

## 육의감비탕(肉薏減肥湯)의 항비만 효능 및 유효성분 규명

왕사한, 송효남\*, 최원익, 박종혁<sup>1</sup>, 정용준<sup>1</sup>, 강세찬<sup>1</sup>, 고성권, 방대혁<sup>2</sup>세명대학교 한방식품영양학부, <sup>1</sup>가천대학교 바이오나노대학, <sup>2</sup>(주)씨알푸드Identification of Anti-obesity Constituents from *Yukeuigambitang*Wang Shian, Hyo-Nam Song\*, Won-Ik Choi, Jong-Hyuk Park<sup>1</sup>, Youg-Joon Jeong<sup>1</sup>,  
Se Chan Kang<sup>1</sup>, Sung Kwon Ko and Dae-Hyuk Bhang<sup>2</sup>

Department of Oriental Medical Food and Nutrition, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

<sup>1</sup>College of Bionano Technology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea<sup>2</sup>Ssial Food Inc., Jecheon 390-250, Korea

**Abstract** - To develop antiobese food materials from medicinal plants, isolation of antiobese active compounds in *Yukeuigambitang* of which activity was already proved in the previous study by animal experiments was performed. Antiobese effect of stepwise solvent fractions from 70% ethanol extract of *Yukeuigambitang* was determined by the differentiation inhibition activity on 3T3-L1 preadipocytes. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction had significant antiobese activity, and n-Hexane and EtOAc fractions were the next. Three phenolic compounds from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction were identified by GC/MS analysis and one compound was finally isolated by HPLC. It was revealed as a new compound presumed to be one of the derivatives produced from the medicinal plants mixture in *Yukeuigambitang*.

**Key words** - Antiobese activity, *Yukeuigambitang*, 3T3-L1 preadipocytes, Phenolic compounds

## 서 언

비만이란 신체에 지방조직이 과잉 축적된 상태로, 남은 열량이 지방으로 전환되어 인체 내 피하조직이나 복부 장관막에 축적되는 현상으로서, 체중이 정상인의 표준체중 보다 25% 이상 초과되거나 신체질량지수(body mass index, BMI)가 27 이상일 때를 말한다(Stenaland and Margoils, 1982).

체중에 비하여 과도한 지방조직이 축적된 비만은 유전적, 영양적, 환경적 및 사회적 요인 등 다양한 원인들이 관여하는 복잡한 증후군으로서(Chua and Leibel, 1997), 최근 서구적인 식생활 패턴과 생활의 편리화로 인하여 즉석 식품의 섭취 증가 및 운동 부족을 야기하여 비만인구가 증가하고 있다(Hill *et al.*, 2007). 그러나 지속적인 운동 또한 어려운 다수의 현대인들은 결과적으로 비만 억제효과를 갖는 약물과 보조식품의 섭취에 의존하고 있어 관련 시장

규모 또한 해마다 증가하고 있는 추세이다.

최근 들어 더욱 난무하는 비만 억제용 식·의약품 등의 장기 복용은 여러 가지 부작용을 초래할 수 있어 안전한 천연물 유래의 항비만 식품소재 개발이 더욱 절실하게 요구되고 있으며 최근에는 생약자원으로부터 항비만에 유용한 식품소재를 탐색하는 연구도 활발하게 이루어지고 있다.

항비만 소재를 탐색하기 위한 *in vitro* 연구에서는 약 30여년 전 Green 박사가 소개한 3T3-L1 세포를 많이 사용하며(Green and Kehinde, 1974), 이 세포는 분화배지를 첨가하면 지방세포로 분화하는 성질을 지닌 전지방세포(preadipocyte)로부터 지방세포(adipocyte)로의 분화를 억제하고 지방생성을 저해하는 소재의 효능 및 기전을 연구하는데 유용하다(Kim *et al.*, 2011).

항비만의 효과를 지닌 대표적인 한약재로는 마황, 산사육, 대황 등이 있으며, 다양한 연구자들에 의하여 항비만 약재들은, 거담화탁(祛痰化濁) 및 이습강지류(利濕降脂類)로서 생대황, 호장근, 창출, 택사, 인진호, 초결명, 반하,

\*교신저자(E-mail) : hnsong@semyung.ac.kr

번사엽, 원충, 대산, 잠용, 괴미, 금은화, 강황, 모근, 하엽, 의이인 등이 해당되고, 활혈거어(活血祛瘀) 및 비만거지류(抗肥滿祛脂類)에는 충울자, 단삼, 적작약, 익모초, 삼칠근, 생산사육, 향부자, 삼릉, 아출, 계혈등, 우슬, 당귀, 작약 등이 효과적이며, 자음양혈(滋陰養血) 및 항비만강지류(抗肥滿降脂類)는 한련초, 여정자, 하수오, 생지황, 국화, 상기생, 영지 등이 해당되는 것으로 보고된 바 있다 (Song *et al.*, 2011).

대황편, 마우편, 구기자, 의이인, 하엽 등은 단미제 항비만 한약으로 많이 보고 되고 있으며(Kim *et al.*, 2006), 또한 동일한 연구자에 의하여 효과적인 항비만 효과를 가진 소재 개발을 위하여 155종의 생약 추출물을 대상으로 pancreatic lipase에 대한 억제 효과를 탐색한 결과, 정향, 대복피, 백자인, 계피, 강황, 향유, 감초, 오배자 및 복분자의 에탄올 추출물이 유의성 있는 억제효과를 나타냄이 보고된 바 있으며, 특히 대복피와 계피가 대표적인 항비만 약 치료제인 orlistat의 pancreatic lipase 억제 효과 대비 80% 와 89% 를 나타낼 정도로 유사한 억제 효과를 나타내었다고 보고하였다.

한편, 식품공전에는 식품의 원료로 사용가능 또는 사용불가능한 한약재의 종류가 수재되어 있는바, 비교적 항비만 효과가 뛰어난 한약재 대부분은 식품의 원료로 사용될 수 없는 것으로 분류되어 있어 허용 가능한 범위내의 한약재로서 항비만 식품소재로 선별하고 처방을 구성하는 것은 매우 어려운 실정이다.

선행연구에서는 항비만 효과를 지닌 식사대용 식품을 개발하기 위한 소재탐색의 전단계로서 식품으로 사용가능한 생약으로 구성된 항비만 처방을 개발하였으며 전임상시험을 통해 그 효능을 검증하였다. 즉, 기존에 보고된 연구에서 항비만 효과가 있는 한약재들을 다수 검토한 후 그중 건비위, 활혈화어를 위주로 하면서 청열이습, 소간이담을 겸하는 한의학에서의 비만치료 원칙에 따라 한의학 전문가의 자문에 따라 새로운 처방 3종을 개발하였다. 이들 처방을 투여한 동물실험에서 육의감비탕만이 유의적인 항비만 효과를 나타냄바 있다(Song *et al.*, 2011).

이에 본 연구에서는 개발된 항비만 처방생약으로부터 비만세포에서 지방세포 분화억제에 대한 유효성분을 규명하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용한 처방은 육계(베트남산, 2009), 의이인(충북 청원산, 2010), 복령(경북 영천산, 2009), 홍화(중국산, 2009), 감초(충북 제천산, 2009),의五味로 구성되어 육의감비탕(肉薏減肥湯)이라 명명하였으며, 해당약재는 (주)에이치엠에이엑스(충북, 제천)에서 시판품을 구입하여 사용하였으며, 세명대학교 한방식품영양학부 표본실에 보관하였다.

### 시약 및 기기

항비만 활성시험에 사용한 3T3-L1 전지방세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였고, 10% calf serum(Invitrogen, USA), 1% penicillin/streptomycin(Sigma, USA) 및 Dulbecco's modified eagle's medium (Gibco, USA)은 시판품을 구입하여 사용하였다.

추출, 분획, MPLC, TLC 및 column chromatography 용 용매는 1급 시약을 사용하였으며, HPLC에는 HPLC급 용매와 3차 증류수를 사용하였다. 역상 column과 gel-filtration column chromatography용으로는 각각 LiChroprep RP-18(40-63  $\mu\text{m}$ )과 Sephadex LH-20(bead size 25-100  $\mu\text{m}$ , Sigma)를 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F254 (layer thickness 0.25 mm, Merck)와 RP-18 F254 S(layer thickness 0.25 mm, Merck)를 사용하여, 발색 시약은 10%- $\text{H}_2\text{SO}_4$  시약과 anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  시약으로 전개된 물질의 발색에 이용하였다.

분취에 사용된 MPLC은 Teledyne ISCO 사에 combiflash<sup>®</sup> Rf와 UV detector(254 nm)를 사용하였으며 column은 동사에 redisep normal-phase flash column(40 g)을 이용하여 분취하였다.

정제에 사용된 HPLC system은 Thermo series로 auto-sampler(Spectra system AS3000), pump(Spectra system P4000), degasser(Spectra system SCM1000), UV detector (Spectra system UV2000)를 사용하였으며, HPLC column은 YMC사의 ODS(ID : 250  $\times$  10 nm, 5  $\mu\text{m}$ ) column을 사용하였다. 화합물 동정에 사용 되어진GC-mass는 Agilent 사에 7890A GC & 5975C MSD와 HP-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) column으로 분석한 후 화합물사전을 이용하여 동정하였다.

### 추출 및 분획

시료 육계 60 g, 의이인 60 g, 백복령 30 g, 감초 20 g, 홍화 20 g을 70% ethanol로 가열 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 2 로 여과 후 회전감압농축기(Eyela, N-1000, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 800 mL의 증류수에 현탁시키고 계통학적 분획방법에 따라 동량의 *n*-Hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH로 각각 3회씩 추출하여 분획한 후 감압농축하였다(Scheme 1).

### Compound의 분리

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획을 MPLC(UV 254 nm)와 redisepp normal-phase flash column(40 g)에 주입한 후에 전개용매 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH를 50 : 1부터 1 : 1까지 순차적으로 전개하여 각각 C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10의 10개 분획으로 구분하였으며, 이 중 C6 분획물을 open column chromatography에 normal-phase silica gel을 packing한 후에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH ( 50 : 1 )을 전개용매로 전개하여 각각 C6A, C6B, C6C, C6D, C6E, C6F의 6개의 분획으로 구분하여 나누었다. C6E 분획물은 open column chromatography에 sephadex LH-20 resin을 packing한 후에 70% MeOH로 전개한 후에 C6E1~5의 5개의 소분획으로 나누었다. 소분획 C6E4를 GC-MS와 HP-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)으로 분석 후 화합물사전을 검색한 결과 3개의 화합물이 단리된 것을 확인하였으며, HPLC system(UV 254 nm)과 semi-prep column(ODS, 250 × 10 mm, 5 μm)에 50% MeOH용매를 전개하여 1종에 화합물을 분리, 정제하였다(Scheme 2).

### 3T3-L1 지방세포 분화억제 시험 및 측정

3T3-L1 전지방세포주는 10% calf serum, 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 3T3-L1 세포주를 96 well plate(Nunc, USA)에 1 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 부유시켰고, 세포가 100% confluent 상태가 되면 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(Sigma, USA), 1 μM dexamethasone(Sigma, USA), 10 μg/mL insulin(Sigma, USA)이 함유된 10% FBS-DMEM(MDI배지)으로 배양하였다(0 day). 각각의 시료들의 지방세포분화억제 효과를 확인하기 위해 MDI배지와 함께 시료를 농도별로 처리하였으며, 48시간

후 10 μg/mL insulin이 함유된 10% FBS-DMEM배지로 교체해주었다. 분화 4일째에 10% FBS만 함유된 DMEM으로 배지를 교체하였고, 분화유도 시작일로부터 총 8일 동안 실험을 진행하였다. 분화된 3T3-L1 세포는 현미경으로 세포 내의 지방과립이 형성된 것을 관찰한 후 3% formaldehyde(Sigma, USA)를 처리하여 5시간 동안 실온에서 고정시켰다. 고정시킨 세포는 PBS로 두 번 세척한 다음 지방에 특이적으로 반응하는 AdipoRed<sup>TM</sup> Assay Reagent(Lonza, USA)를 처리하고, 10분 후 fluorometer(Bio-Tek, USA, excitation 485 nm; emission 535 nm)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 지방세포 분화억제 효능

3T3-L1 전지방세포는 *in vitro*에서 adipogenesis를 포함한 다양한 지방대사와 관련된 연구의 모델로 널리 사용되고 있다(Green and Meuth, 1974). 전지방세포에서 지방세포로의 분화는 분화를 유도하거나 억제하는 다양한 인자들의 조절에 의해서 이루어지며, 이를 응용하여 유효물질의 효능을 측정할 수 있다.

이에 본 시험에서는 육의감비탕의 지방세포 분화억제 효능을 확인하기 위해 분획물을 농도별로 처리하였고, 분화 8일 후에 AdipoRed<sup>TM</sup> Assay Reagent로 측정하여 이의 효능을 EC<sub>50</sub>값으로 나타내었다(Table 1). 그 결과 육의감비탕의 분획물 중 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물에서 가장 우수한 효능이 관찰되었고(EC<sub>50</sub>=69.9 μg/mL), *n*-Hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서도 약한 지방세포 분화억제 효능이 관찰되었다(각각, 232.1 μg/mL, 421.4 μg/mL). 또한 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물을 MPLC를 이용하여 10개의 분획으로 분획하였으며, 10개의 분획을 다시 3T3-L1 cell culture 시험을 시행하

Table 1. Inhibition of adipocyte differentiation of solvent fractions from *Yukeuigambitang*

(unit: μg/mL)	
Solvent fraction	EC <sub>50</sub>
<i>n</i> -Hexane	232.1 ± 2.71
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	69.9 ± 2.11
EtOAc	421.4 ± 13.85
<i>n</i> -Butanol	> 500
H <sub>2</sub> O	> 500

Table 2. Inhibition of adipocyte differentiation of ten fractions from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Solvent fraction	EC <sub>50</sub> (unit: μg/mL)
C1	>100
C2	>100
C3	>100
C4	>100
C5	68.4±11.5
C6	103±5.3
C7	101±3.3
C8	>100
C9	>100
C10	>100

여 이중 C5 분획에서 가장 효과가 컸으며 C6과 C7 분획에서도 항비만 효과가 비교적 우수한 것으로 나타났다(Table 2).

꾸지뽕잎 에탄올 추출물의 경우 50%의 지방축적을 나타내는 농도는 5 mg/mL(Do *et al.*, 2011)였고, 포도씨 탈지박 추출물은 200 μg/mL의 농도에서 11%의 지방축적을 보여준 것(Cho *et al.*, 2010)으로 보고된 것과 비교하면 육의 감비탕 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물의 지방세포 분화억제능은 매우 우수한 것으로 사료된다.

### Compound의 확인

소분획 C6E4은 UV 254 nm와 TLC 발색시약 발색시에 단일화합물로 보여졌으나, gas chromatography - mass 분석을 통한 연구에서 기존의 화합물사전 검색결과 4,4'-Dimethoxy-3'-methoxycarbonylmethoxy-6,6'-dimet

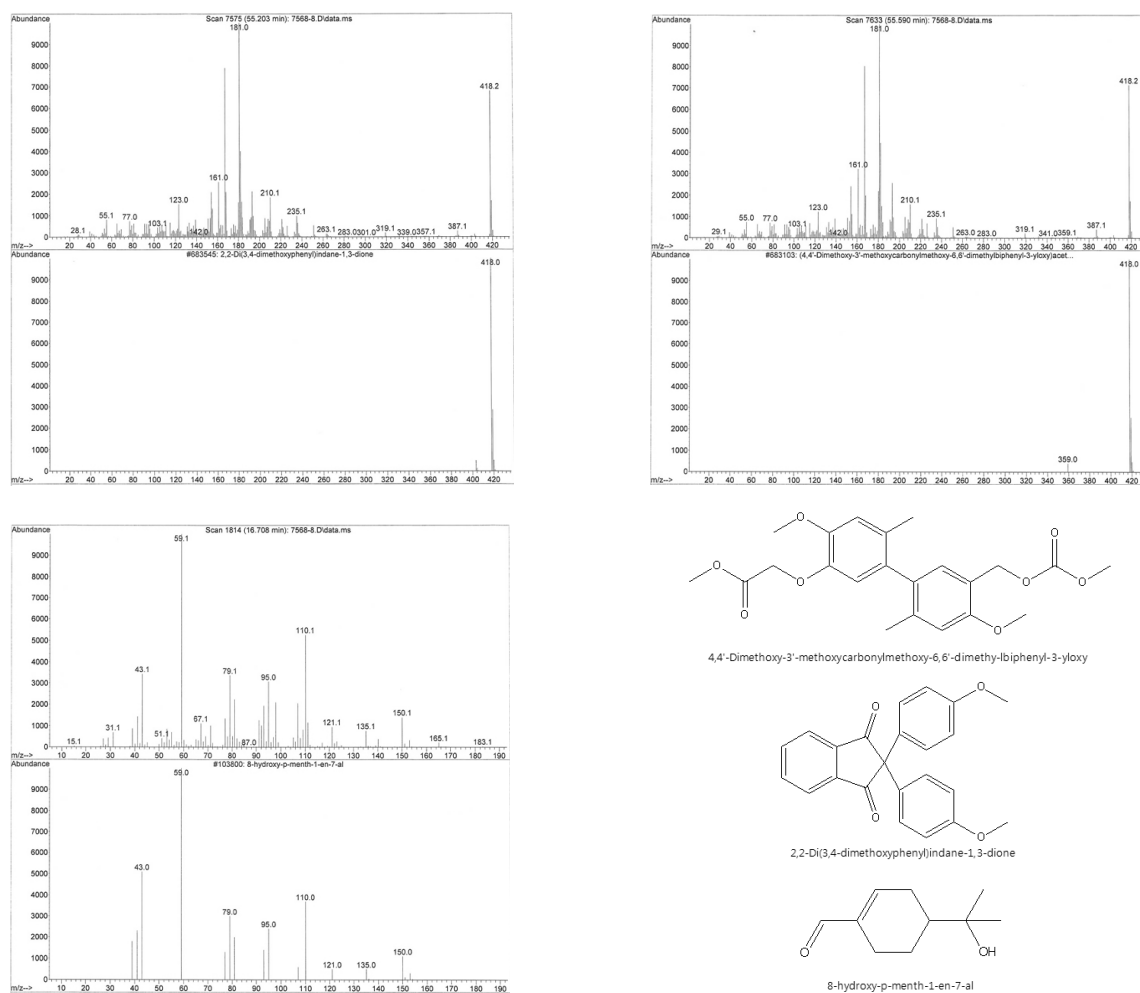


Fig. 1. GC/MS profile and identified 3-compound structure of *Yukeuigambitang*.

## 적 요

hy-lbiphenyl-3-yloxy (Compound A), 2,2-Di(3,4-dimethoxyphenyl)indane-1,3-dione (Compound B), 8-hydroxy-p-menth-1-en-7-al (Compound C) 3종의 화합물이 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이중 함량이 높은 Compound A는 HPLC를 이용하여 단일 화합물로 분리 정제하였다(Fig. 2).

본 연구에서 사용한 육의감비탕에 사용되어지는 생약 중 육계의 지표성분은 주로cinnamic acid를 이용하고 있으며 함량 및 효능면에서는 cinnamic aldehyde가 주된 유효성분으로 알려져 있다(Kim, 1993). 홍화로부터 분리된 성분은 flavonoid류와 quinochalcone계의 색소성분(Chung *et al.*, 2008), polyacetylenic glycoside류이며(Choi *et al.*, 2011), 백복령의 자실체에서는 triterpenoid 성분이 다수 보고되어 있고(Moon and Min, 1987), 감초에서는 glycyrrhizin, liquiritin 등(Lee *et al.*, 2010),이 주성분으로 밝혀져 있다.

이처럼 육의감비탕은 5종의 생약으로 배합 되어져 있으며, 각각의 생약이 포함하는 생리활성성분 또한 매우 다양하여 생약을 열을 이용하여 추출하는 과정에서 본 생약에 포함되어져 있지는 않지만 새롭게 생성되는 화합물 또한 다양하게 존재 할 수 있을 것으로 판단되어지며 각각의 단일 화합물에 대한 식물학적성분 및 생리활성에 관한 부분도 활발하게 연구 될 것으로 사료 된다. 따라서 향후 육의감비탕의 다양한 항비만 성분들에 대한 개별적인 구조와 활성관계 및 항비만 기전에 관한 심도있는 연구가 이루어진다면 안전한 기능성 식품소재로 활용가능할 것으로 기대 된다.

식품의 원료로 사용가능한 안전한 생약자원 유래의 항비만 소재 개발을 위하여 추출물 단계에서 3T3-L1 전지방세포의 지방세포로의 분화 억제 활성 효과를 나타낸 육의감비탕의 생리활성 성분을 규명하고자 하였다. 70% EtOH로 가열추출 후 계통학적인 용매분획법에 의해 분획한 분획물을 대상으로 3T3-L1 세포의 지방분해 억제시험을 실시한 결과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물에서 가장 우수한 활성이 나타났으며, *n*-Hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서도 약한 지방세포 분화억제 효능이 관찰되었다. 이중 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물로부터 각종 chromatography 기법을 통하여 분석한 결과 3종의 phenol류 화합물을 GC-mass 화합물사전 검색을 통해 동정 할 수 있었으며 이 중 1종의 화합물을 HPLC를 이용하여 분리하였다.

단리된 화합물은 육의감비탕을 열추출하는 과정에서 구성하고 있는 생약 중 육계로부터 유래된 유도체인 것으로 추측되며 따라서, 육의감비탕에 포함되어 있는 육계로부터 육의감비탕 조제시 생성되는 물질로 판단된다. 육의감비탕은 선행연구에서 처음으로 개발된 처방으로 본 연구를 통해 단리된 화합물외에도 항비만 효과를 지닌 유사한 화합물들이 존재할 것으로 사료되어 향후 기능성식품의 소재로서 안전하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구는 중소기업청의 2009년 기술혁신개발산업 투자연계사업의 S1066573 과제에 의해 수행된 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

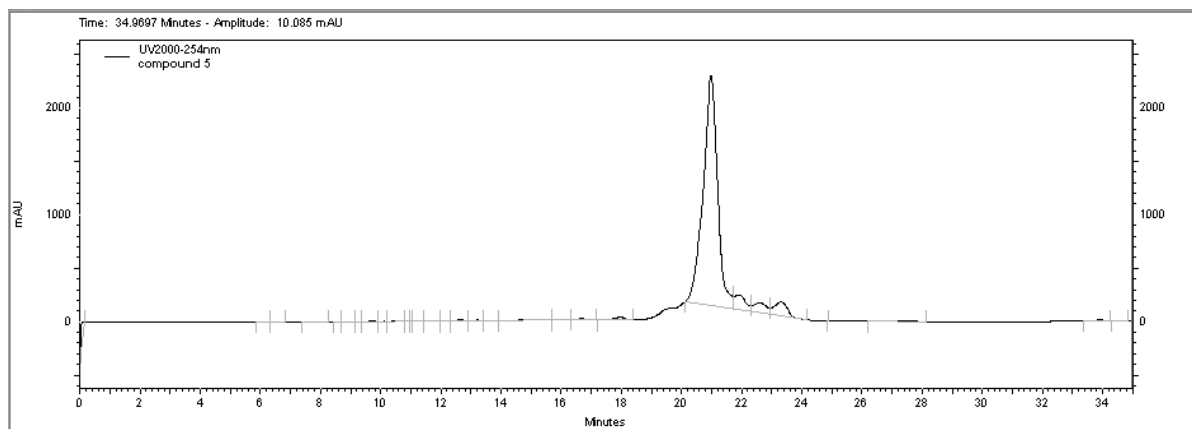


Fig. 2. HPLC spectrum(UV 254nm) of compound A from *Yukeuigambitang*.

## 인용문헌

- Cho, Y., Lee, S.M., Kim, Y., Jeon, G., Sung, J., H.S. Jeong and J. Lee. 2010. Defatted grape seed extracts suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39:927-931.
- Choi, H.G., Jiang, Yanfu., Park, S.H., Son, A.R., M.K. Na and S.H. Lee. 2011. Constituents of flowers of *Carthamus tinctorius* L. and their antioxidant activity. Korean J. Pharmacogn. 42: 110-116.
- Chua, S and R.L. Leibel. 1997. Obesity genes : molecular and metabolic mechanism. Diabetes Rev. 5:2-7.
- Chung, S.H., Moon, Y.J., Kim, S.G., Kim, K.Y., Lee, K.T., H.K. Kim and W.K. Whang. 2008. Isolation of flavonoids from *Carthami flos* and their antioxidative activity. Yakhak Hoeji. 52:241-251.
- Do, G.P., Lee, H.J., J.R. Do and H.K. Kim. 2011. Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes with water and ethanol extracts of *Cudrania tricuspidata* leaves. Korean J. Food Preserv. 18:244-249.
- Green, H and O. Kehinde. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. Cell. 1:113-116.
- Green, H and M. Meuth. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell 3:127-133.
- Hill, J.O., J.C. Peters and H.R. Wyatt. 2007. The role of public policy in treating the epidemic of global obesity. Clin Pharmacol Ther. 81:772-775.
- Kim, D.J., Jung, J.H., Kim, S.G., H.K. Lee and S.K. Lee. 2011. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). Korean J. Food Preserv. 18:366-373.
- Kim, N.M., J.W. Yang and W.J. Kim. 1993. Effect of ethanol concentration on index components and physicochemical characteristics of cinnamon extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 25:282-287.
- Kim, Y.J., Kim, B.H., Lee, S.Y., Kim, M.S., Park, C.S., Lee, M.S., K.H. Lee and D.S. Kim. 2006. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49: 221-226.
- Lee, J.R., Jo, M.J., Park, S.M., S.C. Kim and S.J. Park. 2010. Establishment of UPLC method for analysis of liquiritigenin and studies on the processing of licorice for enhancement of liquiritigenin content. Korean J. Oriental Medical Prescription. 18:145-154.
- Moon, S.K and T.J. Min. 1987. Study on the isolation and structure determination of the triterpenoids from Korean white *Poria cocos*(Schw.) wolf. Korean Biochem. J. 20:178-184.
- Stenaland, S.H and S. Margoils. 1982. Simplifying the calculation of body mass index for quick reference. J. American Diet Assoc. 90:856.
- Song, H.N., H.H. Lee and J.B. Kim. 2011. Antiobese effects of *Yukeuigambitang* on the high fat diet induced obese mice. Korean J. Oriental Physiol. Pathol. 25: 1026-1031.

(접수일 2012.1.4; 수정일 2012.4.2; 채택일 2012.4.23)