pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 4, pp. 299~308 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.4.299

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

인삼양영탕 급성경구독성시험과 한국·중국·일본 문헌 비교 및 동물·인체 적용 용량에 대한 연구

신현규[1] · 서창섭[1] · 이미영[2]*
[1]한국한의학연구원 한의과학연구부, [2]한국한의학연구원 한의약융합연구부

Acute Oral Toxicity Test of Insamyangyoung-tang and a Comparative Study of Korean, Chinese, Japanese Literature, its Dosages Animal and Human Applications

Hyeun-Kyoo Shin[1], Chang-Seob Seo[1], Mee-Young Lee[2]*
[1]*Korea Medicine Science Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, Korea*
[2]*Korea Medicine Convergence Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, Korea*

(Received July 16, 2025/Revised August 18, 2025/Accepted August 18, 2025)

ABSTRACT - *Insamyangyoung-tang* (IYT; *Renshenyangrong-tang* in Chinese and *Ninjinyoei-to* in Japanese) is a traditional 14-herb formulation widely used in Korea, China, and Japan for overcoming fatigue. In this study, its major compounds were characterized using high-performance liquid chromatography multi-component analysis. An acute single-dose oral test was conducted in accordance with Korean Ministry of Food and Drug Safety guidelines. Sprague-Dawley rats (5 males and 5 females per group) were orally administered single IYT doses of 0, 1,000, 2,000, or 5,000 mg/kg. No deaths or abnormal clinical signs or gross pathological findings were observed, thus confirming the median lethal dose 50 (LD_{50}) of IYT in rats to be greater than 5,000 mg/kg. A literature review identified five reports (2 from Japan, 2 from China, and 1 from Korea) on the general toxicity of IYT, which indicated a lethal dose exceeding 160,000 mg/kg, an LD_{50} greater than 10,000 mg/kg, and a maximum tolerated dose exceeding 160,000 mg/kg. These findings suggest a lack of significant correlation between the toxicity dosages in animals suggested in the International Council for Harmonisation (ICH) and Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines and actual clinical dosages in humans. Given that dosages of traditional herbal formulations are already empirically well established for humans through extensive use, a multifaceted review of toxicity testing dosages in animals should be considered, moving beyond the current ICH and OECD guidelines.

Key words: *Insamyangyoung-tang*, Acute toxicity, Lethal dose, Human equivalent dose, Maximum recommended starting dose

인삼양영탕은 송나라 의서인 <태평혜민화제국방>에 기록된 허약증상을 개선하는 한약처방으로, 오늘날 동일 전통의학권역에 속하는 한국·중국·일본(이하 한·중·일)에서 복용하고 있는 의약품이다[1]. 식품의약품안전처(이하 식약처)는 효능으로 피로 권태, 병후 체력 저하, 식욕감퇴(식욕부진), 자한, 수족 냉증, 빈혈의 치료에 효능이 있다고 인정하고[2], 한약제제 제조 허가 시 안전성, 유효성 심사 자료 제출을 면제해 주고 있다[3].

현재 한·중·일에서 수행되는 한약처방 연구는 의약품 허가 목적 보다는 전통적 경험 효과를 세포 및 동물실험, 나아가 인체시험으로 확인하려는 학술적 목적으로 수행하고 있다. 이러한 연구들은 주로 효능 검증을 위한 유효성 연구가 주를 이루고 있고, 인체 무해성을 밝히는 안전성 연구는 희소한 상황이다. 인삼양영탕도 신경 손상 회복, 감염에 면역력 저항, 면역조절, 항 노화 및 피로 개선, 조혈작용, 항암 등 다양한 효과를 보고하였지만[4] 안전성에 대

*Correspondence to: Mee-Young Lee, Korea Medicine Convergence Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Korea
Tel: +82-42-868-9356, Fax: +82-42-861-5800
E-mail: cozy11@kiom.re.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

한 보고는 없는 실정이다.

다만 한약처방을 구성하는 한약재는 외부 요인에 의한 안전성 여부가 식약처 법적 관리 사항이고, 국민 건강에 대한 우려로 사회적 문제로 제기되어, 제조회사 자체 검사와 감독기관 모니터링을 통해 중금속, 잔류농약, 이산화황 유해물질 및 곰팡이 독소 검사 연구[5-8]가 다수 수행되고 있다. 반면에 한약재 물질 자체 독성 유무는 일반인들의 안전성 인식에서 제외되어 있고, 식약처의 의무 관리 사항도 아니므로, 이에 대한 독성연구는 아주 적은 편이다. 다만 정부 및 공공기관에서 과학적 안전성 근거 확보를 위해 식약처는 한약재를 중심으로[9], 한의학연구원은 한약처방을 대상으로[10] 다수의 독성시험 평가를 실시하였다.

한약재나 한약처방 독성시험은 식약처 지침[11]에 따라 시행되며, 이 지침은 의약품국제조화협의회(International Council for Harmonization, ICH) 독성시험 지침[12]과 경제협력개발기구(Organisation for Economic Co-Operation and Development, OECD) 독성시험 지침[13]에 기반을 두고 있다. 1990년에 설립된 ICH는 한국 식약처, 일본 후생노동성, 중국 국가약품감독관리국 등이 가입되어 의약품의 품질과 안전 및 효능 지침을 개발하고 있고[14], OECD는 회원국 38개국 중 일본(1964년), 한국(1996년), 중국(2007년)이 모두 가입되어 있다[15]. 따라서 이들 세 나라의 의약품과 식품 및 기타 물질 독성 평가는 모두 ICH와 OECD 지침을 따르고 있고, 본 연구도 이 지침에 따라 독성시험을 실시하였다.

식약처 독성시험 지침 안내서에 따르면, 독성시험 투여 용량 설정은 추정 임상용량이 미량이고 동시에 현저히 독성이 약한 시험물질에 대해서는 과학적인 근거에 기초하여 용량을 고려하고, 용량 설정시에 ICH나 OECD 지침을 참고하라고 하였다[16]. ICH 지침은 일반적인 급성 독성 연구에서 최대내성용량(maximum tolerated dose, MTD)이 적절하나 MTD 설정이 어려운 경우는 2,000 mg/kg/day 또는 최대투여가능용량(maximum feasible dose)을 권장하고 있다[17]. OECD 지침에서는 2,000 mg/kg을 기본으로 하나, 반수 치사량(lethal dose 50, LD_{50}) 값이 2,000 mg/kg을 초과하는 물질에 대해서는 2,000 mg/kg, 5,000 mg/kg 범위의 용량을 권고하고 있다[18]. 또 식약처 식품 등의 독성시험 안내서에서도 OECD 지침에 따라 2.000 mg/kg을 기본으로 하고 예외적으로 5,000 mg/kg을 권장하고 있다[19]. 이에 따라 기존 한약재 및 한약처방 급성독성시험 경구 투여 용량 또한 이 지침에 따라 투여 용량은 2,000 mg/kg 또는 5,000 mg/kg으로 하였고[9,10], 본 연구도 랫드 경구 투여 용량을 5,000 mg/kg으로 하였다.

한편 여러 한약재로 구성된 한약처방은 전임상과 임상시험 과정을 통해 연구 개발된 의약품이 아니라, 한의서에 근거한 의약품이다. 의약품 개발 과정 중 중요 요소인 인체 임상 복용량은 비임상 동물 독성시험 결과 값을 바탕으로 산정하고 있다[20]. 따라서 독성시험시 경구 투여 용량 설정은 매우 중요한 결정 사항이다. 한·중·일 전통의학계에서 약물 복용량은 한의서에 근거하고 있으며, 인삼양영탕도 <동의보감>에 1회 복용량은 86.0 g(원료 한약재 중량)으로 기록되어 있다[21]. 한약처방의 과학적 안전성 평가를 위하여 ICH와 OECD 동물 독성시험 투여 용량과 한의서 환자 복용량 관계를 살피지 않을 수 없다. 즉 한약처방 동물 독성시험 투여 용량 5,000 mg/kg 평가 결과만으로 임상 현장의 환자 복용량이 안전하다는 과학적인 근거가 될 수 있는가에 대한 검토 필요성을 가지게 되었다.

본 논문은 인삼양양탕으로 급성 경구 독성시험을 수행하고, 한·중·일 세나라의 문헌 DB를 통하여 독성연구 현황을 파악하고, 동물 독성시험 투여 용량에서 인체 복용량, 역순으로 인체 복용량에서 동물 독성시험 투여 용량을 상호 계산하여 비교하였다. 이는 향후 한의서에 근거한 한약재 원료 식품과 의약품에 대한 동물 독성시험 투여 용량과 인체 복용량 관계를 학술적으로 검토하는 기초자료가 되었으면 한다.

Materials and Methods

시험재료 및 시료 제조

인삼양영탕을 구성하는 한약재와 첨가 비율은 동의보감[21] 기준으로 제조하였으며, 원료는 광명당제약(Ulsan, Korea)으로 부터 규격품 한약재를 구입하였고, 이 내용은 Table 1에 제시되어 있다. 각각의 원료 한약재는 최고야 박사에 의해 동정하였으며 표본(KE80-1-KE80-14)은 한국한의학연구원 한의과학연구부(Daejeon, Korea)에 보관하였다. 인삼양영탕 물 추출물은 14종의 배합된 시료 5.0 kg에 물 50 L를 넣어 COSMOS-660 초고속진공저온추출기(KYUNGSEO E&P Co., Ltd., Incheon, Korea)로 100°C에서 2시간 동안 가압 추출하였다. 추출 후 CG-20341-270 표준체(53 mm, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 이용하여 여과한 뒤 PVTFD100R 동결건조기(IlSinBioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)를 사용하여 29.84%의 수율인 1491.9 g의 분말 시료를 얻었다. 제조된 시료는 -20°C (습도: 30%)에 보관하였다.

시약 및 기기

인삼양영탕의 품질관리를 위해 사용된 표준물질로 gallic acid (100.0%), hydroxymethylfurfural (99.0%), chlorogenic acid (99.7%), benzoic acid (99.9%) 및 coumarin (≥ 99.0%)은 Merck KGaA (Darmstadt, Germany), albiflorin (99.8%), liquiritin (99.6%), cinnamic acid (99.5%), cinnamaldehyde (98.0%) 및 glycyrrhizin (99.4%)은 Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan), *prim-O*-glucosylcimifugin (99.4%)은 ChemNorm Biotech Co., Ltd. (Wuhan, China), paeoniflorin (99.4%)과 liquiritin apioside (99.6%)는 Sunny

Table 1. Information of *Insamyangyoung-tang*

Herbal name	Scientific name	Family	Using part	Origin	Amount (g)	Ratio (%)
Paeoniae Radix	*Paeonia lactiflora* Pallas	Paeoniaceae	Root	Uiseong, Korea	788.65	15.75
Angelicae Gigantis Radix	*Angelica gigas* Nakai	Umbelliferae	Root	Pyeongchang, Korea	394.32	7.89
Ginseng Radix	*Panax ginseng* C.A.Meyer	Araliaceae	Root	Geumsan, Korea	394.32	7.89
Atractylodis Rhizoma Alba	*Atractylodes japonica* Koidz.	Compositae	Rhozome	Uljin, Korea	394.32	7.89
Astragali Radix	*Astragalus membranaceus* Bunge	Leguminosae	Root	Jecheon, Korea	394.32	7.89
Cinnamomi Cortex	*Cinnamomum cassia* J.Presl	Lauraceae	Bark	Vietnam	394.32	7.89
Citri Unshius Pericarpium	*Citurs unshiu* Markovich	Rutaceae	Peel	Jeju, Korea	394.32	7.89
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Preparata cum Melle	*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.	Leguminosae	Root and Rhizome	China	394.32	7.89
Rehmanniae Radix Preparata	*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) DC.	Plantaginaceae	Root	China	295.48	5.91
Schisandrae Fructus	*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon	Schisanraceae	Fruit	Samcheok, Korea	295.48	5.91
Saposhnikoviae Radix	*Saposhnikovia divaricate* Schischkin	Umbelliferae	Root	China	295.48	5.91
Polygalae Radix	*Polygala tenuifolia* Willd.	Polygalaceae	Root	China	196.64	3.93
Zingiberis Rhizoma Recens	*Zingiber officinale* Rosc.	Zingiberaceae	Rhizome	Seosan, Korea	157.73	3.15
Zizyphi Fructus	*Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder	Rhamnaceae	Fructus	Boeun, Korea	210.30	4.21
				Total	5000.00	100.00

Biotech Co., Ltd. (Shanghai, China), nodakenin (99.5%)은 ChemFaces Biochemical Co., Ltd. (Wuhan, China) 및 5-*O*-methylvisammioside (99.9%), narirutin (99.5%), hesperidin (98.6%) 및 schizandrin (99.3%)은 Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, China)로부터 각각 구입하여 사용하였다. 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 위한 유기용매인 methanol, acetonitrile 및 water는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하였으며, formic acid는 ACS-grade로 Merck KGaA로부터 구입하였다.

품질관리를 위한 HPLC는 pump (LC-20AT), on-line degasser (DGU-20A_3), column oven (CTO-20A), autosampler (SIL-20AC) 및 photo-diode array detector (PDA, SPD-M20A)로 구성된 Prominence LC-20A 시리즈 시스템 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하였다. 이 시스템은 LabSolution software (Version 5.54, Shimadzu)에 의해 데이터가 수집 및 처리되었다.

표준 용액 및 검액 조제

각 표준 화합물의 표준용액은 methanol을 이용하여 1,000 mg/mL의 농도로 조제한 후 약 4°C (습도: 30%)의 냉장고에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다. HPLC 분석용 검액은 10 mL 볼륨메트릭플라스크에 동결건조된 인삼양영탕 추출물 100 mg을 정확히 취한 후 물을 넣어 표선을 맞춘 후 60분간 상온에서 초음파추출 하였다. 추출액은 polytetrafluoroethylene hydrophilic syringe 필터(pore size: 0.22 mm; Ø25 mm; GVS ABLUO, Sandford, ME, USA)로 여과 후 검액으로 하였다.

HPLC 분석

인삼양영탕의 품질 관리를 위해 마커 화합물로 선정한 18종(gallic acid, hydroxymethyl furfural, chlorogenic acid, albiflorin, *prim*-*O*-glucosylcimifugin, paeoniflorin, liquiritin apioside, liquiritin, nodakenin, 5-*O*-methylvisammioside, narirutin, hesperidin, benzoic acid, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 schizandrin)의 크로마토그래프 분리는 Waters사의 SunFireÔ C_{18} 칼럼(5 mm, 4.6×250 mm, Milford, MA, USA)에서 0.1% (v/v) formic acid가 함유된 water (용매 A)과 0.1% (v/v) formic acid가 함유된 acetonitrile (용매 B)로 구성된 이동상의 기울기 용리를 이용하였다. 이동상의 기울기 용리는 다음과 같다: 최초 5% B, 5-60% B (0-50분), 60-100% B (50-60분, 10분 유지) 및 100-5% B (70-80분). 재평형 시간은 10분이었다. 칼럼 온도는 35°C, 유속은 1.0 mL/min 및 주입량은 10 mL였다. 화합물의 검출은 PDA를 이용하여 190-400 nm 영역을 동시에 스캔하였다.

단회 독성시험 실험계

인삼양영탕(Code-KE80)을 GLP 지정기관인 대구가톨릭대학교에서 식약처 고시 제2022-18호 의약품등의 독성시험기준 단회투여독성시험기준[11]에 따르고, 동물실 환경은 GLP기관 표준작업지침서에 따라 수행되었다. 7주령

Sprague-Dawley 랫드를 ㈜코아텍에서 입수하여 1주일 동안 순화기간을 가졌고, 8주령시에 평균체중은 수컷 229.5±7.75 g, 암컷 170±7.05 g이었다. 시험물질은 경구로 하여 10 mL/kg/day로 투여액량을 정하였다. 본 실험물질 인삼양영탕을 암수 각 한 마리에 5,000 mg/kg 예비실험을 진행하였으며, 투여 후 24시간 뒤에 모두 생존하여 본 실험에서는 동일 농도를 투여하였다. 실험 설계는 40마리 랫드를 1개군에 10마리(암컷 5마리, 수컷 5마리)씩 배정하여 총 4개군으로 나누었다. 4개군은 대조군(G1: 0 mg/kg/day), 저용량군(G2: 1000 mg/kg/day), 중용량군(G3: 2000 mg/kg/day), 고용량군(G4: 5000 mg/kg/day)으로 대조군에는 부형제인 멸균 증류수를 나머지 시험군에는 각각 용량별로 인삼양영탕을 경구 투여하였다.

문헌 검색

한·중·일에서 이미 수행된 인삼양영탕 독성시험 결과를 문헌 DB 검색을 통하여 조사하였다. 한국은 오아시스(https://oasis.kiom.re.kr/index.jsp), DBPia (https://www.dbpia.co.kr/), 국회도서관(https://dl.nanet.go.kr/), 중국은 CNKi (https://oversea.cnki.net/index/), 일본은 CiNii (https://cir.nii.ac.jp/), TSUMURA제약회사(https://www.tsumura.co.jp/)를 검색하였다. 검색어로는 한글 '인삼양영탕', 한자 '人蔘養榮湯(한국)', '人参养荣汤(중국)', '人参養栄湯(일본)' 영어 'Insamyangyoung-tang(한국)', 'Renshenyangrong-tang(중국)', 'Ninjinyoei-to(일본)'로 하였다. 이 검색 과정을 통해 삼국의 일반독성시험 결과를 비교하였다.

일반증상 관찰 및 부검

일반 증상은 투여 당일에 투여 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간에 걸쳐 관찰하였다. 이후 투여 다음 날부터 부검일까지 매일 1회관찰 하였다. 체중은 시험동물 입수일, 군 분리일(투여 시작일)에 측정하였으며, 인삼영양탕 투여 후 1일, 3일, 7일, 그리고 14일(부검일)에 추가적으로 측정하였다. 부검은 투여 14일째 되는 날, 모든 시험 동물을 Isoflurane으로 마취한 후 개복하여 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈 치사 시켰다. 이후 모든 내부 장기의 육안적 이상 유무를 면밀히 관찰하였다.

통계 분석

통계 분석은 SPSS19.0K 프로그램을 활용하였으며 시험

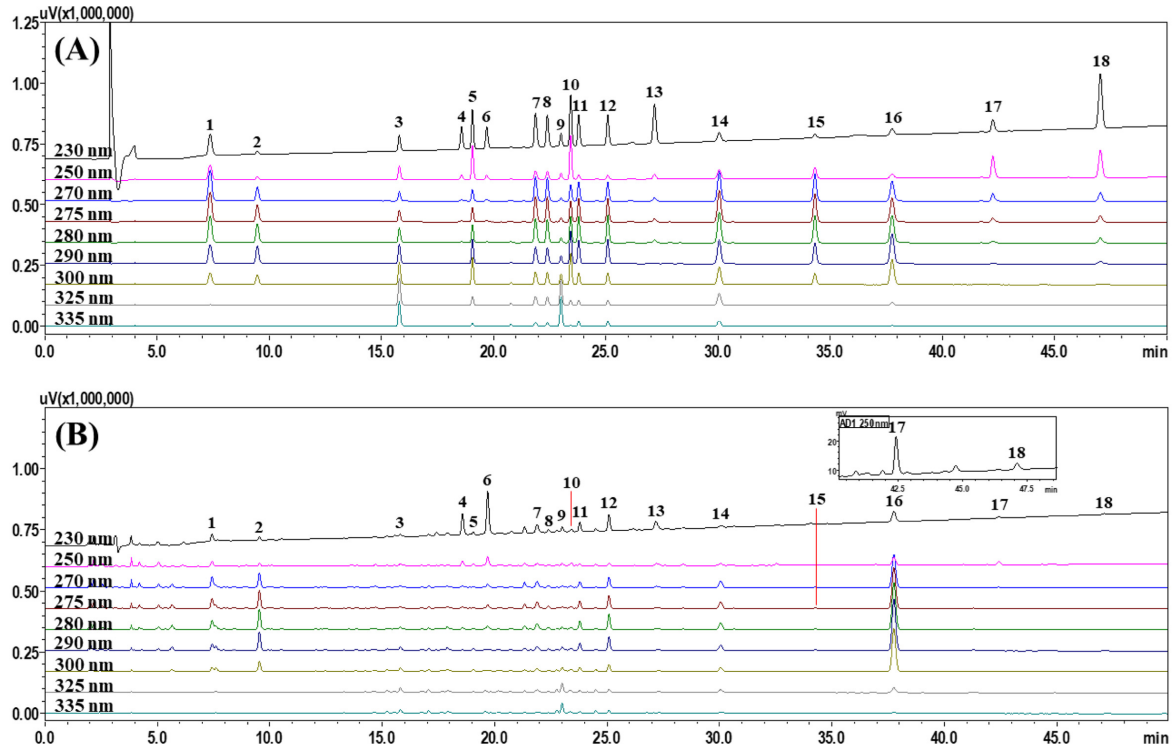

Fig. 1. HPLC chromatograms of standard (A) and *Insamyangyoung-tang* sample (B) solutions monitored at different detection wavelengths. Gallic acid (1), hydroxymethyl furfural (2), chlorogenic acid (3), albiflorin (4), *prim-O*-glucosylcimifugin (5), paeoniflorin (6), liquiritin apioside (7), liquiritin (8), nodakenin (9), 5-*O*-methylvisammioside (10), narirutin (11), hesperidin (12), benzoic acid (13), coumarin (14), cinnamic acid (15), cinnamaldehyde (16), glycyrrhizin (17), schizandrin (18). The concentration of each compound in standard solution was 10 mg/mL (hydroxymethyl furfural, cinnamic acid, and cinnamaldehyde), 20 g/mL (chlorogenic acid, *prim-O*-glucosylcimifugin, nodakenin, 5-*O*-methylvisammioside, benzoic acid, and coumarin), 30 mg/mL (gallic acid, liquiritin, and narirutin), 40 mg/mL (paeoniflorin and hesperidin), 50 mg/mL (albiflorin, liquiritin apioside, and schizandrin), 100 mg/mL (glycyrrhizin).

군의 독성 지표는 대조군과 비교하기 위해 일원배치 분산 분석(ANOVA test)을 통해 유의성을 검정하였다.

동물 투여 용량과 인체 복용량 변환

전임상 동물 투여 용량과 임상 인체 복용량 관계를 알아보기 위하여 식약처와 OECD지침에서 독성시험 평가, 비 임상 및 임상 용량 연계 관련 문헌을 조사하였다. 그리고 동물 인체 등가 용량 공식에 따라 동물실험 무독성 용량(no observed adverse effect level, NOAEL)을 OECD 지침 최고 투여 용량 5,000 mg/kg을 랫드 NOEAL 값으로 하여, 임상시험시 인체 성인(60 kg) 최대안전권장복용량(maximum recommended starting dose, MRSD)으로 변환하였다. 그리고 역순으로 한의서에 기재된 인삼양영탕 성인(60 kg) 1일 복용량에 따라 랫드(150 g) 독성시험 용량으로 변환하여 이를 OECD지침 최고 투여 용량 5,000 mg/kg과 비교하였다.

Results and Discussion

HPLC 분석

인삼양영탕의 품질 관리를 위해 설정된 HPLC-PDA 분석법을 이용하여 18종 화합물의 동시분석을 수행하였다. 정량을 위한 화합물의 최적 파장은 230 nm (albiflorin, paeoniflorin 및 benzoic acid), 250 nm (glycyrrhizin 및 schizandrin), 270 nm (gallic acid), 275 nm (liquiritin apioside, liquiritin, coumarin 및 cinnamic acid), 280 nm (hydroxymethyl furfural, narirutin 및 hesperidin), 290 nm (5-*O*-methylvisammioside 및 cinnamaldehyde), 300 nm (*prim*-*O*-glucosylcimifugin), 325 nm (chlorogenic acid) 및 335 nm (nodakenin)였다. 이들 화합물들은 50분 이내로 다른 성분들의 간섭없이 모두 검출되었으며 표준액과 검액의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 분석 결과 0.10-8.32 mg/g으로 검출되었으며, 이 중 작약의 마커 화합물인 paeoniflorin과 albiflorin이 8.32 mg/g과 5.04 mg/g으로 가장 풍부하게 검출이 되었다 (Table 2).

독성 평가

랫드 암수에게 5,000 mg/kg 단회 경구 투여한 후 모든 시험군과 대조군에서 사망동물은 관찰되지 않았다 (Table 3). 또한, 일반 증상 관찰 결과, 투여 당일부터 14일(부검일)까지 모든 시험군 및 대조군에서 특이한 임상 증상은 나타나지 않았다(Table 4 and 5). 체중 변화를 측정한 결과, 투여 시작일부터 부검일까지 인삼양영탕을 투여한 모든 군에서 암수 모두 유의미한 체중 변화는 관찰되지 않았다(Table 6 and 7). 부검결과, 모든 시험군 및 대조군에서 육안적인 이상 소견은 발견되지 않았다. 이상의 결과를 종합할 때, 랫드 암수 모두에서 인삼양영탕의 LD_{50} 값은 5,000 mg/kg을 초과하는 것으로 판단된다.

Table 2. Amount (mg/g) of marker compounds in *Insamyangyoung-tang* using established HPLC–PDA

Compound	Amount (mg/g)±SD ($\times10^{-2}$)	RSD (%)	Retention time (min)	Detection (nm)	Source[1)]
Gallic acid	0.84±0.67	0.80	7.36	270	PL
Hydroxymethyl furfural	0.68±0.05	0.07	9.46	280	RG
Chlorogenic acid	0.35±0.47	1.32	15.79	325	AG
Albiflorin	5.04±0.78	0.15	18.56	230	PL
prim-*O*-Glucosylcimifugin	0.16±0.05	0.31	19.05	300	SD
Paeoniflorin	8.32±1.25	0.15	19.68	230	PL
Liquiritin apioside	1.84±1.34	0.73	21.85	275	GU
Liquiritin	0.43±0.71	1.65	22.38	275	GU
Nodakenin	0.75±0.05	0.07	22.99	335	AG
Narirutin	0.22±0.02	0.11	23.42	290	CU
5-*O*-Methylvisammioside	1.01±0.62	0.61	23.78	280	SD
Hesperidin	2.62±1.14	0.44	25.08	280	CU
Benzoic acid	0.50±0.10	0.20	27.16	230	PL
Coumarin	0.50±0.11	0.23	30.04	275	CC
Cinnamic acid	0.05±0.02	0.39	34.26	275	CC
Cinnamaldehyde	1.50±0.63	0.42	37.76	290	CC
Glycyrrhizin	1.48±1.46	0.99	42.42	250	GU
Schizandrin	0.10±0.04	0.40	47.10	250	SC

[1)]PL: *P. lactiflora*, RG: *R. glutinosa*, AG: *A. gigas*, SD: *S. divaricate*, GU: *G. uralensis*, CU: *C. unshiu*, CC: *C. cassia*, SC: *S. chinensis.*

Table 3. Mortality in male and female rats

Group/Dose (mg/kg)		Animal ID	Days after dosing														Total mortality
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	G1/0	1101-1105	-[1)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
	G2/1,000	1201-1205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
	G3/2,000	1301-1305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
	G3/5,000	1401-1405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
Female	G1/0	2101-2105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
	G2/1,000	2201-2205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
	G3/2,000	2301-2305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
	G3/5,000	2401-2405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5

[1)]- : No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Table 4. Clinical signs of male and female rats (-6 hours)

Group/Dose (mg/kg)		Animal ID	Clinical sign	Hours				
				0.5	1	2	3	6
Male	G1/0	1101-1105	No clinical signs	-[1)]	-	-	-	-
	G2/1,000	1201-1205	No clinical signs	-	-	-	-	-
	G3/2,000	1301-1305	No clinical signs	-	-	-	-	-
	G3/5,000	1401-1405	No clinical signs	-	-	-	-	-
Female	G1/0	2101-2105	No clinical signs	-	-	-	-	-
	G2/1,000	2201-2205	No clinical signs	-	-	-	-	-
	G3/2,000	2301-2305	No clinical signs	-	-	-	-	-
	G3/5,000	2401-2405	No clinical signs	-	-	-	-	-

[1)]- : No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Table 5. Clinical signs of male and female rats (1-14 days)

Group/Dose (mg/kg)		Animal ID	Clinical sign	Days													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1/0	1101-1105	No clinical signs	-[1)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2/1,000	1201-1205	No clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G3/2,000	1301-1305	No clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G3/5,000	1401-1405	No clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	G1/0	2101-2105	No clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2/1,000	2201-2205	No clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G3/2,000	2301-2305	No clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G3/5,000	2401-2405	No clinical signs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[1)]- : No observable abnormality, +: Observable abnormality.

문헌 조사

한·중·일 문헌 DB조사를 통하여 인삼양영탕을 검색하였더니 한국은 오아시스 7건, DBPia 12건, 국회도서관 21건이 발표되었고, 중국은 CNKi 223건, 일본은 CiNiidp 251건, TSUMURA제약회사 1건이 검색되었다. 이 문헌들 중 독성시험 건수는 일본(연대미상, 1996년) 2건, 한국(2011년) 1건, 중국 2건(2011년, 2023년)으로 총 5건이 보고되었다. 일본 문헌 2건은 제약회사가 인삼양영탕 제품 정보를 구축하기 위한 연구였으나 한국과 중국 문헌 3건은 학술적 연구였다. 이 문헌 조사 결과를 연도별 기준으로 한약 처방 추출, 동물, 용량별 시험군, 투여 횟수 및 기간, 결과 정보로 구분하여 Table 8에 정리하였다.

Table 6. Body weight changes of male rats

Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Days					Gains[1]
		0	1	3	7	14	
G1/0	1101	222.3	248.8	258.2	287.7	323.5	101.2
	1102	223.6	251.0	262.3	294.4	324.2	100.6
	1103	228.9	259.0	273.2	204.0	336.5	107.6
	1104	233.4	264.9	275.8	301.7	334.7	101.3
	1105	241.2	267.8	279.5	304.6	330.9	89.7
	Mean	229.9	258.3	269.8	298.5	330.0	100.1
	S.D.[2]	7.72	8.33	9.12	7.27	5.94	6.47
	N[3]	5	5	5	5	5	5
G2/1,000	1201	217.0	237.6	250.2	272.1	298.5	81.5
	1202	222.9	255.6	265.2	290.1	319.8	96.9
	1203	224.9	252.2	284.9	288.9	320.1	95.2
	1204	233.5	260.0	272.6	300.1	332.0	98.5
	1205	240.8	268.3	284.6	307.8	337.7	96.9
	Mean	227.8	254.7	271.5	291.8	321.6	93.8
	S.D.	9.36	11.32	14.54	13.46	15.05	6.97
	N	5	5	5	5	5	5
G3/2,000	1301	220.4	243.8	266.3	294.9	326.3	105.9
	1302	224.1	249.1	267.5	295.1	328.9	104.8
	1303	227.6	254.3	265.5	293.5	331.5	103.9
	1304	234.4	257.7	272.8	300.4	329.4	95.0
	1305	244.4	275.4	292.9	327.7	370.5	126.1
	Mean	230.2	256.1	273.0	302.3	337.3	107.1
	S.D.	9.48	12.03	11.48	14.43	18.64	11.45
	N	5	5	5	5	5	5
G3/5,000	1401	221.8	246.2	260.3	285.9	318.8	97.0
	1402	223.9	247.8	258.4	289.1	325.7	101.8
	1403	233.3	264.3	280.4	315.2	352.4	119.1
	1404	234.7	262.3	276.8	299.6	332.0	97.3
	1405	236.1	266.6	282.4	313.1	257.9	121.8
	Mean	230.0	257.4	271.7	300.6	337.4	107.4
	S.D.	6.61	9.67	11.43	13.40	17.01	12.10
	N	5	5	5	5	5	5

[1]Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.
[2]S.D.: Standard deviation.
[3]N: Animal number.

Table 7. Body weight changes of female rats

Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Days					Gains[1]
		0	1	3	7	14	
G1/0	2101	163.1	182.3	192.5	206.1	218.4	55.3
	2102	166.2	182.1	191.0	206.2	217.9	51.7
	2103	169.2	186.3	196.1	210.1	223.3	54.1
	2104	172.2	193.0	196.9	210.8	229.0	56.8
	2105	185.6	205.3	217.9	231.1	246.7	61.1
	Mean	171.3	189.8	198.9	212.9	227.1	55.8
	S.D.[2]	8.70	9.72	10.91	10.42	11.86	3.50
	N[3]	5	5	5	5	5	5
G2/1,000	2201	163.2	178.5	191.8	201.8	217.6	54.4
	2202	166.8	186.6	187.7	197.9	217.5	50.7
	2203	171.4	191.4	189.1	197.8	218.6	47.2
	2204	174.8	194.3	208.6	218.6	250.2	75.4
	2205	181.4	202.2	218.6	235.7	254.3	72.9
	Mean	171.5	190.6	199.2	210.4	231.6	60.1
	S.D.	7.07	8.82	13.73	16.56	18.87	13.09
	N	5	5	5	5	5	5
G3/2,000	2301	162.0	180.7	186.2	199.3	215.2	53.2
	2302	163.9	172.4	176.0	181.0	215.8	51.9
	2303	169.0	183.5	199.1	210.4	223.7	54.7
	2304	174.3	191.7	204.2	215.1	230.3	56.0
	2305	177.4	194.2	209.5	220.4	223.5	46.1
	Mean	169.3	184.5	195.0	205.2	221.7	52.4
	S.D.	6.58	8.77	13.69	15.62	6.29	3.83
	N	5	5	5	5	5	5
G3/5,000	2401	163.2	182.5	191.6	200.7	213.8	50.6
	2402	166.4	185.2	193.7	207.9	220.7	54.3
	2403	170.3	189.3	193.1	200.6	219.6	49.3
	2404	173.3	202.6	206.5	220.3	228.4	55.1
	2405	183.8	208.5	218.7	232.6	251.3	67.5
	Mean	171.4	193.6	200.7	212.4	226.8	55.4
	S.D.	7.92	11.35	11.70	13.85	14.67	7.21
	N	5	5	5	5	5	5

[1]Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.
[2]S.D.: Standard deviation.
[3]N: Animal number.

일본은 SD rat 대상으로 160,000 mg/kg 용량으로 단회 투여한 결과, approximate lethal dose (ALD)가 160,000 mg/kg 이상으로 확인되었으며 250, 1,000, 4,000 mg/kg 용량으로 4주 반복 투여 독성 평가를 통해 독성학적 변화가 없다고 보고되었다[22]. 또 다른 연구에서는 LD_{50}>10,000 mg/kg이고 F344/DuCrj 랫드에서 0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg 용량으로 3개월 반복 투여한 결과, 사망개체가 없고 독성학적 의미 있는 변화가 없다고 보고되었다[23].

한국은 ICR 마우스 대상으로 0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg 용량으로 단회 투여하여 사망개체가 없고 독성학적 의미 있는 변화가 없다고 보고되었다[24].

중국은 Kunming 마우스에 원료 기준 용량으로 80,000 mg/

Table 8. Information of acute test assessment by *Insamyangyoung-tang* in Korea, China, Japan

Year	Herbal medicine prescription	Animal (weight)	Animal group by administration dose	Duration	Results
Unknown[22]	-	SD rat	- Male/Female 160 g/kg	Single	- ALD>160 g/kg
		SD rat	- Male/Female 250, 1,000, 4,000 mg/kg/day	1 Month	- No toxicological significance
1996[23]	12 types of herbal medicine, 31 g extracted to 6.7 g (21.6% yield)	-	-	Single	- LD_{50}>10,000 mg/kg
		F344/DuCrj rat (Female: 66±4 g, Male: 79±3 g)	- Male/Female 0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg/day in 4 groups, 12 animals per group	3 Month	- Nor was there any general indication of abnormality - Failed to give any indication of toxicology with hematology, blood chemistry, pathological data
2011[24]	14 types of herbal medicine, 110 g put into 1,100 mL, 11.01 g extracted (10.01% yield)	ICR mice	- Male/Female 0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg in 4 groups, 5 animals per group	Single	- No deaths - No toxicological significance - No body weight change
2011[25]	12 types of herbal medicine, 160 g put into 500 mL, 80 mL extracted	Kunming mice (18-20 g)	- Male /Female 80 g/kg, 160 g/kg in 2 groups, 10 animals per group	Single	- No deaths - Without detectable acute toxicity - MTD>160 g/kg/day · Equal to 76.2 times of human adult's clinical dose per day
2023[26]	12 types of herbal medicine, 1147.5 g put into 10 L, 369.0 g extracted (32.16% yield)	Kunming mice (28-32 g)	- Male/Female 0, 9,300 mg/kg (single), 9,300 mg/kg (repeated) in 5 animals per group	Single, 7 days	- No deaths - No body weight change - No toxicological response

kg과 160,000 mg/kg 각각 단회 투여한 후 사망 개체가 없고 독성학적 변화가 없었으며, MTD는 160,000 mg/kg 이상으로 이는 성인 1일 복용량의 76.2배에 해당하는 고용량이라고 보고하였다[25]. 또 Kunming 마우스에 9,300 mg/kg 용량으로 단회 및 7일 반복 투여로 독성시험하였더니 사망개체와 독성학적 반응이 없음을 보고하였다[26].

본 연구와 기존 인삼영영탕 연구 결과와 비교하여 고찰하면 먼저 구성 한약재수에서 중국, 일본은 12종이었으나 한국은 대추, 생강이 추가되어 14종이었다. 인삼양영탕 추출 수득율을 살펴보면 본 연구에서는 원료 5000 g을 물 50 L에서 100°C 2시간 동안 가압 추출하여 29.8%였으나 다른 연구에서는 10.1%[24], 21.6%[23], 32.1%[26]로 서로 큰 차이를 나타냈다. 수득율이 가장 낮았던 10.1%[24]의 경우 원료 110 g을 물 1,100 mL에서 60°C로 3시간 추출하였고, 가장 높은 32.1%[26]는 원료 1,147 g을 물 10 L에서(온도 미상), 3시간 추출한 것으로 보고하였다. 천연물의 추출 수득율은 전탕 온도, 용매 비율, 가압 여부, 전탕 반복 유무, 침출 시간 및 여과·농축·건조 과정에서의 손실 등과 같은 변수에 따라 달라질 수 있다. 인삼양영탕의 경우도 이러한 요인들, 특히 추출 온도에 의해 서로 다른 수득율을 보인 것으로 해석할 수 있다.

본 연구에서는 인삼양영탕 5,000 mg/kg 추출 엑스 과립을 최고 용량으로 설정 하였으며, 투여액량은 가장 최근 측정한 체중을 기준으로 10 mL/kg/day로 경구 투여하였다. 한국과 일본 2건 연구는 추출 엑스 과립 2,000 mg/k 용량에 투여액량 10 mL/kg/day[23,24] 로 동일하였다. 중국 연구 2건 중 1건은 추출 엑스 과립 9,300 mg/kg 용량에 투여액량 20 mL/kg/day[26]로, 다른 1건은 원료 용량을 기준 80,000 mg/kg과 160,000 mg/kg으로 투여액량 40 mL/kg/day로 경구 투여하였다. 이와 같이 투여용량 및 투여액량 비교에서 한국과 일본은 전통약물 독성시험시 ICH와 OECD 독성시험 투여 용량 지침을 유지하나 중국은 다양하게 적용하고 있는 것으로 사료된다.

동물 독성시험 투여 량과 인체 복용량 상호 용량 변환

동물과 인체 종간 등가 용량을 계산하는 여러 방법이 있지만, 동물 NOEAL 값을 이용하여 인체 MRSD 값을 도출하는 용량 별 인자 접근법을 기반으로 하여, 대사율의 차이를 고려한 체중(weight) 기준과 체표면적(body surface area BSA)에 따른 보정 계수(Km)기준으로 인체 동물간 등가 용량(human equivalent dose, HED) 값을 구하는 수식에 따랐다[27-30].

HED (mg/kg)
=Animal NOAEL dose (mg/kg)
×(weight animal Kg/ weight human Kg)$^{(1-0.67)}$

HED (mg/kg)
=Animal NOAEL dose (mg/kg)
×(Animal Km/Human Km)=Animal NOAEL dose (mg/kg)
×Km ratio

MRSD (mg/kg)=HED (mg/kg)/10(safety factor)

이들 공식에 따라 랫드 NOEAL 5000 mg/kg으로 동물 종 간의 체중과 Km으로 HED를 각각 계산하고 이를 인체 임상시험 허용 용량인 MRSD를 각각 구하였다. 체중기준으로 HED (mg/kg)=5,000 mg/kg×(0.15/60)$^{0.33}$=691.5 mg/kg으로 60 kg 성인에 대비하면 41,490 mg이다. 그리고 Km ratio기준에서는 HED (mg/kg)=5,000 mg/kg×0.162(6/37 Km ratio) =810 mg/kg으로 60 kg 성인에 대비하여 48,600 mg이다. 이들을 안전계수(safety factor) 10으로 나누면 각각 4,149 mg 또는 4,860 mg이 된다. 따라서 임상시험시에 인체에 투여할 수 있는 1일 MRSD는 4.1 g 또는 4.8 g이다. 이에 반해 한의서 기준인 본 연구 추출물 기준으로 하면 한약처방 1첩이 49.9 g이며 전통적으로 하루에 2첩을 복용하도록 한다. 그래서 총 95.0 g을 전탕하여 추출 수율이 29.8%이므로 성인 1일 투여 용량은 28.3 g이다. 앞서 산정한 MRSD 1일 복용량 4.1 g 또는 4.8 g과 비교하면, 7배 용량을 복용한다고 해석할 수 있다.

한편 역순으로 인체 복용량 기준에서 동물 독성시험 투여 용량을 산정하였다. 현재 인삼양영탕 인체(60 kg) 1일 복용량 28.3 g은 471.6 mg/kg(28,300 mg/60 kg)이므로 이를 랫드(150 g)에 독성시험 투여 용량을 추산하다면, 체중 기준으로는 471,6 mg/kg×(60/0.15)$^{0.33}$=3,475 mg/kg이고, Km 기준으로는 471.6 mg/kg×6.17(37/6, Km ratio)=2,910 mg/kg이다. 여기에 안전계수(safety factor) 10을 곱하면 인삼양영탕 인체 1일 복용량 28.3 g의 안전성 평가를 위한 랫드 독성시험 투여 용량은 34,750 mg/kg과 29,100 mg/kg으로 산정되었다. 이는 OECD 동물 독성시험 최고 투여 용량 5,000 mg/kg보다 높은 7배 용량을 투여되어야 하는 것으로 해석된다. 이상과 같이 인삼양영탕 안전성 평가를 위한 독성시험에서 인체 복용량과 동물 투여 용량을 인체 동물간 등가 용량기준에 따라 양방향 산정하였지만 그 최종값 간에는 유의미한 상관성이 없었다.

이미 인체 복용량이 정해져 있는 한약처방을 동물 투여 용량에 따른 인체 복용량과 환자 복용량에 따른 동물 투여 용량을 비교한 결과, 현재 ICH와 OECD 동물 독성시험 지침 투여 용량으로는 한약처방의 과학적인 안전성 근거 확보에는 미흡하다고 판단된다. 따라서 학계는 현재 수행하는 한약을 원료로 하는 의약품과 식품의 동물 경구 투여 독성시험 용량에 대해 다각적인 검토가 필요하다고 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 한국한의학연구원 한방의료기관 한약처방 안전성·유효성 구축 사업(KSN1823311)과 '건강노화를 위한 한의이론 과학화 연구(KSN2313021)'에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

인삼양영탕은 한국·중국·일본의 전통의약권에서 허약 개선에 복용되는 14종 한약재로 구성된 의약품이다. 먼저 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 적용하여 인삼양영탕 주요 물질을 규명하였다. 식품의약품안전처 단회투여독성시험기준에 따라 Sprague-Dawley 랫드 암수 각 5마리에게 0, 1,000, 2,000, 5,000 mg/kg 용량으로 단회 경구 투여하였다. 시험 결과 사망한 랫드는 없었으며 일반 증상 및 부검소견에서도 어떠한 이상 반응도 관찰되지 않아, 랫드에서 인삼양영탕 반수 치사량(LD_{50})은 5,000 mg/kg 이상으로 판단되었다. 문헌조사를 통해 조사된 인삼양영탕 일반독성시험 5건(일본 2건, 중국 2건, 한국 1건)에 따르면 개략치사량(ALD)은 160,000 mg/kg 초과, LD_{50}는 10,000 mg/kg 초과, 최대내성용량(MTD)은 160,000 mg/kg 초과한다고 보고하였다. 랫드 무독성량 5,000 mg/kg을 기준으로 인체 등가 용량 변환하면 인삼양영탕 최대안전권장복용량(MRSD)은 4.1 g 또는 4.8 g이며, 한의서 기준 인삼양영탕 성인 1일 복용량 28.3 g을 랫드 독성시험 투여 용량으로 변환하면 34,750 mg/kg 또는 29,100 mg/kg이다. 인삼양영탕 안전성 평가를 위하여 동물과 인체 종간 등가 용량을 계산하여 보니, 동물 독성시험 투여 용량과 실제 환자 복용 용량 간에 유의미한 상관관계가 없음을 시사한다. 학계에서는 전통적으로 확립된 한약처방 복용량에 대한 동물 독성시험 평가시에 ICH 및 OECD 기준이외에 다각적인 투여 용량 검토가 필요하다고 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Hyeun-kyoo Shin https://orcid.org/0000-0003-2319-6678
Mee-Young Lee https://orcid.org/0000-0001-7337-2460
Chang-Seob Seo https://orcid.org/0000-0002-8156-446X

References

1. Song, K.K., Park, M.Y., Choi, H.Y., Kim, J.D., Anticancer and related immunomodulatory and anticachexic effects of insamyangyoung-tang extracts on non small cell lung carcinoma, NCI-H520, xenograft mice. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.,* **27**, 63-77 (2013).
2. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2013. Information on herbal medicine prescription approval (report) items by efficacy group, Cheongju, Korea, pp. 349-351.
3. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Regulations on reporting product approval for herbal medicine (crude medicine) preparations, etc (No 2023-27), Cheongju, Korea.
4. Choi, S.I., Kim, Y.H., Lee, H.W., Analysis of experimental studies on Insamyangyoung-tang. *J. Soc. Pre. Korean Med.*, **19**, 145-157 (2015).
5. Kim, J.W., Choi, H.Y., Cho, J.H., Kim, D.H., Kang, I.H., Shim, Y.H., Kim, E.K., Myung, S.W., Studies on monitoring hazardous substances of natural medicines(I) - studies on heavy metals of natural medicines in market. *Kor. J. Herbology.*, **17**, 235-245 (2002).
6. Kang, M.J., Kwon, S.H., Kim, S.H., Yeom, M.S., Park, B.K., Lee, H.J., Kim, J.H., Joo, K.S., Heo, M.J., Kwon, M.J., Monitoring and risk assessment of pesticide residues in herbal medicines in Incheon. *J. Food Hyg. Saf.*, **39**, 118-127 (2024).
7. Lee, H.K., Kim, A.K., Kim, O.H., Kim, S.D., Lee, Y.J., Lee, S.R., Kim, I.Y., Lee, J.M., Yu, I.S., Jung, K., Preliminary monitoring of mycotoxins for safety management of medicinal herbs. *J. Food Hyg. Saf.*, **32**, 187-192 (2017).
8. Lee, A.R., Jang, S., Lee, A.Y., Choi, G.Y., Kim, H.k., Monitoring of sulfur dioxide residues in commercial herbal medicines at domestic by geographical origins. *J. Food Hyg. Saf.*, **29**, 152-157 (2014).
9. Shin, H.K., Ha, H.K., Seo, C.S., Lee, M.Y., 2024. Standard herbal medicine formulary, 2nd ed, Korea institute of oriental medicine, Daejeon, Korea, pp. Supplement 7-8.
10. Shin, H.K., Jeon, W.Y., Seo, C.S., Lee, M.Y., Acute toxicity study of 77 herbal formulas according to GLP guidelines in rats. *J. Korean Med.*, **44**, 29-38 (2023).
11. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2022. Toxicity test standards for pharmaceuticals, etc. (Notice no. 2022-18), Cheongju, Korea.
12. The International Council for Harmonisation (ICH), (2025, June 25). Duration of chronic toxicity testing in animal (rodent and non rodent toxicity testing), ICH Guideline S4 (1998). Retrieved from https://www.ich.org/page/safety-guidelines
13. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), (2025, June 25). Test no. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure. Retrieved from https://www.oecd.org/en/publications/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049-en.html
14. The International Council for Harmonisation (ICH), (2025, June 25). The ICH association comprises the following members and observers. Retrieved from https://www.ich.org/page/members-observers
15. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), (2025, June 25). Countries. Retrieved from https://www.oecd.org/en/countries.html
16. Ministry of Food and Drug Safety (MFDA), 2022. Toxicity test standards for pharmaceuticals, etc. (Explanation), 2nd, Cheongju, Korea, pp. 1-16.
17. The International Council for Harmonisation (ICH), (2025, June 25). Nonclinical safety studies, Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2). Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/M3_R2__Guideline.pdf
18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), (2025, June 25). Guidance document on acute oral toxicity testing, Guidance document on acute toxicity testing. Retrieved from https://www.oecd.org/en/publications/guidance-document-on-acute-oral-toxicity-testing_9789264078413-en.html
19. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2021. Guidelines for toxicity testing for food, etc. - single-dose toxicity test (fixed dose method), Cheongju, Korea.
20. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2015. Guideline on nonclinical evaluation of pharmaceuticals, MFDS, Cheongju, Korea, pp. 1-43.
21. Hoe, J., 2011. Donguibogam, 1st ed, Bubin Books, Seoul, Korea, p. 930.
22. Tsumura.co, (2025, June 25). Ninjinyoei-to (108). Retrieved from https://medical.tsumura.co.jp/products/108/pdf/108-if.pdf
23. Shimonishi, I., Hirakawa, K.A., Idogawa, H.K., Ugumori, N.M., Unno, T.S., Awata N.R., Nurimoto, S.C., Three-month repeated oral dose toxicity study of Ninjinyoei-to dried extract in rats. *Pharmacometrics.*, **51**, 7-16 (1996).
24. Kim, E.J., Mouse single oral dose toxicity test of Insamyangyoungtang aqueous extracts, extracts. Master's thesis, Deagu Haany University, Deagu, Korea (2011).
25. Chen, Y.Z., Lin, F., Li, P.P., Acute toxicity test and anti-stress effect of Ginseng tonic decoction in mice. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae,* **17**, 225-229 (2011).
26. Wang, J.M., Therapeutic effects of Renshenyangrong-tang on hypoxia pulmonary hypertension and mechanism. Master's thesis, Shanxi University, Taiyuan, China (2023).
27. Nair, A.B., Jacob, S., A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.*, **7**, 27-31 (2016).
28. Reagan-Shaw, S., Nihal, M.S., Ahmad, N.H., Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.*, **22**, 659-661 (2007).
29. Jacob, S., Nair, A.B., Morsy, M.A., Dose conversion between animals and humans: a practical solution. *Indian J. Pharm. Educ. Res.,* **56**, 600-607 (2022).
30. Shin, J.W., Seol, I.C., Son, C.G., Interpretation of animal dose and human equivalent dose for drug development. *J. Korean Orient. Med.*, **31**, 1-7 (2010).