

초오 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 28일 반복 경구투여독성시험

이종숙 · 이지선* · 박영철* · 최선미 · 이상훈#

한국한의학연구원 의료연구본부 침구경락연구그룹, *대구가톨릭대학교 GLP센터
(Received October 18, 2013; Revised December 20, 2013; Accepted January 17, 2014)

A Repeated-dose 28-Day Oral Toxicity Test of *Aconitum jaluense* Extract in Sprague-Dawley Rats

Lee Jong Suk, Lee Ji Sun*, Park Yeong-Chul*, Sun Mi Choi and Sanghun Lee#

Acupuncture, Moxibustion and Meridian Research Group, Medical Research Division,
Korean Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea
**GLP Center, Catholic University of Daegu 712-702, Korea

Abstract — A 28-day repeated-dose oral toxicity test was performed to determine the no-observed-effect level (NOEL) and establish an optimum dose of the highly toxic Aconiti Ciliare Tuber (ACT) used as a folk remedy. Repeated oral doses of 1,250, 2,500, and 5,000 mg/kg/day of the hot water extract of ACT were administered to five male and five female Sprague-Dawley rats in each group for 4 weeks. The indicators for toxicity included results of examination of common symptoms and changes in weight and feed intake, eye test, urinalysis, hematological and serum biochemical analyses, and post-mortem weight measurement of organs, and visual inspections. All animals survived at the end of the experiment; in addition, we observed no specific test substance-mediated symptoms. We observed no test substance-mediated changes in body weight and feed intake. We observed statistically significant changes in male OB and pH levels ($p < 0.05$). Further, the biochemical test showed statistically significant changes in the IP value of male rats and CL⁻ value of female rats ($p < 0.05$). However, all changes were within historical data. The post-mortem examinations showed no test substance-mediated changes. Moreover, statistically significant changes under the test conditions were confirmed to have been caused by factors other than the test substance. Thus, the maximum NOEL of ACT extract in rats was estimated to be 5,000 mg/kg/day.

Keywords □ NOEL, Aconiti Ciliare Tuber, toxicity test, folk remedy

초오는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라 각지에 40여종이 자생하고 있으며,¹⁾ 이 중 초오로 사용될 수 있는 식물은 약 25종으로 *Aconitum triphyllum* Nakai 세잎돌쩌귀, *Aconitum sibiricum* ROIR. 노랑투구꽃, *Aconitum uchyamai* NAKAI. 그늘돌쩌귀, *Aconitum kusnezoffii* REICHB. 이삭바꽃, *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 늦젓가락나물 등이 있다.^{2,3)}

민간에서 초오는 관절염, 신경통, 중풍, 당뇨병, 냉증 등에 많이 사용되고 있지만⁴⁾ 일반적인 약효만이 알려져 있어 오남용에

따른 급성 중독 사례가 종종 보고되고 있다.⁵⁻⁷⁾ 이는 초오에 많이 함유되어 있는 aconitine류의 알칼로이드 성분 때문으로 초오를 복용하게 되면 오심, 구토, 복통과 같은 위장관 증상, 전신 감각이상, 전신 무기력과 같은 신경학적 증상, 그리고 현기증, 심계항진, 실신 등과 같이 심장독성으로 인한 중독증상이 나타난다.⁸⁾

초오와 비슷한 성질을 가지는 부자는 기원 식물인 *Aconitum Carmichaeli* Debx. 바꽃의 자근을 가공한 것으로 부자에도 aconitine류의 알칼로이드라는 성분이 다량으로 함유되어 있어 혈압하강, 사지궤냉(四肢厥冷), 심실세동 등의 부작용을 일으킬 수 있다.⁹⁾

초오와 부자에 다량으로 함유되어 있는 aconitine은 1~2 mg에 노출되어도 사망한다고 보고되고 있다.¹⁰⁾ 초오와 부자가 독성이 강한 약재임에도 불구하고 aconitine 함량과 통상적인 투여량의 안전성에 대한 객관적인 연구검증은 아직까지도 많이 부족한 실정으로 초오는 김³⁾ 등, 부자는 박¹¹⁾ 등에 의한 연구가 보

#Corresponding Author

Sanghun Lee

Acupuncture, Moxibustion and Meridian Research Group, Medical Research Division, Korean Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Tel.: 042-868-9461 Fax.: 042-869-2735

E-mail: ezhani@kiom.re.kr

Table I – Experimental groups in SD rats

Treatment groups	Sex	No. of rats	Number of rats	Inject volume (ml/kg/day)	Dose ((mg/kg/day)
Normal control (G1) ^{a)}	M / F	5 / 5	1101~1105 / 2101~2105	10	0
Low (G2)	M / F	5 / 5	1201~1205 / 2201~2205	10	1,250
Medium (G3)	M / F	5 / 5	1301~1305 / 2301~2305	10	2,500
High (G4)	M / F	5 / 5	1401~1405 / 2401~2405	10	5,000

^{a)}G1: Vehicle control.

고된 바 있으나 민간에서 사용하고 있는 법제되지 않은 부자의 열수추출 방식에 대한 연구는 이뤄지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 민간에서 사용하고 있는 방법을 그대로 적용하여 SD계통의 암수 랫드에 28일간 반복 경구투여하는 방법으로 식품의약품안전청 고시(제2009-116호)에 준하여 실험을 수행하여 초오에 대한 NOEL(no observed effect level, 최대무영향용량)을 확인 하고자 하였다. 그러나 본 연구에서는 조직병리를 분석하지 않아 초오의 28일 반복투여독성시험이기에 한계가 있으며 오히려 90일 또는 180일 반복투여독성시험에 있어서 용량결정 시험이라고 할 수 있다.

재료 및 방법

시험기관

GLP기관인 대구가톨릭대학교 GLP센터에서 전 과정 시험을 시행하였다. SD계통의 암수 랫드에 28일 반복 경구투여 독성시험은 동물보호법에 근거한 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 실시되었다(승인번호 : 제IACUC-2012-017호).

시험물질

본 시험에 사용한 초오는 법제를 하지 않은 것으로 광명당제약(원산지: 경주 양북면)에서 구입하여 잡질을 제거한 후 사용하였으며 상온 보관하였다.

실험동물 및 사육 환경

본 시험에서는 특정병원균 부재(SPF) 5주령 암수 50마리 Sprague Dawley계 랫드(SD 랫드)를 (주)대한바이오링크에서 구입하여 1주일 동안 검수검역 및 순화를 시켰다. 동물실의 사육 환경은 온도 23±3°C, 상대습도 50±20%, 형광등조명 12 hr (08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 150~300 Lux, 환기횟수 10~20회/시간, 소음 60 dB 이하, 암모니아 농도 20 ppm 이하인 환경에서 사육하였다. 순화, 투여 및 관찰기간 중 Polysulfone 사육상자(260W×420L×150H mm)에 수용하였고, 사육상자 당 동물수는 검역·순화기간 2~3마리/관찰기간 1마리로 하였다. 모든 사육기자재는 고압증기멸균기(121°C 20분)로 멸균하여 사용하였고, 실험동물용 방사선 멸균사료(Zeigler Bros., Inc. USA)와 음용수는 자유 섭취하도록 하였다.

시험군의 구성 및 투여량 설정

입수한 모든 동물 중 균 분리 일에 측정된 평균 체중에 가장 가까운 암수 각 20마리를 선정하여 체중에 따라 각 군 평균 체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 군당 5마리로 시험군을 구성하였다(Table I). 일반적으로 천연물 추출물의 경우에는 예상 임상용량이 높을 수 있기 때문에 가능한 높은 NOEL을 얻기 위해 반복투여독성시험에서 일반적으로 이용되고 있는 한계용량인 1,000 mg/kg/day보다 5배 높은 5,000 mg/kg/day 최고용량으로 하여 공비 2를 두어 2,500, 1,250 mg/kg/day을 중용량군 및 저용량군으로 각각 설정을 하였다.

시험물질의 조제 및 투여

시험물질 추출은 민간에서 초오를 달여 사용하는 방법을 바탕으로 초오 900 g을 3000~5000 ml의 음용수에 넣어 2시간 동안 전탕하였다. 증발되고 남은 용액을 최종 투여액 5 g/10 ml로 맞추어 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 통해 위내에 직접 투여되었다. 초오 추출물은 투여 기간 동안 냉장보관(보관고번호 : K-4) 하였으며, 투여횟수 및 기간은 1회/일, 7일/주, 4주간으로 투여는 오전에 이루어졌다.

관찰 및 검사항목

일반증상관찰 및 체중측정 – 모든 동물에 대해서 1일 1회 90일 동안 일반증상의 종류와 및 증상의 정도와 더불어 사망 및 빈사동물을 관찰하였다. 모든 동물의 체중을 투여개시일, 주 1회, 부검전일 및 부검일에 측정하였다. 부검일 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하고 부검전일 체중을 평가하였다.

사료섭취량 산정 – 투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하였고, 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

안검사 – 동물 도입 시 모든 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰하였다. 투여 마지막 주에는 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 각 군당 5마리에 대해서는 안구에 산동체를 점적하여 안저사진기로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

요검사 – 각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에 요검사를 실시하였다. 동물을 대사 케이지에 수용하여 3~4시간 동안 채뇨한

신선노 중 약 1 ml을 취하여 0.3 ml의 요를 요검사용 시험지에 묻힌 후, 요자동분석기를 이용하여 GLU(glucose), BIL(bilirubin), KET(ketone body), LEU(leukocyte), OB(occult blood), PRO (protein), URO(urobilinogen), NIT(nitrite), SG(specific gravity), pH, Color의 항목을 측정하였다. 일반검사 후 남은 요를 1,500 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 그 침전물을 S.M(Sternheimer-Malbin)법으로 염색하여 RBC(red blood cell), WBC(white blood cell), Epithelial cell 및 Cast를 관찰하였다. 요 총량은 24 시간 동안 계속 채집한 요로 측정하였다.

부검 및 장기중량 측정 - 부검 전날 절식(17시간)한 계획부검 동물에 대하여 부검 당일에 Isoflurane으로 흡입 마취하여 복대 동맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 이후 복대동맥 및 복대정맥을 절단하여 방혈/지사시킨 다음, 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰한 후 기록지에 기록하였다. 부검 시 적절한 장기 난소, 부신, 뇌하수체, 가슴샘, 전립샘, 고환, 부고환, 비장, 신장, 심장, 폐, 뇌, 간장을 전자저울을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기를 각각 측정하였다. 중량측정 장기에 대하여는 부검 시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

혈액학적 검사 - 부검 시 채혈한 혈액 일부를 항응고제인 EDTA2K가 들어있는 CBC bottle에 주입한 후 자동혈액분석기로 일반혈액학적검사(WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, HDW, PLT, MPV, RET)와 백혈구감별계수(NEU, LYM, MONO, EOS, BASO, LUC)를 측정하였다.

혈액생화학학적 검사 - 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube에 주입하고 15~20분간 상온에 방치하여 응고시켰다. 이후, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기를 활용하여 AST, ALT, ALP, BUN, CRE, GLU, CHO, PRO, CPK, ALB, BIL, TG, IP, A/G ratio를 측정하였다. 전해질은 전해질 분석기로 측정하였다.

혈액응고시간 검사 - 부검시 채혈한 혈액 중 1.8 ml을 3.2% sodium citrate 0.2 ml이 들어있는 Microtube에 주입한 후, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 PT(prothrombin time), APTT(activated partial thromboplastin time)를 측정하였다. 혈액응고시간검사를 사용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초 단위로 측정하였다.

통계처리

대조군과 투여군 간의 평균비교에는 모수적인 다중비교 혹은 비모수적인 다중비교를 사용하였으며, 통계학적 분석은 상용 소프트웨어로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 14.0을 이용하였다. Kruskal-Wallis' Htest를 실시한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney U-test를 적용하여 대조군과의 유의성을 확인하였다. 요색조는 Fisher's exact test를 적용하였다.

독성판정기준

초오 열수 추출물의 반복투여독성시험을 통해 얻어진 변화 또는 독성은 독성의 정도와 양상에 따라 weight-based classification (WBC, 독성 강도에 따른 분류)로 이루어졌다. WBC는 이전 연구^{12,13)}를 참고하여 시험물질 유래 중요한 변화, 시험물질 유래 경미한 변화 및 비시험물질 유래 변화의 3단계로 이루어졌다. WBC의 3단계는 본 시험의 목적인 NOEL, NOAEL(No Observed Adverse Effect Level, 최대무독성용량) 및 LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level, 최소독성용량) 등의 독성지표를 얻기 위해 이들 각각의 정의에 따라 시험물질-유래 중요한 변화는 adverse effect로 분류되었고 시험물질-유래 경미한 변화는 시험물질에 의한 non-adverse effect로 분류되었다. 일반적으로 NOAEL은 시험물질에 의해 심각한 독성을 유발하지 않는 최대독성영향이지만 경미한 영향인 non-adverse effect를 나타내는 최대무독성용량이며 LOAEL은 adverse effect를 유발하는

Table II - Definitions of LOAEL, NOAEL and NOEL by three steps of weight-based classification in toxicity test

Weight-based classification	Definitions of Criteria (In Korean)	Criteria of toxicity	Evaluation endpoints (In Korean)
Important compound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> 모든 투여용량에서 용량-의존성을 가진 통계적 및 생물학적 유의성 있는 임상 병리적 및 조직 병리적 변화. 용량-의존성이 없지만 대조군에서 발생하지 않고 통계적 유의성을 가진 조직병리학적 변화. 	Adverse effect	LOAEL
Minor compound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> 일부 용량에서 경미한 용량-의존성 또는 용량-의존성이 없는 특정 투여 용량에서의 임상병리학적 변화. 시험물질의 약리작용으로 고려되는 통계적, 생물학적 유의성¹⁾을 지닌 용량-의존성 또는 용량비-의존성변화. 대조군에서 발생하거나 가역적이 있는 용량-의존성 조직병리학적 변화. 	Non-adverse effect	NOAEL
Noncompound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> Historical data²⁾ 벗어나는 대조군의 결과와의 비교를 통해 얻은 통계적 유의성을 가진 변화. 실험과정에서 실수로 발생하는 변화와 자연발생적 변화를 포함. 	No effect	NOEL

¹⁾Biological significance: Statistical significance between the control and test groups outside the historical data of test system

²⁾Historical data: The range of the control group data obtained by testing (Mean±SD)

최소독성용량을 의미 한다.^{13,14} NOEL은 시험물질에 의한 경미한 변화도 없는 최대무영향용량을 의미한다. 이러한 독성지표의 정의에 따라 WBC에 의한 독성지표를 Table II와 같이 도출하였다.

체중

암수 모두에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table IV).

결 과

일반증상 및 사망동물

실험기간 중 대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물은 없었으며, 투여 중 일반증상 관찰 결과 시험물질에 영향으로 보이는 특이증상은 없었다(Table III).

사료섭취량

암컷에서는 대조군과 비교하여 사료섭취량에 차이가 거의 없었다. 수컷 사료섭취량에서는 대조군(G1:19.9)과 비교하여 고용량군(G2:21.5, G3:21.5, G4:22.2)에서 통계적으로 유의한 증가를 (p<0.05) 보였으나 정상범위내 변화로 비시험물질-유래 변화로 추정된다(Table V).

Table III – Clinical signs of male and female rats

Days	Observed signs	Male groups (mg/kg/day)				Female groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	No finding	0 / 5 ^{a)}	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5 ^{a)}	0 / 5	0 / 5	0 / 5
1-7	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
8-14	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
15-21	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
22-28	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
29	Terminal Sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

^{a)}Number of animals with the sign / Number of animals examined.

Table IV – Body weight changes of male and female rats

Weeks	Male groups (mg/kg/day)				Female groups (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	187.7±3.60	188.3±5.27	189.6±4.67	187.7±4.19	155.3±7.73	154.2±6.53	154.5±4.21	154.7±5.77
1	240.3±8.81	243.1±3.77	242.8±5.73	241.9±9.07	183.7±11.60	183.0±9.31	178.4±7.26	181.5±5.41
2	286.7±10.48	297.4±6.41	293.6±9.62	291.9±14.63	205.3±15.24	207.4±13.89	209.4±9.62	213.6±3.75
3	326.7±13.35	339.8±12.36	335.8±13.70	338.2±23.71	229.3±15.70	221.2±16.77	223.5±10.96	226.1±4.42
4	352.3±16.32	370.2±14.65	361.2±15.56	366.0±24.63	242.4±19.76	236.7±14.53	244.1±13.17	238.9±6.89
Gains ^{a)}	164.6±13.55	181.9±17.56	171.6±16.91	178.4±21.92	87.2±17.53	82.5±12.19	89.6±10.43	84.3±10.66

^{a)}Weight gains in the main groups are body weight difference between week 4 and 1st dosed day.

Table V – Food consumptions of male and female rats

Weeks	Male groups (mg/kg/day)				Female groups (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	17.5±3.27	21.0±1.17	21.4±1.90	22.4±2.55	16.4±2.30	17.0±1.93	16.9±1.89	16.4±1.38
1	19.2±1.00	20.3±0.45	20.1±1.23	20.3±1.56	15.1±1.48	14.3±1.16	14.2±1.13	14.7±0.77
2	20.6±1.08	21.7±0.95	21.9±1.34	21.9±1.79	15.0±2.15	14.9±1.80	16.1±1.20	16.3±0.97
3	21.0±1.53	22.4±1.11	22.3±1.21	23.2±2.44	16.1±2.07	14.4±2.03	15.2±2.13	15.2±0.87
4	21.0±1.23	22.2±0.96	21.7±0.63	23.2±2.42	15.9±2.65	14.9±1.47	16.0±1.45	14.8±1.32
Total mean	19.9±1.51	21.5±0.87	21.5±0.84	22.2±1.20	15.7±0.62	15.1±1.10	15.7±1.02	15.5±0.82

Table VI – Ophthalmic findings of male and female rats

Sites	Observed signs	Male groups (mg/kg/day)				Female groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Left eye	No observed signs	5 / 5 ^{a)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5 ^{a)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	No observed signs	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

^{a)}Number of animals with the sign / Number of animals examined

Table VII – Urinalysis of male and female rats

Tests ^{a)}	Sex		Male				Female			
	Result	Grade	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000
GLU	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
KET	-	0	5	3	3	3	5	5	5	5
SG	+/-	1		2	2	2				
	≤1.005	0								
	1.010	1	4	2	2	2	3	4	2	3
	1.015	2	1	2	2	2	2	1	3	2
pH	1.020	3		1	1	1				
	≤6.5	0								
	7.0	1								1
	7.5	2	3				3	2	2	1
	8.0	3	1	3	1	1	2	3	1	2
PRO	8.5	4	1	2	4	2			2	1
	-	0	4	3	2	3	5	5	5	5
	+/-	1	1	1	3	2				
URO	1+	2		1						
	0.2	0	5	5	5	5	5	5	5	5
NIT	-	0	4	2	1	4	3	3	4	4
	+	2	1	3	4	1	2	2	1	1
	-	0	1	5	5	4	5	5	5	4
OB	+/-	1	3			1				1
	1+	2	1							
LEU	-	0	4	4	4	4	5	5	5	5
	+/-	1	1	1	1	1				

^{a)}The unit of Urobilinogen is Ehrlich unit/dl

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, RO:Urobilinogen, PRO: Protein, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, LEU: Leukocyte.

Table VIII – Hematological values of male and female rats

Tests	Units	Male groups (mg/kg/day)				Female groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,500)	G3 (3,000)	G4 (5,000)
WBC	103/ μ l	3.47±1.17	3.76±0.66	3.70±1.53	4.09±1.72	2.38±1.14	2.17±0.92	2.67±1.31	1.91±0.92
RBC	106/ μ l	7.84±0.25	7.83±0.43	7.92±0.32	7.63±0.21	7.63±0.06	7.34±0.14	7.59±0.36	7.61±0.13
HGB	g/dl	16.26±0.66	16.30±0.78	16.20±0.53	15.94±0.35	15.76±0.45	15.08±0.56	15.40±0.412	15.38±0.27
HCT	%	45.44±1.32	45.16±2.76	44.98±1.90	44.48±1.38	43.62±0.86	41.64±0.83	42.56±1.76	42.80±0.55
MCV	fL	57.96±0.36	57.68±1.48	56.84±0.60	58.34±0.84	57.12±0.94	56.78±0.39	56.10±0.49	56.20±0.72
MCH	pg	20.74±0.56	20.82±0.91	20.48±0.57	20.98±0.67	20.64±0.44	20.52±0.61	20.30±0.60	20.22±0.34
MCHC	g/dl	35.80±0.82	36.10±0.96	36.02±0.72	35.90±0.87	36.10±0.63	36.14±0.87	36.16±0.77	36.00±0.39
RDW	%	10.34±0.36	10.74±0.36	10.62±0.52	10.50±0.38	9.48±0.22	10.00±0.67	9.82±0.30	9.66±0.24
HDW	g/dl	2.49±0.14	2.53±0.13	2.54±0.13	2.53±0.14	2.42±0.06	2.44±0.13	2.44±0.05	2.52±0.18
PLT	103/ μ l	1191.4±108.54	1091.0±125.14	1144.8±110.26	1124.8±48.91	1198.8±111.49	1185.0±140.22	1177.6±98.12	1169.2±152.43
MPV	fL	8.12±0.18	8.28±0.08	8.10±0.27	7.98±0.18	8.34±0.18	8.20±0.35	8.10±0.20	8.24±0.31
RET	%	1.98±0.20	2.27±0.17	1.82±0.08	2.26±0.32	2.00±0.42	2.03±0.42	1.95±0.35	1.82±0.55
NEU	%	9.28±0.78	11.30±0.97	11.76±3.08	11.54±4.03	6.98±1.88	8.16±2.54	8.76±1.94	8.54±0.97
	103/ μ l	0.32±0.10	0.43±0.10	0.41±0.11	0.47±0.21	0.16±0.06	0.16±0.03	0.22±0.08	0.17±0.09
LYM	%	87.26±1.46	85.10±1.06	84.78±3.22	84.46±4.26	88.32±3.18	86.86±2.82	86.70±3.50	85.94±1.42
	103/ μ l	3.03±1.05	3.19±0.52	3.16±1.40	3.46±1.51	2.12±1.07	1.90±0.85	2.34±1.23	1.64±0.79
MONO	%	1.62±0.69	2.10±0.50	1.80±0.29	2.20±0.35	1.94±0.76	2.20±0.64	2.04±0.72	2.56±0.70
	103/ μ l	0.05±0.03	0.08±0.04	0.07±0.04	0.09±0.04	0.05±0.02	0.05±0.03	0.05±0.01	0.06±0.04
EOS	%	1.40±0.34	1.16±0.27	1.28±0.42	1.38±0.28	2.20±1.07	2.34±1.05	2.00±1.14	2.42±0.98
	103/ μ l	0.05±0.01	0.04±0.004	0.05±0.02	0.05±0.02	0.04±0.02	0.04±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01
BASO	%	0.06±0.06	0.10±0.00	0.12±0.08	0.04±0.06	0.08±0.05	0.02±0.05	0.08±0.05	0.04±0.06
	103/ μ l	0.00±0.004	0.00±0.004	0.00±0.005	0.00±0.004	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.00	0.00±0.00
LUC	%	0.30±0.12	0.22±0.08	0.22±0.084	0.38±0.192	0.46±0.29	0.44±0.30	0.40±0.07	0.50±0.20
	103/ μ l	0.01±0.00	0.01±0.004	0.01±0.007	0.01±0.009	0.01±0.007	0.01±0.01	0.01±0.004	0.01±0.01

안검사
 시험 전 군 분리 시 외안검사와 투여 마지막 주에 수행된 안
 저검사 결과에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다(Table VI).

요검사
 수컷 OB 수치가 대조군과 비교하여 저용량 군 및 중용량 군
 에서 통계적으로 유의한 감소를($p<0.05$) 보였으나 정상 범위 내
 변화이며 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 추정된다.
 그리고 수컷 pH 수치가 중용량 군에서 통계적으로 유의한 증가

를($p<0.05$) 보였으나 정상 범위 내 변화로 비시험물질-유래 변
 화로 추정된다(Table VII).

혈액학적 및 혈액응고 검사
 암컷 HCT 수치가 저용량 군에서 통계적으로 유의한 감소를
 ($p<0.05$) 나타냈으나 정상 범위 내 변화이며 용량의존성이 없
 어 비시험물질-유래 변화로 추정된다(Table VIII). 혈액응고 검
 사 결과는 대조군과 비교하여 특이변화가 관찰되지 않았다(Table
 IX).

Table IX – Plasma coagulation values of male and female rats

Tests (sec)	Male groups (mg/kg/day)				Female groups (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
PT	9.06±0.78	8.58±0.54	9.24±0.48	8.64±0.684	8.34±0.39	7.92±0.715	7.92±0.45	8.04±0.50
APTT	16.14±2.74	15.56±2.96	16.78±2.17	17.18±1.24	15.42±2.32	15.54±2.89	14.46±2.66	14.92±1.50

Table X – Serum biochemical values of mael and female rats

Tests	Units	Male groups (mg/kg/day)				Female groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
ALB	g/dl	3.05±0.03	3.05±0.03	3.09±0.06	3.10±0.09	3.17±0.05	3.27±0.24	3.17±0.13	3.22±0.06
ALP	U/l	289.82±49.31	441.02±78.04	471.28±79.47	458.37±86.72	289.82±49.31	233.59±19.48	266.62±49.99	236.20±30.95
ALT	U/l	22.33±2.94	22.34±2.33	25.36±5.33	25.57±5.11	14.72±1.63	14.58±2.45	15.75±3.22	16.97±1.92
AST	U/l	71.73±10.65	69.53±1.86	74.50±7.75	75.69±10.01	70.41±4.07	63.94±7.16	65.45±6.16	68.74±8.88
BIL	mg/dl	0.10±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01	0.09±0.010	0.16±0.064	0.13±0.039	0.13±0.047	0.17±0.072
BUN	mg/dl	11.67±1.21	10.42±1.54	11.23±2.10	12.38±2.85	11.75±2.03	12.90±2.51	11.78±1.17	12.69±1.53
CHO	mg/dl	56.33±8.74	59.70±9.61	57.68±5.96	61.46±9.88	62.66±7.05	74.93±27.53	62.69±13.78	74.13±8.76
CPK	U/l	140.70±33.07	157.09±30.43	141.15±17.52	166.71±63.79	206.34±88.92	182.86±118.51	161.71±47.57	154.41±58.97
CRE	mg/dl	0.33±0.04	0.36±0.05	0.35±0.03	0.33±0.03	0.39±0.03	0.35±0.05	0.38±0.02	0.38±0.06
GLU	mg/dl	155.35±12.00	152.38±19.32	165.88±15.64	166.05±37.38	119.50±9.87	133.13±23.52	133.34±28.36	121.99±35.61
IP	mg/dl	6.03±0.23	5.86±0.32	5.52±0.27	5.71±0.29	5.03±0.43	4.59±0.24	5.14±0.30	4.88±0.49
PRO	g/dl	5.21±0.16	5.21±0.06	5.33±0.06	5.41±0.17	5.25±0.15	5.37±0.44	5.19±0.22	5.36±0.16
TG	mg/dl	31.62±10.79	49.87±18.78	47.16±15.74	45.98±17.98	32.53±6.94	28.41±8.48	29.22±9.70	33.75±17.46
A/G	ratio	1.41±0.08	1.41±0.04	1.38±0.09	1.35±0.09	1.53±0.046	1.56±0.074	1.57±0.03	1.51±0.07
Na ⁺	mg/dl	139.3±0.87	139.7±0.80	139.0±0.88	139.0±1.23	139.7±0.68	138.5±1.86	138.8±1.82	139.3±1.13
K ⁺	mmol/l	4.26±0.19	4.15±0.08	4.26±0.19	4.29±0.25	4.09±0.19	4.18±0.08	4.23±0.18	4.09±0.16
Cl ⁻	mmol/l	110.6±0.82	110.1±2.19	110.8±0.81	110.8±2.69	113.5±1.28	112.6±1.88	112.0±0.47	111.6±1.30

Table XI – Absolute and Relative organ weights of female rats

Organ weight (g)	Absolute organ weights				Relative organ weights			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,500)	G3 (3,000)	G4 (5,000)
Adrenal(L)	0.03±0.007	0.03±0.004	0.03±0.003	0.03±0.002	0.02±0.003	0.02±0.001	0.01±0.001	0.02±0.001
Adrenal(R)	0.03±0.006	0.03±0.004	0.03±0.003	0.03±0.002	0.01±0.003	0.01±0.002	0.01±0.001	0.01±0.001
Pituitary	0.01±0.002	0.01±0.002	0.01±0.002	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.000
Ovary(L)	0.07±0.013	0.06±0.007	0.06±0.007	0.06±0.013	0.03±0.004	0.03±0.003	0.03±0.003	0.03±0.006
Ovary(R)	0.06±0.012	0.06±0.006	0.07±0.009	0.07±0.006	0.03±0.004	0.03±0.003	0.03±0.003	0.03±0.003
Thymus	0.54±0.063	0.48±0.043	0.49±0.074	0.45±0.048	0.24±0.032	0.22±0.020	0.22±0.032	0.20±0.021
Spleen	0.63±0.098	0.59±0.059	0.62±0.036	0.57±0.084	0.28±0.023	0.27±0.029	0.28±0.023	0.26±0.036
Kidney(L)	0.77±0.058	0.78±0.057	0.79±0.032	0.77±0.044	0.34±0.014	0.36±0.016	0.35±0.017	0.34±0.021
Kidney(R)	0.79±0.057	0.81±0.060	0.83±0.078	0.76±0.039	0.35±0.015	0.37±0.007	0.37±0.030	0.34±0.016
Heart	0.76±0.071	0.77±0.040	0.75±0.051	0.76±0.032	0.33±0.011	0.35±0.006	0.33±0.011	0.34±0.013
Lung	1.15±0.084	1.08±0.058	1.14±0.052	1.12±0.042	0.51±0.018	0.49±0.015	0.50±0.007	0.50±0.014
Brain	1.88±0.039	1.85±0.081	1.90±0.077	1.88±0.055	0.84±0.050	0.85±0.042	0.84±0.026	0.84±0.025
Liver	6.66±1.104	6.76±0.767	6.76±0.730	6.53±0.461	2.94±0.268	3.08±0.356	2.97±0.204	2.93±0.218

Table XII – Absolute and relative organ weights of male rats

Organ weight (g)	Absolute organ weights				Relative organ weights			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Adrenal(L)	0.02±0.004	0.03±0.001	0.02±0.001	0.03±0.002	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001
Adrenal(R)	0.02±0.004	0.02±0.005	0.02±0.002	0.03±0.004	0.01±0.001	0.01±0.002	0.01±0.001	0.01±0.001
Pituitary	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0.003±0.000	0.003±0.0003	0.003±0.0001	0.003±0.0002
Testis(L)	1.64±0.0995	1.65±0.146	1.64±0.125	1.67±0.184	0.50±0.036	0.48±0.058	0.49±0.040	0.49±0.063
Testis(R)	1.62±0.128	1.63±0.115	1.62±0.116	1.66±0.161	0.50±0.050	0.47±0.049	0.48±0.041	0.49±0.050
Epididymis(L)	0.41±0.033	0.42±0.028	0.42±0.017	0.42±0.030	0.12±0.010	0.12±0.010	0.13±0.008	0.12±0.009
Epididymis(R)	0.42±0.030	0.41±0.032	0.42±0.010	0.43±0.020	0.13±0.012	0.12±0.013	0.13±0.008	0.13±0.005
Thymus	0.63±0.137	0.77±0.051	0.59±0.094	0.68±0.075	0.19±0.047	0.22±0.015	0.17±0.021	0.20±0.017
Prostate	0.34±0.058	0.37±0.046	0.36±0.035	0.36±0.068	0.10±0.018	0.11±0.014	0.11±0.011	0.11±0.016
Spleen	0.80±0.055	0.83±0.065	0.85±0.115	0.78±0.041	0.24±0.020	0.24±0.012	0.25±0.024	0.23±0.008
Kidney(L)	1.19±0.135	1.13±0.051	1.28±0.103	1.25±0.069	0.36±0.033	0.33±0.008	0.38±0.028	0.37±0.015
Kidney(R)	1.20±0.099	1.17±0.071	1.27±0.062	1.24±0.057	0.36±0.024	0.34±0.017	0.38±0.022	0.36±0.025
Heart	1.11±0.054	1.06±0.058	1.13±0.070	1.12±0.075	0.34±0.012	0.31±0.019	0.34±0.014	0.33±0.006
Lung	1.36±0.111	1.41±0.104	1.45±0.106	1.46±0.083	0.41±0.020	0.41±0.023	0.43±0.030	0.43±0.022
Brain	1.97±0.065	1.99±0.101	1.96±0.022	2.05±0.066	0.60±0.043	0.57±0.044	0.59±0.028	0.61±0.052
Liver	9.48±0.859	10.07±0.611	10.41±0.800	10.31±0.843	2.88±0.149	2.90±0.121	3.10±0.177	3.03±0.055

혈액생화학적 및 전해질 검사

수컷의 IP 수치가 대조군과 비교하여 중용량 군에서 통계적으로 유의한 감소가($p<0.05$) 나타났으나 용량의존성이 없고 정상 범위 내 변화로 판단되어 비시험물질-유래 변화로 추정된다. 또한 암컷 CL 수치가 대조군과 비교해 고용량 군에서 통계적으로 유의한 감소($p<0.05$) 나타났으나 정상 범위 내 변화이며 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 추정된다(Table X).

장기중량

암컷 가슴샘 중량이 고용량 군에서 통계적으로 유의한 감소를($p<0.05$) 나타냈으나 정상 범위 내 변화이며 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 추정된다(Table XI).

부검소견

암수 모두에서 가슴샘의 발적(Table XII), 암컷에서 자궁내 맑은 액체 저류가 관찰되었다. 그러나 시험물질의 영향이 아닌 일반 Rat에서 흔히 나타나는 증상으로 비시험물질-유래 변화로 추정된다.

고 찰

민간에서 초오는 다양한 효능으로 사용되고 있지만 부작용에 관한 내용은 잘 알려지지 않아 오남용으로 인한 중독 사례가 종종 보고 되고 있다. 김⁷⁾ 등에 의하면 헛개나무로 만든 술인 줄 알았는데 술을 만드는 과정에서 초오가 혼합되어 들어가 있어 이를 마시고 집단으로 구토, 구강 및 손발 마비감, 흉부 불편감 등의 중독 증상을 보였다는 증례보고가 있다. 이¹⁵⁾ 등도 초오와 부

자를 관절염과 증풍 후유증으로 발생한 감각장애와 통증 때문에 복용하였다가 흥민, 사지무력, 감각이상, 현운 등의 중독증상을 보이는 환자가 있었다고 보고하였다.

초오에는 독성성분인 aconitine계 알칼로이드가 가장 많이 함유되어 있기 때문에 매우 적은 양으로도 독성이 나타날 수 있다.³⁾ Aconitine 성분은 사람에게 있어 0.2 mg만 복용하여도 중독이 되고 3~4 mg은 치사량으로 조사되었다.¹⁶⁾ 그래서 민간에서는 초오에 명태 또는 돼지족을 같이 넣고 삶아서 먹는데, 실제 명태와 초오를 같이 삶아 먹으면 독성이 줄어든다는 연구결과도 보고되어 있다.¹⁷⁾ 그리고 초오는 가열하는 시간에 따라서 독성성분이 줄어든다는 보고도 있어, 김¹⁸⁾ 등에 의하면 수치지 않은 초오의 총 alkaloid 함량에 비하여 0.5시간 및 1시간 가열하여 수치를 행한 초오의 총 alkaloid 함량은 6.7%와 36.0%의 감소된다고 한다. 본 실험에서도 초오를 민간에서 사용하는 방법 그대로 2시간 전탕하였기 때문에 독성성분이 많이 감소되었을 것으로 예상된다.

초오는 옛날에 시약으로 쓰였을 만큼 독성이 강한 약재임에도 불구하고 독성시험에 관한 연구는 별로 많지 않다. 그래서 이를 바탕으로 본 연구에서는 초오 열수 추출물을 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day으로 경구투여하여 반복투여독성 시험을 실시하였으나 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상 및 시험물질에 의한 영향으로 보이는 증상도 관찰되지 않았다. 초오의 aconitine 함량의 변화를 보면 수치지전에는 366.5 µg/g이었으나 6시간 열수 추출 후에는 18.6 µg/g으로 1/10 이상 감소했다는 보고가 있다.¹⁹⁾ 본 시험에서는 전탕 후 aconitine 함량을 측정하진 않았지만 aconitine 함량이 현저하게 감소했을 것으로 추정되며, 이 때문에 초오추출물 투여에서 독성이 잘 나타나지 않은 것으로 생각되어진다. 우리와 비슷한 결과로 초오와 부자 연구인 김³⁾ 등의 연구

에서 초오전탕액을 ICR mouse에 2, 5, 10 g/kg/day을 2주간 경구투여 하여 관찰한 결과, 임상증상 및 부검소견에서도 별다른 이상이 발견되지 않았다. 박¹¹⁾ 등에 따르면 부자 온탕추출물을 SD 랫드에 경구 투여 하였을 경우 LD₅₀은 10 g/kg 이상이며, 5.0 g/kg씩 14일간 경구투여 하여 관찰한 결과 투여군 1례가 7일째 설사를 나타낸 것을 제외하고는 별다른 이상이 발견되지 않았다고 한다. 그러나 전임상과는 달리 임상에서는 초오의 중독 증상이 나타나고 있다. 증례보고를 보면 초오를 끊이거나 소주에 담구거나 환약으로 복용 했을 경우 위장관 증상(오심, 구토, 복통), 전신 감각이상, 신경학적 증상, 심계항진, 실신 등의 증상들이 2시간 이내에 발생했다고 한다.⁸⁾ 관절통과 소화불량 치료를 위해 초오를 복용했다가 중독증상(심계항진, 흉통, 어지럼증, 실신 등)이 발생한 경우도 있었다.⁵⁾

본 시험조건에서 초오의 투여 농도에 따라서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되었으나 이는 비시험물질-유래변화가 확인되었다. 따라서 본 시험의 독성 판정기준에 따라 암수 모두 NOEL은 5,000 mg/kg/day으로 추정 할 수 있었다. 그러나 초오 열수 추출물에서 아무런 독성현상이 확인되지 않았기 때문에 더 높은 용량과 열수 추출물이 아닌 유기용매 추출물에 대한 독성 정도를 파악할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 민간에서 초오를 사용하고 있는 방법을 이용하여 NOEL을 알아보기 위하여 SD 계통 암, 수 랫드를 이용하여 28일 반복 투여독성시험을 시행하였다.

실험결과 투여기간 중 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상관찰소견에서도 시험물질에 영향으로 보이는 특이증상은 없었다. 체중변화, 증체량 및 사료섭취량에서도 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 임상병리 소견에서 요검사 결과, 수컷 OB 및 pH 수치가 통계적으로 유의한 변화를($p < 0.05$) 보였고, 생화학적 검사에서도 수컷의 IP 수치 및 암컷 CL 수치가 통계적으로 유의한 변화가($p < 0.05$) 나타났으나 이는 모두 정상범위 내 결과로 보여진다. 부검결과에서도 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과로 보아 본 시험 조건에서는 초오의 투여 농도에 따라서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되었으나 이는 비시험물질-유래변화가 확인되었다. 따라서 초오 추출물의 랫드에 대한 NOEL은 5,000 mg/kg/day으로 추정된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원 민간요법 발굴·보존 및 DB구축을 통한 지식 자원화(K12210)의 지원으로 이루어졌다.

참고문헌

- 1) 한국한의학연구원 : 초오 수치지전, 후의 함량변화에 관한 연구, 누리미디어, 서울 p. 1-30 (2001).
- 2) 이창복 : 원색대한식물도감, 향문사, 서울 p. 372-379 (2003).
- 3) Kim, Y. K., Lee, J. H., Song, K. Y., Park, S. K. and Kim, C. : Studies on the liver toxicities with different dosage of wild aconiti tuber decoction. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*. **13**, 123 (2005).
- 4) 조식제 : 특허로 만나는 우리 약초, 도서출판사 아카데미북, 서울 p. 510 (2012).
- 5) Mun, J. M., Lee, B. K., Chun, B. J., Yoon, D. Y., Heo, T. and Min, Y. I. : Analysis of cardiovascular change of an Aconitum-containing Chinese Remedy. *The Korean Society of Emergency Medicine* **13**, 55 (2002).
- 6) Kim, M. R. : Ventricular arrhythmia following aconitine-ingestion - 2 Case Reports -. *The Korean Society of Clinical Toxicology* **4**, 180 (2006).
- 7) Kim, S. C., Kim, Y. S., Ha, Y. R. and Kim, H. J. : An outbreak of Caowu-intoxication after drinking home-brewed alcohol. *The Korean Society of Emergency Medicine* **19**, 339 (2008).
- 8) Lee, J. H. and Kim, K. R. : A clinical study of aconitine poisoning. *The Korean Society of Emergency Medicine* **6**, 154 (1995).
- 9) 전국한의학대학 공동교재편찬위원회 : 본초학, 영림사, 서울 p. 375 (2004).
- 10) Duke, J. A. : Handbook of Medicinal Herbs, Second edition control after acquired brain injury, CRC Press, USA p. 12-13 (2002).
- 11) Park, H. S., Kim, S. H., Kim, P. Y. and Chang, I. M. : Toxicological studies on raw and processed (prebrewed) Aconiti tubers; Acute, subacute toxicity studies and assay of Aconitine Alkaloids. *Korean. J. Toxicol.* **6**, 41 (1990).
- 12) Pack, Y. C. and Cho, M. H. : A new way in deciding NOAEL based on the findings from GLP-toxicity test. *Toxicol. Res.* **27**, 133 (2011).
- 13) Lewis, R. W., Billington, R., Debryune, E., Gamer, A., Lang, B. and Carpanini, F. : Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. *Toxicol. Pathol.* **30**, 66 (2002).
- 14) US FDA : Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Pharmacology and Toxicology (2005).
- 15) 이승무, 안일희, 이연정, 김병균, 김동웅 : 급성 부자 초오 중독에서 감두탕과 고삼의 응용. *대한한학회지* **14**, 399 (1993).
- 16) 김호철 : 한약약리학, 집문당, 서울 p. 250 (2004).
- 17) Ha, J. Y. and Kim, S. N. : An experiment on the toxic change by the effect of Aconiti Ciliare Tuber effect with "Aiaska Pollack - Decoction" and "Kam Doo - Decocion" upon the mice.

- J. of Oriental Medical Pathology* **9**, 59 (1994).
- 18) Kim, N. J., Jung, E. A., Joo, S. M., Song, Bo. W. and Kim, J. W. : Studies on the processing of crude drugs (VI) - On the constituents and biological activities of Aconiti ciliare tuber-. *J. Kor. Soc. Hosp. Pharm.* **16**, 190 (1999).
- 19) Kim, H. K., Lee, H. W. and Jeon, W. K. : Effects of various processing methods on the contents of Aikaloids in the Cho O (Aconiti Ciliare Tuber). *Kor. J. Pharmacogn.* **33**, 296 (2002).