

Screening of Natural Products for Anti-diabetic Activity and Analysis of Their Active Compounds

Hwa Sin Lee^{1†}, Bo Bae Park^{1,2}, Sun Nyoung Yu^{1†}, Min Ji Kim³, Yun Jin Bae³, Yi Rooney Lee³, Ye Eun Lee³, Si Yoon Kim³, Yun Ho Shim³ and Soon Cheol Ahn^{1*}

¹Department of Microbiology & Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 50612, Republic of Korea

²Department of Molecular Medicine, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas 78229, USA

³Mulgeum High School, Yangsan 50612, Republic of Korea

Received February 18, 2023 / Revised July 20, 2023 / Accepted October 12, 2023

Modern people have an increased incidence of metabolic diseases due to changed eating habits, and diabetes is considered the most significant metabolic disease. Given that existing diabetes treatments are accompanied by side effects, the aim of this study was to identify traditional natural products that have anti-diabetic activity. The potential anti-diabetic and antioxidant activities of natural products were examined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay, α -glucosidase assay, and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibition assay. Methanol extracts of *Ulmus davidiana* var. *japonica*, *Acer tegmentosum* branches, *Nelumbo nucifera* seeds, and *Carthamus tinctorius* seeds were found to have high anti-diabetic activity and further fractionated with solvents using ethyl acetate and butanol. Consequently, the ethyl acetate fraction of *C. tinctorius* seeds (MG-11-E) with high α -glucosidase and PTP1B inhibitory activity was selected. MG-11-E was subjected to preparative thin layer chromatography, and fraction #6 showed high α -glucosidase and PTP1B inhibitory activity. Fraction #6 was analyzed and fractionated via high performance liquid chromatography with 50% methanol as the mobile phase, and anti-diabetic activity was observed in the sample that eluted after 4 min as a single peak. The α -glucosidase inhibitory activity exhibited by this sample seemed to be greater than the PTP1B inhibitory activity; thus, it was concluded that a greater anti-diabetic therapeutic effect may be achieved by combining this agent with natural products that inhibit PTP1B activity.

Key words : Anti-diabetic activity, *Carthamus tinctorius* seed, natural products, PTP1B inhibition, α -glucosidase inhibition

서 론

현대인들은 식습관의 불균형, 비만, 스트레스 등의 문제들로 인해 당뇨병과 같은 대사질환에 쉽게 노출되어 있다. 당뇨병은 다양한 합병증의 원인이 되어 그 치료법이나 약물 개발의 필요성이 점점 증가하고 있는 추세이다. 2014년 기준 전세계 당뇨병 환자는 약 4억 2천만 명으로, 1980년의 1억 8백만 명에 비해 크게 늘어났으며 그 유병률은 1980년의 4.7%에서 2014년에는 8.8%로 약 2배 가량

증가하였으며[14], 특히 2018년 기준 대한민국의 30세 이상 성인은 13.8%, 65세 이상 성인은 28%의 유병률을 보였다[2]. 당뇨병 유형 중 90% 가량을 차지하는 제2형 당뇨병의 경우 인슐린 저항성에 의해 유발되는 것이 대표적인 특징으로, 유병률이 증가하고 있는 추세이며 대사 기능의 조절을 부적절하게 변화시켜 고혈당 뿐 만 아니라 고지혈증, 신증, 신경증과 각종 안구 및 혈관질환과 같은 치명적인 합병증을 유발한다[8, 16].

한편 당뇨병 치료 약물들의 내성과 부작용과 같은 문제 또한 당뇨병 치료에 있어 중요한 문제로 나타나고 있다[8]. 특히 잘 알려진 당뇨병 치료제인 메트포르민(metformin)의 경우, 신기능이 저하된 환자에게 투여할 시 젖산 산증과 같은 부작용을 일으키기도 하며 글리메피리드(glimepiride)는 저혈당을 유발하는 등의 문제가 있는 것으로 알려져 있다[10, 13]. 반면, 천연물 추출물의 경우 예로부터 오랫동안 사용되어 왔기 때문에 부작용에 의한 위험요인이 상대적으로 낮아서, 질병의 치료와 부작용의 경감이라

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

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.

는 효과를 모두 확보할 수 있을 것으로 예상된다[15]. 따라서 천연물에서 유래된 물질의 항당뇨 활성 측정을 통하여 새로운 당뇨병 치료제를 탐색하고 있다. 당뇨병의 발병 기작에 있어서 α -glucosidase는 탄수화물을 포도당으로 분해하여 체내의 당을 증가시키며, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)는 insulin receptor (IR) 및 insulin receptor substrate 1 (IRS-1)과 상호작용하여 신호 전달 과정을 저해하며 포도당의 신생을 촉진, 당뇨병을 유발한다[9, 13]. IRS-1은 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), protein kinase B (AKT) 및 glucose transporter type 4 (GLUT4)의 자극 및 인산화를 일으키는 신호 전달 경로 중 하나이며, IRS-1의 인산화에 의하여 GLUT4의 발현이 증가되면 혈중에서 세포 내로의 포도당 유입이 증가되어 혈당 수치가 감소하게 된다[17].

따라서 본 연구에서는 주위에서 쉽게 구입할 수 있고 항당뇨 효능이 예상되는 천연물을 대상으로 항당뇨 활성을 확인하였으며 또한 고혈당 상태는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 촉진시켜 합병증을 유발하므로[1], 이를 제거할 수 있는 천연물을 확인하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging 활성도 평가하였다[4]. 최종적으로 홍화 씨앗에서 α -glucosidase와 PTP1B에 대한 항당뇨 활성을 확인할 수 있었다. 한편 홍화 씨앗에서 추출된 물질의 페놀 성분 중 세로토닌 유도체인 *N-p-coumaroyl* serotonin과 *N-feruloyl* serotonin이 강한 항산화 및 α -glucosidase에 대한 저해 활성이 보고되었다[3]. 이를 통해 천연물 중 특히 홍화 씨앗과 그 추출물을 이용하여 기존 치료제에 비해 부작용 부담이 적은 당뇨 치료제 개발에 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 연구에 사용된 천연물 목록은 Table 1과 같았으며

Table 1. Sample list used in this experiment

Lable	Scientific name
MG-1	<i>Citrus tachibana</i> peel
MG-2	<i>Lonicera japonica</i>
MG-3	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>
MG-4	<i>Angelica gigas</i>
MG-5	<i>Taraxacum platycarpum</i>
MG-6	<i>Acer tegmentosum</i> branch
MG-7	<i>Nelumbo nucifera</i> leaf
MG-8	<i>Nelumbo nucifera</i> seed
MG-9	<i>Allium cepa</i>
MG-10	<i>Hijikia fusiformis</i> HF
MG-11	<i>Carthamus tinctorius</i> L. seed
MG-12	<i>Nerium oleander</i> L.

경상남도 양산시 남부시장의 한약재 소매상에서 구입하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid, α -glucosidase, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG), acarbose, *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP), ursolic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)은 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

천연물 추출물의 제조

건조 상태의 천연물 10 g에 메탄올 500 ml를 첨가하여 실온에서 3일간 추출하였다. 이후 상등액만 취하여 Modul 4080C vacuum concentrator system (Hanil Science Co., Daejeon, Korea)를 통해 용매를 증발시켜 건조한 후, 시료는 4°C 냉장고에서 보관하면서 생리활성 분석 시 회석하여 사용하였다.

용매 추출

건조된 메탄올 추출물 시료들은 증류수에 현탁시킨 후, 같은 비율의 에틸아세테이트를 넣어 혼합하고 교반하였다. 10,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 두 층으로 나누고 에틸아세테이트층을 마이크로 피펫을 이용하여 분획하였으며, 남은 수층에 부탄올을 같은 비율로 혼합, 교반한 후 다시 원심분리하여 부탄올층과 수층으로 분획하였다. 이렇게 분획된 에틸아세테이트층, 부탄올층, 수층을 생리활성 분석에 사용하였다.

항산화 활성

천연물 추출물의 항산화 활성은 DPPH free radical scavenging assay를 이용하였다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 에탄올을 사용하여 1.5×10^{-4} M의 농도로 희석하여 용액을 제조하였으며, 4°C 냉장고에서 차광 보관하였다. 농도별 천연물 추출물 10 μ l와 DPPH 용액 90 μ l를 섞어서 실온에서 30분간 암실에서 차광 반응시킨 후, VersaMax™ microplate reader (Molecular Devices, Toronto, Canada)를 통해 510 nm에서 흡광도를 측정하였다[12]. 음성 대조군으로 증류수와 메탄올을, 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. 이 때 inhibitory activity (%)는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{Sample}} - \text{OD}_{\text{Blank}}}{\text{OD}_{\text{Negative control}}}\right) \times 100$$

α -Glucosidase inhibition assay

효소로는 α -glucosidase, 완충용액으로 100 mM sodium phosphate buffer (SPB, pH 6.8)와 기질로는 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG)를 사용하였다. 100 mM SPB 24 μ l, 농도별 시료 6 μ l, 0.25 unit α -glucosidase 30 μ l, 2.5 mM pNPG 60 μ l를 첨가하여 15분 간 37°C incubator에서 반응

시키고, VersaMax™ microplate reader를 통해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[6]. 효소 및 기질을 첨가하지 않은 blank에는 100 mM SPB 114 µl와 농도별 시료 6 µl를 첨가하였다. 이 때 inhibitory activity (%)는 시료를 녹인 용매인 메탄올을 음성 대조군으로 설정하여 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{Sample}} - \text{OD}_{\text{Blank}}}{\text{OD}_{\text{Negative control}}}\right) \times 100$$

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibition assay

완충용액으로 Tris-buffered saline (TBS, pH 7.5)와 기질로는 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 사용하였다. Blank에는 TBS 50 µl, 40 mM pNPP 40 µl, 농도별 시료 10 µl를, 시험군에는 40 mM pNPP 40 µl, 농도별 시료 10 µl, PTP1B enzyme 50 µl를 각각 첨가하여 반응시켰다. 이 때 TBS는 30 µl의 1 M 1,4-dithiothreitol (DTT, Sigma)을 10ml TBS에 넣어 희석(DTT-TBS)하여 사용하였고, PTP1B enzyme 10 µl를 5 ml의 DTT-TBS에 희석하여 사용하였다. 이후 37°C

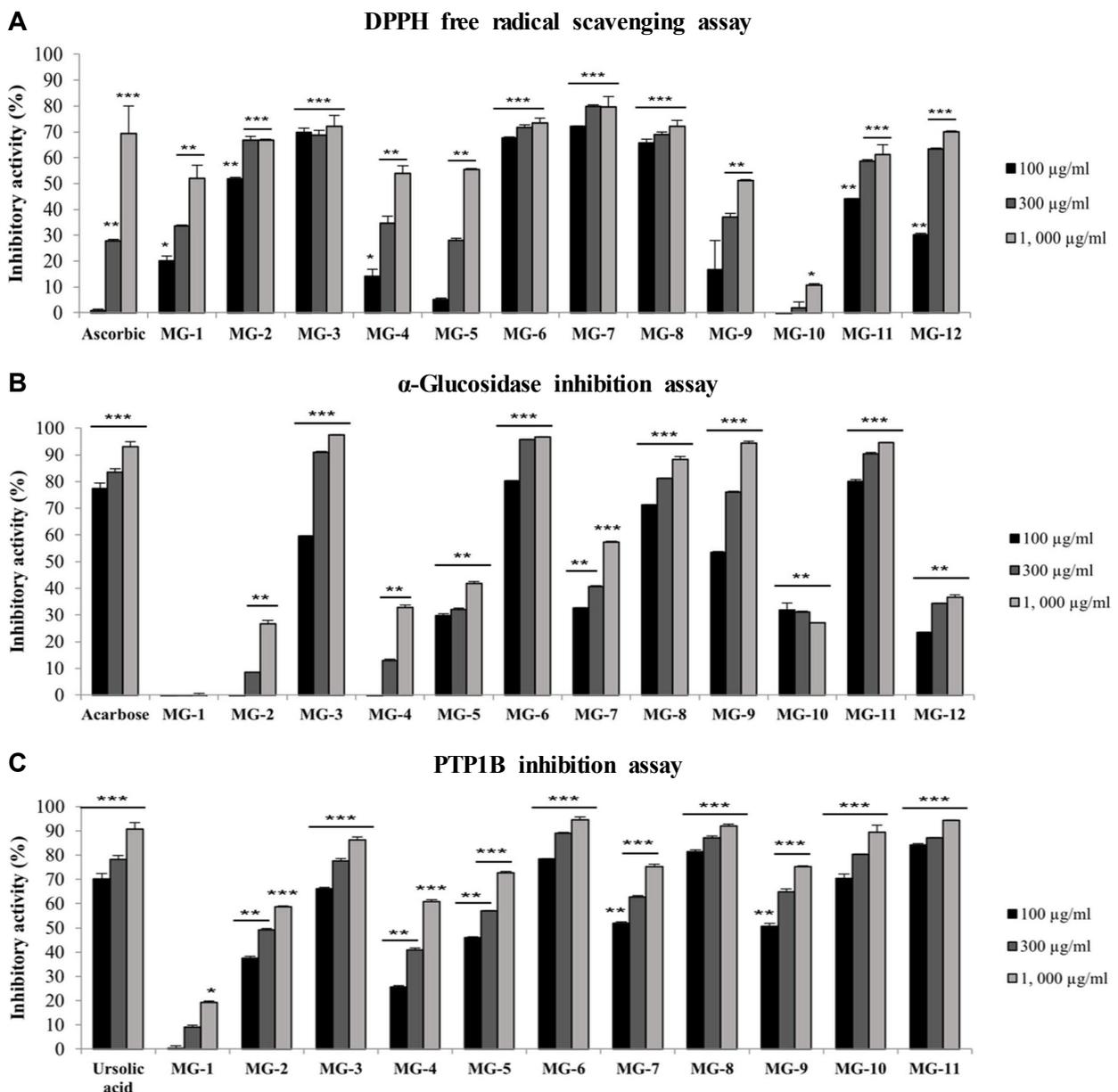


Fig. 1. Anti-diabetic activities of methanol extracts from natural products. (A) DPPH free radical scavenging activity. (B) α-Glucosidase inhibitory activity. (C) PTP1B inhibitory activity. All data were presented as means ± SD of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001, compared to control.

incubator에서 20분간 반응한 후, VersaMax™ microplate reader를 통해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[11]. 이때 inhibitory activity (%)는 시료를 녹인 용매인 메탄올을 음성 대조군으로 설정하여 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{Sample}} - \text{OD}_{\text{Blank}}}{\text{OD}_{\text{Negative control}}}\right) \times 100$$

Preparative thin layer chromatography (TLC)

TLC plate (20×20 cm, 0.5 mm, Merck Co., Darmstadt, Germany)에 시료들을 고르게 점적시킨 후, 클로로포름:메탄올:증류수(4:2:1, lower phase)를 전개용매로 사용하여 진행하였다. 전개는 TLC plate의 상단 1 cm 부분까지 진행하였으며, 전개가 끝나면 TLC plate를 잘 건조시킨 다음, UV lamp (254 nm)를 통해 전개된 성분의 위치를 확인하였다. 이후 확인된 성분의 경계선을 따라 연필로 fraction을 나누어 각 구간의 silica gel을 긁어내 분리한 후, 2 ml의 메탄올로 추출하였다[5]. 추출된 시료들은 위와 같은 용매 조건으로 다시 TLC를 진행하고 UV lamp (254 nm) 및 황산 발색을 통해 각 성분의 분획이 제대로 되었는지를 확인하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC)

분석 기기로는 LC-10 series (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였으며, column으로는 μBondapak™ C18 (Ø 3.9×300 mm, 10 μm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) 및 CAPCELL PAK-MG C18 (Ø 10×250 mm, 5 μm) (Shiseido, Tokyo, Japan)를 사용하였다. Column은 column oven에서 50℃를 유지하였으며, 이동상으로는 50% 메탄올을 이용하여 2 ml/min의 flow rate에서 20분간 용출시키고 220 nm의 파장에서 용출되는 각 성분을 검출하였다. 이후 용출된 머무름 시간대(retention time, RT)에서 분획물을 받아 각각을 농축 혹은 희석한 후, 분획물의 해당노 활성을 측정하였다.

통계처리

모든 실험의 결과는 3번 반복 수행하여 얻어진 것으로, 통계 분석은 ANOVA에 의해 분석하여 mean ± S.D로 표시하였고, 통계적 유의성은 **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001로 판정하였다.

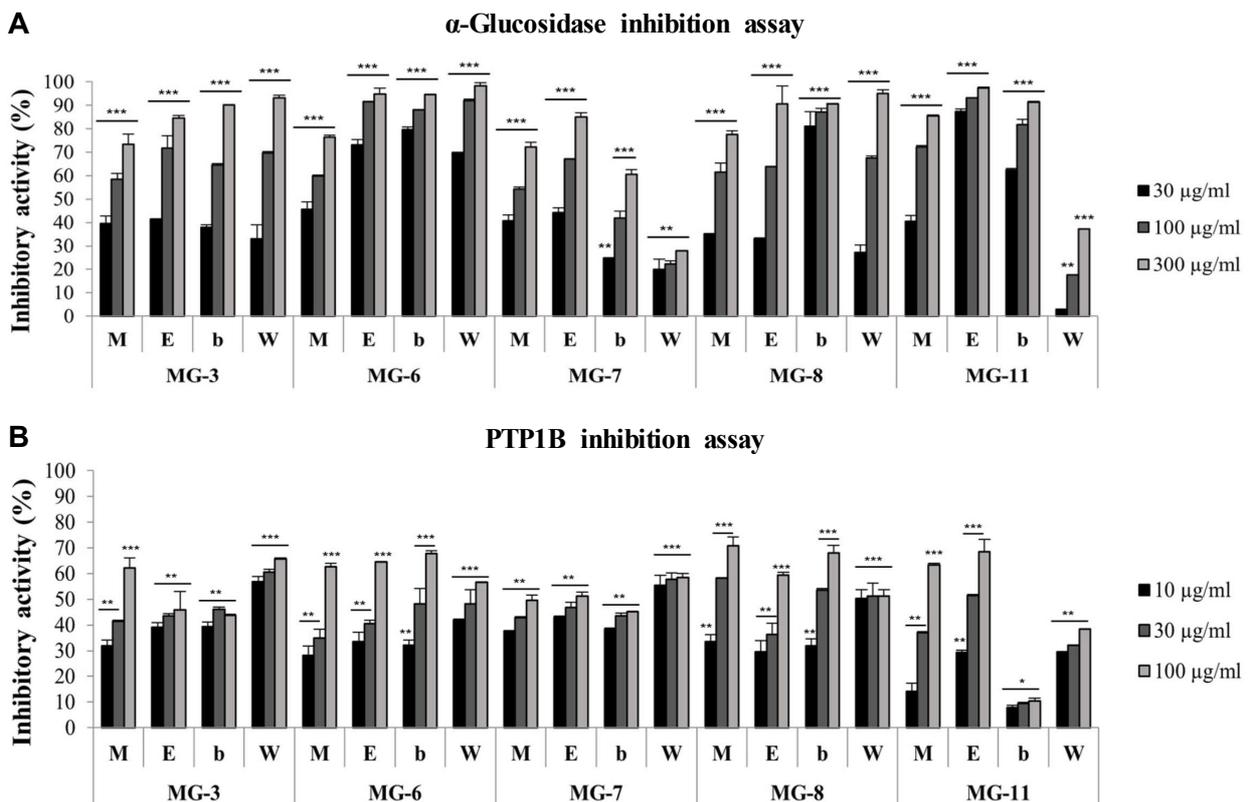


Fig. 2. Anti-diabetic activities of organic solvent extracts from natural products. (A) α-Glucosidase inhibitory activity. (B) PTP1B inhibitory activity. M: methanol extract of natural product, E: ethyl acetate layer, b: butanol layer, W: water layer from methanol extract. All data were presented as means ± SD of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001, compared to control.

결 과

천연물 추출물의 항산화능 측정

천연물 추출물들의 항산화능을 측정하기 위하여 각 시료들을 100, 300, 1,000 µg/ml의 농도로 희석한 후 DPPH free radical scavenging assay를 진행한 결과, 100 µg/ml의 농도에서 MG-2, MG-3, MG-6, MG-7, MG-8, MG-11에서 각각 51.86, 69.73, 71.63, 72.04, 69.02, 58.56%의 항산화 활성이 측정되었으며, 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1A). 그 중 MG-3 (느릅나무), MG-6 (별나무 가지), MG-7 (연잎), MG-8 (연 씨앗)의 항산화 활성이 다른 시료들에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다.

천연물 추출물의 항당뇨 효능 측정

천연물 추출물의 항당뇨 활성을 측정하기 위하여 α-glucosidase 저해 활성과 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 저해 활성을 측정하였다.

α-Glucosidase inhibition assay의 경우, 시료의 농도를 100, 300, 1,000 µg/ml로 희석하여 처리한 결과, 각 농도 별로 MG-3 (느릅나무)에서 59.52, 91.02, 97.54%, MG-6 (별나무 가지)에서 80.22, 95.66, 96.68%, MG-8 (연 씨앗)에

서 71.23, 81.15, 88.33%, MG-9 (양파)에서 53.41, 76.10, 94.50%, MG-11 (홍화 씨앗)에서 80.09, 90.33, 94.63%의 저해 활성을 보였으며 농도 의존적으로 저해활성이 증가하였다(Fig. 1B).

PTP1B inhibition assay 또한 시료의 농도를 100, 300, 1,000 µg/ml로 희석하여 처리하였으며, 그 결과 각 농도 별로 MG-3 (느릅나무)에서 66.17, 77.58, 86.27%, MG-6 (별나무 가지)에서 78.39, 89.11, 94.55%, MG-8 (연 씨앗)에서 81.31, 87.11, 92.06%, MG-10 (툇)에서 71.39, 80.25, 89.53%, MG-11 (홍화 씨앗)에서 84.13, 87.10, 94.34%의 저해 활성을 보였으며 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1C). 항당뇨 효능과 관련된 3가지의 생리활성을 검토한 결과, MG-3 (느릅나무), MG-6 (별나무 가지), MG-8 (연 씨앗), MG-11 (홍화 씨앗)에서 항산화 및 항당뇨 효능이 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 따라서 4가지 천연물들을 선정하고 용매추출을 통해 추가적으로 생리활성을 분석하였다.

용매추출

항당뇨 활성이 비교적 높은 것으로 확인된 4가지의 메탄올(M) 추출물로부터 에틸아세테이트(E), 부탄올(b), 증류수(W)층으로 분획한 시료들을 대상으로 α-glucosidase

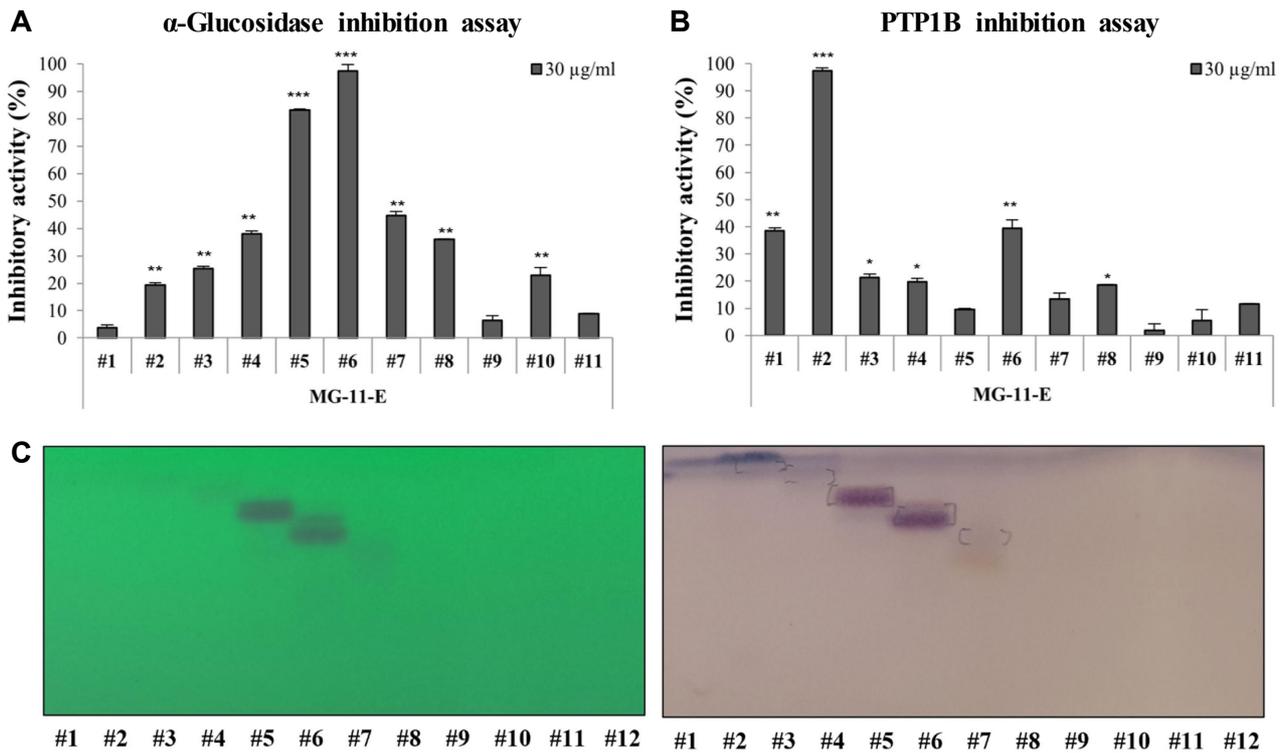


Fig. 3. Preparative thin layer chromatography (TLC) of ethyl acetate fraction (MG-11-E) from methanol extract of *Carthamus tinctorius* seeds. (A) α-Glucosidase inhibitory activity, (B) PTP1B inhibitory activity. (C) TLC captured under UV lamp at 254 nm (up) and after anisaldehyde sulfuric acid staining (down). All data were presented as means ± SD of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001, compared to control.

및 PTP1B inhibition assay를 통해 항당뇨 활성을 측정하였다. 30, 100, 300 µg/ml의 농도에서 α-glucosidase 저해 활성을 조사한 결과, MG-3은 E, b, W층 분획물 모두 비슷한 활성을 보였으며, MG-11의 경우 E층 분획물에서, MG-6과 MG-8은 b층 분획물에서 높은 저해 활성을 보였다(Fig. 2A). 30, 100, 300 µg/ml의 농도에서 PTP1B 저해 활성을 조사한 결과, MG-3, MG-6과 MG-8은 W층 분획물에서, MG-11은 E층 분획물에서 높은 저해 활성을 보였다(Fig. 2B). 따라서 MG-11의 에틸아세테이트층(MG-11-E) 분획

물을 최종적으로 선정하여 추가 실험을 진행하였다.

활성물질의 분획

전개용매로 클로로포름:메탄올:증류수(4:2:1, lower phase)를 사용하여 preparative thin layer chromatography (TLC)하여 전개 순서에 따라 MG-11-E를 총 11개 구획으로 나누고 각 분획의 항당뇨 활성을 측정하였다. α-Glucosidase 저해 활성은 TLC 분획물 #5와 #6에서(Fig. 3A), PTP1B 저해 활성은 TLC 분획물 #2와 #6에서(Fig. 3B) 나타났다. 이를

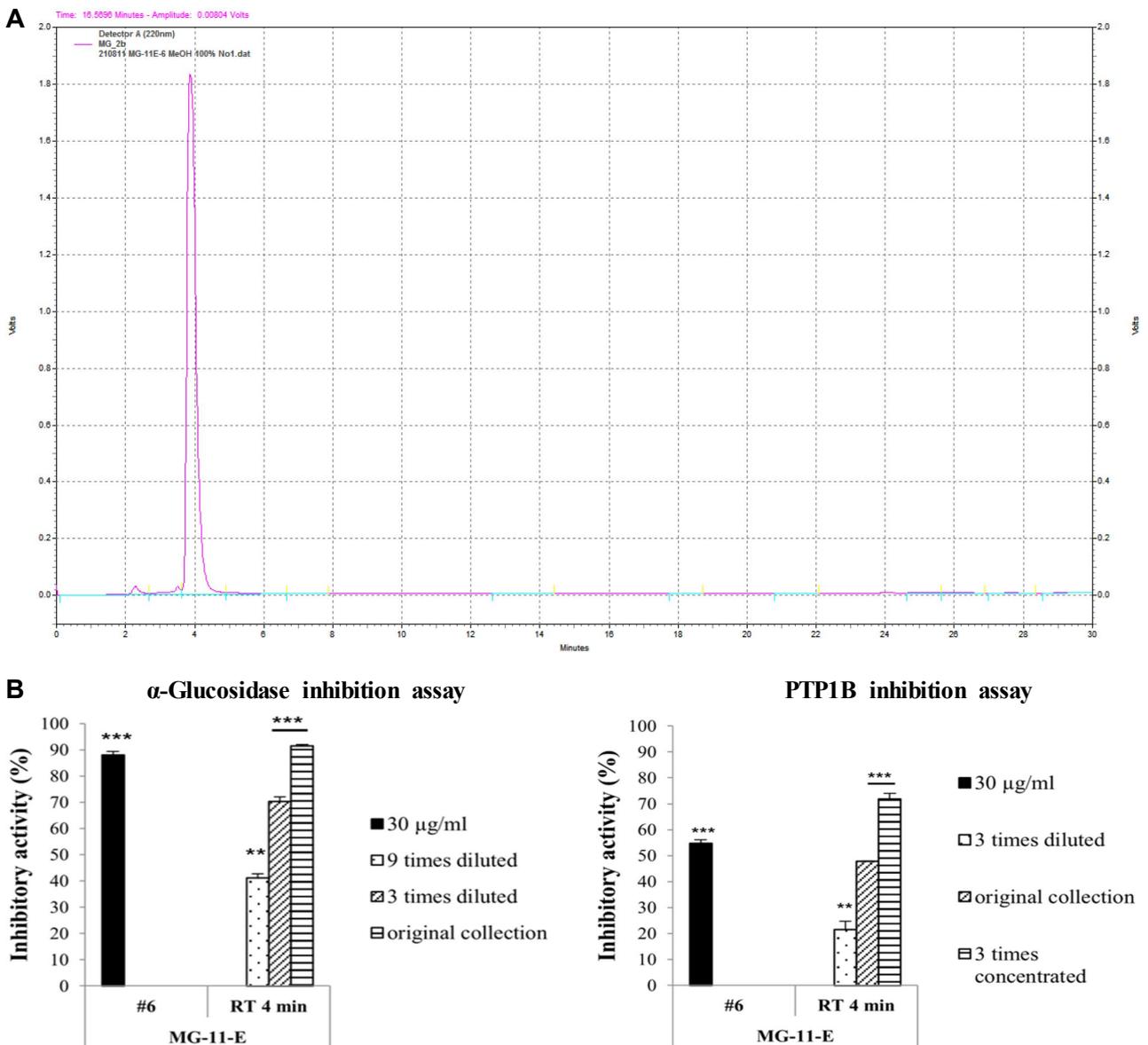


Fig. 4. (A) High performance liquid chromatography (HPLC) of preparative TLC #6 fraction of MG-11-E. HPLC was performed by using Shiseido CAPCELL PAK –MG C18 (Ø 10×250 mm, 5 µm). Sample was flowed for 20 minutes under conditions of 50% methanol and detected at 220 nm. Flow rate was 2 ml/min. (B) α-Glucosidase inhibitory activity (left) and PTP1B inhibitory activity (right) of fraction collected at RT 4 min by HPLC. All data were presented as means ± SD of three independent experiments. ***p*<0.01 and ****p*<0.001, compared to control.

통해 MG-11-E에는 각기 다른 유효 성분이 항당뇨 활성을 나타내는 것으로 추정되었으며 TLC 분획물 #6은 α -glucosidase와 PTP1B 활성을 동시에 저해하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

항당뇨 활성이 우수한 MG-11-E의 TLC 분획물 #6을 고정상으로 Shiseido CAPCELL PAK -MG C18 (O 10 \times 250 mm, 5 μ m), 이동상으로는 50% 메탄올을 사용하여 HPLC로 분석한 결과, Fig. 4A와 같이 머무름 시간(retention time, RT) 4분에서 단일 peak를 보였다. HPLC에서 단일 peak의 분획을 취하여 항당뇨 활성을 측정된 결과, α -glucosidase와 PTP1B에 대한 저해 활성을 보였다(Fig. 4B).

고 찰

본 연구는 항산화 및 항당뇨 활성이 알려진 천연물들 중 인터넷이나 약재상, 한약방 등 주변에서 쉽게 구할 수 있는 것들을 대상으로 진행하였다. 그 결과, 선정된 천연물들 대부분에서 항산화 및 항당뇨 활성을 확인할 수 있었다. 항산화 활성은 느릅나무, 벌나무 가지, 연잎, 연 씨앗, 홍화 씨앗 등에서 나타났으며, α -glucosidase 및 PTP1B 저해를 통한 항당뇨 활성은 느릅나무, 벌나무 가지, 연 씨앗, 홍화 씨앗 등에서 높게 나타났다. 항산화 및 항당뇨 효능 실험에서 높은 활성을 보인 느릅나무, 벌나무 가지, 연 씨앗, 홍화 씨앗은 용매추출을 통해 용매별로 분획하여 각 분획물의 활성을 측정하였다. 그 결과, 에틸아세테이트층 분획물이 부탄올층 및 수층에 비해 높은 항당뇨 활성을 보였다. TLC 분석을 통해 홍화 씨앗의 에틸아세테이트층을 용출되는 성분에 따라 분획하여 항당뇨 활성을 측정된 결과, α -glucosidase 저해능은 분획물 #2에서 특히 높았으나 #1과 #6에서도 저해능을 보였다. 또한 PTP1B 저해능은 #5와 #6에서 높게 나타났다. 홍화 씨앗 에틸아세테이트층의 TLC 분획물 #6의 항당뇨 활성 성분을 HPLC로 분석한 결과, RT 4분에 나타나는 peak의 물질이 α -glucosidase와 PTP1B를 저해하는 것으로 확인되었으며, *in vitro* 효소 저해 활성에서는 α -glucosidase에 비해 PTP1B에 대한 저해 정도가 상대적으로 약한 것으로 확인되었다. 따라서 제2형 당뇨병을 치료하기 위한 방법으로 홍화 씨앗 추출물을 이용하는 것과 더불어 PTP1B를 더욱 강력하게 저해할 수 있는 천연물을 병용한다면 보다 높은 항당뇨 활성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 더불어 홍화 씨앗 뿐 만 아니라 느릅나무, 벌나무 가지, 연 씨앗의 항당뇨 활성물질에 대한 분리, 정제 등의 추가 실험을 통해 항당뇨 효능이 있는 천연물의 개발에 도움이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Calver, A., Collier, J. and Vallance, P. 1992. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Investig.* **90**, 2548-2554.
2. Jung, C. H., Son, J. W., Kang, S., Kin, W. J., Kim, H. S., Kim, H. S., Seo, M., Shin, H. J., Lee, S. S., Jeong, S. J., Cho, Y., Han, S. J., Jang H. M., Rho, M., Lee, S., Koo, M., Yoo, B., Moon, J. W., Lee, H. Y., Yun, J. S., Kim, S. Y., Kim, S. R., Jeong, I. K., Mok, J. O. and Yoon, K. H. 2021. Diabetes fact sheets in Korea, 2020: An appraisal of current status. *Diabetes Metab. J.* **45**, 1-10.
3. Jung, Y. J., Assefa, A. D., Lee, J. E., Lee, H. S., Rhee, J. H. and Sung, J. S. 2019. Analysis of antioxidant activity and serotonin derivatives in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm collected from five countries. *Kor. J. Plant Res.* **32**, 423-432.
4. Kedare, S. B. and Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412-22.
5. Kubo, H. and Hoshi, M. 1985. Elimination of silica gel from gangliosides by using a reversed-phase column after preparative thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* **26**, 638-641.
6. Lee, E. W., Kim, T. W., Kim, H. S., Park, Y. M., Kim, S. H., Im, M. H., Kwak, J. H. and Kim, T. H. 2015. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effects of ethanolic extract of *Ainsliaea acerifolia* and organic solvent-soluble fractions. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 275-280.
7. Lee, Y. K., Lim, K., Hwang, S. H., Ahn, Y. H., Shin, G. T., Kim, H. and Park, I. W. 2016. Metformin induced acute pancreatitis and lactic acidosis in a patient on hemodialysis. *Yeungnam Univ. J. Med.* **33**, 33-36.
8. Nam, J. H., Lee, S. H., Lee, H. J., Han, J. H., Kim, J. G., Ha, S. W. and Kim, B. W. 1999. The prevalence of chronic complications in non-insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Metab. J.* **23**, 702-714.
9. Pyo, S. E., Choi, J. S. and Kim, M. R. 2017. Anti-diabetic mechanism of melania snail. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 1007-1016.
10. Song, Y. D. 2006. Types, effects and side effects of oral hypoglycemic agents. *The Monthly Diabetes* **196**, 20-24.
11. Song, Y. H., Uddin, Z., Jin, Y. M., Li, Z., Curtis-Long, M.

- J., Kim, K. D., Cho, J. K. and Park, K. H. 2017. Inhibition of protein tyrosine phosphatase (PTP1B) and α -glucosidase by geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 1195-1202.
12. Tailor, C. S. and Goyal, A. 2014. Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *Am. J. Ethnomed.* **1**, 244-249.
13. Ukkola, O. and Santaniemi, M. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. *J. Intern. Med.* **251**, 467-475.
14. World Health Organization (WHO). 2016. Global report on diabetes. pp. 1-88. Geneva, Switzerland.
15. Xing, Z. Z., Xiao, Y. L. and Jin, L. 2004. Recent pharmacological studies on natural products in China. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 221-230.
16. Zhang, B. B. and Moller, D. E. 2000. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 461-467.
17. Zhou, Y., F. W., Yanming, H., Qiang, Z., Yuan, Z., Guangrong, Z., Hongjie, Y. and Ping, Z. 2018. A novel PTP1B inhibitor extracted from *Ganoderma lucidum* ameliorates insulin resistance by regulating IRS1-GLUT4 cascades in the insulin signaling pathway. *Food Funct.* **9**, 397-406.

초록 : 항당뇨 효능이 있는 천연물의 탐색 및 활성물질의 분석

이화신^{1†} · 박보배^{1,2} · 유선녕^{1†} · 김민지³ · 배윤진³ · 이이룬³ · 이예은³ · 김시윤³ · 심윤호³ · 안순철^{1*}

(¹부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실, ²미국 텍사스주립대학교 의과대학 분자의학 교실, ³물금고등학교,)

현대인들의 식습관 변화로 인해 대사성 질환의 발생률이 증가하고 있으며, 특히 당뇨병이 가장 큰 문제로 꼽힌다. 하지만 기존의 당뇨병 치료제는 부작용을 동반하고 있어서 예로부터 쓰이던 천연물을 통해 부작용이 적은 항당뇨 활성 물질을 찾고자 하였다. 따라서 본 실험에서는 항당뇨 및 항산화 활성이 있는 천연물을 탐색하기 위하여, DPPH free radical scavenging assay와 α -glucosidase 및 PTP1B inhibition assay를 이용하였다. 항당뇨 효능이 예상되는 12가지의 시료를 메탄올로 추출하고 항당뇨 활성 및 항산화 활성을 측정하였다. 그 중 항당뇨 활성이 우수한 느릅나무, 벌나무 가지, 연 씨앗, 홍화 씨앗 등의 4가지 시료를 대상으로 에틸아세테이트, 부탄올을 이용하여 활성물질을 용매추출하여 항당뇨 활성을 측정하였다. 그 결과, α -glucosidase와 PTP1B 저해활성이 우수한 홍화 씨앗의 에틸아세테이트 분획물(MG-11-E)을 선정하였다. MG-11-E를 대상으로 preparative thin layer chromatography를 수행한 결과, 분획물 #6에서 α -glucosidase 및 PTP1B에 대한 우수한 저해활성을 보였다. 50% 메탄올을 이동상으로 하여 TLC 분획물 #6을 high performance liquid chromatography하여 각각을 분획하고 항당뇨 활성을 측정한 결과, 단일 peak를 보인 RT 4분에서 항당뇨 활성이 확인되었다. 따라서 홍화 씨앗의 추출물의 항당뇨 효능을 나타내는 항당뇨 활성 성분은 PTP1B 보다 α -glucosidase에 대한 저해 활성이 더욱 강하게 나타나 PTP1B를 저해하는 천연물과 조합하여 사용함으로써 당뇨병에 대한 효과를 높일 수 있을 것으로 사료된다.