

경옥고가미방의 베타글루칸, 진세노사이드 함량, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Free Radical 소거 활성 및 단회 투여 독성 연구

이유미* · 문양선[†] · 박희명[‡] · 김형석[‡] · 노웅빈[‡] · 나창수*

동신대학교 한의과대학 경혈진단학교실*, (유)나우리[†], 건국대학교 수의과대학 수의내과학교실[‡]

A Study on the β -glucan, Ginsenoside Content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Free Radical Scavenging Activity and Single Dose Toxicity Assessment of Modified Kyungohkgo

Yu-Mi Lee, Ph.D.*, Yang-Seon Moon, Ph.D.[†], Hee-Myeong Park, D.V.M., Ph.D.[‡],
Heyong-Seok Kim, M.S.[‡], Woong-Bin Ro, D.V.M., Ph.D.[‡], Chang-Su Na, K.M.D.*

Department of Meridian & Acupoint · Diagnosis, College of Korean Medicine, Dongshin University*, Nawoori (Ltd)[†],
Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Konkuk University[‡]

This paper has been written with the support of Jeollanam-do ('2019 R&D supporting program' operated by Jeonnam Technopark.

RECEIVED December 22, 2020

REVISED December 29, 2020

ACCEPTED December 30, 2020

CORRESPONDING TO

Chang-Su Na, Department of Meridian & Acupoint · Diagnosis, College of Korean Medicine, Dongshin University, 67 Dongshindae-gil, Naju 58245, Korea

TEL (061) 330-3522

FAX (061) 330-3519

E-mail nakugi@hanmail.net

Objectives This study was conducted to investigate the beta-glucan, ginsenoside content, antioxidant activity and safety of modified Kyungohkgo added to *Sparassis crispa* and *Hericium erinaceum*.

Methods The marker compounds contents, antioxidant activity and safety of modified Kyungohkgo were tested. The contents of beta-glucan and ginsenoside Rb1, Rg1, and Rg3 marker compounds were measured, the antioxidant activity was measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, and a safety test was conducted via single dose toxicity assessment.

Results Analyzing the contents of marker compounds showed 351.75 mg/g of beta-glucan, 0.0327 mg/g of ginsenoside Rb1 and 0.0802 mg/g of ginsenoside Rg3. In the DPPH free radical scavenging activity, the inhibition concentration 50% of modified Kyungohkgo was 0.2880%. The scavenging activity of modified Kyungohkgo was 5.49% activity at 0.05% concentration, 89.66% activity at 0.5% concentration, 94.68% activity at 1% concentration, and 96.06% activity at 5% concentration. In the single dose toxicity test of modified Kyungohkgo, a dose of 2,000 mg/kg B.W. was set at its highest capacity and observed after oral administration to female and male rats. No toxicological findings were recognized. It was observed that the resulting lethal dose can be set to 2,000 mg/kg B.W. or higher for both females and males.

Conclusions The results of the experiment on modified Kyungohkgo showed that the marker compounds contents were beta-glucan and ginsenoside Rb1 and Rg3, that antioxidant activity was observed through the DPPH free radical scavenging activity, and safety was confirmed through the single dose toxicity assessment. (**J Korean Med Rehabil 2021;31(1):95-108**)

Key words Modified Kyungohkgo, Beta-glucans, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rg3, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Single dose toxicity assessment

서론»»»»

경옥고는 『洪氏集驗方』에서 최초로 기록된 처방으로 인삼, 백복령, 생지황, 붕밀 4가지 약물로 구성된 처방으로 『동의보감』 신형편에 “填精補髓, 調眞養性, 返老還童, 補百損, 除百病, 萬神俱足, 五藏盈溢”의 효과가 있다고 하였고, 또한 천문동, 맥문동, 지골피를 배합하여 益壽永眞膏라고 소개하고 있다¹⁾. 경옥고가미방인 익수영진고는 경옥고에 補陰시킬 수 있는 재료가 추가되어 있어서 益氣養陰의 효과를 증강한 제제로서²⁾, 精血不足으로 인한 근골계통 질환이나 항병력 저하로 인한 각종 질환의 예방과 치료에 응용하고 있다.

본 연구진은 경옥고가미방인 익수영진고에 꽃송이버섯을 가미한 제제의 면역 활성 효과에 대하여 연구한 바 있었는데³⁾, 추가적으로 사용된 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 β -1,3-D-glucan과 함께 다양한 폴리페놀 화합물도 많이 함유하고 있어 면역 활성 및 항암 효과⁴⁻⁶⁾와 함께 항균⁷⁾, 항염증⁸⁾, 항산화⁹⁾에 유효한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는 소재이며, 이 연구에서 경옥고가미방인 익수영진고加꽃송이버섯 제제가 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical 소거능과 total phenol 함량을 유의하게 증가시켰고, 면역관련 cytokine에 있어서 interleukin (IL)-2는 감소, IL-10은 증가를 나타내어 항상성이 유지된다고 제시한 바 있다³⁾.

노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 민주름버섯목 턱수염버섯과 산호침버섯속에 속하는 버섯으로¹⁰⁾ β -glucan과 같은 다당체와 함께 hericenones, erinacines와 같은 aromatic 화합물¹¹⁾이 포함되어 있으며, 노루궁뎅이버섯 추출물은 항산화 효과, 신경세포 보호활성을 나타내어 항암치료 보조제는 물론 인지장애 개선 보조제로 사용되고 있어서¹²⁾, 본 연구에서는 이 재료를 함께 포함한 제제를 경옥고가미방으로 하여 연구에 적용하고자 하였다.

한의약은 자연에 존재하는 수많은 동물, 식물, 광물 등의 천연에서 기원한 원재료로 많이 사용되어 왔으며²⁾, 식품의 경우 국민건강영양조사 등을 통해 독성을 일으킬만한 물질이 포함된 식품의 섭취량을 추정할 수 있지만¹³⁾, 의약품의 경우엔 판매에 관한 권한이 조정되기 때문에 각 국에서는 유익성-위해성 평가 제도에 관한 연구를 활발히 진행하고 있다¹⁴⁾.

본 연구에서는 이전 연구³⁾에서 효능을 확인한 바 있는 익수영진고加꽃송이버섯 제제에 노루궁뎅이버섯을 추가한 제제의 지표성분과 항산화 및 안전성을 확인하기 위하여 Good Laboratory Practice (GLP) 인증을 받은 기관에서 제제 내 베타글루칸과 진세노사이드의 지표 성분 함량분석과 제제의 DPPH free radical 소거활성의 항산화 효과를 관찰하고, 아울러 안전성 관련 단회투여 독성시험을 진행하여 전신적 독성 반응을 평가한 바 다음과 같은 지견을 얻었다.

재료 및 방법»»»»

1. 배합재료, 경옥고가미방 배합 및 제조방법

1) 배합재료

홍삼(*Red ginseng radix*)은 정천고려홍삼(금산, 한국), 백복령(*Poria cocos*) 및 복령피(*Poria cocos Bark*)는 (주)미레로(화순, 한국), 붕밀(*Honey*)은 백화양봉(정읍, 한국), 생지황(*Rehmanniae radix*)은 (영)금산지황(금산, 한국), 천문동(*Asparagi radix*)은 아산농원(화순, 한국), 맥문동(*Liriope tuber*), 구기자(*Lycii fructus*) 인삼당(함평, 한국), 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 (주)바이오글루칸(평택, 한국), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 (영)씨엔지유기농(세종, 한국)에서 모두 국내산으로 구입하여 사용하였다.

2) 경옥고가미방 배합 및 제조방법

재료별 함량은 고행재료로 홍삼 430 g, 백복령 2,100 g, 천문동 160 g, 맥문동 160 g, 구기자 300 g, 꽃송이버섯 210 g, 노루궁뎅이버섯 680 g, 복령피 160 g으로 정하였고, 액상재료로 생지황즙 96,000 g, 붕밀 9,200 g을 사용하였다(Table I).

제조방법은 동의보감에 제시된 방법을 준용하였다. 생지황즙액을 얻기 위해서 생지황 14,000 g을 분쇄기(동방식품기계, 부천, 한국)에 넣어 마쇄하고, 마쇄된 상태에서 착즙기(동방식품기계)에 넣어 생지황즙 9,600 g을 얻었다(수율 68.6%). 생지황과 붕밀을 제외한 나머지 고행재료 4.200 g은 미세분말화 하였고, 이를 생지황즙 9,600 g과 붕밀 9,200g을 함께 균일하게 혼합된 시료

Table I. Material Content of Modified Kyungokgo

Category	Scientific name	Amount (g)	Ratio (%)
Solid materials (A)	<i>Red ginseng radix</i>	430	1.9
	<i>Poria cocos</i>	2,100	9.1
	<i>Asparagi radix</i>	160	0.7
	<i>Liriopis tuber</i>	160	0.7
	<i>Lycii fructus</i>	300	1.3
	<i>Sparassis crispa</i>	210	0.9
	<i>Hericium erinaceum</i>	680	3.0
	<i>Poria cocos Bark</i>	160	0.7
	Sub total	4,200	18.3
Liquid materials (B)	<i>Rehmanniae radix</i> (Juice)	9,600	41.7
	Honey	9,200	40.0
	Sub total	18,800	81.7
Total (A+B)		23,000	100.0

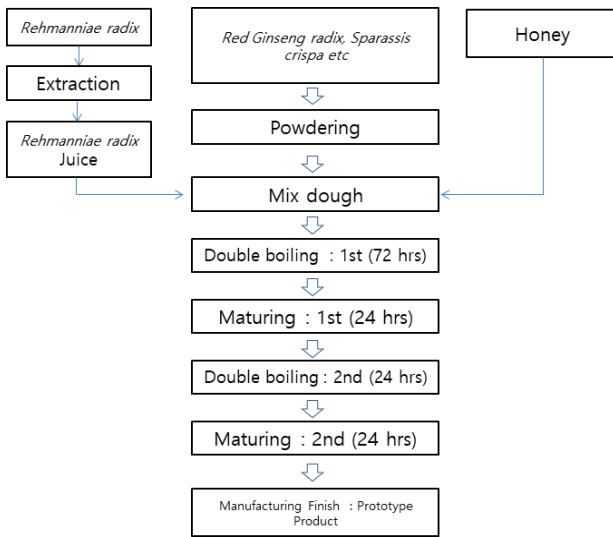


Fig. 1. Manufacturing process of modified Kyungokgo.

23,000 g을 반죽하였고, 온도와 급수가 자동으로 조절되면서 용기가 장착된 증탕기(double boiling apparatus; 반도식품기계, 부산, 한국)에 넣었다. 3일 동안 100±2°C로 유지하면서 1차 증탕을 시행하였고, 1차 증탕이 끝난 후 1일 동안 실온에 방치하면서 1차 숙성시켰다. 다시 1일 동안 1차 증탕과 같은 조건으로 2차 증탕을 시행하였고, 이후 1일 동안 1차 숙성과 같은 조건으로 2차 숙성 과정을 진행하였다. 이러한 일련의 과정을 거쳐서 고형태의 경옥고가미방 시료 22,900 g (수율 99.6%)을 제조하였다(Fig. 1)³⁾.

2. 경옥고가미방 함유 베타글루칸, 진세노사이드 분석

1) 개요

경옥고가미방에 함유된 베타글루칸과 진세노사이드 함량 측정은 공인인증기관인 한국기능식품연구원에서 시행하였으며(번호 D2020022259), 베타글루칸 분석은 ‘건강기능식품공전 제4. 건강기능식품 시험법 3. 개별성분별 시험법 3-25-1 베타글루칸1법’에 의하여 시행하였으며, 진세노사이드 분석은 ‘건강기능식품공전(신) 제4 건강기능식품 시험법 3-54 진세노사이드 4. 시험과정 4.2 시험용액의 조제 4.2.2 농축액’에 의하여 시행하였다.

2) 베타글루칸 측정

(1) 시험재료

베타글루칸 측정에 사용된 시험물질은 경옥고가미방이며 표준물질은 D-(+)-glucose (Sigma Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

(2) 시험 및 검사 방법

① 표준용액의 조제

표준물질 54.79 mg을 채취하여 최종 부피가 100 mL이 되도록 증류수에 완전히 녹여 547.3521 ug/mL 농도의 표준원액으로 만들었으며, 검량선 작성을 위해 표준원액을 증류수로 희석하여 11.4032, 17.1048, 34.2095, 68.4190, 136.8380 ug/mL 농도의 표준용액으로 만들었다.

② 시험용액의 조제

㉠ 전처리 과정

시험은 두 개의 시료 및 공시험을 동시에 실시하였다. 시료 일정량을 삼각플라스크에 넣어 지방이 10% 이상인 경우 탈지하고, 당을 많이 함유한 경우 85% 에탄올 용액으로 시료 20 mg당 10 mL씩으로 세척하고 증류수 10 mL을 가한다. 이 후 아밀라아제(20,000~60,000 U/mL) 약 0.1 mg을 취하고, 0.1 N 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH 6.9로 한 후 20°C에서 2시간동안 진탕하여 효소분해시킨다. 0.1 N 염산용액으로 pH 5.0으로 맞추고 셀룰라아제(1,600 U/mL)를 0.1 mL 넣고 37°C에서 2시간동안 진탕하여 효소분해시킨다. 프로테아제(600~1,300 U/mL) 약 0.1 mL를 넣고 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 7.5로 한 후 37°C에서 2시간동안 진탕하여 효소분해시킨다. 아밀로글루코시다제(10,000 U/mL) 약 0.1 mL를 넣고 0.1 N 염산용액으로 pH 4.8로 한 후 60°C에서 2시간동안 진탕하여 효소분해시킨다. 효소분해물에 95% 에탄올 40 mL를 가하여 4°C에서 12시간동안 침전시킨 후 용액을 원심분리(3,000 rpm, 20분)하여 시료의 침전물을 취한다. 시료의 침전물에 80% 에탄올 50 mL를 가하여 4°C에서 1시간동안 침전시켜 용액을 원심분리(3,000 rpm, 20분)하고, 원심분리된 침전물에 증류수 10 mL를 가한 후 침전물을 혼합하여 균질화시킨다. 균질화된 용액을 증류수로 50 mL가 되도록 한 후 이를 적정농도가 되도록 희석하여 시험용액으로 한다.

㉡ 발색 과정

25 mL 시험관을 농도별 표준용액과 시험용액(공시험 포함)으로 구분하여 각각 5% 페놀용액 1 mL를 넣는다. 농도별 표준용액을 각각 1 mL씩 가하고, 시험용액은 시험용액 0.1 mL과 증류수 0.9 mL를 가한다. 공시험은 증류수 1 mL을 가하여 용액들을 10초간 잘 흔들어 섞는다. 시험관에 각각 황산 5 mL을 가하여 혼합하고 실온에서 20분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정한다. 분석결과는 아래의 계산식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{베타글루칸 (mg/g)} = \frac{\text{시험용액의 농도(ug/mL)} \times \text{최종부피(mL)} \times \text{희석배수} \times 0.9 \times 10}{\text{시료채취량(g)} \times 1000} \times \text{규격}$$

*베타글루칸 전환계수(162/180) = 0.9

3) 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3 측정

(1) 시험재료

진세노사이드 측정에 사용된 시험물질은 경옥고가미방을 사용하였으며, 표준물질은 Ginsenoside Rb1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), Ginsenoside Rg1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), Ginsenoside Rg3 (Chromadex, Los Angeles, CA, USA)를 사용하였다.

(2) 시험 및 검사 방법

㉠ 표준용액의 조제

각 표준물질을 Rb1 7.15 mg, Rg1 9.1 mg, Rg3 6.78 mg을 채취하여 최종 부피가 10 mL이 되도록 완전히 녹여 Rb1 706.42 ug/mL, Rg1 928.14 ug/mL, Rg3 562.062 ug/mL 농도의 표준원액으로 만들었으며, 검량선 작성을 위해 표준원액을 25 mL 70% 메탄올에 완전히 용해시키고 25 mL 총 50 mL로 정용한 후 멤브레인 필터(0.45 um)로 여과한 것을 Ginsenoside Rb1은 1.2375, 6.1876, 30.9380, 154.6900, 309.3800 ug/mL로 Ginsenoside Rg1은 0.9419, 4.7095, 23.5473, 117.7367, 235.4733 ug/mL로 Ginsenoside Rg3은 0.7494, 3.7471, 18.7354, 93.6770, 187.3540 ug/mL 농도의 시험용액으로 만들어 사용하였다.

㉡ 시험용액의 조제

시료 일정량을 70% 메탄올 25 mL로 완전히 용해시키고, 총 50 mL로 맞춘 후 멤브레인 필터(0.45 um)로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

㉢ 분석(측정) 조건

분석을 위해 S-DAD/FLD HPLC system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 활용하였으며, Supelco discovery C18 column (4.6×250 mm; Sigma Aldrich Co., Ltd.)을 장착하여 분석을 진행하였다. 주입된 시료는 10 µL였으며, 온도는 40°C로 유지하였고 1 mL/min 속도로 70분간 진행하였다. 이동상은 acetonitrile과 증류수를 사용하였으며, 5 min (20:80), 20 min (23:77), 25 min (30:70), 30 min (40:60), 35 min (50:50), 60 min (85:15), 62 min (85:15), 65 min (20:80), 70 min (20:80)로 설정되었으며 분석결과는 아래의 계산식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{Ginsenoside (mg/g)} = \frac{\text{시험용액의 농도(ug/mL)} \times \text{최종부피(mL)} \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량(g)} \times 1,000} \times \frac{1}{1,000}$$

4) 경옥고가미방의 DPPH free radical 소거활성 측정

(1) 시험재료

① 시험물질

본 시험에 사용된 시험물질은 경옥고가미방이며, 시험 기간동안 실온(1~30°C)에 보관하였고, 멸균증류수를 이용하여 조제하였다.

② 양성대조물질 및 기타시약

항산화 측정을 위한 양성대조물질은 L-ascorbic acid (Sigma Aldrich Co., Ltd.)를 사용하였으며, 시험에 사용된 시약은 DPPH (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA)와 ethanol (Duksan, Ansan, Korea)이 사용되었다.

(2) 시험절차

① 시험물질 및 시약 조제

경옥고가미방을 순도환산하지 않고 그대로 이용하였으며, 경옥고가미방은 0.05%, 0.5%, 1%, 5%, L-ascorbic 은 0.0005%, 0.001%, 0.0015%, 0.002% 농도로 각각 멸균증류수를 이용하여 조제하였다. DPPH는 ethanol을 이용하여 0.2 mM 농도로 조제하였다.

② 시험군 구성

시험군은 경옥고가미방과 L-ascorbic acid의 각 처리 농도로 구성하였다(Table II).

③ 시료액 반응 및 흡광도 측정

96 well plate에 각 농도별 조제물과 0.2 mM DPPH 및 ethanol을 1:1로 혼합하여 넣은 후 실온에서 30분간 차광상태로 반응시키고 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거활성률(%)은 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenger activity (\%)} = 1 - \frac{A}{B} * 100$$

A: 시험물질의 흡광도

B: 공시료의 흡광도

④ 통계처리

각 실험 결과는 3회 반복 측정하여 평균과 표준편차를 나타내었으며, SPSS 통계 프로그램(Ver. 19.0; IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 먼저, Levene's test를 수행한 후 one way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하여, 실험군간 유의성이 확인되면 분산의 동질성 유무에 따라 사후검정(분산이 동질한 경우 Duncan's 다중검정, 분산이 이질한 경우 Dunnett's T3)을 실시하였으며, 신뢰구간은 95%로 설정하였다.

(3) GLP statement

시험제목 '경옥고가미방의 DPPH free radical 소거활성 측정시험'으로서 시험번호는 'TNK-2020-000097'이며, 모든 절차는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다. 한국화학융합시험연구원 'DPPH를 이용한 free radical 소거활성 측정시험' protocol과 연구방법¹⁵⁻¹⁷⁾에 준하여 수행하였다.

5) Rat에 대한 경옥고가미방의 단회 경구투여 독성시험

(1) 실험 재료

① 실험 동물

실험은 Sprague Dawley (SD) rat를 이용하였으며, 투여 시 성별 및 동물 수는 수컷 20마리, 암컷 20마리 6주령 rat으로 체중범위는 수컷 168.6~190.8 g / 암컷 121.9~134.9 g 이었다. 본 시험은 동물보호법 [법률 제16977호 (2020-02-11, 일부개정)] 및 실험동물에 관한 법률 [법률 제15944호 (2018-12-11, 일부개정)]에 근거한 (재)한국화학융합시험연구원 화순의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다 (IAC-2020-0871).

② 실험 약물

본 실험에 사용된 시험물질은 경옥고가미방이며, 본 시험물질을 칭량한 후 부형제로는 멸균증류수(주사용수)를 사용하였다.

Table II. Group Composition

Group	Name	Concentration (%)
G1 (TS)	Modified Kyungohkgo	0.05, 0.5, 1, 5
G2 (PC)	L-ascorbic	0.0005, 0.001, 0.0015, 0.002

TS: test substance, PC: positive control.

③ 사육 환경

각 stainless steel cage (310W×500D×200H) 당 3마리 이하를 사육하였으며, 평균 온도 21.3~22.3°C, 상대습도 45.5~54.8%, 환기횟수 10~20회/h, 조명주기 12시간 간격으로 광암 조건을 주었으며(광 08:00~20:00/암 20:00~08:00), 조도 150~300 Lux를 유지하였고, 사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5053 (Labdiet, St. Louis, MO, USA) 를, 음수는 R/O수를 자유롭게 섭취시켰다.

(2) 용량 결정 및 투여 방법

① 약물 조제

경옥고가미방을 순도환산하지 않고 그대로 이용하여 본 시험물질을 칭량한 후 부형제인 멸균증류수에 50 mg/mL, 100 mg/mL 및 200 mg/mL 농도로 조제하여 사용하였다.

② 용량 설정 및 군 구성

본 시험의 시험물질 투여량은 식품의약품안전처 고시 중 ‘의약품등의 독성시험기준’에 근거하여 고용량 투여군을 2,000 mg/kg B.W.로 설정하고, 공비를 2로 하여 중용량은 1,000 mg/kg B.W., 저용량은 500 mg/kg B.W.으로 각각 설정하였다. 대조군으로는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하는 부형제 대조군을 두었다(Table III).

(3) 관찰 항목

① 일반 증상

모든 동물에 대하여 1일 1회 관찰하였으며 투여 후 14일간 관찰하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 0.5, 1,

2, 3 및 4시간에 관찰하였다.

② 체중변화

체중은 도입 시, 군 분리 시, 시험물질 투여 개시 직전, 투여 개시 후 7일 및 14일째에 측정하였다.

③ 부검 소견

투여 후 14일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후 isoflurane (아이프란액; 하나제약, 서울, 한국) 마취 하에 방혈치사하여 육안으로 장기를 검사하였다. 이상 장기는 발생하지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

④ 통계처리

본 시험에서는 체중 데이터에 대해 SPSS 통계 프로그램(Ver. 19.0)을 이용하여 통계처리를 하였다. 먼저, Levene’s test를 통해 동질성 검정을 수행하였고, 이후, one way ANOVA 검사를 수행하였다.

(4) GLP statement

시험제목 ‘Rat에 대한 경옥고가미방의 급성 경구독성 시험(독성등급법)’으로서 시험번호는 ‘TGK -2020-0063’이며, 모든 절차는 GLP 규정에 준수하여 실시하였는데, 즉 식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018-1-21) ‘비임상시험관리기준’과 OECD ‘Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 197)’을 따라 진행하였으며, 시험방법은 식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017-08-30) ‘의약품등의 독성시험기준’, [별표1] 단회투여독성시험을 기준으로 시행되었다.

Table III Group Separation of Single Dose Oral Toxicity

Group	Sex	Number	Number of animals	Injection volume (mg/kg B.W.)	Injection liquid measure (mL/kg B.W.)	Injection route
G1	Male	1101-1105	5	0		
	Female	2101-2105	5			
G2	Male	1201-1205	5	500		
	Female	2201-2205	5			
G3	Male	1301-1305	5	1,000	10	Oral
	Female	2301-2305	5			
G4	Male	1401-1405	5	2,000		
	Female	2401-2405	5			

G1: control group, G2-G4: injected modified Kyungohkgo group. Four different dosages of modified Kyungohkgo were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg G4: 2,000 mg/kg). B.W.: body weight.

결과»»»»

1. 경옥고가미방 함유 베타글루칸 진세노사이드 분석

1) 베타글루칸 성분 분석

경옥고가미방의 베타글루칸 성분을 분석한 결과 351.75 mg/g의 함유량이 관찰되었다(Table IV, Fig. 2).

2) 진세노사이드 Rb1, Rg1, Rg3 성분 분석

경옥고가미방의 진세노사이드 Rb1, Rg1, Rg3 성분을 분석한 결과 Rg1 성분은 검출되지 않았으며, Rb1 0.0327 mg/g, Rb3 0.0802 mg/g 함유량이 관찰되었다 (Table V, Fig. 3).

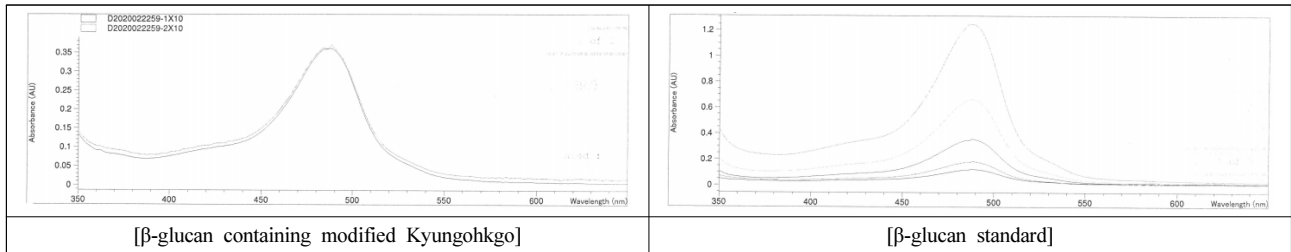


Fig. 2. HPLC analysis of beta-glucan contained modified Kyungohkgo. HPLC: high-performance liquid chromatography.

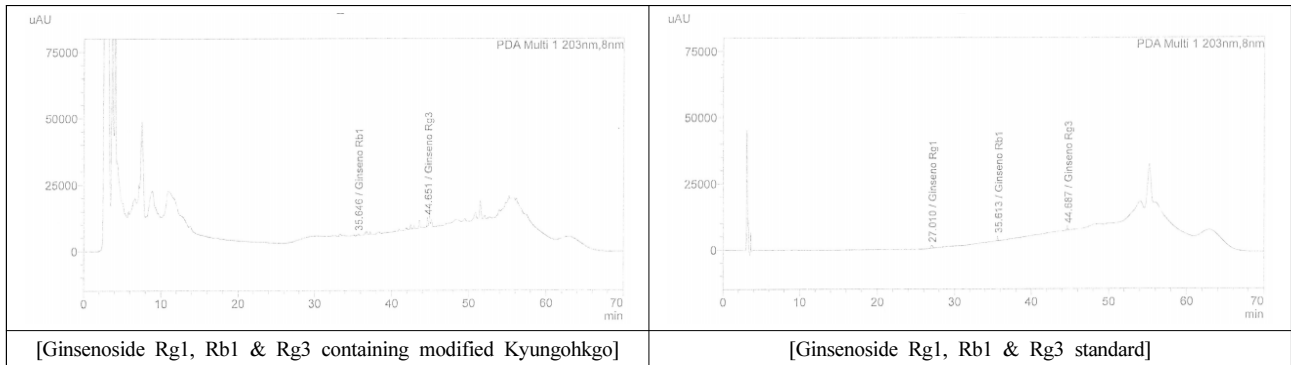


Fig. 3. HPLC analysis of ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg3 contained modified Kyungohkgo. HPLC: high-performance liquid chromatography.

Table IV. Analysis of β-glucan Content Contained Modified Kyungohkgo

β-glucan	Concentration (ug/mL)	Volume (mL)	Sampling (g)	Dilution	Result (mg/g)
1	40.6020	50	0.5240	10	348.68
2	41.7730	50	0.5298	10	354.81
Average					351.75

Table V. Ginsenoside Rg1, Rb1 & Rg3 Contained Modified Kyungohkgo

Ginsenoside	Concentration (ug/mL)	Volume (mL)	Sampling (g)	Dilution	Result (mg/g)
Rg1	0.0000	50	4.2931	1	0.0000
Rb1	2.8074	50	4.2931	1	0.0327
Rb3	6.8822	50	4.2931	1	0.0802

2. 경옥고가미방의 DPPH free radical 소거활성 측정

1) 경옥고가미방의 DPPH free radical 소거활성률(%)

시험물질 경옥고가미방(G1)을 농도별(0.05%, 0.5%, 1% 및 5%)로 처리하여 DPPH free radical 소거활성도를 측정한 결과 5.49%, 89.66%, 94.68% 및 96.06%의 활성을 보였으며, IC₅₀ (50 % 활성률을 나타내는 농도)을 산출한 결과 0.2880%의 농도로 산출되었다(Table VI, Fig. 4).

2) L-ascorbic acid의 DPPH free radical 소거활성률(%)

양성대조 L-ascorbic acid (G2)을 농도별(0.0005%, 0.001%, 0.0015% 및 0.002%)로 처리하여 DPPH free radical 소거활성도를 측정한 결과, 24.36%, 54.48%, 83.96% 및 95.17%의 활성을 보였으며, IC₅₀ (50% 활성률을 나타내는 농도)을 산출한 결과, 0.0009%의 농도로 산출되었다(Table VI, Fig. 4).

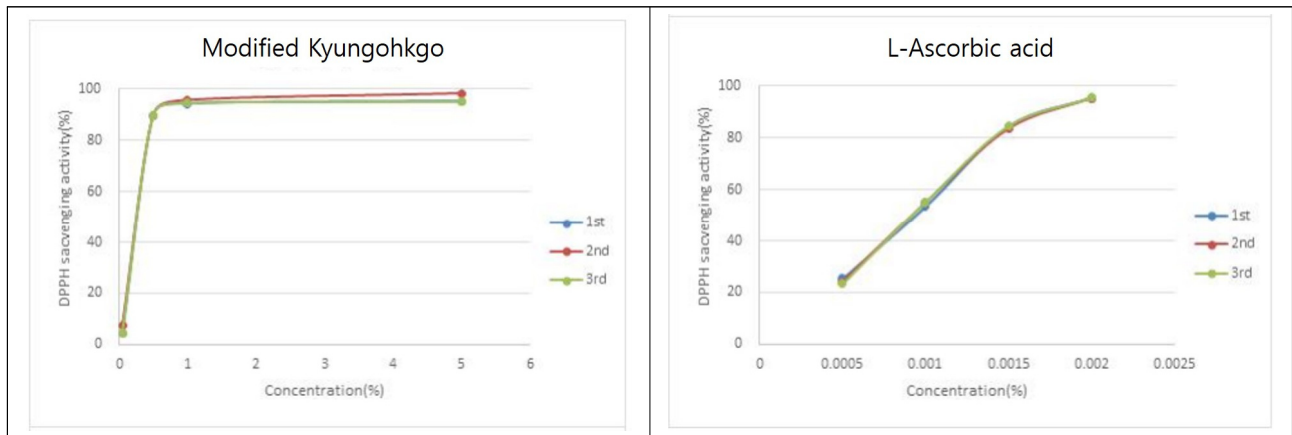


Fig. 4. Analysis of DPPH free radical scavenger activity in modified Kyungohkgo and L-ascorbic acid. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

Table VI. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Modified Kyungohkgo

Group	N	Concentration	OD715	DPPH free radical scavenger activity (%)
G1 (TS)	3	0	0.556±0.010	-
	3	0.05	0.528±0.004	5.49±1.84*
	3	0.5	0.058±0.002	89.66±0.09*
	3	1	0.030±0.004	94.68±0.70*
	3	5	0.022±0.010	96.06±1.79*
G2 (PC)	3	0	0.676±0.009	-
	3	0.0005	0.511±0.001	24.36±1.01*
	3	0.001	0.308±0.011	54.48±1.02*
	3	0.0015	0.108±0.004	83.96±0.59*
	3	0.002	0.033±0.001	95.17±0.17*

Values are presented as mean±standard deviation.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, N: number of well, TS: test substance, -: not applicable, PC: positive control.

*Significantly difference from Control at p<0.05.

3. Rat에 대한 경옥고가미방의 단회 경구투여 독성 시험

1) 사망률 및 일반 증상

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다. 일반증상 관찰 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Tables VII, VIII).

Table VII Mortality after Administration of Modified Kyungohkgo

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality	
		Male	Female
G1	0	0% (0/5)*	0% (0/5)
G2	500	0% (0/5)	0% (0/5)
G3	1,000	0% (0/5)	0% (0/5)
G4	2,000	0% (0/5)	0% (0/5)

G1: control group, G2-G4: injected modified Kyungohkgo group. Four different dosages of modified Kyungohkgo were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg G4: 2,000 mg/kg).

B.W.: body weight.

*Number of dead animals/Number of tested animals.

Table VIII Clinical Signs after Administration of Modified Kyungohkgo

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs
G1	0	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G2	500	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G3	1,000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G4	2,000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal

G1: control group, G2-G4: injected modified Kyungohkgo group. Four different dosages of modified Kyungohkgo were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg G4: 2,000 mg/kg).

B.W.: body weight.

2) 체중 변화

체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다(Table IX).

3) 부검 소견

주요 장기에 대한 육안적 검사 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Table X).

Table IX. Body Weight after Administration of Modified Kyungohkgo

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Day(s) after administration		
				0	7	14
G1	0	Male	Mean	179.6	264.6	304.7
			S.D.	7.0	21.9	36.0
			N	5	5	5
		Female	Mean	131.2	187.7	215.9
			S.D.	3.2	7.9	11.1
			N	5	5	5
G2	500	Male	Mean	182.9	275.0	335.1
			S.D.	8.4	17.6	33.8
			N	5	5	5
		Female	Mean	130.4	183.7	208.5
			S.D.	2.9	12.5	16.8
			N	5	5	5
G3	1,000	Male	Mean	175.5	264.3	317.0
			S.D.	6.9	14.8	21.4
			N	5	5	5
		Female	Mean	131.8	189.6	216.0
			S.D.	3.2	7.4	12.5
			N	5	5	5
G4	2,000	Male	Mean	181.8	267.4	318.5
			S.D.	6.8	10.5	14.0
			N	5	5	5
		Female	Mean	128.6	188.6	216.5
			S.D.	4.8	11.6	14.2
			N	5	5	5

G1: control group, G2-G4: injected modified Kyungohkgo group. Four different dosages of modified Kyungohkgo were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg G4: 2,000 mg/kg).

B.W.: body weight, N: number of animals, S.D.: standard deviation.

Table X. Necropsy Findings after Administration of Modified Kyungohkgo

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Necropsy findings	
			External findings	Internal findings
G1	0	Male	No gross findings (5)*	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)
G2	500	Male	No gross findings (5)	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)
G3	1,000	Male	No gross findings (5)	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)
G4	2,000	Male	No gross findings (5)	No gross findings (5)
		Female	No gross findings (5)	No gross findings (5)

G1: control group, G2-G4: injected modified Kyungohkgo group. Four different dosages of modified Kyungohkgo were orally administered in this study respectively (G1: 0 mg/kg, G2: 500 mg/kg, G3: 1,000 mg/kg G4: 2,000 mg/kg).

B.W.: body weight.

*Number of animals.

고찰»»»»

한의학에서 재활의학 분야의 주요 연구대상은 인체의 운동계통을 이루는 구조적 요소와 여기에 나타나는 질병을 위주로 하고 있으며, 척추와 관절에 나타나는 통증성 질환, 근육계통에 나타나는 마비성 질환 등이 대표적이다. 근과 골은 관절의 구조적, 기능적 측면에서 볼 때 밀접한 관계를 지니고 있어서 모든 근은 筋에 속할 뿐 아니라, 관절의 지지작용과 운동기능을 유지시켜주고 있으며, 한의학에서 근은 肝의 혈액 저장과 조혈작용의 도움을 받아야 원활한 활동을 발휘할 수 있는데 만약 肝陰血이 부족하면 근은 濡養을 받을 수 없게 되고 肝陰虛로 陽亢하면 麻木, 屈伸不利, 抽搐, 癱瘓 등의 증상이 나타나게 된다. 또한 근과 함께 肌肉은 근골과 내장을 호위하는 것과 동력을 전달하는 작용을 발휘하는 것으로 기육은 津液의 溫養과 혈액의 滋養을 통해서 작용이 유지되는데, 이러한 진액과 혈액은 모두 脾胃의 水穀 運化 기능으로 얻어진다. 『素問·痿論』에 ‘脾主身之肌肉’이라 한 것에 볼 수 있듯이 만약 脾의 운화작용이 순조롭지 못하면 津液虧耗, 氣血不足이 초래되어 결과적으로 肌肉의 失養이 나타나게 되는 것이다. 한의학에서 근골, 기육의 부족으로 초래되는 병증의 근간은 腎精虛로 인해 초래하는 것으로 보며 腎精에서 化生된 氣는 인체의 질병에 대한 저항력을 포함하고 있어 腎精이 失調되면 골격과 골수가 쇠약해지고, 질병에 대한

항병력 또한 현저히 쇠약하게 된다¹⁸⁾.

한의학에서 補益腎精하여 虛損된 상태를 신속히 補益할 수 있고, 健脾益氣하여 부족한 氣血을 지속적으로 보충시킬 수 있는 대표적인 제제 중 하나가 瓊玉膏라 할 수 있다. 경옥고의 효능에 대해 『동의보감』¹⁾에서는 “填精補髓 調真養性 返老還童 補百損 除百病萬神俱足 五藏盈溢 髮白復黑 齒落更生 行如奔馬 日進數服 終日不飢渴 功效不可盡述”이라 하여 補百損, 즉 모든 허한 것을 보충할 수 있고 行如奔馬, 즉 근골의 활동성과 관련있는 운동성을 현저히 증강시켜 줄 수 있음을 나타내고 있다.

한편, 경옥고의 근골에 대한 효능에 대하여 『洪氏集驗方』과 『醫學入門』에는 補腎精과 함께 腸을 운화시켜서 근골을 튼튼하게 해주는 효능이 있다고 하였는데, 이는 경옥고가 填精補髓하는 기능과 함께 健脾의 소화력을 강화시킬 수 있음을 제시한다고 볼 수 있다²⁾. 즉 근골의 운동기능을 강건하게 유지하거나 혹은 실조된 기능을 회복하기 위해서는 精血의 보충과 더불어 비위의 健運 작용이 중요함을 의미하고 있는데, 이를 통해 경옥고는 질병에 대한 예방 및 치료 효과에 다양하게 활용할 수 있음을 알 수 있다.

경옥고가미방은 다양한 분야에 활용할 수 있는데 Choi 등¹³⁾은 경옥고 원방에 맥문동 천문동 지골피를 가미한 제제, 즉 익수영진고 재료들을 액상 발효한 발효물이 발효하지 않은 추출물에 비해 자유라디칼 소거능이 2배 가량 높았고, 콜라겐 합성능이 ascorbic acid보다 27%

증진된 효과를 보여 피부 노화를 개선시킬 수 있음을 보고하였고, Park 등¹⁴⁾은 경옥고 원방에 참당귀, 일당귀, 수국, 백년초, 천궁, 황금, 새싹산양삼을 배합한 제제가 스크폴라민 유도 기억력 손상 모델에서 수동회피 시험과 변경행동력 향상 효과를 관찰하였음을 보고하였고, Kim과 Song¹⁹⁾은 경옥고 원방에 단삼, 산사, 황기, 결명자, 맥아를 배합한 제제가 간장과 부고환 지방축적 감소, 총콜레스테롤 감경, 중성지방 감경, high-density lipoprotein-cholesterol 증가 효과가 관찰되었음을 보고하였고, Jung 등²⁰⁾은 경옥고 원방에 육종용, 파극천, 구척, 녹용을 배합한 제제가 성장호르몬, 인슐린양 성장인자-I, 갑상선자극호르몬 증가 효과를 나타내었음을 보고하였고, Do 등²¹⁾은 경옥고 원방에 허수오를 배합한 제제가 insulin like growth factor와 vascular endothelial growth factor 등 성장인자들을 조절하여 hair follicle 및 주변 조직의 성장을 촉진하고 혈액순환을 개선하므로 발모 촉진에 활용할 수 있음을 보고하였다.

한편, Lee 등²²⁾은 경옥고 원방에 표고버섯, 동충하초를 배합한 제제가 대식세포로부터 분비되는 tumor necrosis factor- α 생성능을 향상시켜 면역력 활성화에 효과적임을 보고한 바 있다. 면역계는 감염 시 감염의 인지 및 체액성, 세포성 반응을 통하여 감염물질을 제거하는 역할을 담당하고 있으며, 면역계가 기능을 발휘하지 못할 때 감염성 질환이 발생할 뿐만 아니라 암 억제 기능도 떨어지게 된다. 면역반응 활성화와 억제력 간의 균형을 유지하는 면역항상성 회복이 면역관련 질환을 극복하는데 중요한 요소이다. 면역억제반응에는 다양한 종류의 면역억제세포들이 존재하며, 특히 조절 T세포라고 불리는 T세포의 아형이 자가면역질환의 억제 및 항상성 유지에 필수적인 것으로 알려져 있다²³⁾.

꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 β -1,3-D-glucan 함량이 버섯류 중에서 가장 높은 함량을 가지고 있고 다양한 폴리페놀 화합물도 많이 함유하고 있는 특징이 있어서 면역 활성 및 항암효과⁴⁾, 항산화⁹⁾에 우수한 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다.

본 연구진은 이전 연구³⁾에서 경옥고가미방인 익수영진고에 꽃송이버섯을 가미한 제제의 면역 활성 효과에 대하여 분석 관찰한 바 있는데, 추가적으로 사용된 꽃송이버섯은 β -1,3-D-glucan과 함께 다양한 폴리페놀 화합물을 함유하고 있어 면역 활성 및 항암효과⁴⁾와 함께

항균⁷⁾, 항염증⁸⁾, 항산화⁹⁾에 유효한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는 소재이며, 이 연구에서 활용한 배합 제제가 면역기능, 항산화 효과에 있어서 경옥고가미방인 익수영진고加꽃송이버섯 제제가 DPPH radical 소거능과 total phenol 함량을 유의하게 증가시켰고, cytokine IL-2 감소를, IL-10 증가를 나타내어 면역력 조절계항상성 유지 작용이 발휘됨을 제시한 바 있다³⁾.

한편, 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 담자균류, 민주름버섯목(Aphyllophorales), 턱수염버섯과(Hydniaceae), 산호침버섯속(*Hericium*)에 속하는 버섯류 소재로서²⁴⁾ 암 및 면역기능을 증강시키고 항만성 위염, 항암 효과를 포함하여 그 이외에 항종양 예방, 면역기능 향상, 항상성 유지, 항염 작용, 콜레스테롤 저하, 항혈전, 혈압강하, 혈당강하 등의 기능성 및 약리효과가 보고되고 있듯이²⁵⁻²⁷⁾, 면역기능 향상을 위하여 꽃송이버섯과 유사한 효능을 가진 버섯류 소재라 할 수 있다.

이에 면역력 활성 강화에 특별한 효과가 있는 것으로 알려진 꽃송이버섯과 노루궁뎅이버섯을 익수영진고에 배합할 경우 면역력 활성화에 증강 효과를 발휘할 수 있을 것으로 기대되어 이들 소재가 가미된 경옥고가미방을 전통적인 제조방법에 의하여 제조하였으며, 본 연구에서는 성분분석, 항산화 및 안전성 위주의 연구 관찰이 필요하여 GLP 기관에서 베타글루칸, 진세노사이드 함량, DPPH free radical 소거활성 및 단회 경구투여 독성시험을 시행하였다.

지표성분 분석은 GLP 인증기관에서 베타글루칸과 진세노사이드 Rb1, Rg1, Rg3의 함량을 측정하였다. 베타글루칸 측정은 건강기능식품공전의 건강기능식품 시험법의 개별성분별시험법 가운데 베타글루칸 측정법에 근거하여 시험을 시행하였으며, 측정된 결과 베타글루칸은 351.75 mg/g의 함량을 나타내었는데, 이는 Lim 등²⁸⁾이 꽃송이버섯의 유산균 및 홍국균 발효에 의하여 베타글루칸 함량을 219~244 mg/g으로 높일 수 있었다고 보고한 것보다 높은 수준이며, 본 연구에서 사용한 '3일 중탕-1일 숙성-1일 중탕-1일 숙성'의 제조 방법이 영향을 미친 것으로 추론한다. 진세노사이드 측정은 건강기능식품공전의 건강기능식품 시험법의 진세노사이드-시험과정-시험용액의 조제-농축액 측정법에 근거하여 시험을 시행하였으며, 측정된 결과 진세노사이드 Rb1은 0.0327 mg/g, 진세노사이드 Rg3는 0.0802 mg/g을 나타

내었으며, 단, 진세노사이드 Rg1은 검출되지 않았는데, 이는 시료의 성질, 측정방법 등에 대한 사항에 의한 것으로 추정되는 바 추후 재검증이 필요한 것으로 생각한다.

항산화제들은 활성산소에 전자를 주어 환원시키고 자신은 radical 형태에서도 안전한 구조를 유지할 수 있어야 하며, 활성산소에 전자를 줄 수 있는 능력이 클수록 항산화능이 크다고 할 수 있고 항산화능이 클수록 활성산소의 제거 능력이 크다고 할 수 있다²⁹⁾. 생물체 내에서 생성되는 활성산소는 생체 조직 및 세포를 손상시키는 산화력이 강한 독성물질로서 활성산소 내에 free radical이 포함되어 있는데 이러한 free radical을 제거하게 되는 작용을 항산화 작용이라 하며, 본 시험에서는 경옥고가미방에 대한 항산화 효과를 평가하기 위해 DPPH를 이용하여 free radical 소거활성 측정시험을 GLP 인증기관에서 실시하였다.

경옥고가미방 0.05%, 0.5%, 1% 및 5% 농도에서 free radical 소거 효과를 살펴보기 위해 DPPH free radical 소거활성을 측정된 결과, 5.49%, 89.66%, 94.68% 및 96.06%의 활성을 보였으며, 50% 활성을 나타내는 농도인 IC50을 산출한 결과, 0.2880%의 농도로 산출되었다. 양성대조물질 L-ascorbic acid 0.0005%, 0.001%, 0.0015% 및 0.002% 농도에서 free radical 소거 효과가 24.36%, 54.48%, 83.96% 및 95.17%로 나타났고, IC50을 산출한 결과, 0.0009%의 농도로 산출되었다. 이상의 결과로부터 DPPH free radical 소거활성 측정시험에서 경옥고가미방은 0.05%, 0.5%, 1% 및 5%의 농도에서 free radical 소거 효과가 나타나는 것으로 생각된다.

이전 연구에서 기존 경옥고의 DPPH radical 소거능에 비해 기존 경옥고에 천문동, 맥문동, 구기자 및 꽃송이버섯이 추가된 익수영진고加꽃송이버섯의 DPPH radical 소거능이 약 15% 이상 높게 나타나서 익수영진고加꽃송이버섯이 항산화 활성을 높이는 데 더 유리한 것으로 나타났음을 보고한 바 있으며³⁾, 본 연구의 경옥고가미방 DPPH free radical 소거활성의 IC50은 0.2880% 수준이었고, 1% 농도에서 94.68%의 소거능을 나타낸 것으로 보아 항산화 활성이 우수한 것으로 생각된다.

경옥고가미방에 대한 단회 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 ‘의약품 등의 독성시험기준’³⁰⁾에 따라 SD 계 rat를 사용하여 2,000 mg/kg B.W.을 고용량으로 설정하였고, 공비 2로 두어 1,000 및 500 mg/kg B.W.으로

중용량 및 저용량을 설정하여 암·수 각각에 단회 경구 투여하였으며, 경옥고가미방 투여 후 14일간 사망률, 일반 증상, 체중 변화를 관찰하였으며, 생존동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다. 실험기간 중 경옥고가미방 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반 증상 관찰 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 체중 측정 결과, 경옥고가미방 투여군 모두에서 부형제 투여 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의적인 차이는 관찰되지 않았으며, 부검소견 결과 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 이의 결과로부터 rat에 경옥고가미방 단회 경구투여 시 관련된 독성학적 소견이 인정되지 않았으므로 개략의 치사량은 암·수 모두 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 생각된다.

위의 결과에서 익수영진고에 노루궁뎅이버섯을 배합한 경옥고가미방은 높은 수준의 베타글루칸 함량을 가지고 있다는 것과 DPPH free radical scavenging activity가 1% 농도에서 95% 수준으로 효과적인 항산화 활성을 보이는 것, 단회 경구투여 독성에서 모든 항목에서 독성학적 소견이 나타나지 않았음을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과로 보아 경옥고가미방은 精血不足이나 항병력 저하로 초래되는 각종 질병 예방과 건강 유지를 위한 다양한 분야의 활성 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

결론»»»»

본 연구에서는 精血을 보익하고 면역활성 증강 효과가 있는 익수영진고加꽃송이버섯 제제에 노루궁뎅이버섯을 추가한 경옥고가미방에 대하여 GLP 인증을 받은 기관에서 제제 내에 포함되어 있는 베타글루칸과 진세노사이드의 지표 분석과 제제의 DPPH 항산화 효과를 관찰하고, 아울러 안전성 관련 단회 투여 독성시험을 진행하여 사망률, 일반 증상, 체중 변화 및 부검소견을 통해 전신적 독성 반응을 관찰하였다.

경옥고가미방의 지표 성분 분석에 있어서 베타글루칸은 351.75 mg/g 수준의 함량을 나타내었고, 진세노사이드 Rb1은 0.0327 mg/g, 진세노사이드 Rg3는 0.0802 mg/g을 나타내었다. DPPH free radical 소거 활성에 있어서 경옥

고가미방의 IC50은 0.2880%이었고, 경옥고가미방 0.05%, 0.5%, 1% 및 5% 농도에서 소거능 활성은 5.49%, 89.66%, 94.68% 및 96.06%를 나타내었다. 단회 경구투여 독성시험에서 ‘의약품등의 독성시험기준’에 따라 2,000 mg/kg B.W. 최고용량으로 설정하여 경구 투여 후 관찰한 결과 독성학적 소견이 인정되지 않았으므로 개략의 치사량은 암·수 모두 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 추정되었다.

이상의 결과로 볼 때, 경옥고가미방은 높은 수준의 베타글루칸 함량을 가지고 있다는 것과 양호한 수준의 항산화 효과를 발휘한다는 것 그리고 독성학적 소견이 나타나지 않은 것으로 보아 식의약 소재로서 다양한 분야에 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

References>>>>

1. Heo J. Dongeubogam. Seoul:Namsandang. 1989:78.
2. Kim MD. The literature study on the efficacy and manufacturing process of Gyeongoggo. J Oriental Medical Classics. 2011;24(2):51-64.
3. Na CS, Shin W, Lee YM, Moon YS, Noh HK, Seo SH, Son HS. Effect of original Kyungokgo & Iksuyongjingoo plus Sparassis crispa on antioxidant, immunity improvement and sensory evaluation. Kor J Herbol. 2016;31(4):43-51.
4. Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. J Hematol Oncol. 2009;2:25.
5. Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T. Antitumor 1,3- β -glucan from cultured fruit body of Sparassis crispa. Biol Pharm Bull. 2000;23:866-72.
6. Kim IK, Yun YC, Shin YC, Yoo J. Effect of Sparassis crispa extracts on immune cell activation and tumor growth inhibition. J Life Sci. 2013;23:984-8.
7. Kim MS, Lee KT, Jeon SM, Ka KH. The quantities of methyl orsellinate and sparassol of Sparassis latifolia by host plants. Kor J Mycol. 2013;41:236-42.
8. Choi WS, Shin PG, Yoo YB, Noh HJ, Kim GD. Anti-inflammatory effects of Sparassis crispa extracts. J Mushroom Sci Prod. 2013;11:46-51.
9. Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM, Chung IM. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. J Agric Food Chem. 2008;56:7265-70.
10. Mizuno T. Bioactive substances in Hericium erinaceus and its medicinal utilization. Int J Med Mushrooms. 1999;1:105-19.
11. Ma BJ, Shen JW, Yu HY, Ruan Y, Wu TT, Zhao X. Hericenones and erinacines: stimulators of nerve growth factor (NGF) biosynthesis in Hericium erinaceus. Mycology. 2010;1:92-8.
12. Sokol S, Golak-Siwulska I, Sobieralski K., Siwulski M, Gorka K. Biology, cultivation, and medicinal functions of the mushroom Hericium erinaceum. Acta Mycol. 2015;50:1069-87.
13. Choi JH, Kim HM, Song YS, Park SG, Kim JJ, Lee CK. Anti-aging effects Saccharomyces fermented modified Kyungohkgo extract on skin. The Korea Journal of Herbology. 2007;22(4):219-25.
14. Park HB, Kim SY, Park SJ. Effects of Ginseng Sprout extract and modified Kyung-Ok-Ko on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences. 2019;31(3):151-9.
15. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181:1199-200.
16. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology. 2011;48(4):412-42.
17. Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H. Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. Analytical Sciences. 2014;30(7):717-21.
18. The Society of Korean Rehabilitation Medicine. Korean Rehabilitation Medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:3-9.
19. Kim JB, Song HN. Effects of Kyeongok-go and its two added prescriptions on hyperlipidemic rats induced by high-fat diet. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2014;28(4):371-8.
20. Jung BK, Lee YJ, Yun HJ, Kang MS, Baek JH. The effect of KyungOcGogamibang on the growth of the rats. The Journal of Pediatrics of Korean Medicine. 2009;23(1):141-58.
21. Do EJ, Hwang MY, Kim SY, Lee JS, Yang DS, Yang CH, Kim MR. The effect of Gyungokgo-gamibang extract on hair growth and protein expression in mice. Kor J Herbol. 2011;26(4):9-14.
22. Lee ES, Seo BI, Lee JW, Bae JS. The immunological activities of Kyungohkgo and prescription of modified Kyungohkgo. Kor J Herbol. 2002;17(2):95-100.
23. Na HJ, Jung YS. Immune homeostasis by diversity of regulatory T cell. Molecular and Cellular Biology Newsletter. [serial online] 2015;5(2):[7 screens]. Available

- from: http://www.ksmcb.or.kr/file/webzine/2015_05_02.pdf.
24. Um SY. Chemical constituents of *Hericum erinaceum* for anticancer [dissertation]. Seoul:Sungkyunkwan University; 2012.
 25. Mizuno T, Wasa T, Ito H, Suzuki C, Ukai N. Antitumor active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericum erinaceus*: an edible and medicinal mushroom called Yamabushitake or Houtou. *Biosci Biotech Biochem.* 1992;56:347-8.
 26. Ryu SR, Lee WY, Ka KH. Comparative study on the sawdust cultivation and the antioxidant of *Hericum* spp. *Kor J Mycol.* 2009;37:80-5.
 27. Kawagishi H, Shimada A, Hosokawa S, Mori H, Sakamoto H, Ishiguro Y, Sakemi S, Bordner J, Kojima N, Furukawa S. Erinacines E, F and G stimulator of nerve growth factor (NGF)-synthesis from the mycelia of *Hericum erinaceus*. *Tetrahedon Letters.* 1996;37:7399-402.
 28. Lim CW, Kang KK, Yoo YB, Kim BH, Bae SH. Dietary fiber and β -glucan contents of *Sparassis crispa* fruit fermented with *Lactobacillus brevis* and *Monascus pilosus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012;41(12): 1740-6.
 29. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka G, Nishooka I. Study on the inhibitory effects of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology.* 1998;56:213-22.
 30. Korea Food and Drug Administration Notice No. 2017-71 (2017-08-30) "Toxicity Test Standards, etc."