

SD-rat에 KIOM-MA128을 경구 투여 한 후 혈장 중 Matrine의 약물 동태

이재연 · 백현문 · 송병정 · 채정우 · 정성미 · Sudeep Pradhan · 윤휘열 · 권광일[#]

충남대학교 약학대학

(Received February 24, 2015; Revised May 22, 2015; Accepted May 28, 2015)

Pharmacokinetic Study of Matrine in SD-rat after Oral Administration of KIOM-MA128

Jae-yeon Lee, Hyun-moon Back, Byungjeong Song, Jung-woo Chae, Seong Mee Jung,
Sudeep Pradhan, Hwi-yeol Yun and Kwang-il Kwon[#]

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract — KIOM-MA128 is a novel Korean herbal medicine with anti-atopic, anti-inflammatory and anti-asthmatic effects. This article presents the first pharmacokinetic study on KIOM-MA128. The purpose of this study was to characterize a pharmacokinetic characteristic of matrine, a potential marker of KIOM-MA128, in rats using population pharmacokinetic model. 1, 2 and 8 g/kg of KIOM-MA128 were administered to rats orally and plasma concentrations of matrine was determined by HPLC-MS/MS. Non-compartmental analysis (NCA) was performed using Phoenix[®] and pharmacokinetic model was built using NONMEM[®]. This model was validated with internal validation which is visual predictive check (VPC) and bootstrap. The NCA result of matrine showed that C_{max} was 294.24, 552.22 and 868.65 ng/ml, AUC_{inf} was 1273.05, 2724.76 and 9743.25 ng · hr/ml and T_{max} was 1, 1.3 and 2.3 hr for the doses of 1, 2, and 8 g/kg, respectively. The rat plasma concentrations were described very well with one-compartment model. Pharmacokinetic model for matrine was successfully developed and evaluated. Finally, our model is helpful to understand pharmacokinetic characteristic of KIOM-MA128.

Keywords □ KIOM-MA128, pharmacokinetics, NONMEM, matrine

아토피는 만성 습진성 피부질환으로 소아 및 성인에 모두 발병한다.¹⁾ 아토피의 질병적인 특성상 장기적인 치료가 필요하다. 아토피의 전 세계적인 유병률은 1~20%로 알려져 있고, 우리나라의 유병률은 19세 이상 성인에서 약 3%, 19세 미만 소아 및 청소년에서 약 11.3%로 알려져 있다.^{2,3)} 또한, 우리나라의 아토피 유병률은 증가하고 있으며 영양 및 환경적 영향을 받는 것으로 알려져 있다.^{4,5)}

한국한의학연구원(Korea institute of oriental medicine, KIOM)에서는 항아토피효과를 갖는 KIOM-MA128 처방을 개발하였다. 본 처방은 감초, 고삼, 당귀, 호장근, 음양곽, 금은화, 우방자 등으로 구성되어 있으며 실험동물에서 아토피에 효과를 보

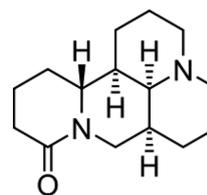


Fig. 1 – Chemical structure of matrine.

인 것으로 나타났다.⁶⁾

Matrine은 고삼에서 추출된 물질이며 substance P에 의해 유도된 IL-1 β , IL-8, MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)을 억제하는 작용을 통하여 아토피에 효능이 있을 것으로 추측한다 (Fig. 1).^{7,8)}

KIOM-MA128 한방제제는 *in vitro* 및 동물시험에서 효능을 보였으나 아직까지 약물동태 정보가 없는 실정이다. 이에 본 연구자는 KIOM-MA128의 약동학적 특성을 파악하기 위해 KIOM-MA128의 구성생약 중 지표성분인 matrine의 약물동태 연구를 진행하였다.

[#]Corresponding Author

Kwang-il Kwon

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Tel.: 042-821-5937 Fax.: 042-823-6566

E-mail: kwon@cnu.ac.kr

실험방법

기기 및 시약

Matrine(purity, 99%)은 Sigma에서 구입하였고, 내부 표준물질인 acetaminophen(purity, 99%)은 Sigma(USA)에서 구입하였다. SD-rat에서 matrine의 혈중농도 분석을 위해 사용한 LC는 Agilent 1100 HPLC(Agilent Technologies, USA), MS/MS는 API 2000(Applied Biosystems, USA)이다. KIOM-MA128은 한 의학연구원으로부터 제공받았다.^{6,9)}

지표성분 선정

한방제제인 KIOM-MA128의 약물동태 연구는 구성생약들이 다양하기 때문에 혈중 농도를 측정하는데 한계가 있다. 이러한 한계점을 해결하고자 Guidance for Industry Botanical Drug Products(FDA, 2004)에서는 지표성분을 선정하여 혈중 농도를 측정하는 것을 권장하고 있다.¹⁰⁾ FDA 가이드라인에 따라 본 연구팀은 KIOM-MA128의 지표성분을 선정하였다.

문헌검색을 통해 아토피에 효과가 있을 것으로 예상되는 물질을 후보로 선정하였으며 후보로는 decursin, decursinol, matrine, oxymatrine이다. LC-MS/MS를 이용하여 후보물질에 대한 함량 분석을 수행하였다. KIOM-MA128 1g에서 후보 지표성분의 함량은 각각 decursin은 80.21 µg, oxymatrine은 76.31 µg, matrine은 547.62 µg가 함유되어 있었으며 decursinol은 검출되지 않았다(Table I). 따라서 본 연구팀은 KIOM-MA128의 지표성분으로 함량이 제일 많은 matrine 성분을 선정하였다.

혈중 농도 분석을 위한 LC-MS/MS 분석법

SD-rat에서의 matrine의 LC-MS/MS 분석법은 Back *et al.*을 참고하였다.¹¹⁾ 칼럼은 Gemini(C18, 50×4.60 mm, 5 µm; Phenomenex, USA)를 이용하였다. 이동상은 D.W.(Distilled water)와 methanol을 20 : 80 비율로 혼합하여 0.15 ml/min의 유속으로 이동시켰다. 칼럼과 auto-sampler의 온도는 각각 25°C, 4°C로 설정하였다. 또한 matrine의 정량을 위해서 positive ion mode[M+H]⁺을 이용하였으며, 5500 V와 350°C의 온도에서 시행하였다.

실험동물 및 실험디자인

7 주령의 수컷 SD-rat 18마리를 bridge사로부터 입수하여 케

이지 당 3마리 이하로 분배한 후 7일간의 순화과정을 거친 후 사용하였다. 순화기간 동안 먹이와 물을 자유롭게 취할 수 있도록 공급하였으며 12시간 간격의 명암, 온도 23±3°C, 습도 50±10%를 유지하였다.

KIOM-MA128 투여 후 혈중 matrine 농도의 변화를 보기 위한 투여 용량은 KIOM-MA128 1, 2, 8 g/kg로 하였으며, 용량 군 당 6마리 씩 경구 투여하였다. 실험 시작 12시간 전 식이를 제한하여 공복상태를 유지하였다. KIOM-MA128을 경구 투여한 뒤 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24시간에서 채혈하였으며, 각 채혈시간에 안와정맥을 통하여 적정량(약 400 µl)을 채혈하였다.

Matrine의 약물동태 분석 및 구획 모델 도입

KIOM-MA128를 투여한 후 얻은 matrine의 혈중 농도 데이터를 통해 약동학적 양상을 파악하였다. Phoenix[®]을 이용하여 non-compartmental analysis(NCA)를 수행하였으며, 추출된 주요 약동학적 매개변수는 체내 최고 혈중 농도(C_{max}), 혈중 약물농도-시간 곡선하 면적(AUC_{0-∞}), 분포용적(V_d/F), 청소율(Cl/F), 반감기(t_{1/2}), 최고 혈중 농도까지 걸리는 시간(T_{max})이다.

NCA를 통해 얻어진 매개변수를 초기값으로 설정하여 NONMEM[®](ver 7.3, ICON, USA) 프로그램으로 non-linear mixed effect model을 이용하여 분석하였다. 또한 추정방법인 first-order conditional estimation with interaction(FOCE+I)를 이용하여 약동학적 매개변수를 산출하였다.

SD-rat에 혈중 matrine 농도를 가장 잘 설명한 모델은 1 구획 모델이며 일차 흡수 속도와 일차 소실 속도를 따른다.

모델의 매개변수는 k_a(일차 흡수 속도 상수), k_{el}(일차 소실 속도 상수), Cl/F(청소율), V_d/F(분포용적)이 있다. 모델에서의 개체 간 차이(Inter-individual variability, IIV)를 설명하기 위해 exponential model을 적용하였다.

$$Cl_i = \theta(Cl) \cdot e^{\eta_i(Cl)}$$

$$V_{d,i} = \theta(V_d) \cdot e^{\eta_i(V_d)}$$

θ 는 집단의 평균을 나타낸다. 그리고 개체 간 차이를 의미하는 η_i 는 평균 0, 분산 ω^2 의 분포를 가진다. 모델에서의 residual variability를 설명하기 위해 proportional model을 적용하였다.

$$C_{ij} = C_{pred} \times (1 + \epsilon_{ij})$$

C_{ij} 는 i번째 환자의 j번째 혈액의 농도, C_{pred} 는 모델로부터 예측된 농도를 나타낸다.

본 모델의 미분 방정식은 다음과 같다.

$$\frac{dA(1)}{dt} = -k_a \times A \quad (1)$$

$$\frac{dA(2)}{dt} = k_a \times A(1) - k_{el} \times A(2) \quad (2)$$

Table I – Content of candidate constituent in KIOM-MA128

지표성분	함량 (µg/g)
Decursin	80.21
Decursinol	Not detected
Oxymatrine	76.31
Matrine	547.62

위와 같은 방법으로 약동학적 매개변수, IIV, residual variability를 추정하였다.

모델은 시각적인 평가 방법인 goodness-of-fit plot(GOF)와 통계적인 방법인 object function value(OFV)를 비교함으로써 평가하였다. 또한 visual predicted check(VPC)와 bootstrap을 통하여 internal validation을 수행하여 모델을 평가하였다. VPC는 관측값의 중위수와 5%, 95%의 백분위수와 모델로부터 얻어진 예측값에 대한 각각의 95% 신뢰구간을 산출하여 신뢰구간 영역 내에 관측값이 분포하는 양상을 시각화하여 평가하는 방법이다. Bootstrap은 기존 데이터로부터 re-sampling 방법으로 1000개의 데이터를 만들어 얻은 매개변수의 요약 통계량을 얻는 방법이다. Bootstrap 시행 중 minimization이 실패한 결과는 제외하였다.^{12,13)} Internal validation 방법인 VPC와 bootstrap을 이용하여 모델을 평가하였다.

결과 및 고찰

한방제제의 약물동태

여러 생약이 함유되어 있는 한방제제의 경우 약물동태 연구를 수행하는데 많은 어려움이 있다. FDA 가이드라인에서는 분석할 한방제제의 유효성분을 아는 경우, 유효성분을 분석하여 약물동태 연구를 수행하는 것을 제안하고 있다. 그러나 유효성분이 알려지지 않은 경우에는 약효가 있을 것으로 예상되는 물질 중 함량이 가장 높은 성분을 지표성분으로 선정하여 약물동태 연구를 수행한다. 유효성분이 알려지지 않은 KIOM-MA128은 함량분석을 통해 지표성분을 선정하였다. 함량이 제일 높은 matrine을 지표성분으로 선정하였으며 KIOM-MA128에 대한 약물동태 연구를 수행하였다. 본 연구는 유효성분이 알려지지 않은 한방제제를 대상으로 약물동태 연구를 수행했다는 점에서 의미를 갖는다고 생각한다.

Matrine의 약동학적 분석

SD-rat에 KIOM-MA128를 1, 2, 8 g/kg의 용량으로 경구 투여

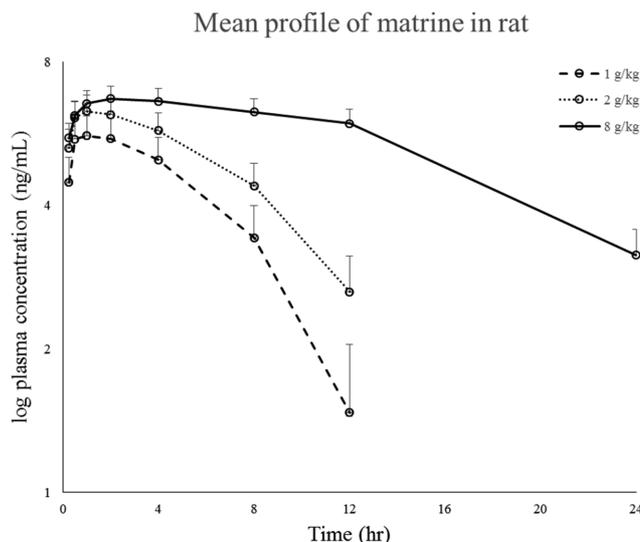


Fig. 2 – Time versus log mean plasma concentration of KIOM-MA128 (1, 2 and 8 g/kg). Dashed line, 1 g/kg; dotted line, 2 g/kg; solid line, 8 g/kg.

한 후 시간에 따른 혈중 matrine의 농도 변화를 Fig. 2에 나타내었다. NCA를 통해 산출된 약동학적 매개변수는 Table II와 같다. 각 용량에 따른 C_{max} 값은 292.24, 552.22, 868.65 ng/ml이며 비선형으로 증가하는 것을 볼 수 있다. 뿐만 아니라 T_{max} 값도 1, 1.3, 2.3 hr으로 용량에 따라 함께 증가하고 있는데, 이는 KIOM-MA128를 고용량 투여함으로써 흡수 과정에서 포화로 인해 지속적으로 흡수가 일어난다고 예측할 수 있다.¹⁴⁾ 따라서 용량이 증가함에 따라 C_{max} 가 비선형 관계를 갖는다고 예측한다.

8 g/kg에서 반감기($t_{1/2}$)가 증가하는 양상을 볼 수 있다. 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 통해 반감기가 8 g/kg에서 유의하게 증가하며(p -value=0.005) 고용량에서 포화 때문에 흡수가 지속되어 반감기가 증가하는 것이라 예측할 수 있다.

KIOM-MA128의 matrine에 대한 약물동태가 기존에 보고된 matrine의 약물동태와 상이한 결과를 보인다(Table III).^{15,16)} 이는 matrine을 복합추출물 형태로 투여했기 때문이라고 예측할

Table II – The result of non-compartment analysis after administrating KIOM-MA128

Parameter	Mean±SD (n=6)		
	1 g/kg	2 g/kg	8 g/kg
C_{max} (ng/ml)	294.24±100.46	552.22±119.47	868.65±116.26
AUC_{inf} (ng·hr/ml)	1273.05±168.88	2724.76±367.43	9743.25±886.22
V_d/F (ml/kg)	893.94	875.66	2,066.80
Cl/F (ml/hr/kg)	398.51	372.91	413.33
$t_{1/2}$ (hr)	1.56±0.37	1.61±0.57	3.43±1.50*
T_{max} (hr)	1	1.3	2.3

C_{max} , maximum plasma concentration; AUC_{inf} , area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity; V_d/F , volume of distribution; Cl/F, Clearance; $t_{1/2}$, terminal half-life; T_{max} , time of maximum plasma concentration, * p <0.01, significant differences were determined by one-way ANOVA (α =0.05) and Tukey's HSD test.

Table III – The comparison of matrine pharmacokinetics in different types

Parameter	KIOM-MA128	Sophora flavescens ¹⁵⁾	Matrine ¹⁴⁾
Dose	1 (g/kg)	0.002 (g/kg)	0.56 (g/kg)
C _{max}	294.24 (ng/ml)	94.6 (ng/ml)	2,529 (ng/ml)
AUC _{inf}	1,273.05 (ng · hr/ml)	18,593 (ng · min/ml)	22,688 (μg · hr/l)

KIOM-MA128, determination of matrine in rat plasma after oral administration KIOM-MA128; Sophora flavescens, determination of matrine in rat plasma after oral administration of Sophora flavescens Ait. extract; Matrine, determination of matrine in rat plasma after oral administration of matrine.

수 있다.¹⁷⁾ KIOM-MA128의 구성생약에 함유된 matrine이 여러 생약과의 상호작용으로 matrine의 약동학적 특성이 다르게 나타난 것이라 생각할 수 있다.

Matrine의 약동학적 모델

시간에 따른 matrine의 혈중 농도 데이터를 가장 잘 설명하는 모델은 1 구획 모델이다. 최종 모델에서 산출된 약동학적 매개변수는 Table IV와 같다. 본 모델을 통하여 산출한 흡수 속도 상수(k_a)는 0.85 hr^{-1} 이며, 분포용적(V_d/F)은 0.18 l , 청소율(Cl/F)은 0.11 l/hr 이다.

모델에서 산출된 매개변수와 NCA를 통해 산출한 값이 비슷하였다. SD-rat의 무게가 250 g 이라고 할 때, NCA(1 g/kg)를 통해 산출한 분포용적은 약 0.22 l 이고 모델을 통해서 산출한 분포

용적은 약 0.18 l 이었다. 또한 청소율도 각각 약 $0.1, 0.11 \text{ l/hr}$ 임을 확인할 수 있었다(Table II, IV).

모델을 평가하기 위해 GOF를 확인하였다(Fig. 3). 관측 값과 individual prediction 값이 선형을 나타내었으며, conditional weighted residual 값이 $-4 \sim 4$ 사이에 들어오며 비 편향적인 양상을 보였으므로 모델의 견고함을 입증하였다.

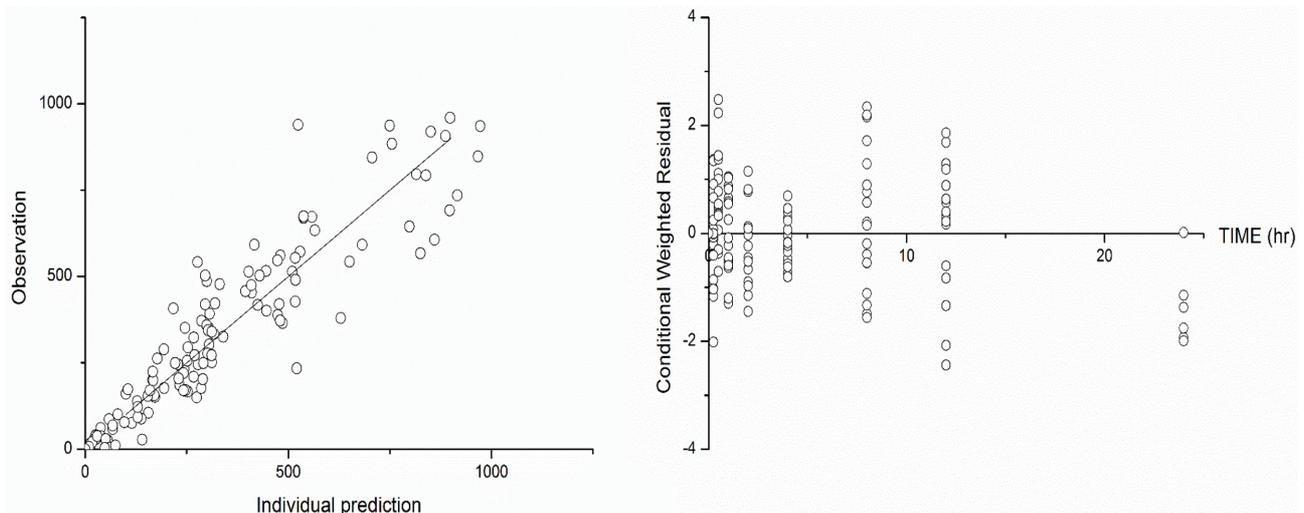
VPC를 이용하여 관측값으로부터 중위수와 5%, 95% 백분위수 그리고 예측값으로부터 각각의 95% 신뢰구간을 산출하였다(Fig. 4). 각 범위 안에 관측값이 잘 들어오는 것을 확인할 수 있으며 모델과 산출된 매개변수가 타당하다고 판단 할 수 있다.

Bootstrap으로도 모델을 진단하였다. 1000번 re-sampling으로 얻어진 결과는 Table IV와 같다. Bootstrap을 통해 얻은 Cl/F 값은 0.11 l/hr , V_d/F 는 0.18 l , k_a 는 0.85 hr^{-1} 이며, 모델에서의 값과

Table IV – Pharmacokinetic parameters from one-compartment and results of bootstrap

PK parameters	One-compartment		Bootstrap analyses	
	Parameter (RSE)	IIV(RSE)	Parameter (2.5%-97.5% percentile)	IIV (2.5%-97.5% percentile)
$k_a \text{ (hr}^{-1}\text{)}$	0.85 (24.6%)	-	0.87 (0.43~1.15)	-
$V_d/F \text{ (l)}$	0.18 (21.2%)	21.5% (27.1%)	0.18 (0.09~0.24)	4.1% (0.57%~9.10%)
$Cl/F \text{ (l/hr)}$	0.11 (3.4%)	7.9% (49.3%)	0.11 (0.11~0.12)	0.83% (0.17%~2.34%)
Proportional error	35.8% (6.7%)		35.4% (30.3%~40.1%)	

k_a , absorption rate constant; V_d/F , volume of distribution; Cl/F , Clearance; IIV, inter-individual variability; RSE, relative standard error.

**Fig. 3** – Goodness of fit plot of matrine in KIOM-MA128.

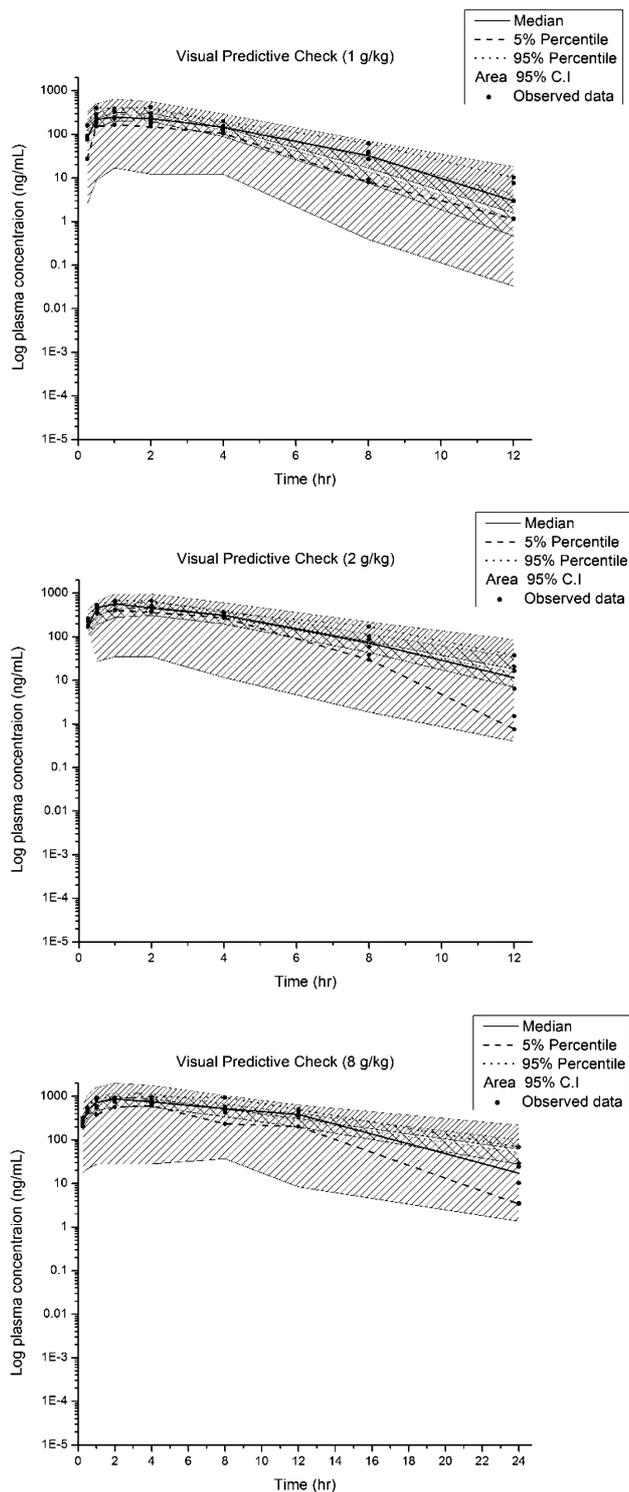


Fig. 4 – Visual predictive check of matrine in KIOM-MA128. The solid line represents the median observed plasma concentration and the diagonal area represents a simulation-based 95% confidence interval for the median. The observed 5% and 95% are presented with dashed line and their simulation-based 95% confidence intervals are shown as diagonal areas. The observed plasma concentrations are represented by black circles.

유사한 결과임을 확인할 수 있었다.

결론

KIOM-MA128은 발효기술을 이용한 한방 처방으로 항아토피 효과를 갖는다. 본 처방은 감초, 고삼, 당귀, 호장근, 음양곽 등으로 구성되어 있으며 실험동물에서 아토피에 효과를 보인 것으로 나타났지만, 현재까지 한방제제인 KIOM-MA128를 설명하는 약물동태 연구가 수행되지 않았다. 한방제제의 특성 때문에 함량분석을 통해 지표성분을 선정하고, 선정된 지표성분에 대한 약물동태 연구를 수행하였다. 본 연구는 SD-rat을 이용하여 KIOM-MA128의 약동학적 특성을 수학적 모델을 이용하여 설명하였다.

모델은 1 구획 모델로 SD-rat의 혈중 농도 양상을 설명하였다. 본 모델에 대하여 GOF으로 평가하였으며, 뿐만 아니라 VPC와 bootstrap으로도 평가를 진행하였다. VPC의 경우 예측된 값들이 관측값을 잘 설명하였고, bootstrap의 경우 매개변수들이 모델에서 산출한 매개변수 값과 비슷하였으므로 적절한 모델로 matrine의 혈중 농도를 잘 설명하고 있다고 판단 할 수 있다.

결론적으로 KIOM-MA128을 SD-rat에 투여 한 후, FDA 가이드라인에 따라 지표성분으로 설정한 matrine의 혈중 농도 양상을 구획 모델을 이용하여 약동학적 특성을 파악하였다. 흡수 속도 상수(k_a) 값은 0.85 hr^{-1} 이며, 분포용적(V_d/F)은 0.18 l , 청소율(Cl/F)은 0.11 l/hr 를 각각 산출하였다. 본 연구는 향후 KIOM-MA128의 약동학적 특성을 설명하는데 기초적인 자료로 사용될 수 있으며 한방제제의 약물동태 연구에 활용될 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원(K14050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- 1) 조민서, 한재경, 김윤희 : 한방병원 소아과를 내원한 소아 아토피 피부염 환자 실태에 관한 조사. 대한한방소아과학회지 **25**, 8 (2011).
- 2) DaVeiga, S. P. : Epidemiology of atopic dermatitis: A review. *Allergy Asthma Proc.* **33**, 227 (2012).
- 3) 2011 국민건강통계 국민건강영양조사 제 5기 2차년도. 보건복지부 질병관리본부 (2011).
- 4) 오재원, 김규언, 편복양, 이혜란, 정지태, 홍수중, 박강서, 이수영, 송상욱, 김철봉, 안강모, 남승연, 손명현, 김우경, 이미희, 차병철, 최성연, 이소연, 이하백, 이상일, 이준성 : 1995년과 2000년의 학동기와 2003년 학동전기 소아에서의 아토피피부염의 역학적 변화에 관한 전국적인 연구. 소아알레르기 및 호흡기 학회지

- 13, 227 (2003).
- 5) Oak, J. W. and Lee, H. S. : Prevalence rate and factors associated with atopic dermatitis among Korean middle school students. *J Korean Acad Nurs.* **42**, 992 (2012).
 - 6) Chung, T. H., Kang, T. J., Cho, W. K., Im, G. Y., Lee, G. S., Yang, M. C., Cho, C. W. and Ma, J. Y. : Effectiveness of the novel herbal medicine, KIOM-MA, and its bioconversion product, KIOM-MA128, on the treatment of atopic dermatitis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012 (2012).
 - 7) Liu, J. Y., Hu, J. H., Zhu, Q. G., Li, F. Q., Wang, J. and Sun, H. J. : Effect of matrine on the expression of substance P receptor and inflammatory cytokines production in human skin keratinocytes and fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* **7**, 816 (2007).
 - 8) Ständer, S. and Luger, T. A. : Itch in atopic dermatitis - pathophysiology and treatment. *Acta Dermatovenerol Croat.* **18**, 289 (2010).
 - 9) Kim, D.-S., Kim, S.-H., Kim, B.-K., Yang, M. C. and Ma, J. Y. : Antiasthmatic effects of herbal complex MA and its fermented product MA128. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012 (2012).
 - 10) Guidance for Industry Botanical Drug Products. Food and Drug Administration (2004).
 - 11) Back, H.-m., Song, B., Chae, J.-w., Yun, H.-y., Ma, J. Y. and Kwon, K.-i. : Determination of matrine in rat plasma after oral administration of novel Korean herbal medicine KIOM-MA128 and application of PK. *J Anal Methods Chem.* 2015 (2015).
 - 12) Parke, J., Holford, N. H. and Charles, B.G. : A procedure for generating bootstrap samples for the validation of nonlinear mixed effects population models. *Comput Methods Programs Biomed.* **59**, 19 (1999).
 - 13) Iwi, G., Millard, R. K., Palmer, A. M., Preece, A. W. and Saunders, M. : Bootstrap resampling: a powerful method of assessing confidence intervals for doses from experiment data. *Phys. Med. Biol.* **44**, 55 (1999).
 - 14) Lawrence, X. Y. and Gordon, L. A. : Saturable small intestinal drug absorption in humans: modeling and interpretation of cefatrizine data. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 199 (1998).
 - 15) Yang, Z., Gao, S., Yin, T., Kulkarni, K. H., Teng, Y., You, M. and Hu, M. : Biopharmaceutical and pharmacokinetic characterization of matrine as determined by a sensitive and robust UPLC-MS/MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 1120 (2010).
 - 16) Zhang, L., Liu, W., Zhang, R., Wang, Z., Shen, Z., Chen, X. and Bi, K. : Pharmacokinetic study of matrine, oxymatrine and oxysophocarpine in rat plasma after oral administration of *Sophora flavescens* Ait. extract by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 892 (2008).
 - 17) Sun, Y. G., Du, Y. F., Yang, K., Chang, L., Cao, L., Ren, Y. P., Sun, Q., Wang, Q., Zhang, L. T. and Lv, P. T. : A comparative study on the pharmacokinetics of a traditional Chinese herbal preparation with the single herb extracts in rats by LC-MS/MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **81-82**, 34 (2013).
 - 18) 한약(생약)제제 비임상시험 가이드라인(Guideline on the Nonclinical Studies of Herbal Drug Products). 식품의약품안전처 (2014).
 - 19) Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M. and van de Vorstenbosh, C. : A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* **21**, 15 (2001).