

## Amaranth의 Squalene 동정과 잔사 추출물의 항암 작용 검색

이재학\* · 문형인\*\* · 이정일\* · 강철환\* · 이승택\*

### Isolation and Identification of Squalene and Antineoplastic Activity of Its Residue Extract in Amaranth

Jae Hak Lee\*, Hyung In Moon\*\*, Jung Il Lee\*,  
Chul Whan Kang\* and Seung Taek Lee\*

**ABSTRACT:** In this study isolation and identification of squalene from amaranth and antineoplastic activity of its residue extract except squalene were determined to examine the utilization of grain amaranth in Korea.

The content of squalene in amaranth grain was about 0.43%. The isolated squalene showed 99% pureness containing the identical molecular weight and structure provisionally in comparison with that of animal squalene from Sigma Co. by means of GC/Mass spectrum.

Antineoplastic activity against human gastric and colon carcinoma cell line was measured in extract (except squalene) from Amaranth using MTT method. Extract from remaining plant good showed significant cytotoxic effect at the concentration of less than 230 $\mu$ g/ml.

**Key words:** Amaranth, Squalene, Antineoplastic activity, Carcinoma cell line, MTT method.

오늘날 식품의 영양생리학적으로 또는 산업적 이용으로 기존작물을 대체하거나 보완할 수 있는 고가치를 지닌 신작물에 대해 커다란 관심이 집중되고 있으며 연구가 활발히 되고 있다<sup>2)</sup>.

Amaranth(*Amaranthus* spp. L.)는 비름과에 속하며 대략 60여종의 amaranth속이 지구상에 존재하며 단지 제한된 몇 종만이 종실용인 재배종이고 나머지는 대부분 잡초종이다. Amaranth는 C<sub>4</sub> 식물에 속하는 유일한 쌍떡잎 식물로서 C<sub>3</sub> 식물과 비교해서 단위 수분 소요량하에서 대기속에 CO<sub>2</sub>를 C<sub>4</sub> pathway를 통해 식물체 당으로 전환시키는 효율이 높고, 건조하고 더운 조건하에서 잘 자란다. 예를 들면 종실용 amaranth는 옥수수와의 동일과중시 수분요구량이 옥수수의 1/2~3/5정

도이다<sup>1,17,23)</sup>.

Amaranth는 quinoa와 메밀과 같이 글루텐 함량이 적고 전분립이 작으며 식품 영양생리학적으로 뛰어난 성분을 갖고 있어 독특한 맛에 영양가가 높은 식품개발(빵류, 면류, 죽류, 과자류, 스프류, popcorn과 같은 류, 짭뽕 사용하는 채소류 등)에 많은 연구가 진행되고 있고, 특히 이유시기의 어린이, 임산부 및 산후 모유가 부족한 산모, 글루텐 함량이 많은 식품에 알레르기 반응을 보이는 사람에게 효과 있게 이용할 수 있다<sup>1,15,17)</sup>.

특히 amaranth는 다기능성 식품개발과 피부화장품 및 컴퓨터 디스켓의 매탈제로 이용되는 squalene이 종실에는 0.34%, 기름에 4.6~8% 정도의 높은 함량(올리브 기름속에 0.5%의 squalene

\* 작물시험장(National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea)

\*\* 서울대학교 천연물과학연구소(Natural Products Research Institute, Seoul National Univ., Seoul 110-460, Korea)

〈'96. 4. 18 接受〉

함량)이 들어 있으며 동물성 squalene의 경우 cholesterol 합성의 전구체로 작용하여 건강식품으로 이용시 부작용을 초래할 가능성이 있지만 식물성 squalene의 경우 cholesterol 합성에 영향을 주지 않는다는 보고<sup>4,12,15)</sup>가 있어 식물성 squalene 이용 가능성을 위해 추출방법을 확립시키고자 하며, 또한 민간에서는 비름을 갑상선종, 자궁염종의 치료에 이용하고 있으므로<sup>21)</sup> squalene 이용과 더불어 그 종실을 항암식품으로서의 개발 가능성을 검색하기 위하여 한국인에 많이 발생하는 위암, 간암, 자궁암, 대장암 중에서<sup>5,18,19)</sup> 식생활과 관련이 깊을 것으로 유추되는 위암과 대장암에 대해 항암작용을 검색하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 amaranth 종실은 1995년도에 독일(Hohenheim대학)에서 도입한 미국산 amaranth종(*Amaranthus cruentus* L.)으로 같은 해에 농촌진흥청 작물시험장 작물환경포에서 재배, 수확하였으며 사용전 건조시켜 coffee mixer 로 거칠게 분쇄하였다.

### 2. Squalene의 분리 및 분석

거칠게 분쇄한 amaranth 건조종자 106g을 n-hexane으로 상온에서 6일씩 3회 추출하였으며 이를 감압 농축하여 얻어진 추출물 A를 분획하기 위해 Kieselgel 60(Merk, Art 7734)을 충전물(A의 50배)로한 직경 4cm의 column을 사용하였다. 용출용매로서는 n-Hexane으로 시작하여 점차 ethyl ether를 첨가하여 극성을 높여주었다(그림 1).

#### 1) 용출용매 n-hexane

Ethyl ether(99:1, v/v)에서 silicagel column을 실시하여 얻은 단일물질 B가 1차적으로 squalene인가를 확인하기 위해 Sigma사에서 구입한 동물성 squalene( $C_{30}H_{50}$ )과 squalane( $C_{30}H_{62}$ )을 standard로 하여 n-hexane을 전개용매로

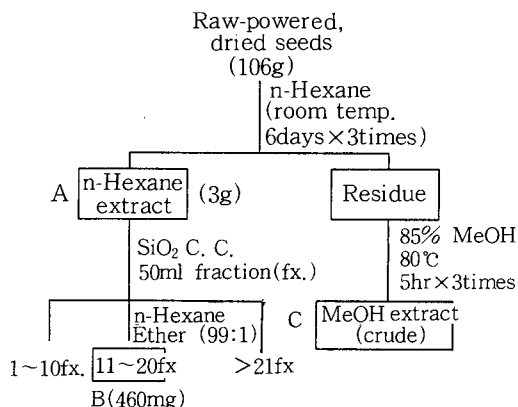


Fig. 1. Schema for the extraction and isolation of the squalene(B) and crude extract of the residue(C) from amaranth seeds.

TLC plate silicagel(60F<sub>254</sub>, layer thickness 0.25mm, 20×20cm)에 전개시켜 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 살포, 95°C에서 발색하여 비교하였다(그림 2).

1차적으로 TLC발색법으로 확인한 squalene 단일물질 B를 2차적으로 확인 분석하기 위해 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)를 사용하였으며 이때의 분석조건은 표 1과 같다. 한편 GC에 의해 순도가 확인된 squalene 성분을 GC-MSD를 사용하여 mass spectrum을 얻은 후 59970C chemstation date system에 의한 computer library searching, 문헌상의 mass spectral data<sup>7,8,10)</sup> 및 retention index<sup>3,10)</sup>을 비교

Table 1. Analytical conditions of GC-Mass selective Detector(MSD) for squalene from amaranth

• Instrument : Hewlett-packard 5890 II GC 5988 MSD
• Column : ULTRA-1(25m×0.2mm×0.33μm)
• Oven temperature : 150°C(2min)→10°C/min→ 320°C(final temp.)
• Injector temp. : 280°C
• Detector temp. : 320°C
• Carrier gas : He 0.5ml/min
• Ionization : Electron energy : 70eV Source temperature : 200°C Trap current : 300μA

하여 동정하였다. 이 분석은 기초과학지원 연구소 서울 분소 화학분석실에서 실시되었다.

### 3. Antineoplastic활성 검색

n-hexane으로 squalene을 추출하고 남은 잔유물을 MeOH로 3회 반복 환류 추출하여 얻은 crude extract을(그림 1) 갖고 antineoplastic활성을 검색하였다.

#### 1) 세포주

실험에 사용된 세포주들은 성장속도가 빠르면서 항암제 감수성이 예민한 SNU-1(위암세포주), 성장속도는 빠르지만 일부의 항암제에 내성을 갖는 SNU-C4(대장암 세포주)를 이용하였다.

#### 2) 항암 효과 검색

식물의 추출물이 암세포주에 나타내는 세포독성을 항암효과의 지표로 삼고 MTT검색법으로 실시하였으며 실험방법은 다음과 같이 하였다.

적정세포수는 약물처리하지 않은 대조군에서 세포접종 당시와 4일 후 MTT실험종료시에 모두 세포가 지수, 함수적으로 활발히 증식하면서 MTT처리후의 OD<sub>540</sub>값이 0.6~0.7에 이를 수 있는 세포수로 정하였다. 적정수의 세포를 180 $\mu$ l의 배지에 부유시켜 96 well plate의 12개 칼럼중 10개의 칼럼에 접종하였다. 천연추출물 시료는 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시킨 후 20 $\mu$ l씩 각 well에 가해 시료의 최종농도는 well당 각각 300, 30, 3 $\mu$ g/ml씩이 되도록 하였다. 한가지 농도에 대해서는 1컬럼(8well)을 동일한 조건으로 사용하며 나머지 한 컬럼에는 약물대신 PBS만을 20 $\mu$ l 첨가하여 100% 생존군(control survival)으로 삼았다. 흡광도 측정시 사용할 blank에는 세포없는 배지만을 180 $\mu$ l 가하고 PBS 또는 약물을 20 $\mu$ l 첨가하였다. 암세포와 약물이 접종된 plate를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>하에서 4일간 배양한 후 0.1mg의 MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma M 2128)를 모든 well에 가해주고 다시 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 더 배양하고 배양종료시 plate를 450 $\times$ g에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30 $\mu$ l정

도만 남기고 모두 빨아낸다. 이때 각 well의 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의한다. 배지가 제거된 각 well에 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 150 $\mu$ l씩 가한 후에 formazan 결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕해 주고 microplate reader (Scanning multi-well spectrophotometer)로 540nm에서 흡광도를 측정한다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan(blue)으로 분해된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 살아 있는 세포수와 비례한다. 그러므로 시험군에서 8개 well의 OD값으로부터 한 컬럼의 평균 OD<sub>540</sub> 값을 구하여 대조군 (100% 생존군)의 평균 OD<sub>540</sub>값에 대한 백분율을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. 50% 억제농도(IC<sub>50</sub>)는 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였으며 이 IC<sub>50</sub>값을 항암효과의 지표로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Amaranth squalene 추출, 분리 및 동정

거칠게 같은 amaranth 종실 106g을 n-hexane으로 상온 추출하여 얻은 추출물의 양은 3g이며

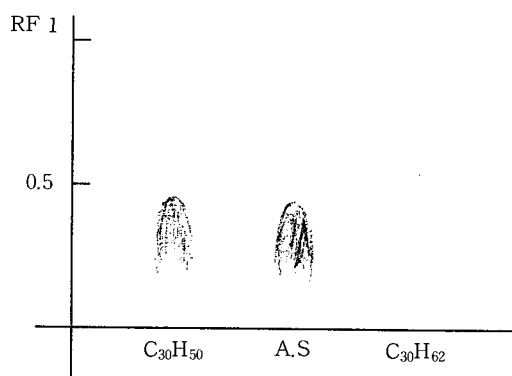


Fig. 2. TLC Chromatogram of plant squalene from amaranth seeds and animal squalene from Sigma Co. with n-hexane as mobile phase. A.S : amaranth squalene.

오렌지색을 띄었다. 이 추출물을 column chromatography를 통해 분리한 단일 성분의 물질(B)는 460mg으로서 무색의 액체를 나타내었다(그림 1). 이 단일 성분물질이 squalene인가를 확인하기 위해 n-hexane을 전개용매로 한 TLC결과(그림 2)를 보면, Sigma사 제품인 동물성 squalene ( $C_{30}H_{50}$ )은 Rf치가 0.45를 보였으며 포화된 동물성 squalane ( $C_{30}H_{62}$ )은 전개되지 않았으며 amaranth에서 분리한 순수 단일물질 B는 동물성 squalene ( $C_{30}H_{50}$ )과 유사한 Rf치 0.41로 동일한 chromatogram을 나타내어 1차적으로 이 물질이 squalene일 것으로 단정되었다.

그림 1과 같은 방법으로 추출, 분리하고 TLC chromatogram으로 1차 확인한 amaranth에서 분리한 식물성 squalene의 순도와 분자구조식이 기존에 알려진 동물성 squalene ( $C_{30}H_{50}$ )과 동일

한 것인지 검색한 GC/Mass Spectrum을 보면 다음과 같다.

그림 3에서 설명되듯이 Sigma사 제품의 동물성 squalene standard ( $C_{30}H_{50}$ )의 순도는 95%를 나타내었고 상기 방법으로 추출한 amaranth squalene은 99%의 순도를 보여주었다. GC/MS-spectrum결과 Sigma사 동물성 squalene의 경우 분자 ion ( $M^+$ )의 m/e이 410이고 주 ion peak로서 m/e 69, 137을 수반하였고 이러한 개열 패턴은 알려진 스쿠알렌 표준식 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyl-2, 6, 10, 14, 22-tetracosahexane으로 확인되었다(그림 4a, 4c). Amaranth 종실에서 추출한 식물성 squalene분자 ion ( $M^+$ )의 m/e이 410이고 주 ion peak로서 m/e 69, 136을 수반하여(그림 4b) 잠정적으로 동물성 squalene과 분자구조식이 일치하는 것으로 간주할 수 있

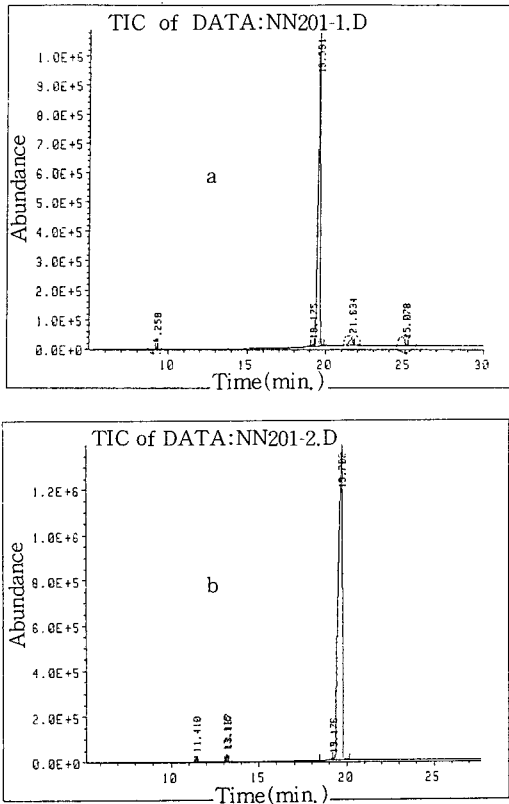


Fig. 3. GC chromatograms of animal squalene from Sigma, Co. (a) and plant squalene from amaranth seeds (b).

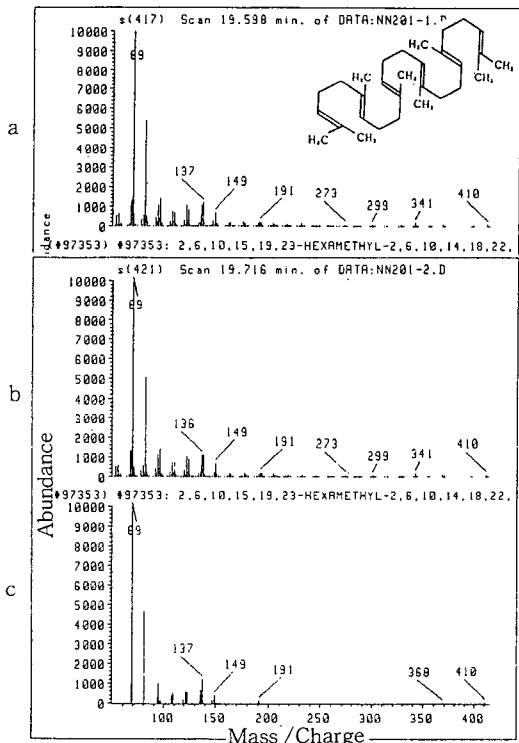


Fig. 4. GC-Mass spectrum of animal squalene from Sigma Co. (a), plant squalene from amaranth seeds (b) and standard squalene in 59970c chemstation date system (c).

Table 2. Amaranth extract (except squalene) with antineoplastic activity

Plant species	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	
	SNU-1	SNU-C4
<i>Amaranthus cruentus</i>	70.211	113.958

나 좀 더 신빙성을 얻기 위해서는 분광학적인 기기분석을 수반해야 할 것이다. 이 결과는 심해 상어의 순도가 높은 동물성 squalene을 얻기 위한 공정과정<sup>20)</sup>에 비추어 순도가 높은 식물성 squalene을 간단한 추출방법으로 획득할 수 있다는 것을 보여주었으며, 현재 보고된 amaranth의 종실 수량이 ha당 2.5~6 tone<sup>11,13,14,22)</sup>에 달하는 것과 이 실험결과 종실에 0.46% squalene함량이 함유한 것에 비추어 보면 ha당 11.5~27kg의 고순도 squalene이 밭에서 생산 가능할 것으로 사려된다.

## 2. 부산물의 Antineoplastic활성 검색

한국인에 호발하는 위암, 간암, 대장암의 암세포 IC<sub>50</sub> 값이 230μg/ml이상으로 나타난 추출물에 대해서는 항암 활성이 없거나 미약한 것으로 간주할 경우<sup>6)</sup>, squalene를 제외한 amaranth추출물은 위암세포주의 경우 IC<sub>50</sub>이 70.211μg/ml이고, 대장암의 경우 IC<sub>50</sub>이 113.958μg/ml로 나타나 위암과 대장암에 대하여 항암효과를 나타내는 것으로 판정할 수 있었다(Table 2).

Amaranth가 위암과 대장암의 항암효과 및 항암제 상승효과를 지닌 squalene<sup>9,16)</sup> 등의 생리활성물질을 함유하고 있으므로 이러한 특성을 개발하여 농가 소득 작물로 일조하기 위하여서는 한국 기후에 맞는 품종선발 및 재배법 연구가 병행되어야 할 것으로 사려된다.

## 摘 要

국내에서 종실용 amaranth의 이용 가능성을 조사하기 위한 목적으로 종실에서 squalene을 분리, 동정하였고, squalene 추출후 부산물의 활용방안으로 그 부산물의 항암활성검색을 한 결과

를 요약하면 다음과 같다.

1. Amaranth 종실에서 추출, 분리한 squalene 함량은 0.43%이고, GC/Mass spectrum으로 확인한 결과 99%의 순도를 나타내었으며, 분자구조식은 잠정적으로 동물성 squalene과 동일한 것으로 나타났다.
2. MTT 방법을 이용한 인간의 위암, 대장암 세포주에 대한 항암활성효과를 검색한 결과 부산물의 조추출물은 230μg/ml보다 낮은 농도에서 유의한 항암효과를 보였다.

## 引用文獻

1. Allos. 1994. Amaranth: Neue Aussichten für eine alte Wunderpflanze. Walter Lang, Imkerhof, D-49457 Mariendrebber.
2. Anthony, K. R. M., J. Meadley and G. Röbbelen. 1993. New Crops for Temperate Regions. Chapman & Hall London, Glasgow. New York. Tork, Melbourne. Madras.
3. Davies, N. W. 1990. Gas Chromatographic Retention Indices of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl Silicone and Carbowax 20M Phases. J. Chromatography 503: 1-24.
4. Garcia, L. A., M. A. Alfaro and R. Bressani. 1987. Digestility and Nutritional Value of Crude Oil from Three Amaranth Species. JAOCS 64 (3): 371-375.
5. Gazdar, A. F., J. G. Park and H. K. Oie. 1990. Colon cancer cell (edited by Poste, G.), Academic Press, Orlando, FL, P227.
6. Hay, R. J., J. G. Park and A. Gazdar (eds). 1994. Academic press, San Diego.
7. Hendriks, H. and A. P. Bruins. 1980. Study of Three Types of Essential Oil of *Valeriana officinalis* L. s. 1. by Combined Gas chromatography-Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry. J.

- Chromatog. 1990: 321-330.
8. Hikino, H., Y. Hikino, H. Kobinata, A. Aizawa, C. Konno and Y. Ohizumi. 1980. Sedative Principles of Valeriana Roots. *Shoyakugaku Zasshi* 34: 19-24.
  9. Ikekawa, T., M. Umeji, T. Manabe, S. Yanoma, K. Irinoda, H. Mizunuma and N. Ikekawa. 1988. Studies on antitumor activity of squalene and its related compounds. *Yakugaku-Zasshi*, Jul. 106(7) : 578-82.
  10. Jennings, W. and T. Shibamoto. 1980. Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by glass capillary Gas Chromatography, Academic Press, New York.
  11. Kaufmann, C. S. and L. E. Weber, 1988. Grain Amaranth. *Advances in New Crops: Proc. of the First National Symposium NEW CROPS*. Research, Development, Economic, Indianapolis, Indiana, Oct. 23-26, 1988, (ed. by Jules Janick, J. E. Simon) Portland, Or, Timber Press, c1990. 127-139.
  12. Laovoravit, N., F. H. Krazer and R. Becker. 1988. The Nutritional Value of Amaranth for Feeding Chickens. *Poultry Science*, 65: 1365-1370.
  13. Lee, J. H., W. Aufhammer and E. Kübler. 1994. Yield potential and grain quality of alternative grain crops (oats, buckwheat, quinoa and amaranth). *Proc. 3rd ESA congress*. Abano-Padova, Italy, 716-717.
  14. Lee, J. H. 1995. Ertrag und Kornqualität der Pseudogetreidearten Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench), Reismelde (*Chenopodium quinoa* Willd.) und Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L. × *A. hybridus* L.) im Vergleich zur Getreideart Hafer (*Avena sativa* L.) in Abhängigkeit vom Anbauverfahren. Dissertation, Universität Hohenheim.
  15. Lehmann, J. W. 1990. The Potential of Grain Amaranths in the 1990's and Beyond. *Proceedings of the 4th National Amaranth Symposium: Perspectives on Production, Proceeding and Marketing*. Minneapolis, Minnesota, 1-8.
  16. Nakagawa, M., T. Yamaguchi, H. Fukawa, J. Ogata, S. Komiyama, S. Akiyama and M. Kuwano. 1985. Potentiation by squalene of the cytotoxicity of anti-cancer agents against cultured mammalian cells and murine tumor. *Jpn-J-Cancer-Res*, Apr. 76(4) : 315-20.
  17. National Research Council. 1984. *Amaranth: Modern prospects for an ancient crop*. National Academy Press, Washington, D. C. USA.
  18. Park, J. G., H. Frucht, R. V. Larocca, Jr. Dp. Bliss, Y. Kurita, T. R. Chen, J. G. Henslee, J. B. Trepel, R. T. Jensen, B. E. Johson, Y. J. Bang and J. P. Kim. 1990. *Cancer Res*, 50, 2773.
  19. Park, J. G. and H. K. Oie, et al 1987. *Cancer Res*, 47, 6710.
  20. 박명윤. 1995. 건강보조식품-바로 알고 바로 먹자, 생활지혜사.
  21. 박석근, 정경진. 1995. 한국 민속채소의 효능과 이용, 서원, P127-131.
  22. Schulz-Schaffer, J., D. M. Webb, G. E. Baldrige, G. F. Stallknecht and R. A. Lsrson. 1989. Registration of Montana-5 Grain Amaranth Germplasm. *Crop. Sci.* 29: 1581.
  23. Shaoxian, Y. and S. Honglinag. 1990. The Research and Development of Grain Amaranth in China. *Proceedings of the 4th National Amaranth Symposium: Perspectives on Production, Proceeding and Marketing*. Minneapolis, Minnesota, 171-177.