

가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*) 잎으로부터 α -Glucosidase의 저해 활성 물질, Hyperoside와 Isoquercetin의 분리 및 구조·동정

이기연¹ · 홍수영¹ · 정혜정¹ · 이재형¹ · 임상현¹ · 허남기¹ · 김성문² · 김희연¹

¹강원도농업기술원 농식품연구소

²강원대학교 바이오컨버전스공학과

Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitory Compounds, Hyperoside, and Isoquercetin from *Eleutherococcus senticosus* Leaves

Ki Yeon Lee¹, Soo Young Hong¹, Hye Jeong Jeong¹, Jae Hyoung Lee¹, Sang Hyun Lim¹,
Nam-Kee Heo¹, Songmun Kim², and Hee-Yeon Kim¹

¹Gangwondo Provincial Agricultural Research & Extension Services

²Department of Bioconvergence Science and Technology, Kangwon National University

ABSTRACT In the present investigation, the anti-diabetic potential of 80% ethanol extract of *Eleutherococcus senticosus* leaves (EEES) was examined based on α -glucosidase inhibitory activities. EEES was sequentially fractionated with *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate (EtAOc), *n*-butanol, and H₂O. Of the various fractions, EtAOc fraction effectively inhibited α -glucosidase activity by 68.05%. Therefore, EtAOc fraction was selected for further isolation and identification studies. EtAOc fraction was separated by medium pressure liquid chromatography with silica and ODS gel to yield eight fractions (EAA~EAH). Based on the results of α -glucosidase inhibitory activity, EAH fraction was re-chromatographed to yielded four more fractions (EAHA~EAHD). Of these, EAHC fraction showed higher α -glucosidase inhibitory activity of 93.60%. EAHC fraction was re-chromatographed and yielded EAHC and EAHCB fractions. Further, identification and chemical structures of these two fractions were analyzed using ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and mass spectra data. Based on the results of the spectral data, the isolated compounds were identified as hyperoside and isoquercetin. Results of the present study indicate that the isolated compounds, hyperoside, and isoquercetin from leaves of *E. senticosus* could be used for the development of new anti-diabetic drugs.

Key words: *Eleutherococcus senticosus*, α -glucosidase inhibitor, hyperoside, isoquercetin

서 론

최근 서구화된 식생활과 생활습관의 변화 등으로 인하여 당뇨, 압, 뇌혈관 질환, 심혈관 질환 등 각종 성인병의 발병이 증가하고 있으며 그중 당뇨병은 전 세계적으로 급증하는 추세이다. 노령화 사회, 비만, 운동부족, 불규칙한 식습관 등으로 인해 그 발병률도 꾸준히 증가하고 있다(1). 당뇨병 치료를 위해 사용되고 있는 기존 혈당강하제의 복용에 따른 내성과 체중증가, 부종, 오심, 소화기장애와 같은 부작용의 문제로 인하여 대체 자원이 요구되고 있다(2).

식사로 섭취된 탄수화물은 amylase에 의해 올리고당과 같은 이당류로 분해되고, 소장 점막의 미세융모막에 존재하는 α -glucosidase에 의해 포도당으로 분해되어 체내에 흡

수된다(3). α -Glucosidase 저해제는 소장에 존재하는 이당류 분해효소 활성에 대해 경쟁적으로 작용하여 이당류에서 단당류로의 분해를 억제한다. 이러한 저해제의 활성은 장내에서 당질의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 급격한 혈당 상승을 조절하고, 이에 따른 인슐린의 과도한 분비를 억제한다(4). α -Glucosidase 저해제는 고인슐린 혈증이나 저혈당을 유발하지 않으며 간독성 유발 및 체장 β -세포 기능 저하 등의 부작용을 최소화할 수 있는 장점이 있지만 지속적인 복용으로 인한 복부팽만, 방귀, 고창, 설사, 변비 등의 부작용을 동반하는 것으로 알려져 있다(5). 따라서 기존의 혈당강하제의 부작용을 최소화하고 식후 고혈당을 효과적으로 조절할 수 있는 천연 자원에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(6,7).

가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*)는 두릅나무과(Araliaceae) 오갈피속(*Acanthopanax*)에 속하는 다년생 낙엽 관목으로 한반도와 시베리아, 중국의 고지대 및 일본의 동북부 등의 극동아시아 지역에 주로 분포하는 저온 음지성 식물이며(8), 다른 오갈피에 비해 줄기 전체에 가늘고 긴 가

Received 30 July 2014; Accepted 30 October 2014

Corresponding author: Hee-Yeon Kim, Gangwondo Provincial Agricultural Research & Extension Services, Gangwon 200-822, Korea

E-mail: heeya80@korea.kr, Phone: +82-33-248-6526

시가 많은 것이 특징이다(9). 생약으로는 오가피라 하여 주로 줄기와 뿌리껍질을 약재로 사용하고 있으며, 동의보감, 한약집성방 등의 고전한의서에 강장 및 근골기능을 향상시키고 신경통, 중풍, 당뇨병, 관절염 등의 치료에 효과가 뛰어난 것으로 기재되어 있다(10).

가시오갈피에 관한 연구는 1969년 Brekhman(11)에 의해 가시오갈피에서 분리된 eleutheroside류의 강장제로서의 효능이 밝혀진 이후, 가시오갈피의 잎, 줄기, 뿌리에 eleutheroside A, D, E, I, K, L, M, sesamin, syringin, iso-fraxidin 및 chlorogenic acid, caffeic acid와 같은 페놀성 화합물이 함유되어 있는 것으로 보고되었으며(12), 가시오갈피의 뿌리와 수피에 주로 함유된 eleutheroside E의 육체피로 저해 효과와 지구력 향상 효과(13) 및 NF-κB 활성 저해에 의한 항염활성 효과(14), 심근경색증 방지 효과(15) 등에 대한 연구가 보고되었다. 또한 가시오갈피의 줄기와 뿌리에 주로 함유되어 있는 유효성분인 syringin의 투여로 인해 당뇨가 유발된 흰쥐의 혈장 인슐린 분비가 촉진되고 근육과 간 조직에서 포도당 이용률이 향상되었으며(16), 가시오갈피 줄기 추출물과 eleutheroside E의 사료 공급으로 제2형 당뇨 모델인 *db/db* 마우스의 혈청 내 지질성분 개선 효과, 혈당 및 혈청 인슐린 농도 저하 효과와 당뇨로 인해 손상된 췌장 α, β-세포의 보호기능이 확인되었다(17).

일반적으로 가시오갈피의 유효성분은 대부분 줄기나 뿌리에만 함유되어 있는 것으로 알려져 있어 주로 가시오갈피의 줄기나 뿌리껍질이 약재로 사용되는데 한방에서도 이들 부위만이 활용되고 있다(18). 이에 따라 가시오갈피 연구는 주로 줄기와 뿌리의 생리활성 검정 및 유효성분의 정량 분석에 관한 연구가 대부분이며 잎에 관한 연구는 거의 이루어진 것이 없다.

본 연구는 가시오갈피 잎의 새로운 기능성 원료 및 의약품 소재 활용을 위해 α-glucosidase 효소 활성을 통해 항당뇨 활성물질을 분리하여 그 구조를 동정하였다.

재료 및 방법

시료 채취 및 조제

본 실험에 사용된 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus* Maxim) 잎 시료는 강원도 철원군에 소재한 강원도농업기술원 인삼약초연구소에서 2008년~2011년 9월 중순경에 수확되었다. 수집된 시료는 냉풍제습건조기(TJHP-1003, Joogang Precision, Daegu, Korea) 40°C에서 72시간 동안 완전 건조시켰다. 가시오갈피 잎 분말 시료 3 kg에 30 L의 80% ethanol을 첨가하고 6시간 동안 상온 교반하여 2회 반복 추출하였다. 가시오갈피 잎 80% ethanol 추출물을 감압 여과하여 잔여물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 ethanol을 완전히 제거하였다. 농축이 완료된 추출물에 증류수 3 L를 첨가하여 용해시킨 후 동결 건조(PVTFD 10R,

Ilshin Co., Ltd., Yangju, Korea)하여 -20°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

α-Glucosidase 저해 활성 측정

가시오갈피 잎 추출물 및 유기용매 분획층에 대한 α-glucosidase 저해 활성은 Lee 등(19)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 100 μL에 0.15 unit/mL α-glucosidase(yeast baker, Sigma®, St. Louis, MO, USA) 200 μL와 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 1 mL를 가하여 405 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(DU 730, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)로 흡광도를 측정하고 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, 5 mM pNPG(4-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside) 200 μL를 가하여 37°C에서 20분간 더 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader(UVM-340, ASYS, Engendorf, Austria)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 변화로부터 효소 저해 활성을 계산하였다. 대조구로는 시료와 같은 농도로 제조한 acarbose를 사용하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료처리구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

유기용매를 이용한 분획물 조제

동결 건조된 가시오갈피 잎 80% ethanol 조추출물을 증류수에 현탁시킨 후 용매의 극성에 따라 분획하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate(EtOAc), *n*-butanol(BuOH) 및 H₂O 층을 얻었다(Fig. 1). 각 분획층을 rotary vacuum evaporator(N-21NS, EYELA)를 이용하여 완전 농축하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 α-glucosidase 저해 활성 측정 및 물질 분리를 위한 시료로 사용하였다.

EtOAc 분획층의 물질 분리

가시오갈피 잎 80% ethanol 추출물의 유기용매 분획층 중에서 α-glucosidase 저해 활성이 가장 높게 나타났던 분

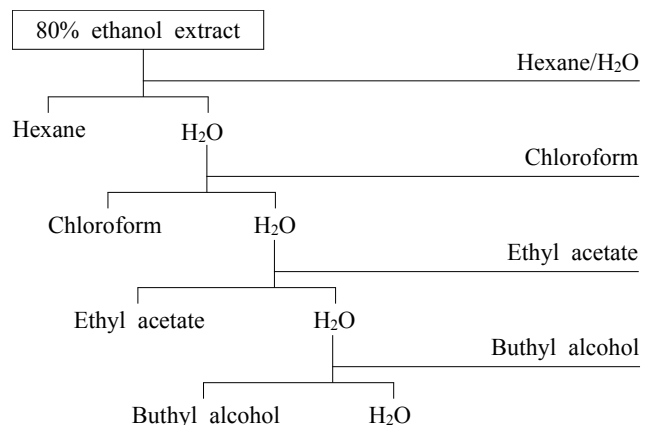


Fig. 1. The extraction procedure for the isolation of inhibitory effect of α-glucosidase components in *Eleutherococcus senticosus* leaves.

Table 1. MPLC analytical condition of EtOAc fraction isolated from 80% ethanol extract *Eleutherococcus senticosus* leaves

Classification	Condition		
Instrument	Sepacore® (Büchi, Flawil, Switzerland) Fraction collector C-660 (Büchi)		
Column	Glass column (26×460 mm, silica gel 0.04~0.063 mm)		
Mobile phase	Solvent A-ethyl acetate : dichlorometane=1:2 Solvent B-methanol		
Injection volume	5 mL		
Flow rate	10 mL/min		
Detector	254 nm, UV Photometer C-635 (Büchi)		
Gradient table			
%A	%B	Elution (L)	
90	10	0.9	
90	10	0.6	
80	20	0.3	
80	20	0.1	
70	30	0.3	
70	30	0.1	
60	40	0.3	
60	40	2.1	
60	40	3.0	
50	50	0.2	
50	50	0.1	
40	60	0.2	
40	60	0.1	
30	70	0.2	
30	70	2.2	
15	85	0.3	
15	85	1.2	
0	100	0.6	
0	100	0.9	
0	100	0.6	

획층(EtOAc)을 MPLC(medium pressure liquid chromatography system, Büchi 620, Büchi Labor Technik AG, Flawil, Switzerland)를 사용하여 1차 분리하였다. Silica gel(Merck, Darmstadt, Germany)이 충전되어 있는 26×460 mm glass column(Büchi Labor Technik AG)에 EtOAc 분획층을 50 mg/mL의 농도로 조제하여 5 mL 주입하고 Table 1의 조건으로 분당 10 mL씩 용출시켜 분리하였다. MPLC상에서 순차적으로 분리된 8개의 1차 분획층들(EAA~EAH) 중 α -glucosidase 저해 활성이 가장 높았던 8번째 분획층(EAH)을 선별하고 MPLC를 사용하여 2차 분리하였다. ODS gel(YMC, Kyoto, Japan)이 충전되어 있는 15×230 mm glass column(Büchi Labor Technik AG)에 분획층을 10 mg/mL의 농도로 조제하여 1 mL 주입하고 Table 2의 조건으로 분당 1 mL씩 용출시켜 분리하였다. EAH 분획층으로부터 순차적으로 분리된 4개의 분획물들(EAHA~EAHD) 중 α -glucosidase 저해 활성이 높고 분리가 비교적 용이하다고 판단된 3번째 분획층(EAHC)을 Unison US-C₁₈ column(19×250 mm, 5 μ m, Imtakt, Kyoto, Japan)을 사용하여 Prep LC/MS(Autopurification system, Waters,

Table 2. MPLC analytical condition of EAH fraction isolated from EtOAc fraction of *Eleutherococcus senticosus* leaves

Classification	Condition			
Instrument	Sepacore® (Büchi) Fraction collector C-660 (Büchi)			
Column	Glass column (15×230 mm, ODS gel 150 μ m)			
Mobile phase	Acetonitrile, methanol, d-water			
Injection volume	5 mL			
Flow rate	10 mL/min			
Detector	254 nm, UV Photometer C-635 (Büchi)			
Gradient table				
Acetonitrile	Methanol	d-water	Elution (mL)	
45	45	10	25	
45	45	10	35	
35	35	30	10	
35	35	70	5	
20	20	60	10	
20	20	60	5	
25	25	50	10	
25	25	50	5	
30	30	40	10	
30	30	60	5	
15	15	70	10	
0	50	50	30	

Milford, DE, USA)로 분리·정제하였다(Table 3).

EtOAc 분획층의 구조 동정

가시오갈피 잎 추출물의 EtOAc 층으로부터 최종 분리된 화합물(EAHC)의 화학구조를 구명하기 위하여 내부표준 물질로 tetramethylsilane이 함유된 CD₃OD 용액을 첨가한 다음 ¹H-NMR(600 MHz, Bruker Avance 600, Rheinstetten, Germany), ¹³C-NMR(600 MHz, Bruker Avance 600)을 사용하여 proton 및 carbon signal을 얻었다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS(statistical package for social science, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

가시오갈피 잎 추출물 및 유기용매 분획층의 α -glucosidase 저해 활성

가시오갈피 잎 80% ethanol 추출물의 추출 수율은 20.36%였으며 이 추출물의 α -glucosidase 저해 활성은 26.11%였다(Table 4). Lim 등(20)의 오갈피나무 속 식물의 항당뇨 및 혈당강하 효과에 관한 연구 결과, 가시오갈피 잎 80% ethanol 추출물의 α -glucosidase 저해 활성은 35.94%로

Table 3. Prep-LC/MS analytical condition of EAHC fraction isolated from EAH fraction of *Eleutherococcus senticosus* leaves

Classification	Condition		
Instrument	Waters autopurification system (Waters, Milford, DE, USA)		
	Waters 3100 single mass system (Waters)		
Column	Unison US-C ₁₈ (19×250 mm, 5 μ m)		
Mobile phase	Eluent A: d-water Eluent B: acetonitrile		
Injection volume	500 μ L		
Detector	3100 single mass		
Run time	25 min		
Mode	Negative		
Capillary (kV)	3	LM 1 resolution	14
Extractor (V)	3	HM 1 resolution	14
RF lens (V)	0.1	Ion energy	1
Cone (V)	50	Gain	1
Source temp (°C)	150	Desolvation gas flow (L/hr)	650
Desolvation temp (°C)	350	Cone (L/hr)	50

Gradient table

Time (min)	Flow rate (mL)	%A	%B
Initial	1.0	82	18

Table 4. Inhibitory effect of α -glucosidase of solvent fractions from 80% ethanol extract of *Eleutherococcus senticosus* leaves

Solvent extracts	Inhibitory activity of α -glucosidase (%) ¹⁾	Yield (%)
EEES ²⁾	26.11±2.61 ³⁾	20.36±1.84
Acarbose	79.72±1.29	-

¹⁾Treatment concentration of samples: 10 mg/mL.

²⁾EEES: 80% ethanol extract of *Eleutherococcus senticosus* leaves.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

본 실험 결과인 26.11%와 비교 시 9.83% 높게 나타났다. 그 원인으로 본 연구에서 사용된 α -glucosidase 기질인 pNPG와 달리 Lim 등(20)의 연구에서는 maltose를 기질로 사용하여 나타난 결과라 판단된다.

가시오갈피 잎 80% ethanol 추출물에 대한 유기용매 분획층의 회수율과 각 분획층의 α -glucosidase 저해 활성 효과를 측정된 결과는 Table 5와 같다. 각 분획층의 α -glucosidase 저해 활성은 EtOAc(68.05%) > BuOH(56.84%) >

Table 5. Inhibitory effect of α -glucosidase of solvent fractions from *Eleutherococcus senticosus* leaves

Solvent extracts	Inhibitory activity of α -glucosidase (%) ¹⁾	Yield (%)
Hexane	26.22±2.54 ^{b2)3)}	11.54±0.84
Chloroform	52.43±1.75 ^c	5.78±0.52
EtOAc	68.05±0.98 ^d	6.62±0.46
BuOH	56.84±1.52 ^e	28.84±0.71
H ₂ O	0 ^a	47.43±0.39
Acarbose	93.18±0.95 ^f	-

¹⁾Treatment concentration of samples: 10 mg/mL.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

³⁾Values with different superscripts within a column indicate significant difference (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

chloroform(52.43%) > hexane(26.22%)의 순으로 나타났으며, 유기용매 분획층의 α -glucosidase 저해 활성이 80% ethanol 추출물의 저해 활성보다 높게 측정되었다. 이 중에서 활성이 가장 높게 나타난 EtOAc 분획물을 대상으로 물질 분리를 진행하였다.

EtOAc 분획층의 물질 분리 및 α -glucosidase 저해 활성

가시오갈피 잎 80% ethanol 추출물의 5개의 유기용매 분획층 중에서 α -glucosidase 저해 활성이 가장 우수하게 나타난 EtOAc 층을 MPLC를 사용하여 1차 분리하여 순차적으로 8개의 분획물(EAA~EAH)을 얻었다. EtOAc 층으로부터 분리된 8개의 분획물들을 감압 농축하여 α -glucosidase 저해 활성을 측정된 결과는 Table 6과 같다. 이 분획물 중 EAF, EAH의 α -glucosidase 저해 활성은 90% 이상으로 경구용 혈당강하제로 사용되는 acarbose와 유의적인 차이가 없었으며, 이 중 TLC 상에서 spot의 수가 적어 비교적 분리가 용이하다고 판단된 EAH 분획물을 대상으로 단일물질 분리를 수행하였다. 가시오갈피 잎 추출물의 EtOAc 분획층으로부터 분리된 EAH 분획물을 MPLC를 사용하여 2차 분리하여 4개의 분획물(EAHA, EAHB, EAHC, EAHD)을 얻었다. EAH 분획물로부터 분리된 4개의 분획물들을 감압 농축하여 α -glucosidase 저해 활성을 측정된 결과는 Table 7과 같다. 이 중 α -glucosidase 저해 활성이 93.60%로 가장 높게 나타난 EAHC 분획물을 prep-LC/MS로 분석하여 두 개의 peak를 확인하였고 이는 MS 값이 동일한 이성질체로 추론되었다. EAHC 분획물을 prep-LC/MS를 사용하여 EAHCA와 EAHCB로 분리·정제하였으며(Fig. 2), 가시오갈피 잎 추출물로부터 분리된 EAHCA와 EAHCB 분획물의 회수율은 각각 0.061%, 0.057%였다.

Table 6. Inhibitory effect of α -glucosidase of EAA, EAB, EAC, EAD, EAE, EAF, EAG, EAH from EtOAc fraction of *Eleutherococcus senticosus* leaves

Solvent extract	Inhibitory activity of α -glucosidase (%) ¹⁾	Yield (%)
EAA	49.52±0.24 ^{a2)3)}	0.14±1.02
EAB	74.91±0.98 ^b	0.20±0.95
EAC	78.74±0.85 ^c	3.28±0.91
EAD	89.93±0.07 ^d	0.67±0.85
EAE	96.27±0.66 ^f	0.47±1.12
EAF	93.14±0.95 ^e	0.34±0.84
EAG	96.55±0.88 ^f	0.96±1.08
EAH	91.73±0.96 ^e	0.54±0.97
Acarbose	92.05±0.70 ^e	—

¹⁾Treatment concentration of samples: 10 mg/mL.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

³⁾Values with different superscripts within a column indicate significant difference ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

EAHC 층으로부터 단리된 물질의 구조 및 동정

EAHCA 화합물의 구조 및 동정: EAHCA의 ¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) 분석 결과, δ (ppm) 7.84(1H, d, H-2'), 7.58(1H, dd, H-6'), 6.86(1H, d, H-5'), 6.39(1H, d, H-8), 6.20(1H, d, H-6), 5.16(1H, d, H-6), 3.85(dd, H-4'), 3.817(dd, H-2''), 3.64(dd, H-6''a), 3.55(dd, H-6''b)였다. EAHCA의 ¹³C-NMR(600 MHz, CD₃OD) 분석 결과, 158.81(C-2), 135.81(C-3), 179.55(C-4), 163.05(C-5), 100.02(C-6), 166.39(C-7), 94.81(C-8), 158.52(C-9), 105.60(C-10), 122.96(C-1'), 116.12(C-2'), 145.86(C-3'), 150.00(C-4'), 117.81(C-5'), 105.46(C-1''), 73.22(C-2''), 75.14(C-3''), 70.07(C-4''), 77.23(C-5''), 61.98(C-6'')이었다. 이상의

Table 7. Inhibitory effect of α -glucosidase of EAHA, EAHB, EAHC, EAHD from EAH fraction of *Eleutherococcus senticosus* leaves

Solvent extract	Inhibitory activity of α -glucosidase (%) ¹⁾	Yield (%)
EAHA	35.48±7.69 ^{b2)3)}	0.43±0.86
EAHB	82.62±7.33 ^c	0.06±1.05
EAHC	93.60±1.46 ^d	0.03±0.98
EAHD	16.47±5.73 ^a	0.03±0.75
Acarbose	94.95±0.60 ^d	—

¹⁾Treatment concentration of samples: 10 mg/mL.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

³⁾Values with different superscripts within a column indicate significant difference ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

NMR spectral data와 이에 대한 문헌자료(21)의 비교를 통하여 화합물 EAHCA는 분자량 464.38, 화학구조식 C₂₁H₂₀O₁₂인 hyperoside(Fig. 3)로 확인 동정되었다. Hyperoside(hyperin)는 flavonoid에 속하는 quercetin의 galactose 배당체(quercetin-3-O-galactoside)로 식물에 존재하는 항산화 물질로 알려져 있다(22). 본 연구에서 가시오갈피 잎으로부터 α -glucosidase의 저해 활성 물질로 분리된 hyperoside는 가시오갈피 및 오갈피의 줄기와 뿌리에 존재하는 화합물질로 보고되었으며(23), ESI-MS(electrospray tandem mass spectrometry)와 HPLC 분석을 통해 가시오갈피 잎과 열매에 함유되어 있는 생리활성 성분으로 확인되었다(21,24).

EAHCB 화합물의 구조 및 동정: EAHCB의 ¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) 분석 결과, δ (ppm) 7.71(1H, d, H-2'), 7.58(1h, dd, h-6'), 6.86(1h, d, H-5'), 6.39(1H, d, H-8),

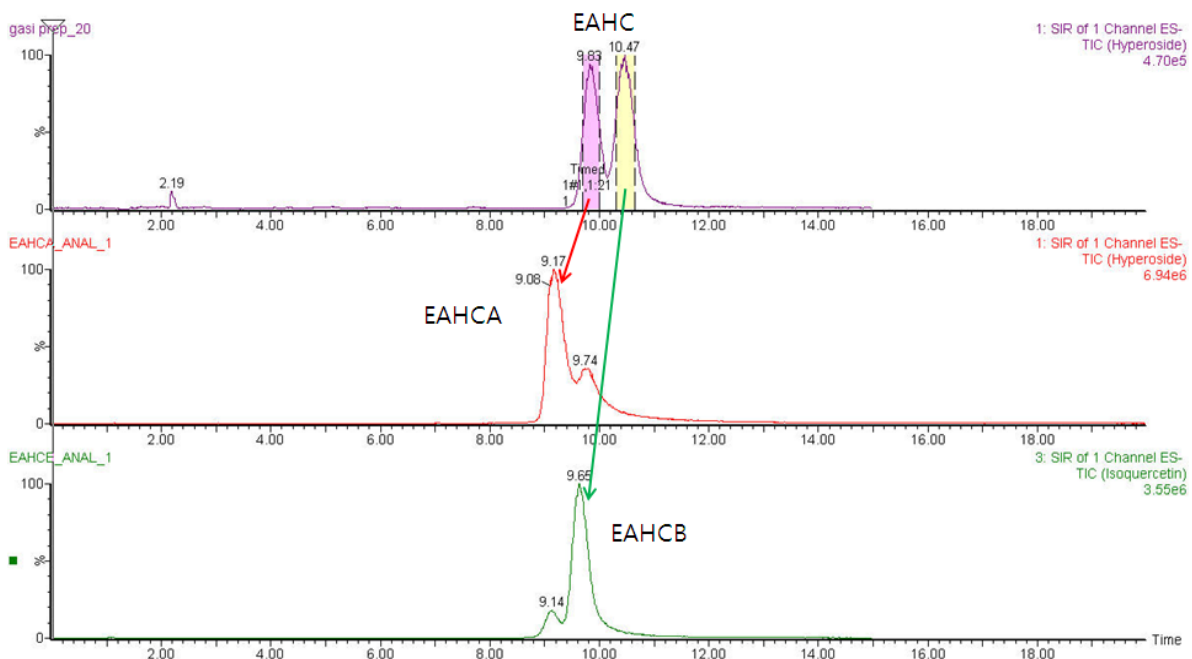


Fig. 2. Prep-LC/MS spectra of EAHCA and EAHCB isolated from EAHC fraction of *Eleutherococcus senticosus* leaves.

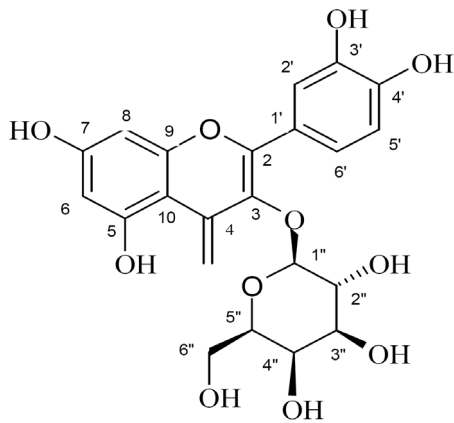


Fig. 3. The chemical structure of hyperoside, a natural compound of inhibitory activities of α -glucosidase from *Eleutherococcus senticosus* leaves.

6.20(1H, d, H-6), 5.24(1H, d, H-1''), 3.71(1H, dd, H-6a''), 3.57(1H, dd, H-6b''), 3.48(1H, t, H-2''), 3.42(1H, t, H-3''), 3.34(1H, t, H-4''), 3.21(1H, ddd, H-5'')이었다. EAHCB의 ^{13}C -NMR(600 MHz, CD_3OD) 분석 결과, 158.52(C-2), 135.66(C-3), 179.53(C-4), 163.10(C-5), 99.94(C-6), 166.12(C-7), 94.75(C-8), 159.06(C-9), 105.72(C-10), 123.11(C-1'), 116.04(C-2'), 145.96(C-3'), 149.89(C-4'), 117.59(C-5'), 123.23(C-6'), 104.35(C-1''), 75.77(C-2''), 78.16(C-3''), 71.26(C-4''), 78.44(C-5''), 62.59(C-6'')였다. 이상의 NMR spectral data와 이에 대한 문헌 자료(25)의 비교를 통하여 화합물 EAHCB는 분자량 464.38, 화학구조식 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ 인 isoquercetin(Fig. 4)으로 확인 동정되었다. Isoquercetin은 flavonoid에 속하는 quercetin의 glucose 배당체(quercetin-3-*O*-glucoside)로 식물에 존재하는 항산화 물질로 알려져 있으며 사과나 양파와 같은 식품뿐만 아니라 많은 약용식물에 함유되어 있다(26). Isoquercetin은 이노작용, 혈당상승억제 효과를 가진 두층나무의 잎에 함유된 flavonoid로 분리되었으며(27), 식이성 고

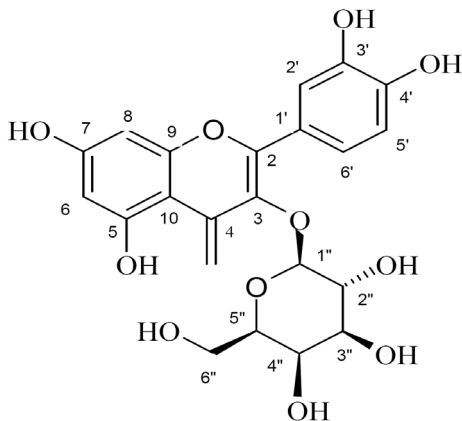


Fig. 4. The chemical structure of isoquercetin, a natural compound of inhibitory activities of α -glucosidase from *Eleutherococcus senticosus* leaves.

지혈증을 유발한 흰쥐에서 고지혈증으로 증가된 인지질과 중성지질의 함량을 감소시킨 와송 추출물의 EtOAc 분획물에 isoquercetin, kaempferol, astragalol 등의 flavonoid가 함유되어 있음이 확인되었다(25). 또한 isoquercetin은 오디(*Morus bombycis*) 씨에서 항산화 활성을 나타내는 물질로 보고되었으며(28), 뽕나무(*Geum japonicum*)에서 분리된 화합물 중에서 세포 내 가장 강한 활성산소 소거력을 나타낸 물질로 확인되었다(29).

Kim 등(30)에 의해 두층 잎으로부터 당화반응 억제제로 isoquercetin을 비롯한 flavonoid 배당체가 분리되었으며 이 화합물들은 두층 잎의 항당뇨 활성을 나타내는 물질이라고 보고하였다. 당화반응은 고혈당상태에서 당의 카르보닐기가 단백질의 아미노기에 비효소적으로 공유 결합하는 반응이며 이 과정을 통해 당과 최종당화산물(advanced glycation endproducts, AGEs)이 생성, 축적된다. AGEs는 당과 아미노산 및 지질반응의 부산물로 혈관 내 침착하여 당뇨로 인한 고지혈증, 심혈관 질환과 관련된 염증반응 유도물질로 알려져 있다(31). 따라서 당화반응 억제제로 isoquercetin은 AGEs의 형성을 저해시켜 AGEs의 축적으로 심화되는 당뇨 합병증인 고지혈증, 동맥경화 및 염증성 질환, 심혈관 질환의 예방 및 치료에 효과적일 것이라 판단된다. Zhang 등(32)은 메밀(*Fagopyrum esculentum*)로부터 분리된 isoquercetin이 제2형 당뇨모델인 KK-Ay 흰쥐의 혈중 포도당 농도, 중성지방 및 총콜레스테롤을 감소시키고 췌장의 링게르한스섬의 기능을 향상시킴으로써 제2형 당뇨병 치료에 유용한 물질임을 시사하였다.

요 약

가시오갈피 잎에 함유된 α -glucosidase의 저해 활성 물질의 분리를 위하여 가시오갈피 잎 80% 에탄올 추출물을 극성 유기 용매를 사용하여 순차 분획하고 각 분획층을 α -glucosidase의 저해 활성 효과를 측정된 결과, EtOAc 층이 68.05%로 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. EtOAc 분획층을 MPLC를 이용하여 fractionation-directed isolation을 수행하고 최종적으로 α -glucosidase 저해 활성이 93.60%로 가장 우수하게 나타난 EAHCB 분획물을 얻었다. EAHCB 분획물을 prep-LC/MS로 분석하여 EAHCA와 EAHCB로 분리·정제하였다. EAHCA 분획물의 화학구조를 구명하기 위하여 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR로 분석한 결과, 분자량 464.38 g/mol, 화학구조식 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ 인 hyperoside로 확인되었다. EAHCB 분획물의 화학구조를 구명하기 위하여 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR로 분석한 결과, 분자량 464.38 g/mol, 화학구조식 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ 인 isoquercetin으로 확인되었다. 본 연구 결과, 가시오갈피 잎으로부터 분리·동정된 hyperoside와 isoquercetin은 α -glucosidase의 저해 활성 물질을 가진 화합물로 향후 혈당조절용 건강식품 또는 치료제 개발을 위한 물질로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청에서 시행한 지역특화작목개발 연구 과제인 참당귀, 가시오갈피 부산물의 기능성 평가 및 가공식품개발(과제번호: PJ009421)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lim SJ, Kim SH. 2001. The effect of each fraction of methanol extract of *Alisma canaliculatum* on blood glucose levels and lipid metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 34: 619-625.
- Laakso M, Cederberg H. 2012. Glucose control in diabetes: which target level to aim for? *J Intern Med* 272: 1-12.
- Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 405-409.
- Yoshio K. 2005. *Obesity and related diseases*. Koonja Publishing Company, Seoul, Korea. p 691-692.
- Oh HC, Kim DH, Cho JH, Kim YC. 2004. Hepato-protective and free radical scavenging activities of phenolics petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *J Ethnopharmacol* 95: 421-424.
- Hwang JY, Han JS. 2007. Inhibitory effects of *Sasa borealis* leaves extracts on carbohydrate digestive enzymes and postprandial hyperglycemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 989-994.
- Choi HJ, Jeong YK, Kang DO, Joo WH. 2008. Inhibitory effects of four solvent fractions of *Alnus firma* on α -amylase and α -glucosidase. *J Life Sci* 18: 1005-1010.
- Kim SK, Kim Y, Park MS, Chio SY, Yun SJ. 1998. Intraspecific relation of *E. senticosus* Max. by RAPD markers. *Korean J Med Crop Sci* 6: 165-169.
- Jin LH, Han SS, Choi YS. 2002. Antioxidant effect of the extracts of *Acanthopanax senticosus*. *Korean J Pharmacogn* 33: 359-363.
- Lee YS, Jung SH, Lim SS, Ji J, Lee SH, Shin KH. 2001. Effects of the water extract from the stem bark of *Acanthopanax senticosus* on hyperlipidemia in rats. *Korean J Pharmacogn* 32: 103-107.
- Brekhman II. 1969. A new medicinal plant of the family Araliaceae the spiny Eleutherococcus. *Izv Sibir Otdel Akad Nauk USSR* 9: 113-120.
- Tang W, Eisenbrand G. 1992. *Chinese drugs of plant origin*. Springer Publishing Company, Berlin, Germany. p 1-12.
- Nishibe S, Kinoshita H, Takeda H, Okano G. 1990. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem Pharm Bull* 38: 1763-1765.
- Yamazaki T, Shimosaka S, Sasaki H, Matsumura T, Tukiya T, Tokiwa T. 2007. (+)-Syringaresinol-di-O- β -d-glucoside, a phenolic compound from *Acanthopanax senticosus* Harms, suppresses proinflammatory mediator in SW982 human synovial sarcoma cells by inhibiting activating protein-1 and/or nuclear factor- κ B activities. *Toxicol In Vitro* 21: 1530-1537.
- Bu Y, Jin ZH, Park SY. 2005. Siberian ginseng reduces infarct volume in transient focal cerebral ischaemia in Sprague-Dawley rats. *Phyto Res* 19: 167-169.
- Liu HS, Liu IM, Cheng JT, Lin CL, Hsu FL. 2008. Hypoglycemic effect of syringin from *Eleutherococcus senticosus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med* 74: 109-113.
- Ahn JY, Um MY, Lee HJ, Jung CH, Heo SH, Ha TY. 2013. Eleutheroside E, an active component of *Eleutherococcus senticosus*, ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. *Evid Based Complement Alternat Med Article ID* 934183.
- Brekhman II, Dardymov IV. 1969. New substance of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol* 9: 419-430.
- Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 405-409.
- Lim SH, Park YH, Kwon CJ, Ham HJ, Jeong HN, Kim KH, Ahn YS. 2010. Anti-diabetic and hypoglycemic effect of *Eleutherococcus* spp. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1761-1768.
- Lee JM, Kim HM, Lee SL, Han S, Cho SH, Lee SH. 2010. Determination of hyperin in the fruits of *Acanthopanax* species by performance lipid chromatography. *Nat Prod Sci* 16: 39-42.
- Choe KH, Choe SN, Choo JJ, Lee JY, Kim JY, Kim JW, Choi JS, Park KS, Park KH. 2007. Tissue concentration of quercetin, isoquercetin and hyperoside, and lipid profile changes following 8-week feeding of *Angelica keiskei* powder in rats. *Korean J Food Sci Technol* 39: 721-724.
- Lee SH, Chung HS, Shin KH, Kim BK. 2004. Determination of hyperin in *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus* by HPLC. *Yakhak Hoeji* 48: 231-235.
- Chen M, Song F, Guo M, Liu Z, Liu S. 2002. Analysis of flavonoid constituents from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrum* 16: 264-271.
- Kim SG, Choi JW, Park HJ, Lee SM, Jung HJ. 2009. Anti-hyperlipidemic effect of the flavonoid-rich fraction from the methanol extract of *Orostachy japonicus* in rats. *Korean J Pharmacogn* 40: 51-58.
- Appleton J. 2010. Evaluating the bioavailability of isoquercetin. *Nat Med J* 2: 1-6.
- Park JC, Kim SH. 1995. Flavonoid analysis from the leaves of *Eucommia ulmoides*. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 901-905.
- Lee YJ, Kim EO, Choi SW. 2011. Isolation and identification of antioxidant polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) seeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 517-524.
- Yean MH, Kim JS, Hyun YJ, Hyun JW, Bae KH, Kang SS. 2012. Terpenoids and phenolics from *Geum japonicum*. *Korean J Pharmacogn* 43: 107-121.
- Kim HY, Moom BH, Lee HK, Choi DH. 2004. Flavonoid glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* 93: 227-230.
- Kim YS. 2005. Antimicrobial activity of yacon K-23 and manufacture of functional yacon jam. *Korean J Food Sci Technol* 37: 1035-1038.
- Zhang R, Yao Y, Wang Y, Ren G. 2011. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A^y mice. *Nutr Metab* 8: 85.