

## 우롱차로부터 분리된 Flavan-3-ol 화합물의 Xanthine Oxidase에 대한 저해 영향

안봉준 · 배만종\* · 최 청\*\*

동국전문대학 향장공업과, \*경산대학교 식품과학과

\*\*영남대학교 식품가공학과

### Inhibitory Effect of Flavan-3-ols Isolated from Oolong Tea on Xanthine Oxidase

Bong-Jeun An, Man-Jong Bae\* and Chung Choi\*\*

Department of Cosmetic Engineering, Dongkuk Junior College

\*Department of Food Science, Kyoungsan University

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

#### Abstract

As a series of study for an anti-gout agent, two flavan-3-ols have been isolated from Oolong tea. They showed positive reaction in anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution and FeCl<sub>3</sub>, which were able to be confirmed in TLC with dimeric flavan-3-ols. The components were identified as procyanidin B-2 and procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate by spectroscopic analysis. Their inhibitory effect on xanthine oxidase was also investigated and procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate showed 60.6% inhibition at 50 μmole. The compound competitively inhibited the xanthine oxidase and dimeric flavan-3-ols containing gallate had higher inhibition activity.

Key words: xanthine oxidase inhibitor, Oolong tea

#### 서 론

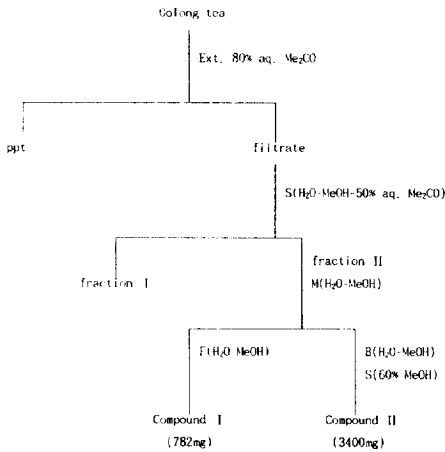
반발효차인 우롱차는 중국에서 널리 애용되고 있으며 일본에서도 최근 소비시장이 급격히 증가되고 있다. 우리나라는 몇 년 전부터 다이어트 음료란 명목으로 소개되어 국내 몇 개 회사에서 시판되고 있다. 여러 연구를 통해 우롱차는 다양한 기능성을 갖고 있는 음료임이 밝혀졌으며, 이에 안 등<sup>(1)</sup>은 일본산 우롱차로부터 flavan-3-ol 화합물의 일부를 분리하여 효소 저해에 관한 연구를 보고한 바 있다.

그 이후 지속적인 연구로 동일한 시료내에 2종류의 flavan-3-ol 화합물을 분리하였기에 통풍 예방 연구의 일환으로 효소 저해능 실험을 실시하였다. Xanthine oxidase는 생체내 퓨린 대사에 관여하는 효소로 xanthine 혹은 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하여 혈장내 urate가 증가되면 골절에 축적되어 심한 통증을

유발하는 통풍을 일으킨다<sup>(2,3)</sup>. 통풍의 원인이 되고 있는 xanthine oxidase를 억제하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며 식물계에서 방어 기작물질로 알려진 flavan-3-ol 화합물이 효소저해제로 관심이 높아가고 있다. Kameda 등<sup>(4)</sup>은 일본산 감나무 잎에서 flavan-3-ol 화합물을 분리하여 angiotensin converting enzyme (ACE)을 저해시킨다는 것을 확인하였고 Funayama 등<sup>(5)</sup>은 이 화합물을 이용 고혈압 기작을 밝힌 바 있다. Hattori 등<sup>(6)</sup>은 녹차잎으로부터 flavan 화합물을 얻어 충치의 원인인 glucosyltransferase (GTase)를 저해하여 충치예방 효과가 있다고 보고하였다. 안 등<sup>(7)</sup>은 Jack Fruit 잎의 flavan-3-ol 화합물의 화학구조를 결정하였고 조 등<sup>(8,9)</sup>은 한국산 녹차로부터 축합형 탄닌을 분리, 통풍 예방 및 고혈압 억제물질로 그 가능성을 제시하였다.

최근 연구에서 안 등<sup>(10)</sup>은 cacao bean husk (CBH)로부터 새로운 신규 화합물인 flavan-3-ol을 확인하여 구조를 결정하였고 충치예방물질로 산업체에 응용된 바 있다. 이러한 결과에서 보듯이 flavan-3-ol 화합물은 효

Corresponding author: Bong-Jeun An, Department of Cosmetic Engineering, Tongkuk Junior College, Kisanmyun, Chilkok-gun, Kyongbuk 718-850, Korea



**Fig. 1.** The procedure for isolation of flavan-3-ols from Oolong tea (5.0 kg) S: Sephadex LH-20, M: MCI-gel CHP-20, F: Fuji-gel, B: Bondapak C<sub>18</sub>

소저해제로서의 우수한 저해능을 갖고 있음이 확인되므로 통풍 예방의 일환으로 xanthine oxidase 저해제 개발에 도움을 주고자 이 연구를 수행하였다.

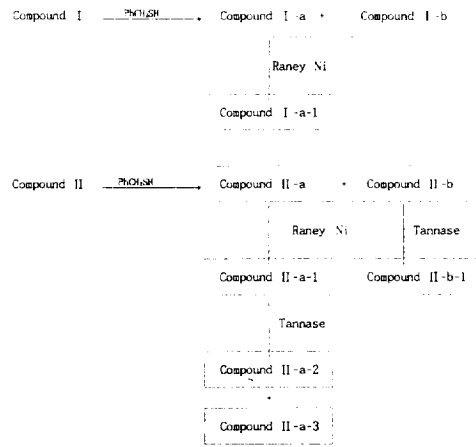
**재료 및 방법**

**재료 및 시약**

본 실험에 사용된 재료는 안 등<sup>(1)</sup>이 보고한 바 있는 동일한 시료, 즉 일본 후쿠오카현의 특산물로서 1994년 5월 제조된 시판용 우롱차(*Camellia sinensis*)를, 시약으로는 Sephadex LH-20 (Pharmacia Co., Sweden), MCI-gel CHP-20 (Mitubish Chemical Ind. Co. Ltd., Japan), Fuji-gel (Hambai Co. Ltd., Japan), Bandapak C<sub>18</sub> Porasil B (Waters, U.S.A.)를 xanthine oxidase (Sigma Co., U.S.A.)를 구입하여 사용하였고 기타 시약은 특급 시약으로 하였다. 기기는 <sup>1</sup>H-NMR (JEOL GX-270, Japan)을 이용하여 acetone-d<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O 용액에 용해하여 측정하였다. MS (JEOL JMX-DX 300, Japan)는 negative ion FAB-mass system으로 분자량을 측정하였고 spectrophotometer (Hitachi 200-10, Japan)에서 urate 생성량을 측정하였다.

**추출 및 분리**

추출 탱크에 80% acetone 수용액을 차일 5.0 kg이 잠길 정도로 가하여 실온에서 24시간 침지한 후 여과하여 상정액과 침전물을 얻었다. 다시 침전물에 80% acetone 수용액을 첨가하고 동일한 조건으로 4회 반복 추출하였다. 각각의 여과액을 모아 acetone을 증발시



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

키고 응고된 클로로필을 여과하여 제거하였다. 여액을 모아 다시 농축하여 2/로 하고 분리용 시료로 하였다. 농축액을 Fig. 1과 같이 Sephadex LH-20 column에 loading하고 물(H<sub>2</sub>O) : methanol (MeOH) (1 : 0→0 : 1)을 용출용매로 하여 분획물 I, II로 하였다. 분획물은 MCI-gel CHP-20, Bondapak C<sub>18</sub>, Fuji gel 등의 column chromatography법으로 compound I~IV를 순수분리 재결정화하였다. 분리중 Sephadex LH-20 column 용출용매는 ethanol (EtOH), 50% EtOH 및 H<sub>2</sub>O : MeOH (1 : 0→0 : 1)를 사용하였고 MCI-gel CHP-20, Fuji gel, Bondapak C<sub>18</sub> column은 H<sub>2</sub>O : MeOH (1 : 0→0 : 1)을 사용하여 gradient로 용출시켰다. Thin layer chromatography (TLC, silica gel)에 의해 분리정도 및 flavan-3-ol 화합물의 유무를 anisaldehyde, FeCl<sub>3</sub> 반응 색깔로 판별하였다.

**분리물질의 thiolysis 및 탈유황반응**

순수분리된 compound I 및 II 화합물 100 mg을 acetic acid (AcOH-EtOH) 5 ml에 용해시키고 benzylmercaptan (PhCH<sub>2</sub>SH) 2 ml를 가해 reflux상에서 반응시켰다. 반응 중 생성물을 TLC상에서 확인하면서 목적 생성물이 형성되면 반응을 중단시켰다. 생성된 반응물을 감압 농축하고 Sephadex LH-20 column (EtOH, 60% MeOH)으로 반복 정제하여 필요한 유도체 화합물을 분리하였다. 앞 반응에서 benzylthioether 화합물 AcOH : EtOH (1:9)에 용해하고 Raney nickel을 첨가, 실온에서 1시간 반응시킨 후 반응액을 여과하고 그 여액을 Sephadex LH-20 column에서 용출용매 EtOH로 반복 정제하였다(Fig. 2).

### Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 xanthine을 기질로 하여 생성된 urate를 spectrophotometry법으로 측정하는 Stripe 등<sup>11)</sup>의 방법을 변형시켜 행하였다. 즉 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.5)에 기질인 0.1 mM xanthine 및 효소액을 m/당 0.02 unit로 혼합하고 37°C에서 3분간 반응시켰다. 반응 종료는 1 N HCl을 가해 반응을 중단시켜 생성된 urate를 292 nm에서 측정 검량선에 의해 산출하였다.

### 결과 및 고찰

#### Compound I, II의 분리 및 특성

Fig. 2에서 분리하여 재결정화된 화합물을 Fig. 3과 같이 TLC상에서 검토했던 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 FeCl<sub>3</sub>에 정색반응을 하였다. 즉 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 갈색과 FeCl<sub>3</sub>에서는 청색반응을 나타내었으므로 이것은 flavan 유래의 물질로 추정할 수 있었다. TLC상에서 compound I, II의 위치는 TLC의 중간정도 위치에 존재하는 것으로 보아 안 등<sup>12)</sup>이 발표한 procyanidin류 dimeric에 가까운 화합물로 추정하게 하였고 compound II는 I보다 좀 낮은 위치에서 보여지므로 이 화합물은 dimeric에 약간의 다른 화합물이 결합되어 있는 것으로 추정된다.

Sepadex LH-20 column에서 methanol 용해는 분리시 60-70% methanol용액에서 용출되는 것으로 보아 두 화합물은 거의 유사한 분자량을 갖는 flavan 물질임을 더욱 확신하게 되었다.

#### Compound I, II의 화학구조 결정

분리되어 순수 재결정화된 compound I, II의 thiolysis, 탈유황반응 및 Tannase처리에 의해 생성된 화합물의 기기분석 결과는 아래와 같다.

Compound I: 무정형분말,  $[\alpha]_D^{25}$ ; +34.1 (C=1.0, acetone), FAB-MS; m/z (%)=577[M-H], <sup>1</sup>H-NMR (acetone -d<sub>6</sub> +D<sub>2</sub>O) δ: 2.72 (1H, dd, J=16, 3H<sub>s</sub>, 4'-H).

2.94 (1H, dd, J=16, 4H<sub>s</sub>, 4-H), 3.98 (1H, brs, 3-H), 4.32 (1H, n, 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, n, B, B'-ringH).

compound I-a: 무정형분말,  $[\alpha]_D^{25}$ ; -28 (C=0.9, acetone), <sup>1</sup>H-NMR (acetone -d<sub>6</sub> +D<sub>2</sub>O) δ: 3.96 (1H, n, 3-H), 4.01 (2H, s, -SCH<sub>3</sub>), 4.08 (1H, d, J=2H<sub>s</sub>, 4-H), 5.28 (1H, d, J=2H<sub>s</sub>, 2-H), 5.90 (1H, d, J=2H<sub>s</sub>, 6-H), 6.04 (1H, d, J=2H<sub>s</sub>, 8-H), 6.74 (1H, d, J=2H<sub>s</sub>, 6'-H), 6.

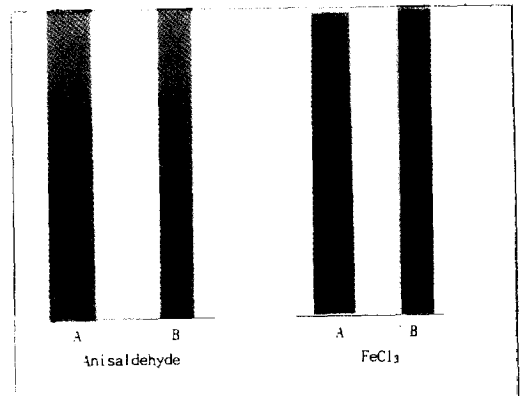


Fig. 3. Thin Layer Chromatography of flavan-3-ols isolated from Oolong tea. Developed solvent; Benzene : Ethylformic acid : Formic acid (1:7:2). A : compound I, B : compound II

83 (1H, d, J=8H<sub>s</sub>, 5'-H), 7.03 (1H, d, J=2H<sub>s</sub>, 2'-H), 16~7.54 (5H, m, aromatic H).

compound I-b: 무정형분말,  $[\alpha]_D^{25}$ ; -58.3 (C=0.6, acetone), <sup>1</sup>H-NMR (acetone -d<sub>6</sub> +D<sub>2</sub>O) δ: 2.88 (1H, dd, J=3, 16H<sub>s</sub>, 4-H), 3.10 (1H, dd, J=4, 16H<sub>s</sub>, 4-H), 5.12 (1H, brs, 2-H), 5.50 (1H, n, 3-H), 6.04 (1H, d, J=8H<sub>s</sub>, 5'-H), 6.90 (1H, dd, J=2, 8H<sub>s</sub>, 6'-H), 7.06 (1H, d, J=2H<sub>s</sub>, 2'-H).

compound I-a-1: 무정형 분말로서 compound I-b와 기기분석치가 일치함.

compound II: 갈색무정형분말,  $[\alpha]_D^{25}$ ; -101.7° (C=1.0, acetone), FAB-MS; m/z (%)=[M-H], <sup>1</sup>H-NMR (acetone -d<sub>6</sub> +D<sub>2</sub>O) δ: 2.76~3.25 (2H, m, 4'-H), 4.80 (1H, n, 4-H), 4.99 (1H, brs, 2'-H), 5.54 (2H, m, 3, 3'-H), 5.65(1H, s, 2-H), 5.92~6.13 (3H in total, m, 6, 8, 6'-H), 6.56~6.97 (6H in total, m, B, B'-ringH), 7.0, 7.08 (each 2H, s, G-H).

compound II-a-2 및 II-b-1: 무정형분말로서 compound I-a-1과 기기분석치가 일치.

compound II-a-3 및 II-b-2: 무색 침상형(H<sub>2</sub>O), mp : 254°C, IRV<sub>max</sub><sup>KBR</sup>Cm<sup>-1</sup>: 3,400 (OH), 1,710 (COOH), 1,620, 1,540 (arom. C=C).

compound I의 화학 구조를 결정하기 위해 thiolysis 및 탈유황반응, tannase처리를 거쳐 형성된 monomeric 유도체를 얻었다. compound I-a는 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 및 FeCl<sub>3</sub>에 갈색, 청색반응을 얻었고 <sup>1</sup>H-NMR에서 alipatic영역 즉 4.08 ppm (1H, d, J=2H<sub>s</sub>)의 signal 분열형태 배열로서 C-4 위치에 1H분의 proton 귀속이 가능함을 알았고 4.01 ppm의 2H분은 thiolysis

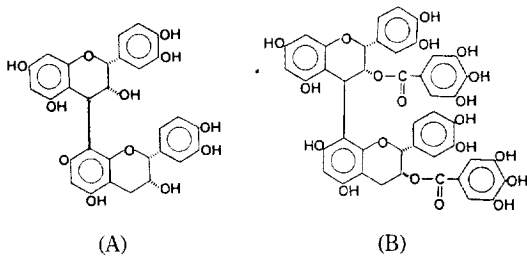


Fig. 4. Structure of flavan-3-ols isolated from Oolong tea A : Procyanidin B-1, B : Procyanidin B-1-O-3,3'-digallate

에서 형성된  $-SCH_3$ 를 암시하는 signal을 얻었다. 귀속 중 3.96 ppm (1H, m)과 5.28 ppm (1H, d,  $J=2H_z$ ) 영역은 H 각각의 분열형태로 보아 H-3과 H-2에 귀속하였고 7.16~7.54 ppm에서는 5H분의 aromatic H가 확인되었고 나머지는 안 등<sup>(1)</sup>이 발표한 결과와 일치하므로 (-)-epicatechin-4 $\beta$ -benzylthioether로 확정하였다. compound I-b와 I-a-1은 4.01 ppm 2H분의  $-SCH_3$ 만 다를 뿐 나머지 proton 귀속은 I-a와 모두 일치하므로 (-)-epicatechin으로 동정하였다.

그러므로 compound I은 <sup>1</sup>H-NMR에서 5.09 ppm의 signal은 flavan-3-ol 화합물임을 입증하는 것으로 보여진다. Thiolysis에서 compound I-a 및 I-b가 1 : 1 mole 비율로 얻어졌기에 이 화합물은 (-)-epicatechin 두분자가 4 $\beta$ →8로 결합된 procyanidin B-2로 판명되었고 FAB-MS 측정에서 577 [M-H]<sup>-</sup>는 위의 결과를 더욱 지지하게 하였다.

Compound II는 thiolysis한 결과 상부 하부 물질이 1 : 1 mole 비율로 얻어졌으며 모두 tannase 처리에 의해 compound II-a-2 와 II-b-1은 앞 compound I-b와 <sup>1</sup>H-NMR 귀속이 일치하였으므로 (-)-epicatechin이었다. compound II-a-3 및 II-b-2의 IR spectrum에서 3,400 (OH), 1,710 (COOH), 1,620, 1,540 (aromatic C=C)의 위치는 전형적인 gallate 화합물로 (-)-epicatechin 한 분자에 gallate 한 분자가 결합된 상·하 모두 같은 물질로 구성된 procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate로 결정하였다. 또한 <sup>1</sup>H-NMR에서 7.00, 7.08 ppm에서 각각 singlet의 2H분의 gallate환에 준하는 proton이 검출된 바 위의 결과를 더욱 확실하게 하였으며 Hashimoto 등<sup>(1)</sup>의 결과와도 일치하였다(Fig. 4).

분리된 화합물의 xanthine oxidase에 대한 저해 영향 및 기작

화학구조가 결정된 procyanidin 두 종류를 10~100  $\mu$ mol로 조제하고 Fig. 5 에서와 같이 procyanidin B-

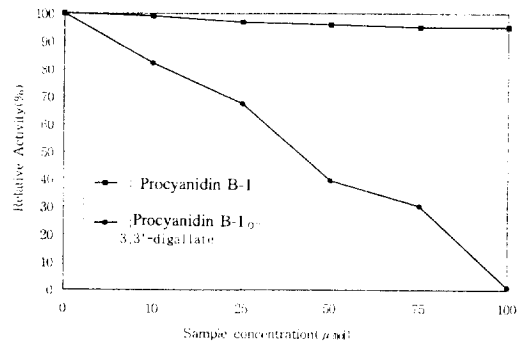


Fig. 5. Effect of flavan-3-ols isolated from Oolong tea on the xanthine oxidase

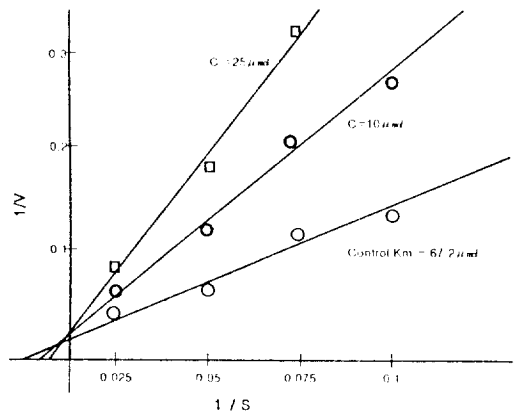


Fig. 6. Inhibition of urate formation by procyanidin B-2-O-3,3'-digallate at 25  $\mu$ mol Substrate: xanthine

2는 농도의 증가에도 거의 저해효과가 관찰되지 않았으나 procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate 화합물은 10  $\mu$ mol에서부터 저해효과가 있었으며 50  $\mu$ mol에서 50%이상 저해됨을 보여 주었고 100  $\mu$ mol에서 완벽한 저해를 보여주었다.

이러한 결과는 같은 종류의 procyanidin B-2 화합물이라도 gallate가 결합된 것이 저해능이 매우 우수하다는 것을 보여주고 있다. 안 등<sup>(1)</sup>이 발표한 앞 보고에도 gallate를 함유한 화합물이 매우 저해능이 좋았다는 결과와 같은 경향이었다. Hattori 등<sup>(6)</sup>이 발표한 glucosyltransferase 저해제는 gallate를 함유한 flavan-3-ol 화합물이 효소 저해능이 높다는 결과와 매우 유사하였다. 저해력이 우수한 procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate의 Lineweaver-Burk plot (25  $\mu$ mol, 10  $\mu$ mol)에서 xanthine oxidase의 경쟁적 저해제임을 확인하였다. 이런 결과도 안 등<sup>(1)</sup>의 앞선 보고와 일치 하였다(Fig. 6). 본 연구는 지속적으로 flavan-3-ol 화합물을 분리 xanthine

oxidase 저해를 관찰하고 저해기작을 규명하고자 한다.

## 요 약

통풍 예방물질에 관한 지속적 연구로서, 우리는 우롱차로부터 두 종류의 flavan-3-ol 화합물을 분리하게 되었다. 이 화합물은 TLC상에서 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 및 FeCl<sub>3</sub>에 정색 반응을 하는 것으로 보아 dimeric flavan-3-ol 화합물로 확신하게 하였다. NMR 등 기기분석에 의해 procyanidin B-2, procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate로 동정되었다. Xanthine oxidase에 대한 분리물질의 저해영향이 조사되었는데 procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate는 50 μmol에서 60.6%의 저해를 보여 주었고 경쟁적으로 저해한다는 것이 확인되었다. 또한 gallate를 함유한 dimeric flavan-3-ol 화합물이 높은 활성을 나타내었다.

## 문 헌

1. 안봉전, 김원국, 최장윤, 권익부, 최 청 : 우롱차로부터 Xanthine oxidase 저해물질의 분리 및 구조. 한국식품과학회지, **24**, 558 (1992)
2. Yagi, K.: Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids.*, **45**, 337 (1987)
3. 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)
4. 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**, 680 (1987)
5. Funayama, S. and Hikono, H.: Hypotensive principles of Diospyros kaki leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2695 (1984)
6. Hattori, M., Namba T. and Hara, Y.: Effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 717 (1990)
7. 안봉전, 권익부, 니시오카 이트슈, 최 청 : Jack Fruit 잎으로부터 Glucosyltransferase Inhibitor 물질 분리 및 구조. 한국생화학회지, **25**, 347 (1992)
8. 조영제, 안봉전, 최 청 : 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과. 한국식품과학회지, **25**, 238 (1993)
9. 조영제, 안봉전, 최 청 : 한국산 녹차로부터 탄닌의 분리 및 효소저해 효과. 한국생화학회지, **26**, 216 (1993)
10. 안봉전, 권익부, 최 청 : *Theobroma cacao* L. 외피로부터 새로운 Flavan-3-ol 화합물의 Glucosyltransferase 저해효과. 한국식품과학회지, **27**, 92 (1995)
11. Stripe, F. and Corte, E. D.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855 (1969)
12. 안봉전, 최 청 : Cacao Bean Husk로부터 Glucosyltransferase 저해물질 구조 결정. 한국농화학회지, **37**, 498 (1994)
13. Hashimoto, F. Nonaka, G and Nishioka, I.: Isolation of four new acylated flavan-3-ols from Oolong tea. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 611 (1987)

(1996년 7월 11일 접수)