

## 산사 추출물의 항산화 및 항당뇨 활성

남상명<sup>1</sup> · 강일준<sup>2</sup> · 신미혜<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>울지대학교 식품산업외식학과, <sup>2</sup>한림대학교 식품영양학과

### Anti-diabetic and Anti-oxidative Activities of Extracts from *Crataegus pinnatifida*

Sang-Myeoung Nam<sup>1</sup>, Il-Jun Kang<sup>2</sup> and Mee-Hye Shin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Technology and Services, Eulji University, Seongnam 461-713, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, Hallym University, Gangwon 200-702, Korea

#### ABSTRACT

This study was performed to investigate the antidiabetic and antioxidant activities of *Crataegus pinnatifida* which was extracted with water and different concentrations of EtOH (0~100%). The extraction yield of 70% EtOH (33.16%) was higher than that of 50% EtOH (27.79%), water (21.71%), 30% EtOH (21.88%) and 100% EtOH (19.03%). Total polyphenol contents of 50% EtOH extract from *C. pinnatifida* were the highest. DPPH and ABTS radical scavenging activities were 80.79±0.83% and 34.92±0.97% in 50% EtOH extract, respectively, which were higher than those of other extracts. The inhibitory activities of 50% ethanol extract from *C. pinnatifida* against advanced glycation end products (AGEs) formation and  $\alpha$ -glucosidase were determined to be 27.09±2.27% and 58.87±0.70%, respectively. The inhibitory activity of water extract from *C. pinnatifida* against aldose reductase was higher (30.68±1.41%) than those of other extracts. Overall, 50% EtOH extract from *C. pinnatifida* showed the highest antidiabetic and antioxidant effects. These results suggest that 50% ethanol extracts from *C. pinnatifida* have potential as a useful ingredient with antidiabetic and antioxidant effects.

**Key words:** *Crataegus pinnatifida*, anti-diabetic, antioxidant, phenolics, advanced glycation end products

#### 서 론

최근 암, 당뇨, 고혈압, 심장질환, 심혈관계 질환 등과 같은 만성질환의 유병률이 증가되면서 이에 대한 예방과 치료의 목적으로 몸에 좋은 약용식물을 첨가하여 약용식물의 생리적 기능을 이용하고자 하는 연구들이 진행되고 있다(Lee *et al* 2007). 현대인의 산화적 스트레스의 원인인 활성산소종(Reactive Oxygen Species)이나 free radical은 체내에서 인간의 대사과정 중에 지속적으로 발생되며, 또한 불안정하고 반응성이 높아서 다른 생체 내 물질들과 쉽게 반응하게 된다. 이들은 체내 고분자들을 공격하여 세포막을 분해하고, 단백질 합성을 억제하여 돌연변이, 세포독성 및 암 등을 초래한다(Wolff *et al* 1991). 식물 속에 함유된 phytochemical을 비롯한 천연 생리활성 물질들(bioactive components)은 체내에 들어오면 항산화작용이나 세포 손상을 억제하는 작용을 통해 항암, 항균, 항 돌연변이 등의 예방 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 왔다. 따라서 현대인들에게는 산화적 스트레스를 경감시킬 수 있는 부작용이 없고 항산화 활성이 뛰어난

천연 항산화제의 개발이 필요하다(Kim *et al* 2012). 또한 만성질환인 당뇨병은 1970년대 발병율이 인구의 1% 미만이었다던 것이 2001년 이후에는 30세 이상의 발병률이 10명 중 1명으로 10% 수준으로 증가하고 있으며, 우리나라 사망원인의 5위에 해당한다. 특히 망막증, 백내장 등 같은 합병증을 야기하므로 당뇨병 치료는 탄수화물의 소화와 흡수를 느리게 하여 식후 혈당을 저하시키면서 합병증을 예방할 수 있어야 한다. 현재 acarbose와 voglibose 등과 같은  $\alpha$ -glucosidase와 같은 혈당강하제는 내성과 체중증가, 부종, 오심, 소화기장애와 같은 부작용이 우려되면서 천연식물을 대상으로 한 억제제 개발이 요구되고 있다(Jung *et al* 2008). 산사(*Crataegus pinnatifida*)는 장미과(Rosaceae)의 열매로 특유의 향과 단맛, 신맛이 나며, 우리나라 및 중국, 일본에 자생한다. 아가위, 적과자 등의 이명으로라고도 불리며, 한방에서는 소식화적(消食化積), 행기산어(行氣散瘀) 작용이 있으며, 식체, 소화불량, 복통, 복부 팽만감에 좋고, 고지혈증이나 어혈이 몸에 남아 있을 때 효과가 있다(Hong *et al* 2002). 산사에 대한 연구는 Park *et al* (2012)의 일반성분 분석결과, 탄수화물 85.6%, 조단백질 2.4%, 조지방 1.9% 및 조회분 0.4%이었고, 산사 100 g의 함유 열량은 369.1 kcal로 분석되었다. 또한 칼슘, 인, 마그네슘 등

\*Corresponding author : Mee-Hye Shin, Tel: +82-31-740-7151, Fax: +82-31-740-7349, E-mail: shin@eulji.ac.kr

이 많이 함유되어 알칼리성 식품이라 할 수 있다. 그 외 flavonoids 화합물을 다량 함유하며, 비타민과 카로틴이 풍부하다(Lee *et al* 2013; Hong *et al* 2002). 산사 추출물 첨가군은 쥐의 혈청 내 지질 수준이 개선되었고(Kim *et al* 2014), 신장 기능 및 간기능 개선에 효과적이라고 하였다(Kim *et al* 2014). 산사의 항당뇨 연구로는 Kim *et al*(2007)은 산사 추출물로부터  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase 저해 물질을 정제하여 분리 동정하였고 Choi *et al*(2011)은 생약재 200여종에서  $\alpha$ -glucosidase 저해활성물질을 탐색하였고, Lee *et al*(2008)은 국내 자생하는 약용 식물 40종을 그리고 Jang *et al*(2006)은 약재 17종을 대상으로 최종당화산물 생성저해 효능을 조사하였다. 그러나 산사에 대한 당뇨 및 당뇨합병증에 대한 실험이 부분적으로 이루어져 아직은 미비하므로, 당뇨와 관련된 당저해 효과를 실험하여 당뇨병 예방에 대한 기초 조사를 하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 기능성식품의 원료로서 가능성이 있는 약용식물 중 산사를 이용하여 각종 소스, 천연 첨가물로서의 가능성을 시험하고자 산사의 항산화 및 항당뇨 활성을 실험하였다. 일반적으로 식품에는 열수추출법을 많이 이용되나 효과적인 실험을 위해 에탄올추출도 함께 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 추출물 제조

본 연구에서 사용된 산사는 2013년 10월에 강원도 영월군에서 재배하고 건조된 것으로 구입하였다. 건조된 산사를 각각 물, 30%, 50%, 70%, 100% 에탄올로 80°C에서 2시간씩 환류 추출하였다. 3번 반복 추출 과정을 거친 후 모아진 추출액을 동결건조하여 본 실험의 시료로 사용하였다. 시료의 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출 후 건조 중량 백분율로 나타내었다.

### 2. 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법(Folin & Denis 1912)을 일부 변형하여 측정하였다. 용매로 액체화 한 시료(1 mg/mL) 200  $\mu$ L에 증류수 1.8 mL를 가하고, 1N Folin-Ciocalteu's phenol reagent(SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA) 200  $\mu$ L를 가한 뒤 5분간 실온에서 방치하였다. 이 혼합액에 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 mL를 가하고, 다시 실온에서 1시간 방치한 후 750 nm에서 spectrophotometer(UVIKON xl, Secomam, France)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid(SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 작성하였으며, 총 페놀 함량은 1 g에 대한 mg gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

### 3. DPPH를 이용한 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois 방법(Blois MS 1958)을 일부 변형하여 측정하였다. 96-well micro plate에 시료 30  $\mu$ L를 가하고,  $1.5 \times 10^{-4}$  M DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액 270  $\mu$ L를 가한 뒤 잘 혼합하여 암소에서 30분간 반응시켰다. 얻어진 반응액은 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 radical scavenging activity(%)와 50% scavenging concentration(SC<sub>50</sub>)으로 나타내었다. 실험에 사용한 시료의 농도는 1 mg/mL이며, 양성대조군은 ascorbic acid(SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

### 4. ABTS를 이용한 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거활성은 Re 방법(Re *et al* 1999)을 일부 변형하여 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 암소에서 12시간 동안 반응시켜서 라디칼을 발생시켰다. 96-well micro plate에 시료 10  $\mu$ L를 가하고 ABTS 용액 290  $\mu$ L를 가한 뒤 잘 혼합하여 암소에서 30분간 반응시켰다. 얻어진 반응액은 750 nm에서 흡광도를 측정한 다음, radical scavenging activity(%)와 50% scavenging concentration(SC<sub>50</sub>)으로 나타내었다. 실험에 사용한 시료의 농도는 1 mg/mL이며, 양성대조군은 trolox(CALBIOCHEM, Darmstadt, Germany)를 사용하였다.

### 5. 최종당화산물(AGEs)의 억제 효과

Bovine Serum Albumin(BSA)(5 mg/mL)와 methylglyoxal solution(2 mg/mL)에 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)로 녹인 시료(10 mg/mL)를 넣고, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 사용하여 총 부피를 5 mL로 맞추었다. 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, spectrofluorometer(Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 반응 전후의 시료의 형광도(Excitation: 355 nm, Emission: 460 nm)를 측정하였다. 최종 당화산물(Advanced Glycation End-products, AGEs)의 억제율은 대조군의 형광도 증가 값을 기준으로 시료의 형광도 증가 값을 비교하여 측정하였다. 양성대조군은 aminoguanidine(SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{S_{24} - S_0}{C_{24} - C_0} \right) \right\} \times 100$$

$C_0$  : 당화반응이 일어나지 않은 대조군

$C_{24}$  : 당화반응이 일어난 대조군

$S_0$  : 당화반응이 일어나지 않은 시료군

$S_{24}$  : 당화반응이 일어난 시료군

## 6. $\alpha$ -Glucosidase 효소 억제 효과

$\alpha$ -Glucosidase 효소 억제 효과를 측정하기 위한 효소원의 조제는 McPherson *et al*(1988)이 사용한 방법을 변형하여 실시하였다. 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 100  $\mu$ L와 효소  $\alpha$ -glucosidase를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시켜 0.00124 U/mL 농도로 만든 효소용액 60  $\mu$ L에 DMSO에 녹인 시료 10  $\mu$ L를 첨가한 후, 37°C에서 15분간 pre-incubation하였다. 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside(pNPG) (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA)를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시켜 2.47 mM 농도로 만든 기질용액 30  $\mu$ L를 pre-incubation이 끝난 용액에 첨가한 직후 405 nm에서 흡광도를 10초마다 1분 동안 kinetics로 측정하였다. 양성대조군으로 acarbose(SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{S-B}{C-B} \right) \right\} \times 100$$

C : 효소반응이 100% 일어난 대조군

B : 효소반응이 0% 일어난 대조군

S : 시료를 처리했을 때 효소반응군

## 7. Aldose Reductase 효소 억제 효과

$\alpha$ -Glucosidase 효소 억제 효과를 측정하기 위한 효소원의 조제는 McPherson *et al*(1988)이 사용한 방법을 변형하여 실시하였다. 효소원의 제조는 무게 200 g이 넘는 rat의 안구를 적출하여 그 안의 수정체의 습중량에 따라 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.2)를 수정체 1개당 500  $\mu$ L씩 넣어 얼음 안에서 균질화시켜주었다. 이를 4°C, 7,500 rpm에서 30분간 원심분리한 후, 그 상층액을 취하여 효소원으로 사용하였다. 활성 억제능 측정 시에는 먼저 1 mL cell에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 530  $\mu$ L를 넣어주고, 제조한 효소원 160  $\mu$ L와 100 mM DL-glyceraldehyde 100  $\mu$ L를 넣어 주었다. 그리고 시료 10  $\mu$ L를 넣어주고, 마지막으로 1.5 mM NADPH를 100  $\mu$ L 넣어주었다. Cell 내부에서 반응시켜준 뒤 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 양성대조군으로 quercetin(SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \left\{ \frac{(C-S)}{(C-B)} \right\} \times 100$$

C : 효소반응이 100% 일어난 대조군(0~4 min 동안의 흡광도 값을 4로 나눈 값)

B : 효소반응이 0% 일어난 대조군(0~4 min 동안의 흡광도 값을 4로 나눈 값)

S : 시료를 처리했을 때 효소반응 군(0~4 min 동안의 흡

광도 값을 4로 나눈 값)

## 8. 통계처리

본 실험의 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 시료 간의 유의성 검증은 Statistical Package for Social Sciences 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one way analysis of variance(ANOVA) test를 한 후 Duncan's multiple test에 의해  $p < 0.05$  수준에서 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 추출용매에 따른 추출수율의 변화

산사 용매별 추출수율은 Table 1과 같다. 200g의 산사를 용매별로 추출한 결과, 물 추출물의 수율은 21.71%이고, 100%, 70%, 50%, 30% 에탄올 추출물 순으로 각각 19.03%, 33.16%, 27.79%, 21.88%로 70% 에탄올 추출물의 수율이 가장 높게 나타났다. Duan *et al*(2014)의 산사 과육에 대한 수율은 70% 에탄올 추출 시 59%의 수율을 나타냈는데, 산사 과육 분말만을 사용하였기 때문에 더 많은 수율을 나타낸 것으로 생각된다. Kim *et al*(2014)의 산사 씨의 추출결과를 보면 70% 에탄올 추출물시 10.23%의 수율을 나타내었다. 최무륜(Seo & Kim 2014)의 경우, 잎은 물(2.95%)보다 70% 에탄올(10%) 추출 시 더 높은 수율을 보인 반면, 줄기는 물(1.63%)과 70% 에탄올(1.47%) 추출에서 물 추출이 다소 더 높게 나타나, 식물의 부위에 따라 수율이 다르게 나타났다.

### 2. 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 작성한 표

**Table 1. Extraction yields and phenolic compound contents of *C. pinnatifida* with different solvent systems**

Extraction solvent system	Extraction yields (%)	Total phenolic content (mg GAE/g <sup>1)</sup> )
DW	21.71	20.02 $\pm$ 0.14 <sup>2)3)c</sup>
30% EtOH	21.88	36.54 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
50% EtOH	27.79	41.83 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
70% EtOH	33.16	40.13 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
100% EtOH	19.03	20.44 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Total phenolic content was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE).

<sup>2)</sup> Each value is presented as mean $\pm$ S.D. of 3 times.

<sup>3)</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

준곡선을 기준으로 하여 실험한 결과 Table 1과 같다. 총 폴리페놀 함량은 물, 100%, 70%, 50%, 30% 에탄올 추출물 순으로 각각 20.02, 20.44, 40.13, 41.83, 36.54 mg GAE/g이며, 50% 에탄올 추출물에서는 가장 높게 나타나, 표준물질에 비해 2배의 활성을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물까지는 에탄올 농도가 증가할수록 페놀 함량이 증가하였지만, 70% 에탄올 추출물에서 약간 감소하였고 100% 에탄올 추출물에서는 급격히 감소하였다. Lee *et al*(2000)은 에탄올 농도에 따른 홍삼의 페놀 화합물이 60%까지는 증가되었으나, 80% 이상에서는 오히려 감소되었다고 한 결과는 본 연구 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 이는 100% 에탄올보다 물과 혼합한 에탄올이 용매의 극성을 변화시켜 폴리페놀의 용해도를 증가시킨다고 한다. Park & Hong(2014)의 추출방법에 따른 상지추출의 항산화효과에서도 같은 결과를 보였으며, 이는 50% 에탄올은 물과 에탄올이 혼합되어 있어 상지에 함유되어 있는 페놀성 물질이 쉽게 용출되었기 때문이라고 하였다. Kim *et al*(2014)의 산사 씨의 총 페놀 함량은 2.67±0.18 mg/g 이고, Duan *et al*(2014)의 산사과육은 70.41±1.47mg/g으로서 수율과 비슷한 경향을 보였다.

### 3. DPPH를 이용한 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 소거활성은 시료의 항산화활성 측정에 많이 활용되는 방법 중 하나이다. DPPH는 항산화물질과 반응하여 음이온 라디칼이 소거되면서 보라색에서 노란색으로 탈색되는 원리로 항산화활성을 측정하는데 사용된다(Bondet *et al* 1997). DPPH를 이용한 라디칼 소거활성을 측정한 결과, 50% 에탄올 추출물의 활성이 80.79%로 가장 높게 나타내었다 (Table 2). 시료 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거활성 변화 곡선으로부터 산화를 50% 억제시키는 농도인 SC<sub>50</sub>은 물, 100%, 70%, 50%, 30% 에탄올 추출물 순으로 각각 0.97, 2.95, 0.46, 0.38, 0.53 mg/mL 활성도를 나타내었다. Park *et al*(2013)의 오

미자의 항산화 특성 연구에서도 50% 에탄올 추출물에서 가장 높은 결과를 나타내었고, 에탄올 농도가 증가함에 따라 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 70%, 99%로 감소하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다. Duan *et al*(2014)의 산사과육은 70% 에탄올 추출 시 91.17%(0.8 mg/ml)로 좀 더 높게 나타났으며 Lee *et al*(2013)의 산사분말 에탄올 추출 시 82.6%(1,000 ppm 농도)의 결과를 보였다. Kang *et al*(1995)은 페놀성 화합물이 항산화 활성에 기인한다고 하였다. 본 연구의 결과에서 30% 에탄올, 50% 에탄올, 70% 에탄올 추출물을 보면 총 페놀 함량이 높을수록 라디칼 소거 활성이 높아, 라디칼 소거 활성이 페놀성 화합물과 관련 있는 것으로 보인다. 그러나 물과 100% 에탄올 추출물을 보면 총 페놀 함량이 약 20 mg GAE/g으로 비슷하지만 라디칼 소거 활성의 SC<sub>50</sub> 값은 0.97, 2.95 mg/mL로 큰 차이를 보인다. 따라서 물, 100% 에탄올 추출물의 라디칼 소거 활성은 Kang *et al*(1995)의 연구와 달리 페놀성 화합물과 관련되지 않은 것으로 사료된다.

### 4. ABTS를 이용한 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거활성도 DPPH를 이용한 방법과 함께 항산화활성을 측정하는데 많이 이용되는 방법이다. ABTS는 항산화물질과 반응하여 양이온 라디칼이 소거되면서 청록색에서 무색으로 탈색되는 원리로 항산화활성을 측정하는데 사용된다(Fellegrini *et al* 1999). Table 2는 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과이다. 50% 에탄올 추출물의 활성도가 소거활성 34.92%, SC<sub>50</sub> 1.22 mg/mL로 가장 높으며, DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 경향이 나타내었다. 그러나 본 연구에서는 ABTS 라디칼 소거활성이 DPPH 라디칼 소거활성보다 비교적 낮은 결과를 나타내었다. Duan *et al*(2014)의 산사 씨도 유사한 경향으로 나타나 ABTS 라디칼 소거활성이 좀 더 낮게 나타났다. 이는 Lee *et al*(2012)이 보고한 두 방법에 대한 기질과 이와 반응하는 물질과의 결합정도가 달라 측정값

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity of *C. pinnatifida* extracted by various ratio of ethanol

Sample (1 mg/mL)	DPPH Scavenging activity (%)	SC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (mg/mL)	ABTS Scavenging activity (%)	SC <sub>50</sub> <sup>4)</sup> (mg/mL)
DW	42.18±1.28 <sup>2)3)d</sup>	0.97±0.02 <sup>d</sup>	13.33±0.47 <sup>c</sup>	4.50±0.12 <sup>c</sup>
30% EtOH	68.59±0.87 <sup>c</sup>	0.53±0.01 <sup>c</sup>	27.37±0.71 <sup>b</sup>	2.57±0.03 <sup>b</sup>
50% EtOH	80.79±0.83 <sup>a</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>	34.92±0.97 <sup>a</sup>	1.22±0.03 <sup>a</sup>
70% EtOH	71.44±1.62 <sup>b</sup>	0.46±0.02 <sup>b</sup>	27.75±0.79 <sup>b</sup>	2.58±0.05 <sup>b</sup>
100% EtOH	26.61±0.06 <sup>c</sup>	2.95±0.02 <sup>c</sup>	14.64±0.59 <sup>c</sup>	4.57±0.04 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Concentration of the material which is required to scavenge 50% of DPPH radicals.

<sup>2)</sup> Each value is presented as mean±S.D. of 3 times.

<sup>3)</sup> Means with different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>4)</sup> Concentration of the material which is required to scavenge 50% of ABTS radicals.

에서 차이가 나타날 수 있다는 것으로 사료된다. Park *et al* (2013)의 오미자의 항산화 특성 연구에서 ABTS 라디칼 소거능도 DPPH 소거능과 같은 결과를 보였다. DPPH 라디칼 소거능은 자유라디칼을 소거하며, ABTS는 양이온 라디칼을 소거하는 차이를 가지므로, 오미자 에탄올 추출물에 의한 폴리페놀류의 추출 정도와 각 기질에 결합하는 정도가 다르기 때문이라고 보고하였다. 또한 총 폴리페놀함량과도 매우 높은 상관성이 있다고 하였다.

### 5. 최종당화산물(Advanced Glycation End Products, AGEs)의 억제 효과

당뇨합병증은 혈당이 정상적으로 유지되었음에도 불구하고 발병하는 경우가 많다. 이는 체내에서 포도당이나 포도당의 대사과정 중에 생성된 carbonyl 화합물과 단백질이 아미노그룹과 반응하여 몇 단계의 중간생성물을 거쳐 AGEs라고 불리는 최종당화산물을 만들어 세포독성을 유발시키기 때문이다(Sato *et al* 2006). 본 실험에서는 산사 추출물의 최종당화산물 생성 억제 효과를 확인하였다. 대조군으로는 최종당화산물의 생성을 억제시키는 aminoguanidine(AG)을 사용하였으며, AG의 아미노 말단은 amadori 화합물의 카보닐기와 반응하여 단백질 간 교차결합을 억제한다고 알려져 있다(Ahmed N 2005). AG에 비해 산사 추출물은 낮은 당화반응 억제 효과를 보였으나, 추출물별로 살펴보면 물 추출물과 100% 에탄올 추출물은 4.05%, 2.15%로 비교적 낮은 억제능력을 보인 반면, 70%, 50%, 30% 에탄올 추출물은 20.05%, 27.09%, 22.23%로 다른 두 추출물보다는 비교적 높게 측정된 것을 볼 수 있었다(Table 3). Jang *et al*(2006)의 80% 에탄올과 Lee *et al* (2008)의 100% 에탄올 결과에서도 산사가 최종당화산물 생성 저해 효과가 있는 것으로 나타났다.

**Table 3. Glycation inhibitory activity of *C. pinnatifida* extracted by various ratio of ethanol**

Sample (10 mg/mL)	Inhibition (%)
Aminoguanidine	87.62±0.24 <sup>1)2)a</sup>
D.W	4.05±1.64 <sup>d</sup>
30% EtOH	22.23±1.18 <sup>c</sup>
50% EtOH	27.09±2.27 <sup>b</sup>
70% EtOH	20.05±1.41 <sup>c</sup>
100% EtOH	2.51±1.57 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup> Each value represents the mean±S.D. of 3 times.

<sup>2)</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

### 6. $\alpha$ -Glucosidase 효소 억제 효과

당뇨병은 암, 뇌혈관 질환 및 심장질환과 함께 3대 질병의 하나이다.  $\alpha$ -Glucosidase는 소장 brush-border membrane에 존재하는 가수분해 효소로서 섭취된 이당류나 다당류의 탄수화물을 흡수되기 위한 단당류의 형태로 가수분해한다(Van de Laar *et al* 2005; Gua *et al* 2006). 따라서  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해제의 개발은 포도당으로 분해되는 것을 지연시켜 제2형 당뇨와 같은 당질 관련 질병의 예방을 효과적이다(Kim *et al* 2005). 본 연구에서는 산사 추출물로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정하여 탄수화물의 포도당 분해 억제효과를 측정하였다. 물 추출물, 100%, 70%, 50%, 30% 에탄올 추출물에서 저해 활성이 높아지는 경향을 보였다. 1 mg/mL 농도에서 저해능을 비교한 결과, 70%, 50%, 30% 에탄올 추출물이 35.62%, 58.87%, 36.78%로 대조군으로 사용한 acarbose보다 더 높은 저해활성을 나타내었다. 각 추출물의 SC<sub>50</sub> 값을 측정해본 결과, 50% 에탄올 추출물이 0.84 mg/mL로 저해 활성이 가장 우수하였다(Table 4). 따라서 산사 50% 에탄올 추출물은 탄수화물의 소화 과정에서  $\alpha$ -Glucosidase의 활성을 억제하는 것으로 보인다.  $\alpha$ -glucosidase에 의한 단당류 생성을 저해함으로써 식사 후 혈당이 급격히 상승하는 증상을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인할 수 있다. Park *et al*(2012)의 산사분말의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성도 연구에서 acarbose 보다 낮은 활성을 보였으나 10 mg/mL의 농도로 처리 시 저해활성을 보였고, 물 추출물(17.6%)보다는 70% 에탄올 추출물(32.5%)에서 다소 높은 저해활성을 보여 유사한 경향을 보였다.

### 7. Aldose Reductase 효소 억제 효과

**Table 4.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of *C. pinnatifida* extracted by various ratio of ethanol**

Sample (1 mg/mL)	Inhibition (%)	SC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (mg/mL)
Acarbose	21.08±2.46 <sup>2)3)c</sup>	4.45±0.06 <sup>d</sup>
D.W	14.69±0.76 <sup>d</sup>	2.64±0.10 <sup>c</sup>
30% EtOH	36.78±0.51 <sup>b</sup>	1.67±0.02 <sup>b</sup>
50% EtOH	58.87±0.70 <sup>a</sup>	0.84±0.02 <sup>a</sup>
70% EtOH	35.62±1.74 <sup>b</sup>	1.82±0.11 <sup>b</sup>
100% EtOH	12.32±1.09 <sup>d</sup>	6.68±0.40 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup> Concentration of the material which is required to scavenge 50% of  $\alpha$ -glucosidase inhibition.

<sup>2)</sup> Each value represents the mean±S.D. of 3 times.

<sup>3)</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

당뇨병에 의하여 수정체 내의 glucose 농도가 상승하면 알도스 환원효소(aldose reductase, AR)에 의하여 sorbitol의 생성이 항진하고, sorbitol의 축적은 세포내 삼투압을 상승시켜 세포가 팽화되어 세포막이 정상을 유지할 수 없게 된다(Hutton *et al* 1976). 이와 동시에 세포내 단백질변성이 진행되면서 수정체가 혼탁하게 되어 백내장 증상을 나타내므로 AR을 당뇨합병증의 한 지표로 사용한다(Gabbay & O'Sullivan 1968). 본 실험에서는 산사 추출물의 항당뇨 활성을 검색하기 위해 rat 수정체의 AR 억제 활성을 측정하여 결과를 나타내었다(Table 5). 표준물질인 quercetin에 비하여 추출물들은 낮은 AR 억제 활성을 보였다. 추출물 중에서 100%, 70%, 50%, 30% 에탄올 각각 8.52±3.39%, 19.32±2.68%, 14.77±1.14%, 22.16±2.11%로 비교적 낮게 측정되었으나, 물 추출물은 30.68±1.41%로 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 민들레와 엉겅퀴의 흰쥐 수정체 AR저해활성측정에서는 메탄올 추출물이 물 추출물보다 높게 나타났다(Jung *et al* 2008).

## 요약

장미과에 속한 낙엽교목인 산사나무의 열매인 산사의 항산화 및 항당뇨 관련 활성을 검토하고, 추출 용매에 따른 차이를 비교하기 위하여 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, 최종당화산물 억제능, α-glucosidase 억제능, aldose reductase 억제능을 측정하였다. 수율은 70% 에탄올 추출물이 33.16%로 가장 높았고, 50% 에탄올 추출물이 27.79%로 그 다음 높았으며, 물, 30% 에탄올, 100% 에탄올은 각각 21.71%, 21.88%, 19.03%를 나타내었다. 총 페놀 함량은 50% 에탄올 추출물이 41.83±0.07 mg GAE/g으로 가장 높았고, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능도 50% 에탄올 추출물이 각각 80.79±0.83%, 34.92±0.97%로 가장 높았다. 최종

당화산물 억제능과 α-glucosidase 억제능도 50% 에탄올 추출물이 27.09±2.27%와 58.87±0.70%로 가장 높게 나타난 반면에 AR은 물 추출물이 30.68±1.41%로 가장 높게 나타나면서 상이한 경향을 보였다. 이상의 결과를 종합해 보면, 알코올 농도에 따른 산사의 추출물 중 50% 에탄올 추출물이 천연 항산화제로서 가치가 있으며, 당뇨병 예방을 위한 천연물로서의 가능성도 보였으나 당뇨병 합병증 치료에 대한 효과는 미흡한 것으로 나타났다. 향후 좀 더 다양한 fraction에서의 연구와 *in vivo* 시험 등을 통한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67: 3-21.
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Sci Technol* 30: 609-615.
- Choi GY, Han GJ, Ha SC (2011) α-Glucosidase inhibitory substances exploration isolated from the herb extract. *Korean J Food Prserv* 18: 620-625.
- Duan Y, Kim MA, Seong JH, Lee YG, Kim DS, Chung HS, Kim HS (2014) Impacts of various solvent extracts from wild haw(*Crataegus pinnatifida* Bunge) pulpy on the antioxidative activities. *J East Asian Soc Dietary Life* 24: 392-399.
- Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C (1999) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299: 379-389.
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
- Gabbay KH, O'Sullivan JB (1968) The sorbitol pathway in diabetes and galactosemia: Enzyme and substrate localization and changes in kidney. *Diabetes* 17: 0012-1797.
- Gua J, Jin YS, Han W, Shim TH, Sa JH, Wang MH (2006) Studies for component analysis, antioxidative activity and α-glucosidase inhibitory activity from *Equisetum arvense*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 77-81.
- Hong SS, Hwang JS, Lee SA, Han XH, Hwang JS, Lee KS

**Table 5. Aldose reductase inhibitory activity of *C. pinnatifida* extracted by various ratio of ethanol**

Sample (1 mg/mL)	Inhibition (%)
Quercetin	95.45±2.13 <sup>1)2)a</sup>
D.W	30.68±1.41 <sup>b</sup>
30% EtOH	22.16±2.11 <sup>ab</sup>
50% EtOH	14.77±1.14 <sup>bc</sup>
70% EtOH	19.32±2.68 <sup>b</sup>
100% EtOH	8.52±3.39 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Each value represents the mean±S.D. of 3 times.

<sup>2)</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

- (2002) Inhibitors of monoamine oxidase activity from the fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Kor J Pharmacogn* 33: 285-290.
- Hutton JC, Schofield PH, Williams JF, Regtop HL, Hollows FC (1976) The effect of an unsaturated-fat diet on cataract formation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr* 36: 161-177.
- Jang DS, Lee YM, Kim YS, Kim JS (2006) Screening of Korean traditional herbal medicines with inhibitory activity on advanced glycation end products (AGEs) formation. *Kor J Pharmacogn* 37:48-52.
- Jung MJ, Heo SI, Wang MH (2008) Rat lens aldose reductase inhibitory of *Taraxacum mogolicum* and two *Cirsium* species. *J Appl Biol Chem* 51: 302-306.
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD (1995) Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
- Kim HS, Kim MA, Yishan Duan, Jang SH, Cho HJ, Ryu JY, Kim SW (2014) Influences of wild Haw (*Crataegus pinnatifida* Bunge) on lowering bun and creatinine concentrations in dyslipidemia. *Journal of Environmental Science International* 23: 1029-1035.
- Kim HS, Kim MA, Yishan Duan, Jang SH, Lee WK, Ryu JY (2014) Effects of Haw (*Crataegus pinnatifida* Bunge) on relaxation in the lipid components and blood glucose of lipid metabolism syndrome. *Journal of Environmental Science International* 23: 1021-1027.
- Kim JH, Kim M, Cho YJ (2007) Isolation and identification of inhibitory compound from *Crataegi fructus* on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 204-209.
- Kim MA, Duan Y, Seong JH, Chung HS, Kim HS (2014) Antioxidative activity of feral haw (*Crataegus pinnatifida* Bunge) seed extracts using various solvents. *Korean J Food Cook Sci* 30: 33-40.
- Kim MJ, Chu WM, Park EJ (2012) Antioxidant and antigentotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1041-1048.
- Kim SH, Hwang SY, Park OS, Kim MK, Chung YJ (2005) Effect of *Pinus densiflora* extract on blood glucose level, OGTT and biochemical parameters in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 973-979.
- Lee JJ, Lee JS, Choi YII, Lee HJ (2013) Antioxidant activity of Sansa (*Crataegi fructus*) and its application to the pork tteokgalbi. *Korean J Food Sci An* 33: 531-541
- Lee JW, Do JH, Lee SK, Yang JW (2000) Determination of total phenolic compounds from Korean red ginseng, and their extraction conditions. *J Ginseng Res* 24: 64-67.
- Lee SM, You YH, Kim KM, Park JJ (2012) Antioxidant activities of native Gwangyang *Rubus coreanus* Miq. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 327-332.
- Lee YM, Kim YS, Kim JM, Jang DS, Kim JH, Yoo JL, Kim JS (2008) Screening of Korean herbal medicines with inhibitory activity on advanced glycation end products (AGEs) formation (II). *Kor J Pharmacogn* 39: 223-227.
- Lee, YS, Choi, JB, Joo, EY, Kim, NW (2007) Antioxidative activities and tyrosinase inhibition of water extracts from *Ailanthus altissima*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1113-1119.
- McPherson JD, Shilton BH, Walton DJ (1988) Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry* 27: 1901-1907.
- Park EJ, Ahn JJ, Kwon JH (2013) Effect of reflux conditions on extraction properties and antioxidant activity of freeze dried-*Schisandra chinensis*. *Korean J Food Sci Technol* 45: 550-556.
- Park HM, Hong JH (2014) Effect of extraction methods on antioxidant activities of *Mori ramulus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1709-1715.
- Park SJ, Han KS, Yoo SM (2012) Nutritional characteristics and screening of biological activity of *Crataegi fructus*. *Korean J Food & Nutr* 25: 413-418.
- Re R, Pellegrini N, Protegente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals 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.
- Seo SJ, Kim NW (2014) Antioxidant activities of extracts from leaves and stems of *Achyranthes japonica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 972-979.
- Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van de Lisdonk EH, Rutten GE, van Weel C (2005)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: Results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 28: 154-

163.

Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV (1991) Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10: 339-352.

---

Date Received	Feb. 25, 2015
Date Revised	Apr. 16, 2015
Date Accepted	Apr. 17, 2015