

민박쥐나물 추출물의 Caffeoylquinic Acid 정량 및 Acetylcholinesterase 활성과 Peroxynitrite 농도에 대한 효과

누그로호 아궁¹ · 최재수² · 박희준^{3*}

¹람봉 망쿠라트 대학교 농식품공학과, ²부경대학교 식품영양학과, ³상지대학교 제약공학과

Quantification of Caffeoylquinic Acids and the Effect of the *Cacalia hastata* var. *orientalis* Extract on Acetylcholinesterase Activity and Peroxynitrite Concentration

Agung Nugroho¹, Jae Sue Choi² and Hee-Juhn Park^{3*}

¹Department of Agro-Industrial Technology, Lambung Mangkurat University, Banjarbaru 70714, Indonesia

²Department of Food Nutrition, Pukyong University, Busan 48513, Korea

³Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Abstract – To find the anti-Alzheimer's activity of *Cacalia hastata* var. *orientalis* (Compositae), caffeoylquinic acids were analyzed in this plant by HPLC and the inhibitory activities of the extract on cholinesterases including acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) and peroxynitrite (ONOO⁻) were assayed. Sum of caffeoylquinic acids in the 80% MeOH extract was quantitatively higher in leaves (35.8% of the extract) than in stems (3.7%). The compound, 3,5-dicaffeoylquinic acid, was contained in the highest amount in the leaf (44.32 mg/g dry weight). The IC₅₀s of the 80% MeOH extract were shown to be 67.45 µg/ml for AChE, and 8.59 µg/ml (for ONOO⁻), respectively, suggesting that the leaves would have the anti-Alzheimer's activity due to the high content of caffeoylquinic acids.

Keywords – *Cacalia hastata* var. *orientalis*, Compositae, Caffeoylquinic acids, Acetylcholinesterase, Peroxynitrite, Anti-Alzheimer

알츠하이머 질환은 노령층에서 나타나는 신경퇴행성 질환으로서 치매의 대부분을 차지하는 질환이다. 지속적인 스트레스로 뇌 중에서도 기억, 인지, 감각, 운동 등을 담당하는 해마에 손상을 받게 되면 이러한 질환이 발생되기 쉽다.¹⁾ 알츠하이머 질환의 발병 원인에 있어서는 정확히 알려져 있지 않지만 amyloid β 설과 콜린효능설이 존재하고 있다. Amyloid β 설은 산화적 스트레스가 지속되면 amyloid β 축적이 일어나 이것이 신경세포독성을 일으키는 것을 말한다.²⁾ 또 콜린효능설은 뇌 acetylcholinesterase(AChE) 활성 증가로 인한 기억을 담당하는 acetylcholine의 감소에 따라 기억 장애가 일어난다는 것이다.³⁾

많은 연구자들은 천연물 중에서 알츠하이머 질환을 치료할 수 있는 성분을 연구한 결과 항산화 및 AChE 억제 효능을 갖는 물질들을 계속 보고하고 있다. 이러한 화합물

중에는 caffeoylquinic acid,²⁾ phenylethanoid glycoside,³⁾ flavonoid⁴⁾ 중에서 알려지고 있다. 뇌에서 아세틸콜린은 기억을 담당하는 신경전달물질이며, 콜린에스테라제에 의해 분해된다. 알츠하이머 질환자에서는 이 효소의 활성이 높으므로 뇌중 아세틸콜린 농도가 낮으며, 그 결과 기억장애가 수반된다.⁵⁾

또 과산화아질산(peroxynitrite, ONOO⁻)는 활성질소종의 하나로서 superoxide anion radical이 nitric oxide radical과 반응하여 생성된 화학종으로 조직의 단백질, 핵산, 인지질 등과 결합하여 독성을 나타낼 수 있다.⁶⁾ ONOO⁻는 인체 내에서 제거할 수 있는 효소가 없기 때문에 이것이 과다하면 혈관질환, neuropathy, retinopathy, neuropathy 등과 같은 병증을 일으킨다.⁷⁾ 알츠하이머 질환은 산화적 스트레스에 따른 퇴행성신경질환(neurodegenerative disorder)에 속하며 ONOO⁻ 역시 알츠하이머 질환을 일으킬 수 있다.⁸⁾ 그러므로 천연의 신경보호효과를 일으키는 화합물들은 이 질환을

*교신저자(E-mail): hjpark@sangji.ac.kr
(Tel): +82-33-730-0564

경감시킬 수 있을 것이다.

저자들은 한국산 국화과에 속하는 산채의 caffeoylquinic acid⁹⁾ 및 flavonoid¹⁰⁾ 분석을 수행해 하여 그 성분 함량이 높음도 입증해 왔다. 특히 국내에 분포하고 있는 민박쥐나물(*Cacalia hastata* var. *orientalis*)을 국화과의 중요한 생물 소재로 보고 이를 이용하기 위한 연구를 하고자 하였다. 민박쥐나물로부터 성분이 분리된 바 없으나, *C. hastata*로부터 bisabolane계의 sesquiterpene endoperoxide 화합물인 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene이 항종양활성을 나타낸다고 보고된 바 있다.¹¹⁾ 또 민박쥐나물(*Cacalia hastata* var. *orientalis*)로부터 (+)-(4S)-cacalohastine을 위주로 하는(정유 중 48%) 정유 성분도 동정된 바 있다.¹²⁾

그러나, 그 이외의 성분에 관한 연구는 없으므로 이 식물의 계속적인 성분에 관한 연구가 필요하다고 생각된다. 본 연구에서는 HPLC를 이용하여 caffeoylquinic acid에 속하는 성분을 지표로 하여 성분 정량하였다. 그리고 콜린에스테라제 억제활성과 ONOO⁻ 억제활성을 조사하여 알츠하이머 질환에 대한 유효성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 - 분석에 사용한 HPLC system은 두 개의 Prostar 210 pump, Prostar 325 UV-vis detector, 그리고 MetaTherm temperature controller로 장착된 Shiseido (Tokyo, Japan) Capcell C18 column(5 μm, 4.6 mm×25 mm)이었다. HPLC 분석에 사용한 용매인 MeOH과 H₂O는 J. T. Baker 사(Phillipsberg, NJ, USA)에서 구입한 HPLC급 용매를 사용하였다. HPLC 데이터 분석은 Varian Star Workstation을 이용하였다. 분석에 사용한 caffeic acid는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, caffeic acid methyl ester(CA-Me)는 이 caffeic acid를 메틸화하여 제조한 것이나 그 합성과정은 생략한다. Peroxynitrite 소거활성 실험에 사용한 diethylenetriaminepentaacetic acid(Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA), dihydrorhodamine 123 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), ONOO⁻(Cayman Chemicals Co., Ann Arbor, MI, USA)는 각각 해당회사로부터 구입한 것을 사용하였다.

식물재료 - 민박쥐나물(*C. hastata* var. *orientalis*, Compositae)는 대관령에서 2016년 7월 중 채집하였다. 잎과 줄기로 나누어서 햇볕에 말리고 분쇄하였다. 이 식물은 상지대학교 산림과학과 송병민 교수에 의해 동정되었다. 표본(natchem-#47)은 상지대학교 제약공학과 천연물화학실험실에 보관 중이다.

추출 - 민박쥐나물의 식물재료인 잎과 줄기를 각각 10.0 g 씩 250 ml의 80% MeOH에 넣고 60°C에서 5시간 동안 초음파 추출하였다. 이를 여과하고 식힌 다음 진공농축기를

이용하여 감압 하에 농축하였다. 이 농축물들을 더욱 동결 건조기로 건조하여 박쥐나물 잎 추출물 1.50 g과 줄기 추출물 0.47 g을 얻었다.

표준용액과 시료용액의 제조 - 3-Caffeoylquinic acid(3-CQ, **1**), caffeic acid(CA, **2**), 5-caffeoylquinic acid(5-CQ, **3**), 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DQ, **4**), 3,4-dicaffeoylquinic acid(3,4-DQ, **5**), caffeic acid methyl ester(CA-Me, **6**)를 표준용액 제조를 위한 지표물질로 사용하였다. 이들을 MeOH에 녹여서 1000 μg/ml의 원액으로 하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 원액을 계대희석하여 실험에 사용하였다. 그리고, 시료용액 제조를 위하여 민박쥐나물 잎과 줄기 80% MeOH 추출물을 MeOH에 녹였으며, 이를 HPLC system에 주입하였다.

HPLC 분석 - 기질기용리를 위해 두 종의 이동상을 사용하였다. Solvent A로서 0.05% HAc-H₂O 용매를, solvent B로서 MeOH 용매를 사용하였다. 고정상 컬럼은 Shiseido Capcell C18 column의 역상컬럼(ODS)이었다. 검출을 위한 자외선은 254 nm의 파장을 사용하였으며 컬럼온도는 40°C로 고정하였고, 흐름속도는 1.0 ml/min로 하였다.

표준용액을 희석하여 제조한 6종의 농도에 대해 HPLC 실험을 하여 피크 면적을 얻은 후 검량선을 작성하였다. x축은 농도로서 μg/ml의 단위이고 y축은 피크 면적으로 나타내었다. 검량선의 직선성을 확인하기 위하여 R² 값을 구하였다. 그리고, 검출과 정량의 감도 결정을 위해 LOD(limit-of-detection) 및 LOQ(limit-of-quantification) 값을 측정하였다. LOD와 LOQ는 각각 S/N 법의 3과 10으로 하였다. 기질기용리는 0-35 min(15→65% B), 35-40 min(65% B), 40-42 min(65→100% B), 42-46 min(100% B), 46-49 min(100→15% B), and 49-55 min(15% B)로 프로그램화된 방법으로 수행하였다.

콜린에스테라제 활성 측정 - Ellman 등(1961)의 방법을¹³⁾ 약간 변형하여 AChE와 BChE의 활성을 측정하였다. 두 활성의 측정을 위해 acetylcholine과 butyrylcholine을 기질로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0) 140 μl, 시료 20 μl, AChE(0.36 U)와 BChE(0.36 U) 20 μl을 각각 96 well microplate에 넣고 실온에서 15분간 배양하였다. 그런 후에 10 μl의 DTNB[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]와 기질인 acetylcholine 혹은 butyrylcholine 10 μl을 넣어서 최종적으로 반응액이 200 μl가 되도록 96 well plate에 넣었다. 이 때 DTNB가 acetylcholine 또는 butyrylcholine이 분해하여 생성된 thiocholine이 반응하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate anion을 15분 후에 microplate reader VERSA max(Molecular Devices, CA, USA)로 412 nm에서 측정하였다. 측정값은 IC₅₀로 표시하였으며 단위는 μg/ml로 하였다. Inhibition(%)=[1-(A_{samp}/A_{con})/A_{std}]×100의 식으로 계산하였다. 여기서 A_{samp}는 측정시료를 넣었을 때, A_{con}는 측정시료

Table I. Linearity and limits of detection and quantification (LOD and LOQ) of the analytes

Analyte	Equation of the linear regression ^a	Linear range (µg/mL)	R ² ^b	t _R	LOD ^c (µg/mL)	LOQ ^d (µg/mL)
3-CQ (1)	y=169.94x+77.29	3.13-100.0	0.9985	5.02	0.16	0.54
CA (2)	y=256.04x+56.82	3.13-100.0	0.9992	6.17	0.15	0.50
5-CQ (3)	y=167.07x+67.55	3.13-100.0	0.9990	8.22	0.22	0.75
3,5-DQ (4)	y=159.35x+68.66	3.13-100.0	0.9984	10.62	0.23	0.76
3,4-DQ (5)	y=136.99x+60.29	3.13-100.0	0.9979	11.44	0.11	0.36
CA-Me (6)	y=176.33x+59.83	3.13-100.0	0.9996	13.65	0.26	0.85

^a); peak area at 254 nm; x, concentration of the standard (µg/mL); ^bR², correlation coefficient for 6 data points in the calibration curves (n=3); ^cLOD, limit of detection (S/N=3); ^dLOQ, limit of quantification (S/N=10)

를 넣고 효소를 넣지 않았을 때, A_{std}는 측정시료를 넣지 않았을 때의 각각의 흡광도를 나타낸 것이다.

ONOO⁻ 소거활성 - ONOO⁻ 소거활성은 Kooy 등의 방법을¹⁴⁾ 이용하여 측정하였다. 이 방법은 ONOO⁻ 존재 하에서 비형광성의 DHR 123으로부터 생성되는 rhodamine 123의 형광을 측정하는 것이다. Rhodamine buffer solution (pH 7.4)은 50 mM sodium phosphate dibasic, 50 mM sodium phosphate monobasic, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride, 그리고 100 µM DTPA로 이루어진 것이다. DHR 123의 최종농도는 5 µM이었다. 이 검색법에서 완충용액은 사용시 조절되었으며 빙수에 보관하면서 사용하였다. 시료 용액은 추출물을 10% dimethyl sulfoxide에 녹여서 제조하였다. 0.3 M NaOH에 녹인 10 µM ONOO⁻ 용액의 존재 하에서나 없는 가운데 최종 형광 강도를 측정하였다. 산화된 DHR 123의 형광 강도는 microplate fluorescence reader FL 500(Bio-Tek Instruments Inc., Winooki, VT, USA)를 이용하여 각각 480 nm와 530 nm의 excitation 및 emission 파장에서 측정하였다. 최종 형광에서 배경형광을 감하여 ONOO⁻ 소거활성을 결정하여, 그 데이터는 평균 ±표준편차로 나타내었다. L-penicillamine을 본 검색의 양성 대조약물로 사용하였다.

결과 및 고찰

저자들은 국화와 산채류의 caffeoylquinic acid와⁹⁾ flavonoid 성분함량을¹⁰⁾ 정량해 왔다. 그러나 저자들은 caffeoylquinic acid를 함유하는 국화와 산채류를 이용한 알츠하이머 질환에 대한 유용성은 연구한 바 없다. 그러므로 한국에서 국화와 식물 중 비교적 희귀한 자원인 민박쥐나물로부터 얻은 추출물의 caffeoylquinic acid류의 함량측정 및 cholinesterase 활성 및 ONOO⁻ 억제효과를 연구하였다.

민박쥐나물의 잎과 줄기를 따로 추출물을 제조하고 4종의 caffeoylquinic acid와 CA 및 CA-Me를 포함한 6종의 화합물을 지표로 하여 동시정량하였다. 6종 지표물질의 6 농도에

서 실험하여 검량선의 식을 구할 수 있었다. x 축은 농도(µg/ml)이고 y 축은 피크 면적을 나타낸 것이다. 검량선들은 R² 값이 0.999 이상이었으므로 직선성이 양호하였고 LOD와 LOQ의 값이 매우 낮으므로 분석정량을 위한 감도가 매우 우수함을 확인하였다. 이러한 결과를 Table I에 나타내었다.

Fig. 1의 크로마토그램에서 알 수 있듯이 CA와 CA-Me의 피크가 매우 작으나 다른 4종의 화합물은 이보다 훨씬 높게 나타났다. 즉, CA는 주로 quinic acid와 결합한 상태로 존재함을 알 수 있다. Table II에 나타내었듯이, 3-CQ, 5-CQ, 3,5-DQ의 농도를 비교했을 때 줄기에서는 그 농도가 매우 낮은 반면 잎에서는 높았다. 이 사실은 caffeoylquinic acid가 주로 잎에 존재함을 나타내는 것이다. 민간에서 민박쥐나물의 잎을 식용하기 때문에 잎으로부터 caffeoylquinic acid의 높은 함량의 입증에 의해 이 식품의 높은 약리활성을 기대할 수 있다. 잎 추출물에서 3,5-DQ는 44.32 mg/g dry weight로서 함량이 가장 높았으나, 5-CQ와 3-CQ는 각각 21.59 mg/g과 18.99 mg/g으로서 유사하였다. 3,4-DQ와 3,5-DQ 비교에 있어서도 3,5-DQ 함량이 높은 것으로 보아 3,5-DQ가 화학적으로 더 안정한 화합물로 예상된다. 총함량에서 있어서는 추출물 중 이들 화합물이 약 36%를 차지하여 매우 높은 함량으로 확인되었다.

활성 실험에서는 AChE에 대한 억제활성으로 그 IC₅₀가 67.45 µg/ml로 나타나 활성이 인정되었으나 BChE는 IC₅₀가 200 µg/ml 이상이였다. ONOO⁻ 소거활성은 그 IC₅₀ 값이 8.59 µg/g으로 나타났다(Table III). Chlorogenic acid는 마우스 실험을 통해 해마와 frontal cortex에서 AChE와 지질과 산화의 억제를 하기 때문에 건망증을 억제한다고 알려졌다.¹⁵⁾ 3,5-DQ는 amyloid β로 처리한 SH-SY5Y 세포에서 신경보호효과를 나타냄에 따라 이 화합물의 알츠하이머 질환에 대한 유효성이 알려졌다.²⁾ 결론적으로, 본 실험을 통하여 민박쥐나물 추출물 중 caffeoylquinic acid 함량을 밝혔을 뿐 아니라 AChE에 대한 억제활성 및 ONOO⁻에 대한 활성을 밝혔으므로 민박쥐나물의 알츠하이머 질환에 대한 유효성을 예견하였다.

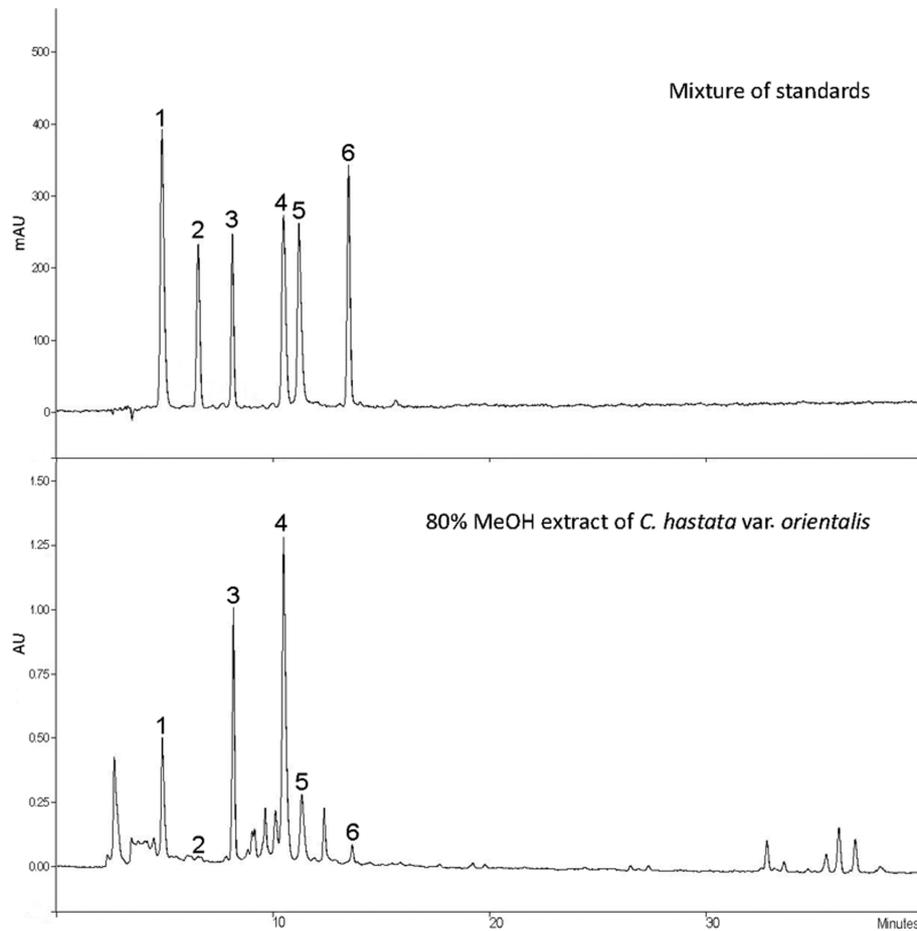


Fig. 1. HPLC chromatogram of standard compounds and the 80% MeOH extract of *C. hastata* var. *orientalis* leaves.

Table II. Content of compounds in the 80% MeOH extract and dried plant materials of *C. hastata* and *orientalis* (mg/g)

Compounds	Leaves		Stems	
	Extract	Dry weight	Extract	Dry weight
3-CQ (1)	57.57	18.99	2.77	0.26
CA (2)	5.76	1.90	2.13	0.20
5-CQ (3)	65.43	21.59	11.12	1.04
3,5-DQ (4)	134.32	44.32	12.39	1.16
3,4-DQ (5)	83.79	27.65	7.78	0.73
CA-Me (6)	11.12	3.67	<LOQ*	<LOQ
Total	357.99	118.12	36.76	3.44

*The compound could not be quantified (<LOQ)

결론

본 연구는 민박쥐나물의 caffeoylquinic acid의 함량측정과 콜린에스테라제 활성과 ONOO⁻ 소거효과를 밝혀서 알츠하이머 질환에 대한 유효성 입증에 목적이 있다. 민박쥐나물 잎 추출물은 줄기 추출물에 비하여 caffeoylquinic acid

Table III. IC₅₀s of the 80% MeOH extract of *C. hastata* var. *orientalis* leaves on the inhibition of AChE, BChE and ONOO⁻

Treatment	AChE	BChE	ONOO ⁻
80% MeOH ext.	67.45±1.83	>200	8.59±0.26
Berberine	0.18±0.03	8.73±0.10	-
Penicillamine	-	-	0.85±0.3

성분의 함량이 훨씬 높았다. 추출물 중 caffeoylquinic acid의 함량은 잎 추출물 중 35.8%, 줄기 추출물 중 3.7%를 차지하였다. 3,5-DQ는 잎에서 44.32 mg/g으로서 가장 많이 함유되어 있었다. 잎 추출물은 IC₅₀가 AChE에 대해 67.45 µg/ml, ONOO⁻에 대해 8.59 µg/ml로 나타났으므로 민박쥐나물 추출물이 알츠하이머 질환에 대해 유효할 것으로 예상된다.

인용문헌

- Fang, Z., Jeong, S. Y., Jung, H. A., Choi, J. S., Min, B. S. and Woo, M. H. (2010) Anticholinesterase and antioxidant con-

- stituents from *Gloiopeltis furcate*. *Chem. Pharm. Bull.* **58**: 1236-1239.
2. Han, J., Miyamae, Y., Shigemori, H. and Isoda, H. (2010) Neuroprotective effect of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1. *Neurosci.* **169**: 1039-1045.
 3. Georgiev, M., Alipieva, K., Orhan, I., Abrashev, R., Denev, P. and Angelova, M. (2011) Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chem.* **128**: 100-105.
 4. Moniruzzaman, M., Asaduzzaman, M., Hossain, M. S., Sarker, J., Rahman, S. M. A., Rashid, M. and Rahman, M. M. (2015) In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of methanolic fruit extract of *Phyllanthus acidus*. *BMC Complement. Altern. Med.* **15**: 403-412.
 5. Luo, W., Chen, Y., Wang, T., Hong, C., Chang, L. P., Chang, C. C., Yang, Y. C., Xie, S. Q. and Wang, C. J. (2016) Design, synthesis and evaluation of novel 7-aminoalkyl-substituted flavonoid derivatives with improved cholinesterase inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem.* **24**: 672-680.
 6. Nugroho, A., Song, B. M., Seong, S. H., Choi, J. S., Choi, J. W., Choi, J. Y. and Park, H. J. (2016) HPLC analysis of phenolic substances and anti-Alzheimer's activity of Korean *Quercus* Species. *Nat. Prod. Sci.* **22**: 299-306.
 7. Patcher, P., Obrosova, I. G., Mabley, J. G. and Szabó, C. (2005) Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutic strategies. *Curr. Med. Chem.* **12**: 267-275.
 8. Choi, R. J., Roy, A., Jung, H. J., Ali, M. Y., Min, B. S., Park, C. H., Yokozawa, T., Fan, T. P., Choi, J. S. and Jung, H. A. (2016) BACE1 molecular docking and anti-Alzheimer's disease activities of ginsenosides. *J. Ethnopharmacol.* **190**: 219-230.
 9. Park, H. J. (2010) Chemistry and pharmacological action of caffeoylquinic acid derivatives and pharmaceutical utilization of chwinamul (Korean mountainous vegetable). *Arch. Pharm. Res.* **33**: 1703-1720.
 10. Nugroho, A., Choi, J. S. and Park, H. J. (2016) Analysis of flavonoid composition of Korean herbs in the family of Compositae and their utilization for health. *Nat. Prod. Sci.* **22**: 1-12.
 11. Kimura, K., Sakamoto, Y., Fujisawa, N., Uesugi, S., Aburai, N., Kawada, M., Ohba, S., Yamori, T., Tsuchiya, E. and Koshino, H. (2012) Cleavage mechanism and anti-tumor activity of 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene isolated from edible wild plants. *Bioorg. Med. Chem.* **20**: 3887-3897.
 12. Miyazawa, M., Kawauchi, Y., Utsumi, Y. and Takahashi, T. (2010) Character impact odorants of wild edible plant-*Cacalia hastata* L. var. *orientalis*-Used in Japanese traditional food. *J. Oleo Sci.* **59**: 527-533.
 13. Ellman, G. L., Courtney, D. and Andres, K. D. V. (1961) Featherstone R.M., A new and rapid colorimetric activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
 14. Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S. (1994) *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 149-156.
 15. Kwon, S. H., Lee, H. K., Kim, J. A., Hong, S. I., Kim, H. C., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K., Kim, S. Y. and Jang, C. G. (2010) Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **649**: 210-217.
- (2017. 8. 14 접수; 2017. 9. 14 심사; 2017. 9. 18 게재확정)