

환삼덩굴(*Humulus japonicus*) 추출물의 항돌연변이 효과와 Flavonoid 성분의 분리

박승우 · 김성환* · 정신교

경북대학교 식품공학과, *경상북도 보건환경연구원

Antimutagenic Effects and Isolation of Flavonoids from *Humulus japonicus* Extract

Seung-Woo Park, Sung-Hwan Kim* and Shin-Kyo Chung

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

*Public Health and Environment Research Institute, Kyungsangbuk-do

Abstract

To investigate the physiological activities of *Humulus japonicus*, we examined the mutagenic and antimutagenic effects of the extract and isolated the flavonoid compounds. The water and methanol extracts of *Humulus japonicus* did not show the mutagenicity by Ames test in the 0.5-4 mg/plate. The methanol extract showed the antimutagenic effect against *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 induced by 4-nitro-o-phenylenediamine(NPD) and 4-nitroquinoline-N-oxide(NQO). The hexane fraction showed comparatively higher antimutagenic effect than other solvent fractions from the methanol extract. The 50% inhibition concentration(IC₅₀) of hexane fraction were 2.0 mg/plate, 0.5 mg/plate in TA98 and TA100 respectively. Quercitrin and luteolin were identified in the ethyl acetate fraction from methanol extract of *Humulus japonicus* by TLC and HPLC.

Key words: *Humulus japonicus*, antimutagenic effects, quercitrin, luteolin

서 론

환삼덩굴(*Humulus japonicus*)은 삼과에 속하는 덩굴성 1년초로서 잎은 대생하며 줄기와 엽병에 가시가 있고 7~8월에 담황색의 꽃이 피는 자웅이주의 식물로서, 우리나라 전역에 분포하고 있다. 현재까지 혈압 강하 작용, 이뇨 작용 등의 약리 작용이 보고되어 있으며⁽¹⁾, 저자 등도 환삼덩굴의 항균성과 항산화성에 대하여 보고한 바 있다⁽²⁾.

생리활성물질에 관한 연구는 유용자원의 탐색과 유효 성분의 분리 및 동정 그리고 안전성의 구명에 초점이 모아지고 있으며, 우리나라에서도 1970년대 이후 활발한 연구가 이루어져 식물로부터 ephedrin, taxodione, diosgenin, luteolin, β -sitosterol 등 여러 종류의 성분이 분리되었다^(3,4).

식물성분중 생리활성을 나타내는 물질은 여러 종류가 있으며 그 중에서도 flavonoid 성분은 2개의 방향족 환과 3개의 탄소로 이루어진 C₆-C₃-C₆의 화합물로서 곡물, 채소, 과일 등 일상 식품과 식물계에 널리 분포되어 있다.

Flavonoid 성분의 생리 및 약리 작용은 항 바이러스⁽⁵⁾,

항혈액 응고 및 급성 간염 억제⁽⁶⁾, 고혈압 및 당뇨병성 백내장 등의 예방⁽⁷⁾, 항산화⁽⁸⁾, 항염증 작용⁽⁹⁾, 혈압강하 및 살충작용 등⁽¹⁰⁾이 있고, 최근에는 에이즈 바이러스 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다⁽¹¹⁾. 이러한 여러가지 생리활성으로 식품에 이용 할 수 있는 기능성 소재로서의 가능성이 높아 최근 천연물중의 flavonoid 성분에 대한 관심이 증대되고 있다.

본 연구는 환삼덩굴의 생리활성을 구명하기 위하여 환삼덩굴을 각종 용매로 추출 및 분획하여 돌연변이원성과 항돌연변이원성을 조사하고, TLC와 HPLC로 flavonoid 성분을 분리하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 환삼덩굴은 1993년 6월 경북 영천 지역에서 채취하여 음건하여 분말로 한 후 80~120 mesh 체를 통과시켜 시료로 사용하였다.

추출 및 용매분획

시료의 추출은 시료에 5배량의 물 또는 메탄올을 가하여 수욕 상에서 환류 냉각하면서 3회 추출한 후 여과하고 감압농축하여 물 추출물과 메탄올 추출물로 하였다.

Corresponding author: Seung-Woo Park, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Table 1. Operating condition of HPLC for analysis of flavonoid compounds from *Humulus japonicus*

Items	Conditions
Instruments	Waters Associates(USA)
Column	Novapak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Detector	UV 280 nm
Mobile phase	MeOH : 0.2% TFA, gradient
Flow rate	1.0 ml/min
Chart speed	0.5 cm/min
Sensitivity	0.2 Auf

메탄올 추출물은 10% 메탄올로 녹인 후 헥산, 클로르포름, 에칠아세테이트, 부탄올 및 물층으로 순차 용매 분획을 실시하였다⁽²⁾.

돌연변이원성 및 항돌연변이원성 시험

Salmonella typhimurium TA98과 TA100을 이용한 Ames test⁽¹²⁾를 실시하였다. 돌연변이 유발물질은 TA98에는 4-nitro-o-phenylenediamine(NPD, Sigma Chemical Co., USA), TA100에는 4-nitroquinoline-N-oxide(NQO, Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다.

시험은 미리 toxicity test를 행하여 시험균주에 항균성을 나타내지 않는 농도에서 실험을 행하였으며, 돌연변이원의 사용량은 dose response test를 행한 후 결정하였고, 시료와 돌연변이원은 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

돌연변이 원성은 음성대조군에 대하여 복귀 돌연변이 집락의 수가 2배 이상 이거나, 농도 의존성이 있는 경우에 돌연변이 원성이 있는 것으로 판정하였다.

항돌연변이 원성은 다음식에 의해 산출하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{M - S_1}{M - S_0} \times 100$$

M : number of revertants by mutagen

S₀ : number of spontaneous revertants

S₁ : number of revertants when the sample and mutagen were added to the test strains

TLC와 HPLC에 의한 flavonoid 성분의 분리

환삼덩굴 메탄올 추출물의 에칠아세테이트 분획에 대한 flavonoid 성분의 확인은 TLC와 HPLC로 행하였다.

TLC plate는 silica gel coating plate(Kieselgel 60, Merck)를, 전개용매는 CHCl₃ : MeOH : H₂O(6 : 4 : 1)을 사용하였고, 발색시약은 10% 황산을 사용하였다.

HPLC는 Table 1과 같은 조건에서 실시하였다.

결과 및 고찰

돌연변이원성

환삼덩굴의 물 추출물과 메탄올 추출물을 plate 당

Table 2. Mutagenicity of water and methanol extracts of *Humulus japonicus* on *Salmonella typhimurium* TA98

Samples	Dose (mg/plate)	Revertants per plate mean ± SD
Spontaneous(DMSO)		24 ± 4
Mutagen(NPD)	0.01	762 ± 37
MeOH extract	0.5	27 ± 6
	1.0	26 ± 7
	2.0	33 ± 5
	4.0	29 ± 6
H ₂ O extract	0.5	23 ± 7
	1.0	27 ± 4
	2.0	25 ± 6
	4.0	31 ± 8

Table 3. Mutagenicity of water and methanol extracts of *Humulus japonicus* on *Salmonella typhimurium* TA100

Samples	Dose (mg/plate)	Revertants per plate mean ± SD
Spontaneous(DMSO)		86 ± 13
Mutagen(NQO)	1 × 10 ⁻⁴	843 ± 48
MeOH extract	0.5	72 ± 19
	1.0	89 ± 25
	2.0	76 ± 13
	4.0	90 ± 21
H ₂ O extract	0.5	97 ± 17
	1.0	81 ± 15
	2.0	93 ± 18
	4.0	112 ± 14

0.5~4.0 mg 농도로 가하여 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과는 Table 2 와 Table 3에 나타내었다.

음성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 TA98은 24 ± 4, TA100은 86 ± 13이었고, 돌연변이 물질을 첨가한 양성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 TA98은 762 ± 37, TA100은 843 ± 48이었다.

환삼덩굴의 물 추출물과 메탄올 추출물을 첨가하여 시험한 결과, frame shift mutant인 TA98과 base pair exchange mutant인 TA100에 대하여 돌연변이 집락의 수가 음성대조군에 비하여 2배 이하이며 농도 의존성을 나타내지 않으므로 환삼덩굴 추출물은 돌연변이원성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다.

물 추출물과 메탄올 추출물의 항돌연변이 효과

환삼덩굴의 물 추출물과 메탄올 추출물을 plate당 1.0 mg의 농도로 첨가하여 항돌연변이 효과를 조사한 결과는 Table 4와 같다.

돌연변이 물질로 NPD(10 µg/plate)를 TA98에 가하여 물 추출물과 메탄올 추출물의 항돌연변이 효과를 조사한 결과, 물 추출물은 항돌연변이 효과가 낮았으나, 메탄올

Table 4. Antimutagenic effects of water and methanol extracts of *Humulus japonicus* on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Stranis	Samples	Dose(mg/plate)	Revertants per plate Mean ± SD	Inhibition %
TA98	Spontaneous(DMSO)		24 ± 4	
	Mutagen(NPD)	0.01	762 ± 37	
	MeOH extract	1.0	528 ± 42	31.7
	H ₂ O extract	1.0	720 ± 57	5.7
TA100	Spontaneous(DMSO)		86 ± 13	
	Mutagen(NQO)	1 × 10 ⁻⁴	843 ± 48	
	MeOH extract	1.0	694 ± 38	19.7
	H ₂ O extract	1.0	815 ± 52	3.7

Table 5. Antimutagenic effects of each fraction of *Humulus japonicus* on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Stranis	Fractions	Dose(mg/plate)	Revertants per plate Mean ± SD	Inhibition %
TA98	Spontaneous(DMSO)		24 ± 4	
	Mutagen(NPD)	0.01	762 ± 37	
	Hexane	1.0	476 ± 39	38.8
	CHCl ₃	1.0	517 ± 48	33.2
	EtOAc	1.0	501 ± 53	35.4
	BuOH	1.0	494 ± 32	36.3
	H ₂ O	1.0	530 ± 22	31.4
TA100	Spontaneous(DMSO)	86 ± 13		
	Mutagen(NQO)	1 × 10 ⁻⁴	843 ± 48	
	Hexane	1.0	314 ± 29	69.9
	CHCl ₃	1.0	517 ± 37	36.3
	EtOAc	1.0	814 ± 59	3.8
	BuOH	1.0	747 ± 40	12.7
	H ₂ O	1.0	803 ± 63	5.3

추출물은 약 32%의 돌연변이 억제활성을 나타내었다.

한편 돌연변이 물질로 NQO(0.1 µg/plate)를 TA100에 가하여 물 추출물과 메탄을 추출물의 항돌연변이 효과를 조사한 결과, 물 추출물은 항돌연변이 효과가 거의 나타나지 않았으나, 메탄을 추출물은 약 20%의 돌연변이 억제활성을 나타내었다. 이로 미루어 환삼덩굴의 메탄을 추출물은 NPD와 NQO로 유도한 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100의 돌연변이를 억제하는 것으로 판단되었다.

메탄을 추출물의 용매분획별 항돌연변이 효과

NPD와 NQO로 돌연변이를 유도한 TA98과 TA100에 대한 메탄을 추출물의 분획별 항돌연변이 효과를 조사한 결과는 Table 5와 같다.

TA98에 대하여는 모든 분획에서 30% 이상의 돌연변이 억제활성을 나타내었으며, hexan 분획이 약 39%의 억제활성을 나타내어 항돌연변이 효과가 가장 우수하였다. 항돌연변이원성이 여러 분획에서 나타나는 것으로 보아 항돌연변이 효과는 단일 성분 뿐만 아니라 이들 성분의 복합적인 작용에 의한 것으로 사료된다.

TA100에 대하여는 에칠아세테이트 분획과 물 분획은 항돌연변이 효과가 거의 관찰되지 않았다. 그러나 클로르포름 분획은 약 37%, hexan 분획은 약 70%의 돌연변이 억제활성을 나타내어 hexan 분획에 강한 항돌연변이 물질이 존재하는 것으로 추정된다. 이는 정 등⁽¹³⁾이 덩굴초의 hexan 분획이 TA100에 대하여 항돌연변이 효과를 보였다는 결과와 유사하였다.

환삼덩굴의 지금까지 알려진 성분으로는 vitexin, cosmosiin, humulone, lupulone 등이 있으나⁽¹⁾ hexan 분획에서 항돌연변이 활성을 나타내는 성분은 기존 보고된 물질 보다는 극성이 낮은 새로운 물질일 가능성도 배제할 수 없으며 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

hexan 분획의 농도별 영향

항돌연변이 효과가 우수한 hexan 분획의 농도별 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

hexan 분획의 농도를 plate당 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg으로 증가시켰을 때, TA98에 대하여는 26.7%, 38.8%, 49.7%, 58.2%로 돌연변이 억제활성이 증가하였고, TA100에 대하여는 50.3%, 69.9%, 80.6%, 87.8%로 돌연변이 억제활

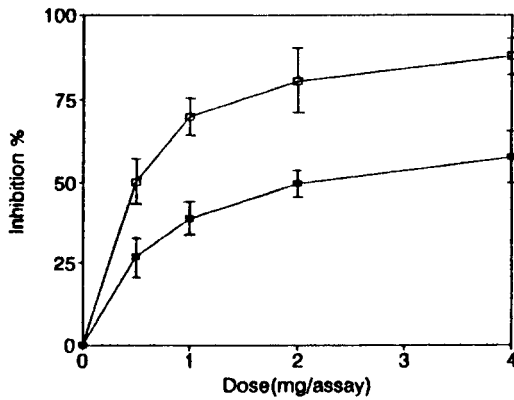


Fig. 1. Antimutagenic effect of hexane fraction from *Humulus japonicus* on the mutagenicity induced by NPD and NQO in *Salmonella typhimurium* TA98(■) and TA100(□), respectively

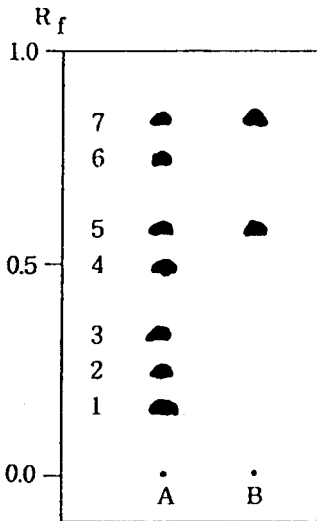


Fig. 2. TLC patterns of ethyl acetate fraction from the methanol extract of *Humulus japonicus*

A: Ethyl acetate fraction, B: Standard of quercitrin(number 5), and luteolin(number 7)

성이 증가하였다.

핵산 분획의 50% 억제농도(IC₅₀)는 TA98에는 2.0 mg, TA100에는 0.5 mg으로서 NPD로 유도한 TA98 보다는 NQO로 유도한 TA100에 대하여 항돌연변이 효과가 우수하여, 환삼덩굴의 핵산 분획은 base pair exchange에 의한 돌연변이를 억제하는데 더욱 더 효과적인 것으로 판단된다.

항변이원성을 나타내는 핵산 분획에 대한 물질의 분리 및 동정이 차후에 이루어져야 할 것으로 생각된다.

TLC와 HPLC에 의한 flavonoid 성분의 분리

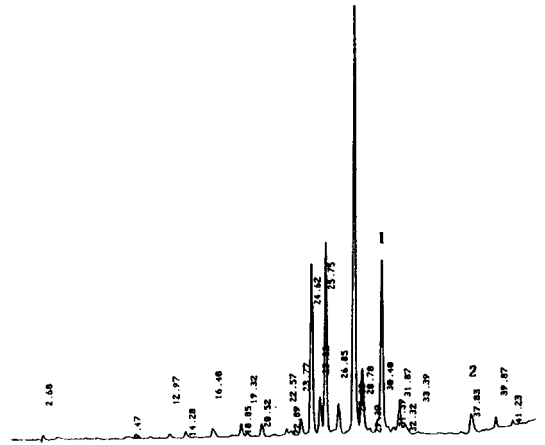


Fig. 3. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from the methanol extract of *Humulus japonicus*
1: Quercitrin, 2: Luteolin

저자 등이 환삼덩굴의 용매분획별 항균성과 항산화성을 조사한 결과 활성을 나타낸 에칠아세테이트 분획이 flavonoid 성분일 것으로 추정되어 TLC와 HPLC를 이용하여 flavonoid 성분을 확인하였다.

Fig. 2와 3에서 나타난 바와 같이 TLC 상에서 quercitrin은 R_f치 0.6, luteolin은 0.8 부근에서 반점이 확인되었고, HPLC에서는 quercitrin은 retention time 30분대, luteolin은 37분대에 peak가 분리되었으며 표품을 이용하여 이들 성분을 확인하였다.

Flavonoid 성분은 항바이러스 작용, 항균효과, 항산화성, 항히스타민 효과 등 많은 생리활성이 있는 것으로 알려져, 최근 식물로부터 flavonoid 성분의 분리 및 동정에 관심이 모아지고 있다⁽¹⁰⁾. 환삼덩굴의 에칠아세테이트 분획에서의 항균성과 항산화성, TA98에 대한 항돌연변이 효과는 quercitrin과 luteolin 등의 flavonoid 화합물에 기인된 것으로 생각되어지며, quercitrin과 luteolin 외의 flavonoid 화합물로 추정되는 수개의 물질이 분리 되었으나 이에 대하여는 확인하지 못하였으나, 현재 flavonoid 성분의 동정 및 정량과 항산화성, 활성산소 소거능에 대한 연구가 진행 중에 있다.

요 약

환삼덩굴의 생리활성물질을 구명하기 위하여 환삼덩굴을 물과 메탄올로 추출하여 돌연변이원성과 항돌연변이 효과를 조사하고 TLC와 HPLC로 flavonoid 성분을 분리하였다. 환삼덩굴의 물 추출물과 메탄올 추출물은 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 Ames test에서 돌연변이원성을 나타내지 않았다. 환삼덩굴의 메탄올 추출물은 NPD와 NQO로 돌연변이를 유도한 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100에 대하여 항돌연

변이 효과를 나타내었다. 분획별 항돌연변이 효과는 핵산 분획에서 높게 나타났으며 50% 돌연변이 억제농도(IC₅₀)는 TA98에 대하여는 2.0 mg/plate, TA100에 대하여는 0.5 mg/plate 였으며, 4.0 mg/plate의 농도에서 TA98에 대하여는 약 58%, TA100에 대하여는 약 88% 정도의 돌연변이 억제활성을 나타내었다. 환삼덩굴의 에칠아세테이트 분획에서 quercitrin과 luteolin을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 1995년 핵심연구과제 연구비 지원(과제번호: 951-0611-053-1)으로 수행된 연구 결과로서 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. 육창수: 원색한국약용식물도감. 아카데미서적, p.138 (1989)
2. 박승우, 우철주, 정신교, 정기택: 환삼덩굴의 용매분획별 항균성 및 항산화성. 한국식품과학회지, 26, 464 (1994)
3. 강삼식, 윤혜숙, 장일무: 천연물 과학. 서울대학교출판부, p.71 (1988)
4. 천연물화학연구위원회: 천연물화학. 영림사, p.94 (1995)
5. Veckeustedt, A. and Horn, M.: Testing of antiviral

- compounds against Mengo virus infection of mice, A 2-step procedure of *in vivo* screening. *E. Allg. Microbiol.*, 16, 57 (1976)
6. Swallow, D.L.: Antiviral agent. In *Progress in Drug Research*. Jucker, E.(ed), *Birkhauer Basel und Stuttgart*, 22, 312 (1978)
7. Hladovec, J.: Antithrombotic effects of some flavonoid alone and combined with acetylsalicylic acid. *Arzneim. Forsch.*, 27, 1989 (1977)
8. Toshimitsu, H., Kazuko, S., Kawasaki, M., Munehisa, A., Shimizu, M. and Morita, N.: Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, 51, 345 (1988)
9. Kim, C.J., Su, S.K., Joo, J.H. and Cho, S.K.: Pharmacological activities of flavonoids(II)-Relationships of anti-inflammatory and antigranulomatous actions. *Yakhak Hoeji*, 34, 407 (1990)
10. 紫田承二: 生理活性 天然物化学. 醫齒藥出版社, 東京, p. 425 (1970)
11. 岩科司: 植物におけるフラボノイド化合物の分布と特性. 食品と開發, 27, 39 (1992)
12. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983)
13. 정병걸, 박정희, 김성환: 덩굴초 성분의 안정성에 관한 연구 (II). 경상북도 보건환경연구원보, 4, 71 (1991)

(1995년 7월 15일 접수)