

감마선 照射 生地黃의 Catapol 성분에 대한 안전성 및 유전독성학적 연구

김종욱* · 최효영¹ · 조정희 · 안덕균² · 육창수¹ · 변명우³ · 이주운³ · 임무혁 · 김도훈
식품의약품안전청, ¹경희대학교, ²자생생명공학연구소, ³한국원자력연구소

Studies on the Stability of Catapol Components, and Genotoxic Safety of γ -Irradiated Rehmanniae Radix crude

Jong-Wook Kim*, Ho-Young Choi¹, Jung-Hee Cho, Duk-Kyun Ahn², Chang-Soo Yook¹,
Myung-Woo Byun³, Ju-Woon Lee³, Moo-Hyeog Im, and Do-Hoon Kim

Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

¹Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Jaseng Research Institute of Biotechnology & Bioscience

³Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-600, Korea

Abstract – This study is concerning to identify the hygienic problems occurring in processing, storage, and distribution of Rehmanniae radix crude, and to investigate the possibility of application of safe and hygienic γ -irradiation techniques. The results are as follows. To compare the contents of catapol, index compound of Rehmanniae Radix crude, between before and after γ -irradiation, 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, and 30 kGy of γ -irradiation was applied to standard catapol and Rehmanniae radix crude. The contents of catapol in standard material and Rehmanniae radix crude were decreased with the increase of γ -irradiation level. However, active components of Rehmanniae Radix crude were not changed with γ -irradiation. These results indicate that active components of Rehmanniae Radix crude were preserved after γ -irradiation and those of Rehmanniae Radix crude did not showed significant change after irradiation of γ -ray up to 20 kGy.

Key words – Rehmanniae Radix crude, γ -irradiation, catapol, kGy

웰빙효과에 대한 국민들의 관심 고조와 생활수준 변화에 따른 건강에 대한 높은 관심 속에 한약재의 수입량과 국내 생산 유통량이 증가하여 한약재의 가공, 저장, 유통을 위한 안전한 새로운衛生化 기술 개발이 요구되고 있다.

방사선 照射技術 경우 도입단계에서 照射에 따른 유해물질 생성 가능성, 잔류방사성, 독성학적 안전성 등에 대한 논란을 야기하고 있으며, 현재 우리나라를 비롯하여 일본 및 중국 등에서 안전성에 대한 연구가 진행되고 있다.

본 연구는 한약재의 가공, 저장 및 유통을 위한 안전한衛生化 기술로 감마선 照射技術의 적용 가능성을 검토하였다. 생약재는 보관, 보존의 관리 소홀로 세균, 해충의 번식이 용이한 점에 대한 위생화, 원료의 안전공급, 효율적 제조공정 등에 이용되어온 기존 위생화 방법인 화학약품(훈증제등)처

리방법의 여러 가지 문제점이 제기되고 있다. 이에 이 문제점을 해결할 수 있는 감마선 조사 기술을 활용한 새로운 생약재의 위생화 방법 검토가 요구되고 있다. 절단 한약재의 경우 완전 건조가 이루어지지 않아 수분함량이 높고, 특히 온도가 높아지면 자체 발열로 효소작용이 왕성해져 변질의 우려가 있다. 그러므로, 한약재 중 비교적 수분함량이 높은 생지황을 연구대상으로 하였다. 따라서, 본 연구는 한약재의 가공, 저장 및 유통을 위한 안전한衛生化 기술로 감마선 照射技術의 적용 가능성을 검토하기 위해 감마선 照射 생지황 한약재의 지표물질인 catapol¹⁾에 감마선 照射를 각 흡수선량별로 실시하여 이를 지표물질의 변화정도를 관찰하고자 한다.

그러므로, 생지황 한약재의 catapol 성분 안전성을 HPLC로 변화를 확인하고, 이에 따른 유전독성학적 안전성을 평가하고자 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험과 배양된 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포

*교신저자(E-mail) : johnki@kFDA.go.kr
(FAX) : 02-380-1600

를 이용한 소핵유발 시험을 실시하여 유의성을 확인하기 위해 본 연구를 진행하였고, 생약재의 위생화를 위한 감마선 조사기술의 이용가능성을 검토하고, 유효성분의 변화를 확인하고, 유전독성학적 안전성을 평가하고자, 1차적으로 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험자료 – 실험에 사용한 지황류는 경상북도 의성에서
재배한 생지황를 직접 구입하여 식품의약품안전청 생약평
가부에서 감정한 것을 본 실험에 사용하였다.

감마선 照射 – 표준품과 시료의 감마선 조사는 한국원자력연구소의 연구실에서 감마선 조사시설(선원 : Co-60 10만 Ci)을 이용하여, 실온에서 시간당 10 kGy의 선량율로 5, 10, 15, 20 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량을 확인하기 위해 free radical dosimeter와 ceric cerous dosimeter를 이용한 결과, 총 흡수선량의 오차는 ± 0.2 kGy^o였다.

시약 및 기기 – 실험에 사용한 시약은 일급 또는 특급으로써 catapol은 和光純藥工業株式會社(wako, Japan)에서 제조된 것을 구입하였으며, acetonitrile과 MeOH, EtOH은 Merck社(GERMANY) 제조한 HPLC용을 사용하였으며, Ames test 시험에 사용한 제품은 oriental yeast (Japan), oxiad nutrient broth, 소핵시험에 사용한 시약은 GIBCO BRL(USA)제품을 사용하였다.

표준품 조제 – catapol 약 2.1 mg을 정밀히 달아 MeOH를 넣어 저량을 20 mL로 하였다.

검액 조제 – 생지황 약 5 g을 정밀히 달아 30%메탄올 100 ml를 넣어 유발에서 연화한 다음 homogenizer를 사용하여 분쇄하였다. 혼탁액을 메스플라스크에 옮기니 다음, 메

Table I. HPLC conditions for the analysis of catapols

Descriptions	Condition	
Instrument	Nanospace SI-2 (Shiseido)	
Column	Capcellpak MG C18 (1.5 mm × 250 mm, 5 µm)	(Shiseido)
	H ₂ O	Acetonitrile
	0 min. 97%	3%
	10 min. 97%	3%
Mobile Phase	13 min. 10%	90%
	18 min. 10%	90%
	19 min. 97%	3%
	25 min. 97%	3%
Flow Rate	0.1 ml/min	
Column Tem.	30(°C)	
Detector	UV 210 nm	
Injection Volume	5 µl	

탄을 넣어 약 100 mL가 되었을 때 때때로 흔들면서 1시간 30분 동안 초음파 진탕 추출한 다음 전량을 100 mL로 하고, 그 액 1 mL에 물을 넣어 정확히 10 mL로 하여 검액으로 하였다. 또 검액을 여지로 여과한 다음 HPLC로 시험하였다.

HPLC 조건 – catapol 분석조건은 Table I에 나타내었다. HPLC UV/VIS-Detector를 사용하여 PDA 방법으로 각 표준물질의 200-500 nm 파장 범위에서 吸光度를 분석하여 최대 흡수 파장을 측정하였다. 이 후 확립된 분석조건에 따라 표준물질들에 대한 농도별 표준곡선을 작성하였고, 표준물질 용액과 각 시료에 대한 감마선 照射시 농도의 변화를 관찰하였다.

Catapol 표준액에 γ -線 照射전후 변화량 – catapol 표준액 일정량을 취하여 감마선 조사(0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 15, 20, 30 kGy)를 실시하여 검량선을 작성하였으며, 표준액에서의 조사전후의 catapol의 변화량을 확인하였으며, 生地黃에 감마선 조사(0, 5, 10, 15, 20 kGy)전후의 catapol의 변화량을 확인하였다.

HPLC에 의한 catapol성분 안정성 시험 – 겸액조제 전 처리방법과 동일하게 처리후 겸액으로 사용하였다. 추출시료를 이용하여 HPLC 기기조건에서 시판 catapol 표준품과의 peak 일치 여부를 확인하였다.

γ -선exposed 생지황의 독성학적 안전성 평가 - (1) Ames test - 시험방법은 Maron과 Ames의 방법^{2,3)}에 따라 배지, 시약 및 4% S9 mix를 조제하여 시험에 사용하였으며 S9분획은 Pheno barbital과 5,6-benzoflavone으로 유도한 Sprague-Dawley rat의 간으로부터 분리한 것으로 일본 Oriental Yeast Co.에서 구입하였다. 시험에 사용한 *S. typhimurium* TA98, TA100은 한국화학연구원에서 분양받았으며 histidine 요구성, deep rough (*rfa*)특성, UV에 대한 민감도 (*uvrB* 돌연변

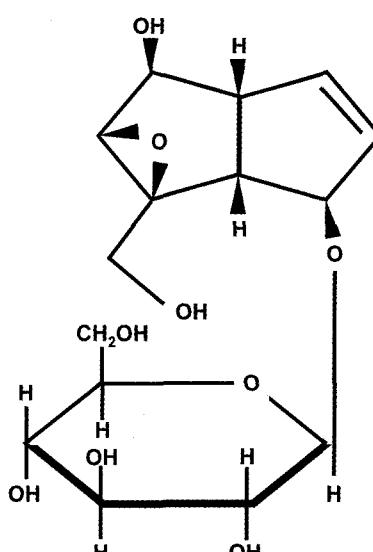


Fig. 1 Chemical structure of catapol

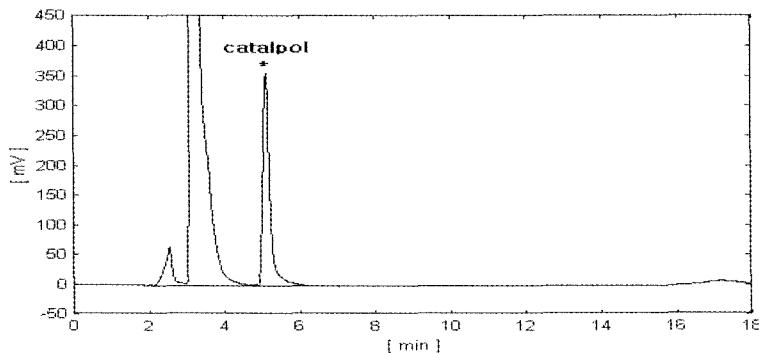


Fig. 2. HPLC profile of catapol (Rt4.93 min.) Standard.

이), R-factor에 의한 ampicillin 또는 teracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다.

(2) 소핵세포 시험 – 시험에 사용된 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포는 염색체가 25개이며, 세포주기는 15 시간으로서 염색체이상 시험에 적합한 조건을 갖춘 세포로서 국립독성연구원에서 분양 받았다. 배지는 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 5 ×

10^{-5} M 2-mercaptoethanol 및 20 mM HEPES buffer를 첨가시킨 Eagle's minimal essential medium을 사용하였으며 모두 GIBCO BRL, Inc. (USA)에서 구입하였다.

결 과

catapol 표준액 및 생자황의 γ -線 照射전후 변화 – catapol 표준액을 각 흡수선량 단계별로 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 30 kGy로 감마선 조사를 실시하여 표준액에서의 감마선 조사에 의한 변화에 따른 검량선을 작성하였다(Fig. 4). HPLC UV/VIS-Detector를 사용하여 PDA 방법으로 표준물

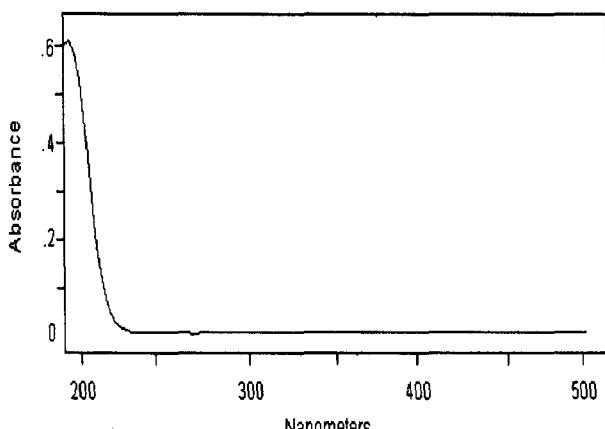


Fig. 3. The PDA spectrum of catapol standard.

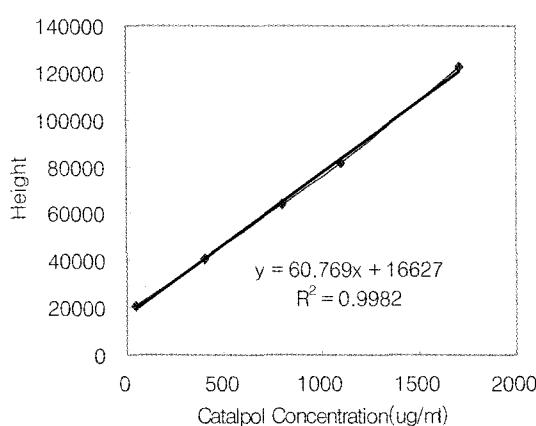


Fig. 4. Calibration curve of catapol standard.

Table II. Reduction rates of catapol (500 ppm in MeOH) according to γ -irradiation strength

Sample	Detection level (ppm)	Reduction rate (%)
control	500.0±2.3	
2.5 kGy	490.1±3.7	2.0
5 kGy	474.4±5.0	5.1
7.5 kGy	464.7±4.8	7.1
10 kGy	445.7±10.2	10.9
12.5 kGy	431.5±7.2	13.7
15 kGy	426.4±6.1	14.7
20 kGy	410.2±5.9	18.0
30 kGy	389.7±6.1	22.1

Table III. Reduction rates of catapol in Rehmanniae Radix crude by the strength of γ -irradiation

Sample	Detection level (ppm)	Reduction rate (%)
control	2802.6±111.7	
5 kGy	1136.6±17.0	59.4
10 kGy	929.6±22.5	66.8
15 kGy	699.7±15.9	75.0
20 kGy	438.7±18.2	84.3

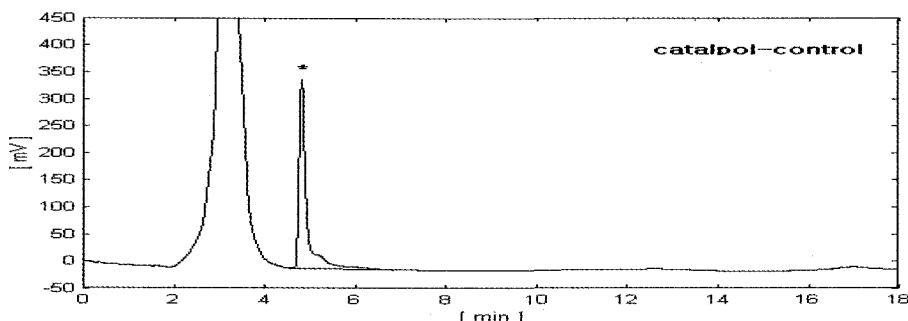


Fig. 5. HPLC profile of catapol in non-irradiated *Rehmanniae Radix* crude.

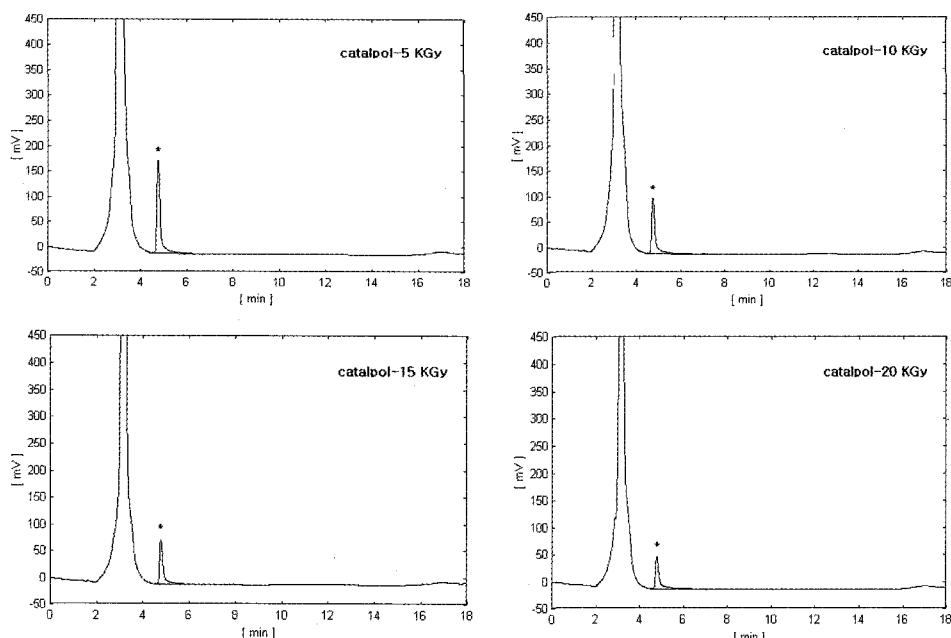


Fig. 6. HPLC profile of catapol in 5, 10, 15, 20 kGy-irradiated *Rehmanniae Radix* crude.

질의 210 nm 파장 범위에서 최대 흡수 파장에서 분석하였다(Fig. 3). 시험 결과 표준액에서 감마선 照射전후 catapol 변화는 각 단계별 감마선 조사량에 따라 점차적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Table III). 생약재 생지황에서 catapol 함량 변화는 γ -線 照射전후 각 단계별(0, 5, 10, 15, 20 kGy) 변화를 확인하였으며, 동결과는 표준품과 같이 감마선 조사량에 따라 점차적으로 감소하는 것을 확인하였다(Table III, Fig. 5, 6).

생지황의 catapol성분 안정성 검증 – 방사선 조사 생지황의 유효성분 안정성을 검증하기 위해 생지황에 많이 함유된 catapol성분을 추출하였다. HPLC 기기의 column은 capcellpak MG C18 (1.5 mm × 250 mm, 5 μ m), 이동상은 3% 및 90% MeCN 용매를 이용하여 적절한 분리를 하여 catapol은 4.93분에서 양호하게 분리되었다(Fig. 2).

생지황의 감마선 照射(5, 10, 15, 20 kGy)군과 비조사(0

kGy)군의 유효성분 정량결과(Table III), 감마선 照射 생지황에서 catapol의 함량이 5 kGy에서 비조사군보다 50% 이상 감소하였고, 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy에서는 조금씩 각 단계별로 감소하였다. 표준품의 chromatogram pattern은 비조사군과 조사군에서 미세하게 감소 변화하였다(Table II).

생지황에서 감마선 비조사군과 5 kGy 照射後 catapol 성분량이 50% 이상 급격하게 감소되었으며(Table III) 최초 照射후 성분량이 급격하게 감소된 요인은 여러 가지의 이화학적인 요인으로 볼수 있으나 특히 수분의 감소로 인하여 여러 성분들 상호변이에 의하여 발생한 것으로 사료되고, 10 kGy이상에서는 미세하게 감소됨을 알 수 있었다.

독성학적 안전성 평가 – 1) *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험 30 kGy로 감마선 照射된 생지황 열수추출물의 세균에 있어서의 돌연변이 유발여부를 검색

하기 위하여 *S. typhimurium*의 histidine 요구성 균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537를 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시하였다.

대상시료가 균주생장 억제를 거의 나타내지 않음을 예비 실험에서 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 의약품 등의 독성 시험 기준(식품의약품안전청 고시 제 1999-61호, 1999년 12월 22일)에 의하여 최고농도를 5 mg/plate로 하여, 대사활성계 미적용(-S) 및 적용(+S) 하에 공비를 2로 한 5단계 농도군으로 시험하였다. 시험결과 복귀변이 집락수의 평균과 표준편차로 나타내었고, 복귀변이 집락수가 음성대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 판정하였다.

시험 결과 음성대조군의 복귀변이 집락수는 문헌치⁴⁾ 범위 이내였고, 양성대조 화합물에 의해 복귀변이 집락수가 현저히 증가하여 본 시험이 적절히 행하여졌음을 알 수 있다. 시험물질을 처리한 균주의 모든 농도군에서는 집락수의 증가 경향은 나타나지 않아, 본 시험 조건하에 사용한 균주

들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

대사활성화시키지 않은 경우와 시킨 경우 모두에서 감마선 조사 생지황추출물에 의한 각 균주의 복귀돌연변이 집락수의 증가를 인정할 수 없었다. 또한 각 용량 단계에서 감마선 조사군과 비조사군의 집락수도 차이가 없었다(Table IV).

이 결과로 보아 감마선 照射 생지황 추출물이 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었으며 하등⁵⁾의 실험결과와 일치하고 있다.

2) 포유류 배양세포를 이용한 소핵시험

30 kGy에서 감마선 照射된 생지황 열수추출물의 유전독성을 평가하고자 수컷 마우스(ICR) 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 투여 용량은 용해 한계 상한선을 최고 용량으로 하였다. Cytokinesis-block method에 따라 생성시킨 binucleated cells 중에 형성된 소핵을 조사한 결과를 Table V에 나타내었다.

약 7주령의 수컷 마우스에 시험물질을 0, 500, 1000, 2000 mg/kg의 용량을 단회 경구 투여하고, 투여 후 약 24시간에

Table IV. Ames test results of gamma-irradiated Rehmanniae Radix crude

Test Sample	S-9 mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate (mean±S.D.)			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Non-irradiated	-		21±5	146±7	16±3	6±2
	+		24±5	147±13	22±1	8±1
	-	5000	20±2	158±6	19±3	6±1
	-	2500	20±1	153±5	25±1	5±0
	-	1250	21±3	159±2	15±0	7±1
	-	625	23±2	150±6	20±4	6±0
	-	312	15±4	155±1	18±1	6±1
	+	5000	21±1	174±4	24±5	6±1
	+	2500	23±2	169±1	24±4	8±1
	+	1250	25±0	147±7	20±1	10±1
30 kGy-irradiated	+	625	31±1	164±4	22±4	9±1
	+	312	21±5	150±8	21±4	10±1
	-	5000	22±1	160±13	27±1	7±2
	-	2500	24±4	170±1	23±1	6±2
	-	1250	22±3	129±8	17±1	8±1
	-	625	23±2	132±3	21±3	7±1
	-	312	24±2	145±4	19±1	5±1
	+	5000	34±1	172±6	24±2	11±0
	+	2500	25±1	145±18	21±1	7±3
	+	1250	31±2	158±7	20±1	8±1
Positive control	+	625	26±0	138±9	21±4	5±1
	+	312	36±1	138±1	22±1	6±2
Positive control	-		425±59 ^a	772±94 ^b	461±63 ^b	227±13 ^c
	+		704±28 ^d	1408±82 ^d	588±11 ^e	591±35 ^e

Positive control agents; a : 4-Nitroquinoline-1-oxide (0.5 μg/plate), b : Sodium azide (0.5 μg/plate), c : 9-Aminoacridine (50 μg/plate), d : 2-Aminoanthracene (2 μg/plate), e : 2-Aminoanthracene (4 μg/plate).

Table V. Bone marrow micronucleus test results of Rehmanniae Radix crude

Test Sample	Dose (mg/kg)	No. of animal	MNPCE/2000PCE (mean ± S.D.)	PCE/NCE+PCE (mean ± S.D.)
water		5	0.36±0.82	0.44±0.02
Non-irradiated Rehmanniae Radix	2000	5	0.51±0.52	0.44±0.04
	1000	5	0.47±0.56	0.44±0.03
	500	5	0.42±0.53	0.45±0.03
30 kGy-irradiated Rehmanniae Radix	2000	5	0.67±0.55	0.44±0.02
	1000	5	0.50±0.51	0.45±0.04
	500	5	0.45±0.53	0.45±0.03
Cyclophosphamide	30	5	27.17±1.87 ^a	0.44±0.02

a : Significantly different from control at $P < 0.01$.

골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다.

음성대조군의 경우 2,000개의 binucleated cells 중에 형성된 소핵은 22.0 ± 5.7 개로 문헌치의 수준⁶⁾이었고, 양성대조화합물에 의해 소핵 수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여졌음을 알 수 있었다. 대사 활성화시키지 않은 경우와 시킨 경우 모두에서 감마선 照射 지향추출물에 의한 소핵수의 증가를 인정할 수 없었으며 각 용량 단계에서 모두 3%이하의 소핵빈도를 보여 음성으로 판정되었다.

개체당 2,000개의 다염성적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵을 가진 다염성적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수한 결과시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았으며, 총적혈구 중 다염성적혈구 비율에서도 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의성은 없었다.

이 결과에서 감마선 조사 생지황추출물이 세포핵분열 중에 이상을 유발하지 않음으로 보아 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었으며, 이 결과는 하 등,⁵⁾ 조⁷⁾의 실험결과와 일치하고 있다. 이와 같은 결과를 토대로 생지황의 유효성분이 10 kGy의 감마선 조사에서는 파괴되지 않고 안전하게 유지되며, 또한 유전독성학적 실험에서 감마선 照射 생지황이 직접변이원이나 간접변이원으로서 작용하지 않음을 알 수 있었다. 이는 감마선 照射에 의하여 유해물질 생성 가능성이 없음을 간접적으로 확인할 수 있는 결과라고 사료된다. 한편, 앞으로 독성학적인 평가는 만성독성실험 및 생식독성실험 등의 지표가 다른 여러 가지 시험에서 얻은 결과로부터 종합적으로 판정되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

이상의 결과로 보아 한약재 생지황을 감마선으로 照射한

후에도 생지황내 유효성분이 그대로 보전되는 것으로 사료되며, 이러한 결과에서 생지황은 20 kGy까지 감마선 照射에도 유효성분의 변화가 거의 없는 것을 인정할 수 있었다. 또한 감마선 照射 생지황 추출물의 독성학적 안전성에 대하여 앞으로 생체내 유전독성시험, 만성독성 및 생식독성시험 등의 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

인용문헌

- 육홍선, 김성애, 조성기, 변명우 (1996) 감마선 조사된 홍삼분말의 항산화 효과 및 유전독성학적 안전성. 한국식품위생안전학회지 **11**: 41-50.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**: 173-215.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* **31**: 347-364.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* **147**: 29-36.
- 허광원, 정해관, 오혜영, 허옥순, 손수정, 한의식, 정성철, 최부영, 김영미, 김필선, 문화희 (1994) 방사선 조사 인삼의 유전독성에 관한 연구. 한국식품위생학회지 **9**: 67-74.
- Wakata A. and Sasaki M.S. (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured chines hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutation Res.* **190**: 51-57.
- 조성기 (1997) CHO세포에서의 소핵시험을 이용한 감마선조사 생약재의 안전성에 관한 유전독성학적 평가. 한국식품영양과학회지 **26**: 952-957.

(2005년 2월 17일 접수)