

결명자의 아질산염 소거작용

도정룡* · 김선봉 · 박영호 · 박영범 · 최재수** · 김동수*

부산수산대학교 식품공학과, *한국식품개발연구원
**부산수산대학교 식품영양학과

The Nitro-scavenging Effects by the Component of Cassiae Torae Semen

Jeong-Ryong Do*, Seon-Bong Kim, Yeung-Ho Park, Yeung-Beom Park,
Jae-Sue Choi** and Dong-Soo Kim*

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan

*Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-Dong, Bundang-Ku, Sungnam, Kyeonggi-do, 463-420, Korea

**Department of Nutrition and Food Science, National Fisheries University of Pusan

Abstract

The present study was conducted to investigate nitrite-scavenging ability of the components of Cassiae torae semen, *Cassia tora* L. The nitrite-scavenging effects of fractions obtained from methanol extract of Cassiae torae semen, *Cassia tora* L. were strong in ethyl acetate fraction, chloroform fraction, water soluble fraction and ethyl ether fraction in order. Compound D showed the strongest nitrite-scavenging effects among compound A, B, C, D separated from Cassiae torae semen. Compound D separated from Cassiae torae semen possessed ten-fold stronger the nitrite-scavenging effect than ascorbic acid.

Key words: nitrite-scavenging ability, Cassiae torae semen, methanol extract

서 론

식품의 가공 및 저장에 널리 이용되고 있는 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내어 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액중의 헤모글로빈이 산화되어 메트헤모글로빈을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 또한 단백질성 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2급 및 3급아민 등의 아민류와 반응하여 니트로사민을 생성하는 것으로 보고되고 있는데⁽²⁾, 이들 니트로사민은 동물실험결과 대부분이 발암성을 나타내는 물질로 밝혀짐으로써 주목을 끌게 되었다.

그리고 니트로사민의 전구물질인 아질산염과 아민이 식품내의 상재 성분으로 널리 존재하고 있으므로 이들을 함유하고 있는 음식을 동시에 섭취했을 때, 뱃내에서 니트로사민이 생성될 가능성이 매우 높다. 이와 관련하여 니트로사민의 생성을 억제하기 위하여 많은 연구가 진행되었는데, ascorbic acid의 니트로사민 생성억제능이 최초로 밝혀진 이래, 여러 연구자들에 의하여 ascorbic acid의 니트로사민의 생성 억제능이 보고되었다⁽³⁻⁵⁾. 또한, 식품성분 상호간의 반응 생성물인 melanoidin도 니트로사민 생성 억제효과가 있는 것으로 알려졌으며⁽⁶⁾,

醬油를 사용한 니트로사민 생성억제 효과는 주로 아미노산의 아질산염 소거작용에 기인된다고 밝히고 있다⁽⁷⁾. 페놀화합물의 니트로소화 반응에 미치는 영향에 대하여 phenol, guaiacol, 그리고 resorcinol은 니트로소화반응을 강력하게 억제한다고 밝혀져 있다⁽⁸⁾. 그리고, 천연물에 의한 아질산염 소거작용에 대한 연구로는 해조 추출물⁽⁹⁾ 및 야채 추출물⁽¹⁰⁾에 관한 보고가 있으며, Normington 등⁽¹¹⁾은 중국오얏에서 분리한 3-hydroxy-2-pyranone이 아질산염을 분해함으로써 니트로소화반응을 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서는 기호음료 소재로 이용되고 있는 결명자를 대상으로 여러가지 획분으로 분획하여 아질산염 소거작용을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 결명자는 부산에 소재한 대연시장에서 구입하였으며, 실험에 주로 사용한 시약은 NaNO₂ (Shinyo pure Chemicals Co.), sulfanilic acid(Hayashi pure Chemical Industries), 1-naphtylamine(Merck)을 사용하였다.

실험방법

유기용제 추출에 의한 분획: 결명자의 메탄올 가용성

Corresponding author: Jeong-Ryong Do, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekyun-Dong, Bundang-Ku, Sungnam, Kyeonggi-do 463-420, Korea

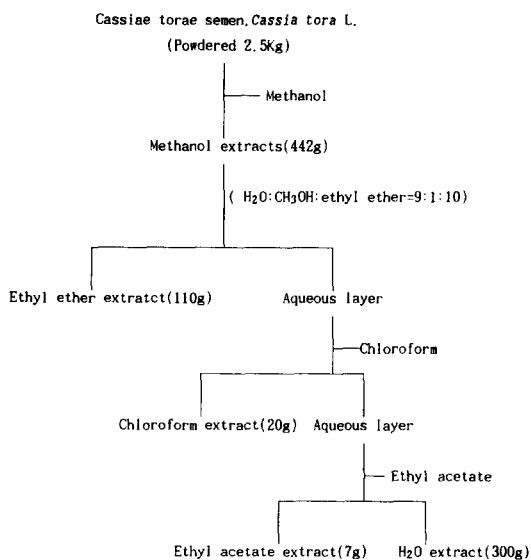


Fig. 1. Fractionation of soluble components of Cassiae torae semen, *Cassia tora* L. by various solvents

획분의 추출과 분획방법은 Fig. 1에 나타내었다. 즉, 분말화한 결명자 2.5 kg에 메탄올 10 l씩 넣어 2회 추출한 후 감압농축하여 메탄올 추출물을 얻었으며, Fig. 1에 나타낸 방법으로 에칠 에테르, 클로로포름, 에칠아세테이트 및 수용성 획분을 얻었다.

Silica gel column chromatography : 결명자의 메탄올을 가용성 획분으로부터 분획한 ethyl ether 획분, chloroform 획분 및 ethyl acetate 획분을 chloroform에 평형화시킨 silica gel column(2.7×52 cm)으로 분획하였다. 전개용매로는 chloroform : methanol의 비율을 10 : 0으로부터 9 : 1, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 4 : 6, 3 : 7, 2 : 8, 1 : 9 및 0 : 10의 비율이 되도록 하여 용출시키고 일정량씩 시험관에 분취한 후 박층 크로마토그래피를 행하였다.

Thin layer chromatography(TLC) : 결명자의 성분을 분리시키기 위하여 박층 크로마토그래피를 행하였다. 즉, 시료를 소정의 농도가 되게 메탄올에 녹인 후 silica gel plate(silica gel 60F₂₅₄ precoated 2×10 cm, layer thickness 0.22 mm)에 spot하였다. 그리고, 미리 각각의 전개용매(chloroform : methanol : acetic=40 : 5 : 5, v/v, chloroform : methanol : water=80 : 20 : 1, v/v 및 40 : 20 : 4 v/v)로 포화시킨 전개조에 spot한 TLC판을 넣고 전개시켰다. 약 9 cm까지 전개시킨 후 TLC판을 전개소에서 꺼내고 전개용매를 완전히 증발시켰다. 그리고 UV 램프로 발색부위를 확인하고 60% 황산용액과 질산은 용액을 분무하여 약 120°C 에서 10~20분간 가열하여 발색시켰다.

아질산염 소거작용 : 시료의 아질산염 소거작용은 김등⁹⁾의 방법에 따랐다. 즉 1 mM NaNO₂용액 1 ml에 소

Table 1. Nitrite-scavenging effects of each solvent extract obtained from methanol soluble fraction of Cassiae torae semen, *Cassia tora* L.

Solvent extract	Nitrite-scavenging ratio,%
Methanol extract	32.0
Ethyl ether extract	10.0
Chloroform extract	57.5
Ethyl acetate extract	95.3
Water extract	33.5

*Nitrite was incubated with each extracts (2 mg) at 37°C for 1 hr under pH 1.2

정농도의 시료를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.2 M 구연산완충액(pH 3.0, 4.2 그리고 6.0)을 사용하여, 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 조정하여 반응용액의 부피를 10 ml로 하였다. 이렇게 한 다음 37°C 에서 1시간 동안 반응시켜서 얻은 반응용액을 각각 1 ml씩 취하고 여기에 2% 초산 용액 5 ml를 첨가한 다음, Griess 시약(30% Acetic acid로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1 : 1비로 혼합한 것, 사용직전 조제) 0.4 ml를 가하여 잘 혼합시킨 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계(Shimadzu-140-20)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 구하였다. 공시험은 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 ml 가하여 상기와 동일하게 행하였다.

$$N(\%) = \left(1 - \frac{A-C}{B}\right) \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1 mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 방치시킨 후의 흡광도

B : NaNO₂ 용액의 흡광도

C : 시료자체의 흡광도

결과 및 고찰

결명자의 아질산염 소거인자를 검색하기 위하여 메탄올 추출물을 구하고 이것의 ethyl ether, chloroform, ethyl acetate 및 수용성 획분의 아질산염 소거작용을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 아질산염 소거율은 ethyl acetate 획분>chloroform 획분>ethyl ether 획분의 순으로 나타났다. 여기서 주목할 사실은 ethyl acetate 획분은 95.3%의 소거율을 나타내어 강력한 아질산염 소거인자가 존재하는 것으로 나타났다. 그리고 각 ethyl ether, chloroform, ethyl acetate 획분을 silica gel column chromatography함으로써 TLC상에서 동일한 Rf치를 나타내는 성분을 분리하였다. Ethyl ether 획분에서 compound A, compound B를 분리하였으며, chloroform 획분에서 compound C, ethyl acetate 획분에서 compound D 성분을 분리하여 이들의 아질산염 소거작

Table 2. Nitrite-scavenging effects of the compounds fractionated from *Cassiae torae* semen, *Cassia tora* L.

Compounds	Nitrite-scavenging ratio, %
Compound A	6.6
Compound B	5.9
Compound C	19.2
Compound D	94.4

*Nitrite was incubated with each extracts (1 mg) at 37°C for 1 hr under pH 1.2

Table 3. The comparison of nitrite-scavenging effects between compound D fractionated from *Cassiae torae* semen, *Cassia tora* L. and ascorbic acid

Concentration (µg)	Nitrite-scavenging ratio, %	
	Ascorbic acid	Compound D
50	3.5	30.9
100	5.1	67.6
200	9.1	91.4
300	11.4	92.5
400	14.4	94.5

*Nitrite was incubated compound D and ascorbic acid at 37°C for 1 hr under pH 1.2

용을 알아본 결과 Table 2에 나타나 있는 바와 같이 아질산염 소거율은 compound D > compound C > compound A > compound B의 순으로 나타났다. 아질산염 소거율이 가장 높은 compound D만을 사용하여 농도별로 아질산염 소거작용을 조사해 본 결과 Table 3에 나타나 있는 바와 같이, 100 µg 첨가에서도 67.6%의 아질산염 소거율을 나타내어 강력한 아질산염 소거작용이 있음을 알 수 있다. 그리고, 천연물 중에서 아질산염을 소거하는 성분을 찾고자 하는 연구가 계속되고 있는데, 해조 추출물과 약재 추출물은 그들의 환원력에 의하여 아질산염을 분해한다고 보고하고 있으며^(9,10), Normington 등⁽¹¹⁾은 오약에서 아질산염 소거인자인 3-hydroxy-2-pyranone을 분리하였다.

Fox와 Ackerman⁽¹²⁾은 ascorbic acid, cysteine, hydroquinone 및 nicotinamide adenine dinucleotide와 같은 환원성 물질을 아질산염과 산성조건하에서 반응시키면 아질산염의 일부는 이들 물질에 의해 nitric oxide(NO)로 전환된다고 보고하고 있으며, 이때의 반응속도는 아질산염 농도에 관해서는 1차, 환원성 물질에 의해서는 0.5차, 수소이온 농도에 관해서는 1.5차에 각각 비례하여 진행된다고 밝히고 있다.

그리고 지금까지 알려진 천연성분 가운데 아질산염 소거작용이 뛰어난 것으로 밝혀져 있는 ascorbic acid와 본 실험에서 분리한 compound D와의 아질산염 소거작용을 비교하여 Table 3에 나타내었다. 이 결과를 보면 ascorbic acid는 첨가량을 높여도 소거율은 매우 완만하게 증가하지만 compound D는 첨가량을 높일 때 소거

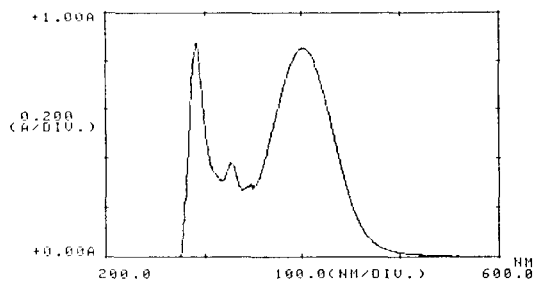


Fig. 2. Absorption spectrum of compound D isolated from *Cassiae torae* semen, *Cassia tora* L. (in CH₃OH)

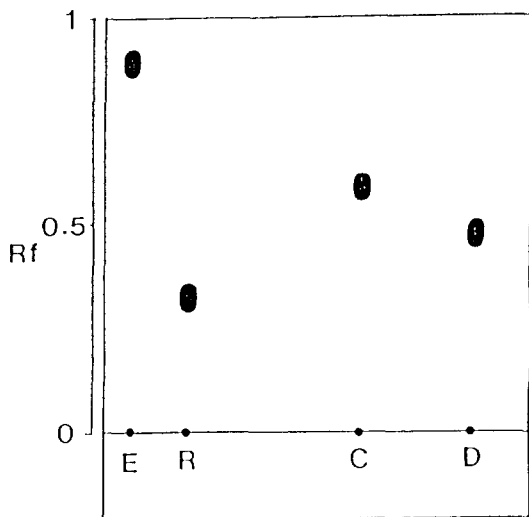


Fig. 3. Thin layer chromatogram on silica gel of compounds isolated from *Cassiae torae* semen, *Cassia tora* L. C; compound C, D: compound D, E: emodin, R: rhein, Developing solvent; CHCl₃-CH₃OH-H₂O(80:20:1, v/v, %). Black spots are positive for UV and H₂SO₄.

율이 급격히 증가하여 200 µg을 첨가하였을 때 ascorbic acid의 경우는 9.1%, compound D의 경우에는 91.4%로 compound D의 아질산염 소거작용이 10배나 강력한 것으로 나타났다.

결명자에서 메탄올 가용성 성분에서 분리한 compound D의 양은 219 mg이었으며, compound D는 황색분말이며, methanol, chloroform, ethyl acetate에서는 소량 녹으며, 물과 acetone에는 불용성이었다. 알칼리 용액에서는 용해하여 짙은 녹색으로 변색하였다. Compound D는 291 nm, 327 nm, 402 nm에서 최대 흡광파장을 나타내었다(Fig. 2).

결명자 중에는 약효성분으로 anthraquinone류인 emodin과 rhein이 각각 1% 이내로 함유되어 있는데⁽¹³⁾ compound C와 D의 용해성과 알칼리용액에서의 변색경향이 유사하여 TLC한 결과 emodin과 rhein의 Rf값은 각각

0.891, 0.318이었으며 compound C와 D의 Rf값은 각각 0.582 및 0.468로 나타나(Fig. 3) emodin 및 rhein과는 다른 성분으로 천연물의 견지에서 확인을 위한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

전통기호음료성분에 의하여 나타나는 기능특성을 조사하기 위한 연구의 일환으로 결명자의 메탄올 추출물을 유기용매에 의한 분획, silica gel column chromatography, thin layer chromatography에 의하여 여러가지 획분으로 분획하여 아질산염 소거작용을 조사한 결과, 아질산염 소거율은 ethyl acetate 획분>chloroform 획분>수용성 획분>ethyl ether 획분의 순으로 나타났으며, ethyl acetate 획분에서 분리한 compound D의 아질산염 소거효과는 매우 강력하여 ascorbic acid보다 10배 뛰어났다.

문 헌

1. Peter, F.S.: The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1761(1975)
2. Crosby, N.T. and Sawyer, R.: N-nitrosamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. "Advances in food research" (C.O. Chichstered.), Academic press, 21, 1(1976)
3. Mirvish, S.S.: Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 633(1970)
4. Arche, M.C. and Weisman, M.: Reaction of nitrite with ascorbate and its relation to nitrosamine formation.

- J. Nat. Cancer Inst.*, **54**(5), 1203(1975)
5. 河端俊治, 赤築秀憲, 石橋 亨: N-니트로소지메틸아민生成에對する L-아스코르빈酸의添加效果. *日本誌*, **40**(12), 1251(1974)
6. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibitory of nitrosamine of formation by non-dialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(5), 1333 (1987)
7. 長堀隆, 田非, 奥原章: 醬油中の N-니트로소아민生成抑制物質. *營養と食糧*, **33**(3), 151(1980)
8. Cooney, R.V. and Ross, P.D.: N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution: Effects of vanillin and related phenols. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 789(1987)
9. 김선봉, 안방원, 염동민, 이동호, 박영호, 김동수: 천연식품성분에 의한 발암성 니트로사민생성인자 분해작용, 2. 해조추출물의 아질산염 분해작용. *한국수산학회지*, **20**(5), 469(1987)
10. 김동수, 안방원, 염동민, 이동호, 김선봉, 박영호: 천연식품성분에 의한 발암성 니트로사민생성인자 분해작용, 1. 야채추출물의 아질산염 분해작용. *한국수산학회지*, **20**(5), 463(1987)
11. Norminton, K.W., Baker, I., Molina, M., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. and Paju, S.: Characterization of a nitrite scavenger 3-hydroxy-2-pyranone, from chinese wild plum juice. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 215 (1986)
12. Fox, J.B. and Ackerman, S.A.: Formation of nitric oxide myoglobin: mechanisms of the reaction with various reductants. *J. Food Sci.*, **33**, 364(1968)
13. 김중만, 김형태, 황신목: 결명자로부터 인스턴트차 제조. *한국식품과학회지*, **22**(3), 241(1990)

(1993년 8월 6일 접수)