

## 카페인산의 효소적 산화반응으로부터 체장 지방분해효소 저해 물질의 분리

- 연구노트 -

김태훈<sup>1</sup> · 김명권<sup>2</sup>

<sup>1</sup>대구대학교 식품공학과

<sup>2</sup>대구대학교 물리치료학과

### Secondary Metabolites from Enzymatic Oxidation of Caffeic Acid with Pancreatic Lipase Inhibitory Activity

Tae Hoon Kim<sup>1</sup> and Myoung Kwon Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology and

<sup>2</sup>Department of Physical Therapy, Daegu University

**ABSTRACT** Pancreatic lipase is a potential therapeutic target for the treatment of diet-induced obesity in humans. As part of our continuing search for novel bioactive compounds, the convenient enzymatic transformation of caffeic acid into neolignans as well as related oxidized-products enhanced pancreatic lipase inhibitory activity. Enzymatic transformation of caffeic acid (1) using polyphenol oxidase originating from Korean pear yielded four oxidized metabolites, which were identified by different spectroscopic techniques (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, DEP/T, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HMQC, and NOESY). The anti-obesity efficacy of caffeic acid reactant was tested by *in vitro* porcine pancreatic lipase assay. All tested samples showed dose-dependent pancreatic lipase inhibitory activities. Four oxidative products including phellinsin A (2), caffeicinic acid (3), isocaffeicinic acid (4), and 7,8-erythro-caffeic acid (5) were isolated and identified. The major metabolites (2~5) were evaluated for their pancreatic lipase inhibitory activity, and oxidized-products (2~3) improved potency against pancreatic lipase when compared to original caffeic acid. This result suggested that the neolignans isolated from oxidative transformation of caffeic acid might be beneficial in the treatment of obesity and relevant diseases, and the convenient enzymatic transformation by polyphenol oxidase may be a valuable method for structural modification and enhancement of activity.

**Key words:** enzymatic transformation, caffeic acid, neolignan, obesity, pancreatic lipase

## 서 론

비만은 섭취에너지와 소비에너지의 불균형에 의해 유발되며 에너지 대사 이상으로 지방세포에 중성지방이 과도하게 축적된 상태를 말한다(1). 최근의 서구화된 식습관으로 인하여 비만인구가 급격히 증가하고 있으며, 비만의 가장 큰 원인은 고열량이나 고지방을 함유한 음식의 과도한 섭취 및 운동 부족으로 인한 과도한 체내지방 축적이지만, 이외에도 신경내분비 계통의 이상, 약물, 유전적 요인 및 생화학적 이상 반응에 의해서도 유발되는 것으로 알려져 있다(2). 비만은 외형상의 문제 외에도 고혈압 및 고지혈증, 제2형 당뇨병, 고혈압, 심장질환, 뇌졸중, 관절염, 동맥경화, 암, 대사증후군, 수면무호흡증, 관절염, 요통 등의 만성질환과 밀접한 연관이 있음이 보고되어 있다(3-5). 비만의 치료와 예방에

있어서 식이요법을 동반한 운동이 가장 적절한 방법이나 최근에는 식욕 억제제, 지방흡수 억제제의 개발이 진행되고 있으며, 그중에서도 식품 중에 존재하는 triglyceride를 약 50~70%를 가수분해하여 2-monoacylglycerol과 fatty acid로 분해하는 key enzyme으로 작용하는 지방분해효소인 pancreatic lipase의 작용을 억제하는 방법이 주목을 받고 있다(6). 현재 항비만 의약품으로 시판중인 lipstatin의 유도체인 tetrahydrolipstatin(orlistat)은 *Streptomyces toxytricini*로부터 유래된 대표적인 pancreatic lipase 저해 물질로서 체내에 섭취된 지방의 소화와 흡수를 억제해 섭취량의 약 30%를 그대로 배설시키는 우수한 효능이 있으나, 최근 위장장애, 과민증, 담즙분비 장애, 지용성비타민 흡수 억제 등의 다양한 부작용이 있는 것이 보고됨에 따라 보다 부작용이 적은 안전한 항비만 물질의 개발이 요구되고 있다(7-9). 최근 천연소재로부터 pancreatic lipase 저해제 개발을 위한 연구(10)가 활발하게 진행되고 있으며, 측백나무(*Thuja orientalis*), 택사(*Alisma orientale*), 배나무(*Pyrus pyrifolia*) 등의 천연 약용식물로부터 지방분해효소를 효과적으로 저해하는 자생 약용식물이 보고되었다(11). 본 연구

Received 1 September 2015; Accepted 8 October 2015

Corresponding author: Tae Hoon Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38453, Korea

E-mail: skyey7@daegu.ac.kr, Phone: +82-53-850-6533

팀에서도 천연소재 유래의 항비만 소재 개발의 일환으로 약용식물 및 생물전환기법을 적용하여 pancreatic lipase 저해 효능을 나타내는 *C*-glycosidic flavonoid, *O*-glycosidic flavonoid, rotenoid를 분리 및 구조 결정하여 그 효능에 대해 보고하였다(12-14).

Caffeic acid는 다양한 식물과 과일에서 흔하게 발견되는 대표적인 천연의 페닐프로파노이드 화합물로 유리 혹은 결합 형태로 존재하며, 다양한 형태의 리그난 화합물의 생합성에 필수적인 전구물질이다. 또한 caffeic acid는 항바이러스, 항산화 및 암 예방 효능 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것이 잘 알려져 있다(15-18). 또한 최근의 연구에서는 에스터화를 통해 결합된 형태의 caffeic acid 유도체는 강한 항염증, 항암, 면역조절 및 항산화 활성을 나타내며 다양한 천연소재에 광범위하게 존재하는 것이 보고되었다(19-22). 천연물의 구조 변환을 위하여 가열 처리, 금속이온, 방사선 조사 등을 활용하여 안정한 형태의 화학구조로의 변화 및 활성 상승을 모색한 천연물 생물전환 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며 청정화학의 관점에서 상업화와 연관하여 다양한 시도가 이루어지고 있다(23-25).

본 연구에서는 천연에 광범위하게 존재하는 성분인 caffeic acid에 대해서 배의 polyphenol oxidase를 활용하여 간편한 효소적 산화반응을 유도하고 neolignan 및 관련 화합물을 생합성하였으며 이들 얻어진 화합물에 대해서 강한 pancreatic lipase 저해 활성을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

본 실험에 시료로 사용한 caffeic acid, porcine pancreatic lipase 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-10A(Tokyo, Japan)를 사용하였다.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR과  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC, HMBC 스펙트럼은  $\text{CD}_3\text{OD}$  용매 ( $\delta_{\text{H}}$  3.35,  $\delta_{\text{C}}$  49.0)를 이용하여 600 MHz FT-NMR spectrometer(Varian VNS600, Palo Alto, CA, USA)로 측정하였으며, 분석 및 column chromatography용 용매는 특급시

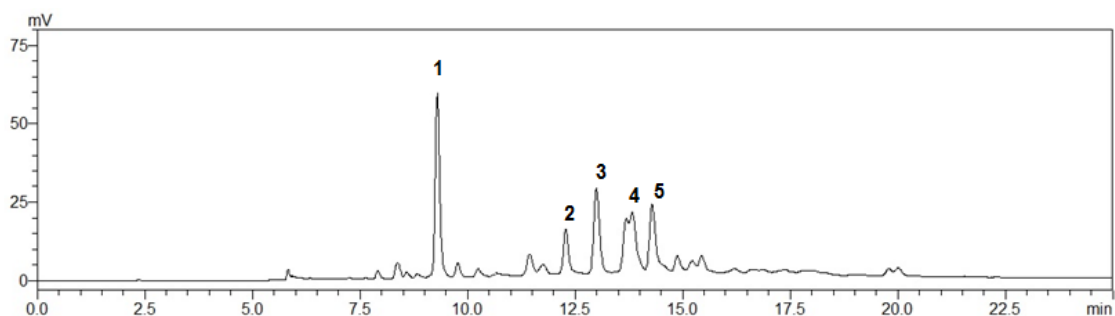
약을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F254(0.25 mm layer thickness, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였고, column chromatography용 고정상은 YMC gel ODS AQ 120S(YMC Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 순수 물질 분리를 하였다. 발색시약으로는 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액을 사용하였고, TLC spot 검출 시 UV lamp의 파장은 254 및 360 nm를 사용하였다. 흡광도 측정을 위한 spectrophotometer는 Infinite F200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)을 사용하였다.

### Caffeic acid 반응 및 분획

경산에서 생산된 배 600 g을 잘게 마쇄한 후 600 mL의  $\text{H}_2\text{O}$ 로 균질화한 후 거즈를 5겹으로 하여 거른다. 얻어진 결과물인 효소원 200 mL와 500 mg의 caffeic acid를 50 mL EtOH에 용해하여 실온에서 2시간 반응한다. 반응물은 필터 후 reversed-phase HPLC를 활용하여 반응을 관찰하였다. 반응물은 감압 농축 후 300 mL의 10% MeOH로 희석하여 300 mL의 ethyl acetate(EtOAc)로 3회 분획하여 EtOAc 가용부(470 mg)를 얻었다. 얻어진 EtOAc 가용부에 대해서 지방분해효소 저해 활성을 평가하였고 활성물질 동정을 위한 분리를 실시하였다.

### 산화 생성 물질의 분리 및 구조 결정

EtOAc 가용분획 100 mg을 YMC gel ODS AQ 120S(1.1 cm i.d.×38 cm)를 이용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 phellinsin A(**2**)(21.2 mg; 2.4%), caffeicinic acid(**3**)(8.5 mg; 1.7%), isocaffeicinic acid(**4**)(6.7 mg; 1.3%), 7,8-*erythro*-caffeic acid(**5**)(7.3 mg; 1.5%)을 순수 분리하였다(Fig. 1). 이동상 용매로는 10%  $\text{HCOOH}$ (solvent A)와 acetonitrile(solvent B)을 사용하여 gradient elution을 다음과 같이 수행하였다. 0~1 min, 90% A; 2~40 min, 10% A, 90% B로 물질 분석 및 분리를 하였으며, 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 280 nm에서 화합물을 검출하였다. 분리한 화합물을 caffeic acid 반응 생성물과 분석하여 phellinsin A(**2**)( $t_{\text{R}}$  12.2 min), caffeicinic acid(**3**)( $t_{\text{R}}$  13.2 min), isocaffeicinic acid(**4**)( $t_{\text{R}}$  13.9 min), 7,8-*erythro*-caffeic acid(**5**)( $t_{\text{R}}$  14.3 min)에서 존재하는 것으로 확



**Fig. 1.** HPLC chromatogram of reacted mixture of caffeic acid revealing the presence of metabolites **1**~**5** peaks. **1**, caffeic acid; **2**, phellinsin A; **3**, caffeicinic acid; **4**, isocaffeicinic acid; **5**, 7,8-*erythro*-caffeic acid.

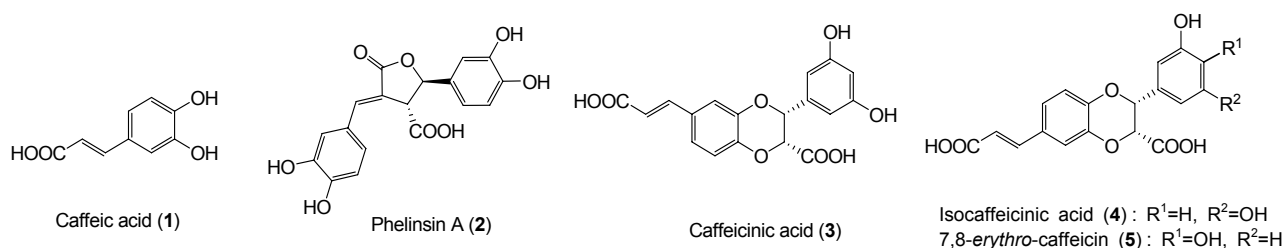


Fig. 2. Structures of enzymatic oxidation metabolites 2~5 of caffeic acid (1).

인하였다(Fig. 2).

Compound 2(phellinsin A): Yellow amorphous powder;  $[\alpha]_D^{20} + 28.0$  ( $c$  0.2, MeOH); FABMS  $m/z$  359  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR(600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.47(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-11), 7.17(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-13), 7.04(1H, dd,  $J=7.8$ , 1.8 Hz, H-17), 6.97(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-16), 6.73(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 6.71(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-9), 6.60(1H, dd,  $J=7.8$ , 1.8 Hz, H-10), 5.57(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-4), 3.93(1H, s, H-3).  $^{13}C$  NMR(150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  175.3 (C-18, 1), 149.4(C-15), 146.8(C-8), 146.7(C-7), 146.6 (C-14), 140.1(C-11), 133.8(C-5), 127.6(C-12), 125.6(C-17), 123.0(C-2), 118.3(C-10), 117.9(C-13), 116.6(C-16), 116.4(C-9), 113.5(C-6), 84.6(C-17), 56.3(C-18).

Compound 3(caffeicinic acid): Yellowish oil;  $[\alpha]_D^{20} + 21.0$  ( $c$  2.0, MeOH); UV(MeOH)  $\lambda_{max}(\log \epsilon)$ : 239(2.67), 291(2.23) nm; CD(MeOH)  $\lambda_{max}(\Delta\epsilon)$ : 225(-3.53), 236 (+2.68), 297(-0.31) nm; FABMS  $m/z$  359  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR, see Table 1.

Compound 4(isocaffeicinic acid): Yellowish oil,  $[\alpha]_D^{20} + 28.7$  ( $c$  0.2, MeOH); UV(MeOH)  $\lambda_{max}(\log \epsilon)$ : 240(2.65), 293(2.21) nm; CD(MeOH)  $\lambda_{max}(\Delta\epsilon)$ : 227(-3.61), 237 (+2.71), 295(-0.33) nm; FABMS  $m/z$  359  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR, see Table 1.

Compound 5(7,8-erythro-Caffeicinic acid): Yellowish oil,  $[\alpha]_D^{20} + 17.5$  ( $c$  0.2, MeOH); UV(MeOH)  $\lambda_{max}(\log \epsilon)$ : 239 (2.63), 292(2.20) nm; CD(MeOH)  $\lambda_{max}(\Delta\epsilon)$ : 226(-3.58), 236(+2.70), 296(-0.31) nm; FABMS  $m/z$  359  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR, see Table 1.

#### Pancreatic lipase 저해 활성 측정

Pancreatic lipase 저해 활성 측정은 Kim 등(26)이 행한 방법을 변형하여 실시하였다. Enzyme buffer(10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 6.8)에 porcine pancreatic lipase를 0.5 g/200 mL의 농도로 4°C에서 4,000 rpm으로 원심분리 한 후 상층액을 사용하여 169  $\mu$ L Tris buffer(100 mM Tris-HCl, 5 mM  $CaCl_2$ , pH 7.0)와 6  $\mu$ L enzyme buffer를 혼합

Table 1.  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectral data of compounds 3~5

Position	3		4		5	
	$\delta_H^2$ ( $J$ in Hz)	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ ( $J$ in Hz)	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ ( $J$ in Hz)	$\delta_C$ , mult.
1	—	128.8	—	128.8	—	128.3
2	6.74 (s)	120.1	6.74 (s)	120.1	6.84 (d, 1.8)	115.3
3	—	147.0	—	147.1	—	146.2
4	6.74 (s)	116.3	6.74 (s)	116.3	—	146.8
5	—	146.5	—	146.6	6.70 (d, 8.4)	116.0
6	6.84 (s)	115.4	6.84 (s)	115.4	6.73 (dd, 8.4, 1.8)	119.9
7	5.16 (d, 4.8)	77.3	5.18 (d, 4.8)	77.6	5.40 (d, 3.0)	76.8
8	4.79 (d, 4.8)	78.3	4.77 (d, 4.8)	78.0	4.98 (d, 3.0)	76.4
9	—	171.5	—	171.6	—	170.6
1'	—	129.8	—	129.7	—	130.0
2'	7.18 (d, 1.8)	117.7	7.21 (d, 1.8)	117.5	7.18 (d, 1.8)	117.6
3'	—	144.7	—	144.1	—	144.8
4'	—	146.1	—	146.5	—	146.3
5'	6.96 (d, 8.4)	118.5	6.93 (d, 8.4)	118.7	7.01 (d, 8.4)	118.5
6'	7.13 (dd, 8.4, 1.8)	123.4	7.13 (dd, 8.4, 1.8)	123.5	7.16 (dd, 8.4, 1.8)	123.3
7'	7.57 (d, 16.2)	146.0	7.57 (d, 16.2)	146.5	7.58 (d, 15.6)	146.0
8'	6.32 (d, 16.2)	117.5	6.33 (d, 16.2)	117.4	6.33 (d, 15.6)	117.6
9'	—	170.6	—	170.6	—	170.5

<sup>1)</sup> $^1H$  NMR measured at 600 MHz,  $^{13}C$  NMR measured at 150 MHz; obtained in  $CD_3OD$  with TMS as internal standard. Assignments based on HMQC and HMBC NMR spectra.

<sup>2)</sup> $J$  values (Hz) are given in parentheses.

한다. 샘플은 distilled water로 용해하여 다양한 농도로 희석한 후 사용한다. Enzyme과 sample을 먼저 37°C에서 15분 동안 shaking incubation 시킨 후 기질로 10 mM *p*-nitrophenyl butyrate(*p*-NPB)를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 shaking incubation 시킨다. 405 nm에서 흡광도를 정하였다. Pancreatic lipase 저해 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

**통계 처리**

실험 결과는 SPSS package program(version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 실험군 간 차이의 유의성은 one-way ANOVA와 Student *t*-test에 의하여 *P*<0.05 수준에서 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**Polyphenol oxidase에 의한 caffeic acid 산화 생성물의 구조 결정**

최근 pancreatic lipase는 지방질 가수분해 효소로 지방의 소화 및 흡수에 중요한 역할을 하며 pancreatic lipase의 활성을 억제하여 지방의 흡수를 막아 지방의 배설을 촉진하는 전략으로 많은 연구가 진행되고 있다. 현재 시판되고 있는 항비만 제제는 우수한 효능에도 불구하고 위장 장애, 과민증, 담즙분비 장애, 지용성비타민 흡수 억제 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 부작용이 없는 식품 및 천연물로부터 pancreatic lipase 저해제의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서 항비만 소재의 개발을 위해 배 유래의 polyphenol oxidase를 활용한 caffeic acid의 산화 생성물에 대해서 pancreatic lipase에 대한 저해 활성을 평가한 결과 161.2±2.8 µg/mL의 우수한 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어, ODS gel을 이용한 column chromatography를 수행하여 4종의 caffeic acid oligomer를 분리하였으며 분리한 단일물질에 대해서 지방분해효소인 pancreatic lipase에 대한 저해 활성을 평가하였다(Table 2).

**Table 2.** Inhibitory effects of isolated compounds 1~5 on pancreatic lipase activity

Compound	IC <sub>50</sub> value (µM) <sup>1)</sup>
Caffeic acid reacted mixture	161.2±2.8
Caffeic acid (1)	>300
Phellinsin A (2)	66.3±2.6
Caffeicinic acid (3)	109.6±3.7
Isocaffeicinic acid (4)	158.4±3.2
7,8-erythro-Caffeicin (5)	196.1±3.6
Orlistat <sup>2)</sup>	0.6±0.2

<sup>1)</sup>The concentration of a compound required for a 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of the pancreatic lipase activity. IC<sub>50</sub> values were calculated from dose inhibition curves. Inhibitory effects are expressed as the mean±SD of duplicate experiments.  
<sup>2)</sup>Orlistat was used as a positive control.

4종의 순수 분리 화합물에 대해서 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 및 DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HMQC, OESY 등의 2D NMR, MS, CD 스펙트럼을 측정 후 문헌치(27-29)와 비교하여 화합물 2는 phellinsin A, 화합물 3은 caffeicinic acid, 화합물 4는 isocaffeicinic acid, 화합물 5은 7,8-erythro-caffeicin으로 동정하였다.

**단일물질의 pancreatic lipase 저해 활성 평가**

비만은 당뇨, 암, 뇌졸중 및 심장병 등의 질병과 밀접한 관련성이 알려져 있어 비만의 예방 및 치료와 관련된 소재 개발의 중요성이 강조되고 있는 실정이다. 현재 시판중인 비만치료제로서 orlistat(상품명: Xenical)은 triglyceride를 분해하는 역할의 췌장 지방분해효소인 lipase에 비가역적인 결합을 하여 불활성화시킴으로써 triglyceride 및 cholesterol의 흡수를 적절히 감소시킵고 동시에 배설시키는 기작으로 항비만 효능을 나타내는 것이 알려져 있으나 복부고통 및 설사 등의 부작용이 문제시되고 있어(9), 이들 부작용이 없는 천연 항비만 소재 개발을 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(11). Pancreatic lipase 저해 활성을 나타낸 배 유래 polyphenol oxidase 활용 caffeic acid 산화반응물에 대해서 EtOAc 분획 후 그 가용부에 대해서 ODS 칼럼크로마토그래피를 이용한 물질의 분리 및 정제를 수행하였다. 얻어진 화합물의 구조는 furan-type 리그난(2) 1,4-benzodioxane-type 네오리그난(3~5)으로 구조를 결정하였으며, 입체구조에 대해서도 기기분석의 결과를 통하여 결정하였다. 얻어진 순수한 화합물에 대해서 pancreatic lipase 저해능을 평가하였고, 그중에서도 furan-type 리그난인 phellinsin A(2)가 66.3±2.6 µM의 가장 강한 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 또한 1,4-benzodioxane-type 네오리그난 중에서는 caffeicinic acid(3)가 109.6±3.7 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 구조 이성질체인 isocaffeicinic acid(4)가 158.4±3.2 mM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냄을 확인하였다. 최근의 식물 및 미생물 등의 천연 소재로부터 지방의 소화 효소를 효과적으로 저해하는 성분들과 관련하여 다양한 성분이 분리되었으며, 그중에서 saponin, flavonoid, catechin, terpenoid 등의 화합물이 강력한 효소 저해 활성을 통한 항비만 선도물질로서 주목을 받고 있다(30). 또한 물푸레나무로부터 강한 지방분해효소 활성을 나타내는 lignan 화합물인 acernikol, dihydrobuddlenol B가 동정되었으며(31), 태국의 열대우림식물인 *Cotyleobium melanoxylo*n으로부터 강한 지방분해효소 활성을 나타내는 stilbene 유도체인 vaticanol A, vaticanol E, vaticanol G가 동정되었다(32). 최근 본 연구팀에서 천연물 유래 산화효소를 활용한 caffeic acid의 산화반응 생성물에 대한 cyclooxygenase-2에 대한 저해 활성(29)을 확인하였으며, 항비만 소재 개발 관련 효소인 pancreatic lipase에 대한 lignan 화합물의 저해활성에 대한 보고는 이번이 처음이고 효능을 나타낸 본 화합물 등에 대하여 세포실험 및 동물실험을 통해 추가적인 항비만 효능 검증

실시하여 새로운 기능성 물질로서의 가능성을 모색할 필요가 있다고 사료된다.

## 요 약

천연식물에 광범위하게 존재하는 대표적인 페닐프로파노이드 화합물인 caffeic acid에 대해 배 유래의 polyphenol oxidase로 산화반응을 수행하여 상대적으로 높은 pancreatic lipase 저해 활성(IC<sub>50</sub>; 161.2±2.8 µg/mL)을 확인하였으며, 이는 caffeic acid와 비교하였을 경우 활성이 상승함을 알 수 있었다. Caffeic acid 산화반응물에 대해서 C<sub>18</sub> 겔을 활용한 column chromatography를 수행하여 4종의 리그난 화합물을 분리하였고, 각 화합물의 화학구조는 NMR 스펙트럼 데이터 해석 및 표준과의 HPLC 직접 비교를 통하여 phellinsin A(2), caffeicinic acid(3), isocaffeicinic acid(4), 7,8-erythro-caffeicin(5)으로 동정하였다. 이들 화합물중 phellinsin A(2)는 IC<sub>50</sub> 값이 66.3±2.6 µM로 가장 강한 효능을 나타내었으며, 다음으로 caffeic acid 2분자의 산화 결합을 통해 생합성된 caffeicinic acid(3)의 IC<sub>50</sub> 값이 109.6±3.7 µM의 저해능을 나타내었다. 배에 존재하는 polyphenol 산화효소에 의해 생합성된 caffeic acid 이량체가 pancreatic lipase 저해 활성 물질임을 확인하였으며, 이들 활성은 caffeic acid가 결합 양상에 따른 화합물의 구조에 따라 다름이 시사되었다. 향후 이들 활성물질의 활성 기작에 대한 연구가 필요하며 본 연구 결과는 보다 우수한 pancreatic lipase 저해능을 가지는 새로운 선도화합물 발굴을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 항비만 물질의 상용화를 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Bray GA, Popkin BM. 1998. Dietary fat intake dose affect obesity. *Am J Clin Nutr* 68: 1157-1173.
- Bray GA, Popkin BM. 1999. Dietary fat affects obesity rate. *Am J Clin Nutr* 70: 572-573.
- Levinson ML. 1977. Obesity and health. *Prev Med* 6: 172-180.
- Rexrode KM, Manson JE, Hennekens CH. 1996. Obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 11: 490-495.
- Sjöström LV. 1992. Morbidity of severely obese subjects. *Am J Clin Nutr* 55: 508S-515S.
- Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H. 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34: 441-445.
- Drent ML, Larsson I, William-Olsson T, Quaade F, Czubayko F, von Bergmann K, Strobel W, Sjöström L, van der Veen EA. 1995. Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19: 221-226.
- Hadváry P, Lengsfeld H, Wolfer H. 1988. Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem J* 256: 357-361.
- Collins P, Williams G. 2001. Drug treatment of obesity: from past failures to future successes?. *Br J Clin Pharmacol* 51: 13-25.
- Yamamoto M, Shimura S, Itoh Y, Ohsaka T, Egawa M, Inoue S. 2000. Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, *Nomame Herba*, on rats fed a high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 758-764.
- Kim HY, Kang MH. 2005. Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. *Phytother Res* 19: 359-361.
- Lee EM, Lee SS, Chung BY, Cho JY, Lee IC, Ahn SR, Jang SJ, Kim TH. 2010. Pancreatic lipase inhibition by C-glucosidic flavones isolated from *Eremochloa ophiuroides*. *Molecules* 15: 8251-8259.
- Hong JY, Shin SR, Bae MJ, Bae JS, Lee IC, Kwon OJ, Jung JW, Kim YH, Kim TH. 2010. Pancreatic lipase inhibitors isolated from the leaves of cultivated mountain ginseng (*Panax ginseng*). *Korean J Food Preserv* 17: 727-732.
- Park CH, Chung BY, Lee SS, Bai HW, Cho JY, Jo C, Kim TH. 2013. Radiolytic transformation of rotenone with potential anti-adipogenic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 1099-1103.
- Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. 1988. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48: 5941-5946.
- Wang GF, Shi LP, Ren YD, Liu QF, Liu HF, Zhang RJ, Li Z, Zhu FH, He PL, Tang W, Tao PZ, Li C, Zhao WM, Zuo JP. 1988. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antiviral Res* 83: 186-190.
- Gupta P, Akanksha, Siripurapu KB, Ahmad A, Palit G, Arora A, Maurya R. 2007. Anti-stress constituents of *Evolvulus alsinoides*: an ayurvedic crude drug. *Chem Pharm Bull* 55: 771-775.
- Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. 1994. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 41: 9-13.
- Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zadunaisky JA, Huang MT, Ferraro T, Conney AH, Grunberger D. 1993. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res* 53: 1255-1261.
- Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efron L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. 1988. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44: 230-232.
- Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H. 2000. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol* 38: 467-471.
- Li SY, Chang CQ, Ma FY, Yu CL. 2009. Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in golden hamsters fed on high fat diet. *Biomed Environ Sci* 22: 122-129.
- Kim TH, Kim JK, Ito H, Jo C. 2011. Enhancement of pancreatic lipase inhibitory activity of curcumin by radiolytic transformation. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 1512-1514.
- Fujimoto A, Shingai Y, Nakamura M, Maekawa T, Sone Y, Masuda T. 2010. A novel ring-expanded product with enhanced tyrosinase inhibitory activity from classical Fe-catalyzed oxidation of rosmarinic acid, a potent antioxidative Lamiaceae polyphenol. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 7393-7396.

25. Kim TJ, Silva JL, Jung YS. 2011. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. *Food Chem* 126: 116-120.
26. Kim JH, Kim HJ, Park HW, Youn SH, Choi DY, Shin CS. 2007. Development of inhibitors against lipase and  $\alpha$ -glucosidase from derivatives of monascus pigment. *FEMS Microbiol Lett* 276: 93-98.
27. Hwang EI, Yun BS, Kim YK, Kwon BM, Kim HG, Lee HB, Jeong WJ, Kim SU. 2000. Phellinsin A, a novel chitin synthases inhibitor produced by *Phellinus* sp. PL3. *J Antibiot* 53: 903-911.
28. Sousa EP, Silva AMS, Pinto MMM, Pedro MM, Cerqueira FAM, Nascimento MSJ. 2002. Isomeric kielcorins and dihydroxyxanthones: Synthesis, structure elucidation, and inhibitory activities of growth of human cancer cell lines and on the proliferation of human lymphocytes *in vitro*. *Helv Chim Acta* 85: 2862-2876.
29. Bae JS, Kim TH. 2012. Enzymatic transformation of caffeic acid with enhanced cyclooxygenase-2 inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 793-796.
30. Birari RB, Bhutani KK. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today* 12: 879-889.
31. Matsuda H, Asao Y, Nakamura S, Hamao M, Sugimoto S, Hongo M, Pongpiriyadacha Y, Yoshikawa M. 2009. Antidiabetogenic constituents from the Thai traditional medicine *Cotylelobium melanoxylon*. *Chem Pharm Bull* 57: 487-494.
32. Ahn JH, Shin EJ, Liu Q, Kim SB, Choi KM, Yoo HS, Hwang BY, Lee MK. 2012. Lignan derivatives from *Fraxinus rhynchophylla* and inhibitory activity on pancreatic lipase. *Nat Prod Sci* 18: 116-120.