

## *Theobroma cacao* L. 외피로부터 새로운 Flavan-3-ol 화합물의 Glucosyltransferase 저해효과

안봉전·권익부\*·최 청\*\*

동국전문대학 향장공업과, \*롯데그룹중앙연구소  
\*\*영남대학교 식품가공학과

### Inhibitory Effect of Novel Flavan-3-ol isolated *Theobroma cacao* L. Husk on Glucosyltransferase

Bong-Jeun An, Ik-Boo Kwon\*\* and Chung Choi\*\*

Department of Cosmetic Engineering, DongKuk Junior Collge  
\*Lotte Group R & D Center.

\*\*Department of Food Science & Technology, Yeungnam University

#### Abstract

In the course of our studies, novel flavan-3-ol structure isolated from *Theobroma cacao* L. husk was established by the thiolysis, desulfurization and spectroscopic method. The structure was identified for cinnamtannin A-2 containing the tetrameric epicatechin and molecular weight was [1153] by FAB-MS negative ion. The inhibitory effect on the glucosyltransferase activity was investigated. Cinnamtannin A-2 showed complete inhibition at 0.03 mM and inhibited on the glucosyltransferase noncompetitively. The hydroxyl group of flavan-3-ol was supposed to be the essential element for inhibition on the glucosyltransferase.

Key words: novel glucosyltransferase inhibitor.

## 서 론

Tannin은 오래 전부터 널리 사용되어 온 식물 성분으로 축합형탄닌 가수분해형탄닌으로 분류하며 이 중 축합형탄닌의 기본 구조는 flavan-3-ol로 구성되어 있다.

Flavan-3-ol 화합물은 약용 식물체내 다량존재하는 polyphenol류로서 최근 많은 생리활성물질이 발견되고 있다<sup>(1,2)</sup>.

Komeda 등<sup>(3)</sup>은 일본산 감나무잎에서 분리된 flavan-3-ol 화합물이 agiotensin converting enzyme를 저해시켜 고혈압억제 효과가 있다는 것을 확인하였고, Funayama 등<sup>(4)</sup>은 이 polyphenol류를 이용하여 고혈압억제작용 기작을 밝힌 바 있다.

Hattori 등<sup>(5)</sup>은 녹차잎에서 분리된 축합형 탄닌들이 충치의 원인이 되고 있는 *Streptococcus mutans*균에 의해 생성된 glucosyltransferase(GTase)를 저해 충치예방효과를 확인하였고 이 화합물들의 화학구조를 밝힌 바 있다.

안 등<sup>(6)</sup>은 우롱차로부터 분리한 flavan-3-ol 화합물들이 통풍의 원인이 되고 있는 xanthine oxidase 저해제로 효과가 우수하였다고 보고하였으며 안 등<sup>(7)</sup>은 jackfruit 잎의 flavan-3-ol 화합물이 GTase를 저해하고 저해기작을 보고하였다. 조 등<sup>(8)</sup>은 한국산 녹차로부터 축합형 탄닌을 분리하고 통풍예방 및 고혈압억제물질로 효과를 입증하였다.

안 등<sup>(9,10)</sup>은 초콜렛 가공과정중 탈각되어 폐기 되고 있는 카카오 외피 즉, cacao bean husk(CBH)로부터 pro-cyanidin류를 분리하고 GTase 저해효과를 관찰 한 바 있으며, 이 외피내 세롭고 강력한 GTase 저해제가 존재하여 이를 분리하고 화학구조를 결정하였으므로 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구의 재료는 1990년 가나에서 생산된 cacao bean을 초콜렛 공정 중 탈각된 외피를, 시약으로는 Sephadex LH-20(Pharmacia Co. Ltd. Sweden), MCI-gel CHP-20(Mitubish Chemical Ind. Japan), Bondapak C<sub>18</sub> Porasil B(Waters Co. Ltd. U.S.A)를 사용하였으며 GTase는 일본 합동주조에서 공급받아 사용하였다.

Corresponding author: Bong-Jeun An, Department of Cosmetic Engineering, DongKuk Junior College, Kisanmyoung, Chilkokgun, Kyoongsangbukdo 718-850, Republic of Korea

기기

본 실험에 사용된 기기는 NMR(JEOL FX, GX-270, Japan)을 270 MHz, MS(JEOL JMS, PX-300, Japan)는 negative ion FAB-mass spectrum을 이용하였고 Spectrophotometer(Hitachi 200-10, Japan)와 ultrasonicator(Ultrasonic Generator US-30, Nissei, Japan)을 사용하였다.

추출 및 분리

CBH분말 10 kg에 60% acetone 35L를 가해 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(300×g, 30 min.)하여 상층액과 침전물을 얻었다. 이 침전물에 다시 60% acetone을 가하고 위와 같은 추출과정을 4회 반복한 후 상층액을 모아 농축하고 여과하여 클로로필을 제거한 후 2L로 분리용 시료로 하였다. 이 시료를 Sephadex LH-20 column에 H<sub>2</sub>O:MeOH(1:0→0:1)를 용출용매로 하여 분획물 1, 2, 3을 얻었고 이중 분획물 3으로부터 MCI-gel [H<sub>2</sub>O-MeOH(1:0→0:1), Sephadex LH-20(EtOH) μ-Bondapak C<sub>18</sub> [H<sub>2</sub>O-MeOH(1:0→0:1)], Sephadex LH-20(60% MeOH)의 순으로 분리하였다. 각 정제과정 중 Thin Layer Chromatography(TLC)를 이용하여 분리 정도 및 유무를 확인하면서 반복정제 하였다(Fig. 1).

GTase 저해활성측정

GTase 저해활성측정은 분리된 화합물의 최종 농도를 0.001 mM에서 1.0 mM까지 조제하고 안 등<sup>9)</sup>의 방법에 의해 측정하였다. 시험관내 기질용액 0.8 ml, 효소액 0.02 ml에 조제된 화합물을 첨가하고 최종 1 ml로 한후 30° 경사에서 37° C에서 16시간 반응시켰다. 반응 후 증류수

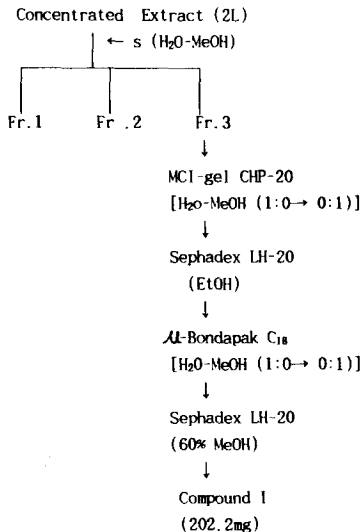


Fig. 1. The procedure for isolation of compound I from *Theobroma cacao* L. husk

3 ml을 가해 2회 세척하고 부착된 glucan을 초음파로 분쇄 한 후 spectrophotometer를 사용하여 550 nm에서 glucan 형성 양을 측정함으로써 저해도를 나타내었다.

분리물질의 thiolysis 및 탈유황반응

순수분리하여 재결정화된 화합물 100 mg을 AcOH-EtOH 5 ml에 용해하고 benzylmercaptan 2 ml을 가해 reflux 상에서 5시간 반응시켰다. 반응 중 생성물을 TLC 상에서 확인하며 목적 생성물이 형성되면 반응을 중단하고 감압농축 한 후 Sephadex LH-20 column(EtOH, 60% MeOH)로 반복정제 하여 그 유도체 화합물을 얻었다. 탈유황반응은 앞 반응에서 benzylthioether화된 화합물을 AcOH:EtOH(1:9)에 용해하고 Raney nickel을 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 반응액을 여과하여 Sephadex LH-20 column에서 용출용매 EtOH로 반복정제 하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

Compound I의 분리 및 특성

분리 과정에서 순수하게 재결정화된 화합물은 Fig. 3과 같이 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 FeCl<sub>3</sub> 정색반응에서 갈색과 청색반응을 하였으므로 이것은 flavan 유래의 화합물로 추정할 수 있었고, TLC상에서 Rf 값은 매우 낮아 대체로 분자량이 큰 flavan 화합물로 생각되어 졌다. 이러한 결과들은 안 등<sup>10)</sup>이 발표한 procyanidin류의 분자량을 비교시 dimeric 이상 화합물로 추정하게 하였다. Sephadex LH-20 column에서 methanol용액의 분리시 거의 90% methanol 용액부근에서 용출되었고 ODS column으로 분리시 40~50% methanol 에서 용출되었으므로 이 화합물은 대체로 분자량이 큰 다량체 flavan 물질임을 더욱 지지하게 하였다.

Compound I의 화학구조 결정

분리되어 순수재결정화된 compound I의 thiolysis 및

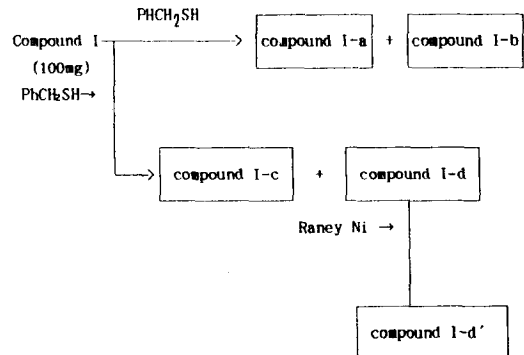
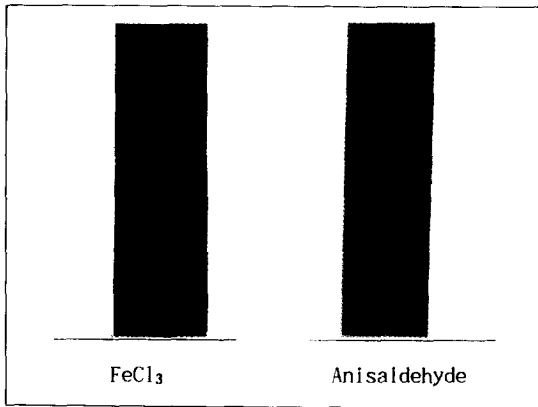


Fig. 2. The procedure for thiolysis and desulfurization of compound I



**Fig. 3. Thin Layer Chromatography of novel flavan-3-ol isolated from *Theobroma cacao* L. husk**  
Solvent: benzene: ethylformic acid: formic acid (1:7:1, v/v/v)

탈유황반응 결과 얻어진 유도체 화합물의 기기분석 결과는 다음과 같다.

#### compound I-a

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-58.30^\circ\text{C}$  ( $C=0.6$ , acetone). 무정형분말  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6 + \text{D}_2\text{O}$ ) ppm: 2.88(1H, dd,  $J=5, 16$  Hz, 4-H), 3.10(1H, dd,  $J=4, 16$  Hz, 4-H), 4.23(1H, m, 3-H), 4.92(1H, s, 2-H), 5.96, 6.08(each 1H, d,  $J=2$  Hz, 6, 8-H), 6.75(1H, d,  $J=8$  Hz, 5'-H) 6.90(1H, dd,  $J=2, 8$  Hz, 6'-H), 7.06(1H, d,  $J=2$  Hz, 2'-H)

#### compound I-b

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-28^\circ\text{C}$  ( $C=0.9$ , acetone), 무정형분말  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6 + \text{D}_2\text{O}$ ) ppm: 3.96(1H, m, 3-H), 4.01(2H, s,  $-\text{SCH}_2-$ ), 4.08(1H, d,  $J=2$  Hz, 6-H), 6.04(1H, d,  $J=2$  Hz, 8-H), 6.74(1H, d,  $J=2$  Hz, 6'-H), 6.83(1H, d,  $J=8$  Hz, 5'-H), 7.03(1H, d,  $J=2$  Hz, 2'-H), 7.16(5H in total m, aromatic H)

#### compound I-c

$[\alpha]_D^{25}$ :  $+34.1^\circ\text{C}$  ( $C=1.0$  acetone). 무정형분말  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6 + \text{D}_2\text{O}$ ) ppm: 2.72(1H, dd,  $J=16, 3$  Hz, 4'-H), 2.94(1H, dd,  $J=16, 4$  Hz, 4'-H), 3.98(1H, brs, 3-H), 4.32(1H, m, 3'-H), 4.70(1H, brs, 4-H), 4.93(1H, brs, 2'-H), 5.09(1H, brs, 2-H), 6.02(3H in total, m, 6, 8, 6'-H), 6.60~7.20(6H in total, m, B, B'-ring H), FAB-MS:  $m/z$ (%)=577 [M-H]<sup>-</sup>

#### compound I-d'

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-28^\circ\text{C}$  ( $C=0.9$ , acetone), 무정형분말  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6 + \text{D}_2\text{O}$ ) ppm: 2.64~2.96(2H, m, 4''-H), 4.60(2H, brs, 3,3'-H), 4.36(1H, brs, 3''-H), 4.82(2H, s, 4,4'-H), 5.04, 5.12, 5.20(each 1H, s, 2,2',2''-H) 5.90~6.20(4H in total, m, B-ring H) FAB-MS:  $m/z$ (%)=865 [m-H]

#### compound I

$[\alpha]_D^{25}$ :  $85.3^\circ\text{C}$  ( $C=1.0$ , acetone), 무정형분말 2.84(2H, m, 4''-H), 4.12(3H, brs, 3,3',3''-H), 4.32(1H, brs, 3''-H), 4.79(3H, s, 4,4',4''-H), 5.08, 5.16, 5.20, 5.27 (each 1H, S, 2,2',2'',2''-H), 5.80~6.20(5H in total, m, A-ring H), 6.40~7.40(12H in total, m, B-ring H), FAB-MS:  $m/z$ (%): 1153 [M-H]

완전 thioysis의해 생성된 유도체 compound I-a와 I-b를 1:3 mole 비율로 얻었고 compound I-a의  $^1\text{H-NMR}$ 에서 3.10 ppm의 분열형태는 alipatic 영역의 methylen유래로 4-H임을 알수있고 4.23, 4.92 ppm은 catechol의 3-H proton으로 확인 되었다<sup>6)</sup>. 6.58~7.06 ppm의 spectrum의 분열 형태로 보아 6'-H, 5'-H, 2'-H의 귀속이 가능하며 2-H의 signal 양상이 singlet로 이 화합물은 (-)-epicatechin 이었다.

compound I-b는  $^1\text{H-NMR}$ 에서 4.01 ppm의 2H분의 singlet로  $-\text{SCH}_2-$  검출되었으며 7.16~7.54 ppm에서 5H분의 aromatic H가 확인되었고 나머지 signal양상은 compound I-a와 일치하여 이 화합물은 epicatechin-4-benzylthioether로 확인되었다.

완전 thiolysis의한 결과로 compound I의 화합물은 상, 하층 모두 epicatechin 화합물임이 확인되었다. 부분 thiolysis에서 생성된 유도체 compound I-c는 Mass spectrum에서 [577]<sup>-</sup>로 flavan-3-ol 화합물 dimeric에 해당하였고  $^1\text{H-NMR}$  signal은 2.72, 2.94 ppm에서 4'-H, 3.98, 4.32 ppm에서 3,3'-H, 귀속이 가능하고 4.93, 5.09 ppm의 2,2'-H, 6.02 ppm에서 multiple한 3H분은 6,8,6'-H를 6.60~7.20 ppm에서 6H분의 B, B'-ringH가 관찰된 바 이 화합물은 epicatechin의 두 분자인 procyanidin B-2로 동정하였고 이러한 결과는 안 등<sup>10)</sup>이 발표한  $^1\text{H-NMR}$  결과와도 잘 일치하였다.

compound I-d는  $^1\text{H-NMR}$ 에서 매우 복잡한 signal 양상을 띄어 탈유황반응을 거쳐 compound I-d'를 얻었다.

compound I-d'는 분자량이 [865]<sup>-</sup>로 flavan-3-ol의 3량체로 추정하게 되었고  $^1\text{H-NMR}$ 에서 2.64~2.96 ppm의 4''-H, 5.04, 5.12, 5.20 ppm은 각각 2,2',2''-H를 암시하고 6.60~7.30 ppm의 9H는 B,B',B''-ringH들로 특징을 이루고 있어 이 화합물은 procyanidin C-1로 동정이 가능하였다. 이런 유도체 화합물의 분석결과의 근거로 compound I의  $^1\text{H-NMR}$  귀속은 4.32 ppm의 1H분의 3''-H, 4.79 ppm에서 3H분의 singlet의 4,4',4''-H 및 5.08~5.27 ppm사이 2,2',2'',2''-H 귀속과 6.04~7.40 ppm사이 12H분의 B-ringH들이 확인되었으므로 이 compound I는 epicatechin-4-epicatechin-4-epicatechin-4-epicatechin으로 구성된 cinnamtannin A-2로 동정하였다.

분자량에서 [1153]<sup>-</sup>은 flavan-3-ol 화합물 4량체로  $^1\text{H-NMR}$  결과를 더욱 지지하였고 이러한 proton 귀속은 Hashimoto들<sup>11)</sup>이 발표한 결과와도 잘 일치하였다.

이 compound I는 *Theobroma cacao* L. 식물에서 처음

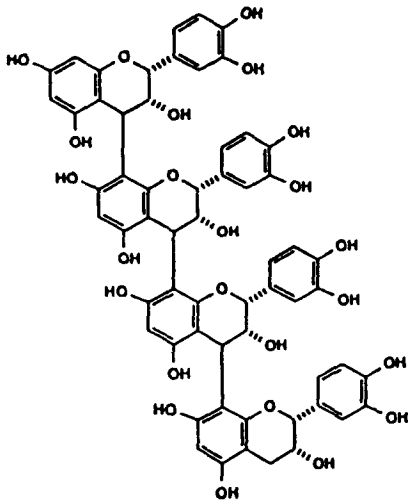


Fig. 4. Structure of cinnamtannin A-2 isolated from *Theobroma cacao* L. husk

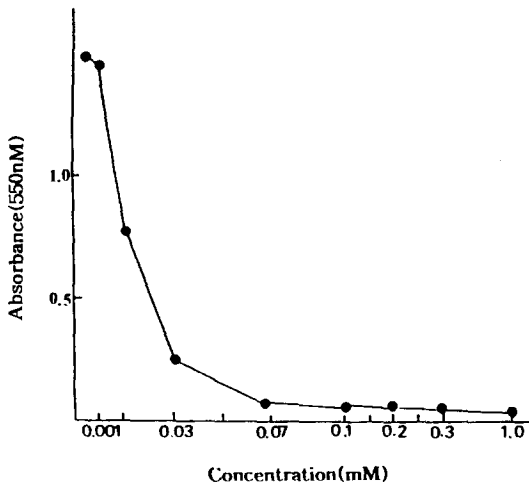


Fig. 5. Effect of various concentration of cinnamtannin A-2 on the GTase activity

분리하여 화학구조가 결정된 것이다(Fig. 4).

화학구조가 결정된 cinnamtannin A-2의 glucosyltransferase저해 영향 및 기작

Cinnamtannin A-2를 0.001 mM에서 1.0 mM로 조제하고 GTase 저해 효과를 관찰하였다.

Fig. 5에서 보여주고 있는 것과 같이 0.001 mM에서는 아무런 영향이 없었으나 0.01 mM에서는 급격히 저해 영향을 거쳐 약 50% 저해가 관찰되었고, 0.03 mM에서 거의 완벽한 저해가 일어났음을 Fig. 6에서 보여주고 있다. 현재 산업체에 이용되고 있는 충치 예방 물질인 Mustrastein보다 활성이 우수하여 산업체 이용이 가능한 것



Fig. 6. Effect of cinnamtannin A-2 on the formation of glucan by glucosyltransferase

A: control B: cinnamtannin A-2 at 0.03 mM

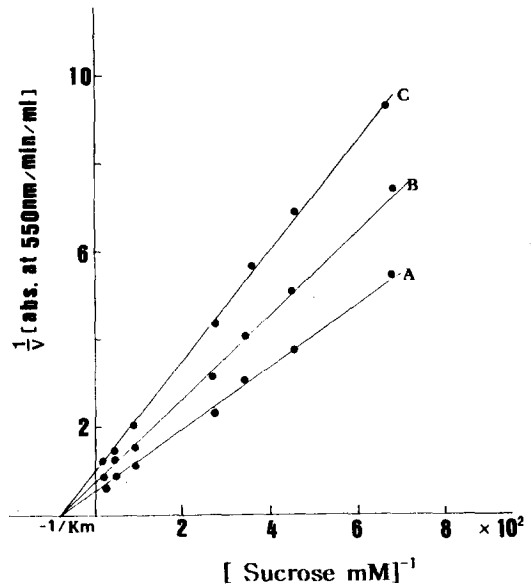


Fig. 7. Inhibition of glucan formation by cinnamtannin A-2

A: control, B: 0.01 mM, C=0.02 mM

으로 생각되어진다.

저해기작면에서 0.01 mM, 0.02 mM로 조제된 cinnamtannin A-2에서 Km 값의 변화가 관찰되지 않았으므로 이 화합물은 GTase를 비경쟁적으로 저해한다는 것을 확인하였다(Fig. 7). 이러한 결과는 안 등<sup>7)</sup>이 보고한 dimeric flavan-3-ol과 비교시 수산기의 수가 많은 cinnamtannin A-2의 저해 영향이 급격히 증가하므로 이 수산기가 GTase 저해요인으로서 작용한다는 것을 추정할 수 있었다.

## 요 약

*Theobroma cacao* L. bean husk에서 새로운 flavan-3-ol 화합물을 분리하여 이 화합물의 화학구조를 thiolysis, 탈유황반응 및 기기분석에 의해 결정하였다. 이 화합물은 FAB-MS에서 [1153] 으로 epicatechin 4분자가 결합된 cinnamtannin A-2였다. GTase 저해는 0.03 mM에서 완벽한 저해효과를 보였고 비경쟁적 저해제로 이 화합물의 수산기가 GTase를 저해하는 중요한 요인으로 추정된다.

## 문 헌

1. Hayashi, T., Sawa, K. and Morita, N.: Inhibition of Cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products.*, 51, 345 (1988)
2. Shukei, C.: Effect of mineral elements on the growth and tannin content. *Shoyakukagaku Zassi.* 45, 49 (1991)
3. Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H. and Kimura, Y.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Natural Products.*, 50(4), 680 (1987)
4. Funayama, S. and Hikono, H.: Hypotensive principles of *Diospyros Kaki* leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, 27(11), 65 (1979)
5. Hattori, M. and Hara, Y.: Effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 717 (1990)
6. 안봉전, 김원국, 최장윤, 권익부, 최 청 : 우롱차로부터 Xanthine Oxidase 저해물질의 분리 및 구조. 한국식품과학회지, 24(6), 558 (1992)
7. 안봉전, 최장윤, 권익부, 나시오카 이트슈, 최 청 : Jack Fruit 잎으로부터 glucosyltransferase inhibitor 물질의 분리 및 구조. 한국생화학회지, 25(4), 347 (1992)
8. 조영재, 안봉전, 최 청 : 한국산 녹차로부터 분리한 flavan-3-ol 화합물의 angiotensin-converting enzyme 저해효과. 한국식품과학회지, 25(3), 238 (1993)
9. 안봉전, 권익부, 이용우, 이신영 : Cacao Bean Husk 추출물의 glucosyltransferase 저해 효과. 한국생물공학회지, 8(1), 75 (1993)
10. 안봉전, 권익부, 유주현, 이신영 : Cacao Bean Husk로부터 분리한 총치 예방물질의 구조결정. 한국생물공학회지, 8(1), 69 (1993)
11. Hashimoto, F., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Isolation of four new acylated flavan-3-ols from Oolong tea. *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 611 (1987)

(1994년 11월 8일 접수)