

토마토로부터 N-nitrosodimethylamine 생성을 억제시키는 유효성분의 검색

최선영 · 이인숙 · 이수정 · 손미예 · 신정혜¹ · 서종권² · 강민정³ · 성낙주*

경상대학교 식품영양학과 · 농업생명과학연구원, ¹남해전문대학 호텔조리제빵과, ²진주국제대학교 식품과학부, ³창신대학 호텔조리제빵과

Received July 13, 2006 / Accepted August 22, 2006

Screening for Components to Inhibit N-Nitrosodimethylamine Formation from Tomato. Sun-Young Choi, In-Sook Lee, Soo-Jung Lee, Mi-Yae Shon, Jung-Hye Shin¹, Jong-Kwon Seo², Min-Jung Kang³ and Nak-Ju Sung. Dept. of Food Science and Nutrition, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, ¹Dept. of Hotel Curinary and Bakery, Namhae College, Namhae 668-801, Korea, ²Division of Food Science, Jinju International University, Jinju 663-759, Korea, ³Dept. of Hotel Curinary and Bakery, Changshin College, Masan 630-522, Korea – A tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1) juice was separated into ascorbate and phenolic portions using a Sep-pak C₁₈ cartridge, and its each portion was tested for inhibition of N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation. Ascorbate and phenolic portions of tomato juice inhibited NDMA formation by 81.37±0.25% and 72.03±0.25%, respectively. The phenolic portion was further fractionated by prep-HPLC and inhibitory effects of NDMA formation by 4 fractions (1~4) from tomato juice was tested under the different pH conditions (pH 1.2 and 4.2). Fraction 2 inhibited NDMA formation by 50.10±0.46% (pH 1.2) and 64.30±0.20% (pH 4.2), respectively. Fraction 2 was further separated into 4 subfractions (2a~2d). Subfraction 2b especially inhibited NDMA formation by 70.62±0.45% (pH 1.2) and 75.30±0.45% (pH 4.2). This subfraction was confirmed *o*-coumaric acid through the analysis of GC-Mass spectrum, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

Key words – N-nitrosodimethylamine, tomato, ascorbic acid, phenolic portion

발암성 N-nitrosamine (NA)은 아질산염과 아민을 함유하고 있는 식품의 조리·가공 및 저장 중에 생성될 가능성이 높다[7]. 따라서 NA 생성을 억제시키기 위해서는 채소 및 과실류의 섭취가 바람직하다. 이는 식물류에 함유되어 있는 ascorbic acid, tocopherol, carotene 및 페놀성 화합물이 생체 내·외에서 NA 생성반응을 억제시키기 때문이다[5]. Ascorbic acid와 페놀성 화합물은 수용액에서 아민과 반응하여 NA를 생성할 수 있는 아질산염을 nitric oxide로 환원시키고 자신은 각각 dehydroxyascorbic acid 및 quinone으로 된다[1]. 페놀성 화합물의 경우 이러한 활성은 유리 수산기의 수나 위치에 따라 작용 기작이 다소 상이한 것으로 보고되어 있다[4]. 즉 이 물질은 니트로소화 물질을 파괴하거나 결합 또는 환원시키는 역할을 함으로써 NA 생성반응을 차단시키거나 지연시킨다.

Lee 등[6]에 의하면 과채류의 대부분이 N-nitrosodimethylamine (NDMA) 생성에 대한 억제 효과가 있으며, 특히 토마토의 경우 pH 6.0의 조건에서도 NDMA의 생성을 최고 53.8% 억제시킨다고 보고하였는데, 이같은 현상은 ascorbic acid보다 환원력이 높은 페놀 화합물이 존재하기 때문이라고 하였다. 또한 Helser와 Hotchkiss[2]는 토마토로부터 ascorbate 획분과 phenolic 획분을 이용하여 N-nitro-

somorpholine (NMOR) 생성억제 효과를 시험한 결과, ascorbate 획분이 phenolic 획분보다 NMOR 생성 억제 효과가 우수하였으며, phenolic 획분 중 주된 작용을 하는 물질은 *p*-coumaric acid와 chlorogenic acid라고 하였다. Ackiwa 등 [11]은 야채류 및 과실류 주스 53종을 대상으로 NDMA 생성 억제 효과를 측정된 결과 대부분의 시료에서 20% 미만에 불과하였으나, 레몬주스에서는 50%의 억제 효과를 보였는데, 이는 레몬주스에 함유된 ascorbic acid 외에 NDMA 생성 억제에 영향을 주는 다른 물질이 존재하기 때문이라고 보고하였다.

이와 같이 ascorbic acid가 NA 생성을 억제시키는 것은 이미 잘 알려진 사실이나 ascorbic acid가 함유된 식물류가 모두 적용되지는 않는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 토마토로부터 Sep-pak C₁₈ cartridge를 사용하여 ascorbate 및 phenolic 획분을 분취하여 발암성 물질인 NDMA의 생성에 미치는 영향을 분석하였고 나아가 phenolic 획분 중 NDMA 생성 억제 효과가 가장 뛰어난 물질을 분리·동정하였다.

재료 및 방법

실험재료

선도 좋은 완숙 토마토(*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1)를 경남 진주시 중앙시장에서 구입하여 흐르는 물에 깨끗

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5975, Fax : +82-55-751-5971

E-mail : snakju@gsnu.ac.kr

이 씻은 후 단시간에 물기를 제거하여 균질화시켜 실험에 사용하였다.

Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 phenolic 화합물의 분리

균질화된 토마토 주스 100 g을 원심분리(8000 rpm, 20 min)하여 얻은 상등액을 Seo와 Morr[8]의 방법에 따라 2 N HCl로 pH 2.5로 조정 후 5 ml의 메탄올, 3차 증류수 및 0.01 N HCl로 미리 활성화시킨 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켰다. 이때 Sep-pak을 통과한 물질을 ascorbate 획분, Sep-pak에 잔존하는 물질을 0.01 N HCl로 세척한 후 75% 메탄올 5 ml에 용리시켜 얻은 것을 phenolic 획분으로 하였다. 각 분획물은 회전식 진공 농축기로 완전건조한 후 3차 증류수에 용해시켰다. 이를 HPLC(LCC 2252, Pharmacia LKB, Sweden)에 주입하여 phenolic 화합물을 분리하였으며, HPLC의 분석조건은 μ Bondapak C₁₈ column(3.9 mm×300 mm, Waters, USA), 이동상 용매로 A(2% acetic acid)와 B(40% acetonitrile)를 이용하여 처음 50분 동안 10% B에서 80% B까지 되게 하고, 이후 30분간 이를 유지하였으며, 100분까지 0% B가 되도록 조건을 설정하였으며, 이때 유속은 1.0 ml/min로 하였다. Phenolic 화합물의 분획은 prep-HPLC를 사용하였으며, column은 pre-column인 Shim-pack G-ODS(8×15 mm, Shimaduz Co., Japan)가 장착된 prep-ODS(7.8×250 mm, Shimaduz Co., Japan), 254 nm에서 UV detector(Pharmacia LKB VWM Detector, Sweden)로 검출하였으며, 유속은 5.0 ml/min로 하였다.

NDMA 생성 억제에 대한 모델계 실험

토마토 주스로부터 Sep-pak을 이용하여 분리한 ascorbate, phenolic 획분 및 prep-HPLC에 주입시켜 얻은 각 분획물을 모아 회전식 진공증발기로 이동상 용매를 제거한 후 증류수에 용해시켜 NDMA 생성 억제용 시료로 하였다. 반응계는 100 mM 아질산나트륨 용액 1 ml에 ascorbate 및 phenolic 분획물을 첨가한 후 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충액(pH 1.2 및 pH 4.2)으로 각각 조제한 200 mM dimethylamine (DMA)용액 0.5 ml를 가하고 상기 완충액으로 총 부피를 10 ml로 한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 ammonium sulfamate를 가하여 반응을 정지시키고 dichloromethane (DCM) 1 ml를 가하여 반응용액 중의 NDMA를 추출한 후 회수한 DCM층을 무수황산나트륨으로 탈수시켜 GC(5890A, Hewlett-Packard, USA)-TEA(543, Thermo Electron Corp., USA)로 NDMA를 분석하였다. GC-TEA의 분석조건은 10% carbowax 20 M/80~100 chromosorb WHP로 충전한 column을 이용하였고, He 가스의 유속은 25 ml/min, injection port의 온도는 180°C, pyrolyzer 온도는 550°C, interface 온도는 200°C, 압력은 1 mmHg로 하였다. 대조구는 시료액 대신

동량의 증류수를 사용하였으며, NDMA 생성 억제 효과는 대조구에 대한 peak의 백분율(%)로써 환산하였다.

Phenolic 획분의 구조 분석

토마토 주스로부터 분획한 phenolic 획분 중 NDMA 생성 억제 효과가 가장 뛰어난 획분(subfraction 2b)을 prep-HPLC로 분취하여 회전식 진공증발기로 이동상 용매를 제거한 다음 75% 메탄올, 5% H₂SO₄ 5 ml를 가하여 70°C 수욕상에서 5시간 가열한 후 완전 건조시켰다. 이것을 3차 증류수에 녹인 다음 분액여두를 이용하여 에테르 및 에틸 아세테이트를 차례로 가하여 에테르 및 에틸 아세테이트 획분을 모아 TLC(ethylacetate : acetone = 5:1, v/v)를 행하였다. 이를 GC-MS(Shimadazu QP-1000EX), NMR(Bruker DRX 500 MHz)을 사용하여 구조를 분석하였다.

통계처리

본 실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS 12.0을 이용하여 각 실험군간의 유의성을 검증한 후 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

Phenolic 획분이 NDMA 생성에 미치는 영향

Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 토마토 주스로부터 분획한 ascorbate 및 phenolic 획분을 pH 1.2의 반응조건에서 첨가량을 달리하였을 때 NDMA 생성에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 1과 같았다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 NDMA 생성량을 100%로 하였을 때, ascorbate 및 phenolic 획분의 NDMA 생성 억제 효과는 시료의 첨가량이 많아질수록 증가하였으며, ascorbate 획분이 phenolic 획분보다 억제 효과가 높았다. 모델계 실험에서 phenolic 획분을 2 ml 첨가했을 때 NDMA 생성 억제 효과는 36.7%였으나, 여타 실험구에서는 모두 50% 이상의 억제효과를 보였으며, 10 ml 첨가 시에는 ascorbate 획분에서 81.37±0.25%, phenolic 획분에서 72.03±0.25%였다.

Fig. 2는 토마토 주스로부터 얻은 phenolic 획분을 prep-HPLC를 이용하여 머무름 시간별로 4개의 fractions (1~4)로 나누어 분취하였으며, fraction 2는 다시 4개(2a~2d)의 단일 peak로 재분취하였다. 각 분획물이 NDMA 생성에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 1 및 2와 같았다. 분획된 fractions의 NDMA 생성 억제율은 fraction 1은 pH 1.2에서 37.57±0.45%, pH 4.2에서 26.07±0.21%, fraction 4는 49.73±0.32%와 29.83±0.25%였다. 특히 fraction 2는 pH 1.2에서 50.10±0.46%, pH 4.2에서 64.30±0.20%를 보여 pH 4.2에서 NDMA 생성 억제 효과가 가장 높았다. 따라서 fraction 2를

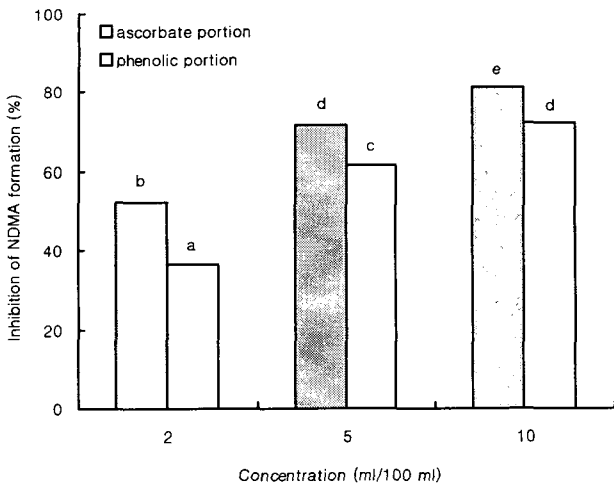


Fig. 1. Inhibition of NDMA formation from the ascorbate and phenolic portion of tomato juice separated by Sep-pak C₁₈ cartridge.
^{a,b,c,d,e} Each value with different superscripts within the different concentration significantly difference at $p < 0.05$.

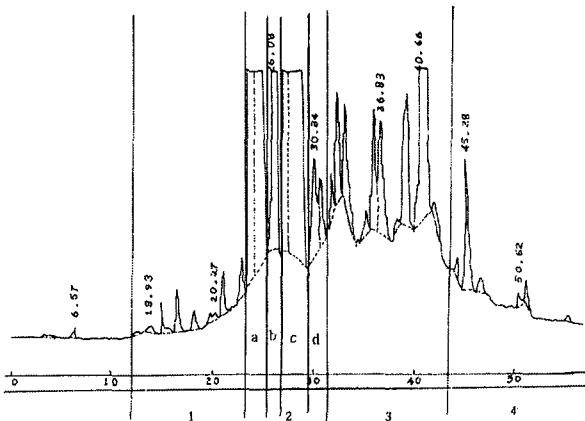


Fig. 2. Preparative-HPLC chromatogram of phenolic portion from tomato juice.

subfractions 2a, 2b, 2c 및 2d로 각각 분취하여 NDMA 생성 억제 효과를 시험한 결과(Table 2), pH 1.2에서 subfraction 2a는 $68.80 \pm 0.50\%$, subfraction 2d는 $67.15 \pm 0.25\%$ 였으며, subfraction 2b에서는 $70.62 \pm 0.45\%$ (pH 1.2) 및 $75.30 \pm 0.45\%$ (pH 4.2)로 억제율이 가장 높았다.

Lee 등[6]은 pH 1.2에서 매실주스를 10 ml 첨가하여 반응시킨 결과 NDMA 생성 억제율이 99.0%였는데, 이는 시료에 함유된 ascorbic acid나 페놀 화합물보다 유기산의 작용이 더 큰 것으로 보고하였다. 토마토가 NMOR 생성을 감소시킬 수 있는 것은 토마토에 함유된 ascorbic acid 외에 phenolic 화합물 등의 항산화 물질이 존재하기 때문이라는 연구보고도 있다[2].

Table 1. Effect of fractions isolated from the phenolic portion of tomato juice on NDMA formation

Fraction no.	Retention time (min)	Inhibition of NDMA formation (%)	
		pH 1.2	pH 4.2
1	12.64 - 23.60	$37.57 \pm 0.45^{a1)}$	26.07 ± 0.21^a
2	23.60 - 31.24	50.10 ± 0.46^b	64.30 ± 0.20^d
3	31.24 - 44.11	38.23 ± 0.31^a	36.90 ± 0.20^c
4	44.11 - 53.00	49.73 ± 0.32^b	29.83 ± 0.25^b

¹⁾Each value represents mean \pm SD (n=3).

^{a,b,c,d} Each value with different superscripts within the same pH significantly difference at $p < 0.05$.

Table 2. Effect of the subfractions of fraction 2 isolated from the phenolic portion of tomato juice on NDMA formation

Subfraction no.	Retention time (min)	Inhibition of NDMA formation (%)	
		pH 1.2	pH 4.2
2a	23.60 - 23.72	$68.80 \pm 0.50^{1)}$	47.50 ± 0.75^c
2b	23.73 - 25.20	70.62 ± 0.45^d	75.30 ± 0.45^d
2c	25.20 - 28.74	34.75 ± 0.50^a	39.80 ± 0.55^b
2d	28.75 - 31.23	67.15 ± 0.25^b	23.75 ± 0.25^a

¹⁾Each value represents mean \pm SD (n=3).

^{a,b,c,d} Each value with different superscripts within the same pH significantly difference at $p < 0.05$.

본 실험에서 토마토 주스로부터 분획한 phenolic획분의 NA생성 억제 활성은 ascorbate 획분에 거의 근접하고 있다. 따라서 NDMA 억제효과가 가장 높은 토마토의 phenolic fraction 2를 prep-HPLC로부터 활성이 가장 높은 물질을 분취하였다.

토마토 phenolic 획분 2b의 구조

NDMA 생성 억제 활성이 가장 높은 subfraction 2b를 정제하여 GC-Mass spectrum으로 분석한 결과 분자이온 $[M^+]$ 의 peak가 $m/z = 166$ 에서 관찰되었고, ¹H-NMR spectrum(Fig. 3)에서는 δ 7.23(H, d, $J=7.8$ & 0.6 Hz)과 δ 7.38(H, d, $J=7.8$ & 0.9 Hz)의 signal은 coupling constant와 multiplicity로 보아 2치환 aromatic ring의 proton들이 ortho, meta coupling함을 알 수 있으며, δ 7.05(H, td, $J=8.3$ & 8.3 & 1.3Hz)와 δ 6.89(H, td, $J=7.5$ & 7.5 & 1.2Hz)는 benzene ring의 proton이 ortho, ortho, meta-coupling하는 것으로 추정할 수 있었다. 이상의 분광학적 자료와 문헌치[10]를 종합해 볼 때 화합물은 C₉H₈O₃의 분자식을 갖는 o-coumaric acid

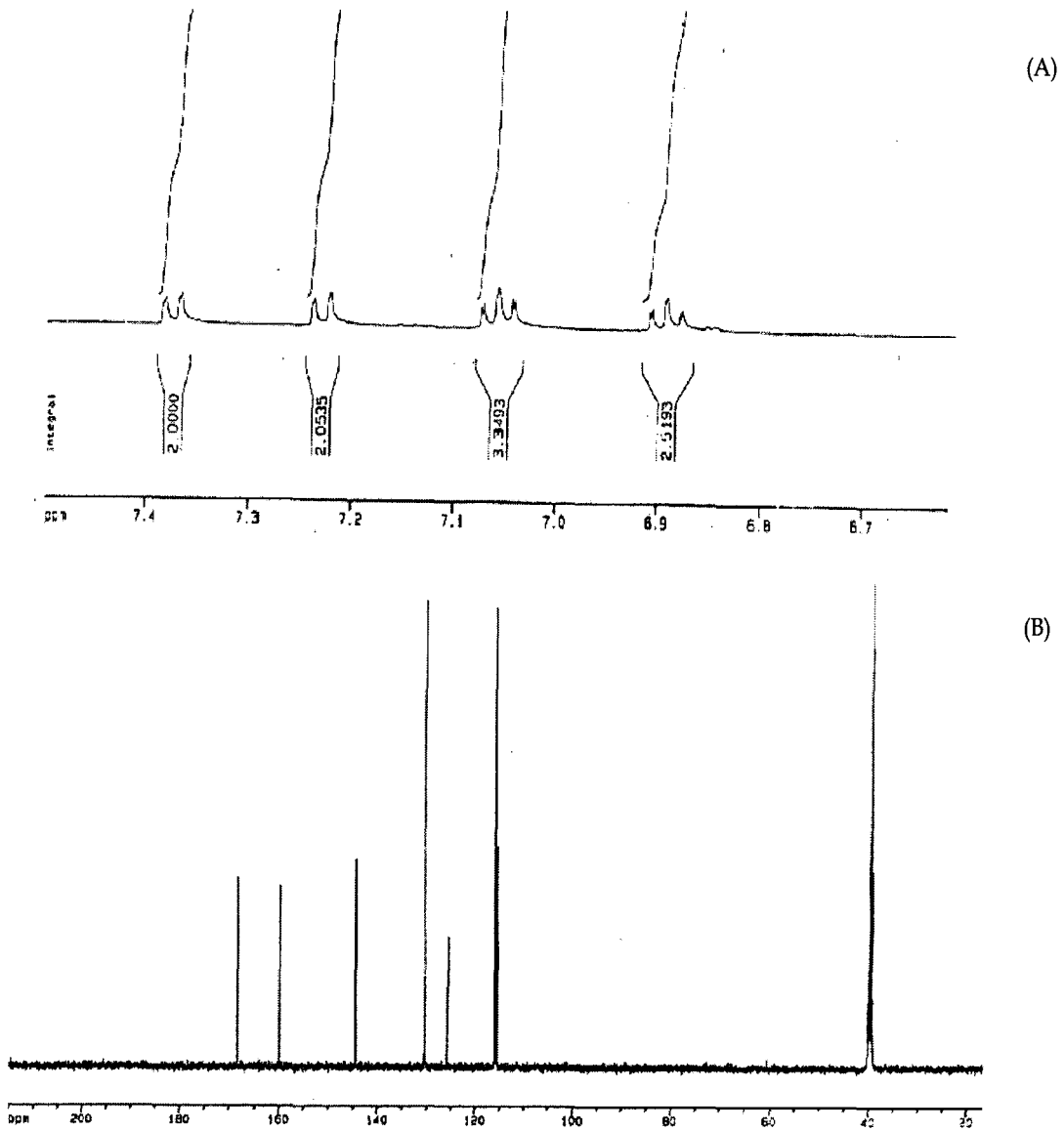


Fig. 3. ¹H-NMR (A) and ¹³C-NMR (B) spectrum of phenolic compound purified from subfraction 2.

임을 알 수 있었다. 토마토 주스에는 phenolic acid ester 및 glucoside가 2~71 mg/kg정도 함유되어 있으며, 그 중 유리 상태의 coumaric acid는 1.9 mg/100 g정도이다[9]. 따라서 본 실험 결과 상기의 subfraction 2b의 NDMA 생성 억제 효과가 다른 subfraction에 비해 뛰어난 것으로 보아 토마토 phenolic 화합물 중 *o*-coumaric acid가 NDMA 생성 억제에 주된 작용을 한 것으로 판단된다.

요 약

토마토 주스를 Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 ascorbate 및 phenolic 획분으로 분리하여 NDMA 생성 억제 효과

를 시험하였다. 시료의 첨가량이 많을수록 NDMA 억제 효과가 비례적으로 증가하여 ascorbate 획분은 최고 81.37±0.25%, phenolic 획분은 72.03±0.25%였다. Phenolic 획분을 prep-HPLC로 4개의 fractions으로 분취하여 NDMA 생성 억제 효과를 실험한 결과 fraction 2에서 활성이 가장 높았으며, fraction 2를 다시 4개의 subfractions으로 재분취하여 활성실험을 한 결과 subfraction 2b의 획분에서 최대 억제율이 pH 1.2에서 70.62±0.45% 및 pH 4.2에서 75.35±0.45%였다. 그래서 subfraction 2b를 분리, 정제한 후 GC-Mass 및 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR로 동정한 결과 phenolic acid의 일종인 *o*-coumaric acid임을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Fiddler, W., E. G. Piotrowski, J. W. Pensabean, R. C. Doerr and A. E. Wassermann. 1972. Effect of sodium nitrite concentration on N-Nitroso dimethylamine formation in frankfurters. *J. Food Sci.* **37**, 668-673.
2. Helser, M. A and J. H. Hotchkiss. 1994. Comparison of tomato phenolic and ascorbate fractions on the inhibition of N-nitroso compound formation. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 129-132.
3. Helser, M. A., J. H. Hotchkiss and D. A. Rao. 1992. Influence of fruit and vegetable juices on the endogenous formation of N-nitrosoproline and N-nitroso-thiazolidine-4-carboxylic acid in humans on controlled diets. *Carcinogenesis* **13**, 2277-2280.
4. Kang, Y. H., Y. K. Park and G. D. Lee. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 232-239.
5. Kurechi, T., K. Kikugawa and S. Fukuda. 1990. Nitrite-reacting substances in Japanese radish juice and their inhibition of nitrosamine formation. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 257-259.
6. Lee, S. J., J. H. Shin, M. J. Chung and N. J. Sung. 2000. Effect of natural foods on the inhibition of N-nitrosodimethylamine formation. *J. Fd. Hyg. Safety* **15**, 95-100.
7. Scanlan, R. A., S. M. Lohsen, D. D. Bills and L. B. Libbey. 1974. Formation of dimethylnitrosamine from dimethylamine and trimethylamine at elevated temperatures. *J. Agric. Food Chem.* **22**, 149-151.
8. Seo, M and C. V. Morr. 1984. Improved high performance liquid chromatographic analysis of acids and isoflavonoids from soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 530-533.
9. Wislaw, D., C. Y. Lee, A. W. Jaworski and K. R. Price. 1988. Identification of phenolic compound in apples. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 430-432.
10. Yoo, Y. B. 1996. Structure elucidation of phenol compounds from edible plants, antihepatotoxic and antimutagenic activities. Ph'D Thesis, Gyeongsang National Univ.
11. Ackiwa, Y., H. Hibasami, T. Kada and T. Komiya. 1997. Inhibitory effect of vegetable and fruit juices on formation of N-nitrosodimethylamine. *Nippon Shokunin Kagaku Kaishi*, **44**, 50-54.