

Capsaicin 및 그 대사산물에 의한 *in vitro*에서의 니트로소 화합물 생성 저해효과

- 연구노트 -

박정순 · 박건영* · 유리나[†]

울산대학교 식품영양학과

*부산대학교 식품영양학과

Inhibition of *in vitro* Nitrosation by Capsaicin and Its Metabolites

Jeong-Soon Park, Kun-Young Park* and Rina Yu[†]

Dept. of Food and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan 680-749

*Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Capsaicin(8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide: CAP) known well as a major compound of hot pepper, was investigated for the inhibition effect on *in vitro* nitrosation. CAP(100 μ mol) inhibited the formation of N-nitrosoproline(NPRO) and N-nitrosothiopropine(NTPRO) by 56% and 26%, respectively. Vanillyl alcohol inhibited the nitrosation of proline by a concentration-dependent manner, and vanillic acid and vanillin were less effective in blocking the nitrosation of proline compared to CAP and vanillyl alcohol. The inhibitory effect of NPRO formation by CAP was evaluated to similar with alpha-tocopherol, and vanillyl alcohol was more effective than alpha-tocopherol in blocking the nitrosation of proline. Our results suggested that CAP and its metabolites such as vanillyl alcohol could inhibit endogenous nitrosation in hydrophobic biological environment.

Key words: capsaicin, N-nitrosoamine, nitrosation, N-nitrosoproline

서 론

대부분의 니트로소 화합물(N-nitroso compound)은 발암성을 나타낸다. 식품, 물, 또는 의약품에서 유래하는 아미노 화합물(amines, ureas, guanidines, carbamates 등)은 물이나 대부분의 채소류, 또는 육가공품에서 유래하는 nitrates(또는 nitrites)와 위내의 산성 조건 하에서 쉽게 반응하여 발암성 니트로소아민(N-nitrosamines, NA)을 형성한다(1). 한편, neutrophils나 macrophage에 의해 생성된 내인성 NO는 NOx(NO₂, NO₃ 등) 혼합물을 형성하여 nitrosation을 일으키거나 free radical 반응을 거쳐 NA를 생성하며, 결과적으로 DNA 염기의 deamination에 의한 돌연변이를 일으키게 된다. NA는 특히 식도암과 위암을 일으킨다고 알려져 있다(1). 비타민 C(ascorbic acid, AsA) 또는 비타민 E(alpha-tocopherol)는 nitrosation을 저해한다고 알려져 있으며(2-8), 이러한 nitrosation 저해작용은 이들 성분의 암예방 기능을 뒷받침해 주기도 한다.

고추의 매운맛 성분 capsaicin(C₁₈H₂₇NO₃, trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide, CAP)은 의약품, 식품첨가물, 향신료 등으로 널리 사용되고 있으며, 특히, 우리나라 사람들이 매일 섭취하고 있는 중요한 향신료 성분이다. CAP는 일반적으로 식욕증진, 에너지 대사항진(9), 생리활성 peptide 방출항진(10), 면역세포 활성화조절(11) 등의 다양한 생리효과를 나타낸다.

CAP는 체내에서 산아미드가 가수분해되어 매운맛을 소실한 vanillylamine으로 된 후, vanillin, vanillyl alcohol, vanillic acid를 거쳐 노로 배설된다(12). CAP는 항산화성 및 항암성을 나타내는 페놀성 물질인 curcumin과 구조적으로 유사하며, *in vitro* 모델계에서 one electron donor로 작용한다고 알려져 있다(13). 또한, CAP는 *in vitro*에서의 간 마이크로솜 산화 모델계에서 지질의 과산화를 억제하는 등 항산화 활성을 나타낸다(14,15). 김치 등의 침채류, 젓갈류, 또는 육류 가공식품은 니트로소 화합물 전구체를 포함하고 있다(2,7). 김치나 젓갈류에 향신료로 사용되는 고추성분인 CAP의

[†]To whom all correspondence should be addressed

항산화 활성은 이들 식품에서 유래하는 니트로소 화합물 전구체에 의한 내인성 nitrosation을 저해할 가능성을 시사하고 있으나, 이에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 고추의 매운맛 성분인 CAP 및 그 대사산물의 *in vitro*에서의 nitrosation 생성 억제 효과에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

L-Proline, L-thioproline, sodium nitrite, vanillin, vanillic acid는 화광제약(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Capsaicin(98% pure), ascorbic acid, alpha-tocopherol은 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, vanillyl alcohol, vanillylamine은 Aldrich Chem. Co.(Milw. WI, USA)에서 구입하였다.

In vitro nitrosation 모델계

In vitro nitrosation 모델반응계에서 생성되는 니트로소아민으로는 N-nitrosoproline(NPRO) 또는 N-nitrosothioproline(N-Nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid, NTPRO)을 대상으로 하였다(2). Proline(또는 thioproline)과 nitrite를 전구체로 하여 내인성 nitrosation에 의해 생성되는 NPRO(또는 NTPRO)는 체내에서 대사가 일어나지 않고 뇨로 배설되며, non-mutagenic, non-carcinogenic이기 때문에 위에서의 내인성 nitrosation 모델계로서 활용된다(3-5).

반응조건은 다음과 같다. 즉, L-proline은 0.1M citrate buffer에 녹여 10 μ mol 용액으로 만든다. Sodium nitrite(NaNO₂)는 3차 증류수에 녹여 10 μ mol 용액으로 한다. CAP는 0.9% saline-2% ethanol-10% Tween 80에 소정 농도로 용해시킨다(12). 대조군에는 CAP를 첨가하지 않은 vehicle(0.9% saline-2% ethanol-10% Tween 80)를 사용하였다. AsA도 각 농도별로 0.1M citrate buffer에 녹인다. Vanillin, vanillic acid, vanillyl alcohol은 ethanol에 녹이고, vanillylamine은 3차 증류수에 녹여 소정농도의 용액을 조제한다. 모든 과정은 0~4°C에서 행한다. Proline, CAP, sodium nitrite 용액을 각각 0.25, 0.25, 0.5ml씩 혼합하여 최종 1ml을 만들고, 여기에 pH 2~3이 되도록 1N HCl을 70 μ l 첨가하여 혼합한 후 37°C, 30분간 incubation한다. 이는 체내 위 속의 pH가 1~2인 산성조건과 체온을 고려한 것이다. 반응 후 생성된 NPRO 및 NTPRO는 high-performance liquid chromatography(HPLC)로 분석하였다.

NPRO 및 NTPRO 합성법

Proline 또는 thioproline 30mg을 H₂O 100 μ l, HCl

20 μ l에 녹인 후 NaNO₂ 25mg을 천천히 첨가시키면서 녹인다. NaOH로 pH 8~9로 맞춘 후 다시 HCl로 pH 3을 맞춘 후, 37°C에서 1시간 incubation시켜 잔유물을 제거한다. 반응용액의 H₂O를 evaporate시킨 후, acetone으로 추출한다. 3회 정도 반복해서 상층액을 취한 후 N₂ gas로 evaporate한다. Chloroform으로 3번 결정화시키면 무색의 결정이 약 6mg 정도 생성된다. 이 결정을 benzen으로 재결정화시키면 옅은 노란색의 결정이 생성되는데 이 결정이 NPRO 또는 NTPRO이다. 모든 실험과정은 얼음 위에서 실시한다. 합성한 NPRO 또는 NTPRO를 3차 증류수에 녹여 37°C 15분 동안 반응시킨 후 HPLC로 분석하여 retention time과 peak pattern을 확인한 후 표준시료로 사용한다(16).

HPLC 분석조건

HPLC(Waters-LC 410, USA) 분석조건은 다음과 같다. NPRO는 Inertsil ODS-2 column(4.6 \times 150mm i.d., GL Sciences Inc., Japan), 2% acetic acid를 mobile phase로 사용하였고, flow rate는 1.5ml/min였으며, UV 235nm에서 측정하였다. NTPRO는 BondapakTMC₁₈ column(3.9 \times 150mm i.d., Waters, USA), mobile phase는 2% acetonitrile/0.01M phosphoric acid를 사용하였고, flow rate는 1.5ml/min였으며, UV 254nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Nitrosation 저해효과를 나타내는 성분으로는 AsA(17), alpha-tocopherol(17), sorbic acid(18,19), erythorbate(19), catechol(6), hydroquinone(7) 등이 알려져 있다. 이들 화합물은 nitrite의 scavenger로 작용하거나 free radical 소거제로서 작용한다. AsA는 이들 두가지 성질을 다 가지므로 가장 효율적인 nitrosation 저해제로서 알려져 있다. 본 연구에서는 *in vitro* 모델계에서 CAP에 의한 nitrosation 저해 효과를 조사하기 위해, proline과 nitrite로부터 생성되는 니트로소아민(NPRO 또는 NTPRO)의 생성량을 조사하여 AsA 및 alpha-tocopherol의 효과와 비교하였다.

CAP는 농도 의존적으로 NPRO 생성을 저해하였으며, CAP 100 μ mol/ml에서는 약 56%의 억제효과를 나타냈다(Fig. 1). 또한, CAP는 NTPRO의 생성도 농도 의존적으로 저해하였으며(Fig. 2), 100 μ mol/ml에서는 약 26%의 억제효과를 보였다. NTPRO는 NPRO보다 생성이 용이한 것으로 알려져 있으나(5), CAP의 저해 효과는 NPRO 생성모델계에서 현저한 것으로 평가되었다. 한편, 가장 효율적인 nitrosation 저해제로서 알려져

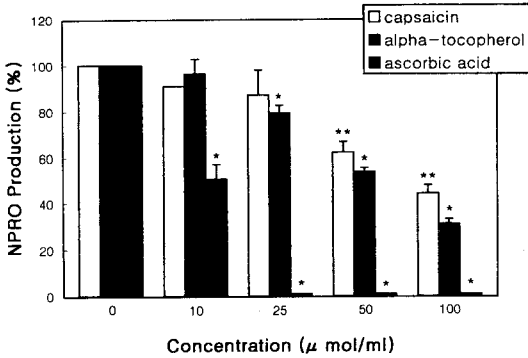


Fig. 1. Inhibitory effect of capsaicin, ascorbic acid and alpha-tocopherol on *in vitro* formation of N-nitrosoproline.

Data are means \pm SEM.
*Significantly different from control ($p < 0.01$)
**Significantly different from control ($p < 0.05$)

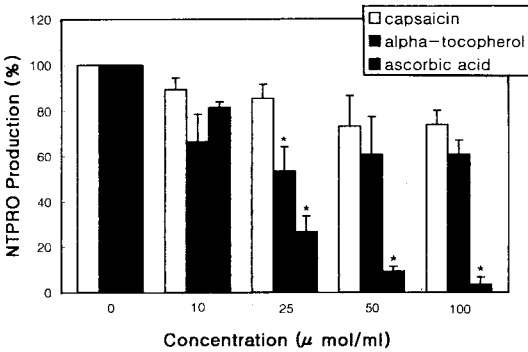


Fig. 2. Inhibitory effect of capsaicin, ascorbic acid and alpha-tocopherol on *in vitro* formation of N-nitrosothioproline.

Data are means \pm SEM.
*Significantly different from control ($p < 0.05$)

있는 AsA는 25 μ mol/ml 이상에서 NPRO 생성을 완전히 억제했으며, NTPRO 생성 역시 100 μ mol/ml에서 96%의 생성 저해 효과가 있었다. Alpha-tocopherol은 100 μ mol/ml에서 약 69%의 NPRO 생성 저해 효과가 있었으며, NTPRO 생성은 100 μ mol/ml에서는 약 39%가 저해되었다. 이러한 AsA 또는 alpha-tocopherol의 nitrosation 저해 효과는 Ohshima와 Bartsch(8)의 결과와 일치하였다. 본 실험모델계에서 CAP에 의한 니트로소아민 생성 저해 효과는 같은 농도의 AsA보다는 떨어지나, alpha-tocopherol의 저해 효과와 유사한 수준에 있는 것으로 평가되었다.

CAP의 대사산물인 vanillylamine, vanillin, vanillic acid, vanillyl alcohol에 의한 NPRO 생성 저해 효과를 Fig. 3에 나타냈다. CAP의 대사산물 중 하나인 vanillylamine은 NPRO 생성 저해 효과가 없는 것으로 나타났

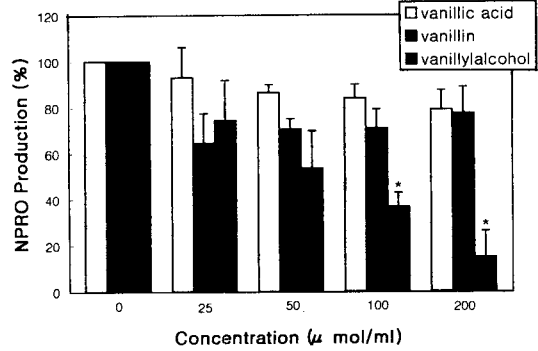


Fig. 3. Inhibitory effects of vanillin, vanillic acid and vanillyl alcohol on *in vitro* formation of N-nitrosoproline.

Data are means \pm SEM.
*Significantly different from control ($p < 0.05$)

다. Vanillyl alcohol은 농도의존적으로 NPRO 생성을 억제했으며, 그 정도는 떨어지나 vanillic acid와 vanillin 또한 NPRO 생성을 억제하는 효과가 있었다. Vanillyl alcohol의 NPRO 생성 억제 효과가 가장 높았는데, 동일한 농도에서의 CAP의 효과보다 높은 저해율을 나타냈으며, alpha-tocopherol보다 NPRO 생성 저해 효과가 높은 것으로 평가되었다. CAP는 페놀계 항산화제인 curcumin과 구조적으로 유사하다. 이들 화합물은 phenolic group과 side chain의 double bond를 가지고 있어, free radical에 수소를 제공함으로써 지질의 과산화를 억제한다(13). 실제로 CAP는 *in vitro* 모델계에서 one electron donor로 작용한다고 알려져 있다(13). 이와같은 CAP의 항산화 활성은 니트로소아민 생성과정에서 CAP가 nitrite의 scavenger로서 작용하거나 free radical 소거 작용에 관여하여 nitrosation을 저해할 가능성을 시사하고 있다. CAP의 작용 메커니즘에 대해서는 계속적인 연구가 요구된다. Vanillyl alcohol이 CAP보다 높은 nitrosation 저해 효과를 보인 것은 부분적으로는 용해도의 차이에 기인할 가능성이 높다. 한편, CAP의 대사산물인 vanillin은 CHO같은 electron-withdrawing group을 가지고 있어 quinon 유사구조형성을 방해하므로 항산화 효과가 다른 대사물질에 비해 떨어지며(15), nitrosation 저해 효과도 낮은 것으로 추측된다.

NPRO 생성 저해 효과는 AsA가 alpha-tocopherol보다 더 효과적인 것으로 보고되어 있는데, 이러한 차이는 nitrosation 반응이 수용계에서 진행되므로 수용성인 AsA가 유리할 것으로 이해되고 있다. 본 실험모델계에서도 CAP에 의한 니트로소아민 생성 저해 효과는 같은 농도의 AsA보다는 떨어지나, alpha-tocopherol과 유사한 수준에 있는 것으로 평가되었다. 실제로, 니트로소화 반응에 관여하는 아민류 중에는 지용성 성

분인 경우도 많을 뿐만 아니라(8), 또한 니트로소화 반응은 생체내 지용성 환경하에서도 진행될 것으로 예상되므로, 이러한 조건 하에서는 CAP가 alpha-tocopherol과 유사한 수준에서 AsA보다도 효과적인 니트로소아민 생성 저해제로 작용할 수 있음을 시사하고 있다. 한편, 식품계에서는 베이컨이나 소시지 같은 가공육류 식품 또는 젓갈류들 중에는 NA 전구체가 다량 함유되어 있는 점을 고려할 때, 천연물질로서의 CAP 및 그 대사산물인 vanillyl alcohol의 nitrosation 저해효과는 이들 식품의 첨가제로서 활용가능성을 시사하고 있다고 하겠다. CAP에 의한 *in vivo*에서의 nitrosation 저해 효과에 관해서는 연구 중에 있다.

요 약

고추의 매운맛 성분인 CAP 및 그 대사산물들의 *in vitro* nitrosation 저해 효과를 조사하였다. CAP는 농도의존적으로 NPRO 생성을 저해하였으며, 100µmol/ml에서 약 56%의 저해 효과를 나타냈다. 또한, NTPRO의 생성은 CAP 100µmol/ml에서는 약 26%가 억제되었다. 한편, CAP의 대사산물 중 vanillylamine은 nitrosation 저해효과가 없었으나, vanillyl alcohol은 농도의존적으로 NPRO 생성을 저해했으며, vanillic acid와 vanillin 또한 NPRO 생성을 저해하는 효과가 있었다. CAP 및 그 대사산물들에 의한 니트로소아민 생성 저해 효과는 alpha-tocopherol의 저해 효과와 유사한 수준에 있었으며, vanillyl alcohol의 저해 효과는 alpha-tocopherol보다 우수한 것으로 평가되었다. 이들 결과로 보아, CAP 및 그 대사산물인 vanillyl alcohol은 생체내 지용성 미세환경하에서 alpha-tocopherol과 유사한 정도의 nitrosation 저해효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 한국과학재단 특정기초연구비 지원(과제번호 : 98-0402-04-01-3)에 의해 수행된 연구결과의 일부입니다.

문 헌

- Hartman, P. E. : Nitrates and nitrites: Ingestion, pharmacodynamics, and toxicology. In "Chemical mutagens" De Serres, F. J. and Hollaender, A.(eds.), Plenum, New York, Vol. 7, p.211(1982)
- 박건영, 최홍식 : 김치와 니트로소아민. 한국영양식량학회지, **24**, 109(1995)
- Mirvish, S. S., Bulay, O., Runge, R. G. and Patil, K. : Study of the carcinogenicity of large doses of dimethylnitramine, N-nitroso-L-proline, and sodium nitrite administered in drinking water to rats. *J. National Cancer Institute*, **64**, 1435(1980)
- Chu, C. and Magee, P. N. : Metabolic rate of nitroso-proline in the rat. *Cancer Res.*, **41**, 3653(1981)
- Otsuka, M., Sakashita, Y., Arakawa, M. and Tsuda, M. : Studies on endogenous formation of N-nitroso compounds in the Guinea pig supplemented with proline or thioproline and sodium nitrate. *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 765(1992)
- Kamm, J. J., Dashiman, T., Conneym, A. H. and Burns, J. J. : Protective effect of ascorbic acid on hepatotoxicity caused by sodium nitrite plus aminopyrine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **70**, 747(1977)
- Cooney, R. V. and Ross, P. D. : N-Nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 789(1987)
- Ohshima, H. and Bartsch, H. : The influence of vitamin C on the *in vivo* formation of nitrosamines. In "Vitamin C" Counsell, J. N. and Horning, D. H.(eds.), Applied Science Publishers, London, p.215(1981)
- Buck, S. H. and Burk, T. F. : The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol. Rev.*, **38**, 179(1986)
- Watanabe, T., Kawada, T. and Iwai, K. : Capsaicin, a pungent principle of hot red pepper, evokes catecholamine secretion from the adrenal medulla of an esthetiged roct. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **142**, 259(1987)
- Yu, R., Park, J. W., Kurata, T. and Erickson, K. L. : Modulation of select immune responses by dietary capsaicin. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **68**, 114(1998)
- Kawada, T. and Iwai, K. : *In vivo* and *in vitro* metabolism of dihydrocapsaicin a pungent principle of hot pepper, in rats. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 441(1987)
- Bina, J. and Lokesh, B. R. : Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **1224**, 255(1994)
- 박정순, 이진옥, 유리나 : 고추의 매운맛 성분 capsaicin의 항산화 활성. 한국식품영양과학회 추계 학술대회 초록집, p.92(1997)
- Pulla, R. C. and Lokesh, B. R. : Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol. Cell. Biochem.*, **111**, 117(1992)
- Lijinsky, W., Kecfer, L. and Loo, J. : The preparation and properties of some nitrosamino acids. *Tetrahedron*, **26**, 5137(1970)
- Gray, J., Reddy, L., Price, S. K., Mandagere, J. F. and Wilkens, W. F. : Inhibition of N-nitrosamines in bacon. *Food Tech.*, **36**, 39(1982)
- Tanaka, K., Chung, K. C., Hayatsu, H. and Kato, T. : Inhibition of nitrosamine formation *in vitro* by sorbic acid. *Food Cosmet. Toxicol.*, **16**, 209(1978)
- 김정관, 이수정, 성낙주 : 멸치젓 숙성 중 아질산염과 아스코르브산이 N-nitrosamine의 생성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지, **26**, 606(1997)