

## 랫드를 이용한 여주 추출물의 안전성 평가

류현열<sup>1</sup> · 이소민<sup>1</sup> · 안규섭<sup>1</sup> · 연 용<sup>1</sup> · 김혜진<sup>1</sup> · 김성은<sup>2</sup>  
이학성<sup>2</sup> · 홍수영<sup>2</sup> · 김현규<sup>2</sup> · 황인국<sup>3</sup> · 송경석<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한국건설생활환경시험연구원(KCL) 바이오융합연구소

<sup>2</sup>콜마비엔에이치(주) 신소재식품연구소

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

### Safety Evaluation of Ethanol Extract from Unripe Fruit of Bitter Melon (*Momordica Charantia* L.) in Sprague-Dawley Rats

Hyeon Yeol Ryu<sup>1</sup>, Somin Lee<sup>1</sup>, Kyu Sup Ahn<sup>1</sup>, Yeon Yong<sup>1</sup>, Hye Jin Kim<sup>1</sup>, Seong-Eun Kim<sup>2</sup>, Hak Sung Lee<sup>2</sup>, Su-Young Hong<sup>2</sup>, Hyun-Kyu Kim<sup>2</sup>, In Guk Hwang<sup>3</sup>, and Kyung Seuk Song<sup>1</sup>

<sup>1</sup>General Toxicity Evaluation Center, Bio Convergence Technology Laboratory, Korea Conformity Laboratories (KCL)

<sup>2</sup>Nutraceutical Food R&D Center, KolmarBNH Co., Ltd.

<sup>3</sup>Department of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration

**ABSTRACT** This study was performed to evaluate repeated dose oral toxicity upon administration of the test substance 1,2-benzisothiazolin-3-one for 90 days and to determine NOAEL (no observed adverse effect level) and target organs in Sprague-Dawley rats. Single, 2-week repeated, and 13-week repeated oral dose toxicity studies were conducted in Sprague-Dawley rats. The dose levels of groups were 1,250, 2,500, and 5,000 mg/kg/d. All dose groups were compared with the vehicle control group. The animals were observed for clinical signs and weekly body weight. Urinalysis, hematology, and serum biochemistry analyses were conducted. Subsequently, animals were sacrificed and subjected to histopathological examination. For the result, NOAEL of ethanol extract from unripe fruit of bitter melon had an optimal dose of 5,000 mg/kg/d and acceptable daily intake up to 3,000 mg/man. There was no target organ detected. Therefore, bitter melon, which contains a variety of bioactive substances, could be widely used as a health functional food ingredient.

**Key words:** *Momordica charantia*, bitter melon, safety evaluation, NOAEL

## 서 론

근래 건강에 대한 관심 증가와 웰빙 열풍으로 천연물을 이용한 다양한 식품의 활용도가 증가함에 따라 미국, 일본, 동남아시아 등에서는 오래전부터 혈당 개선을 효능으로 하는 제품들이 판매되고 있다. 게다가 서구화된 식습관과 과도한 육류 섭취로 인해 매년 당뇨병의 유병률이 증가하고 있으며, 국민건강영양조사(2013)에 의하면 국내 만30세 이상의 성인 당뇨병 유병률은 11%로 전년 대비 2% 증가하였다(1). 특히 65세 이상에서는 21.7%로 연령대가 높아질수록 증가하였다(2). 여주(*Momordica charantia* L.)는 bitter melon, bitter gourd, bitter squash 등의 이명으로 알려져 있으며,

아시아, 아프리카, 카리브해 연안의 열대 및 아열대 지역에서 자생하는 박과(*Cucubitaceae*)의 덩굴식물이다(3). 기록 상으로는 인도에서 유래되었다고 전해지며 14세기 중국에 처음으로 전해졌다. 국내에서는 철원, 정읍, 함양, 제주 등지에서 여주를 재배 및 가공, 판매하여 농가의 부가가치를 높이고 있다(4). 여주에는 페놀계 화합물을 비롯해 carotenoids, flavonoids, isoflavones, terpenes, anthroquinones 같은 생리활성 물질들이 풍부하다고 알려져 있다(5). 이러한 화합물은 항당뇨, 항염증, 항암 등에 효능이 있으며 그중 항당뇨에 관한 연구가 주를 이루고 있다(6). 항당뇨 활성에 기여하는 여주의 주요 성분으로는 열매에 주로 포함된 카란틴(charantin)과 식물성 인슐린(p-insulin)이 있다. 카란틴은 인슐린 분비에 결정적 역할을 하는 베타 세포를 활성화하고, 식물성 인슐린은 체내에서 인슐린과 비슷한 작용을 하는 peptide의 일종으로 궁극적으로 혈당 조절에 기여하는 것으로 알려져 있다(7). 하지만 여주에 포함된 alkaloid계 화합물

Received 28 November 2016; Accepted 28 March 2017

Corresponding author: Kyung Seuk Song, General Toxicity Evaluation Center, Bio Convergence Technology Laboratory, Korea Conformity Laboratories (KCL), Incheon 21999, Korea  
E-mail: songks@kcl.re.kr, Phone: +82-32-859-4043

인 vicine은 G6PD 유전자가 결손된 사람에게 잠두증독(favism)을 일으켜 급성 용혈성 빈혈을 유발한다(8). 이러한 vicine은 주로 완전히 성숙한 여주열매의 종자 외피에 함유된 것으로 알려져 있다(9). 또한, 어린이가 섭취하였을 경우 경련, 저혈당 혼수 등을 일으키며 성인의 경우도 설사, 복통, 저혈당, 흉통, 요실금, 발열을 일으킨다. 여성의 경우에는 생식능력의 감소가 발생할 수 있으며, 산모가 섭취하였을 경우에는 하혈, 진통이 올 수 있고 심할 경우에는 유산하기도 한다(10). 따라서 본 연구에서는 경남 함양 지역에서 재배된 종자가 형성되지 않은 여주 미숙과의 독성에 대해 평가하여 일일허용섭취량(acceptable daily intake, ADI)을 제안하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 여주 원재료 확보

실험에 사용한 여주 원재료는 경남 함양에 소재한 함양영농조합법인 천령식품 지점으로부터 확보하였고 경남 함양군에서 2014년도 4월부터 재배된 Nakanokoya 품종의 여주 미숙과 열매를 6월 중순에 수확하여 물로 세척, 절단 가공한 후 그 절편을 40~50°C 조건으로 수분 함량이 5~7%가 되도록 열풍건조(TJDL-15WA, Joongang Precision Co., Ltd., Daegu, Korea) 하여 사용하였다.

### 여주 추출 분말 제조

여주의 추출은 (주)대호양행(Hwaseong, Korea)에 의뢰하여 다음과 같은 조건으로 대량생산을 수행하였다. 칭량된 여주의 15배수의 70% 주정으로 70°C에서 4시간 동안 1차 추출하고, 추출물을 얻고 남은 잔여물을 다시 10배수의 70% 주정으로 2시간 동안 2차 추출하였다. 농축은 감압농축기(Busung Tech, Anseong, Korea)를 사용하여 65°C로 15~20 Brix까지 농축하였다. 농축된 여주 추출물을 50중량%, 텍스트린 49중량%, 유화제 1중량%로 혼합한 후 65~80°C에서 30~40분간 살균하였다. 이때 온도는 80°C를 넘지 않도록 하였다. 살균된 추출액을 분무건조기(Me Hyun Engineering, Anyang, Korea)를 통해 분말화하고 80 mesh로 여과하여 최종적으로 여주 추출 분말을 얻었다.

### HPLC를 이용한 여주 추출 분말의 vicine 분석

시료 2 g을 칭량하여 25 mL의 증류수를 추출용매로 하여 50°C에서 30분간 초음파 추출(sonication)을 실시하고, 원심분리(3,000 rpm, 15 min) 하여 상층액을 모으고 잔사에 증류수 25 mL를 첨가한 후 상기 방법과 동일하게 추출 및 원심분리 하여 얻은 상층액을 최종 50 mL로 정용한 다음 여과(0.2 µm PTFE syringe filter)하여 이를 HPLC 분석시료로 사용하였다. Vicine 분석에 사용한 칼럼은 Phenomenex hydro-RP C18, 80A(250×4.60 mm, 4 micron, Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였고 시료 주입량

은 10 µL, 검출파장은 270 nm에서 측정하였다. 이동상으로는 A용매(0.5% formic acid in water)와 B용매(0.5% formic acid in acetonitrile)로 하여 A:B는 96:4로, 유속은 0.3 mL/min으로 분석하였다. Vicine 표준용액은 3.12, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 및 200.00 µg/mL로 단계적으로 희석한 후 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였다. Vicine의 검량선 회귀식은  $y=53.279x-14.94$ 였고, 상관계수(R<sup>2</sup>)는 모두 1로 양호한 직선성을 나타냈다.

### 실험동물

단회 경구투여 독성시험, 2주 반복투여 용량결정시험 및 13주 반복 경구투여 독성시험을 위하여 specific pathogen free(SPF) Sprague-Dawley(SD) 랫드를 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 제공받았고, 단회 경구투여 독성시험(8주령) 및 2주 반복투여 용량결정시험(6주령)은 암수 각각 군당 5마리, 13주 반복 경구투여 독성시험(6주령)은 암수 각각 군당 10마리의 동물을 이용하였다. 랫드는 SPF 동물실에 입수하여 약 일주일간의 순화기간을 거친 후 일반 증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였고, 투여 전일에 체중을 측정하고 Excel program을 이용하여 순위화한 체중으로 군 분리를 실시하였다. 동물은 검역, 순화, 투여 및 관찰기간에 스테인리스제 방사육상자(250W×350 L×180H mm)에 수용하였다. 사료 Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet(Harlan Co., Ltd., Madison, WI, USA)를 두얼바이오택(Seoul, Korea)으로부터 공급받아 급이하고, 물은 음용 상수도수를 정수시킨 후 폴리카보네이트제 물병에 넣고 자유섭취 시켰다. 실험동물실은 온도 22±3°C, 상대습도 50±20%, 명암 cycle은 형광등 조명 12 h(08:00 점등~20:00 소등), 환기횟수 10~15회/h, 조도 150~300 lx, 소음 60 db 이하 및 암모니아 농도 5 ppm 이하로 유지하였다. 본 시험은 동물실험윤리규정의 준수에 따라 한국건설생활환경시험연구원 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(승인번호: IA14-01071, IA14-01127, IA15-00106)을 거쳐 수행되었다. 또한, 모든 시험은 식품의약품안전처 고시 제2014-136호(2014년 07월 30일) '의약품등의 독성시험기준'과 식품의약품안전처 고시 제2014-67호(2014년 02월 12일) '비임상시험관리기준'에 준하여 실시하였다.

### 단회 경구투여 독성시험

시험의 투여용량 결정을 위하여 본 시험물질을 이용하여 2,500 및 5,000 mg/kg의 투여용량으로 암수 각 1마리에 단회 경구투여 한 결과, 모든 시험군에서 시험물질에 의한 독성학적 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 시험물질이 천연물인 것을 고려하여 본시험에서는 5,000 mg/kg의 단일 시험물질 투여군을 설정하였고, 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 두었다. 체중을 기준으로 20 mL/kg으로 투여액량을 계산하고, 투여방법은 동물의 경배부 피부를 잡아 고정한

후 경구투여용 존데를 이용하여 단회 경구투여 하였다. 시험 항목은 모든 동물에 대하여 매일 1회 일반증상관찰을 하였으며, 투여 당일에는 투여 30분 후 및 이후 6시간까지 시간마다 관찰하였다. 일반증상관찰은 투여 후 14일까지 실시하였다. 체중은 투여 전, 투여 후 1, 7 및 14일째(부검 전)에 측정하였다. 투여 후 14일째에 모든 생존동물을 CO<sub>2</sub> 가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대정맥과 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈 치사시켜 장기에 대한 육안적인 부검 소견을 관찰하였다.

### 13주 반복 경구투여 독성시험

**용량설정 및 일반증상관찰:** 시험의 투여용량 결정을 위하여 본 시험물질을 이용하여 0, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/d의 투여용량으로 2주 반복투여 용량결정시험을 실시한 결과, 모든 시험군에서 시험물질에 의한 이상증상 및 독성 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 시험물질이 천연물인 것을 고려하여 본 시험에서는 5,000 mg/kg/d를 고용량 투여군으로 하고, 공비를 2로 두어 중용량(2,500 mg/kg/d) 및 저용량(1,250 mg/kg/d)을 투여군으로 설정하였으며, 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 두었다. 체중을 기준으로 20 mL/kg으로 투여액량을 계산하고, 투여방법은 동물의 경배부 피부를 잡아 고정된 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였다. 투여횟수 및 투여기간은 1회/일, 7회/주, 13주간 투여하였다. 투여 전 기간에 걸쳐 1일 1회 투여 직후의 일반증상을 관찰하였고, 모든 동물에 대하여 주 1회 체중과 사료섭취량 측정을 측정하였다. 투여 마지막 주에 부형제 대조군 및 고용량군에 대하여 검안경(Vantage plus, Keeler LTD., Windsor, UK)과 안저사진기(Genesis, Kowa Co., Ltd., Nagoya, Japan)를 이용하여 눈의 안저부위를 관찰하였다.

**임상병리검사:** 투여 마지막 주에 시험군당 암수 각 5마리의 동물을 대사케이지를 이용하여 신선요를 채집하여 요검사를 실시하고, 요량은 약 24시간 동안 채집한 양을 측정하였다. 채집한 신선뇨를 요검사용 시험지(SIEMENS, Erlangen, Germany)와 요자동분석장치(CliniTek 50, SIEMENS)를 이용하여 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(occult blood), pH, 단백질(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen) 및 아질산염(nitrite)을 측정하였고, 요침사 검사는 현미경을 이용하여 적혈구(erythrocyte), 백혈구(leukocyte), 상피세포(epithelial cell), 원주(casts)를 관찰하고 색조는 육안으로 관찰하였다. 모든 동물에 대하여 부검 전 하룻밤 절식한(단, 음수는 제공) 후 부검 당일 동물을 isoflurane으로 마취하고 개복하여 후대동맥에서 주사기를 이용하여 채혈하였다. 채혈한 혈액은 EDTA-K2 Tube(BD, Franklin Lakes, NJ, USA), 3.2% Sodium citrate Tube(Vacurette North America, Monroe, NC, USA), Serum separating Tube(Sekisui Medical Co., Ltd., Osaka, Japan)에 담았고,

혈청과 혈장의 분리를 위하여 원심분리기로 3,000 rpm, 10분간 원심분리 하여 상층액을 검사에 사용하였다. 혈액학적 검사는 EDTA-K2 Tube의 전혈로 혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS)를 이용하여 WBC(white blood cell count), RBC(red blood cell count), HCT(hematocrit), Hb(hemoglobin concentration), RDW(red cell distribution width), MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), differential blood count, PLT(platelet), MPV(mean platelet volume) 및 Reti(reticulocyte)를 측정하였다. 혈액응고시간 검사는 3.2% Sodium citrate Tube에 담아 응고를 방지하고 원심분리 하여 얻어진 혈장을 혈액응고시간 검사장치(ACL7000, Instrumentation Laboratory Co., Lexington, MA, USA)를 이용하여 PT(prothrombin time) 및 APTT(active partial thromboplastin time)를 측정하였다. 혈액생화학적 검사는 Serum separating Tube의 혈액을 실온에 방치 후 응고시켜 원심분리 하여 얻어진 혈청을 혈액생화학검사기(Hitachi 7180, HITACHI, Tokyo, Japan)를 이용하여 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), GGT(gamma(γ)-glutamyl transferase), ALP(alkaline phosphatase), BIL(total bilirubin), BUN(blood urea nitrogen), CRE(creatinine), UA(uric acid), GLU(glucose), CHO(total cholesterol), TG(triglyceride), PRO(total protein), ALB(albumin), A/G ratio(albumin-globulin ratio), LDH(lactate dehydrogenase), CPK(creatine phosphokinase), Ca(calcium), P(inorganic phosphorus), Mg(magnesium), Na(sodium), K(potassium) 및 Cl(chloride)을 측정하였다.

**조직병리검사:** 모든 생존동물에 대하여 최종계획부검을 실시하여 모든 장기의 부검소견을 관찰하였고, 고환, 전립선, 난소, 자궁, 비장, 간장, 흉선, 부신, 신장, 심장, 폐, 뇌 및 뇌하수체를 적출하여 전자저울로 절대장기중량을 측정하였으며, 부검 전 체중을 바탕으로 상대장기중량을 산출하였다. 조직의 보존은 부검 후 뇌(brain), 뇌하수체(pituitary gland), 심장(heart), 폐(lung), 간(liver), 신장(kidney), 방광(urinary bladder), 장간막림프절(mesenteric lymph node), 흉선(thymus), 비장(spleen), 췌장(pancreas), 침샘(salivary gland), 턱밑림프절(submandibular lymph node), 갑상선(thyroid gland), 부갑상선(parathyroid gland), 부신(adrenal gland), 식도(esophagus), 대동맥(aorta), 척수(spinal cord), 좌골신경(sciatic nerve), 골격근(skeletal muscle), 피부(skin), 유선(mammary gland), 위(stomach), 십이지장(duodenum), 공장(jejenum), 회장(ileum), 맹장(cecum), 결장(colon), 직장(rectum), 대퇴골(femur), 흉골(sternum), 기관(trachea), 혀(tongue), 전립선(prostate gland), 고환(testes), 부고환(epididymis), 정낭(seminal vesicle), 난소(ovary), 자궁(uterus) 및 질(vagina)을 10%

중성 포르말린액으로 고정하였으며, 고환(testes)과 부고환(epididymis)은 Bouin's 액에, 안구는 Davidson's 액에 고정하였다. 부형제 대조군 및 고용량군의 모든 고정 장치와 부검소견이 관찰된 모든 장기에 대해 조직전처리, 포매, 박절, hematoxylin and eosin(H&E) 염색 및 봉입하여 조직표본을 제작하여 검경하였다.

**통계학적 방법**

부형제 대조군과 시험물질 투여군 간의 비교는 일반적으로 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였고,  $P < 0.05$  인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정하였다. 발생률의 표기는 일반적으로 백분율로 나타내었다. 통계방법은 상용되는 통계 패키지인 SPSS 12.0K 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 연속자료의 분석(체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액응고시간, 혈액생화학적 검사, 장기중량)은 일반적인 정규성을 가정하고 통계처리를 실시하였다. 일원배치 분산분석(one-way ANOVA) 방법을 통하여 군 간 유의성을 확인하고 등분산을 검정하였다. 일원배치 분산분석에서 유의성이 인정되고 등분산이 인정되면 Duncan's multiple range test를, 등분산이 인정되지 않으면 Dunnett's T test를 사용하였다. 비연속적인 자료의 분석(요검사)은 증상의 정도로 표시된 데이터를 척도변환을 실시하여 카이제곱검정을 사용하였다.

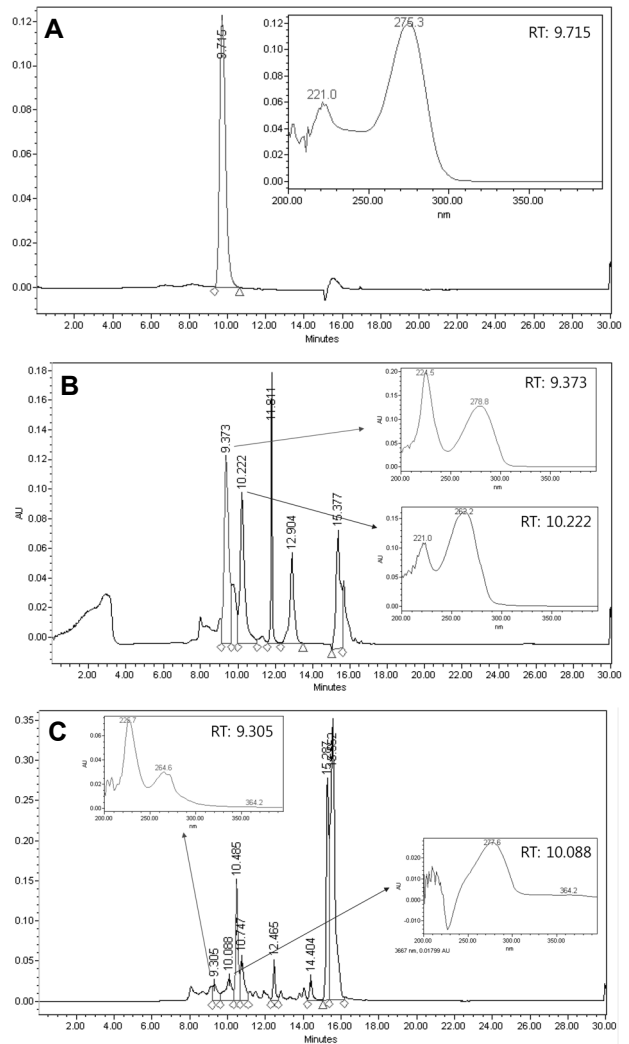
**결과 및 고찰**

**HPLC를 이용한 여주 추출 분말의 vicine 분석**

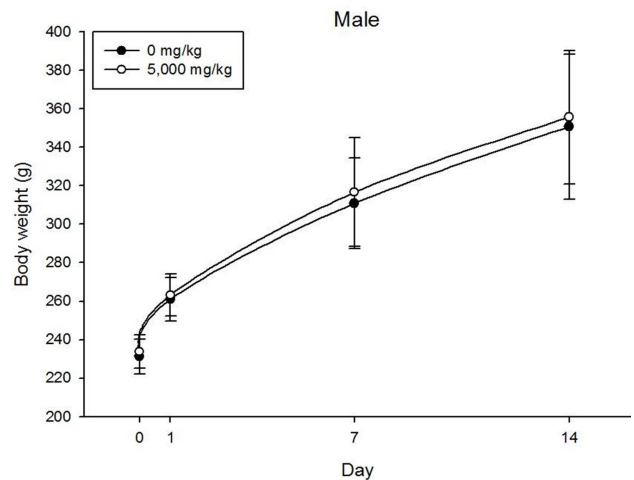
Vicine 피크는 9.715분에 검출되었고, UV spectrum  $\lambda_{max}$  275.3 nm로 확인되었다. 여주 원재료에서는 vicine과 RT값이 일치하는 피크는 없었고, 9.373 및 10.222분에 검출된 근접 피크의 스펙트럼을 확인한 결과 vicine과 일치하는 않는 것으로 보아 원재료로 사용한 여주에는 vicine 존재하지 않거나 극미량일 것으로 판단된다(Fig. 1). 반복 경구용 시험용 시료에서도 vicine과 RT값이 일치하는 피크는 없었고, 9.305 및 10.088분에 검출된 근접 피크의 스펙트럼을 확인한 결과 vicine과 일치하는 않는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터 여주 70% 주정 추출물에는 vicine이 존재하지 않거나 극미량일 것으로 판단된다.

**단회 경구투여 독성시험**

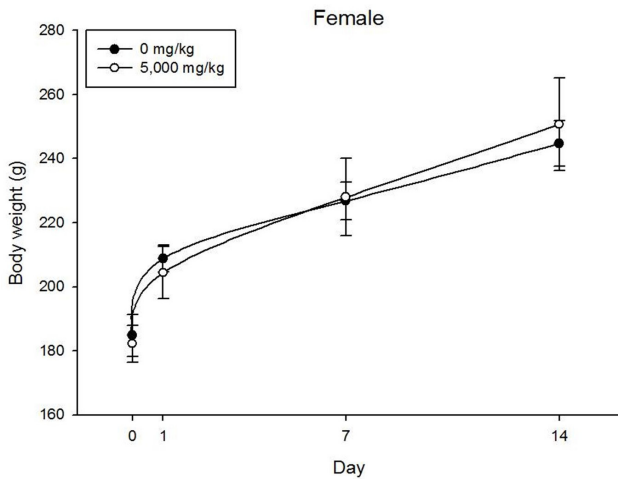
단회 경구투여 독성시험에서 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 투여 전, 투여 후 1, 7 및 14일째 체중측정 결과, 암수 모든 시험군에서 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았고, 정상적인 체중 증가가 관찰되었다(Fig. 2, 3). 실험종료 시 모든 생존동물의 부검 결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다. 본 시험의 최대 투여용



**Fig. 1.** HPLC analysis of vicine in bitter melon. (A) standard material of vicine, (B) raw material of bitter melon, (C) test substance of bitter melon.



**Fig. 2.** Body weight changes in male rats of single oral dose toxicity study. Body weight changed of male rats of vehicle control and bitter melon ethanol extract treated group (n=10 per each groups). Error bar represents standard deviation.



**Fig. 3.** Body weight changes in female rats of single oral dose toxicity study. Body weight changed of female rats of vehicle control and bitter melon ethanol extract treated group (n=10 per each groups). Error bar represents standard deviation.

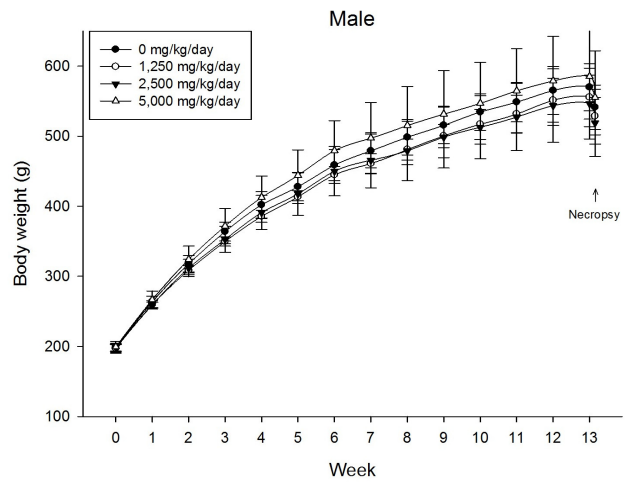
량인 5,000 mg/kg/d 투여군에서 이상증상과 사망동물이 발견되지 않았기 때문에 개략의 치사량(approximate lethal dose, ALD)은 암수 모두 5,000 mg/kg/d로 판단된다.

**13주 반복 경구투여 독성시험**

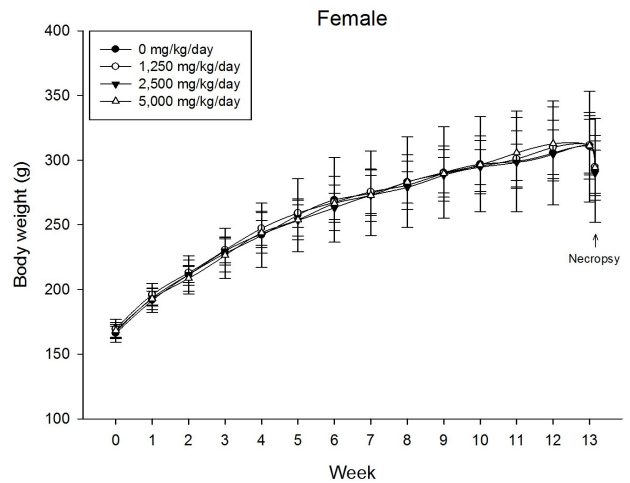
13주 반복 경구투여에서 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 실험기간 동안 암수 2,500 및 5,000 mg/kg/d 투여군 동물에서 각각 투여 6, 4주째부터 산발적으로 유연(salivation)이 발생하였고, 5,000 mg/kg/d 투여군에서 빈도수가 높게 발생하였지만, 시험물질에 의한 일시적인 타액 분비 촉진으로 판단되며 천연물 추출물에서 흔히 발생하는 일반증상으로 독성학적 의미가 없다(11). 체중측정 결과 암수 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4, 5). 사료 섭취량 측정 결과 수컷 2,500 mg/kg/d 투여군 8주차 사료 섭취량의 감소( $P<0.01$ )가 관찰되었다(Fig. 6, 7). 하지만 그 정도가 모두 경미하여 본 기관이 다년간 수집한 SD 랫드의 생물학적 변동 범위에 속하며 체중과 상관성 있는 변화가 관찰되지 않은 항목의 변화로써 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단된다.

안검사를 실시한 결과 암컷 부형제대조군 1례에서 양쪽 안구에 혼탁(opacity)이 관찰되어 조직병리검사 결과, 양측 안구혼탁은 수정체 변성(lenticular degeneration) 및 망막 주름(retinal fold)으로 확인되었으나 부형제대조군에서 관찰된 단발성의 자연발생적 소견이었고, 안구혼탁 및 수정체 변성(일명 백내장, cataract) 소견은 노령화, 영향 또는 외부 환경 등에 의해서도 발병 가능하다고 보고되어 있어 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다(12).

요검사 및 요색조 관찰 결과 암수 시험물질 투여군의 케톤체, 요비중, 단백질 및 요색 항목, 수컷 시험물질 투여군의



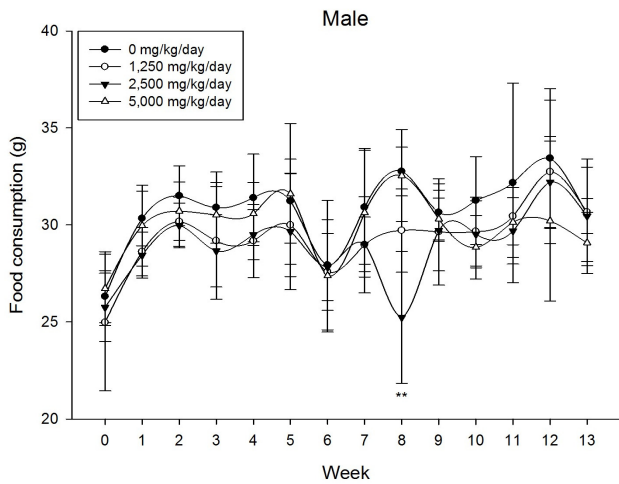
**Fig. 4.** Body weight changes in male rats of 13-week repeated oral dose toxicity study. Body weight changed of male rats of vehicle control and bitter melon ethanol extract treated group (n=10 per each groups). Error bar represents standard deviation.



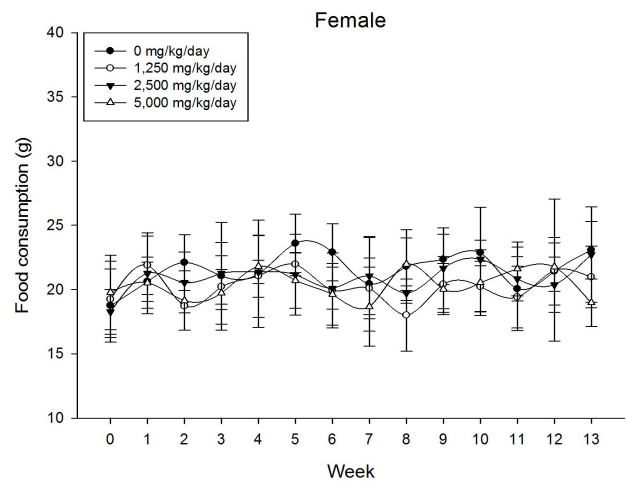
**Fig. 5.** Body weight changes in female rats of 13-week repeated oral dose toxicity study. Body weight changed of female rats of vehicle control and bitter melon ethanol extract treated group (n=10 per each groups). Error bar represents standard deviation.

백혈구 항목에서 부형제대조군보다 증가하는 경향을 보였으며( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ), 암수 모든 시험군의 요색은 벚짚색(straw)과 무색(colorless)이 관찰되었고 시험물질 투여군 대부분의 요색은 벚짚색으로 관찰되었다(Table 1). 하지만 신장에 대한 다른 시험항목(BUN, CRE 등의 신장관련 항목) 및 조직병리학적 검사에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 상관성 있는 이상소견이 관찰되지 않아 독성학적 의미가 없으며, 요색 관찰항목에서 벚짚색은 정상적인 요색으로 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않는다(13).

혈액학적 검사 결과 수컷 1,250 mg/kg/d 투여군의 MCV 및 MCH 수치 증가, 수컷 5,000 mg/kg/d 투여군의 LUC 및 LUP 수치 증가, 암컷 2,500 mg/kg/d 투여군의 RDW 수치 증가, 암컷 5,000 mg/kg/d 투여군의 BA 수치 증가( $P$



**Fig. 6.** Food consumption of male rats in 13-week repeated oral dose toxicity study. Food consumption of male rats of vehicle control and bitter melon ethanol extract treated group (n=10 per each groups). Error bar represents standard deviation. \*\*Significant difference compared with the control group value,  $P<0.01$ .



**Fig. 7.** Food consumption of female rats in 13-week repeated oral dose toxicity study. Food consumption of female rats of vehicle control and bitter melon ethanol extract treated group (n=10 per each groups). Error bar represents standard deviation.

**Table 1.** Urinalysis for the rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Test item	Male group (mg/kg/d)				Female group (mg/kg/d)				
	0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000	
Glucose	Negative	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
Bilirubin	Negative	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
Ketone <sup>*,†</sup>	Negative	5/5	1/5	1/5	0/5	5/5	4/5	5/5	0/5
	Trace	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	4/5
	1+	0/5	2/5	3/5	4/5	0/5	0/5	0/5	1/5
	2+	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Specific gravity <sup>** ,†</sup>	1.005	5/5	0/5	0/5	0/5	3/5	2/5	1/5	0/5
	1.01	0/5	4/5	3/5	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5
	1.015	0/5	1/5	2/5	2/5	1/5	2/5	1/5	0/5
	1.02	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	4/5
	1.025	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Occult blood	1.03	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	
	Negative	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	Trace	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
pH	7	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	2/5
	7.5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5
	8	3/5	4/5	2/5	2/5	4/5	3/5	1/5	1/5
	8.5	2/5	1/5	3/5	2/5	0/5	2/5	3/5	0/5
Protein <sup>*,†</sup>	Negative	5/5	2/5	2/5	0/5	4/5	3/5	5/5	0/5
	Trace	0/5	2/5	1/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5
	1+	0/5	1/5	2/5	4/5	0/5	1/5	0/5	4/5
	2+	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Urobilinogen	0.2	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
Nitrate	Negative	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5
	Positive	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
Leukocyte <sup>**</sup>	Negative	5/5	4/5	3/5	0/5	5/5	5/5	5/5	4/5
	Trace	0/5	1/5	2/5	5/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Color <sup>** ,†</sup>	Colorless	5/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5	3/5	0/5
	Straw	0/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	2/5	5/5

Number of animals with the sign / number of animals examined.

\*Significant difference of male test groups compared with the control group value,  $P<0.05$ .

\*\*Significant difference of male test groups compared with the control group value,  $P<0.01$ .

†Significant difference of female test groups compared with the control group value,  $P<0.05$

**Table 2.** Hematological values for the male rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Test item (unit)	Group (mg/kg/d)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
WBC <sup>1)</sup> (K/ $\mu$ L)	9.16 $\pm$ 2.28 (10)	8.92 $\pm$ 2.31 (10)	9.49 $\pm$ 3.20 (10)	10.10 $\pm$ 2.43 (10)
NE <sup>2)</sup> (K/ $\mu$ L)	1.56 $\pm$ 0.60 (10)	1.37 $\pm$ 0.58 (10)	1.64 $\pm$ 0.63 (10)	1.20 $\pm$ 0.42 (10)
LY <sup>3)</sup> (K/ $\mu$ L)	7.19 $\pm$ 2.02 (10)	7.21 $\pm$ 1.97 (10)	7.44 $\pm$ 3.07 (10)	8.44 $\pm$ 2.09 (10)
MO <sup>4)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.24 $\pm$ 0.11 (10)	0.20 $\pm$ 0.05 (10)	0.24 $\pm$ 0.10 (10)	0.26 $\pm$ 0.11 (10)
EO <sup>5)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.09 $\pm$ 0.03 (10)	0.07 $\pm$ 0.02 (10)	0.08 $\pm$ 0.05 (10)	0.09 $\pm$ 0.05 (10)
BA <sup>6)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.01 $\pm$ 0.01 (10)	0.01 $\pm$ 0.01 (10)	0.01 $\pm$ 0.00 (10)	0.00 $\pm$ 0.01 (10)
LUC <sup>7)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.08 $\pm$ 0.03 (10)	0.06 $\pm$ 0.04 (10)	0.08 $\pm$ 0.04 (10)	0.12 $\pm$ 0.04* (10)
NEP <sup>8)</sup> (%)	17.6 $\pm$ 6.6 (10)	15.2 $\pm$ 5.0 (10)	18.2 $\pm$ 7.1 (10)	12.0 $\pm$ 3.8 (10)
LYP <sup>9)</sup> (%)	77.9 $\pm$ 6.9 (10)	80.9 $\pm$ 5.2 (10)	77.5 $\pm$ 7.6 (10)	83.5 $\pm$ 4.4 (10)
MOP <sup>10)</sup> (%)	2.6 $\pm$ 1.0 (10)	2.3 $\pm$ 0.5 (10)	2.5 $\pm$ 0.9 (10)	2.5 $\pm$ 1.0 (10)
EOP <sup>11)</sup> (%)	1.0 $\pm$ 0.3 (10)	0.8 $\pm$ 0.2 (10)	0.8 $\pm$ 0.5 (10)	0.9 $\pm$ 0.4 (10)
BAP <sup>12)</sup> (%)	0.1 $\pm$ 0.1 (10)	0.06 $\pm$ 0.1 (10)	0.1 $\pm$ 0.0 (10)	0.1 $\pm$ 0.0 (10)
LUP <sup>13)</sup> (%)	0.8 $\pm$ 0.2 (10)	0.7 $\pm$ 0.3 (10)	0.9 $\pm$ 0.3 (10)	1.2 $\pm$ 0.4* (10)
RBC <sup>14)</sup> (M/ $\mu$ L)	8.69 $\pm$ 0.33 (10)	8.54 $\pm$ 0.32 (10)	8.63 $\pm$ 0.14 (10)	8.49 $\pm$ 0.44 (10)
Hb <sup>15)</sup> (g/dL)	15.6 $\pm$ 0.5 (10)	15.8 $\pm$ 0.4 (10)	15.6 $\pm$ 0.3 (10)	15.4 $\pm$ 0.7 (10)
HCT <sup>16)</sup> (%)	46.4 $\pm$ 1.1 (10)	47.2 $\pm$ 1.3 (10)	46.5 $\pm$ 1.2 (10)	46.1 $\pm$ 2.0 (10)
MCV <sup>17)</sup> (fL)	53.5 $\pm$ 1.6 (10)	55.3 $\pm$ 1.3* (10)	53.8 $\pm$ 1.0 (10)	54.3 $\pm$ 1.5 (10)
MCH <sup>18)</sup> (pg)	17.9 $\pm$ 0.7 (10)	18.6 $\pm$ 0.5* (10)	18.0 $\pm$ 0.3 (10)	18.2 $\pm$ 0.5 (10)
MCHC <sup>19)</sup> (g/dL)	33.6 $\pm$ 0.5 (10)	33.6 $\pm$ 0.3 (10)	33.5 $\pm$ 0.3 (10)	33.5 $\pm$ 0.4 (10)
RDW <sup>20)</sup> (%)	12.5 $\pm$ 0.8 (10)	12.1 $\pm$ 0.6 (10)	12.3 $\pm$ 0.4 (10)	12.3 $\pm$ 0.6 (10)
PLT <sup>21)</sup> (K/ $\mu$ L)	980 $\pm$ 75 (10)	973 $\pm$ 118 (10)	1,031 $\pm$ 81 (10)	1,055 $\pm$ 155 (10)
MPV <sup>22)</sup> (fL)	5.5 $\pm$ 0.6 (10)	5.8 $\pm$ 0.2 (10)	5.8 $\pm$ 0.3 (10)	5.5 $\pm$ 0.4 (10)
Reti <sup>23)</sup> (%)	1.93 $\pm$ 0.24 (10)	1.85 $\pm$ 0.29 (10)	1.91 $\pm$ 0.26 (10)	1.77 $\pm$ 0.20 (10)

Mean $\pm$ SD (number of animals).

<sup>1)</sup>White blood cell. <sup>2)</sup>Neutrophil. <sup>3)</sup>Lymphocyte. <sup>4)</sup>Monocyte. <sup>5)</sup>Eosinophil. <sup>6)</sup>Basophil. <sup>7)</sup>Large unstained cell. <sup>8)</sup>Percent of neutrophil. <sup>9)</sup>Percent of lymphocyte. <sup>10)</sup>Percent of monocyte. <sup>11)</sup>Percent of eosinophil. <sup>12)</sup>Percent of basophil. <sup>13)</sup>Percent of large unstained cell. <sup>14)</sup>Red blood cell. <sup>15)</sup>Hemoglobin. <sup>16)</sup>Hematocrit. <sup>17)</sup>Mean corpuscular volume. <sup>18)</sup>Mean corpuscular hemoglobin. <sup>19)</sup>Mean corpuscular hemoglobin concentration. <sup>20)</sup>Red cell distribution width. <sup>21)</sup>Platelet. <sup>22)</sup>Mean platelet volume. <sup>23)</sup>Reticulocyte.

\*Significant difference compared with the control group value,  $P < 0.05$ .

**Table 3.** Hematological values of female rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Test item (unit)	Group (mg/kg/d)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
WBC <sup>1)</sup> (K/ $\mu$ L)	6.22 $\pm$ 1.26 (10)	7.34 $\pm$ 2.68 (10)	5.87 $\pm$ 1.57 (10)	6.93 $\pm$ 2.12 (10)
NE <sup>2)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.72 $\pm$ 0.34 (10)	0.92 $\pm$ 0.34 (10)	0.75 $\pm$ 0.43 (10)	0.82 $\pm$ 0.26 (10)
LY <sup>3)</sup> (K/ $\mu$ L)	5.24 $\pm$ 1.06 (10)	6.09 $\pm$ 2.42 (10)	4.87 $\pm$ 1.57 (10)	5.85 $\pm$ 2.04 (10)
MO <sup>4)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.15 $\pm$ 0.10 (10)	0.18 $\pm$ 0.09 (10)	0.14 $\pm$ 0.07 (10)	0.14 $\pm$ 0.04 (10)
EO <sup>5)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.06 $\pm$ 0.03 (10)	0.07 $\pm$ 0.03 (10)	0.05 $\pm$ 0.02 (10)	0.05 $\pm$ 0.02 (10)
BA <sup>6)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.00 $\pm$ 0.00 (10)	0.01 $\pm$ 0.01 (10)	0.01 $\pm$ 0.01 (10)	0.01 $\pm$ 0.00* (10)
LUC <sup>7)</sup> (K/ $\mu$ L)	0.05 $\pm$ 0.03 (10)	0.07 $\pm$ 0.06 (10)	0.05 $\pm$ 0.03 (10)	0.06 $\pm$ 0.03 (10)
NEP <sup>8)</sup> (%)	11.4 $\pm$ 4.1 (10)	13.2 $\pm$ 3.8 (10)	13.7 $\pm$ 8.3 (10)	12.9 $\pm$ 4.8 (10)
LYP <sup>9)</sup> (%)	84.5 $\pm$ 4.9 (10)	82.4 $\pm$ 3.4 (10)	82.3 $\pm$ 8.5 (10)	83.3 $\pm$ 5.2 (10)
MOP <sup>10)</sup> (%)	2.3 $\pm$ 1.2 (10)	2.5 $\pm$ 1.0 (10)	2.3 $\pm$ 0.9 (10)	2.1 $\pm$ 0.5 (10)
EOP <sup>11)</sup> (%)	1.0 $\pm$ 0.5 (10)	0.9 $\pm$ 0.4 (10)	0.8 $\pm$ 0.3 (10)	0.7 $\pm$ 0.3 (10)
BAP <sup>12)</sup> (%)	0.0 $\pm$ 0.1 (10)	0.1 $\pm$ 0.1 (10)	0.1 $\pm$ 0.1 (10)	0.1 $\pm$ 0.0 (10)
LUP <sup>13)</sup> (%)	0.8 $\pm$ 0.3 (10)	0.9 $\pm$ 0.7 (10)	0.8 $\pm$ 0.4 (10)	0.9 $\pm$ 0.2 (10)
RBC <sup>14)</sup> (M/ $\mu$ L)	7.79 $\pm$ 0.50 (10)	7.89 $\pm$ 0.20 (10)	7.90 $\pm$ 0.44 (10)	7.66 $\pm$ 0.31 (10)
Hb <sup>15)</sup> (g/dL)	15.2 $\pm$ 0.6 (10)	15.1 $\pm$ 0.4 (10)	15.2 $\pm$ 0.7 (10)	14.9 $\pm$ 0.4 (10)
HCT <sup>16)</sup> (%)	44.7 $\pm$ 2.2 (10)	44.7 $\pm$ 0.7 (10)	45.4 $\pm$ 2.0 (10)	44.0 $\pm$ 1.1 (10)
MCV <sup>17)</sup> (fL)	57.4 $\pm$ 1.4 (10)	56.7 $\pm$ 1.3 (10)	57.6 $\pm$ 1.9 (10)	57.4 $\pm$ 1.3 (10)
MCH <sup>18)</sup> (pg)	19.5 $\pm$ 0.6 (10)	19.1 $\pm$ 0.4 (10)	19.3 $\pm$ 0.6 (10)	19.5 $\pm$ 0.7 (10)
MCHC <sup>19)</sup> (g/dL)	34.0 $\pm$ 0.5 (10)	33.7 $\pm$ 0.9 (10)	33.6 $\pm$ 0.8 (10)	33.9 $\pm$ 0.7 (10)
RDW <sup>20)</sup> (%)	11.2 $\pm$ 0.3 (10)	11.4 $\pm$ 0.5 (10)	11.5 $\pm$ 0.4* (10)	11.1 $\pm$ 0.3 (10)
PLT <sup>21)</sup> (K/ $\mu$ L)	1,033 $\pm$ 104 (10)	1,018 $\pm$ 173 (10)	1,009 $\pm$ 140 (10)	1,040 $\pm$ 134 (10)
MPV <sup>22)</sup> (fL)	6.1 $\pm$ 0.6 (10)	6.0 $\pm$ 0.5 (10)	5.9 $\pm$ 0.6 (10)	6.1 $\pm$ 0.5 (10)
Reti <sup>23)</sup> (%)	2.15 $\pm$ 0.36 (10)	1.99 $\pm$ 0.31 (10)	2.31 $\pm$ 0.27 (10)	1.81 $\pm$ 0.34* (10)

Mean $\pm$ SD (number of animals).

<sup>1)</sup>White blood cell. <sup>2)</sup>Neutrophil. <sup>3)</sup>Lymphocyte. <sup>4)</sup>Monocyte. <sup>5)</sup>Eosinophil. <sup>6)</sup>Basophil. <sup>7)</sup>Large unstained cell. <sup>8)</sup>Percent of neutrophil. <sup>9)</sup>Percent of lymphocyte. <sup>10)</sup>Percent of monocyte. <sup>11)</sup>Percent of eosinophil. <sup>12)</sup>Percent of basophil. <sup>13)</sup>Percent of large unstained cell. <sup>14)</sup>Red blood cell. <sup>15)</sup>Hemoglobin. <sup>16)</sup>Hematocrit. <sup>17)</sup>Mean corpuscular volume. <sup>18)</sup>Mean corpuscular hemoglobin. <sup>19)</sup>Mean corpuscular hemoglobin concentration. <sup>20)</sup>Red cell distribution width. <sup>21)</sup>Platelet. <sup>22)</sup>Mean platelet volume. <sup>23)</sup>Reticulocyte.

\*Significant difference compared with the control group value,  $P < 0.05$ .

0.05), 암컷 5,000 mg/kg/d 투여군의 Reti 수치는 감소하였으나( $P<0.05$ )(Table 2, 3), 그 정도가 미미하여 본 기관이 다년간 수집한 SD 랫드의 생물학적 변동범위에 속하고(14), 뚜렷한 용량의존성도 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단된다. 또한, 여주에 포함된 vicine에 의한 급성용혈성 빈혈을 검토한 결과 관련된 항목(RBC, Hb, Reti 등)의 변화는 관찰되지 않았다(15).

혈액응고시간 검사 결과 암수 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 4).

혈액생화학적 검사 결과 수컷 2,500 mg/kg/d 투여군의 UA, 수컷 5,000 mg/kg/d 투여군의 A/G ratio 및 UA 수치의 증가( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ), 암컷 2,500 및 5,000 mg/kg/d

투여군의 T-BIL 수치가 감소하였다( $P<0.01$ )(Table 5, 6). 하지만 그 정도가 경미하여 본 기관이 다년간 수집한 SD 랫드의 생물학적 변동범위에 속하였을 뿐 아니라(14) 뚜렷한 용량 의존성을 보이지 않았고, 다른 검사항목에서 상관성 있는 변화 또한 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단된다.

절대 및 상대 장기중량 측정 결과 암컷 5,000 mg/kg/d 투여군의 뇌에 대한 절대장기중량 수치가 감소하였다( $P<0.01$ )(Table 7, 8). 하지만 그 정도가 경미하여 본 기관이 다년간 수집한 SD 랫드의 생물학적 변동범위에 속하여 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단된다(14).

부검 결과 수컷 부형제대조군 및 5,000 mg/kg/d 투여군에서 좌측 갑상선의 무형성(aplasia) 및 우측 갑상선의 비대

**Table 4.** Plasma coagulation values of rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Sex	Test item	Group (mg/kg/d)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Male	PT <sup>1)</sup>	10.07±0.49 (10)	10.35±0.74 (10)	9.95±0.84 (10)	10.07±0.40 (10)
	APTT <sup>2)</sup>	17.0±2.0 (10)	17.0±1.8 (10)	16.8±1.1 (10)	16.9±2.4 (10)
Female	PT	8.93±0.51 (10)	9.32±0.50 (10)	9.29±0.40 (10)	9.02±0.63 (10)
	APTT	15.5±1.8 (10)	16.2±3.0 (10)	16.6±1.9 (10)	16.0±1.7 (10)

Mean±SD (number of animals).

<sup>1)</sup>Prothrombin time. <sup>2)</sup>Active partial thromboplastin time.

**Table 5.** Serum biochemical values of male rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Test item (unit)	Group (mg/kg/d)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
AST <sup>1)</sup> (IU/L)	121±36 (10)	117±22 (10)	108±24 (10)	97±20 (10)
ALT <sup>2)</sup> (IU/L)	32±4 (10)	35±8 (10)	41±17 (10)	31±4 (10)
ALP <sup>3)</sup> (IU/L)	248±47 (10)	262±34 (10)	263±41 (10)	260±48 (10)
GGT <sup>4)</sup> (IU/L)	0.00±0.00 (10)	0.10±0.32 (10)	0.10±0.32 (10)	0.10±0.32 (10)
LDH <sup>5)</sup> (IU/L)	1,299±753 (10)	1,119±585 (10)	885±454 (10)	817±485 (10)
BUN <sup>6)</sup> (mg/dL)	15.9±1.4 (10)	16.5±1.1 (10)	17.3±2.3 (10)	16.2±2.3 (10)
CRE <sup>7)</sup> (mg/dL)	0.47±0.05 (10)	0.49±0.04 (10)	0.48±0.04 (10)	0.47±0.04 (10)
GLU <sup>8)</sup> (mg/dL)	172±13 (10)	161±27 (10)	169±22 (10)	182±27 (10)
CHO <sup>9)</sup> (mg/dL)	80±15 (10)	76±13 (10)	89±16 (10)	75±10 (10)
TP <sup>10)</sup> (g/dL)	6.4±0.4 (10)	6.4±0.3 (10)	6.5±0.3 (10)	6.3±0.2 (10)
CPK <sup>11)</sup> (U/L)	646±355 (10)	567±274 (10)	448±180 (10)	440±257 (10)
ALB <sup>12)</sup> (g/dL)	2.4±0.2 (10)	2.4±0.1 (10)	2.5±0.1 (10)	2.5±0.1 (10)
T-BIL <sup>13)</sup> (mg/dL)	0.06±0.01 (10)	0.06±0.03 (10)	0.05±0.02 (10)	0.04±0.02 (10)
A/G ratio <sup>14)</sup>	0.62±0.03 (10)	0.61±0.02 (10)	0.61±0.03 (10)	0.66±0.03** (10)
TG <sup>15)</sup> (mg/dL)	69±50 (10)	46±25 (10)	56±19 (10)	72±33 (10)
UA <sup>16)</sup> (mg/dL)	1.8±0.2 (10)	1.9±0.4 (10)	2.2±0.5* (10)	2.3±0.3* (10)
Ca <sup>17)</sup> (mg/dL)	10.3±0.5 (10)	10.4±0.3 (10)	10.6±0.5 (10)	10.5±0.4 (10)
IP <sup>18)</sup> (mg/dL)	8.9±0.8 (10)	8.8±0.5 (10)	9.3±0.6 (10)	8.9±0.4 (10)
Cl <sup>19)</sup> (mmol/L)	108±1 (10)	108±2 (10)	108±1 (10)	108±2 (10)
Mg <sup>20)</sup> (mg/dL)	2.4±0.1 (10)	2.5±0.2 (10)	2.6±0.2 (10)	2.4±0.2 (10)
Na <sup>21)</sup> (mmol/L)	144±2 (10)	144±2 (10)	143±1 (10)	143±1 (10)
K <sup>22)</sup> (mmol/L)	5.6±1.0 (10)	5.5±0.6 (10)	5.9±0.7 (10)	5.4±0.5 (10)

Mean±SD (number of animals).

<sup>1)</sup>Aspartate aminotransferase. <sup>2)</sup>Alanine aminotransferase. <sup>3)</sup>Alkaline phosphatase. <sup>4)</sup>Gamma (γ)-glutamyl transferase. <sup>5)</sup>Lactate dehydrogenase. <sup>6)</sup>Blood urea nitrogen. <sup>7)</sup>Creatinine. <sup>8)</sup>Glucose. <sup>9)</sup>Total cholesterol. <sup>10)</sup>Total protein. <sup>11)</sup>Creatine phosphokinase. <sup>12)</sup>Albumin. <sup>13)</sup>Total bilirubin. <sup>14)</sup>Albumin/globulin ratio. <sup>15)</sup>Triglyceride. <sup>16)</sup>Uric acid. <sup>17)</sup>Calcium. <sup>18)</sup>Inorganic phosphorus. <sup>19)</sup>Chloride. <sup>20)</sup>Magnesium. <sup>21)</sup>Sodium. <sup>22)</sup>Potassium.

\*Significant difference compared with the control group value,  $P<0.05$ .

\*\*Significant difference compared with the control group value,  $P<0.01$ .



**Table 6.** Serum biochemical values of female rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Test item (unit)	Group (mg/kg/d)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
AST <sup>1)</sup> (IU/L)	154±32 (10)	141±30 (10)	144±32 (10)	143±33 (10)
ALT <sup>2)</sup> (IU/L)	37±8 (10)	33±5 (10)	34±7 (10)	35±8 (10)
ALP <sup>3)</sup> (IU/L)	150±41 (10)	122±27 (10)	143±36 (10)	120±23 (10)
GGT <sup>4)</sup> (IU/L)	0.90±0.32 (10)	0.60±0.52 (10)	0.60±0.52 (10)	0.70±0.48 (10)
LDH <sup>5)</sup> (IU/L)	1,568±339 (10)	1,516±802 (10)	1,548±769 (10)	1,765±833 (10)
BUN <sup>6)</sup> (mg/dL)	22.2±4.0 (10)	19.1±1.2 (10)	20.0±3.6 (10)	18.8±2.7 (10)
CRE <sup>7)</sup> (mg/dL)	0.63±0.07 (10)	0.61±0.05 (10)	0.62±0.07 (10)	0.60±0.05 (10)
GLU <sup>8)</sup> (mg/dL)	123±26 (10)	127±11 (10)	124±19 (10)	122±15 (10)
CHO <sup>9)</sup> (mg/dL)	102±28 (10)	100±21 (10)	98±14 (10)	96±15 (10)
TP <sup>10)</sup> (g/dL)	7.4±0.5 (10)	7.1±0.4 (10)	7.2±0.4 (10)	7.4±0.5 (10)
CPK <sup>11)</sup> (U/L)	765±205 (10)	728±346 (10)	796±415 (10)	800±272 (10)
ALB <sup>12)</sup> (g/dL)	3.2±0.3 (10)	3.1±0.3 (10)	3.1±0.2 (10)	3.2±0.3 (10)
T-BIL <sup>13)</sup> (mg/dL)	0.11±0.04 (10)	0.08±0.04 (10)	0.07±0.03** (10)	0.06±0.02** (10)
A/G ratio <sup>14)</sup>	0.77±0.04 (10)	0.79±0.07 (10)	0.75±0.03 (10)	0.77±0.04 (10)
TG <sup>15)</sup> (mg/dL)	54±49 (10)	47±15 (10)	45±23 (10)	48±23 (10)
UA <sup>16)</sup> (mg/dL)	1.6±0.3 (10)	1.6±0.3 (10)	1.9±0.4 (10)	1.9±0.4 (10)
Ca <sup>17)</sup> (mg/dL)	10.6±0.6 (10)	10.6±0.3 (10)	10.7±0.4 (10)	10.7±0.5 (10)
IP <sup>18)</sup> (mg/dL)	7.7±0.7 (10)	7.9±0.7 (10)	8.4±0.7 (10)	8.0±0.8 (10)
Cl <sup>19)</sup> (mmol/L)	105±2 (10)	106±2 (10)	106±2 (10)	105±2 (10)
Mg <sup>20)</sup> (mg/dL)	2.9±0.3 (10)	2.8±0.2 (10)	3.0±0.3 (10)	2.8±0.2 (10)
Na <sup>21)</sup> (mmol/L)	143±4 (10)	142±2 (10)	141±3 (10)	141±2 (10)
K <sup>22)</sup> (mmol/L)	5.4±0.9 (10)	5.7±0.5 (10)	6.0±0.6 (10)	5.9±0.4 (10)

Mean±SD (number of animals).

<sup>1)</sup>Aspartate aminotransferase. <sup>2)</sup>Alanine aminotransferase. <sup>3)</sup>Alkaline phosphatase. <sup>4)</sup>Gamma (γ)-glutamyl transferase. <sup>5)</sup>Lactate dehydrogenase. <sup>6)</sup>Blood urea nitrogen. <sup>7)</sup>Creatinine. <sup>8)</sup>Glucose. <sup>9)</sup>Total cholesterol. <sup>10)</sup>Total protein. <sup>11)</sup>Creatine phosphokinase. <sup>12)</sup>Albumin. <sup>13)</sup>Total bilirubin. <sup>14)</sup>Albumin/globulin ratio. <sup>15)</sup>Triglyceride. <sup>16)</sup>Uric acid. <sup>17)</sup>Calcium. <sup>18)</sup>Inorganic phosphorus. <sup>19)</sup>Chloride. <sup>20)</sup>Magnesium. <sup>21)</sup>Sodium. <sup>22)</sup>Potassium.

\*\*Significant difference compared with the control group value,  $P < 0.01$ .

**Table 7.** Absolute organ weight of male rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Organ	Group (mg/kg/d)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Body weight	541.15±31.76 (10)	528.54±26.61 (10)	518.99±48.08 (10)	555.28±66.62 (10)
Testis (Lt.)	1.7479±0.1295 (10)	1.8560±0.1472 (10)	1.6925±0.1259 (10)	1.7180±0.1302 (10)
Testis (Rt.)	1.7407±0.1031 (10)	1.8623±0.1583 (10)	1.7072±0.1100 (10)	1.7239±0.1541 (10)
Prostate	0.8948±0.1347 (10)	0.9119±0.1782 (10)	0.9006±0.1421 (10)	0.8672±0.1633 (10)
Spleen	0.8657±0.0818 (10)	0.8866±0.0819 (10)	0.8472±0.1470 (10)	0.8717±0.1511 (10)
Liver	13.8556±1.8229 (10)	13.2187±1.4378 (10)	13.5044±1.6386 (10)	15.1539±2.4120 (10)
Adrenal gland (Lt.)	0.0290±0.0044 (10)	0.0302±0.0062 (10)	0.0287±0.0036 (10)	0.0274±0.0033 (10)
Adrenal gland (Rt.)	0.0283±0.0041 (10)	0.0289±0.0050 (10)	0.0275±0.0044 (10)	0.0277±0.0034 (10)
Kidney (Lt.)	1.5855±0.1839 (10)	1.5586±0.0809 (10)	1.5624±0.1284 (10)	1.6616±0.1328 (10)
Kidney (Rt.)	1.5924±0.1964 (10)	1.5977±0.0938 (10)	1.5648±0.1106 (10)	1.7243±0.1782 (10)
Heart	1.5823±0.1162 (10)	1.5589±0.0801 (10)	1.5066±0.1008 (10)	1.5824±0.1686 (10)
Lung	1.6833±0.1194 (10)	1.7392±0.1427 (10)	1.7294±0.1465 (10)	1.7185±0.1023 (10)
Brain	2.1482±0.0675 (10)	2.1615±0.0616 (10)	2.1580±0.0823 (10)	2.1238±0.1076 (10)
Pituitary	0.0125±0.0017 (10)	0.0145±0.0026 (10)	0.0141±0.0022 (10)	0.0125±0.0019 (10)
Thymus	0.3139±0.0672 (10)	0.2824±0.0891 (10)	0.2960±0.0786 (10)	0.3528±0.0741 (10)

Mean±SD (number of animals).

(enlargement), 수컷 2,500 mg/kg/d 투여군에서 우측 귀에 결절(nodule), 암컷 부형제대조군에서 양측 안구의 혼탁 및 좌측 신장의 낭이 각 1례씩 관찰되어 조직병리학적 검사를 실시하였다. 검사 결과 좌측 갑상선의 무형성 및 우측 갑상선의 비대는 편축성의 무형성 및 과다형성(hyperplasia), 우측 귀의 결절은 귓바퀴 연골병증(auricular chondropathy),

양측 안구혼탁(opacity)은 수정체 변성(lenticular degeneration) 및 망막주름(retinal fold), 좌측 신장의 낭(cyst)은 세노관변성을 동반한 신장피질에서의 낭(cyst, with tubular degeneration, cortex)으로 확인되었다. 하지만 부형제대조군에서 관찰되었거나 부형제대조군과의 발생빈도 차이가 없는 자연발생적인 병변이었으며, 특히 귓바퀴 연골병증

**Table 8.** Absolute organ weight of female rats in the 13-week repeated oral dose toxicity study

Organ	Group (mg/kg/d)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Body weight	292.19±40.21 (10)	294.72±20.26 (10)	290.09±17.49 (10)	294.16±25.10 (10)
Ovary (Lt.)	0.0382±0.0102 (10)	0.0418±0.0068 (10)	0.0454±0.0068 (10)	0.0475±0.0134 (10)
Ovary (Rt.)	0.0414±0.0086 (10)	0.0423±0.0073 (10)	0.0414±0.0086 (10)	0.0464±0.0114 (10)
Uterus	0.6834±0.2001 (10)	0.7180±0.2369 (10)	0.7609±0.2569 (10)	0.6335±0.2256 (10)
Spleen	0.6095±0.1121 (10)	0.5506±0.0471 (10)	0.5756±0.0691 (10)	0.5973±0.0905 (10)
Liver	7.8649±1.5374 (10)	7.4848±0.6635 (10)	7.6457±0.5145 (10)	8.3580±0.7877 (10)
Adrenal gland (Lt.)	0.0360±0.0054 (10)	0.0351±0.0059 (10)	0.0365±0.0053 (10)	0.0364±0.0056 (10)
Adrenal gland (Rt.)	0.0346±0.0057 (10)	0.0372±0.0045 (10)	0.0342±0.0050 (10)	0.0344±0.0054 (10)
Kidney (Lt.)	0.9217±0.1883 (10)	0.9540±0.0819 (10)	0.9271±0.0552 (10)	0.9384±0.1184 (10)
Kidney (Rt.)	0.9707±0.1857 (10)	0.9607±0.0823 (10)	0.9702±0.0809 (10)	0.9773±0.1376 (10)
Heart	0.9993±0.1440 (10)	0.9870±0.0914 (10)	0.9996±0.0502 (10)	1.0281±0.1222 (10)
Lung	1.3385±0.1313 (10)	1.2810±0.0663 (10)	1.3287±0.0614 (10)	1.3434±0.0978 (10)
Brain	2.0192±0.0517 (10)	1.9645±0.0800 (10)	2.0712±0.0731 (10)	1.9526±0.0676** (10)
Pituitary	0.0197±0.0031 (10)	0.0185±0.0034 (10)	0.0191±0.0037 (10)	0.0185±0.0040 (10)
Thymus	0.2980±0.0698 (10)	0.2774±0.0414 (10)	0.2431±0.0647 (10)	0.2406±0.0462 (10)

Mean±SD (number of animals).

\*\*Significant difference compared with the control group value,  $P < 0.01$ .

은 시험물질 중용량군에서 관찰된 단발성 소견이었을 뿐 아니라 랫드에서 드물지만 자연발생적으로 발생 가능한 소견으로 보고되어 있어 독성학적 의미는 없었다(16).

암수 부형제대조군 및 5,000 mg/kg/d 투여군의 폐에 대한 조직병리검사 결과, 암·수컷 5,000 mg/kg/d 투여군에서 폐포 또는 종말기관지에 국소성의 염증(focal inflammation, alveolar)이 각 1례씩 관찰되었다. 소견 관찰부위가 폐의 종말기관지 부분이었으며, 투여액량이 20 mL/kg이었던 점, 시험물질 투여 후 암수 모든 시험군에서 유연 증상이 관찰된 점 등으로 미루어 시험물질역류로 인한 경미한 흡인(aspiration) 소견으로 판단되며, 이는 시험물질 경구투여에 의한 직접적인 영향은 아닌 것으로 판단된다.

그 외 암수 부형제대조군 및 5,000 mg/kg/d 투여군 장기·조직에 대한 조직병리검사 결과, 췌장 파리세포의 국소성 위축(atrophy, acinar, focal) 및 국소성의 림프구성 세포 침윤(cell infiltration, lymphocytic, focal), 갑상선 간질 내 국소성의 단핵구성 세포침윤 및 아가미소체낭(ultimobran-chial cyst), 심장의 심근병증(cardiomyopathy) 등이 관찰되었다. 하지만 이러한 소견들은 부형제대조군에서 관찰되었거나 단발성의 자연발생적 병변으로 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단된다(12,17).

모든 시험 결과를 종합해보았을 때 모든 시험항목에서 전신적인 독성학적 변화가 관찰되지 않았으므로 여주 추출물의 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 5,000 mg/kg/d로 판단되며(18), ADI를 3,000 mg/man으로 제시한다(19).

## 요 약

본 연구에서는 향당뇨에 유효성이 있는 천연물질인 여주 추

출물을 이용하여 여주에 포함된 독성물질인 vicine의 분석과 경구투여에 따른 독성을 조사하기 위하여 단회 경구투여 독성시험과 13주 반복 경구투여 독성시험을 진행하였다. 본 시료는 여주 미숙과 열매추출물로 vicine의 분석 결과 존재하지 않거나 극미량일 것으로 판단된다. 단회 경구투여 독성시험과 시험물질에 의한 이상증상과 사망동물은 발생하지 않아 여주 추출물의 ALD는 암수 모두 5,000 mg/kg/d 이상으로 판단된다. 13주 반복 경구투여 독성시험의 투여용량을 결정하기 위하여 0, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/d의 투여용량으로 2주 반복투여 용량결정시험을 실시한 결과, 모든 시험군에서 시험물질에 의한 이상증상 및 독성 변화가 관찰되지 않아 동일한 용량으로 13주 반복 경구투여 독성시험을 진행하였다. 실험기간 동안 사망률, 일반증상, 체중 변화, 사료섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액응고시간 검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 및 조직병리학적 소견을 관찰한 결과, 시험물질에 의한 전신적인 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 여주 추출물의 NOAEL은 5,000 mg/kg/d로 판단되었고, 표적장기는 관찰되지 않았다. 본 연구의 결과로 볼 때 여주 추출물은 투여 가능한 최대 용량에서도 독성이 나타나지 않는 안전한 천연물로 확인하였고, 본 시험 결과를 바탕으로 ADI는 3,000 mg/man으로 판단된다. 따라서 기능성 식품으로서의 개발 가능성을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청에서 수행한 농업연구개발사업의 지원(과제번호: PJ010003)에 의한 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Moon HP. 2014. Korea Health Statistics 2013: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-1). Bureau of Health Policy in Ministry of Health and Welfare Press, Sejong, Korea. p 54-55.
2. Leung L, Birtwhistle R, Kotecha J, Hannah S, Cuthbertson S. 2009. Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of *Momordica charantia* (bitter melon): a mini review. *Br J Nutr* 102: 1703-1708.
3. Lee HJ, Moon JH, Lee WM, Lee SG, Kim AK, Woo YH, Park DK. 2012. Charantin contents and fruit characteristics of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) accessions. *J Bio-Environ Control* 21: 379-384.
4. Yuk HJ, Noh GM, Choe JS, Kwon OK, Hong SY, Kang SS, Cho KM, Park DS. 2015.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of vicine and  $\alpha$ -eleostearic acid from the seeds of *Momordica charantia*. *Korean J Environ Agric* 34: 57-63.
5. Joseph B, Jini D. 2013. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pac J Trop Dis* 3: 93-102.
6. Lin JT, Liu CW, Chen YC, Hu CC, Juang LD, Shiesh CC, Yang DJ. 2014. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT - Food Sci Technol* 55: 374-382.
7. Akhtar MS, Athar MA, Yaqub M. 1981. Effect of *Momordica charantia* on blood glucose level of normal and alloxan-diabetic rabbits. *Planta Med* 42: 205-212.
8. Zhang HX, Wang YW, Zhang XY, Liu MC, Hu ZD. 2003. Analysis of vicine in bitter melon with high performance liquid chromatography. *Anal Lett* 36: 1597-1605.
9. Dutta PK, Chakravarty AK, Chowdhury US, Pakrashi SC. 1981. Vicine, a favism-inducing toxin from *Momordica charantia* Linn. seeds. *Ind J Chem* 20: 669-671.
10. Raintree Nutrition, Tropical Plant Database. Database File for: Bitter Melon (*Momordica charantia*). <http://www.raintree.com/bitmelon.htm> (accessed Jan 2015).
11. Han HY, Kim SN, Yang YS, Han SC, Seok JH, Roh HS, Lee JK, Jeong J, Jeong YW, Kim JA, Min BS. 2015. Toxicity assessment of polygalae radix aqueous extract orally administered to rats for 2 consecutive weeks. *Kor J Pharmacogn* 46: 44-51.
12. Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C. 2013. *Toxicologic pathology: nonclinical safety assessment*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 665,941.
13. Choo SG, Park JO, Kim DS, Kim SY, Jang CS, Han TJ. 2001. *Urinalysis*. 1st ed. Korea Medical Book, Seoul, Korea. p 41.
14. Kim HJ, Lee S. 2016. *Non-clinical historical data (KCL, 2011 ~ 2015)*. Korea Conformity Laboratories, Incheon, Korea. p 2-12.
15. Latimer KS. 2011. *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: Clinical pathology*. 4th ed. John Wiley & Sons, West Sussex, UK. p 26-42.
16. Chiu T, Lee KP. 1983. Auricular chondropathy in aging rats. *Vet Pathol* 21: 500-504.
17. Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, MacKenzie WF. 1990. *Pathology of the fischer rat; reference and atlas*. 4th ed. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA. p 99,464-465,523.
18. Lewis RW, Billington R, Debryune E, Gamer A, Lang B, Carpanini F. 2002. Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. *Toxicol Pathol* 30: 66-74.
19. Klaassen CD. 2010. *Casarett & Doull's essentials of toxicology*. 8th ed. McGraw-Hill Education, New York, NY, USA. p 1313-1317.