

# 해양심층수 미네랄추출물의 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험

지 호<sup>1</sup> · 황재식<sup>2</sup> · 문덕수<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>선박해양플랜트연구소 해수에너지연구센터 연구원

<sup>2</sup>(주)바이오톡스텍 CI-바이오융합연구소 책임연구원

<sup>3</sup>선박해양플랜트연구소 해수에너지연구센터 책임연구원

## Beagle Dog of Deep Sea Mineral Extract Single Dose Oral Dose Escalation Toxicity Test

Ho Ji<sup>1</sup>, Jae Sik Hwang<sup>2</sup>, and Deok Soo Moon<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>Researcher, Seawater Energy Plant Research Center, Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering, Goseong 24747, Korea

<sup>2</sup>Principal Researcher, Biototech co. ltd., Cheongju 28115, Korea

<sup>3</sup>Principal Researcher, Seawater Energy Plant Research Center, Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering, Goseong 24747, Korea

### 요 약

지속적인 경작으로 인한 토양의 미네랄 결핍과 식품의 가공 과정에 일어나는 손실 등으로 인해 5대 영양소 중의 하나인 미네랄이 현대인들에게 충분히 공급되지 않아 결핍되어 있다. 해양심층수에서 추출한 활성미네랄은 높은 농도의 미네랄을 섭취할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 용도로 사용하여 현대인에게 양질의 미네랄을 제공할 수 있다. 해양심층수 미네랄을 건강식품 미네랄 보충제로 사용을 활성화시키고, 고부가가치를 창출하기 위해서는 과학적인 검증을 통한 안전성 확보가 무엇보다 중요하다. 안전성 확보를 위하여 식품의약품안전처에서 규정한 가이드라인에 따라 동물독성시험을 GLP 기관에서 시행하였다. 동물시험 항목으로 비설치류에 대하여 단회투여 독성시험을 시행했으며, 이상반응 및 독성결과를 확인하였다.

**Abstract** – Due to the deficiency of minerals in the soil due to continuous cultivation and losses in the processing of food, minerals, one of the five nutrients, are lacking due to insufficient supply to modern people. Activated minerals extracted from deep seawater can not only consume high concentrations of minerals, but can also be used for various purposes to provide high-quality minerals to modern people. In order to promote the use of deep seawater minerals as a mineral supplement for healthy foods and to create high added value, it is most important to secure safety through scientific verification. To ensure safety, the animal toxicity test was conducted by the GLP organization according to the guidelines prescribed by the Ministry of Food and Drug Safety. As a test item for animals, a single-dose toxicity test was conducted on non-rodents, and adverse reactions and toxicity results were confirmed.

**Keywords:** Deep seawater mineral(해양심층수 미네랄), Single dose toxicity test(단회투여 독성시험), Ministry of food and drug safety(식품의약품안전처), GLP(비임상 시험 기준 실험실), Fluorescence spectroscopy(안전성)

### 1. 서 론

해수는 무궁무진한 자원으로 육상 자원 고갈로 인한 그 중요성이 증대되고 있다. 특히 육상 담수가 부족한 경우 해수담수가 육상 담

수를 대신할 수 있다. 국내에서는 대표적으로 해수담수화 사업이 해양심층수로 이뤄지고 있다. 해양심층수는 태양광이 도달하지 않는 수심 200 m 이상의 깊은 곳에 존재하는 유기물이나 병원균 등이 거의 없을 뿐 아니라 해양식물의 성장에 필수적인 영양염류가 풍부하여 인체의 구성원소와 유사한 조성을 하고 있다(Ji et al.[2014]). 수심 200 m 이상에 부존하는 해양심층수는 저온 안정성, 부영양성, 청

†Corresponding author: dsmoon@kriso.re.kr

정성 등의 자원적 특성을 가지고 있어, 이러한 해양심층수를 활용하여 먹는 물로 만들어 상품화하는 사업이 활발히 이뤄지고 있다 (Moon *et al.*[2004]). 또한 먹는 물을 생산하고 부수적으로 생성되는 농축수를 활용한 여러 제품들이 개발 되고 있는 실정이다. 이러한 농축수는 인체에 필요한 무기성분의 여러 미네랄들을 다량 함유하고 있다. 최근에는 고경도 먹는 해양심층수를 활용하여 고지혈, 당뇨, 콜레스테롤 등의 개선방안을 위한 동물실험 결과도 유의미하게 나오고 있으며(Ha *et al.*[2016]; Lee *et al.*[2016]), 당뇨 진단계의 사람을 대상으로 실시한 혈당 및 지질 지표의 개선 효과를 평가하는 임상시험 결과, 8주간 해양심층수 고경도미네랄탈염수 섭취가 체내 인슐린 저항성을 개선시키는 효과를 확인할 수 있었다. 더불어 혈중 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤이 감소되는 효과도 확인되었다(Ham and Shon[2020]). 이러한 고경도 먹는 해양심층수의 시험결과를 바탕으로, 고경도 해양심층수 농축수를 증발 건조시켜 분말형태로 만든 해양심층수 미네랄 추출물의 기능성이 대두되어지고 있다. 해양심층수 미네랄추출물은 해수담수화 과정에서 나오는 농축수를 증발시켜 얻는 방법, 전기분해 방법 등으로 얻을 수 있으며, 최근에는 막 분리, 전기투석, 이온교환 등을 이용한 방법들도 소개되어지고 있다(Ji *et al.*[2014]; Ji *et al.*[2015]).

해양심층수 미네랄추출물을 식품원료로 쓰이기 위해서는 식품의약품안전처에서 고시한 방법으로 기능성과 더불어 안전성이 확보되어야 사용할 수 있다(MFDS[2017]). 이러한 안전성검사 절차는 식품의약품안전평가원에서 규정한 가이드라인에 따라 GLP(Good Laboratory Practice) 인증기관에서 진행되어야한다(NIFDS[2019]). 안전성검사는 동물로 진행하며, 먼저 설치류를 이용한 시험으로 단회투여 독성시험, 4주 용량 결정시험, 13주 반복투여 독성시험이 있으며, 추가적으로 비설치류 단회투여 독성시험이 있다. 본 연구에서는 NIFDS 규정 가이드라인에 적합하며, 의약품 등의 안전성 시험에 일반적으로 널리 사용되고 있는 비글견을 비설치류 단회투여 독성시험에 사용하였다. 대표적으로 사용되고 있는 비글견은 동물실험용으로 생산되었으며, 자료가 풍부하여 안전성을 판단하기에 좋은 대상이다. 시험물질인 해양심층수 미네랄추출물을 일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하였다.

**Table 1.** Deep seawater magnesium salt information

명칭	해양심층수 미네랄추출물 (마그네슘염)
화학명	염화마그네슘 + 황산마그네슘 + 산화마그네슘
제공일	2017년 01월 23일
제공량	1004.31g(용기포함)
외관 및 색상	흰색 고체분말
제조일	2016년 04월
유효기간	제조일로부터 3년
순도	79%
보관조건	상온, 제습
공급	선박해양플랜트연구소
취급시 주의사항	건조 보관

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 해양심층수 미네랄추출물의 제법 및 성분

본 연구에서는 강원도 고성 앞바다의 해안가로부터 약 3 km, 해수면으로부터 약 300 m 지점에서 취수한 해양심층수를 사용하여 실험을 수행하였다. 사용한 해양심층수의 초기 염도는 3.4 wt%이며, 역삼투 공정과 감압증발공정을 걸쳐서 순도 79%의 해양심층수 미네랄추출물의 마그네슘염을 추출하였다(Table 1).

### 2.2 해양심층수 미네랄추출물의 설치류 단회투여 독성시험 방법

독성시험은 GLP인증기관인 ㈜바이오톡스텍에서 진행하였으며, 시험군으로 비글견을 사용하였다. 비글견은 동물실험용으로 생산되었고, 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 시험 기초자료가 풍부하여 본 시험의 실험동물로 선택하였다. 대조군은 암수 각 1 마리, 시험물질군은 암수 각 2 마리의 비글견을 이용하여 시험물질인 해양심층수 미네랄추출물을 4 일 간격으로 용량을 변경하여 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다(Table 2).

시험은 “비임상시험관리기준” 식품의약품안전처 고시 제 2017-32 호, “의약품등의 독성시험기준” 식품의약품안전처 고시 제 2015-82 호에 근거하여 실시하였으며, 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제 4379 호, 일부개정 2015년 1월 20 일 법률 제 13023호)을 근거한 ㈜바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: 170294). 시험물질을 전자저울 (BP3100S, ENTRIS423-IS, Sartorius, Germany)로 칭량하여 조제용기에 넣고, 일정량의 부

**Table 2.** Beagle gender, number of animals, age and weight range

	성별	수컷	암컷
동물 수	입수 시	3	3
	투여개시 시	3	3
주령	입수 시	4~5	4~5
	투여개시 시	5	5
체중범위	입수 시	6.76 ~ 7.15 kg	5.08 ~ 5.54 kg
	투여개시 시	7.49 ~ 8.22 kg	5.30 ~ 5.40 kg

**Table 3.** Beagle breeding environment

동물실험번호	A201
사육상자 정보	스테인레스 개 사육상자, 800W×900L×830H (mm)
사육밀도	1마리 / 사육상자
온도	19.5 ~ 22.6 °C (허용범위: 18.0 ~ 24.0 °C)
상대습도	46.4 ~ 70.1% (허용범위: 30.0 ~ 70.0 °C)
환기횟수	10 ~ 15회/시간
조명주기	12시간/일 (Am 7 ~ Pm 7)
조도	150 ~ 300 lx
사육관리	사육상자 및 사료통은 1 ~ 2 회/2 주의 빈도로 세척하고, 이 기간에 사료통이 분변 및 뇨 등으로 오염되었을 경우, 그때마다 세척 또는 교환함
사육환경보고	실험기간 중 동물에게 이상을 줄만한 이상사태는 발생하지 않음

형제를 첨가하여 용해시킨 다음, 다시 부형제를 가하여 설정농도로 맞추었으며, 매번 투여당일 조제하였으며, 비글건은 Table 3와 같은 환경에서 관리하였다.

모든 비글건은 입수 시 문신번호를 확인하고, 일반상태, 체중 (HW-100KGV, A&D Co., Ltd) 및 체온을 측정하였다. 입수 후 19 일간의 검역·순화기간 중 매일 1 회 일반증상을 관찰하고, 주 1 회 체중을 측정하였으며, 검역·순화기간 종료 시에 동물의 건강상태를 확인하였으며 별다른 특이사항은 없었다. 사육 상자에는 개체식별카드를 부착하고, 동물은 문신번호로 식별하였다. 검역 순화기간 종료 후, 체중을 기초로 하여 대조군은 암수 각 1 마리, 시험물질투여군은 암수 각 2 마리로 군분리 하였다. 사료는 Cargill Agri Purina Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인한 결과 허용범위 내에 속하였으며, 고품사료를 마리당 약 250 g 씩 1 일 1 회 공급하였고, 매번 투여 시 및 부검 시에는 그 전날의 16:00 ~ 17:00 사이부터 절식시켰다. 음수는 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수를 자동급수장치를 이용하여 자유섭취 시켰다. 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」 (환경부령 제 684 호, 2016 년 12 월 30 일, 타법개정)의 전 항목에 대한 검사를 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시한다. 시험물질의 투여방법은 임상적용 예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였으며, 개체별 투여액량은 투여당일의 체중을 기준으로 산출하고, 경구투여용 카테터를 부착한 일회용 주사기 (50 mL)를 이용하여 위내에 강제 투여하였으며, 투여하고 약 2 시간 후에 사료를 공급하였다. 또한, 4 일 간격으로 용량을 증가하여 총 4 회 투여하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 시험결과

본 시험에서는 1,250 mg/kg을 1 차 투여용량으로 설정하고, 2,500 및 5,000 mg/kg 을 2 및 3 차의 투여용량으로 설정하여 1 및 2 차 투여 후 구토가 비교적 심하게 나타나 다시 300 및 600 mg/kg을 3 및 4 차의 투여용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였으며, 군구성 및 투여량은 Table 4과 같이 설정하였다.

매번 투여당일에는 투여 후 약 30 분간 및 1, 2, 4, 6 시간에 일반상태, 운동성 및 배설물 등에 대한 일반증상을 관찰하였다. 그 다음날부터는 1 일 2 회 이상 관찰하고, 빈사나 사망동물의 유무를 확인하였으며, 최종투여 후 2주간 관찰하였다. 실험기간 중, 암수 모두에서 사망동물은 발생하지 않았으나, 1 차 1,250 mg/kg 투여 후, 약 5~10 분 사이에 모든 개체에서 구토 (vomiting)가 발생하고, 2 차 2,500 mg/kg 투여 후에도 약 5 분 이내에 모든 개체에서 구토가 발생하였으며, 암컷 1 레(개체번호: 2202)에서는 약 6 시간에 설사 (diarrhea)가 관찰되었다. 따라서, 3 차는 용량을 낮추어 300 mg/kg 투여 후, 수컷은 2 레 모두 약 4 시간에 경도의 설사가 관찰되고, 암컷은 1 레(개체번호: 2201)에서 약 1 시간에 경도의 설사가 관찰되었다. 4 차 600 mg/kg 투여 후, 암수 모두 약 5~10 분 사이에 구토가 발생하였으며, 암컷의 1 레(개체번호: 2201)에서는 약 2 시간에는 설사가 관찰되었다. 상기 600 mg/kg 이상의 용량에서 관찰된 비교적 심한 구토증상은 시험물질의 투여에 의한 영향으로 사료되며, 그 외, 경도로 관찰된 설사증상은 용량의존성이나 일관성이 없어 독성학적 의미는 미미한 것으로 판단된다(Table 5).

**Table 4.** Test group and dosage

군	투여량(mg/kg)	투여액량(mL/kg)	동물 수 (동물번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10→10 →5→5	1 (1101)	1 (2101)
G2 시험물질군	1,250→2,500→300→600	10→10 →5→5	2 (1201, 1202)	2 (2201, 2202)

**Table 5.** Clinical signs

Sex	Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Day															
			0*					1	2	3	4*					5	6	7
			0.5hr	1hr	2hr	4hr	6hr				0.5hr	1hr	2hr	4hr	6hr			
Male	G1 0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G2 1,250→2,500→ 300→600	1201	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	
		1202	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	
Female	G1 0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G2 1,250→2,500 →300→600	2201	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	
		2202	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	D	-	-	-

  

Sex	Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Day															
			8*					9	10	11	12*					13	14	15
			0.5hr	1hr	2hr	4hr	6hr				0.5hr	1hr	2hr	4hr	6hr			
Male	G1 0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 1,250→2,500 →300→600	1201	-	-	-	D	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-
		1202	-	-	-	D	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-

  

Sex	Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Day												
			16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
			Male	G1 0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250→2,500 →300→600	1201	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1202	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Female	G1 0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	G2 1,250→2,500 →300→600	2201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		2202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

\*: dosing day. -: no abnormal findings, D: diarrhea, V: vomiting

**Table 6.** Body Weights of Beagle Dogs

Sex	Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Day (kg)											
			0*	1	4*	5	8*	9	12*	13	15	19	25	
Male	G1 0	1101	7.62	7.68	7.80	7.80	8.00	8.16	8.15	8.12	8.19	8.38	8.53	
		N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	G2 1,250→2,500→300→600	1201	7.49	7.55	7.71	7.62	7.78	7.77	7.85	7.94	8.00	8.08	8.13	
		1202	8.22	8.21	8.36	8.41	8.42	8.43	8.54	8.56	8.61	8.72	8.88	
		Mean	7.86	7.88	8.04	8.02	8.10	8.10	8.20	8.25	8.31	8.40	8.51	
		S.D.	0.52	0.47	0.46	0.56	0.45	0.47	0.49	0.44	0.43	0.45	0.53	
		N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Female	G1 0	2101	5.40	5.51	5.34	5.44	5.37	5.46	5.42	5.56	5.56	5.72	5.84	
		N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	G2 1,250→2,500→300→600	2201	5.30	5.37	5.25	5.39	5.37	5.46	5.48	5.55	5.69	5.86	5.90	
		2202	5.37	5.51	5.42	5.34	5.28	5.34	5.19	5.22	5.25	5.17	5.13	
		Mean	5.34	5.44	5.34	5.37	5.33	5.40	5.34	5.39	5.47	5.52	5.52	
		S.D.	0.05	0.10	0.12	0.04	0.06	0.08	0.21	0.23	0.31	0.49	0.54	
		N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	

\*: dosing day.

체중에서는 암수 모두 시험물질의 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 6). 부검에서는 암수 대조군을 포함한 모든 동물에서 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

#### 4. 결 론

본 시험은 암수 각 2 마리의 비글견에 시험물질인 해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)을 일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시한 결과, 암수 모두에서 사망동물은 발생하지 않았다. 300 mg/kg의 용량에서는 경도의 설사만 관찰되고, 600, 1,250 및 2,500 mg/kg의 용량에서는 투여 후 약 10 분 이내에 모든 개체에서 비교적 심한 구토가 발생하였다. 그러나 체중 및 부검에서는 이상 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건 하에 암수 비글견에 대한 최대내성용량(Maximum tolerated dose, MTD)은 2,500 mg/kg 이상으로 판단된다. 이상의 결과, 본 시험 조건에서 시험물질에 의한 특기할 만한 독성학적 변화는 관찰되지 않았고, 이러한 결과들을 바탕으로 해양심층수 미네랄추출물의 비설치류 단회 경구투여 독성시험에 대한 안전성을 확인할 수 있었다.

#### 후 기

본 연구는 해양수산부 국가 R&D사업 “해수추출 미네랄 활용 글로벌 건강기능식품 개발 및 수출(PMS4560)”과 “해양심층수 활용 다단계 복합양식 기술개발(PES4340)”에 의해 수행된 연구 결과입니다.

#### References

- [1] Ha, B.G., Moon, D.S., Kim, H.J. and Shon, Y.H., 2016, Magnesium and calcium-enriched deep-sea water promotes mitochondrial biogenesis by AMPK-activated signals pathway in 3T3-L1 preadipocytes, *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 83(1), 477-484.
- [2] Ham, J.Y. and Shon, Y.H., 2020, Natural Magnesium-Enriched Deep-Sea Water Improves Insulin Resistance and the Lipid Profile of Prediabetic Adults: A Randomized, Double-Blinded Crossover Trial, *Nutrients*, 12(2), 515-529.
- [3] Ji, H., Kim, K.S., Moon, D.S., Kim, H.J., and Lee, H.S., 2015, Production of High Hardness Concentrated Seawater Using NF Membrane, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 18(1), 9-14.
- [4] Ji, H., Moon, D.S., Choi, M.Y., Kim, K.S., Lee, H.S. and Kim, H.J., 2014, Production of High Hardness Concentrated Seawater Using NF Membrane, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 17(4), 333-337.
- [5] Lee, K.S., Kwon, Y.S., Kim, S.Y., Moon, D.S., Kim, H.J. and Shon, Y.H., 2016, Regulatory mechanism of mineral-balanced deep sea water on, *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 86(1), 405-413.
- [6] Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Notification No. 2017-36
- [7] Moon, D.S., Jung, D.H., Kim, H.J. and Shin, P.K., 2004, Features of deep ocean water and underground salt water, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 7(1), 42-46.
- [8] National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS), 2019, KNTP Toxicity Test Manual.

---

Received 17 July 2020

1st Revised 14 September 2020, 2nd Revised 27 October 2020

Accepted 27 October 2020