

## 생강성분 6-Paradol의 세포 독성 및 병리학적 연구

김옥희<sup>1)</sup> · 유은숙\* · 정인경\*\* · 이상섭\*\*\*

식품의약품안전본부 독성연구소 병리부

\*대웅제약 중앙연구소

\*\*삼육대학교 약학부

\*\*\*서울대학교 약학대학

(1997. 9. 25 접수)

## Cytotoxicological and Pathological Studies of 6-Paradol, a Pungent Principle of Ginger

Ok Hee Kim<sup>1)</sup>, Eun Sook Yoo\*, In Kyung Jung\*\* and Sang Sup Lee\*\*\*

Korea Food and Drug Administration, Toxicological Res., Dept. of Pathology, Seoul 122-020,

\*Dae Woong Pharm. Co., Central Research,

\*\*Sahm Yook University, Dept. of Pharmacy,

\*\*\*Seoul National University, College of Pharmacy

**ABSTRACT** : It is previously reported that 6-paradol can induce prolonged analgesia in experimental animals. In order to investigate the mutagenicity of 6-paradol, Ames *Salmonella*/microsome plate assay was carried out with *Salmonella typhimurium* strains, TA 98, TA 100, TA 1535 and TA 1538. 6-Paradol was nonmutagenic in *Salmonella typhimurium* with and without rat liver microsomal activation. The rec assay with *Bacillus subtilis* strains H 17 rec<sup>+</sup> and M 45 rec<sup>-</sup> was carried out to test 6-paradol and other compounds (1-3 mg/disc) for DNA damaging activity. 6-Paradol was also nonmutagenic in DNA damaging activity. The relative size of the inhibition zone for 6-paradol was smaller than that of capsaicin. We have also determined the pathological effects of this compound on the various tissues of rats after administrating (i.p.) with increasing doses of 4, 8, 12, 16 mg/kg at 2 hour intervals and found no significant changes in terms of histology.

**Key words** : 6-paradol, Ames test, rec assay, Brine shrimp bioassay

### 서 론

6-paradol (1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-3 one)은 생강속에 있는 매운맛을 가진 미량성분으로 생강 및 paradise의 열매로부터 Connell 등 (1970)이 분리하였으며 paradol이란 이름도 열매이름인 paradise로부터 유래되었다. 6-paradol의 구조 역시 capsaicin, shogaol 및 gingerol과 마찬가지로 vanillyl 핵을 갖고 있으나 vanillyl 핵에 acyl amide 결합대신 keto alkyl side chain 이 결합되어있는 것이 다르다(Fig. 1). 이러한 생강이나 고추 속의 매운맛을 나타내는 물질이 통증을 억제하

는 작용을 나타낸다고 보고되고 있으며(Heyes and Tyers, 1980; Hayes *et al.*, 1984; Cambell *et al.*, 1989) 더욱이 이러한 물질은 기존의 peptide계 진통물질인 endorphin이나 enkephalin의 수용체와 결합하여 진통작용을 나타내는 아편계 진통제나, 조직 세포막에 존재하는 prostaglandin 합성효소인 cyclooxygenase의 저해제 역할을 하므로서 prostaglandin 생합성을 억제하여 작용을 나타내는 aspirin 과 같은 해열진통제와는 달리 그 작용이 지속적으로 나타낸다고 보고되고 있다(Hayes *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1986; David and Peter, 1989).

본 연구팀은 6-paradol의 mechanical analgesia (Lee, 1986)에

<sup>1)</sup>To whom comespndence should be addressed.

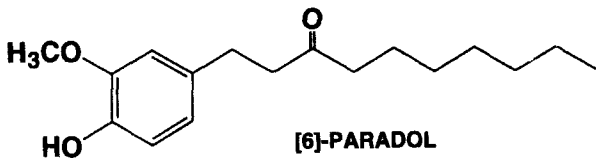


Fig. 1. The structure of 6-paradol.

관한 보고에 이어 chemical, thermal analgesia 에 관한 발표를 하였으며(Kim, 1988), 6-paradol과 그 대사물질의 biliary excretion을 발표하였다(Lee and Kim, 1994).

따라서 본 연구에서는 지속적 작용을 나타내는 생강의 매운 성분 6-paradol의 독성병리학적인 평가를 실시하고자 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀 돌연변이 시험(Ames, 1975; Maron et al., 1983)과 *Bacillus subtilis*의 spore를 이용한 rec assay(Kada et al., 1972; Ham et al., 1990), brine shrimp을 이용한 bioassay(Kinghorn et al., 1977; Meyer et al., 1982) 또한 6-paradol에 의해 각 조직에 미치는 병리학적인 검사를 실시하였다

### 재료 및 방법

#### 실험재료

Dehydroparadol 합성의 원료로 사용한 vanilin은 bolak perfumery Co.의 제품을 사용하였고 side chain합성에 사용한 keton류는 Nakarai pharm. Co.의 제품을, pyrrolidine은 Janssen chemical의 제품을 사용하여 Locksley 와 Rainey (1972)의 방법으로 dehydroparadol과 paradol analogue를 합성하였다. 비교 실험한 capsaicin은 Merck Co. 제품을, NVA 는 Hyundai pharm. Co. 제품을 사용하였고 다른 합성제품은 서울대학교 서영준교수로부터 입수하여 사용하였으며 그 외의 시약은 특급 및 일급의 시약을 사용하였다.

독성검사를 위한 brine shrimp egg는 Living Worle, Metagram Inc. 제품을 사용하였고 sea water는 Instant Oceans, Aquarium system Inc. 제품을 사용하였다.

유전자 변이성 시험에 사용된 균주중 *Salmonella Typhimurium* TA 98, TA 100은 서울대학교 서영준 교수로부터 분양받았으며 TA 1535 및 TA 1538은 고려대학교 이세영 교수로부터 분양받았다. *Bacillus Subtilis* H 17 (rec\*)과 M 45 (rec)는 강원대학교 함승시 교수로부터 분양받아 사용하였다. 각 조직의 병리학적인 검사를 위한 실험동물인 Sprague Dowley male 및 female은 200 g (8주령)을 실험에 사용하였으며 사육 조건은 온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 명암교대 12시간을 유지했다

Table 1. Genetic characteristics of bacterial strains

strain designation	gene affected	additional mutations repair	LPS R factor	mutation type detected
TA 1538	his D	uvrB	rfa* -	frameshift
TA 98	his D	uvrB	rfa pkm101	frameshift
TA 1538	his G	uvrB	rfa -	base pair substitution
TA 100	his G	uvrB	rfa pkm101	base pair substitution

\*The rfa mutation eliminate the polysaccharide side chain of the lipopolysaccharide that coats bacterial surface.

#### 실험방법

##### *Salmonella*를 이용한 유전자 복귀 돌연변이 시험

시험에 사용한 TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538의 유전적 특성은 Table 1과 같으며 각 균주는 -70°C의 DMSO 동결보존으로부터 nutrient broth에 접종해 37°C, 180 rpm으로 회전 배양하여 시험에 사용하였다.

배지 : Ames test를 위한 검색용의 배지로서 Vogel-Bonner salts medium을 사용하였고 top agar는 0.6% difco agar와 0.5%의 NaCl 용액 100 ml에 0.5mM L histidine·HCl/0.5 mM biotin 용액을 사용하였고 nutrient agar plate는 0.8% difco bacto nutrient broth와 0.5% NaCl에 1.5% agar를 첨가하여 사용하였다.

##### S-9 mixture의 조제

대사 활성화를 위하여 S-9 mix를 조제하여 사용하였다. SD male rat(8주령 약 200 g)에 sodium phenobarbital 40 mg/kg을 1일 2회 3일간 피하주사하고 4일째 경주탈골에 의해 도살하여 간을 적출한후 3배용량의 0.15 M KCl 용액을 넣어 균질화하고 9000 g에서 10분간 원심분리후 상등액부분을 S-9 분획으로 하였다. 이조작은 무균 저온에서 시행되었다.

##### 복귀돌연변이시험

Maron 등(1983)의 방법에따라 예비 독성 시험에서 결정된 최고 용해농도를 최고농도로 하여 4단계 농도를 설정하고 시료용액으로하여 음성 대조 물질은 용매인 DMSO를 사용하였고 양성 대조 물질로는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사 활성화법의 적용여부에 따라 2-nitrofluorene (2NF), 2-aminofluorene (2AF), 2-aminoanthracene (2AA), 및 MNNG 등을 적의 사용하였다. 멸균된 tube에 *S. Typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538의 각각의 배양균액 0.1 ml에 검체액 0.1 ml씩 넣고 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) 0.5 ml(대사 활성화법에서는 S-9 mix 0.5 ml)를 넣어 혼합한후 37°C에서 20분간 preincubation 하였다. 여기에 0.5 mM histidine/biotin solution 0.2 ml와 40-45°C의 top agar 2 ml를 가하고 minimal glucose medium plate에 overlay 하여 37°C에서 48시간 배양한

후 복귀변이 집락의 수를 수동식 집락계수기로 계수하였다.

복귀변이 집락의 수는 3배의 plate의 평균치를 나타내었고 돌연변이 유발성의 판정은 용매대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내었다.

#### Bacillus Subtilis의 spore를 이용한 rec assay

Kada 등(1972)의 방법에 의하여 *B. Subtilis* H 17 rec<sup>+</sup> 및 M 45 rec<sup>-</sup> 균주의 포자 및 사용된 배지를 조제하였다.

포자의 조제 : 1% meat extract, 1% yeast extract, 0.5% NaCl 로 된 liquid broth medium으로 H 17 rec<sup>+</sup>와 M 45 rec<sup>-</sup>의 균주를 접종시킨후 37°C 15시간 배양시킨 배양액을 modified Schaeffner's medium으로 이미 조제된 agar plate 에 100 µl씩 micropipette 으로 주입한후 "γ" 자형의 glass rod로 spreading 하였다. H 17 균주는 3일간 M 45 균주는 5일간 37°C에서 30분 동안 lysozyme 처리후 sodium dodesyl sulfate 용액을 첨가하여 다시 30분동안 배양후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 최종에는 멸균증류수로 재 현탁시켜 4°C 냉장고에 보존하면서 포자를 실험에 사용하였다.

#### rec assay

0.8% nutrient broth, 1.5% bacto agar 액을 멸균하여 40~45°C로 식힌후 H 17 및 M 45 spore 현탁액을 각각 배지에 혼합하였다. 포자 함유배지를 10 ml씩 petri dish 에 분주하여 H 17 및 M 45 포자 한천을 굳히고 그 위에 직경 8 mm, 두께 1.2 mm의 paper disc를 petri dish 한 개당 4매 씩 올려놓고 각 시료용액을 30 µl, 60 µl씩 주입하였다. 4°C 냉장고에서 15시간 냉장배양 하고 37°C에서 20시간 배양하여 paper disc 주위에

생성된 inhibition zone의 직경을 측정 하여 H 17 rec<sup>+</sup>와 M 45 rec<sup>-</sup> inhibition zone 의 차이로 변이원성 유무를 판정하였다.

#### Brine shimp을 이용한 독성시험

Meyer 등 (1982)의 방법에 따라 10 ml의 vial에 시험물질을 농도별로 넣고 artificial sea water로 부화시킨 shrimp 중 10마리씩을 vial에 넣었다. 이에 artificial sea water로 5 ml 되도록 채운 뒤 조명하에 24시간 방치하고 생존 마리수를 측정하여 세포독성유무를 판정하였다.

#### 각 조직에 미치는 병리학적 검정

6-paradol로 인한 조직의 손상 유무를 알기위하여 SD rat male(200 g, 7~8 주령)에 4, 8, 12, 16 mg/kg의 6-paradol을 복강내에 투여하고 6, 12, 24, 48, 72, 144시간 및 1개월 후에 각 조직을 채취하여 10% 중성 formalin에 하루 고정후 통상적인 방법으로 paraffin embedding 과정을 거쳐 5 µm 두께로 slide를 제작하였으며 hematoxylin eosin 으로 중복 염색을 시행하여 100배 광학 현미경 관찰을 하였다.

## 실험결과 및 고찰

지속적 진통효과를 갖고있는 생강의 매운성분 6-paradol의 복귀 돌연변이 검사는 Table 2와 같이 13.8 µg/plate에서 각 균주 TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538의 경우에 있어서 S-9 fraction을 첨가하였을때나 첨가하지 않았을 때 모두 대조군과 비슷한 수나 또는 그 이하의 revertants가 관찰되어 non-

**Table 2.** Mutagenic effects of 6-paradon *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 TA 1535 and TA 1538 with or without S-9 mixture

Compounds	concentration (µg/plate)	S-9 mix	No of revertants per plate*			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1538
control(DMSO)	0		36±1.2	148±5.2	21±1.2	28±2.5
6-paradol	13.8	-	32±4.6	135±8.6	10±0.5	13±2.0
	6.9	-	26±1.8	142±6.7	15±4.2	21±3.6
	0.69	-	33±3.4	137±9.5	19±2.2	16±1.9
	0.069	-	24±1.5	146±5.7	16±3.2	35±4.2
2-nitrofluorene	2	-	512±25.7	458±34.8	48±7.5	382±27.4
MNNG	1	-	152±12.7	546±30.2	204±19.5	25±2.8
control (DMSO)	0		35±4.3	151±13.6	23±2.1	18±8.2
6-paradol	1.38	+	28±2.6	159±21.6	24±1.9	18±2.1
	6.9	+	36±5.2	146±14.8	18±4.2	14±2.2
	0.69	+	23±1.7	153±17.6	23±3.7	11±1.7
	0.069	+	29±3.6	154±15.3	23±2.6	18±5.5
2-aminofluorene	10	+	783±48.9	827±38.5	89±11.7	489±43.6
2-aminoanthracene	5	+	564±26.2	705±60.5	110±19.7	178±14.8

\*Each value is mean±SD

Abbreviations: DMSO; dimethyl sulfoxide, MNNG; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

**Table 3.** Mutagenic effects of paradols and capsaicinoids by the spore rec assay

compounds (3 mg/60 µl)	Inhibition zone (mm)			Conclusion
	H17(Rec <sup>c</sup> )	M45(Rec <sup>c</sup> )	Difference	
6P	11.5	13.0	1.5	±
8DHP	9.0	12.5	3.5	±
8P	11.0	11.5	0.5	±
CAP	11.0	15.5	4.5	±
NVA	12.0	17.5	5.5	+
EVA	11.0	12.5	1.5	±
VVA	10.0	11.5	1.5	±
AF(1 µg/disc)	12.0	23.0	11.0	++

b) (-): no inhibition zone, (±): Length of inhibition zone is less than 5 mm, (+): 5~10 mm of inhibition zone, (++) : 10~15 mm of inhibition zone

P: paradol, DHP: dehydroparadol, CAP: capsaicin, NVA: N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl) nonanamide, EVA: N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl) heptanamide, VVA: N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)heptanamide, AF: aflatoxin

mutagenic 함을 나타냈다.

또다른 DNA damaging activity를 측정하기 위한 방법으로 *Bacillus subtilis*에서 DNA repair system이 완전한 H 17 rec<sup>c</sup> 균주와 DNA repair system 이 손상된 mutant인 M 45 rec<sup>c</sup> 균주를 이용하여 chemical mutagen 에 대한 두 균주의 상대적인 민감성을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 6-paradol은 3 mg/disc 농도에서 inhibition zone의 차이가 1.5 mm로 의양성을 나타내고 있으며 capsaicin 은 4.5 mm를 나타냈다. 양성 대조군으로 사용한 aflatoxin B1의 경우 시험물질보다 300배나 낮은 농도인 1 µg/disc에서 inhibition zone의 차이가 10 mm가 넘는 것으로 보아 6- paradol 및 capsaicin에 대한 위의 수치는 비교적 안전한 것으로 생각된다.

그러나 6-paradol과 capsaicin경우를 비교해볼 때는 capsaicin이 더 큰 DNA damaging activity를 나타냈다. 또한 매운맛을 갖고 있지 않은 paradol 류의 합성 중간체인 dehydroparadol류가 매운맛을 갖고있는 paradol류 보다 더 큰 damaging activity를 보인 것은 흥미로운 결과이며 이것은 DNA에 damage를 주는데 있어서 paradol 구조의 side chain에 있는 탄소의 이중결합과 이중결합이 아닌 것이 크게 작용하는 것으로 생각된다. 반면 side chain 이 긴 paradol류 보다 chain 이 짧은 paradol류가 더 큰 차이를 나타내고 있으며 capsaicin 유도체의 경우에는 이와반대로 side chain이 긴 chain 보다 짧은 chain의 차이가 더 크게 나타나 좋은 대조를 보이고있다.

또한 6-paradol의 cytotoxicity를 검사하기위해 brine shrimp bioassay를 한 결과 (Table 4) 6-paradol은 각 10, 100, 1000 µg/

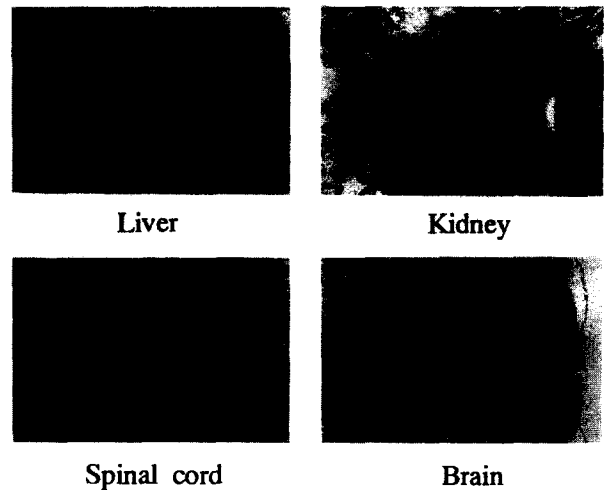
**Table 4.** Brine shrimp bioassay results of paradols and capsaicinoids

compounds	Percent death at 24 hr		
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
6P	6.6	36.6	100
8DHP	6.6	20	60
8P	3.3	60	100
CAP	13.3	40	100
NVA	16.6	53.3	100
EVA	6.6	13.3	100
VVA	3.3	13.3	83.3
control	0	0	0

P: paradol, DHP: dehydroparadol, CAP: capsaicin, NVA: N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)nonanamide, EVA: N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)heptanamide, VVA: N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)pentanamide.

ml농도에서 brine shrimp의 death %는 각 10 ppm에서 6%, 100 ppm에서 36%였다. 이에 비해 capsaicin은 10 ppm에서 13%, 100 ppm 에서 40%인 것으로 보아 6-paradol은 capsaicin 보다 낮은 cytotoxicity를 보이고 있으나 그리 큰 차이가 나지는 않았다.

매운맛을 갖고 있지 않은 dehydroparadol류 보다 매운맛을 갖고있는 paradol류가 100 ppm 농도에서 훨씬 치사율이 높은 것으로 보아 매운맛에 대한 receptor 영향이 cytotoxic 한데 큰 영향이 있는 것으로 생각된다. 즉 DNA damage를 주는데는 매운맛을 내는 차이에 따라 큰 영향이 없으나 cytotoxic한 effect에 있어서는 매운성분과 그렇지 않은 것에 따라 상당히 다른 효과가 나타남을 알수 있었다.



**Fig. 2.** Tissue slices of rat at 24 hrs after 6-paradol injection (16 mg/kg).

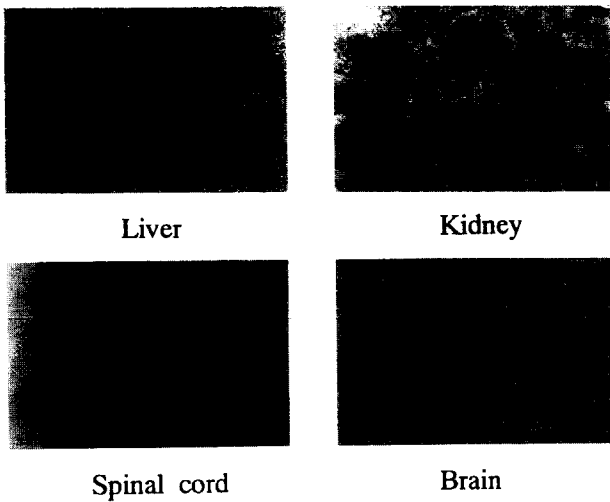


Fig. 3. Tissue slices of rat at 144 hrs after 6-paradol injection (16 mg/kg).

6-paradol의 간 조직에 대한 독성을 검사하기 위하여 rat에 시험물질을 연속적으로 복강내에 주사한후 24, 48, 72, 144시간 및 1개월의 시간 간격으로 도살하여 각각의 liver, kidney, spinal cord 및 brain 조직을 광학 현미경으로 검사하였는데 별다른 특이 소견은 발견되지 않았다(Fig. 2 and 3).

### 감사의 글

본 실험에서 6-paradol에 의한 각 조직에 미치는 병리학적 인 실험에서 조직검사를 도와주신 서울대 의대 김철우 교수님께 감사드립니다.

### 참고문헌

- Ames, B.N., J. McCann, and E. Yamasaki, (1975): Methods for detection carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364.
- Campbell, E.A., Dray, A., and Perkins, M.N., (1989): Comparison of capsaicin and Olvanil and antinociceptive agents *in vivo* and *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **98**, 907.
- Connell, D.W., (1970): Natural pungent compounds III. The paradols and associated compounds. *Aust. J. Chem.* **23**, 369-376.
- David, J.V., and Peter, M.B., (1989): Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the mouse: Comparison with capsaicin. *Life Sci.*, **44**, 711-715.
- Ham, S.S., and Baik, C.W., (1990): Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from Apple. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **22**, 6, 625-631.
- Hayes, A.G., and Tyers, B., (1980): Effects of Capsaicin on nociceptive heat, pressure and chemical threshold and on substance P levels in the rat. *Brain Res.*, **189**, 561-564.
- Hayes, A.G., Oxford, A., Reynolds, M., Shingle, A.H., Smith, C., and Tyers, M.B., (1984): The effects of a series of capsaicin analogues on nociception and body temperature in the rat. *Life Sci.*, **34**, 1241-1248.
- Kada, T., Tutikawa, K., and Sadaie, Y., (1972): *in vitro* and host-mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens; and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mutat. Res.*, **16**, 165-174.
- Kim, O.H., (1988): Analgesic effect and metabolism of 6-paradol in rats. *Ph. D. Thesis, Seoul Natl. Univ.*
- Kinghorn, A.D., Harjes, K.K., and Doorenenbon, N.J., (1977): Screening procedure for phobol esters using brine shrimp larvae. *J. Pharm. Sci.*, **66**, 9, 1362-1363.
- Lee, S.S., (1986): U. S. Pat. 4,623, 665
- Lee, S.S., Kim, K.C., and Lee, S.K., (1986): Substance P mediated new analgesics: Capsainoids and gingerol analogues, *In Contemporary Themes in Biochemistry*. Ed. D. L. Kon, 637646, ICSU Press and Cambridge University Press, London and New York.
- Lee, S.S., Lee, S.K., and Kim, O.H., (1994): Biliary excretion of (6)-paradol and its metabolite in rats. *Seoul Natl. Univ. J. of Pharm. Sci.*, **19**, 47-60.
- Locksley, H.D., and Rainey, D.K., (1972): Pungent compounds part I An improved synthesis of the paradols (alkyl 4-hydroxy-3-methoxyphenethyl ketones) and an assessment of their pungency. *J. Chem. Soc.,(perkin)* **1**, 23, 3001-3006.
- Maron, D.M., and Ames, B.N., (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., and McLaughlin, J.L., (1982): Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plant Res.*, **45**, 31-34.