

생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 잎 70% 에탄올 추출물의 단회와 14일 반복투여 독성시험의 안전성 평가

홍충의 · 서문영 · 구윤창 · 남미현 · 이현아 · 김지훈 · 왕 증 · 양성용 · 이성희 · 노수환 · 이광원[†]
고려대학교 생명과학대학 식품공학부

Single and 14-Day Repeated Oral Toxicity Studies of 70% Ethanol Extract of *Lindera Obtusiloba* Blume Leaves

Chung-Oui Hong, Young Seomun, Yun-Chang Koo, Mi-Hyun Nam, Hyun Ah Lee, Ji-Hoon Kim,
Wang-Zeng, Sung Yong Yang, Sung-Hee Lee, Su Hwan No, and Kwang-Won Lee[†]

Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology,
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

Lindera obtusiloba Blume (LO), which is widely distributed in Korea, Japan and China, has traditionally been used as a popular folk medicine for the treatment of fever, abdominal pain, bruise and extravation. The purpose of this study was to examine the toxicities of the single and 14-day repeated doses in Sprague-Dawley rats orally administrated with LO at doses of 0, 500, 1000, 2000 (14-day repeated toxicity test) and 5000 (single toxicity test) mg (dry weight)/kg of body weight/day. The results showed that there was no difference in body weight change, food intake, water consumption, or organ weight among different dose groups. Also we observed no death and abnormal clinical signs during the experimental period. Between the groups orally administered LO and the control group, there was no statistical significance in hematological test or serum biochemical values. There were no evidences of histopathological alteration as well as abnormal gross finding mediated by single and 14 days treatments with LO. These results suggest that no observed adverse effect level (NOAEL) of the oral application of LO was considered to be more than 2000 mg/kg in rats under the conditions employed in this study.

Key words: *Lindera obtusiloba* Blume, single dose toxicity, 14-day repeated dose toxicity, NOAEL

서 론

천연식물은 예로부터 여러 가지 민간요법으로 사용 또는 섭취가 되어 오면서 효능이 검증이 되어왔고, 최근에 와서 현대의학의 대체요법으로 사용이 되고 있다. 선진국에서는 이미 전 세계에 분포하는 자원식물에 대한 의학 예방 또는 치료기능과 경제적 효용가치를 평가하여 보다 다양한 식물 종의 확보에 주력하고 있다(1). 천연물을 기원으로 하는 생약은 기존에 한방에서의 질병 치료제나 보약의 처방으로 널리 사용되어 왔으나, 최근에 들어서는 각종 기능성식품, 기능성화장품 등의 소재로 다양하게 개발되고 있다(2).

생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)는 음지에서 자라는 녹나무과의 낙엽관목으로 높이가 3 m에 달하고 잎은 호생하며, 3~4월에 잎보다 먼저 황색꽃이 피는 식물로서 가지를 꺾으면 생강냄새가 나기 때문에 생강나무라 부르고 있다. 어린잎은 식용하며, 새싹은 작설차라 하여 차대용으로 사용

하고 있다(3). 주로 대한민국, 일본, 중국 등의 남아시아에 많이 자생하고 있으며, 예로부터 민간요법으로 열, 복통, 타박상, 출혈 등의 치료로 사용하여 왔다(4,5). 그러나 생강나무의 생리학적 기능은 아직 잘 알려져 있지 않다. 생강나무의 메탄올 추출물이 *E. coli*의 UV에 의해 유도되는 돌연변이 억제(6), 정제된 obtusilactone derivatives(7), flavonoid glycosides(3), phytosterols(8), lignans(4), butanolides(5) 등만이 보고되어 있을 뿐이다.

전통적으로 식용으로 섭취된 식물들은 오랜 경험적 사용과 시간에 따라 일반적으로 안전하다고 여겨지고 있다. 그러나 이런 식물에서 추출한 물질은 농축된 많은 phytochemical을 함유하고 있기에 새로이 GLP(Good Laboratory Practice) 기관 등을 통한 안전성 결과가 있어야지만 표준화된 소재로서 사용이 가능하다. 이처럼 생강나무 잎은 과학적으로 검증이 되지 않은 채 의약품이나 기능성식품으로서의 이용 가치는 점차 증가하고 있으나 이에 대한 안전성 평가

[†]Corresponding author. E-mail: kwangwon@korea.ac.kr
Phone: 82-2-3290-3027, Fax: 82-2-925-1970

자료는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 생강나무 잎 70% 에탄올 추출물을 사용하여 전임상 수준의 안전성 평가 시험의 일환으로 급성독성과 반복 투여 시 발현될 수 있는 독성실험을 수행하여 생강나무 잎을 이용한 추출물의 기능성 소재 가능성을 연구하고자 한다.

재료 및 방법

시험물질

다 자란 생강나무 잎은 충청남도 천안에서 채취하여 고려대학교 생명과학부 박권우 교수로부터 검수 받았으며, 1차 동결건조 된 생강나무 잎을 분쇄하여 70% 에탄올에서 3시간 동안 3번 반복 환류 냉각 추출 후, 70% 에탄올 추출물은 원심분리(7000 rpm, 30 min, 4°C)한 후 재차 상등액을 Whatman No. 42로 여과하였다. 여과된 상등액을 추출용매를 완전히 제거하기 위해 감압증류 한 다음 동결건조를 하여 70% 에탄올 추출물 분말을 얻었다(수율: 26.84%). 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물은 차광 상태로 -70°C 냉동보관 하여 사용하였으며, 각 투여군의 농도에 따라 멸균 정제수에 현탁하여 사용하였다.

일반 독성시험

본 시험은 의약품 등의 독성 시험 기준(9)과 비임상시험 관리 기준(10)을 준수하여 실시하였다.

시험 동물 및 사육환경: 본 시험에서는 (주)샘타코로부터 구입한 5주령의 Spargue-Dawley rat를 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중 체중이 200 ± 5 g의 것을 시험에 사용하였다. 실험동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 10~20회/hr, 조명시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux로 설정된 환경에서 랫드 플라스틱 사육 상자(260 W×420 L×180 mm)당 1마리를 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하고, 매일 일정한 시간에 각각의 섭취량을 측정하였다.

단회투여 독성시험: 용량을 설정하기 위하여 생강나무 70% 에탄올 추출물을 3 mL의 증류수에 현탁시켜 625, 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 실시한 예비시험의 결과, 아무런 독성소견이 인정되지 않았다. 따라서 본 시험에서는 OECD에 명시된 최고 농도인 2000 mg/kg(11) 용량보다 더 높은 농도인 5000 mg/kg을 투여군으로 하여 한계 용량군을 설정하였으며, 주사용 멸균 증류수를 투여하는 부형대조군을 두어 시험을 실시하였다.

14일 반복투여 독성시험: 한계 용량인 5000 mg/kg을 투여한 단회투여 독성시험에서 생강나무 70% 에탄올 추출물의 투여에 기인한 것으로 인정되는 아무런 독성 소견이 관찰되지 않았기 때문에 OECD 최고 농도인 2000 mg/kg/day(11)를 고용량으로 하고, 공비 2를 적용하여 1000 mg/kg/day 및 500 mg/kg/day을 중간 용량과 저용량으로 투여하였

다. 대조군은 용매인 주사용 멸균 증류수만을 투여하였다. 각 군당 암수 5마리를 시험에 사용하였다.

투여방법 및 투여기간: 생강나무 70% 에탄올 추출물은 임상적용경로를 따라 경구로 투여하였으며, 투여기간은 단회투여 독성 시험의 경우 시험 물질을 시험 개시 시 투여 전에 하룻밤 절식시킨 후 금속제 경구투여용 존데와 주사기를 사용하여 1회 경구투여 후 2주간 임상증상을 관찰하게 되며, 14일 반복투여 독성시험의 경우 시험 물질을 1일 1회 14일 동안 주사로 경구투여 하였다. 각 개체가 해당하는 군의 투여 당일 체중 평균을 기준으로 그 군에 해당하는 용량에 맞게 멸균증류수에 시험물질을 용해시켜 경구투여 하였다.

일반증상관찰: 단회투여 독성시험의 경우 투여당일은 8시간까지 매시간 일반증상을 관찰하고, 투여 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반 증상의 변화, 독성 증상, 운동성, 외관 및 사망동물의 유무를 주의 깊게 관찰하였다. 14일 반복투여 독성시험의 경우 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 2회 일정한 시간에 일반 증상의 변화, 독성증상, 빈사 및 사망 유무를 관찰하였다.

체중측정: 단회투여 독성 시험의 경우 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시 직전(1일)과 투여 후 2, 5, 8 및 15일째에 측정하였다. 14일 반복투여 독성시험의 경우 시험기간 중 모든 동물에 주 2회와 부검 직전일의 체중을 측정하였다.

사료 및 음수 섭취량 측정: 단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 실험 개시 후 매일 일정량의 사료와 음수를 오전 10시에 공급하고 익일 같은 시각에 잔량을 측정하여 기록하였다.

부검 및 장기중량 측정: 부검 전날 밤부터 절식시킨다. 이산화탄소 또는 에테르로 마취시킨 다음, 복대정맥으로부터 채혈을 실시하고 방혈시켜 안락사를 시킨 후 육안으로 모든 장기를 관찰한다. 그 후 전 실험동물에 대하여 흉선, 폐, 심장, 신장, 간, 비장, 고환, 난소의 중량을 측정하였다.

혈액학적 검사: 부검당일에 복대정맥으로부터 채혈하여 EDTA-3K로 항응고 처리를 하고 자동혈구계산기를 이용하여 백혈구수(WBC, white blood cell count), 적혈구수(RBC, red blood cell count), 혈색소량(Hb, hemoglobin concentration), 헤마토크리치(Hct, hematocrit), 평균적혈구용적(MCV, mean corpuscular volume), 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 혈소판(PLT, platelet)을 측정하였다.

혈액생화학적 검사: 부검당일에 복대정맥으로부터 채취한 혈액의 일부를 30분간 4°C에 냉장보관 후 원심분리(2000 rpm, 20 min)하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 자동생화학분석기를 이용하여 총 단백질(T.P, total protein), 알부민(ALB, albumin), 포도당(GLU, glucose), 콜레스테롤(CHOL, total cholesterol), 총 빌리루빈(T.BIL, total bilir-

ubin), glutamate pyruvate transaminase(GPT), glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), alkaline phosphatase (ALP)를 측정하였다.

조직병리학적 검사: 반복투여 독성시험 후 간과 신장의 조직병리학적 검사를 위하여 분리된 간과 신장을 10% 중성 완충포르말린 용액에 충분히 고정시킨 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매, 박절하였다. 간의 경우에는 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을, 신장의 경우에는 periodic acid 염색(PAS)을 실시하여 광학현미경하에서 조직병리학적 검사를 실시하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며 Sig-maStat(Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA)을 사용하여 ANOVA one-way로 유의차 검정을 실시하여 $p<0.05$ 경우에만 그룹 간 유의차가 있는 것으로 인정하였다.

결 과

단회투여 독성시험

시험기간 동안에 사망한 동물은 암수의 모든 시험군에서 관찰되지 않았으며(Table 1), 시험물질 투여와 관련하여 투여직후에 유연(salivation)이 일시적으로 암수 각각 3례씩 1회 관찰되었다. 수컷 시험물질 투여군의 1례에서 설사(liquid feces)가 투여 당일에 관찰되었다. 시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 체중의 이상변화는 관찰되지 않았다. 부검 결과, 암수의 모든 동물에서 시험물질 투여와 관련된 육안으

로 이상이 있는 소견은 관찰되지 않았다(자료 미 제시).

14일 반복투여 독성시험

일반증상관찰: 사망동물은 시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 관찰되지 않았으며, 유의할 만한 이상 증정도 관찰되지 않았다(Table 2, 3).

체중측정: 투여일로부터 시험 종료 시까지 모든 시험군에서 암컷은 50 g, 수컷은 100 g 내외의 정상적으로 체중이 증가되는 현상을 보였다. 대조군 및 농도별 투여군을 비교할 경우 투여 마지막 날 2000 mg/kg의 암수 체중은 각각 184.3 ± 14.0 g과 260.2 ± 5.0 g이고, 대조군인 0 mg/kg의 암수 체중은 184.0 ± 6.9 g과 260.2 ± 12.1 g으로 투여군과 비투여군간에 유의적 차이가 없었다(Table 4). 다른 투여 그룹도 마지막 날에 비슷한 체중을 보였으며, 모두 별다른 유의성 있는 체중 변화 현상이 관찰되지 않았다.

사료 및 음수 섭취량: 시험기간 동안 각 군당 사료섭취량과 음수섭취량의 변화는 대조군 및 농도별 투여군에서 암수 모두 유의할 만한 차이가 인정되지 않았다(자료 미 제시). 투여 종료 직전의 암수 사료 섭취량을 각 그룹별로 보면 0 mg/kg: 15.43 ± 0.58 , 21.40 ± 1.80 ; 500 mg/kg: 15.00 ± 1.36 , 21.87 ± 1.78 ; 1000 mg/kg: 14.54 ± 1.97 , 20.96 ± 1.61 ; 2000 mg/kg: 14.32 ± 0.38 , 19.37 ± 1.39 로 각 그룹 간에 유의할 만한 차이를 보이지 않았다. 음수 섭취량 역시 투여 종료 직전 각 그룹별로 암수 섭취량을 보면 0 mg/kg: 24.00 ± 4.18 , 33.00 ± 4.47 ; 500 mg/kg: 26.00 ± 5.48 , 35.00 ± 5.00 ; 1000 mg/kg: 31.00 ± 5.48 , 34.00 ± 5.48 ; 2000 mg/kg: 32.00 ± 8.37 ,

Table 1. Mortality of SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for single toxicity test

Dose (mg/kg)		Group summary of mortality															
		Days on test															
		Male and female															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5000	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a=Number animals alive at the start of each study day.

b=Number of mortalities during each study day.

Table 2. Mortality of SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test

Dose (mg/kg)		Group summary of mortality															
		Days on test															
		Male and female															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a=Number animals alive at the start of each study day.

b=Number of mortalities during each study day.

Table 3. Clinical signs of SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test

Dose (mg/kg)		Group summary of mortality														
		Days on test										Male and female				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	b	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
500	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	b	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
1000	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	b	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
2000	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	b	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

a=Number of animals with sign (Normal).
b=Total number of animals observed.

Table 4. Body weights of SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test

Period	Group	Summary of body weights (g)			
		Dose (mg/mL)			
		0	500	1000	2000
Day 1	Male	157.3±5.7	161.8±7.5	158.6±3.7	161.2±3.6
	Female	139.1±4.6	138.2±4.02	138.1±5.2	136.3±7.7
Day 5	Male	196.1±8.0	205.6±7.2	200.4±5.6	201.0±4.5
	Female	158.3±5.6	159.8±5.6	157.0±8.2	158.7±11.7
Day 10	Male	236.2±11.7	246.4±9.2	241.2±8.6	240.4±5.0
	Female	175.7±6.2	175.6±10.2	171.2±10.3	176.6±14.1
Day 13	Male	257.1±11.3	267.2±11.4	262.6±9.0	258.6±6.1
	Female	181.8±12.0	184.1±8.2	183.4±7.5	181.5±14.8
Day 15	Male	260.2±12.1	268.9±13.1	264.8±9.7	260.2±5.0
	Female	184.0±6.9	186.3±9.3	188.3±10.9	184.3±14.0

37.00±4.47로 각 그룹 간에 유의할만한 차이가 관찰되지 않았다.

부검 및 장기중량 측정: 부검결과 암수 모든 동물에서 시험물질 투여와 관련된 육안으로 이상이 있는 소견은 관찰되지 않았다. 또한 장기무게를 측정해본 결과 시험물질과 관련하여 어떠한 무게의 이상 증감도 관찰되지 않았다(Table 5). 독성이 있는 물질이 섭취가 되면 가장 먼저 간에서 해독 작용이 일어나 이 장기에 가장 큰 영양을 줄 수 있는데 각 그룹별 암수 간의 무게를 보면 0 mg/kg: 6.60±0.87, 9.84±0.85; 500 mg/kg: 6.18±0.58, 10.01±0.95; 1000 mg/kg: 6.40±0.44, 10.36±0.82; 2000 mg/kg: 6.08±0.57, 9.48±0.21로 각 그룹 간에 유의할 만한 차이를 보이지 않았으며, 이는 다른

장기인 흉선, 폐, 심장, 신장, 비장, 정소/난소에도 마찬가지로의 결과를 보였다.

혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사: 대조군과 암수의 모든 시험 물질 투여군에서 시험물질 투여 후 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사에서 유의할 만한 변화가 없었다(Table 6, 7). 혈액학적 분석의 백혈구(WBC) 수를 보면 대조군인 0 mg/kg 그룹의 암수에서는 4.0±0.5, 4.6±1.5를, 2000 mg/kg 그룹의 암수에서는 3.6±1.6, 5.9±0.6을 보임으로써 유의적 차이를 나타내지 않았다. 또한 적혈구(RBC) 수, 혈액소량(Hb), 헤마토크리치(Hct), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판(PLT)에서도 마찬가지로 대조군과 투여군 간에 유의적 차가 없는 결과가 관찰

Table 5. Organ weights in SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test

Organs	Male dose (mg/kg)				Female dose (mg/kg)			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
	Thymus	0.83±0.23	0.88±0.19	0.76±0.10	0.68±0.18	0.62±0.14	0.62±0.10	0.50±0.11
Lung	1.35±0.18	1.43±0.10	1.40±0.04	1.31±0.07	1.19±0.16	1.04±0.52	1.11±0.06	1.08±0.09
Heart	1.01±0.07	1.08±0.12	1.09±0.09	0.96±0.13	0.79±0.07	0.76±0.10	0.80±0.08	0.79±0.05
Kidney	2.15±0.17	2.38±0.16	2.28±0.04	2.25±0.14	1.60±0.22	1.59±0.16	1.54±0.10	1.63±0.17
Liver	9.84±0.85	10.01±0.95	10.36±0.82	9.48±0.21	6.60±0.87	6.18±0.58	6.40±0.44	6.08±0.57
Spleen	0.70±0.05	0.76±0.12	0.74±0.09	0.70±0.10	0.51±0.03	0.51±0.04	0.54±0.14	0.50±0.08
Testis/Ovary	2.84±0.10	2.97±0.17	2.80±0.30	2.95±0.20	0.12±0.01	0.13±0.02	0.12±0.04	0.12±0.01

Values are presented as means±SD for 5 rats.

Table 6. Hematological values in SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test

Parameter	Male dose (mg/kg)				Female dose (mg/kg)			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	4.6±1.5	5.6±1.9	4.2±1.2	5.9±0.6	4.0±0.5	3.3±1.1	3.4±1.5	3.6±1.6
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	7.3±0.3	7.3±0.3	7.1±0.2	7.3±0.3	7.8±0.3	7.8±0.3	7.5±0.3	7.4±0.3
Hb (g/dL)	15.1±0.5	15.4±0.6	14.9±0.4	15.5±0.8	15.9±0.4	16.1±0.4	15.5±0.5	15.2±0.6
Hct (%)	46.5±2.2	46.6±2.9	46.2±1.4	47.2±2.3	47.6±0.7	47.4±0.9	46.0±2.0	45.2±2.1
MCV (μ^3)	63.7±1.6	63.8±2.2	64.7±0.7	64.6±2.1	61.3±2.3	60.7±2.2	61.2±1.5	61.0±1.1
MCH (pg)	20.7±0.5	21.1±0.6	20.9±0.4	21.2±0.4	20.6±0.5	20.7±0.7	20.6±0.4	20.5±0.2
MCHC (g/dL)	32.4±1.0	33.2±0.9	32.3±0.6	32.9±0.6	33.5±0.6	34.1±0.9	33.8±0.6	33.6±0.4
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	1421.0±235.8	1493.2±267.2	1534.4±180.5	1545.8±76.0	1476.25±57.6	1351.8±145.2	1442.4±171.5	1322.4±239.1

Values are presented as means±SD for 5 rats.

WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin concentration; Hct, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT, platelet.

Table 7. Serum biochemical values in SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test

Parameter	Male dose (mg/kg)				Female dose (mg/kg)			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
T.P (g/dL)	6.1±0.1	6.1±0.4	6.0±0.1	6.2±0.1	6.1±0.2	6.2±0.3	6.2±0.3	6.1±0.1
ALB (g/dL)	3.9±0.1	3.8±0.2	3.9±0.0	3.9±0.1	4.0±0.2	4.0±0.1	3.9±0.2	3.9±0.1
GLU (g/dL)	152.6±11.2	153.8±10.2	145.0±4.8	154.8±11.0	145.2±9.9	138.6±15.4	14.8±14.0	138.0±14.6
CHOL (mg/dL)	74.4±4.5	72.8±3.9	72.6±3.6	75.4±6.6	79.4±5.7	80.6±7.1	77.4±8.3	75.0±3.7
T.BIL (mg/dL)	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1
GPT (IU/I)	45.4±5.1	45.2±4.3	42.8±3.9	42.0±3.7	43.0±7.9	40.4±8.1	38.0±7.1	39.0±4.4
GOT (IU/I)	123.8±16.0	112.2±10.6	128.2±6.6	125.2±15.6	119.0±21.7	128.6±15.6	124.8±20.5	119.4±12.5
ALP (IU/I)	318.6±43.1	338.4±42.2	348.6±31.9	332.8±25.5	206.2±27.0	194.2±41.5	213.0±48.2	197.4±37.6

Values are presented as means±SD for 5 rats.

T.P, total protein; ALB, albumin; GLU, glucose; CHOL, total cholesterol; T.BIL, total bilirubin; GPT, glutamate pyruvate transaminase; GOT, glutamate oxaloacetate transaminase; ALP, alkaline phosphatase.

되었다. 혈액생화학적 분석의 glutamate pyruvate transaminase(GPT)를 보면 대조군인 0 mg/kg 그룹의 암수에서는 43.0 ± 7.9 , 45.4 ± 5.1 을, 2000 mg/kg 그룹의 암수에서는 39.0 ± 4.4 , 42.0 ± 3.7 을 보임으로써 유의적 차이를 보이지 않았다. 혈액생화학적 분석 역시 혈액학적 분석과 마찬가지로 총 단백질(T.P), 알부민(ALB), 포도당(GLU), 콜레스테롤(CHOL), 총 빌리루빈(T.BIL), glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), alkaline phosphatase(ALP)에서도 대조군과 투여군 간에 유의적 차이를 나타내지 않았다.

조직병리학적 검사: 대조군과 암수의 모든 시험 물질 투여군에서 간과 신장에서 병변이 관찰되지 않았다. 또한 특히 대조군을 포함하여 생강나무 추출물의 용량에 따른 병변의 수나 정도에 있어서 차이를 확인할 수 없었으며, 병변이 동물의 건강상태나 다른 실험 결과에 영향을 미칠만한 의미 있는 것으로 판단되지 않았다(Fig. 1, 2).

고 찰

생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)는 오래전부터 민간 요법에 의해 이용되어져 왔다. 특히 해열, 복통 완화, 지혈 등의 여러 약효를 인정받아 여러 약제에 혼용되어져 왔으나 이를 임상에 적용하기에 앞서 그 안전성을 평가하고자 본

연구를 실시하였다.

본 시험에서 사용된 경구투여 독성실험 시에는 위내 효소에 의한 단백질 등의 분해로 설치류에서는 독성이 거의 초래되지 않는 경우에도, 토끼 등 고등 동물은 설치류에 비해 훨씬 민감하며 특히 위 기능 장애가 있는 환자나 고용량, 장기간 또는 비경구로 노출될 경우 등 다양한 조건에서의 부작용 가능성을 배제할 수 없다. 더욱이 천연물로부터의 생리활성 물질 탐색 및 개발을 전제로 할 경우 조추출액 투여량의 한계나 투여경로와는 달리, 생강나무의 정제된 약리활성 성분을 미량으로 사용하거나 비경구 경로로 투여할 가능성이 높으므로 동물 종 및 투여경로에 따른 독성에 대한 세밀한 재평가가 요구된다 하겠다(2).

실험 결과를 종합해 볼 때, 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물을 설치류인 랫드에 단회투여 시 생강나무 추출물 투여와 관련하여 유전이 투여직후에 일시적으로 관찰되었지만 이는 고용량의 투여에 의한 일시적인 현상이며, 이외의 일반증상이나 사망증상이 나타나지 않았기 때문에 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물 투여에 의한 독성현상은 아니다. 수컷에서 투여 당일에 관찰된 설사는 발생 빈도가 극히 낮은 것으로 보아 시험물질 투여와 관련되지 않는 것으로 사료된다. 한편 암수 모든 시험군에서 생강나무 투여와 관련된 사망률, 체중변화 및 육안적인 부검조건은 관찰되지 않았

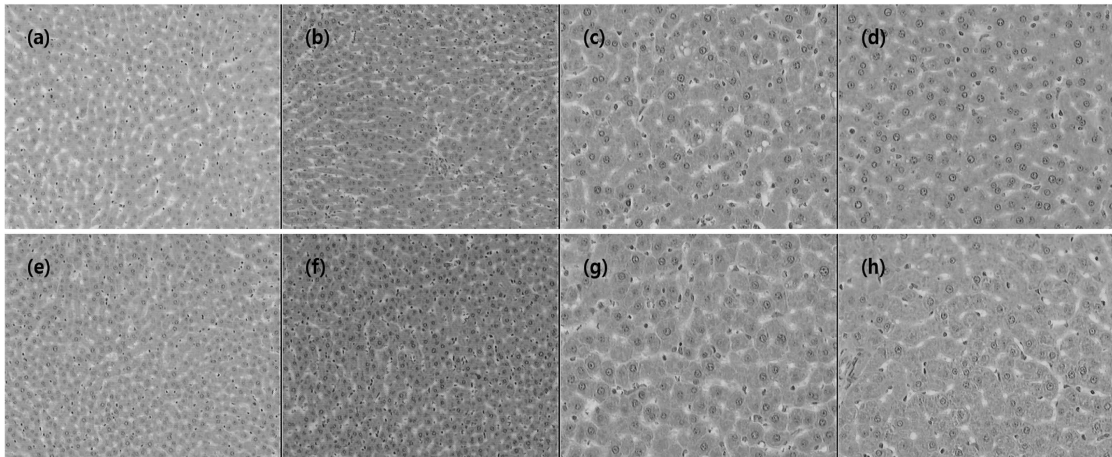


Fig. 1. Representative microscopic findings of the liver of SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14 days. The samples (a) through (d) are from female, and samples (f) through (h) are from male. (a) 0 mg/kg; (b) 500 mg/kg; (c) 1000 mg/kg; (d) 2000 mg/kg; (e) 0 mg/kg; (f) 500 mg/kg; (g) 1000 mg/kg; (h) 2000 mg/kg (hematoxylin-eosin stain, $\times 200$).

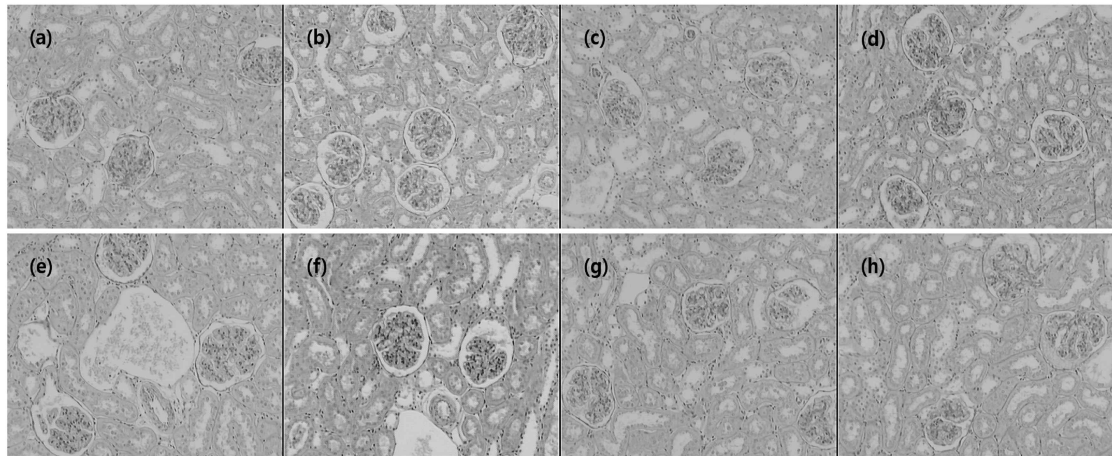


Fig. 2. Representative microscopic findings of the kidney of SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14 days. The samples (a) through (d) are from female, and samples (f) through (h) are from male. (a) 0 mg/kg; (b) 500 mg/kg; (c) 1000 mg/kg; (d) 2000 mg/kg; (e) 0 mg/kg; (f) 500 mg/kg; (g) 1000 mg/kg; (h) 2000 mg/kg (hematoxylin-eosin stain, $\times 100$).

으며(Table 1), 본 시험에서 투여된 5000 mg/kg 용량은 급성 독성에서 실제적 무독성 용량이었다. 또한 14일 반복투여 독성시험에서는 일반증상 관찰 시 모든 암수 동물에 이상 징후가 발견되지 않았고(Table 3), 실험도중 사망하는 개체도 없었으며(Table 2), 체중변화 및 사료, 음수 섭취량 관찰 결과를 볼 때도 별다른 이상 징후가 발견되지 않았다(Table 4). 실험 종료 후 부검을 실시하여 장기무게 및 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사를 실시했으나 대조군 및 생강나무 잎 70% 에탄올 추출물 투여군에서 독성을 나타낸다고 인지할 수 있을 정도의 통계적으로 유의적인 차이가 발생하지 않았다(Table 5~7). 조직병리학적 검사에서 간과 신장을 현미경으로 관찰한 경우에도 독성 증상이 발견되지 않았으므로(Fig. 1, 2) 최대무독성량(no observed adverse effect level (NOAEL))은 2000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었다.

결론적으로 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물의 암수 랫

드에 5000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여는 유연의 일반증상을 유발하였지만, 암수 랫드에서 본 시험물질의 치사량(LD50)은 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되며, 차후의 13주 반복투여 독성 평가를 위해서는 시험 물질의 최고용량을 2000 mg/kg으로 설정함이 타당하다고 판단된다.

본 연구는 과학적 안전성의 근거 없이 사용되어 온 생강나무 잎에 대하여 기능성 phytochemical을 고 함유하는 생강나무 잎 70% 에탄올 추출물의 표준화된 소재를 만든 후 GLP 기관을 통한 전임상 수준의 일부 안전성을 확보하였으며, 위의 결과들로 추후 생강나무 잎을 이용한 여러 가지 일반 가공식품이나 추출물을 이용한 가공품을 만들 때 필요한 안전성의 근거 자료로 충분히 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 이로써 생강나무 잎은 안전한 소재로서 식재료 또는 건강기능식품의 원료로서도 사용이 가능하다고 보겠다. 또한 본 연구는 전임상시험인 일반 독성시험에 한정되

어 있으므로 추후 13주 반복투여독성시험 및 유전독성시험과 필요시 생식독성시험, 발암독성시험, 면역독성시험 등과 임상시험을 수행하여 인체에서의 안전성을 확보하여야 할 것이다.

요 약

생강나무는 한국, 일본, 중국 등지에서 자생하며 열, 복통, 타박상, 출혈 등에 민간요법으로 사용되어온 식물이다. 이 논문의 목적은 오래전부터 민간요법으로 사용되어온 생강나무 잎의 안전성을 평가하고자 생강나무 잎 70% 에탄올 추출물을 암수 각 군당 5마리씩 5000(단회투여 독성시험), 0, 500, 1000, 2000(14일 반복투여 독성시험) mg/kg의 용량으로 단회경구투여와 14일 반복경구투여를 실시하여 15일간의 사망률, 일반증상, 체중변화, 조직병리, 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사를 실시하였다. 시험기간 중 사망동물은 암수 모든 시험군에서 관찰되지 않았으며, 일반증상, 체중변화, 조직병리, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보아 생강나무의 단회투여 독성은 5000 mg/kg 용량을 상회하며, 14일 반복투여의 최고용량인 2000 mg/kg 용량에서도 아무런 독성이 나타나지 않는 것으로 보아 최대무독성량은 이 농도를 상회하는 것으로 판단된다. 이로써 생강나무는 안전한 소재로서 식재료 또는 건강기능식품의 원료로서도 사용이 가능하다고 볼 수 있다.

감사의 글

본 연구는 농림기술관리센터 (과제번호:106019-03--

SB010)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Korea Health Industry Development Institute. 2006. The tendency of Research and development of internal and external natural source remedies. The second: Plan for promotion of natural medicine research & development. p 1-20.
2. Park BG, Lee HS, Jung SH, Koo YC, Hong CO, Lee SJ, Lee KW. 2007. Single and 14-day repeated oral toxicity study and genotoxicological safety estimate of plantamajorside isolate from *Plantago asiatica*. *J Toxicol Pub Health* 23: 79-86.
3. Park JC, Yu YB, Lee JH. 1996. Isolation and structure elucidation of flavonoid glycosides from *Lindera obtusiloba* Blume. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 76-79.
4. Kwon HC, Choi SU, Lee JO, Bae KH, Zee OP, Lee KR. 1999. Two new lignans from *Lindera obtusiloba* Blume. *Arch Pharm Res* 22: 417-422.
5. Kwon HC, Baek NI, Choi SU, Lee KR. 2000. New cytotoxic butanolides from *Lindera obtusiloba* Blume. *Chem Pharm Bull* 48: 614-426.
6. Ishii R, Yoshikawa K, Minakata H, Komura H, Kada T. 1984. Specificities of bio-antimutagens in plant kingdom. *Agric Biol Chem* 48: 2587-2591.
7. Niwa M, Iguchi M, Yamamura S. 1975. Three new obtusilactones from *Lindera obtusiloba* Blume. *Chem Lett* 655-658.
8. Komae H, Hayashi H. 1972. Phytosterols of the trunks of *Lindera obtusiloba* Blume. *Phytochemistry* 11: 1182.
9. Korea Food & Drug Administration. 2005. The standard of toxicity test for medicine and so on. Korea Food & Drug Administration Notice 2005-60.
10. Korea Food & Drug Administration. 2005. The Standard for Nonclinical Demonstration Management. Korea Food & Drug Administration Notice 2005-79.
11. OECD/OCDE. 2001. Guideline for the Testing of Chemicals 423.

(2009년 7월 7일 접수; 2009년 9월 3일 채택)