

단백질 glycation 저해효과가 있는 식품소재

김윤숙* · 최희돈 · 최인욱
한국식품연구원

Anti-glycation Activities from Various Agricultural Products

Yoon-Sook Kim*, Hee-Don Choi, and In-Wook Choi
Korea Food Research Institute

Abstract The ethanolic extracts of 83 kinds of agricultural products, including cereals, vegetables, and Chinese herbs, were tested for their inhibitory activities on protein cross-linking using the [¹⁴C]-N-formyl-lysine incorporation method. Most of the extracts inhibited, but some extracts accelerated, the cross-linking of protein. Of those items with relatively high activities, we selected 20 samples to test for activity against AGE formation using the fluorophotometric method. The ethanol extract of buckwheat that was germinated for 1 day (GB-01) was determined to have the highest activity with both methods. The ethanol extract of GB-01 was further fractionated by organic solvents, including chloroform, ethyl acetate, butanol, and water, in order of increasing polarity. The fraction that was extracted with ethyl acetate presented the highest protein glycation inhibitory activity (95.2% inhibition at the 100 µg/mL addition level). Polyphenol content analysis by HPLC showed that the amounts of rutin and quercetin were increased with the separation procedures. Finally, there was a significant relationship between activity and polyphenol content in the partially purified samples (*p* < 0.05).

Key words: anti-glycation activity, agricultural products

서 론

비효소적 반응인 단백질 glycation의 지속적인 일련의 반응에 의한 최종당화산물의 형성은 당뇨병 합병증의 발병의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다(1). 단백질 glycation은 단백질 변성반응의 대표적인 것으로 단백질의 아미노기와 알도즈 당류와의 비효소적 변성과정을 말하며 이 반응이 계속 진행되면 고리화 반응, 분열, 탈수와 산화반응 등을 통하여 최종당화산물(advanced glycation end products; AGE)을 형성한다(2-4).

AGE의 형성은 체내단백질의 물리화학적 성질을 변화시킬 뿐만 아니라 세포내 신호전달과 유전자 발현을 유발하게 되어 결합조직, 수정체, 혈관 및 신경에 영향을 주어 당뇨병 합병증의 발병에 중심적 역할을 하는 것으로 알려졌다(5). 당뇨병 합병증에 있어 이들 AGE의 중요성은 AGE 생성 억제제인 합성치료제로 아미노구아니딘의 투여가 당뇨병 동물 모델들에서 합병증의 발생을 예방할 수 있었다는 보고들로 뒷받침되고 있다(6-9).

AGE 생성 억제제인 합성 아미노구아니딘이 효과적인 glycation 억제제로 알려져 있으나 사람에게 과다, 장기투여하게 되면 독성 문제가 제기될 수 있다(10). 그러므로 본 연구에서는 단백질의 glycation을 저해할 수 있는 활성이 뛰어난 천연물 유래의 소재 검색을 실시하고 소재의 분리 및 부분정제물의 단백질 glycation

저해효과 및 polyphenol 함량과의 관계를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

재료

단백질 glycation 저해효과가 있는 식품소재의 개발을 위하여 본 연구에서 사용된 시료는 Table 1과 같았으며 시료는 서울 경동시장에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 1급 이상 시약을 사용하였다.

추출물의 제조

생약재, 곡류, 채소류, 허브류 등 총 83종의 시료를 분쇄하고 70% ethanol 용액을 가하여 환류냉각관이 연결된 90°C 수욕조에서 2시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 여과한 후 여액을 증발농축기(40°C)를 이용하여 ethanol 부분이 휘발될 때까지 농축시킨 다음 원심분리(8,000×g, 15 min, 4°C)하였다. 원심 분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 모아 동결 건조시킨 후 냉동보관하면서 저해활성 측정용 시료로 사용하였다.

발아 현미와 메밀의 제조는 건조된 현미와 메밀(50 g)을 8시간 실온에서 침지한 후 항온기(28°C, 98%)에서 현미는 3일과 5일 동안, 메밀은 1일, 3일과 5일 동안 발아시키고 30°C 건조기에서 건조시켜 분쇄하고 추출물 제조용 시료로 하였으며 추출물은 앞서 언급한 70% ethanol 추출법을 이용하여 제조하였다.

수정체 단백질의 분리 및 정제

저해활성 측정의 기질로 사용된 수정체 단백질은 소의 안구에서 수정체를 분리하여 20 mM potassium phosphate buffer(수정체

*Corresponding author: Yoon-sook Kim, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Kyonggi-do, 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9281
Fax: 82-31-780-9281
E-mail: kimyus@kfri.re.kr
Received April 2, 2007; accepted June 4, 2007

Table 1. Materials used to screen glycation inhibitory activity (N = 3)

Scientific name	Korean name	Plant part	Inhibition (%)
			AGEs ^{a)}
<i>Canavalia gladiata</i>	작두콩	seeds	0.9 ± 0.02
<i>Dioscorea batatas</i>	마	root	3.0 ± 0.05
<i>Fagopyrum esculentum</i>	발아메밀(1d)	seeds germinated	40.4 ± 0.12
<i>Fagopyrum esculentum</i>	발아메밀(3d)	seeds germinated	10.1 ± 0.05
<i>Fagopyrum esculentum</i>	발아메밀(5d)	seeds germinated	18.7 ± 0.04
<i>Glycine max</i>	날콩가루	seeds	-2.8 ± 0.12
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i>	맥강	seeds	15.9 ± 0.08
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i>	보리	seeds	2.4 ± 0.01
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i>	보리배아	seeds	10.7 ± 0.03
<i>Oryza sativa</i> L.	발아현미(3d)	seeds germinated	0.3 ± 0.04
<i>Oryza sativa</i> L.	발아현미(5d)	seeds germinated	15.5 ± 0.02
<i>Oryza sativa</i> L.	참쌀	seeds	0.0 ± 0.05
<i>Oryza sativa</i> L.	흑향미	seeds	-9.3 ± 0.42
<i>Panicum miliaceum</i>	기장	seeds	0.2 ± 0.06
<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i>	들깨	seed	-9.3 ± 0.23
<i>Phaseolus angularis</i>	팥	seeds	15.3 ± 0.08
<i>Phaseolus radiatus</i>	녹두	seeds	11.3 ± 0.02
<i>Sesamum indicum</i>	참깨	seeds	-4.4 ± 0.51
<i>Setaria italica</i>	차조	seeds	0.0 ± 0.22
<i>Sorghum bicolor</i>	수수	seeds	-6.3 ± 0.31
<i>Zea mays</i>	옥수수	seeds	0.4 ± 0.01
<i>Angelica keiskei</i>	신선초	leaves	-17.1 ± 0.21
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	양배추	leaves	-13.1 ± 0.14
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	케일	leaves	-6.0 ± 0.25
<i>Corchorus olitorius</i> L.	모로헤이아	leaves	0.9 ± 0.02
<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i>	당근	root	4.7 ± 0.06
<i>Lentimus edodes</i>	표고버섯	body	-3.9 ± 0.12
<i>Oenanthe javanica</i>	미나리	stem & leaves	-1.3 ± 0.22
<i>Platycodon grandiflorum</i>	도라지	root	10.4 ± 0.11
<i>Spinacia oleracea</i>	시금치	leaves	-4.3 ± 0.12
<i>Brassica juncea</i>	겨자분	seeds	0.7 ± 0.01
<i>Cucurbita</i> spp.	호박(씨)	seeds	-15.2 ± 0.09
<i>Helianthus annuus</i>	해바라기(씨)	seeds	-8.8 ± 0.11
<i>Acanthopanax seoulense</i>	오가피	bark	-10.7 ± 0.09
<i>Alisma canaliculatum</i>	택사	rhizome	12.1 ± 0.05
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	지모	rhizome	-13.8 ± 0.14
<i>Angelica dahurica</i>	백지(구릿대)	root	17.3 ± 0.21
<i>Aralia contidentialis</i>	땅두릅(독활)	root	14.2 ± 0.23
<i>Astragalus membranaceus</i>	황기	root	12.1 ± 0.05
<i>Belamcanda chinensis</i>	사간	rhizome	33.8 ± 0.21
<i>Bupleurum falcatum</i>	원시호(시호)	root	8.0 ± 0.04
<i>Carthamus tinctorius</i>	홍화씨	seeds	-2.3 ± 0.25

^{a)}AGEs stand for advanced glycation end products.

4개당 buffer 10 mL 비율)를 가한 후 얼음 위에서 30분간 교반하고 상등액을 회수하였다. 이를 균질화한 후 15분간 원심분리(30,000×g, 4°C)하고 상등액을 취한 후 다시 15분간 원심분리하고 상등액을 취하였다. 20 mM potassium phosphate buffer로 4°C에서 dialysis 한 후 동결건조하여 반응용 기질로 사용하였다.

[¹⁴C]-N-포밀-리신의 incorporation을 이용한 교차결합도 측정
Lee(11)의 방법에 의하여 분석하였다. 즉 1 mL의 0.1 M 인산완

충용액(phosphate buffer, pH 7.0)에 5 mg의 수정체 단백질, 당류인 10 mM 트레오즈(threose), 1 mM 디에틸렌트리아민펜타아세트산(diethylene triaminepentaacetic acid, DTPA), 2 μCi의 [¹⁴C]-N-포밀-리신을 포함하는 반응혼합액을 0.2 μm 여과지를 사용하여 주사여과한 후 2 mL의 살균 바이알(cryogenic vial)에 넣은 다음, 37°C 배양기에 넣어 5일 동안 반응시켰다.

반응혼합물을 매일 50 μL씩 3번 채취하여 2.5 cm 지름의 여과지(Whatman)에 각각 점적하여 트리클로로아세트산(trichloroacetic

Table 1. (continued)

Scientific name	Korean name	Plant part	Inhibition (%)
			AGEs
<i>Cassia tora</i>	결명자	seeds	0.9 ± 0.06
<i>Chrysanthemum indicum</i>	감국	flower & leaves	5.4 ± 0.02
<i>Citrus unshiu</i>	진피(귤껍질)	fruit peel	-0.9 ± 0.31
<i>Cnidium officinale</i>	천궁	rhizome	2.5 ± 0.10
<i>Codonopsis lanceolata</i>	사삼(더덕)	root	4.4 ± 0.08
<i>Codonopsis pilosula</i>	만삼	root	0.4 ± 0.05
<i>Cornus officinalis</i>	산수유	fruit flesh	8.4 ± 0.09
<i>Eucommia ulmoides</i>	두충	bark	22.2 ± 0.04
<i>Eugenia aromaticum</i>	정향	flower bud	4.7 ± 0.07
<i>Fritillaria verticillata</i> var. <i>thunbergii</i>	패모(중국패모)	bulb	2.4 ± 0.04
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	감초	root	26.6 ± 0.08
<i>Hovenia dulcis</i>	지구자	fruit	16.8 ± 0.05
<i>Imperata cylindrica</i> var. <i>koenigii</i>	백모근	rhizome	-3.6 ± 0.05
<i>Ledebouriella seseloides</i>	방풍	root	4.8 ± 0.04
<i>Ligusticum acutilobum</i>	당귀(왜당귀)	root	16.4 ± 0.10
<i>Lycium chinense</i>	구기자	fruit	7.0 ± 0.04
<i>Myristica fragrans</i>	육두구	seeds	4.4 ± 0.03
<i>Ostericum koreanum</i>	강활	root	-0.8 ± 0.12
<i>Paeonia lactiflora</i> var. <i>hortensis</i>	작약	root	-19.1 ± 0.21
<i>Pinellia ternata</i>	반하	root	32.2 ± 0.53
<i>Pinus densiflora</i>	솔순	fruit	17.1 ± 0.08
<i>Pinus koraiensis</i>	잣순	fruit	15.5 ± 0.17
<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	등굴레	rhizome	-13.1 ± 0.04
<i>Rehmannia glutinosa</i>	지황	root	-8.9 ± 0.05
<i>Reynoutria elliptica</i>	호장근	root	-8.7 ± 0.32
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	단삼	root	23.1 ± 0.05
Zingiberaceae	초두구	fruit	3.6 ± 0.10
<i>Zizyphus jujuba</i>	산조인	seeds	9.9 ± 0.01
<i>Achillea millefolium</i>	서양톱풀	leaves	0.6 ± 0.01
<i>Citrus bergamia</i>	베르가모트	leaves	15.4 ± 0.08
<i>Laurus nobilis</i>	월계수	leaves	-9.4 ± 0.15
<i>Lavandula angustifolia</i>	라벤더	leaves	17.0 ± 0.10
<i>Matricaria chamomilla</i>	케모마일	flower, leaves	10.4 ± 0.05
<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperita</i>	페퍼민트	leaves	5.6 ± 0.03
<i>Mentha arvensis</i> var. <i>spicata</i>	스피어민트	leaves	1.7 ± 0.04
<i>Nepeta cataria</i>	개박하	leaves	-8.0 ± 0.03
<i>Ocimum basilicum</i>	바질	leaves	6.3 ± 0.07
<i>Pelargonium inquinans</i>	마시멜로	leaves	4.8 ± 0.05
<i>Rosmarinus officinalis</i>	로즈메리	leaves	-10.6 ± 0.41
<i>Salvia officinalis</i>	세이지	flower	16.5 ± 0.02
<i>Thymus vulgaris</i>	타임	leaves	0.8 ± 0.01

acid)으로 세척하였다. 세척한 후 여과지를 완전히 건조한 다음 [¹⁴C]N-포밀-리신의 혼입(incorporation)도를 액체 신틸레이션 계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 측정함으로써 단백질 교차결합도를 분석하였다. 대조군 시료로서 1 mL의 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.0)에 5 mg의 수정체 단백질, 1 mM DTPA, 2 μCi의 [¹⁴C]N-포밀-리신의 반응혼합액을 준비한 후 상기한 방법으로 동일하게 분석하였다.

형광광도계를 이용한 저해활성 측정(12)

1 mL의 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.0)에 5 mg

의 수정체 단백질, 당류인 10 mM 트레오즈(threose) 및 분석시료를 포함하는 반응혼합액을 γ-ray에 살균된 0.2 μm 여과지를 사용하여 주사 여과한 후 살균 바이알(cryogenic vial)에 넣은 다음, 37°C 배양기에 넣어 5일간 반응시켰다. 배양시료에 10% TCA를 2 mL 가하여 원심분리(30,000×g, 15 min)하였다. 원심분리하여 생긴 침전물에 5% TCA(ice cold)를 2 mL씩 두 번 가하여 세척하고 2 mL 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.0)에 용해시켜 그 중 0.2 mL와 증류수 2 mL를 혼합하여 형광광도계(FP450, Jasco, Tokyo, Japan)을 이용하여 350 nm(excitation)과 425 nm(emission)에서 측정하였다. 대조군 시료는 1 mL의 0.1 M 인산완

충용액(phosphate buffer, pH 7.0)에 5 mg의 수정체 단백질 등 반응 혼합액을 준비한 후 상기한 방법대로 동일하게 분석하였다.

용매 분획에 의한 활성물질의 분리

70% ethanol로 위의 추출방법으로 추출하여 얻은 시료의 농축물 10 mL에 chloroform 40 mL씩 2회 혼합, 분획하여 chloroform fraction을 얻고 나머지 부분에 다시 ethyl acetate, butanol, 및 water를 40 mL씩 2회 혼합하여 계속 극성이 증가하는 순으로 계속 분획하여 ethyl acetate fraction, butanol fraction, 및 water fraction을 얻었다. 각각의 용매 fraction을 증발농축기를 이용, 용매를 제거하여 농축물을 얻어 활성 측정 및 polyphenol 화합물 측정용의 시료로 사용하였다.

단백질 glycation 저해활성물질 중의 polyphenol 화합물 분석

시료의 polyphenol 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 시료를 메탄올로 녹인 후 정용하여 0.45 µm nylon filter로 여과한 것을 HPLC로 분석하였으며 이때 분석조건은 Table 2와 같았다.

결과 및 고찰

[¹⁴C]-N-포밀-리신의 incorporation를 이용한 소재의 단백질 교차결합 저해활성

생약재, 곡류, 버섯류, 허브류 등 총 83종 시료의 ethanol 추출물에 대한 단백질 glycation 저해활성으로 분석하였다. [¹⁴C]-N-포밀-리신의 incorporation을 이용한 방법(11)으로 단백질 교차결합

도를 측정하였다. 유효농도결정을 위하여 각 농도별(10 ng, 1 µg, 100 µg, 10 mg)로 활성을 측정한 결과, 100 µg 수준의 첨가가 대상이 된 대부분의 시료에서 활성의 재현성 있는 결과를 보여 이후 단백질 교차결합도 측정시 추출물의 첨가 수준으로 결정하였다. 대부분의 추출물이 단백질 교차결합 저해활성을 나타내었으나 작약 등 26종은 단백질의 교차결합을 증가시킴으로서 단백질 glycation의 형성을 촉진하는 결과를 나타내었다. 시료군중 단백질의 교차결합 증가에 의한 단백질 glycation의 형성을 촉진 효과가 가장 두드러진 군은 채소류였으며 가장 적은 군은 향신료 군이었다. 시료 중 100 µg/mL의 수준에서 단백질 교차결합 형성에 저해활성을 보인 시료는 59종으로 그 중 가장 높은 활성을 보인 시료는 1일 발아시킨 메밀로 40.4%의 저해활성을 나타내었다(Table 1). 사간, 반하, 감초, 단삼, 백지와 술순 등 생약재들이 그 뒤를 이어 높은 단백질 교차결합 형성 저해활성을 나타내어 생약재들이 좋은 소재가 됨을 확인할 수 있었다. 또한 3일간 및 5일간 발아된 메밀 및 발아현미도 다른 곡류에 비하여 비교적 높은 저해활성을 보여 발아된 곡류의 저해효과가 다른 소재에 비하여 활성이 뛰어난 것을 알 수 있었다. 위의 결과로부터 발아 과정 중 배아의 생리적 변화가 단백질 교차결합 저해물질의 생산을 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

형광물질 분석법을 이용한 AGE 형성 억제 효과

Fig. 1은 [¹⁴C]-N-포밀-리신의 incorporation을 이용한 단백질 교차결합도 측정에서 높은 저해 활성을 보인 시료를 활성의 크기에 따라 순서대로 20종을 선택하여 그 에탄올 추출물의 단백질

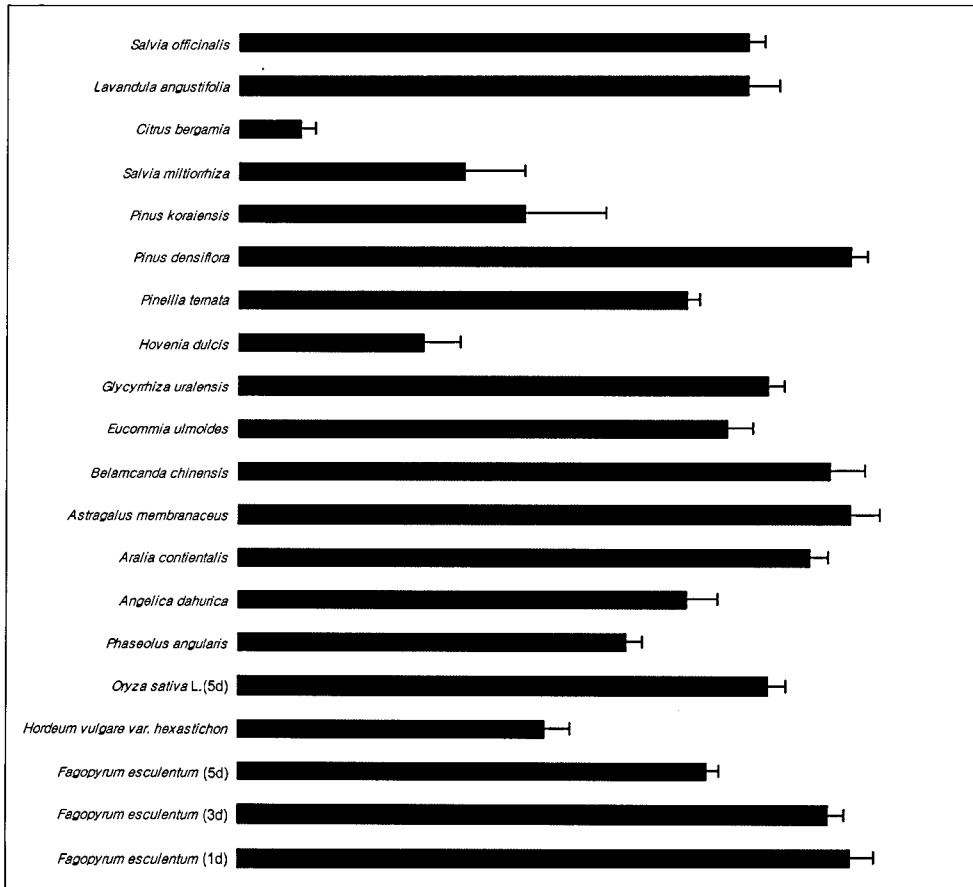


Fig. 1. Inhibitory activity (%) of materials on the formation of AGE (by fluorophotometric method) (N = 3).

Table 2. Operation conditions of HPLC for polyphenol compounds

Instrument	Jasco PU-980 Pump Jasco 851-AS sampler Jasco 807-IT Integrator (Japan) Jasco UV-975
Column	μ Bondapak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Flow rate	0.7 mL/min
Mobile phase	0.05% phosphoric acid/methanol
Injection volume	20 μ L

glycation 저해활성을 AGE의 형광성에 기초한 분석법을 이용하여 확인한 결과이다. 대부분의 추출물이 높은 저해활성을 나타내었으며 단백질 교차결합 저해활성이 가장 높은 발아메밀(1일)이 AGE형성억제 효과도 83.3%로 가장 높았다. 또한 발아메밀(3일)과 술순, 사간의 추출물도 83.3%의 저해활성을 나타내어 단백질 교차결합 저해 효과와 같은 경향을 보였으나 단백질 교차결합 저해활성이 높지 않았던 황기의 추출물이 AGE형성 저해 활성에서는 83.3%의 저해활성을 보여 단백질 교차결합 저해효과 결과와는 다른 양상을 보였다. 단백질 교차결합 저해활성과 AGE형성 저해활성의 결과를 종합하였을 때 발아메밀(1일)이 가장 탁월한 단백질 glycation 저해효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 단백질 glycation 반응이 진행되는 동안 단백질의 교차결합 정도를 예측 하기 위하여 2가지의 분석방법을 사용하였다. 즉 활성의 1차 검색에 사용한 [¹⁴C]-N-포밀-리신의 incorporation을 이용한 단백질 교차결합 저해활성 측정방법은 단백질의 glycation 반응이 진행됨에 따라 형성되는 단백질의 교차결합 정도를 화학적으로 합성한 ¹⁴C으로 균일하게 표식된 N-포밀-리신으로 정확하게 정량화하는 방법으로 amino-carbonyl 결합에 참여하지 않는 리신의 α 위치에 있는 아미노기를 포밀기(-CHO)로 막은 N-포밀-리신을 제조하여 이 기질이 교차 결합될 때 교차 결합된 [¹⁴C]-N-포밀-리신의 혼입 정도에 따라 정량하는 방법으로, 교차 결합도를 측정하는 방법이며 2차 검증에 이용한 형광분석법은 형광성을 가지는 단백질 glycation의 종말산물의 함량을 측정하는 방법을 사용하였다. 그러나 지금까지 단백질 교차결합 측정방법사이의 상관관계는 정립되어 있지 않다. 따라서 일부 시료에서는 두 가지의 분석방법의 결과 사이에 차이를 보인 것으로 생각되나 대부분의 시료에서는 비슷한 경향을 나타냄을 알 수 있어 차후 연구에서도 교차결합의 측정에는 두 가지 이상의 방법을 병행하는 것이 추천된다.

부분정제물질의 단백질 glycation 저해활성

발아 메밀의 에탄올 추출물의 농축액을 용매의 극성이 증가하는 순서(chloroform, ethyl acetate, butanol, water)로 추출 분획하고, 얻은 각 분획의 AGE 형성 저해활성을 형광물질 분석법으로 측정된 결과는 Table 3과 같았다.

최종농도가 100 μ g/mL이 되도록 반응계에 첨가하였을 때 ethyl acetate 분획이 95.2%의 저해활성을 보여 가장 높은 저해효과를 나타내었으며, butanol분획에서도 78.2%의 저해활성을 보여 비교적 높은 활성을 나타내었다. 이는 발아메밀의 70% ethanol 추출물이 83.3%의 저해활성을 보인 것과 비교하였을 때 ethyl acetate 분획의 저해활성은 15% 증가한 반면, butanol은 5.1% 감소한 결과이다. 그러나 처음 얻은 chloroform 분획의 저해활성은 42.7%, 물 분획의 저해활성이 21.5%로, ethanol 추출물의 활성에 비하여 매우 낮은 활성을 보여 chloroform 및 물을 이용한 분획이 활성

Table 3. Inhibitory effects of fractions of sprouted buckwheat extracts with different solvents on the formation of advanced glycation end products (N = 3)

Fractions	Amount added (μ g/mL)	Inhibition (%)
70% Ethanol extract	100	83.3 \pm 3.50
Chloroform	100	42.7 \pm 0.21
Ethyl acetate	100	95.2 \pm 1.23
Butanol	100	78.2 \pm 0.94
Water	100	21.5 \pm 0.45
Aminoguanidine	1,000	51.0 \pm 0.21

Table 4. Rutin and quercetin contents of fractions of sprouted buckwheat extracts with different solvents

Fractions	Contents (mg/100 g)	
	Rutin	Quercetin
70% Ethanol extract	58.7 \pm 3.2 ^a	477.9 \pm 13.5
Chloroform	66.4 \pm 2.5	21.6 \pm 2.5
Ethyl acetate	390.4 \pm 4.3	245.0 \pm 6.5
Butanol	2.5 \pm 1.2	194.7 \pm 11.1
Water	trace	trace

^aData are the average of duplicates determined by HPLC method.

의 본체에 대한 분리방법으로 효과적이지 않음을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 발아메밀 에탄올 추출물 중 활성의 본체가 되는 물질은 약한 극성을 나타내는 물질들일 것으로 추정되었다.

합성 AGE 생성억제제인 aminoguanidine은 1,000 μ g/mL 첨가수준에서 51%의 저해활성을 보여 본 연구의 소재인 발아메밀의 저해활성이 aminoguanidine에 비해 월등한 효과가 있음이 간접적으로 확인할 수 있었다. 이는 발아메밀의 70% ethanol 추출물이 83.3%의 저해활성을 가진 것을 고려할 때 이후의 정제과정을 생략하더라도 단백질 glycation 저해활성을 가지는 소재로서의 가능성을 충분히 갖춘 것으로 사료되었다.

부분정제 물질의 polyphenol 화합물 함량

용매분획을 통하여 활성의 본체가 약한 극성을 가지는 물질일 것으로 추정되므로 좀 더 활성의 본체에 접근하여 활성과 본체 추출물질과의 상관성을 구명하기 위하여, 메밀에 존재하는 것으로 알려진 polyphenol 화합물인 rutin과 quercetin(13-15)의 각 분획별 함량을 분석하여 활성과의 그 상관성을 살펴보고자 하였다.

발아메밀의 추출물을 용매의 극성이 증가하는 chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water의 순서로 추출, 분획하여 얻은 각 분획의 rutin과 quercetin 함량은 Table 4와 같았다. Ethyl acetate 분획의 rutin과 quercetin 함량은 각각 390.4 mg%와 245.0 mg%로 다른 용매를 이용한 분획보다 월등히 높았다. 이는 chloroform 분획의 rutin 함량(66.4 mg%)의 5.9배, quercetin 함량(21.6 mg%)의 11.3배가 높은 결과로 이는 물질이 chloroform과 같은 비극성 용매에서보다는 ethyl acetate와 같은 약한 극성 용매에서 용출되기 쉬운 성분이기 때문인 것으로 생각되었다. Butanol 분획은 rutin 함량은 적었으나 quercetin 함량은 194.7 mg%로 ethyl acetate 분획의 함량과 큰 차이를 보이지 않아 ethyl acetate 분획 후 잔존한 quercetin이 butanol과의 분획에서 용출된 것으로 생각된다. 반면 발아 메밀추출물의 물 분획에서는 rutin과 quercetin은 거의 검출되지 않아 이미 약한 극성을 가진 용매들에 의하여 대부분 분

문 헌

Table 5. Correlation coefficients for polyphenol contents and AGE formation inhibitory activities of sprouted buckwheat extracts

	Content		
	Rutin	Quercetin	Rutin & Quercetin
Inhibition activity	0.6189	0.6387	0.7279*

*Mean significant at $p < 0.05$ level.

확되어 잔존량이 적은 것으로 결론할 수 있었다. Table 5는 단백질 glycation 저해활성과 polyphenol 화합물 함량과의 상관관계를 나타낸 것으로 저해활성은 rutin 또는 quercetin 단일 물질의 함량 보다는 이 두 물질 함량의 합과 더 높은 상관관계를 나타내는 것으로 조사되었다. Quercetin과 rutin의 순수 표준물질이 1,000 µg/mL 첨가수준에서 각각 48.5% 및 53.1%의 저해활성을 보인 것에 비하여 본 연구의 소재인 발아메밀 추출물의 저해활성이 월등한 효과를 나타낸 것은 식물체에 존재하는 미지의 synergist 작용을 하는 물질로 인한 것으로 판단할 수 있다. 이 들 물질들은 활성이 높았던 추출물을 정제하는 과정에서 그 활성이 저하되는 원인이 되기도 한다.

Morimitsu 등(16)은 flavonoids의 AGEs 형성 저해활성을 형광 분광법을 사용하여 검토하였으며, 결과로 flavonoids가 aminocarbonyl 반응의 초기와 말기 모두를 억제한다는 것을 발견하였다. 최근 일부 합성 항산화제들이 동물 실험결과 독성이 있는 것으로 밝혀져(17), 천연물을 이용한 안전한 제품 생산에 관심이 고조되고 있다(18). 단백질 glycation을 억제하는 합성 첨가제로 알려진 aminoguanidine이 비록 무독성으로 간주되지만(LD₅₀ = 1,800 mg/kg in rodents) 최근의 연구들은 높은 dose의 aminoguanidine은 과산화수소를 생성하고 catalase를 저해하여 장기적 적용은 catalase의 저해에 관련된 부작용(acatalasaemia)을 촉진할 수 있어(10) 그 사용에 제한 요인으로 보고하고 있다. 반면, rutin은 식물에 존재하는 천연 물질이며 비교적 물에 용해도가 낮아, 식품의 조리 가공 시에도(19,20) 그 손실량이 적어 rutin의 함량을 증가시킨 발아 메밀은 안전하고 효과적인 단백질 glycation 저해효과를 가진 우수한 당뇨병합병증 예방 식품소재로서의 개발 가능성이 크다.

요 약

식품소재의 단백질 glycation 저해효과를 조사하기 위하여 곡류, 채소류 및 생약재 등 83종 에탄올 추출물에 대한 단백질 가교결합 저해효과를 [¹⁴C]-N-formyl-lysine incorporation method를 이용하여 측정하였다. 대부분의 추출물에서 저해효과가 나타났으나 일부 추출물은 단백질의 가교를 촉진하는 것으로 나타났다. 상대적으로 높은 활성을 나타낸 시료 중 20개를 선별하여 형광 광도법을 이용한 AGE형성 억제능을 조사한 결과, 1일 발아한 메밀의 추출물(GB-1)이 가장 높은 저해활성을 가지는 것으로 나타났다.

차후 GB-01은 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 분획되었으며 그 중 에틸아세테이트 분획이 가장 높은 단백질 glycation 저해활성(95.2% inhibitory activity at 100 µg/mL addition level)을 보였다. HPLC를 이용한 폴리페놀 분석결과 발아 및 추출, 분획과정을 거친 메밀의 아세테이트 분획은 rutin 및 quercetin 함량이 상당히 증가한 것으로 나타나서 부분정제물의 rutin 및 quercetin 함량과 저해활성사이에 높은 상관성을 나타내었다.

- Horiuchi S, Araki N, Moino Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* 266: 7329-7332 (1991)
- Brownlee M, Advanced glycation end products in diabetic complications. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 3: 291-297 (1996)
- Cohen MP, Urdaniva E, Surma M, Wu VY. Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 765-769 (1980)
- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus: I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* 37: 586-600 (1998)
- Song JY, Ihm SH, Suh JY, Cho YJ, Yoo HJ, Paril SW, Ihm JH. Effect of advanced glycation end products on rat aortic vascular smooth muscle cells. *Korean J. Diabetes* 26: 91-99 (2002)
- Taguchi T, Dugiura M, Humada Y, Miwa I. Inhibition of advanced protein glycation by a Schiff base between amin guanidine and pyridoxal. *Eur. J. Pharmacol.* 378: 283-289 (1999)
- Soules-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 40: 1328-1335 (1991)
- Ellis EN, Good BH. Prevention of glomerular basement membrane thickening by aminoguanidine in experimental diabetes mellitus. *Metabolism* 40: 1016-1019 (1991)
- Cameron NE, Cotter MA, Dines K, Love A. Effect of aminoguanidine on peripheral nerve function: an polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 35: 946-950 (1992)
- Ou P, Wolff SP. Aminoguanidine: a drug proposed for the prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1139-1144 (1993)
- Lee KW. Method for the preparation of N-formyl lysine and the analysis of glycation induced-protein crosslinking assay thereby. KR patent No. 0377336 (2002)
- Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agr. Food Chem.* 48: 180-185 (2000)
- Ohara J, Ohinata H, Muramatsu N, Matsushashi T, Oike T. Determination of rutin in buckwheat foods by high performance liquid chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gak.* 36: 114-119 (1989)
- Mukoda T, Sun B, Ishiguro A. Antioxidant activities of buckwheat hull extract toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 209-213 (2001)
- Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharm.* 72: 35-42 (2000)
- Morimitsu Y, Yoshida K, Esaki S, Hirota A. Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus Vulgaris*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 2018-2021 (1995)
- Ford SM, Hook JB, Bond JT. The effects of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on renal function in the rat. II. Effects on organic acid and base transport. *Food Cosmet. Toxicol.* 18: 21-26 (1980)
- Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 44: 131-135 (1996)
- Marshall HG, Pomeranz Y, Chapter G. In: Buckwheat description, breeding, production, and utilization. Volume V. p. 157. *Advances in Cereal and Technology*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA (1982)
- Li SQ, Zhang QH. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Cri. Rev. Food Sci.* 41: 451-464 (2001)