

전략체계	혁신 - 3 - 3		구분	완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S02	작목구분코드	FC-01-0101
과제종류	공동연구		과제번호	PJ015704	
과제명	아스파라거스뿌리의 식품소재화 및 항통풍 효능 연구				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	이재희		농업연구사	강원도원 농업환경연구과	
연구기간	2021 ~ 2022		참여연구기관	국립농업과학원 (재)춘천바이오산업진흥원	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 아스파라거스뿌리의 식품소재화 및 항통풍 효능 연구			농업환경연구과	이재희	'21~'22
색인용어	아스파라거스뿌리, 한시적 식품원료, 항통풍				

ABSTRACT

Asparagus(*Asparagus officinalis* L.), is a well-known vegetable for its unique flavor, texture and presence of many phytochemicals and desirable physiological functions. The spear account only 23.5% of the whole plant and the remaining 76.5% accounts for hard-stem byproducts and roots. Both the hard-stem byproduct and roots was reported to contain many phytochemicals with biological activities. But in Korea, *Asparagus* root is not edible because it is not registered as a food ingredient. This study was conducted to investigate the toxicity symptoms of *Asparagus officinalis* root extract by single oral escalation toxicity in rat. Every female rats were treated with 300 mg/kg of *Asparagus officinalis* root extract. And, it had a eight-day recovery period. In this study, no death animals and toxicity symptoms were observed during the experiment, and there were no abnormal results in weight changes, feed and negative intake measurements. Results of gross findings and absolute organ were not of singularity. These result demonstrated that no toxic symptoms were observed by the test substance *Asparagus* root extract under this test condition, and the non-toxic content.

1

연구목표

아스파라거스(*Asparagus officinalis* L.)는 최근 국민 소득 향상, 식생활 및 소비패턴의 변화에 따라 수요가 급증하는 추세이며, 유망 수출 작목으로써 국내산 아스파라거스의 일본 수출량은 19년 기준 전년도 대비 37.6% 증가('14년 0.5톤 → '17년 18.0톤 → '18년 18.6톤 → '19년 25.6톤)하였다. 아스파라거스 국내 재배면적은 '09년 51.5 ha(174농가) → '15년 48.2 ha(155농가)로

감소 추세이지만, 강원도 재배면적('10년 5.9ha → '16년 34.5ha)은 급증하여 전국면적의 60% 이상 점유하고 있으며, 타 작목에 비해 재배관리 노력이 적어 새로운 소득 작물로 각광받고 있다. 식품위생법 제7조 제1항에 따라 순을 제외한 아스파라거스의 전초 부위(줄기, 잎, 뿌리)는 식품소재로 사용 불가능하다. 순을 제외하고 나머지 부위는 전량 폐기되고 있는 실정으로 아스파라거스 뿌리 부위의 활용 요구가 제기되고 있다. 순 생산 후 또는 아스파라거스 묘의 갱신 시, 폐기되는 뿌리의 양은 주당 3kg 이상으로 그 양이 상당하다. 그래서 아스파라거스뿌리를 식품원료로 등록하여 식품소재로 이용하고자 한다.

2 재료 및 방법

〈제1세부과제: 아스파라거스뿌리추출물의 독성 평가〉

(시험 1) 아스파라거스뿌리추출물의 독성 평가

본 연구는 2021년도에 강원도 양구군 양구읍에서 수확한 아스파라거스뿌리를 이용한 것이다. 식품의약품안전처 한시적 식품원료 등록을 위해서는 비임상시험실시기관(GLP)에서의 독성시험이 수행되어야 하므로, 입찰을 통해 선정된 (재)한국화학융합시험연구원(KTR)에서 독성시험이 수행하였다. 아스파라거스 뿌리는 건조 후 속슬렛 추출장치(MS-EAM, MISUNG, Yangju, Korea)를 이용하여 10배의 증류수를 가하고 80℃에서 6시간씩 환류냉각 추출 후 하였으며, 추출한 시료는 감압농축(N-1110, EYELA, Tokyo, Japan) 하고 동결건조(PVTF20R, ILSHINBIOBASE, Dongduchun, Korea)하여 아스파라거스 뿌리 열수 추출물(*Asparagus officinalis* L. Root Water extracts, ARW)을 제조하여 시험에 이용하였다.

SD 랫드를 대상으로 단회투여독성 시험과 용량 설정을 위한 13주 반복투여 시험을 진행하였다. 또한 유전독성시험으로 복귀돌연변이 시험, 염색체이상시험, 소핵시험 3가지 항목에 대해 시험 수행하였다.

3 결과 및 고찰

〈제1세부과제: 아스파라거스뿌리추출물의 독성 평가〉

(시험 1) 아스파라거스뿌리추출물의 독성 평가

복귀돌연변이 시험에서 농도결정시험을 50, 150, 500, 1,500 및 5,000 μ g/plate로 실시한 결과, 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용(+S9 mix)에서 시험물질에 의한 균주의 생육저해는 확인되지 않았으며, 전체 농도에서 시험물질의 석출도 확인되지 않았다. 시험물질

처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 이상의 결과를 토대로 본시험은 다음 농도에서 실시하였다. 대사활성계 미적용 (-S9 mix) 및 적용 (+S9 mix)한 농도는 각 313, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/plate (TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA)이었다. 본 시험 결과, 대사활성계 미적용 (-S9 mix) 및 대사활성계 적용 (+S9 mix) 에서 시험물질에 의한 균주의 생육저해는 확인되지 않았으며, 전체 농도에서 시험물질의 석출도 확인되지 않았다. 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다(표 1).

<표 1> Result of concentration range-finding test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose (μ g/plate)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.) [Factor] ^{a)}	
			Without S9 mix	With S9 mix
TA98	Negative control	0	27 \pm 4	33 \pm 5
		50	29 \pm 4 [1.1]	32 \pm 3 [1.0]
	Test solution	150	28 \pm 3 [1.0]	33 \pm 7 [1.0]
		500	27 \pm 7 [1.0]	26 \pm 2 [0.8]
		1500	26 \pm 2 [1.0]	32 \pm 3 [1.0]
		5000	31 \pm 3 [1.2]	32 \pm 5 [1.0]
TA100	Negative control	0	99 \pm 8	115 \pm 8
		50	99 \pm 2 [1.0]	116 \pm 12 [1.0]
	Test solution	150	102 \pm 6 [1.0]	123 \pm 16 [1.1]
		500	101 \pm 8 [1.0]	129 \pm 6 [1.1]
		1500	103 \pm 12 [1.0]	118 \pm 9 [1.0]
		5000	102 \pm 4 [1.0]	105 \pm 5 [0.9]
TA1535	Negative control	0	9 \pm 1	10 \pm 2
		50	8 \pm 3 [0.9]	9 \pm 2 [0.8]
	Test solution	150	8 \pm 2 [0.9]	7 \pm 1 [0.7]
		500	7 \pm 2 [0.8]	10 \pm 1 [1.0]
		1500	8 \pm 3 [0.9]	9 \pm 2 [0.8]
		5000	11 \pm 3 [1.2]	9 \pm 2 [0.9]
TA1537	Negative control	0	9 \pm 2	13 \pm 1
		50	9 \pm 4 [1.0]	12 \pm 2 [0.9]
	Test solution	150	8 \pm 2 [0.9]	13 \pm 2 [1.0]
		500	7 \pm 2 [0.8]	9 \pm 2 [0.7]
		1500	8 \pm 2 [0.9]	12 \pm 2 [0.9]
		5000	9 \pm 2 [1.0]	10 \pm 3 [0.8]
WP2uvrA	Negative control	0	38 \pm 4	44 \pm 9
		50	33 \pm 2 [0.9]	53 \pm 2 [1.2]
	Test solution	150	36 \pm 3 [1.0]	41 \pm 3 [0.9]
		500	34 \pm 4 [0.9]	39 \pm 5 [0.9]
		1500	30 \pm 3 [0.8]	52 \pm 4 [1.2]
		5000	33 \pm 4 [0.9]	46 \pm 4 [1.1]

Tester strain	Chemical treated	Dose (μ g/plate)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.) [Factor] ^{a)}	
			Without S9 mix	With S9 mix
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	458 \pm 27	[17.2]
TA100	AF-2	0.01	528 \pm 35	[5.3]
TA1535	NaN ₃	0.5	315 \pm 42	[35.0]
TA1537	9-AA	40.0	281 \pm 29	[31.2]
WP2uvrA	AF-2	0.01	341 \pm 14	[9.1]
TA98	B(a)P	2.5		337 \pm 17 [10.2]
TA100	B(a)P	2.5		948 \pm 18 [8.3]
TA1535	2-AA	2.0		215 \pm 24 [20.8]
TA1537	2-AA	2.0		230 \pm 28 [17.7]
WP2uvrA	2-AA	10.0		411 \pm 28 [9.3]

^{a)} No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate, S.D. : Standard deviation
 NaN₃ : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 9-AA : 9-Aminoacridine,
 2-AA : 2-Aminoanthracene, B(a)P : Benzo[a]pyrene

포유류 골수세포를 이용하여 소핵시험을 진행하기 앞서, 용량 설정 시험을 진행하였다. 시험 물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 확인되지 않았다. 암컷과 수컷 간의 감수성의 차이가 확인되지 않았으므로 일반적으로 감수성이 뛰어나다고 알려져 있는 수컷 마우스를 본시험의 시험동물로 사용하였다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험에서 최고농도는 2,000 mg/kg · B.W./day로 설정하였다. 부검 시, 체중 비교한 결과 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적인 유의성이 관찰되지 않았다(표 2~3).

<표 2> Body weight of animals (Group summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Body weights (mean \pm S.D. g) at the time of			
			Administration (No. of animal)		Sacrifice (No. of animal)	
			1st	2nd		
Male	Negative control	0	34,31 \pm 1,43 (5)	34,73 \pm 1,07 (5)	34,51 \pm 0,81 (5)	
	Test substance	500	34,34 \pm 1,14 (5)	34,82 \pm 1,20 (5)	34,92 \pm 1,49 (5)	
	Test substance	1000	34,13 \pm 0,69 (5)	33,78 \pm 0,62 (5)	33,53 \pm 0,27 (5)	
	Test substance	2000	34,45 \pm 1,46 (5)	34,61 \pm 1,24 (5)	34,32 \pm 1,21 (5)	
	Positive control (CPA)	70	34,13 \pm 1,38 (5)	34,05 \pm 1,73 (5)	34,32 \pm 1,48 (5)	

CPA: Cyclophosphamide monohydrate

<표 3> Body weight of animals (Individual data, male)

Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Animal No.	Body weights (g) at the time of		
			Administration		Sacrifice
			1st	2nd	
Negative control	0	1101	34.29	34.85	34.72
		1102	35.33	36.08	35.28
		1103	32.07	33.60	34.19
		1104	34.12	33.71	33.28
		1105	35.76	35.39	35.10
Test substance	500	1201	32.42	32.70	32.27
		1202	35.12	35.33	35.49
		1203	34.84	35.61	35.74
		1204	34.20	35.21	35.69
		1205	35.13	35.26	35.39
Test substance	1000	1301	33.42	32.93	33.46
		1302	33.82	33.63	33.73
		1303	35.05	34.20	33.74
		1304	34.64	34.53	33.64
		1305	33.70	33.59	33.09
Test substance	2000	1401	35.38	34.65	34.57
		1402	34.24	34.95	34.39
		1403	32.11	32.76	32.73
		1404	35.92	36.22	36.06
		1405	34.62	34.47	33.84
Positive control (CPA)	70	1501	32.73	32.33	31.55
		1502	35.48	35.21	34.37
		1503	32.55	32.01	31.36
		1504	34.98	35.61	33.50
		1505	34.90	35.09	34.34

CPA: Cyclophosphamide monohydrate

소핵시험의 시험군 중 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다(표 4~5).

<표 4> Clinical signs and mortalities (Group summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Clinical Signs	Mortality (dead / total)
	Negative control	0	N	0 % (0/5) ^a
	Test substance	500	N	0% (0/5)
Male	Test substance	1000	N	0% (0/5)
	Test substance	2000	N	0% (0/5)
	Positive control (CPA)	70	N	0% (0/5)

N: Normal, ^a: No. of dead animals/No. of tested animals
CPA: Cyclophosphamide monohydrate

<표 5> Clinical signs and mortalities (Individual data, male)

Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Animal No.	Clinical signs	Mortality (dead / total)
Negative control (SDW)	0	1101	Normal	0 % (0/5) ^a
		1102	Normal	
		1103	Normal	
		1104	Normal	
		1105	Normal	
Test substance	500	1201	Normal	0 % (0/5) ^a
		1202	Normal	
		1203	Normal	
		1204	Normal	
		1205	Normal	
Test substance	1000	1301	Normal	0 % (0/5) ^a
		1302	Normal	
		1303	Normal	
		1304	Normal	
		1305	Normal	
Test substance	2000	1401	Normal	0 % (0/5) ^a
		1402	Normal	
		1403	Normal	
		1404	Normal	
		1405	Normal	

Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Animal No.	Clinical signs	Mortality (dead / total)
Positive control (CPA)	70	1501	Normal	0 % (0/5) ^a
		1502	Normal	
		1503	Normal	
		1504	Normal	
		1505	Normal	

SDW: Sterile Distilled Water, CPA: Cyclophosphamide monohydrate,

^a: No. of dead animals/No. of tested animals

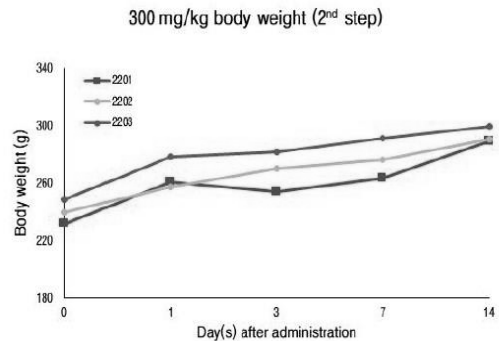
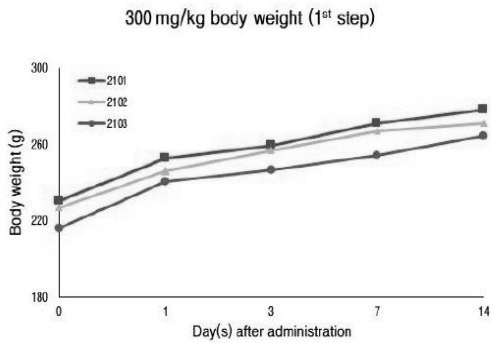
부검 후 개체당 4000개 이상의 다염성적혈구 관찰 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 $(0.07 \pm 0.03)\%$ 이었으며, 500mg/kg · B.W./day 투여군의 소핵출현빈도는 $(0.07 \pm 0.05)\%$, 1000mg/kg · B.W./day 투여군의 빈도는 $(0.08 \pm 0.04)\%$, 2000mg/kg · B.W./day 투여군의 빈도는 $(0.07 \pm 0.02)\%$, 양성대조군의 빈도는 $(6.87 \pm 0.38)\%$ 를 나타내었다. 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현 빈도는 음성대조군에 비해 증가하는 경향이 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 차이도 나타나지 않았다. 한편 양성대조군의 소핵 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다 ($p < 0.05$).

세포독성의 지표인 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 아래와 같은 순서로 평균 $(50.65 \pm 1.91)\%$, $(51.20 \pm 1.54)\%$, $(48.78 \pm 1.04)\%$, $(51.04 \pm 1.35)\%$ 및 $(45.54 \pm 0.64)\%$ 이었으며 모든 시험 물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 한편 양성대조군의 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타났다 ($p < 0.05$).

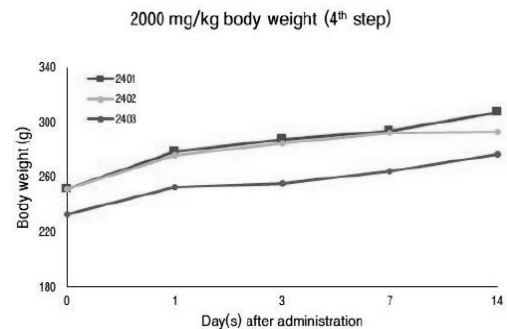
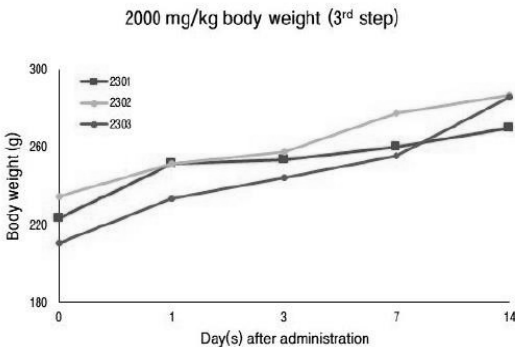
염색체이상시험은 포유류 배양세포로 단시간처리법 및 연속처리법을 이용하여 검정하였다. 단시간처리법에서는 시험물질 처리 개시 시에 시험물질의 침전, 현탁, 부유물은 관찰되지 않았으며, pH는 대사활성계 미적용 3,750 μ g/mL에서 7.15, 대사활성계 적용 4500 μ g/mL에서 6.93으로 확인되었다. 표본관찰 결과, 대사활성계 미적용군의 0, 812.5, 1625, 3250 및 3500 μ g/mL 농도에서 염색체구조이상 세포의 출현빈도는 각각 0.3, 0.3, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다. 그리고, 대사활성계 적용군의 0, 875, 1750, 3500, 4000 및 4500 μ g/mL에 있어서의 염색체구조이상 세포의 출현빈도는 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.3 및 0.0%로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다. 각 처리조건의 음성대조군 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5% 미만으로 확인되었고, 양성대조군의 경우 구조이상 세포의 출현빈도는 10% 이상으로 확인되었다. 연속처리법에서는 시험물질 처리 개시 시에 시험물질의 침전, 현탁, 부유물은 관찰되지 않았으며 최고농도인 5,000 μ g/mL의 pH는 24시간처리 3,200 μ g/mL에서 7.24로 확인되었다. 표본관찰 결과, 0, 700, 1400, 2800, 3000 및 3200 μ g/mL에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.3, 0.0, 0.3

및 0.0% 로 관찰되었고 염색체수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0% 로 관찰되었다. 음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5% 미만으로 확인되었고 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10% 이상으로 확인되었다.

랫드에 대한 급성 경구독성시험에서 아스파라거스뿌리추출물에 대한 급성경구독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 rat를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W. (1st, 2nd step)와 2000 mg/kg B.W. (3rd, 4th step)로 단계를 나누어 각각 3마리에 1회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다. 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다. 일반증상 관찰결과, 모든 투여군에서 이상증상은 관찰되지 않았다. 체중측정 결과, 300 mg/kg B.W. (2nd step)에서 관찰된 일부개체의 체중감소는 일반증상 및 감소 정도 (2.68 %)를 미루어 볼 때, 해당 개체의 우발적인 체중변화로 사료되었다. 부검소견 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 Rat에 대한 급성경구독성시험에서 아스파라거스뿌리추출물은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures)의 분류에 따라 Category 5 or Unclassified 로 분류되었다. 사망률 및 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여에 의한 이상증상은 관찰되지 않았다.



[그림 1] Body weight of female rats (1st step) [그림 2] Body weight of female rats (2nd step)

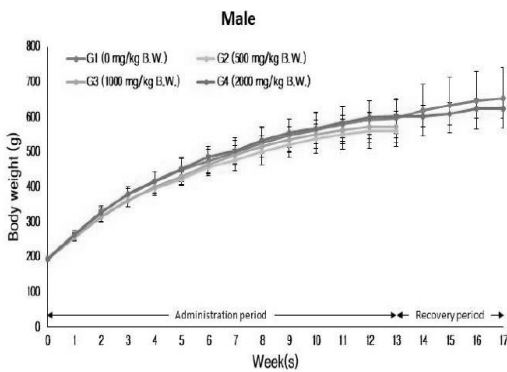


[그림 3] Body weight of female rats (3rd step) [그림 4] Body weight of female rats (4th step)

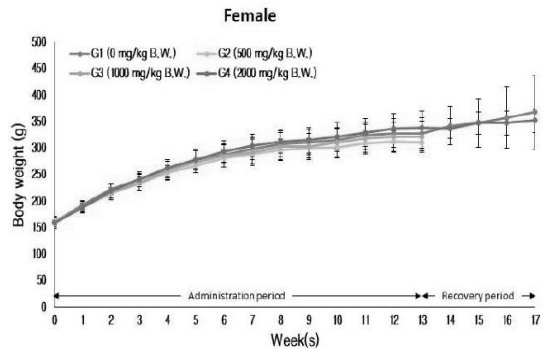
시험물질인 아스파라거스뿌리추출물을 암·수 Rat에 90 일간 반복 경구투여하여 나타나는 전신적 독성반응을 평가하고 최대무독성량을 조사하기 위하여 0(대조군), 500(저용량군), 1000(중용량군) 및 2000(고용량군) mg/kg B.W./day의 투여용량을 설정하여 SD Rat에 90 일간 반복 경구 투여하였다. 실험기간 동안, 시험물질 투여로 인한 빈사 및 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상관찰, 상세 관찰, 감각반응 및 기능관찰 관찰, 체중변화, 사료섭취량 변화, 뇨 검사, 안과학적 검사, 부검 소견, 갑상선 호르몬 검사에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 혈액학적 검사 결과, 암컷 저용량군에서 단핵구 백분율이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 단핵구의 유의적인 증가는 염증, 글루코코티코이드 관련 약물, 종양 및 2차 면역 반응에 의해 관찰 가능한 소견이지만, 암수 시험물질 투여군내에서 용량상관성을 보이지 않고 저용량군에서만 관찰되었으므로 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 우발적인 변화로 사료되었다. 또한, 수컷 고용량군 회복군에서 총백혈구, 림프구 및 염기호성 백혈구가 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 총백혈구와 림프구의 증가는 염증, 통증과 같은 스트레스, 종양에 의해 관찰 가능한 소견이고, 염기호성 백혈구의 증가는 알러지 반응, 기생충 및 종양에 의해 관찰 가능한 소견이다. 하지만, 암수 상관성이 결여되어 있고, 암수 시험물질 투여군에서는 관찰되지 않았으며, 조직병리학적 검사 결과 관련된 병변이 관찰되지 않았기 때문에 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 우발적인 변화로 사료되었다. 암컷 고용량군 회복군에서는 적혈구가 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 평균적혈구혈색소량 및 메트헤모글로빈이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 적혈구의 증가는 탈수, 만성 폐질환, 갑상선호르몬 증가 및 신장 질병시 관찰 가능한 소견이며, 평균적혈구혈색소량의 감소는 빈혈, 감염성 질환 및 신장 질병시 관찰 가능한 소견이다. 하지만, 암수 상관성이 결여되어 있고, 암수 시험물질 투여군에서는 관찰되지 않았으며, 조직병리학적 검사 결과 관련된 병변이 관찰되지 않았기 때문에 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 우발적인 변화로 사료되었다. 절대 장기중량 측정 결과, 수컷 고용량군 회복군의 우측 고환 및 고환무게 합이 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 상대 장기중량 측정 결과, 수컷 고용량군 회복군의 우측 고환이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한, 암컷 고용량군 회복군의 좌측 신장, 우측 신장 및 신장무게합과 우측 난소가 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 수컷 고용량군 회복군에서 관찰된 고환의 절대 및 상대 장기중량의 유의한 증가는 수컷 본시험군에서는 관찰되지 않았고, 고환의 조직병리학적 검사에서 시험물질 투여 관련 독성학적 변화가 관찰되지 않았기 때문에 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 우발적인 변화로 사료되었다. 암컷 고용량군 회복군에서 관찰된 신장과 난소의 상대 장기중량의 유의한 증가는 암컷 본시험군에서는 관찰되지 않았고, 신장의 기능과 관련된 혈액 검사 항목과 신장 및 난소의 조직병리학적 검사 시험물질 투여 관련 독성학적 변화가 관찰되지 않았기 때문에 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 우발적인 변화로 사료되었다.

주요 장기의 조직병리학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 독성학적 병변은 관찰되지 않았다. 수컷과 암컷 시험군 및 회복군에서 관찰된 배경병변들은 일반적인 독성시험에서 관찰 가능한 배경병변으로서 대부분의 소견은 대조군에서도 관찰된 점을 고려하면 시험물질 투여와 관련 없는 배경병변으로 사료되었다. 부검 시 수컷 대조군에서 관찰된 작아진 전립선과 응고선을 포함한 정낭의 조직병리학적 검사 결과, 전립선, 정낭 및 응고선에서 위축이 관찰되었으며, 대조군에서 관찰된 점을 고려하면 시험물질 투여에 의한 독성학적 변화가 아닌 우발병변으로 사료되었다.

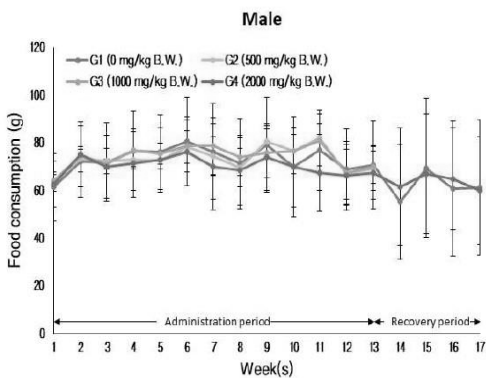
결론적으로, 시험물질인 아스파라거스뿌리추출물의 표적장기는 없으며, 최대무독성량은 2000mg/kg B.W./day으로 사료된다.



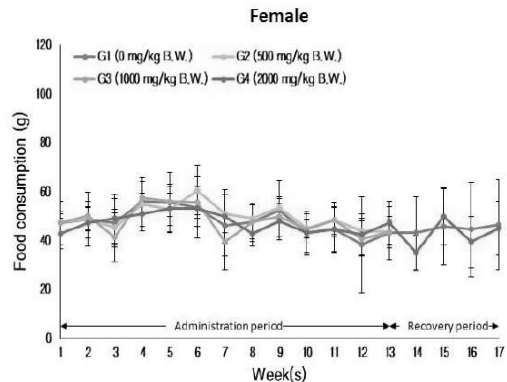
(그림 5) Body weight of male rat



(그림 6) Body weight of female rat



(그림 7) Food consumption of male rat



(그림 8) Food consumption of female rat

또한, 아스파라거스뿌리추출물의 분석법 검증과 안정성 확인을 위해 validation을 7가지 항목에 걸쳐 실시하였다. 시스템 적합성에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 QC 시료를 5회 측정한 peak area와 retention time의 변이계수는 각각 0.7%, 0.0%로 확인하였다(표 6).

<표 6> System of suitability

Conc. of Standard soln. ($\mu\text{g/mL}$)	Classification	Replicates					Mean	SD ^{a)}	CV ^{b)} (%)
		1	2	3	4	5			
1	Peak area	20593	20827	20933	20948	20955	20851	153	0.7
	Retention time	2,191	2,191	2,192	2,191	2,190	2,191	0.001	0.0

a): Standard deviation

b): Coefficient of variation

직선성에서는 (0.1 - 10) $\mu\text{g/mL}$ 농도 범위의 표준용액 검량선의 상관계수 (r)는 1.0000(0일차), 1.0000(7일차)로 확인하였다(표 7).

<표 7> Accuracy of calibration curves on Day 0 and 7.

Conc. of Standard soln. ($\mu\text{g/mL}$)	Day 0		Day 7	
	Peak area	Measured Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	Measured Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
0.1	1919	0.10	2036	0.11
0.5	10355	0.51	10092	0.50
1	20594	0.99	20759	1.00
5	104685	4.99	104897	4.98
10	210041	10.00	211107	10.01

Day 0: $y = 21023.5891x - 279.5159$, $r = 1.0000$

Day 7: $y = 21028.4292x - 368.1849$, $r = 1.0000$

일내재현성 평가를 위해 (1,200) $\mu\text{g/mL}$ 농도의 각 용량별 조제물에서 시험물질의 변이계수는 각각 3.7 %, 0.9 %, 정확성은 각각 90.1%, 104.1%로 확인하였다(표 8).

<표 8> Accuracy and precision of intra-day variation

Conc. of dosing formulation. (mg/mL)	Measured conc.(mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD ^{c)}	CV ^{d)} (%)	Accuracy (%)
	Replicates						
	1	2	3				
1(0.00121) ^{a)}	0,00106	0,00108	0,00113	0,00109	0,00004	3.7	90.1
200(0.24200) ^{b)}	0,25077	0,25448	0,25052	0,25192	0,00222	0.9	104.1

a) Active ingredient (Caffeic acid) concentration in formulation (1mg/mL)

b) Active ingredient (Caffeic acid) concentration in formulation (200mg/mL)

c) Standard deviation

d) Coefficient of variation

균질성에서는 (1,200) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 조제물에서 상층, 중층, 하층의 균질성 확인 결과, 변이계수는 각각 4.5%, 0.6%, 정확성은 91.7%, 104.1%로 확인하였다(표 9).

<표 9> Homogeneity of dosing formulation

Conc. of dosing formulation, (mg/mL)		Measured conc.(mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD ^{c)}	CV ^{d)} (%)	Accuracy (%)
		Replicates						
		1	2	3				
1 (0.00121) ^{a)}	Upper	0.00107	0.00108	0.00120				
	Middle	0.00110	0.00112	0.00107	0.00111	0.00005	4.5	90.1
	Lower	0.00106	0.00113	0.00115				
200 (0.24200) ^{b)}	Upper	0.25084	0.25003	0.25215				
	Middle	0.25181	0.25132	0.25066	0.25193	0.00142	0.6	104.1
	Lower	0.25280	0.25314	0.25458				

a) Active ingredient (Caffeic acid) concentration in formulation (1mg/mL)

b) Active ingredient (Caffeic acid) concentration in formulation (200mg/mL)

c) Standard deviation

d) Coefficient of variation

안정성 평가를 위해 (1,200) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 조제물을 실온에서 4시간 동안 방치 후 안정성 확인 결과, 조제 직후 초기농도에 대한 변동률은 각각 0.0%, 0.7%, 변이계수는 각각 5.5%, -0.4%로 확인하였다(표 10). 또한, (1, 200)mg/mL 농도의 조제물을 냉장에서 7 일간 방치 후 안정성 확인 결과, 조제 직후 초기농도에 대한 변동률과 변이계수는 판정기준을 모두 만족하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 QC 시료를 분석 종료 시에 3회 측정된 결과, 변이계수와 정확성은 각각 1.6%, 101.1%(0일차), 1.0%, 101.8%(7일차)로 확인하였다(표 11).

<표 10> Stability of dosing formulation for 4 h at room temperature

Conc. of dosing formulation, (mg/mL)		Measured conc.(mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD ^{c)}	CV ^{d)} (%)	Accuracy (%)	Variation (%)
		Replicates							
		1	2	3					
0 h	1(0.00121) ^{a)}	0.00106	0.00108	0.00113	0.00109	0.00004	3.7	90.1	-
	200(0.24200) ^{b)}	0.25077	0.25448	0.25052	0.25192	0.00222	0.9	104.1	-
4 h	1(0.00121)	0.00116	0.00115	0.00115	0.00115	0.00000	0.0	95.0	5.5
	200(0.24200)	0.24894	0.25195	0.25168	0.25086	0.00170	0.7	103.7	-0.4

a) Active ingredient (Caffeic acid) concentration in formulation (1mg/mL)

b) Active ingredient (Caffeic acid) concentration in formulation (200mg/mL)

c) Standard deviation

d) Coefficient of variation

<표 11> Accuracy and precision of QC sample on Day 0 and 7.

	Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Measured conc. ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD ^{a)}	CV ^{b)} (%)	Accuracy (%)
		Replicates						
		1	2	3				
Day 0	1	1,01755	1,02373	0,99305	1,01144	0,01623	1.6	101.1
Day 7	1	1,02233	1,02493	1,00628	1,01785	0,01010	1.0	101.8

^{a)} Standard deviation

^{b)} Coefficient of variation

4 적 요

<제1세부과제: 아스파라거스뿌리추출물의 독성 평가>

(시험 1) 아스파라거스뿌리추출물의 독성 평가

- 가. 아스파라거스뿌리추출물은 복귀돌연변이 유발여부 평가를 통해 변이원성을 보유하지 않은 것(음성)으로 판단됨.
- 나. 마우스를 이용하여 포유류 골수세포에 대한 아스파라거스뿌리추출물의 소핵 유발성 유무를 평가한 결과, 본 시험 조건하에서 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
- 다. 아스파라거스뿌리추출물에 대한 염색체이상 유발여부를 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 lung cell (CHL)을 이용하여 염색체이상시험을 실시한 결과, 본 시험 조건하에서 CHL/IU 세포에 대한 염색체이상을 유발하지 않는 것(음성)으로 사료됨.
- 라. 아스파라거스뿌리추출물에 대한 급성경구독성시험을 실시한 결과, 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상 관찰결과 모든 투여군에서 이상 증상은 관찰되지 않았음. 또한, 부검소견 결과 모든 투여군에서 이상소견을 관찰되지 않았음.
- 마. 랫드에 대한 급성경구독성시험에서 아스파라거스뿌리추출물은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS의 분류에 따라 Category 5 or Unclassified로 분류되었음.
- 바. 암·수 랫드에 90일간 반복 경구투여를 통해 나타나는 전신적 독성반응을 평가한 결과, 실험기간 중 시험물질 투여로 인한 빈사 및 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상관찰, 상세관찰, 감각반응 및 기능관찰, 체중변화 등에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적

변화는 관찰되지 않았음.

- 사. 반복투여시험 중 절대 장기중량 측정 결과, 유의한 증가 및 감소들은 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 우발적인 변화로 사료됨.
- 아. 또한, 조직병리학적 검사 결과, 주요 장기에서 시험물질 투여와 관련된 독성학적 병변은 관찰되지 않았음. 부검 시, 전립선, 정낭 및 응고선에서의 위축이 관찰되었으나, 시험물질 투여에 의한 독성학적 변화가 아닌 우발병변으로 사료됨.
- 자. 아스파라거스뿌리추출물의 표적장기는 없었으며, 최대무독성량(NOAEL)은 2,000mg/kg BW/day으로 사료됨.

5

인용문헌

- 동물보호법 [법률 제16977호 (2020-02-11, 일부개정)]
- 식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018-11-21)
- 실험동물에 관한 법률 [법률 제15944호 (2018-12-11, 일부개정)]
- 우원식(2002). 천연물화학연구법. 서울대학교출판부
- Boorman's Pathology of the Rat. Reference and Atlas. Second Edition. Andrew W. Suttie et al. 2018. Academic Press, Inc.
- Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, and K.Yohsikawa, Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens, GANN Monograph on cancer Res., 27:95-107, 1981
- Ishidate. M. Jr, Data book of chromosomal aberration test in vitro, revised edition, Life -Science Information Center, pp31 46, 1987
- OECD "Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"
- OECD "Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"
- OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 "Acute Oral ToxicityAcute
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 408 (Adopted by the Council on 21
- OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4, TG. No. 474 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'(July 29, 2016)
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. No. 473 'In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test' (29 July 2016)

OECD Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997).

OECD Test Guideline No. 471, Bacterial Reverse Mutation Test (Adopted: 21 July 1997, Corrected 26 June 2020)

OECD “Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)”

Toxic Class Method”(Adopted: 17th December 2001)

Visavadiya NP, Narasimhacharya AV. Asparagus root regulates cholesterol metabolism and improves antioxidant status in hypercholesteremic rats, Evid-Based Complement, Alternat, Med. 6: 219–226 (2009)

6 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2021(1년)	학술발표	Single dose toxicity test of Asparagus officinalis root Extract in rat
	홍 보	아스파라거스뿌리 안전성 평가 실시 등
	학술발표	Actue toxicitiy study of Asparagus officinalisL. root extracts in Sprague Dawley rats
2022(2년)	정책제안	아스파라거스뿌리추출물의 식품원료 등록 제안
	홍 보	아스파라거스뿌리추출물 한시적 식품원료 신청 등
	기능성물질 · 소재개발	아스파라거스뿌리추출물의 기능성 소재 개발

성과지표		연도	1년차(2021)		2년차(2022)		계	
			목표	실적	목표	실적	목표	실적
학술 발표	국제			1	1	1	1	
	국내	1	1			1	1	
정책제안				1	1	1	1	
홍 보		1	15	1	14.6	2	29.6	
기능성물질 · 소재개발				1	1	1	1	
계		2	16	4	17.6	6	33.6	

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도	
					'21	'22
과제책임자	농업환경연구과	농업연구사	이재희	과제 총괄	○	○
세부책임자	농업환경연구과	농업연구사	이재희	세부주관 수행	○	○
공동연구자	농업환경연구과	농업연구사	김경대	시험수행 및 평가	○	○
	농업환경연구과	농업연구사	이기연	시험수행 및 평가	○	○
	농업환경연구과	농업연구관	장은하	품질조사 지원	○	○
	농업환경연구과	농업연구관	함진관	품질조사 지원	○	○
	농업환경연구과	공 무 직	배선화	품질조사 지원	○	○
	농업환경연구과	공 무 직	김민정	품질조사 지원	○	○