KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 52, No. 6, pp. 616~621 (2020)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2020.52.6.616

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

다양한 pH조건에서 가열처리에 의한 시나핀산의 화학 안정성 및 생리활성 변화

허윤선[1] · 홍정일[1,*]
[1]서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부

Changes in chemical stability and biological activities of sinapinic acid by heat treatment under different pH conditions

Yunseon Heo[1] and Jungil Hong[1,*]
[1]*Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University*

Abstract Sinapinic acid is a widely-distributed phenolic acid in various edible plants. In this study, changes in chemical stability and biological activities of sinapinic acid by heat treatment were evaluated at different pH values. The decomposition of sinapinic acid with heating at 95°C was accelerated at higher pH; the residual levels after 10 min of heating were 80, 45 and 24% at pH 6, 7 and 8, respectively. Levels of reactive oxygen species derived from sinapinic acid also increased after heating at pH 7 and 8. ABTS radical scavenging activities and ferric reducing antioxidant power of sinapinic acid were reduced significantly after heating at pH 7 and 8. The cytotoxic activity of sinapinic acid against HCT116 cells was significantly enhanced after heating at pH 8 with decreased glutathione levels. The results suggest that heat treatment causes changes in the chemical stability and biological activities of sinapinic acid, and such changes are more prominent at higher pH.

Keywords: sinapinic acid, heat treatment, antioxidant activity, cytotoxicity

서 론

시나핀산(sinapinic acid; 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid)은 시나프산(sinapic acid)으로도 알려져 있으며 자연계에 널리 퍼져있는 페놀산 성분이다. 식물체 내에서 페닐알라닌, 티로신으로부터 생합성 되는 대표적인 페닐프로파노이드 계열의 계피산(cinnamic acid) 유도체로서, 계피산 벤젠고리 구조에 hydroxyl기를 사이에 두고 2개의 methoxy기를 지니고 있다(Nićiforović와 Abramović, 2014)(Fig. 1A). 시나핀산은 향신료, 약용식물, 감귤류 및 베리류와 같은 과일, 야채 등 다양한 식용 식물류에 존재하며(Dabrowski와 Sosulski, 1984; Piñeiro 등, 2004; Thiyam 등, 2006a), 특히 브로콜리와 감귤류 주스(citrus juice) 등에 많은 양이 함유된 것으로 알려져 있다(Stevanovic 등, 2009).

식품소재에서 발견되는 페놀성 물질들의 생리활성에 대한 다양한 연구가 진행되고 있는 가운데, 이들의 건강 기능성 소재화도 활발하게 이루어지고 있다(Xu 등, 2017). 천연 페놀성 식품 성분으로서 시나핀산 역시 항미생물(Engels 등, 2012), 항염증(Yun 등, 2008), 항불안(Yoon 등, 2007), 항암(Hudson 등, 2000), 항히스타민 및 면역조절 활성 등(Raish 등, 2018) 다양한 생물학적 활성들을 나타낸다고 보고되었다. 시나핀산은 페놀성 물질들이 공통적으로 가지는 산화방지 활성을 포함한 다양한 생리활성을 나타내지만 상대적으로 독성에 대한 보고는 거의 없는 안전한 물질로 간주되며, 따라서 각종 퇴행성 질환이나 노화 억제 등에 적용될 수 있는 생체 조절 물질로서의 가능성이 제시되었다(Chen, 2016). 실제 시나핀산의 이러한 생리활성을 기반으로 다양한 기능성 식품 및 제약 산업에서 이용되고 있으며(Thiyam 등, 2006b; Vuorela 등, 2004), UV에 의한 피부 광노화에 대한 보호 효과(Jeon 등, 2019) 등이 보고되어 화장품 산업에서도 활용되고 있다.

식품 중의 페놀성 물질은 가공 공정에서 노출되는 열, pH, 빛, 효소, 산소 등의 다양한 환경적 요인에 의해서 화학적 변화를 나타내고 그에 따라 생리활성의 변화를 나타낸다. Friedman과 Jürgens (2000)은 pH 별 식물성 페놀류 성분의 안정성 실험에서 특정 페놀성 성분이 pH 상승에 따라 더 신속한 구조의 불안정화와 함께 비가역적인 화학적 변화를 초래한다고 보고하였다. 또한 고온과 가압 상태로 시나핀산을 처리하였을 때, 다양한 발색 물질이 생성되는 것도 보고된 바 있다(Cai 등, 1999).

식품에서의 열처리 공정은 일반적으로 식품의 품질을 향상시키거나 저장 수명을 연장시키기 위하여 사용되고 있지만, 열처리 가공 중 생리활성물질의 손실이나 영양소의 파괴 등의 문제를 가지고 있다(Faller와Fialho, 2009). 특히 페놀성 성분은 산화환원 반응에 민감하며 pH 변화에 따른 화학 안정성이 크게 달라지는 것이 알려져 있다(Friedman과 Jürgens, 2000). 따라서 본 연구에서는 약산성(pH 6), 중성(pH 7) 및 약알칼리성(pH 8) 환경에서 식품의 가공 및 조리과정 중에 빈번히 적용되는 가열처리 과정을 적용

*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea
Tel: +82-2-970-5639
Fax: +82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received October 6, 2020; revised November 30, 2020; accepted December 1, 2020

하여 시나핀산의 화학 안정성 변화를 분석하였으며, 이에 따른 산화방지활성과 세포독성 등의 생리활성 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

시나핀산(>98%)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC 분석용 용매 acetonitrile은 J.T. Baker Co. (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며 3-(-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였다. HCl과 ferric chloride는 Samchun chemical (Seoul, Korea)에서 구매, 일급 이상의 물질을 사용하였다. 이 외에 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

세포주 및 세포 배양

인간 대장암 세포주 HCT116은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. HCT116 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 100 unit/mL penicillin과 0.1 mg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640 세포배양액(Welgene Inc., Gyengsan, Korea)에서 배양하였다. 세포는 85% confluency에 도달하였을 때 계대하였으며 37°C, 95% 습도, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다.

가열처리

시나핀산을 서로 다른 pH (6, 7, and 8)의 인산 완충용액에 500 μM이 되도록 희석하고 0.5 mL씩 1.5 mL e-tube에 분주한 후, 95°C의 block heater (Type 17600; Thermoylone, Dubuque, IA, USA)에서 처리시간을 달리하여 가열하였다. 처리 후에 즉시 얼음 위에서 냉각시켰고, 가열 중에 증발하는 수분에 대해서는 가열 전과 후의 무게 차이에 해당하는 증류수를 가하여 일정 농도를 유지하였다. 세포 실험을 위해서는 10 mM 시나핀산을 pH 8의 인산 완충용액에서 30, 60분간 가열하여 각각 약 25와 43% 파괴된 가열처리 물질을 얻었으며 이를 배지에 희석하여 사용하였다.

화학적 변화 및 HPLC분석

가열처리에 의한 시나핀산의 화학적 변화는 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max M3, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 410 nm와 540 nm에서의 흡광도와 400-700 nm에서 흡수 스펙트럼의 변화를 통해 분석하였다. 가열처리 전후 시나핀산의 함량은 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)로 분석하였다. 이동상으로 1% acetic acid가 포함된 증류수(A)와 100% acetonitrile (B)을 사용하였다. A:B의 기울기는 초기 90:10 (v/v)에서 20분에 80:20, 21분에 10:90으로 3분간 유지 후, 24분에 다시 초기 상태로 돌아오도록 설정하였다. 유속 1 mL/min, 시료 주입량 20 μL, 컬럼 온도 28°C, 검출기의 검출 파장 UV 325 nm에서 분석하였으며, 분석 컬럼으로는 HPLC packed column C18 (4.6 mm ID×150 mm×5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

산화방지활성 분석

시나핀산의 산화방지능 분석을 위해 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 소거능과 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 분석법을 사용하였다. ABTS 라디칼은 10 mM ABTS와 10 mM potassium persulfate를 각각 7.4:2.6 (v/v) 비율로 혼합한 후 상온의 암소에서 24시간 방치하여 생성시켰다. 이 ABTS 용액 150 μL에 각 처리 시료 50 μL를 혼합하여 상온의 암소에서 30분 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP 반응액은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine)와 20 mM ferric chloride를 10:1:1 (v/v/v) 비율로 혼합하여 실험 직전에 제조한 뒤 37°C에서 15분간 incubation하여 사용하였다. FRAP 반응액 150 μL와 각 시료 50 μL를 혼합하여 37°C의 암소에서 30분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다(Benzie와 Strain, 1996). 시료의 FRAP 환원능은 Trolox를 표준물질로 사용한 검량곡선으로 정량하였다.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) 측정

시나핀산의 가열처리 과정 중 생성되는 H_2O_2 생성량은 ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay로 분석하였다. 각 시료 40 μL에 FOX assay working solution [400 μM xylenol orange in DW, 800 mM D-sorbitol in 200 mM H_2SO_4, 1 mM ammonium ferrous sulfate in DW (1:1:2, v/v/v)] 160 μL를 가해 상온 암소에서 45분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포독성 및 glutathione 분석

시나핀산에 의한 세포독성은 MTT 환원법을 사용하여 분석하였다. HCT116 세포를 96-well plate에 각 well 당 1.5×10^4씩 분주하여 5% CO_2, 37°C, 습도 95% 조건의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, serum free 배지에 시나핀산을 희석하여 well 당 200 μL씩 24시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 serum free 배지에 희석한 0.5 mg/mL MTT 용액을 well 당 100 μL씩 첨가하여 30-40분 동안 반응시킨 후, 생성된 MTT formazan을 100 μL DMSO에 용해시켜 550 nm에서 흡광도로 측정하였다(Spectra Max M3). 세포 내 glutathione 분석을 위해 상기 조건으로 96-well plate에 배양한 HCT116 세포에 serum free 배지로 희석한 시나핀산을 8시간 동안 처리하였다. 그 후 monobromobimane (mBBr)을 40 μM이 되도록 HBSS에 희석하여 세포에 처리하고, 37°C의 CO_2 배양기에서 30분간 반응시킨 후 excitation 365 nm, emission 465 nm에서 형광 변화를 측정하였다(Poot 등, 1986).

통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 분석하여 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험 군 별 유의차는 일원 배치 또는 이원 배치 분산분석(one-way or two-way ANOVA)을 사용하였고(SPSS Inc., Chicago, IL, USA), 사후 검정은 Tukey's HSD test를 사용하여 95% 유의수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

가열처리에 의한 화학적 특성 변화

서로 다른 pH 조건에서 가열처리에 의한 시나핀산의 안정성 및 화학적 변화를 흡광 스펙트럼과 HPLC를 통해 분석하였다. HPLC 분석 결과, 가열시간의 증가에 따라 시나핀산 peak의 반응이 감소하는 양상을 나타내었으며, pH 8의 시료에서 감소가 가장 크게 나타났다(Fig. 1A). 또한 가열에 의한 시나핀산의 분해는 가열 시간과 pH가 증가할수록 유의적으로 가속화되는 현상을 보였는데, pH 6에서 10분간 가열처리 시 20% 정도가 분해되는 반면, pH 7과 pH 8의 조건에서는 각각 50, 75% 이상이 분해되는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 특히 pH 8 조건에서 5분과 10분

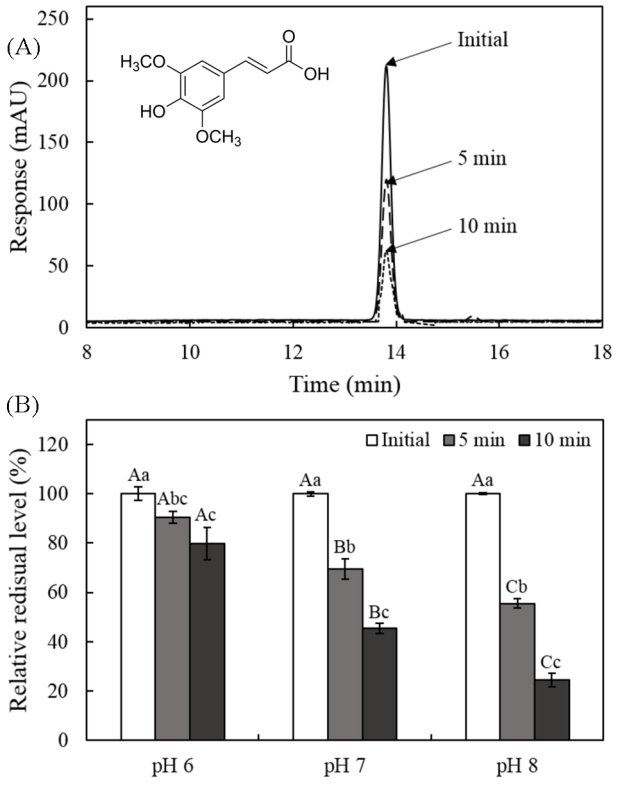

Fig. 1. Changes in residual levels of sinapinic acid during heat treatment. Changes in chromatograms during the heating at pH 8 (A) and residual levels (B) of sinapinic acid by 95°C heating for 0, 5 and 10 min at different pHs were analyzed using HPLC. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters (lowercase and uppercase for comparison among the heating periods and among the pHs, respectively) indicate a significant difference (p<0.05) based on two-way ANOVA and the Tukey's HSD test (B).

가열처리 시 시나핀산의 잔류량은 각각 55.5, 24.5%로 가장 불안정하였다. 이상의 결과는 가열처리에 의해 시나핀산의 화학 안정성이 감소하고 pH의 상승에 의해 분해가 가속화되는 것을 보여주며, 시나핀산이 함유된 식품을 알칼리 조건에서 가열처리 시 가열에 의한 손실이 증가될 수 있음을 시사한다.

가열처리에 의한 시나핀산의 가시광선 영역에서의 흡수 스펙트럼 변화를 분석한 결과, pH 7에서는 황갈색 영역인 400-430 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 가열처리 시간이 증가할수록 peak을 포함한 해당 영역의 흡수 스펙트럼이 전반적으로 증가하였다(Fig. 2A). 한편, pH 8에서는 가열처리 시간의 증가에 따라 400-430 nm 영역의 흡광도 증가와 함께 530-550 nm 적색 영역의 흡광도가 증가하다가 다시 감소하는 결과를 보였다(Fig. 2B). 본 결과를 바탕으로 pH와 가열처리 시간에 따른 시나핀산의 흡광도 변화를 410 nm에서 측정한 결과, pH 8에서는 5분까지 pH 7에서는 가열시간에 의존적으로 흡광도가 증가하였고 pH 6에서는 10분간의 가열처리 시에도 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2C). 또 다른 peak 영역인 540 nm에서 흡광도를 측정하였을 때 pH 8의 시료에서 5분 가열처리 시까지 흡광도가 증가하다가, 10분 처리 시에 다시 감소하였고, pH 7에서는 서서히 지속적으로 증가하는 변화 양상을 보였다(Fig. 2D). 시나핀산은 가열에 의해 탈탄산 되어 일차적으로 syringaldehyde, canolol 등과 같은 유도체로 전환되는 것이 보고되었는데(Nićiforović와 Abramović, 2014), 이들은 무색의 물질로서 본 결과에서 나타난 가열에 의한 흡수 스펙트럼의 변화 양상과는 무관한 것으로 보인다. 하지만 가열에 의한 시나핀산의 지속적인 산화 과정을 통해 생성된 산물들의 산화적 중합반응으로 갈변 물질이 생성되어 410 nm에서의 흡광도가 증가한 것으로 판단된다(Mathew와 Parpia, 1971). 한편 540 nm에서의 흡광도 변화 양상은 약알칼리 환경에서 가열에 의해 시나핀산의 발색 물질이 중간산물로 생성되고, 계속되는 가열에 의해 해당 구조가 다시 파괴되기 때문으로 사료된다(Cai 등, 1999; Jiang 등, 2019).

가열처리에 의한 산화방지활성 및 활성산소종 생성능 변화

가열처리에 따른 시나핀산의 화학 안정성의 변화가 생리활성의 변화를 수반하는지 알아보기 위해 ABTS 라디칼 소거능과 FRAP 분석법으로 산화방지활성을 평가하였다. 각 pH에서 가열처리된 시나핀산의 ABTS 라디칼 소거 활성의 변화를 농도에 따른 그래프로 나타낸 결과, pH 6 시료에서는 가열처리에 의한 소거능의 변화가 크게 나타나지 않았으나(Fig. 3A), pH 7과 8에서는 가열처리에 따른 유의적인 활성의 감소 현상이 나타났다(Fig. 3B and C). 각 그래프 상의 농도와 활성 간의 slope를 계산하여 비교한 결과, 동일한 가열처리 시간에 대해서는 pH가 높아질수록 slope가 큰 폭으로 감소하였으며, 특히 7과 8의 동일한 pH 내에서도 가열처리 시간이 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거 활성이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3D).

FRAP 분석법은 환원능을 가진 물질에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 Fe^{2+}-TPTZ으로 환원되면서 청남색을 나타내는 원리를 이용한 것으로 본 실험에서는 trolox를 표준물질로 검량곡선을 작성하여 환원능을 정량하였다. 가열처리 전의 시나핀산의 pH 6, 7 그리고 8에서의 FRAP 환원능은 각각 198, 201, 193 μM (trolox equivalent)으로 거의 차이가 없었으나, 10분 가열처리 시 각각 169, 172, 162 μM로 감소하였으며, pH 7과 8 시료의 경우 5분의 가열처리에도 FRAP 환원능의 감소가 유의적으로 나타났다(Fig. 3E).

이상의 결과에 의하면 가열처리에 의해 시나핀산의ABTS 라디칼 소거능 및 FRAP 환원능이 감소하면서 전반적으로 산화방지활성이 저하되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 시나핀산과 같은 페놀성 물질들의 산화방지 활성이 전자 공여 후에도 공명 구조에 의한 고리 구조의 안정화를 이루는 화학적 구조에서 비롯되는데(Urquiaga와 Leighton, 2000), 가열에 의한 시나핀산의 산화가 이 구조의 파괴를 초래하고 전자공여능의 감소를 유발하기 때문으로 판단된다. 또한 pH 상승에 따라 유의적으로 산화방지 활성의 감소가 증가하게 되는 것은 pH에 의한 시나핀산의 화학 안정성 저하를 주 요인으로 볼 수 있으며, 이는 pH 증가에 따른 폴리페놀 물질의 화학 안정성 및 활성 감소에 대한 다수의 연구결과들과 부합한다(Friedman과 Jürgens, 2000; Jhoo 등, 2005).

다수의 페놀성 화합물은 일반적으로 산소의 존재 하에 산화가 진행되면서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성한다고 알려져 있다(Chai 등, 2003; Nakayama 등, 2002). 따라서 pH와 가열처리 시간에 따른 시나핀산의 ROS 생성량을 H_2O_2의 양으로 분석하였다. 그 결과 pH 6 시료에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았고, pH 7과 8의 시료에서는 가열처리 후에 ROS 생성량이 전반적으로 증가하였다(Fig. 4). pH 7 시료는 10분 동안 가열처리 시 생성된 H_2O_2의 양이 약 8 μM인 반면에 pH 8 시료는 약 21 μM의 H_2O_2가 생성되었다. 가열처리 시 생성되는 시나핀산의 ROS 양에도 pH가 영향을 미치며 산화가 진행됨에 따라 더 많은 양의 ROS를 생성하는 것으로 판단된다.

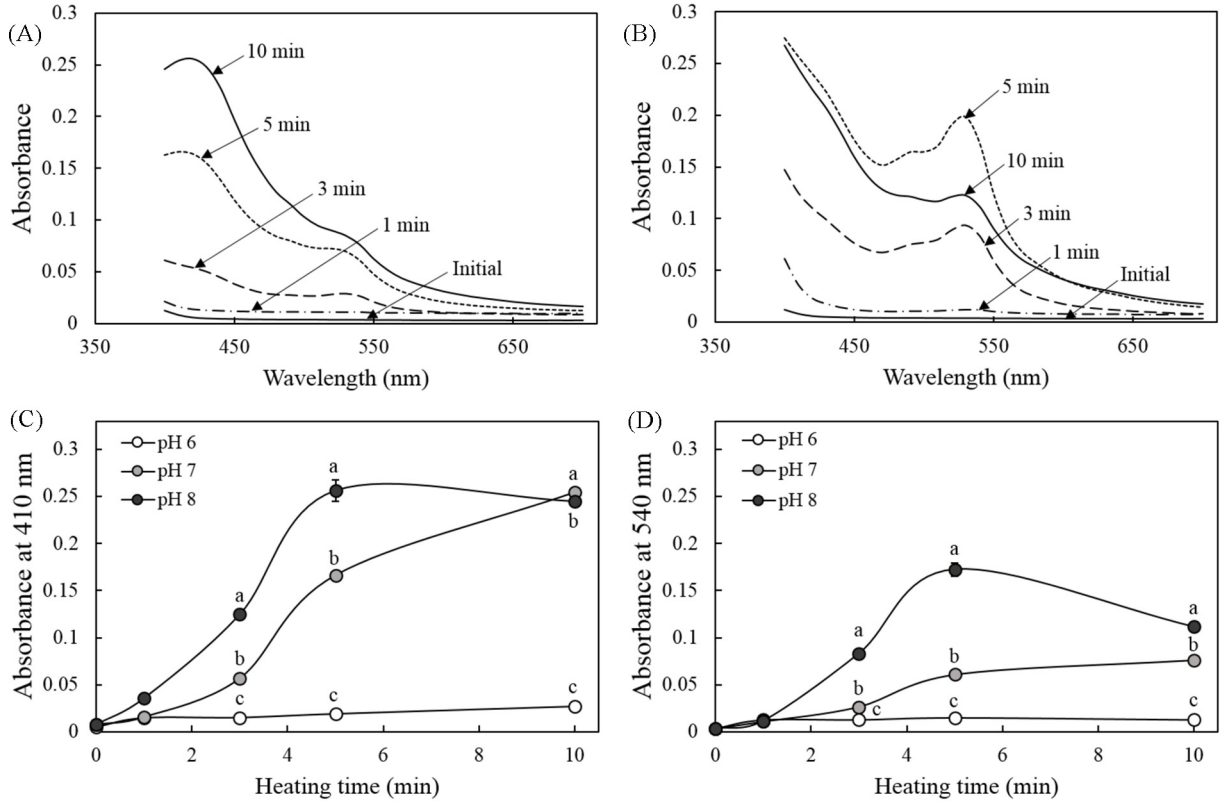

Fig. 2. Changes in absorbance properties of sinapinic acid during heat treatment. Changes in absorbance spectrum of sinapinic acid (500 μM) during 0-10 min heat treatment at 95°C in pH 7 (A) and pH 8 (B) were analyzed. Peak absorbance changes at 410 (C) and 540 nm (D) during the heating at different pH were also analyzed. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

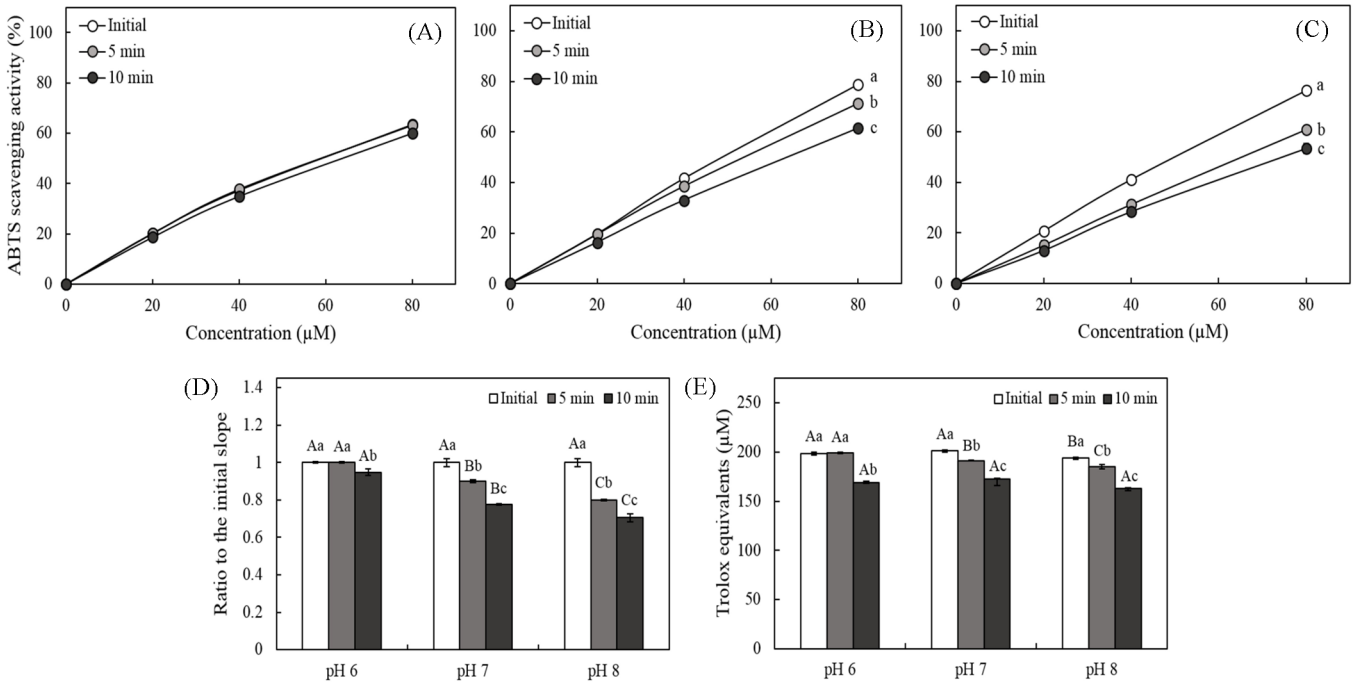

Fig. 3. Changes in antioxidant activities of sinapinic acid by heating treatment. Effects of heat treatment (0-10 min at 95°C) on ABTS radical scavenging activities of sinapinic acid at pH 6 (A), pH 7 (B), and pH 8 (C) were analyzed, and changes in slope (concentration vs. activity) at different heating conditions were calculated (D). FRAP analysis for evaluating changes in antioxidant activity of sinapinic acid by heat treatment was also performed (E). Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way (B and C) or two-way (D and E) ANOVA and the Tukey's HSD test.

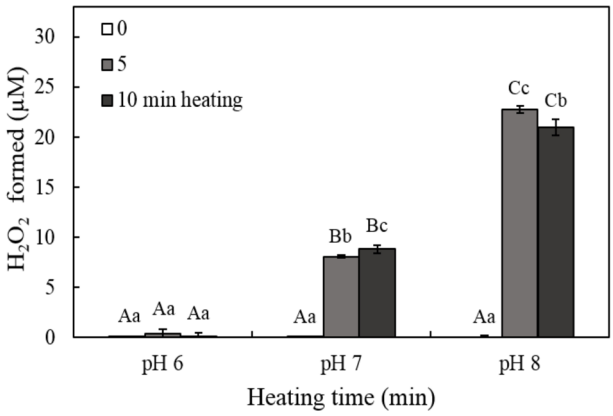

Fig. 4. Changes in H_2O_2 level formed from sinapinic acid by heat treatment. Generation of H_2O_2 from sinapinic acid (500 μM) after heating with different time (0-10 min at 95°C) at different pHs and H_2O_2 level formed was measured. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters (lowercase and uppercase for comparison among the heating periods and among the pHs, respectively) indicate a significant difference (p<0.05) based on two-way ANOVA and the Tukey's HSD test (B).

가열처리에 의한 시나핀산의 세포독성 및 glutathione 분석

가열처리에 의한 시나핀산의 생리활성 평가를 위해 HCT116 인간 대장암세포에 대한 독성 유발 효과를 조사하였다. 세포에 희석 처리를 위하여 화학실험에 비해 20배 농축한 10 mM 시나핀산을 제조하여 pH 8 조건에서 가열처리하였다. 그 결과, 분해 속도가 상당히 지연되어 30분과 60분 가열에 의해 각각 25%와 43%의 시나핀산이 파괴된 HPLC 분석 결과를 얻었으며, 60분 처리 시료의 경우 적색을 띠면서 Fig. 2B에서의 5분 가열 시료와 유사한 흡수 스펙트럼을 얻었다(data not shown). 본 가열처리 시료와 비가열 시나핀산을 농도 별로 세포에 투여하고 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 비교하였다. 가열처리를 하지 않은 시나핀산은 500 μM 농도까지 대장암세포에 유의적인 세포독성을 나타내지 않은 반면, 가열처리한 시나핀산은 가열 시간과 농도에 의존적으로 세포독성이 증가하였으며 특히 500 μM 시나핀산의 60분 가열처리 산화물을 투여한 세포의 생존율은 55%까지 감소하였다(Fig. 5A).

Glutathione은 생체 내의 주요 산화방지 성분으로 세포 내 산화적으로 손상된 구조물을 복구하거나 직접적으로 활성산소를 환원하고 제거하는 역할을 한다(Santos 등, 2013). 가열처리 전/후의 시나핀산을 8시간 동안 처리 후 thiol기와 특이적으로 반응하는 형광물질인 mBBr을 이용하여 세포 내의 glutathione을 분석하였다. 가열처리 전 시나핀산을 세포에 처리한 결과, 500 μM 처리 세포에서 10% 정도 다소 감소하는 현상을 보였으나, 가열처리한 시나핀산은 250와 500 μM 해당 농도에서 각각 20, 50% 이상 glutathione 수준이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 가열처리에 의한 시나핀산 산화물이 비교적 높은 수준의 ROS를 생성한다는 사실을 고려할 때(Fig. 4), 시나핀산 산화물로부터의 ROS를 직접적으로 제거하거나 이에 의한 산화적 손상을 복구하기 위해 세포 중의 glutathione이 이용되었기 때문으로 판단된다.

가열처리한 시나핀산이 과량의 ROS를 생성하는 것과 이를 처리한 세포에서 glutathione 감소를 초래하는 것을 근거로, Fig. 5A에서 나타난 세포독성이 산화적 손상 유발과 관련이 있을 것으로 예상하였다. 따라서 대표적인 항산화제인 *N*-acetyl cysteine (NAC)을 처리하여 세포독성의 변화를 확인하였다. 대조군의 세포 생존율과 비교하였을 때, 가열처리하지 않은 시나핀산(500 μM)과 NAC 2 mM은 유의적인 세포독성을 유발하지 않았으나, 60분간 가열처리한 시나핀산(500 μM)의 처리 시 세포 생존율은 53%까지 감소하였다(Fig. 5C). 그러나 가열처리 시나핀산과 NAC를 동시 처리하였을 때 세포독성은 점차 완화되어 0.5, 1, 및 2 mM NAC와 동시 처리 시 각각 80, 85, 및 88%까지 세포 생존율이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 가열처리 시나핀산에 의한 세포독성은 이로부터 생성된 활성산소종에 의한 세포의 산화적 손상이 주요 기작으로 판단된다.

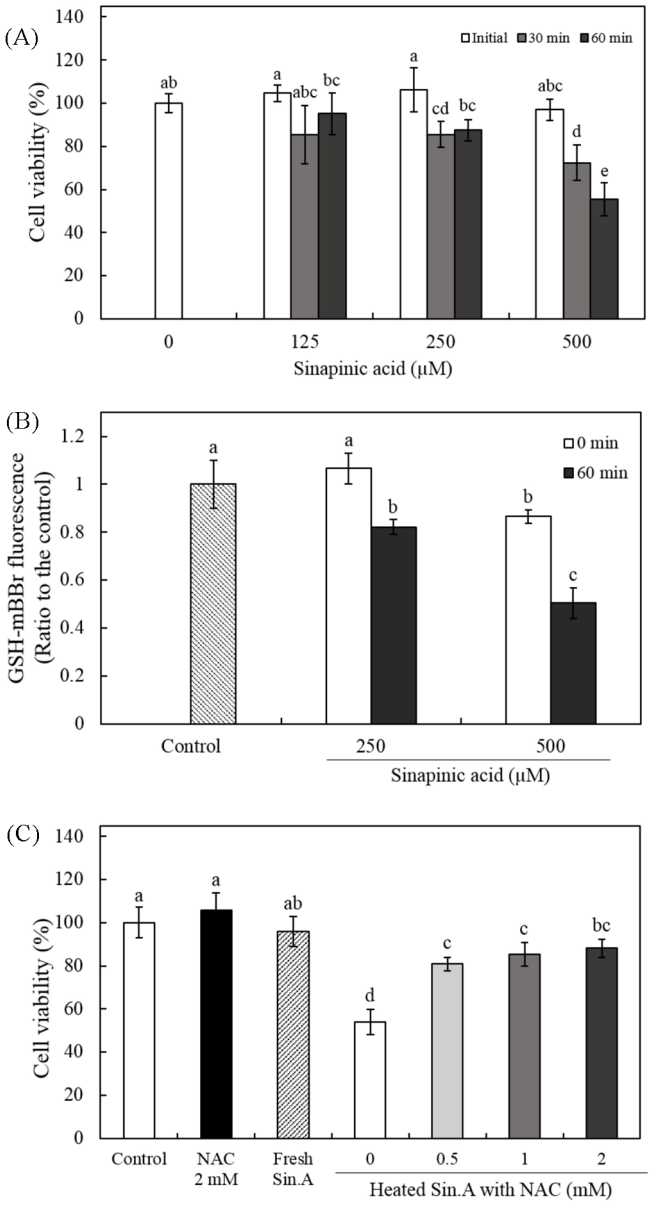

Fig. 5. Changes in cytotoxicity and glutathione levels in cells treated with sinapinic acid after heat treatment. HCT116 cells were incubated with different concentrations of sinapinic acid before or after heating at pH 8, and the cell viability after 24 h was analyzed using MTT assay (A). Changes in glutathione levels in cells treated with sinapinic acid (B) and modulation of sinapinic acid (500 μM) cytotoxicity by NAC (C) were also shown. Each value represents the mean±SD (n=6-8). Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

요 약

본 연구에서는 다양한 pH 환경에서 식품의 가공 및 조리과정 중에 빈번히 적용되는 가열처리 과정을 적용하여 시나핀산의 화학 안정성, 산화방지활성 및 세포독성 등의 생리활성 변화를 조사하였다. 95℃에서 각 시간별로 가열처리한 시나핀산은 가열시간이 증가할수록 더 많이 분해되었으며 pH가 상승할수록 더 신속하게 분해되었다. 가열처리에 의해 시나핀산의 ABTS 라디칼 소거능 및 FRAP 환원능이 모두 감소하였으며, 특히 pH 7과 8에서는 가열처리 시간에 유의적으로 현저하게 감소하였다. HCT116 인간 대장암세포에 대한 시나핀산의 세포독성 평가에서 가열처리 전의 시나핀산은 500 μM 농도까지 세포독성을 나타내지 않은 반면, pH 8에서 가열처리한 후에는 해당 농도에서 유의적인 세포독성을 발현하였으며 세포 내 glutathione 수치 또한 감소되었다. 본 연구결과는 시나핀산의 화학 안정성 및 생리활성이 가열처리와 pH 환경에 의해 많은 영향을 받으며, 시나핀산이 함유된 식품을 알칼리 조건에서 가열처리 시 성분의 손실 및 활성의 변화를 초래할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원의 한국연구재단 중견연구자 지원사업(NRF-2019R1A2C1089617)과, 2020년 서울여자대학교 교내학술 특별연구비 지원에 의해 수행되었음.

References

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-76 (1996)

Cai R, Arntfield SD, Charlton JL. Structural changes of sinapic acid and sinapine bisulfate during autoclaving with respect to the development of colored substances. J. Am. Oil Chem. Soc. 76: 433-441 (1999)

Chai PC, Long LH, Halliwell B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. Biochem. Bioph. Res. Co. 304: 650-654 (2003)

Chen C. Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging. Oxid. Med. Cell. Longev. (2016)

Dabrowski KJ, Sosulski FW. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. J. Agr. Food Chem. 32: 128-130 (1984)

Engels C, Schieber A, Gänzle MG. Sinapic acid derivatives in defatted Oriental mustard (Brassica juncea L.) seed meal extracts using UHPLC-DAD-ESI-MS n and identification of compounds with antibacterial activity. Eur. Food Res. Technol. 234: 535-542 (2012)

Faller ALK, Fialho E. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. Food Res. Int. 42: 210-215 (2009)

Friedman M, Jürgens HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. J. Agr. Food Chem. 48: 2101-2110 (2000)

Hudson EA, Dinh PA, Kokubun T, Simmonds MSJ, Gescher A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. Cancer Epidem. Biomar. 9: 1163-1170 (2000)

Jeon J, Sung J, Lee H, Kim Y, Jeong HS, Lee J. Protective activity of caffeic acid and sinapic acid against UVB-induced photoaging in human fibroblasts. J. Food Biochem. 43: 1-8 (2019)

Jhoo JW, Lo CY, Li S, Sang S, Ang CYW, Heinze TM, Ho CT. Stability of black tea polyphenol, theaflavin, and identification of theanaphthoquinone as its major radical reaction product. J. Agr. Food Chem. 53: 6146-6150 (2005)

Jiang T, Mao Y, Sui L, Yang N, Li S, Zhu Z, Wang C, Yin S, He J, He Y. Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. Food Chem. 274: 460-470 (2019)

Mathew AG, Parpia HAB. Food browning as a polyphenol reaction. Adv. Food. Res. 19: 75-145 (1971)

Nakayama T, Ichiba M, Kuwabara M, Kajiya K, Kumazawa S. Mechanisms and Structural Specificity of Hydrogen Peroxide Formation during Oxidation of Catechins. Food Sci. Technol. Res. 8: 261-267 (2002)

Nićiforović N, Abramovič H. Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. Compr. Rev. Food Sci. F. 13: 34-51 (2014)

Piñeiro Z, Palma M, Barroso CG. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. J. Chromatogr. A. 1026: 19-23 (2004)

Poot M, Verkerk A, Koster JF, Jongkind JF. De novo synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. BBA-Gen. Subjects. 883: 580-584 (1986)

Raish M, Ahmad A, Ahmad Ansari M, Ahad A, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM, Khan A, Ali N. Sinapic acid ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in rats. Biomed. Pharmacother. 108: 224-231 (2018)

Santos CCDMP, Salvadori MS, Mota VG, Costa LM, de Almeida AAC, de Oliveira GAL, Costa JP, de Sousa DP, de Freitas RM, de Almeida RN. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. Neuroscience. 2013: 1-9 (2013)

Stevanovic T, Diouf P, Garcia-Perez M. Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. Curr.Nutr. Food Sci. 5: 264-295 (2009)

Thiyam U, Stöckmann H, Zum Felde T, Schwarz K. Antioxidative effect of the main sinapic acid derivatives from rapeseed and mustard oil by-products. Eur. J. Lipid Sci. Tech. 108: 239–248 (2006a)

Thiyam U, Stöckmann H, Schwarz K. Antioxidant activity of rapeseed phenolics and their interactions with tocopherols during lipid oxidation. J. Am. Oil Chem. Soc. 83: 523-528 (2006b)

Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol. Res. 33: 55-64 (2000)

Vuorela S, Meyer AS, Heinonen M. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. J. Agr. Food Chem. 52: 8202-8207 (2004)

Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. Int. J. Mol. Sci. 18: 96 (2017)

Yoon BH, Jung JW, Lee JJ, Cho YW, Jang CG, Jin C, Oh TH, Ryu JH. Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice. Life Sci. 81: 234-240 (2007)

Yun KJ, Koh DJ, Kim SH, Park SJ, Ryu JH, Kim DG, Lee JY, Lee KT. Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor-κB inactivation. J. Agr. Food Chem. 56: 10265-10272 (2008)