

발간등록번호

11-1543000-000388-01

**수수에서의 항혈전기능 소재 개발
및 원료곡 공급체계 구축**

The development of materials for antithrombosis and
establishment of distribution of sorghum variety

경북대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수수에서의 항혈전기능 소재 개발 및 원료곡 공급체계 구축” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 3 월 7 일

주관연구기관명 : 경북대학교

주관연구책임자 : 김 영 호

협동연구기관명 : 농촌진흥청

협동연구책임자 : 곽 도 연

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 우 미 희

요 약 문

I. 제 목

수수에서의 항혈전기능 소재 개발 및 원료곡 공급체계 구축

II. 연구개발의 목적 및 필요성

뇌졸중과 관상동맥심장질환을 비롯한 심혈관계 질환은 전 세계에 걸쳐서 주요 사망요인으로 알려져 있다. 2012년 심혈관계 질환은 한국인의 사망요인에 있어서 2번째를 차지하였는데, 이는 전체 사망자의 22%를 차지하였다. 더구나 심혈관계 질환의 환자들의 경우, 1차적으로 발생한 심혈관계 질환으로부터 회복하여 생존한 후에도 재차 심장마비 혹은 뇌졸중을 일으키는 경향이 있다. 그러므로 1차적인 심혈관계 질환뿐만 아니라 2차적인 심혈관계 질환의 발병을 감소시키기 위한 노력이 절실히 필요한 실정이다. 병적인 혈전증(pathological thrombosis)은 혈액응고경로가 너무 강하게 활성화되어서, 혈전의 형성을 혈관손상부위에 국한시키거나 제한하는 역할을 수행하는 항응고인자들의 혈전용해기전을 능가하는 수준이 될 때 발생하는데, 실제로 트롬빈은 혈전형성의 마지막 단계를 책임지는 매우 중요한 효소이다.

트롬빈은 혈전의 생성, 성장 및 안정화에 있어서 중추적인 역할을 수행하기 때문에 트롬빈의 효과적인 저해는 혈전증의 치료와 예방에 있어서 매우 중요하다. 현재 잘 알려져 있는 아스피린, 헤파린 및 비타민 K와 같은 전통적인 항응고제는 트롬빈의 간접적인 저해제들이다. 이들이 적절히 사용된다면 효과적이지만, 이들 항응고제들은 여러 제한요소들이 알려져 있어, 예상치 못한 항응고 반응, 증상에 따른 적정량의 결정, 항응고 상황의 모니터링, 헤파린-매개 혈소판의 감소(thrombocytopenia) 현상, 유전적 차이에 따른 항응고 반응결과의 다양성, 여러 단백질이나 세포에 대한 결합, 혈액응고에 결합된 트롬빈에 대해서 저해능 부재와 같은 현상을 나타내는 것으로 알려져 있다.

세계 여러 지역에서 주요 곡물 중 하나이며, 밀, 쌀, 옥수수, 보리에 이어서 전 세계적으

로 다섯 번째로 중요한 곡물이다. 또한 수수는 생존능이 다른 곡류보다 높기 때문에 생산하는데 있어서 더 경제적이다. 수수는 재배특성에 있어서의 유망한 잠재력이외에도 수수의 구성화합물들의 인체 건강을 도우는 생물학적 효과 등이 연구결과 나타나고 있다. 예를 들면, 수수는 탄닌, 페놀산, 안토시아닌, 식물 스테롤 및 식물 2차 대사산물 또는 세포 구성요소인 폴리코사놀 등과 같은 식물 화합물질(phytochemicals)을 풍부하게 지니고 있다. 최근의 연구는 수수가 항식도암 효과와 콜레스테롤 저하 효과를 가지고 있으며, 심장 혈관 질환의 위험을 감소시킬 수 있으며, 특히 높은 항산화 활성이 있음을 보여 주었다.

따라서 본 연구에서는 국내산 잡곡의 경쟁력 강화와 안정적 생산 기반을 구축하기 위하여 항혈전 활성 소재가 확인된 국내산 수수로부터 우수 기능성 성분의 분리·동정과 과학적 작용 기전을 구명하여 수수의 품종 개발 및 품종 고정화를 한다. 이를 통하여 국내산 잡곡의 생산 기반 확충 방안을 마련하고, 잡곡의 부가가치를 높여 농가 소득 증대, 잡곡 수요 확대, 나아가 국내 잡곡 산업의 보호 및 활성화를 위하여 연구하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 수수의 생리활성성분을 분리하고 항혈전 활성을 과학적으로 규명함과 동시에 우수한 수수 품종을 선발하여 우리나라 수수의 우수성과 그 기능성을 밝힘으로서 소비자의 수수 및 수수 유래 기능성 제품의 이용도를 높이고자 하였으며, 이를 통해 수수의 대량 재배로 농가 소득 향상에 기여하고자 하였다.

이를 위해 본 과제에서는 대학과 국공립기관과의 유기적인 공동연구체계 구축과 수행을 통해 항혈전 활성이 우수한 수수 품종을 선발 및 활용하는데 요구되는 기술의 향상과 축적을 위해, (제1세부과제) 수수 유래 항혈전 신소재의 동정 및 작용기전 구명, (제2 세부과제) 항혈전 활성이 우수한 유전자원 선발 및 활용 연구, (제3세부과제) 수수로부터 항혈전 활성 소재의 분리 동정, 구조 결정 및 안정화 기술 개발 등을 달성하고자 다음과 같은 연구내용 및 범위로 연구를 수행하였다.

▶ 제 1 세부 과제 : 수수 유래 항혈전 신소재의 동정 및 작용기전 구명

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
1 차년도 2010 ~ 2011	수수 품종별 항혈전 소재의 탐색	<ul style="list-style-type: none"> • 국내산 수수 품종별 분획물의 항혈전 신기능 활성 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 항 응고 기능성 소재 탐색 : Clotting assay - Activated partial thromboplastin times (APTT) & Thrombin times(TT) 측정 - 항 혈소판 소재 탐색 : Platelet aggregation assay - 혈전 용해성 소재 탐색 : Fibrin plate method • 수입산 수수 추출물과의 활성 비교 검토 	<ul style="list-style-type: none"> • 수수 유래의 항혈전 활성 소재의 확인 • 수입산 수수의 항혈전 활성 검증 • 특허 출원
2 차년도 2011 ~ 2012	항혈전 활성 소재의 작용기전 구명	<ul style="list-style-type: none"> • In vitro 실험계를 이용한 항혈전 활성 소재의 동정 및 작용기전 구명 • 항혈전 활성 소재의 안정성 테스트 • In vivo 실험계를 통한 항혈전 활성 소재의 효과 및 안전성 검증 • 심혈관 기능 개선에 대한 작용기전 구명 	<ul style="list-style-type: none"> • 유효 활성소재의 분자, 세포 생물학적 작용기전 구명
3 차년도 2012 ~ 2013	항혈전 활성소재의 안전성 검토 및 활용방안 모색	<ul style="list-style-type: none"> • 항혈전 신기능 소재의 신약 플랫폼 기술을 통한 안전성 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 기초독성 평가 : 일반 세포 독성, 심장 독성, 유전 독성 - 약동력학 평가 : 초기 약동력학, 대사 안정성, CYP저해도 • In vivo 실험계를 통한 항혈전 효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> - Balloon injury (BI) : Rat - Collagen-epinephrin 유도에 의한 혈전증 테스트 : mouse • 기능성 시제품의 제품화 방안 모색 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 음료, 쿠키 등 	<ul style="list-style-type: none"> • 항혈전 활성능의 in vivo 검증 • 특허 및 논문발표 • 학술대회 포스터 발표 • 국내산 수수 품종의 항혈전 활성 소재의 체계화와 잡곡 영농 확대와 농가 소득 증대

▶ 제 1 협동 과제 : 항혈전 활성이 우수한 유전자원 선발 및 활용 연구

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
1 차년도 2010 ~ 2011	항혈전 기능 우수 품종 선발 및 증식	<ul style="list-style-type: none"> • 재래종을 비롯한 유망 예상 유전자원 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 대상 : 황금찰수수 등 10개 유망 유전자원 - 품종 출원을 위한 품종특성 평가 - 항혈전 기능평가를 통한 우수 유전자원 선발 • 유망 예상 유전자원 증식 <ul style="list-style-type: none"> - 대상 : 황금찰수수 등 10개 유망 유전자원 - 면적 : 유전자원별 10a 내외 - 지역 2개지역 이상 	<ul style="list-style-type: none"> • 항혈전 우수 유전자원 선발 • 유망 유전자원의 증식
2 차년도 2011 ~ 2012	항혈전 기능성 물질함량 증대를 위한 재배특성 및 환경요인평가	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 선발 수수 유전자원에 대한 재배특성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 감광, 감온 및 발아 특성 - 생육특성 및 수량성 - 단일재배에 따른 품종의 고정 및 안정성 - 내병성 • 환경요인 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 시비 특성 : 3처리 수준 이내 - 수분특성 : 관개구/무관개구, - 토양수분함량 등 환경요인 평가 - 항혈전 기능성 물질과의 관계분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 수수의 기능성 물질 증대를 위한 재배법 확립
3 차년도 2012 ~ 2013	항혈전 기능 우수 수수 및 추출물의 활용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 수수 유전자원의 품종보호 출원 및 등록 <ul style="list-style-type: none"> - 농업적 특성자료 평가 - 기능성 물질 특성자료 평가 • 수수 및 추출물의 활용기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 수수 품종의 농가보급(현장실증) - 수수를 이용한 요리법 및 식품 개발 • 수수 및 추출물의 산업체 등 기술이전 <ul style="list-style-type: none"> - 관련 업체 요청시 재배부터 상용화를 위한 제반 기술 이전 	<ul style="list-style-type: none"> • 품종보호 출원 및 등록 • 학술대회 발표

▶ 제 2 협동 과제 : 수수로부터 항혈전 활성 소재의 분리 동정, 구조 결정 및 안정화 기술 개발

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
1 차년도 2010 ~ 2011	수수 품종별 항혈전 기능성 소재 확인을 위한 물질의 분리	<ul style="list-style-type: none"> 수수 품종별 추출물 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 각 품종 분류에 따른 추출물 제조 - 물질의 대량 추출 수수 추출물의 용매 분획물 제조 : 용매분획에 의하여 메탄올, 에탄올, methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol 및 water 분획의 제조 - 수입 수수 추출물 제조 	<ul style="list-style-type: none"> 수수 추출물의 제조 항혈전 생리 활성 분획 확인 수입 수수로부터 추출물 제조
2 차년도 2011 ~ 2012	우수 항혈전 생리 활성 분획으로부터 활성 물질의 분리, 정제 및 구조 결정	<ul style="list-style-type: none"> 수수 품종별 추출물의 용매 분획에 대한 Open column chromatography 실시 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC를 통한 화합물의 분리 우수 활성 물질의 구조결정 <ul style="list-style-type: none"> - 물리, 화학적 방법 : m.p.,$[\alpha]_D$, 유도체 합성 등 - 분광학적 방법 : UV, IR, 1D 및 2D NMR, Mass Spectrometry 등 작용기전 연구를 위한 물질 제조 (추출물 공급) 	<ul style="list-style-type: none"> 우수 분획으로부터 생리활성 소재의 분리, 정제 생리활성 물질의 구조결정 특허 출원 및 학술대회 발표
3 차년도 2012 ~ 2013	수수 유래 항혈전 관련 기능성 물질의 대량 생산 및 안정화 기술	<ul style="list-style-type: none"> 우수 활성 물질의 구조결정 <ul style="list-style-type: none"> - 물리, 화학적 방법 : m.p.,$[\alpha]_D$, 유도체 합성 등 - 분광학적 방법 : UV, IR, 1D 및 2D NMR, Mass Spectrometry 등 원료 물질의 안정화 우수 활성 물질의 대량 생산 기능성 제품화를 위한 제형화 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 우수 생리활성 물질의 구조 결정 우수 생리활성 물질의 대량 생산 논문 투고

IV. 연구개발결과

제1세부과제 : 수수 유래 항혈전 신소재의 동정 및 작용기전 구명

1. 국내산 수수와 중국산 수수의 항혈전능 비교

가. 본 연구를 수행하기 위해 선발된 황금찰수수와 중국산 수수의 항혈전 활성을 비교하기 위하여 국내산 황금찰수수 30 kg을 확보한 후, 95% EtOH로 추출한 다음, hexane, methylene chloride, ethyl acetate, n-Butanol의 유기용매와 물을 이용하여 단계별 추출을 수행하였다. 국내산 황금찰수수의 유기용매 분획과 중국산 수수의 유기용매 분획의 동일한 농도 조건으로 Thrombin Time (TT) assay로 항혈전 활성을 측정하였다.

나. TT assay를 수행한 결과 국내산 황금찰수수의 경우 항혈전 관련 소재가 ethanol, hexane 및 methylene chloride 분획에 집중된 것에 반해 중국산 수수에는 hexane 분획에서만 활성이 높게 나타났다. 이들의 항혈전 활성을 비교해보면 음성대조군인 DMSO의 저해율이 100%일 때 황금찰수수의 에탄올 분획은 315%, hexane 분획은 약 400%의 저해율을 나타낸 것에 비해, 중국산 수수는 같은 농도에서 에탄올과 hexane 분획의 혈전 생성 저해율이 120%와 230%로 나타나 국내산 황금찰수수가 중국산 수수에 비해 항혈전 효과가 월등히 뛰어난 것을 확인하였다.

다. 황금찰수수의 각 유기용매 분획물의 항혈소판 응집 저해 활성능을 평가하였다. 그 결과 음성 대조군인 DMSO의 혈소판 저해율을 100%일 때, 황금찰수수 methylene chloride, ethylacetate 및 buthanol 분획의 활성이 각각 141.7%, 130.8%, 212.5%로 나타났으며, 이는 양성 대조군인 aspirin 0.25 mg/ml의 농도의 활성이 121.4%로 나타난 것과 비교하였을 때 황금찰수수의 항혈소판 응집 저해 활성능이 매우 우수함을 보여주었다.

2. 항혈전 활성 소재의 작용기전 구명

가. 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물을 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 n-butanol로 분획하였을 때, 대부분의 TT-저해활성은 hexane과 methylene chloride 분획에 분포하였으며, 이들 분획의 활성은 동일 농도의 aspirin (최종농도 480 µg/ml) 보다 더 높은 것으로 나타났다.

나. Intrinsic pathway에서의 항혈전 활성을 알아보기 위하여 activated partial thromboplastin time (APTT) 법을 이용하여 assay를 수행하였다. APTT-저해활성은 hexane 및 methylene chloride 분획에 주로 분포하였으며, 이는 양성 대조군인 warfarin (최종농도 3.13 mg/ml) 보다 더 높은 것으로 확인되었다.

다. Extrinsic pathway에서의 항혈전 활성을 알아보기 위하여 prothrombin time (PT) 법을 이용하여 assay를 수행하였다. PT-저해활성은 hexane 분획에 주로 분포하였으며, warfarin (최종농도 3.13 mg/ml) 보다 더 높은 것으로 확인되었다.

라. 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 TT-저해활성은 열 안정성 및 pH 안정성을 조사하였다. 황금찰수수 에탄올 추출물을 100℃에서 시간별 (0, 15, 30, 60분) 처리한 후 TT assay를 수행한 결과, 열처리에 의해서 항혈전 효과가 저해되지 않음을 확인하였다. pH 안정성 조사를 위하여 황금찰수수 에탄올 추출물을 pH2에서 시간별 (0, 60, 120분) 처리한 후, pH7이 되도록 보정하여 TT assay를 수행한 결과 황금찰수수 에탄올 추출물의 활성이 유지되는 것으로 확인되었다. 이는 황금찰수수 추출물을 식품으로 조리되어 우리 몸으로 흡수될 때에도 항혈전의 효과가 유지될 수 있음을 시사한다.

마. In vivo에서의 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 항혈전 효과를 검정하기 위해 rat을 이용한 경동맥 Balloon Injury (BI)-induced reendothelialization 테스트를 수행하였다. 대조군은 DMSO 만을 corn oil과 혼합하여 경구투여 하였고, 실험군으로 황금찰수수 80% 에탄올 추출물을 농도별 (600 mg/kg 또는 1200 mg/kg)로 경구투여하여 테스트하였다. 그 결과, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물을 1200 mg/kg로 투여한 rat에서 분리한 혈장으로 TT, aPTT 및 PT assay를 하였을 때 음성대조군인 DMSO 보다 항혈전 활성능이 약 2배정도 높은 것으로 확인되었으며, 경동맥을 H&E 염색을 통해 관찰하였을 때에도 황금찰수수 80% 에탄올 추출물 투여 농도에 따라 BI에 의해 유도된 혈관내막의 두께도 감소시키는 것이 확인되었다. 이 결과는 황금찰수수 80% 에탄올 추출물이 임상에서 혈전증과 재협착증을 막을 수 있다는 가능성을 시사한다.

바. Mouse를 이용한 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 in vivo 항혈전 효과를 테스트를 하였을 때에도 추출물을 농도별 (600 mg/kg 또는 1200 mg/kg)로 15일간 경구투여한 마우스가 음성대조군인 DMSO를 투여한 mouse에 비해서 tail vein으로 콜라겐과 epinephrin을 주사하여 혈전이 생기도록 유도하였을 때, 마비되거나 사망하는 비율이 낮아짐을 확인하였다.

사. 황금찰수수 80% 에탄올 추출물이 혈전용해 활성을 지니고 있는지 조사하기 위해 fibrin plate 법을 이용하여 혈전용해능을 조사하였다. 그 결과, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 경우는 양성대조군인 plasmin (15 U/ml 또는 30 U/ml)에 비해 1.5 ~ 2.0배 정도 더 높은 혈전용해 활성을 지니고 있음이 확인되었다. 또한 hexane, methylene chloride 분획의 경우에도 혈전용해 활성이 관찰되었으나, 그 외 ethylacetate, n-butanol 및 수층의 분획에서는 혈전용해 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이상의 결과는 황금찰수수 80% 에탄올 추출물이 항혈액응고 활성뿐만 아니라 혈전용해 활성도 지니고 있음을 나타낸다.

아. 황금찰수수 유래의 항혈액응고능을 나타내는 단일성분에 대한 이해를 높이기 위하여, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물 유래의 유기용매 추출분획의 HPLC 분석을 수행하였다. 그 결과 36가지 종류의 페놀화합물이 황금찰수수에 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이 단일 화합물에 대한 TT, APTT 및 PT assay를 수행하여 이들의 항혈전 효과를 검토하였다. 그 결과, benzoic acid, biochanin A, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, formononetin, homogentisic acid, kaempferol, myricetin, pyrogallol, β -resorcylic acid 및 salicylic acid가 항혈전 효과가 우수하며, 이들은 positive control인 aspirin (최종농도 480 μ g/ml) 보다 항응고 효과가 높은 것으로 나타났다. 또한 t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, homogentisic acid, myricetin, 및 pyrogallol (최종농도 3.13 mg/ml)은 APTT를 완전히 저해 할 수 있었으며, 1.88 mg/ml의 최종농도 조건에서도 APTT에 대한 저해활성이 positive control인 warfarin에 비해 더 높게 나타났다. Benzoic acid, biochanin A, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, ferulic acid, homogentisic acid, β -resorcylic acid, 및 salicylic acid (최종농도 3.13 mg/ml 및 1.88 mg/ml)등은 공통적으로 positive control인 warfarin에 비해 PT 저해활성이 비해 더 높게 나타났다. 특히, formononetin은 매우 효과적으로 APTT 및 PT 값을 연장시키는 것으로 확인되었으므로, 이러한 결과는 formononetin의 항혈액응고 활성의 표적이 혈액응고의 내인성 및 외인성 경로에 공통적으로 기여하는 혈액응고인자일 수 있음을 시사해 준다.

3. 항혈전 활성소재의 안전성 검토 및 활용방안 모색

가. 황금찰수수 항혈전 활성소재의 안전성을 검토하기 위하여 황금찰수수 80% 에탄올 추출물을 이용하여 hERG K⁺ channel 활성을 검정을 통해 심장독성 예측 평가를 하였다. 그 결과 양성 대조군인 astemizole과 독성을 비교하였을 때 황금찰수수 80% 에탄올 추출물은 실험 농도에서 심장 독성이 없이 안전한 것으로 나타났다.

나. Zebrafish를 이용하여 심장박동율을 측정하여 심장위험성 평가를 수행하였을 때에도 황금찰수수 80% 에탄올 추출물 10 ~ 100 µg/ml의 농도에서도 독성이 나타나지 않았다.

다. ICR mice를 이용하여 *in vivo* 실험인 Single dose toxicity assay의 경우 황금찰수수 EtOAc 추출물을 1000 mg/kg 농도로 경구투여하여 투여 개시전과 투여 후의 일반증상의 변화, 체중, 및 사망유무를 조사하였을 때에도 이상증상이 관찰되지 않았으며, 부검 후에도 아무런 이상 증상이 관찰되지 않았다.

라. 황금찰수수 80% 에탄올 추출물을 이용하여 Salmonella TA-98과 TA-100 strains에 대한 복귀 돌연변이시험을 하였다. 그 결과 대사 활성화 물질인 S9이 존재할 때와 존재하지 않을 때 음성대조군인 DMSO와 비교하였을 때 TA-98 균주의 돌연변이율이 1.6배와 3.4배로 나타났다. TA-100 균주의 경우에는 3.4배와 1.1배로 나타났다. 양성대조군인 2-nitrofluorene, benzo(a)pyrene, sodium azide의 돌연변이 발생은 적게는 5.6배에서 많게는 8.1배로 돌연변이율이 증가하는 것과 비교하였을 때 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 돌연변이율은 낮은 것으로 확인되었다.

마. 염색체의 손상 및 이상 현상을 관찰하기 위하여 chromosomal aberration assay를 수행하였을 때, 양성 대조군인 mytomycin D와 cyclophosphamide에서는 DNA의 break, gap, ring, hybridization, aneuploid 등의 다양한 형태의 염색체 이상이 나타났으나, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물에서는 염색체 이상 현상이 나타나지 않아 유전독성에 대하여 안전한 화합물로 판단되었다.

바. 이러한 결과들은 황금찰수수가 혈액응고저해활성과 혈전용해활성을 지니고 있음을 보여주며, 아울러 항혈전 식이요법 소재가 될 뿐만 아니라, 혈액순환개선과 함께 혈전생성을 지연시켜 심혈관 질환 예방 및 방지를 기대할 수 있을 것으로 시사된다.

제1협동과제 : 항혈전 활성이 우수한 유전자원 선발 및 활용 연구

1. 항혈전 기능 우수 품종 선발 및 증식

가. 국립식량과학원 기능성작물부에서 보유하고 있는 수수 유전자원 가운데 항혈전 활성도가 높은 품종을 선발하기 위하여 황금찰수수를 비롯하여 종피색이 갈색이나 붉은 계열로 수량성 및 기계화 적성을 고려하여 9계통을 선발하여 총 10개 자원을 확보하여 항혈전 우수 품종을 선발하는데 이용하였다.

나. 선발된 자원을 피산, 원주에 가가 정식하였으며, 품종간의 생육 특성을 조사하기 위하여 수수의 줄수기 (월, 일), 간장 (키), 이삭길이, 분얼수 (개), 줄기 굵기를 지역별, 품종별 조사하여 비교분석하였다.

2. 항혈전 기능성 물질함량 증대를 위한 재배특성 및 환경요인 평가

가. 선발된 계통의 주요 생육특성으로 줄수기는 재배지역에 따른 차이가 없는 것으로 나타났으며, 수수의 간장, 분얼수 및 이삭길이의 비교를 통해 우수 계통을 선발하였다.

나. 재배기간 동안의 일조량 및 평균기온, 전산온도, 강수량 및 평균 풍속등을 조사하여 밀양과 원주에서의 수수의 전반적 생육상황을 조사하였다.

3. 항혈전 기능 우수 수수 및 추출물의 활용기술 개발

가. 선발된 황금찰수수 외 9계통에 대한 항혈전 활성을 비교하기 위하여 80% 에탄올 추출물을 Thrombin Time (TT) assay를 수행하여 항혈전 활성을 측정하여, 항혈전 활성이 높은 계통을 선별하였다.

나. 선발된 수수 4계통의 100% 주정 추출물에 대한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량분석을 통해 135007 및 135028 계통이 대비품종에 비해 높은 함량을 보이는 것을 확인하였다.

다. 항산화 활성 평가를 위하여 대표적인 항산화 측정법인 DPPH법과 ABTS법을 이용하여 측정하였을 때 135007, 135028 계통이 대비품종보다 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

라. 과제 수행을 통하여 농업적 특성과 수량성이 좋으며, 항혈전 활성이 우수한 계통인 135003을 ‘밀양1호’로 선발하였다.

마. 선발된 수수 계통 ‘밀양1호’를 식품가공에 이용하였을 때 특성을 살펴보기 위해 머핀과 차로 가공하여 이화학적 특성을 조사하였으며, 항산화성분함량, 항산화활성 및 항혈전 활성을 조사하였을 때 ‘밀양1호’가 첨가된 머핀과 볶음차에서 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 성분이 ‘황금찰’ 보다 높거나 크게 차이나지 않았고, 항산화 활성과 항혈전 활성에서 ‘밀양1호’ 첨가품이 유의하게 높은 활성을 나타나는 것으로 확인되었다.

제2협동과제 : 수수로부터 항혈전 활성 소재의 분리 동정, 구조 결정 및 안정화 기술 개발

1. 수수 품종별 항혈전 기능성 소재 확인을 위한 물질의 분리

가. 수수의 항혈전 활성 측정을 위하여 수수 300 g을 95% ethanol과 85% ethanol을 각각 1 L를 추출용매로 하여 8시간씩 4회 환류추출한 후 감압 농축하여 추출물을 획득 하였다. 이 추출물을 물 200 ml을 가하여 녹이고 이를 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, n-butyl alcohol 및 수층으로 분획한 후 각 분획 물을 감압 농축하여 각 용매에 대한 추출물을 획득하였다.

나. 중국산 수수와 한국산 수수의 비교 실험을 위하여 중국산 수수 300 g을 95% ethanol로 추출하여 농축한 에탄올 추출물을 각각 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, n-butyl alcohol 및 수층으로 분획한 후 감압 농축하여 제 1 세부과제에서 항혈전 활성 실험을 진행한 결과 중국산 수수의 추출물 및 분획물은 국산 수수의 추출물 및 분획 물에 비하여 항혈전 활성이 현저히 낮게 나타남을 알 수 있었다.

다. 수수를 95% ethanol 및 80% ethanol로 추출 및 분획 후 항혈전 활성을 측정한 결과 95% ethanol 추출물이 더 우수한 활성을 나타내었기에 수수 70 kg을 이용하여 대량 추출을 진행하였다. 수수 70 kg을 95% ethanol 3 L 씩을 넣고 12시간씩 4회 환류 추출하여 추출물을 획득하였다. 이 추출물을 물에 녹인 후 n-hexane 1 L를 가하여 n-hexane 층과 수층으로 나누었으며 이를 5회 반복하였다. 마찬가지로 methylene chloride, ethyl acetate, n-butyl alcohol도 각각 1 L씩을 이용해 유기용매 층과 수층으로 나누었으며 이를 7회 반복하였다. 이를 통해 얻어진 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, n-butyl alcohol 및 수층을 감압 농축하여 각 용매에 대한 분획 물을 획득 하였다.

2. 우수 항혈전 생리 활성 분획으로부터 활성 물질의 분리, 정제 및 구조 결정

가. Ethyl acetate를 이용하여 획득한 분획 물을 flash column chromatography법으로 분리하여 SB-EA-A ~ SB-EA-Z, SB-EA-AA ~ SB-EA-AE 까지 33개의 subfraction으로 나누었다. 이 subfraction에 대해 항혈전 활성을 측정하였으며 측정결과, 항혈전 활성이 우수한 SB-EA-N, AA, O~R subfraction에 대하여 normal phase 및 reverse phase chromatography 그리고 HPLC를 통하여 23개의 화합물을 얻었다.

나. 항혈전 활성이 뛰어난 n-hexane층을 flash column chromatography법으로 분리하여 SB-He-A부터 SB-He-AJ 까지 36개의 subfraction으로 나누었다. 이 subfraction중 SB-He-E와 SB-He-X에 대하여 분리하여 3개의 화합물을 얻었다.

다. n-Butyl alcohol 분획 물을 flash column chromatography법을 이용해 SB-Bu-A ~ SB-Bu-S 까지 33개의 subfraction을 획득 하였으며 이 중 항혈전 활성이 우수한 SB-Bu-B와 SB-Bu-F subfraction에서 2개의 화합물을 얻었다.

라. Ethyl acetate, n-hexane 및 n-butyl alcohol 분획 물에 대해 flash column chromatography법을 이용해 각각 23개, 3개, 2개의 화합물을 분리하였으며 그 구조를 화학적 및 분광학적 방법을 통해 확인하였다. Ethyl acetate 분획 물을 통해 얻은 23개의 화합물은 Quercetin-7-O- β -D-glucoside (1), Luteolin-7-O- β -D-glucoside (2), Luteolin-3'-O- β -D-glucoside (3), Quercetin (4), Quercetin-3-O- β -D-glucoside (5), Taxifolin-7-O- β -D-glucoside (6), Taxifolin (7), Taxifolin-3'-O- β -D-glucoside (8), Aromadendrin-3-O- β -D-glucoside (9), 5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanone-7-O- β -D-glucoside (10), Eriodictyol-7-O- β -D-glucoside (11), (2R)-Eriodictyol-5-O- β -D-glucoside (12), (2S)-Eriodictyol-5-O- β -D-glucoside (13), Protocatechuic acid (14), Benzoic acid (15), Caffeic acid (16), Methyl 3,4-dihydroxycinnamate (17), 1-O-caffeoylglycerol (18), Hwanggeumchal A (19), Hwanggeumchal B (20), Acacetin (21), (+)-catechin (22), (-)-catechin (23)임을 확인하였고 n-hexane 분획으로부터 분리한 3개의 화합물은 octadecane (24), palmitic acid (25), β -sitosterol (26)임을 확인하였다. 그리고 n-butanol 분획 물을 통해 획득한 2개의 화합물은 heptacosan-1-ol (27), coumaric acid (28)임을 확인하였다.

마. Ethyl acetate 분획 물을 통해 얻은 23개의 화합물중 compound 1 ~ 13에 대해 MTT assay를 통해 세포독성을 확인하였다. Human cervical epitheloid carcinoma 세포인 Hela, human breast cancer 세포인 MCF-7 및 human promyelocytic leukemia 세포인 HL-60을 사용해 MTT assay를 수행해 IC₅₀ 값을 측정한 결과 13개의 화합물들 중 오직 compound 1만이 세 종류의 세포 모두에서 100 μ g/ml 보다 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었지만 positive control로 사용한 adriamycin에 비해서는 세 종류의 세포 모두에서 낮은 세포독성을 나타내었다. 또한 이들 13개의 compound를 이용해 DPPH radical 소거 활성을 비교한 결과 compound 1, 6, 7, 8이 10 μ g/ml 미만의 IC₅₀ 값을 갖고 있음을 확인하였지만 이들 중 어떤 화합물도 positive control인 L-ascorbic acid보다 뛰어난 DPPH radical 소거 활성을 갖고 있는 화합물은 없었다.

바. Ethyl acetate 분획 물에서 획득한 23개의 화합물들을 Thrombin Time assay를 이용해 항혈전 활성이 있는지 확인해보았다. 그 결과 23개의 화합물들 중 500 µg/ml 농도의 compound 3이 positive control로 쓰인 aspirin과 동일한 농도에서 비슷한 수준의 항혈전 활성이 있음이 확인 되었다. 그리고 이들 23개의 compound가 alpha-glucosidase 저해능이 있는지 확인해본 결과 23개의 화합물들 중 대부분이 positive control인 acarbose보다 alpha-glucosidase 저해능이 뛰어남을 알 수 있었다.

사. 화학적 및 분광학적 방법을 통해 구조를 확인한 26개의 화합물중 compound 14 ~ 23에 대해 LPS에 의해 유도되는 NO 생성 억제능이 있는지 macrophage RAW264.7 균주를 이용해 확인해보았다. 10개의 화합물 모두 50 µM 까지 처리했을 시 독성을 나타내지 않았다. 10개의 화합물들 중 compound 17이 2.9 µM 의 IC₅₀ 값을 나타내었지만 positive control인 celastrol와 비교하였을 땐 10개의 화합물 모두 NO 생성 억제능이 떨어짐을 확인할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- ▶ 수수의 항혈전 기능 등 잡곡 우수성 입증을 통한 대국민 홍보 및 잡곡 수요 증대
- ▶ 개발된 수수 품종을 이용한 식·의약 소재를 이용한 농식품 개발관련 분야에 기술이전
- ▶ 심혈관 기능 개선 소재 개발을 통한 잡곡의 우수성 입증을 통해 잡곡의 보급 확대
- ▶ 웰빙 식생활에 대한 잡곡의 활용도 증대를 통한 잡곡 영농의 안정적 생산기반 확보
- ▶ 심혈관 질환 (순환기계 성인병: 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 폐경색) 및 methabolic syndrome 예방 및 개선을 통한 국민 건강 증진
- ▶ 바이오소재의 탐색과 기전연구는 관련학문 및 산업분야의 활성화를 유도

SUMMARY

I . Title

The development of materials for antithrombosis and establishment of distribution of sorghum variety

II . Purpose and necessity

Cardiovascular disease including stroke and coronary heart disease is one of the major causes of death worldwide. In 2012, cardiovascular disease was the second leading cause of death in Korean people, accounting for 22% of entire deaths [Statistics Korea: 2012]. Moreover, cardiovascular disease patients tend to commonly experience recurrent heart attacks or stroke even after they survive an attack of cardiovascular disease. Therefore, every possible preventive effort should be made to reduce the occurrence of primary as well as secondary cardiovascular disease.

Pathological thrombosis occurs when the hemostatic pathway is so strongly activated that it exceeds the normal regulatory counterbalance by anticoagulant factors, which are supposed to limit and localize thrombus formation to the injured area [Lippi et al., 2011]. Thrombin is the key effector enzyme responsible for the final step in thrombus formation [Riddel et al., 2007]. Because of the central role it plays in thrombus generation, propagation, and stabilization, effective inhibition of thrombin is crucial in the prevention and treatment of thrombotic disorders [Dahback, 2005; Hoffman M., 2004; Luchtmann-Jones and Broze, 1995]. Thrombin can be inhibited indirectly or directly. Traditional anticoagulants, such as aspirin, heparin (unfractionated and fractionated) and vitamin K antagonists are indirect inhibitors of thrombin. Indirect thrombin inhibitors have comprised the most frequently used anticoagulants in clinical practice for the last five decades. Although effective if appropriately used, these traditional anticoagulant agents are also fraught with many limitations, such as unpredictable anticoagulant response, need for routine dose adjustments and anticoagulant monitoring, heparin-induced thrombocytopenia (HIT), genetic variations in response, binding to various proteins and cells, and lack of inhibition of clot bound thrombin [Gwak and Chun, 2000, Jin et al., 2007; Lison and Spannagl, 2011; Torres-Urrutia et al., 2000]. In this context, every possible preventive effort should be made to develop a novel anticoagulant

which can substitute for traditional anticoagulants.

Sorghum (*Sorghum bicolor* Moench) is one of the principal cereal grains in many parts of the world, and sorghum is the fifth most significant cereal grain in the world after wheat, rice, corn and barley. Particularly, sorghum is critical as a human food resource and folk medicine in Asia and Africa. Moreover sorghum is generally more economical to produce because the possibility of survival of sorghum is higher than other cereal grains. Sorghum appears to possess a promising potential, given its agronomic properties, as well as the emerging evidence on the biological effects of the phytochemicals with a potential impact on human health in a beneficial manner. Sorghum is rich in phytochemicals known to significantly affect human health, such as tannins, phenolic acids, anthocyanins, phytosterols and policosanols that are secondary plant metabolites or integral cellular components. Recent studies have proved that sorghum has anti-oesophageal cancer effects, cholesterol-lowering effects, and can decrease the risk of cardiovascular disease, particularly showed high antioxidant activity [Kil et al., 2009; Kim et al., 2011; Kwon et al., 2004; Sohn et al., 2004; Sohn et al., 2005].

As an attempt to build a foundation for stable production as well as to strengthen competitiveness of sorghum grains in the grain market, we intended to focus on investigation on antithrombotic activity of sorghum grains harvested in Korea and on purification and identification of promising antithrombotic components. In addition, we intended to isolate and breed sorghum varieties, which possess an excellent antithrombotic activity. These studies will be applicable as the basis for development of functional foods which can improve blood circulation and prevent thrombotic diseases.

III. Contents and scope

This project consists of three subjects to investigate examine the antithrombotic activity of sorghum grains and the functional ingredients, and elucidate the underlying mechanisms, to screen sorghum varieties for excellent antithrombotic activity and study application of antithrombotic activity of sorghum grains, and to purify and identify antithrombotic components of sorghum grains.

In the first subject, we have intended to find the bioactive substances of sorghum grains possessing antithrombotic activity in terms of TT, APTT, and PT. We have evaluated the heat- and acid-stabilities of the bioactive substances and underlying mechanisms, which are important factors

in estimating their industrial applications. In order to estimate the safety of their applications as antithrombotic dietary sources, we have investigated the toxicity using bacterial and animal models. In addition, by employing the rat carotid artery balloon-injury (BI) model, we have determined the suppressive effect of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains on the BI-induced neointimal thickening.

The second subject is to isolate and breed sorghum varieties, which possess an excellent antithrombotic activity in terms of genetic background. In addition, we have intended to estimate the possibility of industrial application of sorghum as a functional dietary source.

In the third subject, we have intended to prepare the bio-active fractions and to purify components possessing antithrombotic functional activities by activity-guided isolation from sorghum grains. Structures of isolated compounds have been identified by physical and spectroscopic data of UV, IR, Mass, and 1D- and 2D-NMR etc.

◆ **The first sub-project: Characterization of antithrombotic ingredients in sorghum grains and underlying mechanisms**

Duration of project	Purpose of project	Contents and scope	Main results
First year 2010 ~ 2011	Screening of sorghum varieties for antithrombotic activities	<ul style="list-style-type: none"> • Screening of domestic sorghum grains for antithrombotic activity <ul style="list-style-type: none"> - Investigation of anticoagulant ingredients TT, APTT, and PT assay - Investigation of anti-platelet activity - Investigation of fibrinolytic activity using the fibrin plate method • Comparison of anticoagulant activity between domestic and imported sorghum grains 	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of anticoagulant activity of sorghum grains • Determination of more potent anticoagulant activity of domestic sorghum, as compared to that of imported sorghum • Application of patent
Second year 2011 ~ 2012	Elucidation of mechanism underlying antithrombotic ingredients	<ul style="list-style-type: none"> • Identification of anticoagulant activity and determination of underlying mechanisms using in vitro assay models • Heat- and acid-stability of anticoagulant activities of sorghum grains • Determination of anticoagulant activities of phenolic ingredients using in vitro experimental models 	<ul style="list-style-type: none"> • Understanding on the physiological mechanisms underlying anticoagulant activities of sorghum ingredients. • Registration of patent • Application of patent
Third year 2012 ~ 2013	Safety test of antithrombotic sorghum grains, and estimation of industrial application	<ul style="list-style-type: none"> • Safety test for antithrombotic sorghum grains <ul style="list-style-type: none"> - Estimation of acute toxicity : Cell toxicity, cardiac toxicity, genotoxicity • Investigation of antithrombotic activity of sorghum grains using in vivo animal model <ul style="list-style-type: none"> - Rat balloon-injury (BI) model - Thrombosis test using collagen-epinephrin induction of mouse model • Estimate the possibility of industrial application <ul style="list-style-type: none"> - functional cookies and beverages etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of antithrombotic activities of sorghum grains using in vivo animal models • Publication of research papers • Application of patent • Poster presentation in the Conference • Enhancement in consuming sorghum grains and increase in farmer's income

◆ The second sub-project : Screening sorghum germplasm accession for promising antithrombotic varieties and estimating the possibility of food processing

Duration of project	Purpose of project	Contents and scope	Main results
First year 2010 ~ 2011	Screening of sorghum germplasm accession for antithrombotic activity and breeding	<ul style="list-style-type: none"> • Selection of promising sorghum germplasm accession <ul style="list-style-type: none"> - Ten promising sorghum accession including hwanggeumchal sorghum - Characterization of individual selected accessions for sorghum varieties - Selection of excellent germplasm accession by anticoagulant activity assay • Breeding of promising sorghum varieties <ul style="list-style-type: none"> - Ten promising sorghum accession including hwanggeumchal sorghum - Cultivation area : about 10a per individual varieties - Cultivation regions : over 2 regions 	<ul style="list-style-type: none"> • Selection of promising anticoagulant sorghum genetic accession • Breeding of selected promising genetic varieties
Second year 2011 ~ 2012	Investigation of culture condition and environmental factors required for enhancement in the level of antithrombotic ingredients in sorghum grains	<ul style="list-style-type: none"> • Estimation of culture conditions for first selected sorghum germplasm accession <ul style="list-style-type: none"> - photosensitivity, thermosensitivity and germination characteristics - Growth characteristics and yield - Acquisition of stability of sorghum varieties by single planting - Disease resistance • Assessment of environmental factors <ul style="list-style-type: none"> - Water characteristics: irrigated water/ non-irrigated water - Assessment of environmental factors such as soil moisture - Analysis of the relationship between environmental factors and anti-thrombotic functional ingredients 	<ul style="list-style-type: none"> • Establishment of culture conditions for enhancement in the level of active ingredients of selected sorghum grains
Third year 2012 ~ 2013	Preparation of antithrombotic extract from sorghum grains and its industrial applications	<ul style="list-style-type: none"> • Application and registration of genetically selected sorghum varieties <ul style="list-style-type: none"> - Estimation of agricultural characteristics - Estimation of functional substances • Development of application technology of sorghum grains and extracts <ul style="list-style-type: none"> - Distribution of developed sorghum varieties to the farm - Development of foods processing using selected sorghum grains • Transfer of technology required for industrial application of sorghum grains as antithrombotic 	<ul style="list-style-type: none"> • Application and registration of sorghum varieties • Poster presentation in the Conference

◆ **The third sub-project : Purification and identification of antithrombotic components in sorghum grains and strategy for their stabilization**

Duration of project	Purpose of project	Contents and scope	Main results
First year 2010 ~ 2011	Separation of ingredients varieties to identify functional compounds in sorghum	<ul style="list-style-type: none"> • Preparation of organic solvent extracts from sorghum varieties <ul style="list-style-type: none"> - Organic solvent extraction from sorghum varieties - Mass extraction - Fractionation of 80% ethanol extract using organic solvents (ethanol, methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol and aqueous water fractions preparation - Preparation of organic solvent of imported sorghum • Extracts of sorghum varieties <ul style="list-style-type: none"> - Extracts the classification of each breed - Extract a large amount of material - Cane extract fractions of solvent production: Fractionation by solvent of methanol, ethanol, methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol, and water - Preparation of organic solvent extract of imported sorghum extract 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparation of organic solvent extract from sorghum grains • Identification of active antithrombotic fraction • Extract preparation of imported sorghum grains
Second year 2011 ~ 2012	Separation, purification, and structure determination of promising antithrombotic components in organic solvent fractions of sorghum grains	<ul style="list-style-type: none"> • Performing Open column chromatography for organic solvent fractions from sorghum varieties <ul style="list-style-type: none"> - Separation of active compounds by HPLC • Determining the structure of the excellent active substance <ul style="list-style-type: none"> - Physical and chemical methods: mp, $[\alpha]_D$, including synthetic derivatives - Spectroscopic methods: UV, IR, 1D and 2D NMR, and Mass Spectrometry, etc. • Preparation of materials for understanding of mechanisms of action (Liquid, powder, extract supplied) 	<ul style="list-style-type: none"> • Separation and purification of biologically active substances from active fractions • Determination of the structure of biologically active ingredients • Application of patent and poster presentation in the Conference
Third year 2012 ~ 2013	Mass production and stabilization methodology for sorghum-derived antithrombotic components	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of the molecular structure of the most potent substances <ul style="list-style-type: none"> - Physical and chemical methods: mp, $[\alpha]_D$, synthesis of derivatives - Spectroscopic methods: UV, IR, 1D and 2D NMR, and Mass Spectrometry • Stabilization of the active substances • Mass production of bioactive substances • Commercializing research for functional formulation 	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of the molecular structure of biologically active substances • Mass production of biologically active substances • Submission of research paper

IV. Results

The first sub-project: Characterization of antithrombotic ingredients in sorghum grains and underlying mechanisms

1. Comparison of anticoagulation activity between domestic sorghum and imported sorghum

A. In order to compare anticoagulant activity between hwanggeumchal sorghum grains harvested in Korea and sorghum grains imported from China, 95% ethanol extracts as well as their organic solvent fractions (n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, and n-butanol) were prepared from individual sorghum grains. The anticoagulant activities of individual samples were measured using thrombin time (TT) assay.

B. The thrombin time (TT)-inhibitory activity of ethanol extract of domestic hwanggeumchal sorghum grains, which was easily detectable at a final concentration of 480 $\mu\text{g/ml}$, was mainly partitioned into hexane and methylene chloride fractions, whereas that ethanol extract of chinese sorghum grains a final concentration of 480 $\mu\text{g/ml}$ was partitioned only into hexane fraction. The ethanol extract and hexane fraction of domestic hwanggeumchal sorghum grains at a final concentration of 480 $\mu\text{g/ml}$ could extend TT value by 3.2-fold and 4.0-fold compared with the negative control DMSO. Under the same conditions, the ethanol extract and hexane fraction of chinese sorghum grains exhibited 1.2-fold and 2.3-fold extension of the TT values, respectively. These results show that the anticoagulant activity of domestic hwanggeumchal sorghum grains is more potent than that of chinese sorghum grains.

C. When platelet aggregation inhibitory activities of the ethanol extract and its organic solvent fractions of domestic hwanggeumchal sorghum grains were analyzed at a final concentration of 0.25 mg/ml, the platelet aggregation times of methylene chloride fraction, ethyl acetate fraction and butanol fraction were extended by 1.4-fold, 1.3-fold, and 2.1-fold as compared with the activity of the negative control DMSO. Under these conditions, the positive control aspirin appeared to extend the platelet aggregation time by 1.2-fold. These results suggest that the methylene chloride fraction, ethyl acetate fraction, and butanol fraction of domestic hwanggeumchal sorghum grains possess more potent platelet aggregation inhibitory activity than did the positive control aspirin.

2. Mechanisms underlying anticoagulant activity of sorghum grains

A. When the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains harvested in Korea was fractionated with various organic solvents such as n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, and n-butanol, the TT-inhibitory activity detected in the 80% ethanol extract was distributed in hexane and methylene chloride fractions, and these TT inhibitory activities appeared to be higher than that of aspirin (final concentration 480 µg/ml).

B. Since the anticoagulant activity assessed by TT assay is to investigate the inhibitory effect of sample on thrombin activity crucial for conversion of fibrinogen to fibrin [Flanders et al., 2003], we decided to examine whether the 80% ethanol extract and organic solvent fractions from hwanggeumchal sorghum grains can inhibit the intrinsic pathway [Riddel et al., 2007] and the extrinsic pathway [Riddel et al., 2007] of coagulation cascade by employing activated partial thrombolastin time (APTT) assay and prothrombin Time (PT) assay, respectively. The APTT assay showed that the majority of anticoagulant activity detectable in the 80% ethanol extract was partitioned into both hexane and methylene chloride fractions, which appeared to possess a slightly higher efficacy than that of the positive control warfarin at a concentration of 3.13 mg/ml.

C. The anticoagulant activity of the 80% ethanol extract, which was evaluated by PT assay, was mostly contained in the hexane fraction but not in the other organic solvent fractions including the methylene chloride fraction. Again, the inhibitory effect of the 80% ethanol extract and the hexane fraction on the extrinsic pathway of coagulation cascade appeared to be stronger than that of the positive control warfarin at a concentration of 3.13 mg/ml. These results suggest that the anticoagulant activity of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains can be exerted via direct inhibition of thrombin action as well as via inhibition of the intrinsic and extrinsic pathways of blood coagulation.

D. The 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml were treated at 100°C for 30 min or 60 min, and then their TT-inhibitory activities were compared with those of the untreated samples and the positive control aspirin. The anticoagulant activity of the 80% ethanol extract in terms of TT was not reduced by the heat treatment at 100°C for up to 60 min. To examine the acid stability of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains, the pH of the samples (10 mg/ml DMSO) were adjusted

to 2.0 and incubated at 37°C for 60 min or 120 min. After the pH of the samples was readjusted to 7.0, their TT-inhibitory activities were compared with those of the untreated samples and the positive control aspirin. The anticoagulant activities of the 80% ethanol extract was not significantly influenced by the treatment at pH 2.0 for 120 min. Consequently, these results show that the anticoagulant components contained in the 80% ethanol extract are heat-stable and acid-stable substances. In addition, these results suggest that the anticoagulant activity of hwanggeumchal sorghum grains can be sustained during general cooking process and our body digestion process.

E. To investigate the fibrinolytic activity of the 80% ethanol extract and its organic solvent fractions from hwanggeumchal sorghum grains, 3 μ l of each sample dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml was placed on the fibrin plate using filter-paper discs. When the diameter of the clear area around disc on the fibrin plate was measured as the fibrinolytic activity, the fibrinolytic activities of 80% ethanol extract, n-hexane fraction, and methylene chloride fraction appeared to be 1.5 to 2 times greater as compared to that of plasmin. These results show that the majority of thrombolytic ingredients of 80% ethanol extract from hwanggeumchal sorghum grains is distributed in the n-hexane and methylene chloride fractions, and suggest that the 80% ethanol extract possess not only anticoagulant activity but also thrombolytic activity.

F. To investigate the inhibitory effect of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains on blood coagulation and an experimental restenosis in vivo, we employed a rat carotid artery balloon-injury (BI) model along with oral administration of the 80% ethanol extract (600 mg/kg or 1200 mg/kg) for 17 days beginning 3 day before and continuing for 14 days after BI. Although the hematoxylin-eosin staining of the arterial sections revealed that arterial balloon-injury caused a remarkable intimal thickening by 14 days, the oral administration of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains at 600 and 1200 mg/kg dosages led to a significant inhibition of the thickening compared to vehicle control. These results show that the 80% ethanol extracts of hwanggeumchal sorghum grains could specifically suppress the neointimal hypertrophy and luminal narrowing of the injured artery.

G. The antithrombotic effect of oral administration of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains was investigated using mouse model. The oral administration of the 80% ethanol extract in to mice at concentrations of 600 mg/kg and 1200 mg/kg for 15 days resulted in a

significant reduction in the level of the rates of death and paralysis caused by the injection of collagen and epinephrine into tail vein.

H. In order to examine further the antioxidant properties of hwanggeumchal sorghum, the 80% ethanol extracts of hwanggeumchal sorghum grains were sequentially fractionated with various organic solvents and then individual organic solvent fractions were analysed by HPLC. As a result, 36 phenolic compounds were detected in hwanggeumchal sorghum. The 36 phenolic compounds were tested for their anticoagulant activities in terms of TT, APTT and PT. Anti-coagulant effect of benzoic acid, biochanin A, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, formononetin, homogentisic acid, kaempferol, myricetin, pyrogallol, β -resorcylic acid and salicylic acid were excellent, which was assessed by TT assay, than that of the positive control aspirin in the same dose (final concentration of 480 μ g/ml). In addition, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, homogentisic acid, myricetin, and pyrogallol (final concentration of 3.13 mg/ml) appeared to extend APTT and APTT inhibitory activities of these phenolic compounds were more potent than those of the control warfarin. And benzoic acid, biochanin A, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, ferulic acid, homogentisic acid, β -resorcylic acid, and salicylic acid (final concentration of 3.13 mg/ml and 1.88 mg/ml) exhibited more potent PT inhibitory activity than those of the control warfarin. In particular, formononetin effectively extended both APTT and PT values, indicating that the anticoagulant activity of formononetin can be exerted by inhibition of the intrinsic and extrinsic pathways of blood coagulation.

3. Safety test for antithrombotic sorghum grains and estimation of industrial application

A. For cardiac toxicity prediction, the effect of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains on hERG K⁺ channel activity was investigated. The 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains appeared to be safe in the cardiac toxicity in the valid concentration, as compared to the toxicity of the positive control astemizole.

B. When the cardiac toxicity of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains was evaluated at concentrations ranging from 10 to 100 μ g/ml, the 80% ethanol extract exerted no inhibitory effect on the zebrafish heart beat rate (HBR) at concentrations up to 100 μ g/ml, indicating that the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains did not possess the cardiac toxicity.

C. In the acute toxicity test, which was performed using ICR mice, of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains, there was no mortality and signs of toxicity during the test period of 14 days following oral administration at a single dosage of 1000 mg/kg. The changes in body weight were normal for all animal groups. In addition, necropsy revealed no gross pathological changes in any of the mice. These results demonstrate that the sample had no toxicity to mice in an affordable concentration.

D. To examine whether the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains can induce mutagenesis, a bacterail reverse mutation (Ames) test using *Salmonella typhimurium* strain TA100 (his-) was performed. Because the rate of revertants appeared in the presence of the 80% ethanol extract was below 2.0-fold increase as compared to the rate of increase induced by vehicle control, the mutagenic potential of the ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains was decided to be negative.

E. The clastogenic potential of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains at concentrations of 10~50 µg/ml was evaluated by an in vitro chromosome aberration assay using CHO-K1 cell line, which is known to be very sensitive to clastogens and allows detection of clastogenicity (chromosomal gap, breakage, and exchange) as well as polyploidy, and endoreduplication. There was no significant difference in the incidences of structural and numerical chromosomal aberrations compared to those in the negative control with the presence or absence of the S9 mixture. However, the positive controls (mytomyacin C or cyclophosphamide) induced a high level of chromosomal aberrations (>10%), which indicates that the study was conducted under acceptable experimental conditions. These results suggest that ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains was not clastogenic at concentrations of 10~50 µg/ml.

F. Current results show that the 80% ethanol extract from hwanggeumchal sorghum grains could exert not only anticoagulant activity in terms of TT, APTT and PT, but also fibrinolytic activity. These results suggest that hwanggeumchal sorghum grains have a potential to be applicable as antithrombotic dietary source.

The second sub-project: Screening sorghum germplasm accession for promising antithrombotic varieties and estimating the possibility of food processing

1. Screening of sorghum varieties for antithrombotic activity and breeding

A. In order to develop sorghum varieties having characteristics of antithrombotic activity, sorghum germplasm accessions in NICS (National Institute crop science) were screened and 10 germplasm accessions including Hwanggeumchal variety as control selected in consideration of agricultural characteristics such as seed color, productivity and lodging.

B. The selected germplasm accessions were cultivated at Wonjoo region and characteristics were investigated heading date, stem length, panicle length, number of tiller, and stem width.

2. Investigation of culture condition and environmental factors required for enhancement in the level of antithrombotic ingredients in sorghum grains

A. The heading date of selected accessions were no significant different and investigate acquisition of stability of sorghum varieties by single planting.

B. Growth characteristics of selected germplasm accessions in Wonjoo and Miryang were investigated in terms of amount of sunshine, average temperature, amount of rainfall, and wind speed.

3. Preparation of antithrombotic extract from sorghum grains and its industrial applications

A. To select lines which could exert a promising antithrombotic activity, the anticoagulant activities of 80% ethanol extracts of selected accessions were investigated in terms of Thrombin Time (TT). As a consequence, 4 accessions were selected.

B. When the contents of flavonoids and polyphenols in 100% ethanol extracts of selected 4 accessions were measured, both contents in 135007 and 135028 lines were higher than those of control line.

C. To compare antioxidant activities among selected 4 accessions, DPPH radica- and ABTS

radical-scavenging activities of 100% ethanol extracts of selected 4 accessions was measured. The results showed that the radical scavenging activities of 135007 and 135028 lines appeared to be higher than those of control line.

D. From the above results, 135003 were selected as 'Miryang 1' line in consideration of agricultural characteristics and antithrombotic activity, and named as 'JUNGMO 4002'.

E. For the assesment of food processing characteristics, 'Miryang 1' were processed as muffin and tea. The processed foods of physico-chemical characteristics and antioxidants activity of 'Miryang 1' were similar as Hwanggumchal sorghum, and the processed foods of antithrombotic activity were higher than Hwanggumchal sorghum.

The third sub-project: Purification and identification of antithrombotic components in sorghum grains and strategy for their stabilization

1. Separation of ingredients to identify functional compounds in sorghum

A. To examine antithrombotic activity of sorghum grains, the dried grains (300 g) were milled on a Blender 7012 (Dynamics Corporation, USA), and then extracted 4 times with either 95% or 80% ethanol (1 L) for 8 h at 80°C. The ethanol extract was evaporated, dissolved in water, and then sequentially extracted with n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, and n-butanol. Each organic solvent fractionation was repeated three times. Each organic solvent fraction as well as the remnant aqueous fraction was centrifuged at 7,500 rpm for 15 min to remove insoluble substances. The recovered supernatant of each fraction was then concentrated by rotary vacuum evaporator (Heidolph LR 4000, Germany).

B. In order to compare anticoagulant activity between hwanggeumchal sorghum grains harvested in Korea and sorghum grains imported from China, 95% ethanol extracts as well as their organic solvent fractions (n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, and n-butanol) were prepared from individual sorghum grains (300 g for each). The anticoagulant activities of individual samples were measured using thrombin time (TT) assay. The results show that the anticoagulant activity of domestic hwanggeumchal sorghum grains is more potent than that of Chinese sorghum grains.

C. Because a comparative study of 85% and 95% ethanol extracts of sorghum grains with respect to anticoagulant activities showed that the TT inhibitory activity of 95% ethanol extract appeared to be higher than that of 85% ethanol extract, we decided to extract the sorghum grains (70 kg) with 95% ethanol for a large scale extraction. The sorghum grains (70 kg) were extracted 4 times with 95% ethanol (3 L for each) at 80°C for 14 h. The ethanol extract was evaporated, dissolved in water, and then sequentially extracted with n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, and n-butanol (1 L for each). Each organic solvent fractionation was repeated 7 times. Each organic solvent fraction as well as the remnant aqueous fraction was centrifuged at 7,500 rpm for 15 min to remove insoluble substances. The recovered supernatant of each fraction was then concentrated by rotary vacuum evaporator (Heidolph LR 4000, Germany).

2. Separation, purification, and structure determination of promising antithrombotic components in organic solvent fractions of sorghum grains

A. From the flash column chromatography of ethyl acetate fraction of hwanggeumchal sorghum grains, 33 subfractions (SB-EA-A ~ SB-EA-Z, SB-EA-AA ~ SB-EA-AE) were obtained. Among the 33 subfractions SB-EA-N, AA, and O~R subfraction, which appeared to possess promising anticoagulant activity, were subjected to normal phase chromatography, reverse phase chromatography, and HPLC. As the result, 23 compounds were obtained and identified.

B. From the flash column chromatography of the hexane fraction having strong anticoagulant activity, 36 subfractions (SB-He-A ~ SB-He-AJ) were obtained. Among these 36 subfraction, SB-He-E and SB-He-X were subjected to further chromatographies, and 3 compounds were isolated.

C. From the flash column chromatography of the butanol fraction, 33 subfraction (SB-Bu-A ~ SB-Bu-S) were obtained. Among these 33 subfractions, further chromatographies of SB-Bu-B and SB-Bu-F subfractions, which appeared to have potent anticoagulant activity, led to isolation of 2 compounds.

D. From the flash chromatographies of the ethyl acetate, hexane and butanol fractions, 23, 3, and 2 compounds were isolated, and their structures were identified by chemical and spectroscopic data. The 23 compounds identified from the ethyl acetate fraction were Quercetin-7-*O*- β -D-glucoside (1), Luteolin-7-*O*- β -D-glucoside (2), Luteolin-3'-*O*- β -D-glucoside (3), Quercetin (4), Quercetin-3-*O*- β -D-glucoside (5), Taxifolin-7-*O*- β -D-glucoside (6), Taxifolin (7), Taxifolin-3'-*O*- β -D-glucoside (8), Aromadendrin-3-*O*- β -D-glucoside (9), 5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanone-7-*O*- β -D-glucoside (10), Eriodictyol-7-*O*- β -D-glucoside (11), (2*R*)-Eriodictyol-5-*O*- β -D-glucoside (12), (2*S*)-Eriodictyol-5-*O*- β -D-glucoside (13), Protocatechuic acid (14), Benzoic acid (15), Caffeic acid (16), Methyl 3,4-dihydroxycinnamate (17), 1-*O*-caffeoylglycerol (18), Hwanggeumchal A (19), Hwanggeumchal B (20), Acacetin (21), (+)-catechin (22), (-)-catechin (23). The 3 compound identified from the n-hexane fraction were octadecane (24), palmitic acid (25), and β -sitosterol (26). The 2 compounds identified from the butanol fraction were heptacosan-1-ol (27), and coumaric acid (28).

F. To assess antithrombotic effects of 23 compounds isolated from the ethyl acetate fraction, their effects on thrombin time (TT) were investigated. Among 23 compounds, luteolin-3'-*O*- β -D-glucoside (3)

at a final concentration of 500 µg/ml was able to extend TT value 1.97-fold. At the same time, the positive control aspirin at a final concentration of 500 µg/ml extended TT value by 1.81-fold. In addition, eriodictyol-7-*O*-β-D-glucoside (**10**), quercetin-3-*O*-β-D-glucoside (**4**) and taxifolin-3'-*O*-β-D-glucoside (**7**) at a concentration of 375 µg/ml appeared to extend TT values by 1.58-fold, 1.52-fold, and 1.12-fold, respectively. The positive control aspirin showed only 1.38-fold extension at a concentration of 375 µg/ml.

In order to examine whether 23 compounds can exert antidiabetic effects, their effects on α-glucosidase activity were measured. The results showed that the majority of the 23 compounds possessed more potent α-glucosidase inhibitory activity as compared with the inhibitory activity of a positive control acarbose.

G. When the cytotoxicity of the ethyl acetate fraction-derived 23 compounds were measured toward three cell lines (Human cervical epitheloid carcinomacell line Hela, human breast cancer cell line MCF-7 and human promyelocytic leukemia cell line HL-60) using MTT assay. Only quercetin-7-*O*-β-D-glucoside (**1**) appeared to possess a potent cytotoxicity (< 100 µg/ml), which was lower than that of the positive control adriamycin. In addition, DPPH radical scavenging activity assay revealed that although three compound **1**, **6**, **7**, and **8** showed EC₅₀ values lower than 10 µg/ml, none of these compounds exhibited better DPPH radical scavenging activities than the positive control L-ascorbic acid.

H. Among the 26 compounds, the compounds **14** ~ **23** were examined to understand whether they have inhibitory effect on LPS-induced NO generation in murine macrophage cell line Raw264.7 cells. Ten compounds tested failed to exhibit cytotoxicity at a concentration of up to 50 µM. Although compound **17** showed IC₅₀ of 2.9 µM, its inhibitory effect on NO production was lower than that of the positive control celastrol.

V. Research effects and application planning

- ▶ Enhancement in the demand of miscellaneous cereals via proven excellence of antithrombotic function of sorghum grains.

- ▶ Technology transfer using a formula developed sorghum varieties, which can be applicable in the field of medicine and functional food.

- ▶ Development of functional dietary source useful for ameliorating pathological thrombotic disease as well as restenosis that can occur following percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA).

- ▶ Promotion of public health by consuming antithrombotic sorghum grains, which may lead to prevention and improvement of cardiovascular diseases (circulatory system illnesses: high blood pressure, stroke, atherosclerosis, angina pectoris, myocardial infarction, menopausal color) and metabolic syndrome.

- ▶ Contribute to nation-wide-activation and expansion of bioactive substance-related academic and industry research field.

- ▶ Contribute to make secure conditions for stable cultivation and production of miscellaneous cereal crops via increasing the market demand.

Contents

Chapter 1. Project overview	43
Chapter 2. Technical problems and status in domestic and overseas	45
Chapter 3. Contents and results of research	47
Section 1 : 1 st sub-project	
Title : Characterization of antithrombotic ingredients in sorghum grains and underlying mechanisms	47
1. Materials and methods	47
a. Extraction of hwanggeumchal sorghum	47
b. Thrombin time (TT) assay	48
c. Activated partial thromboplastin time (APTT) assay	48
d. Prothrombin time (PT) assay	49
e. Fibrinolytic activity assay	49
f. Antithrombosis and blood vessel restenosis inhibitory test using rat carotid artery Balloon-injury model	49
g. Thrombosis test using collagen-epinephrin induction of mouse model	50
h. Safety test for antithrombotic sorghum grains	50

i. Statistical analysis	50
2. Results	51
a. Anticoagulant activity of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains	51
b. Heat and acid stability of anticoagulant activities of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains	54
c. Fibrinolytic activity of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains	55
d. Comparison of anticoagulant activity between domestic and imported sorghum grains ..	57
e. Analysis of phenolic compounds of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains and organic solvent extracts using HPLC	58
f. Safety test for 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains	63
g. Antithrombosis and blood vessel restenosis inhibitory test using rat carotid artery Balloon-injury model	69
h. Protective effects of 80% EtOH extract of hwanggeumchal sorghum grains of pulmonary thrombosis induced by the infusion of collagen-epinephrine	71
i. Characterization and purification of antithrombotic biomaterials form organic solvent extractions of hwanggeumchal sorghum	72
j. Anticoagulant activity of phenolic compounds contained in sorghum grains	89
k. Anticoagulant activity of selected sorghum varieties	92

Section 2 : 2nd sub-project

Title : Screening sorghum germplasm accession for promising antithrombotic varieties and estimating the possibility of food processing 98

1. Methods and results 98

a. Screening of sorghum varieties for antithrombotic activity and breeding 98

b. Estimation of culture conditions for first selected sorghum varieties 98

c. Yield and morphological analysis for first selected sorghum varieties 100

d. Anticoagulant activity of first selected sorghum varieties 103

e. Estimation of culture conditions and characterization for second selected sorghum varieties 103

(1) Agricultural climate of miryang and wonju 103

(2) Agricultural characterization for second selected sorghum varieties 104

(3) Productivity test of sorghum grains 104

f. Evaluation of the polyphenol content of selected sorghum varieties 106

g. Selection of promising antithrombotic sorghum ‘Miryang 1’ 107

h. Local adaptability test 107

(1) Cultivation methods 107

(2) Agricultural climate of cultivation area 108

(3) Agricultural characterization of ‘Miryang 1’	108
(4) Antioxidant and anticoagulant activities of ‘Miryang 1’	109
i. Assessment of physicochemical characteristics of processed sorghum products	110
(1) Assessment of physicochemical characteristics of sorghum muffin	110
(2) Assessment of physicochemical characteristics of sorghum tea	112

Section 3 : 3rd-subproject

Title : Purification and identification of antithrombotic components in sorghum grains and strategy for their stabilization	114
---	-----

1. Extraction and fractionation from sorghum grains	114
a. Manufacture of 95% ethanol extract of sorghum grains	114
b. Manufacture of 80% ethanol extract of sorghum grains	115
c. Process of extraction and fractionation from imported sorghum grains	116
d. Process of mass extraction and fractionation from sorghum grains	117
(1) Extraction and fractionation from hwanggeumchal sorghum grains	119
(a) Extraction and fractionation of hwanggeumchal sorghum grains	119
(b) Separation of ethyl acetate fraction of hwanggeumchal sorghum grains	120
(c) Separation of <i>n</i> -hexane fraction of hwanggeumchal sorghum grains	120

(d) Separation of <i>n</i> -Butanol fraction of hwanggeumchal sorghum grains	126
(2) Structure identification of bio-active compounds from EtOAc, <i>n</i> -Hexane and <i>n</i> -BuOH fractions	127
(a) Structures of isolated compounds	127
(b) Physical and spectroscopic data of isolated compounds	128
(3) Bio-activity evaluation of bio-active compounds from EtOAc, <i>n</i> -Hexane and <i>n</i> -BuOH fractions	135
Chapter 4. Achievements to the project targets and contributions to the related fields	139
Chapter 5. Applications and utilization of research results	142
Chapter 6. Collected scientific and technical information in the course of research from oversea	145
Chapter 7. Research facilities and equipments	147
Chapter 8. References	145
※ Summary of major research results	154

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	43
제 2 장	국내외 기술개발 현황	45
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	47
제 1 세부과제 : 수수유래 항혈전 신소재의 동정 및 작용기전 구명		47
1. 연구방법		47
가. 황금찰수수의 유기용매 추출		47
나. Thrombin time (TT) 분석		48
다. Activated partial thromboplastin time (APTT) 분석		48
라. Prothrombin time (PT) 분석		49
마. 혈전 용해 활성 측정		49
바. Rat carotid artery Balloon-injury 모델을 항혈전 및 혈관 재협착 (restenosis) 억제효능 조사		49
사. 콜라겐 (collagen)과 에피네프린 (epinephrine)에 의한 폐색전 (pulmonary thrombosis)유 발 실험		50
아. 황금찰수수 추출물의 안전성 평가		50

자. 통계처리	50
2. 연구결과	51
가. 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 항혈액응고 활성 조사	51
나. 황금찰수수 유래 80% 에탄올 추출물의 트롬빈 저해활성의 열 안정성 및 산 안정성 조사	54
다. 황금찰수수 유래 80% 에탄올 추출물의 혈전용해 활성 조사	55
라. 국내산 황금찰수수와 중국산 수수의 항혈전 활성능 비교	57
마. 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물 및 유기용매분획들에 함유된 폐놀성 화합물의 HPLC를 이용한 분석	58
바. 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 독성조사	63
사. Rat carotid artery Balloon-injury 모델을 이용한 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 항혈전 및 혈관 재협착 (restenosis) 억제효능 조사	69
아. 황금찰수수 에탄올 추출물의 콜라겐 (collagen)과 에피네프린 (epinephrine)에 의한 폐색전 (pulmonary thrombosis)유발 저해 효과 조사	71
자. 황금찰수수 95% 에탄올 추출물 유래의 유기용매 추출물로부터 유효 바이오 소재의 분리	72
차. 잡곡류에 함유된 항혈전 활성이 높은 폐놀 화합물	89
카. 선발 수수 계통별 항혈전 활성 연구	92
제 1 협동과제 : 항혈전 활성이 우수한 유전자원 선발 및 활용 연구	98

1. 연구방법 및 연구결과	98
가. 항혈전 우수 유망 수수 유전자원 선발 및 증식	98
나. 1차 선발 유전자원의 생육특성 평가	98
다. 1차 선발 유전자원의 수량성 및 종실	100
라. 항혈전이 우수한 1차 선발 계통에 대한 항혈전 활성 분석	103
마. 2차 선발 계통의 재배지역별 농업적 주요 특성 및 수량성	103
(1) 밀양, 원주 지역의 농업기상	103
(2) 2차 선발 계통의 주요 농업적 특성	104
(3) 생산력검정 시험	104
바. 선발 계통의 폴리페놀 함량 등 기능성분 평가	106
사. 항혈전 우수 계통 ‘밀양1호’ 선발	107
아. 지역적응성 검정	107
(1) 재배방법	107
(2) 재배지역의 농업기상	108
(3) ‘밀양1호’의 농업적 특성, 수량성, 내재해성 및 병해충 저항성	108
(4) ‘밀양1호’의 항산화활성 및 항혈전활성	109

자. 선발 계통을 이용한 가공품의 이화학적 특성 평가	110
(1) 수수머핀의 이화학적 특성 및 기능성 평가	110
(2) 수수차의 이화학적 특성 및 기능성 평가	112
제 2 협동과제 : 수수로부터 항혈전 활성소재의 분리동정, 구조결정 및 안정화 기술 개발	114
1. 수수의 추출 및 분획	114
가. 수수 95% EtOH 추출 및 분획	114
나. 수수 80% EtOH 추출 및 분획	115
다. 수입산 수수의 추출 및 분획	116
라. 수수의 대량 추출 및 분획	117
(1) 황금찰수수의 추출 및 분획	119
(가) 황금찰수수의 추출 및 분리 배경	119
(나) 황금찰수수 ethyl acetate층의 분리	120
(다) 황금찰수수 n-hexane층의 분리	120
(라) 황금찰수수 n-Butanol층의 분리	126
(2) n-Hexane, EtOAc 및 n-BuOH 층으로부터 얻은 생리활성물질의 구조 결정	127
(가) 분리된 화합물의 구조	127

(나) 분리된 화합물의 물리화학적 및 분광학적 데이터	128
(3) EtOAc, n-Hexane 및 n-BuOH 층으로부터 얻은 화합물의 생리활성 측정 결과 ·	135
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	139
제1절 목표대비 달성도	139
제2절 관련분야에의 기여도	141
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	142
제1절 연구개발 정량적 성과	142
제2절 성과활용계획	144
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	145
제 7 장 연구시설·장비 현황	147
제 8 장 참고문헌	150
<참고> 주요 연구성과 요약	154

제 1장 연구개발과제의 개요

최근 웰빙문화의 확산으로 인하여 건강 기능성식품 시장의 규모가 증대되고 있어, 이미 국내에선 2009년 1조 2029억원, 2010년 1조 9944억원, 2012년 2조 7979억원으로 해마다 급속히 늘어나고 있는 실정이며, 곧 3~4조억원대를 넘어설 만큼 많은 소비자들의 건강 기능성식품에 대한 관심은 매우 높다. 뿐만 아니라, 해외시장 또한 과학기술의 지속적인 발전과 더불어 전 세계적인 인구의 고령화, 글로벌 경제성장, 인류의 건강에 대한 보편적 관심의 급증 등의 이유에서 매년 그 시장이 급속히 발전하며 성장하고 있다.

심혈관계 질환은 심장 관련 질환(심근경색, 고혈압, 심부전, 부정맥, 동맥경화)과 혈관 질환(뇌졸중, 말초혈관 질환)을 포함하는 질환으로 세계 보건기구 (WHO)의 통계에 따르면, 현대 과학과 의학의 눈부신 발전에도 불구하고 지난 30년간 꾸준히 발병율과 유병율이 증가한 질환으로 보고되었으며, 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 심장 순환기 계통 질환에 의한 사망률이 전체 사망률의 30% 내외로 매우 높은 비율을 차지하는 치명적인 질환의 일종이다.

이러한 심혈관계 질환의 발병율과 사망률의 증가는 경제성장과 생활양식의 서구화와 더불어 고지방식 등 식생활의 변화, 스트레스 증가, 수명연장에 따른 인구의 고령화, 운동부족 등에서 주로 기인하고 있다. 이러한 질병 자체 및 그 질병 발생 후 심각한 신체적, 사회적 후유증으로 인하여 국민 의료비 과다지출과 삶의 질 저하가 초래되는 것이 심혈관계 질환의 심각한 문제점으로 지적되고 있는 실정이다.

따라서, 이와 같은 심혈관계 질환에 대한 문제점이 점차 중요하게 인식되면서 전 세계적으로 이들 질환의 발병기전 연구와 더불어 예방 및 치료에 대한 연구에 많은 투자가 이루어지고 있는 바, 혈액순환 개선 효과를 가진 새로운 항혈전 제제의 개발을 위한 연구의 일환으로, 항응고 활성 혹은 피브린 용해 활성을 나타내는 새로운 소재의 발굴을 위한 연구에 노력을 경주하고 있다. 심혈관계 질환을 효과적으로 예방하기 위해서는 혈중 콜레스테롤의 저하, 혈소판 활성 및 혈액응고 활성의 억제, 평활근세포의 증식 억제 등이 요구된다. 혈전성 질환의 예방과 치료에는 혈전용해제, 항혈소판제, 항응고제 등이 보편적으로 사용되고 있는데, 현재 임상에서는 심혈관계 환자의 경우 스타틴 계열의 콜레스테롤 저하제, coumadin 등의 항응고제, 아스피린 등의 항혈소판제를 장기 복용하도록 처방하여 혈관 협착을 억제하고 있다 (Jaques, 1979). 그러나 이러한 유효한 약제들의 투여는 어디까지나 이미 심혈관질환이 발생한 환자를 대상으로 한 2차 예방을 위한 처방이며, 세계적으로도 근원적인 예방을 위한 1차 예방제는 개발되지 못한 상황이다 (McGinnis *et al.*, 1991). 이렇게 그 동안의 순환기질환 관련 약제 연구와 개발에도 불구하고 심혈관 관계 질환의 유병율과 발병률은

전 세계적으로 꾸준히 증가하는 추세인 바, 이제는 관련 질환에 대한 치료제 개발과 함께 심혈관계 발병을 억제, 예방할 수 있는 활성물질 및 식품소재 개발의 필요성이 절실히 대두되고 있는 실정이다.

심혈관계 질병의 예방 및 치료의 일환으로, 향후 인류의 건강을 책임질 21세기형 건강 기능성식품에 대해 전 세계적으로 큰 관심과 많은 연구가 행해지고 있으며, 이러한 건강 기능성식품으로 이용되는 식품 중에서 인류가 가장 오랜 시간 접해왔고 가장 친숙한 식품으로 곡류를 꼽을 수 있다.

수수는 아프리카 대륙이 원산지인 아메리카 대륙의 옥수수, 아시아 대륙의 벼, 중동 기원의 맥류와 더불어 생물기원의 지정학적 관점에서 매우 중요한 작물이다. 우리 조상들이 오곡밥에 수수를 섞어 먹었다는 기록은 조선시대 규합총서에 전하며, 붉은 수수와 붉은 팔고물을 이용하여 만든 수수팔떡은 귀신을 쫓고 건강을 부른다고 하여 오늘날에도 생일떡으로 많이 이용하고 있으며, 아프리카 등에서는 수수죽이 주식으로 이용되고 있다.

수수는 영양학적으로 쌀과 비교했을 때 단백질, 지방, 조섬유, 철, 비타민 B2, 회분 등의 함량은 높고, 탄수화물의 함량은 낮다. 특히 곡류 중 탄닌을 함유하고 있는 유일한 작물이며, 또한 드물게도 다양한 폴리페놀을 함유하고 있는 작물에 속한다. 현재 약 8,000 종이 넘는 폴리페놀 화합물 연구는 아직도 밝혀야 할 분야로 그 연구 가치가 높다. 최근에 수수에 함유되어 있는 다양한 폴리페놀 성분과 함께 그 기능성이 속속 밝혀지고 있다.

잡곡이 항당뇨 등 생활습관성병(성인병)에 효과가 있는 것으로 알려져 있어 건강기능성 식품 등록이 유망한 것으로 전망되며 이를 위해 품종개발, 유용성분 분리정제, 가공이용, 활성검정 등 다양한 분야의 연구가 수행, 축적되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 기존 보유하고 있는 수수 유전자원 가운데 농업적 특성이 우수하면서 항혈전 활성이 높은 유전자원을 선발하여 생산력 · 지역적응시험검정을 통해 항혈전활성이 높은 계통 선발을 목표로 하였다.

제2장 국내외 기술개발 현황

잡곡은 최근 항산화, 항암, 항염증, 항당뇨 등의 생리활성을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있어, 향후 건강 기능성 식품으로의 활용 가능성이 매우 높게 기대되어 그에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 특히, 수수의 건강기능성과 관련하여 수수 추출물의 발암억제 활성(Choi *et al.*, 1998), 항진균 및 항해충 활성 (Lee *et al.*, 2000), 비장세포 및 대식세포 활성 증강 활성 (Ryu *et al.*, 2006), 면역능 증강 활성 (Kim *et al.*, 2006), 항산화 및 항돌연변이활성 (Kwak *et al.*, 2004), 항산화 및 항균 활성 (Kil *et al.*, 2009), 그리고 항당뇨 활성 (Kim *et al.*, 2011)에 대한 보고가 있었다.

그러나 식품으로 이용하고 있는 잡곡류의 건강기능성에 대한 연구가 최근 다양하게 수행되고 있음에도 불구하고, 수수의 항혈전 효과에 대한 연구, 특히 일반적으로 항산화 효과로 널리 알려진 페놀화합물의 효능에 대해서는 아직 밝혀진 바가 많지 않다.

수수는 우리나라에서는 4500여 종의 식물이 분포하고 있지만, 식량에 관련된 재배식물로는 벼, 보리, 콩, 밀 등이 중요한 위치를 차지하고 있고, 잡곡으로는 옥수수, 수수, 조, 기장, 메밀 등이 있다. 옥수수, 수수는 초지가 풍부하여 가축을 많이 키우는 서양에서는 주로 가축의 사료로 이용되어 왔고, 쌀 생산이 부족했던 우리나라에서는 옥수수, 수수, 조, 기장, 메밀 등이 강원도, 경상북도 산간지에서 쌀 대신의 식량공급으로서 이용되어 왔으며, 또한 구황작물로서 춘궁기 때 우리민족이 주로 먹던 작물이었다.

수수는 열대, 아열대의 반건조 지역에서 중요한 식용작물로서 아프리카와 아시아는 세계의 약 80%의 면적을 차지하고 있지만, 자실생산량은 약 50%이며, 수량의 지역 간 차이가 크다. 아프리카의 평균수량은 861 kg/ha, 아시아에서는 1,180 kg/ha이다. 미국의 수량은 1950년대에는 1,200 kg/ha 있었지만 이후에 증가하여 1980년대에는 3,800 kg/ha, 1996~2000년 평균은 4,200 kg/ha (FAO 2001)이다. FAO (2001)의 통계자료에 의하면 세계의 수수생산량의 약 12%가 무역에 상회하고 있다. 수수의 총 수출량 중 미국산이 80%를 점하고 있다. 멕시코와 일본이 중요한 수입국으로서 일본은 연간 234만 톤을 수입하고 있다. 일본에서 수수는 사료배합의 원료로 이용되고 있는데, 옥수수, 콩기름 다음으로 중요한 원료로 이용된다. 일본은 일시적으로 논 전환작물로서 도입이 시험되었지만 자실용 재배는 되지 않으며 청예나 사일리지 사료용으로서 2000년에 4만5천 ha재배되고 있다.

수수는 전 세계적으로 약 30,000종의 품종이 수집 보존이 되어 있고, 우리나라의 경우는 농촌진흥청 국립농업유전자원센터에 약 4,000종의 유전자원이 수집 보존되어 있다. 수수는 형태적으로 다양성의 폭이 매우 넓고 그 용도에 따라 추구하는 품종의 특성 차이가 매우 커서 일반적으로 식용, 사료용, 바이오에탄올생산용 등으로 구분하는 것이 바람직하다. 수수 품종으로는 황금찰수수, 대풍수수가 생산판매 신고가 되어 있으나 대부분 재래종 및 유전자원들에서 선발된 것으로 아직 교배육종이나 성분육종 부분의 품종개발 연구는 미약한 편이다.

수수를 포함한 잡곡의 곡류가 성인병 예방 등의 사회적 관심도가 증가하고 있는 실정이며, 수수 곡류의 건강기능성 소재 탐색 및 개발에 대한 연구가 점차 확대되고 있다. 수수에 함유된 폴리페놀류 및 안토시아닌류 등 건강기능활성이 많은 물질에 대한 정성 및 정량분석이 이루어지고 있으며 수수에서 폴리페놀류와 안토시아닌류의 함량이 매우 높은 것으로 평가되었다. 수수는 곡물 중에서 가장 높은 폴리페놀화합물을 함유하고 있으며, 그 함량이 약 6%에 이르는 품종도 있다 (Dicko 2005). 하지만 항혈전 활성이 우수한 국내산 수수의 품종개발에 관한 연구는 수행된 바가 없는 바, 잡곡의 부가가치를 높여 농가 소득 증대, 잡곡 수요 확대, 나아가 국내 잡곡 산업의 보호 및 활성화로 국내산 잡곡의 경쟁력 강화와 안정적 생산 기반을 구축하기 위하여 항혈전 활성이 우수한 수수 유전자원을 개발하고자 한다.

우수자원의 선발은 현재 국립식량과학원 기능성작물부에서 보유하고 있는 수수 유전자원 가운데 예비실험을 통해 얻어진 결과들을 토대로 항혈전 활성도가 높을 것으로 예상되는 유망 유전자원을 황금찰수수를 비롯한 10여개 내외를 시험 시작전 선발하여 품종출원을 위해 효율적이고 집중적인 연구를 수행하여 빠른 시일에 품종보호 출원을 할 수 있도록 하였다. 품종 육성포장은 경남 밀양 식량원에 위치하고 있으며 품종출원을 위한 농업적인 특성을 1차적으로 평가하였으며 공동 세부과제에서 수행한 항혈전 기능 평가 결과와 함께 농업적 품종특성을 고려하여 가장 유망한 품종을 선발하도록 하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 세부과제 : 수수유래 항혈전 신소재의 동정 및 작용기전 구명

1. 연구방법

가. 황금찰수수의 유기용매 추출

황금찰수수는 농촌진흥청 식량과학원의 기능성 작물부로부터 제공을 받아 사용하였다. 건조된 황금찰수수 400 g을 Waring Blender 7012 (Dynamics Corporation, USA)를 사용하여 파쇄한 다음, 80% 에탄올로 80 °C에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 회수한 에탄올 추출물을 농축하여 물에 녹인 다음 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 n-butanol로 순차적으로 추출하여 각 유기용매 분획을 확보하였다. 이때 각 유기용매 추출은 3회로 실시하였으며, 각 유기용매 분획의 농축을 위해서는 회전감압 농축기 (Eyela N-12, Heidolph WB2000)를 사용하였다 (Fig. 1). 에탄올 추출물로부터 확보한 유기용매분획의 회수량은 Table 1에 나타난 바와 같다.

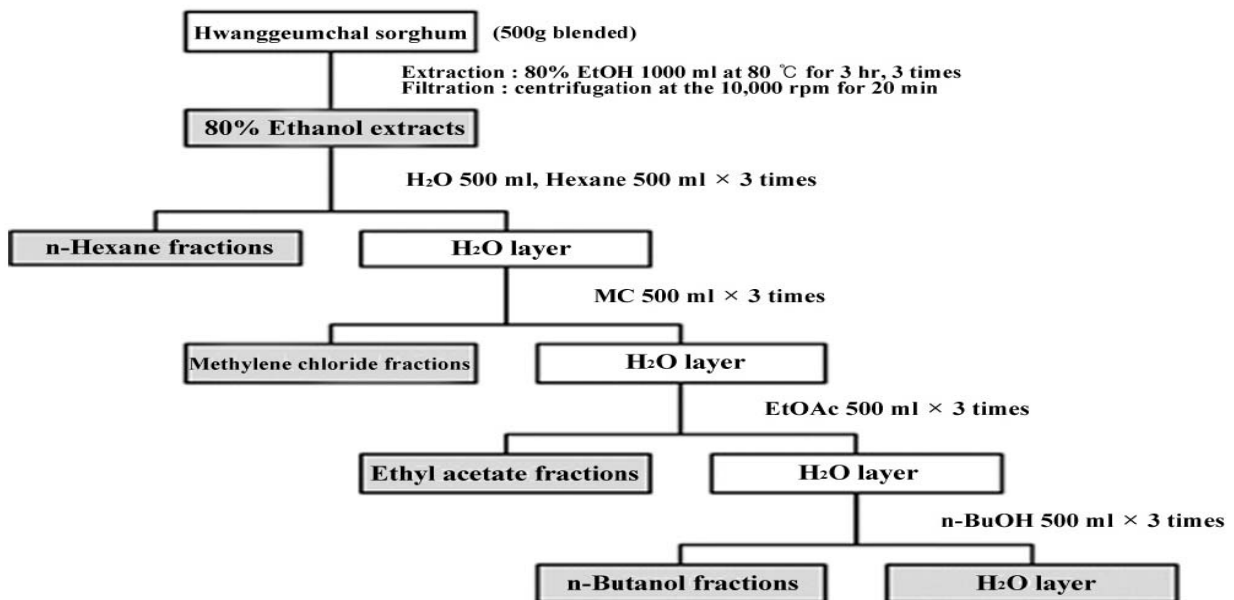


Fig. 1. Procedure for preparation of the 80% ethanol extracts and their organic solvent fractions from Hwanggeumchal sorghum.

Table 1. Dry weight of the 80% ethanol extracts and their organic solvent fractions prepared from Hwanggeumchal sorghum.

(g)

Name	Volumes of fractionation	EtOH	Hexane	M.C.	EtOAc	BuOH	H ₂ O
Hwanggeumchal sorghum	400	23.24	2.28	0.34	0.77	1.52	13.47

나. Thrombin time (TT) 분석

시료의 혈액응고 저해활성을 측정하기 위해, thrombin time (TT)에 미치는 시료의 영향을 자동혈액응고분석기 (Auto Blood Coagulation Analyzer, Sysmex CA-540, Japan)를 사용하였다. 이를 위해, 사람 유래 트롬빈 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 μ l를 DMSO에 용해시킨 상태의 각 시료 10 μ l와 혼합한 다음, 이를 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 전처리하였다. 이어서 50 μ l의 20 mM CaCl₂와 100 μ l의 사람유래 표준 플라즈마용액 (standard human plasma, Siemens, Marburg, Germany)을 첨가하고 반응시키면서 혈액응고에 소요되는 시간을 측정하였다. 이때 DMSO와 DMSO에 용해시킨 aspirin을 negative 및 positive control로 각각 이용하였다. 한편, TT 저해활성은 시료의 응고시간/negative control의 응고시간 x 100%로 나타내었다. 또한 각각의 측정은 세 반복으로 수행하였다.

다. Activated partial thromboplastin time (APTT) 분석

내인성 혈액응고경로에 대한 시료의 저해활성을 측정하기 위해, activated partial thrombin time (APTT)에 미치는 시료의 영향을 자동혈액응고분석기 (Auto Blood Coagulation Analyzer, Sysmex CA-540, Japan)를 사용하여 조사하였다. 이를 위해, 50 μ l의 Dade® Actin® Activated Cephaloplastin reagent (Siemens)를 각 시료 10 μ l와 혼합한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 전처리하였다. 이어서 50 μ l의 사람 유래 표준 플라즈마용액 (standard human plasma, Siemens) 및 50 μ l의 25 mM CaCl₂를 첨가하고 반응시키면서 혈액응고에 소요되는 시간을 측정하였다. 이때 DMSO와 DMSO에 용해시킨 warfarin을 negative 및 positive control로 각각 이용하였다. 한편, APTT 저해활성은 시료의 응고시간/negative control의 응고시간 x 100%로 나타내었다. 또한 각각의 측정은 세 반복으로 수행하였다.

라. Prothrombin time (PT) 분석

외인성 혈액응고경로에 대한 시료의 저해활성을 측정하기 위해, prothrombin time (PT)에 미치는 시료의 영향을 자동혈액응고분석기 (Auto Blood Coagulation Analyzer, Sysmex CA-540, Japan)을 사용하여 조사하였다. 이를 위해, 50 μ l의 Thromborel® S reagent (Siemens)를 DMSO에 용해시킨 각 시료 10 μ l와 혼합한 다음, 37 °C에서 10분간 전처리하였다. 이어서 100 μ l의 사람 유래 표준 플라스마용액 (standard human plasma, Siemens) 첨가하고 반응시키면서 혈액응고에 소요되는 시간을 측정하였다. 이때 DMSO와 DMSO에 용해시킨 warfarin을 negative 및 positive control로 각각 이용하였다. 한편, PT 저해활성은 시료의 응고시간/negative control의 응고시간 x 100%로 나타내었다. 또한 각각의 측정은 세 반복으로 수행하였다.

마. 혈전 용해 활성 측정

시료의 혈전용해활성은 피브린 플레이트법 (fibrin plate method)으로 측정하였다 (Astrup and Mullertz, 1952; Raftery, 1981). 피프린 플레이트를 제작하기 위해, 6.6 ml의 0.75% 피브리노겐 (human fibrinogen/50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, Sigma)과 130 μ l의 트롬빈 (50 U/ml, Sigma)를 혼합한 다음, 페트리 플레이트 (60 mm diam.)에 즉시 붓고 응고되도록 하였다. 준비된 피브린플레이트 상에 각 시료들을 DMSO에 정해진 농도로 녹여서 filter-paper discs (3 mm diam.)를 사용하여 3 μ l씩 올려 놓은 후 37 °C에서 3시간 동안 처리하였다. 이때 시료의 혈전용해 활성은 filter-paper disc 주변에 나타나는 clear zone으로 확인하였다. 한편, 3 μ l의 standard plasmin 용액 (15 U/ml 및 30 U/ml)을 positive control로 사용하였다.

바. Rat carotid artery Balloon-injury 모델을 항혈전 및 혈관 재협착 (restenosis) 억제효능 조사

In vivo 에서의 혈액응고 기전 저해효과를 시험하기 위하여, rat carotid artery Balloon-injury 모델을 이용하여 황금찰수술의 80% 에탄올 추출물이 in vivo조건에서 혈관 재협착을 저해할 수 있는지 조사하였다. 이를 위해 rats을 대상으로 BI 시술 3일전부터 BI 시술 14일 후까지, 80% 에탄올 추출물을 600 mg/kg 혹은 1200 mg/kg 수준으로 경구투여 하였으며, 혈관 내 재협착의 유무를 검정하기 위해 H&E staining를 실시하였으며, 아울러 80% 에탄올 추출물의 경구투여에 의해 rats의 혈액의 응고시간이 연장되어지는지 유무를 TT, APTT 및 PT 분석을 통해 확인하였다.

사. 콜라겐 (collagen)과 에피네프린 (epinephrine)에 의한 폐색전 (pulmonary thrombosis)유발 실험

실험적 혈전의 유도는 DiMinno의 실험방법 (DiMinno and Silver, 1983)에 준하여 실험하였다. C57BL6 마우스를 대상으로 황금찰수수 80% 에탄올 추출물을 600 mg/kg 혹은 1200 mg/kg 수준으로 경구투여를 한 그룹과 negative control로 DMSO를 경구투여한 그룹 또는 positive control로 aspirin (100 mg/kg)으로 경구투여한 그룹을 15일 동안 경구투여한 후에, 0.8 mg/kg의 collagen (sigma)과 60 µg/kg의 epinephrine (sigma)을 조제하여 미정맥에 주사하였다. 항혈전 효과는 혈소판 응집 시약의 투여로 발생하는 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였다.

아. 황금찰수수 추출물의 안전성 평가

황금찰수수 추출물의 안전성 평가를 위한 독성 평가는 한국화학연구원 “신약플랫폼기술팀”에 의뢰하여 기초독성평가와 약동력학 평가를 수행하였다. 심장독성을 검토하기 위하여 hERG K⁺ 채널 테스트와 Zebra fish의 HBR 영향 조사를 하였다. 또한 ICR 마우스에 추출물을 경구투여 하여 급성 동성 테스트를 수행하였으며, 돌연변이 유발 활성이 있는지 알아보기 위하여 Ames test를 수행하였고 염색체 이상 유발을 일으키는지 CHO-K1 세포를 이용한 실험과 in vitro micronucleus assay를 이용하여 황금찰수수의 안전성을 평가를 실시하였다.

자. 통계처리

Kapla-Meier plots을 log-rank test 와 비교 검토하는데 이 비교는 STATA statistics/Data analysis software package (Stata corporation)을 이용하였다.

2. 연구결과

가. 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 항혈액응고 활성 조사

황금찰수수가 혈액응고를 일으키는 트롬빈의 작용을 저해하는 효능이 있는지 조사하기 위하여 황금찰수수 유기용매 분획 추출물을 대상으로 Thrombin time (TT), Activated partial thromboplastin time (APTT) 및 Prothrombin time (PT) 분석법을 이용하여 항혈전 효능을 비교 분석하였다.

TT 값에 미치는 각 유기용매 분획들의 영향을 최종 농도 480 $\mu\text{g/ml}$ 에서 측정한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 hexane과 methylene chloride 분획의 경우에는 트롬빈에 의한 혈액응고가 일어나지 않았다. 이에 반해, ethyl acetate, butanol 혹은 수층의 경우는 트롬빈에 의해 유도되는 혈액응고에 대해 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 조건하에서 positive control인 aspirin은 360 $\mu\text{g/ml}$ 및 480 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종농도에서 TT 값을 각각 1.2배 및 2.0배 연장시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 황금찰수수 80% 에탄올 추출물에 함유된 항혈전 성분이 hexane과 methylene chloride 분획에 분포됨을 보여준다.

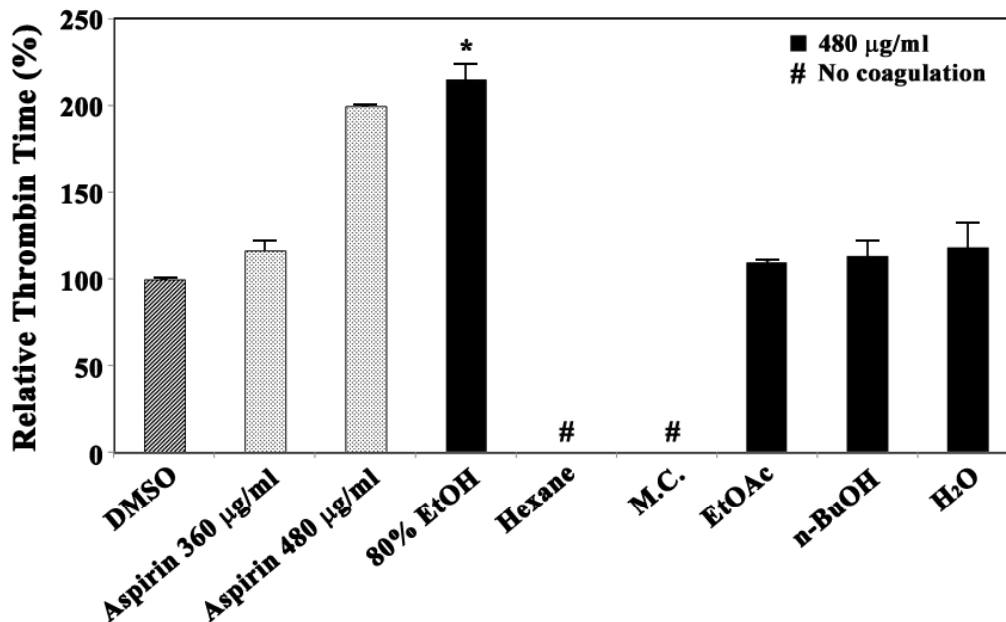


Fig. 2. TT-inhibitory activity of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains. TT of individual samples was measured at a final concentration of 480 $\mu\text{g/ml}$ as described in Materials and Methods. The experiment was performed in triplicates. Symbol: # no coagulation; * $p < 0.05$ as compared with the control.

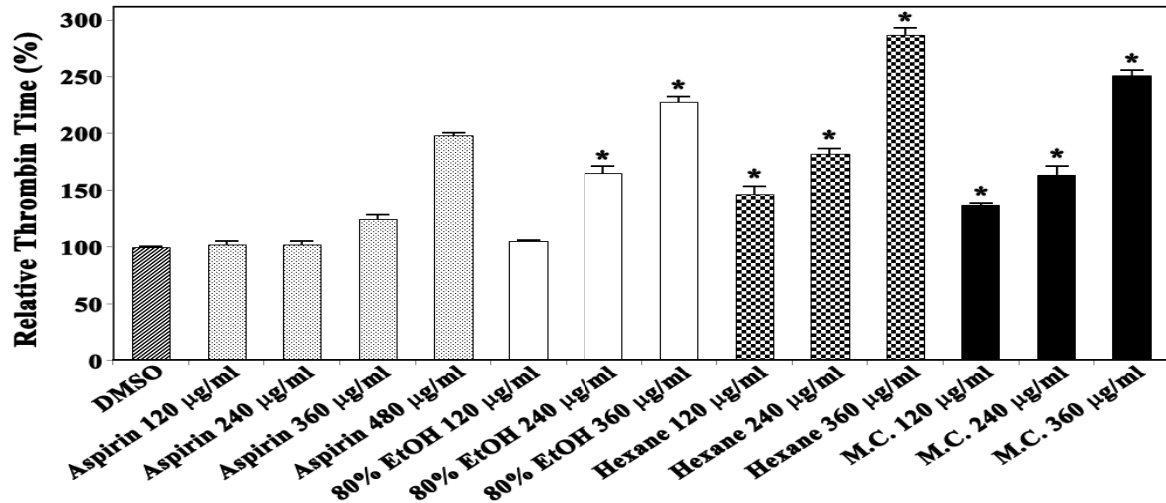


Fig. 3. Dose-dependent effect of 80% ethanol extract, hexane fraction, and methylene chloride fraction of hwanggeumchal sorghum grains on Thrombin time (TT). TT of individual samples was measured at various final concentrations ranging from 120-360 µg/ml as described in Materials and Methods. The experiment was performed in triplicates. Symbol: * $p < 0.05$ as compared with the control.

황금찰수수 유래의 hexane과 methylene chloride 분획의 thrombin time (TT)에 미치는 저해효과를 서로 비교할 뿐만 아니라 positive control인 aspirin과도 비교분석하기 위해, 시료의 최종농도를 120, 240 및 360 µg/ml로 하여 TT에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이, hexane 분획은 120, 240 및 360 µg/ml의 최종농도에서 TT 값을 1.5배, 1.8배 및 2.9배로 연장하는 것으로 나타났으며, methylene chloride 분획은 120, 240 및 360 µg/ml에서 TT 값을 1.4배, 1.6배 및 2.5배 연장시키는 것으로 나타났다. 한편, 비록 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 경우는 120 µg/ml의 최종농도에서는 TT값을 연장시키지 못하였지만, 240 및 360 µg/ml의 최종농도에서는 TT 값을 각각 1.6배 및 2.3배 연장시키는 저해효과가 나타났다. 이러한 결과들은 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물에 함유된 항혈액응고 성분들이 대부분 hexane과 methylene chloride 분획에 분포함을 재확인해준다. Positive control인 aspirin의 경우는 240 µg/ml의 최종농도에서는 TT 값을 연장시키지 못하였지만, 360 µg/ml 및 480 µg/ml의 최종농도에서는 TT 값을 1.2배 및 2.0배 연장시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 황금찰수수 에탄올 추출물이 positive control인 aspirin에 비해 더 강력한 TT 저해활성을 지니고 있음을 확인해주며, 아울러 hexane과 methylene chloride 분획의 TT 저해활성은 positive control인 aspirin에 비해 최소한 약 3배정도 더 높을 수 있음을 시사해준다.

TT 분석법을 이용한 항혈액응고 활성측정은 피브리노겐을 피브린으로 전환시키는 트롬빈작용에 대한 시료의 저해활성을 측정하는 것이므로 (Flanders et al., 2003), APTT 및 PT 분석법을

이용하여 혈액응고의 내인성 경로와 외인성경로 (Riddel et al., 2007)에 미치는 황금찰수수 추출물의 저해활성을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 APTT에 미치는 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 저해활성은 hexane 및 methylene chloride 분획에 분포하였으며, 이때 이들 분획의 APTT 저해활성은 positive control인 warfarin (최종농도 3.13 mg/ml)에 비해 약간 더 높게 나타났다. 또한 Fig. 5에서 보는 바와 같이, PT에 미치는 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 저해활성은 대부분이 hexane 분획에 분포하였고 그 외 분획들에서는 저해활성이 확인되지 않았다. 80% 에탄올 추출물 및 hexane 분획의 PT에 대한 저해활성은 positive control인 warfarin (최종농도 3.13 mg/ml) 보다 더 높게 나타났다.

따라서 이와 같은 연구결과들은 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 항혈액응고 효능이 피브리노겐을 피브린으로 전환시키는 트롬빈작용에 대한 직접적인 저해뿐만 아니라, 혈액응고의 내인성 및 외인성 경로의 저해를 통해서 일어날 수 있음을 시사해 준다.

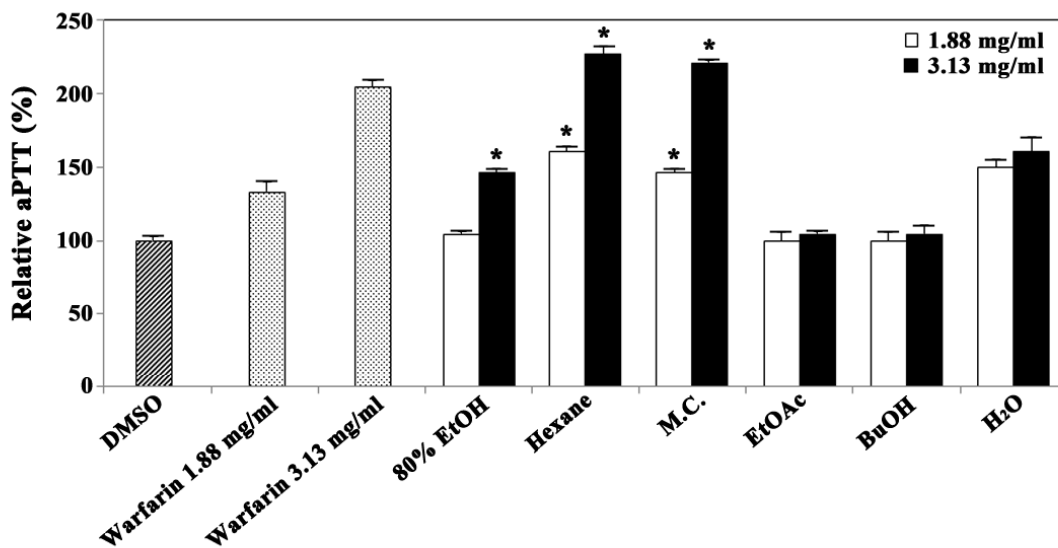


Fig. 4. Activated partial thromboplastin time (APTT)-inhibitory activity of 80% ethanol extract and its organic solvent fractions of hwangeumchal sorghum grains. APTT of individual samples were measured at final concentrations of 1.88 mg/ml and 3.13 mg/ml as described in Materials and Methods. The experiment was performed in triplicates. Symbol: * $p < 0.05$ as compared with the control.

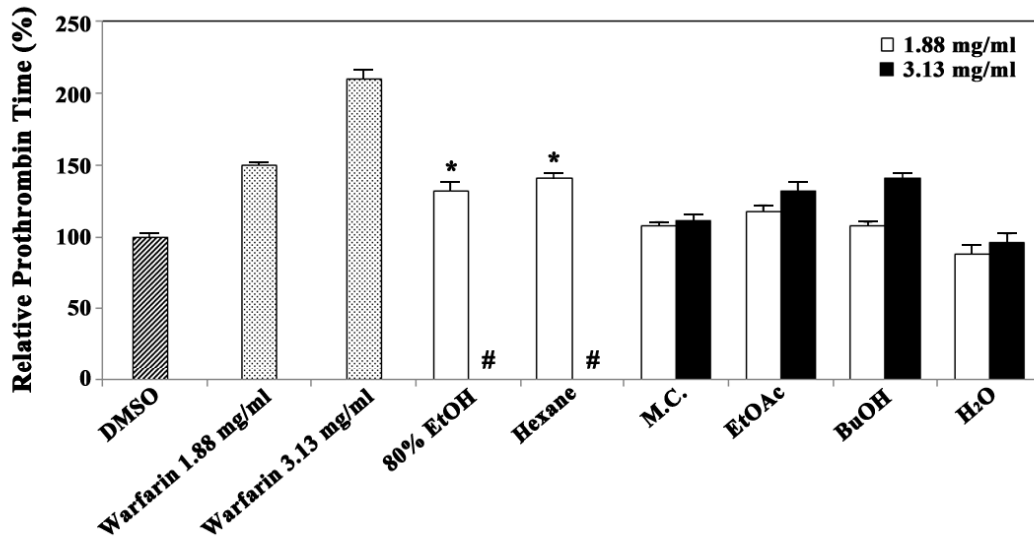


Fig. 5. Prothrombin time (PT)-inhibitory activity of 80% ethanol extract and its organic solvent fractions of hwanggeumchal sorghum grains. PT of individual samples was measured at final concentrations of 1.88 mg/ml and 3.13 mg/ml as described in Materials and Methods. The experiment was performed in triplicates. Symbol: # no coagulation; * $p < 0.05$ as compared with the control.

나. 황금찰수수 유래 80% 에탄올 추출물의 트롬빈 저해활성의 열 안정성 및 산 안정성 조사

황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 항혈액응고 활성의 열 안정성을 조사하기 위해, 80% 에탄올 추출물 (10 mg/ml DMSO)을 100 °C에서 30분 및 60분 동안 처리하였으며, 각각의 시료들의 TT에 대한 저해활성을 비교 분석하였다. **Fig. 6A**에서 보는 바와 같이, 80% 에탄올 추출물의 TT 저해활성은 100 °C에서 60분 동안의 열처리에 의해서도 감소되지 않았다.

또한 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 산 안정성 조사를 하기위해, 80% 에탄올 추출 (10 mg/ml DMSO)의 pH를 2.0로 조절한 다음 37 °C에서 120분 동안 처리하고 pH를 7.0으로 재조정하였으며 각 시료들의 TT에 대한 저해활성을 비교분석하였다. **Fig. 6B**에서 보는 바와 같이, 80% 에탄올 추출물의 TT 저해활성은 pH 2.0에서 120분동안의 처리에 의해서도 크게 영향을 받지 않았다. 따라서 이러한 결과들은, 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물에 함유된 항혈액응고 성분(들)이 열과 산에 대해 매우 안정함을 시사해준다.

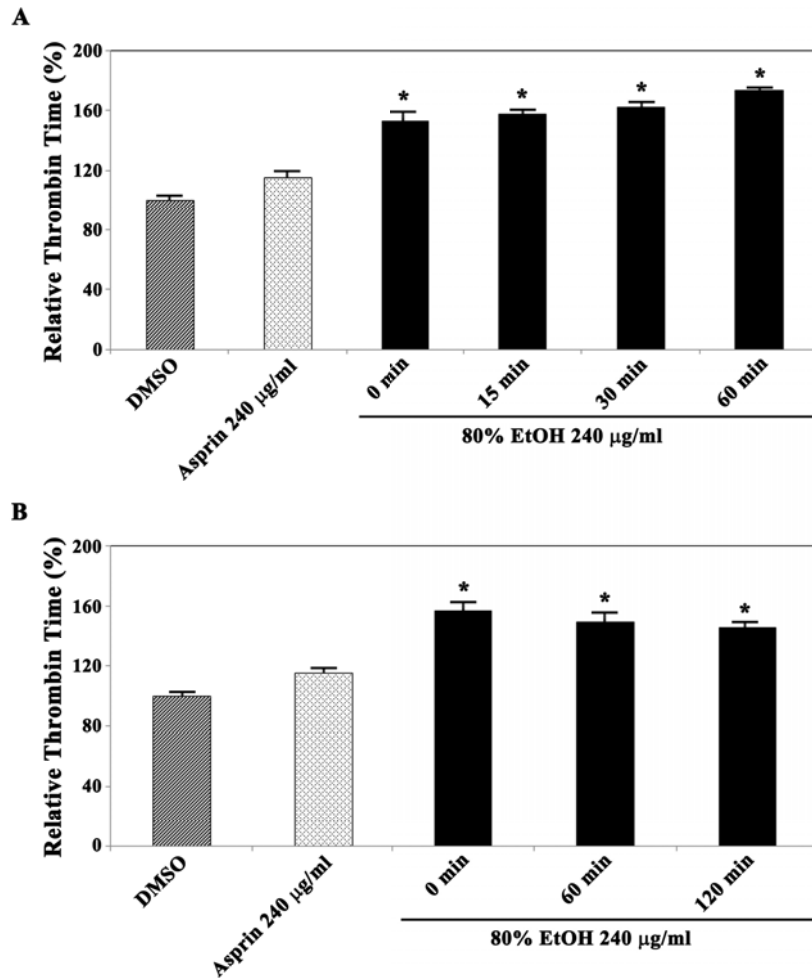


Fig. 6. Heat-stability (A) and acid-stability (B) of TT-inhibitory activity of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains. For heat treatment, the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains (5 mg/ml DMSO) was treated at 100 °C for 15 min, 30 min or 60 min. For acid treatment, the 80% ethanol extract (5 mg/ml DMSO) were adjusted to pH 2.0 and then incubated at 37 °C for 60 min or 120 min prior to adjustment to pH 7.0. The TT-inhibitory activity of individual samples was measured at a final concentration of 240 µg/ml as described in Material and Methods. The experiment was performed in triplicates. Symbol: * $p < 0.05$ as compared with the control.

다. 황금찰수수 유래 80% 에탄올 추출물의 혈전용해 활성 조사

혈관내의 병리적 혈전 생성은 혈약응고 기전과 혈전용해 기전 사이의 균형이 파괴되어 일어나는 혈상이라 할 수 있다 (Fan et al., 2009). 따라서 이상적인 항혈전 제제는 항혈액응고 활성뿐만 아니라 혈전용해 활성도 동시에 지닐 필요성이 있다. 만약 황금찰수수가 혈전생성을 방해할 수 있는 항혈액응고 활성만을 나타낸다면, 혈전용해능의 부재로 인해 혈전증의 치료를 위

해 이용하는데 있어서 제약이 따를 수 있다.

황금찰수수의 80% 에탄올 추출물이 혈전용해 활성을 지니고 있는지 조사하기 위해, 3 μ l의 각 시료 (10mg/ml DMSO)들을 filter paper disc (diam. 3 mm)를 사용하여 피브린 플레이트 상에 올려놓고 37 °C에서 3시간동안 반응시킨 후, filter paper disc 주변에 clear zone이 형성되는 지를 관찰하였으며 그 clear zone의 직경을 측정하여 혈전용해 활성을 나타내었고, 이때 positive control로는 plasmin 용액 (15 U/ml 또는 30 U/ml)을 사용하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 경우는 positive control인 plasmin (15 U/ml 또는 30 U/ml)에 비해 1.5배~2.0배 정도 더 높은 활성을 지니고 있음이 확인되었다. 또한 hexane 및 methylene chloride 분획의 경우에도 혈전용해 활성이 관찰되었으나, 그 외 ethyl acetate, butanol 및 수층 분획들의 경우에는 혈전용해 활성이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 80% 에탄올에 의해 추출되어지는 황금찰수수의 항혈전 활성성분(들)이 주로 hexane 및 methylene chloride 분획에 분포됨을 보여준다.

비록 현재까지 수수의 종자에 혈전용해 활성이 있음이 보고된 바는 없지만, 수수를 기질로 발효생산한 식초에서 혈전용해 활성이 있음이 보고된 바 있다 (Fan et al., 2009). 그러나 수수 종자를 기질로 식초를 발효제조하는 과정은 효모에 의한 알콜발효와 세균에 의한 초산발효 단계로 이루어지므로, 수수 종자를 기질로 생산한 식초에서 보고된 혈전 용해 활성이 수수 종자 유래 식물화합물인지 혹은 미생물 발효과정에 의해 생산된 발효대사 산물인지에 대한 규명연구는 아직 이루어지지 않았다. 또한 식물유래 추출물/생산물에서 관찰되는 혈전용해활성은 주로 plasmin과 같은 세린계 protease를 닮은 효소물질에 기인할 수도 있는 것으로 보고되었다 (Choi and Sa, 2001; Nagda et al., 1983; Taussig and Batkin, 1998; Verma and Bordia, 2001). 아울러 식물 유래 페놀화합물의 일종인 kaempferol이 혈전용해활성을 지니고 있음이 보고되었다 (Rajput et al., 2011).

이상의 연구결과들은 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물이 항혈액응고 활성 뿐만 아니라 혈전용해 활성도 지니고 있음을 나타내며, 황금찰수수는 항혈전 식품소재로 활용될 수 있는 가능성이 있음을 시사한다.

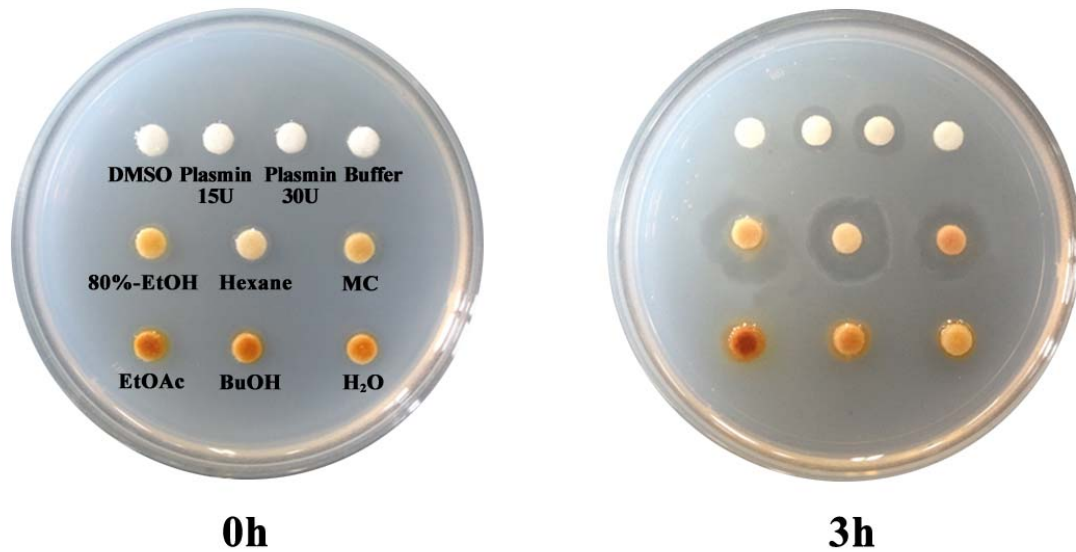


Fig. 7. Fibrinolytic activity of 80% ethanol extract and its organic solvent fractions of hwanggeumchal sorghum grains. Three microliter of plasmin dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer as the positive control and individual samples (10 mg/ml DMSO were loaded on the fibrin plate using filter-paper discs (3 mm diam.). Sequentially, the fibrin plate was incubated at 37 °C for 3 h. The fibrinolytic activity of samples was detected as lytic area surrounding the disc compared to standard plasmin (15 U/ml and 30 U/ml). A representative study is shown and two additional experiments yielded similar results.

라. 국내산 황금찰수수과 중국산 수수의 항혈전 활성화능 비교

본 연구를 위해 선발된 황금찰수수와 중국산수수의 항혈전 활성을 비교하기 위해 제2협동기관인 대구가톨릭대학교에서 분리 추출하여 보내준 황금찰수수 95% 에탄올 추출물 유래의 유기용매 분획과 중국산 수수 95% 에탄올 추출물 유래의 유기용매별 분획을 이용하여 Thrombin Time (TT) Assay로 항혈전 활성을 측정하였다. 대조구 조건과 농도 조건은 국내산 황금찰수수 유래 시료의 분석 조건과 동일하게 하였다.

그 결과, 국산 황금찰수수의 경우 항혈전 관련 소재가 hexane 과 methylene chloride 분획에 집중된 것에 반해 중국산 수수에서는 hexane fraction에서 활성이 가장 높게 나타났으나, 그 외 분획에서도 약하지만 항혈전 활성을 보였다 (Fig. 8). 두 시료의 항혈전활성을 비교한 결과, 국내산 황금찰수수 30 kg을 95% 에탄올로 추출하여 항혈전 활성을 측정한 결과 아스피린 360 µg/ml 의 저해 활성이 거의 나타나지 않을 때, 황금찰수수의 에탄올 분획은 315%, hexane 분획은 약 400%를 보였던 것에 비해, 중국산 수수는 같은 농도에서 에탄올과 hexane 분해의 혈전

저해율이 120%와 230%로 나타나 국산보다 항혈전 활성이 떨어짐을 확인 하였다. 결론적으로 이 실험결과는, 중국산수수의 항혈전 활성에 비해 국산 황금찰수수의 활성이 매우 우수함을 시사한다.

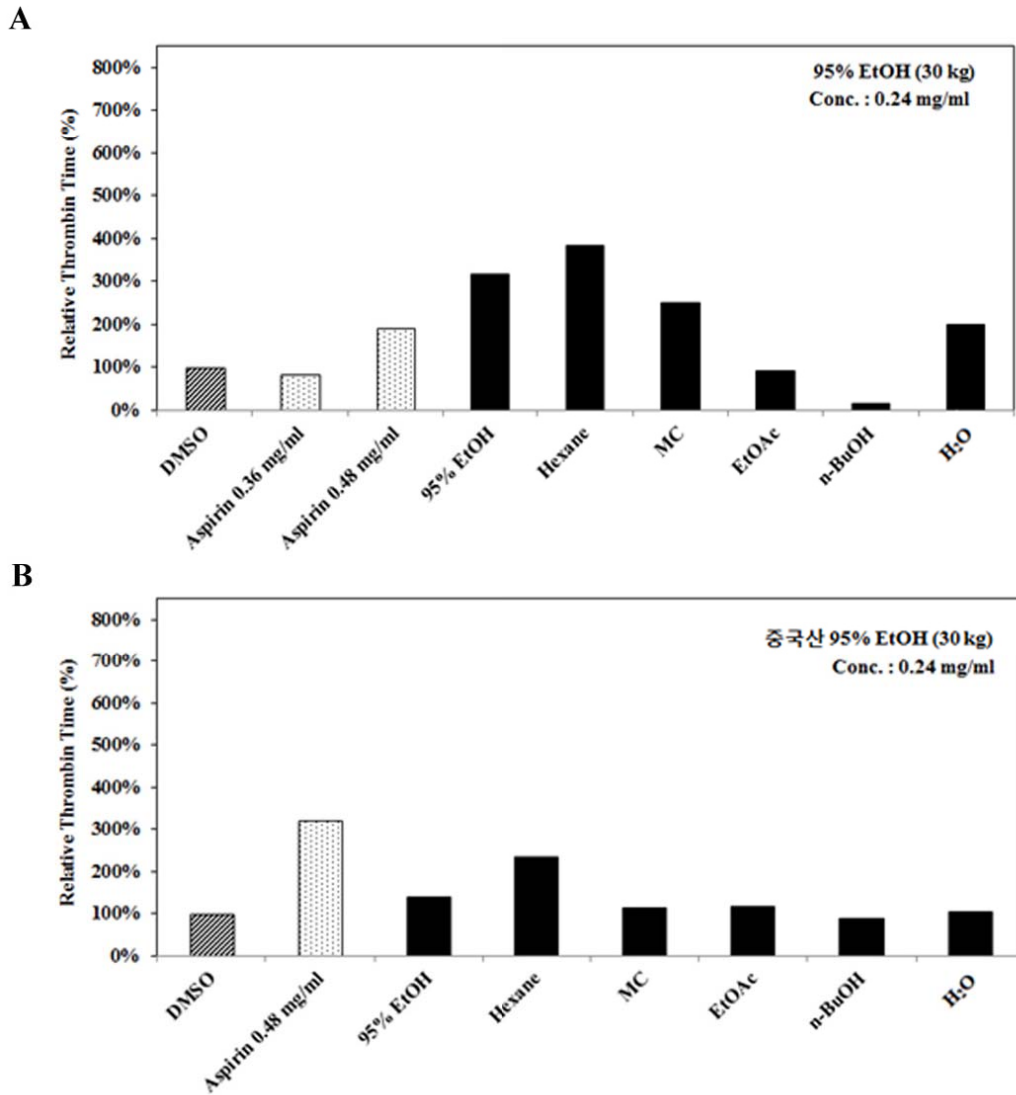


Fig. 8. TT-inhibitory activity of 95% ethanol extract and its organic solvent fractions of hwanggeumchal sorghum grains (A) and china sorghum grains (B).

다. 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물 및 유기용매분획들에 함유된 페놀성 화합물의 HPLC를 이용한 분석

황금찰수수의 항혈액응고 활성이 페놀성 화합물에 기인하는지를 조사하기 위해, 황금찰수수 유래 80% 에탄올 추출물 및 각 유기용매 분획들에 함유된 페놀성 화합물들을 HPLC로 분석하

였다. Table 2에서 나타난 바와 같이, 각 시료들에서 다양한 페놀성 화합물들이 확인되었다.

Table 2. List of phenolic compounds content in the 80% ethanol extracts and the various solvents fractionation of hwanggeumchal sorghum grains.

No.	Name	Fractions (µg/mg)					
		EtOH	Hexane	M.C.	EtOAc	BuOH	H ₂ O
1	Pyrogallol	0.04			0.03		0.05
2	Gallic acid	0.17			0.08		0.13
3	Homogentisic acid	0.08			0.20		
4	4-Hydroxybenzoic acid	0.32	0.06	0.06	2.62		0.07
5	Catechin	1.90	0.15	0.15	5.24		0.50
6	Chlorogenic acid	0.36	0.07				
7	Caffeic acid	0.49	0.05	0.08	1.42		0.29
8	Syringic acid	0.10					
9	Isoorientin	1.81	0.26	0.25	3.45		0.49
10	Orientin	0.72	0.77	0.74	1.39		
11	<i>p</i> -Coumaric acid	0.25	0.07	0.06	0.68	0.82	0.14
12	Ferulic acid	0.08	0.10		0.86		0.87
13	Veratric acid	1.10	0.36	0.33	4.83	0.22	0.46
14	Hesperidin	1.10	0.46	0.42	3.91		0.93
15	<i>o</i> -Coumaric acid	0.17	0.09	0.08	1.35		0.61
16	Protocatechuic acid	1.31	1.00	0.94			
17	Resveratrol	1.40	0.51	0.69	0.44		
18	Salicylic acid	1.76	1.90	1.83	1.73	0.21	
19	<i>t</i> -Cinnamic acid	0.45	0.08	0.09	0.14	0.06	0.03
20	Apigenin	0.89	4.03	3.96	3.33	0.14	0.52
21	Hesperitin	0.33	0.22	2.90	0.31	0.80	
22	α -Vinylguacol	0.60	0.13	0.13	6.72		
23	Formononetin	0.94	0.25	0.18	0.01		
24	Biochanin A		0.15	0.14			
25	Gentisic acid	2.13		8.73		1.16	
26	Apigeninidin	0.27		3.61		1.15	
27	Naringin	1.33			1.84	1.33	
28	Myricetin	0.23			7.00	0.38	
29	Quercetin	9.29	4.66	1.11	7.27	2.13	
30	Naringenin	2.60	0.49	4.50	1.59	2.09	
31	Kaempferol	2.90	0.43	2.53	1.17	6.88	
32	Vanillic acid	1.20					
33	Rutin	0.12					
34	Benzoic acid	0.15					
35	β -Resorecylic acid	0.19					
36	<i>m</i> -Coumaric acid	0.08					

각각의 페놀성 화합물들을 480 µg/ml의 최종농도로서 TT에 미치는 저해활성을 조사 한 결과, biochanin A, kaempferol, β -resorecylic acid 및 salicylic acid와 같은 페놀성 화합물들은 트롬빈에 의해 매개되는 혈액응고반응을 완전히 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 9). 또한 benzoic acid, *t*-cinnamic acid, *m*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, formononetin, homogentisic acid, myricetin, naringin, 및 pyrogallol 등의 10가지 페놀성 화합물들은 TT 값을 각각 1.9배, 1.8배, 1.9배, 1.7배, 1.6배, 1.7배, 1.9배, 1.8배, 1.8배, 및 1.9배 연장시키는 것으로

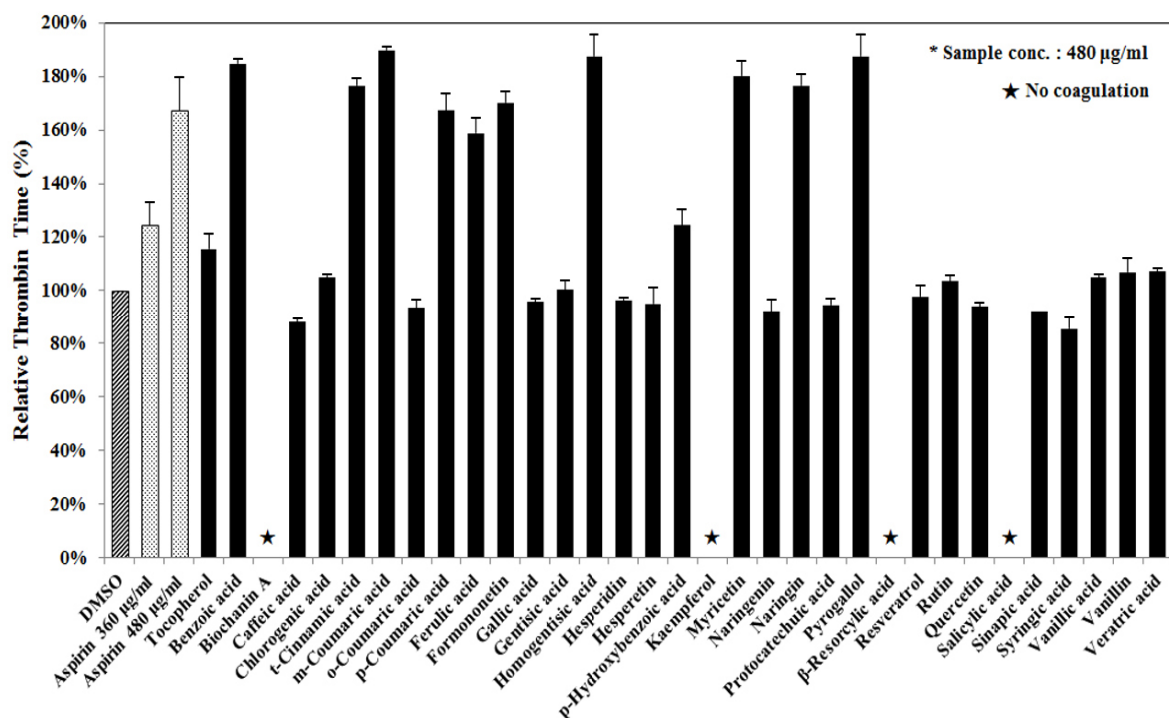


Fig. 9. Inhibitory effect of phenolic compounds identified in the 80% ethanol extract and various solvent fractions of hwanggeumchal sorghum grains on TT. The activity was expressed in terms of clotting time ratio (%) in relation to the control DMSO.

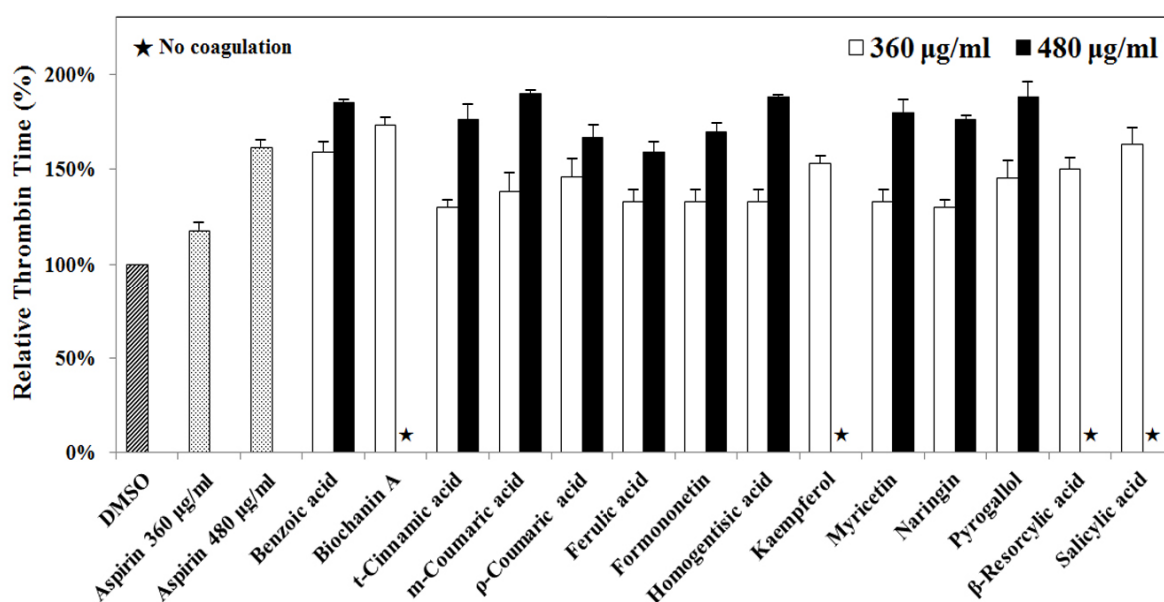


Fig. 10. Dosage effect (360 µg/ml and 480 µg/ml) of individual phenolic compounds on TT. The activity was expressed in terms of clotting time ratio (%) in relation to the control DMSO.

나타났다. 동일한 조건하에서, positive control인 aspirin은 TT 값을 1.7배 정도 연장 시키는 것으로 나타났다. 이들 14가지 페놀성 화합물들의 항혈액응고 활성을 좀 더 조사하기 위해, 이들 페놀성화합물들을 360 $\mu\text{g/ml}$ 및 480 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종농도에서 TT에 대한 저해활성을 positive control인 aspirin과 비교분석하였다. 그 결과, 이들 14가지 페놀성 화합물들의 TT 저해활성은 aspirin 보다 더 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 10).

한편, 트롬빈에 의해 매개되는 혈액응고를 저해하는 것으로 확인된 이들 14가지 페놀성 화합물들이 혈액응고의 내인성 경로와 외인성경로에 의해 매개되는 혈액응고에 대해서도 저해활성을 지니고 있는지를 규명하기 위해, APTT 및 PT 분석법을 이용하여 저해활성을 조사하였다. Fig. 11에서 보는 바와 같이, 페놀성 화합물인 formononetin은 3.13 mg/ml 및 1.88 mg/ml의 최종농도에서는, 내인성 경로에 의해 매개되는 혈액응고를 완전히 저해하는 것으로 나타났으며 625 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도에서는 APTT 값을 1.9배 정도 연장시켰다. 또한 페놀성 화합물들 중 t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, homogentisic acid, myricetin, 및 pyrogallol (최종농도 3.13 mg/ml)은 APTT를 완전히 저해 할 수 있었으며, 1.88 mg/ml의 최종농도 조건에서도 APTT에 대한 저해활성이 positive control인 warfarin에 비해 더 높게 나타났다. 한편, benzoic acid, biochanin, β -resorecylic acid 및 salicylic acid 등은 3.13 mg/ml의 최종농도에서 APTT 값을 연장시키지 못하였다.

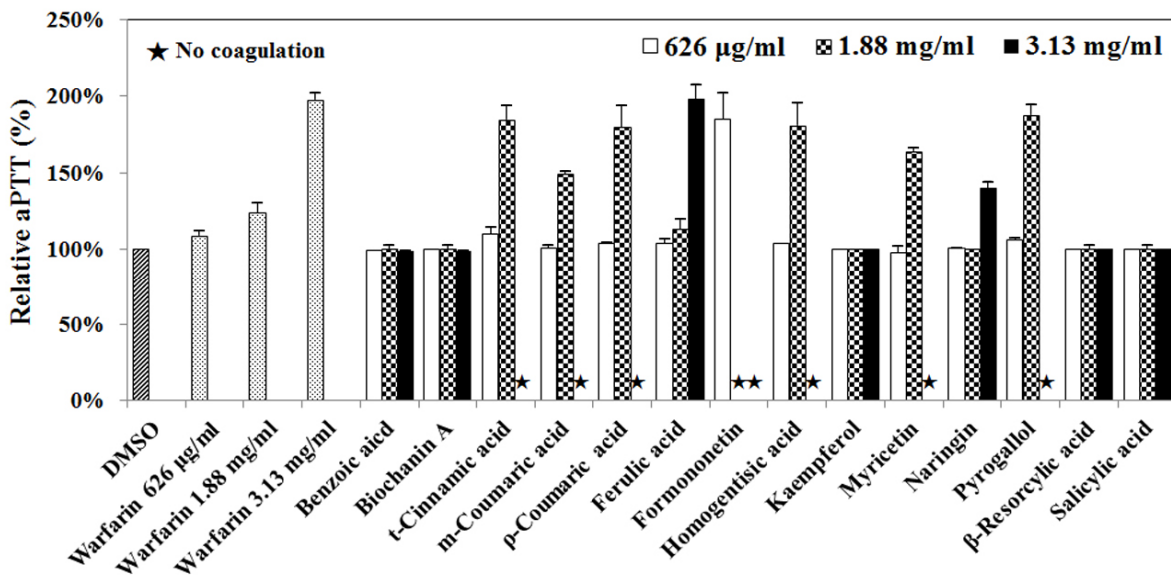


Fig. 11. Inhibitory effect of selected phenolic compound identified in hwanggeumchal sorghum grains on the coagulation measured by APTT assay. The activity was expressed in terms of clotting time ratio (%) in relation to the control DMSO.

APTT 분석의 결과와 마찬가지로, PT 분석 또한 formononetin이 가장 강력한 항혈액응고 활성을 지니고 있음을 나타내었다. Formononetin (최종농도 3.13 mg/ml 및 1.88 mg/ml)은 PT 값을 완전히 저해하였으며, 625 µg/ml의 최종농도에서는 PT 값을 1.7배 연장시키는 것으로 나타났다 (Fig. 12). 또한, benzoic acid, biochanin A, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, p-coumaric acid, ferulic acid, homogentisic acid, β-resorcylic acid, 및 salicylic acid (최종농도 3.13 mg/ml 및 1.88 mg/ml)등은 공통적으로 positive control인 warfarin에 비해 PT 저해활성이 비해 더 높게 나타났다. 특히, formononetin은 매우 효과적으로 APTT 및 PT 값을 연장시키는 것으로 확인되었으므로, 이러한 결과는 formononetin의 항혈액응고 활성의 표적이 혈액응고의 내인성 및 외인성 경로에 공통적으로 기여하는 혈액응고인자일 수 있음을 시사해 준다.

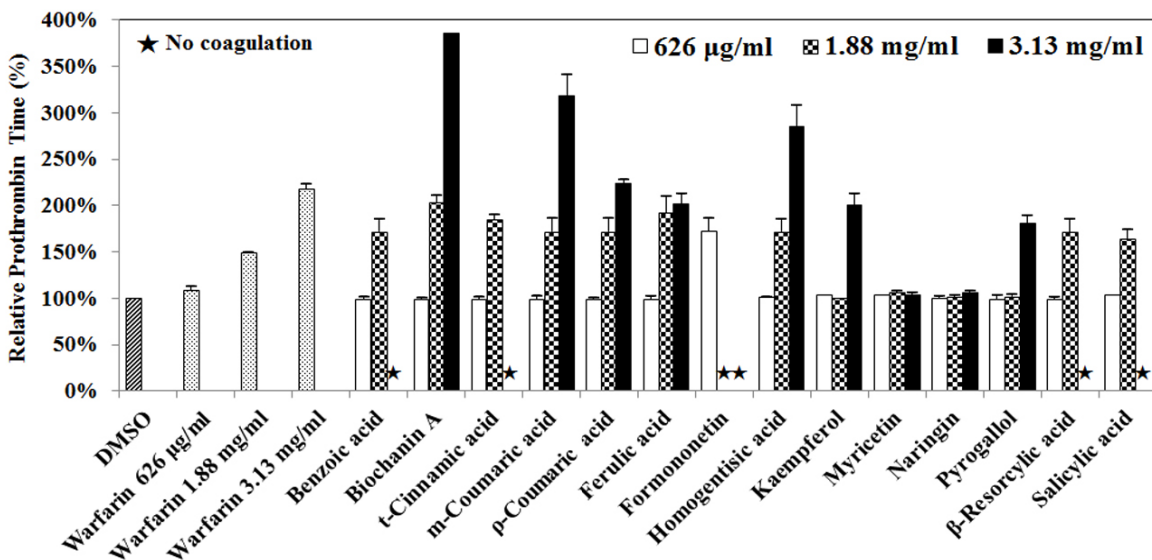


Fig. 12. Inhibitory effect of selected phenolic compound identified in hwanggeumchal sorghum grains on the coagulation measured by PT assay. The activity was expressed in terms of clotting time ratio (%) in relation to the control DMSO.

이상의 연구결과들을 근거해 볼 때, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, formononetin, 및 homogentisic acid와 같은 페놀성 화합물들의 경우는 TT, APTT 및 PT 분석법 모두에서 공통적으로 항혈액응고 활성을 효과적으로 나타내었으므로, 이들 페놀성 화합물들의 항혈액응고 작용표적은 트롬빈에 의해 매개되는 피브리노겐피형성 기전임을 시사해 주었다. 한편, p-coumaric acid, myricetin 및 pyrogallol의 경우는 APTT 값에 대한 저해활성은 현저히 높게 나타났으나, TT 및 PT 값에 대한 저해활성은 그다지 높게 나타나지 않았다. 이러한

결과는 p-coumaric acid, myricetin 및 pyrogallol의 항혈액응고 작용의 표적이 내인성 및 외인성 경로의 공통기전이 아니라 그 상류에 위치한 내인성 경로에만 존재하는 혈액응고인자임을 시사해 준다. 또한, benzoic acid의 경우는 PT 값을 현저히 저해하였으나, TT 및 APTT 값에 대해서는 별다른 저해효과를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 benzoic acid의 항혈전활성 작용 표적이 외인성경로에 특이적인 혈액응고인자임을 시사해준다.

바. 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 독성조사

심장독성을 검토하기 위해, hERG K⁺ 채널 활성화에 미치는 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 영향을 조사하였다. Fig. 13에서 보는 바와 같이, 80% 에탄올 추출물 (~100 µg/ml)의 처리에 의해 hERG K⁺ 채널의 활성이 약 20% 정도의 수준으로 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 조건에서 IC₅₀ 예측값은 157.5 µg/ml로 나타났다. 이러한 결과는 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 경우는, positive control인 astemizole에 비교해 볼 때, 심장독성 면에서 안전한 것으로 나타났다. 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 심장독성을 더 확인하기 위해, zebrafish의 심장박동속도 (heart beat rate, HBR)에 미치는 영향을 조사하였다. Zebra fish의 HBR에 미치는 영향을 측정하기 위해, 수정후 3일이 경과된 embryo를 이용하여 30초 동안 현미경하에서 심장박동 수를 측정하였다. Zebra fish embryo는 수정 후 3일이 경과하면, 대부분의 장기형성이 완료되며 현미경하에도 많은 장기들의 형태 관찰이 가능해진다. 심장독성 측정을 위한 positive control인 astemizole의 경우는 HBR을 50% 감소시키는 농도가 100 µM (45.86 µg/ml)로 확인되었다. 동일한 조건에서 황금찰수수 80% 에탄올 추출물은 100 µg/ml 농도에서도 zebra fish HBR에 대해 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Table 3). 이러한 결과는 80% 에탄올 추출물이 심장독성을 지니고 있지 않음을 보여준다.

황금찰수수의 급성독성을 ICR 마우스를 사용하여 조사하기 위해, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물을 14일 동안 1000 mg/kg의 수준으로 경구투여하였다. 그 결과, Table 4에서 나타난 바와 같이 독성이 전혀 관찰되지 않았다. 아울러 체중의 변화도 정상 수준으로 나타났다 (Fig. 14). 부검결과에서도 전혀 병리적인 이상이 관찰되지 않았다. 이러한 실험결과들을 통해 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물에는 급성독성이 없음을 확인하였다.

또한 황금찰수수 80% 에탄올 추출물에 돌연변이를 유발할 수 있는 돌연변이원의 활성이 있는지를 조사하기 위해, bacterial reverse mutation (Ames) test를 수행하였다. 실험을 위해서, *Salmonella typhimurium* 유래 두 균주를 사용하였다. *S. typhimurium* TA98 (frame-shift mutation) 및 *S. typhimurium* TA100 (base-pair substitution) 균주들을 사용하여 reverse mutation의 비율을 control vehicle인 DMSO와 비교하였다. 이때 metabolic activation을 유도하기 위해, rat 유래 간

추출물인 S9 mixture를 이용하였다. **Table 5** 및 **Fig. 15**에서 보는 바와 같이, 80% 에탄올 추출물 (5000 µg/pate)은 vehicle control인 DMSO에 비해 TA98 균주 (histidine 영양요구주)의 reverse mutation 비율을 S9 mixture의 비존재 혹은 존재 하에서 각각 1.6-fold 및 3.4-fold 증가시키는 것으로 나타났다. 동일한 조건에서 TA100 균주 (histidine 영양요구주)의 경우는 S9 mixture의 비존재 혹은 존재 하에서 reverse mutation 비율을 vehicle control인 DMSO에 비해 각각 1.0배 및 1.1배 증가시키는 것으로 나타났다. 이에 반해, positive controls의 경우에는 reverse mutation 비율을 약 5배~8배 정도 증가시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 근거로 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물은 bacterial reverse mutation을 유발시키는 돌연변이능이 없음을 확인하였다.

한편, 염색체에 이상 (chromosomal gap, breakage 및 exchange)을 일으키는 활성 (clastogenicity)이 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물에 있는지를 조사하였다. 이 실험에는 clastogens에 대해 매우 감수성이 높은 CHO-K1 세포를 사용하였으며, 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물을 10~50 µg/ml의 농도범위에서 측정하였다. **Table 6**에서 보는 바와 같이, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물에는 S9 mixture의 존재 유무에 관계없이 염색체에 이상을 일으키는 활성이 전혀 확인되지 않았다. 이에 반해, positive controls인 mytomyacin C 혹은 cyclophosphamide의 경우는 염색체의 이상을 높은 수준 (>10%)으로 일으킬 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 황금찰수수의 에탄올 추출물에는 염색체 이상을 일으키는 활성이 없음을 확인하였다.

또한 in vitro micronucleus assay를 이용하여, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물에 DNA 손상 및 유사분열 억제능이 존재하는지를 조사하였다. **Table 7**에서 보는 바와 같이, 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물은 10~50 µg/ml의 농도범위에서 micronucleus를 생성시키지 않는 것으로 나타났다. 동일한 조건에서 positive controls인 mytomyacin C 및 cyclophosphamide의 경우는 micronucleus를 생성시켰다. 이러한 결과는, mytomyacin C 및 cyclophosphamide와는 달리, 황금찰수수 유래 에탄올 추출물은 micronucleus 생성능이 없음을 확인해 준다.

결과적으로 이상의 연구결과들은 황금찰수수 유래 80% 에탄올 추출물은 심장독성, 급성독성, 돌연변이 유발능, DNA 독성 및 유사분열 억제능 면에서 안전함을 나타낸다.

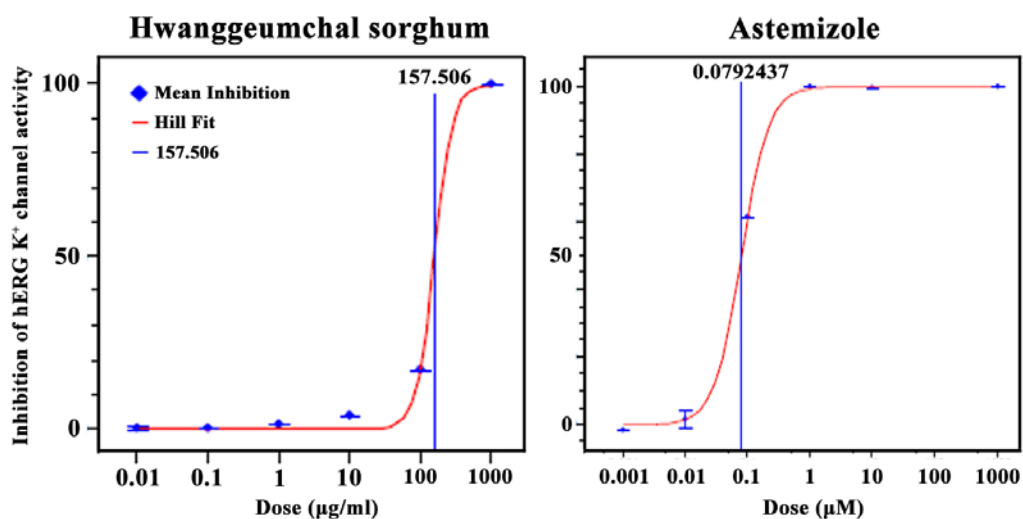


Fig. 13. IC₅₀ values of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains and astemizole calculated by patch clamp assay.

Table 3. Cardiac toxicity of the 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains in zebrafish.

Name	Heart beat rate (%)
Control	100 ± 6.9
Astemizole 100 µM	50
EtOH extracts 10 µg/ml	102.6 ± 7.0
EtOH extracts 100 µg/ml	103.5 ± 5.5

Table 4. Acute toxicity test of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains using ICR mice.

Type		Dose	Percentage
Control	Male	-	0 (0/3)
	Female	-	0 (0/3)
Test group	Male	1000 mg/kg	0 (0/3)
	Female	1000 mg/kg	0 (0/3)

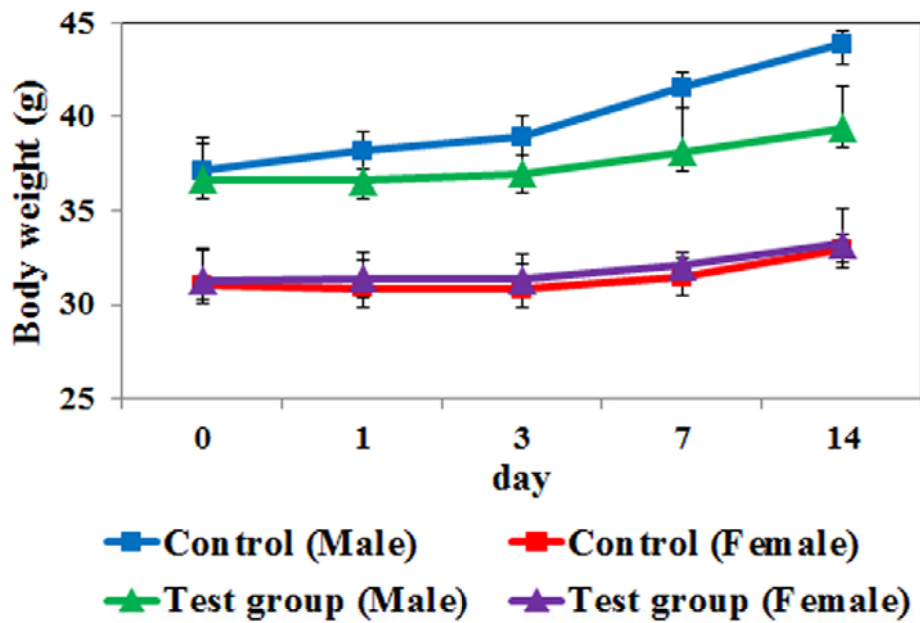


Fig. 14. Changes in the body weight following feeding of 80% ethanol extract of hwanggeumchal sorghum grains.

Table 5. Result obtained from bacterial reverse mutation assay.

Test Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies/plate(Mean) [Factor] [*]	
			Without S-9 mix	With S-9 mix
TA-98	Vehicle Control	0	31 \pm 2	32 \pm 4
	EtOH extracts	5000	50 \pm 9 [1.6]	108 \pm 11 [3.4]
TA-100	Vehicle Control	0	118 \pm 6	130 \pm 4
	EtOH extracts	5000	115 \pm 10 [1.0]	142 \pm 10 [1.1]
Positive control				
TA-98	2-NF	1	252 \pm 8 [8.1]	
TA-98	B.P	2		254 \pm 17 [7.9]
TA-100	S.A	1	768 \pm 13 [6.5]	
TA-100	B.P	2		730 \pm 14 [5.6]

* No. of revertant colonies of treated plate / No. of revertant colonies of vehicle control plate.

S.A, Sodium azide; 2-NF, 2-nitrofluorene; B.P, Benzopyrene.

Test item, 80% ethanol extract; vehicle controls, dimethylsulfoxide (DMSO)

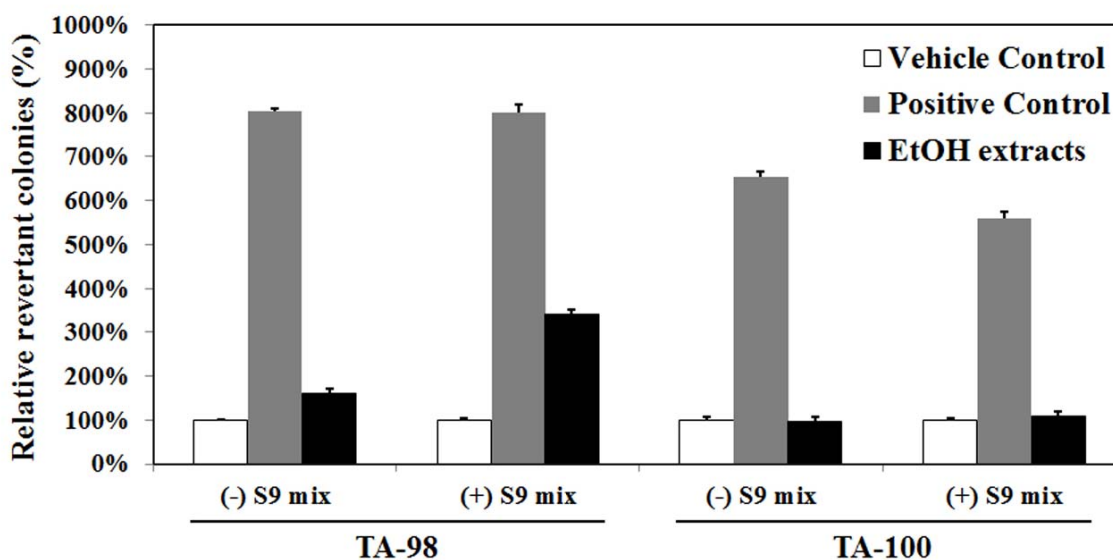


Fig. 15. Relative revertant ratio (%) measured by bacterial reverse mutation assay.

Table 6. Results obtained from chromosomal aberration assay (%).

Treatment		without S-9 Mix	with S-9 Mix
Blank		0	0
Positive control	Mitomycin C	10.00	-
	Cyclophosphamide	-	13.33
EtOH extracts	10 µg/ml	0	0
	30 µg/ml	0	0
	50 µg/ml	0	0

Table 7. Percentage (%) of micronucleus formation.

Treatment		without S-9 Mix	with S-9 Mix
Blank		0.33 ± 0.02	0.88 ± 0.07
Positive control	Mitomycin C	26.70 ± 7.29	-
	Cyclophosphamide	-	29.50 ± 6.47
EtOH extracts	10 µg/ml	0.56 ± 0.36	1.48 ± 0.90
	30 µg/ml	1.54 ± 0.33	2.25 ± 0.84
	50 µg/ml	1.36 ± 0.86	1.98 ± 0.65

사. Rat carotid artery Balloon-injury 모델을 이용한 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 항혈전 및 혈관 재협착 (restenosis) 억제효능 조사

협심증 혹은 심근경색증 환자에 널리 이용되는 관동맥 풍선성형술(PTCA)은 단기간 내에 정상인 혈류를 회복시켜주기 때문에 환자의 증상을 효율적으로 치료하는 방법이다. 그러나 PTCA시술의 장기적인 합병증으로 혈관내강이 다시 좁아져 증상이 재발하는 것을 혈관 재협착(restenosis)이라 한다. 이처럼 신생 평활근세포에 의해 혈관 재협착이 발생할 경우에는 협심증이 재발하여 재시술이 필요하게 되므로 재협착(restenosis)을 예방 및 치료할 수 있는 약제 혹은 대체수단의 개발은 현대 인류복지를 위하여 매우 중요한 과제라 할 수 있다. 혈액응고 기전에 있어서 중요한 역할을 담당하는 트롬빈이 이러한 PTCA시술 후의 혈전형성 및 평활근세포 증식에 중요한 매개체가 된다고 알려져 있다.

본 연구를 통해 황금찰수수는 트롬빈에 의해 매개되는 혈액응고 기전을 매우 효과적으로 저해함을 확인하였으므로, rat carotid artery Balloon-injury 모델을 이용하여 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물이 in vivo조건에서 혈관 재협착을 저해할 수 있는지 조사하였다. 이를 위해 rats을 대상으로 BI 시술 3일전부터 BI 시술 14일 후까지, 80% 에탄올 추출물을 600 mg/kg 혹은 1200 mg/kg 수준으로 경구투여 하였으며, 혈관 내 재협착의 유무를 검정하기 위해 H&E staining를 실시하였으며, 아울러 80% 에탄올 추출물의 경구투여에 의해 rats의 혈액의 응고시간이 연장되어지는지 유무를 TT, APTT 및 PT 분석을 통해 확인하였다.

Fig. 16에서 보는 바와 같이, 80% 에탄올 추출물을 1200 mg/kg 수준으로 17일간 경구투여 하였을 경우, rats의 혈액으로부터 얻은 혈장의 TT, APTT, 및 PT 값은, control rats의 혈장에 비해, 각각 2.1배 2.0배 및 1.7배 연장되는 것으로 나타났다. 특히 에탄올 추출물을 600 mg/kg 수준으로 경구투여한 rats의 혈장의 경우, APTT 값이 2.0배 연장되었고, PT 값은 1.4배 연장되는 것으로 나타났다. 이러한 in vivo 실험의 결과는 80% 에탄올 추출물의 경구투여에 의해 rats의 혈액의 내인성 및 외인성 혈액응고기전이 모두 연장됨을 나타낸다.

아울러 **Fig. 17**에서 보는 바와 같이, 17일간의 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물의 경구투여 (600 mg/kg 혹은 1200 mg/kg)는 balloon injury에 의해 유도되는 평활근세포의 증식에 의한 혈관 내강의 협착을 매우 효과적으로 저해하는 것으로 나타났다.

결과적으로 이와 같은 실험 결과들은, 황금찰수수의 80% 에탄올추출물의 경구투여가 balloon injury에 의해 유도되는 평활근의 신생을 저해할 수 있음을 보여주는 것이다. 또한 이러한 저해활성은 혈관손상부위에 일어나는 초기 혈전의 침착 (initial thrombus deposit)이 황금찰수수 유래 유효성분에 의해 억제되기 때문일 수 있을 것이다 (Kageyama S. et al., 2000). 따라서 본연구결과는 황금찰수수의 80% 에탄올 추출물이 혈전증 및 PTCA시술 후 수반되는 혈관 재협착 (restenosis)착을 예방하거나 치료하는 소재가 될 수 있음을 시사해 준다.

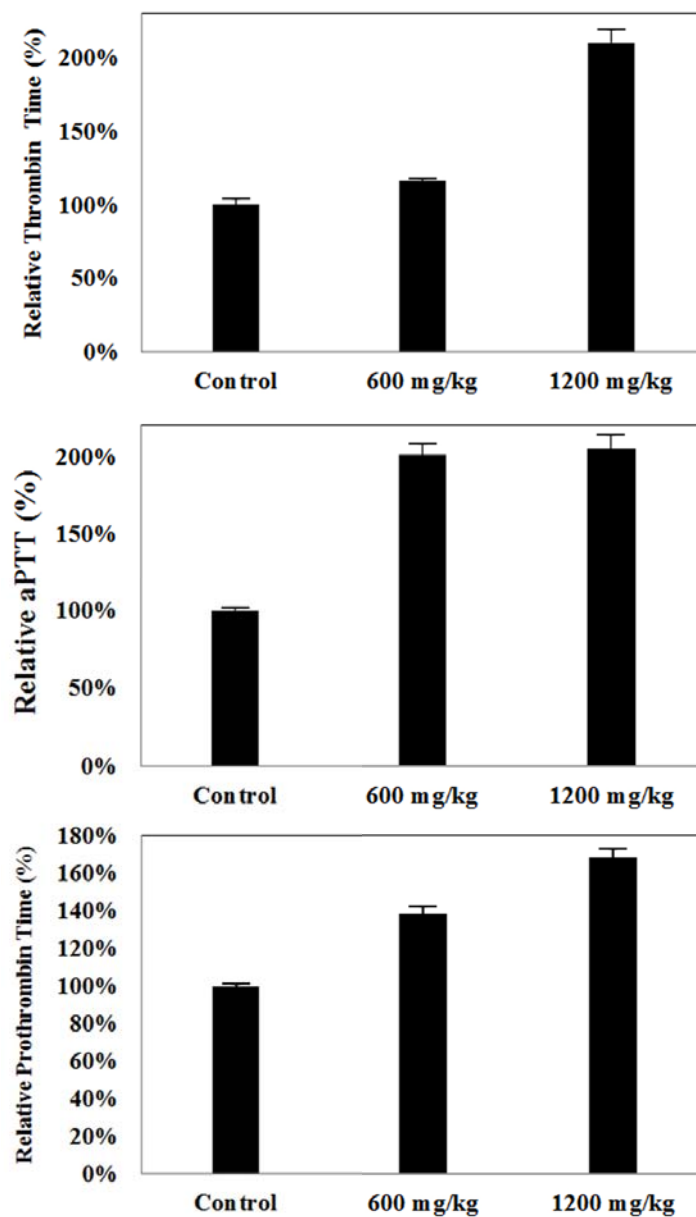


Fig. 16. Anticoagulation activity of the plasma from rats given DMSO or the 80% ethanol extracts of hwanggeumchal sorghum grains (600 mg/kg or 1200 mg/kg per day), from 3 days before to 14 days after BI.

Balloon injury

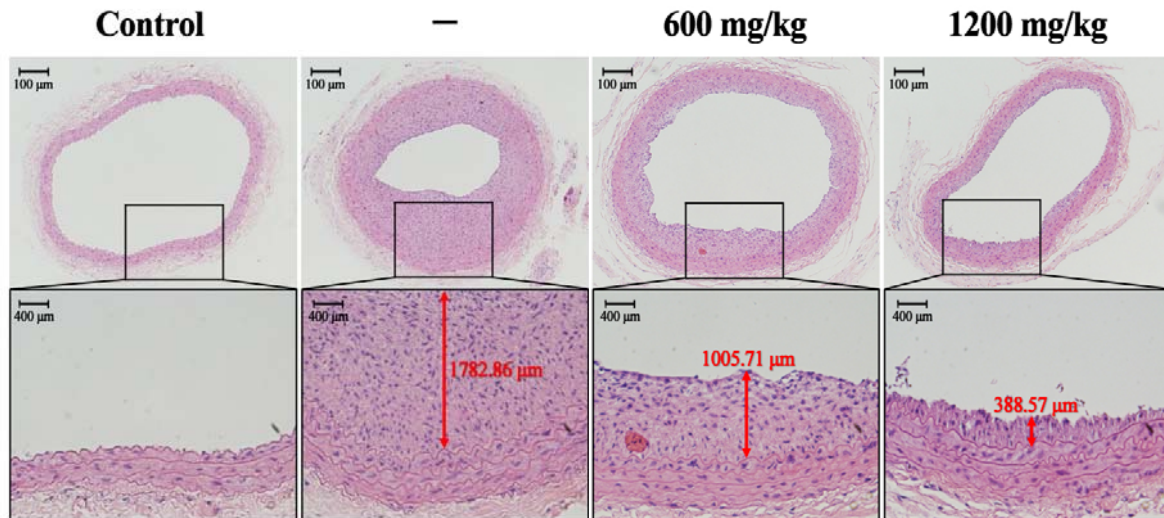


Fig. 17. Representative photomicrographs of cross-sections of uninjured (con) and balloon injury-induced reendothelialization in carotid arteries of rats given DMSO or the 80% ethanol extracts of hwanggeumchal sorghum grains, 600 and 1200 mg/kg per day, from 3 days before to 14 days after BI.

아. 황금찰수수 에탄올 추출물의 콜라겐 (collagen)과 에피네프린 (epinephrine)에 의한 폐색전 (pulmonary thrombosis) 유발 저해 효과 조사

실험적 혈전의 유도는 DiMinno의 실험방법 (DiMinno and Silver, 1983)에 준하여 0.8 mg/kg의 collagen (sigma)과 60 µg/kg의 epinephrine (sigma)을 조제하여 C57BL6 마우스 미정맥에 주사하였고, 혈소판 응집 시약의 투여로 발생하는 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물 숫자의 백분율로 계산하였다. **Table 8**에서 보는 바와 같이 DMSO를 경구투여한 negative control 그룹은 9마리 중 7마리가 죽음에 이르러 22.2% 저해효과를 나타냈다. 그러나 황금찰수수 80% 에탄올 추출물 600 mg/kg을 경구투여한 그룹은 6마리 중 3마리가 마비 또는 죽음에 이르러 50% 저해효과를 나타냈으며 황금찰수수 80% 에탄올 추출물 1200 mg/kg을 투여한 그룹은 8마리 중 3마리가 마비 또는 죽음에 이르러 62.5%의 저해효과를 나타내었다. 이는 positive control인 aspirin 100 mg/kg을 경구투여한 그룹에서 4마리 중 2마리가 죽어 50%의 저해효과를 보인 것과 비교하였을 때, 황금찰수수 80% 에탄올 추출물이 콜라겐과 에피네프린 투여에 의한 폐색전 유발을 더 잘 저해함을 알 수 있었다.

Table 8. Protection of mice from thrombotic challenge

Treatment		No. of killed or paralyzed / No. of tested	Protection (%)
Control (DMSO)		7 / 9	22.2%
Aspirin (100 mg/kg)		2 / 4	50.0%
hwanggeumchal sorghum grains	600 mg/kg	3 / 6	50.0%
	1200 mg/kg	3 / 8	62.5%

자. 황금찰수수 95% 에탄올 추출물 유래의 유기용매 추출물로부터 유효 바이오 소재의 분리

앞서 1차년도에 제 2 협동 과제에서 분리한 황금찰수수 95% 에탄올 추출물의 각 유기용매 분획을 chromatography 하여 hexane 36개, methylene chloride 52개, ethyl acetate 28개, n-butanol 18개의 분획으로 분리하였다(Table 9, 10, 11, 12). 분획한 각 시료를 대상으로 Thrombin Time (TT) Assay를 시행하였다. 유기용매 별 분획 보다 더 정제된 시료이기 때문에 활성 측정 시 시료농도를 낮게 조정하여 48 µg/ml으로 실험하였다. Control로는 이전과 마찬가지로 negative control로 DMSO를, positive control로 Aspirin 360 µg/ml, 480 µg/ml을 사용하였다. 측정 시료의 농도와 맞추어 Aspirin 12, 24, 48 µg/ml도 추가하여 실시하였다.

Table 9. List of hexane fractions

No.	Fraction	Total	No.	Fraction	Total
1	수수 Hexane Fraction A	10 mg	19	수수 Hexane Fraction S	10 mg
2	수수 Hexane Fraction B	10 mg	20	수수 Hexane Fraction T	20 mg
3	수수 Hexane Fraction C	10 mg	21	수수 Hexane Fraction U	10 mg
4	수수 Hexane Fraction D	10 mg	22	수수 Hexane Fraction V	10 mg
5	수수 Hexane Fraction E	10 mg	23	수수 Hexane Fraction W	20 mg
6	수수 Hexane Fraction F	10 mg	24	수수 Hexane Fraction X	30 mg
7	수수 Hexane Fraction G	10 mg	25	수수 Hexane Fraction Y	20 mg
8	수수 Hexane Fraction H	10 mg	26	수수 Hexane Fraction Z	10 mg
9	수수 Hexane Fraction I	10 mg	27	수수 Hexane Fraction AA	5 mg
10	수수 Hexane Fraction J	20 mg	28	수수 Hexane Fraction AB	10 mg
11	수수 Hexane Fraction K	10 mg	29	수수 Hexane Fraction AC	10 mg
12	수수 Hexane Fraction L	20 mg	30	수수 Hexane Fraction AD	10 mg
13	수수 Hexane Fraction M	20 mg	31	수수 Hexane Fraction AE	10 mg
14	수수 Hexane Fraction N	10 mg	32	수수 Hexane Fraction AF	10 mg
15	수수 Hexane Fraction O	20 mg	33	수수 Hexane Fraction AG	10 mg
16	수수 Hexane Fraction P	20 mg	34	수수 Hexane Fraction AH	10 mg
17	수수 Hexane Fraction Q	10 mg	35	수수 Hexane Fraction AI	10 mg
18	수수 Hexane Fraction R	20 mg	36	수수 Hexane Fraction AJ	10 mg

Table 10. List of methylene chloride fractions

No.	Fraction	Total	No.	Fraction	Total
1	수수 M.C Fraction A	10 mg	27	수수 M.C Fraction AA	10 mg
2	수수 M.C Fraction B	10 mg	28	수수 M.C Fraction AB	10 mg
3	수수 M.C Fraction C	10 mg	29	수수 M.C Fraction AC	10 mg
4	수수 M.C Fraction D	10 mg	30	수수 M.C Fraction AD	10 mg
5	수수 M.C Fraction E	10 mg	31	수수 M.C Fraction AE	10 mg
6	수수 M.C Fraction F	10 mg	32	수수 M.C Fraction AF	10 mg
7	수수 M.C Fraction G	10 mg	33	수수 M.C Fraction AG	10 mg
8	수수 M.C Fraction H	10 mg	34	수수 M.C Fraction AH	10 mg
9	수수 M.C Fraction I	10 mg	35	수수 M.C Fraction AI	10 mg
10	수수 M.C Fraction J	10 mg	36	수수 M.C Fraction AK	10 mg
11	수수 M.C Fraction K	10 mg	37	수수 M.C Fraction AL	10 mg
12	수수 M.C Fraction L	10 mg	38	수수 M.C Fraction AM	10 mg
13	수수 M.C Fraction M	10 mg	39	수수 M.C Fraction AN	10 mg
14	수수 M.C Fraction N	10 mg	40	수수 M.C Fraction AO	10 mg
15	수수 M.C Fraction O	10 mg	41	수수 M.C Fraction AP	10 mg
16	수수 M.C Fraction P	10 mg	42	수수 M.C Fraction AQ	10 mg
17	수수 M.C Fraction Q	10 mg	43	수수 M.C Fraction AR	10 mg
18	수수 M.C Fraction R	10 mg	44	수수 M.C Fraction AS	10 mg
19	수수 M.C Fraction S	10 mg	45	수수 M.C Fraction AT	10 mg
20	수수 M.C Fraction T	10 mg	46	수수 M.C Fraction AU	10 mg
21	수수 M.C Fraction U	10 mg	47	수수 M.C Fraction AV	10 mg
22	수수 M.C Fraction V	10 mg	48	수수 M.C Fraction AW	10 mg
23	수수 M.C Fraction W	10 mg	49	수수 M.C Fraction AX	10 mg
24	수수 M.C Fraction X	10 mg	50	수수 M.C Fraction AZ	10 mg
25	수수 M.C Fraction Y	10 mg	51	수수 M.C Fraction BA	10 mg
26	수수 M.C Fraction Z	10 mg	52	수수 M.C Fraction BB	10 mg

Table 11. List of ethyl acetate fractions

No.	Fraction	Total	No.	Fraction	Total
1	수수 EtOAc Fraction A	10 mg	15	수수 EtOAc Fraction T	10 mg
2	수수 EtOAc Fraction B	10 mg	16	수수 EtOAc Fraction U	10 mg
3	수수 EtOAc Fraction C	10 mg	17	수수 EtOAc Fraction V	10 mg
4	수수 EtOAc Fraction E	10 mg	18	수수 EtOAc Fraction W	10 mg
5	수수 EtOAc Fraction F	10 mg	19	수수 EtOAc Fraction X	10 mg
6	수수 EtOAc Fraction G	10 mg	20	수수 EtOAc Fraction Y	10 mg
7	수수 EtOAc Fraction H	10 mg	21	수수 EtOAc Fraction Z	10 mg
8	수수 EtOAc Fraction M	10 mg	22	수수 EtOAc Fraction AA	10 mg
9	수수 EtOAc Fraction N	10 mg	23	수수 EtOAc Fraction AB	10 mg

10	수수 EtOAc Fraction O	10 mg	24	수수 EtOAc Fraction AC	10 mg
11	수수 EtOAc Fraction P	10 mg	25	수수 EtOAc Fraction AD	10 mg
12	수수 EtOAc Fraction Q	10 mg	26	수수 EtOAc Fraction AE	10 mg
13	수수 EtOAc Fraction R	10 mg	27	수수 EtOAc Fraction AF	10 mg
14	수수 EtOAc Fraction S	10 mg	28	수수 EtOAc Fraction AG	10 mg

Table 12. List of n-butanol fractions

No.	Fraction	Total	No.	Fraction	Total
1	수수 BuOH Fraction A	10 mg	10	수수 BuOH Fraction K	10 mg
2	수수 BuOH Fraction B	10 mg	11	수수 BuOH Fraction L	10 mg
3	수수 BuOH Fraction C	10 mg	12	수수 BuOH Fraction M	10 mg
4	수수 BuOH Fraction D	10 mg	13	수수 BuOH Fraction N	10 mg
5	수수 BuOH Fraction E	10 mg	14	수수 BuOH Fraction O	10 mg
6	수수 BuOH Fraction F	10 mg	15	수수 BuOH Fraction P	10 mg
7	수수 BuOH Fraction G	10 mg	16	수수 BuOH Fraction Q	10 mg
8	수수 BuOH Fraction H	10 mg	17	수수 BuOH Fraction R	10 mg
9	수수 BuOH Fraction J	10 mg	18	수수 BuOH Fraction S	10 mg

먼저, hexane fractions의 농도를 48 $\mu\text{g/ml}$ 로 맞추어 실험을 수행 한 결과, **Fig 18**에서 보는 바와 같이 전반적으로 높은 활성도를 나타내었다. 특히 D~N, Q, S~AC, AH~AJ 구간에서 높은 활성을 보였다. 정확한 결과를 도출해내기 위해 농도를 낮추어 실험을 시행해볼 필요가 있었다. 앞의 실험들을 참고하여 12 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 Thrombin Time (TT) Assay 를 한 결과 D~K, Q~T, Y~AC, AH~AJ 구간에서 다소 높은 활성을 보였다. 농도 의존적 패턴을 파악하고 좀 더 확실한 구간을 찾아내기 위해 중간 농도인 24 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 실험을 추가 시행해 보았다. D~K, N, Q, U, Y~AB 구간에서 눈에 띄는 활성도를 나타내었다.

다음으로 methylene chloride fractions의 농도도 위와 동일하게 48 $\mu\text{g/ml}$ 로 맞추어 Thrombin Time (TT) Assay를 시행해 보았다. **Fig 19**에서 보는 바와 같이 I~P, W~AC, AE~AK, AO~BB 구간에서 높은 활성을 보였다. 특히 높은 활성을 보인 X, AE, AP, AZ, BB fraction의 농도를 낮추어 12, 24 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 실험을 시행해 보았으며, 전반적으로 농도 의존적인 패턴을 보였다.

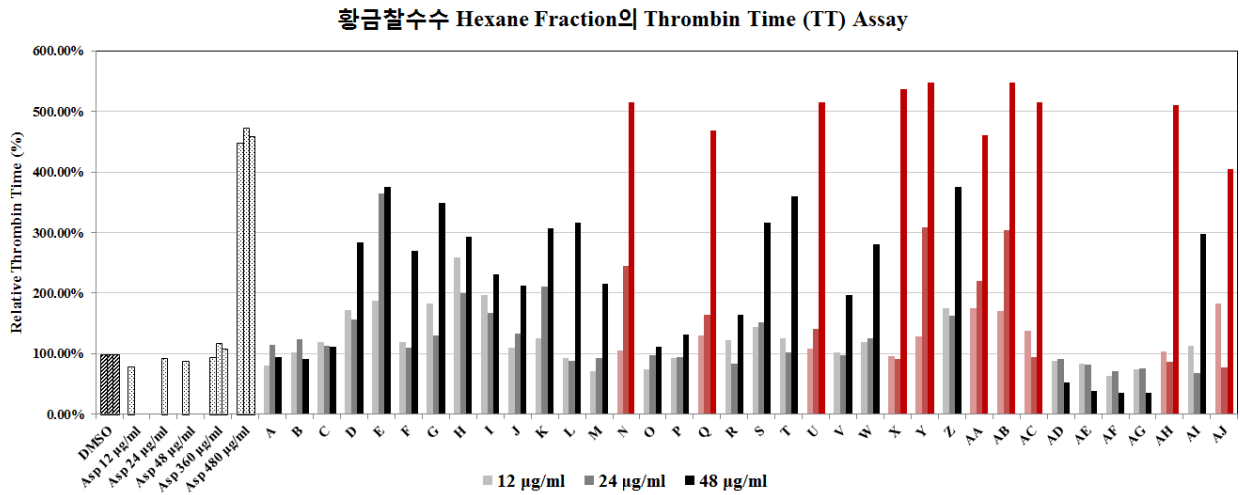


Fig. 18. Thrombin inhibition activity of hexane fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

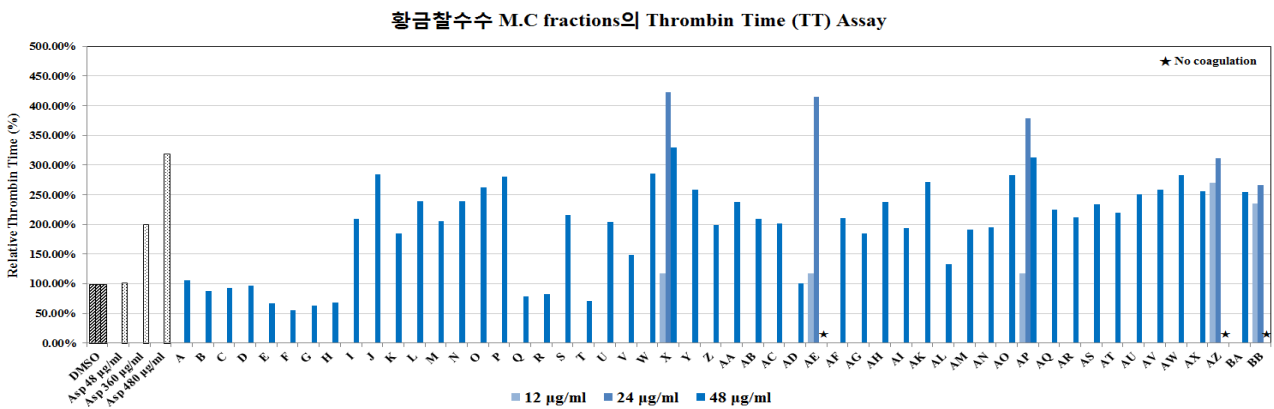


Fig. 19. Thrombin inhibition activity of methylene chloride fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

Ethyl acetate fractions 또한 48 µg/ml 농도로 Thrombin Time (TT) Assay를 시행해 보았을 때, Fig. 20 의 C, F~M, O~R, V~AC 구간에서 비교적 높은 활성을 보였다. Positive control인 aspirin 480 µg/ml의 활성과 비교하여 보았을 때 이와 유사하거나 더 높은 활성을 나타내는 C, F, G, O, P, Q, R, V, W, X, Y, Z, AA, AB, AC fraction의 농도를 낮추어 12, 24 µg/ml 농도에서 같은 방법으로 활성을 확인한 결과 동일하게 활성이 농도 의존적이었다.

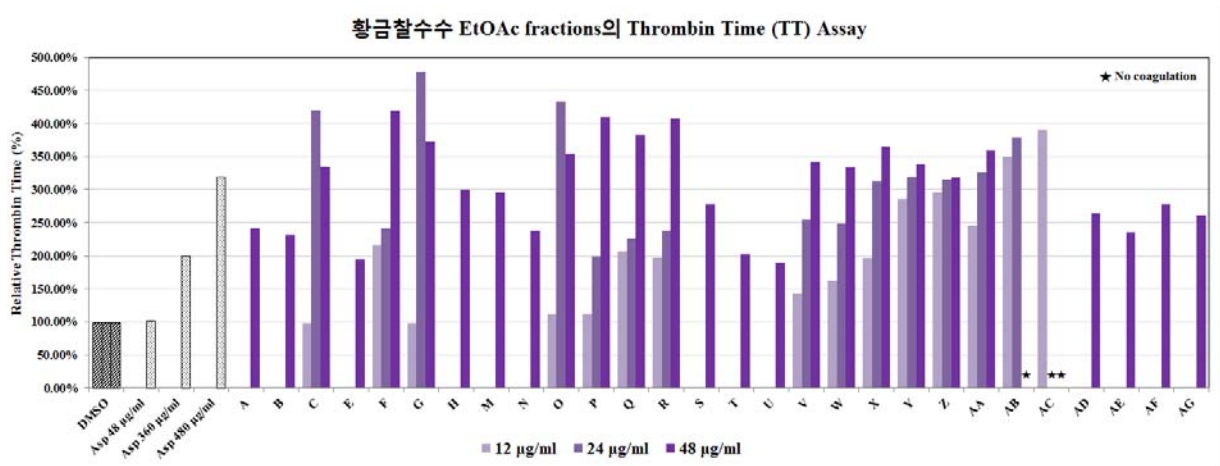


Fig. 20. Thrombin inhibition activity of ethyl acetate fractions from hwangeumchal sorghum grains.

n-Butanol fractions를 48 µg/ml 농도로 Thrombin Time (TT) Assay를 시행했을 때, Fig. 21 의 E, L~R 구간에서 positive control인 aspirin 480 µg/ml의 활성과 대등하거나 월등한 양상을 보였다. 같은 방식으로 12, 24 µg/ml 농도로 활성을 재측정 해보았을 때 농도 의존적인 패턴을 확인할 수 있었다.

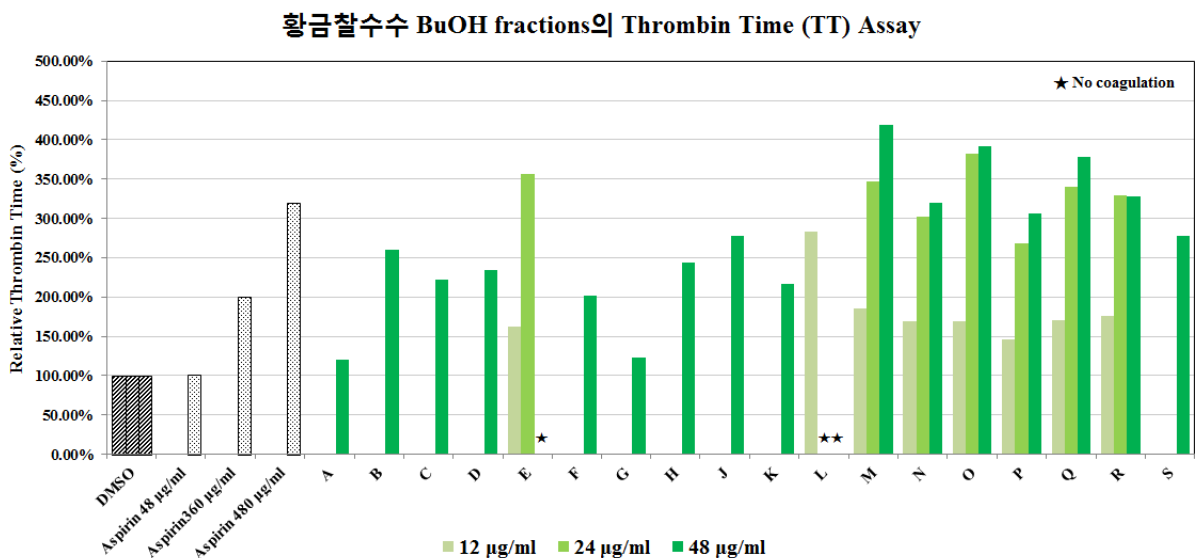


Fig. 21. Thrombin inhibition activity of n-butanol fractions from hwangeumchal sorghum grains.

항혈전 활성을 살펴보기 위해 트롬빈 활성 저해 실험뿐만 아니라, 내인성 손상에 관련된 activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Assay와 외인성 손상에 관련된 Prothrombin Time (PT) Assay를 수행하였다. 두 가지 실험을 통해 수수 유래 물질이 혈액 응고 반응의 상위 단계를 저해하는지를 확인할 수 있었다.

APTT Assay의 경우, 먼저 황금찰수수 95% 에탄올 추출물과 각 유기용매 분획의 활성을 측정해 보았다. Fig. 22에서 보는 바와 같이, 시료의 농도는 625 µg/ml로 맞추었으며, negative control은 DMSO, positive control은 warfarin 3.125 µg/ml을 사용하였다. positive control의 경우 사전에 다양한 농도로 Assay를 수행해 본 결과 위의 농도에서 TT Assay의 aspirin 480 µg/ml 활성과 비슷하게 나타났기 때문에 결정하게 되었다. warfarin은 알려진 대로 APTT를 negative control인 DMSO보다 2배정도 연장시키는 것을 볼 수 있으나, 나머지 유기용매 분획들에서는 그렇지 않음을 알 수 있었다. 모두 negative control인 DMSO의 활성과 비슷한 정도만을 보여주었다.

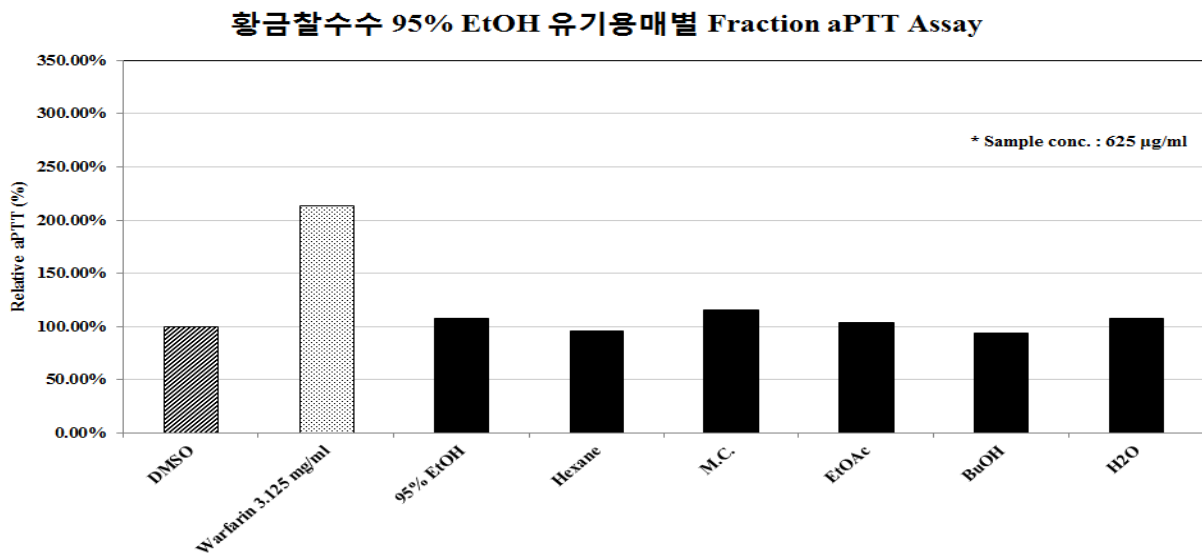


Fig. 22. Thromboplastin inhibition activity of the various organic solvent extracts from hwanggeumchal sorghum grains.

더 나아가 각 유기용매 fractions에서 chromatography하여 분획한 샘플들을 추가로 모두 APTT Assay 수행해 보았다. Fig. 23, 24, 25, 26에서 보는 바와 같이, hexane fractions의 경우 A, K, P~S, Y~AC, AG~AJ에서, methylene chloride fractions의 경우에는 I, N~O, AM~AQ, AU~AV, AX

에서 비교적 높은 활성을 보여주었다. 뿐만 아니라 ethyl acetate fractions은 E, G, W~X, AA에서, n-butanol fractions은 B, D에서 약하지만 약간의 활성능을 나타내었다.

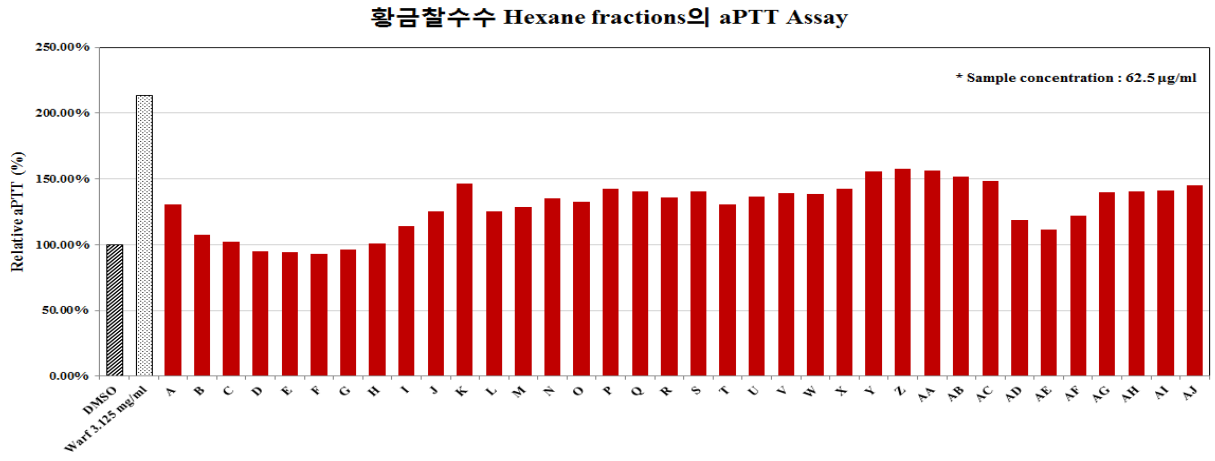


Fig. 23. Thromboplastin inhibition activity of hexane fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

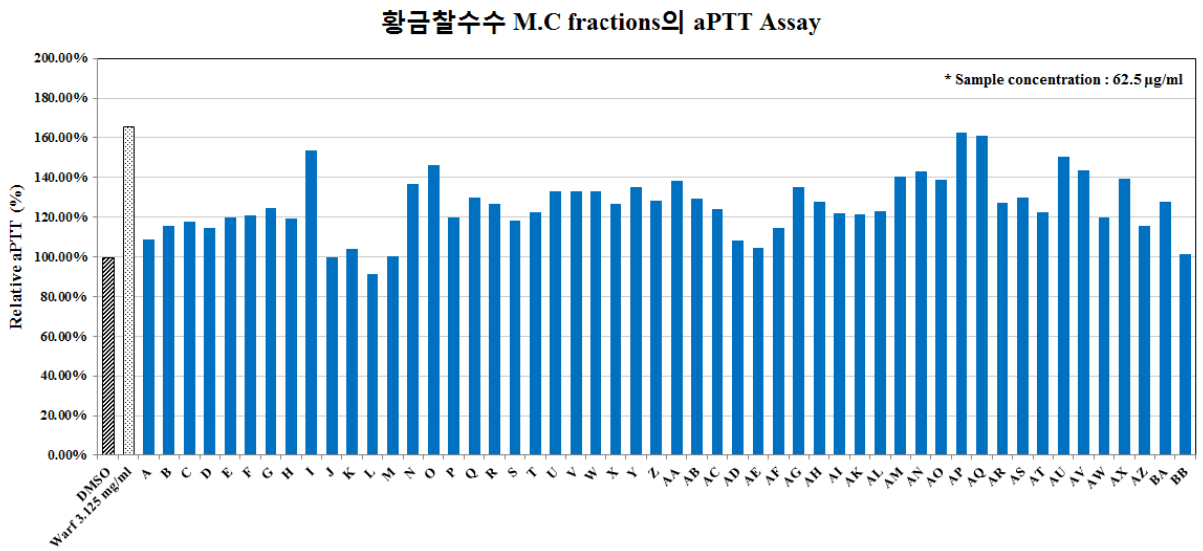


Fig. 24. Thromboplastin inhibition activity of methylene chloride fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

황금찰수수 EtOAc fractions의 aPTT Assay

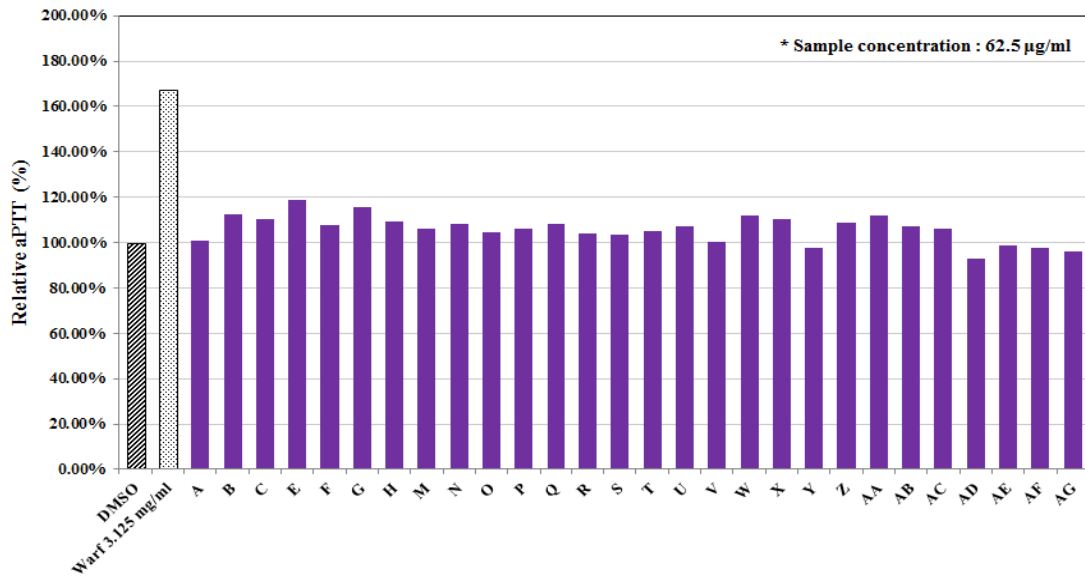


Fig. 25. Thromboplastin inhibition activity of ethyl acetate fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

황금찰수수 BuOH fractions의 aPTT Assay

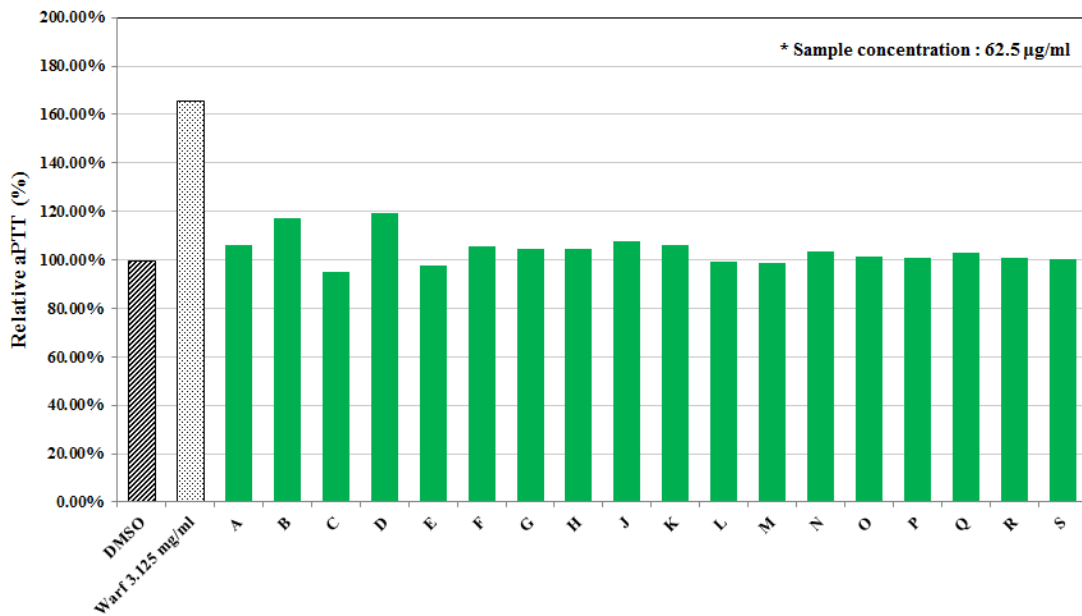


Fig. 26. Thromboplastin inhibition activity of n-butanol fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

PT Assay의 경우에도 위와 동일하게 황금찰수수 95% 에탄올 추출물과 각 유기용매 분획의 활성을 먼저 측정해 보았다. **Fig. 27**에서 보는 바와 같이, 시료의 농도는 같은 방법으로 625 μ g/ml로 하여 실험하였으며, negative control은 DMSO, positive control은 warfarin 3.125 μ g/ml을 동일하게 사용하였다. APTT Assay와 마찬가지로 유기용매별 분획의 활성을 측정했을 때에는 negative control인 DMSO와 비슷한 활성능만을 보여주었다. 이 역시 각 유기용매 fractions를 chromatography하여 분획한 샘플들을 추가적으로 PT Assay를 측정해 보았다. **Fig. 28, 29, 30, 31**에서 보는 바와 같이, hexane, methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol fractions 모두에서 APTT Assay와 달리 높은 활성을 보이는 분획을 찾을 수 없었다. 따라서 수수 각 유기용매 추출물이 외인성 손상과 관련된 PT Assay에는 영향을 주지 않음을 판단할 수 있었다.

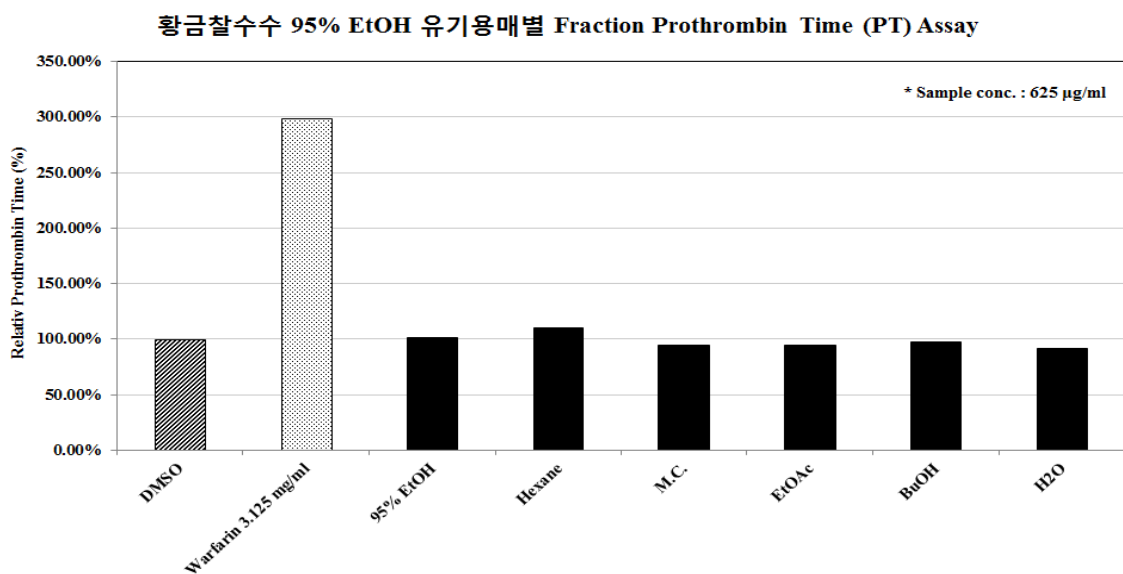


Fig. 27. Prothrombin inhibition activity of the various organic solvent extracts from hwanggeumchal sorghum grains.

황금찰수수 Hexane fractions의 PT Assay

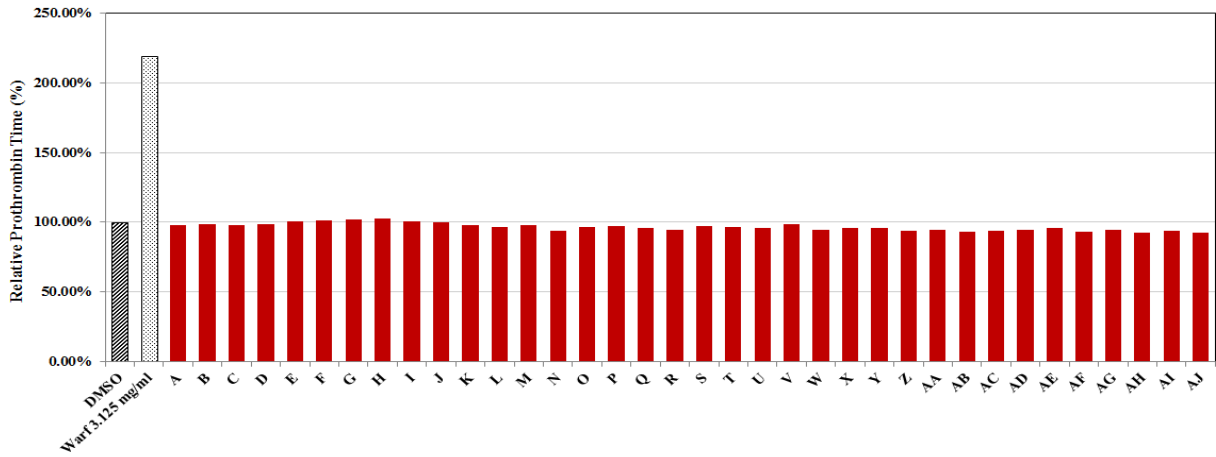


Fig. 28. Prothrombin inhibition activity of hexane fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

황금찰수수 M.C fractions의 PT Assay

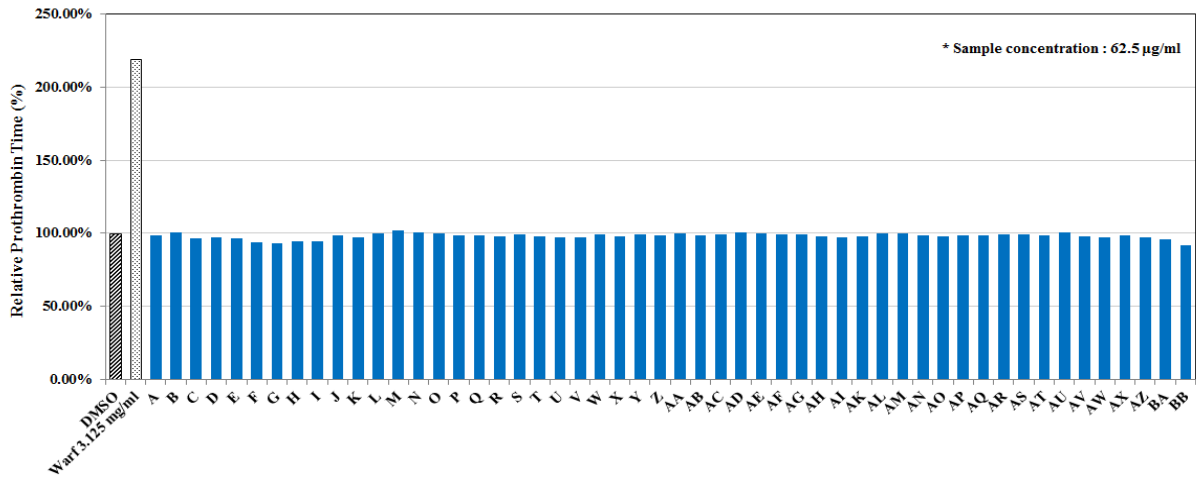


Fig. 29. Prothrombin inhibition activity of methylene chloride fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

황금찰수수 EtOAc fractions의 PT Assay

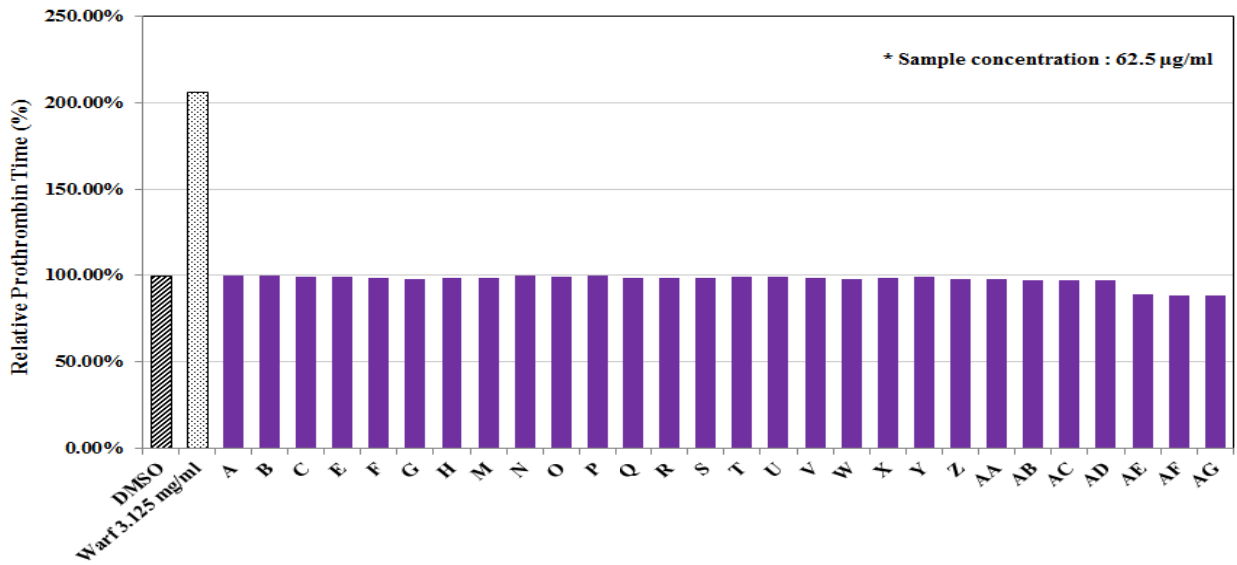


Fig. 30. Prothrombin inhibition activity of ethyl acetate fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

황금찰수수 BuOH fractions의 PT Assay



Fig. 31. Prothrombin inhibition activity of n-butanol fractions from hwanggeumchal sorghum grains.

각 유기용매 fractions의 항혈전 활성을 살펴본 결과, 그 중 마지막 유기용매인 n-butanol fractions를 주의 깊게 살펴볼 필요가 있었다. 제2협동과제와 협의하여 n-butanol fractions 중에서도 높은 활성을 보인 L, M fraction에서 활성물질을 탐색해보기로 하였다. n-butanol fraction L, M에서 한 번 더 분획되어진 subfraction 31개를 제공받았으며 이들 분획들도 동일하게 Thrombin Time (TT) Assay를 시행해보았다. 먼저 sample의 농도를 이전 fractions의 농도와 동일하게 48 $\mu\text{g/ml}$ 으로 맞추어 측정해보았으나 활성이 높게 나타나 12 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 낮추어 다시 실험해보았다 (Fig. 32). 그 결과, n-butanol L, M subfraction 5, 6, 28, 29, 30에서 특히 높은 활성을 보여 농도를 한 번 더 낮춰보기로 하였다. 초기 농도의 1/10인 4.8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 활성을 측정해보았으며 그 결과는 Fig. 33와 같다. 특히 n-butanol L, M subfraction 5, 30은 100배 농도인 aspirin 480 $\mu\text{g/ml}$ 의 활성과 대등한 정도를 보여주어 주목할 필요가 있다.

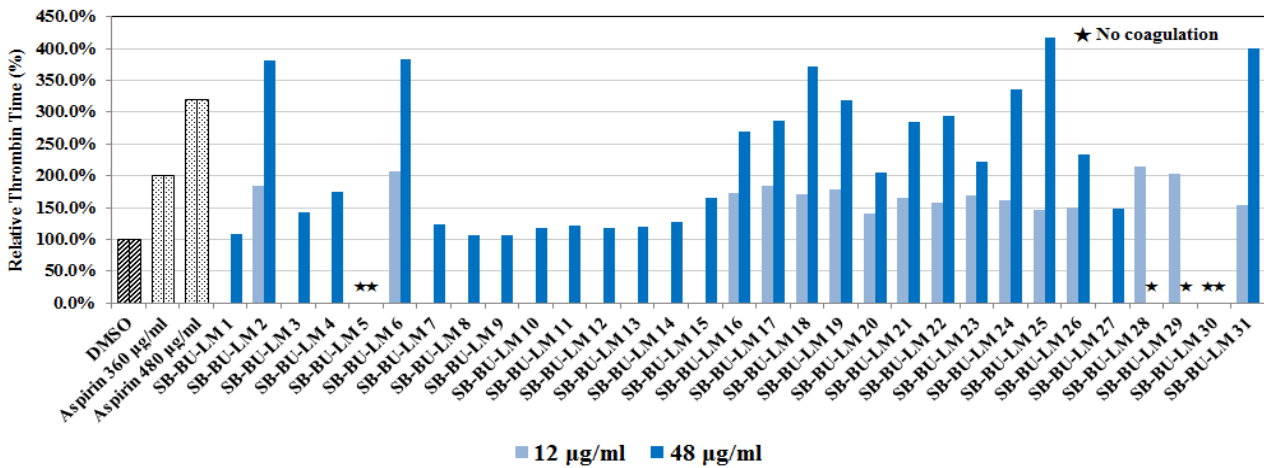


Fig. 32. Thrombin inhibition activity of n-butanol subfractions from hwanggeumchal sorghum grains.

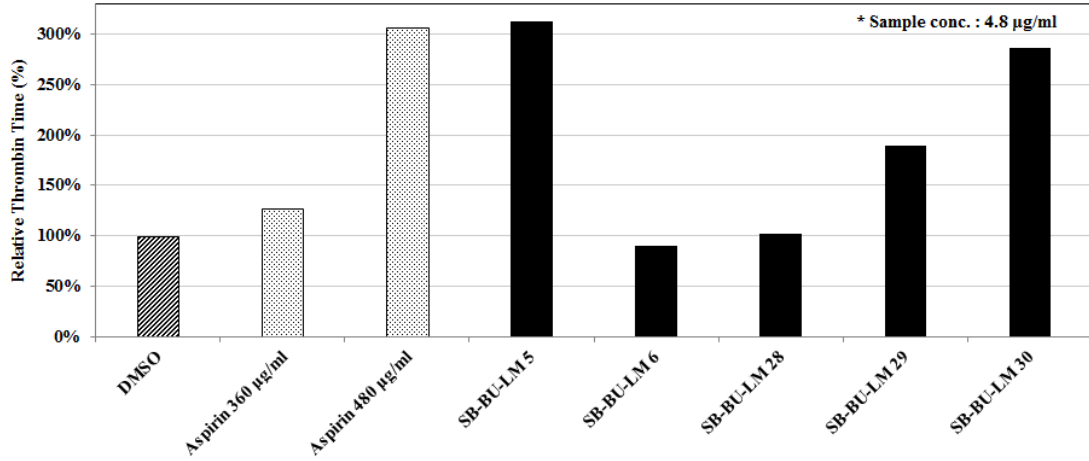


Fig. 33. Thrombin inhibition activity of n-butanol subfractions from hwanggeumchal sorghum grains.

선행 실험을 통해 항혈전 활성이 좋은 각 유기용매 별 분획들을 제2협동과제에 알려주었으며, 유기용매 분획 내에서 몇 가지 유효 후보 단일물질들을 얻을 수 있었다. β -Sitosterol, Oleic acid and Palmitic acid Mixture, Heptacosanol, Quercetin-7-O- β -D-glucoside, SB-Et-AB-04, Quercetin-7-O-glucoside, Octacosanol, Luteolin-7-glucoside, Eriodictyol-7-O-glucoside, Luteolin-3'-O-glucoside를 확보하였고, 위와 동일하게 항혈전 활성을 측정하기 위해 Thrombin Time (TT) Assay를 시행해 보았다. 유기용매 분획의 농도와 동일한 $48 \mu\text{g/ml}$ 으로 실험을 수행해보았고, positive control인 aspirin $480 \mu\text{g/ml}$ 의 활성과 비교했을 때, 대등하거나 우수한 활성능을 보인 단일물질은 농도를 24, $12 \mu\text{g/ml}$ 까지 낮춰서 측정해보았다 (**Fig. 34**). 실험 결과 Oleic acid and Palmitic acid Mixture에서 매우 높은 활성능을 보여 주었으며, 그 외에 Quercetin-7-O-glucoside, Octacosanol, Luteolin-3'-O-glucoside에서 positive control인 aspirin $480 \mu\text{g/ml}$ 과 동일하거나 우수한 활성을 나타냈다. Fatty acid 계열인 Oleic acid와 Palmitic acid는 이미 항혈전 관련 연구가 많이 진행되어 있기 때문에, 이외 3가지 단일물질에 초점을 맞춰볼 필요가 있었다.

수수에서 분리된 단일물질 Thrombin Time(TT) Assay

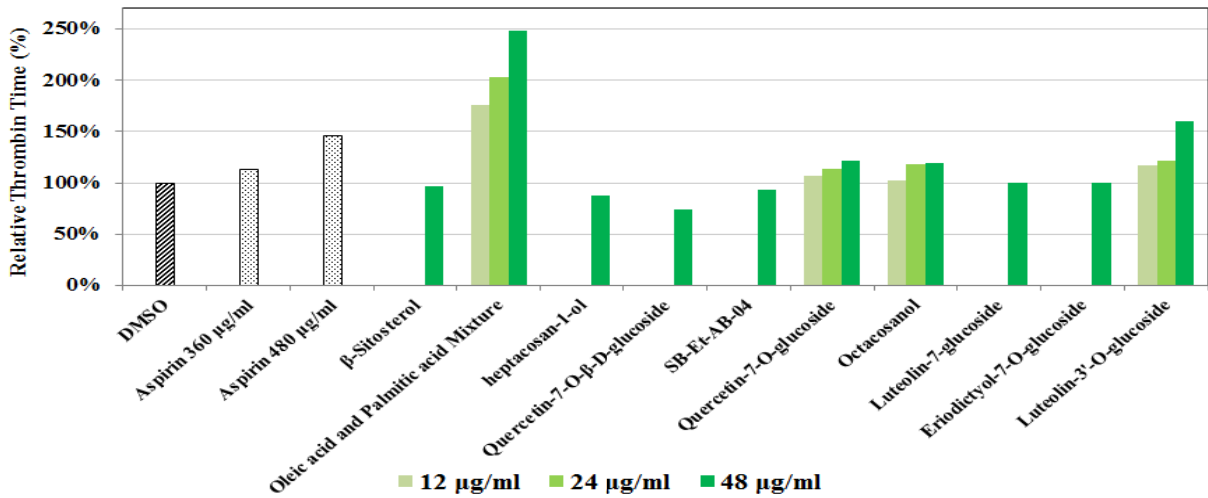


Fig. 34. Thrombin inhibition activity of some components in the various organic solvent from hwanggeumchal sorghum grains.

각 유기용매별 분획들의 실험 결과를 종합해 볼 때, hexane fractions의 경우 초반 구간인 D~K와 중반 구간 N, Q, U, 후반 구간 Y~AB, AH~AJ에 집중해볼 필요가 있었다. 특히 활성이 높은 E, H, N, Q, U, Y, AB, AC, AJ는 선별하여 성분 물질을 알아내기 위해 Gas Chromatography-mass spectrometry (이하 GC-MS)에 시료를 맡겨 분석을 의뢰했다. Methylene chloride fractions의 경우에는 I~P, W~Y, AE~AK, AO~AP, AU~BB 구간에서 높은 활성을 나타냈다. 활성이 매우 높은 X, AE, AP, AZ, BB를 선별하여 위와 같이 GC-MS 분석을 의뢰했다. Ethyl acetate fractions의 경우, C~G, O~R, V~AC 구간에서 비교적 높은 활성을 보였으며 구간별 활성이 높은 fraction인 F, G, O, W, AA, AB, AC를 GC-MS 분석 의뢰하였다. 마지막으로 n-butanol fractions의 경우에는 B~E, H~J, L~S 구간에서 활성이 높았다. 그 중에서 E, L, M, O, Q를 선택하여 GC-MS 분석을 의뢰하였다. 선별한 각 유기용매별 fractions에 대한 GC-MS 동정 연구 결과는 Table 13와 같다.

Table 13. Components in the various organic solvent from hwanggeumchal sorghum grains by GC-MS analysis.

No.	Compounds	Fraction	Composition (%)	Quality
1	Palmitic acid	Hexane E	50.82	99
		Hexane H	17.84	99
		Hexane N	42.72	99
		Hexane Q	51.33	99
		Hexane U	54.27	99
		Hexane Y	36.26	99
		Hexane AB	15.13	99
		Hexane AC	5.68	98
2	Linoleic acid	Hexane H	57.09	99
3	Oleic acid	Hexane E	42.62	99
		Hexane H	20.29	91
		Hexane N	36.97	99
		Hexane Q	32.09	99
		Hexane U	28.28	99
		Hexane Y	32.29	99
		Hexane AB	55.01	99
		4	Stearic acid	Hexane E
Hexane H	3.58			96
Hexane N	2.24			99
Hexane Q	3.07			97
Hexane U	2.61			98
Hexane Y	1.74			98
Hexane AB	2.18			41
5	Hexanoic acid			Hexane N
		Hexane U	3.78	86
		Hexane Y	2.42	86
		Hexane AC	1.68	90
		Hexane AJ	1.88	90
6	Caprylic acid	Hexane N	0.51	83
		Hexane U	0.61	91
		Hexane AB	1.6	91
7	Stigmast-4-en-3-one	Hexane Y	5.03	99
9	Azelaic acid	Hexane AB	1.58	91
		Hexane U	1.79	91
		Hexane AB	1.23	98
		Hexane AC	23.86	98
		Hexane AJ	49.37	98
		M.C AE	66.15	99
		M.C AZ	62.55	99
		M.C BB	10.88	99
		EtOAc F	35.16	99
		EtOAc G	44.71	99
		EtOAc O	23.92	99
		EtOAc AA	55.27	99
		EtOAc AB	60.76	98
		EtOAc AC	62.09	99
		BuOH E	65.84	99
		BuOH L	42.46	99
		BuOH M	69.60	98
		BuOH O	59.85	99
		BuOH Q	62.61	99
		10	Ethyl linoleate	Hexane
11	Campesterol	Hexane Y	1.56	99

		Hexane AC	5.71	99
		M.C AZ	1.63	90
		M.C BB	1.22	96
		Hexane AC	3.18	96
		M.C AE	14.29	86
		M.C AZ	9.04	90
		EtOAc F	1.09	90
		EtOAc O	4.32	97
12	Palmitamide	EtOAc AA	8.53	96
		EtOAc AB	8.00	83
		EtOAc AC	10.61	97
		BuOH L	8.05	97
		BuOH O	11.42	83
		BuOH Q	9.47	64
		Hexane AJ	4.37	86
		M.C AE	1.87	80
		M.C AZ	1.51	91
		M.C BB	1.14	86
		EtOAc F	5.04	86
		EtOAc G	1.36	91
		EtOAc AA	1.58	97
		EtOAc AB	1.51	90
		EtOAc AC	1.72	91
		BuOH E	2.05	90
		BuOH L	1.47	90
		BuOH M	11.03	86
		BuOH O	1.99	90
		BuOH Q	1.9	90
14	γ -Sitosterol	M.C AZ	4.18	99
		EtOAc O	1.51	91
		M.C AZ	1.44	94
		EtOAc F	15.54	96
		EtOAc G	4.32	96
		EtOAc O	1.00	89
		EtOAc AA	1.46	94
		EtOAc AB	0.68	91
		EtOAc AC	0.86	94
		BuOH L	1.87	94
		BuOH M	2.1	97
		BuOH O	0.98	91
16	β -Sitosterol	Hexane AC	3.56	99
		M.C BB	2.74	99
17	Nicotinamide	EtOAc O	19.87	97
		EtOAc AA	10.96	86
18	D-Allose	EtOAc AB	7.60	90
		BuOH M	4.74	90
19	Tridecyl acrylate	M.C BB	57.21	87
		Hexane AJ	4.13	90
20	Octadecanamide	EtOAc O	2.07	83
		BuOH O	7.85	72
21	Ethyl oleate	Hexane AC	5.6	58
22	Syringol	EtOAc F	4.12	97

다양한 단일물질들이 GC-MS를 통하여 발견되었으며, 전체적인 fractions에서 주로 fatty acid 계열이나 fatty acid amide 계열의 단일물질들이 다량 함유되어 있다는 결과를 얻을 수 있었다. Fatty acid 계열 단일물질들로는 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, stearic acid, hexanoic acid, caprylic acid, azelaic acid 등이 있었으며, fatty acid amide 계열 단일물질들로는 palmitamide, oleamide, myristamide, stearamide, nicotinamide, octadecanamide 등이 함유되어 있었다. 그 외에 ethyl linoleate, campesterol, β -sitosterol, p-vinylguaiacol, D-allose 등의 단일물질도 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

GC-MS를 통하여 확인한 수수 내 함유된 후보단일물질들을 구매하여 항혈전 실험인 Thrombin Time (TT) Assay를 수행해 보았다. 각 단일물질의 농도는 유기용매 별 fractions의 실험과 동일하게 12, 24, 48 $\mu\text{g/ml}$ 로 정하였으며, 동일하게 negative control인 DMSO와 positive control인 aspirin 360, 480 $\mu\text{g/ml}$ 도 함께 실험하여 비교할 수 있게 하였다.

실험 결과 Fig. 35에서 보는바와 같이 fatty acid 계열의 단일물질들에서는 aspirin과 대등한 활성능을 보여주고 있으나, 나머지 fatty acid amide 계열이나 그 외 단일물질들은 활성을 보여주지 않고 있다. 농도를 2배로 올려서 동일한 실험을 반복해 보았지만 역시나 항혈전 활성은 negative control인 DMSO와 비슷한 정도를 보였다.

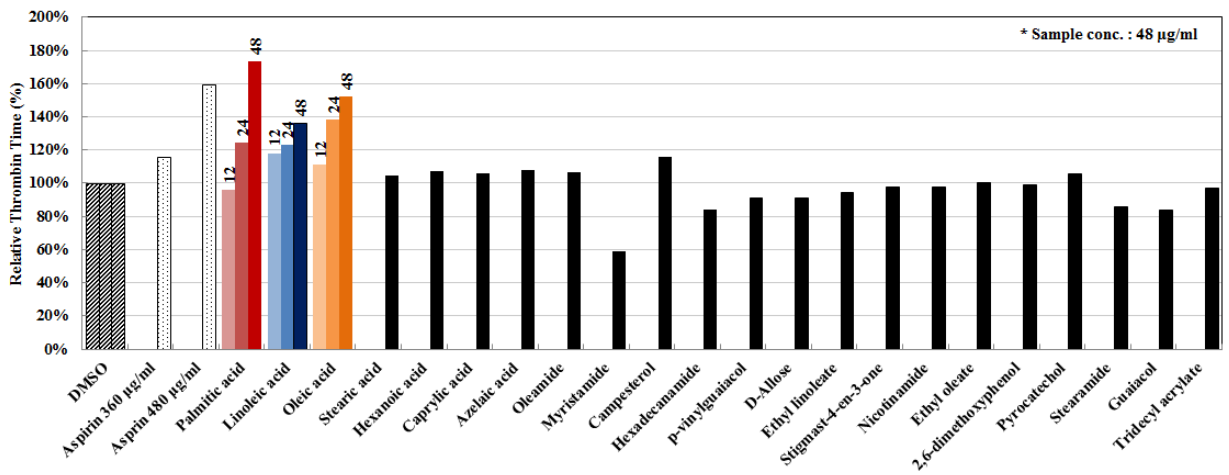


Fig. 35. Thrombin inhibition activity of some components in the various organic solvent from hwanggeumchal sorghum grains.

GC-MS를 통해 fatty acid와 fatty acid amide, 그 외 기타 단일 물질들을 확인했지만 분석 과정 중 휘발성이 없는 다량의 물질들을 확인할 수 없다는 사실을 인지하고 추가적인 단일물질 탐색 과정이 필요하게 되었다.

항혈전 활성을 측정하기 위해 또 다른 방법인 Fibrin plate를 이용하는 Fibrinolytic assay를 수행해 보았다. 이미 알려진 선행연구들을 참고하여, 사람 유래 Fibrinogen을 Sodium Phosphate Buffer에 섞은 뒤 사람 유래 Thrombin을 첨가하여 Fibrin Plate를 제작하였다. 2시간 정도 가만히 두어 굳게 만든 뒤, pasteur pipet을 사용하여 샘플 개수만큼 미세한 구멍을 만들었다. 각 샘플 농도는 항혈전 활성인 TT Assay에서 사용한 initial concentration과 같게 하여 5 mg/ml를 사용하였고, negative control로는 샘플의 용매인 DMSO와 plasmin의 용매인 50mM tris-HCl buffer를 처리하였다. Positive control로는 fibrinolytic activity가 있다고 알려진 Plasmin을 1 U/ml, 5 U/ml 두 가지 농도로 처리하였다. 샘플이 담긴 plate는 37°C에서 incubation 시키며 시간에 따라 변화하는 양상을 관찰하였다. 샘플을 처리하고 3시간 뒤부터 뚜렷한 변화양상이 나타나기 시작했으며, positive control인 plasmin 5 U/ml에서는 예상대로 fibrolysis가 일어나 초기 구멍 크기보다 넓어진 결과를 확인할 수 있었다. 마찬가지로 샘플 영역에서는 강력한 fibrolysis는 일어나지 않았지만, 국산수수와 중국산수수의 95%-EtOH 추출물과 hexane, methylene chloride fraction에서 구멍 주위로 환모양의 lysis가 일어나는 것을 확인할 수 있었다 (Table 14).

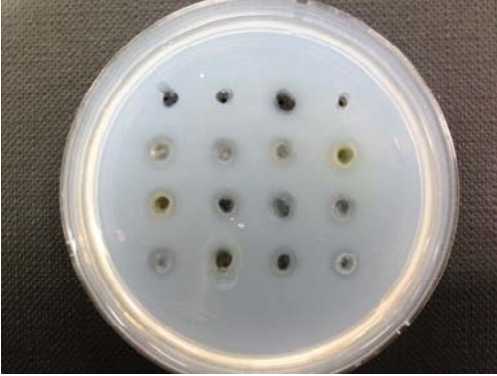
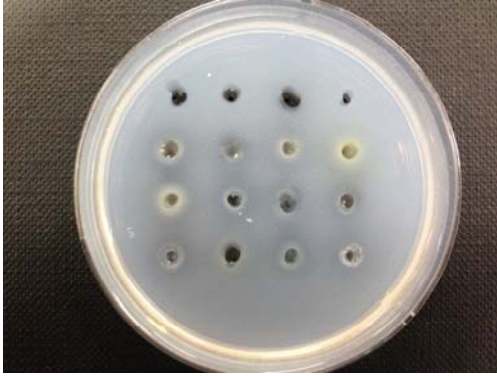
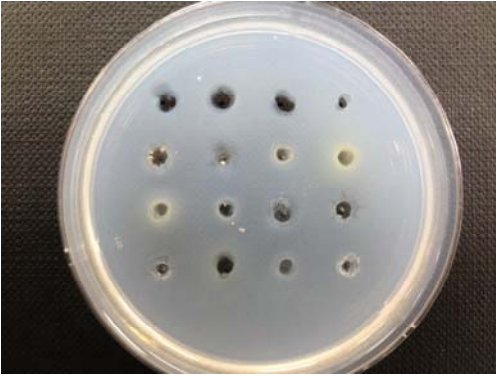
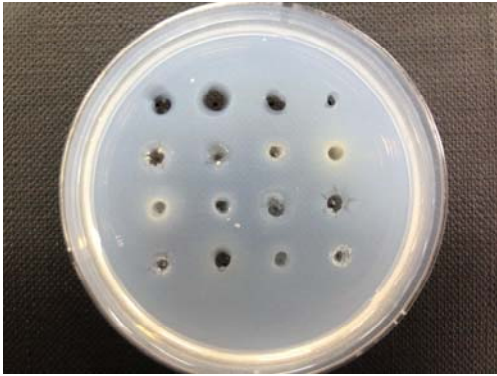
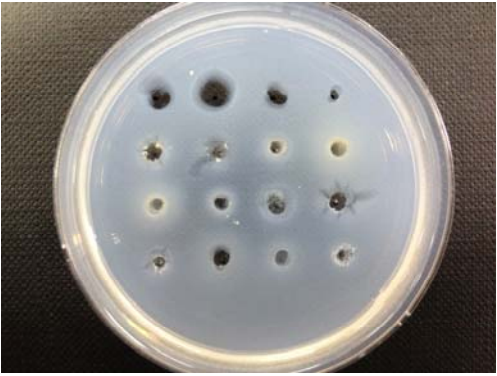
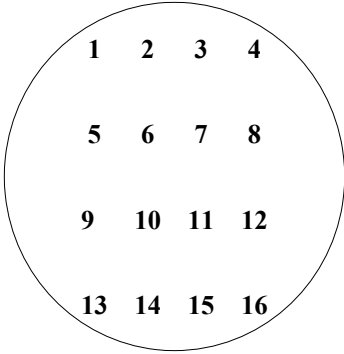
위의 결과를 통하여 수수 추출물 내에 항혈전 효과는 가용성 Fibrin이 응고되는 과정을 지연시켜 혈전이 생성되는 것을 막아주는 기능을 할 뿐만 아니라, 이미 응고된 Fibrin을 lysis시켜주는 기능도 가지고 있음을 알 수 있었다. 따라서 수수 내에 항혈전 관련 물질을 통하여 다양한 방법으로 응용과 적용이 가능할 것으로 예상된다.

차. 잡곡류에 함유된 항혈전 활성이 높은 페놀 화합물

잡곡류의 phenolic compounds들을 선별하여 항혈전 활성을 측정할 수 있는 Thrombin Time(TT) Assay를 수행해보았다. 선행실험을 통하여 농도 48 $\mu\text{g/ml}$ 에서 positive control인 aspirin 480 $\mu\text{g/ml}$ 에 준하는 활성능을 보이는 phenolic compounds를 알아낼 수 있었다. 농도별로 재실험을 해보아 농도 의존적 패턴을 보이는가를 확인할 뿐만 아니라, 낮은 농도에서도 항혈전 활성을 나타내는지 동시 확인해 보았다. 그 결과, Fig. 36에 나타난 것처럼 8가지 phenolic compounds들이 농도 의존적 패턴을 보일 뿐만 아니라, 저농도에서도 높은 활성을 보여주었다. 이와 더불어 제2협동과제에서 80%-EtOH 수수 추출물을 가지고 HPLC 분석을 하였다. 그 결과는 Table 15에 나타내었으며, 여러 가지 단일물질 뿐만 아니라 항혈전 활성이 높은 후보 phenolic compound도 다량 포함하고 있었다. 특별히 Pyrogallol이라는 phenolic compound는 항혈

전 활성인 TT Assay에서도 높은 활성능을 보여주었는데 HPLC 분석 결과에서도 보이는바와 같이 수수 추출물 내에 다량 함유되어 있다는 사실을 알 수 있었다. 이에 수수 내에 항혈전 활성이 높은 단일물질과 phenolic compounds들에 관심을 가지고 주의 깊게 후보 물질을 탐색할 필요가 있다.

Table 14. Fibrinolytic activity of golden glutinous sorghum and chinese sorghum.

			
0h		1h	
			
2h		3h	
			
4h			
1	Plasmin 1U/ml (5 μ l)	9	황금찰수수 BuOH 5mg/ml (5 μ l)
2	Plasmin 5U/ml (5 μ l)	10	황금찰수수 H ₂ O 5mg/ml (5 μ l)
3	DMSO (5 μ l)	11	중국수수 EtOH 5mg/ml (5 μ l)
4	Buffer (5 μ l)	12	중국수수 Hexane 5mg/ml (5 μ l)
5	황금찰수수 EtOH 5mg/ml (5 μ l)	13	중국수수 M.C 5mg/ml (5 μ l)
6	황금찰수수 Hexane 5mg/ml (5 μ l)	14	중국수수 EtOAc 5mg/ml (5 μ l)
7	황금찰수수 M.C 5mg/ml (5 μ l)	15	중국수수 BuOH 5mg/ml (5 μ l)
8	황금찰수수 EtOAc 5mg/ml (5 μ l)	16	중국수수 H ₂ O 5mg/ml (5 μ l)

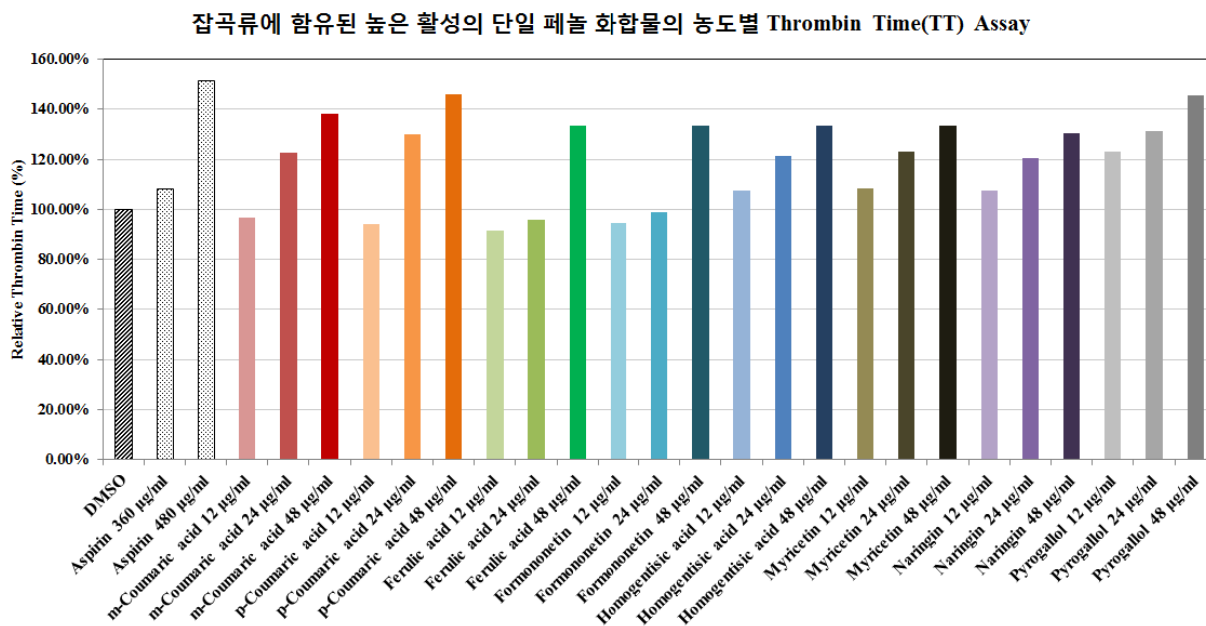


Fig. 36. Thrombin time inhibition activity of phenolic compounds in Sorghum grains.

Table 15. 수수 80% 주정 추출물의 phenolic compound 함량

연번	RT(min)	Compounds	Contents (µg/mg extract residue)
1	3.46	Gallic acid	3.5106
2	4.93	Pyrogallol	10.3308
3	8.85	Chlorogenic acid	1.4959
4	10.15	(+)-Catechin	11.9895
5	10.73	p-Hydroxybenzoic acid	1.4572
6	12.51	Caffeic acid	3.3779
7	16.47	Vanillin	0.7860
8	17.41	p-Coumaric acid	1.1121
9	18.47	Rutin	8.3263
10	19.03	Ferulic acid	4.8520
11	20.62	Salicylic acid	9.2036
12	22.59	Naringin	1.8674
13	23.16	Hesperidin	2.2259
14	25.32	Myricetin	4.5072
15	31.61	Quercetin	2.0986
16	32.43	t-Cinnamic acid	0.4115
17	34.78	Naringenin	3.8808
18	35.38	Kaempferol	1.1401

카. 선발 수수 계통별 항혈전 활성 연구

제1협동과제인 국립식량과학원 기능성작물부 잡곡과에서 선발한 수수와 그 외 계통별 수수 종자별 자원을 제공받았으며 그에 대한 정보는 **Table 16**과 같다. 각 샘플명은 원주로 명명되었고 황금찰수수 계통은 원주135001과 같으며, 그 외 계통과 출처에 기록된 대로 국산과 수입산 수수인 원주 시리즈의 80% 에탄올 추출물을 받았다.

Table 16. Specifications of Won-Ju series grains

계통번호	계 통 명	출 처	IT 번호	비 고
135001	Whanggeumchal			
135002	Daepung			
135003	IS1228	국립농업유전자원센터	IT152844	
135004	CS-62 LOCAL COLLECTION	국립농업유전자원센터	IT201477	
135005	CAPRICORN	USDA. ARS		PI236278
135006	X8-6-2-3-8-2	USDA. ARS		PI236286
135007	X13-17-1-7-4	USDA. ARS		PI236294
135008	Kubanskoe krasnoe	국립농업유전자원센터	IT251872	
135009	Roky 78-1	국립농업유전자원센터	IT033303	
135028	CS-4 LOCAL COLLECTION	국립농업유전자원센터	IT201458	
135029	CS-115 LOCAL COLLECTION	국립농업유전자원센터	IT201493	
135030	30	국립농업유전자원센터	IT223407	

항혈전 활성을 측정하기 위해 Thrombin Time (TT) Assay를 수행하였으며, 이전에 수행했던 황금찰수수 TT Assay와 마찬가지로 샘플의 농도는 240 µg/ml, negative control은 DMSO, positive control은 aspirin 360 µg/ml, 480 µg/ml으로 하여 실험을 하였다. 또한, 실험실에서 예전에 80% 에탄올로 추출한 황금찰수수 샘플도 함께 추가하여 정확한 활성의 비교가 가능하게 하였다. 실험 결과는 **Fig. 37**과 같으며, 실험실에서 추출한 황금찰수수 80% 에탄올 분획은 이전과 동일하게 aspirin 360 µg/ml의 활성보다 약간 높은 수치를 보여주었고, 원주135003과 원주135007에서 positive control인 aspirin 480 µg/ml에 버금가는 활성능을 나타내었다. 하지만 황금찰수수 계통인 원주135001에서 계속해서 낮은 활성이 나타났기 때문에

이에 대한 원인 분석이 필요했다. 제1협동과제인 밀양 식량과학원에서 제공한 원주 시리즈 80% 에탄올 추출물과 실험실에서 추출한 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 추출 과정상의 차이로 인한 원인이 가장 크다고 판단하여 실험실에서 자체적으로 활성이 우수하다고 확인된 원주135001, 원주135003, 원주135007을 이전과 동일한 방법으로 80% 에탄올에서 추출하였다. 추출된 샘플은 이전 제1협동과제에서 제공받은 샘플과 함께 동일한 방법으로 TT Assay를 수행해보았다. 결과는 Fig. 38과 같으며, 추출방법에 따른 항혈전 결과에 영향이 있음을 알 수 있었다. 먼저 원주135003과 원주135007의 경우에는 이전에 제1협동과제에서 받은 80% 에탄올 추출물에서는 높은 활성을 나타내었지만, 실험실에서 추출한 80% 에탄올 추출물에서는 그 활성이 떨어지는 것으로 나타났다. 반면, 황금찰수수 계통인 원주135001은 제1협동과제에서 받은 80% 에탄올 추출물에서는 활성이 낮았지만 새롭게 실험실에서 추출한 샘플에서는 이전 황금찰수수 추출물의 활성과 마찬가지로 positive control인 aspirin 480 µg/ml과 대등한 트롬빈 저해 활성을 보여주었다. 이 결과를 통해 추출방법에 따른 항혈전 활성의 차이가 발생함을 알 수 있었으며, 결론적으로 원주135001, 원주135003, 원주135007에서 높은 항혈전 활성의 물질을 지니고 있음을 알 수 있었다.

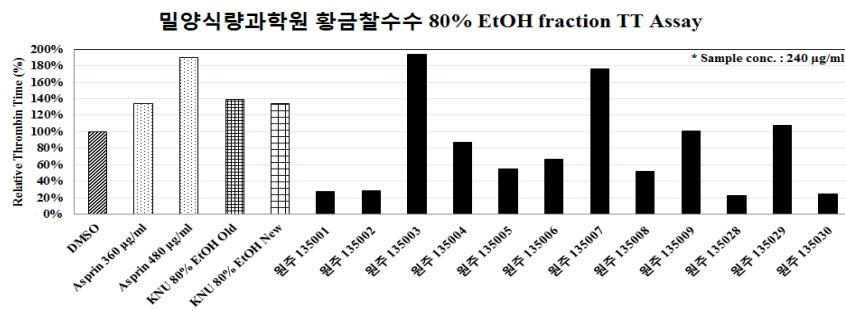


Fig. 37. Thrombin inhibition activity of 80% EtOH extracts of Won-Ju series grains.

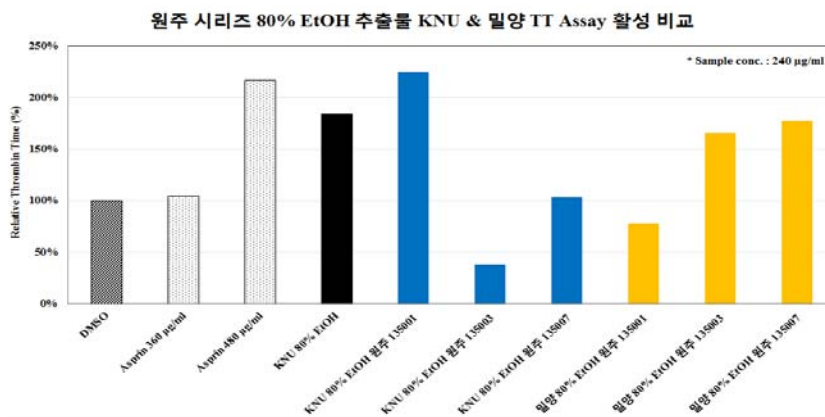


Fig. 38. Thrombin inhibition activity of 80% EtOH extracts of Won-Ju 135001, 135003, 135007 grains.

원주 시리즈 또한 항혈전 활성 성분 물질을 알아내기 위해 Gas Chromatography-mass spectrometry에 시료를 맡겨 분석을 의뢰하였다. 그 결과는 **Table 17**에 나타나 있으며, 주로 확인되는 물질은 fatty acid amide 계열의 물질들이었다. Oleamide, Palmitamide, Myristamide, Stearamide의 함량이 공통적으로 높게 나타났는데, 이들 물질은 황금찰수수 유기용매 추출물의 GC-MS 결과에서도 동일하게 다량 확인되었던 물질들이었다. 때문에 원주 시리즈 또한 휘발되지 않는 물질들의 폭넓은 확인이 어렵다고 판단하여 제1협동 과제에 HPLC 분석을 의뢰하기로 하였다. Fatty acid amide 계열의 물질 뿐만 아니라 다양한 Phenolic compounds를 표준물질로 함께 보내어 원주 시리즈 내에 함유되어 있는 항혈전 활성이 높은 단일물질을 발견해 내고자 하였다.

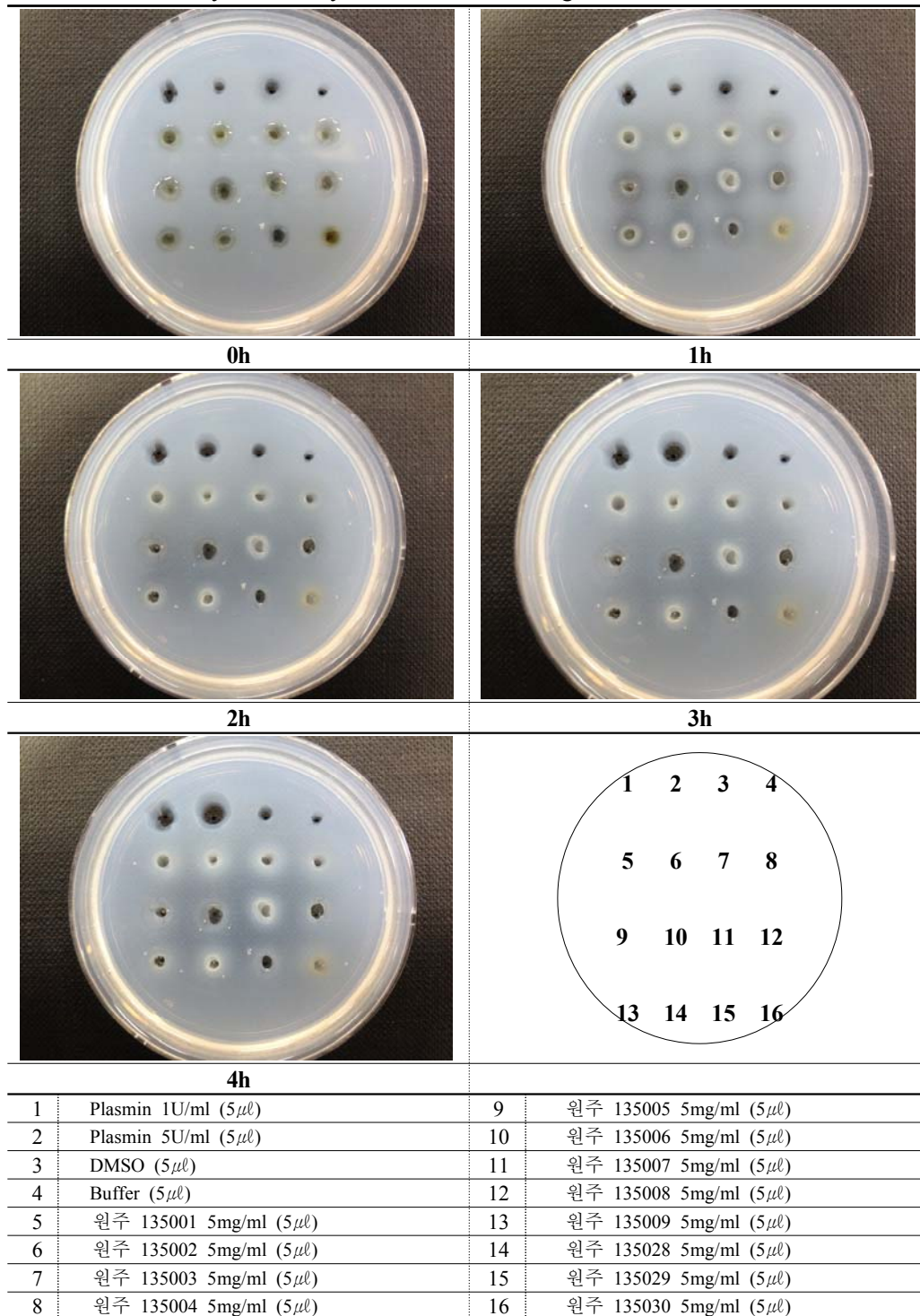
Table 17. Components in the Won-ju series grains by GC-MS analysis

No.	Compounds	Fraction	Composition (%)	Quality
1	Oleamide	원주135001	65.13	98
		원주135002	53.75	98
		원주135003	32.46	98
		원주135004	27.46	98
		원주135005	41.98	98
		원주135006	30.45	98
		원주135007	42.62	98
		원주135008	28.59	98
		원주135009	30.45	98
		원주135028	43.01	98
		원주135029	37.34	99
원주135030	49.21	98		
2	Palmitamide	원주135001	9.05	97
		원주135002	7.88	95
		원주135003	7.37	72
		원주135004	4.93	90
		원주135005	6.73	80
		원주135007	5.90	96
		원주135008	5.65	81
		원주135009	4.67	90
		원주135028	5.56	95
		원주135029	5.72	80
		원주135030	5.72	64
3	Myristamide	원주135001	3.81	86
		원주135002	3.78	86
		원주135003	0.84	90
		원주135004	0.53	91
		원주135005	0.69	59
		원주135006	4.95	86
		원주135007	1.18	91
		원주135008	0.71	90
		원주135009	0.42	80
		원주135028	1.38	83
		원주135029	1.94	97
원주135030	6.52	86		
4	Stearamide	원주135001	6.72	55
		원주135002	7.02	78
		원주135003	7.27	60
		원주135004	2.31	90
		원주135005	4.44	72
		원주135006	1.73	78
		원주135007	4.34	55
		원주135008	4.01	87

		원주135009	3.72	80		
		원주135028	2.26	80		
		원주135030	4.12	59		
5	p-Vinylguaiacol	원주135001	0.27	60		
		원주135002	0.35	72		
		원주135003	0.46	62		
		원주135004	1.09	72		
		원주135005	0.38	53		
		원주135006	0.78	97		
		원주135007	0.43	81		
		원주135008	0.43	64		
		원주135009	0.41	78		
		원주135028	0.15	81		
		원주135029	0.58	96		
		6	Ethyl Oleate	원주135002	5.45	99
				원주135003	5.27	99
원주135004	1.10			72		
원주135006	1.20			91		
원주135007	6.38			91		
원주135008	7.44			99		
원주135009	11.02			91		
원주135028	12.48			99		
원주135029	3.36			87		
원주135030	6.32			91		
7	Ethyl Palmitate	원주135001	1.08	98		
		원주135002	2.96	95		
		원주135003	2.91	98		
		원주135004	4.95	98		
		원주135005	4.30	99		
		원주135006	5.05	98		
		원주135007	2.56	98		
		원주135008	4.66	98		
		원주135009	5.78	98		
		원주135028	3.00	98		
		원주135029	1.42	98		
		원주135030	2.98	98		
		8	2,4,6-Triphenyl-1-hexene	원주135002	1.30	78
원주135003	0.95			37		
원주135004	0.82			42		
원주135005	0.70			78		
원주135009	1.11			59		
원주135028	0.54			50		
9	1-Mercapto-2-heptadecanone	원주135001	0.56	91		
		원주135002	0.79	90		
		원주135003	1.62	86		
		원주135006	1.48	72		
		원주135028	1.24	83		
		원주135029	0.39	86		
		원주135030	0.98	86		

항혈전 활성을 측정하는 또 다른 방법인 Fibrin plate를 이용하는 Fibrinolytic assay를 원주 시리즈에도 수행해 보았다. 동일한 방법으로 Fibrin Plate를 제작하여 2시간 정도 가만히 굳게 두었으며, pasteur pipet을 사용하여 샘플 개수만큼 미세한 구멍을 만들었다. 각 샘플 농도는 항혈전 활성인 TT Assay에서 사용한 initial concentration과 동일하게 5 mg/ml를 사용하였고, negative control로는 샘플의 용매인 DMSO와 plasmin의 용매인 50 mM tris-HCl buffer를 처리하였다. Positive control로는 fibrinolytic activity가 있다고 알려진 Plasmin을 1 U/ml, 5 U/ml 두 가지 농도

Table 18. Fibrinolytic activity of Won-Ju series grains.



로 처리하였다. 샘플이 담긴 plate는 37 °C에서 incubation 시키며 시간에 따라 변화하는 양상을 관찰하였다. 샘플을 처리하고 3시간 뒤부터 뚜렷한 변화양상이 나타나기 시작했으며, positive control인 plasmin 5 U/ml에서는 예상대로 fibrolysis가 일어나 초기 구멍 크기보다 넓어진 결과를 확인할 수 있었다. 마찬가지로 샘플 영역에서는 강력한 fibrolysis는 일어나지 않았지만, 원주 135001, 원주135002, 원주135003, 원주135007, 원주135028에서 구멍 주위로 환모양의 lysis가 일

어나는 것을 확인할 수 있었다 (Table 18). 위의 결과를 통하여 수수 추출물과 마찬가지로 원주 시리즈 내에도 항혈전 효과가 있으며 이는 가용성 Fibrin이 응고되는 과정을 지연시켜 혈전이 생성되는 것을 막아주는 기능 뿐만 아니라, 이미 응고된 Fibrin을 lysis시켜주는 기능도 가지고 있음을 알 수 있었다. 특히, 원주135001, 원주135003, 원주135007은 TT Assay에서도 높은 활성능을 보여주었기 때문에 효과적인 항혈전 활성을 나타내는 물질을 함유하고 있을 것이라고 예상할 수 있었다.

제 1 협동과제 : 항혈전 활성이 우수한 유전자원 선발 및 활용 연구

1. 연구방법 및 결과

가. 항혈전 우수 유망 수수 유전자원 선발 및 증식

항혈전 활성이 우수한 수수 유전자원을 선발하기 위하여 예비조사에서 1차 선발로서 종피색이 갈색이나 붉은 계열로서 수량성 및 기계화 적성을 고려한 9 계통을 선발하고 황금찰수수를 대비품종으로 하였다. 총 10자원을 괴산(논포장)과 원주(밭포장)에서 4월 27일(괴산), 4월 28일(원주) 육묘 파종 후 5월 24일(괴산)과 5월 25일~26일(원주)에 각각 정식하였다.

나. 1차 선발 유전자원의 생육특성 평가

선발된 자원의 생육상황을 조사한 것을 표 19과 20에 나타내었다. 두 지역간 엽의 수나 분얼수에서는 차이가 크게 나지 않는 것으로 평가되어 기본적인 유전적 특성은 차이가 없으나 기후 등에 따라 초기생육에서 차이가 나는 것으로 평가되었으며, 괴산지역에 정식된 수수가 초기생육에서 파종부터 정식시기가 하루의 차이가 있었음에도 불구하고 초장이 길어 생육이 빠르게 나타나는 경향이였다. 4번 계통의 경우는 출수가 시작되었으며 7번의 경우 일부 출수가 되는 것으로 조사되어 4번과 7번의 경우 조기 수확용으로 적합할 것으로 판단되었다. 생육중기에 들어서 괴산의 경우 잦은 강우에 의해 대비품종인 황금찰수수 등을 포함하여 대부분의 품종에서 불임과 이삭 곰팡이병이 확산되어 수량성이 매우 떨어질 것으로 예측되었다.

표 19. 1차 선발 수수 괴산 증식포장의 생육상황

선발주	초장	직경	엽수	분얼수	선발주	초장	직경	엽수	분얼수
	cm		개			cm		개	
1	82.9	22.0	8.0	2.5	6	81.9	16.0	6.8	2.2
2	81.3	23.8	8.3	1.9	7	79.2	12.8	3.8	2.9
3	82.0	20.2	7.5	2.1	8	80.5	16.9	6.6	2.3
4	83.8	14.1	5.2	2.3	9	91.2	16.3	6.9	3.2
5	80.9	16.3	7.0	2.5	10	95.6	16.6	6.0	1.9

표 20. 1차 선발 수수 원주 증식포장의 생육상황

선발주	초장	직경	엽수	분얼수	선발주	초장	직경	엽수	분얼수
	cm		개			cm		개	
1	68.4	1.6	7.6	1.5	6	67.2	1.2	6.9	2.6
2	68.2	1.5	7.8	1.7	7	53.2	0.8	4.5	2.5
3	69.4	1.4	7.0	2.9	8	70.7	1.3	6.8	3.0
4	46.8	0.8	6.0	2.6	9	52.4	0.7	5.8	3.9
5	71.8	1.3	7.6	2.8	10	76.8	1.3	6.1	2.8

그림 39는 원주에서 재배된 1차 선발수수의 초장을 나타낸 것으로, 대비품종인 1번(황금찰수수)은 밀양에서 재배되었을 때 보다 초장이 약간 낮게 나타났으며, 3번과 10번을 제외하고는 전체적으로 단간형으로 분류할 수 있었다. 6호의 경우는 콤팩트 수확이 충분이 가능한 112.8cm로 가장 작았으며 다른 계통의 경우도 기계화는 가능할 것으로 판단되었다.

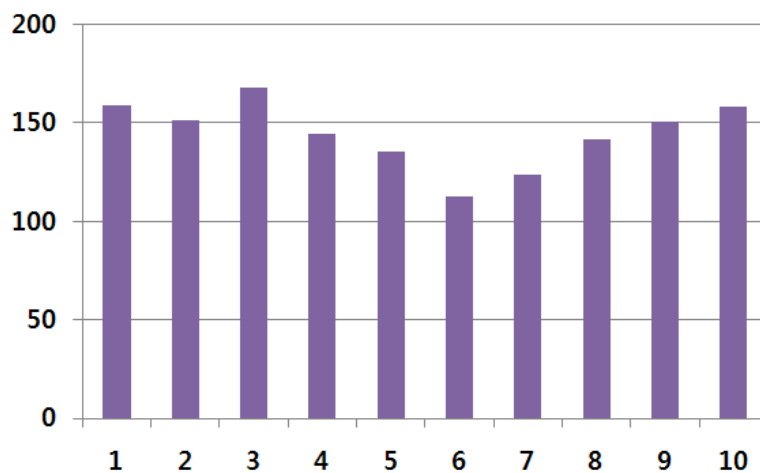


그림 39. 괴산에서 선발 유전자원들의 생육길이(간장+ 이삭목)

또한, 본 시험연구의 선발자원 포장은 원거리에 위치하였으므로 영상 모니터링을 통한 수수의 생육특성 평가 가능성을 알아보기 위하여, 원주포장에 영상센서를 설치하여 선발 수수의 생육특성 평가를 모니터링하였다. 그림 40은 황금찰수수의 초장변화를 일단위로 나타낸 것으로 수수의 경우 출수기 직전 생육속도가 log phase 단계로 매우 빠른 것을 확인할 수 있었으며, 그림 1의 결과로 보았을 때 생육이 최고를 보였던 7월 18일 전후를 출수기로 파악할 수 있었다. 또한 영상을 통하여 출수기와 개화기, 등숙기 등을 직접 관찰할 수 있어(그림 41), 영상모니터링을 통한 생육특성 평가가 가능한 것으로 판단되었다.

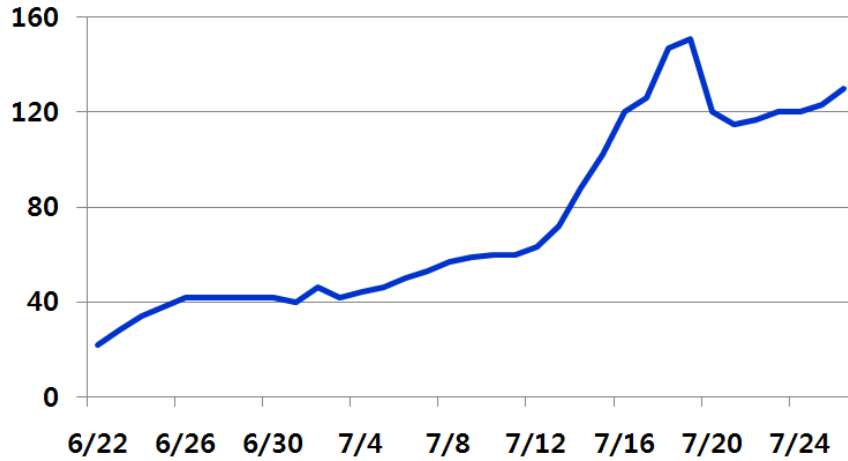


그림 40. 황금찰 수수의 생육곡선

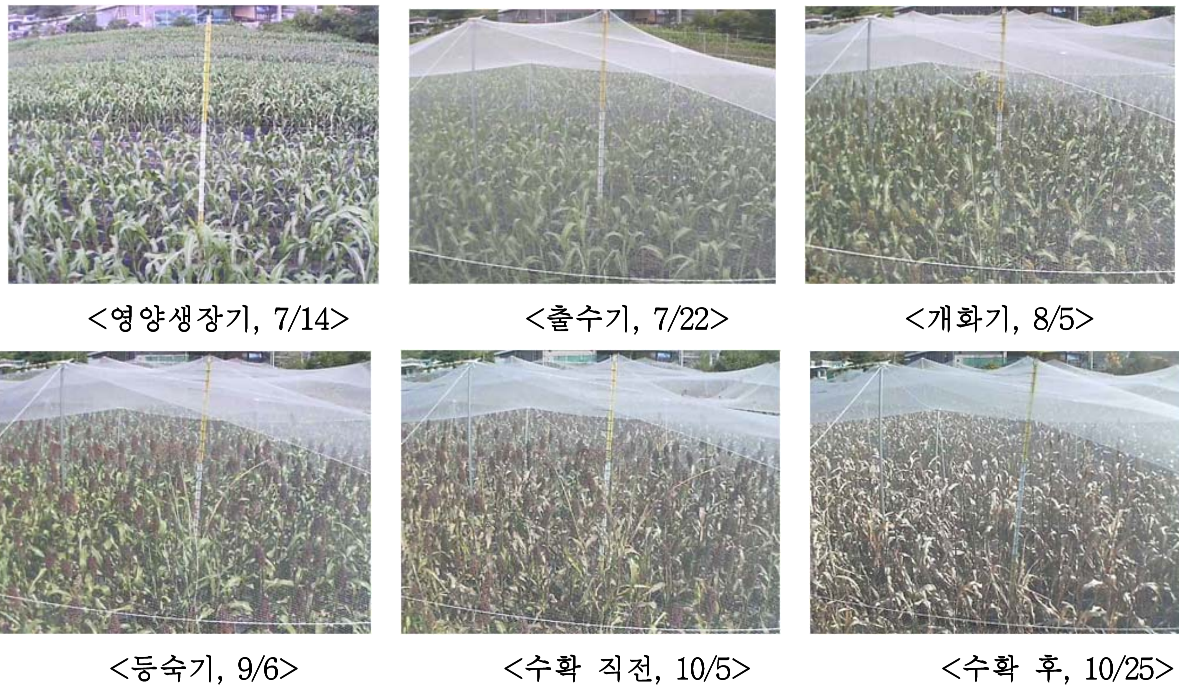


그림 41. 영상센서를 이용한 수수의 생육상황 조사

다. 1차 선발 유전자원의 수량성 및 종실

원주와 괴산에서 재배된 1차 선발수수의 수량성을 표 21에 나타내었다. 괴산의 경우 초기 생육이 매우 좋았으나 개화기에 잦은 강우에 의해 불임이 증가하였으며 이삭 곰팡이가 많이 발생하여 전체적으로 수량이 매우 낮았는데 이는 논포장에서 발작물 재배시 고려해야 되는 중요한 사항으로 판단되었다. 괴산지역에서 재배된 수수는 전체적으로 수량성이 매우

낮아 선발품종에 대한 항혈전 활성 대비 수량성을 평가하는 자료로 사용하기에는 부적절한 것으로 평가되었다.

원주의 경우 상대적으로 B slop의 경사 및 배수가 양호한 포장이면서 상대적으로 개화기에 강우가 괴산보다 많지 않아 후기 생육이 양호하였으며, 원주의 경우 4번과 5번을 제외하고 대비품종인 1번과 수량이 비슷하거나(3번, 7번, 9번) 높은 경향(2번, 6번, 8번, 10번)으로 나타났다. 그림 42는 원주에서 수확된 선발 수수 유전자원의 조곡 종자를 사진으로 나타낸 것으로 붉은색, 연한갈색, 진한 갈색 등의 다양한 종피색을 나타내고 있다.

표 21. 괴산 및 원주 선발 수수포장에서 수량 (단위 : kg/10a)

계통	1 (황금찰수수)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
괴산	20.3	45.6	128.3	62.4	17.3	28.5	50.5	56.4	198.4	103.0
원주	345.6	418.0	368.6	196.7	161.2	533.6	303.5	393.8	368.8	396.6











계통번호	조곡 특성	계통번호	조곡 특성
1 (붉은색)		2 (붉은색)	
3 (갈색)		4 (연한갈색)	
5 (연한갈색)		6 (연한적색)	
7 (연한갈색)		8 (진한갈색)	
9 (검은갈색)		10 (연한갈색)	

그림 42. 선발 수수 유전자원의 조곡 종자 양태(원주)

라. 항혈전이 우수한 1차 선발 계통에 대한 항혈전 활성 분석

1차년도에서 선발된 황금찰수수 (대비품종) 외 9계통에 대한 항혈전 활성을 비교하기 위해 80% 에탄올 추출물을 Thrombin Time (TT) Assay로 항혈전활성을 측정하였다. 측정 결과 135003 계통이 약 340%, 135007이 250%의 저해율을 보여 아스피린의 저해율 237%보다 높아 항혈전 활성이 우수한 계통으로 나타났다 (그림 43).

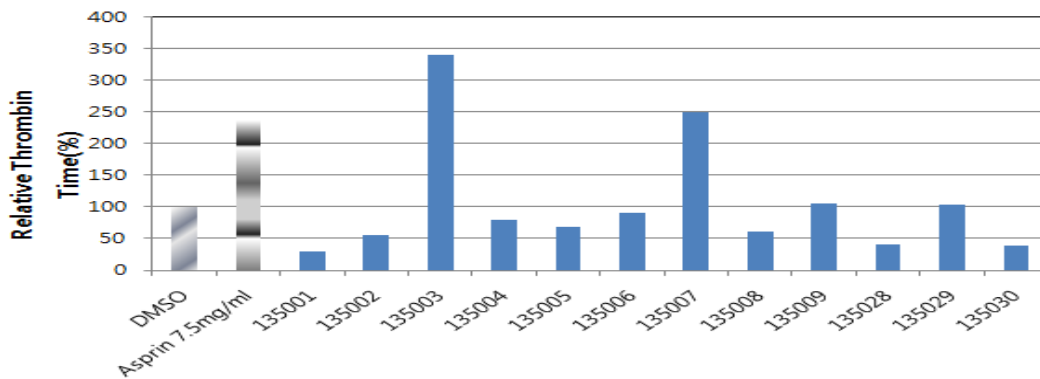


그림 43. 1차 선발된 계통의 항혈전 활성 평가 (Thrombin Time Assay)

마. 2차 선발 계통의 재배지역별 농업적 주요 특성 및 수량성

(1) 밀양, 원주 지역의 농업기상

TT Assay를 통한 항혈전 분석 결과 항혈전 활성이 우수한 135003, 135007과 더불어 재배적 특성이 우수한 4계통을 선발하여 선발품종과 대비품종 2계통에 대한 주요 재배적 특성 및 수량성 검정을 위해 밀양(경남) 및 원주(강원) 2 지역에서 생산력검정시험을 수행하였다. 각 지역별 육묘상에 밀양은 5월 17일, 원주는 5월 15일 파종 후 원주는 5월31일, 밀양은 6월 4일 각각 정식하였으며, 기타 재배법은 표준재배법에 준하였다.

재배된 지역의 농업기상 특성을 살펴보면 평균기온과 적산온도는 밀양지역이 원주지역에 비하여 높았으며, 강수량은 원주가 밀양에 비해 10% 더 많아 올해 밀양 지역이 여름 가뭄이 더 심하였던 것으로 판단된다. 그러나 일조시간은 밀양이 원주에 비하여 약간 낮은 경향이였으며, 평균풍속은 밀양이 원주에 비하여 약간 높게 나타났는데 이는 9월에 경남지역을 통과한 태풍의 영향으로 9월의 평균 풍속이 높아진 것에 여겨진다.

표 22. 선발계통의 지역별 재배기간 중 농업기상

지역	월별	평균기온 (°C)	적산온도 (°C)	강수량 (mm)	일조시간 (hr)	평균풍속 (m/s)
밀양	6	22.6	677.6	56	139.8	1.75
	7	27.0	837.4	244	151.1	1.59
	8	27.4	848.9	288	141.5	1.76
	9	21.1	580.3	316	166.2	1.44
		24.6	2,944.2	903	598.6	1.64
원주	6	23.6	706.5	71	196.5	1.82
	7	25.6	794.4	450	125.6	1.55
	8	26.5	822.5	338	147.4	1.76
	9	19.5	585.8	156	148.9	1.26
		23.8	2,909.2	1,015	618.4	1.60

(2) 2차 선발 계통의 주요 농업적 특성

선발된 계통의 주요 생육특성으로 출수기는 7.26~30일 사이로 재배지역에 따른 차이는 없는 것으로 나타났으며, 간장은 밀양에서는 100~173cm, 원주에서는 73~162cm로 대비품종 포함 원주에 재배된 계통들이 평균 24.5cm 키가 작은 것으로 나타났다. 특히 135007번은 선발된 4계통 중 키가 가장 작아 쓰러짐에 강하고 기계화 수확 적성도 우수할 것으로 여겨진다. 또한 이삭길이는 재배지역간 큰 차이가 없었으나 분얼수는 원주에서 평균 0.6개 많고, 줄기 굵기는 3.3cm 원주 재배계통이 굵은 것으로 나타났다. 이러한 재배지역간의 생육차이는 기상요인으로만 보았을 때 영양생장기(6월)의 적산온도와 일조시간이 원주지역이 높은 것으로 여겨지며, 밀양에서 재배된 계통들이 대부분 키가 큰 것은 영양생장기의 일조부족으로 다소 웃자란 영향인 것으로 판단된다. 따라서 전반적인 생육상황은 밀양보다 원주에서 재배된 계통들이 생육이 우수한 것으로 나타났다.

(3) 생산력검정 시험

선발된 계통들의 수량성 및 재해저항성 특성으로 수량성은 항혈전 활성이 높았던 135003 계통이 원주에서 374kg/10a로 대비품종과 비슷하였으나, 135007 계통은 216kg/10a로 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 재배 지역별 수량성은 원주에서 재배된 계통들의 평균 수량이 밀양에서 재배된 계통보다 2배 이상의 수량성을 보여 선발된 계통들이 중북부 지역에서 적응성이 보다 높은 것으로 나타났다. 또한 135003과 135007 계통은 도북에도 대비품종에 비해 강하였으며, 특히 135007 계통은 키가 작은 단간으로서 기계화 수확에도 적합한 것으로 판단되어 생력재배에 매우 유리한 계통으로 여겨진다.

표 23. 선밭계통의 주요 생육특성

계통	출수기 (월.일)		간장(키) (cm)		이삭길이 (cm)		분얼수 (개)		줄기 굵기 (cm)	
	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주
135001*	7.21	7.24	161	146	19	23	1.5	1.9	14.9	16.9
135002*	7.29	7.26	214	163	27	24	1.5	2.0	15.1	22.0
135003	7.28	7.26	173	162	22	23	1.5	2.0	19.4	21.2
135004	7.26	7.28	153	135	25	25	1.5	1.8	14.7	17.1
135007	7.27	7.26	100	73	30	28	1.5	2.7	15.1	19.1
135028	7.29	7.30	167	142	21	23	1.5	2.4	13.6	16.3
평균	7.27	7.27	161.3	136.8	24.0	24.3	1.5	2.1	15.5	18.8

* : 대비품종

표 24. 선밭계통의 수량성 및 재해저항성 특성

계통	천립중 (g)		수량성 (kg/10a)		도복 (1-9)		병해충 (1-9)	
	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주
135001*	16.2	17.9	99	413	9	7	3	3
135002*	17.2	14.6	188	375	7	5	3	3
135003	16.6	14.3	149	374	3	3	3	3
135004	22.3	22.0	145	443	3	3	3	3
135007	18.3	14.8	162	216	1	1	5	5
135028	25.3	22.6	182	563	1	1	1	1
평균	19.3	17.7	154.2	397.3	-	-	-	-

* : 대비품종



135003

135004

135007

135028

그림 44. 2차 선발 계통들의 생육 모습(원주)



135001

135002

135003

135004

135007

135028

그림 45. 2차 선발 계통들의 이삭 모양

바. 선발 계통의 폴리페놀 함량 등 기능성분 평가

선발된 수수 4계통의 100% 주정 추출물에 대한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과 135003과 135004 계통은 대비 품종에 비해 두 성분 모두 함량이 다소 낮았으나, 135007 및 135028 계통은 대비품종에 비해 높은 함량을 보였다. 또한 재배지역별 분석결과 135028 계통을 제외한 모든 계통의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 밀양보다는 원주지역에서 재배한 계통들에서 높은 함량을 보였다 (그림 46, 그림 47).

항산화 활성 평가를 위해 대표적 항산화 측정법인 DPPH법과 ABTS법을 이용 항산화 활성 분석 결과 135003 및 135004 계통이 다소 낮은 항산화 활성을 보인 반면 135007, 135028 계통은 대비품종보다 높은 활성을 나타내었다. 재배 지역별 활성은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 마찬가지로 원주에서 재배된 대부분의 계통들이 밀양보다 높은 활성을 보여 주었다 (그림 48, 그림 49).

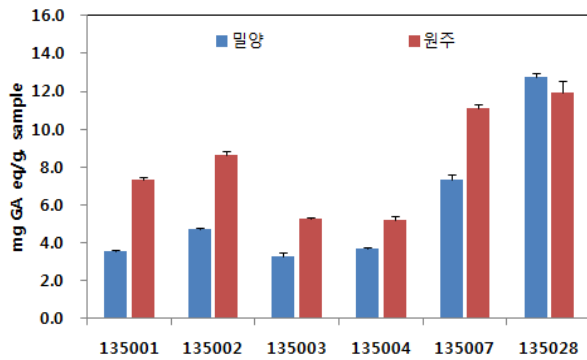


그림 46. 폴리페놀 함량

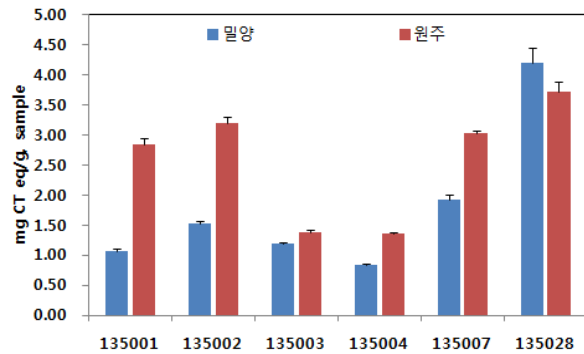


그림 47. 플라보노이드 함량

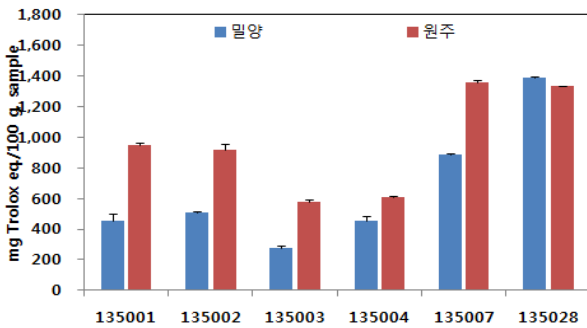


그림 48. DPPH 라디칼 소거 활성평가

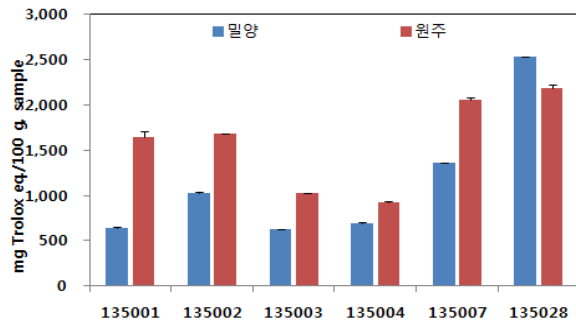


그림 49. ABTS 라디칼 소거 활성평가

사. 항혈전 우수 계통 '밀양1호' 선발

2년 동안 수행한 결과 농업적 특성과 수량성이 좋으며, 항혈전 활성이 우수한 계통인 135003을 '밀양1호'로 선발하였다

아. 지역적응성 검정

(1) 재배방법

지역적응성 검정을 위해 '황금찰'을 대조품종으로 하여 밀양(경남) 및 원주(강원)지역에 재배하였다. 각 지역별 육묘상에 6월 5일 파종 후 밀양은 6월18일, 원주는 6월 24일 각각 정식하였으며, 재식거리는 60×20cm, 주당본수는 1본, 시비량은 10a당 N-P₂O₅-K₂O을 10-7-8로 하였다.

(2) 재배지역의 농업기상

평균기온은 밀양지역이 원주지역에 비하여 낮았으며, 일조시간도 원주지역에 비해 적었다. 강수량은 원주가 밀양에 비해 23% 더 많았다. 2013년도는 태풍의 영향도 받지 않아 밀양지역 보다는 원주에서의 작물 생육이 더 좋을 것으로 생각된다.

표 25. 지역별 지역적응시험 재배기간 중 농업기상

지역	월별	평균기온 (°C)	강수량 (mm)	일조시간 (hr)	평균풍속 (m/s)
밀양	6	23.7	89.6	55.1	1.4
	7	27.5	249.1	142	2.0
	8	28.3	170	231.7	1.3
	9	22.4	64.1	170.5	1.2
		25.5	572.8	599.3	1.5
원주	6	23.9	199.2	229.3	1.4
	7	26.0	214.1	121.7	1.5
	8	26.9	153.5	222.7	1.3
	9	20.4	138.3	184.1	1.1
		24.3	705.1	757.8	1.3

(3) ‘밀양1호’의 농업적 특성, 수량성, 내재해성 및 병해충 저항성

‘밀양1호’의 농업적 특성을 비교해보면 출수기는 밀양에서는 8월2일, 원주는 8월18일로 ‘황금찰’ 보다 8일 정도 늦었다. 간장은 밀양지역에서는 136cm로 ‘황금찰’에 비해 16cm 작았으나 원주 지역에서는 13cm 더 컸다. 줄기굵기는 ‘황금찰’에 비해 더 굵어 도복에 좀 더 강할 것으로 생각된다.

2013년도에는 수확기에 태풍피해가 없어 ‘밀양1호’와 ‘황금찰’의 도복피해는 나타나지 않았으며 병해충 피해도 양호한 편이었다. ‘밀양1호’의 수량성은 10a당 밀양지역에서는 308kg로 ‘황금찰’보다 낮았으나 원주지역에서는 297kg로 높은 수량을 보였다.

표 26. ‘밀양1호’의 농업적 특성

계통	출수기 (월.일)		간장(키) (cm)		이삭길이 (cm)		분얼수 (개)		줄기 굵기 (cm)	
	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주
밀양1호	8.2	8.18	136	193	25.0	21.9	1.1	1.6	23.7	15.8
황금찰(대비)	7.26	8.10	152	180	24.3	23.6	1.4	1.5	17.9	15.2

표 27. ‘밀양1호’의 수량성, 도복 및 병해충 저항성

계통	천립중 (g)		수량성 (kg/10a)		도복 (1-9)		병해충 (1-9)	
	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주	밀양	원주
밀양1호	14.6	18.1	308	297	1	1	3	3
황금찰(대비)	18.2	18.3	396	277	1	1	3	3

(4) ‘밀양1호’의 항산화활성 및 항혈전활성

‘밀양1호’의 항산화함량을 분석한 결과 폴리페놀, 플라보노이드, 탄닌 성분이 ‘황금찰’에 비해 높았으며 DPPH, ABTS 항산화활성도 유의하게 높아 기능성이 높은 계통으로 유망할 것으로 생각된다. 혈액의 응고능력을 측정하는 상대적 트롬빈(thrombin) 시간으로 항혈전활성을 분석한 결과 지표물질인 아스피린보다 적은 농도인 5 mg/ml에서 중모4002가 190.5%로 황금찰보다 12% 높은 활성을 보였다.

표 28. ‘밀양1호’의 항산화성분함량과 항산화활성

계통	폴리페놀 (mgGAE/g)	플라보노이드 (mgCE/g)	탄닌 (mgTAE/g)	DPPH (mgTE/100g)	ABTS (mgTE/100g)
밀양1호	11.45	4.55	4.57	477.2	1278.3
황금찰(대비)	9.88	3.99	3.91	343.1	925.2

표 29. ‘밀양1호’의 항혈전활성

시료농도	아스피린-지표물질 (7.5mg/ml)	수수 (5 mg/ml)		
		중모4002	황금찰	지수
상대적 트롬빈 시간 (%)	150.2	190.5a	170.3b	112

자. 선발 계통을 이용한 가공품의 이화학적 특성 평가

(1) 수수머핀의 이화학적 특성 및 기능성 평가

선발된 수수 계통 ‘밀양1호’를 식품가공에 이용하였을 때 특성을 살펴보기 위하여 머핀 및 차로 가공하여 이화학적 특성을 살펴보았다. 표 30은 ‘밀양1호’를 가루로 체분하여 10%, 20%, 30% 첨가한 머핀과 이와 대조로 ‘황금찰’수수를 첨가하였을 때 일반성분을 나타낸 표이다. 일반 성분은 수분, 조단백 및 무기성분 함량을 조사하였는데, 처리별 머핀의 수분 및 단백질함량은 백 밀 100%로 만든 머핀 및 처리간 큰 차이가 없었고, 미네랄 함량은 칼륨과 마그네슘함량이 수수 가루의 첨가량이 증가함에 따라 대조에 비하여 증가하였으며, 계통간에는 차이가 없었다. Ca 함량은 처리 간에 차이가 없었다.

표 30. 밀양1호 및 황금찰수수가 함유된 머핀의 이화학적 특성

계통	첨가율 (%) (w/w)	함유량 (g/100 g)		다량 무기염류 (mg/100 g)		
		수분	단백질	K	Ca	Mg
백 밀 100%		21.9±0.53	6.5±0.04	97.8±8.66	45.4±1.94	14.6±0.16
밀양1호	10	18.8±0.22	6.8±0.12	127.7±3.82	49.8±4.26	26.0±1.87
	20	19.4±0.49	6.7±0.04	134.1±16.73	47.6±0.28	32.1±0.59
	30	19.2±0.08	6.8±0.04	152.4±2.73	45.8±0.34	39.6±0.20
황금찰	10	23.7±0.27	6.5±0.01	134.3±17.39	48.2±0.82	23.6±1.43
	20	20.5±0.36	6.8±0.12	149.4±2.69	50.2±1.47	31.8±0.31
	30	19.1±0.67	6.7±0.01	157.6±8.91	49.5±2.17	37.6±0.79

표 31은 ‘황금찰’과 선발된 수수 ‘밀양1호’ 가루를 첨가한 머핀의 겉면과 속의 색도 변화를 측정한 결과이다. 대조구 머핀 겉면의 명도(L-value), 적색도(a-value), 황색도(b-value) 값은 각각 68.85, 45.71 및 82.31로 나타났으며, ‘황금찰’수수가루 10, 20 및 30%, ‘밀양1호’ 수수가루 10, 20 및 30% 첨가머핀의 겉면의 L, a, b 값은 각각 60.09~45.32, 16.67~13.66 및 34.97~26.38로 대조구와 큰 차이를 보였다. 수수가루 첨가량이 증가할수록 명도 및 황색도는 감소하였고, 적색도는 뚜렷한 경향이 없었다. 이는 어두운 계열 수수인 ‘황금찰’와 ‘밀양1호’분말의 첨가량이 증가할수록 명도 및 황색도 값이 감소하는 것으로 판단된다. 대조구 머핀 내부의 명도, 적색도, 황색도는 각각 82.31, 1.81 및 34.75로 나타났으며, 수수분말 첨가 머핀의 명도, 적색도, 황색도는 품종 및 첨가 농도별로 각각 48.17~63.85, 6.17~9.62 및 21.40~24.27로 대조구와 차이가 컸다. 내부도 수수 가루 첨가량이 증가할수록 명도 및 황색도는 감소하였으며, 적색도는 증가하는 경향이였다. 이는

붉은 수수가루 첨가 머핀의 색 변화에 영향을 미쳤기 때문으로 생각되며 겉면에 비하여 내부의 색변화가 더 뚜렷하였다. 수수 품종별로는 ‘황금찰’첨가 건면의 적색도가 ‘밀양1호’ 첨가 건면보다 높게 나타나 ‘황금찰’가루의 첨가시 머핀의 색이 더 붉게 나타남을 알 수 있었다.

표 31. 밀양1호 및 황금찰수수가 함유된 머핀의 색도

구분	계통	첨가율 (%) (w/w)	L-value (Lightness)	a-value (Redness)	b-value (Yellowness)	
겉면	백밀 100%		68.85±4.073	45.71±2.609	82.31±0.1032	
	밀양1호	10	53.52±1.768	16.67±0.594	33.95±1.032	
		20	49.21±0.544	15.71±0.007	29.33±0.382	
		30	48.61±2.722	14.80±1.252	26.98±0.488	
	황금찰 수수	10	60.09±1.442	14.23±0.643	34.97±0.184	
		20	52.90±4.271	13.66±0.983	29.45±0.735	
		30	45.32±1.577	15.58±0.368	26.38±1.294	
	속면	백밀 100%		82.31±0.127	1.81±0.170	34.75±0.276
		밀양1호	10	63.85±0.424	6.17±0.170	24.27±0.170
20			58.10±0.424	7.68±0.127	22.18±0.014	
30			52.21±0.672	9.10±0.156	21.84±0.163	
황금찰 수수		10	62.43±0.453	6.49±0.163	23.92±0.233	
		20	57.27±0.262	8.10±0.021	22.66±0.014	
		30	48.17±1.782	9.62±0.205	21.40±0.269	

표 32는 ‘황금찰’과 선발된 ‘밀양1호’ 가루를 첨가한 머핀의 폴리페놀, 탄닌, 플라보노이드 함량 및 ABTS radical 소거활성을 측정된 결과이다. 폴리페놀, 탄닌, 플라보노이드 모두 대조구에 비하여 수수가루를 첨가한 구에서 첨가비율이 높을수록 증가하는 경향이었으며, 특히 탄닌의 함량은 대조구에 비하여 1.4~3.2배 증가하였다. 이는 수수가 곡류 중 페놀성 화합물 함량이 높을 뿐 아니라 다른 곡물에는 거의 없는 탄닌이 높은 수준으로 포함되어 있기 때문으로 (Brown et al, 2001; Parr & Bolwell, 2000) 본 과제에서 선발된 ‘밀양1호’에도 황금찰수수에 비하여 17%함량이 높은 4.57 mg TAE/g 의 탄닌이 포함되어 있다(표 28). 탄닌은 연구초기에는 체내 소화흡수기작과 관련된 영양학적 분야에서 관심의 대상이었지만(Butler,1992; Nguz et al., 1998), 최근에는 축합형 탄닌의 HIV-1 Virus의 저해효과 (Chan, 1998), 면역력 증진을 통한 항암효과(Ferreira & Slade, 2002) 등 여러 가지 생리적 활성들이 밝혀지면서 기능성 물질로 새로이 주목받고 있다. 유색계열 수수의 추출물중 phenolic compound에는 free radical을 안정화시킬 수 있는 phenolic ring이 있어 우수한 항산화력을 가지는데 (Middleton & Kandaswami, 1994), Shi 등 (2001)은 이러한 항산화성분들은 lipoxygenase와 cyclooxygenase와 같은 산화효소를 저해함으로써 강력한 항산화효과를 나타내 활성산소 억제에 기여하고 있다고 보고하였다. 품종에 따라서는 동일한 양의 수수가루를 첨가하였을 때 ‘황금찰’에 비하여 ‘밀양1호’ 수수 첨가시 폴리페놀, 탄닌 및 플라보노이드 함량이 비

숫하거나 조금 증가하였는데, ‘황금찰’에 비해 ‘밀양1호’ 첨가시 폴리페놀 - 0.1~6.5%, 탄닌 2.8~59.4%, 플라보노이드 7.9~17.2% 증가하였다. 이는 선발된 ‘밀양1호’이 황금찰 수수에 비하여 항산화성분이 조금 더 많이 함유하고 있다는 특징이 반영된 결과로 생각된다. 항산화활성은 ABTS radical 소거능을 살펴보았을 때 대조구에 비하여 1.6~3.8배 증가하였으며, 첨가량이 늘어날 수록 증가하였다. 품종별로는 ‘밀양1호’의 10% 첨가시 58% 증가하였고, 20%, 30% 첨가시에는 ‘황금찰’수수와 큰 차이가 나타나지 않았다. 천연물의 항산화활성은 활성 radical에 전자를 공여하고 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 특성을 가지고 있고 인체 내에서는 활성 radical에 의한 노화를 억제시키는 역할을 하고 있으며, radical 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다고 한다(Kim et al. 2001). 수수의 첨가에 따른 항산화활성은 머핀으로 제조된 이후에도 유지되어서 수수의 radical 소거활성은 열에 상당히 안정적인 것으로 나타났다.

표 32. ‘밀양1호’ 및 ‘황금찰’수수 첨가 머핀의 폴리페놀, 탄닌, 플라보노이드 및 ABTS 라디칼소거능 변화

구분	첨가율(% (w/w))	Polyphenol ¹⁾	Tannin ²⁾	Flavonoid ³⁾	ABTS radical scavenging activity ⁴⁾
백밀 100%		1.06±0.028	0.19±0.011	0.02±0.003	0.39±0.032
밀양1호	10	1.27±0.041	0.42±0.045	0.15±0.008	0.96±0.040
	20	1.51±0.044	0.45±0.009	0.32±0.001	1.10±0.023
	30	1.63±0.018	0.60±0.026	0.47±0.011	1.47±0.029
황금찰수수	10	1.20±0.023	0.26±0.008	0.13±0.028	0.61±0.028
	20	1.49±0.027	0.44±0.007	0.30±0.003	1.10±0.012
	30	1.64±0.018	0.56±0.010	0.40±0.005	1.48±0.017

¹⁾ mg gallic acid equivalent per gram sample.

²⁾ mg tannic acid equivalent per gram sample.

³⁾ mg catechin equivalent per gram sample.

⁴⁾ mg Trolox equivalent per 100 gram sample.

⁵⁾ Each value is mean±SD (n=3).

(2) 수수차의 이화학적 특성 및 기능성 평가

선발된 수수 계통 ‘밀양1호’와 대조로 ‘황금찰’ 수수를 이용하여 볶음차로 가공하였을 때 이화학적 특성을 표 33에 나타내었다. 수분함량은 1.34~1.35 g/100 g로 차이가 없었고, 단백질, 칼륨,

칼슘, 마그네슘 함량은 ‘황금찰’수수에 비하여 ‘밀양1호’로 만든 수수차에서 약간 증가하는 경향이 있었다.

표 33. ‘밀양1호’ 및 ‘황금찰’ 수수 볶음차의 이화학적 특성

구분	함유량 (g/100 g)		다량 무기염류 (mg/100 g)		
	수분	단백질	K	Ca	Mg
밀양1호	1.35±0.32	8.31±0.04	608.7±0.75	13.7±0.23	239.7±2.98
황금찰수수	1.34±0.37	8.51±0.08	666.7±33.22	12.9±0.19	257.4±18.49

표 34는 ‘황금찰’과 ‘밀양1호’로 만든 수수차의 폴리페놀, 탄닌, 플라보노이드 함량 및 ABTS radical 소거활성을 측정한 결과이다. ‘밀양1호’와 ‘황금찰’수수의 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 크게 차이가 나지 않았고, 탄닌함량은 ‘밀양1호’에서 약간 높았다. 항산화활성 역시 ‘밀양1호’로 만든 수수차에서 평균값은 약간 높았으나, 오차범위 내의 차이로 통계적 유의성은 없었다.

표 34. ‘밀양1호’ 및 ‘황금찰’수수 볶음차의 폴리페놀, 탄닌, 플라보노이드 및 ABTS 라디컬소거능

구분	Polyphenol ¹⁾	Tannin ²⁾	Flavonoid ³⁾	ABTS radical scavenging activity ⁴⁾
밀양1호	15.49±0.210	7.73±0.216	2.97±0.216	18.19±0.240 ^a
황금찰수수	15.71±0.505	7.15±0.409	3.20±0.409	17.76±0.581 ^a

1) mg gallic acid equivalent per gram sample.

2) mg tannic acid equivalent per gram sample.

3) mg catechin equivalent per gram sample.

4) mg Trolox equivalent per 100 gram sample.

5) Each value is mean±SD (n=3).

제 2 협동과제 : 수수로부터 항혈전 활성소재의 분리동정, 구조결정 및 안정화 기술 개발

1. 수수의 추출 및 분획

가. 수수 95 % EtOH 추출 및 분획

수수 300 g을 Fig. 50에 나타낸 바와 같이 1회에 95 % EtOH 1 L씩 가하여 8시간씩 4회 환류추출한 후 감압 농축하여 EtOH extract (이하 ext.) 17.2002 g을 얻었다. 이 EtOH ext.를 물 200 mL를 가하여 녹이고 여기에 *n*-hexane 200 mL를 가하여 장시간 방치한 후 *n*-hexane 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 4회 반복 실시하였다. 얻어진 *n*-hexane 층을 감압 농축하여 *n*-hexane ext. 5.50316 g을 얻었다. 수층에 CH₂Cl₂를 200 mL 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 CH₂Cl₂ 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 4회 반복 실시하였다. 얻어진 CH₂Cl₂ 층을 감압 농축하여 CH₂Cl₂ ext. 0.5903 g을 얻었다. 다시 수층에 EtOAc 200 mL를 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 EtOAc 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 4회 반복 실시하고 얻어진 EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc ext. 1.4491 g을 얻었다. 다시 수층에 *n*-BuOH 200 mL를 가하고 흔들어 장시간 방치하여 *n*-BuOH 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 3회 반복 실시하여 얻어진 *n*-BuOH 층을 감압 농축하여 *n*-BuOH ext. 4.8910 g을 얻었다. 최종적으로 수층을 감압 농축하여 H₂O ext. 5.0381 g을 얻었다.

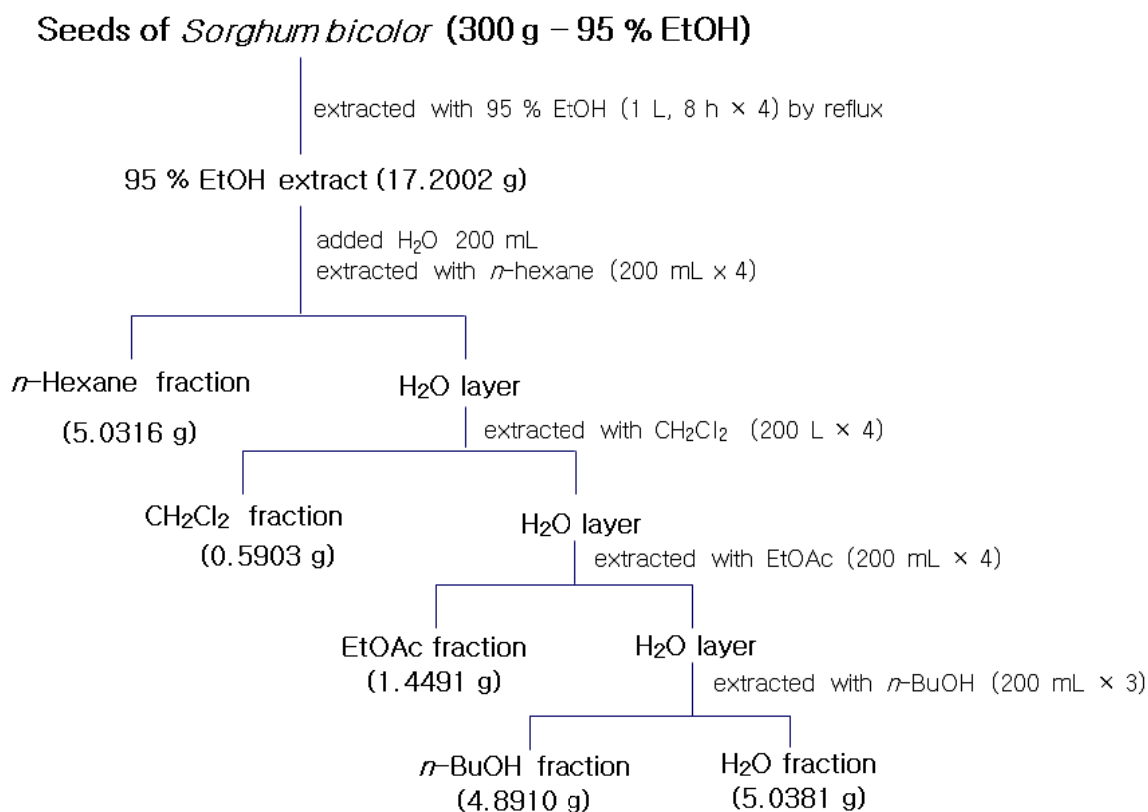


Fig. 50. Extraction and fractionation procedures from Seed of *S. bicolor*.

나. 수수 80 % EtOH 추출 및 분획

수수 300 g을 **Fig. 51**에 나타낸 바와 같이 85 % EtOH로 8시간씩 4회 환류추출한 후 감압 농축하여 EtOH extract (이하 ext.) 19.3032 g을 얻었다. 이 EtOH ext.를 물 200 mL를 가하여 녹이고 여기에 *n*-hexane 200 mL를 가하여 장시간 방치한 후 *n*-hexane 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 4회 반복 실시하였다. 얻어진 *n*-hexane 층을 감압 농축하여 *n*-hexane ext. 5.5109 g을 얻었다. 수층에 CH₂Cl₂를 200 mL 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 CH₂Cl₂ 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 4회 반복 실시하였다. 얻어진 CH₂Cl₂ 층을 감압 농축하여 CH₂Cl₂ ext. 0.6713 g을 얻었다. 다시 수층에 EtOAc 200 mL 를 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 EtOAc 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 4회 반복 실시하고 얻어진 EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc ext. 1.3433 g을 얻었다. 다시 수층에 *n*-BuOH 200 mL를 가하고 흔들어 장시간 방치하여 *n*-BuOH 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 3회 반복 실시하여 얻어진 *n*-BuOH 층을 감압 농축하여 *n*-BuOH ext. 4.4061 g을 얻었다. 최종적으로 수층을 감압 농축하여 H₂O ext. 7.0684 g을 얻었다.

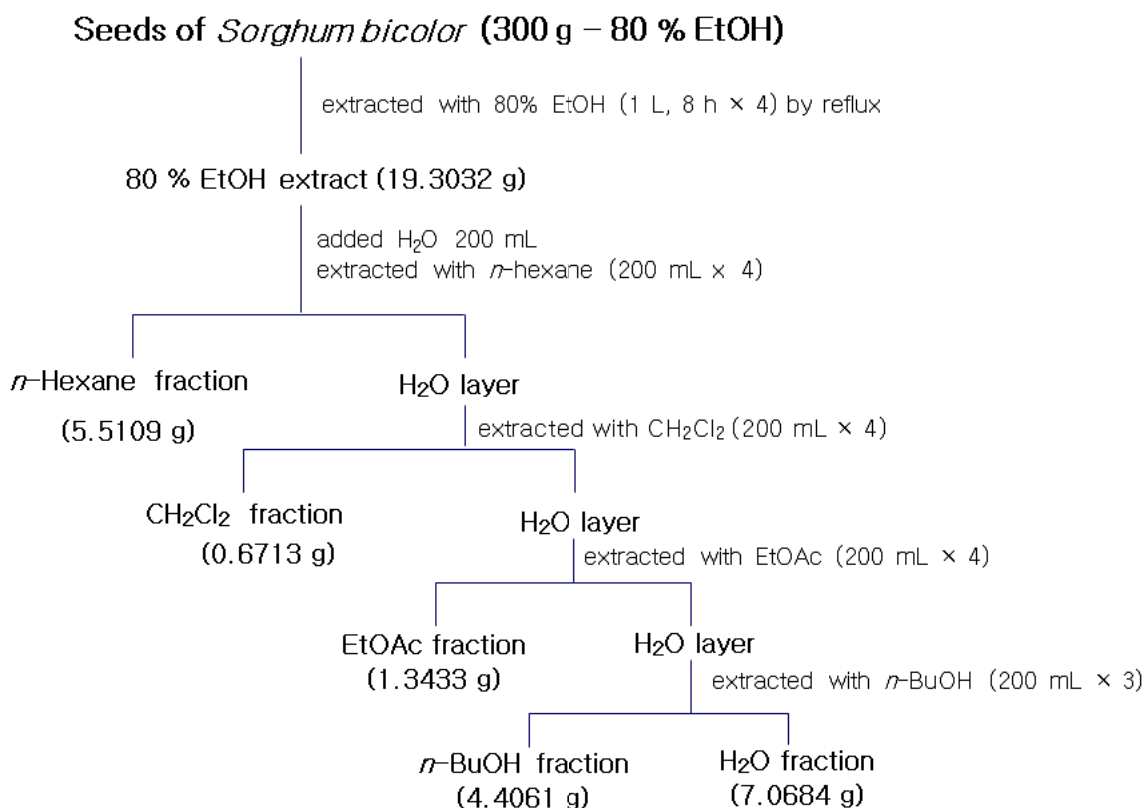


Fig. 51. Extraction and fractionation procedures from Seed of *S. bicolor*.

다. 수입산 수수의 추출 및 분획

중국산 수수 300 g을 **Fig. 52**에 나타낸 바와 같이 95 % EtOH로 8시간씩 4회 환류추출한 후 감압 농축하여 EtOH extract (이하 ext.) 5.4879 g을 얻었다. 이 EtOH ext.를 물 150 mL를 가하여 녹이고 여기에 *n*-hexane 150 mL를 가하여 장시간 방치한 후 *n*-hexane 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 4회 반복 실시하였다. 얻어진 *n*-hexane 층을 감압 농축하여 *n*-hexane ext. 1.8530 g을 얻었다. 수층에 CH₂Cl₂를 150 mL 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 CH₂Cl₂ 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 4회 반복 실시하였다. 얻어진 CH₂Cl₂ 층을 감압 농축하여 CH₂Cl₂ ext. 0.3127 g을 얻었다. 다시 수층에 EtOAc 150 mL 를 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 EtOAc 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 4회 반복 실시하고 얻어진 EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc ext. 0.2086 g을 얻었다. 다시 수층에 *n*-BuOH 150 mL를 가하고 흔들어 장시간 방치하여 *n*-BuOH 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 3회 반복 실시하여 얻어진 *n*-BuOH 층을 감압 농축하여 *n*-BuOH ext. 0.4147 g을 얻었다. 최종적으로 수층을 감압 농축하여 H₂O ext. 2.4932 g을 얻었다.

중국산 수수의 추출물 및 분획물은 국산 수수의 추출물 및 분획물에 비하여 항혈전활성 등

의 생리활성이 현저히 낮게 나타났다 (제1세부과제 결과 참조).

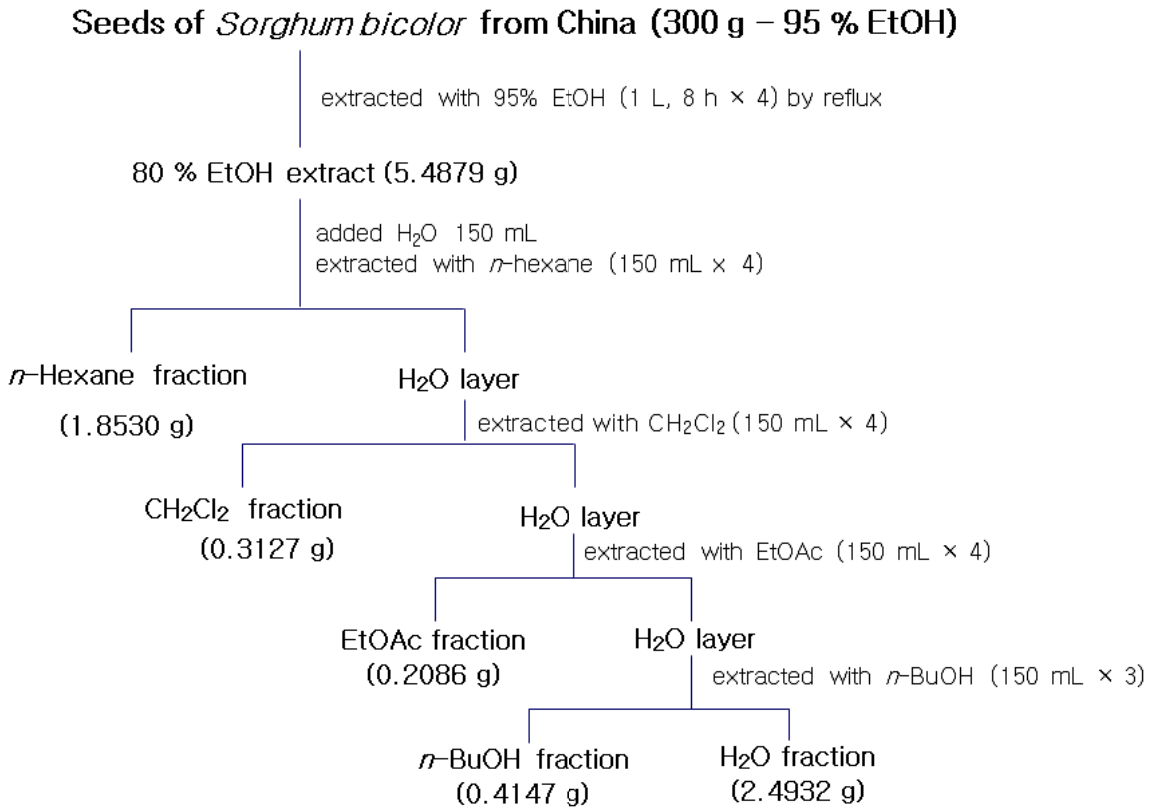


Fig. 52. Extraction and fractionation procedures from Seed of *S. bicolor*.

라. 수수의 대량 추출 및 분획

제1세부과제에서 황금찰수수를 80% 에탄올로 추출한 후, 다양한 유기용매별로 추출하여 항혈전 활성을 측정하였을 때 hexane과 methylene chloride 분획에서 항혈전 관련 유효 활성이 확인되었다. 그러나 수수 대량으로부터 항혈전 소재를 분리할 때는 수수 유래 당성분의 혼재가 염려되어 추출 에탄올 농도를 80% 와 95% 로 하여 항혈전 활성소재를 분리 추출하여 그 활성을 비교 조사하였다 (Fig. 53). 먼저 수수 시료 양을 3 kg으로 하여 80%와 95% 에탄올로 각각 추출하여 항혈전 활성을 비교한 결과, 에탄올 80 %로 추출한 경우 보다 에탄올 95 %로 추출하였을 때 hexane과 methylene chloride 층에 항혈액응고 활성 소재 분리가 뚜렷하게 나타났다. 따라서 수수로부터 대량으로 항혈전 소재 분리 시 95% 에탄올로 추출하기로 제1세부과제와 협의하여 결정하였다.

Fig. 54에 나타낸 바와 같이 한 번에 수수 700 g을 취하여 95 % EtOH 3 L씩을 넣고 12시간

씩 4회 환류 추출하였으며, 수수 700 kg에 대하여 동일한 방법으로 환류추출한 후 감압 농축하여 EtOH extract (이하 ext.) 약 2.0 kg을 얻었다. 이 EtOH ext.를 7개의 분획깔때기에 나누고 각 분획깔때기에 물 1.4 L를 가하여 녹이고 여기에 *n*-hexane 1 L를 가하여 장시간 방치한 후 *n*-hexane 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 5회 반복 실시하였다. 얻어진 *n*-hexane 층을 감압 농축하여 *n*-hexane ext. 1106.6 g을 얻었다. 각 수층에 CH₂Cl₂를 1 L씩 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 CH₂Cl₂ 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 7회 반복 실시하였다. 얻어진 CH₂Cl₂ 층을 감압 농축하여 CH₂Cl₂ ext. 156.1 g 을 얻었다. 다시 각 수층에 EtOAc 1 L씩 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 EtOAc 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 7회 반복 실시하고 얻어진 EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc ext. 108.8 g을 얻었다. 다시 수층에 *n*-BuOH 1 L씩을 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 *n*-BuOH 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 7회 반복 실시하여 얻어진 *n*-BuOH 층을 감압 농축하여 *n*-BuOH ext. 395.0 g을 얻었다. 최종적으로 수층을 감압 농축하여 H₂O ext. 212.1 g을 얻었다.

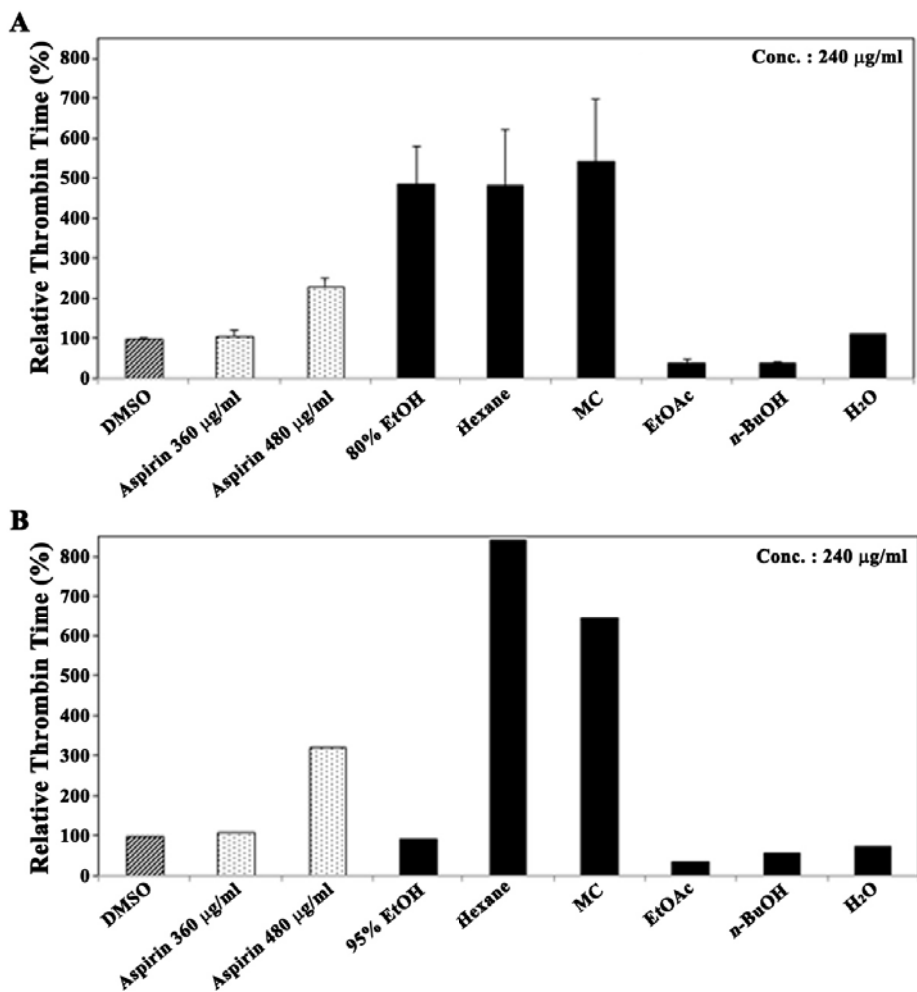


Fig. 53. Thrombin inhibition activity of 80 % EtOH extract (A) and 95% EtOH extracts (B) from 3 kg of golden glutinous sorghum.

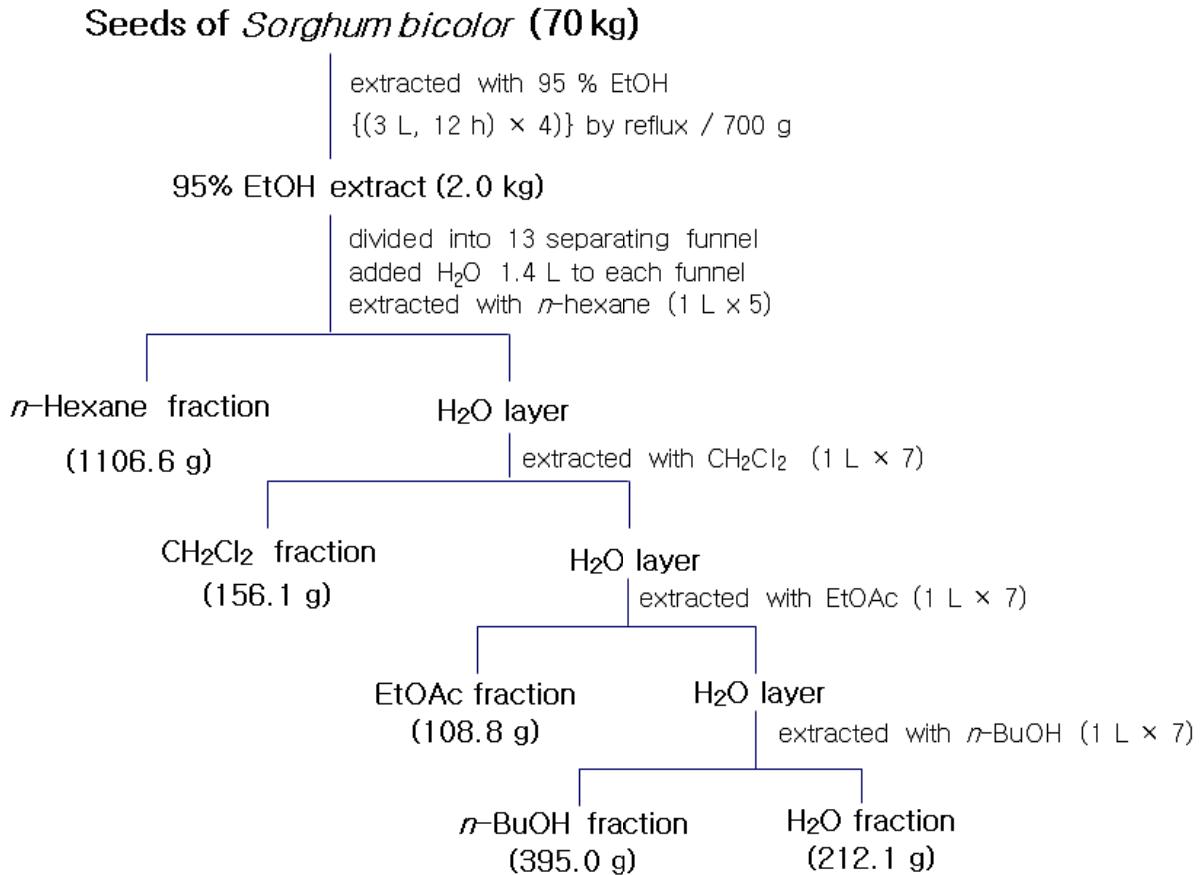


Fig. 54. Extraction and fractionation procedures from the seeds of *S. bicolor*.

(1) 황금찰수수의 추출 및 분획

(가) 황금찰수수의 추출 및 분리 배경

예비실험을 통한 수수를 95 % EtOH 및 80 % EtOH로 추출 및 분획하여 각 추출물 및 분획물에 대하여 항혈전활성 등을 측정한 결과(제1세부과제 결과 참조) 95 % EtOH 추출물이 우수하였으므로 수수의 추출용매로 95 % EtOH를 사용하였다.

Fig. 55에 나타낸 바와 같이 한 번에 수수 700 g을 취하여 95 % EtOH 3 L씩을 넣고 12시간씩 4회 환류추출하였으며, 수수 70 kg에 대하여 동일한 방법으로 환류추출한 후 감압 농축하여 EtOH extract (이하 ext.) 약 2.0 kg을 얻었다. 이 EtOH ext.를 7개의 분획깔때기에 나누고 각 분획깔때기에 물 1.4 L를 가하여 녹이고 여기에 *n*-hexane 1 L를 가하여 장시간 방치한 후 *n*-hexane 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 5회 반복 실시하였다. 얻어진 *n*-hexane 층을 감압 농축하여 *n*-hexane ext. 1106.6 g을 얻었다. 각 수층에 CH₂Cl₂를 1 L씩 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 CH₂Cl₂ 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 7회 반복 실시하였다. 얻어진 CH₂Cl₂

층을 감압 농축하여 CH₂Cl₂ ext. 156.1 g 을 얻었다. 다시 각 수층에 EtOAc 1 L씩 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 EtOAc 층과 수층으로 나누었으며, 이 조작을 7회 반복 실시하고 얻어진 EtOAc 층을 감압 농축하여 EtOAc ext. 108.8 g을 얻었다. 다시 수층에 *n*-BuOH 1 L씩을 가하고 흔들어 장시간 방치한 후 *n*-BuOH 층과 수층으로 나누었다. 이 조작을 7회 반복 실시하여 얻어진 *n*-BuOH 층을 감압 농축하여 *n*-BuOH ext. 395.0 g을 얻었다. 최종적으로 수층을 감압 농축하여 H₂O ext. 212.1 g을 얻었다.

(나) 황금찰수수 ethyl acetate층의 분리

Ethyl acetate층을 flash column chromatography법으로 분리한 과정은 다음과 같다. Column (I.D.; 75 × 9 cm)에 silica gel (230~400 mesh)을 약 40 cm 정도 채우고 100% *n*-hexane 으로 elution 시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, EtOAc층 108.8 g 중 103.8 g을 silica gel (70~230 mesh) 370 g에 흡착시켜 column에 loading 하였다. 이 후 100% *n*-hexane을 mobile phase로 elution을 시작하여 *n*-hexane 용액에 CH₂Cl₂ 농도를 0% ~ 100%(gradient), CH₂Cl₂ 용액에 MeOH 농도를 0% ~ 100% (gradient)로 elution 시켜 SB-ET-A ~ SB-ET-Z, SB-MC-AA ~ SB-MC-AE까지 33개의 subfraction으로 나누었으며, 얻어진 분획의 총 무게는 74.2 g을 얻었다. 그 분리과정은 Fig. 56와 Fig. 57에 나타내었다. 33개의 subfraction에 대하여 항혈전활성 등을 측정하였으며(제1세부과제 결과 참조), 항혈전활성이 우수한 SB-EA-N, AA, O~R subfraction에 대하여 normal phase 및 reverse phase chromatography 그리로 HPLC를 통하여 분리한 결과 23개의 화합물을 얻었다. 이화학적 및 분광학적 방법으로 그 구조를 확인하였으며, 화합물 1~23의 구조를 Fig. 58에 나타내었다.

(다) 황금찰수수 *n*-hexane층의 분리

항혈전작용이 우수한 *n*-hexane층을 flash column chromatography법으로 분리한 과정은 다음과 같다. Column (I.D.; 75 × 9 cm)에 silica gel (230~400 mesh)을 약 40 cm 정도 채우고 100% *n*-hexane 으로 elution 시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, *n*-hexane 층 1106.6g 중 231.2 g을 silica gel(70~230 mesh) 370 g에 흡착시켜 column에 loading 하였다. 이 후 100% *n*-hexane을 mobile phase로 elution을 시작하여 *n*-hexane 용액에 CH₂Cl₂ 농도를 9%, 11%, 16%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (gradient)로 elution 시켜 SB-HE-A부터 SB-HE-AJ 까지 36개의 subfraction으로 나누었으며, 얻어진 분획의 총 무게는 185.2 g을 얻었다. Subfraction별 무게는 Table 35에 나타내었다. 그 중에서 SB-He-E 와 SB-He-X 에 대하여 분리하여 3개의 화합물을 얻었다. 분리과정을 Fig. 59에 나타내었다.

Seeds of *Sorghum bicolor* (70 kg)

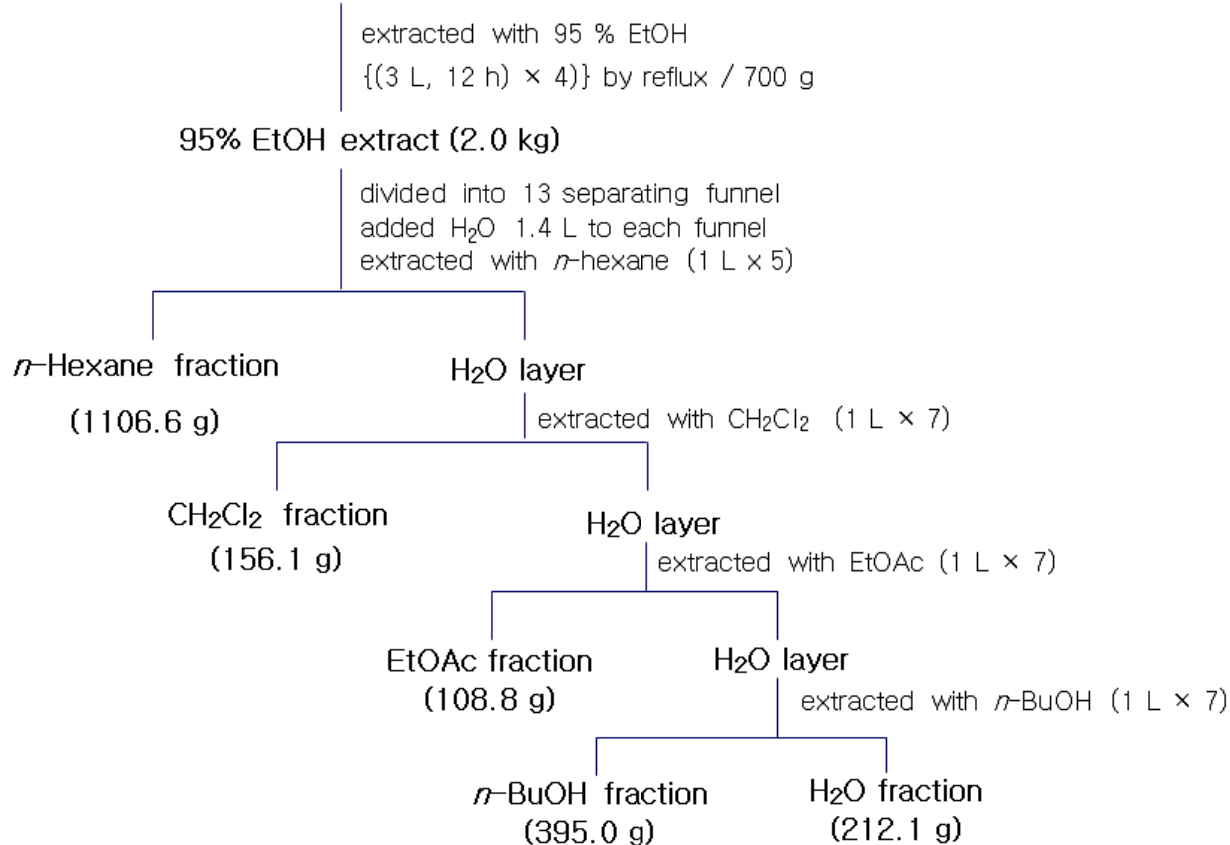


Fig. 55. Extraction and fractionation procedures from the seeds of *S. bicolor*.

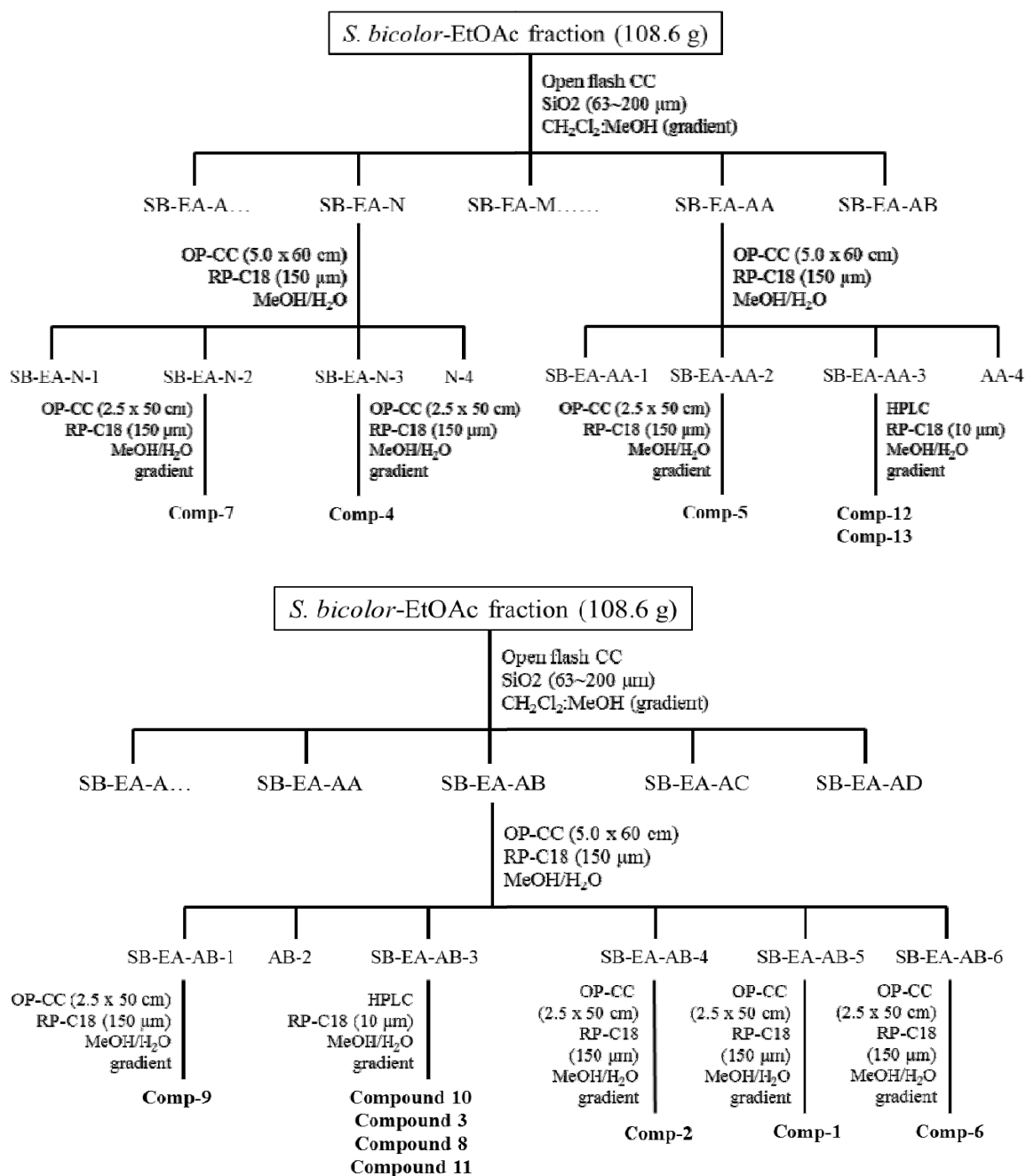


Fig. 56. Isolation scheme of compounds (1–13) from the ethyl acetate fraction of the seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench var. *hwanggumchal*.

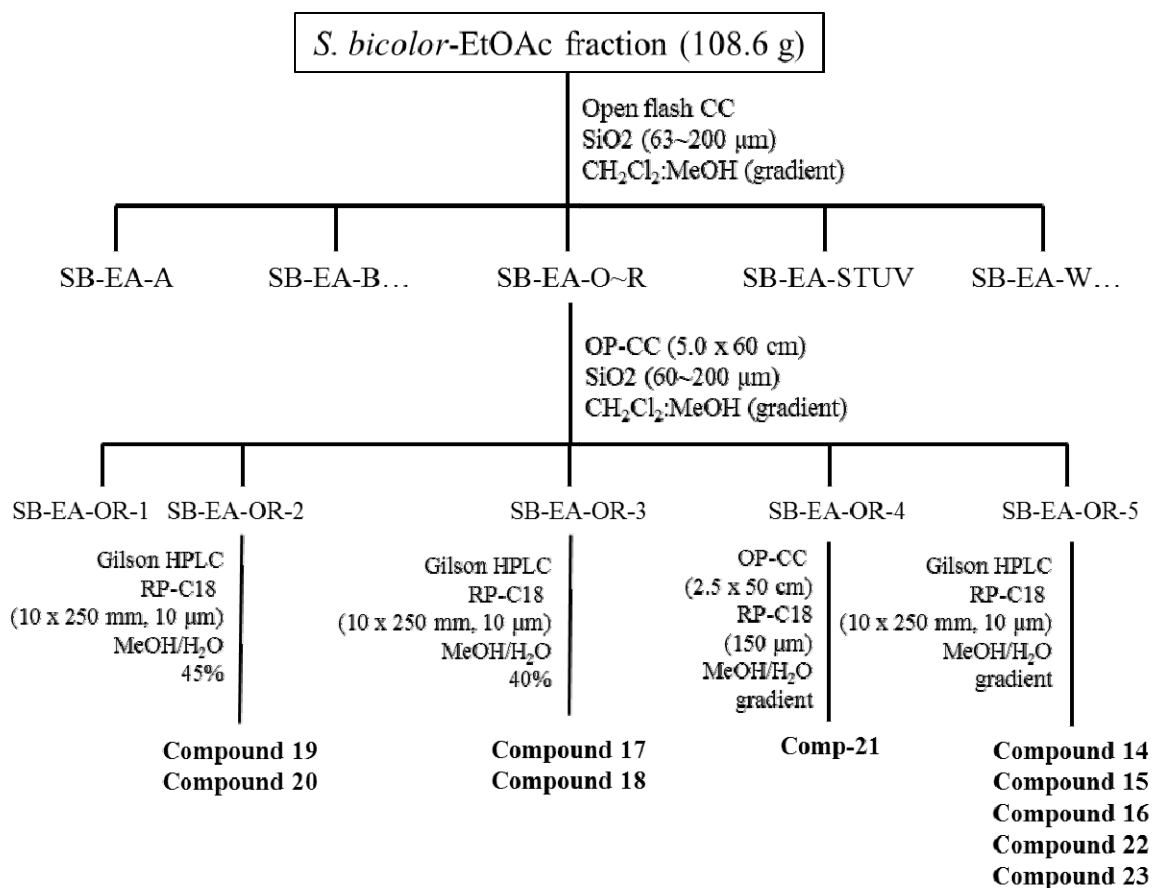


Fig. 57. Isolation scheme of compounds (14–23) from the ethyl acetate fraction of the seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench var. *hwanggumchal*.

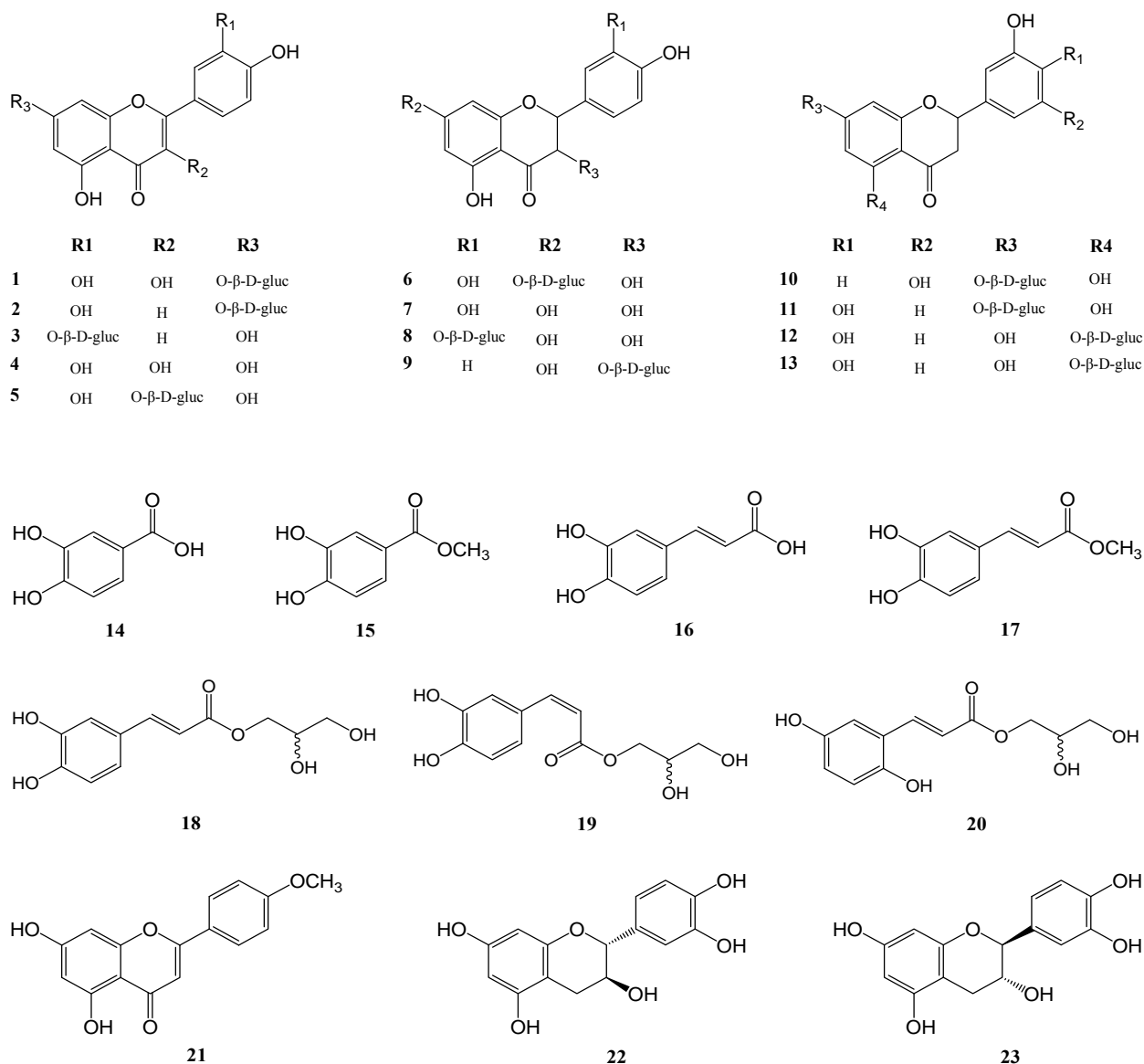


Fig. 58. Chemical structures of isolated compounds (1–23) from the EtOAc fraction of the seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench var. *hwanggumchal*.

Table 35. Subfractions of *n*-hexane fraction from the ethanol extract of *S. bicolor*.

subfraction No.	weight (g)	subfraction No.	weight (g)	subfraction No.	weight (g)
SB-HE-A	1.0641	SB-HE-M	11.6058	SB-HE-Y	7.0178
SB-HE-B	1.3224	SB-HE-N	3.3677	SB-HE-Z	0.7790
SB-HE-C	3.3718	SB-HE-O	6.5806	SB-HE-AA	0.8067
SB-HE-D	4.9662	SB-HE-P	2.3224	SB-HE-AB	0.5382
SB-HE-E	9.7917	SB-HE-Q	2.1127	SB-HE-AC	1.4404
SB-HE-F	4.5379	SB-HE-R	11.5943	SB-HE-AD	0.6635
SB-HE-G	2.0512	SB-HE-S	0.4832	SB-HE-AE	1.9930
SB-HE-H	0.7701	SB-HE-T	6.2444	SB-HE-AF	5.6165
SB-HE-I	0.8517	SB-HE-U	0.7709	SB-HE-AG	0.8907
SB-HE-J	32.0946	SB-HE-V	6.8346	SB-HE-AH	0.8012
SB-HE-K	1.3651	SB-HE-W	11.8658	SB-HE-AI	0.7831
SB-HE-L	5.6060	SB-HE-X	25.9574	SB-HE-AJ	0.9849

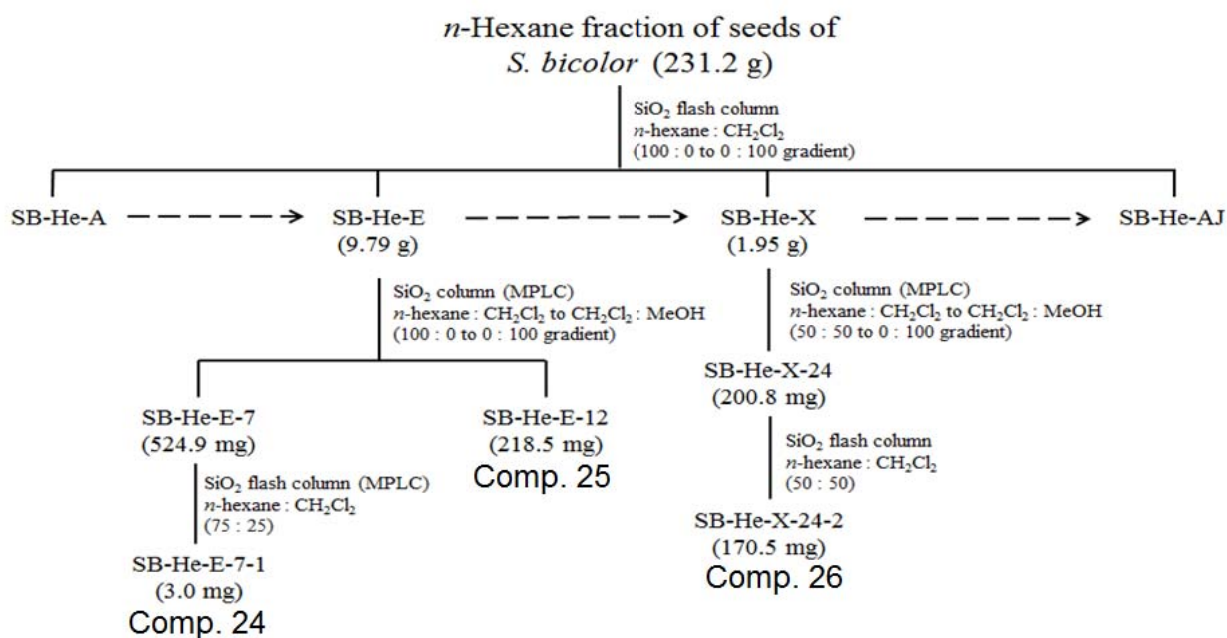


Fig. 59. Isolation scheme of compounds (24–26) from the *n*-hexane fraction of the seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench var. *hwanggumchal*.

(라) 황금찰수수 *n*-Butanol층의 분리

n-Butanol층을 flash column chromatography법으로 분리한 과정은 다음과 같다. Column (I.D.; 75 × 9 cm)에 silica gel (230~400 mesh)을 약 40 cm 정도 채우고 100% dichlormethane 으로 elution 시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, BuOH층 395.0 g 중 200.0 g을 silica gel(70~230 mesh) 370 g에 흡착시켜 column에 loading 하였다. 이 후 CH₂Cl₂ 용액에 MeOH 농도를 0% ~ 100% (gradient)로 elution 시켜 SB-Bu-A ~ SB-Bu-S까지 33개의 subfraction으로 나누었으며, 얻어진 분획의 총 무게는 74.2 g을 얻었다. 그 분리과정을 Fig. 60에 나타내었다. 18개의 subfraction에 대하여 항혈전활성 등을 측정하였으며(제1세부과제 결과 참조), 항혈전활성이 우수한 SB-ET-E, L ~ M subfraction이 좋은 항혈전활성을 보였다. 그 중 SB-ET-B 와 SB-ET-F subfraction에 대하여 분리하여 화합물 2개를 얻었다.

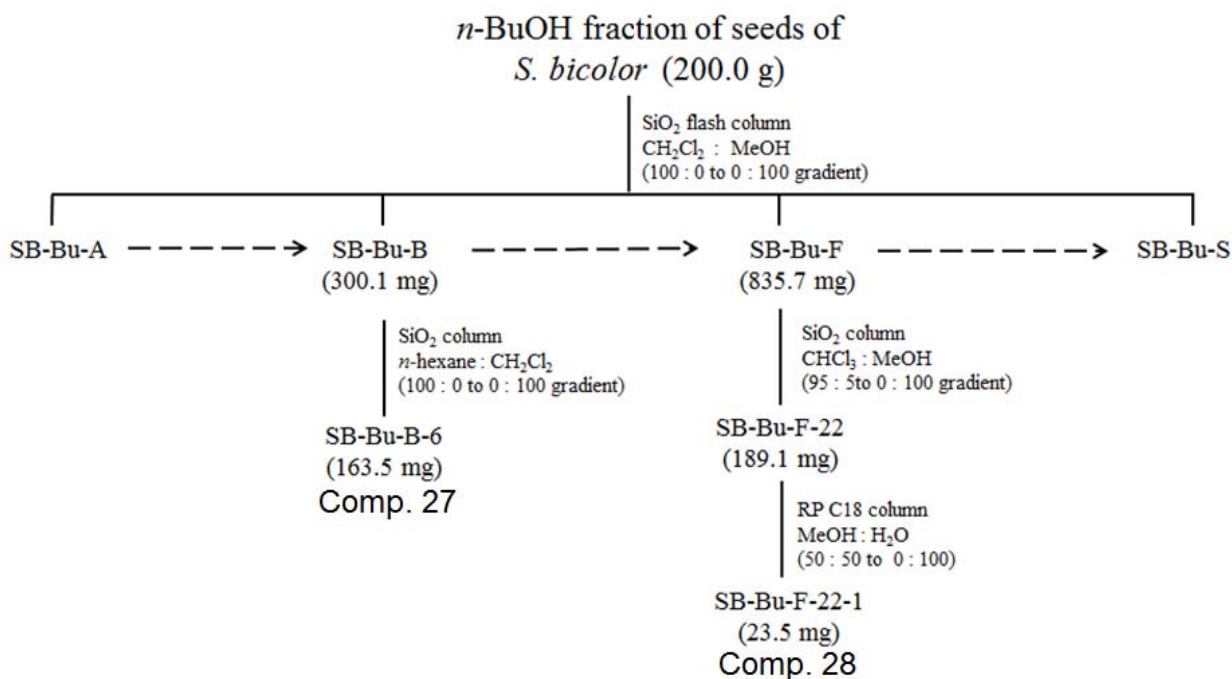


Fig. 60. Isolation scheme of compounds (27, 28) from the *n*-BuOH fraction of the seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench var. *hwanggumchal*.

(2) *n*-Hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH 층으로부터 얻은 생리활성물질의 구조 결정

(가) 분리된 화합물의 구조

EtOAc, *n*-Hexane 및 *n*-BuOH fraction에 대하여 SiO₂ open column chromatography를 실시하여 얻은 분획을 RP C18 column open chromatography, SiO₂ open column chromatography를 반복 실시하였다. EtOAc 분획으로부터 23개의 화합물을 분리하여 그 구조를 화학적 및 분광학적 방법으로 측정된 결과 Quercetin-7-*O*-β-D-glucoside (1), Luteolin-7-*O*-β-D-glucoside (2), Luteolin-3'-*O*-β-D-glucoside (3), Quercetin (4), Quercetin-3-*O*-β-D-glucoside (5), Taxifolin-7-*O*-β-D-glucoside (6), Taxifolin (7), Taxifolin-3'-*O*-β-D-glucoside (8), Aromadendrin-3-*O*-β-D-glucoside (9), 5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanone-7-*O*-β-D-glucoside (10), Eriodictyol-7-*O*-β-D-glucoside (11), (2*R*)-Eriodictyol-5-*O*-β-D-glucoside (12), (2*S*)-Eriodictyol-5-*O*-β-D-glucoside (13), Protocatechuic acid (14), Benzoic acid (15), Caffeic acid (16), Methyl 3,4-dihydroxycinnamate (17), 1-*O*-caffeoylglycerol (18), Hwanggeumchal A (19), Hwanggeumchal B (20), Acacetin (21), (+)-catechin (22), (-)-catechin (23)임을 확인하였다. *n*-Hexane 분획으로부터 3개의 화합물을 분리하여 그 구조를 화학적 및 분광학적 방법으로 측정된 결과 octadecane (24), palmitic acid (25), β-sitosterol (26)임을 확인하였다. 또한 *n*-butanol 분획으로부터 2개의 화합물을 분리하여 그 구조를 화학적 및 분광학적 방법으로 측정된 결과 heptacosan-1-ol (27), coumaric acid (28)임을 확인하였다. 분리된 화합물 1~23의 구조를 Fig. 58에, 화합물 24~28의 구조를 Fig. 61에 나타내었다.

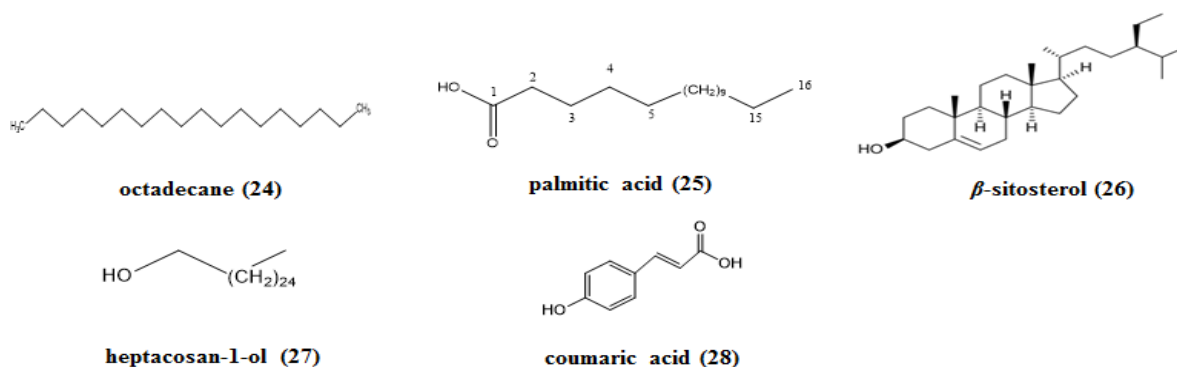


Fig. 61. Chemical structures of isolated compounds (24–28) from the *n*-hexane and *n*-butanol fractions of the seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench var. *hwanggeumchal*.

(나) 분리된 화합물의 물리화학적 및 분광학적 데이터

Quercetin-7-O-β-D-glucoside (1)

Yellow powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ: 7.75 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.65 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 6.45 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.04 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''), 3.30–3.92 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6a'', H-6b''); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz) δ: 146.4 (C-2), 137.8 (C-3), 177.6 (C-4), 162.3 (C-5), 100.3 (C-6), 164.6 (C-7), 95.7 (C-8), 157.9 (C-9), 106.4 (C-10), 124.1 (C-1'), 116.3 (C-2'), 149.1 (C-3'), 148.9 (C-4'), 116.4 (C-5'), 122.0 (C-6'), 101.8 (C-1''), 74.9 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.5 (C-5''), 62.6 (C-6''); FAB-MS *m/z* (rel. int.): 465.10 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₁H₂₀O₁₂, 464.10).

Luteolin-7-O-β-D-glucoside (2)

Yellow powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ: 6.40 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.50 (1H, s, H-3), 6.69 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.80 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 7.33 (1H, dd, *J* = 2.0 and 8.0 Hz, H-6'), 7.31 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 5.06 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 3.40–3.83 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''a, H-6''b); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz) δ: 161.1 (C-2), 122.2 (C-3), 182.8 (C-4), 163.6 (C-5), 99.9 (C-6), 165.6 (C-7), 94.8 (C-8), 157.7 (C-9), 105.9 (C-10), 119.3 (C-1'), 115.6 (C-2'), 149.5 (C-3'), 150.6 (C-4'), 113.1 (C-5'), 102.9 (C-6'), 100.4 (C-1''), 73.5 (C-2''), 76.7 (C-3''), 70.0 (C-4''), 77.2 (C-5''), 61.2 (C-6''); FAB-MS *m/z* (rel. int.): 448.10 [M]⁺, (calcd for C₂₁H₂₀O₁₁, 448.10).

Luteolin-3'-O-β-D-glucoside (3)

Yellow powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ: 6.29 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.50 (1H, s, H-3), 6.74 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.15 (1H, dd, *J* = 2.0 and 8.4 Hz, H-6'), 7.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 4.94 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 3.17–3.92 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''a, H-6''b); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz) δ: 162.0 (C-2), 105.2 (C-3), 182.4 (C-4), 158.6 (C-5), 99.2 (C-6), 170.0 (C-7), 93.9 (C-8), 158.0 (C-9), 105.5 (C-10), 124.2 (C-1'), 114.2 (C-2'), 149.4 (C-3'), 147.9 (C-4'), 116.8 (C-5'), 118.9 (C-6'), 101.4 (C-1''), 73.5 (C-2''), 78.7 (C-3''), 70.0 (C-4''), 77.2 (C-5''), 62.2 (C-6''); FAB-MS *m/z* (rel. int.): 471.10 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₁H₂₀O₁₁, 448.10).

Quercetin (4)

Yellow needles; $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 6.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.37 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.62 (1H, dd, $J = 2.0$ and 7.5 Hz, H-6'), 7.73 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 147.9 (C-2), 137.2 (C-3), 177.3 (C-4), 162.5 (C-5), 99.3 (C-6), 165.7 (C-7), 94.4 (C-8), 158.2 (C-9), 104.4 (C-10), 124.1 (C-1'), 116.0 (C-2'), 146.2 (C-3'), 148.7 (C-4'), 116.2 (C-5'), 121.6 (C-6'); ESI-MS m/z 301.23 $[\text{M-H}]^-$, (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, 302.30).

Quercetin-3-O- β -D-glucoside (5)

Yellow amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 6.12 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.30 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.57 (1H, dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, H-6'), 7.82 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 5.04 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.45–3.85 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6a'', H-6b''); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 158.1 (C-2), 130.2 (C-3), 180.2 (C-4), 162.8 (C-5), 100.3 (C-6), 164.6 (C-7), 97.7 (C-8), 160.4 (C-9), 105.4 (C-10), 122.2 (C-1'), 115.4 (C-2'), 146.6 (C-3'), 149.5 (C-4'), 121.8 (C-5'), 120.9 (C-6'), 104.6 (C-1''), 75.6 (C-2''), 76.9 (C-3''), 71.3 (C-4''), 76.7 (C-5''), 62.5 (C-6''); ESI-MS m/z 487.10 $[\text{M+Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$, 464.10).

Taxifolin-7-O- β -D-glucoside (6)

Yellow powder; $^1\text{H-NMR}$ (Pyridine- d_5 , 400 MHz) δ : 7.37 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2'), 7.08 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.98 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.15 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.08 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 5.26 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 4.90 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-2), 4.55 (1H, d, $J = 11.2$, H-3) 3.54–4.07 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6a'', H-6b''); $^{13}\text{C-NMR}$ (Pyridine- d_5 , 100 MHz) δ : 85.4 (C-2), 73.8 (C-3), 199.9 (C-4), 167.2 (C-5), 98.3 (C-6), 164.8 (C-7), 96.8 (C-8), 163.9 (C-9), 103.6 (C-10), 129.8 (C-1'), 116.9 (C-2'), 147.8 (C-3'), 148.6 (C-4'), 117.0 (C-5'), 120.8 (C-6'), 101.9 (C-1''), 73.8 (C-2''), 78.8 (C-3''), 71.4 (C-4''), 79.5 (C-5''), 62.6 (C-6'').

Taxifolin (7)

Yellow amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ : 6.89 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, dd, $J = 2.0$ and 8.0, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.15 (1H, d, $J = 2.0$, H-6), 6.13 (1H, d, $J = 2.0$, H-8), 4.92 (2H, dd, $J = 2.0, 12.8$ Hz, H-2, H-3), 4.50 (1H, d, $J = 11.6$, H-1'), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol- d_4) δ : 85.0 (C-2), 73.6 (C-3), 199.9 (C-4), 164.8 (C-5), 98.3

(C-6), 167.2(C-7), 96.8 (C-8), 163.97 (C-9), 103.6 (C-10), 129.8 (C-1'), 116.9 (C-2'), 147.8 (C-3'), 148.6 (C-4'), 117.0 (C-5'), 120.9 (C-6'); ES-MS (positive) m/z : 305.25 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{15}H_{12}O_7$, 304.25).

Taxifolin-3'-O- β -D-glucoside (8)

Yellow powder; 1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ : 6.89 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.15 (1H, d, $J = 2.0$, H-6), 6.13 (1H, d, $J = 2.0$, H-8), 4.92 (2H, dd, $J = 2.0, 11.6$ Hz, H-2, H-3), 4.50 (1H, d, $J = 11.2$, H-1''), 3.54–4.07 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6a'', H-6b''); ^{13}C -NMR (100 MHz, Methanol- d_4) δ : 85.0 (C-2), 73.6 (C-3), 199.9 (C-4), 164.8 (C-5), 98.3 (C-6), 167.2 (C-7), 96.8 (C-8), 164.0 (C-9), 103.6 (C-10), 129.8 (C-1'), 116.9 (C-2'), 147.8 (C-3'), 148.6 (C-4'), 117.0 (C-5'), 120.9 (C-6'), 101.9 (C-1''), 73.8 (C-2''), 78.8 (C-3''), 71.4 (C-4''), 79.5 (C-5''), 62.6 (C-6'').

Aromadendrin-3-O- β -D-glucoside (9)

Yellow powder; UV (MeOH) λ_{max} nm: 223, 293; IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3253 (OH), 1635 (C=O), 1614, 1598, 1517 (C=C), 1253, 1161, 1071 (C-O); 1H -NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 7.36 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', H-6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', H-5'), 5.91 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.89 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.23 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-2), 4.97 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-3), 4.38 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.24–3.87 (6H, m, H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6a'', H-6b''); ^{13}C -NMR (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 195.2 (C-4), 168.1 (C-7), 164.5 (C-5), 163.3 (C-9), 158.3 (C-4'), 129.5 (C-2', C-6'), 127.5 (C-1'), 115.3 (C-3', C-5'), 101.6 (C-10, C-1''), 93.4 (C-6), 95.4 (C-8), 82.6 (C-2), 77.2 (C-5''), 76.5 (C-3''), 76.2 (C-3), 73.5 (C-2''), 70.2 (C-4''), 61.6 (C-6''); FAB-MS m/z 473 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{21}H_{22}O_{11}$, 450.1).

5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanone-7-O- β -D-glucoside (10)

Yellow powder; UV (MeOH) λ_{max} nm: 215, 282 and 334; IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3385, 1696, 1635, 1580, 1528, 1446, 1344, 1242, 1073, and 857; 1H -NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 6.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.33 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.83 (H, s, H-4'), 6.70 (2H, d, $J = 0.8$ Hz, H-2'/6'), 5.22 (1H, dd, $J = 2.8$ and 12.0, H-2), 4.68 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.39–3.87 (6H, m, H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6a'', H-6b''), 3.17 (1H, dd, $J = 2.8, 19.2$ Hz), 2.74 (1H, dd, $J = 2.8, 17.2$ Hz); ^{13}C -NMR (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 80.1 (C-2), 42.5 (C-3), 197.6 (C-4), 162.3 (C-5), 100.4 (C-6), 164.6 (C-7), 95.7 (C-8), 157.3 (C-9), 106.4 (C-10), 124.1 (C-1'), 116.3 (C-2'),

149.1 (C-3'), 148.9 (C-4'), 161.4 (C-5'), 116.4 (C-6'), 101.84 (C-1''), 74.9 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.5 (C-5''), 62.6 (C-6''); FAB-MS m/z (rel. int.): 473 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{21}H_{22}O_{11}$, 450.11).

Eriodictyol-7-O- β -D-glucoside (11)

Yellow powder; 1H -NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 5.29 (1H, dd, $J = 3.2, 12.4$ Hz, H-2), 3.05 (1H, dd, $J = 17.0$ and 12.8 Hz, H-3a), 2.70 (2H, dd, $J = 17.0$ and 2.8 Hz, H-3b), 6.45 (1H, br s, H-6), 6.11 (1H, br s, H-8), 6.88 (1H, br s, H-2'), 6.75 (2H, br s, H-5'/ 6'), 4.75 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.90 (1H, br d, $J = 12.4$ Hz, H-6a''), 3.71 (1H, m, H-6b''), 3.38-3.52 (4H, overlapped, H-2'', 3'', 4'', 5''); ^{13}C -NMR (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 80.7 (C-2), 44.1 (C-3), 193.6 (C-4), 164.9 (C-5), 97.0 (C-6), 167.0 (C-7), 98.0 (C-8), 164.6 (C-9), 105.0 (C-10), 131.5 (C-1'), 114.8 (C-2'), 147.0 (C-3'), 146.6 (C-4'), 116.3 (C-5'), 119.4 (C-6'), 101.3 (C-1''), 74.7 (C-2''), 78.3 (C-3''), 71.2 (C-4''), 77.8 (C-5''), 62.4 (C-6'').

(2R)-Eriodictyol-5-O- β -D-glucoside (12)

Yellow amorphous powder; UV λ_{max} (MeOH) nm: 232 and 284; 1H -NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 5.29 (1H, br d, $J = 11.2$ Hz, H-2), 3.05 (1H, dd, $J = 11.2, 15.6$ Hz, H-3a), 2.68 (1H, br d, $J = 15.6$ Hz, H-3b); 6.42 (1H, br s, H-6), 6.13 (1H, br s, H-8), 6.92 (1H, br s, H-2'), 6.79 (2H, br s, H-5'/ 6'), 4.85 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.30-3.96 (6H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6a'', 6b''); ^{13}C -NMR (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 80.3 (C-2), 46.3 (C-3), 193.2 (C-4), 161.6 (C-5), 100.2 (C-6), 166.6 (C-7), 99.5 (C-8), 166.0 (C-9), 106.8 (C-10), 131.8 (C-1'), 114.7 (C-2'), 146.8 (C-3'), 146.4 (C-4'), 116.3 (C-5'), 119.3 (C-6'), 103.9 (C-1''), 74.6 (C-2''), 78.4 (C-3''), 71.2 (C-4''), 77.4 (C-5''), 62.5 (C-6''); ESI-MS (m/z 449.40, $[M-H]^-$) (calcd for $C_{22}H_{24}O_{10}$, 450.40).

(2S)-Eriodictyol-5-O- β -D-glucoside (13)

Yellow amorphous powder; 1H -NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 5.24 (1H, br d, $J = 12.4$ Hz, H-2), 2.93 (1H, dd, $J = 12.4$ and 16.8 Hz, H-3a), 2.70 (1H, br d, $J = 16.8$ Hz, H-3b); 6.47 (1H, br s, H-6), 6.13 (1H, br s, H-8), 6.92 (1H, br s, H-2'), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 4.78 (1H, br d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.30-3.96 (6H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6a'', 6b''); ^{13}C -NMR (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 80.2 (C-2), 46.2 (C-3), 192.1 (C-4), 162.2 (C-5), 100.4 (C-6), 166.9 (C-7), 99.5 (C-8), 166.4 (C-9), 107.0 (C-10), 131.6 (C-1'), 114.7 (C-2'), 146.7 (C-3'), 146.4 (C-4'), 116.3 (C-5'), 119.3 (C-6'), 104.9 (C-1''), 74.6 (C-2''), 78.5 (C-3''), 71.2 (C-4''), 77.0

(C-5"), 62.5 (C-6"); ESI-MS (m/z 449.25, [M-H]⁻) (calcd for C₂₂H₂₄O₁₀, 450.25).

Protocatechuic acid (14)

Brown powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ : 7.37 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.36 (1H, dd, J = 2.0, 8.4 Hz, H-6), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : 169.0 (-COO⁻), 151.9 (C-4), 146.3 (C-3), 123.8 (C-6), 122.7 (C-1), 117.5 (C-2), 116.0 (C-5).

Benzoic acid (15)

White powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ : 7.43 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.42 (1H, d, J = 2.0, 8.4 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 3.84 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz): δ 172.1 (-COO⁻), 151.9 (C-4), 146.3 (C-3), 123.8 (C-6), 122.7 (C-1), 117.5 (C-2), 116.0 (C-5), 52.4 (-OCH₃).

Caffeic acid (16)

White powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ : 7.60 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7) , 7.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, 2.0, 8.0 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.31 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : 171.0 (-COO⁻), 152.1 (C-4), 147.9 (C-3), 124.4 (C-6), 117.2 (C-2), 115.8 (C-5).

Methyl 3,4-dihydroxycinnamate (17)

White powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ : 7.54 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.94 (1H, d, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.26 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8), 3.76 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : 170.1 (-COO⁻), 149.9 (C-4), 148.3 (C-3), 128.9 (C-6), 122.4 (C-1), 116.9 (C-2), 115.6 (C-5), 52.1 (-OCH₃).

1-O-caffeoylglycerol (18)

Brown amorphous powder; ¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ : 7.58 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.05 (1H, br s, H-2), 6.95 (1H, br d, J = 8.0 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.29 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8), 4.26 (1H, dd, J = 4.0, 11.2 Hz, H-1'a), 4.16 (1H, dd, J = 6.0, 11.2 Hz, H-1'b), 3.90 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, m, H-3'a), 3.60 (1H, m, H-3'b); ¹³C-NMR (Methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : 169.4 (C-9), 149.5 (C-4), 146.9 (C-3), 147.2 (C-7), 127.9 (C-1), 123.1 (C-6), 116.3 (C-8), 115.3 (C-2), 115.0 (C-5), 71.4 (C-2'), 66.7 (C-1'), 64.2 (C-3').

Hwanggeumchal A (19)

Brown amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 7.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.05 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-7), 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.78 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-8), 4.21 (1H, dd, $J = 4.8, 11.6$ Hz, H-1'a), 4.12 (1H, dd, $J = 7.0, 11.6$ Hz, H-1'b), 3.85 (1H, m, H-2'), 3.56 (1H, m, H-3'a), 3.53 (1H, m, H-3'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 168.4 (C-9), 148.5 (C-4), 145.9 (C-3), 145.4 (C-7), 128.3 (C-1), 125.2 (C-6), 118.7 (C-2), 116.5 (C-5), 115.9 (C-8), 71.3 (C-2'), 66.4 (C-1'), 64.2 (C-3').

Hwanggeumchal B(20)

Yellowish amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 7.61 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 6.89 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 6.80 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-4), 6.58 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.22 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8), 4.26 (1H, dd, $J = 4.0, 11.2$ Hz, H-1'a), 4.16 (1H, dd, $J = 6.0, 11.2$ Hz, H-1'b), 3.89 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, m, H-3'a), 3.58 (1H, m, H-3'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 170.0 (C-9), 157.6 (C-6), 154.3 (C-3), 149.2 (C-7), 126.1 (C-1), 124.0 (C-4), 112.5 (C-8), 109.2 (C-5), 106.7 (C-2), 71.5 (C-2'), 66.6 (C-1'), 64.2 (C-3').

Acacetin (21)

Yellow amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 7.83 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'/H-6'), 6.96 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'/H-5'), 6.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 6.57 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 3.94 (3H, 4'-OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz): δ 180.3 (C-4), 164.9 (C-7), 163.6 (C-2), 162.3 (C-5), 162.1 (C-4'), 161.2 (C-9), 129.0 (C-2'/C-6'), 123.2 (C-1'), 116.9 (C-3'/C-5'), 108.2 (C-10), 106.5 (C-3), 56.5 (4'-OCH₃).

(+)-catechin (22)

White amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 6.84 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 6.72 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-2'), 5.94 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 5.86 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 4.57 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2), 3.99 (1H, m, H-3), 2.86 (1H, dd, $J = 5.6, 16.0$ Hz, H-4a), 2.51 (1H, dd, $J = 8.0, 16.0$ Hz, H-3b); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 156.6 (C-5), 156.4 (C-7), 155.7 (C-9), 145.1 (C-4'), 145.0 (C-5'), 131.0 (C-2'), 118.9 (C-6'), 114.9 (C-3'), 114.1 (C-1'), 99.6 (C-10), 195.1 (C-6), 94.3 (C-8), 81.7 (C-2), 67.6 (C-3), 27.3 (C-4).

(-)-catechin (23)

Brownish amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 6.84 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 6.71 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-2'), 5.92 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 5.85 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 4.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-2), 3.97 (1H, m, H-3), 2.84 (1H, dd, $J = 5.2, 16.0$ Hz, H-4a), 2.50 (1H, dd, $J = 8.0, 16.0$ Hz, H-3b).

(3) EtOAc, n-Hexane 및 n-BuOH 층으로부터 얻은 화합물의 생리활성 측정 결과

Table 36. MTT cytotoxic activity of compounds **1–13** against HeLa, MCF-7 and HL-60 cell lines and their DPPH radical scavenging activity

Compounds	Cytotoxic activity IC ₅₀ (μg/mL)			Antioxidant activity
	HeLa ^{c)}	MCF-7 ^{d)}	HL-60 ^{e)}	IC ₅₀ (μg/mL)
1	34	5.7	27.12	5.7
2	>100	>100	95.48	38.9
3	>100	>100	>100	44.7
4	>100	>100	>100	24.8
5	>100	>100	>100	>100
6	>100	>100	>100	5.6
7	>100	>100	46.4	9
8	>100	>100	>100	5.9
9	>100	>100	66.66	15.6
10	>100	>100	>100	55.7
11	>100	>100	98.22	16.9
12	>100	>100	>100	>100
13	>100	>100	>100	>100
Adriamycin ^{a)}	0.46	2.35	0.38	—
L-ascorbic acid ^{b)}	—	—	—	2.8

^{a)} Positive control for MTT assay

^{b)} Positive control for DPPH assay

^{c)} Human cervical epitheloid carcinoma cells

^{d)} Human breast cancer cells

^{e)} Human promyelocytic leukemia cells

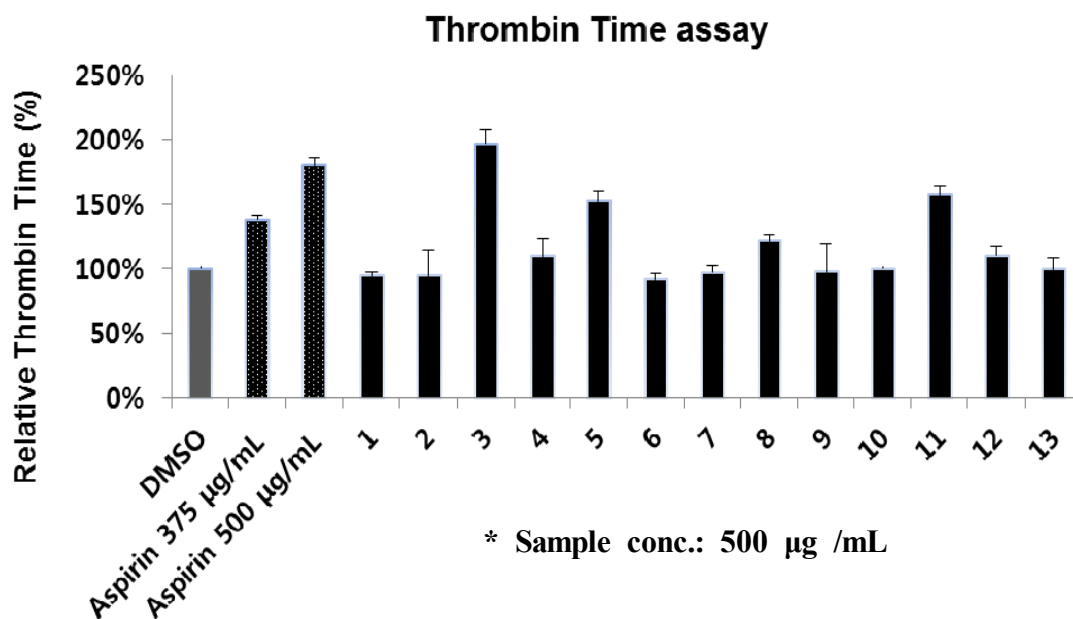


Fig. 62. Inhibitory effect of isolated compounds (1–13) from EtOAc fraction of the seeds of *S. bicolor* on thrombin time (TT) activity assay

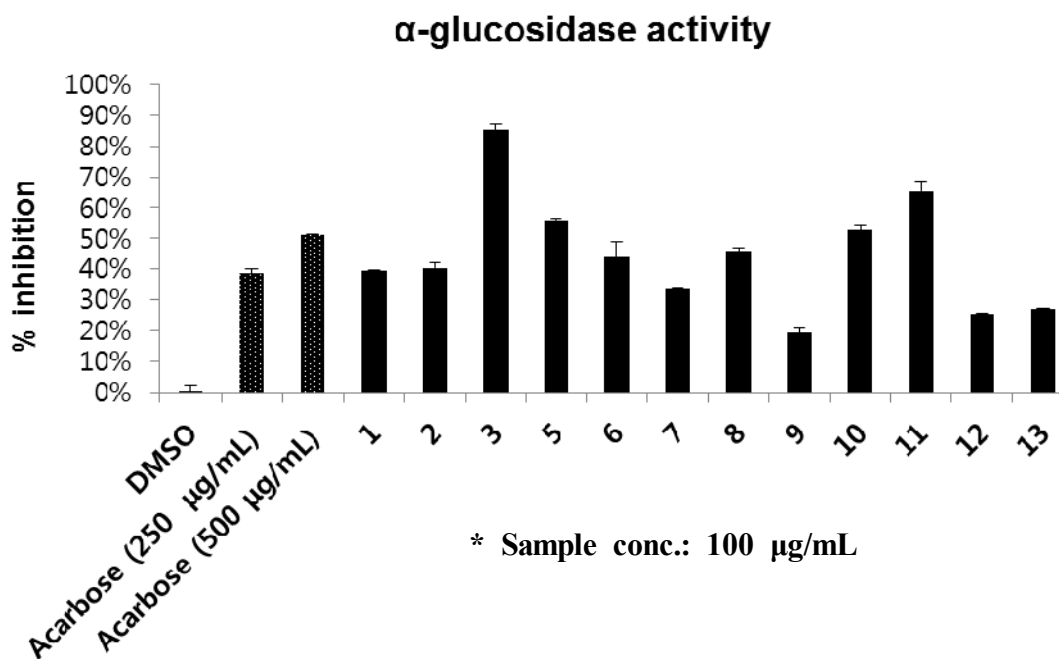


Fig. 63. Inhibitory effect of isolated compounds (1–13) from EtOAc fraction of the seeds of *S. bicolor* on α-glucosidase activity assay.

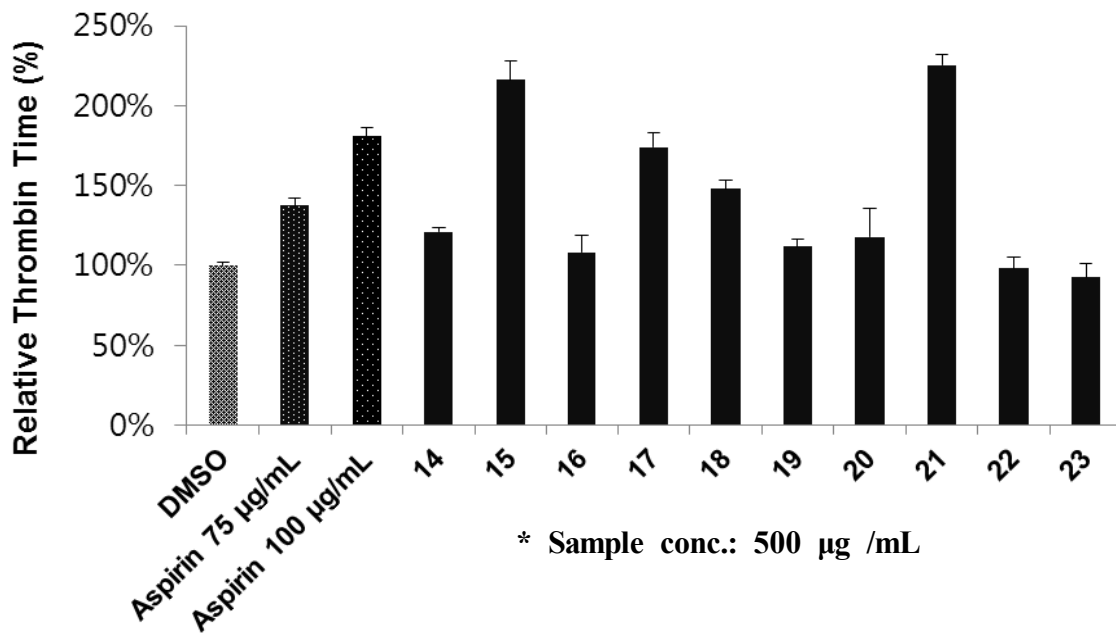


Fig. 64. Inhibitory effect of isolated compounds (14–23) from EtOAc fraction of the seeds of *S. bicolor* on thrombin time (TT) activity assay.

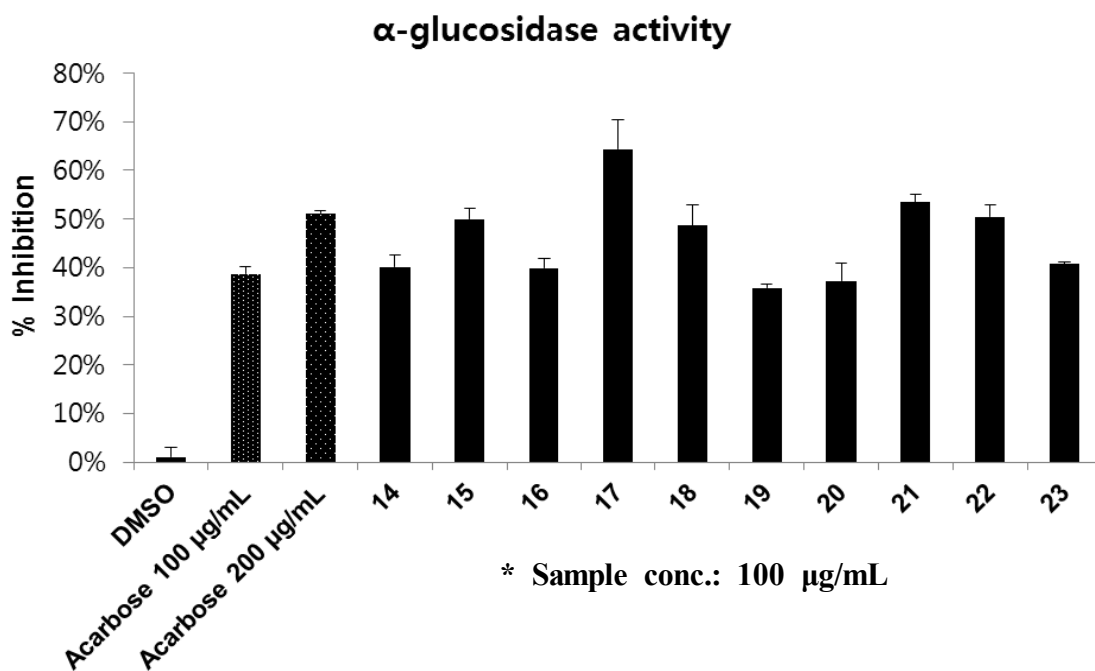


Fig. 65. Inhibitory effect of isolated compounds (14–23) from EtOAc fraction of the seeds of *S. bicolor* on α -glucosidase activity assay.

Table 37. Inhibition of LPS-induced NO production of isolated compounds **1–12** in macrophage RAW264.7 cells

Compounds	IC₅₀ value (μM)^a	Cytotoxicity (% Inhibition)^b
14	> 50	NT
15	11.9 ± 0.3	NT
16	47.3 ± 1.1	NT
17	2.9 ± 0.2	NT
18	29.0 ± 0.6	NT
19	> 50	NT
20	> 50	NT
21	45.6 ± 1.5	NT
22	> 50	NT
23	> 50	NT
Celastrol^c	1.0 ± 0.1	-

^a The inhibitory effects are represented as the molar concentration (μM) giving 50% inhibition (IC₅₀) relative to the vehicle control. These data represent the average values of three repeated experiments.

^b Data showed no cytotoxic effect of compounds **14–23** on cell viability. RAW264.7 cells were incubated with or without compounds (5–50 μM) and LPS (1 μg/mL). The data shown are means ± SD of three independent experiments.

^c The compound was used as positive control.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표대비 달성도

구분	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과	달성도 (%)
제1세부	<ul style="list-style-type: none"> • 국내산 수수 품종별 분획물의 항혈전 신기능 활성 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 항 응고 기능성 소재 탐색 - 항 혈소판 소재 탐색 - 혈전 용해성 소재 탐색 • 수입산 수수 추출물과의 활성 비교 검토 	<ul style="list-style-type: none"> • 수수 유래의 항혈전 활성 소재의 확인 • 국내산 우수 수수 품종의 선별 • 수입산 수수의 항혈전 활성 검증 • 특허 출원 	100 100 100 100
	<ul style="list-style-type: none"> • In vitro 실험계를 이용한 항혈전 활성 소재의 동정 및 작용기전 구명 • In vivo 실험계를 통한 항혈전 활성 소재의 효과 및 안전성 검증 • 심혈관 기능 개선에 대한 작용기전 구명 	<ul style="list-style-type: none"> • 유효 활성소재의 분자, 세포 생물학적 작용기전 구명 • 특허 출원 	100 100
	<ul style="list-style-type: none"> • 항혈전 신기능 소재의 신약 플랫폼 기술을 통한 안정성 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 기초독성 평가 : 일반 세포 독성, 간 독성, 심장 독성 유전 독성 - 약동력학 평가 : 초기 약동력학, 대사 안정성, CYP저해도 	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 항혈전 효능 물질의 특허화 • 국내산 수수 품종의 항혈전 활성 소재의 체계화와 잠곡 영농 확대와 농가 소득 증대 • 특허 및 논문발표 	100 100 100
	○ 항혈전 기능 우수 품종 선발 및 증식	<ul style="list-style-type: none"> • 예비시험을 토대로 항혈전 우수 유전자원 1차 선발 및 재배특성평가 • 시료확보를 위한 유망 수수 유전자원 증식 	100 100
제1협동	○ 1차 선발 계통에 대한 항혈전 활성 평가 및 2차 선발	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 선발 계통에 대한 항혈전 활성 평가 • 2차 계통 선발 	100 100
	○ 수수 우량계통 육성	<ul style="list-style-type: none"> • 선발된 수수 계통의 생산력 및 지역적응시험 	100

		<ul style="list-style-type: none"> 지역별 농업적특성, 수량, 건강기능성 활성 비교를 통한 우량계통 육성 기능성 소재화를 위한 가공특성 구명 	100
			100
제2협동	<ul style="list-style-type: none"> 수수 품종별 추출물 제조 <ul style="list-style-type: none"> 각 품종 분류에 따른 추출물 제조 물질의 대량 추출 수수 추출물의 용매 분획물 제조 : 용매분획에 의하여 메탄올, 에탄올, methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol 및 water 분획의 제조 수입 수수 추출물 제조 	<ul style="list-style-type: none"> 수수 추출물의 제조 항혈전 생리활성 분획 확인 수입 수수로 부터 추출물 제조 	100
	<ul style="list-style-type: none"> 수수 품종별 추출물의 용매 분획에 대한 Open column chromatography 실시 HPLC를 통한 화합물의 분리 	<ul style="list-style-type: none"> 우수 분획으로 부터 생리활성 소재의 분리, 정제 	100
	<ul style="list-style-type: none"> 우수 활성 물질의 구조결정 <ul style="list-style-type: none"> 물리, 화학적 방법 : m.p.,$[\alpha]_D$, 유도체 합성 등 분광학적 방법 : UV, IR, 1D 및 2D NMR, Mass Spectrometry 등 작용기전 연구를 위한 물질 제조 (액, 가루, 추출물 공급) 	<ul style="list-style-type: none"> 생리활성 물질의 구조결정 	100
	<ul style="list-style-type: none"> 우수 활성 물질의 구조결정 <ul style="list-style-type: none"> 물리, 화학적 방법 : m.p.,$[\alpha]_D$, 유도체 합성 등 분광학적 방법 : UV, IR, 1D 및 2D NMR, Mass Spectrometry 등 원료 물질의 안정화 우수 활성 물질의 대량 생산 기능성 제품화를 위한 제형화 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 우수 생리활성 물질의 구조 결정 우수 생리활성 물질의 대량 생산 논문발표 	100

제2절 관련분야에의 기여도

가. 수수의 95% 에타놀 추출물을 소재로 하여 항혈전 효과를 보유한 기능성 건강기능 식품 (쿠키, 차, 음료 등)의 개발 추진.

나. 항혈전 효과가 우수한 수수 우량계통의 선발하고 농업적 특성 구명을 통해 농가보급에 요구되는 기초요건 확립.

다. 이상의 유효 성분과 이들 개발기술은 특허 출원과 논문 발표를 통하여 국내 생물자원의 보호 관련 학계, 농업 및 산업 분야에의 활용에 기여.

라. 새로운 항혈전 건강기능성 물질의 확인 및 개발.

마. 잡곡 유래 항혈전 효능을 이용한 기능성 제품의 산업화에 기여.

바. 항혈전 활성이 우수한 품종 ‘밀양1호’의 홍보를 통해 ‘밀양1호’의 재배를 확산시키고, 이를 통해 농민의 소득증대와 더불어 국민들에게 항혈전 활성 우수 수수를 공급하며, 또한 다양한 상품개발을 통하여 항혈전 우수 소재의 공급이 원활히 될 수 있도록 함.

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구개발 정량적 성과

세부(협동)과제명	과제책임자	성과물유형	성과물명	성과물주담당자	적용년월	승인여부
제1세부: 수수유래 향혈전 신소재의 동정 및 작용기전 구 명	김영호	교육	- 교육명 :2010 잡곡산업 전망과 부가가치 향상 방안 심포지엄 -참석대상 : 농민, 정책관계자 -인원: 200명 -장소 : 한국국학진흥원 대강당	김영호	2010.08. 26	
		교육	-교육명 : 잡곡생산성 향상 및 이용증대 방안 국제 심포지엄 -참석대상 : 잡곡산업협회회원, 잡곡생산 유통관계자 -인원 : 200명 -장소 : 천안박물관	김영호	2013.09. 03	
		교육	-교육명 : 곡물 기능성이용 현황 및 발전방향 세미나 -참석대상 : 연구 및 지도관계자, 공무원, 친환경 농식품 세계화 연구회원 -인원 : 70명 -장소 : 농업기술원 연구동	김영호	2013.10. 08	
		연구인력 양성 성과	박사 : 3명 석사 : 3명 학사 : 1명	김영호	2010~ 2013	
		특허등록	-특허명 : 향혈전 활성을 지닌 수수 추출물 및 그 제조방법 -등록번호 : 10-1303751	김영호	등록일 2013.08. 29	
		특허출원	-특허명 : 페놀 화합물을 유효성분 으로 포함하는 향혈전용 조성물 -출원번호 : 10-2013-0043563	김영호	출원일 2013.04. 19	
		논문	-논문명 : Comparative evaluation of antioxidant activities of ethanol extracts and their solvent fractions obtained from selected miscellaneous cereal grains -학술지 : Journal of life science 24(1) 26-38 (2014)	김영호	게재일 2014.01. 14	
		논문	-논문명 : Anticoagulant and fibrinolytic activities of	김영호	게재일 2013.12.	

			hwanggeumchal sorghum in vitro -학술지 : Journal of life science 23(12) 1460-1470 (2013)		30	
		학술대회 발표	Anti-thrombin activity of golden glutinous sorghum -Asia-Pacific Nutrigenomics Conference 2012, 경북대학교	김민수	2012.10. 11	
		학술대회 발표	Anti-thrombin activity of golden glutinous sorghum -한국미생물생명공학회 영남지부, 경주	김민수	2012.02. 17	
		학술대회 발표	Anticoagulation Activity of Hwanggeumchal Sorghum Grains in vitro and in vivo -한국미생물생명공학회, 평창	김민수	2013.07. 03	
제1협동: 항혈전 활성이 우수한 유전자원 선발 및 활용 연구	곽도연	품종	중모 4002	김정인		
		홍보	'수수' 고지혈증 등 성인병 예방 탁월(OBS)	서명철	2011.9.1 4	
		홍보	생활습관병 수수로 예방한다(PBC 경제광장)	서명철	2011.9.1 4	
		홍보	'수수' 고지혈증 등 성인병 예방 탁월(동아일보)	서명철	2011.9.1 4	
		홍보	수수, 고지혈증, 고혈당증, 혈전예방 효과(식품저널)	서명철	2011.9.1 4	
		홍보	'수수' 고지혈증 등 성인병 예방 탁월(푸드투데이)	서명철	2011.9.1 4	
		홍보	생활습관병 예방 '수수'로 해결(버섯정보신문)	서명철	2011.9.1 5	
		홍보	생활습관병 예방 수수께끼 '수수'로 푼다.(충청신문)	서명철	2011.9.1 6	
		홍보	생활습관병 수수로 예방(한국영농신문)	서명철	2011.9.2 6	
		학술대회 발표	Influence of Heat Treatment on the Antioxidant Compounds and Activities of Non-milled Sorghum (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench) -한국식품영양과학회 국제심포지엄, 제주	김정인	2012. 10.31	
		교육	-교육명 : 잡곡생산교육 -교재명 : 잡곡의 기능성 및 가공제품 개발 -참석대상 : 농촌지도사	고지연	2013. 10.24. /2013.	

			-교육기간: 10.24 / 11.7 - 인원 : 1기 39명, 2기 41명 - 교육기관 : 농촌진흥청 - 장소 :농촌인적자원개발센터 - 주요내용 : 잡곡의 건강 기능성 및 가공제품 개발 - 과제성과 기여율: 20%(2013)		11.7	
제2협동: 수수로부터 항혈전 활성 소재의 분리 동정, 구조 결정 및 안정화 기술 개발	우미희	연구인력 양성 성과	박사 : 1명 석사 : 3명	우미희	2011~ 2012	
		논문	Antithrombotic and antidiabetic flavonoid glycosides from the grains of Sorghum bicolor (L.) Moench var. hwanggeumchal -학술지 : Archives of Pharmacal Research	우미희	투고 중	
		학술대회 발표	Antithrombotic constituents from seeds of Sorghum bicolor -2012 대한약학회 춘계학술대회, 제주	오지훈	2012. 04.20	
		학술대회 발표	Antithrombin constituents from seeds of Sorghum bicolor L. -2012 대한약학회 추계학술대회, 서울	부베통	2012. 10.23	
		학술대회 발표 예정	New anti-inflammatory caffeoylglycerides from the grains of Sorghum bicolor - 2014 15 th Tetrahedron Symposium, London, England	응구엔 피홍	2014.06. 23.~28 (초록제 출함)	

제2절 성과활용계획

본 연구를 통하여 국내산 수수의 항혈전 기능을 과학적으로 증명함으로써 잡곡의 우수성을 입증하였으며, 이러한 결과는 국민들에게 적극적으로 홍보함으로써 국내산 수수의 소비를 증진시키고 국민들의 심혈관계 질환과 같은 생활습관병 예방에 도움을 줄 수 있다.

또한, 본 연구를 통해 육성된 ‘밀양1호’는 신품종선정위원회에서 중간모본으로 승인되어 ‘중모4002’라는 품종명을 부여하였다. 이후 국립종자원에 품종출원을 할 예정이다. ‘중모4002’는 폴리페놀, 플라보노이드 등 다양한 기능성 성분함량과 항산화활성이 높을 뿐만 아니라 항혈전 활성이 ‘황금찰’에 비해 12%높아 기능성 수수 육성 계통용으로 기대해 볼 수 있다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 해외과학기술정보

1.특허

특허1	특허명	Use of onion extracts to prevent and treat acute and chronic cardiac and vascular complications and their sequelae, as well as to resolve hematomas
	보유국	미국
	등록년도	2009-09-15
	유사점	양파로부터 혈전 형성 억제 추출물을 획득하여 in vitro와 in vivo test를 통하여 양파 추출물의 양에 비례하여 항혈전 효과를 보여 혈전증 치료 효과를 통한 급성 또는 만성 심장질환 예방과 치료제로서의 가능성을 보여준 것이 유사함.
차이점	양파의 항혈전 효과에 기인하는 성분에 대한 언급이 없으며, 항혈전 효과를 이용하여 외과 수술 또는 성형수술 후의 외상치료에 이용한다는 것이 본 과제와 다름	
특허2	특허명	A garlic health care capsule for treating cardiac and cerebral vascular diseases and cancer as well as its preparing method
	보유국	중국
	등록년도	2008-04-09
	유사점	마늘에서 분리 추출한 ajoene이 항혈전 효과를 보여 심장-뇌 혈관 질병의 치료 가능성을 타진한 내용의 특허
차이점	대상 작물이 다르고, ajoene이 항혈전 작용 뿐만 아니라 면역능의 향상과 암세포의 성장을 억제하는 능력을 가지고 있어 심혈관 질환 뿐만 아니라 암과 종양의 예방과 치료에 중점을 둔다는 것이 상이함.	

2. 논문

논문1	논문명	Antithrombotic and fibrinolytic activities of methanolic extract of aged sorghum vinegar
	학술지명 및 게재년도	Journal of agricultural and food chemistry (2009)
	저자	Fan J, Zhang Y, Chang X, Zhang B, Jiang D, Saito M, Li Z.
	유사점	수수를 발효시켜 얻은 식초의 추출물이 in vitro와 in vivo에서 항혈전 효과를 나타내며, 추출성분이 콜라겐과 에피네프린으로 thrombotic death를 유도한 rat에 효과적으로 작용하며 프로트롬빈 시간과 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간, 트롬빈 시간에 활성화를 나타낸다는 것이 유사함.
차이점	수수식초의 메탄올 추출물에서 항 혈전 활성 물질이 있다고 보고한 논문이다. 활성 검색은 유사하나, 본 과제에서는 수수 알곡 자체로부터 항혈전 관련 물질을 탐색하고자 하며, 초기 추출물 제법도 차이가 있다. 과제 후반 단계에서 발효주 나 발효 식품에 활용 계획이 있어 그때 함량 및 성분 비교를 통해 검정할 수 있는 사항임.	
논문2	특허명	Comparison of Content in Phenolic Compounds, Polyphenol Oxidase, and Peroxidase in Grains of Fifty Sorghum Varieties from Burkina Faso
	학술지명 및 게재년도	Journal of agricultural and food chemistry (2002)
	저자	Dicko MH, Hilhorst R, Gruppen H, Traore AS, Laane C, van Berkel WJ, Voragen AG.
	유사점	서아프리카 지역에서 얻은 50종의 수수의 phenolic compounds, peroxidase 및 polypehnl oxidase의 활성 및 함량을 각 품종마다 비교함
	차이점	항 혈전 관련 활성에 대해서는 전혀 언급되지 않았음.

제7장 연구시설·장비 현황

제 1 세부과제 : 경북대학교

기자재/시설/장비명	규격	구입가격 (천원)	수량	용도	비고
Live Cell Image	Deltavision Elite	300,000	1	Live cell 관찰 및 동영상 촬영	공실관 임차
FACS Arias	BD FACS aria III	450,000	1	세포주기 측정 및 cell sorting	공실관 임차
Confocal Scanning Microscope	LSM700	250,000	1	세포의 관찰 및 이미지 분석용	공실관 임차
항온항습기	800×800×2400	10,000	1	온도, 습도 조절	기관보유
원심분리기	SET	5,000	1	원심분리	기관보유
Hotplate Stirrer	SET	800	1	가열 및 교반	기관보유
클린룸	39m ²		1	세포배양	기관보유
레이저 온도계	ea	500	1	온도측정	기관보유
Real-time PCR	ea	50,000	2	DNA 증폭용	기관보유
Sonicator	ea	4,420	1	입자분산	기관보유
Desicator	ea	92	1	시료건조	기관보유
Dispenser	SET	22,000	1	시료주입	기관보유
Fume hood	SET	3,100	1	입자합성	기관보유
초저온원심분리기	SET	4,500	1	원심분리	기관보유
Low temperature freezer	SET	6,000	1	시료보관	기관보유
Auto Clave	SET	7,000	1	시료멸균	기관보유
세포배양실	42 m ²		1	세포주 배양	기관보유

제 1 협동과제 : 농촌진흥청 국립식량과학원

기자재/시설/장비명	규 격	구입가격 (천원)	수 량	용 도	비 고
고성능 액체크로마토그래피	UV	80,000	1	기능성분 분석	식량원
기체크로마토그래피	FID	30,000	1	기능성분 분석	식량원
이온크로마토그래피	ECD	60,000	1	아미노산 등 분석	식량원
질량분석기(GC/MSD)	MSD	90,000	1	활성물질 분자량 측정	식량원
ICP		200,000	1	무기성분 분석	식량원
식이섭유 분석기	6구	40,000	1	식이섭유 분석	식량원
용매추출기	6구	20,000	1	조지방 함량 분석	식량원
저온초미분쇄기	20kg	150,000	1	시료 전처리	식량원
진공회전농축기	1L	100,000	1	시료 전처리	식량원
동결건조기	12kg	80,000	1	시료 전처리	식량원
Spectrophotometer	UV/VIS	30,000	1	생리활성검정	식량원
Well plate reader	UV/VIS	10,000	1	생리활성검정	식량원
자동킬달분석기	20구	40,000	1	단백질 정량	식량원
원소분석기		80,000	1	원소분석	식량원
발효반죽기		10,000	1	제빵 가공적성 검정용	식량원
제빵용 오븐		20,000	1	제빵 가공적성 검정용	식량원
초고성능 액체크로마토그래피	DAD	800,000	1	기능성분 분석	식량원

제 2 협동과제 : 대구가톨릭대학교

기자재/시설/장비명	규격	구입가격 (천원)	수량	용도	비고
LC-MS	Quattro II spectrometer	200,000	1	분자량 측정	기초과학지원연구원 임차
HPLC (Waters)	2695 separation, 996 photodiode array detector	50,000	1	화합물 분리 및 확인	기관보유
HPLC (Waters)	600 controller, 486 tunable absorbance detector	50,000	1	화합물 분리 및 확인	기관보유
HPLC (Gilson)	UV/VIS-151, 321 Pump, 231 XL Autosampler	50,000	1	화합물 분리 및 확인	기관보유
MPLC (Biotage)	Isolera One	40,000	1	화합물 분리	기관보유
UV	Shimadzu UV-1601PC	30,000	1	구조 결정	기관보유
FT/IR	Jasco 300-E	60,000	1	구조 결정	기관보유
NMR	Varian OXFORD AS400	350,000	1	구조 결정	기관보유
Polarimeter	JASCO DIP-370	20,000	1	구조 결정	기관보유
GC/Mass	Agilent 5975C MSD	100,000	1	구조 결정	기관보유
Rotary evaporator	Eyela	4,000	5	화합물 추출 및 분리	기관보유
Fraction collector	ea	1,500	5	화합물 분획	기관보유
Sonicator	Branson 8210	12,000	1	화합물 분리 및 추출	기관보유
융점측정기	Yanaco micro melting point apparatus	5,000	1	융점 측정	기관보유

제8장 참고문헌

- Ajjan, R. and Grant, P. J. 2006. Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis* 186, 240-259.
- Astrup, T. and Mullertz, S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40, 346-351.
- Awika, J. M. and Rooney, L. W. 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry* 65, 1199-1221.
- Baoshan S, Jorge M, Ricardo DS, Isabel S. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 46: 4267-4274.
- Bazzano, L. A., He, J., Ogden, L. G., Loria, C. M., Vupputuri, S., Myers, L. and Whelton, P. K. 2002. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *Am J Clin Nutr* 76, 93-99.
- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 524-535.
- Butler LG. 1992. Antinutritional effects of condensed and hydrolysable tannins. In *Plant Polyphenol : Synthesis, properties and significance* ; Hemingway RW, Laks PE. (Eds). Plenum press: New York. pp: 693-698.
- Chan DC, Kim PS. 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* 93: 681-684.
- Choi, H. S. and Sa, Y. S. 2001. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Spirodela polyrhiza*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 781-786.
- Dahback, B. 2005. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: Genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic disease. *J Intern Med* 257, 209-223.
- Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
- Dicko, MH., Gruppen, H., Traore, AS., Van Berkel, WJH., Voragen, AGJ., 2005. Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2581-2588.
- DiMinno, G. and Silver, M. J. 1983. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **225**, 57-60.
- Duval B, Shetty K. 2001. The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *J Food Biochem* 25: 361-377.
- Fan, J., Zhang, Y., Chang, X., Zhang, B., Jiang, D., Saito, M. and Li, Z. 2009. Antithrombotic and fibrinolytic activities of methanolic extract of aged sorghum vinegar. *J Agric Food Chem* 57, 8683-8687.

- Fardet, A. 2010. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutr Res Rev* 23, 65-134.
- Ferreira D, Slade D. 2002. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Nat Prod Rep* 19: 517-541.
- Flanders, M. M., Crist, R. and Rodgers, G. M. 2003. Comparison of five thrombin time reagents. *Clin Chem* 49, 169-172.
- Gillman, M. W., Cupples, L. A., Gagnon, D., Posner, B. M., Ellison, R. C., Castelli, W. P. and Wolf, P. A. 1995. Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. *JAMA* 273, 1113-1117.
- Gwak, H. S. and Chun, I. K. 2000. Preformulation study of Aspalatone, a new antithrombotic agent. *J Appl Pharm* 8, 332-337.
- Ha, Y. D. and Lee, S. P. 2001. Characteristics of proteins in Italian millet, sorghum and common millet. *Korean J Postharvest Sci Technology* 8, 187-192.
- Hoffman, M. 2004. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 16, 17-20.
- Hoppe, B., Tolou, F., Dörner, T., Kiesewetter, H. and Salama A. 2006. Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population. *Thromb Haemost* 96, 465-470.
- Jin, Y. R., Yu, J. Y., Lee, J. J., You, S. H., Chung, J. H., Noh, J. Y., Im, J. H., Han, X. H., Kim, T. J., Shin, K. S., Wee, J. J. and Yun, Y. P. 2007. Antithrombotic and antiplatelet activities of Korean red ginseng extract. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100, 170-175.
- Joshiyura, K. J., Ascherio, A., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., Hennekens, C. H., Spiegelman, D. and Willett, W. C. 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA* 282, 1233-1239.
- Joshiyura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D. and Willett, W. C. 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 134, 1106-1114.
- Kandaswami C, Middleton EJr. 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In *Free radicals in diagnostic medicine*. Armstrong D, ed. Plenum Press, New York and London. p 351-376.
- Kil, H. Y., Seong, E. S., Ghimire, B. K., Chung, I. M., Kwon, S. S., Goh, E. J., Heo, K., Kim, M. J., Lim, J. D., Lee, D. K. and Yu, C. Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem* 115, 1234-1239.
- Kim JE, Joo SI, Seo JH, Lee SP. 2009. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 989-995.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
- Kim, J. S., Hyun, T. K. and Kim, M. J. 2011. The inhibitory effects of ethanol extracts from

- sorghum, foxtail millet and proso millet on α -glucosidase and α -amylase activities. *Food Chem* 124, 1647-1651.
- Kim, M. S., Oh, I. T., Jun D. Y., Lee, J. Y., Sohn, H. Y., Kwak, D. Y., Seu, M. C., Woo, K. S., Ko, J. Y., Jung, T. W., Nam, M. H., Woo, M. H. and Kim, Y. H. 2013. Anticoagulant and fibrinolytic activities of hwanggeumchal sorghum in vitro. *J L Sci* 23, 1460-1470.
- Kwak, C. S., Lim, S. J., Kim, S. A., Park, S. C. and Lee, M. S. 2004. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and job's tears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33, 921-929.
- Kweon, Y. M. and Park, K. Y. 1998. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of sorghum. *J Korean Assoc Cancer Prev* 3, 128-135.
- Lane, D. A. and Grant, P. J. 2000. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 95, 1517-1532.
- Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J KOREAN Soc Food Sci Nutr* 37(4), 405-409.
- Lee SM, Lee J. 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of vegetable oils, margarines, butters, and peanut butters consumed in Korean diet. *Food Sci Biotechnol* 15: 183-188.
- Lippi, G., Franchini, M. and Targher, G. 2011. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 8, 502-512.
- Lison, S. and Spannagl, M. 2011. Monitoring of direct anticoagulants. *Wien Med Wochenschr* 161, 58-62.
- Liu, S., Manson, J. E., Lee, I. M, Cole, S. R., Hennekens, C. H., Willett, W. C. and Buring, J. E. 2000. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the women's health study. *Am J Clin Nutr* 72, 922-928.
- Lunchtman-Jones, L. and Broze, J. 1995. The current status of coagulation. *Ann Med* 27, 47-52.
- Marquart, L., Wiemer, K. L., Jones, J. M. and Jacob, B. 2003. Whole grain health claims in the USA and other efforts to increase whole-grain consumption. *Proc Nutr Soc* 62, 151-160.
- Melzig, M. F. and Henke, K. 2005. Inhibition of thrombin activity by selected natural products in comparison to neutrophil elastase. *Planta Med* 71, 787-789.
- Middleton E, Kandaswami C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol*. 48: 115-119.
- Nagda, K. K., Ganeriwal, S. K., Nagda, K. C. and Diwan, A. M. 1983. Effect of onion and garlic on blood coagulation and fibrinolysis in vitro. *Indian J Physiol Pharmacol* 27, 141-145.
- Nguz K, van Gaver D, Huyghebaert A. 1998. In vitro inhibition of digestive enzymes by sorghum condensed tannins (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Sci de Aliments* 18: 507-514.
- Park, M. Y., Kim, J. H. and Park, D. S. 2011. Anti-inflammatory activities of hog millet (*Panicum miliaceum* L.) in murine macrophages through IRAK-4 signaling. *Korean J Food Nutr* 24, 268-272.

- Parr AJ, Bolwell GP. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agr* 80: 985-1012.
- Raftery, A. T. 1981. Method for measuring fibrinolytic activity in a single layer of cells. *Arch J Clin Pathol* 34, 625-629.
- Rajput, M. S., Mathur, V., Agrawal, P., Chandrawanshi, H. K. and Pilaniya, U. 2011. Fibrinolytic activity of kaempferol isolated from the fruits of *Lagenaria siceraria* (Molina) Standley. *Nat Prod Res* 25, 1870-1875.
- Riddel, J. P. Jr., Aouizerat, B. E., Miaskowski, C. and Lillicrap, D. P. 2007. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs* 24, 123-131.
- Sahyoun, N. R., Jacques, P. F., Zhang, X. L., Juan, W. and McKeown, N. M. 2006. Whole-grain intake is inversely associated with the metabolic syndrome and mortality in older adults. *Am J Clin Nutr* 83, 124-131.
- Shi H, Noguchi N, Niki E. 2001. Flavonoids and other polyphenols. *Methods Enzymol.* 335: 157-166.
- Slavin, J. L., Martini, M. C., Jacobs, D. R. and Marquart, L. 1999. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr* 70, 459S-463S.
- Slavin, J. 2004. Whole grains and human health. *Nutr Res Rev* 17, 99-110.
- Sohn, H. Y., Kwon, C. S., Son, K. H., Kwon, G. S., Kwon, Y. S., Ryu, H. Y. and Kum E. J. 2005. Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 593-598.
- Taussig, S. J. and Batkin, S. 1988. Bromelain. The enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. *J Ethnopharmacol* 2, 191-203.
- Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30: 229-241.
- Torres-Urrutia, C., Guzman, L., Schmeda-Hirschmann, G., Moore-Carrasco, R., Alarcon, M., Astudillo, L., Gutierrez, M., Carrasco, G., Yuri, J. A., Gwak, H. S. and Chun, I. K. 2000. Antiplatelet, anticoagulant, and fibrinolytic activity in vitro of extracts from selected fruits and vegetables. *Blood Coagul Fibrinolysis* 22, 197-205.
- Ulbricht, T. L. and Southgate, D. A. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338, 985-992.
- Verma, S. K. and Bordia, A. 2001. Ginger, fat and fibrinolysis. *Indian J Med Sci* 55, 83-86.
- Vine, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. 2009. *Retina* 29, 1-7.
- Wee, J. J., Kim, Y. S., Kyung, J. S., Song, Y. B., Do, J. H., Kim, D. C. and Lee, S. D. 2010. Identification of anticoagulant components in Korean red ginseng. *J Ginseng Res* 34, 355-362.
- Yamamoto, J., Yamada, K., Naemura, A., Yamashita, T. and Arai, R. 2005. Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition* 21, 580-587.

<참고> 주요 연구성과 요약 (제 1 세부과제)

in vitro/in vivo에서 수수의 항혈전 기능성소재의 탐색

□ 연구 배경

- 심혈관계 질환은 심장 관련 질환 (심근경색, 고혈압, 심부전, 부정맥, 동맥경화)과 혈관 질환 (뇌졸중, 말초혈관 질환)을 포함하는 질환으로, 지난 30년간 꾸준히 발병율과 유병율이 증가한 질환으로 보고되었으며, 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 심장 순환기 계통 질환에 의한 사망률이 전체 사망률의 30% 내외로 매우 높은 비율을 차지하는 치명적인 질환임.

- 최근, 식품으로 이용하고 있는 잡곡류의 건강기능성에 대한 연구가 다양하게 수행되고 있음에도 불구하고, 수수의 항혈전 효과에 대한 연구는 아직껏 수행된 바가 없음. 따라서 본 연구진은 심혈관계 질환의 문제점을 해결하고자, 잡곡류를 대상으로 항혈전 기능 탐색 및 항혈전 소재 개발을 위하여 잡곡류를 80% 에탄올로 추출한 후 이들을 이용하여 트롬빈 작용에 의해 유도되는 혈장의 응고를 저해하는 항응고 활성에 관한 연구에 노력하던 중, 황금찰수수 조곡 유래의 80% 에탄올 추출물이 positive control인 aspirin 보다도 더 우수한 항혈전 활성 효과를 지님을 발견하게 되어 특허 출원 및 등록, 또한 이에 대한 논문을 발표함.

- 뿐만 아니라, rat의 balloon injury (BI)-induced reendothelialization 실험과 mouse의 콜라겐과 에피네프린에 의한 폐색전 유발 테스트에서도 황금찰수수 80% 에탄올 추출물이 in vitro 실험계 뿐만 아니라 in vivo 실험계에서도 항혈전 효과가 우수한 것으로 나타남. 이러한 연구결과는, 혈액순환을 개선하고 혈전증을 예방할 뿐만 아니라 협심증 혹은 심근경색증 환자를 대상으로 널리 시술되고 있는 관동맥 중재술 후 발생할 수 있는 혈관재협착을 예방하는 기능성식품의 개발에 수수가 식품소재로 활용될 수 있음을 시사해주는 것임.

- 황금찰수수 80% 에탄올 추출물의 HPLC 분석을 통해 황금찰수수에 함유한 페놀화합물을 밝혔내었고, 이중에 biochanin A, t-cinnamic acid, m-coumaric acid, formononetin, homogentisic acid, kaempferol, pyrogallol, β-resorcylic acid 및 salicylic acid가 aspirin 보다 우수한 항혈전 효과를 나타내는 단일물질임을 밝힘.

□ 특허 및 논문

구분	제목	등록(출원)번호/ 저널 권(호)	등록일
특허등록	항혈전 활성을 지닌 수수 추출물 및 그 제조방법	10-1303751	2013.08.29

특허출원	페놀 화합물을 유효성분으로 포함하는 항혈전용 조성물	10-2013-0043563	2013.04.19
논문	Anticoagulant and fibrinolytic activities of hwanggeumchal sorghum in vitro	Journal of life science 23(12) 1460-1470	2013.12
논문	Comparative evaluation of antioxidant activities of ethanol extracts and their solvent fractions obtained from selected miscellaneous cereal grains	Journal of life science 24(1) 26-38	2014.01

□ 파급효과

- 본 연구를 통해 밝혀진 수수의 항혈전 활성에 대한 내용을 바탕으로, 혈전 생성 억제 및 혈액순환 개선을 위해 효과적으로 활용되어 혈전증 관련 질환 저해제 또는 발생을 저하제로 유용하게 사용할 수 있음.
- 수수 추출물을 함유하는 항혈전용 조성물은 심혈관계 질환을 효과적으로 예방할 수 있는 각종 약제 등의 의약산업이나 일상생활에서 손쉽고 간편하게 섭취할 수 있는 건강식품 등 식품산업에 널리 응용될 수 있음.

<참고> 주요 연구성과 요약 (제 1 협동과제)

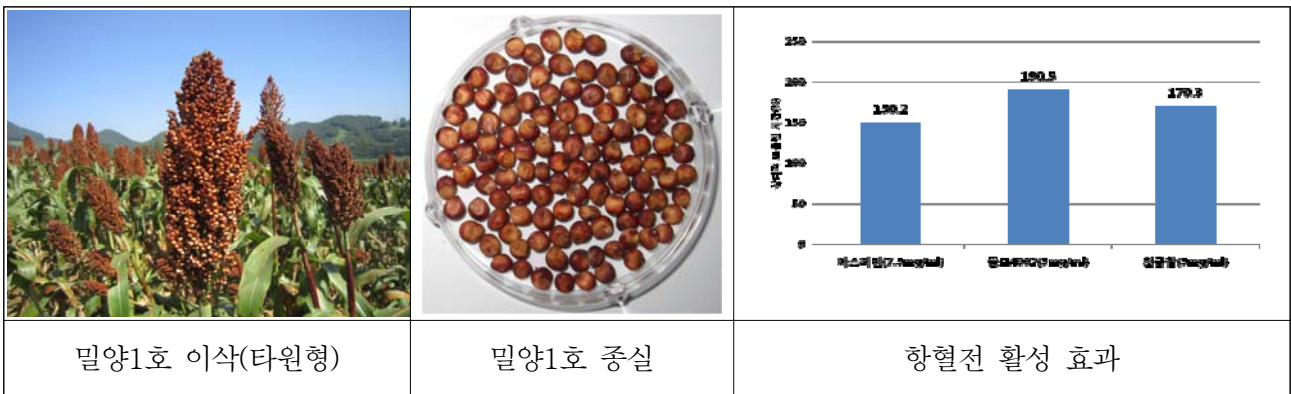
항혈전 활성이 높은 수수 중간모본 ‘밀양1호’ 육성

□ 연구 배경

- 수수는 다른 작물에 비해 탄닌, 폴리페놀 등 항산화성분을 많이 함유하고 있고, 항혈전 활성이 높아 건강기능식품의 원료곡으로 개발 가능성이 높은 작물임
- 도복과 병해충에 강하고 수량이 높은 계통을 육성할 필요가 있음

□ 주요 특성

- 파종 후 출수까지 평균 67일, 수확까지는 115일인 중생종임
- 간장은 164cm, 이삭길이는 23.8cm 정도이며 줄기직경은 19.4mm로 도복에 강함
- 이삭형태는 타원형, 밀수형이며, 반침껍질색과 종식색은 갈색임
- 배유특성이 찰수수임
- ‘12~’13년 지역적용시험에서 ‘밀양1호’의 현곡평균수량 평균이 316kg/10a 으로 ‘황금찰’과 비슷함
- 항산화활성이 ‘황금찰’보다 39% 높음
- 혈액의 응고능력을 측정하는 상대적 트롬빈시간을 측정한 결과 5mg/ml 농도에서 ‘밀양1호’는 190.5%로 ‘황금찰’보다 12% 높음
- 용도는 기능성 수수 육성 계통용임



□ 파급효과

- 항혈전 활성이 높은 수수 품종육성을 위한 교배 모·부분 이용 가능
- 기능성 수수 계통으로 웰빙시대에 수요 증대 예상

<참고> 주요 연구성과 요약 (제 2 협동과제)

수수로부터 항혈전 및 항당뇨 활성이 우수한 선도물질 개발

□ 연구 배경

- 수수는 다른 작물에 비해 탄닌, 폴리페놀 등 항산화성분을 많이 함유하고 있고, 항혈전 활성이 높아 건강기능식품의 원료곡으로 개발 가능성이 높은 작물임
- 수수로부터 항혈전활성과 연계한 생리활성물질을 개발할 필요가 있음

□ 주요 특성

- 수수의 Ethyl acetate 분획물로부터 23종의 화합물을 분리하여 그 구조를 이화학적 및 분광학적 방법으로 확인한 결과 Quercetin-7-O-β-D-glucoside (1), Luteolin-7-O-β-D-glucoside (2), Luteolin-3'-O-β-D-glucoside (3), Quercetin (4), Quercetin-3-O-β-D-glucoside (5), Taxifolin-7-O-β-D-glucoside (6), Taxifolin (7), Taxifolin-3'-O-β-D-glucoside (8), Aromadendrin-3-O-β-D-glucoside (9), 5,7,3',5'-tetrahydroxy-flavanone-7-O-β-D-glucoside (10), Eriodictyol-7-O-β-D-glucoside (11), (2R)-Eriodictyol-5-O-β-D-glucoside (12), (2S)-Eriodictyol-5-O-β-D-glucoside (13), Protocatechuic acid (14), Benzoic acid (15), Caffeic acid (16), Methyl 3,4-dihydroxycinnamate (17), 1-O-caffeoylglycerol (18), Hwanggeumchal A (19), Hwanggeumchal B (20), Acacetin (21), (+)-catechin (22), (-)-catechin (23)임.
- 수수의 Ethyl acetate 분획물에서 획득한 23개의 화합물들을 Thrombin Time assay를 이용해 항혈전 활성을 확인한 결과 500 μg/ml 농도의 **luteolin-3'-O-β-D-glucoside(compound 3)**가 **positive control**로 쓰인 **aspirin**과 동일한 농도에서 비슷한 수준의 항혈전 활성이 있음이 확인함.
- 수수의 Ethyl acetate 분획물에서 획득한 23개의 화합물들을 alpha-glucosidase 저해능이 있는지 확인해본 결과 **상기 23개의 화합물들 중 대부분이 positive control인 acarbose보다 alpha-glucosidase 저해능이 뛰어난**을 확인함.

□ 파급효과

- 심혈관 질환 (순환기계 성인병: 당뇨병, 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 폐경색) 및 metabolic syndrome 예방 및 개선을 통한 국민 건강 증진
- 개발된 화합물을 이용한 식·의약 소재를 농식품 및 의약 개발관련 분야에 기술이전

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.