

## 한국산 감잎의 Polyphenol 화합물의 생리활성물질의 화학구조 및 효소저해효과

안봉진\* · 최희진 · 손준호 · 우희섭\*\* · 한호석 · 박정혜 · 손규목\*\*\* · 최 청  
영남대학교 생물산업공학부, 경산대학교 생명자원공학부\*, 동주대학 식품과학계열\*\*, 창원전문대학 식품영양과\*\*\*  
(2003년 9월 4일 접수)

### Identification of Biologically Effect and Chemical Structure of Polyphenol Compounds from the Leaves of Korea Persimmon (*Diospyrus kaki* L. Folium)

Bong-Jeon An\*, Hee-Jin Choi, Jun-Ho Son, Hee-Seob Woo\*\*,  
Ho-Suk Han, Jung-Hye Park, Gyu-Mok Son\*\*\*, and Cheong Choi

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

Faculty of Life Resources and Engineering, Kyungsan University\*

School of Food science, Dongju College\*\*

Department of Food & Nutrition, Changwon Junior College\*\*\*

(Received September 4, 2003)

#### Abstract

The lyophilization of the solution extracted from 60 percent of acetone applied to persimmon leaves, the compounding process in accordance with the solution's concentration, and the gel filtration through Sephadex G-50 of biologically activated substances obstructing enzyme activity, such as tyrosinase, xanthine oxidase, and angiotensin converting enzyme (ACE) led to the assumption that polyphenol was the compound serving as biologically activated substances obstructing enzyme activity. Xanthine oxidase involved in pruin metabolism oxidizes hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. In the continuous study for natural compound, nine flavan-3-ols have been isolated from the persimmon leaves. The structures of (+)-catechin, (+)-gallocatechin, procyanidin B-1, pyrocyanidin C-1, prodelphinidin B-3, gallocatechin-(4 $\alpha$ →8)-catechin, procyanidin B-7-3-O-gallate, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate and (-)-epigallocatechin-(4 $\beta$ →8)-epigallocatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin were established by NMR and their inhibitory effect on xanthine oxidase activity was investigated. Procyanidin B-7-3-O-gallate, (-)-epigallocatechin-(4 $\beta$ →8)-epigallocatechin -(4 $\beta$ →8)-catechin and procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate showed 94%, 90.69%, 80.90% inhibition at 100 ( $\mu$ )M and inhibited on the angiotensin converting enzyme respectively. Procyanidin B-7-3-O-gallate and procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate showed 66%, 63% inhibition at 100 ( $\mu$ )M and inhibited on the xanthine oxidase competitively. Procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate showed 70% inhibition at 100 ( $\mu$ )M and inhibited on the tyrosinase competitively.

**Key Words** : persimmon leaf tea, polyphenol compounds, tyrosinase, xanthine oxidase, angiotensin converting enzyme

## I. 서론

차는 동양에서 처음으로 인류에게 알려졌다. 녹차와 홍차의 건강증진 효과에 대해서는 오래전부터 폭넓게 인식되어 왔으나, 최근에서야 그 효과를 뒷받침하는 연구들이 진행되고 있다. 차의 생화학적 작용에 대한 이해와 차나무 *Camellia sinensis*에 존재하는 polyphenol류에 대한 연구가 깊게 진전됨에 따라서, 차의 규칙적인 섭취가 만성질환의 예방 및 건강증진에 도움을 줄 것이라고 하는 생각이 더욱 더 확고하게 되었다. 감잎은 녹차 이상으로 다양한 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 감나무의 학명은 *Diospyros*로 Dios는 신이란 뜻이고 Pyros는 곡물이란 뜻으로 서양에서도 과실의 신이라 할만큼 훌륭한 식품으로 여겨왔다<sup>1)</sup>. 감나무는 우리나라, 중국, 일본 등 동양권에만 성장하는 식품으로 특히 우리 조상들은 밤, 대추와 함께 삼실과의 하나로 우리 생활 속에 깊이 뿌리 내려져 오고 있다. 감잎은 예로부터 널리 알려져 온 민간약제로써 수분 3.2%, 단백질 14.4%, 지질 6.9%, 당질 54.5%, 섬유질 11.6%, 회분 9.4%, 탄닌 4.2%, 카페인, 콜린, 플라보노이드, 배당체, 유기산, 큐마린 등 다양한 화합물이 함유되어 있다.<sup>2-4)</sup> 또한 고혈압 억제 작용<sup>5,6)</sup>, 면역기능증진<sup>7)</sup> 및 동맥경화<sup>8)</sup> 등 성인병에 탁월한 효과가 인정되고 있다.

최근의 연구에서 과일 및 잎에서 분리된 flavonoid 성분이 고혈압의 원인이 되고 있는 angiotensin converting enzyme를 저해한다는 보고가 있으며<sup>4)</sup> 미성숙 감으로부터 탄닌을 분리하여 화학구조를 밝혀냄으로서 감의 성분에 따라 화학 구조가 다르다는 것을 입증한 바 있다<sup>9)</sup>. Funayama 등<sup>10)</sup>은 감잎의 고혈압에 대한 영향을 살펴 본 결과 gallate를 함유한 탄닌 화합물들이 혈압 상승 억제 효과 있음을 입증하였고 Uchida 등<sup>11)</sup>은 감잎 탄닌을 고혈압을 유발시킨 쥐에 주입시켜 생명의 연장을 검토하였다.

Osawa와 Namiki<sup>12)</sup>는 천연 항산화제의 구조적 설명과 분석에서 flavan-3-ol 화합물의 hydroxyl기가 지방산화과정 중 free radical의 증가를 억제하므로 우수한 항산화제라 하였고 Hashimoto 등<sup>13)</sup>은 축합형탄닌 분리 기술을 설명하고 순수 분리된 화합물이 스트레스로 유발된 위산과 peptide 활성기능에 영향을 끼침을 보고한바 있다. An 등<sup>14,15)</sup>은 flavan-

3-ol화합물들을 Sephadex LH-20, MCI-gel, Fuji-gel 등으로 분리하여 xanthine oxidase, glucosyltransferase 저해제임을 확인하고 통풍, 충치 예방물질로 효과를 입증하였다.

감잎속에 다량으로 함유되고 있는 생리 활성물질로 추정되는 탄닌화합물들은 축합형, 가수분해형으로 구분되며<sup>16)</sup> 극단적으로 복잡한 혼합물로서 분리 및 구조해석이 매우 어려웠으나 점차 새로운 구조가 밝혀지고 있는데 탄닌을 두 그룹의 화학적 성질에 기인하여 결정하고 두 성질을 동시에 동만하는 복합체의 구조를 띤 것도 있다<sup>17,18)</sup>. 이런 화합물의 구조 확인을 위해선 우선 순수 분리가 매우 중요하며 Sephadex LH-20 dextran gel과 reverse-phase 즉, 고 다공성 polystyren ODS 등의 chromatography로 분리 가능해 졌으며<sup>19,20)</sup> 유동성 저분자의 polyphenol 화합물과 구조적 isomer 분리에 매우 효과가 높다<sup>21,22)</sup>. 이러한 근거로 구조적 설명은 화학적 의미에 근거를 두어 감잎으로부터 분리한 생리활성의 물질을 규명하기 위하여  $[\alpha]_D$ , melting point, 원소 분석과 고분해  $^1H_1$ ,  $^{13}C$  spectroscopy, FT-MS의 기기 데이터 분석으로 화학 구조를 결정하였고 이들 화합물의 tyrosinase, xanthine oxidase 및 angiotensin converting enzyme(ACE)의 활성저해효과를 규명하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료

본 실험에 사용된 감잎은 청도, 창녕 및 상주에서 재배하는 감나무인 청도반시, 창녕부유, 상주동시의 3품종에서 1996년 5월부터 9월까지 경시적으로 두번째 내지 세번째 잎을 채취하였다. 채취한 감잎은 표면의 이물질 제거 후 polyethylene film에 넣어 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

### 2. 감잎 아세톤 추출물의 분리

건조된 감잎 10kg을 60% acetone을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 1,690×g에서 30분 원심분리하여 상징액과 침전물을 얻었고 이 침전물은 다시

60% acetone을 가하고 위와 같은 추출 과정을 4회 반복하였다. 각각의 상정액을 모아 농축 여과하여 chlorophyll을 제거하고 2L의 농축물로 만든 후 acetone 추출물로서 분획을 위한 시료로 하였다.

### 3. 탈류환원 반응

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

### 4. 저해물질의 부분정제

아세톤 추출물을 동결건조하여 얻은 350mg을 Sephadex G-50 column(2.5×20.0cm)에 의해 분획하였다. 용출액은 증류수를 사용하고 용출 속도는 1 mL/min로 튜브당 3mL을 취하여 tyrosinase, xanthine oxidase, 및 ACE 저해 활성 실험을 한 후 동결건조 시켰다. 이와 동시에 Sephadex LH-20 column (2.5×500cm)에도 아세톤 추출물에서 동결건조된 350mg을 loading하여 분획하고 용출용매는 물과 methanol을 사용하며 유출 속도는 0.8mL/min로 3mL씩 취하여 저해실험을 한 후 분획별로 동결건조하였다.

### 5. TLC에 의한 polyphenol류의 분리동정

Column에 의해 분리된 용출액을 cellulose 및 silica gel thin layer chromatography(TLC ; 5.0×5.0cm)에 2~10회씩 spotting하고 cellulose TLC는 2% acetic acid, silica gel TLC는 benzen: ethylformic acid : formic acid (1 : 7 : 1, 1 : 7 : 2, 2 : 5 : 1, V/V/V)의 용매로 전개한 다음 전개정도를 자외선에서 확인하였다. Cellulose와 silica TLC상에서 FeCl<sub>3</sub>에 의해 청색으로 발색되는 물질은 가수분해형 polyphenol로 동정하며 silica TLC에서 FeCl<sub>3</sub>에 비하여 청색으로, anisaldehyde에 의해 갈색으로 발색되는 물질은 축합형 polyphenol로 분류하였다.

### 6. Sephadex LH-20에 의한 분리정제

시료의 양에 따라 column을 선정하여 흡착성의 성질에 의해 분리하였다. 용출 용매는 normal phase type으로서 ethanol→H<sub>2</sub>O→acetone 및 60% methanol, 60→80% methanol과 reverse phase는 H<sub>2</sub>O→methanol→acetone의 순으로 용출시켜 TLC상에서 polyphenol 유무 및 종류를 확인한 후 감압농축하였다.

### 7. MCI-gel CHP 20P에 의한 정제

MCI-gel은 다공성 polystyren gel로서 흡착성을 이용하며 용출용매는 일반적인 reverse phase type인 H<sub>2</sub>O→ethanol로 용출하고 polyphenol 유무는 TLC 상에서 확인하였다.

### 8. Octadecyl silica gel(ODS)에 의한 분리

알칼리화 된 silica gel로서 본 실험에서는 Bondapak C<sub>18</sub>, Prep-PAK 500/C<sub>18</sub>, Fuji-gel ODS G3, Cosmosil 75 C<sub>18</sub>-OPN을 주로 사용하였고 추출 용매로서는 H<sub>2</sub>O→methanol type을 사용하였다.

### 9. Toyoperal HW 40(TSK gel)

친수성 vinylpolymer로서 본 실험에서는 30~60 μm 입자 크기의 fine을 사용 하였고 용출용매로서는 H<sub>2</sub>O→methanol, H<sub>2</sub>O→acetone type을 병행하였다.

### 10. Melting point 및 $[\alpha]_D$ 측정

용해점은 시료 1~2 mg을 취하여 미량용점 측정 장치를 이용하여 측정하였으며  $[\alpha]_D$ 는 시료 2~5 mg을 acetone 및 methanol에 용해하여 polarimeter (JASCO, DIP-370)에 의해 측정하였다.

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times A}{C \times l} (.)$$

- A : 선광각
- C : 1 ml 속에 함유된 시료양
- l : 측정 cell의 크기

## 11. Infrared Spectrum (IR)에 의한 구조 해석

IR spectrum은 할로겐화 알칼리 정제법을 이용하였다. 순수 분리된 시료 1 mg을 KBr 100 mg 분말과 잘 섞어 배합하고 압력을 가해 가압정제를 만들어 측정하였다. 표준물로서는 시료가 들어 있지 않은 KBr 분말을 가압정제하여 측정하였다.

## 12. Nuclear magnetic resonance (NMR)에 의한 구조 해석

NMR spectrum은 FT 방법(Pulse Fourier transform method)을 이용하여 순수정제물 7-10 mg을 측정 용매 acetone -D<sub>6</sub> -D<sub>2</sub> O에 5-20%(W/V) 비율로 용해시키고 TMS[tetramethylsilane : (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si]를 기준 물질로 하여 PMR(100, 270MHz)과 CMR(25.05, 67.80MHz)을 병행하여 측정하였다.

## 13. Mass spectrum에 의한 분자량 측정

고체 시료 1 mg 감압상태 (10<sup>-6</sup>~10<sup>-8</sup> mmHg)에 가열(100~300°C) 기화시켜 측정하는 negative ion FAB-mass spectrum을 이용하여 측정하였다. 이때 측정 용매로서는 acetone/glycerol (50 : 50, v/v)를 사용하여 측정하며 측정 조건에서 이온원의 가속가압을 2~3 kV, 이온화의 전압은 22~28 eV 이었고 시료 온도는 100~250°C에서 질량분석을 하였다.

## 14. 원소 분석

분석 시료 소량 (0.3~1 mg)을 취해 48시간 감압 건조하여 완전히 수분을 제거하고 자동 원소분석기로 시료에 함유된 C 및 H의 양을 분석하였으며, 0은 분자량을 기준으로 계산치에 의해 환산하였다.

## 15. 분리 정제 물질의 효소저해 실험

감나무 잎으로부터 분리하여 구조가 결정된 단일 물질을 10 mM과 1 mM 농도로 조제하여 일반적인 tyrosinase, xanthine oxidase 및 ACE 저해실험 방법에 의해 저해활성을 측정하였다.

## 1) Tyrosinase 효소저해 활성측정

Tyrosinase 활성저해 측정 방법은 tyrosinase의 작용과 생성되는 dopachrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi 등<sup>23)</sup>의 방법에 따라 행하였다. Mushroom tyrosinase를 90 unit/mL 0.5 mL, 기질로서 DOPA 0.5 mL, buffer 1 mL의 혼합액에 시료 용액 1 mL을 첨가 25°C, 2분간 반응시켜 475 nm에서 측정하고 dopachrome의 변화를 저해 값으로 환산하였다.

## 2) Xanthine oxidase 효소저해 활성측정

Xanthine oxidase 활성저해 측정법은 Stirpe와 Corte<sup>24)</sup>의 방법에 준하여 측정 하였다. 즉 반응구는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 1 mM에 효소액 0.1 mL와 탄닌용액 0.1 mM를 가하고 대조구에는 탄닌대신 증류수를 0.1 mL첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid 1 mL를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여 다음식 으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = 1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \times 100$$

## 3) Angiotensin converting enzyme(ACE) 효소저해 활성측정

ACE저해효과 측정은 Cushman와 Ondetti 등<sup>25)</sup>의 방법에 의하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 3.8)에 기질 Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) 2.5 mM을 녹인액 0.15 mL, ACE 0.1 mL와 탄닌용액 0.1 mL를 혼합하며, 대조구는 탄닌 대신 증류수 0.1 mL를 첨가 하여 37°C에서 30 분간 반응시키고 1N-HCl 35 mL 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 mL의 ethylacetate를 첨가한 후 ethylacetate 층으로부터 용매를 증류시킨 잔사를 2 mL의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 280 nm에서 측정하였다.

## 4) Thiolytic 의한 thioether 유도체 형성 및 정제

시료 10~20 mg을 ethanol 5~25 mL에 용해하여 acetic acid 1~5 mL, benzylmercaptan을 2~6 mL 첨

가한 후 100°C에서 반응하고 그 반응액을 농축하였다. 농축액을 Sephadex LH-20에 의해 1차 분리하고 완전히 순수물질로 분리 될 때까지 반복 정제하였다. 이 때 용출 용매 60% methanol 및 ethanol을 사용하였으며 용출속도는 1 mL/min로 용출하였다.

을 가하여 실온에서 24 시간 추출한 후 1,690×g에서 30분간 원심분리하여 상정액과 침전물을 얻었고 이 침전물은 다시 60% acetone을 가하고 위와 같은 추출 과정을 4회 반복하였다. 각각의 상정액을 모아 농축 여과하여 chlorophyll을 제거하고 2L의 농축물로 만든 후 acetone 추출물로서 분획하였다.

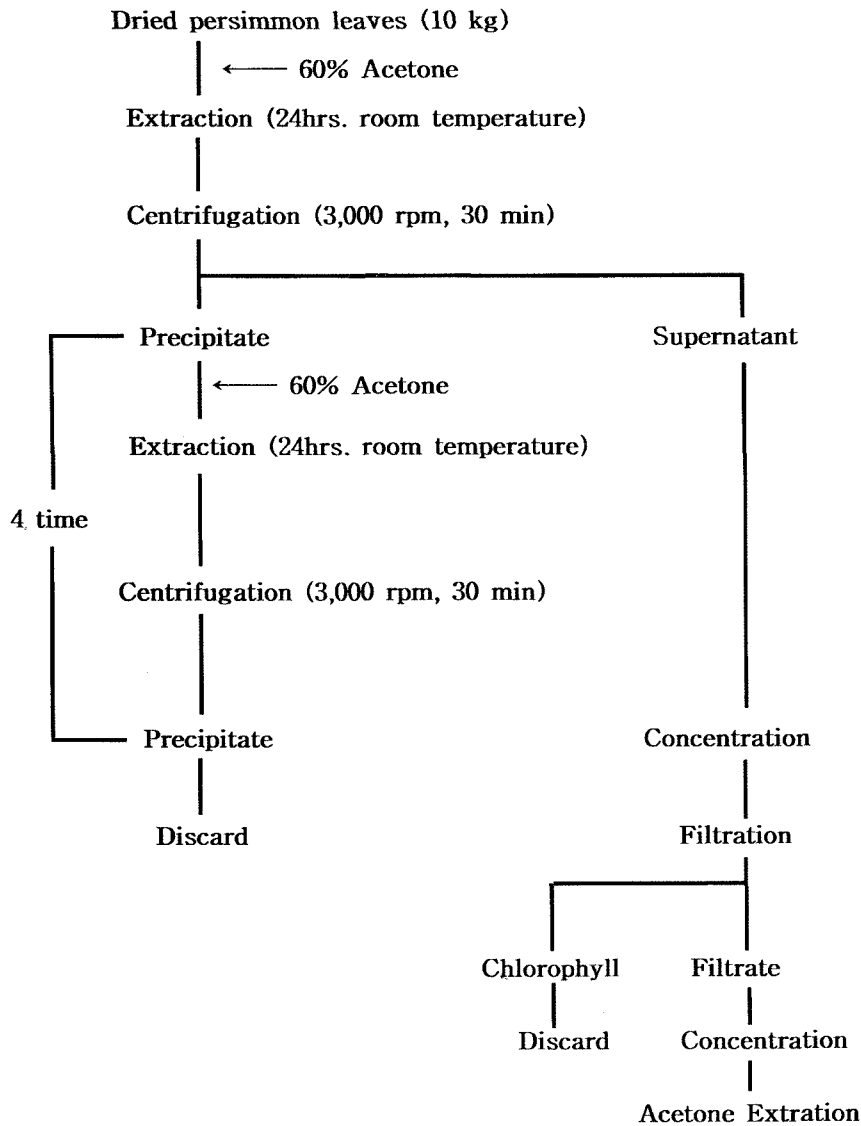
### III. 결과 및 고찰

#### 1. 감잎의 아세톤 추출물의 분리

건조된 감잎 10kg을 (Fig. 1)과 같이 60% acetone

#### 2. 생리활성물질의 분리, 정제 및 TLC에 의한 동정

감잎추출물의 성상과 Sephadex G-50에 의한 분획결과 효소저해 활성물질로 생각되어지는 화합물은 polyphenol류라 추정하게 되었으므로, (Fig. 2)와

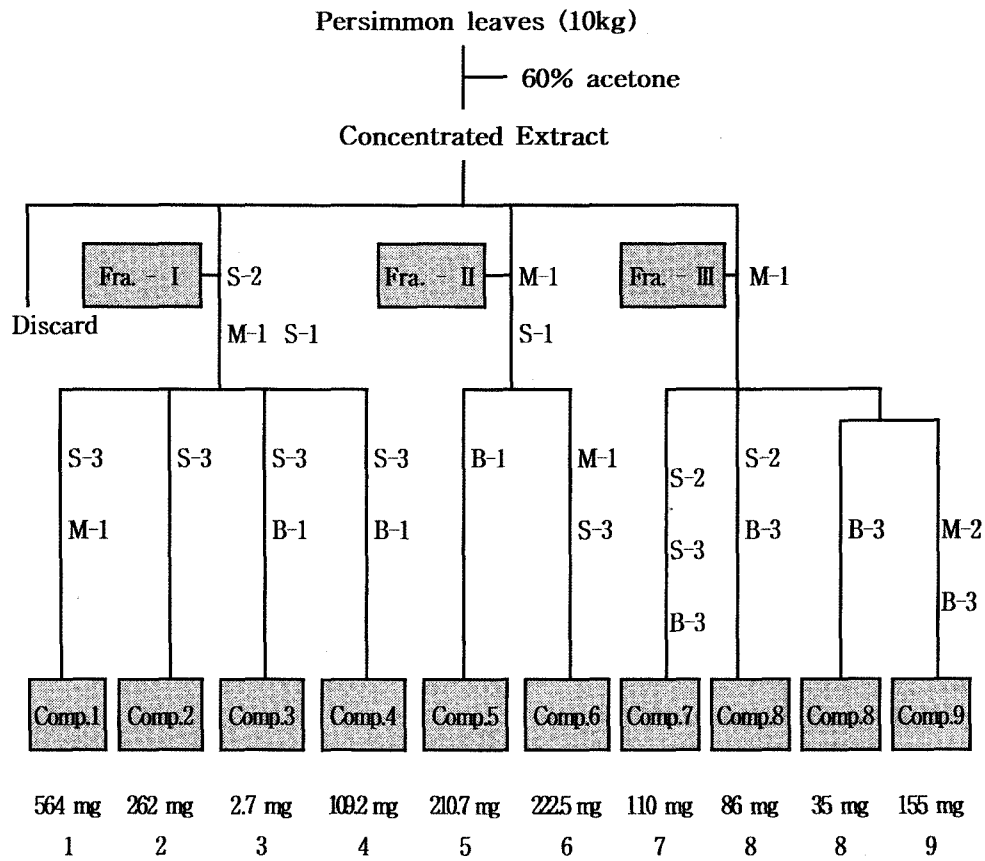


<Fig. 1> A procedure for extraction of dried persimmon leaves

같이 polyphenol류 분리방법에 의해 단일 물질을 분리하였다. F-1, F-2, F-3의 fraction으로 분획 한 후 F-1 fraction에서 compound 1~4까지 4종류의 화합물이, F-2 fraction에서는 compounds 5, 6화합물을 순수정제하여 재결정시켰다. 각 compound을 TLC상에서 확인한 결과 polyphenol화합물이라 추정되는 monomer가 2종류, dimer가 3종류, trimer가 1종류로 확인되었고 FeCl<sub>3</sub>와 anisaldehyde 총액으로 spray시킨 결과 각각 청색과 갈색반응을 나타내었으므로 proanthocyanidin계통으로 추정하게 되었다. 실험에서 Sephadex LH-20 gel에 H<sub>2</sub>O와 methanol 혼합용

액의 농도 변화를 용출한 결과 methanol 30%에서 흡착성이 약한 proanthocyanidin류가 보이기 시작하여 90% methanol에서 거의 모든 화합물이 용출되는 것으로 확인되었다. Ethanol용액에서는 monomer, dimer, trimer순으로 용출되었고, MCI-gel, Bondapak C<sub>18</sub>, column에서는 methanol 40%이내에서 용출되는 것이 확인되었다.

그리고 F-3 fraction에서는 compound 7, 8, 9화합물을 순수정제하여 재결정시켰다. TLC상에서 재결정화 된 화합물은 대체로 하층에 전개되어 있음을 확인하였다. 반응 색깔에 있어서 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Gel	Solvent
M : MCI gel CHP-20	1. MeOH →H <sub>2</sub> O (0:1→1:0)
S : Sephadex LH-20	2. EtOH →Water (5%→40%)
B : Bondapak C <sub>18</sub>	3. MeOH (60%)

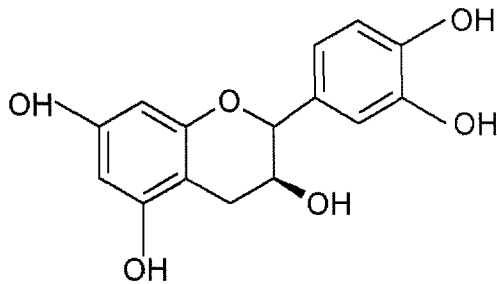
<Fig. 2> A procedure for isolation of polyphenol from persimmon leaves

정색반응시 붉은색이 강한 선명함을 보여 주었고 FeCl<sub>3</sub> 용액에서는 청색반응을 관찰할 수 있었다. Sephadex LH-20에 methanol : H<sub>2</sub>O (0:1→1:0) 용출용매를 사용할 때 이 화합물은 약 60% methanol 용액에서 용출되었다. 이러한 결과는 분리된 화합물이 flavan-3-ol 골격을 기본으로하는 축합형 탄닌으로 추정되며 반응색으로 붉은 정도와 선명도를 보아 화합물 B환에 hydroxyl기가 1개가 더 결합하고 있거나 다른 부위에 gallate가 함유한 화학구조로 추정되었다. 용출속도에서 결과를 비교해 보면 정제된 화합물은 겔의 흡착정도로 보아 procyanidin (proanthocyanidin)계통으로 추정하게 되었고 분자량은 dimer 이상에서 다른 화합물이 결합되어 있음을 확인 할 수 있었다.

3. 생리활성 물질의 물리 및 화학적 성질

1) 기지물질의 구조결정

(1) Compound 1 ((+)-catechin)



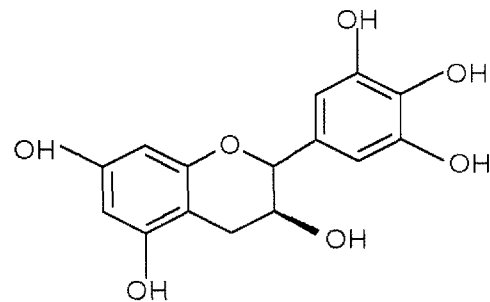
무색침상형(H<sub>2</sub>O)으로 mp. 172~175°C 이고 선광도는  $[\alpha]_D^{25} +9.4^\circ$  (C=1.0, acetone)이었다. 원소분석에

<Table 1> Mechanical data compound 1, (+)-Catechin

Type	Colorless needles
FAB-MS(m/z)	[289]
Polarity	$[\alpha]_D^{25} +9.4^\circ$ (C=1.0, acetone)
<sup>1</sup> H-NMR (acetone-d <sub>6</sub> -D <sub>2</sub> O)	2.52(1H, dd, J=16.8Hz, 4-H)
	2.94(1H, d, J=16.6Hz, 4-H)
	4.02(1H, m., 3-H)
	4.57(1H, d, J=8Hz, 2-H)
	5.90(1H, d, J=2Hz, 6-H)
	6.06(1H, d, J=2Hz, 8-H)
	6.75(1H, dd, J=8, 2Hz, B-ring 6-H)
6.92(1H, d, J=2Hz, 6-H)	
8.04(1H, d, J=8Hz, B-ring 5-H)	

서 C, 62.06%, H, 4.86%, O, 33.7%인 C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>의 분자식으로 구성되어 있으며, Negative FAB-MS에서 m/z: 289[M-H]<sup>-</sup> 분자량을 얻었다. IR spectrum에서 IR(KBr)cm<sup>-1</sup> : 3400의 OH가 1620, 1580에서 C=C의 signal이 관찰 되었고 이런 PMR, CMR은 일반적인 catechol 유래의 spectrum으로서 이 물질의 확실한 귀속으로 본실험의 물질 동정에 기본을 설정하였다. 즉, CMR 및 PMR spectrum에 의하면 지방족(aliphatic) 영역의 2.54 ppm(dd, J=16, 9Hz) 및 2.92 ppm(dd, J=16Hz, 5Hz)의 signal은 그 분열형태 배열에 의해 chemical shift로부터 C-링의 C-4 위치에 1 H분의 귀속이 가능하였다. 4.01 ppm(dd, J=9.8, 5Hz) 및 4.57 ppm(d, J=8Hz)의 signal도 각각의 분열 형태로부터 C-링의 3-H, 2-H에 귀속시켰으며 이런 귀속은 COSY spectrum의 결과로 더욱 명확하게 되었다. 그러므로 compound 3은 (+)-catechin으로 동정하였다.

(2) Compound 2 ((+)-Gallocatechin)



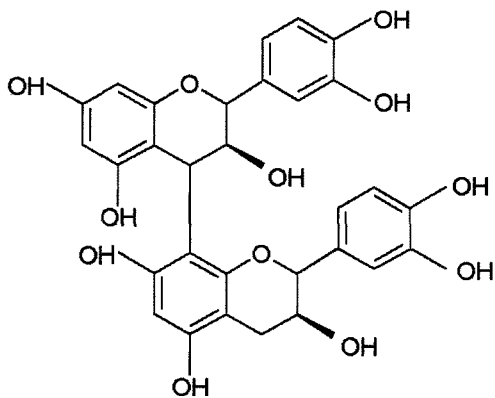
무색침상형(H<sub>2</sub>O)로서 mp. 172~175°C, 선광도는  $[\alpha]_D^{25} +12.4^\circ$  (C=1.0, acetone)이며, anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 갈색과 FeCl<sub>3</sub>에 청색 반응을 하였다. 분자

<Table 2> Mechanical data compound 2, (+)-Gallocatechin

Type	Colorless needles(H <sub>2</sub> O)
FAB-MS(m/z)	[306]
Polarity	$[\alpha]_D^{25} +12.4^\circ$ (C=1.0, acetone)
<sup>1</sup> H-NMR (acetone-d <sub>6</sub> -D <sub>2</sub> O)	2.49(1H, dd, J=8.16Hz, 4-H)
	2.91(1H, dd, J=6, 16Hz, 4-H)
	3.98(1H, m, 3-H)
	4.48(1H, d, J=8Hz, 2-H)
	5.87, 6.03(each 1H, d, J=2Hz, 6,8-H)
6.48(2H, S, 2', 6'-H)	

량은 Negative FAB-MS에서  $m/z$  : 306[M-H]<sup>-</sup>으로 catechin 보다 산소 한 분자에 해당하는 양이 첨가되어 있음을 시사하였고 PMR 비교시에도 catechin은 6.922 ppm에서 doublet의 2'-H, 6.48ppm에서 2', 6'-H에 해당하는 두 개의 proton이 singlet로 존재함이 확인된 바 이것은 galloyl기를 시사하였다. 그러므로 compound 2는 (+)-gallocatechin임이 확인되었다.

(3) Compound 3 (Procyanidin B-1)



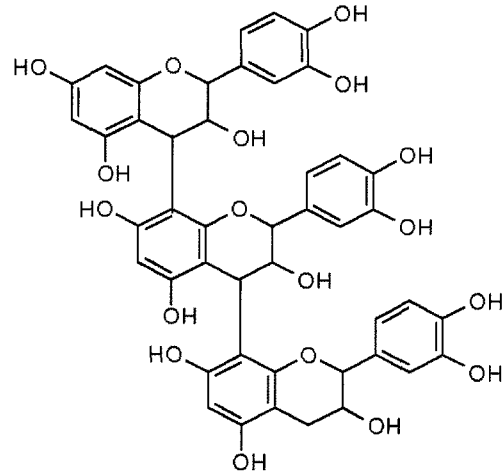
염갈색 무정형 분말로서  $[\alpha]_D^{25} + 40.2^\circ$  (C=1.0, acetone)로서 Negative FAB-MS에 의해 분자량은  $m/z$  : 577[M-H]<sup>-</sup>을 얻었으며 anisaldehyde- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에서 갈색 반응을 보였다. PMR에서 flavan 골격에 해당하는 5.08, 5.16, 5.20, 5.25 ppm에서 2-H에 해당하는 signal이 형성되어 있음이 관찰되었기에 분리된 상부의 물질은 (-)-epicatechin-4 $\beta$ -benzylthioether로 동정하였다. CMR spectrum은 29.2,

<Table 3> Mechanical data compound 3, Procyanidin B-1

Type	A amorphous powder
FAB-MS(m/z)	[577] <sup>-</sup>
Polarity	$[\alpha]_D^{25} : +40.2^\circ$ (C=1.0, acetone)
<sup>1</sup> H-NMR (acetone-d <sub>6</sub> -D <sub>2</sub> O)	2.58(1H, dd, J=16, 8Hz, 4'-H)
	2.83(1H, dd, J=16, 6Hz, 4'-H)
	3.98(1H, brs, 3-H) 4.10(1H, m, 3'-H)
	4.68(1H, brs, 4-H) 4.76(1H, m, 2'-H)
	5.08(1H, brs, 2-H) 5.94(1H, d, J=2Hz, 6-H)
	5.97(1H, s, 6'-H)
	6.03(1H, d, J=2Hz, 8-H)
	6.62-7.08(6H in total, m, B, B'-H)

37.8 ppm의 C-4', 4와 66.2, 70.1, 76.2, 81.8ppm에서 각각 C-3', 3, 2, 2'의 귀속이 확인되었고 PMR에서 <Table 3>과 같은 signal을 얻었으므로 이 화합물은 epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin으로 결합된 procyanidin B-1로 동정하였다.

(4) Compound 4 (Procyanidin C-1)



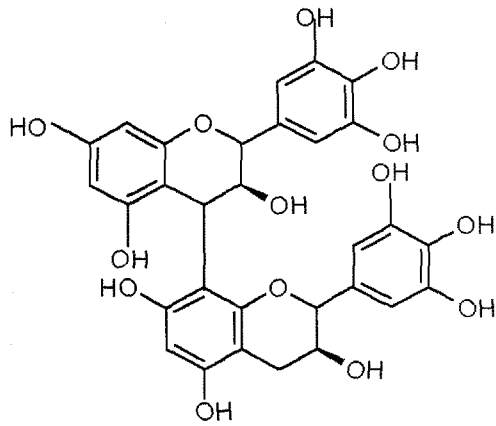
염갈색의 무정형분말로서  $[\alpha]_D^{25} + 75.5^\circ$  (C=1.0, acetone)으로 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액에서 procyanidin 특색인 갈색 반응을 띄었다. Negative FAB-MS에 의해 compound 4는  $m/z$  : 865[M-H]<sup>-</sup> 분자량을 얻었다. Compound 4의 PMR에서 상단 부위에 해당하는 4-H의 결합 정수가 적으므로  $\beta$ 형임이 밝혀졌다. PMR분석에 의해 signal의 값은 <Table 4>와 같았으며, compound 4는 epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin으로 결합된 procyanidin C-1로 동정하였다.

<Table 4> Mechanical data compound 4, Procyanidin C-1

Type	A amorphous powder
Polarity	$[\alpha]_D^{25} : +75.5^\circ$ (C=1.0, acetone)
FAB-MS(m/z)	[865] <sup>-</sup>
<sup>1</sup> H-NMR (acetone-d <sub>6</sub> -D <sub>2</sub> O)	2.64-2.96(2H, m, 4''-H)
	4.12(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, A-ring H)
	6.60-7.30(9H in total, m, B-ring H)



(5) Compound 5 (Prodelphinidin B-3)

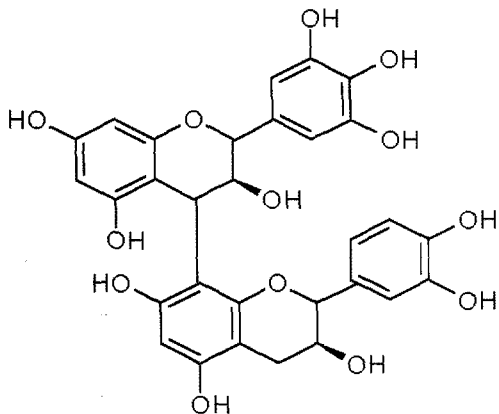


염갈색의 무정형으로 선광도는  $[\alpha]_D^{25} - 157.6^\circ$  (C=1.0, acetone)이었고 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 갈색 반응을 나타내었으며 Negative FAB-MS에서 m/z : 609[M-H]<sup>-</sup>의 분자량을 얻었다. PMR spectrum은 <Table 5>와 같으며, 이 물질은 4-H의 coupling constant가 크므로 α로 결합되어 있음이 확인되었다. 그러므로 compound 5는 galocatechin-(4α→8)-galocatechin인 prodelphinidin B-3으로 동정하였다.

<Table 5> Mechanical data compound 5, Prodelphinidin B-3

Type	A amorphous powder
FAB-MS(m/z)	[609] <sup>-</sup>
Polarity	$[\alpha]_D^{25} : -157.6^\circ$ (C=1.0, acetone)
<sup>1</sup> H-NMR (acetone-d <sub>6</sub> -D <sub>2</sub> O)	2.58(1H, dd, J=7, 151Hz, 4'-H)
	2.94(1H, dd, J=5, 15Hz, 4'-H)
	4.25-4.67(3H, m, 2, 4, 2'-H)
	5.78-6.14(3H in total, m, 6, 8, 6'-H)
	6.19, 6.41, 6.58, 6.62(4H in total, B, B'-H)

(6) Compound 6 (Galocatechin-(4α→8)-catechin)

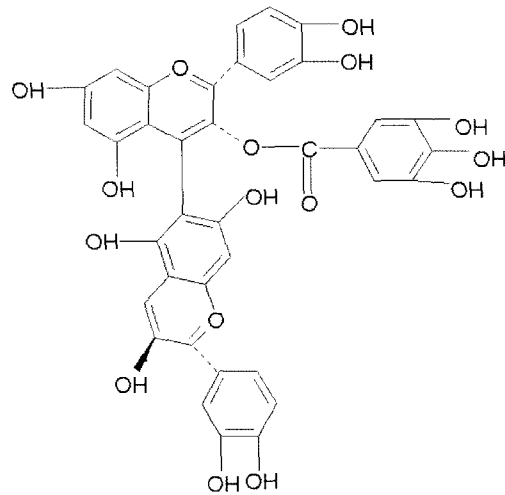


<Table 6> Mechanical data compound 6, Galocatechin-(4α8)-catechin

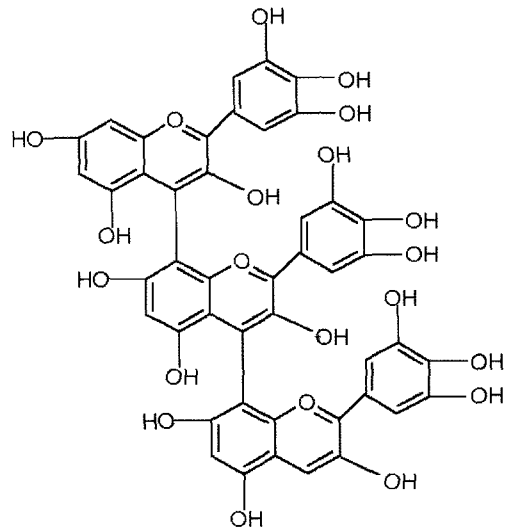
Type	A amorphous powder
Polarity	$[\alpha]_D^{25} : -196.8^\circ$ (C=1.0, acetone)
<sup>1</sup> H-NMR (acetone-d <sub>6</sub> -D <sub>2</sub> O)	2.40-3.00(2H, m, 4-H)
	4.01-4.76(5H in total, m, 2, 3, 4, 2', 3'-H)
	5.76-6.33(3H in total, m, A-ring H)
	6.46-7.28(5H in total, m, B-ring H)

염갈색의 무정형으로 선광도는  $[\alpha]_D^{25} - 196.8^\circ$  (C=1.0, acetone)이었으며, anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액에서 적갈색 반응을 하였다. PMR spectrum은 <Table 6>과 같으며, 상부에 해당하는 4-H의 coupling constant가 크므로 본 화합물은 galocatechin-(4α→8)-catechin으로 동정하였다.

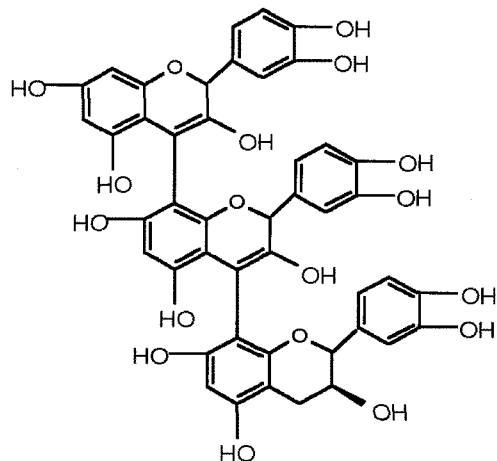
(7) Compound 7 (Procyanidin B-7-3-O-gallate)



(8) Compound 8 (Procyanidin C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate)



(9) Compound 9 ((-)-epigallocatechin-(4 $\beta$ -8)-epigallocatechin-(4 $\beta$ -8)-catechin)



**Compound I-a-1, II-a-1, II-b, II-c-1 [(-)-epicatechin-3-O-gallate]**

colorless needles,  $[\alpha]_D^{29}$  : -13.9° (C=1.0, acetone),  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 2.79(1H, dd, J=17, 3Hz, 4-H), 3.09(1H, dd, J=17, 4Hz, 4-H), 5.15(1H, brs, 2-H), 5.56(1H, m, 3-H), 6.38, 6.08(each 1H, d, J=2Hz, 6, 8-H), 6.65(2H, s, 2', 6'-H), 7.00, 7.23(each 2H, s, G-H), 7.06(1H, d, J=2Hz, 2'-H),  $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 26.6(4-C), 69.1(3-C), 78.2(2-C), 101.6, 103.6(6,8-H), 104.5(4a-C), 106.6(2', 6'-C), 109.9, 110.3(2xG, 2,6-C), 133.1(4'-C), 139.0, 139.8(each G, 4-C), 145.7, 146.0(3', 5'-C, 2xG, 3,5-C), 151.5, 156.7, 157.5(5,7,8a-C), 165.2, 166.6(each COO)

**Compound I-b, III-b [(+)-catechin]**

colorless needles( $H_2O$ ),  $[\alpha]_D^{29}$  : +91.5° (C=0.7, acetone), IR : 3300(OH), 1620(arom, C=C),  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 2.54(1H, dd, J=16, 8Hz, 4-H), 2.92(1H, dd, J=16, 6Hz, 4-H), 4.01(1H, m, 3-H), 4.57(1H, d, J=8Hz, 2-H), 5.87(1H, d, J=2Hz, 6-H), 6.04(1H, d, J=2Hz, 6-H), 6.76(1H, dd J=8, 2Hz, 6'-H), 6.82(1H, d, J=8Hz, 5'-H), 6.92(1H, d, J=2Hz, 2'-H)

**Compound I-c [procyanidin B-7]**

colorless needles,  $[\alpha]_D^{21}$  : +47.8 (C=1.0, acetone),  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 2.46(1H, dd, J=8, 16Hz, 4'-H), 2.86(1H, dd, J=8, 16Hz, 4'-H), 3.95(1H, m, 3'-H), 4.80(1H, s, 3-H), 4.52(1H, d, J=8Hz, 2'-H), 4.64(1H, s,

4-H), 4.96(1H, s, 2-H), 6.00-6.15(3H in total, m, A-ring H), 6.70-7.04(6H in total, m, B-ring H)

**Compound I-d, II-d-1 [gallate]**

colorless needles( $H_2O$ ), mp 266-268, IR  $V_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  : 3400(OH), 1710(COOH),  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 7.20(2H, s, galloyl)

**Compound II-d-1 [procyanidin B-2]**

colorless powder,  $[\alpha]_D^{20}$  : +34.9° (C=1.0, acetone),  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 2.62-3.08(2H, m, 4'-H), 4.00(1H, s, 3-H), 4.31(1H, br s, 3'-H), 4.75(1H, s, 4-H), 4.96(1H, s, 2'-H), 5.12(1H, s, 2-H), 5.80-6.20 (3H in total, m, A-ring H), 6.60-7.20(6H in total, m, B-ring H)

**Compound II-d-1 [procyanidin C-1]**

colorless powder,  $[\alpha]_D^{25}$  : +75.5° (C=1.0, acetone),  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 2.64-2.96(2H, m, 4''-H), 4.12(2H, br s, 3, 3'-H), 4.36(2H, br s, 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, A-ring H), 6.60-7.30(9H in total, m, B-ring H)

**Compound III-a-1 [prodelpinidin B-1]**

colorless powder,  $[\alpha]_D^{21}$  : -64.4° (C=1.2, acetone),  $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6$ + $D_2O$ ) $\delta$  : 2.80-3.24(2H, m, 4-H), 4.40(1H, m, 3-H), 4.87(1H, brs, 4-H), 5.17(2H, brs, 2, 2'-H), 5.60(1H, m, 3'-H), 5.96-6.10(3H in total, m, 6, 8, 6'-H), 6.52, 6.70(each 2H, B, B'-H)

기기분석 결과에 의해 화합물 I-a-1는 무색 침상형으로  $[\alpha]_D^{29}$  : -13.9°를 얻었고  $^1\text{H-NMR}$ 에 의하면 aliphatic 영역에 의한 2.90 (dd, J=18, 3Hz), 및 3.10(dd, J=18, 4Hz) signal은 분열 양상에서 chemical shift값이 C환의 C-4 proton임이 확인되었다. 더욱이 5.07(brs) 및 5.55(m)의 signal의 분열상도 C환의 2-H, 3-H의 귀속임을 알았다. Aromatic영역에서도 6.63(brs)의 분열 양상은 각각 catechol환(B환) 6'-H, 5'-H 및 2'-H에 귀속시켰다. 또한 6.05(brs)의  $^1\text{H-NMR}$  signal은 분열형태로 보아 각각 A환의 6-H, 8-H의 귀속이 결정되었고 7.03(s)은 singlet로 2-H분의 gallate를 시사하는 것으로 보아 이 화합물은 (-)-epicatechin-3-O-gallate으로 동정하였다. 화합물 II-a-1, II-b, II-c-1도 동일한 화합물로 확인되었다. 화합물 I-b는 무색 침상형으로  $[\alpha]_D^{29}$  :

+9.4°를 얻었고 IR에서 3250(OH), 1610, 1520 (aromatic c=c) 확인되었다. 1H-NMR의하면 aliphatic 영역에 의한 2.52(dd, J=16, 8Hz) 및 2.94(d, J=16, 6Hz) signal은 분열양상에 있어서 chemical shift값이 C환의 C-4 proton임이 확인되었다. 더욱이 4.02(ddd, J=9, 8, 5Hz) 및 4.57(d, J=8Hz)의 signal은 분열상도 C환의 3-H, 2-H의 귀속임을 알았다. Aromatic영역에서도 6.75(dd, J=8, 2Hz), 6.82(d, J=8Hz) 및 6.92(d, J=2Hz)의 분열 양상은 ABX-type 시사하므로 각각 catechol환(B환) 6'-H, 5'-H, 및 2'-H에 귀속시켰다. 또한 5.09 및 6.06의 1H-NMR signal은 각각 J=2Hz의 doublet로 A환의 6-H, 8-H의 귀속이 결정되어 (+)-catechin으로 동정되었다.

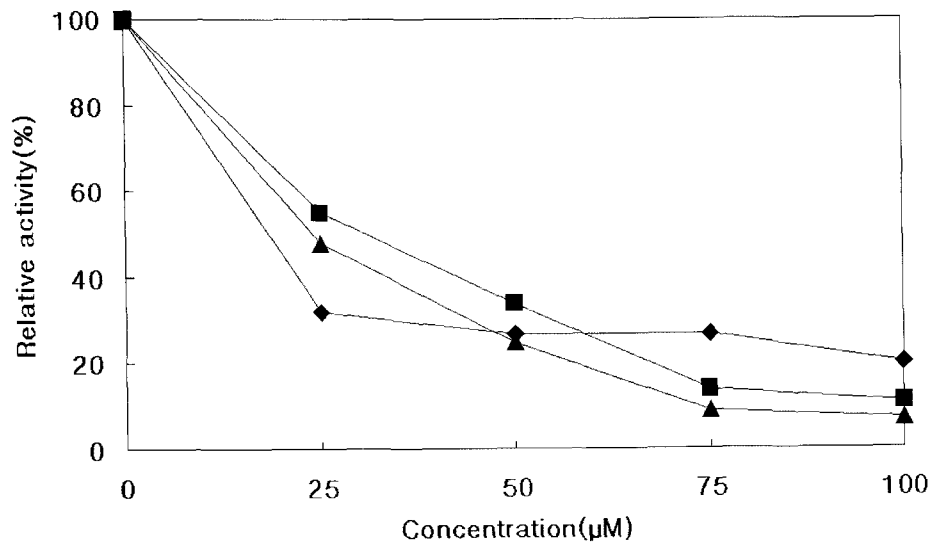
화합물 III-b도 1H-NMR에서 I-b과 singal이 일치하므로 (+)-catechin이었다. 화합물 I을 tannase로 반응시 화합물 I-c와 I-d로 분리되었고, compound I-d는 IR에서 3400의 hydroxyl, 1710의 carboxyl기가 확인되었으며 1H-NMR에서도 7.02 ppm에서 2H의 siglet의 galloyl기가 확인되므로 gallate였다. 화합물 II-d-2도 역시 1H-NMR signal이 일치하였다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 compound ①은 (-)-epicatechin-3-O-gallate와 (+)-catechin로 결합된 procyanindin B-7-3-O-gallate였다. 화합물 ②는 완전 thiolysis에 의해 compound II-a와 II-b를 2 : 1 mole

비율로 얻었고 compound II-a를 탈유황반응시 화합물 II-a-1를 얻을 수가 있었다. 이 화합물은 앞에서 확인된 바 있는 화합물 I-a-1과 일치하였다. (-)-epicatechin-3-O-gallate로 동정하게 되었다. 부분 thiolysis 및 tannase 처리시 화합물 II-c-1은 1H-NMR에서 (-)-epicatechin-3-O-gallate와 일치하였다. 화합물 II-d-2의 tannase처리에 의해 화합물 II-d-1과 화합물 II-d-2를 무색 결정형으로 얻었다. 화합물 II-d-2는 gallate화합물이었다. 이러한 결과를 볼 때 화합물 II는 procyanindin-C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate로 동정되었다. 화합물 ③은 부분 thiolysis에서 compound III-a와 compound III-b를 얻을 수 있었고 화합물 III-a를 탈유황원반응시 화합물 III-a-1로 이 화합물은 An 등<sup>15)</sup>이 감나무잎에서 충치예방물질분리에서 이미 밝혀진 procyanindin B-2로 확인되었다. 화합물 II-b는 1H-NMR에서 (+)-catechin으로 동정된 바 화합물 ③은 epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin으로 확인되었다.

4. 분리정제 물질(신규화합물)의 효소저해 실험

1) Tyrosinase

감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과는 <Fig. 3>과 같다



<Fig. 3> Effect of polyphenols isolated from persimmon leaves on the tyrosinase

- ◆: Procyanidin C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate
- : Epiallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin
- ▲: Procyanidin B-7-3-O-gallate

Procyanidin C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate는 100 μM에서 70%의 강한 저해효과를 나타냈으며 epigallocatechin-(4β→8)-epigallo-catechin-(4β→8)-catechin는 51%의 저해효과를 나타내었다. 이러한 효과는 화장품의 미백재료로 사용되고 있는 kojic acid, albumin보다 우수 하였으며 여성들의 미에 관심을 줄 수 있는 기능성 화장품의 식품 소재로 가능성이 높다 할 수 있다.

2) Xanthine oxidase(XOase)

감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 XOase 저해활성측정을 조사한 결과는 <Fig. 4>와 같다. Procyanidin B-7-3-O-gallate와 procyanidin C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate 즉, gallate가 붙은 화합물에서 100μM의 농도에서 66%와 63%의 강한 저해효과를 나타냈으며 현재, 통풍 예방약으로 판매되고 있는 allopurnol 성분보다 효과가 강한 것으로 확인되고 있다.

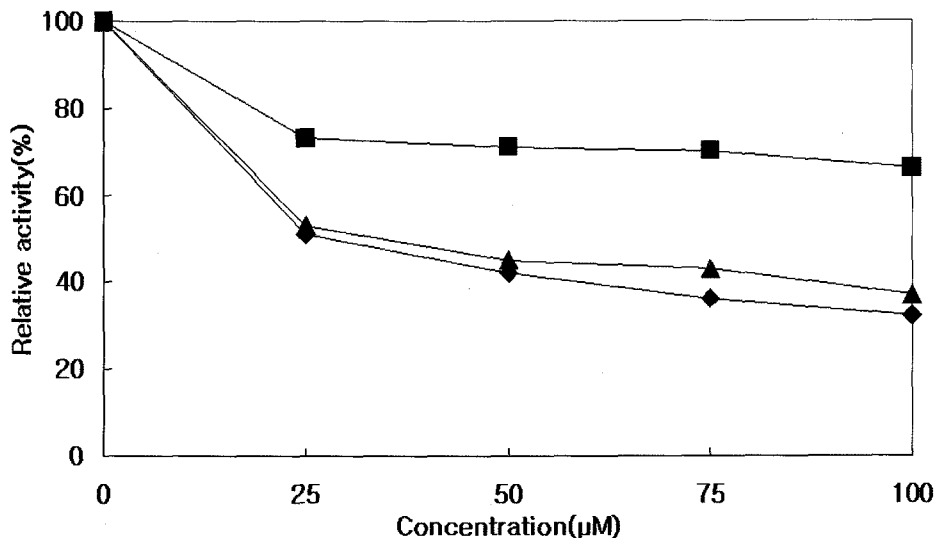
3) Angiotensin converting enzyme(ACE)

감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 ACE 저해활성측정을 실험한 결과는 <Fig. 5>과 같다. Procyanidin B-7-3-O-gallate는 100μM농도에서 94%의 저해효과를 나타내었으며 epigallocatechin-(4β→

8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin, procyanidin C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate는 각각 90.69, 80.90% 저해를 하였다. 이러한 결과로 감잎의 지속적인 섭취는 고혈압의 억제에 효과가 있을 것이라 생각된다.

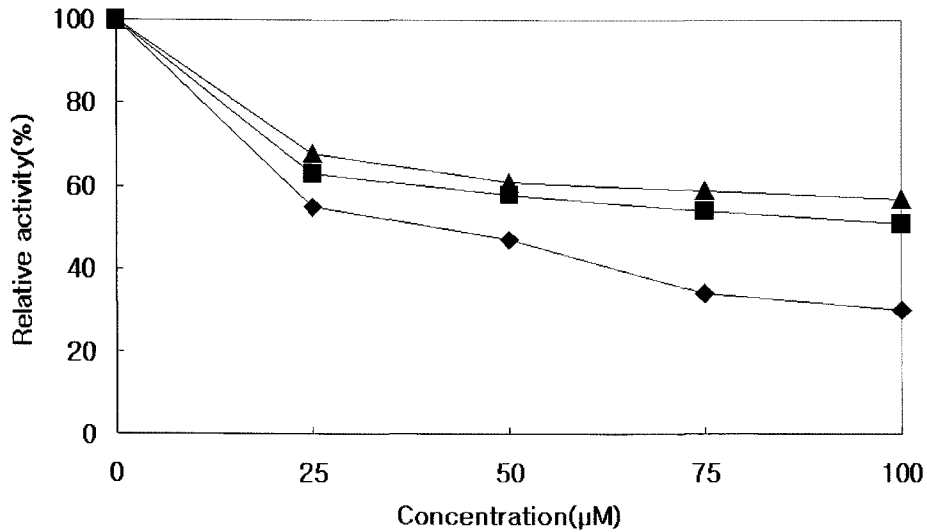
IV. 요약 및 결론

한국산 감잎으로부터 통풍치료, 미백효과, 고혈압 억제효과와 개발목적으로 9종의 flavan-3-ol 화합물을 분리하였고 기기분석에 의해 화학구조를 밝혔다. 각 화합물은 (+)-catechin, (+)-gallocatechin, procyanidin B-1, pyrocyanidin C-1, prodelfphinidin B-3, gallocatechin-(4α→8)-catechin과 신물질인 procyanidin B-7-3-O-gallate, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate, (-)-epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin 이었다. 감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 ACE 저해활성측정을 실험한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate는 100 μM농도에서 94%의 저해효과를 나타내었으며 epigallocatechin-(4β→8)-epigallo-catechin-(4β→8)-catechin, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 각각 90.69, 80.90% 저해를 하였다. Xanthine oxidase 저해



<Fig. 4> Effect of polyphenols isolated from persimmon leaves on the xanthine oxidase

- ◆: Procyanidin C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate
- : Epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin
- ▲: Procyanidin B-7-3-O-gallate



<Fig. 5> Effect of polyphenols isolated from persimmon leaves on the angiotensin converting enzyme

- ◆: Procyanidin C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate
- : Epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin
- ▲: Procyanidin B-7-3-O-gallate

활성측정을 조사한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate와 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate 즉, gallate가 붙은 화합물에서 100 µM의 농도에서 66%와 63%의 강한 저해효과를 나타냈다. Tyrosinase 저해활성을 측정 한 결과는 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 100 µM에서 70%의 강한 저해효과를 나타냈으며, epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin는 51%의 저해효과를 나타내었다.

### 감사의 글

이 연구는 1996년도 농림부 첨단기술 개발 사업 과제 (No. 388, 1996)에 의하여 연구비를 받아 수행 하였으므로 이에 감사드립니다.

### ■참고문헌

- 1) Chung SH, Moon KD, Kim JK, Seong JH, Sohn TH. Change of chemical components in persimmon leaves during growth for processing persimmon leaves tea. Korean J Food Sci Technol 26: 141-146, 1994.
- 2) Choi HJ, Son JH, Woo HS, An BJ, Bae MJ, Choi C. Changes of composition in the species of persimmon leaves during growth. Korean J Food Sci Technol 30: 529-534, 1998.
- 3) Choi SH. The aroma components of duchung tea and persimmon leaf tea. Korean J Food Sci Technol 22(4): 405-410, 1990.
- 4) Choi SJ, Jun WJ, Yu KW, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitor from porphura yezoensis. J Korean Soc Food Sci Nutr 29: 719-725, 2000.
- 5) Park JY, Park EM, Lee MK, Jang JY, Kim MJ, Cho SY. Effect of persimmon leaves extract on serum and lever lipid concentrations in hypercholesterolemic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 29: 537-542, 2000.
- 6) Kameda K, Takaku T, Okuda H, Kimura Y. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. J Natural Products 50: 680-686, 1978.
- 7) Kim BG, Rhew TH, Choe ES, Chung HY, Park KY, Rhee SH. Effect of selected persimmon leaf

- components against spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem Pharm Bull* 38: 1049-1054, 1990.
- 8) Cushman DW, Ondetti MA. Inhibitors of angiotensin converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem Pharmacology* 29: 1871-1877, 1980.
  - 9) Matsuo T, Ito S. The chemical structure of kaki tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.)(in Japanese). *Agric Biol Chem* 42: 1637-1639, 1978.
  - 10) Funayama S, Hikino H. Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chem Pharm Bull* 27: 2865-2870, 1979.
  - 11) Uchida S, Ohta H, Niwa M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Ozaki M. Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem Pharm Bull* 38: 1049-1054, 1990.
  - 12) Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric Biol Chem* 45: 735-740, 1981.
  - 13) Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka I. Novel Chalcon-flavan Dimers, Assamicans A, B and C and a New Flavan-3-ol and Proanthocyanidins from the Fresh Leaves of *Camollia sinensis* L. *Chem Pharm Bull* 37(1): 77-82, 1989.
  - 14) An BJ, Kim WK, Choi JY, Kwon IB, Choi C. Structure and Isolation of xanthine oxidase Inhibitor from Uolong Tea. *Korean J Food Sci Technol* 24: 558-562, 1992.
  - 15) An BJ, Choi JY, Kwon IB, Nishioka I, Choi C. Structure and Isolation of Glucosyltransferase Inhibitor from Jack Fruit tea Leaf. *Korean Biochem J* 25: 347-353, 1992.
  - 16) Storch J, Ferber E. Detergent-Amplified Chemiluminescence of Lucigenin for Determination of Superoxide Anion Production by NADH Oxide and Xanthine Oxidase. *Analytical Biochemistry*, 169: 262, 1988.
  - 17) Nonak G. Isolation and Structure elucidation of Tannins. *Pure & Appl. Chem.* 61(3): 357, 1989.
  - 18) Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka I. Isolation of Four New Acylated Flavam-3-ols from Oolong Tea. *Chem Pharm Bull* 35(2): 611, 1987.
  - 19) Wani MC, Taylor HL, Wall ME. The Isolation and Structure of Taxol, from *Taxus brevifolia*. *American J Chem Soc* 2325, 1971.
  - 20) Haslam F. Galloyl ester in the Aceraceae. *Phytochemistry*, 4: 495, 1965.
  - 21) Okuda T, Yoshida T, Hattano T. Ellagitannins as active constituents of medicinal Plants. *Plant medica* 55: 117(502).
  - 22) Morimoto Y, Nonaka G, Nishioka I. Isolation and Structure of Novel bi-and triflavonoids from the leaves of *Cassia fistula* L. *Chem Pharm Bull* 38: 717, 1988.
  - 23) Yagi K. Lipid peroxides and human disesse. *Chem Phys Lipids.* 45: 337-341, 1987.
  - 24) Stirpe F, Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244: 3855-3860, 1969.
  - 25) Cushman DW, Ondetli MA. Inhibitors of angiotensin converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem Pharm* 29: 1871-1877, 1980.