

## 삼백초 Hexane 분획물의 Heterocyclic Amine 돌연변이성 조정효과

이상호<sup>1)</sup> · 박철우 · 박경아 · 이영춘<sup>2)</sup> · 김무남 · 하영래\*

<sup>1)</sup>해태제과 중앙연구소, <sup>2)</sup>중앙대학교 식품공학과, <sup>3)</sup>경상대학교 농화학과  
(1997. 8. 13 접수)

### Modulation of the Bacterial Mutagenicity for food-borne Mutagens by Hexane Fraction from *Saururus chinesis* (Lour.) Bail

Sang Ho Lee<sup>1)</sup>, Cheryl W. Park, Kyung A. Park, Young C. Lee<sup>2)</sup>, Mu N. Kim and Yeong L. Ha\*

<sup>1)</sup>Institute of Hatai Confectionary Co., LTD, Seoul 140-721, Korea,

<sup>2)</sup>Department of Food Technology, Chungang University, Ahnsung 456-756, Korea

Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang Institute of Cancer Research  
Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**ABSTRACT :** Antimutagenic activity of *Saururus chinesis* (Lour.) Bail was investigated for food-borne mutagens using *S. typhimurium* TA98. Methanol extract from *Saururus Chinesis* (Lour.) Bail was fractionated into hexane, chloroform, ethylacetate and butanol fractions, followed by determination of antimutagenic activity for food-borne mutagenic heterocyclic amines (HCA). The hexane fraction exhibited a strong antimutagenic activity for 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQ), 2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (MeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 3-amino-1-methyl-5H-pyridido[4,3-b]indole acetate (Trp-2-A); however its fraction rather enhanced the bacterial mutagenicity of 2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-diMeIQx) and 2-amino-3,7,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline (7,8-diMeIQx). Active principle in the fraction was found to be two major compounds ( $\gamma$ -crene B and epi-bicyclosiquiphellandrane) and 6 minor compounds ( $\delta$ -caryophyllene,  $\gamma$ -elemene,  $\beta$ -cabenene,  $\delta$ -cadinene,  $\delta$ -selinene, and patchoulene). Modulation effect for the mutagenic activity of the food-borne mutagenic HCA by the fraction might be derived from a cumulative effect of each individual compounds. Hence, this hexane fraction might be use to reduce the production of mutagenic HCA during cooking process of protein-rich foods.

**Key word :** Antimutagenic activity, Food-borne mutagens, *Saururus chinesis* (Lour.) Bail

## 서 론

삼백초(三白草)는 삼백초과에 속하며 천성초(天性草)라고도 하고 학명은 *Saururus Chinesis* (Lour.) Bail이다. 삼백초는 좁채라 불리고 역시 삼백초과에 속하는 어성초(*Houttuynia Cordata* Thunb.)와 구별되는 다년생 초본이다.

삼백초는 이뇨, 항암, 항균, 해독 등 다양한 건강 증진효과가 있다고 보고되었다. 즉 삼백초의 전초는 청리습열(靑利濕熱)효

과 (오줌을 맑게 하고 습열을 사라지게 하는 효과), 부종을 삭히며 해독하는 효과가 있으며, 각기(脚氣), 황달(黃疸), 임탁(淋濁), 대하(貸下), 소아부만, 옹종(癰腫), 수종(水腫), 적취(積聚), 정종 등을 치료한다고 보고되었다(曹, 1994; 鄭, 1990). 또한 삼백초는 bacteria의 감염에 의한 급만성요도염, 전립선염, 방광염, 임질, 이질(痢疾)을 치료하는 효과가 있으며 과중한 노동으로 인한 피로, 관소(官所)의 장형(杖刑)후유증, 타박상으로 인한 후유증과 근육통, 골격 및 골수의 염증에 의한 통증을 치료

\*To whom Correspondence should be addressed.

하는 효과가 있으며, 월경조절을 조절하는 역할도 있다고 기록되어 있다(傳統醫學研究所編, 1994; 曹, 1994; 小, 1978).

어성초는 삼백초와 비슷한 생리활성을 갖지만 항균성효과가 강한 것으로 보고되었다(傳統醫學研究所編, 1994; Choi *et al.*, 1994; 姜, 1986; 김, 1994; 金, 1994; 林, 1989; 宋, 1986). 최근 김(1994)과 최 등(1994)은 어성초즙액과 건조어성초의 가열추출액이 AFB<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>)과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)의 돌연변이성을 감소시킨다고 보고하였다. 그러나 어성초보다 항암성이 강한 것으로 기록되어 있는 삼백초에 대한 항돌연변이성 효과에 관한 보고는 아직 문헌상으로 찾아보기 어렵다.

단백질이 풍부한 육고기나 어류 등의 식품을 고온으로 조리할 경우 돌연변이성이 강한 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)나 돌연변이성은 약하지만 생성량이 많은 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) 등의 heterocyclic amine (HCA)이 생성된다(Gross and Gruter, 1992; Sugimura, 1985; Thiebaud *et al.*, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1992). 인간은 HCA 발암물질/돌연변이성물질에 노출을 줄이기 위하여 조리방법을 달리하거나(Johansson *et al.*, 1995; Kize *et al.*, 1994) 이들 돌연변이성물질의 생성억제제를 첨가할 필요가 있다(Balasubramanian and Govindasamy, 1996; Barch *et al.*, 1996; Formica and Regelson, 1995). 따라서 삼백초의 추출물을 육고기나 어류 등을 높은 온도로 조리할 때에 생성되는 HCA의 돌연변이성을 저하시키기 위하여 이용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 삼백초추출물이 여러 가지 HCA의 *Salmonella typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성에 미치는 영향에 대하여 연구하기 위하여 삼백초를 methanol로 추출하고 다시 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol로 분획하였다. 각 추출물의 HCA의 돌연변이성 억제효과 실험을 실시한 결과 hexane 분획물에서 강한 항돌연변이성을 나타내었다. 본 연구에서는 hexane 분획물의 항돌연변이성을 발표하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약

2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQ), 2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-diMeIQx), 2-amino-3,7,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline (7,8-diMeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-2-A)는 Toronto Research Chem-

ical Ltd (Toronto, Canada)에서 구입하여 사용하였다. Methanol, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol은 Samchun Pure Chemical Inc., (Japan)로부터 구입하여 사용하였고, dimethylsulfoxide (DMSO)는 Katayama Chemical Co.(Japan)에서 구입하였다. d-Biotin (monosodium salt), D-glucose-6-phosphate (monosodium salt),  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.), L-histidine HCl은 Junsei Chemical Co., Ltd (Japan)에서 구입하고 그 외 사용된 시약은 1급 이상이였다.

### 시료의 추출 및 용매 분획

삼백초(경남 거창군 화성농협 시험포에서 재배)를 음건시킨 후 분쇄하고 시료중량의 20배 methanol로 환류추출(12 시간, 2회)하여 얻은 methanol 추출물을 감압농축하였다. 농축액 10 g에 증류수 50 ml를 가해 현탁시키고 Figure 1에서와 같이 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol순으로 용매 분획하여 감압농축한 후 시료로 사용하였다.

### 항돌연변이성 실험

항돌연변이성 실험은 Maron과 Ames의 preincubation 법(1983)에 준하여 Lee 등(1985)의 방법에 따라 수행하였다. *S. typhimurium* TA98은 KIST에서 분양 받아 genotype (*rfa* mutation, ampicillin resistance, histidine biotin 요구도) 시험에서 이상이 없음을 확인한 후 사용하였다. S9-cofactor mixture는 Maron과 Ames의 방법(1983)에 따라 Arochlor 1254를 Sprague Dawley rat에 몸무게 kg당 500 mg을 주사하여 얻은 간으로부터 조제한 S9을 cofactor mixture(1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 120 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 12 mM EDTA, 200 mM glucose-6-phosphate, 16.2 mM NADP)에 대해 5% 첨가하여 조

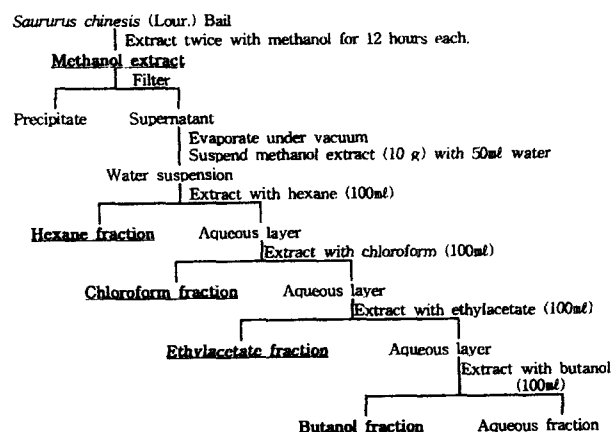


Fig. 1. Solvent fractionation of the methanol extract from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail.

제하였다.

돌연변이성 물질을 함유한 test tube에 S9-cofactor mixture 0.5 ml, 하룻밤 배양된 균주( $1\sim 2 \times 10^9$  cell/ml) 0.1 ml, DMSO에 용해된 시료 0.1 ml를 가하여 vortex한 후 진탕배양(37°C, 150 rpm, 30 min)하고 여기에 45°C water bath에 보관 중인 top agar(histidine과 biotin을 각각 0.5 mM 함유한 용액을 10% 함유) 2 ml를 가하여 minimal glucose agar plate에 도말한 다음 37°C에서 48시간 배양한 후 revertants 수를 계산하여 시료의 항돌연변이성을 측정하였다.

### GC-MS의 분석

성분동정에 사용된 GC-MS system은 Finningan 4510 GC-EI automated mass spectrophotometer (Sunvalle, CA, USA)를 사용하였다. Column은 Ultra-1 capillary column (25 m $\times$ 0.2 mm, i.d., 0.11  $\mu$ m)으로 temperature program (50~250°C, 4°C/min)을 하였으며 FID detector를 사용하였다. Carrier gas는 He을 ion source는 70eV를 사용하였다. Compound는 Willeybns Library의 data base와 비교하여 잠정적으로 동정하였다.

## 결 과

### 삼백초추출물의 항돌연변이성 검색

삼백초의 methanol 추출물을 Figure 1에 따라 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol fraction으로 분획한 다음 이들 분획물의 항돌연변이성을 Ames의 preincubation법(1983)으로 조사하였다. 사용된 돌연변이성물질은 식품을 조리할 때 생성되는 대표적인 돌연변이성 물질인 IQ였으며, 사용된 균주

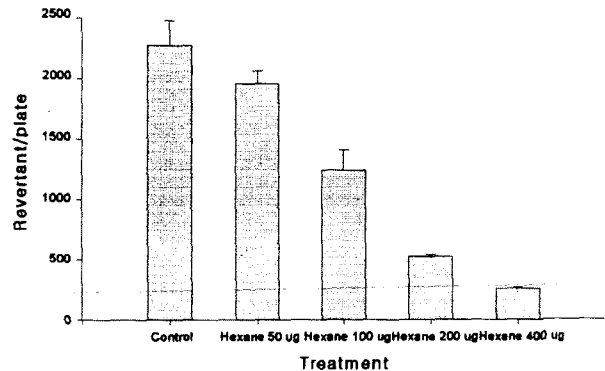
**Table 1.** Inhibitory effect of IQ's mutagenicity for *S. typhimurium* TA98 by fractions from *Saururus Chinesis* (Lour.) Bail<sup>1)</sup>

Treatment ( $\mu$ g/plate) <sup>2)</sup>	Revertant/plate	Avg $\pm$ S.D. <sup>3)</sup>
	Inhibition (%)	
Control (IQ 0.02 $\mu$ g)	770 $\pm$ 46	
methanol extract	385 $\pm$ 40	50
Hexane extract	39 $\pm$ 7	95
Chloroform extract	347 $\pm$ 6	55
Butanol extract	508 $\pm$ 49	34

<sup>1)</sup>Antimutagenicity assay was based on the preincubation method described by Maron and Ames (1983). S9 fraction was prepared from the liver of Sprague-Dawley male rat injected with Arochlor 1254 (500 mg/kg body weight).

<sup>2)</sup>Each plate contained 0.02  $\mu$ g IQ and/or 200  $\mu$ g fraction extract from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail dissolved in 50  $\mu$ l DMSO.

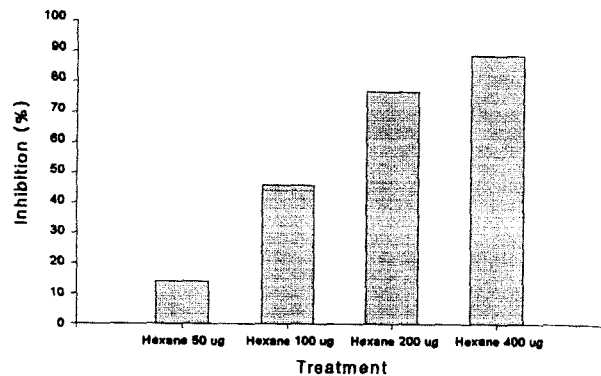
<sup>3)</sup>Mean  $\pm$  S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants(5 $\pm$ 2).



**Fig. 2.** Dose-dependent reduction of IQ mutagenicity for *S. typhimurium* TA98 by hexane fraction from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. Each treatment contained 0.05  $\mu$ g IQ dissolved in 50  $\mu$ l DMSO. Bar represented mean  $\pm$  S.D. of triplication and mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants (12 $\pm$ 2).

는 *S. typhimurium* TA98였다. Table 1에서 보는 바와 같이 수행된 실험조건하에서 0.02  $\mu$ g의 IQ는 약 770개의 revertant를 보였으나 이 revertant 수는 methanol, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 분획물 처리 (200  $\mu$ g/plate)에 의해 각각 50%, 95%, 55%, 34%로 감소하였다. 특히 hexane 분획물에 의해 IQ의 돌연변이성은 크게 감소되었다.

Figure 2에서는 hexane 분획물의 처리량에 따른 항돌연변이성 효과를 조사하였다. IQ 0.05  $\mu$ g의 *S. typhimurium* TA98에 대한 control 처리구의 revertant 수(2275개)는 hexane 분획물 50, 100, 200, 400  $\mu$ g 처리로 각각 1961, 1241, 526, 257개로 감소되어 IQ의 *S. typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성 저해



**Fig. 3.** Inhibition rate of IQ mutagenicity for *S. typhimurium* TA98 by hexane fraction from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. Each treatment contained 0.05  $\mu$ g IQ dissolved in 50  $\mu$ l DMSO and the hexane fraction dissolved in 50  $\mu$ l DMSO. Inhibition rate of treatments was calculated against the control shown in Figure 2.

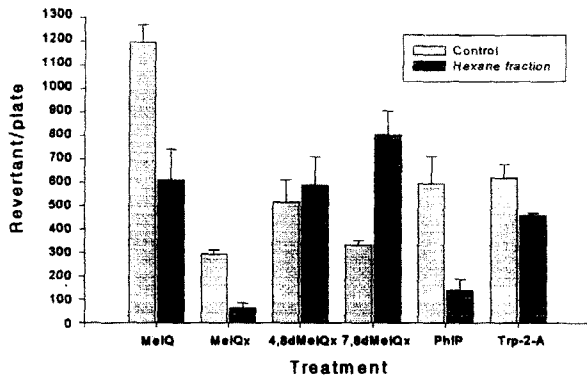


Fig. 4. Effect of hexane fraction from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail on mutagenicity of various mutagens for *S. typhimurium* TA98. Treatment contained 0.02  $\mu\text{g}$  mutagen dissolved in 50  $\mu\text{l}$  DMSO and 200  $\mu\text{g}$  hexane fraction dissolved in 50  $\mu\text{l}$  DMSO.

효과가 각각 14, 46, 77, 89%로 처리량에 따른 효과가 나타났다(Fig. 3).

Hexane extract의 각종 돌연변이성 물질에 대한 항돌연변이성 효과

Figure 4에서는 hexane 분획물의 여러 가지 돌연변이성 HCA과 AFB<sub>1</sub>에 대한 돌연변이성 억제효과를 조사하였다. 이들 돌연변이성물질(MeIQ, MeIQx, 4,8-diMeIQx, 7,8-diMeIQx, PhIP, TP2A: 모두 0.05  $\mu\text{g}$  사용)의 *S. typhimurium* TA98에 대한 revertant 수는 각각 1198, 294, 517, 333, 597, 622개로 나타났다. Hexane 분획물 처리 (200  $\mu\text{g}$ )는 MeIQ, MeIQx, PhIP 및 Trp-P-2의 돌연변이성을 각각 49, 78, 77, 26%로 감소시켰지만 4,8-diMeIQx와 7,8-diMeIQx의 돌연변이성을 각각 14 및

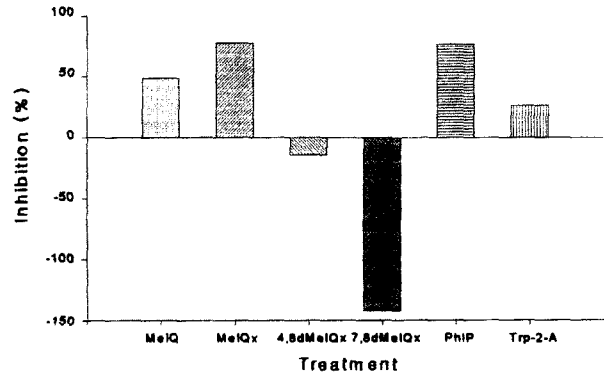


Fig. 5. Mutagenicity modulation effect of hexane fraction from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. Inhibition rate was calculated against control of the data shown in Figure 4.

142%로 증가시켰다(Figure 5).

Hexane extract에 함유된 성분의 동정

Figure 6는 hexane extract의 GC chromatogram이고 Willeybns Library의 data base에 근거하여 similarity가 90% 이상으로 동정된 결과를 Table 2에 나타내었다.  $\gamma$ -crene B와 epi-bicyclosesquiphellandrene이 함량의 비율이 높은 화합물이었으며 그 외에도 t-caryophyllene,  $\gamma$ -elemene,  $\beta$ -cabebene,  $\delta$ -cadinene,  $\delta$ -selinene 그리고 Patchoulene 등이 함유되어 있었다.

## 고 찰

항암, 항균, 및 청리습열(靑利濕熱)효과, 각기(脚氣), 황달(黃疸), 임탁(淋濁), 대하(貸下), 웅종(癰腫), 수종(水腫), 적취(積

Table 2. Compounds identified from the hexane fraction from *Saurus chinensis* (Lour.) Bail

Scan number <sup>1)</sup>	Compound name	Similarity <sup>2)</sup>	Relative Area <sup>3)</sup>	RAR <sup>4)</sup>
681	5-Methyl-2-(1-methylethyl)-phenol	90	60	1.0
786	$\alpha$ -copaene	89	34	0.6
836	t-Caryophyllene	91	183	3.1
850	$\gamma$ -Elemene	93	743	12.4
854	$\gamma$ -Crene B	97	1516	25.3
903	Epi-bicyclosesquiphellandrene	99	1205	20.1
908	5,7-Dimethoxy-1-naphtol	92	82	1.4
919	$\beta$ -Himachlene	92	59	1.0
934	$\beta$ -Cabebene	91	350	5.8
945	$\delta$ -Cadinene	99	326	5.4
959	$\delta$ -Selinene	95	304	5.1

<sup>1)</sup>Scan number was appeared on the chromatogram shown in Figure 6.

<sup>2)</sup>Similarity of compound when compared to the data base of the Willeybns Library.

<sup>3)</sup>Relative area of each compound.

<sup>4)</sup>Relative area ratio of each compound to the area of scan number 681.

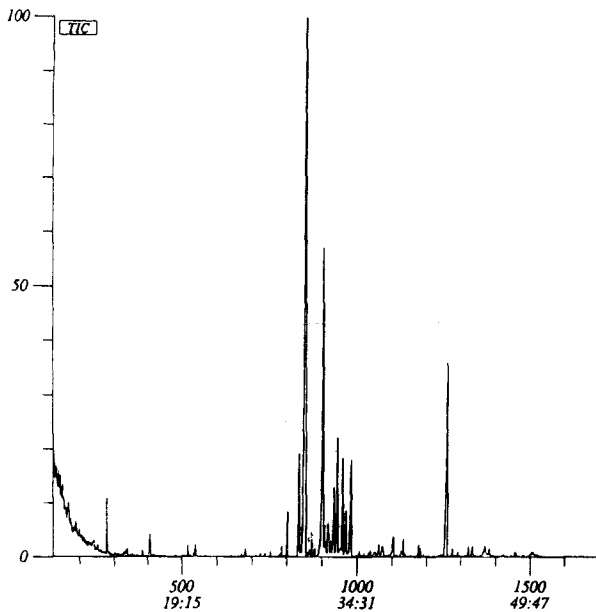


Fig. 6. A GC-MS chromatogram of the hexane fraction from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail.

聚), 및 정종 치료효과 bacteria의 감염에 의한 급만성요도염, 전립선염, 방광염, 임질, 이질(痢疾) 치료효과가 있는 삼백초 methanol 추출물의 hexane 분획물은 고단백 식품을 가열할 때에 생성되는 HCA, 즉 IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, TP2A의 돌연변이성을 강하게 감소 시켰다. 그러나 이 추출물은 4,8-di-MeIQx, 과 7,8-diMeIQx의 돌연변이성은 오히려 증가시켰다.

Hexane 분획물의 HCA 돌연변이성 modulator에 관여하는 성분은 주로 휘발성 물질로 2개의 다량 화합물( $\gamma$ -crene B와 epi-bicyclosquiphellandrane)과 9개[5-Methyl-2-(1-methylethyl)-phenol,  $\alpha$ -copaene, t-caryophyllene,  $\gamma$ -elemene, 5, 7-dimethoxy-1-naphthol,  $\beta$ -himachlene,  $\beta$ -cabebene,  $\delta$ -cadinene,  $\delta$ -selinene]의 미량 화합물이 동정되었다.

본 연구에서는 각 화합물이 HCA의 돌연변이성에 미치는 정도는 화합물의 구입이 불가능하여 조사할 수 없었다. 그러나 실제 hexane 추출물의 HCA의 돌연변이성에 대한 modulator효과는 각 화합물의 단독 효과라기보다는 전 화합물의 복합적인 효과라 생각된다.

고단백질 식품을 고온 가열할 때에 생성되는 HCA 중 돌연변이성이 가장 강한 것은 IQ이고 생성량이 가장 많은 것은 PhIP이지만 4,8-diMeIQx, 과 7,8-diMeIQx은 돌연변이성도 강하지 않으면서 생성량도 극히 적다(Gross and Gruter, 1992; Kize et al., 1994; Sugimura, 1985; Wakabayashi et al., 1992). 따라서 이들 두 HCA (4,8-diMeIQx,과 7,8-diMeIQx)은 실제로 고단백 식품을 가열할 때에 큰 문제가 되지 않아 고단백 육고기나 어

류 등의 식품을 고온으로 조리할 때 삼백초의 hexane 추출물은 처리할 경우 생성되는 돌연변이성을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구의 일부는 1996년도 농림수산특정과정(첨단) 연구비에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

## 참고문헌

- Balasubramanian, S. and S. Govindasamy: Inhibitory effect of dietary flavonol quercetin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* 17: 877 (1996).
- Barch, D.H. L.M. Rundhaugen, G.D. Stoner, N.S. Pillay and W.A. Rosche: Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis* 17: 265 (1996).
- 傳統醫學研究所編: 本草藥材圖鑑. 成輔社發行 p. 209 (1994).
- 曹圭亨: 三白草 健康法. 서진각, 自然藥植資源開發 시리즈 3 (1994).
- Choi, Y.H., E.Y. Kim, K.Y. Park, S.H. Rhee and W.H. Lee: Antimutagenic effects of the juice and boiling water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23: 916 (1994).
- 鄭必根: 生藥草. 鴻新文化社 p. 173 (1990)
- Formica, J.V. and W. Regelson: Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.* 33: 1061 (1995).
- Gross, G.A. and A. Gruter: Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food products. *J. Chromatogr.* 592: 271 (1992).
- Johansson, M.A.E., L. Fredholm, I. Bjerne and M.J. Gerstad: Influence of frying fat on the formation of heterocyclic amines in fried beef burgers and pan Residues. *Fd. Chem. Toxic.* 33: 993 (1995).
- 姜允皓: 數種의 漢藥物이 白鼠의 自然殺害細胞 活性에 미치는 影響. 경희대학교대학원 박사학위논문 (1986).
- 김은영: 어성초의 항돌연이 및 항암효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문집 (1994).
- 金根永: 魚腥草의 化學的 組成과 抗微生物 活性. 전남대학교 대학원 식품공학과(1994).
- Kize, M.G., F.A. Dolbeare, K.L. Carroll, D.H. Moore II, and J.S. Felton: Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Fd. Chem. Toxic.* 32: 595 (1994)
- Lee, E.J., K.N. Bahn, Y.G. Lee, K.H. Shim, and Y.L. Ha: Method for the detection of mutagenicity of fried fish. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 15: 106 (1995).
- 林사비나: 魚腥草수역의 항종양효과에 관한 연구. 경희한의

- 대논문집, **12**: 467 (1989)
- Maron, D.M. and B. N. Ames.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**: 173 (1983).
- 小學館: 中藥大事典. 上港科學技術出版社, 東京, p. 507 (1978).
- 宋晸垓: 魚腥草 抽出物이 肺炎誘發 생쥐의 免疫反應 및 組織變化에 미치는 影響. 원광대학교 대학원 한의학과 (1986).
- Sugimura T.: Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutat. Res.* **150**: 33 (1985).
- Thiebaud, H.P., M.G. Knize, P.A. Kuzmicky, D.P. Hsieh, and J. SFelton: Airborne mutagens produced by frying beef, pork and a soy-based food. *Fd. Chem. Toxic.* **33**: 821 (1995).
- Wakabayashi, K, M. Nagao, H. Esumi, and T. Sugimura: Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res. (Suppl)* **52**: 2092s (1992).