

## 와송의 항돌연변이 효과

박희준 · 문숙희\* · 박건영\* · 최재수\*\* · 정해영 · 양한석 · 서석수  
부산대학교 약대학, \*부산대학교 식품영양학과, \*\*부산수산대학교 식품영양학과

(Received June 1, 1991)

### Antimutagenic Effect of *Orostachys japonicus*

Hee Juhn Park, Suk Hee Moon\*, Kun Young Park\*, Jae Sue Choi\*\*,  
Hae Young Chung, Han Suk Young and Suk Soo Suh  
College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea  
\*Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea  
\*\*Dept. of Nutrition and Food Science, Pusan National University, Pusan 608-737, Korea

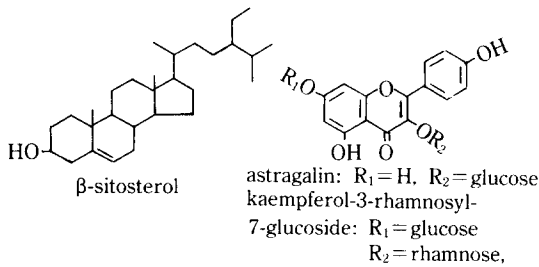
**Abstract**—The anti-mutagenic effect of *Orostachys japonicus* (OJ) toward aflatoxin (AFB<sub>1</sub>) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in the *Salmonella* assay system was studied. The methanol extract of OJ inhibited the mutagenicity induced by AFB<sub>1</sub> about 97% when 5% of the extract added to the system. Butanol fraction from the methanol extract was the most effective against AFB<sub>1</sub>. However, other fractions of hexane, chloroform, and ethylacetate also showed considerable antimutagenic activity against AFB<sub>1</sub>. Several identified compounds from the fractions of OJ exhibited anti-mutagenic effect.  $\beta$ -Sitosterol, astragaloside and kaempferol-3-rhamnosyl-7-glucoside were selected from the compounds, and these compounds inhibited the mutagenicity dose-dependently. These 3 compounds also decreased the mutagenicity induced by MNNG. From these results, it is suggested that the major compounds such as triterpene, sterol and flavonoid in the OJ were responsible for the inhibition of the AFB<sub>1</sub> and MNNG-induced mutagenicities.

**Keywords** □ *Orostachys japonicus*, aflatoxin B<sub>1</sub>, MNNG, anti-mutagenicity.

최근 식물과 동물로부터 천연 항돌연변이물질들을 찾으려는 시도가 계속되고 있으며, 실제로 야채류, 과일류, 해조류, 동물들로부터 이들이 발견되고 있다.<sup>1-5)</sup> 많은 연구자들은 또한 한약재로서 사용되는 생약류로부터 항돌연변이물질들을 찾으려고 하고 있으며 현재까지 *Rhubarb radix*,<sup>6)</sup> *Zingiber officinale*,<sup>7)</sup> *Ranunculus*와 *Anemone plants*,<sup>8)</sup> *Isodonis herba*,<sup>9)</sup> *Cinnamomi cortex*,<sup>10)</sup> *Paeoniae*, *Bupleuri*, *Hoelen*과 *Glycyrrhizae radix*<sup>11)</sup> 등에서 항돌연변이 효과가 알려져 있으며 최근 Ishii 등<sup>12)</sup>과 Meng 등<sup>13)</sup>은 수백종의 한약재 엑기스로부터 많은 생약류 등이 항돌연변이 작용을 가지고 있음을 밝혔다.

저자 등은 수집종의 한국산 생약류로부터 돌연변이 및 항돌연변이 효과를 검색하는 가운데 와송의 MeOH 추출물이 현저한 항돌연변이 효과를 나타내었으므로 이를 체계적으로 분획하고 각각의 분획물로부터 항돌연변이활성을 검토하고 그 활성성분을 구명하고자 하였다. 와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 일명 岩松, 屋松, 昨葉何草 등으로 불리는 들나물과(Crassulaceae)의 다년생 초본식물로서 한방에서 解熱, 消腫, 止血, 利濕 등에 사용되며 우리나라에서 민간요법으로 암치료에도 많이 사용되고 있다.<sup>14,15)</sup> 그러나 민간에서 이용되고 있는 항암약제는 약화학적 및 약리학적 검토자료가 거의 없는 실정이므로 이러한 연구의 일환으로 와송 MeOH 엑기스의 각 분획물과 확인된 주성분들이 항암효과에 앞서 항

본 논문에 관한 문의는 양한석에게 연락바람.



**Fig. 1**—Chemical structures of antimutagenic compounds

돌연변이 효과를 나타내는지를 연구하였다. 외송의 화학성분에 관하여서는 이미 저자 등<sup>16,17)</sup>에 의하여 보고된 바 있다.

### 실험방법

**실험재료**—1989년 5월 중에 경남 양산에서 채취한 외송(*Orostachys japonicus* A. Berger)을 채집하여 동정하고 실험재료로 사용하였다.

**시약**—Aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>), N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine(NMMG), dimethyl sulfoxide(DMSO), glucose-6-phosphate, NADPH는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다. 용매는 추출시에만 공업용을 종류하여 사용하였으며, 나머지는 1급시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(Merck, Art 7734), TLC는 precoated Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plate(Merck, Art 5735)를 사용하였다.

**시료조제**—전보<sup>16,17)</sup>에 따라 행하였다. 즉 시료(5 kg)를 MeOH로 추출하고 용매는 40°C에서 감압상태에서 증발시켜 건조된 분말상태의 MeOH extract를 만들었다. 위의 추출물중 일부분(2~3g)만 취하고 나머지는 다시 증류수에 녹여 hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O의 순으로 순차적으로 분획한 후 이들을 감압하에서 건조하여 분말을 얻었다(각각 26g, 54g, 20g, 31g 및 8g). Fr. 1(fatty acid ester mixture), glutinone, primary long chain alcohol, friedelin, triterpene seco acid mixture는 hexane fraction으로부터  $\beta$ -sitosterol( $\beta$ -sitosterol과 campesterol의 7:3 혼합물)은 hexane 및 CHCl<sub>3</sub> fraction으로부터, astragalol, quercitrin, isoquercitrin 및 kaempferol-3-rhamnosyl-7-glucoside는 EtOAc 및 BuOH fraction 으로부터 분리하였으며 직접 표준품과 동정하여 그

**Table I**—Inhibitory effect of methanol extract from *O. japonicus* on the mutagenicity induced by aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 1  $\mu$ g/plate) in *Salmonella typhimurium* strains of TA98 and TA100.

Treatment	MeOH ext. concentration(%)	Revertants/plate	
		TA98	TA100
Spontaneous		38 $\pm$ 1*	120 $\pm$ 13
Aflatoxin B <sub>1</sub>		1731 $\pm$ 71	1976 $\pm$ 13
AFB <sub>1</sub> + MeOH ext.	2.5	308 $\pm$ 37(84%)*	404 $\pm$ 87(85%)
AFB <sub>1</sub> + MeOH ext.	5.0	89 $\pm$ 12(97%)	167 $\pm$ 5(97%)

\*Each value represents mean  $\pm$  S.D. based on 3 Expts. The values in parentheses represents the inhibition rate.

구조를 확인하였다. 건조된 각 분획물 및 분리된 각 화합물들은 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

**Ames mutagenicity test**—*Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성인 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 미국 California 대학(Berkeley 분교)의 Ames 박사로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 그리고 실험전에 균주들은 정기적으로 histidine 요구성, *rfa*, *uvr-B* 돌연변이와 R factor에 대한 유전형질을 확인하였다.

S9 fraction과 S9 mixture는 Maron과 Ames<sup>18)</sup>의 방법에 따라 제조하였는데 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발실험을 위해 사용하였다. 돌연변이 유발실험은 preincubation test를 이용하였는데, 즉 0.5 ml의 S9 mixture(MNNG의 경우는 phosphate buffer 0.5 ml), 하룻밤 배양된 균주(1~2  $\times$  10<sup>9</sup> cells/ml) 0.1 ml와 시료(돌연변이원 물질; AFB<sub>1</sub> 또는 MNNG)와 시험분획물 또는 시험화합물 0.1 ml를 병의 멸균한 cap tube에 첨가하여 가볍게 vortex 하였다. 그리고 37°C에서 30분간 예비배양한 후 45°C의 top agar 2 ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex 하였다. 그 후 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 수를 계산하였다.

### 결과 및 고찰

수중 생약의 screening 차원에서 외송이 항암효과의 유의성이 인정된다는 한 등<sup>19)</sup>의 보고는 있었으나 그 밖에 외송에 대한 생리활성에 관한 연구는 거의 찾아볼 수 없다. Table I에서 보는 바와 같이 외송의 MeOH 추출물은 *Salmonella typhimurium* TA98과

**Table II**—Inhibitory effect of each fractions of methanol extract on the mutagenicity induced by aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 1 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

Treatment	Revertants/plate	
Spontaneous	162 ± 11*	
Aflatoxin B <sub>1</sub>	2181 ± 103	
	Fraction(Fr)	concentration(%)
	1.25	2.50
AFB <sub>1</sub> + Hexane Fr.	621 ± 71(67%)	234 ± 46(96%)
AFB <sub>1</sub> + CHCl <sub>3</sub> Fr.	792 ± 58(69%)	345 ± 6(91%)
AFB <sub>1</sub> + EtOAc Fr.	250 ± 10(96%)	232 ± 28(96%)
AFB <sub>1</sub> + BuOH Fr.	184 ± 17(99%)	162 ± 8(100%)
AFB <sub>1</sub> + H <sub>2</sub> O Fr.	1962 ± 78(11%)	2281 ± 199(9%)

\*Each value represents mean ± S.D. based on 3 Expts. The values in parentheses represents the inhibition rate.

TA100에서 각각 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성을 크게 저해했으며 5% 첨가농도에서는 거의 대부분(97%)이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. AFB<sub>1</sub>은 indirect mutagen으로 간의 microsomal fraction에 있는 효소계에 의해 activation을 받는데 와송의 MeOH 추출물은 발암물질의 전환 또는 발암물질이 DNA와 결합하는 것을 저해하는 것으로 생각된다. 특히 한 방에서는 와송이 항암작용을 하는 것으로 알려져 있는데<sup>15)</sup> 와송은 항암작용에 앞서 항돌연변이적 역할을 담당하고 있는 것으로 사료되었다.

이 항돌연변이적 역할을 담당하고 있는 물질을 동정하기 위하여 MeOH 추출물을 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 물층으로 분획하여 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이 효과를 검토하였다. Table II에서 나타나 있듯이 각 분획물의 농도를 1.25%로 하여 AFB<sub>1</sub>과 반응시켰을 때 물층을 제외하고는 각 획분이 상당한 저해효과를 나타내었으며 그 중 butanol 분획물이 가장 저해효과가 컸었다. 첨가농도 2.5% 수준에서도 butanol 분획물이 가장 저해효과가 컸으나(100%) hexane, chloroform, ethylacetate 분획물들도 그 효과가 컸었다(90~95%). 관련 활성성분을 찾기 위해 이들 분획물로부터 분리하여 동정된 물질들<sup>16,17)</sup>을 25 mM 농도로 하여 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과는 Table III과 같다. 대부분의 화합물에서 저해효과를 나타내었는데 hexane 분획물로부터 분리한 triterpene seco acid methylester mix-

**Table III**—Inhibitory effect of various compounds (25 mM) found in *O. japonicus* on the mutagenicity induced by aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 1 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100.

Treatment	Revertants/plate
Spontaneous	142 ± 19*
Aflatoxin B <sub>1</sub>	949 ± 22
AFB <sub>1</sub> + Fr.1(fatty acid ester mixture)	785 ± 102(20%)
AFB <sub>1</sub> + Triterpene seco acid methyl ester	508 ± 50(55%)
AFB <sub>1</sub> + Glutinine	659 ± 66(36%)
AFB <sub>1</sub> + Friedelin	892 ± 16( 7%)
AFB <sub>1</sub> + Primary long chain alcohol	770 ± 93(22%)
AFB <sub>1</sub> + β-Sitosterol	650 ± 75(37%)
AFB <sub>1</sub> + Astragalin	560 ± 24(48%)
AFB <sub>1</sub> + Quercitrin	608 ± 72(42%)
AFB <sub>1</sub> + Isoquercitrin	595 ± 38(44%)
AFB <sub>1</sub> + Kaempferol-3-rhamnosyl-7-glucoside	560 ± 14(48%)

\*Each value represents mean ± S.D. based on 3 Expts. The values in parentheses represents the inhibition rate.

ture, glutinine과 chloroform 분획물로부터 분리한 β-sitosterol 등이 저해효과를 나타내었고, ethylacetate 분획물에서 분리한 astragalin, quercitrin과 isoquercitrin 그리고 butanol 분획물에서 분리한 kaempferol-3-rhamnosyl- 7-glucoside 등의 flavonoid 화합물 역시 저해효과를 나타내었다. 반면 지방산 methyl ester 혼합물인 sufraction(Fr. 1), friedelin, primary long chain alcohol은 저해효과가 없거나 약하게 나타났다.

이상의 결과에서 보면 와송의 항돌연변이성 물질은 대체적으로 각 획분에서 넓게 분포되어 있음을 확인할 수 있었으며 와송의 flavonoid류, triterpene 및 식물성 sterol 등의 성분들이 광범위하게 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성에 대한 저해효과를 나타내었다고 볼 수 있다.

이들 분리동정된 물질중 상대적으로 강한 효과를 나타내는 β-sitosterol과 astragalin 및 kaempferol-3-rhamnosyl- 7-glucoside의 농도별에 따른 저해효과를 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 세 화합물 모두 첨가농도의 증가에 따라 저해효과가 증가되는 것을 확인할 수 있으며, 특히 β-sitosterol의 경우 농도증가에 따라서 두드러진 저해효과를 관찰할 수 있었다. 이러한

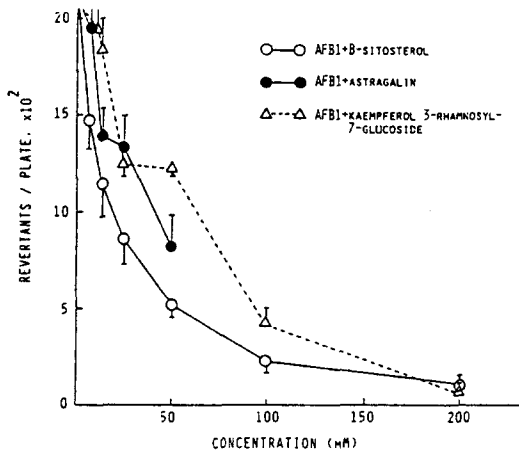


Fig. 1—Inhibitory effect of identified compounds of  $\beta$ -sitosterol, astragalalin and kaempferol-3-rhamnosyl-7-glucoside from *O. japonicus* on the mutagenicity induced by aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>, 1  $\mu$ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Table IV—Inhibitory effect of  $\beta$ -sitosterol, astragalalin and kaempferol-3-rhamnosyl-7-glucoside (25 mM) from *O. japonicus* on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5  $\mu$ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

Treatment	Revertants/plate
Spontaneous	100 $\pm$ 13*
MNNG	440 $\pm$ 40
MNNG + $\beta$ -Sitosterol	316 $\pm$ 25(36%)
MNNG + Astragalalin	325 $\pm$ 35(34%)
MNNG + Kaempferol-3-rhamnosyl-7-glucoside	263 $\pm$ 17(52%)

\*Each value represents mean  $\pm$  S.D. based on 3 Expts. The values in parentheses represents the inhibition rate.

사실은 Lawson<sup>20)</sup> 등에 의한  $\beta$ -sitosterol이 N-methyl-N-nitrosourea의 돌연변이를 억제하는 항돌연변이 활성성분으로서 저농도에서는 그 효과가 미약하고 고농도로 갈수록 강한 저해효과를 나타낸다고 하는 보고와 아주 잘 일치한다. Table IV에서는 direct mutagen인 MNNG의 돌연변이 유발성에 이들 세 화합물(25 mM 농도첨가)의 저해효과를 검토한 결과는 나타내고 있는데 kaempferol-3-rhamnosyl-7-glucoside에 의한 저해효과가 컸으며 저해 pattern은 AFB<sub>1</sub>을

첨가한 경우와 비슷한 효과를 나타내었다.

결국 항암제로 민간에서 널리 사용되는 와송은 항돌연변이 효과가 있다고 하겠다. 와송의 MeOH 추출물은 AFB<sub>1</sub>에 대한 돌연변이 유발 저해효과를 크게 나타내었으며, 각 분획물중 chloroform, ethylacetate, butanol 분획물들 모두 상당한 저해효과를 나타내었다. 그외 이들내의 분리동정된 여러 화합물들도 농도에 따라 그 저해도가 증가되는 것을 관찰할 수 있어 와송에서의 항돌연변이 효과는 어느 한 화합물에 의한 효과라기 보다는 다양한 화합물의 복합, 즉 와송의 주성분인 triterpene, sterol 및 flavonoid 성분들의 복합작용에 의한 항돌연변이적 효과에 의해 일어난 결과라고 볼 수 있으며, 민간에서 항암제로 쓰이는 와송의 항암효과에 대한 생화학적인 연구가 더욱 계속되어야 하리라 생각한다.

## 결 론

*Salmonella* assay system에서 와송의 추출물 및 그들 성분들의 AFB<sub>1</sub>과 MNNG에 대한 항돌연변이 유발 억제효과를 검토한 결과 와송의 methanol 추출물은 강력한 항돌연변이 효과가 있음이 나타났다. 와송의 5% methanol 추출물을 실험계에 첨가했을 때 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성은 97% 정도 저해되었다. 와송의 methanol 추출물중 butanol 분획물이 가장 효과가 있었으며 그외 hexane, chloroform, ethylacetate 분획물들도 상당한 저해효과를 나타내었다. 와송의 성분중 여러 화합물이 저해효과를 나타내었으며 그중  $\beta$ -sitosterol, astragalalin과 kaempferol-3-rhamnosyl 7-glucoside의 돌연변이유발 저해효과를 본 결과 농도의 증가에 따라 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발성을 크게 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 이 세 화합물들은 MNNG에 대해서도 같은 저해효과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 와송의 항돌연변이 물질로 작용한 것은 와송의 주요성분이 triterpene, sterol, flavonoid 등으로써 이들 성분들의 복합작용이라 추측되었다.

## 감사의 말씀

이 연구는 1990년도 한국과학재단 연구비지원(과제번호 90-0500-03)에 의한 결과의 일부이며 이를

감사드린다.

## 문 헌

- 1) Kada, T.: Recent research on environment mutagens. *Nippon Nogekagaku Kaishi* **55**, 597(1981).
- 2) Morita, K., Hara, M. and Kada, T.: Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1235(1978).
- 3) Seo, J.S., Lee, Y.W., Suh, N.J. and Chang, I.M.: Assay of antimutagenic activities of vegetable plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 88(1990).
- 4) Baik, C.W. and Ham, S.S.: Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from apple by using SOS chromotest. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 618(1990).
- 5) Wall, M.E., Wani, M.C., Manikumar, G. Taylor, H., Hughes, T.J. and Gaetano, K.: Plant antimutagenic agents, 7. Structure and antimutagenic properties of cymobarbatol and 4-isocymobarbatol, new cymopols from green alga(*Cymopolia barbata*). *J. Nat. Prod.* **52**, 1092(1989) and references cited therein.
- 6) Kushi, A., Koiwai, A., Yoshida, D. and Goto, F.: Effect of emodin on the mutagenicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2513(1980).
- 7) Nakamura, H. and Yamamoto, T.: Mutagen and antimutagen in ginger, *Zingiber officinale*. *Mutation Res.* **103**, 119(1982).
- 8) Minakata, H., Komura, H., Nakanishi, K. and Kada, T.: Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants. *Mutation Res.* **116**, 317(1983).
- 9) Kakinuma, K., Okada, Y., Ikegawa, N., Kada, T. and Nomoto, M.: Antimutagenic diterpenoids from a crude drug *Isodonis herba* (Enmei-So). *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1647(1984).
- 10) Kakinuma, K., Koike, J., Kotani, K., Ikegawa, N., Kada, T. and Nomoto, M.: Cinnamaldehyde: Identification of an antimutagen from a crude drug, *Cinnamomi cortex*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1905(1984).
- 11) Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y., Sato, T., Yamada, A., Hibi, M. and Yamada, F.: Antimutagenicity of extracts from crude drugs in Chinese medicines. *Mutation Res.* **174**, 1(1986).
- 12) Ishii, R., Yoshikawa, K., Minakata, H., Komura, H. and Kada, T.: Specificities of bio-antimutagens in plant kingdom. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2587(1984).
- 13) Meng, Z.M., Sakai, Y., Ose, Y., Sato, T., Nagase, H., Kito, H., Sato, M., Mizuno, M., Ono, K. and Nakane, H.: Antimutagenic activity by the medicinal plants in traditional Chinese medicines. *Shoyakugaku Zasshi* **44**, 225(1990).
- 14) 김재백 : 원색천연약물 대사전(상권), 남산당, 서울, p.447(1984).
- 15) 배성식 : 한방과 건강 **1**, 26(1990).
- 16) Park, H.J., Young, H.S., Park, K.Y., Rhee, S.H., Chung, H.Y. and Choi, J.S.: Flavonoids from the whole plants of *Orostachys japonicus*. *Arch. Pharm. Res. in press* (1991).
- 17) 박희준, 양한석, 김정옥, 이숙희, 최재수 : 와송의 성분에 관한 연구, 생약학회지, 인쇄중 (1991).
- 18) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173(1983).
- 19) 한대석, 정보섭, 김영중 : 생약의 항암성에 관한 연구. 생약학회지 **11**, 7(1980).
- 20) Lawson, T., Nunnally, J., Walker, B., Bresnick, E., Wheeler, D. and Wheeler, M.: Isolation of compounds with antimutagenic activity from Savoy Chieftain cabbage. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1363 (1989).