

*Salmonella typhimurium*에 의한 생약 추출물의
돌연변이성 연구 (II)

김 숙 영 · 문 자 영 · 이 동 욱 · 박 기 현

한국인삼연초연구소 화학부

**The Mutagenic Activity of Some Medicinal Plant Extracts in
Strain TA 98 of *Salmonella typhimurium***

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

Division of Chemistry
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute
(Received Mar. 13. 1988)

Abstract

The mutagenic activities of the pyrolyzates(300, 600, 750 and 850°C) of extracts from four anti-tussive or expectorant medicinal plants(*Daturae Folium*, *Scopoliae Rhizoma*, *Acori Rhizoma*, and *Schizandrae Fructus*) were studied in the Ames *Salmonella*/microsomes test system.

The pyrolyzate of *Schizandrae Fructus* did not show the mutagenicity to tester strain TA98 of *Salmonella typhimurium*. However, those of other medicinal plants, *Daturae Folium*, *Scopoliae Rhizoma*, and *Acori Rhizoma*, exhibited the mutagenic activity to this strain and the mutagenicity of them were decreased gradually to 70% of the initial activity according to time course after the preparation of the samples with DMSO.

서 론

사포닌성 생약인 원지등이 진해 또는 거담의 효과를 나타내는 이외에 이와 비슷한 효과를 갖는 몇 가지 알칼로이드성 또는 비알칼로이드성 생약이 알려져 있다. 그 중 오미자 (*Schizandrae Fructus*)는 비알칼로이드성 생약제재로 중추신경과 호흡 및 순환에 관여하는 중추 등에 작용하여 반사기능을 증대시키는 반면 해소에 관련된 중추에 대하여는 억제작용을 함으로써 진해 효과를 나타낸다.^{1,2)}

한편, 알칼로이드성 진해제인 낭탕 (*Scopoliae Rhizoma*)과 만타나 (*Daturae Folium*)는 부교감 신경계에 작용하는 생약이며 그 유효성분은 scopolamine, atropine 등으로, 그 중 atropine은 부교감 신경계에 작용하여 기관지 평활근의 수축을 이완시킴으로써 진해 및 거담의 효과를 나타낸다.¹⁾

최근에 흡연으로 인한 해소 천식을 진정시키기 위해 영국, 중공등에서는 담배에 거담의 효과가 있는 생약재를 첨가한 약용담배제조가 시도되고 있으며, Elliott와 Reid³⁾는 몇 종류의 atropine계 알칼로이드를 함유하고 있는 약초를 담배의 형태로 제조하여 (herbal cigarette) 흡연에 의한 몇 가지 임상적 영향을 담배 (tobacco cigarette)의 그것과 비교하여 본 결과, 약초 담배가 일반 담배에 비하여 심장 박동 수가 감소되고 salivary flow rate가 감소하는 결과를 얻었다.

그러나 이와같은 생약재를 담배에 첨가하여 효과를 검토하기에 앞서 그 약재 자체가 생체에 미치는 영향을 고려하여 안전성을 확인하는 것이 생약재 이용에서 일반적으로 실시되고 있다. 이의 점정에는 급성 및 만성 독성실험 등 여러 실험을 실시하고 있으나 그 중 단기적으로 물질의 돌연변이 유발성을 검정하는 방법으로 Ames test가 널리 이용되고 있다.

발암성 물질로 알려진 화합물중 85% 이상이 돌

연변이 유발성을 가지고 있음에 기초하여 Ames 등은 TA1535, TA1538 등 몇 가지 *Salmonella* 균주를 사용하여 화합물의 돌연변이 유발성을 측정함으로써 발암성 여부를 검색하는 방법을 확립하였다.⁴⁾ 이는 histidine 생합성에 관여하는 유전자가 변이된 *Salmonella typhimurium* 균주 (*his* mutant)가 어떤 화합물이나 이들 물질의 대사 산물에 의해 *his*⁺ revertant로 회복되는 것을 측정함으로써 돌연변이성을 검색하는 방법이다.

저자들은 진해 혹은 거담의 효과가 있는 것으로 알려진 만타나, 낭탕, 백창 및 오미자 등 몇 가지 생약재에 대하여 담배 첨가물로서의 안전성 검토의 일환으로 이들 추출물의 열분해 산물에 대한 Ames test를 실시하여 단기적 발암성 및 돌연변이 유발성 여부를 검색하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 시료

Histidine, biotin, NADP, glucose-6-phosphatase, dimethylsulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical Co. 제품을, Aroclor 1254는 Analabs Co. 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 1급 또는 특급 시약들을 사용하였다. 시료로 사용한 만타나 (*Daturae Folium*, *Datura Stramonium* L), 낭탕 (*Scopoliae Rhizoma*, *Scopolia Parviflora Nakai*), 오미자 (*Schizandrae Fructus*, *Schizandra Chinensis Baill*)와 백창 (*Acori Rhizoma*, *Acorus Asisticus Nakai*) 등은 정선하여 분말상태로 만든 다음 각각 200g을 취하여 50% ethanol 1200 ml를 50°C로 유지하면서 3일간 연속 감압 추출하였으며 다시 1000 ml의 50% ethanol로 2일 및 1일간 3차에 걸쳐 추출하고 추출액을 모아 40°C에서 70° Brix까지 감압 농축한 후 냉동 건조하여 일정량씩 열분해 하였다.

2. 생약 추출물의 열분해

McCammon⁵⁾ 과 박등⁶⁾ 의 방법을 다소 수정하여 전보(前報)⁷⁾ 의 방법과 동일하게 실시하였다.

3. S-9 분획의 조제

Maron과 Ames⁸⁾ 의 방법에 따라 corn oil 에 녹인 Aroclor 1254(500 mg/kg)를 Sp-D계 흰 쥐(웅성, 200g)에 1회 주사하고 5일후에 간을 적출하여 microsome 분획(S-9분획)을 조제한 후 돌연변이 유발성 실험을 위한 생약 추출물들의 대사에 사용하였다.

4. 돌연변이 유발성 실험

Salmonella typhimurium TA98을 시험 균주로 사용하여 Ames 등⁴⁾ 의 방법에 따라 변이주의 기능을 검정한 후 다음과 같이 실시하였다. 즉, 2 ml의 molten top agar(0.6% agar, 0.5% NaCl, 0.05 mM histidine, 0.05mM biotin)를 시험관에 취하고 45°C로 유지하면서 DMSO에 녹인 시료 0.1 ml(0~500 µg/0.1 ml)와 0.1

ml의 시험 균주액(overnight nutrient broth culture, 1×10^8 cell/ml) 및 0.1 ml의 S-9 분획, 8 µmole MgCl₂, 33 µmole KCl, 5 µmole glucose-6-phosphate, 4 µmole NA-DP와 100 µmole sodium phosphate buffer (pH7.4)를 포함하고 있는 S-9 혼합액 0.5 ml를 차례로 넣은 후 잘 혼합하여 minimal glucose agar plate(1.5% agar, 2% glucose와 minimal salt)에 부어 균일하게 하였다. 이 plate를 37°C에서 48시간 보온한 후 형성된 revertant colony를 관찰하였다.

결과 및 고찰

만타나, 낭탕, 오미자, 백창 등 진해 및 거담효과가 있는 것으로 알려진 몇 가지 약용 식물을 선정하여 이의 50% ethanol 추출물과 추출물의 열분해 산물에 대해 Salmonella typhimurium TA98 균주를 이용한 단기적 돌연변이 유발성 실험을 실시하였다.

Table 1은 이들 생약재의 추출물과 850°C에

Table 1. The mutagenic activities of the extracts from some medicinal plants and pyrolyzates (at 850°C) of the extract in Salmonella typhimurium TA98 using 500 µg of samples with and without S-9 mixture.

Medicinal plants	Revertants/plate			
	Extract		Pyrolyzate	
	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
Spontaneous	26	39	25	39
Daturae Folium	27	51	41	188
Scopoliae Rhizoma	28	50	28	218
Acori Rhizoma	31	49	27	115
Schizandrae Fructus	27	43	25	56

서의 각 열분해 산물 500 µg에 대한 돌연변이 유발성 실험 결과로 추출물과 이의 열분해 산물 모두 S-9 혼합액을 첨가하지 않았을 때에 형성된

revertant colony의 수가 spontaneous revertant colony에 비해 유의성있는 증가를 보이지 않았으며 추출물 자체의 경우는 S-9 혼합

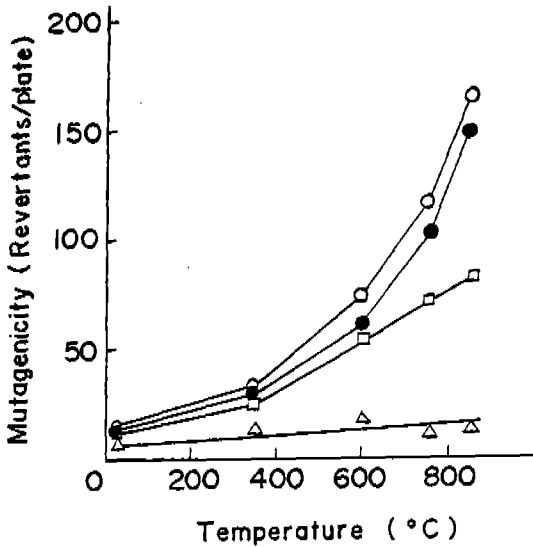


Fig.1. Effect of pyrolysis temperature on the mutagenic activity of pyrolyzates of medicinal plant extracts (●-●; *Daturae Folium*, ○-○; *Scopoliae Rhizoma*, □-□; *Acori Rhizoma*, △-△; *Schizandrae Fructus*). The mutagenicity test was performed using *Salmonella typhimurium* TA98 with pyrolyzates of 500 μ g.

The number of spontaneous revertant colonies (39) have been subtracted.

액을 첨가하였을 때에도 이와 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 그 열분해 산물들은 S-9 혼합액을 첨가하였을 때 revertant colony가 증가하여 낭탕이 spontaneous의 5배로 가장 높았고 오미자를 제외하고 모두 spontaneous의 3배이상 revertant colony가 증가하였다. 이들 결과로부터 생약재의 추출물이나 이의 열분해 산물들은 *Salmonella* 균주의 돌연변이를 유발하지 않으나 열분해 산물의 경우 S-9 혼합물 존재하에서는 TA98 균주에 대하여 돌연변이를 유발함을 알 수 있었다. 즉, 만타나 등 이들 생약재의 추출물이나 그

열분해 산물 자체는 돌연변이를 유발하는 물질을 갖지 않으나 열분해에 의해 생성된 물질들인 간 microsomes의 효소계에 의해 대사된 후 그 대사 산물이 TA98 균주에 대한 돌연변이 유발 물질로 작용함을 확인할 수 있었다. 대표적인 돌연변이 유발 물질로 알려진 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) 계열 화합물 중 benzo(a)pyrene 등도 그 자체는 돌연변이 유발성이 적으나 이물질 대사에 관여하는 간의 microsomal cytochrome P-450 효소계에 의해 대사된 중간 대사산물이 강력한 돌연변이 유발 물질로 작용한다.”

한편, 오미자는 이의 추출물과 열분해 산물 모두가 S-9 혼합액 존재하에서도 revertant colony의 수가 spontaneous 수준과 비슷한 것을 보아 오미자는 열분해 산물이나 그 대사 산물도 돌연변이 유발성을 갖지 않음을 알 수 있었다. 또한 저자들은 이들 생약재를 300~850°C까지의 온도 범위에서 열분해하여 온도 증가에 따른 열분해 산물 각각에 대한 돌연변이 유발성의 증가를 살펴 보았다. Fig.1은 각 온도에서의 열분해 산물 500 μ g에 의해 형성되는 revertant colony의 수를 비교한 것으로 이들 생약재 모두 300°C에서의 열분해 산물은 spontaneous의 경우와 큰 차이가 없었으나 온도 증가에 따라 colony의 수가 증가하는 경향을 보였다. 특히 낭탕은 850°C에서 spontaneous revertant의 5배 이상의 증가를 나타냄으로서 돌연변이 유발성이 가장 뚜렷하였으며 만타나, 백창의 순으로 백창은 spontaneous의 약 3배의 증가를 보였다. 그러나 오미자는 열분해 온도 증가와 관계없이 spontaneous revertant의 수와 비슷한 수준을 유지하였다.

어떤 물질들 그 자체는 돌연변이 유발성을 갖지 않으나 열분해 될 때 돌연변이 유발성 물질이 생성되는 많은 예가 알려져 있다. 특히, tryptophan, arginine 등 여러 아미노산의 열분해 산

물들은 S-9 존재하에서 TA98 균주에 대해 돌연변이 유발성을 나타내며 탄수화물 중 sucrose 의 열분해 산물은 2-aminofluorene 과 같은 방향족 아민의 돌연변이 유발성을 증대시킨다.¹¹⁾ 또한 높은 돌연변이성을 갖는 것으로 널리 알려진 PAH계열의 화합물들도 750~1,600°C 의 고온에서 많이 생성된다.

한편, 담배 연기 응축물의 경우 원료 잎담배의 종류에 따라 돌연변이성에 차이를 나타내며¹²⁾ 잎담배의 질소 화합물의 함량이 높을수록 *Salmonella* 균주에 대하여 높은 돌연변이 유발성을 나타낸다.¹⁴⁾ 만타나, 백창 등 진해 및 거담효과가 있는 생약재들은 그 추출물들이 각기 다른 다양한

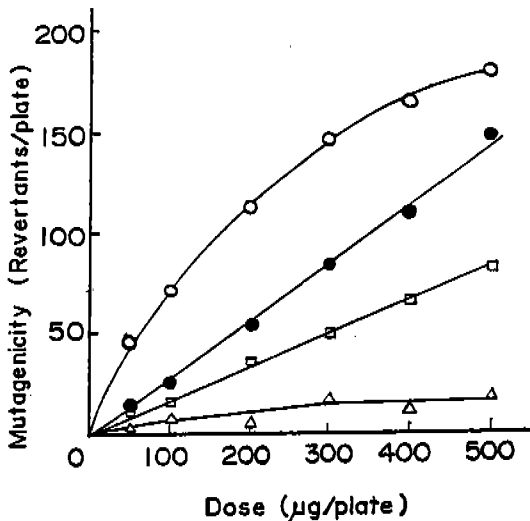


Fig. 2. Dose-response curve of mutagenic activity of pyrolyzates obtained from the extracts of medicinal plants (●-●; *Daturae Folium*, ○-○; *Scopoliae Rhizoma*, □-□; *Acori Rhizoma*, △-△; *Schizandrae Fructus*) at 850°C. *Salmonella typhimurium* TA98 was used in the presence of S-9 mixture. The spontaneous revertant colonies (39) have been subtracted.

조성을 가지고 있어 이들이 열분해 될 때 구성 성분 에 따라 각기 다른 화합물을 생성하거나, 새로운 물질로 분해되어 돌연변이 유발성에 차이를 나타내는 것으로 생각된다.⁷⁾

Ames test 에 의한 돌연변이 유발성의 평가는 revertant colony 의 통계적인 유의성과 동일투여량에 대한 재현성 및 투여량에 따른 colony 의 비례적 증가를 기준으로 한다.⁸⁾

Fig. 2는 생약재 열분해 산물의 투여량을 증가시키면서 revertant colony 수의 변화를 관찰한 것이다. TA98 균주에 대하여 S-9 혼합물 존재하에서 각 생약 추출물의 850°C 열분해 산물의 돌연변이 유발성을 측정하여 본 결과 만타나, 낭탕, 백창 등은 열분해 산물의 투여량이 증가함에 따라 돌연변이 유발성이 비례적으로 증가하였다. 그 증가 정도에는 서로 차이를 보였으나 이들 모두 spontaneous 에 비하여 유의성있는 증가를 나타내어 최고 농도인 500 µg에서 낭탕은 spontaneous revertant colony 의 약 5배, 만타나는 4.5배, 백창은 3배의 증가를 보임으로써 이들 열분해 산물이 돌연변이 유발성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 오미자는 투여량 증가와 관계없이 500 µg에서도 spontaneous 와 비슷한 수준을 보여 그 열분해 산물이 TA98 균주에 대한 돌연변이성을 나타내지 않았다.

한편, 돌연변이성 측정 시료의 용매로 DMSO, acetone, ethanol 등을 사용할 수 있으나 그 중 DMSO가 균주에 미치는 영향이 적어 가장 적합한 용매로 알려져 있다.⁸⁾ Mizusaki 등¹³⁾은 담배 연기 응축물을 DMSO에 용해하여 돌연변이 유발성 실험의 시료로 조제한 후 저장 시간 경과에 따른 돌연변이 유발성의 변화를 측정한 결과 조제 14일 후에는 약 70%의 돌연변이성이 잔존함을 관찰하였다. 저자들은 열분해 산물을 DMSO에 용해하고 그 직후, 7일 및 14일 후에 각 돌연변이성을 측정하여 저장 시간에 따른 변화를 관찰하였다 (Table 2). 돌연변이성을 갖지

Table 2. Change in mutagenic activities of pyrolyzates of some medicinal plant extracts according to the storage period after preparation of the samples. The *Salmonella typhimurium* TA98 was used in the presence of S-9 mixture with 300 µg of pyrolyzates in DMSO.

Medicinal plants	Revertants/plate		
	Immediately	7 days	14 days
Daturae Folium	122 (100)*	107 (88)	88 (72)
Scopoliae Rhizoma	175 (100)	126 (72)	128 (73)
Acori Rhizoma	88 (100)	74 (84)	74 (84)
Schizandrae Fructus	56 (100)	53 (95)	54 (96)

* Percent of the number of revertants assayed immediately after the preparation.

** The average number of spontaneous revertants was 39/plate.

않는 오미자의 경우는 저장 시간이 경과하여도 형성된 revertant colony의 수가 시료 용액을 조제한 직후의 수와 큰 차이가 없었다. 그러나 돌연변이성을 나타내었던 다른 시료들은 시간 경과에 따라 형성되는 revertant colony의 수가 감소하였으며 돌연변이 유발성이 큰 물질일수록 그 감소 비율이 증가하였다. 즉, 낭탕은 7일 후 약 28%가 감소되었고 만타나와 백창은 12 및 16%의 감소를 보였으며 만타나는 14일 후까지 계속하여 감소하는 경향을 보였다. 그러나 낭탕과 백창은 조제 7일 후까지 돌연변이성이 감소한 이후 대체로 그 수준에서 변화를 보이지 않았다.

이와 같이 Ames test를 위하여 DMSO에 시료를 용해하였을 때 조제 후 저장 시간의 경과에 따라 형성되는 revertant colony가 감소하는 결과가 담배 연기 용출물에서 뿐만 아니라 생약 추출물의 열분해 산물에서도 나타나는 것을 볼 때, 이러한 감소 현상이 돌연변이성을 갖는 다른 시료에도 적용될 것으로 생각된다. 그러므로 *Salmonella* 균주를 이용한 돌연변이 유발성 실험의 경우 시료를 조제한 즉시 실험을 실시할 때 그 물질의 돌연변이 유발성 여부에 대한 가장 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과에서 선정 한 4가지 생약재 중 낭탕, 만타나 및 백창 추출물은 850 °C까지의 온도에서 얻은 열분해 산물이 *Salmonella typhimurium* TA98 균주에 대하여 돌연변이 유발성을 나타내나, 오미자의 열분해 산물은 이 균주에 대해 돌연변이 유발성을 갖지 않음을 알 수 있었다.

결 론

진해 및 거담효과를 갖는 생약재 중 만타나, 낭탕, 백창 및 오미자의 50% ethanol 추출물을 300, 600, 750, 850 °C의 온도에서 각각 열분해한 후 그 열분해 산물들의 돌연변이 유발성을 *Salmonella typhimurium* TA98을 이용하여 평가하였다.

이들 중 오미자의 열분해 산물은 이 균주에 대하여 돌연변이성을 나타내지 않았으나 만타나, 낭탕 및 백창 추출물의 열분해 산물은 열분해 온도와 투여량의 증가에 따라 유의성 있게 revertant colony의 형성이 증가되어 돌연변이 유발성을 가짐을 확인할 수 있었다. 또한 시료를 DMSO에 용해한 후 시간의 경과에 따라 그 돌연변이 유발성을 비교한 결과 revertant colony의

형성이 초기의 약 70%까지 감소하였으므로 시료를 조제한 즉시 실험을 실시하는 것이 바람직함을 알았다.

참 고 문 헌

1. 김종원 외, 현대 생약학, 한국학습교재사.
2. 김재길, 원색 천연약물 대사전 하권, 도서출판 남산당.
3. Elliott, H.L. and Reid, J.L., Br. J.Clin. Pharmac., 10, 487 (1980).
4. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., Mutation Res., 31, 347 (1975).
5. McCammon, C.S., Jr., Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 37, 487 (1976).
6. Park, J.Y., Kim, O.C. and Park, J.W., J. Kor. Soc. Tob. Sci., 4, 63 (1982).
7. Kim, S.Y., Moon, J.Y., Lee, D.W. and Park, K.H., J. Kor. Soc. Tob. Sci., 9, 87 (1987).
8. Maron, D.M. and Ames, B.N., Mutation Res., 113, 173 (1983).
9. Gelboin, H.V. and TS'O, P.O.P., Polycyclic hydrocarbons and cancer, volume 1, Academic Press (1978).
10. Matsumoto, T., Yoshida, D., Mizusaki, S. and Okamoto, H., Mutation Res., 48, 279 (1977).
11. Okamoto, H., Mizusaki, S., Yoshida, D. and Matsumoto, T., Agric. Biol. Chem., 32, 1433 (1979).
12. Badger, G.M., Natl. Cancer Res., 12, 30 (1952).
13. Mizusaki, S., Takashima, T. and Tomaru, K., Mutation Res., 48, 29 (1977).
14. Mizusaki, S., Okamoto, H., Akiyama, A. and Fukuhara, Y., Mutation Res., 48, 319 (1977).