대한한방부인과학회지
J Korean Obstet Gynecol
VOL.26 NO.4 : 048-065 (2013)

산모의 한약 복용이 모유에 미치는 영향
- HPLC와 LC/MS/MS를 이용한 생화탕 지표성분 분석 -

우석대학교 한의과대학 한방부인과학교실
박가영, 이아영, 반지혜, 박정경, 이은희

ABSTRACT

Effects of Herbal Medicine on Breastfeeding
- Analysis of Marker Substances in *Saenghwa-tang* by HPLC and LC/MS/MS -

Ka-Young Park, Ah-Young Lee, Ji-Hye Ban, Jung-Kyung Park, Eun-Hee Lee
Dept. of Korean Obstetrics & Gynecology, College of Korean Medicine, Woo-Suk University

Objectives: We took breast milk samples and analyzed them using HPLC and LC/MS/MS, to evaluate the effects of taking *Saenghwa-tang* during breastfeeding on breast milk.

Methods: The study participants were 20 lactating women who admitted in Korean medical postpartum care center. Breast milks were collected from paticipants who have been administrated *Saenghwa-tang* for more than 3 days. We used HPLC and LC/MS/MS for the determinations of amygdalin, liquiritins, 6-gingerol, decursin and decursinol angelate in *Saenghwa-tang*.

Results:
1. Participants' Mean±S.D (standard deviation) of age is 31.05±1.96, and 15 participants had normal delivery and 5 participants had cesarean delivery. 12 participants were primipara and 8 participants were multipara. Mean±S.D of lactating date is 9.4±0.94.
2. Using HPLC, we learned LOQ level peak that matches the peak retention time of standard components of *Saenghwa-tang* was not detected from 20 breast milk samples.
3. Using LC/MS/MS, decursin of Angelicae Gigantis Radix was detected from HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11, and the each concentrations are 16, 2, 64, 11 ppb. Liquiritin of Glycyrrhizae Radix was not detected from HMSP 13~HMSP 18.

Conclusions: Data obtained by this approach shows that this method is reliable and suitable for determining the safety of taking *Saenghwa-tang* during breastfeeding.

Key Words: *Saenghwa-tang*, Breastfeeding, HPLC, LC/MS/MS, Herbal medicine, Marker Substance

Corresponding author(Eun-Hee Lee) : Woo-Suk Univ. Jeonju Korean Medicine Hospital, 46, Eoeun-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea
Tel : 063-220-8606 E-mail : lovedmsl@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

모유는 생후 첫 6개월 동안 영아의 성장과 발육에 필요한 모든 영양분을 공급하는 가장 이상적인 식품이다[1]. 이러한 모유수유의 장점이 부각되면서 1970년대 이후 WHO와 UNICEF를 중심으로 모유수유 운동이 전세계적으로 전개되었고[2], 우리나라 역시 2000년에 약 10%로 저조했던 생후 1개월 된 아기의 완전모유 수유율이 2005년에는 58.2%에 달할 만큼 증가[3]하였으며, 실제 임상에서 산모들이 모유수유에 대해 갖는 관심은 매우 높다.

수유 중인 산모는 임신 혹은 출산 후 발생한 질환(임신성 당뇨 및 혈압, 유선염, 산후우울증, 치질, 피부질환, 폐수종, 각종 관절통 등), 치과 치료나 만성 질환(고혈압, 당뇨, 갑상선 질환, 결핵, 류마티스 관절염, 정신질환 등)으로 인한 다양한 약물 노출[3]을 경험하게 된다. 이와 더불어 산모가 약물 복용시 약물이 모유로 이동하는 과정에 관한 지속적인 연구가 이루어지고 있으나, 대다수의 약물의 임상시험이 불가능한 상황이다[4]. 모유 수유시 약물 복용의 다양한 가이드라인이 제시되고 있음에도 불구하고, 의료인들의 미흡한 정보와 이에 따른 산모의 불안은 수유를 중단하게 하는 원인이 되고 있다[5].

우리나라 여성들은 산후의 제반 증상을 치료하기 위해서 한방치료를 받거나 모유수유 중 한약을 복용하는 경우가 많다. 장 등[6]의 산후조리원 한방 의료 현황 조사에서 알 수 있듯이 우리나라는 산후조리 및 산후 한약 복용에 대한 인지도가 높다. 그 중 대표적인 처방인 生化湯은 ≪傅靑主女科≫ 產後篇·產後諸症治法에 원방이 수재되어 있으며 當歸, 川芎, 桃仁, 乾薑, 甘草로 구성된 산후의 통치방으로 산후 임상에서 다양하게 활용하는 처방이다. 生化湯 및 그 加減方은 산후자궁의 회복과 산후복통, 산후혈훈, 태반잔류 및 산후출혈 등 각종 병증의 예방과 치료에 효과가 있음이 실험과 임상연구를 통해 밝혀져 있다[7].

모유수유 중 한약 복용에 대한 안전성 연구는 아직까지 보고된 예가 많지 않다. 2011년 민족의학신문에 '모유수유 중 한의사가 처방하는 한약의 투여는 안전하다'는 주제로 대한모유수유한의학회의 기고[8]가 있었고, 전탕 전과 후의 중금속, 잔류이산화황 및 잔류농약 함량을 조사한 결과, 전탕 후 중금속 함량은 현저히 감소하고, 잔류이산화황 및 잔류농약은 검출되지 않았다[9,10]고 밝힌 연구가 있었다. 특히 Hale이 제시한 가이드라인[11]에서 출산 후 다용하는 한약재들이 대부분 'L3 : 과학적 데이터가 부족하나 전문가 처방에 의해 가이드라인대로 투여시 비교적 안전한 약물'에 속하고 있으나, 단일 약재를 사용하지 않고 복합처방을 하게 되는 한약에 있어서의 정보 제공 및 가이드라인은 없는 실정이다.

최근 복합적인 화합물로 구성된 한약 처방의 지표성분을 High performance liquid chromatography(HPLC)를 통해 정성 정량 분석하는 연구가 진행되고 있다[12,13]. 약리효능 물질과 지표물질이 일치하지 않는다는 한계가 있으나, 복합적인 화합물로 구성된 한약을 개별적인 단일 성분으로 분석할 수 있는 장점을 가진 HPLC를 이용한 접근은 그 의미를 갖는다.

이에 저자는 모유수유 중 한약 복용이

모유에 미치는 영향을 평가하기 위해 生化湯 加減方을 복용하고 있는 건강한 산모 20명을 대상으로 한약 복용 후 이행유에 해당하는 모유를 채취한 후, HPLC와 liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC/MS/MS)를 이용하여 生化湯의 지표물질로 amygdalin, liquiritin, 6-gingerol, decursin 및 decursinol angelate를 선정, 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

Ⅱ. 연구대상 및 방법

1. 임상시험 형식

본 연구는 OO대학교 부속한방병원에서 구성한 임상시험심사위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인을 받아 실시하였으며, IRB 승인 번호는 WSOH IRB 1304-01이었다. 본 임상시험의 목적과 내용 및 구체적인 방법에 대해 충분히 설명한 후, 임상시험 참여 동의서를 작성한 자에 한하여 연구를 시작하였다.

2. 대 상

1) 연구 대상

본 연구는 2013년 4월부터 6월까지 OO대학교 부속한방병원 산후클리닉에 입원하여 生化湯 加減方을 복용 중이며, 임상시험 모집과정에 참여의사를 밝힌 건강한 산모를 대상으로 하였다. 최초 지원자는 21명이었으며, 모유 채취에 대한 거부감으로 1명이 임상시험 참여를 중단하여 최종적으로 총 20명이 임상시험을 마쳤다.

2) 선정 기준

(1) 만 28세 이상 40세 이하의 재태기간 37~42주에 단태 분만하였으며, 임신시 합병증이나 산과적 문제점이 없는 건강한 산모

(2) 生化湯 加減方을 3일 이상 7일 이하 동안 복용한 산모 중 이행유의 모유를 제공할 수 있는 자로, 활력징후가 정상 범위에 속하며 본 임상시험에 참여하기로 동의한 자

3) 배제 기준

(1) 고혈압, 당뇨, 갑상선 질환 등의 만성 질환을 갖고 있는 자

(2) 중금속 및 유기오염물질에 대한 직업적 노출이 있는 자

(3) 출산 후 산부인과에서 통상적으로 처방한 항생제 및 소염진통제가 아닌 다른 민간요법 약물(호박즙, 가물치 등)을 복용하였던 자

(4) 출산 후 출혈, 발열 등의 산부인과적 질환이 발생한 자

(5) 기타 피험자로 부적합하다고 연구자가 판단한 자

4) 연구 대상의 복용 한약 : 生化湯加減方

OO대학교 부속한방병원 산후클리닉에서 生化湯加減方을 복용 중인 산모를 대상으로 하는 연구이므로, 본 병원에서 시행하는 임상투여 원칙에 따라서 진행하였다. 임상시험 기간 동안 生化湯加減方의 약재는 동일한 구입처에서 일괄 구입한 것을 사용했으며, 처방의 첩당 분량과 구성 및 가감 약재는 아래와 같다(Table 1). 처방은 生化湯 원방을 기준으로, 산모의 증상에 따라 개별 약재를 가감하여 활용하였다. 乳汁不足이나 乳汁不通에 王不留行, 木通을 가미하고, 浮腫에 澤蘭, 燈心, 黑小豆를 가미하였다. 上熱感이 있는 경우에 黃芩, 咳嗽가 심

한 경우에 桑白皮, 腰痛에 杜冲, 續斷을 가미하였다. 兒枕痛에 白灼藥, 소화력이 약한 경우에 香附子, 砂仁을 가미하였고, 변비에 大黃을 가미하였다. 약재를 첩당 분량 무게를 맞추어 거름망보자기에 싼 후 약탕기에 넣고, 물을 약재의 10배로 첨가하여 100℃에서 120분간 전탕하였다. 生化湯 加減方은 4℃ 이하 냉장보관을 원칙으로 하고, 냉장보관 기간은 7일 이내로 하였다.

Table 1. The Composition of *Saenghwatanggagam-bang*

Herbal medicine	Pharmaceutical name	Amount (g)
當　歸	*Angelicae Gigantis Radix*	16
川　芎	*Cnidii Rhizoma*	12
乾薑炒黑	*Zingiberris Siccatum Rhizoma*	4
桃　仁	*Persicae Semen*	4
炙甘草	*Glycyrrhizae Radix*	2
王不留行	*Melandrii Herba*	4
木　通	*Akebiae Caulis*	4
澤　蘭	*Lycopi Herba*	4
燈　心	*Junci Medulla*	4
黑小豆	*Glycine Semen Nigra*	8
黃　芩	*Scutellariae Radix*	4
桑白皮	*Mori Cortex Radicis*	4
杜　仲	*Eucommiae Cortex*	4
續　斷	*Dipsaci Radix*	4
白灼藥	*Paeoniae Radix*	4
香附子	*Cyperi Rhizoma*	4
砂　仁	*Amomi Fructus*	4
大　黃	*Rhei Rhizoma*	2
	Total	38~54

5) 生化湯加減方의 복용량 및 복용 기간

生化湯加減方을 1첩 분량으로 하여, 하루에 2첩을 3회에 나누어 1회에 120 ml를 복용하였다. 대상 산모는 生化湯加減方을 5.55±1.05일 동안 복용하였으며, 최소 3일에서 최대 7일 동안 복용하였다.

3. 방　법

1) 모유 채취

모유 채취 당일 아침, 연구자가 방문 혹은 전화로 피험자에게 모유 채취 시간 및 채취 방법에 대해 고지하였다. 오전 9시에서 12시 사이에 피험자 임의대로 유축기를 사용하거나 손으로 한쪽 유방의 모유를 짜내며, 모유의 전유와 후유의 불균형을 방지하기 위해 피험자의 판단에 의해 한쪽 젖을 다 비울 때까지 유축하는 것을 원칙으로 하였다. 유축한 모유의 양은 50~160 ml 정도로 피험자에 따라서 다양하게 나타났다. 다 짜낸 모유는 30~50 ml 정도의 양을 저밀도 폴리에틸렌(LLDPE) 재질의 모유 저장팩에 담아 밀봉하였다. 피험자가 모유를 보관하는 시간 및 연구원 이동시간을 포

함하여 냉장보관 다섯 시간 이내에 연구자가 방문 확인한 후, 알미늄 호일로 싸서 분석 직전까지 -20℃의 냉동고에 보관하였다.

2) 지표물질의 정량 분석

(1) 성분 패턴 비교 분석

① 조제시약

표준원액 및 내부표준 용액의 diluent로서 사용하기 위해 메스실린더를 이용하여 deionized water와 methanol을 각각 50 ml씩 측정 후 100 ml bottle에 넣고 5분 동안 sonication하여 50% methanol 수용액(v/v)을 제조하였다. 조제 시약은 실온에서 보관하고, 사용 기한을 조제 후 2주간으로 하였다.

② 시료의 준비

분석 시료는 모유 약 20 ml를 취하여 50 ml conical tube에 넣고 ethyl acetate 10 ml를 첨가하여 현탁 추출 후 2500 rpm 및 4℃에서 10분 동안 원심분리하였고, 상층액 중 일정량을 취하여 질소농축하고 남은 여액 약 0.2~0.3 ml에 50% methanol 수용액(v/v) 0.6 ml를 첨가하여 층 분리 및 13000 rpm, 4℃에서 5분 동안 원심분리하여 15 μl를 HPLC에 주입하였다. 대조 표준품으로는 amygdalin, liquiritin, 6-gingerol, decursin, decursinol angelate를 μg/ml 농도로 1, 2, 5, 10, 20 μg/ml에 희석하여 사용하였다.

③ HPLC 기기 및 분석 조건

시료 분석을 위한 HPLC 기기는 Agilent 1200Series(USA)로, Automatic liquid sampler(ALS, G1329A), Binary pump (G1312A), Multi-wavelength detector(G1365D), Thermostatted column compartment(TCC, G1316A), Degasser(G1322A)를 사용하였으며, 소프트웨어는 Chemstation(Agilent, USA)을 사용하였다.

HPLC 분석을 위해 사용된 컬럼은 Phenomenex사(USA)의 Gemini-NX C18 (5 μm, 3.0 mm×150 mm)를 사용하였고, 컬럼 온도는 25℃로 유지하였다. 유속은 0.6 ml/min으로 하였고, 주입량은 15 μl였다. 이동상은 물(HPLC grade)과 acetonitrile (HPLC grade)을 혼합하여 사용하였고, 용매 비율은 0-5 min(3, B), 5-15 min(3→20, B), 15-25 min(20→35, B), 25-32 min(35→40, B), 32-38 min(40→45, B), 38-42 min(45→60, B), 42-45 min(60→60, B), 45-50 min(60→3, B)로 설정되었고, gradient elution 방법으로 용리되었다. UV 파장은 각 성분의 검출 파장인 203 nm로 설정되었다(Table 2).

Table 2. HPLC Analytical Condition of Marker Substance in *Saenghwa-tang*

Column	Phenomenex Gemini-NX C18 (5 μm, 3.0 mm×150 mm)		
Mobile phase	Acetonitrile:water =25:75-68:32-25:75-25:75 (gradient elution)		
	min	DW(%)	CH_3CN(%)
	0	97	3
	5	97	3
	15	80	20
	25	65	35
	32	60	40
	38	55	45
	42	40	60
	45	40	60
	50	97	3
Detector	UV wavelength at 203 nm		
Temperature	25℃		
Flow rate	0.6 ml/min		
Injection volume	15 μl		

④ LC/MS/MS 기기 및 분석 조건

일부 시료의 추가 분석을 위한 LC/MS/MS 기기는 Waters사(Waters Corp., UK)의 ACQUITY TQD로, Acquity™ Ultra Performance LC system과 Acquity™ TQD를 구성으로 하는 system을 사용하였다. 소프트웨어는 MassLynx™ 4.1과 Empower™ 2 system(Waters Corp., UK)을 사용하였다. 분석에 이용된 UPLC에 적용된 컬럼은 Acquity UPLC® BEH C18 컬럼으로 2.1 mm 내경의 50 mm 길이였으며, pore size는 1.7 μm였다. 이동상 조건은 0.1% 포름산 수용액(A)과 0.1% 포름산을 함유한 아세토니트릴 용액(B)로 구성되어 gradient 분리 방법을 사용하였다. 용매 비율은 0-4 min(30→90, B), 4-4.5 min(90→30, B)로 설정되었다. 유속은 0.3 ml/min으로 하였고, 주입량은 5 μl였다.

LC/MS/MS 분석 조건으로 MRM(Multiple Reaction Monitoring) mode에서 monitor되었으며, ESI(electrospray ionization source) interface가 사용되었다. Decursin 분석은 positive ion mode에서, liquiritin 분석은 negative ion mode에서 수행하여 확인하였다. Profile 데이터는 m/z 50-1200에서 scanning하였으며, decursin의 이온화 monitoring은 m/z 329>229로 liquiritin의 이온화 monitoring은 m/z 417>225로 확인하였다. Desolvation gas로 질소를 사용하였으며, decursin 분석을 위한 collision voltage와 energy는 각각 34와 28이었으며, liquiritin 분석을 위한 collision voltage와 collision energy는 각각 34와 22이었다. ESI source temperature는 120℃로 설정되었다.

Table 3. LC/MS/MS Analytical Condition of Marker Substance in *Saenghwa-tang*

Column	Waters Acquity® BEH C18 (1.7 μm, 2.1 mm×50 mm)				
Mobile phase	0.1% Formic acid in water (A) : 0.1% formic acid in aetonitrile (B) =30:70-90:10-90:10-30:70 (gradient elution)				
	min		A		B
	0		70		30
	4		10		90
	4.5		10		90
	5		70		30
Temperature	25℃				
Flow rate	0.3 ml/min				
Injection volume	5 μl				
Mass Condition	MRM	Ion Mode	Specific Ion	CV	CE
	Decursin	ES+	329 〉 229	34	28
	Liquiritin	ES-	417 〉 255	34	22

3) 시험 중지 및 탈락 기준

시험기간 중 발생한 부작용으로 인하여 시험을 계속할 수 없다고 연구자가 판단하거나 피험자가 시험 중단을 요구한 경우, 유선염을 비롯한 모유 성분에 영향을 줄 수 있는 피험자의 신체상의 변화가 발생한 경우에 해당 피험자의 시험 참여를 중지하였다. 피험자가 자발적으로 시험 참여를 중단하거나 참가 동의를 철회한 경우, 기타 연구자가 부적합하다고 판단한 자는 탈락시켰다.

4. 통계 처리

연구 결과의 분석은 한글판 SPSS for window 21.0을 이용하여, $P<0.05$를 유의기준으로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 일반적 특성

본 임상시험에 참여 의사를 밝힌 사람은 총 21명이었다. 이 중 모유 채취에 대한 거부감으로 1명이 임상시험 참여를 중단하여 총 20명이 임상시험을 시행하였다.

1) 연령 및 분만 방식, 임신 주수, 분만 횟수

대상 산모의 평균 연령은 31.05±1.96세이며, 최소 연령은 27세, 최대 연령은 34세였다. 대상 산모의 분만 방식은 자연분만(Normal delivery, N/D)이 15명(75%), 제왕절개분만(Caesarean delivery, C/S)이 5명(25%)이었다. 대상 산모의 평균 임신 주수는 39.44±0.87주였으며, 최소 임신 주수는 38주 1일이었고, 최대 임신 주수는 41주 4일이었다. 대상 산모의 평균 분만 횟수는 1.5±0.69회였으며, 최소 분만 횟수는 1회, 최대 분만 횟수는 3회였다. 대상 산모 중 초산부는 12명(60%), 경산부는 8명(40%)이었다.

2) 신장 및 체중, 체질량지수(BMI)

대상 산모의 신장은 161.29±4.11 cm, 임신 전 체중은 59.4±7.84 kg, 임신 전 체질량지수(BMI)는 22.85±3.09 kg/m^2, 만삭 체중은 72.45±4.95 kg, 만삭 BMI는 27.9±2.37 kg/m^2, 입원 당시 체중은 68.79±5.01 kg,

입원 당시 BMI는 26.51±2.38 kg/m^{2}이었다(Table 4).

3) 모유 채취 시행일

대상 산모의 모유 채취는 분만일을 1일로 하여 분만일로부터 9.4±0.94일에 이루어졌으며, 최소 8일에서 최대 11일째에 시행하였고, 입원일로부터 6.55±1.05일에 이루어졌으며 최소 4일에서 최대 8일째에 시행하였다.

Table 4. Characteristics of Study Subjects

Characteristics		Mean±SD	Min[d]	Max[e]
Age		31.05±1.96	27	34
Height (cm)		161.29±4.11	154.2	169.5
Weight (kg)	PG[a]	59.4±7.84	44	77
	GMx[b]	72.45±4.95	64	81
	Initial[c]	68.79±5.01	59.5	78.3
BMI (kg/m^2)	PG[a]	22.85±3.09	16.3	30.0
	GMx[b]	27.9±2.37	23.4	32.5
	Initial[c]	26.51±2.38	22.0	30.7

Values are number and mean±standard deviation (SD).
a) PG (Pregravida), b) GMx (Gestational maximum), c) Initial (In admission day),
d) Min (Minimum), e) Max (Maximum)

2. HPLC에 의한 모유 시료의 분석

生化湯加減方을 복용한 산모에게서 채취한 모유의 분석을 위해 amygdalin, liquiritin, 6-gingerol, decursin 및 decursinol angelate의 표준물질을 HPLC을 이용하여 profiling을 실시하였으며(Table 2), 각 표준물질에 대한 chromatogram은 다음과 같다(Fig. 1). 표준성분들의 검출시간(retention time)은 amygdalin이 3.6 min, liquiritin은 약 18.2 min, 6-gingerol은 약 33.6 min, decursin은 약 43.2 min, decursinol angelate는 약 43.4 min으로 확인되었다.

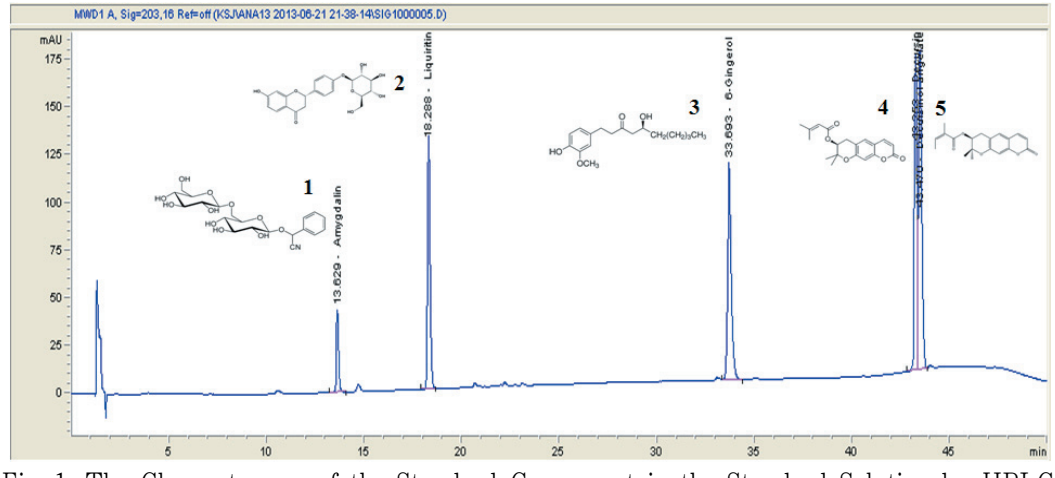

Fig. 1. The Chromatogram of the Standard Component in the Standard Solution by HPLC. Amygdalin (1), Liquiritin (2), 6-Gingerol (3), Decursin (4), and Decursinol Angelate (5) as the Active Compound.

또한, amygdalin, liquiritin, 6-gingerol, decursin 및 decursinol angelate 등 표준물질 5종의 성분에 대한 검량선 작성 결과 linearity($r^2 \geq 0.99$)는 유의하였으며, 직선방정식은 아래와 같다(Table 5).

Table 5. Equation and Corelation Coefficient(r^2) Value of Active Compounds

Analyte	Equation	Corelation coefficient(r^2)
Amygdalin	$y = 36.546x + 0.1035$	0.99999
Liquiritin	$y = 109.687x - 0.8834$	0.99999
6-Gingerol	$y = 157.771x - 0.8509$	0.99999
Decursin	$y = 155.561x - 1.2927$	0.99999
Decursinol angelate	$y = 172.238x - 0.0251$	0.99999

대상 산모가 복용한 生化湯의 chromatogram은 다음과 같다(Fig. 2). 生化湯의 주요 약재들이 함유하고 있는 표준성분들의 검출시간은 amygdalin이 약 13.6 min, liquiritin은 약 18.2 min, 6-gingerol은 약 33.6 min, decursin은 약 43.2 min, decursinol angelate는 약 43.4 min으로 확인되었다.

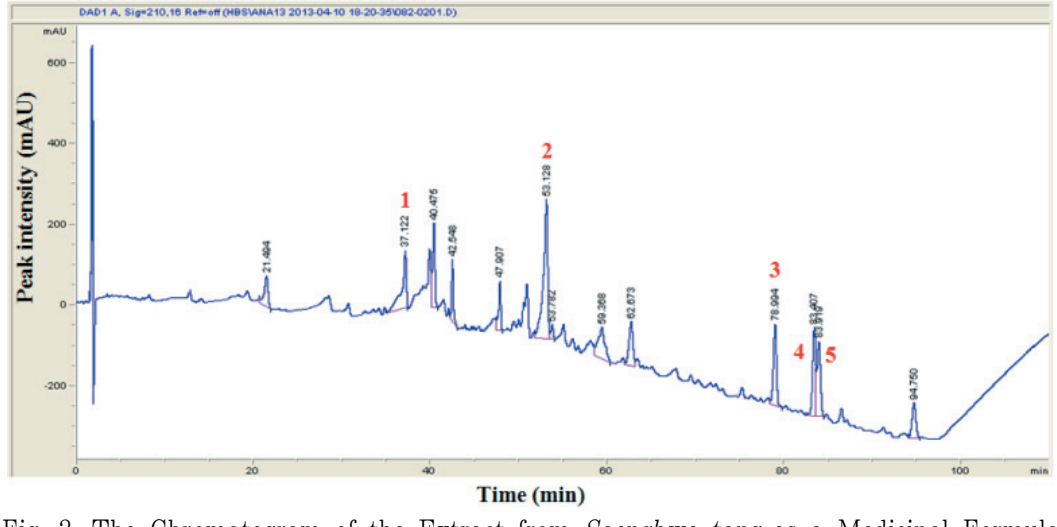

Fig. 2. The Chromatogram of the Extract from *Saenghwa-tang* as a Medicinal Formula by HPLC-DAD.
Amygdalin (1), Liquiritin (2), 6-Gingerol (3), Decursin (4), and Decursinol Angelate (5) as the Active Compound.

生化湯加減方을 복용한 대상 산모에게서 채취한 모유의 chromatogram에서 20개의 모유 시료 중 해당 표준성분의 검출시간과 일치하는 limit of quantitation (LOQ) 수준의 뚜렷한 peak는 검출되지 않았다. 그러나 일부 시료에서 표준성분

중 감초의 liquiritin (2), 당귀의 decursin (4) 및 decursinol angelate (5)의 검출시간과 일치되는 작은 peak가 확인되었다 (Fig. 3). 하지만 이들 peak들의 limit of detection(LOD) 또는 signal to noise(S/N) ratio가 작아 peak로 판단하기가 어려워 좀 더 정확한 표준물질 검증을 위해 LC/MS/MS를 이용한 추가 분석을 실시하였다. 모유 시료 HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11에 대해서 decursin 성분의 검출 여부를 검토하고, HMSP 13~HMSP 18에 대해 liquiritin 성분의 검출 여부를 LC/MS/MS를 이용하여 알아보았다.

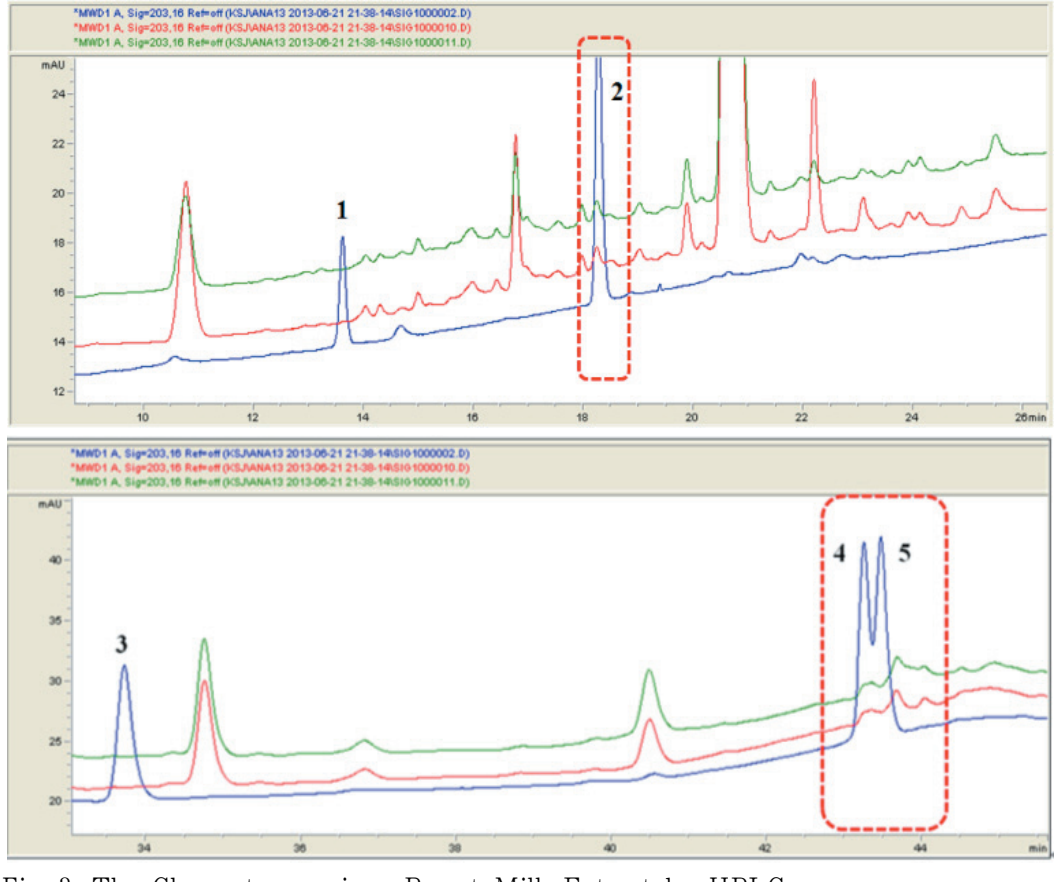

Fig. 3. The Chromatogram in a Breast Milk Extract by HPLC.
Amygdalin (1), Liquiritin (2), 6-Gingerol (3), Decursin (4) and Decursinol Angelate (5) as the Active Compound. The Lowest line (−) means the Standard Compound.

3. LC/MS/MS에 의한 모유 시료의 분석

HPLC chromatogram에서 LOD 또는 S/N ratio가 작아 peak로 판단하기가 어려워 일부 시료를 대상으로 LC/MS/MS를 이용하여 추가 분석을 시행하였다. HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11에서 나타난 당귀의 decursin에 해당하

는 LC/MS/MS chromatogram은 다음과 같다(Fig. 4). 다음에서 Std. 1-3은 decursin 3회 반복이고, 해당 시료의 결과는 HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11에서 검출시간 2.96 min으로 decursin이 검출되었다.

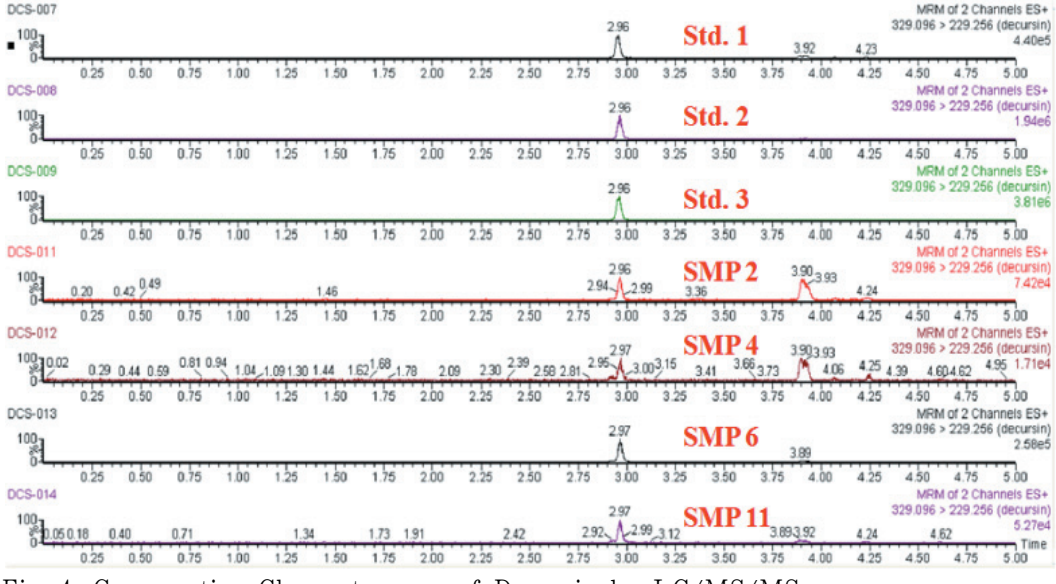

Fig. 4. Comparative Chromatograms of Decursin by LC/MS/MS.

당귀의 decursin은 HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11에서 모두 검출되었으며, 그 농도는 각각 16, 2, 64, 11 ppb였다(Table 6).

Table 6. Contents of Decursin in Sample Extracts from the Breast Milk

Sample number	Contents of decursin (mg/ℓ)
HMSP 02	0.016
HMSP 04	0.002
HMSP 06	0.064
HMSP 11	0.011

HMSP 13~HMSP 18에서 나타난 감초의 liquiritin에 해당하는 LC/MS/MS chromatogram은 다음과 같다(Fig. 5). 감초의 liquiritin은 해당 모유 시료인 HMSP 13~HMSP 18에서 모두 검출되지 않았다.

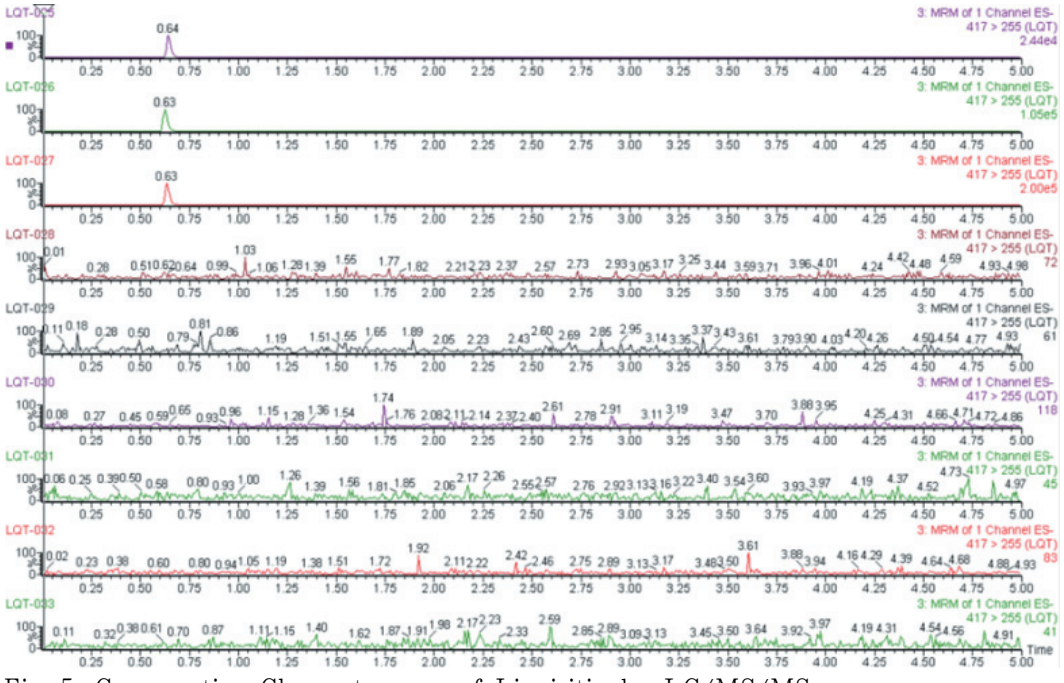

Fig. 5. Comparative Chromatograms of Liquiritin by LC/MS/MS.

Ⅳ. 고 찰

세계보건기구(WHO)는 모유수유가 영아의 건강한 성장과 발달을 위한 이상적인 영양공급원이며, 생후 6개월까지 모유만 먹일 것을 권고하고 있다[14]. 모유는 각종 면역물질과 항체를 포함하고 있어 감염질환 발생을 현저히 줄여주며, 모유수유를 한 아기의 지능지수가 분유수유한 아기보다 더 높은 것으로 알려져 있다. 모유수유는 산후출혈을 예방하고, 체중 감소에 도움이 되며, 산후우울증의 발생을 감소시키는 등 산모에게도 긍정적인 영향을 미친다[15]. 이러한 모유수유의 다양한 장점이 부각되면서 우리나라 역시 모유수유 증진 운동의 효과로 2000년에 약 10%로 저조하였던 모유수유율이 2005년에는 생후 1개월 된 아기의 완전모유 수유율이 58.2 %에 달할 만큼 증가하였다[3]. 하지만, 생후 1개월에 과반수를 넘는 우리나라의 모유수유율은 생후 6개월에는 42.2%, 12개월에는 33.4% 정도로 크게 감소하는 것으로 보고되고 있다[16].

모유수유를 중단하게 되는 원인으로는 유방울혈, 젖물리기의 어려움, 유두 손상, 젖양의 부족, 유두통증 등이 있으며[17], 이 외에도 임신 중 혹은 출산 후 발생한 질환, 치과 치료 등을 위해 수유 중 복용한 약물이 아기에게 미칠 영향을 걱정하여 수유를 중단하는 경우도 있다[18]. 모유수유 중 복용한 약물이 아기에게 미치는 영향에 대해 정확히 알지 못하는 불안감 때문에 산모가 일시적으로 모유수유를 중단하기도 하고, 임상에서 의료인들 역시 모유수유를 유지하며 복용할 수 있는 약물을 선택하는데 참고할 만한 정

보가 부족하여 산모에게 정확히 조언해 줄 수 없는 경우가 많다.

모유수유 중 약물 복용시 약물 성분이 모유로 이동하는 기전에 대해서 현재까지 다양한 연구가 진행되었다. 윤 등[19]은 크게 Experimental model method(In vitro models와 In vivo models)와 Predictive regression model method로 나누어 살펴보았다. Experimental model method 중 Animal model은 백서와 토끼의 경우 인간의 모유에 비해 너무 높은 단백질과 지질의 구성을 가지고 있어, Milk/Plasma ratio(M/P ratio)의 차이가 크며, 약물 대사과정과 비율, 혈장 단백질 결합, 신장 제거율 등이 사람과 다르므로 그대로 반영하기에 어려움이 있다. 인간을 대상으로 직접 milk 및 plasma의 약물 농도를 측정하는 것이 가장 이상적인 방법이지만 역시 모유수유 중인 여성을 실험대상으로 해야 한다는 어려움이 있다고 밝혔다.

따라서 Predictive regression model method는 약동학적인 이론을 바탕으로 M/P ratio를 구할 수 있는 방정식을 도출하게 되었으며, 이를 통한 추정값과 그동안 축적된 약물의 M/P ratio 사이의 비교연구를 통하여 방정식을 실용화하는데 주력한다고 보고하고 있다. 하지만 이러한 연구들에서 약물의 모유 유입과 아기에 미치는 영향에 대한 임상시험이 대부분 불가능하기 때문에 실제로 적용하기에는 한계가 있다.

모유수유 중 복용하는 약물의 안전성이 확인되지 않은 만큼 아기에게 미칠 약물의 부작용을 우려하여, 산모들이 산후 제반 증상을 치료하기 위해 전통적으로 널리 활용되었던 한약제제 및 천연식품을 복용하는 경우도 많다. 예를 들어, 산후우울에 St. John's wort, 산후변비에는 senna, 수유 중 감기와 같은 상기도 감염에 garlic과 echinacea를 활용하는 경우를 보고하고 있다[20]. 하지만 대부분 민간요법으로 쓰여오던 효능 위주로 언급하며, 무작위화나 대조군 설정을 하지 않은 연구가 많아 그 안전성과 효능에 관해서 정확한 근거를 제시하는 연구는 부족한 실정이다. Barnes PM 등[21]의 조사에 따르면, 22% 이상의 미국 여성들이 한약제제를 포함한 천연제제의 약물을 건강을 위해 복용하고 있으며, Nordeng H 등[22]은 출산 후 발생한 질환으로 인해 복용하는 약물의 부작용에 대한 염려로 모유수유 중 한약제제 및 천연식품 복용이 증가한다고 보고하고 있다.

강 등[23]의 연구에 따르면, 우리나라 산모들은 산후조리의 개념에 대해 인식하고 있을 뿐만 아니라, 출산 후 특별한 산후조리의 필요성에 대해서도 보편적으로 공감하고 있다. 이에 따라 국내에서는 의료기관에 부설된 산후조리원이 활발하게 운영되고 있으며, 산모들의 한방 산후조리 프로그램에 대한 만족도 및 한약 복용에 대한 인지도도 높은 편이다[24].

산후 활용하는 대표적인 처방인 生化湯은 ≪傅靑主女科≫ 產後篇·產後諸症治法에 원방이 수재되어 있으며 當歸, 川芎, 桃仁, 乾薑, 甘草로 구성된다. 生化湯 및 그 加減方은 산후자궁의 회복과 산후복통, 산후혈훈, 태반잔류 및 산후출혈 등 각종 병증의 예방과 치료에 효과가 있음이 실험과 임상연구를 통해 밝혀져 있다[7]. 生化湯은 산후에 특별한 병증이 발생하지 않은 경우 분만 후 제 1일에서 2~3일 내에 5~7일 내외 동안 투

여하는 것이 바람직하며, 특정 증상이나 질환이 있을 경우에는 증상에 따라 가감하여 기간에 구애받지 않고 활용할 수 있는 처방이다. 산후 제반 증상을 치료하기 위해 임상에서 많이 활용되고 있으며, 그 효과에 대한 연구가 활발히 진행중이다[25,26].

일반적인 한약재의 안전성 연구로는 체내에 잔류할 수 있는 한약재 내 중금속 함량과 관련한 연구로서, 물 세척만으로도 중금속이 20-38% 제거되어 중금속 함량을 식약청 기준치보다 낮출 수 있었다는 연구[27]와 전탕 전과 후의 중금속, 잔류이산화황 및 잔류농약 함량을 조사한 결과, 전탕 후 중금속 함량은 현저히 감소하고, 잔류이산화황 및 잔류농약은 검출되지 않았다고 밝힌 연구[9,10]가 있었다. 또한 한약제제나 음료를 이용하여 중금속, 벤조피렌, 보존제, 당 등의 유해성 물질을 측정한 결과 기준치 이하로 안전하다는 연구[28]가 있으며, 최근 한약제제연구에서 제시하고 있는 독성시험을 통해 다수의 한약 처방이 단회독성 또는 반복독성이 나타나지 않는다는 보고[29]가 있다. 임신 중에 사용하는 처방인 保生湯이 임신 중 태아에 미치는 영향 등 한약이 임신 중 모체 및 태아에 미치는 영향에 관한 연구[30,31]들은 다수 있지만 모유수유 중 노출되는 한약 성분의 안전성을 알아보는 실험적 연구는 보고된 바 없으며, 모유를 통해서 한약이 유아에게 노출되는 정도를 측정하는 방법에 관한 연구[19]가 있었다.

지금까지 국내에서는 모유의 안전성을 평가하는 방법의 하나로, 잔류성 유기물질과 같은 유해물질이 혈액과 모유를 통해 노출되는 경로에 관한 연구가 다양하게 이루어졌다. 태아와 신생아는 유해물질 노출에 상대적으로 취약하여 낮은 농도에서도 장해 발생 가능성이 높기 때문에 혈액과 모유를 통한 노출수준 조사는 태아와 신생아에서 유해물질의 노출을 예측하기 위한 자료로서 의미가 있다. 서 등[32]은 우리나라 임산부의 모체혈, 제대혈, 모유의 PFOA와 PFOS의 농도를 조사하여 모체를 통한 태아와 신생아의 간접 노출 실태를 파악하였고, 초유 중 indicator PCBs의 농도를 측정하여 영향인자를 파악하고 산모와 유아의 위해성 평가를 시도한 연구가 있었다[33].

한약은 한약재 하나의 경우에도 단일 물질이 아닌 복합물질로 구성되며, 대개 여러 한약재로 구성된 처방으로 복용하기 때문에 기존에 사용된 단일 성분인 약물을 대상으로 혈장 약물 농도와 모유 약물 농도를 측정하여 평가한 방식을 그대로 적용하기에는 무리가 따른다. 따라서, 한약재의 복합 성분인 처방 자체를 동일한 단일 약물로 평가하거나 복합 성분인 한약재를 단일 약물로 평가할 수 있는 방법의 필요성에 대해 언급하며, Rath 등[34]이 한약재의 유효 성분을 지표 물질로 삼아 HPLC를 이용한 측정 방법을 제시하고 있다.

한약의 표준화나 약리활성물질 분석의 유용한 도구가 되고 있는 HPLC는 U/V visible, RI(refractive index), fluorescence, ECD(electrochemical detector)등 검지기의 발달로 천연물, 의약품, 단백질, DNA 등의 분리와 분석에 널리 사용되고 있다. HPLC를 이용한 분석법은 표준품과의 검출시간 비교라는 제한적 특성과 분석물질의 표준품을 반드시 확보하고 있어야 하는 단점이 있다[12]. 하지만 HPLC

의 분리는 분단위 또는 초단위로 실시될 수 있으며 시료의 혼합물이 각각의 성분으로 쉽게 분리될 수 있는 높은 분리능을 갖고 있다. 또 HPLC의 검출기는 감도가 좋아 시료의 10^{-9} g 또는 1 ng까지도 측정할 수 있으며, HPLC는 유기물 및 무기물을 포함한 넓고 다양한 시료의 형태까지 응용될 수 있는 장점이 있어[19], 폭넓게 활용되고 있다.

최근 HPLC를 이용하여 한약재 내의 지표성분을 분석하거나 복합처방의 지표성분을 동시 분석하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 엄 등[35]은 감초 내 주요 지표성분인 glycyrrhizic acid의 HPLC 정량 분석을 실시하여 발효에 의한 지표성분 변화를 관찰하였고, 복합물질로 이루어져 있는 한약 처방을 정성적, 정량적 방법으로 분석하기 위해 四物湯, 烏藥順氣散 등의 처방의 대표적인 지표물질을 선정하여 HPLC를 통해 분석한 연구가 있었다[12,13].

모유수유 중 복용한 약물이 모유를 통해 아기에게 미치는 영향을 파악하기 위해 HPLC를 사용하여 성분 분석을 시도한 연구는 있었으나[36], 국내에서 모유수유 중 복용한 한약의 지표물질을 모유 추출물 시료에서 분석한 연구는 아직까지 보고된 바 없다. 산후의 제반 증상을 치료하기 위해 임상에서 보편적으로 활용되는 生化湯의 경우, 변방인 木香生化湯의 안전성과 유효성에 관한 임상연구 보고[37]가 있을 뿐, 처방의 표준화나 지표성분 분석 및 모유를 통해 아기에게 미치는 영향에 대한 임상적 연구는 아직 이루어지지 않은 상태이다.

본 연구에서는 生化湯加減方을 복용하고 있는 20명의 건강한 산모를 대상으로 하여 한약 복용 후 이행유에 해당하는 모유를 채취한 후, HPLC와 LC/MS/MS를 이용하여 生化湯의 지표물질로 선정한 amygdalin, liquiritin, 6-gingerol, decursin 및 decursinol angelate를 분석하였다.

먼저, HPLC를 이용한 분석 결과 모든 시료에서 生化湯의 지표물질로 보이는 성분은 관찰되지 않았다. 다만 감초의 liquiritin의 peak retention time과 유사한 peak이 HMSP 13~HMSP 18에서 나타났고, 당귀의 decursin 및 decursinol angelate의 peak retention time과 유사한 peak이 HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11에서 확인되었다. 이는 LOD 또는 S/N ratio가 작아 peak로 판단하기 위해서는 LC/MS 또는 LC/MS/MS 등의 보다 감도가 높은 기기를 이용하여 분석할 필요성이 있었다.

의심되는 모유 시료를 대상으로 LC/MS/MS를 이용하여 추가 분석한 결과, 당귀의 decursin은 HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11에서 모두 검출되었으며, 그 농도는 각각 16, 2, 64, 11 ppb였다. 감초의 liquiritin은 HMSP 13~HMSP 18에서 모두 검출되지 않았다.

당귀의 약리 효과는 decursin과 decursinol angelate와 관련하여 보고되고 있으며, 항종양 효과, 박테리아 성장 억제 효과, 순환계 질환과 관련된 효과, 대사 억제 효과, 항염증 효과, 항산화 효과, 인지 개선 증진 효과 등으로 요약할 수 있다[38]. 또한, decursin과 decursinol angelate의 급성 및 아급성 독성 연구보고에서 간독성 및 신독성을 보이지 않으며, 혈액독성도 없다는 것을 밝히고 있다[39].

일반적으로 약물이 모유에 들어가는 양은 산모의 혈장 역동학과 지질의 용해성,

분자량과 기타 요소들에 의해 결정되는데, 그 중 첫번째 원칙은 모유에서는 모체 몸 속 약물의 1% 이하보다 적게 발견된다는 것이며, 아기의 무게별 약물 용량이 모체의 것보다 10% 이하이면 그 약물은 아기에게 안전하다고 볼 수 있다[5]. LC/MS/MS를 이용한 질량 분석을 통해 일부 모유 시료에서 당귀의 decursin 성분이 검출되었으나, 실제 아기에게 영향을 미칠 만한 양은 아닌 것으로 판단된다.

이상의 결과로 미루어 보아 모유수유 중 한약 복용시 모유를 통해 유아에게 미치는 정도를 파악하기 위한 방법 중에서 유효 성분의 정량화를 통한 Human model의 접근이 가장 타당하며[19], 본 연구는 이를 최초로 시도한 임상시험이었다는 데 그 의의가 있다. 향후 더 많은 수의 모유 시료를 수집하여 확대 연구를 진행하거나, 生化湯加減方을 복용하기 전과 복용 후의 모유 시료를 비교 연구한다면 生化湯加減方 복용이 모유에 미치는 영향에 관해 더욱 정확하게 검증할 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

모유수유 중 生化湯 加減方을 일정 기간 복용한 20명의 산모의 모유를 채취하여 모유에 나타난 生化湯加減方의 지표물질 amygdalin, liquiritin, 6-gingerol, decursin 및 decursinol angelate의 함량을 정량 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 연구에 참여한 산모의 평균 연령은 31.05±1.96세이며, 자연분만이 15명, 제왕절개분만이 5명이었고, 초산부는 12명, 경산부는 8명이었다. 대상 산모의 모유 채취는 분만일로부터 9.4±0.94일에 이루어졌다.
2. HPLC 분석 결과, 20개의 모유 시료 중 生化湯의 해당 표준 성분의 peak retention time과 일치하는 LOQ 수준의 peak는 검출되지 않았다.
3. LC/MS/MS 분석 결과, 당귀의 decursin은 HMSP 02, HMSP 04, HMSP 06, HMSP 11에서 검출되었으며, 그 농도는 각각 16, 2, 64, 11 ppb였다. 감초의 liquiritin은 HMSP 13~HMSP 18에서 모두 검출되지 않았다.

□ 투 고 일 : 2013년 10월 16일
□ 심 사 일 : 2013년 10월 29일
□ 게재확정일 : 2013년 11월 8일

참고문헌

1. Lawrence PB. Breast milk: Best source of nutrition for term and preterm infants. Pediatr Clin North Am. 1995;41:925-41.
2. International Pediatric Association. Recommendations for action programmes to encourage breastfeeding. Acta Pediatr Scand. 1976;65(3):275-7.
3. 육지형 등. 한국 마더세이프 전문 상담 센터의 수유부 약물 상담 내용 분석 : 5년간의 경험. 대한주산회지. 2011;22(2):129-35.
4. Fleishaker JC. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. Advanced Drug Delivery Reviews. 2003;55(5):643-52.

5. Rebecca M, et al. 모유수유 A to Z. 서울:민족의학신문. 2010:195-227.
6. 장석우, 허수정, 조현주. 서울시 소재 산후조리원의 의료인 연계 및 한방의료 현황 조사. 대한한방부인과학회지. 2011;24(4):174-85.
7. 이태균, 오주석, 김동일. 〈부청주여과〉를 중심으로 살펴본 생화탕의 운용에 대한 고찰. 대한한방부인과학회지. 1999;12(2):327-48.
8. 김성준. 한의사가 처방한 한약 투여는 안전합니다. 서울:민족의학신문. 2011.
9. 서창섭 등. 전탕 전과 후의 중금속, 잔류농약 및 잔류이산화황의 농도변화-소화기계 약을 중심으로. 대한본초학회지. 2009;24(1):111-9.
10. 서창섭 등. 전탕 전과 후의 중금속, 잔류농약 및 잔류이산화황의 농도변화-감기약을 중심으로. 대한본초학회지. 2008;23(4):51-8.
11. Hale TW. Medications and mother's milk. 14th edition. Amarillo:Pharmasoft Publishing. 2010:13-20.
12. 유영법 등. HPLC-MS/MS에 의한 사물탕의 지표성분 분석. 대한본초학회지. 2007;22(2):97-102.
13. 서창섭, 김정훈, 신현규. HPLC-PDA를 이용한 오약순기산 중 6종 성분의 동시분석. 대한한의학방제학회지. 2012;20(2):37-46.
14. Sobti J, Mathur GP, Gupta A. WHO's proposed global strategy for infant and young child feeding: a viewpoint. J Indian Med Assoc. 2002;100(8):502-6.
15. 대한산부인과학회. 산과학. 서울:군자출판사. 2007:483-4.
16. 연승은, 이혜경. 산후 모유수유 교육방법에 따른 초산모의 모유수유 적응, 태도 및 실천효과. 여성건강간호학회지. 2012;18(2):75-84.
17. 양현주, 서지민. 효과적인 모유수유 개념 분석. 여성건강간호학회지. 2011;17(4):317-27.
18. 차선화 등. 수유 중 약물 복용에 따른 불안과 수유율. 대한주산회지. 2003;14(3):290-5.
19. 윤영진 등. 모유를 통한 한약의 유아 노출 정도 측정법 고찰. 대한한방부인과학회지. 2005;18(2):133-47.
20. Budzynska K, et al. Systematic review of breastfeeding and herbs. Breastfeed Med. 2012;7(6):489-503.
21. Barnes PM, Bloom B, Nahin RL. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. Natl Health Stat Rep. 2008;10(12):1-23.
22. Nordeng H, Havnen GC. Use of herbal drugs in pregnancy: a survey among 400 Norwegian women. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2004;13:371-80.
23. 강종근, 이인선, 조혜숙. 연령에 따른 산후조리에 대한 인식과 수행정도가 산후풍 발생에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2008;21(3):143-66.
24. 박장경 등. 협진 의뢰 산모의 한방산후조리 현황 분석 및 만족도 조사. 대한한방부인과학회지. 2010;23(1):108-23.
25. 하정일, 김동일. 가미생화탕과 가미보허탕의 연속 투여가 산후 체중정체와 체성분 변화에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(2):164-75.
26. 박소월 등. 보허탕과 생화탕의 산후회복효과에 대한 비교연구. 대한한방

부인과학회지. 2001;14(2):113-28.
27. 이승훈, 최호영, 박창호. 한약재 내 중금속 함량분석 및 물세척 효과. 한국생물공학회지. 2003;18(2):90-3.
28. 조현례 등. 한약제제(액제)의 안전성 평가. 식품위생안전성학회지. 2011;26(3):266-72.
29. 강석용, 박영철, 박용기. 알러지성 비염 한약제제 KOB의 랫드에서의 13주 반복 경구투여에 의한 독성 연구. 대한본초학회지. 2013;28(1):15-21.
30. 김창석 등. 보생탕이 랫드의 모체와 태자에 미치는 영향에 대한 연구. 대한예방한의학회지. 2005;9(2):59-75.
31. 김동현 등. 한약이 임신 중 태아에 미치는 영향(3) - 한약 및 한약 처방이 돌연변이원성과 염색체 이상에 미치는 효과. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):1-8.
32. 서춘희 등. 부산 지역 임산부의 모체혈, 제대혈, 모유에서 PFOA, PFOS의 농도. 한국환경보건학회지. 2011;38(1):8-17.
33. 위성욱 등. 대도시에 거주하는 여성의 모유 중 Indicator PCBs와 식이습성 및 인구통계학적 인자간의 관계. 한국환경보건학회지. 2010;36(3):199-207.
34. Rath K, et al. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of Artemisia annua L.(annual wormwood). Am J Trop Med Hyg. 2004;70(2):128-32.
35. 엄영란 등. HPLC를 이용한 발효 감초의 지표 성분 분석. 한국한의학연구원논문집. 2009;15(1):85-9.
36. Kmetec V, Roskar R. HPLC determination of tramadol in human breast milk. J Pharm Biomed Anal. 2003;32(4-5):1061-6.
37. 황덕상 등. 목향생화탕(木香生化湯) 산후음료의 안전성과 산후조리에 관한 유효성 임상연구. 대한한방부인과학회지. 2006;19(4):216-24.
38. 손추영 등. 신약 개발을 위한 참당귀(Angelicae gigas Nakai) 추출 Decursin과 Decursinol Angelate의 약리 작용. 약학회지. 2009;53(6):303-13.
39. Kim KM, et al. Oral acute and subacute toxicity studies of decursin and decursinol angelate of *Angelica gigas* Nakai. Mol Cell Toxicol. 2009;5(2):153-9.