

메밀싹 추출물의 항산화 효과 및 유전독성억제 효과

김수현 · 이의용 · 함승시[†]

강원대학교 바이오산업공학부

Antioxidation and Antigenotoxic Effects of Buckwheat Sprout Extracts

Soo-Hyun Kim, Eue-Yong Lee and Seung-Si Ham[†]

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

This study was carried out to determine the antioxidative and antigenotoxic effects of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) sprout using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical donating method and micronucleus test. Buckwheat sprout were extracted with 70% ethanol and then further fractionated to n-hexane, chloroform, ethyl acetate (EtOAc), butanol and water. Among the five fractions, the EtOAc fraction showed the highest electron donating activity (RC₅₀ 26.1 µg/mL). The effects of buckwheat sprout extracts on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) induced by MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) were investigated in the bone marrow. 10, 20, 40 and 80 mg/kg of each extract were administered to animals immediately after injection of MNNG and the exposure time was 36 hrs. Inhibition effects of buckwheat sprout ethanol extract were 23.4%, 40.6%, 56.3% and 73.4%, respectively. When the fraction of hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water from 70% ethanol extract were treated with concentration of 80 mg/kg, the suppression rates of the MNPCE were 64.1, 67.9, 75.8, 74.2 and 63.3%, respectively.

Key words: buckwheat sprout, antigenotoxic effect, micronucleus test, antioxidative effect

서 론

메밀(Buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench)은 옛부터 구황작물의 하나로 재배되어 왔으며, 그 소비는 주로 막국수, 메밀묵 및 부침개 등의 주원료로 이용되어 왔으나 식생활이 서구화되어짐에 따라 증가하는 각종 성인병의 예방과 치료에 메밀이 효과가 있다는 각종 보고와 함께 메밀의 소비도 증가하고 있다(1). 메밀나물의 모양은 숙주나물과 유사한 모양을 가지고 있으나 그 모양이 더 길고 가늘며 자라난 새싹은 꽃 봉우리처럼 말려 있어 그 모양이 특이하고, 담황색을 띄고 있다. 또한 콩나물이나 숙주나물의 경우에는 콩 비린내 등 특유의 냄새 때문에 날것으로 먹기 힘든 반면, 메밀나물은 그 자체의 향만 있을 뿐 다른 이취가 나지 않는다. 또한 조직이 연하고 부드럽기 때문에 생식하거나 샐러드나 죽석나물무침 등에 이용할 수 있으며 메밀나물을 소재로 한 각종 음료 및 식품의 개발도 가능하다고 알려져있다(2).

메밀의 생리활성 물질인 rutin은 자연계에 널리 분포되어 있고 모세혈관을 강화시켜 동맥경화, 고혈압, 뇌출혈과 같은 심혈관계 질환을 예방하고, 당뇨병, 잇몸출혈, 구취제거 등에도 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(3-10). 발아메밀에 관한

연구로는 본태성 고혈압쥐의 혈압, 혈당 및 혈중 지질수준에 미치는 영향(11), 발아메밀의 일반영양성분 및 특수성분 함량 변화(12) 그리고 메밀종자와 메밀나물의 화학적 성분 비교(13) 등에 관한 연구들이 보고된 바 있다.

따라서 메밀은 여러 가지 가공식품으로 이용되고 있으나 영양성분이나 기능성의 관점에서 완벽히 기술되어 있지 못한 실정이다. 이에 본 연구에서는 메밀을 이용하여 콩나물 형태의 채소로 재배하여 rutin 함량을 분석하고 항산화성 및 소동물을 이용한 유전독성 억제효과를 밝힘으로써 신선 채소로의 이용은 물론 기능성 식품의 소재로서의 가치를 밝히고 가공식품개발의 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 조제

실험에 사용된 메밀싹(길이 12~16 cm 정도, 하배축의 두께 약 1.8~1.9 mm 정도)은 추출에 적합하도록 분말화하여 시료중량의 10배인 70% 에탄올을 첨가하고 8시간씩 80°C에서 3회 추출한 후 모두 모아 감압여과장치에서 뜨거운 상태로 여과하였다. 여과물은 감압 농축기를 사용하여 추출용매

[†]Corresponding author. E-mail: hamss@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6453, Fax: 82-33-250-6453

Table 1. Instrument and operation conditions for rutin analysis by high performance liquid chromatography

Instrument	HPLC Waters 600E
Pump	Waters 600 Controller
Column	Waters μ -Bondapak C ₁₈
Mobile phase	2.5% acetic acid, methanol, acetonitrile (35:5:10)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	Photodiode array detector (350 nm)

를 제거한 후 동결건조 후 실험에 사용하였으며 각각의 분획물 조제의 경우 용매의 극성에 따라 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 부탄올 순으로 순차적으로 분획한 후 농축시킨 다음 동결건조하여 실험에 사용하였다.

Rutin 함량 측정

메밀씨의 rutin 함량은 시료를 순수 메탄올에 녹여 0.45 milipore filter로 여과하여 HPLC로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다.

수소전자공여능(electron donating ability)에 의한 항산화 활성

메밀씨의 항산화 활성은 Choi 등의 방법(14)에 의해 측정하였다. 여러 농도의 시료를 4 mL의 1.5×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl solution (in methanol) 1 mL를 첨가한 후, 30분간 암소에서 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 3회 반복하였으며 RC_{50} 은 시료가 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는 농도로 표시하였으며, 검체의 농도에 따른 수소전자공여능 검정(Standard curve)을 통해 결정하였다.

유전독성 억제효과

변이원물질의 농도에 따른 유전독성 억제효과를 검토하기 위해 소핵유발물질로 MNNG를 사용하였으며 마우스당 투여량은 0.2 mL(체중 25 g 기준)가 되도록 50, 100, 150 그리고 200 mg/kg 용량으로 증류수에 용해하여 투여 직전에 측정된 체중에 따라 산출하여 복강투여하였다. 복강투여 36시간 후에 희생시킨 다음 검경하여 MNNG 자체의 용량반응관계를 실험하였다. 그 결과 양성 대조군으로서 이용할 수 있는 MNNG의 유전독성 용량이 결정되었으며, 메밀씨 추출물의 억제효과를 파악하기 위하여 메밀씨 추출물 및 분획물(10, 20, 40 및 80 mg/kg)은 양성대조군으로서 MNNG(150 mg/kg)를 복강투여하는 시각에 경구투여하였다. 그 후 36시간 노출시킨 후 검경하여, 각 투여군의 가장 높은 억제농도를 관찰하였다. 동시에 용매의 영향을 음성대조군(negative control)으로 하였다. MNNG 및 시료를 투여한 마우스는 Schmid 방법(15)에 따라 경추탈골하여 희생시킨 후 대퇴골을 적출하여 실험을 진행하였다. 검경은 2,000개의 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte: PCE) 중 소핵을 가진 소핵다염성 적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte: MNPCE)를 계수하여 생성빈도(%)를 구하였다.

Table 2. Rutin contents of 70% ethanol extract and each fraction from buckwheat sprout (mg/100 g)

Sample	Rutin
70% ethanol	991.7
Hexane fraction	44.9
Chloroform fraction	14.0
Ethyl acetate fraction	441.2
Butanol fraction	416.4
Aqueous fraction	-

통계처리

*In vivo*계 유전독성 억제효과 측정 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SAS(Statistical analysis system) program을 이용하여 실험군 당 평균(mean) \pm 표준편차(SEM)로 표시하였고, 각 군의 평균차의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

메밀씨 추출물의 rutin 함량

메밀씨 추출물의 rutin 함량은 Table 2와 같다. 메밀씨를 70% 에탄올로 추출하였을 경우 100 g의 시료 중 rutin이 991.7 mg으로 가장 높았으며 에틸 아세테이트, 부탄올, 헥산 및 클로로포름 분획으로 순차 분획하였을 경우 100 g 당 각각 441.2 mg, 416.4 mg, 44.9 mg 그리고 14.0 mg의 함량을 보였다. 그러나 물 분획물에서는 rutin이 측정되지 않았다. Shim(1)은 메밀 품종별 rutin 함량이 9.5~30.3 mg으로 차이가 있음을 보고하였으며 Kwon(16)의 보고에 따르면 동결건조 시료의 경우 건량 기준으로 메밀종자는 17.2 mg/100 g, 발아 후 7일째 메밀나물은 363.1 mg/100 g의 함량을 나타내었으며 Kim 등(13)은 메밀종자는 18.7 mg/100 g, 메밀나물은 343.6 mg/100 g의 함량을 나타냄으로써 본 실험과 마찬가지로 메밀을 발아시킨 것으로 보아 많은 rutin 함량을 얻을 수 있었다. 또한 최근에는 토양세균인 *Agrobacterium rhizogenes*와 식물 조직을 공동배양함으로써 얻어진 형질전환된 모상근을 배양하여 유용 이차대사산물을 생산하는 방식이 많은 주목을 받고 있는데, Lee 등(17)은 메밀을 모상근 배양법으로 배양한 후 rutin의 함량을 측정한 결과 1.4 mg/g 건조중량으로 rutin 생성을 위한 또 다른 대안책이라고 하였다.

수소전자공여능에 의한 항산화활성

메밀씨 에탄올 추출물 및 분획물의 수소전자공여능은 RC_{50} 으로 표시하였다. 그 결과 Table 3에서와 같이 물 분획물을 제외한 모든 분획물에서 산화를 50% 억제시키는데 요구되는 시료의 농도가 100 μ g 이하였으며 특히, 메밀씨 에틸 아세테이트 및 부탄올 분획물의 항산화 억제효과가 다른 분획물에 비하여 높은 항산화활성 효과가 있음을 알 수 있었다. Kwak 등(18)은 기장, 수수, 메밀, 울무로부터 얻은 에탄올 추출물에 의한 DPPH 라디칼 제거율을 측정된 결과, 최고

Table 3. Electron donating ability (EDA) of 70% ethanol extract and each fraction from buckwheat sprout

Sample	RC ₅₀ ¹⁾ (μg)
70% ethanol	76.7
Hexane fraction	100.4
Chloroform fraction	74.7
Ethyl acetate fraction	26.1
Butanol fraction	35.5
Aqueous fraction	304.4
α-Tocopherol	12.9
BHA ²⁾	14.8

¹⁾Amount required for 50% inhibition of DPPH after 30 min.
²⁾Butylated hydroxyanisole.

농도 500 μg/assay로 처리했을 때 메밀 57.9%, 기장 49.2%, 수수 44.2%, 율무 39.9%로 메밀이 다른 3가지 곡류보다 DPPH에 의한 라디칼 제거율이 높았다고 보고하였다.

MNNG 투여 농도에 따른 유전독성

MNNG 투여 농도에 따른 소핵생성빈도(MNPCEs/1000 cells)를 검토하기 위하여 MNNG 용액을 50, 100, 150 및 200 mg/kg으로 복강 내 투여 후 36시간 사육시킨 다음 소핵생성을 검토해 본 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 각각의 소핵생성 빈도는 3.7±0.7, 4.3±0.6, 12.8±0.8 그리고 15.6±1.1 (MNPCEs/1000 cells)을 나타내었다. 그러나 200 mg/kg을 투여한 경우에는 마우스의 중량변화가 대조군에 비해 낮았고, 대체적으로 건강치 못하였다. 따라서 억제효과를 규명하기 위한 MNNG의 농도를 150 mg/kg으로 설정하였다.

메밀싹 에탄올 추출물과 분획물의 유전독성 억제효과

양성대조군(positive control)에 대한 소핵유발 억제효과를 검토하기 위하여 MNNG와 메밀싹 에탄올 추출물과 분획물을 동시에 투여하였다. MNNG 150 mg/kg은 복강 내로, 시료는 10, 20, 40 및 80 mg/kg의 농도로 경구투여하여 36시

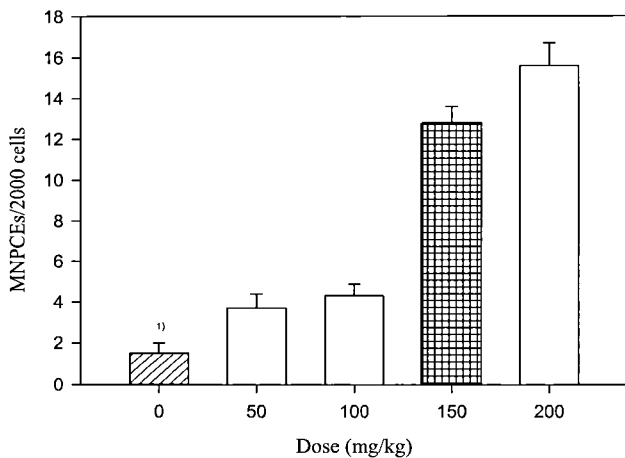


Fig. 1. Micronucleus of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) in ICR male mice 36 hrs after administration.

////: negative control, □: positive control.
¹⁾Each of the values is expressed in terms of mean±SD (n=6).

간 사육 후에 소핵생성빈도를 관찰하였다. 동시에 용매의 영향을 음성대조군으로 하였다. 메밀싹 에탄올 추출물의 소핵생성 억제효과는 Fig. 2에 나타내었으며, 양성대조군의

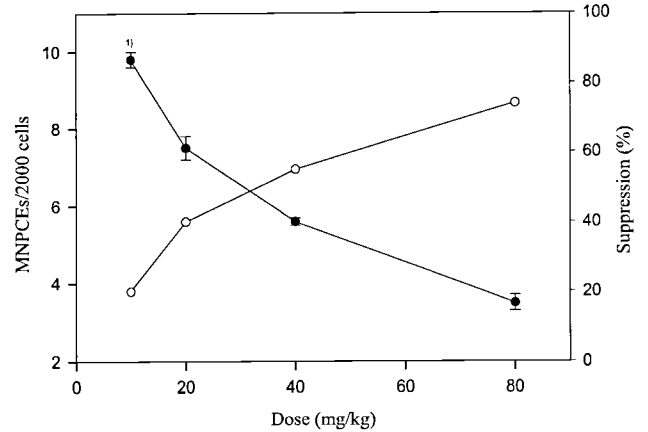


Fig. 2. Suppression of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 150 mg/kg) induced micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) by single treatment of buckwheat sprout 70% ethanol extract in bone-marrow cells of ICR male mice.

●—: MNPCEs/2000 cells, ○—: suppression.
¹⁾Each of the values is expressed in terms of mean±SD (n=6).

Table 4. Suppression of MNNG induced micronucleated polychromatic erythrocyte by single treatment of each fractions of buckwheat sprout in bone marrow cells of ICR male mice

Fractions	Dose (mg/kg)	MNPCEs/2000 cells	Suppression ²⁾ (%)
Negative control ³⁾		1.4±0.5 ¹⁾	
Positive control ⁴⁾		12.8±0.8	
Hexane	10	10.3±0.71 ^a	19.5
	20	8.3±0.3 ^b	35.2
	40	6.3±0.6 ^c	50.8
	80	4.6±0.5 ^d	64.1
Chloroform	10	9.4±0.7 ^b	26.6
	20	8.4±0.5 ^b	34.4
	40	6.2±0.3 ^c	51.6
Ethyl acetate	80	4.1±0.5 ^d	67.9
	10	7.6±0.3 ^b	40.6
	20	5.3±0.6 ^c	58.6
Butanol	40	3.7±0.3 ^d	71.1
	80	3.1±0.4 ^d	75.8
	10	8.1±0.7 ^b	36.7
Aqueous	20	7.3±0.5 ^b	42.9
	40	4.7±0.4 ^d	63.3
	80	3.3±0.4 ^d	74.2
	10	10.3±0.6 ^a	19.5
Aqueous	20	7.7±0.7 ^b	39.8
	40	6.1±0.3 ^c	52.3
	80	4.7±0.8 ^d	63.3

¹⁾Each point represents the mean±SD of 6 mice (p<0.05).
²⁾100-[MNPCEs of sample/MNPCEs of positive control×100].
³⁾Distilled water (0.2 mL/25 g).
⁴⁾*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (150 mg/kg, I.P.).

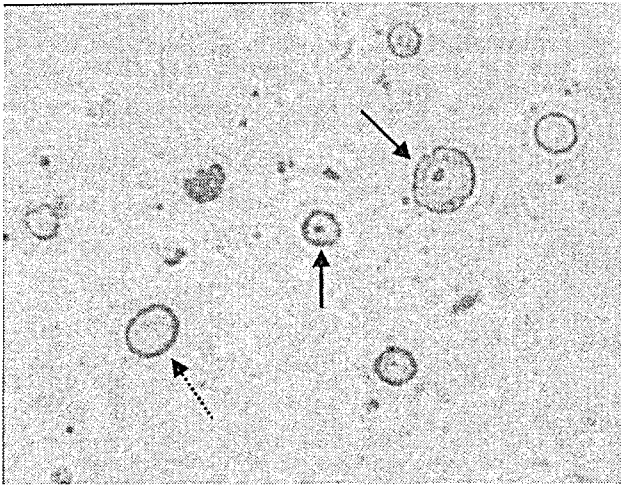


Fig. 3. Morphology of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) in bone marrow cells of ICR male mice. **.....▶**: polychromatic erythrocyte (PCE) in the bone marrow cells of ICR male mice, **————▶**: micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in the bone marrow cells of ICR male mice.

12.8±0.8에 비하여 10, 20, 40 및 80 mg/kg의 농도에서 9.8±0.4, 7.6±0.6, 5.6±0.3 및 3.4±0.5로 23.4%, 40.6%, 56.3 그리고 73.4%의 억제효과를 나타내었다. 또한 Table 4는 각각의 분획물에 대한 소핵생성 억제효과를 나타내었다. 유전손상물질(MNNG: 150 mg/kg, I.P.)만 투여한 양성대조군에 비해서 시료농도를 10, 20, 40 및 80 mg/kg 처리하였을 경우 동일한 시료 농도 80 mg/kg에서 핵산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 및 물층이 각각 4.6±0.5, 4.1±0.5, 3.1±0.4 및 3.3±0.4 그리고 4.7±0.8로 64.1, 67.9, 75.8, 74.2 그리고 63.3%의 유전독성 억제효과를 나타내었으며 그 중 에틸 아세테이트 분획물이 3.1±0.4의 75.8%로 가장 높은 유전독성 억제효과를 나타내었다. Fig. 3은 적혈구의 분화과정 중에서 polychromatic erythrocyte(PCE) 중 micronucleus를 함유하는 polychromatic erythrocytes(MNPCEs)로써 피검화 물질의 염색체 이상 유발성을 나타내었다.

요 약

메밀싹을 건조 후 세절하여 70% 에탄올을 가하여 추출한 추출물과 용매의 극성에 따라 분별분리를 행하여 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물로 조제하여 여섯 가지의 추출물 및 분획물을 얻었다. 이들 시료들에 대하여 항산화활성을 측정된 결과 에틸아세테이트 분획물에서 RC₅₀ 값이 26.1 µg/mL의 강한 항산화활성을 나타내었다. 염색체 유발 물질인 MNNG(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)를 마우스에 50, 100, 150 그리고 200 mg/kg으로 투여한 경우의 소핵생성은 각각 3.7±0.7, 4.3±0.6, 12.8±0.8 그리고 15.6±1.1로써 농도증가에 비례적으로 증

가하였으며 대조군에서는 1.4±0.5의 소핵생성을 나타내었다. MNNG를 150 mg/kg과 메밀싹 추출물을 각각 10, 20, 40 그리고 80 mg/kg으로 동시에 투여한 경우 각각 23.4, 40.6, 56.3 그리고 73.4%의 소핵생성 억제효과를 나타내었다. 메밀싹 용매 분획물 실험에서는 핵산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 그리고 물 분획물이 시료농도 80 mg/kg의 투여군에서 양성대조군에 비해 각각 64.1, 67.9, 75.8, 74.2 및 63.3%의 소핵생성 억제율을 나타내었다. 따라서 메밀싹은 건강식품으로서의 개발가능성을 가진 매우 유용한 원료를 알 수 있었고, 추후 이러한 생리활성을 나타내는 부분만을 분리, 정제하여 추가적인 검색 및 활용방안에 대하여 충분한 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

문 헌

1. Shim TH. 2000. Studies on the composition and biological activity Korean buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *PhD Dissertation*. Gangwon National University, Chunchon. p 1-3.
2. Lee EY. 2003. Studies on biological activities of buckwheat sprout. *MS Thesis*. Gangwon National University, Chunchon. p 71-72.
3. Griffith JQ, Couch JF, Lindauer MA. 1995. Effect of rutin on increased capillary fragility in man. *Proc Soc Exp Bio Med* 55: 228-229.
4. Matsubara Y, Kumamoto H, Lizuka Y, Murakami T, Okamoto K, Miyake H, Yokoi K. 1995. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peelings. *Agric Biol Chem* 49: 900-905.
5. Lee JS, Park SJ, Sung KS, Han CK, Lee MH, Jung CW, Kwon TB. 2000. Effects of germinated-buckwheat on blood pressure, plasma glucose and lipid levels of spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Sci Technol* 32: 206-211.
6. He J, Klag MJ, Whelton PK, Mo JP, Chen JY, Qian MC, Mo PS, He GQ. 1995. Oats and buckwheat intakes and cardiovascular disease risk factors in an ethnic minority of China. *Am J Clin Nutr* 61: 366-372.
7. Hertog MG, Kromhout D, Aracanis C, Blackburn H, Buzina E, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. 1995. Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancer in the countries study. *Arch Intern Med* 155: 381-386.
8. Keli SO, Hertog MGK, Feskens EJM, Kromhout D. 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: The Zutphen study. *Arch Intern Med* 154: 637-642.
9. Lee JS, Lee MH, Chang YK, Ju JS, Son HS. 1995. Effects of buckwheat diet on serum glucose and lipid metabolism in NIDDM. *Korean J Nutr* 28: 809-816.
10. Lee JS, Son SS, Maeng YS, Chang YK, Ju JS. 1994. Effects of buckwheat on organ on organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 27: 819-827.
11. Lee JS, Park SJ, Sung KS, Han CK, Lee MH, Jung CW, Kwon TB. 2000. Effects of germinated-buckwheat on blood pressure, plasma glucose and lipid levels of spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Sci Technol* 32: 206-211.
12. Lee MH, Son HS, Choi OK, Oh SK, Kwon TB. 1994. Changes in physico-chemical properties and mineral con-

- tents during buckwheat germination. *J Korean Food Nutr* 7: 262-273.
13. Kim YS, Kim JG, Lee YS, Kang IJ. 2005. Comparison of the chemical components of buckwheat seed and sprout. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 81-86.
 14. Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. *Korean J Pharmacol* 24: 299-303.
 15. Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31: 9-15.
 16. Kwon TB. 1994. Changes in rutin and fatty acids of buckwheat during germination. *Korean J Food Nutr* 7: 124-127.
 17. Lee SY, Cho SI, Park MH, Kim YK, Choi JE, Park SU. 2007. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M). *Prep Biochem biotechnol* 37: 239-249.
 18. Kwak CS, Lim SJ, Kim SA, Park SC, Lee MS. 2004. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and job's tears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 921-929.

(2007년 5월 14일 접수; 2007년 6월 26일 채택)