

추출방법에 따른 소목 심재의 항산화 및 항당뇨 활성 평가

홍영주[#], 정경한, 정윤희, 김태훈^{*}

대구대학교 식품공학과

Evaluation of Antioxidant and Anti-diabetic Effects of Sappan Lignum by Extraction Method

Young Ju Hong[#], Gyeong Han Jeong, Yun Hee Jeong, Tae Hoon Kim^{*}

Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The heartwood of Sappan Lignum has been used since ancient times as an ingredient in folk medicines against anti-bacterial and anti-anemia purposes. Many bioactive constituents have been derived from this biomass such as chalcones and homoisoflavonoids. In the current investigation, the antioxidant and anti-diabetic properties using DPPH and ABTS⁺ radicals scavenging, α -glucosidase, and advanced glycation end products (AGEs) inhibition assays were evaluated by different extraction methods of Sappan Lignum.

Methods : In our continuing investigation for bioactive natural ingredients, the antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of Sappan Lignum extracts were prepared from different extraction methods and the biological efficacies were investigated *in vitro*. The antioxidant properties were evaluated employing radical scavenging assays using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS⁺) radicals. In addition, the anti-diabetic effects of Sappan Lignum extracts were tested via α -glucosidase and AGEs formation inhibitory assay. The total phenolic contents were determined using a spectrophotometric method.

Results : All the tested samples showed dose-dependent radical scavenging and α -glucosidase inhibitory activities. Among the tested extracts, the 80% methanolic extract of Sappan Lignum was showed the most potent activity with an IC₅₀ value of 82,3 ± 1,7 μ g/ml against DPPH radical scavenging assay. While, ABTS⁺ radical scavenging activity of 80% methanolic extract was higher than those of other extracts. Also, α -glucosidase inhibitory and AGEs formation effects of each extracts and total phenolic contents were evaluated.

Conclusions : These results suggested that Sappan Lignum can be considered as a new effective source of natural antioxidant and anti-diabetic materials.

Key words : Sappan Lignum, DPPH, ABTS⁺, α -glucosidase, advanced glycation end products (AGEs)

I. 서 론

현대인들은 여러 퇴행성 질환과 생활 습관성 질병으로 건강이 위협받고 있는데, 이것은 과도한 산화적 스트레스에 대한

노출이 원인이다. 인체는 산화 억제물질과 산화촉진물질이 균형을 이루어서 자유라디칼의 생산과 항산화 방어체계가 유지되는데 자외선, 흡연, 매연, 약물, 스트레스, 방사선 등의 요인으로 그 균형이 깨진다. 그로 인해서 과도하게 생성된

*Corresponding author : Tae Hoon Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University 201 Daegudae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38453, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-850-6533 · E-mail : skyey7@daegu.ac.kr

#First author : Young Ju Hong, Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University 201 Daegudae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38453, Republic of Korea.

· Mobile : +82-10-7277-5658 · E-mail : tldsks2210@naver.com

· Received : 6 September 2017 · Revised : 23 September 2017 · Accepted : 15 November 2017

superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide, hydroxyl, peroxyxynitrite 등과 같은 활성 산소종은 산화적 스트레스를 일으켜 세포 구성성분인 DNA, 당, 단백질, 지질 등에 비가역적, 비 선택적 파괴를 촉진 시킨다^{1,2)}. 이런 작용은 노화를 비롯해 피부질환, 뇌질환, 심혈관계질환, 암 등의 여러 질병의 원인이다^{3,4)}. 체내에서 ROS나 자유라디칼을 중화시켜 성인병 예방, 노화방지 등의 기능을 하는 성분을 항산화물질이라 하며, butylated hydroxy anisol(BHA), butylated hydroxy toluene(BHT) 등의 합성 항산화제가 개발되어 사용되었으나^{5,6)} 이들 합성항산화제는 암, 지질대사 불균형 등의 부작용이 발견되어 사용을 제한할 것을 권하고 있다⁷⁾. 최근 식물의 페놀성분에 항산화 등 중요한 생리학적, 생물학적 역할을 하는 물질이 발견되고 있다⁸⁾.

당뇨병은 가장 흔한 내분비계 질환으로 당뇨병의 원인은 아직까지 확실하게 알려지지 않았지만 인슐린 민감성의 저하와 인슐린 분비능의 이상에 의해서 나타나는 것으로 추정하고 있다⁹⁾. 일반적으로 스트레스나 비만 등으로 인해 인슐린 작용력이 감소하면 인슐린 저항성이 나타난다. 인슐린 저항성을 극복하기 위해서 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비가 증가하다가 인슐린을 만들어 내는 췌장 베타세포가 점차 망가져 어느 한도를 넘으면 더 이상 인슐린분비가 증가하지 못하여 혈당이 높아지고 결국 2형 당뇨병으로 발전하는 것으로 알려져 있다. 한편 이와 반대로 인슐린 분비능이 감소한 경우에는 당뇨병 발병 위험이 3배정도 증가하고 식후 순간적인 혈당의 상승이 나타날 수 있고 이 상태가 지속적으로 반복이 되면 포도당 독성이 나타나서 인슐린 저항성이 나타나게 되고, 당뇨병으로 발전할 가능성이 몇 배나 증가한다^{9,10)}. 그러나 제 2형 당뇨병이 인슐린 분비능 감소에 비해 발생 가능성이 높다고 보고되어 있다. 결국 당뇨병은 혈당이 높아져서 나타나는 질병으로 인슐린 저항성을 감소시키고 인슐린 분비능을 증가시킴으로 호전시킬 수 있다.

당뇨병 치료제로 쓰이는 약물로는 sulfonylurea 계열의 췌장 베타세포를 자극해 인슐린 분비량을 증가시키는 것과 간에서 포도당 생합성을 억제하는 metformin 계열의 약물 그리고 최근에 개발된 인슐린 저항성을 개선시키는 thiazolidinedione 계열의 약물이 있다^{11,12)}. 그 외에도 탄수화물 섭취 후 탄수화물의 소화를 하는 α -glucosidase를 억제하여 혈당 상승을 방지하는 α -glucosidase 억제제 약물도 판매되고 있다¹³⁾. 대부분 약물치료를 하는 경우에는 단일 약물만 사용하기도 하지만 기능이 다른 두 가지 이상의 약물을 조합하여 사용해서 서로 상승작용을 나타내 혈당이 효과적으로 저하되도록 하고 있다¹⁴⁾.

당뇨합병증의 주요 원인으로 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)의 생성 증가와 알도스 환원 효소와 관련된 polyol pathway flux의 증가, protein kinase C의 활성화가 알려져 있으며¹⁵⁾, 특히 최종당화산물(AGEs)은 고혈당에서 환원당과 단백질의 비효소적 반응으로 생성되는데 생성이 되면 분해가 힘들어 정상혈당으로 회복이 되어도 분해가 되지 않고 여러 조직이나 혈액 단백질에 결합하여 장기의 손상을 유발한다¹⁶⁾. 생성된 AGEs의 조직 내 결합(AGEs-protein cross-link) 억제 물질과 AGEs 생성 억제제의 개발이 진행되고¹⁷⁾, 천연에 존재하는 AGEs의 생성 억제 방법이 그중에서도 주목 받는다¹⁸⁾. 그리고 고혈당과 단백질의 비효소적 당화과정에서 생성되는 AGEs는 활성 산소종(reactive oxygen species,

ROS)에 의해서 생성이 가속되거나 세포표면의 AGEs 수용체와 결합하여 ROS 생성을 유발하여 당뇨합병증을 유발시키거나 세포손상 유발에 관여하는 것으로 보고되어 있다¹⁹⁾. 장의 소장점막에 존재하는 당분해효소인 α -glucosidase를 저해하면 탄수화물의 분해를 방해해 소장에서의 흡수를 지연시키므로 식후 급격한 혈당상승을 막아준다²⁰⁾. 대표적인 α -glucosidase 저해제로는 acarbose 및 voglibose가 시판되고 있으나 이들을 장기 복용할 경우 내성 및 각종 부작용을 야기할 수 있어 사용이 제한된다^{21,22)}. 따라서 보다 안전하며 효능이 우수한 천연 기능성 소재의 탐색이 필요한 실정이다.

소목(Sappan Lignum)은 *Caesalpinia*속 *Caesalpinia*과과로 열대 지방에서 주로 서식하며, 특히 인도, 페루 및 말레이시아 등에서 주로 발견되었고, 소목의 심재에 예부터 전통 의학에서 중요한 역할을 하였다²³⁾. 소목심재는 붉은 주황색을 띄며, 홍색계 염료로 많이 쓰이며, 이전 연구에서는 진정제²⁴⁾, 항보체 활성²⁵⁾, 면역 조절²⁶⁾, 간 보호²⁷⁾, 항염증²⁸⁾, 세포독성²⁹⁾ 및 저혈당³⁰⁾ 등의 효능이 보고되어져 있다. 또한 소목심재의 주요성분으로는 triterpenoid, steroid³¹⁾, flavonoid^{32,33)} 및 phenol^{34,35)}류의 화합물들이 분리 동정되었다. 본 연구에서는 소목 심재를 다른 유기용매 및 열수추출을 하여 항산화 활성과 관련된 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거활성과 항 당뇨와 관련된 α -glucosidase 억제활성 및 최종당화산물 생성억제 활성에 대하여 우수한 활성이 나타나 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 시료로 사용한 소목 심재(Sappan Lignum)는 울릉도에서 2015년 11월에 채취한 소목을 사용하였다. 표본 시료는 대구대학교의 식품공학과 천연물 화학실험실에 보관하고 있다. 본 실험에서 사용된 gallic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS⁺), bovine serum albumin(BSA), *Saccharomyces cerevisiae* 유래의 α -glucosidase, (+)-catechin, aminoguanidine, acarbose 및 추출에 사용된 acetone, ethyl alcohol(EtOH), methyl alcohol(MeOH), 기타 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 추출 방법

소목심재의 유기용매 추출은 70% acetone, 80% EtOH, 80% MeOH 용매 200 mL에 소목심재 40 g을 24시간 침치추출을 3회 반복 후 추출물을 얻었다. 열수추출물은 소목심재 40 g에 증류수 200 mL을 가한 후 100°C에서 3시간 추출하였다. 각 추출물을 filter paper로 여과한 후, 저온감압 농축하여 건조시킨 후 70% acetone 추출물(18.1 g), 80% EtOH 추출물(19.4 g), 80% MeOH 추출물(19.5 g), 열수추출물(17.8 g)을 얻었으며, 각 추출물을 대상으로 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거활성과 α -glucosidase 및 AGEs 생성저해 활성을 측정하였다.

3. 항산화 활성 측정

1) 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법³⁶⁾에 따라 측정하였으며, 추출물을 1.0 mg/ml 농도로 조제한 후, 시료 50 μ l와 Folin-Denis 시액 50 μ l, 0.7M 탄산나트륨 포화용액 50 μ l를 차례로 넣은 다음 이것을 잘 혼합하여 실온에서 60분 방치한 후 UV/VIS 분광광도계로 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질은 gallic acid를 이용하여 표준곡선을 작성하여 양을 환산하였다.

2) DPPH 라디칼 소거활성 측정

소목심재 추출물의 전자공여능은 Blois 방법³⁷⁾에 따라 측정하였다. 각 시료용액에 120 μ l에 0.45 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 용액 60 μ l을 넣고 교반한 후 15분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

3) ABTS+ 라디칼 소거활성 측정

소목심재 추출물에 대하여 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS⁺) radical 소거능을 Re³⁸⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS⁺와 2.4 mM K₂O₈S₂동량을 혼합 후 실온, 암소에서 12시간 방치하여 라디칼의 생성을 유도한 후 ABTS⁺ 라디칼 용액을 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.7-0.8 정도가 되도록 희석한 후 사용하였다. 희석한 ABTS⁺ 라디칼 용액 100 μ l와 생약 추출액 100 μ l을 혼합하여 실온에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 positive control로는 (+)-catechin을 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 백분율로 나타내었다.

4. 항당뇨 활성 측정

1) α -Glucosidase 억제활성 측정

α -Glucosidase 억제활성은 Eom³⁹⁾ 등이 행한 방법을 변형하여 효소-기질반응을 이용한 분광학적 방법으로 측정하였다. 즉, 1 U/ml α -glucosidase 90 μ l에 시료 혹은 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 10 μ l를 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 15분 동안 incubation 시켰다. 반응 후 기질인 1 mM p-NPG 100 μ l를 첨가한 후 5분간 반응시키고 405 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 기질로부터 유리되어 나오는 p-nitrophenol을 측정하였다. 양성대조군으로는 α -glucosidase 저해제로 알려진 acarbose를 사용하였으며 α -glucosidase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2) 최종당화산물 생성 억제활성 측정

최종당화산물 생성 억제활성은 Vinson과 Howard⁴⁰⁾가 행한 방법을 변형하여 실시하였다. 10 mg/ml의 우혈청 알부민(bovine serum albumine)을 0.2 M phosphate buffer(pH .4)에 용해

시키고 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.

III. 결 과

1. 항산화 활성

1) 총 페놀 함량

소목 심재의 각 추출물 총 페놀 함량은 Table 1에 나타내었으며, 그 결과 소목 심재의 80% MeOH 추출물에서 47.2 \pm 1.7 mg GAE/g으로 가장 많은 페놀성 화합물을 함유 하는 것으로 나타났으며, 그 다음 80% EtOH 추출물에서 41.2 \pm 1.4 mg GAE/g으로 많은 페놀성 화합물이 함유하였다. 70% acetone 추출물과 열수 추출물은 각 36.4 \pm 1.5, 33.3 \pm 1.1 mg GAE/g으로 다른 추출방법에 비하여 상대적으로 낮은 총 페놀 함량을 나타내는 것으로 확인되었다.

Table 1. Total phenolic contents of several extracts obtained from Sappan Lignum

Extracts	Phenolic contents (mg GAE/g) ^a
70% Acetone ext.	36.4 \pm 1.5
80% EtOH ext.	41.2 \pm 1.4
80% MeOH ext.	47.2 \pm 1.7
Hot water ext.	33.3 \pm 1.1

^aData represent the mean \pm SD three replications.

2) DPPH 라디칼 소거 활성

소목 심재에서 추출한 여러 용매의 추출물에 대하여 DPPH 라디칼 소거활성을 평가한 결과, 소목 심재 80% MeOH 추출물의 IC₅₀값이 82.3 \pm 1.7 μ g/ml로 가장 우수한 DPPH 라디칼 소거활성이 나타났으며, 다음으로 소목의 80% EtOH 추출물에서 IC₅₀값이 90.0 \pm 2.9 μ g/ml의 소거 활성을 확인하였다. 또한 소목의 70% acetone 및 열수 추출물은 IC₅₀값이 각 109.8 \pm 1.8 μ g/ml와 126.8 \pm 3.1 μ g/ml의 상대적으로 낮은 라디칼 소거 활성을 확인하였다. 이상의 결과로부터 소목의 추출 방법에 따른 DPPH 라디칼 소거활성은 양성대조군으로 사용된 천연 항산화 성분인 (+)-catechin(IC₅₀ = 64.9 \pm 3.5 μ g/ml)과 비교하였을 때 다소 약한 활성임을 확인하였으며 추출물 상태에서의 효능으로 물질의 분리 및 정제시에 우수한 라디칼소거 활성성분의 존재를 시사하였다. 최근 페놀성 화합물과 DPPH 라디칼 소거활성 밀접한 상관관계가 있다는 보고⁴³⁾에 근거하여 Table 1 및 2에서 나타낸 바와 같이 페놀성 화합물의 함량과 DPPH 라디칼 소거활성은 밀접한 상관관계가 있음을 시사하였다.

Table 2. Comparison of DPPH radical scavenging activities of Sappan Lignum extracts by different extraction conditions

Extracts	Inhibition (%) ^a					IC ₅₀ (μg/ml)
	500 μg/ml	250 μg/ml	125 μg/ml	62.5 μg/ml	31.3 μg/ml	
70% Acetone ext.	89.5±0.4	76.8±0.8	53.6±0.9	32.5±0.8	16.2±0.7	109.8±1.8
80% EtOH ext.	90.1±0.9	82.8±0.9	63.1±1.7	36.9±1.4	18.2±0.9	90.0±2.9
80% MeOH ext.	91.0±0.6	83.2±1.0	63.7±0.6	41.9±1.3	21.4±1.1	82.3±1.7
Hot water ext.	89.0±1.2	73.3±0.5	52.6±1.0	21.6±0.8	15.1±1.2	126.8±3.1
(+)-Catechin ^b	93.2±1.1	89.4±0.3	75.0±0.6	47.8±1.7	32.8±1.0	64.9±3.5

^aAll samples were examined in triplicate experiments. Radical scavenging activity are expressed as the mean±SD of triplicate experiments.

^b(+)-Catechin was used as a positive control.

3) ABTS+ 라디칼 소거 활성

소목 심재에 대해서 각각의 유기용매와 열수 추출물에 대하여 ABTS⁺ 라디칼 소거활성실험을 활용하여 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과 소목 심재 80% MeOH 추출물에서 IC₅₀ 값이 12.4±2.1 μg/ml의 우수한 ABTS⁺ 라디칼 소거활성이 나타났고, 다음으로 80% EtOH 추출물과 70% acetone 추출물에서 각각 IC₅₀ 값이 13.7±1.6 μg/ml 및 19.0±2.2 μg/ml의 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 또한 열수 추출물에서는 IC₅₀

값이 25.3±0.9 μg/ml로 유기 용매를 활용한 추출물에 비해 상대적으로 낮은 활성을 확인하였다. 열수 추출을 제외한 용매 추출물의 경우 양성대조군인 (+)-catechin(IC₅₀ = 20.6±0.2 μg/ml)보다 우수한 ABTS⁺ 라디칼 소거활성을 확인하였으며 이는 유기용매 추출물에서 상대적으로 우수한 ABTS⁺ 라디칼 소거활성을 나타내는 물질의 존재가 시사되어 향후 라디칼 소거활성을 가진 활성성분의 분리 및 동정이 필요하다고 사료된다.

Table 3. Comparison of ABTS⁺ radical scavenging activities of Sappan Lignum extracts by different extraction conditions

Extracts	Inhibition (%) ^a					IC ₅₀ (μg/ml)
	200 μg/ml	100 μg/ml	50 μg/ml	25 μg/ml	12.5 μg/ml	
70% Acetone ext.	89.9±1.6	81.8±0.6	64.6±0.8	59.7±1.0	41.2±0.8	19.0±2.2
80% EtOH ext.	99.1±0.4	97.2±0.9	84.1±0.7	62.9±0.9	50.9±1.0	13.7±1.6
80% MeOH ext.	99.8±1.4	98.8±0.9	84.8±1.4	63.8±1.2	54.6±0.2	12.4±2.1
Hot water ext.	87.6±2.0	79.6±1.1	68.3±0.5	50.7±0.8	32.4±0.5	25.3±0.9
(+)-Catechin ^b	96.1±0.6	83.2±1.3	58.5±1.7	28.6±0.5	10.2±0.7	20.6±0.2

^aAll samples were examined in triplicate experiments. Radical scavenging activity are expressed as the mean±SD of triplicate experiments.

^b(+)-Catechin was used as a positive control.

2. 항당뇨 관련 활성

1) α-Glucosidase 억제활성

본 연구에서 소목심재를 추출방법에 따른 소목 추출물의 당뇨관련 활성을 α-glucosidase를 활용하여 활성을 평가하였다. 그 결과 Table 4에서 나타난 것처럼 80% MeOH 추출물에서 IC₅₀ 값이 5.3±0.6 μg/ml로 우수한 α-glucosidase 억제활성이 나타났으며, 80% EtOH 추출물과 70% acetone 추출물에서 IC₅₀ 값이 6.3±0.2 μg/ml 및 6.6±1.1 μg/ml로 우수한 억제활성을 확인하였다. 열수 추출물의 경우 IC₅₀ 값이 11.3±2.3 μg/ml의 활성을 확인하였으며, 모든 추출물에서 양성대조군인 acarbose(IC₅₀ = 501.1±13.2 μg/ml)보다 50배 이상의 우수한 α-glucosidase에 대한 저해 활성을 확인하였다. 본 연구에서는 소목심재에 대하여 추출방법에 따른 항당뇨 활성의 1차 스크리닝에 활용되는 α-glucosidase 억제활성을 평가한 결과, 모든 추출물에서 우수한 α-glucosidase 억제활성을 확인하여 소목심재의 기능성 소재로서의 개발가능성을 확인하였다. 향후 추가적인 연구를 통하여 소목 심재의 항당뇨 활성 성분의 개발을 위하여 추가적인 연구개발이 필요하다고 사료

된다.

2) 최종당화산물 생성 억제활성

본 연구에서는 소목 심재를 다양한 유기용매와 물을 이용한 추출물에 대하여 최종당화산물 생성 억제활성을 평가한 결과, 80% MeOH 추출물에서 IC₅₀ 값이 12.4±2.3 μg/ml로 우수한 최종당화산물 생성 억제활성을 확인하였다. 또한 80% EtOH 추출물의 IC₅₀ 값은 13.3±1.6 μg/ml의 우수한 활성을 나타내었고, 70% acetone 추출물에서 IC₅₀ 값이 19.0±2.2 μg/ml의 최종당화산물 생성 억제활성을 확인하였으며, 이들 활성은 양성대조군인 aminoguanidine(IC₅₀ = 20.6±0.2 μg/ml)보다 우수한 활성이었다. 최근 본 연구팀에서 천연물 유래의 생리 활성 소재 개발을 위한 연구가 수행 중이며, 당뇨합병증과 연관된 최종당화산물 생성 억제활성에 대한 소목심재 추출물의 보고는 이번이 처음이며, 향후 소목 심재 추출물에 대해서 각종 칼럼크로마토그래피법을 활용한 단일물질의 분리 및 정제연구를 통하여 활성 성분의 동정을 위한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

Table 4. Comparison of α -glucosidase Inhibitory effects of Sappan Lignum extracts by different extraction conditions

Extracts	Inhibition (%) ^a					IC ₅₀ (μ g/ml)
	50 μ g/ml	25 μ g/ml	12.5 μ g/ml	6.3 μ g/ml	3.1 μ g/ml	
70% Acetone ext.	97.6 \pm 2.1	89.7 \pm 0.9	67.9 \pm 1.1	47.2 \pm 1.8	27.4 \pm 1.1	6.6 \pm 1.1
80% EtOH ext.	98.0 \pm 0.2	92.7 \pm 1.5	72.9 \pm 0.9	49.2 \pm 1.3	27.3 \pm 1.5	6.3 \pm 0.2
80% MeOH ext.	98.9 \pm 1.7	95.7 \pm 1.6	76.5 \pm 1.0	50.7 \pm 1.2	29.7 \pm 0.3	5.3 \pm 0.6
Hot water ext.	88.0 \pm 0.7	69.7 \pm 1.3	49.8 \pm 0.6	24.2 \pm 1.1	21.5 \pm 0.9	11.3 \pm 2.3
Acarbose ^b	26.1 \pm 1.2	13.8 \pm 0.7	8.3 \pm 0.5	6.4 \pm 1.0	2.9 \pm 0.8	501.1 \pm 13.2

^aAll samples were examined in triplicate experiments. Inhibitory effects are expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments.

^bAcarbose was used as a positive control.

Table 5. Inhibitory effects of Sappan Lignum extracts of advanced glycation end products(AGEs) *in vitro*

Extracts	Inhibition (%) ^a					IC ₅₀ (μ g/ml)
	200 μ g/ml	100 μ g/ml	50 μ g/ml	25 μ g/ml	12.5 μ g/ml	
70% Acetone ext.	89.9 \pm 0.4	81.8 \pm 2.1	64.6 \pm 0.9	59.7 \pm 0.7	41.2 \pm 1.1	19.0 \pm 2.2
80% EtOH ext.	99.0 \pm 0.3	97.2 \pm 1.8	84.1 \pm 1.0	62.9 \pm 0.6	50.9 \pm 1.5	13.6 \pm 1.6
80% MeOH ext.	99.3 \pm 1.6	98.8 \pm 0.3	84.8 \pm 0.7	63.8 \pm 1.1	54.6 \pm 0.8	12.4 \pm 2.3
Hot water ext.	87.6 \pm 1.5	79.6 \pm 0.8	68.3 \pm 1.1	50.7 \pm 0.6	32.4 \pm 0.5	25.3 \pm 0.9
Aminoguanidine ^b	96.1 \pm 1.2	83.2 \pm 1.0	58.5 \pm 0.7	28.6 \pm 0.8	10.2 \pm 0.4	20.6 \pm 0.2

^aAll samples were examined in triplicate experiments. Inhibitory effects are expressed as the mean \pm SD of triplicate experiments.

^bAcarbose was used as a positive control.

IV. 고찰

페놀성 화합물은 벤젠 고리에 hydroxyl기가 치환된 방향족 탄소 화합물을 지칭하며, 천연물에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물(secondary metabolites)로 다양한 구조와 기능을 나타내는 것이 잘 알려져 있다⁴¹⁾. 페놀성 화합물은 항산화 및 항암 효과와 같은 생리활성 이외에도 탄닌과 같은 고분자의 페놀성 화합물은 단백질과 결합하는 특성을 나타내기도 한다⁴²⁾. 최근, 항산화 활성소재 개발에 범용되고 있는 DPPH 라디칼은 항산화 활성이 있는 물질과 반응하면 안정한 형태로 돌아가면서 보라색이 탈색이 되어 흡광도 값이 감소하는 원리이며⁴³⁾, ABTS⁺ 역시 항산화물질과 반응 후 라디칼이 소거되어 본래의 색상인 청록색이 탈색되는 원리를 이용하는 방법으로 최근의 연구에 광범위하게 이용되고 있다³⁸⁾.

체내에서 탄수화물의 분해에 관여하는 효소인 α -glucosidase의 활성을 저해하는 기작의 항당뇨 치료제인 acarbose와 voglibose⁴⁴⁾ 등이 개발되었으나, 이들 물질의 장기간 복용 시에는 구토, 설사 및 복부팽만감 등의 부작용 보고되어 보다 안전하고 혈당 강하 효능이 뛰어난 천연소재개발과 관련된 연구가 시급하다⁴⁵⁾.

또한, 최종당화산물 생성은 당뇨병증 유발과 밀접한 관계가 있으며, 대표적인 최종당화산물 생성 억제제로는 aminoguanidine이 대표적이나 독성으로 인하여 보다 안전한 천연물 유래의 치료제 탐색이 지속적으로 진행되고 있다.

본 연구에서는 항산화 및 항당뇨 활성과 관련하여 소목심재에 대해서 추출방법에 따라 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 평가를 통하여 항산화 활성을 평가하였고, 항당뇨 활성과

관련된 α -glucosidase 억제활성 및 최종당화산물 생성 억제 활성에 대한 평가를 수행하였다. 그 결과, 80% MeOH 추출물에서 DPPH, ABTS⁺ 라디칼 소거활성, α -glucosidase 억제 활성 및 최종당화산물 생성 억제와 관련된 가장 우수한 효능이 확인되었으며 이들 활성을 총 페놀성 화합물의 함량과도 관련 깊은 것으로 추정되었다. 이상의 연구결과로부터 소목 심재의 우수한 항산화 및 항당뇨 활성을 나타낸 물질의 존재가 시사되었으며 추가적인 연구를 통하여 소목에 존재하는 기능성 성분의 분리 및 동정이 필요하다고 사료된다.

V. 결론

소목 심재에 대해서 추출방법에 따라 얻어진 추출물의 항산화 및 항당뇨 활성을 비교 및 평가할 목적으로 항산화 활성은 DPPH, ABTS⁺ 라디칼 소거활성, 항당뇨 효능은 α -glucosidase 억제활성, 최종당화산물 생성 억제활성 평가를 통하여 연구를 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 소목 심재 80% MeOH 추출물에서 총 페놀함량이 47.2 \pm 1.7 mg GAE/g 가장 높은 총 페놀함량이 확인되었으며, DPPH 라디칼 소거활성 평가에서 총 페놀 함량이 가장 높은 80% MeOH 추출물에서 IC₅₀값이 82.3 \pm 1.7 μ g/ml로 가장 우수한 라디칼 소거활성을 확인하였다.
2. ABTS⁺ 라디칼 소거활성에서는 80% MeOH 추출물이 IC₅₀값이 12.4 \pm 2.1 μ g/ml로 우수한 활성을 나타냈으며,

α -glucosidase 억제 활성에서도 80% MeOH 추출물이 IC₅₀값이 5.3±0.6 μ g/ml로 가장 우수한 억제활성을 확인하였다.

3. 최종당화산물 생성 억제활성에서는 80% MeOH 추출물 > 80% EtOH 추출물 > 70% acetone 추출물 > 열수 추출물 순서의 억제 활성을 확인하였으며, 열수추출물을 제외한 모든 유기용매 추출물에서 양성대조군인 aminoguanidine 보다 우수한 최종당화산물 생성 억제활성을 확인하였다.

이상의 결과로부터 소목심재의 추출방법별 추출물에서 우수한 항산화, 항당뇨 및 당뇨합병증 억제 활성을 확인하였으며, 향후 각종 칼럼크로마토그래피법 및 기기분석을 활용하여 추가적인 물질 동정연구 수행 및 활성 기작 연구를 통하여 천연물 유래의 기능성 신소재 개발의 가능성이 있을 것으로 기대된다.

References

1. Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. Arch Biol Med Exp. 1988 ; 21(1) : 85-92.
2. Halliwell B, Aruoma OJ. DNA damage by oxygen-derived species. FEBS Lett, 1991 ; 281(1-2) : 9-19.
3. Jennings PE, Barnett AH. New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. Diabetic Med. 1988 ; 5(2) : 111-117.
4. Shim JS, Kim SD, Kim TS, Kim KN. Biological activities of flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. Korean J Food Sci Technol, 2005 ; 37(1) : 78-83.
5. Farag RS, Badei AZMA, Hewedi GSA, Baroty EL. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. J American Oil Chem Soc. 1984 ; 66(6) : 792-799.
6. Frei B. Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press, San Diego, 1994 ; 44-55.
7. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxy toluene. J Oil Chem Soc. 1975 ; 52(2) : 59-62.
8. Maltese F, Erkelens C, van der Kooy F, Choi YH, Verpoorte R. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. Food chem, 2009 ; 116(2) : 575-579.
9. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. Diabetes care. 1992 ; 15(3) : 318-368.
10. Kahn SE, Prigeon R.L, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Palmer JP. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. Diabetes care. 1993 ; 42(11) : 1663-1672.
11. Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, Baron AD. Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2003 ; 26(8) : 2370-2377.
12. Tosi F, Muggeo M, Brun E, Spiazzi G, Perobelli L, Zanolini E, Moghetti P. Combination treatment with metformin and glibenclamide versus single-drug therapies in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, comparative study. Metabolism. 2003 ; 52(7) : 862-867.
13. Oudjeriouat N, Moreau Y, Santimone M, Svensson B, Marchis-Mouren G, Desseaux V. On the mechanism of α -amylase. Eur J Biochem. 2003 ; 270(19) : 3871-3879.
14. Goldstein BJ, Pans M, Rubin CJ. Multicenter, randomized, double-masked, parallel-group assessment of simultaneous glipizide/metformin as second-line pharmacologic treatment for patients with type 2 diabetes mellitus that is inadequately controlled by a sulfonylurea. Clin Ther. 2003 ; 25(3) : 890-903.
15. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. Diabetes care. 2005 ; 54(6) : 1615-1625.
16. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. Diabetes care. 2006 ; 29(6) : 1420-1432.
17. Vlassara H. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. Ann Med. 1996 ; 28(5) : 419-426.
18. Matsuda H, Wang T, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. Bioorg. Med. Chem. 2003 ; 11(24) : 5317-5323.
19. Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. Diabetes care. 1992 ; 41(1) : 26-29.
20. Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. Diabetes care. 1992 ; 53(1) : 119-124.
21. Tsujimoto T, Shioyama E, Moriya K, Kawaratani H, Shirai Y, Toyohara M, Fukui H. Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: a case report and review of the literature. World J Gastroenterol. 2008 ; 14(39) : 6087-6092.
22. Kihara Y, Ogami Y, Tabaru A, Unoki H, Otsuki M. Safe and effective treatment of diabetes mellitus associated with chronic liver diseases with an alpha-glucosidase inhibitor, acarbose. J Gastroenterol. 1997 ; 32(6) : 777-782.

23. Lee EB, Xing MM, Kim DK. Lifespan-extending and stress resistance properties of brazilin from *Caesalpinia sappan* in *Caenorhabditis elegans*. *Arch Pharm Res*. 2017 ; 40(7) : 825–835.
24. Baek NI, Jeon SG, Ahn EM, Hahn JT, Bahn JH, Jang JS, Choi SY. Anticonvulsant compounds from the wood of *Caesalpinia sappan* L. *Arch Pharm Res*. 2000 ; 23(4) : 344–348.
25. Oh SR, Kim DS, Jung KY, Lee JJ, Lee HK. Anticomplementary activity of constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*. *Planta Med*. 1998 ; 64(5) : 456–458.
26. Choi SY, Yang KM, Jeon SD, Kim JH, Khil LY, Chang TS, Moon CK. Brazilin modulates immune function mainly by augmenting T cell activity in halothane administered mice. *Planta Med*. 1997 ; 63(5) : 405–408.
27. Moon CK, Park KS, Kim SG, Won HS, Chung JH. Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl₃-induced toxicity. *Drug Chem Toxicol*. 1992 ; 15(1) : 81–91.
28. Hikino H, Taguchi T, Fujimura H, Hiramatsu Y. Antinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of heamatoxylon campechianum wood1. *Planta Med*. 1977 ; 31(3) : 214–220.
29. Hung TM, Dang NH, Dat NT. Methanol extract from vietnamese *Caesalpinia sappan* induces apoptosis in HeLa cells. *Biol Res*. 2014 ; 47(1) : 20–24.
30. Kim YM, Kim SG, Khil LY, Moon CK. Brazilin stimulates the glucose transport in 3T3-L1 cells. *Planta Med*. 1995 ; 61(4) : 297–301.
31. Oswal VB, Garg SC. Unsaponifiable matter of the fixed oil from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. *Asian J. Chem*. 1993 ; 5(3) : 676–676.
32. Namikoshi M, Nakata H, Yamada H, Nagai M, SAITOH T. Homoisoflavonoids and related compounds. II. Isolation and absolute configurations of 3, 4-dihydroxylated homoisoflavans and brazilins from *Caesalpinia sappan* L. *Chem Pharm Bull*. 1987 ; 35(7) : 2761–2773.
33. Namikoshi M, Nakata H, Saitoh T. Homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan*. *Phytochemistry*. 1987 ; 26(6) : 1831–1833.
34. Nagai M, Nagumo S, Lee SM, Eguchi I, Kawai KI. Protosappanin A, a novel biphenyl compound from Sappan Lignum. *Chem Pharm Bull*. 1986 ; 34(1) : 1–6.
35. Badami S, Moorkoth S, Rai SR, Kannan E, Bhojraj S. Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. *Chem Pharm Bull*. 2003 ; 26(11) : 1534–1537.
36. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965 ; 16(3) : 144–158.
37. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181(4617) : 1199–1200.
38. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999 ; 26(9) : 1231–1237.
39. Eom SH, Lee SH, Yoon NY, Jung WK, Jeon YJ, Kim SK, Kim YM. α -Glucosidase and α -amylase-inhibitory activities of phlorotannins from *Eisenia bicyclis*. *J Sci Food Agric*. 2012 ; 92(10) : 2084–2090.
40. Vinson JA, Howard TB. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem*. 1996 ; 7(12) : 659–663.
41. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006 ; 99(1) : 191–203.
42. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998 ; 56(11) : 317–333.
43. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2008 ; 37(3) : 269–275.
44. Shin JA, Lee JH, Kim HS, Choi YH, Cho JH, Yoon KH. Prevention of diabetes: a strategic approach for individual patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012 ; 28(2) : 79–84.
45. Bischoff H. The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin Invest Med*. 1995 ; 18(4) : 303–311.