

## 검정콩 안토시아닌의 마우스를 이용한 안전성 연구

김용호 · 도선길\* · 김동선\* · 우성식\* · 김옥진\*\* · †이혜정\*\*\*

순천향대학교 의료생명공학과, \*(주)유니젠,

\*\*원광대학교 동물자원개발연구센터, \*\*\*가천의과대학교 식품영양학과

### Evaluation of Toxicity of Anthocyanin from Black Soybean by Feeding Test in Mice

Yong-Ho Kim, Seon-Gil Do\*, Dong-Seon Kim\*, Sung-Sick Woo\*

Ok-Jin Kim\*\* and †Hye-Jeong Lee\*\*\*

Dept. of Medicinal Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

\*Unigen, Inc, Cheonan 330-863, Korea

\*\*Center for Animal Resources Development, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*\*\*Dept. of Food and Nutrition, Gachon University of Medicine and Science, Incheon 417-842, Korea

#### Abstract

Over the past few years, anthocyanin has been demonstrated to exert potentially anti-oxidative and bioavailability effects including anti-cardiovascular disease and cancer-preventive effects in humans. This study was conducted to assess the toxicity of anthocyanin extracts from black soybean seed coats via oral administration in a mice feeding test. The final anthocyanin-containing products induced signs of toxicity on mortality in the 4-week feeding test. The incidence of clinical signs and changes in body and organ weight were also not observed in all anthocyanin-treated groups as compared with the control groups. In hematology analysis, RBC indices concluding MCV, MCH, and MCHC and WBC differential counting such as NEU, LYM, MONO, EOS, and BASO evidenced no significant differences between the anthocyanin treatment and control groups. The biochemical parameters in serum analysis - ALT, AST, BUN, Crea etc.- were also not significantly altered in those groups. Absolute and relative organ weights were not increased after 4 weeks of treatment with anthocyanin extracts in mice. In conclusion, anthocyanin extracts from the black soybean has biological activity without any toxic effects, which also suggests that the consumption of soy containing anthocyanin products may be a good source for health and medical supplies.

Key words: soybean, anthocyanin, toxicity, hematology, serum.

#### 서 론

검정콩은 우리나라, 일본, 중국 동북부 지방 정도에서만 재배되고 있으며, 우리나라에서는 전통적 음식인 밥밀콩, 콩자반, 콩강정, 떡소용 등에 이용하여 왔다. 특히 예로부터 검정콩은 소위 '약콩'으로 불리고 민간요법에 많이 활용되었으며, 최근에는 검정콩의 기능성이 부각됨으로써 검정콩을 이용한

여러 가지 가공 제품이 개발되고 있다.

그러나 검정콩의 이용 정도에 비하여 생리활성에 관한 연구는 그동안 미미하였는데, 최근에는 국내에서도 콩의 생리활성 부각과 함께 검정콩의 천연 색소에 관한 연구가 활기를 띠고 있다<sup>1-3)</sup>. 한편, 검정콩 항산화 효과의 차이는 종피의 안토시아닌 함량과 높은 관련성이 있음을 보고하기도 하였다<sup>4)</sup>.

안토시아닌은 식물체에서 적색, 자색 및 청색을 내는 수용

† Corresponding author: Hye-Jeong Lee, Dept. of Food and Nutrition, Gachon University of Medicine and Science, Incheon 417-842, Korea.

Tel: +82-32-820-4232, Fax: +82-32-813-3570, E-mail: hjlee@gachon.ac.kr

성 색소로서 자연에 다양한 종류가 존재하며, 천연 색소로서 최고의 이용 가치가 있다고 알려져 있다<sup>5,6)</sup>. 또한, 안토시아닌 계통의 색소는 식품 착색 물질뿐만 아니라 생체 내에서 생리 활성에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 이들 색소에 대한 연구들도 활발히 진행되고 있는데<sup>7)</sup>, 안토시아닌의 효과로는 항암작용<sup>8~10)</sup>, 면역 증강<sup>11,12)</sup>, DNA 손상 억제<sup>13,14)</sup> 등이 보고되어 있으며, 특히 항산화 효과에 관한 연구 결과<sup>15~18)</sup>가 많이 발표되었다.

본 연구는 검정콩 천연 색소인 안토시아닌에 대하여 동물에서의 식이실험을 통한 안전성 자료를 확보하고자 수행되었다. 안토시아닌을 마우스에 경구 투여한 후 나타나는 독성 변화를 관찰하기 위해 임상증상, 혈청생화학적 검사, 조직병리학적 검사 등을 실시하였으며, 이를 통하여 검정콩 안토시아닌에 대한 안전성을 분석하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

검정콩 안토시아닌 추출용 공시재료는 2006년 충남농업기술원과 경기농업기술원에서 재배된 재래 검정콩을 분양받아 사용하였다. 안토시아닌 추출은 pilot 규모에서 대량으로 수행되었는데, 검정콩 종피 700 g을 15 l의 용매(methanol(MeOH) 80%)를 사용하여 색소 추출을 하였다. 색소 추출액은 감압 농축시켜 MeOH를 제거하였으며, 이후 얻어진 농축물을 최종 생산물로 하였다. 최종 생산물의 안토시아닌 함량은 reverse phase HPLC를 이용하여 분석하였다<sup>3)</sup>. Tosoh Bioscience TSK-gel™ ODS-120T(5 μm, 15 cm×4.6 mm) 칼럼과 UV-visible 530 nm Detector를 사용하였으며, mobile phase는 H<sub>2</sub>O : methanol : formic acid를 78 : 17 : 5(v/v/v), flow rate는 1 ml/min로 수행되었다. 분석에 사용된 표준물질인 cyanidin-3-glucoside(C3G), delphinidin-3-glucoside(D3G), petunidin-3-glucoside(Pt3G)은 노르웨이의 Polyphenols사에서 구입하여 사용하였다. 최종 생산물의 안토시아닌 함량은 D3G가 13.2 mg/ml, C3G가 52.5 mg/ml, Pt3G가 2.7 mg/ml이었다.

### 2. 시료의 투여

본 실험에 사용된 시험계는 마우스 ICR 계통을 (주)코아텍(경기 평택, 한국)에서 구입 후 사용하였다. 구입시 주령 및 체중범위는 5주령으로 암·수 각 25마리였으며, 수컷 25~30 g, 암컷 20~26 g이었다. 이들은 약 1주일간의 검역 순화 기간을 거친 후 시험에 투여되었다. 사육 환경 조건은 온도 22±3℃, 상대습도 50±20%, 환기 회수 및 방식은 10~15회/시간으로 전 배기방식을 택하였다. 사료는 일반 마우스 사료를 (주)중

양실험동물(서울, 한국)에서 구입 후 사용하였으며, 급이 방법은 급이기에 고형사료를 넣어 자유 섭취시켰다. 검정콩에서 추출된 안토시아닌은 마우스에 경구 투여시켰으며, 개체별 투여액은 체중을 기준으로 산출하였다. 단회 독성 시험은 투여 전에 약 16시간 동안 음수를 자유 섭취시키면서 절식시킨 후 5,000 mg/kg의 용량으로 위내에 단회 강제 투여하고, 약 3~4시간 후에 사료를 급여하였다. 반복 경구 투여 독성 시험은 매일 오전 일정한 시간에 4주간 1일 1회 위내에 강제 투여하였으며, 투여 용량은 1,000 mg/kg으로 설정하여 조정하였다. 대조군에는 정제수를 투여하였으며, 투여액은 10 ml/kg으로 하였다.

### 3. 일반 증상 관찰 및 부검

관찰기간 중 모든 시험계에 대하여 1일 1회 일반 상태, 운동성, 자율신경계의 기능 및 배설물 등의 일반 증상을 관찰하였다. 관찰기간 중 빈사동물은 더 많은 자료를 얻기 위하여 ether로 마취하여 복대동맥에서 가능한 범위 내로 혈액을 채취하고 부검을 실시하였으며, 모든 시험동물은 부검 전 18시간 이상 절식시켰다.

### 4. 혈액학적 검사 및 혈청학적 검사

실험종료 시 모든 생존동물은 절식시킨 후 복대동맥으로부터 혈액을 채취한 후, 그 중 약 200 μl는 EDTA가 함유된 CBC bottle에 취하여 혈구자동측정기(ADVIA 120, Bayer, Germany)로 혈액학적 검사를 실시하였다. 측정 항목들은 총 적혈구수(RBC: total erythrocyte count), 혈색소량(HGB: hemoglobin concentration), 헤마토크리트(HCT: hematocrit), 평균 적혈구 용적(MCV: mean cell volume), 평균 적혈구 헤모글로빈량(MCH: mean cell hemoglobin), 평균 적혈구 헤모글로빈 농도(MCHC: mean cell hemoglobin concentration), 혈소판수(PLT: platelet), 총 백혈구수(WBC: total leucocyte count)를 조사하였으며, 총 백혈구수 백분율로는 중성호성 백혈구(NEU: neutrophils), 림프구(LYM: lymphocytes), 단핵구(MONO: monocyte), 산호성 백혈구(EOS: eosinophils), 염기호성 백혈구(BASO: basophils) 등을 분석하였다. 혈청생화학적 검사는 혈액학적 검사에서 사용하고 남은 혈액을 사용하여 수행하였다. 즉, 혈액을 원심분리(3,000 rpm, 10분)한 후, 혈청을 분리하여 혈액생화학분석기(7080, Hitachi, Japan)를 이용하여 관련 항목들을 측정하였다. 알려진 아미노기전이효소(ALT: alanine aminotransferase), 아스파테이트 아미노기전이효소(AST: aspartate aminotransferase), 알칼라인 포스파타제(ALP: alkaline phosphatase), 혈액요소질소(BUN: blood urea nitrogen), 크레아티닌(Crea: creatinine), 총빌리루빈(T-Bili: total bilirubin), 총콜레스테롤(T-Chol: total cholesterol), 트리글리세라이드(TG: triglycerides) 등이 조사되었다.

## 5. 장기 관찰 및 조직병리학적 검사

사망동물, 빈사 처분동물 및 관찰기간 종료 시 계획부검 동물에 대해서, 외관검사를 실시한 후 체표, 두부, 경부, 흉부 및 복부를 포함한 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다. 부검 시 개체별로 장기들을 적출하여 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대 장기 중량비를 산출하였다. 사용된 장기는 심장, 간, 신장, 비장(spleen), 고환, 난소, 부고환, 폐 등이었다. 조직 검사를 위하여 부검 시 육안 소견이 관찰된 장기·조직을 적출하여 10% 중성 완충 포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정된 후 조직절편을 제작하였다. 그 후 박절과정을 거쳐 슬라이드를 제작한 후, 대조군과 고용량군의 모든 개체, 빈사 및 사망개체의 기관·조직에 대하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.

## 6. 통계 처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량 등 자료들에 대해 Levene's test를 실시하여 분산의 동질성을 확인하고, 분산이 이질적인 경우 적절한 data transformation을 실시한 후 분산의 동질성을 재확인하였다. 이후 one way ANOVA test를 수행하여 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 실험동물의 In Vivo 독성

안토시아닌의 섭취로 인한 이상 반응 여부를 확인하기 위하여 쥐를 이용하여 실험한 결과는 다음과 같다.

검정콩 안토시아닌 조추출물을 5,000 mg/kg 단회 처리 및 1,000 mg/kg을 4주간 반복하여 쥐에 투여한 결과, 모든 군에서 사망동물이 관찰되지 않았다(Table 1). 또한, 시료 투여와 관련된 이상 증상들도 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 검정콩 안토시아닌 조추출물은 경구 사용 시 안전한 물질로 사료되었다. 미국 환경보호청(US Environment Protection Agency, 1998)에서는 경구 투여 반수 치사량이 체중 kg 당

Table 1. Mortality in mice after anthocyanin treatment

Administration	Sex	Dose(mg/kg)	Number of death
Single oral administration	Male	0	0/6 <sup>1)</sup>
		5,000	0/6
	Female	0	0/6
		5,000	0/6
Repetition 4 weeks	Male	0	0/6
		1,000	0/6
	Female	0	0/6
		1,000	0/6

<sup>1)</sup> Values: number of dead animals/number of tested animals.

5,000 mg 이상이면 무해한 물질로 분류하고 있다<sup>19)</sup>.

Table 2는 안토시아닌 고농도(5,000 mg/kg) 단회 섭취가 쥐의 암·수에게 나타나는 체중 변화를 분석한 결과이다. 실험기간 동안 단회 독성시험에서 흑색 분(糞)이 암·수 모두 투여 1일차에 관찰되었으며 체중도 감소하였으나, 이후로는 관찰되지 않았다. 따라서 고용량 투여에 의한 일시적 현상으로 판단되어 약물 투여에 의한 증상으로 인정되지 않았다. 이외의 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 또한, Table 2에서 나타난 것처럼 단회 투여 시작 일 체중에서 14일 관찰기간 동안의 체중 증감에 있어 암·수 모두 군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 즉, 투여 전일 절식으로 인한 체중 감소를 제외하면 시험 물질 투여에 의한 특이적인 체중 변화는 관찰되지 않았으며 사망한 개체도 없었다. 따라서 안토시아닌에 의한 명확한 중독량 또는 개략의 치사량은 5,000 mg/kg 이상인 것으로 판단되었다.

이와 같은 결과는 4주 반복 독성시험에서도 같은 경향이 있었다(Table 3). 시험 전 기간에 걸쳐 체중 변화에 있어 군간의 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며, 시험 물질 투여에 의한 특이적인 체중 변화도 관찰되지 않았다. 이것은 OECD 가이드라인<sup>20)</sup>에 따른 한계시험 용량인 1,000 mg/kg을 4주간 반복 경구 투여 시 암·수 모든 투여 군에서 시험 물질에 의한 체중 변화가 관찰되지 않는 것으로 판단할 수 있었다.

Table 2. Body weight changes in mice after single oral administration with anthocyanin (5,000 mg/kg, po)

Group	0 day	1 day	3 days	8 days	14 days	
Male	Control	32.17±1.00	30.54±0.78	34.60±1.69	36.05±2.09	37.40±1.55
	Treat	32.18±0.76	30.38±1.05	33.58±2.38	35.68±2.86	37.94±2.68
	p value	0.9850	0.7750	0.4140	0.8060	0.6730
Female	Control	26.35±1.00	24.31±0.92	27.61±1.57	28.60±1.84	30.22±1.56
	Treat	26.34±1.04	23.85±1.60	27.32±1.23	28.85±2.36	29.67±2.24
	p value	0.9930	0.5550	0.7250	0.8400	0.6290

**Table 3. Body weight changes in mice during 4 weeks treatment with anthocyanin** (1,000 mg/kg, po)

Group		0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Male	Control	32.18±1.05	34.06±1.92	35.53±1.29	36.56±1.38	37.15±1.33
	Treat	32.18±1.06	34.93±1.60	34.93±1.74	35.85±0.85	37.03±1.27
	<i>p</i> value	1.0000	0.4150	0.5120	0.3100	0.8790
Female	Control	25.35±0.91	27.15±2.11	27.57±2.07	28.15±2.35	29.38±2.43
	Treat	26.36±0.93	26.58±1.61	27.24±2.46	28.12±1.55	29.00±1.62
	<i>p</i> value	0.9950	0.6140	0.8040	0.9770	0.7590

## 2. 안토시아닌 투여에 의한 쥐의 혈액 생화학적 검사

Table 4는 4주 반복 독성시험 후 실험동물인 쥐의 혈액학적 검사를 실시한 결과이다. 일반적으로 혈액학적 수치는 보통 혈액 내에 존재하는 세포수를 의미하는데, 이는 정상 범위 내에 존재하는 것이 보통 정상이다. 본 실험에서는 수컷의 경우 대조군에 비해 투여군에서 헤마토크리트 수치인 HCT( $p<0.05$ )는 증가하였으며, 암컷에서는 Differential Counting에서의 중성호성백혈구인 NEU의 %가 대조군에 비해 증가( $p<0.05$ )하였다. 그러나, 이러한 변화는 모두 생리적 변동 범위에 속하

는 것으로 사료되어 시험 물질에 의한 독성학적 의미는 없는 것으로 판단되었다. 즉 통계의 유의치는 산발적인 결과로 일관성이 없었으며, 또한 모든 수치가 정상범위에 속함으로 본 연구결과에서 나타난 변화는 독성증상으로 판단되지 않았다. 유의성이 나타난 것은 채혈 및 동물의 상태에 따라 민감하게 영향을 받은 것도 원인의 하나인 것으로 사료된다.

혈청학적 검사(Table 5)에서도 같은 경향으로 수컷 및 암컷의 모든 개체에서 혈청학적 검사 상의 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 4주 시료 투여후 암컷의 ALT 활성 및 콜레스테롤

**Table 4. Hematology in mice after 4 weeks treatment with anthocyanin** (1,000 mg/kg, po)

Group	RBC <sup>1)</sup> (10 <sup>6</sup> cells/ $\mu$ l)	HGB <sup>2)</sup> (g/dl)	HCT <sup>3)</sup> (%)	RBC indices			PLT <sup>7)</sup> (10 <sup>3</sup> cells/ $\mu$ l)	WBC <sup>8)</sup> (10 <sup>3</sup> cells/ $\mu$ l)	WBC differential counting(%)					
				MCV <sup>4)</sup> (f l)	MCH <sup>5)</sup> (pg)	MCHC <sup>6)</sup> (g/dl)			NEU <sup>9)</sup>	LYM <sup>10)</sup>	MONO <sup>11)</sup>	EOS <sup>12)</sup>	BASO <sup>13)</sup>	
Male	Control	8.27±0.31	14.6±0.6	41.1±1.5	49.5±1.6	18.0±0.3	36.2±1.2	986±302	2.87±0.38	11.8±3.7	74.2±4.6	4.1±0.5	7.0±1.4	0.2±0.1
	Treat	8.69±0.59	15.5±0.6	44.3±1.8	51.1±2.8	17.8±1.0	34.9±1.4	979±342	3.56±1.00	15.6±9.4	74.2±11.1	4.8±0.9	4.6±2.2	0.1±0.1
	<i>p</i> value	0.2000	0.0520	0.0140*	0.3100	0.6660	0.1650	0.9710	0.1900	0.4250	0.9940	0.1980	0.0810	0.0730
Female	Control	8.37±0.58	15.3±1.0	42.0±3.6	49.2±1.9	18.2±0.3	36.9±1.6	929±332	1.92±0.62	9.1±2.8	77.9±6.3	3.9±1.5	8.3±3.7	0.1±0.1
	Treat	8.58±0.68	16.1±0.6	45.0±1.9	51.5±1.0	18.2±1.0	34.9±1.6	723±180	4.26±2.17	14.9±3.4	72.4±8.0	4.5±1.2	6.4±3.6	0.4±0.3
	<i>p</i> value	0.6630	0.2520	0.1820	0.0740	0.9910	0.1000	0.3040	0.0520	0.0270*	0.2880	0.5520	0.4650	0.1120

<sup>1)</sup> RBC: total erythrocyte count, <sup>2)</sup> HGB: hemoglobin concentration, <sup>3)</sup> HCT: hematocrit, <sup>4)</sup> MCV: mean cell volume,

<sup>5)</sup> MCH: mean cell hemoglobin, <sup>6)</sup> MCHC: mean cell hemoglobin concentration, <sup>7)</sup> PLT: platelet, <sup>8)</sup> WBC: total leucocyte count,

<sup>9)</sup> NEU: neutrophils, <sup>10)</sup> LYM: lymphocytes, <sup>11)</sup> MONO: monocyte, <sup>12)</sup> EOS: eosinophils, <sup>13)</sup> BASO: basophils,

\* Significant differences as compared with control(\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ).

**Table 5. Biochemistry in mice after 4 weeks treatment with anthocyanin** (1,000 mg/kg, po)

Group	ALT <sup>1)</sup> (u/l)	AST <sup>2)</sup> (u/l)	ALP <sup>3)</sup> (u/l)	BUN <sup>4)</sup> (mg/dl)	Crea <sup>5)</sup> (mg/dl)	T-Bili <sup>6)</sup> (mg/dl)	T-Chol <sup>7)</sup> (mg/dl)	TG <sup>8)</sup> (mg/dl)	
Male	Control	53.6±27.7	70.2±14.1	163.0±25.1	34.3±5.6	0.52±0.12	0.14±0.03	144.0±21.0	110.0±42.0
	Treat	56.1±21.6	53.4±22.5	128.8±48.4	30.9±7.6	0.51±0.10	0.17±0.05	164±38.3	129.2±20.6
	<i>p</i> value	0.8690	0.1500	0.1550	0.3980	0.9180	0.2460	0.2780	0.3500
Female	Control	32.8±12.7	68.2±12.0	151.1±90.8	28.0±6.0	0.50±0.10	0.06±0.03	95.0±12.0	88.0±47.0
	Treat	45.5±17.2	59.3±14.8	140.0±30.2	28.2±12.2	0.47±0.07	0.05±0.01	108.1±19.9	85.1±56.9
	<i>p</i> value	0.1780	0.2850	0.7830	0.9300	0.8970	0.5280	0.1900	0.9270

<sup>1)</sup> ALT: alanine aminotransferase, <sup>2)</sup> AST: aspartate aminotransferase, <sup>3)</sup> ALP: alkaline phosphatase, <sup>4)</sup> BUN: blood urea nitrogen,

<sup>5)</sup> Crea: creatinine, <sup>6)</sup> T-Bili: total bilirubin, <sup>7)</sup> T-Chol: total cholesterol, <sup>8)</sup> TG: triglycerides.

함량이 다른 항목들에 비하여 높게 측정되었으나 유의성은 나타나지 않았다. Dikshith 등<sup>21)</sup>은 동물의 독성실험에서 병리학적인 조직 손상 이전에 막 투과성에 변화가 있을 경우 ALT 활성이 증가된다고 하였는데, 본 연구의 결과가 이런 내용과 일치하는지의 여부는 추후 정밀 분석이 필요하겠으나 Table 5에서 유의성이 나타나지 않았으므로 시료 투여에 따른 독성은 나타나지 않는 것으로 판단되었다.

### 3. 안토시아닌 투여가 각 장기에 미치는 영향

Table 6은 검정콩 안토시아닌 조추출물의 4주간 반복 투여 후 실험동물의 장기중량을 관찰한 결과이다. 수컷 및 암컷 모든 개체에서 절대 장기 중량의 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 또한, 상대적인 장기 중량의 변화도 없었다. 한편, 모든 생존동물의 도살 부검 시 육안적 소견에 있어서 시험 물질에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 이밖에도 도살 부검 후 심장, 간, 신장, 비장, 췌장, 폐 등에 대한 조직병리학적 검사를 실시한 결과 시험 물질과 관련된 이상 소견이 관찰되지 않았다(Table 7).

Anthocyanin 투여 소수의 개체에서 간세포의 국소적 변성 소견과 국소적인 염증세포 침윤이 관찰되었으나, 염증세포 침윤은 암컷 음성 대조군 개체에서도 관찰된 결과로 anthocyanin 투여에 의한 변화로 보기 어렵고, 국소적 간세포 변성 소견 또한 소수의 간세포에서 관찰되는 점과 혈액생화학적 변화에서 ALT, AST의 유의한 변화가 관찰되지 않은 점으로 미루어 anthocyanin 투여에 의한 변화가 아닌 것으로 판단된다. 폐장의 소견 또한 anthocyanin 투여 수컷 두 개체에서 가벼운 간질성 폐렴 소견이 관찰되었으나, 음성대조 개체에서도 동일

소견이 관찰되는 점으로 미루어 anthocyanin 투여에 의한 변화가 아닌 것으로 판단되었다. 이외에 다른 장기에서 특이한 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다.

따라서 암·수 마우스를 이용한 이상과 같은 연구 결과를 볼 때 검정콩 추출 안토시아닌 조추출물은 경구 사용시 안전한 물질인 것으로 판단되었다.

## 요약 및 결론

검정콩 천연 색소인 안토시아닌에 대하여 동물에서의 식이 실험을 통한 안전성 자료를 확보하고자 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

1. 검정콩 안토시아닌 조추출물에 대한 암·수 마우스를 이용한 단회 경구 투여 독성시험을 실시한 결과, 단회 경구 투여에 의한 명확한 중독량 또는 개략의 치사량은 5,000 mg/kg 이상으로 나타났다.
2. 암·수 마우스를 이용한 안토시아닌 투여량 1,000 mg/kg의 4주간 반복 경구 투여시에도 암·수 모든 투여군에서 시험 물질에 의한 독성 변화가 관찰되지 않았다.
3. 시험 기간 동안 치사한 동물은 없었으며, 4주 후의 체중 및 장기의 무게 변화에 이상이 없었다.
4. 혈액학적 수치 및 혈청학적 수치도 모든 시료 투여군에서 정상치 범위를 나타내었으며, 부검 후의 육안적 소견과 여러 가지 조직들의 병리학적 검사에서도 이상 징후가 발견되지 않았다.

따라서 검정콩 안토시아닌 조추출물은 경구 사용시 안전한 물질로 판단되었다.

Table 6. Organ weight changes in mice after 4 weeks treatment with anthocyanin

Group	Spleen	Liver	Kidney (L)	Kidney (R)	Testis (L)	Testis (R)	Epididymus (L)	Epididymus (R)	Ovary (L)	Ovary (R)	Thymus	Heart	Lung	
Male	Control	0.094±0.019	1.463±0.098	0.255±0.028	0.263±0.032	0.121±0.008	0.128±0.006	0.037±0.002	0.039±0.004	-	-	0.048±0.011	0.159±0.013	0.201±0.025
	Treat	0.085±0.013	1.452±0.105	0.232±0.020	0.238±0.026	0.116±0.010	0.118±0.013	0.039±0.003	0.037±0.006	-	-	0.034±0.021	0.148±0.015	0.233±0.088
	p value	0.3440	0.48550	0.1270	0.1650	0.3210	0.1130	0.2250	0.7110	-	-	0.1630	0.1820	0.4160
Female	Control	0.114±0.020	1.206±0.192	0.163±0.012	0.172±0.018	-	-	-	-	0.008±0.001	0.009±0.003	0.062±0.007	0.128±0.012	0.171±0.015
	Treat	0.098±0.015	1.093±0.166	0.159±0.010	0.170±0.008	-	-	-	-	0.006±0.001	0.008±0.002	0.054±0.014	0.116±0.013	0.179±0.018
	p value	0.1480	0.3030	0.5540	0.8700	-	-	-	-	0.1040	0.4920	0.2520	0.1370	0.4100

Table 7. Histological findings in mice after 4-weeks treatment with anthocyanin

Dose		Male		Female	
		0 mg/kg	1,000 mg/kg	0 mg/kg	1,000 mg/kg
Liver	Focal hepatocyte degeneration	0/6	1/6 <sup>1)</sup>	0/6	0/6
	Focal cellular infiltration	0/6	0/6	1/6	1/6
Lung	Mild interstitial pneumonia	1/6	2/6	0/6	0/6

<sup>1)</sup> Values: number of clinical signed animals/number of tested animals.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 농림부 농림기술개발연구과제(106041-03-2-SB010)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Kim, YH, Kim, DS and Woo, SS. Anthocyanin-induced cytotoxicity on human leukemia and adenocarcinoma cells. *5th International Crop Science Congress & Exhibition Abstracts*. p167. 2008
- Choung, MG, Han, WY, Kang, ST, Baek, IY, Shin, DC, Kim, SD, Kim, SC, Moon, HP and Kang, KH. Structural analysis of anthocyanin in black soybeans. *Kor. Soybean Digest*. 19: 68-77. 2002
- Kim, YH, Lee, JH, Lee, YS and Yun, HT. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. *Kor. Soybean Digest*. 23:1-9. 2006
- Kim, YH, Yun, HT and Park, KY. Biological effects of black colored soybean. *Plant Resources*. 7:195-199. 2004
- Francis, FJ. Food colorants: Anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 28:273-314. 1989
- Harborne, JB and Wiliam, CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem*. 55:481-504. 2000
- Kong, JM, Chia, LS, Goh, NK, Chia, TF and Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem*. 64:923-933. 2003
- Plochmann, K, Korte, G, Koutsilier, E, Richling, E, Riederer, P, Rethwilm, A, Schreier, P and Scheller, C. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 460:1-9. 2007
- Yang, CS, Landau, JM, Huang, MT and Newmark, HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr*. 21:381-406. 2001
- Tsukada, YI, Miyazawa, K and Kitamura, N. High intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J. Biol. Chem*. 276:40968-40976. 2001
- Koide, T, Kamei, H, Hashimoto, Y, Kojima, T and Hasegawa, M. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biotherapy and Radiopharmacol*. 12:277-280. 1997
- Park, YE, Jeong, JC, Cho, HM, Lee, HJ, Hwang, YS, Choi, SSN, Lee, SJ, Park, ES, Lim, JD and Choung, MG. Antimutagenic effect and cytotoxicity to human cancer cell lines of colored potato extracts. *Kor. J. Crop. Sci*. 53:75-84. 2008
- Deguchi, T, Ohba, R and Ueda, S. Radical scavenging activity of a purple pigment, hordeumin, from uncooked barley bran-fermented broth. *J. Agric. Food Chem*. 48:3198-3201. 2000
- Espin, JC, Soler-Rivas, C, Wichers, HJ and Garcia-Viguera, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem*. 48: 1588-1592. 2000
- Kanatt, SR, Chander, R, Radhakrishna, P and Sharma, A. Potato peel extract a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *J. Agric. Food Chem*. 53:1499-1504. 2005
- Prior, RL, Wu, X and Schaich, K. Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. *J. Agric. Food Chem*. 53:4290-4302. 2005
- Espin, JC, Soler, C, Wichers, HJ and Garcia, C. Anthocyanin based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food Chem*. 48:1588-1592. 2000
- Wang, SY and Lin, HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and straeberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem*. 48: 140-146. 2000
- US Environmental Protection Agency. Health effects test guidelines OPPTS 870. 1100 acute oral toxicity, US Government Printing Office. Washington, DC. USA. 1998
- OECD. Draft final report of the validation of the updated test guideline 407 : Repeated dose 28-day oral toxicity study in laboratory rats. 2006
- Dikshith, TS, Datta, KK, Raizada, RB and Kushwah, HS. Effects of paraquat dichloride in male rabbits. *Ind. J. Experimental Biol*. 17:926-928. 1979

(2008년 10월 6일 접수; 2008년 11월 1일 채택)