생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
28(3) : 138~142(1997)

구기자의 혈당강하작용

신준수, 김경순, 정기화,[1] 정춘식,[1] 고광호, 박정일, 허 훈, 김박광*
서울대학교 약학대학, 덕성여자대학교 약학대학[1]

Antidiabetic Activity of Lycii Fructus

Joon Su Shin, Kyoung Soon Kim, Gi Hwa Jeong,[1] Chun Sik Cheong,[1]
Kwang Ho Ko, Jeong Hill Park, Hoon Huh and Bak-Kwang Kim*
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; and
[1]College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-174, Korea

Abstract – To elucidate antidiabetic activity of Lycii Fructus, the extract of the Lycii Fructus was subjected to bioactivity-guided fractionation. The extract of the Lycii Fructus was partitioned succesively with hexane, dichloromethane, ethylacetate and butanol. The butanol fraction, which is most abundant in the Lycii Fructus, was subjected to silica gel column chromatography and resulted in seven fractions, namely, Fr. I - Fr. VII. Among tested several subfractions, Fr. IV showed the highest antidiabetic activity in the streptozotocin-induced model rat.

Key words – Lycii Fructus; antidiabetic activity; blood glucose level; streptozotocin-induced rat model

당뇨병(diabetes mellitus)은 당이 뇨로 배설되는 질병으로 췌장에 있는 Langerhans섬의 β-세포에서 분비되는 insulin의 생리작용이 저조하거나 충분한 양의 insulin을 공급하지 못함으로서 생기는 질환이다. 당뇨병에는 insulin 의존성 당뇨병(제1형)과 insulin 비의존성 당뇨병(제2형)이 있는데 근본적인 치료법이나 특별한 예방법은 없는 실정이다. 당뇨가 유발되면 insulin과 glucagon의 분비이상으로 생체내 대사조절기능이 비정상으로 되어 고혈당증, 고지혈증, 케톤산증 및 근육과 지방세포에서의 변화도 생기게 된다. 당뇨증상이 오래 지속되면 합병증으로 망막증, 신증, 다리의 괴저, 신경증, 산독증 및 혼수를 유발한다.

현재 당뇨병 치료제로 사용되고 있는 경구혈당강하제중 sulfonylurea제제는 장기간 복용시 심장과 혈관계통의 안전도에 문제가 있으며, biguanide제제중 phenformin도 lactic acidosis, 혈소판감소 및 피부질환을 일으키며 또한 insulin은 저혈당, 알레르기, 주사부위 피하조직의 비대 또는 위축 등의 부작용이 나타남으로 당뇨병과 관련된 성인병문제가 중요한 사회문제로 대두되어 이에 대한 관심은 날로 증가되고 있는 추세이다.

따라서 본 연구자들은 민간에서 당뇨병치료제로 많이 쓰여지고 있는 생약으로부터 보다 안전한 혈당강하제를 개발하기 위해 본 연구를 수행하게 되었다.

현재 한방에서 당뇨병 치료의 목적으로 사용되고 있는 생약중에서 천화분, 달개비, 산수유, 산약, 연자육, 구기자, 맥문동, 갈근, 창출, 두충 등에 대하여 항 당뇨시험을 실시하여 그 결과를 전보[1]에 발표하였다. 구기자(枸杞子, *Lycium chinense* Miller)

*교신저자 : Fax 02-878-1652

는 가지과 식물로서, 낙엽관목, 높이 1.2 m인 양성화이며 개화기는 6-7월, 결실기는 10월, 분포생육지는 전국야지 또는 재배되고 있다. 식용, 관상용, 약용으로 쓰이고 있으며, 한방에서는 세안, 소염, 해열, 강장, 당뇨병, 치통 및 보간 등에 사용되고 있다. 이용부위는 식물의 전부, 뿌리껍질(지골피) 또는 열매로 아미노산, betaine, physalin, zeaxanthin, rutin 등의 성분을 함유하고 있다.[2] 구기자의 휘발성분,[3,4] 성분단리,[5-9] 구조,[10-12] 합성[13-15] 등에 관한 연구가 발표되어 있으나 항 당뇨성분에 대해서는 아직 보고된 바가 없어서 새로운 항 당뇨성 약물을 개발하려는 목적으로 먼저 이 물질의 여러 유기용매분획들에 대하여 당뇨시험을 하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 - 본 실험에서 사용한 구기자는 충남 청양 운곡농협에서 구입한 후 음건하여 사용하였다.

시약 및 기기 - 생약식물을 추출할때 사용하는 용매는 공업용을 재증류하여 사용하였으며, 그외 칼럼을 하거나 재결정시에는 특급시약을 사용하였다. 당뇨유발물질인 streptozotocin(STZ), citric acid 및 sodium citrate는 Sigma chemical Co., 혈액의 포도당검사는 glucose E-kit를 영동제약에서 구입하여 사용하였다.

사용기기는 pH 측정시 HANNA instrument 8520의 electrode pH meter를 사용하였고, UV/visible spectrophotometer는 Hewlett+Packard 8452A, 원심분리기기는 *pbi* international의 ALC 4218 centrifuge를 사용하였다. 또한 shaking water bath는 Masuda의 model M-305(Japan), micropipette은 Gilson Co.(Italy), dispenser는 Witeg Co.(Germany)의 LABMAX, vortex는 Scientica(Italy), hot plate와 stirrer는 Whatman Co.의 기기를 사용하였다.

당뇨병의 유도 및 혈장 포도당 측정 - 당뇨를 유발시키기 위하여 실험동물로 랫트를 사용하여 16시간 절식시킨 후 랫트의 꼬리정맥에 streptozotocin 45 mg/kg의 농도를 이용하였으며 0.01 M의 시트레이트완충액에 주사직전에 45 mg/2 ml의 농도로 용해시켜 제조한 STZ 조제액을 2 ml/kg의 용량으로 꼬리정맥에 주사하였다. 주사한 지 24시간 후에 랫트의 안구총맥으로부터 모세관을 이용하여 혈액 1 ml를 취하고 이를 3,000 rpm에서 15분간 동안 원심분리한 후 혈장을 분리하여 후술하는 포도당산화효소법에 따라 혈중 glucose 농도를 측정하여 당뇨병의 발생여부를 확인하였다. 즉, 혈장내의 glucose를 산화시켜 과산화수소와 글루콘산을 형성시키고 여기서 생성되는 과산화수소는 과산화효소를 이용하여 페놀과 4-아미노안티피린을 정량적으로 산화, 축합시켜 생성된 적색의 물질을 정량하여 혈장내의 glucose의 양으로 결정하였다. 혈장내의 glucose 농도는 다음식에 따라 계산하였다.

$$\text{glucose (mg/dl)} = \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 200$$

이러한 실험결과로부터 실험동물의 혈장중의 glucose 농도가 300 mg/dl 이상인 동물만 당뇨병이 유발된 것으로 판정하고 이하의 혈당강하효과 실험에서 당뇨병 랫트로 사용하였다.

혈당강하작용 검색 - 정량의 생약추출물을 2% Tween 20에 녹여 1일 1회, 7일간 경구투여하였다. 약물 최종투여 24시간 후 ether로 마취시키고 안구정맥총에서 채혈한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈장을 시료로 사용하였다. 고형사료(삼양사료) 및 물은 충분히 공급하였다.

추출 및 분획 - 구기자 5 kg을 음건한 후 환류냉각장치를 이용하여 $CHCl_3$: MeOH(3 : 1) 10 L씩 6시간 3회 추출하고, 용매를 감압하에서 제거하여 extract 170 g을 얻었다. Scheme 1과 같이 이를 메탄올로 현탁시키고, 등용적의 hexane으로 3회 추출하여 용매를 제거하고 Hexane 가용부 33 g을 얻었다. 그리고 메탄올층은 감압농축하여 메탄올엑스를 얻은 다음 물로 현탁시켜 등용적의 CH_2Cl_2로 3회 추출하고 용매를 제거하여 CH_2Cl_2 가용부 11.5 g을 얻었다. 다시 수층을 부탄올로 3회 추출하여 BuOH 가용부 27 g을 얻었다. 이 부탄올 가용부를 메탄올에 녹여 여기에 EtOAc를 더 이상 침전이 생기지 않을 때까지 소량씩 가한 다음 EtOAc층을 취해 감압하에서 용매를 제거하여 EtOAc 가용부 8.5 g과 침전 14.6 g을 얻었다. 본 실험에 있어서는 구기자 50 Kg을 사용하였으며, 상기의 추출 및 분획조작에 준하여 10회 반복하여 추출 및 분획하였다.

구기자의 유기층 분획별 효능시험 - 구기자의 메탄올, 디클로로메탄 및 부탄올 추출물과 각각의 세부분획에 대하여 효능을 검색하였다. 부탄올 층의 활성을 재확인 하기 위해 부탄올층을 좀 더 세분화하여 구기자의 에틸아세테이트엑스, 부탄올잔사엑스를 다시 위의 시험법에 따라 효능을 검색하였다.

실험 결과의 처리 - 각 시험물질 투여 전의 blood glucose level(mg/dl)을 측정한 다음 시험물질 투여 7일 후의 blood glucose level(mg/dl)을 측정하였다. 각 실험결과는 mean±S.D.로 표시하였으며 Analysis of Varience(ANOVA)로 유의성을 검정하였다. 항 당뇨 효과에 대해 유의성이 있는 생약의 blood glucose inhibition rate는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{B_0 - B_7}{B_0} \times 100$$

B_0=시험물질 투여 전의 blood glucose level (mg/dl)

B_7=시험물질 투여 7일 후의 blood glucose level(mg/dl)

결과 및 고찰

구기자의 유기층 분획별 효능시험 - 구기자의 메탄올, 디클로로메탄 및 부탄올 추출물을 시험물질로 하여 상기 시험조건하에서 효능을 검색한 결과, 디클로로메탄 및 부탄올 추출물이 항 당뇨효과를 나타내었다(Table I).

구기자 추출물 중에서 가장 양이 많은 부탄올층을 좀 더 세분화하여 부탄올 층의 활성을 재확인 하기 위하여 구기자의 에틸아세테이트엑스, 부탄올잔사엑스를 시험물질로 하여 다시 상기의 시험법에 준해서 효능을 검색하였다. 그 결과 부탄올층과 에틸아세테이트층이 모두 유의성있는 효과를 나타내었다(Table II).

Table I. Effect of each fraction on blood glucose level in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animal	blood glucose 0 day	level (mg/dl) 7 day
Control	-	4	470.0±49.1	427.3±53.9
K6-Hexane	250	6	444.6±76.9	352.9±175.7
K6-CH_2Cl_2	220	5	449.9±40.9	264.8±103.6*
K6-BuOH	250	5	503.9±69.3	373.2±167.1*

Values are mean±S.D. Significantly different from the control (*p<0.05).

Table II. Effect of each fraction on blood glucose level in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animal	blood glucose 0 day	level (mg/dl) 7 days
Control	-	8	474.9±48.4	493.0±77.4
K6-EtOAc	150	5	513.7±43.1	379.2±62.6*
K6-Residue	150	6	460.6±50.0	353.5±144.8*

Values are mean±S.D. Significantly different from the control (*p<0.05).

헥산층 세부분획의 효능시험 - 헥산엑스 9.7 g을 전개용매 hexane : EtOAc(40 : 1)를 써서 gradient방식으로 실리카겔 칼럼크로마토그라피를 실시하여 8개의 분획으로 나누었다. 이 각각의 분획에 대하여 상기의 시험법에 준해서 효능을 검색한 결과 IV번과 VI분획이 유의성있는 항 당뇨효과를 나타내었다(Table III).

디클로로메탄층 세부분획의 효능시험 - 디클로로메탄엑스 21.1 g을 적당량의 소량 메탄올에 녹여 $CHCl_3$: MeOH(20 : 1 → 1 : 1) gradient방식으로 실리카겔 칼럼크로마토그라피를 실시하여 6개의 분획으로 나누었다. 이 각각의 분획에 대하여 효능을 검색한 결과는 Fr.II, III 및 IV이 유의성 있는 효과를 나타내었다(Table IV).

에틸아세테이트층 세부분획의 효능시험 - 에틸아세테이트엑스 48 g을 적당량의 소량 메탄올에 녹여 $CHCl_3$: MeOH gradient방식으로 실리카겔 칼럼크로마토그라피를 실시하여 5개의 분획으로 나누었

Table III. Effect of hexane extract on blood glucose level in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animal	blood glucose 0 day	level (mg/dl) 7 days
Control	-	8	492.6±39.4	529.2±44.5
Fr. II	100	6	490.8±68.6	398.4±181.0
Fr. III	100	6	494.7±22.6	457.7±79.2
Fr. IV	100	6	466.4±62.7	385.2±149.4*
Fr. V	100	6	452.5±46.9	463.0±37.9
Fr. VI	100	6	488.3±38.0	449.0±32.9*

Values are mean±S.D. Significantly different from the control (*p<0.05).

Table IV. Effect of CH_2Cl_2 extract on blood glucose level in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animal	blood glucose 0 day	level (mg/dl) 7 days
Control	-	9	551.6±34.8	563.9±84.6
Fr. I	100	6	438.9±59.7	545.5±84.6
Fr. II	100	6	511.1±35.5	428.8±94.2**
Fr. III	80	6	553.4±38.1	493.2±25.1**
Fr. IV	100	6	517.9±66.4	496.8±48.0*
Fr. V	100	6	533.9±41.9	530.3±58.1

Values are mean±S.D. Significantly different from the control (*p<0.05). Significantly different from the control (**p<0.01).

다. 이 각각의 분획에 대하여 효능을 검색하였다 (Table V).

부탄올층 세부분획의 효능시험 - 부탄올 엑스 163 g을 적당량의 소량 메탄올에 녹이고 여기에 소량씩 EtOAc를 가하여 더 이상 침전이 생기지 않을때까지 가한 다음 경사시켜 EtOAc층을 분리한 후 남은 잔사를 감압건조하여 88 g을 얻었다. 이를 반복하여 얻은 잔사중 200 g을 취해 전개용매 $CHCl_3$: MeOH : H_2O(15 : 5 : 0.2)로 실리카겔 칼럼크로마토그라피를 실시하여 7개의 대분획으로 나누어 효능을 시험한 결과 IV번 분획이 유의성 있는 항 당뇨효과를 나타내었다(Table VI).

혈당강하효과가 있는 분획의 blood glucose inhibition rate - 좀더 정확한 혈당강하효과를 알아보기 위해 유의성이 있게 혈당강하 효과를 나타낸 세부분획 CH_2Cl_2층 및 BuOH층 등의 blood glucose inhibitionrate를 구한 결과 CH_2Cl_2층은 41.1%, BuOH층은 25.9%로 나타나 구기자의 혈당강하효과를 확인할 수 있었다. BuOH층을 에틸아세테이트

Table V. Effect of EtOAc extract on blood glucose level in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animal	blood glucose 0 day	level (mg/dl) 7 days
Control	-	7	490.7±22.9	520.7±49.5
Fr. I	100	6	489.1±19.5	491.8±53.8
Fr. II	100	6	465.7±54.2	444.9±167.1
Fr. III	100	6	486.1±43.5	459.3±69.5
Fr. IV	100	6	481.4±26.7	582.4±39.9*
Fr. V	100	6	473.3±59.0	521.9±102.2

Values are mean±S.D. Significantly different from the control (*p<0.05).

Table VI. Effect of each fraction of BuOH extract on blood glucose level in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animal	blood glucose 0 day	level (mg/dl) 7 days
Control	-	8	509.7±50.0	478.6±62.8
Fr. I	100	6	441.7±50.0	444.7±32.7
Fr. II	100	6	501.6±70.5	480.3±48.3
Fr. III	100	6	493.6±35.4	483.9±40.5
Fr. IV	100	6	472.7±31.0	410.3±37.7*
Fr. V	100	6	481.8±39.6	464.0±80.7
Fr. VI	100	6	503.7±47.2	471.5±61.3
Fr. VII	100	6	456.3±52.4	504.6±61.6

Values are mean±S.D. Significantly different from the control (*p<0.05).

엑스, 부탄올잔사엑스로 좀 더 세분화하여 blood glucose inhibition rate를 구한 결과 에틸아세테이트엑스 시험물질은 26.2%, 부탄올잔사엑스 시험물질은 23.1%로 나타나 역시 혈당강하효과가 있음을 알았다. 분획별 컬럼크로마토그래피에 의한 세부분획의 활성을 확인한 결과 Hexane 층의 경우 Fr. IV 는 17.4%, Fr. VI는 8.0%, CH_2Cl_2 층의 경우 Fr. II는 16.1%, Fr. III는 10.9%, Fr. IV는 4.1%, EtOAc층을 분리한 후 남은 부탄올잔사의 경우 Fr. IV에서 13.2%로 나타났다.

결 론

구기자의 항당뇨효과를 알아보기위해 메탄올, 디클로로메탄 및 부탄올 추출물을 시험물질로 하여 혈당강하효과를 검색한 결과, 디클로로메탄 및 부탄올 추출물이 항 당뇨효과를 나타내었다. 부탄올층을 좀 더 세분화하여 부탄올층의 활성을 재확인 하기 위하여 부탄올층을 에틸아세테이트엑스, 부탄올잔사엑스로 분리하여 효능을 검색한 결과, 부탄올층과 에틸아세테이트층이 모두 유의성있는 효과를 나타내었다. 각 분획별 컬럼크로마도그래피에 의한 세부분획의 활성을 확인한 결과 헥산엑스에서는 IV번 및 VI번 분획에서 효과를 나타내었으며, 디클로로메탄 엑스는 II번, III번 및 IV번 분획이 유의성 있는 항 당뇨효과를 나타내었으나, 엑스량이 적고 또한 많은 성분이 함유되어 있었으며, 에틸아세테이트엑스는 거의 효과가 나타나지 않았다.

그리고 항 당뇨효과에 유의성이 있는 부탄올엑스

에 대해서는 에틸아세테이트 용매를 가할때 용해되지 않는 잔사를 감압건조시킨 후 일정량 취해 소량의 메탄올에 녹인 다음 전개용매 $CHCl_3$: MeOH : H_2O를 써서 gradient방식으로 실리카겔 칼럼크로마토그라피를 실시하여 7개의 분획으로 분리한 다음, 이 각각에 대하여 효능을 검색한 결과 Fr.IV가 유의성 있는 항 당뇨효과를 나타내었다. 그리고 기대와는 달리 활성분획이 얻어짐에 따라 작용이 감소하고 있으나 계속 효능이 나타나는 가운데 물질을 단리하는 과정이므로 앞으로의 진행에 따라 좋은 결과가 나타날 여지가 있다고 생각된다.

차후에 이 Fr. IV를 칼럼크로마토그라피(MeOH, cephadex LH 20)로 분리하여 얻은 세부분획들을 Column 또는 TLC 등으로 물질을 단리하여 구조를 규명하고 또한 효능을 검색한 다음 이 활성성분의 아급성 독성시험 및 합성법 등에 대하여 계속 연구하고자 한다.

사 사

이 연구는 1995년도 과기처 선도기술개발사업연구비(과제번호: 4-2-24) 지원으로 수행되었으며, 이에 심심한 사의를 표하는 바이다.

인용문헌

1. Kim, J. H., Kim, K. S., Park, J. H., Lee, B. J., Huh, H., Jeong, G. H., Cheong, C. S. and Kim, B. K. (1996) Antidiabetic effect screening of some natural products. *J. Appl. Pharmacol.* 4: 291-295.
2. 한국자원식물연구소 편 (1989) 한국 식물대보감, 자원편, 최신원색판, 하권, 120. 제일출판사, 서울.
3. Sannai, A., Fujimori, T. and Kato, K. (1982) Isolation of (-)-1,2-dehydro-cyperone and solavetivone from *Lycium chinense*. *Phytochemistry* 21: 2986-2987.
4. Sannai, A., Fujimori, T. and Kato, K. (1983) Neutral volatile components *Lycium chinense* M. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2397-2399.
5. Yahara, S., Shigeyama, C., Wakamatsu, K., Yasuhara, T. and Nohara, T. (1989) Structures of anti-ace and -renin peptides from Lycii radicis Cortex. *Tetrahedron Letters* 30: 6041-6042.
6. Mimura, N. and Kinoshita, T. (1986) O-phtahl-aldehyde-N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *J. Chromatogr.* 352: 169-177.
7. Izumitani, Y., Yahara, S., Kobayashi, N., Nohara, Y. (1990) Novel acyclic diterpene glycosides, capsianosides A-F and I-V from *Capsicum* plants (Solanaceous studies. XVI). *Chem. Pharm. Bull.* 38: 1299-1307.
8. Yahara, S., Kobayashi, N., Izumitani, Y. Nohara, T. (1991) New acyclic diterpene glycosides, capsianosides VI, G and H from the leaves and stems of *Capsicum annunm* L. *Chem. Pharm. Bull.* 39: 3258-3260.
9. Yahara, S., Shigeyama, C., Ura, T., Wakamatsu, K., Yasuhara T. and Nohara, T. (1993) Cyclic peptides, acicyclic diterpene glycosides and other compounds from *Lycium chinense* Mill. *Pharm. Bull.* 41: 703-709.
10. Nelson, G. L., Lovy G. C. and Cargioli, J. D. (1972) Solvent effects in carbon-13 nuclear magnetic resonance. Electronic perturbation of aromatic systems. *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 3089-3094.
11. Englert, G., Klinga, K., Hamet, R., Schlittler E. and Vetter, W.(1973) Die Struktur von Maytenin. Helv. *Chim. Acta.* 56: 474-478.
12. Funayama, S., Yoshida, K., Konno C. and Hikino, H.(1980) Structure kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium chinense* root barks. *Tetrahedron Letters* 21: 1355-1356.
13. McManis, J. S. and Ganem, B.(1980) Chemistry of naturally occurring polyamines. 1. Total synthesis of celacinnine, celabenzine and maytenine. *J. Org. Chem.* 45: 2041-2042.
14. Chantrapromma, K., McManis, J. S. and Ganem, B.(1980) The chemistry of naturally occurring polyamines. 2. A total synthesis of thermospermine. *Tetrahedron Letters* 21: 2475-2476.
15. Chantrapromma, K. and Ganem, B. (1981) Total synthesis of kukoamine A, an antihypertensive constituent of *Lycium chinense*. *Tetrahedron Letters* 22: 23-24.

(1997년 7월 2일 접수)