

감잎 열탕 추출물 및 감잎 탄닌의 Xanthine Oxidase 저해 효과

문 숙 희 · 이 민 경*

경남정보대학 식품영양과, *동아대학교 식품영양학과

Inhibitory Effects of Xanthine Oxidase by Boiled Water Extract and Tannin from Persimmon Leaves

Suk-Hee Moon and Min-Kyung Lee*

Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam College of Information & Technology, Pusan 616-701, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

Abstract

The influence of hot water extracts and tannin obtained from persimmon leaves on xanthine oxidase were investigated. Above two samples had higher inhibitory effects against xanthine oxidase, and the effects were increased with addition of the samples. The inhibition ratio of xanthine oxidase by hot water extracts and tannin obtained from persimmon leaves was 92.4% and 92.1% by addition of 2.0 mg/ml of the hot water extracts and the tannin, respectively. The inhibitions by the hot water extracts and the tannin were of competitive mode with respect to xanthine as a substrate.

Key words : xanthine oxidase, hot water extracts, tannin, persimmon leaves.

서 론

감잎은 우리 나라에서 쉽게 구할 수 있고, 값이 저렴할 뿐 아니라 비타민 A, C, D 및 엽록소가 풍부해서 고혈압, 심장병 등의 성인병 예방에 좋으며, 그외 비타민 B₁, 판토텐산, 엽산의 함유량도 녹차엽보다 많아 감잎차로서의 이용 개발은 매우 가치있는 일이라 하겠다¹⁾. 또한 감잎에 함유되어 있는 탄닌과 이와 관련된 화합물은 고혈압, 동맥경화, 신장장해 호전, 혈압강화작용, 면역기능 부활, 활성산소 유리기 소거작용, 미생물독소와 뱀독소의 해독작용 및 돌연변이·발암촉진 억제작용 등 여러 가지 생물학적 활성과 함께 약리작용을 나타낸다고 한다^{1~3)}.

통풍은 혈액 속에 퓨린의 최종대사물인 요산(uric acid)이 증가되어 불용성인 요산염이 관절이나 관절 주위조직, 신장 등에 결정으로 침착되므로 염증이 일어나 통증을 느끼게 되는 대사성 질환으로서 요산의 결정이 관절의 연골, 관절낭 및 주위의 연부조직에 침착되어 자극을 주는 것이므로, 급성통풍인 경우 손·

발가락 관절 부근에서 심한 통증을 느끼고 빨갛게 붓고, 윤택이 나며 연해지고, 만성화되면 요산 결정이 생겨 통풍결절이 생기게 된다⁴⁾. 한편 xanthine oxidase(XOase)는 생체내 퓨린대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요산을 형성하여 요산이 혈장 내에 증가되면 골절에 축적되므로 통증을 동반하는 통풍을 일으키는 효소로 알려져 있으며^{5,6)}, flavonoids, folic acid, amethopterin, aldehydes 등에 의해 xanthine oxidase활성이 저해된다는 많은 연구와 함께^{7,8)}, xanthine oxidase의 활성을 저해하여 실제로 통풍치료에 사용되는 물질로는 allopurinol, alloxanthine 등이 알려져 있다⁹⁾

일반적으로 flavonoid류는 xanthine oxidase에 대해 강한 저해제로 작용하며, 방향족 hydroxyl기가 많은 flavonoid일수록 그 저해작용이 강하고, hydroxyl기의 위치에 따라 저해효과가 다르며, galloyl기를 함유한 flavonoid화합물의 저해능이 우수하다는 보고가 있다^{10,11)}. 또한 flavonoid류에 의한 xan-

thine oxidase 저해양상은 flavonoid류의 종류에 따라 또는 농도에 따라 비경쟁적 저해제, 경쟁적 저해제 및 혼합형 저해제로 작용한다^{11~13)}.

감잎탄닌은 polyphenol의 화합물이며 catechin, catechin-3-gallate, galocatechin, galocatechin-3-gallate가 1:1:2:2의 비율로 이루어져 있고, 그외 알려지지 않은 말단잔기와 proanthocyanidin group에 속하는 것으로 구성되어 있는 여러 가지 복합형 탄닌의 혼합물¹⁴⁾로 통풍을 일으키는 효소로 알려져 있는 xanthine oxidase(XOase)를 저해하는 효과가 예상된다. 따라서 우리의 전통차로 이용되고 있는 감잎차로 마시는 경우를 고려하여 감잎의 열탕 추출물과 함께 감잎으로부터 탄닌을 분리하고 이들의 xanthine oxidase활성을 측정함으로써 감잎의 통풍 예방효과를 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

감잎은 경남 하동군 화개면 탑리에서 10월에 채집한 삼시 품종의 감잎으로 이를 건조·분쇄한 후 시료로 이용하였다.

2. 시료의 조제

감잎의 경우 감잎차로 마시는 경우를 고려하여 건조 분쇄한 감잎에 소량의 증류수를 넣고 120℃에서 1시간 가열한 뒤 감압농축하고 이를 cellulose membrane(Sigma Chemical Co., USA)으로 투석한 후 동결건조하여 분말상의 감잎 열탕 추출물을 얻었다. 한편, 감잎으로부터의 탄닌은 Okonogi 등²⁾의 방법에 의하여 분리하였다. 즉 건조분쇄한 100g의 감잎에 소량의 증류수를 넣고 120℃에서 1시간 가열하여 150ml 아세톤으로 추출한 뒤 농축하였다. 농축액에 메탄올 100ml를 넣고 여과(여과지 Whatman No. 2, England)한 뒤, 이 여과액에 디에틸에테르 80ml를 넣고 염산을 이용하여 pH를 4.0으로 맞춘 뒤 cellulose membrane으로 투석한 후 동결건조하여 분말상의 탄닌을 얻었다.

3. Xanthine oxidase 저해율 측정

Xanthine oxidase 저해작용은 Stirpe와 Corte¹⁵⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 반응구는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 용액에 xanthine 2mM을 녹인 기질액 1ml를 준비하고, 여기에 효소액(xanthine oxidase) 0.1ml와 시료(감

잎 열탕 추출물 또는 감잎 탄닌) 0.1ml를 가하고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.1ml 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시키고, 20% trichloroacetic acid (TCA) 1ml를 가하여 반응을 종료시키고 여과하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하여 다음식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}}\right) \times 100$$

결과 및 고찰

1. 감잎 열탕 추출물 및 감잎 탄닌의 효소 저해 효과

감잎으로부터 추출된 감잎의 열탕 추출물을 1ml당 0.1~0.2mg 첨가하여 xanthine oxidase 저해효과를 살펴본 결과 Table 1에서와 같이 0.1mg 첨가시 82.9%의 저해율을 나타냈으며, 열탕 추출물의 농도가 증가할수록 저해효과도 서서히 증가하여 2.0mg 첨가시에는 92.4%의 저해효과를 나타내었다.

감잎으로부터 추출된 감잎탄닌을 1ml당 0.1~2.0mg 첨가하여 xanthine oxidase 저해효과를 살펴본 결과는 Table 2에서와 같이 0.1mg, 0.5mg, 1.0mg, 2.0mg 첨가시 각각 46.4%, 79.0%, 86.9% 및 92.1%의 xanthine oxidase 저해작용을 나타내어 감잎의 열탕 추출물과 마찬가지로 농도가 증가할수록 저해효과가 증가하는 것으로 나타났다. 여¹⁶⁾ 등의 연구에 의하면 녹차, 오롱차 및 홍차의 추출물(수용성 획분)이 모두 xanthine oxidase에 대해 저해작용을 나타내며, 농도가 증가할수록 저해작용도 증가하며, xanthine oxidase 저해작용을 나타내는 주요인자를 polyphenol 화합물인 catechine이라 한다. 또한 녹차 탄닌의 경우 gallate 화합물이 non-gallate 화합물에 비해 xanthine oxidase 저해효과가 우수하다는 보고¹⁷⁾와 함께 차의 발효 정도에 따라서도 xanthine oxidase 저해효과가 달라지는데 이는 발효과정중 (-)-EGC 및 (-)-EGCg의 함량이 현저히 감소되어 이들 catechin류의 영향으로 비발효차에 비해 발효차의 경우 xanthine oxidase 저해효과가 다소 감소한다고 하였다¹⁶⁾. 따라서 감잎 탄닌의 구성성분이 catechin, catechin-3-gallate, galocatechine, galocatechin-3-gallate가 1:1:2:2의 비율로 이루어져 있고 많은 gallate기가 결합되어 있음을 고려해볼 때¹⁴⁾ 감잎의 열탕 추출물 및 감잎 탄닌의 xanthine oxidase 저해작용은 감잎의 구성성분인 이들

Table 1. Effect of hot water extract from persimmon leaves on xanthine oxidase activity

Concentration (mg/ml)	Uric acid (g/ml)	Inhibition (%)
Control	45.16	—
0.1	7.71	82.9
0.5	6.09	86.5
1.0	5.38	88.1
2.0	3.41	92.4

Table 2. Effect of tannin from persimmon leaves on xanthine oxidase activity

Concentration (mg/ml)	Uric acid (g/ml)	Inhibition (%)
Control	45.16	—
0.1	24.19	46.4
0.3	9.49	79.0
1.0	5.91	86.9
2.0	3.58	92.1

축합형 탄닌이 주요인자로 작용했으리라 사료된다. 이상과 같이 본 실험에 사용된 감잎의 열탕 추출물 및 감잎 탄닌은 생체내에서 통풍에 관여하는 효소인 xanthine oxidase 효소에 대해 농도에 비례해서 높은 저해작용을 나타내고 있어 경제적이고 품질 좋은 한국산 감잎차를 기능성 식품으로 이용하고 대중화하는데 크게 기여하리라 생각된다.

2. 감잎 열탕 추출물 및 감잎 탄닌에 의한 xanthine oxidase의 저해기작

기질의 농도를 변화시키면서 Lineweaver-Burk plot한 결과 Fig. 1, Fig. 2와 같이 감잎 열탕 추출물

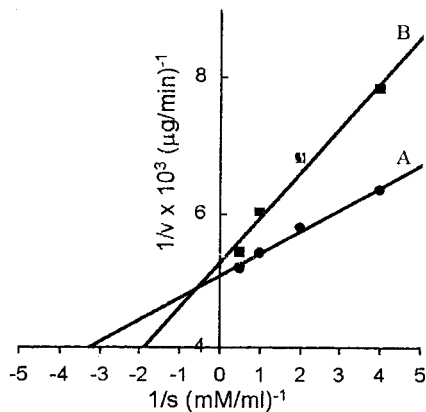


Fig. 1. Inhibitory effect of tannin obtained from persimmon leaves on xanthine oxidase. A:Control, B:Tannin

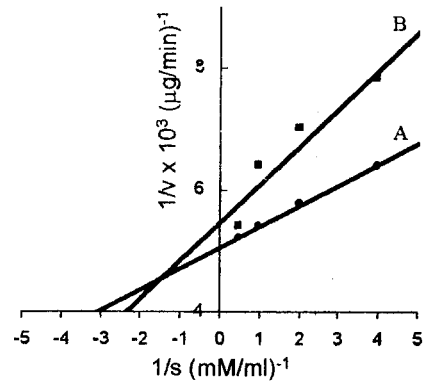


Fig. 2. Inhibitory effect of hot water extract obtained from persimmon leaves on xanthine oxidase.

A:Control, B:Tannin

및 감잎 탄닌은 경쟁적 저해를 하고 있었다. 이는 galloyl기를 함유한 flavonoid 화합물이 xanthine oxidase 저해효과가 우수하며 경쟁적으로 저해한다는 연구와 일치하였다¹¹⁾. 그러나 Iio¹³⁾ 등에 의하면 quercetin, kaempferol, myricetin등의 flavonoid에 의한 xanthine oxidase 저해효과는 무경쟁적 저해에 가까운 혼합된 형태를 나타낸다고 하였고, 조 등¹⁷⁾은 녹차에서의 탄닌류가 xanthine oxidase에 대해 비경쟁적 저해를 한다는 연구와는 다소 상이한 결과를 나타냈으나 이는 탄닌의 구조 및 종류에 기인하리라 사료된다. 또한 xanthine oxidase에 대한 flavonoid의 연구로는 galloyl기를 함유한 flavonoid가 xanthine oxidase 저해효과가 우수하고 기질에 대해 경쟁적 저해를 한다는 보고와 함께 hydroxy기의 위치에 따라 xanthine oxidase 저해효과가 다르다는 결과도 있다¹⁰⁾.

요 약

우리 나라에서 쉽게 구할 수 있고, 값이 저렴하여 대중적으로 널리 이용될 수 있는 감잎으로부터의 열탕 추출물과 함께 탄닌을 분리하여 xanthine oxidase 활성을 측정함으로써 감잎의 통풍 예방효과를 살펴보았다. 감잎의 열탕 추출물을 농도별로 첨가하여 xanthine oxidase 저해효과를 살펴본 결과 열탕 추출물의 농도가 증가할수록 저해효과가 증가하여 2.0mg 첨가시 82.4%의 높은 저해효과를 나타냈으며, 감잎탄닌도 감잎의 열탕 추출물과 마찬가지로 농도에

비례해서 xanthine oxidase 저해효과가 증가하는 것으로 나타났다. 한편 감잎 열탕추출물 및 감잎 탄닌은 xanthine oxidase에 대해 경쟁적 저해를 하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 江蘇新醫院編 : 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, p. 15-27(1978).
2. Okonogi, T., Hattori, Z., Ogiso, A. and Mitsui, S. : Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxin. *Toxicon.*, 17, 524(1970).
3. Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M. : Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats(SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem. Pharm. Bull.*, 38(4), 1049(1990).
4. 오수미 : 식사요법, 교문사, 서울, p. 311~314(1986).
5. Jonnes, P. H. : Iodine as an antihypertensive agent, *Dissertation Abstracts International* 3, 679(1973).
6. Storch, I. and Ferber, E. : Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase, *Anal. Biochem.*, 169, 262(1988).
7. 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).
8. Moreth, F. F. and Bray, R. C. : Inhibition of xanthine oxidase by various aldehydes. *Biochemistry*, 23, 1332(1984).
9. Lehninger, A. L. : Principles of biochemistry. Worth Publishers INC., New York, p. 634 (1988).
10. Hayashi, T., Sawa, K. and Morita, N. : Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, 51, 345(1988).
11. Hatano, T., Yasuhara, T., Yoshihara, R. and Okuda, T. : Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Planta Medica*, 57, 83 (1991).
12. Kang, I. Y., Kim, S. Y., Kim, H. S. and Huh, K. : Effect of phenazine dioxide derivatives on the hepatic xanthine oxidase activity. *Yakhak Hoeji*, 34(2), 112 (1990).
13. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N. and Fukumoto, M. : Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, 49(7), 2173(1985).
14. Stirpe, F. and Corie, E. D. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 244, 3855 (1969).
15. 여생규, 박영범, 김인수, 김선봉, 박영호 : 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 xanthine oxidase 억제작용, *한국영양식량학회지*, 24(1), 154(1995).
16. 조영제, 천성숙, 최청 : 한국산 녹차로부터 분리한 축합형 탄닌의 xanthine oxidase 저해효과. *한국영양식량학회지*, 22(4), 418(1993).
17. Choi, J. S., Park, S. H. and Choi, J. H. : Nitrite scavenging effect by flavonoids and its structure-effect relationship. *Arch. Pharm. Res.*, 12(1), 26 (1989).

(1998년 6월 9일 접수)