

Ames Test에 의한 정유의 돌연변이원성

박 희 준

상지대학교 응용식물과학부

Mutagenicity of the Essential Oils in Ames Test

Hee-Juhn Park

Division of Applied Plant Sciences, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – Mutagenic activity of essential oils was tested using *Salmonella typhimurium* TA100 in the presence or absence of S9 fraction prepared from the mouse liver. Growth inhibitory effect of the oils on the bacteria was measured to warrant the mutagenic effect. Most oils were found to be very strongly toxic against the bacteria at a high dose (2,000 µg/plate). At lower doses than this concentration, the *Curcuma longa* oil was found to be the most mutagenic with S9 fraction whereas it was not mutagenic without the fraction suggesting that this oil could undergo activation for the mutagenicity by cytochrome P450. However, the mutagenicity of the *Eugenia caryophyllata* oil was disappeared under S9 fraction. Other oils obtained from *Cinnamomum cassia*, *Chrysanthemum sibiricum*, *Paeonia moutan*, the flower of *Artemisia princeps* var. *orientalis*, *Allium sativum*, were not mutagenic. This result suggested that antimutagenicity assay on the essential oil is necessary for the biological available substances.

Key words – Essential oil, mutagenic, S9 fraction

항암제는 천연물이나 또는 합성물로부터 개발될 수가 있고 전자에 대해서는 항암약물을 위하여 다각도로 연구되고 있다. 천연물의 항암효과에 대해서는 테르페노이드, 스테로이드, 페놀성 화합물, 알칼로이드 및 다당체 등에 대하여 항암효과를 나타낸다는 보고가 수없이 많다.

이러한 항암효과를 구명하기 위하여 여러가지의 검색과정이 있을 수 있지만 특히 세포독성을 검색함을 첫 단계로 하는 수가 많다. 이러한 세포독성 효과는 apoptosis 유도효과¹⁾ 혹은 괴사²⁾를 기전으로 하는 효과 등이 있을 수 있겠으나 주로 전자를 이용한 항암약물의 개발을 위한 연구가 많이 이루어지고 있다. 저자는 여러가지의 항암에 관한 물질을 식물성분으로부터 검색하는 가운데 주로 비극성 화합물 중에서 세포독성 효과가 우수한 경우가 많았으며 apoptosis 기전연구에 있어서도 비교적 일관성과 재현성 있는 결과들이 용이하게 얻어졌다. 또한, 친핵적 항산화제에 의해 세포독성 효과가 차단되는 cinnamaldehyde 경우에서와 같이 이들 정유들은 주로 친전자적 작용에 의한 세포독성을 나타낼 것으로 추측된다.³⁾

정유는 휘발성 식물성분의 총칭으로서 그 구조가 다양하지만 주로 monoterpene, sesquiterpene이 많고 또 일부는 phenylpropanoid계의 방향족 화합물들도 많다. 정유는 향기를 나타내는 특징을 가지는 경우가 많기 때문에 기능성 식품의 개발 및 정유로서의 노화질환개선을 위한 각종의 보고서들이 많다. 주로 이들 물질의 항노화작용은 NO 저해효과,⁴⁾ P450 저해효과⁵⁾ 등과 관련이 있는 경우가 많고 유효 화합물의 친전자성에 의거한 경우가 대부분이다. 그러므로, 이들 화합물들은 높은 농도에서 세포독성을 나타낸다.

이러한 정유를 기능성물질로 활용하기 위해서는 돌연변이성이 있는가 없는가 하는 점이 발암성과 관련하여 매우 중요하다고 할 수가 있다. 그런 의미에서 본 연구에서는 Ames 박사가 개발한 *Salmonella typhimurium* TA100을 이용하여 S9 fraction의 존재유무에 따른 뜻있는 결과를 얻었으므로 이를 보고한다.

실험방법

식물재료 – 본 실험에 사용된 식물재료는 계피(*Cinnamomum cassia*의 수피), 구절초(*Chrysanthemum sibiricum*의 전초),

*교신저자(E-mail) : hjpark@mail.sangji.ac.kr

목단피(*Paeonia moutan*의 근피), 강황(*Curcuma longa*의 근경), 쑥 꽃(*Artemisia princeps* var. *orientalis*), 마늘(*Allium sativum*의 신선한 인경), 정향(*Eugenia caryophyllata*)의 꽃봉오리를 각각 사용하였다. 이 중 계피, 강황, 목단피, 정향은 강원도 원주시 천일약업사에서 구입하고 감정한 후 사용하였으며 마늘은 강원도 원주 중앙시장에서 구입한 것을 사용하였으며 쑥은 강원도 횡성군 태기산에서 10월경 채집한 후 사용하였다. 마늘의 경우는 정유의 추출전까지 신선한 채로 4°C에 보관하였다.

추출 - 7종의 식물재료의 정유를 추출하기 위하여 수증기증류 장치에서 0.5-2.0 kg을 평량하여 각각 6시간 증류하였다. 단 마늘의 경우에 한해서 마늘의 조직을 분쇄한 후 1시간 이후 증류하였다. 증류물을 에테르로 3회 분획한 후 분획물을 무수 Na₂SO₄로 탈수한 후 건조하였다. 이렇게 하여 얻어진 정유의 수득량은 강황정유 0.15%, 쑥 꽃 정유 0.12%, 목단피 정유 1.6%, 마늘 정유 0.09%, 구절초 정유 0.15%, 계피 정유 1.13%, 정향 정유 1.26%로 각각 나타났다. 이들을 -5°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

Salmonella typhimurium TA 100의 증식 억제효과 실험 - 먼저 사면배지에 배양된 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 1백균이를 취해 10 ml nutrient broth에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후 실온에서 건조한 두께 4-5 mm인 plate에 균액 0.2 ml를 주입하여 멸균된 면봉으로 균일하게 펼치고 멸균된 8 mm paper disc(Toyo Roshi Kaisha)를 넣고 각 정유 추출물을 soluble solid의 함량이 50 µl/disc가 되도록 흡수시킨 다음 30°C에서 24-49시간동안 배양한 후 disc 주위의 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 비교하였다.

Ames test - *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성인 *Salmonella typhimurium* TA 100을 미국 California university(Berkerley 분교)의 Ames 박사로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 그리고, 실험 전에 정기적으로 histidine 요구성, *rfa*, *uvr-B* 돌연변이와 R factor에 대한 유전형질을 확인하였다.

S9 fraction과 S9 mixture는 Maron과 Ames⁶⁾의 방법에 따라 제조하여 정유의 돌연변이유발실험을 위해 사용하였다. 돌연변이 유발실험은 preincubation test를 사용하였다. 즉, 0.5 ml의 S9 mixture, 하룻밤 배양된 균주(1-2×10⁹ cells/ml) 0.1 ml와 정유를 병냉의 멸균한 cap tube에 첨가하고 가볍게 vortex하였다. 그리고, 37°C에서 30분간 예비배양한 후 45°C의 top agar 2 ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하였다. 그 후 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 수를 계산하였다. 그리고 통계처리하는 하지 않았다.

Table I. Growth inhibitory effect of various kinds of oil in the *Salmonella typhimurium* TA100

Essential oil (µg/plate)	Revertants/plate				
	125	250	500	1000	2000
<i>C. cassia</i> ¹⁾	-	-	+	++++	+++++
<i>C. sibiricum</i> ²⁾	-	-	+	++++	+++++
<i>P. moutan</i> ³⁾	-	-	-	-	+++++
<i>C. longa</i> ⁴⁾	-	+	+++	++++	+++++
<i>A. princ. var. orientalis</i> ⁵⁾	-	-	-	++	+++++
<i>A. sativum</i> ⁶⁾	-	+	++	+++++	+++++
<i>E. caryophyllata</i> ⁷⁾	-	-	-	-	+++++

-: No toxic

+: Very weakly toxic (below 20%)

++: Somewhat toxic (20-40%)

+++ : Certainly toxic (40-60%)

++++: Strongly toxic (60-80%)

+++++: Very strongly toxic (over 80%)

Plant part: ¹⁾stem bark, ²⁾herb, ³⁾stem bark, ⁴⁾rhizome, ⁵⁾herb, ⁶⁾bulb, ⁷⁾bud

Table II. Effect of various kinds of oil on the mutagenicity in the *Salmonella typhimurium* TA100 without S9 fraction

Essential oil (µg/plate)	Revertants/plate			
	62.5	125	250	500
<i>C. cassia</i>	94±2 ¹⁾	97±1	98±7	- ²⁾
<i>C. sibiricum</i>	95±3	94±1	212±6	289±4
<i>P. moutan</i>	95±3	97±2	95±1	205±5
<i>C. longa</i>	96±4	96±1	95±1	205±8
<i>A. princeps var. orientalis</i>	96±3	93±3	94±1	254±11
<i>A. sativum</i>	210±4	267±9	332±5	-
<i>E. caryophyllata</i>	96±1	95±4	96±2	819±2
Spontaneous	105±11			

¹⁾Values represent meanS.D. based on three experiments.

²⁾not tested

Table III. Effect of various kinds of oil on the mutagenicity in the *Salmonella typhimurium* TA100 with S9 fraction

Essential oil (µg/plate)	Revertants/plate			
	62.5	125	250	500
<i>C. cassia</i>	93±1	93±2	88±2	-
<i>C. sibiricum</i>	93±1	95±3	96±2	210±7
<i>P. moutan</i>	96±1	91±1	93±2	115±12
<i>C. longa</i>	96±1	95±2	204±9	1246±11
<i>A. princeps var. orientalis</i>	100±3	97±1	92±1	228±14
<i>A. sativum</i>	97±3	181±12	293±1	-
<i>E. caryophyllata</i>	96±1	96±1	94±3	155±8
Spontaneous	95±2			

¹⁾Values represent meanS.D. based on three experiments.

²⁾not tested

결과 및 고찰

정유 중에서 세포독성 뿐 아니라 항균효과^{7,8)}를 나타낸다는 보고가 많기 때문에 돌연변이원성의 조사를 위하여 먼저 *S. typhimurium* TA100에 대한 항균성을 먼저 조사하였는데 그 결과를 Table I에 나타내었다. 모든 정유들이 2,000 µg/plate의 상대적으로 높은 농도에서 아주 강한 항균효과를 나타내었다. Table I에 나타낸 대로 계피, 구절초는 500 µg/plate에서는 아주 약한 항균효과를 나타내었으며 목단피, 쑥꽃 및 정향은 전혀 항균효과를 나타내지 않으며 강황은 확실히 항균효과가 있으며 마늘의 경우는 어느 정도 항균효과가 있다고 할 수가 있다.

그러므로 7개 생약 정유의 돌연변이원성을 62.5–500 µg/ml의 dose로 *S. typhimurium* TA100 균주의 돌연변이효과를 revertants를 계수함으로써 판정하였다. S9 fraction의 작용유무에 의해서 어떻게 변하는지를 동시에 실험하였는데 Table II의 결과는 S9 fraction이 없이 incubation한 결과를 나타내고 Table III은 S9 fraction의 존재 하에서 incubation하고 계수한 결과를 나타낸다.

Table II에서 대부분의 정유들은 S9 fraction이 존재하지 않을 때에는 심각한 돌연변이원성을 나타내지 않았으나 정향은 500 µg/plate에서 강한 돌연변이원성 효과를 나타내었다. 반면에 S9 fraction을 처리한 경우의 결과를 나타낸 Table III에 나타낸 바와 같이 정향은 Table II의 결과와는 달리 돌연변이원 효과가 거의 사라진다. 반면에, 강황의 경우는 아주 약한 돌연변이원 효과가 S9 fraction을 처리함에 따라 오히려 돌연변이 효과가 매우 크게 나타났다. Table II와 III의 결과를 종합하면 정향은 S9 fraction의 존재없이 돌연변이원성이 있으며 존재 하에 그 효과가 사라지며 강황은 그 반대로서 S9 fraction의 존재 하에 아주 큰 돌연변이원성 효과를 나타낸다는 것이 증명되었다. 이 사실은 실제로 동물에 투여되었을 때 발암제로서 가능성이 있는 것은 강황의 정유라 할 수가 있다.

이상의 사실로서 여러 가지의 고찰이 가능하지만 몇 가지 중요한 사실을 열거하면 계피, 구절초, 목단피, 쑥꽃, 마늘의 정유는 유전독성이라는 측면에서 보면 아주 안전하게 사용될 수 있다고 말할 수 있으며 강황 정유는 현 연구의 결과로 발암성을 나타낼 가능성이 매우 높다. 또 계피의 경우는 cinnamaldehyde의 함유로 높은 *in vitro* 항암성과⁹⁾ *in vivo* 항암성¹⁰⁾이 보고되었으므로 현연구의 결과는 계피의 항암제로서의 가능성을 아주 높여주는 중요한 계기를 보여준다고 할 수가 있다. 또한 계피가 높은 친전자성을 가지는 cinnamaldehyde 등의 성분을 함유하였다고 하더라도³⁾ 현실 농도에서 돌연변이 유발능이 없는 것과 이미 보고된 바

와 같이 항돌연변이 효과를 갖는 것은¹¹⁾ P450의 저해에 따르는 free radical의 감소가 더 항돌연변이에 직접적으로 기여하는 것으로 예상할 수가 있다.⁵⁾

저자들에게 의한 연구 중에서 많은 정유가 acetaminophen으로 유도한 지질과산화물을 저해한다는 보고를 하였지만¹²⁾ 생리활성 정유의 개발을 위해서는 그 물성과 관련하여 돌연변이원성에 대한 고찰이 꼭 필요한 실정이라고 생각된다.

사 사

본 연구는 2001학년도 상지대학교 교수연구비에 의해서 수행되었습니다. 본 실험을 도와주신 부산대학교 식품영양학과 정근옥 연구원께 감사드립니다.

인용문헌

1. Park, H. J., Kwon S. H., Han Y. N., Choi J. W., Miyamoto K., Sung Ho Lee and Lee, K. T. (2001) Apoptosis-Inducing Costunolide and a Novel Monoterpene from the Stem Bark of *Magnolia sieboldii*, *Arch. Pharm. Res.* **24**: 342-348.
2. Trump, B. F., Berezsky, I. K., Chang, S. H. and Phelps, P. C. (1997) The pathway of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis, *Toxicol. Pathol.*, **25**: 82-88.
3. Choi, J., Lee, K. T., Ka, H., Jung, W. T. and Park, H. J. (2001) Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties, *Arch. Pharm. Res.*, **24**: 418-423.
4. Park, H. J., Jung, W. T., Basnet, P., Kadota, S. and Namba, T. (1996) Syringin 4-O-glucoside, A New Phenylpropanoid Glycoside and Costunolide, Nitric Oxide Synthase Inhibitor from the Stem Bark of *Magnolia Sieboldii*, *J. Nat. Prod.* **59**: 1128-1130.
5. Beedam, C. (1997) The role of non-P450 enzymes in drug oxidation, *Pharm. Sci.* **19**: 255-63.
6. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
7. Chang, S. T., Chen, P. F. and Chang, S. C. (2001) Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*, *J. Ethnopharmacol.* **77**: 123-127.
8. 박희준, 권상혁, 이명선, 김갑태, 정원태(2000) 배초향 지상부에서 얻은 정유의 조성과 항균효과, *한국식품영양과학회지* **29**: 1123-1126.
9. Park, J. Y., Kwon, B. M., Chung, S. K. and Kim, J. H. (2001) Inhibitory effect of 2-O-benzoylcinnamaldehyde on vascular endothelial cell proliferation and migration, *Ophthal. Res.* **33**: 111-116.
10. Lee, C. W., Hong, D. H., Han, S. B., Park, S. H., Kim, H. K.,

- Kwon, B. M. and Kim, H. P. (1999) Inhibition of human tumor growth by 2-hydroxy- and 2-benzoylcinnamaldehydes, *Planta Med.* **65**: 263-266.
11. Shaughnessy, D. T., Setzer, R. W. and DeMarini, D. M. (2001) The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in Salmonella TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites, *Mut. Res.*, **480**: 55-69.
12. Choi, J., Lee, K.T., Jung, W. T., Jung, H. J., Lee, S. H. and Park, H. J. (2002) Inhibitory effects of the essential oils on acetaminophen-induced lipid peroxidation in the rat, *Nat. Prod. Sci.* **8**: 18-22.

(2002년 7월 10일 접수)