

기호음료 성분의 Angiotensin-I 전환효소 저해작용

도정룡* · 김선봉 · 박영호 · 김동수*

부산수산대학교 식품공학과 *한국식품개발연구원

Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity by the Component of Traditional Tea Materials

Jeong-Ryong Do*, Seon-Bong Kim, Yeung-Ho Park and Dong-Soo Kim*

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan

*Korea Food Research Institute

Abstract

The present study was conducted to investigate Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition activity of the components of traditional tea materials in Korea. Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition activity of water soluble fractions obtained from the samples were strong in Zingiberis rhizoma, Acanthopanax cortex, Schizandrae fructus, Perilla semen, Cassiae torae semen, Zizyphy fructus in order. ACE inhibition activity of fractions obtained from methanol extract of Cassiae torae semen were strong in ethyl acetate fraction, ethyl ether fraction, water fraction, chloroform fraction in order. Compound C showed the strongest ACE inhibition activity among compound A, B, C, D separated from Cassiae torae semen, but Compound C separated from Cassiae torae semen was lower than bradykinin in the ACE inhibition activity.

Key words: Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition activity, Zingiberis rhizoma, Cassiae torae semen

서 론

Angiotensin-I 전환 효소(KininaseII peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1, 이하 ACE라 약함)는 불활성인 angiotensin-I의 C 말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 혈관벽 평활근 수축 등의 작용에 의하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 angiotensinII를 생성하는 한편, 혈압강화작용을 가지는 bradykinin을 분해하여 불활성화 시킴으로써 고혈압의 원인이 되고 있다^{1, 2)}. 따라서, 이들 ACE에 대하여 저해작용을 나타내는 성분에 관한 연구가 활발하게 진행 되고 있는데,鈴木 등³⁾은 식품에 존재하는 ACE 저해인자는 가열조리에 안정하며 체내에서의 흡수도 용이한 비교적 저분자의 물질로서, 그 저해능은 혈압강화제와 비교하였을 때에는 비교적 낮은 활성을 나타내지만 대량으로 상시 섭취하는 식품중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대된다고 보고하였으며, ACE 저해능을 가진 성분을 살펴보면 casein 가수분해물에 의한 것⁴⁻⁷⁾, 인공적으로 합성한 peptide에 의한 것⁸⁻¹⁰⁾이 보고되어 있으며, zein 가수분해물에 의한 것¹¹⁾, 무화과 유액 중의 peptide에 의한 것 및 징어리와 갈치에서 분

획한 peptide에 의한 것^{12,13)}이 있는데, 이들은 모두 peptide와 그 유도체들이며 ACE 저해능은 peptide를 구성하는 아미노산의 종류와 배열순서 및 치환시킨 관능기에 따라 저해능이 다르게 나타났다고 보고하였다. 原 등¹⁴⁾은 茶 成分에 의한 ACE 저해능을 조사하였으며, 그들은 茶의 polyphenol성분이 ACE 저해능을 나타낸다고 보고하였다.

이상에서 살펴 본 바와 같이 식품 성분의 생리활성 작용에 관한 연구는 최근에 큰 관심의 대상이 되어 왔으나, 전통 기호음료 성분이 갖는 생화학적 기능특성 특히 성인병 중의 하나인 고혈압 억제와 관련이 있는 ACE 저해작용 등의 기능특성에 대해서는 연구된 바가 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 기호 음료의 소재로 이용되고 있거나 앞으로 이용할 가능성이 큰 결명자, 들깨, 대추, 모과, 오미자, 오갈피 및 생강으로부터 추출한 추출물을 silica gel column chromatography, thin layer chromatography 및 유기용매에 의한 분획 등에 의하여 여러가지획분으로 분획하여 ACE 저해작용을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 시료 가운데 결명자, 대추, 들깨는

Corresponding author: Jeong-Ryong Do, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-Dong, Bundang-Ku, Sungnam, Kyeonggi-do 463-420, Korea

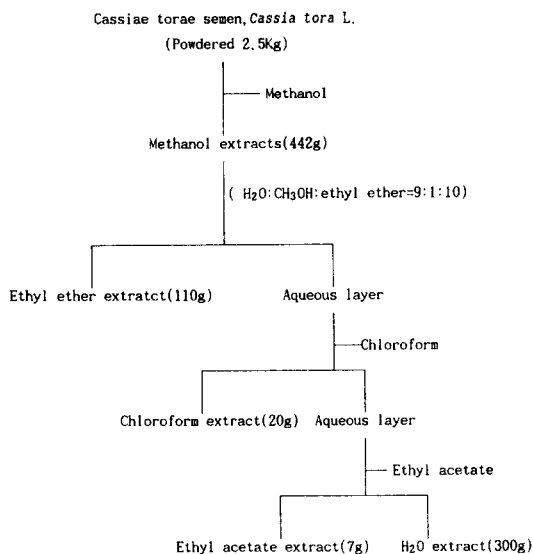


Fig. 1. Fractionation of soluble components of *Cassia tora* L. by various solvents

부산에 소재한 대연시장에서 구입하였으며, 모과, 생강, 오갈피, 오미자는 한약 재료상에서 구입하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 주로 사용한 시약인 angiotensin I 전환 효소 (ACE)는 토끼 허파의 아세톤 추출물(Sigma Co.), 기질은 hippuryl-histidyl-leucine(Sigma Co.)을 사용하였다.

실험방법

시료의 조제 : 결명자, 들깨, 모과, 오미자, 오갈피, 생강은 분쇄한 분말 5g에 증류수 200 ml를 넣고 60°C 에서 진탕시키면서 12시간 추출하였다. 수용성 획분, 에탄올 가용성 획분, 에탄올 침전 획분은 8,000 rpm에서 20분간 원심분리(Hitachi 20PR-5) 하고 동양여지 No.2를 사용하여 감압 여과하여 수용성 획분을 얻었다. 여기에 3배량의 에탄올을 첨가하여 1시간 이상 방치한 후 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 에탄올 가용성 획분과 에탄올 침전 획분으로 나누었다. 에탄올 침전 획분은 100°C 에서 건조하여 시료로 하였으며, 수용성 획분과 에탄올 가용성 획분은 진공동결 건조하여 시료로 하였다.

유기용제 추출에 의한 분획 : 결명자의 메탄올 가용성 획분의 추출과 분획은 Fig. 1에 나타내었다. 즉, 분말화한 결명자 2.5 Kg에 메탄올 10l를 넣어 2회 추출하여 메탄올 추출물을 얻었으며, 여기에 클로로포름, 에칠아세테이트 각각 2l를 사용하여 클로로포름 획분과 에칠아세테이트 획분을 얻었다.

Silica gel column chromatography : 결명자의 메탄올 가용성 획분으로부터 분획한 ethyl ether 획분, chloroform 획분 및 ethyl acetate 획분의 silica gel column chromatography는 이들 획분을 chloroform에 평형화 시킨

silica gel column(2.7×52 cm)에 주입하고 chloroform과 methanol을 사용하여 용출시키고 일정량씩 시험관에 분취하였다.

Thin layer chromatography(TLC) : 단일 성분을 분리시키기 위하여 박층 크로마토그래피를 행하였다. 즉, 시료를 소정의 농도가 되게 메탄올에 녹인후 silica gel plate(silica gel 60F254 precoated 2×10 cm, layer thickness 0.22 mm)에 spot하였다. 그리고, 미리 각각의 전개 용매(chloroform : methanol : acetic acid=40 : 5 : 5, v/v, chloroform : methanol : water=80 : 20 : 1, v/v, 및 40 : 20 : 4, v/v)로 포화시킨 전개조에 spot한 TLC판을 넣고 전개시켰다. 약 9 cm까지 전개 시킨후 TLC판을 전개소에서 꺼내고 전개용매를 완전히 증발시켰다. 그리고 UV램프로 발색부위를 확인하고 60% 황산용액과 질산은 용액을 분무하여 약 120°C 에서 10~20분간 가열하여 발색시켰다.

Angiotensin I 전환 효소(ACE) 저해작용 : ACE 저해작용의 측정은 Cushman과 Cheung⁽¹⁵⁾의 방법에 따랐다. 즉, 소정농도의 시료 50 μl에 ACE 조효소액 50 μl 및 sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μl를 가한 후 37°C 에서 5분간 preincubation시켰다. 여기에 기질로써 Hippuryl-His-Leu용액(25 mg/2.5 ml sodium borate buffer) 50 μl를 가하여, 다시 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 μl를 가하여 반응을 정지시켰다. (공시험은 시료용액 대신에 증류수 50 μl를 사용하였으며 대조구는 1 N HCl 250 μl를 가한 다음 ACE 조효소액 50 μl를 가하였다). 여기에 ethyl acetate 1.5 ml를 가하여 15초간 vortex한 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상층액 1 ml를 취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 후 증류수 3 ml를 가하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의하여 ACE 저해율로써 나타내었다.

$$ACE\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 시료 첨가구의 흡광도

B : 시료 무첨가구의 흡광도

단, A, B모두 대조구의 흡광도를 제외한 수치임

결 과

결명자, 들깨, 대추, 모과, 오갈피, 오미자 및 생강에서 추출한 수용성획분과 에탄올 침전획분의 ACE 저해작용을 조사하여 Table 1과 2에 나타내었다. 수용성 획분의 ACE 저해작용은 생강>오갈피>오미자>들깨>결명자>모과>대추의 순으로 나타났으며, 에탄올 침전획분의 ACE 저해작용은 생강>오갈피>들깨>결명자>오미자>모과>대추의 순으로 나타났으며, 에탄올 가용성 획분이 에탄올 침전획분보다 ACE 저해작용이 대체로

Table 1. Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition effects of water-soluble fraction obtained from favorite beverage materials

Samples	ACE inhibition ratio,%
Cassiae torae semen, <i>Cassia tora</i> L.	14.2
Perilla semen, <i>Perilla frutescens</i> Brit	16.5
Zizyphi fructus, <i>Zizyphus sativa</i> Gaertner	0
Chaenomelis fructus, <i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	0.5
Schizandrae fructus, <i>Schizandra chinensis</i> Baillon	23.4
Acanthopanax cortex, <i>Acanthopanax sessiliflorum</i> seeman	28.0
Zingiberis rhizoma, <i>Zingiber officinale</i> Rosc	47.9

*The amount of sample used was 500 µg.

Table 2. Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition effects of ethanol-soluble and ethanol-precipitate fraction separated from water-soluble fraction obtained from favorite beverage materials

Samples	ACE inhibition ratio,%	
	Ethanol-solubles	Ethanol-precipitates
Cassiae torae semen, <i>Cassia tora</i> L.	15.6	6.0
Perilla semen, <i>Perilla frutescens</i> Brit	11.1	7.9
Zizyphi fructus, <i>Zizyphus sativa</i> Gaertner	2.6	0
Chaenomelis fructus, <i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	3.8	0
Schizandrae fructus, <i>Schizandra chinensis</i> Baillon	13.8	2.0
Acanthopanax cortex, <i>Acanthopanax sessiliflorum</i> seeman	16.5	9.9
Zingiberis rhizoma, <i>Zingiber officinale</i> Rosc	44.1	12.6

*The amount of sample used was 500 µg.

뛰어난 것을 알 수 있었다(Table 2). 일반 가정에서 음료의 소재로 많이 이용하고 있는 결명자에서 추출한 결명자의 메탄올 가용성 성분을 여러가지 용매로 분획한 후 분획의 ACE 저해작용은 Table 3에 나타나 있듯이, ethyl acetate 획분>ethyl ether 획분>수용성 획분>methanol 획분>chloroform 획분의 순으로 나타났다. 그리고 silica gel column chromatography에 의하여 분리하여 TLC하였을 때 동일한 Rf치를 나타내는 성분을 분리하여 compound A, B, C, D라 하였다. ethyl ether 획분에서 분리한 compound A와 compound B, chloroform 획분에서 분리한 compound C, ethyl ether 획분에서 분리한 compound

Table 3. Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition effects of each solvent extract obtained from methanol soluble fraction of Cassiae torae semen, *Cassia tora* L.

Solvent extract	ACE inhibition ratio,%
Methanol extract	28.6
Ethyl ether extract	34.6
Chloroform extract	16.0
Ethyl acetate extract	43.7
Water extract	31.9

*The amount of sample used was 500 µg.

Table 4. Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition effects of compounds fractionated from Cassiae torae semen, *Cassia tora* L.

Compounds	ACE inhibition ratio,%
Compound A	12.7
Compound B	23.7
Compound C	34.9
Compound D	10.0

*The amount of sample used was 50 µg.

Table 5. Angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibition effects of bradykinin and compound C fractionated from Cassiae torae semen, *Cassia tora* L.

Sample(µg)	ACE inhibition ratio,%	
	Compound C	Bradykinin
10	2.0	15.3
50	20.6	66.3
100	36.7	95.9
150	41.1	98.5

D의 ACE 저해작용은 Table 4에 나타나 있듯이 compound C>compound B>compound D>compound A의 순으로 나타났다. 여기서 가장 효과가 뛰어난 compound C를 사용하여 강력한 ACE 저해제로 알려져 있는 bradykinin과 그 효과를 농도별로 비교하여 Table 5에 나타내었다. 그 결과, compound C의 ACE 저해작용은 bradykinin에 비하여 낮은 것으로 나타났다.

결명자의 메탄올 가용성 성분에서 분리한 compound C의 양은 407 mg이었다. 그리고, compound C는 흑갈 색이고, methanol에 용해하였으나, 물에는 불용성이었다. 알칼리 용액에서는 용해하여 적색으로 변색하였다. spectrophotometer(Shimadzu UV-160)를 사용하여 scanning한 결과 Fig. 2에 나타나 있듯이, compound C의 최대 흡광도는 293 nm와 364 nm로 나타났다. 그리고 결명자에 함유되어 있는 것으로 알려진 rhein과 emodin표품을 사용하여 함께 TLC한 결과(Fig. 3) rhein과 emodin의 Rf치와 일치하지 않았다.

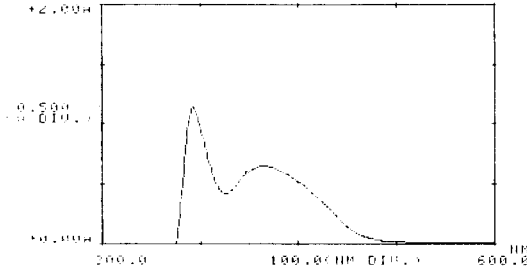


Fig. 2. Absorption spectrum of compound C isolated from *Cassiae torae semen*, *Cassia tora* L. (in CH₃OH)

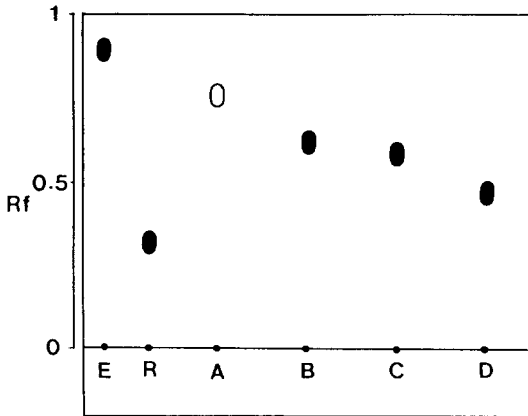


Fig. 3. Thin layer chromatogram on silica gel of compounds isolated from *Cassiae torae semen*, *Cassia tora* L.

C; compound Cm D; compound D, E; emodin, R; rhein
 Developing solvent; CHCl₃-CH₃OH-H₂O(80:20:1, v/v%)
 Black spots are positive for UV and H₂SO₄

불활성형인 angiotensin I의 C 말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시킴으로써 성인병의 하나인 고혈압을 유발하는 angiotensin I 전환효소(ACE)에 대한 저해작용을 살펴보기 위하여, 결명자, 들깨, 대추, 모과, 오미자, 오갈피, 생강 추출물을 사용하여 ACE 저해작용을 조사해 본 결과, 수용성 획분의 저해작용은 생강>오갈피>오미자>들깨>결명자>모과>대추의 순으로 나타났다(Table 1). 原 등⁽¹⁴⁾은 茶成分의 ACE 저해작용을 조사한 결과 茶의 polyphenol 성분인 catechin, epicatechin, galocatechin, epigallocatechin, epicatechingallate, epigallocatechin gallate, free theaflavin, theaflavin monogallate 및 theaflavin digallate가 ACE 저해작용을 나타낸다고 보고하면서, 이들 polyphenol類가 ACE의 활성부위로 생각되는 Zn²⁺를 포함하는 부위, 수소 결합을 하는 부위 및 정전하를 가지는 부위의 3개소에 대해 분자구조적으로 특이하게 작용하여 ACE 저해작용을 나타낸다고 보고 하였다. 본 실험에서는 수용성 획분을 에탄올 가용성 획분과 에탄올

침전 획분으로 분획하여 ACE 저해능을 조사한 결과, 저분자 성분이 주로 존재하는 에탄올 가용성 성분의 ACE 저해작용이 훨씬 뛰어났다(Table 2). 鈴木 등⁽⁴⁾은 식품에 존재하는 ACE 저해인자는 가열조리에도 안정하며 체내에서의 흡수가 용이한 저분자의 물질로서 그 저해작용은 혈압 강하제와 비교하였을 때, 비교적 낮은 활성을 나타낸다고 보고하였다. 그리고, 결명자에서 분리한 compound A, B, C 및 D 가운데, ACE 저해작용이 가장 뛰어난 compound C와 혈압 강하제인 bradykinin과의 ACE 저해작용을 여러가지 농도에서 비교하였을 때, compound C의 저해작용이 비교적 낮은 것으로 나타났다(Table 5). 그러나, 일상 생활에서 섭취하는 식품 성분이라는 점에서 그 유용성이 기대된다.

요 약

전통 기호음료 성분에 의하여 나타나는 기능특성을 조사하기 위한 연구의 일환으로 결명자, 들깨, 대추, 모과, 오미자, 오갈피 및 생강 추출물을 ion-exchange chromatography, 유기용매에 의한 분획, silica gel column chromatography, thin layer chromatography에 의하여 여러 가지 획분으로 분획하여 Angiotensin I 전환효소(ACE) 저해작용을 조사한 결과는 다음과 같다.

기호음료 원료에서 추출한 수용성 획분의 ACE 저해작용은 생강>오갈피>오미자>들깨>결명자>모과>대추의 순으로 나타났다. 일반 가정에서 널리 이용되고 있는 결명자에서 분리한 compound C는 ACE 저해제로 알려져 있는 bradykinin에 비하여 ACE 저해작용이 비교적 낮았다.

문 헌

1. 池本文彦, 岩尾 洋, 山本研二郎: 高血壓の生化學. 化學と生物, 19(8), 482(1981)
2. Manjusri, D. and Richard, L.S.: Pulmonary angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 250(17), 6762 (1975)
3. Horovitz, Z.P.: Angiotensin converting enzyme inhibitors. Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich, p.3 (1981)
4. 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒 照: 食品中のアンジオテンシンI變換酵素阻害能 について. 日本農藝化學會誌, 57 (11), 1143(1983)
5. Maruyama, S. and Suzuki, H.: A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46(5), 1393(1982)
6. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H.: Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 49(5), 1405(1985a)
7. Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., and Suzuki, H.: Angiotensin I-converting

- enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(9), 2557(1987 b)
8. Kohmura, M., Nio, N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E. and Ariyoshi, Y.: Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein. *Agric. Biol. Chem.* **53**(8), 2107(1989)
 9. Kohmura, M., Nio, N. and Ariyoshi, Y.: Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptide fragments of human κ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(3), 835(1990a)
 10. Kohmura, M., Nio, N. and Ariyoshi, Y.: Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptide fragments of various β -caseins. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(4), 1101(1990b)
 11. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S.: Structures and Activity of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors in an α -Zein Hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(5), 1313(1991)
 12. Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(10), 2763(1989b)
 13. 末網邦隆, 篋島克裕: イワシおよびタチウオ筋肉由来間基性ペプチドのアンジオテンシンI 轉換酵素阻害能について. *日水誌*, **52**(11), 1981(1986)
 14. 原征彦, 松崎妙子, 鈴木建夫: 茶成分のアンジオテンシンI 變換酵素阻害能について. *日農化*, **61**(7), 803(1987)
 15. Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637 (1971)

(1993년 7월 1일 접수)