

Jack Fruit 잎으로부터 새로운 Glucosyltransferase 저해물질 분리 및 화학구조

안봉진

경산대학교 생명자원과학부

Chemical Structure and Isolation of Novel Glucosyltransferase Inhibitor from *Artocarpus heterophyllus* folium

Bong-Jeun An

Faculty of Life Resources Science, Kyungsan University

Abstract

In the course of studies for anti-plaque agents, novel procyanidin structure isolated from *Artocarpus heterophyllus* folium was established by thiolysis and spectroscopic analysis. The chemical structure was identified for (-)-epiafzelecin-(4 β →8)-afzelecin-(4 α -8)-catechin containing the trimeric flavan-3-ols and molecular weight was 833[M-H] by FAB-MS negative ion method. The inhibitory effect on the glucosyltransferase activity was investigated, novel compound showed complete inhibition at 1.0 mM and inhibited on the glucosyltransferase noncompetitively.

Key words: procyanidin structure, novel glucosyltransferase inhibitor

서 론

구강내 존재하는 *Streptococcus mutans*군에 의해 분비되는 GTase는 기질로서 설탕등을 이용 glucan을 형성함으로써 충치가 발생하는 것으로 알려져 있다^(1,2).

최근 충치 예방에 관한 연구가 여러 분야에서 진행되고 있으며 Endo 등⁽³⁾은 *Aspergillus terreus* M 3328 배양액으로부터 glycoprotein성분을 분리하여 Mutastein이라 명하고 이 물질이 GTase저해에 높은 활성을 가지므로 산업화에 성공하였다. 이를 계기로 배양산물 및 천연물로부터 GTase저해제 탐색 연구가 여러 연구자에 의해 진행되어 왔는데 Hattori 등⁽⁴⁾은 녹차 잎에서 분리된 축합형 탄닌들이 충치 예방에 우수한 효과가 있다고 발표하였고, Namba 등⁽⁵⁾ 중국 한약재 추출물로부터 flavanone, flavanol 성분들을 분리하고 GTase 저해능을 관찰한 바 있다.

OKami 등⁽⁶⁾은 *Streptomyces neyagawanesis* MF 980-F로부터 ribocitrin이란 GTase 저해제를 분리 보고하였다. 안 등⁽⁷⁾은 Cacao Bean Husk에서 여러 종류의 폴리페놀성분을 분리하여 GTase 저해 활성을 검증하였고 그 중 Cinnamtannin A-2는 산업화에 성공한 Mutastein보다 저해 활성이 높다는 것을 밝혔다.

본 연구는 동인도가 원산이며 동남아시아에서 과일로 애용되고 있는 Jack Fruit 잎으로부터 GTase저해물질 분리, 구조 결정 및 활성 검정을 한 결과 procyanidin C-1은 매우 우수한 GTase저해제 임이 밝혀졌다⁽⁸⁾. 이어서 Jack Fruit 잎으로부터 GTase저해 물질을 계속 탐색한 결과 아직 화학 구조가 밝혀지지 않은 새로운 폴리페놀성물질을 분리하였고 화학구조 결정과 GTase저해 검증 실험이 완료되어 보고 하고자 한다.

우리는 여러 식물체로부터 충치의 원인이 되는 glucosyltransferase (GTase)저해제를 탐색, 분리, 구조 결정에 관해 지속적인 연구를 수행 중에 있다.

재료 및 방법

실험재료

Jack Fruit 잎은 안 등⁽⁸⁾에 의해 보고된 시료와 동일한 말레이시아산으로 산지로부터 1994년 5월에 채집하여 통풍 건조하였고, 시료량은 건조 무게로 900 g을 본 실험에 사용하였다.

Corresponding author: Bong-Jeun An, Faculty of Life Resources Science, Kyungsan University, Kyungsan-si, Kyung-sangbug-do 712-240, Korea

시약 및 기기

본 실험에서 분리용 gel은 Sephadex LH-20 (Pharmacia Co. Sweden), MCI-gel CHP-20 (Mitsubishi Chemical Co. Ltd. Japan), Bondapak C₁₈ (Waters Associates Inc. U.S.A), Fuji-gel (Hambai Co. Ltd. Japan)이었고, GTase는 일본 합동 주정에서 정제된 실험용 효소를 공급 받아 사용하였다.

기기로서는 NMR (JEOL, GX-270, Japan) 을 사용하여 acetone-d₆+D₂O용매에 용해하고 TMS를 기준 물질로 측정하였고, MS(JEOL, JMX-DX 300, Japan)는 negative ion FAB-Mass에 의해 분자량을 측정하였다.

추출 및 분리

건조된 Jack Fruit 잎 900 g를 추출 탱크에서 60% acetone를 가해 실온에서 24시간 침지후 원심 분리하고 상층액을 모았다. 침전물은 위와 같은 과정을 4회 반복하여 얻은 상층액 전부를 감압 농축하여 분리용 시료로 하였다. 분리는 폴리페놀 성분 연구에 널리 이용되고 있는 gel을 Nonaka 등⁹⁾의 보고에 기초를 두고 gel의 성질과 폴리페놀 분리 정도에 준해 각 단계별로 진행하였다. 즉 Fig. 1과 같이 추출 농축된 시료 1 L를 Sephadex LH-20 column에 loading하고 추출 용매로서 메탄올:증류수(0:1→1:0)로 단계별 gradient로 용출시켰다. 용출된 분획물은 Thin Layer Chromatography (TLC)상에서 폴리페놀 화합물이라 추정되는 것을 모아 농축하고 MIC-gel CHP-20으로 재 분리하였으며 용

출 용매로서는 메탄올:증류수(0:1→1:0)로 하여 Fraction I, II, III로 분리하였다. 이중 Fraction III를 Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20, Bondapak C₁₈ column에 연속 적으로 반복하고 폴리페놀 단일 물질이 될 때까지 반복 정제하였다. 이때 용출 용매는 메탄올:물(0:1→1:0), 에탄올용액(5%→40%), 60%메탄올, 순수 증류수를 사용하였다.

TLC에 의한 폴리페놀 동정

각 gel의 단계별로 분리된 화합물을 cellulose, silica로 코팅된 TLC (5.0×5.0 cm)에 전개하였다. 전개 용매로는 cellulose에서는 2% acetic acid를, silica TLC에서는 benzene:ethylformic acid:formic acid=1:7:2, 2:7:1, 2:5:1, 3:6:1의 농도 비로 전 한 다음 건조하여 280 nm에서 분리 정도를 확인하였다. 동정은 cellulose TLC에는 1% FeCl₃-MeOH, silica는 1% FeCl₃-MeOH 및 anisaldehyde-H₂SO₄ 발색액으로 반응 시킨 후 반응 물질의 형태, 전개 정도, 반응색등을 관찰하였다.

분리 물의 thiolysis 및 순수정제

신규 화합물이라 추정되는 분획물을 재결정화하여 건조한 후 시료 50 mg을 5% acetic acid (AcOH/EtOH) 5 mL에 용해하고 benzylmercaptan (PhCH₂SH) 2 mL를 가해 reflux상에서 반응시켰다. 생성물은 silica TLC 상에서 전개하여, 목적물의 형성을 확인하였다. 반응이 종료되면 농축하여 Sephadex LH-20 column으로 분리하였으며 추출 용매는 메탄올:물(0:1→1:0), 에탄올 용액(5%→40%) 사용하여 순수 정제된 화합물을 각각 재결정화하여 기기 분석 및 생리 활성 검증을 하였다(Fig. 2).

Glucosyltransferase 저해 특성

효소저해 활성 역제는 Endo 등⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉 사용된 효소는 *Streptococcus mutans* MF-3에서 정제된 sucrose GTase를 이용 하였고, 기질로서

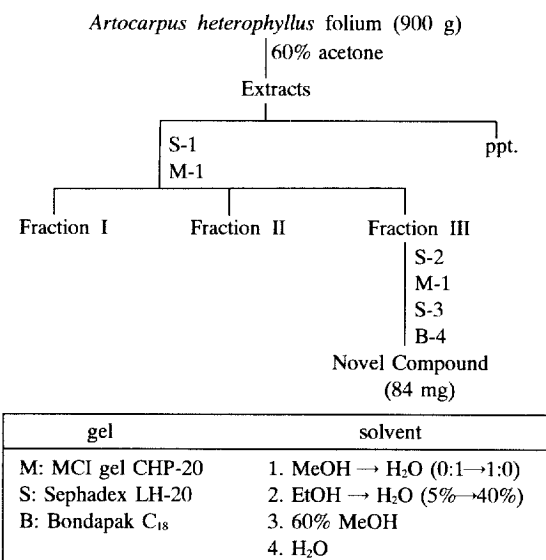


Fig. 1. The procedure for isolation of Novel procyanidin *Artocarpus heterophyllum* folium.

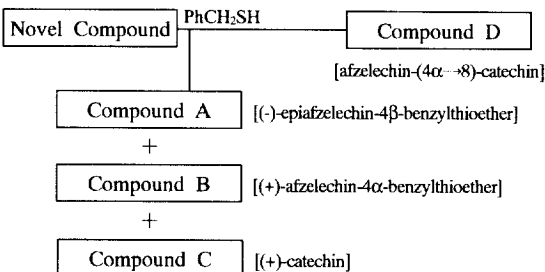


Fig. 2. The procedure for thiolysis of novel compound.

sucrose를 기질로하여 생성된 glucan량을 spectrophotometry법으로 측정하는 것으로, 신규 화합물과 tiolysis에서 얻어진 순수정제물을 각 농도별로 조제하고 완충 용액(phosphate buffer pH=6.7) 0.18 mL에 용해시켰다. 여기에 기질(sucrose+NaN₂) 0.8 mL, GTase 0.02 mL를 유리관 (13.0×100 mm)에 잘 석은 다음 30°경사를 이루게 하여 37°C에서 16시간 반응시켰다. 반응후 증류수 3 mL을 가해 2회 세척하고 수용성 glucan을 제거한 다음 증류수 3 mL을 다시 첨가하여 초음파로 분산하고 550 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

신규 화합물의 분리 및 성상

신규 화합물로 추정되는 화합물을 Fig. 1과 같이 여러 종류의 gel을 이용하여 분리하고 TLC 확인에 의한 순수정제물을 감압 증류하고 소량의 증류수를 첨가하여 재결정화하고 건조시켜 분말을 얻었다. 이 화합물은 anisaldehyde-H₂SO₄ 및 1% FeCl₃용액에서 갈색과 청색의 정색 반응을 보여주었고, TLC의 전개 정도는 benzene:ethylformic acid:formic acid=1:7:2에서 매우 낮은 전개값을 보여주므로 procyanidin류임이 확인되었다. 전개 정도를 비교시 Nonaka 등⁽⁹⁾과 안 등⁽⁷⁾의 보고에서와 비교할 때 procyanidin류로서 trimeric에 해당되는 화합물로 추정하게 되었다(Fig. 3). Sephadex LH-20 column에서 메탄올로 용출시 비교적 흡착성이 강하여 70% methanol농도 부근에서 용출되었고 또 다른 ODS-column에서 에탄올을 용출 용매로 사용할 때 30~40% ethanol에서 분리되었다. 이것은 Morimoto 등⁽¹⁰⁾에 의해 발표한 결과와 비교할 때 procyanidin 화합물 중 분자량이 비교적 큰 화합물일 가능성을 시사하였다.

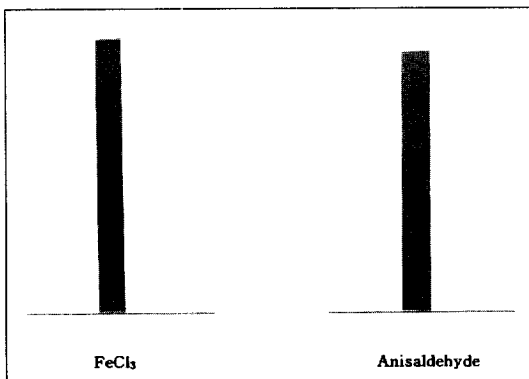


Fig. 3. Thin layer chromatography of novel compound isolated from the *Artocarpus heterophyllus* folium.

신규 화합물의 화학 구조 결정

순수 재결정화된 건조 분말을 thiolysis에 의해 분해하고 각 생성물을 Fig. 3과 같이 유도체 화합물을 얻었다. 이 화합물을 다음과 같이 기기 분석에 의해 결과를 확인하였다.

Compound A: α_D^{25} : -33.3° (C=1.0, acetone) 무정형분말, ¹H-NMR (acetone-d₆+D₂O) δ : 4.03~4.12 (5H in total each s, 3, 4-H, 3-OH, -SCH₂), 5.34 (1H, brs, 2-H), 5.92, 6.05 (each 1H, d, J=2 Hz, 6, 8-H), 6.83 (2H, d, J=9 Hz, 3', 5'-H), 7.31 (2H, d, J=9 Hz, 2', 6'-H), 7.20~7.52 (5H in total, m, aromatic H), FAB-MS: m/z(%)=395 [M-H]⁻

Compound B: α_D^{25} : +51.0° (C=0.7, acetone) 무정형분말, ¹H-NMR (acetone-d₆+D₂O) δ : 4.12 (2H, s, -SCH₂), 4.16~4.30 (1H, m, 3-H), 4.40 (1H, d, J=4 Hz, 4-H), 5.00 (1H, d, J=8 Hz, 2-H), 5.83 (1H, d, J=2 Hz, 6-H), 6.04 (1H, d, J=2 Hz, 8-H), 6.85 (2H, d, J=8 Hz, 2', 6'-H), 7.32 (2H, d, J=8 Hz, 3', 5'-H), 7.19~7.49 (5H in total, aromatic H)

Compound C: α_D^{25} : +9.4° (C=1.0, acetone), 무색침상형, 2.52 (1H, dd, J=8, 16 Hz, 4-H), 2.94 (1H, d, J=16.6 Hz, 4-H), 4.02 (1H, m, 3-H), 4.57 (1H, d, J=8 Hz, 2-H), 5.90 (1H, d, J=2 Hz, 6-H), 6.06 (1H, d, J=2 Hz, 8-H), 6.75 (1H, dd, J=8, 2 Hz, B-ring 6-H), 8.04 (1H, d, J=8 Hz, B-ring 5-H), 6.92 (1H, d, J=2 Hz, 6-H).

Compound D: α_D^{25} : +51.0° (C=0.7, acetone) 무정형분말, ¹H-NMR (acetone-d₆+D₂O) δ : 2.54~2.96 (2H, m, 4'-H), 4.04~4.62 (5H in total, m, 2, 3, 4, 2', 3'-H), 5.87~6.57 (3H in total, m, 6, 8, 6'-H), 6.62~7.30 (6H in total, m, B, B'-H), FAB-MS: m/z(%)=561 [M-H]⁻

Novel Compound: α_D^{25} : -160° (C=0.425, methanol) 무정형분말, 분자량: C₄₅H₃₈O₁₆·H₂O, 계산치: C=63.38%, H=4.69%, 분석치: C=63.39%, H=4.52%, ¹H-NMR (acetone-d₆+D₂O) δ : 2.46~2.89 (2H, m, 4''-H), 3.85 (1H, m, 3''-H), 3.92 (1H, brs, 3-H), 4.01 (1H, brs, 3'-H), 4.47 (1H, brs, 6, 6', 8, 8'-H), 6.623~7.21 (9H in total, B, B', B''-ringH), FAB-MS: m/z(%)=833 [M-H]⁻

유도체 화합물과 신규 화합물은, 무정형, 혹은 침상형으로 확인되었으며 신규 화합물의 ¹H-NMR은 매우 복잡한 signal양상을 보여 주었다. 원소 분석에서 C가 63.39%, H가 4.52%의 값을 얻었으며 추정되는 계산치는 C는 63.38%, H는 4.69%로 그의 일치하여 C₄₅H₃₈O₁₆·H₂O로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 분자량 측정시 negative ion FAB-MS에서 m/z(%)=833 [M-H]⁻로 flavan-3-ol 화합물의 trimeric에 해당하는 값을 알 수 있

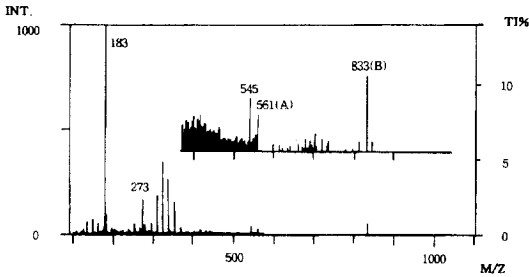


Fig. 4. Mass spectrum of novel compound and derivatives. A: afzelechin-(4 α →8)-catechin, B: novel compound.

었다. 유도체에서 fragment로 확인된 분자량은 273 [M-H]⁻, 545 [M-H]⁻, 561 [M-H]⁻가 확인되므로 trimeric flavan-3-ol화합물의 구성 물질로 확인이 가능하였다(Fig. 4). 이러한 분자량 값은 procyanidin C-1의 값과 비교시 산소 2 분자에 해당하는 값이 부족한 것으로 확인하였다. 유도체의 thiolysis에서 A,B,C와 D화합물의 비는 1:2 q비율로 얻었으며, 이중 화합물 A는 분자량 측정에서 395 [M-H]⁻였으며 4.03~4.12사이의 5H분의 signal 양상은 3, 4-H, 3-OH, -SCH₂를 암시하였고, 5.34는 1H분의 2-H, 6.83는 5'-H 귀속이 확인되었다. 7.20~7.52의 5H분의 aromatic H의 귀속을 나타내므로 이 화합물은 (-)-epiafzelechin-4 β -benzylthioether로 확인되었으며 Hashimoto 등⁽¹¹⁾에 의해 발표된 ¹H-NMR 결과와도 일치하였다.

화합물 B는 4.12 ppm에서 2H분의 singlet는 -SCH₂의 귀속이, 4.16~4.30에서 1H분의 multiple한 3-H, 5.00, 5.83에서 2-H, 6-H 귀속을 하였으며, 6.85는 2', 6'-H 귀속으로 전형적인 (+)-catechin이었으나 분자량 측정시 산소 한 분자가 모자라는 것으로 보아 (+)-afzelechin-4 α -benzylthioether로 확인하였다. 화합물 C는 ¹H-NMR에서 signal양상이 Hattori 등⁽¹⁰⁾이 발표한 결과와 일치하므로 (+)-catechin으로 확인되었다. 유도체 화합물D는 무정형으로서 분자량이 561 [M-H]⁻ flavan-3-ol dimer인 것으로 확인되었다. ¹H-NMR에서도 2.54~2.96의 2H분은 multiple한 4'-H 귀속이, 4.04~4.62에서는 5H분이 2, 3, 4, 2', 3-H귀속이 가능하였고, 6.62~7.30에서 6H분의 B, B'-ring H 확인되므로 이것은 Nonaka 등⁽¹²⁾이 발표한 ¹H-NMR과도 일치하여 afzelechin-(4 α →8)-catechin으로 확인하였다. 각각의 유도체 화합물의 ¹H-NMR귀속 결과를 분석해 볼 때 제일 위 상부로부터 (-)-epiafzelechin, (+)-afzelechin, (+)-catechin으로 구성되어 있으며 ¹H-NMR signal (4.03~4.12)에서 비교적 저자장을 보여 주므로 A와 B는 β 형 결합을 확인하였다. 신규 화합물은 epiafzelechin-(4 β →8)→afzelechin-

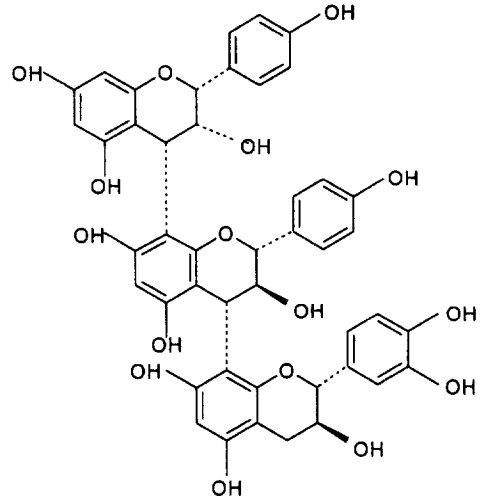


Fig. 5. Novel chemical structure isolated from *Artocarpus heterophyllum* folium.

(4 α →8)-catechin으로 구조 결정하였다. 이 화합물은 축합형으로 처음 구조가 밝혀진 신규화합물이었다(Fig. 5).

Glucosyltransferase(GTase)에 대한 신규화합물의 저해 영향 및 기작

신규화합물(epiafzelechin-(4 β →8)-afzelechin-(4 α →8)-catechin)과 thiolysis에서 형성된 (+)-catechin, afzelechin-(4 α →8)-catechin을 0.01 mM에서 1.0 mM로 조제하여 GTase저해 영향을 살펴보았다. 그 결과 (+)-

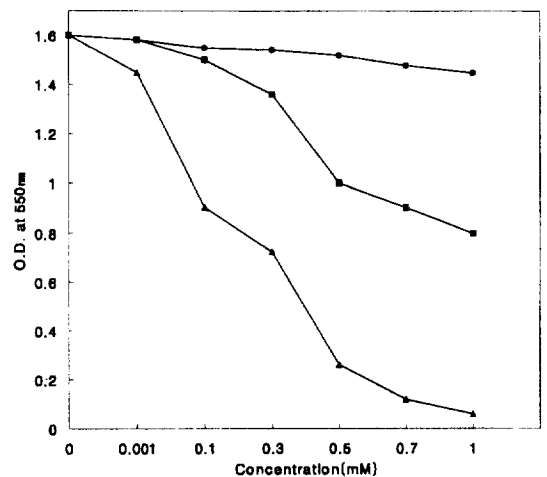


Fig. 6. Effect of derivatives and novel compound isolated from *Artocarpus heterophyllum* folium on the glucosyltransferase. ●—●: (+)-catechin, ■—■: afzelechin-(4 α →8)-catechin, ▲—▲: novel compound.

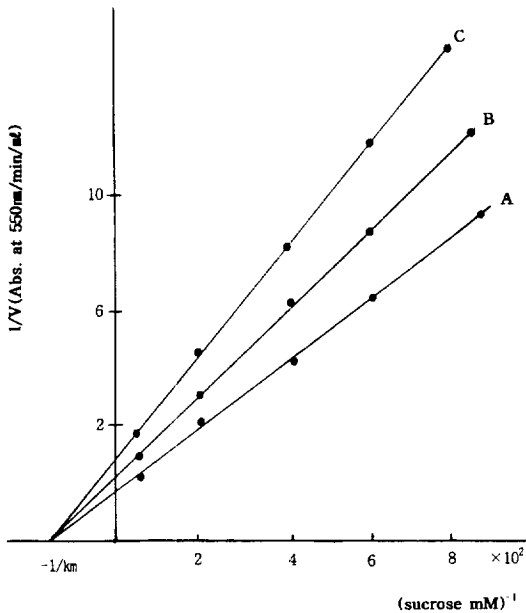


Fig. 7. Inhibition of glucan formation by novel compound. A: control, B: 0.1 mM, C: 0.3 mM.

catechin은 전혀 저해 영향이 관찰되지 않았고 afzelechin-(4 α →8)-catechin은 0.5 mM에서 약간의 저해가 관찰되었다(Fig. 6). 신규화합물은 0.1 mM에서부터 급격한 저해가 보이기 시작하여 1.0 mM에서 완벽한 저해 효과가 확인되었다. 이것은 안 등⁽⁶⁾이 Cacao Bean Husk에서 분리하여 구조 결정 후 GTase 저해 효과를 관찰하여 매우 우수한 저해제임이 판단된 cinnamtannin A-2와 거의 유사한 저해활성이 관찰되었다. 또한 Hattori 등⁽⁴⁾이 녹차로부터 분리하여 GTase저해 영향을 확인한 결과 이러한 축합형 탄닌이 저해제로서 기능이 우수하다는 결과와 잘 일치하였으며 저해 기작 실험에서 GTase에 대해 신규화합물은 비경쟁적으로 저해한다는 것이 확인되었다(Fig. 7).

요 약

충치 예방물질의 지속적인 연구로 Jack Fruit 잎으로부터 새로운 procyanidin류를 분리하였고 thiolysis 및 기기 분석에 의해 구조를 결정하였다. 신규화합물의 화학 구조는 flavan-3-ol 화합물의 삼량체인 (-)-epiafzelechin-(4 β →8)-afzelechin-(4 α →8)-catechin의 구조로, 분자량이 833 [M-H]⁻ 이었다. 화학 구조가 결정된 신규화

합물의 glucosyltransferase 저해 실험 결과 1.0 mM에서 완벽한 저해 효과가 관찰되었고 저해기작은 비경쟁적 저해제임을 알았다.

감사의 글

본 연구를 위해 기기 분석과 구조 결정에 도움을 주신 일본九州大學 藥學部 生藥學教室의 Morimoto Satoshi 조교수님께 감사드립니다.

문 헌

1. Elattori, M. and Hara, Y.: Effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 717 (1990)
2. Sakanaka, S., Kim, M. J. and Yamamoto, T.: Antibacterial substances in Japanese Green Tea extract against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium. *Agric Biol. Chem.*, **53**(9), 2307 (1989)
3. Endo, A. and Murakawa, S.: Mutastein, A new inhibitor of adhesive-insoluble glucan synthesis by glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *The J. Antibiotics*, **335**(3), 203 (1983)
4. Hattori, M., Ishigami, T. and Hara, Y.: Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(3), 717 (1990)
5. Namba, T., Tsunozuka, Y., Takagi, S. and Hattori, M.: Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines. *Shoyakugakaku Zasshi*, **338**(3), 253 (1984)
6. Okami, Y., Ohnuki, T. and Takashio, M.: The structure of a novel inhibitor of dextranucrase. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1267 (1981)
7. 안봉진, 권익부, 최 청 : *Theobroma cacao* L. 외피로부터 새로운 flavan-3-ol 화합물의 glucosyltransferase 저해 효과. *한국식품과학회지*, **27**(1), 92 (1995).
8. 안봉진, 최장운, 권익부, 니시오카이트슈, 최청 : Jack Fruit 잎으로부터 Glucosyltransferase inhibitor물질의 분리 및 구조. *한국생화학회지*, **25**(4), 347 (1992)
9. Nonaka, G.H.: Isolation and structure elucidation of tannins. *Pure & Appl. Chem.*, **61**(3), 357 (1989)
10. Morimoto, S., Nonaka, G.H. and Nishioka, I.: Isolation and structure of novel bi- and triflavonoids from the leaves of *Cassia fistula* L. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 717 (1988).
11. Hashimoto, F., Nonaka, G.H. and Nishioka, I.; Isolation of four new acylated flavan-3-ols from Oolong Tea. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 611 (1987)
12. Nonaka, G.H., Hus, F.L. and Nishioka, I.: Structure of dimeric, trimeric and tetrameric procyanidins from *Areca catechu* L. *J. C. S. Chem. Comm.*, 781 (1981)

(1997년 9월 4일 접수)