

## 100종 नेपाल 식물 추출물로부터 $\alpha$ -Amylase 및 $\alpha$ -Glucosidase 저해제의 선별

김미선<sup>1</sup> · 안선미<sup>1</sup> · 정인창<sup>1</sup> · 권기석<sup>2</sup> · 손호용<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>안동대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>안동대학교 생명자원과학부

**Screening of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from Nepalese Plant Extracts. Kim, Mi-Sun<sup>1</sup>, Seon-Mi Ahn<sup>1</sup>, In-Chang Jung<sup>1</sup>, Gi-Seok Kwon<sup>2</sup>, and Ho-Yong Sohn<sup>1\*</sup>.** <sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea, <sup>2</sup>The School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea – In the course of screening for anti-acidosis and anti-diabetes agent from natural products, the inhibitory activities of Nepalese plant extracts against microbial  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase were evaluated. Among the 100 different kinds of ethanol extracts, *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don and *Myrica nagi* Thunb showed strong inhibition activities against  $\alpha$ -amylase. The IC<sub>50</sub> values of *C. deodara* (Roxb.) G. Don, *M. nagi* Thunb and acarbose, a commercial available anti-diabetes agent, were 44.5, 47.5 and 50.5  $\mu$ g/mL, respectively. Considering the crude extract of *C. deodara* (Roxb.) G. Don, and *M. nagi* Thunb, these extracts have strong potentials as anti-acidosis or anti-diabetes agent. In a while, *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) extract showed a good inhibition activity to  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, even it was recently reported. The selected three extracts did not show any hemolysis activity against human red blood cell up to 1 mg/mL, and the inhibition activities were maintained by heat or acid treatment. Moreover, treatment of HCl (0.01N) for 1 h into *C. operculatus* (Roxb.) and *M. nagi* Thunb increased the inhibition activity from 50% to 70%. Our results suggest that *C. deodara* (Roxb.) G. Don, *M. nagi* Thunb, and *C. operculatus* (Roxb.) are potential as anti-acidosis and anti-diabetes agents.

**Key words:** *Cedrus deodara*, *Cleistocalyx operculatus*, *Myrica nagi*, nepalese plant extract,  $\alpha$ -amylase inhibitor,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor

### 서 론

자연계의 수 많은 생명체들은 생명유지를 위한 탄소원 공급이 필수적이다. 이산화탄소 고정반응을 갖지 못한 생명체는 외부로부터 탄소원을 공급받아 생명을 영위하게 되는데, 주된 자연계의 탄소원으로는 당질, 전분질, 목질계 등이 있다. 이중 전분질의 경우 다양한 amylase와 glucosidase에 의해 분해되며 생성된 당은 탄소원 및 에너지원으로 이용되므로 전분분해 효소들의 대사적 중요성을 이해 할 수 있다. 그러나 종종 이들 전분 분해효소들의 조절되지 않은 반응은 당의 급격한 생성과 이에 따른 유기산 생성을 야기하여 당뇨, 산독증(acidosis) 등의 질병을 유발하게 된다[4-6, 9]. 따라서 이러한 질병을 예방하기 위해서는 전분질의 공급을 제한하거나  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 효소활성을 조절 할 필요가 있으며[7, 11], 실제 acarbose와 같은  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제들이 인간의 type II 당뇨병 및 반추동물의 산독증 예방 및 치료를 위해 이용되어 왔다[2, 18, 19]. 그러나 acarbose와 같이 임상에서 사용되고 있는  $\alpha$ -amylase

및  $\alpha$ -glucosidase 저해제들은 전분분해 억제 효과 및 혈당상승 억제 효과는 우수하지만, 지속적으로 복용, 급여시에는 설사와 복통을 동반하는 것으로 알려져 있어[10, 15], 보다 안전한  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제 개발이 필요한 실정이다.

최근까지, 많은 연구자들이 안전성이 확보된 천연물로부터 안전하고 우수한 효과를 가지는  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제들을 탐색해 온 결과, Lim 등[15]은 1,400여종의 국내 자생 목본류의  $\alpha$ -amylase 저해활성을 평가하여 최종적으로 말채나무 추출물의 유용성을 보고하였으며, 그 외 황기[26], 왕겨[9], 산사자[11], 미세조류[8] 등에서 다양한  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성이 알려져 있다. 또한 quercetine과 같은 hydroxyflavones의  $\alpha$ -glucosidase 저해효과도 보고되었으며[4, 13]. 최근에는 다양한 인도 자생식물체로부터  $\alpha$ -amylase 저해제 선별[2] 및 베트남 식용식물체로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해제 선별 결과[17]도 보고된 바 있다.

본 연구에서는 반추동물의 급성 산독증 및 인간 type II 당뇨병의 예방 및 치료제 개발을 위한 연구의 일환으로, 100종의 नेपाल 식물 추출물을 이용하여 미생물 유래의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 평가하였다. 이는 국내 자생식물체에 대한  $\alpha$ -amylase 저해활성 탐색이 이미 광범위하게

\*Corresponding author

Tel: 82-54-820-5491, Fax: 82-54-820-7804

E-mail: hysohn@andong.ac.kr

진행되어 왔으며, 또한 국내의 기후조건과는 전혀 다른 네 팔의 경우 새로운 생리활성 소재가 다양하게 존재[3, 22, 23] 하는 것으로 알려지면서, 네 팔 자생 식물의 생리활성 탐색이 활발하게 이루어지고 있음[1, 12, 20, 21, 24]을 반영한 것이다. 그 결과 현재 임상에서 사용되고 있는 acarbose보다 강력한  $\alpha$ -amylase 저해활성을 나타내는 2종의 추출물을 선정하였으며, 또한  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase에 대해 동시에 강력한 저해 활성을 나타내는 1종을 선별하였다. 최종 선별된 3종의 추출물은 인간 적혈구에 대해 용혈활성을 나타내지 않으며, 열 및 산 처리에도 안정하여 반추동물의 급성 산독증 및 인간 당뇨병 치료에도 이용 가능하리라 판단된다.

## 재료 및 방법

### 천연물 시료 및 효소

본 연구의 시료는 네 팔의 자생식물 100종으로부터 조제된 methanol 추출물로 한국자생식물사업단(<http://extract.pdrc.re.kr>)으로부터 구입하여 사용하였다. 추출물의 종류, 학명, 과명 및 사용부위는 Table 1에 나타내었으며, 추출물은 Dimethylsulfoximide(DMSO)에 녹인 후 원하는 농도로 조정하였다. 사용 효소는 반추동물 산독증에 관련되는 미생물 유래의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase를 구입하여 사용하였으며,  $\alpha$ -amylase는 *Bacillus amyloliquifaciens*,  $\alpha$ -glucosidase는 *Aspergillus niger* 유래의 효소를 국내의 전분가공업체 (ApisBio Co. Daegu, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

### $\alpha$ -amylase 저해 활성

$\alpha$ -amylase 저해활성은 Lim 등[15]의 방법을 수정하여 사용하였다. 먼저 다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu$ L와 50 mM phosphate buffer(pH 6.8)로 희석한  $\alpha$ -amylase(0.25 U/mL) 25  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후, 0.5% soluble starch(Samchun Chemicals Co., Korea) 25  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 10분간 반응하였다. 이후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 반응액에 150  $\mu$ L의 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid, Sigma Co., USA) 용액을 가하여 100°C에서 5분간 가열하여 발색한 후 상온에서 방냉하였다. 발색액은 96 well microplate reader(Tecan Co., USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 3회 반복한 후 평균값을 구하여 다음의 식으로 저해율을 계산하였다. 저해율(%)=[1-(시료 첨가구 효소활성/대조구 첨가구 효소활성)] $\times$ 100. 효소활성은 unit로 환산하여 나타내었으며,  $\alpha$ -amylase 활성을 50% 저해하는 농도를 IC<sub>50</sub>으로 계산하였다.

### $\alpha$ -glucosidase 저해 활성

다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu$ L와 50 mM Sodium acetate buffer(pH 5.6)로 희석한  $\alpha$ -glucosidase(0.68 U/mL)

25  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후, 0.5% soluble starch (Samchun Chemicals Co., Korea) 25  $\mu$ L를 가하여 60°C에서 10분간 반응하였다. 이후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰으며, 생성된 포도당을 DNS 용액을 가하여 동일한 방법으로 발색한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 실험은 3회 반복한 후 평균값을 구하여 저해율을 계산하였다. 한편 pNPG(p-nitrophenol glucoside; Sigma Co., USA)를 이용한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 Lim 등[15]의 방법을 이용하여 평가하였다. 다양한 농도의 천연물 시료 2.5  $\mu$ L와 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.6)로 희석한  $\alpha$ -glucosidase(0.25 U/mL) 25  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 하고 1 mM pNPG 용액 25  $\mu$ L를 가하여 60°C에서 10분간 반응하였다. 이후 1M NaOH 25  $\mu$ L를 가하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다.

### 인간적혈구에 대한 용혈 활성

네 팔 천연물 추출물들의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다[25]. 먼저 PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100  $\mu$ L를 96-well microplate에 가하고 시료용액 100  $\mu$ L를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100  $\mu$ L를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다. 시료의 용매 대조구로는 DMSO(2%), 실험 대조구로는 triton X-100(0.1%)을 사용하였다. 용혈활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$(\%) \text{ hemolysis} = [(Abs. S - Abs. C) / (Abs. T - Abs. C)] \times 100$$

Abs. S: 시료 첨가구의 흡광도, Abs. C: DMSO 첨가구의 흡광도, Abs. T: triton X-100 첨가구의 흡광도

### 선정시료의 열 및 산 안정성

최종 선정된 3종의 추출물을 각각 100  $\mu$ g/mL 농도로 조정 후 열 안정성 및 산 안정성을 평가하였다. 열 안정성의 경우 80°C에서 60분간 열처리 후 잔존  $\alpha$ -amylase 저해활성을 평가하였으며, 산 안정성의 경우에는 pH 2(0.01N HCl) 조건에서 60분 처리 후 pH 7로 조정 후 잔존  $\alpha$ -amylase 저해활성을 평가하였다. 대조구로는 100  $\mu$ g/mL 농도의 acarbose를 이용하였다.

### 통계처리

실험결과의 통계분석은 SPSS program을 이용하여 mean  $\pm$ SD로 나타내었으며, one-way ANOVA 분석 및 Duncan의 다중비교검정(p<0.05)을 실시하였다.

**Table 1. The list of Nepalese plants used in this study.**

No.	Scientific name	Family	Used part
1	<i>Abelmoschus moschatus</i> Medik.	Malvaceae	seed
2	<i>Abrus precatorius</i> L.	Fabaceae	seed
3	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	Amaranthaceae	stem
4	<i>Acorus calamus</i> L.	Araceae	root
5	<i>Adhatoda vasica</i> Nees	Acanthaceae	leaf
6	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corrêa	Rutaceae	fruit
7	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corrêa	Rutaceae	bark
8	<i>Allium hypsistum</i> Stearn	Liliaceae	leaf
9	<i>Allium sativum</i> L.	Liliaceae	root
10	<i>Alstonia scholaris</i> (L.) R. Br.	Apocynaceae	bark
11	<i>Amaranthus viridis</i> L.	Amaranthaceae	whole
12	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb.	Thymelaeaceae	heartwood
13	<i>Argemone mexicana</i> L.	Papaveraceae	stem
14	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Asteraceae	Whole
15	<i>Asparagus racemosus</i> Willd.	Liliaceae	Root
16	<i>Astilbe rivularis</i> Buch	Saxifragaceae	root
17	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Meliaceae	leaf
18	<i>Bauhinia variegata</i> L.	Fabaceae	bark
19	<i>Berberis aristata</i> DC.	Berberidaceae	leaf, stem
20	<i>Berberis aristata</i> DC.	Berberidaceae	root
21	<i>Bergenia ciliata</i> (Haw.) Sternb.	Saxifragaceae	root
22	<i>Betula utilis</i> D. Don	Betulaceae	bark
23	<i>Boerhavia diffusa</i> L.	Nyctaginaceae	stem
24	<i>Bombax ceiba</i> L.	Bombacaceae	flower
25	<i>Buddleia asiatica</i> Lour.	Loganiaceae	leaf, stem
26	<i>Butea monosperma</i> (Lam.) Taub.	Fabaceae	fruit
27	<i>Caesalpinia crista</i> L.	Fabaceae	seed
28	<i>Calotropis gigantea</i> (L.) R. Br.	Asclepiadaceae	leaf
29	<i>Carum bulbocastanum</i> Koch	Apiaceae	seed
30	<i>Carum roxburghianum</i> (DC.) Kurz	Apiaceae	fruit
31	<i>Cassia angustifolia</i> Vahl	Fabaceae	leaf
32	<i>Cassia fistula</i> L.	Fabaceae	root bark
33	<i>Cassia tora</i> L.	Fabaceae	seed
34	<i>Cedrus deodara</i> (Roxb.) G. Don	Pinaceae	stem
35	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Apiaceae	whole
36	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl	Lauraceae	leaf, stem
37	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Lauraceae	bark
38	<i>Cissampelos pareira</i> L.	Menispermaceae	root
39	<i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrad.	Cucurbitaceae	seed
40	<i>Cleistocalyx operculatus</i> (Roxb.) Myrtaceae	Myrtaceae	bark
41	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	whole
42	<i>Cuminum cyminum</i> L.	Apiaceae	seed
43	<i>Curcuma angustifolia</i> Roxb.	Zingiberaceae	root
44	<i>Curcuma longa</i> L.	Zingiberaceae	root
45	<i>Cuscuta reflexa</i> Roxb.	Convolvulaceae	stem
46	<i>Cynodon dactylon</i> Pers.	Poaceae	whole
47	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Cyperaceae	root
48	<i>Desmodium gangeticum</i> (L.) DC.	Fabaceae	whole
49	<i>Didymocarpus albicaulis</i> C.B. Clarke	Gesneriaceae	leaf
50	<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	Dioscoreaceae	root
51	<i>Dolichos biflorus</i> L.	Fabaceae	seed
52	<i>Drymaria diandra</i> Blume	Caryophyllaceae	whole

**Table 1. Continued.**

No.	Scientific name	Family	Used part
53	<i>Eclipta erecta</i> L.	Asteraceae	whole
54	<i>Embelia ribes</i> Burm. f.	Myrsinaceae	fruit
55	<i>Entada phaseoloides</i> (L.) Merr.	Fabaceae	seed
56	<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	Asteraceae	leaf, stem
57	<i>Euphorbia hirta</i> L.	Euphorbiaceae	whole
58	<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.	Polygonaceae	seed
59	<i>Ferula narthex</i> Boiss.	Apiaceae	Resin
60	<i>Galinsoga ciliata</i> S.F.Blake	Asteraceae	leaf, stem, flower
61	<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	Asteraceae	whole
62	<i>Gaultheria fragrantissima</i> Wall.	Ericaceae	Leaf
63	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Fabaceae	Root
64	<i>Gmelina arborea</i> Roxb. ex Sm.	Verbenaceae	Root
65	<i>Gymnema sylvestre</i> (Retz.)	Asclepiadaceae	Leaf
66	<i>Holarrhena pubescens</i> Wall. & G.Don	Apocynaceae	bark, seed
67	<i>Leucas cephalotes</i> (Roth) Spreng.	Lamiaceae	whole
68	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Liliaceae	Seed
69	<i>Luffa echinata</i> Roxb.	Cucurbitaceae	Fruit
70	<i>Mammea longifolia</i> Planch. & Triana	Clusiaceae	fruit, bud
71	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Meliaceae	bark
72	<i>Mesua ferrea</i> L.	Clusiaceae	flower
73	<i>Mimosa pudica</i> L.	Fabaceae	whole
74	<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	fruit
75	<i>Mucuna nigricans</i> (Lour.) Steud.	Fabaceae	seed
76	<i>Mucuna prurita</i> Hook.	Fabaceae	seed
77	<i>Myrica nagi</i> Thunb.	Myricaceae	bark
78	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Myricaceae	seed
79	<i>Nardostachys jatamansi</i> (D. Don) DC.	Valerianaceae	root
80	<i>Nelumbium nucifera</i> Gaertn.	Nymphaeaceae	seed
81	<i>Nyctanthes arbor-tristis</i> L.	Oleaceae	leaf
82	<i>Ocimum sanctum</i> L.	Lamiaceae	whole
83	<i>Operculina turpethum</i> (L.) J. Silva	Convolvulaceae	root
84	<i>Oroxylum indicum</i> (L.) Kurz	Bignoniaceae	root bark
85	<i>Oxalis corniculata</i> L.	Oxalidaceae	whole
86	<i>Oxalis latifolia</i> Kunth	Oxalidaceae	whole
87	<i>Parnassia nubicola</i> Wall. ex Royle	Saxifragaceae	root
88	<i>Anethum sowa</i> Roxb. ex Fleming	Apiaceae	fruit
89	<i>Phyllanthus emblica</i> L.	Euphorbiaceae	fruit
90	<i>Piper longum</i> L.	Piperaceae	fruit
91	<i>Piper nigrum</i> L.	Piperaceae	fruit
92	<i>Pistacia chinensis</i> Bunge	Anacardiaceae	gall
93	<i>Psoralea corylifolia</i> L.	Fabaceae	seed
94	<i>Pterocarpus marsupium</i> Roxb.	Fabaceae	stem
95	<i>Pterocarpus santalinus</i> L. f.	Fabaceae	heartwood
96	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	Fabaceae	root
97	<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	fruit
98	<i>Raphanus sativus</i> L.	Brassicaceae	seed
99	<i>Rheum webbianum</i> Royle	Polygonaceae	root
100	<i>Rhododendron lepidotum</i> Wall.	Ericaceae	leaf, stem

**결과 및 고찰**

**100종 시료의  $\alpha$ -amylase 저해활성**

100종 नेपाल 천연물의  $\alpha$ -amylase 저해활성을 평가한 결과는 Table 2에 나타내었다. 0.5 mg/mL 농도에서 86종의

**The inhibitory activity of Nepalese plants extract against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, and hemolytic activity against human red blood cell.**

No.	$\alpha$ -amylase inhibition (%)		$\alpha$ -glucosidase inhibition (%)		Hemolysis against hRBC (%)		
	0.5*	1.0	DNS*1* pNPG***		0.1	0.25	0.5
			0.5	0.5			
1	19.31	21.61	23.65	-1.83	0.00	69.61	93.14
2	6.89	2.50	18.36	2.42	0.00	0.00	0.00
3	9.60	8.66	10.48	2.63	0.00	0.00	0.00
4	7.16	8.28	23.85	-3.36	0.00	0.00	8.72
5	11.60	10.96	27.38	-8.27	0.00	0.00	0.00
6	12.52	12.19	19.28	-2.27	0.00	0.00	0.00
7	10.21	10.21	23.29	-13.86	0.00	0.00	0.00
8	16.05	18.34	21.36	-0.40	0.00	0.00	0.00
9	11.63	15.17	20.86	-0.55	0.00	0.00	0.00
10	6.45	12.71	19.58	-11.70	0.00	0.00	0.00
11	7.40	8.57	18.73	-1.90	0.00	0.00	0.00
12	40.84	46.76	20.17	-2.85	0.00	0.00	3.22
13	2.35	1.40	15.79	-0.80	0.00	0.00	0.00
14	12.60	12.83	16.64	-3.26	0.00	0.00	0.00
15	3.80	6.91	13.81	-0.93	0.00	0.00	0.00
16	61.25	62.57	8.54	2.04	0.00	0.00	0.00
17	9.01	10.71	15.43	-9.45	0.00	0.00	0.00
18	56.16	52.26	10.65	8.45	0.00	0.00	0.00
19	3.40	15.67	20.82	16.82	0.00	0.00	0.00
20	8.56	11.69	21.27	0.17	0.00	0.00	0.00
21	50.33	57.12	19.19	7.84	0.00	0.00	0.00
22	2.26	2.32	15.32	-7.85	0.00	0.00	0.00
23	0.18	0.77	21.80	-2.40	0.00	0.00	0.00
24	21.90	21.56	16.61	-2.83	0.00	0.00	0.00
25	3.78	6.51	28.13	4.51	2.15	89.51	92.07
26	9.21	32.95	25.39	-14.35	0.00	0.00	0.00
27	11.28	11.03	26.76	-3.21	0.00	58.70	93.08
28	7.09	13.40	28.64	2.67	0.00	0.00	0.00
29	13.93	12.79	30.42	0.99	0.00	10.17	25.09
30	13.31	19.11	34.67	4.28	0.00	65.72	83.70
31	3.74	6.19	23.70	-0.10	0.00	0.00	0.00
32	18.18	24.55	19.63	-2.18	0.00	0.00	0.00
33	3.16	9.25	27.49	-4.97	0.00	0.00	0.00
34	53.27	50.10	16.31	4.12	0.00	0.00	0.00
35	-2.85	2.07	16.58	1.30	0.00	0.00	0.00
36	-1.41	21.56	23.21	-2.45	0.00	0.00	0.00
37	40.25	54.94	21.52	5.79	0.00	0.00	0.00
38	0.58	3.55	22.90	3.83	0.00	0.00	0.00
39	16.00	6.42	16.80	-3.26	0.00	94.60	87.87
40	52.18	50.19	18.69	4.73	0.00	0.00	0.00
41	27.25	7.81	27.20	-1.26	0.00	1.30	10.52
42	8.71	14.11	24.97	-21.07	2.26	1.29	4.99
43	16.20	11.92	23.07	-5.70	3.62	0.00	0.00
44	-1.45	-10.74	28.58	5.70	21.13	100.00	100.00
45	12.88	12.01	23.30	0.45	3.10	8.75	12.07
46	16.71	18.66	35.84	7.33	3.46	6.77	11.48

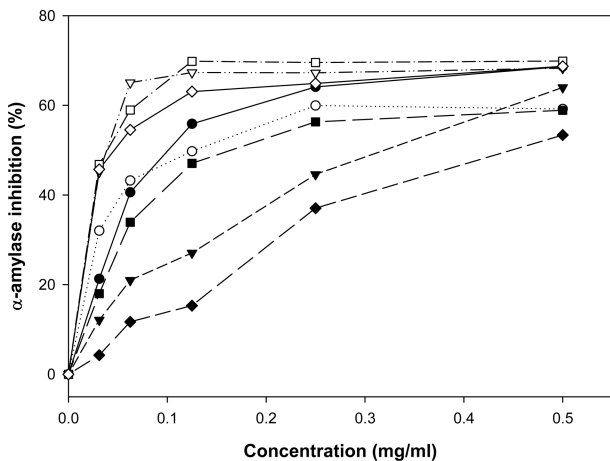
**Table 2. Continued**

No.	$\alpha$ -amylase inhibition (%)		$\alpha$ -glucosidase inhibition (%)		Hemolysis against hRBC (%)		
	0.5*	1.0	DNS*1* pNPG***		0.1	0.25	0.5
			0.5	0.5			
47	22.83	23.84	15.22	2.62	6.68	10.74	19.83
48	17.37	17.20	24.09	6.39	4.18	16.00	11.97
49	9.60	11.46	15.51	6.67	0.00	6.97	11.61
50	8.47	20.23	16.38	12.65	1.25	5.12	3.10
51	-0.46	-4.40	23.91	5.54	1.81	6.35	6.45
52	-3.69	0.95	16.29	1.79	4.21	4.53	3.01
53	-1.15	-3.64	17.51	5.54	5.60	31.35	99.45
54	47.58	65.59	21.73	2.61	5.15	48.92	71.62
55	-16.83	2.00	21.61	-1.91	7.85	39.44	95.75
56	-5.23	3.33	19.95	2.02	4.89	3.14	8.56
57	2.88	11.12	22.19	2.44	0.00	0.00	7.55
58	12.46	13.49	18.44	-5.36	0.00	36.94	99.29
59	-3.35	2.47	20.12	12.23	1.48	1.64	7.13
60	-1.56	2.41	19.16	3.73	0.00	0.00	0.00
61	5.99	6.98	11.62	-3.32	0.00	0.00	0.00
62	8.15	29.58	17.73	-2.70	0.00	0.00	0.00
63	15.95	16.78	0.00	-3.26	0.00	0.00	0.00
64	25.96	16.78	19.02	7.26	0.00	2.03	16.84
65	16.44	15.35	19.92	17.30	0.00	44.80	95.13
66	20.50	23.34	30.47	-1.19	0.00	43.99	93.05
67	11.62	13.57	25.99	1.71	0.00	0.00	0.00
68	24.70	17.86	28.28	-1.13	0.00	60.06	97.86
69	15.07	13.19	31.44	-3.66	0.00	1.64	10.80
70	41.68	68.28	22.70	-5.06	0.00	0.00	0.00
71	11.55	11.69	21.02	-3.69	0.00	0.00	7.10
72	13.50	9.19	22.19	-2.31	0.00	0.00	1.19
73	6.62	11.89	17.02	-1.16	1.71	0.00	0.00
74	10.47	6.37	12.42	4.22	0.00	0.31	39.08
75	14.42	16.22	4.62	1.26	0.00	0.00	9.96
76	13.98	12.29	27.61	-12.16	0.00	0.00	6.87
77	65.17	62.47	26.71	-1.58	0.00	0.00	0.00
78	30.54	37.48	26.24	3.46	0.00	65.55	82.27
79	8.07	14.59	22.18	-3.56	0.00	0.00	0.00
80	51.83	65.96	27.38	6.33	0.00	0.00	0.00
81	16.17	15.16	32.35	-7.95	0.00	0.00	0.00
82	7.08	15.27	29.83	-5.66	0.00	0.00	0.00
83	10.25	15.01	18.51	-5.21	0.00	0.00	0.00
84	3.86	13.94	18.12	0.59	0.00	0.00	0.00
85	6.38	14.64	12.68	-4.60	0.00	0.00	0.00
86	16.25	20.47	29.22	3.00	0.00	0.00	0.00
87	5.21	6.30	27.43	-5.23	0.00	0.00	0.00
88	7.96	8.38	28.17	0.00	0.00	0.00	0.00
89	4.07	9.96	21.30	7.51	0.00	0.00	0.00
90	3.76	7.93	24.09	-6.45	0.00	0.00	0.00
91	9.22	15.75	11.35	-36.00	0.00	0.00	0.00
92	38.64	26.70	14.12	-4.04	0.00	8.01	86.26
93	3.03	3.51	21.05	14.70	0.00	65.45	89.77
94	6.32	8.56	20.71	10.70	0.00	0.00	0.00
95	21.18	28.89	10.83	10.12	0.00	0.00	0.00
96	5.18	6.43	24.54	21.91	0.00	0.00	0.00
97	7.82	21.09	17.50	5.68	0.00	0.00	0.00
98	5.75	5.28	24.53	1.35	0.00	9.05	100.00
99	12.48	10.80	17.98	6.54	0.00	0.00	0.00
100	14.56	34.07	21.54	10.38	0.00	0.00	0.00

\*Concentration (mg/mL)

시료는 30% 미만의 저해활성을 나타내었으며, *Entada phaseoloides*(L.) Merr.의 경우는 약 17%의 α-amylase 촉진 활성을 나타내었다. Type II 당뇨치료제로 사용되고 있는 acarbose의 경우에는 0.125 mg/mL 농도에서 63%, 0.25 mg/mL 농도에서 64.8%, 0.5 mg/mL 농도에서 68.7%의 저해를 나타내었으며(Fig. 1), 네팔 식물 추출물의 경우 0.5 mg/mL 농도에서 50% 이상의 저해를 나타낸 시료는 *Astilbe rivularis* Buch., *Bauhinia variegata* L., *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb., *Cedrus deodara*(Roxb.) G. Don, *Cleistocalyx operculatus*(Roxb.), *Myrica nagi* Thunb. 및 *Nelumbium nucifera* Gaertn.의 7종이었으며, 1 mg/mL 농도에서는 추가적으로 *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Embelia ribes* Burm. f. 및 *Mammea longifolia* Planch. & Triana의 3종에서 50% 이상의 저해를 나타내어 1 mg/mL의 농도에서는 전체 시료중 10종에서 우수한 α-amylase 저해활성을 나타내었다. 이들 중 *C. operculatus*(Roxb.)와 *E. ribes* Burm. F의 경우에는 최근 α-amylase 저해활성이 보고된 바 있다[16, 17]. 한편 현지에서 당뇨 치료제로 이용되는 천연물은 *Azadirachta indica* A. Juss., *Dioscorea bulbifera* L., *Gymnema sylvestre* (Retz.), *Momordica charantia* L. 및 *Pterocarpus marsupium* Roxb.의 5종으로, 본 실험에서 선정된 α-amylase 저해제와 일치하는 경우는 없었으나 8.5~20% 정도의 저해활성을 나타내었다.

한편 0.5 mg/mL 농도에서 우수한 저해활성을 나타낸 7종의 시료를 대상으로 다양한 농도에서의 α-amylase 저해활성을 평가한 결과는 Fig. 1에 나타내었으며, IC<sub>50</sub>을 평가한 결과 *C. deodara*(Roxb.) G. Don, *M. nagi* Thunb., acarbose, *A. rivularis* Buch., *B. variegata* L., *C. operculatus*(Roxb.), *B. ciliata*(Haw.) Sternb., *N. nucifera* Gaertn.의 순으로 44.5,



**Fig. 1.** Inhibition of microbial α-amylase by methanol extract of *Astilbe rivularis* Buch. (●), *Bauhinia variegata* L. (○), *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. (▼), *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don (▽), *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) (■), *Myrica nagi* Thunb. (□), and *Nelumbium nucifera* Gaertn. (◆). Acarbose (◇) was used as positive control.

47.5, 50.5, 101.5, 105.0, 118.1, 348.2 및 430.5 μg/mL로 확인되어 α-amylase 저해활성의 경우 *C. deodara*(Roxb.) G. Don와 *M. nagi* Thunb. 추출물은 acarbose보다 우수한 것으로 확인되었다.

**100종 시료의 α-glucosidase 저해 활성**

네팔 천연물 0.5 mg/mL 농도에서 soluble starch를 이용한 α-glucosidase 저해활성을 평가한 결과, 94종의 시료에서 30% 미만의 저해활성을 나타내었으며, *Carum bulbocastanum* Koch, *Carum roxburghianum*(DC.) Kurz, *Cynodon dactylon* Pers., *Holarrhena pubescens* Wall. & G. Don, *Luffa echinata* Roxb. 및 *Nyctanthes arbortristis* L.의 6종에서 30.4~35.8%의 저해활성을 나타내었다. 한편 α-amylase 저해활성이 우수한 7종의 천연물 시료 중에서는 *N. nucifera* Gaertn., *M. nagi* Thunb., *B. ciliata*(Haw.) Sternb., *C. operculatus*(Roxb.), *C. deodara*(Roxb.) G. Don, *B. variegata* L. 및 *A. rivularis* Buch.의 순으로 저해가 강력하였으며, 27.38~8.54%의 α-glucosidase 저해활성을 나타내었다. 한편 네팔 천연물 0.5 mg/mL 농도에서 pNPG를 기질로 이용한 α-glucosidase 저해활성을 평가한 결과, 49개의 시료에서 20% 미만의 약한 저해 활성을, 나머지 48개의 시료에서는 0~15%의 α-glucosidase 촉진활성을 나타내었다(Table 2). 가장 우수한 저해활성을 나타낸 시료는 21.9%의 저해효과를 보인 *Pueraria phaseoloides*(Roxb.) Benth였으며, 가장 우수한 촉진활성을 나타낸 시료는 *Piper nigrum* L. 및 *Cuminum cyminum* L.로 각각 36% 및 21%의 촉진활성을 나타내었다. 최근 *C. cyminum* L로부터 분리된 cuminaldehyde의 미약한 α-glucosidase 저해활성(IC<sub>50</sub>: 0.5 mg/mL)이 보고되어 있으나 [14], 본 연구에서는 *C. cyminum* L 추출물을 사용한 점과, rat의 α-glucosidase가 아닌 미생물유래의 α-glucosidase를 대상으로 저해활성을 평가한 점이 다르므로 이에 대한 추가연구가 필요하다고 판단된다. 또한 본 결과는 기질종류에 따라 α-glucosidase 저해활성이 달라질 수 있음을 나타내며, 실질적인 항산독증제 이용을 위해서는 전분을 기질로 사용한 경우, α-amylase 및 α-glucosidase 저해효과를 동시에 나타내는 천연물의 선택이 필요하리라 판단된다. 따라서 본 연구에서는 α-amylase 저해활성이 매우 강력한 *C. deodara* (Roxb.) G. Don,와 *M. nagi* Thunb. 및 고혈당 치료 효과가 보고[16]된 *C. operculatus* (Roxb.)을 최종 선정하였다.

**100종 시료의 인간 적혈구 용혈 활성**

네팔 시료의 실제적 이용가능성을 검토하기 위해 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였다(Table 2). 먼저 0.1 mg/mL 농도에서 *Curcuma longa* L.에서 21.1%의 용혈활성이 나타났으며, 나머지 시료에서는 0~7.8%의 용혈현상이 나타났다. 0.25 mg/mL 농도에서는 *Abelmoschus moschatus* Medik., *Buddleia asiatica* Lour., *Caesalpinia crista* L., *Carum*

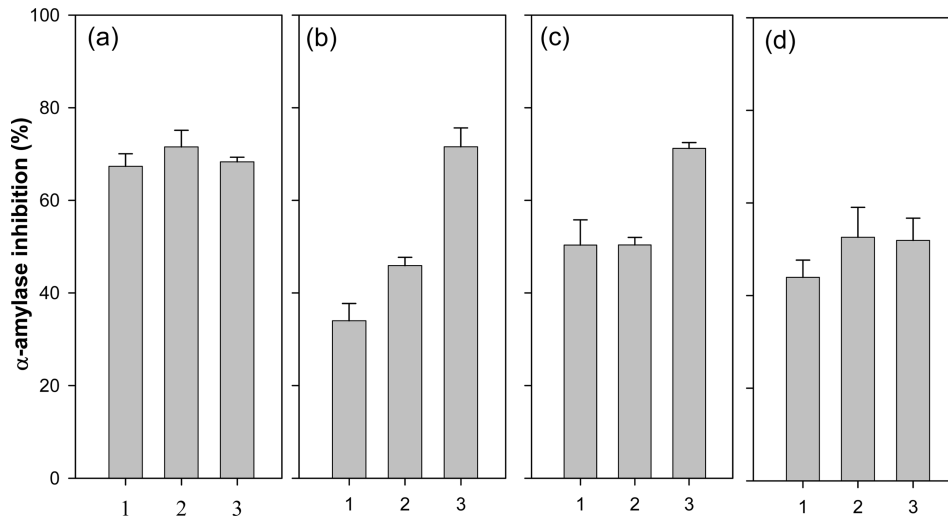


Fig. 2. Changes of  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of (a) *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don, (b) *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.), (c) *Myrica nagi* Thunb and (d) acarbose by heat-, and acid- treatment. 1: without treatment 2: heat treatment (80°C for 1 h), 3: acid treatment (pH 2 for 1 h). Error bar indicate the standard error of each mean value (n=3).

*roxburghianum*(DC.) Kurz, *Citrullus colocynthis*(L.) Schrad, *Linum usitatissimum* L., *Myristica fragrans* Houtt. 및 *Psoralea corylifolia* L.의 8종에서 50% 이상의 용혈이 확인되었다. 한편 1 mg/mL 농도에서는 *Curcuma longa* L.을 비롯한 총 17종에서 70% 이상의 강력한 용혈현상을 나타내었다. 그러나 본 연구에서  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 선정된 *C. deodara*(Roxb.) G. Don, *M. nagi* Thunb.와 *C. operculatus*(Roxb.)은 1 mg/mL 농도에서도 전혀 용혈현상을 나타내지 않았다.

#### 최종 선정된 3종 추출물의 열 및 산 안정성

*C. deodara*(Roxb.) G. Don, *M. nagi* Thunb.와 *C. operculatus*(Roxb.)의 각각의추출물(100  $\mu$ g/mL)을 대상으로 열 안정성 및 산 안정성을 평가한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 대조구로 사용된 acarbose(100  $\mu$ g/mL)는 산 및 열 처리에 안정하였으며, 선정된 추출물 3종 모두 80°C에서 60분간 열처리에 안정된  $\alpha$ -amylase 저해활성을 나타내었다. 한편 선정된 추출물 중 *C. operculatus*(Roxb.)와 *M. nagi* Thunb.는 의 60분간 산 처리(0.01N HCl)시  $\alpha$ -amylase 저해활성이 유의적으로 약 20% 정도 증가되는 현상을 나타내었으며, *Cedrus deodara*(Roxb.) G. Don 및 acarbose의 경우에는 활성변화가 인정되지 않았다. 이러한 결과는 선정된 네팔 천연물 추출물들이 산 및 열 처리에 안정하며, 적절한 산처리에 의해  $\alpha$ -amylase 저해활성을 증대시킬 수 있음을 추측하게 한다. 현재 선정된 3종으로부터 활성물질의 정제 및 *C. operculatus*(Roxb.)와 *M. nagi* Thunb.의 산 처리에 의한 활성증대 기작 연구를 진행 중에 있다.

#### 요 약

반추동물의 급성 산독증의 예방 및 치료제 개발 연구의 일환으로 100종의 네팔 식물추출물을 이용하여 미생물 유래의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 평가하였다. 그 결과 *Cedrus deodara*(Roxb.) G. Don와 *Myrica nagi* Thunb.추출물에서 acarbose보다 강력한  $\alpha$ -amylase 저해활성을 확인하였으며, 각각의 IC<sub>50</sub>는 44.5, 47.5 및 50.5  $\mu$ g/mL로 확인되었다. 또한 고혈당 치료 효과가 보고된 *Cleistocalyx operculatus*(Roxb.) 추출물에서는 강력한  $\alpha$ -amylase 저해활성 및 양호한  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 확인하였다. 최종 선정된 3종의 추출물은 1 mg/mL 농도까지 인간적혈구에 대한 용혈활성이 없었으며, 80°C, 또는 0.01N HCl 조건에서 60분간 처리시에 활성의 변화가 나타나지 않았으며, 특히 *C. operculatus*(Roxb.)와 *M. nagi* Thunb.의 경우 산 처리시에 오히려 20% 정도의 저해활성의 증가가 나타났다. 이러한 결과는, 최종 선정된 3종의 추출물이 미생물 유래의 전분분해 효소의 저해를 통해 반추동물의 급성 산독증 예방 및 치료에 이용 가능성을 제시하고 있다.

#### REFERENCES

- Adhikari, A., H. P. Devkota, A. Takano, K. Masuda, T. Nakane, P. Basnet, and N. Skalko-Basnet. 2008. Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation: in vitro tyrosinase inhibition. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**: 353-360.
- Baht, M., S. S. Zinjarde, S. Y. Bhargava, A. R. Kumar, and B. N. Joshi. 2008. Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. *eCAM*, 1-6.

3. Dall'Acqua, S., B. B. Shrestha, S. Comai, G. Innocenti, M. B. Gewali, and P. K. Jha, 2009. Two phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* Gaertn. *Fitoterapia* **80**: 279-282
4. Gao, H. and J. Kawabata. 2005.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 1661-1671.
5. Ha, J. K. and R. J. Emerick. 1984. Effect of dietary buffers on rumen and blood parameters of rumen-cannulated. *Kor. J. Anim. Sci.* **26**: 682-688.
6. Ha, J. K., R. J. Emerick, and L. B. Embry. 1985. Effect of buffers and alfalfa hay on ruminal and systemic parameters of sheep fed high concentrate diets. *Kor. J. Anim. Sci.* **27**: 80-96.
7. Ha, J. K., R. J. Emerick, and L. B. Embry. 1985. Effect of hay sources in reducing ovine rumen acidosis. *Kor. J. Anim. Sci.* **27**: 20-23.
8. Heo, S. J., J. Y. Hwang, J. I. Choi, J. S. Han, H. J. Kim, and Y. J. Jeon. 2009. Diploretrohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **615**: 252-256.
9. Kim, H. Y. 1997. In vitro inhibitory activity on rat intestinal mucosa  $\alpha$ -glucosidase by rice hull extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 601-608.
10. Kim, J. H., M. U. Kim, and Y. J. Cho. 2007. Isolation and identification of inhibitory compound from *Crataegi fructus* on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**: 204-209.
11. Krause, K. M., D. K. Combs, and K. A. Beauchemin. 2003. Effects of increasing levels of refined cornstarch in the diet of lactating dairy cows on performance and ruminal pH. *J. Dairy Sci.* **86**: 1341-1353.
12. Kumar, S., K. Zierys, W. Wiegerebe, and K. Müller. 2000. Medicinal plants from nepal: evaluation as inhibitors of leukotriene biosynthesis. *J. Ethnopharmacol.* **70**: 191-195.
13. Lee, D. S., J. K. Kim, and S. H. Lee. 2006. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity by quercetin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 368-372.
14. Lee, H. S. 2005. Cuminaldehyde: Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitor derived from *Cuminum cyminum* L. seeds. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 2446-2450.
15. Lim, C. S., C. Y. Li, Y. M. Kim, W. Y. Lee, and H. I. Rhee. 2005. The inhibitory effect of *Corus walteri* extract against  $\alpha$ -amylase. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 103-108.
16. Mai, T. T. and N. V. Chuyen. 2007. Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 69-76. .
17. Mai, T. T., N. N. Thu, P. G. Tien, and N. Van Chuyen. 2007. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) **53**: 267-276.
18. McLaughlin, C. L., A. Thompson, K. Greenwood, J. Sherington, and C. Bruce. 2009. Effect of acarbose on acute acidosis. *J. Dairy Sci.* **92**: 2758-2766.
19. McLaughlin, C. L., A. Thompson, K. Greenwood, J. Sherington, and C. Bruce. 2009. Effect of acarbose on milk yield and composition in early lactation dairy cattle fed a ration to induce subacute ruminal acidosis. *J. Dairy Sci.* **92**: 4481-4488.
20. Rajbhandari, M., R. Mentel, P. K. Jha, R. P. Chaudhary, S. Bhattarai, M. B. Gewali, N. Karmacharya, M. Hipper, and U. Lindequist. 2009. Antiviral activity of some plants used in nepalese traditional medicine. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **6**: 517-522.
21. Rajbhandari, M., U. Wegner, M. Jülich, T. Schöpke, and R. Mentel. 2001. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 251-255.
22. Shrestha K., and D. J. Lee. 2005. Conservation status and utilization of plant resources in Nepal. *Kor. J. Intl. Agri.* **17**: 11-20.
23. Shrestha, P. M. and S. S. Dhillion. 2003. Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal. *J. Ethnopharmacol.* **86**: 81-96.
24. Suzuki, A., O. Shirota, K. Mori, S. Sekita, H. Fuchino, A. Takano, and M. Kuroyanagi. 2009. Leishmanicidal active constituents from Nepalese medicinal plant Tulsi (*Ocimum sanctum* L.). *Chem. Pharm. Bull.* **57**: 245-251.
25. Woo, S. S., Y. K. Park, C. H. Choi, K. S. Hahm, and D. G. Lee. 2007. Mode of antibacterial action of a signal peptide, Pep<sup>27</sup> from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **363**: 806-810.
26. Yin, Y., S. I. Heo, M. J. Jung, and M. H. Wang. 2009. Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 1-5.

(Received February 1, 2010/Accepted March 17, 2010)