

한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과

조영제 · 안봉전* · 최 청

영남대학교 식품가공학과, *동국전문대학 약용식품과

Inhibition Effect of Against Angiotensin Converting Enzyme of Flavan-3-ols isolated Korean Green Tea

Young-Je Cho, Bong-Jeun An* and Cheong Choi

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

*Department of Herb and Food Science, Tongguk Junior College

Abstract

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

Key words: angiotensin-converting enzyme, flavan-3-ol, green tea

서 론

Phenol성 물질 중 flavan-3-ol을 기본골격으로 하는 축합형 탄닌의 성상은 가장 최근에 알려졌는데 그 중에서도 탄닌의 특징인 단백질 및 금속이온과의 결합에 관해서는 그 응용을 포함해서 많은 연구가 진행되어 왔고 효소활성의 저해작용도 중요한 탄닌의 역할로 인식되어 지고 있으며^(1,2), 식물체에서 분리한 phenol 화합물이 각종 세균, 효모의 생육억제 활성 및 효소 저해활성이 있음을 보고하였다^(3,4). 고혈압이 발생하는 기작에서 renin-angiotensin system 이 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 angiotensin converting enzyme(ACE)는 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해 시킴으로서 강력한 혈관수축 작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 가지며 adrenal cortex에서 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제한다. ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화시킴으로서

결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다⁽⁵⁻⁹⁾. ACE 저해작용을 갖는 nonapeptide인 tetrotide가 고 renin증 환자에서 뿐만 아니라 정상인에서도 현저한 혈압강화 작용을 가짐이 밝혀져⁽¹⁰⁻¹²⁾ ACE 억제제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시된 후 ACE 저해제에 대한 연구가 있었고^(13,14), Cushman 등⁽¹⁵⁾, Swett 등⁽¹⁶⁾, William 등⁽¹⁷⁾은 ACE에 대한 경쟁적 저해제를 합성하였으며 Kameda 등⁽¹⁸⁾, Funayama 등⁽¹⁹⁾은 persimmon leaf에서 분리한 flavonoid가 ACE 저해활성을 가진다고 보고하였으나 flavan-3-ol을 기본골격으로 하는 축합형 탄닌에 관한 ACE 저해효과 연구는 보고된 바가 적다. 따라서 본 연구에서는 각종 생리활성 물질로서 주목되고 있는 탄닌류를 많이 함유하고 있는 한국산 녹차로부터 천연 효소저해물질 탐색 연구의 일환으로 탄닌을 분리하여 효소저해효과를 검토함으로써 새로운 기능성 식품 또는 의약품 소재로서 산업화의 기초 자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험의 재료는 제주도 지방에서 재배되어 92년에 제조된 건조녹차(*Camellia sinensis* L.)중 秋茶를 시중에서 구입하여 공시 재료로 사용하였고 기기는 Spectro-

Corresponding author: Cheong Choi, Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

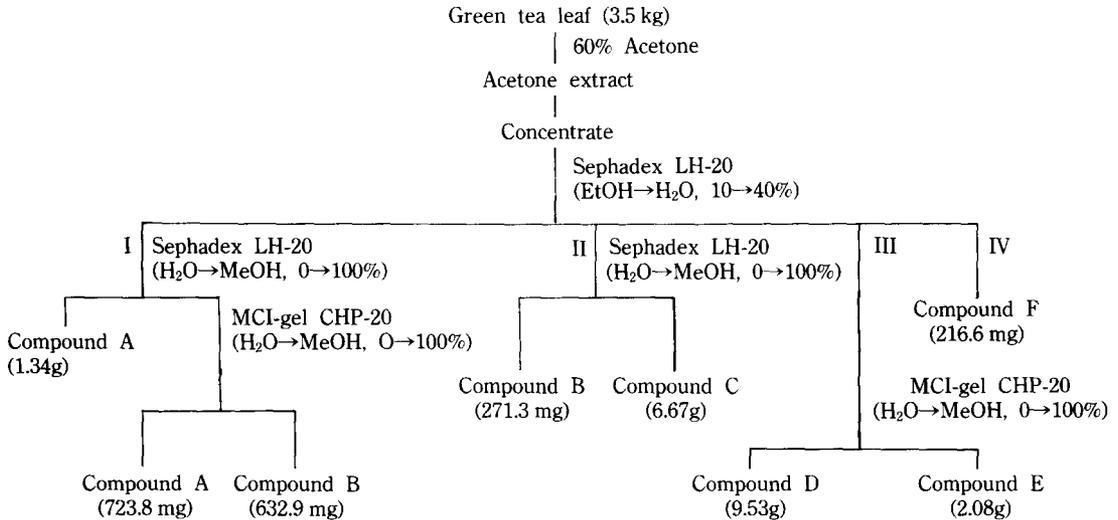


Fig. 1. The flow chart for the isolation of tannins from Korean green tea

photometer(LKB, Sweden)를 사용하였으며, 사용된 시약은 Sephadax LH-20(Pharmacia, Co, Sweden), Angiotensin converting enzyme, Hippuryl-His-L-Lys, Hippuric acid(Sigma Co., U.S.A) 등이고 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

녹차로부터 아세톤 추출물의 분리

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

탄닌 화합물의 정제

안 등⁽²⁰⁾의 방법에 따라 저분자 탄닌의 분리에 효과가 탁월한 Sephadex LH-20과 구조적 이성체 탄닌류의 분리가 용이한 MCI-gel CHP 20을 이용한 column chromatography로 normal phase type으로서 EtOH→H₂O 및 reverse phase type으로 H₂O→MeOH의 순으로 Fig. 1과 같이 용출시켜 6가지 순수한 flavan-3-ol 화합물을 분리하였으며, 이들 화합물은 ¹H-NMR, IR, Mass를 이용한 구조 분석에서 (+)-catechin, (-)-epicatechin-3-o-gallate (-)-epigallocatechin-3-O-gallate, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin, procyanidin B-3-3-O-gallate로 동정하였다.

ACE 저해 실험

ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법⁽¹⁵⁾에 의하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M

Table 1. Effect of acetone extract from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Concentration (mg/ml)	Hippuric acid (μg/ml)	Inhibition (%)
Control	261.53	-
2.0	19.80	92.43
1.0	69.25	73.52

potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질(Hippuryl-L-histidyl-L-leucine ; HHL) 2.5 mM을 녹인액 0.15 ml, ACE 0.1 ml와 탄닌용액 0.1 ml를 혼합하였으며, 대조구는 탄닌 대신 증류수 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1 N-HCl 0.35 ml 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 ml의 EtOAc를 첨가하였다. EtOAc 층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 2 ml의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 280 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

녹차 추출물의 효소저해효과

녹차에서 추출 농축된 acetone 추출물을 동결 건조하여 1 ml당 1~2 mg 으로 첨가하여 ACE 저해 실험을 한 결과 Table 1에서와 같이 1 mg에서 74%, 2 mg에서 거의 92%의 저해효과를 나타내었다.

분리 탄닌의 ACE 저해효과

(+)-Catechin에 의한 ACE 저해효과 : 정제된 (+)-catechin을 각 농도별로 첨가하여 ACE 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 Table 2에서와 같이 100 μg 정도가 첨가되었을 때 만이 저해율이 56.86%로 저해효과가 인

Table 2. Effect of (+)-catechin from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Concentration (µg/ml)	Hippuric acid (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	281.21	—
100	121.31	56.86
50	197.28	26.85
30	249.24	11.37
10	278.41	—

Table 3. Effect of (-)-epicatechin-3-O-gallate from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Concentration (µg/ml)	Hippuric acid (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	281.21	—
100	33.07	88.24
50	107.51	61.77
30	181.97	35.29
10	236.55	15.88

Table 4. Effect of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Concentration (µg/ml)	Hippuric acid (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	281.21	—
100	19.29	93.14
50	71.34	73.63
30	124.07	55.88
10	211.36	24.84

정되었으며 그 이하의 농도에서는 큰 저해효과가 관찰되지 않았다.

(-)-Epicatechin-3-O-gallate에 의한 ACE 저해효과 : 정제된 (-)-epicatechin-3-O-gallate를 각 농도별로 첨가하여 ACE 저해효과를 측정된 결과 Table 3에서와 같이 50 µg 첨가시에 61.77%라는 저해율을 보였으며, 저농도의 탄닌 첨가에 의해서도 저해효과가 관찰되어 저해효과는 상당히 뛰어나다.

(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate에 의한 ACE 저해효과 : (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate를 각 농도별로 첨가하여 ACE 저해효과를 측정된 결과 Table 4에서와 같이 30 µg 첨가시에 55.88%의 저해율을 나타내었으며 10 µg 첨가시에도 24.84%라는 저해율을 보여 저해효과는 극히 우수하였다.

(+)-Gallocatechin에 의한 ACE 저해효과 : 분리된 (+)-gallocatechin을 각 농도별로 처리하여 ACE 저해효과를 검토한 결과 Table 5에서와 같이 100 µg 첨가에서도 저해효과가 26.47%에 불과해 저해효과는 높지 않았다.

(-)-Epigallocatechin에 의한 ACE 저해효과 : (-)

Table 5. Effect of (+)-gallocatechin from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Concentration (µg/ml)	Hippuric acid (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	281.21	—
100	206.77	26.47
50	251.43	10.59
30	274.88	2.25
10	281.62	—

Table 6. Effect of (-)-epigallocatechin from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Concentration (µg/ml)	Hippuric acid (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	281.21	—
100	137.85	50.98
50	202.36	28.04
30	242.99	13.59
10	277.13	1.45

Table 7. Effect of procyanidin B-3-3-O-gallate from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Concentration (µg/ml)	Hippuric acid (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	281.21	—
100	45.93	83.67
50	99.67	64.56
30	179.08	36.32
10	259.70	7.65

Epigallocatechin을 각 농도별로 처리하여 ACE 저해효과를 검토한 결과 Table 6에서와 같이 100 µg 첨가시에 50.98%의 저해율을 보였고 그 이하의 농도에서는 저해효과가 크지 않았다.

Procyanidin B-3-3-O-gallate에 의한 ACE 저해효과 : Procyanidin B-3-3-O-gallate를 각 농도별로 처리하여 ACE 저해효과를 검토한 결과 Table 7에서와 같이 100 µg 첨가시 83.63%, 50 µg 첨가시에 64.54%의 저해율을 보였고 그 이하의 농도에서는 큰 활성저해가 관찰되지 않았다.

탄닌 복합물의 상승 효과 : 분리된 탄닌을 서로 mix하여 물질간 상승효과를 본 결과 Table 8에서와 같이 여러가지가 섞여 있을 때 저해효과가 가장 우수해 탄닌 단일성분에 의한 저해효과보다 혼합물에 의한 저해효과의 상승 효과가 확인되었다.

녹차에서 분리한 탄닌류의 ACE 저해효과는 catechin류 보다는 epimer인 epicatechin류에서 저해활성이 강하였으며 gallate가 결합된 화합물들의 효소저해 능력이 gallate가 없는 화합물에 비해 월등히 우수해 gallate 화합물이 효소와의 결합능이 우수하다는 것을 뒷받침하여

Table 8. Effect of mixed tannins from Korean green tea on angiotensin converting enzyme activity

Compound	Concentration (µg/ml)	Hippuric acid (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	—	261.53	—
AB	50	56.33	78.46
(1:1 w/w)	100	20.74	92.07
AC	50	95.90	63.33
(1:1 w/w)	100	45.56	82.58
BC	50	113.71	56.52
(1:1 w/w)	100	32.40	87.61
ABC	50	67.16	74.32
(1:1:1 w/w/w)	100	12.45	95.24

A; (-)-Epicatechin-3-O-gallate, B; (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate, C; Procyanidin B-3-3-O-gallate

주었다.

일반적으로 탄닌 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 단백질의 아미드 결합과 탄닌의 페놀성 수산기간의 수소결합에 의한 반응으로 단백질과 탄닌복합체의 침전물을 형성한다. 이런 현상은 pH, 이온강도, 단백질 및 탄닌농도에 의한 상호작용으로 비경쟁적 효소를 저해함으로써 효소의 용해성 및 안정성을 저하, 효소 불활성화를 일으키는 것으로 보고되고 있으며⁽¹⁹⁾, Hattori 등⁽²¹⁾이 glucosyltransferase의 저해제로서 galloyl기를 함유한 flavan-3-ol 화합물의 저해능이 우수하였다는 보고와 비슷하였다.

Kameda 등⁽¹⁸⁾, Funayama 등⁽¹⁹⁾은 persimmon leaf에서 분리한 flavonoid 물질들이 ACE 저해 활성을 가지며 galate가 결합된 galloyl flavonoid의 저해 활성이 nongalloyl flavonoid보다 저해효과가 더 우수하였다고 보고하였으며 본 실험 결과와 유사하였다.

ACE에 대한 탄닌의 저해 양상

ACE에 대한 저해 양상을 살펴보기 위하여 기질의 농도를 변화시키며 저해 활성이 인정되는 각 화합물들을 50 µg씩 첨가하여 효소활성 측정을 하고 Lineweaver-Burk plot하여 탄닌을 첨가하지 않은 대조구와 비교한 결과 Fig.2와 같이 ACE에 대해 비경쟁적 저해를 한다는 것을 알 수 있었다.

요 약

기능성 식품과 생약재료의 이용을 위한 연구의 일환으로 한국산 녹차로부터 탄닌을 분리하여 angiotensin converting enzyme 저해효과를 측정하였다. 녹차의 acetone 추출물에서 angiotensin converting enzyme 저해 효과가 있음이 확인되었고 정제된 탄닌의 효소저해효과를 검토한 결과 angiotensin converting enzyme 저해는 galloyl tannin류가 nongalloyl tannin류보다 활성이 더 우수하였고 구조적 이성체에서도 (+)-catechin류 보다

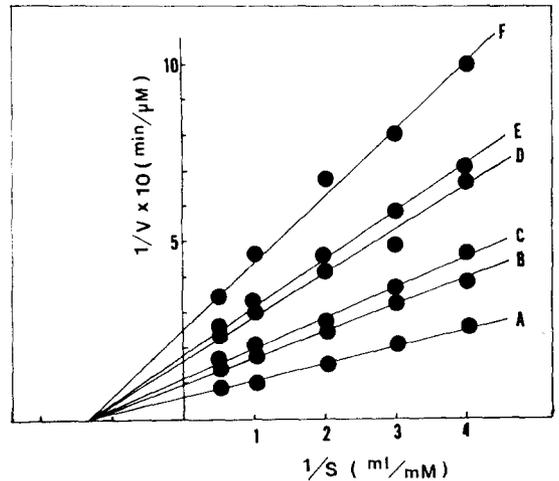


Fig. 2. Inhibitory effect of flavan-3-ols (50 µg) on angiotensin converting enzyme

A; None inhibitor, B; (-)-epigallocatechin, C; (+)-catechin D; (-)-epicatechin-3-O-gallate, E; procyanidin B-3-3-O-gallate, F; (-)-epigallocatechin-3-O-gallate

(-)-epicatechin류가 효소저해효과가 더 좋았으며, 각 물질간 상승 효과가 인정되었다. 녹차에서의 탄닌류는 angiotensin converting enzyme에 대해 비경쟁적 저해를 하는 것을 알 수 있다.

문 헌

- Sharma, A. and Sehgal, S.: Effect of domestic processing, cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba. *Plant Food for Human Nutrition*, 42(2), 127(1992)
- Tan, N.H., Wong, K.C. and Lumen, B.O.: Relationship of tannin 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)
- Okuda, T., Yoshida, T. and Ashida, M.: Tannins of medicinal plants and drugs. *Heterocycles*, 16, 1618 (1981)
- Namba, T., Tsunozuka, Y., Nunome, S., Takeda, T., Kakiuchi, Y.Z. Kobayashi, K., Takagi, S. and Hattori, M.: Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines (part iv). Screening of crude drugs for anti-plague action and effect of artemisia capillaris spikes on adherence of Streptococcus mutans to smooth surface and synthesis of glucan by glucosyltransferase. *Shoyakugaku Zasshi*, 38(3), 253(1984)
- Soffer, R.L.: Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 73(1976)
- Ondetti, M.A. and Cushman, D.W.: Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 283(1982)
- Douglas, W.W.: Chapter 27, The plasmacological basis

- of therapeutics. 6th ed A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman. Macmillian Publishing Co., Inc. New York, (1980)
8. Hollenberg, N.K.: Pharmacologic interruption of the renin-angiotensin system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 559(1979)
 9. Cushman, D.W. and Ondetti, M.A.: Interruption of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1871(1980)
 10. Stewart, J.M., Ferreira, S.H. and Greene, L.J.: Bradykinin potentiating peptide Pca-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitors of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1557(1971)
 11. Gavras, H., Brunner, H.R., Laragh, J.H., Sealey, J.E., Gavras, I. and treat vasoconstriction and volume factors in hypertensive patients. *New England J. Med.*, **291**, 817(1974)
 12. Case, D.B., Wallace, J.M., Keim, H.J., Weber, M.A., Drayer, J.I.M., White, R.P. Sealey, J.E. and Laragh, J.H.: Estimating renin participation in hypertension: Superiority of converting enzyme inhibitor over saralasin. *Am. J. Med.*, **61**, 790(1976)
 13. Petrillo, E.W. and Ondetti, M.A.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Medicinal chemistry and biological actions. *Med. Chem. and Biol. Act. Med. Res. Rev.*, **2**, 1(1982)
 14. Wyvratt, M.J. and Patchett, A.A.: Recent developments in the design of an angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Medicinal Res. Rev.*, **5**, 483(1985)
 15. Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. and Ondetti, M.A.: Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochem.*, **16**, 5484 (1977)
 16. Sweet, C.C., Ulm, E.H., Gross, D.M., Vassil, T.C. and Ston, C.A.: A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*, **288**, 280(1980)
 17. William, J.G., Patricia, L.A., Debra, S.P., Arthur, A.P., Edgar, H.U. and Theodore, C.V.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Synthesis and Biological activity of acyl tripeptide analogues of enalapril. *J. Med. Chem.*, **28**, 434(1985)
 18. 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)
 19. Funayama, S. and Hikono, H.: Hypotensive principles of Diospyros Kaki Leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**(11), 2865(1979)
 20. Armstrong, G.S.: A study of tannin protein interactions, *Dissertation Abstracts International*. **44**(9), 2695 (1984)
 21. 안봉진, 김원주, 최창윤, 권익부, 최 청 : 우롱차로부터 Xanthine Oxidase 저해물질의 분리 및 구조. *한국식품과학회*, **24**(6), 558(1992)
 22. Hattori, M., Namba, T. and Hara, Y.: effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 717(1990)

(1993년 1월 30일 접수)