

담배연기응축물로 유도된 돌연변이와 구절초 추출물의 억제 효과

이진희 · 임흥빈[†]

충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과

Inhibitory Effect of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* Kitamura Extracts against Mutagenicity of Cigarette Smoke Condensates (CSC)

Jin Hee Lee and Heung Bin Lim[†]

Department of Industrial Plant Science & Technology, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, Chungju 361-763, Korea.

ABSTRACT : This study was carried out to investigate whether *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* Kitamura (*C. zawadskii*) extracts has an inhibitory effect against the mutagenicity by cigarette smoke condensates (CSC). *C. zawadskii* was extracted with 70% ethanol and the yield was 18.5%. We further fractioned 70% ethanol extract sequentially to diethyl-ether, chloroform, dichloromethane, and aqueous water, and gained the yield of 17.5%, 5.6%, 5.8%, 32.8% and 35.5%, respectively. In the Ames test, there was no mutagenic effect of crude extract and its solvent fractions up to 2 mg/plate toward *Salmonella typhimurium* TA 98 with or without S-9 mix metabolic activations. On the contrary, the crude extract showed an inhibitory activity against the mutagenicity of CSC in the presence of S-9 mix metabolic activation. Diethyl ether layer among five solvent fractions showed the highest inhibitory activity. The inhibitory activity of diethyl ether fraction was also increased in a dose-dependent manner and the inhibitory rate was about 97.7% at the concentration of 1 mg/plate. In this study, we conclude that crude extract of *C. zawadskii* itself is potentially safe for mutagenicity, and the diethyl ether fraction has an inhibitory effect against the mutagenicity of CSC.

Key Words : Ames Test, *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* Kitamura, Cigarette Smoke Condensates, Mutagenicity, Inhibitory Effect

서 언

최근 암을 치료하고, 암의 전이를 차단하기 위하여 부작용이 적으면서도 경제적인 부담을 덜 수 있는 약재나 성분을 천연물에서 찾기 위한 연구가 많이 시도되고 있다 (Ha *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2010; Ha *et al.*, 2009). 천연물은 생합성 산물인 1차, 2차 대사물로 구성되어 있다. 1차 대사물은 식물자원에 공통적으로 분포하는 것이며, 2차 대사물은 어느 특정식물에 국한하여 분포하는 것으로 일반적으로 함량을 적지만 다양한 생리활성을 갖는다. 변이원성이라는 시각으로 볼 때 2차 대사물에는 돌연변이를 유발하는 성분도 다수 존재하지만 (Brusick, 2008) 이와는 반대로 돌연변이를 억제하는 성분도 다수 존재한다는 연구 결과가 발표되고 있다 (Mosovska *et al.*, 2010; Wongwattanasathien *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2009).

구절초는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 전초를 구절초

라 하여 한방이나 민간에서 폐렴, 기관지염, 기침, 감기, 인두염, 방광질환, 부인병, 냉증, 위장병 및 고혈압 등에 사용되고 있다. 구절초 성분에 관한 연구로는 flavonoid계 화합물인 linarin (Lee, 1967), carotenoid계 화합물인 16개의 xanthophylls (Kishimoto *et al.*, 2004), monoterpene계 화합물인 camphor과 borneol (Ye and Deng, 2009), sesquiterpene lactone계 화합물인 angeloylcumambrin B, cumambrin A (Yang *et al.*, 1996), sterol화합물인 campesterol (Choi *et al.*, 2007) 그리고 정유성분 (Shin and Choi, 1982; Marongiu *et al.*, 2009) 등이 보고되고 있다. 또한 구절초의 생리 활성에 관한 연구로는 구절초 꽃에서 분리한 angeloylcumambrin B, tigloylcumambrin B 등이 그람 양성균인 *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus cereus* ATCC 27348과 그람 음성균인 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 6677, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10490에 항균활성이 있으며 (Jang *et al.*, 1997), 잎줄기 추출물은 페놀성 물질 함량 및 free radical 소거활성이 우

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-294-7129 (E-mail) heungbin@chungbuk.ac.kr

Received 2011 May 9 / 1st Revised 2011 June 15 / 2nd Revised 2011 June 16 / Accepted 2011 June 17

수하고 (Woo *et al.*, 2010), 구절초 전초의 Chloroform 분획물에서 구조 동정된 acacetin이 결장암, 신장암의 인체암 세포주에서 유의할 만한 세포독성을 나타낸다는 (Kwon *et al.*, 2006) 연구 결과 등이 있다. 한편, 예비실험에서 한약재 23종의 조추출물을 제조하고, 돌연변이 원성과 담배연기응축물을 이용한 돌연변이 억제활성을 조사했을 때 구절초 조추출물은 상대적으로 돌연변이 억제활성이 우수하였다. 그러나 돌연변이에 대한 구절초의 연구결과는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 구절초를 70% 에탄올로 추출하고, 이를 다시 극성에 따라 diethyl ether, chloroform, dichloromethane, butanol, water 순으로 분획한 다음, 돌연변이원으로 담배연기응축물을 이용하여 *Salmonella typhimurium* TA 98균주로 Ames test를 실시하고, 구절초 조추출물과 그 분획물 자체의 안전성을 확인하였으며, 또한 이들이 담배연기응축물에 대한 돌연변이를 억제하는 효과가 있는지 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 시약

실험에 사용한 구절초 (*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* Kitamura)는 대한민국 정부지정 약초웰빙특구에서 분말형태의 시료를 구입하였다. 생산자는 제천학들 영농법인이고, 생산지는 경기도 가평군 하면이었다. 직접 돌연변이원인 4-nitroquinoline-n-oxide (4-NQ), 그리고 간접 돌연변이원인 2-aminoanthracene (2-AA), 또한 균주배양을 위한 agar, L-histidine 및 D-biotin 등의 시약은 Sigma-Aldrich (USA)의 제품을 사용하였다. 그 외 사용된 모든 추출용매 및 시약은 특급 이상을 사용하였다. 간의 이물질대사 효소군 S-9 mix (Molecular Toxicology, USA)을 구입하여 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

2. 사용균주

Ames test용 시험 균주는 구조 이동형 변이균주인 *Salmonella typhimurium* TA 98로서 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양받아 정기적으로 유전형질을 확인하면서 실험에 사용하였다. 유전형질은 Maron과 Ames 방법 (1983)에 따라 histidine 요구성, *uvrB* mutation 유지여부, R-factor 유지여부, *rfa* mutation 유지여부, 자발적 돌연변이수로 확인하였다. 유전형질이 확인된 균주는 nutrient broth no. 2 (Oxoid, USA)에 접종 배양하여 배양액 1mL당 dimethylsulfoxide (DMSO)를 0.09 mL 가하고 냉동보관용 용기에 채워 -70°C에 보관하였다. 보관된 냉동 균주를 실온에서 서서히 녹이고 0.4 mL 취하여 100 mL의 nutrient broth에 접종하고, 37°C에서 120 rpm으로 진탕배양 하였으며, 3차 계대배양으로 4시간 배양한 다음 시험에 사용하였다.

3. 구절초 조추출물 조제 및 용매 분획

70% 에탄올 용액에 구절초 분말 100 g을 넣고, 1 L로 한 다음 실온에서 3일간 3회 추출하고, 그 추출물을 감압 여과하여 농축시킨 다음 동결 건조하여 구절초 조추출물을 얻었다. 구절초 조추출물을 다시 극성에 따라 용매로 분획하였다. 먼저 조추출물을 증류수 200 mL에 현탁시킨 다음, 동량의 diethyl ether를 첨가하여 잘 혼합한 한 다음, 12~24시간 실온에 방치하여 두 층이 완전히 분리된 것을 확인하고, diethyl ether층만을 분리하여 diethyl ether분획을 얻었다. 그리고 diethyl ether분획을 분리하고 남은 물층에 다시 chloroform을 가하고 같은 방법으로 chloroform분획을 얻었다. 또한 계속해서 같은 방법으로 dichloromethane, butanol 순으로 물층에 첨가하여 dichloromethane과 butanol분획을 얻었으며, 남은 잔여물은 물분획으로 하였다. 각각의 모든 분획물은 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음 동결 건조하였다. 동결 건조된 diethyl ether, chloroform, dichloromethane과 butanol 분획은 DMSO에 그리고 물 분획은 PBS 7.4 용액에 각각 40 mg/mL의 농도로 각각 용해시킨 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하고 -70°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. 시험용 배지 및 용액 조제

Ames test를 하기 위한 배지중 his/bio plate는 증류수에 agar와 magnetic bar를 넣고 고압 멸균한 다음, 40% glucose 용액과 50×VB salts, histidine 및 biotin 용액을 뜨거울 때 잘 섞어준 뒤, petridish에 25 mL씩 분주하여 굳혀서 제조하였다. Biotin plate는 his/bio plate 제조법과 같으나 histidine 용액은 첨가하지 않고 제조하였다. Nutrient broth는 nutrient broth no. 2 분말 2.5 g을 증류수 100 mL에 첨가하여 제조하고 고압 멸균하여 사용하였다. 그리고 nutrient agar plate는 증류수 1 L에 nutrient broth no. 28과 agar 15 g을 넣고 고압멸균 후 petridish에 25 mL씩 분주하여 굳힌 다음 사용하였다. MGA plate는 증류수에 agar 15 g, 50×VB salts 용액 20 mL, 40% glucose 용액 50 mL넣고, 1 L로 맞춘 다음, 121°C에서 20분간 고압 멸균한 다음, 60°C까지 냉각하고, petridish에 25 mL 씩 분주하여 수분을 증발시킨 후 실험에 사용하였다.

Vogel-Borner medium E (50×VB salts) 용액은 증류수에 citric acid monohydrate 100 g, magnesium sulfate 10 g, potassium phosphate dibasic anhydrous 500 g, sodium ammonium hydrogen phosphate 175 g을 넣어 녹이고 증류수로 1 L로 맞춘 다음, 고압 멸균하여 사용하였다. Top agar 조제는 증류수에 agar 6 g과 NaCl 5 g 넣어 녹이고 증류수로 1 L가 되게 채운 다음, 고압 멸균하여 사용하였다. Histidine-biotin 용액 (H/B solution)은 증류수에 L-histidine 104.8 mg과

D-biotin 122.0 mg을 넣어 녹이고 증류수로 1 L가 되게 채운 다음, 고압 멸균하여 4°C 냉장고에 보관하면서 top agar 100 mL당 H/B solution 10 mL의 비율로 혼합하여 실험에 사용하였다.

5. 담배연기응축물(CSC) 포집

표준담배 3R4F 40개피를 자동흡연장치(Heinr Borgwaldt RM 20, Germany)를 이용하여 ISO 흡연조건(흡연부피: 35 mL, 흡연시간: 2초, 흡연주기: 1분, 풍초길이: tip paper + 3 mm) 하에서 연소시키고, 캄브리지 유리섬유필터를 이용하여 담배 연기응축물을 포집하였다.

6. 돌연변이원성 시험

구절초 조추출물과 각각의 용매분획물 그 자체가 돌연변이 원성을 나타내는지에 대한 조사는 Maron과 Ames방법 (1983)에 준하여 실시하였다. 즉 양성대조군으로는 직접 돌연변이원 4-NQO 0.5 µg/plate, 간접 돌연변이원 2-AA 0.5 µg/plate의 농도로 하였다. 그리고 구절초 조추출물 및 용매분획물의 농도는 125, 250, 500, 1,000, 2,000 µg/plate로 하였다. 직접 돌연변이원 성시험(-S-9 mix)에서는 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 500 µL를 사용하였으며, 대사활성 물질이 필요한 간접 돌연변이원의 시험(+S-9 mix)에서는 S-9 mix 500 µL를 사용하였다. 멸균된 시험관에서 14~16시간 배양한 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주 100 µL (1~2 × 10⁹ cells/mL)와 돌연변이원 100 µL를 각각 cap tube에 첨가한 다음 가볍게 3~5초 vortex한 후 37°C shaking incubator에서 30분간 예비 배양하였다. 그 후 45°C top agar 10 mL에 0.5 mM histidine/biotin 1 mL의 비율로 첨가하여 예비 배양이 끝난 cap tube에 2 mL씩 분주하고, 3~5초 가볍게 vortex한 후 최소한천배지에 도말하여 37°C incubator에서 48시간 배양하였다. 각각의 plate에서 복귀돌연변이 집락수(revertant colony)를 계수하여 돌연변이원성을 평가하였다.

7. 돌연변이 억제 시험

또한 Maron과 Ames방법 (1983)에 준하여 구절초 조추출물과 각각의 용매 분획물이 담배연기응축물에 대한 돌연변이를 억제하는 효과가 있는지 조사하였다. 즉 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주를 멸균된 시험관에 넣고 14~16시간 배양한 균주 100 µL (1~2 × 10⁹ cells/mL), 담배연기응축물 200 µg, S-9 mixture 500 µL, 구절초 조추출물 및 용매분획물 50 µL를 cap tube에 넣고 가볍게 3~5초 vortex한 다음, 37°C shaking incubator에서 30분간 예비 배양하였다. 그 후 45°C top agar 10 mL에 0.5 mM histidine/biotin 1 mL의 비율로 첨가하여 예비 배양이 끝난 cap tube에 2 mL씩 분주하고, 3~5초 가볍게 voltex한 후 최소한천배지에 도말하여 37°C

incubator에서 48시간 배양하였다. 각각의 plate에서 복귀 돌연변이 집락수를 계수하고, inhibition rate (%)를 계산하였다.

Inhibition rate는 다음 식에 의해 산출되었다.

$$\text{Inhibitions (\%)} = \frac{M - B}{M - A} \times 100$$

M : number of revertants by mutagen

A : number of spontaneous revertants

B : numbar of revertants when the sample and mutagen were added to the test strains

7. 통계처리

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 데이터 분석은 StatView version (4.0 Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA)을 이용하였고, Fisher's protected least significant difference test 혹은 Scheffe's F test에 의해 두 처리군 사이에 p값이 0.05보다 작은 값을 나타내었을 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 구절초 조추출물 및 극성별 분획

구절초 분말 시료 100 g을 70% 에탄올 1 L로 72시간 실온에서 3회에 걸쳐 추출했을 때 얻은 조추출물은 18.5 g이었다. 그러나 구절초 줄기를 동결건조하고 20배의 증류수를 가한 다음 진탕항온조에서 50°C 200 rpm으로 6시간 추출하고 그 상등액을 동결건조하여 얻은 수율 43%에 비해서는 낮은 수준이었다 (Lee and Lee, 2007). 이와 같은 결과는 추출재료 및 추출용매 그리고 추출방법에 차이가 있어서 나타나는 결과라고 판단된다. Table 1은 구절초 조추출물을 극성에 따라 다섯 개의 용매로 순차적으로 분획했을 때 얻어진 수율을 나타내고 있다. 순차분획물중 물 분획물 수율이 35.5%로 가장 높았고, 다음은 butanol 분획물로서 수율이 32.8%이었으며, chloroform 분획물의 수율은 5.6%로 다섯 개의 분획물 중에서 가장 낮은 수율을 나타내었다.

2. 담배연기응축물 적정 투여농도 조사

구절초 조추출물과 용매 분획물이 돌연변이 억제효과가 있는지 조사하기 위하여 시험배지에 투여할 담배연기응축물의 농도를 결정하였다. 3R4F 표준담배 40개피에서 담배연기응축물 0.42 g을 얻었다. Fig. 1은 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주가 접종된 시험배지에 흰쥐 간이물질대사 효소군 (S-9 mix)을 넣고, 담배연기응축물을 25 µg/plate에서 1600 µg/plate 까지 농도별로 처리하고 배양했을 때 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과를 나타낸 것이다. 시험배지에 담배연기응축물을

Table 1. Yield of solvent layer fractionated in crude extract from *C. zawadskii*.

| Fraction | Yields (g) | Yields (%) [†] |
|-----------------|------------|-------------------------|
| Diethyl ether | 3.22 | 17.5 |
| Chloroform | 1.03 | 5.6 |
| Dichloromethane | 1.07 | 5.8 |
| Butanol | 6.02 | 32.8 |
| Water | 6.51 | 35.5 |

[†]Yield = solid extract or fraction (g)/raw material (dry weight) × 100

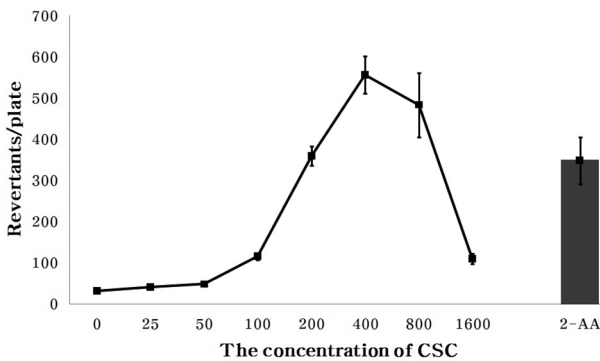


Fig. 1. Dose response curve of CSC mutagenicity (+S-9 mix).

처리하지 않은 음성대조군의 경우 복귀 돌연변이 집락수는 31.0 ± 3.0 개이었으나 양성대조군인 2-AA를 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수는 347.3 ± 56.6 개이었다. 또한 담배연기응축물을 25, 50, 100, 200, 400, 800과 1600 µg을 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수는 각각 41.0 ± 3.5 , 47.7 ± 2.5 , 115.3 ± 8.2 , 359.0 ± 23.5 , 555.3 ± 44.9 , 482.7 ± 78.0 와 109.3 ± 12.5 개로 담배연기응축물 처리농도 400 µg까지는 처리농도가 증가할수록 복귀돌연변이 집락수도 증가하였으나 400 µg 이상에서는 복귀돌연변이 집락수는 오히려 감소하였다. 담배연기응축물 400 µg 이상 처리농도는 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주에 독으로 작용하는 것이 아닌가 생각된다 (Shin *et al.*, 2007). 따라서 구절초 조추출물과 분획물이 담배연기응축물의 돌연변이 억제효과를 평가하기 위한 처리농도를 200 µg/plate로 정하였다.

3. 구절초 조추출물의 돌연변이원성 조사

Table 2는 구절초 조추출물 그 자체가 돌연변이 유발성을 나타내는 지를 조사하기 위하여 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주가 접종된 시험배지에 구절초 조추출물을 125 µg서 2 mg 농도까지 처리했을 때 얻은 복귀 돌연변이 집락수를 나타낸 결과이다. *Salmonella typhimurium* TA 98 균주가 접종된 시험 배지의 자발적 복귀 돌연변이 집락수 (음성대조군)는 S-9 mix 처리 시 27.3 ± 3.5 개이었으며, S-9 mix를 처리하지 않

Table 2. Mutagenicity on crude extract from *C. zawadskii*.

| Treatment (±S-9 mix) | Dose (µg/plate) | Revertants/plate | |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | without S-9 | with S-9 |
| Spontaneous | | 17.7 ± 1.5 | 27.3 ± 3.5 |
| Mutagen (4-NQO) [†] | 0.5 | 448.0 ± 8.5 | |
| Mutagen (2-AA) [‡] | 0.5 | | 524.7 ± 10.7 |
| Crude extract | 125 | 19.7 ± 3.5 | 29.7 ± 4.7 |
| | 250 | 19.0 ± 2.0 | 32.7 ± 1.5 |
| | 500 | 17.7 ± 1.5 | 32.3 ± 3.1 |
| | 1000 | 19.2 ± 4.4 | 34.7 ± 3.2 |
| | 2000 | 18.7 ± 2.3 | 32.7 ± 8.4 |

[†]4-NQO : 4-Nitroquinoline-n-oxide

[‡]2-AA : 2-Aminoanthracene

았을 때는 17.7 ± 1.5 개이었다. 그리고 시험배지에 직접 돌연변이원인 4-NQO를 0.5 µg 처리하였을 때 복귀 돌연변이 집락수는 448.0 ± 8.5 개이었으며, 또한 간접 돌연변이원인 2-AA를 0.5 µg 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수는 524.7 ± 10.7 개로 Maron과 Ames의 실험결과와 일치하였으며, 시스템이 매우 양호하게 작동하고 있음을 확인하였다 (Maron and Ames, 1983). 한편 S-9 mix를 처리했을 때와 처리하지 않았을 때를 구분하여 시험배지에 구절초 조추출물을 농도별로 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수는 음성대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않을 뿐만 아니라 음성대조군과 2배이상 차이가 나지 않았다. 따라서 구절초 조추출물 그 자체는 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주에 대하여 돌연변이 유발효과는 없는 것으로 판단되었다.

5. 구절초 조추출물 용매분획물의 돌연변이원성 조사

구절초 조추출물 용매분획물 그 자체도 돌연변이 유발 효과가 있는지 조사하였다. *Salmonella typhimurium* TA 98 균주가 접종된 시험배지에 구절초 조추출물 용매분획물을 125 µg에서 2000 µg까지 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수의 변화는 Table 3과 4에 나타나 있다. Table 3은 S-9 mix을 첨가했을 때의 결과이고 Table 4는 S-9 mix을 첨가하지 않았을 때의 결과이다. 시험배지에 S-9 mix를 첨가하지 않고 구절초 조추출물의 diethyl ether, chloroform, dichloromethane, butanol 그리고 물 분획물 모두 농도를 증가시키며 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수는 통계적으로 유의하게 증가하지 않았다. 또한 S-9 mix를 첨가하고 구절초 조추출물 용매분획물의 농도를 증가시켜도 S-9 mix를 첨가하지 않았을 때와 같이 복귀 돌연변이 집락수는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 구절초 조추출물의 용매분획물 그 자체도 간접적으로나 직접적으로 돌연변이 유발효과는 없는 것으로 판단되었다.

Table 3. Mutagenicity on various solvent fractions of crude extract from *C. zawadskii*.

| Treatment (+S-9 mix) | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertants/plate |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Positive control (2-AA) [†] | 0.5 | 471.7 \pm 15.5 |
| Diethyl ether fraction | Spontaneous | 28.0 \pm 1.0 |
| | 125 | 29.3 \pm 1.5 |
| | 250 | 26.7 \pm 3.2 |
| | 500 | 33.0 \pm 2.0 |
| | 1000 | 27.7 \pm 1.2 |
| | 2000 | 28.7 \pm 2.5 |
| Chloroform fraction | Spontaneous | 30.3 \pm 1.2 |
| | 125 | 29.3 \pm 0.6 |
| | 250 | 25.3 \pm 2.5 |
| | 500 | 27.7 \pm 1.5 |
| | 1000 | 31.3 \pm 3.5 |
| | 2000 | 29.7 \pm 1.2 |
| Dichloromethane fraction | Spontaneous | 28.7 \pm 0.6 |
| | 125 | 27.0 \pm 2.6 |
| | 250 | 30.3 \pm 1.2 |
| | 500 | 32.0 \pm 3.0 |
| | 1000 | 29.0 \pm 2.0 |
| | 2000 | 29.7 \pm 4.0 |
| Butanol fraction | Spontaneous | 31.3 \pm 0.6 |
| | 125 | 31.0 \pm 2.0 |
| | 250 | 30.3 \pm 2.1 |
| | 500 | 28.3 \pm 0.6 |
| | 1000 | 27.3 \pm 3.5 |
| | 2000 | 30.7 \pm 1.5 |
| Water fraction | Spontaneous | 28.7 \pm 0.6 |
| | 125 | 33.7 \pm 4.6 |
| | 250 | 29.3 \pm 1.5 |
| | 500 | 26.3 \pm 1.5 |
| | 1000 | 31.7 \pm 3.1 |
| | 2000 | 27.0 \pm 2.6 |

[†]2-AA : 2-Aminoanthracene, There was no a statistical significance between solvent fractions, and between concentrations

6. 구절초 조추출물의 돌연변이 억제 효과 조사

Table 5는 구절초 조추출물이 담배연기응축물에 대하여 돌연변이 억제효과가 있는지 조사하기 위하여 담배연기응축물을 plate당 200 μg 처리하고, S-9 mix와 함께 구절초 조추출물을 500 μg 처리하였을 때 복귀 돌연변이 집락수의 변화를 조사한 결과이다. *Salmonella typhimurium* TA 98 균주의 자발적 복귀 돌연변이 집락수는 평균 34.3 \pm 2.5개이었으나 시험배지에 담배연기응축물을 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수는 367.3 \pm 20.6개이었다. 그러나 담배연기응축물 200 μg 과 함께 구절초 조추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 동시에 처리했을 때 복귀 돌연변이 집락수는 123.3 \pm 12.7개로 돌연변이 억제율이 73.2%를 나타내었다.

Table 4. Mutagenicity on various solvent fractions of crude extract from *C. zawadskii*.

| Treatment (-S-9 mix) | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertants/plate |
|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Positive control (4-NQO) [†] | 0.5 | 458.7 \pm 26.8 |
| Diethyl ether fraction | Spontaneous | 18.3 \pm 0.6 |
| | 125 | 18.7 \pm 1.5 |
| | 250 | 18.7 \pm 0.6 |
| | 500 | 20.3 \pm 1.2 |
| | 1000 | 18.0 \pm 1.0 |
| | 2000 | 17.7 \pm 2.1 |
| Chloroform fraction | Spontaneous | 20.7 \pm 0.6 |
| | 125 | 18.3 \pm 1.2 |
| | 250 | 18.7 \pm 0.6 |
| | 500 | 17.3 \pm 2.1 |
| | 1000 | 17.7 \pm 1.5 |
| | 2000 | 18.7 \pm 0.6 |
| Dichloromethane fraction | Spontaneous | 20.7 \pm 0.6 |
| | 125 | 17.7 \pm 1.2 |
| | 250 | 17.7 \pm 1.5 |
| | 500 | 17.7 \pm 0.6 |
| | 1000 | 19.3 \pm 1.5 |
| | 2000 | 18.7 \pm 0.6 |
| Butanol fraction | Spontaneous | 17.0 \pm 1.7 |
| | 125 | 18.0 \pm 3.6 |
| | 250 | 20.3 \pm 0.6 |
| | 500 | 18.7 \pm 0.6 |
| | 1000 | 21.3 \pm 1.5 |
| | 2000 | 22.0 \pm 2.6 |
| Water fraction | Spontaneous | 18.7 \pm 0.6 |
| | 125 | 19.0 \pm 2.0 |
| | 250 | 19.7 \pm 1.5 |
| | 500 | 17.0 \pm 2.6 |
| | 1000 | 18.3 \pm 2.3 |
| | 2000 | 16.7 \pm 1.2 |

[†]4-NQO : 4-Nitroquinoline-n-oxide, **There was no a statistical significance between solvent fractions, and between concentrations

Table 5. Inhibitory effects of crude extract from *C. zawadskii* against mutagenicity of CSC.

| Treatment (+S-9 mix) | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertants/plate | Inhibition rate (%) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|
| Spontaneous | | 34.3 \pm 2.5 | |
| Positive control(2-AA) [†] | 0.5 | 524.7 \pm 10.7 | |
| CSC [‡] | 200 | 367.3 \pm 20.6 | |
| CSC + 70% ethanol extract | 500 | 123.3 \pm 12.7* | 73.2 |

[†]2-AA : 2-Aminoanthracene

[‡]CSC : Cigarette smoke condensates

*Significantly different from CSC group (p < 0.01)

7. 구절초 조추출물 용매분획물의 돌연변이 억제효과 조사

한편 구절초 조추출물 어느 분획이 담배연기응축물에 대한

Table 6. Inhibitory effects of various solvent fraction from crude extract from *C. zawadskii* against the mutagenicity of CSC.

| Treatment (+S-9 mix) | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertants/plate | Inhibition rate(%) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Spontaneous | | 34.7 \pm 3.2 | |
| Positive control(2-AA) [†] | 0.5 | 498.7 \pm 21.6 | |
| CSC [‡] | 200 | 345.7 \pm 15.0 | |
| CSC+Diethyl ether Fraction | 1,000 | 44.3 \pm 4.0* | 96.9 |
| CSC+Chloroform Fraction | 1,000 | 282.7 \pm 24.3* | 20.2 |
| CSC+Dichloromethane Fraction | 1,000 | 348.7 \pm 14.4 | 0.0 |
| CSC+Butanol Fraction | 1,000 | 330.3 \pm 16.4 | 5.0 |
| CSC+Water Fraction | 1,000 | 338.0 \pm 17.2 | 2.5 |

[†]2-AA : 2-Aminoanthracene

[‡]CSC : Cigarette smoke condensates

*Significantly different from CSC group (p < 0.01)

돌연변이를 억제하는 효과가 가장 크게 나타나는지 조사하기 위하여 담배연기응축물 200 μg 과 구절초 조추출물 용매 분획물을 각각 1 mg/plate 농도로 동시에 처리했을 때 얻은 결과를 Table 6에 나타냈다. 담배연기응축물에 대한 돌연변이 억제율은 구절초 조추출물 diethyl ether 분획, chloroform 분획, dichloromethane 분획, butanol 분획, 그리고 물 분획이 각각 96.9%, 20.2%, 0.0%, 5.0%, 그리고 2.5%이었다. 따라서 같은 농도에서 chloroform 분획과 diethyl ether 분획이 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주에서 담배연기응축물에 대한 돌연변이 억제효과를 보였으며, 이 중 diethyl ether 분획이 돌연변이 억제효과가 더 큰 것으로 나타났다.

8. Diethyl ether 분획의 농도별 돌연변이 억제효과 조사

구절초 조추출물 분획물중 diethyl ether 분획이 담배연기응축물에 대하여 돌연변이 억제 효과가 가장 높게 나타났기 때문에 이 diethyl ether 분획을 농도별로 처리했을 때의 돌연변이 억제 효과 정도를 조사하였다. Table 7은 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주에 대하여 간접 돌연변이원인 담배연기응축물을 plate 당 200 μg 처리하고, S-9 mix와 함께 diethyl ether 분획물 농도를 31.3~1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 범위로 처리했을 때의 담배연기응축물에 대한 돌연변이 억제효과를 나타낸 것이다. 시험배지에 diethyl ether 분획물 처리 농도가 증가할수록 담배연기응축물에 대한 돌연변이 억제효과도 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 특히 시험배지에 diethyl ether 분획물 1 mg 농도에서는 담배연기응축물에 대한 돌연변이 억제효과가 97.7%이라는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 *Salmonella typhimurium* TA 98균주를 이용한 *in vitro* 돌연변이 검출계에서 구절초 조추출물 diethyl ether 분획은 담배연기응축물에 의한 돌연변이를 억제할 가능성이 있다고 판단되었다. 구절초 조추출물 diethyl ether 분획에 대한 내용성분 분리

Table 7. Inhibitory effects with concentration on the diethyl ether fraction of crude extract from *C. zawadskii* against the mutagenicity of CSC.

| Treatment (+S-9 mix) | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertants/plate | Inhibition rate (%) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|
| Spontaneous | | 33.7 \pm 3.1 | |
| Positive control(2-AA) [†] | 0.5 | 459.3 \pm 41.6 | |
| CSC [‡] | 200 | 364.7 \pm 18.2 | |
| CSC+Diethyl ether fraction | 31.3 | 338.0 \pm 14.7 | 8.1 |
| | 62.5 | 297.3 \pm 22.0* | 20.3 |
| | 125 | 210.7 \pm 20.8* | 46.5 |
| | 250 | 172.3 \pm 18.3* | 58.1 |
| | 500 | 92.0 \pm 17.2* | 82.4 |
| | 1,000 | 41.3 \pm 7.7* | 97.7 |

[†]2-AA : 2-Aminoanthracene

[‡]CSC : Cigarette smoke condensates

*Significantly different from CSC group (p < 0.01)

및 동정 그리고 돌연변이 억제효과 확인 등 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 한편 계피의 에탄올 조추출물의 hexane 분획은 *Salmonella typhimurium* TA 98균주를 이용했을 때 benzo [a] pyrene (B[a]P)에 대한 돌연변이 억제활성이 800 μg 에서 98% 이상이였으며 (Jeong *et al.*, 1998), 험프리 생즙액 200 μL 를 처리했을 때 B[a]P에 대한 돌연변이 억제활성은 50%이었고 (Ham *et al.*, 1992), 또한 썸바귀 메탄올 조추출물 부탄올 분획은 TA 98 균주에서 B[a]P에 대한 돌연변이 억제활성이 100 μg 에서 90% 이상을 나타내었으며 (Kim *et al.*, 2002a), 음나무 내피 메탄올 조추출물 부탄올 분획은 100 μg 에서 B[a]P에 대한 돌연변이 억제활성이 74.5%이었다고 보고하고 있다 (Kim *et al.*, 2002b). 또한 태국에서 자라는 꽃 *Curcuma sessilis*와 *Punica granatum*의 메탄올 추출물은 TA-98 균주에서 1-aminopyrene에 대한 돌연변이 억제 활성이 15 mg에서 90% 이상이었고 (Wongwattanasathien *et al.*, 2010), 브라질의 차추출물도 TA 98 균주에서 2-aminofluorene에 대하여 돌연변이 억제활성을 나타낸다고 (Horn and Vargas, 2008) 보고하고 있다. 그러나 한약재 전처리 과정과 추출물 제조 및 분획 과정이 다르고, 또한 이들 논문의 대부분은 추출물 처리에 따른 복귀 돌연변이 집락수의 변화를 나타내지 않고 억제율로만 표기하고 있어서 돌연변이 억제효과와 추출물 처리 농도로의 정확한 비교는 불가능하였다.

돌연변이 억제 물질은 대부분 발암원의 흡수를 방해하거나 발암원이 DNA에 결합하여 DNA adducts를 형성하는 것을 감소시킴으로서 암 발생을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Steele and Kelloff, 2005). 이에 따라 구절초 조추출물 diethyl ether 분획물에는 첫째 발암원의 흡수의 경우와 같이 간의 이물질대사 효소에 의해 대사되고 반응성이 큰 담배연기응축물 대사산물과 직접 반응하여 무독화시키는 성분이 존재

할 가능성이 있으며, 두 번째는 담배연기응축물 대사산물에 의한 DNA repair system을 회복시키는데 중요한 역할을 하는 화합물을 함유할 가능성이 있다고 판단된다.

감사의 글

본 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

LITERATURE CITED

- Brusick D.** (2008). Critical assessment of the genetic toxicity of naphthalene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 51:537-542.
- Chang JS, Bae JT, Oh EJ, Kim JY, Park SH and Lee KR.** (2009). Cancer preventive potential of methanol extracts of *Hypsizigus marmoreus*. *Journal of Medicinal Food*. 12:493-500.
- Choi JM, Lee EO, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, Shim BS, Kim NI, Song MC, Baek NI and Kim SH.** (2007). Identification of camphesterol form *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. *Phytotherapy Research*. 21:954-959.
- Ha JH, Jeong MH, Seo YC, Choi WY, Jeong HS, Jung JH, Yu KW and Lee HY.** (2010). Enhancement of anticancer of low quality ginseng by *Phelinus linteus* fermentation. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:135-142.
- Ha JH, Kim Y, Jeong SS, Jeong MH, Jeong HS, Jeong JH, Yu KW and Lee HY.** (2009). High pressure extraction process of low quality fresh ginseng for enhancing anticancer activities. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:397-406.
- Ham SS, Park GG, Park YH and Park WB.** (1992). Antimutagenic effect of the extracts of comfrey. *Journal of Korean Society of Food and Nutrition*. 21:539-543.
- Horn RC and Vargas VM.** (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology In Vitro*. 22:1043-1049.
- Jang DS, Park KH, Choi SU, Nam SH and Yang MS.** (1997). Antibacterial substances of the flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 40:85-88.
- Jeong ET, Park MY, Lee JG and Chang DS.** (1998). Antimicrobial activity and antimutagenesis of cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume) bark extract. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 13:337-343.
- Jeong HS, Kim SS, Oh SH, Jeong MH, Choi WY, Seo YC, Na CS, Kwag HG and Lee HY.** (2010). Enhancement of anticancer activities of *Ephedra sinica* Stapf extracts by nanocapsulation. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:143-150.
- Kim MJ, Kim JS, Jeong DM, Ham SS and Yu CY.** (2002a). Effect of antioxidant, antimutagenicity and anticancer of root extract from *Ixeris dentate* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 10:222-229.
- Kim MJ, Kim JS, Kang WH and Yeon KD.** (2002b). Antimutagenic and cytotoxic effects of extracts of *Kalopanax pictus* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 10:132-138.
- Kishimoto S, Maoka T, Nakayama M and Ohmiya A.** (2004). Carotenoid composition in petals of *Chrysanthemum (Dendranthema grant. (Ramat.) Kimura)*. *Phytochemistry*. 65: 2781-2787
- Kwon HS, Ha TJ, Hwang SW, Jin YM, Nam SH, Park KH and Yang MS.** (2006). Cytotoxic flavonoids from the whole plants of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura. *Journal of Life Sciences*. 16:746-749.
- Lee SH and Lee JS.** (2007). Production and characteristics of antidandruff compound from *Chrysanthemum zawadskii*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35:220-225.
- Lee YC.** (1967). Studies on the constituents of *Chrysanthemum sibiricum* Fischer. *Korean Journal of Pharmaceutical Society*. 11:7-16.
- Maron DM and Ames BN.** (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. 113:173-215.
- Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Laconi S, Deidda D and Maxia A.** (2009). Chemical and biological comparisons on supercritical extracts of *Tanacetum cinerariifolium* Sch. Bip. with three related species of *Chrysanthemums* of Sardinia (Italy). *Natural Product Research*. 23:190-199.
- Mosovska S, Mikulasova M, Brindzova L, Valik L and Mikusova L.** (2010). Genetic and antimutagenic activities of extracts from pseudocereals in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Food and Chemical Toxicology*. 48:1483-1487.
- Shin HJ, Sohn HO, Park CH, Lee HS, Min YJ, and Hyoun HC.** (2007). Evaluation of the *in vitro* biological activity of selected 35 chemicals. *Journal of the Korean Society of Tobacco Science*. 29:30-40.
- Shin SH and Choi YM.** (1982). Analysis of essential oil from *Chrysanthemum sibiricum* and the comparison with essential oils from some *Chrysanthemum* spp. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 13:153-156.
- Steele VE and Kelloff GJ.** (2005). Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutation Research*. 591:16-23.
- Wongwattanasathien O, Kangsadalampai K and Tongyongk L.** (2010). Antimutagenicity of some flowers grown in Thailand. *Food and Chemical Toxicology*. 48:1045-1051.
- Woo JH, Shin SL, Jeong HS and Lee CH.** (2010). Antioxidant effect of extracts obtained from three *Chrysanthemum* Species. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 39:631-636.
- Yang MS, Park KH, Jang DS, Choi SU, Nam SH and Shiro M.** (1996). Cumambrin A in *Chrysanthemum boreale* Makino preparation, X-ray crystal structure and ¹³C- and ¹H-NMR study of cumambrin A. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 27:207-211.
- Ye Q and Deng C.** (2009). Determination of camphor and borneol in flos *Chrysanthemi Indici* by UAE and GC-FID. *The Journal of Chromatographic Science*. 47:287-290.