J. Fd Hyg. Safety 17(1), 8-14 (2002)

식물추출혼합물의 니코틴 분해능에 미치는 효과

김지훈* · 이동희** · 조희재*** · 정종문†

*(주)유젠바이오 생명과학연구소, **서울시립대 생명과학과,
***(주)제일제당 제약연구소, †수원대학교 생명과학과

Effects of Phyto-Extract Mixture on the Nicotine Decomposition

Ji-Hoon Kim*, Dong-Hee Lee, Hee-Jae Cho*** and Jong-Moon Jeong†**

*Life Science Research Center of EugenBio Inc. Hwasung, 445-743, Korea
**Department of Life Science, University of Seoul, 130-743, Korea
***Institute of Science & Technology, Cheil Jedang Co. Icheon, 467-810, Korea
†Department of Life Science, University of Suwon, Hwasung, 445-743, Korea

ABSTRACT – Cotinine, one of nicotine metabolites, has been known to reduce 4-(methylnitro samino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)-induced O^6MeG DNA adducts significantly in A/J mice when administered together with NNK. In order to examine the effects of phyto-extract mixture on the conversion of cotinine from nicotine, cellular and clinical experiments were carried out. When the phyto-extract mixture was added to culture media, human liver cells (FLCFR5) produced cotinine from nicotine 2~3 times compared to the control. The phyto-extract mixture which was microinjected into *Xenopus oocyte* along with nicotine showed the almost similar production of cotinine compared with the results of hepatic cell culture. In clinical test employing 17 to 20 healthy men, concentrations of urinary cotinine derived from smoking after taking phyto-extract mixture increased up to 2 times compared to the control group. These results indicatethat the phyto-extract mixture can increase the metabolic efficiency of nicotine to cotinine, leading to the reduced formation of O^6MeG DNA adducts.

Key words □ nicotine, cotinine, O^6MeG DNA adducts, phyto-extract mixture

니코틴은 흡연을 통하여 폐(lung)에 흡수되어 빠른 속도로 체내에서 물질대사가 일어나는 무색 또는 연황색의 강독성 물질로, 신경 마디의 세포막 상에 작용하여 혈압상승, 골격근섬유 경련초래 및 흥분으로 인한 구강내 마비 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 니코틴은 노화촉진 등에 중요한 요인으로 작용할 뿐만 아니라 심하면 발작, 경련, 호흡마비 및 근육경련 등을 유발하기도 한다[1].

니코틴의 대사는 개인에 따라 약 3배까지 차이를 나타내는데[2], 이러한 차이는 흡연자의 흡연 행위가 대사의 중요 결정인자가 될 수 있음을 의미한다. 체내에 흡입된 니코틴의 70-80% 정도는 코티닌으로 전환되고, 코티닌의 10-15%가 소변으로 배출되며, 나머지는 4-oxo-4-(3-pyridyl)butanoic acid (keto acid) 형태로 전환된다. 다시 이 keto acid의 85%는 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid(hydroxy acid)로 전환되어 소변으로 배출된다. 코티닌으로 대사되지 않은 니코틴 중 4%는 flavin-containing monooxygenase(FMO)에 의해 nicotine-1'-N-oxide로 전환되어, 대부분 그대로 소변으로 배출되므로[3] 니코틴의 80-90%는 뇨 대사물(urinary metabolites)로서 배출된다[4-7]. 니코틴에서 코티닌으로의 대사과정은 체내에서 두 단계의 과정에 의하여 진행되는데, cytochromes P450(CYPs)에 의하여 니코틴이 nicotine-△1'(5)-iminium ion으로 전환되며, cytosolic aldehyde oxygenase에 의하여 iminium ion이 다시 코티닌으로 전환된다[8].

이전 보고에 의하면 N'-nitrosonornicotine(NNN), 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK), NNAL, NAT, N'-nitrosoanabasine(NAB), iso-NNAN 및 iso-NNAC와 같은 니코틴의 중간 대사산물인 니트로사민(nitrosamine)이 담배에서 동정되었는데, 이들 중에서 NNN, NNK, NAT는 다른 중간 대사물질보다 많은 양이 검출되어졌고, 특히 NNN, NNK, NNAL은 아주 강력한 발암물질들로 확인되었으며[9,10], O^6-methylguanine은 NNK로 유도되는 암에 대한 돌연변이능(promutagenic) 생물학적 지표로 사용되고 있다[11]. 또한 니코틴과 코티닌 같은 경쟁적 억제제를 통해 NNK의 대사 활성을 방해함으로써 NNK에 의한 폐종양이 효과적으로 억제되

†Author to whom correspondence should be addressed.

는 것이 생체 내·외 실험에서 확인되었다[12].

본 연구에서는 흡연으로 인한 체내 니코틴 및 담배의 유해성에 주목하고 이들 유해산물에 대한 독성 제거능이 탁월한 식물추출 혼합제재를 제조하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 그 효능을 검증하였다. 본 연구에서의 식물추출 혼합제재는 phenolic compound들을 다량 함유한 녹차를 포함하여 8종의 식물체로부터 추출한 천연혼합제재이고 본 연구자들은 다양한 문헌조사와 기초연구를 바탕으로 식물추출 혼합제재 내 유효성분들이 흡연을 통해 유입된 체내 니코틴을 코티닌으로 다량 생성 유도됨은 물론 폐암 유발물질로 알려진 니트로사민 유도체들의 생성 대사경로에 영향을 줌으로써 흡연에 의한 각종 질환의 위험을 감소시킬 수 있다고 가정하였다. 따라서, 간세포에서 유래한 FLCFR5 세포주와 *Xenopus oocyte*를 이용한 *in vitro* 실험과 흡연자들을 대상으로 한 임상실험을 통해 니코틴이 코티닌으로 전환되는데 있어 식물추출 혼합제재가 미치는 영향을 분석하였다

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 천연식물소재인 녹차(*Camellia sinensis*; 40~80%), 상엽(*Morus alba*; 5~20%)은 경동시장에서 국내산으로 구입하였고, 은행(*Ginko biloba* L.; 5~20%), 감초(*Glycyrrhiza glaba* L.; 1~10%), 진피(*Citrus unshiu* M.; 0.5~5%)는 (주)삼광약업에서 공급받아 사용하였으며, 사과(*Malus pumila* M.; 1~10%), 레몬(*Citrus limon* F.; 1~10%), 그리고 샐러리(*Apium graveolens* L.; 1~10%)는 시장에 나와 있는 싱싱한 것들을 이용하였다. 녹차엽 및 상엽 추출물은 80°C에서 30분간 추출 후 100 mesh 망에 여과하였으며, 과채류(사과, 레몬, 샐러리) 및 은행 추출물은 깨끗이 세척 후 분쇄하여 착즙하고 100 mesh망에 여과하여 준비하였다. 또한 한약재(감초, 진피) 추출물은 100°C에서 2시간 추출하여 100 mesh망에 여과하였으며, 위의 엽류 추출물과 과채류 여과액을 함께 잘 혼합하여 분사 건조하여 분말을 만든 후 실험에 사용하였다.

(-)-니코틴과 코티닌양을 측정하는 DBA 방법에 사용된 sodium acetate, KCN, chloramine-T, barbituric acid는 Sigma (St, Louis, Mo, USA)에서, 그리고 acetone은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 식물추출 혼합 제재를 이용하여 직접혼합법으로 니코틴 분해능 측정에 사용된 세포주는 간세포에서 유래한 FLCFR5 세포주를 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였고, 직접주사법에는 *Xenopus oocyte*가 사용되었다.

Phyto-extract mixture의 퀘르세틴 분석

Phyto-extract mixture로부터 퀘르세틴(Quercetin)의 함량은 high performance liquid chromatography (HPLC)법으로 정량하였다[13].

식물추출혼합물과 태평양에서 시판하는 가루설록차 내에 함유되어있는 퀘르세틴을 추출하기 위하여 메탄올과 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 4:1로 혼합한 추출용액에 적정량 녹여 30초 동안 강하게 섞어 혼합하였다. 혼합한 용액을 10분 동안 9000 rpm에서 원심분리하고 상등액을 취하여 상등액과 동일한 양의 증류수를 넣고 섞어준 후 0.45 μm filter로 여과하여 역상컬럼(Delta-pak C18, 300Å, Waters)에 10 μl 주입하였다. 이동상은 56% (v/v)의 0.1 M ammonium acetate (pH 5.15)와 44%(v/v)의 메탄올 용액을 사용하였으며, flow-rate은 0.3 mL/min으로 하였다. 흡광도는 M720 Absorbance detector(Yongin, Co., Korea)를 375 nm에 맞추어 측정하였다.

코티닌 정량법

흡연관련 질환 연구는 정확한 흡연량 측정이 매우 중요하므로 흡연자로부터 주로 니코틴, 코티닌, 티오사이네이트, 카복시헤모글로빈 등을 측정한다. 이중 코티닌 측정법이 가장 정확한 것으로 알려져 있는데, 니코틴의 반감기가 약 30분인데 반해, 코티닌은 24시간 정도로 안정하므로 측정 과정에서 오차를 줄일 수 있다. 반면 티오사이네이트는 다이어트와 같은 외부요인에 의하여 오차폭이 크고, 카복시헤모글로빈 측정법은 일산화탄소에 의해 변동이 심하기 때문에 정확한 흡연량 측정에 문제가 있다. 지금까지 코티닌 측정은 보통 Gas Chromatography(GC)[14], High Performance Liquid Chromatography(HPLC)[15,16], Radioimmunoassay(RIA)[17], 혹은 Direct Barbituric Acid(DBA) 방법[18]등이 사용되어 왔다. GC 및 HPLC 방법은 상당한 정확성을 갖지만, 다수의 시료를 측정하기에는 불편이 따르고, RIA는 방사성 동위원소를 사용하여야 하기 때문에 본 연구에서는 배제하였다. 따라서 본 실험에서는 시험관 내에서의 직접혼합법 또는 직접주사법 실험을 통한 코티닌 생성량 측정을 위해 Barlow 등[19]에 의하여 개발된 DBA법을 이용하였다. 코티닌 정량법은 1.5 ml 폴리프로필렌 튜브에 200 μl의 시료 혹은 표준시료를 첨가하였으며, 이때 실험 결과의 신뢰성을 기하기 위하여 한 시료당 3회 반복 실험하였다. 측정 대상시료(뇨 또는 세포주 추출물)에 100 μl의 4 M sodium acetate(pH 4.7) buffer, 40 μl의 1.5 M KCN, 40 μl의 0.4 M chloramine T, 200 μl의 78 mM barbituric acid(in acetonitrile/water(50/50, v/v))를 순서대로 넣고 10초 동안 잘 혼합하였으며, 이 혼합물을 상온(25°C) 에서 15분간 반응시킨 후, 40 μl의 1 M sodium

metabisulphite를 넣어 반응을 중지시켰다. 그런 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하여 코티닌 시료의 표준곡선과 비교 분석하여 정량하였다.

세포배양을 이용한 니코틴 분해능 분석

세포배양을 이용한 니코틴 분해능 측정에 사용된 세포주는 한국세포주은행에서 분양받은 간세포에서 유래한 FLCFR5 세포주를 사용하였으며, 일주일간 배양한 간세포를 1 mM 니코틴이 함유되고 5% FBS가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 배지에서 1일간 배양하였다. 배양된 세포에 효능 검증을 할 대상물인 0.3% 식물추출 혼합제재를 첨가하여 시간대 별로 배양하였다. 원심분리하여 상층액을 회수하고, 상층액에 포함된 코티닌을 DBA법으로 정량하였다. 아울러 식물추출 혼합 제재의 성분이 세포내에 먼저 흡수되어 존재할 경우, 신규 유입되는 니코틴 중화의 효용성을 검증하기 위하여, 식물추출 혼합 제재가 함유된 배지(120 µl per ml 배지)에 6시간 동안 예비 배양하였다. 예비배양이 완료된 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, 니코틴이 함유된 배지에 세포를 배양하였다. 세포배양을 각 시간대 별로 종료시킨 후, 세포를 4°C에 보관된 PBS로 3~4차례 씻어 낸 다음, 스크래퍼를 이용하여 세포를 수확하였다. 항원심분리를 이용하여 세포를 수거한 다음, 냉장 보관된 PBS 100 µl를 넣고 초음파 분쇄기(Vibra Cell-200; Newton, Conn., USA)로 단속적으로 30초간 파쇄하고, DBA법을 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한 대조군으로 0.3% 식물추출 혼합 제재 대신 증류수를 사용하여 동일하게 실시하였다.

직접주사법에 의한 니코틴 분해능 분석

본 실험에 사용된 미숙란은 지름이 1.0-1.2 mm에 해당되는 난발생 단계 IV 또는 V의 것을 사용하였다. 미숙란은 모체에서 분리한 후, 15°C의 Optimized Re-Routing(OR2) 용액[20]에서 하루 정도 배양하였다. 미숙란은 유리주사바늘이 침투할 수 없을 정도의 단단하고 질긴 보호막이 있는데, 이 보호막은 세포외부로부터 물질의 유입을 저해하므로 15°C에서 배양을 종료시킨 후, Collagenase type 3(Sigma, Co.)을 처리하여 보호막을 제거하였다[21]. 직접혼합법의 경우와 마찬가지로 준비된 0.5 µl 혼합액을 각 미숙란에 Eppendorf micromanipulator를 이용하여 주사하고 세포주의 실험과 같은 시간대 별로(0, 10, 20, 30, 60, 120분) 배양한 후, 생성된 코티닌을 정량하였다. 아울러, 주사기법의 효용성을 대비하기 위하여, OR2 배양액에 세포배양 실험에서와 같이 니코틴 및 식물추출 혼합 제재를 배지에 첨가한 후, 동일 배양 시간대 동안 식물추출 혼합 제재의 니코틴 분해 효능을 검증하였다. 온도 조건은 15°C, 25°C, 32°C 그리고 37°C에서 수행하였으나, 37°C에서는 미숙란이 쉽게 터지는 문제가 발생하여 배제시켰다. 실험에 사용된 미숙란은 모두 OR2 용액 하에서 Dounce homogenizer를 이용하여 분쇄 처리하였고, 난황은 원심분리하여 제거하였다. 원심분리 후 상등액을 취한 다음, DBA법으로 코티닌을 측정하였다.

임상실험에 의한 니코틴 분해능 분석

식물추출 혼합 제재의 니코틴 분해에 관한 효능을 검증하기 위하여 시중에서 판매되는 담배 중 디스(THIS)를 선택하여 하루에 15~25개피를 태우는 건장한 20대의 남자(17~20명)를 대상으로 임상실험을 실시하였다. 실험 오차를 최소화하고자 3회 반복 실시하여 통계처리 하였으며, 물을 음용하는 대조군과 식물추출 혼합제재를 음용하는 실험군은 동일 피실험자들을 대상으로 다른 날에 실시하였고 몸의 상태를 되도록 동일하게 하기 위해 오후 2시부터 4시까지 일정시간에 실험을 실시하였다. 실험은 평소처럼 흡연을 하게 하였으며, 실험방법은 Fig. 1과 같다. 이상에서 채취된 소변은 즉시 -20°C에 보관하고 48시간 후에 꺼내어 일괄적으로 소변의 니코틴 주요 대사산물인 코티닌을 DBA법을 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

Phyto-extract mixture의 성분 분석

본 실험은 체내 니코틴 및 담배의 유독물질을 효과적으로 제거할 수 있는 카테킨(catechin)과 EGCG(epigallocatechin gallate)와 같은 phenolic compound와 퀘르세틴 등을 다량 함유한 녹차는 물론, 다양한 천연식물들을 이용하여, 담배의 유해성분에 대한 분해 및 생성 억제능이 뛰어난 혼합추출물을 제조하였다.

퀘르세틴은 광합성 식물에서만 독특하게 발견되는 플라보노이드로, 정상적인 건강식이요법을 하였을 때 대략 하루에

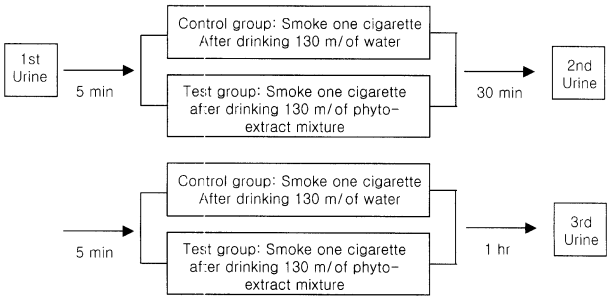

Fig. 1. Clinical test scheme of Phyto-extract mixture for metabolic conversion of nicotine into cotinine.

25 mg이 소비되는 것으로 추정된다. 또한, 최근에는 항암제로써 1기 임상평가에 조치를 해왔다[22]. 퀘르세틴은 항암효과로써의 우수한 역할을 한다는 좋은 증거들이 많이 보고되고 있으며, 퀘르세틴 10 μM 주위의 농도에서 유방암[23], 백혈병[24], 자궁암[25], 위암[26], 결장암[27]의 cell line 증식이 억제된다는 것이 보고되어져 왔다.

Phyto-extract mixture 내에 함유되어 있는 퀘르세틴을 분석하기 위하여, 녹차를 대조군으로 하여 HPLC를 이용하여 정량하였다. 그 결과, 본 연구에서의 phyto-extract mixture에는 항산화 및 항돌연변이에 우수한 효능을 지니는 것으로 알려진 퀘르세틴이 1 mg당 56 ng 함유되어 있는 반면, 가루녹차인 경우 5 mg의 추출물에서 퀘르세틴에 해당되는 peak를 전혀 검출할 수 없었다(Fig. 2).

FLCFR5 세포배양을 이용한 식물추출 혼합제재의 니코틴 분해능 분석

체내에서 니코틴의 대사가 일어나는 주된 장소가 간이기 때문에, 간세포에서 유래된 세포주를 이용하여 니코틴에서 코티닌으로 전환되는 대사속도에 식물추출 혼합제재가 미치는 영향을 분석하였다. Fig. 3은 본 실험에서 사용된 식물추출 혼합제재의 니코틴 분해 효능을 FLCFR5 세포주를 이용하여 분석한 결과, 식물추출 혼합제재를 투여한 경우가 대조군인 물을 투여한 경우보다 코티닌의 생성량이 2~3배 많이 생성되는 것을 알 수 있었다. 또한 식물추출 혼합제재의 기능성 성분을 세포 내에 미리 흡수시킨 후, 새로 유입시킨 니코틴의 대사 상태를 확인하기 위하여, 배지 1 ml당 120 μl의 0.3% 식물추출 혼합제재가 함유된 배지에 6시간 동안 FLCFR5 세포를 예비 배양하였다. 예비 배양이 완료된 후, PBS로 세척하고, 니코틴이 함유된 배지에 배양한 다음, 세포내 코티닌 함량을 측정하였다. 식물추출 혼합제재가 미리 처리된 세포에서 니코틴 분해능을 측정한 결과 Fig. 3과 비슷한 양상을 나타내었다(Fig 4). 이와 같은 실험 결과는 식물추출 혼합제재를 장기 복용하거나 흡연 직전에 음용할 경우, 니코틴 분해능에는 큰 차이가 없을 것으로 사료된다. Fig. 3에서 식물추출 혼합제재의 니코틴 분해 결과가 식물추출 혼합제재를 기 흡수시킨 실험 결과와 같은 유형을 보인다는 것은 니코틴 분해 효능이 있는 성분은 세포막 투과성을 보이고, 세포 내에서 안정성을 유지할 수 있다는 것으로 해석할 수 있다. 이상의 세포배양을 이용한 실험 결과는 식물추출 혼합제재가 니코틴을 분해하는 대사경로에 관여하여 코티닌 생성량을 2-3배 정도 증가시키도록 중요한 역할을 함

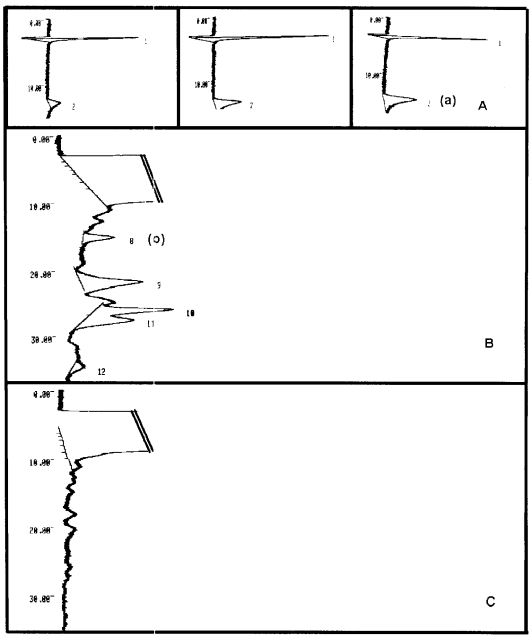

Fig. 2. Chromatograms of (A) standard, (B) phyto-extract mixture (1 mg), and (C) green tea powder (1 mg)
Chromatogram A; (a) quercetin, 160 ng. Chromatogram B; (b) quercetin, 56 ng.
Quercetin was detected by absorbance at 375 nm and identified by its retention time (15.2 min). Any peak corresponding to quercetin was not detected in 5 mg of green tea powder.

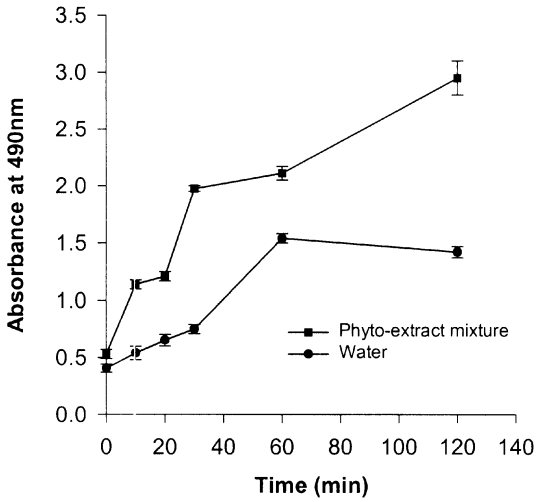

Fig. 3. Comparison of cotinine production by human liver cells (FLCFL5).
When human liver cells came to be confluent, 1mM of nicotine was added into each cell culture after washing cells with fresh medium. After 24 hrs of incubation, the cells were treated further with distilled water or phyto-extract mixture (120 μl of 0.3% phyto-extract mixture per ml of cell culture medium).

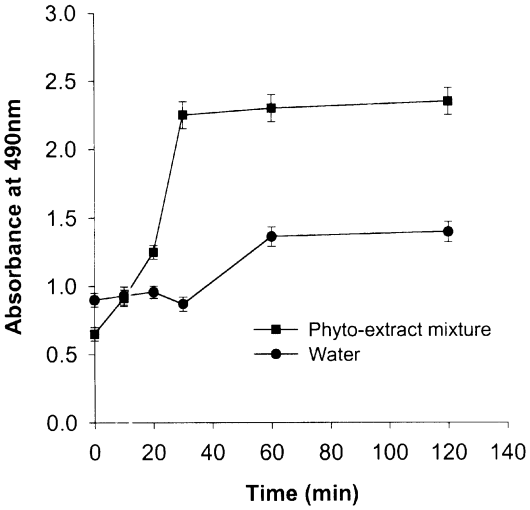

Fig. 4. Comparison of cotinine production by hepatic cells (FLCFL5) in which the phyto-extract mixture was added 6 hrs before nicotine treatment.

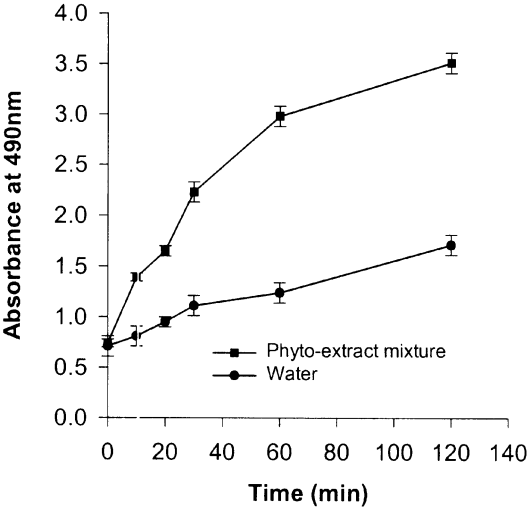

Fig. 5. Measurement of nicotine metabolic efficiency using Xenopus oocyte microinjection.
Five minutes after the injection of 0.5 ß° of 1 mM nicotine into the *Xenopus oocytes*, either 0.5 µl phyto-extract mixture (0.3%) or water was injected. The oocytes were cultured for the time intervals identical to the ones for cell lines. Then, the concentration of cotinine was measured by DBA assay.

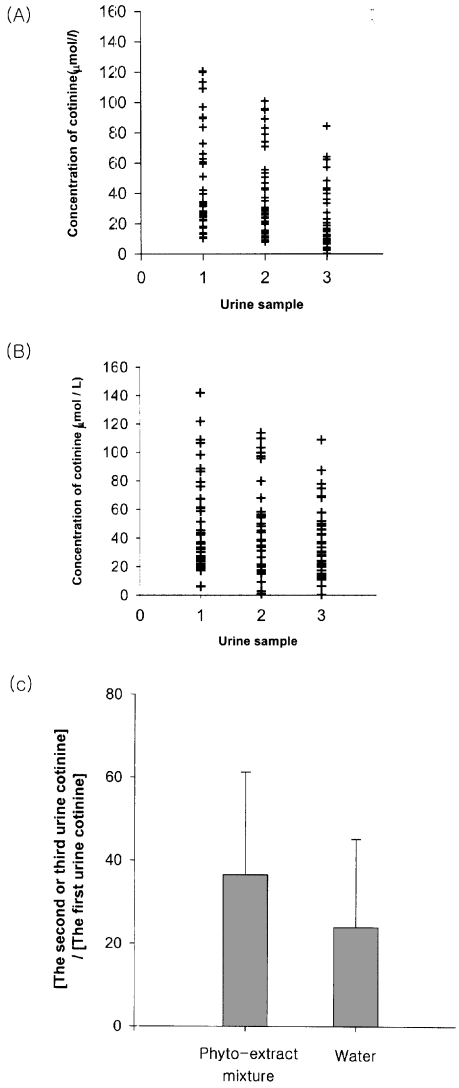

Fig. 6. Increased concentration of cotinine in smokers' urine by the Phyto-extract mixture.
Panel A is the distribution of the concentration of cotinine in smoker's urine samples who drank water and then smoked whereas panel B is the distribution of the concentration of cotinine in the smoker's urine who drank phyto-extract mixture and then smoked. Panel C shows the production ratio of cotinine in each smoker's urine who drank either Phyto-extract mixture or water. Urine samples were collected three times from each smoker (37 smokers), designated as 1st, 2nd, and 3rd urine sample (refer to Fig. 1)

을 보여 주었다.

Xenopus oocyte을 이용한 식물추출 혼합제재의 니코틴 분해능 분석

직접주사법을 이용한 실험 결과, FLCFR5 세포주를 이용한 직접혼합법 실험 결과에(Fig. 3) 비하여 오히려 빠른 니코틴 분해 양상을 보였다(Fig. 5). 이 같은 실험결과는 니코틴이 세포 내에서 대사되어 코티닌을 생성하고 따라서 세포 내에 직접 니코틴을 주사하게 되면 코티닌 생성이 니코틴을 세포 밖에 섞어 넣어줄 때보다 훨씬 빨라짐을 의미한다.

임상실험을 통한 식물추출 혼합제재의 니코틴 분해능 분석

실제 흡연자들에 대하여 식물추출 혼합제재 효능을 검증하기 위하여 하루에 15~25개피를 태우는 건장한 20대 남자(17~20명)를 대상으로 임상실험을 실시하였다. 본 실험에서 채취한 피검자들의 1차, 2차, 그리고 3차 소변으로부터 코티닌을 정량하여, 소변 내 코티닌 농도를 분석하였다(Fig. 6). Fig. 6에서 (A)는 대조군으로 실험자가 물을 음용하고 담배를 피운 후 배출한 소변에서 코티닌 정량을 실시한 것이고, (B)는 식물추출 혼합제재를 음용하고 담배를 피운 후 배출한 소변에서 코티닌 정량을 실시한 분포도이다.

이는 식물추출 혼합제재에 의해 체내에서 니코틴이 많은 양의 코티닌으로 대사되었음을 나타낸다. Fig. 6의 (c)는 식물추출 혼합 제재 또는 물을 음용 후 흡연한 남자들의 소변에서 측정한 코티닌 값을 평균한 것으로, 각 개인의 2차와 3차 뇨 시료 각각의 코티닌 값을 각 개인의 1차 뇨 시료의 코티닌 값으로 나눈 값을 다시 전체 평균하여 얻은 값이다. 실험군의 니코틴 분해율(코티닌 생성률)은 대조군의 약 2배에 달한다는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과들은 실험에 사용된 천연식물소재 및 한약재 추출제재인 식물추출 혼합제재가 체내에서 니코틴을 코티닌으로 분해하는데 촉진제로 작용하거나 혹은 니코틴이 니트로사민류로 전환되는 것을 억제하여 상대적으로 코티닌으로 변환되는 양이 증가함으로 추정할 수 있었다. 기존 실험결과에서 식물추출 혼합제재로 인해 니트로소모폴린 생성억제 및 항산화 효능이 녹차에 비해 2~3배 높은 것으로 나타났다[28]. 이러한 결과들은 더 많은 연구와 생화학적 분석이 필요하겠지만 본 연구내용과 유의성 있는 결과를 보여줌으로써 니코틴 분해능이 니트로세이션 억제능과 항산화 효능과 연관관계가 있을 것으로 생각되어진다.

감사의 말씀

본 연구는 산자부에서 시행한 1998년 산자부 공업기반기술개발과제(A00982-5411-25-1-2)의 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

국문요약

천연식물소재 및 한약재 추출제재인 식물추출 혼합제재가 인체내에서 니코틴 분해능에 미치는 영향을 FRCFR5 세포주, *Xenopus oocyte*, 임상 실험을 통하여 검토하였다. 본 실험은 체내에 잔존하는 니코틴이 식물추출 혼합 제재에 의해 무독한 대사산물인 코티닌으로 분해량이 증가되고 동시에 NNK, NNN, NNA 등과 같은 폐암 유발물질인 니트로사민 유도체 생성 경로가 억제될 것이라는 가정을 전제로 실험을 수행하였다. 본 실험 결과에서 볼 수 있듯이 식물추출 혼합 제재에는 니코틴에서 코티닌으로 전환시키는 대사 활성물질이 함유되어 있다는 사실을 알 수 있으나, 실제로 어떤 유효성분들이 관여하는지 그리고 정확한 작용 기작을 규명하기 위해서는 더 많은 분석 및 생화학적 연구가 앞으로 수행되어야 할 것이다. 간세포에서 유래된 FRCFR5 세포주 실험 결과, 니코틴과 식물추출 혼합 제재가 첨가된 배지에서 니코틴과 물을 첨가한 배지보다 니코틴에서 코티닌으로 전환능력이 약 2~3배 높게 나타났으며, 이러한 결과는 *Xenopus oocyte*에 직접 주사한 경우와 거의 비슷한 양상을 보였다. 임상실험 결과 식물추출 혼합 제재 음료를 음용하고 담배를 피운 실험군이 물을 음용하고 담배를 피운 대조군에 비해 약 2배 정도 높은 코티닌 함량을 나타내었다. 이는 실험군의 소변 중에 계속적으로 다량의 코티닌이 배출되는 것을 의미하며, 식물추출 혼합 제재 섭취시 체내에 존재하는 니코틴이 코티닌으로 지속적이면서 효과적으로 전환되는 것을 말한다. 이상의 생체 내・외 실험에서 알 수 있듯이 식물추출혼합물은 니코틴에서 코티닌 생성을 약 2배정도 증가 시키는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Damaj, M.I., Welch, S.P. and Martin, B.R.: Characterization and modulation of acute tolerance to nicotine in mice. J. Pharmacol. Exp. Thr., 277, 454-461 (1996).
2. Benowitz, N.L., Jacob, P.3rd., Jones, R.T. and Rosenberg, J.: Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. J. Phamacol. Exp. Ther., 221, 368-372 (1982).
3. Benowitz, N.L., Jacob. P.3rd., Fong, I. and Gupta, S.: Nicotine metabolic profile in man: Comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 268, 296-301 (1994).
4. Kyerematen, G.A., Morgan, M.L., Chattopadhyay, B., deBethizy, J.D. and Vessel, E.S.: Disposition of nicotine and eight metabolites in smokers and nonsmokers: identification in smokers of two metabolites that are longer lived than cotinine. Clin. Pharmacol. Ther., 48, 641-651 (1990).

5. Caldwell, W.S., Greene, J.M., Byrd, G.D., Chang, K.M., Uhrig, M.S., deBethizy, J.D., Crooks, P.A., Bhatti, B.S. and Riggs, R.M.: Characterization of the glucuronide conjugate of cotinine: a previously unidentified major metabolite of nicotine in smokers' urine. Chem. Res. Toxicol., **5**, 280-285 (1992).
6. Byrd, G.D., Chang, K.M., Greene, J.M. and deBethizy, J.D.: Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in smokers. Drug. Metab. Dispos., **20**, 192-197 (1992).
7. Jacob. P.3rd., Benowitz, N.L. and Shulgin, A.J.: Recent studies of (s)-nicotine metabolism in humans. Pharmacol. Biochem. Behav., **30**, 249-253 (1988).
8. Kyerematen, G.A. and Vesell, E.S.: Metabolism of nicotine. Drug Metab. Rev., **23**, 3-41 (1991).
9. Hoffmann, D., Brunnemann, K.D., Prokopczyk, B. and Djordjevic, M.V.: Tobacco-specific N-nitrosamines and Areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenecity, and relevance to humans. J. Toxicol. Environ. Health, **41**, 1-52 (1994).
10. Spiegelhalder, B. and Bartsch, H.: Tobacco-specific nitrosamaines. Eur. J. Cancer Prev., **5**, 33-38 (1996).
11. Brown, B.G., Ching, G.C., Ayres, P.H., Lee, C.K. and Doolittle, D.J.: The effect of cotinine or cigarette smoke co-administration on the formation of O6-methylguanine adducts in the lung and liver of A/J mice treated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). Toxicol Scien., **47**, 33-39 (1999).
12. Brunnemann, K.D. and Hoffmann D.: Analytical studies on tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. Crit. Rev. Toxicol., **21**, 235-240 (1991).
13. Jones D.J, Lim C.K, Ferry D.R, Gescher A.: Determination of quercetin in human plasma by HPLC with spectrophotometric or electrochemical detection. Biomed. Chromatogr. **12**(4), 232-5 (1998).
14. McNiven, N.L., Raisinghani, K.H., Patashnik, S. and Dorfman, R.I.: Determination of nicotine in smokers' urine by gas chromatography. Nature, 208, 788-789 (1965).
15. Ubbink, J.B., Lagendijk, J. and Vermaak, W.H.: Simple high-performance liquid chromatographic method to verify the direct barbituric acid assay for urinary cotinine. J. Chromatogr., **620**, 254-259 (1993).
16. Kolonen, S.A. and Puhakainen, E.V.: Assessment of the automated colorimetric and the high-performance liquid chromatographic methods for nicotine intake by urine samples of smokers' smoking low- and medium-yield cigarettes. Clin. Chim. Acta., **196**, 159-166 (1991).
17. Van Vunakis, H., Gjika, H.B. and Langone, J.J.: Radioimmunoassay for nicotine and cotinine. IARC Sci. Publ., **81**, 317-330 (1987).
18. Peach, H., Ellard, G.A., Jenner, P.J. and Morris, R.W.: A simple, inexpensive urine test of smoking. Thorax., **40**, 351-357 (1985).
19. Barlow, R.D., Stone, R.B., Wald, N.J. and Puhakainen, E.J.: The direct barbituric acid assay for nicotine metabolites in urine: a simple colorimetric test for the routine assessment of smoking status and cigarette smoke intake. Clin. Chim. Acta., **165**, 45-52 (1987).
20. Lee, D.H., Bennett, S. and Pedersen, K.: Free movement of 27K zein in the endoplasmic reticulum. Protein Eng., **9**, 91-96 (1995).
21. Lee, D.H.: Characterization of 27K zein as a transmembrane protein. J. Biochem. Molecular Biology, **31**, 196-200 (1998).
22. Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J., Kerr, D.J.: Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. Clin. Cancer Res. 2(4), 659-68. (1996).
23. Scambia, G., Ranelletti, F.O., Benedetti, Panici, P., Piantelli, M., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Ferrandina, G., Pierelli, L., Capelli, A., Mancuso, S.: Quercetin inhibits the growth of a multidrug-resistant estrogen-receptor-negative MCF-7 human breast-cancer cell line expressing type II estrogen-binding sites. Cancer Chemother Pharmacol. **28**(4), 255-8. (1991).
24. Larocca, L.M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Panici, P.B., Scambia, G., Mancuso, S., Capelli, A., Ranelletti, F.O.: Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukaemias: growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids. Br J Haematol. **75**(4), 489-95. (1990).
25. Scambia, G., Ranelletti, F.O., Benedetti, Panici, P., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Piantelli, M., Mancuso, S.: Synergistic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer cell growth. Anticancer Drugs. **1**(1), 45-8. (1990).
26. Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., Nishino, H., Aoike, A.: The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. FEBS Lett. 15, 260(1), 10-3. (1990)
27. Agullo, G., Gamet, L., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C.: Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. Cancer Lett. 25, 87(1), 55-63. (1994).
28. Kim, J.H., Shin, M.J., Cho, H.J., Lee, S.W., Jeong J.M.: Analysis of nitrosation inhibition and antioxidant effect by phyto-extract mixture. Korean J. Food Sci. Technol. **33**(6), 656-663 (2001).