

고욤나무 잎으로부터 활성유도 분획법에 의한 α -Glucosidase 저해물질 분리 및 확인

김상준¹ · 김지애¹ · 김다혜¹ · 곽설화¹ · 유강열¹ · 장선일^{2,3} · 김선영^{1*} · 정승일^{1*}
¹전주생물소재연구소, ²전주대학교 보건관리학과, ³주아토크엔에이

Bio-assay Guided Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitors from the Leaves of *Diospyros lotus*

Sang Jun Kim¹, Ji-Ae Kim¹, Da Hye Kim¹, Seol Hwa Kwak¹, Kang-Yeol Yu¹,
Seon Il Jang^{2,3}, Seon-Young Kim^{1*} and Seung-II Jeong^{1*}

¹Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju 561-360, Korea

²Department of Health & Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

³Ato Q&A Corporation, Jeonju 560-759, Korea

Abstract – To establish the anti-diabetic(α -glucosidase inhibitory) activity of *D. lotus* leaf extract, isolate and identify the constituents responsible for the activity. The methanolic extract of leaves was partitioned between water, *n*-butanol and ethyl acetate. Bio-assay guided fractionation, based on inhibition of α -glucosidase, allowed isolation and identification of the active components. Liquid chromatography/mass spectrometry(LC/MS), ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra analyses demonstrated that the active compound was myricetin-3-O- α -L-rhamnoside(1). Compound 1 demonstrated a strong inhibition on the α -glucosidase, in vitro and α -glucosidase inhibitory value was calculated as 98.08%, when that of a reference drug, acarbose was estimated as 83.03%. The present study indicates compound 1 could be considered as an α -glucosidase inhibitor and developed as an important antidiabetes agent for type II diabetes therapy.

Key words – *Diospyros lotus*, α -Glucosidase, Myricetin-3-O- α -L-rhamnoside, Acarbose, Antidiabete

당뇨병(diabetes mellitus)은 현대에서 가장 중요한 만성 질환으로 꼽히며 특히 선진국일수록 발생 빈도가 높은 추세이다.¹⁾ 당뇨병은 인슐린 작용의 부족에 의한 만성 고혈당증이 지속됨에 따라 심근경색, 협심증, 시신경손상, 족부궤양 등 합병증이 발생하는 대사 이상을 수반하는 질환군으로 인슐린은 주로 탄수화물 대사에 관여하며 탄수화물 대사의 이상이 기본적인 문제이나, 이로 인해 체내의 모든 영양소 대사가 영향을 받게 되므로, 총체적인 대사성의 질병이라고 할 수 있다. 따라서 혈당조절은 당뇨병으로 인한 만성 합병증 발생을 예방하거나 지연 시킬 수 있는 방법으로 인슐린 분비의 기능이 비정상적으로 저하되는 환자의 경우 식사 후 췌장에서의 인슐린 분비 능력이 저하되고, 인슐린 감수성이 약화되어 혈당이 급격히 상승하는 것을 조절이 필요하다.^{2,4)} 현재 α -glucosidase 저해제로는 acarbose, voglibose 등이 임

상에서 널리 사용되고 있지만, 이러한 약물들은 공통적으로 복부팽만, 설사 등의 위장 장애와 같은 부작용을 야기하고 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 따라서 이러한 기존 약제들의 문제점들을 극복하기 위하여 새로운 α -glucosidase 저해물질을 찾는 연구들이 꾸준히 진행되고 있다.

고욤나무(*Diospyros lotus* L.)은 우리나라와 중국을 비롯한 아시아에서 자연적으로 자생하는 낙엽성 식물로 직접 과일을 섭취하거나 잎을 차로 가공하여 먹을 수 있다는 점과 생육이 좋고 기후환경에 강하여 감점을 붙쳐 감나무를 생산할 수 있기 때문에 많은 나라에서 재배하고 있다. 고욤나무 열매는 감보다 작다고 하여 소시(小柿), 열매 모양이 마치 소젓꼭지를 닮았다고 하여 우내시(牛奶柿)로 불리어졌으며 전통의약분야에서는 성숙한 과일인 고욤을 군천자(楡糰子)라고 하여 진정, 진통, 수렴 및 변비치료에 사용되어 왔다.⁶⁾ 고욤의 생화학적 성분은 지방산, 당, 플라보노이드 및 비휘발성 물질이 보고되었고, 최근에는 혈액의 항응

*교신저자(E-mail): siunite@hanmail.net, seon02@jbmi.re.kr
(Tel): +82-63-711-1050, +82-63-711-1053

고, 뇌세포 보호 작용, 항산화 및 항암효과에 대한 보고가 있다.^{7,9)} 고욤나무에 대한 연구는 주로 고욤씨 및 열매를 위주로 이루어졌으며 잎을 대상으로 한 연구는 거의 없으며 최근에 저자 등에 의해 고욤잎 추출물과 분획물의 항산화 및 α -glucosidase 저해 활성 및 플라보노이드 화합물의 정량을 보고한바 있다.¹⁰⁾ 본 연구에서는 α -glucosidase 저해 활성을 탐색하던 중 고욤나무 잎의 메탄올 추출물중 대조약물로 사용한 acarbose에 비하여 월등한 저해활성을 나타내는 부탄올 분획물 함유된 활성물질을 분리 정제하기 위하여 *in vitro* α -glucosidase 저해 활성을 지표로 하여 활성유도 분획법(bioactivity-guided fractionation)에 따라 고욤나무 잎 추출물의 분리, 정제를 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 시료는 전라북도 진안군 부귀면 수향리 신기마을에서 2013년 6월 30일에 채취하였다. 고욤나무 잎의 동정은 마을 주민으로부터 확인한 후 최종적으로 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준 교수님으로부터 동정을 받았다. 고욤나무 잎 표본(JSI-01)은 전주생물소재연구소에 보관하고 있다. 채취된 고욤나무 잎은 즉시 증류수로 세척한 후 5분간 증기찜을 한 후 실온에서 선풍기를 활용하여 건조하였으며, 최종적으로 건조기에 40°C로 12시간 동안 건조하여 분말로 제조하였다.

기기 및 시약 - 본 실험에 사용된 α -glucosidase, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(*p*-NPG), myricetin은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 추출, 분리 및 정제를 사용한 용매는 모두 특급(GR) 및 1급 시약을 사용하였으며, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum은 Jeol JMN-EX 400 spectrometer(Japan)을 이용하여 측정하였다. Column chromatography는 silica-gel(230-400 mesh, merck)을 사용하였고, TLC는 Kiesel gel 60 F₂₅₄(0.25 mm, Merck)을 사용하였다. prep-HPLC용 column은 JAI GS-310(JAICO. Ltd.) column을 사용하였다. 발색시약으로는 10% H₂SO₄ EtOH 용액을 사용하였으며, UV의 검색은 254와 365 nm에 측정하였다.

α -Glucosidase 효소저해 활성 - α -glucosidase 저해 활성을 측정하기 위하여 Tibbot 등의 방법¹¹⁾에 따라 반응 혼합액은 50 mM sodium succinate buffer(pH 4.2)에 *p*-nitrophenol- α -D-glucopyranoside(PNPG)를 용해시켜 1 mg/mL의 농도로 기질을 만들었다. 기질 50 μ L와 효소액 25 μ L를 혼합하고 대조구에는 증류수 25 μ L, 반응구에는 시료(0.1 mg/mL) 25 μ L를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N-NaOH 25 μ L를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 *p*-nitrophenol(PNP)은 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 양은 표준물질 *p*-nitrophenol로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여

다음의 식으로 저해율을 구하였다. Acarbose(1.0 mg/mL)을 양성 대조구로 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - \text{반응구의 PNP 생성량} / \text{대조구의 PNP 생성량}) \times 100$$

추출 및 분리 - 잘 건조된 고욤나무 잎을 분말로 만든 후 420 g을 10배 가량의 MeOH로 12시간 동안 냉침 시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 MeOH 추출물 76.85 g을 얻었다. 추출물을 증류수와 MeOH 혼합액(9:1)에 현탁시킨 후 동량의 *n*-hexane(Hx), chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc, EA) 및 *n*-butanol(*n*-BuOH)로 순서로 용매 분획하여 Hx 분획 2.58 g, C 분획 0.24 g, EtOAc 분획 5.80 g, *n*-BuOH 분획 10.80 g을 각각 얻었다. α -glucosidase 활성이 우수한 *n*-BuOH 분획물 5 g을 용출용매 CHCl₃:MeOH=97:3→60:40로 silica-gel(230-400 mesh, 800 g) column(ϕ =5.0×100 cm) chromatography를 실시하여 총 17개의 분획으로 나누었다. 그 중 활성을 측정된 뒤 효능이 우수한 분획 Fr. 16(78 mg)를 prep-HPLC(용매, MeOH, 254 nm) 화합물 1을 얻었다(Fig. 1).

화합물 1: Myricetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside(Myricitrin). Yellow powder, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.93 (br s, H-2'), 6.34 (d, *J*=2 Hz, H-8), 6.18 (d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.30 (d, *J*=1.1 Hz, H-1"), 4.20 (m, H-2"), 3.76 (dd, *J*=3.1, 9.4 Hz, H-3"), 3.51(dq, *J*=6.1, 9.4 Hz, H-5"), 3.29 (t, *J*=9.4 Hz, H-4"), 0.95 (d, *J*=6.3 Hz, H-6"); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 179.2 (C-4), 165.4 (C-7), 162.7 (C-5), 159.0 (C-2), 158.0 (C-9), 146.4 (C-3'), 146.4 (C-5'), 137.4 (C-4'), 135.8 (C-3), 121.5 (C-1'), 109.1 (C-6'), 109.1 (C-2'), 105.4 (C-10), 103.1 (C-1"), 99.3 (C-6), 94.2 (C-8), 73.3 (C-4"), 71.7 (C-3"), 71.5 (C-5"), 71.4 (C-2"), 17.2 (C-6").

결과 및 고찰

식물추출물 대상으로 α -glucosidase 저해제를 찾기 위해 고욤나무 잎 메탄올 추출물에서 α -glucosidase 저해효과를 나타냄을 알 수 있었으며, 92.07% 저해율을 보여주었다. 한편 동일한 실험조건 하에서 실시한 대조약물 acarbose의 저해율이 83.03%로 측정되어 고욤나무 잎 메탄올 추출물은 대조약물 acarbose 보다 높은 효소활성 저해효과를 나타내었다.

또한, 메탄올 추출물을 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc 및 *n*-BuOH로 단계적으로 용매분획하여 얻은 EtOAc 분획물 및 *n*-BuOH 분획물이 높은 저해효과를 나타내었다. 특히 *n*-BuOH 분획물의 경우 96.61%의 높은 활성 저해효과를 나타내었으며, EtOAc 분획물은 동일한 농도에서 90.60%, 그

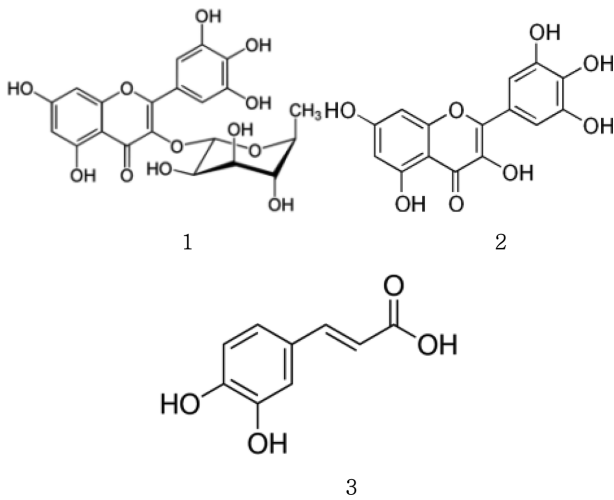


Fig. 1. Structures of isolated compounds from the leaves of *Diospyros lotus*. 1. myricitrin, 2. myricetin, and 3. caffeic acid.

러나 CHCl₃ 분획물은 미미한 효소 저해율을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 고욤나무 잎 추출물에 함유된 α-glucosidase 활성 저해 성분들은 주로 *n*-BuOH 분획물에 분포하는 것으로 예측되어 이 *n*-BuOH 분획물로부터 활성 저해성분들의 분리 정제를 시도하였다. 우선 *n*-BuOH 분획물을 silica gel column chromatography를 실시하여 Fr. 1~Fr. 17등 총 17개의 분획으로 나눈 후 각 분획의 활성 저해효과를 각각 측정하여 본 결과, Fr. 16는 78.0%의 높은 효소활성 저해효과를 보여준 반면 Fr. 1~Fr. 11은 모두 40% 이하의 활성을 나타내었다. 이 중 가장 우수한 저해효과를 나타낸 Fr. 16를 재차 prep-HPLC를 실시하여 정제한 결과, α-glucosidase에 대하여 강력한 효소저해활성을 나타내는 화합물 1을 분리하였다. 화합물 1은 미황색 분말로서 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum 등 각종 분광학적 data 를 문헌^{12,13}과 비교하여 본

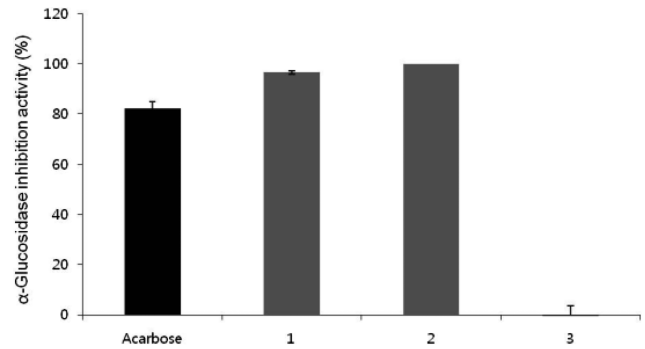


Fig. 3. α-glucosidase inhibitory activity of isolated compounds from the leaves of *Diospyros lotus*. 1. myricitrin, 2. myricetin, 3. caffeic acid. and acarbose.

결과 myricetin-3-O-α-L-rhamnoside (myricitrin)로 확인되었다(Fig. 1).

화합물 1은 α-glucosidase 활성을 저해하였으며, 활성 저해는 98.07%로 산출되었고, 대조약물로 사용한 acarbose (83.03%)에 비하여 훨씬 강력한 활성 저해효과를 나타내었다. 한편 화합물 1과 함께 Fr. 12로부터 분리된 화합물 3의 caffeic acid의 활성 저해는 10% 이하의 낮은 활성 저해율을 나타내었다. 또한 고욤나무 잎에서 분리한 화합물 1(myricitrin)의 구조와 α-glucosidase 활성 저해효과의 상호관계를 확인하기 위하여 화합물 1의 구조에 3번 위치에 rhamnoside의 1분자가 없는 고욤나무 잎 추출물의 주요성분 중의 하나로 보고된 화합물 2(myricetin)의 α-glucosidase 활성 저해효과가 대조약물로 사용한 acarbose에 버금가는 99.82%의 강력한 활성 저해효과를 나타내었다.

이 결과로 rhamnoside의 1분자가 α-glucosidase 활성 저해율에 구조적인 장애로 인해 약간 낮은 활성 저해율을 나타냈음을 알 수 있었다(Fig. 3).

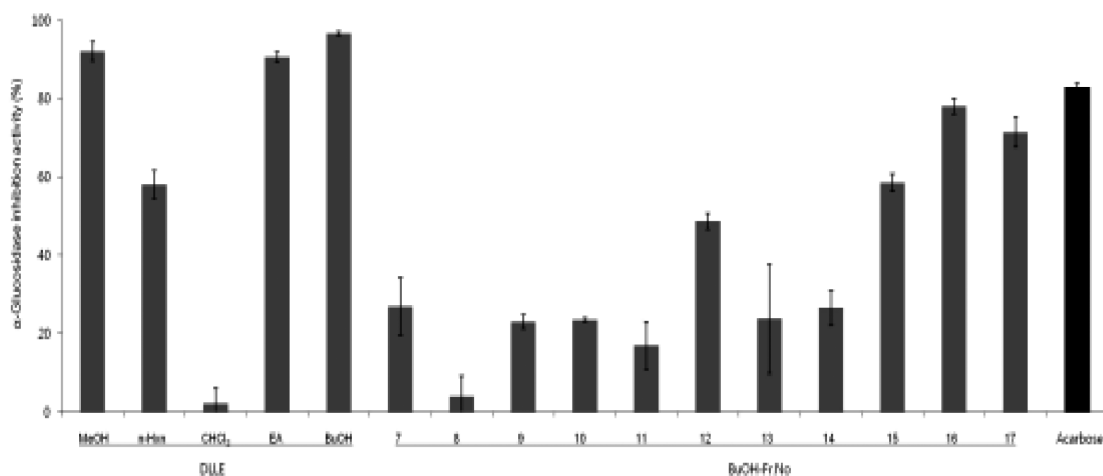


Fig. 2. α-glucosidase activity inhibition of extracts or fractions from the leaves of *Diospyros*. Data represent the mean±SD of at least three independent experiments.

결 론

당뇨병에 효과 있는 천연물 소재의 탐색하여 과학적인 실험근거를 목적으로 소장 흡수 저해효소인 α -glucosidase를 target로 저해율을 조사하였다. 소재중에 우리나라 고유의 생약자원인 고욤잎을 활성유도 분획법(bioactivity-guided fractionation)에 따라 분리, 정제를 시도 단일 물질로 myricetin-3-O- α -L-rhamnoside(myricitrin)을 얻었다. Myricitrin의 α -glucosidase 활성을 억제하는 효과가 대조약물로 사용한 acarbose(83.03%)에 버금가는 98.07%의 강력한 활성 저해 효과를 나타내었다. Myricitrin의 단일성분을 직접 또는 함유된 *n*-BuOH 분획물을 이용하여 항당뇨활성을 직접적으로 평가할 수 있는 일련의 표준 실험을 통하여 천연물의약이나 기능성식품 소재로의 개발가치가 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2013년도 지역산업기술개발사업(과제번호:R0002271)으로 산업통상자원부의 지원을 받아 연구되었다.

인용문헌

1. Korean Statistical Association. (2013) Annual report on the cause of death statistics. Korean Statistical Association, Seoul.
2. DeFronzo, R. A. (1992) Pathogenesis of type 2(non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia* **35**: 389-397.
3. Schwartz, S., Raskin, P., Fonseca, V. and Graveline, J. F. (1998) Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **338**: 861-866.
4. Hong, S. H., Kim, M. J., Noh, S. G., Suh, D. W., Youn, S. J., Lee, K. W., Lee, H. C., Chung, Y. S., Chung, H. R., Kwon, H. S., Cha, B. Y., Son, H. Y. and Yoon, K. H. (2008) A study on resistance in type 2 diabetic patient against commencement of insulin treatment. *Korean Diabetes J.* **32**: 269-279.
5. Said, A., Hawa, U. W., Nofal, S. M., Rashes, K. and Huefner, A. (2009). Pharmaco-chemical studies on the aqueous methanolic extract of *Diospyros lotus* Leaves. *Res. J. Phytochem.* **3**: 1-12.
6. Moghaddam, A. H., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bigdellou, R., Mohammadzadeh, S. and Ebrahimzadeh, M. A. (2012) Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta Pol. Pharm.* **69**: 687-692.
7. Ayaz, F. A. and Kadioglu, A. (1999) Fatty acid compositional changes in developing persimmon(*Diospyros lotus* L.) fruit. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* **27**: 257-261.
8. Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U. W., Rashed, K., Menichini, F., Frega, N. G. and Menichini, F. (2009) Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**: 264-270.
9. Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., Fazelian, M. and Eslami, B. (2009) In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Diospyros lotus* and *Pyrus boissieriana* growing in Iran. *Pharmacogn Mag.* **5**: 122-126.
10. Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, J. A., Kim, D. H., Kwak, S. H., Chung, C. H., Jeon, I. H., Jang, S. I. and Jeong, S. I. (2014) Anti-oxidant and α -glucosidase inhibition activity of extracts or fractions from *Diospyros lotus* L. leaves and quantitative analysis of their flavonoid compounds. *J. Life Sci.* **24**: 935-945.
11. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from berley. *Plant Mol. Biol.* **30**: 229-241.
12. Fayek, N. M., Monem, A. R., Mossa, M. Y., Meselhy, M. R. and Shazly, A. H. (2012) Chemical and biological study of *Manilkara zapota*(L.) Van Royen leaves(Sapotaceae) cultivated in Egypt. *Pharmacognosy Res.* **4**: 85-91.
13. Venkateswara, Rao, G., Sahoo, M. R., Madhavi, M. S. L. and Mukhopadhyay, T. (2014) Phytoconstituents from the leaves and seeds of *Manilkara zapota* Linn. *Der Pharmacia Lettre* **6**: 69-73.

(2015. 6. 8 접수; 2015. 6. 12 심사; 2015. 6. 15 게재확정)