

나노 칼슘의 급성/아급성 안전성 평가

정은영¹ · 서형주²

¹전주대학교 가정교육과
²고려대학교 식품영양학과

Acute/Subacute Toxicity of Nano Calcium

Eun Young Jung¹ and Hyung Joo Suh²

¹Department of Home Economic Education, Jeonju University
²Department of Food and Nutrition, Korea University

ABSTRACT The objective of this study was to obtain data on the safety-in-use of nano calcium as a dietary supplement by assessing its acute and subacute oral toxicities in female and male Sprague-Dawley rats. A single oral dose of 5,000 mg/kg of nano calcium did not result in mortality or significant changes in the general behavior and gross appearance of the internal organs of rats. For subacute toxicity study, nano calcium was administered orally at a dose of 1,000 mg/kg daily for 14 days. There were no significant differences in organ weights between control and treated groups of both sexes. Hematological analysis and blood chemistry revealed no toxic effects of nano calcium. Pathologically, neither gross abnormalities nor histopathological changes were observed. These results show that nano calcium possesses very low toxicity as indicated in a rat model.

Key words: egg shell calcium, nano calcium, acute toxicity, subacute toxicity

서 론

세계적으로 고령화 사회로 진입하면서 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 골다공증과 같은 칼슘 대사 관련 질병의 완화 등을 위해 칼슘 섭취를 증가시킬 수 있는 많은 연구가 진행되고 있다(1). 칼슘은 체내에서 가장 많은 무기질로 뼈와 치아를 구성할 뿐만 아니라 체액에 존재하면서 생리조절 기능을 보이는 중요한 무기질이다(2). 칼슘 공급을 위해 소뼈 분말, 굴피 분말, 난각 분말 등을 비롯한 유기물과 결합된 형태의 칼슘을 원료로 다양한 칼슘 강화식품, 칼슘 보충제 및 체내 칼슘 이용성 증진 물질들이 개발되고 있다(3-6).

칼슘은 섭취량이 충분하다고 해도 칼슘의 형태에 따라 체내에서의 이용률이 다르고 칼슘의 실제 흡수율이 낮아 효율성에 문제를 가지고 있다. 특히 기존의 칼슘 입자는 마이크로 단위의 입자 크기를 가지고 있어 실제 흡수율이 떨어지는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 나노 기술(nanotechnology)을 통해 칼슘 분말의 비표면적을 넓히고 수용성을 높임에 따라 칼슘 분말의 체내 흡수율을 높일 수 있다고 알려져 있다(7). 최근 나노 칼슘 분말에 대한 유효성과 영양 효과가 동물 실험을 통하여 다양하게 비교 검토되

고 있다(7,8).

나노 기술은 식품 분야에서 품질, 조직감, 맛 등을 개선하거나 지방 함량 섭취를 낮추는 기능, 식품성분의 파괴 및 분해 방지와 생체 이용성 증진 등과 같은 기존의 기술로서는 해결이 어려운 문제점들을 극복할 수 있는 미래기술로 발전하고 있다(8-10). 그러나 최근 나노 소재는 생체 내 축적과 독성 등에 관한 지식과 정보가 부족하여 안전성 문제가 제기되면서 미국과 영국 등의 소비자 단체를 중심으로 안전성 확보를 요구하는 압력이 정부에 제기되고 있다(11). 나노 식품 소재에 대한 독성 및 안전성에 대한 연구개발 시도는 거의 이루어지지 않았다. 나노 물질은 작은 크기 때문에 기존의 마이크로 물질들에 비해 비표면적이 증가하고 수용성이 높아지는 것이 특징인데 이에 따른 잠재적인 물리적, 생물학적, 특성 변화의 가능성 때문에 나노물질의 안전 관리에 대한 필요성이 점차 증가하고 있다(12,13). 나노 물질은 충분한 안전성을 확보한 후 식품에 적용을 하는 것이 바람직하다. 따라서 본 연구에서는 난각 칼슘을 이용해 나노 칼슘을 제조하고 제조된 나노 칼슘의 안전성 평가를 위해 Organization of Economic Co-operation and Development (OECD) guideline에 따라 동물을 이용하여 급성 및 아급성 안전성 평가를 실시하였다.

Received 30 September 2014; Accepted 15 October 2014

Corresponding author: Hyung Joo Suh, Department of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 136-713, Korea
E-mail: suh1960@korea.ac.kr, Phone: +82-2-3945-5639

재료 및 방법

나노 칼슘 제조

실험에 사용된 나노 칼슘은 케이씨프레쉬(KC Fresh, Geochang, Korea) 제품을 이용하였다. 나노 칼슘을 이용하여 나노 칼슘을 다음과 같은 방법으로 분획 제조하였다. 나노 칼슘을 100% 에탄올에 5% 농도로 용해한 후 초음파분산기(VCX750, Sonic & Materials Inc., Newtown, CT, USA)로 균질화시켜 나노 칼슘(nano calcium, NC)을 제조하였다. 또한 원심분리기(J2-MC, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)를 이용하여 3,000 rpm(C-3)과 5,000 rpm(C-5)에서의 상등액을 분획하였다. 이를 채취하여 증발기(N-Nseries, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 에탄올을 기화시킨 후 나노 칼슘을 획득하였다.

나노 칼슘 입자 크기 분석

입자크기분석기(Delsa Nano C, Beckman Coulter Inc.)를 이용하여 칼슘의 나노 및 마이크로 분말의 크기 분포를 분석하였다. 시료 제조를 위하여 칼슘 분말의 농도가 각각 0.05, 0.1%가 되도록 첨가하였고 분산매로는 에탄올을 사용하였다. 첨가된 칼슘 분말은 혼합 후 초음파분산기(VCX 750, Sonic & Materials Inc.)로 3분간 분산시킨 후 사용하였다. 각 시료별 3회 반복 측정하였다.

시험동물 및 사육조건

시험 동물은 대한바이오(Daehan Bio Co., Seoul, Korea)에서 생산된 7주령의 특정 병원체 부재 Sprague-Dawley계 rat 암수를 분양받아 6일간의 검역 및 순화과정을 거친 뒤 건강한 동물을 선별하였다. 폴리카보네이트 사육 케이지(240 W×390 L×175 H mm)를 이용해 실험실 온도 22~24°C, 습도 60±5%가 유지되며 밤낮 주기(12시간 light/12시간 dark)가 자동 조절 장치에 의해 조절되는 고려대학교 동물실에서 사육하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였고 물과 사료는 자유 섭취시켰다. 사료는 일반 사료(Samyang Co., Seoul, Korea)를 이용하였으며 사료의 주요 구성 성분은 다음과 같다(g/kg of diet): 탄수화물 600, 식이섬유 50, 단백질 230, 지방 35, 수분 80.

독성시험: 급성 및 아급성 독성시험

급성 독성시험은 단회투여 안전성 평가로 OECD guideline(14)에 따라 12시간 동안 절식시킨 후 암수 6마리씩 대조군과 시험군에 각각 물과 나노 칼슘(5,000 mg/kg)을 1회 경구 투여하고 4시간 후 사료를 재급여하였다. 아급성 독성 시험은 반복투여 안전성 평가로 OECD guideline(15)에 따라 암수 6마리씩 대조군과 시험군에 각각 물과 나노 칼슘(1,000 mg/kg)을 14일간 매일 동일한 시간에 반복 투여하였다. 단독투여 독성시험과 반복투여 독성시험 모두 14일간

매일 1회 일반증상 관찰을 실시하였으며 체중은 이틀에 한 번 측정하고 사료 섭취량과 음수 섭취량은 매일 측정하였다. 15일째에 부검을 실시하였다. 시험물질의 무해용량(no observed adverse effect level, NOAEL) 및 표적장기에 미치는 효과를 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 확인하였다. 본 동물 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다(승인번호: KUIACUC-2013-141).

혈액 분석: 혈액학적 분석 및 혈액생화학적 분석

부검 전 12시간 동안 절식시킨 후 ether로 마취시켜 복부 대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 항응고제인 ethylenediaminetetraacetic acid와 heparin이 함유된 채혈병에 각각 넣어 전자는 전혈 샘플로, 후자는 분리하여 혈장 샘플로 사용하였다. 전혈 샘플은 채취 즉시 혈액 작용 인자들의 분석을 위해 사용되었다. 혈액학적 검사는 자동 혈구 분석기 KN-21N(Sysmex, Seoul, Korea)을 이용하였으며 혈액 분석 인자는 다음과 같다: 적혈구수(red blood cell, RBC), 백혈구수(white blood cell, WBC), 적혈구용적비(hematocrit, Hct), 혈색소수(hemoglobin, Hgb), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균혈구혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수(platelet).

혈장은 4°C, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 분리하여 분석 전까지 -70°C에서 보관하였다가 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 혈액생화학적 검사는 자동 생화학검사기 FUJI DRI-CHEM 3500 analyzer(Fuji Photo Film Co., Osaka, Japan)를 이용하였으며 혈액 생화학적 분석 인자는 다음과 같다: 혈당(glucose), 혈중요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 크리아티닌(creatinine), 총 단백질(total protein), 알부민(albumin), 총 빌리루빈(total bilirubin), 아스파라진산 아미노전이효소(aspartate aminotransferase, AST), 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT).

장기분석: 장기 무게 분석 및 조직병리학적 분석

혈액 채취 이후 간, 신장, 비장, 심장을 적출하여 먼저 육안적 검사를 실시하고 식염수로 수세하고 수분 제거 후 적출한 장기는 무게를 측정하였으며 측정된 장기 무게는 체중 100 g에 대해 상대적인 무게로 나타내었다.

통계처리

실험 결과는 SPSS program(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 대조군에 대한 시험군 간의 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 분석하였다.

Table 1. Average particle size of nano calcium (NC)

Sample	Treatment	Particle size (nm)
NC	Non-treatment	2,157.4±56.4
C-3	Supernatant after fraction with centrifugation at 3,000 rpm	208.3±25.4
C-5	Supernatant after fraction with centrifugation at 5,000 rpm	96.5±12.4

Values are mean±SD of triple determinations.

결 과

나노 칼슘의 입자 크기

나노 칼슘으로부터 비중 차이를 이용하여 분획한 나노 칼슘의 입자 크기를 측정된 결과 분획 전 나노 칼슘(NC)이 2,157.4 nm의 크기를 보인 반면, 분획 공정을 거친 3,000 rpm 상등액(C-3)과 5,000 rpm 상등액(C-5)의 나노 칼슘은 각각 208.3 nm와 96.5 nm 크기를 보였다(Table 1). 5,000 rpm에서 채취한 칼슘(C-5)의 입자 크기는 나노 입자 크기를 보유함을 확인하였으며 이때 회수율은 3.2%였다. 입자 크기에 따른 분획 공정을 거치지 않은 일반 나노 칼슘에 비하면 C-3와 C-5는 분획 공정을 거치면서 입자 크기가 확연히 작아짐을 나타내었다. 이후의 실험들에서는 나노 크기를 보이는 C-5 나노 칼슘을 이용하여 안전성을 평가하였다.

치사율

시험물질을 투여한 후 14일간 사망 유무를 관찰한 결과 모든 시험군의 암수동물에서 나노 칼슘의 투여에 기인된 사망은 관찰되지 않았다(데이터 미공개). 급성 독성시험의 결과로 보아 rat에서 본 시험물질의 LD50 값은 암수 모두 5,000 mg/kg을 훨씬 상회하는 것으로 나타났다.

일반 증상

식품의약품안전처의 시험기준과 동일하게 OECD guideline(14,16)에서도 급성 독성시험 시 체중, 사료 섭취량, 시험기간 중 일반증상, 부검 시 주요 장기의 육안적 소견관찰을 기준으로 정하고 있다. 본 지침에 따라 체중 및 사료 섭취량은 이틀에 한 번씩 측정하였으며, 일반 증상 관찰 시

에는 피부, 털, 눈, 점막, 호흡 및 운동 상태 등을 관찰하고 또한 유연, 설사, 경련 등의 상태를 면밀하게 관찰하였다. 시험기간 동안 이상 징후를 보이는 동물은 관찰되지 않았다.

나노 칼슘에 대한 급성 및 아급성 독성시험을 진행한 결과(Table 2) 급성 독성시험의 암수 대조군의 체중증가량은 각각 66.88 g과 112.54 g이었으며 시험군의 경우 50.88 g과 113.74 g으로 대조군과 유의적인 차이는 없었다. 아급성 독성시험의 경우도 암수 대조군의 체중증가량은 각각 35.66 g과 108.36 g이었으며 시험군의 경우 48.16 g과 109.88 g으로 대조군과 유의적인 차이는 없었다. 또한 암수 모두 나노 칼슘 투여군은 대조군에 비교하여 사료 섭취량과 음수 섭취량(데이터 미공개)의 유의적인 차이가 없었다.

혈액학적 분석

나노 칼슘을 경구 투여 후 전혈에서의 혈액지표들을 평가한 결과(Table 3), 모든 혈액학적 지표에서의 대조군과 시험군 사이에 유의적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 급성 및 아급성 독성시험에서 모두 동일하게 나타났다. MCV는 단일 적혈구의 크기 혹은 적혈구의 평균 용적을 측정하는 것으로 빈혈을 분류하는 데 유용한 지표인데 13~22주령의 rat 암컷과 수컷의 MCV 정상수준은 각각 53.50~58.30, 51.70~58.40 fL이다. 또한 적혈구 안에 있는 평균 혈액소의 농도를 의미하는 MCHC의 정상범위는 13~22주령의 rat 암컷과 수컷이 각각 32.60~36.00, 32.90~35.30 g/dL이다(17). 본 시험동물에서는 정상범위에 비해 MCV는 다소 높게 측정되었으며 MCHC는 다소 낮은 수준으로 측정되었으나 이는 정상범위에서 유의한 차이를 나타내는 수준은 아니었으며 더욱이 대조군과 시험군의 유의한 차이가 없어 이는 나노 칼슘 독성에 의한 결과로 해석될 수 없다.

혈액생화학적 변화

독성시험을 위해 나노 칼슘을 경구 투여 후의 혈액에서의 생화학적 지표를 측정된 결과는 Table 4에 나타내었다. 수화 상태를 평가하고 간, 신장, 염증성 질환에 대한 추가적인 지표인 총 단백질 수치는 급성 독성시험 결과 수컷의 경우 나노 칼슘 시험군의 수치가 대조군과 유의적인 차이를 보였으나 이는 정상범위 내의 수치(5.90~6.60 g/dL)(17)로 표

Table 2. Body weight gain and food intake of rats treated orally with nano calcium for acute/subacute toxicity test

		Group for acute toxicity ¹⁾		Group for subacute toxicity ²⁾	
		Control	Nano calcium	Control	Nano calcium
Female	Body weight gain (g)	66.88±5.26	50.88±8.45	35.66±15.88	48.16±14.39
	Food intake (g/d)	16.97±0.95	14.87±0.64	13.18±1.01	14.77±0.81
Male	Body weight gain (g)	112.54±10.82	113.74±11.27	108.36±9.31	109.88±13.11
	Food intake (g/d)	21.37±0.63	21.98±0.52	21.46±0.81	22.10±0.74

Values are means±SD for 5 rats/group.

¹⁾The group for acute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days.

²⁾The group for subacute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 1,000 mg/kg daily for 14 days.

Table 3. Hematological parameters of rats treated orally with nano calcium for acute/subacute toxicity test

		Group for acute toxicity ¹⁾		Group for subacute toxicity ²⁾	
		Control	Nano calcium	Control	Nano calcium
Female	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.04±0.88	7.65±1.39	7.16±0.90	7.76±0.27
	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.62±2.33	7.05±0.76	5.86±2.51	6.02±2.25
	Hct (%)	44.58±5.25	46.98±8.11	43.58±5.43	48.66±1.55
	Hgb (g/dL)	13.40±2.79	15.28±2.12	14.16±1.56	14.30±2.15
	MCV (fL)	63.34±1.25	61.54±0.99	60.86±1.16	62.70±1.06
	MCH (pg)	18.96±3.10	20.14±1.95	19.88±1.83	18.36±2.45
	MCHC (g/dL)	29.96±5.23	32.78±3.19	32.64±3.01	29.32±3.97
	Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,044.40±285.98	1,100.20±227.56	1,173.80±99.42	1,098.20±234.01
Male	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.97±0.92	7.53±0.91	6.70±0.91	8.13±0.84
	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.13±1.08	6.19±1.21	6.05±0.80	9.14±1.67
	Hct (%)	45.14±7.23	49.00±6.84	43.65±5.82	52.45±4.51
	Hgb (g/dL)	14.02±1.39	14.85±2.65	12.55±2.24	15.98±1.06
	MCV (fL)	64.52±2.40	64.98±2.32	65.15±1.34	64.68±1.72
	MCH (pg)	20.20±1.27	19.58±1.45	18.78±2.54	19.70±0.80
	MCHC (g/dL)	31.40±3.23	30.15±2.38	28.85±4.36	30.50±0.65
	Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,249.00±269.95	1,198.50±174.73	1,125.75±342.37	1,298.50±244.41

Values are means±SD for 5 rats/group.

¹⁾The group for acute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days.

²⁾The group for subacute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 1,000 mg/kg daily for 14 days.

RBC, red blood cell; WBC, white blood cell; Hct, hematocrit; Hgb, hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 4. Blood biochemical parameters of rats treated orally with nano calcium for acute/subacute toxicity test

		Group for acute toxicity ¹⁾		Group for subacute toxicity ²⁾	
		Control	Nano calcium	Control	Nano calcium
Female	Glucose (mg/dL)	72.80±9.23	71.60±11.52	115.20±48.65	82.20±11.34
	BUN (mg/dL)	18.30±2.30	22.14±5.13	19.58±2.19	19.06±2.50
	Creatinine (mg/dL)	0.22±0.04	0.26±0.05	0.28±0.04	0.30±0.07
	Total protein (g/dL)	6.24±0.21	6.08±0.16	6.12±0.28	6.08±0.29
	Albumin (g/dL)	3.98±0.24	3.80±0.07	3.78±0.40	3.92±0.24
	Total bilirubin (mg/dL)	0.46±0.09	0.44±0.05	0.44±0.09	0.42±0.13
	AST (U/L)	89.80±17.54	87.20±17.54	95.40±10.62	75.40±11.74
	ALT (U/L)	24.40±3.13	22.80±4.76	20.20±3.90	21.60±1.95
Male	Glucose (mg/dL)	101.40±16.07	130.80±53.37	149.80±14.52	159.40±52.80
	BUN (mg/dL)	17.78±3.68	16.90±1.21	18.34±0.84	17.70±1.20
	Creatinine (mg/dL)	0.18±0.04	0.16±0.05	0.16±0.05	0.18±0.08
	Total protein (g/dL)	5.96±0.11*	6.24±0.25*	6.10±0.22	6.12±0.23
	Albumin (g/dL)	3.90±0.22	4.10±0.20	4.00±0.28	3.94±0.32
	Total bilirubin (mg/dL)	0.32±0.08	0.34±0.05	0.34±0.05	0.36±0.05
	AST (U/L)	86.40±8.56	100.40±13.16	76.60±7.44	67.60±3.78
	ALT (U/L)	30.20±4.15	29.80±3.11	28.20±1.79	28.20±3.56

Values are means±SD for 5 rats/group.

¹⁾The group for acute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days.

²⁾The group for subacute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 1,000 mg/kg daily for 14 days.

*Significantly different from control, $P < 0.05$. The differences between control and treated group (nano calcium) were evaluated by Student's *t*-test.

BUN, blood urea nitrogen; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

준 편차가 적어 통계적으로 차이를 나타낸 것으로 생각되며 나노 칼슘의 안전성의 문제로 생각되지 않았다. 다른 혈액생화학적 지표는 대조군과 시험군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 아급성 독성시험에서도 모두 혈액생화학적 지표에서 나노 칼슘 투여군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 따라서 혈액생화학적 지표는 급성 및 아급성 독성시

험에서는 독성이 관찰되지 않아 나노 칼슘은 혈액학적 뿐 아니라 혈액생화학적으로도 혈액에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

장기의 무게 변화 및 조직병리학적 분석

장기 무게의 변화는 독성여부를 판단할 수 있는 간접 지표

로 독성물질에 따라 간, 신장 등에서의 상대적 장기 무게의 변화가 관찰된다(14,15). 독성시험을 위해 나노 칼슘을 경구 투여 후 장기의 무게 변화를 측정된 결과(Table 5), 간, 신장, 심장, 비장 등의 무게 변화는 암수 모두 대조군과 시험군 사이에 유의적인 차이는 없었다.

또한 간과 신장에서 조직병리화학적 검사를 실시한 결과 대조군과 시험군 모두 세포의 괴사나 탈락, 증식이 나타나지 않았으며 모세혈관의 확장, 경도의 출혈 등의 변화가 관찰되지 않았고 별다른 이상소견이 없이 정상범위 수준의 조직병리학적 소견만이 관찰되었다(데이터 미공개).

고 찰

식품 나노 기술은 식품의 영양소 섭취 또는 변화조절을 가능하게 할 수 있는 기술이기 때문에 강화식품 또는 건강기능식품산업의 시장규모를 크게 확대시킬 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 나노 기술을 통해 제조한 나노 칼슘은 기존의 칼슘제와는 달리 골밀도의 증가와 더불어 골다공증을 치료할 수 있는 효능이 우수한 것으로 보고되고 있으나 객관적인 독성 및 안전성 자료를 확보하지 않고 있다(8-10). 본 연구는 난각 칼슘을 분획하여 제조된 나노 칼슘의 신뢰할 수 있는 안전성 자료를 확보하기 위하여 독성시험기준에 따라 안전성 평가를 실시하였다.

식품의약품안전처를 비롯한 OECD(14-16)에서는 시험물질의 안전성 평가를 위해 급성, 아급성, 아만성, 만성 등의 투여기간에 따른 독성시험법을 규정하고 있으며 또한 염색 체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험 등의 유전독성 시험, 생식독성 시험 등을 실시하여 각 시험물질의 안전성을 철저하게 평가하도록 규정하고 있다. 급성 독성시험 시 2주

간의 관찰 기간을 설정하며 시험 결과에 있어서는 개략의 치사량, 일반증상의 매일 관찰기록, 시험기간 중 최소 3회 이상의 체중 측정, 부검 시 육안적 해부소견을 기술하고 육안적 이상소견이 관찰된 장기나 조직에 대해서는 필요 시 병리조직학적 검사를 실시한다고 명시되어 있다. 투여용량은 한계용량이 명확히 명시되어 있지 않기 때문에 본 시험에서는 식품의약품안전처의 '비임상시험기준'에 명시되어 있는 OECD guideline(14)에 의거하여 급성 독성시험 시 추천하는 5,000 mg/kg 용량을 한계용량으로 설정하였다.

본 시험에 앞서 용량 설정을 위한 예비시험에서 Spargue-Dawley 계통의 암수 rat에 각각 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 및 5,000 mg/kg 용량으로 단회 경구독성시험을 실시하였다. 예비시험 결과, 5,000 mg/kg 이하의 용량에서 어떠한 독성 영향도 관찰되지 않아 본 시험에서 급성독성에서 추천하는 5,000 mg/kg을 한계용량으로 설정하여 암수 rat에 각각 0(대조군) 및 5,000 mg/kg(나노 칼슘 투여군) 용량으로 단회 경구 투여 후 14일간의 사망률, 일반증상, 체중 변화 및 부검 시 내부장기의 이상소견을 관찰하여 독성증상 발현 여부를 관찰하였다.

또한 OECD guideline(15)에 의거하여 1,000 mg/kg의 용량을 14일간 반복투여 하고 독성과 관련된 안전성 지표를 관찰하였다. 본 연구의 결과 단독투여와 반복투여에서 나노 칼슘은 모든 암수 rat에 대하여 사망이 관찰되지 않았으며 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중 변화가 관찰되지 않았고 특이한 임상 증상 및 부검 시 내부 장기의 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.

그러므로 본 시험조건에서 암수 rat의 나노 칼슘의 LD50은 5,000 mg/kg을 상회할 것으로 나타났으며 이러한 시험 결과는 나노 칼슘의 인체위해성 평가에 있어 매우 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 칼슘 섭취는 1회 복용이 아닌 장기간 복용을 하기 때문에 장기적인 독성 및 안전성 자료의 확보가 필요할 것으로 사료되며, 이에 추후 4주 및 13주 반복투여 독성시험을 수행하여 장기적인 독성 및 안전성 자료를 구축하고 추가적으로 유전독성시험을 비롯한 여러 독성 및 안전성 관련 시험을 수행해야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 난각 칼슘을 이용하여 분획 공정을 통해 나노 칼슘을 제조(입자 크기가 96.5 nm)하였으며 이에 대해 안전성 평가를 위해 OECD guideline에 따라 동물을 이용하여 단회투여의 급성 독성시험과 반복투여의 아급성 독성시험을 실시하였다. 그 결과 급성 및 아급성 독성시험의 모든 암수동물에서 나노 칼슘의 투여에 기인된 사망은 관찰되지 않았으며 나노 칼슘은 모든 암수 rat에 대하여 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중 변화를 초래하지 않았다. 또한 나노 칼슘 투여군에서 특이한 임상 증상 및 부검 시 내부 장기

Table 5. Relative organ weights of rats treated orally with nano calcium for acute/subacute toxicity test

Organ weight (g/100 g BW)	Group for acute toxicity ¹⁾		Group for subacute toxicity ²⁾	
	Control	Nano calcium	Control	Nano calcium
Female				
Liver	3.02±0.31	2.83±0.11	3.27±0.39	2.77±0.50
Kidney	0.72±0.07	0.66±0.04	0.69±0.07	0.71±0.05
Spleen	0.27±0.04	0.26±0.02	0.27±0.02	0.26±0.02
Heart	0.41±0.04	0.42±0.02	0.42±0.03	0.39±0.04
Male				
Liver	3.09±0.19	3.15±0.34	3.02±0.09	3.01±0.06
Kidney	0.69±0.04	0.74±0.05	0.73±0.06	0.73±0.04
Spleen	0.24±0.02	0.24±0.02	0.23±0.02	0.23±0.02
Heart	0.40±0.03	0.38±0.03	0.37±0.03	0.40±0.03

Values are means±SD for 5 rats/group.

¹⁾The group for acute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days.

²⁾The group for subacute toxicity was given water vehicle or nano calcium at 1,000 mg/kg daily for 14 days.

의 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다. 따라서 급성 및 아급성 독성시험의 결과 나노 칼슘은 혈액과 장기 등 평가 지표에 독성으로 인한 영향을 나타내지 않으며 안전한 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 고부가가치식품개발사업에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Heaney RP. 2000. Calcium, dairy products and osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 19: 83S-99S.
2. Denk E, Hillegonds D, Hurrell RF, Vogel J, Fattinger K, Häuselmann HJ, Kraenzlin M, Walczyk T. 2007. Evaluation of ⁴¹calcium as a new approach to assess changes in bone metabolism: effect of a bisphosphonate intervention in postmenopausal women with low bone mass. *J Bone Miner Res* 22: 1518-1525.
3. Lee S, Chang SO. 1994. Comparison of the bioavailability of calcium from anchovy, tofu and nonfat dry milk (NFD) in growing male rats. *Korean J Nutr* 27: 473-482.
4. Lee SH, Hwangbo YS, Kim JY, Lee YS. 1997. A study on the bioavailability of dietary calcium sources. *Korean J Nutr* 30: 499-505.
5. Kim JS, Choi JD, Kim DS. 1998. Preparation of calcium based powder from fish bone and its characteristics. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 41: 147-152.
6. Han JH, Choi HS, Ra KS, Chung S, Suh HJ. 2014. Intestinal permeability of oyster shell calcium with different particle sizes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 454-458.
7. Chen HS, Chang JH, Wu JSB. 2008. Calcium bioavailability of nanonized pearl powder for adults. *J Food Sci* 73: H246-H251.
8. Vaikousi H, Lazaridou A, Biliaderis CG, Zawistowski J. 2007. Phase transitions, solubility, and crystallization kinetics of phytosterols and phytosterol-oil blends. *J Agric Food Chem* 55: 1790-1798.
9. Peters R, Dam G, Bouwmeester H, Helsper H, Allmaier G, Kammer F, Ramsch R, Solans C, Tomaniova M, Hajslova J, Weigel S. 2011. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. *Trends Anal Chem* 30: 100-112.
10. Gokmen V, Mogol BA, Lumaga RB, Fogliano V, Kaplun Z, Shimoni E. 2011. Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *J Food Eng* 105: 585-591.
11. Hou JG, Wang Y, Xu W, Yang L, Wu ZQ, Zhang YH. 1998. Formation of (110) oriented layered silver nano-crystallites. *Mater Lett* 34: 36-39.
12. Douroumin D, Fahr A. 2006. Nano- and micro-particulate formulations of poorly water-soluble drugs by using a novel optimized technique. *Eur J Pharm Biopharm* 63: 173-175.
13. Thomas K, Sayre P. 2005. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part I : Evaluating the human health implications of exposure to nanoscale materials. *Toxicol Sci* 87: 316-321.
14. Organisation of Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. The OECD Guideline for Testing of Chemical: 420 Acute Oral Toxicity. OECD, Paris, France.
15. Organisation of Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. The OECD Guideline for Testing of Chemical: 407 Repeated Dose Oral Toxicity-Rodent: 28-Day or 14-Day Study. OECD, Paris, France.
16. Organisation of Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. OECD Guidelines for Testing of Chemical: 423 Acute Oral Toxicity-Acute Class Method. OECD, Paris, France.
17. Giknis MLA, Clifford CB. 2006. *Clinical laboratory parameters for Crl:CD (SD) rats*. Charles River Laboratories Inc., Wilmington, MA, USA.