

## 해조류 추출물의 Xanthine Oxidase 저해작용

김외경 · 이태기 · 박영범 · 박덕천 · 이용우\* · 여생규\*\* · 김인수\*\*\* · 박영호 · 김선봉†

부경대학교 식품공학과, \*동의공업전문대학 식품공업과

\*\*부산전문대학 식품가공과, \*\*\*경상대학교 식품과학과

### Inhibition of Xanthine Oxidase by Seaweed Extracts

Oe-Kyung Kim, Tae-Gee Lee, Yeung-Beom Park, Duck-Chun Park, Yong-Woo Lee\*,  
Saeng-Gyu Yeo\*\*, In-Soo Kim\*\*\*, Yeung-Ho Park and Seon-Bong Kim†

Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology, Dong Eui Technical Junior College, Pusan 614-053, Korea

\*\*Dept. of Food Processing, Pusan Junior College, Pusan 616-737, Korea

\*\*\*Dept. of Food Science, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

#### Abstract

Inhibition of xanthine oxidase by seaweed extracts obtained from *Undaria pinnatifida*, *Ecklonia stolonifera*, *Ecklonia cava*, *Laminaria japonica*, *Sargassum fulvellum*, *Codium fragile*, *Enteromorpha compressa* and *Porphyra tenera* were investigated. Extracts of *E. stolonifera* and *E. cava* remarkably inhibited xanthine oxidase activity compared to those of other seaweed. The xanthine oxidase inhibitory activity of *E. cava* was higher than that of *E. stolonifera*. Diethyl ether extract from *E. cava* was more effective in the inhibition of xanthine oxidase than other solvent extracts. Two xanthine oxidase inhibitors(A-1 and A-2) from diethyl ether extract were isolated and purified by silica gel column chromatography, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. Xanthine oxidase inhibitory activities of these compounds were 27.8 and 48.1% per 0.4mg, respectively. The active compound A-2 had absorption peak at 420nm, 456nm and 467nm, which can be considered as siphonaxanthine.

Key words: seaweed, xanthine oxidase, *E. cava*

#### 서 론

Xanthine oxidase는 생체내 퓨린대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요산을 형성한다. 요산이 혈액 중에서 이상 증가하게 되면 낮은 용해성으로 인하여 골절에 축적되어 통풍을 유발하며, 신장에 침착되어 신장질환을 일으킨다고 알려져 있다(1). 따라서 단백질의 과잉섭취는 다량의 요산 생성을 증대시키므로 식생활에서 가급적 단백질의 양을 제한하는 것이 중요하다. 이와같이 통풍을 예방하려면, 식이요법과 약물요법이 병행되어야 하며, 근본적인 치료로는 식이요법이 가장 중요하다. 통풍의 치료에 사용되는 약물로는 hypoxanthine의 유사체인 allopurinol과 alloxanthine이 있는데 allopurinol은 xanthine oxidase에

의하여 alloxanthin으로 산화된 다음, 이것이 xanthine oxidase에 강하게 결합하여 요산 생성의 최종단계에 관여하는 xanthine oxidase의 효소활성을 저해함으로써 요산의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(2).

Xanthine oxidase의 활성을 저해할 목적으로 천연물을 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔는데, 식물체에 널리 존재하는 flavonoid류 성분 중 분자내 hydroxy기의 위치에 따라 그 저해효과가 다르며(3), gallate기를 함유한 flavonoid 화합물은 경쟁적으로 저해한다고 보고되고 있다(4). 또한 녹황색 채소류의 잎에 존재하는 folate(5,6)와 거담제와 이수제의 원료로 사용되는 팔꽃나무의 꽃과 눈으로부터 분리된 genkwanin, luteolin-7-methyl ether 및 luteolin(7) 및 차(茶) polyphenol 화합물에 의한 xanthine oxidase 저해효과 등도 보고

† To whom all correspondence should be addressed

되어 있다(8-10).

이와같이 xanthine oxidase 저해작용에 관한 연구는 주로 식용식물에 대한 보고는 있으나 반면, 해조류에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 일상 식생활에서 많이 섭취하고 있는 해조류를 대상으로 하여 해조류의 기능특성 해석의 일환으로서 xanthine oxidase 저해작용에 대하여 살펴 보았다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에는 갈조류인 미역(*Undaria pinnatifida*), 감태(*Ecklonia stolonifera*), 곰피(*Ecklonia cava*), 다시마(*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum fulvellum*)과 녹조류인 청각(*Codium fragile*), 파래(*Enteromorpha compressa*) 및 홍조류인 김(*Porphyra tenera*)을 부산 부전시장과 기장에서 각각 구입하여 사용하였으며, xanthine oxidase는 Sigma사(미국)의 것을 구입하였고, 기타 시약은 연구용 특급을 사용하였다.

### 시료의 조제

시료 해조류 1kg을 마쇄하여 methanol 4L를 가하여 48시간 2회 추출하여 얻은 것을 농축하여 methanol 추출물로 하여 실험에 사용하였으며, 실험 해조류 중 xanthine oxidase 저해활성이 가장 뛰어난 감태 methanol 추출물은 diethyl ether, chloroform, ethyl acetate 및 물을 각각 일정량 가해, 각각의 용매 추출물을 만들어 실험에 사용하였다.

### Xanthine oxidase 저해작용

Xanthine oxidase 저해작용은 Noro 등(7)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 소정의 시료 추출물 1ml에 40mU의 xanthine oxidase 0.1ml 및 1/15M phosphate buffer (pH 7.5) 2.9ml를 가하여 25°C에서 15분간 preincubation 시켰다. 여기에 기질로써 150mM xanthine 2ml를 가하고, 다시 30분간 반응시킨 후 1N HCl 1ml를 가하여 반응을 정지시킨 다음, 분광광도계를 사용하여 290nm에서 흡광도를 측정하여 xanthine oxidase의 활성도를 나타내었다. 대조구는 시료대신 시료를 녹인 DMSO를 가하여 상기와 같은 방법으로 행하였으며 효소의 저해율은 반응용액 중에 생성된 uric acid의 백분율로써 나타내었다.

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

A: 대조구의 효소활성도

B: 시료 첨가시의 효소활성도

### Silica gel column chromatography

감태 methanol 추출물로 부터 얻은 ethyl ether획분을 methanol과 ethyl acetate로 평형화시킨 후 silica gel column(2.7×60cm)에 주입하여 methanol과 ethyl acetate의 농도를 10 : 0 부터 0 : 10 까지 변화시키면서 일정량씩 분취하였다.

### Thin layer chromatography(TLC)

Silica gel column chromatography에서 분리한 각 획분은 silica gel plate(silica gel 60 F254 precoated, 4×12cm)에서 spot한 후 hexane, ethyl acetate 및 chloroform(6 : 1 : 5, v/v)으로 전개시킨 후, UV lamp와 60% 황산용액의 분무로 확인하였다.

### High performance liquid chromatography(HPLC)

Silica gel column chromatography와 TLC로 부터 분리한 compounds A, B 및 C 중에서 xanthine oxidase 저해활성이 가장 강한 compound A를 HPLC(Waters, μBondapak C18; Detector, UV 456nm; Mobile phase, 76% acetone, 1.8ml/min)로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 해조류 추출물의 xanthine oxidase 저해작용

식용으로 많이 사용하고 있는 미역, 다시마, 곰피, 모자반, 감태, 청각, 파래 및 김 등 8종류의 해조류를 methanol로 추출하여 건조한 후 건물 0.5mg을 사용하여 xanthine oxidase 저해작용을 살펴 본 결과를 Table 1에 나타내었다. 감태가 76.1%로 가장 높은 저해율을 나타내었고, 다음으로는 곰피, 청각 및 미역의 순으로 나타났다. 그 외의 해조류에서는 거의 활성을 나타내지 않거나 아주 낮았다. 특히 이들 해조류 중 갈조류인 다시마와 *Ecklonia*속의 감태 및 곰피에서 가장 높은 저해율을 나타내었다.

이들 해조류 중 xanthine oxidase 저해활성이 가장 높은 감태 methanol 추출물을 diethyl ether, chloroform, ethyl acetate 및 수용성의 획분으로 각각 나누어 살펴 본 결과(Fig. 1), xanthine oxidase 저해활성은 diethyl ether>ethyl acetate>chloroform>수용성 획분의 순으로 나타났으며, 시료의 농도를 0.5mg으로 첨가할 경우, 수용성 획분을 제외한 용매추출물 모두 50% 이상

Table 1. Inhibition of xanthine oxidase by methanol extract of seaweed

Seaweed			Inhibition rate, % <sup>1)</sup>
Division	Families	Species	
Phaeophyta	Alariaceae	<i>Undaria pinnatifida</i>	10.8
	Laminariaceae	<i>Ecklonia cava</i>	76.1
		<i>Ecklonia stolonifera</i>	63.9
		<i>Laminaria japonica</i>	27.9
		<i>Sargassum fulvellum</i>	10.7
Chlorophyta	Codiaceae	<i>Codium fragile</i>	32.9
	Ulvaceae	<i>Enteromorpha compressa</i>	14.8
Rhodophyta	Bangiaceae	<i>Porphyra tenera</i>	8.6

<sup>1)</sup>Inhibition rate was determined with 0.5mg of seaweed extracts

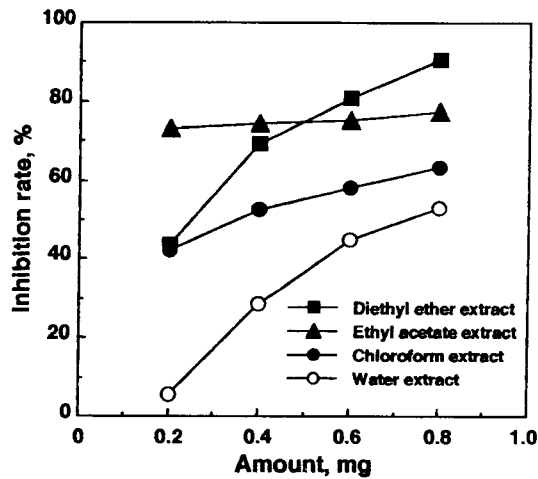


Fig. 1. Inhibition of xanthine oxidase according to amount of *E. cava* extract.

의 저해율을 나타내었다. 또한 시료 농도가 증가함에 따라 저해율이 증가하는 것으로 나타났다. 특히 용매 추출물 중에서도 diethyl ether 획분은 0.8mg 첨가시 95%의 높은 저해율을 나타내었다.

Xanthine oxidase 저해인자의 분리

감태 methanol 추출물로 부터 추출한 각 유기용매 추출물의 수율은 물>diethyl ether>ethyl acetate>chloroform의 순으로 나타났다. 그리고 각 용매 추출 후 남은 잔사는 물이나 다른 어떤 유기용매에도 녹지 않았으며, xanthine oxidase 저해활성도 없는 것으로 나타났다.

감태를 이용하여 xanthine oxidase 저해인자를 분리하기 위하여 감태의 diethyl ether 추출물을 methanol과 ethyl acetate를 10 : 0에서 0 : 10으로 농도 비율을 달리하면서 silica gel column chromatography로 용출·분획하여 TLC에 의해 분획물의 분리정도를 확인하면서 분리를 행하였다. Hexane : ethyl acetate : chloroform

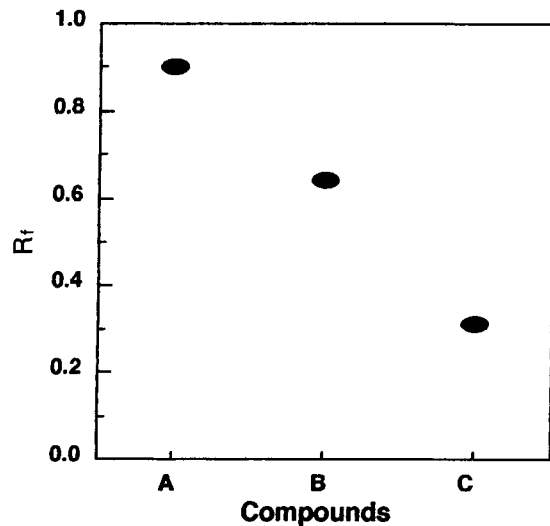


Fig. 2. Thin layer chromatogram of compounds A, B and C separated from diethyl ether extract of *E. cava* by silica gel column chromatography.

(6 : 1 : 5)의 용매 조건에서 TLC를 행한 결과, R<sub>f</sub> 값이 각각 0.9, 0.64 및 0.32였으며, 노란색, 초록색 및 갈색을 나타내는 물질을 분리하여 compounds A, B 및 C라 명명하였다(Fig. 2).

이들 compounds A, B 및 C에 대한 xanthine oxidase 저해작용을 살펴 본 결과(Table 2), 각각 53.1, 1.1 및 8.0%의 저해활성을 나타내었으며, 이들 중 가장 높은 저

Table 2. Inhibition of xanthine oxidase by compounds A, B and C separated from diethyl ether extract of *E. cava*

Compounds	Inhibition rate, % <sup>1)</sup>
A	53.1
B	1.0
C	8.0

<sup>1)</sup>Inhibition rate was determined with 0.4mg of each compound

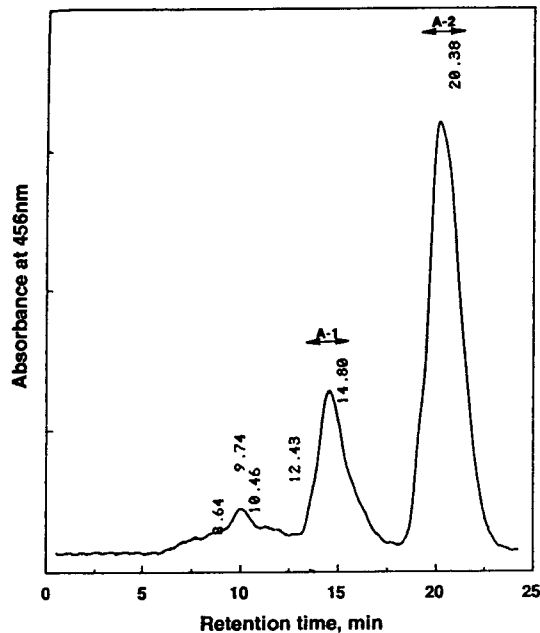


Fig. 3. HPLC profile of compound A separated from TLC. Compound A was loaded into a  $\mu$ Bondapak C18 column (3.9  $\times$  300mm) and eluted with 76% acetone at the flow rate of 1.8ml/min.

Table 3. Inhibition of xanthine oxidase by compounds A-1 and A-2 purified from compound A

Compounds <sup>1)</sup>	Inhibition rate, % <sup>2)</sup>
A-1	27.8
A-2	48.1

<sup>1)</sup>Compounds A-1 and A-2 were purified from compound A by HPLC

<sup>2)</sup>Inhibition rate was determined with 0.4mg of each compound

해활성을 나타내는 compound A를 HPLC를 이용하여 compounds A-1과 A-2의 두획분으로 분리하여(Fig. 3), xanthine oxidase 저해작용을 살펴 본 결과(Table 3), compounds A-1 및 compounds A-2는 각각 27.8% 및 48.1%의 저해율을 나타내었다.

Xanthine oxidase 저해인자를 동정하기 위하여 xanthine oxidase 저해작용이 가장 뛰어난 compounds A-2의 최대 흡수파장을 측정해 본 결과(Fig. 4), 456nm에서 최대 흡수파장을 나타내었으며, 그 양쪽에 420nm 및 467nm의 작은 흡수파장대를 갖는 물질인 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때, 감태 추출물의 xanthine oxidase 저해활성을 갖는 성분은 siphonaxanthine과 유사한 것으로 추정되며, 현재 저해인자에 대한 구조분석 등이

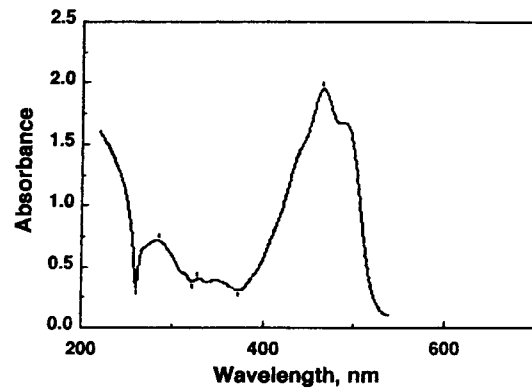


Fig. 4. Absorption spectrum of compound A-2 isolated from *E. cava*.

진행 중에 있다.

Iio 등(11,12)은 flavonoid류 중 myricetin과 kaempferol 등이 통풍 치료제로 사용되고 있는 allopurinol과 거의 비슷한 xanthine oxidase 저해효과를 낸다고 보고하고 있고, 이는 flavonoid류 중에서도 hydroxyl기가 많을수록 친수성이 증가되어 표면에 친수성과 소수성이 공존하는 계면활성제의 상태로 효소와 결합하여 효소의 활성을 저해하기 때문이라고 알려져 있다. 또한 음용되고 있는 차(茶)들의 xanthine oxidase 저해작용에 대하여 많은 보고가 되어 있는데, gallate기가 결합되어 있는 (-)-EGCg 및 (-)-ECg(8), flavonoid 화합물(3,4) 등과 같이 차(茶)의 xanthine oxidase 저해 성분은 gallate기를 함유하고 있는 polyphenol 성분이라고 보고되고 있다.

이상으로 미루어 보아 해조류 중의 xanthine oxidase 저해작용에는 해조류 중에 함유되어 있는 siphonaxanthine 외에 polyphenol 성분도 관여할 것으로 추정된다.

## 요 약

해조류의 기능특성 해석의 일환으로 해조류 중 갈조류인 미역(*Undaria pinnatifida*), 감태(*Ecklonia stolonifera*), 곰피(*Ecklonia cava*), 다시마(*Laminaria japonica*) 및 모자반(*Sargassum fulvellum*)과 녹조류인 청각(*Codium fragile*), 파래(*Enteromorpha compressa*) 및 홍조류인 김(*Porphyra tenera*) 등을 시료로 하여, 생체내 퓨린대사에서 xanthine 및 hypoxanthine으로부터 요산을 형성, 혈액 중 이상 고요산 증상에 의하여 신장질환 및 통풍을 유발하는 효소인 xanthine oxidase 저해작용에 대하여 살펴 본 결과, 갈조류의 다시마과 *Ecklonia* 속인 감태와 곰피가 가장 높은 저해율을 나타내었으며,

용매 추출물에 있어서는 diethyl ether>ethyl acetate>chloroform>수용성 희분의 순으로 나타났다. 또한 xanthine oxidase 저해작용이 가장 높은 감태 diethyl ether 추출물을 silica gel column chromatography, thin layer chromatography 및 HPLC를 통하여 xanthine oxidase 저해인자를 분리한 결과, xanthine oxidase 저해작용이 가장 강한 활성성분은 420, 456, 467nm에서 흡수파장을 가지는 물질로서, 이는 siphonaxanthine인 것으로 추정되었다.

### 감사의 글

본 연구는 1995년도 동원학술연구재단의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 문헌

1. Storch, J. and Feber, E. : Detergent-Amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem.*, **169**, 262(1988)
2. Lehninger, A. L. : Principles of biochemistry. Worth Publishers INC., New York, p.634(1988)
3. Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M. and Morita, M. : Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, **51**, 345(1988)

4. Hatano, T., Yashimura, T., Yoshihara, R. and Okuda, T. : Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Plant. Med.*, **57**, 83(1991)
5. Kohashi, M., Kenichi, A. and Tatsuo, W. : Non-thermal effect of ceramics radiation on folate structure and on xanthine oxidase inhibition by folate. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **39**, 425(1993)
6. Fish, K. M., Massey, V., Sands, R. H. and Dunham, W. R. : The interaction of bisulfite with milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19665(1990)
7. Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. and Fukushima, S. : Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984(1983)
8. 여생규, 박영범, 김인수, 김선봉, 박영호 : 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 xanthine oxidase 억제작용. *한국영양식량학회지*, **24**, 154(1995)
9. 조영제, 천성숙, 최청 : 한국산 녹차로부터 분리한 축합형 탄닌의 xanthine oxidase 저해효과. *한국영양식량학회지*, **22**, 418(1993)
10. 안봉건, 김원국, 최장윤, 권익부, 최청 : 우롱차로부터 xanthine oxidase 저해물질의 분리 및 구조. *한국식품과학회지*, **24**, 558(1992)
11. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N. and Fukumoto, M. : Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2173(1985)
12. Iio, M., Yoshimi, O., Setsumi, K. and Michi, F. : Effects of flavonoids on xanthine oxidase as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 635(1986)

(1996년 8월 22일 접수)