최 종
연구보고서

GOVP1200609830

GA 0566-05060

인슐린 분비 및 저항성 개선 기능이 있는 약용작물을 이용한 건강기능식품 개발

Development of functional food utilizing medicinal plant which ameliorates insulin secretion and insulin resistance

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농 림 부

자료출처 : 인슐린 분비 및 저항성 개선 기능이 있는 약용작물을 이용한 건강기능식품 개발 / 농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “인슐린 분비 및 저항성 개선 기능이 있는 약용작물을 이용한 건강기능식품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 13일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
총괄연구책임자 : 김혜영
세부연구책임자 : 류미라
세부연구책임자 : 홍석산
세부연구책임자 : 이영철
연 구 원 : 김현구
연 구 원 : 강문희
연 구 원 : 김 경

요 약 문

Ⅰ. 제 목

인슐린 분비 및 저항성 개선 기능이 있는 약용작물을 이용한 건강기능식품 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 인슐린 분비를 개선시키거나 인슐린 저항성을 개선하는 효과가 있는 약용작물을 이용하여 내당능 장애 혹은 당뇨병 전단계를 개선하여 당뇨병 발병 위험을 감소시킬 수 있는 건강기능식품을 개발함이다.

농산물 시장 개방 시대에 부응할 수 있는 고소득 대체 작물을 제시하여 농촌경제의 활성화를 이루고 가공 및 유통 과정에서의 소득 창출과 고용 증대를 꾀하고자 함에 본 연구의 필요성이 있다.

최근 소득 수준의 향상 및 의료 기술의 발달로 수명이 연장되어 인구의 노령화가 가속화되어, 당대사의 이상에서 오는 당뇨병의 이병률이 급증하고 있다. 당뇨병을 예방할 수 있는 건강기능식품의 개발이 경제적 사회적 측면에서도 필요하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 구명
   - 인슐린 분비 촉진 성분의 분리 및 화학구조 결정
   - 인슐린 저항성 개선 성분의 분리 및 화학구조 결정
2. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 구명
   - 세포계에서의 인슐린 분비 촉진 작용 검정
   - 세포계에서의 인슐린 저항성 개선 작용 검정
   - 실험동물에서의 인슐린 분비 촉진 작용 확인

· 실험동물에서의 인슐린 저항성 개선 작용 확인

· 실험동물에서의 내당능 개선 작용 확인

3. 약용작물을 이용한 건강기능식품 제조 공정 확립

· 이화학적 특성 분석

· 내당능 장애 개선 성분 추출 및 농축의 최적화

· 내당능 장애 개선 식품 제조 공정의 표준화

· 대량 생산 공정 확립

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

본 연구에서는 내당능 장애을 개선할 수 있는 건강기능식품의 원료가 되는 약용작물로서 여주를 발굴하였다. 내당능 장애 발생의 가장 주요한 기작인 인슐린 분비 장애 및 인슐린 저항성에 있어서, 여주가 어떻게 작용하는지를 *in vitro* 실험 및 동물실험으로 규명함으로써 기능성을 입증하였다. 건강기능식품 제조의 지표성분을 설정하여 최적 제조 공정을 확립하였다. 추출 공정 방법으로부터 건강기능식품 원료의 후보를 선정하였다.

2. 연구결과 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 인슐린 분비 및 저항성 개선 기능이 있는 약용작물을 이용하여 당뇨병을 예방할 수 있는 건강기능식품 후보를 선정하였다. 연구결과는 국내 특허 출원 완료하였으며, SCI 논문 게재완료 1건, 투고중 2건의 성과가 있었다. 또한 건강기능식품 관련 업계에 기술이전할 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Development of functional food utilizing medicinal plant which ameliorates insulin secretion and insulin resistance

II. Purpose and significance of the research

The purpose of the research was to develop the functional food for curing pre-diabetes utilizing the medicinal plant which ameliorates insulin secretion and insulin resistance.

III. Contents and scope of the research

1. Isolation and identification of the components which ameliorates insulin secretion and insulin resistance from the medicinal plant

· Isolation and identification of the components which ameliorates insulin secretion from the medicinal plant

· Isolation and identification of the components which ameliorates insulin resistance from the medicinal plant

2. Efficacy of the activity in insulin secretion and in insulin resistance of the medicinal plant

· In vitro and in vivo efficacy of the activity in insulin secretion of the medicinal plant

· In vitro and in vivo efficacy of the activity in insulin resistance of the medicinal plant

3. Manufacturing process for the functional food from the medicinal plant

· Physico-chemical characteristics

· Condition for extraction, filtration, concentration and drying of the active components

· Standardization of the manufacturing process for the functional food

CONTENTS

Summary

Chapter 1. Outline of the research project

1. Purpose of the research

2. Significance of the research

3. Content and scope of the research

Chapter 2. State of the art

Chapter 3. Contents and results of the performance of the research

1. Methods

2. Results

Chaper 4. Degree of the purpose-performance and contribution for the related sciences

Chapter 5. Plans for using the results

Chapter 6. Foreign information about sciences and technologies collecting during the research performance

Chapter 7. Literature cited

목 차

목 차 7

제 1 장 연구개발과제의 개요 15

제 1 절 연구개발의 목적 15

제 2 절 연구개발의 필요성 15

1. 기술적 측면 15

2. 경제·산업적 측면 17

3. 사회·문화적 측면 18

제 3 절 연구개발의 범위 20

제 2 장 국내외 기술개발 현황 21

제 1 절 원재료의 특성 21

제 2 절 혈당조절용 소재의 기술 개발 현황 21

1. 발병 위험 감소를 목표로 하는 질병에 대한 설명 21

가. 당뇨병 21

나. 내당능 장애 혹은 당뇨병 전단계 22

2. 혈당조절용 소재의 기술 개발 현황과 전망 23

가. 국외 기술 동향 23

나. 국내 기술 동향 23

다. 현 기술 상태의 취약 부분 24

라. 앞으로의 전망 24

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 25

제 1 절 이론적 실험적 접근 방법 25
1. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 구명 25
가. 원재료 (plant material) 25
나. 용매에 의한 추출 25
다. 용매에 의한 분획 25
라. Solid phase extraction (SPE) 26
마. Silica gel chromatography에 의한 정제 26
바. Semi-preparative HPLC에 의한 정제 27
사. HPLC에 의한 정제 27
2. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 측정 27
가. 세포배양계에서 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 측정 27
나. 생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 검증 28
3. 약용작물로부터 기능성 소재 제조 공정 확립 31
가. 이화학적 특성 분석 31
나. 사포닌 정성 및 정량 분석 32
다. 최적 제조 조건 확립 33
제 2 절 연구내용 및 결과 33
1. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용 구명 33
가. 약용작물의 세포배양계에서의 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 33
나. 약용작물의 생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 45
2. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 규명 58
가. 약용작물로부터 인슐린 분비 성분 분리 58

나. 약용작물로부터 인슐린 저항성 개선 성분의 분리 68
다. 약용작물로부터 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분의 구조 동정 73
3. 약용작물을 이용한 건강기능식품 제조 공정 확립 84
가. 원재료의 이화학적 특성 분석 84
나. 여주의 최적 추출 조건 확립 89
다. 여주를 이용한 건강기능식품의 제조 93
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 97
제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점 97
제 2 절 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 98
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 99

<표 차례>

표 1. 여주의 부위별 물 추출물이 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비에 미치는 영향 36

표 2. 여주의 부위별 50% ethanol 추출물의 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비 효과 37

표 3. MC-AEE 및 MC-SF의 6주간의 투여가 Wistar 및 GK rats의 체중, 식이섭취량 및 간중량에 미치는 영향 46

표 4. Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose. Plasma glucose and insulin levels during OGTT at 13 weeks of ages after 6-week administration of MC-SF (2mg/kg BW). 52

표 5. Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose. Area under the curve (AUC) of plasma glucose and AUC of plasma insulin during OGTT in GK and Wistar rats after 6-week administration of MC-SF (2mg/kg). 53

표 6. MC-AEE 및 MC-SF의 6주간 투여가 Wistar 및 GK rat의 공복시 혈당 및 인슐린치에 미치는 영향 54

표 7 MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 Wistar 및 GK rat의 췌장 인슐린 함량 (μg/g 췌장)에 미치는 영향 54

표 8 MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 위스타 쥐 및 지케이 쥐의 hyperinsulinemic-euglycemic clamps에서 whole-body glucose disposal rate에 미치는 영향. 55

표 9 MC-AEE 및 MC-SF의 8주간의 투여가 ICR 및 NOD mice의 체중 및 식이섭취량에 미치는 영향 56

표 10 MC-AEE 및 MC-SF의 8주간의 투여가 ICR 및 NOD mice의 혈당치에 미치는 영향 57

표 11 MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 ICR 및 NOD mice의 췌장 인슐린 함량 (μg/g 췌장)에 미치는 영향 58
표 12 여주 미숙과의 50% 에탄올 추출물의 용매 분획물의 흰쥐 췌장 소도에서의 인슐린 분비 촉진 효과 60
표 13 여주 씨의 50% 에탄올 추출물의 용매 분획물의 흰쥐 췌장 소도에서의 인슐린 분비 촉진 효과 60
표 14 여주의 SPE 분획물이 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비에 미치는 영향 62
표 15 Silica gel column chromatography로 분획한 분획물의 인슐린 분비 효과 (평균±표준편차, n=3). 65
표 16 화합물 1 및 2의 인슐린 분비 효과 (평균 ± 표준편차, n=3) 67
표 17. 여주 미숙과 추출물의 용매 분획물의 포도당 이동 효과 68
표 18 Solid phase extraction 흡착물의 포도당 이동 효과 69
표 19 LC-18 SPE 분획물의 포도당 이동 효과(평균 ± 표준편차, n=3 70
표 20 Silica gel column chromatography에 의한 분획물의 포도당 이동 촉진 효과 (평균±표준편차, n=3) 71
표 21 HPLC에 의해 분리한 화합물의 포도당 이동 촉진 효과 (평균±표준편차, n=3) 73
표 22 열・산・알칼리 처리를 한 여주 미숙과 50% ethanol 추출물의 포도당 이동효과 77
표 23 위장관액 처리를 한 여주 미숙과 50% ethanol 추출물의 포도당 이동효과 78
표 25 추출 용매의 종류 및 조성이 미숙과 50% ethanol 추출물의 포도당 이동효과에 미치는 영향 79
표 25 추출용매가 여주 미숙과로부터 조사포닌 추출에 미치는 영향(단위는 ㎍/㎎ 추

출물임) 80

표 26 추출온도가 여주 미숙과로부터 조사포닌 추출에 미치는 영향 80

표 27 추출시간이 여주 미숙과로부터 조사포닌 추출에 미치는 영향 81

표 28 진공감압건조기를 이용한 농축에서 농축 온도가 농축 효율에 미치는 영향 82

<그림 차례>

그림 1 배지의 포도당 농도가 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비량에 미치는 영향. 35

그림 2 배지의 포도당 농도가 여주 미숙과의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과에 미치는 영향. 38

그림 3 배지의 포도당 농도가 여주 씨의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과에 미치는 영향. 39

그림 4 인슐린의 3T3-L1 지방세포내로의 포도당 이동 효과 40

그림 5 여주의 물 추출물(0.5mg/mL)의 3T3-L1 지방세포에서의 포도당 이동 효과. 41

그림 6 여주의 50% ethanol 추출물(0.5mg/mL)의 3T3-L1 지방세포에서의 포도당 이동 효과. 42

그림 7 여주 미숙과의 50% ethanol 추출물의 지방세포에서의 포도당 이동 효과. 44

그림 8 Combined effect of insulin and unripe fruit extract on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes 45

그림 9 Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose. 47

그림 10 Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose 50

그림 11 Solid phase extraction column(SPE)에 의해 분리된 성분의 인슐린 분비 활성. 61

그림 12 여주 미숙과의 n-butanol 층 및 SPE 분획층을 동일한 조건으로 분석하였을 때의 HPLC chromatogram. 63

그림 13 여주의 preparative HPLC 분획물의 인슐린 분비 효과 66

그림 14 F-3 분획물의 HPLC chromatogra 67

그림 15 G-5 분획물의 HPLC chromatogram 72

그림 16 G-6 분획물의 HPLC chromatogram 72

그림 17 열, 산, 알칼리 처리를 한 여주 미숙과 및 씨의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과 74

그림 18 위장관액 처리를 한 여주 미숙과(위쪽) 및 씨(아래쪽)의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과. 75

그림 19 다양한 유기용매를 이용해 추출된 여주미숙과 추출물의 농도별 인슐린 분비 활성 76

제 1 장　연구개발과제의 개요

제 1 절　연구개발의 목적

인슐린 분비를 촉진시키거나 인슐린 저항성을 개선하는 효과가 있는 약용작물을 이용하여, 내당능 장애 혹은 당뇨병 전단계를 개선하여 당뇨병으로의 진행을 예방할 수 있는 건강기능식품을 개발하고자 함

1.　제 2 절　연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

국내에서 재배되는 약용작물은 일반 작물에 비해 국제 경쟁력이 높아 2000년 전국 재배 면적이 9,926 ha, 생산량 30,141 M/T에 달하고 있으나 그 가공 방법은 아직 단순한 차원에 머물고 있어서 고부가가치화를 위한 기술 개발이 필요하다. 국내 약용작물 가공산업은 각 지역 단위별 가공 공장에서 특산품 가공 형태로 이루어져 제품의 품질이 낮으며 시장도 미비하므로 약용작물 가공산업 활성화를 위한 기술 개발이 필요하다. 현재 대부분의 약용작물 가공 제품들은 다류와 단순 가공식품, 여러 식물의 혼합 건강 식품류 등이어서 부가가치가 낮으므로, 성분의 추출 정제를 통한 고부가가치를 창출할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

건강증진 및 질병위험 감소 효과가 전통적으로 알려져 온 약용작물일지라도, 가공식품으로 개발하기 위하여는 과학적 효능 입증 및 그 작용 기작 및 활성 성분의 구명이 필요하다.

건강기능식품에 대한 사회적 관심이 높아지고 시장이 확대됨에 따라 정부는 효능이 입증되지 않은 기능성 식품에 대한 폐해를 막고 소비자를 보호하기 위하여 2002년 '건강기능식품에 관한 법률'을 제정 공포하였으며, 시행령, 시행규칙, 각종 고시가 제정되어 2004년 1월 31일부터 시행되고 있다. 이 법에 의하면 건강기능식품의 표시(health claim) 및 광고를 위하여 기능성에 대한 유효성 평가를 시행하여 이에 대한 결과를 확보하도록 되어 있다. 이 법의 인정을 받을 수 있는 객관적인 실험 수행 기술 개발이 필요하다.

건강기능식품법의 '기능성'은 영양소 기능, 건강유지 개선 기능, 질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련된 기능 등을 의미한다. 건강기능식품의 규정에 맞도록 혈당조절 효과를 객관적으로 입증하는 기술의 개발이 필요하다.

혈당 조절 부전에 의하여 발병하는 당뇨병은 췌장 베타세포의 기능 장애에 의해 인슐린 분비가 부족하거나, 말초 조직에서의 인슐린 저항성 때문에 생기는 당 이용율 저하 또는 양자의 결함 때문에 발생한다. 따라서 이러한 당대사 이상에 의해 발생하는 당뇨병은 적절한 식이요법을 통하여 그 예방이 가능하다는 점에서 특히 건강기능식품 개발이 중요한 의미를 갖고 있다. 이러한 사회적 필요성에 비추어 혈당조절 관련 건강기능식품은 혈당 조절 부전이 나타내는 기전에 따라 건강기능식품이 개발될 필요성이 있다. 즉 인슐린 분비를 자극하여 혈당조절에 도움을 줄 수 있는 기능성 식품, 말초조직에서 당대사의 효율을 향상시킴으로써 혈당 조절에 도움을 줄 수 있는 기능성 식품 등이 있을 수 있으며, 이 두 기전을 동시에 만족하는 복합 기능의 기능성 식품의 개발이 필요하다.

당뇨병이 아직 발병하지는 않았으며 혈당치가 정상인과 당뇨환자의 중간 정도인 상태를 내당능 장애 혹은 당뇨병 전단계라고 한다. 내당능 장애의 원인은 췌장의 인1·

슐린 분비 장애 및 말초 조직의 인슐린 저항성이다. 내당능 장애가 시작되면 5년 안에 25%, 10년 안에 60%가 당뇨병으로 악화된다는 통계도 있다. 따라서 비교적 치유가 쉬운 내당능 장애 때 건강을 되찾으면 각종 성인병을 예방할 수 있다.

최근 의학자들은 내당능 장애가 노화가 진행되면서 많은 사람들이 겪으며 성인병으로의 이환률이 높기 때문에 내당능 장애에도 약물 치료가 필요하다고까지 주장하고 있다. 그러나 내당능 장애는 질환이라고 보기에는 아직 이르며, 약물 치료는 그 부작용을 고려할 때 바람직하지 않다. 따라서 내당능 장애를 개선할 수 있는 건강기능식품의 개발이 필요하다. 이는 건강기능식품은 성인병의 치료보다는 예방에 초점을 맞추어야 더 효과적이라는 개념에도 부합한다.

2. 경제・산업적 측면

WTO 체제와 UR 타결 이후 생산비와 국제 가격을 비교한 가격 경쟁면에서 쌀, 콩, 사과, 배, 감귤, 고추 등 주요 작물의 국제 경쟁력은 낮아져서 이들 작물의 생산량은 감소하고 재배 면적이 감소하는 추세이며 이에 따라 농지 전용, 한계 농지 등이 발생하고 있다. 따라서 경쟁력 있는 약용작물의 발굴이 필요하다.

지역 경제를 활성화하며 지역 균형 발전의 기반을 제공하기 위하여 고부가가치 소재로 활용 가능한 지역적 특산 약용작물을 육성할 필요가 있다.

우리나라도 이미 고령화 사회에 진입하고 있으며 2020년에는 60세 이상 인구가 800만명에 달할 것으로 예상된다. 노인 인구의 40%가 내당능 장애를 겪으므로 이를 위한 건강기능식품의 개발이 필요하다.

전국민 의료보험의 확대 및 건강에 대한 높은 관심 등으로 정기 건강 검진 실시가 보편화되어 자신의 혈당치를 알기가 쉬워서 당뇨병 발병 위험군이 증가할 것이며 이

들을 위한 건강기능식품의 개발이 필요하다.

성인병으로 인한 노동력 상실과 더불어 연간 2조원을 상회하는 성인병 관련 의료비 지출이 증가하면서 국가 재정에 막대한 지장을 초래할 것이므로 이의 예방이 필요하다.

세계 기능성 식품 시장은 2002년 기준으로 2천억 불 정도의 규모를 가지고 있으며 1995년 이후 연평균 8-11%의 시장 성장률을 나타내고 있어 2010년에는 5천억 불 규모로 예측된다. 국내 기능성 식품 시장은 2002년 매출을 기준으로 약 2조 1000억원 정도이고 1998년 이후 매년 20-30%의 성장을 이루고 있어 2010년에는 세계 시장의 10%에 육박할 것으로 추정된다. 건강기능식품 시장 규모는 국내 생산 및 판매액과 수입액을 합쳐 약 3조 4000억원으로 추정되며 통상 기능성 식품이라 생각되는 품목군(건강보조식품, 특수영양식품, 인삼 제품류)은 6600억원의 시장 규모를 가지고 있어 기능성 식품 시장의 20%를 점유하고 있으며 80%에 해당하는 건강 표방 식품이 판매되고 있다. 그러나 건강기능식품의 시장은 제품의 생산액과 매출액의 차이가 커 생산실적 규모로 6600억원의 시장을 나타내고 있는 시장이 실제 유통 시장에서는 1조 5000억원 규모로 추산되고 있는 것이 현실이다.

3. 사회・문화적 측면

계속되는 이농 현상의 증대와 도시로의 집중 유입은 인구문제, 환경 오염 등을 야기하여 큰 사회 문제인 바, 농가 소득을 증대시킬 수 있는 고부가가치 작물을 발굴할 필요가 있다.

최근 당뇨병 발병의 주요 원인이 식생활에 있다는 것이 밝혀지고, 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강 증진 내지 질병 예방을 위한 접근 방법

의 하나로 건강기능식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 식생활의 서구화와 고령화 등으로 당뇨병이 급증하고 있으며, 이로 인해 향후 10년 이내에 환자와 가족 등 우리나라 국민의 4분의 1 정도인 1천 200만명 가량이 당뇨합병증으로 직간접적 피해를 입는 당뇨대란이 우려된다는 경고가 나왔다. 대한당뇨병학회는 2002년 4월 '한국인 당뇨병 발생 현황' 보고서를 통해 우리나라 성인의 당뇨병 유병률은 10% 선으로 최소 300만명에서 최대 500만명 정도가 당뇨병 환자로 추정되고 있으며, 동물성 식품과 지방질 섭취의 증가와 신체 활동량 감소, 노령 인구 증가, 생활 양식의 서구화 등으로 증가 추세에 있다고 주장하였다. 국내 인구의 20%를 차지하는 베이비붐 세대(1955-63년생)가 현재 당뇨병이 가장 많이 발병하는 연령대인 40-50세에 이르렀으며, 심장과 신장, 시력 등의 기능 저하 같은 완치 불가능한 당뇨합병증이 당뇨병 발병 뒤 10년 후에 최고조에 달한다는 점을 감안할 때 2010년 이후에는 당뇨병 환자는 전 국민의 4분의 1인 천만명에 육박할 것으로 전망된다. 따라서 당뇨병의 발병을 예방할 수 있는 건강기능식품의 개발이 필요하다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 구명

   · 인슐린 분비 촉진 성분의 분리 및 화학구조 결정

   · 인슐린 저항성 개선 성분의 분리 및 화학구조 결정

2. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 구명

   · 세포계에서의 인슐린 분비 촉진 작용 검정

   · 세포계에서의 인슐린 저항성 개선 작용 검정

   · 실험동물에서의 인슐린 분비 촉진 작용 확인

   · 실험동물에서의 인슐린 저항성 개선 작용 확인

   · 실험동물에서의 내당능 개선 작용 확인

3. 약용작물을 이용한 건강기능식품 제조 공정 확립

   · 이화학적 특성 분석

   · 내당능 장애 개선 성분 추출 및 농축의 최적화

   · 내당능 장애 개선 식품 제조 공정의 표준화

   · 대량 생산 공정 확립

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 원재료의 특성

본 연구의 원재료인 여주 (Momordica charantia Linn.)는 박과(Cucurbitaceae family)의 일년생 덩굴 약용작물이다. 여주는 아시아 지역이 원산지이며 6~8월에 노란색 꽃이 피며 8~9월에 붉은 빛이 도는 황색의 과실이 군데군데 달리는데 타원형의 과실 전체에 혹같은 돌기가 있고 완숙되면 끝이 3개로 갈라지고 홍색의 육질로 둘러싸인 무늬가 있고 납작한 타원형 종자가 그 안에 들어 있다. 여주는 식품 제조 가공의 주원료로 식품의약품안전청의 식품원료 리스트에 등재되어 있다. 여주의 혈당강하 작용은 전통적으로 알려져 왔으나 과학적 연구를 통한 입증이 미흡하였으며 그 작용 기작 및 활성 성분에 대한 구명은 더욱 미약하였다. 본 연구진은 여주의 혈당강하 기작으로서 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용을 in vitro 세포배양계를 이용하여 확인하였다. 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용의 세포 배양 실험은 기술상의 제약 때문에 기능성 식품 분야에서 시도되지 못하였다.

실험동물에게 streptozotocin 또는 alloxan을 투여하여 췌장의 β-cell에 손상을 준 후 여주를 쥬스나 추출물의 형태로 공급했을 때 혈당강하효과를 나타내었으며, 당뇨 합병증의 진행을 늦추어 보호 효과를 보였다.

제 2 절 혈당조절용 소재의 기술 개발 현황

1. 발병 위험 감소를 목표로 하는 질병에 대한 설명

가. 당뇨병

당뇨병은 혈중 포도당 농도가 비정상적으로 지속적으로 상승된 대사성 질환이다. 만성적인 고혈당증은 단백질의 비효소적 당화, 삼투압 및 대사과정에 영향을 미쳐, 결국 신경장애, 신장질환, 안질환 및 심혈관계 질환과 같은 당뇨병성 합병증을 일으키며 이로 인해 하지절단, 말기 신부전증, 시력상실 및 심근경색과 같은 심각한 결과를 초래한다.

당뇨병은 제 1형과 제 2형으로 분류하며, 제 1형 당뇨병은 당뇨환자의 약 10%를 차지하며, 30세 이하에서 주로 발생한다. 제 2형 당뇨병은 당뇨환자의 약 90% 이상을 차지하며 주로 45세 이상에서 발병한다.

제 1형 당뇨병은 췌장의 자가면역질환으로 인슐린을 생산하는 베타세포의 파괴가 그 원인이 되며, 제 2형 당뇨병은 간, 근육, 지방조직과 같은 표적 세포의 인슐린 저항성과 췌장 베타세포의 인슐린 분비 장애 등이 특징으로 나타난다.

나. 내당능 장애 혹은 당뇨병 전단계

소장을 통하여 흡수된 혈중 포도당을 간이나 근육 등 포도당이 이용될 수 있는 조직으로 이동시켜서 혈당치를 낮추는 현상은 체내에서 자연적으로 일어나며 흡수된 포도당에 견딘다는 의미로 내당능(耐糖能; glucose tolerance)이라고 하며, 이 능력의 저하를 내당능 장애라고 한다. 내당능 장애는 의학적으로 당뇨병의 전(前)단계로서 혈당치를 기준으로 정상인과 당뇨병의 중간 사이를 의미하며, pre-diabetes라 지칭하기도 한다.

내당능 장애의 진단은 다음과 같다. 세계보건기구(WHO)의 기준에 따르면 공복 혈당이 140mg/dl 이상이고, 식사 2시간 뒤 혈당이 200mg/dl 이상이면 당뇨병이다. 이에 비해 내당능 장애는 공복 혈당이 110-140 mg/dl 이고 식사 2시간 뒤 혈당이 140-200mg/dl 인 경우에 해당된다. 1997년 미국 당뇨병학회는 식사 뒤 혈당은 따지지 말고 공복 혈당이 126mg/dl 이상이면 당뇨병, 110-125mg/dl 이면 내당능 장애라는 새 진단 기준을 내놓았다. 각국에서는 두 기준을 함께 쓰고 있다. 내당능 장애는 혈중 포도당을 에너지원으로 쓰기 위해 간이나 근육에 저장시키는 호르몬인 인슐린의 생성이나 작용과 관계 있다. 내당능 장애의 발생 원인은 췌장 β 세포에서의 인슐린 분비 기능의 장애와 말초 조직의 인슐린 저항성이다. 예전에는 내당능 장애일 때 약물 치료법보다 운동 식이요법 등을 통해 당뇨병이나 기타 질환으로 진행되는 것을 막

는 것이 최선이라고 여겼지만 2000년 국제당뇨연맹 등에서는 내당능 장애도 약물 치료가 필요하다고 지침을 바꿨다. 내당능 장애는 노화와 밀접한 관련이 있는 현상으로 그 발생 빈도는 연령 증가에 따라 증가된다. 국내의 역학 조사에 의하면 60세 미만 인구 중 15%, 60세 이상 인구 중에는 40%가 내당능 장애를 겪고 있는 것으로 추정된다. 즉 노화가 진행되면서 거의 모든 사람에게 발생한다.

내당능 장애 상태가 지속되면 당뇨병, 비만, 고혈압, 심장병, 동맥경화 등 각종 성인병으로 이환될 가능성이 높다. 즉 성인병은 갑자기 발병하는 것이 아니라 성인병 환자의 대부분이 발병 전에 일정 기간 동안 내당능 장애 상태로 있다가 성인병 발병의 중요한 다른 인자가 작용함으로써 발병하게 된다.

2. 혈당조절용 소재의 기술 개발 현황과 전망

가. 국외 기술 동향

당뇨병을 예방하거나 개선하기 위한 기능성 식품은 국외에서는 활발히 개발되고 있다. 미국 시장에 당뇨 개선용 기능성 식품으로 이미 출시되었거나 출시 예정인 제품으로는 수용성 식이섬유, 무기질류, 아미노산류, 대사 조절제, 허브류, 지방산류 등이 있다 (Annual Bibliography of significant advances in dietary supplement research, Office of Dietary Supplement, NIH 1999-2000).

2001년도 일본의 특정보건용 식품 시장에서 매출 기준으로 혈당강하 제품은 5% 차지하였다. 일본의 혈당 개선 관련 특정보건용 식품은 2001년 현재 전체 승인 품목 299건 중 33건 (11%)이었다. 매출 구성은 전체 매출 4,120억엔 중 184억엔 (4.5%)이었다. 대표 품목은 Yakult사 및 Calpis사의 제품이다. 소재별로 살펴보면 non-digestible dextrin, polyphenol, 소맥 알부민, L-arabinose 등이 주종이었다. 제형별로는 청량음료수 (분말, 녹차 제형 포함; 21건, 구성 비율 64%), 분말스프 제형 (3건, 구성 비율 9%), 즉석 백반 (2건, 구성 비율 6%), 기타 (된장국, 과립 감미료, 충진 두부 등, 7건, 구성 비율 <21%) 등이다.

나. 국내 기술 동향

2005년 2월 11일 국내에서는 바나바 (banaba; Lagerstroemia speciosa Pers.) 추출

물이 “식후 혈당을 조절하는 기능”에 대하여 식약청으로부터 개별인정형 건강기능식품 원료로 허가를 받았다.

다. 현 기술 상태의 취약 부분

당뇨병 환자는 우리나라만 약 500만명에 이르고, 전세계적으로 1억 8천 5백만명이 당뇨병으로 시달리고 있으며 이로부터 직간접적으로 미치는 경제적 손실은 1300억불(150조원)로 추산하고 있다. 당뇨병은 족부절단, 망막증으로 인한 시각손실, 신장병 및 심혈관질환 등 매우 심각한 후유증을 나타내고 당뇨병의 발병율이 매년 급증하고 있으며, 병의 지속에 의해 여러 합병증 유발과 결국 사망까지 초래하는 심각한 질환이지만 아직까지 시판되어온 당뇨병 치료제는 부작용을 나타내는 경우가 많이 있으며 30-50%의 당뇨병 환자에게는 뚜렷한 치료효과를 나타내지 못하는 실정이다. 특히 기존약물로 치료효과가 미미하였던 내당능 장애자 (impaired glucose tolerance), 공복혈당장애자, 당뇨초기환자, 당뇨발병위험 환자군의 예방 소재의 개발이 필요하다.

국내에서 인슐린 분비 및 저항성 개선 기능이 있는 약용작물에 대한 과학적 연구는 전무하였으며, 따라서 활용 기술도 개발되지 못하였다. 국외에서는 약용작물의 인슐린 대체 효과에 대하여는 민간요법으로 전해 왔으나 인슐린 분비 및 작용 개선 기작 구명, 활성 성분 구명 등에 관한 연구가 미흡한 실정이다. 국외에서도 아직 약용작물의 인슐린 분비 및 작용 개선 효과를 이용하여 내당능 장애 개선 소재를 제조하고자 하는 기술 개발이 이루어지지 못하였다.

라. 앞으로의 전망

성인병은 발병하기 전에 예방하는 것이 더 중요하다는 인식이 확대되어 내당능 장애 개선용 식품의 수요는 높다. 평균 수명이 증가함에 따라 노화로 인한 내당능 장애를 가진 사람들이 증가하며 이를 위한 식품의 수요는 높다. 국내 건강기능식품도 이제는 작용 기작 및 활성 성분이 밝혀진 원료로 제조하여야 그 제품도 경쟁력이 높으며, 그 원료 작물도 부가가치가 상승할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 실험적 접근 방법

1. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 구명

가. 원재료 (plant material)

여주는 미숙과(unripe fruits), 과숙과(ripe fruits), 씨(seeds), 씨를 둘러싼 껍질 등 부위별로 준비하였다. 미숙과는 여물지 않은 씨를 포함하였다. 씨는 과숙과의 씨이며 상온에서 건조시켰다. 나머지 부위는 잘게 썰어서 동결 건조시켰다. 건조된 부위별 시료는 분쇄기로 분쇄하였다.

나. 용매에 의한 추출

시료에 시료의 10배의 물 혹은 50% 에탄올 (v/v)을 가하여 heating mantle에서 용매를 끓여서 추출하였다. 추출액을 식혀서 pore size 0.2 ㎛ 의 여과지로 여과하였다. 추출 및 여과 과정을 3회 반복하여 여과액을 합하였다. 물로 추출한 여과액은 동결 건조시켰다. 50% 에탄올로 추출한 여과액은 감압건조기로 농축시켜 부피를 1/5로 감소시킨 후 동결 건조시켰다.

다. 용매에 의한 분획

시료를 50% 에탄올로 추출하여 농축 건조시킨 것을 증류수에 1 g residue/20mL로 현탁시킨 후 분액여두(separatory funnel)에 넣고 증류수와 동량의 n-hexane (d=0.660), chloroform (d=1.484), ethyl acetate (d=0.898), 1-butanol (d=0.810)로 순차적으로 분획하였다.

라. Solid phase extraction (SPE)

여주 추출물의 활성 물질의 특성을 파악하기 위하여 solid phase extraction tubes에의 흡착 여부를 조사하였다. 사용한 tubes의 silica-based packing materials로서 reversed phase는 C_8, C_{18}, cyanopropyl bonded silica, phenyl bonded silica 등이었으며, normal phase는 silica gel, diol bonded silica, aminopropyl bonded silica 등이었으며, ion exchanger는 quaternary amine bonded silica with Cl counter ion, sulfonic acid bonded silica, weak cation exchanger bonded to silica 등이었다.

Supelclean LC-18 cartridge (60mL, 5g, Supelco, USA)를 methanol로 활성화시킨 후 증류수 60mL로 평형화시켰다. 증류수에 현탁한 butanol 분획물을 cartridge에 흡착시킨 후 증류수, 20% acetonitrile, 40% acetonitrile, 100% acetonitrile 각각 2000mL씩을 흘려서 fraction I, II, III, IV으로 분취하였다.

마. Silica gel chromatography에 의한 정제

SPE로 분획한 분획물 중에서 가장 활성이 높은 분획물을 methanol에 용해하여 silica gel (Silica gel 60; particle size 0.063~0.200mm; 70~230mesh ASTM, Merck)과 함께 섞은 후 dry oven에서 methanol을 완전히 휘발시켜 시료가 silica gel에 흡착되게 하였다. glass column(5×100cm)을 chloroform으로 씻은 후 silica gel (Silica gel 60; particle size 0.063~0.200mm; 70~230mesh ASTM, Merck) 1kg을 chloroform으로 습식충진 시킨 후 상층부에 시료를 chloroform으로 현탁하여 스포이드로 loading한다. 시료를 chloroform/methanol/water gradient (15/3/0, 10/3/0, 13/7/1, 6/4/1, 0/100/0)로 용출시켰다. 용출된 용액을 10mL씩 분취하여, 각각의 fraction을 60㎕씩 TLC plate (25TLC aluminium sheets, 20×20cm Silicagel gel 60 F_{254}, Merck)에 점적한 후 chloroform/methanol/water의 조성을 달리하여 전개하고(15/3/0, 10/3/0, 13/7/1,

6/4/1), 발색시약으로 30% 황산 용액을 spray한 후 105℃에서 5분 가열하여 발색한 후 spot pattern을 확인하여, 동일한 spot으로 확인되면 서로 합쳐 감압농축하였다.

바. Semi-preparative HPLC에 의한 정제

Silica gel column chromatography로 분획한 분획물 중에서 가장 활성이 높은 분획물을 syringe filter(PTFE 0.45㎛, Milipore)로 여과한 후 semi-preparatice HPLC로 정제하였다. 기기는 Waters Delta Prep 3000 (Waters, USA), column은 μBondapak C_{18} (125Å, 7.8×300mm, Waters)이었으며, UV 208nm에서 감지하였으며, 용매는 acetonitrille/water gradient를 사용하였다.

사. HPLC에 의한 정제

기기는 Jasco 사 제품이었으며, column은 Symmetry C_{18} (5㎛, 3.9×150mm)이었으며, UV 208 nm에서 감지하였으며, 용매는 acetonitrille/water gradient를 사용하였다.

2. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 측정

가. 세포배양계에서 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 측정

1) 흰쥐 췌장 소도에서 인슐린 분비 효과 측정

Collagenase와 ficoll gradient를 이용하여 흰쥐 췌장 소도를 분리하여, 인슐린 분비 효과 실험에 사용하였다. 흰쥐 췌장 소도를 배양하는 배양액에 시료를 첨가하여 대조군과 비교하였다. 시료를 첨가하여 1시간 동안의 인슐린 분비량을 측정하였다. 인슐린 측정은 enzyme immunoassay를 이용하였으며, rat insulin으로 표준곡선을 작성하여 함량을 계산하였다.

2) 생쥐 지방세포에서 인슐린 저항성 개선 작용 검증

인슐린 저항성이란 간, 근육, 지방 조직과 같은 인슐린 표적 세포가 인슐린에 대한 반응성이 감소하여, 포도당이 세포내로 이동 혹은 흡수(transport or uptake)되는 현상이 정상적으로 일어나지 않는 상태이다. 3T3-L1 전지방세포(preadipocyte)는 인슐린이나 그와 유사한 유도 물질의 존재 하에서 지방세포로 분화하는 특성이 있어 인슐린성 물질이나 인슐린 저항성 개선 물질을 탐색하고 인슐린 신호 전달 체계를 연구하는 모델로 많이 이용된다. 3T3-L1 지방세포에서는 바깥에서 안쪽으로 한 방향으로만 포도당의 insulin-stimulated specific transport가 일어난다. 이 세포에서 시료가 포도당을 세포 바깥에서 안쪽으로 이동시키는 것을 증가시키는지를 분석하였다.

ATCC에서 구입한 3T3L1 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), high glucose에서 배양하면서 70% confluency에서 subculture 하였다. 완전히 confluency 이룬 후 지방세포로 분화시켰다. 분화 유도 성분은 1 ㎍/mL human recombinant insulin (Eli Lilly), 0.1 ㎍/mL dexamethasone (Sigma), 0.12 mg/mL 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)이었다. 분화된 지방세포내로 2-deoxy-[^{3}H] glucose가 이동되는 정도를 washed and lysed cells의 radioactivity를 liquid scintillation counter로 측정하였다.

나. 생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과 검증

1) 제 2형 당뇨 모델 동물에서의 효과 검증

가) 투여 시료

MC-AEE 및 MC-SF

나) 실험 동물

유전적으로 인슐린 분비에 결함이 있어서 혈장 인슐린치가 낮으며 인슐린 저항

성도 가진 비만하지 않은 제2형 당뇨 모델쥐(non-obese Type 2 diabetes)인 Goto-Kakizaki (GK) rats를 사용하였다. GK rats를 유전적으로 변형하기 전의 정상적인 모델인 Wistar rats도 함께 실험하였다.

다) 투여 방법

생후 6주된 체중이 250-300 g인 GK 및 Wistar rats을 온도가 25℃, 실내습도가 40-60%로 잘 유지되는 사육실에서 충분한 사료 및 식수를 제공하여 사육하였다. 생후 7주가 되었을 때부터 생후 13주까지 6주 동안 시료를 20% ethanol에 용해하여 MC-AEE는 10mg/kg body weight의 용량으로, MC-SF는 2 mg/kg BW의 용량으로 1일 1회 경구로 투여하였다. 대조군은 동일한 부피의 20% 에탄올 용액을 경구 투여하였다.

라) 측정 항목

(1) 체중, 식이섭취량, 장기 중량

(2) 경구 포도당 부하 검사 (oral glucose tolerance test)

시료 투여가 끝나지 전 2일전에 수행하였다. 검사 당일 9시간 금식 후 포도당 용액 (400g/L)을 2g/kg of body weight 용량으로 경구 투여하였다. 포도당 투여 후 0, 30, 60, 120분에 안와정맥총을 통해 혈액을 채취하여 혈당 및 인슐린을 측정한다.

(3) 혈장 성분 : 공복시 혈당, 인슐린(fasting plasma glucose and insulin)

(4) 췌장의 인슐린 함량(pancreatic insulin content)

시료 투여가 종료된 후 흰쥐의 췌장을 적출한다. 림프절, 지방을 제거하고 물기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 적출한 췌장은 즉시 5 mL cold 2N acetic acid로 polytron homogenizer에서 균질화한 후, 100 ℃에서 10 분간 끓였다. 균질화한 용액을 4℃에서 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 액체 질소에서 냉동시켜서

인슐린을 분석할 때까지 -70℃에 보관하였다.

(5) Hyperinsulinemic-euglycemic clamp

시료 투여가 끝나기 2일전에 마취 하에 우측 내경 정맥에 도관을 삽입하고, 시료 투여가 종료되고 나면 120-min hyperinsulinemic euglycemic clamps (6 mU/kg/min for lean mice and 10 mU/kg/min for ob/ob mice)를 4시간 금식 후 20% 포도당 용액을 서서히 주입하면서 6.6 mmol/L 정도로 혈당을 유지시켰다. 매 15분마다 tail vein에서 혈액 채취하여 혈당을 측정하였다. Clamp test 후반부의 평균 포도당 주입 속도는 whole body glucose disposal을 나타내는 지표로 사용하였다.

2) 제 1형 당뇨 모델 동물에서의 효과 검증

가) 투여 시료

MC-AEE 및 MC-SF

나) 실험 동물

인슐린을 생성하여 분비하는 췌장 소도의 베타세포가 자가면역으로 파괴되어 인슐린 분비가 저하하는 제 1형 당뇨의 유전적 모델인 nonobese diabetic (NOD) mice를 이용하였다. NOD mice를 유전적으로 변형하기 전의 정상적인 쥐인 ICR mice도 함께 실험하였다.

다) 투여 방법

생후 4주된 NOD 및 ICR mice를 온도가 25℃, 실내습도가 40-60%로 잘 유지되는 사육실에서 충분한 사료 및 식수를 제공하여 사육하였다. 생후 5주가 되었을 때부터 생후 13주까지 8주 동안 시료를 20% ethanol에 용해하여 MC-AEE는 10mg/kg body weight의 용량으로, MC-SF는 2 mg/kg BW의 용량으로 1일 1회 경구로 투여

하였다. 대조군은 동일한 부피의 20% 에탄올 용액을 경구 투여하였다.

라) 측정 항목

(1) 체중, 식이섭취량, 장기 중량

(2) 혈장 성분 : 공복시 혈당, 인슐린(fasting plasma glucose and insulin)

(3) Insulitis의 판정

(4) 췌장의 인슐린 함량(pancreatic insulin content)

여주 투여가 종료된 후 흰쥐의 췌장을 적출한다. 림프절, 지방을 제거하고 물기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 적출한 췌장은 즉시 5 mL cold 2N acetic acid로 polytron homogenizer에서 균질화한 후, 100 ℃에서 10 분간 끓였다. 균질화한 용액을 4℃에서 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 액체 질소에서 냉동시켜서 인슐린을 분석할 때까지 -70℃에 보관하였다.

3. 약용작물로부터 기능성 소재 제조 공정 확립

가. 이화학적 특성 분석

여주를 섭취하면 소화 기관을 거치면서 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분이 변화될 수 있다. 또한 가공 처리도 성분에 영향을 줄 수 있다. 따라서 소화 흡수나 가공 처리에 의한 성분 변화를 알아보기 위하여 열, 산, 알칼리, 위액(gastric juice), 장액(intestinal juice) 등에 대한 안정성을 조사하였다.

열 안정성으로는 100℃에서 1시간 동안 끓였을 때의 활성의 변화를 시험하였다.

산 알칼리 안정성으로는 0.1N HCl, 0.1N NaOH에 대한 안정성을 시험하였다.

Simulated gastric juice는 70mM HCl 및 86mM NaCl(pH 1.82) 용액이었으며, 이 용액에 2% pepsin을 첨가한 용액에 대한 안정성도 시험하였다. Simulated intestinal

juice는 69mM NaCl, 48mM $NaHCO_3$, 5mM $CaCl_2$, 0.8mM urea, 0.3% BSA, 254mM TAPS가 함유된 용액(pH 8.8)이었으며, 여기에 2% amylase, trypsin, lipase, protease를 첨가한 용액에 대한 안정성도 시험하였다.

나. 사포닌 정성 및 정량 분석

여주의 추출, 여과, 농축의 최적 조건을 확립하려면 지표 성분이 설정되어야 한다. 그러나 기능 성분을 규명하는 연구를 본 연구에서는 진행중이며, 여주의 기능 성분이 기존에 밝혀져 있지 않다. 따라서 정제해 나아가는 과정 중의 분획물을 대상으로 정성 시험을 수행하여 기능 성분이 사포닌이라는 결과를 얻었다. 조사포닌 함량을 지표 성분으로 하여 실험실적으로 최적 조건 확립 연구를 수행하였다.

1) 사포닌 정성 시험

여주 분획물은 Libermann-Buchard 반응, 용혈 시험, $Ba(OH)_2$ 침전 반응에 의하여 정성적으로 조사포닌임을 확인하였다. 조사포닌은 sulfuric acid-vanillin method로 분석하였다.

가) Libermann-Buchard 반응 : 시료를 acetic anhydride에 녹여 진한 황산을 가하면 사포닌이 존재하면 색의 변화가 일어난다.

나) 용혈 시험 : 적혈구를 부풀려서 터뜨리는 사포닌의 성질에 기초한다. 흰쥐의 혈액으로부터 적혈구를 분리하여 phosphate buffered saline (pH 7.4)에 2%(v/v)으로 현탁하여 V-shaped wells을 가진 microtiter plates에 넣는다. 여기에 시료를 가하여 용혈로 인한 turbidity를 spectrophotometer로 읽는다.

다) $Ba(OH)_2$ 침전 반응 : $Ba(OH)_2$ 포화 용액에 시료를 가하여 침전 정도를 본다.

2) 사포닌 분석

Sulfuric acid-vanillin method : 시료(2mg/mL MeOH) 50㎕에 8% 바닐린 용액(in EtOH) 150㎕를 넣은 후 냉수조에서 75% 황산용액 2mL을 첨가하였다. 60℃에서 10분간 발색시킨 후 545nm에서 흡광도를 측정하였다. Saponin(BDH)으로 표준곡선을 작성한 후 농도를 계산하였다.

다. 최적 제조 조건 확립

1) 추출 조건 확립

20, 50, 70, 100% methanol 및 20, 50, 70, 100% ethanol, 0.1N acetic acid, 0.1N NH_4OH, 100% acetone 등 추출 용매에 따른 추출 효율을 측정하였다. 25, 50, 70℃ 등의 추출 온도에 따른 추출 효율을 측정하였다. 10분, 30분, 60분, 2시간, 5시간 등의 추출 시간에 따른 추출 효율을 측정하였다.

2) 여과 조건 확립

추출 후 실험실에서 가능한 방법으로 여과, 원심분리, trap filter의 3단계 공정을 적용하였다.

3) 농축 조건 확립

진공감압건조기를 이용한 농축 조건을 실험하였다.

4) 건조 조건 확립

열풍 건조, 냉동 건조, 분무 건조 등을 검토하였다.

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용 구명

가. 약용작물의 세포배양계에서의 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과

1) 흰쥐 췌장 소도에서의 인슐린 분비 촉진 효과

가) 포도당에 의한 인슐린 분비 효과

생체내에서는 혈당치가 상승하여 췌장 소도의 β 세포에 도달하면, β 세포는 포도당의 자극에 의하여 인슐린을 분비한다. 이 때 혈당치에 따라 인슐린의 분비량이 달라진다. 이를 세포 배양계에서 반영하여 흰쥐 췌장 소도를 배양할 때 배지의 포도당 농도에 따른 인슐린 분비량을 알아보았다. 그 결과 정상 상태의 혈당치를 반영한 포도당 농도인 3.3mM에서의 인슐린 분비는 0mM과 유의적 차이가 없었으며, 8.4mM에서 33.4mM까지의 포도당 농도에서는 농도 의존적으로 증가하지만, 100mM 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다. 본 연구에 사용한 췌장 소도 실험계에서는 포도당에 의하여는 30 ng/5 islets/60 min 이상의 인슐린 분비는 일어나지 않았다 (그림 1).

나) 여주 추출물의 인슐린 분비 촉진 효과

(1) 추출용매가 여주 추출물의 인슐린 분비에 미치는 영향

(가) 물 추출물의 인슐린 분비 촉진 효과

여주를 미숙과, 씨, 과숙과, 씨껍질의 4 부위로 준비하여, 물로 추출하여, 배지의 포도당 농도가 3.3 및 16.7mM 일 때, 인슐린 분비 효과를 검증하였다. 그 결과 모든 부위의 물 추출물은 포도당 농도가 3.3mM일 때 씨, 미숙과, 과숙과, 씨껍질의 순으로 효과를 높았다. 포도당 농도가 16.7mM일 때는 미숙과 및 씨만 유의적 효과를 보였다. 즉 여주 추출물은 배지의 포도당 농도가 낮을 때가 높을 때에 비하여 그 효과가 높았다(표 1).

(나) 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 촉진 효과

50% ethanol 추출물인 경우에도 씨, 미숙과, 과숙과, 씨껍질의 순으로 효과가 높았으며, 포도당 농도가 3.3 mM일 때가 16.7mM일 때에 비하여 효과가 높았다(표 2). 50% 추출물은 물 추출물에 비하여 효과가 1.5-2배 높았다. 따라서 인슐린 분비 효과

의 보다 정밀한 실험 및 활성 성분 정제 실험은 씨 및 미숙과의 50% ethanol 추출물로 수행하였다.

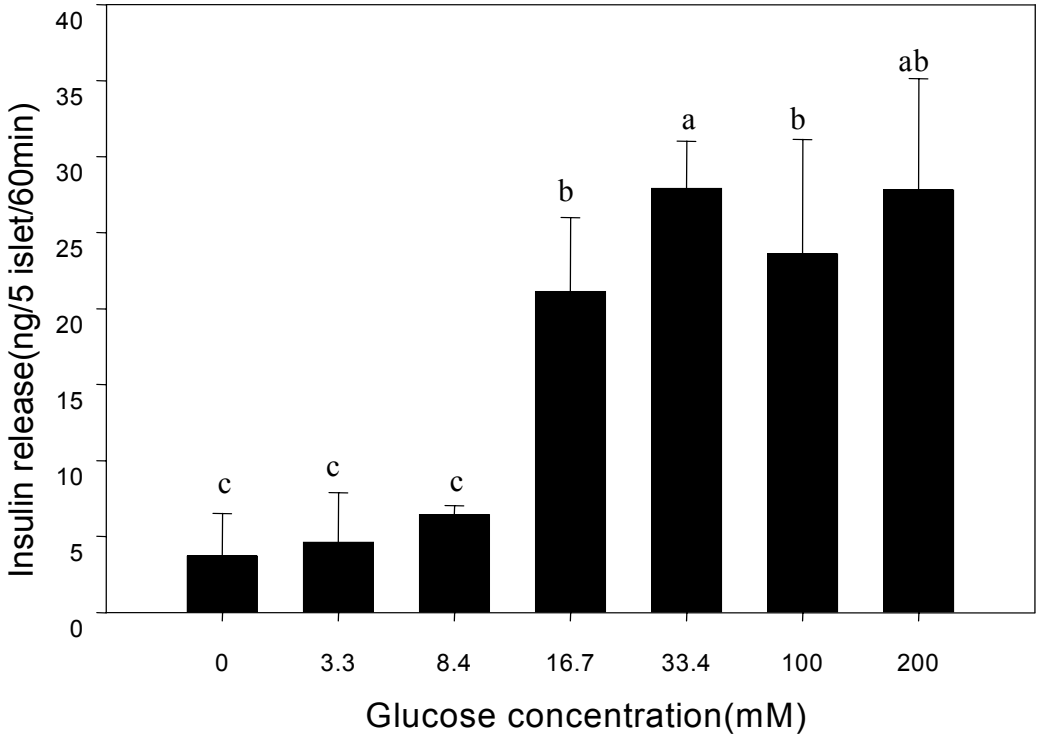


그림 1. 배지의 포도당 농도가 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비량에 미치는 영향.
Data are means±SD, n=6-10. Means with different letters differ, $P<0.001$.

앞서 그림 1에 제시한 포도당 농도에 의한 인슐린 분비를 보면, 포도당 농도가 33.4mM일 때 30ng/5 islets로 최대 분비량이었으며, 포도당 농도를 100, 200mM로 증가시켜도 인슐린 분비량은 더 이상 증가하지 않았다. 그러나 여주 미숙과 50% ethanol 추출물은 120ng/5 islets까지, 씨 추출물은 160ng/5 islets까지 인슐린 분비량이 증가되었다(그림 2). 여주 추출물은 췌장 소도로부터 인슐린을 분비시키는 능력이

포도당과 다른 것으로부터, 여주 추출물의 인슐린 분비 효과는 일단 포도당과 유사한 성분이 추출되어져서 나타내어지는 효과는 아니며, 포도당과 다른 기작에 의하여 인슐린을 분비시킬 수 있는 가능성이 보였다.

표 1. 여주의 부위별 물 추출물이 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비에 미치는 영향

여주의 부위	추출물의 농도 (mg/mL)	배지의 포도당 농도 (mM) 3.3 인슐린 분비량 (ng/5islets/60min)	분비촉진 효과[1]	16.7 인슐린 분비량 (ng/5islets/60min)	분비촉진 효과
대조군	-	3.73 ± 1.82	1	18.2 ± 6.07	1
미숙과	0.25	48.3 ± 27.3**	12.9	60.6 ± 22.2*	3.33
	0.50	51.3 ± 30.1**	13.8	84.3 ± 57.0	4.64
	1.00	80.3 ± 45.7***	21.5	115 ± 37.3***	6.31
씨	0.25	44.6 ± 29.6**	12.0	65.2 ± 32.1	3.59
	0.50	47.1 ± 11.7***	12.6	82.1 ± 2.55***	4.52
	1.00	134 ± 21.0***	35.8	135 ± 15.9***	7.40
과숙과	0.25	20.10 ± 16.7	5.39	29.9 ± 11.6	1.64
	0.50	47.8 ± 18.6***	12.8	69.7 ± 13.1*	3.83
	1.00	60.9 ± 16.8***	16.3	86.1 ± 16.1	4.73
씨껍질	0.10	16.7 ± 4.31***	4.49	35.0 ± 13.5	1.93
	0.25	15.8 ± 3.43***	4.23	40.8 ± 11.0	2.25
	0.50	17.4 ± 11.3**	4.65	24.0 ± 10.4	1.32

[1]인슐린 분비 촉진 효과 = 추출물 첨가구의 인슐인 분비량/대조구의 인슐린 분비량

표 2. 여주의 부위별 50% ethanol 추출물의 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비 효과

여주의 부위	추출물의 농도 (mg/mL)	배지의 포도당 농도 (mM) 3.3 인슐린 분비량[1] (ng/5islets/60min)	3.3 분비촉진 효과	16.7 인슐린 분비량 (ng/5islets/60min)	16.7 분비촉진 효과
대조군		3.73 ± 1.82	1	18.2 ± 6.07	1
미숙과	0.25	53.0 ± 46.2*	14.2	24.4 ± 10.3	1.34
	0.50	66.8 ± 24.6**	17.9	74.8 ± 51.5*	4.11
	1.00	121 ± 36.0**	32.5	115 ± 26.8*	6.32
씨	0.25	72.9 ± 61.3*	19.5	35.1 ± 4.24*	1.93
	0.50	98.8 ± 46.0**	26.5	58.3 ± 11.8*	3.21
	1.00	146 ± 15.3***	39.3	173 ± 32.3***	9.50
과숙과	0.25	46.8 ± 19.9**	12.5	20.2 ± 11.3	1.11
	0.50	63.1 ± 23.1**	16.9	36.3 ± 16.7	2.00
	1.00	90.8 ± 30.8**	24.4	59.3 ± 24.0*	3.26
씨껍질	0.10	15.1 ± 3.43*	4.05	17.7 ± 10.9	0.97
	0.25	7.45 ± 4.64	2.00	21.7 ± 5.87	1.19
	0.50	16.8 ± 5.16*	4.52	28.0 ± 15.3	1.54

[1]인슐린 분비 촉진 효과 = 추출물 첨가구의 인슐인 분비량/대조구의 인슐린 분비량

(2) 배지의 포도당 농도가 여주의 인슐린 분비에 미치는 영향

배지의 포도당 농도가 여주의 인슐린 분비 촉진 효과에 미치는 영향을 조사하였다. 배지의 포도당 농도가 0, 3.3, 8.4, 16.7, 33.4 mM 일 때, 여주 추출물 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL이 췌장 소도의 인슐린 분비 효과를 조사하였다.

미숙과의 인슐린 분비 효과는 배지의 포도당 농도가 증가함에 따라 증폭되지 않았으며, 포도당 농도가 3.3mM일 때 가장 효과가 높았으며, 33.4mM 포도당에서는 오히려 효과가 없었다(그림 2). 씨의 인슐린 분비 효과도 배지의 포도당 농도에 비의존적임을 보여준다(그림 3).

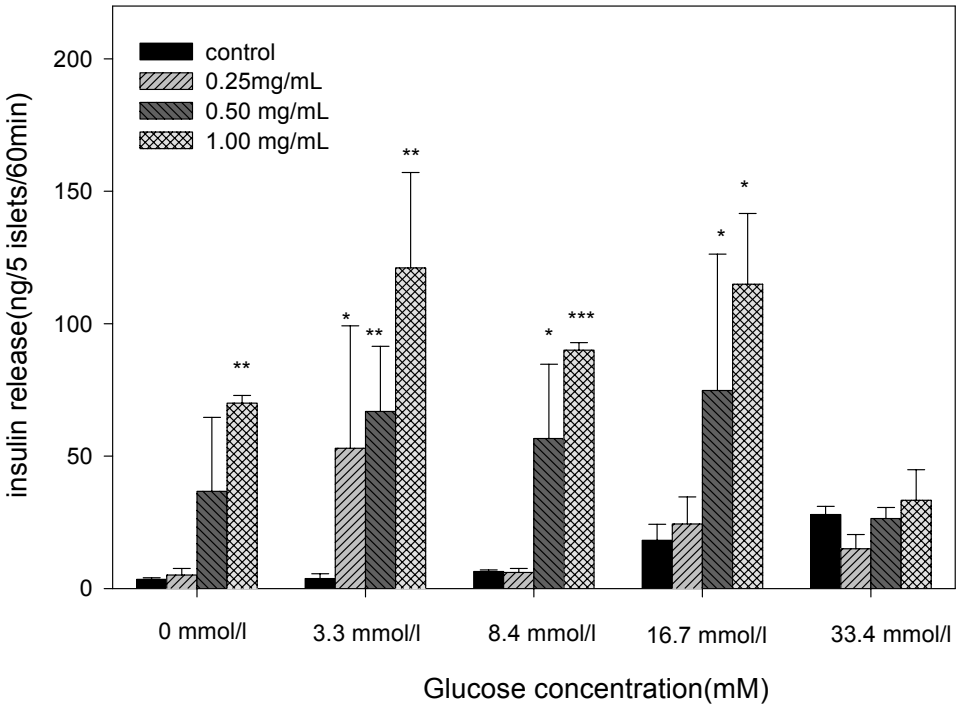


그림 2. 배지의 포도당 농도가 여주 미숙과의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과에 미치는 영향. $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ vs. control.

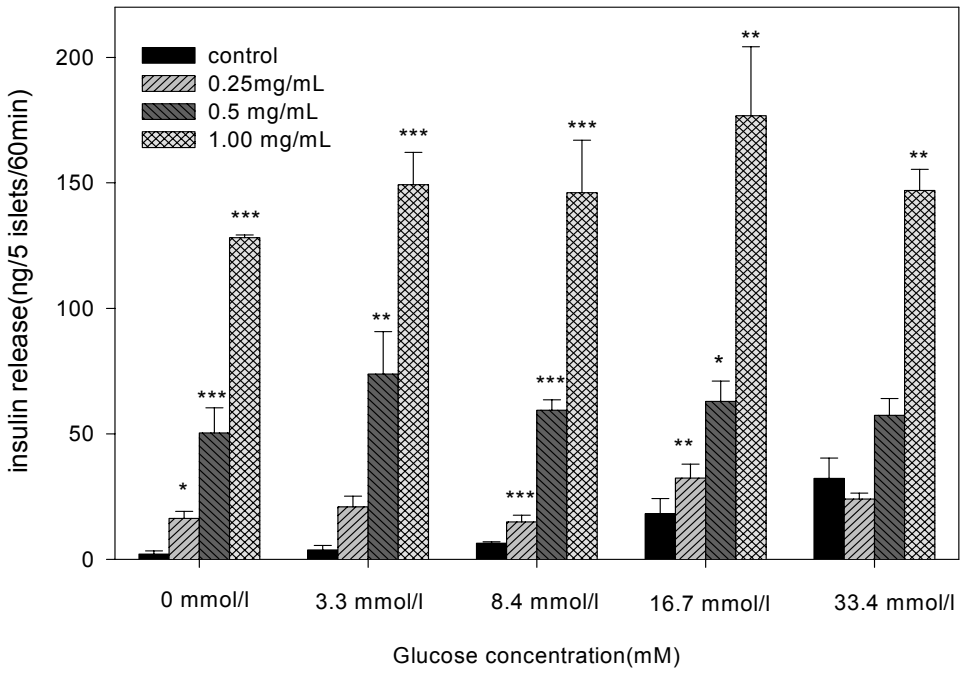


그림 3. 배지의 포도당 농도가 여주 씨의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과에 미치는 영향. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

2) 생쥐 지방섬유아세포주에서의 포도당 이동 증진 효과

가) 인슐린에 의한 포도당 이동 조사

인슐린 2-50nM은 3T3-L1 지방세포에서 ^{3}H-포도당의 세포내로의 이동을 농도 의존적이면서 유의적으로 증가시켰다(그림 4).

그림 4. 인슐린의 3T3-L1 지방세포내로의 포도당 이동 효과. Values are means±SD(n=6). Means with different letters differ(p>0.001).

나) 여주 추출물의 포도당 이동 효과

여주 미숙과 및 씨의 물 및 50% ethanol 추출물의 3T3-L1 지방세포내로의 포도당 이동 효과를 실험하였다. 여주 미숙과 및 씨의 물 추출물 0.5mg/mL은 포도당 이동 효과가 없었다(그림 5의 위쪽). 인슐린 10nM이 존재할 때는 여주 미숙과 물 추출물 0.5mg/mL은 30%의 유의적인 포도당 이동 증진 효과가 있었다(그림 5의 아래쪽). 이는 미숙과 물 추출물 단독으로는 포도당 이동 효과가 없으나 인슐린이 존재하면 인슐린의 포도당 이동 효과를 증진시키는 것이다. 그러나 씨 물 추출물은 인슐린의 작용을 증진시키지 않았다.

미숙과의 50% ethanol 추출물 0.5mg/mL은 인슐린 10nM이 나타내는 포도당 이동 효과의 90%의 유의적 효과를 보였다(그림 6의 위쪽). 씨의 50% ethanol 추출물 0.5mg/mL도 인슐린 10nM 효과의 40%의 유의적 효과를 보였다(그림 6의 아래쪽). 인슐린 10nM을 첨가하면, 미숙과 50% ethanol 추출물은 인슐린 10nM 단독 효과의 약 2배의 유의적 효과를 보였으며, 씨 50% ethanol 추출물도 인슐린 10nM 단독 효과의 약 1.5배의 유의적 효과를 보였다.

미숙과의 물 추출물은 미약하기는 하지만 인슐린의 작용을 증폭시켰으며, 미숙과 및 씨의 50% ethanol 추출물은 그 자체로서도 포도당 이동 효과를 보였으며, 인슐린의 작용을 증진시키는 효과도 보였다.

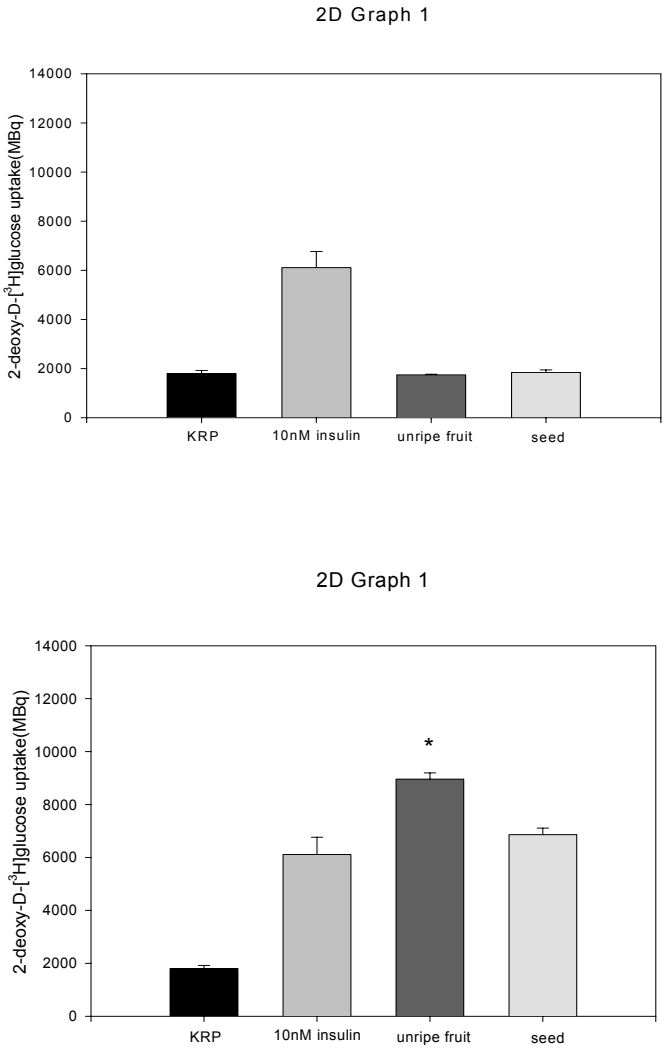
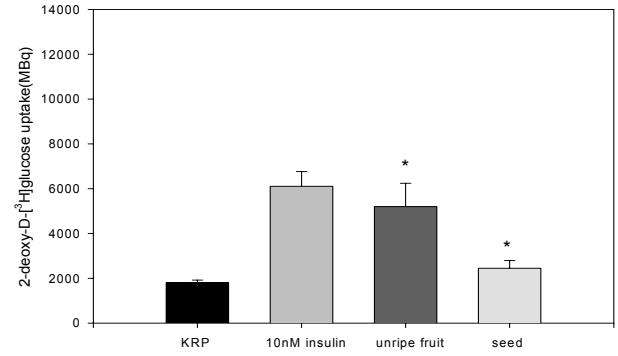


그림 5. 여주의 물 추출물(0.5mg/mL)의 3T3-L1 지방세포에서의 포도당 이동 효과.

Differentiated 3T3-L1 cells were incubated with the extract in the absence(upper) or presence(lower) of 10nmol/L insulin, and then assayed for the glucose uptake activities. Values are means±SD, n=6.

*$p<0.05$ compared with KRP(upper) and 10nM insulin(lower) incubations without extract.



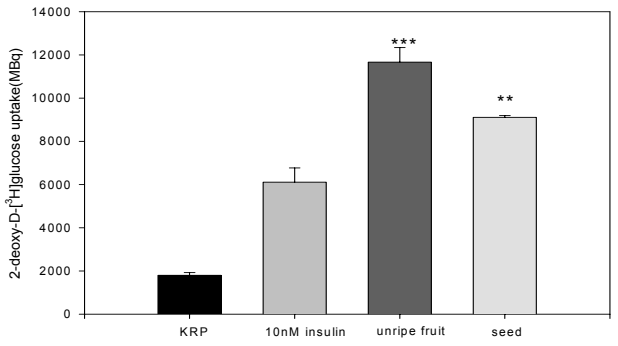


그림 6. 여주의 50% ethanol 추출물(0.5mg/mL)의 3T3-L1 지방세포에서의 포도당 이동 효과. Differentiated 3T3-L1 cells were incubated with the extract in the absence(upper) or presence(lower) of 10nmol/L insulin, and then assayed for the glucose uptake activities. Values are means±SD, n=6. *$p<0.05$, ***$p<0.001$ compared with KRP(upper) and 10nM insulin(lower) incubations without extract.

다) 여주의 포도당 이동 효과의 특성

여주의 지방세포에서의 포도당 이동 효과가 인슐린 유사 작용인지 인슐린 증강 작용인지를 알기 위하여, 먼저 인슐린이 존재하지 않을 때의 여주의 효과와, 인슐린 이 존재할 때의 인슐린의 효과를 비교 분석하였다. 그 결과 인슐린이 존재하지 않을 때 여주 미숙과 추출물을 0.004-0.5 mg/mL의 농도로 가하면, 0.5mg/mL 농도만이 유의적인 효과를 보였다(그림 7의 위쪽). 그러나 인슐린 10nM이 존재하면 미숙과 추출물 0.02-0.5 mg/mL의 범위에서 유의적인 효과를 보였다(그림 7의 아래쪽). 이로부터 미숙과 추출물의 작용은 주로 인슐린의 작용을 증강시키는 작용인 것으로 사료된다.

다음에는 미숙과 추출물이 인슐린의 포도당 이동에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 2-50 nM의 인슐린과 함께 0.5mg/mL의 미숙과 추출물을 첨가하여 포도당 이동 효과를 조사하였다. 그 결과 일정 농도의 미숙과 추출물과 함께 배양하였을 때 인슐린의 농도가 증가하면서 포도당 이동이 상승적으로(synergistically) 증가하였다(그림 8). 즉 미숙과 추출물은 인슐린이 존재할 때 인슐린의 작용을 증진시킨다고 할 수 있다.

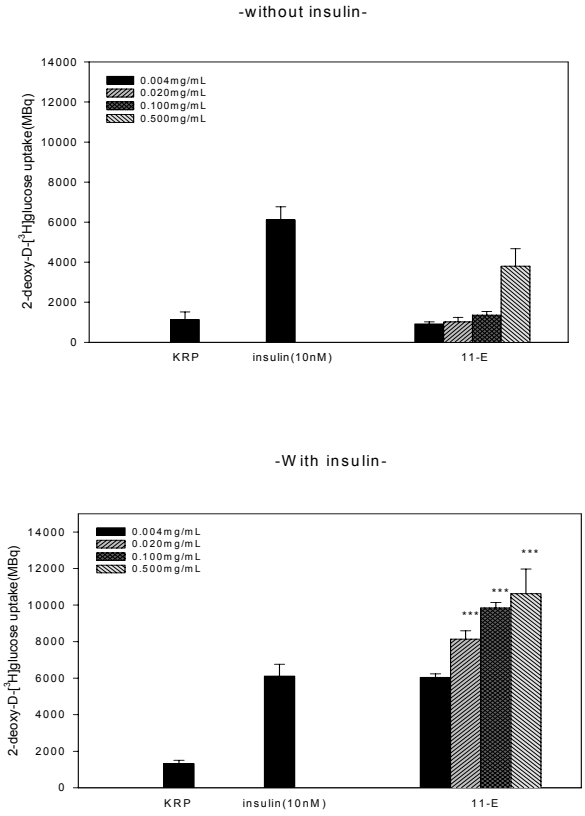


그림 7. 여주 미숙과의 50% ethanol 추출물의 3T3-L1 지방세포에서의 포도당 이동 효과. Differentiated 3T3-L1 cells were incubated with the extract in the absence(upper) or presence(lower) of 10nmol/L insulin , and then assayed for the glucose uptake activities. Values are means±SD, n=6. *p<0.05, ***p<0.001 compared with KRP(no insulin) and 10nM insulin incubations without the extract.

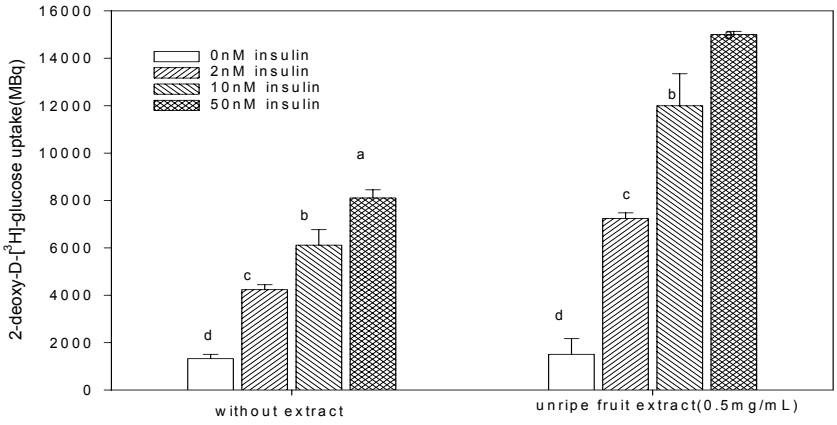


그림 8. Combined effect of insulin and unripe fruit extract on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Differentiated 3T3-L1 cells were incubated with insulin in the presence of 0.5 mg/mL unripe fruit extract.

나. 약용작물의 생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과

여주의 인슐린 분비 효과를 췌장 소도를 이용한 in vitro 실험에서 확인한 결과에 의하면 물 추출물보다는 50% 에탄올 추출물이 효과가 높았으며, 씨, 미숙과, 과숙과, 씨껍질의 순으로 효과가 높았다. 또한 여주의 포도당 이동 효과를 지방세포를 이용한 in vitro 실험에서 확인한 결과에 의하면 물 추출물은 효과가 없었으며, 50% 에탄올 추출물이 효과가 있었으며, 씨보다는 미숙과의 효과가 높았다. 여주를 주로 이용하는 부위는 과실이며 식품공전에 식품의 원료로 등재되어 있는 부위는 과실이기 때문에 여주의 in vivo 효과는 미숙과로부터 혈당조절용 건강기능식품 원료 후보로 선정된 MC-AEE 및 MC-SF를 대상으로 실험하였다.

생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 효능 검정에 사용한 실험 동물은 Goto-Kakizaki (GK) rats이었다. GK rats는 유전적으로 인슐린 분비에 결함이 있어

서 혈장 인슐린치가 낮으며 포도당의 자극에 의하여 인슐린이 적절하게 분비되지 못하며 인슐린 저항성도 함께 가진 제 2형 당뇨병 모델쥐이다. GK rat을 유전적으로 변형시키기 전의 정상적인 모델인 Wistar rats도 함께 실험하였다.

현재까지 보고된 여주의 동물실험 결과에 의하면 여주는 streptozotocin이나 alloxan으로 유도한 제 1형 당뇨 모델에서 혈당강하 효능을 보였다. 이는 인슐린을 분비하는 췌장 소도의 베타세포의 파괴를 막아서 인슐린의 분비를 회복시키는 기능을 가지고 있을 것으로 사료되어 제 1형 당뇨 모델 동물인 nonobese diabetic (NOD) mice에서의 효능도 실험하였다.

1) 제 2형 당뇨 모델 동물에서의 여주의 인슐린 분비 및 저항성 개선 효과

(가) 체중, 식이섭취량, 장기 중량에 미치는 영향

MC-AEE (10 mg/kg/day) 및 MC-SF (2 mg/kg/day)를 유전적으로 인슐린 분비에 결함이 있으며 인슐린 저항성이 있는 GK rats에게 6주간 경구 투여하였을 때, 체중증가량, 식이섭취량, 간 중량에는 영향을 주지 않았다(표 3).

표 3. MC-AEE 및 MC-SF의 6주간의 투여가 Wistar 및 GK rats의 체중, 식이섭취량 및 간중량에 미치는 영향

	Wistar 쥐			GK 쥐		
	대조군	MC-AEE 섭취군	MC-SF 섭취군	대조군	MC-AEE 섭취군	MC-SF 섭취군
초기 체중(g)	216.37±3.73	216.93±5.15	216.67±4.15	164.96±5.11	164.88±5.83	164.69±4.99
말기 체중(g)	381.21±17.51	364.58±30.84	371.66±29.84	306.17±7.82	301.68±16.32	305.71±6.91
식이 섭취량 (g/day)	24.40±0.87	23.81±2.60	24.01±1.13	19.31±0.47	18.35±1.17	18.55±0.17
간 중 (g/100g BW)	2.56±0.10	2.62±0.14	2.55±0.19	2.64±0.09	2.73±0.10	2.51±0.21

각각의 값은 평균치 ± 표준오차 (n=7).

(나) 경구 포도당 부하 검사 (oral glucose tolerance test)에 미치는 영향

① MC-AEE가 경구 포도당 부하 검사에 미치는 영향

포도당 2g/kg body weight을 경구 투여하였을 때 GK rat는 인슐린 분비에 결함이 있어서 포도당을 혈액으로부터 조직으로 이동시키는 속도가 늦어 혈당치의 급속한 상승이 관찰되었다. MC-AEE 10 mg/kg/day의 6주간의 투여에 의하여 포도당 부하 후 1시간의 혈당치 상승(△glucose $_{1hr-0hr}$)은 GK rat에서는 대조군 222mg/dL, MC-AEE 투여군 184mg/dL이었으며, Wistar rat에서는 대조군 90mg/dL, MC-AEE 투여군 70mg/dL이었다(그림 9). 즉 MC-AEE 투여에 의하여 포도당 부하 후 1시간의 혈당치 상승이 대조군에 비하여 GK rat에서는 17%, Wistar rat에서는 22% 유의적으로 감소하였다.

경구 포도당 부하 검사에서의 혈당치의 감소가 인슐린 분비 증가로 인한 것인지를 알아보기 위하여, 혈장의 인슐린 함량을 분석하였다(그림 9). GK rat에서 포도당 부하 후 0.5시간의 인슐린치 상승(△insulin $_{0.5hr-0hr}$)은 대조군 43pg/mL, MC-AEE 투여군 263pg/mL이었으며, 1시간의 인슐린치 상승(△insulin $_{1hr-0hr}$)은 대조군 163pg/mL, MC-AEE 투여군 239pg/mL이었다. Wistar rat에서 포도당 부하 후 0.5시간의 인슐린치 상승(△insulin $_{0.5hr-0hr}$)은 대조군 134pg/mL, MC-AEE 투여군 252pg/mL이었으며, 1시간의 인슐린치 상승(△insulin $_{1hr-0hr}$)은 대조군 212pg/mL, MC-AEE 투여군 311pg/mL이었다. 즉 MC-AEE 투여에 의하여 GK rat에서 포도당 부하 후 0.5시간 및 1시간의 인슐린치 상승이 대조군에 비하여 각각 612%, 147% 유의적으로 증가하였다. MC-AEE 투여에 의하여 Wistar rat에서 포도당 부하 후 0.5시간 및 1시간의 인슐린치 상승이 대조군에 비하여 각각 188%, 147% 유의적으로 증가하였다.

경구 포도당 부하로 인한 혈당 및 인슐린치의 상승량을 baseline 위의 면적(Area

under the curve; AUC)를 구하여 비교하였다(그림 10). GK rat의 혈당은 대조군에 비하여 1시간 동안의 AUC가 26%, 2시간 동안의 AUC가 20% 유의적으로 감소하였다. Wistar rat의 혈당은 대조군에 비하여 1시간 동안의 AUC가 31%, 2시간 동안의 AUC가 21% 유의적으로 감소하였다. GK rat의 인슐린은 대조군에 비하여 0.5시간 동안의 AUC가 725%, 1시간 동안의 AUC가 34%, 2시간 동안의 AUC가 177% 유의적으로 증가하였다. Wistar rat의 인슐린은 대조군에 비하여 1시간 동안의 AUC가 182%, 2시간 동안의 AUC가 227% 유의적으로 증가하였다.

이로써 MC-AEE이 생체내에서 인슐린 분비 효과를 보여 혈당을 강하시킴을 입증하였다.

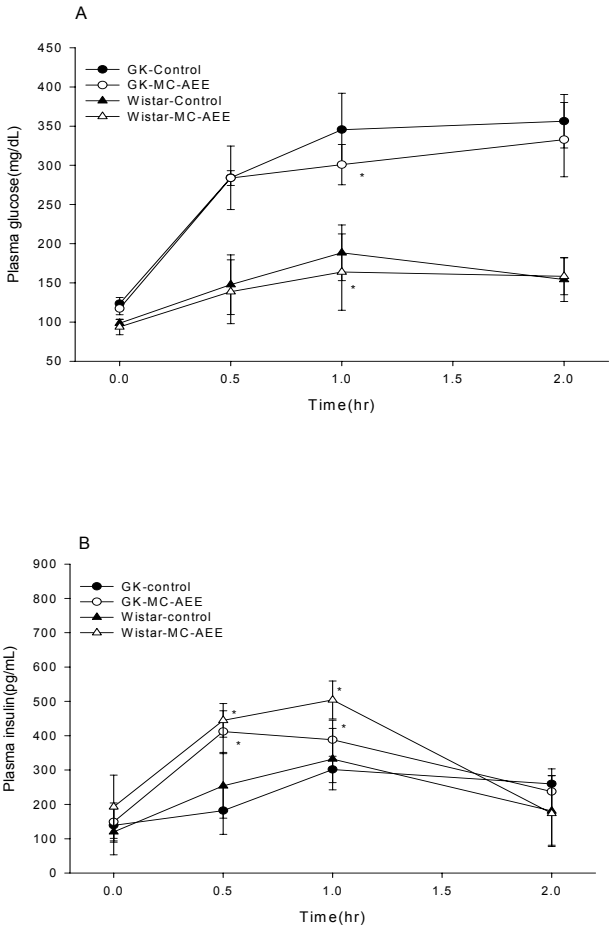


그림 9. Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose. Plasma glucose levels(A) and plasma insulin levels(B) during OGTT at 13 weeks of ages after 6-week administration of MC-AEE. Significance (control vs. MC-AEE) is shown in the text of result. Values are expressed as mean± SEM, n=7, $^{*}p<0.05$

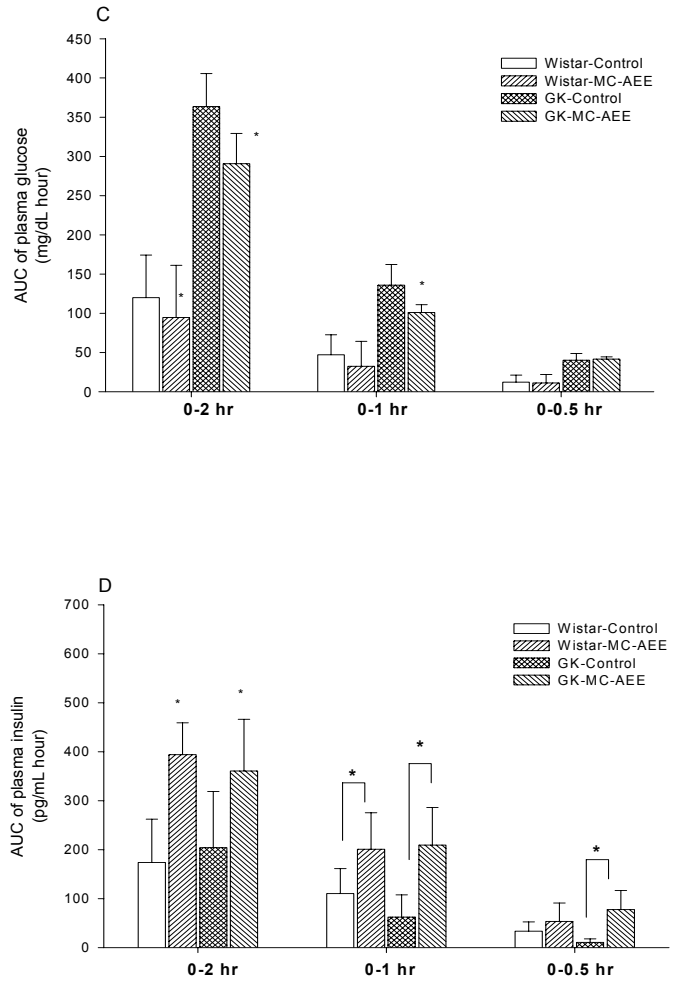


그림 10. Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose. Area under the curve (AUC) of plasma glucose (C) and AUC of plasma insulin (D) during OGTT in GK and Wistar rats after 6-week administration of MC-AEE. Significance is shown in the text of result. Values are expressed as mean±SEM, n=7, $^{*}p<0.05$

② MC-SF이 경구 포도당 부하 검사에 미치는 영향

MC-SF 2 mg/kg BW/day의 6주간의 투여에 의하여 포도당 부하 후 1시간의 혈당치 상승량(△glucose $_{1hr-0hr}$)은 GK rat에서는 대조군 231.6mg/dL, MC-SF 투여군 135.7mg/dL이었으며, Wistar rat에서는 대조군 90mg/dL, MC-SF 투여군 65.7mg/dL이었다(표 4). 즉 MC-SF 투여에 의하여 포도당 부하 후 1시간의 혈당치 상승이 대조군에 비하여 GK rat에서는 %, Wistar rat에서는 22% 유의적으로 감소하였다.

경구 포도당 부하 검사에서의 혈당치의 감소가 인슐린 분비 증가로 인한 것인지를 알아보기 위하여, 혈장의 인슐린 함량을 분석하였다(표 4). GK rat에서 포도당 부하 후 0.5시간의 인슐린치 상승량(△insulin $_{0.5hr-0hr}$)은 대조군 43pg/mL, MC-SF 투여군 296.2pg/mL이었으며, 1시간의 인슐린치 상승량(△insulin $_{1hr-0hr}$)은 대조군 163pg/mL, MC-SF 투여군 285.9pg/mL이었다. Wistar rat에서 포도당 부하 후 0.5시간의 인슐린치 상승량(△insulin $_{0.5hr-0hr}$)은 대조군 134pg/mL, MC-SF 투여군 314.1 pg/mL이었으며, 1시간의 인슐린치 상승량(△insulin $_{1hr-0hr}$)은 대조군 212pg/mL, MC-SF 투여군 498.6pg/mL이었다. 즉 MC-SF 투여에 의하여 GK rat에서 포도당 부하 후 0.5시간 및 1시간의 인슐린치 상승이 대조군에 비하여 각각 689%, 175% 유의적으로 증가하였다. MC-SF 투여에 의하여 Wistar rat에서 포도당 부하 후 0.5시간 및 1시간의 인슐린치 상승이 대조군에 비하여 각각 234%, 235% 유의적으로 증가하였다.

경구 포도당 부하로 인한 혈당 및 인슐린치의 상승량을 baseline 위의 면적(Area under the curve; AUC)를 구하여 비교하였다(표 5). GK rat의 혈당은 대조군에 비하여 1시간 동안의 AUC가 31%, 2시간 동안의 AUC가 35% 유의적으로 감소하였다. Wistar rat의 혈당은 대조군에 비하여 1시간 동안의 AUC가 48% 유의적으로 감소하였다. GK rat의 인슐린은 대조군에 비하여 0.5시간 동안의 AUC가 651%, 1시간 동안

의 AUC가 414%, 2시간 동안의 AUC가 196% 유의적으로 증가하였다. Wistar rat의 인슐린은 대조군에 비하여 1시간 동안의 AUC가 200%, 2시간 동안의 AUC가 215% 유의적으로 증가하였다.

이로써 MC-SF는 생체내에서 인슐린 분비 효과를 보여 혈당을 강하시킴을 입증하였으며, MC-AEE에 비하여 20%의 용량으로 투여하였을 때 더 높은 효과를 보였다.

표 4. Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose. Plasma glucose and insulin levels during OGTT at 13 weeks of ages after 6-week administration of MC-SF (2mg/kg BW).

Groups	0 hour	0.5 hour	1 hour	2 hour
Plasma glucose levels (mg/dL)				
Wistar-control	98.5 ± 3.1	154.9 ± 4.5	215.5 ± 5.3	150.7 ± 3.0
Wistar-MC-SF	100.5 ± 5.2	147.7 ± 3.9	166.2 ± 4.3*	152.5 ± 1.5
GK-control	125.5 ± 2.8	280.5 ± 7.1	357.1 ± 5.9	341.0 ± 2.9
GK-MC-SF	124.9 ± 3.0	275.8 ± 5.0	260.6 ± 4.9**	310.9 ± 5.7*
Plasma insulin levels (pg/mL)				
Wistar-control	100.1 ± 8.0	234.1 ± 9.3	312.1 ± 6.2	180.6 ± 3.2
Wistar-MC-SF	105.9 ± 6.1	420.0± 11.6**	500.2 ± 13.1**	150.4 ± 5.1
GK-control	105.5 ± 4.5	148.5 ± 8.2	268.5 ± 8.8	241.0 ± 4.7
GK-MC-SF	104.7 ± 5.3	400.9± 10.1**	390.6 ± 6.7**	250.7 ± 9.0

Values are given as means ± SEM for 7 rats in each group. Wistar-MC-SF group was compared with Wistar-control group. GK-MC-SF group was compared with GK-control group. *P<0.05, **P<0.01.

표 5. Glucose tolerance and in vivo insulin secretory response to glucose. Area under the curve (AUC) of plasma glucose and AUC of plasma insulin during OGTT in GK and Wistar rats after 6-week administration of MC-SF (2mg/kg).

Groups	0-2 hr	0-1 hr	0-0.5 hr
AUC of plasma glucose (mg/dL • hour)			
Wistar-control	115.5 ± 2.3	48.3 ± 3.0	10.1 ± 0.3
Wistar-MC-SF	95.1 ± 3.5	25.1 ± 1.7*	11.8 ± 1.2
GK-control	351.2± 15.7	135.0 ± 8.0	25.1 ± 3.0
GK-MC-SF	230.0± 12.9**	93.6 ± 3.6*	26.7 ± 1.9
AUC of plasma insulin (pg/mL • hour)			
Wistar-control	188.1 ± 7.1	100.2 ± 8.0	15.7 ± 3.0
Wistar-MC-SF	405.0± 12.2**	200.0± 16.7**	28.1 ± 0.9**
GK-control	200.7 ± 5.6	50.9± 2.2	10.8 ± 1.1
GK-MC-SF	393.1± 15.4***	210.8± 9.5***	70.3 ± 2.7***

Values are given as means ± SEM for 7 rats in each group. Wistar-MC-SF group was compared with Wistar-control group. GK-MC-SF group was compared with GK-control group. *P<0.05, **P<0.01.

(다) 공복시 혈당 및 인슐린치에 미치는 영향

MC-AEE 및 MC-SF의 6주간의 투여가 종료된 후 공복시 혈당 및 인슐린치를 측정하였다(표 6). Wistar rat에서는 여주 투여가 혈당치 및 인슐린치에 영향을 주지 않았다. GK rat에서는 MC-AEE 투여군은 대조군에 비하여 혈당치는 22% 유의적으로 감소하였으며, 인슐린치는 22% 유의적으로 증가하였다. GK rat에서는 MC-SF 투여군은 대조군에 비하여 혈당치는 26% 유의적으로 감소하였으며, 인슐린치는 29% 유의적으로 증가하였다. 이는 MC-AEE 및 MC-SF 투여는 GK rat의 낮은 혈장 인슐린치를 증가시켜 혈당을 낮춘다고 해석될 수 있다.

표 6. MC-AEE 및 MC-SF의 6주간 투여가 Wistar 및 GK rat의 공복시 혈당 및 인슐린치에 미치는 영향

분석 항목	위스타 쥐			지케이 쥐		
	대조군	MC-AEE 투여군	MC-SF 투여군	대조군	MC-SF 투여군	MC-SF 투여군
혈장 포도당 (mg/dL)	123.68 ± 16.54	121.84 ± 12.53	118.05 ± 9.08	183.18 ± 31.21	143.60* ± 23.16	135.50** ± 15.11
혈장 인슐린 (ng/mL)	0.985 ± 0.041	0.854 ± 0.054	0.998 ± 0.081	0.435 ± 0.054	0.531* ± 0.034	0.559** ± 0.056

각각의 값은 평균치 ± 표준오차임 (n=7).

*P<0.05, **P<0.01 Student's t-test에 의하여 통계적으로 유의함..

(마) 췌장 인슐린 함량

Wistar 및 GK rat에서 MC-AEE 투여군 및 MC-SF 투여군은 대조군에 비하여 췌장 중량에 차이가 없었다. 6주간의 MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 췌장 인슐린 함량에 미치는 영향은 표 7에 나타내었다. 그 결과 췌장 인슐린 함량이 Wistar rat에서는 차이가 없었으며, GK rat에서는 MC-AEE 투여군은 160%, MC-SF 투여군은 176% 유의적으로 증가하였다. GK rat은 췌장에 인슐린 저장(store or reserve)이 낮아져서 내당능 장애 및 당뇨 증세를 보인다. 여주는 GK rat의 췌장에 인슐린 저장을 증가시킴으로써 인슐린이 필요한 상황에서 즉각적으로 혈액으로 방출될 수 있게 하는 작용을 하는 것으로 해석되었다.

표 7. MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 Wistar 및 GK rat의 췌장 인슐린 함량 (μg/g 췌장)에 미치는 영향

위스타 쥐			지케이 쥐		
대조군	MC-AEE군	MC-SF군	대조군	MC-AEE군	MC-SF군
10.0±0.9	11.3 ± 1.2	12.0 ± 2.1	5.8±0.7	9.3 ± 0.9**	10.2 ± 1.8**

Values are expressed as mean± SEM, n=7, **p<0.01 vs. each control.

(바) 인슐린 저항성에 미치는 영향

MC-AEE 및 MC-SF이 insulin-stimulated glucose disposal에 효과가 있는지를 검정하기 위하여 hyperinsulinemic-euglycemic clamp를 시행하였다. Insulin-stimulated glucose disposal rate은 혈당을 6.6 mmol로 유지하기 위하여 주입되는 포도당 주입 속도와 동일한 것으로 간주한다. 표 8에 clamped blood glucose levels 및 외부로부터 포도당이 주입되는 속도(exogenous glucose infusion rates)를 나타내었다. GK rats 대조군의 포도당 주입 속도는 Wistar rats 대조군의 속도의 18% (64.9 vs. 360.2 μmol/kg/min)에 불과하여, 말초조직의 인슐린 저항성이 극심함을 보여 주었다. 6주간의 여주 투여에 의하여 지케이 쥐에서 insulin-stimulated glucose disposal rate은 대조군에 비하여 MC-AEE는 1.8배 유의적으로 (115.9 vs. 64.9 μmol/kg/min), MC-SF는 1.9배 유의적으로 (123.6 vs. 64.9 μmol/kg/min) 증가시켰다.

표 8. MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 위스타 쥐 및 지케이 쥐의 hyperinsulinemic-euglycemic clamps에서 whole-body glucose disposal rate에 미치는 영향.

측정 항목	위스타 쥐			지케이 쥐		
	대조군	MC-AEE 투여군	MC-SF 투여군	대조군	MC-AEE 투여군	MC-SF 투여군
Clamped blood glucose(mg/dl)	124.9 ±9.08	125.4 ±10.12	123.1 ±9.00	128.1 ±11.7	125.3 ±12.4	123.1 ±9.9
Glucose infusion rate(μmol/kg/min)	360.2 ±29.8	400.2 ±46.8	390.1 ±30.2	64.9 ±4.7	115.9** ±8.67	123.6** ±9.0

각각의 값은 평균치 ± 표준오차임 (n=7).

**P<0.01 대조군과 비교하여 통계적으로 유의함.

2) 여주가 제1형 당뇨병에 미치는 in vivo 효과

(가) 체중 및 식이섭취량에 미치는 영향

MC-AEE (10 mg/kg/day) 및 MC-SF (2 mg/kg/day)를 유전적으로 췌장 소도가 파괴되어 인슐린 분비가 저하하는 제 1형 당뇨 모델인 NOD mice에게 8주간 경구 투여하였을 때, 체중증가량, 식이섭취량에는 영향을 주지 않았다(표 9).

표 9. MC-AEE 및 MC-SF의 8주간의 투여가 ICR 및 NOD mice의 체중 및 식이섭취량에 미치는 영향

	ICR mice			NOD mice		
	대조군	MC-AEE 섭취군	MC-SF 섭취군	대조군	MC-AEE 섭취군	MC-SF 섭취군
초기 체중(g)	24.56 ±1.62	24.23 ±0.98	24.08 ±1.15	20.28 ±0.11	20.88 ±0.83	20.69 ±0.99
말기 체중(g)	32.29 ±1.85	34.58 ±2.84	33.66 ±2.84	35.17 ±1.82	31.68 ±1.32	35.71 ±1.91
식이 섭취량 (g/day)	2.40 ±0.07	2.81 ±0.60	2.51 ±0.13	2.31 ±0.47	2.35 ±1.17	2.55 ±0.17

각각의 값은 평균치 ± 표준오차 (n=10).

(나) 혈장 포도당 농도에 미치는 영향

정상적인 동물인 ICR mice에서는 MC-AEE를 10 mg/kg BW로, MC-SF를 2 mg/kg BW로 8주간 투여하였을 때 혈당강하 효과는 관찰되지 않았다. 제 1형 당뇨 모델인 NOD mice에서는 MC-AEE를 10 mg/kg BW로 8주간 투여하였을 때는 혈당치가 대조군에 비하여 15% 유의적으로 감소하였으며, MC-SF를 2 mg/kg BW로 8주간 투여하였을 때는 혈당치가 13% 유의적으로 감소하였다(표 10).

표 10. MC-AEE 및 MC-SF의 8주간의 투여가 ICR 및 NOD mice의 혈당치에 미치는 영향

	ICR mice			NOD mice		
	대조군	MC-AEE 섭취군	MC-SF 섭취군	대조군	MC-AEE 섭취군	MC-SF 섭취군
혈당치 (mg/dl)	101.08 ±9.77	99.30 ±7.67	104.19 ±10.05	210.66 ±10.21	180.08** ±10.43	183.71** ±12.83

각각의 값은 평균치 ± 표준오차 (n=10).

**Significantly different from control ($P<0.01$).

(다) 췌장 인슐린 함량에 미치는 영향

ICR 및 NOD mice에서 MC-AEE 투여군 및 MC-SF 투여군은 대조군에 비하여 췌장 중량에 차이가 없었다. 8주간의 MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 췌장 인슐린 함량에 미치는 영향은 표 11에 나타내었다. 그 결과 여주 투여가 ICR mice의 췌장 인슐린 함량에는 영향을 주지 않았다. NOD mice에서는 MC-AEE 투여군은 대조군의 239%, MC-SF 투여군은 212% 유의적으로 증가하였다. NOD mice는 췌장이 손상되어 인슐린 저장(store or reserve)이 낮아져서 내당능 장애 및 당뇨 증세를 보인다. 여주는 NOD mice의 췌장 손상을 저해하여 인슐린 저장을 증가시킴으로써 인슐린이 필요한 상황에서 즉각적으로 혈액으로 방출될 수 있게 하는 작용을 하는 것으로 해석되었다.

표 11. MC-AEE 및 MC-SF의 투여가 ICR 및 NOD mice의 췌장 인슐린 함량 (μg/g 췌장)에 미치는 영향

ICR mice			NOD mice		
대조군	MC-AEE군	MC-SF군	대조군	MC-AEE군	MC-SF군
12.00±0.71	10.1 ± 1.3	12.0 ± 2.1	4.23±0.54	10.11 ± 0.90**	8.98 ± 0.89**

Values are expressed as mean± SEM, n=7, **p<0.01 vs. each control.

2. 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 규명

가. 약용작물로부터 인슐린 분비 성분 규명

1) 용매에 의한 추출

여주의 물 추출물 및 50% 에탄올 추출물의 인슐린 분비 효과를 시험한 결과에 의하면 50% 에탄올 추출물의 효과가 더 높았다. 따라서 활성 성분 규명은 50% 에탄올 추출물을 대상으로 시행하였다. 여주를 동결 건조하여 분쇄한 것(100 g)에 50% ethanol(v/v)을 2000 mL 가하여 75℃에서 2시간 동안 환류추출을 하여 추출액을 얻는다. 이 과정을 3번 반복하여 얻어진 추출액을 여과한 후 감압농축하였다.

2) 용매에 의한 분획

여주의 50% ethanol 추출물을 증류수에 1g residue/20mL로 분산시켜, 분액여두로 n-hexane(d=0.660), chloroform (d=1.484), ethyl acetate(d=0.898), 1-butanol (d=0.810)으로 순차적으로 분획하였다. 분획한 용매를 감압 건고하여 그 잔사의 인슐린 분비 효과를 시험하였다. 그 결과 미숙과의 경우 용매에 의한 분획에 의하여 활성이 3배 정도 증가하였으며 butanol 층의 효과가 가장 높았다 (표 12). 그러나 씨의 경우는 용매에 의한 분획에 의하여 활성이 증가하지 않았으며 butanol 층의 활성이 높았다 (표 13). 따라서 활성 성분 분리는 미숙과를 대상으로 수행하였다. 여주 미숙과의 50%

ethanol 추출물 1.0 mg/mL은 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비를 32.5배 촉진시켰다. 50% ethanol 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, water로 순차적으로 분획하였을 때, butanol 층의 인슐린 분비 촉진 효과가 가장 높았다.

3) Solid phase extraction (SPE)

앞 서 수행한 용매에 의한 분획 결과로부터 butanol 층의 효과가 높았으므로, butanol 층의 활성 물질의 특성을 파악하기 위하여, 여러 종류의 SPE tubes에 흡착하는 성분들의 인슐린 분비 활성을 조사하였다. 그 결과 미숙과는 C_{18}, cyanopropyl bonded silica, phenyl bonded silica tubes 등에 흡착하는 성분들의 인슐린 분비 효과가 높았다(그림 11의 위쪽). 씨는 C_{18}, cyanopropyl bonded silica, SAX tubes 등에 흡착하는 성분들의 인슐린 분비 효과가 높았다(그림 11의 아래쪽). 일단 미숙과 및 씨가 공통적으로 흡착되는 reversed phase C_{18} SPE column을 이용하여 더 정제하였다. 부탄올층을 reversed phase C_{18} SPE column에 loading 한 후 acetonitrille의 함량을 증가시켜서 용출시킨 분획물의 인슐린 분비 효과를 측정하였다(표 14). 그 결과 acetonitrille 100%로 용출시킨 분획물의 인슐린 분비 효과가 가장 높았다.

표 12. 여주 미숙과의 50% 에탄올 추출물의 용매 분획물의 흰쥐 췌장 소도에서의 인슐린 분비 촉진 효과

여주 시료	농도(㎍/mL)	인슐린 분비량 (ng/5 islets/60min)
미숙과		
50% EtOH 추출물	20	23.59 ± 1.45
용매 분획물		
Hexane 층	20	30.01 ± 2.39
Chloroform 층	20	37.77 ± 4.22
Ethyl aceteate 층	20	40.20 ± 3.40
1-Butanol 층	20	73.89 ± 5.66
Water 층	20	15.07 ± 1.04

평균 ± 표준편차 (n=3)

표 13. 여주 씨의 50% 에탄올 추출물의 용매 분획물의 흰쥐 췌장 소도에서의 인슐린 분비 촉진 효과

여주 시료	농도(㎍/mL)	인슐린 분비량 (ng/5 islets/60min)
씨		
50% EtOH 추출물	20	68.33 ± 4.67
용매 분획물		
Hexane 층	20	35.99 ± 2.30
Chloroform 층	20	41.54 ± 3.21
Ethyl aceteate 층	20	30.17 ± 2.09
1-Butanol 층	20	70.66 ± 5.93
Water 층	20	20.20 ± 1.07

평균 ± 표준편차 (n=3)

그림 11. Solid phase extraction column(SPE)에 의해 분리된 성분의 인슐린 분비 활성. 위쪽 : 여주미숙과, 아래쪽: 여주씨 Means in the same column with the same superscript are not significantly different($p>0.001$).

표 14. 여주의 SPE 분획물이 흰쥐 췌장 소도의 인슐린 분비에 미치는 영향

여주 미숙과 분획물	농도(㎍/mL)	인슐린 분비량 (ng/5 islets/60min)
대조군	-	5.89 ± 0.25
Butanol 층	50	69.59 ± 2.45
SPE 분획물		
DW	50	40.79 ± 10.31
ACN 20	50	39.81 ± 8.62
ACN 40	50	40.22 ± 13.41
ACN 100	50	103.02 ± 1.84

평균 ± 표준편차 (n=3)

n-Butanol 층을 Superclean LC-18 cartridge에 흡착시킨 후 증류수-acetonitrille (ACN) gradient를 이용하여 흡착된 성분을 용출시켰다. 흡착되지 않은 층은 SPE-DW층이라 하고, 흡착된 층 중 ACN 20%로 용출된 층은 SPE-ACN20층, ACN 40%로 용출된 층은 SPE-ACN40층, ACN 100%로 용출된 층은 SPE-ACN100층이라 하고, 인슐린 분비 촉진 작용을 검정하였다. 그 결과 인슐린 분비 촉진 작용은 SPE-ACN100층이 가장 높았다 (표 14). n-Butanol 층 및 SPE로 분획한 층들을 동일한 조건의 HPLC로 분석하였을 때 (그림13), SPE에 의하여 성분들이 분획됨을 확인하였다.

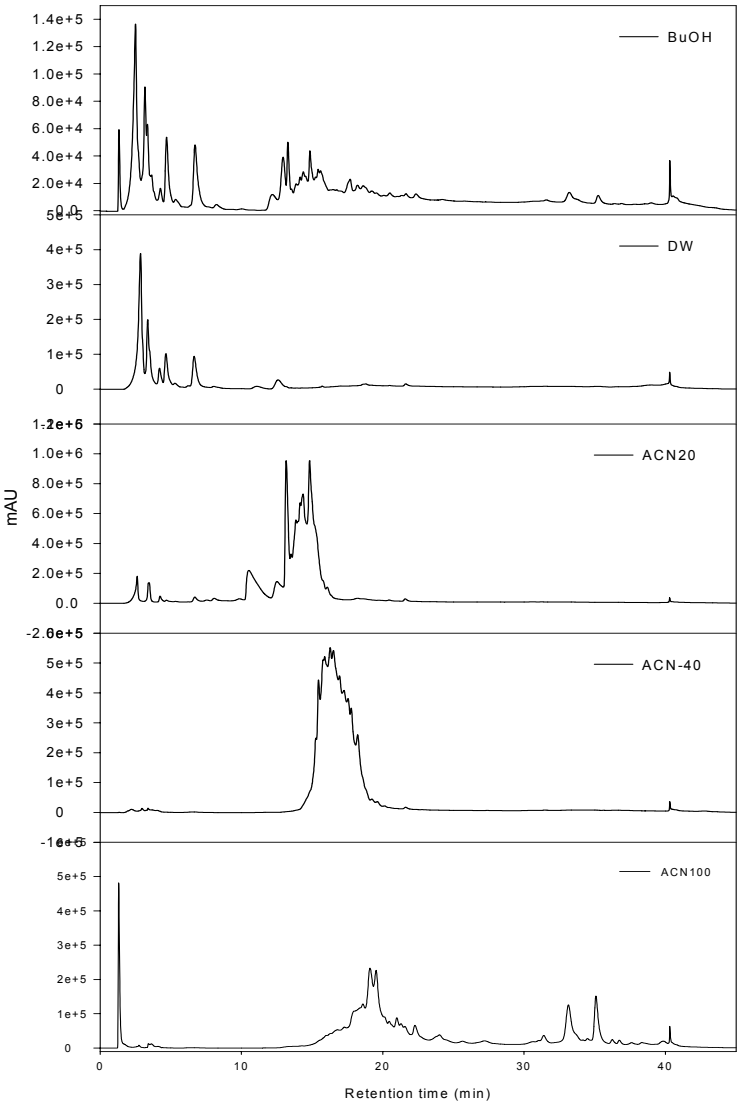


그림 12. 여주 미숙과의 n-butanol 층 및 SPE 분획층을 동일한 조건으로 분석하였을 때의 HPLC chromatogram. 맨 위는 n-butanol 층이며, 아래 4개는 n-butanol층을 SPE로 분획함.

분석조건: Column: BondapakⓇC_{18}, 125Å, 3.9×300mm, 10㎛; Flow rate: 1mL/min; UV detection 208nm; Mobile phase: 0-7min, acetonitrile 5%, 35-40min, acetonitrile 100%, 45-50min, acetonitrile 5%.

4) Silica gel chromatography에 의한 정제

n-Butanol에 의하여 분획한 층을 SPE reversed C_{18} column으로 정제한 후 silica gel chromatography를 시행하였다. 부탄올 층을 methanol에 용해하여 silica gel(Silica gel 60; particle size 0.063～0.200mm; 70～230mesh ASTM, Merck)과 함께 섞은 후 60℃에서 methanol을 완전히 휘발시켜 시료가 silica gel에 흡착되게 하였다. 유리 칼럼(3×60cm)을 chloroform으로 씻은 후 silica gel resin 800g을 chloroform으로 습식 충진 시킨 후 상층부에 chloroform으로 녹인 시료를 스포이드로 충진하고 나서, chloroform/methanol/water gradient (15/3/0, 10/3/0, 13/7/1, 6/4/1, 0/100/0)로 silica gel column chromatography를 실시하였다. column을 통과해 나온 용액을 분취하여, 각각의 fraction을 60㎕씩 TLC plate (25TLC aluminium sheets, 20×20cm Silicagel gel 60 F_{254}, Merck)에 점적한 후 chloroform/methanol/water의 조성을 달리하여 전개하고(15/3/0, 10/3/0, 13/7/1, 6/4/1), 발색시약으로 30% 황산 용액을 spray한 후 105℃에서 5분 가열하여 발색한 후 spot pattern을 확인하여, 동일한 spot으로 확인되면 서로 합쳐 감압농축하여 모두 24개의 fraction으로 분리하였다. DMSO에 용해하여 total saponin 함량과 insulin 분비 효과를 분석하였다 (표 15).

표 15. Silica gel column chromatography로 분획한 분획물의 인슐린 분비 효과 (평균±표준편차, n=3).

분획물 #	10mL씩 분취시 번호	residue (mg)	conc.(㎍/mL)	인슐린 분비량 (ng/5 islets/60min)
F1-1	1-6	60	50	6.23±1.34
F1-2	7-12	55	50	20.64±3.74
F1-3	13-17	40	50	7.46±5.11
F1-4	18-20	70	50	4.47±1.36
F1-5	21-23	45	50	5.56±2.93
F2-1	24-31	35	50	4.77±1.60
F2-2	32-39	30	50	4.04±0.98
F2-3	40-44	35	50	16.29±2.88
F2-4	45-55	55	50	5.41±2.95
F2-5	56-63	25	50	28.77±3.28
F3-1	64-71	30	50	4.38±1.07
F3-2	72-79	40	50	4.38±1.78
F3-3	80-85	70	50	2.94±0.64
F3-4	86-87	25	50	3.07±2.05
F3-5	88-99	295	50	2.78±1.37
F4-1	100-123	560	50	3.17±0.80
F4-2	124-128	180	50	16.76±2.72
F4-3	129-162	870	50	39.63±3.22
F5-1	163-164	280	50	4.20±1.48
F5-2	165	120	50	2.61±0.26
F5-3	166	120	50	4.92±1.89
F5-4	167-171	500	50	137.82±0.13

5) Semi-preparative HPLC에 의한 정제

Silica gel chromatography에 의한 분획물 중에서 인슐린 분비 효과가 높은 분획물을 preparative HPLC로 정제하였다. Waters Delta Prep 3000 system을 사용하였으며, column은 Waters μBondapak C_{18} (125Å, 7.8×300mm)이었으며, UV 212nm에서 detection하였으며, acetonitrille/water gradient로 분취하였다. 그 결과 분획물 F-3의 효과가 가장 높았다 (그림 14).

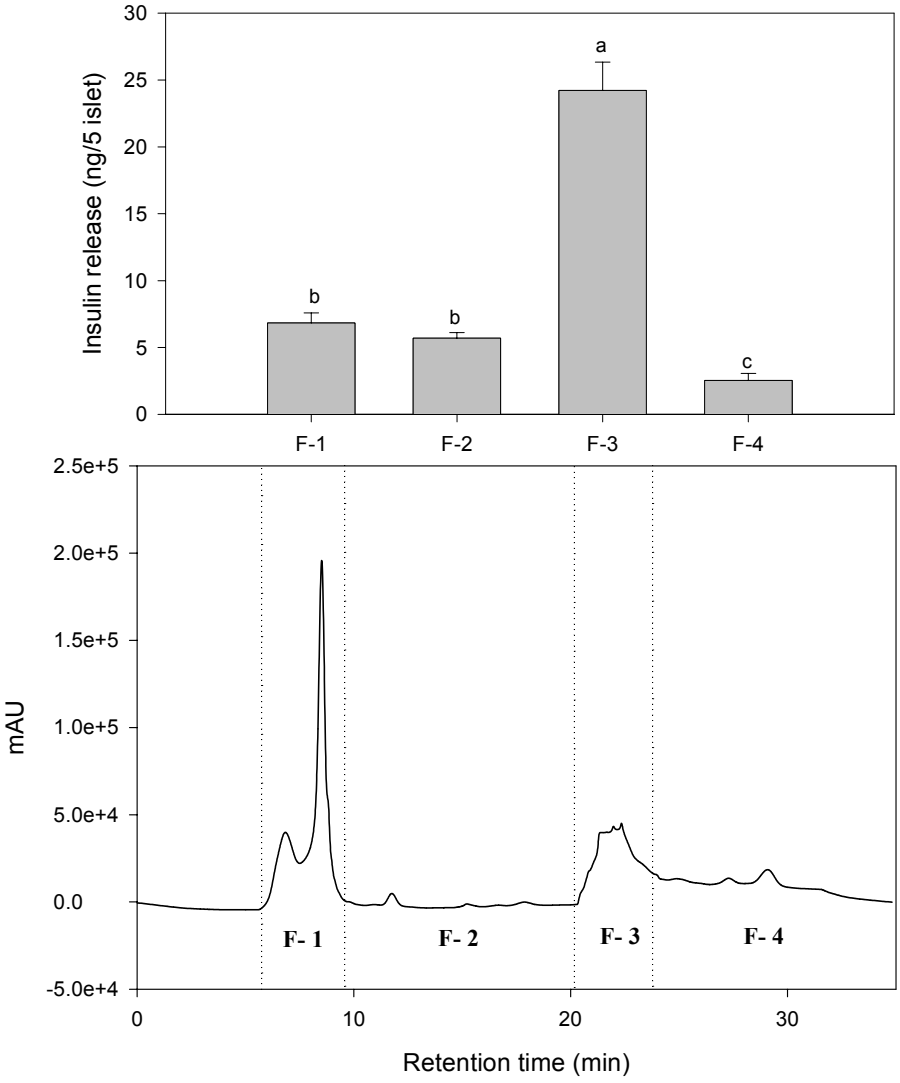


그림 13. 여주의 preparative HPLC 분획물의 인슐린 분비 효과. Means with different letters differ($p>0.001$).

6) HPLC에 의한 정제

Preparative HPLC로 분획한 분획물 중 가장 인슐린 분비 효과가 높은 F-3 분획물을 정제하여 (그림 15), 화합물 1 및 2를 얻어서 인슐린 분비 효과를 측정하였다(표 16). 그 결과 화합물 1 및 2는 F-3 분획물에 비하여 인슐린 분비 효과가 1.5배, 1.7배 높았다.

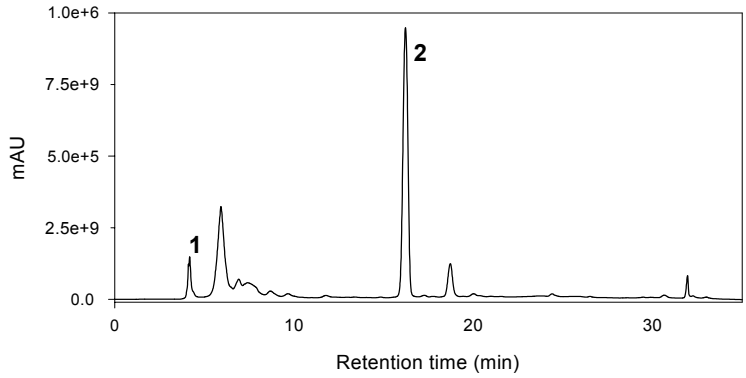


그림 14. F-3 분획물의 HPLC chromatogram. Column은 μBondapak C18(125Å, 3.9×300mm, Waters), UV 208nm에서 감지함. 용매 조건: 0-10min acetonitrille 50→70%, 15-20min acetonitrille 100%, 25-30min acetonitrille 50%.

표 16. 화합물 1 및 2의 인슐린 분비 효과 (평균 ± 표준편차, n=3)

시료	농도(μg/mL)	인슐린 분비량 (ng/5 islets/60min)
대조군	-	5.89 ± 0.25
화합물 1	50	200.1 ± 10.9
화합물 2	50	231.2 ± 20.3

나. 약용작물로부터 인슐린 저항성 개선 성분의 규명

1) 용매에 의한 분획

지방세포에서의 포도당 이동 효과는 씨에 비하여 미숙과가 효과가 높았으므로, 활성 성분의 정제는 미숙과를 대상으로 수행하였다. 여주 미숙과로부터 인슐린 저항성 개선 성분의 정제 과정을 그림 2에 나타내었다. 미숙과의 50% ethanol 추출물 0.5 mg/mL은 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 10nM의 포도당 이동 효과를 2배 증진시켰다. 미숙과의 50% ethanol 추출물을 증류수에 1g residue/20mL의 농도로 분산시켜, 분액여두로 n-hexane(d=0.660), chloroform (d=1.484), ethyl acetate(d=0.898), 1-butanol (d=0.810)으로 순차적으로 분획하였다. 분획한 용매를 감압 건고하여 그 잔사의 지방세포에서의 포도당 이동 효과를 조사하였다. 그 결과 부탄올층의 효과가 높았다(표 17).

표 17. 여주 미숙과 추출물의 용매 분획물의 포도당 이동 효과

Group	Conc.	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake		P value
		mBq/20min	% of insulin only	
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-	-
insulin	10nM	6,288 ± 416	100	**
미숙과 60% ethanol 추출물	0.1mg/mL	9,797 ± 788	156	**
hexane 분획물	0.1mg/mL	7,421 ± 614	118	-
chloroform 분획물	0.1mg/mL	6,482 ± 394	113	-
ethyl acetate분획물	0.1mg/mL	7,090 ± 585	113	-
butanol 분획물	0.1mg/mL	12,700 ± 957	202	**
물 분획물	0.1mg/mL	8,484 ± 811	135	**

미숙과 추출물 및 분획물은 인슐린 10nM과 함께 배양하였을 때의 효과임.***p<0.01 vs. insulin only.

나) Solid phase extraction (SPE)

여주 미숙과의 50% ethanol 추출물의 1-butanol 분획물의 SPE tubes에의 흡착에 의한 효과를 조사하였다. 그 결과 reversed phase C_{18} SPE column에 흡착되는 분획물의 포도당 이동 효과가 높았다(표 18).

표 18. Solid phase extraction 흡착물의 포도당 이동 효과.

Group	Conc.	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake		P value
		mBq/20min	% of insulin only	
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-	-
insulin	10nM	6,288 ± 416	100	**
미숙과 50% ethanol 추출물	0.1mg/mL	9,797 ± 788	156	**
C8 흡착물	0.1mg/mL	10,500 ± 1,132	167	-
C18 흡착물	0.1mg/mL	14,166 ± 1,510	225	-
CN 흡착물	0.1mg/mL	7,111 ± 834	113	-
PH 흡착물	0.1mg/mL	8,011 ± 900	127	-
SAX 흡착물	0.1mg/mL	6,965 ± 620	111	**
SCX 흡착물	0.1mg/mL	6,500 ± 300	103	**
WCX 흡착물	0.1mg/mL	9,627 ± 878	153	**
Silica gel 흡착물	0.1mg/mL	6,627 ± 523	105	-
Diol bonded silica	0.1mg/mL	7,200 ± 667	115	-
Aminopropyl	0.1mg/mL	6,730 ± 626	107	-

미숙과 추출물 및 분획물은 인슐린 10nM과 함께 배양하였을 때의 효과임.***p<0.01 vs. insulin only.

n-Butanol 층을 Superclean LC-18 cartridge에 의하여 SPE-DW층, SPE-ACN20층, SPE-ACN40층, SPE-ACN100층으로 분획하였을 때 포도당 이동 효과는 SPE-ACN40층이 가장 높았다(표 19).

표 19. LC-18 SPE 분획물의 포도당 이동 효과(평균 ± 표준편차, n=3)

Group	Conc.	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake		P value
		mBq/20min	% of insulin only	
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-	-
insulin	10nM	6,288 ± 416	100	-
insulin 10nM+butanol layer	0.1mg/mL	9,990 ± 811	159	-
insulin 10nM+SPE-DW	0.1mg/mL	6,607 ± 788	105	-
insulin 10nM+SPE-ACN20	0.1mg/mL	7,561 ± 450	120	-
insulin 10nM+SPE-ACN40	0.1mg/mL	11,202 ± 975	178	**
insulin 10nM+SPE-ACN100	0.1mg/mL	7,670 ± 659	122	-

**p<0.01 vs. insulin only.

나) Silica gel column chromatography에 의한 정제

SPE로 분획한 분획물 중 가장 포도당 이동 효과가 높은 ACN 40 분획물을 silica gel column에 loading 한 후 chloroform/methanol/water gradient (15/3/0, 10/3/0, 13/7/1, 6/4/1, 0/100/0)로 용출시키면서 10mL씩 분취하여, TLC pattern이 유사한 것끼리 합쳐서 모두 10의 분획물을 얻었다. 이들의 포도당 이동 촉진 효과를 실험한 결과 G-5 및 G-6 분획물의 효과가 가장 높았다(표 20).

표 20. Silica gel column chromatography에 의한 분획물의 포도당 이동 촉진 효과 (평균±표준편차, n=3)

Group	Conc.	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake		P value
		mBq/20min	% of insulin only	
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-	-
insulin	10nM	6,288 ± 416	100	-
insulin 10nM + G-1 분획물	0.1mg/mL	6,331 ± 245	101	-
insulin 10nM + G-2 분획물	0.1mg/mL	9,366 ± 101	149	**
insulin 10nM + G-3 분획물	0.1mg/mL	6,748 ± 614	107	-
insulin 10nM + G-4 분획물	0.1mg/mL	8,130 ± 927	129	-
insulin 10nM + G-5 분획물	0.1mg/mL	20,129 ± 965	320	***
insulin 10nM + G-6 분획물	0.1mg/mL	19,613 ± 994	312	***
insulin 10nM + G-7 분획물	0.1mg/mL	6,440 ± 544	102	
insulin 10nM + G-8 분획물	0.1mg/mL	9,161 ± 634	146	**
insulin 10nM + G-9 분획물	0.1mg/mL	8,385 ± 165	133	-
insulin 10nM + G-10 분획물	0.1mg/mL	6,552 ± 611	104	-

**p<0.01, ***p<0.001 vs. insulin only.

다) Semi-preparative HPLC에 의한 정제

Silica gel column chromatography로 분획한 분획물 중 가장 포도당 이동 촉진 효과가 높은 G-5 및 G-6 분획물을 semi-preparative HPLC로 정제하여 (그림 16, 17), 화합물 3-6을 분리하여 포도당 이동 촉진 효과를 측정하였다. 그 결과 분리한 4개의 화합물 모두는 3T3 L1 지방세포에서 인슐린 10nM의 포도당 이동 효과를 4배 이상

증가시키는 효과가 있었다(표 21).

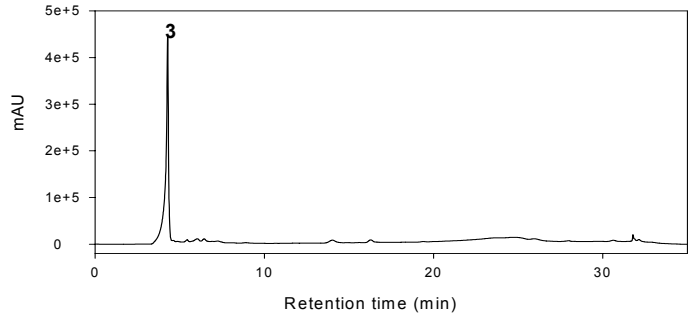


그림 15. G-5 분획물의 HPLC chromatogram. 기기는 Delta Prep 3000(Waters, USA), column 은 μBondapak C18(125Å, 7.8×300mm, Waters), UV 208nm에서 감지함. 용매 조건: 0-10min acetonitrille 50→70%, 15-20min acetonitrille 100%, 25-30min acetonitrille 50%.

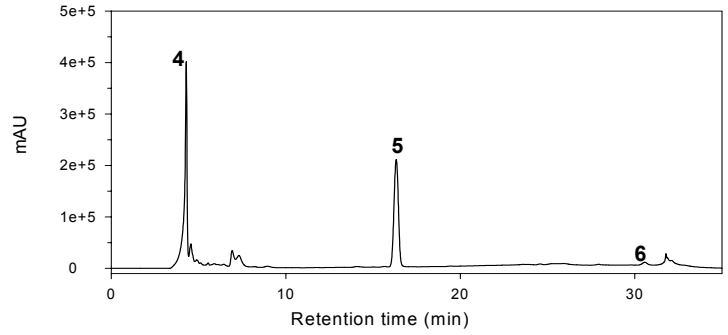


그림 16. G-6 분획물의 HPLC chromatogram. 기기는 Delta Prep 3000(Waters, USA), column 은 μBondapak C18(125Å, 7.8×300mm, Waters), UV 208nm에서 감지함. 용매 조건: 0-10min acetonitrille 50→70%, 15-20min acetonitrille 100%, 25-30min acetonitrille 50%.

표 21. HPLC에 의해 분리한 화합물의 포도당 이동 촉진 효과 (평균±표준편차, n=3)

Group	Conc.	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake		P value
		mBq/20min	% of insulin only	
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-	-
insulin	10nM	6,288 ± 416	100	-
insulin 10nM + 화합물 3	0.1mg/mL	32,450 ± 3449	516	***
insulin 10nM + 화합물 4	0.1mg/mL	33,747 ± 2486	537	***
insulin 10nM + 화합물 5	0.1mg/mL	30,101 ± 3663	479	***
insulin 10nM + 화합물 6	0.1mg/mL	26,240 ± 3764	417	***

***p<0.001 vs. insulin only.

다. 약용작물로부터 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분의 구조 동정

여주 미숙과로부터 인슐린 분비 및 저항성 개선 활성을 세포배양 실험으로 측정하면서, 추출, 분획, column chromatography, preparative HPLC, HPLC 등의 과정을 거쳐서 6개의 화합물을 분리하였다. 이 중에서 화합물 2 및 화합물 5는 NMR 및 MS spectroscopy를 통하여 동일한 화합물임을 확인하였다. 이 화합물의 구조를 NMR 및 MS spectroscopy에 의하여 동정하였다.

1) Nuclear magnetic resonance spectroscopy

1-Dimensional (1-D) NMR (^{1}H, ^{13}C, DEPT135) 및 2-Dimensional (2-D) NMR (COSY, HMQC, HMBC) spectroscopy를 이용하여 화합물 2의 구조를 동정하였다.

^{1}H NMR로부터 특징적인 cholesterol backbone을 알 수 있었다. 즉 NMR up field (1.3 ~ 0.7 ppm)에 singlet 메칠(CH_3) peak 4개와 doublet 메칠(CH_3) peak 1개가 있는 것으로 steroid 임을 추측 할 수 있고, 1.62 와 1.74 ppm에 2개의 singlet 메칠(CH_3) peak가 더 있음을 알수 있다. 또한 5 ~6 ppm에 2개의 doublet peak는 alkene의 이중

결합의 proton으로 2개의 이중결합이 있음을 알 수 있고, 3.4 ~ 4.2 ppm의 3개의 peak들로부터 alcohol이 붙어있는 proton임을 추측할 수 있다. 마지막으로 9.74 ppm의 singlet peak는 aldehyde proton peak임을 예측할 수 있다 (그림 18).

^{13}C NMR으로부터 총 탄소의 개수가 31임를 peak의 개수로 알 수 있으며, ^{1}H NMR에서 예측한 결과들을 입증할 수 있다. 즉 207.1 ppm의 peak로부터 aldehyde가 있음을 증명하며, 122 ~ 144 ppm의 4개의 peak로부터 2개의 이중결합이 있음을 다시 한번 증명할 수 있다. 또한 63 ~74 ppm의 3개의 탄소 peak들로부터 hydroxy group을 포함하는 탄소가 3개가 있음을 알 수 있다 (그림 19).

DEPT135 NMR data로부터 수소를 포함하는 탄소의 종류를 구별할 수 있다. 즉 메칠(CH_3-)탄소, 메칠렌(CH_2-)탄소, 메타인(CH-)탄소, 그리고 수소가 붙어 있지 않은 quarternary carbon을 구별할 수 있다. spectrum으로부터 총 31개의 탄소 peak중 CH_3- peak가 7개, CH_2- peak가 8개, CH- peak가 10개, 그리고 proton이 붙어있지 않은 quarternary carbon이 6개 이다 (그림 20).

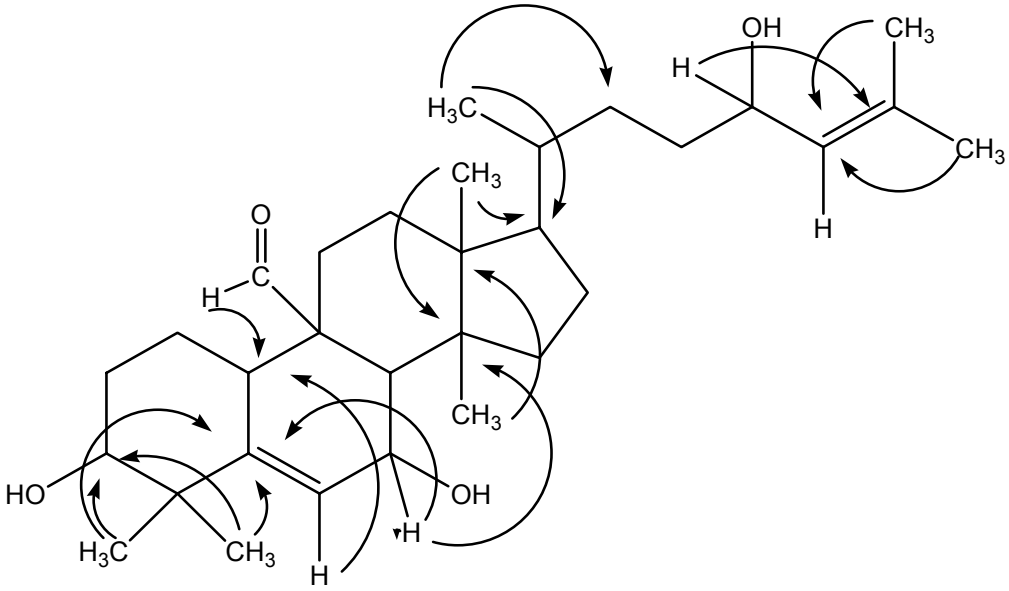
2D NMR의 COSY를 통해서 이웃하는 proton의 위치를 알 수 있다 (그림 21). 또한 HMQC (Proton-Carbon one bonding connection)를 통하여 어느 proton이 어느 carbon과 서로 결합하고 있는 것을 알 수 있다 (그림 22).

HMBC (proton-carbon long-range coupling)를 통하여 위에서 얻은 부분적인 정보를 조합하여 분자 구조를 결정할 수 있었다. 1.6 ppm 근처처의 2개의 메칠 peak들이 130ppm 근처의 metylene 탄소와의 결합을 보이므로 terminal side chain에 이중결합이 있음을 알 수 있고, 0.97ppm 과 1.12ppm 의 메칠 proton peak들이 144.5ppm의 alkene 탄소 peak와 3-bond coupling을 하고, 74.3ppm의 oxygen bearing carbon과 3-bond coupling을 하는 것으로 보아 4번 위치에 2개의 메틸 group이 있고 5번 위치에 이중결합이 있음을 알 수 있다 (그림 23).

9.75ppm의 aldehyde proton이 4.94ppm의 quarternary carbon과 correlation을 하는 것으로 보아 10번 위치에 aldehyde가 존재함을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 화합물 2는 $C_{31}H_{50}O_3$의 분자식을 가지며 분자량 470인 19(R)-methoxy-5 β, 19-epoxycucurbita-6, 23-diene-3 β, 25-diol 이다.

HMBC Correlation



$$MW = C_{31}H_{50}O_3$$

그림 17. HMBC correlation

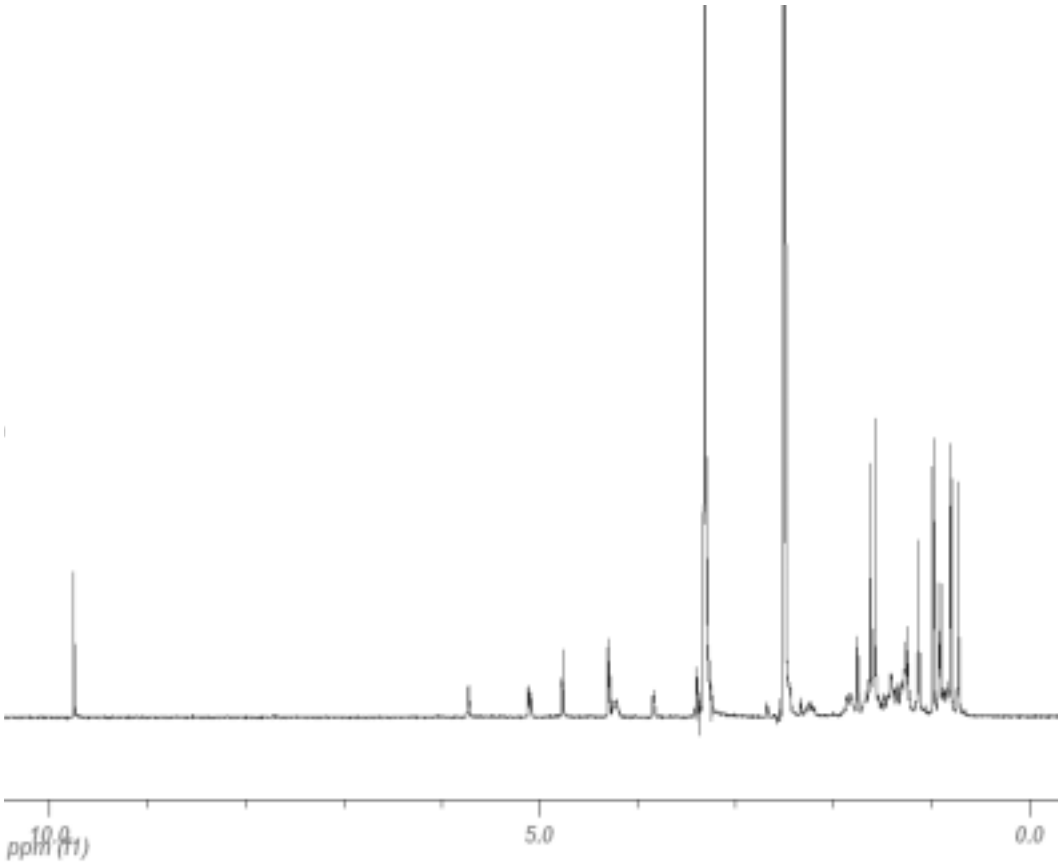


그림 18. 1H NMR spectrum data

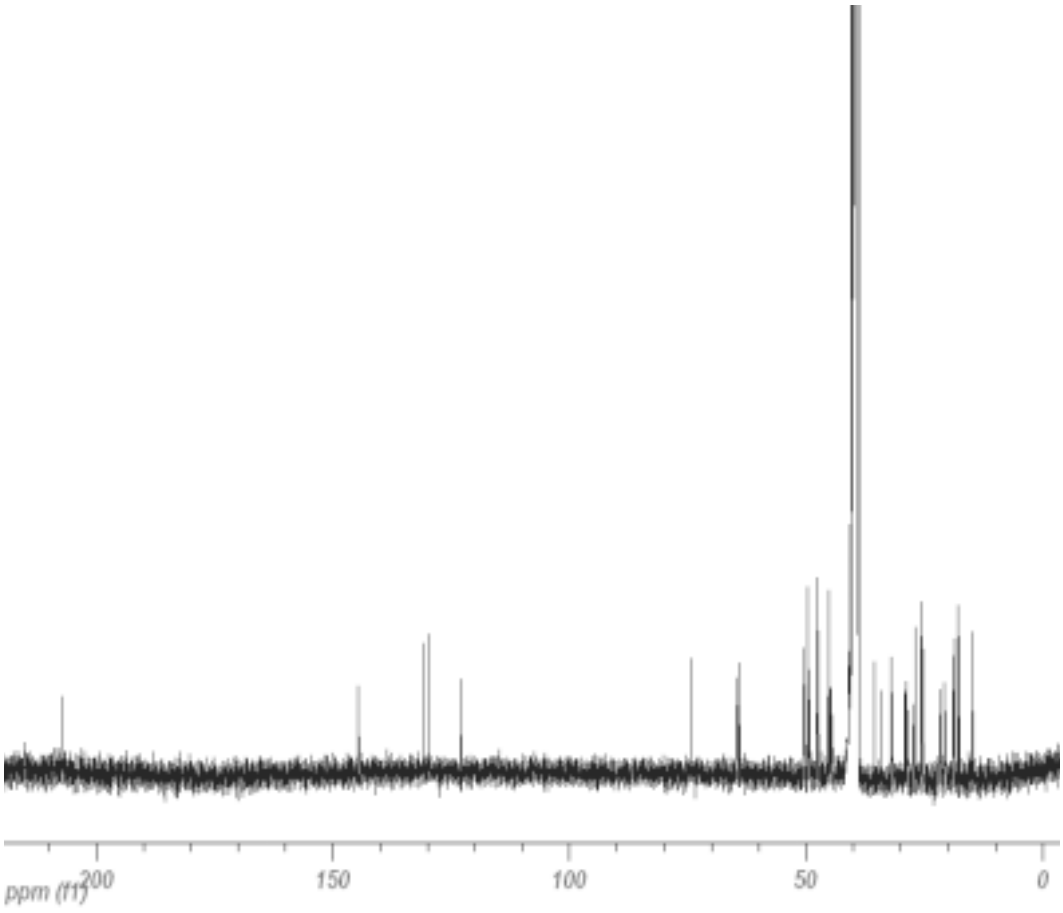


그림 19. 13C NMR spectrum data

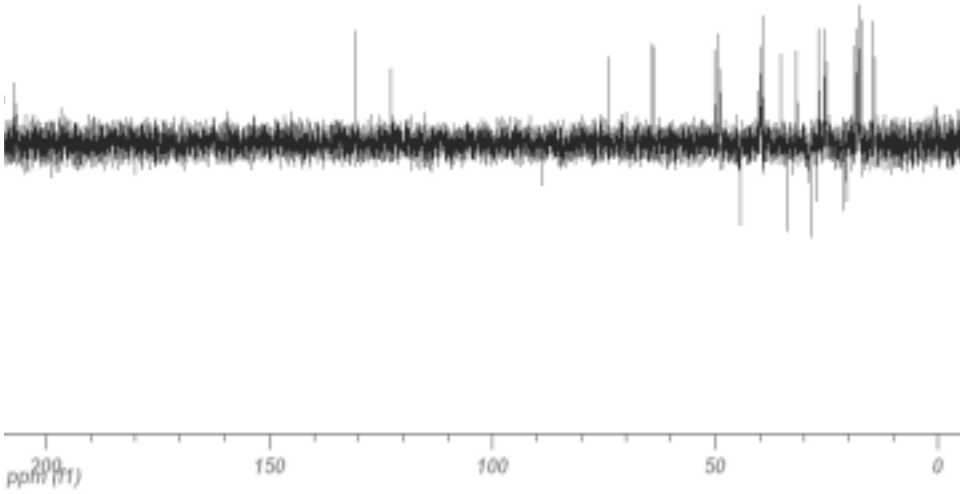


그림 20. DEPT 135 NMR spectrum data

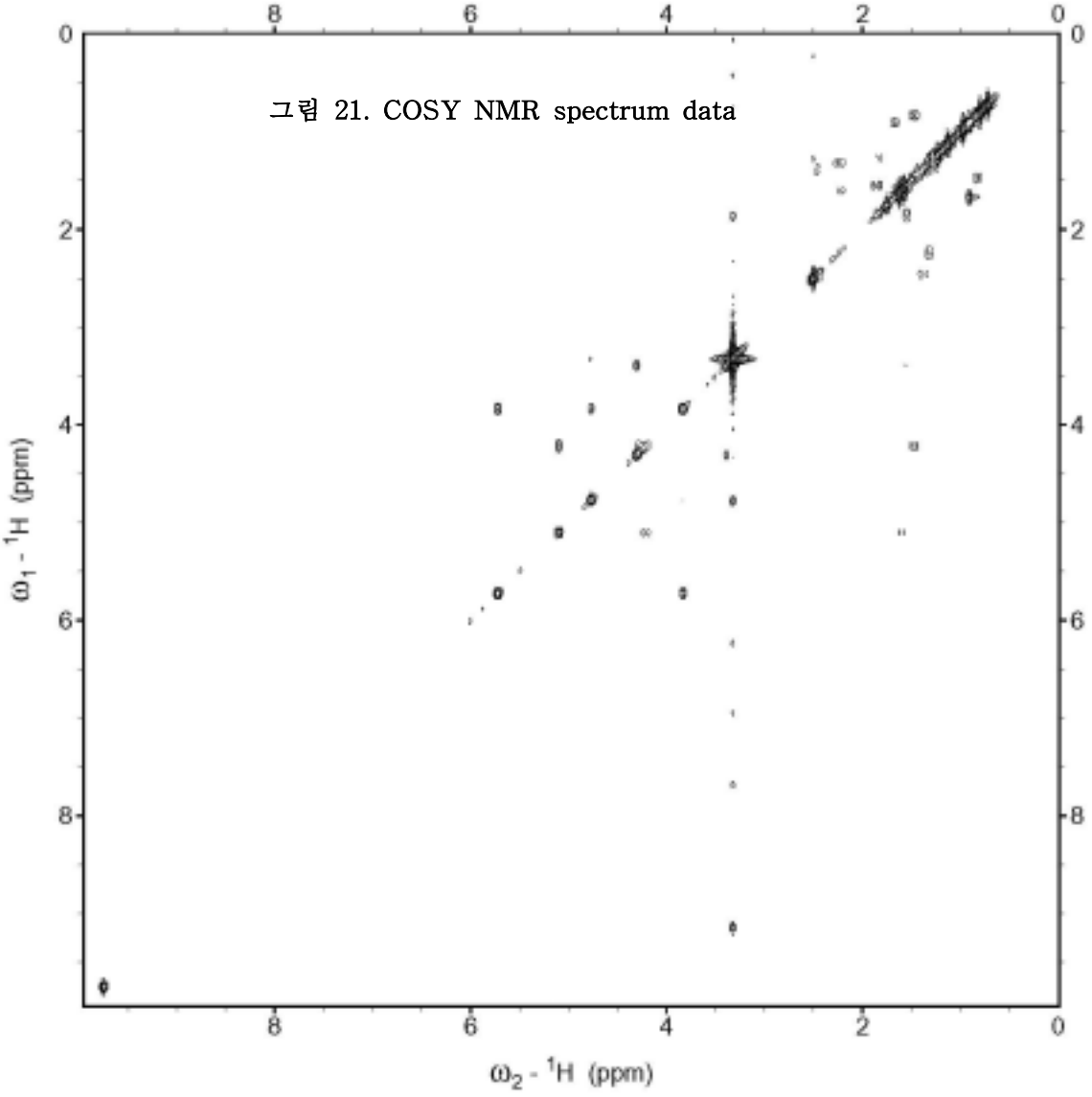


그림 21. COSY NMR spectrum data

그림 21. COSY NMR spectrum data

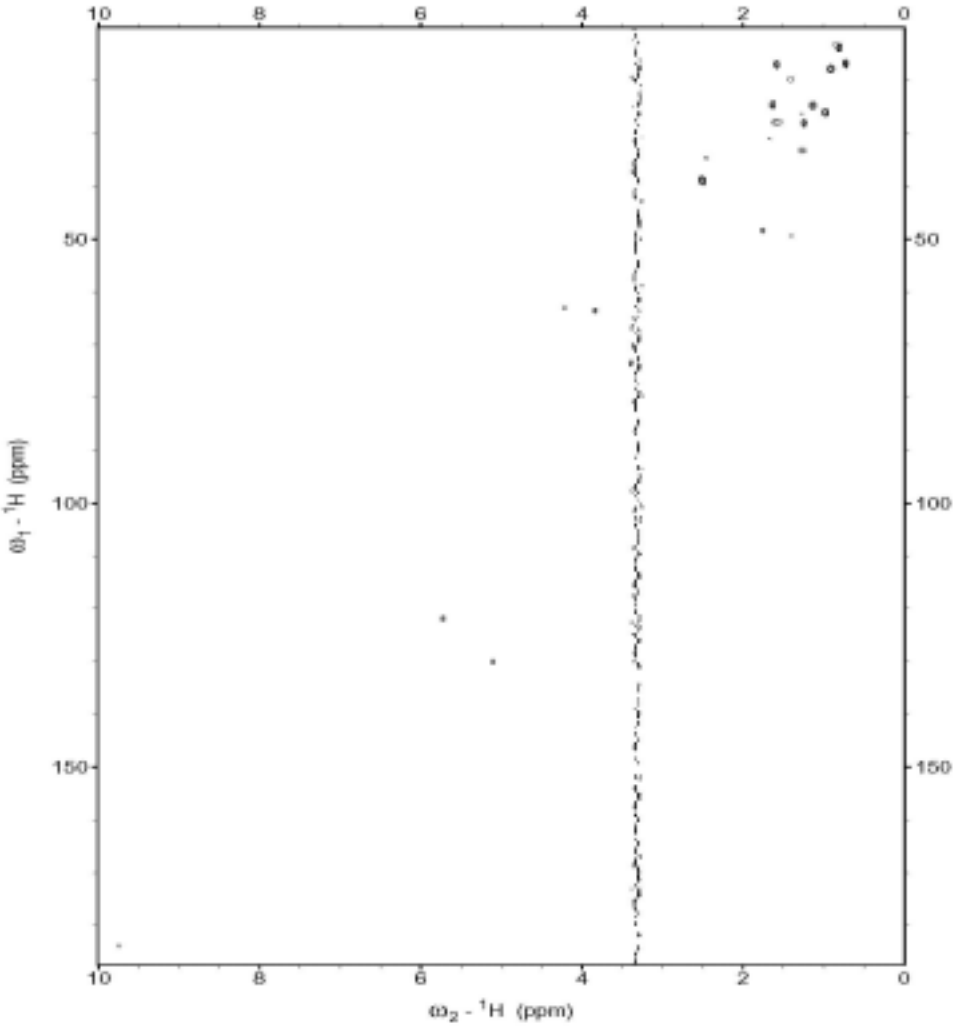


그림 22. HMQC NMR spectrum data

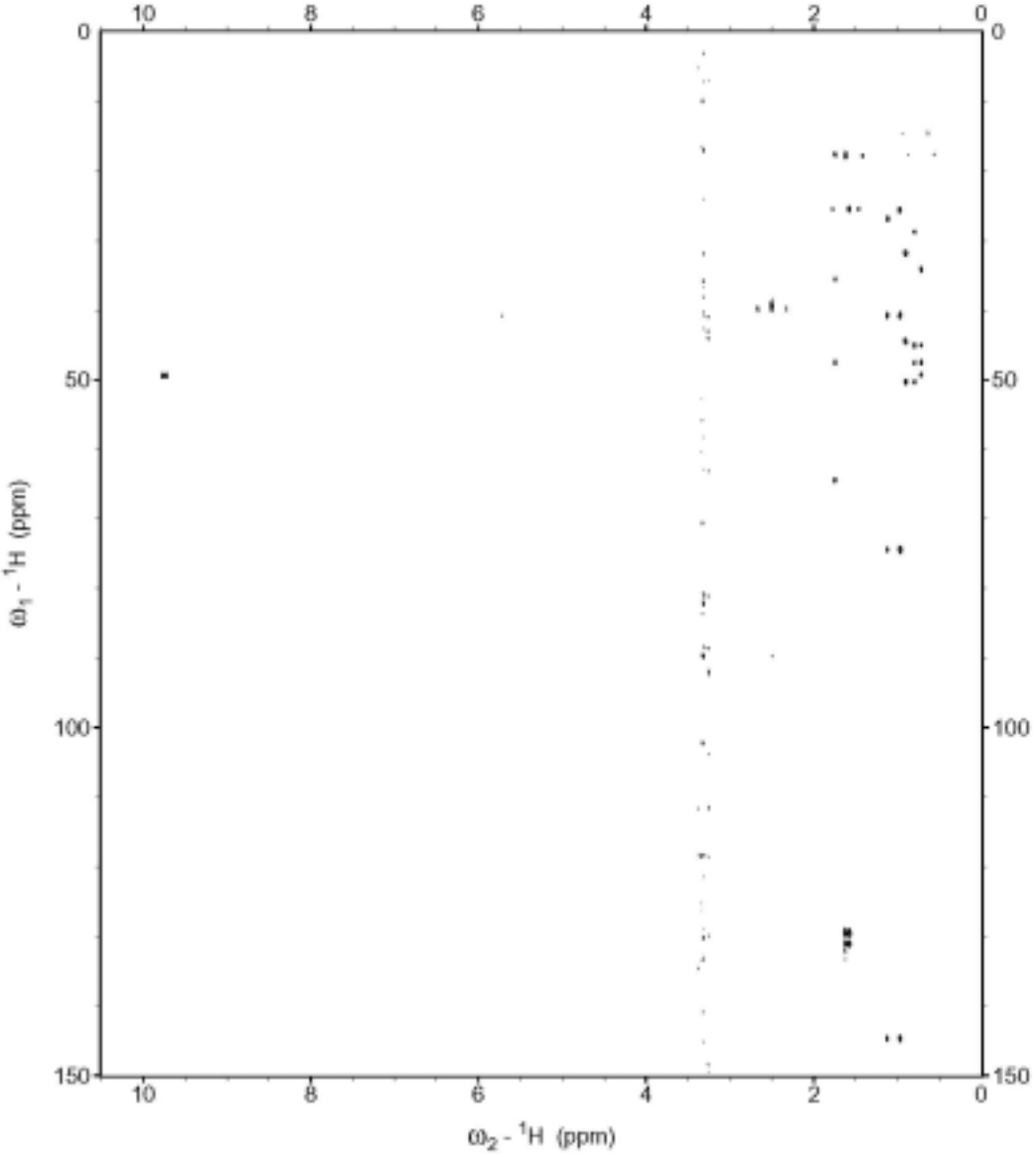


그림 23. HMBC NMR spectrum data

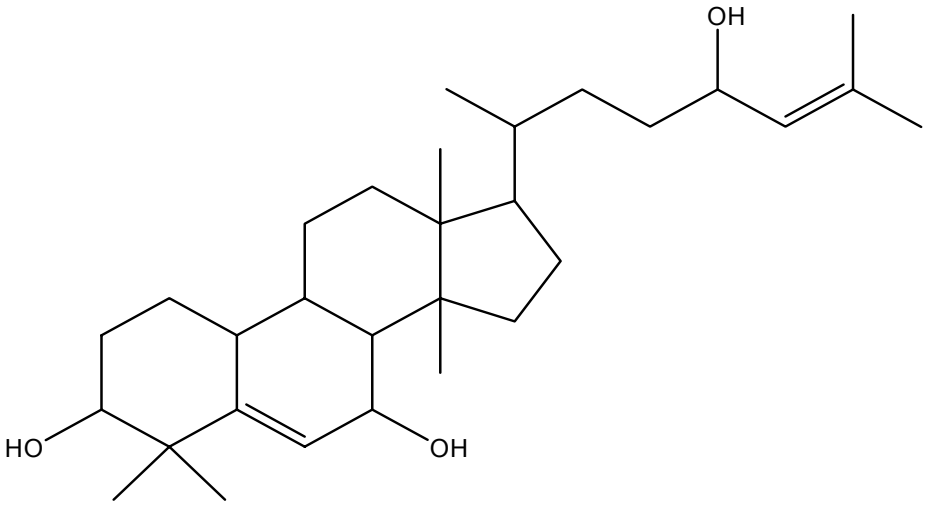
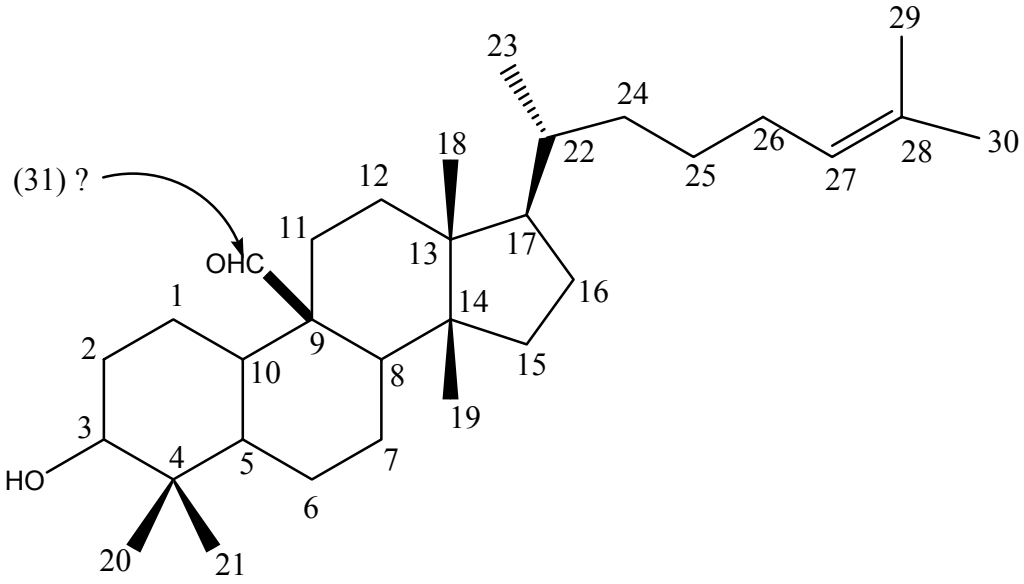


그림 24. 화합물 2의 기본 구조



Cholesterol backbone numbering

그림 25. 화합물 2의 구조 numbering

2) Mass spectroscopy

화합물 2의 positive-ion ESI-MS spectrum (그림 26) 을 보면, quasimolecular ion peak 이 m/z 470.7 $(M+H)^+$ 에 있어서 분자식 $C_{31}H_{50}O_3$ 및 분자량 470을 확인하였다.

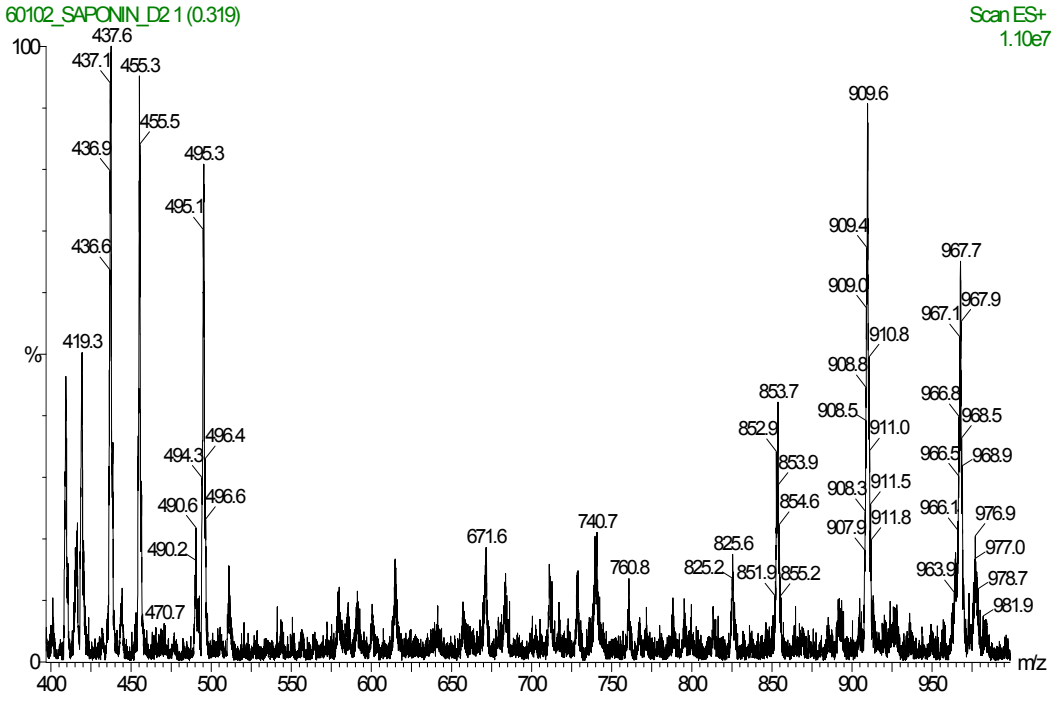


그림 26. 화합물 2의 ESI(+)-MS spectrum

3. 약용작물을 이용한 건강기능식품 제조 공정 확립

가. 원재료의 이화학적 특성 분석

1) 인슐린 분비 소재의 이화학적 특성

가) 열 · 산 · 알칼리에 대한 안정성 분석

여주 미숙과 및 씨의 50% ethanol 추출물을 100℃에서 2시간 끓이거나, 상온에서 0.1N HCl 이나 NaOH과 24시간 동안 반응시킨 후 인슐린 분비 효과를 측정하였다. 그 결과 처리하지 않은 대조군에 비하여 유의적인 차이가 없었다(그림 17). 즉 열, 산, 알칼리에 안정하였다.

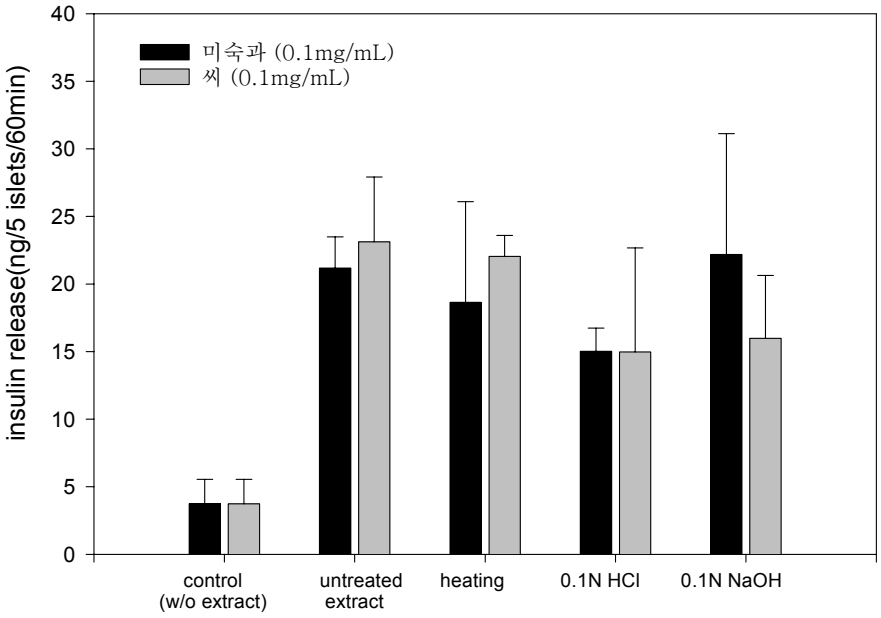


그림 27. 열, 산, 알칼리 처리를 한 여주 미숙과 및 씨의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과. 배지의 포도당 농도는 3.3mM임.

나) 위·장관액에 대한 안정성 분석

Simulated gastric juice (70mM HCl, 86mM NaCl, final pH 1.82) 및 2% pepsin을 첨가한 위액을 처리한 후에도 인슐린 분비 효과에 차이가 없었다. Simulated intestinal juice (69mM NaCl, 48mM $NaHCO_3$, 5mM $CaCl_2$, 0.8mM urea, 0.3% BSA, final pH 8.8) 및 2% amylase, trypsin, lipase, protease를 첨가한 장액에 처리한 후에도 인슐린 분비 효과에 차이가 없었다(그림 18). 이는 여주 미숙과 및 씨의 인슐린 분비 성분은 위장관액에 노출된 후에도 안정됨을 의미한다.

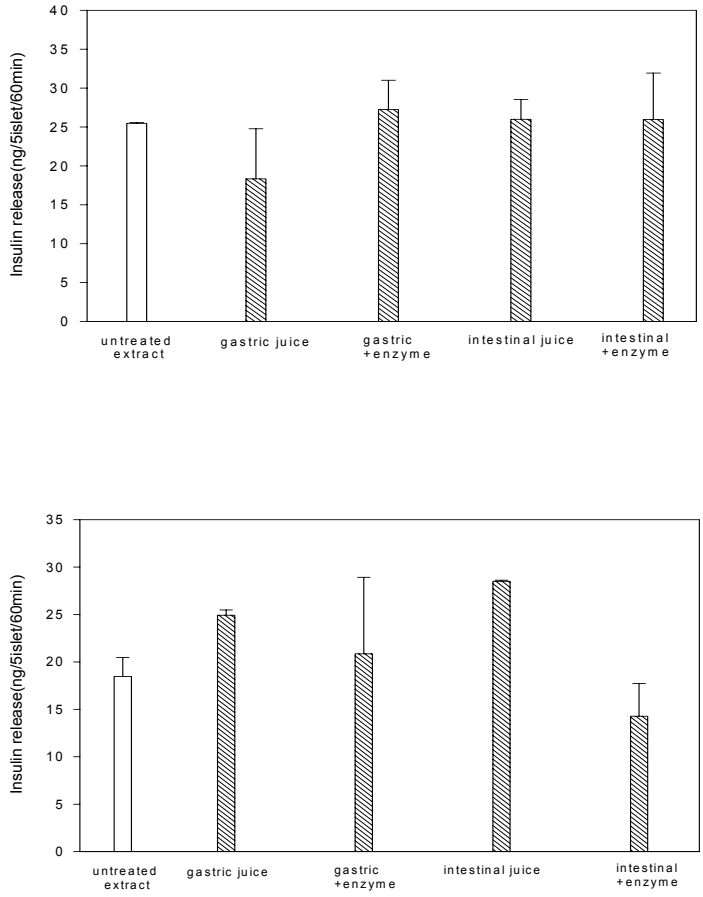


그림 28. 위장관액 처리를 한 여주 미숙과(위쪽) 및 씨(아래쪽)의 50% ethanol 추출물의 인슐린 분비 효과. 배지의 포도당 농도는 3.3 mM이며, 추출물의 농도는 0.13mg/mL임.

다) 추출 용매 및 조성 조건 확립

추출 용매의 종류와 조성이 인슐린 분비 효과에 미치는 영향은 100% ethanol, 50% ethanol, 100% methanol, 50% methanol, 0.1N acetic acid, 0.1N NH_4OH, 100% acetone 등으로 2시간 상온에서 추출하여 조사하였다. 그 결과 50% ethanol로 추출하였을 때 인슐린 분비 성분이 가장 많이 추출되었다(그림 29).

여주미숙과

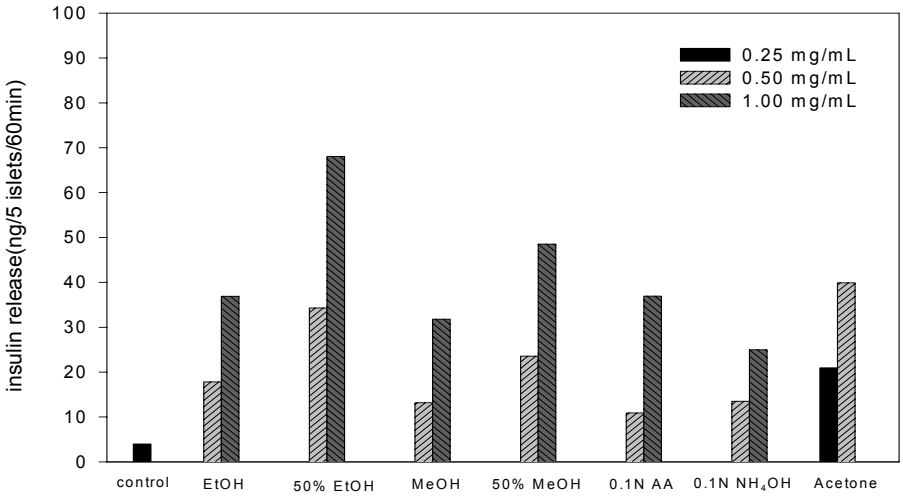


그림 29. 다양한 유기용매를 이용해 추출된 여주미숙과 추출물의 농도별 인슐린 분비 활성

2) 인슐린 저항성 개선 소재의 이화학적 특성 분석

가) 열·산·알칼리에 대한 안정성 분석

여주 미숙과의 50% ethanol 추출물을 100℃에서 2시간 끓이거나, 상온에서 0.1N HCl 이나 NaOH과 24시간 동안 반응시킨 후 포도당 이동 효과를 측정하였다. 그 결

과 처리하지 않은 대조군에 비하여 유의적인 차이가 없었다(표 22). 즉 열, 산, 알칼리에 안정하였다.

표 22. 열・산・알칼리 처리를 한 여주 미숙과 50% ethanol 추출물의 포도당 이동효과

Group	Conc.	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake		P value
		mBq/20min	% of unripe fruit	
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-	-
insulin	10nM	6,288 ± 416	-	-
미숙과 50% ethanol 추출물	0.1mg/mL	9,797 ± 788	100	-
열 처리물	0.1mg/mL	10,172 ± 1,744	104	-
산 처리물	0.1mg/mL	9,722 ± 754	99.2	-
알칼리 처리물	0.1mg/mL	11,011 ± 985	112	-

미숙과 추출물 및 처리물은 인슐린 10nM과 함께 배양하였을 때의 효과임.

나) 위・장관액에 대한 안정성 분석

Simulated gastric juice (70mM HCl, 86mM NaCl, final pH 1.82) 및 2% pepsin을 첨가한 위액을 처리한 후에도 포도당 이동 효과에 차이가 없었다. Simulated intestinal juice (69mM NaCl, 48mM $NaHCO_3$, 5mM $CaCl_2$, 0.8mM urea, 0.3% BSA, final pH 8.8) 및 2% amylase, trypsin, lipase, protease를 첨가한 장액에 처리한 후에도 포도당 이동 효과에 차이가 없었다(표 23). 이는 여주 미숙과의 포도당 이동 효과는 위장관액에 노출된 후에도 안정됨을 의미한다.

표 23. 위장관액 처리를 한 여주 미숙과 50% ethanol 추출물의 포도당 이동효과

Group	Conc.	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake		P value
		mBq/20min	% of unripe fruit	
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-	-
insulin	10nM	6,288 ± 416	-	-
미숙과 50% ethanol 추출물	0.1mg/mL	9,797 ± 788	100	-
위액 처리물	0.1mg/mL	9,561± 1,023	97.6	-
위액+pepsin 처리물	0.1mg/mL	9,670 ± 450	98.7	-
장액 처리물	0.1mg/mL	1,132 ± 975	116	-
장애+효소 처리물	0.1mg/mL	1,098 ± 956	112	-

미숙과 추출물 및 처리물은 인슐린 10nM과 함께 배양하였을 때의 효과임.

다) 추출 용매 및 조성 조건 확립

추출 용매의 종류와 조성이 포도당 이동 효과에 미치는 영향은 100% ethanol, 50% ethanol, 100% methanol, 50% methanol, 0.1N acetic acid, 0.1N NH_4OH, 100% acetone 등으로 2시간 상온에서 추출하여 조사하였다. 그 결과 50% ethanol에 의하여 추출하였을 때 포도당 이동 증진 성분이 가장 많이 추출되었다(표 24).

표 24. 추출 용매의 종류 및 조성이 미숙과 50% ethanol 추출물의 포도당 이동효과에 미치는 영향

추출 용매	추출물의 농도	2-deoxy-[^{3}H] glucose uptake	
		mBq/20min	% of insulin only
basal(KRP)	-	2,607 ± 422	-
insulin	10nM	6,288 ± 416 b	100
50% ethanol	0.1mg/mL	9,797 ± 788 a	156
100% ethanol	0.1mg/mL	6,561 ± 403 b	104
50% methanol	0.1mg/mL	7,754 ± 667 b	123
100% methanol	0.1mg/mL	6,850 ± 575 b	109
0.1N acetic acid	0.1mg/mL	6,098 ± 956 b	97
0.1N NH_4OH	0.1mg/mL	6,551 ± 821 b	168
100% acetone	0.1mg/mL	6,777 ± 925 b	108

각 추출물은 인슐린 10nM과 함께 배양하였을 때의 효과임.

Means with different letters differ($p<0.01$).

나. 여주의 최적 추출 조건 확립

앞서 서술한 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분의 정제 과정에서 여주 미숙과의 50% ethanol 추출물의 n-butanol 분획물은 Libermann-Buchard 반응, 용혈 시험, $Ba(OH)_2$ 침전 반응에 의하여 정성적으로 조사포닌이 함유되어 있음을 확인하였다. 추출과 관련된 최적 조건을 확립하기 위하여, 각 단계에서 조사포닌 함량을 지표로 하여 추출 실험을 수행하였으며, 원심분리 및 여과를 통하여 입자가 큰 고형분을 제거하였다. 이어서 microfiltration 및 ultrafiltration을 통하여 입자가 큰 성분은 제거하였다.

1) 추출 용매

용매를 ethanol 용액(20, 50, 60, 100%) 및 methanol 용액(20, 50, 60, 100%)으로 달리하여 상온에서 200 rpm으로 교반하면서 2시간 동안 추출하였다. 추출 효율은 추출물의 조사포닌 함량을 Libermann-Buchard 반응으로 정량하여 비교하였다. 그 결과 50% ethanol 용액의 추출 효율이 가장 높았다(표 25).

표 25. 추출용매가 여주 미숙과로부터 조사포닌 추출에 미치는 영향(단위는 ㎍/㎎ 추출물임)

용매/조성	20%	50%	60%	100%
Ethanol	131.5±5.55	170.1±8.28	150.0±8.82	151.1±4.92
Methanol	143.5±7.01	148.1±5.92	150.5±9.13	124.1±5.93

결과= 평균±표준편차(n=3).

2) 추출 온도

온도를 25, 50, 70℃로 달리하여 200 rpm으로 교반하면서 50% ethanol로 2시간 동안 추출하였다. 그 결과 70℃에서 추출 효율이 가장 높았다(표 26).

표 26. 추출온도가 여주 미숙과로부터 조사포닌 추출에 미치는 영향

온도	25℃	50℃	70℃
조사포닌 함량 (㎍/㎎ 추출물)	170.0 ± 10.1	198.5 ± 14.9	213.9 ± 15.0

결과= 평균±표준편차(n=3).

3) 추출 시간

시간을 10분, 30분, 1시간, 2시간, 5시간으로 달리하여 200 rpm으로 교반하면서

50% ethanol로 70℃ 추출하였다. 그 결과 2시간 동안 추출하는 것이 가장 효율적이라고 판단되었다(표 27).

표 27. 추출시간이 여주 미숙과로부터 조사포닌 추출에 미치는 영향

추출시간	10 분	30 분	1 시간	2 시간	5 시간
조사포닌 함량 (㎍/㎎ 추출물)	149.2±9.14	130.6±10.76	186.7±7.05	200.4±5.57	210.3±8.10

결과= 평균±표준편차(n=3).

4) Trap filter

고형분 제거를 위해 사용된 trap filter의 pore size은 10 ㎛이며, 유속은 500mL/min이었다.

5) 원심분리

Trap filter로 여과한 여액을 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 농축하였다.

6) Microfiltration

원심분리한 여과액에 대하여 400K membrane을 사용하여 MF를 시도한 결과 permeate flux는 초기에 85 L/m^2・hour에서 말기에는 40 L/m^2・hour로 감소하였다. MF에 소요된 시간은 약 1시간 45분이었다.

7) Ultrafiltration

30 KDa membrane을 사용한 한외여과의 cross flow rate(CFR)가 1.5 L/min이고

transmembrane pressure difference (TMP)가 15 psi일 때가 최적 조건이었다. 초기 flux는 35 L/m^2・hour이었다.

8) Reverse osmosis에 의한 농축 공정 확립

최대 작동 가능 압력보다 조금 낮은 압력인 500 psi, 온도 35℃에서 RO를 실시하였다. 그 결과 permeate의 flux는 초기에 28 L/m^2・hour에서 concentration factor (CF)가 3으로 증가함에 따라 20 L/m^2・hour로 감소하였으며 permeate의 saponin 함량은 CF가 1, 2, 3일 때 각각 2.1, 5.8, 40.0 ㎍/mL이었다. 한편 retentate의 경우 초기의 saponin 함량이 655 ㎍/mL에서 CF가 2, 3으로 증가함에 따라 1457, 4078 ㎍/mL로 각각 2.22, 6,23배 증가하였다.

9) 진공감압건조기에 의한 농축 조건 확립

진공감압 건조기의 농축 온도가 농축 시간 및 효율에 미치는 영향은 표 28에 나타내었다. 그 결과 40℃가 최적 온도이었다.

표 28. 진공감압건조기를 이용한 농축에서 농축 온도가 농축 효율에 미치는 영향

농축온도(℃)	30	40	50	60
여과액 1L을 농축하는데 걸리는 시간(분)	300	90	45	30
조사포닌 함량 (㎍/㎎ 추출물)	200.4±10.2	201.1±10.9	156.8±7.05	95.5±7.05

결과= 평균±표준편차(n=3)

다. Pilot plant 실험

본 연구에서 얻어진 결과를 산업화함에 있어서 공정면에서 적응하기 어려운 공정

의 대체 공정의 확립과 대량 생산 시에 야기될 수 있는 기술적인 측면의 문제점을 해결하기 위하여 100 L 규모의 추출을 행하고 이후의 분리 농축 공정을 수행하였다. 실험실적 방법으로는 추출 후 여과 → 원심분리 → trap filter의 3단계 공정이 적용되었으나 연속식 원심분리기로 10,000 rpm에서 깨끗하게 분리함으로써 공정을 단순화할 수 있었다. 이후 MF 및 UF 공정에서는 이미 확립한 조건을 적용하였을 때 문제가 없었다. 이후 RO 공정에서의 permeate flux는 21 L/m^2・hour로 통상적으로 산업화에 적용되고 있는 RO 공정에서의 flux (30 L/m^2・hour)와 거의 대등한 값을 나타내었다.

감압농축은 centrifugal thin film evaporator에 의하여 40℃에서 0.1mm의 박막을 이용하여 이루어졌으며 약 50분이 소요되었다. 농축 후에는 spray drier를 사용하여 건조하였다.

다. 여주를 이용한 건강기능식품의 제조

2002년 제정되어 2004년 1월 31일부터 시행되고 있는 '건강기능식품에 관한 법률'에서는 건강기능식품의 형태는 통상적인 식품의 형태가 아닌 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조하여 가공한 식품으로 규정하고 있다. 따라서 본 연구에서는 앞서 서술한 가항 및 나항의 결과로부터 제조된 여주 추출물을 원료로 하여 건강기능식품을 제조하는 실험을 수행하였다.

1) 정제

여주 추출물을 이용한 정제의 제조는 여주 추출물을 정제용 틀에 넣고 압력과 열을 가하여 제조하였다.

2) 캅셀

여주 추출물을 이용한 건강기능식품 형태의 하나인 캅셀의 제조에 관한 것으로서, 쓴맛이 강하여 복용이 불편하거나 거부감을 가지기 쉬운 여주 추출물의 쓴맛을 차단하여 소비자가 복용이 편리하도록 상품 가치를 극대화하기 위해 지방산 에스테르 및 셀룰로오스 고분자 물질, 메타크릴산 공중합체 등을 이용하여 여주 추출물로 캅셀을 제조하였다.

여주 추출물 60-95% 중량%에 스테아릴 스테아레이트의 지방산 에스테르와 에틸 셀룰로오스의 셀룰로오스 고분자 물질이 3-5:1로 혼합된 1차 벽재 물질 3-20 중량%를 심지물에 유동층 코팅기를 사용하여 코팅하고, 상기 1차 코팅 위에 유드라지트 L30 D-55, 콜리코트 MAE 30 DP에서 선택된 1종 이상의 메타크릴산 공중합체 2-20%를 2차 벽재 물질로 재차 유동층 코팅기를 사용하여 2차 코팅시켰다.

3) 분말

여주 미숙과를 50% 주정으로 추출한 후 여과, 원심 분리를 거쳐서, 진공감압농축기로 농축한 후 동결 건조한 후 분쇄하여 여주 추출물 분말을 제조하였다.
다른 식물

4) 과립

여주 추출물을 이용한 과립의 제조는 추출물의 함량을 10% 범위, 무수결정포도당의 함량은 60-70% 범위일 때 과립화하기에 가장 적당하였으며 그 이상 첨가하면 과립화하기엔 반죽이 너무 질었고, 색상이 너무 진하였다. 여주 추출물 과립의 제조 공정을 그림 과 같이 확립하였다.

분말 원료 계량

여주추출물 10%

설탕(분말) 20%

무수결정 포도당 70%

↓

혼합
↓
정제수 첨가
↓
교반 및 반죽 (Mixer 기 이용)
↓
과립화 (20-40 mesh 내림)
↓
건조 (dry oven에서 24hr)

그림 30. 여주 추출물의 과립 제조 공정

5) 액상

여주 미숙과를 50% 주정으로 추출한 후 여과, 원심분리를 한 후 고형분 함량이 65%가 될 때까지 감압농축하여, 액상 형태의 여주 미숙과 추출물을 제조하였다.

6) 환

여주 추출물, 꿀, 올리고당, 밀가루풀, 정제수와 함께 혼합, 반죽하여 자환기에서 국수 모양으로 성형하였다. 이 때 내려진 가락이 서로 달리붙지 않게 밀가루 분말을 뿌려 주었다. 자환기에서 국수 가닥처럼 내려진 가닥을 절단기에 환 모양으로 절단하여 제환하고 절단된 환들을 환제틀에 넣고 정환한 다음 열풍 건조기에서 40-50℃, 3-4시간 건조하였다 (그림 31).

원료 (여주 미숙과를 50% 주정으로 추출한 후 농축하여 동결건조시켜 분쇄한 것)
↓
배합 및 혼합 (먼저 분말인 원료를 믹서기로 혼합한 후 액상 원료인 꿀, 밀가루풀 (밀가루:물=1:6)을 혼합하여 반죽함)
↓
반죽

↓
자환 (반죽물을 자환기에 들어갈 수 있게 일정한 모양으로 성형한 후 자환기에 내리고 가닥이 서로 붙지 않도록 밀가루를 뿌려줌)
↓
제환 (내려진 가닥에 골고루 밀가루를 뿌리고 제환기의 절단 간격을 조절한 후 한 가닥씩 절단하여 제환함)
↓
정환
↓
건조 (정환된 환을 열풍건조기에서 40-50℃, 3-4시간 건조시킴)

그림 31. 여주 추출물의 환 제조 공정

그림 32. 여주 추출물을 이용한 건강기능식품

상기와 같이 여주 추출물로 제조한 건강기능식품의 형태에 관한 실험을 수행하였다. 실험한 형태 중에서 여주 추출물은 약간의 쓴 맛이 있기는 하지만 너무 역하여 반드시 캅셀로 만들어야 하는 정도는 아니었으며, 과립 및 환은 부재료가 첨가되어 여주의 효능을 약화시킨다. 따라서 여주의 효능 및 섭취하기 편리한 형태 등을 고려하면 정제가 가장 바람직한 형태인 것으로 판단되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점

구분	연구개발목표		달성도
1차년도 (2002)	○ 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 추출	○ 약용작물로부터 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분을 추출 정제하였는가?	100%
	○ 약용작물의 세포계에서의 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용 확인	○ 세포배양계에서 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용을 확인하였는가?	
	○ 약용작물의 최적 추출 조건 확립	○ 약용작물의 최적 추출조건을 확립하였는가?	
2차년도 (2003)	○ 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 정제	○ 약용작물로부터 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분을 정제하였는가?	100%
	○ 약용작물의 생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용 검증	○ 약용작물의 생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용을 확인하였는가?	
	○ 약용작물의 최적 여과 및 농축 조건 확립	○ 약용작물의 최적 여과 및 농축 조건을 확립하였는가?	
3차년도 (2004)	○ 약용작물의 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 분리 및 구조 분석	○ 약용작물로부터 인슐린 분비 및 저항성 개선 성분 분리하였는가?	100%
	○ 약용작물의 생체내 내당능 장애 개선 작용 확인	○ 개발된 소재의 생체내 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용, 내당능 장애 개선 작용을 확인하였는가?	
	○ 약용작물을 이용한 건강기능식품 제조 공정 확립	○ 약용작물의 최적 건조 및 대량 생산 조건을 확립하였는가?	

제 2 절 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도

본 연구는 여주의 인슐린 분비 및 저항성 개선 기능을 이용하여 내당능 장애 혹은 당뇨병 전단계를 개선할 수 있는 건강기능식품 제조 기술을 개발하였으므로 계획된 목표를 100% 달성하였다. 각각의 세부내용도 계획된 목표를 100% 달성하였다.

내당능 장애 발생의 가장 주요한 기작인 인슐린 분비 장애 및 인슐린 저항성 증가에 있어서, 여주가 어떻게 작용하는지를 *in vitro* 흰쥐 췌장 소도 베타세포 및 생쥐 지방섬유아세포를 이용하여 규명하였으므로, 계획된 목표를 100% 달성하였다. 즉 여주를 부위별로 나누어서 준비하여, 효능 확인 및 성분 정제 실험을 수행한 결과 과실 및 씨는 효능 및 성분이 유사한 것으로 판단되어서 생체내 효능 확인 및 성분 분리는 과실을 대상으로 수행하였다. 흰쥐 췌장 소도에서 여주 과실 및 씨의 50% ethanol 추출물 1.0 mg/mL은 각각 32.5배, 39.3배 인슐린 분비를 촉진시킴을 확인하였다. 3T3-L1 지방세포에서 여주 과실 및 씨의 50% ethanol 추출물 0.5 mg/mL은 인슐린 10nM과 함께 배양하였을 때 인슐린 10nM의 효과의 각각 2배, 1.6배 증진시킨는 효과를 확인하였다. 여주 과실 및 씨의 50% ethanol 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, water로 순차적으로 분획하였을 때, 과실 및 씨 모두 chloroform 및 butanol 층의 인슐린 분비 효과가 가장 높음을 확인하였다. 여주 과실의 50% ethanol 추출물을 용매로 순차적으로 분획하였을 때, 과실 물층의 포도당 이동 효과가 가장 높음을 확인하였다. 여주 과실 및 씨의 50% ethanol 추출물은 열, 산, 알칼리 등에 안정하였다. 여주 과실 및 씨를 다양한 종류의 용매로 추출하여 인슐린 분비 효과 및 포도당 이동 효과를 측정하였을 때, 50% ethanol 추출물의 효과가 가장 높았다.

여주의 인슐린 분비 및 저항성 개선 작용을 당뇨병 모델 동물을 이용한 생체 실험으로 확인하였으며, 활성 성분은 silica gel column chromatography 및 preparative HPLC로 정제하여 단일 화합물로 분리하였으며, 조사포닌을 지표 물질로 하여 효율적 추출 여과 농축 조건을 확립하였으므로, 계획된 목표를 100% 달성하였다. 활성 성분 정제에서는 여주 미숙과를 50% ethanol로 추출하여 n-butanol 분획물을 얻어 solid phase extraction, silica gel column chromatography, preparative HPLC를 통하여 인슐린 분비 촉진 물질 2개를 분리하였으며, 인슐린 저항성 개선 물질을 4개 분리하였으므로 계획된 목표를 100% 달성하였다.

생체내 효과 확인에서는 제2형 당뇨 모델 동물인 GK rat 및 제1형 당뇨 모델 동물인 NOD mice를 이용하여 인슐린 분비 개선 및 인슐린 저항성을 통하여 혈당이 조절됨을 입증하였으므로 계획된 목표를 100% 달성하였다.

추출 조건 확립에서는 효율적 추출 용매, 온도, 시간, 여과 조건 등을 확립하였으므로 계획된 목표를 100% 달성하였다.

농산물 시장 개방 시대에 부응할 수 있는 고소득 대체 작물로서의 가능성을 제시하여 농촌경제의 활성화를 이루고 가공 및 유통 과정에서의 소득 창출과 고용 증대를 꾀할 수 있을 것으로 기대된다. 여주의 부위별 효능 및 추출 처리 조건에 따른 효능의 변화를 체계적으로 살펴봄으로써 이후의 여주의 연구에 유용한 연구 자료를 제공하여 관련 분야의 발전에 기여하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

혈당강하 기능에 대한 인체 시험이 추가 연구로 필요하다.

건강기능식품 업체에 기술 이전할 예정이다.

편집순서 8

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.