

수중생약의 Brine Shrimp 독성에 관한 연구(I)

김 윤 철 · 김 정 희
원광대학교 약학대학

Studies on the Brine Shrimp Toxicity of Crude Drugs (I)

Youn Chul Kim and Jeung Hee Kim

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iri 570-749, Korea

Abstract—Brine shrimp toxicity of water extracts of twenty three crude drugs was tested by the brine shrimp bioassay. Eight crude drugs were shown to have 100% mortality in 1000 $\mu\text{g/ml}$. They were fractionated by Amberlite XAD-2 column chromatography and were tested by the brine shrimp bioassay. Methanol fraction of Rhei Rhizoma ($\text{LC}_{50}=49.60 \mu\text{g/ml}$) and Cantharis ($\text{LC}_{50}=54.08 \mu\text{g/ml}$) were shown to have potent brine shrimp toxicity in this test.

Keywords—screening · brine shrimp bioassay · crude drugs

Brine shrimp bioassay는 선박의 부착생물에 의한 오손을 방지할 수 있는 활성물질의 생물검정법으로 개발, 이용될 뿐 아니라¹⁾, 천연물로부터 생리활성물질을 탐색하는 데 있어서 간편하고 비용이 적게드는 유용한 방법으로 널리 이용되고 있으며²⁻⁸⁾, 김 등은 수중생약에 대하여 brine shrimp bioassay를 이용하여 생리활성물질의 검색결과를 발표한 바 있다.⁹⁾

한편, 중국의 약물서인 신농본초경에서는 약물을 상, 중, 하품으로 구분하여 수재하였으며, 이 중 하품에 수재되어있는 125종의 약물은 그 작용이 주로 질병을 치료하며, 독성이 강하여 장기간 복용하지 못하도록 되어있다.¹⁰⁾ 하품 수재의 약물들은 그 작용으로 미루어 독성이 있고 또한 강력한 생리활성성분을 함유하고 있음을 예상할 수 있으며, 현대 과학적인 방법으로 이들 약물로부터 많은 생리활성물질이 발견되고 있는 것은 주지의 사실이다. 저자들은 새로운 생리활성물질의 분리를 목적으로 brine shrimp bioassay를 이용하여 신농본초경의 하품에 수재되어 있는 약물중 비교적 사용빈도가 높은 23종 생약의 수

침 extract에 대하여 생리활성을 검색한 다음, 활성을 나타낸 8종 생약의 수침 extract를 nonionic polymer인 Amberlite XAD-2 column에 의해 분획하고, 각 분획에 대하여 brine shrimp bioassay를 실시하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

실험재료 및 시약—본 실험에 사용한 생약 재료는 한약건재상에서 부자 외 22종 (Table I) 생약을 구입하여 확인한 다음 사용하였고, brine shrimp egg는 Sanders brine shrimp Co. Inc. (U.S.A.)를 사용하였으며, 분획용 MeOH 및 시료조제용 DMSO는 1급시약을 사용하였다.

추출, 분획 및 시료의 조제—재료 생약을 각각 20 g씩 세절하여 증류수로 약 1시간 sonication한 후 여과하고 여액을 감압농축한 다음 동결건조기로 완전 건조하여 H₂O extract로 하였으며, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 100%의 치사율을 보인 8종의 수침 extract (Table II)는 다시 Amberlite XAD-2 column에 의해 H₂O, 50% MeOH 및

Table I. The results of brine shrimp bioassay by water extracts

Materials	LC ₅₀ (μ g/ml)
부자 Aconiti Tuber	>1000
반하 Pinelliae Tuber	>1000
대황 Rhei Rhizoma	489.47
장력자 Drabae Semen	>1000
길경 Platycodi Radix	>1000
선복화 Inulae Flos	>1000
사간 Belamcandae Rhizoma	515.85
감수 Euphorbiae Rhizoma	829.81
청상자 Celosiae Semen	6.48.09
백급 Bletillae Rhizoma	>1000
대극 Euphorbiae Radix	528.55
관중 Crassirhizomae Rhizoma	524.39
완화 Gcnkwa Flos	>1000
상육 Phytolaccae Radix	>1000
편측 Polygoni avicularis Herba	>1000
백두옹 Pulsatillae Radix	490.99
연교 Forsythiae Fructus	>1000
하코초 Prunellae Spica	>1000
파두 Tigllii Semen	325.55
육리인 Pruni japonicae Semen	565.52

반묘 Cantharis	473.01
백렴 Ampelopsis Radix	33.58
송라 Usnea	567.07

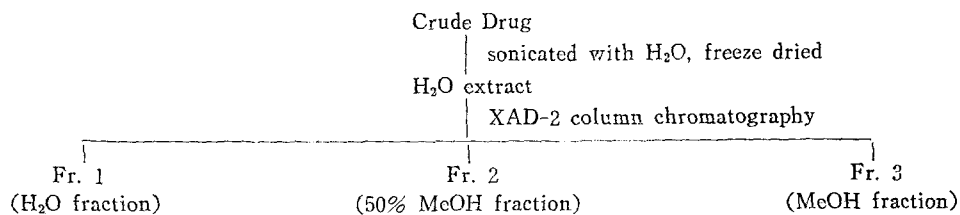
MeOH을 순차적으로 용출시켜 3개의 fraction으로 분획한 다음 이를 감압농축 후 동결건조기로 건조하여, 각각 H₂O, 50% MeOH 및 MeOH fraction으로 하였다(Scheme I). 수침 extract와 H₂O fraction (Fr. 1)은 증류수로, 50% MeOH (Fr. 2) 및 MeOH fraction (Fr. 3)은 10% DMSO로 각각 20 mg/ml의 시료용액을 만들고, 10배씩 희석하여 20, 2, 0.2 mg/ml의 시료용액을 조제하였다.

Brine shrimp의 부화—천일염 9g을 증류수 300 ml에 녹인 후 1 l beaker에 넣고, brine shrimp egg 약 2g을 넣은 다음 aeration시키면서 실온에서 부화시켰다. 24시간 후에 부화된 brine shrimp nauplii를 走光性을 이용하여 포집하였다.

Brine shrimp bioassay—김 등⁹⁾에 의한 방법으로 실시하였다. 즉, 10 ml 6 wells plate에 부화된 지 24시간 경과한 brine shrimp nauplii 약 100마리를 3% 천일염 용액 3.8 ml와 함께 가

Table II. The results of brine shrimp bioassay by Fr. 1~3

Materials	LC ₅₀ (μ g/ml)		
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3
Rhei Rhizoma	509.39	586.43	49.60
Belamcandae Rhizoma	523.57	538.30	516.28
Euphorbiae Radix	528.55	511.32	>1000
Crassirhizomae Rhizoma	510.79	>1000	>1000
Pulsatillae Radix	994.12	>1000	473.34
Tigllii Semen	222.77	543.12	385.93
Cantharis	>1000	512.86	54.08
Ampelopsis Radix	156.53	539.83	479.91

**Scheme I.** Extraction of crude drugs

하고 각각의 시료용액 0.2 ml를 넣어 1000, 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 한 후 24시간 후에 치사 및 반치사 개체수를 세어 다음과 같은 방법으로 치사율을 구하고¹¹⁾, linear regression법을 이용하여 LC_{50} (Lethal concentration necessary to kill 50% of the brine shrimp nauplii)를 구하였다.

$$\text{치사율} = \frac{(\text{치사 개체수} \times 1) + (\text{반치사 개체수} \times 0.7)}{\text{전 개체수}} \times 100$$

결과 및 고찰

신농분초경 하품에 속하는 생약중 23종 생약의 수침 extract를 brine shrimp bioassay를 이용하여 검색한 결과, 12종의 생약에서 LC_{50} 이 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 독성을 나타내었으며, 그 중 백련의 수침 extract는 LC_{50} 이 33.58 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 강한 독성을 나타내었다(Table I). 또한, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 100%의 치사율을 보인 8종 생약(Table II)의 수침 extract를 Amberlite XAD-2 column chromatography에 의해 Fr. 1~3으로 분획하고, 각 분획에 대하여 brine shrimp bioassay를 실시한 결과, 대황과 반묘의 Fr. 3에서 강한 독성을 나타냈다. 즉 대황과 반묘의 수침 extract의 LC_{50} 치는 각각 489.47 및 473.01 $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 Fr. 3에서는 각각 49.60과 54.08 $\mu\text{g/ml}$ 를 나타내었다. 또한, 대극은 Fr. 1 (528.55 $\mu\text{g/ml}$) 및 Fr. 2(511.32 $\mu\text{g/ml}$)에서 수침 extract(528.55 $\mu\text{g/ml}$)와 같은 정도의 독성이 나타났고, 관중과 백두옹은 각각 Fr. 1(510.79 $\mu\text{g/ml}$)과 Fr. 3(473.34 $\mu\text{g/ml}$)에서만 그 수침 extract(각각 524.39 및 490.99 $\mu\text{g/ml}$)와 비슷한 LC_{50} 치를 나타내었다. 파두의 경우에는 Fr. 1 (222.77 $\mu\text{g/ml}$)에서 그

수침 extract (325.55 $\mu\text{g/ml}$)에 비하여 LC_{50} 치가 낮게 나타났다. 한편, 수침 extract에서 가장 낮은 LC_{50} 치를 나타낸 백련은 각 분획에서는 오히려 독성이 저하 됨을 알 수 있었다(Table II). 이상과 같이 수증생약의 수침 extract의 Amberlite XAD-2 column을 통한 분획에서 brine shrimp에 대한 독성물질이 함유되어 있음을 알 수 있었으며, 현재 이들 독성물질의 분리가 진행 중에 있다
<1993년 7월 29일 접수 : 8월 9일 수리>

문헌

1. 宮内 徹夫 : 生態化學 8, 41 (1986).
2. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L.: *Planta Med.* 45, 31 (1982).
3. Hui, Y.H., Chang, C.J., McLaughlin, J.L. and Powell, R.G.: *J. Nat. Prod.* 49, 1175 (1986).
4. Powell, R.G., Bajaj, R. and McLaughlin, J.L.: *J. Nat. Prod.* 50, 293 (1987).
5. Anderson, J.E., Chang, C.-J. and McLaughlin, J.L.: *J. Nat. Prod.* 51, 307 (1988).
6. Wang, Z.-W., Ma, W.-W., McLaughlin, J.L. and Gupta, M.P.: *J. Nat. Prod.* 51, 382 (1988).
7. Chaichantipyuth, C., Pummangura, S., Naowsaran, K., Thanyavuthi, D., Anderson, J.E. and McLaughlin, J.L.: *J. Nat. Prod.* 51, 1285 (1988).
8. Marles, R.J., Farnsworth, N.R. and Neill, D.A.: *J. Nat. Prod.* 52, 261 (1989).
9. J.S. Lee and J.W. Kim: *Kor. J. Pharmacogn.* 21, 100 (1990).
10. 申信求 : 申氏本草學, 總論, 壽文社, 서울, p.23 (1972).
11. 山田 耕史 : 高知大學修士論文 (1992).