

韓國茶 原料에 대한 毒性 研究

變異原性 檢索

방형애 · 이용욱 · 서난주* · 장일무*
서울대학교 보건대학원 · 서울대학교 생약연구소*

Toxicological Study on Korean Tea Materials: Screening of Potential Mutagenic Activities by Using SOS-Chromotest

Hyung-Ae Pang, Young Wook Lee, Nan Joo Suh* and Il-Moo Chang*
Graduate School of Public Health and Natural Products Research Institute*,
Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—In terms of regulatory toxicology, especially for the traditional Chinese medicines, problems can be arise from a fact that there is no distinctive barrier between herbal drugs and food/beverage. An example is that many kinds of Chinese herbal materials have been also used as tea materials in Korea, China, Japan and Vietnam.

Sixteen tea materials (also used as herbal materials) were extracted with 70% ethanol and the extract further partitioned with chloroform and water. Those ethanol extract and fractions were subjected to the SOS-Chromotest to examine potential mutagenicity. It was found that ethanol extract of *Chaenomelis Fructus* (*Chaenomeles japonica* Lindley, 木瓜, Rosaceae) and both ethanol extract and water fraction of *Cassiae Semen* (*Cassia tora* Linne, 決明子, Leguminosae) showed relatively high mutagenic activities in SOS-Chromotest.

Keywords—Mutagenicity · SOS-Chromotest · *Chaenomelis Fructus* · *Cassiae Semen*

韓國의 전통적인 固有茶라고 할 수 있는 것은 綠茶의 일종인 雀舌茶라고 할 수 있겠으나 한 약재로 쓰이는 많은 수의 藥用植物을 材料로 사용하여 茶라는 명칭으로 生活 주변에서 常用하고도 있다. 예를 들자면, 人蔘茶, 雙和茶, 生薑茶, 울무차, 杜冲茶, 桂皮茶 등등으로 약 50 여 종 이상을 헤아릴 수 있다.¹⁾ 이러한 茶의 원료로 사용되는 것은 한약재로도 쓰이는 것으로서 건강음료와 한약과의 엄밀한 구분을 짓기에는 어려움이 따를 수 있는 것이 規制 毒性 측면의 現實이기도 하다.²⁾ 이들 茶 原料들은 기호 식품

으로써 많은 천연물 성분을 함유하고 있음은 自明하다고 하겠으며, 이들 천연물 성분중에는 毒性을 일으킬 수도 있는 가능성을 배제할 수 없다.

본 연구진은 天然物의 毒性 研究 일환으로써 현재 국내에서 常用하고 있는 韓國茶 原料 16종을 선정하여 이들의 變異原性 유발 여부를 *in vitro* 방법의 하나인 SOS-Chromotest를 사용하여 검색하고자 하였다. 이들 16종의 原料는 70% ethanol 엑스 및 이로부터 얻어진 chloroform 및 물 분획을 제조하여 試料로 만들어 變異原性 檢索을 실시하였다.

*All corresponds should be addressed to Prof. I.-M. Chang.

實驗方法

材料

16종의 茶 原料는 다음의 표 I에 제시한 바와 같다. 이들은 市中에서 구입한 후 생약학적으로 확인한 후 시료로 사용하였다.

試料 調製

시료는 다음과 같이 엑스 및 분획을 제조하였다.

各 材料에서 異物質을 제거한 후 300 g을 取하여 70% ethanol(ethanol : water, 7 : 3, v/v)에서 3시간 동안 가열하여 추출하고 용매는 45~50° 감압상태에서 증발시켜 건조된 분말 상태의 ethanol extract를 만들었다. 위의 추출물 중 일부분(2~3 g)만 취하고 나머지는 다시 water : chloroform(1 : 1, v/v)에 녹여 water fraction, chloroform fraction으로 분리한 후 이들을 감압하에서 건조하여 분말을 얻었다.

건조된 試料를 實驗에 使用할 때에 ethanol extract와 chloroform fraction은 DMSO에, water fraction은 Tris-buffer에 각각 녹여 사용하였다.

變異原性 檢索 菌株

SOS Chromotest에는 E. coli PQ 37을 사용하였다.

培地 및 試藥

Luria-Bertani medium : pH 7.4, 1% bactotryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1% NaCl, 20 µg/ml ampicillin을 사용하였다.

기타 시약으로는 0.4 M Tris-buffer (pH 7.4), B-Buffer (pH 7.4), 0-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside solution(ONPG) 4 mg/ml (pH 7.4), ampicillin stock solution 4 mg/ml, aflatoxin B 1, mitomycin C, dimethylsulfoxide (DMSO), β-nicotinamide adenine dinucleotide-3-phosphate (NADP), glucose-6-phosphate를 사용하였다.

S9과 S9 mixture 調製

Polychlorinated biphenyls (PCB, 500 mg/ml)을 올리브유에 200 mg/ml 濃度로 용해시키고 Sprague-Dawley rat (숫컷, 200 g)에 500 mg/kg 용량으로 복강 注射하였다.

희생시키기 12시간 전에는 물만을 주고 5일째에 肝만을 취하여 0.15 M KCl 용액으로 肝에 있는 血液을 세척하여 제거하였다. 간 무게의 3배 정도의 0.15 M KCl 용액을 첨가한 후 가위로 잘

Table I. Tea materials used for experiment

生藥名(Herbal drug name)	學名(Scientific name)
葛根 Puerariae Radix	쑤 <i>Pueraria thunbergiana</i> Benth.
桂皮 Cinnamomi cassia Cortex	계피나무 <i>Cinnamomum cassia</i> Blume.
木瓜 Chaenomelis Fructus	모과나무 <i>Chaenomeles japonica</i> Lindley
五味子 Schizandrae Fructus	오미자 <i>Schizandra chinensis</i> Bailon
枸杞子 Lycii Fructus	구기자나무 <i>Lycium chinensis</i> Miller
大棗 Zizyphi Fructus	대추나무 <i>Zizyphus vulgaris</i> var. <i>inermis</i> Bun.
當歸 Angelicae gigantis Semen	당귀 <i>Angelica gigas</i> Nakai
決明子 Cassiae Semen	결명자 <i>Cassia tora</i> Linne
薏苡仁 Coicis Semen	울무 <i>Coix lachryma-jobi</i> . var. <i>ma-yuen</i> Stapf.
玉蜀黍 Zeae Semen	옥족서 <i>Zea mays</i> Linne
麥芽 Hordei Semen	대맥 <i>Hordeum vulgare</i> Linne
杜沖 Eucommiae Cortex	두충 <i>Eucommia ulmoides</i> Oliver
生薑 Zingiberis Rhizoma	생강 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe
柿葉 Diospyrois Folium	감나무잎 <i>Diospyros kaki</i> Thunb.
紫蘇子 Perillae Semen	들깨 <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt
七葉膽 Gynostemmae Herba	덩굴 <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Mak.

게 자르고 균질화 시킨 뒤(500 rpm, 6회 stroke) 10분간 9,000 rpm으로 원심분리한 후 그 상등액을 S9 fraction으로 사용하였다. 보관은 -80° 에서 하였다.

본 실험에 사용한 S9 mixture의 조성은 다음과 같다.

Salt solution(100 ml, 1.65 M KCl+100 ml, 0.4 M $MgCl_2 \cdot H_2O$) 0.2 ml; glucose-6-phosphate (1 M) 0.05 ml; NADP (0.1 M), 0.15 ml; Tris buffer(0.4 M, pH 7.4) 2.5 ml; LB medium 6.1 ml; S9 fraction 1 ml

SOS-Chromotest³⁻⁵⁾

냉동보관된 E. coli PQ 37 菌株를 LB 배지에 접종시킨 뒤 37° 에서 15~18시간 배양하였다. 600 nm에서 배양액의 흡수도가 OD 1.0 정도로 자란 용액 0.5 ml을 LB 배지 4.5 ml에 다시 넣어 10배 희석 후 37° 에서 2시간 동안 배양을 계속하였다.

이 배양액을 10배 희석시킨 용액에서 1 ml을 취하여 LB배양액 3 ml에 넣어 섞음으로써 4배 희석시킨 후에 이 배양액 0.4 ml씩을 20 μ l positive control(mitomycin C, 0.3 μ g/ml), 20 μ l negative control (dimethylsulfoxide, 100%) 및 20 μ l의 test group(엑스 또는 분획, 50 mg/ml) 이 들어 있는 시험관에 각각 分注하고 37° 에서 2시간 동안 배양시켰다. 3.58 ml LB배지를 다시 넣어 4 ml의 최종 부피가 되게 만든 후 37° 에서 80분 배양시켰다.

배양이 끝난 후 β -galactosidase 活性를 測定하기 위해 각 시험관에서 0.2 ml씩을 취하여 새로운 시험관으로 옮기고 0.4 ml O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) 용액과 1.8 ml B-Buffer 용액을 첨가한 후 10초동안 와동시킨 뒤 30분간 28° 에서 배양하였다.

30분후 1.6 ml Na_2CO_3 용액(1 M)을 첨가해 효소 반응을 정지시킨 뒤 420 nm와 550 nm에서 흡수도(OD)를 측정하였다.

Cell density를 측정하기 위하여 β -galactosidase 活性度 測定 30분전에 3.8 ml 배양액을 취하여 600 nm에서의 흡수도를 측정하였다.

Enzyme unit 계산은 다음의 공식에 의해 산출하였다.⁶⁻⁷⁾

$$\text{Unit} = 1000 \times \frac{\text{OD } 420 - 1.75 \text{ OD } 550}{t \times V \times \text{OD } 600}$$

t : ONPG 용액 첨가 후 반응시간(분)

V : β -galactosidase 活性度 測定에 사용된 culture volume(ml)

實驗結果 및 考察

Positive control 및 negative control의 β -galactosidase(EC. 3. 2. 1. 23) 활성도

SOS-Chromotest에 사용되는 E. coli PQ 37은 ampicillin에 저항을 띠고 있다. 그러므로 ampicillin(20 μ g/ml 배지)으로 selection하여 실험목적에 적당한 균주를 사용하는지 여부를 알기 위하여 positive control(양성대조군)로 기존의 변이 원성 물질로 알려진 mitomycin C 및 aflatoxin B1을 사용하였다. 茶 원료의 chloroform 분획을 용해시키기 위하여 negative control(음성 대조군)으로 사용한 DMSO가 균주에 영향을 미치는지 여부를 살폈다.

그 결과는 표 II에 제시하였으며 mitomycin C는 약 358 unit의 β -galactosidase 활성도를 보였고 aflatoxin B1의 경우는 S-9존제하에 약 320 unit를 보였다. 반면에 DMSO는 48 및 34(S-9 첨가시) unit를 보여준 것으로 미루어 ampicillin에 저항을 갖는 균주가 selection이 되었음을 알 수 있었다. 아울러 최적 효소 반응 시간은 2시간이었으므로 이 시간 범위를 검색에 이용하였다.

茶 試料에 대한 變異原性 측정

16종류의 茶 原料를 ethanol 엑스 및 chloroform

Table II. β -galactosidase activities produced by positive and negative controls

	β -galactosidase activity(unit)*	
	Without S9	With S9
Positive		
MMC(0.3 μ g/ml)	358	—
AFB1(0.02 μ g/ml)	—	320
Negative		
DMSO	48	34

* Each value represents the average of duplicate experiments.

Table III. Mutagenicity assay of tea materials, ethanol extract by SOS-Chromotest with S-9 mixture and without S-9 mixture

Tea materials tested	β -galactosidase activity(unit)*	
	Without S-9	With S-9
Puerariae Radix 葛根	45	49
Cinnamomi Cortex 桂皮	43	53
Chaenomelis Fructus 木瓜	144	84
Schizandrae Fructus 五味子	70	61
Lycii Fructus 枸杞子	51	84
Zizyphi Fructus 大棗	48	46
Angelicae gigantis Semen 當歸	63	68
Cassiae Semen 決明子	121	76
Coicis Semen 薏苡仁	27	67
Zea Semen 玉蜀黍	41	67
Hordei Semen 麥芽	57	52
Eucommiae Cortex 杜冲	53	50
Zingiberis Rhizoma 生薑	80	69
Diospyrois Folium 柿葉	43	60
Perillae Semen 紫蘇子	78	59
Gynostemmae Herba 七葉膽	73	74

* Each value represents the average of duplicate experiments.

분획과 water 분획으로 만든 48개의 茶 試料에 대해 SOS-Chromotest를 실시하였다. 이들 중 chloroform 분획은 DMSO에 water 분획은 Tris 완충액 (pH 7.4, 0.4 M)에 50 mg/ml이 되도록 용해하여 사용하였다. 한편 각각의 시료에 S-9 mixture를 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 검색한 결과는 표 III, IV, V에 보여 준다.

표 III에 의하면 ethanol로 추출한 엑스 시료 중 木瓜(Chaenomelis Fructus)와 決明子(Cassiae semen)가 S-9을 첨가하지 않았을 때 negative control 값의 약 2배를 나타냈다. 이러한 높은 β -galactosidase 활성도는 이들이 변이원성을 유발시키는 천연물 성분을 함유할 가능성을 보여 준다고 하겠다.

이들 두 가지 시료의 chloroform 및 water 분획 시료의 경우에는 표 IV 및 V에 보여 주듯이 決明子의 경우는 water 분획에도 높은 효소 활성도를 보여주나 chloroform 분획에는 낮은 값을

Table IV. Mutagenicity assay of tea materials, water fraction by SOS-Chromotest with S-9 mixture and without S-9 mixture

Tea materials tested	β -galactosidase activity(unit)*	
	Without S-9	With S-9
Puerariae Radix 葛根	70	79
Cinnamomi Cortex 桂皮	83	68
Chaenomelis Fructus 木瓜	89	61
Schizandrae Fructus 五味子	76	59
Lycii Fructus 枸杞子	85	63
Zizyphi Fructus 大棗	59	69
Angelicae gigantis Semen 當歸	69	71
Cassiae Semen 決明子	135	96
Coicis Semen 薏苡仁	73	94
Zea Semen 玉蜀黍	77	77
Hordei Semen 麥芽	71	83
Eucommiae Cortex 杜冲	91	90
Zingiberis Rhizoma 生薑	69	68
Diospyrois Folium 柿葉	67	78
Perillae Semen 紫蘇子	98	82
Gynostemmae Herba 七葉膽	71	80

* Each value represents the average of duplicate experiments.

보여 주었다. 木瓜의 경우는 chloroform 및 water 분획 모두 효소 활성도가 낮았다.

그리하여 이들 두가지 茶 原料가 변이원성 유발 능력 여부를 갖는지를 좀더 확인하기 위하여 木瓜의 ethanol 엑스 및 決明子의 ethanol 엑스와 water 분획시료의 농도가 증가할때 β -galactosidase의 활성도 증감 여부를 실험한 결과는 표 VI에 보여 준다.

시료의 농도를 4 mg/ml 부터 300 mg/ml까지 단계적으로 증가시킬때 효소활성도도 따라서 증가함을 볼 수 있었다. 이는 이들 두 茶 原料의 천연물 성분 중에 변이원성 유발 능력이 있는 것이 존재할 가능성을 강력히 시사한다고 볼 수 있다. 아울러 본 실험은 기호 식품 내지 건강 음료로 상용하는 茶들도 安全性 연구가 필요하다는 하나의 예가 될 수 있다고 하겠다.

Table V. Mutagenicity assay of tea materials, chloroform fraction by SOS-Chromotest with S-9 mixture and without S-9 mixture

Tea materials tested		β -galactosidase activity(unit)*	
		Without S-9	With S-9
Puerariae Radix	葛根	84	68
Cinnamomi Cortex	桂皮	12	49
Chaenomelis Fructus	木瓜	59	89
Schizandrae Fructus	五味子	82	80
Lycii Fructus	枸杞子	61	66
Zizyphi Fructus	大棗	46	79
Angelicae gigantis Semen	當歸	56	43
Cassiae Semen	決明子	65	70
Coicis Semen	薏苡仁	68	75
Zea Semen	玉蜀黍	71	84
Hordei Semen	麥芽	95	67
Eucommiae Cortex	杜冲	74	56
Zingiberis Rhizoma	生薑	65	98
Diospyrois Folium	柿葉	84	76
Perillae Semen	紫蘇子	72	86
Gynostemmae Herba	七葉膽	91	92

* Each value represents the average of duplicate experiments

Table VI. Dose-response study of Chaenomelis Fructus and Cassiae Semen samples

Concentration	β -galactosidase activity(unit)*		
	Chaenomelis Fructus (EtOH ext.)	Cassiae Semen (EtOH ext.)	Cassiae Semen (Water Frac.)
4 mg/ml	64	59	81
25 mg/ml	108	86	97
50 mg/ml	144	121	135
100 mg/ml	433	338	382
300 mg/ml	1,091	545	965

* Each value represents the average of duplicate experiments.

〈1990년 3월 2일 접수 : 3월 15일 수리〉

文 獻

1. 문조중, 안장수, 이종옥, 광인신, 유순영, 양화영, 국산 茶類의 規格制定에 관한 연구, 국립 보건원 보, 제20권, p.299(1983).
2. Chang, I.-M., Toxicity of Herbal Drugs in *Int. Forum on R & D for Procedures Involving Risk Assessment of Toxic Chemicals* (Ed. by I.-M. Chang and C.W. Park), p.243(Korean Soc. Toxicol.) (Seoul) (1987).
3. Chang, I.-M., Assay of Mutagenicity and Antimutagenicity of Traditional Herbal Drugs by Using SOS-Chromo/umu Test and Micronucleus Test in Mice in *Proc. Int. Symp. on New Drug Development from Natural Products* (Ed. by I.R. Lee, H.S. Yun-Choi and I.-M. Chang), p.229 (Korean Soc. Pharmacognosy) (Seoul) (1989).
4. Chang, I.-M., Oh, K.B., Suh, N.J., Shon, M.K., Zong, M., Yang, H.C. and Chung, M.H., Study on Mutagenicity of Pinellia Tuber: A possible Model for the Understanding Wisdom in the Use of Traditional Chinese Herbal Medicines in *Proc. 2nd Int. Symp. Recent Advances in Natural Products Research*, p.402, (Nat. Products Res. Inst.) (Seoul) (1989).
5. Quillardet, P. and Hofnung, M., *Mut. Res.* **147**, 65(1985).
6. Ohta, T., Nakamura, N., Moriya, M., Shirasu, Y., Kada, T.: *Mut. Res.* **131**, 101(1984).
7. Whong, W., Wen, Z., Stewart, Y.-F., Ong, T.-M.: *Mut. Res.* **175**, 139(1986).