

미나리에서 분리한 플라보노이드 화합물의 아플라톡신 B₁에 대한 항돌연변이 효과

박종철[†] · 하정옥* · 박건영*

순천대학교 한약자원학과

*부산대학교 식품영양학과

Antimutagenic Effect of Flavonoids Isolated from *Oenanthe javanica*

Jong-Cheol Park[†], Jung-Ok Ha* and Kun-Young Park*

Dept. of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

The flavonoids isolated from *Oenanthe javanica* were investigated on the antimutagenic effect against aflatoxin B₁(AFB₁). The 0.5 and 1.0mg/plate of isorhamnetin reduced the mutagenicity of AFB₁ about 33 and 59%, respectively. Persicarin showed the 40 and 47% inhibition rate at previous concentration, respectively.

Key words: antimutagenic, *Oenanthe javanica*, isorhamnetin, persicarin

서 론

최근 식물로부터 천연 항돌연변이 물질들을 찾으려는 시도가 계속되고 있으며, 실제로 야채류, 과일류, 해조류로부터 이들이 발견되고 있다(1). 저자 등은 식용식물의 항돌연변이 효과에 대해 발표한 적이 있으며(2,3), 그중 미나리(*Oenanthe javanica* Dc.)가 우수한 돌연변이 억제활성이 있음을 보고한 바 있다. 미나리는 산형과에 속하는 다년초로서 7, 8월에 흰꽃이 피며 열매는 작은 타원형으로 맺으며, 줄기는 끊어 심거나 모를 옮겨 심는데 생활력이 상당히 강한 편이다. 다른 식품에서 맛보지 못하는 독특한 향미가 있는 식물이며, 따라서 우리나라 사람들이 가장 좋아하는 대표적인 향채 중의 하나로서 입맛을 잃었을 때 식욕을 되찾는 등의 식품으로 이용하고 있다. 미나리는 다른 채소에서 맛보지 못하는 독특한 향미가 있어 김치를 담글 때 곁들여 쓰기도 하며, 미나리생채, 미나리강회, 미나리볶음, 미나리적 등으로도 이용되는 우리나라 중요한 식품 중의 하나이다. 또한 약품으로도 이용되는 이 식물은 한방에서 전초를 水芹(수근)이라 하여 약용한다. 즉 해열, 이뇨효능으로서 황달, 수종, 소변불리, 고혈압 등

을 치료하는데 달여서 복용하기도 하며(4) 또한 중국(5)에서는 음주 후 熱毒을 제거하는 곳에 사용하기도 한다. 저자 등은 한국인의 식생활에서 많이 사용하는 미나리 MeOH 추출물이 *Salmonella typhimurium* TA 100 균주에서 aflatoxin B₁과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine에 의해 유도된 돌연변이에서 억제효과가 있음을 발견하고 활성물질 연구의 일환으로서, 이 식물에서 플라보노이드 성분을 분리하여 이에 대한 항돌연변이효과를 관찰하였다. 즉 미나리에서 3종의 화합물을 분리하여 *in vitro*에서 *Salmonella typhimurium* TA 100균주를 이용하여 돌연변이 억제효과를 관찰하였으며, 이와 유사한 구조인 엉겅퀴에서 분리한 3종 플라보노이드 화합물에 대해서도 함께 실험하였다.

재료 및 방법

식물재료

미나리 지상부를 1993년 8월 순천시 인왕동 근교에서 채집하여 음건, 세절하여 사용하였다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

시약 및 기기

용매는 특급 및 1급 시약을, column chromatography 용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, Merck, No.7734), NMR spectrum은 Bruker AM 200 spectrometer로서 DMSO-d₆ 용매를 사용하였으며, EI-Mass Spectrum은 Kratos MS25 RFA, FAB-Mass Spectrum은 JEOL model JMS/SX/SX 102A를 이용하여 측정하였다.

추출 및 분리

음건 세절한 미나리 지상부 2.2kg에 MeOH을 가하여 수욕상에서 3시간 동안 환류 냉각하면서 추출하였다. 농축한 후 10% MeOH로 녹여 잔사를 제거한 후 용매의 극성을 증가시킨 계통 분획법에 의해 Hexane, CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 및 H₂O 분획분을 얻었다. 이 중 EtOAc 분획분을 silica gel column chromatography로서 CHCl₃-MeOH-H₂O(5 : 1 : 1, 하층), CHCl₃-MeOH-H₂O(25 : 8 : 5, 하층) 및 CHCl₃-MeOH-H₂O(65 : 35 : 10, 하층) 용출 용매로 화합물 1, 2 및 3을 분리하였다.

화합물 1의 특성

mp : 307-309°C
 MS(m/z, %) : 316(M⁺, 100), 245(45.4), 153(32.7), 151(27.8), 69(45.4)
¹H-NMR(DMSO-d₆, 200MHz)δ : 12.5(C₅-OH), 10.78(C₇-OH), 9.71(C₃-OH), 7.75(1H, d, J=2.1Hz, H-2), 7.68(1H, dd, J=2.1&8.6Hz, H-6), 6.92(1H, d, J=8.6Hz, H-5), 6.46(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.18(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 3.81(1H, s, -OCH₃)
¹³C-NMR(DMSO-d₆, 50.3MHz)δ : 175.7(C-4), 163.8(C-7), 160.4(C-5), 156.2(C-9), 148.9(C-3'), 147.2(C-4'), 146.5(C-2), 135.9(C-3), 121.8(C-1'), 121.6(C-6'), 115.5(C-5'), 111.8(C-2'), 103.0(C-10), 98.2(C-6), 93.5(C-8), 55.9(-CH₃)

화합물 2의 특성

mp : 253-254°C
¹H-NMR(DMSO-d₆, 200MHz)δ : 7.60(1H, dd, J=2.0&8.5Hz, H-6), 7.55(1H, d, J=2.0Hz, H-2), 6.81(1H, d, J=8.5Hz, H-5), 6.37(1H, d, J=1.96Hz, H-8), 6.18(1H, d, J=1.96Hz, H-6), 5.34(1H, d, J=7.4Hz, anomeric H)
¹³C-NMR(DMSO-d₆, 50.3MHz)δ : 177.5(C-4), 164.2(C-7), 161.3(C-5), 156.3(C-2&9), 148.4(C-4'), 144.7(C-

3'), 133.5(C-3), 121.9(C-6'), 121.0(C-1'), 115.9(C-5'), 115.1(C-2'), 103.9(C-10), 101.9(C-1'), 98.7(C-6), 93.4(C-8), 75.8(C-5'), 73.2(C-3'), 71.2(C-2'), 67.9(C-4'), 60.2(C-6')

화합물 3의 특성

mp : 287-289°C
 FAB-MS(m/z) : 435 [M+H]⁺
¹H-NMR(DMSO-d₆)δ : 8.01(1H, d, J=2.1Hz, H-2'), 7.61(1H, dd, J=8.8&2.1Hz, H-6'), 6.79(1H, d, J=8.8Hz, H-5'), 6.45(1H, d, J=2.2Hz, H-8), 6.20(1H, d, J=2.2Hz, H-6)
¹³C-NMR(DMSO-d₆)δ : 177.7(C-4), 164.1(C-7), 161.2(C-5), 156.2(C-2), 156.1(C-9), 149.3(C-3'), 146.9(C-4'), 132.5(C-3), 122.0(C-6'), 121.3(C-1'), 115.1(C-2'), 113.6(C-5'), 104.0(C-10), 98.6(C-6), 93.5(C-8), 55.7(O-CH₃)

돌연변이 유발물질

Aflatoxin B₁(AFB₁)은 Sigma 회사(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 DMSO(Aldrich chemical Co., USA) 녹여 사용하였다.

항돌연변이 효과

Salmonella typhimurium TA100 균주를 이용하여 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R-factor 등의 유전형질을 확인한 후 실험에 사용하였다. 간접돌연변이원(AFB₁)을 활성화시키기 위하여 Ames의 방법(6)에 따라 S9 mixture를 첨가하였다. S9 mixture는 쥐의 간으로부터 얻은 S9 fraction 10%에 MgCl-KCl salts(2%), 1M glucose-6-phosphate (0.5%), 1M NADP(4%), 0.2M phosphate buffer(pH 7.4) 및 멸균수를 혼합하여 S9 mixture를 조제하였다. 항돌연변이 실험은 preincubation mutagenicity test (7,8)를 이용하였다. 미리 전열 멸균시킨 glass cap tube에 S9 mix 0.5ml, 하룻밤 배양된 균주(1~2×10⁹ cells/ml) 0.1ml와 돌연변이 유발물질 50μl, 시료 50μl를 ice bath에 담긴 cap tube에 넣어 vortex하고 37°C에서 30분간 예비배양하였다. 45°C의 top agar 2ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다. 시료는 미나리에서 분리한 isorhamnetin, hyperoside, persicarin과 엉겅퀴에서 분리한 acetin 7-rutinoside, cirsimaritin 4'-glucoside 및 hispi-

dulin 7-neohesperidoside의 0.1mg, 1.0mg씩을 DMSO 50ml에 녹여 항돌연변이 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose reponse 및 독성실험)을 통하여 결정하였으며 사용된 농도에서는 시험균에 대해 독성을 나타내지 않았다.

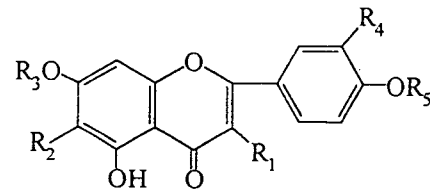
결과 및 고찰

암은 가장 치료하기 어려운 병의 하나로 우리나라도 근래에 와서 암 발생이 크게 증가되고 있으며 최근 통계청 보고에 의하면 5명 중 1명이 암으로 사망한다고 알려져 있다. 암 발생의 80~90%는 환경 인자에 의해 일어나는데 이 환경 요인으로 발생하는 암 환자 중 30~60%(9,10)가 식이와 관련된다고 알려져 있다. 암 발생에 있어 식품의 역할은 발암물질의 운반자 및 발암전구 물질을 발암물질로 변하게 하거나 발암성을 돕거나 세포를 발암물질에 민감하게 유도하는 등 면역계에 영향을 끼쳐 발암 방어기전의 기능을 떨어뜨리는데 관여할 수 있다. 반면에 어떤 영양소들은 항(발)암적인 역할을 하는데 그 역할은 발암물질의 불활성화, 흡수, 발암전구물질의 대사활성의 저해, 최종 발암원으로 전환의 억제 및 세포분화 등의 유도에 관여하는 것으로 알려져 있다(11,12). 식이는 이처럼 발암에 관여할 뿐만 아니라 예방 또는 최근에는 치료의 가능성까지 기대되고 있다. 여러 역학 조사를 보면 β -carotene, 비타민 C 등이 풍부한 채소류는 암을 예방하며 암환자의 치료의 가능성까지 민간에 널리 알려져 시행되고 있다.

채소 및 과일 주스는 돌연변이 유발 물질의 활성을 억제한다는 여러 보고가 있으며 이중에 존재하는 항돌연변이 유발 물질로서는 비타민 C, β -carotene, cysteine, polyphenols, peroxidase 등이 알려져 있다(13). 본 연구에서는 한국인의 식생활에서 많이 사용하는 미나리 MeOH 추출물이 *Salmonella typhimurium* TA100 균

주에서 AFB₁에 의해 유도된 돌연변이에서 61%(2), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine에 의해 유도된 돌연변이에서 80%(3)의 억제효과가 있음을 발견하고 이의 활성물질 연구의 일환으로서, 미나리에서 플라보노이드 성분을 분리하여 이에 대한 항돌연변이효과를 관찰하였다. 플라보노이드 화합물의 항돌연변이 활성 연구로서 영경귀에서 분리한 3종의 플라보노이드 화합물들에 대한 효과도 같이 관찰하였다.

즉 미나리의 MeOH 추출물에서 분획한 ethyl acetate 가용부로부터 silica gel column chromatography를 이용하여 3종의 플라보노이드 화합물을 분리하였으며, 화합물 1, 2, 3은 표준품(14,15)과의 NMR data 비교에 의해 isorhamnetin, hyperoside 및 persicarin으로 각각 동정하였다(Fig. 1). 이들 화합물들의 활성실험에서 isorhamnetin은 0.5mg/plate에서 33%, 1.0mg/plate에서는 59%, hyperoside는 1.0mg/plate에서 4%, persicarin은 0.5mg/plate에서 40%, 1.0mg/plate에서 47%의 돌연변이 저해효과를 나타내었다(Table 1). 따라서 미나



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Isorhamnetin	OH	H	H	OCH ₃	H
Hyperoside	O-Glc.	H	H	OH	H
Persicarin	O-SO ₃ K	H	H	OCH ₃	H
Acacetin	H	H	Rha.(1-6)Glc.	H	CH ₃
7-rutinoside	H	H	Rha.(1-6)Glc.	H	CH ₃
Cirsimaritin	H	OCH ₃	CH ₃	H	Glc.
4'-glucoside	H	OCH ₃	CH ₃	H	Glc.
Hispidulin	H	OCH ₃	Rha.(1-2)Glc.	H	H
7-neohesperidoside	H	OCH ₃	Rha.(1-2)Glc.	H	H

Fig. 1. Structures of flavonoids.

Table 1. Effect of compounds isolated from *Oenanthe javanica* on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 1.5 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Compound	Dose(mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
Spontaneous		194 \pm 12 ¹⁾	
AFB ₁		1863 \pm 70	
Isorhamnetin	0.5	1307 \pm 28	33
	1.0	872 \pm 50	59
Hyperoside	0.5	1879 \pm 81	—
	1.0	1799 \pm 88	4
Persicarin	0.5	1200 \pm 119	40
	1.0	1081 \pm 75	47

¹⁾The values are mean \pm S.D. of 3 replications

Table 2. Effect of some flavonoids on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 1.5µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Compound	Dose(mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
Spontaneous		194±12 ¹⁾	
AFB ₁		1863±70	
Acacetin	0.5	1857±62	-
7-rutinoside	1.0	1200±40	40
Cirsimaritin	0.5	1482±78	23
4'-Glucoside	1.0	1041±28	49
Hispidulin	0.5	1884±124	-
7-Neohesperidoside	1.0	1697±330	10

¹⁾The values are mean±S.D. of 3 replications

리 추출물의 항돌연변이 효과는 이러한 미나리에 함유된 플라보노이드 화합물들이 활성물질의 일부로 작용하는 것으로 사료된다. 식용 및 약용으로 많이 사용되는 미나리는 독특한 향기와 맛으로 입맛을 잃었을 때 식욕 회복에도 이용되며, 황달, 수종, 소변불리, 고혈압 등에도 사용되는 식품이다. 이 식물이 항돌연변이 효과가 있으며 또한 함유된 플라보노이드 화합물이 이러한 효과가 있음은 흥미있는 결과로 생각된다. 저자 등은 전보(16)에서 플라보노이드 화합물에 대한 항돌연변이 활성을 검색한 바 있으며, 계속 연구로서 영경귀 지상부에서 분리한 플라보노이드 성분인 acacetin 7-rutinoside, cirsimaritin 4'-glucoside 및 hispidulin 7-neohesperidoside(17)에 대해서도 항돌연변이 효과를 실험하였다. 그중 1mg/plate 농도에서 acacetin 7-rutinoside와 cirsimaritin 4'-glucoside가 40% 및 49%의 억제 활성이 있음을 관찰하였다(Table 2). 우리나라에서 많이 이용되는 미나리에 함유된 플라보노이드 성분의 항돌연변이 활성은 매우 흥미있는 결과라 사료되며, 생화학적인 항돌연변이 기작에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 하겠다.

요 약

미나리의 MeOH 추출물에서 분획한 ethyl acetate 가용부를 silica gel column chromatography를 이용하여 isorhamnetin, hyperoside 및 persicarin의 플라보노이드 화합물을 분리하였으며, *in vitro*에서 *Salmonella typhimurium* TA 100균주를 이용하여 항돌연변이 활성을 관찰하였다. 이들 화합물 중 isorhamnetin은 0.5 mg/plate에서 33%, 1.0mg/plate에서는 59%, persicarin은 0.5mg/plate에서 40%, 1.0mg/plate에서 47%의 돌연변이 저해효과를 나타내었다. 이와 유사한 플라보노이드 화합물로서 영경귀 지상부에서 분리한 acacetin 7-rutinoside, cirsimaritin 4'-glucoside 및 hispidulin

7-neohesperidoside에 대해서도 1mg/plate 농도에서 acacetin 7-rutinoside와 cirsimaritin 4'-glucoside가 40% 및 49%의 돌연변이 억제활성이 관찰되었다.

문 헌

- Morita, K., Hara, M. and Kada, T. : Studies on natural desmutagens-Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1235(1978)
- Lee, K. I., Park, K. Y. and Rhee, S. H. : Antimutagenic effect of green-yellow vegetables toward aflatoxin B₁ and 4-nitroquinoline-1-oxide. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 143(1992)
- Park, K. Y., Lee, K. I. and Rhee, S. H. : Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 149(1992)
- Kim, J. K. : Illustrated natural drugs encyclopedia. Namsangdang, Seoul, p.244(1984)
- Sanghai Science and Technological Publisher : The dictionary of chinese drugs. Shougakukan, Tokyo, p.2771(1985)
- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347(1975).
- Yahagi, T., Nagao, M., Sugimura, T., Fuuya, A. and Matsushima, T. : Mutagenicity of purrolizidine alkaloids in *Salmonella*-microsome test. *Mutat. Res.*, **68**, 211(1979).
- Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. : Factors modulating mutagenicity in microbial test. In "Short-terms for detecting carcinogens" Norphth, K. H. and Garner, R. C.(eds.), Springer, Berling, p.273(1980).
- Doll, R. and Peto, R. : The causes of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1191(1981)
- Rhew, T. H. : Food, nutrition and cancer. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **14**, 305(1985)
- Kada, T., Inoue, T., Morita, K. and Namiki, M. : Dietary desmutagens. In "Genetic toxicology of the diet"

- Knudsen, I.(ed.), Alan R. Liss Inc., N.Y., p.245(1986)
12. Micozzi, M. S. and Tangrea, J. A. : General introduction : Rationale for the nutritional prevention of cancer. In "Nutrition and cancer prevention" Moon, T. E. and Micozzi, M. S.(eds.), Marcel Dekker, Inc., N.Y., p.3 (1989)
 13. Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z-L. and Hosoda, H. : Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1396(1988)
 14. Park, J. C., Yu, Y. B. and Lee, J. H. : Isolation of sterols and flavonoids from the herb of *Oenanthe javanica*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **24**, 244(1993)
 15. Park, J. C., Young, H. S., Yu, Y. B. and Lee, J. H. : Isorhamnetin sulphate from the leaves and stems of *Oenanthe javanica* in Korea. *Planta Med.*, **61**, 377 (1995)
 16. Choi, J. S., Park, K. Y., Moon, S. H., Rhee, S. H. and Young, H. S. : Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Samonella assay system. *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 71(1994)
 17. Park, J. C., Lee, J. H. and Choi, J. S. : A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *Phytochemistry*, **39**, 261(1995)

(1996년 5월 8일 접수)