

천연 Rutin의 항균효과와 급성독성에 미치는 영향

임교환, 어성국, 김영소, 이종길, 한성순*

충북대학교 약학대학

Antimicrobial Activity and Acute Toxicity of Natural Rutin

Kyo Hwan Rym, Seong Kug Eo, Young So Kim,

Chong Kil Lee and Seong Sun Han*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract - As part of our search for less toxic antimicrobial agents from natural resources, antimicrobial activity of rutin isolated from *Sophora japonica* was tested *in vitro* against four kinds of gram positive bacteria and four kinds of gram negative bacteria by serial broth dilution method. Among eight kinds of bacteria tested, the antimicrobial activity of rutin was the most potent against *Mycobacterium smegmatis* showing MIC of 375 µg/ml. The acute toxicity of rutin was examined in mice and rats, and LD₅₀ value administered intraperitoneally in mice was 650 mg/kg (Confidence limit: 894-1,473 mg/kg). There were no significant changes in serum biochemical values and histopathological changes as compared with those of control after intraperitoneal administration with rutin in rats.

Key words - rutin; antimicrobial activity; minimal inhibitory concentration(MIC); acute toxicity; LD₅₀; serum biochemical values; histopathological changes.

Rutin(5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol-3-rutinoside)은 담황색 침상으로서¹⁾ 생리활성으로는 모세혈관 저항성의 효과적 강화, 심장수축작용의 증강,²⁾ 이뇨작용,³⁾ hyaluronidase의 억제작용, 모세혈관벽의 합성, Vitamin C와의 상승작용, 방사성 상해에 의한 궤양의 방지 등이 보고되었다.¹⁾

항균효과에 관한 연구로는 Kimura 등⁴⁾이 *Sophora japonica*의 에탄올 엑스가 *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium avidum* 및 *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균효과가 있으며, 이는 rutin, quercetin 및 isorhamnetin-3-rutinoside의 상호작용에 의한 것이라고 보고하였고, 鈴木良夫 등⁵⁾은 rutin이 1-1.5%의 농도

에서 *Staphylococcus aureus*와 *Shigella flexnerii*에 대하여 강한 발육저지작용이 있다고 보고하였다.

Rutin의 안전성에 관한 연구로는 Willson 등⁶⁾이 흰쥐, guinea pig에 30-50 mg/kg을 정맥, 복강내 주사시와 토끼에 100-200 mg/kg을 정맥주사하였을 때 독성을 나타내지 않았으며, 만성독성시험에 있어서는 1% rutin을 함유한 사료를 투여시 albino 흰쥐의 증식율에 영향이 없고, 400 일간 투여 후 장기중량 및 병리조직학적 검사 등으로 판정하였을 때 유의한 독성을 나타내지 않았다고 보고하였으며, Hein 등⁷⁾은 생쥐와 토끼에 매일 400 mg/kg의 rutin을 4개월간 투여시 기관에 대한 상해가 없었으며, histamine sensitivity에 있어서의 변화도 없었다는 보고가 있을 뿐이다.

*교신저자 : Fax 0431-68-2732

Rutin의 특수독성에 관한 연구로는, Brown 등⁸⁾이 salmonella/mammalian microsome test를 이용한 돌연변이원성 시험에서 변이원성이 없다는 것을, Hirono 등⁹⁾은 ACI 흰쥐에 대한 발암성 시험 결과 발암성이 없음을 각각 보고하였다. Malczak 등¹⁰⁾에 의하면 rutin이 chick embryo에 대한 beta-aminopropionitrile의 최기형성을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 한편, Plouvier 등¹¹⁻¹⁵⁾에 의하면, flavonoid 화합물은 배당체 형태로는 위나 소장에서 거의 체내로 흡수되지 못하고 대부분 장내 세균의 가수분해를 받아 비당체로 되며, 배당체가 비당체로의 전환은 약효발현에 필수적인 것으로 밝혀졌다.

이상의 연구보고를 종합하여 볼 때 *in vitro*에서 rutin은 가수분해되지 않고 항균효과는 배당체 형태로 발현될 것이므로, 항균력은 quercetin보다 약하지만 더 안전한 것으로 사료되어 8종의 병원성 세균에 대하여 항균력시험을 실시하고,¹⁶⁾ 안전성을 검토하기 위하여 급성독성시험으로 LD₅₀의 측정, 혈액생화학적 시험 및 장기조직의 병리조직학적 시험을 실시하여 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료, 기기 및 시약 - 실험에 사용한 재료는 시판되는 괴화 *Sophora japonica*를 청주 시내에서 구입하여 사용하였다. Nutrient broth와 nutrient agar는 Difco사에서 구입하였으며, 추출용매 및 시약은 특급 이상을 사용하였다. 기기로는 균수측정에 UV-spectronic 21(Milton Roy Co., U.S.A)을, 세균배양을 위하여 electric incubator(Astell Hearson Co., U.K.)와 shaking water bath incubator(Gallen Kamp Co., U.K.)을 사용하였고, 혈액생화학적 시험에 Gilford 3500 autoanalyzer(U.S.A), 병리조직학적 시험시 microtome(Shandon Co., U.K.)과 광학현미경(Nikon Co., Japan)을 각각 사용하였다.

시료의 분리 - 실험재료인 *Sophora japonica*를 ethanol로 3회 추출하여 얻은 ethanol 추출액을 methanol에 용해시킨 후, Sephadex LH-20 column(9 cm 50 cm)을 이용하여 methanol로 용출시켰을 때 5개의 분획을 얻었다. 두 번째 분획을

농축하여 물을 가한 후 CHCl₃로 추출하였을 때 수층에서 담황색의 침상결정을 얻었다.⁴⁾

시험균주 - 본 대학 미생물학교실에서 계대배양하여 보관하고 있는 균주 중 gram 양성균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 14990, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468을 사용하였고, gram 음성균으로 *Escherichia coli* ATCC 10586, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Serratia marcescens* ATCC 29633을 사용하여 모두 8종의 세균을 사용하였다.

시료용액의 조제 - Rutin을 vacuum desiccator 중에서 향량이 될 때까지 건조시킨 후 용매로 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 tween 80을 사용하여 용해시키고 nutrient broth로 최고농도가 750 µg/ml가 되도록 시료용액을 조제하였다. DMSO와 tween 80은 균의 발육억제에 전혀 영향이 없는 농도에서 사용하였고 대조시험을 병행하였다.

균액의 조제 - 시험균주 중 *Serratia marcescens*는 26°C에서, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*는 30°C에서 그 밖의 균주는 37°C에서 18시간 액내 배양하여 UV-Spectronic 21으로 540 nm에서 T(%)=30이 되도록 균수를 조정 한 후 1 ml를 100배 희석하여 사용하였다.¹⁷⁾

항균력시험 - Rutin의 시료용액을 serial broth dilution method¹⁸⁾에 따라 실험실계된 농도로 배수희석한 후 9개의 시험관에 각 농도의 용액을 각각 1 ml 씩 분주하고 10번 시험관을 대조시험관으로 한 후 각 시험관에 균액 50 µl를 접종하여 각 균주의 최적온도에서 18시간 배양한 후 균의 발육여부를 관찰하여, 최소발육저지농도(minimal inhibitory concentration: MIC)로 항균력을 평가하였다. 더 정확한 MIC를 구하기 위하여 결정된 MIC를 세분하여 실험하였다.

시험동물 및 사육조건 - 시험동물은 4-5주령의 ICR 생쥐 및 6주령의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 한국화학연구소 실험동물실로부터 분양받아 온도 24±2°C, 상대습도 70±5%, 환기회수 10-12 회/hr, 9시간 점등, 15시간 소등조건의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 5 마리씩 넣어 사육

하였다. 1주일간의 순화사육 기간 동안 일반증상을 관찰하여 체중감소가 없는 건강한 동물만을 선별하여 시험에 사용하였으며 실험동물사료(제일사료) 및 수도물을 자유롭게 섭취시켰다. 부검할 동물은 8시간 전부터 사료공급을 중단하였다.

실험군 분리 및 투여용량의 결정 - 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위로 군분리를 실시하였다. 각 시험 당 사용동물수는 LD₅₀ 측정용은 ICR 생쥐를 10마리씩 5군으로 하고, 혈액생화학적 검사용 Sprague Dawley계 흰쥐는 1군을 5마리씩 7군으로 하였으며 개체식별은 사육상자별 피모색소 표시법을 이용하였다. 투여용량은 예비실험 결과를 토대로 하여 LD₅₀ 측정시험은 1,669, 982, 578, 340, 200 mg/kg(투여액량: 0.5 ml/30 g b. w.)의 5개의 용량군으로, 혈액생화학적 시험 및 병리조직학적 시험은 50 mg/kg와 100 mg/kg의 2개의 용량군(투여액량: 0.5 ml/30 g b. w.)을 설정하였다.

시료용액의 조제 및 투여 - 시료용액은 20%(w/v)의 propylene glycol 용액에 rutin을 균일하게 현탁되도록 시험 당일 투여 전에 조제하였으며 용매 대조군에는 모두 20% propylene glycol 용액만을 투여하였다. 시료용액의 투여는 복강투여 경로를 택하여 26G×1/2" 주사침이 부착된 1 ml 주사기로 각 1회 투여하였다.

사망율 및 LD₅₀ - 투여 당일부터 7일간 매일 일반상태의 변화, 운동성 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

혈액생화학적 시험 - 주사 후 24시간 후에 urethane(1 g/kg)으로 마취시켜 심장에서 채혈하고 이 혈액을 3000 r.p.m에서 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 total protein, creatinine, GOT, GPT, phosphorus, calcium, blood urea nitrogen(BUN), alkaline phosphatase 및 albumin의 양을 Gilford 3500 autoanalyzer로 측정하였다.

병리조직학적 시험 - 혈액생화학적 시험용 혈액을 취한 다음 장기를 육안으로 관찰한 후 5개의 중요기관인 간장, 신장, 비장, 고환 및 소장을 적출하여 10% 중성 완충포르말린액에 5일간 고정시키고 장기를 3 mm 정도로 세절하여 paraffin에 고정화한

후 장기를 rotary microtome으로 7 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin-eosin으로 염색 후 광학현미경으로 그 소견을 관찰하였다.

통계학적 분석 - LD₅₀의 산출은 Litchfield-Wilcoxon 법에 의하여 computer program pharmacological system version 4.1¹⁹⁾을 이용하여 계산하였고, 혈액생화학적 시험 결과의 유의성은 student's t-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

항균력시험 - 항균력시험 결과 gram 양성균 및 음성균에 대한 천연 rutin의 MIC는 Table I과 같다.

괴화 *Sophora japonica*에서 추출한 rutin을 분리확인하고 8 종의 병원성 세균에 대하여 항균력시험을 실시한 결과, gram 양성균인 *Mycobacterium smegmatis*에 대하여 MIC가 375 μg/ml로 가장 우수한 항균력을 나타내었으며, 다음으로는 gram 양성균인 *Micrococcus luteus*와 gram 음성균 중 *Proteus mirabilis*에 대하여 MIC가 500 μg/ml로 우수한 항균력을 보여 주었다. 그 외의 시험균에 대하여 MIC가 625, 688 μg/ml의 항균력을 나타내었고 *Bacillus cereus*에 대해서는 MIC가 750 μg/ml를 나타내었다. 또한 rutin의 gram 양성균과 음성균에 대한 항균력의 차이는 본 실험결과 나타나지 않았다. Rutin을 가수분해하면 rutin과 비당

Table I. MICs of rutin against gram positive and negative bacteria

Microbial class	Strain	MIC (μg/ml)
Gram positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14990	625
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	750
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	500
	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 14468	375
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933	625
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	500
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	625
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 29633	688

Table II. Mortality of ICR mice administered intraperitoneally with rutin

Dose (mg/kg)	Day after administration							Mortality	LD ₅₀ (mg/kg) (Confidence limit)
	1	2	3	4	5	6	7		
1,669	10	0	0	0	0	0	0	10/10	650 (894-1,473)
982	6	1	1	0	0	0	0	8/10	
578	3	1	0	0	0	0	0	4/10	
340	0	1	0	0	0	0	0	1/10	
200	0	0	0	0	0	0	0	10/10	

(p=0.05).

Table III. Serum biochemical values in Sprague Dawley rats administered intraperitoneally with rutin

Dose (mg/kg)	control	50	100
Total protein(g/dl)	5.27± 0.23	5.30± 0.22	5.18± 0.18
Creatinine(mg/dl)	0.93± 0.05	0.96± 0.23	0.90± 0.13
GOT(IU/l)	74.80±22.20	76.90±25.00	68.90±32.10
Phosphorus(mg/dl)	11.60± 0.90	12.00± 1.10	11.80± 0.80
Calcium(mg/dl)	10.20± 1.20	10.10± 0.80	10.30± 0.90
BUN(mg/dl)	30.20± 8.60	30.70± 7.60	34.20± 7.90
GPT(IU/l)	15.60± 2.70	17.40± 5.20	19.60± 3.90
Alkaline phosphatase(IU/l)	117.60±12.20	109.40±24.30	120.60±18.50
Albumin(g/dl)	2.92± 0.83	2.96± 0.88	2.86± 0.70

Mean±S.D. n=5.

체인 quercetin의 양이 비례하게 되나 항균력 시험 결과를 비교하여 보면 rutin의 항균력은 quercetin 과 비례하지 않았으며,¹⁶⁾ 이러한 결과는 *in vitro*에서 rutin이 가수분해되어 비당체인 quercetin으로 전환되지 않고 배당체 형태로 항균력을 나타내기 때문인 것으로 사료된다.

사망율 및 LD₅₀ - ICR 생쥐에 대하여 1,669, 982, 578, 340, 200 mg/kg의 농도로 조제한 시료용액으로 1회 복강투여하여 LD₅₀이 650 mg/kg임을 산출하였으며, 이때 1473-894 mg/kg의 신뢰한계를 나타내었다(Table II).

혈액생화학적 시험 - Sprague Dawley계 흰쥐에 rutin을 50, 100 mg/kg의 농도로 1회 복강투여후 혈청 중 total protein, creatinine, GPT, GOT, phosphorus, calcium, BUN, alkaline phosphatase, albumin 양 등을 측정된 결과 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다(Table III). 즉 GOT, GPT 및 alkaline phosphatase 검사치의 t-test에 의한 검정에서 대조군에 비하여 전혀 유의성이 없었으므로 시험용량에서 간장에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 creatinine, phosphorus 등의 검사치가 정상

인 것으로 보아 신장의 배설 능력에 영향이 없음을 나타내었으며 total protein, albumin, calcium 등의 양에도 영향이 없었으므로 protein의 흡수나 대사능력도 정상임을 보여주었다.

병리조직학적 시험 - 간장, 신장, 비장, 교환 및 소장 등의 장기의 표본을 만들어 현미경 검사한 결과 시료용액의 투여에 기인한다고 사료되는 유의할 만한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.(Fig. 1, 2, 3, 4, 5)

급성독성시험 결과 ICR 생쥐에 대한 LD₅₀가 650 mg/kg 임을 산출하였고(Table II), Sprague Dawley계 흰쥐에 대한 혈액생화학적 시험시 시료를 100 mg/Kg까지 투여하여 정상군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 변화를 발견할 수 없었다(Table III). 또한 병리조직학적 시험 결과에서도 대조군과 비교하여 투여군에서 유의한 조직학적 병변이 나타나지 않았다. 김¹⁶⁾이 보고한 quercetin의 혈액생화학적 시험 및 병리조직학적 시험에서는 시료를 50 mg/kg 투여했으나 rutin은 100 mg/kg 까지 투여해도 아무런 이상을 발견할 수 없었던 것 등을 비교하여 볼 때, rutin은 비당체인 quercetin 보다 더 독성이 적은 것으로 사료된다.

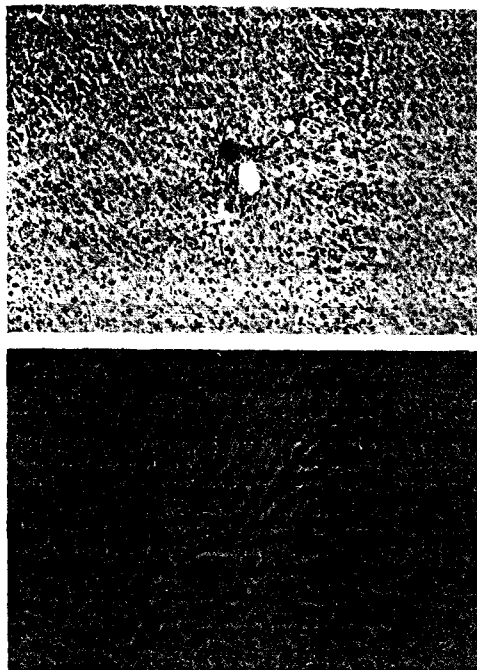


Fig. 1. Microphotograph of liver in control rat (above) and rat administered with rutin(below) (100 mg/kg) (H and E $\times 100$).

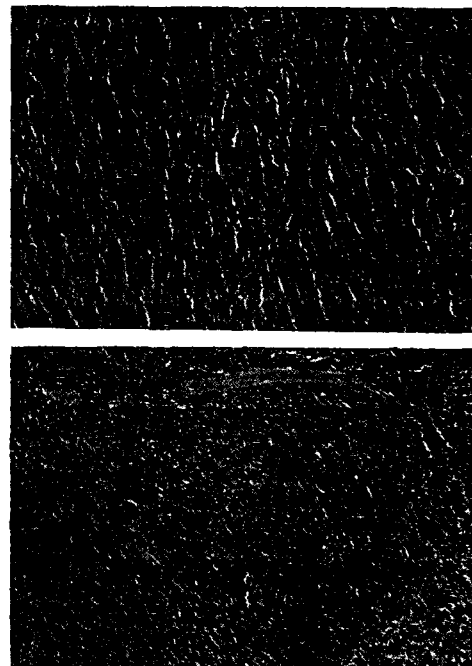


Fig. 3. Microphotograph of spleen in control rat (above) and rat administered with rutin(below) (100 mg/kg)(H and E $\times 100$).

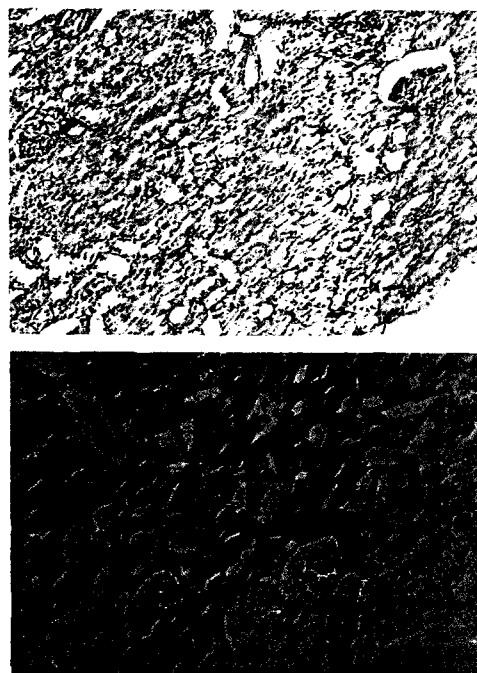


Fig. 2. Microphotograph of kidney in control rat (above) and rat administered with rutin(below) (100 mg/kg) (H and E $\times 100$).

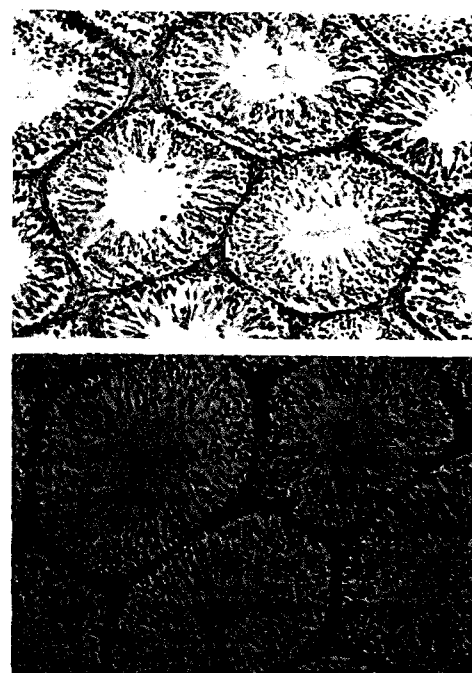


Fig. 4. Microphotograph of testis in control rat (above) and rat administered with rutin(below) (100 mg/kg)(H and E $\times 100$).



Fig. 5. Microphotograph of small intestine in control rat(above) and rat administered with rutin(below)(100 mg/kg)(H and E×100).

결 론

괴화 *Sophora japonica*에서 추출단리한 rutin에 대한 항균력시험과 급성독성시험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항균력시험 결과 gram 양성균인 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468에 대하여 MIC가 375 µg/ml로 가장 우수한 항균력을 나타내었으며, *Micrococcus luteus* ATCC 4698과 *Proteus mirabilis* ATCC 25933에 대하여 MIC가 500 µg/ml을 나타내었다.

2. 생쥐의 복강투여시 LD₅₀은 650 mg/kg(Confidence limit: 894-1,473 mg/kg)이었고 흰쥐의 복강투여시 total protein, creatinine, GPT, GOT, phosphorus, calcium, BUN, alkaline phosphatase, albumin 양 등의 혈액생화학적 시험에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화를 발견할 수 없었으며, 간장, 신장, 비장, 고환 및 소장등의 장기에 대한 병리조직학적 시험을 실시하였을 때 대조군과 비교하여 유의성 있는 병변이 관찰되지 않았다.

인용문헌

1. Griffith, J. Q., Krewson, C. F. and Naghski, J. (1954) Rutin and Related Flavonoids, 5-44. Mack Publishing Co., Easton, Pa.
2. 柴田承二 (1982) 生物活性 天然物質, 429. 醫齒藥出版株式會社, 東京.
3. Tokushi Fukuda (1932) The pharmacological effects of flavone groups. *Arch. Exptl. Path. Pharmacol.* 64: 685-694.
4. Kimura, M. and Hiromi, Y. (1984) Interaction in the antibacterial activity of flavonoids from *Sophora japonica* L. to *Propionibacterium*. *Yakugaku Zasshi*. 104: 340-346.
5. 鈴木良夫 (1963) 岐阜醫科大學紀要, 10, 123. 岐阜醫科大學, 岐阜.
6. Wilson, R. H., Mortarotti, T. G. and Doxtader, E. K. (1947) Toxicity studies on rutin. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 64: 324-327.
7. Hein, H and Laubmann, H. (1950) Investigations on the toxicity of rutin and its influence on the action of histamine. *Arztl. Forsch.* 4: 666-670.
8. Brown, J. and Dietrich, P. S. (1979) Mutagenicity of plant flavonoids in the Salmonella/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutat. Res.* 66: 223-240.
9. Hirono, I., Ueno, I., Hosaka, S., Takanashi, H., Matsushima, T., Sugimura, T. and Natori, S. (1981) Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACl rats. *Cancer Lett.* 13: 15-21.
10. Malczak and Tadeusz, H. (1982) The teratogenicity of beta-aminopropionitrile and the protective of rutin and (+)-cathchin in chick embryos. *Diss. Abstr. Int. B.* 42: 4025-4029.
11. Plouvier, V. (1943) The presence of rutinoides in the flower of certain magnolia. *Compt. rend.* 216: 459-461.
12. Simpson, F. J., Talbot, G. and Westlake, D. W. S. (1960) Production of carbon monoxide in the enzyme degradation of rutin. *Biochem. Biophys. Research Comuns.* 2: 15-21.
13. Hay, G. W., Westlake, D.W.S. and Simpson, F. J. (1961) Degradation of rutin by *Aspergillus flavus* and characterization of rutinose. *Can. J. Microbiol.* 7: 921-925.
14. MacDonald, I. A., Mader, J. A. and Bussard, R. G. (1983) The role of rutin and quercitrin in

- stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial preparations of human feces and saliva. *Mutat. Res.* 122: 95-101.
15. 김동현 (1993) 한방약물과 장내미생물. 99. 도서출판 신일상사. 서울.
 16. 김용직 (1983) 천연 quercetin의 항균력에 미치는 수종 항생물질의 병용효과 및 안전성. 충북대학교 대학원 석사학위논문.
 17. Gary, S. M. and Douglas, M. J. (1979) Mycology for the Clinical Laboratory, 262-266. Reston Publishing Co. Inc., Reston, Virginia.
 18. 한성순 등(1992) 실험종합미생물학. 99. 도서출판 대학사, 서울.
 19. Litchfield, J. T. and Willcoxon, F. (1949) A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-115.

(1996년 12월 2일 접수)