

안개나무 가지 추출물로부터 분리한 α -glucosidase 저해활성물질

차미란^{1,2} · 박지희¹ · 최연희¹ · 최춘환^{1,2} · 홍경식¹ · 최상운¹ · 김영섭¹ · 김영균³ · 김영호^{2*} · 유시용^{1*}
¹한국화학연구원, ²충남대학교 약학대학, ³국민대학교 삼림과학대학

Alpha-glucosidase Inhibitors from the Branches Extract of *Cotinus coggygia*

Mi-Ran Cha^{1,2}, Jee Hee Park¹, Yeon Hee Choi¹, Chun Whan Choi^{1,2}, Kyung Sik Hong¹, Sang Un Choi¹,
Young Sup Kim¹, Young-Kyoon Kim³, Young Ho Kim^{2*} and Shi Yong Ryu^{1*}

¹Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343, Korea
²College of Pharmacy Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
³College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

Abstract – The ethanol (EtOH) extract of the branches of *Cotinus coggygia* (Anacardiaceae) exhibited a significant inhibition on the yeast α -glucosidase, one of the key enzymes related with diabetes mellitus, in a dose dependent manner, *in vitro*. The intensive phytochemical survey of the EtOH extract of the species by way of bioactivity-guided fractionation resulted in the isolation of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose (**1**) as an active principle responsible for the inhibition on α -glucosidase, together with two related components **2** and **3**. Compound **1** demonstrated a strong inhibition on the yeast α -glucosidase, *in vitro* and IC₅₀ value was calculated as 0.96 mg/ml, when that of a reference drug, acarbose was estimated as 5.3 mg/ml. On the other hand, other related constituents of the species, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose (**2**) and gallic acid (**3**) were exhibited relatively poor inhibition upon the yeast α -glucosidase, respectively.

Key words – *Cotinus coggygia*, α -glucosidase, pentagalloylglucose, tannin

당뇨병은 고혈당 상태가 오랜 시간 지속됨에 따라 뇌중풍, 심근경색, 협심증, 시신경손상, 족부궤양 등 만성합병증이 발생하게 되는 대사성질환으로서 현재 우리나라 인구의 약 10%가 이 질병을 앓고 있으며, 그 발병률 또한 급격히 증가하고 있는 추세이다.^{1,2)} 따라서 혈당조절은 당뇨병으로 인한 급성 및 만성 합병증 발생을 예방 하거나 지연시킬 수 최선의 방법으로 알려져 있으며 만성당뇨병 환자의 경우 보다 적극적인 혈당 조절이 필요하다. 특히 인슐린 분비의 기능이 비정상적으로 저하되어있는 인슐린 비의존성 당뇨병(제 2형 당뇨병) 환자의 경우, 식사 후 췌장에서 인슐린 분비 능력이 저하되고, 말초조직의 인슐린 감수성이 약화되어 혈당이 급격히 상승하는 것에 대한 조절의 필요하다.³⁻⁵⁾ 현재 임상에서 쓰이는 경구용 혈당강하제로는 인슐린 분비를 촉진하는 sulfonylurea와 주로 간에서 당 생성을 억제함으로써 혈당강하 효과를 나타내는 biguanide계 (metformin)

약물, 소장에서 탄수화물의 소화를 억제하는 α -glucosidase 저해제 (acarbose, voglibose, miglitol) 등이 있고, 지방조직이나 근육 등과 같은 말초조직에서의 인슐린 저항성을 개선시키는 thiazolidinedione계 (troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone) 및 non-sulfonylurea계 인슐린 분비촉진제로서 K-ATP차단으로 인슐린 분비를 촉진하는 meglitinide계열인 repaglinide (prandine, novonorm)이 잘 알려져 있다.⁶⁾ α -Glucosidase 저해제는 소장 점막의 brush border에 분포하고 있는 탄수화물 소화효소 즉 maltose, sucrose, glucoamylase 등 각종 α -glucosidase의 효소활성을 저해함으로써 다당류가 단당류로 분해되는 과정을 억제하여, 식후 과도한 혈당 상승을 지연시키는 효과를 나타내게 된다.^{7,8)}

현재 α -glucosidase 저해제로는 acarbose, voglibose 등이 임상에서 널리 사용되고 있지만, 이러한 약물들은 공통적으로 복부팽만, 설사 등의 위장 장애와 같은 부작용을 야기하고 있는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 따라서 이러한 기존 약제들의 문제점들을 극복하기 위하여 새로운 α -glucosidase 저해 물질을 찾는 연구들이 꾸준히 진행되고 있다.

*교신저자 (E-mail): syryu@kricr.re.kr, yhk@cnu.ac.kr
(Tel): 042-860-7163, 042-821-5933

한편 저자 등은 400 여종의 식물추출물을 대상으로 α -glucosidase 저해 활성을 검색하여 본 결과, 안개나무 가지의 에탄올 추출물을 비롯한 40 여종의 식물추출물들이 우수한 α -glucosidase 저해효과를 나타냄을 알 수 있었다.

안개나무 (*Cotinus coggygria* Scop.)는 옷나무과 (Anacardiaceae)에 속하는 낙엽활엽관목으로서 남해안을 비롯한 우리나라 각지에 자생 혹은 식재되어 있는 고급 화목류로서 약재로 사용된 문헌적 근거는 없으나 최근 약리활성에 대한 연구로 항산화활성, 간염억제 활성 등이 일부 보고되어 있다.¹⁰⁻¹²⁾

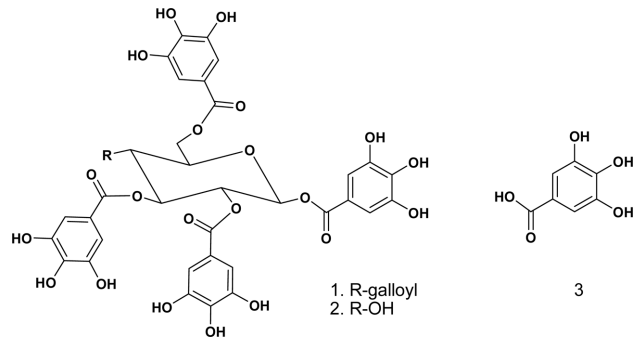
저자 등은 여러 식물 추출물들의 α -glucosidase 저해 활성을 탐색하던 중 안개나무 가지의 에탄올 추출물이 대조약물로 사용한 acarbose에 비하여 월등한 효소저해활성을 나타냄에 따라, 안개나무 가지추출물에 함유된 활성물질을 분리 정제하기 위하여 *in vitro* α -glucosidase 저해 활성을 지표로 하여 활성유도 분획법 (bioactivity-guided fractionation)에 따라 안개나무 가지 추출물의 분리, 정제를 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 시료는 2007년 8월경 한국화학연구원 원내에 자생하고 있는 안개나무의 가지를 채취하여 음건한 후 실험에 사용하였으며, voucher specimen은 한국화학연구원에 보관되어 있다.

기기 및 시약 - 본 실험에 사용된 시약은 모두 특급(GR) 및 1급 시약을 사용하였으며, NMR spectra는 Bruker의 AM-300과 AMX 500을 이용하여 측정하였다. Column chromatography는 silica-gel (230-400 mesh, merck)을 사용하였고, TLC는 Kiesel gel 60 F254 (0.25 mm, Merck)을 사용하였다.

α -glucosidase 효소저해 활성 - α -Glucosidase inhibition assay 방법은 Watanabe의 방법¹³⁾을 이용하였으며, 효소는 효모로부터 얻어진 α -glucosidase (Sigma 9001-42-7, E.C 3.2.1.20)를 사용하였고, 기질은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Fluka, BioChemika)를 사용하였다. α -Glucosidase는 0.2% BSA와 0.02% NaN₃가 포함된 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 0.7 μ m가 되도록 녹여서 효소 용액으로 사용하였고, *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside는 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 5 mM이 되게 녹여서 기질 용액으로 사용하였다. DMSO에 녹인 sample을 microplate에 10 μ l씩 loading하고, 대조군에는 DMSO를 10 μ l씩 처리하였다. Sample을 loading한 microplate에 효소 용액을 50 μ l씩 첨가하여 섞어 주고, 5분 동안 실온에서 incubation 시킨 후에 microplate reader (BIO-RAD, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 다음으로 기질 용액을 50 μ l씩 첨가하고 5분 동안 실온에서 incubation 시킨 후에 405 nm에서 흡광도



를 측정하였다. 기질 첨가 후 변화된 흡광도의 차이로부터 효소 저해율을 산출하였다. 각 실험은 3회 반복 수행하였으며 각 실험치의 평균치를 구하였다.

추출 및 분리 - 잘 건조된 안개나무 가지 (1 kg)를 EtOH에 7일간 냉침 시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 EtOH extract 98 g을 얻었다. 이를 증류수 2 L에 현탁시킨 후 동량의 methylenechloride (MC), ethylacetate (EtOAc) 및 *n*-Butanol (*n*-BuOH)로 단계적으로 추출하여 MC 분획물 17 g, EtOAc 분획물 40 g, *n*-BuOH 분획물 14 g 및 잔류물층 25 g을 각각 얻었다. EtOAc 분획물 40 g을 용출용매 MC: MeOH: H₂O = 200: 5: 1~10: 5: 1로 silica-gel (230-400 mesh, 800 g) column (ϕ =5.0 \times 100 cm) chromatography를 실시하여 총 6개의 분획 Fr. 1 (0.5 g), Fr. 2 (15 g), Fr. 3 (17 g), Fr. 4 (4.5 g), Fr. 5 (10 g) 및 Fr. 6 (1 g)으로 나누었다. 그 중 Fr. 5 (10 g)를 다시 EtOAc: EtOH: H₂O = 80: 5: 4~15: 5: 4의 용매조건으로 silica-gel column chromatography를 실시하여 Fr. 5a (8.5 g)와 Fr. 5b (410 mg) 및 Fr. 5c (800 mg)로 나누었고, 이 중 Fr. 5b에서 화합물 1을 얻었다.

화합물 1 (1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose) - Pale yellow powder; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.13, 7.07, 7.00, 6.97 and 6.92 (each 2H, s, Gal H-2,6), 6.26 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, Glc H-1), 5.93 (1H, t, *J* = 9.7 Hz, Glc H-4), 5.63 (1H, t, *J* = 9.7 Hz, Glc H-3), 5.58 (1H, dd, *J* = 9.7, 8.3 Hz, Glc H-2), 4.53 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, Glc H-6), 4.39 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, Glc H-5); ¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 167.9, 167.3, 167.0, 166.9, 166.2, 146.6, 146.5, 146.4, 146.4, 146.3, 140.8, 140.3, 140.2, 140.1, 140.0, 139.9, 121.1, 120.4, 120.2, 120.2, 119.7, 110.6, 110.5, 110.4, 110.4, 110.3, 93.8 (Glc C-1), 74.4 (Glc C-5), 74.1 (Glc C-3), 72.2 (Glc C-2), 69.8 (Glc C-4), 63.1 (Glc C-6).

결과 및 고찰

갈근, 괴화 등 150 종의 생약재를 포함하여 총 420종의

식물추출물을 대상으로 yeast α -glucosidase 저해 활성을 검색하여 본 결과, 안개나무 가지 에탄올 추출물을 비롯한 40여종의 식물추출물들이 우수한 α -glucosidase 저해효과를 나타냄을 알 수 있었다.

즉 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 기질로 사용한 *in vitro* yeast α -glucosidase (Sigma 9001-42-7, E.C 3.2.1.20) 저해효과 검색실험¹³⁾ 결과, 안개나무 가지의 에탄올 추출물은 농도의존적으로 α -glucosidase 활성을 저해하였으며, 10 mg/ml의 측정농도에서 약 79% 효소 저해율을 보여주었다. 또, 단계별로 희석한 검체들의 효소 저해율을 근간으로 산출된 50% 효소활성 저해농도(IC₅₀)는 3.37 mg/ml로 나타났다. 한편 동일한 실험조건 하에서 실시한 대조약물 acarbose의 50% 효소활성 저해농도 (IC₅₀)는 5.3 mg/ml로 측정되어 안개나무 가지의 에탄올 추출물은 대조약물 acarbose 보다 높은 효소활성 저해효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 또한, 에탄올 추출물을 MC, EtOAc 및 *n*-BuOH로 단계적으로 용매분획하여 얻은 MC 분획물 및 EtOAc 분획물 역시 높은 효소활성 저해효과를 나타내었다. 특히 EtOAc 분획물의 경우 5 mg/ml의 측정농도에서 95.8%의 높은 효소활성 저해효과를 나타내었으며, MC 분획물은 동일한 농도에서 47.0%, 그리고 *n*-BuOH 분획물과 잔류 물층은 50% 이하의 미미한 효소 저해율을 나타내었다 (Fig. 1). 따라서 안개나무 가지 추출물에 함유된 α -glucosidase 효소활성 저해성분들은 주로 EtOAc 분획물에 분포하는 것으로 예측되어 이 EtOAc 분획물로부터 효소활성 저해성분들의 분리 정제를 시도하였다. 우선 EtOAc 분획물을 silica-gel column chromatography를 실시하여 Fr. 1~Fr. 6 등 총 6개의 분획물로 나눈 후 각 분획의 효소활성 저해효과를 각각 5 mg/ml의 측정농도에서 측정하여 본 결과, Fr. 4는 78.0%, Fr. 5는 94.9%, Fr. 6은 91.7%의 높은 효소활성 저해효과를 보여준 반면 Fr. 1~Fr. 3은 모두 40% 이하의 활성을 나타내었다. 이 중 가장 우수한 효소활성 저해효과를 나타낸 Fr. 5를 재차 silica-gel column chromatography를 실시하여 정제한 결과, yeast α -glucosidase에 대하여 강력한 효소저해활성을 나타내는 화합물 1을 분리하였다. 화합물 1은 미황색 분말로서 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum 등 각종 분광학적 data를 문헌^{14,15)}과 비교하여 본 결과 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose로 확인되었다.

화합물 1은 농도 의존적으로 yeast α -glucosidase 활성을 저해하였으며, 50% 효소활성 저해농도 (IC₅₀)는 0.95 mg/ml로 산출되었고, 대조약물로 사용한 acarbose (IC₅₀ = 5.3 mg/ml)에 비하여 훨씬 강력한 효소활성 저해효과를 나타내었다. 한편 화합물 1과 함께 Fr. 5a로부터 분리된 화합물 2 (1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose) 역시 대조약물로 사용한 acarbose에 버금가는 강력한 효소활성 저해효과를 나타내었으나 (IC₅₀ = 3.2 mg/ml), EtOAc 분획물에 가장 많이

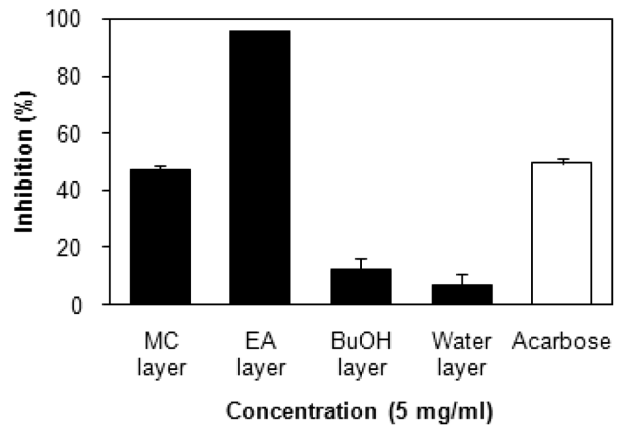


Fig. 1. Enzyme inhibitory activity of some solvent fractions from the extract of *C. coggyria* on the yeast α -glucosidase, *in vitro*.

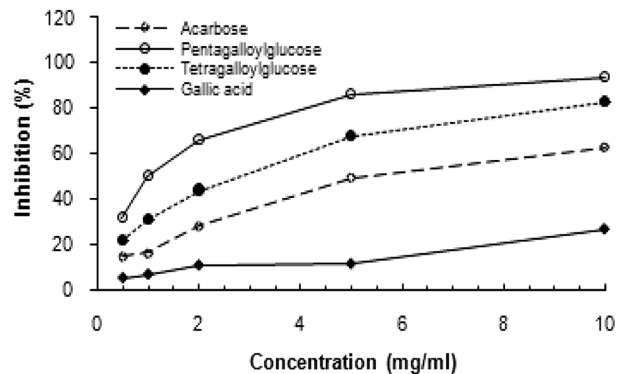


Fig. 2. α -Glucosidase inhibitory activity of pentagalloylglucose (1), tetragalloylglucose (2), gallic acid (3) and acarbose.

존재하고 있는 gallic acid는 10 mg/ml의 측정농도에서도 20% 이하의 효소활성 저해율을 나타내었다 (Fig. 2).

사 사

이 연구는 대한민국 산업기술연구회 소관기관 협동연구사업 및 산림청 ‘산림과학기술개발사업(과제번호 : S120808 L1101104)’의 연구비 지원을 받아 수행한 연구결과로 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Woo, J. T., Kim, Y. S., Choi, Y. K., Kim, J. W., Yang, I. M., Kim, S. W., Kim, D. Y., Kim, K. W., Lee, M. K., Lee, M. S. and Jung, J. H. (1998) Lowering effect of voglibose, monotherapy on uncontrolled postprandial glucose in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) being treated with strict diet control. *J. Korean Diabet. Assoc.* **22**:

- 419-428.
2. Choi, H. J., Kang, J. S., Choi, Y. W., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. (2008) Inhibitory activity on the diabetes related enzymes of *Tetragonia tetragonioides*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 419-424.
 3. DeFronzo, R. A. (1992) Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia* **35**: 389-397.
 4. Schwartz, S., Raskin, P., Fonseca, V. and Graveline, J. F. (1998) Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **338**: 861-866.
 5. Hong, S. H., Kim, M. J., Noh, S. G., Suh, D. W., Youn, S. J., Lee, K. W., Lee, H. C., Chung, Y. S., Chung, H. R., Kwon, H. S., Cha, B. Y., Son, H. Y. and Yoon, K. H. (2008) A study on resistance in type 2 diabetic patient against commencement of insulin treatment. *Korean Diabetes J.* **32**: 269-279.
 6. Wansi, J. D., Lallemand, M. C., Chiozem, D. D., Toze, F. A. A., Mbaze, L. M., Naharkhan, S., Iqbal, M. C., Tillequin, F., Wandji, J. and Fomum, Z. T. (2007) α -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochemistry* **68**: 2096-2100.
 7. Del Prato, S., Bianchi, C. and Marchetti, P. (2007) Beta-cell function and anti-diabetic pharmacotherapy. *Diabetes-Metab. Res. Rev.* **23**: 518-527.
 8. Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H. and De Grauw WJ. (2009) Alpha-glucosidase inhibitors for people with impaired glucose tolerance or impaired fasting blood glucose. *Cochrane Database Syst. Rev.* **18**: CD005061.
 9. Tsujimoto, T., Shioyama, E., Moriya, K., Kawaratani, H., Shirai, Y., Toyohara, M., Mitoro, A., Yamao, J., Fujii, H. and Fukui H. (2008) Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: a case report and review of the literature. *World J. Gastroenterol.* **14**: 6087-6092.
 10. Westenburg, H. E., Lee, K. J., Lee, S. K., Fong, H. H. S., van Breemen, R. B., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. (2000) Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygria*. *J. Nat. Prod.* **63**: 1696-1698.
 11. Tsankova, E. T., Dyulgerov, A. S. and Milenkov, B. K. (1993) Chemical composition of the Bulgarian sumac oil. *J. Essent. Oil Res.* **5**: 205-207.
 12. Demirci, B., Demirci, F. and Baser, K. H. C. (2003) Composition of the essential oil of *Cotinus coggygria* Scop. from Turkey. *Flavour Fragr. J.* **18**: 43-44.
 13. Kim, J. S., Kwon, C. S. and Son, K. H. (2000) Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 2458-2461.
 14. Murray, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H. and Haslam E. (1994) Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **219**: 923-935.
 15. Zhang, Y., DeWitt, D. L., Murugesan, S. and Nair, M. G. (2004) Novel lipid-peroxidation and cyclooxygenase-inhibitory tannins from *Picrorhiza kurroa* Seeds. *Chem. Biodivers.* **1**: 426-441.

(2009년 8월 10일 접수)