Hanguk Nonghwahak Hoechi
(J. Korean Agric. Chem. Soc.)
36(6), 424~427(1993)

갓으로부터 분리, 동정된 4-decanol의 항돌연변이 효과

김정옥 · 김무남* · 박건영** · 문숙희** · 하영래*** · 이숙희**
부산여자대학교 화학과, *식품영양학과, **부산대학교 식품영양학과,
***경상대학교 농화학과

초록 : 갓(*Brassica juncea* Cosson)의 chloroform추출물이 *Salmonella typhimurium* TA100균주에서 AFB_1의 돌연변이유발을 억제시키는 효과가있었으며, chloroform획분 중에 존재하는 화합물을 GC-MS로 분리/동정한 결과 4-decanol이 다량으로 함유되어있었다. 4-Decanol을 0.5%되게 DMSO에 녹인용액을 처리하였을 때 대조구에 비해 AFB_1과 MNNG의 돌연변이성을 각각 99%와 93%저해효과를 보이므로서 강한 항돌연변이 물질임이 밝혀졌다(1993년 8월 27일 접수, 1993년 11월 4일 수리).

서 론

갓(*Brassica juncea* Cosson)은 십자화과에 속하는 엽경채소류 중의 하나로 미국이나 유럽 그리고 일본 등지에서는 주로 씨를 분말상태로 만들어 겨자(mustard)향신료로 사용하고있다.[1] 한국에서는 겨자씨향신료 뿐만 아니라 독특한 맛과 향으로 인해 잎을 배추김치의 양념재료로 사용하거나 갓김치의 재료로 사용하므로서 그 소비량이 늘어나고있다. 전남에서 생산되는 돌산갓은 우수한 갓김치의 재료로 인정받고있으며, 갓김치의 상품화가 추진되고있다. 따라서 최근 돌산갓의 여러가지 화학적성분 분석결과를 보고하는 등[2-3] 갓에 관한 연구가 진행되고있다. 갓 중에 존재하는 독특한 성분으로는 매운맛을 내는 sinigrin이라는 allylisothiocianate의 glucosinolate를 비롯하여 여러가지 함황화합물이있으며, 이들은 배당체로부터 갓 자체의 myrosinase의 작용에 의해 생성되는 것으로 알려져있다.[4] 함황화합물 중에는 반응성이 크며 항균성, 항곰팡이성, 항혈액응고성에 효과를 보이는 생리활성물질이 많이 있는것으로 보고되어있다.[5-6] 마늘 중의 allicin은 항암효과를 나타내는 함황화합물의 한 예로서[5] 함황화합물을 함유하고있는 식물체의 항암효과가 주목되며 이러한 측면에서 갓의 항돌연변이 효과 및 항암 효과를 가질 수있는 채소로 생각되었다.

최근 항암 및 항 돌연변이 효과를 가지고있는 녹황색 채소를 섭취하고자하는 인구가 늘어나고있어 여러가지 생리활성효과를 나타내는 녹황색채소의 항돌연변이효과 검색이 활발히 이루어지고있다. 마늘, 들깻잎, 쑥, 감잎 등이 항돌연변이효과가 있음이 본 연구진에의해 보고된 바 있다.[7-10] 본 연구에서는 갓을 hexane, chloroform, aqueous 층으로 분획하여 이들 각층의 AFB_1(aflatoxin B_1)에 대한 항돌연변이 효과를 조사하였다. 그 결과 chloroform 층이 효과가 가장 크게 나타나 chloroform 획분 중의 화합물을 GC-MS로 분리, 동정하였으며 그중 다량으로 존재하면서 일반 식물체에 존재하지 않는 화합물인 4-decanol의 AFB_1(Aflatoxin B_1)과 MNNG(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)에 대한 항돌연변이 효과를 조사하였으므로 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

1991년 8월 전남 여천 돌산에서 재배한 한국산 갓 500 g을 깨끗이 씻어 물을 뺀다음 증류수 500 ml을 넣어 homogenizer를 사용하여 10분간 마쇄하여 가아제로 거른 후 Buchner funnel로 흡입여과 시켰다. 이 여과액을 500 ml의 재증류한 hexane으로 추출한 다음 남은 수층을 다시 chloroform 500 ml로 추출 한 것을 rotary vacuum evaporator를 사용하여 65℃ 에서 농축하여 AFB_1에 대한 항돌연변이 효과시험과 화합물 분리, 동정을 위한 시료로 사용하였다.

항돌연변이 실험

AFB_1 및 MNNG는 미국 Sigma 회사(St. Louis, Mo.

Key words : Mustard leaf, antimutagenic compound, 4-decanol
Corresponding author : J. O. Kim.

USA)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다. 이들 돌연변이 물질에 대한 항돌연변이 실험은 Matsushima 등[11] 및 Yahagi 등[12]의 실험방법에 따라 preincubation mutagenicity test를 이용하여 행하였다. 이때 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* TA 100균주를 각각 사용하였으며, 균주는 정기적으로 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 돌연변이, *uvr*B 돌연변이와 R factor 등의 유전형질을 확인한 후 사용하였다. S9 mixture의 조제는 체중이 약 200 g되는 Sprague-Dawley rat(male)의 간에서 얻은 S9 fraction 10%에 $MgCl_2$-KCl salt 2%, 1 M glucose-6-phosphate 0.5%, 1 M nicotine adenine dinucleotide phosphate(NADP)4%, 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 및 멸균수를 혼합하여 조제하였다.[13] 항돌연변이 실험은 S9 mixture 0.5 m*l*, 하룻밤 배양된 균주($1\sim2\times10^9$ cells/m*l*) 0.1 m*l*, 돌연변이 유발물질 50 μ*l*, 그리고 DMSO에 녹인 갓의 chloroform fraction 또는 4-decanol(Sigma Chemical Inc. USA)을 ice bath에 담긴 cap tube에 넣어 가볍게 와류교반하고 37℃에서 30분간 예비배양하였다. 45℃의 top agar 2 m*l*씩을 각 tube에 붓고 3초간 교반하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37℃에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다.

균주에 대해 시료의 독성 유무를 살펴보기 위해 독성실험을 행하였으며, 독성이 나타나지 않는 시료의 농도범위 내에서 항돌연변이 실험을 행하였다. 먼저 멸균된 test tube에 top agar 2 m*l*, 하룻밤 배양된 균주($1\sim2\times10^9$ cells/m*l*) 0.1 m*l*, test chemical 0.1 m*l*를 첨가하고 가볍게 vortex한 후 nutrient agar plate에 분주한 뒤 37℃에서 24시간 배양시킨 후 대조군과 비교하여 독성유무를 확인하였다.

Chloroform 획분 중의 화합물 분리 및 동정

갓의 chloroform 층을 GC-MS(Hewlett Packard; HP 5890 GC-HP 5970 MS, Orlando, FL, USA)를 이용하여 분석하였다. HP-5 fused silica WCOT capillary column (30 m×0.25 mm, i.d., 0.25 μm coating thickness; Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)을 사용하였으며, column oven 온도는 70℃에서 5분간 유지시킨 후, 150℃까지 1분당 20℃로 programming 시킨다음 150℃에서 1분간 유지한다. 다시 분당 5℃씩 승온시켜 300℃에서 30분간 유지하였다. 검출기 및 주입구의 온도는 310℃로 조절하여 사용하였으며, carrier gas (1 m*l*/min, split ratio 1/25)는 helium을 사용하였다. Mass spectra는 70 eV의 전자 에너지로 기록되었으며 이온원의 온도는 280℃이었다. 각 peak는 Chemstation(HP 91153C, NBS-REVEL) mass spectral data base와 표준 화합물의 mass spectrum에 근거하여 동정하였다.

결과 및 고찰

갓의 chloroform획분을 독성이 나타나지 않는 범위내의 농도에서 AFB_1에 대한 항돌연변이효과는 Table 1과 같다. Chloroform획분의 농축액을 각각 5%되게 DMSO에 녹인다음, 이 용액의 *Salmonella typhimurium* TA100에서 AFB_1의 돌연변이성을 저해 할 수 있는 효과를 조사하였을 때 그 저해효과가 dose response로 나타났으며 5% 농도에서는 95%의 높은 저해율를 나타내었다. 따라서 chloroform 추출물 중에 존재하는 화합물을 HP-5 fused silica capillary GC column으로 분리하여(Fig. 1) GC-

Table 1. Effect of chloroform extracts of mustard leaves on the mutagenicity induced by aflatoxin B_1 (AFB1, 1 μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100.

Treatments	Revertants/plate	Inhibition ratio (%)
Spontaneous	110± 12	
AFB_1	1714± 39	
AFB_1+Chloroform fraction (5%[1])	192± 16	95

[1]Percent represents the concentration of chloroform extract in DMSO.

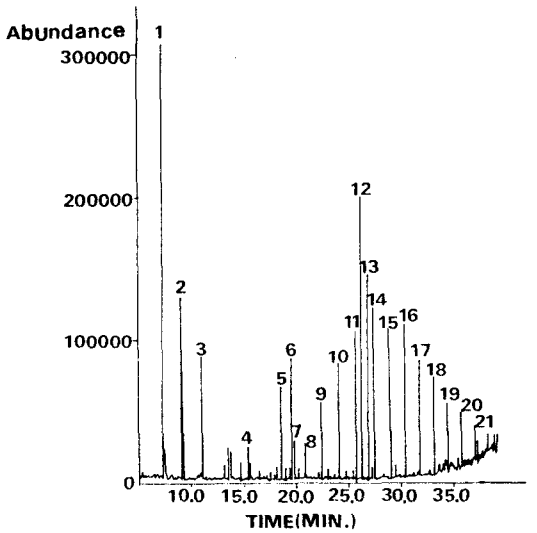

Fig 1. Total ion chromatogram (TIC) of GC-MS of chloroform fraction from mustard leaf.

Table 2. Compounds identified from chloroform fraction of mustard leaves by GC-MS.

Peak no.	Compounds	Mass spectral data; m/z (%base peak)
1	4-Decanol	55(100), 73(82), 97(72), 115(28), 69(13), 57(10), 72(9), 98(8), 56(6)
2	Hapto-5-indenyl-hapto-5-pentamethylcyclopentadienyl-cobalt	309(100), 310(25), 324(22), 571(11), 91(11), 119(9), 113(9), 207(5), 323(4)
3	3,8,4,7-Ethanediylidene cyclopent[a]indene,1,2,3 3a,3b,4,7,7a,8,8a-decahydro	252(100), 117(98), 185(93), 184(72), 134(70) 207(58), 91(49), 119(44)
4	2H, 8H-Benzo[1,2-b:5,4-b'] dipyran-10-propanol, 5-methoxy-2,2,8,8-tetra methyl	315(100), 330(38), 317(23), 91(21), 103(18), 237(17), 119(16), 150(12), 331(9), 165(7)
5	4-Methoxy-2'6'-dinitro-3,5-di-t-butylbiphenyl	371(100), 386(52), 91(43), 293(40), 119(34), 372(32), 178(22), 103(18), 57(15), 387(14)
6	Gibberellin A_2	207(100), 57(60), 71(57), 85(28), 281(28), 83(27), 69(23), 147(23), 208(22), 96(21)

MS로 동정한 결과, 4-decanol(peak no 1), Hapto-5-indenyl-hapto-5-pentamethylcyclopentadienyl-cobalt(peak no 2), 3,8,4,7-Ethanediylidene cyclopent[a]indene-1,2,3,3a, 3b,4,7,7a,8,8a-decahydro(peak no 3), 2H,8H-Benzo[1,2-b : 5,4-b']dipyran-10-propanol, 5-methoxy-2,2,8,8-tetramethyl(peak no 4), 4-methoxy-2'6'-dinitro-3,5-di-t-butylbiphenyl(peak no 5), Gibberellin A_2(peak no 6), 그리고 일련의 hydrocarbone 화합물들이 동정되었다(Table 2). 이중 4-decanol은 relative abundance가 가장높아 갓의 chloroform획분 중에 가장 다량으로 함유되어 있는 화합물로 추정되었으며, 일반 식물체 또는 다른 천연물 중에 흔히 존재하지 않는 화합물로 알려져 있어 천연물 중의 화합물 분석시에 내부표준물질로 많이 사용되어왔다.[9,14-15] 따라서 4-decanol 표준품을 사용하여 4-decanol의 항돌연변이 효과실험을 행하였다. 이때 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* TA100이었으며 돌연변이원으로는 AFB_1과 MNNG를 사용하였다. 독성시험결과 0.5%(4-decanol/DMSO) 이내에서는 독성이 나타나지 않았으므로 4-decanol을 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 그리고 0.5% 용액이되게 DMSO에 녹인다음 각각의 농도에서 저해효과를 조사하였다. 0.4%와 0.5%농도의 4-decanol을 처리하였을 때 AFB_1의 돌연변이성을 각각 93%와 99%를 저해하였으며, MNNG의 돌연변이성도 각각 79%와 93%를 저해하므로서 이 두 돌연변이물질의 돌연변이성에 대해 강한 저해효과를 나타내었다(Table 3). 따라서 4-decanol은 갓의 chloroform추출물이 항돌연변이효과를 나타내게 하는 중요한 화합물로 생각되며 4-decanol의 항돌연변이효과에 대한 mechanism은 계속 연구가 진행되어야 할것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 연구비 지원(과제번호: 90-0500-03)에 의한 결과의 일부이며 이를 감사드린다.

참 고 문 헌

1. Farrell, K. T.: In 'Spices, Condiments and Seasonings,' Van Nostrant Company, USA, 150(1985)
2. 조영숙, 박석규, 전순실, 문주석, 하봉석: 한국영양식량학회지, 22 : 48(1993)
3. 박석규, 조영숙, 박정로, 전순실, 문주석: 한국영양식량학회지, 22 : 53(1993)
4. 한국식물학연구회: 약품식물학각론, 진명출판사, pp. 306(1980)
5. Eric, B: Chemical News, 3 : 253(1985)
6. Bordia, A., Joshi, H. K., and Sanadhya, B. N.: Atherosclerosis, 28 : 155(1977)
7. 김소희, 김정옥, 이숙희, 박건영, 박희준, 정해영: 한국영양식량학회지 20 : 253(1977)
8. 이경임, 이숙희, 김정옥, 정해영, 박건영: 한국영양식량학회지, 22 : 175(1993)
9. Jeong-Ok Kim, Yeong-Sook Kim, Jong-Ho Lee, Moo-Nam Kim, Sook-Hee Rhee, Suk-Hee Moon, and Kun-Young Park: J. Korean Soc. Food Nutr. 21 : 308(1992)
10. 문숙희: 감잎의 항돌연변이 및 항암효과, 박사학위논문, 부산대학교 대학원(1993)

11. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M.: In 'Short Term Test, Systems for Detecting Carcinogens.' Norphth, K. H. and Garner, R. C. (eds), Springer, Berling, USA p. 273(1980)
12. Yahagi, T., Nagao, M., Sugimura, T., Fuuya, A. and Matsushima, T.: Mutat. Res. 68 : 211(1979)
13. Maron, D. M. and Ames, B. N.: Mutat. Res. 113 : 173(1983)
14. Mu-Nam Kim and Lindsay, R. C.: J. Korean Soc. Food Nutr. 21 : 731(1992)
15. Olafsdottir, G., Steinke, J. A., and Lindsay, R. C.: J. Food Sci. 50 : 1431(1985)

Antimutagenic effects of 4-decanol identified from mustard leaf

Jeong Ok Kim,[1)] Mu Nam Kim*, Kun Young Park**, Suk Hee Moon**, Yeong Lae Ha***, Suk Hee Rhee** (Department of Chemistry, Pusan Women's University, Pusan 607-737, Korea, *Department of Food Science and Nutrition, Pusan Women's University, **Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735 and ***Department of Agricultural Chemistry, Gyeong Sang National University, Chinju 660-701, Korea.

Abstract : The chloroform extract of mustard leaves (*Brassica juncea* Cosson) reduced mutagenicity of AFB_1 in bacterial assay (*Salmonella typhimurium* TA100). 4-Decanol was one of major compounds in the chloroform extract when analyzed by GC-MS on HP-5 capillary column. The authentic compound of 4-decanol dissolved in DMSO (0.5%) inhibited mutagenic activities of AFB_1 and MNNG in *Salmonella typhimurium* TA100 at a rate of 99% and 93%, respectively. This result indicates that 4-decanol is an antimutagenic compound present in chloroform extract of mustard leaves.

[1)]Formerly J. Kim Ha