

## 냉이(*Capsella bursa-pastoris*)에탄올 추출물의 유리라디칼 소거 및 Xanthine Oxidase 저해활성

홍정일<sup>1</sup> · 권미향<sup>2\*</sup> · 나경수<sup>3</sup> · 성하진<sup>4</sup> · 양한철<sup>1</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 식품공학과, <sup>2</sup>고려대학교 생물공학연구소, <sup>3</sup>대구공업전문대학 식품영양과, <sup>4</sup>고려대학교 유전공학과

**초록** : 냉이에탄올 추출물중의 항산화활성을 나타내는 물질의 특성을 조사하기 위해 각종 용매로 분획을 실시하여 핵산 분획(Fr.H), 에테르 분획(Fr.E), 에틸아세테이트 분획(Fr.EA), 부탄올 분획(Fr.B), 물 분획(Fr.D)의 5분획을 얻었다. 부탄올 분획은 가장 높은 수소공여능 및 과산화 지질 형성 억제 효과를 보인 반면, xanthine/xanthine oxidase-cytochrome c 환원 반응계에 의한 superoxide radical의 소거능에 있어서는 에테르 분획이 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 각 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해효과를 측정된 결과 에테르 분획이 가장 큰 저해 효과를 보였으며 IC<sub>50</sub>값은 5.65 µg이었다. 이러한 결과로 부터 에테르 분획의 높은 superoxide radical 소거능이 xanthine oxidase에 의한 라디칼 형성계에 대한 저해 활성으로 부터 기인한 것임을 알 수 있었다. 각 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해 효과는 Fr.B < Fr.EA < Fr.E의 순으로 나타났으며 Fr.D는 저해효과를 보이지 않았다. 에테르 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해 형태는 비경쟁적 저해임을 확인 하였다. 에테르 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해는 단백질에 대한 비특이적인 결합 성질에 기인하는 것으로 밝혀졌으나 에틸아세테이트 분획은 약 50배의 다른 단백질(albumin)이 함유된 반응계에서도 xanthine oxidase에 대해 60% 이상 저해 활성을 유지하였다(1995년 11월 10일 접수, 1995년 12월 11일 수리).

### 서 론

노화의 원인중에 하나로 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등의 활성 산소의 역할이 대두되어 이들의 제거에 대한 관심이 높아지고 있다.<sup>1)</sup> 이들은 건강한 조직에서는 백혈구 등이 이를 이용하여 외부에서 침입한 각종 비자기 물질들을 비특이적으로 제거하는 필수적인 물질이기도 하지만 주로 불포화 지방산이 풍부한 생체막에서 자유라디칼 반응에 관여함으로써 지질 과산화를 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>2,3)</sup> 이들은 지질 외에도 생체내 구성물질인 단백질, 아미노산, 펩티드 및 효소,<sup>4,5)</sup> 당질,<sup>6)</sup> DNA<sup>7)</sup> 등에 비특이적으로 작용하여 세포의 구조적 기능적 손상을 야기하며 각종 염증, 암 등을 비롯한 생체내 이상<sup>8-10)</sup>을 초래한다고 알려져 있다.

따라서 활성산소 및 각종 유리라디칼에 의해 야기되는 과산화 반응과 각종 손상에 대한 생체내 방어기구가 다각도로 연구되고 있는데 대표적인 것으로서 superoxide dismutase (SOD), catalase, 및 glutathione peroxidase 등의 효소, tocopherol, ascorbic acid, riboflavin, uric acid, Selenium 등의 항산화 영양소 또는 항산화력을 갖는 혈청 단백질인 ceruloplasmin, transferrin, ferritin, lactoferrin, metallothionein 등이 밝혀져 있다.<sup>11)</sup> xanthine oxidase (xanthine : oxygen oxidoreductase, EC 1.2.3.2)는 분자상의 산소를 수소(전자)수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매한다.

Xanthine과 xanthine oxidase 반응의 생성물인 uric acid는 통풍의 원인이 되기도 하는데<sup>12,13)</sup> 따라서 이 효소의 저해효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의의를 가진다. xanthine oxidase의 저해물질로는 다양한 탄닌류 및 관련 페놀성 물질들이 보고되어 있다.<sup>14,15)</sup>

본 연구에서는 각종 식품 재료를 대상으로 SOD 활성의 검색과정중 superoxide radical의 소거능이 우수하였던 냉이를 선정하여 유리라디칼 소거특성을 검색하고 xanthine oxidase에 대한 저해 활성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

실험에 사용된 냉이는 경동 시장에서 구입하였고 이를 수세한 후 동결건조시켜 4℃에 냉장보관하면서 유리라디칼 소거활성 측정을 위한 추출시료로 사용하였다.

#### 시약

실험에 사용한 추출 및 기타 용매는 특급시약을 사용하였고, cytochrome c (from horse heart M.W. 12384), capillary GC용 99% linoleic acid (cis-9, cis-12-Octadecadienoic acid), 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), xanthine oxidase(from milk, Grade IV) 및 2-thiobarbituric acid는 Sigma사 제품을 사용하였다.

찾는말 : super oxide radical, xanthine oxidase inhibition, antioxidant  
\*연락처자

### 냉이의 항산화 성분 추출 및 분획

냉이 건조시료를 10배량의 95% 에탄올로 80°C에서 3회 환류추출 하였다. 이를 농축, 건조하여 에탄올 추출물을 얻고 이를 적정량의 물에 분산시킨 후 Fig. 1과 같은 방법으로 분획하였다.

### 냉이 추출물 분획별 유리 라디칼 소거 특성 검토

#### (1) 총 페놀량 측정

총 페놀 물질은 Folin-Denis의 방법을 변형하여 측정하였다.<sup>16)</sup> 추출액 1 ml에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 1 ml을 가하고 3분 후 50% Folin-Ciocalteu시약 0.2 ml을 가하였다. 이를 상온에서 30분간 방치 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로 tannic acid (Merck사)를 에탄올에 녹여 사용하였다.

#### (2) 수소공여능 (Electron donating ability) 측정

수소공여능 측정은 Blios의 방법<sup>17)</sup>에 준하여 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)을 이용하여 측정하였다. 즉 DPPH 20 mg을 에탄올 150 ml에 녹여 DPPH 용액을 제조하고, 이 용액 0.5 ml에 각 분획을 1 mg/ml의 농도가 되도록 에탄올에 용해시킨 후 반응액 1 ml당 0.005%~0.05%가 되도록 첨가량을 조절하면서 517 nm에서 30분 동안의 흡광도 감소를 측정하였다.

#### (3) Superoxide anion radical 소거 활성 측정

Superoxide anion radical 소거 활성의 측정은 xanthine/xanthine oxidase를 이용한 superoxide dismutase 활성 측정법을 이용하였다.<sup>18)</sup> 50 mM pH 7.5 phosphate buffer, EDTA, cytochrome c, xanthine이 혼합된 반응액 중에 각 분획을 에탄올에 녹여 첨가하고 xanthine oxidase 희석액 20  $\mu$ l를 가하여 반응을 개시하였다. 반응개시 후 60초간의 흡광도 변화를 550 nm (UVICON-930 spectrophotometer)에서 측정하였다. 각 분획의 농도를 변화시켜 4~6회 측정하고 시료가 첨가되지 않은 에탄올을 동량 첨가했을 때를 대조군으로 하여 각각에 대해서 550 nm에서 cytochrome c의 환원이 억제되는 비율로써 검량선을 작성하였다. 반응액의 총 volume은 1 ml이 되게 하였고 반응액 중 함유물의 최종농도는 각각 phosphate buffer (8.70 $\times$ 10<sup>-1</sup> mM), EDTA (1.74 $\times$ 10<sup>-3</sup> mM), cytochrome c (1.74 $\times$ 10<sup>-3</sup> mM), xanthine (3.48 $\times$ 10<sup>-2</sup> mM) 이 되게 하였다. 한편 xanthine oxidase는 550 nm에서의 분당 흡광도 변화가 약 0.02 가량 되도록 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 희석하여 첨가하였다. 활성은 cytochrome c의 환원을 50% 억제하는 량을 1 U로 계산하였고 그때의 시료량을 IC<sub>50</sub>으로 나타내었다.

#### (4) 자외선 조사에 대한 과산화지질 형성 억제능 검토

0.8% (w/v) sodium lauryl sulfate에 linoleic acid가 0.1% (w/v) 되도록 분산시켜 기질로 사용하였다. 이 기질용액 0.8 ml, 50 mM pH 7 Tris buffer 1.0 ml, 0.1 mM EDTA 0.1 ml를 혼합하고, 각 분획은 에탄올에 10 mg/ml, 1

mg/ml, 0.1 mg/ml 농도로 녹인 후 0.1 ml을 가하여 총 반응 volume이 2.0 ml이 되도록 하였다. 대조구는 시료를 첨가하지 않은 에탄올을 0.1 ml 가하였다. 그리고 자외선 램프(30 W)를 30 cm 거리에서 60분 조사하여 반응시켰다. 이 반응액에 0.44 M trichloroacetic acid 0.5 ml, 0.8% (w/v) 2-thiobarbituric acid 0.5 ml을 가한 후 100°C에서 15분간 발색시키고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각에 대한 대조구는 자외선 조사를 하지 않고 위와 같이 처리하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (5) 철 이온 의존성 유리라디칼 형성 반응계에 의한 과산화지질 형성 억제능 검토

0.8% (w/v) sodium lauryl sulfate에 linoleic acid가 0.1% (w/v) 되도록 제조한 기질 0.7 ml과 50 mM pH 7 Tris buffer 1.0 ml을 혼합한 후 상기와 같은 방법으로 각 분획을 0.1 ml을 가하고 2 mM ascorbic acid 및 0.2 mM FeSO<sub>4</sub>를 각각 0.1 ml 가하여 총 반응volume이 2 ml이 되도록 하였다. 이를 37°C에서 60분 반응시키고 상기와 같은 방법으로 처리하여 532 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 각각에 대한 억제능을 구하였다.

#### (6) 냉이 분획의 xanthine oxidase 저해 활성 측정

xanthine 0.5 ml 및 pH 7.5 50 mM phosphate buffer 0.3 ml를 혼합한 후 각 분획의 농도를 달리하여 0.1 ml 가하고 위의 buffer에 50배 희석한 xanthine oxidase를 가하여 293 nm에서 3분간 흡광도의 증가를 측정하였다. SOD assay system에서의 xanthine oxidase의 저해활성은 상기와 같은 방법으로 반응액을 제조하고 293 nm에서 3분간 흡광도 증가를 측정하였다.<sup>19)</sup>

#### (7) 냉이 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해 기작 측정

기질 xanthine의 농도를 변화시키면서 에테르 분획 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g의 첨가시 4의 방법에 따라 활성을 측정하였고, Lineweaver-Burk plot에 의해 저해기작을 결정하였다. 냉이 에테르 분획의 xanthine과 효소에 대한 작용을 조사하기 위하여 0.1 mM xanthine 및 50 mM pH 7.5 phosphate buffer로 50배 희석한 xanthine oxidase에 각각 에테르 분획을 가하고 4°C에서 12시간 저장한 후, 4의 방법에 따라 저해 효과를 측정하였고, xanthine 및 xanthine oxidase 단독으로 저장한 대조군에 동량의 에테르 분획을 가하였을 때의 저해 효과를 측정하여 상대적인 활성으로 나타내었다.

에테르 분획과 에틸아세테이트 분획의 xanthine oxidase에 대한 특이적 결합성질을 알아보기 위하여 bovine serum albumin을 4의 반응계에 0.005~5.0 mg/ml의 농도가 되도록 첨가한 후 효소 활성의 변화를 조사하였다.<sup>14)</sup>

## 결과 및 고찰

### 냉이 에탄올 추출물 분획의 성질

냉이 에탄올 추출물을 Fig. 1과 같이 분획하여 각 분획의 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

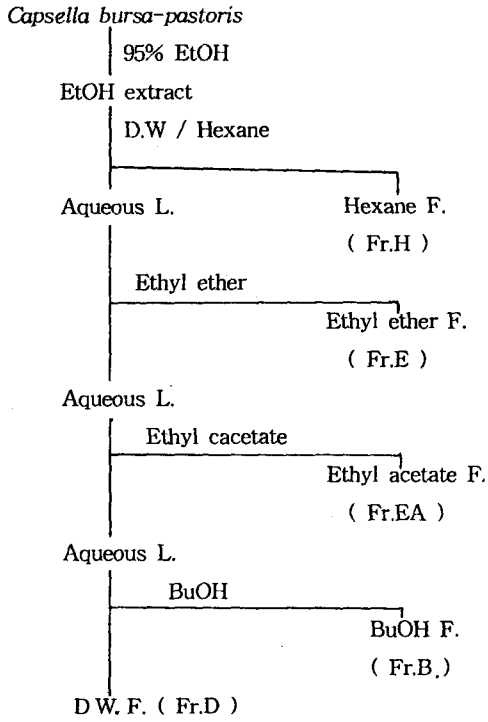


Fig. 1 Preparations of several fractions from the 95% ethanol extract of *Capsella bursa-pastoris* by solvent partitioning.

Table 1. Properties of solvent fractions of ethanol extract from *Capsella bursa-pastoris*

Fractions	Solid yield (%)	Phenol content (%)	Abs.* at	
			280 nm	285 nm
Fr.H	25.84	—	—	—
Fr.E	3.30	9.31	1.619	1.631
Fr.EA	6.21	13.2	0.924	0.833
Fr.B	16.29	12.0	0.861	0.737
Fr.D	48.36	1.23	0.124	0.107

\* Conc. 0.1 mg sample/ml EtOH

**분획별 수소공여능 검토**

DPPH를 이용하여 각 분획의 양을 증가시키면서 수소공여능을 측정하였을때의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 부탄을 분획에서 월등히 큰 수소공여능을 나타내었으며 에틸아세테이트 분획, 에테르 분획의 순이었다. 환원성 항산화제의 경우는 유지의 자동산화 과정중에 생성되는 ROO·, R·, RO· 등에 수소 또는 전자를 주는 수소(전자)공여능 즉 환원력이 중요한 작용을 하지만 항산화제의 일반적인 작용을 수소공여능만으로 설명할 수 없으며 오히려 환원제에 의해서 radical 반응이 연쇄적으로 유발되는 경우도 보고되어 있다.<sup>20)</sup>

**Superoxide anion radical 소거활성 검토**

Table 2와 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 xanthine-xanthine oxidase에 의해 형성된 superoxide anion radical 소거활성 측정에서는 부탄을 분획과 에테르 분획이 다른

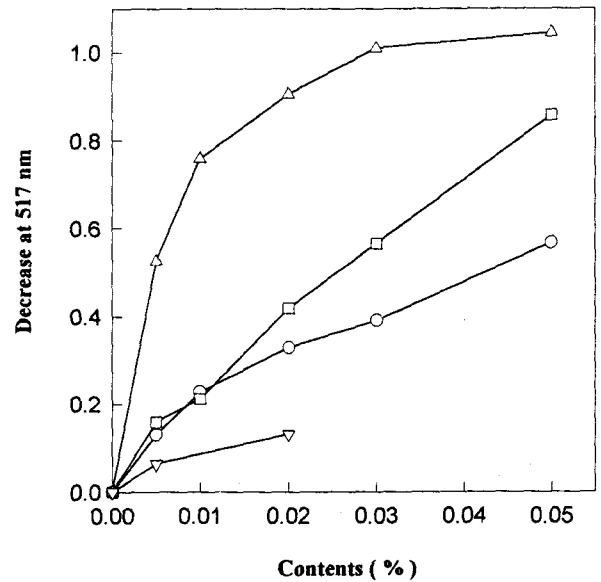


Fig. 2. Electron donating abilities of fractions of fractions from *Capsella bursa-pastoris*. ○—○, Fr. E; ▽—▽, Fr. D; △—△, Fr. B; □—□, Fr. EA.

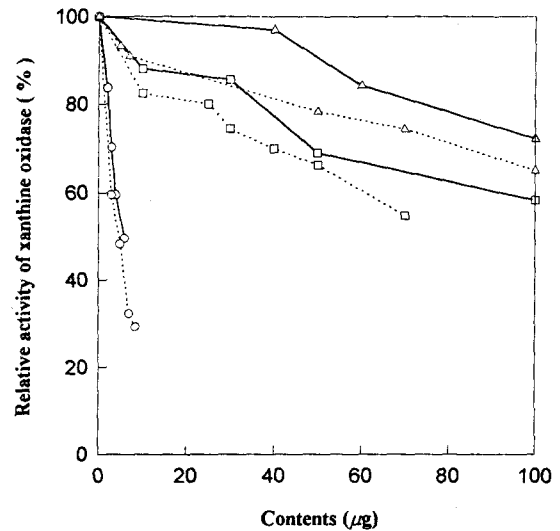


Fig. 3. Inhibitory effects on xanthine oxidase of fractions from *Capsella bursa-pastoris*. ○—○, Fr. E; □—□, Fr. EA; △—△, Fr. B. Solid line —, xanthine/xanthine oxidase system; dot line ·····, superoxide dismutase assay system.

Table 2. Superoxide radical scavenging activities of fractions from *Capsella bursa-pastoris* in xanthine/xanthine oxidase-superoxide radical generating system

Fraction	Unit (U/mg) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (µg) <sup>b</sup>
Fr.H	—	—
Fr.E	221.730	4.510
Fr.EA	19.164	52.180
Fr.B	210.700	4.746
Fr.D	7.732	129.331

<sup>a</sup> Calculated by SOD unit, <sup>b</sup> Inhibition of 50% cytochrome c reduction

Table 3. Inhibition rates(%) of lipid peroxidation by U.V radiations of *Capsella bursa-pastoris* solvent fractions (ethanol contained)

Contents (%)	Fr. D	Fr. B	Fr. EA	Fr. E
0.05	5.26± 3.33	62.56± 6.16	41.04± 2.82	61.44± 9.35
0.005	-	19.84± 4.31	20.51± 5.58	18.31± 3.26
0.0005	-	3.01± 1.97	2.02± 0.55	0.55± 0.07

\* Mean of triplicate

Table 4. Inhibition rates (%) of lipid peroxidation by U.V radiations of *Capsella bursa-pastoris* fractions (ethanol excepted)

Contents (%)	Fr. D	Fr. B	Fr. EA	Fr. E
0.005	19.53± 3.27	53.87± 10.03	21.49± 6.20	42.26± 15.89
0.0005	6.89± 2.44	21.14± 8.32	15.98± 2.71	8.46± 6.94

\* Mean of triplicate

분획에 비해 월등히 높은 활성을 나타내었다. 이는 수소공여능의 결과와 차이가 있는 것으로 에테르 분획은 비교적 다른 분획에 비해 낮은 수소공여능 즉 환원력을 보였지만 xanthine/xanthine oxidase-cytochrome c 환원 반응계에서는 대단히 큰 cytochrome c 환원에 대한 억제능을 나타내었다. 이러한 결과는 에테르 분획이 superoxide anion radical의 소거능이 클 경우에 나타나지만, 또는 xanthine oxidase에 의한 반응 즉 superoxide radical생성 반응의 저해에 의해서도 나타날 수 있다.

**과산화지질 형성억제능 검토**

(1) 자외선에 의한 과산화지질 형성 억제능 검토

이 반응계에서는 자외선이 반응계 물분자에 작용함으로 형성되는 hydroxyl radical, 반응계 내에 금속이온과 같은 기존의 라디칼 및 고 에너지의 자외선이 직접 유 지분자에 작용하여 형성된 유지의 allyl radical에 의해서 유지의 산화가 진행될 수 있다.<sup>21)</sup>

위 반응계에서는 hydroxyl radical의 강력한 소거 활성을 가진 에탄올<sup>22)</sup>에 각 분획 시료를 녹여 첨가하여 반응계 내의 에탄올 농도가 약 1M 정도가 되도록 하였다. 따라서 hydroxyl radical에 의해 야기되는 유지 산패 반응의 영향을 감소시킬 수 있다. 또한 EDTA를 첨가하여 기존에 존재하는 금속 이온의 영향을 최소화 하여 라디칼 소거활성을 검토하였다. Table 3의 결과를 보면 부탄올 분획에서 가장 높은 억제 활성을 보였고 물 분획이 가장 낮은 활성을 나타내었다.

Table 4에서와 같이 반응계내에서 에탄올을 배제하였을 때의 결과에서도 부탄올 분획이 가장 높은 억제 활성을 나타내었는데, 이 결과는 부탄올 분획이 유지의 allyl radical, peroxy radical 및 hydroxyl radical과 이에 의해 연쇄되는 라디칼에 모두 강력한 소거작용을 나타 낼 수 있었다. 에탄올 첨가시보다 반응계내에 에탄올이 배제되었을 경우에 모든 분획에서 더 높은 억제활성을 나타내는 것으로 보아 냉이의 유리라디칼 소거물질은 유지의 allyl radical이나 peroxy radical에

Table 5. Inhibition rates (%) of lipid peroxidation by iron/ascorbic acid dependent free radical formation system of *Capsella bursa-pastoris* fractions

Contents (%)	Fr. D	Fr. B	Fr. EA	Fr. E
0.05	13.98± 7.52	66.86± 2.87	40.35± 3.33	50.56± 16.79
0.005	14.15± 5.27	21.03± 3.47	23.14± 3.47	30.36± 2.75
0.0005	-	4.89± 2.70	8.61± 5.39	15.43± 2.65

\* Mean of triplicate

대해서 보다는 hydroxyl radical, 또는 superoxide anion radical과 같은 활성 산소와 관계된 라디칼의 소거에 더 효과적으로 작용하는 것으로 예상된다.

(2) 철 이온 의존성 유리라디칼 형성 반응계에 의한 과산화 지질억제능 검토

이 반응계에서는 2가의 철이온에 의해 생성된 산소 라디칼이 수소이온과 과산화수소를 형성하는데,<sup>23)</sup> 이 반응에서 유발된 라디칼 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>이 모두 지질의 산화에 작용할 수 있으며 특히 hydroxyl radical에 의해 주로 산화가 진행될 것으로 예상된다. 이 반응계를 통한 각 추출 분획들의 과산화 지질 억제능을 검토한 결과 Table 5에서와 같이 부탄올 분획이 가장 높은 억제 활성을 나타내었다. 따라서 부탄올 분획은 유지의 allyl radical, peroxy radical 및 hydroxyl radical과 이에 의해 연쇄되는 라디칼에 모두 높은 소거작용을 가지는 것으로 추측된다. 부탄올 분획의 경우 0.005%와 0.0005% 첨가시에는 에테르 분획이나 에틸 아세테이트 분획 보다 상대적으로 낮은 활성을 나타내는 것으로 보아 일정 농도 이하에서는 지질의 산화를 유발하는 라디칼의 소거보다는 자신의 산화에 의한 환원성질을 나타내는 것으로 보인다. 실제 생체내에서 철 이온에 의한 과산화지질 유발은 효소적으로 ceruloplasmin에 의해 억제되며, Fe, Cu등의 금속에 의한 과산화지질 유발은 비효소적으로 transferrin, ferritin, serum albumin, amino acid, phosphate 등과 같은 복합적인 방어체계에 의해서 억제된다고 알려져 있다.<sup>24)</sup>

**Xanthine oxidase에 대한 저해 효과**

Xanthine oxidase와 xanthine, hypoxanthine과 같은 기질과의 반응은 일반적인 라디칼 형성 반응으로 알려져 있다. xanthine/xanthine oxidase-cytochrome c 반응계에서 측정되는 superoxide anion radical에 대한 소거효과는 어떤 물질에 의해 반응계 자체가 억제될 경우, 즉 xanthine oxidase의 활성이 저해되는 경우 그 물질의 실제 라디칼 소거효과보다 높은 활성으로 나타내게 된다. 따라서 냉이 추출물의 xanthine oxidase의 활성저해에 의한 실제 superoxide anion radical 소거능을 알아보기 위하여 특히 탄닌을 비롯한 많은 페놀류들에 있어서 xanthine oxidase에 대한 저해활성이 보고되고 있는 바 냉이 추출물의 xanthine oxidase 저해 활성을 조사하였다.

Fig. 3과 Table 6의 결과와 같이 물 분획을 제외한

Table 6. Inhibitory effects on xanthine oxidase of fractions from *Capsella bursa-pastoris*

Fractions	Fr. D	Fr. B	Fr. EA	Fr. E
IC <sub>50</sub> (μg)	— <sup>a</sup>	201.90	120.02	5.649
IC <sub>50</sub> (μg) <sup>b</sup>	—	143.66	79.17	4.763

<sup>a</sup> Not detected.

<sup>b</sup> Effect in xanthine/xanthine oxidase - cyt. c reduction system.

각 분획에서 효소 저해 활성을 나타냈고 특히 에테르 분획에서는 다른 분획에서보다 월등한 저해활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. Xanthine/xanthine oxidase-cytochrome c 반응계에서도 xanthine oxidase에 대하여 수치의 차이는 있지만 역시 같은 경향을 나타내는 것으로 보아 Table 2에서 나타난 에테르 분획의 superoxide anion radical에 대한 소거활성은 대부분 라디칼에 대한 소거활성이 아니라 xanthine oxidase의 저해에 의해 라디칼 형성 자체가 억제됨으로서 나타나는 현상임을 확인하였다.

한편 에테르 분획의 물질들이 정제된 상태가 아니므로 xanthine oxidase를 억제하는 물질과 라디칼 소거능을 나타내는 물질들이 동일 물질이라고 생각할 수 없으며 실제 에테르 분획의 silica gel-60에 의한 컬럼 크로마토그래피 결과 DPPH 라디칼에 대한 소거활성이 크게 나타난 분획에서는 매우 낮은 xanthine oxidase 저해 활성을 나타내었다. 그러나 Hatano<sup>13)</sup> 등은 효소의 저해 활성과 라디칼 소거능간의 상관관계는 찾을 수 없지만 xanthine oxidase를 강하게 저해하는 ellagic acid와 같은 탄닌 및 관련 물질들이 라디칼 소거능도 공유한다고 한 바 있다.

#### 냉이 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해 기작

냉이 에테르 분획의 xanthine oxidase 저해 형태를 조사한 결과 Fig. 4에서와 같이 비경쟁적 저해를 나타냈고 따라서 에테르 분획은 xanthine oxidase에 비경쟁적으로 결합하여 그 활성을 저해하는 것을 알 수 있었다. 이러한 경향은 Hatano 등이<sup>25)</sup> 보고한 탄닌류 및 관련 polyphenol류들에 의한 저해형태와 일치하는 결과로서 이러한 탄닌류들의 저해 활성은 탄닌류의 단백질에 대한 결합 성질, 즉 탄닌류의 단백질과의 친화성과는 관계가 없으며 따라서 효소에 본 구조로 하는 축합형 탄닌이 xanthine oxidase에 대한 경쟁적 저해를 함을 보고하였다.

따라서 냉이 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해 활성이 저해물질의 효소 또는 단백질에 대한 비특이적인 결합 성질에 의한 것인지를 확인하기 위하여 반응계내에 단백질의 농도를 증가시키면서 저해효과의 해제여부를 조사하여 Fig. 5에 나타내었다. 반응계내에 xanthine oxidase 만이 존재할 경우 반응계의 단백질 농도는 0.0054 mg/ml이 되는데, 에테르 분획의 경우 반응계의 bovine serum albumin 농도가 0.01 mg/ml에서 약 50% 가량의

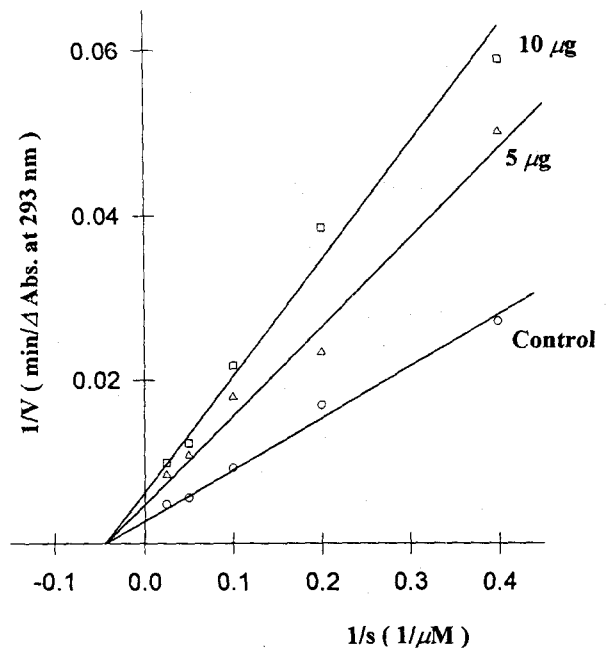


Fig. 4. Inhibition type of Fr. E on xanthine oxidase. Xanthine oxidase conc.  $8.26 \times 10^{-3}$  unit.

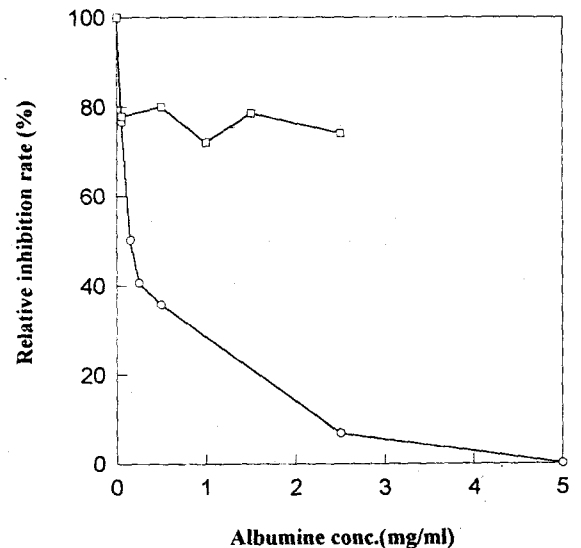


Fig. 5. Changes in inhibitory effects of Fr. E and Fr. EA on xanthine oxidase by increase of albumine concentration. Xanthine oxidase conc.  $8.26 \times 10^{-3}$  unit; inhibition conc. Fr. E, 0.006 mg/ml; Fr. EA, 0.1 mg/ml; □-□, Fr. EA; ○-○, Fr. E.

저해효과가 해제되었고 2.5 mg/ml에서는 90% 이상의 저해효과가 해제됨을 알 수 있었다. 따라서 냉이 에테르 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해 활성은 이들의 단백질에 대한 비특이적인 결합에 의한 것임을 확인하였다. 그러나 에틸 아세테이트 분획의 경우 bovine serum albumin의 농도가 2.5 mg/ml로 효소만 존재할 경우에 비하여 약 50 배 가량 반응계의 단백질 농도를 증가시켰음에도 60% 이상의 저해활성을 나타내는 것

으로 보아 에틸 아세테이트 분획의 xanthine oxidase에 대한 저해활성은 효소의 특정 부위에의 결합에 의한 것으로 예상된다.<sup>14)</sup>

참 고 문 헌

1. Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875.
2. Lynch, R. E. and I. Fridovich (1978) Espects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **253**, 1838.
3. 中村 良, 川岸舜朗, 渡邊乾二, 大澤俊彦 (1990) "食品機能化學", 三共出版, 東京, pp 6-26.
4. Redpath, J. L. (1981) Free radical reactions with simple biochemical systems. *J. Chem. Educ.* **58**, 131.
5. 川岸舜朗 (1991) 活性酸素と蛋白質. *化學と生物* **30**, 122.
6. 栢村直樹 (1991) 活性酸素と糖質. *化學と生物* **30**, 40.
7. Ishida, R. and T. Takahashi (1975) Increased DNA chain breakage by combined action of bleomycin and superoxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 1432.
8. McCord, J. M. (1974) Free radicals and inflammation. *Science* **185**, 529.
9. Petrone, W. F., D. K. English, K. Wong, and J. M. McCord (1980) Free radicals and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 1159.
10. Draper, H. D. and R. P. Bird (1984) Antioxidants and cancer. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 433.
11. 大柳善彦 (1989) "SODと活性酸素調節劑", 日本 醫學館, 東京.
12. Kelley, W. N. and J. B. Wyngaarden (1974) Enzymology of gout. *Adv. Enzymol.* **41**, pp. 23-28.
13. Hatano, T., T. Yasuhara, T. Fukuda, T. Noro, and T. Okuda (1989) Phenolic constituents of Licorice. II. Structures of

Licopyranocoumarin, Licoarylcoumarin and Glisoflavone, and inhibitory effects of Licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3005.

14. Iio, M., A. Moriyama, Y. Matsumoto, N. Takaki, and M. Fukumoto (1985) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2173.
15. 조영제, 안봉진, 최 청 (1993) 한국산 녹차로부터 탄닌의 분리 및 효소 저해 효과. *한국생화학회지* **26**, 216.
16. Salunkhe, D. K., J. K. Chavan, and S. S. Kadam (1989) Dietary tannins: Consequences and Remedies. CRC Press, pp. 84-87.
17. Blios, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199.
18. McCord, J. M., and I. Fridovich (1969) Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049.
19. Beyer, W. F. and I. Fridovich (1987) Assaying for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **161**, 559.
20. Mahoney, J. R., E. Graf (1986) Role of alpha-tocopherol ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model system. *J. Food Sci.* **51**, 1293.
21. Hatano, T., T. Yasuhara, T. Fukuda, T. Noro, and T. Okuda (1990) Effects of interaction of tannins with co-existing substance. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1224.
22. Takahama, U. (1987) Oxidation products of kaempferol by superoxide anion radical. *Plant Cell Physiol.* **28**, 953.
23. Helliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1981) Formation of thiobarbituric acid reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salt. *FEBS* **128**, 347.
24. Decker, E. A., A. D. Crum, and J. T. Calvert (1992) Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 756.

**Free Radical Scavenging Activities and Inhibitory Effects on Xanthine Oxidase by Ethanol Extract from *Capsella bursa-pastoris***

Jung-Il Hong<sup>1</sup>, Mee-Hyang Kweon<sup>2\*</sup>, Kyung-Soo Ra<sup>3</sup>, Ha-Chin Sung<sup>4</sup>, Han-Chul Yang<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Food Technology, Korea University, Seoul, Korea; <sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea; <sup>3</sup>Department of Food Nutrition, Taegu Technical Junior College, Taegu, Korea; <sup>4</sup>Department of Genetic engineering, Korea University, Seoul, Korea)

**Abstract**: To examine the characteristics of antioxidative compounds from *Capsella bursa-pastoris*, ethanol extracts were separated into five organic solvent fractions; hexane(Fr.H), diethyl ether (Fr.E), ethyl acetate(Fr.EA), butanol (Fr.B), and water(Fr.D) fractions. Fr.B showed the greatest electron donating ability and inhibitory effect on lipid peroxidation. Whereas Fr.E had the most excellent activity in the superoxide radical scavenging activity by xanthine/xanthine oxidase-cytochrome c reduction system. The inhibitory effect of each fraction on xanthine oxidase was also measured. Fr.E had the strongest inhibitory effect on xanthine oxidase and IC<sub>50</sub> was 5.65 µg. The results indicate that the superoxide radical scavenging activity of Fr.E is caused by the inhibitory effect on radical generating system of xanthine oxidase. Also the order of inhibitory effect on xanthine oxidase was Fr.B<Fr.EA<Fr.E. But Fr.D had not an effect on xanthine oxidase. The inhibition type of Fr.E on xanthine oxidase turned out to be a noncompetetive inhibition. The inhibition by Fr.E maybe due to nonspecific binding to protein. Yet in the reaction system contained about 50 fold amount of other proteins, the inhibitory effect of Fr.EA on xanthine oxidase still remained above 60%.

\*Corresponding author