

우롱차로부터 Xanthine Oxidase 저해물질 분리 및 구조

안봉전 · 김원극 · 최장윤 · 권익부 · 최 청*

롯데중앙연구소 생물공학팀, *영남대학교 식품가공학과

Structure and Isolation of Xanthine Oxidase Inhibitor from Oolong Tea

Bong-Jeun An, Won-Keuk Kim, Jang-Youn Choi, Ik-Boo Kwon and Cheong Choi*

Department of Biotechnology, Lotte R&D Center

*Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

Abstract

Xanthine oxidase involved in prurine metabolism oxidizes hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. The derangement of prurine metabolism results in gout that associates painful deposit of monosodium urate in the cartilage of joints. In the continuous study for natural compound, six flavan-3-ols have been isolated from the leaves of Oolong tea. The structures of procyanidin B-1, B-3, procyanidin B-3-3-O-rhamnose, procyanidin B-1-3-O-gallate, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-O-gallate were established by NMR and their inhibitory effect on xanthine oxidase activity was investigated. Flavan-3-ols containing the gallate had a high inhibitory capacity. Procyanidin B-1-3-O-gallate showed complete inhibition at 50 μ M and inhibited on the xanthine oxidase competitively.

Key words: xanthine oxidase inhibitor, flavan-3-ol, Oolong tea

서 론

Xanthine oxidase는 생체내 퓨린 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하며 urate가 혈장내에 증가되면 골절에 축적되므로 통증을 동반하는 통풍을 일으키는 효소로 알려져 왔다^(1,2).

이러한 효소를 저해할 목적으로 천연물에서 많은 연구가 진행되어 왔는데 Hayashi 등⁽³⁾은 식물계에 널리 존재하는 flavonoid류를 분리하고 xanthine oxidase 저해효과를 관찰한 결과 hydroxy기의 위치에 따라 저해능의 효과가 다르다는 것을 보고한 바 있다.

Hatano 등⁽⁴⁾은 galloyl기를 함유한 flavonoid 화합물이 xanthine oxidase 저해효과가 우수하였으며 경쟁적으로 저해한다는 사실을 보고하였다. 또한 Noro 등⁽⁵⁾은 거담제와 이수제의 원료로 사용하고 있는 팔꽃나무의 꽃눈으로부터 분리된 genkwanin, luteolin이 xanthine oxidase에 강한 저해효과가 있었다고 보고하였다. 그러나 flavan-3-ol을 기본 골격으로 하는 축합형 탄닌에 관한 xanthine oxidase 저해효과 실험은 아직 보고된 바 없다. 그러므로 새로운 통풍치료제 개발을 목적으로 각종 생

리활성의 효과가 인정되고 있으며 우리와 쉽게 접할 수 있는 우롱차로부터 flavan-3-ol 화합물을 분리하고 그 구조를 밝혔으며 xanthine oxidase 저해능을 관찰하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구의 재료는 일본 후쿠오카현에서 특산물로 1989년 9월 제조된 시판용 우롱차엽(Camellia sinensis)을 사용하였으며 시약으로서는 Sephadex LH-20(Pharmacia Co. Sweden), MCI-gel CHP-20(Mitubishi chemical Ind. Co. Ltd. Japan), Fuji gel(Hambai Co. Ltd. Japan) Bondapak C₁₈ Porasil B(Water U.S.A.)를 xanthine oxidase(Sigma Co. U.S.A.)를 구입하여 실험에 사용하였다.

기기

¹H-NMR(JEOL GX-270, Japan)을 사용하여 acetone-d₆+D₂O 용매에 용해하고 TMS를 기준물질로 하여 측정하였고, IR(JASCO IR-700, Japan)은 KBr 정제법으로, MS(JEOL JMX-DX 300, Japan)은 negative ion FAB-Mass system에 의해 분자량을 측정하였다.

추출 및 분리

차엽 7.5 kg을 추출탱크에서 80% acetone-수용액 35

Corresponding author: Bong-Jeun An, Department of Biotechnology, Lotte R&D Center, 23, 4ka, Yangpyungdong, Youngdeungpo-ku, Seoul 150-104, Korea

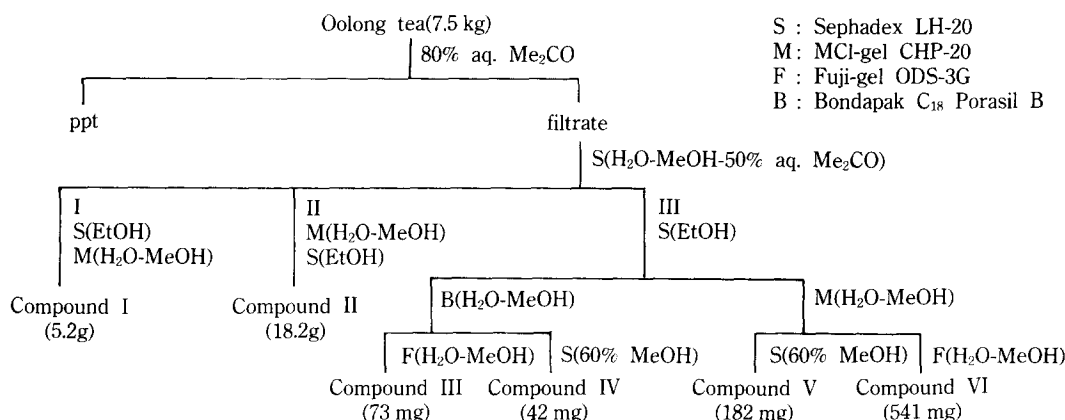


Fig. 1. A procedure for isolation of polyphenol from Oolong tea

1를 가하여 실온에서 24시간 침지한 후 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 상등액과 침전물을 얻었다. 다시 침전물에 80% acetone-수용액을 첨가 동일한 조건으로 4회 반복 추출하였다. 각각의 상등액을 모아 농축액과 하여 응고된 클로로필을 제거하고 2l로 하였다. 농축액을 Fig. 1과 같이 Sephadex LH-20 column에 loading하고 H₂O : MeOH(1 : 0→0 : 1)을 용출용매로 하여 fraction I, II, III로 분획하였다. 분획물을 다시 MCl-gel CHP-20, Sephadex LH-20, Bondapak C₁₈, Fuji-gel 등의 column chromatography법으로 compound I~VI를 분리하였다.

분리중 Sephadex LH-20 column의 용출용매는 EtOH 및 H₂O : MeOH(1 : 0→0 : 1)을 사용하였고 MCl-gel CHP-20, Fuji-gel, Bondapak C₁₈ column은 H₂O : MeOH(1 : 0→0 : 1) 사용하여 gradient로 용출시켰다. 분획물을 Thin Layer Chromatography(TLC)에 탄닌의 분리 정도 및 유무를 확인하면서 반복 정제하였다.

화합물(compound I~VI)의 단리

Compound I : Fraction I에서 Sephadex LH-20, MCl-gel CHP-20로 분리하였으며 무색의 침상형 결정체(H₂O)를 얻었다.

mp ; 240~243°C, $[\alpha]_D^{25}$; -38.6°(C=1.0, acetone)

IR(KBr)cm⁻¹ ; 3400(OH), 1625, 1520(arom. C=C)

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O) δ ; 2.88(1H, brs, 2-H), 3.10(1H, dd, J=4, 16Hz, 4-H), 5.12(1H, brs, 2-H), 5.50(1H, m, 3-H), 6.04(1H, d, J=8Hz, 5'-H), 6.90(1H, dd, J=2, 8Hz, 6'-H), 7.06(1H, d, J=2Hz, 2'-H), FAB-MS(%) ; 289[M-H]⁻

Compound II : Fraction II로부터 MCl-gel CHP-20, Sephadex LH-20로 분리된 무색침상형(H₂O)을 얻었다.

mp ; 266~269°C, $[\alpha]_D^{25}$; -190.2°(C=1.0, acetone)

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O)δ ; 2.88(1H, dd, J=18, 3 Hz, 4-H), 3.10(1H, dd, J=18, 8Hz, 4-H), 5.12(1H, brs, 2-H), 5.50(1H, m, 3-H), 6.04, 6.08(each 1H, d, J=2Hz,

6, 8-H), 6.75(1H, d, J=8Hz, 5'-H), 6.90(1H, dd, J=8, 2Hz, 6'-H), 7.03(2H, s, G-H), 7.06(1H, J=2Hz, 2'-H)

Compound III : Fraction III으로부터 Sephadex LH-20, Bondapak C₁₈, Fuji-gel순에 의해 분리된 무정형 분말로써 anisaldehyde-H₂SO₄와 FeCl₃ 용액에 청색반응을 하였다.

$[\alpha]_D^{25}$; -198.1°(C=1.0, acetone)

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O)δ ; 2.54~2.96(2H, m, 4'-H), 4.04~4.99(5H, in total, m, 2, 3, 4, 2', 3'-H), 5.87~6.19(3H in total, m, 6, 8, 6'-H), 6.32~7.20(6H in total, m, B, B'-H), FAB-MS(%) ; 577[M-H]

Compound IV : Fraction III으로부터 Sephadex LH-20, Bondapak C₁₈과 Sephadex LH-20 column에 60% MeOH로 용출하여 분획하였다. 무정형 분말로써 anisaldehyde-H₂SO₄와 FeCl₃ 용액에 청색반응을 하였다.

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O)δ ; 1.16~1.24(3H, m, Me-5'''), 2.5~2.9(2H, m, H-4), 5.8~6.3(3H, m, A-ring H), 6.4~7.1(6H, m, B-ring H), FAB-MS(%) ; 723[M-H]⁻

Compound V : Fraction III으로부터 Sephadex LH-20, MCl-gel CHP-20 및 Sephadex LH-20에 60% MeOH로 단리한 것을 역시 anisaldehyde-H₂SO₄와 FeCl₃ 용액에 청색반응을 한 무정형 분말을 얻었다.

$[\alpha]_D^{25}$; 40.2°(C=1.0, acetone)

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O)δ ; 2.58(1H, dd, J=16, 8 Hz, 4'-H), 2.83(1H, dd, J=16, 6Hz, 4'-H), 3.98(1H, brs, 3-H), 4.10(1H, m, 3'-H), 4.68(1H, brs, 4-H), 4.76(1H, m, 2'-H), 5.08(1H, m, 3'-H), 5.94(1H, d, J=2Hz, 6-H), 5.97(1H, s, 6'-H), 6.03(1H, d, J=2Hz, 8-H), 6.62~7.08(6H in total, m, B, B'-ring H). FAB-MS(%) ; 577[M-H]⁻

Compound VI : Fraction III으로부터 Sephadex LH-20, MCl-gel CHP-20 및 Fuji-gel을 사용하여 무정형 분말을 얻었다.

$[\alpha]_D^{25}$; -18.6°(C=1.0, acetone)

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 2.55(1H, dd, $J=8$, 16 Hz, 4'-H), 2.90(1H, dd, $J=6$, 16Hz, 4'-H), 4.03(1H, m, 3'-H), 4.42(1H, d, $J=6\text{Hz}$, 2'-H), 4.62(1H, s, 4-H), 5.32(1H, s, 3-H), 5.47(1H, s, 2-H), 5.96~6.18(3H in total, m, A-ring H), 6.69~6.95(6H in total, m, B-ring H), 6.97(2H, s, galloyl H)

Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 xanthine을 기질로 하여 생성된 urate를 spectrophotometry법으로 측정하는 Stripe 등⁽⁶⁾의 방법을 변형시켜 행하였다. 즉 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.5)에 기질인 0.1 mM xanthine 및 효소액 ml당 0.02 unit를 혼합하고 37°C에서 3분간 반응시켰다. 반응 종료는 1 N HCl을 가해 반응을 중단시키고 생성된 urate를 292 nm에서 측정 검량선에 의해 산출하였다.

결과 및 고찰

Compound I~VI의 분리 및 화학구조

Fraction I, II, III에서 각종 column chromatography로 분리된 화합물은 TLC 상에서 순수한 단일물질로 분리되었음이 확인되었고 ani-saldehyde- H_2SO_4 와 FeCl_3 용액에 각각 갈색 및 청색반응을 하였으므로 flavan-3-ol 화합물임을 추정하게 하였다. TLC의 Rf값에서 compound I과 II는 flavan-3-ol monomeric compound로 III~VI는 dimeric compound로 생각되어졌다.

Compound I은 IR spectrum에서 3400 cm^{-1} 의 OH와 1615, 1520 cm^{-1} 에서 C=C 결합을 알 수 있었고 $^1\text{H-NMR}$ 에서도 2.88, 3.10 ppm에서 각각의 1H분의 4-H가, 5.12 ppm의 1H분의 2-H 및 5.50 ppm의 1H분의 3-H가 signal의 귀속이 가능하였고 6.04~6.90 ppm 사이에는 B-ring의 2H분 5',6'-H가 확인되었다. Negative FAB-MS로 측정된 분자량은 289[M-H]였기에 (-)-epicatechin으로 동정하였다.

Compound II는 $^1\text{H-NMR}$ 의 signal은 compound I과 거의 일치하였으나 7.03 ppm에서 2H분의 singlet로 존재하는 gallate 화합물의 H가 존재함이 확인된 바(-)-epicatechin-3-O-gallate 화합물로 동정하였다.

Compound III은 negative FAB-MS 분자량 측정에 의해 577[M-H]를 얻었다. 이것은 flavan-3-ol 화합물 두 분자가 존재함을 확인하였고 $^1\text{H-NMR}$ 에서 2.54~2.96 ppm 사이 2H분의 4'-H와 6.32~7.20 ppm 사이 6H분의 B,B'-ring H가 형성된 바 이러한 spectrum은 Kashiwada 등⁽⁷⁾의 signal과 일치하므로 catechin 두 분자가 4 α -8로 연결된 procyanidin B-3로 동정하였다.

Compound IV는 분자량이 723[M-H]로 확인되었고 1.16~1.24 ppm에서 3H분의 methyl기에 해당하는 proton이 관찰된 바 당이 결합된 것으로 알 수 있었다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 의 2.5~2.9 ppm 사이 2H분의 4-H와 6.4~7.1

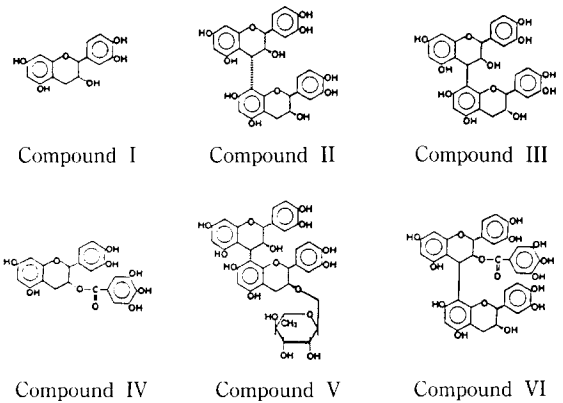


Fig. 2. Structure of polyphenols isolated from oolong tea

ppm의 6H분의 B-ring에 해당하는 proton은 전형적인 flavan-3-ol 화합물임을 알 수 있었다. 또한 Morimoto 등⁽⁸⁾이 발표한 procyanidin B-3-3'-O-rhamnose와 일치하였다.

Compound V는 역시 flavan-3-ol의 dimeric에 해당하는 분자량 577[M-H]를 얻었고 $^1\text{H-NMR}$ 은 2.58, 2.83 ppm에서 각각 1H분의 4'-H가 5.94 ppm에서 J 값이 2 Hz인 6-H, 5.97 ppm에서 singlet의 6'-H가 보여진 바 compound III과 다른 형태의 화합물로 확인되었고 이것은 Hashimoto 등⁽⁹⁾이 발표한 procyanidin B-1과 일치하였으므로 epicatechin과 catechin으로 결합된 화합물로 동정하였다.

Compound VI는 $^1\text{H-NMR}$ 의 signal은 compound V와 거의 일치하였으나 6.97 ppm에 2H분의 proton이 singlet로 존재하는 gallate 화합물이 결합되어 있음이 확인되었으므로 이 화합물은 procyanidin B-1-O-gallate로 동정하였다. 이중 compound IV, V 및 VI는 일본산 우롱차(후쿠오카현)에서 처음으로 화학구조가 확인되었다. 각각 동정된 화학구조는 Fig. 2와 같다.

분리된 화합물의 xanthine oxidase에 대한 저해 영향 및 기작

화학구조가 결정된 각각의 화합물은 10~100 μM 로 조제하고 저해효과를 관찰하였다. Fig. 3은 flavan-3-ol의 monomeric compound에 해당하는 (-)-epicatechin과 (-)-epicatechin-3-O-gallate의 저해효과를 비교한 것으로 (-)-epicatechin은 약간의 저해능이 있었으나 (-)-epicatechin-3-O-gallate는 25 μM 부터 완만한 저해가 형성되어 100 μM 에서 49%의 저해가 되었다.

Fig. 4는 dimeric compound인 procyanidin류를 비교 실험한 것으로 procyanidin B-1, B-3, B-3-3'-O-rhamnose는 저해능이 관찰되지 않았으나 procyanidin B-1-3-O-gallate는 25 μM 에서 저해가 급격히 증가하여 50 μM 에서는 xanthine oxidase를 완전히 불활성화시켰다. 즉

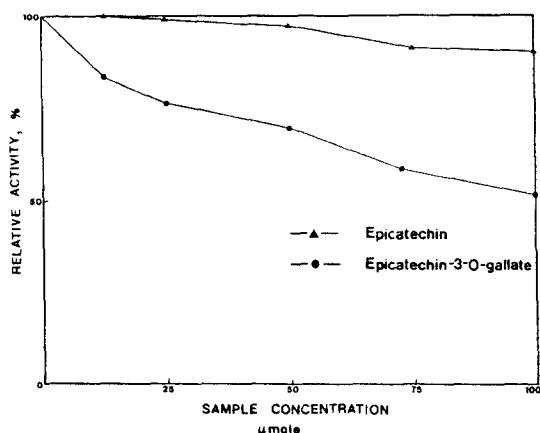


Fig. 3. Effect of isolated polyphenols from oolong tea on the xanthine oxidase

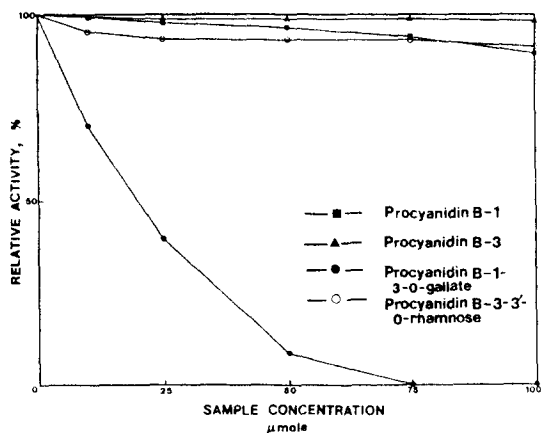


Fig. 4. Effect of isolated polyphenols from oolong tea on the xanthine oxidase

gallate가 결합된 flavan-3-ol 화합물이 활성이 좋았고 monomeric 보다 dimeric flavan-3-ol 화합물이 탁월한 저해효과가 관찰된 것은 hydroxy기의 증가에 따른 결과로 추정하게 되었다. 그리고 rhamnose가 결합된 procyanidin B-3-3'-O-rhamnose는 저해능이 관찰되지 않았으므로 당의 결합은 저해활성과 무관한 것으로 생각되어졌다. 이러한 결과들은 Hattori 등¹⁰⁾이 발표한 glucosyltransferase 저해제로써 gallate를 함유한 flavan-3-ol 화합물이 저해능이 우수하였다는 보고와 유사하였다. Fig. 5는 활성이 우수하였던 (-)-epicatechin-3-O-gallate와 procyanidin B-1-3'-O-gallate의 Lineweaver-Burk plot에서 두 화합물 모두 xanthine oxidase에 대해 경쟁적으로 저해한다는 것을 알 수 있었다. 이것은 flavan-3-ol 화합물이 xanthine oxidase에 대한 기작을 처음 밝혔으며 이러한 것은 gallate 화합물이 효소와 결합능이

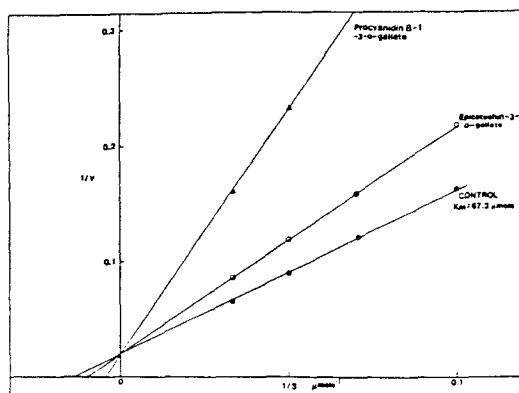


Fig. 5. Inhibition of uric acid formation by (-)-epicatechin-3-O-gallate and procyanidin B-1-3-O-gallate at 25 μmole

Substrate: xanthine

우수하다는 것을 뒷받침하였다.

요 약

Xanthine oxidase는 퓨린 대사에 관여하여 xanthine 혹은 hypoxanthine을 산화하여 요산을 생성하게 하는 효소이다. 이상 퓨린 대사로 인해 형성된 요산은 관절에 축적되어 통증을 동반하는 통풍을 유발한다. 본 연구는 천연물로부터 통풍치료제의 개발을 목적으로 우롱차로부터 6종의 flavan-3-ol 화합물을 분리하였고 기기분석에 의해 화학구조를 밝혔다. 각 화합물은 (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-O-gallate, procyanidin B-1, B-3, procyanidin B-3-3'-O-rhamnose procyanidin B-1-3-O-gallate였다. Xanthine oxidase 저해 영향을 관찰한 결과 gallate가 결합된 flavan-3-ol 화합물이 저해활성이 강하였고 procyanidin B-1-3-O-gallate는 50 μM에 완전한 저해효과를 나타내었고 xanthine oxidase에 경쟁적으로 저해한다는 것이 밝혀졌다.

감사의 말

이 연구를 위해 성심성의껏 지도를 하여주신 日本九州大學 生藥學教室의 지도교관 西岡五夫 교수님과 野中原 郎 조교수님께 감사를 드립니다.

문 헌

1. Jonnes, P.H.: Iodine as an antihypertensive agent. *Ibid.*, 3, 678(1973)
2. Storch, J. 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)

3. Hayashi, T., Sawa, K. and Morita, N.: Inhibition of Cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, **51**, 345(1988)
4. Hatano, T., Yasuhara, T., Yoshihara, R. and Okuda, T.: Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Planta Med.*, **57**, 83(1991)
5. Noro, T. and Fukushima, S.: Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984(1988)
6. Stripe, F. and Corte, E.D.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855(1969)
7. Kashiwada, Y., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Tannins and related compounds. XI. Isolation and characterization of proanthocyanidins with an intramolecularly doubly-linked unit from the fern, *Dicranopter is pedata* HOUTT. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 856(1990)
8. Morimoto, S., Nonaka, G., Chen, R.F. and Nishioka, I.: Isolation and structures of novel Bi- and Triflavonoids from the leaves of *Cassia fistula* L. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 39(1988)
9. Hashimoto, F., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Isolation of four new acylated flavan-3-ols from Olong tea. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 611(1987)
10. Hattori, M., Namba, T. and Hara, Y.: Effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 717(1990)

(1992년 8월 26일 접수)