

## 울릉 마가목의 클로로겐산 이성체의 최종당화산물의 생성 저해 및 라디칼 소거 활성

- 연구노트 -

김 태 훈

대구대학교 식품공학과

### Chlorogenic Acid Isomers from *Sorbus commixta* of Ulleung Island Origin and Their Inhibitory Effects against Advanced Glycation End Product (AGE) Formation and Radical Scavenging Activity

Tae Hoon Kim

Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University

**ABSTRACT** Advanced glycation end product (AGE) formation and reactive oxygen species are potential therapeutic targets for the prevention of diabetic nephropathy and other pathogenic complications. Activity-guided isolation of an ethylacetate-soluble portion of 80% methanolic extract from fruits of *Sorbus commixta* of the Ulleung Island origin using AGE formation inhibition assay led to the isolation and identification of three caffeoylquinic acid derivatives of a previously known structure, 3-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid; 1), 4-*O*-caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid; 2), and 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid; 3). The structures of these compounds were confirmed by interpretation of nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data. Among the isolates, the major metabolite, neochlorogenic acid (1) showed the most potent inhibitory effect against AGE formation with an IC<sub>50</sub> value of 167.5±3.5 μM. Furthermore, all isolated chlorogenic acid isomers were evaluated for their radical scavenging activity against peroxynitrite, and structurally related isomers 1, 2, and 3 exhibited potent inhibitory effects in this radical scavenging assay. This result suggests that the monocaffeoyl quinic acid derivatives isolated from *S. commixta* might be beneficial for the regulation of diabetic complications and related diseases.

**Key words:** *Sorbus commixta*, diabetic complications, chlorogenic acid isomers, advanced glycation end products (AGEs), peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)

## 서 론

당뇨합병증의 주요 원인으로 알도스 환원효소 관련 polyol pathway flux의 증가, protein kinase C의 활성화, 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs) 생성 증가가 알려져 있으며(1), 이들 원인에 의하여 당뇨병성 신증, 망막증, 백내장, 동맥경화 등의 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있다(2). 특히 AGEs는 고혈당 조건에서 환원당과 단백질의 비효소적 반응에 의해 형성되는데 한번 생성되면 분해되기 힘들어 정상혈당으로 회복되어도 분해되지 않고 혈액 단백질이나 여러 조직에 결합하여 장기의 손상을 유발한다(3). 당뇨합병증의 예방 및 치료제 개발과 관련하여 최근에는 AGEs의 생성 억제제 및 생성된 AGEs의 조직 내 결합(AGEs-protein cross-link)을 억제하는 물질의 개발

이 진행되고 있으며(4), 그중에서도 천연소재 중에 존재하는 최종당화산물 생성을 억제하는 방법이 주목받고 있다(5). 또한, 고혈당과 단백질의 비효소적 당화과정으로부터 생산되는 AGEs는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 생성이 가속화되거나 세포표면의 AGEs 수용체와 결합함으로써 ROS 생성을 유발하여 세포 손상을 유발하거나 당뇨합병증 유발에 관여하는 것으로 보고되어 있다(6). 이러한 접근방법을 기초로 하여 현재까지 알려진 대표적인 최종당화산물 생성 저해제로는 aminoguanidine, pyridoxamine, ALT-711 등이 있으며(7-9), 이들 중 aminoguanidine이 임상실험에서 독성을 나타내는 것이 보고됨에 따라 보다 부작용이 적은 안전한 최종당화산물 생성 저해 물질의 개발이 요구되고 있다(10). 최근에는 보다 안전하고 우수한 효능을 지닌 새로운 물질 발굴을 위하여 천연소재로부터 최종당화산물 생성 저해제 개발을 위한 연구(11)가 활발하게 진행되고 있으며, 다래나무(*Actinidia arguta*) 뿌리, 석류나무(*Punica granatum*) 껍질, 사철쑥(*Artemisia capillaris*) 전초 등의 천연 약용식물로부터 최종당화산물의 생성을 효과적으로 저해하는 천연물인 flavonoid, ellagitannin, neolig-

Received 8 April 2016; Accepted 16 May 2016

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

nan 등이 보고되었다(12-14).

마가목(*Sorbus commixta*)은 장미과의 낙엽활엽수로서 고산지대에 자생하는 소교목에 속하는 나무이며, 우리나라의 강원도와 남부지방의 해발 700 m 이상의 지역에서 군락을 형성하는 것이 보고되어 있다. 열매는 보통 붉은색이고 크기는 약 5~8 mm 정도로 가을이 되면 붉은색으로 물들며, 목재는 단단하여 예로부터 조각재로 많이 사용하였다. 우리나라를 비롯한 동양에서는 관절염과 성인병 치료를 위해 마가목 가지를 건조하여 음료로 음용하였으며, 열매를 활용한 마가목 술은 신장염에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(15). 마가목 열매에는 chalcone 배당체(16), 마가목 수피에서는 lupane-type triterpene, lignan, flavonoid 화합물이 보고되어 있으며(17), catechin 배당체의 항산화 활성이 보고되어 있다(18). 본 연구팀에서도 천연소재 유래의 당노합병증과 관련된 최종당화산물 생성 억제 천연소재 개발의 일환으로 다양한 약용식물로부터 AGEs 생성 저해 활성을 확인하였으며, 본 연구에서 울릉도산 마가목 열매에서 최종당화산물 저해 및 라디칼 소거 활성 물질을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기기

본 실험에서 사용한 bovine serum albumin(BSA), 3-morpholinopyridone(SIN-1), dihydrorhodamine123 (DHR123), aminoguanidine, penicillamine 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-10A(Tokyo, Japan)를 사용하였다. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR과 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, NOESY, HSQC, HMBC 스펙트럼은 CD<sub>3</sub>OD 용매(δ<sub>H</sub> 3.35, δ<sub>C</sub> 49.0)를 이용하여 600 MHz FT-NMR spectrometer(VNS600, Varian, Palo Alto, CA, USA)로 측정하였으며, 분석 및 column chromatography용 용매는 특급시약을 사용하였다. FABMS 스펙트럼은 Micro Mass Auto Spec OA-TOF(Micromass, Manchester, UK)를 활용하여 분자량을 측정하였으며, 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 순수물질을 분리하였다. 발색시약으로는 vanillin-sulfuric acid 시액과 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 Gm BH, Grödig, Austria)을 사용하였다.

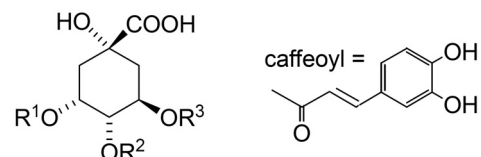
추출 및 분획

울릉도 자생의 신선한 마가목 열매 1.0 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 80% methyl alcohol(MeOH) 3 L로 3일간

3회 반복 추출한 다음 얻어진 결과물(47.0 g)에 대해 최종당화산물 생성 저해 효능을 평가한 결과 IC<sub>50</sub> 값이 311.2±2.7 µg/mL의 효능을 나타내었다. 계속해서 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획은 80% MeOH 추출물을 감압 농축하여 MeOH을 제거하고 물에 현탁된 추출시료를 저극성용매인 *n*-hexane으로 먼저 추출한 후 수용층을 다시 ethyl acetate(EtOAc), *n*-butyl alcohol(*n*-BuOH)을 이용하여 각각 순차적으로 3회 분획하여 추출하였다. 각 용매추출 분획을 감압 농축하여 건조시킨 후 *n*-hexane 가용분획(4.1 g), EtOAc 가용분획(7.2 g), *n*-BuOH 가용분획(8.2 g), H<sub>2</sub>O 가용분획(25.5 g)을 각각 얻었다. 각 가용분획에 대하여 당노합병증과 관련된 최종당화산물 억제능에 대한 활성을 측정하여 가장 강한 활성을 나타낸 울릉도 자생 마가목 열매 80% MeOH 추출물의 EtOAc 가용부(IC<sub>50</sub>=181.2±2.8 µg/mL)에 대해 activity-guided isolation을 수행하여 활성 물질의 분리 정제를 시행하였다.

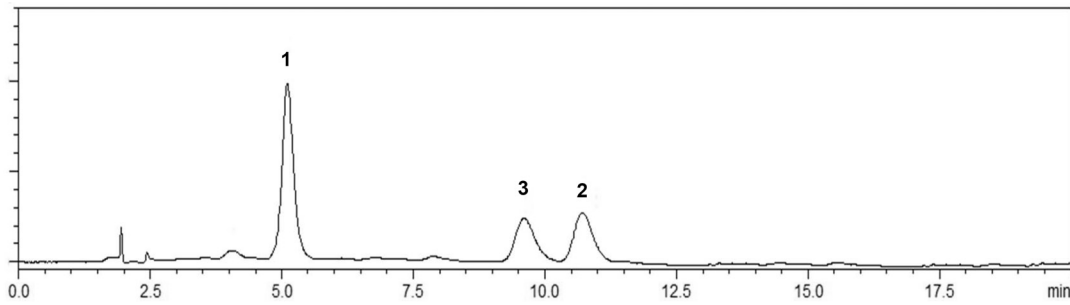
물질 분리 및 구조결정

EtOAc 가용분획 7.2 g을 H<sub>2</sub>O-MeOH 혼합용매를 용출 용매로 사용하여 Toyopearl HW-40(coarse grade; 1.5 cm i.d.×60 cm)을 사용한 column chromatography를 실시하여 총 6개의 용리액[SC-1, H<sub>2</sub>O-MeOH(100:0); SC-2, H<sub>2</sub>O-MeOH(7:3); SC-3, H<sub>2</sub>O-MeOH(1:1); SC-4, H<sub>2</sub>O-MeOH(3:7); SC-5, H<sub>2</sub>O-MeOH(0:10); SC-6, H<sub>2</sub>O-Me<sub>2</sub>CO(3:7)]을 얻었으며, 각 분획물에 대하여 활성을 테스트한 결과 SC-1(IC<sub>50</sub>=205.1±3.2 µg/mL)의 AGEs 생성 저해 활성을 확인하였다. 활성을 나타낸 용리액 SC-1(300 mg)에 대해 YMC gel ODS AQ 120S(1.1 cm i.d.×40 cm)를 이용한 칼럼크로마토그래피 및 ODS column(YMC gel ODS A-323, 4.6 mm×150 mm)을 이용한 semi-preparative HPLC를 수행하여 neochlorogenic acid(1)(32.3 mg), cryptochlorogenic acid(2)(17.2 mg) 및 chlorogenic acid(3)(13.8 mg)를 분리하였다(Fig. 1). 이동상 용매로는 1% HCOOH(solvent A)와 acetonitrile(solvent B)을 92:8의 비율로 혼합하여 isocratic mode로 분석하였으며(Fig. 2), 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 280 nm에서 화합물을 검출하였다. 분리한 화합물을 마가목 열매 80%



| Compound                   | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Neochlorogenic acid (1)    | Caffeoyl       | H              | H              |
| Cryptochlorogenic acid (2) | H              | Caffeoyl       | H              |
| Chlorogenic acid (3)       | H              | H              | Caffeoyl       |

Fig. 1. Structures of isolated compounds 1~3 from *Sorbus commixta*.



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of the 80% MeOH extract revealing the isolated metabolites 1~3. Neochlorogenic acid (1), cryptochlorogenic acid (2), chlorogenic acid (3).

MeOH 추출물과 분석하여 neochlorogenic acid(1)( $t_R$  5.1 min), cryptochlorogenic acid(2)( $t_R$  10.7 min) 및 chlorogenic acid(3)( $t_R$  9.6 min)에서 존재하는 것으로 확인하였다.

**Compound 1(neochlorogenic acid):** White amorphous powder; FABMS  $m/z$  355  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR(600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.57(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-7'), 7.05(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.94(1H, dd,  $J=8.0, 2.0$  Hz, H-6'), 6.77(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.31(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8'), 5.40(1H, m, H-5), 4.12(1H, m, H-3), 3.68(1H, dd,  $J=10.2, 3.6$  Hz, H-4), 1.90-2.14(4H, m, H-6, 2).  $^{13}C$  NMR(150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  177.3(C-7), 169.1(C-9'), 149.7(C-4'), 146.7(C-7'), 146.5(C-3'), 127.8(C-1'), 123.0(C-6'), 117.3(C-5'), 115.7(C-8'), 115.1(C-2'), 75.1(C-1), 74.3(C-4), 73.0(C-3), 68.1(C-5), 41.0(C-6), 36.7(C-2).

**Compound 2(cryptochlorogenic acid):** White amorphous powder; FABMS  $m/z$  355  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR(600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.57(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-7'), 7.05(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.96(1H, dd,  $J=8.0, 2.0$  Hz, H-6'), 6.74(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.35(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8'), 4.77(1H, m, H-5), 4.27(1H, m, H-3), 4.25(1H, dd,  $J=10.2, 3.6$  Hz, H-5), 2.20(1H, m, H-6), 2.15(1H, m, H-2), 2.03(1H, m, H-2), 2.00(1H, m, H-6).  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  177.4(C-7), 169.3(C-9'), 149.5(C-4'), 146.5(C-7'), 146.3(C-3'), 127.5(C-1'), 123.1(C-6'), 117.0(C-5'), 115.5(C-8'), 115.0(C-2'), 78.8(C-4), 74.7(C-1), 70.1(C-3), 65.2(C-5), 41.0(C-6), 37.7(C-2).

**Compound 3(chlorogenic acid):** White amorphous powder; FABMS  $m/z$  355  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR(600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.60(1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-7'), 7.09(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.99(1H, dd,  $J=8.0, 2.0$  Hz, H-6'), 6.82(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.30(1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8'), 5.35(1H, m, H-5), 4.20(1H, m, H-3), 3.76(1H, dd,  $J=10.2, 3.6$  Hz, H-5), 2.20(1H, m, H-6), 2.14(2H, m, H-2).

#### *In vitro* 최종당화산물 생성 저해 활성

최종당화산물 생성 저해 활성은 Vinson과 Howard(19)

가 행한 방법을 변형하여 실시하였다. 10 mg/mL의 우혈청 알부민(bovine serum albumin)을 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4)에 용해시키고, 0.2 M의 fructose와 glucose를 처리하였다. 이때 0.2 M phosphate buffer에 0.02% sodium azide를 넣어 반응기간 동안 박테리아의 생성을 방지하였다. 시료는 10%의 DMSO에 녹여 준비하였으며, 이 반응액에 추출물 또는 양성 대조군인 aminoguanidine을 첨가한 후 37°C에서 7일 동안 반응시켰다. 배양 후에는 spectrofluorometric detector(Infinite F200, Tecan Austria GmBH)를 이용하여 형광도(Ex: 350 nm, Em: 450 nm)를 측정하였다.

#### ONOO<sup>-</sup> 라디칼 소거능

시료를 10%의 DMSO에 녹여 농도별로 조제한 용액을 96-well plate에 각 well당 10  $\mu$ L씩 첨가한 후 90 mM sodium chloride와 5 mM potassium chloride가 함유된 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 5 mM DTPA(4  $\mu$ L) 및 5 mM DHR123(0.2  $\mu$ L)이 첨가된 용액을 제조하여 각 well당 180  $\mu$ L씩 첨가하였다. 계속해서 200  $\mu$ M SIN-1 용액을 10  $\mu$ L 첨가한 후 차광상태로 실온에서 10분간 방치한 다음 spectrofluorometric detector(Infinite F200, Tecan Austria GmBH)를 이용하여 형광도(Ex: 485 nm, Em: 530 nm)를 측정하였다(20). ONOO<sup>-</sup> 라디칼 소거 활성은 대조군에 대한 감소 정도로 나타내었으며 양성 대조군으로는 penicillamine을 이용하였다.

#### 통계처리

실험 결과는 SPSS package program(version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 실험군 간의 차이의 유의성은 one-way ANOVA와 Student's *t*-test에 의하여  $P < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

#### 활성추적 탐색을 통한 화합물의 구조 결정

최종당화산물은 고혈당 조건에서 조직에 축적되는 단백

질 당화산물로서 당뇨병 환자에서 정상인보다 수배 이상 함량이 증가하는 것으로 밝혀져 있어 당뇨병성 합병증과 밀접한 상관성을 갖는 중요한 요인으로 알려져 있다(21). 또한, 당뇨병으로부터 생성되는 산화적 스트레스에 의해 최종당화산물을 생성되고 세포표면의 수용체와 결합한 최종당화산물은 또다시 ROS를 생성하는 순환과정을 반복한다(6). 최근 AGEs는 당뇨합병증과 관련하여 중요한 역할을 하며 당뇨합병증 치료 및 예방 전략으로 많은 연구가 진행되고 있다. 최근에 개발된 대표적인 최종당화산물 생성 저해제는 aminoguanidine이 있으며 최근에는 독성이 보고되어 보다 안전하고 부작용이 없는 천연물로부터 AGEs 생성 저해제의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서 당뇨합병증에 효과적인 천연소재의 개발을 위해 울릉도 자생 마가목 열매의 80% MeOH 추출물의 EtOAc 가용부에 대해서 AGEs 생성에 대한 저해 활성을 평가한 결과 181.2±2.8 µg/mL의 우수한 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 ODS gel을 이용한 column chromatography를 수행하여 3종의 quinic acid isomer를 분리하였으며, 분리한 단일물질에 대해서 당뇨합병증과 관련된 AGEs 및 ONOO<sup>-</sup> 라디칼 소거 활성을 평가하였다.

3종의 분리한 순수한 화합물에 대해서 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 및 DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HMQC, NOESY 등의 2D NMR, FABMS 스펙트럼을 측정 후 문헌치(22,23)와 비교하여 화합물 1은 neochlorogenic acid, 화합물 2는 cryptochlorogenic acid, 화합물 3은 chlorogenic acid로 동정하였다.

**단일물질의 AGEs 생성 저해 활성**

AGEs 생성 저해 활성을 나타낸 울릉도산 마가목 열매의 EtOAc층에 대해서 Toyopearl HW-40 및 ODS 칼럼크로마토그래피를 충전제로 활용한 물질의 분리 및 정제를 수행하였다. 얻어진 화합물의 구조는 quinic acid 유도체로서 3-O-caffeoylquinic acid인 neochlorogenic acid(1), 4-O-caffeoylquinic acid인 cryptochlorogenic acid(2), 5-O-caffeoylquinic acid인 chlorogenic acid(3)로 이들 구조 이성체의 구조를 결정하였다. 얻어진 순수한 화합물에 대해서 당뇨합병증과 관련된 최종당화산물 생성 억제능을 평가하였고(Table 1), 그중에서도 quinic acid의 3번 위치에 caffeic acid가 결합되어 있는 neochlorogenic acid(1)가 가장 강한 167.5±3.5 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 또한, quinic acid의 4번 위치에 caffeic acid가 ester 결합한 cryptochlorogenic acid(2)가 185.9±3.7 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 이들 화합물의 구조이성질체인 chlorogenic acid(3)가 207.8±4.8 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냄을 확인하였다. 최근 당뇨합병증과 관련하여 식물 및 미생물 등의 천연소재로부터 최종당화산물의 생성을 효과적으로 저해하는 다양한 천연성분이 분리되었으며, 그중에서 flavonoid, ellagitanin, neolignan 등의 화합물이 강력한 최종당화산물 생

**Table 1.** Inhibitory effects of isolated compounds 1~3 from *S. commixta* on the formation of advanced glycation end products (AGEs) *in vitro*

| Compound                     | IC <sub>50</sub> value (µM) <sup>1)</sup> |
|------------------------------|---|
| 80% MeOH extract             | 311.2±2.7 <sup>c2)</sup>                  |
| <i>n</i> -Hexane extract     | —   |
| EtOAc extract                | 181.2±2.8 <sup>b2)</sup>                  |
| <i>n</i> -BuOH extract       | —   |
| H <sub>2</sub> O extract     | —   |
| Neochlorogenic acid (1)      | 167.5±3.5 <sup>a</sup>                    |
| Cryptochlorogenic acid (2)   | 185.9±3.7 <sup>b</sup>                    |
| Chlorogenic acid (3)         | 207.8±4.8 <sup>b</sup>                    |
| Aminoguanidine <sup>3)</sup> | 872.3±5.1 <sup>d</sup>                    |

<sup>1)</sup>All tested samples were examined in triplicated experiments.  
<sup>2)</sup>Results expressed as IC<sub>50</sub> value using µg/mL unit.  
<sup>3)</sup>Aminoguanidine was used as a positive control.  
 Means with different letters (a-d) within the column differ significantly (*P*<0.05).

성 저해를 통한 당뇨합병증 예방 및 치료와 관련된 선도물질로서 주목을 받고 있다(12-14). 또한, 산수유로부터 얻어진 gallic acid 유도체인 7-O-galloyl-D-sedoheptulose가 최종당화산물에 효과적인 물질로서 동정되었으며(24), 상항버섯으로부터 강한 최종당화산물 생성 저해 활성을 나타내는 페놀성의 유도체인 interfungins A가 동정되었다(25). 최근 본 연구팀에서 천연물유의 생리활성 소재 개발을 위한 연구를 수행 중이며, 당뇨합병증에 효과적인 소재 개발 관련 타겟인 최종당화산물에 대한 마가목 및 마가목의 페놀성 화합물의 활성에 대한 보고는 이번이 처음이며, 효능을 나타낸 본 화합물 등에 대하여 쥐의 수정체를 활용한 백내장에 대한 효능을 평가하고 있으며, 세포실험 및 동물실험을 통해 추가적인 효능 검증을 시행하여 새로운 기능성 물질로서의 가능성을 모색할 필요가 있다고 생각한다.

**단일물질의 ONOO<sup>-</sup> 라디칼 저해 활성**

생체조직의 노화와 관련된 각종 퇴행성 질환 및 생활습관성 질병이 사회적 문제로서 주목을 받고 있으며, superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitric oxide(NO), nitrogen dioxide(·NO<sub>2</sub>), peroxyntirite(ONOO<sup>-</sup>) 등과 같은 활성산소종은 인간의 대사 과정에서 계속 발생하여 당뇨합병증 및 다양한 질병의 주요인자로 작용하고 있으며(26), 그중에서도 ONOO<sup>-</sup>는 당뇨병성 신증 환자의 신장 조직에서도 증가하는 것으로 이미 밝혀져 있다(27). 최근에 알려진 대표적인 최종당화산물 생성 저해제로인 aminoguanidine은 독성이 보고되어 보다 안전하고 부작용이 없는 천연물 유래의 AGEs 생성 억제물질의 개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 최종당화산물 생성 억제능을 나타낸 마가목의 EtOAc 분획물에 대해서 Toyopearl HW-40 및 ODS 칼럼크로마토그래피를 이용한 물질의 분리 및 정제를 수행하였다. 얻어진 화합물의 구조는 neochlorogenic acid(1), cryptochlorogenic acid(2) 및 chlorogenic acid(3)의 구조이성질체로 기기분석의 결과를

**Table 2.** ONOO<sup>-</sup> radical scavenging activity of isolated compounds 1~3 from *S. commixta*

| Compound                      | IC <sub>50</sub> value (μM) <sup>1)</sup> |
|-------------------------------|---|
| Neochlorogenic acid (1)       | 4.5±0.3 <sup>b</sup>                      |
| Cryptochlorogenic acid (2)    | 4.0±0.2 <sup>a</sup>                      |
| Chlorogenic acid (3)          | 5.7±0.4 <sup>d</sup>                      |
| L-Penicillamine <sup>2)</sup> | 5.2±0.3 <sup>c</sup>                      |

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub> values were calculated from dose inhibition curves. Scavenging effects are expressed as the mean±SD of triplicate experiments.

<sup>2)</sup>L-Penicillamine was used as a positive control.

Means with different letters (a-d) within the column differ significantly ( $P<0.05$ ).

통하여 구조를 결정하였으며, 그중에서도 quinic acid의 4번 위치에 caffeic acid가 결합되어 있는 cryptochlorogenic acid(2)가 가장 강한 라디칼 소거 활성인 4.0±0.2 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 구조이성질체인 neochlorogenic acid(1)가 4.5±0.3 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고, quinic acid의 5번 위치에 caffeic acid가 결합되어 있는 chlorogenic acid(3)가 5.7±0.4 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다(Table 2). 최근의 연구에서 페놀성 화합물과 라디칼 소거 활성은 밀접한 연관성이 있음이 구조-활성 상관관계 연구(28)를 통하여 밝혀졌으며, 페놀성 화합물을 함유한 약용식물인 로즈마리, 재스민 등에 대해서 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 나타내는 것으로 주목받고 있다(29).

최근 항산화 활성 성분의 분리와 관련하여 chlorogenic acid 구조이성질체의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 라디칼 소거 활성이 cryptochlorogenic acid가 50 μM에서 약 37%의 소거 활성을 나타내었으며, neochlorogenic acid는 50 μM에서 약 31%, chlorogenic acid는 50 μM에서 약 30%의 라디칼 소거 활성을 나타냄을 보고하였다(22). 본 연구팀에서 천연물 유래 항산화 물질의 개발을 위하여 울릉도산 마가목 열매의 EtOAc층에 대해서 Toyopearl HW-40 및 ODS 칼럼크로마토그래피를 증진제로 활용한 물질의 분리 및 정제를 수행하여 얻어진 3종의 quinic acid 구조이성질체인 neochlorogenic acid(1), cryptochlorogenic acid(2) 및 chlorogenic acid(3)에 대해서 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 확인하였으며, 울릉도산 마가목 열매에는 항산화 작용을 가지는 quinic acid 구조이성질체를 함유하는 것을 확인하였다. 이상의 연구 결과로부터 새로운 기능성 소재 개발을 위한 중요한 기초자료로 활용할 수 있으며 당뇨 합병증의 치료 및 예방을 위한 천연물로 활용이 가능할 것이라 생각한다.

## 요 약

천연물로부터 당뇨합병증에 효과적인 소재를 개발하기 위하여 본 연구를 수행하였으며, 울릉도산 마가목 열매의 80% methyl alcohol 추출물의 ethyl acetate 가용부로부터 최종 당화산물 생성 억제능(IC<sub>50</sub>; 181.2±2.8 μg/mL)을 확인하였

다. 효능성분의 동정을 위하여 C<sub>18</sub> 겔 등을 활용한 column chromatography를 수행하여 3종의 페놀성 화합물을 분리하였고, 각 화합물의 화학구조는 NMR 스펙트럼 데이터 해석 및 표준과의 HPLC 직접 비교를 통하여 neochlorogenic acid(1), cryptochlorogenic acid(2) 및 chlorogenic acid(3)로 동정하였다. 이들 화합물에 대해 최종당화산물 생성 억제능을 평가한 결과 neochlorogenic acid(1)가 가장 강한 167.5±3.5 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고, cryptochlorogenic acid(2)는 185.9±3.7 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 또한, 이들 물질에 대해 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 평가한 결과 cryptochlorogenic acid(2)가 가장 강한 라디칼 소거 활성인 4.0±0.2 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고, 구조이성질체인 neochlorogenic acid(1)가 4.5±0.3 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 이들 활성은 caffeic acid가 결합 양상에 따른 화합물의 구조에 따라 다름이 시사되었다. 향후 이들 활성 물질의 활성 기작에 대한 연구가 필요하며 본 연구 결과는 더욱 우수한 최종당화산물 생성 억제능을 가지는 새로운 선택화합물 발굴을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 당뇨합병증 예방 및 치료에 효과적인 천연물질의 상업화를 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

## 감사의 글

이 논문은 2015학년도 대구대학교 학술연구비지원에 의한 논문임.

## REFERENCES

- Brownlee M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625.
- Ahmed N. 2005. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67: 3-21.
- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. 2006. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 29: 1420-1432.
- Vlassara H. 1996. Advanced glycation endproducts and atherosclerosis. *Annal Med* 28: 419-426.
- Matsuda H, Wang T, Managi H, Yoshikawa M. 2003. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg Med Chem* 11: 5317-5323.
- Edelstein D, Brownlee M. 1992. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* 41: 26-29.
- Ceriello A. 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "casual" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 26: 1589-1596.
- Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR. 2002. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 51: 2826-2832.
- Doggrell SA. 2001. ALT-711 decreases cardiovascular stiffness and has potential in diabetes, hypertension and heart

- failure. *Expert Opin Investig Drugs* 10: 981-983.
10. Rahbar S, Figarola JL. 2003. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 419: 63-79.
  11. Yokozawa T, Nakagawa T, Terasawa K. 2001. Effects of oriental medicines on the production of advanced glycation endproducts. *J Tradit Med* 18: 107-112.
  12. Jang DS, Lee GY, Lee YM, Kim YS, Sun H, Kim DH, Kim JS. 2009. Flavan-3-ols having a  $\gamma$ -lactam from the roots of *Actinidia arguta* inhibit the formation of advanced glycation end products *in vitro*. *Chem Pharm Bull* 57: 397-400.
  13. Ito H, Li P, Koreishi M, Nagatomo A, Nishida N, Yoshida T. 2014. Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products. *Food Chem* 152: 323-330.
  14. Islam MN, Ishita IJ, Jung HA, Choi JS. 2014. Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties. *Food Chem Toxicol* 69: 55-62.
  15. Bae K. 2000. *The medicinal plants of Korea*. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, Korea. p 236.
  16. Bhatt LR, Bae MS, Kim BM, Oh GS, Cha KY. 2009. A chalcone glycoside from the fruits of *Sorbus commixta* Hedl. *Molecules* 14: 5323-5327.
  17. Na MK, An RB, Min BS, Lee SM, Kim YH, Bae KH. 2002. Chemical constituents from *Sorbus commixta*. *Nat Prod Sci* 8: 62-65.
  18. Na MK, An RB, Lee SM, Min BS, Kim YH, Bae KH, Kang SS. 2002. Antioxidant compounds from the stem bark of *Sorbus commixta*. *Nat Prod Sci* 8: 26-29.
  19. Vinson JA, Howard III TB. 1996. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J Nutr Biochem* 7: 659-663.
  20. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 16: 149-156.
  21. Sato T, Iwaki M, Shimogaito N, Wu X, Yamagishi S, Takeuchi M. 2006. TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. *Curr Mol Med* 6: 351-358.
  22. Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. 2000. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem* 48: 5512-5516.
  23. Merfort I. 1992. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* 31: 2111-2113.
  24. Yamabe N, Kang KS, Park CH, Tanaka T, Yokozawa T. 2009. 7-O-Galloyl-D-sedoheptulose is a novel therapeutic agent against oxidative stress and advanced glycation endproducts in the diabetic kidney. *Biol Pharm Bull* 32: 657-664.
  25. Lee YS, Kang YH, Jung JY, Lee S, Ohuchi K, Shin KH, Kang IJ, Park JHY, Shin HK, Lim SS. 2008. Protein glycation inhibitors from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull* 31: 1968-1972.
  26. Halliwell B. 1991. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection?. *Drugs* 42: 569-605.
  27. Thuraisingham RC, Nott CA, Dodd SM, Yaqoob MM. 2000. Increased nitrotyrosine staining in kidneys from patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 57: 1968-1972.
  28. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956.
  29. Choi HR, Choi JS, Han YN, Bae SJ, Chung HY. 2002. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytother Res* 16: 364-367.