

Cacao Bean Husk로부터 분리한 충치 예방물질의 구조 결정

권 익 부 · 안 봉 전 · *유 주 현 · **이 신 영

롯데 중앙연구소 생물과학연구팀

*연세대학교 식품공학과

**강원대학교 발효공학과

Structure Determination of Anti-plaque Agents for Prevention of Dental Caries from Cacao Bean Husk

IK-Boo Kwon, Bong-Jeun An, *Ju-Hyun Yu and **Shin-Young Lee

Dept. of Biotechnology, Lotte R & D Center

*Dept. of Food Engineering, Yonsei University

**Dept. of Fermentation Engineering, Kangweon National University

ABSTRACT

For an anti-plaque agent, two flavan-3-ols isolated from Theobroma cacao bean husk showed positive reactions with H_2SO_4 -anisaldehyde solution, $FeCl_3$, and were identified as monomeric, dimeric flavan-3-ols in TLC.

They were (-)-epicatechin and procyanidin B-2(epicatechin-(4 β -8)-epicatechin). The structures were established by spectroscopic and chemical methods.

(-)-Epicatechin had moderate inhibitory activity on GTase at concentration of 1.0mM while procyanidin B-2 showed complete inhibition activity at the same concentration. The hydroxyl group of flavan-3-ol was supposed to be the essential element for inhibition on GTase.

서 론

탄닌은 oak gall로부터 피혁 연화성분으로 추출 분리되어 탄닌으로 명명된 후 약용식물 및 차엽의 주요 화합물군으로 알려져 왔다(1,2). 최근 분리 및 기 분석의 발달로 새로운 탄닌 성분의 화학구조 해석 연구와 더불어 약리활성물질로서의 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 중국산 한약재와 일본 녹차류로부터 분리, 구조가 확인된 탄닌 화합물군은 혈압강하(3), 항산화(4), 항균성(5), 항암(6) 및 항에이즈(7) 등의 효과가 보고 되어진 바 있다. 또한 안(8,

9) 등은 Jack fruit 잎과 우롱차로부터 분리한 탄닌 화합물이 충치를 유발하게 하는 glucosyltransferase와 통풍의 원인이 되고 있는 xanthine oxidase 저해능이 있음을 보고 하였다.

전보(제1보)에서 저자 등은 충치예방물질 탐색의 일환으로 초콜렛 공정중 탈갈되어 폐기되고 있는 cacao bean 외피로부터 GTase 저해능을 탐색하였고 저해활성 물질이 탄닌류임을 확인한 바 있다. 본 연구에서는 cacao bean의 외피내에 함유된 각각의 tannin류를 분리하고 화학구조를 밝혔으며 이 화합물의 GTase에 대한 저해 활성효과를 조사 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구의 재료는 가나산 cacao bean 외피이며 시약으로서는 Sephadex LH-20(Pharmacia Co. Sweden), MCI-gel CHP-20(75-15 μ m, Mitusbish chemical Ind. Co. Ltd. Japan), Fuji-gel(Hambai co. Ltd. Japan), Prep-Pak 500/C₁₈(37~75 μ m, Waters, U. S. A)를, glucosyltransferase는 일본 합동주정에서 공급받아 실험에 사용하였다.

기기

본 실험에 사용된 기기는 Infrared spectrum (JASCO IR-700, Japan), NMR(JEOL FX, GX-270, Japan)은 270MHz로, MS(JEOL JMS-PX-300, Japan)는(10⁻⁶~10⁻⁶mmHg)에서 Negative ion FAB-mass spectrum을 이용하여 측정하였고 가속가압은 6~7KV에서 질량분석을 하였다. 또한 Spectrophotometer(Hitachi 200-10, Japan)와 Ultra-sonicator(UI-trasonic Generator US-30, Nissei, Japan)를 사용하였다.

추출 및 분리

Cacao bean husk 외피 10kg을 90% acetone을

가해 실온에서 24시간 침지한 후 원심분리(3,000rpm, 30min)하여 상층액과 침전물을 얻었고 다시 침전물에 90% acetone을 첨가하여 동일한 조건으로 4회 반복 추출하였다. 각각의 상층액을 모아 농축 여과하여 chlorophyll을 제거하고 2 ℓ 로 하였다. 이를 Fig. 1에서와 같이 Sephadex LH-20 column(25.0 \times 150cm)에 loading하고 H₂O : MeOH (1:0 \rightarrow 0:1)을 용출용매로 하여 fraction I, II, III로 분획하였으며 이중 fraction I을 MCI-gel CHP-20, Sephadex LH-20, Fuji-gel, Prep-Pak 500/C₁₈ 등의 각종 column chromatography법으로 compound I 및 II를 분리하였다. 분리중 Sephadex LH-20 column 용출용매는 주로 normal phase인 경우 [EtOH \rightarrow H₂O \rightarrow AcOH(1:0:0 \rightarrow 9:1:1 \rightarrow 8:2:0 \rightarrow 6:4:0 \rightarrow 54:36:0 \rightarrow 36:24:30 \rightarrow 0:1:1)]을 사용하였고 reverse phase type인 경우는 [H₂O \rightarrow MeOH \rightarrow AcOH(1:0:0 \rightarrow 1:1:0 \rightarrow 0:1:0 \rightarrow 1:0:1)]을 사용하였다. MCI-gel CHP-20과 Fuji-gel 및 Prep-Pak 500/C₁₈ column 용출용매는 [H₂O \rightarrow MeOH \rightarrow (1:0 \rightarrow 0:1)] 순으로 gradient로 용출하였고 thin layer chromatography(TLC)에서 탄닌의 종류 및 유무를 확인하면서 반복 정제하였다.

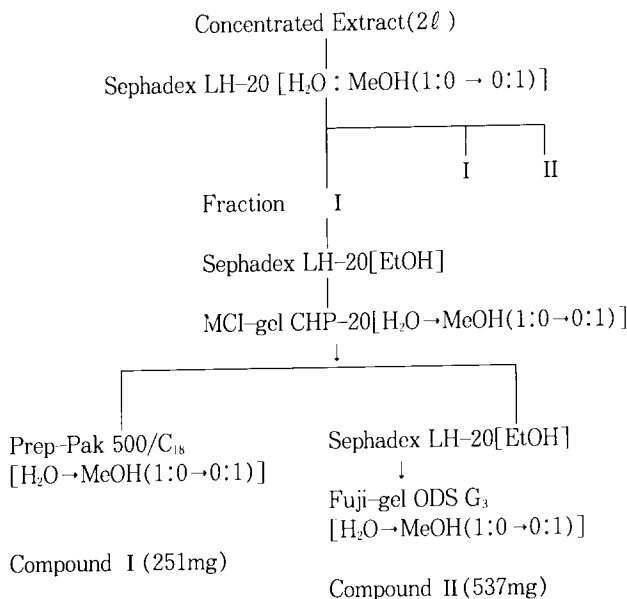


Fig. 1. A procedure for isolation of tannin compounds from cacao bean husk extract.

Glucosyltransferase활성 저해 측정

GTase 저해활성 측정은 분리된 compound I, II를 0.01mM~1.0mM 농도로 조제하고 Endo(10)들의 방법에 의해 측정하였다. 즉 시험관에 기질용액 0.8ml, 효소액 0.02ml를 혼합하여 최종 용량이 1ml로 한 후 30°C 경사에서 37°C 16시간 반응시켰다. 반응후 증류수 3ml를 가해 2회 반복 세척하고 초음파로 분쇄한 후 spectrophotometer로 550nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Compound I, II의 분리

Fig. 1의 과정에 의해 얻어진 compound I과 II는 Fig. 2에서 보여주고 있는 것과 같이 anisaldehyde-H₂SO₄와 FeCl₃ 용액에 각각 갈색 및 청색반응을 하였으므로 flavan-3-ol임을 추정할 수 있었다. 이런 결과는 西岡(11)가 발표한 flavan-3-ol 화합물의 탐색방법에서 flavan-3-ol 화합물은 anisaldehyde와 FeCl₃에 동시에 양성반응을 한다는 결과와 일치하였다. TLC의 R_f값은 西岡(12) 등이 발표한 flavan-3-ol TLC R_f값을 비교시 monomeric과 dimeric에 해당하는 물질로 생각되었다. Sephadex LH-20 column으로 분리시는 40~60% methanol 용액에서 compound I 및 II가 용출되었고 ODS

column으로 분리시 10~20% methanol용액에서 두 화합물이 TLC검정으로 확인되었다. 이러한 결과들은 Sephadex LH-20 column으로 polyphenol류 분리시 저분자 물질 분리에 용이하였다는 Nonaka(13) 등의 결과에 잘 일치하였다.

Compound I, II의 화학구조 및 GTase 저해 영향 화합물(Compound I, II)의 단리

Compound I : Fraction I에서 Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20, Prep-Pak 500/C₁₈로 분리된 것으로 무색침상형(H₂O) 결정을 얻었다.

mp. : 239~240°C, $[\alpha]_D^{25}$: -58.3°C(C=0.6, acetone),

IR(KBr)cm⁻¹ : 3400(OH), 1620, 1580(C=C),

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O):

2.88(1H, dd, J=5, 16Hz, 4-H),

3.10(1H, dd, J=4, 16Hz, 4-H),

4.23(1H, m, H-3),

4.92(1H, s, H-2) 5.96,

6.08(each 1H, d, J=2Hz, 6, 8 H),

6.75(1H, d, J=8Hz, 5'-H),

6.90(1H, dd, J=2, 8Hz, 6'-H),

7.06(1H, d, J=2Hz, 2'-H)

Compound II : Fraction I에서 Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20, Fuji-gel순으로 분리하였다. Compound II는 무정형 분말로써 anisaldehyde-H₂SO₄와 FeCl₃ 용액에 갈색 및 청색반응을 하였다.

$[\alpha]_D^{27}$; +32.1(C=1.0, acetone),

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O):

2.72(1H, dd, J=16, 3Hz, 4'-H),

2.94(1H, dd, J=16, 4Hz, 4'-H), 3.98(1H, brs. 3-H),

4.32(1H, m, 3'-H), 4.70(1H, brs. 4-H),

4.93(1H, brs. 2'-H), 5.09(1H, brs. 2-H),

6.02(3H in total, m, 6, 8, 6'-H),

6.60~7.20(6H in total, m, B, B'-ring H),

FAB-MS; m/z(%)=577[M⁺H]

Compound II의 thiolysis

Fig. 3와 같이 재결정된 시료(compound II) 100mg을 AcOH-EtOH(5ml)에 용해하고 benzylmercaptan(2ml)을 가해 reflux상에서 5시간 반응시켰다. 반응중 생성물은 TLC에서 확인하면서 목적 생성물이 확인되면 반응을 중단하고 감압여과하였다. 이것을 Sephadex LH-20 column(EtOH)로 반복정제하여 compound II a 및 II b를 얻었다.

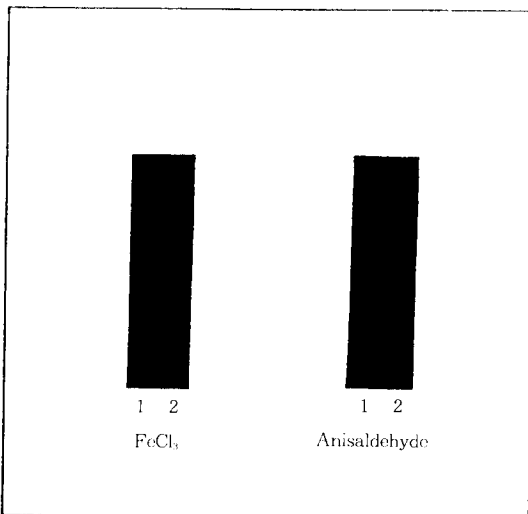


Fig. 2. Thin layer chromatogram of tannins isolated from cacao bean husk.

Solvent; benzn:ethylformic acid:formic acid(2:7:1, v/v/v)

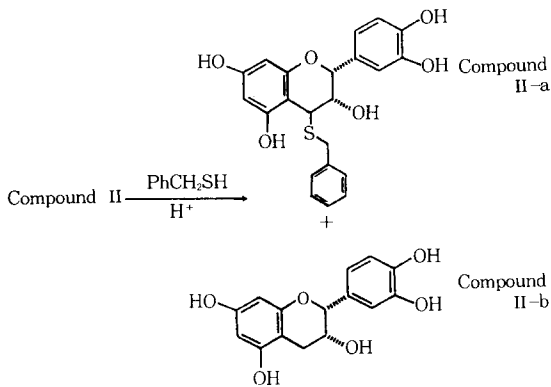


Fig. 3. Scheme for the thiolysis of compound II

Compound II-a: $[\alpha]_D^{25}$; -28°C ($C=0.9$, acetone), $^1\text{H-NMR}$ (acetone- $d_6 + \text{D}_2\text{O}$): 3.96 (1H, m, 3-H), 4.01 (2H, 2. $-\text{SCH}_2^-$), 4.08 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, 6-H), 6.04 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, 8-H), 6.74 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, 6'-H), 6.83 (1H, d, $J=8\text{Hz}$, 5'-H), 7.03 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, 1'-H), 7.16~7.54 (5H in total, m, aromatic H)

Compound II-b: 무색침상형 (H_2O), $[\alpha]_D^{25}$; -58.3°C ($C=0.6$, acetone), mp. 239~240 $^\circ\text{C}$, IR 및 $^1\text{H-NMR}$ 은 compound I의 signal과 일치하였다.

Compound I은 발색반응에서 축합형 탄닌으로 확인되었고 IR spectrum에서 3400 cm^{-1} 의 OH가 1620, 1580 cm^{-1} 에서 aromatic C=C가 관찰되었으며 signal의 형태로 보아 전형적인 catechin류임이 시사되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 2.88ppm의 1H분의 4-H가, 3.10ppm에서 또한 1H분의 4-H, 4.23ppm에서 1H분의 3-H가 확인되었으며 4.92ppm에서 1H분의 2-H signal이 귀속되었고 6.75~6.90ppm 사이에서는 B-ring의 2H분 5', 6'-H가 보였다. Fig. 4는 $^{13}\text{C-NMR}$ 로써 31ppm에 C-4, 68ppm의 C-3, 79ppm은 C-2rk 95~96ppm 사이에서 C-6,8의 탄소가 보였으며 negative FAB-MS에 의해 분자량이 289 $[\text{M-H}]^-$ 확인된 바 (-)epicatechin으로 등장하였다.

Compound II는 역시 anisaldehyde- H_2SO_4 용액 및 FeCl_3 에 갈색 및 청색반응을 하였으므로 축합형 탄닌으로 생각되어졌다. $^1\text{H-NMR}$ 의 5.09ppm의 signal은 flavan-3-ol의 2-H를 암시하므로 이 화합물은 catechin류라 추정하게 되었다. 분자량에서 m/z ; [577] $^-$ 은 flavan-3-ol 화합물 2당체에 해당하

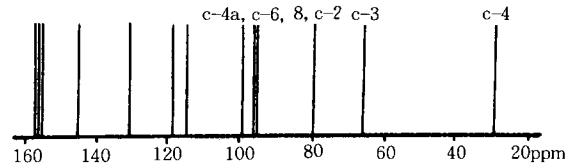


Fig. 4. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound II.

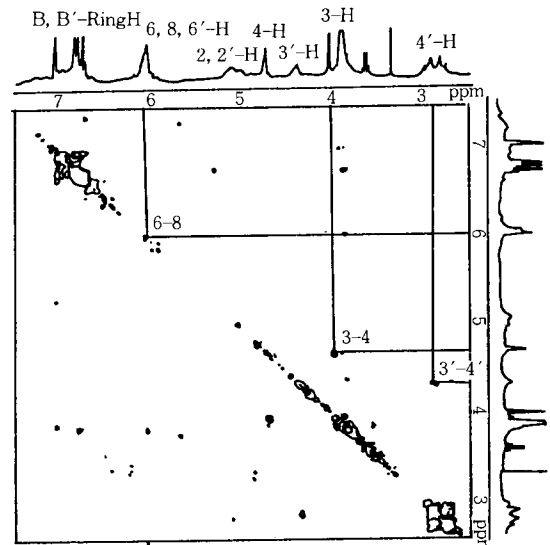


Fig. 5. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum of compound II.

는 것으로 위 결과를 더욱 지지하였다. 이 화합물은 thiolysis 한 결과 compound II-a는 $^1\text{H-NMR}$ 에서 4.01ppm의 2H분의 $-\text{SCH}_2^-$ 가, 7.16~7.54ppm에서 5H분의 aromatic H가 확인되었고 그 외 signal은 compound I과 일치하였으므로 (-)epicatechin-4 β -benzylthioether로 동정하였다. 또한 compound II-b는 $^1\text{H-NMR}$ 이 compound I과 일치하였으므로 (-)epicatechin이었다. 한편 Fig. 5는 compound II의 COSY spectrum로써 proton의 3'-4', 3-4, 6-8가 서로 상관관계가 인정되었으므로 이 화합물은 epicatechin-(4 β -8)-epicatechin으로 결합된 procyanidin B-2로 동정하였다. Compound I, II의 화학구조는 Fig. 6과 같다. 화학구조가 결정된 두 화합물의 GTase에 대한 저해 효과를 살펴본 결과는 Fig. 7과 같다. 이와 같이 축합형 탄닌의 monomer인 compound I은 농도의 증가에 따라 비교적 완만한 GTase 저해를 보였으나 dimer인 compound II는 0.3mM부터 GTase에 대한 저해가 급격히 증가하여 1.0mM에서의 0.D값은 0.092 ± 0 .

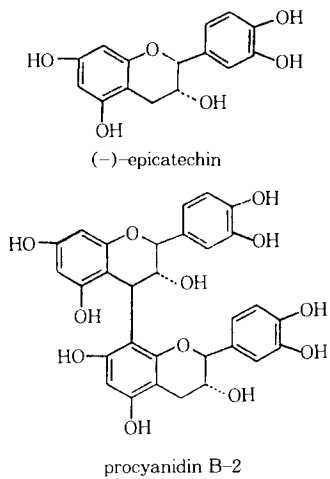


Fig. 6. Structure of the tannins isolated from cacao bean husk.

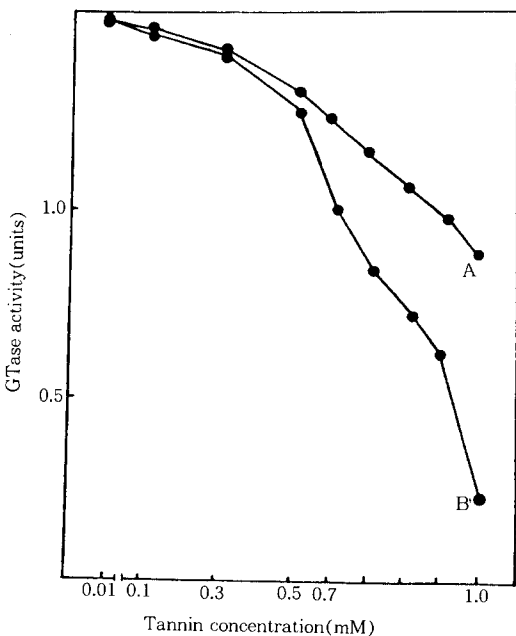


Fig. 7. Effect of the tannins isolated from cacao bean husk on the GTase activity.

A: compound I [(-)-epicatechin]

B: compound II [procyanidin B-2]

015로 거의 완전히 GTase의 활성을 저해함을 나타내었다. 따라서 monomer보다 dimer가 GTase 저해 활성이 높은 것으로 알 수 있었다. 이러한 결과는

안(14) 등이 flavan-3-ol 화합물을 효소저해제로 사용할 때 저분자보다 고분자 flavan-3-ol 화합물이 저해효과가 높다는 결과와 일치하였고, Oquni(15) 등은 polyphenol류를 항암제로 사용할때 hydroxy기가 활성기로서 작용한다고 보고한 사실을 고려할 때 본 연구결과와 유사하였다.

요 약

Cacao bean외피로부터 분리된 물질은 anisaldehyde-H₂SO₄ 및 FeCl₃에 각각 갈색 및 청색반응을 하였고 TLC상에서 monomer 및 dimer의 flavan-3-ol 물질로 확인되었다. 물질의 구조를 NMR로 검정한 결과 compound I 과 II는 각각 (-)-epicatechin과 epicatechin-(4 α -8)-epicatechin의 결합 화합물인 procyanidin B-2이었다. 분리된 두 화합물은 GTase에 대해 높은 저해활성이 있었고 특히 procyanidin B-2는 1.0mM에서 완전히 저해시켰다. 이것은 flavan-3-ol 구조내에 OH기의 증가에 따라 GTase 저해활성도 높아지는 것으로 추정되었다.

참고 문헌

1. A. Sequin and T. White(1957), *J. Sci. Food Agric.*, **8**, 377.
2. O. T. Schmidt and D. M. Schmidt(1952), *Justus Liebig's Ann. Chem.*, **578**(25), 31.
3. T. Matsuzaki and Y. Hara(1985), *Nippon Nogeika-gaku Kaishi*, **59**, 129.
4. K. Kameda, T. Takaku, H. Okuda, Y. Kimura, T. Okuda, T. Hatano, I. Agata and S. Arichi(1987), *J. Nat. Prod.*, **40**, 680.
5. S. Sakanaka, M. J. Kim, M. Taniguchi and T. Yamamoto(1989), *Agric. Biol. Chem.* **53**(9), 2307.
6. J. Muramatsu, M. Fukuyo and Y. Hara (1986), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 613.
7. G. Nonaka, I. Nishioka, E. Kilkuskie and K. H. Lee(1990), *J. Natural Products*, **53**, 587.
8. 안봉전(1991), 한국식품과학회, 한국농학회 1991년도 추계 학술발표회 논문초록집, 22.
9. 안봉전, 김원극, 최장운, 권익부, 최 청(1992), 한국식품과학회 1992년도 춘계 학술발표회 논문 초록집, 28.
10. A. Endo, O. Hayashima and s. Murakawa

- (1983), *J. Antibiotics*, **36**, 203.
11. 西岡五夫, 野中源一郎(1986), *ファルマシア レピコー*, **21**, 27.
 12. 西岡五夫(1986), *化學と生物*, **24**, 428.
 13. G. Nonaka(1989), *Pure & Appl. chem*, **61**(3), 357.
 14. 안봉전, 최장윤, 권익부, 니시오카 이트슈오, 최청(1992), *한국생화학회지*, **25**, 347.
 15. I. Oguni, K. Nasu, S. Yamamoto and T. Nomura(1988), *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1879.