내지 않았다. 또한 투여용량군 간의 체중변화에 있어서도 용량의존성을 나타내지 않았다(Table III, IV).

부검소견—EA를 생쥐에 경구 및 복강투여하였을 때, 모든 생존동물의 도살부검에서 시험용액의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의성 있는 병변도 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사—혈청중 total protein, creatinine, SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, bilirubin direct, albumin, creatinine, BUN, uric acid, calcium, phosphorus, 및 glucose 등의 양은 대조군에 비하여

Table III—Body Weights of male and female ICR mice administered orally with EA (Mean±SD: g)

Sex	Days after treatment	Dose(mg/kg B.W.)					
		6,000	3,000	1,500	750	375	0(Control)
Male	0	23.12± 1.23 (5)	23.35± 1.16 (5)	23.49± 1.42 (5)	23.71± 1.26 (5)	23.52± 1.36 (5)	23.46± 1.12 (5)
	7	32.37± 2.51 (5)	33.51± 1.96 (5)	33.76± 1.73 (5)	33.54± 1.58 (5)	34.10± 1.62 (5)	33.16± 2.19 (5)
	14	35.43± 2.57 (5)	35.79± 2.91 (5)	36.18± 2.15 (5)	35.71± 2.05 (5)	36.96± 1.45 (5)	36.73± 2.34 (5)
Female	0	22.52± 1.45 (5)	22.73± 1.38 (5)	22.43± 1.06 (5)	22.78± 1.46 (5)	22.45± 0.74 (5)	22.51± 1.32 (5)
	7	26.87± 1.73 (5)	27.35± 1.69 (5)	27.23± 1.81 (5)	27.61± 1.23 (5)	27.58± 1.48 (5)	28.03± 1.67 (5)
	14	27.61± 0.93 (5)	28.25± 1.56 (5)	28.76± 1.63 (5)	28.41± 1.74 (5)	28.26± 1.57 (5)	28.18± 1.63 (5)

(5): No. of animals examined

EA: Extract of *Elfvigina applanata*

Table IV—Body Weights of male and female ICR mice administered intraperitoneally with EA (Mean±SD: g)

Sex	Days after treatment	Dose(mg/kg B.W.)					
		5,000	2,500	1,250	625	312.5	0(Control)
Male	0	32.34± 1.92 (5)	32.71± 1.64 (5)	32.55± 1.52 (5)	32.73± 1.67 (5)	32.91± 1.86 (5)	32.67± 1.61 (5)
	7	34.18± 4.37 (5)	34.83± 3.58 (5)	34.21± 2.52 (5)	33.97± 4.17 (5)	34.43± 3.34 (5)	35.30± 2.98 (5)
	14	35.61± 4.35 (5)	35.59± 3.17 (5)	35.63± 3.41 (5)	36.34± 3.72 (5)	36.67± 2.68 (5)	36.84± 3.74 (5)
Female	0	25.73± 1.83 (5)	25.94± 1.92 (5)	25.63± 1.53 (5)	25.21± 1.84 (5)	25.58± 1.65 (5)	25.57± 1.83 (5)
	7	26.49± 2.32 (5)	27.38± 3.36 (5)	26.32± 2.46 (5)	26.54± 2.92 (5)	26.75± 3.51 (5)	26.77± 2.75 (5)
	14	27.95± 2.63 (5)	28.38± 2.91 (5)	28.75± 1.87 (5)	28.12± 3.35 (5)	28.65± 2.47 (5)	28.26± 1.96 (5)

(5): No. of animals examined

EA: Extract of *Elfvigina applanata*

통계학적으로 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다 (Table V).

병리조직학적 검사—모든 생존동물을 도살부검한 후 채취한 위, 신장, 소장, 췌장, 간, 폐, 심장, 뇌 등의 장기의 표본을 만들어 현미경 검사한 결과 시험용액의 투여에 기인한다고 사료되는 유의할 만한 병리조직학적 소견은 관찰되지 않았다 (Fig. 1,2,3,4).

생쥐에 대한 경구 및 복강 급성독성시험 결과 모든 투여 용량군에서의 사망에는 전혀 관찰되지 않았으므로 LD₅₀의 산출이 불가능하였고, 일반적인 임상증

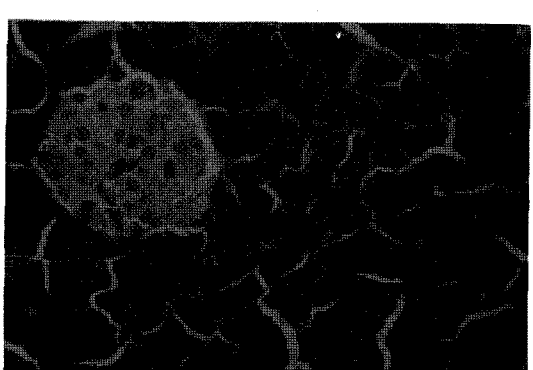
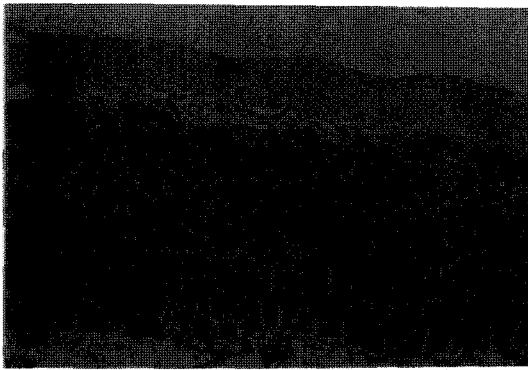
상에서 아무런 이상이 발견되지 않았으며, 체중변화나 모든 생존동물의 부검 및 병리조직학적 검사 결과에서도 어떠한 이상도 관찰되지 않았다. 경구투여군의 혈액생화학적 검사에서도 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 즉 SGOT, SGPT 및 alkaline phosphatase 검사치에서 보는 바와 같이 투여군과 대조군의 t-test에 의한 검정에서 유의성이 없었으므로 이는 시험용량에서 간에 독성을 나타내지 않았음을 알 수 있었다. 또한 creatinine, phosphorus 등의 검사치가 정상인 것으로 보아 신

Table V—Serum biochemical values in ICR mice administered orally with EA

	control	male	female
Total protein (g/dl)	5.80± 0.60	5.95± 0.51	5.50± 0.10
Cholesterol (mg/dl)	108.3 ± 30.6	109.5 ± 19.3	89.5 ± 5.8
SGOT (IU/l)	93.7 ± 11.9	118.5 ± 31.3	109.8 ± 14.1
SGPT (IU/l)	26.7 ± 6.4	49.3 ± 14.4	37.5 ± 7.9
Alk. phosphatase (IU/l)	98.7 ± 32.0	61.5 ± 27.6	107.0 ± 25.4
Bilirubin Direct (mg/l)	0.03± 0.058	0.05± 0.058	0.05± 0.055
Albumin (g/dl)	3.93± 0.35	3.65± 0.10	3.80± 0.11
Creatinine (mg/dl)	0.47± 0.15	0.45± 0.17	0.43± 0.10
BUN (mg/dl)	24.0 ± 4.0	24.8 ± 3.8	22.3 ± 3.5
Uric acid (mg/dl)	3.23± 1.86	3.60± 0.57	3.83± 1.37
Calcium (mg/dl)	9.77± 0.15	10.03± 0.39	9.67± 0.32
Phosphorus (mg/dl)	9.87± 2.31	11.33± 2.46	9.83± 1.88
Glucose (mg/dl)	122.6 ± 21.5	117.5 ± 10.1	129.5 ± 7.8
Triglyceride (mg/dl)	47.33± 17.00	37.25± 7.80	37.00± 8.08

EA: extract of *Elfvigia applanata*(6,000 mg/kg)

Mean± S.D. n=5

**Fig. 1**—Microphotograph of stomach (above) and kidney (below) of the mice on oral administration of EA.(H & E. X100)EA: extract of *Elfvigia applanata* (6,000 mg/kg)

장의 배설능력에 영향이 없었음을 시사하였으며 total

Fig. 2—Microphotograph of jejunum (above) and pancreas (below) of the mice on oral administration of EA.(H & E. X100)EA: extract of *Elfvigia applanata* (6,000 mg/kg)

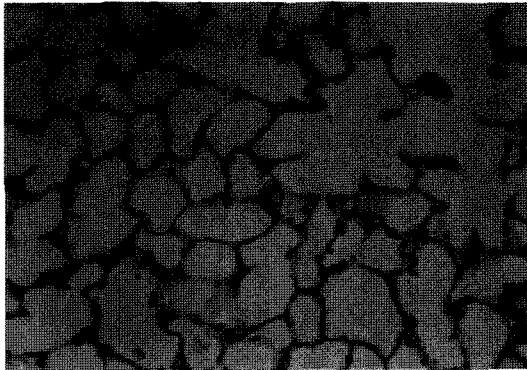
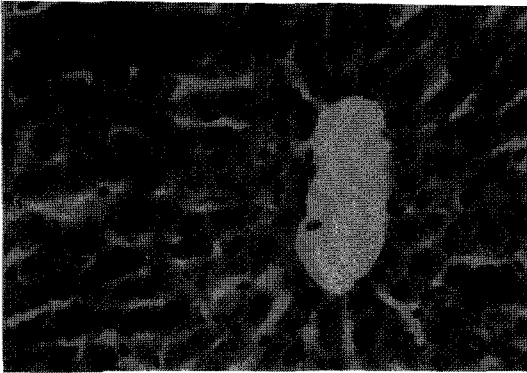


Fig. 3—Microphotograph of liver (above) and lung (below) of the mice on oral administration of EA.(H & E. X100)
EA: extract of *Elfvngia applanata* (6,000 mg/kg)

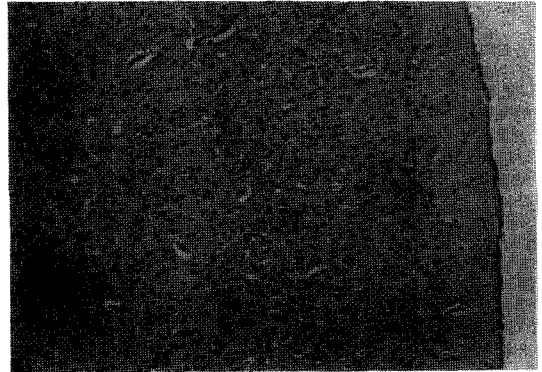
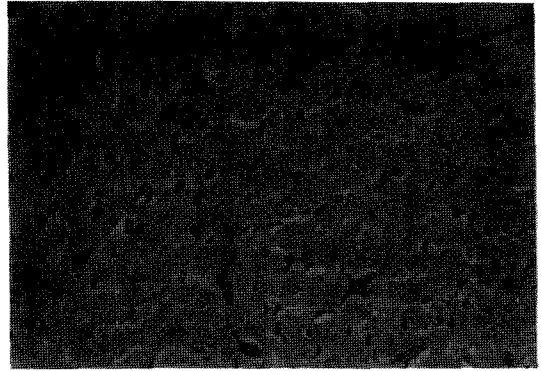


Fig. 4—Microphotograph of heart (above) and cerebrum (below) of the mice on oral administration of EA.(H & E. X100)
EA: extract of *Elfvngia applanata* (6,000 mg/kg)

protein, albumin, calcium 등의 양에도 영향이 없었으므로 protein의 흡수나 대사능력도 시험용량에서 정상임을 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 잔나비결상의 수침 엑스는 생쥐에 경구투여할 때 6,000 mg/kg 까지, 복강투여할 때 5,000 mg/kg 까지 투여해도 독성 및 부작용이 관찰되지 않았으므로 안전성이 있는 것으로 사료된다.

결 론

잔나비결상 수침엑스의 생쥐에 대한 급성독성시험 결과 투여가능한 최대용량 (경구: 6,000 mg/kg, 복강: 5,000 mg/kg)을 비롯한 모든 투여 용량군에서의 사망에는 전혀 관찰되지 않았으므로 LD₅₀의 산출이 불가능하였다. 또한 임상증상, 체중변화, 부검, 혈액생화

학적 검사는 대조군과 비교하여 통계학적 유의차를 발견할 수 없었으며 병리조직학적 검사에서도 대조군과 비교하여 유의성 있는 병변이 관찰되지 않았다.

감사의 말씀

“이 논문은 1993년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비의 일부에 의하여 연구되었음”을 감사드립니다.

문 헌

- 1) 金三純, 金養燮, 한국산 버섯도감, 유평출판사, 서울 pp. 300-301 (1990).
- 2) Lee, J. Y. and Hong, S. W., *Illustrated flora and fauna of Korea, 28(Mushrooms)*, The Ministry of Educa-

- tion, pp. 366-367 (1983).
- 3) Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H. and Sakamura, S.: Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, **28**(1), 193-197 (1988).
 - 4) Protiva, J., Skorkovska, H., Urban, J. and Vystřcil, A.: Triterpenoids LXIII. Triterpenes and steroids from *Ganoderma applanatum*. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **45**(10), 2710-2713 (1980).
 - 5) Misaki, A., Sone, Y., Yoshida, M. and Takeuchi K.: Manufacture of a new β -glucan. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 60, 188, 402 (1985).
 - 6) Mizuno, T., Ushiyama, M., Usui, T., Arakawa, M., Shinkai, K. and Shimizu, M.: Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides. VI. Isolation and characterization of antitumor active β -D-glucan from mycelial cells of *Ganoderma applanatum*. *Shizuoka Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, (32), 41-58 (1982).
 - 7) Nakashima, S., Umeda, Y. and Kanada, T.: Effect of polysaccharides from *Ganoderma applanatum* on immune response. I. Enhancing effect on the induction of delayed hypersensitivity in mice. *Microbiol. Immunol.*, **23**(6), 501-513 (1979).
 - 8) Kondo, A. and Kondo, K.: Moxa cautery composition containing germanium. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 62, 209, 022 (1987).
 - 9) Han, S. S. and Baik, S. R.: Studies on inorganic constituents and antimicrobial activity of *Elfvvingia applanata*(P_{er}) K_{ARST}. in Korea. *Chungbuk J. Pharm. Sci.*, Vol. 3, 44-50 (1988).
 - 10) Kandefer, S. M., Kawecky, Z. and Guz, M.: Fungal nucleic acids as interferon inducers. *Acta Microbiol. Pol.*, **28**(4), 277-291 (1979).
 - 11) Nerud, F., Misurcova, Z. and Musilek, V.: Production of milk-clotting enzymes by Basidiomycetes. *Folia Microbiol.*(Proque), **34**(4), 310-315 (1989).
 - 12) Yamada, Y., Hsu, C. S., Iguchi, K. and Suzuki, M.: Chemical constituents of fungi. II. Coenzyme Q₉ from *Ganoderma applanatum*. *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo.*, (23), 290-292 (1973).
 - 13) Ripperger, H. and Budzikiewicz, H.: Steroids from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry*, **14**(10), 2297-2298 (1975).
 - 14) Svridonov, V. N. and Strigina, L. I.: Isolation and identification of ergosterol peroxide from *Cetraria richardsonii* and *Ganoderma applanatum*. *Khim. Pri. Soedin.* (5), 669 (1976).
 - 15) 국립보건안전연구원: 국립보건안전연구원 예규 제 10호 '의약품등의 독성시험 기준' (1988).
 - 16) Ronald, J. T. and Rodney, B. M.: *Manual of pharmacologic calculation with computer programs*, Springer-Verlag, pp.153-166 (1987).