

장생 도라지(*Platycodon grandiflorum*) 추출물의 돌연변이 억제효과

손미예 · 서종권 · 김행자¹ · 성낙주*

경상대학교 식품영양학과 · 농업생명과학연구원, ¹경상대학교 가정교육과

Antimutagenic Effect of Extract of *Platycodon grandiflorum*

Mi-Yae Shon, Jong-Kwon Seo, Haeng-Ja Kim¹ and Nak-Ju Sung*

Department of Food and Nutrition, Institute of Agriculture & Life Science,
Gyeongsang National University

¹Department of Home Economics Education, Gyeongsang National University

To investigate the antimutagenic effect of *Platycodon grandiflorum* DC, methanol extract of *Platycodon grandiflorum* DC was investigated. In Ames test, the methanol extract showed inhibitory effects of 80-90% on the mutagenicity induced by indirect mutagen of IQ(2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) and direct mutagen of MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. And then the methanol extract was further fractionated. Among the solvent extracted fractions from the methanol extract, the ethyl acetate fraction and butanol fraction exhibited the greatest antimutagenic effect suppressing the mutagenicity IQ and MNNG with inhibition rate of 99% and 98%.

Key words: *Platycodon grandiflorum*, fractionation, antimutagenic effect

서론

도라지는 초롱꽃과에 속하는 다년생 채소로서 예부터 우리나라 사람들에게는 부식으로서 뿐만아니라 약용식물로서 매우 중요한 위치를 점유해 왔다. 이 등⁽¹⁾에 의하면 천연에 존재하는 도라지는 진정, 해열, 진통작용을 가지며, 항염증작용이 있어 임상응용의 가능성을 제시한 바 있고, 또 황 등⁽²⁻⁴⁾은 도라지의 추출성분이 인체의 결장암 세포와 직장암 세포를 대상으로 한 실험에서 암세포의 증식억제 효과가 매우 높다고 보고한 바 있다. 뿐만아니라 도라지는 triterpenoid 계 사포닌과 당질, 섬유질을 상당량 함유하고 있어 한방에서 약재로 사용하기도 하며⁽⁵⁾, 약리성분에 관한 연구로는 Kubota 등⁽⁶⁾ 및 Akiyama 등⁽⁷⁾이 sapogenin의 구조를 밝힌 바 있다.

최근 도라지의 여러 가지 약리 효과를 검증한 결과로 도라지의 소비량이 증가하면서 재배면적이 확대되고 있으며, 특히 도라지를 20년 이상 장기 재배하는 방법이 개발됨에 따라 20년근 이상의 도라지-즉 장생 도라지-의 약리 성분을 이용한 기능성 및 생리활성 물질 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁽⁸⁾. 따라서 국내에서만 재배되고 있는 장생 도

라지는 일반 도라지와 더불어 그들의 일반성분과 약리성분을 비교한 정 등⁽⁹⁾에 의하면 일반성분은 성장기간에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 무기물은 장생 도라지가 일반 도라지보다 훨씬 더 높게 정량되었고, 또한 다가 불포화지방산인 linoleic acid가 일반 도라지보다 장생 도라지에서 그 함량이 높게 검출된다고 하였으며, linoleic acid는 oleic acid, linolenic acid 등과 함께 변이원성 물질을 둘러싸거나 활성화 효소와의 상호작용을 방해하는 성질들을 가지므로 항돌연변이 및 항암작용을 나타낸다고 보고되어 있다^(10,11).

또 황 등⁽¹²⁾은 proline, arginine 및 glutamine 등의 당원성 필수아미노산 함량이 일반 도라지보다 풍부하며, 삼백초와 어성초에서 많이 검출되는 아미노산으로써 해열진통소염, 진해거담, 건위, 소화 등의 효력을 나타내는 것으로 잘 알려져 있는 proline성분이 장생 도라지에서만 상당량 검출된다고 주장하였다. 그리고 장 등⁽¹³⁾과 김⁽¹⁴⁾은 장생 도라지의 사포닌은 인삼의 사포닌과 같은 물질로서 가수분해가 어렵고 물리적, 화학적 방법으로 규명이 잘 되지 않는다고 보고하였다. 한편 색소류인 클로로필 a와 식물성 sterol, polyphenol류 및 indol류 등이 함유되어있다는 보고가 있으며, 이러한 성분들은 식물류에 존재하는 항암성분으로 잘 알려져 있는 물질들이다⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

따라서 본 연구에서는 장생 도라지 추출물을 이용한 생리적 기능 활성물질로의 탐색을 위하여 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 Ames test로서 항돌연변이원성을 검토하였다.

*Corresponding author : Nak-Ju Sung, Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
Tel: 82-55-751-5975
Fax: 82-55-751-5971
E-mail: snakju@nongae.gsnu.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 장생 도라지는 지리산 일대에서 재배되는 것을 구입하여 건조 분말화한 후 실험용 재료로 사용하였다.

시료의 추출 및 분획

도라지를 흐르는 물에 깨끗이 씻어 세절하여 동결건조시킨 후 60 mesh로 분말화하였다. 이 시료를 일정량 취하여 환류냉각기를 부착시킨 플라스크에 시료중량에 대하여 10배량의 70% 메탄올을 첨가하여 80°C에서 8시간씩 3회 추출하였다. 이를 감압 여과장치에서 뜨거운 상태로 여과한 다음 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결건조하였다. 각 용매별 분획물의 제조는 메탄올 농축액을 용매의 극성에 따라 분별분리를 행하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층으로 극성의 차이에 따라 다섯 가지 분획물을 분리한 후 감압농축 후 동결건조하였다. 이 추출물들은 실험에 사용할 때 dimethyl sulfoxide(DMSO)나 증류수에 녹여 사용하였다.

변이원물질과 균주

변이원물질로서 직접 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, Sigma Chemical Co.)와 간접 돌연변이 물질로는 고단백질 식품의 조리과정에서 주로 발생하는 polycyclic aromatic hydrocarbon인 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ, Wako Chemical Inc.)을 DMSO나 3차 증류수에 녹여 실험에 사용하였다. 시험균주로 사용한 *S. typhimurium* TA98과 TA100은 유전자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다.

돌연변이원성 실험

장생 도라지 추출물 자체의 농도 증가에 따른 돌연변이원성 실험은 돌연변이물질을 제외한 *S. typhimurium*의 변이주인 TA98과 TA100을 이용한 결과 장생 도라지 추출물 자체의 각 농도증가에 따른 돌연변이 colony수의 변화를 증류수와 비교하여 관찰하였다.

항돌연변이원성 실험

Ames와 Maron⁽¹⁸⁾의 방법에 따라 미리 멸균시킨 cap tube에 시료 50 µL, 돌연변이원 50 µL, S9 mixture 500 L, 균주 100 µL를 넣고 37°C에서 20분간 전배양시켰다. 이것을 histidine과 biotin을 함유한 2 mL의 top agar용액에 혼합한 후 최소 평판배지(minimum glucose agar plate)에 골고루 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀변이주의 colony수를 계수하였다. 실험에 사용한 돌연변이원으로 IQ는 균주별로 0.02 µg, 2 µg을 사용하였고, MNNG는 0.1 µg, 0.01 µg을 각각 사용하였다. 장생 도라지 분획물의 농도는 200, 1000, 2000, 4000 µg/plate로 사용하였고, 항돌연변이 활성은 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율로 나타내었으며 아래의 식으로 산출하였다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = M - S_i \times 100$$

$$M - S_0$$

M: 돌연변이원이 존재할 경우의 복귀 돌연변이 균수

S₀: 자연 복귀 돌연변이 균수

S_i: 시료를 첨가하였을 때의 복귀 돌연변이 균수

결과 및 고찰

돌연변이원성 시험

장생 도라지의 메탄올 추출물이 돌연변이 유발성에 어떤 영향이 있는가를 검토하기 위하여 추출물을 실험균주에 대해 plate당 200, 1000, 2000 및 4000 µg의 농도로 첨가하여 조사한 결과는 Table 1과 같다. Table에서 보는 바와 같이 TA98과 TA100 균주에 대한 추출물의 농도 증가에 따른 colony 수의 변화는 없었으며 증류수와 추출물의 각 농도에 따른 colony 수가 비슷하게 나타났다. 이와 같은 결과로부터 메탄올 추출물 자체에는 돌연변이원성과 독성이 없는 것으로 판단되었으며, 실험에 사용한 돌연변이 물질의 농도는 dose response 실험을 통하여 결정하였다.

메탄올 추출물의 농도별 항돌연변이원성

장생 도라지의 메탄올 추출물을 예비실험과 마찬가지로 plate당 200, 1000, 2000, 4000 µg의 농도로 첨가하여 항돌연변이원성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. TA98 균주에 대하여 양성변이원 물질로 직접변이원 물질인 MNNG(0.1 µg)와 S-9 mix를 필요로 하는 간접변이원물질인 IQ(0.02 µg)를 사용하였다. 변이원 물질에 대한 억제율은 농도증가에 따라 증가하였는데, 4000 µg/plate의 농도를 첨가하였을 때 MNNG에 대해 80.2%의 억제율을 보였고, IQ는 89.0%의 억제율을 보였다. TA 100에 대해서는 MNNG(0.01 µg)와 IQ(0.2 µg)를 사용하여 실험한 결과 직접변이원물질인 MNNG는 90.1%의 억제율을 보인 반면에 간접변이원물질인 IQ는 75.4%의 억제율을 나타내었다.

이상과 같이 IQ와 MNNG에 대한 장생 도라지 메탄올 추출물의 돌연변이 유발 억제 효과는, 돌연변이 유발원에 따라 약간의 차이를 나타내었으나 IQ와 MNNG가 우리의 식생활에서 흔히 발생될 수 있고, 한국인에게 많이 발생되는 위암과 간암에 관계가 있는 발암물질임을 감안할 때 큰 의미를 가질 것으로 판단된다.

Table 1. Mutagenicity test of methanol extract of *Platycodon grandiflorum* using *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100

Dose of methanol extract (µg/plate)	Strains (His ⁺ revertants/plate) ¹⁾	
	TA98	TA100
200	53	167
1000	20	207
2000	24	202
4000	45	141
Distilled water ²⁾	41	210

¹⁾Data are means of 5 plates

²⁾Negative control: 0.1 mL/plate

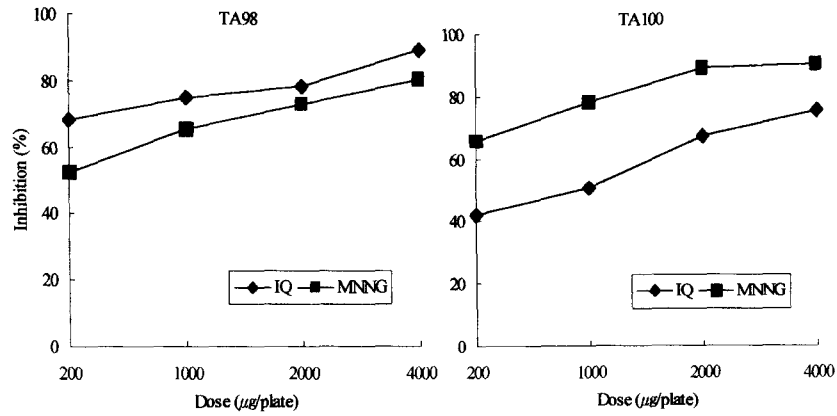


Fig. 1. Antimutagenic effects of methanol extract of *Platycodon grandiflorum* against mutagens on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. IQ (TA98, 0.02 µg/plate; TA100, 0.2 µg/plate), MNNG (TA98, 0.1 µg/plate; TA100, 0.01 µg/plate)

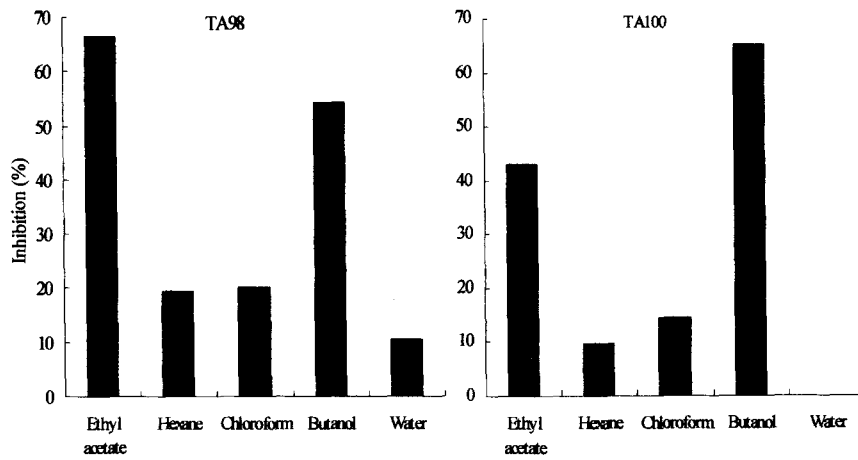


Fig. 2. Antimutagenic effects of solvent fraction of *Platycodon grandiflorum* against MNNG (0.1 µg, 0.01 µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

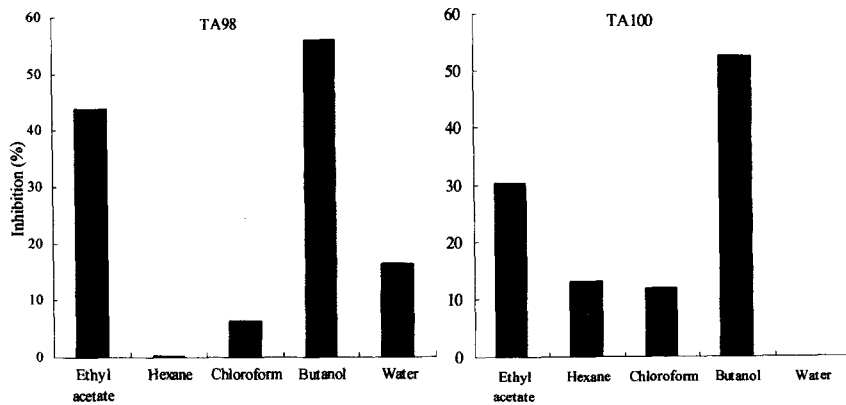


Fig. 3. Antimutagenic effects of solvent fraction of *Platycodon grandiflorum* against IQ (0.02 µg, 0.2 µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

메탄올 추출 용매분획물의 항돌연변이원성

돌연변이 유발 억제효과를 나타내는 장생 도라지 성분들의 특성을 검토하고자 장생 도라지 메탄올 추출물을 각 분획별로 나누어서 IQ와 MNNG를 사용하여 돌연변이 유발 억제효과를 알아보았다. plate당 200 µg의 농도를 첨가하여 실험한 결과는 Fig. 2와 3과 같다.

Fig. 2에서 장생 도라지 메탄올 추출물의 분획물중 에틸아세테이트층과 부탄올층이 효소활성화 단계를 필요로 하지 않는 직접 돌연변이 물질인 MNNG사용시 *S. typhimurium* TA98은 66.4%와 54.2%의 저해율을 보였고, *S. typhimurium* TA100사용시 42.9%와 65%의 저해율을 보였다. Fig. 3에서는 변이원 활성화를 위하여 S-9 mixture를 필요로 하는 간접돌

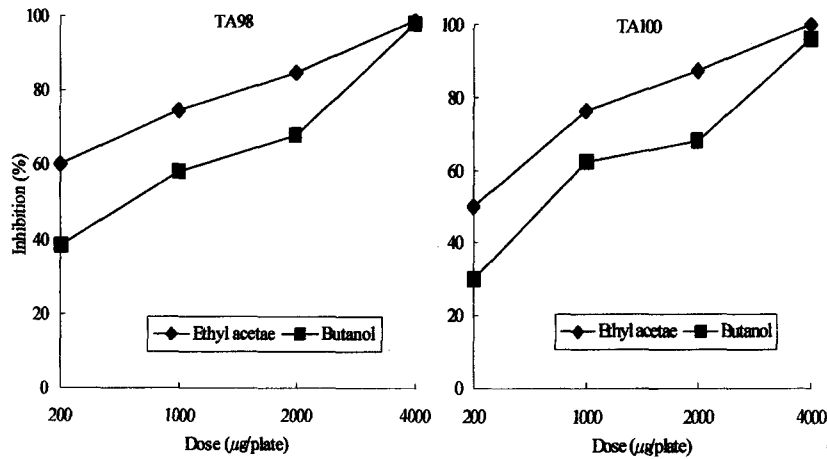


Fig. 4. Antimutagenic effects of ethyl acetate and butanol fractions of *Platycodon grandiflorum* against MNNG (0.1 µg, 0.01 µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

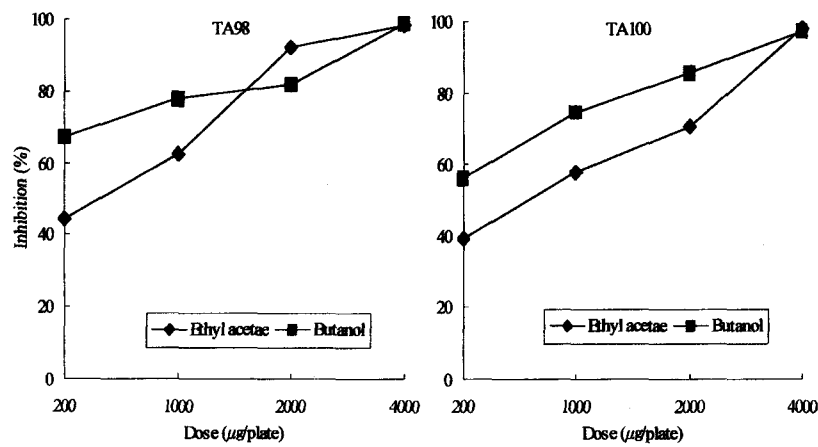


Fig. 5. Antimutagenic effects of ethyl acetate and butanol fractions of *Platycodon grandiflorum* against IQ (0.02 µg, 0.2 µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

연변이 물질인 IQ를 사용하여 억제효과를 검토한 결과, *S. typhimurium* TA98을 사용할 경우 44.0%와 56.0%의 돌연변이 억제효과를 나타내었으며, *S. typhimurium* TA100을 사용할 경우, 30.1%와 52.4%의 저해율을 보였다. 그러나 핵산, 클로로포름 및 물층은 0~10%의 비교적 낮은 저해율을 보인 바, 균이나 돌연변이원의 종류에 따라 항돌연변이에 상당한 차이를 나타내었다^(19,20). 이것은 장생 도라지 추출물의 성분 중 생리활성물질이 다양하게 분포되어 있음을 예측케하였다. 서 등⁽²¹⁾은 식용식물의 항변이원성에 관한 연구에서 도라지의 70%에탄올 추출물중 주요 천연성분으로 mitomycin C를 유발하는 변이원성을 억제시키는 물질이 존재할 가능성이 있음을 보고하였고, Ham 등⁽²²⁾은 약용식물인 강원도산 당귀(*Angelica gigantis*)의 추출물이 MNNG에 대하여 항돌연변이활성을 나타낸다고 보고하였다.

에틸아세테이트 및 부탄올층의 농도별 항돌연변이원성

돌연변이 유발 억제효과를 나타내는 에틸아세테이트층과 부탄올층을 plate당 200, 1000, 2000, 4000 µg의 농도로 첨가하여 농도증가에 따른 돌연변이 억제효과를 살펴 본 결과는 Fig. 4 및 5와 같다. Fig. 4에서 직접돌연변이 물질인 MNNG

를 사용한 경우 *S. typhimurium* TA98에서 에틸아세테이트층과 부탄올층의 저해율은 추출물을 최저로 첨가한 농도(200 µg/plate)에서 각각 62.3%와 38.2%의 저해율을 보이다가 4000 µg/plate에서는 98.9%, 98.0%의 높은 저해율을 나타내었으며, *S. typhimurium* TA100에서는 이들 두 층의 저해율은 각각 50.0%와 30.0%로써 농도의존적으로 저해율의 수치가 높아져 4000 µg/plate에서는 각각 100%와 95.8%의 저해율을 나타내었다. Fig. 5에서는 간접돌연변이 물질인 IQ를 사용하여 저해율을 살펴본 결과, *S. typhimurium* TA98에서 200 µg/plate사용시 에틸아세테이트층과 부탄올층의 저해율은 각각 44.4%와 56.3%였으나, 4000 µg/plate에서는 98.6%와 98.9%의 높은 저해율을 나타내었으며, *S. typhimurium* TA100을 사용한 경우, 200 µg/plate에서 각각 39.3%, 56.3%의 저해율을 나타내다가 4000 µg/plate에서는 98.2%와 97.1%의 저해율을 보였다.

이와 같은 연구결과로부터 장생도라지 추출물의 활성은 수용성, 지용성으로 양분되어 있으며, 수용성 생리활성 성분은 사포닌을 비롯한 아미노산, 섬유소 및 indole화합물의 효과로 추측되며, 또한 앞으로 연구해야할 미지의 성분 때문인 것으로 생각된다. 그리고 지용성 분획물의 돌연변이 유발억제

과는 이 등⁽²³⁾의 연구에 의하면 도라지 석유에테르 추출물의 유효성분이 항암활성을 나타낸다는 보고와 유사하며, 이러한 결과들은 장생 도라지가 가지고 있는 리놀렌산과 여러 사포닌 종류의 약리성분에 기인한 결과라 생각되며, 또한 미확인 의 복합 물질들도 관여한 것이라 추측된다. 따라서 앞으로 장생 도라지 추출물의 돌연변이 억제기전에 대한 연구와 활성 물질 분리 동정에 대한 연구가 절실히 요구된다.

요 약

장생 도라지의 메탄올 추출물과 분획물들의 돌연변이 유발 억제 효과를 조사하기 위하여 IQ와 MNNG를 사용하여 Ames mutagenicity test를 검토하였다.

장생 도라지 메탄올 추출물의 돌연변이원성은 없었으며, 또한 메탄올 추출물의 농도 증가에 따른 돌연변이 억제 효과는 상당히 높게 나타났다. 그리고 메탄올 추출물의 분획물 중 에틸아세테이트층과 부탄올층에서 돌연변이 억제 효과가 인정되었으며, 농도 증가에 따라 colony 수가 감소하였다. *S. typhimurium* TA98과 TA100 균주와 각 돌연변이 물질에 따라 돌연변이 억제효과는 다소간의 차이가 있었으나, 장생 도라지의 약리 성분은 대사 활성화 과정의 돌연변이 억제 효과뿐만 아니라, 체내 세포에 직접적으로 영향을 미치는 직접 돌연변이원에 대해서도 억제효과가 관찰되었다.

문 헌

- Lee, E.B.: Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum*. Kor. J. Phamarogr., 5, 49-56 (1974)
- Hwang, W.I.: A study on the growth inhibition of human colon cancer cells by eucommial leaf extract. Korean J. Food Nutr., 5, 13-19 (1992)
- Lee, C.S., Ju, J.S. and Hwang, W.I.: The inhibitory effect of water extracts of the trichosanthes semen and sinapsis semen against some cancer cells growing. Korean University Medical Journal, 20, 39-45 (1983)
- Lee, T.H., Paik, J.M. and Hwang, W.I.: Effect of *Prunus mume* extract on the growth rate of animal leukemic cells(L1210, P388) and human colon cancer cells(HRT-18, HCT-48, HT-29). Korean University Medical Journal, 25, 365-370 (1988)
- Lee, S.I.: Chinese pharmaceuticals. Soo Seo Won, p.129(1981)
- Kubota, T., Kitatan, H. and Hinoh, H.: The structure of platycodigenic acid A, B and C further triterpenoid constituents of *Platycodon grandiflorum* A. De. Candolle. Chemical Commun, 22, 1314-1320 (1969)
- Akiyama, T., Tanaka, O. and Shibata, S.: Chemical studies on the oriental plant drugs XXX. Sapogenins of the roots of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. (1) Isolation of the sapogenins and the stereochemistry of polygalacic acid. Chem. Phrm. Bull., 20, 1945-1951 (1972)
- Sung, N.J., Lee, S.J., Shin, J.H., Lee, I.S. and Chung, Y.C.: Effects of *Platycodon grandiflorum* extract on blood glucose and lipid composition in alloxan induced hyperglycemic rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 25, 986-992 (1996)
- Chung, J.H., Shin, P.G., Ryu, J.C., Jang, D.S., and Cho, S.H.: Chemical compositions of *Platycodon grandiflorus*(jacquin) A. De Candolle. Agr. Chem. Biotechnol., 40, 148-151 (1997)
- Shimoi, K. and Tomita, I.: Mutagens and antimutagens in the living environment. Eisei Kagaku, 37, 149-154 (1991)
- Olson, J.A.: Biological actions of carotenoids. J. Nutr., 110, 94-102 (1989)
- Hwang, J.B., Yang, M.O., and Shin, H.K.: Survey for amino acid of medicinal herbs. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 35-41 (1998)
- Jang, J.G., Lee, K.S., Kwon, D.W., Nam, K.Y. and Choi, J.H.: Study on the changes of saponin contents in relation to root age of *Panax ginseng*. Korean J. Food Nutr., 12, 37-43 (1983)
- Kim, J.Y. and Staba, E.J.: Saponins and sapogenins from American ginseng plants. Kor. J. Pharmacogn., 4, 193-196 (1973)
- Ong, T.M., Whong, W.Z., Stewart, S. and Brockman, H.E.: Chlorophyllin; a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. Mutat. Res., 173, 111-117 (1986)
- Morita, K., Hara, M. and Kada, T.: Studies on natural desmutagen: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation on mutagenic pyrolysis products from amino acids. Agric. Biol. Chem., 42, 1235-1241 (1978)
- Meng, Z.M., Sakai, Y., Ose, Y., Sato, T., Nagase, H., Kito, H., Sato, M., Mizuno, M., Ono, K. and Nakane, H.: Antimutagenic activity by the medicinal plants in traditional Chinese medicines. Shoyakaku Zasshi, 44, 225-231 (1990)
- Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res., 113, 173-215 (1983)
- Calle, L.M. and Sullivan, P.D.: Screening of antioxidants and other compounds for antimutagenic properties towards benzo(a)pyrene-induced mutagenicity in strain of *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res., 101, 99-106 (1982)
- Tatematsu, M., Takahashi, M., Fukushima, S., Hananouchi, M. and Shirai, T.: Effect in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. J. Nati, Cancer Inst., 55, 101-107 (1975)
- Seo, J.S., Lee, Y.W., Suh, N.J. and Chang, I.M.: Assay of antimutagenic activities of vegetable plants. Kor. J. Pharmacogn., 8, 1-7(1977)
- Ham, M.S., Kim, S.S., Hong, J.S., Lee, J.H., Chung, E.K., Park, Y.S. and Lee, H.Y.: Screening and comparison of active substances of *Angelica gigas* Nakai produced in Kangwon and *Angelica acutiloba* Kitagawa produced in Japan. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 624-629 (1996)
- Lee, J.Y., Hwang, W.I., Lim, S.T.: Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 13-21 (1998)

(2001년 4월 26일 접수)