



HPLC로 표준화한 가미홍화탕(KH-19)의 랫드와 Beagle견에 대한 단회경구투여독성시험

유영범 · 성현제¹ · 윤유식

한국한의약연구원 의료연구부, ¹한라한방병원

Acute Oral Toxicity Study of Standardized *Gami-Honghwa-Tang* (KH-19) in Rats and Beagle Dogs

Young-Beob Yu, Hyun Jea Sung¹ and Yoo-Sik Yoon

Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-810

¹Halla Oriental Hospital, Seoul 133-832, Korea

Received January 25, 2005; Accepted February 22, 2005

ABSTRACT. *Gami-Honghwa-Tang* (KH-19), a herbal prescription for reducing the side effect of radiotherapy, is composed of eight crude herbs such as *Rehmanniae Radix Preparata*, *Angelicae Gigantis Radix*, *Cnidii Rhizoma*, *Paeoniae Radix*, *Comi Fructus*, *Moutan Cortex Radicis*, *Lycii Fructus*, *Carthami Flos*, and *Glycyrrhizae Radix*. In this study, marker substances in KH-19 were analyzed by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) and safety evaluation of standardized KH-19 was evaluated by good laboratory practices (GLP) guideline of Korea Food and Drug Administration. HPLC-DAD was employed to determine the quantities and the qualities of several marker substances such as 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF), paeonol, loganin, paeoniflorin, glycyrrhizin, and decursin in the KH-19. In acute oral toxicity study on rat, transient inhibition of body weight was shown, but change in general symptom was not detected. No dead animal was observed up to 5,000 mg/kg in both male and female animals. In acute oral toxicity study on Beagle dog, transient vomiting, diarrhea, anorexia, and body weight reduction were observed. However, no dead animal was observed up to 2,000 mg/kg in both male and female animals.

Keywords: *Gami-Honghwa-Tang*, HPLC-DAD, Acute oral toxicity study, GLP, Rats, Beagle dogs.

서 론

최근 국내·외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품의 개발이 관심의 대상이 되고 있으며 전통 한약재 외의 허브류나 천연물 기능성식품의 수입이 증가하는 추세에 있다. 한약재는 한방의료기관에서는 한약으로, 제약회사에서 한약제제의 원료로 사용될 뿐 아니라, 식품회사에서 건강기능식품의 재료나 민간에서 건강을 위한 식품으로 소비되고 있다. 이렇듯 그 활용범위와 법적 테두리가 다양한 한약의 통합된 관리 체계가 구축되어 있지 않은 것

이 현실이다. 일부 한약재들은 식품으로 오용되어 독성과 부작용이 나타나는 경우도 있으며 식품으로 허가된 제품 또한 장기간 복용하는 경우에는 건강에 심각한 악영향을 초래할 우려가 있다. 최근에는 독성간염의 원인의 61.7% 한약과 한약재에 있다는 보고가 있었으며(안 등, 2002) 광방기廣防己(*Aristolochia fangchi*)에 함유된 아리스톨로크산(aristolochic acid)의 급성 진행성 간질성신염유화증(Rapidly progressive interstitial renal fibrosis)이 보고되어 사회적 관심이 되었고(Vanherweghem *et al.*, 1993; 이 등, 2000; 허 등, 2000) 한약의 간독성에 관한 논문이(이 등, 1998) 발표되고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 한약재의 잔류농약, 중금속 함유 문제도 심각하게 거론되고 있어서(김 등, 2001; 이 등, 2002) 한약이 의약품으로 기능을 수행할 수 있도록 독성부분에서의 다양한 연

Correspondence to: Young Beob Yu and Yoo Sik Yoon, Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Jeonmin-dong 461-24, Yuseong-gu, Daejeon 305-810, Korea
E-mail: ybyu@kiom.re.kr, ysyoon2@kiom.re.kr

구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 가미홍화탕(KH-19)은 간장과 신장을 보하고 저하된 혈액의 양을 증가시킬 목적으로 구성된 처방으로 사물탕의 구성요소인 당귀, 천궁, 작약, 숙지황에 산수유, 구기자, 목단피, 홍화, 감초를 가한 처방이다. 사물탕의 구성 한약재인 당귀에는 decursin(유와 조, 2000), 작약의 paeoniflorin(He *et al.*, 2002), 숙지황의 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF)(Lee *et al.*, 2002)과 산수유의 loganin(Wang *et al.*, 2003), 목단피의 paeonol(Zhao and Sun, 2003), 감초의 glycyrrhizin(Jiang *et al.*, 2004) 등이 활성성분 혹은 지표성분으로 널리 알려져 있다. 저자 등은 선행 연구에서 가미홍화탕의 구성약재인 당귀(유와 조, 2000), 작약(Yu *et al.*, 2004), 구기자(조 등, 2000) 등의 유전독성학적 연구를 시행하여 그 안전성을 확인하였다. 본 연구에서는 한방처방의 하나이며 방사선 치료 후 조혈기능향상을 목적으로 조성된 가미홍화탕을 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)로 표준화 하고 랫드와 beagle 견을 이용한 급성독성학적 안전성을 실험하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 제조

가미홍화탕(KH-19)의 조성과 구성약제 및 기원은 Table 1에 표시하였다. 가미홍화탕의 전임상실험과 최종 제품 생산에 용이하게 적용할 수 있도록 연조엑스 시제품을 (주)대한뉴팜(한국, 경기도) 공장에서 제작하였다. 먼저 숙지황(약전규격, 중국산) 133 g, 당귀(약전규격, 국산) 100 g, 천궁(약전규격, 중국산) 100 g, 작약(약전규격, 국산) 100 g, 산수유(약전규격, 중국산) 67 g, 목단피(약전규격, 중국산) 33 g, 구기자(약전규격, 중국산) 33 g, 홍화(약전규격, 중국산) 13 g, 감초(약전규격, 중국산) 20 g을 정제수 5400 ml를 가하여 95°C의 온도에서 환류추출기를 이용하여 6 시간 가온 추출한 다음 200 메쉬채로 여과하여 75°C에서

진공 농축기를 이용하여 연조 엑스를 얻었으며 이를 동결 건조하여 실험용 시료로 사용하였다.

HPLC-DAD에 가미홍화탕의 표준화

HPLC는 Shimadzu사(일본, 교토)의 LC-6AD pump와 LC-10AD controller, SPD-M 10Avp photodiode array UV-VIS 검출기를 사용하였으며, acetonitrile, methanol 등은 Merck사 HPLC용 용매를 사용하였고, 지표물질 중 5-HMF, paeonol, loganin, glycyrrhizin은 Sigma(USA)와 Wako(Japan)에서 구입하였으며, paeoniflorin, decursin과 decursinol angelate은 silicagel, C₁₈, Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 직접분리하고 ¹H-NMR, ¹³C-NMR(Bruker Advance 400 MHz) 등 분광학적 방법으로 그 구조를 동정한 후 실험에 사용하였다. 분석용 초자류는 특급(Pyrex, USA)을, 그 외에 실험에 사용한 모든 시약은 특급 혹은 1급을 사용하였으며, 물은 3차 증류수를 여과(pore size 0.2 μm, Sartorius, Germany)하여 사용하였다. 가미홍화탕(KH-19) 분석용 시료의 조제는 (주)대한뉴팜으로 공급받은 시제품을 동결건조하여 500 mg을 100% MeOH 10 ml에 넣고 10분간 초음파 추출한 후 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 0.45 μm syringe filter로 여과한 것을 HPLC에 10 μl를 주입하였다. 분석조건은 Table 2에 나타내었으며, 지표물질의 확인은 chromatogram에서 표준물질의 머무름시간과 photodiode array detector(190~400 nm)에서 얻어진 UV spectra의 pattern을 비교하여 확인하였다.

안전성 시험

본 시험은 의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청, 1999)과 비임상시험관리기준을 참조하여 실시하였다.

랫드를 이용한 독성시험.

실험동물: 7주령된 Sprague-Dawley(SD) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드를 (주) 샘타코 BIO KOREA: 경

Table 1. The botanical origins of crude drugs in KH-19

Herbal name	Pharmaceutical name	Marker substance ((%) criterion on KP, KHP)	Amount (g)
熟地黄	Rehmanniae Radix Preparata	5-HMF (0.1)	13
當歸	Angelicae Gigantis Radix	decursin	10
川芎	Cnidii Rhizoma		10
芍藥	Paeoniae Radix	paeoniflorin (2.0)	10
山茱萸	Corni Fructus	loganin (0.5)	7
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	paeonol (1.0)	3
枸杞子	Lycii Fructus	betaine (0.5)	3
紅花	Carthami Flos		1
甘草	Glycyrrhizae Radix	glycyrrhizin (2.5)	2
			59

KP: Korean Pharmacopoea, KHP: Korean Herbal Pharmacopoea

Table 2. Analytical condition of marker substances in KH-19

Pump	Shimadzu LC-10AD vp
Detector	Shimadzu SPD-10A vp UV-VIS detector
Column	Aquasil C18 (4.6 250mm) 5-HMF : 283 nm loganin : 237 nm
Wavelength	paeoniflorin: 232 nm paeonol : 274 nm glycyrrhizin: 251 nm decursin : 328 nm
Column temp.	Room temperature
Solvent system	(A=0.05% TFA in H ₂ O : B=0.05% TFA in acetonitrile 0 min) (0 min 100 : 0, 20 min, 90 : 10, 40 min 70 : 30, 60 min 50 : 50, 80 min 0 : 100, 90 min 100 : 0)
Flow rate	1 ml/min

기도 오산시 서량동 77-1)에서 암수 각각 32마리씩을 구입하였다. 1주간의 적응기를 둔 다음 수컷 260.52 g~276.15 g, 암컷 185.73 g~205.36 g의 체중의 SD 랫드를 각각 15마리씩 실험에 투입하였다. 본 시험은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 주식회사 썬온의 전임상연구센터 제 1 동물사육구역의 5호실에서 수행되었다. 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(Harlan, 미국)를 급여기를 이용하여 자유섭취 시켰다.

시험물질의 투여: 본 시험물질의 임상예정용량(300 mg/kg) 및 예비시험을 근거로 설치류에서의 고전적인 단회 경구투여 한계용량으로 사용되는 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고 그 다음 용량으로 현재 많이 사용되는 2,000 mg/kg과 부형제 대조군을 설정하였다. 동물의 군분리는 우선, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 5 g 간격으로 구분하여 각각의 평균체중에 가까운 동물들을 암수 각각 15마리씩을 선택하였다. 이렇게 선택된 암수 각 15마리를 각 군에 5마리씩 균등하게 분배되도록 순위화 한 체중을 이용하여 무작위 법으로 분배하였다.

투여경로는 경구투여를 선택하였다. 투여 방법은 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고 금속제 경구 투여용존대를 이용하여 위내에 직접 주입하였다. 사람에서의 적용 예상경로로서 경구투여를 선택하였다. 투여횟수는 1일 1회로 투여 당일 오전에 투여하였다. 투여개시 직전의 절식된 체중을 측정하고 이를 기준으로 투여 액량을 계산하였다. 투여 액량은 10 ml/kg으로 산출하였다.

관찰 및 검사항목: 전 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여 직후 및 투여 후 6시간까지는 매 시간마다 관찰하였다. 모든 동물

에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 3, 7 및 14일째의 체중을 측정하였다. 계획도살 시까지 생존한 동물들에 대하여는 ether를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대동맥을 절단하는 방법으로 방혈치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

통계학적 방법: 동물의 사망이 관찰되지 않아 치사량을 구하는 통계는 사용하지 않았고 체중은 군별 평균 및 표준편차를 구하여 대조 비교하였다.

Beagle 견을 이용한 독성시험.

실험동물: 중앙 실험동물주식회사(서울시 서초구)에서 암수 각 5개월령 된 Beagle Dog 7마리씩 입수하였다. 약 9일간의 적응기간 후 각각 체중 수컷 6.564~9.149 kg, 암컷 6.762~8.321 kg의 Beagle Dog 6마리씩을 실험에 투여하였다. 입수 시 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였다. 동물 입수 후 9일간 시험을 실시하는 동물실 내에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다. 본 시험은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 주식회사 썬온의 전임상연구센터 제 2 동물사육구역의 9호실에서 수행되었다. 동물은 스테인레스제 망 사육상자(900 L×800 W×750 H mm)에 순화 및 관찰기간 모두 1마리씩 사육하였다. 사료는 푸리나 주식회사로부터 공급 받은 성견용 사료를 하루에 300 g씩 급여하였다. 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 자동급수 장치를 이용하여 자유섭취 시켰다.

시험물질의 투여: 본 시험물질은 숙지황 등의 열수 추출물로서 문헌적 자료에 의하면 단회 투여에 의한 독성이 크지 않을 것으로 판단되었다. 또한 본 시험에 앞서서 실시한 랫드를 이용한 단회투여 독성시험 결과와 군분리 후 남은 동물에서 2,000 및 5,000 mg/kg을 투여한 예비시험결과에서 2,000 mg/kg 투여군에서는 특이한 증상이 없었으나 5,000 mg/kg 투여군에서 구토가 관찰되었다. 따라서, 아래와 같이 단회 경구투여 한계량(OECD, 2002)인 2,000 mg/kg을 고용량군으로 하고 공비를 2로 하여 아래로 2개의 용량군을 추가하였다. 투여경로는 경구투여를 선택하였으며, 투여 전에 하룻밤 절식시킨 후 경구투여용 카테터를 이용하여 위내에 강제 주입하였다. 투여 당일 오전에 1회 투여하였다. 투여개시 직전의 절식된 체중을 측정하고 이를 기준으로 투여 액량을 계산하였다. 투여액량의 산출은 본 시험물질의 고형분 함량이 53.24% 라는 시험성적서를 참조하여 결정하였다.

관찰 및 검사항목: 전 동물에 대하여 매일 1회 이상 일반증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여직후

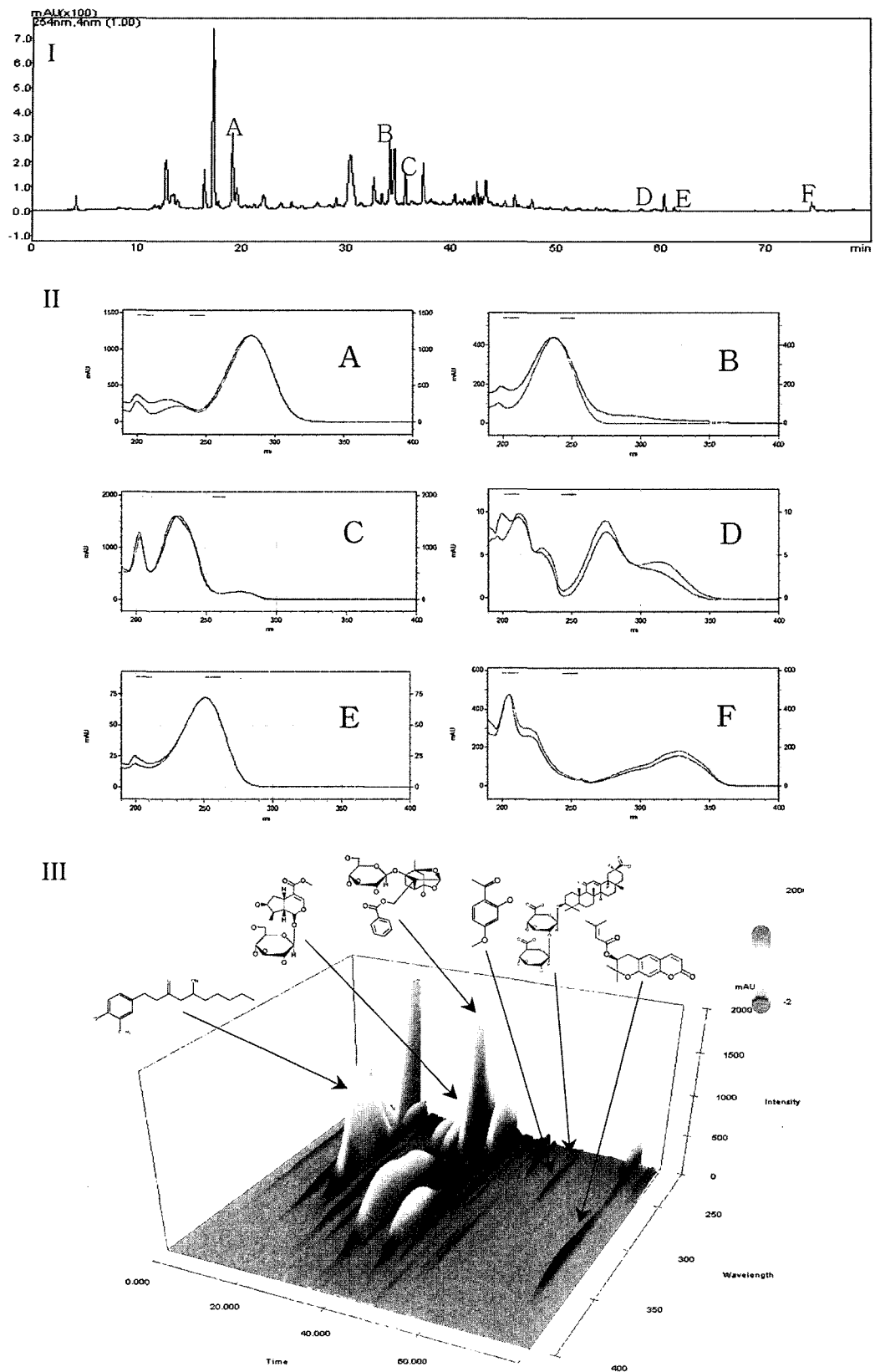


Fig. 1. HPLC chromatogram (I, 254 nm), UV-spectra (II, 190~400 nm) of marker substances and 3-dimension chromatogram (III, 190~400 nm) of KH-19. A: 5-HMF, B: loganin, C: paeoniflorin, D: paeonol, E: glycyrrhizin, F: decursin.

및 이후 6시간까지 매시간 마다 관찰하였다. 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 3, 7 및 14일째의 체중을 측정하였다. 시험 도중에 사망동물이 발생하면 발견 즉시 부검하여 내부장기의 부검소견을 관찰한다. 계획도살 시까지 생존한 동물들에 대하여는 펜토바비탈을 이용하여 심마취한 후 액외동정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 후 부검하여 모든 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였다.

통계학적 방법: 평균과 표준편차를 구하여 군간의 체중을 비교하였다.

결 과

가미홍화탕의 표준화

가미홍화탕에 포함된 화학물질을 동정하기 위하여 지표물질의 UV spectrum(190~400 nm)으로 database를 구축하고, 이 지표물질과 가미홍화탕(KH-19) 분석물질간의 머무름 시간, spectra 등을 대조하였다. 그 결과 5-HMF, loganin, paeoniflorin, paeonol, glycyrrhizin과 decursin 등이 지표물질의 spectra와 머무름 시간이 일치하여 가미홍화탕의 화학물질로 동정하였다. 그리고 지표물질을 이용하여 검량선을 작성하고 가미홍화탕(KH-19)에 포함된 지표물질의 함량을 분석한 결과 paeoniflorin이 0.97%로 가장 많이 함유되어 있었고, loganin(0.17%), 5-HMF(0.14%), glycyrrhizin(0.06%), decursin(0.03%), paeonol(0.003%) 순서로 포함 되어 있었다(Fig. 1).

랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

사망동물 및 최소치사량을 살펴본 결과 모든 시험군에서 본 시험물질 투여 이후 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 3). 따라서 본 시험물질의 최소치사량(MLD)은 암수 모두에서 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 관찰되었다. 일반증상을 살펴본 결과 모든 시험군에서 본 시험물질의 투여와 관련된 증상은 투여당일은 물론 투여 이후의 전

Table 4. Incidence of clinical signs of male and female rats in the single dose toxicity of KH-19

Day	Sign observed	Dose level (mg/kg)					
		Male			Female		
		0	2,000	5,000	0	2,000	5,000
0	Appears normal	5/5*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
1	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
2	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
3	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
4	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
5	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
6	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
7	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
8	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
9	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
10	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
11	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
12	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
13	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
14	Appears normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

관찰기간 동안 관찰되지 않았다(Table 4). 체중변화에서는 투여 3일 후 암수 시험물질 투여군 전례 및 암컷 부형제 투여군 2례에서 체중증가의 역제가 일시적으로 관찰되었으나 7일째부터는 모두 정상적인 성장이 관찰되었다(Table 5). 부검소견에서 본 시험물질의 투여와 관련된 특이 변화는 관찰되지 않았다. 단, 폐의 암적색 반점(Dark red spots)이 수컷의 경우 2,000 mg/kg 투여군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 각 1례씩 그리고 암컷에서는 부형제 투여군에서 3례, 2,000 mg/kg 투여군에서 1례에서 관찰되었으나 용량의존성이 없는 우발적인 변화였다(Table 6).

Beagle 견을 이용한 단회경구투여 독성시험

사망동물 및 최소치사량(Minimum lethal dose)시험에서는 전 시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 7). 따라서 최소치사량은 2,000 mg/kg을 상회하는

Table 3. Mortality of male (M) and female (F) rats administered orally with KH-19

Dose (mg/kg)	No. dead/ No. dosed	Number of death															mld* value	
		Days after dosing																
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
M	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>5,000
F	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>5,000

*: MLD : Minimum lethal dose.

Table 5. Body weights of male (M) and female (F) rats in the single dose toxicity of KH-19

Dose (mg/kg)	Body weights (grams) n=5						
	0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	gain	
M	0	265.11 ± 5.4	279.39 ± 6.7	286.57 ± 6.1	325.07 ± 10.6	372.89 ± 23.7	107.77 ± 19.0
	2,000	268.27 ± 5.8	288.03 ± 6.0	286.02 ± 4.8	321.88 ± 7.9	365.34 ± 14.0	97.07 ± 9.3
	5,000	268.07 ± 6.4	288.26 ± 6.4	287.33 ± 5.4	322.61 ± 6.6	362.94 ± 8.9	94.87 ± 11.2
F	0	196.66 ± 6.8	209.39 ± 7.7	208.29 ± 8.7	230.41 ± 15.0	250.25 ± 13.7	53.59 ± 8.7
	2,000	193.07 ± 4.8	210.17 ± 4.6	205.16 ± 0.8	223.27 ± 5.6	248.08 ± 5.5	55.01 ± 7.4
	5,000	196.87 ± 7.5	210.53 ± 6.8	207.00 ± 6.2	223.20 ± 9.7	250.68 ± 12.3	53.81 ± 9.6

Table 6. Gross findings of male (M) and female (F) rats in the single dose toxicity of KH-19

Dose (mg/kg)	Gross observation			
	Location	Gross findings	Frequency	
M	0	No gross findings	5/5*	
	2,000	Lung	No gross findings	4/5
			Dark red spots	1/5
	5,000	Lung	No gross findings	4/5
			Dark red spots	1/5
	F	0	No gross findings	2/5*
2,000		Lung	Dark red spots	3/5
			No gross findings	4/5
5,000		Lung	Red spots	1/5
			No gross findings	5/5

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

것으로 관찰되었다. 일반증상에서 수컷의 경우 투여 다음 날 모든 용량군에서 설사가 관찰되었다. 투여 당일에는 1,000 mg/kg 및 2,000 mg/kg 투여군에서 투여 직후 및 1~3시간째 사이에 구토증세를 보였다. 수컷 1,000 mg/kg 투여군의 1마리에서는 투여후 2일째 및 12일째에도 구토가 관찰되었다. 암컷의 경우 1,000 mg/kg 및 2,000 mg/kg 투여군에서 각각 1마리가 투여 당일에 설사(diarrhea) 증상을 보였다. 1,000 mg/kg 투여군에서 1마리가 투여후 2일째 구토증세, 2,000 mg/kg 투여군에서 1마리가 투여 직후 및 투여 후 4시간째에 구토증세를 보였다. 또한 암컷 500 mg/kg 용량군에서 13일차, 1,000 mg/kg 용량군에

서 3일차, 9일차, 10일차에서 식욕부진으로 인해 사료를 남겼으나(anorexia) 용량상관성이 없는 우발적인 변화였다(Tables 8, 9). 체중변화에서는 수컷의 경우 2,000 mg/kg 투여군에서 평균체중이 투여후 1일째에 감소가 관찰되었다. 500 및 1,000 mg/kg 투여군에서는 각각 1마리에서 경미한 체중의 감소가 관찰되었으나 평균체중의 경우에는 증가하였다. 암컷의 경우 1,000 mg/kg에서 1마리가 투여후 3일째 체중증가억제가, 2,000 mg/kg에서 1마리가 투여 다음날 체중감소가 관찰되어 평균체중의 감소가 관찰되었다. 평균체중을 보면 암수 모두 2,000 mg/kg 투여군에서 투여후 1일째에 일시적인 체중증가 억제가 관찰되었다(Table 10). 부검소견에서 수컷 1,000 mg/kg 투여군의 1마리에서 폐에 전체적으로 홍갈색 반점이 산재되어진 것을 관찰할 수 있었으나 용량의존성이 없는 우발적인 변화였다(Table 11).

고 찰

한약은 의약품으로 분류하면서도 기존의 화학약품과 여러 가지 면에서 그 특이성이 뚜렷하다. 첫째 한약은 농산물로 재배되거나 자연에서 채취한다는 점이며 둘째로 이들은 단일성분으로 이루어지지 않고 복합성분으로 구성되어 있고 아직 밝혀지지 않은 성분들을 포함하고 있으며 셋째 한약은 단일한약재로 사용하는 경우가 드물고 여러 가지 약재의 혼합인 복합제제로 사용한다는 점과 넷째 약

Table 7. Mortality of male (M) and female (F) dogs administered orally with KH-19

Dose (mg/kg)	No. dead/ No. dosed	Number of death										mld* value	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8~14			
M	0	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>5,000
F	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>5,000

*: MLD : Minimum lethal dose.

Table 8. Incidence of clinical signs of male dogs in the single dose toxicity of KH-19

Day	Signs observed	Dose level (mg/kg)		
		500	1,000	2,000
0	Appears normal	1/2*	0/2	1/2
	Vomiting	0/2	0/2	1/2
	Diarrhea	1/2	2/2	1/2
1	Appears normal	1/2	2/2	1/2
	Diarrhea	1/2	0/2	1/2
2	Appears normal	2/2	1/2	2/2
	Vomiting	0/2	1/2	0/2
3	Appears normal	2/2	2/2	2/2
4	Appears normal	2/2	2/2	2/2
5	Appears normal	2/2	2/2	2/2
6	Appears normal	2/2	2/2	2/2
7	Appears normal	2/2	2/2	2/2
8	Appears normal	2/2	2/2	2/2
9	Appears normal	2/2	2/2	2/2
10	Appears normal	2/2	2/2	2/2
11	Appears normal	2/2	2/2	2/2
12	Appears normal	2/2	1/2	2/2
	Vomiting	0/2	1/2	0/2
13	Appears normal	2/2	2/2	2/2
14	Appears normal	2/2	2/2	2/2

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

물이 표준화 되어 있지 않아서 같은 처방이라도 한방병원, 한의원간의 약물에 의한 효과나 부작용이 상이하여 추적이 어렵다는 점 등 다양한 문제점을 가지고 있다. 특히 제배산이 대다수인 한약재는 잔류농약, 중금속, 토양부착 미생물 등 식물자체의 성분 이외의 외인적 요인들도 포함하고 있어 더욱 약화사고의 원인을 찾기가 힘든 실정이다. 일반의약품으로 생산되는 한약제제의 경우 GMP 시설에서 생산되고 있으며 적절한 제약기준을 요구받고 있어서 약화사고 후에 발생하는 사후 처리가 용이한 점이 있으나 한방병원, 한의원, 그리고 한약국, 양약국, 건강원 등에서 자체 추출하고 포장하여 투약하는 한약추출물의 경우는 그 표준화에 대한 방안이 아직 미흡한 실정이다. 이러한 이유에도 불구하고 오랜 기간의 임상경험을 근거로하여 한약제제의 임상시험기준을 완화하고 있는 실정이다. 한약에 관한 전반적인 제도적 안정이 이루어지지 않은 상황

Table 9. Incidence of clinical signs of female dogs in the single dose toxicity of KH-19

Day	Signs observed	Dose level (mg/kg)		
		500	1,000	2,000
0	Appears normal	2/2*	1/2	1/2
	Vomiting	0/2	0/2	1/2
	Diarrhea	0/2	1/2	1/2
1	Appears normal	2/2	2/2	2/2
	Appears normal	2/2	1/2	2/2
2	Appears normal	2/2	1/2	2/2
	Vomiting	0/2	1/2	0/2
3	Appears normal	2/2	1/2	2/2
	Anorexia	0/2	1/2	0/2
4	Appears normal	2/2	2/2	2/2
5	Appears normal	2/2	2/2	2/2
6	Appears normal	2/2	2/2	2/2
7	Appears normal	2/2	2/2	2/2
8	Appears normal	2/2	1/2	2/2
9	Appears normal	2/2	1/2	0/2
	Anorexia	0/2	1/2	2/2
10	Appears normal	2/2	1/2	0/2
	Anorexia	0/2	1/2	2/2
11	Appears normal	2/2	2/2	2/2
12	Appears normal	2/2	2/2	2/2
13	Appears normal	0/2	2/2	2/2
	Anorexia	2/2	0/2	0/2
14	Appears normal	2/2	2/2	2/2

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

에서 양방의료계를 비롯한 여러 연구기관에서 한약의 인체 독성에 관한 연구를 통하여 안전성에 의문을 제기하고 있다. 이에 본 연구에서는 한약처방인 가미홍화탕(KH-19)을 HPLC로 표준화하고 랫드와 Beagle 견을 이용하여 급성독성 시험을 실시하여 그 안전성을 검토하였다.

한약은 복합물질로 구성되어 있어서 그 분석에 문제점을 가지고 있었으나 최근 들어서 HPLC 성능향상과 검출기의 다양화 등으로 인하여 일부나마 처방 내에 화학성분의 분석이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 HPLC에 Diode Array Detector(DAD)를 사용하여 기존의 단일파장에 따른 2차원 chromatogram의 한계를 일부 극복하였고, 각 지표성분의 UV-spectrum분석을 통하여 한약처방내의 정성과 정량분석이 용이하였다.

Table 10. Body weights of male (M) and female (F) dogs in the single dose toxicity of KH-19

Dose (mg/kg)		Body weights (kg)					
		0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	gain
M	500 (n=2)	7.86 ± 1.8	7.87 ± 1.6	8.02 ± 1.8	8.26 ± 1.7	8.67 ± 1.9	0.82 ± 0.05
	1000 (n=2)	8.22 ± 1.2	8.30 ± 1.4	8.47 ± 1.3	8.74 ± 1.3	8.97 ± 1.2	0.75 ± 0.04
	2000 (n=2)	8.32 ± 0.8	8.29 ± 0.4	8.38 ± 0.5	8.72 ± 0.3	9.01 ± 0.2	0.68 ± 0.6
F	500 (n=2)	7.49 ± 1.0	7.75 ± 1.0	7.92 ± 1.1	8.07 ± 1.1	8.23 ± 1.1	0.74 ± 0.1
	1000 (n=2)	7.65 ± 0.9	7.69 ± 1.0	7.71 ± 1.1	8.14 ± 0.8	8.41 ± 1.0	0.76 ± 0.01
	2000 (n=2)	7.92 ± 0.3	7.90 ± 0.3	8.00 ± 0.1	8.26 ± 0.02	8.56 ± 0.2	0.64 ± 0.1

Table 11. Gross findings of male (M) and female (F) dogs in the single dose toxicity of KH-19

Dose (mg/kg)	Gross observation		Frequency	
	Location	Gross findings	Death	Survivors
M	500	no gross findings	0/0	2/2*
	1,000	no gross findings	0/0	1/2
		lung	diffused reddish brown spots	0/0
	2,000	no gross findings	0/0	2/2
F	500	no gross findings	0/0	2/2*
	1,000	no gross findings	0/0	2/2
		2,000	no gross findings	0/0

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

이와 같이 한약처방의 표준화를 실시하고 표준화된 한약처방의 급성독성학적 연구를 실시하였다. KH-19의 랫드에 대한 단회 경구투여 독성시험에서 암수 모두에서 일시적인 체중증가의 억제는 보였으나 일반증상의 변화는 보이지 않았고 사망동물도 관찰되지 않아 최소치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회할 것으로 판단되었다. KH-19의 Beagle 견에 대한 단회 경구투여 독성시험에서 독성증상은 투여 후 설사와 구토증세 및 이에 따른 일시적 체중증가 억제가 관찰되었으나 사망동물은 관찰되지 않았기에 최소 치사량은 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었다.

한약처방의 안전성연구의 일환으로 표준화된 가미홍화탕(KH-19)의 급성독성 시험을 실시하여 그 안전역을 확인하였다. 그러나 본 연구는 전 임상시험의 독성시험에 한정되어 있으므로 추후 임상시험에 있어서 약물성 간손상 시험 등을 통하여 인체에서의 안전성을 확보하여야 할 것이다.

참고문헌

김은정, 문귀임, 이문홍, 오현숙, 최종동, 정정순, 안경아, 김영림, 장문익, 김지연 (2001): Microwave를 이용한 생약재 잔류농약의 추출방법에 관한 연구. *식품의약품안전청보고서*, **5**, 278-290.

식품의약품안전청 (1999): 의약품등의 독성시험기준. *식품의약품안전청 고시 제 1999-61호*.

식품의약품안전청 (2000): 비임상시험관리기준. *식품의약품안전청 고시 제 2000-63호*.

안병민, 이동수, 백종태, 장성희, 장이선 (2002): 식물체제에 의한

간손상의 빈도. *식품의약품안전청연구보고서*, **6**, 1045-1046.

유영범, 조성기 (2000): 감마선 조사 당귀 (*Angelica gigas* Nakai)의 유효성분 안정성 및 유전독성학적 안전성. *한국식품영양과학회지*, **29**, 300-306.

이병철, 최기림, 이진신, 장원만, 안영민, 안세영, 두호경 (2000): Chinese Herb Nephropathy란 용어는 올바른 것인가? 대한한방내과학회지, **21**, 543-548.

이영자, 김우성, 이창희, 허문희, 정지윤, 이선화, 김재이, 진중성, 김미경, 진선경, 이명자, 박영채, 홍기형 (2002): 유통 한약재의 잔류농약 및 잔류이산화황에 대한 모니터링. *식품의약품안전청보고서*, **6**, 678-693.

이지현, 류인림, 윤성준, 신원혁, 이정석, 최의혁, 홍수희, 유종훈, 김영목, 이동윤, 이준상 (1998): 한약재 복용으로 인한 간염 17예에 대한 임상적 고찰. *대한소화기학회지*, **32**, 69-74.

조성기, 유영범, 오현, 박연길, 변명우 (2000): 감마선 조사 생약재 (어성초, 구기자)의 안전성에 관한 유전독성학적 평가. *한국식품저장유통학회지*, **7**, 68-73.

허옥순, 이진하, 김세은, 주인선, 신동우, 이정호, 김지연, 강숙경, 이형규, 백승화, 문병우, 김진수 (2000): 유통 방기의 화학적 분석. *식품의약품안전청연구보고서*, **4**, 111-118.

He, J.X., Akao, T. and Tani, T. (2002): Development of a simple HPLC method for determination of paeoniflorin-metabolizing activity of intestinal bacteria in rat feces. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1233-1237.

Jiang, Y., Lu, H.T. and Chen, F. (2004): Preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of licorice using high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **1033**, 183-186.

Lee, J.H., Koh, J.A., Hwang, E.Y. and Hong, S.P. (2002): Quantitative determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from rehmanniae radix preparata according to various processings. *Kor. J. Herbology*, **17**, 145-149.

OECD (2002): Acute Oral Toxicity-OECD fixed dose method. 425.

Vanherweghem, J.L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. and Vanhaelen, M. (1993): Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*, **341**, 387-391.

Wang, S.F., Chen, X.G., Hu, Z.D. and Ju, Y. (2003): Analysis of three effective components in Fructus corni and its preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Biomed Chromatogr.*, **17**, 306-311.

Yu, Y.B., Jeong, I.Y., Park, H.R., Oh, H.H. and Jung, S.K. (2004): Toxicological safety and stability of the components of an irradiated Korean medicinal herb, Paeoniae Radix Job. *Radiation Physics and Chemistry*, **71**, 115-119.

Zhao, X. and Sun, Y. (2003): Analysis of Paeoniae Radix by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Sci.*, **19**, 1313-1315.