

Cacao bean으로부터 분리된 polyphenol 성분의 화학구조분석과 ACE 저해효과

이만종* · 장영렬 · 임무현¹

롯데그룹중앙연구소, ¹대구대학교 식품공학과

초 록 : Ghana산 cacao bean으로부터 acetone으로 추출하고 Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20, Bondapak C₁₈ 및 Fuji gel ODS G₃ chromatography 등을 이용하여 7종의 polyphenol 화합물(compound 1 - compound 7)을 분리 정제하였고, 이들 화합물의 화학구조를 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR 및 MS를 사용하여 검색하였고 아울러 angiotensin converting enzyme(ACE)의 저해효과를 조사 검토하였다. 분리정제한 7종의 polyphenol 화합물의 구조를 분석한 결과, compound 1: [(+)-catechin], compound 2: [(-)-epicatechin], compound 3: [procyanidin B-1, (-)-epicatechin-(4 β →8)-(+)-catechin], compound 4: [procyanidin B-2, (-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin], compound 5: [procyanidin B-7, (-)-epicatechin-(4 β →6)-(+)-catechin], compound 6: (procyanidin B-2,3,3'-O-digallate) 및 compound 7: [cinnamtannin A-2, (-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin]임을 동정하였다. ACE의 저해효과는 procyanidin B-2,3,3'-O-digallate (compound 6)가 100 μ M에서 94.6%로 매우 우수하였으며, (+)-catechin (compound 1), (-)-epicatechin (compound 2), procyanidin B류 (compound 3, 4, 5) 및 cinnamtannin A-2 (compound 7)도 각각 67.9%, 61.9%, 88.6%, 82.5%, 72.2% 및 82.3%의 비교적 우수한 저해효과가 있었다. 아울러 결합방식에서는 4 β →6보다 4 β →8의 결합방식이, 그리고 procyanidin 류에서는 gallate를 갖는 물질이 이를 함유하지 않은 물질보다 더욱 높은 ACE의 저해효과를 나타내었으며, 또한 hydroxyl 기가 많을수록 효소 저해효과도 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 chocolate의 주원료인 cacao bean의 polyphenol 성분 또한 녹차 등에서 볼 수 있는 생리활성효과에 손색없는 것으로 판단되고, 이러한 기능성에 기초하여 chocolate, 음료 등의 식품이나 의약품의 기능성 소재로서의 산업적 응용 가능성이 높은 것으로 사료된다.(1997년 12월 29일 접수, 1998년 2월 7일 수리)

서 론

탄닌은 피혁의 연화 및 염색 등의 광범위한 용도로서 고대로부터 사용되어 왔으나 식품중에서 탄닌의 성상은 가장 최근에 알려졌는데 구조분석, 생리활성 기능 및 효소활성의 저해작용도 중요한 탄닌의 역할로 인식되어지고 있다.

탄닌은 단백질과 결합하는 특성을 가진 폴리페놀을 총칭하는 것으로 분자량은 약 500이상이며 Freudenberg¹⁾에 의하여 가수분해되어지는 것과 그렇지 않은 것으로 분류되었다.

Haslam²⁾은 탄닌을 가수분해형 탄닌과 축합형 탄닌으로 크게 분류하고 이 방법에 의하여 분류하고 있으나 이 분류에 포함되지 않는 새로운 형의 탄닌을 신형탄닌으로 분류하였다.

Gallotannin으로서 널리 알려진 것은 五倍子,³⁾ 沒食子⁴⁾ 탄닌으로서 Freudenberg¹⁾ 등에 의하여 처음으로 가수분해되어지는 tanin이 밝혀졌으며, Haslam²⁾이 일반구조를 결정하였고, Ellagitannin은 ellagic acid를 갖는 화합물군으로 divi-divi,⁵⁾ myrobalan⁶⁾(복사 양배추속 자두 유사 과실), 호두⁷⁾ 등의 주요 탄닌원이며 Schmidt⁸⁾등이 myrobalan (*Termi-*

nalia chebula), divi-divi (*Caesalpinia coriaria*)로부터 corilagin을 분리하였고, 그 후 10종류의 신형 탄닌구조가 확인되었다.

Weinges,⁹⁾ Okuda⁹⁾등의 연구로 축합형 탄닌은 quebracho, gambir, cutch 등의 주요탄닌원으로 오래전부터 알려져 왔었지만 catechin의 C-C결합이 확인된 후 연구가 급진되었다.

Hattori,¹⁰⁾ Ittah,¹¹⁾ Petereit,¹²⁾ Okuda, Nishioka,¹³⁾ Ahn,¹⁴⁾ Foo¹⁵⁾ 등이 연구한 축합형 탄닌은 flavan-3-ol을 기본 구성단위로 각종의 결합양식에 의해 dimer, trimer, oligomer, polymer를 형성하고 산처리를 하면 anthocyanidin류를 생성하므로 proanthocyanidin으로 총칭되고 있으며 大黃(*Rheum undulatum*=Haubarb),¹⁶⁾ 何首烏(새박뿌리),¹⁷⁾ 桂皮類,¹⁸⁾ 樹皮(*Cinnamomum camphora*),¹⁹⁾ 楊梅皮,²⁰⁾ 營實(*Rosa multiflora*),²¹⁾ 阿仙藥²²⁾등에서 축합형 탄닌의 구조가 결정되어 보고하였다.

일반적으로 탄닌성분은 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 왔고 화학구조 또한 밝혀지고 있으며 혈압상승에 관여하는 angiotensin converting enzyme (ACE) 저해효과가 고혈압 발생 기작인 renin-angiotensin system에서 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 ACE는 renin에 의하여

찾는말 : angiotensin converting enzyme (A.C.E), cacao bean, polyphenol compounds, inhibition effect

*연락처

생성된 decapeptide인 angiotensin I으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로써 강력한 혈관수축작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 가지며 adrenal cortex에서 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제한다.

Cushman,²³⁾ Kameda,²⁴⁾ Funayama,²⁵⁾ Namba,²⁶⁾ Douglas²⁷⁾ 등의 연구에서 ACE는 활성부위에 Zn⁺⁺을 함유하는 metalloproteinase들 특히 carboxypeptidase와 유사하며 이들 중 mercaptoacylamino acid들이 강력한 억제작용을 나타냄으로서 이들이 ACE의 활성부위에서 말단의 carboxyl기가 cationic site와 ionic 결합을 하고, sulfhydryl기가 ACE의 Zn⁺⁺과 강력히 결합하여, 이들 결합이 말단의 peptidyl amide기에 의한 수소결합 및 side chain의 lipophilic pocket에서의 결합등에 의해 보강됨으로서 강력한 억제작용이 있음을 추정하였다.

이와같이, Yagi,²⁸⁾ Nonaka,²⁹⁾ Scholz,³⁰⁾ Yamaguchi,³¹⁾ Kwon³²⁾ 등의 연구에서 미백효과, 통풍예방(질소대사개선), 혈압강하 등과 항산화효과 및 신진대사 개선, 충치예방 등에 효과가 있는 것으로 보고되었고, polyphenol류에 관하여 천연물 소재로부터 생리활성물질의 탐색과 이용에 대한 관심이 고조되고 있다.

따라서 본 연구에서는 cacao bean의 polyphenol 성분에 대한 구조분석 확인연구와 생리활성효과의 연구는 아직 미비한 실정이므로 Ghana산 cacao bean으로부터 이들 성분을 분리정제하여 그 화학구조를 분석 확인하고 ACE 효소에 대한 저해효과를 조사연구하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 cacao bean (*Theobroma cacao* L.)은 아프리카지역 Ghana산으로 롯데그룹회사에서 chocolate 제조 공정중 원료로 공급되어 가공공정을 거쳐 탈각되어진 bean을 사용하였다.

기기 및 시약

본 실험에 사용된 기기는 Infrared Spectrum (JASCO IR-700, Japan), Nuclear Magnetic Resonance (JEOL FX-100, GX-270, Japan), Mass Spectrometer (JEOL JMS-PX 300, Japan), Spectrophotometer (Hitachi 200-10, Japan), Polarimeter (Jasco DIP-370, Japan)이며, 사용된 시약은 Sephadex LH-20 (25-100 μ m) (Pharmacia Co. Sweden), MCI-gel CHP 20 (75-150 μ m, Mitsubishi Chemical Ind. Co. Ltd., Japan), Toyopearl HW-40 (30-60 μ m, TOYO, Co. Ltd., Japan), μ -Bondapak C₁₈ (37-78 μ , Waters Associates, Inc., U.S.A.), Cosmosil 75 C₁₈-OPN(42-105 μ m, Nakala Teque, Inc., Japan), Fuji-gel ODS G₃ (Hambai Co. Ltd., Japan) 등이고, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다. Angiotensin converting enzyme은 Sigma Co.(U.S.A)에서 구입하였으며

unit를 결정하여 실험에 사용하였다.

추출과 분리정제

본 실험의 추출분리는 Furuichi³³⁾ 등의 방법에 따라서 수행하여 건조된 cacao bean 10 kg에 60% acetone 수용액 35 kg을 가하고 실온(25°C)에서 24시간 추출한 후에 원심분리(4,500 \times g(=3,000 rpm), 30 min)하여 상층액과 침전물을 분리하고 같은 방법에 따라 동일하게 추출과정을 4회 반복하였다. 각각의 횟수별 상층액을 모아서 filtering하여 상층액에서의 주성분인 chlorophyll을 제거한 다음 농축하여 2 l의 농축물로 만든 다음 acetone 추출물로서 분획을 위한 시료로 하였다.

이 추출물을 Fig. 1과 같이 Sephadex LH-20 (25-100 μ m) column에 loading하고 10%단위로 하여 methanol : water (0:1 \rightarrow 1:0)을 용출용매로 사용하여 fraction I, II로 분획하였다. 이들 분획물을 다시 MCI-gel CHP-20에는, methanol : water (0:1 \rightarrow 1:0)를, μ -Bondapak C₁₈에는 methanol : water (0:1 \rightarrow 1:0), 60% methanol, methanol (60% \rightarrow 80%)를, Fuji-gel ODS G₃에는 methanol : water (0:1 \rightarrow 1:0)를, Sephadex LH-20에 ethanol : water (1:0 \rightarrow 8:0), 60% methanol 등의 각종 column 및 용출용매로서 각각을 분리하여 compound 7개를 분획하였다.

각각의 gel chromatography 방법에 의하여 용출된 용출용액은 compound group별로 동결건조하여 정제시료로 하였다.

이 분획물은 TLC상에서 compound 1, 2는 Rf치가 상부에서 존재하였고, compound 3, 4, 5는 중간부, compound 6, 7은 차례로 각각 하부에서 관찰되었고 anisaldehyde-H₂SO₄

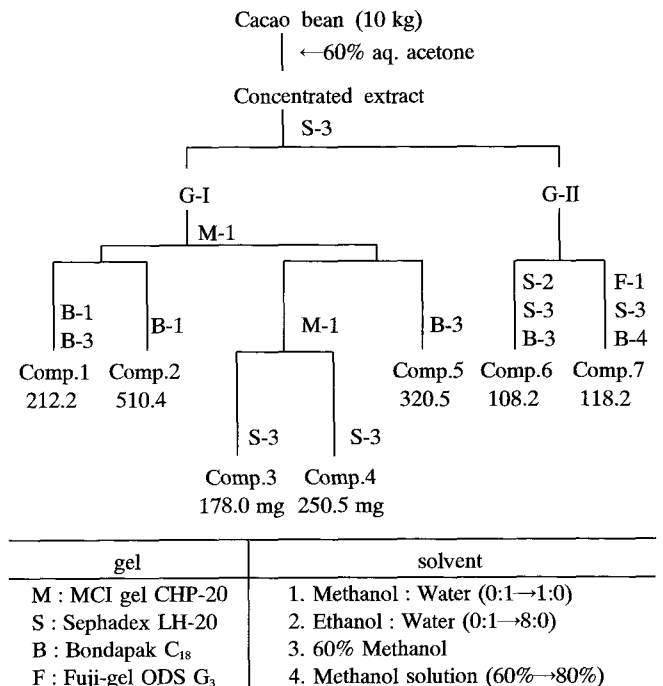


Fig. 1. Procedure for isolation of condensed tannin from cacao bean.

용액 및 FeCl₃용액에서 붉은색과 청색반응을 띄었다.

Thiolysis에 의한 thioether 유도체 형성 및 정제

시료 10-20 mg을 ethanol 5-25 ml에 용해하여 acetic acid 1-5 ml, benzylmercaptan을 2-6 ml 첨가한 후 100°C에서 반응시켰고 그 반응액을 농축하였다. 농축액을 Sephadex LH-20에 의해 1차 분리하였고 완전히 순수물질로 분리될 때까지 반복 정제하였다. 이 때 용출 용매로는 60% methanol 및 ethanol을 사용하였으며 1 ml/min의 속도로 용출하였다.

탈황환원 반응

시료 5-10 mg을 acetic acid : ethanol (1:9, v/v) 혼합액에 용해한 후 Raney nickel을 가하여 실온에서 1시간 방치하였다. 반응 종료 후 침전된 Raney nickel 생성물을 여과한 후 감압 농축하고 용출용매로 ethanol을 사용하여 Sephadex LH-20 column으로 정제하였다.

효소반응에 의한 유도체 분리

시료 20 mg을 phosphate buffer(pH 6.7) 2.5 ml에 용해하고 crude hesper-nidase를 가해 37°C에서 목적물이 생성될 때까지 반응시켰다. 반응후 농축하여 Sephadex LH-20 column에서 ethanol을 가해 순수정제하고 재결정화하였다.

화합물 (compounds 1-7)의 분석

Compound 1은 Fraction G-I로부터 Sephadex LH-20, MCI-gel μ -Bondapak C₁₈등의 gel-fraction을 거쳐 무색의 침상결정을 얻었으며 m.p. : 179-182°C, $[\alpha]_D^{29} + 12.7^\circ$ (c=0.9, acetone), IR에서 3300-(OH), aliphatic 영역 = broad, 1620-(C=C) aromatic, ¹H-NMR에서 2.54(1H, dd, J=16, 9 Hz, H-4), 2.92(1H, d, J=16, 5 Hz, H-4), 4.01(1H, m, H-3), 4.57(1H, d, J=8 Hz, H-2), 5.92(1H, d, J=2 Hz, H-6), 6.04(1H, d, J=2 Hz, H-8), 6.04(1H, d, J=8 Hz, H-5'), 6.76(1H, dd, J=8, 2 Hz, H-6'), 6.92(1H, d, J=2 Hz, H-2'), ¹³C-NMR에서 29.1 (C-4), 116.1 (C-5'), 68.6 (C-3), 120.2 (C-6'), 82.9 (C-2), 132.3 (C-1'), 95.7 (C-8), 145.9 (C-4'), 96.6 (C-6), 146.0 (C-3'), 100.9 (C-4a), 157.1 (C-8a), 115.7 (C-2'), 157.5 (C-5), 158.0 (C-7)의 결과를 분석했다.

Compound 2는 fraction G-I로부터 MCI-gel CHP-20, μ -Bondapak C₁₈등의 gel-fraction으로부터 무색의 침상결정을 얻었으며 m.p. : 240-243°C, $[\alpha]_D^{25} - 58.3^\circ$ (c=0.6, acetone), IR에서 3460-(OH), aliphatic 영역 = sharp, 1520, 1615-(C=C) aromatic, ¹H-NMR에서 2.28(1H, dd, J=3, 16 Hz, H-4), 3.10(1H, dd, J=4, 16 Hz, H-4), 4.23(1H, m, H-3), 4.92(1H, br. s, H-2), 5.96, 6.08(1H, d, J=2 Hz, H-6, 8), 6.75(1H, d, J=8 Hz, H-5'), 6.90(1H, dd, J=2, 8 Hz, H-6'), 7.06(1H, d, J=2 Hz, H-2')의 결과를 분석하였다.

Compound 3은 fraction G-I로부터 MCI-gel CHP-20, Sephadex LH-20등의 gel-fraction을 통하여 무정형 분말을 얻었다.

m.p. : 240-243°C, $[\alpha]_D^{27} + 40.2^\circ$ (c=1.0, acetone), FAB-

MS에서 [577], ¹H-NMR에서 2.56(1H, dd, J=6, 16 Hz, H-4'), 2.80(1H, dd, J=7, 16 Hz, H-4'), 3.98(1H, br. s, H-3), 4.06(1H, m, H-3'), 4.66(1H, br. s, H-4), 4.78(1H, d, J=8 Hz, H-2'), 5.08(1H, br. s, H-2), 5.93, 6.03(3H in total, m, H-6, 8, 6'), 6.60(6H in total, m, B, B'-ring-H), anisaldehyde 반응에서 적색반응, FeCl₃에서 청색반응을 나타냈다.

Compound 4는 compound 3과 동일조건에서 Sephadex LH-20으로 분리하였으며 무정형의 분말을 얻었다. $[\alpha]_D^{17} + 31.8^\circ$ (c=0.6, acetone), FAB-MS에서 [577], ¹H-NMR에서 2.71(1H, dd, J=16, 4 Hz, H-4'), 2.96(1H, dd, J=16, 5 Hz, H-4'), 4.00(1H, br. s, 3-H), 4.31(1 H, br. s, 3'-H), 4.75(1H, br. s, H-4), 4.95(1H, br. s, H-2'), 5.12(1H, br. s, H-2), 5.95(3H in total, m, H-6, 8, 6'), 6.61(6H in total, m, B, B'-ring-H)의 결과를 분석했다.

Compound 5는 fraction G-I에서 MCI-gel CHP-20, μ -Bondapak C₁₈에서 무정형의 분말을 얻었다. $[\alpha]_D^{26} + 129.4^\circ$ (c=1.1, acetone), 분자식(C₃₀H₂₆C₁₂ · 3H₂O), 원소분석(C:59.77, H:5.17), FAB-MS에서 [577], ¹H-NMR에서 2.47(2H, dd, J=16, 8 Hz, H-4'), 2.87(1H, dd, J=16, 6 Hz, H-4'), 3.94(1H, m, H-3'), 4.06(1H, br. s, H-3), 4.51(1H, d, J=8 Hz, H-2'), 4.60(1H, br. s, H-4), 4.96(1H, br. s, H-2), 6.04(1H, br. s, H-8'), 6.11(2H, br. s, 6, H-8), 6.64(6H in total, m, B, B'-ring H)의 분석 결과를 얻었다.

Compound 6은 fraction G-II로부터 Sephadex LH-20, μ -Bondapak C₁₈의 gel-fraction으로부터 무정형의 분말을 얻었다. $[\alpha]_D^{26} - 101.7^\circ$ (c=1.0, acetone), FAB-MS에서 [879], ¹H-NMR에서 2.76(2H, m, H-4'), 3.25(2H, m, H-4'), 4.80(1H, m, H-4), 4.99(1H, br. s, H-2'), 5.54(2H, m, H-3, 3'), 5.65(1H, s, H-2), 5.92(3H in total, m, H-6, 8, 6'), 6.19(3H in total, m, H-6, 8, 6'), 6.56(6H in total, m, B, B'-ring H), 6.97(6H in total, m, B, B'-ring H), 7.00(2H, br. s, G-H), 7.08(2 H, br. s, G-H)의 분석결과와 탈황 환원반응으로 얻어진 물질에서 무정형의 침상결정을 얻어서 m.p. : 266-268°C, IR에서 3400-(OH), 1710-(COOH), ¹H-NMR에서 7.02(2 H, S, galloyl)의 결과를 얻었다.

Compound 7은 fraction G-II로부터 Fuji-gel ODS G₃, Sephadex LH-20, μ -Bondapak C₁₈의 gel을 단계적으로 fraction하여 무정형의 분말을 얻었다.

$[\alpha]_D^{23} + 59.8^\circ$ (c=1.2, acetone), C₆₀H₃₈C₂₄ · 3H₂O FAB-MS에서 1153 [M-H], ¹H-NMR에서 2.84(2H, m, H-4'), 4.12(3H, br. s, H-3, 3', 3''), 4.32(1H, br. s, H-3'''), 4.79(3H, br. s, H-4, 4', 4''), 5.08(1H, br. s, 2, H-2', 2'', 2'''), 5.16(1H, br. s, H-2, 2', 2'', 2'''), 5.20(1H, s, H-2, 2', 2'', 2'''), 5.27(1H, br. s, H-2, 2', 2'', 2'''), 5.8-6.20(5H in total, m, A-ring H), 6.40-7.40(12H in total, m, B-ring H)의 결과를 Check하였다.

ACE 효소저해 실험

Cacao bean으로부터 분리된 각각(compound 1-7)의 물질을 10-100 μ M 농도로 조제하여 Cushman²³⁾ 등의 방법에 의하여 Fig. 6, 7와 같이 측정했다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl

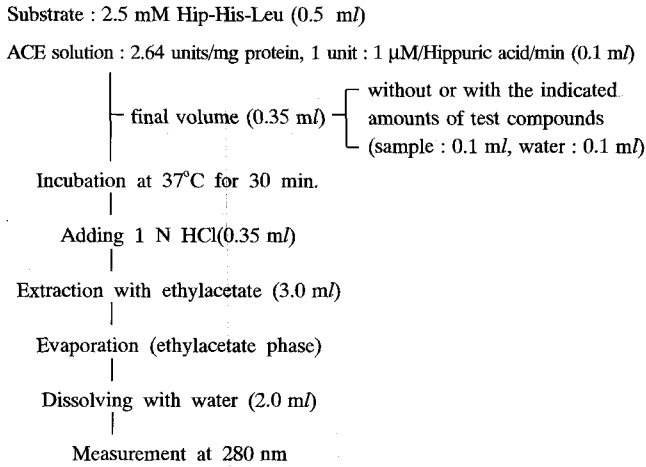


Fig. 2. Assay of angiotensin converting enzyme activity.

을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 녹인 기질(Hippuryl-L-histidyl-L-leucine : HHL) 0.15 ml, ACE 0.1 ml와 탄닌용액 0.1 ml를 혼합했으며, 대조구는 탄닌대신 증류수 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1N-HCl 0.35 ml 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3.0 ml의 ethylacetate를 첨가했다. Ethylacetate층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 2.0 ml의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 280 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

화합물의 구조결정

Compound 1은 무색침상형으로 IR spectrum에서 3300의 -OH기, 1620에서 aromatic C=C의 signal이 확인되었으며, ¹H-NMR spectrum을 관찰하면 aliphatic 영역에 의한 2.54 (dd, $J=16.9$ Hz) 및 2.92 ppm(dd, $J=16.5$ Hz)의 signal은 분열양상과 chemical shift값으로부터 C환의 methylene proton의 귀속이 확인되었다. 또한 4.01(m) 및 4.57(d, $J=8$ Hz)의 signal도 각각의 분열양상에 따라 C환의 H-3, H-2 귀속이 가능하였다. Aromatic 영역에 의한 6.04-6.92 ppm signal은 즉 6.76(dd, $J=8, 2$ Hz), 6.04(d, $J=8$ Hz) 및 6.92 ppm(d, $J=2$ Hz)의 분열양상 ABX-type를 시사하고, 각각 catechol 환(B환)의 H-6', H-5'에 귀속하였다. 나머지 proton영역에서, 5.92, 6.04 ppm의 signal은 각각 $J=2$ Hz, doublet이기 때문에 H-6, H-8의 귀속이 확인되었다. ¹³C-NMR에서 29.1, 68.6 및 82.9 ppm의 signal은 각각 C-4, C-3, C-2에, 115.7, 116.1 및 120.2 ppm의 signal은 C-2', C-5'와 C-6'의 귀속이 관찰되었다. 이상의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR의 signal 귀속결과 및 비선광도로부터 (+)-catechin임이 확인되었고 이들 signal을 기본 구조로 하여 나머지 compound 2-7을 구조해석하였다.

Compound 2는 무색 침상형으로서 m.p. 240-243°C, 선광도 $[\alpha]_D^{25} -58.3^\circ$ (C=0.6, acetone)의 결과를 얻었으며 IR spectrum 조사에서 3460(OH), 1615, 1520에서 aromatic의 C=C의 signal이 확인되었다. ¹H-NMR에서 spectrum 2.28(dd, $J=$

3, 16 Hz)과 3.10 ppm(dd, $J=4, 16$ Hz)의 분열양상과 chemical shift값으로 보아 aliphatic영역(C환)의 H-4의 귀속이 가능하고, 4.23, 4.92 ppm에서도 signal의 분열상은 C환의 H-3, H-2에 귀속시켰다. 또한 6.75(d, $J=8$ Hz), 6.90(d, $J=2, 8$ Hz), 7.06 ppm(d, $J=2$ Hz)과의 분열양상으로 보아 B환의 5', 6', 2'의 귀속이 확인되었고, 나머지 proton영역 5.96, 6.08 ppm signal은 각각 $J=2$ Hz, doublet를 형성하므로 H-6, H-8의 귀속이 확인되었고, 비선광도, $[\alpha]_D^{25} -58.3^\circ$ (C=0.6, acetone)의 값을 비교한 결과 이 화합물을 (-)-epicatechin으로 구조를 결정하였다. (-)-Epicatechin은 TLC상에서 Rf값이 (+)-catechin과 동일하고 발색반응에서도 서로 유사하여 동정이 거의 불가능하지만 IR spectrum 조사에서 aliphatic 영역의 흡수에 있어서 (+)-catechin의 signal은 broad한 반면 (-)-epicatechin은 sharp한 모양으로 확인이 명확하게 되었다.

Compound 3은 갈색계통의 무정형 분말로 선광도 $[\alpha]_D^{25} + 40.2^\circ$ (c=1.0, acetone)로 나타냈고, negative FAB-MS에서 $m/z=[577]$ 의 분자이온 peak를 얻었으며 anisaldehyde-H₂SO₄, FeCl₃용액에 붉은색과 청색반응을 하였다.

이 화합물은 benzylmercaptan으로 환원 thiolysis한 결과 Fig. 3과 같이 compound 3-a 및 3-b를 1:1의 비율로 얻었으며 dimer일 가능성을 시사하였고 분자량에서 flavan-3-ol 두 분자가 중첩되어 있음을 추정하게 하였다.

Compound 3-a는 3.96 ppm에서 signal 분열양상으로 보아 C환의 H-3가 확인되었고 4.01 ppm 2H의 signal은 singlet로 thiolysis에서 형성된 -SCH₂의 귀속이 확인되었다. 4.08 ppm(d, $J=2$ Hz)은 aliphatic영역 즉 C환의 H-4 귀속이 확인되었고, 6.74(d, $J=2$ Hz), 6.83(d, $J=8$ Hz) 분열양상으로 보아 B환의 H-5', 6'에 귀속시켰다. 또한 5.93, 6.03 ppm에서 $J=2$ Hz, doublet 분열양상으로 H-6, H-8의 귀속과 7.16~7.54 ppm에서 분열양상으로 보아 compound 3-a는 (-)-epicatechin-4 β -benzylthioether라 구조결정하였다. Compound 3-b의 ¹H-NMR signal은 compound 1의 (+)-catechin과 일치하며 compound 3은 상부에 (-)-epicatechin 하부에

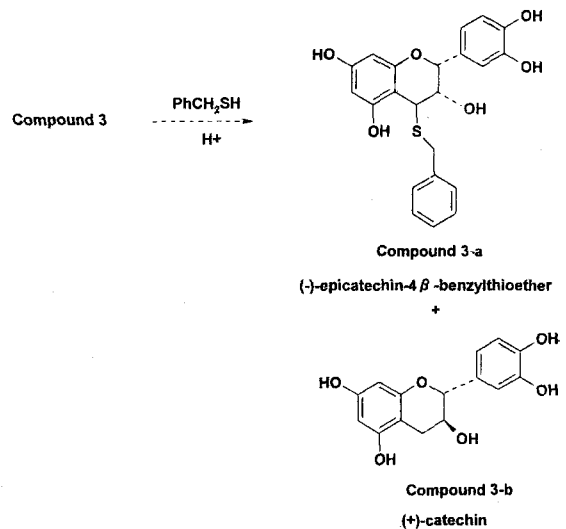


Fig. 3. Thiolysis of compound 3.

(+)-catechin으로 구성되어 있음을 확인하였고, ¹H-NMR에서 상부에 해당하는 H-4의 결합정수가 대체로 적으므로 (-)-epicatechin과 (+)-catechin은 4β→8의 결합으로 이루어진 procyanidin B-1으로 구조결정을 하였다.

Compound 4는 무정형 분말로서 선풍도 $[\alpha]_D^{17} + 31.8^\circ$ (c=0.6, acetone)이었으며 negative FAB-MS $m/z=[577]$ 의 분자이온 peak를 얻었다.

Compound 4를 benzylmercaptan으로 환원 thiolysis한 결과 compound 4-a 및 4-b를 1:1의 비율로 얻어 flavan-3-ol 화합물의 이량체임이 확인되었고, ¹H-NMR에서 signal 양상은 compound 3-a와 일치하였으므로 이 화합물도 (-)-epicatechin-4β-benzylthioether로서 이량체의 상부 물질임이 확인되었다.

Compound 4-b는 ¹H-NMR의 signal양상은 compound 2와 일치하여 (-)-epicatechin이었고, 상부의 4-H의 결합정수가 작은 값을 취하므로 이 화합물 역시 4β→8결합을 하였다. 그러므로 이 화합물은 (-)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin으로 구성된 procyanidin B-2였으며, Nonaka²⁰등이 발표한 procyanidin류의 ¹H-NMR signal양상과도 잘 일치되어 위 결과를 더욱 지지하고 있다.

Compound 5는 무정형 분말을 얻었고, FAB-MS의 분자이온peak로 $m/z=[577]$ 값을 얻어 compound 3, 4와 같이 flavan-3-ol 화합물의 이량체임이 확인되었다. 이 화합물을 완전 thiolysis하면, compound 5-a와 5-b를 얻었는데 이것은 ¹H-NMR에서 동정하여 본 결과 compound 3과 동일한 화합물인 (-)-epicatechin-4β-benzylthioether와 (+)-catechin을 1:

1의 비율로 얻었다. 즉, 상부의 (-)-epicatechin과 하부의 (+)-catechin으로 compound 3의 이성체로 생각되어졌다. Compound 5의 ¹H-NMR spectrum에서 하부 unit의 H-2'에 해당하는 signal의 chemical shift를 compound 3의 δ4.76과 비교할 때 고자장(δ4.51)으로 확인되었고, 이 chemical shift는 H-2의 signal과 거의 동일하였다. 이것은 하부 unit의 C환은 상부 unit의 영향을 거의 받지 않음을 시사하므로 상, 하부의 두 화합물은 C-4→C-6의 결합을 시사하였다. 또, compound 3의 2개 B환의 H-2 signal중 1개가 broad한 singlet으로서(δ6.90) 확인되는 것에 비해, compound 5는 비교적 날카로운 singlet(δ6.93, 7.01)가 확인되므로 compound 5의 2개 B환은 상호 interaction이 없음을 시사하므로 C-4→C-6의 결합을 더욱 지지하였다. 이 화합물의 상부 unit의 H-4의 chemical shift(δ4.60) 및 결합정수(br. singlet)로부터 compound 3과 같이 상부 unit의 C-4배위는 β로 결론지었다. 그러므로 이 화합물은 (-)-epicatechin과 (+)-catechin이 4β→6으로 결합된 procyanidin B-7으로 구조결정을 하였으며 Foo¹⁵ 등이 발표한 ¹H-NMR의 signal 양상과 잘 일치하는 경향을 보여 이 결과를 더욱 지지하고 있다.

Compound 6은 무정형 분말로서 선풍도 $[\alpha]_D^{26} - 101.7^\circ$ (c=1.0, acetone)를 얻었으며 negative FAB-MS의 분자이온 peak $m/z=[879]$ 로부터 분자량이 880으로 확인되었다.

발색반응에서 anisaldehyde-H₂SO₄용액에 compound 3-5에 비해 붉은색이 진한 것으로 보아 gallate의 함유를 추정하게 하였고 분자량의 값에서도 flavan-3-ol 화합물 이량체에 두 분자의 gallate가 결합되어 있음을 시사하였다.

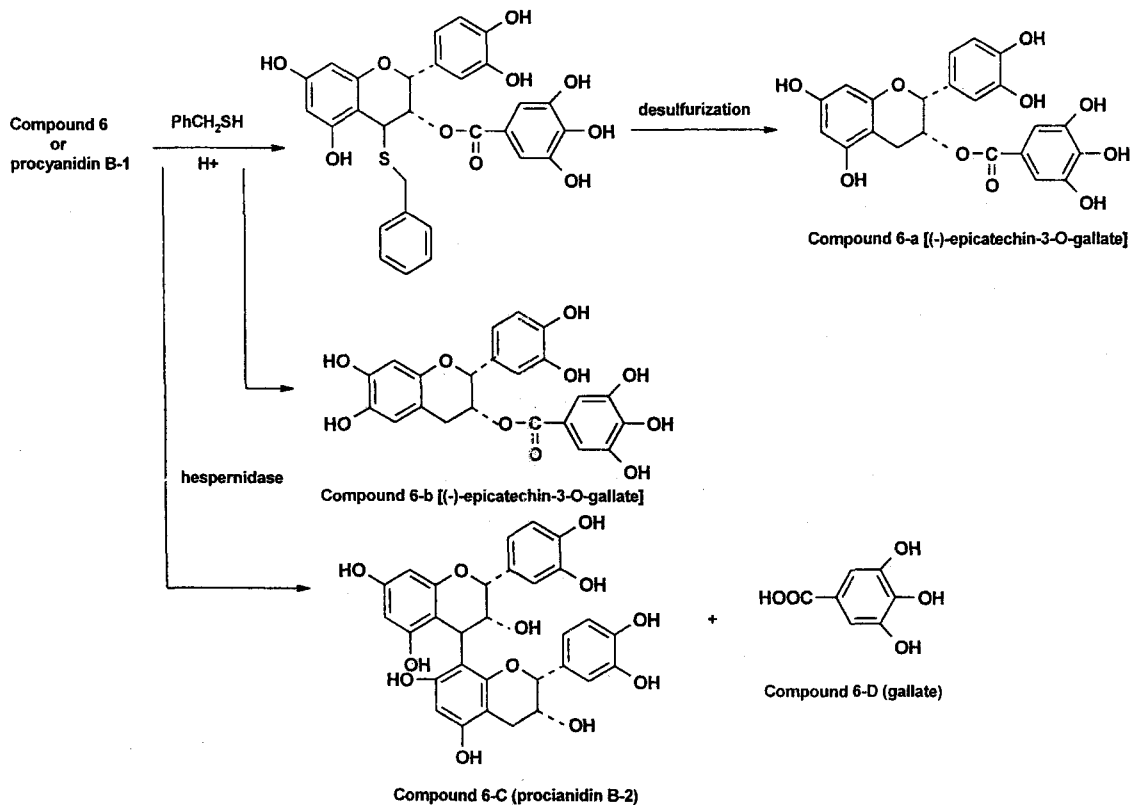


Fig. 4. Procedure for hesperidase reaction, desulfurization and thiolysis of compound 6.

Compound 6의 thiolysis 및 desulfurization에서 Fig. 4와 같이 compound 6-a 및 6-b를 1:1의 비율로 얻었으며 이 화합물은 TLC 및 ¹H-NMR data로부터 동일한 화합물임을 확인하였다. 이 화합물의 ¹H-NMR의 spectrum은 2.88(dd, J=3, 16 Hz); 3.10 ppm(dd, J=4, 16 Hz)은 aliphatic 영역의 H-4의 귀속을, 5.12, 5.50 ppm의 signal양상은 C환의 H-2, H-3에 귀속을 하였고, 6.04, 6.08은 J=2 Hz, doublet 양상을 보이므로 H-6, 8에 귀속시켰다. 또한 6.75-7.06 ppm에서 관측된 signal들의 분열양상에서 aromatic환을 시사하는 것으로 H-2', 5', 6'에 귀속시키므로 이 화합물은 (-)-epicatechin-3-O-gallate이고 이 화합물 두 분자가 상, 하로 결합하고 있음을 확인하였다.

Compound 6을 crude hesperidase에 반응시켜 compound 6-c와 6-d를 얻었는데, compound 6-c는 compound 4의 procyanidin B-2와 일치하였고 compound 6-d는 ¹H-NMR에서 singlet의 H-2', 6'가 확인된 바 gallic acid로 확인되었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 procyanidine에 두 분자의 gallate가 결합된 procyanidin B-2, 3, 3'-O-digallate임이 확인되었다.

이 결과는 Morimoto³⁹등이 발표한 ¹H-NMR의 signal 결과와도 일치하는 경향을 나타내었으며 위의 결과와 일치하는 것으로 확인되었고 Kameda²⁹ 등과 Funayama²⁵ 등의 연구결과 감나무잎에서 분리한 flavonoid 화합물이 ACE에 저해활성을 가지며 gallate를 함유한 flavonoid가 gallate를 함유하지 않는 flavonoid보다 저해효과가 좋았다고 보고하였는데 이는 본 연구의 결과와 일치하였다.

Compound 7은 무정형 분말로서 선광도 [α]_D²⁵ +59.8° (c=1.2, acetone)를 나타냈고, anisaldehyde-H₂SO₄ 용액에서 붉은색의 정색반응을 하였다. Negative FAB-MS에서 분자이온 peak m/z=1153[M-H]로부터 분자량이 1154로 결정되었으며 이것은 flavan-3-ol 화합물 4량체에 해당하였다. 완전 thiolysis에서 compound 7-c와 compound 7-d를 3:1의 비율로 얻었으며, ¹H-NMR에서 compound 7-d는 compound 3-a, 4-a와 동일한 signal양상을 보여 (-)-epicatechin-4β-benzyl-thioether로 동정하였고, compound 7-d는 compound 4-b와 ¹H-NMR signal과 일치하여 (-)-epicatechin으로 동정하였다. 부분 thiolysis 및 desulfurization에서 compound 7-c 및 7-d를 1:1의 비율로 얻었으며 이 두 화합물 역시 ¹H-NMR에서 동일한 signal을 나타내고 있었다. Compound 7-c 및 7-d는 ¹H-NMR에서 compound 4와 일치하므로 (-)-epicatechin의 상·하 결합인 procyanidin B-2였다. 이러한 결과들을 볼 때 compound 7은 (-)-epicatechin(4β→8)-(-)-epicatechin-(4β→8)-(-)-epicatechin-(4β→8)-(-)-epicatechin으로 구성된 flavan-3-ol의 tetramer인 cinnamtannin A-2로 확인되었다. Cinnamtannin A-2는 Nonaka 등이 발표한 ¹H-NMR의 결과와도 일치하였으며 이와같이 Fig. 7에서와 같이 7종의 Compound들을 확인하여였다.

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과

분리정제 화합물 7종류는 고혈압과 연관된 ACE에 대해

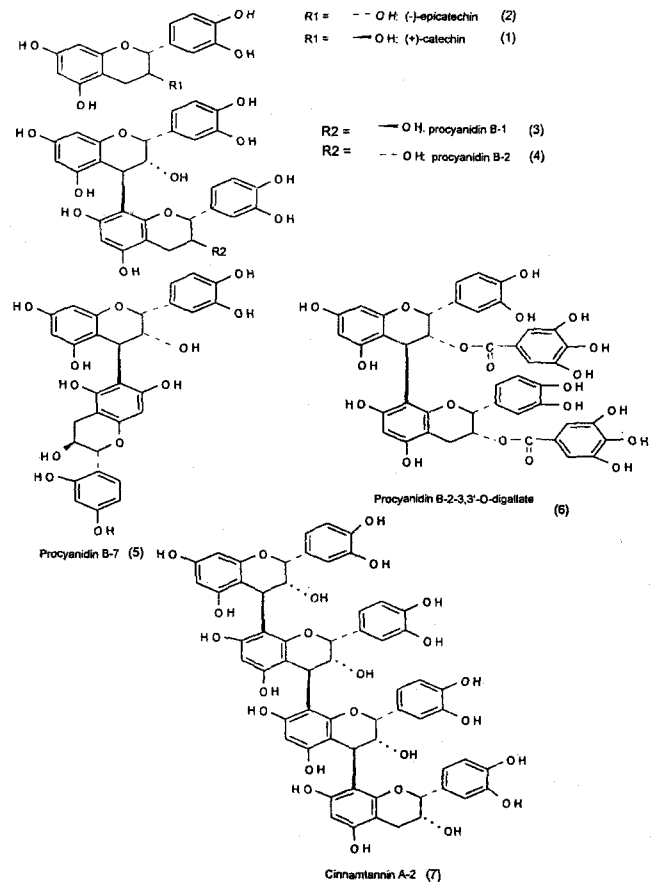


Fig. 5. Structure fo polyphenols isolated from cacao bean.

대체로 우수한 저해효과가 관찰되었다. (+)-Catechin 및 (-)-epicatechin의 10-100 μM에서 각각 10.0-67.9%, 10.0-61.9%로 저해효과가 증가하는 경향을 보였고 procyanidin B-7은 100 μM에서 72.2%, procyanidin B-1은 88.6%의 저해를

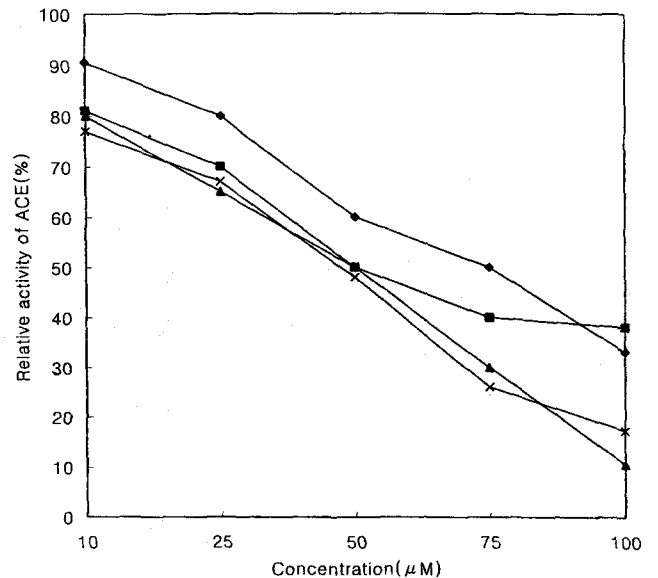


Fig. 6. Effect of compounds is olated from cacao bean on the angiotensin converting enzyme. ●-●(+)- catechin (Com 1), ■-■(-) epicatechin (Com 2), ▲-▲ procyanidin B-1 (Com 3), ×-× procyanidin B-2 (Com 4)

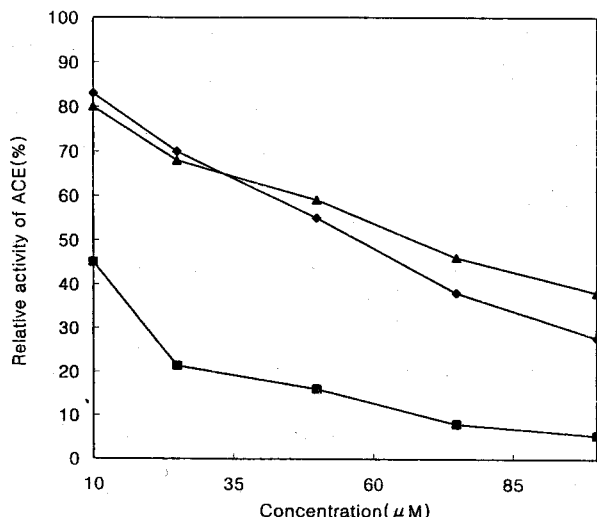


Fig. 7. Effect of compounds isolated from cacao bean on the angiotensin converting enzyme. ●-● procyanidin B-7 (Com 5), ■-■ procyanidin B-2, 3, 3'-O-digallate (Com 6), ▲-▲ cinnamtannin (Com 7)

procyanidin B-2는 82.5%의 저해효과가 있었다. Procyanidin B-2,3,3'-O-digallate는 25 μM에서도 78.6%의 높은 저해효과를 시작으로 100 μM에서 거의 완벽한 저해인 94.6%의 효과를 얻었고 cinnamtannin A-2는 82.3%로 procyanidin B-1, procyanidin B-2와 거의 유사한 저해효과가 관찰되었다. 이러한 결과에서 추출물중에 procyanidin B-2, 3,3'-O-digallate는 우수한 ACE의 저해제임이 확인되었다. 일반적으로 tannin 유래의 화합물과 효소(단백질)와의 결합은 아미드결합과 tannin의 페놀성 수산기간의 수소결합에 의한 반응으로 단백질과 tannin 복합체를 형성한다. 이런 현상은 pH, 이온강도, 단백질 및 tannin의 농도에 의한 상호작용으로 효소를 저해함으로써 효소의 안정성을 저하, 효소불활성화를 일으키는 것으로 보고되고 있으며 glucosyltransferase의 저해제로서 galloyl기를 함유한 flavan-3-ol 화합물의 저해능이 우수하다는 Hattori¹⁰⁾ 등의 보고와 유사하였다.

Kameda³⁾ 등은 감잎에서 추출하고 gel fraction한 compound 물질이 ACE 저해효과가 있음을 연구발표하였으며, Cho³⁵⁾ 등은 한국산 녹차에서 acetone 추출후 Sephadex LH-20, MCI gel CHP-20의 gel fraction에 의해 분리한 tannin류의 ACE 저해효과 연구에서 (+)-catechin류보다 (-)-epicatechin류가 저해활성이 높으며 비경쟁적으로 저해하는 것으로 보고하였으며 (-)-epicatechin-3-O-gallate가 100 μM 농도에서 95.2%의 ACE 저해효과가 있었다고 발표하였다.

참고문헌

- Freudenberg, K. (1920) Die chemie der Naturischen Gerbstoff, Springer-Verlag, Berlin.
- Haslam, E. (1966) Chemistry of Vegetable Tannins. Academic Press, London and New York.
- Freudenberg, K., and F. Blumel (1924) Justus Liebigs, *Ann. Chem.*, **440**, 45.

- Schmidt, O. T. (1935) *ibid.*, **515**, 77.
- Schmidt, O. T., and R. Lademann (1951) *Ann. Chem.*, **571**, 232.
- Schmidt, O. T., and D. M. Schmidt (1952) *Ann. Chem.*, **578**, 31.
- Bock, K., N. F. Lucour, and B. J. Nielsen (1980) The structure of acertannin, *Phytochemistry*, **19**, 2033.
- Weinges, K., and F. Nader (1968) *Ann. Chem.*, **715**, 164.
- Okuda, T., T. Yoshida, and T. Hatano (1989) Ellagitannins as active constituents of medicinal plants, *Plant Medica*, **55**, 117.
- Hattori, M., T. Namba, T. Ishigami, and Y. Hara (1990) Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(3), 717.
- Ittah, Y. (1991) BSA-bound persimmon tannin interactions with other proteins, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2119.
- Petereit, F., H. Kolodziej, and A. Nahrstedt (1991) Flavan-3-ols proanthocyanidins from *Cistus incanus*, *Phytochemistry*, **30**(3), 981.
- Nishioka, I., and G. Nonaka (1986) Tannin, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 27.
- Bongjeon, Ahn, Choi J.Y., Kwon I.B., I. Nishioka, and Choi C. (1992) Structural studing of glucosyltransferase and tyrosinase inhibitors isolated from Jack fruit folium, *Kor. J. Biochem.*, **25**(4), 347.
- Foo, L. Y., and J. J. Karchesy (1991) Procyanidin tetramers and pentamers from Douglas fir bark, *Phytochemistry*, **30**(2), 667.
- Nagasawa, S., G. Nonaka, and I. Nishioka (1981) *ibid.*, **29**, 874
- Nonaka, G., N. Miwa, and I. Nishioka (1982) Stilbene glycoside gallates and proanthocyanidins from polygonum multiflorum, *Phytochemistry*, **21**(2), 429-432.
- Okuda, T., T. Yoshida, and K. Mori (1981) Tannins of medicinal plants and drugs, *Heterocycles*, **15**, 1323-1348.
- Okuda, T., T. Hatano, and K. Yazaki (1982) Dehydrogenation, furosinin and furosin, dehydroellagitannins from *Geranium Thunbergii*, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1113-1116.
- Okuda, T., M. U. Memon, and T. Shingu (1982) Agrimoniin and Potentillin, and ellagitannin dimer and monomer having an α-glucose core, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **163**-167.
- Okuda, T., T. Yoshida, and M. Ashida (1981) *Heterocycles*, **16**, 1681.
- Nonaka, G., and I. Nishioka (1981) The chemistry of indoles, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(11), 3145-3157.
- Cushman, D. W., and M. A. Ondetti (1980) Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1871.
- Kameda, K., T. Takaku, H. Okuda, and Y. Kimura (1987) Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin converting enzyme activity, *J. Natural Products*, **50**(4), 680.
- Funayama, S., and H. Hikino (1979) Hypotensive principles of *Diospyros Kaki* Leaves, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**(11), 2865.

26. Namba, T., Y. Tsunozuka, S. Nunome, T. Takeda, Y. Z. Kakiuchi, K. Kobayashi, S. Takagi, and M. Hattori (1984) Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines (part iv), Screening of crude drugs for anti-plague action and effect of *Artemisia capillaris* pikes on adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface and synthesis of glucan by glucosyltransferase, *Shoyakugaku Zasshi*, 38(3), 253.
27. Douglas, W. W., A. G. Gilman, L. S. Goodman, and A. Gilman (1980) Chap. 27, The pharmacological basis of therapeutics, 6th Ed., Macmillan Publishing Co., Inc. New York.
28. Yagi, A. (1987) Lipid peroxidase and human disease, *Chem. Phys. Lipids*, 45, 337.
29. Nonaka, G. I., F. L. Hsu, and I. Nishioka (1981) Structure of dimeric, trimeric and tetrameric procyanidins from *Areca catechu*, *L. J. C. S. Chem. Comm.*, 781.
30. Scholz, E., and E. Rimpler (1989) Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root, *Planta medica*, 55, 379-384.
31. Yamaguchi, N. H., and S. Z. Naito (1984) Isolation of antioxidants from cacao bean husk and its application, *New food industry*, 26, 1.
32. Ik-Boo, Kwon (1991) Studies on glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk, *Kangwon univ.*, Ph. D. Graduate paper.
33. Furuichi, E., G. Nonaka, and I. Nishioka (1986) Isolation and structures of procyanidins(condensed tannins) from *Rhaphiolepis umbellata*, *Agri. Biol. Chem.*, 50(8), 2061-2067.
34. Morimoto, Y., G. I. Nonaka, and I. Nishioka (1988) Isolation and structures of novel and triflavonoids from the leaves of *Cassia fitula* L., *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 717.
35. Young-Je, Cho, An B. J., and Choi C. (1993) Inhibition effect of against angiotensin converting enzyme of falvan-3-ols isolated Korean green tea, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25(3), 241.

The chemical structure of polyphenols isolated from cacao bean and their inhibitory effect on ACE.

Man Chong Lee,* Young Youl Chang and Moo Hyun Yim¹ (Lotte Group R&D Center, Seoul 150-104, Korea, ¹Department of food science and technology, Taegu University, Kyung San, 713-714 Korea)

Abstract : Seven kinds of polyphenol compounds having ACE activities were isolated and purified by Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20, μ -Bondapak C₁₈ and Fuji-gel ODS G₃ successively from cacao bean(Ghana). The chemical structures of each compound were determined and identified using analyzers such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR, MS, polarimeter and Elemental Analysis. Inhibition effects of isolated polyphenols on angiotensin converting enzyme (concerned with hypertension) were also observed. The results obtained were as follows; The compounds isolated and identified were confirmed and determined as compound 1 [(+)-catechin], compound 2 [(-)-epicatechin], compound 3 [procyanidin B-1 : (-)-epicatechin-(4 β →8)-(+)-catechin], compound 4 [procyanidin B-2 : (-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin], compound 5 [procyanidin B-7 : (-)-epicatechin-(4 β →6)-(+)-catechin], compound 6 (procyanidin B-2,3,3'-O -digallate), compound 7 [cinnamtannin A-2 : (-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin]. In the inhibition effect on ACE, procyanidin B-2,3,3'-O-digallate (compound 6) showed a higher value of 94.6% for ACE in 100 μ M than other compounds such as (+)-catechin (compound 1), (-)-epicatechin (compound 2), procyanidin B-1 (compound 3), procyanidin B-2 (compound 4), procyanidin B-7 (compound 5) and cinnamtannin A-2 (compound 7) showing 67.9%, 61.9%, 88.6%, 82.5%, 72.2% and 82.3% for ACE, respectively. Inhibition of 4 β →8 in coupling bond on the ACE enzyme was more effective than that of 4 β →6. Procyanidin containing gallate inhibited more effectively than those containing not any. It was also observed that a lot of hydroxy group in the compounds increased the inhibitory effect.

Key words : angiotensin converting enzyme(A.C.E), cacao bean, polyphenol compounds, inhibition effect

*Corresponding author

정 정 공 고

두부공업폐수에서 *Rhodobacter capsulatus* KK-10을
이용한 δ -Aminolevulinic Acid의 생산

정대열¹ · 최양문 · 조흥연* · 양한철

¹오뚜기 종합연구소, 고려대학교 생명공학연구소, 고려대학교 생명공학원
(1997년 10월 13일 접수, 1997년 11월 21일 수리)

(한국농화학회지 제 40 권 제 6 호)

틀 린 곳	틀 린 것	바로 잡은 것
556명 저자 소속	오뚜기 종합연구소	오뚜기 중앙연구소