

Research Article

Open Access

여주씨에서 분리한 Vicine과 α -Eleostearic Acid의 α -glucosidase 저해효과

육흥주¹, 노건민¹, 최정숙¹, 권오경², 홍수영², 강상수³, 조계만⁴, 박동식^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부, ²콜마비엔에이치(주), ³경상대학교 의학전문대학원 해부학교실,
⁴경남과학기술대학교 식품과학부

α -Glucosidase Inhibitory Effect of Vicine and α -Eleostearic Acid from the Seeds of *Momordica charantia*

Heung Joo Yuk¹, Geon Min Noh¹, Jeong Sook Choe¹, Oh Kyung Kwon², Su Young Hong², Sang Soo Kang³, Kye Man Cho⁴ and Dong Sik Park^{1*} (¹Department of Agro-food Resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju-Gun, 565-851, Korea, ²Advanced Food Materials Research Institute, Kolmar BNH Inc. Sejong, 339-706, Korea, ³Department of Anatomy, School of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-751, Korea, ⁴Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju, 660-758, Korea)

Received: 13 February 2015 / Revised: 2 March 2015 / Accepted: 18 March 2015

Copyright © 2015 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

BACKGROUND: *Momordica charantia* (MC) have been used in various parts of the world to treat diabetes. Despite the highest effects of phytochemicals than any other part of the plant, the main components of seed of MC grown in Korea and their properties have not been studied extensively.

METHODS AND RESULTS: The seeds of MC were extracted into five different polarity solvents: 30%, 50%, 70%, 95% ethanol and distilled water. The 95% ethanol extract showed the most potent inhibition (IC_{50} =88.7 μ g/mL) against α -glucosidase. To investigate the compounds responsible for this effect, activity guided fractionation of MC seeds by chromatography yielded two phytochemicals

which were confirmed as vicine (1) and α -eleostearic acid (2) based on their NMR and ESI-MS spectroscopic data. Among them, α -eleostearic acid (2) possessed potent α -glucosidase inhibitory activities with IC_{50} values from 32.4 μ g/mL.

CONCLUSION: Collectively, the results from this present study strongly suggest that both extract and α -eleostearic acid (2) have potent α -glucosidase inhibitory activity. Furthermore, α -eleostearic acid (2) as the most active α -glucosidase inhibitor was proven to be present in high quantities in the MC seeds by a HPLC chromatogram.

Key words: Bitter melon, α -Eleostearic acid, α -Glucosidase, *Momordica charantia*, Vicine

서론

여주(*Momordica charantia* L.)는 Bitter Melon 또는 Bitter gourd로 알려진 덩굴성 한해살이 박과식물로, 예로부

*Corresponding author: Dong Sik Park
Phone: +82-63-238-3671; Fax: +82-63-238-3844;
E-mail: dpark@korea.kr

터 일반적인 과실이 아니라 귀중한 약재로도 활용되어 왔다 (Giron *et al.*, 1991; Zong *et al.*, 1995; Viridi *et al.*, 2003). 우리나라에서는 미숙 과실의 쓴맛 때문에 쓴오이라고도 하며 덩굴성 작물로 심어 주로 관상용으로 이용해 왔으나, 기능성 성분이 높은 박과채소로의 관심이 높아지면서 함양, 정읍, 철원, 제주도 등 전국 각지에서 여주를 재배 가공 판매하여 부가가치를 높이는 농가가 많아지고 있다.

여주에서 다양한 생리활성을 나타내는 성분들이 보고되고 있는데, 구성성분으로는 essential oil, flavonoid, phenolic acid, triterpene 및 alkaloid 등이 알려져 있다(Liu *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012; Kenny *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013). 특히 여주의 과실에 함유되어 있는 triterpene glycoside인 charantin이라는 성분은 췌장의 β 세포에 작용하여 인슐린의 분비를 촉진함으로써 혈당을 낮춰 주는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Parkash *et al.*, 2002; Rathi *et al.*, 2002; Schmourlo *et al.*, 2005). 또한 alkaloid계 vicine이라는 성분과 polypeptide-p라는 식물 인슐린(vegetable insulin) 역시 혈당강하에 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있지만(Khanna *et al.*, 1981) 여주 과실 이외의 다른부위 특히, 씨(종자)의 주요 생리활성물질 및 혈당개선의 효과에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

최근 경제성장과 생활수준의 향상으로 한국인의 식생활이 서구화로 변모됨에 따라 비만인구의 증가로 인한 당뇨병자가 급격히 증가하면서 사회적 문제로 대두되고 있다. α -glucosidase는 소장에 존재하는 당분해효소로서 그 저해제는 탄수화물의 포도당으로의 소화를 지연시킴으로써, 결국 식후의 혈당치를 감소시키는 역할을 한다(Maki *et al.*, 2007). 현재까지 약용작물로부터 α -glucosidase 저해제의 분리 및 구조동정에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Hu *et al.*, 2013), 저해제로는 deoxynojirimycin (DNJ)가 α -glucosidase 저해활성을 나타내고 있고, 그 외에도 acarbose 및 voglibose 등의 합성저해제도 시판되고 있다(Creutzfeldt, 1999; Asano, 2003). 하지만 장기적으로 복용할 경우 복부 팽만감, 구토 등 부작용이 나타날 수 있으므로 약용식물로부터 α -glucosidase의 활성을 억제시킬 수 있는 기능성 소재를 검증하는 것은 매우 중요하다.

따라서 본 연구는 국내에서 재배된 여주에 들어있는 여주 씨 추출물의 α -glucosidase 저해효과를 측정하고 함유된 기능성물질과의 상관관계를 알아보고자 하였다. 또한 효소저해제의 함량을 HPLC를 통한 정량분석을 수행함으로써 여주씨에 함유된 기능성성분의 혈당개선 식의약 소재로의 응용가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

실험에 사용한 α -glucosidase (EC 3.2.1.20, from Baker's Yeast)와 기질(*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 실험에 이용한 모

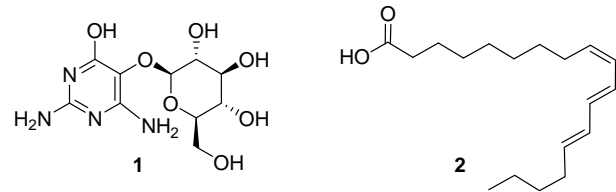


Fig. 1. Chemical structures of vicine (1) and α -eleostearic acid (2) from the seeds of *Momordica charantia*.

든 시약은 특급시약을 사용하였다. 물질 분리를 위해 Column chromatography (CC)용 silica gel 및 octadecyl silica gel (ODS)은 Merck (Darmstadt, Germany)을, Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 사용하였고, 분석을 위해 nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum은 Bruker AM500 instrument (Billerica, MA, USA)으로 측정하였고, electronic ionization mass spectrometer (EI/MS) spectrum은 JEOL JMS 505-WA (JEOL, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 정성 및 정량분석을 위해 2998 photodiode array detector (PDA)가 장착된 Alliance e2695 HPLC system (Waters Co., Milford, MA, USA) 및 Micromass ZQ MS (Waters Co., Milford, MA, USA)를 사용하였다.

추출 및 분리

본 실험에 사용한 여주씨는 함양영농조합법인에서 2014년 9월에 제공받은 여주과실을 수세하여 과육과 완숙된 씨를 분리한 다음 여주씨를 동결건조 한 후 최종 분쇄하여 사용하였다. 본 추출에 앞서 증류수, 30%, 50%, 70% 에탄올 및 95% 에탄올 등으로 추출을 실시하여 α -glucosidase 저해활성을 비교한 결과 가장 높은 억제효과를 가진 95% 에탄올 추출물을 생리활성물질의 분리를 위한 추출 용매로 결정하였다. 분리를 위해 여주씨 분말 200 g을 95% 에탄올에 1일간 침적시키고 추출된 여액을 감압, 농축하여 건조된 추출물 10 g을 얻었다. 얻어진 95% 에탄올 추출물을 헥산(2 L \times 2)/물(1 L)로 분배 추출 후 물층에 대하여 역상 크로마토그래피 및 재결정법을 이용하여 고순도의 vicine (1)을 분리 하였으며, 상기의 방법으로 분리된 화합물은 HPLC-ESI/MS, ^1H and ^{13}C NMR 등의 기기분석을 통한 정성분석으로 화학적 구조를 밝혔다. 이 후 헥산층에 대하여 silica gel CC를 실시하여(헥산-에틸아세테이트=20:1 \rightarrow 1:1) 7개의 분획물(A-G)을 얻었다. 그 중 TLC에 전개시켜 UV흡수가 약하게 있고, 10% 황산을 분무, 건조 한 후 발색한 결과 갈색으로 발색된 분획물 C에 대해 sephadex LH-20의 CC를 통한 선택적인 정제 과정을 거쳐 지표수준의 고순도 eleostearic acid (2)를 분리하여 HPLC-ESI/MS 및 GC-EI/MS를 통해 표준물질과 비교하여 정성분석 하였다(Fig. 1).

Vicine (1): White powder; ESI-MS m/z 305 [M+H] $^+$; ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 6.35 (3-NH $_2$), 6.00

(5-NH₂), 5.03 (H-1'), 3.63 (H-2', 5'), 3.16 (H-6'), 3.06 (H-3', 4'); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 159.65 (C-1), 158.87 (C-5), 152.45 (C-3), 113.93 (C-6), 108.43 (C-1'), 77.94 (C-5'), 76.50 (C-2'), 73.49 (C-3'), 70.17 (C-4'), 61.60 (C-6').

α -Eleostearic acid (2): Colorless oil; ESI-MS m/z 279 [M+H]⁺; HR-EIMS m/z 278.2250 (calc. 278.2246, err 1.5 ppm); ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 6.40 (H-11, $f=13.5$ Hz), 6.17 (H-12, $f=13.5$ Hz), 6.10 (H-13, $f=14.2$ Hz), 5.99 (H-10, $f=10.9$ Hz), 5.71 (H-14, $f=14.1$ Hz), 5.39 (H-9, $f=10.9$ Hz), 2.29 (H-2, $f=7.4$ Hz), 2.19 (H-8, $f=6.8$ Hz), 2.12 (H-15, $f=6.8$ Hz), 1.61 (H-3), 1.35 (H-4, 5, 6, 7, 16, 17), 0.93 (H-18, $f=6.9$ Hz); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ 179.35 (C-1), 134.39 (C-14), 132.73 (C-11), 130.97 (C-9), 130.66 (C-13), 128.68 (C-10), 125.70 (C-12), 33.58 (C-2), 32.15 (C-15), 31.35 (C-16), 29.35-28.72 (C-4, 5, 6, 7), 27.25 (C-8), 24.70 (C-3), 21.90 (C-17), 12.87 (C-18).

HPLC-ESI/MS에 의한 정량/정성분석

분석시료 조제를 위한 추출은 건조분말시료 1 g을 cornical tube에 칭량하여 30 mL의 에탄올(30%, 50% 70%, 95%) 및 증류수를 추출용매로 하여 50°C에서 1시간동안 초음파추출(sonication) 하였다. 추출된 각 시료를 원심분리(3000 rpm, 15 min)를 한 후 상층액을 취하여 0.2 μ m PTFE syringe filter로 여과하여 이를 HPLC-MS 분석시료로 사용하였다. 분석 컬럼은 Phenomenex hydro-RP C18, 80A (250 \times 4.60 mm, 4 micron, Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였고 시료 주입량은 10 μ L, 검출파장은 270 nm에서 측정하였다. 이동상으로는 A용매(0.5% formic acid in water)와 B용매(0.5% formic acid in acetonitrile)를 사용하였고, 유속은 0.8 mL/min로 하였다. 이동상의 농도구배조건은 B 용매를 10분까지 4%로 일정하게 유지하였고, 32분까지 90%로 일정하게 증가시킨 후 37분까지 컬럼 세척(B, 100%)과 40분까지 B용매 0%로 급격하게 감소시켰다. 정량분석을 위한 표준용액의 제조는 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/mL로 각각 조제하여 검량선을 작성한 후 계산된 함량으로 나타내었다. 여주씨의 생리활성물질의 정성분석을 위한 MS의 분석조건은 cone voltage 30 V, source temperature 120°C, desolvation temperature 350°C, 고순도 N₂ 가스 L/h이었으며, 분자량 측정범위는 m/z 100-1000으로 설정하였다.

α -Glucosidase 저해활성 측정

α -glucosidase 저해활성은 합성기질인 1 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*NPG)를 phosphate buffer (pH 6.8)에 첨가한 후 시료를 넣고 그 혼합액에 효소액 첨가 후 37°C에서 15분간 반응시키고 0.1 M NaOH를 첨가하여 반응을 종결시켜 기질인 *p*NPG로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 *p*-nitrophenol을 405 nm에서 측정하여 α -glucosidase

활성의 억제 정도를 측정하였다(Yuk *et al.*, 2011). 샘플 무첨가구는 negative control로 사용하였으며, 기질 무첨가구는 blank로 사용하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100,$$

Abs_{sample}, blank, and control: Absorbance of the sample, blank, and control

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, USA)를 이용하여 모든 값은 mean \pm SD 값으로 나타내었고, 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

생리활성물질의 분리 및 동정

여주씨 분말 500 g을 에탄올로 침지하여 얻어진 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 클로로포름(chloroform)과 물층으로 분획하고 각각 농축하여 2개의 분획물을 얻었다. 각각의 분획물에 대해 순상, 역상 및 sephadex LH-20 CC를 반복 실시하여 2종의 화합물을 분리하였다.

화합물 1은 백색의 분말형태로서 ESI/MS에서 m/z 305 [M+H]⁺의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 304로 결정하였다. 특히 쪼개짐 이온(fragment ion)인 m/z 143을 갖고 있어 6탄당 한분자가 결합된 배당체 화합물임을 추측하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 10개의 carbon이 관측되었고, 화학적 이동의 δ 159.65 (C-1)에서 1개의 hydroxylated aromatic carbon 시그널이, δ 158.87 (C-5), δ 152.45 (C-3)에서 2개의 아미노기가 치환된 carbon 시그널이 관찰되었다. δ 108.43 (C-1')에서 1개의 아노머 탄소 시그널이 관찰되어 한분자의 당이 결합되어 있음을 알 수 있었고 전형적인 단당(glucose)의 carbon 시그널인 δ 77.94 (C-5'), δ 76.50 (C-2'), δ 73.49 (C-3'), δ 70.17 (C-4')를 확인하였으며, 1개의 methylene carbon δ 61.60 (C-6')이 관측되었다. 이러한 결과를 토대로 화합물 1은 문헌치와 비교하여 알칼로이드(alkaloid)계 화합물인 vicine으로 동정하였다(Delfini *et al.*, 1990).

화합물 2는 무색의 오일(oil) 형태의 클로로포름에 잘 용해되는 지용성의 물질로 ESI/MS에서 m/z 279 [M+H]⁺의 분자이온 peak가 관찰되어 분자량을 278로 결정하였다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 6.40 (H-11), 6.17 (H-12), 6.10 (H-13), 5.99 (H-10), 5.71 (H-14), 5.39 (H-9)의 시그널로부터 olefinic methine proton 6개가 존재함을 확인하였고, δ 2.29 (H-2), 2.19 (H-8), 2.12 (H-15), 1.61 (H-3)의 시그널로부터 ally 위치의 methylene이 관측되었다. 또한 δ 1.35 (H-4, 5, 6, 7, 16, 17)에서 다수의 methylene proton 시그널과 δ 0.93 (H-18)에서 triplet의 말단 methyl proton 시

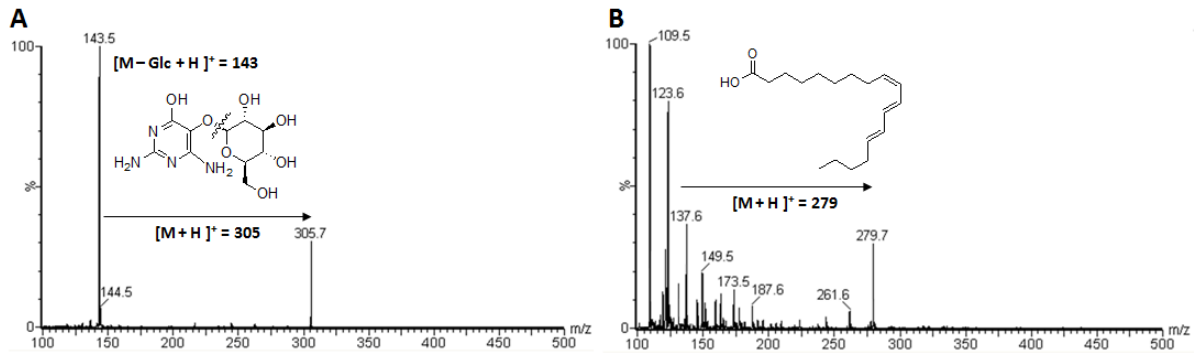


Fig. 2. Positive ion mass spectrum acquired by HPLC-ESI/MS analysis of vicine (A) and α -eleostearic acid (B).

Table 1. The contents of vicine (1) and α -eleostearic acid (2) in various extracts from the seeds of *Momordica charantia*

| Peak no. | t_R (min) | Dried seeds (mg/g) ^{a)} | | | | |
|----------|-------------|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | H ₂ O | 30% EtOH | 50% EtOH | 70% EtOH | 95% EtOH |
| 1 | 10.6 | 7.10±0.4 ^{b)} a | 4.60±0.3 b | 3.98±0.4 c | 3.34±0.3 d | 0.52±0.1 e |
| 2 | 29.8 | ND ^{c)} c | 0.59±0.1 c | 10.9±0.9 b | 21.7±2.1 a | 23.5±1.7 a |

a) Extract contents at 270 nm are given as mg/g dry weight

b) All values are means±SD ($n=3$)

c) ND=not detected

그날이 관측되었다. ¹³C-NMR spectrum에서 18개의 carbon이 관측되었고 δ 179.35 (C-1)에서 carbonyl carbon과 δ 134.39 (C-14), 132.73 (C-11), 130.97 (C-9), 130.66 (C-13), 128.68 (C-10), 125.70 (C-12)에서 6개의 olefinic carbon, 33.58~21.90 사이에서 methylene 시그널과, δ 12.87에서 terminal methyl 시그널이 확인되었다. 보다 정확한 지용성(휘발성) 성분의 동정을 위해 GC-EI/MS 분석에서 $[M]^+$ =278의 신뢰도 높은 모분자량의 이온값을 얻었으며, 고분해능 질량분석기(HR-EIMS)를 통한 278.2250 (calc. 278.2246, err 1.5 ppm)의 소수점 4째 자리까지의 정확한 질량값을 관찰함으로써 불포화지방산인 탄수소:이중결합비(18:3)을 갖는 필수지방산임을 알 수 있었다. 또한 구조동정을 위한 표준물질과의 검출시간, 최대파장 흡수밴드(λ_{max} =270.5 nm)의 비교를 통해 다가불포화지방산의 일종인 α -eleostearic acid (α -ESA)로 동정하였다(Kai et al., 2014).

HPLC에 의한 정량분석

여주씨에서 주요성분을 정량하기 위한 HPLC 분석조건을 검토한 결과에서 Fig. 2에서와 같이 Phenomenex hydro-RP C18 (250×4.60 mm, 4 μ m, 80 Å)의 입도(particle size)가 작은 역상(C18)컬럼을 사용하였을 때 vicine, α -ESA 등 주요 생리활성성분의 분리능이 양호하였다. 본 연구에서는 여주씨의 에탄올 추출농도별에 대한 주요성분의 함량을 분석하기 위해 상기의 두 성분을 지표성분으로 최종 설정하여 표준정량곡선을 작성하였다. 최적의 HPLC 분석조건하에서 얻어진 표준정량곡선에서는 vicine (1), α -ESA (2) 성분이 10, 50,

100, 500, 1000 μ g/mL 농도 범위에서 회귀식이 각각 $y=28869x+23910$, $y=14983x+6838.4$ 이고, 상관계수(r^2) 값이 각각 0.9998, 0.9999로서 피크면적(y)과 성분들의 농도(x) 사이에 고도의 직선성을 확인할 수 있었다.

에탄올의 농도를 달리하여 여주씨의 추출물을 제조한 후 각 추출물의 지표성분 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같았다. 추출수율이 가장 높았던 70% 에탄올 추출물 중 vicine, α -ESA 함량은 각각 3.34±0.3, 21.7±2.1 mg/g이었다. vicine (1)의 경우 물, 30%, 50%, 70%, 95% 에탄올 추출물까지 각각 7.10±0.4, 4.60±0.3, 3.98±0.4, 3.34±0.4, 0.52±0.1의 함량을 나타내었으며, 극성도가 증가할수록 다량 추출되었고 95% 에탄올 추출물에서는 그 함량이 현저히 줄어들었다. 반면 α -eleostearic acid (2)의 경우 에탄올 농도별 추출물은 각각 ND(검출안됨), 0.59±0.1, 10.9±0.9, 21.7±2.1, 23.5±1.7의 함량을 나타내었고 특히, 50% 에탄올 이상의 지용성물질의 추출조건에서 그 함량이 지속적으로 증가하였다. 이러한 경향은 vicine 성분의 추출은 95% 에탄올보다는 극성이 훨씬 높은 물 추출 혹은 70% 에탄올 이하의 폴라(polar)한 조건에서 추출하는 것이 성분 용출에 더 용이함을 시사하고 있으며, 동일한 추출 조건에서 α -eleostearic acid는 95% 에탄올 추출물의 함량이 23.5±1.7으로 가장 높은 것으로 보아 50% 에탄올 이상의 non-polar한 조건에서 추출하는 것이 성분 용출에 더 용이함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이상의 결과를 토대로 추출수율과 지표성분의 함량을 고려할 때, α -glucosidase에 저해활성을 나타내는 여주씨 분말 시료에 대한 최적의 추출조건은 α -eleostearic acid 성분이 다량 추출

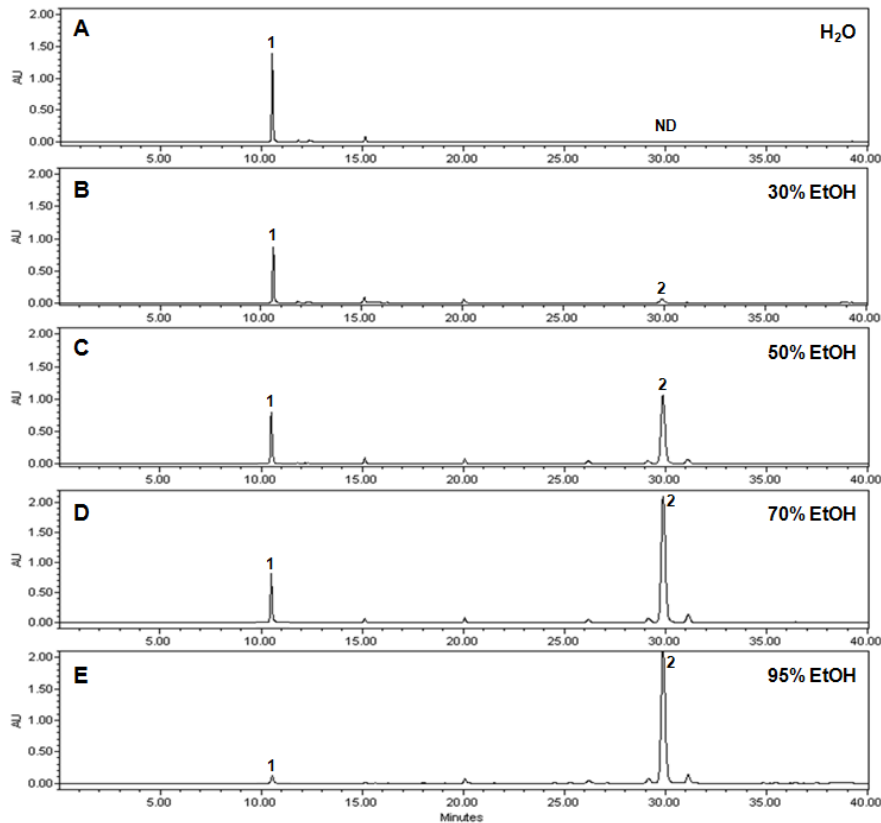


Fig. 3. HPLC-PDA profiles (at 270 nm) of vicine (1) and α -eleostearic acid (2) in seeds extracts from the five different polarity solvents.

되는 조건인 95% 에탄올의 조건인 것으로 판단된다.

α -Glucosidase 저해활성 측정

에탄올 농도별에 따른 다양한 여주씨 추출물 및 주요성분의 α -glucosidase 저해활성은 Table 2에 나타내었다. pNPG를 기질로 사용한 *in vitro* yeast α -glucosidase 저해활성결과, 물 추출물 및 30% 에탄올 추출물에서는 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 측정농도에서 저해율이 10% 미만으로 나타났고, 50%, 70%, 95% 에탄올 추출물의 저해율은 각각 62%, 72%, 80% 이상으로 높게 나타났다. 가장 저해활성이 높은 95% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 목표 효소를 저해하였으며, 단계별로 희석한 검체들의 효소 저해율을 근간으로 산출된 50% 효소활성 저해농도(IC_{50})는 88.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 따라서 여주씨 추출물에 함유된 α -glucosidase 효소활성 저해성분들은 주로 non-polar한 추출물에 분포하는 것으로 예측되어 분리한 단일성분들의 저해활성을 검증하였다.

Vicine(1)은 극성도가 매우 높은 물질로서 α -glucosidase에 대해 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 측정농도에서 저해율이 13% 이하로 목표효소에 대한 저해효과를 나타내지 못했다. 반면 α -eleostearic acid (2)는 활성이 기대되는 non-polar한 물질로서 동일한 측정농도에서 저해율 90% 이상의 강력한 저해효과를 나타내었다. 또한 농도 의존적으로 α -glucosidase를 저해하였으며, IC_{50} 값은 43.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 α -glucosidase의

Table 2. Inhibitory effects of the seed extract of *Momordica charantia* using different solvents and vicine (1) and α -eleostearic acid (2) on α -glucosidase inhibitory activities

| Compound | α -glucosidase | |
|------------------------------------|--|------------------------------|
| | IC_{50} ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Inhibition ^{b)} (%) |
| H ₂ O (distilled water) | >1000 | 8.1±0.4 d |
| 30% EtOH | >1000 | 9.8±1.2 d |
| 50% EtOH | 252.8±14.3 | 62.3±2.1 c |
| 70% EtOH | 143.5±10.7 | 72.7±3.7 b |
| 95% EtOH | 88.7±6.4 | 80.1±2.8 a |
| 1 | >1000 | 13.4±1.6 |
| 2 | 43.4±2.9 | 91.3±2.2 |

a) All compounds were examined in a set of experiments repeated three times; IC_{50} values of compounds represent the concentration that caused 50% enzyme activity loss

b) Sample concentration was 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

치료제 및 대조약물로 사용되는 DNJ (IC_{50} =124 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 약 3배 가까이 우수한 저해효과를 확인하였다. 따라서 여주씨 추출물에서 저해효과가 가장 우수한 95% 에탄올 추출물

및 그 속에 다량 함유된 생리활성물질인 α -eleostearic acid 는 α -glucosidase 저해 효과에 중요하게 기여하고 있음을 나타내며, 식후의 혈당 상승을 억제시켜 줄 수 있는 잠재력이 있음을 확인하였다.

요 약

최근 들어 여주의 혈당개선의 약리학적인 효능이 보고됨에 따라 기능성 채소로 각광받고 있다. 주로 여주 과실만이 식용으로 쓰이지만 여주씨 또한 다양한 가공과정을 거칠 경우(건여주 혹은 건조분말, 환, 엑기스 등) 필연적으로 함께 섭취되기도 한다. 본 연구에서는 과실 이외의 특히, 연구결과가 미비한 여주씨에 대해 생리활성물질의 구명 및 혈당개선의 효과에 대한 연구를 수행하였다. 다양한 추출물 및 단일 활성성분의 혈당개선 *in vitro* 검증법인 α -glucosidase에 대한 저해효과를 측정하였고, 활성을 나타내는 추출물 또는 활성성분과의 상관관계를 구명하였다. 구체적으로는 95% 에탄올 추출물 및 비극성 용매 등에 다량 추출되는 생리활성물질인 α -eleostearic acid는 우수한 저해효과를 나타내었다($IC_{50}=43.4 \mu\text{g/mL}$). 또한 효소저해제의 함량을 HPLC를 통한 정량분석을 수행함으로써 여주씨에 함유된 기능성성분의 혈당개선 식의약 소재로의 응용가능성을 연구하였다.

Acknowledgment

This study was funded by a Research Program for Agricultural Science & Technology Development (PJ01000304) and Postdoctoral Fellowship Program of Rural Development Administration, Korea.

References

- Asano, N. (2003). Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*, 13(10), 93R-104R.
- Creutzfeldt, W. (1999). Effects of the α -glucosidase inhibitor acarbose on the development of long-term complications in diabetic animals: pathophysiological and therapeutic implications. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 15(4), 289-296.
- Delfini, M., Nola, A. D., Carnovale, E., Lepri, A., Gaggelli, E., & Russo, N. (1990). ^{13}C NMR Study of the Natural Glycosides Vicine and Convicine. *Spectroscopy letters*, 23(5), 657-667.
- Girón, L. M., Freire, V., Alonzo, A., & Cáceres, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2), 173-187.
- Hu, X. J., Wang, X. B., & Kong, L. Y. (2013). α -Glucosidase inhibitors via green pathway: biotransformation for bicoumarins catalyzed by *Momordica charantia* Peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(7), 1501-1508.
- Kai, H., Akamatsu, E., Torii, E., Kodama, H., Yukizaki, C., Akagi, I., Ino, H., Sakakibara, Y., Suiko, M., Yamamoto, I., Okayama, A., Morishita, K., Kataka, H., & Matsuno, K. (2014). Identification of a bioactive compound against adult T-cell Leukaemia from bitter gourd seeds. *Plants*, 3(1), 18-26.
- Khanna, P., Jain, S. C., Panagariya, A., & Dixit, V. P. (1981). Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. *Journal of Natural Products*, 44(6), 648-655.
- Kenny, O., Smyth, T. J., Hewage, C. M., & Brunton, N. P. (2013). Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. *Food chemistry*, 141(4), 4295-4302.
- Kim, H. Y., Kwon, S. H., & Cho, E. J. (2013). Phytochemical Constituents of Bitter Melon (*Momordica charantia*). *Natural Product Sciences*, 19(4), 286-289.
- Liu, J. Q., Chen, J. C., Wang, C. F., & Qiu, M. H. (2009). New cucurbitane triterpenoids and steroidal glycoside from *Momordica charantia*. *Molecules*, 14(12), 4804-4813.
- Maki, K. C., Carson, M. L., Miller, M. P., Turowski, M., Bell, M., Wilder, D. M., & Reeves, M. S. (2007). High-viscosity hydroxypropylmethylcellulose blunts postprandial glucose and insulin responses. *Diabetes Care*, 30(5), 1039-1043.
- Parkash, A., Ng, T. B., & Tso, W. W. (2002). Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome-inactivating peptide from bitter gourd (*Momordica charantia*) seeds. *The Journal of peptide research*, 59(5), 197-202.
- Rathi, S. S., Grover, J. K., & Vats, V. (2002). The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Phytotherapy Research*, 16(3), 236-243.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R. R., Alviano, C. S., & Costa, S. S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 563-568.
- Singh, R., Kumar, A., Giri, D. D., Bhuvaneshwari, K., & Pandey, K. D. (2012). Gas chromatography-mass spectrometry analysis and phytochemical screening of

- methanolic fruit extract of *Momordica charantia*. *Journal of Recent Advances in Agriculture*, 1(4), 122-127.
- Virdi, J., Sivakami, S., Shahani, S., Suthar, A. C., Banavalikar, M. M., & Biyani, M. K. (2003). Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 107-111.
- Yuk, H. J., Lee, J. H., Curtis-Long, M. J., Lee, J. W., Kim, Y. S., Ryu, H. W., Park, C. G., Jeong, T. S., Park, K. H. (2011). The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent α -glucosidase inhibitory activity. *Food chemistry*, 126(3), 1057-1063.
- Zong, R. J., Morris, L., & Cantwell, M. (1995). Postharvest physiology and quality of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 6(1), 65-72.