

독성시험관리기준 적용 갈근탕의 안전성 평가

노종현¹ · 장지훈¹ · 이무진 · 양버들 · 우경완 · 이현주 · 김아현 · 심미옥 · 조현우 · 정호경[†]
한약진흥재단

Safety Evaluation Test of Galgeun-tang Applied to Guidelines for the Testing of Chemicals

Jong Hyun Nho¹, Ji Hun Jang¹, Mu Jin Lee, Beodul Yang, Kyeong Wan Woo, Hyun Joo Lee, A Hyeon Kim, Mi Ok Sim, Hyun Woo Cho and Ho Kyung Jung[†]
National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

ABSTRACT

Background: Galgeun-tang used in traditional Korean medicine, is a mixture of the medicinal plants *Cinnamomi Ramulus*, *Ephedrae Herba* and *Puerariae Radix*, and has been prescribed for the treatment of various ailments, including fever. Although the use of traditional medicinal herbs to treat diseases has recently increased, their safety and toxicity profiles incompletely elucidated. Thus, we evaluated Galgeun-tang's toxicity in male and female Sprague-Dawley rats.

Methods and Results: Galgeun-tang (1,000, 2,000 and 4,000 mg/kg) was orally administered to rats for 13 weeks, and then, they were maintained for 4 weeks without administration (recovery period). Their clinical signs, and hematological and urinary properties, were monitored. The results showed that Galgeun-tang administration slightly increased serum creatinine, urea nitrogen and, aspartate aminotransferase levels. Additionally, 2,000 and 4,000 mg/kg Galgeun-tang significantly increased urinary bilirubin and protein levels of male and female rats, which were restored during the recovery period.

Conclusions: The no-observed-adverse-effect level of orally administered Galgeun-tang was 4,000 mg/kg in both female and male rats, and no target organs were identified. In addition, 400 mg/kg was found to be the no-observed-effect level for toxicity under the study conditions.

Key Words: Galgeun-tang, Guidelines for the Testing of Chemicals, Herbal Medicine, Safety Evaluation

서 언

갈근탕은 계지 (*Cinnamomi Ramulus*), 마황 (*Ephedrae Herba*), 대추 (*Zizyphi Fructus*), 감초 (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*), 작약 (*Paeoniae Radix*), 갈근 (*Puerariae Radix*) 및 생강 (*Zingiberis Rhizoma Crudus*)의 복합제제이다. 현재 까지 갈근탕은 몸살감기에 사용되고 있으며 항진작용, 면역증진 및 부종개선 효과를 가진다고 알려져 있다 (Son *et al.*, 2011). 여러 연구에 따르면 갈근탕은 항알러지, 항비만 및 항골다공증 효과가 있으며 (Shim *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2013;

Ki *et al.*, 2016), daidzein, puerarin, albiflorin, paeoniflorin 및 cinnamic acid와 같은 중요 성분들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2012).

예로부터 현재까지 많은 한약재들은 민간요법과 처방으로 많이 이용되고 있고 인구 고령화와 생활사 변화에 따라 한약 처방에 대한 관심과 수요가 증가되었다. 그러나 일부 한약재들은 잠재적으로 독성을 가지고 있기 때문에 고농도로 추출된 한약처방을 장기간 또는 과복용하는 경우 복용자의 건강에 영향을 미칠 수 있으나 최근까지 한약재의 잠재적인 독성 및 안전성에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다 (Yun *et al.*,

¹Jong Hyun Nho and Ji Hun Jang are contributed equally to this paper

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-860-2841 (E-mail) thej01234@gmail.com

Received 2019 April 11 / 1st Revised 2019 April 22 / 2nd Revised 2019 May 4 / 3rd Revised 2019 May 12 / Accepted 2019 May 12

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2009). 또한 갈근탕에 대한 독성 평가는 지금까지 이루어지지 않았으며, 생리학적이 또는 약리학적이 효과 이전에 안전성평가를 진행하는 것이 더욱이 중요하다고 생각된다.

이에 따라 본 연구는 “의약품 등의 독성시험관리기준 (식품의약품안전처 고시 제2014-136호)”에 따라 갈근탕의 안전성 평가를 실시하였고, 그 결과를 공유하여 갈근탕의 안전한 처방 및 복용에 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조와 투여

실험에 사용된 갈근탕정은 경방신약주식회사에서 구매하였으며 갈근탕의 구성 및 추출 수율은 테이블에 표기하였다 (Table 1). 갈근탕정은 믹서를 이용해 분쇄하고, 일정 농도가 되도록 멸균수에 완전히 녹여 사용하였다.

본 시험은 의약품등의독성시험기준 (식품의약품안전처 고시 제 2015-82호), 한약[생약]제제 비임상시험기준 (식품의약품안전처 고시 제 2016-112호), 소아용의약품의 비임상 안전성 평가지침의 의약품평가지침 23 (식품의약품안전처) 및 2008년 1월 기준 유럽의약품기구 지침인 의약품의 동물에 대한 비임상 평가 지침을 준수하여 실험을 진행했다.

동물은 13 주 반복 경구투여 평가를 위해 실험군당 15 마리씩 배정하였고, 반복 투여가 끝난 뒤 4 주 회복 평가를 위해 10 마리를 제외한 나머지 5 마리를 배정하였고 실험군은 정상대조군 (0), 저농도 갈근탕 투여군 (1,000 mg/kg; GT 1,000), 중농도 갈근탕 투여군 (2,000 mg/kg; GT 2,000) 및 고농도 갈근탕 투여군 (4,000 mg/kg; GT 4,000)으로 실험군을 분리하고 매일 오전에 경구투여용 존데를 이용하여 13 주 동안 1 일 1 회 경구투여하였다. 13 주 반복 경구투여가 끝난 뒤 정상 회복군 (0R) 및 고농도 갈근탕 투여 회복군 (GT 4,000R)으로 분리하여 회복평가를 진행하였다.

2. 실험동물

본 시험은 동물보호법 (제정 1991년 5월 31일 법률 제

4379호, 일부개정 2015년 1월 20일 법률 제 13023호)에 근거하여 한약진흥재단 한약자원본부 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 2017-01-13). 실험동물은 3 주령 수컷 SD (Sprague-Dawley) 랫드를 Orientbio (Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 반입 시 전체 동물에 대한 외관 검사를 실시한 뒤 체중을 측정하였다. 순화기간 동안 매일 1 회 야윌, 사망, 식욕부진, 거식 및 배설상태를 포함한 일반증상을 관찰하였으며, 순화기간 종료일에 체중을 측정하고 일반증상과 체중변화를 확인해 동물의 건강상태를 평가하였다. 순화기간 동안 발견된 이상동물은 CO₂ 가스를 이용해 안락사 시켰다. 사육 조건은 온도 (20 ± 2°C), 습도 (55 ± 5%), 명암조건 (12 시간) 및 조도 (150 - 300 Lux)로 설정한 뒤 사육하였고 실험동물용 고형사료인 Teklad global 18% protein rodent diet (2918C, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA)와 장흥군 수돗물을 필터유수살균기로 여과한 뒤 자외선을 조사하고 자유섭취 하였다.

3. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상 관찰

앞에서 언급한 식품의약품안전처 의약품 등의 독성시험기준을 참고하여 모든 시험 동물에 대해 하루에 한번 야윌, 사망, 식욕부진, 거식 및 배설상태를 포함한 일반증상을 관찰하였으며 본 시험군은 13 주 동안 관찰하고, 회복군은 4 주간 관찰하여 총 17 주간 실험을 진행하였다.

2) 체중측정

모든 실험 동물에 대하여 주 1 회 및 시험종료 날짜에 체중을 측정하였고, 부검일의 체중은 전날 절식을 실시함에 따라 체중평가 및 데이터에서 제외했다.

3) 사료섭취량 측정

시험기간 동안 일주일마다 사료섭취량을 측정하여 1 일 평균섭취량을 계산하였다.

Table 1. Composition of Galgeun-tang.

Latin name	Scientific name	Herb contents (mg/g)	Extract contents (mg/g)	Ratio (%)	Yield (%)
<i>Cinnamomi Ramulus</i>	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	151.5	420.8	42.1	36
<i>Ephedrae Herba</i>	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	41.2	179.2	17.9	23
<i>Zizyphi Fructus</i>	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>inermis</i> Rehder	63.8	193.4	19.3	33
<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	4.7	42.9	4.3	11
<i>Paeoniae Radix</i>	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	60.4	137.2	13.7	44
<i>Puerariae Radix</i>	<i>Pueraria lobata</i> Ohwi	4.5	26.5	2.6	17
<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	54.3	106.5	10.7	51

4) 요검사

각 시험군당 5 마리에 대하여 투여 13 주 및 회복 4 주에 요검사를 실시하였다. 배설 후 약 3 시간 내에 신선요를 채취하였고, 채취 중 음수를 제외한 투여 및 사료급여를 중단하였다. 요검사 항목은 glucose, bilirubin, ketone body, specific gravity, occult blood, pH, protein, urobilinogen, nitrite 및 leukocyte를 포함하여 측정하였다.

5) 혈액학적 평가

각 시험군당 5 마리에 대해 혈액학적 평가를 진행하였으며, isoflurane으로 마취하고 배대동맥을 통해 혈액을 채취하였다. 혈액학적 평가는 채취한 혈액을 BD Vacutainer™ glass blood collection tube with K₃ EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에 넣은 후, IDEXX ProCytex DX Hematology Analyzer (IDEXX, Westbrook, ME, USA)를 이용해 erythrocyte count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT), leucocyte count (WBC), 백혈구백분율과 reticulocytes (reti)를 측정하였다.

6) 혈액생화학학적 평가

혈액생화학학적 평가는 배대동맥에서 채취한 혈액의 일부를 혈액학적 검사에 사용한 뒤 이를 제외한 나머지 혈액을 사용했다. 전혈은 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리 후 혈청을 채취하였고 혈액생화학 분석기인 FUJI DRI-CHEM 4000i (Fujifilm, Doko, Japan)를 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine (CRE)을 측정하였다.

7) 성주기 검사

10 일 동안 시험군당 5 마리의 암컷에 대해 성주기 검사를 실시하였다. 멸균된 면봉을 Dulbecco's phosphate buffered saline pH 7.4 (DPBS)에 일정하게 적셔 질 내부에 세포들을 채취하였고 슬라이드에 도말하였다. 이후 슬라이드는 Diff-Quick으로 염색하여 현미경으로 발정전기 (proestrus), 발정기 (estrus), 발정후기 (metestrus) 및 발정정지기 (diestrus)를 관찰하였다.

Estrous cyclicity (%)

$$= (\text{regular cycle} / \text{No. of total animals}) \times 100$$

8) 부검

사망 및 빈사동물을 포함한 모든 시험동물에 대해 장기 조

직에 대해 자세한 육안검사를 실시하였다.

9) 장기중량 측정

간, 심장, 비장, 폐, 신장, 고환, 부고환, 난소, 자궁을 포함한 장기에 대한 습중량 (absolute weight)을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기 중량비 (relative weight)를 산출하였다.

4. 통계처리

통계처리는 SPSS (Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계처리 했다. 평균값과 표준편차를 구하였다. 시험군 간 평균 차이를 검증하기 위해 일원배치 분산분석 (One-way ANOVA)을 한 뒤 Tukey-Kramer Multiple Comparison Test를 이용해 유의수준 5%에서 통계적인 차이를 검증하였다 ($p < 0.05$).

결 과

1. 일반증상

정상대조군 및 갈근탕을 투여한 모든 시험동물은 빈사 또는 사망동물이 발생하지 않았고, 하루에 한번 식욕부진, 거식, 배설상태와 같은 일반증상을 평가하였을 때 이상소견이 나타나지 않았다 (Table 2).

2. 체중변화

갈근탕 13 주 경구투여 및 4 주 회복기간 동안 실험동물들의 체중을 측정하였을 때, 투여 첫 주에 암수 모두 갈근탕 투여에 따른 유의적인 체중변화가 관찰되었지만 이는 일시적인 변화로 생각되며, 반복투여 13 주째에 암수 모두에서 정상대조군과 비교했을 시 유의적인 체중변화는 관찰되지 않았다 (Table 3). 회복평가에서 4 주째에 암컷 정상대조군 (female, G5, 0R)에 비해 암컷에 대한 4,000 mg/kg 갈근탕 회복군 (female, G6, GT 4,000R)의 유의적인 체중감소가 나타났다. 이는 정상대조군 대비 약 13% 정도 체중이 감소하였다.

3. 사료섭취량

갈근탕 경구투여 13 주 및 4 주 회복기간 동안 암수 모두에게서 평균 사료섭취량을 측정된 결과, 반복투여 4 주째에 암컷에 대한 2,000 mg/kg 갈근탕 투여군 (female, G3, GT 2,000)에서 평균사료섭취량이 유의적으로 증가된 것으로 나타났다. 이는 매우 미미하고 개체차이로 보이며 5 주째에 정상대조군과 비교하였을 때 차이가 나타나지 않음에 따라 독성에 의한 변화가 아닌 것으로 사료된다. 또한 모든 시험군은 연령증가에 따라 자연스럽게 평균사료섭취량이 상승하는 경향을 나타내었다 (Table 4).

Table 2. Summary of clinical signs of male and female rat administered with Galgeun-tang (GT).

		Sex; Male																	
Group/Dose	No. of animals	Signs	Week of dosing										Week of recovery						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
G1 (0)	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G2 (GT 1,000)	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G3 (GT 2,000)	10	Abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G4 (GT 4,000)	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G5 (0R)	5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
G6 (GT 4,000R)	5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
		Sex; Female																	
G1 (0)	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G2 (GT 1,000)	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G3 (GT 2,000)	10	Abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G4 (GT 4,000)	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
G5 (0R)	5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
G6 (GT 4,000R)	5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0

0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, 0R (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks.

Table 3-1. Change in body weights of male and female rat administered with Galgeun-tang for 13-weeks.

		Week of dosing (g)													
Sex	Group/Dose (mg/kg)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Male	G1	Mean	50.2	94.6	160.7	226.7	373.5	411.3	416.9	4,988.9	506.1	468.5	498.9	506.1	512.3
	0	S.D.	1.5	5.7	9.5	13.8	26.8	23.4	22.5	25.8	26.6	29.4	25.8	26.6	26.0
	G2	Mean	44.5*	93.8	156.6	219.4	369.9	401.5	401.5	483.7	497.7	453.1	483.7	497.7	510.2
	GT 1,000	S.D.	3.9	6.3	10.7	15.6	33.2	39.7	39.7	48.5	49.8	40.0	45.1	42.6	50.1
	G3	Mean	47.0	83.1	159.1	223.9	368.2	401.5	395.5	485.9	495.7	460.7	485.9	495.7	502.1
	GT 2,000	S.D.	3.3	9.3	6.3	9.9	22.3	36.6	29.4	39.7	41.6	35.8	39.7	41.6	42.0
	G4	Mean	45.1*	84.8	150.7	215.9	366.2	399.5	400.1	484.4	503.1	462.4	484.4	503.1	511.9
	GT 4,000	S.D.	3.5	6.9	13.4	14.6	27.0	30.1	30.7	37.7	40.4	29.4	37.7	40.4	41.8
Female	G1	Mean	44.4	87.3	128.1	168.9	242.5	258.0	262.1	266.5	277.8	293.1	291.4	297.3	306.8
	0	S.D.	2.3	5.3	7.8	11.1	14.8	20.6	21.1	20.5	21.2	25.3	27.0	26.1	24.5
	G2	Mean	47.5	85.1	125.2	165.2	232.4	245.9	245.9	256.5	266.0	280.4	280.4	284.9	295.9
	GT 1,000	S.D.	5.3	4.9	6.2	9.9	13.4	13.9	13.9	15.2	17.5	19.6	19.6	17.7	19.8
	G3	Mean	44.3	75.5	126.1	167.6	235.5	249.9	247.2	255.9	270.6	285.4	285.4	294.6	294.3
	GT 2,000	S.D.	3.5	6.6	5.8	6.5	21.3	23.3	20.1	28.3	25.9	29.2	29.2	32.4	20.3
	G4	Mean	39.9*	85.1	127.3	169.2	237.7	247.7	252.4	262.9	271.6	290.9	290.9	296.3	302.0
	GT 4,000	S.D.	3.2	5.9	9.0	13.2	17.7	22.3	19.0	21.3	22.8	28.2	28.2	28.5	27.3

0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks. Values are expressed as means ± SD (n = 10). *Means with difference letters are significantly different to normal control group of toxicity evaluation (G1) by Tukey-Kramer Multiple Comparison Test (p < 0.05).

갈근탕의 반복 경구투여 독성평가

Table 3-2. Change in body weights of male and female rat administered with Galgeun-tang for 4-weeks of recovery evaluation.

Sex	Group/Dose (mg/kg/day)		Week of recovery (g)			
			1	2	3	4
Male	G5	Mean	524.6	531.4	536.0	542.8
	OR	S.D.	23.1	25.2	27.4	27.8
	G6	Mean	524.6	537.4	548.6	560.8
	GT 4,000R	S.D.	46.0	45.1	47.4	48.4
Female	G5	Mean	314.2	322.8	334.6	346.0
	OR	S.D.	26.1	25.4	25.1	24.9
	G6	Mean	295.0	296.4	298.2	299.6*
	GT 4,000R	S.D.	19.4	19.4	19.9	19.8

OR (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means \pm SD (n = 5). *Means with difference letters are significantly different to normal control group of recovery evaluation (G5) by Tukey-Kramer Multiple Comparison Test ($p < 0.05$).

Table 3-3. Change in body weights of male and female rat administered with Galgeun-tang for 4-weeks of recovery evaluation.

Sex	Group /Dose (mg/kg/day)		Week of recovery (g)			
			1	2	3	4
Male	G5	Mean	524.6	531.4	536.0	542.8
	OR	S.D.	23.1	25.2	27.4	27.8
	G6	Mean	524.6	537.4	548.6	560.8
	GT 4,000R	S.D.	46.0	45.1	47.4	48.4
Female	G5	Mean	314.2	322.8	334.6	346.0
	OR	S.D.	26.1	25.4	25.1	24.9
	G6	Mean	295.0	296.4	298.2	299.6*
	GT 4,000R	S.D.	19.4	19.4	19.9	19.8

OR (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); Maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means \pm SD (n = 5). *Means with difference letters are significantly different to normal control group of recovery evaluation (G5) by Tukey-Kramer Multiple Comparison Test ($p < 0.05$).

Table 4-1. Change in mean food consumption of male and female rat administered with Galgeun-tang for 13-weeks.

Sex	Group/Dose (mg/kg)		Week of dosing (g)												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Male	G1	Mean	59.6	69.7	93.2	102.6	114.8	116.6	125.6	128.6	128.5	127.8	130.9	131.6	131.7
	0	S.D.	5.7	8.6	6.1	5.3	4.3	5.1	4.4	4.2	3.4	6.6	4.8	2.7	2.7
	G2	Mean	55.7	73.2	93.8	104.9	117.1	118.4	128.6	133.4	131.3	131.5	133.8	135.3	134.0
	GT 1,000	S.D.	4.6	8.6	4.6	5.3	4.3	5.8	4.4	4.5	3.6	6.7	5.0	3.3	2.6
	G3	Mean	61.8	71.9	102.4	111.8*	114.1	117.7	128.3	132.3	133.2	130.5	134.6	136.3	134.4
	GT 2,000	S.D.	5.7	8.6	6.1	5.3	5.7	4.6	4.4	4.2	3.4	6.6	4.8	2.7	2.7
	G4	Mean	57.0	67.1	97.6	107.0	109.3	112.9	126.6	132.0	131.0	131.6	130.5	133.2	132.3
	GT 4,000	S.D.	5.7	8.6	6.1	5.3	5.7	4.6	4.8	2.7	3.6	4.4	6.6	3.4	4.2
Female	G1	Mean	47.2	54.4	77.1	84.4	94.1	109.3	109.3	115.1	114.3	111.6	116.6	119.1	116.0
	0	S.D.	6.3	8.1	6.3	5.3	6.0	4.4	4.4	4.2	3.4	6.6	4.8	2.7	2.7
	G2	Mean	44.7	55.1	76.3	85.4	95.1	110.4	110.4	110.4	115.2	115.4	117.2	116.3	116.9
	GT 1,000	S.D.	5.7	8.2	6.0	6.2	4.1	4.6	4.6	4.1	5.8	6.7	4.6	3.1	2.8
	G3	Mean	45.8	55.8	76.3	85.0	95.1	110.7	110.7	110.4	114.7	114.0	117.4	116.1	118.1
	GT 2,000	S.D.	7.3	8.1	6.0	5.7	4.1	4.5	4.5	4.3	3.7	6.9	5.0	3.0	4.3
	G4	Mean	46.6	57.6	79.0	86.3	97.3	113.0	113.0	112.8	117.2	116.3	119.7	118.6	119.3
	GT 4,000	S.D.	5.7	8.6	6.1	5.3	4.3	4.4	4.4	4.2	3.4	6.6	4.8	2.7	2.7

0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks. Values are expressed as means \pm SD (n = 5). *Means with difference letters are significantly different to normal control group of toxicity evaluation (G1) by Tukey-Kramer Multiple Comparison Test ($p < 0.05$).

Table 4-2. Change in mean food consumption of male and female rat administered with Galgeun-tang for 4-weeks of recovery evaluation.

Sex	Group/Dose (mg/kg)		Week of recovery (g)			
			1	2	3	4
Male	G5	Mean	160.3	157.8	151.6	151.5
	OR	S.D.	4.9	5.1	8.4	4.6
	G6	Mean	165.6	159.9	151.6	152.3
	GT 4,000R	S.D.	4.1	4.8	10.4	4.9
Female	G5	Mean	143.2	139.1	133.3	134.0
	OR	S.D.	5.0	8.0	7.7	5.1
	G6	Mean	140.4	141.3	148.0	142.1
	GT 4,000R	S.D.	8.5	5.7	5.4	6.2

OR (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means ± SD (n = 5).

4. 요검사

정상대조군과 비교하여 13 주 동안 갈근탕 경구투여시 1,000 mg/kg 농도부터 요단백 (protein) 수치가 증가하는 경향이 암수 모두에게서 나타났지만 이는 4 주 회복평가기간에 모두 정상적으로 회복되었다. 암컷에 대한 갈근탕 투여군 모두 bilirubin 수치가 농도대비 증가되었으나 회복평가기간동안 수치변화가 나타나지 않았다 (Table 5). 종합하면 갈근탕 경구투여는 투여기간동안 요단백 및 bilirubin 수치에 영향을 미치는 것으로 나타났지만 이는 갈근탕 투여를 중지하면 정상적으로 회복되는 것으로 확인되었다.

5. 혈액학적 검사

시험동물 부검 시 채취한 전혈에 대해 혈액학적 검사를 수행한 결과 암컷에 대한 2,000 mg/kg 갈근탕 투여군 (female, G3, GT 2,000)에서 RBC와 HGB 수치가 유의적으로 감소된 것으로 나타났지만 이는 실험군 내에서 오차가 크기 때문에 개체차이인 것으로 사료되며 이를 제외한 여러 투여군은 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다 (Table 6).

6. 혈액생화학적 검사

시험동물 부검 시 채취한 혈청에 대해 혈액생화학적 검사를 수행한 결과 수컷에 대한 갈근탕 4,000 mg/kg 농도로 투여군은 정상대조군과 비교하여 AST, BUN 및 CRE 수치가 유의적 증가되었지만 증가량은 미미하였다. 하지만 회복평가기간 동안 모든 수치는 정상적으로 회복되는 것으로 나타났다. 암컷 실험군은 갈근탕을 2,000 또는 4,000 mg/kg 농도로 투여하였을 때 혈액생화학적 인자들이 증가되는 것으로 나타났지만, 수컷 실험군과 마찬가지로 회복평가기간동안 모두 정상적으로 회복되었다 (Table 7).

Table 5. Individual of urinalysis results in main groups.

Group/Dose (mg/kg)		Sex; Male			
		G1		G4	
		0	GT 1,000	GT 2,000	GT 4,000
Glucose (mg/dL)	Negative	5	5	5	4
	Trace	-	-	-	1
Bilirubin	Negative	5	5	4	4
	Small	-	-	1	1
Ketone body (mg/dL)	Negative	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	15	4	3	4	4
Specific gravity	40	1	2	1	1
	≤1.100	5	2	2	5
	1.150	-	3	2	-
Occult blood	1.200	-	-	1	-
	Negative	5	5	5	5
	≤7.5	-	-	-	-
pH	8.0	-	1	-	-
	8.5	5	4	5	5
	≥9.0	-	-	-	-
Protein (mg/dL)	Negative	-	-	-	-
	≥25	4	3	-	-
	≥50	-	-	-	-
Urobilinogen (EU/dL)	≥100	1	2	5	5
	0.2	5	3	3	3
	≥1.0	-	2	2	2
Nitrite	Negative	5	5	5	5
	Positive	-	-	-	-

0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks.

Table 5. continued.

Group/Dose (mg/kg)		Sex; Female			
		G1	G2	G3	G4
		0	GT 1,000	GT 2,000	GT 4,000
Glucose (mg/dl)	Negative	4	5	5	4
	Trace	1	-	-	1
Bilirubin	Negative	1	-	-	-
	Small	3	4	-	-
	Moderate	1	1	5	5
Ketone body (mg/dl)	Negative	2	-	-	-
	5	1	-	-	1
	15	1	5	5	4
	40	1	-	-	-
Specific gravity	≤1.100	4	2	-	5
	1.150	1	-	1	-
	1.200	-	3	4	-
Occult blood	Negative	5	5	5	5
	≤7.5	3	2	-	-
pH	8.0	1	3	5	-
	8.5	1	-	-	5
	≥9.0	-	-	-	-
Protein (mg/dl)	Negative	2	-	-	-
	≥25	-	-	-	-
	≥50	-	-	-	-
Urobilinogen (EU/dl)	0.2	1	-	-	-
	≥1.0	4	5	5	5
Nitrite	Negative	5	5	5	5
	Positive	-	-	-	-

0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks.

7. 성주기 검사

암컷 동물의 성주기를 검사한 결과 모든 실험군에서 정상대조군과 비교하여 정상적인 발정주기를 보였으며 (100%), 발정기부터 다음 발정기까지 기간은 각각 2.4, 2.0, 2.4 및 2.6 일로 정상대조군 및 갈근탕 투여군간 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (Table 8).

8. 부검

모든 실험동물에 대해 안락사를 실시한 뒤 5 분 이내에 부검을 실시하였다. 전신의 장기에 대한 육안검사를 진행한 결

Table 5. continued.

Group/Dose (mg/kg)		Sex		Male		Female			
		G5		G6		G5		G6	
		OR	GT 4,000R	OR	GT 4,000R	OR	GT 4,000R	OR	GT 4,000R
Glucose (mg/dl)	Negative	5	4	5	5	5	5		
	Trace	-	1	-	-	-	-		
Bilirubin	Negative	-	4	4	3	-	-		
	Small	5	1	-	2	-	-		
	Moderate	-	-	-	-	-	-		
Ketone body (mg/dl)	Negative	-	-	4	3	-	-		
	5	-	1	1	-	-	-		
	15	1	3	-	2	-	-		
	40	4	1	-	-	-	-		
Specific gravity	≤1.100	-	1	3	4	-	-		
	1.150	2	4	-	-	-	-		
	1.200	2	-	1	1	-	-		
	1.250	1	-	-	-	-	-		
	≥1.300	-	-	1	-	-	-		
Occult blood	Negative	5	5	5	5	5	5		
	≤6.5	-	-	1	-	-	-		
pH	7.0	-	-	1	-	-	-		
	7.5	-	1	-	-	-	-		
	8.0	4	1	-	4	-	-		
	8.5	1	3	3	1	-	-		
	≥9.0	-	-	-	-	-	-		
	Negative	-	-	4	4	-	-		
Protein (mg/dl)	≥25	5	5	1	1	-	-		
	≥50	-	-	-	-	-	-		
	≥100	-	-	-	-	-	-		
Urobilinogen (EU/dl)	0.2	1	4	5	5	-	-		
	≥1.0	4	1	-	-	-	-		
Nitrite	Negative	5	5	5	5	-	-		
	Positive	-	-	-	-	-	-		

OR (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); Maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks.

과 출혈, 비대, 위축과 같은 이상소견은 관찰되지 않았다 (Table 9). Rat 부검 시 흔하게 찾아볼 수 있는 가슴샘의 발적과 같은 증상도 확인되지 않은 것으로 보아 갈근탕의 투여가 암수 모두에서 장기에 대한 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

Table 6. Summary of hematological parameters in main and recovery groups.

Sex	Group		RBC ¹⁾	HGB ²⁾	HCT ³⁾	MCV ⁴⁾	MCH ⁵⁾	MCHC ⁶⁾	PLT ⁷⁾	WBC ⁸⁾	WBC differential counting (%)				
			(10 ⁶ /μℓ)	(g/dℓ)	(%)	(fl)	(pg)	(g/dℓ)	(10 ³ /μℓ)	(10 ³ /μℓ)	NEU ⁹⁾	LYM ¹⁰⁾	MONO ¹¹⁾	EOS ¹²⁾	BASO ¹³⁾
Male	G1	Mean	9.2	16.2	50.8	55.1	17.6	31.9	783.0	13.0	14.2	76.5	7.8	1.3	0.2
		S.D.	0.5	0.6	2.5	2.3	0.8	0.5	410	1.5	3.8	5.4	2.4	0.8	0.1
	G2	Mean	9.4	16.2	50.4	54.1	17.4	32.2	990	15.1	14.9	77.2	6.6	1.0	0.2
		S.D.	0.9	1.4	5.1	1.4	0.6	0.6	197	2.2	4.4	5.4	1.7	0.3	0.1
	G3	Mean	9.3	16.1	50.6	54.4	17.4	31.9	922	13.6	13.8	77.2	7.9	0.8	0.1
		S.D.	0.4	0.8	2.7	1.9	0.5	0.6	103	1.6	4.6	4.6	2.0	0.3	0.1
	G4	Mean	9.0	15.9	49.9	55.4	17.6	31.8	942	13.2	13.2	78.4	7.3	0.9	0.2
		S.D.	0.6	1.2	3.7	2.3	0.5	0.7	260	2.3	4.4	6.6	2.3	0.1	0.1
	G5	Mean	9.1	15.6	47.5	51.7	17.0	32.8	1,045	14.6	16.3	47.1	8.2	1.2	0.2
		S.D.	0.4	1.0	3.0	1.8	0.8	0.5	129	0.9	7.2	8.9	2.4	0.5	0.1
	G6	Mean	9.2	15.8	48.9	53.0	17.2	32.4	1,028	17.3	14.8	77.0	7.0	0.8	0.1
		S.D.	0.6	0.8	2.5	1.0	0.3	0.26	108	3.3	5.7	6.2	0.7	0.3	0.1
Female	G1	Mean	8.4	15.5	48.8	58.0	18.5	31.7	875	10.9	9.6	82.0	5.9	1.9	0.1
		S.D.	0.4	0.7	2.1	1.5	0.5	0.3	261	2.2	2.2	4.5	1.2	2.5	0.1
	G2	Mean	8.4	15.4	49.3	58.8	18.5	31.4	931	9.8	9.0	83.1	6.5	1.3	0.2
		S.D.	0.4	0.4	1.9	1.9	0.5	0.5	121	2.5	4.8	4.1	2.0	0.7	0.2
	G3	Mean	6.3*	11.8*	37.5	58.0	18.6	32.2	782	8.6	13.9	78.0	6.6	1.4	0.2
		S.D.	3.2	5.8	1.7	6.7	1.5	2.1	403	4.7	4.6	5.4	2.0	0.6	0.1
	G4	Mean	8.3	15.4	49.9	60.3	18.6	30.8	892	10.4	11.7	80.6	6.4	1.2	0.1
		S.D.	0.6	0.7	2.1	3.3	0.8	0.4	117	2.1	4.9	4.0	2.5	0.7	0.1
	G5	Mean	8.1	14.9	46.0	57.0	18.6	32.5	861	7.7	12.0	78.8	7.7	1.3	0.3
		S.D.	0.3	0.6	2.3	1.4	0.5	0.4	483	1.2	4.4	7.1	2.8	0.2	0.2
	G6	Mean	8.8	15.9	50.1	57.0	18.1	31.8	1,030	7.3	8.9	81.7	7.9	1.2	0.2
		S.D.	0.2	0.5	2.1	1.5	0.3	0.5	178	1.2	4.4	3.9	2.2	0.4	0.1

¹⁾RBC; erythrocyte count, ²⁾HGB; hemoglobin, ³⁾HCT; hematocrit, ⁴⁾MCV; Mean corpuscular volume, ⁵⁾MCH; Mean corpuscular hemoglobin, ⁶⁾MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration, ⁷⁾PLT; platelet, ⁸⁾WBC; White blood cell, ⁹⁾NEU; neutrophil, ¹⁰⁾LYM; lymphocyte, ¹¹⁾MONO; monocytes, ¹²⁾EOS; eosinophils, ¹³⁾BASO; basophils. 0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, 0R (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6). Maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means ± SD (n = 5). *Means with difference letters are significantly different to normal control group of toxicity evaluation (G1) by Tukey-Kramer Multiple Comparison Test (p < 0.05).

Table 7. Summary of biochemical parameters in main and recovery groups.

Sex	Group	Male				Female			
		ALT ¹⁾ (U/ℓ)	ALP ²⁾ (U/ℓ)	BUN ³⁾ (mg/dℓ)	CRE ⁴⁾ (mg/dℓ)	ALT ¹⁾ (U/ℓ)	ALP ²⁾ (U/ℓ)	BUN ³⁾ (mg/dℓ)	CRE ⁴⁾ (mg/dℓ)
G1	Mean	74.0	377.0	18.0	0.4	86.4	378.6	17.8	0.3
	S.D.	10.0	109.0	4.0	0.1	11.2	57.7	2.2	0.1
G2	Mean	75.9	416.4	17.7	0.5	75.2	361.4	19.2	0.4
	S.D.	11.4	65.6	2.9	0.1	7.1	77.7	2.1	0.1
G3	Mean	73.4	366.8	18.6	0.6	73.0	431.4*	20.2	0.6*
	S.D.	11.2	82.8	4.9	0.1	8.0	45.5	1.9	0.1
G4	Mean	116.4*	397.4	20.9*	0.8*	105.6*	445.8*	20.1	0.7*
	S.D.	18.9	87.8	4.7	0.1	16.4	46.0	3.63	0.1
G5	Mean	61.8	358.5	18.2	0.4	67.0	290.0	16.9	0.8
	S.D.	8.7	81.1	1.6	0.1	10.3	13.3	2.3	0.5
G6	Mean	69.8	360.8	16.8	0.4	61.0	288.2	16.5	0.8
	S.D.	9.3	84.5	0.9	0.1	6.2	69.5	3.0	0.6

¹⁾ALT; alanine aminotransferase, ²⁾ALP; alkaline phosphatase, ³⁾BUN; Blood urea nitrogen, ⁴⁾CRE; creatinine. 4,000R (G6); maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means ± SD (n = 5). *Means with difference letters are significantly different to normal control group of toxicity evaluation (G1) by Tukey-Kramer Multiple Comparison Test (p < 0.05).

Table 8. Summary of estrous cycle in main groups.

Group/Dose (mg/kg)		Estrous cyclicity (%)	Length of estrous cycle (days)	Length of stage (days)			
				Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
G1	Mean	100	2.4	2.6	2.6	2.8	5.0
0	S.D.	(5/5)	0.5	0.5	0.5	0.4	1.0
G2	Mean	100	2.0	2.4	2.2	2.4	6.0
GT 1,000	S.D.	(5/5)	0.0	0.5	0.4	0.5	0.7
G3	Mean	100	2.4	2.4	2.4	2.4	5.8
GT 2,000	S.D.	(5/5)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.8
G4	Mean	100	2.6	2.8	2.6	2.4	5.2
GT 4,000	S.D.	(5/5)	0.5	0.4	0.5	0.5	1.3

0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks. Values are expressed as means \pm SD (n = 5).

Table 9. Summary of necropsy findings in male and female rats administered with Galgeun-tang.

		Male					
Group		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Dose (mg/kg)		0	GT 1,000	GT 2,000	GT 4,000	0R	GT 4,000R
Organ / Findings	No. of examined	5	5	5	5	5	5
Abnormal organs	Remarkable findings	0	0	0	0	0	0
		Female					
Group		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Dose (mg/kg)		0	GT 1,000	GT 2,000	GT 4,000	0R	GT 4,000R
Organ / Findings	No. of examined	5	5	5	5	5	5
Abnormal organs	Remarkable findings	0	0	0	0	0	0

0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, 0R (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); Maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means \pm SD (n = 5).

9. 장기중량

부검을 진행한 뒤 실험동물의 자궁 (uterus), 난소 (ovary), 고환 (testis), 정소 (epididymis), 간 (liver), 심장 (heart), 비장 (spleen) 및 신장 (kidney)의 절대 장기중량과 정강뼈의 둘레 및 길이를 측정된 결과, 수컷에 대한 4,000 mg/kg 갈근탕 회복군 (male, G6, GT 4,000R)은 회복주 수컷 정상대조군 (male, G5, 0R)과 비교하였을 때 심장에 대한 습중량의 차이가 나타나지 않았지만 절식체중에 비례한 상대장기 중량비가 감소된 것으로 나타났다. 하지만 이는 개체별 오차범위가 다른 값과 비교하여 크기 때문에 개체차이 인 것으로 사료된다. 암컷에 대한 4,000 mg/kg 갈근탕 투여군 (female, G4, GT 4,000)은 정상대조군 (female, G1, 0)과 비교하여 비장의 상대장기 중량비가 유의적으로 증가된 것으로 나타났지만 증가량이 매우 미미하였고 습중량의 차이는 나타나지 않았다.

암컷에 대한 4,000 mg/kg 갈근탕 회복군 (female, G6, GT 4,000R)은 암컷 정상대조군 (female, G5, 0R)과 비교하여 심장, 폐, 신장의 상대장기 중량비와 정강뼈의 길이와 두께의 상대비가 증가되는 것으로 나타났지만 습중량의 차이는 없었다 (Table 10, 11).

고찰

Organisation for economic co-operation and development (OECD)의 급성독성시험의 허용한계용량인 2,000 mg/kg의 농도 (OECD, 2001)와 건강기능식품의 한계용량인 2,000 mg/kg 농도 (Oh *et al.*, 2006)를 포함하여 실험 농도를 설정하고 갈근탕을 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg의 농도로 13 주 반복경구투여 및 4 주 회복시험을 실시했다.

Table 10. Summary of absolute organ weights in male and female rats administered with Galgeun-tang.

Sex	Group/Dose (mg/kg)		Weight (g)							Tibia (mm)		
			B.W. ¹⁾	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidneys	Testis Lt. ²⁾	Epididymis	Length	Diameter
Male	G1	Mean	498.2	15.9	1.7	0.9	2.1	3.9	3.4	1.2	42.2	3.7
	0	S.D.	25.0	1.8	0.1	0.1	0.4	0.4	0.3	0.1	3.8	0.2
	G2	Mean	493.8	15.5	1.5	0.8	2.0	3.8	3.7	1.3	44.0	3.4
	GT 1,000	S.D.	50.7	1.5	0.1	0.2	0.2	0.4	0.3	0.1	1.8	0.5
	G3	Mean	504.8	15.5	1.5	0.8	2.0	4.1	3.4	1.2	42.5	3.3
	GT 2,000	S.D.	46.7	2.4	0.2	0.1	0.2	0.6	0.4	0.1	2.8	0.2
	G4	Mean	502.0	15.4	1.6	0.9	2.2	3.9	3.6	1.3	43.4	3.5
	GT 4,000	S.D.	23.9	1.8	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.2	0.8	0.2
	G5	Mean	542.8	15.3	1.6	0.8	2.1	4.2	3.6	1.3	54.3	3.5
	OR	S.D.	27.8	0.7	0.2	0.1	0.2	0.	0.3	0.0	1.3	0.3
G6	Mean	560.8	15.4	1.0	1.0	2.2	3.9	3.6	1.2	43.9	3.6	
GT 4,000R	S.D.	47.0	2.7	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	1.4	0.2	
Female	Group/Dose (mg/kg)		B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidneys	Uterus Lt. ²⁾	Ovary	Tibia (mm)	
											Length	Diameter
	G1	Mean	308.0	8.7	1.0	0.5	1.6	2.3	0.7	0.3	40.2	2.8
	0	S.D.	29.5	1.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.8	0.3
	G2	Mean	292.4	8.5	1.0	0.5	1.5	2.1	0.7	0.1	39.6	2.7
	GT 1,000	S.D.	26.4	1.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	1.1	0.1
	G3	Mean	295.0	9.2	1.0	0.5	1.5	2.2	0.7	0.1	39.7	2.7
	GT 2,000	S.D.	29.5	1.3	0.1	0.0	0.2	0.3	0.4	0.0	0.8	0.1
	G4	Mean	293.0	8.8	1.0	0.7	1.7	2.2	0.6	0.1	39.9	2.8
	GT 4,000	S.D.	19.2	1.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.0	0.9	0.2
G5	Mean	346.0	9.7	1.0	0.5	1.6	2.1	0.1	0.6	39.4	2.6	
OR	S.D.	24.9	1.1	0.1	0.0	0.2	0.2	0.0	0.1	1.2	0.2	
G6	Mean	299.6	10.6	1.1	0.6	1.8	2.5	0.1	0.6	39.5	2.8	
GT 4,000R	S.D.	19.8	1.9	0.1	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	

¹⁾B.W.; Body weight, ²⁾Lt; left. 0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, OR (G5); normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means ± SD (n = 5).

위의 시험기간은 식품의약품안전평가원의 의약품등의 독성 시험기준 해설서를 근거로 하여 13 주의 시험기간을 지정하였고 (OECD, 2001; NIFDSE, 2012), 다양한 약용작물들을 대상으로 수행된 독성평가시험과 같이 독성이 유발된 경우 유발된 독성의 가역성을 확인하기 위해 추가적으로 4 주 동안 회복평가기간을 지정하였다 (Nho *et al.*, 2018). 모든 시험군에서 빈사 및 사망동물은 발생하지 않았고, 일반증상, 뇨검사, 부검을 포함한 독성평가시험에서 독성학적으로 의미 있는 변화

가 관찰되지 않았다.

갈근탕의 주요성분으로 알려져 있는 daidzein은 *in vitro* 상에서 높은 농도로 처리했을 때 신경세포에 독성을 일으키는 것으로 알려져 있지만 (Jin *et al.*, 2007), 50 일간 암컷 랫드에게 1,000 mg/kg 농도로 반복경구투여 했을 때 식이섭취량과 체중을 감소시키지만 조직병리소견이 나타나지 않고 설치류의 생식능력에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다 (Lamartiniere *et al.*, 2002). Puerarin은 수용성 글리코사이드

갈근탕의 반복 경구투여 독성평가

Table 11. Summary of relative organ weights in male and female rats administered with Galgeun-tang.

Sex	Group/Dose (mg/kg)		Weight (g)							Tibia (mm)		
			B.W. ¹⁾	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidneys	Testis	Epididymis	Length	Diameter
Male	G1	Mean	498.2	3.19	0.35	0.19	0.42	0.79	0.69	0.25	8.47	0.74
	0	S.D.	25.0	0.32	0.01	0.03	0.07	0.06	0.05	0.02	0.77	0.03
	G2	Mean	493.8	3.13	0.31	0.15	0.41	0.77	0.75	0.27	8.97	0.69
	GT 1,000	S.D.	50.7	0.08	0.03	0.03	0.04	0.06	0.07	0.02	0.61	0.11
	G3	Mean	504.8	3.05	0.30	0.16	0.39	0.80	0.69	0.25	8.46	0.66
	GT 2,000	S.D.	46.7	0.27	0.03	0.02	0.02	0.07	0.15	0.05	0.90	0.05
	G4	Mean	502.0	3.07	0.33	0.17	0.44	0.77	0.72	0.26	8.66	0.70
	GT 4,000	S.D.	23.9	0.25	0.02	0.01	0.01	0.07	0.09	0.04	0.49	0.05
	G5	Mean	542.8	2.82	0.29	0.15	0.39	0.77	0.67	0.25	8.36	0.62
	OR	S.D.	27.8	0.17	0.02	0.02	0.02	0.03	0.06	0.01	0.40	0.07
	G6	Mean	560.8	2.77	0.18**	0.18	0.38	0.70	0.65	0.22	7.88	0.64
	GT 4,000R	S.D.	47.0	0.58	0.07	0.07	0.07	0.11	0.04	0.03	0.85	0.05
Female	Group/Dose (mg/kg)		B.W.	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidneys	Uterus	Ovary	Tibia (body)	
											Length	Diameter
	G1	Mean	308.0	2.83	0.32	0.18	0.51	0.74	0.24	0.08	13.18	0.91
	0	S.D.	29.5	0.22	0.02	0.02	0.05	0.05	0.07	0.11	1.50	0.11
	G2	Mean	292.4	2.91	0.33	0.18	0.51	0.72	0.22	0.03	13.62	0.93
	GT 1,000	S.D.	26.4	0.20	0.02	0.03	0.05	0.02	0.05	0.01	1.13	0.07
	G3	Mean	295.0	3.10	0.33	0.18	0.50	0.75	0.25	0.03	13.57	0.93
	GT 2,000	S.D.	29.5	0.16	0.02	0.02	0.07	0.08	0.13	0.01	1.57	0.11
	G4	Mean	293.0	2.99	0.33	0.23*	0.59	0.74	0.21	0.04	13.65	0.97
	GT 4,000	S.D.	19.2	0.20	0.02	0.02	0.04	0.05	0.06	0.01	0.62	0.08
	G5	Mean	346.0	2.81	0.28	0.15	0.46	0.61	0.03	0.18	11.43	0.76
	OR	S.D.	24.9	0.42	0.04	0.01	0.07	0.08	0.01	0.04	0.61	0.04
G6	Mean	299.6	3.54	0.36**	0.19	0.59**	0.84**	0.04	0.21	13.24**	0.94**	
GT 4,000R	S.D.	19.8	0.52	0.03	0.03	0.08	0.12	0.01	0.04	0.86	0.05	

¹⁾B.W.; Body weight, ²⁾Lt; left. 0 (G1); normal control, GT 1,000 (G2); 1,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 2,000 (G3); 2,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, GT 4,000 (G4); 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration to rats for 13 weeks, OR (G5); Normal control of recovery evaluation, GT 4,000R (G6); maintained for 4 weeks without Galgeun-tang after 4,000 mg/kg Galgeun-tang administration for 13 weeks. Values are expressed as means ± SD (n = 5). Means with difference letters are significantly different to normal control group of toxicity evaluation (G1) (*p < 0.05) and normal control group of recovery evaluation (G5) (**p < 0.05) by Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

이며 250 mg/kg의 농도로 수컷 랫드에게 28 일간 경구투여했을 때 조직학적 또는 혈액학적으로 독성을 유발하지 않는 것으로 알려져 있다 (Chung *et al.*, 2009). 또한 랫드에 대한 cinnamic acid의 반수치사량 (LD₅₀)은 3,570 mg/kg으로 알려져 있어 섭취에 주의를 요하지만 이는 매우 높은 농도로 갈근탕에 포함되어있는 cinnamic acid의 양으로 부정적인 영향을 미치기에는 현저히 낮은 농도라 생각된다 (Bickers *et al.*, 2005;

Seo *et al.*, 2010).

체중변화측정에서 암컷 4,000 mg/kg 갈근탕 회복군 (female, G6, GT 4,000R)의 유의적인 체중감소 (약 13%)가 나타났는데, 설치류에서 실험물질에 의한 체중감소가 정상대조군에 비해 20% 이상 감소되었다면 독성학적인 의미가 있는 것으로 간주하는 것으로 알려져 있지만 체중감소 비율이 크고 4,000 mg/kg 갈근탕 반복경구투여를 중지한 뒤 나타난 현상으로 의

미가 있다고 사료되어, 회복주를 4 주 이상으로 설정하여 체중의 편차를 측정하는 추가적인 평가가 필요하다고 사료된다 (Dietze *et al.*, 2016).

요검사에서 갈근탕 반복투여에 따라 요단백과 빌리루빈이 증가되었는데, 요비중이 높은 상태에서 매우 증가된 요단백은 독성학적 의미가 있을 수 있으나 시험결과에서 요단백 상승량이 매우 낮았고 요비중에 변화 처리 농도대비 유의적이지 않았음에 따라 독성학적 의미가 없었다. 또한 빌리루빈은 우로 빌리노겐과 함께 증가되어야 간성원인으로 간주하고, 빌리루빈 자체의 증가는 담낭에 영향을 미친다고 알려져 있지만 갈근탕 투여에 의한 빌리루빈 증가는 수치가 유의적으로 증가했으나 양이 미미하고 회복기간에 정상으로 회복되는 것으로 보아 관련 장기에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다 (Kim *et al.*, 2012).

장기중량측정에서 몇몇 실험군의 상대장기 중량비가 갈근탕 투여 및 회복주에서 증가되는 것으로 나타났지만 습중량에 대한 차이는 나타나지 않았을 뿐만 아니라 부검 시 여러 장기에 대한 육안적 검사에서 눈에 띄는 장기 비대 및 위축과 같은 이상이 발견되지 않았다. 따라서 이는 실험군간 개체 차이에 따른 결과로 보여지며 증가량과 감소폭이 미미하기 때문에 독성학적인 의미가 없는 것으로 사료된다. 또한 장기중량이 정상대조군과 비교하여 20% 정도 차이를 나타냄과 동시에 조직병리학적 소견이 함께 동반되어야 독성학적인 의미를 가진다고 알려져 있기 때문에, 추가적으로 갈근탕 반복경구투여에 따른 조직병리학적 검사를 수행해야한다고 생각된다 (Amacher *et al.*, 1998).

결과를 종합했을 때 수컷 및 암컷 랫드에 대한 무독성량 (NOAEL, no-observed-adverse-effect level)은 4,000 mg/kg 로 보이고, 2,000 mg/kg 농도에서 경미한 변화가 나타났기 때문에 무해용량 (NOEL, no-observed-effect level)은 400 mg/kg 으로 추정된다.

이러한 결과를 바탕으로 한의학에서 이용되는 처방전 중 하나인 갈근탕의 안전성과 이에 포함되어있는 여러 약용식물을 안전하게 사용할 수 있도록 우리나라 고유의 질병치료제에 대한 인식개선과 개발에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한국 토종자원의 한약재기반구축사업의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Amacher DE, Schomaker SJ and Burkhardt JE. (1998). The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight

and histological change in rat toxicology studies. Food and Chemical Toxicology. 36:831-819.

Bickers D, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, Sipes IG, Smith RL and Tagami H. (2005). A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients: The RIFM expert panel. Food and Chemical Toxicology. 43:799-836.

Chung HJ, Chung MJ, Hong SJ, Jeun J, Kweon DK, Choi CH, Park JT, Park KH and Lee SJ. (2009). Toxicological evaluation of the isoflavone puerarin and its glycosides. European Food Research and Technology. 230:145-153.

Dietze S, Lees KR, Fink H, Brosda J and Voigh JP. (2016). Food deprivation, body weight loss and anxiety-related behavior in rats. Animals. 6:E4. <https://doi.org/10.3390/ani6010004> (cited by May 18).

Ha HK, Lee JK, Lee MY, Lim HS and Shin HK. (2013). Galgeun-tang, an herbal formula, ameliorates atopic dermatitis responses in dust mite extract-treated NC/Nga mice. Journal of Korean Medicine. 34:1-11.

Jin Y, Wu H, Cohen EM, Wei J, Jin H, Prentice H and Wu JY. (2007). Genistein and daidzein induced neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures. Journal of Biomedical Science. 14:275-284.

Ki SH, Kim HJ, Ko SG and Song YK. (2016). Anti-obesity effects of Galgeun-tang in high fat diet induced obese mice model. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 26:13-28.

Kim YH, Cho KH, Ko BJ and Han BD. (2012). The interpretation of urinalysis and its clinical applications. Korean Journal of Family Practice. 2:214-220.

Kim YJ, Kim OS, Seo CS, Lim HS, Yoo SR, Jeon WY, Jin SE, Shin IS, Kim JH, Shin NR, Kim SS, Lee MY, Jeong SJ, Ha HK and Shin HK. (2012). Study on comparison of ingredient quantities and biological activities of Galgeun-tang according to extraction solvent. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 26:908-914.

Lamartiniere CA, Wang J, Smith-Johnson M and Eltoum IE. (2002). Daidzein: Bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. Toxicological Sciences. 65:228-238.

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation(NIFDSE). (2012). Manual of toxicity study standard to drugs. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Cheongju, Korea. p.10.

Nho JH, Lee MJ, Jung HK, Jang JH, Sim MO, Jang MC, Yong JH, Se HS, An BK, Kim JC and Cho HW. (2018). A 26-week repeated oral dose toxicity test and a 4-week recovery test of *Cassia tora* L. water extract in sprague-dawley rats. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 26:157-169.

Oh JM, Jo JH, Kim BH and Kim SK. (2006). Single dose toxicity study of *Buxus microphylla* var. *koreana* Nakai extract in mice. Korean Journal of Environmental Toxicology. 21:331-335.

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). (2001). OECD guidelines for the testing of chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris, France. p.4.

- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).** (2000). Guidelines for the testing of chemicals revised draft guideline 423, acute oral toxicity. Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, France. p.14.
- Seo CS, Kim JH and Shin HK.** (2010). Simultaneous determination of albiflorin, cinnamaldehyde, cinnamic acid, daidzin, glycyrrhizin, liquiritin, paeoniflorin and puerarin in Galgeun-tang by HPLC-PDA. *Journal of Korean Medicine.* 31:8-15.
- Shim KS, Park H, Lee JH, Ma CJ, Choi SU, Lee JH and Ma JY.** (2011). Inhibitory effect of Galgeun-tang on RANKL-induced osteoclast differentiation and bone loss in ovariectomized rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 16:158-166.
- Son CY, Song BJ, Ma JY and Kwon KI.** (2011). Anti-platelet aggregation study of fermented Galgeun tang and fermented Ssanghwa tang. *Yakhak Hoeji.* 55:374-378.
- Yun YJ, Shin BC, Lee MS, Cho SI, Shin WJ, Park HJ and Lee HJ.** (2009). Korean herbal medicine on liver function: A systematic review in Korean literature. *Korean Journal of Oriental Internal Medicine.* 30:153-172.