



Original Article / 원저

## 탁리소독음 피부외용제형의 급성경피독성시험, 피부자극시험 및 안점막자극시험

이정복<sup>1</sup>, 최재환<sup>2</sup>, 김희택<sup>3</sup>, 김윤경<sup>4,5</sup>, 유영범<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>소니메디 한방생명과학연구소, <sup>2</sup>(주)인투바이오 피부융합연구소, <sup>3</sup>세명대학교  
한 의과대학, <sup>4</sup>원광대학교 약학대학 한약학과, <sup>5</sup>원광한약연구소, <sup>6</sup>남부대학교  
한방제약개발학과

## Acute toxicity, Dermal and Ocular Irritation Studies of Taglisodog-eum ointment

Jung Bok Lee<sup>1</sup>, Jae Hwan Choi<sup>2</sup>, Hee Taek Kim<sup>3</sup>, Yun Kyung Kim<sup>4,5</sup>, Young Beob Yu<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>SONIMEDI R&D Center, <sup>2</sup>IN2BIO co. Ltd. R&D Center, <sup>3</sup>College of  
Oriental Medicine, Semyung University, <sup>4</sup>Department of Korean  
Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, <sup>5</sup>Wonkwang  
Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University,  
<sup>6</sup>Department of Herbal Pharmaceutical Development, Nambu University

### ABSTRACT

**Objectives** : Taglisodog-eum(TSE), a poly herbal formula, has been widely used to improve carbuncles by removing inflammation of the lymphatic channels in Traditional Korean Medicine. We previously reported the action mechanism of TSE on experimental atopic dermatitis and the establishment of formulation for TSE ointment. In this study, we examined the toxicity test on skin and eye irritation by TSE ointment to prove the safety of Taglisodog-eum ointment in clinical use.

**Methods** : Acute skin toxicity of the TSE ointment was evaluated in Sprague-Dawley(SD) rats. After dermal administration of

TSE ointment(2,000mg/kg), body weight, mortality, and clinical signs of the rats were observed for 14days. Primary skin irritation and ocular irritation tests for TSE ointment were performed in male New Zealand White Rabbits. In dermal and ocular irritation test, body weight, mortality, clinical signs, Primary Irritation Index(P.I.I.), and The Index of Acute Ocular Irritation(I.A.O.I.) of rabbit were observed after applying at abraded skin and eye balls with Taglisodog-eum ointment.

**Results** : In the results of acute skin toxicity, no significant differences were found in body weight, the clinical sign and the mortality between control and TSE ointment treated group. In primary dermal irritation test, body weight, the clinical sign and the mortality were not significantly changed and Primary Irritation Index(P.I.I.) was 0.8, indicating TSE ointment as weak irritant material. In ocular irritation test, The Index of Acute Ocular Irritation was 0.0, indicating TSE ointment as non-irritating to the eye of the rabbits. To evaluate toxicity of the TSE ointment in animal test, body weight, the clinical signs, the skin and eye irritation check were conducted; TSE ointment was considered to be weak dermal irritant in test animals. The no response of eye irritation test was observed in this experimental condition.

**Conclusions** : According to the above toxicity test, We consider that this results is helpful for saying about the safety of TSE ointment in clinical use.

**Key words** : Taglisodog-eum, ointment, Acute toxicity, Dermal and Ocular Irritation

## I. 서론

한의약에서 널리 활용되어온 처방들이 전임상, 임상에서 효능과 안전성 과정을 거쳐 일반의약품 및 전문의약품의 형태로 출시되고 있다. 기존 한약제제의 효능과 더불어 새로운 효능, 효과를 밝히거나 제형의 변화를 통하여 적용성이 확장된 제품을 개발하려는 노력이 급속히 이루어지고 있다. 저자 등은 한방에서 다빈도로 활용되어온 탁리소독음 한약제제의 적용확장성을 위하여 아토피 피부외용제로 개발을 시도하였으며, 전임상에서의 그 효능과 메카니즘을 밝혀 보고하였다<sup>1,2)</sup>. 본 연구는 동물실험에서 효능과 기전이 입증된 탁리소독음을 임상에 적용해 보기 위해 외용제제로 만든 후 전임상 독성시험을 실시하였다. '탁리소독음'은 동의보감, 방약합편 및 의학입문에 수재된 처방으로 감초, 금은화, 당귀, 복령, 작약, 백지, 백출, 연교, 인삼, 진피와 황기를 주원료로 구성되어있다. 탁리소독음은 기혈(氣血)이 독사(毒邪)에 의해 막혀서(阻滯) 기육(肌肉)과 골(骨) 사이에서 발생하는 창종(瘡腫)의 하나인 용저(癰疽)에 주로 사용되며, 원기허약(元氣虛弱)

등에도 임상에서 처방되고 있다<sup>3)</sup>. 또한 탁리소독음은 기존 식품의약품 안전처의 허가 과립제로서 '기타의 중앙치료제'로서 품목분류가 이루어져 있다. 화농성 임파선염, 항문주위염, 유선염 등의 효능효과로 10여 개의 제약회사에서 일반의약품을 생산하고 있는 품목이다. 이러한 효능효과에 근거하여 탁리소독음을 아토피 피부부염 외용제로 개발을 시도하였다. 아토피 환자의 경우 혈청내 nerve growth factor<sup>4)</sup>나 substance P<sup>5)</sup>, brain derived growth factor<sup>6)</sup>의 농도가 높게 나타나는 병의 경중 정도와 연관성이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 brain derived growth factor는 eosinophil의 apoptosis 정도를 감소시켜 accumulation을 통해 염증반응이 심화시킨다고 알려져 있다<sup>7)</sup>. 또한 아토피 환자들은 피부 표면에 *Staphylococcus aureus*가 많이 colonization하며 여기서 분비되는 toxin인 super antigen이 T cell과 macrophage를 activation시켜 아토피 증상을 심화시킨다고 알려져 있다<sup>8)</sup>. 아토피 피부에는 박테리아, 곰팡이, 바이러스에 대한 host defense에 필요한 antimicrobial peptide도 부족하여 skin infection에 대한 susceptibility가 높다고 알려

\* Corresponding author : Young-Beob Yu, Department of Herbal Pharmaceutical Development, Nambu University, 23, Cheomdanjungang-ro, Gwangsan-gu, Gwangju, 62271, Republic of Korea.

Tel : +82-62-970-0163 Fax : +82-62-970-0163, E-mail : ybyu@nambu.ac.kr

• Received : October 26, 2016 / Revised : November 14, 2016 / Accepted : November 24, 2016



저 있다<sup>9)</sup>. 한의학에서는 아토피 피부염의 병인을 모체의 자극성 음식 섭취로 열이 태아에게 침입(胎毒) 유전적 요인(稟賦不足)과 생선류, 기름기 많은 음식관계 그리고 혈액과 진음(津陰)을 손상시켜 피부를 영양하지 못하여 발생한다고 생각하고 있다. 이는 홍반(紅斑), 수포(水疱), 구진(丘疹), 삼출(滲出), 결가(結痂), 소양증 등 다양한 피부 증상이 나타나는 질환을 포함하고 있다<sup>10,11)</sup>. 이렇듯 아토피는 염증과의 중요한 관련성이 알려져 있어, 한의학 처방에서 각종 염증제어와 관련한 탁리소독음 제제를 외용제로 개발하기 위한 소재로 선택하였고, 전보에서 이의 전 임상 효능을 과학적으로 밝혔다. 본 연구에서는 탁리소독음 외용제형의 전임상 안전성을 평가하기 위하여 급성경피독성시험, 피부자극시험, 안점막자극시험을 실시하여 그 안전성을 평가하였기에 보고하고자 한다. 저자 등은 한약의 안전성에 관한 연구를 지속적으로 수행하여 가미홍화탕의 랫드와 Beagle견에 대한 단회경구투여독성시험<sup>12)</sup>, 가미삼황산의 단회경구투여독성시험<sup>13)</sup>, 사물탕의 급성독성<sup>14)</sup>, 팔물탕의 급성독성<sup>15)</sup>, 팔물탕의 4주 반복독성투여 독성시험<sup>16)</sup>, 십전대보탕의 급성독성 시험<sup>17)</sup> 등에 관하여 연구논문을 보고한 바 있다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용한 시료는 광명당제약(울산, 한국)에서 원료의약품으로 생산되는 제품을 시험성적서와 함께 공급받아 사용하였다. 시료의 식물학적 동정은 남부대학 한방제약개발학과 유명범 교수에게 받았으며, 남부대학 한방제약개발학과 한약약리학 실험실에 voucher specimen (NBU-HP-574-600)을 보관 중이다.

### 2. 원료의 추출 및 제형구성

시료로 사용한 인삼(Ginseng Radix) 1.25 g, 황기(Astragali Radix) 1.25 g, 작약(Paeoniae Radix) 1.25 g, 당귀(Angelicae Gigantis Radix) 1.25 g, 백출(Atractylodis Rhizoma Alba) 1.25 g, 진피(Citri Unshii Pericarpium) 1.25 g, 연교(Forsythiae Fructus) 1.25 g, 금은화(Lonicerae Flos) 1.25 g, 복령(Hoelen) 1.25 g, 백지(Angelicae Dahuricae Radix) 0.63 g 및

감초(Glycyrrhizae Radix) 0.63 g을 각각 정선하여 약전 통칙 중 절도에 따라 조절로 하였다. 그리고 추출기에 넣고 10 배량의 70% 에탄올을 넣어 80℃에서 5시간 추출하여 추출액을 여과하고 여액을 60℃ 이하에서 감압농축(N-1100, Eyela, Japan)하고 동결건조(본디로, 일신바이오베이스, 한국)한 건조엑스 1.2 g을 얻었다. 동결 건조한 탁리소독음 건조엑스를 5%로 하는 제형을 확립하기 위하여 유화제 모노스테아린산글리세릴과 글리세릴스테아레이트의 의 함량을 변화시켜 최적 제형을 구성하였다. 제형은 먼저 원료를 칭량, 1차 유화, 2차 유화를 실시하고 주성분인 탁리소독음 건조엑스를 용제에 녹여 3차 유화를 실시한 후 냉각 탈포하여 제형을 완성하였다.

### 3. 시험동물 및 사육환경

급성경피독성시험을 위해 특정병원체 부재한 8주령의 암수 Sprague-Dawley 랫드를 (주)코아텍으로부터 구입하여 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 사용하였다. 피부자극시험은 New Zealand White rabbit 8주령(1524 ~ 1837 g) 수컷 6마리를 (주)샘타코에서 구입하여 사용하였고, 안점막 자극성 평가에는 New Zealand White rabbit 9주령의 수컷(1478~1737 g) 9마리를 (주)샘타코에서 구입하여 시험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 20 ± 3℃, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간 (형광등 조명 오전 8시~오후 8시), 조도 200~300 Lux로 유지하였다. 랫드의 경우 랫드용 스테인레스제 망사육장(250W×350L×180H mm)에 1마리씩 개별 사육하였다. 토끼는 토끼용 스테인레스 사육상자(380W×500D×300H mm)에 1마리씩 넣어 사육하였고, 랫드와 토끼 모두 음수와 사료는 자유로이 급여하였다. 사료는 랫드용 고품사료(두얼바이오텍, 경기, 한국)와 토끼용 고품사료(퓨리나코리아, 경기, 한국)를 각각 자유 섭취시켰으며, 물은 상수도수를 소독시킨 후 자유 섭취시켰다.

### 4. 급성경피독성시험

시험물질을 비설치류에 단회 투여하고 그 후 시험계의 일반상태의 변화를 주된 지표로 하여 개략적인 치사량을 구할 목적으로 급성경피독성시험을 실시하였다. 실험은 식품의약품안전처 고시 제2009-183호의 '비

임상시험관리기준<sup>18)</sup> 및 식품의약품안전성 고시 제 2009-116호의 '의약품 등의 독성시험기준<sup>19)</sup>'에 의거하여 실시하였다. SD Rat를 이용하여 대조약 (수컷 5마리, 암컷 5마리), 시험약 (수컷 5마리, 암컷 5마리)으로 경피에 2,000 mg/kg의 크림제제 투여 하였다. 시험물질은 투여 하루 전에 구간배부를 중심으로 체표면적의 20% 이상을 제모한 후 첩포 거즈에 시험물질을 도포하여 비자극성 테이프를 이용하여 피부에 밀착시켰다. 24시간이 지난 후에 비자극성 테이프를 제거하고 멸균증류수를 적신 거즈를 이용하여 시험물질을 닦아주었다. 일반증상은 투여직후 매시간 6시간 까지 관찰하고 그 후로는 매일 1회 14일까지 관찰하였다. 체중은 투여전, 투여후, 1, 3, 7 및 14일에 측정하였다. 체중의 변화는 일원배치 분산분석을 이용하여 구간 비교하였으며, 반수치사량은 사망동물이 관찰되지 않아 실시하지 않았다.

## 5. 피부자극시험

시험물질을 토끼 피부에 적용한 후에 국소적으로 나타나는 자극성 및 정도 평가 목적으로 피부자극시험을 실시하였다. 시험군은 수컷 6마리를 이용하여 각 동물의 경배부에 약 2.5×2.5 cm 정도의 크기로 척추를 중심으로 좌우 2구획씩 설정하여 좌측구획은 시험물질을 적용하는 처치부위로, 우측구획은 대조부위로 하였다. 제모는 시험물질 적용 약 24시간 전에 실시하였으며, 도포부위는 찰과피부 2개소와 비찰과피부 2개소로 하였다. 2개소의 찰과피부는 수정칼(도루코)을 이용하여, 각질층은 손상되나 진피는 손상되지 않고 피가 나지 않을 정도로 찰과상을 입혔다. 투여량은 찰과피부 1개소와 비찰과피부 1개소에 각각 0.5 mL씩 흡수성 거즈를 이용하여 1회 적용하였으며, 시험물질이 적용 부위에 잘 고정 되도록 침투성이 없고 반응성이 없는 비닐(Tegaderm 1626W, 3M Health Care)로 덮은 다음 잘 고정 후 접착식 탄력붕대(Coban 1583, 3M Health Care)등을 사용하여 고정 후 24시간 폐쇄 첩포 시켰다. 대조구획은 멸균생리 식염수(4015P61, 대한약품공업주식회사)를 0.5 mL 처리한 흡수성 거즈를 동일한 방법으로 고정하였다. 시험물질을 피부에 24시간 동안 노출시킨 후 시험 물질이 잔류되지 않도록 미온의 멸균생리식염수(4015P61, 대한약품공업주식회사)를 이용하여 도포부위를 부드럽게 세정해 주었다. 피부반응 평가는 식품의약품안전청 고시 제 2009-116

호(2009. 08. 24) '의약품 등의 독성시험기준<sup>19)</sup> 및 '피부반응의 평가법 및 피부 일차자극표'에 따라 실시하고, 시험물질 적용 후 24시간 및 72시간 때의 홍반 평점과 부종 평점을 더해서 평균치를 산출하고 평균의 합계를 4로 나누어 피부자극성을 평가하였다. 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 1차 자극지수(PII, primary irritation index)의 산출방법에 따랐다<sup>20,21)</sup>.

## 6. 안점막자극시험

시험물질을 토끼의 안점막에 적용한 후에 국소적으로 나타나는 안점막자극성 평가를 목적으로 안점막 자극시험을 실시하였다. 실험개시 24시간 전에 모든 동물을 대상으로 Slit Lamp (ECONOMSET, 독일)를 이용하여 안검사를 실시한 후, 안구손상 등 각막, 결막, 홍채등에 손상이 없는 건강한 동물임을 확인하고 투여 당일 체중을 측정하여 2.0 ~ 3.0 kg의 동물만을 선택한 후, 무작위로 선별하여 시험에 사용하였다. 시험물질은 건강한 수컷 9마리를 이용하여 세안군 3마리와 비세안군 6마리로 구성하여 시험물질을 결막낭에 투여하였다. 세안군과 비세안군 동물에 대해서 좌측 안구를 시험물질 처치구획으로, 우측 안구를 대조구획으로 설정하였다. 좌안 결막낭 내에 시험물질을 1회 0.1 mL 적용하고 적용 후 시험물질의 누출방지를 위해 양 안검을 잡아 약 1초간 폐안시켰다. 세척군 3마리에 관해서는 점안 20~30초 후 양쪽 눈을 미온의 멸균생리 식염수(4015P61, 대한약품공업주식회사)로 세척을 하였고 비세안군은 이를 실행하지 않았다. 모든 동물에서 투여 후 1시간째에 생리적 기전에 의해 시험물질이 제거되지 않을 경우에도 양안 모두 미온의 멸균생리 식염수로 잔류물이 없도록 세척하였다. 식품의약품안전청 고시 제2009-116호(2009. 08. 24) '의약품등의 독성시험기준<sup>19)</sup>'에 따라 용량 설정을 하였다. 외관, 사료섭취 및 물 섭취 상태, 사망동물의 유무 등을 시험물질 적용 후 시험종료일까지 매일 관찰하였다. 시험물질 적용 직전과 적용 후 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일 후에 개체별 체중을 측정하였다. 시험물질 적용 후 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째에 slit Lamp(제조사 : ECONOM SET, 독일)를 이용하여 각막, 홍채, 결막에서의 자극성 유무를 관찰하였다. 안점막반응 평가는 식품의약품안전청 고시 제2009-116호(2009. 08. 24) '의약품등의 독성시험기준<sup>19)</sup>' 평가표 및 '안구병변의



등급표'에 준하여 실시하였다. 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 안구병변의 등급에 따른 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째의 개체별안자극지수[I.I.O.I (The individual index of ocular irritation)]를 산출하였고, 이를 이용하여 각 시기별 평균안자극지수 [M.I.O.I (Mean index of ocular irritation)]를 산출하였으며, 평균안자극지수 중 최고치를 급성안자극지수 [I.A.O.I (The index of acute ocular irritation)]로 이용하여 안자극성판단기준표에 따라 안점막 자극 정도로 구분하였다<sup>20,22)</sup>.

### III. 결과

#### 1. 급성경피독성시험

시험물질인 탁리소독음 연고에 대한 급성경피투여독성시험을 Sprague-Dawley(SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 0 및 2,000 mg/kg b.w 용량으로 시험을 실시하였다. 시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았으며, 모든 시험동물에서 특이한 일반증상과 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다. 체중측정결과, 군간 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다. 대부분의 시험동물에서 투여 후 1일에 일시적인 체중감소가 관찰되었으나, 투여 중 철폐 또는 사육 스트레스에 의한 증상으로 판단된다. 투여 후 3 및 14일에 관찰된 체중 감소는 부형제대조군에서도 관찰되었고, 발생빈도가 적어 우발적으로 발생한 것으로 추정된다. 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보아 탁리소독음 연고의 반수치사량(LD<sub>50</sub>, Lethal Dose 50)은 2,000 mg/kg b.w 이상으로 판단된다.

#### 2. 피부자극시험

시험물질인 탁리소독음연고의 1차 피부자극성을 조사하기 위하여 6마리의 New Zealand White계 수컷 토끼에 시험물질 0.5 mL을 비찰과 피부와 찰과 피부에 적용한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 피부반응을 평가하였다. 시험결과, 본 시험물질 적용으로 기인된 일반증상, 반사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다 (Table 5). 체중 측정 결과 투여 후 체중이 투여 시 체중에 비해 약간의 감소가 관찰되었으나 투여 스트레스로 인한 일시적인 증상으로 사료된다. 시험물질 적용에 기인된 체중변화는 관찰되지 않았다. (Table 6)

시험물질을 적용 후 비찰과 부위 피부반응 결과 적용 24시간째 4/6례의 아주 가벼운 홍반과 2/6례의 뚜렷한 홍반이 관찰되었고 72시간째의 경우 피부반응이 관찰되지 않았다. 찰과 부위 피부반응 결과 적용 24시간째 3/6례의 아주 가벼운 홍반과 4/6례의 뚜렷한 홍반이 관찰되었고 72시간째의 경우 2/6례의 아주 가벼운 홍반이 관찰되었다. 대조부위에서 찰과 부위 및 비찰과부위에서 피부반응 결과 적용 24시간째 찰과 부위에서만 3/6례의 아주 가벼운 홍반이 관찰되었으며 72시간째의 경우 1/6례의 아주 가벼운 홍반이 관찰되었다. 대조부위에서 찰과 부위 및 비찰과부위에서 피부반응 결과 적용 24시간째 찰과 부위에서만 2/6례의 아주 가벼운 홍반이 관찰되었으며 72시간째의 경우 1/6례의 아주 가벼운 홍반이 관찰되었다. 시험물질인 탁리소독음 연고의 도포 24 및 72시간째 피부반응 평가결과 평균점수는 '3.3', 1차 피부 자극지수(P.I.I.; Primary Irritation Index)가 '0.8'로 약한 자극성 물질로 평가되었다 (Table 7).

#### 3. 안점막자극시험

시험물질인 탁리소독음 연고의 안점막자극성을 조사하기 위하여 9마리의 New Zealand White계 수컷 토끼에 시험물질 0.1 mL을 결막낭 내에 처치한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 안자극성을 평가하였다. 시험결과, 모든 동물에 있어서 시험물질 적용부위를 제외하고 특이한 일반증상은 관찰되지 않았으며, 반사 및 폐사 동물은 발견되지 않았다 (Table 8). 체중 측정 결과 투여 후 체중이 투여 시 체중에 비해 약간의 감소가 관찰되었으나 투여 스트레스로 인한 일시적인 증상으로 사료된다. 시험물질 적용에 기인된 체중변화는 관찰되지 않았다 (Table 9). 세척군의 시험물질 적용 부위인 좌안 세척군과 대조부위인 우안세척군에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째 모든 시험기간 중 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다. 비세척군의 시험물질 적용부위인 좌안 비세척군과 대조부위인 우안세척군에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째 모든 시험기간 중 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다 (Table 10). 세척군의 M.I.O.I (Mean index of ocular irritation)는 시험물질적용부위인 좌안과 대조안구인 우안에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째 모두 0.0으로 판정되었다. I.A.O.I (The index of acute ocular irritation)는 M.I.O.I 최대값으로 시험물질적용 부위인 세척군의 좌

안에서 0.0으로, 대조안구인 우안은 0.0으로 판정되었다. 비세척군의 M.I.O.I 는 시험물질적용부위인 좌안과 대조안구인 우안에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째 모두 0.0으로 판정되었다. 시험물질적용 부위인 좌안 비세척군에서 I.A.O.I는 0.0이었으며 대조안구인 우안도 0.0으로 판정되었다 (Table 10). 이상의 결과에서 탁리소독음 연고의 안점막 적용 시 일반증상, 사망률 및 체중에 영향은 주지 않았으며 New Zealand White 계 수컷 토끼의 안점막에 적용 후 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째의 세척군 및 비세척군의 안자극을 판정하였을 때, 『Table 2. Evaluation of eye irritation』에 의한 급성안자극지수(I.A.O.I)는 0.0으로 무자극성 (Non Irritant) 물질로 평가되었다.

#### IV. 고찰

근래에 들어와서 한약처방의 제형변화, 효능, 효과의 용도변경 등을 통한 한약제제 의약품개발이 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서도 한방에서 각종 용종에 널리 활용되어온 탁리소독음 제제를 아토피피부염의 효능평가를 통해 그 효능을 확인하였고 이의 임상 적용확장성을 위하여 탁리소독음 연고제를 개발하기 위하여 전임상 독성실험을 실시하였다.

의약품인 한약은 농산물로 재배되거나 자연에서 채취되기도 하며, 복잡한 구성성분을 포함하고 있다. 이러한 한약제들을 처방하여 더욱 복잡한 복합제제로 사용하여 안전성을 파악하는데 상당한 어려움을 겪고 있다. 자연에서 재배하는 한약제는 잔류농약, 중금속, 토양부착 미생물 등 그 위해요소를 다분히 함유하고 있을 수 있다. GMP 제약시설에서 생산되는 한약제제의 경우 이러한 위해요소를 최소화하기 위한 노력을 하고 있다. 이러한 한약제제의 활용성을 극대화 하기 위하여 다양한 방안들이 제시되고 있으며, 그 중 하나로 제형의 변화를 들고 있다. 기존의 약탕기에서 추출된 액제의 경우 보관에 어려움이 있으며, 휴대가 불편하고, 복용량도 많아 현대인의 기호에 맞지 않는 부분이 있다. 이에 부응하기 위해 정제나 과립, 연고제 등의 개발을 시도하고 있으며 저장성과 복용성, 휴대성을 확보하기 위해 몇몇 공공연구소와 한방제약회사들이 노력을 경주하고 있는 실정이다. 본 연구에서도 한약제제의 적용 확장에 부응하기 위하여 제형의 변화를 시도하였고, 기존 내복약 과립제의 탁리소독음 제형을

아토피피부염에 사용되는 외용제로 개발하기 위하여 효능평가, 안전성 등의 연구를 수행하였다. 본 연구는 그 중 탁리소독음 외용제의 전임상 안전성에 관한 것이다.

탁리소독음 연고에 대한 급성경피투여독성시험을 Sprague-Dawley(SD)을 통하여 실시하였으며, 모든 시험동물에서 이상증상과 사망동물이 관찰되지 않았다. 또한 체중측정군간의 유의한 변화가 관찰되지 않았고 부검결과에서도 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과로 탁리소독음 연고의 반수치사량(LD<sub>50</sub>, Lethal Dose 50)은 2,000 mg/kg b.w 이상으로 판단하였다(Table 3, 4). 탁리소독음연고의 피부 자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White계 수컷 토끼에 시험물질 0.5 mL을 비찰과 피부와 찰과 피부에 적용하였다. 그 결과 일반증상, 체중변화, 반사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다 (Table 5,6). 시험물질을 적용 후 비찰과 부위 피부반응 결과 적용 24시간째 일부에서 가벼운 홍반이 관찰되었고, 찰과 부위 피부반응 결과 적용 24시간째 일부에서 아주 가벼운 홍반이 관찰되었다. 대조부위에서 찰과 부위 및 비찰과 부위에서 피부반응 결과 일부에서 아주 가벼운 홍반이 관찰되었다. 이상의 결과를 통해 시험물질인 탁리소독음 연고의 도포 피부반응 평가결과 1차 피부 자극지수 (P.I.I.; Primary Irritation Index)가 '0.8'로 약한 자극성 물질로 평가되었다 (Table 7). 탁리소독음 연고의 안점막자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White계 수컷 토끼에 시험물질 0.1 mL을 결막낭 내에 처치한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 안자극성을 평가하였다. 시험결과, 모든 동물에 있어서 일반증상, 빈사 및 폐사 동물은 발견되지 않았으며 (Table 8) 시험물질 적용에 기인된 체중변화는 관찰되지 않았다 (Table 9). 시험물질 투여 후 세척군, 비세척군의 좌안과 대조부위인 우안에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째 모든 시험기간 중 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다 (Table 10). 세척군과 비세척군 모두에서 M.I.O.I (Mean index of ocular irritation)는 시험물질적용부위인 좌안과 대조안구인 우안에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째는 모두 0.0으로 판정되었다. I.A.O.I (The index of acute ocular irritation)는 M.I.O.I 최대값으로 시험물질적용 부위인 세척군과 비세척군의 좌안에서 0.0이며 대조안구인 우안은 0.0으로 판정되었다 (Table 10). 본 시험조건에 탁리소독음



연고의 안점막 적용 시 일반증상, 사망률 및 체중에 영향을 주지 않았으며 안점막에 적용 후 안자극을 판정하였을 때, 급성안자극지수(I.A.O.I)는 0.0으로 무자극성(Non Irritant)물질로 평가되었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 탁리소독음 연고는 동물 피부적용 시 일반증상, 사망률 및 체중에 영향을 주지 않았으며, 1차 피부 자극지수(P.I.I.; Primary Irritation Index)가 0.8로 약한 자극성 물질로 평가되었고, 안자극 시험에서 급성안자극지수(I.A.O.I, The index of acute ocular irritaion)는 0.0으로 무자극성(Non Irritant) 물질로 평가되어 임상적 적용이 가능할 것으로 판단되

었다.

저자 등은 탁리소독음 제제의 효능확대를 위해 아토피 피부염 치료제로서의 가능성을 동물실험을 통하여 확인하였고, 산업화를 위한 기초연구로 외용제 제형을 확립하였으며, 탁리소독음 외용제 제형의 안전성 평가를 실시하여 그 임상적용가능성을 확립하였다. 본 연구의 후속연구를 통하여 다수의 한약제제의 새로운 효능, 효과를 발굴할 계획이며, 신제형을 확립하고, 안전성을 확보하여 한약제제가 한방의료의 중요한 축이 될 수 있도록 노력할 계획이다.

**Table 1.** Safety evaluation of primary dermal irritation in rabbits

Primary irritation index (P.I.I)	Classification
0.0~0.5	Non-irritant
0.6~2.0	Weak irritant
2.1~5.0	Moderate irritant
5.1~8.0	Severe irritant

**Table 2.** Draize scoring scale of ocular irritation evaluations

Index of acute ocular irritation	Classification
0.0 ~ 0.5	Non irritant
5 ~ 15	Mild irritant
5 ~ 30	Moderate irritant
30 ~ 60	Severe irritant
60 ~ 80	Extreme irritant
80 ~ 110	Maximal irritant

**Table 3.** Body weight changes of male rats treated with Taglisodog-eum ointment

	Animal No.	Days after treatment (g)				
		0-day	1-day	3-day	7-day	14-day
G1 (0 mg/Kg)	1	225.86	217.51	240.49	265.49	278.13
	2	230.86	223.46	240.08	258.23	289.37
	3	232.94	228.30	246.24	276.18	311.65
	4	234.67	232.85	246.39	270.17	278.56
	5	242.28	233.77	258.02	283.50	273.39
	Mean±S.D.	233.32±6.00	227.18±6.79	246.24±7.24	270.71±9.71	286.22±15.37
G2 (2,000 mg/kg)	6	224.93	217.77	229.40	251.22	270.35
	7	227.54	226.55	241.94	258.80	282.00
	8	232.69	232.49	250.03	280.67	295.97
	9	235.92	234.89	252.38	276.78	295.92
	10	236.53	225.57	250.70	277.98	282.12
	Mean±S.D.	231.52±5.13	227.45±6.69	244.89±9.55	260.09±13.20	285.27±10.85

**Table 4.** Body weight changes of female rats treated with Taglisodog-eum ointment

Animal No.	Days after treatment (g)					
	0-day	1-day	3-day	7-day	14-day	
G1 (0 mg/kg)	11	197.42	195.06	194.70	201.22	208.73
	12	201.85	200.27	204.85	213.36	215.99
	13	212.02	203.50	218.21	232.08	232.39
	14	212.01	205.30	210.53	219.58	227.42
	15	207.24	205.00	208.98	216.97	188.38
Mean±S.D.	206.11±6.42	201.83±4.28	207.45±8.62	216.64±11.13	214.58±17.36	
G2 (2,000 mg/kg)	16	206.58	202.28	199.10	210.08	223.72
	17	204.69	201.76	205.50	208.43	213.58
	18	209.94	203.50	212.17	231.75	238.77
	19	212.94	209.94	212.24	218.12	222.85
	20	221.40	225.65	226.69	234.35	241.40
Mean±S.D.	211.11±6.56	208.63±10.07	211.14±10.26	220.55±12.02	228.06±11.71	

**Table 5.** Mortality and clinical signs of rabbit treated with Taglisodog-eum ointment

No. of rabbits	Mortality	Clinical signs
6	0/6 <sup>a)</sup>	Normal

<sup>a)</sup> No. of dead animals/No. of tested animals

**Table 6.** Body weight changes of individual rabbit treated with Taglisodog-eum ointment

Animal No.	Days after treatment (g)			
	0-day	1-day	2-day	3-day
1	2552.18	2469.10	2533.91	2561.85
2	2263.61	2116.48	2207.19	2224.85
3	2045.36	2053.65	2004.16	2073.52
4	2063.51	2004.32	2072.31	2115.19
5	2049.00	2008.49	2088.71	2070.68
6	2148.09	2030.02	2108.49	2149.86
Mean±S.D.	2186.96±197.53	2113.68±178.86	2169.13±190.39	2199.32±186.54

**Table 7.** Dermal irritation of rabbit treated with Taglisodog-eum ointment

change	site				control site								test site							
	change				Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema			
	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded	
Phases (hours) <sup>a)</sup>	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	2	1	8	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	1.3	0.0	1.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ΣMean Score					0.5								3.3							
PII <sup>b)</sup>					0.1								0.8							

<sup>a)</sup> Time after topical application

<sup>b)</sup>PII (primary irritation index) = total/4





**Table 8.** Mortality and clinical signs of rabbit treated with Taglisodog-eum ointment

Group	No. of animals	Mortality	Clinical signs
T1 (No eye washing)	6	0/6 <sup>a)</sup>	Normal
T2 (Eye washing)	3	0/3	Normal

<sup>a)</sup>No. of dead animals/No. of tested animals

**Table 9.** Body weight changes of rabbit treated with Taglisodog-eum ointment

Animal No.	Days after treatment (g)					
	0-day	1-day	2-day	3-day	4-day	
Rinsed	1	2004.76	2036.86	2048.67	2078.90	2081.49
	2	2011.92	2068.59	2076.46	2109.53	2088.68
	3	2077.26	2066.94	2126.96	2159.05	2175.75
	4	2262.77	2315.35	2357.38	2344.89	2365.43
	5	2001.43	2012.02	2017.97	2071.85	2077.35
	6	2201.17	2215.27	2244.17	2293.55	2376.18
Non rinsed	7	2012.13	2072.60	2040.41	2111.24	2123.53
	8	2003.62	2026.81	2063.89	2044.23	2016.66
	9	2025.93	2057.13	2014.32	2020.50	2010.66
Mean±S.D.	2066.78±97.69	2096.84±100.82	2110.03±116.71	2137.08±111.48	2146.19±136.81	

**Table 10.** Ocular irritation of rabbit treated with Taglisodog-eum ointment

Group	Animal No.	Rinsed						Nonrinsed			
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	
Cornea	Degree of opacity (A)	1day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Diffuse areas of opacity (B)	1day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Iris (C)	1day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7day		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Conjunctiva	Redness (D)	1day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Edema (E)	1day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4day	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7day	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Conjunctiva	Discharge(F)	1day	0	0	0	0	0	0	0	0
		2day	0	0	0	0	0	0	0	0
		3day	0	0	0	0	0	0	0	0
		4day	0	0	0	0	0	0	0	0
		7day	0	0	0	0	0	0	0	0
I.I.O.I		1day	0	0	0	0	0	0	0	0
		2day	0	0	0	0	0	0	0	0
		3day	0	0	0	0	0	0	0	0
		4day	0	0	0	0	0	0	0	0
		7day	0	0	0	0	0	0	0	0
M.I.O.I		1day			0.0 <sup>a)</sup>				0.0	
		2day			0.0				0.0	
		3day			0.0				0.0	
		4day			0.0				0.0	
		7day			0.0				0.0	

※ L : Test treatment                      ※ R : Control

I.I.O.I (The individual index of ocular irritation) = (A× B× 5) + (C×5) +(D+E+F) × 2

M.I.O.I (Mean index of ocular irritation) : from 1day to 7day

<sup>a)</sup>I.A.O.I (The index of acute ocular irritation) = the maximum value of M.I.O.I

## V. 결론

한약제제의 일종인 탁리소독음의 임상적용 확장성을 고려하여 아토피피부외용제를 개발을 시도하였으며 이를 위해 전임상 독성학적 안전성을 평가하였다. S.D. Rat를 활용한 급성경피독성시험, New Zealand White계 토끼를 활용한 피부자극시험과 안점막자극시험을 실시하여 그 안전성을 평가여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 탁리소독음 연고에 대한 급성경피투여독성시험을 Sprague-Dawley(SD)을 통하여 실시하였으며, 시험동물에서 이상증상과 사망동물이 관찰되지 않았고, 유의한 체중의 변화가 관찰되지 않았으며, 부검결과에서도 특이한 육안소견이 관찰되지 않아, 반수치사량(LD<sub>50</sub>, Lethal Dose 50)은 2,000 mg/kg b.w 이상으로 판단하였다.
2. 탁리소독음 연고의 피부자극성시험을 위해 New Zealand White계 수컷 토끼에 시험물질 0.5 mL을 비찰과 피부와 찰과 피부에 적용하였으며, 그 결과 일반증상, 체중변화, 반사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다.
3. 피부자극시험에서 시험물질을 적용 후 비찰과 부위 피부반응 결과 적용 24시간째 일부에서 가벼운 홍반이 관찰되었고, 대조부위에서도 찰과 부위 및 비찰과부위에서 일부에서 아주 가벼운 홍반이 관찰되었다. 이같은 결과를 통해 탁리소독음 연고의 피부 반응 평가결과 1차 피부 자극지수(P.I.I.; Primary

Irritation Index)가'0.8'로 약한 자극성 물질로 평가되었다.

4. 안점막자극성은 New Zealand White 토끼에 시험 물질 0.1 mL을 결막낭 내에 처치한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 안자극성을 평가하였으며, 시험결과, 모든 동물에 있어서 일반증상, 체중의 변화, 반사 및 폐사 동물은 발견되지 않았다.
5. 안점막 자극시험에서 시험물질 투여 후 세척군, 비 세척군의 좌안과 대조부위인 우안에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째 모든 시험기간 중 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다
6. 안점막 자극시험의 시험물질 세척군과 비세척군 모두에서 M.I.O.I (Mean index of ocular irrtraion)는 시험물질적용부위인 좌안과 대조안구인 우안에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째는 모두 0.0으로 판정되었다. 따라서 급성안자극지수(I.A.O.I)는 0.0으로 무자극성(Non Irritant)물질로 평가되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 탁리소독음 연고는 동물실험의 피부적용 시 일반증상, 사망률 및 체중에 영향을 주지 않았으며, 1차 피부 자극지수(P.I.I.; Primary Irritation Index)가'0.8'로 약한 자극성 물질로 평가되었고, 안자극시험에서 급성안자극지수(I.A.O.I, The index of acute ocular irritaion)는 0.0으로 무자극성(Non Irritant)물질로 평가되어 임상적 적용이 가능할 것으로 판단되었다.

## 감사의 글

이 논문은 보건복지부 한의약선도기술개발사업(과제 고유번호 B090072)의 지원에 의하여 연구되었음.

## References

1. Hwang JS, Kim JE, Kim HT, Yu YB, Im SH. Topical application of Taglisodog-eum inhibits the development of experimental atopic dermatitis. *J Ethnopharmacol.* 2013;145(2):536-46.
2. O Mj, Yu YB, Lim SH, Kim HT. A clinical study for the effect of ointment contained Takrisodok-Eum on recovering the damaged skin barrier by Atopic dermatitis. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2011;24(3):84-107.
3. Lee SM, Hong SU. The Effects of Taklisodok-eum Extract on Acute Sinusitis-induced mouse. *J Korean Orient Med.* 2008;29(4):1-12.
4. Horiuchi Y, Bae S, Katayama I. Nerve growth factor (NGF) and epidermal nerve fibers in atopic dermatitis model NC/Nga mice. *J Dermatol Sci.* 2005;39(1):56-8.
5. Ostlere LS, Gordon DJ, Ayliffe MJ, Rustin MH, Pereira RS, Holden CA. Substance P binding to peripheral blood mononuclear leukocytes in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1997;77(4):260-3.
6. Takano N, Sakurai T, Kurachi M. Effects of anti-nerve growth factor antibody on symptoms in the NC/Nga mouse, an atopic dermatitis model. *J Pharmacol Sci.* 2005;99(3):277-86.
7. Raap U, Deneka N, Bruder M, Kapp A, Wedi B. Differential up-regulation of neurotrophin receptors and functional activity of neurotrophins on peripheral blood eosinophils of patients with allergic rhinitis, atopic dermatitis and nonatopic subjects. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(9):1493-8.
8. Jinnestal CL, Belfrage E, Back O, Schmidtchen A, Sonesson A. Skin barrier impairment correlates with cutaneous *Staphylococcus aureus* colonization and sensitization to skin-associated microbial antigens in adult patients with atopic dermatitis. *Int J Dermatol.* 2014;53(1):27-33.
9. Mutou Y, Ibuki Y, Kojima S. Immunomodulatory effects of ultraviolet B irradiation on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2007;23(4):135-44.
10. Kim GS, Lee JY, Kim DK. An experimental study on the anti-allergic effect of the Taklisodok-um. *J Korean Orient Pediatr.* 1994;8(1):27-37.
11. Weon Ho, Hwang CY, Lim KS, Kim JH, Ko SG, Lee BK, Lee DH, Kim NK. Effect of Taklisodok-um and Hwangryunhaedok-tang on Atopic Dermatitis. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2011;24(1):121-41.
12. Yu YB, Sung HJ, Yoon YS. Acute oral toxicity study of standardized Gami-Honghwa-Tang (KH-19) in Rats and Beagle Dogs. *J Toxicol Pub Health.* 2005;21(1):63-70.
13. Yu YB, Kim SH, Yoon YS. Acute oral toxicity study of standardized herbal preparations (Gami-Samhwang-san, SH-21-B) in Rats. *J Toxicol Pub Health.* 2005;21(3):255-261.
14. Ma JY, Yu YB, Ha HK, Huang DS, Ma CJ, Shin HK. Acute toxicity study on Samul-tang (Siwu-tang) in Mice. *Herb Formula Sci.* 2007;15(2):113-117.
15. Ma JY, Yu YB, Ha HK, Huang DS, Shin HK. Acute toxicity study on Palmul-tang(Bawu-tang) in Mice. *Kor J Herbology.* 2007;22(2):13-16.
16. Ma JY, Yu YB, Ha HK, Huang DS, Shin HK. Subacute toxicity study on Panmultang (Bawu-tang) in SD Rats. *Kor J Herbology.* 2007;22(4):59-64.
17. Ma JY, Huang DS, Lee NH, Ha HK, Yu YB, Shin HK. Acute Toxicity Study on Sipjeondaebotang in Rats. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2008;22(5):1192-1195.
18. KFDA. Guidelines for Good Laboratory Practice. KFDA. notification. No. 2009-183. 2009.
19. KFDA. Toxicity study criteria of medicine and medical supplies. Seoul. KFDA. notification. No. 2009-116. 2009.

20. Draize JH, Woodard G and Calverry HO. Methods for the study of irritaion and toxicity of sub-  
stances applied topically to the skin and mucous  
membranes. J Pharmacol Exp Ther. 1994;82:  
377-90.
21. Patrick E and Maibach HI. Dermatotoxicology.  
In Hayes AW, Editor. Principles and Methods of  
Toxicology. 2nd ed. New York:Raven Press.  
1989:383-406.
22. Ballantyne B. Ophthalmic Toxicology in General  
& Applied Toxicology. Ballantyne B, ed. New  
York:Stockton Press. 1993:567-93.