

작약(*Paeoniae radix*) 추출물의 식후 과혈당 억제작용

지승택[†] · 이성진 · 이강은 · 손용태 · 정요경
제네티카(주) 부설연구소

Inhibitory Effect of Extracts from *Paeoniae radix* on Postprandial Hyperglycemia

Seung-Taek Ji[†], Sung-Jin Lee, Kang-Eun Lee, Yong-Tae Son and Yo-Kyung Chung

Research & Development Institute, PaxGenetica Inc., Seoul 135-010, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the inhibitory effect of extracts from *Paeoniae radix* on postprandial hyperglycemia. Organic solvent (hexane, ethyl acetate, butanol, water) extracts from *Paeoniae radix* were fractionated by high performance liquid chromatography. These fractions were used to screen α -glucosidase (EC 3. 2. 1. 20) inhibitors by microplate colorimetric assay. The fractions 11, 12, 18, 19 of ethyl acetate extract from *Paeoniae radix* showed inhibitory activity by 85%, 84%, 77%, 77% at concentration of 20 μ g/mL, respectively. The selected fractions (no. 10~no. 19) significantly reduced by 22% the blood glucose elevation in comparison with positive control in mice loaded with maltose. The fractions of *Paeoniae radix* were determined *in vitro* inhibitory activity on α -glucosidase and *in vivo* inhibition effect on blood glucose elevation in mice. Therefore, these results suggest that the extract of *Paeoniae radix* can be used as a new nutraceutical for inhibition on postprandial hyperglycemia as well as resource pool for lead compounds as a α -glucosidase inhibitor.

Key words: *Paeoniae radix*, postprandial hyperglycemia, α -glucosidase inhibitor, α -glucosidase

서론

당뇨병은 크게 발생하는 기전에 따라 인슐린 부족현상에 의해 발생하는 인슐린 의존형 당뇨병 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM)과 유전적 소인, 인슐린 저항성, 베타 세포 기능저하 등의 상호작용으로 인한 인슐린 비의존형 당뇨병 (noninsulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)으로 분류한다. 전형적인 인슐린 의존형 당뇨병은 소아에서 흔히 발생하고 인슐린 분비능이 거의 없으며 심한 고혈당과 케톤산증, 다뇨, 다음(多飲), 체중감소 및 피로감을 나타낸다. 인슐린 비의존형 당뇨병은 성인당뇨로서 당뇨병의 가장 흔한 형태로 세계적으로 90%를 차지하는 만성질환이다(1,2). 의학 적 치료들은 당뇨병환자들의 과혈당을 조절하여 과혈당으로 발생하는 미세 혈관성 및 거대 혈관성 합병증 등의 증상완화 및 예방을 도모하여 정상적인 삶을 유지시킬 수가 있으며 정상적인 혈당조절은 대부분 당뇨병 환자들의 치료의 목표이다. 식후 과혈당(postprandial hyperglycemia)은 당뇨병의 혈관성 합병증 발생의 중요한 위험요소로서 혈당을 효과적으로 조절하기 위해서는 섭취된 탄수화물의 체내 흡수를 억제하는 것이다. 따라서 소장내 α -glucosidase 저해제는 정상 혈당을 유지시키는 뛰어난 기능성의 생리활성 물질이다(3,4).

α -glucosidase(EC 3. 2. 1. 20)는 탄수화물의 소화과정 중에서 최종단계 즉 maltose 분해를 촉매하는 효소로서 소장 상피세포 내막에 위치한다. 이러한 α -glucosidase 저해제들은 이당류인 maltose 분해를 억제하여 소화를 지연시켜 혈당을 효율적으로 감소시키는 효과를 가져온다. 이러한 α -glucosidase 저해제로서 식후 과혈당(postprandial hyperglycemia)을 조절하기 위하여 acarbose, miglitol, voglibose가 개발되어 의약품으로 사용되고 있으나 사용자에게 따라 부작용이 발생하고 있다(4-6). 따라서 국내외적으로 증가추세에 있는 당뇨병을 치료하며 당뇨병 환자와 그 가족들의 삶의 질을 개선하기 위해서는 보다 부작용이 적고 안전한 혈당강하제의 개발이 필요하다.

작약(*Paeoniae radix*)은 목단과에 속하는 식물로서 다년초이고 근은 비후했으나 곳곳이 자라되 방추형이고 긴 것은 30 cm 내외의 길이를 갖는다. 이 식물은 진경, 진통, 수렴, 완화약으로 근육의 경련, 두통, 복통, 이질, 세균성감염 및 지한(止汗), 조경(調經) 등에 유효하다. 주로 간에 작용하며 간의 기운을 부드럽게 하고 혈액을 보충하는 기능이 있어서 월경의 주기가 불규칙한 여성과 스트레스로 인해 짜증이 있는 경우에 좋은 효과를 나타낸다. 지금까지의 작약에 대한 대부분의 연구는 한방에서 뇌졸중의 후유증이나 동맥경화의 예

[†]Corresponding author. E-mail: jist@paxgenetica.com
Phone: 82-2-514-3698. Fax: 82-2-514-1977

방 및 치료에 처방되고 있는 작약의 항고지혈증에 관한 많은 연구가 이루어졌으며(7-9), 작약에는 gallic acid methyl ester, catechin, paeoniflorin, albiflorin, paeonal, beta-sitosterol, campesterol, bezonic acid, oleanolic acid, hederagenin, beta-sitosterol 3-O-glucoside 등의 성분이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다(10).

최근에는 천연물의 다양한 생리활성 물질에 많은 관심이 생기면서 천연물의 α -glucosidase 저해제에 대한 탐색 연구가 활발히 이루어지고 있다. 최근에 *Gyrophora esculenta* 에서 혈당상승억제 효과를 확인하였으며(11), 곡류에서는 *Elymus sibiricus*, *Fagopyrum esculentum*, *Perilla frutescens* var. *japonia* 등의 메탄올 추출물이 α -glucosidase의 저해 효과를 나타내었다(12). 또한 해양생물의 일종인 홍조류 *Odonthalia corymbifera*로부터 α -glucosidase 저해제인 4-bromo-2,3-dihydroxy-6-hydroxymethyl-phenyl 2,5-dibromo-6-hydroxy-3-hydroxy-methylphenyl ether와 bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether를 확인하였다(13). 그리고 Kim 등(14)은 천연물에 존재하는 21종류의 flavonoid의 α -glucosidase와 amylase 저해효과 실험을 통하여 luteolin의 강한 저해활성이 있는 것으로 보고되고 있지만 식물로부터의 연구는 아직 부족한 상태이고 새로운 nutraceutical 소재와 의약품의 실용화를 위해 더 많은 저해제의 탐색과 연구가 필요하다.

본 연구자들은 작약의 생리활성 물질을 연구하던 중 작약의 유기용매 추출물로부터 α -glucosidase 저해효과를 규명하여 천연물질의 생리활성 신소재로서의 작약의 이용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

재료

작약(생산지: 경북 의성, 판매원: 영주농협)을 건조약재의 상태로 서울 양재동 소재 농협 하나로 클럽에서 구입하여 분

쇄한 다음 추출용 재료로 사용하였다.

유기용매 추출물의 제조

작약 건조약재와 MeOH를 1:3(W/V)의 비율로 섞어 7일 동안 냉침하여 추출한 후에 여과(Whatman paper No. 2)하여 여과액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)로 40°C에서 감압농축하였다. 이 농축물을 70% MeOH로 다시 녹인 후에 극성도에 따라 4가지 용매(hexane, ethyl acetate, butanol, water)를 이용하여 순차적으로 추출하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 40°C에서 감압농축하였으며, 물 추출물은 freeze dryer(Ilshin, Korea)를 이용하여 동결건조하여 추출물 시료로 사용하였다.

유기용매 추출물의 분획 제조

Hexane, ethyl acetate, butanol 추출물을 MeOH, isopropanol의 용매로 77 mg을 녹인 후에 membrane filter(Millipore 0.45 μ m)로 여과하여 0.5 mL을 silica gel column(DAISO, Japan)이 부착되어 있는 고속 액체 크로마토그래피(AKTA explorer 10, Amersham Pharmacia, Sweden)에 주입하여 이동상 용매인 cyclohexane, butanol, isopropanol의 농도를 변화시키면서 각각의 시험관에 17 mL을 받아 36개의 분획물을 얻어 speed vac(EYELA, Japan)을 이용하여 감압농축시킨 후에 분획물 시료로 사용하였다. 물추출물은 고속 액체 크로마토그래피(Waters Delta 600, USA)의 Prepak C₁₈ cartridge (25×100 mm, Waters)에 200 mg을 주입한 후 이동상 용매인 물과 MeOH의 농도를 변화시키면서 각각의 시험관에 10 mL을 받아 30개의 분획물을 얻어 speed vac(EYELA, Japan)을 이용하여 감압농축시킨후에 분획물 시료로 사용하였다 (Table 1, 2).

실험동물

식후혈당 억제실험에 사용한 동물은 수컷 ICR계 mouse로서 한림실험동물 연구소에서 구입한 생후 7주 내외, 체중 25±5 g의 mouse를 사용하였다. 실험에 사용하기 전까지 온

Table 1. Working conditions of high performance liquid chromatography for fractions of 4 solvent extracts

Item \ Solvent extracts	Hexane, ethyl acetate, butanol extract	Water extract
Instrument	AKTA explorer 10	Waters Delta 600
Detector	UV-900 (254, 215 nm)	Photodiode Array
Column	Silica gel (22×250 mm)	Prepak C ₁₈ cartridge (25×100 mm)
Flow rate	8 mL/min	11 mL/min
Mobile phase	Cyclohexane, Butanol, Isopropanol, MeOH	H ₂ O, MeOH
Injection volume	0.5 mL	2 mL

Table 2. Gradient changes in mobile phases of high performance liquid chromatography for fractions of 4 solvent extracts

Hexane extract	Ethyl acetate extract	Butanol extract	Water extract
A: Cyclohexane	A: Cyclohexane	A: Cyclohexane	A: H ₂ O
B: Butanol	B: Isopropanol (IPA)	B: IPA : MeOH (4 : 6)	B: MeOH
B: 0 → 5% : 4.5 CV	B: 0 → 20% : 4 CV	B: 5 → 35% : 3 CV	B: 0 → 0% : 0.9 CV
5 → 15% : 0.5 CV	20 → 100% : 2 CV	35 → 35% : 1 CV	0 → 80% : 2.4 CV
15 → 100% : 1 CV		35 → 100% : 2 CV	

도는 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 60%의 항온, 항습 장치가 되어 있는 동물실험실에서 표준사료로 사육하며 동물실험실 환경에서 1주간 순응시킨 후 사용하였다.

α -glucosidase 조효소액 및 glucose reagent 조제

생후 6주령된 수컷 Sprague-Dawley rat을 한림실험동물 연구소로부터 구입하여 위와 동일한 조건의 동물실험실 환경에서 1주간 순응시킨 후 사용하였다. Choi 등(15)의 방법에 따라 16시간 동안 절식시킨 후, 흰쥐의 소장 상피층을 취하여 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 현탁한다. Ultrasonic Processor(Sonics, USA)을 이용하여 현탁액을 초음파로 15초간 3회 분쇄하고, 4°C , 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

α -glucosidase 효소 활성 측정시에 이용할 glucose reagent는 *O*-phenylenediamine 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, peroxidase 5 units/mL 그리고 glucose oxidase 0.96 units/mL로 만들어 사용하였다.

α -glucosidase 활성억제 측정

α -glucosidase의 활성억제 측정을 위하여 Dahlqvist(16)의 방법을 변형하여 사용하였다. 조효소액, 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0), 2 mM maltose 그리고 시료액을 최종 농도가 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하여 40분간 37°C 에서 배양한 후, water bath(80°C , 3분)에서 효소를 불활성화하였다. 반응용액에서 100 μL 를 새로운 96 well plate에 옮겨주고, glucose reagent를 동량 첨가한 후, 37°C 에서 30분간 배양하고 3 N HCl을 첨가하여 490 nm에서 흡광도를 ELISA reader를 이용하여 측정하였다. 저해활성 정도는 양성대조구의 비교하여 상대적인 저해 퍼센트를 구하였다.

식후혈당억제 실험

Mouse를 실험하기 전 16시간동안 절식시킨 후, 각 군당 6마리로 나누어 실험하였다. 대조군의 경우는 5% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 경구 투여하였고, 실험군에는 5% DMSO에 녹여 둔 Glucobay 100(80 mg/kg)과 작약 분획물(400 mg/kg)을 각각 경구 투여하였다. 30분이 경과한 후, 음성대조군에 증류수를 경구 투여하고 나머지 실험군은 2 g/kg의 농도로 maltose를 경구 투여하고 30분후에 혈당을 측정하였다(11). 혈당측정은 각각의 mouse 안와정맥에서 혈액을 채취하여 glucose meter (SUPER GLUCOCARDTMII, Japan)를 이용하여 측정하였다.

통계분석

모든 실험결과는 Statistical Analysis System 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 Student's *t*-test를 이용하여 $p=0.01$ 수준에서 양성대조군과 실험군으로부터 얻은 실험결과의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

작약의 α -glucosidase 활성 저해력

작약의 hexane 추출물 36개 분획물과 water 추출물 30개

분획물에서는 α -glucosidase 활성을 저해하는 효과를 나타내지 못하였으나, ethyl acetate 추출물의 10~19번 분획물들은 매우 강한 저해 활성을 나타내었다. 10번 분획에서는 44% 저해율을 나타내었으며 11, 12번 분획은 각각 85%, 84%의 강한 억제활성을 나타내었다. 그리고 16, 17, 18, 19번 분획에서도 67%, 73%, 77%, 77%의 억제 효과를 보였다. Butanol 추출물의 12번, 22번, 23번 분획들도 각각 41%, 69%, 48%의 α -glucosidase 활성에 대한 저해력을 보였다(Fig. 1).

In vitro α -glucosidase 실험에서 Kim 등(14)은 luteolin의 최종농도가 5 mg/mL일 때 90% 저해 효과를 나타내었으며 곡류의 MeOH 추출물에서는 0.5~1 mg/mL의 농도에서 90% 정도의 저해 활성도를 보였다(12). 그러나 본 실험에 사용한 α -glucosidase assay의 분획 농도는 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이므로 저해활성능이 매우 우수한 천연물이라 사료된다.

Mouse에 maltose 부하시 혈당상승 억제효과

식후 과혈당(postprandial hyperglycemia)을 예방하기 위하여 탄수화물의 흡수를 지연시키는 α -glucosidase 저해제의 효과를 조사하기 위하여 이와 같은 기전으로 사용하는 Glucobay 100과 rat 소장 유래의 α -glucosidase 저해활성 검색에 효과가 있는 작약 ethyl acetate 추출물의 10~19번 분획을 경구 투여하여 작약 분획물의 *in vivo*에서 혈당강하 작용을 측정하였다.

용매로 사용한 5% DMSO만을 경구투여한 첫 번째 음성대조군의 혈당치는 95 mg/dL로서 정상 혈당치를 나타내었다. 따라서 용매로 사용한 5% DMSO는 본 실험에 영향을 나타내지 않음을 알 수가 있다. Maltose를 경구투여한 두 번째 양성대조군에서는 maltose가 쥐의 소장에 위치하는 α -glucosidase에 의해 포도당으로 분해 되어 신체내로 빠르게 흡수되어 187 mg/dL의 높은 혈당치를 보였다. 그러나 maltose를 경구투여하기 30분전에 혈당강하제로 이용되고 있는 Glucobay 100과 *in vitro* α -glucosidase 효소 활성 억제 실험에서 효과가 있는 분획물인 ethyl acetate 10~19번의 추출물을 경구 투여한 실험군에서는 α -glucosidase 활성을 양성대조군과 비교하여 각각 26%, 22%로 매우 유의성 높게 혈당강하 효과를 나타내었다(Fig. 2).

Glucobay 100은 acarbose로 구성되어 장내의 탄수화물 소화효소인 α -glucosidase를 저해하여 탄수화물의 소화, 흡수 시간을 지연시켜 혈당치의 상승을 억제한다(4-6). 작약 분획물들은 이러한 Glucobay 100과 비교하여 볼 때 저해 활성 농도가 5배 높지만은 실제적으로 작약 분획물들을 구성하고 있는 많은 천연 화학물질을 고려해 볼 때 단일물질의 저해능도는 대단히 낮을 것이라 생각된다.

최근에는 뽕잎에서 기능성 식품 소재로서 α -glucosidase 저해활성을 갖는 1-deoxynojirimycin의 존재도 보고되었으며(17,18), 인도 약초인 *Salacia oblonga*의 뿌리부분의 MeOH 추출물로부터 유효성분인 salacinol을 확인하여 당뇨병에 유효한 건강차 살라시아 오블롱가차를 상품화하였다(19,20).

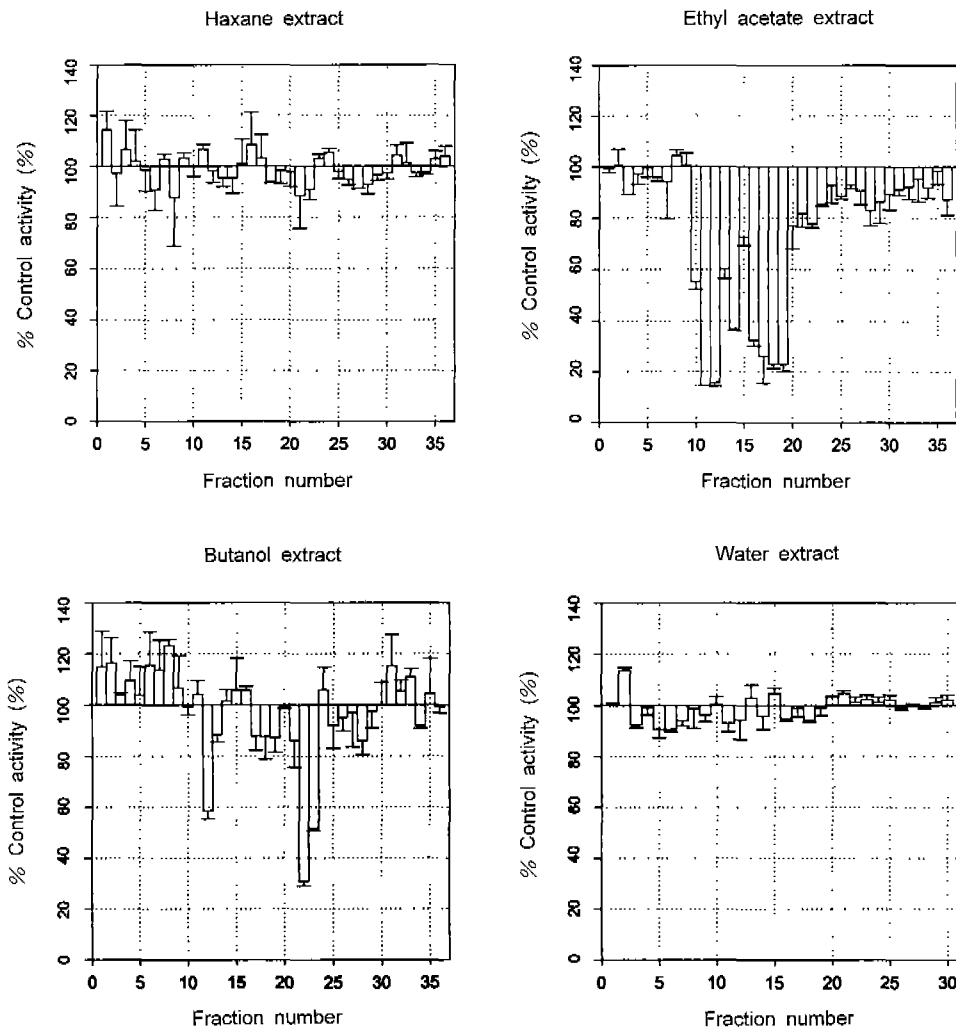


Fig. 1. Effect of fractions (20 µg/mL) from *Paenoiæ radix* on rat intestinal α-glucosidase.

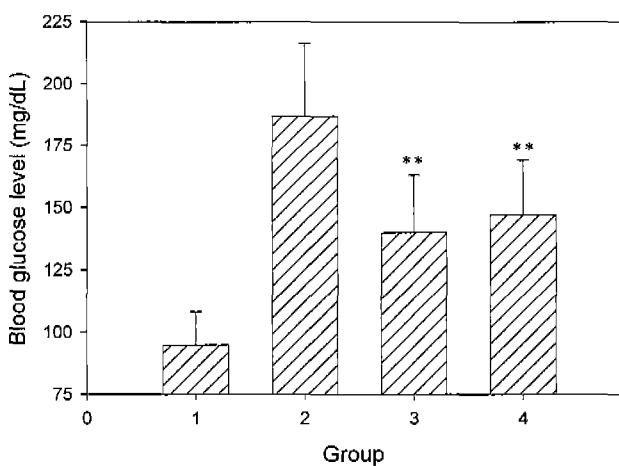


Fig. 2. Inhibitory effect of Glucobay 100 and ethyl acetate fractions of *Paenoiæ radix* on blood glucose elevation in mice loaded maltose (2 g/kg).

1: Negative control, 2: Positive control, 3: Glucobay 100 (80 mg/kg), 4: Effective ethyl acetate fractions (no. 10~no. 19) of *Paenoiæ radix* (400 mg/kg).

**Significant different at p<0.01 as compared with positive control.

따라서 본 연구의 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통하여 확인된 α-glucosidase 저해 활성을 갖는 작약 분획물들은 식후의 혈당상승 작용을 억제하는 새로운 nutraceutical 소재와 해당뇨 신약개발을 위한 탐색자원으로서 매우 가치있는 자원으로 기대되며 순수한 단일물질을 분리·정제하기 위하여 실험을 계속 진행중에 있다.

요 약

본 연구에서는 작약 추출물의 식후 과혈당 억제작용을 조사하였다. 작약 유기용매(hexane, ethyl acetate, butanol, water) 추출물들을 high performance liquid chromatography를 이용하여 분획한 분획물(fraction)들의 α-glucosidase(EC 3.2.1.20) 저해제를 탐색하였다. 작약 ethyl acetate 추출물의 11, 12, 18, 19번 분획물들은 20 µg/mL에서 각각 85%, 84%, 77%, 77%의 강력한 저해 활성을 나타내었으며, 작약 ethyl acetate 추출물의 10~19번 분획을 경구투여한 *in vivo* 당(maltose) 부하 실험에서도 양성대조군과 비교하여 유의

성 있게 22%의 혈당을 낮추었다. 따라서 본 연구의 *in vitro* 와 *in vivo* 실험을 통하여 확인된 α -glucosidase 저해 활성을 갖는 작약 분획물들은 식후의 혈당상승 작용을 억제하는 새로운 nutraceutical 소재와 항당뇨 신약개발을 위한 탐색자원으로서 매우 가치있는 자원으로 기대된다.

문 헌

1. Oates, J.A. and Wood, J.J. : Oral hypoglycemic agents. *New England Journal of Medicine*, **321**, 1231-1245 (1989)
2. Vessby, B., Aro, A., Skarfors, E., Berglund, L., Salminen, I. and Lithell, H. : The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol esters. *Diabetes*, **43**, 1353-1357 (1994)
3. Bischoff, H. : Pharmacology of α -glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, **24**, 3-10 (1994)
4. Mooradian, A.D. and Thurman, J.E. : Drug therapy of postprandial hyperglycemia. *Drugs*, **57**, 19-29 (1999)
5. Krause, H.P., Keup, U. and Plus, W. : Inhibition of disaccharide digestion in rat intestine by the α -glucosidase inhibitor acarbose (BAYg5421). *Digestion*, **23**, 232-238 (1982)
6. Breitmeier, D., Gunther, S. and Heymann, H. : Acarbose and 1-deoxynojirimycin inhibit maltose and maltooligosaccharide hydrolysis of human small intestinal glucoamylase-maltase in two different substrate-induced modes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **346**, 7-14 (1997)
7. Park, K.K., Park, H.S., Cho, Y.H., Yang, H.O., Ko, W.K., Ro, H.S. and Lee, Y.E. : Isolation of hyperlipidemic substances from methanol extract of *Paeoniae radix*. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*, **29**, 55-60 (1999)
8. Ro, H.S., Ko, W.K., Yang, H.O., Park, K.K., Cho, Y.H. and Park, H.S. : Effect of several solvent extracts from *Paeoniae radix* on experimental hyperlipidemia in rats. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*, **27**, 145-151 (1997)
9. Cho, Y.H., Park, K.K., Park, H.S., Ro, H.S. and Ko, W.K. : Antihyperlipidemic effects of *Bupleuri radix*, *Paeoniae radix* and *Uncariae ramulus et uncus* on experimental hyperlipidemia in rats. *The Journal of Applied Pharmacology*, **5**, 43-47 (1997)
10. Kang, S.S., Kim, J.S., Yun, H.S. and Han, B.H. : Phytochemical studies on *Paeoniae radix*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, **24**, 247-250 (1993)
11. Choi, H.J., Kim, N.J. and Kim, D.H. : Hypoglycemic effect of GE974 isolated from *Gyrophora esculenta* in normal and diabetic mice. *Korean Journal of Pharmacognosy*, **31**, 268-272 (2000)
12. Lee, H.S. and Kim, M.K. : Rat intestinal α -glucosidase and aldose reductase inhibitory activities of grain extracts. *Food Science and Biotechnology*, **10**, 172-177 (2001)
13. Kurihara, H., Mitani, T., Kawabata, J. and Takahashi, K. : Two new bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera*. *Journal of Natural Products*, **62**, 882-884 (1999)
14. Kim, J.S., Kwon, C.S. and Son, K.H. : Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **64**, 2458-2461 (2000)
15. Choi, H.J., Kim, N.J. and Kim, D.H. : Inhibitory effect of GE974 isolated from *Gyrophora esculenta* on α -glucosidase. *Korean Journal of Pharmacognosy*, **31**, 196-202 (2000)
16. Dahlqvist, A. : Assay of intestinal disaccharidases. *Enzymologia Biologica et Clinica*, **11**, 52-56 (1970)
17. Yoshikuni, Y. : Inhibition of intestinal α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia by moranoline and its N-alkyl derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**, 121-126 (1994)
18. Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. : N-containing sugar from the *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research*, **259**, 243-255 (1994)
19. Matsuda, H., Murakami, T., Yashiro, K., Yamahara, J., Yoshikawa, M. : Antidiabetic principles of natural medicines. IV. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from the roots of *Salacia oblonga* Wall. (Celastraceae) : structure of new friedelane-type triterpene, kotalagenin 16-acetate. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, **47**, 1725-1729 (1999)
20. Ghavami, A., Johnston, B.D., Jensen, M.T., Svensson, B. and Pinto, B.M. : Synthesis of nitrogen analogues of salacinol and their evaluation as glycosidase inhibitors. *Journal of American Chemical Society*, **123**, 6268-6271 (2001)

(2001년 8월 17일 접수; 2002년 1월 17일 채택)