



Original Article / 원저

## 홍국 발효 황금의 마우스 단회 경구투여 독성시험

박재찬·최해운·김종대\*

대구한의대학교 한의과대학 내과학 교실

### Mouse Single Oral Dose Toxicity Test of Red Koji Fermented *Scutellariae Radix* Aqueous Extracts

Jae-Chan Park · Hae-Yun Choi · Jong-Dae Kim.\*

Dept. of Korean Medicine, College of Korean Medicine,  
Daegu Haany University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The objectives of this study was to obtain acute information (single oral dose toxicity) of Red-Koji (Monascus purpureus 12002) Fermented *Scutellariae Radix* Aqueous Extracts (fSR), has been traditionally used in Korean medicine for treating various diseases including inflammatory diseases.

**Methods** : In order to observe the 50% lethal dose (LD50), approximate lethal dosage (ALD) and target organs, fSR powders were once orally administered to female and male ICR mice at dose levels of 2,000, 1,000, 500 and 0 (control) mg/kg (body weight.). The mortality and changes on body weight, clinical signs and gross observation were monitored during 14days after single oral treatment of fSR with organ weights and histopathological observations of 12 types of principle organs.

**Results** : After single oral treatment of fSR, we could not find any mortality and toxicological evidences up to 2,000 mg/kg treated group, the limited dosages in rodents, on the body and organ weights, clinical signs, gross and histopathological observations, except for some accidental findings.



**Conclusions** : The results obtained in this study suggest that the LD50 and ALD of fSR in both female and male mice after single oral treatment were considered as over 2,000 mg/kg because no mortalities were detected up to 2,000 mg/kg and can be safely used in clinics.

**Keyword** : Red Koji Fermented *Scutellariae Radix*, Toxicity

## I. 서 론

黃芩 (*Scutellariae Radix*; SR)은 꿀풀과 (*La-biatae*)에 속한 황금 (*Scutellaria baicalensis Georgi*)의 뿌리를 절편하여 건조한 약재로 性은 寒하고, 味는 苦하며, 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 淸熱涼血, 安胎의 效能이 있다<sup>1)</sup>.

최근 들어 유산균, 효모, 고초균 등 미생물을 이용한 발효기술의 진보로 천연물의 생리활성효능이 증가된 발효산물을 얻거나 또는 상호간의 상승효과에 의해 생리활성 효능이 상승되는 제품들이 개발되고 있다<sup>2)</sup>. 특히 *Bifidobacterium* 속 유산균으로 발효시킨 발효홍삼의 항고지혈 및 혈당강하 효능이 증가되며<sup>3)</sup>, *Bacilluslicheniformis* 균주로 발효시킨 발효 홍삼 청국장에서도 약리활성의 증가가 인정된 바 있어<sup>4)</sup>, 발효 한약재의 개발이 주목을 받고 있는 실정이다<sup>5)</sup>. 최근 들어 *Monascus* 속의 홍국균이 생산하는 홍국색소 그 자체가 식품첨가물로 이용되고 있으며, 홍국균 자체가 콜레스테롤 생합성 효소 (HMG-CoA reductase) 활성 억제, 혈압상승 억제 및 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 따라서 홍국의 우수한 생리활성 효능 때문에 이를 새로운 건강기능식품 개발에 활용하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있는 가운데 홍국을 소재로 한 된장, 고추장, 발효메밀, 발효 콩 등이 상품화 되고 있는 실정이며<sup>7)</sup>, 홍국 발효에 의해 인삼의 항고지혈증 및 항산화 활성의 증가가 이미 잘 알려져 있으나<sup>6)</sup>, 독성에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 한의학에서 청열약으로 널리 사용되어온 황금 추출물을 생리활성을 증가시키기 위해 홍국균 (*Monascus purpureus* 12002; 한국 식품개발연구원)으로 발효시킨 홍국 발효 황금 추출물의 일반 독성시험 중 마우스 경구 단회투여 독성 시험을 실시하여, 장기투여 독성 시험과 생식·발생독성 시험을 위시한 특수 독성시험에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

본 실험에서는 반수치사율 (50% lethal dose, LD<sub>50</sub>), 개략적 치사량 (approximate lethal dosage; ALD), 최대 내성 용량 (maximum tolerance dosage; MTD) 및 표적장기 (target organ)를 산출하기 위하여, 한국식품의약품안전처 고시<sup>8)</sup>에 따라 홍국 발효 황금 추출물 2,000, 1,000 및 500 mg/kg을 단회 경구 투여한 다음 14일간 체중 및 임상증상을 관찰하였으며, 14일 후 최종 부검을 통하여 12개의 주요 장기에 대한 장기 중량의 측정, 육안 부검 및 조직병리학적 검사를 각각 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 사양관리

암수 각 20마리의 ICR 마우스 (6-wk old upon receipt, SLC, Japan)를 9일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도 (20–24℃)와 습도 (48–52%)가 조절된 사육실에서 마우스용 polycarbonate 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료 (Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 모든 실험동물은 투여일 및 최종 부검일

\*교신저자 : 김종대, 대구시 수성구 상동 대구한의대학교 한의과대학  
· Tel : 053-770-2122  
· Fax : 053-770-2189  
· Email : omendoim@dhu.ac.kr  
•접수 2013/05/31 •수정 2013/06/07 •채택 2013/06/10

18시간 전 절식을 실시하였으며 (이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), picric acid로 개체를 식별하였다.

## 2. 홍국 발효 황금 추출물

본 실험에 사용된 황금 (*Scutellaria baicalensis Georgi*)은 지역 약업사 (Omniherb, Korea)에서 매입한 것을 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 선정된 황금 100g을 취하여 정제수 1L로 80°C에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)로 감압-농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer (Labconco Freezone1, Labconco Corp., MO, USA)를 사용하여 동결 건조시켜, 총 272.00g (수율 약 27.20%)의 연갈색 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 황금 물 추출물에 고체 배양한 홍국균 1.15%를 첨가하여, 40°C에서 3일간 배양하여, 홍국 발효 황금 추출물을 준비하였다. 홍국균의 고체 배양은 PDA (potato dextrose agar: Difco Co., USA) 배지를 사용하여 24°C에서 4일간 균체를 배양한 후, 배지 중량의 10%에 상당하는 멸균수를 배지에 첨가하고, 분쇄하여 사용하였다. 홍국 발효 황금 추출물은 고압 멸균기 (Hanback ST. Co., Korea)로 멸균한 다음, 전기 미세분쇄기 (Sungchang Machine Co., Sungnam, Korea)를 사용하여, 세말하여, 연갈색의 분말을 얻어 실험

험에 사용하였다. 준비한 홍국 발효 황금 추출물은 -20°C의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 100 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다.

## 3. 군분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 5마리씩 Table 1에 기록한 8그룹으로 구분하였다. 현재까지 홍국 발효 황금에 대한 독성자료 역시 찾아 볼 수 없어, 한국식품의약품안전처 고시<sup>8</sup>와 OECD 실험기준<sup>9</sup>에 의거하여, 설치류 최고 한계투여용량인 2,000mg/kg을 최고 용량으로 설정하였으며, 공비 2로 1,000 및 500 mg/kg을 중간 및 저용량 투여군으로 설정하였다. 또한 암수 각각에 대한 매체 대조군(vehicle)을 추가 하였다. 홍국 발효 황금은 멸균 증류수에 용해시켜 20ml/kg의 용량으로 overnight 절식 후 존데(sonde)가 부착된 1ml 주사기를 이용하여 경구 투여 하였으며, 매체 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수만 공급하였다. 식이와 음수에 따른 약물의 흡수 변화를 최소화하기 위해, 투여 후 대략 3시간 동안 사료와 음수 공급을 제한하였다 (Table 1).

## 4. 임상증상의 관찰

모든 실험동물의 임상증상을 투여 전후에 각각 functional observational battery test<sup>10-11</sup>를 기초하여 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 일반 증상을 관찰, 기록하였으며, 투여일 이후에도 하

Table 1. Experimental Design Used in This Study

Group	Sex	No. of animals	Dose (mg/kg) of fSR	Animal No.
Vehicle control*	Male	5	0	M-01 ~ M-05
The highest dosage	Male	5	2000	M-06 ~ M-10
The middle dosage	Male	5	1000	M-11 ~ M-15
The lowest dosage	Male	5	500	M-16 ~ M-20
Vehicle control*	Female	5	0	F-01 ~ F-05
The highest dosage	Female	5	2000	F-06 ~ F-10
The middle dosage	Female	5	1000	F-11 ~ F-15
The lowest dosage	Female	5	500	F-16 ~ F-20

\* Vehicle control; distilled water 20 ml/kg as vehicle in this study. All test articles in vehicle were once orally administered in a volume of 20 ml/kg, dissolved in distilled water.



투여 최소한 2번씩 모든 실험동물의 임상증상을 관찰, 기록하였다.

#### 5. 체중의 측정

모든 실험동물의 체중을 투여전 1일, 투여직전, 투여 후 1, 2, 7, 13 및 14일 (최종 희생일)에 각각 측정하였으며, 실험 시작시 개체차이에 따른 체중의 변화를 최소화하기 위하여, 투여일 ~ 투여 후 7일, 투여 후 7일 ~ 13일 및 투여일 ~ 투여 후 14일간의 체중 증가량인 증체량을 각각의 체중을 이용하여 산출하였다.

#### 6. 육안 부검

투여 14일 후 모든 실험동물은 overnight 절식을 실시하였으며, ethyl ether (Duksan Pure Chemical Co., Korea) 마취하에 부검을 실시하고, 폐, 가슴샘, 부신, 심장, 신장, 비장, 고환, 전립샘, 간, 췌장, 부고환, 악하임과절, 난소, 뇌, 피부, 소화관, 기도, 난관 및 자궁 등 주요 장기를 위주로 이상 육안소견을 각각 관찰, 기록하였다.

#### 7. 장기 중량의 측정

모든 실험동물은 육안부검 소견을 관찰 기록한 후 폐, 심장, 가슴샘, 좌측 신장, 좌측 부신, 비장, 좌측 고환, 간, 췌장 비장엽, 좌측 부고환, 좌측 악하임과절, 좌측 난소, 뇌 및 자궁에 대한 절대중량을 각각 측정하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 각각의 장기 절대중량의 비율인 상대 중량을 산출하였다.

#### 8. 조직 병리학적 관찰

폐, 심장, 가슴샘, 좌측 신장, 좌측 부신, 비장, 좌측 고환, 간, 췌장 비장엽, 좌측 부고환, 좌측 악하임과절, 좌측 난소, 뇌 및 자궁 등의 일부 조직을 10% 중성포르말린에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 4 $\mu$ m의 절편을 제작하였다. 이후 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하고, 광학현미경 하에서 이상 유무를 관찰, 기록하였다.

#### 9. 통계처리

모든 수치는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 Scheffe test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U (MW) test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 단회 투여독성시험의 경우, 반수치사량 및 95% 신뢰한계 (confidence limits)를 Probit 방법으로 측정하였으며, 임상 증상, 육안부검 및 조직병리학적 소견은 각각 그 정도에 따라 0 (normal), 1+ (slight), 2+ (moderate) 및 3+ (severe)로 구분하였다. 통계처리 및 Probit 방법은 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 사망률

홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 있는 사망률은 실험 전 기간 동안 관찰되지 않았다 (Table 2).

#### 2. 임상 증상

홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 임상증상은 실험 전 기간 동안 인정되지 않았다.

#### 3. 체중의 변화

본 실험의 결과, 홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 체중 및 증체량의 변화는 인정되지 않았다 (Table 3).

#### 4. 장기 중량의 변화

각각의 동일 성별 매체 대조군에 비해 의미 있는 장기중량의 변화는 모든 홍국 발효 황금 추출물

Table 2. Mortalities Observed in Female and Male Mice after Single Oral Treatment of fSR

Groups	Day after administration													Total*	
	0 <sup>a</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		13
Vehicle control															
Male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)
Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)
fSR treated male groups															
2000 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)
1000 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)
500 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)
fSR treated female groups															
2000 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)
1000 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)
500 mg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0%)

Values are expressed as number of died animals; <sup>a</sup> treatment day; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); \* total mortalities during 14 days of observation periods - died animals/total observed animals (percentages; 5 mice per group)

Table 3. Weight Gains in Female and Male Mice after Single Oral Treatment of fSR

Groups	Intervals		
	Day 0 <sup>a</sup> ~ Day 7	Day 7 ~ Day 13	Day 0 ~ Day 14 <sup>b</sup>
Vehicle control			
Male	8.14±1.19	1.96±0.29	4.40±1.02
Female	6.14±1.91	0.70±2.48	1.92±2.75
fSR treated male groups			
2000 mg/kg	9.40±1.29	1.92±0.86	6.18±1.33
1000 mg/kg	8.42±1.23	1.46±0.93	4.29±1.34
500 mg/kg	7.94±1.42	0.80±1.57	3.84±2.36
fSR treated female groups			
2000 mg/kg	5.54±2.48	0.90±1.37	1.44±2.69
1000 mg/kg	5.02±0.88	1.90±0.92	2.62±1.31
500 mg/kg	5.18±1.68	2.20±1.27	2.98±1.73

Values are expressed as mean ± SD of five mice; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); <sup>a</sup> Day of treatment after overnight fasted; <sup>b</sup> Day of sacrifice after overnight fasted



투여군에서 인정되지 않았다 (Table 4~7).

### 5. 부검 소견

다양한 [1 ~ 3+] 정도의 폐 충출혈(congestion), 가슴샘 위축, 비장 위축, 악하임과절 종대 및 자궁 부종 소견이 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에 걸쳐 산발적으로 관찰된 이외에, 홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 의미 있는 육안 부검소견은 인정되지 않았다 (Table 8~9).

### 6. 조직병리학적 소견

다양한 정도의 폐 충출혈 - 폐포 벽의 비후와 염증세포 및 적혈구 축적 (Fig. 1), 가슴샘 피질 임파구 감소 (Fig. 2), 비장 적색수질 임파구 증생 (Fig. 3), 간 국소 염증세포 침윤 (Fig. 4) 및 자궁 점막 탈락 (Fig. 5) 소견이 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에 걸쳐 산발적으로 관찰된 이외에 홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 조직병리학적 소견은 인정되지 않았다 (Table 10, 11).

Table 4. Changes on the Absolute Organ Weights Observed in Male Mice after Single Oral Treatment of fSR

Groups	Principal Organs					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.210±0.023	0.191±0.010	0.063±0.014	0.321±0.034	0.003±0.001	0.101±0.017
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.207±0.012	0.191±0.008	0.058±0.013	0.325±0.048	0.003±0.002	0.119±0.014
1000 mg/kg	0.209±0.008	0.194±0.010	0.047±0.008	0.289±0.013	0.003±0.001	0.129±0.025
500 mg/kg	0.195±0.008	0.188±0.017	0.047±0.011	0.310±0.063	0.002±0.001	0.096±0.029
Groups	Testis L	Liver	Pancreas S	Brain	Epididymis L	Lymph node L <sup>a</sup>
	Vehicle control	0.119±0.007	1.614±0.032	0.178±0.010	0.499±0.010	0.050±0.003
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.128±0.017	1.607±0.133	0.194±0.013	0.488±0.012	0.048±0.004	0.004±0.002
1000 mg/kg	0.131±0.010	1.552±0.100	0.188±0.036	0.494±0.012	0.046±0.004	0.005±0.002
500 mg/kg	0.111±0.004	1.530±0.205	0.173±0.014	0.491±0.022	0.045±0.005	0.003±0.002

Values are expressed as mean ± SD of five mice; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); L, left sides; S, splenic lobes; <sup>a</sup> Submandibular lymph node

Table 5. Changes on the Absolute Organ Weights Observed in Female Mice after Single Oral Treatment of fSR

Groups	Ovary L	Liver	Pancreas S	Brain	Uterus	Lymph node L <sup>a</sup>
	Vehicle control	0.020±0.003	1.175±0.199	0.166±0.025	0.488±0.012	0.195±0.081
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.018±0.009	1.180±0.202	0.150±0.016	0.486±0.030	0.177±0.083	0.003±0.002
1000 mg/kg	0.022±0.005	1.203±0.037	0.160±0.017	0.468±0.029	0.171±0.045	0.004±0.001
500 mg/kg	0.018±0.005	1.298±0.194	0.151±0.015	0.485±0.015	0.245±0.040	0.005±0.003
Groups	Principal Organs					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.179±0.021	0.149±0.021	0.058±0.021	0.197±0.020	0.004±0.001	0.139±0.047
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.179±0.017	0.148±0.009	0.052±0.020	0.208±0.013	0.003±0.001	0.125±0.035
1000 mg/kg	0.172±0.015	0.140±0.007	0.069±0.014	0.196±0.010	0.005±0.002	0.117±0.030
500 mg/kg	0.180±0.008	0.149±0.008	0.048±0.020	0.215±0.020	0.005±0.003	0.107±0.018

Values are expressed as mean ± SD of five mice; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); L, left sides; S, splenic lobes; <sup>a</sup> Submandibular lymph node

Table 6. Changes on the Relative Organ Weights Observed in Male Mice after Single Oral Treatment of fSR

Groups	Principal Organs					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.582±0.069	0.528±0.032	0.175±0.037	0.889±0.094	0.009±0.004	0.282±0.054
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.545±0.045	0.505±0.030	0.153±0.033	0.853±0.096	0.009±0.005	0.314±0.045
1000 mg/kg	0.578±0.040	0.538±0.045	0.131±0.022	0.800±0.029	0.009±0.003	0.358±0.072
500 mg/kg	0.545±0.051	0.523±0.048	0.130±0.023	0.853±0.082	0.007±0.002	0.297±0.058
Groups	Principal Organs					
	Testis L	Liver	Pancreas S	Brain	Epididymis L	Lymph node La
Vehicle control	0.331±0.020	4.470±0.165	0.492±0.023	1.383±0.047	0.138±0.009	0.014±0.012
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.340±0.055	4.231±0.290	0.513±0.055	1.287±0.085	0.127±0.018	0.009±0.006
1000 mg/kg	0.364±0.040	4.292±0.283	0.520±0.094	1.368±0.074	0.129±0.016	0.013±0.005
500 mg/kg	0.309±0.024	4.234±0.160	0.484±0.059	1.372±0.143	0.129±0.020	0.007±0.003

Values are expressed as mean ± SD of five mice, % of body weight; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); L, left sides; S, splenic lobes; <sup>a</sup>Submandibular lymph node

Table 7. Changes on the Relative Organ Weights Observed in Female Mice after Single Oral Treatment of fSR

Groups	Principal Organs					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
Vehicle control	0.633±0.033	0.528±0.048	0.201±0.050	0.701±0.066	0.016±0.003	0.485±0.117
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.649±0.072	0.536±0.054	0.185±0.053	0.752±0.059	0.011±0.004	0.446±0.088
1000 mg/kg	0.596±0.023	0.487±0.011	0.239±0.040	0.681±0.034	0.017±0.005	0.408±0.100
500 mg/kg	0.618±0.060	0.511±0.049	0.161±0.053	0.736±0.059	0.016±0.010	0.363±0.029
Groups	Principal Organs					
	Ovary L	Liver	Pancreas S	Brain	Uterus	Lymph node La
Vehicle control	0.070±0.010	4.147±0.412	0.587±0.080	1.741±0.179	0.682±0.233	0.008±0.004
fSR treated groups						
2000 mg/kg	0.064±0.024	4.221±0.313	0.541±0.046	1.766±0.250	0.624±0.241	0.009±0.004
1000 mg/kg	0.075±0.013	4.192±0.321	0.558±0.058	1.627±0.106	0.592±0.146	0.013±0.003
500 mg/kg	0.062±0.013	4.424±0.348	0.518±0.037	1.668±0.156	0.849±0.211	0.015±0.010

Values are expressed as mean ± SD of five mice, % of body weight; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); L, left sides; S, splenic lobes; <sup>a</sup>Submandibular lymph node



Table 8. Necropsy Findings Observed Male Mice after Single Oral Treatment of fSR

Organs-Findings	Groups	Vehicle control	fSR treated as		
			2000 mg/kg	1000 mg/kg	500 mg/kg
Lung					
Normal		4/5	4/5	4/5	4/5
Congestion		1/5	1/5	1/5	1/5
Thymus					
Normal		5/5	5/5	4/5	5/5
Atrophy		0/5	0/5	1/5	0/5
Spleen					
Normal		3/5	4/5	5/5	3/5
Atrophy		2/5	1/5	0/5	2/5
Lymph node <sup>a</sup>					
Normal		3/5	4/5	4/5	4/5
Hypertrophy		2/5	4/5	1/5	1/5

Observed animals/total observed animals of five mice; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); <sup>a</sup> Bilateral submandibular lymph node.

Table 9. Necropsy Findings Observed Female Mice after Single Oral Treatment of fSR

Organs-Findings	Groups	Vehicle control	fSR treated as		
			2000 mg/kg	1000 mg/kg	500 mg/kg
Lung					
Normal		4/5	4/5	3/5	5/5
Congestion		1/5	1/5	2/5	0/5
Thymus					
Normal		3/5	4/5	5/5	4/5
Atrophy		2/5	1/5	0/5	1/5
Spleen					
Normal		4/5	5/5	5/5	5/5
Atrophy		1/5	0/5	0/5	0/5
Uterus					
Normal		2/5	3/5	2/5	0/5
Edematous		3/5	2/5	3/5	5/5
Lymph node <sup>a</sup>					
Normal		5/5	3/5	5/5	4/5
Hypertrophy		0/5	2/5	0/5	1/5

Observed animals/total observed animals of five mice; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); <sup>a</sup> Bilateral submandibular lymph node.

Table 10. Histopathological Findings Observed Male Mice

Organs-Findings	Groups	Vehicle control	fSR treated as		
			2000 mg/kg	1000 mg/kg	500 mg/kg
Lung					
Normal		4/5	4/5	4/5	4/5
Congestion		1/5	1/5	1/5	1/5
Thymus					
Normal		5/5	5/5	4/5	5/5
cDE <sup>†</sup>		0/5	0/5	1/5	0/5
Spleen					
Normal		4/5	4/5	4/5	5/5
rHP <sup>†</sup>		1/5	1/5	1/5	0/5
Liver					
Normal		3/5	5/5	4/5	5/5
IF <sup>†</sup>		2/5	0/5	1/5	0/5

Observed animals/total observed animals of five mice; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); <sup>a</sup> Left submandibular lymph node; <sup>†</sup>Abbreviations: cDE, decreases of cortex lymphoid cells; rHP, hyperplasia of red pulp lymphoid cells; IF, focal inflammatory cell infiltration

Table 11. Histopathological Findings Observed Female Mice

Organs-Findings	Groups	Vehicle control	fSR treated as		
			2000 mg/kg	1000 mg/kg	500 mg/kg
Lung					
Normal		4/5	4/5	3/5	5/5
Congestion		1/5	1/5	2/5	0/5
Thymus					
Normal		3/5	3/5	4/5	5/5
cDE <sup>†</sup>		2/5	2/5	1/5	0/5
Spleen					
Normal		3/5	4/5	3/5	4/5
rHP <sup>†</sup>		2/5	1/5	2/5	1/5
Liver					
Normal		4/5	4/5	4/5	5/5
IF <sup>†</sup>		1/5	1/5	1/5	0/5
Uterus					
Normal		4/5	5/5	5/5	4/5
DM <sup>†</sup>		1/5	0/5	0/5	1/5

Observed animals/total observed animals of five mice; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); <sup>a</sup> Left submandibular lymph node; <sup>†</sup>Abbreviations: cDE, decreases of cortex lymphoid cells; rHP, hyperplasia of red pulp lymphoid cells; IF, focal inflammatory cell infiltration; DM, desquamation of mucosa layers



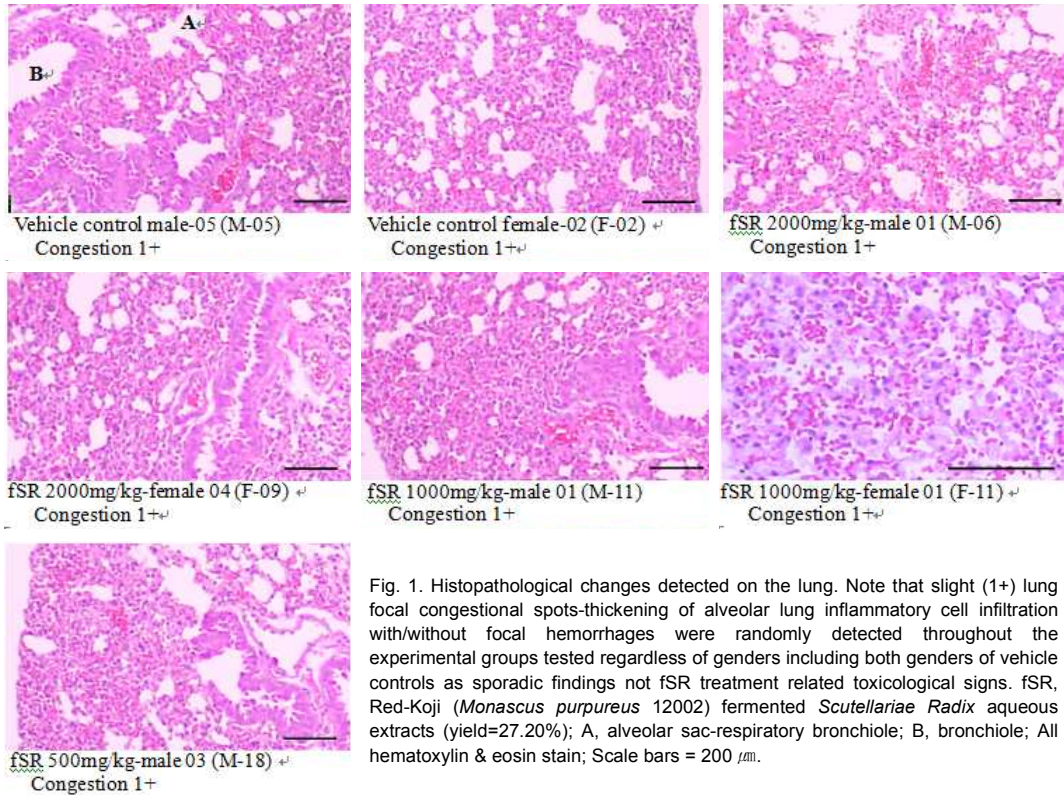


Fig. 1. Histopathological changes detected on the lung. Note that slight (1+) lung focal congestional spots-thickening of alveolar lung inflammatory cell infiltration with/without focal hemorrhages were randomly detected throughout the experimental groups tested regardless of genders including both genders of vehicle controls as sporadic findings not fSR treatment related toxicological signs. fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); A, alveolar sac-respiratory bronchiole; B, bronchiole; All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200  $\mu$ m.

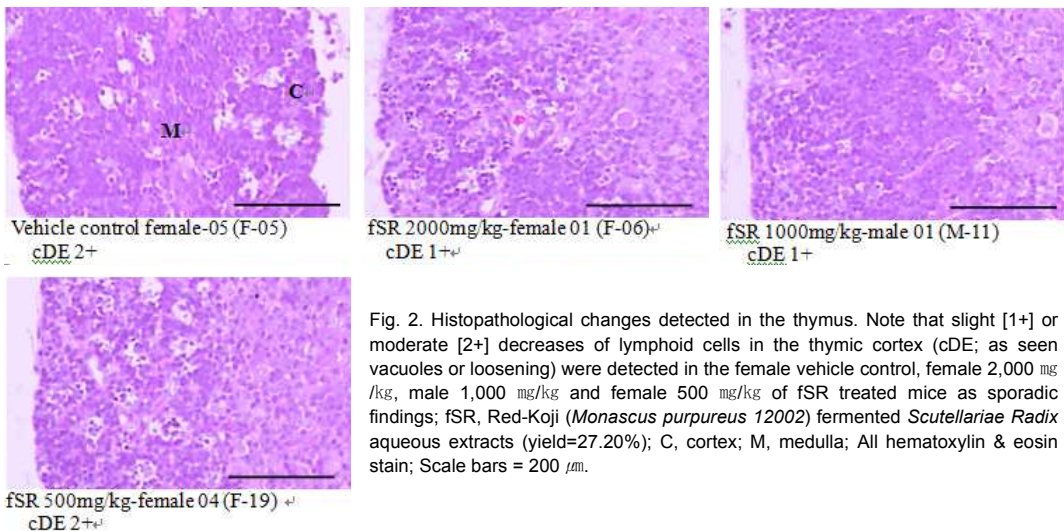


Fig. 2. Histopathological changes detected in the thymus. Note that slight [1+] or moderate [2+] decreases of lymphoid cells in the thymic cortex (cDE; as seen vacuoles or loosening) were detected in the female vehicle control, female 2,000 mg/kg, male 1,000 mg/kg and female 500 mg/kg of fSR treated mice as sporadic findings; fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); C, cortex; M, medulla; All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200  $\mu$ m.

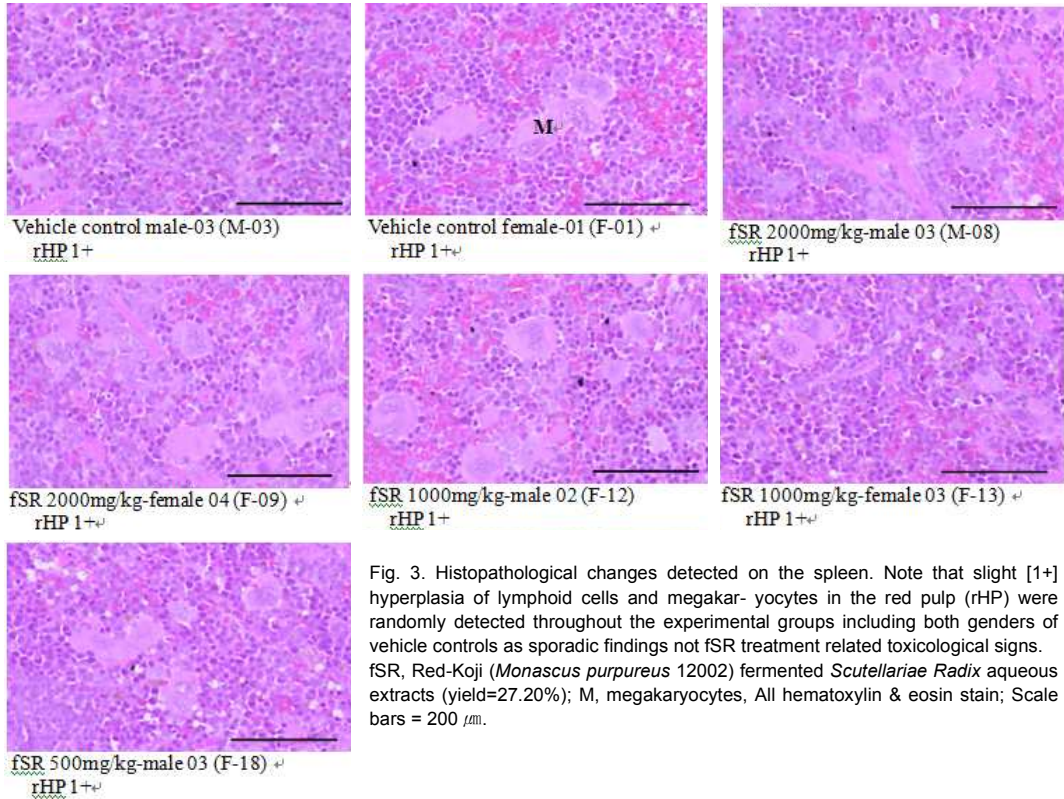


Fig. 3. Histopathological changes detected on the spleen. Note that slight [1+] hyperplasia of lymphoid cells and megakaryocytes in the red pulp (rHP) were randomly detected throughout the experimental groups including both genders of vehicle controls as sporadic findings not fSR treatment related toxicological signs. fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); M, megakaryocytes, All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200  $\mu$ m.

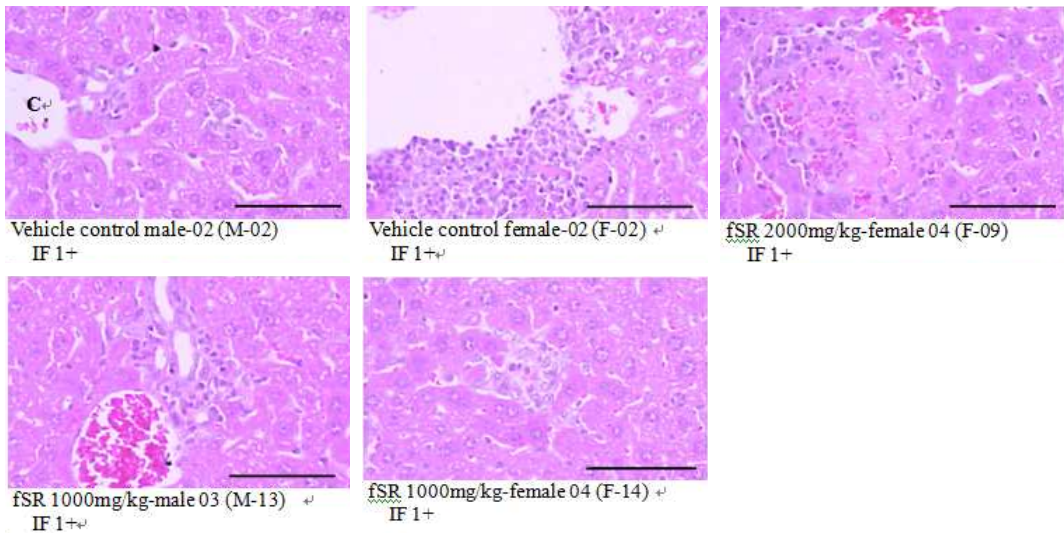


Fig. 4. Histopathological changes detected in the liver. Note that slight [1+] focal inflammatory cell infiltrations (IF) were detected throughout the experimental groups including both genders of vehicle controls as sporadic findings not fSR treatment related toxicological signs. fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); C, central vein; All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200  $\mu$ m.

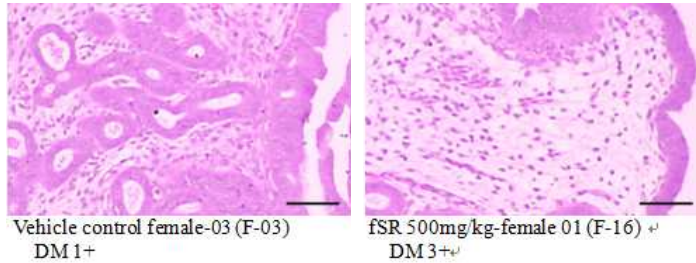


Fig. 5. Histopathological changes detected in the uterus. Note that slight [1+] or severe [3+] desquamation of uterus mucosa (DM) were observed in one (1/5; 20%) female mice in vehicle control, fSR 2,000 and 500 mg/kg treated group as a process of estrus cycle, respectively. fSR, Red-Koji (*Monascus purpureus* 12002) fermented *Scutellariae Radix* aqueous extracts (yield=27.20%); L, lumen; All hematoxylin & eosin stain; Scale bars = 200  $\mu$ m.

#### IV. 고 찰

본 연구에서는 한의학에서 청열약으로 널리 사용하는 황금은 氣味상 苦寒한데 苦味는 燥濕하고 寒性은 清熱하여 清熱燥濕하는 常用藥物이 되어, 濕熱諸症에 사용하는데, 특히 肺經의 熱을 瀉하는데 더욱 우수하다. 그러므로 邪熱이 肺를 犯하여 나타나는 肺熱咳嗽, 淡黃粘稠 등의 證에 반드시 사용하는 대표적인 清熱藥의 하나이다<sup>12)</sup>. 황금 추출물 및 황금 유래 성분, 특히 Flavonoids로서 baicalein 및 wogonin의 약리효과에 대한 많은 연구가 진행 되어 왔으며, 항바이러스 효과<sup>13)</sup>, 항 당뇨 효과<sup>14)</sup>, 신경계 보호 효과<sup>15)</sup>, 조혈작용<sup>16)</sup>, 항산화 효과<sup>17)</sup>, 항암효과<sup>18)</sup>, 면역활성<sup>19)</sup>, 항염효과<sup>20)</sup>, ritonavir 독성완화 효과<sup>21)</sup>, 항돌연변이 원성<sup>22)</sup>이 비교적 잘 알려져 있다. 또한, 황금물 추출물의 마우스 단회 경구투여 독성시험<sup>23)</sup>, 황금과 아카시아 복합 추출물에 대한 랫트 90일 반복 경구 투여 독성실험<sup>24)</sup>, 황금 에탄올 추출물 및 황금의 flavonoid 성분들에 대한 랫트 단회 투여 독성실험<sup>25)</sup> 등 안전성과 관련된 연구도 다양하게 보고되고 있다.

황금 추출물을 생리활성을 증가시키기 위해 홍국균 (*Monascus purpureus* 12002; 한국식품개발연구원)으로 발효시킨 홍국 발효 황금 추출물의 일반 독성시험 중 현재 한국식품의약품안전처

고시 의약품 등의 독성시험기준<sup>8)</sup>에 명시되어 있는 마우스 경구 단회투여독성 시험을 실시하여, 장기투여 독성 시험과 생식 발생독성 시험을 위시한 특수 독성시험에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

현재까지 발효 황금 추출물에 대한 독성 자료를 찾아 볼 수 없어, 본 실험에서는 한국식품의약품안전처 고시<sup>8)</sup>와 OECD 실험기준<sup>9)</sup>에 의거하여, 설치류 최고 한계투여용량인 2,000mg/kg을 최고 용량으로 설정하였으며, 공비 2로 1000 및 500 mg/kg을 중간 및 저용량으로 설정하여, 단회 경구 투여하고, 14일간 체중 및 임상증상을 관찰하였으며, 14일 후 최종 부검을 통하여 12개의 주요 장기에 대한 장기 중량, 육안 부검 및 조직병리학적 관찰을 실시한 결과, 단회투여 독성 시험에서 설치류 최대 한계투여 용량인 2,000mg/kg까지 홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 사망례가 인정되지 않았으며, 홍국 발효 황금 추출물의 투여와 관련된 임상증상, 체중, 증체량 및 장기 중량의 변화 역시 인정되지 않았다. 또한 육안부검시 다양한 정도의 폐 충출혈, 가슴샘 위축, 비장 위축, 악하임파절 종대 및 자궁 부종 소견이 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 산발적으로 인정되었고, 조직병리학적 검사시 다양한 정도의 폐 충출혈, 가슴샘 피질 임파구 감소, 비장 적색수질 임파구 증생, 간 국소 염증세포 침윤 및 자궁 점막 탈락 소견이 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에 걸쳐 산발적으로 관찰된 이외에 홍국 발



효 황금 추출물 투여와 관련된 육안 부검 및 조직 병리학적 소견은 인정되지 않았다.

본 실험에 사용한 실험동물의 체중 및 장기중량은 동일한 주령의 마우스들의 정상 범주<sup>26-7)</sup>에 포함되어 관찰되었으며, 각각 동일 성별의 매체 대조군과 비교하여, 홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 체중 및 증체량의 변화는 인정되지 않았다.

한국식품의약품안전처 고시<sup>8)</sup> 및 OECD 기준<sup>9)</sup>에 따르면, 설치류에서 투여한계 농도를 2000mg/kg 또는 최대 용해농도로 규정하고 있고, 투여 용량은 20ml/kg을 넘지 못하게 규정하고 있다. 본 실험에서 사용한 홍국 발효 황금 추출물은 멸균 증류수에 100mg/ml까지 비교적 잘 용해되어, 20ml/kg의 용량 즉, 2,000mg/kg을 최고 농도로 투여하였다.

육안 부검시 인정된 다양한 정도의 폐 충출혈, 가슴샘 위축, 비장 위축, 악하임파절 종대 및 자궁 부종 소견들과 조직병리학적 검사시 인정된 다양한 정도의 폐 충출혈, 가슴샘 피질 임파구 감소, 비장 적색수질 임파구 증생, 간 국소 염증세포 침윤 및 자궁 점막 탈락 소견은 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에 걸쳐 산발적으로 관찰되었으며, 용량 의존성이 전혀 인정되지 않아, 홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련 없는 우발적 병소로 판단되고, 이들 병소들은 정상 마우스에서 드물게 인정되는 소견으로 알려져 있고<sup>28-9)</sup>, 특히 자궁은 성주기(estrus cycle)에 따라 쉽게 변화할 수 있어<sup>30)</sup> 자궁 부종은 성주기에 따른 이차적 변화로 판단된다.

US Environmental Protection Agency<sup>31)</sup>에 따르면 일반적으로 반수 치사량이 5,000~15,000mg/kg인 물질을 무독성 물질로, 500~5,000mg/kg을 비교적 저독성 (Class III) 물질로 규정하고 있으나, 한국식품의약품 안전처 고시<sup>8)</sup> 및 OECD 기준<sup>9)</sup>에 따르면, 설치류에서 투여한계 농도를 2,000mg/kg으로 제한하고 있다. 따라서 본 실험의 마우스 단회 경구투여 독성실험에서 홍국 발효 황금 추출물의 반수치사량 및 개략적 치사량은 각각 2,000mg/kg 이상으로 관찰되었다.

## V. 결 론

설치류에서 투여한계 농도인 2,000mg/kg까지 홍국 발효 황금 추출물 투여와 관련된 사망례는 인정되지 않아, 마우스 단회 경구투여 독성실험에서 홍국 발효 황금 추출물의 반수치사량 및 개략적 치사량은 각각 2000mg/kg 이상으로 관찰되어, 비교적 안전한 약물로 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, UM JY, Kim SC, Y JH, Cho MK, Yim JP, Hong SH. Herbal Pharmacology. Seoul:Shin-II books. 2001:242-6.
2. Bae JH, Lee MJ, Lee SM. Antimicrobial Effect of *Cutellaria baicalensis* Geroqe Extracts on Food-Borne Pathogens. J Microbiol Biotechnol. 2005;33:35-40.
3. Trinh HT, Han SJ, Kim SW, Lee YC, Kim DH. Bifidus fermentation increases hypolipidemic and hypoglycemic effects of red ginseng. J Microbiol Biotechnol. 2007;17:1127-33.
4. Lee SI, Shin JG, Kim SD. Effect of ginseng-chungkukjang effects on lipid profiles of serum in alcohol administered diabetic-induced rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2005b;34:1362-6.
5. Cha JY, Park JC, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Lee CH, Cho YS. Effect of *Monascus purpureus*-Fermented Korean Red Ginseng Powder on the Serum Lipid Levels and Antioxidative Activity in Rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009;38:1153-60.
6. Tsukahara M, Shinzato N, Tamaki Y, Nami-hira T, Matsui T. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp.with deep-red

- color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009;158:476-82.
7. Pyo YH, Lee TC. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Monascus*-fermented soybean extracts: evaluation of *Monascus*-fermented soybean extracts as multifunctional food additives. *J Food Sci.* 2007;72: S218-23.
  8. KFDA. Toxicity Study Criteria of medicine and medical supplies. Seoul. KFDA. notification No. 2009-116. 2009.
  9. Organization for Economic Co-Operation and Development (Ed.). OECD guideline (423) for testing of chemicals - acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001.
  10. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systemic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse. *Psychopharmacology.* 1968;13:222-57.
  11. Dourish CT. Effects of drugs on spontaneous motor activity. In: *Experimental Psychopharmacology.* Greenshaw AJ, Dourish CT, Ed. Clifton:Humana Press. 1987:325-34.
  12. Kim IR, Kim HC, Kook YB, Park SJ, Park YG, Park JH, Seo BI, Seo YB, Song HJ, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Yim KH, Cho SI, Jeong JG, Joo YS, Choi HY. *Herbology.* Seoul:Younglim. 2007;216-18.
  13. Błach-Olszewska Z, Jatczak B, Rak A, Lorenc M, Gulanowski B, Drobna A, Lamer-Zarawska E. Production of cytokines and stimulation of resistance to viral infection in human leukocytes by *Scutellaria baicalensis* flavones. *J Interferon Cytokine Res.* 2008;28: 571-81.
  14. Waisundara VY, Hsu A, Huang D, Tan BK. *Scutellaria baicalensis* enhances the anti-diabetic activity of metformin streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Am J Chin Med.* 2008;36:517-40.
  15. Sun X, Chan LN, Gong X, Sucher NJ N-methyl-D-aspartate receptor antagonist activity in traditional Chinese stroke medicines. *Neurosignals.* 2003;12:31-8.
  16. Udut EV, Zhdanov VV, Gur'iantseva LA, Minakova Mlu, Dygai AM. Mechanisms of the erythropoiesis-stimulating effect of skullcap (*Scutellaria baicalensis*) extract. *Eksp Klin Farmakol.* 2005;68:43-5.
  17. Przybylska D, Długosz A. The research on Antoxid activity in free radicals processes. *Acta Pol Pharm.* 2007;64:491-5.
  18. Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Lett.* 2007;245:299-74.
  19. Wang JY, Chuang HN, Chiu JH, Fu SL, Tsai TH, Tsou AP, Hu CP, Chi CW, Yeh SF, Lui WY, Wu CW, Chou CK. Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi on macrophage-hepatocyte interaction through cytokines related to growth control of murine hepatocytes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231: 444-55.
  20. Huang ST, Lee Y, Gullen EA, Cheng YC. Impacts of baicalein analogs with modification of the 6th position of A ring on the activity toward NF- $\kappa$ B-, AP-1-, or CREB-mediated transcription. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008b;18:5046-9.
  21. Mehendale S, Aung H, Wang CZ, Tong R, Foo A, Xie JT, Yuan CS. *Scutellaria baicalensis* and a constituent flavonoid, bai-



- calein, attenuate ritonavir-induced gastroin-  
testinal side-effects. *J Pharm Pharmacol.*  
2007;59:1567-72.
22. Lee BH, Lee SJ, Kang TH, Kim DH, Sohn  
DH, Ko GI, Kim YC. Baicalein: an in vitro  
antigenotoxic compound from *Scutellaria*  
*baicalensis*. *Planta Med.* 2000;66:70-1.
23. Lee JW, Jung YS, Jung TY, Kim JD, Choi  
HY. Mouse Single Oral Dose Toxicity Test  
of *Scutellariae Radix* Aqueous Extracts.  
*Korean J Orient Int Med.* 2013;34:46-59.
24. Yimam M, Zhao Y, Ma W, Jia Q, Do SG,  
Shin JH. 90-day oral toxicity study of  
UP446, a combination of defined extracts  
of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu*, in  
rats. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:1202  
-9.
25. Chang BY, Malla B, Sohn DH, Kim YC,  
Kim SY. Acute Toxicity of a Combined  
Preparation of the Standardized Extracts of  
*Scutellaria baicalensis* GEORGI and *Salvia*  
*multiorrhiza* BUNGE. *Kor J Pharmacogn.*  
2011;42: 295-70.
26. Plata EJ, Murphy WH. Growth and haema-  
tologic properties of the BALB/wm strain  
of inbred mice. *Lab Anim Sci.* 1972;22:  
712-20.
27. Yamaguchi C, Fujita S, Obara T, Ueda T.  
Effects of room temperature on repro-  
duction, body weight and organ weights,  
food and water intakes, and hematology in  
mice. *Exp Anim.* 1983;32:1-11.
28. Lee JH, Yang KJ, Shin HD, Park BR, Son  
CW, Jang HJ, Park DC, Lee HS, Ku SK. Single  
subcutaneous dose toxicity of Polycan®, a  
 $\beta$ -glucan originated from *Aureobasidium* in  
mice. *Lab Anim Res.* 2005a;21:299-305.
29. Lee HS, Lee IG, Ku SK. Single oral dose  
toxicity study of water extracts of *Picrorrhiza*  
*Rhizoma* in mice. *J Toxicol Pub Health.*  
2006;22:117-29.
30. Banks WJ. Female reproductive system.  
In: Banks WJ, ed. *Applied veterinary  
histology*, 2nd ed. Baltimore:Williams &  
Wilkins. 1988:506-29.
31. US Environmental Protection Agency Health  
Effects Test Guidelines OPPTS 870.100.  
*Acute Toxicity Testing Background.* US EPA  
August. Washington. USA. 1998.