

## 각종 Flavonoids의 라디칼 봉쇄능과 ACE 활성 억제능에 관한 연구

강진훈

고신대학교 식품영양학과

### Studies on the Radical Scavenging Effects and the Inhibitory Effects on ACE Activity of Several Flavonoids

Kang Jin Hoon

Dept. of Food and Nutrition, Kosin University, Busan 606-701, Korea

#### Abstract

This study was carried out to identify the biophysical utility of bioflavonoids by the determination of their antioxidative activities, radical scavenging activity and inhibitory effect on the ACE activity. The results obtained were as follows; All flavonoids experimented greatly inhibited the linoleic acid oxidation from the early period of oxidation, and the radical scavenging ability was also greater in genistein and daidzein than other flavonoids, generally showing donating ability. Rutin has the metal-chelating ability with  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , which means to have the inhibitory effect on the promotive oxidation of lipid by metal ion. All flavonoids experimented inhibited the angiotensin converting enzyme (ACE) activity, which was greater in genistein and daidzein than other flavonoids.

**Key words:** flavonoids, radical scavenging effect, ACE inhibition, metalion, lipid oxidation

#### 서론

Flavonoid는 우리나라 자연에도 다양하게 분포되어 있고 그 종류도 다양해서 식품의 종류에 따라서도 분포형태나 분포 종류가 다른 것으로 알려져 있다. 그런 만큼 flavonoid의 약리학적 효과는 매우 다양한 것으로 보고되고 있으며 특히, 1990년대 중반부터는 식물 추출물의 활용분야가 넓어지고 의약학적 분야에서도 새로운 천연 항산화성 물질들을 개발하는 노력이 박차를 가해오고 있는 시점에서 flavonoid의 약리학적 효과에 대한 연구는 더욱 활발하게 진행되고 있는 실정이다.

지금까지 알려진 flavonoid의 생물학적 특성을 살펴보면 혈압강화효과(1,2), 당뇨병과 galactosemia의 억제효과(3), 적혈구 세포 응고의 감소효과(4), rheumatic fever의 예방효과(6-8) 등을 들 수 있다. 이러한 flavonoid는 담황색 또는 노란색을 띠고 있는 색소화합물로서 자연에서 유리상태로 존재하기도 하나 대개는 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당과 결합한 배당체로 식물의 표피에 존재하는 것으로 알려져 있어(9) 이들 식품의 생물학적 특성과 밀접한 관계를 맺고 있는 것으로 판단된다.

한편 근래에 들어서서는 대두의 생물학적 특성에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있고 많은 부분이 밝혀지고 있는데

대두에 많이 함유되고 있는 flavonoid는 isoflavone으로서 주로 그 종류가 daidzein, glycitein, genistein 등으로 이들의 약리학적 효과나 영양학적 가치 등에 대해서도 많은 연구가 진행되어 왔다. Isoflavone은 일반적으로 많이 알려져 있는 flavonoid로부터 파생된 화합물로서 자연에서는 극히 제한적으로 분포되어 있는 성분으로 알려져 있다(10). 특히, 그 작용과 기능이 여성 호르몬과 유사하다고 해서 phytoestrogen이라고 부른다(11). 대두나 대두식품은 영양학적으로도 효용가치가 있는 정도의 isoflavone을 함유하는 주요 식품으로 알려져 있다. 특히, 많은 유행성 질병에 대한 연구 결과에 의하면 대두 isoflavone의 섭취량은 호르몬 의존성 질병, 특히 유방암, 전립선암, 그리고 골다공증 등의 발생을 예방하는 데 반비례한다고 한다(12-17). 동물실험 결과에서도 isoflavone은 쥐의 흑색종 세포의 전이를 억제한다고 하였으며(18), LDL-cholesterol 함량을 저하시킬 뿐 아니라 총 cholesterol 함량을 감소시킴으로써 심혈관계 질환의 위험을 감소시키는데 좋은 효과를 나타낸다고 Carroll과 Kurowska(19) 및 Anderson 등(20)이 주장하였다.

대두에서 발견되는 주요 isoflavone은 비당질인 genistein, daidzein 및 glycitein 등과  $\beta$ -glucoside 배당체인 genistin, daidzin 및 glycitin, 이들의 malonyl과 acetyl 배당체인 6"-O-malonylgenistin, 6"-O-malonyldaidzin, 6"-O-malonyl-

glycitin, 6"-acetylgenistin, 6"-acetyldaidzin, 6"-acetyl gly-citin 등의 3형태, 12종류를 들 수 있다(10). 이처럼 iso flav-one은 그 존재형태가 다양하고 식품에 따라서 분포하는 종 류나 양이 다른 것으로 알려져 있다.

따라서 우리나라에서 flavonoid의 종류와 분포가 풍부하 고 다양한 만큼 이에 대한 연구도 지속적으로 진행되어야 할 필요가 있다. 그래서 본 연구에서는 자연에 분포하는 다양한 flavonoid를 재료로 하여 이들의 항고혈압능, 금속착체 형성 능, 항산화능 등을 조사하고 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 재료

본 실험에 사용한 flavonoid로는 rutin, kaempferol, nari-ngin, hesperidin, morin을 비롯하여 daidzein, glycitein, gen-istein 등을 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였으며 항산화 능 측정을 위해 사용한 지질은 linoleic acid(Sigma Co.)이었 다. 또한 angiotensin converting enzyme(ACE)은 Sigma Co.에서 구입하여 정제하여 분리하였으며 이를 위해 사용한 기질은 Hippuryl-His-Leu(Sigma Co.)이었다.

#### 항산화능 실험

Flavonoid의 지질 산화 억제능은 일본 기준유지분석시험 법(21)에 따라 POV를 측정하여 비교하였다.

POV는 일정량의 flavonoid 시료와 linoleic acid 1 g을 인 산 완충액(pH 7.2)을 이용하여 혼합한 것을 37°C에 항온 저 장시키면서 경시적으로 측정하였다. 즉, 반응이 끝난 시료를 꺼내어 30 mL의 chloroform : acetic acid(2 : 3) 용액에 용해한 후 포화 KI 1 mL를 첨가하고 암소에서 10분간 방치하였다. 여기에 75 mL의 물을 가하고 혼합한 다음 전분용액을 지지 약으로 하여 0.01 N 티오황산나트륨 표준액으로 적정하였다.

#### Radical 봉쇄능의 측정

Flavonoid의 radical 봉쇄능은 DPPH의 수소공여능(22)을 측정하여 나타내었다. 즉, 1% 농도의 시료용액 0.5 mL를 취하여 100 µM의 DPPH 3.0 mL와 함께 10초 동안 격렬히 혼합하고 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시키면서 경시적으 로 516 nm에서의 흡광도를 측정하고 그 변화의 차이를 항온 저장 직전의 흡광도를 기준으로 하여 아래와 같은 식에 의하 여 봉쇄능으로 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging rate (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

#### 금속 착체 형성능

CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O와 MgSO<sub>4</sub> 용액과 pH 4.0의 초산완충액으로 평형화한 TSK gel HW-40F column(Sephadex G-25 fine, ϕ 5 cm × 100 cm) 상에서 일정 농도의 rutin을 재료로 선택 하고 100 mL로 조제한 용액을 이용하여 분획하고 UV/VIS spectrophotometer(Hitachi model 3210)을 이용하여 366 nm

에서 흡광도를 측정하였다. Elution은 증류수로 하였다.

#### ACE 저해능

Angiotensin converting enzyme(ACE)의 저해능은 Cush-man과 Cheung(23)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 소정의 시료용액 50 µL에 ACE 조효소액 50 µL 및 sodium borate buffer(pH 8.3) 100을 가한 후 37°C에서 5분간 preincubation 시켰다. 여기에 기질로써 Hippuryl-His-Leu 용액(25 mg/2.5 mL sodium borate buffer) 50 µL를 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 µL를 가하여 반응을 정지 시켰다(공시험은 시료 대신에 증류수 50 µL를 사용하였으며 대조구는 1 N HCl 250 µL를 가한 다음 ACE 조효소액 50 µL를 가하였다). 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초 간 vortex한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상층액 1 mL를 취하였다. 이 상층액을 완전히 건조하여 아래의 식 에 따라 ACE 저해율을 나타내었다.

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

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 시료 무 첨가구의 흡광도

단, A, B 모두 대조구의 흡광도를 제외한 수치임

### 결과 및 고찰

#### Flavonoid의 항산화능

여러 종류의 flavonoid를 linoleic acid와 함께 37°C에서 4일 동안 반응시키면서 과산화물가를 측정하였으며 그 결과 는 합성항산화제로 강한 항산화능을 보유하는 BHT의 항산 화능을 측정한 결과와 비교하였는데 Fig. 1 및 Fig. 2에 그 결과를 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 linoleic acid의 대조구에 비해서 공시한 flavonoid의 산화가 더디게 일어나 flavonoid의 항산 화능이 우수하다는 사실을 확인할 수 있었다. 특히, 반응시 간이 경과할수록 대조구와의 차이가 크게 나타났으며 BHT 의 경우와 비교하여서도 항산화능이 유사하거나 다소 강하 게 나타나는 것을 알 수 있었다. 전반적으로 공시한 시료 간에는 뚜렷한 차이 없이 전반적으로 큰 항산화능을 나타내 었지만, 그 중에서도 morin, daidzein과 genistein의 지질 산 화 억제능이 다소 큰 것으로 나타났다.

#### Radical 봉쇄능

Flavonoid의 지질 산화 억제능이 큰 것으로 나타났기 때 문에 이들 시료의 라디칼 봉쇄능과 연관이 있을 것으로 사료 되어 DPPH법을 이용하여 라디칼 봉쇄능을 조사하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다.

실험 결과 표에서 보는 바와 같이 모든 시료에서 대조구와 비교하였을 때 강한 수소공여능력을 함유하고 있는 것으로 나타났으며 생리적으로 radical의 봉쇄제로 작용하는 ascor-

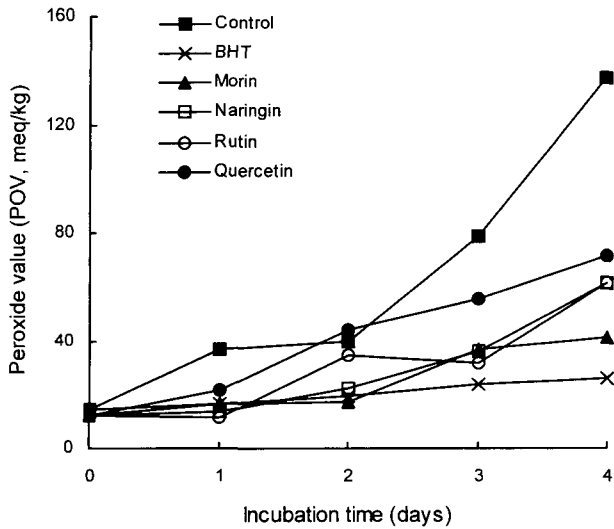


Fig. 1. Effects of flavonoids on the linoleic acid peroxidation.

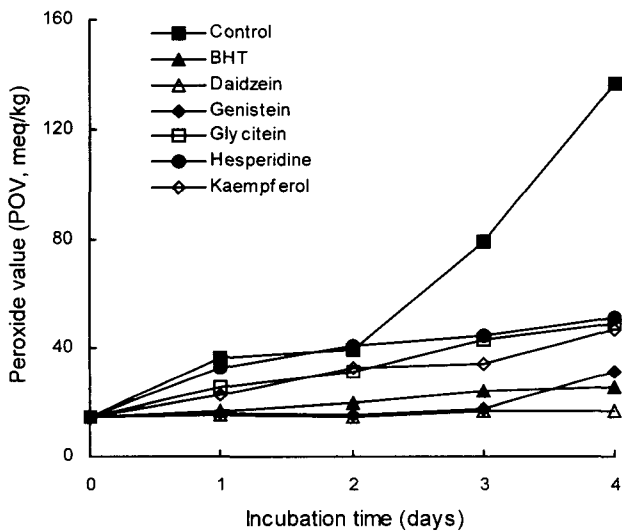


Fig. 2. Effects of various flavonoids on the linoleic acid peroxidation.

Table 1. Comparisons of radical scavenging abilities of various flavonoids

	Reaction time (hrs)		
	0.5	1	1.5
Control	2.5	7	8.5
Ascorbic acid	46.9	69	84.5
Genistein	3.7	4.6	7.1
Morin	94.6	96.5	94.6
Quercetin	96.1	93.5	93.5
Naringin	6.1	9.7	34.7
Hesperidin	48.9	54.2	57.7
Rutin	94	94.5	94.1
Daidzein	80.3	82.3	87.3
Glycitein	59.4	67.8	84.5
Kaempferol	10	29.1	30.3

bic acid(AsA)를 이용해서 동일한 실험을 행하고 비교한 결과에서도 전반적으로 AsA와 유사하게 또는 AsA보다 우수

한 radical 봉쇄능력을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 그 중에서도 morin, rutin, quercetin, daidzein 등이 95% 내외로 AsA보다 큰 봉쇄능을 나타내었다. 한편, hesperidine, gly-cirein 등도 AsA와 유사한 45% 내외의 봉쇄능을 가지는 것으로 나타났으나 naringin과 kaempferol은 별다른 봉쇄능을 나타내지는 않았다. 그러나 genistein이 대조구와 비슷하게 봉쇄능을 가지지 못하는 것으로 나타난 것을 다소 의외였다.

이와 같이 지질산화 억제능과 radical 봉쇄능에서 상호간에 일치한 결과를 나타내었다는 사실에서 flavonoid의 지질 산화억제능이 지질 산화과정에서 생성되는 radical을 봉쇄함으로써 더욱 더 크게 나타난다는 사실을 알 수 있었다.

따라서 자연에 존재하는 대부분의 flavonoid가 나타내는 지질 산화 억제능은 라디칼의 소거능이 큰 것에서 찾아 볼 수 있다고 생각할 수 있다. 이러한 결과는 Kang(24)이 감귤 껍질에서 flavonoid를 분리 추출하여 실시한 지질 산화억제능에서도 동일한 결과를 나타낸 바 있다. Kim 등(25)이 대두에서 각종 용매를 이용하여 flavonoid를 추출하여 실험한 항산화능에서도 동일한 결과를 나타내었으며 불나무 순차용매 추출물의 항산화 효과를 비교한 Lee 등(26)의 연구결과에서도 이러한 사실을 입증한 바 있다.

특히, daidzein, glycitein 등의 isoflavone과 hesperidin, quercetin, rutin, morin 등의 flavonoid의 라디칼 소거능이 반응 초기에 크게 나타나는 것으로 보아 이들의 항산화 효과가 아주 우수한 것으로 생각되었으며 이들이 지질 산화의 초기 반응에 다량으로 생성되는 것으로 알려져 있는(27) 활성산소종에 의한 지질 산화도 억제할 것으로 사료된다. 그러나 genistein과 naringin은 별다른 항산화 효과를 나타내지 않은 것으로 보아 시료 간에도 다소간의 차이가 있는 것으로 판단된다.

Flavonoid의 금속착체 형성능

Rutin을 재료로 하여 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O로 각 평형화한 TSK gel HW 40F column상에서 fractionation 하였는데 그 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3처럼 분획이 나타나는 것으로 보아 rutin이 금속과의 결합능이 강한 것으로 판단된다. CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 군에서 모두 결합능을 가지는 것으로 나타났는데 이는 지질의 산화억제능을 비롯하여 각종의 mixed-function oxidation계에 의한 단백질의 산화도 억제할 것으로 사료된다. Kang(24)의 연구결과에서 감귤껍질에서 분리한 항산화성분에서도 이러한 결과를 나타낸 것으로 보고된 바 있다. Yeum(28)은 단백질 가수분해물의 금속과의 결합능을 실험하였는데 그 결과 Cu<sup>2+</sup>을 강하게 결합하는 것으로 보고하였다. 단백질 가수분해물은 peptide이기 때문에 아미노산 잔기에 존재하는 음의 하전과의 결합을 예상할 수 있는데 본 연구에서의 flavonoid는 구조 중에 치환되어 있는 수산기(OH group)와의 산화환원반응에 의한 결과가 아닌가 추정이 된다.

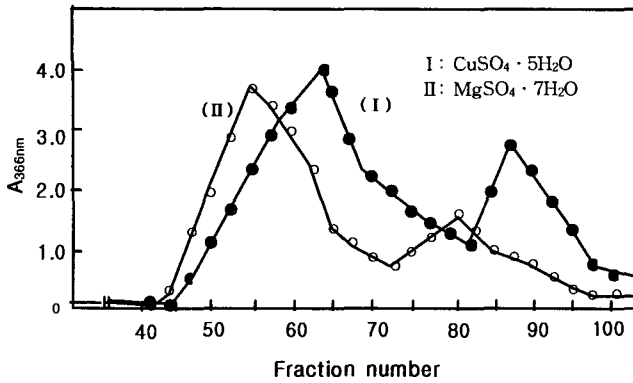


Fig. 3. Elution profiles of rutin binded with  $Cu^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ , respectively, by Sephadex G-25 gel chromatography. Fractions of 5 mL each were collected.

Angiotensin converting enzyme(ACE) 활성 저해능  
ACE는 인체 내에서 angiotensin을 활성화 시켜서 혈압을 상승시키는 작용을 하게 된다. 근래에 들어 항고혈압을 위한 각종의 연구에서 ACE 활성 저해에 많은 관심을 가지고 실험이 시행되고 있는데 본 연구에서도 이러한 차원에서 실험을 시행하였다. 즉, 조효소액을 정제하여 ACE를 분리시키고 각종의 flavonoid와 함께 일종 온도에서 반응시킨 다음 시료가 없는 대조군과의 차이를 이용하여 저해율을 측정함으로써 항고혈압능을 비교하였다.

그 결과를 Fig. 4에 나타내었는데 전반적으로 모든 시료에서 다소간의 ACE 저해효과가 나타났다. 특히, daidzein과 genistein의 저해효과가 가장 큰 것으로 나타났는데 isoflavone류의 항고혈압 효과를 확인할 수 있었다. 그 외의 시료에서도 다소간의 차이가 있었지만 대부분 15% 내외의 저해효과를 찾아볼 수 있었다. Flavonoid의 항고혈압능에 관한 연구는 그다지 많이 찾아볼 수는 없는데 대두 제품에서의 항고혈압에 관하여서는 다수의 논문이 발표되어 있다. 즉, 어육단백질 가수분해물에서 얻어진 다수의 peptide에서 ACE 저해능이 있다고 Yeum(28)이 보고한 바 있으며 대두 제품인 된장에서 분리한 peptide가 혈압조절능력이 있다고 하는 Sin

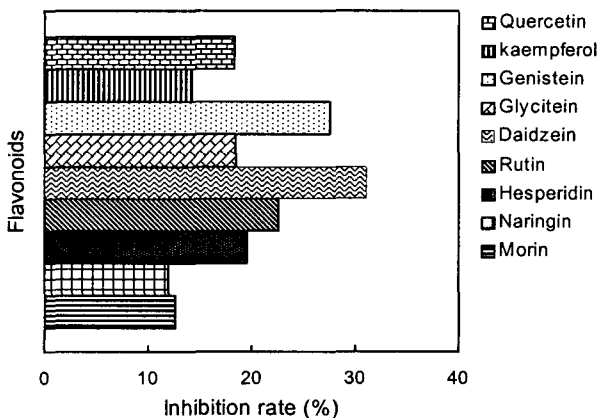


Fig. 4. Inhibition rate of the ACE activities of flavonoids.

등(29)의 보고가 있다. 특히, 본 연구에서 공시한 재료 중에서 isoflavone인 daidzein과 genistein에서 저해효과가 큰 것으로 나타나 이들 isoflavone이 phytoestrogen이라고 하는 명칭이 붙을 만큼 호르몬과 유사한 기능과 구조를 하고 있는 것으로 미루어보아 역시 호르몬의 작용에 의해 유발되기 쉬운 고혈압의 저해에 관여하는 것이 아닐까 추정된다.

요 약

천연에서 생산되는 식물성 천연항산화성 물질인 flavonoid의 지질 산화 억제능과 라디칼 봉쇄능 및 금속착체 형성능을 비롯하여 ACE 저해능을 조사하고 그 결과를 보고하였다. 즉, flavonoid와 linoleic acid를 반응시킨 결과 linoleic acid의 산화를 크게 억제하는 것으로 나타났으며 특히, 산화의 초기에 억제 효과가 큰 것으로 나타났다. 이들의 DPPH에 대한 수소 공여능을 조사한 실험에서 공시한 대부분의 flavonoid가 양질의 효과를 나타내었으나 naringin과 kaempferol은 봉쇄능이 약한 것으로 나타났으나 daidzein과 morin, quercetin 등은 아주 우수한 radical 봉쇄능을 가지는 것으로 나타났다. 한편, rutin의 금속 착체 형성능을 조사한 실험에서는  $Cu^{2+}$  ion과  $Mg^{2+}$  ion에 대한 결합능이 있는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 ACE 저해능을 조사한 실험에서는 모든 시료에서 ACE 활성을 저해하는 결과를 나타내었다. 특히, isoflavone인 daidzein과 genistein에서 저해능이 가장 큰 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 고신대학교 교내연구지원비에 의해 수행되었으며 이를 감사드립니다.

문 헌

1. Matsubara Y, Kumamoto H, Lizuka Y, Murakami T, Okamoto K. 1985. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peelings. *Agric Biol Chem* 49: 909-915.
2. Park GL, Avery SM, Byers JL, Nelson DB. 1983. Identification of bioflavonoids from Citrus. *Food Tech* December: 98-106.
3. Havsteen B. 1983. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharm* 32: 1141-1149.
4. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. 1984. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by flavonoids. Structure activity relations. *Biochem Pharm* 33: 1525-1531.
5. Rao CN, Rao VH. 1980. Effect of bioflavonoids on the urinary excretion of hydroxyproline, hydroxylysyl glycosides and hexosamine in adjuvant arthritis. *Ital J Biochem* 29: 89-95.
6. Rao CN, Rao VH, Steinmann B. 1981. Influence of bioflavonoids of lysosomal acid hydrolases and lysosomal stability. *Ital J Biochem* 30: 46-53.

7. Rao CN, Rao VH, Steinmann B. 1981. Influence of bioflavonoids on the collagen metabolism in rats with adjuvant induced arthritis. *Ital J Biochem* 30: 54-61.
8. Rao CN, Rao VH, Steinmann B. 1981. Influence of bioflavonoids on the metabolism and crosslinking of collagen. *Ital J Biochem* 30: 259-267.
9. Bate-Smith EC. 1954. Flavonoid compounds in foods. In *Advanced in food research*. Academic press, New York. Vol 5, p 261.
10. Hou HJ, Chang KC. 2002. Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. *Food Chemistry and Toxicology* 67: 2083-2089.
11. Lee GA. 2002. Metabolism improving effect of high isoflavone containing bean sprouts in diabetitis. *MS thesis*. Kyungpook National University. p 5.
12. Aldercreutz H, Goldin BG, Gorbach SL, Hockerstedt KAV, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makeia TH, Wahala KT, Hase TA, Fotsis T. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 125: 7575-7765.
13. Arjimandi BH, Alekel I, Hollis SW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. 1996. Dietary soy protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167.
14. Messina M. 1999a. Soy, soy phytoestrogens (isoflavones), and breast cancer. *Am J Clin Nutr* 70: 574-575.
15. Messina M. 1999b. Legumes and soybeans; overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 439-450.
16. Stephens FO. 1999. The rising incidence of breast cancer in women and prostate cancer in man. Dietary influences; a possible preventive role for nature's sec hormone modifiers-the phytoestrogens (review). *Oncology Reports* 6: 865-870.
17. Lamartiniere CA. 2000. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr* 71: 1705-1707.
18. Li D, Yee JA, McGuire MH, Murphy PA, Yan I. 1999. Soybean isoflavones reduce experimental metastasis in mice. *J Nutr* 129: 1075-1078.
19. Carroll KK, Kurowska EM. 1995. Soy consumption and cholesterol reduction: a review of animal and human studies. *J Nutr* 125: 594-597.
20. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. 1999. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 70: 464-474.
21. 日本油化学协会編. 1981. 日本基準油脂分析試験法. 2. 14. 15. 71.
22. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1201.
23. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
24. Kang JH. 1993. Studies on the antioxidative effect and the inhibitory effect on the DNA damage of bioflavonoid extracted from *Citrus sinensis*. *The Kosin Journal of Health Sciences* 3: 74-81.
25. Kim JY, Maeng YS, Lee GY. 1995. Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents. *Korean J Food Sci Technol* 27: 635-639.
26. Lee YJ, Shin DH, Chang YS, Kang WS. 1993. Antioxidative effect of *Rhus javanica* Linne extract by various solvents. *Korean J Food Sci Technol* 25: 677-682.
27. Kang JH. 1987. The damage of plasmid DNA by lipid peroxidation and its inhibition. *PhD Dissertation*. Pukyong National University. p 40-46.
28. Yeum DM. 1991. Functional properties of enzymatic protein hydrolysates. *PhD Dissertation*. Pukyong National University. p 37.
29. Sin JI, An CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. 1995. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Technol* 27: 230-237.

(2003년 4월 30일 접수; 2003년 10월 25일 채택)