

양파껍질에서 분리한 플라보놀의 Xanthine Oxidase 저해기작

나경수 · 배승환* · 손흥수** · 정수현*** · 서형주****†

대구공업전문대학 식품영양과, *고려대학교 자연자원연구소

안산공업전문대학 식품공업과, *고려대학교병설보건전문대학 식품영양과

Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonols from Onion Skin

Kyung-Soo Ra, Song-Hwan Bae*, Hung-Soo Son**

Soo-Hyun Chung*** and Hyung-Joo Suh****†

Dept. of Food and Nutrition, Taegu Technical College, Daegu 704-305, Korea

*Institute of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Dept. of Food Technology, Ansan Technical College, Ansan 425-080, Korea

***Dept. of Food and Nutrition, Junior College of Allied Health Sciences,
Korea University, Seoul 136-703, Korea

Abstract

The influence of flavonols from onion skin on xanthine oxidase was investigated. Methanol extract was showed 12.8% of yield, 661.3mg% of flavonoids contents and 88.7% of inhibitory effect on xanthine oxidase. F₁ and F₂ fractions were obtained from the methanol extract by ODS and Sephadex LH-20 chromatography. F₁ and F₂ fractions flavonols(3-OH free) identified by UV/visible spectroscopy. Inhibitory effects of F₁ and F₂ on xanthine oxidase were increased with increasing concentration. IC₅₀s of F₁ and F₂ were 0.95µg and 0.67µg, respectively. To confirm the specificity of F₁ and F₂ against xanthine oxidase, albumin was added to the reaction mixture. The inhibition of F₁ and F₂ may be due to specific binding to xanthine oxidase. The modes of their inhibitions were of mixed type with respect to xanthine as a substrate.

Key words: xanthine oxidase, onion skin, flavonol

서 론

플라보노이드는 배당체의 형태로 야채류에 널리 분포되어 있으며, 일상적인 식품섭취 과정을 통해 1일 최대 1g까지 섭취가 가능하며, 음식을 통해 공급된 플라보노이드는 침이나 장내 세균의 glycosidase에 의해 분해되어 aglycone의 형태로 흡수된다. 이러한 플라보노이드중 식물체에 널리 분포되어 있는 성분은 quercetin이다(1). 특히 양파에는 quercetin 4'-glucoside, quercetin 4',7-diglycoside, quercetin 3,7-diglycoside, quercetin 3,4'-diglycoside, quercetin aglycone 외에 isorhamnetin monoglycoside, kaempferol monoglycoside 등의 플라보노이드류가 분포되어 있으며, 이중 80%가 quercetin diglycoside, monoglycoside, quercetin aglycone으로 구성되어 있다(2). 양파의 종류와 부위에

따른 플라보노이드의 함량은 차이가 커서 노란 양파와 붉은 양파의 육질에서 플라보노이드 농도는 60mg/kg에서 1,000mg/kg의 함량을 보이며, 색을 가진 마른 껍질에 특히 플라보노이드의 함량이 높아 2.5~6.5%로 많은 양이 함유되어 있다(3). 이와 같이 양파껍질에 많은 양이 함유되어 있는 플라보노이드는 항염, 항게양, 항동맥경화, 항균, 항돌연변이, 항암, 항종양 및 항산화효과를 발휘하는 것으로 알려져 있으며(4-9), xanthine oxidase에 대한 저해효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(10-12).

Xanthine oxidase는 생체내 퓨린대사에 관여하는 효소로, xanthine 혹은 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하여 혈장내 urate가 증가되면 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍을 일으킨다(13). 통풍의 원인이 되는 xanthine oxidase를 억제하기 위한 많은 연구가

† To whom all correspondence should be addressed

진행되고 있으며(14,15), 식물계의 방어기작 물질로 알려진 플라보노이드 화합물이 효소 저해제로 관심이 높아지고 있다.

다양한 생리적 기능을 보유하는 양파의 과육 및 껍질의 보다 효과적으로 이용하는 방안으로 다양한 생리적 기능을 검토한 결과, 항산화력과 xanthine oxidase에 대한 저해기작이 뛰어난 것을 확인하였다(9). 본 연구에서는 양파껍질의 이용성을 증대시키기 위하여 xanthine oxidase의 저해효과를 검토하였다.

재료 및 방법

재료

무안에서 재배된 양파(*Allium cepa* L.)를 구입하여 분리한 비식용부분의 양파 껍질은 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐 동결건조한 후 분쇄하여 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 플라보노이드 정제에 사용한 Sephadex LH-20은 Pharmacia Co.(Sweden), xanthine oxidase는 Sigma Co.(USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase의 저해활성 측정은 Strip와 Corte(16)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 시료 추출물 1ml에 40mU의 xanthine oxidase 0.1ml 및 1/15M phosphate buffer(pH 7.5) 2.9ml를 가하여 25°C에서 15분간 preincubation시켰다. 여기에 기질로써 150mM xanthine 2ml를 가하고 30분간 반응시킨 후 1N HCl를 가하여 반응을 정지시켜 290nm에서 흡광도를 측정하여 xanthine oxidase의 활성을 나타내었다.

플라보노이드 측정

플라보노이드 함량 측정은 식품공전의 방법(17)에 따라 quercetin을 표준 물질로 하여 다음과 같이 측정하였다. 추출물 0.5ml에 에탄올 1.5ml, 10% 질산알루미늄용액 0.1ml, 1M 초산칼륨용액 0.1ml, 물 2.8ml를 가하여 교반한다. 실온에서 40분간 정치 후 물을 대조액으로 하여 415nm에서 흡광도를 측정하였다.

추출 및 분리

양파껍질 분말에 10배량의 메탄올을 가하고 환류 냉각하에서 3회 추출한 후 여과 농축하여 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물은 Park과 Lee(18)의 방법에 따라 ODS column으로 전처리한 후 Leighton 등(2)의 방법에 따

라 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리하였다.

분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수 패턴

분획물을 메탄올에 용해한 후 자외선 및 가시광선의 흡수패턴의 변화를 조사하였으며, 이때 UV/Vis spectrophotometer(Beckman DU-65, USA)를 사용하여 200~500nm의 범위에서 측정하였다.

결과 및 고찰

추출 및 분리

양파껍질로부터 플라보노이드를 추출하고자 물, 50% 메탄올, 90%메탄올을 사용하여 추출한 결과(Table 1), 각각 7.7%, 8.8%와 12.8%의 추출율로 메탄올 양이 증가할수록 추출되는 양이 증가되는 경향을 보였으며, 각 추출물의 플라보노이드 함량은 물 추출물이 319.5mg%, 50% 메탄올 추출물이 482.4mg%, 90% 메탄올 추출물이 661.3 mg%로 메탄올의 함량이 증가할수록 증가하는 경향을 보였다. 각 추출물의 xanthine oxidase에 대한 저해효과를 측정된 결과(Table 1), 플라보노이드 함량이 높은 90% 메탄올 추출물이 88.7%의 저해율로 가장 높은 저해 효과를 보였으며, 플라보노이드 함량이 비교적 적은 50% 메탄올 추출물과 물 추출물은 35.6%와 12.2%의 낮은 저해 효과를 보였다. 따라서 양파 껍질에 함유되어 있는 플라보노이드를 효과적으로 추출할 수 있는 방법은 90% 메탄올을 이용하는 방법이며, xanthine oxidase 저해를 역시 플라보노이드의 추출이 효율적인 90% 메탄올에서 가장 높은 저해효과를 보였다.

양파 껍질에 함유되어 있는 플라보노이드를 분리하고자 90% 메탄올 추출물을 ODS column chromatography에 의해 전처리하여 당과 다른 불순물을 제거한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 한 결과(Fig. 1), 두 개의 분획(F₁, F₂)를 얻었다. Leighton 등(2)은 양파 과육으로부터 quercetin diglycosides, isorhamnetin glucoside, quercetin 4'-monoglucoside와 quercetin 등 4개의 분획을 보고하였으며, Park과 Lee

Table 1. Yield, flavonoids contents and inhibition effect of extract from onion skin

Extract	Yield (%)	Flavonoids (mg%)	Inhibition effect (%)
Water	7.7	319.5	12.2
50% Methanol	8.8	482.4	35.6
90% Methanol	12.8	661.3	88.7

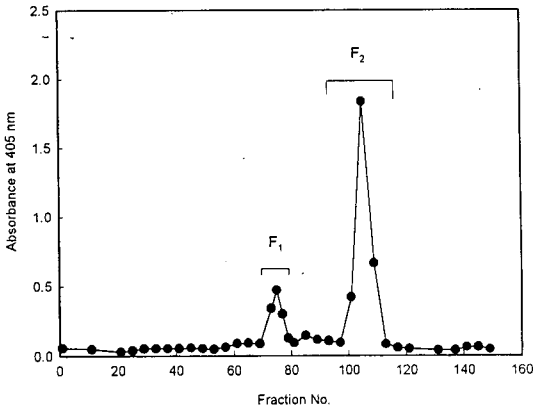


Fig. 1. Chromatogram of methanol fraction obtained from ODS column on Sephadex LH-20 column. Fractions were eluted with methanol that contained 7.5% acetic acid as a mobile phase at 0.8ml/min.

(18)는 양파 과육으로부터 quercetin diglycosides, rutin, isorhamnetin glucoside, quercetin 4'-monoglucoside 와 quercetin 등 5개의 분획을 분리하고, 양파 과육에서의 quercetin 4'-monoglucoside가 주성분임을 보고 하였다. 본 실험에서는 양파 껍질로부터 얻은 두 개의 분획은 이들의 보고(2,18)와 chromatogram을 비교한 결과, quercetin 4'-monoglucoside(F₁)와 quercetin(F₂)로 추정되었다.

분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수 패턴

Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 얻은 분획 F₁과 F₂의 자외선과 가시광선에서의 흡수 패턴을 측정 한 결과(Fig. 2), F₁ 분획은 253nm와 364nm에서, F₂ 분획은 255nm와 369nm에서 최대흡수피크를 나타내었다. 일반적으로 플라보노이드의 흡수 패턴은 3-OH가 치환된 경우 250~280nm(band II)와 330~360 nm(band I)에서 최대 피크를, 3-OH가 치환되지 않은 경우 250~280nm(band II)와 350~385nm(band I)에서 최대 피크를 나타내므로(19) 양파 껍질에서 분리한 F₁과 F₂는 3-OH가 유리상태로 존재하는 플라보놀임을 알 수 있었다.

Xanthine oxidase 저해활성

양파 껍질에서 분리한 플라보놀 분획 F₁과 F₂에 의한 xanthine oxidase의 저해활성을 측정하고자 각 분획의 농도를 달리하여 저해활성을 측정 한 결과(Fig. 3), 분획의 농도가 증가할수록 xanthine oxidase의 활성이 감소 되는 경향을 보였다. 각 분획의 IC₅₀값을 측정 한 결과 F₁과 F₂는 0.95μg과 0.67μg으로 F₁보다 F₂ 분획이 xan-

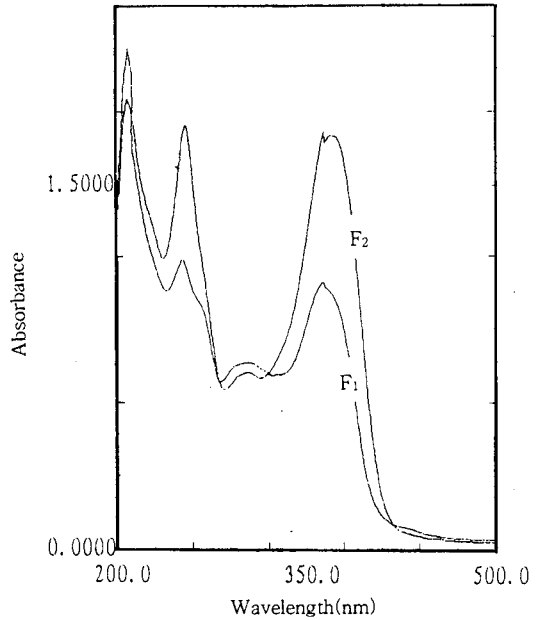


Fig. 2. Spectrophotograms of F₁ and F₂ fractions from onion skin.

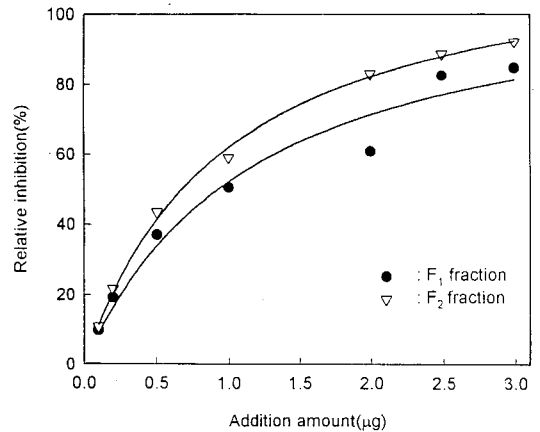


Fig. 3. Inhibition of F₁ and F₂ fractions from onion skin on xanthine oxidase activity.

thine oxidase에 대한 저해활성이 높았다. 플라보놀이 당이 결합되어 있거나 -OH기의 증가에 따른 친수성도의 증가로 인해 xanthine oxidase에 대한 저해활성이 감소하였다는 보고(12)로 미루어 F₁ 분획은 -OH기가 F₂ 분획에 비해 많거나 당이 결합되어있는 플라보놀로 추정이 되며, F₁ 분획을 산 가수분해 후 TLC에 의해 구 성당을 확인한 결과(결과 미제시), 포도당이 결합되어 있음이 확인됨에 따라 F₁ 분획에 결합된 당 또는 친수성의 증가로 인해 효소와의 반응이 제한되어 F₂에 비해 효소의 저해활성이 낮은 것으로 추정된다.

단백질 첨가효과

양과 껍질에서 분리한 분획 F₁과 F₂의 xanthine oxidase에 대한 저해활성이 저해물질의 효소 또는 단백질에 대한 비특이적 결합 성질에 의한 것인지를 확인하기 위해서 반응계내에 단백질의 농도를 증가시키기에 따라 저해효과의 해제여부를 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. 반응계내에 단백질(혈청단백질) 농도의 양을 증가시키기에 따라 F₁과 F₂ 분획 공히 80% 이상의 저해활성을 보임에 따라 양과 껍질에서 분리한 플라보놀은 xanthine oxidase에 대한 저해활성은 효소에 대한 특이적인 것으로 추측된다.

Xanthine oxidase 저해기작

양과껍질에서 분리한 분획 F₁과 F₂에 의한 xanthine oxidase에 대한 저해기작을 측정하고자 기질인 xanthine의 농도를 각각 달리한 후 각 분획을 3mg 첨가하여 xanthine oxidase에 대한 저해활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot를 작성하였다(Fig. 5). 그 결과 분획 F₁과 F₂의 Km'값이 0.98μM과 0.81μM이며, 이때의 Vmax'값은 21.74μM와 14.28μM로 Km과 Vmax값이 각각 다른 것으로 보아 이는 비경쟁적과 무경쟁적 저해 형태가 서로 혼합되어 있는 형태이다. 이러한 경향은 플라보노이드인 myricetin, keampferol과 quercetin이 xanthine oxidase에 대해 비경쟁적 저해와 무경쟁적 저해의 혼합형임을 보고한 Ilo 등(12)의 보고와 일치하였다. 즉 양과껍질에서 분리한 분획은 xanthine oxidase에 대한 저해 기작을 비교한 결과, quercetin과 같은 aglycone과 그 배당체에 의한 저해활성임을 추정할 수 있었다.

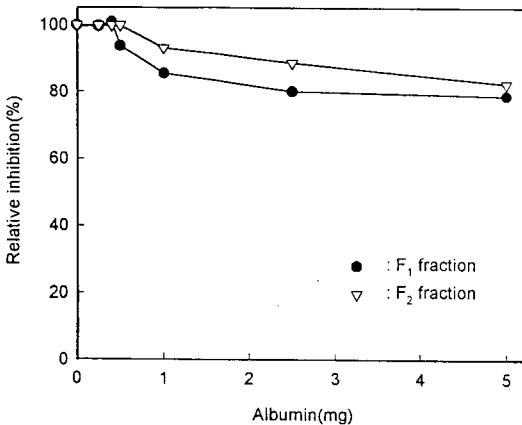


Fig. 4. Changes in inhibitory effects of F₁ and F₂ on xanthine oxidase by increasing of albumne concentration.

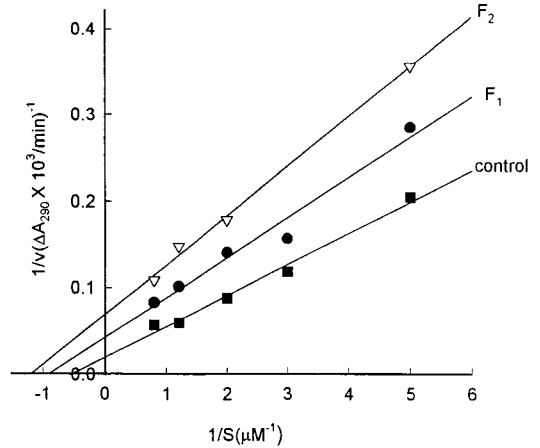


Fig. 5. Double-reciprocal plot of xanthine oxidase kinetics in the presence of F₁ and F₂ fraction.

요 약

양과껍질의 90% 메탄을 추출물은 12.8%의 추출물, 661.3mg%의 플라보노이드 함량과 88.7%의 xanthine oxidase 저해율을 보였다. 이 추출물을 ODS column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 F₁과 F₂의 두개의 분획을 얻었으며, 자외선과 가시광선에서의 흡수패턴에 의해 3-OH가 유리상태로 존재하는 플라보놀임을 알 수 있었다. F₁과 F₂ 분획의 농도를 달리하여 저해활성을 측정할 결과, 분획의 농도가 증가할수록 xanthine oxidase의 활성이 감소되는 경향을 보였으며, F₁과 F₂의 IC₅₀값은 0.95μg과 0.67 μg이었다. 반응계내에 단백질(혈청단백질) 농도의 양을 증가시키기에 따라 F₁과 F₂ 분획 공히 80% 이상의 저해활성을 보임에 따라 양과 껍질에서 분리한 플라보놀의 xanthine oxidase에 대한 저해활성은 효소에 대한 특이적인 것으로 추측된다. F₁과 F₂에 의한 xanthine oxidase에 대한 저해는 비경쟁적과 무경쟁적 저해 형태가 서로 혼합되어 있는 형태이다.

감사의 글

이 논문은 1996년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으므로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. MacDonald, I. A., Bussard, R. G., Hutchinson, D. M. and Holdeman, L. V. : Rutin-induced β-glucosidase activity in *Streptococcus faecium* VGH-1 and *St-*

- reptococcus* sp. strain FRP-17 isolated from human feces : formation of the mutagen, quercetin, from rutin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 350(1984)
2. Leighton, T., Ginther, C., Fluss, L., Harter, W. K., Cansado, J. and Nortario, V. : Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in allium vegetables. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*, ACS, Washington, D.C., p.220(1992)
 3. Bilyk, A., Cooper, P. L. and Sapers, G. M. : Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion(*Allium cepa* L.) tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 274(1984)
 4. Villar, A., Gasco, M. A. and Alcaraz, M. J. : Anti-inflammatory action and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glycosides, a novel plant flavonoid. *J. Pharmacol.*, **36**, 820(1984)
 5. Frag, R. S., Daw, Z. Y. and Abo-Raya, S. H. : Influence of some essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic mechanism. *J. Food Sci.*, **54**, 74(1989)
 6. Katiyar, S. K. : Protection against TPA-induced inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction of green tea. *Carcinogenesis*, **14**, 361(1993)
 7. Michael, G. L. H., Edith, J. M. F. and Peter, C. H. H. : Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *Lancet*, **342**, 1007(1993)
 8. Hertogo, M. G., Hollamn, D. C., Katan, M. B. and Kromhout, D. : Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*, **20**, 21(1993)
 9. 나경수, 서형주, 정수현, 손종연 : 양파껍질에서 분리된 용매 추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지*, **29**, 595(1997)
 10. 안봉전, 배만중, 최청 : 우롱차로부터 분리된 flavan-3-ol 화합물의 xanthine oxidase에 대한 저해 영향. *한국식품과학회지*, **28**, 1084(1996)
 11. 조영제, 안봉전, 최청 : 한국산 녹차로부터 탄닌의 분리 및 효소저해효과. *한국생화학회지*, **26**, 216(1993)
 12. Ilo, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N. and Fukumoto, M. : Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2173(1985)
 13. Yagi, K. : Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids*, **45**, 337(1987)
 14. Lewis, A. S., Murphy, L., McCalla, C., Fleary, M. and Purcell, S. : Inhibition of mammalian xanthine oxidase by folate compounds and amethopterin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 12(1984)
 15. Morpeth, F. F. and Bray, R. C. : Inhibition of xanthine oxidase by various aldehydes. *Biochemistry*, **23**, 1332(1984)
 16. Strip, F. and Corte, E. D. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855(1969)
 17. 식품공업협회 : 프로폴리스식품. 식품공전, p.425(1997)
 18. Park, Y. K. and Lee, C. Y. : Identification of isorhamnetin 4'-glucoside in onions. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 34(1996)
 19. Markham, K. R. : Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, London, p.36(1982)

(1998년 3월 6일 접수)