

단풍취 추출물의 Acetylcholinesterase 저해 및 Peroxynitrite 소거에 대한 활성과 Caffeoylquinic Acid 성분의 분석

누그로호 아궁¹, 최재수², 송병민³, 박희준^{4*}

¹람봉망쿠라트대학교 식품공학과, 교수, ²부경대학교 식품영양학과, 교수,
³상지대학교 산림과학과, 교수, ⁴상지대학교 제약공학과, 교수

Effect of *Ainsliaea acerifolia* Extract on Anti-acetylcholinesterase and Peroxynitrite Scavenging and Analysis of Caffeoylquinic Acids

Agung Nugroho¹, Jae Sue Choi², Byong-Min Song³ and Hee-Juhn Park^{4*}

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

²Professor, Department of Food and Nutrition, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

³Professor, Department of Forest Science, Sangji University, Wonju 26339, Korea

⁴Professor, Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Abstract - Anti-acetylcholinesterase (anti-AChE) activity and peroxynitrite scavenging activity of *Ainsliaea acerifolia* (Compositae) were studied to find its anti-Alzheimer's activity. The IC₅₀ was 73.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in AChE assay and 8.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in peroxynitrite assay. Caffeoylquinic acids that have been reported to have anti-Alzheimer's activity were analyzed in the leaf- and stem extract by HPLC. Caffeoylquinic acids occupied 25.1% of the leaf extract which was higher than 8.1% of the stem extract. Particularly, the content of 3,5-dicaffeoylquinic acid (145.6 mg/g) was highest of the tested caffeoylquinic acids. In addition, the IC₅₀ values of 3,5-dicaffeoylquinic acid were shown to be 3.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in peroxynitrite assay and 69.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in anti-AChE assay.

Key words - Acetylcholinesterase, *Ainsliaea acerifolia*, Alzheimer's disease, Caffeoylquinic acid, Compositae, Peroxynitrite

서 언

지속적인 스트레스는 기억, 인지, 감각, 운동을 담당하는 뇌 부위인 해마에 손상을 입혀서 기억장애 증상을 수반하는 알츠하이머 질환이 발생된다. 이 질환의 발생은 주로 amyloid β 설과 콜린효능설에 기반하여 일어난다고 인식되고 있다. 전자는 산화적 스트레스의 지속에 따라 amyloid β 의 축적의 결과 신경세포 독성이 일어나는 과정이다(Han *et al.*, 2010). 후자는 뇌의 acetylcholinesterase (AChE)의 활성증가에 따라 기억을 담당하는 acetylcholine이 감소하게 된 결과 일어나는 기억장애 질환이다(Georgiev *et al.*, 2011).

현재 AChE의 감소를 일으키는 기전을 가지는 donepezil, rivastigmine, gallantamine과 같은 약물이 개발되어 알츠하이머 질환 치료약이 되고 있다(Lai *et al.*, 2016). 또 천연물을 이용하여 AChE 억제제를 탐색하여 알츠하이머 질환을 치료하려는 노력도 수행되고 있다. 저자들도 이러한 연구를 수행하여 특히 일부 국화과 식물의 추출물과 성분들이 그러한 효과를 나타내고 있음을 보고해 왔다(Choi *et al.*, 2017).

한편, 신체에서 발생될 수 있는 활성질소종의 하나인 peroxy-nitrite ion (ONOO⁻)도 신체조직의 단백질, 핵산, 인지질 등과 결합하여 독성을 나타낸다고 한다. Nitric oxide(NO)는 신체에서 신호전달을 위해 필요한 매개체이지만 이것은 염증을 일으킬 수 있다. NO가 과다하게 생산될 때는 superoxide anion radical과 결합하여 neuropathy, retinopathy, nephropathy와

*교신저자: E-mail hjpark@sangji.ac.kr

Tel. +82-33-730-0564

같은 증상을 일으킬 수 있다(Patcher *et al.*, 2005). 나아가서 peroxynitrite의 과다생산은 알츠하이머 질환의 또 다른 원인이 될 수 있다고 한다(Choi *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2010).

단풍취(*Ainsliaea acerifolia*, Compositae)는 한국에서 자생하는 국화과 식물의 산야초이다. 이 식물은 숲속 그늘에서 자라는 국화과의 다년생 초본식물이다. 높이는 35-80cm에 달하며 7-9월에 흰꽃이 피는 이 식물의 어린 순을 나물로 먹는다. 이 식물은 중풍, 동맥경화, 고혈압, 숙취해소, 피로회복 등의 목적으로 한국 사회에서 이용되고 있다(Kim, 1996). 산나물류에 포함된 caffeoylquinic acid에 속하는 화합물 중에서 알츠하이머 질환에 유효할 것이라는 보고가 나오고 있다(Han *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2010). 본 연구에서는 이 식물의 aq. MeOH 추출물이 peroxy-nitrite 감소효과와 AChE 활성 저해작용을 나타냈으므로 caffeoylquinic acid에 속하는 화합물을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

HPLC system으로서 두 개의 Prostar 210 pump, Prostar UV-vis detector, 그리고 Shiseido (Tokyo, Japan) Capcell C18 column (5 μ m, 4.6 x 25 mm)으로 구성되었다. 이동상 용매인 MeOH과 H₂O는 J. T. Baker사(Phillisberg, NJ, USA)의 제품으로서 HPLC 급 시약을 사용하였다. HPLC data는 Varian Star Workstation 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 지표물질 caffeoylquinic acid 4종인 3-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, 3,4- dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid은 본 실험실에서 보관 중인 시료를 사용하였다. 그리고, caffeic acid는 Sigma사(St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, 이의 메틸에스터인 caffeic acid methyl ester는 합성하여 사용하였

는데 그 과정은 생략한다. 분석실험에 사용된 이러한 6종 화합물의 구조는 Fig. 1에 나타내었다. Peroxynitrite 소거활성을 위해 사용한 시약인 diethylenetriaminepentaacetic acid (Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA), dihydrorhodamine 123 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), ONOO-(Cayman Chemicals Co., Ann Arbor, MI, US은 각 해당회사에서 구입하여 사용하였다.

식물재료

단풍취(*A. acerifolia*, Compositae)는 2018년 8월 강원도 대관령에서 채집한 후 잎과 줄기의 부위를 구별하여 건조한 후 세절하여 사용하였다. 이 식물은 상지대학교 산림과학과 송병민 교수가 동정하였다. 이 식물의 표본(natchem# 81)은 현재 상지대학교 제약공학과 천연물화학 실험실에 보관 중이다.

추출

식물재료 잎과 줄기를 따로 10.0 g씩 80% MeOH 250 mL에 넣은 후 60°C 온도에서 5시간동안 초음파추출하였다. 이를 여과한 후 감압농축한 후 동결건조하여 단풍취 aq. MeOH extract로서 잎 추출물 0.57 g과 0.23 g을 각각 얻었다.

HPLC 분석법

두 용액 0.05% acetic acid가 함유된 H₂O (v/v)와 0.05%가 함유된 acetic acid CH₃CN (v/v)를 HPLC 분석을 위한 이동상으로 사용하였다. 전자를 Solvent A로 하고 후자를 Solvent B로 하였다. 용리과정은 다음과 같은 linear gradient elution 방식으로 프로그램화하여 수행하였다. 기울기 용리는 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)로 프로그램된 방법을 사용하였다.

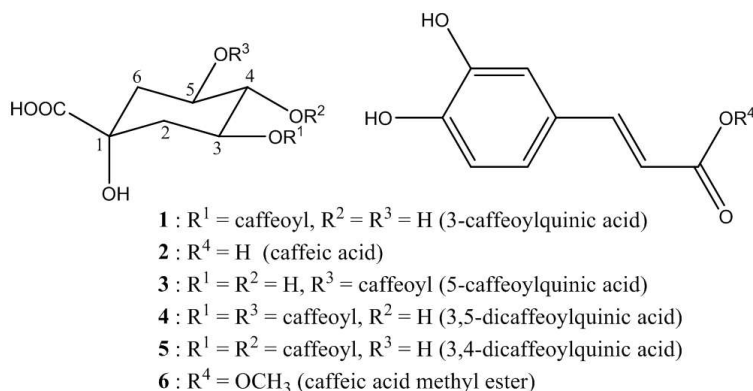


Fig. 1. Structure of compounds used for HPLC analysis.

6종 시료의 표준용액에 대해 검량선 작성을 위한 실험을 하여 직선성을 확인하였다. x 축은 농도인 $\mu\text{g/mL}$ 로 하였으며 y 축은 피크 면적을 나타내었다. 그 결과 검량선은 $y = 169.94x + 77.29$ (3-caffeoylquinic acid), $y = 256.04x + 56.82$ (Caffeic acid), $y = 167.07x + 67.55$ (5-caffeoylquinic acid), $y = 159.35x + 68.66$ (3,5-dicaffeoylquinic acid), $y = 136.99x + 60.29$ (3,4-dicaffeoylquinic acid), $y = 176.33x + 59.83$ (Caffeic acid methyl ester)을 확립하여 함량계산에 이용하였다. 이렇게 작성된 검량선은 3.13 - 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 그 R^2 값이 0.997 이상임을 확인하였다. 그리고, 흐름속도는 1.0 mL/min로 하였고 컬럼 온도는 40°C로 하였다. 검출을 위한 자외선 파장은 254 nm였으며, 각 시료당 40분간 모니터링하였다.

AChE 활성의 결정

AChE의 활성은 Ellman *et al.* (1961)의 방법을 약간 변경하여 측정하였다. 이 활성 측정을 위한 기질로 ACh를 사용하였다. 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)

140 μL , 시료 20 μL , AChE (0.36 U) 20 μL 를 각각 96 well plate에 넣고 실온에서 15분간 인큐베이션하였다. 그 후 DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]와 기질 ACh 10 μL 를 넣어서 반응액이 200 μL 가 되도록 맞추어서 96 well plate에 넣었다. 이 때 DTNB가 ACh를 분해하여 생성된 thiocholine의 반응에 따라 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate anion을 15분 후에 412 nm 파장에서 microplate reader VERSAmax (Molecular Devices, CA, USA)로 측정하였다. 억제율(%) = $[1 - (A_{\text{sampl}}/A_{\text{con}}) / A_{\text{std}}] \times 100$ 의 식을 이용하여 계산하였다.

Peroxynitrite 소거활성의 결정

Kooy *et al.* (1994)의 방법에 따라 peroxynitrite 소거활성을 측정하였다. DHR 123이 peroxynitrite의 작용에 따라 생성되는 rhodamine 123의 형광을 측정함으로써 그 소거활성을 평가하였다. 즉, 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 제조된 것이다. DHR 123의 최종농도를 5 μM 로 하였다. 이 실험에서 완충용액은 사용시에 제조하여 빙수에 보관하면서 사용하였다. 0.3 M peroxynitrite의 존재 하에서나 부존재 하에서 측정하였다. Microplate fluorescence reader FL 500 (Bio-tek Instruments Inc., Winooki, VT, USA)을 이용하여 각각 480 nm와 530 nm의 excitation 및 emission 파장에서 측정하였다. 최종형광에서 배경형광을 빼주어서 peroxynitrite 소거활성을 결정하였고, 그 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 양성대조군으로는 L-penicillamine을 사용하였다.

결과 및 고찰

단풍취 aq. MeOH 추출물은 AChE 활성을 억제하였고, peroxynitrite 소거활성이 나타났다. Table 1에 나타내었듯이, AChE에 대한 억제활성으로 그 IC_{50} 가 73.4 $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었고 peroxynitrite 소거활성의 IC_{50} 는 8.60 $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다. 그리고, 단풍취에 가장 많이 함유된 것으로 예상된 3,5-dicaffeoylquinic acid의 활성으로 AChE에 대한 억제효과로서 그 IC_{50} 가 69.19 $\mu\text{g/ml}$ 이었고 peroxynitrite 소거에 관한 IC_{50} 는 3.79 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 이 화합물의 활성은 단풍취 추출물의 효과와 유사하게 나타났다.

한편 caffeoylquinic acid에 속하는 화합물 중 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid가 알츠하이머질환에 유효할 것이라는 보고가 있다(Han *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2010). Chlorogenic acid는 해마와 frontal cortex에서 AChE와 지질과 산화를 억제하여 알츠하이머 질환에 유효할 것이라고 보고되었다(Kwon *et al.*, 2010). 또 3,5-dicaffeoylquinic acid가 amyloid β 로 유도한 SH-SY5Y 세포의 손상을 억제하였으므로 이 화합물은 알츠하이머 질환에 유효할 것으로 보고되었다(Han *et al.*, 2010).

Table 1. IC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$) of *A. acerifolia* extract and 3,5-dicaffeoylquinic acid on peroxynitrite and AChE

Treatment	Peroxynitrite	AChE
<i>A. acerifolia</i> aq. extract	10.55 \pm 0.277 ^a	73.4 \pm 1.01
3,5-Dicaffeoylquinic acid	3.79 \pm 0.250	69.19 \pm 1.27
L-Penicillamine	0.845 \pm 0.353	-
Berberine	- ^b	0.177 \pm 0.310

^aData represent mean \pm SEM. ^bNot tested.

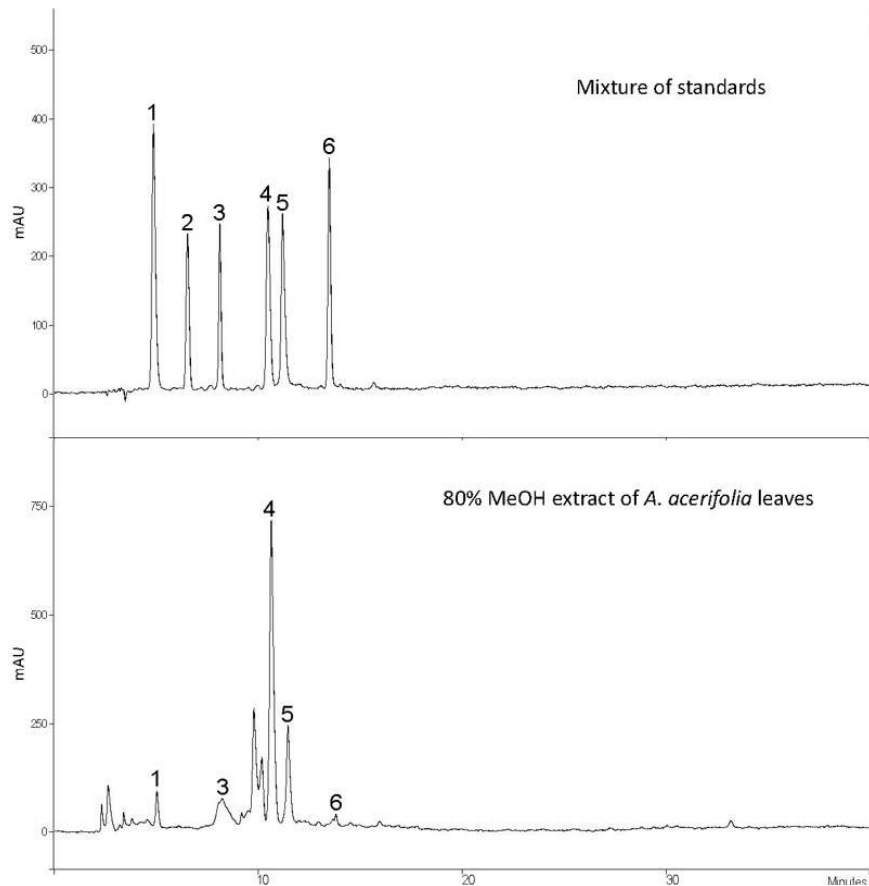


Fig. 2. HPLC chromatograms of mixed standards and extract of *A. acerifolia* leaves.

본 실험에서는 caffeoylquinic acid에 속하는 3-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid 외에도 caffeic acid 및 caffeic acid methyl ester를 지표물질로 하여 HPLC의 방법으로 단풍취 추출물로부터 분석하고자 하였다. 5종의 표준 화합물 혼합물과 추출물의 HPLC chromatogram을 Fig. 2에 나타내었다.

6종 화합물의 retention time은 5.02분(3-caffeoylquinic acid), 6.17분(caffeic acid), 8.22분(5-caffeoylquinic acid), 10.62분(3,5-dicaffeoylquinic acid), 11.44분(3,4-dicaffeoylquinic acid), 13.65분(caffeic acid methyl ester)에서 각각 나타났다. 각 화합물의 검량선은 실험항에 나타내었고, 이들은 직선범위 3.13 - 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 에서 그 R^2 값이 모두 0.997 이상이었으므로 이들 6종 화합물의 직선성이 확인되었다. 6종 화합물의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.23 $\mu\text{g/ml}$, 0.75 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 나타났으므로 검출과 정량을 위한 감도는 높음을 알 수 있었다.

이러한 분석법을 확립한 후 HPLC 측정에 따른 단풍취 추출물 중 함량을 계산한 결과를 Table 2에 나타내었다. 여기에 잎과 줄

기에 대한 결과, 그리고 추출물 중 함량 및 식물 건조물당 함량을 각기 나타내었을 뿐 아니라 함량의 합계도 나타내었다. 먼저 추출물 중 총함량으로 잎의 경우 25.1%의 매우 높은 함량을 보였으며, 줄기에서는 8.10%의 함량을 보여 줄기에서는 상대적으로 그 함량이 낮음을 알 수 있다. 잎 추출물 중 개별 화합물의 함량을 살펴보면 3,5-dicaffeoylquinic acid가 145.6 mg/g의 값을 보여 그 함량이 가장 높았다. 더욱이 caffeic acid는 이 HPLC chromatogram에서 나타나지 않으므로 caffeic acid는 주로 quinic acid와 결합한 채로 존재함을 알 수 있다. 또, Han *et al.* (2010)도 3,5-dicaffeoylquinic acid가 알츠하이머 질환에 유효할 것이라고 보고한 바 있기 때문에 단풍취 추출물은 이것의 높은 함량에 따라 알츠하이머 질환에 유효할 것으로 예상된다.

적 요

국화과에 속하는 단풍취의 추출물이 가지는 알츠하이머에 대한 효과를 알기 위하여 AChE에 대한 억제효과와 peroxy-

Table 2. Content of compounds in the extracts (80% MeOH) and dried plant materials of *A. acerifolia* (mg/g)

Compounds ^z	Leaves		Stems	
	Extract	Dry weight	Extract	Dry weight
3-caffeoylquinic acid (1)	11.88	2.54	16.36	1.18
Caffeic acid (2)	< LOQ*	< LOQ	2.54	0.18
5-caffeoylquinic acid (3)	29.40	6.29	3.71	0.27
3,5-dicaffeoylquinic acid (4)	145.63	31.16	36.95	2.66
3,4-dicaffeoylquinic acid (5)	61.35	13.13	17.67	1.27
Caffeic acid methyl ester (6)	2.87	0.61	3.81	0.27
Total	251.38	53.78	81.04	5.83

^zThe compound could not be quantified (< LOQ).

nitrite 소거효과를 연구하였다. 단풍취 추출물은 AChE에 대한 억제효과로서 그 IC₅₀가 73.4 µg/ml이었으며 peroxynitrite 소거효과에 관한 IC₅₀는 8.60 µg/mL이었으므로 알츠하이머 질환에 유익할 것으로 판단된다. 단풍취에 가장 많이 함유된 성분인 3,5-dicaffeoylquinic acid 성분의 활성도 이와 유사한 활성을 보였으므로 단풍취 추출물의 효과는 주로 이 화합물의 활성에 따른 것으로 예상된다. Caffeoylquinic acid가 알츠하이머 질환에 효과있다는 보고가 있으므로 이 식물의 잎과 줄기 추출물에서 6종의 지표물질을 이용하여 정량법을 확립한 후 정량하였다. 그 결과 잎에서는 성분 함량이 25.1%를 차지하여 줄기의 함량보다 훨씬 높았다. 특히 잎 추출물 중 3,5-dicaffeoylquinic acid의 함량이 145.6 mg/g에 달하여 알츠하이머 질환 치료에 유익할 것으로 예상된다.

References

- Choi, J.S., B.M. Song and H.J. Park. 2017. Identification of the component with anti-acetylcholinesterase activity from the essential oil of *Artemisia iwayomogi*. Korean J. Plant Res. 30:17-21 (in Korean).
- Choi, R.J., A. Roy, H.J. Jung, M.Y. Ali, B.S. Min, C.H. Park, T. Yokozawa, T.P. Fan, J.S. Choi and H.A. Jung. 2016. BACE1 molecular docking and anti-Alzheimer's disease activities of ginsenosides. J. Ethnopharmacol. 190:219-230.
- Ellman, G.L., D. Courtney and K.D.V. Andres. 1961. Featherstone R.M., A new and rapid colorimetric activity. Biochem. Pharmacol. 7:88-95.
- Georgiev, M., K. Alipieva, I. Orhan, R. Abrashev, P. Denev. and M. Angelova. 2011. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. Food Chem. 128:100-105.
- Han, J., Y. Miyamae, H. Shigemori and H. Isoda. 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.
- Kim, T.J. 1996. Korean Resources Plants. 1996. Department of Seoul National University, Seoul, Korea. p. 215.
- Kooy, N.W., J.A. Royall, H. Ischiropoulos and J.S. Beckman. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic. Biol. Med. 16:149-156.
- Kwon, S.H., H.K. Lee, J.A. Kim, S.I. Hong, H.C. Kim, T.H. Jo, Y.I. Park, C.K. Lee, Y.B. Kim, S.Y. Lee and C.G. Jang. 2010. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-cholinesterase and anti-oxidative activities in mice. Eur. J. Pharmacol. 649:210-217.
- Lai, T.S., W.F. Wang, B.S. Yip, Y.W. Yang, G.S. Peng, S.J. Tsai, Y.C. Liao and M.C. Pai. 2016. Real-world evaluation of compliance and preference in Alzheimer's disease treatment: an observational study in Taiwan. Patient Pref. Adherence 10:383-390.
- Patcher, P., I.G. Obrosova, J.G. Mabley and C. Szabó. 2005. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutic strategies. Curr. Med. Chem. 12:267-275.

(Received 25 April 2019 ; Revised 15 June 2019 ; Accepted 23 July 2019)