

*Salmonella typhimurium*에 의한
생약추출물의 돌연변이성 연구 (I)

김숙영 · 문자영 · 이동욱 · 박기현

한국인삼연구소, 화학부

**THE MUTAGENIC ACTIVITY OF SOME MEDICINAL PLANT
EXTRACTS IN STRAINS TA98 AND TA100 OF *SALMONELLA*
*TYPHIMURIUM***

Sook Young Kim, Ja Yeong Moon, Dong Wook Lee and Ki Hyun Park

Division of Chemistry
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute
(Received Sep. 1, 1987)

Abstract

The mutagenic activities of the pyrolyzates (300, 600, 750 and 850°C) of extracts from three saponaceous expectorants (*Platicodi Radix*, *Polygalae Radix* and *Asiasari Radix*) and two nonalkaloidal antitussives (*Lirionis Tuber* and *Codonopsis lanceolata Radix*), medicinal plants, were studied in the Ames Salmonella/microsomes test system. The pyrolyzates of *Codonopsis lanceolata Radix* and *Asiasari Radix* extracts at 850°C were slightly mutagenic to tester strain TA98 (frame shift) and TA100 (base-pair substitution) of *Salmonella typhimurium*, and the mutagens in these pyrolyzates required the metabolic activation by a liver microsomal fraction. However, the extracts and pyrolyzates of all medicinal plants tested except the above two results did not show the significant increase in revertant colonies.

서론

한방제재의 수요가 증가됨에 따라 오늘날 한방에 대한 과학적인 연구가 체계적으로 시도되고 있으며 이의 효능이 점차 밝혀지고 있어 의약품으로서의 가치를 재평가하게 되었다.¹⁻³⁾ 그러므로 한방에서 효과가 인정되는 많은 생약제 또는 천연물은 식품이나 향신료(향료)⁴⁻⁶⁾ 및 기호품으로서 이용되기도 하는데 현재 그 수요가 증가하는 추세에 있다. 이와같은 천연물 중에는 이를 적절하게 처리한 후 생체에 적용할 경우 생체막의 보호효과 뿐 아니라 생체의 기능보전에 직접 또는 간접으로 영향을 미치므로 질병의 예방과 치료에 특히 바람직한 생약으로 분류되고 있다.²⁾ 예를 들면 원지등 사포닌을 함유한 몇가지 생약은 기도점막을 완화시키는 작용을 나타냄으로써 진해 또는 거담의 효과가 탁월한 것으로 지적되고 있다. 따라서 한방제재와 관련된 첨가물에 의한 담배의 품질개선은 보다 낫 해로운 담배제조는 물론 금연운동의 대처방안으로 제시될 수 있으리라 생각된다.

그러나 한방요법으로 어떤 천연물이 호흡기계의 기능을 강화하고 탁월한 진해 혹은 거담효과가 인정된다 하더라도, 담배에 적용할 경우 고온에서의 열분해 및 열합성에 의한 여러가지 새로운 물질이 생성될 수 있는 특수성 때문에, 열분해 산물에 대한 약리적인 효능과 안전성에 대한 평가는 매우 중요한 선결문제중의 하나이다.

저자들은 대한약전 등에서 인체의 호흡기능을 강화하고 거담(祛痰) 및 진해(鎮咳)작용이 있는 것으로 알려진 몇가지 생약제를 제조담배의 향료로서 혹은 약용담배 제조를 위한 첨가물로서의 이용가능성을 구명하기 위하여, 먼저 이들 생약제 추출물의 열분해 산물에 대하여 안전성의 일환으로 돌연변이 유발성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 시료

본 실험에 사용된 시약 중 histidine, biotin, NADP, glucose-6-phosphate, Aroclor 1254, dimethylsulfoxide (DMSO) 등은 Sigma 사 제품을, 그외 시약들은 1급 또는 특급 시약을 각각 사용하였다. 시료로 사용한 길경(桔梗, *Platycodi Radix*, *platycodon grandiflorum* A. DC), 맥문동(麥門冬, *Liriodopsis Tuber*, *Ophiopogon japonicus* ker-Gawler), 원지(遠志, *Polygalae Radix*, *Polygala tenuifolia* Willdedow), 세신(細辛, *Asiasari Radix*, *Asiasarum sieboldi* F. Maekawa) 및 더덕(*Codonopsis lanceolata Radix*, *Codonopsis lanceolata*) 등의 50% ethanol 추출물은 본 연구소 화학부 제 1 연구실로부터 공급받았으며, 냉동건조 후 일정량씩 열분해 하였다.

2. 생약 추출물의 열분해

생약 추출물의 열분해는 glass capillary drawing machine (shimazu GDM-1B)을 이용하여 Mccammon⁷⁾ 과 박⁸⁾ 등의 방법을 다소 수정한 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 즉, 약 50mg의 시료를 석영관(외경 10mm, 두께 0.5mm)의 하단부에 넣고 질소 gas를 20ml/min의 유속으로 통과시키면서 300°C, 600°C, 750°C, 850°C의 온도에서 각각 2분동안 열분해하여 생성된 gas분획을 dry ice와 acetone으로 냉각하였다. 그후 methanol에 용해하여 질소기류 하에서 농축하였다. 이 농축물을 DMSO로 용해시킨 다음 Ames test용 시료로 사용하였다.

3. S-9 분획의 조제

돌연변이 유발성 실험을 위한 쥐의 간 microsome 분획은 Dorothy⁹⁾ 등과 Kier¹⁰⁾ 등의 방법에 따라 corn oil에 녹인 Aroclor 1254를 흰쥐 (Sp-D 200g♂, 500mg/kg)에 1회 주사하고 5일 후에 간을 적출하여 microsome 분획을 조제하였다.(S-9 fraction).

4. 돌연변이 유발성 실험

생약 추출물의 열분해 산물에 의한 돌연변이 유발성 실험을 위하여 시험균주인 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을(한국 화학 연구소로부터 공급) Ames 등¹¹⁾의 방법에 따라 변이주의 기능을 검정한 후 다음과 같이 실시하였다. 즉, 2ml의 molten top agar(0.6% agar, 0.5% NaCl)를 시험관에 취하고 45°C로 유지하면서 0.1ml의 시료(0~500 µg/0.1 ml)와 0.1ml의 시험 균주액(Overnight nutrient broth culture, 1×10⁸ cell/ml) 및 0.5ml의 S-9 혼합액(rat liver microsomal fraction 0.1ml, 8 µmole MgCl₂, 33 µmole KCl, 5 µmole glucose-6-phosphate, 4 µmole NADP and 100 µmole sodium phosphate buffer pH 7.4)을 차례로 가하였다. 그후 잘 혼합하여 minimal glucose agar plate(1.5% agar, 2% glu-

cose and minimal salts)에 부어 균일하게 하였다. 이 plate를 37°C에서 48시간 보온한 후 생성된 revertant colony를 계산하였다.

결과 및 고찰

인체의 호흡기능에 유효한 영향을 미치는 약용 식물 중 saponin성 거담제(祛痰劑)인, 길경(Platycodi Radix), 원지(Polygalae Radix) 및 더덕(Codonopsis Lanceolate Radix)과 비 alkaloid성 진해제(鎮咳劑)인 세신(Asiasari Radix)과 맥문동(Liriopsis Tuber)의 50% ethanol 추출물과 300°C부터 850°C까지의 온도 범위에서 이들을 열분해시킨 산물들의 gas분획에 대한 mutagenic activity를 *Salmonella typhimurium*을 이용하여 측정하였다. *Salmonella* 균에 의한 돌연변이 유발성 실험은 이물질(xenobiotics) 대사에서 주된 역할을 하는 microsomal mix-

Table 1. The mutagenic activities of the extracts of medicinal plants in strains TA98 and TA100 of *Salmonella typhimurium* with and without S-9 mixture.

Medicinal plants	Added amount (µg/plate)	No. of revertants/plate			
		TA98		TA100	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
Spontaneous	0	16	25	110	109
Platicody Radix	50	15	21	113	95
	500	5	13	107	130
Liriopis Tuber	50	12	22	128	73
	500	9	20	109	106
Polygalae Radix	50	22	26	81	85
	500	10	18	34	51
Asiasari Radix	50	26	14	126	80
	500	18	29	89	77
Codonopsis lanceolate Radix	50	18	24	98	122
	500	17	23	89	100

ed function oxidase (MFO) system에 의해 시료가 대사되는 과정중 mutagenic activity를 나타내는지의 여부를 확인하는 데 기초를 두고 있다.

한편, Wright 등¹²⁾에 의하면 몇종의 야생 버섯과 식용버섯의 물, ethanol 및 ether 추출물에서 S-9 혼합물의 존재 또는 비존재시 모두 mutagenicity를 나타냈다고 한다. 따라서, 선정된 생약 추출물들의 자체에 *Salmonella* 균주들

의 돌연변이를 유발하는 물질이 존재하는가를 확인하기 위하여 S-9 혼합물을 첨가했을 때와 첨가하지 않았을 때의 mutagenic activity를 측정하였다. Table 1에서와 같이, 두 시험균주 모두 S-9 혼합물의 존재와는 상관없이 mutagenicity를 나타내지 않았으며, 시료의 양은 500 µg까지 증가시켰을 때에도 유의성 있는 revertant의 증가는 관찰되지 않았다.

Fig.1은 S-9 혼합물의 존재하에서 *S. typhimurium* TA98을 사용하여 각 생약 추출물의 열분해 산물 500 µg에 대한 mutagenic activity를 측정한 결과로서, 300 °C에서 생성된 열분해 산물에 의하여 형성된 revertant 수는 각

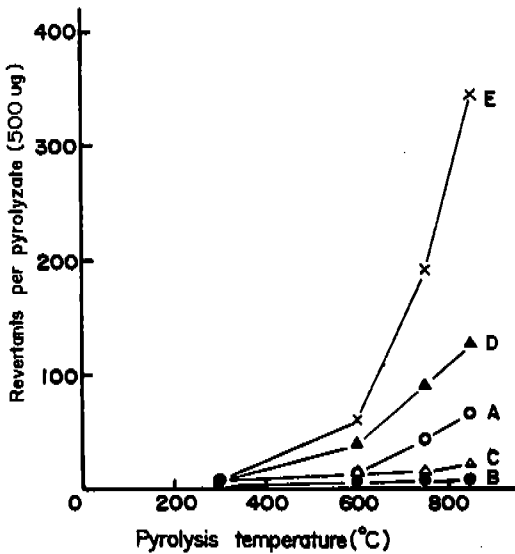


Fig.1. Effect of pyrolysis temperature on mutagenic activity of pyrolyzates.

Pyrolyzates obtained from the extracts of medicinal plants at the various temperatures were tested for mutagenic activity by using *Salmonella typhimurium* TA98. The number of revertants per pyrolyzate of 500 µg was calculated from the revertants per plate. Spontaneous revertant colonies have been subtracted (36).

- A ; Platycodi Radix,
- B ; Liriopsis Tuber,
- C ; Polygalae Radix,
- D ; Asiasari Radix,
- E ; Codonopsis lanceolata Radix.

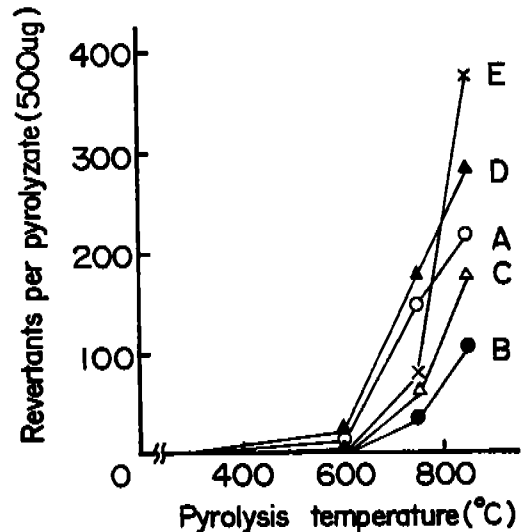


Fig.2. Effect of pyrolysis temperature on the mutagenicity of pyrolyzates of medicinal plant extracts.

The mutagenesis test was performed using TA100 with pyrolyzates of 500 µg. The number of spontaneous revertants was subtracted (109).

- A ; Platycodi Radix,
- B ; Liriopsis Tuber,
- C ; Polygalae Radix,
- D ; Asiasari Radix,
- E ; Codonopsis lanceolata Radix.

각 spontaneous revertant 수와 별차이 없이 낮았으나, 열분해 온도가 상승함에 따라, 그리고 생약의 종류에 따라 형성된 revertant 수는 그 정도의 차이는 있지만 일반적으로 증가하는 경향을 보였다. 특히, 더덕은 열분해 온도가 높아짐에 따라, 즉 750 °C와 850 °C에서 각각 다른 생약들 보다 훨씬 많은 revertant를 생성시켰으며, 그다음 세신, 길경의 순이었고, 같은 조건에서 TA100에 대한 mutagenic activity도 TA98과 비슷한 경향을 보였다(Fig.2).

많은 물질들이 열분해 될 때 돌연변이 유발성 물질이 많이 생성된다는 것은 이미 잘 알려져 있으며³⁻¹⁵⁾, 특히 돌연변이성이 높은 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH) 화합물은 750 °C~1,600 °C까지의 높은 온도에서 많이 생성된다.^{16,17)} 또한 시료의 종류에 따라 생성되는 mutagen들과 mutagenic activity도 각기 다르다. 예를 들면, 탄수화물중 sucrose가 열분해될 때는 PAH계열 화합물보다 오히려 2-aminofluorene과 같은 방향족 amine의 생성으로 더 강력한 mutagenicity를 나타내며¹⁸⁾, 담배 연기 응축물에서의 돌연변이 유발성은 원료인 담배의 용해성 탄수화물 들이나 질소의 함량에 의해 크게 좌우된다고 한다.¹⁹⁾ 본 실험에서도 더덕과 세신 추출물의 열분해시 온도가 상승함에 따라, 즉 750 °C와 850 °C에서 다소 revertant colony의 수가 증가됨은 Falk¹⁶⁾ 등의 결과와 일치하였으나, 이들 두 생약 추출물들이 약리작용을 나타내는 순수한 단일 물질들이 아닐 뿐만 아니라 추출물의 조성이 다양하기 때문에 어떤 물질에 의해 mutagenicity가 증가되었는지는 분명하지 않다. 그러나, 맥문동과 원지는 열분해 온도가 상승함에 따라 revertant colony의 생성이 완만하거나 큰 변화가 없는 것으로 보아 이 온도 범위 내에서 이들 추출물이 열분해 될 때 PAH 계열 화합물을 비롯한 돌연변이 유발성 물질이 거의 생성되지 않는 것으로 생각된다.

열분해 산물들의 돌연변이성 실험에서 열분해

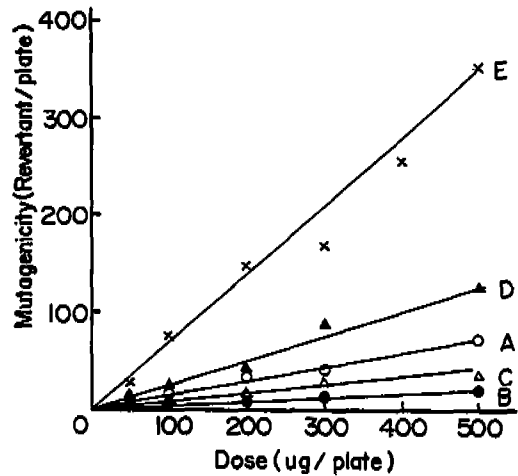


Fig.3. Dose-response curve of mutagenic activity of pyrolyzates. Pyrolyzates obtained from the extracts of medicinal plants at 850 °C were tested for mutagenic activity by using *Salmonella typhimurium* TA98 in the presence of S-9 mixture. Spontaneous revertant colonies have been subtracted (36).

- A ; Platycodi Radix,
- B ; Liriopis Tuber,
- C ; Polygalae Radix,
- D ; Asiasari Radix,
- E ; Codonopsis lanceolata Radix.

산물들의 투여량과 형성되는 revertant 수와의 상관관계는 Fig.3 과 같다. 즉, S-9 혼합물의 존재하에서 균주 *S. typhimurium* TA98을 사용하여 mutagenic activity를 측정 한 결과 revertant의 수는 열분해 산물들의 투여량에 비례하여 증가하였다. 그리고 TA98과 TA100을 각각 사용하여 S-9 혼합물의 존재시와 비존재시에서, 가장 mutagenicity가 높은 더덕의 850 °C 열분해 산물에 대한 mutagenic activity를 측정 한 결과, 두 균주 각각에 대하여 S-9 혼합물이 없는 상태에서는 mutagenicity가 없었다(Fig.4). 이것은 더덕의 850

℃ 열분해 산물들이 그 자체는 mutagenic activity가 거의 없으나 생체내에서 대사될 때 높은 활성을 갖는 물질로 전환되는 것으로 볼 수 있다.

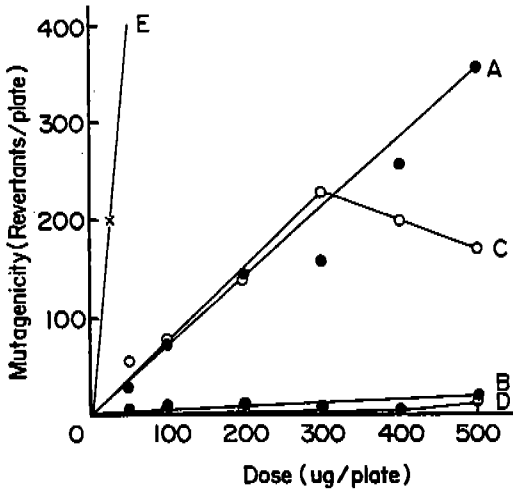


Fig.4. Mutagenic activities of pyrolyzates from *Codonopsis lanceolata* Radix with and without S-9 mixture on strains TA98 and TA100 of *Salmonella typhimurium*.

The pyrolyzates obtained from *Codonopsis lanceolata* Radix at 850℃ were tested for the mutagenic activity. Benzo(a) pyrene was tested with S-9 mixture on TA98 in comparison with the pyrolyzates of *Codonopsis lanceolata* Radix.

Spontaneous revertant colonies have been subtracted (TA98, 36; TA100, 109).

- A; *Codonopsis lanceolata* Radix, TA98 with S-9 mix.,
- B; *Codonopsis lanceolata* Radix, TA98 without S-9 mix.,
- C; *Codonopsis lanceolata* Radix, TA100 with S-9 mix.,
- D; *Codonopsis lanceolata* Radix, TA100 without S-9 mix.,
- E; Benzo(a)pyrene, TA98 with S-9 mix.

PAH 계열 화합물 중에서 일반적으로 가장 발암성과 돌연변이성이 높은 것으로 알려져 있는 benzo(a) pyrene²⁰⁻²³⁾에 대하여 S-9 혼합물 존재하에서 TA98에서의 mutagenic activity를 측정하여 더덕의 850℃에서의 열분해 산물의 돌연변이성과 상호 비교하였다(Fig.4) 더덕의 열분해 산물 280μg에 의하여 생성된 revertant 수가 약 200개로써 이는 benzo(a) pyrene 5μg에 의하여 생성된 revertant 수와 비슷한 수준이었다. 이것은 선정된 시료 중에서는 가장 강력한 돌연변이성 물질로 나타났으나 benzo(a) pyrene과 같은 강력한 돌연변이성 물질에 비하면 mutagenicity가 매우 낮음을 알 수 있다.

이상의 실험결과로부터 선정된 천연물 중 원지와 맥문동 추출물은 850℃까지의 열분해 산물에 대해서는 안전하다고 볼 수 있다. 그러나 약용 담배의 첨가물로 이용하기 위해서는 이들을 첨가한 제조 담배의 연기 응축물에 대해서도 돌연변이성의 정도가 확인되어야 함은 물론 고온에서 열분해된 후 유효성분의 이행과 다른 연기 성분들과의 반응 및 생체에 미치는 영향 등은 앞으로 더욱 연구되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

진해제인 세신, 맥문동과 사포닌성 거담제인 길경, 원지 및 더덕의 50% ethanol 추출물을 300, 600, 750, 850℃에서 각각 열분해 한 후 그 열분해산물들에 대한 돌연변이 유발성을 *Salmonella typhimurium* TA100과 TA98을 이용하여 평가하였다.

이들중 더덕과 세신추출물의 850℃ 열분해 산물은 S-9 혼합물의 존재하에 두 균주 모두에서 약간의 돌연변이성을 나타냈다.

그러나 850℃이하 온도에서 얻은 이들 추출물의 열분해 산물들과 위의 다른 생약 추출물들은 본 실험 조건하에서 유의성 있는 revertant col-

ony의 증가가 관찰되지 않아 돌연변이성이 없는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. 久保遊徳, 谿忠人, 『漢方醫學』
2. 김종원外, 현대 생약학, 『학습교재사』
3. Park, D.K., and Lee, W.H., Kor. J. Pharmacol. 14(4), 178-192 (1983).
4. Lust, J., The Herb Book, Benedict Lust Publications (1974).
5. Grieve, M.M., A mordern Herbal Volume I, II., Dover Publication Inc., (1971).
6. Shigeru, A., J., Chinse Medicine K(4), 285-290 (1982).
7. Mccammon, C.S., The NIOSH Char coal tube and other solid sorbent - sampling the certification program., Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 37, 489 (1976).
8. Park, J.Y., Kim, C.O., and Park, J.W., J. Kor. Soc. Tob. Sci., 4(2), 63 (1982).
9. Dorothy, M.M., and Ames, B.N., Mutation Research 113, 173-215 (1983).
10. Kier, L.D., Yamasaki, E., and Ames, B.N., Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 4159-4163 (1974).
11. Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E., Mutation Research 31, 347-364 (1975).
12. Wright, A. W., Knuutinen, J., Lindroth, S., Pellinen, M., Wieden, K.G., and Seppa, E. L., Fed. Chem. Toxic. 20, 265(1982).
13. Matsumota, T., Yoshida, D., Muzusaki, S., and Okamoto, H., Mutation Research 48, 279 (1977).
14. Matsumota, T., Yoshida, D., Muzusaki, S., and Okamoto, H., Mutation Research 56, 281 (1978).
15. Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Kawachi, T., and Sugimura, T., Cancer Letters 2, 335 (1977).
16. Folk, H. I., and P.E., Cancer Research, 12, 30 (1952).
17. Badger, G. M., Natl. Cancer Research, 12, 30 (1952).
18. Okamoto, H., Mizusaki, S., Yoshida, D., and Matsumoto, T., Agric. Biol. Chem., 32(7), 1433(1979).
19. Mitsusaki, S., Hokamoto, H., Akiyama, A., and Hukuhara, Y., Mutation Research 48, 319 (1977).
20. Dipple, A., in Chemical Carcinogens, Searle, G. E. ed., American Chemical Society, Washington, D. C. 245-314 (1976).
21. Lubet, R. A., Brown, D. Q., and Kouri, R. E., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 6, 929-942 (1973).
22. Nagata, C., Tagashira, Y., Kodama, M., Ioki, Y., and Oboshi, S., Gann, 64, 277-285 (1973).
23. Gelboin, H.V., Kinoshita, N., and Wiebel, F. J., Fed. Proc., 31, 1298 (1972).