대한예방한의학회지 제15권 제1호(2011년 4월)
Kor. J. Oriental Preventive Medical Society 2011 ; 15(1) : 37-47

오매(烏梅)의 다성분동시분석 및 마우스를 이용한 경구 단회투여 급성독성시험

이인선[1)] · 한창현[2)] · 이철[3)] · 황방연[3)] · 정상혁[1)] · 이영준[4)] · 전원경[1)]*
[1)]한국한의학연구원 한의융합연구본부, [2)]한국한의학연구원 전통의학정보연구본부
[3)]충북대학교 약학대학, [4)]대구한의대학교 한의과대학 예방의학교실

Simultaneous determination and acute toxicity study of Fructus mume extracts in ICR mice

In Sun Lee,[1)] Chang Hyun Han,[2)] Chul Lee,[3)] Bang Yeon Hwang,[3)]
Sang Hyeok Jung,[1)] Young Joon Lee[4)] & Won Kyung Jeon[1)]*
[1)]TKM Integrated Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine
[2)]TKM Information Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine
[3)]College of Pharmacy, Chungbuk National University
[4)]Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Daeggu Haany University

Abstract

Objectives : Previous studies have shown that Fructus mume (FM) has anti-platelet effects. The present study was performed to determine the acute oral toxicity and quality control of a crude extract of FM in ICR mice.

Methods : We investigated the *in vivo* single dose acute toxicity of FM 95% ethanol extract. This test was orally administered once by gavage to 20 male and 20 female mice at dose levels of 0 (control group), 1250, 2500 and 5000㎎/㎏ body weight, respectively. Mortalities, clinical findings, autopsy findings and body weight changes were monitored daily for the 14 days following the administration. HPLC analysis was performed for the simultaneous determination of ursolic acid and p-hydroxycinnamic acid in FM. Reverse-phase chromatography using a C18 column and photodiode array detection at 211 nm was

· 접수 : 2011년 3월 14일 · 수정접수 : 2010년 4월 18일 · 채택 : 2011년 4월 26일
* 교신저자 : Won Kyung Jeon, Ph.D Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 461-24 Jeonmindong, Yusung-gu, Daejeon 305-811, South Korea
Tel : +82-42-868-9505, Fax : +82-42-868-9573, E-mail : wkjeon@kiom.re.kr

used for quantification of the two maker components. The mobile phase for gradient elution consists of water and acetonitrile.

Results : We observed survival rates, general toxicity, change of body weight, and autopsy. The mice did not die after single oral administration of maximum dose of FM. Autopsy of animal revealed no abnormal gross finding. Therefore, LD_{50} value of FM for ICR mice was more than 5000㎎/kg on oral route. The HPLC analysis showed that ursolic acid and p-hydroxycinnamic acid amounts to 9.75- and 0.12% in the extract with the retention times of 47.99- and 15.38 minutes, respectively.

Conclusions : These results suggest that no toxic dose level of FM in mice is considered to be more than 5000㎎/kg. Consequently, it was concluded that FM have no effect on acute toxicity and side effect in ICR mice. For the quality control of FM extract, simultaneous determination of ursolic acid and p-hydroxycinnamic acid was established.

Key words : Fructus mume, Acute toxicity, LD_{50}, Simultaneous determination, Ursolic acid, p-Hydroxycinnamic acid

I. 서 론

烏梅는 類球形 또는 扁球形으로 표면은 烏黑色 혹은 갈흑색으로 쭈글쭈글하고 고르지 않으며 基部에는 圓形의 果梗의 흔적이 있다. 果核은 단단하고 橢圓形으로 황갈색이면 표면에는 볼록한 點이 있고, 種子는 扁卵形으로 연한 황색이다.[1] 烏梅는 木氣의 純全을 얻고 生하였는데 陰에 屬한다. 性이 升도하고 降도하여 斂肺, 澁腸, 涌痰, 消腫, 殺蟲의 要藥이 된다. 烏梅는 酸澁하고 溫하여 木瓜와 비슷하나 다만 肺에 入하면 收하고 腸에 入하면 澁하고 筋骨에 入하면 軟하고 蟲에 入하면 伏하고 外用으로는 死肌惡肉, 惡痣를 治한다.[2] 烏梅 味는 酸澁하고 性은 溫平하다. 下氣시키고 煩熱을 제거하며 消渴, 吐逆, 反胃, 癨亂을 멎게 하고 虛勞骨蒸을 치료하며 酒毒을 풀어주고 肺癰, 肺痿로 咳嗽, 喘急하는 것을 수렴시키며, 肺疽瘡毒, 喉痺, 乳蛾를 消하며 澁腸시키고 冷熱瀉痢, 便血, 尿血, 崩淋, 帶濁, 夢精, 夢泄을 멎게하며, 蟲과 伏蛔를 죽이고 蟲, 魚, 馬汗, 硫黃毒을 해독시킨다.[3] 한방에서는 당뇨병을 消渴이라고 하고 그 치료는 肺를 補하고 火를 내리며 혈액을 생기게 하는 것을 위주로 하였고, 上消, 中消, 下消로 구분하여 치료하여 왔다. 上消는 갈증이 심하고 음식을 장에서 흡수하지 못하는 것으로 한방에서는 生津養血湯과 黃芩湯이 上消의 치료제로 사용되어 왔고, 이 두 처방의 공통 원료 중 하나가 오매이다. 즉, 오매의 혈당 강하 효과에 대한 연구는 거의 없었지만 전통적으로 한방에서 당뇨병 치료제로 사용되어 왔다.[4] 오매(Fructus mume)는 장미과(Rosaceae)의 매화나무(Prunus mume Si eb.)의 미성숙한 과실을 가공한 한약재로 유기산(citric acid, malic acid, oxalic acid, tartaric acid, fumaric acid, succ공통 c acid 등)을 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.[5-7] 오매의 효능에 대한 실험적 연구는 항균, 항암, 항염증, 항스트레스, 항인플루엔자 활성, 혈행개선효과 등이 보고되어 있다.[8-15] 본 실험실에서 한약재 또는 식물소재를 대상으로 혈행개선에 유효한 활성후보소재를 도출하고자 연구를 수행하던 중에 가감제호탕과 이의 주재료인 오매의 혈소판응집억제 효능이 우수하다는 것을 실험적으로 검증한 바 있다.[16] 그러나 오매에 대해 실험동물을 이용한 독성시험에 대한 안전성 평가는 진행하지 않았으므로 본 연

구에서는 오매의 마우스에 대한 경구급성독성 시험을 우선적으로 수행하였으며 본 실험 결과를 근거로 하여 반복투여독성시험을 위한 적절한 경구투여용량 단계를 선택할 계획이다. 본 연구에서는 오매에 대한 급성독성을 평가하기 위해 식품의약품안전청의 「의약품등의 독성시험기준」[17]에 의하여 마우스를 이용한 경구 단회투여 급성독성시험을 수행함으로써 오매의 급성독성에 관한 기초자료를 얻었기에 보고하고자 한다. 또한 본 연구팀에서 오매의 혈소판응집억제기능을 가지는 활성성분 추적실험을 통하여 ursolic acid와 p-hydroxycinnamic acid를 분리한 바 있어 이를 기반으로 유효성분 2종에 대한 다성분동시분석을 수행함으로써 오매의 품질관리를 위한 관한 기초자료를 얻었기에 보고하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시약 및 표준 물질

본 분석에 사용한 지표 물질 ursolic acid(90% 이상, Sigma, St. Louis, MO, USA, cat. U-6753)와 p-hydroxycinnamic acid (98% 이상, Wako Co., Osaka, Japan cat. 082-06521)는 각각 구입하여 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 acetonitrile과 water는 덕산화학의 HPLC급 용매를 사용하였다.

2. 표준용액의 조제

Ursolic acid와 p-hydroxycinnamic acid의 표준용액 조제를 위하여 각각의 지표성분들의 무게를 정확하게 칭량하고 100% MeOH에 녹인 후, 단계 별 희석을 통해 2μg/ml, 20μg/ml, 100μg/ml, 250μg/ml의 농도로 하여 1 : 1의 비율로 표준용액을 서로 혼합하여 HPLC를 분석을 통해 각각의 검량선을 작성하였다. 오매 95% 에탄올 추출물은 정확히 11.4mg을 측정한 후, 10mg/ml의 농도로 100% MeOH로 희석하였으며 모든 표준용액과 검액은 조제 후 0.45μm membrane filter로 여과하여 분석하였다.

3. 기기 및 분석 조건

HPLC는 Waters사의 시스템을 사용하였으며, 이 시스템은 515 pump와 717plus autosampler, 2996 PDA dectector로 구성되어 있다. HPLC 분석 결과는 Water사의 software인 Empower를 사용하여 처리하였다. Column은 YMC사의 YMC J'sphere ODS-H80(4μm, 150×4.6mm)을 사용하였으며 이동상은 acetonitrile과 water의 gradient 시스템으로 구성하여 flow rate는 1ml/min으로 하였다. PDA dectector의 검출 파장은 211nm로 분석하였다.

4. 실험동물 및 사육환경

본 연구의 시험내용은 한국한의학연구원 동물실험 윤리위원회에서 승인을 받았으며(승인번호 10-163) 실험동물에 대한 지침을 준수하여 가이드라인에 따라 수행 하였다. 시험구역은 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시하였으며, 시험동물은 암수 ICR계 마우스 4주령을 오리엔트 바이오(경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1)에서 분양받아 사용하였다. 시험에 사용한 ICR 마우스를 입수 후, 외관을 육안으로 검사한 다음 7일간의 순화기간동안 일반증상을 관찰하여 건강한 암·수 모두 40마리(암 20, 수 20)를 선발하여 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시한 후, 본 실험을 수행하였다. 순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수는 시간당 12~16회, 조명(12시간 명암주기), 조도는 150~300Lx로 조정하여 시험 전 기간 동안 동일한 환경에서 자유롭게 먹이에

접근할 수 있도록 하였다. 시험기간 중에 사용된 사료는 실험동물용 고형사료(PMI nutrition, USA)를 사용하였으며 사료의 오염물질 확인은 공급처에서 제공한 자료를 근거한바 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다. 물은 음수가 가능한 상수도수를 급여하였다. 실험자는 121℃에서 30분간 멸균 처리및 소독된 기구를 사용하여 실험을 실시하였다.

5. 시료의 조제

오매는 한국화학연구원에서 품질이 우수한 약재를 대상으로 구입하여 외부형태를 비교 검사한 후 한약재 보관소에 보관하였으며 실험에 필요할 때 마다 정량하여 사용하였다. 오매(Mume Fructus) 4Kg을 정량하고 95% 에탄올에 넣어 실온에서 일주일 동안 방치하는 방법으로 추출한 다음 여과지로 여과하였다. 상기 여과액을 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 35~40℃의 수용액 상에서 회전진공농축기를 이용하여 감압 농축한 후 동결건조시켜 오매 동결건조물(480g, 수율 12%)을 제조하였다. 실험에 사용하기 전까지 냉암소(冷暗所)에 보관하였다.

6. 실험군 설계 및 투여용량의 설정

5주령 마우스에 대한 오매의 단회투여 급성독성을 평가하기 위하여 체중을 측정하고 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하여 투여군별로 암·수 각 5마리씩 사용하였다. 투여 경로는 한방임상적용경로에 따라 경구를 선택하였으며, 투여량은 투여 당일의 체중을 기준으로 하여 계산하였다. 시험물질은 한약추출물로 단회투여에 의한 사망은 없을 것으로 예측되어 투여 용량은 최대량 5000㎎/㎏을 기준하여 5000, 2500, 1250, 0㎎/㎏ 등으로 정하였다(Table 1). 각 용량군의 오매는 투여 직전에 3차 증류수로 용해하여 실험에 사용하였다. 경구투여하기 전에 하룻밤 절식시킨 후 배부 피부 고정법으로 고정하고 경구투여용 금속제 존데와 주사관을 이용하여 1회 투여/투여 당일로 위내에 강제 경구 투여 하였다.

7. 임상증상 및 사망 동물의 관찰

임상 증상은 투여당일에는 오매 투여 직후부터 6시간 동안 매시간 관찰하였으며, 그 후 14일 동안 1일 1회 일반상태 관찰법에 의하여 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무

Table 1. The Groups of Administration

Group	No. of animals (head)	Dose volume (ml/kg)	Dose (mg/kg)
Vehicle control	5 males 5 females	10	0
T1	5 males 5 females	10	5000
T2	5 males 5 females	10	2500
T3	5 males 5 females	10	1250

에 대해서 대조군과 비교 관찰하였고 모든 경과를 상세히 기록하였다.[17]

8. 부검 및 체중변화

실험 종료 후, 에테르로 마취하여 후대정맥을 통한 방혈치사 시킨 다음 부검하여 외관 및 내부 장기(심장, 신장, 폐, 간, 비장, 소장, 대장)의 이상 유무를 육안 소견으로 관찰하였다. 체중 변동을 알아보기 위해 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 경구투여 직전과 투여 후 1일, 3일, 7일과 부검하기 직전인 14일째에 체중을 자동전자저울을 이용하여 각각 측정하였다.

9. 통계처리

체중에 대한 통계분석은 SPSS 12.0 패키지(SPSS, USA)를 이용하였으며, 모든 측정값은 평균과 표준편차로 계산하였다. 대조군과 투여군의 분석 수치에 대한 유의적 검증은 반복측정분산분석(repeated measured ANOVA)을 유의성 $p<0.05$으로 검정하여 유의성이 인정된 경우 대조군과 투여군 간에 차이가 있는지 조사하기위하여 다중비교법인 Dunnett test를 실시하였다. 체중 측정기간 동안 대조군과 투여군 간의 체중변화에 대한 통계분석은 friedman test를 적용하였다. 분석결과에 대한 $p<0.05$ 수준에서 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 분석 조건 확립

오매의 95% 에탄올 추출물로부터 ursolic acid와 p-hydroxycinnamic acid의 정확한 함량 분석을 위해 acetonitrile과 water를 gradient elution system을 통해 HPLC 분석하였다. 0% ACN (~0 min), 10% ACN (~5 min), 30% ACN (~25 min), 80% ACN (~40 min), 100% ACN (~45 min), 100% ACN (~60 min)으로 이동상을 설정하여 상기 표준물질들을 분석하였고, 동시분석의 최적 검출 파장으로는 211nm을 선택하였다. 지표성분의 peak는 retention time과 UV spectra를 비교하여 확인하였다(Fig. 1).

2. 함량 분석

오매의 95% 에탄올 추출물에 함유된 p-hydroxycinnamic acid는 15.38 min에 ursolic acid는 47.99 min에서 retention time을 나타내었으며, 함량은 p-hydroxycinnamic acid가 0.12%, ursolic acid가 9.75%로 나타났다.

3. 치사율 및 LD_{50} 값

오매를 1250, 2500, 5000mg/kg 농도별로 단회경구투여한 후 암수 ICR 마우스를 14일 동안 독성징후와 동물의 사망발현에 대해 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 경구투여시 본 실험의 경우 오매 추출물의 최대량 5000mg/kg까지 투여하여도 사망동물을 관찰할 수 없어 개략의 반수치사용량(LD_{50})을 5000mg/kg 이상으로 산출하였다. 따라서 마우스에 대한 오매의 개략의 치사량은 암·수 모두에서 5000mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었다.

4. 체중 변화

Fig. 2, 3과 같이 모든 시험군에서 경구투여 후 시간 경과에 따라 정상적인 체중증가가 유의하게 관찰되었는데(p=0.000) 이는 오매에 의한 체중증가 억제를 나타내지 않는 것으로 보아 독성이 없는 것으로 판단되었다. 또한 모든 시험군 간의 체중변화 검정을 위해 반복측정분산분석을 수행한 결과 암컷 ICR 마우스의 경

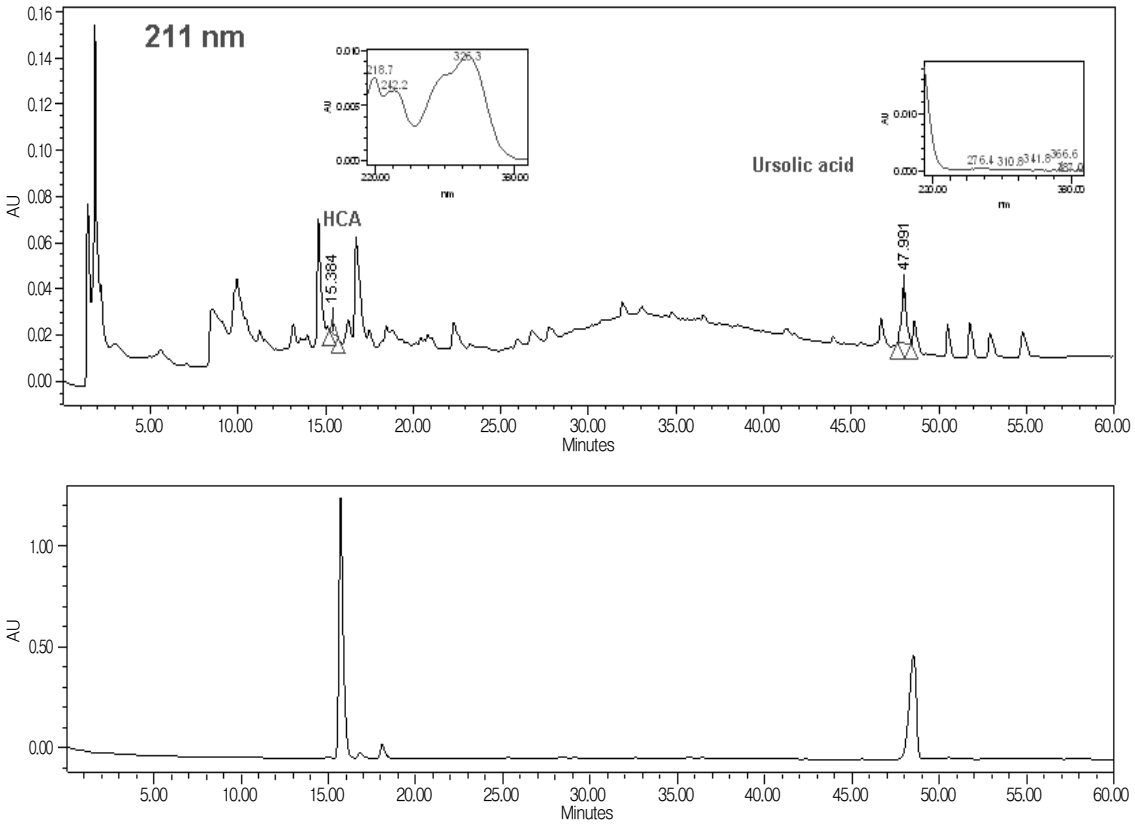

Fig. 1. HPLC chromatogram of p-hydroxycinnamic acid and ursolic acid in Fructus mume extract by 95% ethanol

Table 2. Mortality of Male And Female ICR Mice Treated Orally with Fructus Mume Extracts by 95% Ethanol

Sex	Group	Days after treatment															Final Mortality	LD_{50} (mg/kg)
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Male	C	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000
	T_1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T_2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T_3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Female	C	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000
	T_1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T_2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T_3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

* Values are expressed as number of dead animals/total animals. C : vehicle orally treated group, T_1 : 5000mg/kg(day) of Fructus mume orally treated group, T_2 : 2500mg/kg(day) of Fructus mume orally treated group, T_3 : 1250mg/kg(day) of Fructus mume orally treated group.

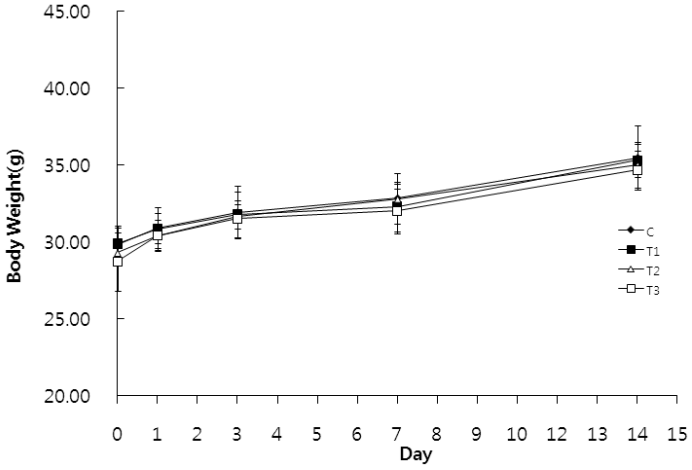

Fig. 2. Effects of Fructus mume and vehicle on body weight in male ICR mice. C : vehicle orally treated group, T_1 : 5000㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_2 : 2500㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_3 : 1250㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group. P values represent significant differences for 14 days at several points of body weight measurement. $^*P < 0.0001$ (Friendman test).

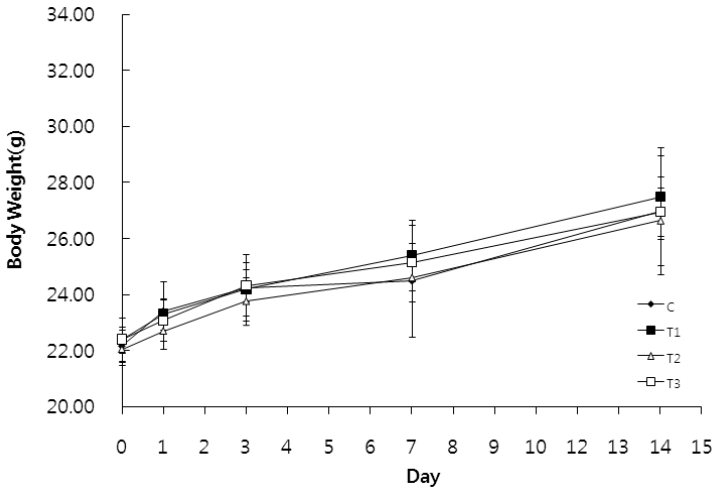

Fig. 3. Effects of Fructus mume and vehicle on body weight in female ICR mice. C : vehicle orally treated group, T_1 : 5000㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_2 : 2500㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_3 : 1250㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group. P values represent significant differences for 14 days at several points of body weight measurement. $^*P < 0.0001$ (Friendman test).

우 각 시험군 간의 유의한 차이는(p=0.735) 나타나지 않았으며, 수컷 ICR 마우스에서도 각 시험군 간의 유의한 차이가(p=0.777) 나타나지 않았다. 대조군과 투여군 간의 체중변화에 대한 사후 검정 결과는 table 3과 같이 암컷 수컷 모두 독성에 의한 체중변화는 없는 것으로 관찰되었다. 그리고 투여용량군 사이의 체중변화는 용량의존성을 나타나지 않았다.

Table 3. Body Weights in Male And Female ICR Mice Treated Orally with Fructus Mume Extracts by 95% Ethanol

Sex	Group	Days after treatment					*P*-value
		0	1	3	7	14	
Male	C	29.84±1.08*	30.91±1.00	31.94±1.68	32.84±1.64	35.47±2.08	
	T_1	29.89±1.19	30.84±1.39	31.78±1.51	32.30±1.62	35.30±1.09	0.990
	T_2	29.29±0.81	30.37±0.76	31.65±0.78	32.80±0.98	35.01±1.47	0.918
	T_3	28.72±1.90	30.42±1.03	31.50±1.22	32.02±1.47	34.67±1.25	0.635
Female	C	22.17±0.57	23.41±1.07	24.25±1.18	24.49±2.00	26.98±2.26	
	T_1	22.38±0.46	23.30±0.54	24.20±0.97	25.40±1.27	27.49±1.49	0.913
	T_2	22.04±0.57	22.69±0.62	23.75±0.85	24.60±0.85	26.64±1.59	0.892
	T_3	22.40±0.77	23.07±0.73	24.32±0.57	25.14±0.69	26.94±0.86	0.994

* Results are mean ± S.D. (n=5). Group abbreviation : C : vehicle orally treated group, T_1 : 5000㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_2 : 2500㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_3 : 1250㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group. P values represent significant differences between the control and experimental group values, respectively(Repeated measured ANOVA, Dunnett t-test).

Table 4. Clinical Signs in Male And Female ICR Mice Treated Orally with Fructus Mume Extracts by 95% Ethanol

Sex	Variable	\Group	C*	T_1	T_2	T_3
		\Dose(㎎/㎏)	0	5,000	2,500	1,250
		\No. of animal	5	5	5	5
Male	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0
Female	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0

C* : vehicle orally treated group, T_1 : 5000㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_2 : 2500㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_3 : 1250㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group.

5. 임상 증상

시험물질 오매 투여한 후 관찰한 결과 Table 4에서와 같이 경구투여 후 14일 동안 암수 ICR 마우스 모두 본 실험물질의 투여에 관한 어떠한 독성증상의 이상 소견이 관찰되지 않았다.

6. 부검 소견

오매 경구투여 후 14일째 생존동물 모든 암수 ICR 마우스를 부검하여 주요 장기에 대한 육안적 소견을 관찰한 결과 Table 5와 같다. 부검 결과, 대조군과 시료투여군 등의 모든 시험군에서 시험물질의 투여에 기인된 외관상이나 내부 장기에 어떠한 육안적 이상소견이나 병변이 발견되지 않았다.

Ⅳ. 고 찰

오매(烏梅)는 매화나무의 미성숙한 과실을 채취하여 짚불연기에 훈증하여 건조한 것으로 성

Table 5. Autopsy Findings in Male And Female ICR Mice Treated Orally with Fructus Mume Extracts by 95% Ethanol

Sex	Variable	\Group	C*	T_1	T_2	T_3
		\Dose(㎎/㎏)	0	5,000	2,500	1,250
		\No. of animal	5	5	5	5
Male	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0
Female	normal		5	5	5	5
	abnormal		0	0	0	0

C* : vehicle orally treated group, T_1 : 5000㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_2 : 2500㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group, T_3 : 1250㎎/㎏(day) of Fructus mume orally treated group.

질이 따듯하고 독이 없고 맛이 시다. 담을 삭히고, 토하는 것과 갈증, 이질을 멎게 하며 술독을 사용될 수 있으며, 상한과 조갈에 주로 쓰인다. 검은 사마귀를 없애고 입이 마르면서 침을 자주 뱉는 것을 치료한다고 기록되어져 있다.[18] 본 연구에 사용된 시험물질인 오매는 95% 에탄올 추출한 다음 농축하여 동결건조의 제조과정을 거쳤으며 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 마우스는 독성시험에 적합한 실험동물로서 급성독성시험에 널리 사용되고 있고, ICR 계통의 마우스는 풍부한 시험 기초 자료가 축적되어 있어서 시험결과의 해석 및 평가 시에 활용하는데 적당한 것으로 알려져 있다. 시험물질인 오매는 “의약품등의 독성시험기준”에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 ICR 마우스에 각각 고용량군, 중간용량군, 저용량군 등으로 시험물질의 투여군을 나누었으며, 대조군은 3차 증류수를 투여하였다.[19] 본 연구는 오매 추출물의 ICR 마우스를 이용한 단회 경구투여에 의한 독성시험의 정보를 얻기 위하여 식품의약품안전청 고시 제2009-116호(2009년 8월 24일)의 “의약품 등의 독성시험기준을 근거로 하여 실시하였다.[17] 시험물질 오매추출물에 대한 단회 경구투여 독성시험을 ICR 마우스에서 경구로 최고용량 5000㎎/㎏까지 투여한 결과, 폐사 및 일반증상과 모든 생존동물에 대한 해부병리소견에서 시험물질의 투여에 기인한다고 판단되는 변화는 관찰되지 않았다. 또한 대조군과 비교하여 투여군 체중의 유의한 증가가 없으므로 독성에 의한 체중변화는 없는 것으로 판단되었다. 본 연구는 오매에 대한 급성독성평가를 목적으로 ICR 암·수 마우스에게 각각 0, 1250, 2500, 5000㎎/㎏ 용량으로 단회 경구투여한 후 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰한 결과를 얻었다. 본 시험결과에 따르면 마우스에서 오매의 경구투여는 모든 시험군의 마우스가 생존하여 평균치사량을 산출할 수 없었으며, 임상증상 관찰 시 실험물질의 투여에 관한 어떠한 독성증상의 이상 소견이 관찰되지 않았다. 또한 경구투여 한 마우스의 체중변화는 대조군과 시험물질 투여군 간의 독성으로 인한 유의한 차이를 발견할 수 없었고, 모든 장기에 육안적 이상병변은 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구결과를 바탕으로 다음 실험에서는 반복투여독성시험을 위한 오매의 고용량은 5000㎎/㎏으로 설정해야 할 것으로 판단되다. 향후 오매를 실험동물에 반복투여 하여 중·장기간 내에 나타나는 독성을 질적·양적으로 검사하는 독성평가를 수행함으로써 반복투여에 의한 안전성 기초자료를 확보할 계획이다. 본 실험에 사용된 오매 추출물의 지표물질 분

석을 통한 시료 표준화를 위하여 관련된 기발표 논문을 검색한 결과 오매의 다양한 성분 중 oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid 및 succinic acid등의 유기산에 의한 동시분석법은 이미 보고되어 있으나,[6] 유효성분을 포함하는 다른 성분에 대한 분석법은 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 오매에 함유된 유효성분 ursolic acid와 p-hydroxycinnamic acid에 대하여 HPLC법을 이용하여 동시 분석조건을 확립하였고, 함량 분석을 시행하였다. 이러한 결과를 바탕으로 오매에 함유된 이들 성분을 활용하여 오매의 표준화를 위한 지표물질로 적절한 것으로 판단하였다. 따라서 본 연구는 다성분 동시분석법을 확립하여 표준화된 오매 시료를 대상으로 급성독성시험을 수행하여 무독하다는 결과를 얻음으로써 이는 향후 연구자가 시험물질이나 기술수준에 관한 이용 가능한 정보에 따라 시험계획을 강구할 수 있는 기본적 근거로 활용될 수 있겠다.

V. 결 론

본 시험에 사용된 오매 시료의 품질관리를 위해 유효성분에 대한 다성분동시분석법을 확립하였고 이를 이용하여 함량분석을 한 결과 ursolic acid와 p-hydroxycinnamic acid가 각각 9.75%, 0.12% 함유하는 것으로 측정되었다. 시험물질인 오매는 암·수 ICR 마우스에서의 LD_{50}값은 경구투여가 5000㎎/㎏ 이상인 생체내 저독성의 안전한 물질로 작용되는 것으로 판단된다.

VI. 감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 일반연구자지원사업(2010-0016541)과 기초기술연구회 협동연구사업(Kiom-2010-2)의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. 서부일, 최호영. 임상 한방본초학. 서울 ; 영림사. 2004 : 919-20.
2. 李尙仁 著. 서울 ; 도서출판 修書院. 1975 : 158.
3. 張介賓 著, 김영남 譯. 國譯 景岳全書 5. 서울 ; 一中社. 1992 : 102.
4. 고병섭, 박성규, 최수봉, 전동화, 장진선, 박선민. 오매 추출물의 혈당 강하 효과. 한국식품영양과학회지. 2004 ; 33(6) : 951-2.
5. Wang L, Zhang HY, Wang L. Comparison of pharmacological effects of Fructus Mume and its processed products. Zhong Yao Cai. 2010 ; 33(3) : 353-6.
6. Zhanguo C. Jiuru L. Simultaneous and direct determination of oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid, and succinic acid in Fructus mume by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr Sci. 2002 ; 40(1) : 35-9.
7. Chen ZG, En BT, Zhang ZQ. Simultaneous determination of eight organic acids in Fructus mume by RP-HPLC. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2006 ; 31(21) : 1783-6.
8. Chen Y, Wong RW, Seneviratne CJ, Hägg U, McGrath C, Samaranayake LP, Kao R. The antimicrobial efficacy of Fructus mume extract on orthodontic bracket : a monospecies-biofilm model study invitro. Arch Oral Biol. 2011 ; 56(1) : 16-21.
9. Yang JD, Hu LB, Zhou W, Yin YF, Chen J, Shi ZQ. Lysis of Microcystis aeruginosa with extracts from Chinese medicinal herbs. Int. J. Mol. Sci. 2009 ; 10(9) :

4157-4167.
10. Choi HJ, Kang OH, Park PS, Chae HS, Oh YC, Lee YS, Choi JG, Lee GH, Kweon OH, Kwon DY. Mume Fructus water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Med Food. 2007 ; 10(3) : 460-6.
11. Shen H, Cheng T, Qiao C, Su Z, Li C. Antitumor effect in vitro and immune-response in vivo of fructus Mume. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1995 ; 20(6) : 365-8.
12. Ina H. Yamada K, Matsumoto K. Miyazaki T. Effects of Benzyl Glucoside and Chlorogenic Acid from Prunus mume on Adreno cortico tropic Hormone (ACTH) and Catecholamine Levels in Plasma of Experimental Menopausal Model Rats. Biol Pharm Bull. 2004 ; 27(1) : 136－137.
13. Yingsakmongkon S, Miyamoto D, Sriwilaijaroen N, Fujita K, Matsumoto K, Jampangern W, Hiramatsu H, Guo CT, Sawada T, Takahashi T, Hidari K, Suzuki T, Ito M, Ito Y, Suzuki Y. In vitro inhibition of human influenza A virus infection by fruit-juice concentrate of Japanese plum (Prunus mume SIEB. et ZUCC). Biol Pharm Bull. 2008 ; 31(3) : 511-5.
14. 박승희, 박금주, 김재기. 오매(Mume Fructus) 추출물의 혈행개선 효과. 약학회지. 2009 ; 53(5) : 298-302.
15. Chuda Y, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Matsumoto K, Nagata T, Kikuchi Y. Mumefural, citric acid derivative improving blood fluidity from fruit-juice concentrate of Japanese apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc). J Agric Food Chem. 1999 ; 47 (3) : 828-31.
16. Jeon WK, Kim YE, Park SO, Kwon DY, Ahn SW, Lee JH, Ji MS, Ko BS. The modified Je-Ho-Tang, Korean hrbal medicine, inhibits hole-blood aggregation and platelet adhesion to collagen under flow. Thromb Res. 2008 ; 122(6) : 804-809.
17. 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시2009-116호. 서울 ; 식품의약품안전청. 2009.
18. 허준 著, 김형준, 윤석희 譯, 동의보감. 하동 ; 동의보감출판사. 2005 : 481.
19. 고병섭, 박민정, 박소민, 전원경, 천진미, 정필문, 박선민, 최수봉, 오명숙, 장문석, 박성규. 가미옥천산의 ICR 마우스 경구 투여에 의한 급성 독성시험 연구. 동의생리병리학회지. 2005 ; 19(5) : 1200-1203.