

## 고온가열된 어류의 돌연변이성 검색을 위한 시료 추출방법

이은주 · 반경녀 · 이영근\* · 심기환\*\* · 하영래<sup>1</sup>

경상대학교 농화학과, 식물분자생물 우수연구센터, 암연구소, \*부산시환경보건연구원, \*\*경상대학교 식품공학과  
(95. 7. 13 접수)

### Method for the Detection of Mutagenicity of Fried Fish

Eun J. Lee, Kyeong N. Bahn, Young G. Lee\*, Ki H. Shim\*\* and Yeong L. Ha<sup>1</sup>

Department of Agricultural Chemistry, Plant Molecular Biology and Biotechnology

Research Center, and Gyeongsang Institute of Cancer Research,

Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea,

\*Pusan Institute of Health and Environment, Pusan 608-104, Korea,

\*\*Department of Food Science and Technology,

Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**ABSTRACT :** A method was developed to detect total mutagenicity of fried fish for *S. typhimurium* TA98, using Ames assay. Method described herein circumvented problems associated with the sample preparation for Ames assay, i.e., a multi-purification step of sample and interference with solvent residuals. Experiment A, the best method developed in the present study, consisted of two important steps: pH adjustment of the aqueous sample solution from fried fish samples to remove impurities, and simultaneous distillation extraction (SDE) for partially purified samples to remove volatile compounds from solvents. The procedure and results were described as below. Fillet of gizzard shad (*Konosirus punctatus*) fish sample fried for 10 min each side on the temperature-controlled fry-pan (210°C) was homogenized in an aqueous acidic solution (pH 2) with a homogenizer, followed by filtration through Celite. The filtrate (pH 2), removed some impurities by extraction with chloroform:methanol (2:1, v/v) mixture, was adjusted pH to 10 and then centrifuged to remove precipitate. The ethylacetate extract from the filtrate of pH 10 was rotoevaporated and purified by SDE apparatus for 2 hours. Experiment A revealed significantly higher revertants (1928 per 25 g fried sample) than other Experiment (B, C, or D) tested. Experiment A gave good results in the mutagenicity test of fried fish sample with few purification steps using only 25 g fried sample and 650 ml of solvents; and thus this method could be a useful tool for the screening the mutagenicity or antimutagenicity of other foods as well.

**Key words :** Mutagenicity, Simultaneous distillation extraction (SDE), Fried fish.

### 서 론

Fish를 고온으로 가열하면 돌연변이성 및 발암성 물질이 생성된다는 사실이 Sugimura 등 (1977a, 1977b)에 의해 밝혀

진 후 fish의 smoke condensate와, broil, fry, barbecue한 fish에 서도 강한 돌연변이성 물질이 생성된다고 보고되었다 (Ichrotsubo and Mower, 1982; Kasai *et al.*, 1980; Wakabayash *et al.*, 1992). 고온에서 가열된 fish로부터 분리 및 동정된 돌

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.

연변이성 물질은 heterocyclic amines (HCAs), 지방산 분해산물 및 nitroamine 등으로 밝혀졌다 (Gross and Gruter, 1992; Kurosaka *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994; Nukaya *et al.*, 1994; Sugimura 1985; Sugimura *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1988). HCAs중에서 돌연변이성이 강한 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)-imidazo[4,5-b]pyridine (PhiP) 등은 동물실험에서 발암물질임이 확인되었지만 (Adamson *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1988; Ohgaki *et al.*, 1987; Takayama *et al.*, 1984; Sato *et al.*, 1987; Tsuda *et al.*, 1988), 이들은 고온가열된 fish에 미량으로 존재하고 (Sugimura *et al.*, 1989; Wakabayashi *et al.*, 1992), 유추하여 얻은 일일 섭취량을 동물실험에서 얻은 TD50 값 (Peto *et al.*, 1984)과 비교할 때 암을 유발하기에는 충분한 양이 못된다. 따라서, 고온가열된 fish가 인간의 암발생에 관계가 있을 것이라는 보고 (Ikeda *et al.*, 1983; Sugimura *et al.*, 1989)는 이들에 함유된 HCAs과 여러 가지 돌연변이성 물질 (total mutagenic substances)이 복합적으로 작용하기 때문인 것으로 생각된다.

고온가열된 fish로부터 HCAs를 분리, 동정하는 방법은 많이 연구되었지만 (Knize *et al.*, 1993; Kurosaka *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1978), 이들 방법은 전체적인 돌연변이성 물질 (total mutagenic substances)을 추출하는 방법으로는 부적합하다. 현재 개발되어 있는 돌연변이성 물질의 추출방법은 대량의 시료와 유기용매를 사용함으로, 추출하는데 많은 시간과 노력을 요할 뿐만 아니라, 용매를 증발 제거한 후 추출물과 함께 남는 용매 잔사는 돌연변이 억제효과가 있어 실제 fish를 가열할 때 생성되는 돌연변이성을 측정하는 데는 많은 문제가 있다. 본 연구실에서 Ichinotsubo *et al.* (1982)의 방법에 따라 시료를 사용하지 않고 그들이 사용한 유기용매만으로 조제한 용매잔사를 Ames preincubation 방법 (1983)으로 *S. typhimurium* TA98에 대하여 돌연변이성 실험을 실시한 결과, 유기용매 잔사 물에 의한 *S. typhimurium* TA98과 TA100의 revertant 수가 spontaneous에 의한 revertant 수 보다 훨씬 적어 유기용매 잔사에 의한 돌연변이 저해효과를 확인하였다. 또한 실제로 많은 독성학 연구자들이 Ames preincubation 방법 (1983)으로 식품 중의 돌연변이성 또는 항돌연변이성을 측정할 때 유기용매잔사에 의한 오차를 실감하고 있다.

따라서 본 연구에서는 일상생활에서 고온으로 가열되고 있는 fish product의 돌연변이성을 Ames preincubation 방법으로 측정하기 위하여 기존의 방법에 비해 훨씬 적은 양의 시료와

유기용매를 사용하여, 간편하면서도 유기용매잔사의 방해 배제할 수 있는 추출방법을 개발하였다. 고온 (210°C)으로 가열된 전어시료 (fish 중에서 *S. typhimurium* TA98에 대해 상대적으로 높은 돌연변이성을 보였음)의 돌연변이성 물질 추출을 위해 개발된 가장 양호한 방법은 다음과 같다. 돌연변이성 물질을 수용액 (pH 2.0)으로 추출하고, 이 추출물에 함유된 지방성 물질을 chloroform:methanol (2:1, v/v)로 추출하여 제거하고, pH를 10으로 조절한 다음 원심분리하여 상등액을 다시 소량의 유기용매로 추출하였다. 이 유기용매 추출물을 농축한 후 simultaneous distillation extraction (SDE) 장치를 사용하여 2시간 정제 (유기용매에서 유래된 돌연변이성 휘발물질 제거)하였다. 이렇게 정제된 시료가 Ames의 preincubation 방법에서 *S. typhimurium* TA98에 대한 가장 많은 돌연변이성을 보였고, 이 정제된 시료에 함유된 돌연변이성 물질을 GC-MS로 확인한 결과 대부분 amine 유도체 및 지방산 분해산물로 밝혀졌다.

## 재료 및 방법

### 시약

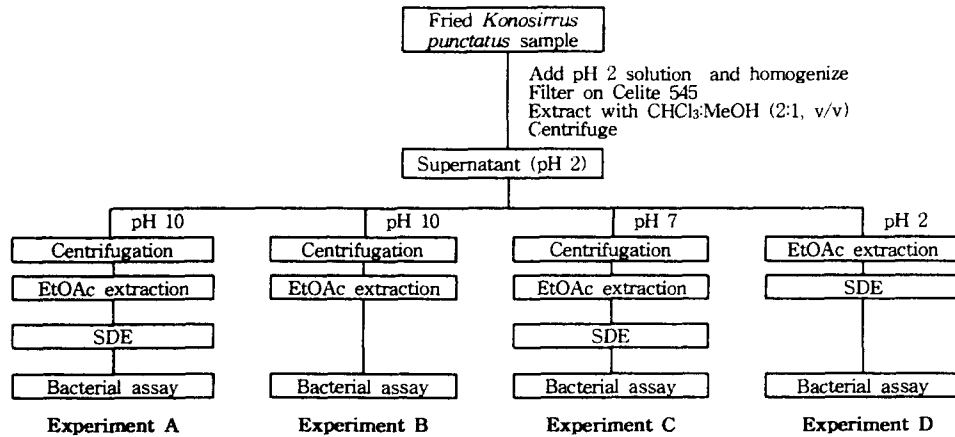
Chloroform과 methanol (Samchun Pure Chemicals Inc. Ltd., Japan), diethylether (Junsei Chemical Co. Ltd., Japan) 및 ethylacetate (J. T. Baker Inc., USA)는 glass column을 통해 재증류하여 사용하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO)는 Katayama Chemicals (Japan) 사, IQ는 Toronto Research Chemicals (Canada)사, Celite 545는 Shinyo Pure Chemicals (Japan) 사에서 구입하였다. 그 외에 사용된 시약은 1급 이상이였다.

### 시료처리

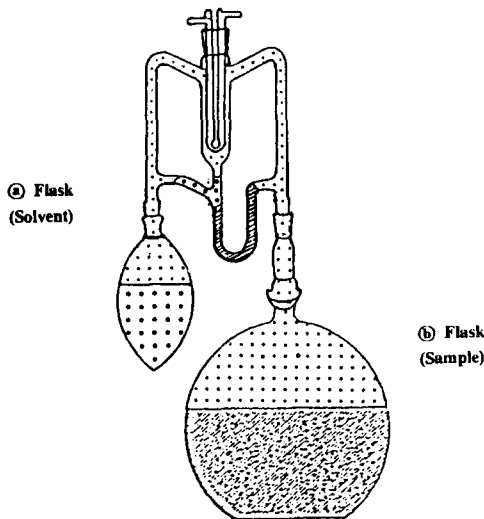
시장에서 구입한 신선한 전어 (*Konosirus punctatus*)의 껍질을 벗긴 후 얇은 포 (2 cm × 4 cm × 2 mm)를 만들어 210°C로 조절된 fry-pan에서 각 면당 10 분씩 가열하였다.

### 시료추출 및 정제

고온가열된 fish시료에 함유된 돌연변이성 물질의 추출 및 정제는 Figure 1과 같이 행하였다. 즉 시료 25 g에 수용액 (pH 2) 100 ml를 가하여 균질기 (Omni Mixer Homogenizer, Omni, USA)로 균질화한 후 균질액의 pH를 다시 2로 조절하고 균질화하였다. 이 과정을 반복하여 균질액의 pH가 2로 안정화되면 하룻밤 방치하여 여과 보조제 Celite를 사용하여 진공여과하였다. 여액에 chloroform:methanol (2:1, v/v) 300 ml를 가하



**Fig. 1.** Extraction and purification of mutagenic substances from *Gizzard shad* (*Konosirrus punctatus*) for *S. typhimurium*. These experiment examined the influence of pH adjustment of the aqueous sample solution and/or SDE purification of ethylacetate extracts. Amount of fish sample or solvents used : Jeon-yeo, 25 g; aqueous solution (pH 2), 100 ml; chloroform : methanol, 650 ml; ethylacetate, 250 ml.



**Fig. 2.** Simultaneous Distillation Extraction (SDE) apparatus. Diethylether (20 ml) as the solvent and ethylacetate extract dissolved in methanol (18 ml) and water (2 ml) were placed in the flask ③ and ④, respectively.

여 1분간 진탕추출한 다음 원심분리 (Centricon T-324, Konttron, Swiss: 4°C, 9000×g, 30 min)하여 시료추출물(상등액)을 얻었다. 하층은 수용액 (pH 2) 100 ml로 다시 추출하여 상기 시료추출물에 합쳐 진공농축기 (EYELA Evaporator, Tokyo Rikakikal Co. Ltd., Japan)로 잔여 유기용매를 제거하였다. 이 시료추출물의 pH를 10, 7 또는 2로 조절하고 (pH를 7 또는 10으로 조절한 시료추출물에서 생성된 침전물은 원심분리하여 제거하였다) SDE 장치 (Figure 2)를 이용하여 다음 4가지

방법 (Experiment A, B, C, D)으로 정제하여 돌연변이성 실험 시료로 사용하였다.

Experiment A (시료추출물의 pH를 10으로 조절하고 SDE 장치로 정제): pH가 10으로 조절된 시료추출물을 ethylacetate 로 두번 추출(150 ml, 100 ml)하여 진공농축한 다음 methanol 2 ml에 용해한 후 SDE장치 (Figure 2)의 ③ flask에 옮겨 증류수 18 ml를 가하여 전체를 20 ml되게 조절하였고, SDE장치의 ④ flask에는 diethylether 20 ml를 가한 후 SDE 장치에 연결하여 sand bath상에서 동시 추출하였다. 일정시간 추출한 다음 ③ flask의 시료용액은 진공농축기로 잔여 유기용매를 제거한 후 동결건조하였고, ④ Flask의 diethylether 추출물은 진공농축하였다.

Experiment B (시료추출물의 pH를 10으로 조절하고 SDE에 의한 정제는 없었음): pH가 10으로 조절된 시료추출물을 ethylacetate로 두번 추출 (150 ml, 100 ml)한 다음 진공농축하였다.

Experiment C와 D (시료용액의 pH를 각각 7과 2로 조절하고 SDE 장치에 의한 정제): pH 7 (Experiment C) 또는 pH 2 (Experiment D)로 조절된 시료추출물을 ethylacetate로 두번 추출 (150 ml, 100 ml)한 다음 진공농축하여 얻은 농축물을 methanol 2 ml에 용해하여 SDE장치 (Figure 2)의 ③ flask에 옮기고 여기에 증류수 18 ml를 가하여, Experiment A와 같은 방법으로 동시추출하였다.

**돌연변이성 실험**

돌연변이성 실험은 *S. typhimurium* TA98 [일본의 Kik-

koman회사에서 분양 받아 genotype (*rfa* mutation, ampicillin resistance, histidine requirement) 시험에서 이상이 없음을 확인한 후 사용]을 이용하여 Ames의 preincubation 법 (1983)에 준하여 실시하였다. S9-cofactor mixture는 Maron과 Ames의 방법 (1983)에 따라 Arochlor 1254를 Sprague Dawley rat에 몸무게  $kg$ 당 500 mg을 주사하여 얻은 간으로부터 조제한 S9을 cofactor mixture (1M  $Na_2HPO_4$ , 300 mM  $KH_2PO_4$ , 120 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 12 mM EDTA, 200 mM Glucose-6-phosphate, 16.2 mM NADP)에 대해 5% 첨가하여 조제하였다. 돌연변이성 실험은 ice bath 상에서 S9-cofactor mixture 0.5 ml, 하룻밤 배양된 균주 ( $1-2 \times 10^9$  cells/ml) 0.1 ml, 시료 (500  $\mu g$ /0.1 ml DMSO) 또는 용매잔사물 (400  $\mu g$ /0.1 ml DMSO) 0.1 ml를 혼합한 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% 함유함) 2 ml를 가하여 minimal glucose agar plate에 도말한 다음 37°C에서 48시간 배양한 후 revertants 수를 계산하여 돌연변이성을 측정하였다.

### Recovery 실험

고온가열된 전어시료의 돌연변이성 recovery test에 IQ를 돌연변이성 물질로 사용하였다. 즉, 고온가열된 전어시료(25 g), IQ (0.1  $\mu g$ ), 고온가열된 전어시료 (25 g)+IQ (0.1  $\mu g$ )의 각 처리를 Figure 1의 Experiment A의 방법에 따라 추출, 정제한 시료의 돌연변이성을 Ames의 preincubation 방법 (1983)으로 측

정한 결과로 IQ의 recovery를 계산하였다.

### GC-MS에 분석

GC-MS 분석은 capillary column인 Ultra-2 (HP-5; 5% cross-linked phenylmethylsilicone, 50 m  $\times$  0.20 mm  $\times$  0.33  $\mu m$ , film thickness)와 FID가 부착된 Gas chromatography (Hewlett Packard 5890 series II)를 사용하였다. Carrier gas (20 ml/min)는 He를 사용하였으며, oven temperature는 temperature program (200°C~280°C, 2°C/min)을 하였다. Electron energy source는 70 eV로 하여 Electron Impact ionization mode로 MS chromatogram을 얻었다. 물질 동정은 Willeybns Library의 data base에 의하였다.

## 결 과

### 돌연변이성 물질의 추출 및 정제

Table 1은 고온가열된 전어에 함유된 돌연변이성 물질을 Figure 1의 4가지 방법 (Experiment A, B, C, D)에 따라 추출 및 정제 (SDE 장치에 의해 2시간 정제)한 후 *S. typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성을 Ames의 preincubation 방법 (1983)으로 조사한 결과를 나타낸 것이다. 건조시료 25 g을 4가지 방법으로 추출하여 정제한 시료의 돌연변이성은 Experiment A에서 가장 많은 1928개의 revertants를 얻었고, Experiment B, C, D에서는 각각 1008, 1050, 444개의 revertants를 얻어, Ex-

**Table 1.** Effect of sample purification methods on the mutagenicity of fried Gizzard shad for *S. typhimurium* TA98

Exp. <sup>1)</sup>	SDE purification	Revertants/Plate <sup>2)</sup>	Revetans/Fried sample (25 g)	Substance/Fried sample (mg/25 g)
A	Sample extract (b) <sup>3)</sup>	189.0 $\pm$ 18.0 <sup>4)</sup>	1928.0 $\pm$ 184.0 <sup>5)</sup>	5.1 $\pm$ 0.4 <sup>6)</sup>
	Solvent residual (a)	-1.0 $\pm$ 0.3		
B <sup>6)</sup>	Sample extract	120.0 $\pm$ 9.0 <sup>4)</sup>	1008.8 $\pm$ 67.2 <sup>5)</sup>	4.2 $\pm$ 0.5 <sup>6)</sup>
C	Sample extract (b)	150.0 $\pm$ 15.0 <sup>4)</sup>	1050.0 $\pm$ 105.0 <sup>5)</sup>	3.5 $\pm$ 0.5 <sup>6)</sup>
	Solvent residual (a)	-1.0 $\pm$ 1.0		
D	Sample extract (b)	60.0 $\pm$ 3.0 <sup>4)</sup>	444.0 $\pm$ 30.0 <sup>5)</sup>	3.7 $\pm$ 0.4 <sup>6)</sup>
	Solvent residual (a)	-1.0 $\pm$ 3.0		

<sup>1)</sup>Experiment was shown in Figure 1.

<sup>2)</sup>Each assay contained S9-cofactor mixture (0.5 ml)+purified sample (500  $\mu g$ ) or solvent residual (400  $\mu g$ ).

<sup>3)</sup>(a) and (b) represented the flask (a) and (b) of SDE apparatus, respectively, shown in Figure 2.

<sup>4)</sup>Mean  $\pm$  SD of three experiments. Mean value was obtained from the subtraction of spontaneous revertants (37  $\pm$  1). IQ (0.1  $\mu g$ ) gave 2772  $\pm$  136 revertants (positive control).

<sup>5)</sup>Different letters in a column represented significantly different at  $p < 0.05$  by LSD test.

<sup>6)</sup>SDE was not applied on the sample purification step.

periment A가 B, C, D 보다 유의성이 있는 높은 돌연변이성을 보였다 ( $p < 0.05$ ). 또한 정제시료 500  $\mu\text{g}$ 으로부터 나타난 돌연변이성은 Experiment A, B, C, D에서 각각 189, 120, 150, 60개의 revertants로 Experiment A가 역시 가장 높은 돌연변이성을 보였다. 시료 25 g으로부터 얻은 추출물을 SDE 장치로 정제하였을 때 얻은 diethylether 층으로 추출된 양(Figure 2, SDE 장치의 (a) flask)은 Experiment A, C, D 공히 약 500  $\mu\text{g}$ 이었으며 이 중 400  $\mu\text{g}$  취하여 Ames assay로 revertant 수를 조사한 결과 각 Experiment에서 공히 -1개를 보여 그 차이는 없었다. 또한 SDE로 정제된 시료의 양(Figure 2, SDE 장치의 (b) flask)은 Experiment A에서 가장 많은 5.1  $\mu\text{g}$ 을 얻었는데, 이는 Experiment B의 4.2 mg과는 유의성은 없었지만 Experiment C의 3.5 mg, Experiment D의 3.7 mg과는 유의성이 있는 ( $p < 0.05$ ) 많은 양이었다. 이와 같이 각 Experiment에서 정제된 시료 양에 차이는 추출 및 정제 과정에서 이용된 pH 조절과 SDE의 영향 때문으로 생각된다.

Table 2에서는 여러 가지 유기용매 잔사물이 IQ의 돌연변이성에 미치는 효과를 조사하였다. Method I과 II에서는 각각 Convektiond 방법과 Ichinotsubo 등의 방법에 따라 시료 없이 유기용매만 사용하여 blank test로 추출한 후 SDE 장치로 정제하여 Experiment A (Method III)의 결과와 비교하였다. Method I과 II에서는 Experiment A에서 사용한 chloroform: methanol 대신에 각각 methylene chloride, hexane을 사용하였고, ethylacetate 대신에 각각 methylene chloride, ethylacetate를 사용하였다. Experiment A의 용매잔사는 IQ의 *S. typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성을 1% 저해하였으나 Method I과 II에서는 각각 20%, 15% 저해하였다. 이 결과는 Experiment A에서 사용된 용매잔사물 중 *S. typhimurium* TA

98의 revertant에 영향을 미치는 물질이 SDE 장치에 의해 모두 제거되었거나 유기용매에 *S. typhimurium* TA98의 revertant에 영향을 미치는 물질이 거의 없음을 의미한다. 따라서 Table 1에서 보여준 Experiment A로 측정된 돌연변이성은 순수하게 전어 (*Konosirus punctatus*)시료에서 유래한 것으로 생각된다.

#### 돌연변이성 물질 추출에 미치는 pH와 SDE의 영향.

Figure 1의 Experiment A, C, D 방법에 따라 시료추출물 pH를 각각 10, 7, 2로 조절한 다음 ethylacetate로 추출한 후 SDE 장치에 의해 2시간 정제하여 *S. typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성을 조사한 결과 Experiment A에서는 Experiment C나 D 보다 시료 25 g 당 각각 약 1.8 및 4.3 배의 높은 revertants를 얻었다(Table 1). 따라서 전체 돌연변이성 물질의 추출에는 시료추출물의 pH를 10으로 조절하는 것이 가장 양호 하였다. 이러한 효과는 ethylacetate 추출물을 SDE로 정제한 후에 얻어진 시료의 양에서도 비슷한 결과가 나타났다. 즉 25 g의 전어시료로부터 얻어진 정제시료의 양은 Experiment A, C, D에서 각각 5.1, 3.5, 3.7 mg을 얻어 Experiment A가 C, D에 비해 유의성이 있는 차이를 보였다 ( $p < 0.05$ ).

시료추출물의 pH를 10으로 조절한 다음 ethylacetate로 추출하고 SDE 장치에 의해 2시간 정제한 시료 (Experiment A)와 SDE로 정제하지 않았는 시료 (Experiment B)의 *S. typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성은 동일량 (500  $\mu\text{g}$ )으로 비교할 때 SDE로 정제한 시료가 SDE로 정제하지 않았는 시료 보다 약 1.6배 정도의 높은 revertants를 얻었기 때문에 SDE에 의한 정제 효과를 볼 수 있었다(Table 1).

**Table 2.** Reduction of IQ's mutagenicity for *S. typhimurium* TA 98 by the solvent residuals used in experimental Methods

Method <sup>1)</sup>	Residuals (mg)	Revertants/plate <sup>2)</sup>	Inhibitor rate (%)	Reference
Control (IQ 0.01 $\mu\text{g}$ )		491 $\pm$ 1.3 <sup>3)</sup>	0	
I	Solvent (a) <sup>4)</sup>	460 $\pm$ 1.8	7	Conventional solvent mutagen extraction
	Solvent residuals (b)	391 $\pm$ 1.1	20	
II	Solvent (a)	425 $\pm$ 5.0	13	Ichinotsubo et al. (1982)
	Solvent residuals (b)	419 $\pm$ 5.8	15	
III	Solvent (a)	494 $\pm$ 3.6	+0.6	Present study (Experiment A)
	Solvent residuals (b)	484 $\pm$ 5.8	1	

<sup>1)</sup>Test solvent residual of Method III was the Experiment A of Figure 1.

<sup>2)</sup>Each assay contains S9 (5%)+IQ (0.01  $\mu\text{g}$ )+400  $\mu\text{g}$  solvent residuals in (a) flask or 500  $\mu\text{g}$  in (b) flask.

<sup>3)</sup>Mean  $\pm$  SD of three experiments. Mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants (27  $\pm$  1).

<sup>4)</sup>(a) and (b) represent the flask (a) and (b) of SDE apparatus, respectively.

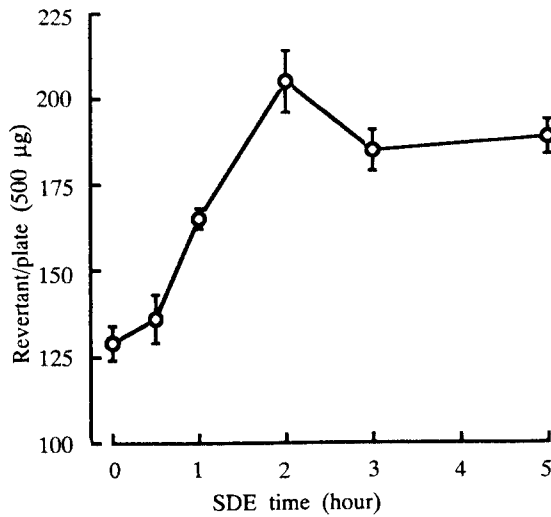


Fig. 3. Effect of the purification time of the ethylacetate extract attained from Experiment A (Figure 1) by SDE on the number of revertant of *S. typhimurium* TA98.

SDE에 의한 정제시간의 영향

Experiment A에서 SDE 장치에 의한 적정 정제시간 (optimum purification time)을 조사한 결과는 Figure 3에서와 같다. 시료 25 g으로부터 얻어진 ethylacetate 추출물을 SDE로 0, 0.5, 1, 2, 3, 5 시간 정제한 시료에 의한 *S. typhimurium* TA 98의 revertant수는 시료 500 µg 당 각각 128, 135, 162, 215, 190, 185개 었다. 따라서 revertants수는 SDE 수행 시간에 따라 점차 증가를 하다가 2 시간에서 최대치에 달한 후 (수행 0시간 과 비교하여 5% 수준에서 유의성이 있었다) SDE를 3 시간 이상 수행하였을 경우에는 약간 떨어지는 경향이었으나 유의성은 없었다. 따라서 시료의 ethylacetate 추출물에 함유된 돌연 변이성 물질의 SDE 장치를 사용한 추출 및 정제는 2시간 수행하는 것이 가장 양호하였다.

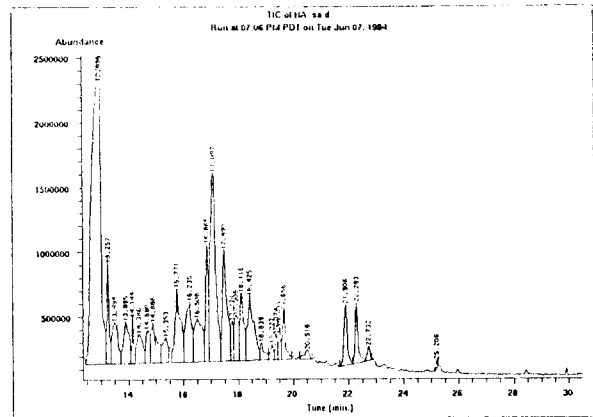


Fig. 4. GC-MS chromatogram of the substance extracted from Gizzard shad (*Konosirus punctatus*) by Experiment A in Figure 1.

돌연변이성 recovery 시험

Table 3에서는 Experiment A에 의한 돌연변이성 recovery 실험 결과를 나타낸 것이다. 본 실험에서는 *S. typhimurium* TA98에 대해 돌연변이성이 강하고 고온가열시에 생성되는 HCAs의 일종인 IQ를 첨가 (spike) 하여 수행하였다. 즉 고온 가열된 전어시료 (25 g), IQ (0.01 µg), 가열된 전어시료(25 g)에 IQ (0.01 µg)를 첨가한 각각의 시료를 Experiment A 방법에 따라 추출한 다음 SDE 장치로 2시간 정제하여 *S. typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성을 조사한 결과 각각 1165개, 1789개 및 2808개의 revertants를 얻었다. 따라서 Experiment A 방법으로 약 95% 정도의 IQ의 돌연변이성이 회수되었다.

돌연변이성에 관련된 물질의 동정

고온가열된 전어시료에 함유된 돌연변이성 물질 (*S.*

Table 3. Recovery of IQ<sup>2</sup> mutagenicity for *S. typhimurium* Ta98 by Experiment A

Treatment <sup>1)</sup>	Revertants/plate <sup>2)</sup>	Revertants/total sample	Substance (mg)/total sample	Recovery rate (%)
IQ (0.01 µg)	364±16.2	1165±51.8	1.6±0.3	
Fried Gizzard shad (25 g)	208±17.0	1789±146.2	4.3±0.5	
Fried Gizzard shad (25 g)+ IQ (0.01 µg)	319±16.2	2808±168.5	4.4±0.4	95

<sup>1)</sup>experiment A was applied for the extraction and purification of the same used in treatments.

<sup>2)</sup>Each assay contained S9-cofactor mixture (0.5 ml)+purified sample (500 µg) of flask (b) in Experiment A.

<sup>3)</sup>Mean ±SD of three experiments. Mean value was obtained by subtraction of spontaneous revertants (30±2).

Table 4. Compounds indentified from the extract<sup>1)</sup> of Gizzard shad (*Konosirus punctatus*) muscle and their relative concentrations

Retention time <sup>2)</sup>	Compound identified <sup>3)</sup>	Area(%) <sup>4)</sup>
12.975	3-Pyridine carboxamide	22.25
13.257	<i>t</i> -Caryophyllene	1.72
13.494	4-Amino-1,2,4-triazol-5-one	2.11
13.895	1-Benzimidazole	1.94
14.144	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol	0.70
14.386	1,4-Dimethyl-2,5-diketopiperidine	1.46
14.680	Unknown	1.10
14.886	N-Ethyl-N-(2-hydroxyethyl)-propylamine	1.93
15.353	Unknown	1.06
15.771	Unknown	3.37
16.235	4-Azabenzimidazole	3.02
16.508	1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone	2.80
16.859	Unknown	2.52
17.097	3,4-Dimethoxyfuran	8.90
17.497	Unknown	4.34
17.774	Unknown	0.74
17.906	3-Ethyl-S-triazolo[4,3-a]pyridine	1.73
18.116	2,4-Diethoxyl-phenolacetate	2.10
18.425	3,5-Diethoxyl-phenolacetate	3.51
18.830	Unknown	0.61
19.227	N-(1,1-dimethylethyl)2,2,2-t-acetamide	0.44
19.374	N-Methyl-2-propyl-5-butylpiperidine	0.46
19.499	1,2-Benzenedicarboxylic acid	0.60
19.657	3,9-Diazatricyclo[7,3,0,0(3,7)]dodeca-2,8-dione	1.26
20.516	Iodomethyl-bengene	0.37
21.906	Unknown	1.69
22.293	2-Butyl-delta2-1,3,4-oxadizolin-5-one	1.47
22.732	4-(Phenylmetyl)-2,6-piperazinedinone	0.31
25.213	Hexadioic acid dioctyl ester	0.10
25.958	Phenylalanine proline diketopiperazine	0.10

<sup>1)</sup>Extract was obtained from the residues after SDE step of Experiment A in Figure 1.

<sup>2)</sup>Time (min) measured by the following conditions. Oven temperature; initial temp., 100°C; rate, 10°C/min; final temp., 280°C. M. S. temperature; 230°C; quad., 120°C; and column, Ultra-2 (HP-2).

<sup>3)</sup>Identified by matching the sample spectrum with that of Data base of Willeybns library.

<sup>4)</sup>Relative area percentage.

*typhimurium* TA98에 대해 돌연변이성이 있을 것으로 추측되는 물질)을 Experiment A 방법으로 추출 및 정제한 다음 GC-MS로 분리 동정한 결과는 Figure 3 (GC chromatogram) 및 Table 3 (동정된 화합물)과 같다. 30개의 화합물이 분리되었으나 Willeybns data base와 비교하여 similarity가 90% 이상인 화합물은 22개였다. 이들 화합물은 amide계나 아미노산 및 지방산의 분해산물과의 축합물질이었다. 그 중 chromatogram에 나타난 각 화합물의 면적이 전체 면적의 2% 이상인 화합물은 3-pyridine carboxamide (22.3%), 3,4-dimethoxyfuran (8.9%), 3,5-diethoxyphenol acetate (3.5%), 4-azabenzimidazole (3.0%), 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone (2.8%), 2,4-diethoxyphenol acetate (2.1%), 4-amino-1,2,4-triazol-5-one (2.1%) 이었다.

## 고 찰

고온가열(210°C, 10분)된 전어의 *S. typhimurium* TA98에 대한 돌연변이성을 Ames의 preincubation 법 (1983)으로 측정하기 위해 개발된 가장 양호한 방법은 Experiment A 방법이었다. 시료 25 g을 수용액 (pH 2, 100 ml)으로 추출한 다음 chloroform:methanol (400 ml)로 불순물을 제거하고 pH를 10으로 조절한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 ethylacetate (250 ml)로 추출, 농축하였다. 이 농축물을 10% methanol 용액 (20 ml)에 용해한 후 SDE 장치를 사용하여 diethylether (20 ml)로 하여 2시간 정제하였다. 이렇게 하여 얻어진 최종 정제된 추출물의 양은 약 5 mg 정도였다.

Experiment A 방법에서 중요한 단계는 pH 조절과 SDE에 의한 저분자 휘발성 물질의 제거이다. 시료추출액 (pH 2)을 pH 10으로 조절함에 따라 형성되는 침전물 (주로 protein, fat, sugar 등)은 원심 분리로 제거할 수 있었으며, 상등액 (pH 10)에 함유된 돌연변이성 물질은 ethylacetate로 쉽게 추출되었다. Ethylacetate 추출물에 함유된 휘발성 물질 (주로 유기용매에서 유래됨)은 SDE 과정에서 diethylether에 의해 제거되었다. 따라서 Experiment A 방법으로 측정된 고온 가열된 전어의 돌연변이성을 IQ (491 revertants/0.01 µg IQ)로 환산할 경우 시료 25 g 당 0.039 µg IQ (1.56 ppb)에 상응하는 것으로 일반적으로 고온가열된 fish의 시료에 존재하는 양과 비슷하다 (Sugimura *et al.*, 1989). 본 연구에서 미량의 PhiP이 TLC로 분리 확인되었지만 정량은 되지 않았다.

Experiment A는 돌연변이성 물질 (특히 HCAs)을 추출하기 위한 지금까지 보고된 다른 방법들과 직접 비교는 할 수는 없다. 그렇지만 Experiment A는 이들 방법들에 사용된 시료의 양 (0.5 kg 이상)이나 유기용매의 양 (10 liter 이상)에 비하여 적은 시료 (25 g의 고온가열된 시료)와 적은 유기용매 (약 650 ml)를 사용하여 Ames assay를 10회 정도 반복하는 데에 충분한 양인 약 5 mg 정도의 정제시료를 얻을 수 있었고, 유기용매에 의한 돌연변이성의 저해를 유발하지 않는 간단한 방법이어서 일반적으로 가정에서 조리하는 fish 중의 돌연변이성의 측정에 이용될 수 있을 것이다. 또한 이 방법은 다른 식품 중의 돌연변이성이나 항돌연변이성의 정도를 측정하는 데에도 역시 이용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 1992년도 과학재단 특정목적기초 연구비 (92-24-00-13)와 경상대학교 식물분자생물 우수연구센터 연구비 지원에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Adamson, R.H., U.P.Thorgeirsson, S.M.Sieber, E.G.Snyderwine, S.S. Thorgeirsson, J.Reeves, D.W.Dalgard, S. Takayama, and T. Sugimura, (1989): Studies of the carcinogenic potential 2-aminomethylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) in non-human primates, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **80**: 125-130.
2. Gross, G.A. and A.Gruter, (1992): Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food products, *J. Chromatogr.* **592**: 271-278.
3. Ichirotsubo, D.Y. and H.F.Mover, (1982): Mutagens in dried/salted Hawaiian fish, *J. Agric. Food Chem.* **30**: 937-939.
4. Ikeda, M., K.Yoshimoto, S.Kono, H.Kato, and M.Kuratsune, (1983): A cohort study on the possible association between broiled fish intake and cancer, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **74**: 640-650.
5. Ito, N., R.Hasegawa, M.Sano, S.Tamano, H.Esumi, T.Takayama, and T.Sugimura, (1991): A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)-imidazo[4,5-b]pyridine (PhiP), *Carcinogenesis* **12**: 1503-1506.
6. Kasai, H., Z.Yamaizumi, K.Wakabayashi, M.Nagao, T. Sugimura, S.Yokoyama, T.Miyazawa, N.E.Spingarn, J.H. Weisburger, and S.Nishimura, (1980): Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions, *Proc. Jpn. Acad.* **56B**: 278-285.
7. Kato, T., H.Ohgaki, H.Hasegawa, S.Sato, S.Takayama, and T.Sugimura, (1988): Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), *Carcinogenesis* **9**: 71-77.
8. Knize, M.J., J.S.Felton, and G.A.Gross, (1993): Chromatographic methods for the analysis of heterocyclic amine food mutagens/carcinogens, *J. Chromatogr.* **624**: 253-265.
9. Ohgaki, H., H.Hasegawa, M.Suenaga, S.Sato, S.Takayama, and T.Sugimura, (1987): Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, MeIQx from cooked food, *Carcinogenesis* **8**: 665-670.
10. Takayama, S., Y.Nakatsuru, M.Masuda, H.Ohgaki, S.Sato, and T.Sugimura, (1984): Demonstration of carcinogenicity in F344 rats of IQ from broiled sardine, fried beef and beef extract, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **75**: 467-472.
11. Kurosaka, R., H.Wakabayashi, H.Ushiyama, H.Nukaya, N. Arakawa, T.Sugimura, and M.Nagao, (1992): Detection of 2-amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)-imidazo[4,5-b]pyridine in broiled beef, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **83**: 912-922.
12. Kim, I.S., K.Wakabayashi, R.Kurosaka, Z.Yamaizumi, F. Jinno, S. Koyota, A.Teda, H.Nukaya, M.Takahashi, T. Sugimura, and M. Nagao, (1994): Isolation and identification of a new mutagen, 2-amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline (4-CH<sub>2</sub>OH-8-MeIQx) from beef extract, *Cancer* **15**: 21-26.
13. Maron, D.M., and B.N.Ames, (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mut. Res.* **113**: 173-178.
14. Nukaya, H., S.Koyota, F.Jinno, H.Ishida, K.Wakabayashi, R. Kurosaka, Kim, I.S., Z.Yamaizumi, H.Ushiyama, T. Sugimura, M. Nagao, and K.Tsuji, (1994): Structural determination of a new mutagenic heterocyclic amine, 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline (7,9-Di-MeI<sub>3</sub>IQx) present in beef extract, *Cancer* **15**: 1151-1154.



15. Peto, R.M., M.C. Pike, L. Bernstein, L.S. Gold, and B.M. Ames, (1984): The TD50: a proposed general convention for the numerical description of the carcinogenic potency of chemicals in chronic-exposure animal experiments, *Environ. Health Perspect.* **58**: 1-8.
16. Sugimura, T., M. Nagao, T. Kawachi, M. Honda, T. Yahagi, Y. Seino, S. Sato, N. Matsukura, T. Matsushima, A. Shirai, M. Sawamura, and H. Matsumoto, (1977a): Mutagen-carcinogens in foods with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods, *In Origins of Human Cancer* (H.H. Hiatt, and J.D. Watson, editors). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. p 1561-1577.
17. Sugimura, T., T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, and T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, Y. Iitaka, and I.A. Tai, (1977b): Mutagenic principles in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products, *Pro. Jpn. Acad.* **53**: 58-66.
18. Sugimura, T., (1985): Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process, *Mut. Res.* **150**: 33-41.
19. Sugimura, T., K. Awkabayashi, M. Nagao, and H. Ohgaki, (1989): Hetero-cyclic amines in cooked food. In *Food Toxicology: A Perspective on the Relative Risks* (S. Taylor, and R. Scanlan, editors). Marcel Dekker, Inc., New York. p31-55.
20. Sato, H. M. Takahashi, F. Furukawa, Y. Miyakawa, R. Hasegawa, K. Toyada, and Y. Hayashi, (1987): Initiating activity in a two-stage mouse skin model of nine mutagenic pyrolysate of amino acids, soybean globulin and proteinaceous food, *Carcinogenesis* **8**: 1231-1234.
21. Takahashi, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, M. Yamamoto, T. Masui, T. Goto, N. Kinai, I. Tomita, and T. Sugimura, (1985): Quantification of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and MeIQ in beef extracts by liquid chromatography with electro chemical detection (LCEC), *Carcinogenesis* **6**: 1195-1199.
22. Tsuda, H., M. Asamoto, T. Ogiso, T. Inoue, N. Ito, and M. Nagao, (1988): Dose-dependent induction of liver and thyroid neoplastic by short-term administration of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline combined with partial hepatectomy followed by phenobarbital or low dose 3-methyl-4-dimethyl-aminobenzene promotion, *Jpn. J. Cancer, Res. (Gann)* **79**: 691-697.
23. Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi, and T. Sugimura, (1992): Food-derived mutagens and carcinogens, *Cancer Res. (Suppl)* **52**: 2092s-2098s.
24. Yamamoto, T., K. Tsuji, T. Kosuge, T. Okamoto, K. Shudo, K. Takeda, Y. Iitaka, K. Yamaguchi, Y. Seino, T. Yahagi, M. Nagao, and T. Sugimura, (1978): Isolation and structure determination of mutagenic substances in L-glutamic acid pyrolysate, *Proc. Jpn. Acad.* **54**: 248-250.
25. Zhang X.M., K. Wakabayashi, Z.C. Liu, T. Sugimura, and M. Nagao, (1988): Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines in Chinese cooked foods, *Mut. Res.* **201**: 181-188.