

## Safety Evaluation of Modified Samultang - Bacterial Reverse Mutation Test -

### 변형 사물탕의 안전성 평가 -복귀돌연변이시험-

Seong Hee Hwang<sup>1</sup>

황성희<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Professor, School of Bio Food and Nutrition Science, Semyung University, South Korea,  
[h2seong@semyung.ac.kr](mailto:h2seong@semyung.ac.kr)

**Abstract:** Samultang's prescription consists of Dangkwil, Cheongung, Bakjakyak, and Sookjihwang's 5 g each, and it is the most basic prescription among various herbal prescriptions used to protect energy and blood by adding other medicines based on this prescription. Among them, Sookjihwang has side effects on patients with weak digestive systems, so various combinations are being attempted to reduce them. Since some of the effects of the modified Samultang with Omija added instead of Sookjihwang were confirmed, a next stage experiment to confirm the safety of the modified Samultang was required, and a genetic toxicity test was conducted. The genotoxicity test conducted a return mutation test using a bacterial strain, which is a test in which bacteria that require histidine use changes in genes that change to a species that does not require histidine to screen for mutations. In the reverse mutation experiment with bacterial strains, no increase in return mutation colony count by test substances was observed in all doses of all strains under and under the metabolic activity system, and no precipitation and growth inhibition by test substances were observed in all doses. Therefore, it is judged that the test substance modified Samultang does not cause the reverse mutation of the bacterial strain under this test condition.

**Keywords:** Modified Samultang, Safety Test, Genetic Toxicity, Bacterial Reverse Mutation Test, AMES Test

**요약:** 사물탕의 처방은 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황 각각 5 g으로 구성되어 있으며, 이 처방을 기본으로 다른 약재를 추가해 기운(氣)과 혈류(血)를 보해주는 여러 용도로 이용되는 한방처방 중에서 가장 기본적인 처방이다. 그중 숙지황은 소화기계가 약한 환자에게 부작용이 있어 이를 줄이는 다양한 조합이 시도되고 있다. 숙지황 대신 오미자를 첨가한 변형 사물탕의 효과가 일부 확인되었으므로 변형 사물탕의 안전성을 확인하는 다음 단계의 실험이 요구되어 유전 독성 실험을 진행하였다. 유전독성시험은 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이실험을 시행하였는데 이는 성장 시 히스티딘이 필요한 박테리아가 히스티딘이 필요 없는 종류로 변화하는 돌연변이 성질을 이용하여 변이 여부를 스크리닝하는 검사법이다. 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이 실험에서는 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 시험물질에 의한 복귀돌연변이 콜로니 수의 증가가

Received: March 26, 2023; 1<sup>st</sup> Review Result: May 10, 2023; 2<sup>nd</sup> Review Result: June 04, 2023  
Accepted: June 30, 2023

관찰되지 않았으며, 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주의 모든 용량에서 시험 물질에 의한 침전 및 생육 저해가 관찰되지 않았다. 따라서 시험 물질 변형 사물탕은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연 변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

**핵심어:** 변형 사물탕, 안전성 검사, 유전독성, 복귀돌연변이 시험, AMES 테스트

## 1. 서론

사물탕(四物湯)은 한의학 및 중의학의 전통 처방으로, 한의학에서는 《동의보감》, 《방약합편》 등 대부분의 의학서적에서 인용되고 있는 널리 사용되는 처방이다. 《동의보감》에 따르면 모든 혈허(血虛)에 사용하며, 월경 관련 증상에 많이 사용되지만, 헤모글로빈 부족과 같은 증상이 있는 남성과 여성 모두에게 사용할 수 있다. 구체적으로는 빈혈, 월경 곤란, 복통, 자궁의 출혈 등에 응용할 수 있다[1].

사물탕 처방은 당귀, 천궁, 백작약 및 숙지황 각각 5g으로 구성되어 있으며, 이 처방에다 다른 약재를 더해 기운(氣)과 혈류(血)를 개선해 주는 여러 용도로 이용되므로 사물탕은 한방에서 가장 기본적인 처방 중의 하나로 널리 이용된다[2]. 사물탕에 들어가는 재료 중 숙지황은 약재의 성질이 중탁하여 위가 약한 사람 및 담이 많고 소화력이 약한 자는 복용을 금하는 약재로 그 성분에는 영양분이 높고 유분이 많아 오랜 기간 복용 시 소화 장애를 일으켜 설사와 복창(腹脹)과 같은 부작용이 생기기도 한다[3][4]. 사물탕이 널리 사용되는데 이러한 숙지황의 성질은 제한이 되는 요소이다. 이러한 숙지황을 대체하고 또한 사물탕의 효능을 동일하게 나타낼 수 있는 대체 한약재를 찾게 되었다.

Jung 등(2010)은 사물탕의 원료 약재를 HeLa, HepG2, AGS cells에 시험한 결과 당귀, 목단피, 백작약, 백화사설초가 암세포의 생존율을 감소시킨다고 하였다[5]. HeLa cells에서는 당귀, 목단피, 백작약, 백화사설초가, HepG2 cells에서는 백작약, 백화사설초가 농도 의존적으로 감소시키는 것을 관찰하였고, AGS cells는 당귀, 목단피, 백화사설초 처리군에서 대체적으로 농도의 증가에 따른 생존율 감소 경향을 관찰할 수 있었다. Lee(1993)는 사물탕과 사물탕 약재 중 2가지를 선정하여 배합한 처방을 Phenylhydrazine-HCl로 용혈성 빈혈을 일으킨 쥐에 투여하였더니 Hematocrit 수치, 혈중 적혈구 수, Hemoglobin 농도 등이 증가하였고 철분과 TIBC에 대한 감소를 나타내었다고 보고하였다[6].

Lim(1999)은 cyclophosphamide(CTX)로 혈소판 감소증을 유발시킨 쥐와 phenylhydrazine으로 용혈성 빈혈이 유발된 쥐에게 사물탕 구성 약재 중 3가지로 처리하였더니, 사물탕 처리 군에서 CTX 처리 군에 비하여 긍정적 결과를 보였고, 사물탕 구성 약재 중 당귀를 제외한 3가지로 배합된 약재에서 항 빈혈 효과가 현저하게 나타났다고 보고하였다[7].

이러한 다른 연구자의 연구 결과를 바탕으로, 숙지황을 대체할 수 있는 한약재로 오미자를 선택하였는데 이는 오미자가 신농본초경(神農本草經), 명의별록(名醫別錄), 일화자제가본초(日華子諸家本草) 등에, 간의 기운을 모으고 위(腎)를 보호하며 진액을 생성하는 효능을 갖고 있다고 알려져 있기 때문이었다. 사물탕의 처방에서 오미자로 숙지황을 대체한 처방을 제안하였고 이러한 변형 사물탕이 여성 갱년기 증상 완화에 효과가 있음을 확인하였다[8].

따라서 본 연구에서는 숙지황 대신 오미자를 첨가한 변형 사물탕이 널리 사용되기 위해 여성 갱년기 증상의 완화에 사용될 경우 안전한 약제인지 유전독성을 검사하여 확인하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

오미자를 첨가한 변형 사물탕의 효과가 일부 확인된바, 시험 물질의 안전성을 확인하는 다음 단계의 실험이 요구되어 유전독성 실험을 진행하였다. 유전독성시험 중 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이실험을 하였다.

### 2.1 변형 사물탕 제조

기존 사물탕 조합인 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황 각 5g에서 숙지황 대신 오미자 10g을 첨가하였다. 결정된 배합 비율에 따라 약재를 섞어 증류수 3000ml와 함께 round flask에 넣고 3시간 동안 가열추출 하였다. 추출액은 rotary evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조하여 분말 시료를 제조하였다.

### 2.2 양성 대조물질

양성 대조물질은 고시 및 가이드라인[9]에 제시된 것 중에서 선택하였다[표 1].

[표 1] 양성 대조물질

[Table 1] Positive Control Substances

Name	Temp.	Maker
Sodium azide(SA)	RT.	Sigma-Aldrich, U.S.A
2-Nitrofluorene(2-NF)	RT.	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Aminoanthracene(2-AA)	RT.	Sigma-Aldrich, U.S.A.
Benzo[a]pyrene(B[a]P)	RT.	Sigma-Aldrich, U.S.A.
9-Aminoacridine(9-AA)	RT.	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF-2)	RT.	Wako, Japan

양성 대조물질 SA는 멸균주사용수로, 2-NF, 9-AA, AF-2, B[a]P 및 2-AA는 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 준비하였다.

조제된 양성 대조물질은 갈색튜브에 분주하여 deep freezer(DW-86L-338, Haier, China)에 동결보존(-80 ~ -60 ° C)하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

각 균주에 대한 양성 대조물질의 종류와 용량은 [표 2]와 같다.

### 2.3 대사활성계

대사활성계 S9은 Aroclor 1254(Monsanto KL615)로 Molecular Toxicology, Inc.에서 공급받아 냉동보관(-20 ° C 이하)하여 사용하였다.

[표 2] 균주에 대한 양성대조물질의 종류와 용량

[Table 2] Positive Control Substances & Name of Strain & Dose

S9 mix	Name of strain	P.C.S	Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
S9mix(-)	TA98	2-NF	1.0
	TA100	SA	1.0
	TA1535	SA	1.0
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2uvrA(pKM101)	AF-2	0.005
S9mix(+)	TA98	2-AA	0.5
	TA100	B[a]P	2.0
	TA1535	2-AA	2.0
	TA1537	2-AA	2.0
	WP2uvrA(pKM101)	2-AA	20.0

S9 Mix는 사용 전에 조제하며 그 조성 요소는 [표 3]과 같다.

[표 3] S9 Mix의 조성

[Table 3] Composition of S9 Mix

Comp. of S9 Mix	conc. in S9 mix 1mL
Rat liver S9 fraction	50 $\mu\text{L}$
0.4 M $\text{MgCl}_2$	8 $\mu\text{mol}$
1.65 M KCl	33 $\mu\text{mol}$
1 M Glucose-6-phosphate	5 $\mu\text{mol}$
0.1 M NADP	4 $\mu\text{mol}$
0.2 M Sodium phosphate buffer, pH 7.4	100 $\mu\text{mol}$

## 2.4 시험계

Molecular Toxicology(MOLTOXTM)사로부터 구입한 다음의 균주를 형질 확인 후 계대배양한 것을 사용하였다. 균주의 유전자형은 [표 4]와 같다.

[표 4] 시험균주의 유전자형

[Table 4] Genotype of Strains

Species	Name of strain	Genotype	
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa</i> $\Delta$ <i>uvrB</i> (pKM101)
	TA100	<i>hisD46</i>	<i>rfa</i> $\Delta$ <i>uvrB</i> (pKM101)
	TA1535	<i>hisD46</i>	<i>rfa</i> $\Delta$ <i>uvrB</i>
	TA1537	<i>hisD46</i>	<i>rfa</i> $\Delta$ <i>uvrB</i>
<i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA(pKM101)	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i> (pKM101)

## 2.5 용량설정

### 2.5.1 예비시험

시험 물질(변형 사물탕)은 5,000 µg/plate 을 최고 용량으로 설정하며, 최고 용량을 포함하여 공비 4의 총 7 단계로(1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 312.5, 1,250 및 5,000 µg/plate) 설정하였다. 음성대조군 및 양성대조군을 포함하고, 음성대조군은 부형제를 사용하였다. 각 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

## 2.5.2 본시험

예비시험 결과, 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주의 모든 용량에서 시험 물질에 의한 침전 및 생육 저해는 관찰되지 않았다. 따라서, 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주는 5,000µg/plate 을 본 시험의 최고 용량으로 하여 공비 2의 총 5 용량으로 설정하였다. 대사활성계 존재 시와 부재 시로 설정하였다. 예비시험과 동일하게 음성대조군 및 양성대조군을 설정하며, 음성대조군은 부형제를 사용하였다. 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였다. 본시험은 결과의 재현성을 확인하기 위해 동일한 조건으로 반복 수행하였다.

## 2.6 시험방법

### 2.6.1 전배양

동결 보존된 각 균주를 해동하여 2.5 % nutrient broth 액체배지에 접종하고 약 37°C 진탕 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 ELISA reader(과장:600 nm, EPOCH, Biotek, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 또한 생균 수가 1 x 10<sup>9</sup> cells/mL 이상인 균주를 사용하였다.

### 2.6.2 처리방법

대사활성계 존재 시에서는 각 용량의 시험 물질, 음성 대조물질과 양성 대조물질 및 균 배양액을 각 0.1 mL씩 시험관에 넣고, S9 mix 0.5 mL을 멸균된 시험관에 넣었다. 살모넬라균주는 살모넬라용 top agar, 대장균에는 대장균용 top agar를 각 2 mL씩 분주 후 vortexing 하였다. 그 후 최소 glucose 한천 평판배지에 고르게 부어 굳혔다. 대사활성계 부재 시에서는 S9 Mix 를 대신해서 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 를 0.5 mL 첨가하였다. 그 후 대사활성계 존재 시와 같은 방법으로 처리하였다.

### 2.6.3 배양

Top agar가 굳은 후 plate를 뒤집어 약 37°C 배양기(JSBI-420CP, JSR, Korea)에서 약 48시간 배양하였다.

### 2.6.4 무균검사

잡균에 의한 오염 유·무를 확인하기 위해 시험 물질 최고 용량, S9 Mix 및 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 멸균된 시험관에 넣고 top agar를 가해서 혼합한 후, 최소 glucose 한천 평판배지에 중층 하여 실온에 방치하였다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 약 37°C 배양기에서 약 48시간 배양한 후, 잡균의 오염으로 인한 콜로니 형성 유·무를 확인하였다.

## 2.7 관찰 및 계수

배양 종료 후, 육안으로 콜로니의 수를 관찰하였다.

시험물질에 의한 기본성장균층 (background lawn) 의 생육저해 유·무는 현미경을 이용하여 관찰하였다.

## 2.8 시험결과의 판정

생육 저해의 판정 기준은 콜로니 수가 음성대조군과 비교하여 확연히 감소하거나 집락의 크기가 확연하게 작아지는 경우 또는 background lawn이 음성대조군과 비교 시 없어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다. 대사활성계 유·무와 관계없이 최소 1 개 이상의 균주 및 1 용량 이상에서 복귀돌연변이 콜로니수가 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하거나 또는 용량 의존적이거나 재현성 있는 증가를 보일 경우 양성으로 판정하였다.

## 2.9 결과 처리

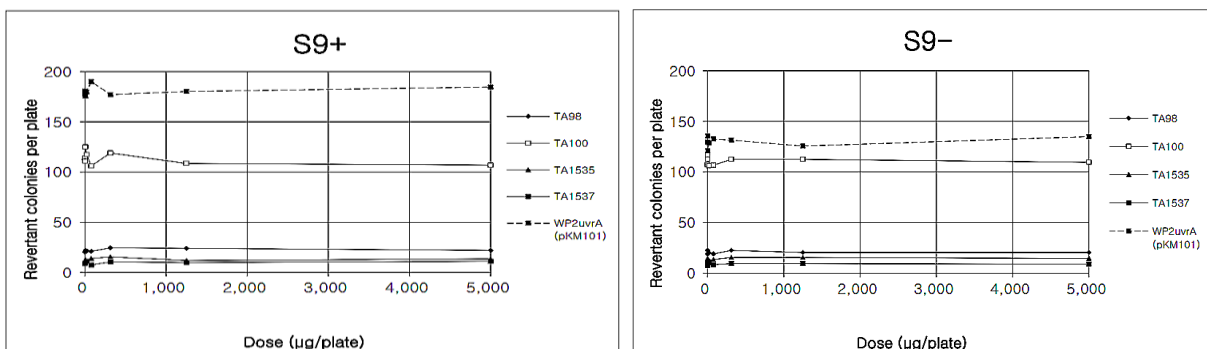
복귀돌연변이 콜로니수를 기록하고, 평균과 표준편차를 구하며, 결과에 따라 통계학적 검사는 실시하지 않았다.

# 3. 결과 및 고찰

## 3.1 예비시험

예비시험은 변형 사물탕 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$  을 최고 용량으로 설정하고, 최고 용량을 포함하여 공비 4의 총 7 단계 용량으로 처리하여 시험 물질에 의한 침전 및 생육 저해를 관찰하였다. 그 결과, 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주의 모든 용량에서 시험물질에 의한 침전 및 생육저해는 관찰되지 않았다(그림 1, 표 5).

따라서, 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주는 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 본 시험의 최고 용량으로 하여 공비 2의 총 5 용량으로 설정하였다.



[그림 1] 대사활성계 존재시/부재시에서 다양한 균주의 양-반응곡선(예비시험)

[Fig. 1] Dose-Response Curve of Revertant Colony Numbers of Differential Bacterial Strains in the Presence/Absence of Metabolic Activation System(Preliminary Study)

[표 5] 대사활성계 존재시/부재시에서 플레이트 당 복귀돌연변이 콜로니수(예비시험)

[Table 5] Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence and Absence of Metabolic Activation System (Preliminary Study)

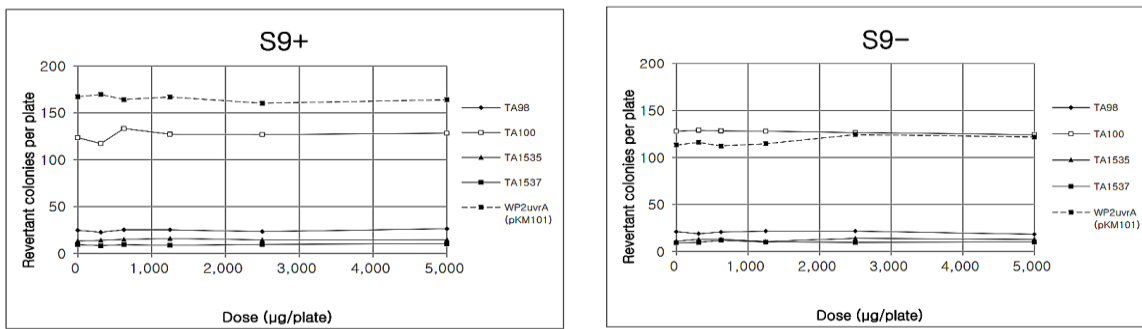
Strain	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	No.of revertant colonies/plate presence of metabolic activation		Strain	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	No.of revertant colonies/plate absence of metabolic activation			
		No.	mean $\pm$ S.D.			No.	mean $\pm$ S.D.		
TA98	0	21	20	21 $\pm$ 1	TA98	0	19	19	19 $\pm$ 0
	1.22	21	20	21 $\pm$ 1		1.22	22	23	23 $\pm$ 1
	4.88	23	21	22 $\pm$ 1		4.88	18	20	19 $\pm$ 1
	19.5	25	18	22 $\pm$ 5		19.5	19	21	20 $\pm$ 1
	78.1	18	24	21 $\pm$ 4		78.1	20	18	19 $\pm$ 1
	312.5	26	23	25 $\pm$ 2		312.5	22	23	23 $\pm$ 1
	1250	24	24	24 $\pm$ 0		1250	20	21	21 $\pm$ 1
	5000	22	22	22 $\pm$ 0		5000	23	18	21 $\pm$ 4
	2-AA(0.5)	318	296	307 $\pm$ 16		2-NF(1.0)	245	303	274 $\pm$ 41
TA 100	0	116	112	114 $\pm$ 3	TA 100	0	103	111	107 $\pm$ 6
	1.22	101	121	111 $\pm$ 14		1.22	113	112	113 $\pm$ 1
	4.88	128	122	125 $\pm$ 4		4.88	117	117	117 $\pm$ 0
	19.5	117	118	118 $\pm$ 1		19.5	104	108	106 $\pm$ 3
	78.1	100	112	106 $\pm$ 8		78.1	109	104	107 $\pm$ 4
	312.5	118	120	119 $\pm$ 1		312.5	118	107	113 $\pm$ 8
	1250	100	117	109 $\pm$ 12		1250	106	119	113 $\pm$ 9
	5000	110	104	107 $\pm$ 4		5000	112	107	110 $\pm$ 4
	B[a]P(2.0)	768	734	751 $\pm$ 24		SA(1.0)	472	586	529 $\pm$ 81
TA 1535	0	14	10	12 $\pm$ 3	TA 1535	0	12	16	14 $\pm$ 3
	1.22	14	9	12 $\pm$ 4		1.22	13	13	13 $\pm$ 0
	4.88	11	14	13 $\pm$ 2		4.88	13	15	14 $\pm$ 1
	19.5	9	14	12 $\pm$ 4		19.5	11	14	13 $\pm$ 2
	78.1	14	14	14 $\pm$ 0		78.1	11	16	14 $\pm$ 4
	312.5	16	15	16 $\pm$ 1		312.5	18	13	16 $\pm$ 4
	1250	11	13	12 $\pm$ 1		1250	13	18	16 $\pm$ 4
	5000	12	15	14 $\pm$ 2		5000	14	15	15 $\pm$ 1
	2-AA(2.0)	185	177	181 $\pm$ 6		SA(1.0)	488	521	505 $\pm$ 23
TA 1537	0	10	8	9 $\pm$ 1	TA 1537	0	9	8	9 $\pm$ 1
	1.22	9	9	9 $\pm$ 0		1.22	8	10	9 $\pm$ 1
	4.88	11	8	10 $\pm$ 2		4.88	7	8	8 $\pm$ 1
	19.5	10	12	11 $\pm$ 1		19.5	10	11	11 $\pm$ 1
	78.1	8	7	8 $\pm$ 1		78.1	7	10	9 $\pm$ 2
	312.5	11	10	11 $\pm$ 1		312.5	9	10	10 $\pm$ 1
	1250	11	9	10 $\pm$ 1		1250	11	8	10 $\pm$ 21
	5000	10	12	11 $\pm$ 1		5000	9	9	9 $\pm$ 0
	2-AA(2.0)	273	326	300 $\pm$ 37		9-AA(80.0)	592	498	545 $\pm$ 66
WP2 <sub>uvr</sub> A(pKM101)	0	183	178	181 $\pm$ 4	WP2 <sub>uvr</sub> A(pKM101)	0	124	135	130 $\pm$ 8
	1.22	166	188	177 $\pm$ 16		1.22	136	135	136 $\pm$ 1
	4.88	180	171	176 $\pm$ 6		4.88	121	121	121 $\pm$ 0

	19.5	181 178	180 ± 2		19.5	128 129	129 ± 1
	78.1	187 193	190 ± 4		78.1	132 133	133 ± 1
	312.5	173 181	177 ± 6		312.5	124 139	132 ± 11
	1250	179 181	180 ± 1		1250	124 127	126 ± 2
	5000	184 185	185 ± 1		5000	135 135	135 ± 0
	2-AA(20.0)	2004 1986	1995 ± 13		AF-2(0.005)	921 947	930 ± 25

### 3.2 본시험

#### 3.2.1 시험물질에 의한 복귀 돌연변이 콜로니 수

대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주의 모든 용량에서 음성 대조군과 비교하여 시험물질에 의한 복귀 돌연변이 콜로니 수의 증가가 관찰되지 않았다[그림 2].

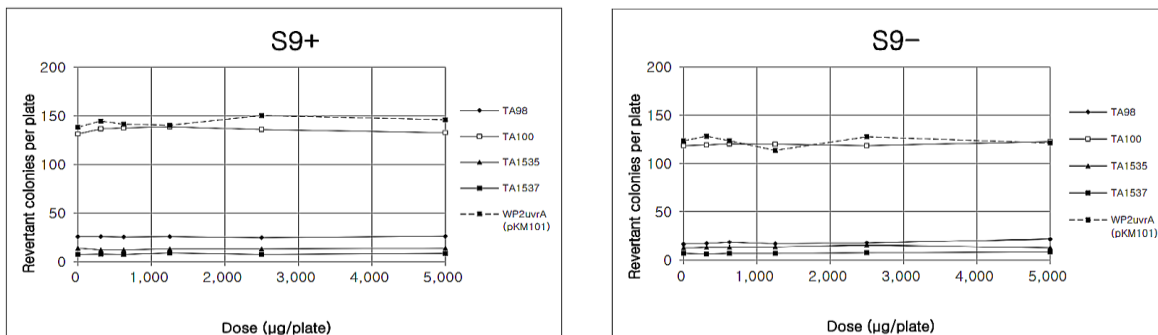


[그림 2] 대사활성계 존재 시/부재 시에서 다양한 균주의 양-반응곡선(본시험1)

[Fig. 2] Dose-Response Curve of Revertant Colony Numbers of Differential Bacterial Strains in the Presence and Absence of Metabolic Activation System(Main Study 1)

#### 3.2.2 시험물질에 의한 침전 및 생육저해

본시험 결과, 대사 활성계 존재시 및 부재시의 모든 균주의 모든 용량에서 시험물질에 의한 침전 및 생육저해는 관찰되지 않았다[그림 3].



[그림 3] 대사 활성계 존재 시/부재 시에서 다양한 균주의 양-반응곡선(본시험2)

[Fig. 3] Dose-Response Curve of Revertant Colony Numbers of Differential Bacterial Strains in the Presence and Absence of Metabolic Activation System(Main Study 2)



3.2.3 양성 대조군의 복귀 돌연변이 콜로니 수

변형 사물탕의 용량을 다양하게 투여한 음성 대조군(변형 사물탕)과 앞에서 언급한 양성 대조군(SA,2-NF,9-AA,AF-2,B[a]P 및 2-AA)의 복귀 돌연변이 콜로니 수를 비교하였다. 음성 대조군의 복귀 돌연변이 콜로니 수는 historical data 범위 내에 평가되었고, 양성 대조군의 복귀 돌연변이 콜로니수는 음성 대조군에 비해 2배 이상 증가하였음을 볼 수 있었다. 이는 음성 대조군은 음성반응을, 양성 대조군은 뚜렷한 복귀 돌연변이 양성반응을 나타낸 것이다[표 6,7].이상의 결과로부터, 시험물질 변형 사물탕은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

[표 6] 대사활성계 존재 시/부재 시에서 플레이트 당 복귀 돌연변이 콜로니 수(본시험1)

[Table 6] Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence & Absence of Metabolic Activation System(Main Study 1)

Strain	Dose (µg/plate)	No.of revertant colonies/plate presence of metabolic activation		Strain	Dose (µg/plate)	No.of revertant colonies/plate absence of metabolic activation	
		Colony No.	mean±S.D.			Colony No.	mean±S.D.
TA98	0	27 23 24	25 ± 2	TA98	0	22 22 19	21 ± 2
	312.5	22 25 21	23 ± 2		312.5	18 20 19	19 ± 1
	625	29 22 25	25 ± 4		625	20 20 22	21 ± 1
	1250	26 26 24	25 ± 1		1250	20 21 24	22 ± 2
	2500	25 23 22	23 ± 2		2500	23 20 22	22 ± 21
	5000	25 28 26	26 ± 2		5000	19 18 18	18 ± 8
	2-AA(0.5)	290 297 281	289 ± 8		2-NF(1.0)	286 285 300	290 ± 8
TA100	0	121 120 130	124 ± 6	TA100	0	126 121 137	128 ± 8
	312.5	112 118 122	117 ± 5		312.5	123 135 129	129 ± 6
	625	131 134 135	133 ± 2		625	127 137 121	128 ± 8
	1250	126 134 122	127 ± 6		1250	122 125 137	128 ± 8
	2500	127 122 132	127 ± 5		2500	125 133 122	127 ± 6
	5000	136 127 122	128 ± 7		5000	122 121 130	124 ± 5
	B[a]P(2.0)	877 936 808	874 ± 64		SA(1.0)	711 688 680	693 ± 16
TA 1535	0	13 14 13	13 ± 1	TA 1535	0	11 12 10	11 ± 1
	312.5	12 16 14	14 ± 2		312.5	13 15 11	13 ± 2
	625	15 18 12	15 ± 3		625	15 10 14	13 ± 3
	1250	17 15 16	16 ± 1		1250	10 13 9	11 ± 2
	2500	13 13 17	14 ± 2		2500	12 16 14	14 ± 2
	5000	14 14 16	15 ± 1		5000	14 13 12	13 ± 1
	2-AA(2.0)	586 511 622	573 ± 57		SA(1.0)	218 176 169	188 ± 27
TA 1537	0	9 10 9	9 ± 1	TA 1537	0	9 11 8	9 ± 2
	312.5	7 7 11	8 ± 2		312.5	8 10 11	10 ± 2
	625	9 9 10	9 ± 1		625	10 13 13	12 ± 2

	1250	7 11 8	9 ± 2		1250	12 10 8	10 ± 2
	2500	10 8 11	10 ± 2		2500	11 9 9	10 ± 1
	5000	11 8 12	10 ± 2		5000	10 9 11	10 ± 1
	2-AA(2.0)	327 317 303	316 ± 12		9-AA(80.0)	332 364 411	369 ± 40
WP2uvrA (pKM101)	0	171 167 164	167 ± 4	WP2uvrA (pKM101)	0	116 118 106	113 ± 6
	312.5	175 163 171	170 ± 6		312.5	113 116 119	116 ± 3
	625	164 165 164	164 ± 1		625	112 114 111	112 ± 2
	1250	175 166 160	167 ± 8		1250	110 115 119	115 ± 5
	2500	162 162 157	160 ± 3		2500	126 122 125	124 ± 2
	5000	164 168 160	164 ± 4		5000	129 115 122	122 ± 7
	2-AA(20.0)	1582 1571 1611	1588 ± 21		AF-2(0.005)	1612 1776 1704	1697 ± 82

[표 7] 대사활성계 존재 시/부재 시에서 플레이트 당 복귀 돌연변이 콜로니 수(본시험2)

[Table 7] Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence and Absence of Metabolic Activation System (Main Study 2)

Strain	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	No. of revertant colonies/plate presence of metabolic activation		Strain	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	No. of revertant colonies/plate absence of metabolic activation	
		Colony No.	mean ± S.D.			Colony No.	mean ± S.D.
TA98	0	29 25 24	26 ± 3	TA98	0	18 17 15	17 ± 2
	312.5	28 27 23	26 ± 3		312.5	18 17 17	17 ± 1
	625	25 26 26	26 ± 1		625	20 18 18	19 ± 1
	1250	26 26 26	26 ± 0		1250	17 18 16	17 ± 1
	2500	24 25 26	25 ± 1		2500	17 17 20	18 ± 2
	5000	26 27 26	26 ± 1		5000	22 24 20	22 ± 2
	2-AA(0.5)	313 348 378	346 ± 33		2-NF(1.0)	344 344 309	332 ± 20
TA 100	0	133 132 129	131 ± 2	TA 100	0	117 120 119	119 ± 2
	312.5	134 143 133	137 ± 6		312.5	119 115 124	119 ± 5
	625	136 141 136	138 ± 3		625	117 129 115	120 ± 8
	1250	139 135 142	139 ± 4		1250	127 118 115	120 ± 6
	2500	135 134 139	136 ± 3		2500	115 127 114	119 ± 7
	5000	128 133 137	133 ± 5		5000	127 118 123	123 ± 5
	B[a]P(2.0)	808 832 760	800 ± 37		SA(1.0)	576 649 622	616 ± 37
TA 1535	0	14 16 12	14 ± 2	TA 1535	0	11 13 14	13 ± 2
	312.5	12 12 13	12 ± 1		312.5	11 14 5	13 ± 2
	625	13 12 12	12 ± 1		625	13 15 12	13 ± 2
	1250	11 16 13	13 ± 3		1250	16 11 15	14 ± 3
	2500	13 12 15	13 ± 2		2500	17 15 15	16 ± 1
	5000	13 13 16	14 ± 2		5000	13 14 12	13 ± 1
	2-AA(2.0)	212 176 181	190 ± 20		SA(1.0)	704 748 711	721 ± 4

TA 1537	0	7 7 9	8 ± 1	TA 1537	0	7 6 8	7 ± 1
	312.5	8 6 10	8 ± 2		312.5	7 7 5	6 ± 1
	625	9 7 7	8 ± 1		625	9 7 5	7 ± 2
	1250	8 8 11	9 ± 2		1250	9 6 6	7 ± 2
	2500	7 7 9	8 ± 1		2500	8 6 9	8 ± 2
	5000	9 7 10	9 ± 2		5000	9 8 9	9 ± 1
	2-AA(2.0)	467 481 428	459 ± 27		9-AA(80.0)	256 392 311	320 ± 68
WP2 <sub>uvrA</sub> ( pKM101)	0	138 135 142	138 ± 4	WP2 <sub>uvrA</sub> ( pKM101 )	0	121 123 127	124 ± 3
	312.5	146 141 147	145 ± 3		312.5	139 124 122	128 ± 9
	625	140 144 140	141 ± 2		625	123 125 123	124 ± 1
	1250	139 140 142	140 ± 2		1250	124 109 108	114 ± 9
	2500	151 151 149	150 ± 1		2500	131 129 123	128 ± 4
	5000	147 145 146	146 ± 1		5000	120 124 120	121 ± 2
	2-AA(20.0)	1796 1874 1800	1823 ± 44		AF-2(0.005)	1800 1804 1755	1786 ± 27

#### 4. 결론

사물탕의 처방은 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황 각각 5g으로 구성되어 있으며, 이 처방을 기본 으로 다른 약재를 추가해 기운(氣)과 혈류(血)를 보해주는 여러 용도로 이용되는 한방처방 중에서 가장 기본적인 처방이다. 그중 숙지황의 부작용을 줄이는 다양한 조합이 시도되고 있다[5-7]. 이전 연구에서 오미자를 첨가한 변형 사물탕의 효과가 일부 확인된바[8], 시험 물질의 안전성을 확인하는 다음 단계의 실험이 요구되어 유전독성 실험을 진행하였다. 그중 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이실험을 하였는데 유전독성 시험으로 시험 물질의 유전독성 및 발암원성을 예측할 수 있기 때문이다. Ames 시험법은 복귀돌연변이 성을 이용한 실험으로 시험법의 개발자인 B. N. Ames라는 사람의 이름을 딴 시험법으로[10], 히스티딘을 필요로 하는 박테리아가 히스티딘이 필요 없는 종으로 변화하는 유전자의 변화를 이용하여 변이 여부를 스크리닝하는 시험법이다. 시험원리는 균주를 시험 물질에 처리하여 배지에 이식한 후 일정 기간 동안 배양한 후 형성된 콜로니수를 대조군과 비교하는 것이다[11-13].

박테리아 균주를 이용한 본 복귀돌연변이 실험에서는 예비시험 결과, 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주의 모든 용량에서 시험 물질에 의한 침전 및 생육 저해는 관찰되지 않아, 5,000µg/plate 을 본시험을 진행하였다. 그 결과 최고용량 대사활성계 존재 시 및 부재 시의 모든 균주의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 시험 물질에 의한 복귀돌연 변이 콜로니 수의 증가가 관찰되지 않았으며 침전 및 생육저해도 관찰되지 않았다. 따라서 시험물질 변형 사물탕은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

유전독성은 발암성 위험에 대해 시험계를 통해 평가하는 것이기 때문에 한약재와 같이 장기적인 사용 경험이 있다고 하여 혹은 약물 감시 자료만으로 평가할 수가 없으며, 유전독 성에 대한 정보가 문헌 자료 등에서 보고되어 있지 않다고 해서 안전하다는 것을 의미하는 것은 아니다. 따라서 새로운 규격 의약품(한의약품)의 유전독성시험은 임상시험 전 최소 복귀돌연 변이시험(Ames test)을 실시할 것을 권장한다[14]. 널리 사용되는

한약재나 한약재를 이용한 약침의 경우에도 복귀돌연변이 시험은 안전성을 증명하는 좋은 평가도구로 이용된다[15].

본 연구의 결과로 사물탕 처방에서 숙지황을 빼고 대신 오미자를 넣은 처방은 복귀돌연변이 실험을 통한 유전독성시험 결과 박테리아 균주의 돌연변이를 유발하지 않으므로 차후 위장 장애 문제가 감소한 건강기능식품의 개발 등에 유용한 자료로 사용될 것으로 사료된다.

## 5. 감사의 글

이 논문은 2022년도 세명대학교 연구과제로 수행되었음.

## Referenes

- [1] [https://www.health.kr/researchInfo/herbalMedicine2\\_detail.asp?idx=47](https://www.health.kr/researchInfo/herbalMedicine2_detail.asp?idx=47), Dec 12 (2022)
- [2] <http://encykorea.aks.ac.kr/Contents/Item/E0025608>, Dec 10 (2022)
- [3] <http://encykorea.aks.ac.kr/Contents/Item/E0054475>, Nov 28 (2022)
- [4] G. Wölkart, A. Schrammel, C. N. Koyani, S. Scherübel, K. Zorn-Pauly, E. Malle, B. Pelzmann, M. Andrä, A. Ortner, B. Mayer, Cardioprotective effects of 5-hydroxymethyl furfural mediated by inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> currents, *British Journal of Pharmacology*, (2017), Vol.174, No.20, pp.3640-3653.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.13967>
- [5] J. J. Jung, S. Y. Goo, S. R. Lim, J. S. Sung, D. I. Kim, Anti-cancer effects of Samultang-Gami on HeLa, HepG2, AGS Cells, *The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology*, (2010), Vol.23, No.3, pp.38-55.  
DOI: <https://doi.org/10.15204/jkobgy.2010.23.3.038>
- [6] H. W. Lee, H. J. Kim, J. A. Ryuk, K. J. Kil, B. S. Ko, Hemopoietic effect of extracts from constituent herbal medicines of Samul-tang on phenylhydrazine-induced hemolytic anemia in rats, *International Journal of Clinical Experment Pathology*, (2014), Vol.7, No.9, pp.6179-6185.
- [7] S. R. Lim, A study on Effects of Samultang and Samultang Composition on Lucopenia, Thrombocytopenia and Anemia, *Journal of Hachwa Medicine*, (1999), Vol.8, No.1, pp.837-851.
- [8] S. H. Hwang, S. Y. Park, Y. K. Shin, Evaluation of the efficacy of modified Samultang in female menopausal animal models using ovarian resection rats, *Journal of The Korea Convergence Society*, (2022), Vol.13, No.4, pp.573-582.  
DOI: <https://doi.org/10.15207/JKCS.2022.13.04.573>
- [9] [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_209/down.do?brd\\_id=data0009&seq=25452&data\\_tp=A&file\\_seq=3](https://www.mfds.go.kr/brd/m_209/down.do?brd_id=data0009&seq=25452&data_tp=A&file_seq=3), Jan 21 (2022)
- [10] B. N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, (1975), Vol.31, No.6, pp.347-363.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90046-1)
- [11] D. M. Maron, B. N. Ames, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, (1983), Vol.113, No.3-4, pp.173-275.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- [12] B. S. Kim, B. H. Margolin, Statistical methods for the Ames Salmonella assay:a review, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, (1999), Vol.436, No.1, pp.113-122.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(98\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00025-8)
- [13] V. L. Singer, T. E. Lawlor, S. Yue, Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test), *Mutation*

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, (1999), Vol.439, No.1, pp.37-47.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00172-7)

[14][https://www.law.go.kr/%ED%96%89%EC%A0%95%EA%B7%9C%EC%B9%99/%EC%9D%98%EC%95%BD%ED%92%88%EB%93%B1%EC%9D%98%EB%8F%85%EC%84%B1%EC%8B%9C%ED%97%98%EA%B8%B0%EC%A4%80/\(2017-71,20170830\), Aug 30 \(2017\)](https://www.law.go.kr/%ED%96%89%EC%A0%95%EA%B7%9C%EC%B9%99/%EC%9D%98%EC%95%BD%ED%92%88%EB%93%B1%EC%9D%98%EB%8F%85%EC%84%B1%EC%8B%9C%ED%97%98%EA%B8%B0%EC%A4%80/(2017-71,20170830), Aug 30 (2017))

[15] J. H. Hwang, J. S. Ku, C. Jung, Bacterial Reverse Mutation Test of CP pharmacopuncture, The Journal of Korean Medicine, (2020), Vol.41, No.3, pp.55-68.

DOI: <http://dx.doi.org/10.13048/jkm.20025>