

한국산 도꼬마리 추출물로부터 항균·항암물질의 탐색

† 김 현 수 · 유 대 식 · ¹이 인 선 · ²김 용 원 · ³여 수 환
계명대학교 자연과학대학 미생물학과, 식품가공학과¹, 계명문화대학 원예조경과²
계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터³
(접수 : 2003. 1. 3., 게재승인 : 2003. 2. 26.)

Screening of the Antimicrobial and Antitumor Activity of *Xanthium strumarium* L. Extract

Kim, Hyun-Soo[†], Tae-Shick Yu, In-Seon Lee¹, Yong-Won Kim², and Soo-Hwan Yeo³

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

¹Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²Department of Horticulture and Landscape Architecture, Keimyung College, Daegu 704-701, Korea

³Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received : 2003. 1. 3., Accepted : 2003. 2. 26.)

To isolate and purify the antimicrobial and antitumor agents in *Xanthium strumarium* L. hydrothermal extract. The crude extract was extracted in ether or ethylacetate under neutral, acidic, and alkali conditions. The antimicrobial activity of each extract was tested against 16 strains of bacteria, 2 strains of yeast, and 2 strains of fungus. The ether neutral extract (XE-N) exhibited the strongest growth inhibition upon the 8 strains of gram-positive bacteria, 6 strains of gram-negative bacteria and *Cryptococcus neoformans*. Fluorescein diacetate (FDA) testing of XE-N and XEA-N showed growth inhibition of the 3 strains of *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* even at 30 ng/mL, with the exception of *P. aeruginosa*. XE-N-S1 and XE-N-S3 from neutral ether extract (XE-N), XE-N-S3 from the acidic ether extract (XE-A), and XEA-N-S1 from ethylacetate (XEA-N) were purified as antimicrobial and antitumor agents. However all purified compounds decomposed with the exception of XE-N-S1. The results upon the antitumor activities of the crude extract and of its purified compounds, showed that XE-N-S1 had the best antitumor activity against HeLa cells. In terms of antitumor activity against HepG2 cells, XE-N-S1 and XE-N-S3 were superior, and against HT29 cells XE-N and XE-N-S1 were good, against Saos2, NCI H522, NCI H1703, Clone M3 cells XE-N-S1 was very good, and against LN CAP cells XE-N-S3 was the best. Comparing of cellular toxicities various extracts and purified compounds with the existing antitumor agents, XE-A, XEA-A and XEA-B had the lowest toxicity, and XE-B had a lower toxicity than etoposide. XE-N-S1 and XE-N-S3 showed higher toxicities than etoposide, and the toxicity of XE-A-S3 was higher than that of etoposide, and lower than that of cisplatin.

Key Words: antimicrobial agent, antitumor agent, purification, *Xanthium strumarium* L.

서 론

식물은 인류에게 매우 유용한 물질을 제공할 뿐만 아니라, 훌륭한 화학공장으로서의 역할을 수행하며 이들에 의해 유래된 복잡하고 독특한 신규생리활성 물질들이 지금까지 20,000 개 이상이 밝혀져 왔다. 대부분 이차대사산물인 이들 유용물질들은 의약품, 향신료, 방향제, 색소, 살충제 및 고순도 화학제품 등의 다양한 용도로 사용되고 있으며, 전세계 의약품 시장의 25%을 차지하고, 미국에서만 90억 달러 이상의 판매

고 및 매년 1,600개 이상 식물 유래의 신물질이 발견되어왔다. 본 연구의 재료로서 국화과(Compositae)에 속하는 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.)는 전체에 거센 털이 나 있으며 줄기는 곧게 서고, 키는 1.5 m 정도이다. 꽃은 8-9월 경에 황갈색을 띤 머리꽃이 줄기 끝에서 핀다. 열매는 대추씨와 비슷하고 과피 부분에 갈고리 모양의 역센 털이 나 있으며 들이나 길가에서 주로 자라는 한해살이 풀로 한국을 포함한 동북아시아 및 유럽 등지에 폭넓게 분포·자생하는 것으로 알려져 있다. 도꼬마리에 관한 연구는 중국산 도꼬마리(*Xanthium sibiricum* Patr. ex Widd)가 시초로서 열매의 씨(창이)가 해열, 발한, 진통, 산풍, 거습, 궤양성 피부병, 신경통 및 악성 종양 등에 탁월한 효과가 있으며, 항균효과로서는 티푸스균, 이질균과 더불어 황색포도상구균에 상당한 저해효과가 있는 것으로 알려져 있다. 창이엽에는 거풍습, 진통, 해

† Corresponding Author : Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University 704-701, Korea
Tel : 53-580-5284, Fax : 53-580-6447
E-mail : hskim@kmu.ac.kr

열, 살충 등 다양한 효능이 있으며, 장이자에 함유된 성분으로는 T-lactone구조를 가진 xanthinin과 carotenoid, alkaloid, saponine, xanthostrumarin, xanthostrunarin 및 oleic acid 등이 알려져 있다. 이러한 성분을 지닌 도꼬마리가 전통적 민간요법으로 정착되어 습진 등의 피부병 치료에 널리 이용되었을 뿐만 아니라, 다양한 약리 작용을 하는 것으로 보아 항균성 및 항암성 물질의 존재가 예상된다. 최근에는 생약 및 식용 식물 그리고 각종 난배양성 유용미생물(VBNC) 등으로부터 새로운 기능을 가진 천연생리활성물질의 연구가 동·서양을 비롯하여 활발히 진행되면서, 천연 한약재 중에서 항세균효과 및 항암효과를 갖는 성분에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 단풍나무에서 추출된 ginnalin, 황화호에서 추출된 astemismic acid, 황백이나 황련 등에서 추출된 berberin, 감귤류의 과피에 포함된 hesperidin 등의 성분이 항세균효과를 가지며, 충치 유발균인 *Streptococcus mutans* 증식억제 효과를 가진 생약제 및 향신료, 초피 추출물의 항암효과, 심황(turmeric)으로부터 분리된 phenol 화합물의 항암효과 등 다수가 보고된 바 있으며, 약용식물의 성분 중 flavonoids, alkaloids, glycosides, polyphenols 등 각종 성분의 항균·항암효과가 알려져 있다. 또한, 녹차를 비롯하여 식품 중에 함유된 성분을 분리하여 항균·항암 및 각종 생리기능 효과에 관한 수많은 연구가 수행되어 있다(1-6). 이와 같은 관점에서 본 연구자는 한국산 도꼬마리로부터 새로운 항균 및 항암효과 등 다양한 생리활성기능이 있는 신규물질의 탐색과 응용을 위한 일환으로서 도꼬마리의 각 부위로부터 추출한 성분이 세균 및 진균류 등에 대한 광범위한 항균효과를 가진다는 사실과 더불어 분자량 386 및 230인 2종류의 항균성 물질을 분리·정제한 결과를 보고하였다(7). 그 후 계속된 연구에서 이들 항균성 물질이 직장암 세포주에 강력한 생육저해 효과를 보임에 따라 다양한 암세포주에 대한 항암효과를 비롯하여 항변이원성효과, 기타 각종 생리활성기능을 가진 성분의 규명이 기대되고 있으나, 이전의 연구결과는 분리된 항균성 물질의 안정성에 문제가 야기되었다. 따라서 한국산 도꼬마리 중에 존재하는 모든 성분을 안정하고 효율적인 새로운 정제방법을 확립하여 항균효과 및 변이원성, 항변이원성 등 생리활성 효과를 조사, 확인하여 우수한 항균 및 항암물질을 탐색하여 부가가치가 높은 신규 약제로서 개발하고자 한다. 본 연구에서는 한국산 도꼬마리로부터 추출한 성분이 항균 및 항암효과를 가지는 점과 이들 물질을 다양한 추출법으로 분리·정제한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용된 재료는 경남·경북 지역의 산야에 자생하는 *Xanthium strumarium* L.(한국명: 도꼬마리)을 2000년 10월 중 채취하여 음건, 세절한 후 사용하였다.

시료의 조제

도꼬마리 추출액의 조제는 잎과 열매를 대상으로 시료 300 g를 3~5회 열수 추출하여 evaporator(EYELA Co. Japan)로 농축한 추출액 1 L을 유기용매인 ether 및 ethylacetate를 이용하

여 분별 추출하였다. 각 추출물을 중성, 산성 및 알칼리성 조건에서 추출하여 filter paper로 여과한 후, 수지성분 및 유독 성분으로 알려진 불용성의 황색물질인 xanthostrumarin 배당체를 제거하여 항균 및 항암활성의 검사 시료로 사용하였다.

시험균주 및 사용배지

도꼬마리 추출물의 항균효과를 검토하기 위하여 본 실험에 사용한 시험균주는 8종의 그람 양성세균, 8종의 그람 음성세균 및 3종의 진균류를 선정하여 사용하였다.

시험균주의 생육배지는, 세균의 경우 LB agar(tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, yeast extract 5 g/L)를 효모류는 Y agar (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L) 그리고 곰팡이는 YM agar (yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 5 g/L, glucose 10 g/L, pH 5.5)를 사용하였다.

항균효과 및 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) 측정

Agar diffusion 법

18~24시간 배양한 (*A. fumigatus*는 7일 배양한 slant로부터 조제한 spore 용액을 사용) 각 시험균주가 포함된 고체배지에 각종 시료 20 μ L가 첨가된 건조한 paper disc (ϕ : 6 mm, Whatman Co.)를 올려놓고, 28 $^{\circ}$ C (효모, 곰팡이)와 37 $^{\circ}$ C (세균)에서 24시간 배양하였다. 항균력 test는 clear zone의 형성유무로 확인하였으며 50, 100, 150 및 200 μ g의 농도에 따른 항균효과를 검토하였다. 항균성 물질의 확인은 시험균이 함유된 agar plate위에 전개한 TLC plate를 얹고 30분간 방치한 후, TLC plate를 제거하고, 37 $^{\circ}$ C에서 agar plate를 24시간 배양하였을 때 spot 부위의 clear zone 형성 유무로서 확인하였다.

FDA (fluorescein diacetate)법

FDA 측정은 Chand 등(8)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 대수증식기의 시험균 175 μ L와 시료 20 μ L를 (각 시료당 3점씩) 96 well microplate에 넣고 30 $^{\circ}$ C에서 40분간 배양 후, 0.2% FDA (acetone에 용해) 5 μ L를 첨가하여 90분간 배양을 계속하였다. 항균효과는 microplate reader(Bio-rad Co. Model 550)를 사용하여 시험균이 생산하는 esterase에 의한 FDA 분해산물인 fluorescein 생성량을 흡광도 490 nm에서 그리고 균 생육도는 655 nm에서 측정하였으며, 항균효과는 시료의 첨가 및 미첨가의 차이로서 확인하였다.

항균성 물질의 항균 spectrum

각 추출물 중 항균효과가 가장 우수한 추출획분 10 μ g에 대하여 그람 양성세균 8균주, 그람 음성세균 8균주 및 진균 3균주에 대한 항균 spectrum을 조사하였다.

세포 배양

위암 세포주(SNU 668), 폐 편평세포암 세포주(NCI H1703), 폐 선암 세포주(NCI H 522), 전립선암 세포주(LN CAP clone), 흑색종 세포주(Clone M3) 및 대장암 세포주(HT29)는 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 RPMI-1640 media를 사용하였고, 자궁암 세포주인 HeLa cell과 간암 세포주인 HepG2 cell은 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 F10 media를

사용하였으며, 골육종 세포주인 Saos2 cell 및 인간 정상피부 섬유아세포(Human Normal Skin Fibroblast)는 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 DMEM high glucose media를 사용하여 36°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

Trypan Blue Exclusion Assay

0.4% trypan blue 50 µL에 trypsin이 처리된 세포 50 µL을 넣고 섞은 후, hemocytometer에 넣고 1분 후 세포수를 세어 viable cell counting을 시행하였다.

배양 세포계를 이용한 추출물의 항암효과 (MTT assay)

위암 세포주, 폐암 세포주, 자궁암 세포주, 간암 세포주, 대장암 세포주, 골육종 세포주, 전립선암 세포주, 흑색종 세포주 및 인간 정상피부 섬유아 세포주를 각각 배양하다가 대수 증식기에 도달되면, 단계별로 희석된 농도의 추출물 시료를 각각의 배양세포에 접종하고 일정시간 배양한 후, 나타나는 항종양 효과를 검토하였다. 항종양 효과의 분석방법은 3-(4, 5-dimethyl-2-tetrazolyl)-2, 5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT)검사를 하였다. 즉, 대수증식기에 있는 세포 1×10⁴개씩을 180 µL의 배양액에 부유시켜 96 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양한 후 단계적으로 희석된 추출물 10 µL을 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도의 MTT 10 µL을 첨가하여 4시간 더 배양하고, 상층액 180 µL을 제거한 다음 DMSO 150 µL을 첨가하여 rocker에서 20분간 흔들어 준다. ELISA reader(Dynatech Co.)를 이용하여 570 nm 파장에서 O.D를 측정하여 항암효과를 판정하였으며, 대조군으로 항암제를 녹인 용매를 사용하였다. 또한, 기준에 시판되는 항암제와 항암효과를 비교 검토하기 위하여 etoposide, cisplatin 및 5-fluorouracil (5-FU) 등을 사용하였다.

항균 및 항암성 물질의 분리·정제

항균 및 항암성 물질의 분리·정제는 Fig. 1에서 보는 바

와 같이 도꼬마리 300 g(잎 및 열매)를 증류수를 사용하여 3회 열수 추출하여 감압 농축한 열수 추출액(1 L)을 ether 및 ethylacetate를 이용하여 분별 추출하고, 각 추출물을 다시 중성, 산성, 염기성의 6개 fraction으로 나누어 추출하였다. 무수 Na₂SO₄로 건조한 후, 농축하여 항균 및 항암효과를 검토한 다음, 농축액을 소량의 methanol로 용해시켜 TLC(Silica gel 60 F₂₅₄)를 사용하여 정성 분석하고 항균활성이 우수한 signal을 silica gel column을 사용하여 분리하였다. 분리된 물질은 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Shimpak column C₁₈) 및 GC/MS를 통하여 분석하여 정제도와 분자량을 확인하였으며, 정제 과정 중의 항균성 물질의 확인은 *E. coli* K-12 및 *B. subtilis* PCI 219주를 사용하여 agar diffusion법으로 확인하였다.

결과 및 고찰

도꼬마리 추출물의 항균효과 및 MIC

항균 및 항암성 물질의 분리·정제를 위하여 도꼬마리 열수 추출액을 ether 및 ethylacetate를 이용하여 분별 추출하였다. 각각의 추출물을 다시 중성, 산성, 염기성 조건에서 추출한 후, *E. coli* 및 *B. subtilis*를 대상으로 agar diffusion법으로 항균활성을 검토한 결과 ether 및 ethylacetate의 중성 및 산성 추출물에서 우수한 항균효과를 나타내었다(결과 미공개). 따라서 이들 추출물을 각각의 농도로 희석하여 항균활성을 검토한 결과, 50 µg의 농도에서 ethylacetate의 중성 추출물보다 ether의 중성 추출물에서의 항균효과가 우수하였다(Table 1).

항균 spectrum

각 추출물 중 ether 중성 추출물(XE-N)의 항균효과가 가장 우수하였으므로 이 확보에 대하여 항균 spectrum을 조사하였다. 추출물 10 µg에 대한 항균효과는 Table 2에서 보는 바와 같이 그람 양성세균 7균주, 그람 음성세균 7균주를 비롯하여 진균 중 병원성 효모인 *Cryptococcus neoformans*에서도 항균 효과를 나타내었다.

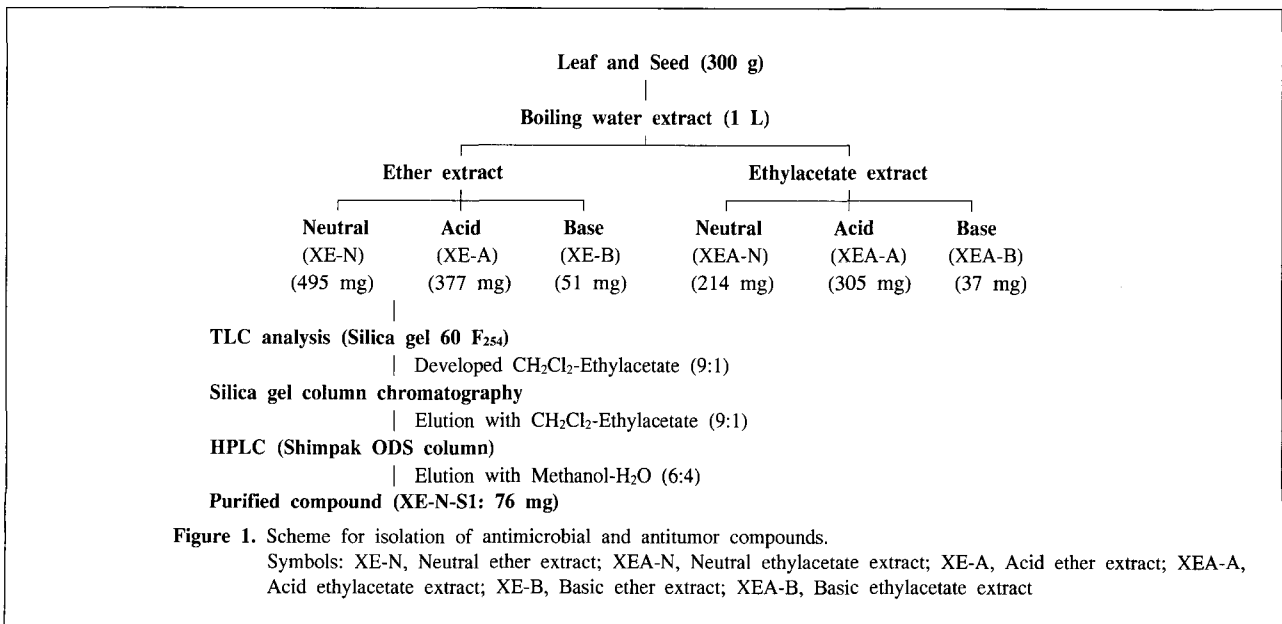


Figure 1. Scheme for isolation of antimicrobial and antitumor compounds.

Symbols: XE-N, Neutral ether extract; XEA-N, Neutral ethylacetate extract; XE-A, Acid ether extract; XEA-A, Acid ethylacetate extract; XE-B, Basic ether extract; XEA-B, Basic ethylacetate extract

Table 1. Antibacterial activity of each extract by various concentration

Sample (µg)	Test strains	Inhibitory zone (ø, mm)	
		<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i> PCI 219
XE-N	50	15	13
	100	16	17
	150	17	21
	200	17	23
XE-A	50	8	9
	100	10	11
	150	11	13
	200	11.5	15
XE-N	50	-	-
	100	7	-
	150	8.5	10
	200	10.5	11
XE-A	50	-	-
	100	-	6
	150	-	8
	200	-	9

Symbols; -, no inhibition

Table 2. Antimicrobial spectra of extract by neutral ether

Strains	Sample	Inhibitory zone (ø, mm)
	XE-N (10 µg)	
Gram-positive		
<i>Mycobacterium phlei</i> KCTC 1932		12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927		10.5
<i>Streptococcus equii</i>		13
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>		7.5
<i>Bacillus megaterium</i>		8
<i>Bacillus subtilis</i>		7.5
<i>Bacillus thermoglucosus</i>		-
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12197		7.5
Gram-negative		
<i>Escherichia coli</i> K-12		10.5
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923		-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1930		9
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 1645		13
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190		10.5
<i>Salmonella typhi</i>		7.5
<i>Serratia marcescens</i>		7.5
<i>Proteus vulgaris</i>		9
Yeasts		
<i>Cryptococcus neoformans</i>		7.5
<i>Hansenulla anomala</i> B-7		-
Fungus		
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFO 5840		-

FDA method에 의한 도꼬마리 추출물의 항균효과

도꼬마리 추출물 중 항균활성의 효과는 지금까지 agar diffusion법을 사용하여 확인하였다. Agar diffusion법은 시료의 확산, 배지 중의 성분, 장시간이 요구되는 점 등에서 시료에 따라 다소 부정확한 경우도 있다. 따라서 액체배양을 통한 항균효과의 정량분석을 하기 위해 시험균이 생산하는 esterase생산 저해를 지표로 하는 fluorescein diacetate(FDA)법을 사용하였다. 우선 항균효과가 입증된 추출물을 대상으로 FDA 분석

조건을 확립하기 위해 XE-N(ether의 중성 추출물), XEA-N(ethylacetate의 중성 추출물)을 대상으로 항균효과를 분석하였다. Table 3에서 보인 바와 같이 시험균으로서 세균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 효모인 *C. albicans*를 대상으로 검토한 결과, *P. aeruginosa*를 제외한 3균주에 대해 30 ng/mL에서도 뚜렷한 저해효과를 나타내었다.

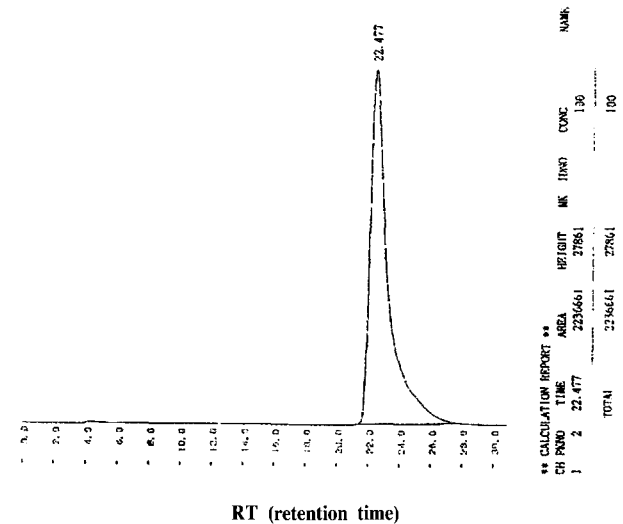


Figure 2. Purification of XE-N-S1 by Second-HPLC.

Ether 중성 추출물(XE-N)로부터 항균, 항암성 물질의 분리·정제

항균 및 항암성 물질의 분리·정제는 Fig. 1에서 보인 바와 같이 열수 추출액을 ether 및 ethylacetate를 이용하여 중성, 산성, 염기성의 6개 fraction으로 나누어 각각 추출하였다. 이 중 항균활성이 가장 강한 ether 중성 추출물을 대상으로 생리활성물질의 분리·정제를 수행하였다. 농축액을 소량의 methanol로 용해시켜 TLC (Silica gel 60 F₂₅₄)로 분석하였다. 전개용매로는 CH₂Cl₂와 ethylacetate를 각각 9:1의 비율로 혼합하여 사용하였으며, short wave UV lamp (254 nm)로 확인한 결과, R_f치가 0.71 (S1), 0.59 (S2) 및 0.39 (S3)로서 세 개의 signal이 검출되었다. TLC plate assay를 통하여 항균활성이 우수한 signal S1, S2 및 S3을 silica gel column을 이용하여 각각 분리하였다. 분리된 S1을 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Shimpak column C₁₈, MeOH : H₂O = 1:1)를 이용하여 분석한 결과, retention time 20.664분에서 peak가 나타났으나 소량의 혼합물이 공존하므로 Second-HPLC로서 재 정제를 수행하였다. 분취용 Metachem nucleosil (C₁₈) column을 사용하여 MeOH : H₂O = 6:4의 용매로서 흡광도 254 nm에서 검출된 peak를 분취하였다. Fig. 2에서 보인 바와 같이, 22.477분에서 single peak로서 검출되었으며, chromatopak(Shimadzu Co.)으로 분석한 결과, 순도가 100%로 정제되었음을 알 수 있었다. 정제된 XE-N-S1을 UV/Visible spectrophotometer(Parmacia Co. Biochrom 4060)를 사용하여 200~900 nm에서 scanning한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 215 nm에서 최대 흡광도를 나타내었으며, GC/MS를 통하여 분석한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 분자량이 248인 단일물질로 확인되었다.

Table 3. Antimicrobial activity of XE-N and XEA-N by FDA method.

Sample	Wavelength	490 nm (FDA)				655 nm			
		E	P	S	C	E	P	S	C
Control		1.101	1.485	0.715	0.539	0.171	0.171	0.294	0.371
	30 ng	0.943	1.634	0.666	0.507	0.201	0.372	0.291	0.339
	50 ng	1.017	1.624	0.667	0.514	0.206	0.352	0.269	0.349
	100 ng	0.964	1.622	0.700	0.479	0.207	0.348	0.286	0.317
XE-N	30 ng	0.907	1.474	0.608	0.477	0.190	0.398	0.281	0.325
	50 ng	0.917	1.568	0.667	0.536	0.183	0.366	0.302	0.384
	100 ng	0.910	1.525	0.683	0.526	0.192	0.350	0.289	0.366
Control		1.391	0.543	0.578	0.559	0.175	0.180	0.245	0.371
	1 µg	1.237	0.641	0.653	0.494	0.197	0.195	0.258	0.319
	5 µg	0.935	0.693	0.550	0.482	0.221	0.282	0.215	0.292
	10 µg	0.816	0.738	0.556	0.516	0.228	0.362	0.233	0.321
	1 µg	1.110	0.730	0.501	0.475	0.209	0.246	0.238	0.310
XE-N	5 µg	0.970	0.616	0.494	0.497	0.234	0.272	0.213	0.323
	10 µg	0.873	0.718	0.506	0.501	0.283	0.334	0.187	0.310

Symbols: E, *Escherichia coli*; P, *Pseudomonas aeruginosa*; S, *Staphylococcus aureus*; C, *Candida albicans*

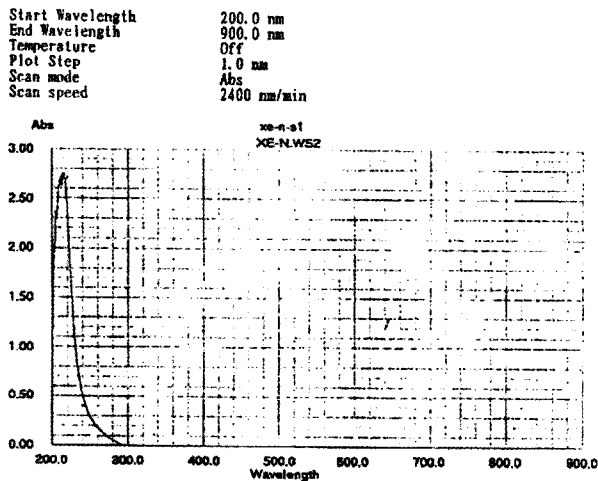


Figure 3. Absorption spectrum of XE-N-S1 by UV/Visible spectrophotometer.

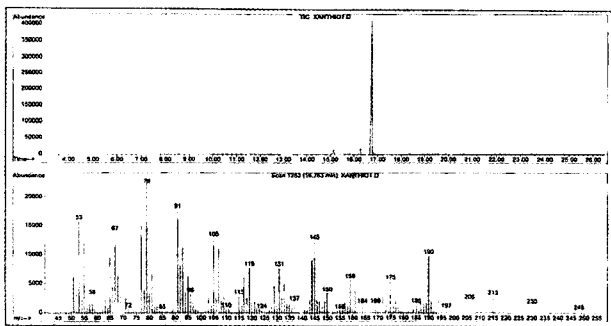


Figure 4. Analysis of purified XE-N-S1 by GC/MS.

XE-N-S3의 분리

Ether 중성 추출물 중, 위에서 분리한 S1 이외의 혼합된 S2와 S3을 분리하기 위하여 먼저 XE-N-S1을 분리한 후, R_f치가 0.59 (S2)와 0.39 (S3)를 포함한 농축액을 소량의 MeOH로 용해시킨 다음, TLC를 사용하여 분석하였다. 전개용매로는 CH₂Cl₂와 ethylacetate를 각각 8.5:1.5의 비율로 혼합하여 사용하였으며 TLC분석 결과를 참조하여 동일용

매 조건 하에서 silica gel column을 사용하여 분리하였다. 분리된 XE-N-S3을 HPLC(Shimadzu LC-10AD, Metachem nucleosil C₁₈, MeOH : H₂O = 6:4)를 이용하여 분석한 결과, retention time 10.735분의 peak가 main으로 정제도는 91%를 보였으며, 8.979분의 peak가 혼합되어 나타났다(결과 미계재). 이들 화합물을 분리하기 위하여 Second-HPLC (Shimadzu LC-10AD, Methachem nucleosil C18, MeOH : H₂O = 1:1)를 실시하여 재 정제한 결과, retention time 20.275분의 단일 peak임을 확인하였다. 분리된 화합물의 분자량을 조사하기 위하여 GC/MS로 측정된 결과, 분자량 262인 단일 물질로 확인되었지만, 정제 후 수일 내에 분해되는 것으로 보아 상당히 불안정한 물질로 판단되었다.

Ether 산성 추출물(XE-A)로부터 항균, 항암성 물질의 분리·정제

항균효과가 입증된 XE-A로부터 항균, 항암성 물질의 분리·정제는 XE-N의 정제과정과 동일한 방법을 사용하였다. 먼저 추출 농축액을 소량의 MeOH로 용해시킨 다음 TLC로 분석하였다. 전개용매로는 CH₂Cl₂와 ethylacetate를 각각 9:1의 비율로 혼합하여 사용하였으며, short wave UV lamp (254 nm)로 확인한 결과, R_f치가 0.74 (S1), 0.63 (S2), 0.55 (S3)와 0.38 (S4)로 4 종류의 signal이 검출되었다. 이들 signal에 대한 항균 활성은 TLC plate assay를 통하여 확인한 결과, 3 개의 signal 즉, S1, S2, S3에서 각각 항균활성을 나타내었다. 따라서 이들을 분리하기 위해 TLC분석 결과를 기초로 농축액을 silica gel 60 column에 충전한 후, 위와 동일한 용매를 사용하여 용출하였다. 그 결과 4개의 signal 중 분리가 용이한 XE-A-S3을 분리하였으며, HPLC(Shimadzu LC-10AD, Metachem nucleosil C₁₈, MeOH : H₂O = 6:4)를 이용하여 분석한 결과, retention time 11.222분의 peak가 main으로 정제도가 92%를 보였으며, 8.930분의 peak가 약간 혼합되어 나타났다. 이들 물질을 분리하기 위해 용매조건을 달리하여 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Methachem nucleosil C18, MeOH : H₂O = 1:1)로 정제하였으나(결과 미계재), XE-N-S3와 마찬가지로 수일 내에 분해되는 것으로 보아 이 물질 또한 상당히 불안정

한 것으로 추정되었다.

Ethylacetate 증성 추출물(XEA-N)로부터 항균, 항암성 물질의 분리 및 정제

항균 및 항암효과가 입증된 한국산 도꼬마리의 ethylacetate 증성 추출물(XEA-N)로부터 항균, 항암성 물질의 분리·정제는 XE-N의 정제과정과 동일한 방법으로 수행하였다. 먼저 추출 농축액을 소량의 MeOH로 용해시킨 후, TLC(Silica gel 60 F₂₅₄)로 분석하였다. 전개용매로는 CH₂Cl₂와 ethylacetate를 각각 9:1의 비율로 혼합하여 사용하였으며, short wave UV lamp (254 nm)로 확인한 결과, R_f치가 0.73 (S1), 0.61 (S2) 및 0.46 (S3)으로서 3 종류의 물질이 검출되었다. TLC분석 결과를 바탕으로 농축액을 silica gel 60 column에 충전한 후, 위와 동일한 용매를 사용하여 용출하였다. 그 결과, XEA-N-S2를 분리하였으며, HPLC (Shimadzu LC-10AD, Metachem nucleosil C₁₈, MeOH : H₂O = 6:4)를 이용하여 재 정제한 결과, retention time 14.691분의 단일 peak임이 확인되었지만, 이 물질 또한 빠른 시간 내에 분해되었다.

도꼬마리 추출물 및 정제된 유효물질의 항암효과

항암효과를 검토하기 위하여 도꼬마리 추출물 및 정제된 생리활성물질을 DMSO 및 EtOH에 용해하여 사용하였는데, XE-A와 XE-B 및 XEA-A와 XEA-B는 잘 용해되지 않았다. 각종 시료에 대한 암세포 억제농도(MIC)는 Table 4, 5에 나타난 바와 같이, HeLa 자궁암 세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였고 XE-N-S3도 우수한 효과를 나타내었다. HepG2 간암세포에 대한 항암효과는 2종류, XE-N-S1과 XE-N-S3의 물질, HT29 대장암세포에 대한 항암효과는 XE-N 추출물과 XE-N-S1의 물질이 우수하였고, Saos2 골육종암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였지만 XE-N 추출물도 우수하였다. 또한 NCI H522 폐 선암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였고, NCI H1703 폐 편평 세포암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였으며, XE-N-S3 물질도 상대적으로 우수한 효과를 나타내었다. LN CAP 전립선 암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S3가 가장 우수하였고, XE-A-S3, XE-N-S1 물질도 우수한 효과를 나타내었다. Clone M3 흑색종암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수한 물질이었다. 실험에 사용한 추출물과 정제품 중 XE-A, XE-B, XEA-A 및 XEA-B 추출물은 용매에 잘 녹지 않았기 때문에 실제로 이들에 대한 항암효과는 Table 4, 5에 나타난 것보다 더 높은 항암효과를 가지고 있을 것으로 생각된다. 또한 HSF 인간 정상 피부 섬유아세포에 대한 각종 추출물 및 정제물의 세포독성을 조사하기 위해 기존에 시판되는 항암제 etoposide와 cisplatin을 구입하여 비교 검토해 본 결과, XE-A, XEA-A 및 XEA-B 추출물이 가장 독성이 낮았으며, XE-B 추출물도 etoposide에 비해 상대적으로 독성이 낮았다. 한편 XE-N-S1과 XE-N-S3 물질은 항암제인 etoposide보다 높은 독성을 나타내었으며, XE-A-S3 물질은 etoposide보다는 독성이 높았으나, cisplatin보다는 낮았다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 분리·정제된 물질 중, 항균 및 항암효과가 뚜렷이 있으며 안정성이 있는 XE-N-S1 물질에 대하여 현재 구조결정을 수행 중에 있으며, 또한, 항암효과는 뚜렷이

있으나 불안정한 물질에 대해서 안정한 형태를 유지할 수 있는 조건을 검토 중에 있다.

Table 4. Minimal inhibitory concentration (MIC) of anticancer agents tested against SNU668, HeLa, HepG2, HT29 and Saos2 cancer cells

Sample	MICs (µg/mL) in each of human cancer cells ^a tested				
	SUN668	HeLa	HepG2	HT29	Saos2
XE-N	228.8	110.9	110.9	55.4	13.8
XE-A	>1625.0	>1625.0	>1625.0	>1625.0	NT
XE-B	1250.0	625.0	625.0	312.5	NT
XE-N-S1	109.3	27.3	27.3	54.7	<13.6
XE-N-S3	365.0	46.8	46.8	93.7	NT
XE-A-S3	650.0	162.5	81.2	325.0	NT
XEA-N	425.0	425.0	425.0	106.2	106.2
XEA-A	>1800.0	>1800.0	>1800.0	>1800.0	NT
XEA-B	1700.0	1700.0	1700.0	1700.0	1700.0
Etoposide	125.0	250.0	125.0	125.0	250.0
Cisplatin	>75.0	50.0	>75.0	>75.0	75.0
5-FU	7500.0	5000.0	2500.0	>7500.0	5000.0

Human cancer cells^a: SNU668, stomach cancer cell; HeLa, cervical cancer cell; HepG2, hepatic cancer cell; HT29, colon cancer cell; Saos2, osteosarcoma cell; NT, not tested.

Table 5. Minimal inhibitory concentration (MIC) of anticancer agents tested against NCI H522, NCI H1703, LN CAP, Clone M3 and HSF

Sample	MICs (µg/mL) in each of human cancer cells ^a tested				
	NCI H522	NCI H1703	LN CAP	Clone M3	HSF
XE-N	NT	NT	NT	NT	NT
XE-A	NT	>1625.0	203.1	NT	>1625.0
XE-B	NT	625.0	78.1	NT	625.0
XE-N-S1	<6.8	<6.8	27.3	13.6	54.7
XE-N-S3	NT	46.8	<5.8	NT	46.8
XE-A-S3	NT	81.2	20.3	NT	162.5
XEA-N	NT	NT	NT	NT	NT
XEA-A	NT	>1800.0	>900.0	NT	>1800.0
XEA-B	NT	1700.0	850.0	NT	>1700.0
Etoposide	250.0	125.0	125.0	125.0	250.0
Cisplatin	50.0	50.0	50.0	>75.0	75.0
5-FU	5000.0	5000.0	5000.0	2500.0	5000.0

Human cancer cells^a: NCI H522, lung adenocarcinoma cell; NCI H1703, lung squamous cell carcinoma cell; LN CAP, prostate cancer cell; Clone M3, melanoma cell; HSF, human skin fibroblast; NT, not tested.

요 약

항균 및 항암성 물질을 탐색하기 위하여 도꼬마리 열수 추출액을 ether 및 ethylacetate를 이용하여 증성, 산성, 염기성 조건에서 추출한 후, 각각의 추출물을 세균 16균주 및 곰팡이와 효모 2균주를 대상으로 항균활성을 조사하였다. Ether 증성 추출물(XE-N)은 항균효과가 가장 우수하였으며, 특히 그람 양성세균(7균주), 그람 음성세균(7균주)을 비롯하여 진균 중 *Cryptococcus neoformans*에도 뚜렷한 항균효과를 나타내었다. XE-N 및 XEA-N을 대상으로 FDA method에 의한 항균효과를 검토한 결과, *P. aeruginosa*를 제외한 3균주에 대해 30 ng/mL에서도 저해효과를 나타내었다. XE-N으로부터 XE-N-S1, XE-N-S3을, Ether 산성 추출물(XE-A)로부터 XE-N-S3을, ethylacetate 증성 추출물(XEA-N)로부터 XEA-N-S2를 항균, 항암성 물질로 정제하였으나, XE-N-S1을 제외한 다른 물질들

은 빠른 시간 내에 모두 분해되었다. 도꼬마리 추출물 및 정제된 생리활성물질에 대한 항암효과를 검토한 결과, HeLa 자궁암 세포에 대해서는 XE-N-S1이 가장 우수하였다. HepG2 간암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S, XE-N-S3가 우수하였고, HT29 대장암세포에 대한 항암효과는 XE-N, XE-N-S1이 우수하였다. Saos2 골육종 암세포, NCI H522 폐선 암세포, NCI H1703 폐 편평세포 암세포와 Clone M3 흑색종 암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였다. LN CAP 전립선 암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S3가 가장 우수한 효과를 나타내었다. 또한 HSF 인간 정상 피부 섬유아세포에 대한 각종 추출물 및 정제물의 세포독성을 기존의 항암제인 etoposide와 cisplatin과 비교·검토한 결과, XE-A, XEA-A 및 XEA-B가 가장 독성이 낮았으며, XE-B도 etoposide에 비해 독성이 낮았다. 한편 XE-N-S1, XE-N-S3은 etoposide보다 높은 독성을 나타내었으며, XE-A-S3은 etoposide보다는 독성이 높았으나, cisplatin보다는 낮았다.

감사의 글

본 연구는 농림부·농림기술관리센터의 농림기술개발연구과제의 연구비 지원에 의해 수행된 결과의 일부임.

REFERENCES

1. You, Y. S., K. M. Park, and Y. B. Kim (1993), Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 187-191.
2. Kim, S. H. and K. Y. Park (1993), Inhibitory effects of chinese pepper on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 628-634.
3. Nagabhusan, M. and S. V. Bhide (1992), Curcumin as an inhibitor of cancer. *J. Am. Coll. Nutr.* **11**, 192-198.
4. Dkai, Y., T. Eksttikul, O. Svendsby, M. Ilzuka, K. Ito, and N. Minamiura (1993), Antitumor activity in an extract of Thai rice seedling. *J. Ferment. Bioeng.* **76**, 367-370.
5. Mizuno, M., M. Toda, N. Ueno, G. Danno, and K. Kanazawa (1989), Desmutagenicity of a dibenzofuran-quinone derivative toward the mutagenicity of Trp-p-2, *Agric. Biol. Chem.* **53**, 959-964.
6. Senji, S., M. Kim, M. Taniguchi, and T. Yamamoto (1989), Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a Cariogenic Bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2307-2311.
7. Kim, H. S., and J. O. Shin (1997), Isolation and Antimicrobial Activity of *Xanthium strumarium* L. Extract. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 183-188.
8. Chand, S., I. Lusunzi, D. A. Veal, L. R. Williams, and P. Karuso (1994), Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. *J. Antibiotics* **47**, 1295-1304.