pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 1, pp. 68~77 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.1.68

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

In-vitro 및 *In-vivo* 모델에서 발효 황련해독탕의 식후혈당 상승 억제 효과

민경남[1] · 김관호[2]*
[1]안양대학교 화장품발명디자인학과
[2]한국이엠효소연구소

Anti-hyperglycemia Effect of Fermentation Hwangryunhaedoktang Using *In-vitro* and *In-vivo* Models

Kyung Nam Min[1], Kwan Ho Kim[2]*
[1]*Department of Cosmetics Inventive Design, Anyang University, Anyang, Korea*
[2]*Korea EM Enzyme Research Laboratory, Daejeon, Korea*

(Received February 3, 2025/Revised February 17, 2025/Accepted February 17, 2025)

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the postprandial anti-hyperglycemic effect of fermented Hwangryunhaddocktang (FHHT) on rat intestinal α-glucosidase and porcine pancreatic α-amylase and to evaluate the anti-diabetic effect of FHHT using animal models (Sprague Dawley rats). FHHT inhibited the digestive enzyme activities of α-glucosidase and α-amylase in a dose-dependent manner, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values in order were α-amylase (9.321 mg/mL), followed by α-glucosidase (0.143 mg/mL), maltase (1.159 mg/mL), glucoamylase (0.263 mg/mL), and sucrase (0.112 mg/mL). In the animal model experiments, FHHT exhibited a statistically significant inhibitory effect on postprandial glucose uptake after ingestion of the polysaccharide starch and disaccharide sucrose (P<0.01). Therefore, these results indicate that the postprandial anti-hyperglycemic effect of FHHT, as a mechanism for regulating the energy metabolism of carbohydrate uptake inhibition, provide a biochemical rationale for the development of a medicinal herbal-based functional food.

Key words: Hwangryunhaedoktang, Anti-diabetic, Digestive Enzyme, α-Glucosidases, α-Amylase

2021년 한국의 질병 관리청 조사에 따르면 당뇨병은 30세 이상의 응답자 수 4,701명 중 대략 13.2%가 유병인구이고 전 세계 인구의 약 3%가 당뇨로 고생하고 있으며, 2022 보건복지부 통계 연보에 따르면 2021년 한국인의 사망원인 6위가 당뇨병으로 전체 사망자 수의 1.1%를 차지하고 있다. 당뇨병은 서구화된 식생활과 비만 인구 비중이 확대됨에 따라 환자의 수가 매년 증가하고 있으며 유전 또는 비정상적인 대사에 의한 인슐린의 분비 장애와 인슐린 저항성 그리고 고혈당이 주요 증상으로 나타난다[1]. 체내 고혈당이 장기화가 되면 혈관 장애, 만성 감염, 신경병증 등 합병증을 유발하여 삶의 질을 급격하게 떨어뜨린다. 또한 유병 연령이 낮아지고 발병률이 급격히 증가함에 따라 당뇨병에 대한 예방과 치료 방법이 다양하게 연구되고 있다[2].

한국의 성인 당뇨병은 인슐린 분비 장애로 인한 제1형 당뇨보다 인슐린 비의존형인 제2형 당뇨의 비중이 높은 것으로 보고되고 있고 인슐린은 인체 에너지 대사 조절 작용과 성장 및 전해질 조절에도 필수적인 생체 호르몬으로 알려져 있다[3]. 인슐린 저항성은 인슐린 작용이 정상 이하로 저하된 상태를 의미하고 비만 및 고지방식이에 의한 혈당 상승과 함께 제2형 당뇨병 발생 인자로 지목되고 있다[4-7].

식후 급격한 혈당 상승을 억제하는 대표적인 약물인 일본 다케다제약의 보글리보스(Voglibose®)와 독일 바이엘사의 아카보스(Acarbose®)는 α-glucosidases의 저해제로 분류되어 시판되고 있다. 이들 약물을 식전에 복용했을 때 소장에서 분비하는 α-glucosidases류인 sucrase, maltase,

*Correspondence to: Kwan-ho Kim, Korea EM Enzyme Research Laboratory, Daejeon 34842, Korea
Tel: +82-10-6715-4546
E-mail: kkkhoh@naver.com

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

glucoamylase, lactase 등의 활성을 억제하여 섭취된 이당류가 소장으로 흡수되는 것을 억제함으로써 혈당 상승이 억제되는 것으로 알려져 있다[8].

현재 제2형 당뇨병 및 대사 증후군의 치료는 식이 및 운동에 의한 유지요법에 의존하는 상황이고 설폰 요소제, α-glucosidases 억제제 등의 약물은 장기 투약 시 부작용의 발생 사례가 보고되고 있어[9-11] 최근 항당뇨 효능의 천연 소재 발굴을 위해 전통적인 한약재에 관심이 집중되고 있다.

황련해독탕(Hwangryunhaedoktang, HHT)은 동의보감에서 사화해독의 대표적인 탕약으로 황련, 황백, 황금, 치자가 처방되어 각종 열병의 치료에 이용되어 왔고[12] 고지혈증, 고혈압, 뇌졸중 환자의 재발 방지와 뇌혈류 개선 등의 효능으로 뇌혈관질환 및 심혈관질환에도 이용해 왔다[13]. Lee 등[14]의 연구에 따르면 고지혈증 환자가 HHT를 8주 동안 1일 3회 경구 복용했을 때 맥파 속도, 염증 인자, 대동맥 탄성도, 혈중 지질 지표, 당 대사 지표가 개선된 것으로 나타나 혈중 지질 대사에 대한 효능이 보고되었다. Kim 등[15]은 HHT에 대황을 가미한 청혈단으로 흰쥐의 혈압이 강하된 결과를 보고하였고, Zhao[16]는 마우스에 HHT를 투여하여 인슐린 저항성이 개선된 결과를 발표하였다. Ye 등[17]에 의해서는 HHT 투여로 혈당이 감소 되어 인슐린의 저항성이 개선되었다는 결과가 보고됨으로써 항당뇨 관련 임상연구가 다수 진행되었음을 알 수 있다. 제2형 당뇨병 환자에게 HHT 단독과 병용 치료한 RCT 임상 연구의 문헌 고찰과 메타분석 연구에서 두 경우 모두 당뇨병 환자의 혈당이 강하되어 HHT 복용이 당뇨병 환자에게 유효하게 작용한 것으로 보고 되었다[18].

상기 내용을 종합 분석하면 HHT의 항당뇨 임상적 연구는 그동안 활발하게 진행되어 왔으나 그 효능을 정량적으로 뒷받침할 수 있는 연구는 미약한 실정임을 알 수 있었다. 따라서 본 연구팀은 HHT를 발효하여 제조한 FHHT의 혈당조절 효능을 확인하기 위하여 식후 혈당 상승을 유발하는 소화 효소들에 대한 FHHT 추출물의 저해 활성과 동물실험을 통해 FHHT 섭취에 의한 식후 혈당 상승 억제 효능을 평가함으로써 항당뇨 효과를 검증하였다.

Materials and Methods

재료 및 기기

황련(*Coptis japonica*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*), 치자(*Gardenia jasminoides*)를 한국산으로 2023년 10월 서울 청량리의 약령시장에서 각각 구입하였다. 발효에 사용한 *Aspergillus oryzae, Lactobacillus plantarum*은 2023년 10월 ㈜제일바이오텍(Gyeongju, Korea)에서 구입하였고 약재의 계량을 위해 전자식 저울 FX-3000 (AND Co, Seoul, Korea)을 사용하였다. 정제수 제조를 위해 역삼투 정수기 URE RO-42 (Human Corporation, Seoul, Korea)를 사용하였고, 한방 약재의 발효 과정에 필요한 열풍건조기 CO-42 (Yuyu Instrument, Seoul, Korea)와 여과지는 Whatman No.2 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 효소는 rat 유래 intestinal acetone powder (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하였고 기질은 *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (*p*NPG)를 실험에 사용하였다. α-Glucosidase류의 활성을 분석하기 위해서는 Sigma S9765인 soluble starch (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하고 기질은 sucrose, maltose, starch (Junsei, Tokyo, Japan)를 사용하였다. Glucose oxidase 활성 분석을 위해 Sigma D2679인 o-dianisidine reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 Sigma G3660인 glucose oxidase/peroxidase reagent (Sigma-Aldrich Co.)를 활용하였다.

동물실험을 위해 고형사료(Teklad, Orem, UT, USA)와 ㈜두열바이오텍(Seoul, Korea)의 깔집을 사용하였고, 혈당 측정을 위해서는 Caresens II로 측정하였다. 대조군은 sucrose와 starch를 사용하였고 양성대조군은 “식후혈당 감소”의 기능성으로 식약처 건강기능식품 개별인정형 제2018-10호로 인증된, 2당인 키토바이오스(Chitobiose)가 주지표 물질인 키토올리고당으로 만든 α-glucosidase 저해 소재인 ㈜건풍바이오(Seoul, Korea)의 고투카원(GO2KA1) 원료를 공여받아 사용하였다.

발효 황련해독탕 및 시료 제조

발효한 천연물은 발효 전보다 플라보노이드, 페놀류 등이 증가하여 항산화 활성이 향상되고 생리 활성 펩타이드의 증가로 인해 인체 적용 시 정장 작용 등 유효성이 향상되어 건강에 이롭다고 알려져 있다[19]. 발효한 황련해독탕(fermented Hwangryunhaedoktang, FHHT)을 피부 분야에서 연구한 Um 등[20]과 Yang 등[21]의 보고에서도 FHHT가 발효 전보다 항산화 활성이 증가하여 피부 미백과 항주름에 효과적이었다는 결과를 확인할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 발효 물질의 과학적인 효과를 근거로 FHHT를 실험 대상으로 하여 Alshannaq 등[22]에 의한 최적의 *Aspergillus oryzae* 균체 생장과 효소 생산 조건 및 Tefara 등[23]의 *Lactobacillus plantarum* 배양액 최적 발효 농도를 근거로 실험하였다. FHHT를 제조하기 위해 Table 1과 같이 음건한 황련, 황백, 황금, 치자를 동일 비율로 처방하여 혼합한 한방조성물 1 kg을 약 1-5 mm^3 크기로 자르고 정제수와 *Aspergillus oryzae* 파우더를 1:1 비율로 혼합한 후 20 g을 균일하게 접종하여 28°C에서 36 h 간 1차 발효하였다. 이후 2×10^8 cfu의 *Lactobacillus plantarum* 배양액을 10 g 균일하게 접종하여 동일 조건으로 2차 발효하고 정제수를 10배 가하여 2시간 가압중탕을 통해 열수추출을 진행하였다. 추출물은 여과지로 여과하고 감압 농축하여 38 h 동결건조 후 얻어진 평균 수율 2.884 g/100 mL 배양액의 갈색 분말을 실험에 사용하였다.

Table 1. Prescription of Hwangryunhaedoktang

Herb	Scientific name	Ratio
Hwangryun	Coptis japonica	1
Hwangbaek	Phellodendron amurense	1
Hwanggeum	Scutellaria baicalensis	1
ChiJa	Gardenia jasminoides	1

In-vitro 활성 평가법

Rat intestinal α-glucosidase 저해 활성 분석

한국 식품의약품안전처에서 제공하는 건강기능식품 기능성 시험 가이드 방법을 응용하여 α-glucosidase의 저해 활성을 측정하였다. 100 mg의 rat 유래 intestinal acetone powder를 0.9% NaCl solution 3 mL에 배합한 후 냉수조에서 30 s 동안 12회 초음파 처리하여 10,000 ×g, 4°C에서 30 min 원심 분리하였다. 분리된 상층액을 바로 분석에 사용하여 50 mL의 시료를 100 mL의 rat 유래의 α-glucosidase 반응액에 넣고 37°C에서 10 min 동안 정치시켰으며. 50 mL의 양으로 5 mM *p*NPG 반응액을 가하였다. 이후 37°C에서 15 min 간 반응시키고 405 nm 지점에서 ELISA reader (Premstar Medical, Shanghai, China)로 흡광도를 측정함으로써 rat α-glucosidase에 대한 활성을 분석하였다.

Porcine pancreatic α-amylase 저해 활성 분석

0.02 M sodium phosphate buffer (pH 6.9 with 0.006 M sodium chloride)에 녹인 1U 농도의 porcine pancreatic α-amylase 용액 300 mL에 시료를 200 mL을 넣고 25°C에서 10 min 간 배양하였다. 이 용액에 25°C 온도에서 10 min 동안 전처리 배양한 1%의 starch 용액을 500 mL 첨가하고 25°C에서 10 min 동안 반응시켜 30% Rochelle 염에 녹인 1%의 dinitrosalicylic acid (DNS) 용액을 1 mL 첨가한 후 반응을 정지시켰다. 이후 중탕기를 이용하여 5 min 간 처리한 후 실온에 보관하며 식히고 10 mL의 증류수를 배합하여 α-amylase로 인해 기질에서 분해된 당과 DNS 용액이 반응한 액을 540 nm로 ELISA Reader (Premstar Medical)로 흡광도를 측정함으로써 α-amylase에 대한 활성을 분석하였다.

Rat intestinal glucose oxidase 활성 분석(Sucrase, Maltase, Glucoamylase)

한국 식품의약품안전처에서 제공하는 건강기능식품 기능성 시험 가이드 방법을 응용하여 100 mg의 rat intestinal acetone powder를 3 mL의 0.9%용 NaCl 용액에 첨가하였다. 다음 냉수조를 이용하여 30 s 간 12회 초음파 처리하여 10,000 ×g, 4°C의 환경에서 30 min 동안 원심 분리하였고 분리된 상층 액은 즉시 실험에 사용하였다. 측정방법은 96 Clear Plate를 이용하여 100 mL 용량의 rat α-glucosidase 반응액에 50 mL 시료를 첨가한 후 37°C로 설정한 배양기에서 10 min 간 정치시켰다. 각 실험 방법으로 50 mL의 200 mM sucrose, 100 mM maltose, 혹은 1% starch 반응액을 가한 후 37°C에서 30 min 간 반응시켰다. 30 min 동안 반응하는 사이 *o*-dianisidine reagent와 glucose oxidase/peroxidase reagent를 혼합한 용액 1 mL을 용량 2 mL의 에펜도르프 튜브(eppendorf tube, E-tube)에 투입하여 37°C로 설정한 배양기에 5 min 간 방치시켰다. 앞서 30 min 동안 반응한 rat 유래 intestinal acetone powder (Sigma, Livonia, MI, USA)와 시료, 기질 용액이 혼합된 시약 200 mL을 취하여 *o*-dianisidine reagent 와 1 mL Glucose oxidase/peroxidase reagent를 섞은 용액에 첨가한 후 37°C로 설정한 배양기에서 10 min 간 2차 반응을 유도하였다. 다음 각각의 2 mL 용량으로 E-tube 12 N 황산 1 mL를 첨가하여 정지시킨 후 200 mL씩 96 clear plate에 넣고 540 nm에서 ELISA Reader로 흡광도를 측정하였고 rat intestinal glucose oxidase (sucrose, maltose, glucoamylase)의 활성을 분석하였다. 시료가 용해된 용매 혼합물을 대조군으로 하여 실험하였다.

동물 모델(SD-Rats)을 이용한 효능 평가법

동물(Rat)을 이용한 단회 투여에 따른 혈당 지수 평가

본 연구에서 수행한 rats를 이용한 단회 투여에 따른 혈당 지수 평가실험의 동물실험윤리에 관한 심의는 한남대학교 동물실험윤리심의위원회의 심사를 통해 승인되었다(H2024-2). Rat의 사육 공간(SPF zone)은 헤파필터를 통한 공기가 유지되도록 하였고 실험 조건은 온도 22°C, 습도 50%가 유지되도록 하였으며, 깔집은 3일에 한 번씩 교체하여 고형사료를 자율적으로 섭식하게 하였다. 사육실의 점등 및 소등한 시간은 12시간을 기준으로 나누었고 24시간 절식의 경우 수분 공급은 자유롭게 하였다.

시험은 경구 투여 전 공복혈당을 측정하고 공복혈당의 평균을 기준으로 하여 대조군, FHHT 섭취 군으로 분류한 후 대조군에는 1차에 starch, 2차에는 sucrose를 각각 2.0 g/kg-b.w.의 농도로 투여하였다. FHHT 군은 1종만 0.1 혹은 0.5 g/kg-b.w. 첨가하였고 양성 대조군은 “식후혈당 감소”의 기능성으로 식약처 건강기능식품 개별인정형 제2018-10호로 인증된, 2당인 키토바이오스(Chitobiose)가 주 지표물질인 키토올리고당으로 만든 α-glucosidase 저해 소재인 ㈜건풍바이오(Seoul, Korea)의 고투카원(GO2KA1) 원료를 첨가하여 마리당 1 mL의 양을 경구 투여하였으며 실험방법 Table 2와 Table 3으로 나타내었다. 식후혈당상승억제 효능평가를 위한 유효농도의 결정은 양성대조물질의 동물모델에서의 다수의 선행연구결과를 고려하여 0.5 g/kg-rat 무게로 설정하였다[24,25].

Table 2. The first test using starch first test

Group	Treatment
I	Starch–2.0 g/kg-body weight
II	FHHT–Starch 2.0 g/kg-body weight+FHHT 0.1 g/kg-body weight
III	FHHT–Starch 2.0 g/kg-body weight+FHHT 0.5 g/kg-body weight
IV	Positive control–Starch 2.0 g/kg-body weight+GO2KA1 0.5 g/kg-body weight

Table 3. Second test with sucrose

Group	Treatment
I	Sucrose–2.0 g/kg-body weight
II	FHHT–Sucrose 2.0 g/kg-body weight+FHHT 0.1 g/kg-body weight
III	FHHT–Sucrose 2.0 g/kg-body weight+FHHT 0.5 g/kg-body weight
IV	Positive control–Sucrose 2.0 g/kg-body weight+GO2KA1 0.5 g/kg-body weight

혈당 측정은 경구 투여 후 30 min, 1 h, 2 h, 3 h 시점에서 실시하였고 멸균한 메스로 rat의 꼬리 끝부분을 미미하게 절개한 후 약 0.5 mL의 혈액을 혈당 스트립에 흡수시켜 area under the curve (AUC)를 측정하여 전체 혈당 흡수율을 비교하였다. 이후 약물 동력학의 데이터를 통해 통계적으로 유의적인 차이를 분석하였다.

통계처리

본 연구에서는 Choi 등[8]의 연구와 동일한 방법으로 Statistical Analysis System (SAS)을 사용하여 Duncan의 다범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 $P<0.05$에서 다수의 각 시료 간의 유의미한 차이를 검증하였다. 추가로 대조군 대비 시료 처리 군별 두 군 간의 통계적 유의차를 비교하기 위하여 Student *t*-test를 수행하였다(*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$).

Results and Discussion

In-Vitro 활성

Rat intestinal α-glucosidase 저해 활성

α-Glucosidase는 이당류를 단당류로 분해하여 소장 내로 흡수시키는 역할을 하는데 이 효소의 활성 저하는 혈당 상승을 억제하여 당뇨 환자의 혈당조절에 유효하다고 알려져 있다.

FHHT의 rat intestinal α-glucosidase 농도별 저해 활성의 결과는 Fig. 1과 같이 0.05 mg/mL 농도보다 0.2 mg/mL와 0.5 mg/mL에서 점차 증가하여 FHHT의 농도가 증가함에 따라 혈당조절이 가능한 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 발효하지 않은 Zhao[16]의 HHT 연구에서도 확인할 수 있는데 그 결과에 의하면 HHT가 당뇨 유발 rat의 인슐린 저항성을 개선하고 혈관 증식을 억제하여 당뇨병 치료에 효과적이라고 보고한 것과 높은 연관성을 갖는 결과라고 볼 수 있다.

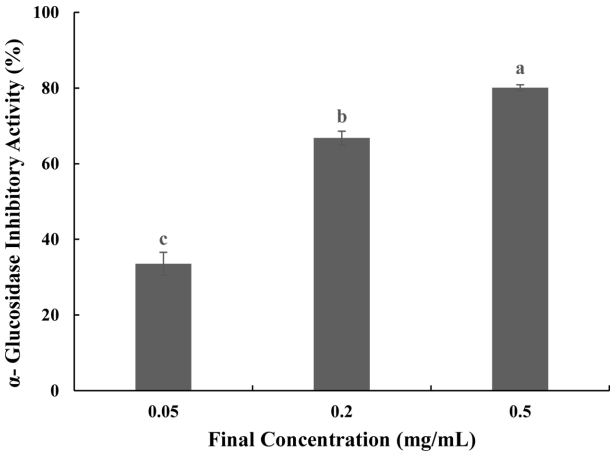

Fig. 1. Dose dependent changes in α-glucosidase inhibitory activity (% inhibition) of FHHT (mg/mL). The mean and standard deviation (±S.D.) of values obtained from four measurements are shown in the results. [a-c]Different corresponding letters indicate significant differences at $P<0.05$ by Duncan's test.

Porcine pancreatic α-amylase 저해 활성

α-Amylase도 이당류를 단당류로 분해하여 소장 내로 흡수시키므로 이 활성을 저해하면 혈당 상승이 억제된다. FHHT의 α-amylase 저해 활성을 실험한 결과 Fig. 2와 같이 α-amylase 농도 2 mg/mL 대비 5 mg/mL과 10 mg/mL에서 증가함으로써 FHHT의 농도가 증가함에 따라 혈당조절이 가능한 것으로 확인되었다. 현재까지 보고에 의하면 HHT 또는 FHHT가 α-amylase 활성을 저해한다는 직접적인 연구 문헌을 찾기가 어렵지만 기존 Zhao[16] 와 Ye 등[17]의 항당뇨 연구 결과로 HHT는 인슐린 저항성을 개선하고 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현 저

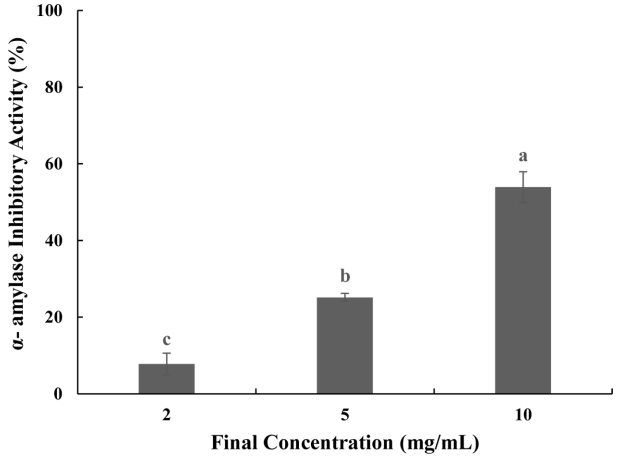

Fig. 2. Dose dependent changes in α-amylase inhibitory activity(% inhibition) of FHHT (mg/mL). The mean and standard deviation (±S.D.) of values obtained from four measurements are shown in the results. [a-c]Different corresponding letters indicate significant differences at $P<0.05$ by Duncan's test.

하로 혈관 증식을 억제하는 것을 알 수 있다. 이러한 HHT의 항당뇨 선행연구 결과는 FHHT의 본 시험 결과와 높은 상관성이 있을 것으로 사료된다.

Rat intestinal glucose oxidase 활성(Sucrase, Maltase, Glucoamylase)

α-Glucosidase의 활발한 활성은 식사 후 혈당을 상승시키므로 이를 저해하면 sucrose가 glucose로 분해되어 흡수되는 양이 감소하여 급격한 혈당 상승을 억제할 수 있다. FHHT의 기질 특이성을 이용한 개별 α-glucosidase의 효소 저해 활성은 Fig. 3a와 같이 sucrase에 대해 0.05 mg/mL 농도보다 0.2 mg/mL 농도에서, maltase도 Fig. 3b와 같이 0.5 mg/mL 보다 2 mg/mL에서 더 높은 저해 활성을 보였다. 또한 glucoamylase도 0.05 mg/mL 농도보다 0.5 mg/mL 농도에서 더 높은 저해 활성을 보인 결과로 보아 FHHT가 고농도일수록 α-glucosidase의 활성을 저해하여 식후의 혈당 상승을 더욱 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 예측된다.

α-Glucosidase의 활성을 저해하면 maltose가 glucose로 분해되어 흡수되는 양이 줄어들어 식후 급격한 혈당 상승을 억제할 수 있다. Fig. 3b와 같이 maltase는 0.5 mg/mL 대비 2 mg/mL에서 증가한 결과를 보여 FHHT가 고농도일수록 α-glucosidase 효소 저해 활성이 우수해져 식후의 혈당 상승을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 예측된다. Fig. 3c의 glucoamylase도 FHHT의 농도 0.01 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL 중 0.5 mg/mL에서 가장 높은 저해 활성이 나타났다. 이러한 결과를 통해 FHHT의농도 의존적으로 glucoamylase가 glucose로 분해됨으로써 흡수되는 양이 저하되어 식후의 급격한 혈당 상승이 억제될 수 있음을 예측할 수 있다.

위의 결과를 토대로 각 효소의 저해 활성을 50% 효소 저해 활성(IC_{50}) 값으로 계산한 결과는 Table 4로 나타내었다.

위의 표에서 α-amylase는 9.321 mg/mL, p-NPG 기질을 이용한 α-glucosidase는 0.143 mg/mL, sucrase는 0.112 mg/mL, maltase는 1.159 mg/mL, glucoamylase는 0.263 mg/mL로 나타나 maltase, glucoamylase, sucrase 순의 효소 특이적 저해 활성 효과를 확인하였다.

이는 2008년 Shinde 등[26]이 연구한 식후혈당 강하 약물인 Acarbose®가 α-glucosidase에 대해 도출된 IC_{50} 값의 233 mg/mL인 결과와 비교하면 FHHT가 낮은 활성을 보였으나 Acarbose®가 의약품인 점을 고려하여 FHHT의 활성을 판단해야 할 것으로 사료된다. 혈당과 α-glucosidase의 관련성을 연구한 Wei 등[27]에 의하면 황련은 α-glucosidase 억제 활성 IC_{50}가 160.9 mg/mL으로 나타났고 Yin 등[28]은 6년근 황기추출물 1.0 mg의 농도에서 α-glucosidase에 대한 저해 활성이 49.7%로 나타난 것으로 보고하였다.

이상의 결과를 통해 α-glucosidase류의 효소 저해 활성은

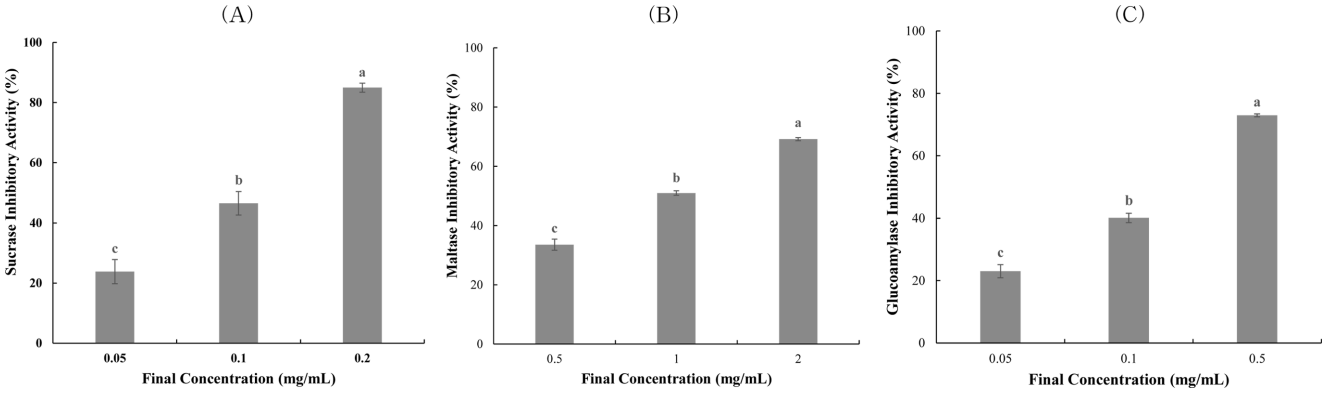

Fig. 3. Dose dependent changes in sucrase (a), maltase (b), and glucoamylase (c) inhibitory activities (% inhibition) of FHHT (mg/mL). The mean and standard deviation (±S.D.) of values obtained from four measurements are shown in the results. [a-c]Different corresponding letters indicate significant differences at $P<0.05$ by Duncan's test.

Table 4. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of FHHT on α-amylase, α-glucosidase, sucrase, maltase, and glucoamylase activities

	FHHT IC_{50} (mg/mL)*
α-Amylase	9.482±0.62[a]
α-Glucosidase	0.146±0.02[c]
Sucrase	0.113±0.01[c]
Maltase	1.142±0.02[b]
Glucoamylase	0.266±0.01[c]

*The results were expressed as the mean±S.D. [a-c]Different corresponding letters indicate significant differences at P<0.05 by Duncan's test.

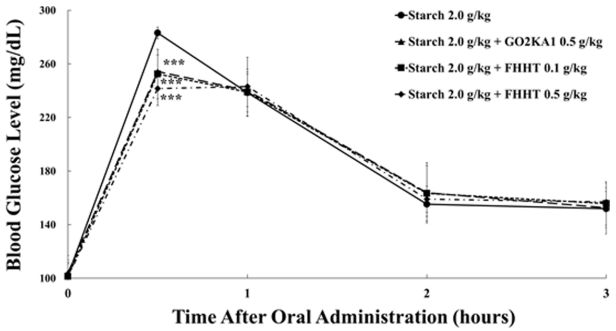

Fig. 4. Dose-dependent anti-hyperglycemic effect of FHHT on starch loading test. After fasting for 24 h, 5-week-old, male SD rats were orally administered with starch solution (2.0 g/kg-body weight (b.w.)) with or without samples (FHHT 0.1 g/kg-b.w., FHHT 0.5 g/kg-b.w., and positive control: GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.). The results were expressed as the mean±S.D. were observed. * P<0.05, ** P< 0.01, and *** P< 0.001 compared to differences between control and each group by student's t-test.

FHHT의 농도에 따라 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있고 이는 동물이 설탕(sucrose), 전분(starch), 맥아당(maltose)을 섭취했을 때 FHHT가 혈당 상승을 효과적으로 억제하는 것으로 해석할 수 있다. 특히 가장 높은 저해 활성을 보인 Sucrase는 설탕을 주로 섭취하는 당뇨 환자의 체내 탄수화물 분해 및 장내 흡수를 억제하여 항당뇨에 효과적일 것을 시사하였다.

Butala 등[29]은 선행연구에서 lodhrasavam의 19종에 해당하는 각 식물의 항산화 활성이 α-glucosidase와 α-amylase를 저해하는 데 효과적인 작용을 하여 항당뇨 효과가 나타난 것으로 보고하였다. Kim[30] 의 연구에서 황련의 대표적 항산화 물질인 berberine[31]의 DPPH 라디컬 소거능은 9.0%, superoxide dismutase (SOD) 유사 활성율은 58.0%로 나타나 항산화 효능이 우수하다고 보고하였다. 황백은 Jang 등[32]의 연구에서 berberine과 palmatine은 reducing power, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) 및 아질산염에 대한 소거 활성이 증가한 것으로 berberine의 항산화 우수성을 보고하였다. Kim 등[33]은 작약, 치자, 구절초, 수세미, 황금 초임계 추출물 중에서 황금과 치자나무의 항산화 효능이 가장 우수한 것으로 보고하였다.

이와 같은 결과를 종합적으로 판단하여 FHHT의 황련, 황백, 황금, 치자 4종에 해당하는 각 한약재의 phytochemical 기반의 항산화 효능이 탄수화물 분해효소의 저해와 포도당의 흡수 억제에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

동물 모델(SD-Rats)을 이용한 효능 평가

동물(Rat)을 이용한 단회 투여에 따른 Starch 흡수 측정

FHHT의 농도 0.1, 0.5 g/kg-b.w.과 starch 2.0 g/kg-b.w.의 농도로 일반 SD-rat에 경구 투여한 후의 혈당 변화 측정 결과는 Fig. 4와 같다. Starch만 투여한 control은 투여 30 min 후 283.1±4.3 mg/dL으로 혈당이 급격히 상승하였으나 양성 대조군인 GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.은 254.3±12.5의 결과를 보였다(P<0.001). FHHT의 농도 0.5 g/kg-b.w. 군은 241.6±12.7 mg/dL으로 나타났고, 0.1 g/kg-b.w. 군은 252.5±18.5 mg/dL을 보여서 대조군 대비 낮은 혈당 상승의 결과를 나타냈다(P<0.001). 이 과정에서 FHHT 0.5 g/kg-b.w. 군은 30 min대에 양성 대조군보다 현저히 낮은 혈당 상승 값을 보였고, starch는 30 min대에 가장 높은 혈당 상승효과가 발현되었으나 점차 감소하여 식후 3 h 시점에서 공복혈당 값을 나타냈다. 이 실험 결과로 FHHT는 2종의 농도에서 모두 다당류 starch에 대해 대조군 대비 낮은 수치가 확인되어 FHHT가 혈당 상승 억제 효능이 있는 것으로 사료된다.

시료 투여 후 약동력학 (Pharmacodynamic, PD) 분석

FHHT의 농도 0.1, 0.5 g/kg-b.w.과 starch 2.0 g/kg-b.w.의 농도로 일반 SD-rat에 경구 투여한 후 pharmacodynamic의 지표 계산 결과는 Table 5와 같다. Starch를 투여한 대조군의 C*max* 경우 282.1±6.1 mg/dL의 수치로 나타났고 GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.군은 255.2±11.5 mg/dL의 결과를 보였다(P<0.001). FHHT의 0.5 g/kg-b.w.는 249.6±10.8 mg/dL으로 나타났고 0.1 g/kg-b.w.는 254.1±16.7 mg/dL으로 나타나 대조군 대비 낮은 Cmax 값을 확인하였다(P<0.001).

Area Under Curve (AUClast)의 값은 starch 투여한 대조군은 576.6±14.8 hr·mg/dL로 나타났고 GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.은 573.4±28.2 mg/dL의 결과를 보였다. FHHT의 0.5 g/kg-b.w.군은 565.9±26.5 mg/dL로 나타났고 0.1 g/kg-b.w.은 572.1±23.7 mg/dL으로 나타나 대조군보다 낮은 결과를 보였다.

결론적으로 FHHT를 동물 모델을 통한 농도에 따른 식후의 혈당 상승 억제 효능은 다당류 starch에 대해 C*max*, AUC*last* 값을 분석한 결과 실험한 농도 모두 control 대비 낮은 수치를 보였다. C*max* 값의 경우 FHHT 0.5 g/kg-

Table 5. Changes in pharmacodynamics (PD) parameters of control and after administration of FHHT and GO2KA1 with starch ingestions

Groups	PD parameters		
	C*max* $_{(mg/dL)}$	T*max* (hr)	AUC*last* (hr-mg/dL)
Starch	282.1±6.1[a]	0.5±0.0[b]	576.6±14.8
GO2KA1 0.5 g/kg	255.2±11.5[b,***]	0.6±0.2[b]	573.4±28.2
FHHT 0.1 g/kg	254.1±16.7[b,***]	0.6±0.2[b]	572.1±23.7
FHHT 0.5 g/kg	249.6±10.8[b,***]	0.8±0.3[a,**]	565.9±26.5

C*max* (maximum blood glucose levels), T*max* (time when glucose peak) and AUC*t* (area under the curve) were observed. The results were expressed as the mean±S.D. [a-b]Different corresponding letters indicate significant differences at $P<0.05$ by Duncan's test. *$P<0.05$, **$P<0.01$, and ***$P<0.001$ compared to differences between control and each group by unpaired student's *t*-test.

b.w.와 0.1 g/kg-b.w.에서 통계적으로 모두 유의하게 낮은 결과를 보임으로써 FHHT의 식후혈당 상승 억제 효능을 확인할 수 있었다($P<0.001$).

동물(SD-rat)을 이용한 단회 투여에 따른 sucrose 흡수 측정

FHHT의 농도 0.1, 0.5 g/kg-b.w.과 sucrose 2.0 g/kg-b.w.의 농도로 일반 SD-rat에 경구 투여한 후의 혈당 변화를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. Sucrose만 투여한 대조군의 경우 투여 30 min 후 248.8±3.4 mg/dL으로 혈당이 상승하였으나 양성대조 GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.군은 242.6±5.0으로 나타났다($P<0.001$). FHHT의 농도 0.5 g/kg-b.w.군은 219.4±15.4 mg/dL의 결과를 보였고 0.1 g/kg-b.w.군은 225.4±17.1 mg/dL으로 나타나 대조군 대비 낮은 혈당 상승 결과를 나타냈다($P<0.001$). 양성대조군보다 FHHT는 30 min 대에 더 낮은 혈당 상승을 나타냈고 양성대조군은 1 h 대에 다른 군들보다 급격히 감소하여 3 h까지 비슷한 혈당을 나타냈다. Starch의 경우 30 min대에 가장 높은 혈당 상승이 발현된 후 점차 감소하여 식후 3 h 시점에서 공복혈당 값을 나타냈다.

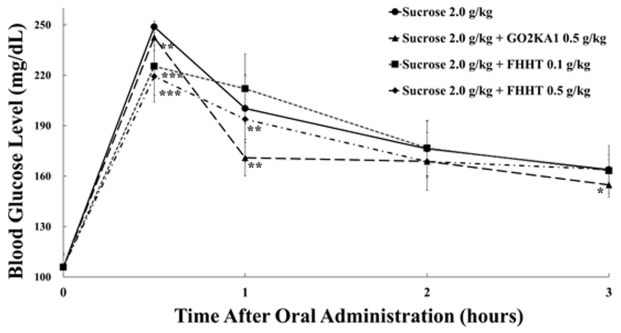

Fig. 5. Dose-dependent anti-hyperglycemic effect of FHHT on sucrose loading test. After fasting for 24 h, 5-week-old, male SD rats were orally administered with sucrose solution (2.0 g/kg-body weight (b.w.)) with or without samples (FHHT 0.1 g/kg-b.w., FHHT 0.5 g/kg-b.w., and positive control: GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.). The results were expressed as the mean±S.D. were observed. *$P<0.05$, **$P<0.01$, and ***$P<0.001$ compared to differences between control and each group by student's *t*-test.

시료 투여 후 Pharmacodynamic (PD) 지표

FHHT 농도별 0.1, 0.5 g/kg-b.w.과 sucrose 2.0 g/kg-b.w.의 농도로 일반 SD-rat에 경구 투여 후 Pharmacodynamic 지표의 계산 결과는 Table 6과 같았다.

Sucrose를 투여한 대조군의 C*max* 경우 248.8±1.9 mg/dL의 수치가 확인되었고 GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.는 242.6±3.5 mg/dL를 나타냈다. FHHT는 0.1 g/kg-b.w.에서 225.4±14.7 mg/dL로 나타났고 0.5 g/kg-b.w.에서 219.4±12.5 mg/dL로 나타나 FHHT 농도별 모두 이당 sucrose에 대하여 대조군 대비 낮은 C*max* 값을 확인하였다($P<0.01$). 양성대조군의 경우, 식후 30분에서는 통계적 유의차를 보이지 않으나 식후 1시간에서의 혈당은 대조군의 201±8.9 mg/dL 대비 169±6.4 mg/dL ($P<0.01$)로 유의적인 감소를 확인할 수 있었다.

이상의 시간대별 혈당감소의 결과로, Area Under Curve (AUC*last*)의 값의 경우 sucrose 투여한 대조군의 559.4±27.7 hr·mg/dL 대비 GO2KA1 0.5 g/kg-b.w.에서 522.3±21.1 mg/dL로 나타났다($P<0.05$). FHHT 0.1 g/kg-b.w.에서 549.3±24.8 mg/dL와 FHHT 0.5 g/kg-b.w.에서 521.4±14.6 mg/dL의 결과를 보여 AUC*last* 값 분석 결과 대조군보다 유의적으로 감소하는 결과를 확인하였다($P<0.01$).

위의 결과에서 C*max* 값의 경우 FHHT 0.5 g/kg-b.w., 0.1 g/kg-b.w.로 나타나 통계적으로 모두 유의하게 낮은 것을 확인하였고, AUC*last* 값은 FHHT 0.5 g/kg-b.w. 군만 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 확인하였다($P<0.01$). 이러한 결과로 FHHT가 탄수화물에 속하는 이당류 sucrose의 섭취에 대해서도 당 흡수를 억제하여 체내 에너지 대사의 조절 기전으로 혈당조절이 가능할 것으로 사료된다.

상기의 내용으로 본 연구에서는 Rat 유래의 α-glucosidase와 α-amylase에 대한 FHHT의 농도별 저해 활성과 동물모델을 이용하여 식후의 혈당 상승 억제 효능을 평가하여 다음과 같은 결과를 확인하였다.

FHHT는 농도 의존적으로 α-glucosidase와 α-amylase의 소화 효소 활성을 저해하였고, 개별 α -glucosidase의 저해

Table 6. Changes in pharmacodynamics (PD) parameters of control and after administration of FHHT and GO2KA1 with sucrose ingestions

Groups	PD parameters		
	C*max* $_{(mg/dL)}$	T*max* (hr)	AUC*last* (hr-mg/dL)
Sucrose	248.8±1.9[a]	0.5±0.0	559.4±27.7[a]
GO2KA1 0.5 g/kg	242.6±3.5[a,**]	0.5±0.0	522.3±21.1[b,*]
FHHT 0.1 g/kg	225.4±14.7[b,**]	0.5±0.0	549.3±24.8[a]
FHHT 0.5 g/kg	219.4±12.5[b,**]	0.5±0.0	521.4±14.6[b,**]

C*max* (maximum blood glucose levels), T*max* (time when glucose peak) and AUC*t* (area under the curve) were observed. The results were expressed as the mean±S.D. [a-b]Different corresponding letters indicate significant differences at $P<0.05$ by Duncan's test. *$P<0.05$, **$P<0.01$, and ***$P<0.001$ compared to differences between control and each group by unpaired student's *t*-test.

활성도 농도 의존적으로 증가함으로써 sucrase, maltase, glucoamylase에 대해 모두 효과적인 것으로 나타났다.

IC_{50} 값의 결과는 α-amylase는 9.321 mg/mL, p-NPG 기질을 이용한 α-glucosidase는 0.143 mg/mL, maltase 1.159 mg/mL, glucoamylase 0.263 mg/mL, sucrase 0.112 mg/mL로 나타나 각각의 효소 특이적 저해 활성을 확인하였다. 그리고 동물 모델 실험에서 FHHT가 탄수화물에 속하는 다당류 starch 및 이당류 sucrose의 섭취에 대하여 실험 농도별 모두 통계적으로 유의한 식후혈당 상승 억제 효능을 보였다.

결론적으로, FHHT는 당뇨 환자에서 발생할 수 있는 식후 급격한 혈당 상승(혈당 spike)을 효과적으로 감소시킬 수 있는데 이는 4종 한약재의 다양한 phytochemical 기반의 이당류 분해 흡수 효소 α-glucosidase의 저해 활성에 기인하는 것으로 사료된다.

본 연구는 발효 식품의 특성과 과학적 유효성을 근거로 하여 FHHT를 실험하였으므로 발효 전, 후의 비교 데이터는 제시할 수 없었으나, *In-Vitro*와 동물 실험을 통해 식후혈당 상승 억제 효과를 확인함으로써 항당뇨 효능을 검증하였다. 향후 추가 연구를 통해 FHHT 내의 생리 지표 물질을 도출하고, 이에 따른 발효 전, 후의 효능 변화에 관한 연구를 수행하고자 한다.

본 실험의 결과에서 있듯이, FHHT는 당 흡수 억제를 통한 체내 에너지 대사 조절 기전으로 혈당 및 체중조절이 가능할 것으로 예측됨으로써 추후 지표 성분을 분리정제 및 구조 동정하는 추가 연구가 필요함을 알 수 있었다. 또한 생리 활성 지표 물질의 이당류 분해효소 저해 활성 및 패턴 분석과 개별 효소 저해 활성 피놀릭 화합물의 동물 모델을 통한 혈당 감소 효능평가를 통해 더 정확하고 과학적인 검증이 필요하다고 사료된다. 본 연구에서 단회 투여 실험으로 확보된 작용기전 및 유효농도(용량)를 토대로 향후 장기 투여(rat 모델에서 6-8주 반복투여) 시험을 통해 소재의 유효성과 인체 임상 시험을 위한 최종 섭취 용량 설정이 가능할 것으로 사료된다. 이로써 FHHT의 당 흡수 억제를 통한 항당뇨 효능이 확인되었고 추가 연구의 필요성 및 시사점을 제시함으로써 본 연구가 항당뇨의 새로운 한방 건강 기능식품으로 활용되기 위한 참고 자료가 될 것으로 사료된다.

국문 요약

본 연구는 발효 황련해독탕(FHHT)의 식후혈당 상승 억제 효능을 검증하기 위해 농도별로 Rat 유래 α-glucosidase와 돼지 췌장 유래 α-amylase에 대한 저해 활성과 sprague dawley rat 모델을 이용한 식후혈당 상승 억제 효능을 평가하였다. 그 결과, FHHT는 농도 의존적으로 α-glucosidase와 α-amylase의 소화 효소 활성을 저해하였고 IC_{50} 값은 α-amylase 9.321 mg/mL, α-glucosidase 0.143 mg/mL, maltase 1.159 mg/mL, glucoamylase 0.263 mg/mL, sucrase 0.112 mg/mL로 확인되었다. 동물 모델 실험에서는 FHHT가 다당류 starch 및 이당류 sucrose 섭취 후 통계적으로 유의한 식후혈당 상승 억제 효능을 보였다($P<0.01$). 이와 같은 결과를 통해 FHHT의 당 흡수 억제를 통한 항당뇨 효능을 확인하였고 추가 연구의 필요성 및 시사점을 제시함으로써 본 연구가 항당뇨의 새로운 한방 건강 기능식품으로 활용되기 위한 참고 자료가 될 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Kyung Nam Min https://orcid.org/0000-0001-7624-4333
Kwan Ho Kim https://orcid.org/0009-0006-5389-3334

References

1. Xu, M.L., Wang, L., Xu, G.F., Wang, M.H., Antidiabetes and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Sonchus asper* (L) Hill extract. *Kor. J. Pharmacogn.*, **42**, 61-67 (2011).

2. Cha, M.R., Park, J.H., Choi, Y.H., Choi, C.W., Hong, K.S., Choi, S.U., Kim, Y.S., Kim, Y.K., Kim, Y.H., Ryu, S.Y., Alpha-glucosidase inhibitors from the branches extract of *Continus coggygria. Kor. J. Pharmacogn*., **40**, 229-232 (2009).
3. Lee, K.W., Shon, H.Y., Kang, S.K., Park, B.K., Park, D.H., Min, B.S., Song, H.Y., Prevalence of diabetes mellitus and associated diseases among Korean subjects as studied with AMHTS. *Diabetes Metab J*., **8**, 5-14 (1984).
4. Defronzo, R.A., The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.,* 37, 667-687 (1988).
5. Defronzo, R.A., Bonadonna, R.C., Ferrannini, E., Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care.,* **15**, 318-368 (1992).
6. Shulman, G.I., Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest*., **106**, 171-176 (2000).
7. Lillioja, S., Mott, D.M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J.E., Ravussin, E., Knowler, W.C., Bennett, P.H., Bogardus, C., Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus: prospective studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.*, **329**, 1988-1992 (1993).
8. Choi, H.Y., Ha, K.S., Jo, S.H., Ka, E.H., Chang, H.B., Kwon, Y.I., Antioxidant and anti-hyperglycemic effects of a sanghwang mushroom(Phellinus linteusau) water extract. *Korean J. Food Nutr*., **25**, 239-245 (2012).
9. Marles, R.J., Farnsworth, N.R., Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine.,* **2**, 137-189 (1995).
10. Yeh, G.Y., Eisengerg, D.M., Kaptchucj, T.J., Pjillips, R.S., Systematic review of herbs and dietary supplements for glymcemic control in diabetes. *Diabetes Care*., **26**, 1277-1294 (2003).
11. Cheng, A.Y., Fantus, I.G., Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ.*, **172**, 213-226 (2005).
12. Ji, Y.J., Lee, J.W., Lee, I.S., Antimicrobial effect of medicinal plants against methicllin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *J. Life Sci.,* **17**, 412-419 (2007).
13. Chen, M., Liao, Z., Lu, B., Wang, M., Lin, L., Zhang, S., Li, Y., Liu, D., Liao, Q., Xie, Z., Huang-lian-jie-du-decoction ameliorates hyperglycemia and insulin resistant in association with gut microbiota modulation. *Front Microbiol.,* **9**, 2380 (2018).
14. Lee, B.R., Han, K.S., Park, H.J., Kim, A.R., Kwon, O.J., Yang, C.S., Cho, C.S., Efficacy of Hwangryunhaedok-tang (Huang-lian-jie-du-tang, Oren-gedoku-to) for patients with hyperlipidemia: a study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel, investigator-initiated clinical trial. *Trials*., **21**, 750 (2020).
15. Kim, N.J., Jin, S.M., Choi, H.J., Joo, S.M., Song, B.W., Kim, J.W., Studies on interactions between western and traditional heral medicines(I)-effects of chunghyuldan on the pharmacokinetics and pharmacodydnamics of nicardipine in rats. *J. Kor. Soc. Health-Syst. Phar.,* **19**, 383-394 (2002).
16. Zhao, X.G., Clinical study on the effect of Huanglian Jiedu Decoction on type 2 diabetes and experimental study on the effect of HIF-1α and VEGF on the blood vessels of type 2 diabetic rats. Master's thesis, University of Shandong Traditional Chinese Medicine, Jinan, China (2013).
17. Ye, L., Liang, S., Guo, C., Yu, X., Zhao, J., Zhang, H., Shang, W., Inhibition of M1 macrophage activation in adipose tissue by berberine improves insulin resistanc. *Life Sci.,* **166**, 82-91 (2016).
18. Chen, Y.J., Wu, Q.G., Liu, Y., Xiong, S.L., Metaanalysis of the effect of Huanglian Jiedu Decoction alone and in combination on the treatment of type 2 diabetes. *J. Chin. Exp. Tradit. Med. Pharmacol.,* **24**, 212-220 (2018).
19. Martí-Quijal, F.J., Khubber, S., Remize, F., Tomasevic, I., Roselló-Soto, E., Barba, F.J., Obtaining antioxidants and natural preservatives from food by-products through fermentation: a review. *Fermentation.,* **7**, 1-12 (2021).
20. Um, J.N., Min, J.W., Joo, K.S., Kang, H.C., Antioxidant, anti-wrinkle and whitening effect of fermented extracts of Hwangryunhaedoktang. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*., **43**, 69-78 (2017).
21. Yang, H.J., Joo, H.A., Baek, S.C., Park, J.S., Hon, S.H., Anti-inflammatory effects of Hwangnyeonhaedok-tang and Fermented Hwangnyeonhaedok-tang. *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol*., **24**, 1-15 (2011).
22. Alshannaq, A.F., Gibbons, J.G., Lee, M.K., Han, K.H., Hong, S.B., Yu, J.H., Controlling aflatoxin contamination and propagation of Aspergillus flavus by a soy-fermenting Aspergillus oryzae strain. *Sci. Rep.,* **8**, 16871 (2018).
23. Tefara, S.F., Jiru, E.B., Bairu, A. G/M., Optimization of lactobacillus plantarum fermentation conditions for the production of lactic acid. *Biomass Convers. Biorefinery.,* **14**, 6637–6647 (2022).
24. Jo, S.H., Ha, K.S., Moon, K.S., Kim, J.G., Oh, C.G., Kim, Y.C., Apostolidis, E., Kwon, Y.I., Molecular weight dependent glucose lowering effect of low molecular weight chitosan oligosaccharide (GO2KA1) on postprandial blood glucose level in SD rats model. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 14214-14224 (2013).
25. Kim, G.J., Jang, Y., Kwon, K.T., Kim, J.W., Kang, S.I., Ko, H.C., Lee, J.Y., Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Jeju citrus (Citrus unshiu) leaf extract and hesperidin inhibit small intestinal α-glucosidase activities in vitro and postprandial hyperglycemia in animal model. *Int. J. Mol. Sci*., **25**, 1-15 (2024).
26. Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., Zito, S.W., α-Glucosidase inhibitory activity of *Syaygium cumini* (Linn). Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki(GK) rats. *Carbohydr. Res.,* **343**, 1278-1281 (2008).
27. Peng, W., Tang, C., Li, Y., Lv, X.M., Fan, G., Zhang, Y., Inhibitory effects of various ratios of polysaccharides/alkaloids from rhizome of *coptis chinensis franch* on α-glucosidase. *Trop. J. Pharm. Res.,* **15**, 307-312 (2016).
28. Yin, Y., Heo, S.I., Jung, M.J., Wang, M.H., Antioxidant andantidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus. Trop. J. Pharm. Res.*, **40**, 1-5 (2009).

29. Butala, M.A., Kukkupuni, S.K., Vishnuprasad, C.N., Ayurvedic anti-diabetic formulation Lodhrasavam inhibits α-amylase, α-glucosidase and suppresses adipogenic activity *in vitro. J. Ayurveda Integr. Med.,* **8**, 145-151 (2017).
30. Kim, I.C., Antioxidative property and whitening effect of the puerariaradix, poria cocos and coptidis rhizoma. *J. Korean. Appl. Sci. Technol.,* **25**, 219-225 (2008).
31. Pongkittiphan, V., Chavasiri, W., Supabphol, R., Antioxidant effect of berberine and its phenolic derivatives against human fibrosarcoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.,* **16**, 5371-5376 (2015).
32. Jang, G.W., Choi, S.I., Han, X., Men, X., Kwon, H.Y., Choi, Y.E., Park, B.W., Kim, J.J., Hwan, L.O., Development and validation of analytical method and antioxidant effect for berberine and palmatine in *P.amurense*. *J. Food Hyg. Saf.,* **35**, 544-551 (2020).
33. Kim, B.R., Lee, S.M., Hwang, T.Y., Kim, H.S., Anti-oxidative and skin barrier effects of natural plants with a supercritical extract. *J. Korean Soc. Food Preserv.,* **20**, 597-601 (2013).