

한국산 녹차로 부터 분리한 축합형 탄닌의 Xanthine Oxidase 저해효과

조영제 · 천성숙 · 최 침[†]

영남대학교 식품가공학과

Inhibitory Effect of Condensed Tannins Isolated from Korean Green Tea against Xanthine Oxidase

Young-Je Cho, Sung-Sook Chun and Cheong Choi[†]

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712 - 749, Korea

Abstract

For the purpose of utilizing tannins in the functional foods and crude drugs the xanthine oxidase inhibition of tannins isolated from Korean green tea was determined. Acetone extract from Korean green tea showed inhibitory effect against the xanthine oxidase. The galloyl tannins showed higher inhibitory activity against xanthine oxidase than the nongalloyl tannins. In terms of stereo isomers, (-)-epicatechins had higher inhibitory activity than the (+)-catechins. The synergistic activity was also observed. Tannins isolated from Korean green tea appeared to be incompetitive inhibitor against the xanthine oxidase.

Key words : xanthine oxidase, condensed tannin, green tea

서 론

녹차가 일반 식물 성분에 비해 특이한 점은 카페인을 함유하고 있고 polyphenol이 많이 들어 있어 일반 식물은 달리 여러가지 생리활성과 관련되는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 탄닌은 단백질과 결합하는 특성을 지닌 polyphenol을 총칭하는 것으로 탄닌 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 탄닌의 hydroxyl기와 단백질의 활성 부위와의 공유결합에 의한 반응으로 고도의 소수성 아미노산 잔기와의 소수성 결합과 수소결합을 포함하는 2단계 기작에 의해 탄닌 복합체의 침전물을 형성한다³⁾.

통풍은 생합성에 의한 purine 뉴클레오티드의 과다 생성을 일으키는 여러가지 대사 이상에 기인하는 요산의 과다 생성이며, xanthine oxidase (XOase)는 생체내 퓨린 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로 부터 urate를 형성하며 urate가 혈장내에 증가되면 골절에 축적되므로 통증을 동반하는 통풍을 일으키는 효소로 알려져 왔다^{4,5)}. 이러한 통풍에 사용

되는 약물중 allopurinol 과 alloxanthine은 요산의 생성 마지막단계인 xanthine oxidase의 효소활성을 저해함으로써 요산의 생성을 억제하며 저농도에서는 비경쟁적 저해제로 작용한다. 이러한 효소저해제는 천연물을 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔는데 Kang 등⁶⁾은 XOase의 비경쟁적 저해제로서 phenazine dioxide를 합성하였고 Hayashi 등⁷⁾은 식물계에 널리 존재하는 flavonoid류를 분리하고 XOase 저해 효과를 관찰한 결과 hydroxyl기의 위치에 따라 저해능의 효과가 다르다는 것을 보고한 바 있다. Hatano 등⁸⁾은 galloyl기를 함유한 flavonoid 화합물이 XOase 저해효과가 우수하였으며 경쟁적으로 저해한다는 사실을 보고하였다. 현재 생리활성 물질로서 주목되고 있는 polyphenol은 녹차에도 상당량 함유되어 있으며 그중 flavan-3-ol을 기본골격으로 하는 축합형 탄닌에 관한 XOase저해효과는 연구된 것이 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 혈압강하^{9,10)}, 질소대사개선^{11,12)}, 항산화제¹³⁾ 등의 효과가 인정되어 왔으며 우리 고유의 전통차로 이용되고 있는 한국산 녹차로 부터 천연 효소저해물질 탐색 연구의 일환으로 탄닌을 분리하고 XOase

[†]To whom all correspondence should be addressed

저해 효과를 검토함으로써 새로운 기능성 식품 또는 통풍 치료제의 개발을 위한 기초 자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험 재료는 제주도 지방에서 재배되어 제조된 건조 녹차(*Camellia sinensis* L.)중 추차를 시중에서 구입하여 공시 재료로 사용하였고, 사용된 기기는 spectrophotometer (LKB, Sweden), 사용된 시약은 Sephadex LH-20(Pharmacia Co. Sweden), xanthine oxidase, xanthine, uric acid(Sigma Co., U.S.A.) 등이고 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

녹차로부터 아세톤 추출물의 분리

건조된 녹차잎 3.5kg에 60% acetone을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(5000×g, 30min) 하여 상징액과 침전물을 얻었고 이 침전물은 다시 60% acetone을 가하여 위와 같은 추출과정을 4회 반복하였다. 각각의 상징액을 모아 농축 여과하여 chlorophyll을 제거하고 rotary evaporator로 농축한 후 acetone 추출물로서 분획을 위한 시료로 사용하였다.

Sephadex LH-20에 의한 XOase 저해물질의 분획
Acetone 추출물을 동결 건조하여 얻은 200mg을 Se-

phadex LH-20 column(2.0×60.0cm)에 의해 분획하였다. 용출액은 60% MeOH을 사용하였고 용출 속도는 1.6ml/min로 tube당 3ml을 취하여 분획한 후 동결 건조시켜 XOase 저해효과를 실험하였다.

탄닌 화합물의 정제

Sephadex LH-20과 MCI-gel CHP 20P column을 이용하여 normal phase type으로서 EtOH→H₂O 및 reverse phase type으로 H₂O→MeOH의 순으로 Fig. 1과 같이 용출시켜 6가지 순수한 탄닌을 분리 하였으며, 분리된 탄닌은 ¹H-NMR, IR, Mass를 이용한 구조 분석에서 (+)-catechin(A), (-)-epicatechin-3-O-gallate(B), (-)-epigallocatechin-3-O-gallate(C), (+)-gallocatechin(D), (-)-epigallocatechin(E), procyanidin B-3-3-O-gallate(F)로 동정 하였다.

효소 저해 효과

XOase 활성저해 측정법은 Stirpe와 Corte¹⁴⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 반응구는 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 xanthine 2mM을 녹인 기질액 1ml에 효소액 0.1ml와 탄닌용액 0.1ml를 가하고 대조구에는 탄닌 대신 증류수를 0.1ml 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid(TCA) 1ml를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm 에서 측정하여 다음 식으로 저해율을 구하였다.

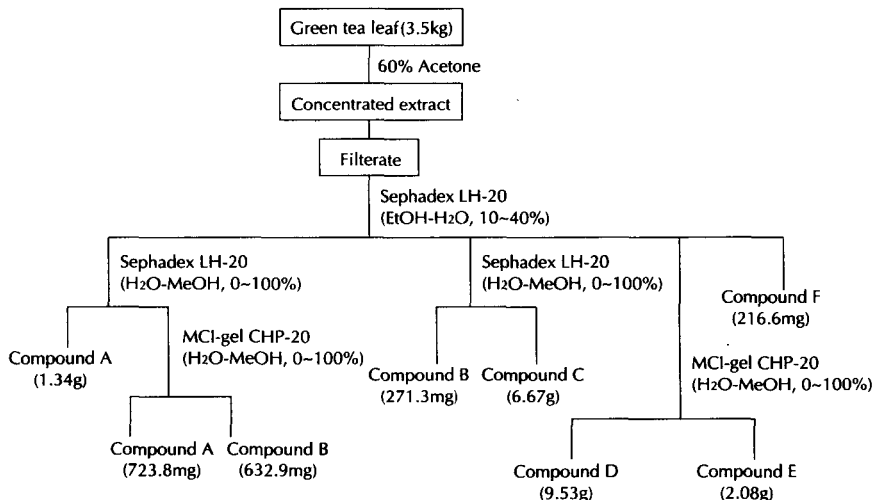


Fig. 1. A procedure for isolation of tannin from Korean green tea.

- A : (+)-Catechin
- B : (-)-Epicatechin-3-O-gallate
- C : (-)-Epicatechin-3-O-gallate
- D : (+)-Gallocatechin
- E : (-)-Epigallocatechin
- F : Procyanidin B-3-3-O-gallate

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

결과 및 고찰

녹차 추출물의 효소저해 효과

녹차에서 추출 농축된 acetone 추출물을 동결 건조하여 1ml 당 1~2mg으로 첨가하여 XOase 저해효과를 살펴 본 결과 Table 1에서와 같이 1mg에서 80.12%, 2 mg에서 86.37%의 저해 효과를 나타내었다.

Sephadex LH-20 분획물의 XOase 저해 효과

녹차에서 추출 농축된 acetone 추출물을 동결 건조하여 Sephadex LH-20을 이용하여 60% MeOH로 fraction한 결과 A, B 2부분으로 분획되었으며 분획 회수된 녹차 분획물을 XOase에 대해 저해 효과를 조사한 결과 A 분획물(2mg/ml)에서 약 89.57%로 저해효

Table 1. Effect of acetone extract from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Concentration (mg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	46.52	-
1.0	9.25	80.12
2.0	6.34	86.37

Table 2. Effect of fraction by Sephadex LH-20 of acetone extract from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Fraction	Concentration (mg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	-	46.52	-
A	1.0	16.96	63.54
	2.0	4.85	89.57
B	1.0	46.97	-
	2.0	45.22	2.79

Table 3. Effect of (+)-catechin obtained from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Concentration (μg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	50.61	-
10	50.46	-
50	49.68	1.84
100	37.52	25.59
300	27.03	49.59

과가 있어 초기에 용출되는 물질에 효소 저해 성분이 함유되어 있음이 확인되었다(Table 2).

XOase에 대한 탄닌의 영향

(+)-Catechin에 의한 XOase 저해

정제된 (+)-catechin을 각 농도별로 첨가하여 XOase의 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 Table 3에서와 같이 300μg 처리시에 49.59%의 저해율이 관찰되었고 50μg이하의 농도에서는 저해 효과를 거의 관찰할 수 없었다.

(-)-Epicatechin-3-O-gallate에 의한 XOase 저해

(-)-Epicatechin-3-O-gallate를 각 농도별로 처리한 결과 Table 4에서와 같이 50μg에서 27.11%의 저해를 보이기 시작하여 300μg에서 61.57%로 서서히 증가하였다.

(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate에 의한 XOase저해

(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate를 각 농도별로 처리하여 XOase 저해효과를 관찰한 결과 Table 5에서와 같이 100μg에서 40.51%, 300μg에서 64.69%의 저해율을 보였다.

(+)-Galocatechin에 의한 XOase 저해

(+)-Galocatechin을 각 농도별로 처리하여 XOase 잔존활성을 살펴본 결과 Table 6에서와 같이 300μg을

Table 4. Effect of (-)-epicatechin-3-O-gallate obtained from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Concentration (μg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	50.61	-
10	48.76	3.66
50	36.89	27.11
100	30.52	39.70
300	19.45	61.57

Table 5. Effect of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate obtained from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Concentration (μg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	50.61	-
10	51.22	-
50	43.01	15.02
100	30.11	40.51
300	17.87	64.69

첨가하여도 저해율은 25.47%에 불과해 저해 효과가 비교적 낮았다.

(-)-Epigallocatechin에 의한 XOase 저해

(-)-Epigallocatechin을 각 농도별로 처리하여 XOase

Table 6. Effect of (+)-gallo catechin obtained from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Concentration (μg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	50.61	-
10	50.87	-
50	51.11	-
100	50.26	0.69
300	37.72	25.47

Table 7. Effect of (-)-epigallocatechin obtained from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Concentration (μg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	50.61	-
10	50.94	-
50	52.20	-
100	45.78	9.54
300	32.43	35.92

Table 8. Effect of procyanidin B-3-3-O-gallate obtained from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Concentration (μg/ml)	Uric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	50.61	-
10	49.68	1.84
50	37.72	25.47
100	32.89	35.01
300	22.38	55.78

Table 9. Effect of mixed tannins obtained from Korean green tea on xanthine oxidase activity

Compound	Concentration (μg/ml)	Uric acid (μg/2ml)	Inhibition (%)
Control	-	48.34	-
AB	100	32.11	33.58
	300	10.25	78.80
AC	100	42.50	12.08
	300	27.48	43.15
BC	100	39.52	18.25
	300	20.51	57.57
ABC	100	40.56	16.09
	300	4.54	90.61

A : (-)-Epicatechin-3-O-gallate

B : (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate

활성을 살펴본 결과 Table 7에서와 같이 XOase 저해 활성은 300μg 첨가시 35.92%로 저해 효과가 크지 않았다.

Procyanidin B-3-3-O-gallate에 의한 XOase 저해

Procyanidin B-3-3-O-gallate를 각 농도별로 처리한 결과 Table 8에서와 같이 50μg 첨가시 25.43%의 저해율로 농도가 증가 할수록 저해 효과도 증가하여 300μg 첨가시 55.78%로 저해 효과가 상승하였다.

탄닌 조합에 의한 상승 효과

저해활성이 비교적 높은 물질들을 서로 조합하여 XOase 저해 효과를 살펴본 결과 300μg 첨가시에 상승 효과가 관찰되었으며 100μg에서는 상승효과가 거의 없었다 (Table 9).

Hatano 등⁸⁾은 flavonoid에 gallate가 붙으면 저해 효과가 증대된다고 보고한 것과 비교하여 본 실험에서의 gallate화합물들은 다른 non-gallate 화합물에 비해 우수한 저해 효과의 향상이 관측되어 Hatano 등⁸⁾의 보고와 유사하였다. 또한 catechin류 보다 epicatechin류의 활성이 조금 높게 측정되었다.

XOase에 대한 탄닌의 저해 기작

기질의 농도를 변화시키면서 Lineweaver-Burk plot 한 결과 Fig. 2와 같이 비경쟁적 저해를 하고 있었다.

Hatano 등⁸⁾과 Kang 등⁹⁾은 galloyl flavonoid와 phenazine dioxide가 XOase에 대해 비경쟁적 저해제로 작용한다고 보고하였다.

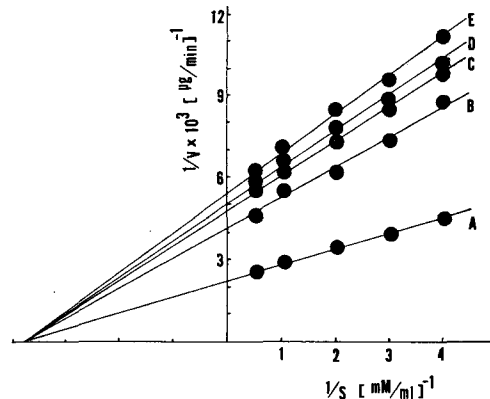


Fig. 2. Inhibitory effect of condensed tannins on xanthine oxidase.

A ; Control · B ; (-)-Catechin

C ; Procyanidin B-3-3-O-gallate

D ; (-)-Epicatechin 3-O-gallate

E ; (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate

요 약

기능성 식품과 생약재료의 이용을 위한 연구의 일환으로 한국산 녹차로부터 탄닌을 분리하여 xanthine oxidase 저해효과를 측정하였다. 녹차의 acetone 추출물에서 xanthine oxidase 저해효과가 있음이 확인되었고 정제된 탄닌의 효소 저해효과를 검토한 결과 xanthine oxidase 저해의 경우 galloyl tannin류가 nongalloyl tannin류보다 활성이 더 우수하였고 구조적 이성체에서도 (+)-catechin류 보다 (-)-epicatechin류가 효소저해 효과가 더 좋았으며, 각 물질간 상승 효과가 인정되었다. 녹차에서의 탄닌류는 xanthine oxidase에 대해 비경쟁적 저해를 하는 것을 알 수 있었다.

문 헌

- Sharma, A. and Sehgal, S. : Effect of domestic processing, cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean. *Plant Food for Human Nutrition*, **42**(2), 127 (1992)
- Tan, N. H., Wong, K. C. and Lumen, B. O. : Relationship of tannin levels and trypsin inhibitor activity with the *in vitro* protein digestibilities of raw and heat-treated winged bean. *J. Agric. Food Chem.*, **32**(4), 819 (1984)
- Armstrong, G. S. : A study of tannin protein interactions. *Dissertation Abstracts International*, **44**(9), 2695 (1984)
- Jonnes, P. H. : Iodinine as an antihypertensive agent. *Ibid.*, **3**, 679 (1973)
- 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)
- 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)
- Hayashi, T., Sawa, K. and Morita, N. : Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, **51**, 345 (1988)
- Hatano, T., Yasuhara, T., Yoshihara, R. and Okuda, T. : Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Planta Medica*, **57**, 83 (1991)
- Scholz, E. and Rimpler, E. : Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root. *Planta Medica*, **55**, 379 (1989)
- Funayama, S. and Hikono, H. : Hypotensive principles of *Diospyros kaki* Leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**(11), 2865 (1979)
- Nonaka, G. and Nishioka, I. : Tannins and related compounds. X(1). Rhubarb (2) : Isolation and structures of glycerol gallate, gallic acid glucoside gallate, galloyl glucoses and isolindleyin. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1652 (1983)
- Nagasawa, Y., Shibutani, S., Oura, H., Shoyama, Y. and Nishioka, I. : Effect of extract from rhei rhizoma on urea-nitrogen concentration in rat serum. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1736 (1980)
- Hirose, Y., Yamaoka, H. and Nakayama, M. : A novel quasi-dimeric oxidation production of (+)-catechin from lipid peroxidation. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 567 (1990)
- Stirpe, F. and Corte, E. D. : The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855 (1969)

(1993년 2월 2일 접수)