

산양산삼복합약침의 표준화 및 급성독성시험

백상현¹, 이인희², 김민정², 김은지², 하인혁², 이진호², 이재웅²
¹강남자생한방병원 한방내과, ²자생한방병원 R&D센터

Component Analysis and Toxicity Study of Combined Cultivated Wild Ginseng Pharmacopuncture

Sang-hyun Baek¹, In-hee Lee², Min-jeong Kim², Eun-je Kim², In-hyuk Ha², Jin-ho Lee², Jae-woong Lee²

¹Dept of Internal Medicine, Jaseng Hospital of Korean Medicine

²Jaseng Spine and joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation, Jaseng Hospital of Korean Medicine

ABSTRACT

Objectives: The marker substances of cultivated wild ginseng pharmacopuncture that may not be detected during the process of steaming remain controversial. We developed a combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture that contains all the marker substances. The aim of this experiment was to investigate the marker substances and test the toxicity of the combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

Methods: The marker substances were detected using HPLC. Intravenous injection toxicity studies were conducted at Medvill, an authorized institution for non-clinical studies, under the regulations of Good Laboratory Practice. We observed survival rates, abnormal behaviors, weight changes, gross findings in autopsy, blood biochemical properties, and histological abnormalities of organs such as the liver and kidney.

Results: HPLC data showed that ginsenosides Rg1, Rb1, and Rg3 were detected at concentrations of 19.29, 47.64, and 3.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Administration of combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture resulted in no dead animals or significant toxicological changes.

Conclusions: The combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture contains all the marker substances and is a relatively safe treatment medium. Further studies should be conducted to confirm the present findings.

Key words: combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture, component analysis, toxicity study

1. 서론

산삼은 오가피과(두릅나무과; Araliaceae)에 속한 다년생 초목인 인삼(*panax ginseng* C. A. Mey.)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 蔘을 일컫

으며¹, 산양산삼은 산삼의 씨앗이나 유삼을 인위적으로 산에서 재배한 蔘을 말한다.

예로부터 산삼은 대표적인 補氣劑로, 靈藥으로 여겨졌으며 그 모양새가 사람을 닮았다고 하여 인삼으로 표현되어 왔다². 性은 微寒, 微溫, 溫 등이고 味는 甘, 苦 등으로 표현되고 있으며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年 등의 효능이 있다³. 蔘에 대한 최초의 문헌은 대략 BC 50년경이고⁴ AD 200년에 저술된 傷寒論에서 최초로 처방에 사용되었으며⁵, 이후

· 투고일: 2015.06.05, 심사일: 2015.06.22, 게재확정일: 2015.06.25

· 교신저자: 이재웅 서울시 강남구 신사동 635번지
자생한방병원 2층 R&D센터

TEL: +82-2-3218-2153 FAX: 02-3445-6644

E-mail: leejw@jaseng.co.kr

여러 처방들에 널리 사용되고 있다. 하지만 자연에서 자생한 산삼의 효능은 인삼보다 우수하다고 추정되지만⁶ 희귀성과 고가로 인해 약재로 사용하기 어려운 실정인지라, 그 대체 약재로서 산삼의 씨앗을 산속에 뿌려 키운 산양산삼이 주목을 받고 있다.

기존 연구 또한 인삼보다는 인삼에 대해 많이 진행 되어왔다. 인삼의 효능은 신경의 기능을 조절하고⁷, 혈액과 신진대사기능을 조절하며⁸, 강심, 항이노 및 성기능 증강효과가 있고⁹, stress에 대한 저항력을 높이며¹⁰, 염증의 억제¹¹, 항산화¹², 면역항체생산을 촉진¹³ 및 항암 효과¹⁴ 등 많은 연구가 보고되고 있다.

이러한 인삼의 효능을 나타내는 약리활성 물질로 가장 주목을 받고 있는 성분이 바로 사포닌이다¹⁵. 사포닌은 배당체의 하나로 그 수용액을 저으면 비누처럼 지속성 거품이 생긴다는 데에서 유래하였다. 인삼의 사포닌인 ginsenoside는 다른 식물계에는 거의 존재하지 않는 dammarane 계열의 triterpenoid인 protopanaxadiol('PPD)과 protopanaxatriol('PPT)의 배당체이며, ginsenoside Ro 만이 일반 식물에 널리 존재하는 사포닌인 oleanolic acid 계열이다.

현재까지 ginsenoside에 대해서는 많은 연구 보고가 이루어지고 있다. 그 중 ginsenoside Rb1은 위염 및 위궤양에 유효하고 항산화 작용이 있으며¹⁶, ginsenoside Rb2는 암독소 호르몬에 대한 길항 작용 및 중앙혈관 신생 억제작용이 있고¹⁷, ginsenoside Rc는 장내 세균에 의한 대사산물을 이용한 항암제 개발 가능성이 보고¹⁸된 바 있다. Ginsenoside Rd는 신 기능부전의 치료효과¹⁹와 신경계의 보호 작용²⁰이 보고된 바 있다. 이 외에도 산삼에서 소량으로 존재하는 것으로 알려진 비극성 사포닌인 ginsenoside Rg3와 ginsenoside Rh2의 항암작용 및 항전이작용²¹⁻²³ 등이 보고되어 있다. 그러나 단일 사포닌의 효능보다는 여러 가지 사포닌이 복합되었을 때에 더욱 생리활성이 우수하다는 주장^{24,25}도 신중히 고려해 봐야 할 것으로 생각된다.

또한 사포닌 이외에도 인삼에는 항암효과가 있다고 알려진 polysaccharide와 phenol계 화합물, 정

유성분인 sesquiterpene계 화합물, 그리고 alkaloid 성분 등이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다²⁶.

산양산삼약침이란 약침요법의 일종으로 산양산삼을 증류식으로 추출하여 침구, 경락이론과 본초이론에 의거하여 경혈이나 압통점²⁷에 주입하거나 혈맥주입²⁸하는 방법으로 침과 약물의 효과를 동시에 기대할 수 있는 치료법이다.

그러나 산양산삼약침을 만드는 과정에서 한의학적으로는 의미 있는 방법으로 만들어져도 성분인 된 약재의 효능에 대한 지표성분이 간혹 검출되지 않아서 유효성 여부에 대한 논란이 학계에서 있었다. 그렇기에 본 연구에서는 산양산삼약침 제조를 증류추출 및 알코올수침법을 이용하여 산양산삼복합약침을 만들었고 산양산삼복합약침의 표준화를 위하여 지표성분에 대한 정량분석을 하였다. 또한 시술 시 안전성을 확보하고자 투여경로를 정맥으로 한 정맥투여 급성독성시험을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 기기 및 시약

산양산삼복합약침의 조제를 위하여 사용한 산양산삼은 천방농산(충청남도, 한국)에서 재배된 10년 근 산양산삼을 구입하였다. 시료의 추출과 알코올수침에 사용한 주정은 (주)대정화학(시흥, 한국)에서 생산한 1급 시약을 사용하였다(Lot 번호 : 140613). 표준품으로 사용된 ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rg3는 Sigma Aldrich(USA)에서 구입하였고, 각각 99, 98, 98%의 순도를 사용하였다. 정량분석에 사용된 water, acetonitrile(ACN), methanol은 HPLC grade(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), phosphoric acid는 JUNSEI chemical (JAPAN)을 사용하였다.

본 실험에 사용된 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)는 Waters(USA)의 Waters 600s controller, WatersTM 626 pump, Waters temperature control module, Waters In-Line degasser,

Waters™ 717plus autosampler, Waters™ 996 photodiode array detector를 사용하였다.

혈액생화학분석기는 Hitachi 7020(HITACHI, Japan)와 전해질분석기는 PDC-800(FUJIFILM, Japan)을 사용 하였다.

2. 산양산삼 복합약침의 조제방법

건조 된 산양산삼을 증류수와 배합하여 증류 추출기를 이용하여 증류액을 얻었다. 증류 후 남은 잔사를 70% 주정을 이용하여 3시간동안 환류 추출하였다. 추출액을 여과 후 여액을 감압농축하였다. 농축된 추출물을 80%, 90% 주정을 이용하여 알코올수침하여 정제 하였으며 정제된 추출물은 여과 후 동결 건조 하여 약침의 원료로 사용하였다. 정제된 약침원료를 증류액에 녹이고 NaCl을 이용하여 염도를 0.9%로 보정하였으며 Na₂HPO₄를 이용하여 pH를 7.0으로 보정하여 약침을 조제하였다. 조제된 약침은 여과 후 121 °C에서 15분 간 멸균하여 사용하였다.

3. Ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rg3의 HPLC 분석법

표준물질 ginsenoside Rg1(0.1 mg/mL), ginsenoside Rb1 (0.5 mg/mL)과 ginsenoside Rg3(1 mg/mL)는 HPLC grade water를 이용하여 조제하여 4 °C에서 보관하여 사용하였다.

각 물질에 대한 분석은 대한약전의 분석법 등을 기초로 하여 분석조건을 설정하였다.

Column은 TC-C18(5 um, 4.6 I.D.×250 mm, Aglient), Column temperature는 35 °C, Injection Volume은 20 uL, Flow rate는 1.0 mL/min을 유지하였다. UV 흡광도 파장은 203 nm를 이용하여 측정하였다. 이동상으로는 water와 acetonitrile을 초음파를 이용하여 degassing하여 사용하였고, gradient system을 이용하여 분석하였다(Table 1).

분석 후 함량 계산은 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다.

Calculation; (Sample Area/Standard Area) (Standard injection vol./Sample injection vol.) Standard conc.Standard purity=Sample conc. mg/mL

Table 1. Composition of the Mobile Phase Employed in the Gradient HPLC System

Time (min)	Composition of mobile phase(%)	
	Water	Acetonitrile
0	80	20
10	80	20
40	68	32
55	50	50
70	35	65
72	10	90
82	10	90
84	80	20
100	80	20

4. 시험계

본 연구에 사용된 시험계는 Sprague-Dawley (SD) 계통의 특정병원균 부재(SPF)의 8주령 된 암 (176.8~206.7 g), 수 (244.4~259.1 g) 랫드로서 (주) 오리엔트바이오(경기도, 한국)로부터 분양받아 사용하였다. 본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법²⁹⁾에 근거한 (주)메드빌(서울, 한국)의 동물실험윤리위원회(IACUC)에 의해 승인 하에 진행되었다.(승인 번호 : 14-053)

1주일간의 순화사육 기간 동안에 증상관찰 등을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 순화기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 관찰기간 중에는 군 분리 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였다.

군 분리는 순화종료일에 일반증상 및 체중에 이상이 없는 동물 중 암·수 각각 20마리를 선발하였다. 선발한 동물은 평균체중 및 표준편차를 계산하

여 농도별로 각각 5마리씩 균일하게 분리하였다. 군 분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외시켜 SOP에 따라 처리하였다.

5. 사육환경조건

시험은 (주)메드빌의 동물실 II에서 실시하였다. 사육환경은 온도 18.4~25.5 °C, 상대습도 36.5~56.4%, 조명시간 12 시간(08:00 점등~20:00 소등), 조도 150-300 Lux의 사육환경에서 Polycarbonate cage [420W×270L×180H(mm)]에 순화기간 동안에는 2-3 마리, 관찰기간 동안에는 1 마리로 사육하였다. 시험기간 중 동물실의 온도, 습도는 컴퓨터시스템을 이용한 자동 온 습도 측정기에 의하여 10분마다 측정되었으며 환기회수 및 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었다. 시험기간 중 실험동물실의 환경은 비임상시험관리기준³⁰에 준하여 수행되었다. 사료는 PMI Nutrition International Inc(USA) 사로부터 공급받은 실험동물용 고형사료인 LabDiet 5053를 자유롭게 먹도록 하였으며, 물은 서울특별시의 수도물을 UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 정제수를 Polycarbonate 음수병(250 mL)에 넣어 자유섭취 시켰다. 음수의 분석 및 확인은 먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙³¹의 전 항목에 대하여 보건환경 연구원(경기도 과천시)에 의뢰하여 년 1회 검사를 실시하며, 그 결과가 허용범위 내에 속하는지를 확인하였으며, 허용범위 내의 물을 사용하였다.

6. 투여용량 및 시험군의 구성

투여경로는 임상예정 경로에 따라 정맥투여를 선택하였다. 투여액량은 1 mL/kg으로 하고, 개체별 투여량은 당일 체중측정을 기준으로 산출하여 일회용 주사기(1 mL, 26G)를 이용하여 1회 정맥투여를 실시하였다. 투여 농도는 고농도를 산삼약침 임상 사용 농도의 100배(G4)로 설정하고, 50배(G3) 및 10배(G2)를 중간 및 저농도로 설정하였다. 또한, 부형제에 대한 영향을 알아보기 위하여 대조군

(G1)을 설정하였다.

7. 관찰 및 검사 항목

1) 일반증상

모든 동물에 대하여 투여 당일에는 투여 후 0.5, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반 증상을 관찰하였으며, 그 후 부검일까지 매일 1회 이상 일반증상 관찰하였다. 일반증상의 관찰은 사망여부, 독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기, 및 증상의 정도를 관찰하였다.

2) 체중변화

모든 동물에 대하여 투여 직전(0일), 투여 후 1, 3, 7일 및 14일에 측정하였다.

3) 부검조건

관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대하여 16시간 이상 절식시킨 다음 G1 및 G4군은 isoflurane 가스 마취하에 개복 후 복대동맥으로부터 채혈하고, 복대 정·동맥을 절단하여 방혈 치사 시킨 뒤 부검을 실시하고, G2 및 G3군은 CO₂가스 마취하에 동일한 방법으로 부검을 실시하였다. 부검 시 모든 동물의 전신 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

4) 혈액생화학적 검사 및 조직병리학적 검사

최고농도인 G4에서도 사망이나 이상증상이 관찰되지 않아 혈액생화학적 검사와 조직병리학적 검사는 G4와 대조군인 G1을 이용하여 진행하였다. G1 및 G4 동물에 대하여 개복 후 복대동맥으로부터 채혈하고, 이를 이용하여 혈액생화학적 검사를 실시하였다.

채혈한 혈액 중 약 3 mL을 clot activator가 들어있는 vacutainer tube에 주입하고 15-20분간 상온에 방치하여 응고시킨 후, 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 혈액생화학분석기와 전해질분석기를 이용하여 측정하였다.

조직병리학적 검사는 G1 및 G4군에서 간 및 신장을 적출하여 10% 중성완충포름알린 용액에 고정하고, 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 조직절편 제작,

박절, Hematoxylin & Eosin염색을 실시하여 조직 병리학적 검사를 실시하였다. 잔여 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다.

8. 통계학적 분석

통계학적 분석은 체중 및 혈액생화학적 검사에 대하여 SPSS program(SPSS 16.0)을 사용하여 실시하였다. 정규성과 등분산성을 만족하면 One-way analysis of variance(ANOVA)을 실시하며, 유의성이 인정되면 다중비교방법인 Dunnett test를 통하여 대조군과의 유의성을 양측 5% 수준에서 확인하였다. 정규성이나 등분산성을 만족하지 않으면 Kruskal-Wallis' H-test를 실시하며, 유의성이 인정되면 Bonferroni

방법으로 다중성을 보장한 Mann-Whitney U-test를 통하여 대조군과의 유의성을 유의수준: 양측 5% 수준으로 확인하였다.

III. 결 과

1. 산양산삼복합약침의 활성성분 함량

조제된 산양산삼복합약침을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rg3 함량은 각각 19.29 ug/mL, 47.64 ug/mL, 3.02 ug/mL 함유되어 있음을 확인 하였다 (Table 2, Fig. 1).

Table 2. Content Analysis for Ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg3 in Combined Cultivated Wild Ginseng Pharmacopuncture by HPLC

Compound	Ginsenoside Rg1	Ginsenoside Rb1	Ginsenoside Rg3
Sample (ug/mL)			
Combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture	19.29	47.64	3.02

Calculation; (SPL Area/STD Area) (STD injection vol./SPL injection vol.) STD conc.STD purity=SPL conc. mg/mL

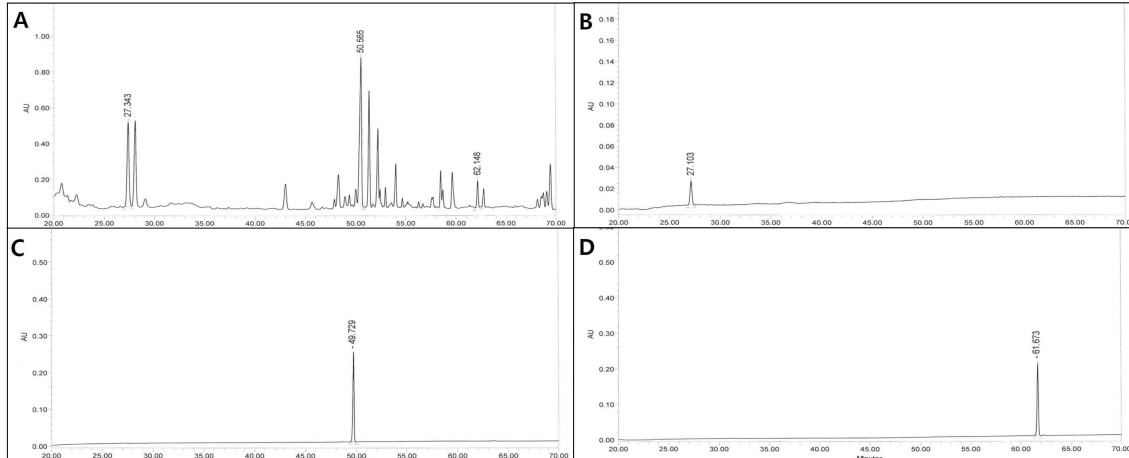


Fig. 1. HPLC chromatogram of combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture and ginsenoside standard.

A : Combined Cultivated Wild Ginseng Pharmacopuncture, B : ginsenoside Rg1, C : ginsenoside Rb1, D : ginsenoside Rg3.

2. 사망례 및 임상증상

전 시험기간 동안 대조군을 포함한 산양산삼복합약침 투여 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 3). 따라서 본 시험에서 랫드의 개략치 사량은 임상사용농도의 100배 이상으로 사료된다. 또한 전 시험기간 동안 모든 시험군에서 이상증상은 관찰되지 않았다.

3. 체중 및 체중증가량의 변화

산양산삼복합약침 투여에 의한 체중 변화를 14 일 동안 관찰하였다. 체중 증가에 있어서 수컷 대조군과 시험군은 각각 371.2±9.0 g, 367.5±16.4 g, 368.1±20.8 g과 377.9±16.1 g으로 군간 유의한 차이가 없었다(p>0.05, Fig. 2). 또한 암컷 대조군과 시험군은 각각 228.5±9.6 g, 232.6±8.8 g, 231.4±12.6 g 과 232.6±14.5 g으로 증가된 체중에 있어서 군간 유의한 차이가 나타나지 않았다(p>0.05, Fig. 3).

4. 부검소견 및 조직병리학적 검사

수컷 및 암컷 대조군과 시험군 모두의 부검에서 육안적으로 이상이 있는 개체는 관찰되지 않았다 (Table 3).

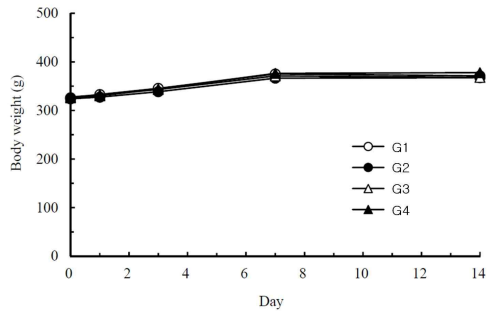


Fig. 2. Body weight changes of male SD rats (p>0.05).

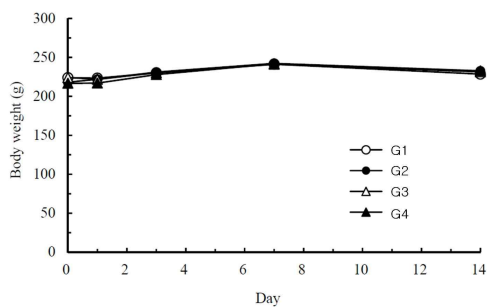


Fig. 3. Body weight changes of female SD rats (p>0.05).

Table 3. Mortality, Clinical Signs, and Autopsy Opinion in SD Rats with Intravenous Injection of Combined Cultivated Wild Ginseng Pharmacopuncture

Sex	Group	No. of animals	Mortality (dead/total)	Clinical signs	Gross findings
Male	G1	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings
	G2	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings
	G3	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings
	G4	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings
Female	G1	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings
	G2	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings
	G3	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings
	G4	5	0% (0/5)	No abnormality findings	Unremarkable findings

G1 : control, G2 : 10 times of clinical use concentration, G3 : 50 times of clinical use concentration, G4 : 100 times of clinical use concentration

5. 혈액생화학적 검사 및 조직병리학적 검사

산양산삼복합약침 투여로 인한 간, 신장 및 생체 전반에 미치는 영향을 관찰하고자 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 그 결과 고농도 투여군인 G4에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 이상 소견도 관찰되지 않았다 (Table 4).

간과 신장에 대한 조직병리학적 검사 결과, 수컷 G1 신장에서 낭(cyst), 암컷 G1 및 G4 투여군 신장에서 무기질침착(mineralization) 소견이 관찰되었으나, 이는 모두 자연발생적이거나 우발적인 것이며, 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다(Fig. 4, 5).

Table 4. Blood Biochemistry Changes in SD Rats with Intravenous Injection of Combined Cultivated Wild Ginseng Pharmacopuncture

항 목	Male		Female	
	G1	G4	G1	G4
AST (IU/L)	176±23	155±24	131±20	126±15
ALT (IU/L)	37±7	42±4	30±6	33±7
ALP (IU/L)	614±120	595±156	374±95	401±59
BUN (mg/dL)	17±1	17±3	18±1	18±1
CRE (mg/dL)	0.5±0.1	0.6±0.1	0.5±0.0	0.5±0.0
GLU (mg/dL)	110±6	108±11	112±12	108±11
CHO (mg/dL)	70±21	83±9	81±11	66±14
TP (g/dL)	6.2±0.2	6.4±0.1	6.7±0.1	6.5±0.3
CK (IU/L)	739±200	529±177	466±145	301±96
ALB (g/dL)	2.7±0.0	2.7±0.1	3.0±0.1	2.9±0.2
BIL (mg/dL)	0.00±0.01*	0.01±0.01*	0.04±0.04	0.03±0.00
TG (mg/dL)	35±26	46±17	16±1	14±3
IP (mg/dL)	10.71±1.08	10.96±1.02	9.19±0.80	10.20±1.55
A/G ratio (ratio)	0.75±0.04	0.74±0.05	0.79±0.06	0.79±0.05
Ca ²⁺ (mg/dL)	11.6±1.3	12.5±0.9	11.8±1.1	11.9±0.9
Na ⁺ (mmol/L)	142±1	142±0	142±1	142±1
K ⁺ (mmol/L)	4.6±0.4	4.5±0.2	4.4±0.1	4.5±0.2
Cl ⁻ (mmol/L)	103±1	102±2	106±1	104±2

AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase, ALP : alkaline phosphatase, BUN : blood urea nitrogen, CRE : creatinine, GLU : glucose, CHO : total cholesterol, TP : total protein, CK : creatinine kinase, ALB : albumin, BIL : total bilirubin, TG : triglyceride, IP : inorganic phosphorus, Ca²⁺ : calcium ion, A/G ratio : albumin/globulin ratio, Na⁺ : sodium ion, K⁺ : potassium ion, Cl⁻ : chloride ion, * : Values below the level of detection are excluded from statistics.

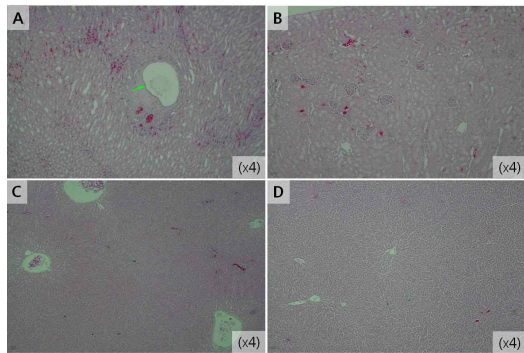


Fig. 4. Histological observation of male SD rats with intravenous injection of combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

(A) Kidney of G1 group. (B) Kidney of G4 group. (C) Liver of G1 group. (D) Liver of G4 group. Arrow (A) was seen as a cyst, but it is not determined by the test substance.

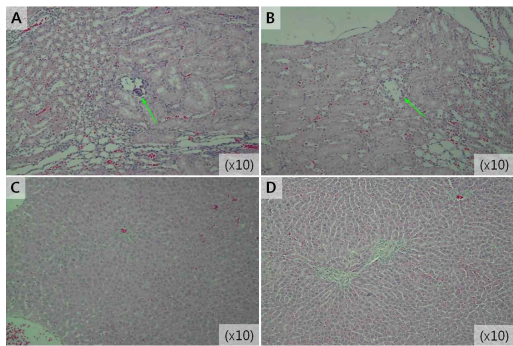


Fig. 5. Histological observation of female SD rats with intravenous injection of combined cultivated wild ginseng pharmacopuncture.

(A) Kidney of G1 group. (B) Kidney of G4 group. (C) Liver of G1 group. (D) Liver of G4 group. Arrows (A, B) as seen as mineralization but, it is not determined by the test material.

IV. 고찰

산양산삼약침은 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 본초인 蔘(panax ginseng C. A. Mey.)의 근으로 야생에서 자연발아하여 성장한 자연산 산삼이나, 산삼의 씨 또는 인삼의 씨앗을 수대에 걸쳐

쳐 산에서 재배하여 성장한 산양산삼 혹은 산양삼을 이용한다.

주요성분으로는 수십 종의 사포닌과 정유, 아미노산과 펩티드류 비타민, 포도당, 과당 그리고 flavonoids 등을 함유하고 있다. 약침에서는 사포닌의 일종인 ginsenoside를 분리, 정제하여 사용한다³².

산삼약침에 대한 기존 연구에서는 항산화³³, 항암, 항암제에 대한 정상세포의 방어효과에 우수한 효과³⁴가 있으며, 암의 전이를 억제하는 효과^{35,36}가 있다고 보고되어 있다. 또한 산양산삼약침의 임상적 예로는 폐암³⁷⁻³⁹, 근위축성 측삭 경화증⁴⁰, 전립선암⁴¹, 대장암⁴² 등의 환자 치료에 적용한 케이스가 있다.

산양산삼약침의 조제 과정의 경우 기존 연구를 보면 증류약침이 대부분이고, 약침을 만드는 과정에서 약재의 효능에 대한 지표성분이 간혹 검출되지 않아서 유효 여부에 대한 논란이 학계에서 있었다. 이에 산양산삼 증류약침의 효과를 가지면서 산삼의 주요 성분인 ginsenoside가 함유된 산양산삼복합약침을 증류추출 및 알코올수침법을 이용하여 개발하였으며, 본 연구에서는 산양산삼복합약침의 표준화를 위하여 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였다.

현재까지 인삼류 자체의 성분에 대한 표준화 연구는 비교적 많이 진행이 되었다. 정 등⁴³은 인삼과 산양삼, 그리고 산삼의 특이적인 ginsenoside 함량 패턴을 확보하고, 인삼과 산양삼을 홍삼화 시켰을 때 어떠한 성분의 변화가 일어나는지 관찰하고자 HPLC를 이용하여 여러 ginsenoside 의 함량을 비교 분석하였다. 이 등⁴⁴의 연구에서는 위와 유사하게 인삼과 산양산삼을 원료로 하여 홍삼과 홍산삼을 만든 후 인삼, 홍삼, 산양산삼 및 홍산삼의 특유 성분인 ginsenoside Rg2, Rg3, Rh1, 그리고 Rh2의 성분 비교 분석하였다.

또한, 한 등⁴⁵의 인삼과 산양삼, 산삼의 HPLC를 이용하여 부위별 성분 분석을 통해 비극성 사포닌인 ginsenoside Rg3, Rh2와 극성 사포닌인 ginsenoside Rb1, Rg1의 패턴 분석한 연구가 있었다. 그러나, 인삼이나 산양산삼 약침에 대한 표준화 연구는 거

의 찾아볼 수 없었다.

본 연구에서는 산양산삼의 경우 약전상 설정된 지표물질이 없어 인삼의 주요 ginsenoside인 ginsenoside Rg1과 ginsenoside Rb1, 그리고 항암효과가 높다고 알려진 ginsenoside Rg3⁴⁶의 함량을 분석을 하였고, 그 결과 각각 19.29 ug/mL, 47.64 ug/mL, 3.02 ug/mL 함유되어 있음을 확인하였다.

이와 더불어 산양산삼복합약침의 성분 분석과 더불어 SD계통의 랫드에 산양산삼 복합약침을 단회 정맥투여 했을 때의 독성이 있는가를 확인하였다.

독성실험은 의약품 등의 시험물질 안정성 평가를 하기 위하여 중요한 기초자료이며, 필수적이라 할 수 있다. 독성연구의 주요목적은 신약의 안정성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위해 시행하는 것으로 독성실험은 크게 급성 독성실험(단회투여독성시험), 아급성 독성실험(1개월 반복 투여 독성시험), 그리고 만성 독성실험(3개월 이상 반복투여 독성시험)으로 나누는데, 본 실험에서는 급성 독성실험을 의약품 독성시험 기준⁴⁷에 의거하여 시행하였다.

인삼류약침과 관련된 이전 독성 연구에서 이 등⁴⁸은 홍삼, 백삼, 수삼의 종류별 인삼수침액의 실험동물을 대상으로 중완에 주입한 독성 시험법에 관한 규정에 따라 급성독성시험을 실시한 바 LDLD₅₀, 임상증상, 혈액학적 소견 및 육안적 소견 등에 대하여 무해한 것으로 결과를 얻은 바가 있다. 또한 권 등³⁴은 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 mouse와 rat를 이용한 LDLD₅₀, 임상관찰 및 체중측정, 생화학 혈청검사의 급성 독성시험과 임상관찰 및 체중측정, 장기의 무게측정, 생화학 혈청검사 등의 아급성 독성시험 결과에서 독성이 없는 것으로 확인하였다.

본 연구에서는 산양산삼복합약침을 단회 정맥투여 했을 때의 독성을 조사하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 SD계통의 랫드를 이용한 산양산삼 약침을 단회 정맥투여 독성시험을 진행 한 결과 실험기간 동안 암·수 모든 시험물질 투여군에서 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았고, 체중은

순조롭게 증가하였으며, 부검 시 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다. 그 외, 혈액생화학적 검사, 간 및 신장의 조직병리학적 검사 결과, 시험물질 투여에 의한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험 조건하에서 산양산삼 복합약침의 독성은 인정되지 않았고, 개략의 치사량은 암·수 모두 임상사용농도의 100배 이상으로 판단하였다.

위 결과를 종합해 볼 때, 산양산삼복합약침은 성분분석 결과 ginsenoside 성분을 함유하고 있으며, 임상사용농도에서는 안전한 약침으로 판단된다. 하지만 산양산삼 증류약침의 경우 효능에 대한 연구 결과는 많지만 산양산삼복합약침의 경우 아직 효능에 대한 정확한 연구가 부족하며, 향후 효능에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사려 된다.

V. 결 론

증류추출 및 알코올추출법을 이용하여 만든 산양산삼 복합약침의 지표성분에 대한 HPLC 정량분석 및 급성독성시험을 한 결과 다음과 결과를 얻었다.

1. HPLC 정량분석한 결과, 극성 사포닌인 ginsenoside Rg1과 ginsenoside Rb1의 함량은 각각 19.29 ug/ml, 47.64 ug/ml였다.
2. 비극성 사포닌인 ginsenoside-Rg3의 함량은 3.02 ug/ml였다.
3. SD계통의 랫드를 이용한 산삼약침을 단회 정맥 투여 독성시험을 진행 한 결과 암·수 모든 시험물질 투여군에서 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았다.
4. 시험군은 대조군에 비해 체중은 유의한 차이가 없었고, 부검 시 특이한 육안소견은 관찰되지 않았으며 혈액생화학적 검사, 간과 신장의 조직 병리학적 검사 결과, 시험물질 투여에 의한 독성학적인 변화 또한 관찰되지 않았다.

위의 결과를 종합해 볼 때, 산양산삼복합약침은

ginsenoside 성분을 함유한 안전한 약침제제이며, 향후 치료에 있어 많이 활용될 수 있을 것으로 기대되고 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 신순식. 산삼 감정 기준의 객관성. 한의학연구소 동의 한의연 제 5집 2001;107-14.
2. 전국한과의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울: 영림사; 1994, p. 531.
3. 중약대사전편찬위원회. 완역중약대사전. 권7. 서울: 정담; 1997, p. 3473-9.
4. 조선총독부전매국. 인삼사. 서울: 법인문화사; 1990, p. 3-5.
5. 장중경. 중경전서. 서울: 대성문화사; 1984, p. 130-217.
6. 김성진, 신순식, 서부일, 지선영. 산삼, 장뇌삼, 인삼의 항암효과에 대한 비교연구. 대한본초학회지 2004;19(2):41-50.
7. Brekhman II. Panax ginseng. Leningard: Gosudarst Isdatet Med Lit; 1957, p. 1-5.
8. 고려인삼학회. 고려삼의 이해. 서울: 고려인삼학회; 1998, p. 127-37.
9. 최진호. 인삼의 신비. 서울: 교문사; 1984, p. 13-4.
10. 남기열. 최신 고려인삼. 대전: 한국인삼연초연구원; 1996, p. 56.
11. Oliveira ACC, Perez AC, Merino G, Prietp JG. and Alvarez AI. Protective effects of Panax ginseng on muscle injury and inflammation after eccentric exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2001;130:369-77.
12. Kim JS, Kim KW, Choi KJ, Kwak YK, Im KS, Lee KM and Chung HY. Screening of anti-oxidative components from red ginseng saponin. *Korean J Ginseng Sci* 1996;20:173-8.
13. Kim MJ and Jung NP. The effects of ginseng saponin on the mouse immune system. *Korean J Ginseng Sci* 1987;11:130-5.
14. Ha TY, Lee JH, and Han JH. Inhibitory effects of Panax ginseng on tumorigenesis in mice. *J Cheonbuk medical Sci* 1987;11(1):1-11.
15. Shibata S, Tanaka O, Soma K, Iita Y, Ando T, Nakamura H. Studies on saponins and sapogenins of ginseng. The structure of panaxatriol. *Tetrahedron Lett* 1965;3:207-13.
16. 정춘식. 흰쥐의 염산에탄올 유발 위염 위조직에서 ginsenoside Rb1의 항산화 효과. 생약학회지 2002;33(3):252-256.
17. Choi KJ. The constituent of material ginseng and management of quality. *Korean J Ginseng Sci* 1991;15(3):247-56.
18. Hideo H, Seong JH, Yasatosi M, Masamori W, Hur JD. Metabolites of ginseng saponin by enterobacteria and anti cancer substance include it's useful constituent. *Korea Plant* 1998;No 10-164266-0000.
19. Choi SS, Lee JK, Han KJ, Lee HK, Lee J, Suh HW. Effects of ginsenoside Rd on nitric oxide system induced by lipopolysaccharide plus TNF- α in C6 rat glioma cells. *Arch Pharm Res* 2003;26:375-82.
20. Yokozawa T and Liu ZW. The role of ginsenoside Rd in cisplatin-induced acute renal failure. *Ren Fail* 2000;22:115-27.
21. Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H and Zhang R. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of Panax ginseng. *Cancer Chemoth Pharmacol* 2007;59:589-601.
22. LY Wu J. Inhibitory effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on growth and metasis of Lewis pulmonary carcinoma. *Zhonggliu Fangzhi Yanjiu* 2006;33: 311-3.
23. David GP and David DK. Ginsenosides

- 20(S)-protopanaxadiol and Rh2 reduce cell proliferation and increase sub-G1 cells in two cultured intestinal cell lines, Int-407 and Caco-2. *Can. J Physiol Pharmacol* 2004;82:183-90.
24. Morita, T. Chemical studies on Panax genus plants grown in Asia. *Hiroshima Univ Doctoral Thesis* 1986:6-7.
25. Attele AS, Wu JA and Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1685-93.
26. 박종대. 고려인삼의 화학성분에 관한 고찰. *고려인삼학회지* 1996;20(4):389-415.
27. 대한약침학회. 약침요법 시술 지침서. 서울: 대한약침학회; 1999, p. 13-4, 112-8, 138-203.
28. 이종영, 조병준, 권기록, 강대인. 혈맥에 대한 문헌적 고찰. *대한약침학회지* 2005;8(3):11-20.
29. 법률. 동물보호법. 법률 제 12512호(2014. 3. 24). 2014
30. 식품의약품안전처. 식품의약품안전청 고시 제 2014-67호(2014년 2월 12일). 2014
31. 환경부. 환경부령 제 439호(2011. 12. 30). 2011
32. 대한약침학회 학술위원회. 약침학. 서울: Elsevier Korea; 2011, p. 3-5, 9-17, 28-9, 229-41.
33. 권기록, 위중성, 김성욱. 산삼의 문헌적 고찰. *대한약침학회지* 2003;6(2):67-75.
34. 권기록, 조아라, 이선구. 정맥주입용 산양산삼 증류약침의 급성 아급성 독성실험 및 Sarcoma-180 항암효과에 관한 실험적 연구. *대한약침학회지* 2003;6(2):15-26.
35. 조희철, 이선구, 권기록. 농도별 산양산삼 증류약침의 Apoptosis에 관한 실험적 연구. *대한약침학회지* 2004;7(2):1-18.
36. Kwon KR, Kim BW. Comparative study of Various Ginseng Herbal Acupuncture-By measuring the increase of life span of mice and Expression of cytokine mRNA. *J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society* 2005;22(2):203-10.
37. 박봉기, 조종관, 권기록, 유화승. 6개월간 산삼 약침요법을 시행 받은 IIIb기 편평세포폐암 환자에 대한 증례보고. *대한약침학회지* 2007;10(3):143-7.
38. 김구, 최용석, 주종천, 문구. 산양산삼 약침치료로 종양 퇴축을 보인 폐암환자에 대한 증례보고. *대한약침학회지* 2011;14(4):33-7.
39. 빙산휘, 권기록, 유화승. 산삼약침 혈맥주입을 시행한 비소세포성폐암 환자 2례. *대한약침학회지* 2008;11(2):13-9.
40. 유영진, 이광호, 권기록, 이연희, 안중철, 선승호, 이선주. 산삼약침 치료를 시행한 근위축성 측삭경화증 3례에 대한 임상보고. *대한약침학회지* 2010;13(4):119-27.
41. 연희, 김채원, 이광호. 양방 항암치료와 병행하여 산삼약침과 봉약침 치료를 받은 전립선암 환자들의 PSA 수치 변화 관찰 보고. *대한약침학회지* 2011;14(4):81-8.
42. 임창락, 권강, 서영찬, 방선휘, 김성수, 성신. 한방치료와 XELOX 요법을 병행하여 호전된 간, 폐 전이 대장암 환자 1례. *대한암한의학회지* 2012;17(1):17-25.
43. 정희선, 임청산, 차배천, 최석호, 권기록. 인삼·산양삼·자연산 산삼의 ginsenoside 함량 분석 및 홍삼화 후의 변화 관찰. *대한약침학회지* 2010;13(1):63-77
44. 이장호, 권기록, 차배천. HPLC를 이용한 인삼, 홍삼, 산양산삼 및 홍산삼의 성분 비교 분석. *대한약침학회지* 2008;11(2):87-95
45. 한영주, 권기록, 차배천, 권오만. 인삼과 산양삼, 산삼의 HPLC를 이용한 부위별 성분 분석 비교. *대한약침학회지* 2007;10(1):37-53
46. Liu WK, Xu SX, Che CT. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sciences* 2000;67(11):1297-306.
47. 식품의약품안전본부. '의약품 독성시험기준' 제 98-116호, 1996
48. 이혜정. 종류별인삼수침액기스의 독성연구. *대한침구의학회지* 1993;10(1):167-73.