

랫드 및 토끼에 대한 치자 황색색소에 관한 단회 투여 경구 독성 시험

김 희 구 · 이 상 준
부산대학교 미생물학과

Single-Dose Oral Toxicity of the Gardenia Yellow Pigment in Rats and Rabbits

Hee-Goo Kim and Sang-Jun Lee

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

This study was performed to evaluate single-dose toxicity of the gardenia yellow pigment in Sprague-Dawley rats and New-Zealand White rabbits via oral routes. The yellow pigment was administered in rats at does levels of 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5mg/kg and 0mg/kg. And also yellow pigment was administered in rabbits at does levels of 5,000, 2,500, 1,250mg/kg and 0 unit/kg. The rats and rabbits of both sexes were observed daily for 14 days after single oral administration. Yellow pigment treated rats and rabbits did not induce any mortalities and abnormal signs in clinical findings, body weights, gross findings and histopathological finding. Based on these results, it is impossible to estimate LD₅₀ values in rats and rabbits. Therefore, it was concluded that gardenia yellow pigment have no effect on acute toxicity and side effect in rats and rabbits.

Key words : gardenia yellow pigment, single-dose toxicity, LD₅₀.

서 론

식품용으로 사용되는 착색료는 일반적으로 화학적 합성착색료와 천연착색료로 구분되어지며, 20세기초부터 석탄의 액화산업과 석유화학의 발달로 인하여 타르(tar)계의 아조(azo)색소와 키산틴(xanthine) 색소가 합성되면서 값싸고 색상이 선명하며, 착색이나 염색하기 쉬운 것 등의 장점으로 인하여 각종 인공 합성 색소가 식품, 의약품, 화장품, 의류 및 사료 등에 많이 사용되어 왔다. 그러나 최근에 식품에 사용되고 있는 인공 합성색소의 안정성에 대한 여러 가지 문제점이 대두되면서, 이에 대한 각종 규제가 강화되고 있다^{1~5)}.

식용색소 적색 1호는 간장독임이 밝혀졌고, 적색 4호는 방광 및 부신피질의 손상을 이유로 인하여 1965년 식용으로서 사용이 전면 금지되었고, 황색 3호에

서는 발암성 물질로 알려진 β -naphthylamine이 형성된다는 사실이 확인되었다^{6~8)}.

전보⁹⁾에서 추출한 치자 황색색소에 대한 랫드 및 토끼에 대한 급성독성시험의 결과는 아직 보고된 바 없다. 이에 본 연구에서는 치자 황색색소에 대한 생체의 안전성 여부를 검토하기 위하여 시험물질을 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5 및 0mg/kg의 용량으로 랫드에 대한 단회투여 경구 독성시험을, 토끼에는 5,000, 2,500 및 1,250mg/kg의 용량으로 토끼에 대한 단회 경구 독성시험을 실시하였다.

재료 및 방법

본 시험은 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호 “의약품 등의 독성시험기준”(1996년 4월 16일 제정)¹⁰⁾에 준하여 실시하였다.

1. 시험물질

시험물질인 치자 황색색소는 전보에서 추출한 것을 사용하였으며, -4°C 의 냉암소에 보관하였으며, 시험당일 각 투여군의 농도에 맞게 주사용 증류수에 용해시켜 사용하였다. 대조군에는 주사용 증류수만을 투여하였다.

2. 실험동물 및 사육조건

본 시험에 사용한 Sprague-Dawley 랫드는 삼육 실험동물연구소로부터 5~6주령의 암·수 각각 40마리를 입수한 후 1주일간 검역과 순화·사육을 거쳐 건강한 암·수 각각 30마리를 선별하여 시험에 사용하였다. New-Zealand White 토끼는 삼육실험동물연구소로부터 2~3개월령의 암·수 각각 15마리를 입수한 후 1주일간 검역과 순화 사육을 거쳐 건강한 암·수 각각 12마리를 선별해 시험에 사용하였다. 본 실험은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 환기 회수 10~12회/hr, 조명시간 12hr, 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시되었다. 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료 주식회사)를, 물은 상수도수를 자유 섭취시켰다.

3. 시험군의 구성

시험군의 구성은 Table 1과 같다. 랫드에는 선발된 암·수 각 30마리의 동물을 군간 체중이 고르게 황색색소 5개 용량군 및 대조군의 6개군으로 군당 암·수 각 5마리씩 배치하였다. 체중은 암컷은 평균체중이 120~140g, 수컷은 150~170g 범위였다. 토끼는 선발된 암·수 각 12마리의 동물을 군간 체중이 고르게 황색색소 3개 용량군 및 대조군의 4개군으로

Table 1. Experimental design for single-dose oral toxicity of gardenia yellow pigment

Animal species	Group	Dose (mg/kg)	No. of animals examined	
			Male	Female
Rats	Yellow pigment	5,000	5	5
		2,500	5	5
		1,250	5	5
		625	5	5
		312.5	5	5
	Control	0	5	5
Rabbits	Yellow pigment	5,000	3	3
		2,500	3	3
		1,250	3	3
	Control	0	3	3

군당 암·수 각 3마리씩 배치하였다. 체중은 암컷은 평균체중이 2.0~2.8kg, 수컷은 2.1~2.9kg 범위였다.

4. 투여방법 및 투여기간

투여경로는 임상적용경로인 경구경로를 택하였다. 투여액은 랫드에서는 20ml/kg, 토끼에서는 5ml/kg으로 하였으며, 시험개시시의 체중 측정결과에 따라 투여액을 산출하였다. 투여는 랫드에는 sonde를 사용하여 단회 위내 투여하였으며, 토끼에는 위 카테터를 이용하여 단회 위내 투여하였다.

5. 일반상태 및 폐사의 관찰

투여 당일은 12시간까지 매시간마다 일반상태를 관찰하고, 투여 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

6. 체중변화

투여 직전과, 투여 7일 후 및 부검 직전인 14일에 3회 체중을 측정하였다.

7. 부검

시험종료시 랫드는 에테르 마취로 방혈치사시켰으며, 토끼는 20ml의 공기를 이정맥내로 투여하여 치사시킨 다음 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

8. 사망한 동물에 대한 병리조직 소견

육안적으로 이상장기는 10% 중성포르말린액에 고정후 일반적인 파라핀 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 한 후 그 소견을 관찰하였다.

9. 통계학적 분석

LD_{50} 치의 산출을 위하여 computer program pharmacologic calculation system Version 4.1을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법¹¹⁾에 의하여 계산하였다. 체중에 대한 유의성 검정법으로 one-way analysis of variance(ANOVA)에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰될 때 대조군과 각 용량군과 비교하기 위하여 Dunnett's t-test를 하며, 발생병변의 빈도는 χ^2 (chi-square) 검정을 하였다.

결과 및 고찰

1. LD_{50} 에 대한 안정성

Table 2. Mortality and clinical findings in SD rats and New-Zealand White rabbits administered orally with gardenia yellow pigment

Animal species	Group	Dose (mg /kg)	Final mortality		Clinical findings	
			Male	Female	Male	Female
Rats	Yellow pigment	5,000	0/5	0/5	—*	—
		2,500	0/5	0/5	—	—
		1,250	0/5	0/5	—	—
		625	0/5	0/5	—	—
		312.5	0/5	0/5	—	—
	Control	0	0/5	0/5	—	—
Rabbits	yellow pigment	5,000	0/3	0/3	—	—
		2,500	0/3	0/3	—	—
		1,250	0/3	0/3	—	—
	Control	0	0/3	0/3	—	—

*No abnormality was detected.

Table 3. Changes of body weights in SD rats administered orally with gardenia yellow pigment

(mg : g)

Sex	Days after treatment		Groups					
			I	II	III	IV	V	VI
M	0	Mean	160.58	161.24	160.76	160.20	160.78	161.36
		S. D.	± 2.13	± 1.52	± 0.97	± 1.34	± 1.57	± 1.79
		N	5	5	5	5	5	5
	7	Mean	203.46	204.71	203.54	204.98	204.52	205.24
		S. D.	± 3.12	± 2.34	± 1.73	± 2.67	± 2.37	± 2.92
		N	5	5	5	5	5	5
	14	Mean	251.37	253.51	252.79	253.54	252.83	254.50
		S. D.	± 4.06	± 3.42	± 2.67	± 3.54	± 3.31	± 4.28
		N	5	5	5	5	5	5
F	0	Mean	131.58	132.32	132.64	132.72	131.89	131.79
		S. D.	± 2.56	± 2.78	± 1.95	± 1.88	± 1.69	± 2.03
		N	5	5	5	5	5	5
	7	Mean	155.65	157.83	158.61	157.34	156.28	158.01
		S. D.	± 3.79	± 3.56	± 4.12	± 3.52	± 2.98	± 3.26
		N	5	5	5	5	5	5
	14	Mean	182.12	183.91	184.58	183.27	182.70	185.24
		S. D.	± 5.29	± 4.78	± 5.82	± 4.23	± 3.79	± 4.26
		N	5	5	5	5	5	5

I : 5,000mg /kg, II : 2,500mg /kg, III : 1,250mg /kg, IV : 625mg /kg, V : 312.5mg /kg, VI : Control
 M : Male, F : Female, N : No. of animals examined
 Values represent Mean ± S. D. for 5 rats.

시험물질을 랫드에 경구투여시, 암·수 각각에서 투여할 수 있는 최고 용량인 체중 kg당 5,000mg의 용량에서도 사망에는 전혀 관찰되지 않아 LD₅₀치의 산정은 불가능하였다(Table 2). 토끼에 경구투여시, 암·수 각각에서 투여할 수 있는 최고 용량인 체중 kg당 5,000mg의 용량에서도 사망에는 전혀 관찰되

지 않아 LD₅₀치의 산정은 불가능하였다(Table 2).

2. 사망율

시험 전기간을 통하여 경구투여에 있어 랫드와 토끼의 암·수 모두에서 사망에는 전혀 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 4. Changes of body weights in New Zealand White rabbits administered orally with gardenia yellow pigment (mg : kg)

Sex	Days after treatment		Groups			
			I	II	III	IV
M	0	Mean	2.53	2.54	2.57	2.55
		S. D.	± 0.18	± 0.25	± 0.31	± 0.29
		N	3	3	3	3
	7	Mean	2.61	2.64	2.62	2.66
		S. D.	± 0.21	± 0.24	± 0.33	± 0.32
		N	3	3	3	3
	14	Mean	2.69	2.73	2.73	2.75
		S. D.	± 0.25	± 0.27	± 0.32	± 0.34
		N	3	3	3	3
F	0	Mean	2.43	2.44	2.41	2.43
		S. D.	± 0.18	± 0.20	± 0.23	± 0.19
		N	3	3	3	3
	7	Mean	2.51	2.53	2.49	2.52
		S. D.	± 0.23	± 0.22	± 0.21	± 0.23
		N	3	3	3	3
	14	Mean	2.62	2.65	2.58	2.63
		S. D.	± 0.26	± 0.27	± 0.24	± 0.27
		N	3	3	3	3

I : 5,000mg /kg II : 2,500 mg /kg III : 1,250 mg /kg IV : Control

M : Male, F : Female, N : No. of animals examined

Values represent Mean ± S. D. for 3 rabbits.

Table 5. Gross findings of necropsy in SD rats and New Zealand White rabbits administered orally with gardenia yellow pigment

Animal species	Group	Dose (mg /kg)	Male		Female	
			NO	NGF	NO	NGF
Rats	Yellow pigment	5,000	5	5	5	5
		2,500	5	5	5	5
		1,250	5	5	5	5
		625	5	5	5	5
		312.5	5	5	5	5
	Control	0	5	5	5	5
Rabbits	Yellow pigment	5,000	3	3	3	3
		2,500	3	3	3	3
		1,250	3	3	3	3
	Control	0	3	3	3	3

NO : No. of observations, NGF : No gross findings

3. 임상증상

시험 전기간을 통하여 경구투여에 있어 랫드와 토끼의 암·수 모두에서, 본 시험물질에 의한다고 생각되는 특이한 임상증상은 전혀 관찰되지 않았다(Table 2).

4. 체중변화

시험 전기간을 통하여 경구투여에 있어 랫드(Table 3)와 토끼(Table 4)의 암·수 모두에서, 각 군간에 유의성 있는 차이는 전혀 관찰되지 않았다.

시험 전기간을 통하여 경구투여에 있어 랏드(Table 3)와 토끼(Table 4)의 암·수 모두에서, 각 군간에 유의성 있는 차이는 전혀 관찰되지 않았다.

5. 부검소견

생존동물의 부검에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되어지는 어떠한 유의할 만한 병변은 관찰되지 않았다(Table 5).

6. 병리조직학적 소견

생존동물의 부검에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떤 유의할 만한 병리조직학적 소견은 관찰되지 않았다.

요 약

치자에서 분리한 황색색소에 대한 랏드 및 토끼에 있어서의 단회투여 경구 독성시험을 수행하였다. 황색색소는 랏드의 경우 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5 및 0mg/kg의 용량으로 경구로, 토끼에는 5,000, 2,500 및 1,250mg/kg의 용량으로 경구로 암·수 각각에 1회 투여한 후 14일 동안 관찰하였다. 시험결과에 있어 랏드 및 토끼의 모든 황색색소 투여군에서 사망예, 임상증상, 체중변화, 육안적 소견 및 병리조직학적 소견에서 특기할만한 이상은 관찰되지 않았으며 랏드와 토끼에서 황색색소의 LD₅₀치를 산출할 수 없었다. 따라서 LD₅₀치는 랏드 암·수 모두에서 체중 kg당 5,000mg 이상인 것으로 판단되었으며, 토끼 암·수 모두에서 체중 kg당 5,000mg 이상인 것으로 판단되었다. 이상의 결과로부터 치자로부터 분리한 황색색소는 랏드 및 토끼에서 단회

투여 경구 독성시험에서 어떠한 독성 및 부작용을 유발하지 않는 안전한 제제로 사료된다.

참고문헌

1. 後藤力雄 : 天然色素の法的規制の現状と規格化, *A Technical J. on Food Chemistry & Chemicals*, 7: 29~34 (1988).
2. 鈴木秀昭 : 天然色素の市場動向, *Food Chem.*, 88, 76 (1988).
3. Lauro, G. J. : A primer on natural colors, *Cereal Foods World*, 36: 949~953(1991).
4. Francis, F. J. : Future trends, in Development in Food Colors-2, Walford, J., Ed., Applied Science Publishers, 238~247(1984).
5. Knewstubb, C. J. and Henry, B. S. : Natural colors-a challenge and an opportunity, Food Technology International, Sterling Publ. Ltd., London, 179~186(1988).
6. 김동훈 : 식품화학, 탐구당(1990).
7. Richard V. Lechowich : Food ingredient safety evaluation, *Food Technology*, 69~70(1981).
8. Shuichiro Yoshino : FDA의食用赤色3號の使用制限とわが國の残留農薬對策, *食品と科學*, 115(1990).
9. Kim, H. G. and Joo, S. H. : Yellow color extraction from *Gardenia jasminoides* Ellis for development of natural food color, *The Korean J. of Food & Nutrition*, 10(2), 241~245(1997).
10. 식품의약품 안전본부(1996년 4월 16일) : 의약품 등의 독성기준. 식품의약품 안전본부 고시 제96-8호, 서울.
11. Tallarid, R. J. & Hurray, R. B. : Manual of pharmacologic calculation with computer programs, pp 153~166. Springer-Verlag(1987).

(1997년 12월 19일 접수)