

Brine Shrimp Bioassay를 이용한 수중생약의 생리 활성 검색

이 지 숙 · 김 진 웅
 서울대학교 약학대학

Screening of Biological Activity of Crude Drugs Using Brine Shrimp Bioassay

Ji Sook Lee and Jinwoong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Brine shrimp bioassay has been frequently utilized as a basic screening method for detecting a broad range of bioactive compounds from natural products. Each methanol, chloroform, and water extract of thirty-eight crude drugs were screened in the brine shrimp bioassay, and a number of crude drugs exhibited toxicity against brine shrimp nauplii.

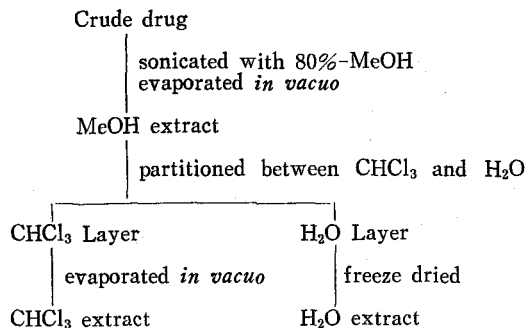
Keywords—Brine shrimp bioassay • *Artemia salina* • screening of crude drugs

최근 물질특허의 개방으로 우리나라에서도 천연물로부터 생리 활성물질을 분리하고 의약품을 개발하려는 많은 연구가 진행되고 있다. 이를 위해서 이용되는 생물학적 검정법은 거의가 고가의 실험기구나 시약을 사용하므로 bioassay system 유지에 많은 비용이 들고, 많은 시간과 노력을 요구하는 경우가 대부분이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 누구나 손쉽게 적은 비용으로 간편하게 시작할 수 있는 brine shrimp bioassay를 도입하여 생약의 생리 활성 성분을 검색하고 분리하는데 이용하고자 이 실험을 수행하였다. 이 방법은 천연물로부터 광범위한 생리 활성 성분을 검출할 수 있는 장점이 있어서 자주 이용되고 있으며, 특히 이 방법을 이용하여 분리된 화합물들이 P388 lymphocytic leukemia bioassay에서 활성을 나타내는 경우가 대부분이므로 항암제 개발에 이용되고 있다.¹⁻⁸⁾ 저자들은 천연물로부터 생리 활성 성분을 분리하는 의약품 개발 연구의 일환으로서 brine shrimp bioassay를 이용하여 38종 생약의 생리활성을 검색하였다.

실험 방법

재료 및 시약—실험대상 38종 생약은 시중에서 구입하였고, 생약추출용 MeOH과 분획용 CHCl₃은 공업용을 사용전 증류하여 사용하였으며 시료조제용 DMSO는 1급시약을 사용하였다.

추출, 분획 및 시료의 조제—이들 생약 20~50 g을 세절하여 80%-MeOH로 약 1시간 sonication한 후 하루 밤 방치하고 여과 및 감압 농축하여 MeOH extract를 조제하였으며, 일부를 다



Scheme I. Solvent extraction and fractionation scheme of crude drugs

Table I. Brine shrimp bioassay results of crude drugs

Species	Used parts	LC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)		
		MeOH ext.	CHCl ₃ ext.	H ₂ O ext.
<i>Acanthopanax sessiflorum</i>	stem barks	>1000	316.22	>1000
<i>Albizia julibrissin</i>	stem barks	127.64	60.39	666.38
<i>Alisma orientale</i>	rhizomes	>1000	>1000	>1000
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	rhizomes	226.47	6.78	>1000
<i>Angelica dahurica</i>	roots	205.94	32.52	>1000
<i>Anthriscus sylestris</i>	roots	>1000	>1000	>1000
<i>Asiasarum sieboldi</i>	roots	335.98	175.32	662.24
<i>Asparagus cochinchinensis</i>	tubers	>1000	>1000	>1000
<i>Atractylodes japonica</i>	rhizomes	>1000	>1000	59.21
<i>Bupleurum falcatum</i>	roots	>1000	428.28	>1000
<i>Cassia obtusifolia</i>	seeds	345.57	41.46	>1000
<i>Coptis japonica</i>	rhizomes	432.45	502.02	>1000
<i>Corydalis ternata</i>	tubers	>1000	81.54	>1000
<i>Cyperus rotundus</i>	rhizomes	>1000	86.25	>1000
<i>Dendrobium moniliforme</i>	whole plants	>1000	316.22	>1000
<i>Evodia officinalis</i>	fruits	393.12	13.13	>1000
<i>Fritillaria ussuriensis</i>	bulbs	>1000	>1000	>1000
<i>Gentiana scabra</i>	roots	646.20	234.62	713.25
<i>Glehnia littoralis</i>	roots	>1000	>1000	>1000
<i>Glendistia japonica</i>	spines	>1000	>1000	>1000
<i>Lycium chinensis</i>	fruits	339.81	>1000	316.22
<i>Lycium chinensis</i>	root barks	210.68	>1000	>1000
<i>Magnolia obovata</i>	root barks	>1000	56.72	>1000
<i>Morus alba</i>	root barks	>1000	>1000	>1000
<i>Paeonia lactiflora</i>	roots	>1000	>1000	>1000
<i>Paeonia albiflora</i>	roots	>1000	>1000	>1000
<i>Paeonia suffruticosa</i>	stem barks	>1000	207.33	>1000
<i>Pinellia ternata</i>	tubers	316.22	492.59	204.80
<i>Plantago asiatica</i>	seeds	369.59	>1000	>1000
<i>Polygala tenuifolia</i>	roots	186.21	177.42	>1000
<i>Pueraria thunbergiana</i>	roots	>1000	>1000	>1000
<i>Rhus javanica</i>	galls	64.30	15.43	206.82
<i>Rubus coreanus</i>	fruits	348.10	358.94	338.14
<i>Sanguisorba officinalis</i>	roots	>1000	>1000	316.22
<i>Schizandra chinensis</i>	fruits	207.71	262.88	215.44
<i>Scirpus flaviatilis</i>	rhizomes	960.10	>1000	>1000
<i>Sophora flavescens</i>	roots	>1000	>1000	>1000
<i>Xanthium strumarium</i>	fruits	>1000	>1000	>1000

시 CHCl_3 과 H_2O 로 분획한 후 감압 농축하여 CHCl_3 및 H_2O extract를 조제하였다(Scheme I). 80%-MeOH, CHCl_3 및 H_2O extract를 10%-DMSO로 20 mg/ml 농도의 시료용액을 만들고, 10배씩 희석하여 단계별 농도 시료 용액을 조제하였다(20, 2, 0.2 mg/ml).

Brine shrimp의 부화—Meyer 등¹⁾에 의한 방법으로 실시하였다. 즉 Instant Ocean(Aquarium System, Inc.) 38 g을 증류수 1 l에 녹여 인공해수를 만든 다음, 비대칭 칸막이가 있는 용기(30×20×5 cm)에 넣었다. 용기의 넓은 쪽에 brine shrimp eggs(*Artemia salina* Leach)를 넣은 후 aluminum foil을 씌워 어둡게 하고 aeration 시키면서 실온에서 부화시켰다. 약 24시간 후부터 부화되기 시작하였고, 부화된 brine shrimp nauplii는 양성 주광성이므로 용기의 좁은 쪽에 빛을 쬐어 유도 이동시켰다.

Brine Shrimp Bioassay—조제한 단계별 농도 시료 용액을 20 ml beaker에 각각 0.2 ml씩 duplicate로 넣고, 부화한 지 24시간 경과한 brine shrimp nauplii 20마리 정도를 인공해수 3.8 ml와 함께 가하였다(최종농도는 각각 1000, 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임). 투여한 지 24시간 지난 후에 죽은 shrimp의 수를 세어 %-mortality를 측정하고 linear regression법을 이용하여 LC_{50} (Lethal concentration necessary to kill 50% of the brine shrimp)를 결정하였다.

실험결과 및 고찰

총 38종 생약의 MeOH, CHCl_3 및 H_2O extract를 brine shrimp bioassay를 이용하여 brine shrimp nauplii에 대한 독성을 검사한 결과, 수

종 생약에서 LC_{50} 이 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 독성을 나타내었다(Table I). 식물의 엑스가 brine shrimp에 대하여 독성을 나타내는 경우는 그 엑스에 생리활성 물질이 함유되어 있는 것으로 간주되고 있다.¹⁾ 따라서 brine shrimp에 독성을 나타낸 생약들은 현재 그 유효성분을 분리하고자 계속 연구하고 있는 중이다.

감사의 말씀—이 논문은 1989년 문교부 지원 한국학술진흥재단의 신진교수 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사하는 바입니다.

(1990년 3월 2일 접수 : 3월 15일 수리)

문헌

1. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L.: *Planta Med.* 45, 31(1982).
2. Anderson, J.E., Chang, C.-J. and McLaughlin, J.L.: *J. Nat. Prod.* 51, 307(1988).
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. Wang, Z.-w., Ma, W.-W., McLaughlin, J.L. and Gupta, M.P.: *J. Nat. Prod.* 51, 382(1988).
6. Chaichantipyuth, C., Pummangura, S., Naowsaran, K., Thanyavuthi, D., Anderson, J.E. and McLaughlin, J.L.: *J. Nat. Prod.* 51, 1285(1988).
7. Ferrigni, N.R., McLaughlin, J.L., Powell, R.G. and Smith, Jr., C.R.: *J. Nat. Prod.* 47, 347(1984).
8. Marles, R.J., Farnsworth, N.R. and Neill, D.A.: *J. Nat. Prod.* 52, 261(1989).