

ICR계 마우스에서 홍화씨 에탄올 추출물의 급성독성시험

황윤환¹· 박병권²· 임종환³· 김명석¹· 송인배¹· 명노일⁴· 정상일⁴· 윤효인^{1*}

충남대학교 수의과대학 · 동물의학연구소¹,
전진바이오팜², 비엔씨 바이오팜³, 엠엔에이치 엘씨⁴

Acute Toxicity of Ethanolic Extract of Safflower Seed in ICR Mice

Youn-Hwan Hwang¹, Byung-Kwon Park², Jong-Hwan Lim³, Myoung-Seok Kim¹,

In-Bae Song¹, Ro-Eal Myung⁴, Sang-Il Chung⁴ and Hyo-In Yun^{1*}

¹Research Institute of Veterinary Medicine and College of Veterinary Medicine,

Chungnam National University,

²JUNJINBIO, ³B&C Biopharm, ⁴MNH LC

Abstract : The present study was carried out to investigate the potential acute toxicity of safflower seed by a single oral dose in ICR mice. Twenty animals of each sex were randomly assigned to four groups of 5 rats each and were administered singly by gavage at dose levels of 0, and 2,500 mg/kg body weight. Mortalities, clinical findings, and body weight changes were found and complete gross postmortem examinations were performed. Throughout the study period, no treatment-related deaths were observed. There were no adverse effects in clinical signs, body weight, and gross findings at any dose tested. The results showed that the single oral administration of safflower seed did not cause any toxic effect at the dose levels of 2,500 mg/kg in rats and the minimal lethal dose was considered to be over 2,500 mg/kg body weight for both sexes.

Key words : Safflower seed, acute toxicity, mice.

*Corresponding author: 042-821-6759,hiyun@cnu.ac.kr.

서 론

홍화 (*Carthamus tinctorius* L.)의 씨앗은 전통적으로 혈액순환 증대, 울혈 개선·진통에 사용되어 왔으며, 골절, 골다공증·골형성 부전증 등 골질환의 치료에 효과가 있음이 구전 되어 왔다. 홍화씨는 그 성분 및 효능에 대한 연구가 드물지만 추출유에는 리놀레산이 다량 함유되어 있고 동맥경화 예방 및 치료, 뇌수초염의 증상을 개선하는 것으로 알려져 있으며, 홍화씨 메탄올 추출물의 CCl_4 간독성에 대한 보호작용 등이 보고 된 바 있다¹. 최근에는 칼슘채널을 활성화하여 골절치유에 효과가 있음이 확인되었다. 불포화지방산인 리놀레산이 갈색 지방조직내에서 주요한 연료원으로서 열생산에 기여한다^{2,3}. Gibney와 L'Estrange⁴은 리놀레산이 고농도로 함유된 홍화씨를 첨가한 사료를 면양에게 급여한 결과 체지방 중 리놀레산의 함량이 증가한다고 보고하였다. 이는 분만초기에 나타날 수 있는 cold stress에 의한 면양의 치사율을 감소시킬 수 있다^{5,6}. 김 등⁷은 홍화씨 분말을 산란계의 사료첨가제로 이용하여 난각에 미치는 영향을 평가한 결과 후기 난각질과 부화율의 개선을 통해 종란 생산성을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 이와 같이 홍화씨 추출물의 약리활성과 영양학적 연구는 증가하고 있으나 안전성에 대한 평가는 미흡하다.

본 연구에서는 홍화씨 에탄올 추출물을 제조하여 단회 투여한 후 급성독성을 평가하기 위해 식품의약품안전청의 의약품 등의 독성시험기준⁸에 준하여 시험을 수행하였으며 부가적으로 혈액학적 검사를 실시하였다.

재료 및 방법

시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 바이오링크(주)에서 입수한 4주령의 특정병원체 부재 (specific pathogen free) ICR 마우스를 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것을 선발하여 시험에 공시하였다. 실험동물은 MJ사의 GOG 항온항습장치를 이용하여 온도 $23\pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55\pm 3\%$, 조명시간

12시간 (07:00~19:00) 및 조도 $150\sim 300$ Lux로 설정된 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 사육상자당 5마리로 수용하였으며 실험동물용 고품사료와 상수도 여과수를 자유급식시켰다.

시험물질의 추출 및 조성

칠곡 소재의 농장으로부터 홍화씨를 구입하여 100g 당 에탄올 1,000ml 비율로 혼합하고, 70°C 에서 5시간 동안 중탕·추출하였다. 이 추출액을 1,500g에서 15분간 원심분리시키고 상층액을 여과하여 감압농축한 다음 동결건조시켰다. 시험물질은 건조된 분말을 멸균증류수로 희석하여 고용량군과 저용량군의 시험물질을 조제하였다. 대조군은 멸균증류수만을 사용하였다.

시험물질의 투여

5ml의 증류수에 용해하여 투여 가능한 최대용량인 2,500mg/kg 용량을 투여하였으며 임상에서의 주요 적용경로인 경구로 하였다. 모든 동물은 투여 4시간 전에 절식시킨 후 금속제 경구용 존대와 주사기를 이용하여 강제 경구투여를 하였고, 3~4시간 후에 사료를 급여하였다. 투여 당일 체중을 기준으로 체중 kg 당 10ml로 투여량을 계산하였다.

체중 측정

모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 1, 3, 7 및 14일째에 체중을 측정하였다.

일반증상 관찰 및 부검

투여 당일에는 투여 후 6시간까지 매시간마다, 익일부터는 매일 1회 이상 투여 후 14일째까지 일반증상을 관찰하였다. 투여 후 14일째에 전 생존동물을 CO_2 로 마취시킨 후 개복하여 혈액학적 검사를 위해 후대정맥에서 채혈 후 방혈 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

혈액학적 검사

혈액시료는 각각의 EDTA가 들어있는 채혈병 (MICROTAINER®, USA)에 취한 후 자동혈구계수기 (MS9-5, France)를 이용하여 측정하였다.

통계학적 분석

본 시험에서는 얻은 측정치의 통계학적 분석은 SPSS 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA에서 유의한 F 값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이의 유의수준 $p < 0.05$ 로 *t*-test를 이용하여 실시하였다. 사망동물이 관찰되지 않아 반수 치사량 (LD₅₀)의 산출을 위한 통계처리는 실시하지 않았다.

결과 및 고찰

최근 골다공증 예방 및 혈액순환 개선, 사료첨가제로서의 가능성을 가진 홍화씨로부터 에탄올을 이용하여 추출한 물질에 대한 안전성 평가의 목적으로 식품의약품안전청의 독성시험기준(2005)에 따라 추출물 2,500mg/kg를 단회 경구투여 한 후 급성독성을 조사하였다.

체중 변화

시험물질을 투여한 후 체중을 측정한 결과(Table 1), 처치군 및 대조군에의 체중은 모두 정상적으로 증가하였으며, 대조군과 처치군 사이의 체중은 통계학적 유의성은 인정되지 않았다.

일반증상 및 부검소견

시험기간 중 일반증상을 관찰한 결과(Table 2), 수컷 2,500 mg/kg 투여군에서 투여초기에 탈모가 관찰되었다. 그 외의 전 시험군 및 대조군에서 임상증상은 관찰되지 않았다. 시험기간 중 관찰된 탈모 소견은 발생빈도가 매우 낮은 뿐 아니라 용량 상관성이 인정되지 않으므로, 이는 동일군 내의 강제 경구투여에 의한 스트레스에 기인한 것으로 사료된다^{9,10}. 시험물질 투여 후 14일째 육안적인 부검소견을 관찰한 결과(Table 3), 모든 생존동물에서 본 시험물질의 투여에 기인한 것으로 사료되는 병변은 관찰되지 않았다.

사망동물 및 치사량

시험물질을 투여한 후 14일간 사망유무를 관찰한 결과(Table 4), 모든 시험군에서 시험물질의 투여에

기인된 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 마우스에서 본 시험물질의 최소치사량(minimal lethal dose)은 암수 모두 2,500mg/kg을 상회하는 것으로 나타났다.

혈액학적 검사

혈액학적 검사 소견에서는 대조군과 비교하여 차이를 나타내지 않았으며 모두가 정상범위 내에 속하였다 (Table 5).

결론적으로, 약리학적 및 영양학적으로 이용 가능성이 있는 홍화씨 추출물의 ICR 계통 마우스를 이용한 단회 경구투여 결과, 2,500mg/kg 이하의 용량에서 어떠한 독성작용도 나타나지 않았다. 따라서 본시험을 통하여 홍화씨 추출물은 안전한 천연 추출물이라는 것을 확인하였다.

참고문헌

1. MacDonald-Wicks LK, Garg ML. Modulation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress by dietary fat in rats. *J Nutr Biochem* 2002;13:87-95.
2. Lammonglia MA, Bellow RA, Grings EE, Bergman JW. Effects of prepartum supplementary fat and muscle hypertrophy genotype on cold tolerance in newborn calves. *J Anim Sci* 1999;77:2227-2233.
3. Lee YC, Oh SW, Chang JH et al. Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures. *Food Chemistry* 2004;84:1-6.
4. Gibney MJ, L'Estrange JL. Effects of dietary unsaturated fat and of protein source on melting point and fatty acid composition of lamb fat. *J Agric Sci* 1975;84:291-296.
5. Bolte MR, Hess BM, Means WJ et al. Feeding lambs high-oleate or high-linoleate safflower seeds differentially influences carcass fatty acid composition. *J Anim Sci* 2002;80:609-616.

6. Encinias HB, Lardy GP, Encinias AM et al. High linoleic acid safflower seed supplementation for gestating ewes: Effects on ewe performance, lamb survival, and brown fat stores, *J Anim Sci* 2004;82:3654-3661.
7. 김은집, 신승철, 유선종 등. 홍화씨 분말 및 키토산의 사료 내 첨가가 증량 생산성 및 후기 난각질에 미치는 영향. *한국가금학회지* 2006;33:15-24.
8. 식품의약품안전청 의약품등의 독성시험기준. 식품의약품 안전청고시 제 2005-60호, 서울, 2005.
9. Kim JC, Kang BH, Shin CC et al. Subchronic toxicity of plant sterol esters administered by gavage to Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1569-1580.
10. Son WC. Analysis of fighting-associated wounds causing death of young male CD-1 mice in carcinogenicity studies. *Scnad. J Lab Anim Sci* 2003;30:101-111.

Table 1. Body weight changes in male and female rats after single oral administration of ethanolic extract of safflower seeds (n=5)

Dose (mg/kg)	Days after treatment				
	0	1	3	7	14
Male					
0	25.5 ± 0.7 ^a	26.1 ± 0.7	28.0 ± 1.0	30.9 ± 2.0	33.5 ± 1.7
2,500	25.4 ± 0.6	25.7 ± 0.6	27.8 ± 1.3	30.9 ± 1.9	35.0 ± 2.3
Female					
0	23.3 ± 0.6	24.0 ± 0.5	24.7 ± 0.9	26.0 ± 1.7	27.1 ± 2.1
2,500	23.1 ± 0.5	24.0 ± 0.5	24.7 ± 1.5	25.1 ± 1.7	27.9 ± 2.3

^a Values are presented as means ± SD (g).

Table 2. Clinical finding in male and female rats after single oral administration of ethanolic extract of safflower seeds (n=5)

Dose (mg/kg)	Findings	Days after treatment														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male																
0	normal	5 ^a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2,500	normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Fur Loss	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female																
0	normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2,500	normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

^a Number of dead animals.

Table 3. Gross findings in male and female rats after single oral administration of ethanolic extract of safflower seeds (n=5)

Dose (mg/kg)		0	2,500
Male	Normal Appearance	5 ^a	5
Female	Normal Appearance	5	5

^a Number of animals with the gross findings.

Table 4. Mortality in male and female rats after single oral administration of ethanolic extract of safflower seeds (n=5)

Dose (mg/kg)	Days after treatment														Mortality (%)	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male																
0	0 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female																
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Number of dead animals.

Table 5. Gross findings in male and female rats after single oral administration of ethanolic extract of safflower seeds (n=5)

Dose (mg/kg)	Male			Female
	0	1250	2500	5000
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	8.85 ± 0.73	8.68 ± 0.62	7.78 ± 0.72	8.54 ± 0.66
Hb (g/dl)	13.35 ± 0.87	12.15 ± 0.79	14.50 ± 1.18	14.08 ± 1.09
HCT (%)	42.21 ± 2.68	45.92 ± 2.53	38.43 ± 2.56	45.56 ± 2.65
MCV (fl)	51.97 ± 3.34	51.37 ± 1.42	52.21 ± 2.84	51.62 ± 1.50
MCH (pg)	13.42 ± 0.46	14.75 ± 2.43	14.23 ± 0.74	15.94 ± 0.59
MCHC (g/dl)	30.23 ± 2.64	30.81 ± 0.85	31.03 ± 1.71	30.71 ± 1.94
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	5.27 ± 2.33	4.33 ± 1.22	5.29 ± 1.03	4.75 ± 1.13
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	776.8 ± 150.9	758.8 ± 97.5	678.8 ± 150.9	788.8 ± 97.5

Abbreviation : RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular concentration; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT, platlet.