

## 결명자 추출물의 아질산염 소거인자의 특성

박영범 · 이태기 · 김외경 · 도정룡\* · 여생규\*\* · 박영호 · 김선봉

부산수산대학교 식품공학과, \*한국식품개발연구원,

\*\*부산전문대학 식품가공과

### Characteristics of Nitrite Scavenger Derived from Seeds of *Cassia tora* L.

Yeung-Beom Park, Tae-Gee Lee, Oi-Kyung Kim, Jeong-Ryong Do\*, Saeng-Gyu Yeo,  
Yeung-Ho Park and Seon-Bong Kim

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

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

\*\*Department of Food Processing, Pusan Junior College, Pusan 616-737, Korea

#### Abstract

The present study was conducted to elucidate nitrite scavenger derived from seeds of *Cassia tora* L. Methanolic extract of *Cassia tora* L was refractionated into ethyl ether, chloroform, ethyl acetate and water fraction, and nitrite scavenging abilities of these fractions were investigated. Among these fractions, ethyl acetate fraction had the strongest nitrite scavenging ability(97%/2 mg). Therefore, to further investigate nitrite scavenger, ethyl acetate fraction was fractionated by silica gel column chromatography with a chloroform-methanol(10:0~0:10) and then compound A and B were isolated. Compound A had a stronger nitrite-scavenging effect than compound B. Therefore the further separation of compound A was carried out by HPLC(32% acetonitrile, 1 ml/min) using  $\mu$ Bondapak C18 column(3.9  $\times$  300 mm) and finally compound A-1 was obtained from compound A. Compound A-1 had by far nitrite-scavenging ability as compared with that of ascorbic acid. Compound A-1 was identified as nor-rubrofusarin-6- $\beta$ -mono-D-glucoside from the profiles of UV, IR and <sup>1</sup>H-NMR.

Key words: nitrite scavenger, *Cassia tora* L., nor-rubrofusarin-6- $\beta$ -mono-D-glucoside

#### 서 론

육제품이나 수산가공품 등에 발색제로 첨가되는 질산염이나 아질산염은 육의 발색 및 육색의 안정화 뿐만 아니라<sup>(1)</sup> *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용<sup>(2)</sup>, 육의 보수성 및 결착성 등<sup>(3)</sup>을 개선하는데에 중요한 역할을 한다고 한다. 이러한 질산염류는 자연계에도 널리 분포하는데, 이를테면 채소류<sup>(4)</sup>, 음료수 등<sup>(5)</sup>에 상당량 함유되어 있다. 이들 질산염은 소화기관내에서, 또는 식품의 저장중에 질산 환원효소나 질산염 환원세균에 의하여 아질산염으로 환원되며<sup>(6,8)</sup> 이 질산염은 2급 및 3급의 아민류와 반응하여 나트로사민을 생성하는 것으로 알려져 있다<sup>(9,10)</sup>. 또 이들 나트로사민의 일부는 체내에서 diazoalkane(CnH2nN2)으로 전환되어 핵산이나 단백질 또는 세포내 성분을 alkyl화 함으로써 암을 유발한다고 알려져 있다<sup>(11,12)</sup>. Yamazaki 등<sup>(13)</sup>은 N-nitrosodimethylamine은

로부터 diazonium ion의 생성과정에 있어서 N-nitrosodimethylamine은 cytochrome P450의 isozyme인 cytochrome P450 2E1에 의해 활성화 되며 또한 acetyl transferase는 diazonium ion의 생성을 촉진시킨다고 보고하였다.

이와같이 나트로사민은 식품성분의 상호반응으로 식품자체내에서 생성될 수 있을 뿐만 아니라, 나트로소화 반응이 인체내 위의 pH와 유사한 범위에서 최적조건을 가지기 때문에 많은 관심이 모아지고 있다. 이러한 나트로사민의 생성을 억제하기 위한 연구로는 ascorbic acid<sup>(14,15)</sup> 및 Maillard 반응 생성물<sup>(16)</sup>에 의한 억제작용이 보고되어 있으며, 저자 등도 melanoidin<sup>(17,18)</sup>, 야채추출물<sup>(19)</sup> 및 해조추출물<sup>(20)</sup>과 같은 천연물에 의한 아질산염 소거작용을 보고한 바 있다. 따라서 본 실험에서는 음료수로 널리 이용되고 있는 결명자를 용매추출하여 나트로사민의 전구물질인 아질산염 소거작용과 아질산염 소거인자의 해석을 시도하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료

본 실험에 사용한 결명자(*Cassia tora* L.)는 94년 4월경

Corresponding author: Seon-Bong Kim, Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Daeyeon-dong, Nam-gu, Pusan 608-737, Korea

부산 대연시장에서 구입하였다. 압착분쇄한 결명자에 메탄올을 가해 24시간, 실온에서 추출하는 조작을 2회 반복한 후, 혼합액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 용매를 완전히 제거한 것을 메탄올 추출물로 하였으며 이를 실험에 사용하였다.

**메탄올 추출물의 분획**

메탄올로 추출하여 얻은 농축물에 ethyl ether 및 물을 가해 ethyl ether fraction을 분획하였으며 나머지 부분에 다시 순차적으로 chloroform, ethyl acetate를 가해 chloroform, ethyl acetate 및 물순으로 각각의 분획물을 얻었다.

**아질산염 소거작용**

결명자 추출물 각 획분의 아질산염 소거작용은 김 등<sup>(18)</sup>의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 1 mM NaNO<sub>2</sub>용액 1 ml에 소정농도의 시료를 첨가하고 여기에 0.1N HCl(pH 1.2)과 0.1M 구연산 완충용액(pH 3.0, 4.2 및 pH 6.0)을 사용하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 조정후, 반응용액의 부피를 10 ml로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 얻은 반응액을 1 ml씩 취하고 여기에 2% 초산용액 5 ml를 첨가한 다음, Griess시약 0.5 ml를 가하여 혼합시켜 실온에서 15분간 방치시킨 후, 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 백분율(%)로써 나타내었다. 공시험은 Griess시약 대신 증류수 0.4 ml를 가하여 상기와 같은 방법으로 행하였다.

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

S: 아질산염 소거율

A: 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액의 흡광도

C: 시료 추출물의 흡광도

**활성획분의 분리 및 정제**

추출물의 분획과정에서 얻은 ethyl acetate획분을 chloroform으로 평형화 시킨 silica gel column(2.7×52 cm)에 주입하고 chloroform과 methanol의 농도를 10 : 0부터 0 : 10까지 변화시키면서 일정량씩 분취하였다. 용출하여 얻은 분획물은 단일성분의 분리정도를 확인하기 위하여 박층크로마토그래피(TLC)를 행하였다. 이때 TLC의 전개용매로는 chloroform, 메탄올 및 물의 조성비를 80 : 20 : 1로 하여 silica gel plate(Merck)를 전개하여 단일성분의 분리정도를 확인하였다.

TLC를 행하여 얻은 획분은 HPLC를 이용하여 활성획분을 분리, 정제하였다. 이때 HPLC의 분석조건으로, column은 μBondapak C18 column(3.9×300 mm)을 사용하였고, 이동상은 30% acetonitrile, UV: 254 nm, flow

rate: 1 ml/min였다.

**Compound A-1의 기기분석**

HPLC에 의해 얻은 compound A-1의 IR(Shimadzu Model 435), <sup>1</sup>H-NMR(Bruker AC 250), UV(Shimadzu UV-200)분석은 다음과 같다.

IR(KBr)cm<sup>-1</sup>: 3400, 2800, 1675, 1580, 1410, 980~1120 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2.38(3H, s, aromatic Me), 3.26-5.10(7H, β-glucosyl moiety), 6.16(1H, s, H-3), 6.68(1H, d, J=2.1 Hz, H-7), 6.72(1H, d, J=2.1 Hz, H-9), 7.07(1H, s, H-10), 8.31(1H, s, OH), 10.3(1H, s, OH). UV(MeOH)nm: 400, 326, 277, 252, 222, 202.

**결과 및 고찰**

**pH에 따른 아질산염 소거작용**

결명자의 메탄올 추출물로 부터 순차 용매분획한 각 분획물의 pH별 아질산염 소거작용을 Fig. 1에 나타내었다.

pH변화에 따른 각 용매 분획물의 아질산염 소거작용은 거의 비슷한 경향을 나타내어 인체의 위내의 pH와 유사한 pH 1.2 및 pH 3.0에서 아질산염 소거작용이 높았으나 pH 4.2와 pH 6.0에서는 매우 낮은 것으로 나타나 결명자 추출물의 아질산염 소거작용은 pH의존성이 매우 큰 것으로 나타났다.

Fox와 Ackerman<sup>(21)</sup>은 ascorbic acid, cysteine, nicotinamide adenine dinucleotide와 같은 환원성 물질을 산성조건하에서 반응시키면 아질산염은 이들 환원성 물질에 의해 nitric oxide로 전환된다고 보고하고 있으며 이때의 반응속도는 아질산염 농도에 대해서는 1차, 환원성 물질에서는 0.5차, 수소이온농도에 대해서는 1.5차에 비례하여 진행된다고 밝히고 있다. 한편 ethyl acetate획분은 각 pH영역에서는 다른 용매분획물보다 아질산염 소거작용이 뛰어나 pH 1.2에서 45%, pH 3.0에서 42%의 아질산염 소거작용을 나타내었으나 pH 4.2에서 급격히 감소하여 pH 6.0에서는 아질산염 소거작용이 전혀 나타나지 않았다.

**활성획분의 분리 및 분획획분의 아질산염 소거작용**

앞의 결과에서 아질산염 소거작용이 가장 뛰어난 ethyl acetate획분의 아질산염 소거인자를 보다 구체적으로 살펴보기 위하여 ethyl acetate획분을 chloroform과 메탄올의 농도비율을 달리하면서 silica gel column chromatography로 용출분획하고 TLC를 통하여 분획획분의 분리정도를 확인하였다. 이때 분획물의 R<sub>f</sub>값이 0.53인 것을 compound A, 0.64인 것을 compound B라 명명하고 이들 획분의 아질산염 소거작용을 Table 1에 나타내었다.

Compound A는 pH 1.2와 3.0에서 각각 44.5와 38.2%의

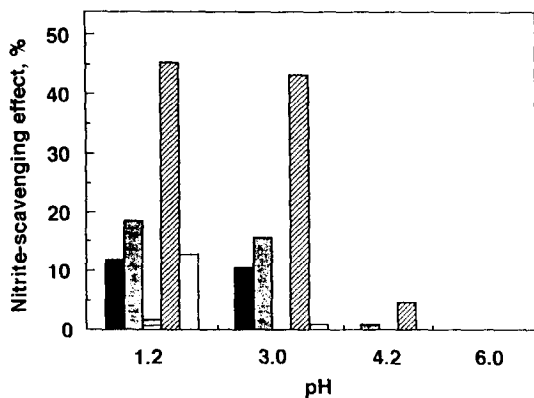


Fig. 1. Nitrite-scavenging effect of solvent fractions obtained from methanol extract of *Cassia tora* L. seed. Nitrite was incubated with 1 mg of each fraction at 37°C for 1 hour under different pH

■; Methanol extract, ▨; Chloroform fraction, ▤; Ethyl ether fraction, ▩; Ethyl acetate fraction, □; Water fraction

Table 1. Nitrite-scavenging effect of the compound A and B fractionated from ethyl acetate fraction

	Nitrite-scavenging <sup>1)</sup> , %			
	pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	pH 6.0
Cpd. A	44.5	38.2	—	—
Cpd. B	2.7	—	—	—

<sup>1)</sup>Nitrite scavenging effect was determined with 200 µg of each compound.

아질산염 소거작용을 나타내었으나 pH 4.2와 6.0에서는 아질산염 소거작용이 없는 것으로 나타났다. Compound B는 전 pH범위에서 아질산염 소거작용이 없는 것으로 나타났다.

따라서 column chromatography로 부터 분획한 compound A를 사용하여 HPLC를 통한 활성물질의 분리를 시도하였다. 이때의 HPLC chromatogram은 Fig. 2과 같으며 compound A-1의 농도에 따른 아질산염 소거작용을 아질산염 소거작용이 뛰어난 것으로 알려진 ascorbic acid와 비교하여 Table 2에 나타내었다.

그 결과 아질산염 소거작용을 위내의 pH와 유사한 pH 1.2에서 서로 비교했을 때, compound A-1은 농도증가에 따른 아질산염 소거작용이 급격히 증가하여 200 µg 첨가시 54.5%의 아질산염 소거능을 나타낸 반면, ascorbic acid의 경우는 5.4%의 아질산염 소거작용을 나타내어 compound A-1은 ascorbic acid에 비해 아질산염 소거작용이 월등히 우수한 것으로 나타났다.

반응시간에 따른 아질산염의 소거효과 또한 시간경과에 따른 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 아질산염은 낮은 pH에서 protonate form인 nitrous acid(pKa=3.4)로

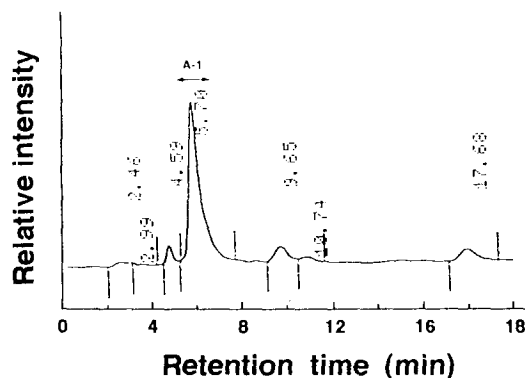


Fig. 2. HPLC chromatogram of compound A obtained by silica gel column chromatography Compound A was charged into a µBondapak C18 column(3.9×300 mm). Elution was done with 32% acetonitrile at a flow rate of 1 ml/min. The purified fractions was indicated by bar A-1

Table 2. Nitrite-scavenging effect of the compound A-1 and ascorbic acid

Concentration(µg)	Nitrite-scavenging, %	
	Compound A-1	Ascorbic acid
40	4.3	—
100	25.0	2.2
200	54.4(53.5, 52.5, 52.8) <sup>1)</sup>	5.4
300	74.4	8.5
400	95.7	10.7

Nitrite was incubated in compound A-1 or ascorbic acid at 37°C for 1 hr at pH 1.2.

<sup>1)</sup>Values in parenthesis means results incubated for 2 hr, 3 hr and 4 hr, respectively.

되어 있어, 2급, 3급 아민과 반응하여 니트로사민이 용이하게 생성되므로 본 실험에서와 같이 강산성 조건하에서 compound A-1의 아질산염 소거작용이 아질산염 소거제로 널리 알려져 있는 ascorbic acid보다 월등한 효과를 나타내는 것으로 미루어 생체내 특히 위내에서 발암성 니트로사민의 생성억제에 크게 기여할 것으로 생각된다.

#### Compound A-1의 구조해석

Compound A-1의 UV, IR 및 <sup>1</sup>H-NMR의 spectra를 Fig. 3, 4 및 5에 각각 나타내었다. 그 결과 compound A-1은 400, 326, 277, 252, 222, 202 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었다. Compound A-1은 3400과 980~1120 cm<sup>-1</sup>에서의 강한 적외선 흡수와 δ 3.26~5.10영역에서 proton signal을 나타내어 glycoside라는 것을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 C<sub>2</sub>의 methyl group(δ 2.38), C<sub>5,8</sub>의 두개의 hydroxyl proton(δ 8.31, 10.3), C<sub>3,7,9,10</sub>의

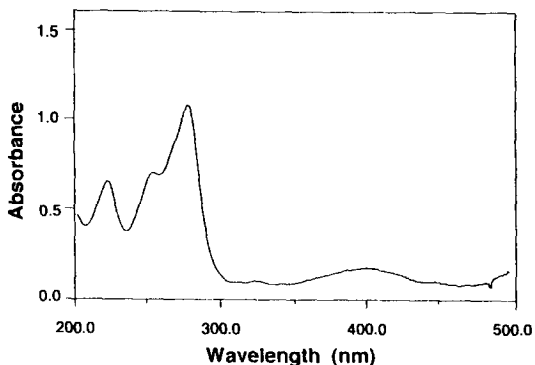


Fig. 3. UV spectrum of compound A-1

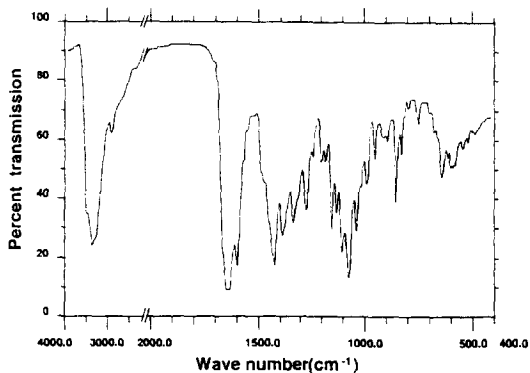


Fig. 4. Infrared spectrum of Compound A-1

aromatic proton( $\delta$  6.16, 6.68, 6.72, 7.07)이 관찰되어 compound A-1의 화학구조는 nor-rubrofusarin-6- $\beta$ -mono-D-glucoside로 동정되었다.

Cooney와 Ross<sup>(22)</sup>은 phenol 화합물이 니트로소화 반응에 미치는 영향에 관해서 조사하여 phenol, guaiacol 그리고 resorcinol은 니트로소화 반응을 촉진시켰으나 hydroquinone과 catechol은 니트로소화 반응을 강력히 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 아질산염 소거작용에는 3-hydroxy-2-pyranone같은 phenol화합물<sup>(23)</sup>이 아질산염 소거효과를 나타내며, 유기산, 당질 등과 같은  $\gamma$ -pyrone구조 즉, hydroxyl기와 carbonyl기가 근접해 있는 구조를 가진 물질들은 니트로소화 반응을 억제한다고 보고하였다<sup>(24)</sup>. 본 실험에서도 아질산염 소거효과가 높은 compound A-1은 nor-rubrofusarin-6- $\beta$ -mono-D-glucoside중에  $\gamma$ -pyrone구조를 가지는 부위가 아질산염 소거작용에 관여하는 것으로 생각된다.

### 요 약

결명자 추출물을 이용하여 발암성 니트로사민의 직접적인 생성인자인 아질산염 소거작용과 그 소거인자의

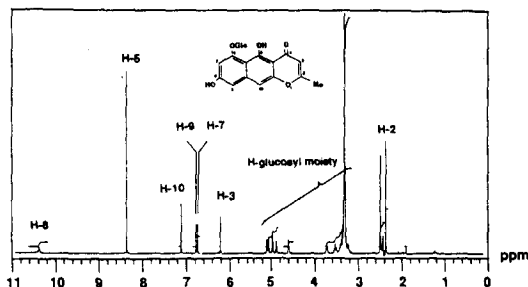


Fig. 5. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound A-1

분리 및 동정을 시도하였다.

결명자의 메탄올 추출물을 chloroform, ethyl ether, ethyl acetate, 물분획 순으로 순차용매 분리한 결과 ethyl acetate획분이 가장 우수한 것으로 나타났다. Ethyl acetate획분을 silica gel column chromatography하여 얻은 compound A와 B획분 중에서 compound A는 pH 1.2에서 44.5%/200  $\mu$ g의 아질산염 소거능을, compound B는 극히 낮은 아질산염 소거능을 나타내었다. HPLC를 이용하여 compound A획분으로 부터 compound A-1획분을 분리하고 아질산염 소거효과를 ascorbic acid와 비교하였을 때 compound A-1은 ascorbic acid에 비해 월등한 소거효과를 나타내었으며, UV, IR 및 <sup>1</sup>H-NMR의 결과로부터 그 구조는 nor-rubrofusarin-6- $\beta$ -mono-D-glucoside으로 추정하였다.

### 문 헌

1. Fox, J.B.: The chemistry of meat pigments. *J. Agric. Food Chem.*, 14, 207 (1967)
2. Pivnick, H., Rubin, L. J., Barnett, H.W., Nordin, H.R., Ferguson, P.A. and Perrin, H.: Effect of sodium nitrite and temperature on toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in perishable cooked meats vacuum-packed in air-impermeable plastic pouches. *Food Technol.*, 21, 100 (1967)
3. 박영호, 장동석, 김선봉: 수산가공이용학, 형설출판사, p. 580 (1994)
4. 박건영, 최홍식: 김치와 니트로소아민. *한국영양식량학회지*, 21, 109 (1992)
5. Tannenbaum, S.R., Sinskey, A.J. and Weisman, M.: Nitrite in human saliva: Its possible relation to nitrosamine formation. *J. Nat. Cancer Inst.*, 53, 79 (1974)
6. Leonard, B.: Nitrogen metabolism in plants. Arnold, E.(ed), 1st ed. p.19 (1976)
7. Hayashi, N. and Watanabe, K.: Fate of nitrate and nitrite in saliva and blood of monkey administered orally sodium nitrate solution and microflora of oral cavity of the monkey. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 19, 392 (1978)
8. Takagi, S. and Nakao, Y.: Effect of nitrate during curing. *J. Japan Soc. Food Sci. & Tech.*, 18, 1 (1971)
9. Crosby, N.T. and Sawyer, R.: N-nitrosamines: A re-

- view of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. In *Advances in Food Research* (C.O. Chichstered.), Academic Press, 21, 1 (1976)
10. Fiddler, W., Pensabene, J.W., Kushnir, I. and Piotrowski, E.G.: Effect of frankfurter cure ingredients on N-nitrosodimethylamine formation in a model system. *J. Food Sci.*, **38**, 714 (1973)
  11. Dutton, A. and Health, D.F.: The detection of metabolic products from dimethyl nitrosamine in rats and mice. *Biochem. J.*, **70**, 619 (1958)
  12. Magee, P.N. and Hultin, J.: Toxic liver injury and carcinogenesis: Methylation of proteins of rat liver slice by dimethylnitrosamine *in vitro*. *Biochem. J.*, **83**, 108 (1962)
  13. Yamazaki, H., Oda, Y., Funae, Y., Imaoka, S., Inui, U., Guengerich, F.P. and Shimada, T.: Participation of rat liver cytochrome P4502E1 in the activation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine to products genotoxic in acetyltransferase-overexpressing *Salmonella typhimurium* strain(NM2009). *Carcinogenesis*, **13**(6), 979 (1992)
  14. Mirvish, S.S., Wallcare, L., Eagen, M. and Shubik, P.: Ascorbate-nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, **177**, 65 (1972)
  15. Kawabata, T., Shazuki, H. and Ishibashi, T.: Effect of ascorbic acid and on the formation of N-nitrosodimethylamine *in vitro*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **40**(12), 1251 (1974)
  16. Kato, H., Lee, I.E., Cheyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibitory of nitrosamine formation by non-dialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(5), 1333 (1987)
  17. 김선봉 : Maillard 반응생성물의 화학적 해석과 생물작용. *식품과학회지*, **19**, 25 (1986)
  18. 김선봉, 이동호, 염동민, 박진우, 도정룡, 박영호 : Glucose-아미노산계 Maillard반응생성물의 아질산염 소거작용. *한국식품과학회지*, **23**, 453 (1988)
  19. 김동수, 안방원, 염동민, 이동호, 김선봉, 박용호 : 천연식품성분에 의한 발암성 니트로사민생성인자 분해작용. 1. 야채추출물의 아질산염 분해 작용. *한국수산학회지*, **20**(5), 463 (1987)
  20. 김선봉, 안방원, 염동민, 이동호, 박영호, 김동수 : 천연식품성분에 의한 발암성 니트로사민생성인자 분해작용. 2. 해조추출물의 아질산염 분해작용. *한국수산학회지*, **20**(5), 469 (1987)
  21. 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)
  22. 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)
  23. Normington, K.W., Baker, I., Molina, M., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. and Puji, S.: Characterization of a nitrite scavenger, 3-Hydroxy-2-pyranone, from chinese wild plum juice. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 215 (1986)
  24. Theiler, R.F., Sato, K., Aspelund, T.G. and Miller, A.F.: Inhibition of N-nitrosamine formation in a cured ground pork belly model system. *J. Food Sci.*, **49**, 341 (1984)
- 
- (1994년 12월 8일 접수)