

ICR 마우스를 이용한 누룩 고체 발효 쌍화탕의 급성독성에 관한 연구

이지혜, 엄영란, 마진열

한국한의학연구원 신한방제제연구센터

Acute Toxicity Study on *Ssanghwa-tang* Fermented with Nuruk in ICR Mice

Ji-hye Lee, Young-ran Um, Jin-yeul Ma

Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Objective : *Ssanghwa-tang* has been used as herbal medicine, favorite beverage or health beverage. This study was performed to evaluate the acute toxicity and safety of fermented *Ssanghwa-tang* extract in ICR mice.

Methods : 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, clinical signs, changes of body weight for 14 days. After 14 day of administration, all mice were sacrificed and major organ were observed.

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

Conclusions : These results suggest that *Ssanghwa-tang* fermented with nuruk extracts might be safe to ICR mice.

Key words : *Ssanghwa-tang*, Fermentation, Acute toxicity, Nuruk, LD₅₀

I. 서 론

배당체는 소장에서 흡수될 수 없으며, 소화기계 전반에 걸쳐 흡수되기 전에 장관에 존재하는 미생물 효소에 의해 가수분해 되어 비배당체로 전환되며, 당의 β 결합은 장관에서 미생물에 의해 접촉되지 않고서는 분해되지 않는다는 연구 결과가 보고되었다. 배당체에 비해 비배당체가 혈액 내로의 흡수나 생리활성 면에서 더 효과적이며, 생리활성은 배당체의 존재, 종류, 결합위치에 따라 소장에서의 흡수율이 좌우되며, 소장에 존재하는 β-glucosidase 활성에 의한 deglycosylation 과정이 flavonoid 배당체의 흡수 및 대사 과정에도 중요한 것으로 보고되고 있다^{1,2)}. 즉,

쌍화탕의 구성 약재인 감초의 glycyrrhizin이 대사체인 glycyrrhetic acid, glycyrrhetic acid-gluA로, 숙지황의 aucubin이 aucubigenin으로, 작약의 paeoniflorin이 paeonimetabolin I, II 등으로 대사되기 위해서는 β-glucosidase의 역할이 필요하며, 배당체의 가수분해 정도가 약효발현에 밀접한 영향을 미친다. 최근 한의학계에서도 한약의 유효성분 증가 및 품미개선 등 다양한 장점을 지닌 발효한약에 관심을 높이고 있으며, 한약의 발효기법과 발효된 한약에 대한 약효와 부작용 여부 및 실제 임상 적용 문제에 대한 많은 연구보고가 진행 중이다³⁻⁷⁾.

쌍화탕은 동의보감의 처방서인 방약합편에 의하면 혈기가 손상 되었을 때나 강정 및 피로회복, 병 후기가 허약하고 식은땀이 날 때 매우 효과가 있어 피로회복 등에 널리 사용되어 온 한약제제로 백작약, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 계피, 감초, 생강, 대추로 구성되어 있다^{8,9)}. 쌍화탕은 현재 한의학에서 한방처방으로 뿐만 아니라

□ 접수 ▶ 2010년 11월 1일 수정 ▶ 2010년 11월 16일 채택 ▶ 2010년 11월 30일
□ 교신저자 마진열, 대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원
Tel 042-868-9466 Fax 042-868-9573 E-mail jyma@kiom.re.kr

소비자가 이용하기 쉽게 가공 처리 하여 분말차, 액상차 등의 기호식품 및 건강식품으로도 시판되는 등 그 활용 범위가 높으며³⁾, 쌍화탕의 임상적 효능에 대한 연구 또한 항 피로^{10,11)}, 간기능 개선¹²⁾, 항염 및 중추신경 억제 효과^{13,14)}, 진통 및 항경련 효과¹⁵⁾ 등이 다각도로 이루어졌다. 본 연구에서는 임상 뿐 아니라 기호식품으로도 널리 판매되는 쌍화탕의 효능을 강화하기 위하여 쌍화탕을 누룩을 이용하여 고체 발효 하였으며, 누룩으로 고체 발효한 쌍화탕의 사용례가 보고되지 않았기에 효능시험이전에 안전성을 검증하고자 단회투여 독성 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

1) 약재

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

2) 고체 발효

발효에 사용된 누룩은 부산시 금정구 산성누룩을 사용하였으며, 쌍화탕 처방에 누룩발효액(누룩50 g, 고두밥 500 g을 넣어 섞은 후 발효시킴)을 넣은 후 dry oven에서 37℃를 유지하면서 22일간 고체발효를 실시하였다.

3) 시험물질 추출

쌍화탕 및 누룩으로 발효시킨 쌍화탕은 건조감량의 무게를 고려하여 각 한 첩 분량씩 정밀히 측정하여 1000 ml의 생수(화이트, 경남 산청군 삼장면 덕교리

<Table 1> The Prescription of *Ssanghwa-tang*

Herb	Scientific Name	Herbal Name	Dose(%)
작약	<i>Paeonia lactiflora</i>	Paeoniae Radix	27.99
숙지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Rehmanniae Radix Preparata	11.20
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	Astragali Radix	11.20
당귀	<i>Angelica gigas</i>	Angelicae Gigantis Radix	11.20
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	Cnidii Rhizoma	11.20
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	Cinnamomi Cortex	8.39
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glycyrrhizae Radix	8.39
생강	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	Zingiberis Rhizoma Crudus	4.45
대조	<i>Zizyphus jujuba</i>	Ziziphi Fructus	5.97
Total (%)			100

800)에 1시간동안 침적시킨 다음 180분간 전탕추출법(한국, 대용약탕기)에 의한 시험물질 추출을 실시하였다. 시험물질은 동결건조기(한국, 일신 FD5512)를 사용하여 분말 형태로 조제하여 실험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

실험동물은 암·수 ICR 마우스(오리엔트 바이오, 경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1) 4주령을 사용하였다. 실험은 한국한의약연구원 동물실험실에서 실시되었으며, 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 균 분리를 실시하여 본 실험에 사용하였다. 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. 본 실험은 실험동물 윤리위원회의 심의를 거쳤으며, 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호 의약품등의 독성시험방법의 “비임상시험 관리기준”(2005년 10월 25일)에 따라 실시되었다.

3. 실험군 및 한방처방 투여

US Environmental Protection Agency OPPTS 870.100¹⁶⁾에 따르면 일반적으로 반수 치사량이 5000~15000 mg/kg인 물질을 무독성 물질로 규정하고 있다. 본 실험에서는 5000 mg/kg를 기준으로 하여 공비 0.5로 각각 3개 군을 설정하였으며, 대조군을 포함하여 암수 ICR 마우스를 각각 7개의 용량군으로 나누었다 <Table 2>. 투여 경로는 한방 임상에서 가장 널리 이용되고 있는 경구투여법을 이용하였으며, 각 용량군의 한약제는 투여 직전에 3차 증류수에 희석하여 실험에 사용하였으며 동물을 하룻밤 절식시킨 후 배부 피부 고정법으로 고정하고 경구투여용 금속제 존데와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구 투여 하였다.

4. 임상증상 및 부검

임상 증상은 투여 직후부터 6시간 동안 매시간 관찰하였으며, 그 후 14일(1일 1회) 동안 일반증상 관찰법에 의하여 관찰하였다¹⁷⁾. 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.

<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
SHT [†] ₁	6~10	5	Male	10	1250
SHT ₂	11~15	5	Male	10	2500
SHT ₃	16~20	5	Male	10	5000
SNT [‡] ₁	21~25	5	Male	10	1250
SNT ₂	26~30	5	Male	10	2500
SNT ₃	31~35	5	Male	10	5000
CON	36~40	5	Female	10	0
SHT ₁	41~45	5	Female	10	1250
SHT ₂	46~50	5	Female	10	2500
SHT ₃	51~55	5	Female	10	5000
SNT ₁	56~60	5	Female	10	1250
SNT ₂	61~65	5	Female	10	2500
SNT ₃	66~70	5	Female	10	5000

* : Control group
 † : *Ssanghwa-tang* extract treatment group
 ‡ : *Ssanghwa-tang* fermented with Nuruk treatment group.

5. 통계학적 방법

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

<Table 3> Mortality of Male and Female ICR Mice Treated with *Ssanghwa-tang* and Fermented *Ssanghwa-tang* Extract

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	0/5	>5000 mg/kg
	SHT 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		
	SHT 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		
	SHT 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		
	SNT 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		
	SNT 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		
	SNT 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	0/5	>5000 mg/kg
	SHT 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		
	SHT 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		
	SHT 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		
	SNT 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		
	SNT 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		
	SNT 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, SHT1: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Treated Group, SHT2: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SHT3: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group, SNT1: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Treated Group, SNT2: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SNT3: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group.
 * : Values are expressed as No. Dead/No. animal.

<Table 4> Clinical Signs of Male ICR Mice Treated with *Ssanghwa-tang* and Fermented *Ssanghwa-tang* Extract

Variable	Sex	Female							Male						
	Group	CON	SHT ₁	SHT ₂	SHT ₃	SNT ₁	SNT ₂	SNT ₃	CON	SHT ₁	SHT ₂	SHT ₃	SNT ₁	SNT ₂	SNT 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
Gaspings		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
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

CON: Control group, SHT1: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Treated Group, SHT2: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SHT3: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group, SNT1: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Treated Group, SNT2: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SNT3: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group.
 * : Values are expressed as No. abnormal/No. normal

Ⅲ. 결 과

1. 치사율 및 LD₅₀

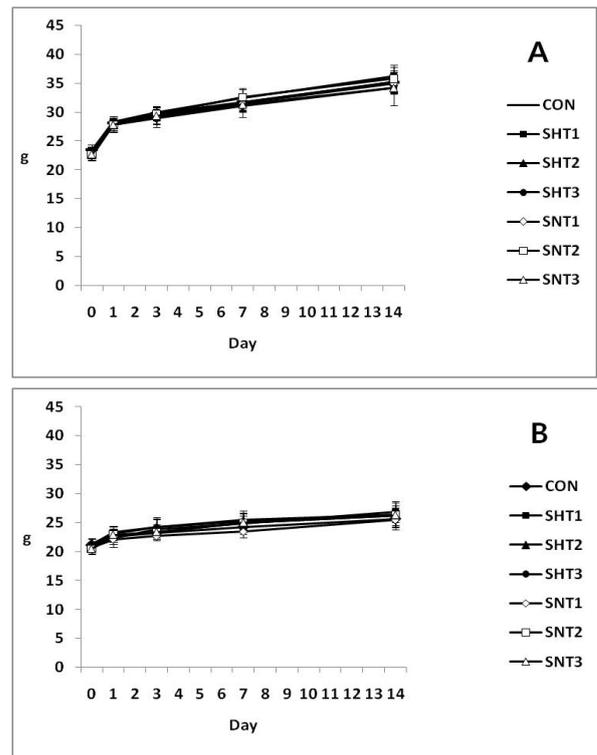
쌍화탕 및 발효 쌍화탕 단회 투여 후 사망관찰 결과는 <Table 3>과 같다. 모든 실험동물에서 사망은 관찰되지 않았으며, 5000 mg/kg/day 농도도 경구 투여하여도 사망을 관찰할 수 없어 LD₅₀ 값은 산출되지 않았다.

2. 임상 증상

쌍화탕 및 발효 쌍화탕 단회 투여 후 임상 증상의 발현 유무를 관찰한 결과는 <Table 4>와 같다. 시험 물질 투여 당일 6시간, 이후 14일간 실험동물을 관찰한 결과, 보행장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 피어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등 시험 물질 투여와 관련된 어떠한 임상증상의 이상소견도 관찰되지 않았다.

3. 체중 변화

쌍화탕 및 발효 쌍화탕 단회 투여 후 체중 변화를 측정한 결과는 <Figure 1>과 같다. 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 14일 모두 대조군과 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물 투여군 간의 유의한 체중의 차이는 관찰되지 않았으며, 경구 투여 후 시험물질 투여군과 대조군 모두



<Figure 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, SHT1: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Treated Group, SHT2: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SHT3: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group, SNT1: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg (day) Treated Group, SNT2: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SNT3: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group.

(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	CON	SHT ₁	SHT ₂	SHT ₃	SNT ₁	SNT ₂	SNT ₃	CON	SHT ₁	SHT ₂	SHT ₃	SNT ₁	SNT ₂	SNT 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
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, SHT1: Extraction of *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Treated Group, SHT2: Extraction of *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SHT3: Extraction of *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group, SNT1: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 1250 mg/kg(day) Treated Group, SNT2: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 2500 mg/kg(day) Treated Group, SNT3: Extraction of Fermented *Ssanghwa-tang* 5000 mg/kg(day) Treated Group.
* : Values are expressed as No. abnormal/No. normal.

개시체중에 비하여 체중이 증가하였고, 체중 증가량 또한 유의한 차이가 없었다.

4. 부검 소견

주요 내부 장기에 대한 육안적 소견을 관찰한 결과는 <Table 5>와 같다. 실험 종료 후, 모든 실험동물을 부검하여 방혈한 후, 주요 내부장기에 대한 육안적 이상 병변을 관찰한 결과, 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량의 쌍화탕 및 발효쌍화탕 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.

IV. 고 찰

누룩은 밀을 주원료로 성형하여 저온에서 장기간에 걸쳐 다양한 미생물군에 의해 발효되며, 각종 전분분해효소가 풍부하여 효율적인 당화를 유도하는 효소제로서의 역할을 한다¹⁸⁾. 본 연구에서는 쌍화탕의 효능을 강화하기 위하여 누룩을 이용하여 쌍화탕을 고체 발효하였으며, 효능평가 이전에 안전성을 검증하고자 단회투여 독성실험을 실시하였다. 단회투여 독성실험은 시험동물에 시험물질을 단회투여 하였을 때 단기간 내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사하는 시험으로, 본 연구에서는 단회투여 용량을 US Environmental Protection Agency OPPTS 870.100¹⁶⁾에서, 반수 치

사량이 5000~15000 mg/kg인 물질을 무독성 물질로 규정하는데 기인하여, 5000 mg/kg을 고농도로 설정하였다. 실험물질은 임상적용 경로를 고려하여 경구로 투여하였다. 쌍화탕 및 고체발효쌍화탕 열수 추출물은 동결 건조하여 0(control), 1250, 2500, 5000 mg/kg 용량으로 암·수 ICR 마우스에 단회 경구투여 하였고, 이후 14일 간 사망 및 임상증상이 관찰되었으며, 1, 3, 7, 14일의 체중이 측정되었고, 실험 종료 후 부검하여 내부 장기에 대한 병변 유무를 육안으로 관찰하였다. 그 결과 모든 암·수 ICR 마우스에 대하여 사망이 관찰되지 않았고, 이로 인하여 LD₅₀은 산출할 수 없었다. 또한 시험기간 동안 각 농도의 쌍화탕 및 발효쌍화탕 추출물을 투여한 시험물질 투여군과 대조군에서 경구투여 후 1, 3, 7, 14일의 체중에서 유의한 차이가 나타나지 않았고, 전 시험기간 동안 특이한 임상증상이 나타나지 않았으며, 부검소견에서도 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 독성실험의 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 이용하여 발효한 쌍화탕의 급성독성 실험결과¹⁹⁾와 같으며, 암수 ICR 마우스에 있어 쌍화탕

및 누룩고체발효쌍화당의 LD₅₀은 5000 mg/kg을 상회할 것으로 생각되어 누룩을 이용한 고체발효로 인한 급성 독성이 발생하지 않는 것으로 사료되나, 추후 실험적 연구를 통하여 포괄적인 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 누룩을 이용하여 고체 발효한 쌍화당의 안전성에 대한 자료를 마련하고자, ICR 마우스에 단회투여 독성실험을 실시하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 단회투여 후 14일 간 모든 실험동물에서 사망 동물이 관찰되지 않아, LD₅₀ 값은 산출되지 않았다.
2. 실험물질을 투여한 모든 실험동물에서 정상대조군과 비교하여 유의한 체중변화 및 임상증상의 이상소견은 관찰되지 않았다.
3. 실험 종료 시, 모든 실험동물을 부검하여 주요 내부 장기에 대한 육안적 병변을 관찰한 결과, 이상 병변은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 누룩으로 발효한 고체 발효 쌍화당은 ICR 암수 마우스에 대하여 급성 독성이 없는 한의약물로서 그 효능규명을 통한 활용이 기대된다.

VI. 감사문

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 P09020의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, et al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr.* 2000;130(7):1695-1699.
2. Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in

- the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr.* 2003;42(1):29-42.
3. 이지혜, 엄영란, 심기석, 전원경, 이재훈, 마진열. 마우스를 이용한 발효쌍화당의 급성독성 실험. *대한한방내과 학회지.* 2009;30(4):780-787.
 4. 손미예. 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 및 항암효과. *식품산업과 영양.* 2007;12(2):51-57.
 5. 이형범, 김혜자, 정명수, 조화은, 최윤희, 임규상, 등. 송이 버섯과 동충하초 균사체를 혼합 배양한 한방추출물의 발효에 의한 생리활성. *대한본초학회지.* 2008;23(1):1-8.
 6. 심기석, 이지혜, 이재훈, 마진열. *Lactobacillus fermentum* 으로 발효한 쌍화당의 파골 세포 분화와 난소 적출한 랫트의 골다공증에 미치는 영향. *한국한의학연구원 논문집.* 2010;16(1):149-155.
 7. 김덕희, 백경연. 과일, 야채 및 한약재 발효액의 품질과 기능성에 대한 연구. *한국식품영양학회지.* 2007;20(2):195-201.
 8. 김수환. 알기쉬운 동의보감. 서울:조은. 1976:752.
 9. 황도연. 방약합편. 서울:송원문화사. 1978.
 10. 박원경, 박순달. 쌍화탕이 백서의 운동부하 후 항피로에 Monoamine 함량 변화에 미치는 영향. *제한동의학술원 논문집.* 1995;1(1):130-145.
 11. 이강욱. 쌍화탕 투여가 운동 수행 후 피로회복에 미치는 영향. *한국체육과학학회지.* 1999;8(2):475-484.
 12. 조태영, 심창구, 이민화, 김신근. 쌍화탕이 슬포브로모프탈레인의 간클리어라스에 미치는 영향. *약제학회지.* 1987;17(2):89-93.
 13. 김일혁, 황규진. 쌍화탕의 항염증작용에 관한 연구. *생약학회지.* 1981;12(3):131-5.
 14. 정지창, 박대규. 쌍화탕의 중추억제 및 항염증작용에 관한 연구. *약제학회지.* 1986;16(1):24-30.
 15. 한대석, 이형규, 조희재. 쌍화탕의 진통 및 항경련효과에 관한 연구. *생약학회지.* 1983;14(2):60-3.
 16. U.S. Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.100, Acute Toxicity Testing Background. Washington:US EPA. 1998.
 17. Hayes AW. Principles and Methods of Toxicology. New York: Raven press. 1984:17-19.
 18. 이효형, 이진형, 고유진, 박미화, 이정옥, 류충호. 전통 누룩 발효과정 중 품질 및 항원성 변화. *한국식품영양 과학회지.* 2009;38(1):76-82.