

## 단풍취의 최종당화산물 생성 저해 및 라디칼 소거 물질의 동정

— 연구노트 —

정경한 · 김태훈

대구대학교 식품공학과

### Characterization of Anti-Advanced Glycation End Products (AGEs) and Radical Scavenging Constituents from *Ainsliaea acerifolia*

Gyeng Han Jeong and Tae Hoon Kim

Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University

**ABSTRACT** Reactive oxygen species (ROS) and advanced glycation end products (AGEs) are valuable therapeutic targets for the regulation of diabetic complications. Activity-guided isolation of the ethylacetate (EtOAc)-soluble portion of 70% ethanolic extract from aerial parts of *Ainsliaea acerifolia* was performed, followed by AGE formation inhibition assay for the characterization of four dicaffeoylquinic acid derivatives of a previously known structure, methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid (1), 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid (2), 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid (3), and methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid (4). The structures of these compounds were confirmed by interpretation of nuclear magnetic resonance (NMR, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, two-dimensional NMR) and mass spectroscopic data. Among the isolates, the major secondary metabolites, 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid (2) and 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid (3) showed the most potent inhibitory effects against AGE formation with IC<sub>50</sub> values of 0.6±0.1 μM and 0.4±0.1 μM, respectively. Furthermore, all isolated dicaffeoylquinic acid derivatives were evaluated for their radical scavenging activities using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical, and compound 3 exhibited the most potent inhibitory effect in a concentration-dependent manner. This result suggests that the caffeoylquinic acid dimers isolated from *A. acerifolia* might be beneficial for the prevention of diabetic complications and related diseases.

**Key words:** *Ainsliaea acerifolia*, diabetic complications, dicaffeoylquinic acid derivatives, advanced glycation end products (AGEs), ABTS<sup>+</sup>

## 서 론

최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)의 생성 증가, 알도스 환원효소(aldoase reductase, AR) 경로의 이상 및 protein kinase C(PKC)와 신장 조직 내 여러 세포와 작용하는 성장인자나 사이토카인(cytokine)의 활성화로 인한 세포의 기질 단백질 축적이 당뇨병증의 주요 원인으로 알려져 있으며(1), 이로 인하여 신경증, 망막증, 백내장, 신장병, 동맥경화 등의 합병증을 유발한다고 보고되고 있다(2). 그중에서도 AGEs는 고혈당 조건에서 환원당과 단백질의 비효소적 반응에 의하여 형성되는 것으로, 한번 생성되면 분해되지 않아 정상혈당으로 회복되어도 잔존하여 혈액 단백질이나 여러 조직과 결합하여 장기의 손상을 유발한다(3). 당뇨병증의 예방 및 치료제 개발과 관련하여 최근에는 AGEs의 생성 억제제 및 생성된 AGEs의 조직 내 결합

(AGEs-protein cross-link)을 억제하는 물질의 개발이 관심을 받고 있으며(4), 그중에서도 천연소재 중에 존재하는 최종당화산물 생성을 억제하는 방법이 주목을 받고 있다(5). 또한, 고혈당과 단백질의 비효소적 당화과정으로부터 생산되는 AGEs는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 생성이 가속화되거나 세포표면의 AGEs 수용체와 결합하여 ROS 생성으로 세포손상 및 당뇨병증 유발에 관여하는 것으로 보고되고 있다(6). 이러한 당뇨병증 유효소재 개발방법을 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 더욱 부작용이 적은 안전한 최종당화산물 생성 저해 물질의 개발의 필요성이 대두되고 있는 시점이다(10). 최근에는 더욱 안전하고 우수한 효능을 지닌 새로운 당뇨병증 유효 성분의 발굴을 위하여 천연소재로부터 최종당화산물 생성 저해제 개발을 위한 연구(11)가 활발하게 진행되고 있으며, 익소라(*Ixora undulate*)의 잎, 사과(*Malus domestica*)의 잎, 사철쭉(*Artemisia capillaris*) 전초 등의 천연물로부터 최종당화산물의 생성을 효과적으로 저해하는 화합물인 flavonoid,

Received 9 March 2017; Accepted 25 April 2017

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

dihydrochalcone, neolignan 등의 유효성분이 보고되었다(12-14).

단풍취(*Ainsliaea acerifolia*)는 국화과(Compositae)의 다년초로서 어린잎은 식용으로 쓰이며 국내의 산지에 자생하는 산채 자원 중의 하나이다. 중국에서 *Ainsliaea*속 식물 7종이 예로부터 류머티즘성 관절염과 장염 치료제 등에 이용되어 왔고 이전의 연구로부터 단풍취에 존재하는 성분으로는 sesquiterpene lactone, lignan, caffeoylquinic acid 등의 화합물의 존재가 밝혀졌으며, 이들 화합물은 항비만, 항당뇨, 항바이러스 등의 우수한 생리활성을 가지는 것이 보고된 바 있다(15,16). 본 연구에서는 단풍취의 70% 에탄올 추출물에서 우수한 AGEs 생성 저해 활성을 확인하였으며, 단풍취로부터 분리된 4종의 dicaffeoylquinic acid 유도체의 최종당화산물 저해 및 라디칼 소거 활성 물질을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

본 실험에 사용한 bovine serum albumin(BSA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS<sup>+</sup>), aminoguanidine, (+)-catechin 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-10A(Shimadzu, 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( $\delta_H$  3.35,  $\delta_C$  49.0)를 이용하여 600 MHz FT-NMR spectrometer(VNS600, Varian, Palo Alto, CA, USA)로 측정하였으며, 분석 및 칼럼크로마토그래피용 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, 칼럼크로마토그래피용 고정상은 YMC gel ODS AQ 120S(YMC Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 순수물질분리를 하였다. 흡광도 측정을 위한 spectrophotometer는 Infinite F200(Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)을 사용하였다.

### 재료

본 실험에 시료로 사용된 단풍취(*Ainsliaea acerifolia*)는 경북 영양군 수비면에서 2013년도 5월에 채취된 신선한 단풍취를 사용하였으며, 표본시료는 대구대학교 식품공학과 천연물화학실험실에 보관하고 있다.

### 추출 및 분획

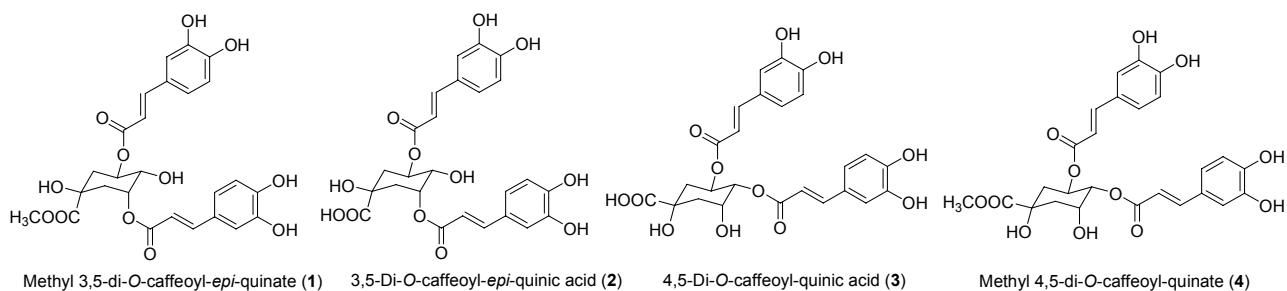
신선한 단풍취 5.0 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 70% 에탄올 25 L로 3일간 3회 반복 추출한 후 농축하였다. 얻어진 결과물(203.3 g)에 대해 최종당화산물 생성 저해효능을

평가한 결과 IC<sub>50</sub> 값이 28.3±3.1 µg/mL로 우수한 효능을 나타내었다. 계속해서 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획은 70% 에탄올 추출물(203.3 g)을 물에 현탁하여 저극성 용매인 *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(73.8 g), EtOAc 가용분획(56.0 g), *n*-BuOH 가용분획(27.9 g), H<sub>2</sub>O 가용분획(186.0 g)을 각각 얻었다. 각 가용분획에 대하여 당뇨합병증과 관련되어 있는 최종당화산물 억제능에 대한 활성을 측정하여 가장 강한 활성을 나타낸 단풍취 70% 에탄올 추출물의 EtOAc 가용부(IC<sub>50</sub>=5.5±1.1 µg/mL)에 대해 activity-guided isolation을 수행하여 활성물질의 분리 정제를 실시하였다.

### 화합물 분리 및 구조 결정

EtOAc 가용분획 20.0 g을 H<sub>2</sub>O-MeOH 혼합용매를 용출 용매로 사용하여 Toyopearl HW-40(coarse grade; 2.8 cm i.d.×51 cm)을 사용한 칼럼크로마토그래피를 실시하여 총 5개의 용리액[MP01, H<sub>2</sub>O-MeOH(100:0); MP02, H<sub>2</sub>O-MeOH(80:20); MP03, H<sub>2</sub>O-MeOH(60:40); MP04, H<sub>2</sub>O-MeOH(40:60); MP05; H<sub>2</sub>O-MeOH(0:100)]을 얻었으며, 각 분획물에 대하여 활성을 테스트한 결과 MP03에서 상대적으로 가장 우수한 AGEs 생성 저해 활성(IC<sub>50</sub>=3.8±2.5 µg/mL)을 확인하였다. 활성을 나타낸 용리액 MP03에 대해 YMC gel ODS AQ 120S(1.1 cm i.d.×40 cm)를 이용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(**1**)(6.5 mg), 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(**2**)(41.5 mg), 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(**3**)(35.0 mg) 및 methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(**4**)(27.3 mg)를 분리하였다(Fig. 1). HPLC 분석 시의 이동상 용매로는 1% formic acid(solvent A)와 acetonitrile(solvent B)을 사용하여 gradient mode로 A(80%)-B(20%)의 용매조성으로 20분 동안 분석 후 A(0%)-B(100%)로 25분 동안 물질을 분석하였으며, 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 254 nm에서 화합물을 검출하였다. 분리한 화합물을 단풍취 70% 에탄올 추출물과 분석하여 methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(**1**)(*t*<sub>R</sub> 6.5 min), 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(**2**)(*t*<sub>R</sub> 5.0 min), 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(**3**)(*t*<sub>R</sub> 4.3 min) 및 methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(**4**)(*t*<sub>R</sub> 8.2 min)의 존재를 HPLC 상에서 확인하였다.

**Methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(**1**):** Yellow amorphous powder; FABMS *m/z* 531 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.61(1H, d, *J*=15.6 Hz, H-7'), 7.54(1H, d, *J*=15.6 Hz, H-7''), 7.07(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.06(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2''), 6.97(1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.96(1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6''), 6.78(1H, d,



**Fig. 1.** Structures of isolated compounds 1~4 from *Ainsliaea acerifolia*.

$J=8.4$  Hz, H-5'), 6.77(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5''), 6.34(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8'), 6.21(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8''), 5.43 (1H, m, H-3), 5.39(1H, m, H-5), 3.96(1H, dd,  $J=9.0$ , 3.0 Hz, H-4), 3.69(3H, s, H-OCH<sub>3</sub>), 2.31(1H, dd,  $J=14.4$ , 3.6 Hz, H-6<sub>ax</sub>), 2.23(1H, dd,  $J=13.6$ , 3.0 Hz, H-2<sub>eq</sub>), 2.11(1H, dd,  $J=13.6$ , 9.0 Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2.06(1H, m, H-6<sub>eq</sub>); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  180.1(C-7), 168.0(C-9', 9''), 148.1(C-4''), 147.9(C-4'), 145.5(C-3''), 145.4(C-3'), 145.3(C-7', 7''), 126.7(C-1''), 126.5(C-1'), 121.5 (C-6', 6''), 111.5(C-5', 5''), 114.7(C-8''), 114.2(C-8'), 113.8(C-2', 2''), 74.9(C-1), 73.1(C-5), 71.8(C-4), 71.1 (C-3), 52.9(C-OCH<sub>3</sub>), 39.5(C-2), 36.3(C-6).

**3,5-Di-O-caffeoyl-epi-quinic acid(2):** Yellow amorphous powder; FABMS  $m/z$  517 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.60(1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-7'), 7.58 (1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-7''), 7.06(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 7.06(1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2''), 6.94(1H, dd,  $J=8.4$ , 1.8 Hz, H-6'), 6.94(1H, dd,  $J=8.4$ , 1.8 Hz, H-6''), 6.77(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 6.73(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5''), 6.40(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8'), 6.20(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8''), 5.53 (1H, ddd,  $J=15.0$ , 10.2, 4.8 Hz, H-3), 5.38(1H, d,  $J=3.6$  Hz, H-5), 3.91(1H, dd,  $J=9.6$  Hz, H-4), 2.27(1H, dd,  $J=15.6$  Hz, H-6<sub>ax</sub>), 2.17(2H, m, H-2), 2.09(1H, m, H-6<sub>eq</sub>); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  180.1(C-7), 168.0(C-9', 9''), 148.1(C-4''), 145.5(C-4'), 145.4(C-3''), 145.4(C-3'), 145.3(C-7', 7''), 126.7(C-1''), 126.5(C-1'), 121.5 (C-6', 6''), 115.1(C-5', 5''), 114.7(C-8''), 114.2(C-8'), 113.8(C-2', 2''), 74.9(C-1), 71.8(C-5), 71.8(C-4), 71.1 (C-3), 39.5(C-2), 36.3(C-6).

**4,5-Di-O-caffeoyl-quinic acid(3):** Yellow amorphous powder; FABMS  $m/z$  517 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.53(1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-7'), 7.53(1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-7''), 7.01(1H, d,  $J=2.6$  Hz, H-2'), 7.01 (1H, d,  $J=2.6$  Hz, H-2''), 6.77(1H, dd,  $J=8.4$ , 2.4 Hz, H-6'), 6.75(1H, dd,  $J=8.4$ , 2.4 Hz, H-6''), 6.96(1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-5'), 6.92(1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-5''), 6.27(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8'), 6.23(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8''), 5.61(1H, m, H-4), 5.17(1H, m, H-5), 4.41(1H, m, H-3), 2.37(1H,

m, H-6<sub>ax</sub>), 2.32(1H, m, H-2<sub>ax</sub>), 2.11(1H, m, H-2<sub>eq</sub>) 2.09 (1H, m, H-6<sub>eq</sub>); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  178.0(C-7), 168.7(C-9', 9''), 149.7(C-4''), 149.6(C-4'), 147.4 (C-3''), 147.3(C-3'), 146.9(C-7', 7''), 127.9(C-1''), 127.8 (C-1'), 123.3(C-6', 6''), 116.6(C-5', 5''), 115.2(C-8''), 115.1(C-8'), 115.0(C-2', 2''), 76.6(C-1), 75.3(C-4), 70.2 (C-5), 65.9(C-3), 42.0(C-2), 37.1(C-6).

**Methyl 4,5-di-O-caffeoyl-quininate(4):** Yellow amorphous powder; FABMS  $m/z$  531 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.59(1H, d,  $J=16.8$  Hz, H-7'), 7.50(1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-7''), 7.02(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2'), 7.00 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2''), 6.90(1H, dd,  $J=9.6$ , 1.8 Hz, H-6'), 6.90(1H, dd,  $J=9.6$ , 1.8 Hz, H-6''), 6.74(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 6.74(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5''), 6.28(1H, d,  $J=16.2$  Hz, H-8'), 6.16(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8''), 5.53(1H, m, H-5), 5.10(1H, dd,  $J=8.4$ , 3.0 Hz, H-4), 4.34(1H, m, H-3), 3.71(3H, s, H-OCH<sub>3</sub>), 2.31(1H, dd,  $J=14.4$ , 13.8, 3.6, 3.0 Hz, H-6<sub>ax</sub>), 2.25(2H, m, H-2), 2.08(1H, dt,  $J=14.4$ , 13.8, 6.6, 3.6 Hz, H-6<sub>eq</sub>); <sup>13</sup>C NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  175.3(C-7), 168.6(C-9', 9''), 149.9(C-4''), 149.9(C-4'), 148.8(C-3''), 147.8(C-3'), 146.9(C-7', 7''), 127.8(C-1''), 127.7(C-1'), 123.3(C-6', 6''), 116.6(C-5', 5''), 115.3(C-2', 2''), 114.8(C-8''), 114.7(C-8'), 75.9 (C-1), 75.0(C-5), 69.2(C-4), 68.7(C-3), 53.2(C-OCH<sub>3</sub>), 38.7(C-2), 38.5(C-6).

**In vitro 최종당화산물 생성 저해 활성**

최종당화산물 생성 저해 활성은 Vinson과 Howard(17)의 방법을 변형하여 실시하였다. 10 mg/mL의 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 dimethyl sulfoxide에 녹여 준비했으며, 이 반응액에 분리된 화합물 또는 양성 대조군인 aminoguanidine을 첨가한 후 37°C에서 7일 동안 반응시켰다. 반응 후에는 spectrofluorometric detector(Infinite F200, Tecan Austria GmBH)를 이용하여 흡광도(Ex: 350, Em: 450 nm)를 측정

하였다.

### ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성

단풍취에서 분리된 화합물의 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능을 Re 등(18)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS<sup>+</sup>와 2.4 mM K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> 동량을 혼합 후 실온, 암소에서 12시간 방치하여 라디칼의 생성을 유도한 다음 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.7~0.8 정도가 되도록 희석한 후 사용하였다. 희석한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액 100 µL와 분리된 화합물 100 µL를 혼합하여 실온에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 (+)-catechin을 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 백분율로 표시하였다.

### 통계처리

실험 결과는 SPSS package program(version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였다. 평균값은 one-way analysis of variance (ANOVA)로 비교하였으며, Duncan's multiple test를 실시하여 5% 유의수준에서 평균 간의 다중비교를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리된 화합물의 구조 결정

고혈당 조건에서 조직에 축적되는 단백질 당화산물을 최종당화산물이라고 하며, 당뇨병 환자에서 정상인보다 수배 이상 함량이 증가하여 당뇨병성 합병증과 밀접한 상관성을 갖는 중요한 요인으로 알려져 있다(19). 당뇨병으로부터 생성되는 산화적 스트레스에 의해 최종당화산물이 생성되고 세포표면의 수용체와 결합한 최종당화산물은 또다시 ROS를 생성하는 순환과정을 반복한다(6). 최근 최종당화산물은 당뇨병증과 관련하여 중요한 역할을 하며 당뇨병증 치료 및 예방 전략으로 많은 연구가 진행되고 있으며, 대표적인 최종당화산물 생성 저해제로 aminoguanidine이 개발되었으나 임상실험에서 독성이 보고되어 보다 안전하고 부작용이 없는 대체의 AGEs 생성 저해 물질의 개발이 활발하게 진행되고 있다(10). 천연물 유래의 당뇨병증 유효성분 개발의 일환으로 본 연구에서 우수한 효능을 확인한 단풍취 70% 에탄올 추출물의 EtOAc 가용부에 대해서 AGEs 생성에 대한 저해 활성을 평가한 결과, 5.5±1.1 µg/mL의 매우 우수한 IC<sub>50</sub> 값을 확인하여 Toyopearl HW-40 및 ODS gel을 이용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 4종의 dicaffeoylquinic acid 유도체를 분리하였으며, 분리한 단일물질에 대해서 당뇨병증과 관련된 AGEs 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 평가하였다.

반복적인 칼럼크로마토그래피를 활용하여 분리한 4종의 순수한 화합물에 대해서 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR의 1D NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HSQC, NOESY 등의 2D NMR 및 FABMS

**Table 1.** Inhibitory effects of isolated compounds **1**~**4** from *A. acerifolia* on the formation of advanced glycation end products (AGEs) *in vitro*

Compound	IC <sub>50</sub> value (µM) <sup>1)</sup>
70% ethanol extract	28.3±3.1 <sup>d2)</sup>
<i>n</i> -Hexane layer	125.8±2.8 <sup>b2)</sup>
EtOAc layer	5.5±1.1 <sup>e2)</sup>
<i>n</i> -BuOH layer	32.1±1.0 <sup>d2)</sup>
H <sub>2</sub> O layer	52.3±2.1 <sup>e2)</sup>
Methyl 3,5-di- <i>O</i> -caffeoyl- <i>epi</i> -quinic acid ( <b>1</b> )	23.6±6.9 <sup>d</sup>
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoyl- <i>epi</i> -quinic acid ( <b>2</b> )	0.6±0.1 <sup>f</sup>
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoyl-quinic acid ( <b>3</b> )	0.4±0.1 <sup>f</sup>
Methyl 4,5-di- <i>O</i> -caffeoyl-quinic acid ( <b>4</b> )	5.1±1.1 <sup>e</sup>
Aminoguanidine <sup>3)</sup>	882.9±7.1 <sup>a</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.

Different letters (a-f) within the same column indicate significant differences (*P*<0.05).

스펙트럼을 측정된 후 참고문헌(20-22)과 비교하여 화합물 **1**은 methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid, 화합물 **2**는 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid, 화합물 **3**은 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid, 화합물 **4**는 methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid로 동정하였다.

### 단일물질의 AGEs 생성 저해 활성 평가

단풍취 70% 에탄올 추출물의 EtOAc층으로부터 얻어진 순수한 화합물에 대해서 당뇨병증과 관련된 최종당화산물 생성 억제능을 평가하였고(Table 1), 그중에서도 quinic acid의 4번 및 5번 위치에 caffeic acid가 결합되어 있는 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(**3**)와 3번 및 5번 위치에 caffeic acid가 결합되어 있는 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(**2**)의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 0.4±0.1 µM과 0.6±0.1 µM로 1 µM 이하인 IC<sub>50</sub> 값으로 강력한 생성 저해 활성을 나타내었다. 그리고 quinic acid 1번 위치의 COOH기에 methyl ester가 결합되어 있는 methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(**4**)가 5.1±1.1 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(**1**)가 23.6±6.9 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냄을 확인하였다. 단풍취로부터 분리된 화합물 **1**~**4**는 양성대조군인 aminoguanidine(IC<sub>50</sub>=882.9±7.1 µM)과 비교하여 매우 우수한 최종당화산물 생성 억제능을 나타내었으며, 추가적 실험을 통하여 유망 식의약 후보 물질 개발을 위한 중요한 자료라 판단된다. 최근의 연구로부터 당뇨병증과 관련하여 식물 및 미생물 등의 천연 소재로부터 최종당화산물의 생성을 효과적으로 조절하는 다양한 구조의 천연 화합물이 분리 및 구조 결정되었으며, 그중에서 flavonoid, dihydrochalcone, neolignan 등의 화합물이 강한 최종당화산물 생성 저해를 통한 당뇨병증 예방 및 치료와 관련된 선도물질로서 주목을 받고 있다(12-14). 또한, *Derris ferruginea* 잎과 줄기에서 얻어진 isoflavonoid 유

도체인 derrisisoflavone G가 최종당화산물 생성 저해에 효과적인 물질로 동정되었으며(23), *Calophyllum flavoramulum* 잎에서도 강한 최종당화산물 생성 저해 활성을 나타내는 xanthone 유도체인 3-methoxy-2-hydroxyxanthone이 동정되었다(24). 본 연구팀에서는 지속해서 천연물 유래의 당뇨합병증 유효 활성 소재 개발을 위한 연구를 수행 중이며, 우수한 효능을 나타낸 이들 화합물에 대해서 세포실험 및 동물실험을 통해 추가적인 효능 검증을 실시하여 새로운 기능성 물질로서의 가능성을 검증할 필요가 있다고 생각된다.

**단일물질의 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성 평가**

청록색을 띠는 ABTS<sup>+</sup>는 항산화능의 물질에 의해 ABTS<sup>+</sup>가 소거되어 본래의 색상인 청록색이 탈색되는 원리를 이용한 항산화 활성 측정 방법으로 천연물로부터 항산화 활성 물질 개발을 위한 연구에 광범위하게 사용되고 있다(18). 생체조직의 노화와 관련된 각종 퇴행성 질환 및 생활습관성 질병이 사회적 문제로서 주목을 받고 있으며, 다양한 활성산소종들은 인간의 대사 과정에서 계속 발생하여 당뇨합병증 및 다양한 질병의 주요인자로 작용하고 있다(25). 우수한 최종당화산물 생성 억제능을 나타낸 단풍취 70% 에탄올 추출물의 EtOAc 분획물에서 분리한 화합물인 methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(1), 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(2), 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(3) 및 methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(4)에 대해 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 평가하였으며(Table 2), 그중에서도 가장 우수한 최종당화산물 생성 억제 활성을 나타낸 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(3)가 가장 강한 라디칼 소거 활성인 14.6±0.4 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 다음으로 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(2)가 18.8±0.4 µM의 우수한 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 또한, methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(4)가 23.4±1.2 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고, methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(1)가 41.2±2.3 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 quinic acid 부분의 COOH기에 methyl화는 라디칼 소거 활성을 약화시키는 결과를 확인하였다. 최근 페놀성 화합물의 구조적 차이와 라디칼 소거 활

성의 밀접한 연관성을 체계적인 연구를 통하여 구조-활성 상관관계(26)를 규명하였으며, 분자 내에 prenyl기를 포함하는 다량의 페놀성 화합물을 함유한 뽕나무과의 뽕나무속 (*Artocarpus*) 잎과 껍질 추출물이 우수한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 나타내는 것으로 주목받고 있고(27), 오리나무 (*Alnus incana*) 껍질 역시 우수한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성 갖는 페놀성 화합물을 함유하고 있는 것을 확인하였다(28).

본 연구에서 천연물 유래 항산화 물질의 개발을 위하여 단풍취 70% 에탄올 추출물의 EtOAc층에서 분리된 4종의 dicaffeoylquinic acid 유도체인 methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(1), 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(2), 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(3) 및 methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(4)에 대해서 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 확인하였으며, 단풍취에는 라디칼 소거능이 우수한 caffeoylquinic acid 이량체가 함유하는 것을 확인하였다. 이상의 연구 결과로부터 새로운 기능성 소재 개발을 위한 중요한 기초자료로 활용할 수 있으며 당뇨합병증의 치료 및 예방을 위한 천연물로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

**요 약**

당뇨합병증에 효과적인 천연물 유래의 신소재를 개발하기 위하여 본 연구를 수행하여 단풍취 70% 에탄올 추출물의 EtOAc 가용부로부터 최종당화산물 생성 억제능(IC<sub>50</sub>=5.5 ±1.1 µg/mL)을 확인하였다. 활성을 나타내는 성분의 동정을 위하여 C<sub>18</sub>겔 등을 활용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 4종의 dicaffeoylquinic acid 유도체 화합물을 분리하였고, 각 화합물의 화학구조는 NMR 스펙트럼 데이터 해석 및 표준품과의 HPLC 직접 비교를 통하여 methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(1), 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(2), 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(3) 및 methyl 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(4)로 동정하였다. 이들 화합물에 대해 최종당화산물 생성 억제능을 평가한 결과 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(3)가 가장 강한 0.4±0.1 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(2)가 0.6±0.1 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 또한, 이들 물질에 대해 ABTS<sup>+</sup> 소거 활성을 평가하여 4,5-di-*O*-caffeoyl-quinic acid(3)가 가장 강한 라디칼 소거 활성인 14.6 ±0.4 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 구조 이성질체인 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid(2)가 18.8±0.4 µM의 IC<sub>50</sub> 값을 확인하였다. 단풍취에서 분리한 화합물의 활성은 caffeic acid의 결합방식 및 methyl화 여부에 따른 화합물의 구조에 따라 다름이 시사되었다. 향후 우수한 활성을 나타낸 이들 화합물의 *in vivo* 실험을 통한 활성기작의 검증이 필요하다고 생각된다. 또한, 추가적인 연구를 통하여 식의약 소재로 활용이 가능한 새로운 천연신소재 발굴을 위한 기초자료제공 및 당뇨합병증에 효과적인 천연 물질의 상업화를 위한 귀중한 자료로 활용할 수 있으리라 판단된다.

**Table 2.** ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of isolated compounds 1~4 from *A. acerifolia*

Compound	IC <sub>50</sub> value (µM) <sup>1)</sup>
Methyl 3,5-di- <i>O</i> -caffeoyl- <i>epi</i> -quinic acid (1)	41.2±2.3 <sup>a</sup>
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoyl- <i>epi</i> -quinic acid (2)	18.8±0.4 <sup>c</sup>
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoyl-quinic acid (3)	14.6±0.4 <sup>c</sup>
Methyl 4,5-di- <i>O</i> -caffeoyl-quinic acid (4)	23.4±1.2 <sup>b</sup>
(+)-Catechin <sup>2)</sup>	17.3±1.1 <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>(+)-Catechin was used as a positive control. Different letters (a-c) within the same column indicate significant differences (*P*<0.05).

## 감사의 글

이 논문은 2016학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 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 JE. 2006. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 29: 1420-1432.
- Peyroux J, Sternberg M. 2006. Advanced glycation end-products (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol* 54: 405-419.
- 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, Anderson 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 Invest Drugs* 10: 981-983.
- Yokozawa T, Nakagawa T, Terasawa K. 2001. Effects of Oriental medicines on the production of advanced glycation endproducts. *J Tradit Med* 18: 107-112.
- Rahbar S, Figarola JL. 2003. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 419: 63-79.
- Sugimoto S, Wanas AS, Mizuta T, Matsunami K, Kamel MS, Otsuka H. 2014. Structure elucidation of secondary metabolites isolated from the leaves of *Ixora undulate* and their inhibitory activity toward advanced glycation end-products formation. *Phytochemistry* 108: 189-195.
- de Bernonville TD, Guyot S, Paulin JP, Gaucher M, Loufrani L, Henrion D, Derbré S, Guilet D, Richomme P, Dat JF, Brisset MN. 2010. Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry* 71: 443-452.
- 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.
- Choi SZ, Yang MC, Choi SU, Lee KR. 2006. Cytotoxic terpenes and lignans from the roots of *Ainsliaea acerifolia*. *Arch Pharm Res* 29: 203-208.
- Kim T, Jo C, Kim HS, Park YM, Wu YX, Cho JH, Kim TH. 2016. Chemical constituents from *Ainsliaea acerifolia* as potential anti-obesity agents. *Phytochem Lett* 16: 146-151.
- 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.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- 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.
- Kim HJ, Lee YS. 2005. Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. *Planta Med* 71: 871-876.
- Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. 1996. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull* 19: 966-970.
- Basnet P, Matsushige K, Hase K, Kadota S, Namba T. 1996. Four di-*O*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol Pharm Bull* 19: 1479-1484.
- Morel S, Helesbeux JJ, Séraphin D, Derbré S, Gatto J, Aumond MC, Abatuci Y, Grellier P, Beniddir MA, Pape PL, Pagniez F, Litaudon M, Landreau A, Richomme P. 2013. Anti-AGEs and antiparasitic activity of an original prenylated isoflavonoid and flavanones isolated from *Derris ferruginea*. *Phytochem Lett* 6: 498-503.
- Ferchichi L, Derbré S, Mahmood K, Touré K, Guilet D, Litaudon M, Awang K, Hadi AHA, Le Ray AM, Richomme P. 2012. Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry* 78: 98-106.
- Halliwell B. 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs* 42: 569-605.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956.
- Lin KW, Wang BW, Wu CM, Yen MH, Wei BL, Hung CF, Lin CN. 2015. Antioxidant prenylated phenols of *Artocarpus* plants attenuate ultraviolet radiation-induced damage on human keratinocytes and fibroblasts. *Phytochem Lett* 14: 190-197.
- Ponomarenko J, Trouillas P, Martin N, Dizhbite T, Krasilnikova J, Telysheva G. 2014. Elucidation of antioxidant properties of wood bark derived saturated diarylheptanoids: A comprehensive (DFT-supported) understanding. *Phytochemistry* 103: 178-187.