

흑진주벼로부터 색소추출물의 안전성

류수노*† · 박순직* · 강삼식** · 이은방** · 한상준**

*한국방송통신대학교, **서울대학교 천연물과학연구소

Food Safety of Pigment in Black Rice cv. Heugjinjubyeo

Su-Noh Ryu*, Sun-Zik Park*, Sam-Sik Kang**, Eun-Bang Lee** and Sang-Jun Han**

*Dep. of Agriculture Science, Korea National Open Univ., Seoul 110-791, Korea

**National Products Research Institute, Seoul National Univ., Seoul 110-460, Korea

ABSTRACT: Acute toxicity of the pigment fraction of Heugjinjubyeo was investigated in male and female mice following oral administration. Major component of pigment fraction was analyzed as cyanidin 3-glucoside (C3G), which composition content was 96%. The pigment fraction as given at the single oral doses of 1000, 3000 and 9000mg/kg in male and female mice did not show any abnormal behaviours, body weight loss or other toxic symptoms during observation period of 14 days. There were no dead mice among 6 mice at a single dose of 9000 mg/kg. Thus, it is concluded that the minimum lethal doses (MLD) of the pigment extract might be more than 9000 mg/kg p.o., in male and female mice.

Keywords : Heugjinjubyeo, Pigment fraction, Cyanidin-3-glucoside, Mice, Minimum lethal doses (MLD).

유색미는 쌀겨 고유의 회백색 이외에 적색(red) 또는 자색(purple)을 띠고 있는 쌀로서 품종에 따라 색깔의 정도는 다양하다. 적색 및 적갈색을 띠는 유색미는 색소 추출액의 최대 흡수 파장이 438~456 nm과 460 nm인 탄닌계 색소가 포함되어 있고, 자색 및 흑자색을 띠는 유색미에는 색소 추출액의 최대 흡수파장이 527~530 nm과 535~538 nm인 안토시아닌계 색소가 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 1996).

Cho *et al.* (1996)은 한국산 유색미 흑진주벼의 주요 안토시아닌 색소가 cyanidin 3-glucoside임을 확인하였고, Ryu *et al.* (1998)은 HPLC 분석에 의해 cyanidin 3-glucoside의 함유량이 470 mg(100g 종자)정도이며, 이것은 흑진주벼의 총 안토시아닌 함량 중 95.3%를 차지하는 것으로 보고하였다.

안토시아닌 중에서도 유색미에 많이 존재하는 cyanidin 3-glucoside의 항산화 활성을 Choi *et al.* (1994)은 linoleic acid의 자동산화 과정에서, Tsuda *et al.* (1998)은 쥐의 장기

를 이용한 실험에서 확인하였다.

안토시아닌 색소는 인간의 low-density lipoprotein, lecithin-liposome system(Satue-Gracia *et al.*, 1997)과 ascorbic acid-copper system(Sarma *et al.*, 1997)에서 항산화 활성이 있는 것으로 보고되어 있고, heterocyclic amine과 같은 돌연변이원의 mutagenic activity(Yoshimato *et al.*, 1999), superoxide anion radical scavenging activity(Kaneyuki *et al.*, 1999)와 O₂⁻ scavenging activity(Noda *et al.*, 1998) 및 사염화탄소(CCl₄)에 의해 손상된 간을 보호하는 작용(Obi *et al.*, 1998) 등 다양한 연구결과가 보고되고 있다. 따라서 anthocyanin은 색소로써의 효용가치 뿐만 아니라 BHT, BHA와 같은 합성 항산화제를 대체하여 사용될 수 있는 것으로 보인다. 그러나 유색미 추출 색소의 항산화기능은 일부 밝혀지고 있으나, 이들 물질의 섭취량에 따른 안전성에 대한 연구결과는 발표된 바가 없다.

따라서 본 연구자들은 흑진주벼로부터 안토시아닌 색소 cyanidin 3-glucoside(C3G)분획을 대량으로 추출 및 분리하여 안정성에 대한 동물 실험한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

시험물질

동물실험을 위한 색소는 흑진주벼 10 kg를 이용, 도정한 후 부산물로 나오는 쌀겨를 이용하여 Fig. 1과 같이 추출하여 사용하였으며 추출물의 C3G의 순도는 96%로 45 g을 확보하였다. 추출물을 4°C에 보관하면서 사용하였으며, 이 추출물은 1% CMC에 현탁하여 시험물질로 사용하였다. 한편 추출된 흑진주벼 C3G(Cyanidin 3-glucoside)와 P3G(Peonidin 3-glucoside) 색소의 화학구조는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

실험동물 및 사육환경

시험구역은 서울대학교 천연물과학연구소 실험 동물실에서

†Corresponding author: (Phone) +82-2-3668-4631 (E-mail) ryusn@knou.ac.kr

<Received July 15, 2000>

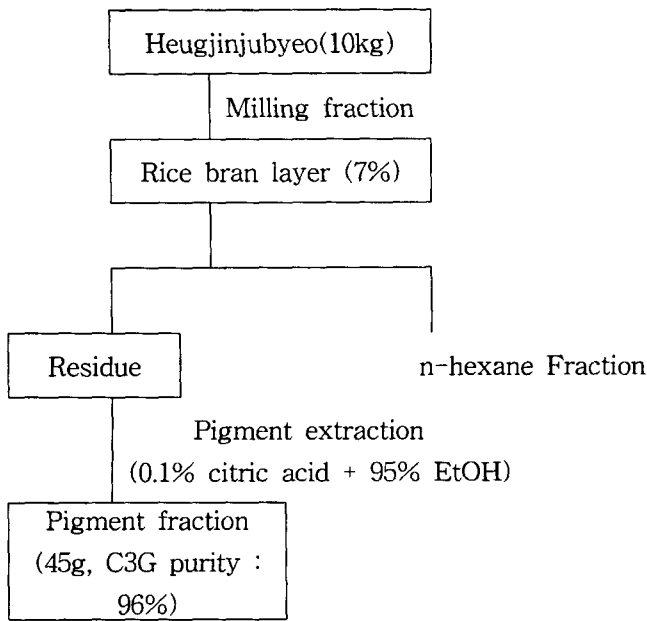
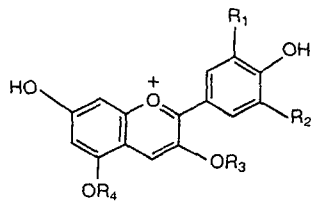


Fig. 1. Flow chart of preparation of pigment fraction from Heugjinjubyeo.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
C3G [†]	OH	H	Glu	H
P3G [‡]	OCH ₃	H	Glu	H

[†]cyanidin 3-glucoside

[‡]peonidin 3-glucoside

Fig. 2. Chemical structure of Heugjinjubyeo pigment.

실시하였다. ICR계 생쥐를 본 연구소에서 분양 받아 실험동물실에서 1주일이상 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 동물실내의 명암은 12시간씩으로 자동조절 시켰으며, 온도는 22~25°C를 유지토록 하였고, 삼양유지(주)의 사료와 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험군 분리 및 투여용량

순화기간 중 건강하다고 판정된 생쥐에 대하여 체중을 측정하고 암수 각 24수를 암수별로 구분하고 투여용량별로 각각 6수씩 군 분리를 하였다. 동물의 개체식별은 Tag 표시법으로 하여 경구로 투여하였다. 투여용량의 설정은 색소추출물을 최대 용량을 9000 mg/kg으로 하여, 3개 용량군과 대조군으로 나누어 Table 1과 같이 실시하였다. 실험동물의 체중범위는 수

Table 1. Treatments of dose and number of mice used in this experiment.

Group	Oral administration (mg/kg)	Dose (ml/kg)	Mouse(number)	
			male	female
Control [†]	0	10	6	6
Low	1000	10	6	6
Middle	3000	10	6	6
High	9000	10	6	6

[†]1% CMC solution

컷 21 g~27 g 및 암컷 18 g~24 g이었다.

시험물질의 조제 및 투여

사용된 mice는 하룻밤 절식시킨 다음, 시험물질을 체중 kg 당 10 ml씩 투여되도록 1% CMC 용액에 색소추출물을 현탁하여 제조하였으며, 대조군은 1% CMC용액만을 경구로 투여하였다. 시험물질의 제조는 투여직전에 하였으며, 투여액량은 투여직전의 체중에 따라 산출하였고 1회 투여하였다.

관찰 및 검사항목

1) 중간치사량(LD₅₀)

모든 시험동물에 대한 상태는 투여 당일은 투여 후 6시간까지 매시간 관찰하였으며, 투여 익일부터는 14일까지 매일 1회씩 동물의 사망 발현 유무를 관찰하였다.

2) 증상 관찰

모든 시험동물에 대한 상태는 투여 당일은 투여 후 6시간까지 매시간 관찰 하였으며, 투여 익일부터 14일 까지 매일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망 발현 유무를 관찰하였다.

3) 체중 측정

경구 투여한 동물에 대해서는 시험물질 투여 직전과 투여 후 2일 간격인 2일, 4일, 6일, 8일, 10일, 12일 및 14일째에 체중을 측정하였다.

4) 부검

관찰기간 종료 후 모든 동물을 에테르로 마취하여 치사시킨 다음, 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

통계학적 방법

체중측정의 결과 표시는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Student's t-test 및 Dunnett's t-test를 사용하였다.

결과 및 고찰

실험동물의 폐사율과 중간치사량(LD₅₀) 및 임상증상

검체를 생쥐에 1회 경구 투여한 결과는 Table 2와 같으며

Table 2. Mortality of male and female mice administered intragastrically with Heugjinjubyeo pigment.

Sex	Dose (g/kg)	Hours after treatment						Days after treatment														Final Mortality	
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	3.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	9.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	3.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	9.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6

Table 3. Changes of body weight in male and female mice administered intragastrically with Heugjinjubyeo pigment (g, Mean \pm SD)

Sex	Dose (g/kg)	No. of mice	Days after treatment											Weight gain
			0	2	4	6	8	10	12	14				
Male	0	6	32.7 \pm 1.7	35.8 \pm 1.5	36.3 \pm 1.6	36.2 \pm 1.4	36.8 \pm 1.5	38.1 \pm 1.2	37.8 \pm 1.3	37.8 \pm 1.5	5.1a [†]			
	1.00	6	33.1 \pm 2.3	36.3 \pm 2.5	37.5 \pm 2.9	36.8 \pm 2.3	38.1 \pm 3.1	38.8 \pm 2.9	39.5 \pm 3.4	38.0 \pm 3.2	4.9a			
	3.00	6	33.9 \pm 2.5	35.2 \pm 3.3	35.8 \pm 3.0	35.5 \pm 3.0	36.7 \pm 3.3	36.6 \pm 3.5	37.1 \pm 3.7	37.0 \pm 3.4	5.1a			
	9.00	6	30.3 \pm 1.5	35.9 \pm 2.1	36.3 \pm 2.3	36.3 \pm 2.0	37.3 \pm 2.3	38.0 \pm 2.7	38.0 \pm 2.3	39.6 \pm 2.4	6.3a			
Female	0	6	26.3 \pm 3.8	26.9 \pm 2.4	27.5 \pm 3.3	26.9 \pm 3.2	27.6 \pm 3.0	27.8 \pm 2.7	28.2 \pm 3.8	28.0 \pm 3.1	1.7a			
	1.00	6	24.8 \pm 1.3	25.9 \pm 1.4	26.6 \pm 0.9	26.1 \pm 1.5	27.8 \pm 1.3	27.1 \pm 1.0	27.6 \pm 1.9	27.2 \pm 1.8	1.8a			
	3.00	6	26.0 \pm 1.3	26.3 \pm 1.3	27.3 \pm 2.1	26.7 \pm 1.2	27.8 \pm 2.0	27.9 \pm 2.2	28.1 \pm 2.4	27.8 \pm 2.2	1.6a			
	9.00	6	24.8 \pm 1.3	26.2 \pm 1.6	25.8 \pm 1.8	25.6 \pm 1.8	26.9 \pm 1.8	26.1 \pm 1.9	27.2 \pm 2.0	26.8 \pm 2.1	2.0a			

[†]Means followed by the same letter in a column are not significantly different at 5% level.

대조군 및 전체 시험물질 투여군의 암수 모든 동물군에서 사망 예는 발견되지 않았다. 따라서 중간 치사량을 계산할 필요가 없었으며 최소치사량은 9000 mg/kg 이상의 경구 용량임을 알 수 있었다. 본 시험물질의 경구 투여시 중간치사량(LD₅₀)은 암수 모두 9000 mg/kg 이상이였다.

또한 시험 전기간을 통하여 경구 투여시 생쥐의 암수 모두에서 시험물질에 기인된 이상 소견은 발견되지 않았다 (Table 2).

체중 변화와 부검 소견

검체를 경구 투여하였을 때, 전투여군의 암수 동물의 체중 증가는 대조군에 비하여 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다 (Table 3).

검체 투여 14일 후에 실시한 부검결과, 전투여군에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병변을 관찰하지 못하였다.

이상의 실험 결과를 요약하면, 흑진주벼 색소추출물의 급성독성 실험에서 생쥐의 암수 모두 9000 mg/kg의 대량 경구 용량에서도 사용한 6마리가 모두 사망하지 않았으며, 투여군 모두의 경구 용량에서 14일간 측정된 체중변화는 대조군과 유

의성 있는 변화를 관찰할 수 없었으며, 증상의 이상도 관찰할 수 없었다.

또한 부검 결과도 특별한 의견상 이상도 발견되지 않았다. 따라서 생체내에서 안전성이 높은 물질임을 알 수 있었다.

적 요

흑진주벼 색소 분획의 급성독성 시험을 하기 위하여 ICR계 생쥐 각 암수 6마리를 1주일 이상 순화시킨 다음 경구투여를 실시하여 14일 동안 급성독성 평가를 한 결과는 다음과 같다.

1. 색소추출물의 급성독성 실험에서 생쥐의 암수 모두 9000 mg/kg의 대량 경구 용량에서도 사용한 6마리가 모두 사망하지 않았다.

2. 1000, 3000 및 9000 mg/kg 경구 용량에서 14일간 측정된 체중변화는 대조군과 유의성 있는 변화가 없었고 증상의 이상도 보이지 않았다.

3. 경구 용량 시험의 부검결과 대조군과 유의성 있는 체중 변화와 다른 증상의 이상이 관찰되지 않아서 안전성이 높은 물질로 확인되었다.

인용문헌

- Choi, H. C. and S. K. Oh. 1996. Diversity and function of pigments in colored rice. *Korean J. Crop Sci.* 41(Special Issue) : 1-9.
- Cho, M. H., Y. S. Paik, H. H. Yoon and T. T. Hahn. 1996a. Chemical of the major color component from a Korean pigmented rice variety. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 39 : 304-308.
- Cho, M. H., H. H. Yoon and T. R. Hahn. 1996b. Thermal stability of the major color component cyanidin 3-glucoside from a Korean pigmented rice variety in aqueous system. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 39 : 245-248.
- Choi, S. W., W. W. Kang, T. Osawa and S. Kawakishi. 1994. Antioxidative activity of crysanthem in black rice hulls. *Food and Biotechnology* 3 : 233-237.
- Dougall, D. K., D. C. Baker, E. Gakh and M. Redus. 1997. Biosynthesis and stability of monoacylated anthocyanins. *Food Technology* 51 : 69-71.
- Kaneyuki, T., Y. Noda, M. Traber, A. Mori and L. Packer. 1999. Superoxide anion and hydroxyl radical scavenging activities of vegetable extracts measured using spin resonane. *Biochemistry and Molecular Biology International* 47 : 979-989.
- Noda, Y., T. Kaneyuki, K. Igarashi, A. Mori and L. Packer. 1998. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 102 : 175-187.
- Obi, F. O., I. A. Vsenu and J. O. Osayande. 1998. Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat by *H-rosasinensis* anthocyanin extract administered in ethanol. *Toxicology* 131 : 93-98.
- Ryu, S. N., S. Z. Park and C. T. Ho. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *J. Food and Drug Analysis* 6 : 729-736.
- Sarma, A. D., Y. Sreelakshmi and S. Sharma. 1997. Antioxidant activity of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry* 45 : 67.
- Satue-Gracia, M. T., M. Heinonen and E. N. Frankel. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 3363.
- Sharp, R. N. 1991. Rice production, processing, and utilization in Handbook of Cereal Science and Technology, Marcel Dekker, Inc., New York, 301.
- Tsuda, T., F. Horio and T. Osawa. 1998. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids* 33 : 583-588.
- Yamashita, K., S. Nakano, M. Kuwata, H. Yada, K. Irimura, H. Morinaga and K. Morita. 1992. Single dose toxicity studies of suplatast tosilate (IPD-115IT). *J. Toxicol. Sci.* 17(suppl. 2) : 1-9.
- Yoshimoto, M., S. Okuno, M. Yoshinaga, O. Yamagawa, M. Yamaguchi and J. Yamada. 1999. Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63 : 537-541.