

페놀성 화합물의 아질산염 소거 및 전자공여 작용

강운한 · 박용곤 · 이기동
한국식품개발연구원

The Nitrite Scavenging and Electron Donating Ability of Phenolic Compounds

Yoon-Han Kang, Yong-Kon Park and Gee-Dong Lee
Korea Food Research Institute

Abstract

Phenolic compounds are known to inhibit the nitrosation or oxidation reaction. In the present work, the effects of phenolic compounds including phenolic acids and flavonoids on the nitrite-scavenging and electron donating ability were tested as scavenger of nitrite which is believed to participate in the formation of N-nitroso compounds and investigated as electron donor. The nitrite scavenging ability appeared in all the phenolic acids and showed the highest value at pH 1.2. Among the phenolic compounds, phenolic acids showed higher nitrite-scavenging action than some flavonoids. Furthermore, the nitrite scavenging action of phenolic compounds was pH dependent, highest at pH 1.2 and lowest at pH 6.0. The electron donating ability (EDA) by reduction of α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) among hydroxybenzoic acids was in the decreasing order of gallic acid, gentisic acid, syringic acid, protocatechuic acid, salicylic acid, vanillic acid, benzoic acid and p-hydroxybenzoic acid. EDA of hydroxycinnamic acids was in the decreasing order of hydrocaffeic acid, caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid and trans-cinnamic acid. EDA of flavonoids was in the decreasing order of (+)catechin, rutin, quercetin, naringin and hesperidin. Other phenolic compounds were significantly high in electron donating abilities.

Key words: phenolic compounds, flavonoids, nitrite-scavenging ability, electron donating ability

서 론

질산염은 시금치를 비롯한 채소류에 많이 포함되어 있으며, 아질산염은 육제품의 발색과 *Clostridium botulinum* 성장저해제로 각종 식품에 첨가되고 있다. 질산염은 식물체내, 소화기관 및 식품의 저장과정에서 질산환원효소, 환원제균 등의 작용에 의해 아질산염으로 환원된다. 질산염이 많이 함유된 식품을 다량 섭취하게 되면 methemoglobin증 등 중독증상과 아질산염과 제2급 및 3급아민과의 nitroso화 반응은 위장내의 낮은 산성조건에서 쉽게 일어나서 발암물질인 nitrosamine을 생성⁽¹⁾할 수 있다. Ascorbate와 같은 환원 물질이 아질산염과 반응하게 되면 nitrosamine의 생성을 저해할 수 있다는 보고⁽²⁾가 있으며, Gray 등⁽³⁾은 모델계를 만들어 phenolic 화합물인 tannic acid 유도체를 식품보존료 및 N-nitrosamine 형성 저해제로 사용

한 바 있다. Theiler 등⁽⁴⁾은 식육을 이용하여 아질산염을 첨가한 모델계를 만들어 N-nitrosamine의 생성을 저해하는 실험을 하였으며, 이 때 curing용액 혼연성분으로 phenolic 물질이 포함되어 있었다.

산소를 이용하여 생명을 유지하고 있는 생물에서는 산소가 전자전달계의 말단에서 전자의 授受에 관여하므로 산소는 1전자 환원된 O_2 (superoxide)를 생성하며 계속 환원(4전자 환원)되어 H_2O 를 생성하게 된다. 이 과정에서 생성된 활성산소는 생체의 산화적 장애를 초래하게 되므로 생체의 산화적 장애를 억제하기 위해 SOD (superoxide dismutase) 유사활성을 지닌 천연물 소재를 개발하는데 많은 연구가 이루어지고 있다⁽⁵⁾. 또한 활성산소와 쉽게 반응하는 물질로서 비교적 잘 조사되어 있는 화합물은 flavone과 flavonol을 들 수 있으며, 이러한 화합물 가운데 catechin이 대표적인 물질이라 할 수 있다.

본 연구에서는 아질산염 분해인자의 검색의 일환으로 각종 phenolic 화합물의 아질산염 분해작용을 검토하였으며, 또한 식물 추출물에 광범위하게 존재하

Corresponding author: Yoon-Han Kang, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam, Kyonggi-do 463-420, Korea

는 항산화물질의 검색 판단계로 각종 phenol성 화합물의 전자공여 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 phenol성 화합물은 phenolic acids, flavonoids, 기타 phenol성 화합물 및 기타 환원력이 있는 물질을 사용하였다. Phenolic acids로 hydroxybenzoic acids와 hydroxycinnamic acids를 사용하였는데 hydroxybenzoic acids로는 benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, salicylic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, syringic acid, gallic acid였으며, hydroxycinnamic acids로는 trans-cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, hydrocaffeic acid, ferulic acid를 사용하였다. 또한 flavonoids로는 (+)catechin, naringin, hesperidin, quercetin, rutin 등이고, 그 외 tannic acid, catechol, 4-methylcatechol, chlorogenic acid, L-ascorbic acid 및 umbelliferone을 사용하였다.

아질산염 소거작용의 측정

각종 phenol성 화합물과 기타 화합물의 아질산염 소거능은 Kato 등⁽⁶⁾과 김 등⁽⁷⁾의 방법에 의거하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 1 mM NaNO₂용액 2 ml에 phenol성 화합물을 증류수로 0.5, 1, 3, 6 mM이 되도록 제조한 각 농도의 phenol성 화합물 용액을 1 ml 가 하고 여기에 0.1 N HCl, 0.2 M 구연산 완충액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조절하여 반응용액을 10 ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 ml씩 취하여 2% 초산 용액 5 ml, Griess시약(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전 조제) 0.4 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계(DU-7 UV/VIS Spectrophotometer)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 산출하였다. 이때 대조구는 Griess시약 대신 증류수를 0.4 ml 가하여 상기와 같은 방법으로 실시하였으며, 아질산염 소거작용은 화합물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율(%)로 나타내었다.

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

N: 아질산염 소거율

A: 1 mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 방

치시킨 후의 흡광도

B: NaNO₂ 용액의 흡광도

C: 시료 자체의 흡광도

전자공여작용

전자공여작용(electron donating ability)은 각종 화합물이 α, α -diphenyl- β -picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여 효과로서 화합물의 환원력을 측정하였다. 아질산염 소거작용시 제조한 각기 다른 농도의 각종 phenol성 화합물 용액과 기타 화합물 0.2 ml에 4×10^{-4} M DPPH 용액(absolute ethanol에 용해) 0.8 ml를 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하고 10분 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여 효과는 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도를 이용하여 백분율로 나타내었다.

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

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 시료 무첨가구의 흡광도(공시험)

결과 및 고찰

아질산염 소거작용

Phenolic acids 가운데 hydroxybenzoic acids 8종을 0.5, 1, 3, 6 mM로 농도를 조절하여 이 용액을 이용하여 pH 1.2, 3.0, 4.2, 6.0에서 반응시킨 후 아질산염 소거율을 Fig. 1에 나타내었다. 사람의 위내 pH와 유사한 pH 1.2에서 gentisic acid 및 gallic acid 6 mM용액의 아질산염 소거율은 각각 82.0, 42.0%였으며, pH 3.0에서는 소거율이 잔존하였으나 pH 6.0에서는 거의 대부분의 phenolic acid의 아질산염 소거작용은 없는 것으로 나타났다. 특히 gallic acid의 경우 6 mM용액을 이용한 pH 4.2에서의 소거율은 44.8%로 다른 phenolic acid의 소거율보다 다소 높은 경향이였다.

Phenolic acid 가운데 hydroxycinnamic acids를 각각 다른 pH에서 아질산염 소거작용을 나타낸 것은 Fig. 2와 같으며, 0.5 mM로 부터 6 mM로 증가하였을 때 trans-cinnamic acid를 제외한 *p*-coumaric acid 등 4종의 소거작용은 증가하는 경향이였으며, pH가 4.2로 증가하여도 대부분 아질산염 소거작용이 나타났으며, pH 6.0에서는 모든 phenolic acids에 있어서 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

Flavonoids인 (+)catechin, naringin, hesperidin, quercetin, rutin 등 5종을 각 농도별로 제조한 후 pH를 달

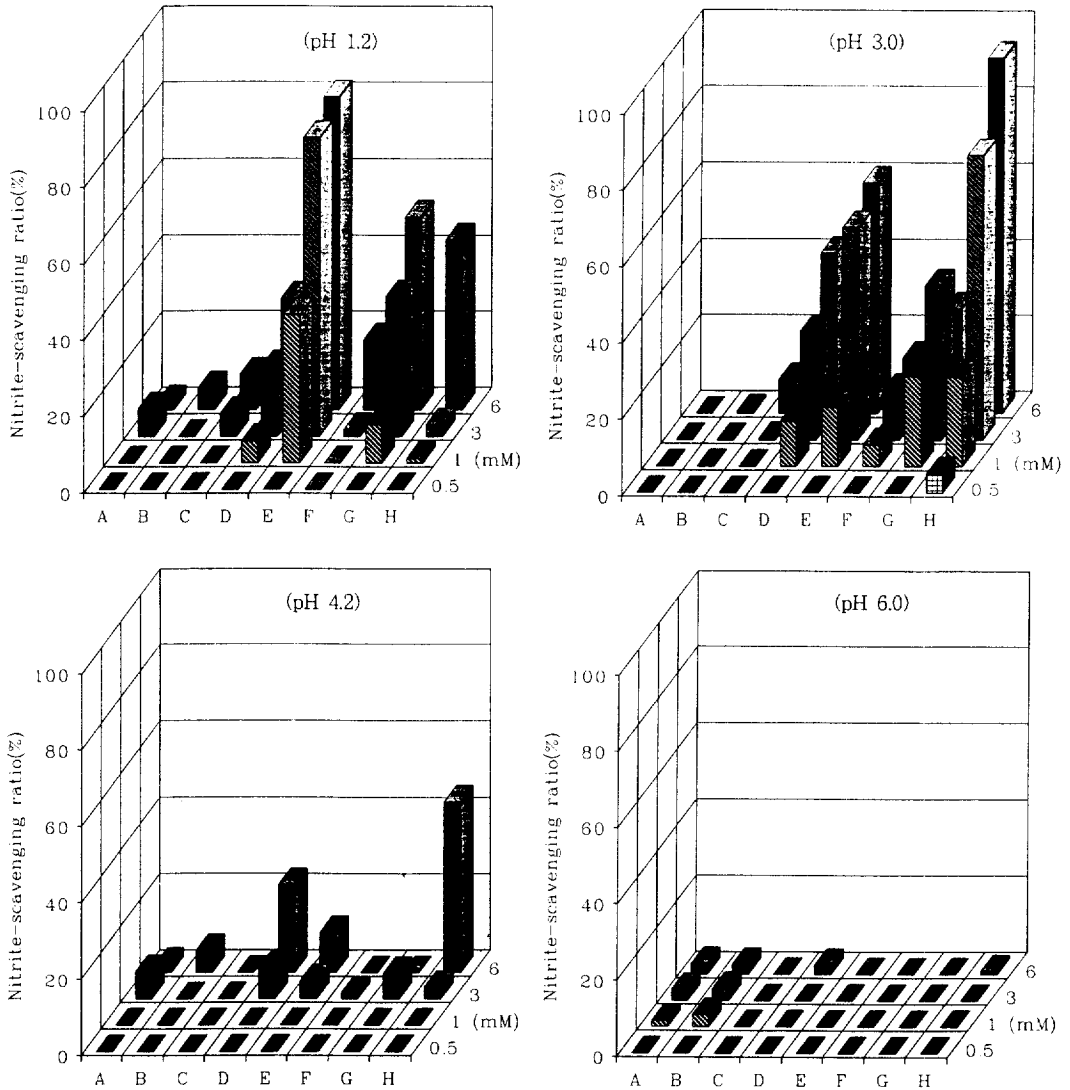


Fig. 1. Nitrite scavenging effects of hydroxybenzoic acids under different pH conditions benzoic acid (A), *p*-hydroxybenzoic acids (B), salicylic acid (C), protocatechuic acid (D), gentisic acid (E), vanillic acid (F), syringic acid (G) and gallic acid (H)

리하면서 아질산염 소거율을 나타낸 것은 Fig. 3과 같다. (+)Catechin만이 pH 1.2~pH 4.2에 이르는 범위에서 소거율이 높은 편으로서, pH 4.2에서 0.5 mM용액의 아질산염 소거율은 29.5%를 나타낸 반면 상대적으로 수용성이 낮은 naringin, hesperidin 등은 소거율이 없었다.

탄닌산을 포함한 phenol성 물질과 환원력이 강한 ascorbic acid 등의 아질산염 소거율을 pH별로 나타낸 것은 Fig. 4와 같으며, tannic acid와 dihydroxyphenols인 catechol류는 L-ascorbic acid보다 소거율이 높

은 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 phenolic acids 대부분은 아질산과 반응하여 이를 분해하는 것으로 나타났으나 flavanone glycosides인 naringin 등 일부 flavonoid 화합물은 소거율이 낮았으며 이는 polyphenol 화합물이 아질산염을 효과적으로 분해하여 니트로사민의 생성을 억제한다고 보고한 Takashi 등⁽⁸⁾의 결과와 nitrite 소거에 대한 flavonoid 화합물과 phenol성 화합물을 검토한 이 등⁽⁹⁾의 결과와 유사하였다.

Kuenzig 등⁽¹⁰⁾은 phenolic acids 중 caffeic acid와

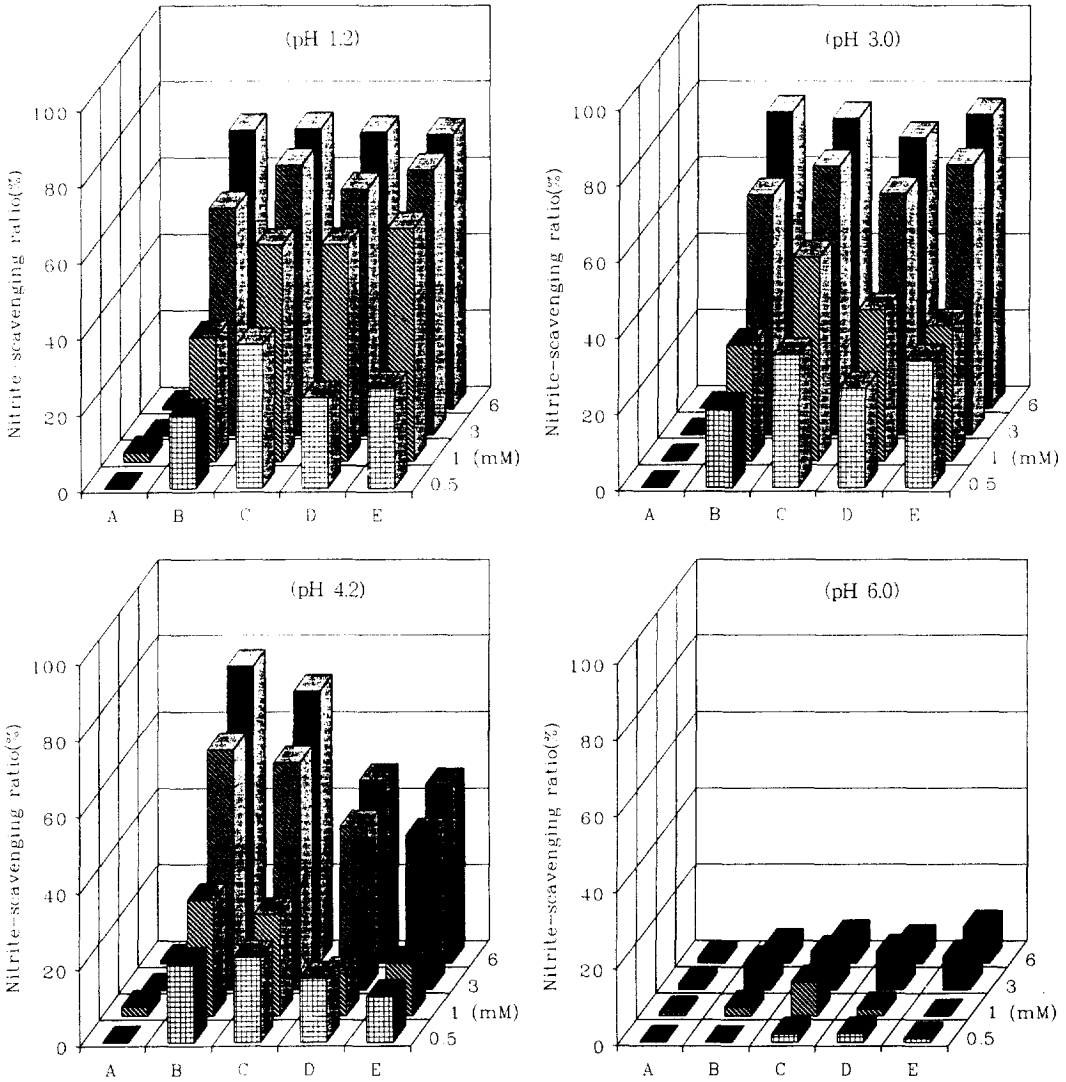


Fig. 2. Nitrite scavenging effects of hydroxycinnamic acids under different pH conditions trans-cinnamic acid (A), *p*-coumaric acid (B), caffeic acids (C), hydrocaffeic acid (D) and ferulic acid (E)

ferulic acid가 아질산과 반응하여 니트로사민의 생성을 억제하며 Shenoy 등⁽¹¹⁾에 의하면 각종 phenol은 amines의 nitrosation의 저해제로 관여하고, 이들 phenol 가운데 catechol은 ascorbic acid와 유사한 저해효과를 나타낸다고 하였다. Walker 등⁽¹²⁾은 catechol이 산성조건에서 amine보다도 더 경쟁적으로 nitrite와 반응한다고 하였다. 이와 같이 nitrosation의 저해는 nitrosating agents가 nitric oxide, nitrous oxide 혹은 nitrogen과 같은 해가 없는 산물로 전환하기 때문이며, Cooney 등⁽¹³⁾에 의하면 각종 phenol성 화합물은 산성조건에서 N-nitromorpholine 형성 즉 nitroso화 반응을 강력하게 억

제하며, Pignatelli 등⁽¹⁴⁾은 dihydroxyphenol류가 nitrous acid에 의해 quinone으로 산화되고 nitrous acid는 무해한 nitric oxide로 변화된다고 보고하였다.

따라서 이러한 phenol성 화합물은 amine류와 반응할 수 있는 nitrite를 nitrite oxide로 변환시키며, phenol성 화합물 또한 nitrosating agent에 의해 자신이 산화되어 quinone으로 되는 항산화제로 작용하게 되므로 결과적으로 phenol 가운데 free hydroxy group의 수는 중요하게 되며 이러한 phenol성 화합물의 촉매 작용 기작은 C-nitrosate 후 quinone monoxime tautomer로 되어 N₂O₃와 반응하여 N-nitrosating agent를

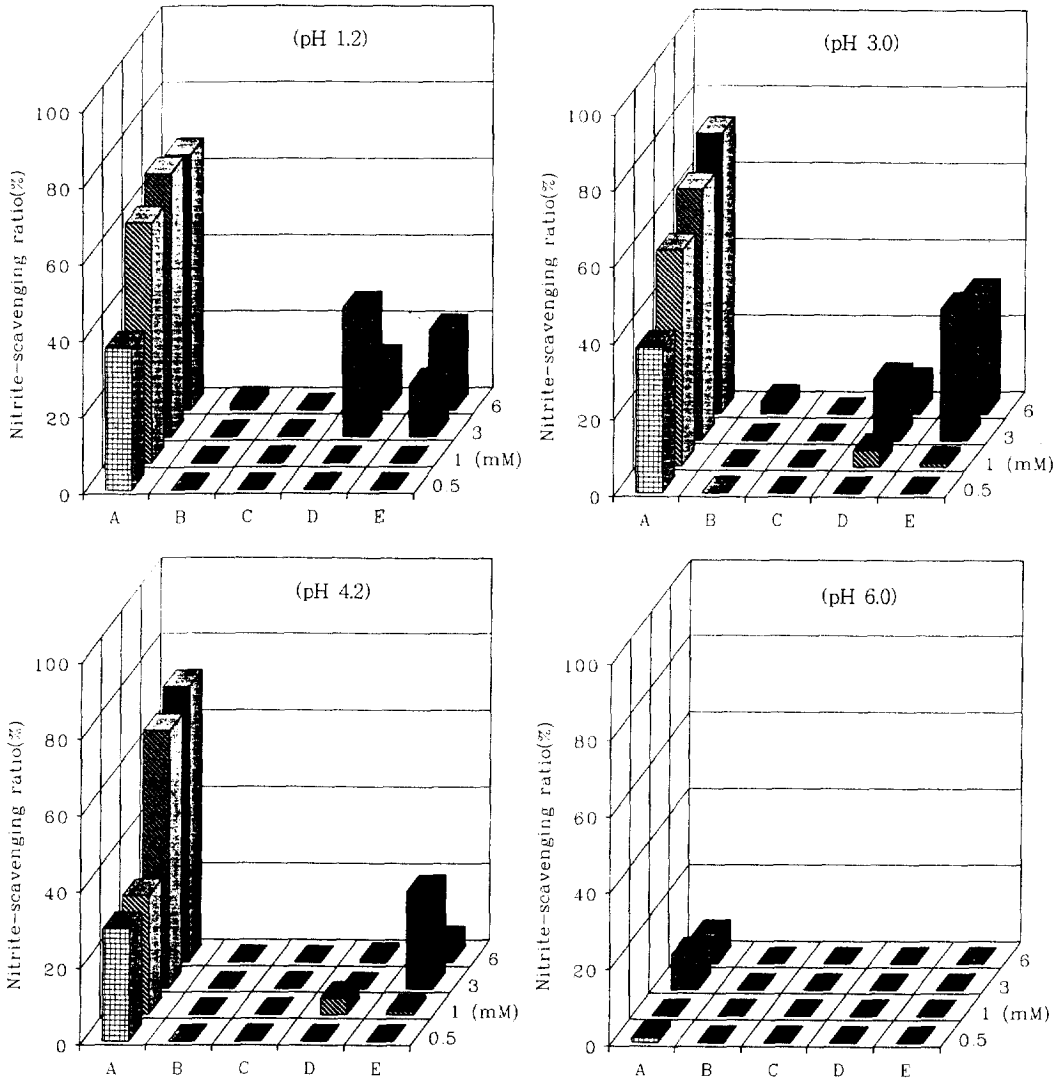


Fig. 3. Nitrite scavenging effects of flavonoids under different pH conditions (+)catechin (A), naringin (B), hesperidin (C), quercetion (D) and rutin (E)

생성한다고 제안하였다⁽¹⁵⁾.

전자공여작용

Phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenol성 물질에 대한 항산화 작용의 지표가 되는 전자공여능에 대한 효과를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 전자공여능은 전반적으로 농도가 상승함에 따라 증가하였으며 1 mM~6 mM 사이에서 농도차에 의한 효과는 크지 않은 것으로 나타났다. Hydroxybenzoic acids 가운데에서 전자공여능의 크기는 gallic acid>gentisic acid>syringic acid>protocatechuic acid>salicylic acid>

vanillic acid>benzoic acid>p-hydroxy benzoic acid 순으로 나타났다. hydroxycinnamic acids 가운데에서 전자공여능의 크기는 hydrocaffeic acid>caffeic acid>ferulic acid>p-coumaric acid>trans-cinnamic acid 순으로 나타났다. Flavonoids 가운데에서는 (+) catechin은 0.1 mM의 낮은 농도에서도 높은 전자공여능을 보였다. 이상의 결과에서 페놀성물질 중 phenolic acids와 flavonoids 및 catechol류와 chlorogenic acid 등을 포함한 기타 페놀성물질 등의 전자공여능 비교에 있어서 작용의 크기는 환원력이 큰 것은 높은 값을 나타내는 것으로 나타났다.

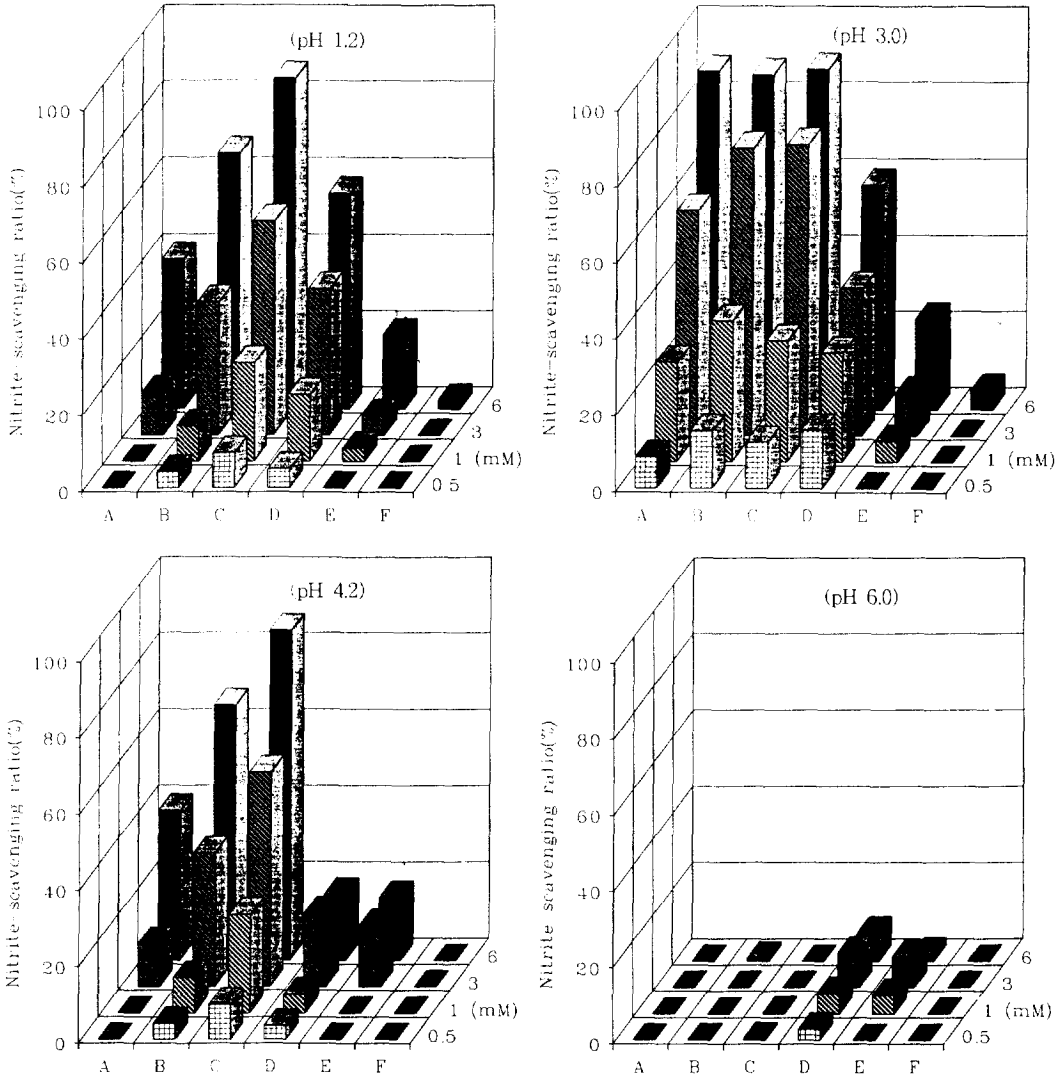


Fig. 4. Nitrite scavenging effects of phenolics and others under different pH conditions tannic acid (A), catechol (B), 4-methylcatechol (C), chlorogenic acid (D) and L-ascorbic acid (E)

요 약

천연에 광범위하게 존재하고 있는 각종 페놀성 화합물은 니트로화 반응의 저해제로 관여하거나 항산화제로 작용하는 것으로 알려져 있어 본 연구에서는 이들 각종 페놀성 화합물의 아질산염 소거작용과 전자공여 작용 유무를 알아보기 위하여 이들 화합물의 농도를 0.1 mM~6 mM 용액을 조제한 후, 이 액 일정량을 이용해 아질산염 소거작용과 전자공여 작용을 비교하였다. 아질산염 소거율에서 phenolic acid류는 높은 활성을 보였으며, 일부는 pH 1.2, 3.0에서 fla-

vonoids보다 높은 활성을 나타내었다. 전자공여능에서 phenolic acid류 가운데 hydroxybenzoic acids는 gallic acid>gentic acid>syngic acid>protocatechuic acid>salicylic acid>vanillic acid>benzoic acid>p-hydroxy benzoic acid 순으로 나타났으며, hydroxycinnamic acids 가운데 전자공여능의 크기는 hydrocaffeic acid>caffeic acid>ferulic acid>p-coumaric acid>trans-cinnamic acid 순으로 나타났고, flavonoids 가운데에서는 (+)catechin>rutin>quercetin>naringin=hesperidin 순으로 나타났다. 또한 tannic acid를 포함한 기타 phenolic 화합물에 있어서도 높은 전

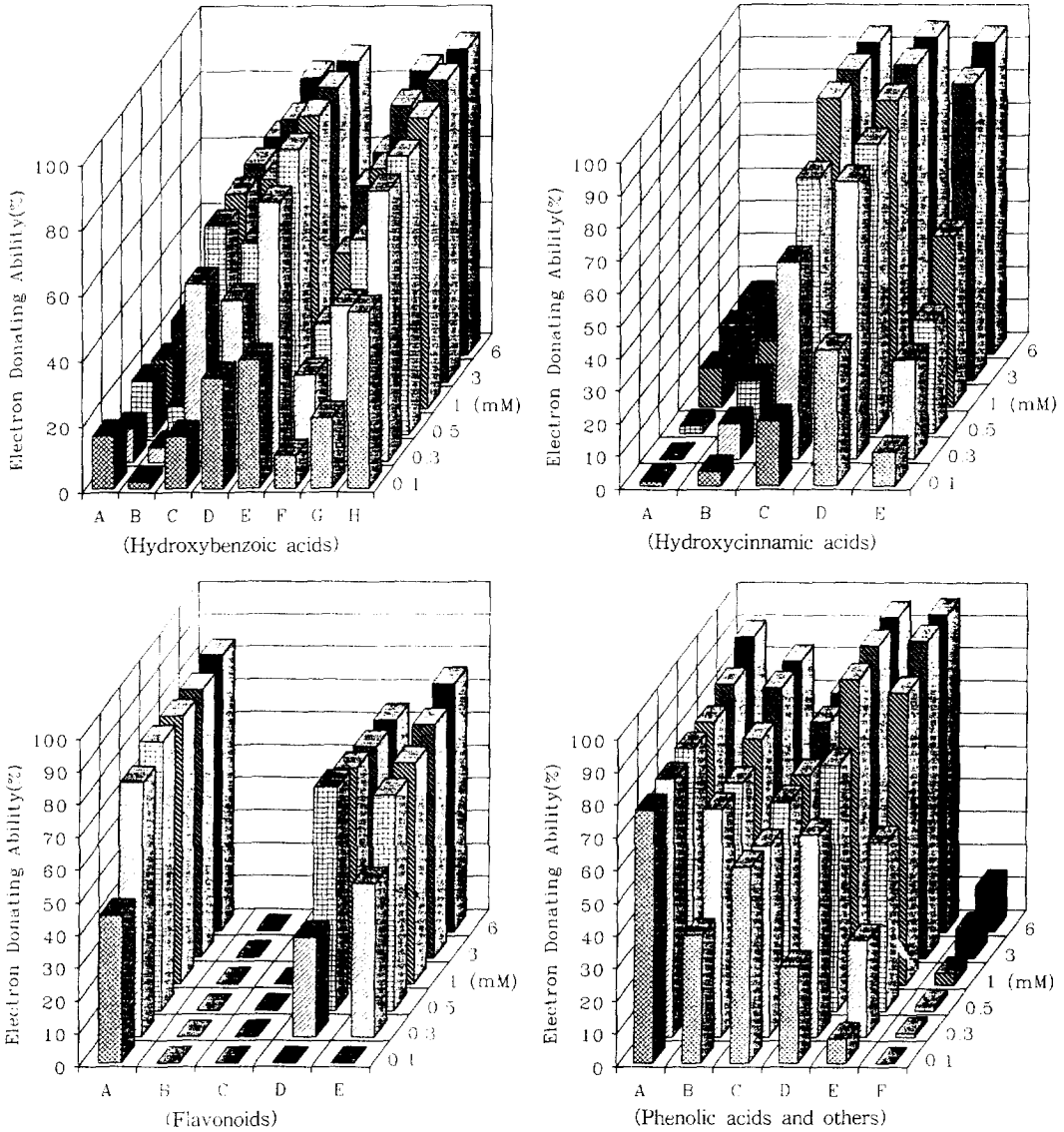


Fig. 5. Electron donating abilities of hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavonoids and others Hydroxybenzoic acids: benzoic acid (A), *p*-hydroxybenzoic acids (B), salicylic acid (C), protocatechuic acid (D), gentisic acid (E), vanillic acid (F), syringic acid (G) and gallic acid (H); Hydroxycinnamic acids: trans-cinnamic acid (A), *p*-coumaric acid (B), caffeic acids (C), hydrocaffeic acid (D) and ferulic acid (E); Flavonoids: (+)catechin (A), naringin (B), hesperidin (C), quercetin (D) and rutin (E); Phenolics and others: tannic acid (A), catechol (B), 4-methylcatechol (C), chlorogenic acid (D), L-ascorbic acid (E) and umbelliferone (F)

차공여능을 나타내었다.

문헌

- 岡部 召二: 野菜および食品中の窒酸鹽をめぐって. 化學と生物, 15, 352 (1977)
- Mirvish, S.S., Wallcave, L., Eagen, M. and Shubik, P.: Ascorbate-nitrite reaction; Possible means of blocking

- the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, 177, 65 (1972)
- Gray, J. and Dugan, J.R.: Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.*, 40, 981 (1975)
- 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)
- 川岸舜朗: 活性酸素と蛋白質. 化學と生物, 30, 122

- (1992)
6. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by non-dialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1333 (1987)
 7. 김동수, 안방원, 염동민, 이동호, 김선봉, 박영호 : 천연 식품성분에 의한 발암성 니트로생성인자 분해작용, 1. 야채추출물의 아질산염분해작용. *한국수산화학회지*, **20**, 463 (1987)
 8. Takashi, Y., Yamamoto, M. and Tamura, A.: Studies on the formation of nitrosamines : The effects of some polyphenols on nitrosation of diethylamine. *J. Food Hyg. Soc.*, **19**, 224 (1978)
 9. 이지현 : 수중의 화합물들의 아질산염 소거능과 N-nitrosoproline 생성에 미치는 영향. 부산수산대 석사학위논문 (1992)
 10. Kuenzig, W., Chau, J., Norkus, E. and Conney, A. H.: Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis*, **5**, 309 (1984)
 11. Shenoy, N.R. and Choughuley, A.S.U.: Effect of certain phenolics on nitrosamine formation. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 721 (1989)
 12. Walker, E.A., Pignatelli, B. and Friensen, M.: The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation. *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 81 (1982)
 13. Cooney, R.V. and Ross, P.D.: N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution : Effect of vanillin and related phenols. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 789 (1987)
 14. Pignatelli, B., Scriban, R., Descotes, G. and Bartsch, H.: Modifying effect of polyphenols and other constituents of beer on the formation of N-nitroso compounds. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **42**, 18 (1984)
 15. Davies, R., Massey, R. C. and McWeeny, D. J.: The catalysis of the N-nitrosation of secondary amines by nitrosophenols. *J. Food Chem.*, **6**, 115 (1980)
-
- (1995년 8월 21일 접수)