

최 종  
연구보고서

자생식물 활나물 안전 생산 기술 및  
항암물질 개발이용 연구

Development of technique for stability  
yield and antitumor compound of  
*Crotalaria sessiliflora* L.

연구기관  
한국화학시험연구원

농림자료실



0012289

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “자생식물 활나물 안전 생산기술 및 항암물질 개발이용 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 한국화학시험연구원  
총괄연구책임자 : 성 하 정  
세부연구책임자 : 성 하 정  
협동연구기관명 : 작 물 과 학 원  
협동연구책임자 : 박 회 운  
협동연구기관명 : 호 서 대 학 교  
협동연구책임자 : 강 명 화

# 요 약 문

## I. 제 목

자생식물 활나물 안전 생산기술 및 항암물질 개발이용 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종 개발목표는 활나물(*Crotalaria sessiliflora* L.) 안전 다수확 재배기술을 확립을 통한 고품질 활나물의 개발하고, 활나물에 함유된 항암 활성 물질을 탐색 및 항암효능을 평가하여 활나물을 이용한 항암관련 기능성식품의 개발이다. 항암치료제는 부작용이 많으므로 부작용 치료약품이 개발되고 있으나 부작용의 종류가 다양하고 또한 치료제 자체의 부작용도 간과할 수 없으며 가격도 상당히 비싸기 때문에 부작용 없는 저렴한 기능성 성분의 개발이 절실 요구된다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 활나물 안전생산기술 개발

활나물은 우리나라 96개 지역에 분포하였으며, 지역별 수집 유전자원의 생육은 차이가 없었다. 활나물 종자의 발아적온은 25 °C이며, 종자의 발아율은 GA3 0.1 mM 처리에서 58%로, 저온처리 45%보다 높았다. 포장 출현율은 종피찰상 15분 처리가 48%로 무처리 35%보다 높았다. 활나물 작물화를 위한 표준재배기술에 있어서 피복재료는 흑색비닐, 파종기는 5월 20일, 재식밀도는 20x10cm, 질소소비량은 9kg/10a에서 생육이 우수하였다. 활나물 수확적기는 종자등숙이 완료된 10월 10일경이 지상부 생체중이 37.9g/

주로 가장 높았으며, 지상부 생체 중에서 종자를 포함한 화퇴중이 18.9g/주로 49.8%를 차지하였다. 활나물 수확시기별 총 페놀함량은 수확시기별로 차이가 적었으나, DPPH에 의한 전자공여능은 8월 20일 수확한 추출물이 51.95%로 높게 나타났으며, hydroxy radical 소거활성, SOD 유사활성도는 10월 20일에 수확한 추출물에서 가장 높았다.

## 2. 활나물 함유 항암활성 물질의 분리기술 확립

경제 발전에 따른 생활수준의 향상으로 노령인구가 증가하고, 동물성 식품과 지방의 섭취가 증가함에 따라 암이나 만성퇴행성질환이 증가하고 있으며, 혈액을 공급하는 관상동맥이 경화되어 혈관이 딱딱해지고 탄력을 잃거나 부분적으로 막혀서 심장근육으로 혈액이 원활하게 공급하지 못해 발생하는 뇌혈관질환과 심장질환 등의 순환기계 질환들의 발생이 계속 증가하고 있는 추세이다. 암이나 만성퇴행성 질환 및 여러 질병에 대한 사회적 관심이 증가됨에 따라 이에 대한 연구가 약용식물 뿐만 아니라 식물체 내에 존재하며 약리 효과가 뛰어난 기능성 물질에 대한 관심이 높아지면서 과일과 채소에 함유된 천연 물질 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 또한, 가공식품과 인스턴트 식품의 이용이 증가함으로써 식품의 장기보존을 위해 항산화제, 보존제 같은 첨가물의 중요성과 함께 개발의 필요성이 더욱 대두 되고 있다. 활나물은 두과식물로 예로부터 종양, 식도암, 직장암, 폐암, 위암 및 만성기관지염에 이르기까지 각종 질환들을 치료하거나 해독제로 민간요법에서 널리 이용되어 왔다. 단백질, 전분, 지방 및 미량의 colchicine 뿐만 아니라, monocrotaline이 전초에 0.02%, 종자에 0.4%가 함유되어 있고 또 다른 alkaloid 계통의 물질이 함유되어 있어 이들 성분들에 의해 다양한 생리 활성 효과가 나타난다. 따라서 본 연구에서는 활나물의

부위별 이화학적 특성 및 유효성분의 함량을 분석하였고, 활나물 전초 추출물로 부터 산화억제 효과 및 대장암 억제 효과를 측정하였으며, 이를 보고자 한다. 활나물의 부위별 일반성분 분석결과 수분은 줄기19.78%, 잎 9.56%, 뿌리 7.02%, 씨 6.78%로 나타났고, 조지방은 줄기 2.2%, 잎 2.5%, 뿌리 0.6%, 씨 3%로 나타났으며, 조회분은 줄기 10.5%, 잎 10.8%, 뿌리 6.15%, 씨 10.89%로 나타났다. 조단백질은 씨 11.59%, 잎8.69%, 줄기5.79%, 뿌리 2.89%로 나타났다. 본 실험의 분석결과 농산물의 생산지, 기후적 특성 및 토양적 차이로 인해 특수 및 일반성분의 차이가 나타난 것으로 보인다. 활나물 전초(종자)의 유효성분 추출 및 분리는 전초(종자)추출물 100g을 추출하여 감압농축한 후 지방성분을 제거하고, water와 butanol 용매를 1:1 비율로 혼합하여 분획 추출하였다. butanol 층을 sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 10 (Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5, Fr6, Fr7, Fr8, Fr9, Fr10) 개의 소분획물을 얻었으며, 이중 Fr1, Fr4, Fr6 의 분획물에서 분취한 시료는 methanol : acetonitrile : methylene chloride : hexane (10 : 34 : 50 : 6) 의 전개용매로 TLC를 실시하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(in EtOH)로 발색하여 spot을 확인하였다. 동일한 Rf값을 갖는 형광물질과, 또 다른 2개의 형광물질이 검출되었다. 이 물질을 Prep-HPLC system을 이용하여 분취하였고 정량하여 GC/MS로 분자량을 측정하였다. <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR을 측정하여 monocrotalin을 구조동정 하였다. 활나물 부위별 monocrotalin 함량을 측정한 결과 잎 9.18 mg/100g, 줄기 9.30 mg/100g, 뿌리 6.70mg/100g 및 씨에서 8.86 mg/100g으로 측정되어 부위별로 monocrotalin 함량이 낮은 것으로 나타났다. 새로운 천연항산화제는 물론 항암제나 암의 예방 및 치료를 위한 우수한 소재로서의 이용가능성이 시사되었다.

### 3. 활나물 추출물의 항암 및 독성에 미치는 영향

Hep3B 세포와 MCF-7세포는 100% MeOH Ex-RFX. 추출물과 잎추출물에서, 그리고 HT-29 세포에서는 100% MeOH Ex-RFX. 추출물과 줄기 추출물에서 가장 강한 세포생존율을 억제하였다. Hep3B 세포는 80% MeOH Wa. 추출물과 줄기 추출물에서, MCF-7 세포에서는 80% EtOH Soni. 추출물과 잎 추출물에서, 마지막으로 HT-29 세포에서는 80% MeOH Wa. 추출물과 줄기 추출물에서 가장 강한 세포증식율의 억제를 나타냈다. 활나물 추출물의 발암 개시 후 단계에서의 투여는 60 mg/kg의 용량에서 유의성 있는 감소를 나타냈고 120 mg/kg의 용량에서는 DMH 단독투여군보다 4개 이상의 AC로 이루어진 ACF의 수가 감소하는 경향을 보였지만 유의성 있는 결과는 아니었다. 그러나 대장내 총 ACF 수에 있어서 활나물 추출물 30과 60 mg/kg의 용량은 농도의존적인 대장내 총 ACF 수의 유의성 있는 감소를 유도하였고 120 mg/kg의 용량은 DMH 단독투여군과 비교해 대장내 총 ACF 수의 감소를 나타냈지만 30과 60 mg/kg 용량군에 비해 대장내 총 ACF 수의 증가를 나타냈다. 반면에 0.5 mg/kg의 MCT 및 0.25 mg/kg의 bleomycin 투여군은 유의성 있는 AC 형성을 억제하였다. 또한, 강제수영부하실험에서 60 mg/kg과 120 mg/kg의 활나물 추출물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 부동시간의 감소를 보였으며 탐식능에 있어서 30 mg/kg과 60 mg/kg의 활나물 수컷 투여군에서 용량의존적인 탐식능의 증가를 보였다. 랫드에 대한 500, 1,000 또는 2,000 mg/kg의 활나물 추출물 (CSE) 28일 경구 반복투여는 사망률, 임상증상, 체중, 장기무게, 혈액학적 수치, 혈청학적 수치 및 병리조직학적 수치를 대조군과 비교하여 유의적으로 변화시키지 않아, 그 무독성량 (no observed adverse effect level, NOAEL)은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단되었다.

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 국내 자생식물 활나물의 작물화를 위한 유전자원 수집 및 재배기술 개발 결과를 요약하면 아래와 같다. 활나물은 우리나라 96개 지역에 분포 하였으며, 활나물 종자 발아는 종피찰상 15분 처리가 우수하였다. 활나물 작물화를 위한 표준재배기술은 피복재료는 흑색비닐, 파종기는 5월 20일, 재식밀도는 20×10cm, 질소시비량은 9kg/10a에서 생육이 우수하였다. 활나물 추출물은 DMH에 의한 다단계 발암과정 중 초기단계에서 효과적으로 암발생을 억제시킬 수 있는 것으로 사료되며, 그 활성성분은 모노크로탈린으로 밝혔다. 이러한 결과는 향후 식물유래 천연 항암기능소재 및 제품개발에 이용될 수 있을 것이다.

# Summary

## I. Title

Development of technique for stability yield and antitumor compound of *Crotalaria sessiliflora* L.

## II. Objective and necessity of research and development

Purpose of this study was development of functional food associated with antitumor through investigation of compound having an antitumor activity and evaluation of antitumor effect using *Crotalaria sessiliflora* L. crop. Recently, medicine reduced side effect of antitumor agents are developing because of a lot of side effect of antitumor agents. However, because of variety of side effect and high price of antitumor agents, development of a functional compound without side effect is required urgently.

## III. Contents and scope of research and development

1. Development of technique for Stability Yield in *Crotalaria sessiliflora* L.

For a crops of domestic native plant "*Crotalaria sessiliflora* L.", it was summarized a collection resources and cultivation technics as followings. The distribution of *Crotalaria sessiliflora* L. ranged in our country 96 areas, the lifestyle of collection

resources at individual the area did not have a difference. The optimal temperature of seed germination is 25°C, the germination rate with GA<sub>3</sub> 0.2mM is 58%, it was higher than 45% of low temperature treatment. The emergence rate from field condition is higher as 48% in seed scratched for 15 minute than that of control as 35%. The standard cultivation technique for *Crotalaria sessiliflora* L. crop, it was excellent for growth to condition that clothing material is the black vinyl, sowing time is May 20th and planting density is 20×10cm, and amount of fertilized nitrogen is 9kg/10a. The optimal harvest time of *Crotalaria sessiliflora* crop was on October 20th when completed grain filling. on this time, fresh weight of above ground per plant was high as a 37.9g, and flower bud contained seed take possess 49.8% with 18.9g of fresh weight.

## 2. Isolation and identification of antioxidant substance from *Crotalaria sessiliflora* L.

As economic growth has brought higher standards of living, leading to the increase in the aged population and thus higher interest in health foods, there has been a steadily growing demand for food products associated with adult diseases, robustness, and aging. The Westernization of eating habits has lowered the incidence of infectious diseases, but on the other hand such a change seems to be increasing the prevalence of chronic degenerative diseases such as cancer, heart troubles, hypertension, and diabetes. As a result, there is an increasing public interest in cancer or other chronic degenerative diseases and a

growing number of medical studies have begun to focus on such diseases. Recently, those studies are being considered more important in the conduct of research into and development of Korean medicinal plants, especially with significant attention given to physiological activation. As this leads to an elevated interest in functional matters, which are present in plants and provide great medical effect, many studies are being conducted on natural matters in fruits or vegetables as well as medicinal plants. Furthermore, the high consumption of processed and instant foods has brought an increase in the use of such food additives as antioxidants or preservatives for long-term preservation of foodstuffs, and thus great emphasis has been placed on the importance of medicinal plants and the necessity to develop them. The *Crotalaria sessiliflora* L. has been used among other things as a folk remedy or antidote for a number of diseases including tumors, cancer, and chronic bronchitis. Among the components of the *Crotalaria sessiliflora*, monocrotaline is contained in the seeds and other parts of the plant, at ratios of 0.4% and 0.02% each, and has multiple physiological activities with anticancer effects. In addition, the plant is of great dietetic and nutritive significance in that it is rich in alkaloid compounds and has a high level of physiological activity. This study examined general components in different parts of the *Crotalaria sessiliflora* plant and separated and refined antioxidants and single substances (effective for vascular relaxing). When the plant was analyzed for the contents of the components in its stem, leaves, root, and seeds, the results in order showed 19.78%, 9.56%, 7.02%, and 6.78% for moisture 2.2%, 2.5%, 0.6%, and 3.0% for crude fat; 10.5%, 10.8%, 6.15%, and 10.89% for crude ash; and 5.79%, 8.69%, 2.89%, 11.59% for

crude protein. In the analysis of antioxidant compounds in the *Crotalaria sessiliflora* plant's different parts, the study used a solvent mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>OH (3:1) to measure total phenolic acid content, electron donating activity, and SOD-liked activity and a lecithin, deoxyribose oxidation system was used to measure the antioxidant effects of those parts, so that we could know which part of the plant has antioxidant effect. In order to draw or separate effective components from the *Crotalaria sessiliflora* L. extract with a 1:1 solvent mixture of water and butanol was used after removal of sugar and fat from the extract. From the decompressed and concentrated butanol layer, 10 small fractions (Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5, Fr6, Fr7, Fr8, Fr9, and Fr10) were obtained using a column chromatography filled with sephadex LH-20. The activity of each fraction was measured in the same method as that used to measure the antioxidant effect of each part. On Fr, Fr4, and Fr6 fractions being of higher activity levels, TLC was done with a mixed solvent system of methanol, acetonitrile, methylenechloride, and hexane (10:34:50:6 by volume). The TLC spots were detected by visualizing them with a UV lamp and 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (in EtOH). Monocrotalin is contained in the seeds and other parts of the plant, at ratio of 8.86mg/100g and 9.18mg/100g each, and has multiple physiological activities with anticancer effects. Among the components of the *Crotalaria sessiliflora*., monocrotaline was purified by preparative reverse-HPLC to isolated monocrotaline. Their purity was confirmed by proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) and carbon nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C-NMR). On the other hand, the high consumption of processed and instant foods has brought an increase in the use of such food additives as antioxidant or preservatives for

long-term preservation of foodstuffs, and thus great emphasis has been placed on the important of medicinal plants and the necessity to develop them.

### 3. Antitumor effect and toxicity of *Crotalaria sessiliflora* L.

100% MeOH Ex-RFX. extract and leaf extract of *C. sessiliflora* L showed the strongest inhibition of cell viability in Hep3B cell and MCF-7 cell. 100% MeOH Ex-RFX extract and stem extract of *C. sessiliflora* L showed the strongest inhibition of cell viability in HT-29 cell on CytoScan<sup>TM</sup>-TPM cytotoxicity assay. 80% EtOH Wa. extract and stem extract of *C. sessiliflora* L in Hep3B cell, 80% EtOH Soni. extract and leaf extract of *C. sessiliflora* L in MCF-7 cell, and 80% MeOH Wa. extract and stem extract of *C. sessiliflora* L. in HT-29 cell showed the strongest inhibition of cell viability on MTT assay. 60 mg/kg of *C. sessiliflora* L. extract induced significant decrease of the number of 3AC compared to control on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced aberrant crypt foci (ACF) in rat colonic mucosa. On the other hand, 120 mg/kg of *C. sessiliflora* L. extract did not induce significant decrease of the number of AC compared to control on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced aberrant crypt foci (ACF) in rat colonic mucosa. However, total number of ACF was significantly decreased in the colon of rats treated with 30 and 60 mg/kg of *C. sessiliflora* L. extract compared to control for 8 weeks. But, 120 mg/kg of *C. sessiliflora* L. extract showed decrease of total number of ACF in the colon compared to control. In addition, AC formation was inhibited

by treatment of 0.5 mg/kg monocrotaline (MCT) and 0.25 mg/kg bleomycin. Also, in forced swimming test, 60 mg/kg and 120 mg/kg of *C. sessiliflora* L. extract showed significant decrease of immobility time compared to control and phagocytic activity was showed dose-dependent increase in 30 mg/kg and 60 mg/kg of *C. sessiliflora* L. extract compared to control. 500, 1,000 and 2,000 mg/kg of *C. sessiliflora* L. extract exhibited no toxicity after chronic administration on rats. Therefore, these findings indicate that *C. sessiliflora* L. extract may have chemopreventive effects via on DMH-induced rat colon carcinogenesis.

#### **IV. Suggestion on the result and utilization of research and development**

For a crops of domestic native plant "*Crotalaria sessiliflora* L.", it was summarized a collection resources and cultural practice as followings. The distribution of *Crotalaria sessiliflora* L. ranged in our country 96 areas. The best pre-sowing treatments for *Crotalaria sessiliflora* L. seed germination were seed scratched for 15 minute. The standard cultivation technique for *Crotalaria sessiliflora* L. crop, it was excellent for growth to condition that clothing material is the black vinyl, sowing time is May 20th and planting density is 20×10cm, and amount of fertilized nitrogen is 9kg/10a. The present study suggests that *C. sessiliflora* L. extract may inhibit colon carcinogenesis in initiation stage of DMH-induced carcinogenesis and the active

components are monocrotaline, hexanedioic acid and bis(2-ethylhexyl)ester, bis(2-ethylhexyl) phthalate. Therefore, these results can be use in development of functional food related with antitumor effect.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the project-----	14
Section 1. Objectives of the project -----	14
Section 2. Importance of the project -----	17
Chapter 2. Current status of related research developed in Korea and other countries -----	18
Section 1. Current status of <i>C. sessiliflora</i> L. cultivation -----	18
Section 2. Related research status for antitumor effect of <i>C.</i> <i>sessiliflora</i> L. -----	18
Chapter 3. Research contents and results -----	20
Section 1. Material and method -----	20
Section 2. Results -----	47
Section 3. Discussion and conclusion-----	132
Chapter 4. Achievement and contribution -----	137
Section 1. Achievements of research aims -----	137
Section 2. Contribution of research field -----	138
Chapter 5. Application plan of results -----	139
Chapter 6. Knowledge from foreign countries -----	140
Chapter 7. References -----	141

## 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요 -----	14
제 1 절 연구개발의 필요성 -----	14
제 2 절 연구개발의 목적 및 범위 -----	17
제 2 장 국내·외 기술개발 현황 -----	18
제 1 절 활나물 재배 연구 현황 -----	18
제 2 절 활나물의 항암작용에 관한 보고 현황 -----	18
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	20
제 1 절 연구수행 방법 -----	20
제 2 절 연구수행 결과 -----	47
제 3 절 고찰 및 결론 -----	132
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	137
제 1 절 목표달성도 -----	137
제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도 -----	138
제 5장 연구개발의 활용계획 -----	139
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	140
제 7장. 참고문헌 -----	141

# 제 1 장 연구개발 과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

농산물에는 색소류, 폴리페놀, 플라본 배당체 및 리그난 배당체 등이 종피, 잎, 줄기 및 식물 표면에 왁스형태로 존재하는데 이들 성분들이 다양한 생리활성을 나타냄에 따라 약용으로 이용되는 등 매우 중요한 자원으로 인정되고 있고, 작물의 새로운 용도개발, 고부가가치 상품의 생산을 통하여 농산물의 활성화를 기대할 수 있다. 물질문명의 발달과 함께 첨단 기기분석의 발달은 천연 자원 연구에 획기적인 발전을 이루어왔으나 아직도 천연물로부터 신약(新藥) 개발은 쉬운 일이 아니지만 독일에서 개발된 뽕나무추출물에는 면역증강작용 및 항암효과가 인정되어 주사제로 개발되어 미국 및 유럽 등에서 광범위하게 사용되고 있고 최근 우리나라로 수입되고 있다. 현재 한국에서도 순수 국산 상기생에서 자연 추출공정을 거쳐 상기생 약침제제를 만들어 임상에서 상용되고 있고, 우리나라 자생 식물인 할미꽃 뿌리에서 추출한 천연추출물이 기존항암제의 단점을 보완하면서 위, 폐, 간 및 대장 등의 암세포만을 선택적으로 파괴하는 추출물을 개발하여 주사제로 개발하였다. 국내 야산에서 재배된 주목잎으로부터 분리한 천연 항암제 『Taxol』이 난소암, 유방암 등 말기암 환자에게 탁월한 효과가 있어 대량생산에 성공하였고, 우리나라 옷나무로부터 알레르기 반응을 일으키는 urushiol과 옷나무 추출물이 쥐의 혈액암, 인체 위암, 인체 폐암, 자궁암 및 결장암 세포의 증식 억제 효과가 우수한 것으로 나타나 현재 임상시험 중에 있다. 이처럼 천연물질 또는 생약성분함유 식물(natural/medicinal herbs)에서 유래한 기능성 물질로부터 개발된 주사제

및 약제는 부작용이 적어 장기간 약제를 복용해야 하는 암환자 및 암발생 가능성이 높은 인구집단에서 암발생을 억제 또는 지연시키려는 보조제로 개발하려는 의학적 시도가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 암 치료약은 부작용이 많으므로 부작용 치료약품이 개발되고 있으나 부작용의 종류가 다양하고 또한 치료제 자체의 부작용도 간과할 수 없으며 가격도 상당히 비싸기 때문에 부작용 없는 저렴한 기능성 성분의 개발이 절실히 요구된다. 본 연구진은 이미 천연물로부터 항산화성이 높은 식물 추출물과 이 추출물을 저분자화시켜 생체에서 흡수되기 쉬운 상태로 개발하여 항암 부작용 완화 및 암 예방 기능성 음료를 개발하여(특허등록번호 : 제 0355012호) 시판 중에 있다.

최근에 활나물이 간암, 유방암 및 백혈병 등 각종 암의 치료효과가 있다는 보고에 따라 예비실험을 실시한 결과 활나물에 함유되어 있는 기능성 성분을 확인하였고, 따라서 활나물로부터 약성이 우수한 수종을 발굴하여 약리효과를 과학적으로 규명하여 식·약용으로 이용되는 특수수종을 새로운 소득수종으로 개발하고 그 과학적 효능과 활성 물질을 찾아내어 식품 및 의약품으로 개발함과 동시에 기능성 물질의 추출 조건을 확립하고 분리·정제하였다. 고분자 성분을 저분자화 하고 활나물에 함유되어 있는 성분을 극대화하는 시스템을 개발하여 유효성분의 생체내 흡수를 촉진시키므로 약효를 극대화할 수 있을 것이다. 이와 같은 추출물을 이용하여 항암 및 부작용 완화 제품이 개발된다면 경제적 인 부가가치는 물론 항암치료의 의료 수준 향상과 환자의 인간다운 삶을 증진하는데 일조할 수 있다고 사료된다.

## 2. 경제·산업적 측면

농산물의 수입개방으로 우리 농산물의 경쟁력 강화가 무엇보다 중요한 시점에 작물의 생산성과 부가가치를 높이고, 기능성 식물자원을 탐색하여 수익성 작목으로 정착시키는 연구 개발 노력이 절실히 요청되고 있다. 활나물에는 Monocrotaline이라는 특정 성분이 암 치료 및 예방에 좋은 효과가

있는 것으로 알려져 있으며 진초에 0.02%, 종자에 0.4%나 함유되어 있어 이의 이용가치가 충분한 것으로 판단된다. 본 연구진의 예비 실험결과에서는 각종 산화 스트레스에 대한 억제 효과가 있는 것으로 나타나 성인병 예방 또는 치료 의약품으로 개발 가능성이 높으며, 개발이 성공되면 화학요법 특히 약물요법 및  $\gamma$ -ray요법에 의해 초래되는 부작용을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 건강 지향적 시대 흐름에 부응하여 현재 국내 건강식품 시장규모는 1조원 이상으로 추정되고 있으며 이중 50% 이상이 건강식품의 원료 뿐 아니라 완제품의 형태로 수입되고 있는 실정이고 그 수입량도 급격히 증가하고 있으나 무분별한 원료의 사용과 효능이 불확실한 제품의 유통으로 시장의 혼란을 초래하고 있다. 따라서 본 연구는 활나물의 활성이 강한 항산화 물질을 암 치료 의약품 또는 보조제로 개발하기 위하여 기능성물질의 추출 및 무독화 하는 시스템을 개발하여 생체내 효능을 높일 수 있는 관련 연구와 활나물의 재배생산기술을 개발하여 원료 생산 기반을 확고히 하고 농가 소득 작물로 활용하고자 한다.

### 3. 사회·문화적 측면

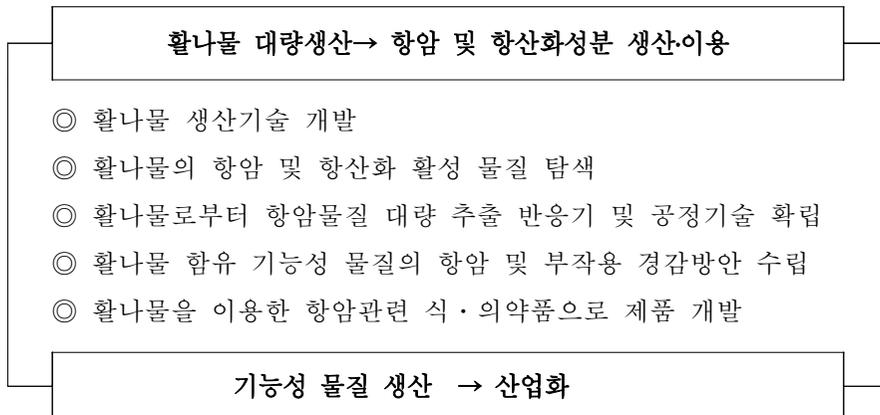
한국의 경우 암환자는 환자 4.5명당 한 명이며 수많은 연구에서 암을 정복하려는 연구가 이루어지고 있지만 아직까지도 뚜렷한 방안을 제시하지 못하고 있는 불치병으로써 환자와 가족의 정신적 고통과 경제적 손실이 크고, 최근 항암효과가 있다고 알려진 물질들이 많이 개발되고 있으나 그 효과와 항암 작용에 대한 과학적 검증이 없이 유통되는 경우도 있어 소비자의 불안과 사회적으로 문제가 되는 실정이다. 활나물은 독성이 강한 물질로 알려졌음에도 불구하고 중국 및 북한에서는 백혈병, 피부암, 간암, 자궁암 등을 치료하기 위해 다른 한약제와 혼합하여 또는 단독으로 다양하게 사용되고 있는 것으로 전해지고 있다. 그러나 활나물에 함유되어 있는 약효성분에 대한 과학적인 해석이 매우 부족하며 활나물에 미량 함유되어 있

는 Monocrotaline이라는 성분이 생체 내에서 독성을 나타내므로 이들 독성 경감효과 및 활나물 함유 항암성분등에 관한 자세한 연구가 매우 필요하다. 이 연구가 성공적으로 마무리되면 활나물로부터 천연 항산화물질의 개발과 동시에 암 치료에 널리 활용될 것으로 기대된다.

## 제 2절 연구개발의 목적 및 범위

본 연구는 우리나라 자생식물인 활나물을 원료로 한 항암 관련 기능성 물질을 개발하여 새로운 수요를 창출하고, 고품질의 원료생산을 위한 안전 다수확재배 기술, 고품질 우량종의 선발 및 육성 보급하고자 한다. 또한 기능성 약리성분의 물리·화학적 특성, 품종 및 환경 변이를 구명하여 품질이 우수한 품종의 개발로 활나물의 소비를 촉진시키고 약리작용을 구명하고 건강 기능성 식품을 개발하여 국민 건강에 이바지 하고자 한다.

구적으로 내려오는 암에 좋은 약초로 알려진 활나물로부터 생리활성 물질을 추출하고 간암 모델 동물에게 직접 투여하여 항암효과를 구명하며, 부작용 또는 독성을 검정하여 부작용 없고 안전한 기능성 식·의약품 및 첨가소재로 개발하고자 한다.



## 제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

### 제1절 활나물 재배 연구 현황

활나물 (*Crotalaria sessiflora* L.)은 두과식물로 예로부터 종양, 식도암, 직장암, 폐암, 위암 및 만성기관지염에 이르기까지 각종 질환들을 치료하거나 해독제로 민간요법에서 널리 이용되어 왔다. 활나물은 일년생 초본으로 높이가 20~70cm이고, 표면을 제외한 전체에 긴 갈색 털이 나 있고 황무지의 잡초밭에서 자생하며 전국에 널리 분포되어있다. 그러나 활나물은 종자 발아율이 매우 부진하고 타작물의 발아를 억제하는 것으로 알려져 자원화하기에 상당한 어려움이 있었으나 최근 활나물 종자의 휴면 타파를 위해 저온처리방법, 저온 대체 효과가 있는 것으로 알려진 gibberellin (GA<sub>3</sub>), 종자의 수분 상태를 조절하는 KNO<sub>3</sub>와 경실종자의 연화처리가 휴면을 타파하여 발아율을 높이는 방법이 개발되었으나 아직 대량 생산방법이 확립되지 않은 실정이다.

### 제2절 활나물의 항암작용에 관한 보고 현황

활나물은 1년생 두과식물로 생약명이 농길리 (農吉利)로 예로부터 종양, 각종 암, 만성기관지염을 치료하거나 해독제로 이용되어 왔음. 최근에는 항암 효과가 있는 것으로 알려진 Monocrotaline 라는 특정 성분을 많이 함유하고 있다. Shin 등의 연구결과, 활나물 추출물에 대한 세포독성 및 항암작용에 관한 연구에서 hexane 추출물이 세포독성이 적으면서 항암 활성이 강한 것으로 보고하였다. 최근 활나물 중 Monocrotaline이라는 특정성분이

항암효과를 나타내는 것으로 알려졌으나 Monocrotaline 성분의 항암효과에 대한 연구가 초기 단계에 불과하다. 농길리에 대한 항암 작용에 관한 중국에서 쥐를 대상으로 한 동물실험결과 sacorma-180, 백혈병 L615, 쥐 혀암-256등에 농길리 추출물 투여 24시간 후 억제작용이 있고, 이중에서 혀암-256에 대한 치료효과가 제일 현저하다고 보고되었고, 또 다른 보고에 의하면, S37에 대한 억제율이 54-75%로 나타났고 독성을 감소시키기 위한 방안으로 농길리 추출액의 모핵 탄소원자에 산소원자를 넣으면, 독성을 낮출수 있어 sacorma-180에 대한 억제율도 낮아진다고 보고하였다. 그러나 활나물에 약효 성분으로 알려진 Monocrotaline이 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으므로 구전으로가 아니라 자생 활나물로부터 기능성 성분을 추출하고 이들의 독성 정도를 판단하고 무독화 시키는 시스템을 개발하고자 한다. 이런 문제점의 해결을 위하여 국내 자생 식물인 활나물로부터 항암 성분을 추출하여 주사제 또는 의약품으로 개발하여 생체내 작용을 명확히 밝혀 이들 자원을 계속적으로 보존하면서 의약품 및 암 관련제품을 영구적으로 개발하고자 한다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구수행 방법

#### [제1협동과제] 활나물 안전생산기술개발

##### 1. 유전자원 수집 및 특성조사

활나물 유전자원 수집은 기존의 분포도 연구결과를 기초로 하여 위도별로 조사하였으며, 다시 기초 분포도를 기준으로 권역별로 유전자원 수집 및 수집지의 자생지 환경을 조사 하였다. 유전자원 수집은 남부, 중부 등 권역별로 수집 하였으며, 자원 수집 시 토성, 고도, 토양산도 등 자생지 환경을 조사하였다. 수집한 종자는 작물과학원 인삼약초과 시험포장에 증식한 후 생육특성을 조사하였다.

##### 2. 종자 발아율 향상 기술개발

발아 시험용 종자는 경기 수원에서 수집한 자원을 증식, 수확 후 상온에서 저장한 종자 중에서 미숙종자를 제거한 후 이용하였다. 발아율 향상시험은 발아적온구멍, GA<sub>3</sub> 처리, 종피찰상처리 등 3개 시험을 수행하였으며, 이중 발아적온구멍 시험 및 GA<sub>3</sub> 처리 시험은 직경 9cm의 petri dish에 흡습지 2매를 깔고 반복당 100립씩 4반복으로 시험하였다. 발아적온 구멍시험은 15, 20, 25, 30℃에 온도조건의 암상태에서, GA<sub>3</sub> 처리는 무처리(중류

수 침종 4시간), 저온처리(5°C, 습윤층적저장 30일) 및 GA<sub>3</sub> 농도별 0.02, 0.2, 2mM( 4시간 침종)로 종자를 전처리한 후 암상태, 25°C에서 시험 하였다. 발아율조사는 유근이 1mm 이상 돌출한 것을 발아개체로 하여 매일 발아조사 하였다. 발아율 향상을 위한 종피찰상 시험은 굵은 모래와 종자를 10 : 1의 비율로 혼합하여 5분, 10분, 15분간 막자로 마찰한 후 발아율을 검정하였다. 발아시험용 종자 파종상은 200구 원예용 연결포트에 파종하였으며, 파종상의 상토는 시판용 바로커를 사용하였다. 처리별 발아율은 5일 간격으로 조사하였다.

### 3. 활나물 재배기술 개발

활나물 안전생산기술 개발연구는 표준재배기술개발과 기 개발 된 표준재배기술을 종합 적용하여 수량성 증대를 위한 연구를 수행 하였다. 표준재배기술개발은 2003년부터 2005년까지 3년간 작물과학원 인삼약초과 시험포장에서 수행하였다, 피복재료 선발시험, 파종기 시험, 재식밀도 시험은 4월 20일경에 사양토 토성의 포장에 6-7-8-2,000kg/10a(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O-퇴비/10a)를 전량 기비로 시용한 후 주간 10cm로 파종하였다. 피복재료선발 시험은 짚, 흑색비닐, 무피복 등 3처리, 파종기 시험은 4월중순, 4월하순, 5월상순, 5월중순 4처리, 재식밀도 시험은 조간 20cm에 주간 10, 15, 20cm와 조간 30cm에 주간 10, 15, 20cm인 6처리, 질소 시비량 시험은 0, 3, 6, 9, 12kg/10a 등 5처리로 하여 자생식물 활나물 작물화를 위한 표준재배기술 개발 연구를 수행하였다. 활나물 수량성 제고를 위한 재배기술 개발은 2기 작 재배 가능성을 검정하기 위하여 개화전, 개화후, 종자등숙기 생육시기별로 생육특성 및 성분품성을 조사하였으며, 이식재배 효과를 검정하기 위하

여 실생 및 육묘이식재배의 생육특성을 비교하였다. 시험별 생육특성은 처리별 20 주씩 3반복으로 조사하였으며, 조사항목은 입모율, 초장, 경경, 분지수, 분지장, 경엽중 등을 조사하였다. 페놀함량 및 항산화능 등을 조사하였다.

## [제2협동과제] 활나물 함유 항암활성 물질의 분리기술 확립

### 1. 활나물 부위별 이화학적특성 및 생리활성

#### 가. 활나물의 공시재료

본 실험에 사용된 활나물은 수원 농촌 진흥청 작물과학원(National Crop Experimental Station) 약용작물 시험포장에서 2002-2005년까지 매년 재배하여 수확하였다. 수확 후 뿌리, 줄기, 잎, 종자부분으로 분류하여 세척한 후 그늘에서 자연 건조하여 공시재료로 사용하였다.



활나물 (*Crotalaria sessiliflora* L.)

#### 나. 방 법

## 1) 활나물의 이화학적 특성

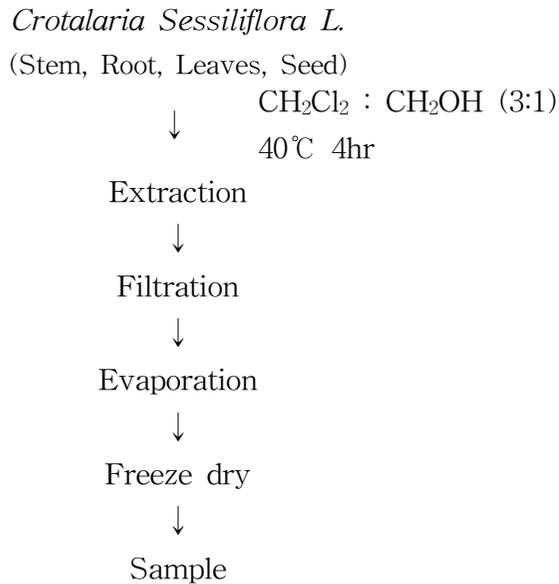
### 가) 일반성분 분석

활나물을 부위별로 수분, 조회분, 조단백질 및 조지방 함량은 AOAC방법으로 정량하였다. 즉 수분은 상압가열 건조법, 조회분은 550℃에서 직접회화법, 조단백질 함량은 Micro Kjeldahl 방법, 조지방질 함량은 Soxhlet 추출법에 의해 측정하였다.

### 나) 활나물의 부위별 생리활성 측정

#### (1) 활나물 부위별 추출물 제조

활나물의 잎, 줄기, 뿌리, 씨를 메틸렌클로라이드 : 에탄올 (3 : 1) 혼합용매로 상온에서 반복 추출하고 여과지에 거른 후 rotary evaporator (EYELA N-1000, Japan)를 이용하여 감압 농축하여 용매를 완전히 제거시킨 후 동결 건조기를 이용하여 건조 후 각 추출물의 수율을 계산하였다 (Fig. 1).



**Fig 1. Schematic procedure for extraction of  
*Crotalaria Sessiliflora L.***

(2) 항산화능 측정

(가) 페놀성 화합물 정량

총 페놀 함량은 AOAC의 Folin-Denis(1)법을 이용하여 비색 정량하였다. 활나물 부위별 시료 추출물을 ethanol을 이용하여 mg/mL로 녹인 후 분석시료로 이용하였다. 시료 0.1 mL에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 2.0 mL 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0-1.0 mg/mL의 농도의 catechin을 이용하여 시료의 페놀성 화합물 정량을 위한 검량선을 작성하였으며, 모든 과정은 3회 반복 실험하였다.

(나) 전자 공여능 측정(Electron donating ability : EDA)

부위별 시료의 항산화 활성은 DPPH free radical 소거법에 의한 전자공여능(EDA)으로 측정하였다. 각 추출방법에 의하여 추출된 시료는 0.5 mL DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydazyl) 시약 3 mL를 가하고, 실온에서 30분간 방치 후 UV-visible spectrophotometer(Phanrmaca biotech Ultraspec 3000 Engalnad)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다.

$$\text{EDA(Electron donating ability) (\%)} = 100 - \left( \frac{A}{B} \right) \times 100$$

A: 시료 첨가군의 흡광도

B: 시료 무첨가군의 흡광도

(다) SOD-liked activity

SOD 유사활성 측정은 부위별 추출물 시료 0.2 mL에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 3 mL와 0.2 mM pyrogallol를 가하여 25°C에서 10분간 방치한 후 1N-HCl로 반응을 정지 시킨 후 420 nm에서 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

$$\text{SOD-liked activity(\%)} = 100 - [(\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료무첨가군의 흡광도})] \times 100$$

(라) Hydroxyl radical 소거능

FeSo<sub>4</sub>/EDTA 용액, 2-deoxyribose, 부위별 추출물, phosphate-buffer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 혼합, 2시간 동안 반응시킨 후 TCA(trichloro acetic acid)용액과 TBA(thiobarbituric acid)용액을 넣고 15분 가열한 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 비교하였다.

$$\text{Hydrogen radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A : 시료 무첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

(마) Lecithin oxidation system

일정량의 lecithin을 chloroform에 녹인 후 질소가스를 이용하여 용매를 완전히 제거한 한 부위별 추출물, 2 mM FeSO<sub>4</sub>, 2 mM ascorbic acid를 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 30분간 incubating 한 후 과산화 지질을 TBARS법(2-thiobarbutric acid relative substance)에 의하여 측정하였다.

(바) Hydrogen peroxide 소거능

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, hydrogen radical 소거활성은 SOD에 의해 생성되는 과산화수소에 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜주는 능력을 측정하는 것으로 hydrogen peroxide 소거활성은 Muller의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.

시험관에 PBS buffer 0.1 mL, ethanol 또는 시료를 0.2 mL 가한 후 1.0 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.002 mL를 가하여 5분동안 방치한 후 1.25 mM ABTS[2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] 0.03 mL와 peroxidase 0.03 mL를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydrogen radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A : 시료 무첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

(3) 활나물 부위별 추출물의 유지에 대한 항산화 효과 측정

부위별 추출물을 소량의 에탄올에 녹인 후 각각 0.02, 0.05%농도로 옥수수유에 첨가하였다. 실험대조군으로는 추출물을 일체 첨가하지 않은 옥수수유를 사용했으며, 천연항산화제로 tocopherol과 합성항산화제로 BHT를 각각 0.02%씩 첨가하여 비교하였다. 각 시료들은  $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하면서 과산화물가(Peroxide value: POV)()와 공액이중산가(Conjugated linoleic acid value: CDV)를 측정하여 산패도를 측정하였으며, 상대적 항산화 효과를 비교하기 위하여 Ahn의 방법에 의하여 산출하였다. 즉 기질 옥수수유의 과산화물가가 100(meq/kg oil)에 도달하는 시간을 유도기간(Induction period: IP)으로 설정한 다음, 대조군의 유도기간에 대한 각 추출물이 첨가된 기질유지의 유도기간으로부터 다음과 같은 상대적 항산화 효과(Relative antioxidant effectiveness: RAE)를 구하였다.

$$\text{RAE} = \frac{\text{IP of antioxidant added substrate}}{\text{IP of the control}} \times 100$$

(4) 항균활성 측정

실험에 사용한 균주는 *Bacillus subtilis*(ATCC 9372), *Staphylococcus aureus*(ATCC13301), *Listeria monocytogenes*(ATCC19112), *Salmonella* Enteritidis(ATCC13076), *Pseudomonas flourescens*(ATCC11250), *Escherichia coli*(ATCC15489)종을 각각 사용하였고 생육배지는 nutrient

broth와 agar(Difco)를 사용하였다.

부위별 추출물의 항균력 검색은 한천배지확산법(disk plate method)로 측정하였다. 즉 각각의 시료를 추출용액인 에탄올을 사용하여 5% 농도로 조절한 후 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter(Milipore Co., USA)로 여과 제공하고, 멸균된 paper disk(Toyoseisakusho, 8 mm, Japan)에 20  $\mu\text{L}$ 씩 흡수시켰다. 추출용매인 에탄올을 완전히 휘발시킨 후 평판배지에 paper disk를 밀착시키고, 4°C냉장고에서 1시간 방치 후 30°C의 incubator에서 48시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하여 항균력을 비교하였다.

## 2. 활나물 추출물의 Sephadex LH-20분획 및 생리활성 측정

### 가. 활나물 추출물의 Sephadex LH-20분획

활나물 추출물 100 g을 2000 mL의 증류수로 40°C water bath에서 4시간 동안 추출한 후 순차적으로 분획한 n-butanol 층을 농축하여 open column chromatography에 sephadex LH-20을 4 x 50 cm까지 충전시키고, butanol 분획물 2 g을 loading하였다. 전개용매는 chloroform : ethanol (100 : 0 - 0 : 100)으로 용출하였다. 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 흡수파장을 확인 하였으며, 같은 파장의 분획물은 모아서 감압 농축한 후 시료로 사용하였다.

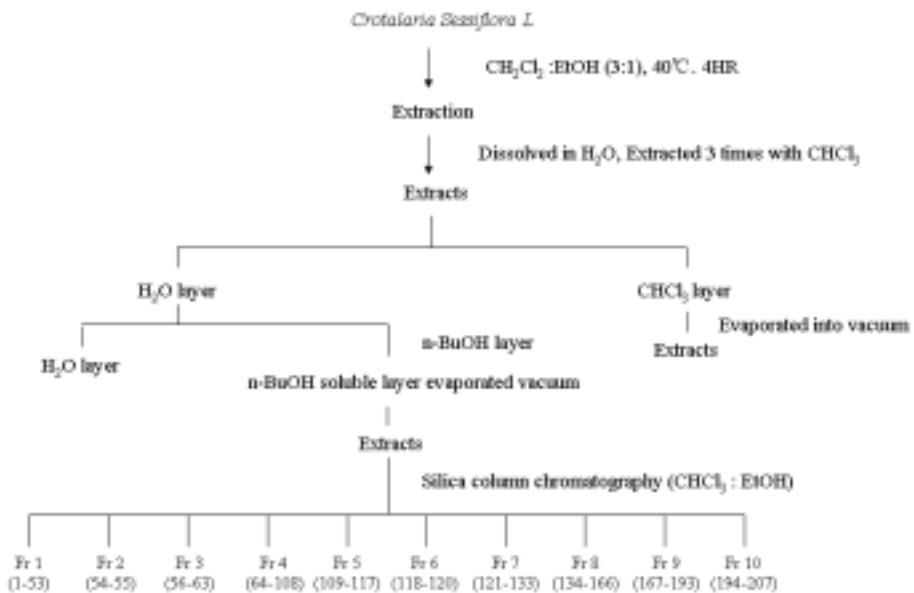


Fig 2. Scheme of extraction and solvent fractionation of n-butanol extract from *Crotalaria sessiliflora L.*

#### 나. 항산화능 측정

분획별 추출물의 free radical 소거능 (총 페놀함량, 전자공여능, SOD-like activity, hydroxyl radical scavenging, hydrogen radical scavenging)을 측정하였다.

#### 다. TLC 분석

활성이 좋았던 Fr1, Fr4, Fr6의 분획물 시료는 MeOH : Acetonitrile : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Hexane (10 : 34 : 50 : 6, v/v/v/v)를 전개용매로 사용하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(in EtOH)로 발색하여 spot을 확인하였다.

#### 라. HPLC 분석

HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 다음 Table 1의 조건으로 분석하였다. 즉, mobile phase는 methanol : H<sub>2</sub>O(40 : 60) 에서  $\mu$  Bondapak C18(3.9 x 300 mm) 컬럼을 사용하였으며, 280 nm에서 20분간 측정하였다.

Table 1. Operating conditions of HPLC.

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	MeOH : H <sub>2</sub> O = 40 : 60
Detector	UV 280 nm
Flow rate	1.0 mL/min

### 3. 분리정제 및 구조 동정

#### 가. 재 료

##### 1) 분획별 추출물 제조

활나물 추출물 100 g을 2000 mL 의 증류수로 40℃ water bath에서 4시간 동안 추출한 후 농축하였다. 농축 한 후 butanol로 분획하였고 Open column chromatography에 sephadex LH-20을 4 x 50 cm까지 충전시키고, 분획물 2 g을 loading하였다. 전개용매는 chloroform : ethanol (100 : 0 - 0 : 100)으로 용출하였다. 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 흡수파장을 확인 하였으며, 같은 파장의 분획물은 모아서 감압 농축한 후 시료로 사용하여 항산화능 측정 결과 활성이 높았던 Fr1, Fr4, Fr6을 시료로 사용하였다.

## 2) HPLC 분취

Preparative reverse-HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Table 1의 조건으로 분취하였다. 즉, mobile phase는 methanol : H<sub>2</sub>O(40 : 60) 에서  $\mu$ Bondapak C18(3.9 x 300 mm) 컬럼을 사용하였으며, 280 nm에서 20분간 측정하였다.

**Table 2. Operating conditions of HPLC.**

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	MeOH : H <sub>2</sub> O = 40 : 60
Detector	UV 280 nm
Flow rate	1.0 mL/min

## 3) GC/MS 분석

Preparative reverse-HPLC system에 의해 분취하여 농축한 추출물을 GC/MS로 분자량을 측정하였다.

**Table 3. Operating conditions of GC/MS.**

Items	Conditions
GC	Agilent 6890N(USA)
Column	HP 5MS, 0.5 mm * 30 m * 0.25 $\mu$ m
Column temp	Held 200°C at 2 min, temperature programmed at 10°C/min to 300°C and held at this point for a further 30 min
Carrier gas	He
Flow rate	1 mL/min
Injector volume	1 $\mu$ L
MASS	Agilent 5973i (USA)
MS quad	150°C
MS source	230°C

#### 4) NMR 구조분석 및 동정

분자량을 측정 한 추출물을 감압농축하여  $^1\text{H}$ -NMR spectrum은 Varian Unity Inova 300MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, DMSO- $d_6$ 용매를 사용하였고 ppm 단위로 나타내었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum은 Varian Unity Inova 75 MHz(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, DMSO- $d_6$ 용매(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI., USA)를 사용하였고 ppm 단위로 나타내었다.

## [제1세부과제] 생리활성 물질의 항암 및 독성기전에 미치는 영향

### 1. 암세포주를 이용한 in-vitro 세포독성 측정

#### 가. CytoScan™-TPM Cytotoxicity Assay

1) 1) 각 세포주를  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 맞추고 96well plate에 각각 100ul를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> gas, 37°C의 incubator에서 24시간 배양한 후 각각의 well에 10% FBS 함유된 RPMI 1640 cell culture medium에 negative, positive control 및 각 용매 종류별 분획물을 녹여 농도별(최종농도 : 0.25, 0.5, 1.0mg/ml)로 첨가하였다.

2) Negative control로는 culture medium만을, positive control로는 cell death를 유도하는 Adriamycin을 농도별(2.5, 5.0, 10ug/ml)첨가하였다.

3) 5% CO<sub>2</sub> gas와 37°C의 cell culture incubator에서 48h 동안 배양한 후 모든 well을 Phosphate Beffered Saline(200ul PBS/well)로 2회 씻어내었다.

4) 남아있는 PBS를 제거하기 위하여 clean paper towel로 싸서 PBS를 제거하였다.

5) 1ml의 CytoScan Solution-I에 20ul sodiumdodecylsulfate(SDS) solution을 혼합하므로써 CytoScan™ Solution-I solution을 준비한 후, 각각의 well에 SDS를 함유하는 CytoScan™ Solution-I solution을 25ul씩 첨가하고 5분간 incubation 시켰다.

6) CytoScan™ Solution-II solution을 각각의 well에 200ul 씩 첨가 후 30분간 incubation시킨 다음 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 추출물 분획별 암세포 증식 억제효과 측정(MTT assay)

1) 각 세포주를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 맞추고 96well에 각각 100ul를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> gas, 37°C의 incubator에서 24시간 배양한 후 용매 종류별 분획물을 멸균증류수에 녹여 농도별(최종농도 : 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml)로 첨가하였다.

2) 48시간 배양한 후 각 well을 PBS 완충용액으로 2회씩 씻어낸 후 MTT 용액(2mg/ml)을 200ul씩 주입하고 4시간 동안 배양한 후 well 바닥에 형성된 formazam이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액 200ul를 각 well에 첨가하였다.

3) 그 후 UV-visible spectrophotometer 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 대조군의 흡광도를 100%로 정하고 상대적인 성장억제율(%)로 처리군을 표시하였다.

## 2. 1,2-Dimethylhydrazine에 의해 유발된 Colonic Aberrant Crypt Foci에 대한 활나물 추출물의 암예방 효과

가. 실험동물 및 사육환경

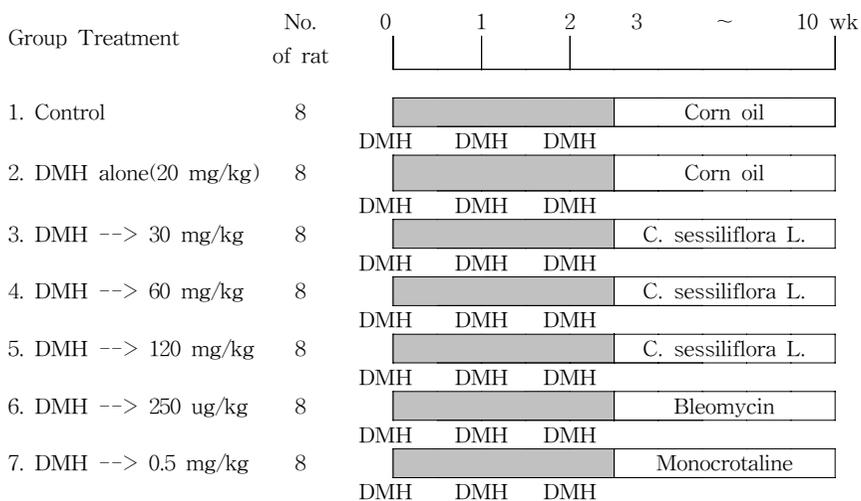
대장암 전암병변 (ACF)를 측정하기 위해 4주령 SD계 수컷 랫드 (오리엔트(주)) 56 마리를 사용하였고, 이들 랫드는 사육상자 (polycarbonate

cage)에 3마리씩 넣고 사육되었다. 실험기간 동안의 사육환경은 온도  $22 \pm 2$  °C, 상대습도  $55 \pm 5$  %, 인공조명 (12시간 점등, 12시간 소등), 조도 150-300 Lux로 유지되었으며, 기초자료로 퓨리나코리아를, 음수는 필터를 이용하여 여과된 정제수를 자유로이 급여하였다.

#### 나. 대장암 전암병변 측정을 위한 실험설계 및 실험물질 투여

대장발암물질로는 DMH (Sigma-aldrich, USA)를 체중 kg 당 20 mg/kg 용량으로 멸균생리식염수에 용해하여 복강으로 1주일에 1회씩 3주간 (총 3회) 투여하였다.

실험물질 투여군은 활나물 추출물을 30, 60, 120 mg/kg의 용량으로 멸균수에 용해하여 DMH 마지막 투여 1주일 후부터 8주간 매일 1회씩 경구 투여하였다. 양성대조군으로는 bleomycin을 DMH 투여 3주 후부터 시험종료일까지 주 1회, 250 ug/kg의 용량으로 복강투여되었고, 활나물의 지표물질인 monocrotaline은 0.5 mg/kg의 용량으로 DMH 투여 3주 후부터 시험종료일까지 매일 1회 투여되었다 (Scheme 1).



## Scheme 1. Experimental protocol for colon carcinogenesis in rats.

다. 대장의 이상선화소 (Aberrant Crypt Foci, ACF)와 이상선화 (Aberrant Crypt, AC)의 측정

랫드의 대장점막의 ACF와 AC는 Bird 등의 방법에 준해서 메틸렌블루로 염색을 실시한 후 관찰하였다. 실험개시 후 10주에 동물을 희생시키고 대장조직을 생리식염수와 10% 중성완충포르말린을 1 : 1의 비율로 섞어서 만든 용액으로 내강을 부풀리고, 결장부터 항문까지 장간막 백선을 따라 절개하여 여과지에 대장조직을 펼쳐 10% 중성완충 포르말린에 고정하였다. 고정한 조직을 세 등분으로 나누어 0.2% 농도의 메틸렌블루 용액으로 1분간 염색을 하였다. 염색된 조직을 광학현미경 (X40, X100)으로 관찰하여 대장의 ACF와 AC의 수를 측정하였다.

### 3. 활나물 추출물의 면역기능 증진에 관한 연구 (강제수영부하실험)

가. 실험재료

1) 실험동물 : 5주령 ICR계 mouse, male 20마리, female 20마리

2) 부형제 : 0.5% CMC

3) 환경조건

- 온, 습도 범위 : 온도  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$
- 명암 Cycle : 형광등조명(08:00 점등 ~ 20:00 소등)
- 조도 ; 200 ~ 300Lux
- 사육상자의 종류 : 순화, 검역, 투여 및 관찰기간 중

polycarbonate 케이지(400×250×200 mm)에 8마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

- 사육상자당 동물수 : 순화, 검역기간 - 8마리  
투여기간 - 8마리

#### 4) 사료

- 종 류 ; 실험동물용 쥐사료
- 공급원 ; (주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1)

#### 5) 음수

자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

### 나. 실험방법

#### 1) 군 구성

ICR계 mouse 5마리를 하나의 군으로 대조군, 120 mg/kg, 60 mg/kg, 30 mg/kg 의 용량군을 설정하였다. 대조군은 부형제로 사용한 0.5% CMC를 경구 투여하였다.

#### 2) 실험물질 투여

30mg/kg, 60mg/kg, 120mg/kg의 용량으로 0.5% CMC에 현탁하여 10ml/kg의 용량으로 2주간 ICR mouse에 경구 투여하였다.

#### 3) 강제수영부하실험

수영부하 시험 당일 mouse를 약 23-25 ℃ 수온의 물을 채운 300×420×500mm 크기의 폴리카보네이트 케이지에 강제로 빠뜨려서 10분 동안 관찰하였다.

#### 4) 부동시간 판정기준

생쥐가 물 위에 머리를 내밀고 움직임이 없고, 위쪽을 향해 떠 있을 때를 부동시간으로 판정하였다. 관찰 10분 중 2분 이상 부동시간을 기록하였다. 대조군과 비교하여 부동시간이 현저하게 감소한 경우 면역기능증진 효과가 있는 것으로 판정할 수 있다.

### 4. 활나물 추출물의 면역기능 증진에 관한 연구 (Carbon clearance test)

#### 가. 실험재료

1) 실험동물 : 5주령 ICR mouse male 32 마리, female 32마리

2) 실험시약 : India ink,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

3) 실험기기 : Spectrophotometer (Perkin Elmer)

#### 4) 환경조건

- 온도, 습도 범위 ; 온도  $22\pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$
- 명암 Cycle ; 형광등조명(08:00 점등 ~ 20:00 소등)
- 조도 ; 200 ~ 300Lux
- 사육상자의 종류 ; 순화, 검역, 투여 및 관찰기간 중 polycarbonate 케이지 (400×250×200 mm)에 8마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.
- 사육상자당 동물수 ; 순화, 검역기간 - 8마리  
투여기간 - 8마리

#### 나. 사료

- 종 류 ; 실험동물용 쥐사료
- 공급원 ; (주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1)

#### 다. 음수

자외선 살균처리 된 음용수를 자유섭취 시켰다.

#### 라. 실험방법

##### 1) 실험군

수컷과 암컷 각각 대조군과 30 mg/kg, 60 mg/kg, 120 mg/kg의 3단계 용량으로 설정하였다.

##### 2) 실험물질 투여

실험물질인 활나물 추출물을 2주간 경구 투여하였다.

##### 3) 시약조제

주사용 먹물은 India ink 원액을 주사용 멸균생리식염수로 3배로 희석하였고 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액은 0.1 g 에 100 ml의 증류수를 넣어 조제하였다.

##### 4) India ink 주사

마우스 미정맥으로 희석한 India ink를 10 g의 체중 당 0.1 ml의 양을 계산하여 주사하였다.

##### 5) OD측정

India ink 주사 완료 후 즉시 시간을 측정하였다. 먹물 주입 후 2분과 10분에 각각 눈의 정맥 총에서 40  $\mu$ l의 혈액을 취해 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 4 ml에 넣고 분광 광도계 600 nm파장에서 OD(Optical density)를 측정하고 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

용액을 blank로 하였다. 쥐를 희생시킨 후 간과 비장을 적출하여 여과지로 장기 표면의 혈액을 제거하고 장기무게를 측정하였다. 탐식 지수로 쥐의 탄소 제거능력을 나타내는데 실험군의 탐식지수가 대조군에 비해 현저히 높은 경우 실험 결과를 양성으로 판정하였다.

#### 6) Corrected phagocytic index 계산 및 통계학적 분석

Phagocytic index K와 Corrected phagocytic index “a”를 다음 수식에 의하여 구한 후 student t-test 를 실시하여 대조군과 각 실험군의 값을 비교하여 유의성을 검증하였다.

$$K = (\log OD T1 - \log OD T2) / (T2 - T1), a = (\text{체중/간무게+비장무게}) \times \sqrt{3} of K$$

### 5. 활나물 추출물의 독성시험연구

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 시험물질

호서대학교에서 제공된 활나물 추출물을 실험에 사용하였다

##### 2) 실험동물

실험동물로는 암수 각각 랫드를 30마리씩을 오리엔트(주)로부터 구입하여 약 1주간 순화시킨 후 그 기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물 암수 각각 20마리씩을 실험에 사용하였다.

##### 3) 사육환경

본 시험의 환경은 온도 18.6~23.3℃, 상대습도 35.2~67.1%, 환기횟수 10~15 회/hr, 조명시간 12시간(오전8시~오후8시), 조도 200~300 Lux의 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

#### 4) 투여약량 수준 설정 및 시험 물질조제

[시험군의 구성]

군 (mg/kg)		성별	투여액량 (ml/kg)	마리수	개체번호
대조군	0	Male	10	5	1101~1105
		Female	10	5	2101~2105
활나물 추출물	500	Male	10	5	1201~1205
		Female	10	5	2201~2205
	1,000	Male	10	5	1301~1305
		Female	10	5	2301~2305
	2,000	Male	10	5	1401~1405
		Female	10	5	2401~2405

#### 5) 투여방법

시험물질은 경구 투여용 존데를 이용하여 kg당 10 ml의 볼륨으로 28일간 주 7회 28일 동안 반복(경구)투여 하였다.

#### 6) 관찰항목

##### 가) 사망률 및 임상증상 관찰

시험기간 중 임상증상 및 사망의 유무에 관하여 1일 1회 관찰하고, 이상소견이 관찰될 경우에는 증상의 종류, 발현일 및 필요에 따라 증상의 정도를 기록하였다.

##### 나) 체중측정

체중은 입수 시 및 군분리 시와 투여 개시 후 주 1회씩 체중을 측정하였다.

다) 부검소견 및 병리학적 검사

모든 투여군 및 대조군의 생존동물에 대해 Ether 마취시킨 후 부검을 실시하고 간, 심장, 비장, 폐, 흉선, 신장, 부신, 부고환, 고환(난소), 뇌에 대한 병리학적 검사를 위해 H&E 염색을 실시하였다.

라) 혈액학적 검사

부검동물의 복대동맥으로부터 채혈한 혈액 중 2 ml은 EDTA가 함유된 튜브에 취하여 혈구자동측정기(Hemavet, USA)로 분석하였고, 1 ml의 혈액은 sodium citrate가 함유된 vacutainer에 취하여 원심분리 후 혈장을 분리하여 혈액응고분석기(Coagrex-100S, Japan)을 이용하여 PT 및 APTT를 측정하였다.

- 총적혈구수(Total erythrocyte count : RBC)
- 혈색소량 (Hemoglobin concentration (Hb))
- 헤마토크리트치 (Hematocrit : Hct,PCV)
- 적혈구지수 (RBC indices)
- 평균적혈구용적 (Mean cell volume : MCV)
- 평균적혈구헤모글로빈량 (Mean cell hemoglobin : MCH)
- 평균적혈구헤모글로빈농도 (Mean cell hemoglobin concentration : MCHC)
- 총백혈구수 (Total leucocyte count : WBC)
- 혈소판 (Platelet : PLT)
- 감별백혈구수 (Differential WBC count)
- 망상적혈구수 (Reticulocyte count)
- 프로트롬빈시간 (Prothrombin time : PT)

- 부분활성트롬보플라스틴시간 (Activated partial thromboplastin time : APTT)

마) 혈액생화학적 검사

약 7 ml의 혈액을 실온에서 응고시킨 다음 원심 분리를 통해 혈청을 분리하여 혈액생화학분석기(Hitachi 7060 Japan)를 이용하여 다음과 같은 항목을 측정하였다.

Items	Test methods
- Total protein (T-protein)	- Biuret
- Albumin (ALB, g/dL)	- Bromcresol green
- Albumin/globulin ratio (A/G)	- Albumin/Globulin ratio
- Total bilirubin (T-BIL, mg/dL)	- Azibilirubin
- Alkaline phosphatase (ALP, U/L)	- p-Nitrophenylphosphate substrate (DEA buffer)
- Aspartate aminotranferase (GOT, U/L)	- JSCC method
- Alanine aminotransferase (GPT, U/L)	- JACC method
- Creatinine (CREA, mg/dL)	- Jaffe method
- Blood urea nitrogen (BUN, mg/dL)	- Urease GLDH method
- Cholesterol (CHOL, mg/dL)	- COD-HDAOS
- Triglycerides (TG, mg/dL)	- GPO-HDAOS, Glycerol blanking
- Glucose (GLU, mg/dL)	- Hexokinase method
- Calcium (CA, mg/dL)	- OCPC method
- Inorganic phosphorus (IP)	- Fiske Subbarow method
- Lactate dehydrogenase (LDH)	- LD : LD(L-P)
- Creatine kinase (CK)	- JSCC
- Sodium (Na, mmol/L)	- Ion selection electrode
- Potassium (K, mmol/L)	- Ion selection electrode
- Chloride (Cl, mmol/L)	- Ion selection electrode

바) 장기중량 측정 및 육안소견

모든 동물에 대해 부검시 육안적 검사를 실시한 후에 심장(Heart), 간(liver), 신장(kidney), 부신( adrenal gland), 비장(spleen), 고환 (testis), 난소

(ovary), 부고환(epididymis), 뇌(barin), 뇌하수체(pituitary gland), 흉선(thymus), 갑상선(thyroid gland), 전립선(prostate), 자궁(uterus) 및 폐(lung)에 대한 무게를 측정하였다.

#### 사) 자료의 통계처리

체중, 혈액학적검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량의 자료에 대해서는 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하였고, 분산의 동질성이 인정된 경우 one way ANOVA test를 실시하여 유의성이 관찰되면 사후검정으로 Scheffe 검정을 실시하였다. Levene's test 결과 분산이 이질적이면 사후검정으로 Dunnett's 검정을 실시하였다. 병리학적 결과는 발생 빈도수로 나타내었으며 Fisher's exact probability test로 검정하였다. 모든 통계분석은 SPSS(Base 10.1 User's Guide, USA) 통계프로그램을 이용하여 수행하였다.

## 제 2 절 연구수행 결과

### [제1협동과제] 활나물 안전생산기술 개발

#### 1. 유전자원 수집 및 특성조사

활나물(*Crotalaria sessiflora* L.)은 두과의 1년생 초본으로 잎 표면을 제외하고 전체에 긴 갈색털이 있으며, 잎은 호생하고 엽병이 거의 없으며 엽형은 선형 또는 피침형으로 길이 4-10cm이다. 꽃은 7-9월에 피고 청자색이며 원줄기와 가지 끝에 수상으로 달린다. 꽃받침은 2개로 깊게 갈라지고 위쪽의 것은 2개로 갈라지고 아래쪽은 3개로 갈라지고 꽃과 잎을 감싼다. 꼬투리는 긴 타원형이며, 밋밋하고 길이 10 - 12mm로 2개로 갈라진다.

우리나라 활나물 분포지역은 남부 제주도부터 중북부 강원 지역까지 우리나라 전국에 자생하고 있으며 분포 지점수는 96개 지역으로 보고되고 있다(Table 1).

Location	The number of plant distribution
N33°-34°, E126° -127°	1
N34°-35°, E125° -126°	3
N34°-35°, E126° -127°	9
N34°-35°, E127° -128°	3
N34°-35°, E128° -129°	3
N35°-36°, E126° -127°	4
N35°-36°, E127° -128°	9
N35°-36°, E128° -129°	6
N36°-37°, E126° -127°	3
N36°-37°, E127° -128°	8
N36°-37°, E128° -129°	12
N36°-37°, E129° -130°	2
N37°-38°, E124° -125°	2
N37°-38°, E126° -127°	9
N37°-38°, E127° -128°	15
N37°-38°, E128° -129°	2
N38°-39°, E127° -128°	5
Total	96

**Table 1. Status of distribution in *Crotalaria sessiliflora* L.**

활나물 재배기술 개발 연구를 위한 첫 단계로 표 1의 활나물 분포도를 참조하여 우리나라 남부지역인 경남 함양, 중부 지역인 충남 예산 및 경기 수원 지역에서 유전자원을 수집하였다. 수집지역별 활나물 자생지 환경 및 수집종의 생육특성은 Table 2, 3과 같다.

**Table 2. Expenditure of collection resources and environment of native site in *Crotalaria sessiliflora* L.**

Collection site	Collection place	Environment of native site		
		Height(m)	Acidity(pH)	Earthiness
Gyeonggi Suwon	1	253	6.8	Sandy loam
Chungnam Yesan	2	300	6.7	Sandy soil
Gyeongnam Hamyang	2	350	6.5	Sandy loam

표 2에서 활나물은 해발 253 - 350 m에 분포하며, 사토 및 사양토이며, pH 6.5 - 6.8인 토양에서 자생하는 것으로 조사되었다. 특히 경사지이며 자갈이 섞인 토양에 조건에서 군락으로 자생하고 있었다.

수원, 예산, 함양 3개 지역 수집종간의 생육을 비교한 결과 경기 수원 수집종의 생육이 우수하였으나, 전반적으로 지역 수집종간에 식물학 및 작물학적 특성에서 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 3).

**Table 3. Growth characteristics of collection resources in *Crotalaria sessiliflora* L.**

Collection site	Flowering date	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Leaf length (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)
Gyeonggi Suwon	Aug. 12	43.1	6.1	7.3	15.6	39.6	38.9
Chungnam Yesan	Aug. 18	42.1	6.5	7.2	18.3	35.2	32.5
Gyeongnam Hamyang	Aug. 21	45.6	6.4	7.6	14.3	41.5	35.2

## 2. 종자 발아율 향상 기술개발

활나물은 종자 발아율이 낮아 작물화를 위한 장애요인이 되는 것으로 보고되고 있으며, 종자의 발아에 관여하는 요인은 외부환경요인인 온도, 습도 등과 종자자체요인에 의한 휴면으로 구분 할 수 있으나, 활나물의 경우 물리적인 요인이 종자 발아를 억제하는 것으로 판단된다. 최근 활나물 종자의 휴면 타파를 위해 종자의 수분 상태를 조절하는  $KNO_3$ 와 경실종자의 연화 처리가 휴면을 타파하여 발아율을 높이는 연구보고가 있으나 아직 대량 생산방법이 확립되지 않은 실정이다. 활나물 종자의 발아적온을 구명하기 위하여 암조건에서 온도별 15, 20, 25, 30℃ 에서 발아시험을 한 결과는 Fig. 1과 같다. 온도 처리별 발아율은 치상 2일부터 4일까지 급격히 증가 하였으나, 4일 이후부터는 발아율 증가 추세는 감소하는 경향이였다. 치상 후 10일경의 발아율은 25℃에서 51%로 가장 높아 활나물의 발아적온은 25℃인 것으로 판단된다. 약용작물은 작물의 생태적인 특성에 의하여 정도의 차이는 있으나 파종시기는 4월상 - 중순이며 대부분이며 이는 종자 생리적 특성이 고온 발아성 종자보다는 저온 발아성 종자가 많으며, 활나물의 경우 발아적온이 25℃인 것으로 추정할 때 우리나라 기상에서 활나물 파종시기는 5월 이후가 적합한 것으로 사료된다.

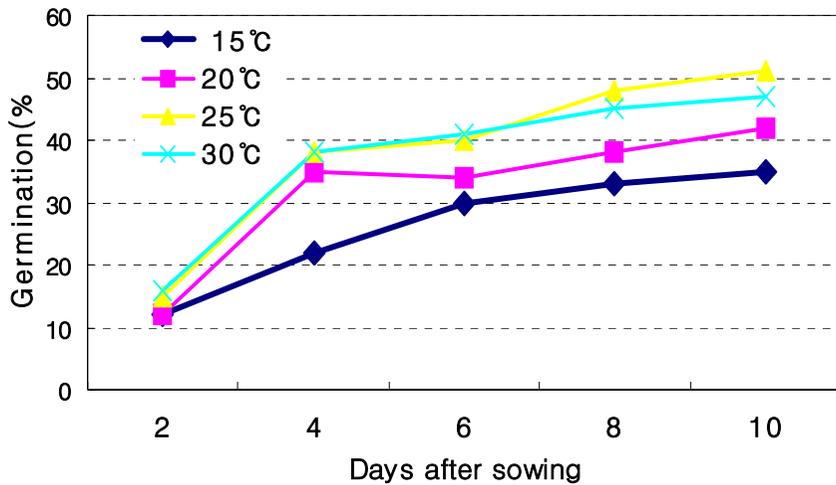


Fig. 1. Germination rate to temperature condition

활나물은 70일 동안 증적처리를 한 후 20 - 30°C 온도조건에서 10% 정도 발아된다고 보고 되었다.

표 4는 저온처리 대체효과가 있는 GA<sub>3</sub> 및 습윤증적저장 후 발아율을 조사한 결과로서 처리별 발아율은 무처리 32%, GA<sub>3</sub> 0.2mM처리 58%, 습윤증적저장 30일 처리에서 45% 나타났으며, GA<sub>3</sub> 처리시 발아율은 0.1 mM 암조건에서 60%이며, 3°C 저온처리 7일에서 발아율이 높다고 보고와 유사한 경향을 보였다.

Table 4. Germination rate to GA<sub>3</sub> concentration and cold treatment in *Crotalaria sessiliflora* L.

Treatment	Control	0.02mM	0.2mM	2mM	Cold treatment
Germination (%)	32	45	58	52	45

*Crotalaria*속 식물종자는 물리적 휴면을 보이는 것으로 보고되어 있으며, 물리적 휴면 타파 방법으로 종피찰상, KNO<sub>3</sub> 및 acetone 등을 처리하여 종자 발아율을 높이는 방법으로 이용되고 있으며, 본 연구에서는 활나물 재배농가 현장에서 간이로 적용할 수 있는 종피찰상에 의한 발아율 향상시험을 검정하였다. 모래와 종자비율을 10 : 1의 혼합한 후 막자로 5, 10, 15분 마찰한 후 종자 발아율을 검정한 결과 무처리 35% 비하여 종피찰상 15분 처리가 발아율 48%로 실용성 있는 종자 발아율 향상 기술이 되었다(Table 5).

Table 5. Germination rate to seed scratched treatment in *Crotalaria sessiliflora* L.

Treatment	5min.	10min.	15min.	Control
Germination (%)	38	42	48	35

\* seed scratched treatment : sand friction for 5, 10 and 15 minutes

### 3. 활나물 재배기술 개발

활나물은 자원식물로서 재배기술이 개발되지 않았으며, 활나물 작물화를 위한 기본적인 재배기술인 피복재배기술 및 파종기, 재식밀도, 질소소비량 시험을 수행한 결과는 Table 6, 7, 8와 같다. 현대 농작물재배에서 피복재배가 보편화 되어 있으며, 피복재배는 작물 재배시 가장 문제가 되고 있는

잡초 발생을 효율적으로 억제할 수 있으며, 또한 피복재배 효과로 토양수분보존으로 인한 입모율 향상 및 생육촉진 효과가 인정 되고 있으며, 표 6은 활나물 재배시 적합한 피복재료 선발과 각 피복재료별 생육특성을 조사한 결과이다. 피복재료별 생육은 흑색비닐피복 재배가 입모율이 28.6%로 무피복 및 짚피복 재배보다 높았으며, 초장, 분지수, 분지장 등 농업형질의 생육이 우수한 것으로 나타났다. 수량은 흑색비닐피복 재배가 입모율 및 생육이 우수하여 무피복보다 268% 증수되는 결과를 보였다.

**Table 6. Growth characteristics to mulching materials in *Crotalaria sessiliflora* L.**

Treatment	Emergence rate (%)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	
							Fresh	Index
Black PE mulching	28.6	25.6	4.9	13.0	20.6	32.6	312	268
Straw mulching	23.5	22.7	3.7	10.3	18.7	27.8	218	187
Non mulching	15.3	19.8	3.7	9.7	16.0	22.6	116	100

Table 7은 활나물 종자 파종시기를 구명하기 위하여 4월 중순부터 5월 중순 까지 10일 간격으로 흑색비닐을 피복한 포장조건에서 종피찰상 처리를 한 종자를 파종한 후 생육을 조사한 결과이다. 입모율은 4월 20일 파종구에서 13.2%이며, 파종기가 늦어질수록 증가하여 5월 20일 파종구에서 42.1%를 나타내었다. 이는 활나물 종자의 발아적온이 25℃인 선행 결과와 일치하는 경향이었으며, 반면 지상부의 초장, 분지수 등은 파종시기별로 차이가 없었다. 단 수량은 단위면적당 입모주수가 많은 5월 20일 파종구가 가장 높게 나타났다.

Table 7. Growth characteristics to sowing time in *Crotalaria sessiliflora* L.

Sowing time	Emergence rate (%)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	
							Fresh	Index
Apr. 20	13.2	24.9	5.5	12.1	20.5	32.4	143	100
Apr. 30	25.1	24.2	4.8	11.7	21.0	35.7	298	208
May 10	20.7	29.4	5.1	13.1	23.8	39.7	275	192
May 20	42.1	31.1	5.3	13.2	24.5	38.5	541	378

Table 8은 활나물 재배의 재식밀도를 구명한 시험으로 조간 20cm에 주간 10, 15, 20cm와 조간 30cm에 주간 10, 15, 20cm의 재식조건에 종피찰상처리를 한 종자를 4월 중순에 파종한 후 생육을 조사한 결과이다. 재식밀도별 지상부 생육은 처리 간에 차이가 없었으며, 수량은 소식재배구보다 밀식재배구가 높게 나타나 활나물 재배의 재식밀도는 20×10cm가 적합하였다.

Table 8. Growth characteristics to planting density in *Crotalaria sessiliflora* L.

Planting density (cm)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield(kg/10a)	
						Fresh	Index
20×10	23.0	5.1	12.7	16.9	32.7	313	272
20×15	23.7	5.1	13.1	17.2	34.9	223	193
20×20	22.2	5.4	13.2	16.2	36.6	175	152
30×10	21.5	5.0	13.5	15.5	30.7	196	170
30×15	21.5	5.0	14.0	16.7	36.8	156	135
30×20	21.5	5.1	14.5	13.9	35.9	115	100

Table 9는 질소 시비수준별 활나물 생육은 무비구에 비하여 질소 시비량이 증가 할수록 초장, 경경 등 생육은 점진적으로 증가하였으나 시비수준 12kg/10a 처리에서 감소하는 경향을 보였다. 시비수준별 생육특성은 9kg/10a 처리에서 초장 26.4 cm, 경경 5.2 mm, 분지수 13.9개, 경엽중 34.2g/주로 생육 및 수량이 가장 우수하였다.

**Table 9. Growth characteristics to amount of fertilized nitrogen in *Crotalaria sessiliflora* L.**

Nitrogen application (kg/10a)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield(kg/10a)	
						Fresh	Index
0	26.3	4.9	12.3	22.1	23.7	227	100
3	22.4	5.1	12.8	20.0	31.4	301	132
6	26.5	5.0	13.1	22.9	32.0	306	134
9	26.4	5.2	13.9	20.3	34.2	327	144
12	26.1	5.8	13.1	22.3	28.9	276	121

Table 10, 11, 12는 활나물 다수확 재배기술 개발을 위한 기초연구로서 육묘이식 재배와 직파재배의 생육특성을 비교하였으며, 또한 2기작 재배기술 개발을 위한 전 단계 연구로 시기별로 생육특성을 조사한 결과이다. 표 10은 활나물 종자를 5월 중순에 연결포트에 파종한 후 30일간 육묘하여 6월 20일에 이식재배한 후 생육을 조사한 결과이다. 전반적인 생육은 육묘이식재배가 직파재배보다 생육이 월등히 우수하였으며, 이식 후 포장 입모율은 95.6%를 높게 나타냈다. 육묘이식재배가 생육은 우수하나 선행 연구에서 활나물의 재식밀도는 20×10cm가 적합한 것으로 나타났으며, 일반적으로 단위면적당 재식주수가 많은 작물은 실용적인 측면에서는 경영비가 증가 하는 문제점이 있었으며, 활나물의 경우에도 동일한 문제점이 도출되었으며 차후 보완 기술개발이 요구된다.

**Table 10. Comparison of growth characteristics between seedling and transplanting in *Crotalaria sessiliflora* L.**

Treatment	Emergence rate (%)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Index
Seedling	40.2	26.4	5.1	14.5	20.6	34.5	100
Transplanting	95.6	69.5	11.2	27.0	44.0	92.7	268

\* Sowing time : Seedling - Apr. 20, Transplanting - Jun. 20

Table 11, 12는 활나물 수확시기별로 생육을 조사한 결과이며, 개화기 전인 8월 20일 수확구는 초장, 경경 등 지상부 생육이 부진하였으며, 개화기 직후인 9월 20일 수확구에서는 8월 20일 수확구보다 화퇴중이 증가하여 주당 경엽중은 10.2g에서 18.1g으로 증가 하였다. 종자 등숙기인 10월 20일 수확구에서는 지상부 생체중이 37.9g/주 가장 높았으며, 지상부 생체중에서 종자를 포함한 화퇴중이 18.9g/주로 49.8%를 차지하였다.

Table 11. Growth characteristics to harvesting time in *Crotalaria sessiliflora* L.

Harvesting times	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of branch	Branch length (cm)	Fresh weight(g/plant)			
					Leaf	Stem	Flower bud	Total
Aug. 20	15.0	2.7	6.1	11.3	5.2	5.0	-	10.2
Sep. 20	23.5	3.7	11.5	17.1	6.1	6.2	6.5	18.1
Oct. 20	28.5	5.1	11.9	22.1	6.3	12.7	18.9	37.9

Table 12는 활나물 생육시기별 성분함량을 조사한 결과로서 총 페놀함량은 8월 20일에 1.05, 9월 20일에 1.06, 10월 20일에 1.04 mg/mL로 시기별로 차이가 적었으나, 활나물 수확시기별 추출물의 DPPH에 의한 전자공여능을 측정한 결과는 8월 20일 수확한 추출물이 51.95%로 높게 나타났으며, 이결과는 국내 약용 및 식물자원의 항산화성 탐색결과에 의하면 포도씨와 음양곽을 제외한 대부분의 식물자원이 20% 미만의 활성을 보인 연구결과에 비하면 아주 높은 활성을 보여주고 있다. hydroxy radical 소거활성은 10월 20일에 수확한 추출물에서 95.75%로 가장 높았으며, 한국산 약초에 대한 항산화 효과를 검색한 결과 삼나무, 삼주, 오갈피 잎들은 hydroxy radical 소거능이 90% 이상이었다는 결과와 비슷한 결과를 나타내었다.

활나물의 hydrogen peroxide 소거활성은 10월 20일에 수확한 추출물에서 71.42%로 가장 높았으며, 천연 항산화제인 tocopherol, sesamol의 67.42, 68.57% 보다는 높은 결과를 보여주었으며, Yoo 등의 포도 과피의 항산화 활성 55.6 - 66.6%보다도 높은 결과를 보여 천연물로서의 항산화 소재로 개발 가능할 것으로 여겨진다. SOD 유사활성도 10월 20일에 수확한 추출물의 활성이 97.71%로 천연항산화제인 sesamol보다 매우 높게 측정되었다. 녹차추출물의 SOD 유사활성이 85.3%인 결과와 비교하여 볼 때 활나물의

수확.시기별 추출물의 SOD 유사 활성이 비슷하거나 높은 경향을 나타내었고, superoxide anion 제거능이 높은 물질을 함유하고 있음을 예상할 수 있다.

**Table 12. Antioxidative activity of *Crotalaria sessiliflora* L. extracts according to harvest time**

Harvesting times	Total Phenols (mg/mL)	TBARS (%)	RAE TBARS (%)	SOD (%)	DPPH (%)
Aug. 20	1.05±0.000	95.58±0.03	63.04±0.43	89.53±1.64	51.95
Sep. 20	1.06±0.002	95.66±0.09	69.33±0.35	94.64±0.75	39.297
Oct. 20	1.04±0.001	95.75±0.08	71.42±0.46	97.71±0.32	35.487
Tocopherol	1.63±0.001	97.19±0.05	67.42±0.18	98.34±0.26	51.086
Sesamol	4.75±0.002	94.35±0.05	68.57±0.18	72.77±0.78	58.997

**[제2협동과제] 활나물 함유 항암활성 물질의 분리기술 확립**

**1. 활나물 부위별 이화학적특성 및 생리활성**

가. 활나물 부위별 이화학적 특성

활나물의 부위별 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. 수분함량은 줄기 19.78%, 잎 9.56%, 뿌리 7.02%, 씨 6.78%로 부위별에 따른 수분의 함량에 차이가 있었다. 조회분 함량은 씨 10.89%로 가장 높았고, 뿌리 6.15%로 가장 낮았다. 조지방 함량은 씨 3%로 가장 높았고, 뿌리 0.6%로 가장 낮게 나타났다. 조단백질 함량은 씨 11.59%, 잎 8.69%, 줄기 5.79%, 뿌리 2.89%로 뿌리에서 가장 낮았다.

Table 1. Proximate composition of *Crotalaria Sessiliflora L.*

	Moisture	Crude fat	Crude ash	Crude protein
	(%)			
Stem	19.8	2.2	10.5	5.8
Leaves	9.6	2.5	10.8	8.7
Root	7.0	0.6	6.2	2.9
Seed	6.8	3.0	10.9	11.6

## 나. 활나물의 부위별 추출물의 생리활성

### 1) 부위별 추출물의 항산화능

#### 가) 수율

활나물의 **methylene chloride, ethanol** 혼합 용매에 의하여 부위별로 추출한 결과는 줄기 3.00, 잎 3.28, 종자 2.90 ,뿌리 1.77%의 순으로 부위별로 수율의 차이는 크지 않았지만 잎에서 수율이 가장 높은 것으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Yield of *Crotalaria Sessiliflora L.*

Sample	Stem	Leaves	Seed	Root
Yield (%)	3.00	3.28	2.90	1.77

#### 나) 총 페놀함량

총 페놀성화합물 함량은 잎 추출물에서 가장 높았고, 줄기 추출물에서 가장 낮았다. 즉 총 페놀함량은 잎 2.98, 뿌리 2.34, 종자 2.26, 줄기 2.11 mg/mL이었으며, 활나물의 주요성분으로 알려진 monocrotaine은 1.30 mg/mL로 측정되었다. 활나물 부위별 추출물은 기존의 항산화제인 tocopherol보다는 페놀성 화합물 함량이 높았으나 sesamol에 비하여는 낮은 수준이었다(Fig 1). 페놀화합물을 식물자원에 함유되어 있는 천연물질로써 다양한 구조와 생리활성 기능을 가지고 있다. Kang 등의 연구에 의하면 활나물을 에탄올 용매로 추출한 경우 부위에 따른 페놀 함량은 0.71-0.99 mg/mL로 측정된 것과 비교하여 볼 때 용매에 의한 추출수율과 페놀함량이 다르게 측정되었다.

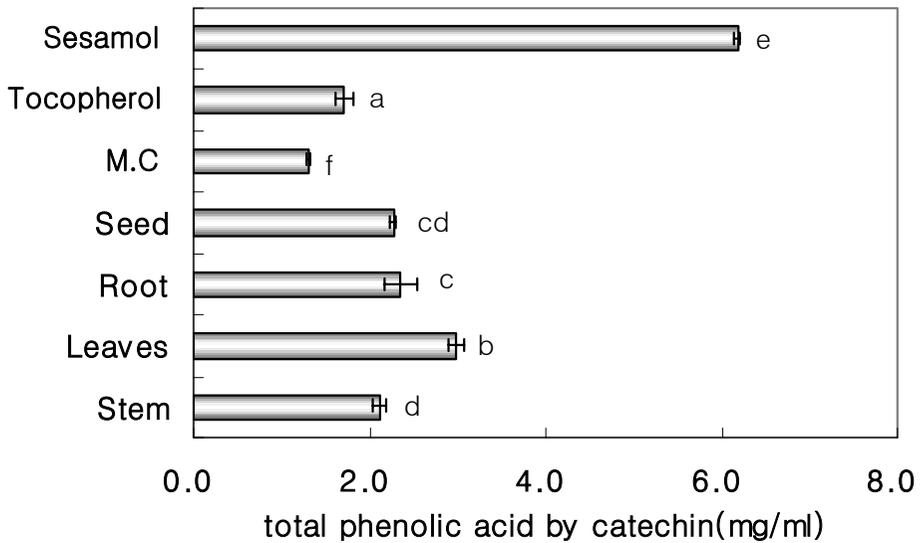


Fig 1. Total phenolic acid contents of extracts from each part of *Crotalaria Sessiliflora L.* M.C, monocrotaline.

다) 전자공여능(Electron donating activity) 측정

인체 내의 free radical은 지질, 단백질 등과 결합하여 생체의 노화를 일으키는 물질이며 이러한 free radical을 제거할 수 있는 천연물에 대한 연구가 끊임없이 이루어지고 있다. 특히 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) radical 소거법은 항산화 물질의 전자 공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색이 탈색되는 정도를 나타내는 정도를 지표로 하여 항산화능을 측정하는 방법이다. 활나물 부위별 추출물에 대한 DPPH에 의한 전자공여능을 측정한 결과는 Fig 2와 같다. 활나물의 잎과 줄기 추출물의 전자공여능은 각각 16.87, 16.06%로 매우 높았고,

뿌리 추출물과 종자 추출물이 각각 11.12, 9.31%인 반면 천연항산화제인 tocopherol의 전자공여능이 9.28%이었다. 따라서 활나물 추출물의 전자공여능은 sesamol 23.96% 보다는 낮았으나 천연항산화제 tocopherol과 비교할 때 높거나 비슷한 수준은 나타내었다. 밤꽃 추출물의 전자공여능을 비교한 결과 17.22% 이었으며, 한국 약용 및 식물자원의 항산화성 식물탐색에 대한 결과에 의하면 포도씨와 음양곽을 제외한 식물자원이 20%미만의 활성을 보고한 바와 유사한 결과를 보여주고 있다.

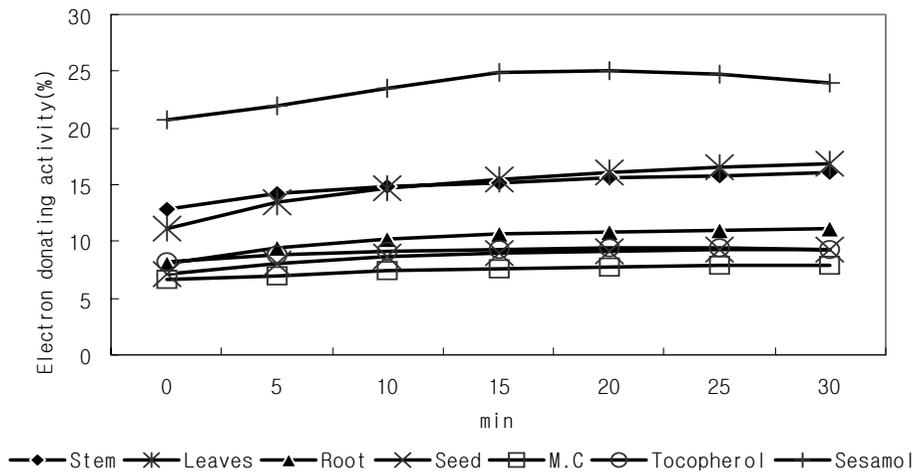


Fig 2. Electron donating ability of extracts from each part of *Crotalaria Sessiliflora L.* M.C, monocrotaline.

라) Hydroxy radical 소거능

Hydroxy radical( $\cdot\text{OH}$ )은 활성산소 중 반응성이 매우 강하여 생체 산화

에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 활나물 부위별 추출물에 대한 hydroxy radical 소거활성은 Fig 3과 같다. 즉 활나물의 잎 추출물에서 44.65%로 가장 높았으며, 줄기, 종자, 뿌리 추출물은 각각 41.99, 38.08, 37.10%이었고, 천연항산화제인 sesamol 33.14%로 가장 낮은 결과를 보여주었다. 한국산 약초 잎에 대한 항산화 효과를 검색한 결과 삼나무, 삼주, 오갈피 잎들은 hydroxy radical 소거능이 90% 이상이었다는 결과와 비교할 때 활나물 추출물의 hydroxy radical 소거활성은 다소 낮은 결과를 나타내었다.

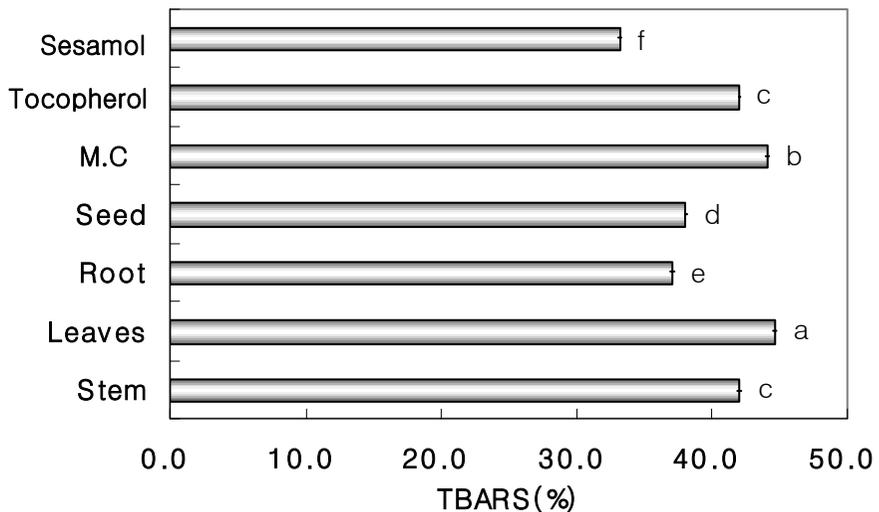


Fig 3. Hydroxyl radical scavenging ability of extracts from each part of *Crotalaria Sessiliflora L.* M.C, monocrotaline.

마) Hydrogen peroxide 소거능

Hydrogen peroxide 소거활성은 SOD에 의하여 생성된 과산화수소를

peroxidase를 첨가하여 물과 산소 분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜 주는 항산화능력을 측정하는 방법으로 활나물의 hydrogen peroxide 소거활성은 Fig 4와 같다. 활나물 잎 추출물의 hydrogen radical 소거능이 64.19%로 가장 높아, 천연 항산화제인 sesamol의 67.97%와 비슷한 수준이었으며, tocopherol의 53.70% 보다는 높은 결과를 보여주었다. 활나물의 잎 추출물에 대한 hydrogen radical 소거능은 Yoo 등의 포도 과피의 항산화활성 55.6 - 66.6%와 유사한 결과를 보여 천연물로서의 항산화 소재로 개발 가능할 것으로 여겨진다.

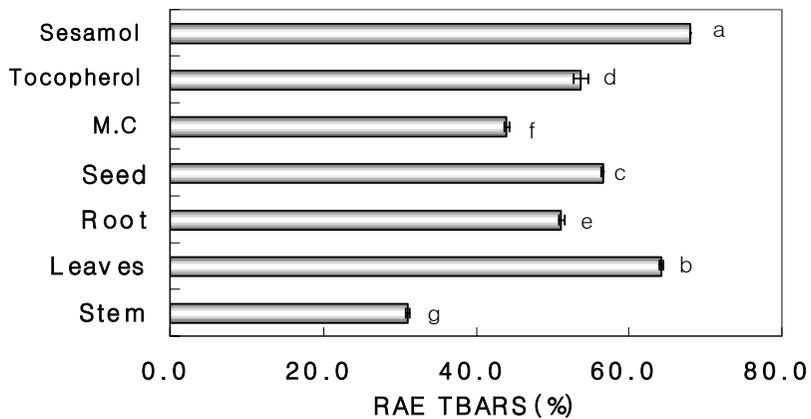


Fig 4. Relative antioxidative effects of extracts from each part of *Crotalaria Sessiliflora L.* M.C, monocrotaline.

바) SOD-liked activity

Superoxide dismutase는 세포내 활성산소를 과산화수소로 전환시키는 촉매시키는 생체내의 항산화 효소 중 하나이며, SOD에 의하여 생성된 과산

화수소는 catlase 또는 peroixdase에 의하여 물분자와 산소분자로 전환된다. SOD 유사활성은 잎 추출물의 활성이 86.27%로 가장 높았으며, 줄기와 뿌리 추출물은 각각 56.25, 50.88% 순 이었으며, 종자 추출물의 경우 18.43%로 가장 낮았다. 활나물의 잎, 줄기, 뿌리 추출물의 SOD 유사활성은 천연항산화제인 tocopherol보다 매우 높게 측정되었다. 녹차추출물의 SOD 유사활성이 85.3%인 결과와 비교하여 볼 때 활나물의 잎 추출물의 SOD 유사 활성이 비슷한 경향을 나타내었고, 활나물 잎 추출물은 superoxide anion 제거능이 높은 물질을 함유하고 있음을 예상할 수 있다 (Fig. 5).

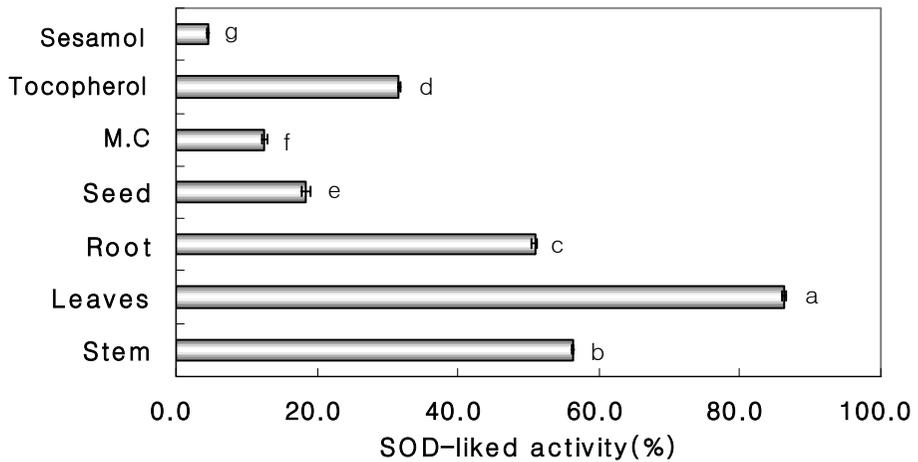
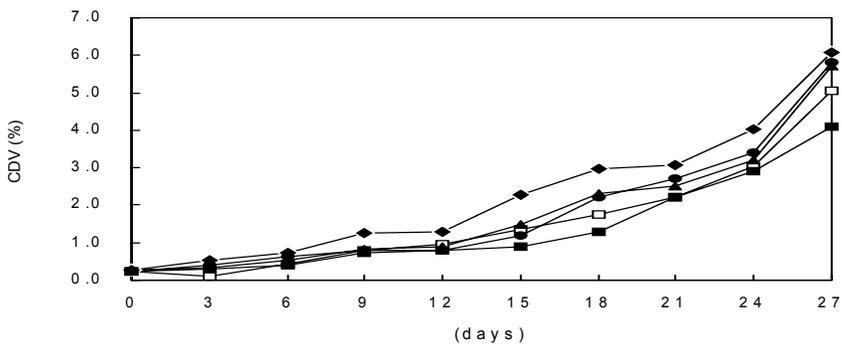


Fig 5. SOD-liked activites of extracts from each part of *Crotalaria Sessiflora L.* M.C, monocrotaline.

## 2) 활나물 부위별 추출물의 유지에 대한 항산화 효과

활나물의 부위별 추출물의 항산화성을 검토하기 위하여 옥수수유에 추출물과 항산화제를 각 농도별로 첨가하여 60±2°C에 저장하면서 3일 간격으

로 POV를 측정된 결과는 다음 Fig 6과 같았다. 활나물의 잎, 줄기, 뿌리 추출물은 대조군에 비하여 저장기간 동안 높은 항산화성을 나타내었고, 0.05% 농도 추출물들이 항산화활성이 높게 나타났다. CDV를 측정된 결과 도 저장기간에 따라 POV 경향과 비슷한 결과를 나타내었다. 또한 식물성 유지의 POV가 60~100 meq/kg oil, 동물성 지방의 경우 20~40 meq/kg fat에 도달하는데 소요되는 시간을 그 유지의 산화 유도기간으로 측정하고 있다(16). 따라서 POV가 100 meq/kg oil에 도달하는 시간을 유도기간으로 설정하여 활나물 추출물과 대조군간의 유도기간을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 즉 합성항산화제 BHT는 25.0일인데 비하여 활나물 잎, 줄기 0.05% 추출물이 각각 23.1일과 22.1일로 유도기간이 대조군 19.4일에 비하여 연장되는 것을 알 수 있었다. 위의 결과를 통하여 활나물 추출물은 유지에 대한 항산화 효과가 있는 것으로 나타났고, 천연 추출물로서 가치가 있는 것으로 사료된다.



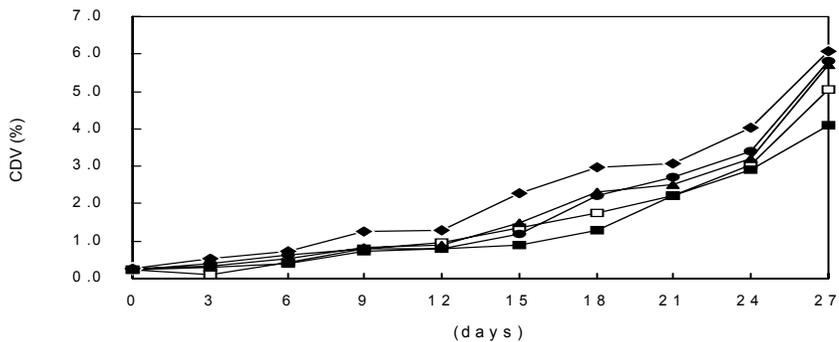


Fig 6. POV and CDV of corn oils containing with the *Crotalaria sessiflora L.* extracts. —◆— Control, —□— BHT 0.02, —▲— Leaf 0.05, —●— Stem 0.05, —■— Root 0.05.

Table 3. Induction Period(IP) and relative antioxidant effectiveness(RAE) of the corn oil containing various concentrations of *Crotalaria Sessiflora L.* extracts stored at  $60\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 30 days

	IP	RAE
Control	19.4	100
BHT	25	129
Leaf 0.02	20.8	107
Leaf 0.05	23.1	119
Stem 0.02	20.5	105
Stem 0.05	22.1	114
Root 0.05	20.5	106
Root 0.02	18.9	97.2

### 3) 활나물의 항균활성 측정

활나물 추출물을 2% 농도로 희석하여 paper disc agar diffusion 법을 이용하여 항균성을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 활나물 부위별 추출물의 항균성을 측정한 결과 활나물 잎 추출물이 모든 균종에서 강한 항균력을 나타냈고, 줄기추출물, 뿌리 추출물 순으로 항균활성을 나타내었다. 그림 양성균주의 잎 추출물은 12.2-12.4 mm의 활성저해환을 보였다. 특히 *Pseudomonas fluorescens* 에 대해 잎 추출물은 14.5 mm, 줄기추출물은 12.5 mm의 강한 항균활성환을 나타내었다. Jung 등은 오미자 종자의 용매 추출물의 항균활성이 물추출물 보다 높게 측정되었고 *S. Enteritidis*균주에 처리한 결과 균체가 팽윤되고 표층구조가 허물어졌다고 보고한 바 있다. 활나물 부위별 추출물의 균체에 대한 항균반응을 실험한 결과, 항균활성이 높게 나타난 것은 활나물의 추출물에 의해 미생물 표층구조가 허물어

저 균체성분이 유출되어 균생육이 억제된 것으로 생각된다.

**Table 4. Antibacterial activity of the extract of *Crotalaria sessiliflora* L.**

	Inhibition zone (mm)		
	LeafEX	StemEX	RootEX
Gram positive			
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	+++	+	+
Gram negative			
<i>Salmonella typhymirium</i>	+	+	++
<i>Pseudomonas floescens</i>	+++	++	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+

- : no inhibition (-8 mm), +: slight inhibition (8~9 mm), ++: moderate inhibition (10~11 mm), +++: heavy inhibition (12 mm-).

#### 다. 결과

활나물의 부위별 일반성분을 분석한 결과, 씨에서 조회분(10.89%), 조지방(3%), 조단백질(11.59%) 함량이 높게 측정되었으며, 수분함량은 줄기(19.78%)에서 높게 측정되어 부위별 성분 함량이 다르게 나타났다. 추출

수율은 줄기 3, 잎 3.28, 종자 2.90, 뿌리 1.77%의 순으로 부위별 차이는 크게 나지 않았으나 잎 추출물에서의 수율이 가장 높은 것으로 나타났다.

활나물의 부위별 생리활성은, 총 페놀성화합물 함량, 전자공여능, hydroxyl·hydrogen radical 소거능, SOD 유사활성 등 free radical 소거능이 다른 부위에서보다 잎에서 높게 측정되었으며, POV, CDV 측정 결과 모든 부위에서 대조군에 비하여 저장기간 동안 높은 항산화성을 나타내었고, 대조군에 비하여 저장기간이 연장됨을 알 수 있었다. 또한, 잎 추출물이 모든 군종에서 강한 항균력을 나타냈다.

## 2. 활나물 추출물의 Sephadex LH-20분획 및 생리활성 측정

### 가. 활나물 추출물의 Sephadex LH-20분획에 의한 분획물 제조

활나물 n-butanol 분획물 2 g을 loading하여 chloroform : ethanol (100 : 0 - 0 : 100)으로 용출한 시료를 UV-vis spectrophotometer에 의해 흡수파장을 확인한 결과는 다음과(Fig 7)같으며, 같은 파장의 분획물은 하나의 Fr으로 모아서 감압 농축한 후 시료로 사용하였다.

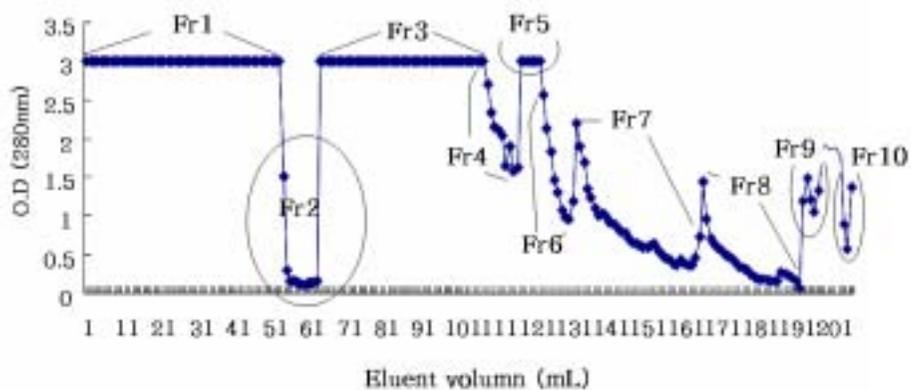


Fig.7. Silica chromatogram of each fractionation prepared by UV-spectrum.

### 나. 분획별 항산화능 측정

#### 1) 총 페놀함량

폴리페놀 화합물 중 flavonoid는  $^1\text{O}_2$ 나  $\text{O}_2^-$ 와 반응하며 안정한

complex를 형성하여 이들의 소거작용을 가지고 있어 지질의 과산화에 대한 항산화제로 잘 알려져 있다. 활나물 추출물로부터 항산화 활성이 높은 정제된 분획물을 동정하기 위해 silica gel을 이용하여 chloroform : ethanol (100 : 0 - 0 : 100)로 Fr1 - Fr10 까지의 물질을 얻어 각 분획별 페놀 함량을 측정 한 결과는 Fig 8과 같다. 페놀성 화합물은 sesamol(4.55 mg/mL) > Fr4(2.98 mg/mL) > tocopherol(2.24 mg/mL) > Fr1(1.34 mg/mL) > Fr5(1.07 mg/mL) > Fr10(1.00 mg/mL) > Fr3(0.97 mg/mL) > Fr7(0.93 mg/mL) > Fr8(0.91 mg/mL) > Fr6(0.86 mg/mL) > Fr9(0.74 mg/mL) > Fr2(0.68 mg/mL) > monocrotaline(0.49 mg/mL) 순으로 나타났다. 페놀화합물의 함량과 항산화 효과와는 밀접한 관계가 있다는 보고와 비교하여 볼 때, 총 페놀화합물의 함량이 높은 것이 뛰어난 항산화 효과를 가지고 있을 것으로 예상된다.

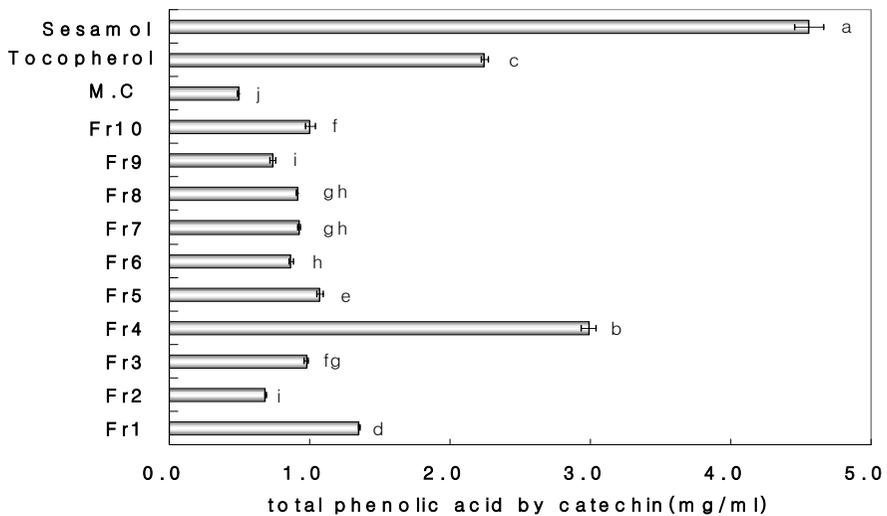


Fig 8. Total phenolic acids contents of each fractions purified from glass column chromatogram in *Crotalaria Sessiliflora L.*

## M.C, monocrotaline.

### 2) 전자공여능(Electron donating activity) 측정

전자공여능의 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거법으로 측정하는데 DPPH는 분자 내 radical을 함유하고 있으며 토코페롤, 아스코르빈산, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원, radical이 소거되어 짙은 자색이 탈색되는데, 이 정도를 항산화물질의 수소공여능으로 측정하는 방법이다. 이때의 DPPH의 거동은 hydroxyl radical과 유사하여 free radical 소거실험에 활용된다. DPPH와 활나물 잎 추출물의 분획물을 반응시켜 DPPH scavenger 활성을 측정한 결과, Fr4(69.15%) > sesamol(39.71%) > tocopherol(32.83%) > Fr1(31.56%) > Fr10(31.33%) > Fr3(26.96%) > Fr5(25.67%) > Fr8(22.25%) > Fr6(20.73%) > Fr7(19.67%) > Fr9(18.42%) > Fr2(12.88%) > monocrotaline(10.83%) 순으로 Fr4에서 높게 나타났다. 이러한 결과는 포도씨 추출물이 95.3%의 전자공여능을 나타낸다고 보고한 장 등에 의한 결과와 비교하면 낮은 수준이나, 기존의 항산화제인 tocopherol이나 sesamol보다도 높은 활성을 보였다 (Fig. 9).

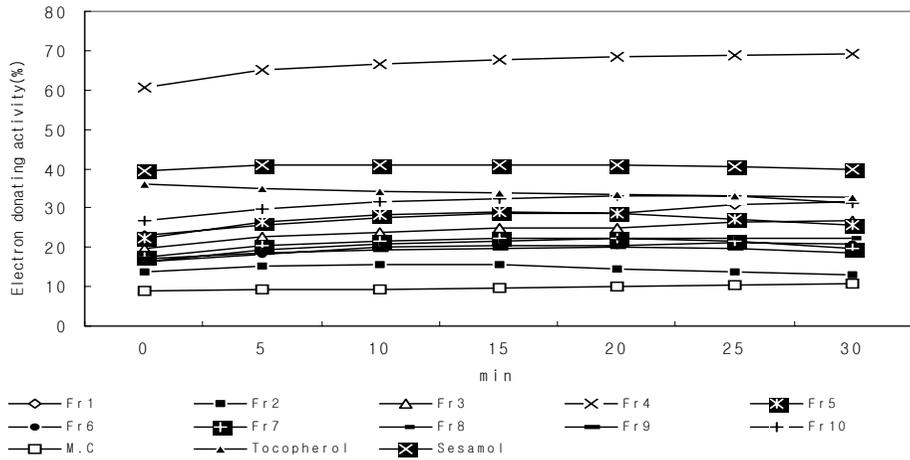


Fig 9. Electron donating ability of each fractions purified from glass column chromatogram in *Crotalaria Sessiliflora L.* M.C, monocrotaline.

### 3) Hydroxy radical 소거능

Hydroxy radical( $\cdot\text{OH}$ ) 소거능은 2-deoxyribose oxidation method에 의해 측정하였다. Hydroxy radical은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 활나물 잎추출물을 sephadex LH-20에 의해 분리한 분획물의 Hydroxy radical 소거활성을 측정한 결과, monocrotaline(94.23%) > tocopherol(94.12%) > Fr6(94.08%) > Fr8(93.99%) > Fr7(93.90%) > Fr10(93.77%) > Fr9, Fr5(93.70%) > Fr3(93.66%) > Fr2(93.04%) > Fr1(92.97%) > sesamol(92.19%) > Fr4(92.15%) 순으로 김 등의 한국산 약초 잎과 유 등의 포도부산물 결과와

비교하여 볼 때 활나물 잎 추출물의 분획물이 높은 수준의 hydroxy radical 소거활성을 보이는 것으로 보아 활나물에는 항암성분 뿐만 아니라, 항산화 활성이 높은 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 사료된다 (Fig. 10).

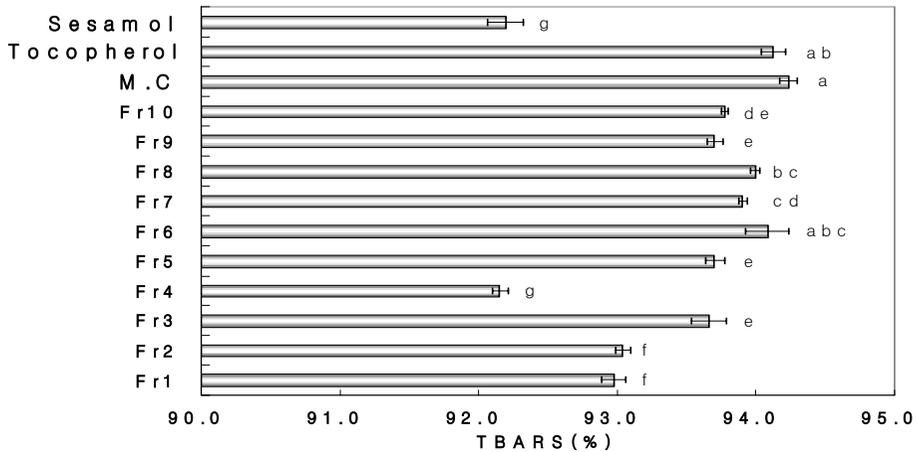


Fig 10. Hydroxy radical scavenging activity of each fractions purified from glass open column chromatogram in *Crotalaria Sessiliflora L.*

M.C, monocrotaline.

#### 4) Hydrogen peroxide 소거능

$H_2O_2$ 는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 과산화지질은 동맥경화, 뇌졸중 등과 같은 성인병의 원인이 되고, 간장의 세포막에 과산화지질을 증가시켜 세포의 기능이 저하되어 염증이 유발되며, 그 결과 간경화, 간염 등을 초래한다고 보고되고 있다. Hydrogen radical 소거활성

은 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜주는 능력을 측정하는 것으로 본 실험결과 sesamol(65.73%) > Fr6(63.51%) > tocopherol(63.26%) > monocrotaline(61.39%) > Fr5(60.71%) > Fr4(57.82%) > Fr10(54.93%) > Fr3(49.74%) > Fr8(42.60%) > Fr9(42%) > Fr7(41.32%) > Fr2(41.23%) > Fr1(37.58%) 순으로 Fr6 분획물이 sesamol보다는 낮았으나, tocopherol과 유사한 hydrogen radical 소거능을 나타내었다 (Fig. 11).

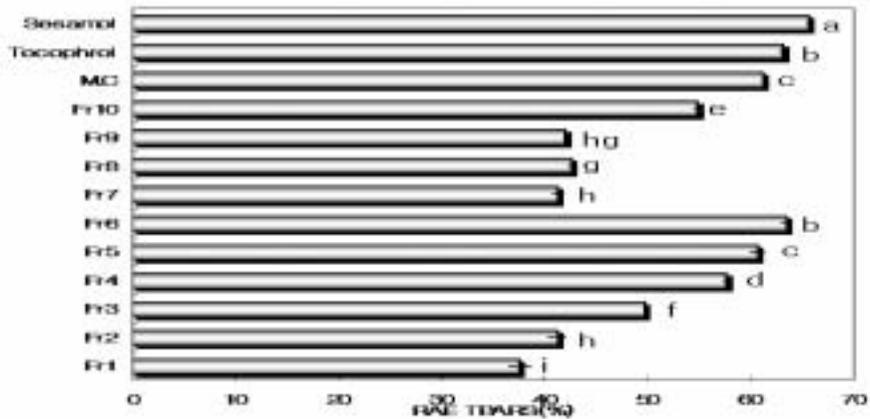


Fig 11. Hydrogen radical scavenging activities of each fractions on the peroxidation of egg yolk lecithin.

M.C, monocrotaline.

##### 5) SOD 유사활성

Superoxide anion의 활성을 억제 시킬 수 있는 유사물질의 활성능을 측

정한 결과 tocopherol(97.34%) > Fr4(94.18%) > Fr1(92.79%) > Fr2(87.30%) > Fr8(79.34%) > Fr10(79.33%) > Fr3(78.44%) > Fr5(72.22%) > Fr7(70.93%) > Fr6(65.76%) > Fr9(64.76%) > monocrotaline(46.82%) 순으로 총 페놀 함량과 전자 공여능이 높았던 Fr4에서 높은 SOD 유사활성을 나타내었다 (Fig. 12).

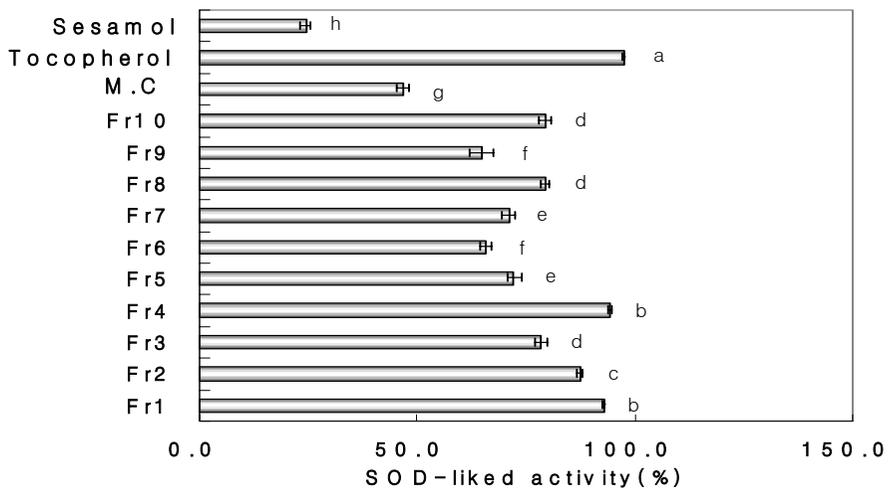


Fig 12. SOD-liked activities of each fractions purified from glass open column chromatogram in *Crotalaria Sessiliflora L.*

M.C, monocrotaline.

#### 다. TLC 분석

TLC 분석은 항산화 활성이 높았던 Fr1, Fr4, Fr6 분획 추출물을 가지고 MeOH : Acetonitrile : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Hexane (10 : 34 : 50 : 6)을 전개 용매로 TLC를 실시하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로

각각 발색하여 spot을 확인 한 결과 Fr1, Fr4, Fr6 분획 추출물에서 3가지 형광 물질을 검출하였다. (Fig. 13).

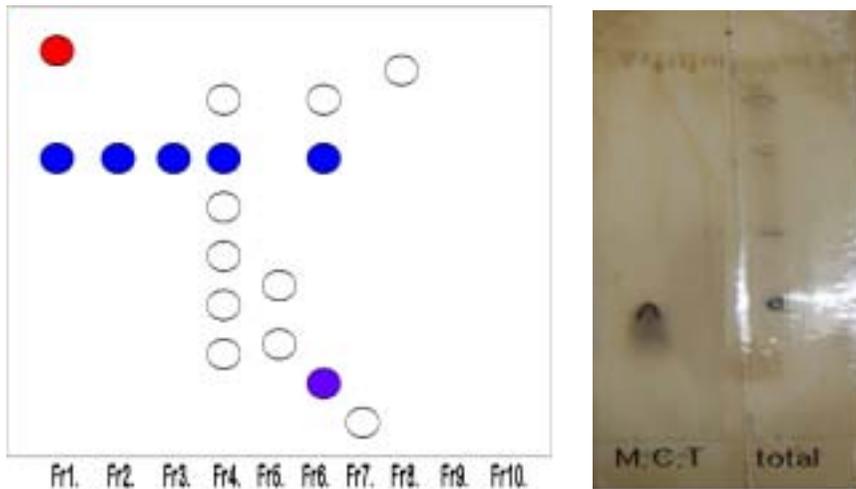
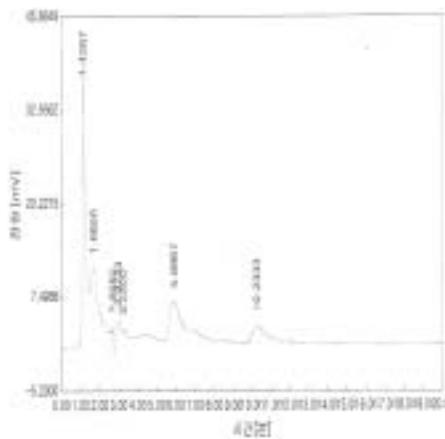


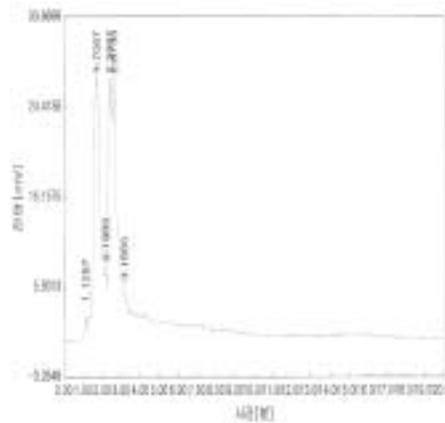
Fig 13. TLC patten of isolated Fig 14. TLC patten of fractions from n-butanol extract of *Crotalaria Sessiliflora L.*

#### 라. HPLC 분석

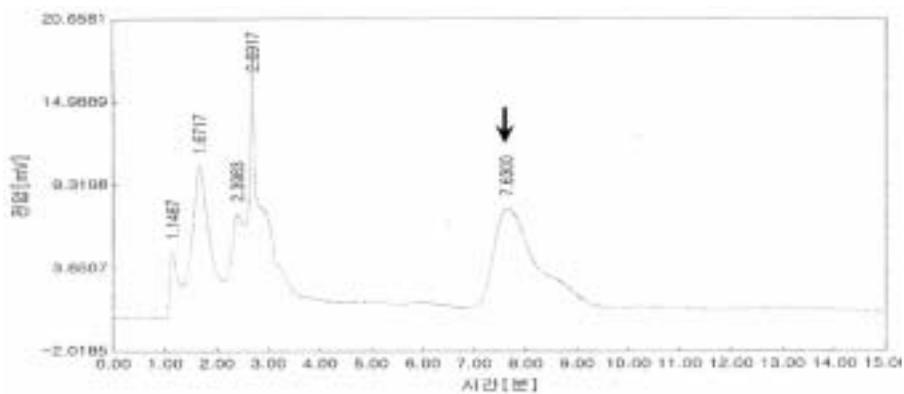
HPLC 분석 결과는 다음 Fig 15, 16과 같다. Silica gel을 이용한 분획추출물의 경우 극성이 높은 물질일수록 2,3분대에 나오는 물질의 양이 많았고, 같은 시간대에 높은 피크가 나타났다. 따라서 항산화 활성이 높은 부분은 극성이 높은 물질인 것으로 생각되어지며, 이 물질에 대한 좀 더 자세한 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것이다.



Fr 1



Fr 4



Fr 6

Fig 15. HPLC analysis of fraction from *Crotalaria Sessiliflora L.*

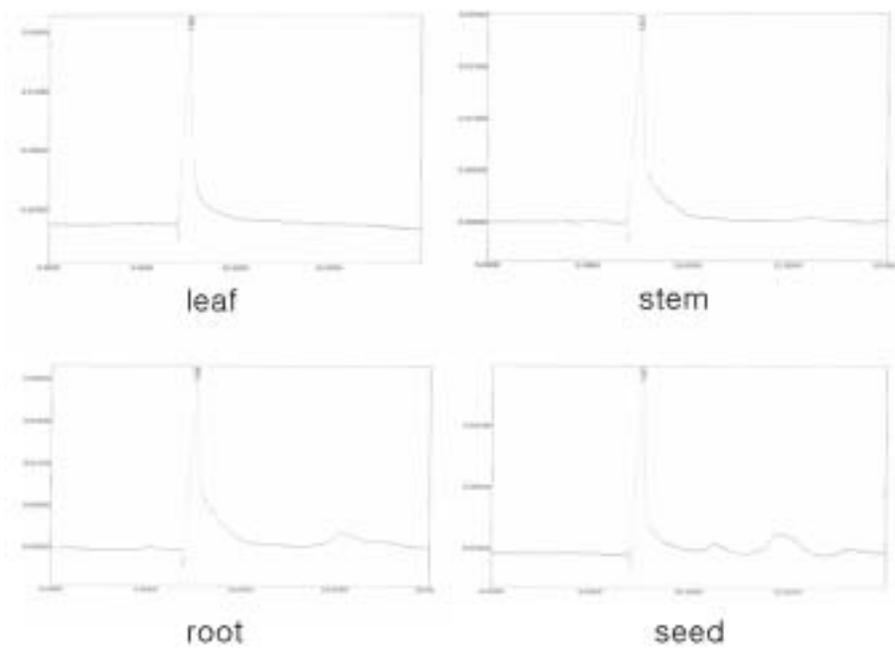


Fig 16. HPLC pattern of each part from *Crotalaria Sessiliflora L.*

### 3. 분리정제 및 구조 동정

#### 가. HPLC를 이용한 피크 분리·정제

활나물로부터 최종적으로 2가지의 물질을 분리정제 하였으며, Pre-HPLC를 이용하여 Table 1과 같은 조건으로 각각의 화합물을 분취하여 compound 1(11mg), 2(13mg)을 얻었다(Fig 17).

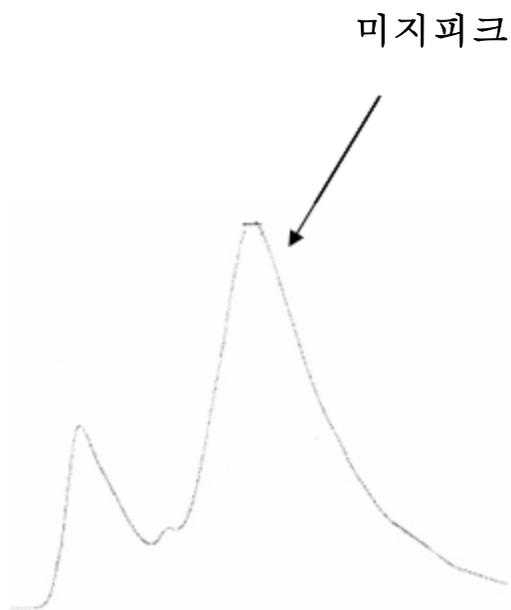


Fig 17. HPLC chromatogram of isolated from *Crotalaria Sessiliflora L.*

나. LC · GC/MS분석

LC · GC/MS로 분자량과 피크의 분리를 확인하기 위해서 전자에 충격을 주어서 fragmentation을 분석한 결과 Monocrotaline의 adipate와 91%의 유사성을 나타내었다 (Fig. 18, 19).

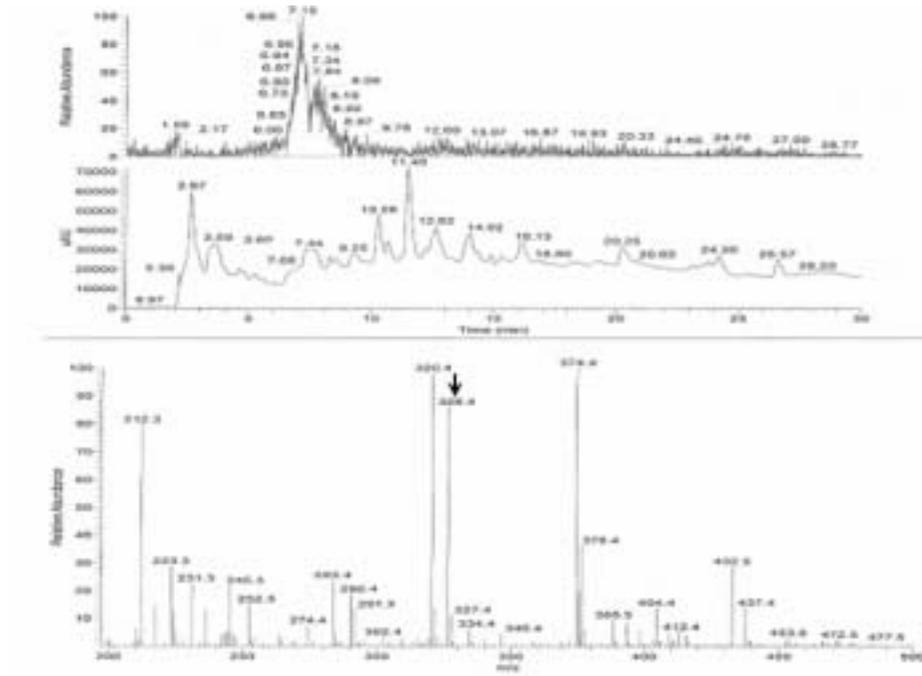


Fig. 18 LC/MS chromatogram of n-butanol fraction from *Crotalaria sessiliflora* L.

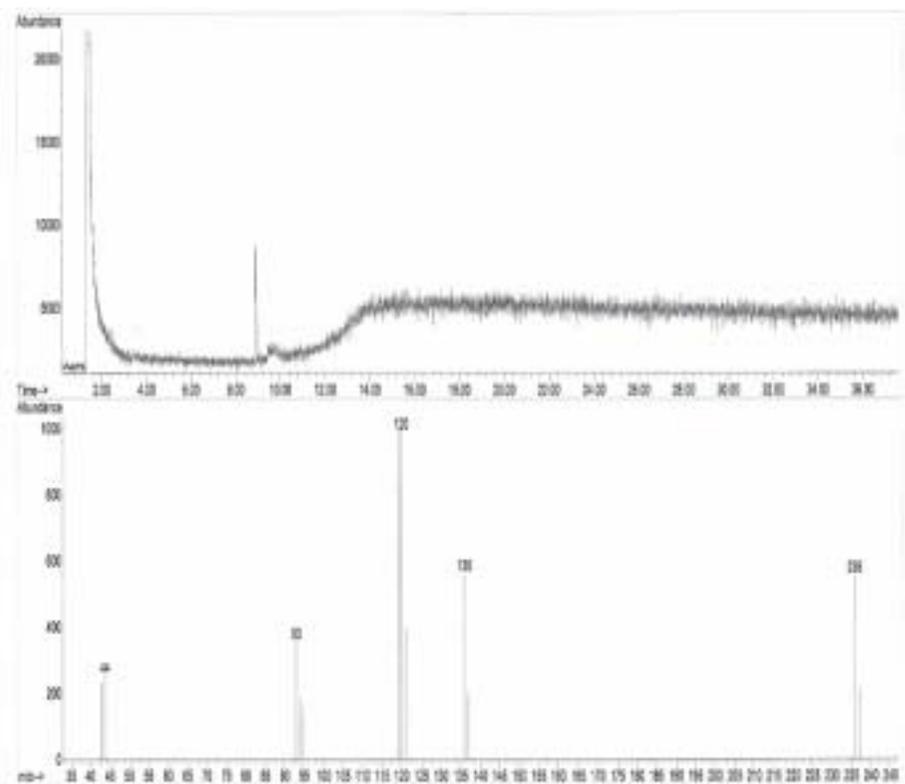


Fig. 19 GC/MS chromatogram of n-butanol fraction from *Crotalaria sessiliflora* L.

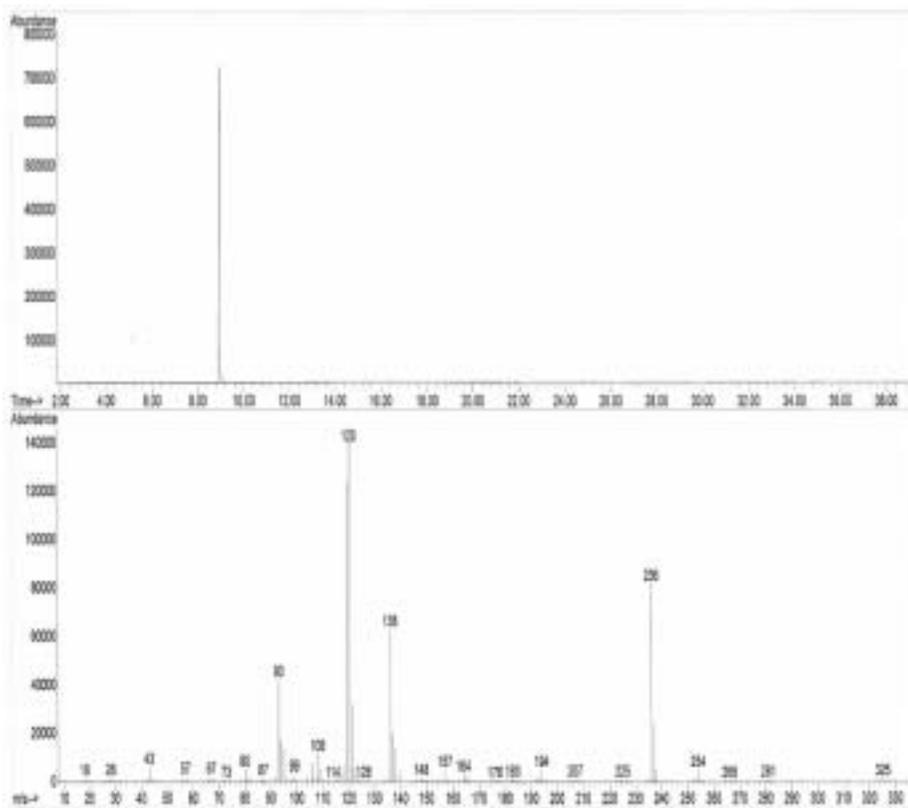


Fig 20. GC/MS chromatogram of Monocrotaline

## 다. NMR 구조분석 및 동정

활나물 추출물중 활성이 강한 fraction에 존재하는 미지의 물질을 구조 동정하기 위해  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR(nuclear magnetic resonance spectrophotometer)로 분석하였다.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum은 Varian Unity Inova 300, 75 MHz(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, DMSO- $d_6$ 용매(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI., USA)를 사용하였고 ppm 단위로 나타내었다.

### 1) 미지물질의 구조 결정

가) 미지물질의  $^1\text{H}$ -NMR(300MHz, DMSO- $d_6$ )를 측정한 결과는 Fig. 21과 같이  $\delta$  1.07(3H, d J=7.33), 1.18(3H, d), 1.31(3H, s), 1.83(1H, m), 1.94(1H, m), 3.70(4H, m, d, q), 4.26(1H, s), 2.43(1H, d J=11.38), 4.58(1H, d J=11.47), 4.98(2H, s), 6.05(1H, s)에서 OH기 두 개를 포함해 proton이 23개 관찰 되었다.

또한,  $^{13}\text{C}$ -NMR(75 MHz, DMSO- $d_6$ )을 측정한 결과는 Fig 24와 같이  $\delta$  175.35, 174.51, 135.64, 133.91, 79.04, 77.39, 76.01, 74.86, 61.49, 59.12, 53.60, 42.59, 33.19, 22.70, 18.37, 14.55로 carbon이 16개 관찰 되었다.

나) Monocrotaline 대하여  $^1\text{H}$ -NMR(300MHz, DMSO- $d_6$ )를 측정한 결과는 Fig. 22, 23과 같이  $\delta$  1.21(3H, d J=7.08), 1.29(3H, s), 1.39(3H, s), 2.08(2H,

m), 2.59(1H, q J=8.55), 2.80(1H, q J=7.08), 2.87(1H, s), 3.21(1H, m), 3.49(1H, d.d J=14.90), 3.88(2H, d.d), 4.38(1H, s), 4.67(1H, d J=12.69), 4.89(1H, d J=11.72), 5.05(1H, m), 6.04(1H, s)에서 proton이 23개 관찰되었다.

또한  $^{13}\text{C}$ -NMR(75 MHz, DMSO-d6)을 측정한 결과는 Fig 25와 같이  $\delta$  175.34, 174.51, 135.64, 133.94, 79.02, 77.41, 76.00, 74.87, 61.53, 59.13, 53.62, 42.60, 33.21, 22.71, 18.36, 14.54로 carbon이 16개 관찰되었다.

이러한 모든 분석 결과는 Table 5에서 보는 바와 같이 화학식이  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_6$  이며, 분자량은 325.35의 Monocrotaline으로 동정되었으며, 화학 구조는 Fig 26과 같다.

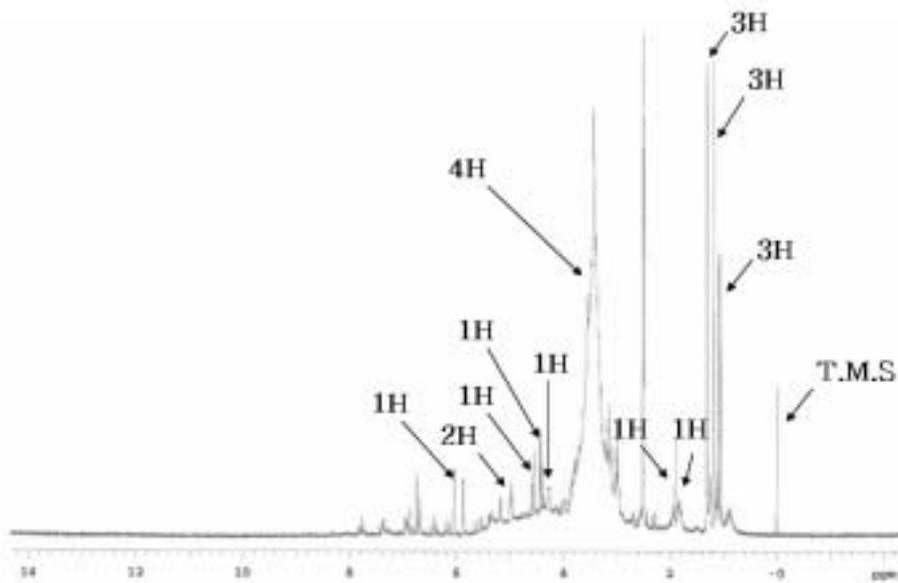


Fig. 21.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz) spectrum of the *Crotalaria sessiliflora* L.

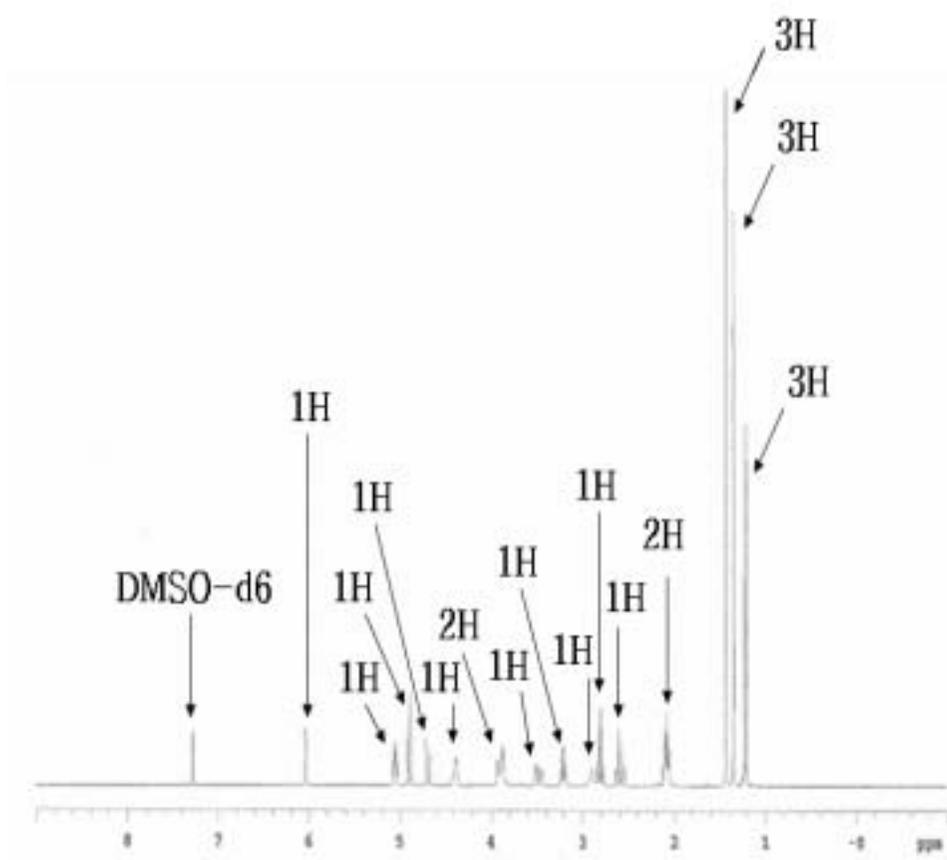


Fig. 22. <sup>1</sup>H-NMR(300 MHz) spectrum of the Monocrotaline

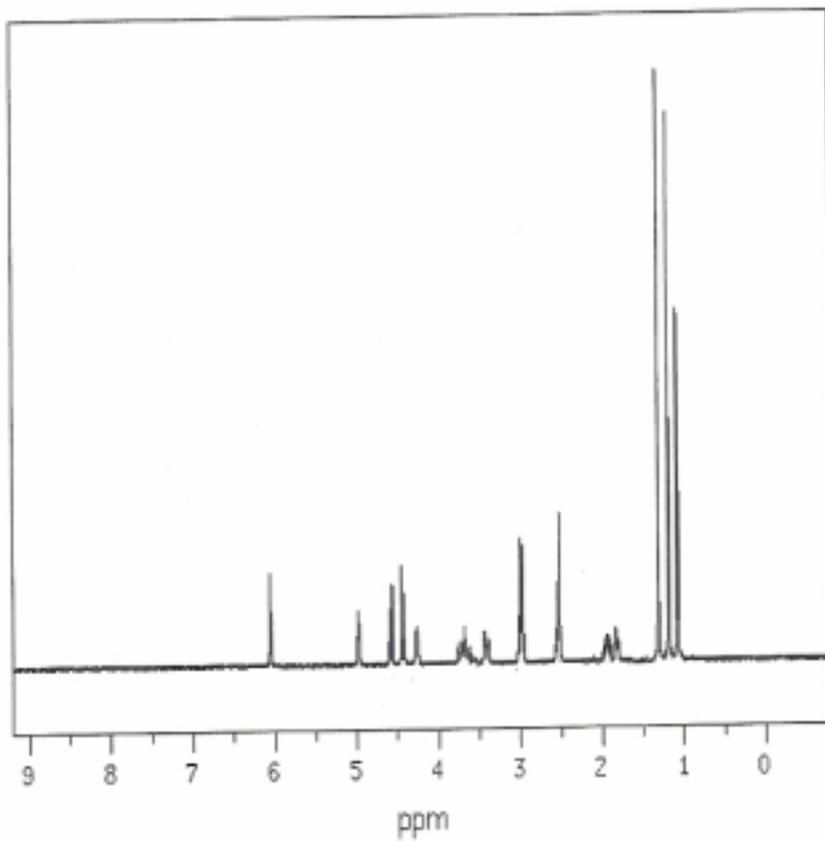


Fig. 23.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of monocrotaline from *Crotalaria sessiliflora* L.

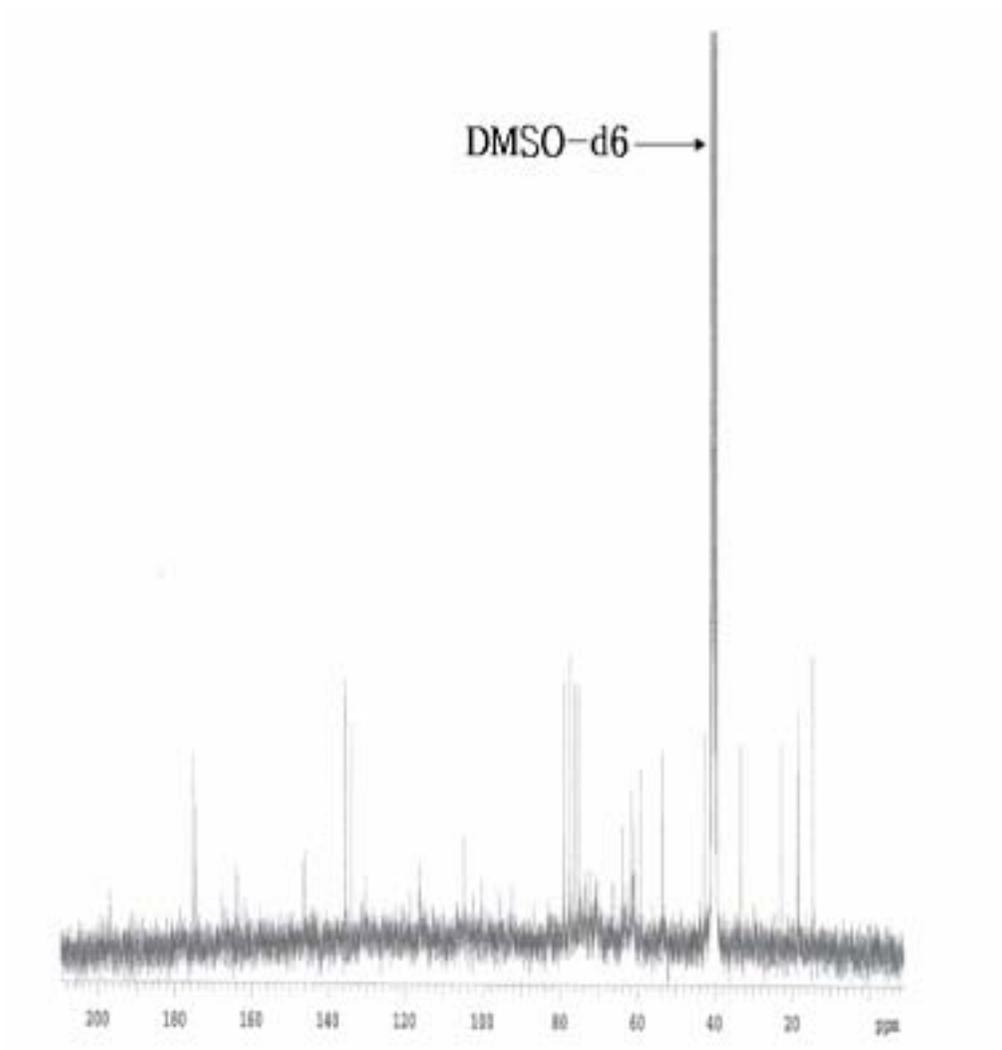


Fig. 24.  $^{13}\text{C}$ -NMR(75MHz) spectrum of the *Crotalaria sessiliflora* L.

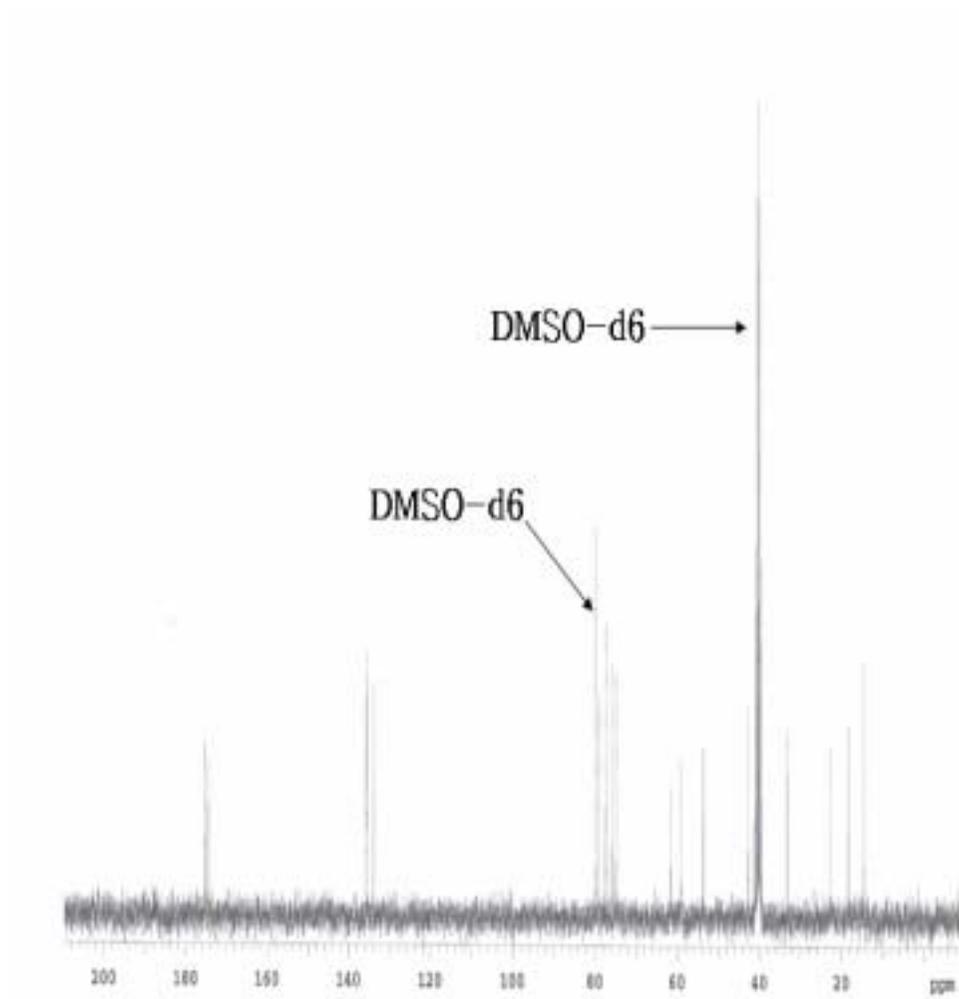


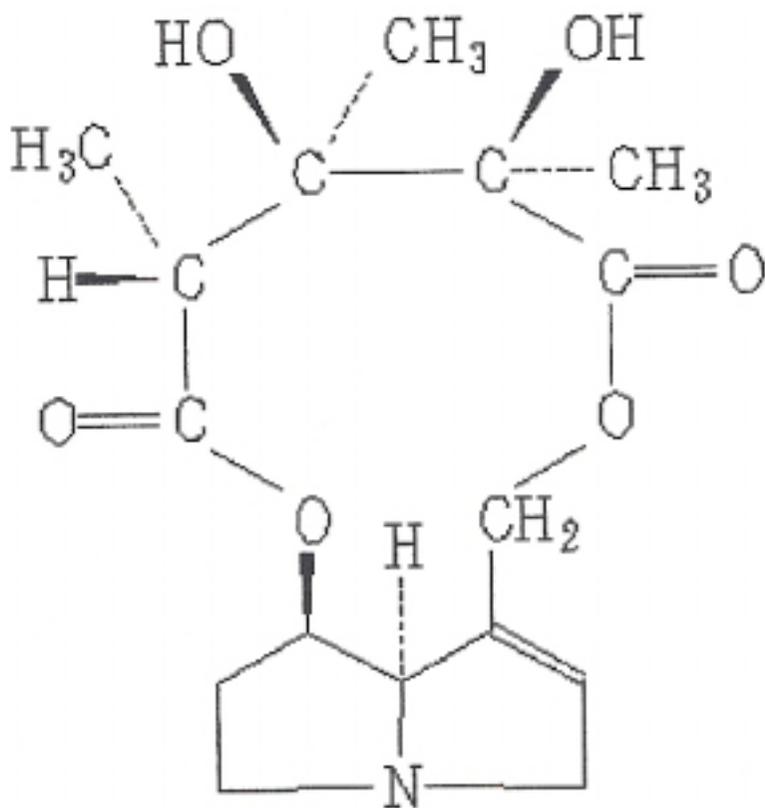
Fig. 25.  $^{13}\text{C}$ -NMR(75MHz) spectrum of the spectrum of the **Monocrotaline**

Table 5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift of the *Crotalaria Sessiliflora l.* (300 and 75MHz, DMSO-d6)

Proton and Carbon NO.	<i>Crotalaria Sessiliflora L.</i>	
	$\delta$ H	$\delta$ C
1	6.05(1H, s)	175.35
2	4.98(2H, s)	174.51
3		135.64
4	4.58(1H, d J=11.47)	133.91
5	4.26(1H, s)	79.04
6		77.39
7	3.70(4H, m, d, q)	76.01
8	2.43(1H, d J=11.38)	74.86
9	1.94(1H, m)	61.49
10		59.12
11	1.83(1H, m)	53.60
12		42.59
13	1.31(3H, s)	33.19
14	1.18(3H, d)	22.70
15		18.37
16	1.07(3H, d J=7.33)	14.55

Table 6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift of the Monocrotaline (300 and 75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

Proton and Carbon NO.	Monocrotaline	
	$\delta$ H	$\delta$ C
1	6.04(1H, s)	175.34
2	5.05(1H, m)	174.51
3	4.89(1H, d J=11.72)	135.64
4	4.67(1H, d J=12.69)	133.94
5	4.38(1H, s)	79.02
6	3.88(1H, dd)	77.41
7	3.49(1H, dd J=14.90)	76.00
8	3.21(1H, m)	74.87
9	2.87(1H, s)	61.53
10	2.80(1H, q J=7.08)	59.13
11	2.59(1H, q J=8.55)	53.62
12	2.08(2H, m)	42.60
13	1.39(3H, s)	33.21
14	1.29(3H, s)	22.71
15	1.21(3H, d J=7.08)	18.36
16		14.54



Monocrotaline



Fig. 26. Structure of monocrotaline from *Crotalaria Sessiliflora L.*

라. 부위별 Monocrotaline 정량

구조를 동정하여 momocrotalin이 활성 물질이라는 것을 증명하였다. 따

라서 활나물 부위별 추출물에서 Monocrotaline의 함량을 측정한 결과 Table 7과 같다. 잎이 9.18 mg/100g, 줄기 9.30 mg/100g, 뿌리 6.70mg/100g, 및 씨에서 8.86mg/100g,으로 측정되어 부위별로 monocrotalin 함량이 낮은 것으로 나타났다.

**Table 7. Content of monocrotalin in each parts**

	Monocrotaline(mg/100g)
Leaves	9.18
Stem	9.30
Root	6.70
Seed	8.86

## 4 . 가공식품 개발

### ■활나물의 가공적성 연구

#### ■*Crotalaria Sessiliflora L.* 차 제조

#### ■Tea bag 제조

■활나물은 잎에 효능이 있어 잎을 이용한 가공적성 결과 차와 음료수로 개발하는 것이 적당한 것으로 나타났다. 본 연구결과 잎을 이용하여 *Crotalaria Sessiliflora L.* 차 제조는 Fig. 1와 같은 방법으로 제조 하였다.

### *Crotalaria Sessiliflora L.*



Washing



Drying (40℃)



Gruning



Tea bag

Fig 27. Preparation procedure of *Crotalaria Sessiliflora L.*



*[Crotalaria Sessiliflora L. ]*



*[Crotalaria Sessiliflora L. ]*



[*Crotalaria Sessiliflora L.* tea bag]

## [제1세부과제] 생리활성 물질의 항암 및 독성기전에 미치는 영향

### 1. 암세포주 세포증식 억제효과

#### 가. CytoScan™-TPM Cytotoxicity Assay

##### 1) 암세포주에 대한 추출용매별, 추출부위별 암세포독성 결과

##### 가) Hep3B Cell line(Liver Cancer Cell)

Hep3B 세포에 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C, 80% EtOH Soni., 80% MeOH Wa., 100% MeOH Ex-RFX. 활나물 추출물, 그리고 활나물에 함유된 독성물질인 MCT(Monocrotaline, St. Louis. MO, USA)과 ADR(Adriamycin, St. Louis. MO, USA)을 농도별(2.5, 5.0, 10 ug/ml)로 48시간 처리한 후 세포 생존율(%)을 CytoScan™-TPM Cytotoxicity Assay 법으로 측정하였다. 대조군과 비교해 각각의 활나물 추출물들 중 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 80% EtOH Soni. 추출물은 농도 의존적으로 세포 생존율(각각 81.1%, 79.5%, 64.5%)을 유의성 있게 감소시켰으며 ( $p < 0.01$ ), 1.0 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C 추출물, 1.0 mg/ml 농도의 80% MeOH Wa. 추출물과 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 100% MeOH Ex-RFX. 추출물은 각각 1.0 mg/ml, 1.0 mg/ml과 0.5, 1.0mg/ml의 농도에서 세포 생존율이 각각 55.6%, 60.8%와 79.6%, 45.8%으로 유의성 있는 차이( $p < 0.01$ )를 나타냈다. 반면, 2.5, 5.0, 10 ug/ml 농도의 ADR과 MCT는 세포 생존율이 각각 58.9, 45.8, 38.2%와 68.7, 59.1, 49.2%로 대조군과 비교해 농도 의존적으로 유의한 차이( $p < 0.01$ )를 보였다 (Fig. 1).

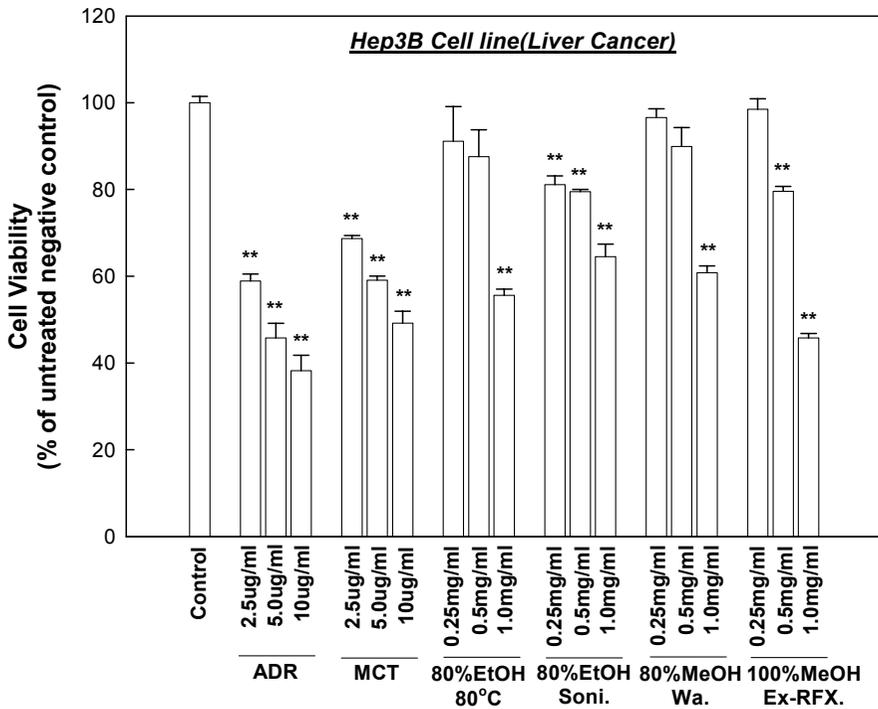
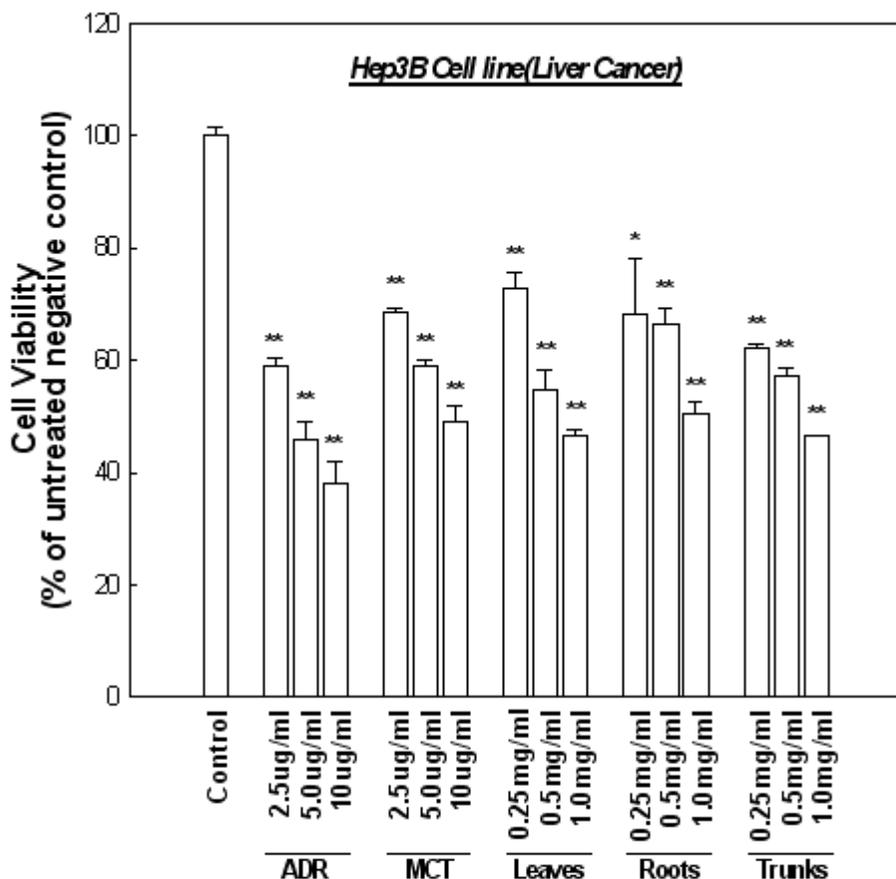


Fig. 1. Cell viability of *Crotalaria sessiflora* L. extracted from various solvents and extraction methods in Hep3B cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora* L. Extracts was added to the medium. Cell viability was measured by *CytoScan™-TPM Cytotoxicity Assay Kit™*. Values represent Mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

활나물의 부위별(잎, 뿌리, 줄기) 추출물에 있어서 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 잎, 뿌리와 줄기 추출물은 세포 생존율이 각각 72.8, 54.8, 46.7%, 68.1, 66.4, 50.5%, 62.2, 57.4, 46.5%로 대조군과 비교해 농도 의존적으로 유의성 있는 차이(p<0.05, p<0.01)를 나타냈다(Fig. 2).

4) MCT-7 Cell line (Breast Cancer Cells)



**Fig. 2. Cell viability of extracts prepared from different sections of *Crotalaria sessiflora* L in Hep3B cells.** Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora* L. Extracts was added to the medium, Cell viability was measured by *CytoScan<sup>TM</sup>-TPM Cytotoxicity Assay Kit<sup>TM</sup>*. Values represent Mean±SEM, \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

MCF-7 세포에서는 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C, 80% EtOH Soni., 80% MeOH Wa.와 100% MeOH Ex-RFX. 활나물 추출물의 세포 생존율이 각각 64.3, 58.8, 44.9%, 80.3, 73.1, 71.1%, 67.0, 59.8, 55.4%와 63.7, 56.6, 41.2%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 유의한 감소( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )를 보였고, 이와 마찬가지로 2.5, 5.0, 10 ug/ml 농도의 ADR과 MCT의 60.2, 50.8, 39.7%와 72.3, 59.6, 49.1% 세포 생존율 또한 대조군과 비교해 유의한 감소( $p < 0.01$ )를 나타냈다 (Fig. 3).

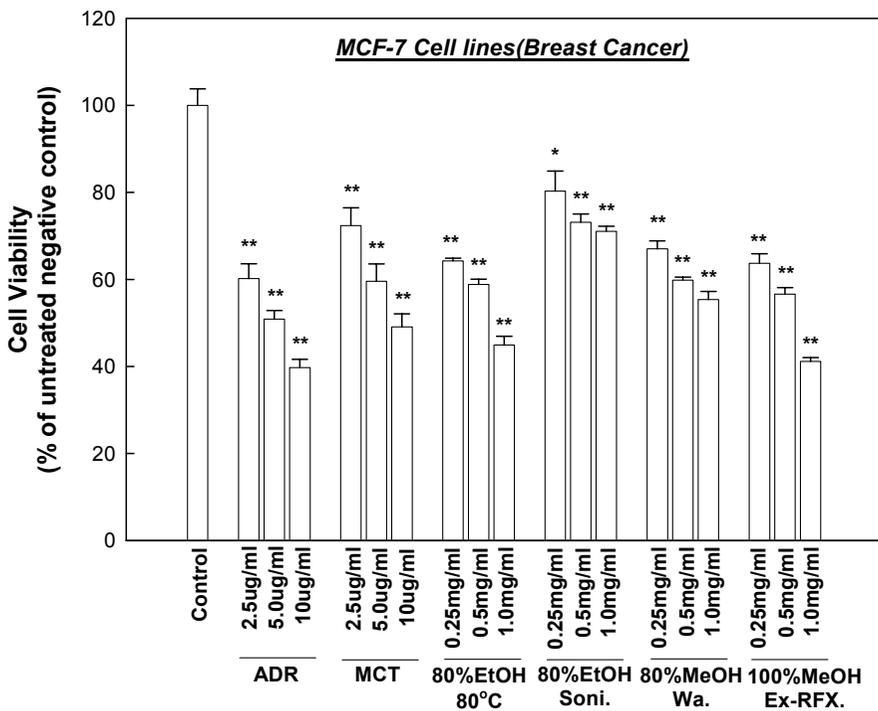


Fig. 3. Cell viability of *Crotalaria sessiflora* L. extracted from various solvents and extraction methods in MCF-7 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora* L. Extracts was added to the medium. Cell viability was measured by

*CytoScan<sup>TM</sup>-TPM Cytotoxicity Assay Kit<sup>TM</sup>*. Values represent Mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 잎, 뿌리와 줄기 추출물은 세포 생존율이 각각 79.2, 53.3, 42.4%, 74.8, 60.4, 45.5%와 73.7, 56.9, 50.5%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 세포 생존율의 유의성 있는 감소(p<0.05, p<0.01)를 나타냈다 (Fig. 4).

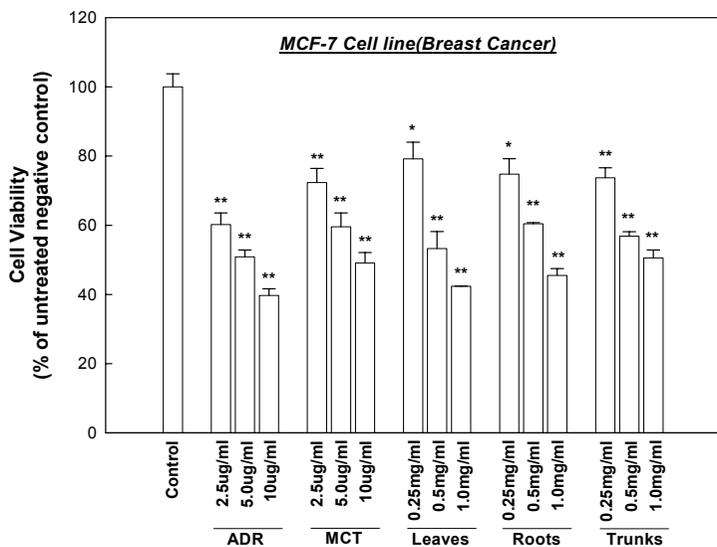


Fig. 4. Cell viability of extracts prepared from different sections of *Crotalaria sessiflora L.* in MCF-7 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell viability was measured by *CytoScan<sup>TM</sup>-TPM Cytotoxicity Assay Kit<sup>TM</sup>*. Values represent Mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

다) HT-29 Cell line(Colon Cancer Cell)

대조군과 비교해 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C, 80%

EtOH Soni., 80% MeOH Wa.와 100% MeOH Ex-RFX. 활나물 추출물의 세포 생존율은 각각 72.5, 69.5, 44.0%, 64.6, 62.8, 51.2%, 77.7, 74.4, 48.3%와 78.3, 63.2, 36.4%로 농도 의존적인 유의한 감소( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )를 나타냈고, 이와 마찬가지로 2.5, 5.0, 10 ug/ml 농도의 ADR과 MCT의 세포생존율은 각각 55.4, 49.2, 32.9%와 56.4, 52.3, 43.0%로 나타나 대조군과 비교해 유의한 감소( $p < 0.01$ )를 보였다(Fig. 5).

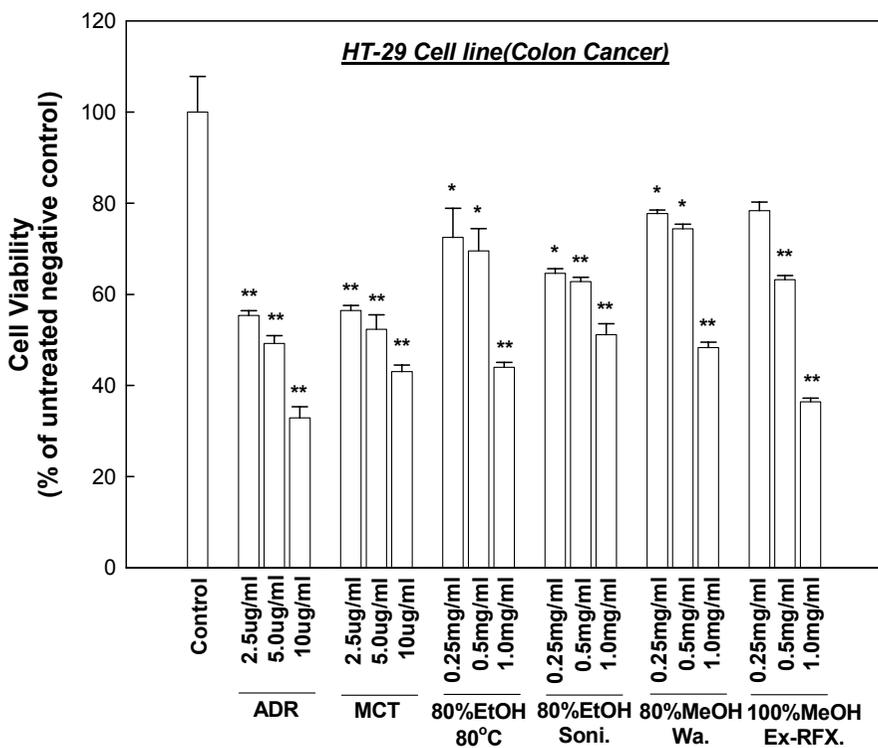


Fig. 5. Cell viability of *Crotalaria sessiflora* L. extracted from various solvents and extraction methods in HT-29 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora* L. Extracts was added to the medium. Cell viability was measured by *CytoScan*<sup>TM</sup>-TPM Cytotoxicity Assay Kit<sup>TM</sup>. Values represent Mean±SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared to control.

부위별 추출물에서는 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 잎과 줄기 추출물의 세포 생존율이 각각 57.9, 54.1, 34.7%와 49.5, 45.6, 37.0%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 세포 생존율의 유의성 있는 감소( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )를 나타냈고, 뿌리 추출물에 대한 세포 생존율은 0.5 mg/ml과 1.0 mg/ml 농도에 서만 각각 52.8%와 37.0%로 통계학적으로 유의한 감소( $p<0.01$ )를 보였다 (Fig. 6).

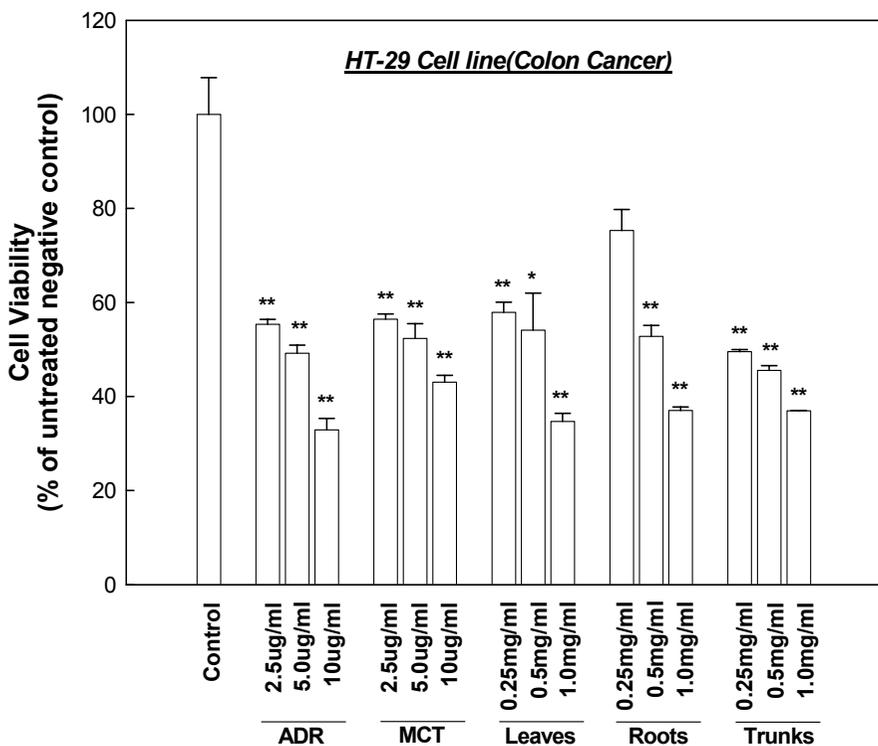


Fig. 6. Cell viability of extracts prepared from different sections of *Crotalaria sessiflora L.* in HT-29 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell viability was measured by *CytoScan<sup>TM</sup>-TPM Cytotoxicity Assay Kit<sup>TM</sup>*. Values represent Mean±SEM. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  compared to control.

라) IC<sub>50</sub> values of various extracts(*CytoScan<sup>TM</sup>-TPM Cytotoxicity Assay*)

다양한 종류의 추출물을 가지고 3종의 암세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, 대부분의 추출물들이 대조군과 비교해 세포 생존율의 억제를 나타내었으며, 생존율이 50%가 되도록 하는 추출물의 농도인 50% 억제농도(IC<sub>50</sub>)은 80% EtOH 80°C 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=1.50 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.77 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.90 mg/ml), 80% EtOH Soni. 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=4.06 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=20.84 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=1.33 mg/ml), 80% MeOH Wa. 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=1.75 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=1.80 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=1.11 mg/ml), 100% MeOH Ex-RFX. 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=0.95 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.63 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.68 mg/ml), 잎 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=0.77 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.68 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.47 mg/ml), 뿌리 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=1.26 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.81 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.60 mg/ml), 줄기 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=0.80 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.93 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.26 mg/ml)으로 나타나 Hep3B 세포와 MCF-7세포는 100% MeOH Ex-RFX. 추출물과 잎추출물에서, 그리고 HT-29 세포에서는 100% MeOH Ex-RFX. 추출물과 줄기 추출물에서 가장 강한 세포생존율을 억제하였다(Table 1).

**Table 1. IC<sub>50</sub> values of various extracts determined by CytoScan<sup>TM</sup>-TPM Cytotoxicity Assay**

Extracts	Cytotoxicity(IC <sub>50</sub> , mg/ml)		
	Hep3B Cell	MCF-7 Cell	HT-29 Cell
80% EtOH 80 °C	1.50	0.77	0.90
80% EtOH Soni.	4.06	20.84	1.33
80% MeOH Wa.	1.75	1.80	1.11
100% MeOH Ex-RFX.	<b>0.95</b>	<b>0.63</b>	<b>0.68</b>
Leaves	<b>0.77</b>	<b>0.68</b>	0.47
Roots	1.26	0.81	0.60
Trunks	0.80	0.93	<b>0.26</b>

나. MTT Assay

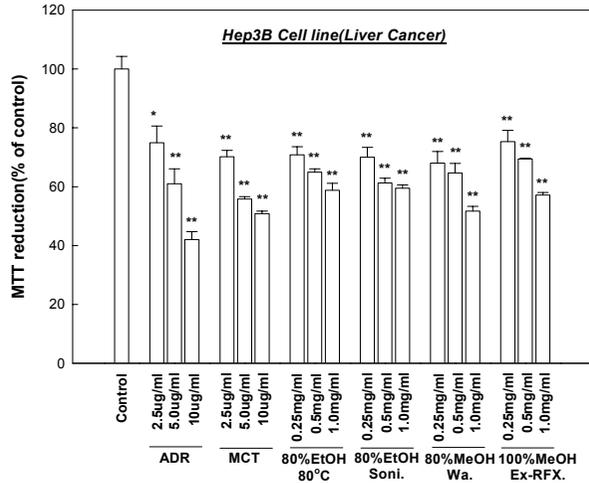
1) 암세포주에 대한 추출용매별, 추출부위별 암세포 증식억제 결과

가) Hep3B Cell line(Liver Cancer Cell)

Hep3B 세포에 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C, 80% EtOH Soni., 80% MeOH Wa., 100% MeOH Ex-RFX. 활나물 추출물, 그리고 MCT(Monocrotaline)와 ADR(Adriamycin)을 농도별(2.5, 5.0, 10 ug/ml)로 48시간 처리한 후 세포 증식율(%)을 MTT Assay 법으로 측정하였다.

Hep3B 세포에서는 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C, 80% EtOH Soni., 80% MeOH Wa.와 100% MeOH Ex-RFX. 활나물 추출물의 세포증식율이 각각 70.8, 65.0, 58.8%, 70.1, 61.3, 59.5%, 68.0, 64.6, 51.8%와 75.3, 69.4, 57.2%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 유의한 세포 증식율의 감소(p<0.01)를 보였고, 이와 마찬가지로 2.5, 5.0, 10 ug/ml 농도의 ADR과

MCT의 74.9, 61.0, 42.0%와 70.2, 55.8, 50.9% 세포증식을 또한 대조군과 비교해 유의한 감소( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )를 나타냈다(Fig. 7).



**Fig. 7. Cell proliferation of *Crotalaria sessiflora L.* extracted from various solvents and extraction methods in Hep3B cells.** Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell proliferation was measured by the MTT assay. Values represent Mean±SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared to control.

부위별 추출물에서는 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 뿌리과 줄기 추출물의 세포 증식율이 각각 72.6, 54.1, 36.0%와 70.0, 46.7, 38.8%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 세포 증식율의 유의성 있는 감소( $p < 0.01$ )를 나타냈고, 잎 추출물에 대한 세포 생존율은 0.25, 0.5 mg/ml과 1.0 mg/ml 농도에 서 각각 67.1, 66.4%와 33.0%로 통계학적으로 유의한 감소( $p < 0.01$ )를 보였다(Fig. 8).

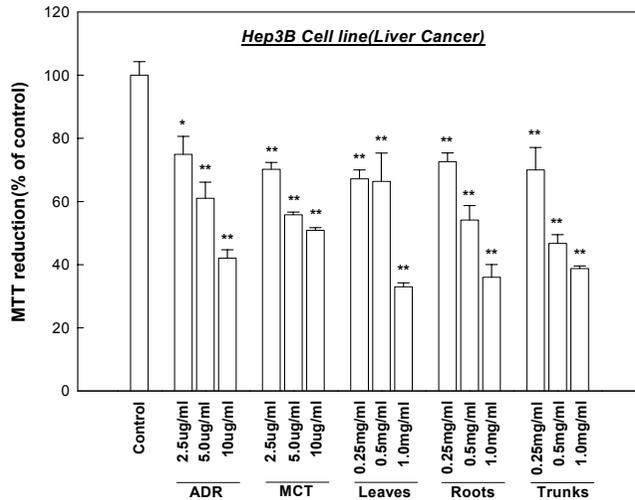


Fig. 8. Cell proliferation of extracts prepared from different sections of *Crotalaria sessiflora L.* in Hep3B cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell proliferation was measured by MTT assay. Values represent Mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

나) MCF-7 Cell line(Breast Cancer Cell)

MCF-7 세포에서는 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C, 80% EtOH Soni., 와 100% MeOH Ex-RFX. 활나물 추출물의 세포 증식율이 각각 77.2, 64.7, 30.2%, 80.7, 45.1, 28.8%와, 85.8, 46.7, 31.6%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 유의한 세포 증식율의 감소(p<0.01, p<0.05)를 보였고, 80% MeOH Wa. 추출물은 0.5 mg/ml과 1.0 mg/ml 농도에서 각각 49.1%와 25.9%로 통계학적으로 유의성 있는 감소(p<0.01)를 나타냈다. 또한, 2.5, 5.0, 10ug/ml 농도의 ADR과 MCT의 61.9, 45.8, 32.8%와 65.3, 59.3, 51.1% 세포증식율은 대조군과 비교해 유의한 감소(p<0.01)를 보였다

(Fig. 9).

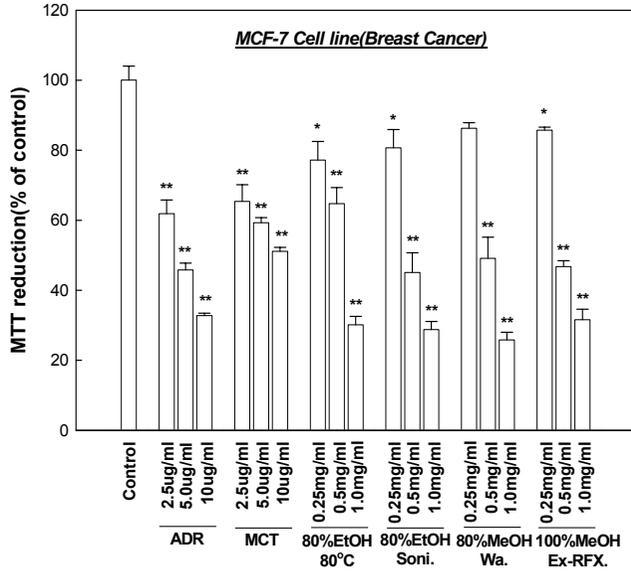


Fig. 9. Cell proliferation of *Crotalaria sessiflora L.* extracted from various solvents and extraction methods in MCF-7 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell proliferation was measured by the MTT assay. Values represent Mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

부위별 추출물에서는 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 잎, 뿌리와 줄기 추출물의 세포 증식율이 각각 66.4, 35.3, 31.6%, 73.1, 59.5, 45.6%와 64.4, 43.0, 29.3%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 세포 증식율의 유의성 있는 감소 (p<0.01)를 나타냈다(Fig. 10).

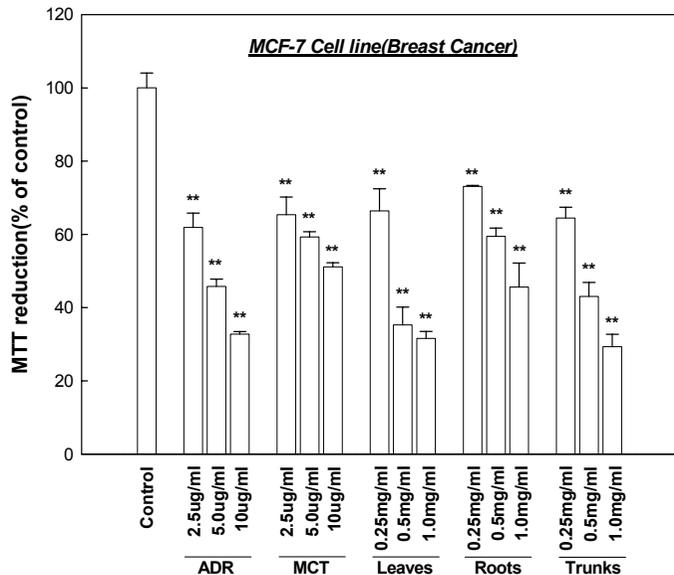


Fig. 10. Cell proliferation of extracts prepared from different sections of *Crotalaria sessiflora L.* in MCF-7 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell proliferation was measured by MTT assay. Values represent Mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

다) HT-29 Cell line(Colon Cancer Cell)

2.5, 5.0, 10 ug/ml 농도의 ADR과 MCT의 세포 증식율이 각각 69.7, 58.9, 29.9%와 70.4, 62.3, 53.2%로 나타나 대조군과 비교해 유의한 감소 (p<0.05, p<0.01)를 보였으며, 이와 마찬가지로 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 80% EtOH 80°C, 80% EtOH Soni.와 80% MeOH Wa. 활나물 추출물의 세포 생존율은 각각 71.2, 64.4, 58.3%, 70.5, 62.7, 58.9%와 68.5, 64.7, 52.1%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 유의한 감소(p<0.01)를 보였다. 또한, 100% MeOH Ex-RFX. 추출물의 경우에는 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도

의 세포증식율이 각각 78.3, 69.8, 57.5%로 대조군과 비교해 통계학적으로 유의한 감소( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )를 나타냈다.(Fig. 11).

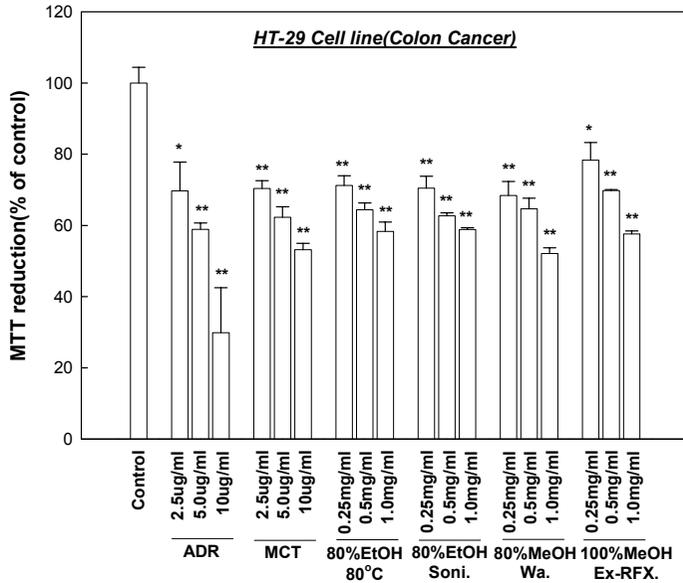


Fig. 11. Cell proliferation of *Crotalaria sessiflora L.* extracted from various solvents and extraction methods in HT-29 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell proliferation was measured by the MTT assay. Values represent Mean±SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared to control.

부위별 추출물의 경우에는 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도의 잎, 줄기, 뿌리 추출물의 세포 증식율이 각각 73.8, 60.6, 33.2%, 72.9, 54.4, 36.3%와 70.3, 47.0, 39.0%로 대조군과 비교해 농도 의존적인 세포 증식율의 유의성 있는 감소( $p < 0.01$ )를 나타냈다(Fig. 12).

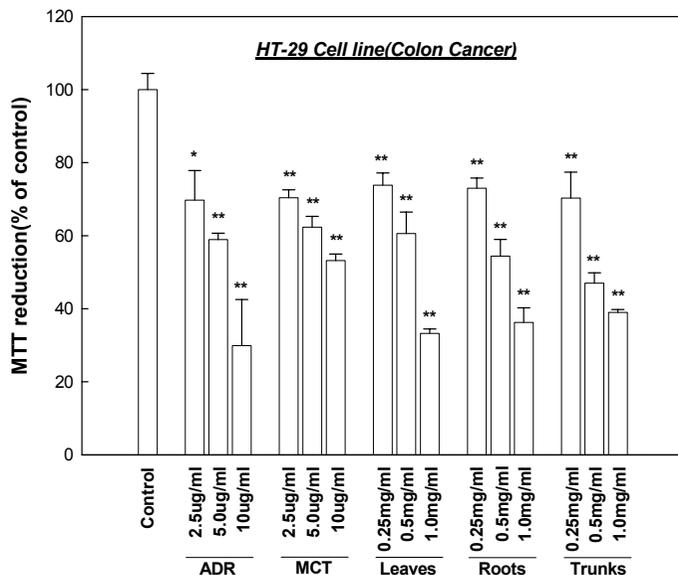


Fig. 12. Cell proliferation of extracts prepared from different sections of *Crotalaria sessiflora L.* in HT-29 cells. Cells were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 48h and ADR(Adriamycin), MCT(Monocrotaline), or *Crotalaria sessiflora L.* Extracts was added to the medium. Cell proliferation was measured by MTT assay. Values represent Mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

라) IC<sub>50</sub> values of various extracts(MTT Assay)

3종의 암세포에 대한 세포증식을 측정 한 결과, 대부분의 추출물들이 대조군과 비교해 세포 증식의 억제를 나타내었으며, 세포 증식이 50%가 되도록 하는 추출물의 농도인 50% 억제농도(IC<sub>50</sub>)은 80% EtOH 80°C 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=2.76 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.62 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=2.41 mg/ml), 80% EtOH Soni. 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=2.98 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.52 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=2.68 mg/ml), 80% MeOH Wa. 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=1.33 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.54 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=1.35

mg/ml), 100% MeOH Ex-RFX. 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=1.87 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.56 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=1.72 mg/ml), 잎 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=0.62 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.40 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.61 mg/ml), 뿌리 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=0.59 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.80 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.59 mg/ml), 줄기 추출물(Hep3B: IC<sub>50</sub>=0.54 mg/ml, MCF-7: IC<sub>50</sub>=0.42 mg/ml, HT-29: IC<sub>50</sub>=0.55 mg/ml)으로 나타나 Hep3B 세포는 80% MeOH Wa. 추출물과 줄기 추출물에서, MCF-7 세포에서는 80% EtOH Soni. 추출물과 잎 추출물에서, 마지막으로 HT-29 세포에서는 80% MeOH Wa. 추출물과 줄기 추출물에서 가장 강한 세포증식율의 억제 효과를 나타냈다(Table 2).

**Table 2. IC<sub>50</sub> values of various extracts determined by MTT Assay**

Extracts	Cell Proliferation(IC <sub>50</sub> , mg/ml)		
	Hep3B Cell	MCF-7 Cell	HT-29 Cell
80% EtOH 80 °C	2.76	0.62	2.41
80% EtOH Soni.	2.98	<b>0.52</b>	2.68
80% MeOH Wa.	<b>1.33</b>	0.54	<b>1.35</b>
100% MeOH Ex-RFX.	1.87	0.56	1.72
Leaves	0.62	<b>0.40</b>	0.61
Roots	0.59	0.80	0.59
Trunks	<b>0.54</b>	0.42	<b>0.55</b>

## 2. 1,2-Dimethylhydrazine에 의해 유발된 Colonic Aberrant Crypt Foci에 대한 활나물 추출물의 암예방 효과

### 가. 일반증상 및 체중

시험 전 기간을 통하여 모든 실험동물들이 실험물질에 기인한다고 생각되는 특이적인 임상증상은 관찰되지 않았다 (Table 3).

#### 나. 장기무게의 측정

활나물 추출물을 8주간 랫드에 투여하여 내부 장기에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 장기의 (간, 비장, 신장, 폐, 심장, 흉선)의 손상 여부를 조사하였다. 부검시 육안소견에서는 특이사항이나 병변을 발견할 수 없었으며 주요장기의 중량을 측정하여 각 군간 절대 장기중량 및 체중에 대한 상대 장기중량을 비교분석하였을 때 MCT 투여군의 절대 장기중량에서 대조군에 비해 유의한 차이 ( $p<0.05$ )를 나타냈지만 MCT 투여군의 상대장기중량은 대조군과 비교해 유의성 있는 변화는 유도되지 않았다 (Table 4, 5). 그러므로 활나물 추출물을 장기 투여하였을 시에 장기에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

#### 다. 대장암 전암병변의 검사 (ACF와 AC의 측정)

정상대조군의 SD 랫드에서 ACF가 전혀 발견되지 않았으며, DMH 단독 투여군에서는 ACF가 Fig. 3에서처럼 유발되었다. ACF내 AC의 숫자에 따라 분류했을 때, DMH 단독 투여군에서 3개 이하와 4개 이상의 AC를 포함하는 ACF의 수는 각각  $94.3\pm 14.31$ 과  $32.7\pm 4.18$ 로 측정된 반면, 활나물 추출물 30, 60, 120 mg/kg 투여군에서는 각각  $54.3\pm 7.97$ ,  $33.0\pm 9.85$ ,  $72.3\pm 21.07$ 과  $16.3\pm 6.12$ ,  $11.3\pm 2.73$ ,  $19.3\pm 9.82$ 로 나타나 60 mg/kg 투여군에서 DMH 단독투여군과 비교해 유의성 있는 ACF 수의 감소 ( $p<0.05$ )를 나타냈다. 또한, Bleomycin 투여군과 활나물 추출물의 지표물질인 MCT 투여군에서 각각  $25.8\pm 9.20$ ,  $6.8\pm 1.80$ 으로 대조군에 DMH 단독투여군에 비해 유의성 있는 ACF 수의 감소를 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 대장내 총 ACF의 수에 따라 분류했을 경우, DMH 단독투여군에서  $143.3\pm 12.57$ 로 대장내 ACF의 형성이 유도되었고, 30, 60, 120 mg/kg의 활나물 추출물 투여군, bleomycin 투여군 및 MCT 투여군은 각각  $70.7\pm 12.88$ ,  $47.7\pm 15.38$ ,  $91.7\pm 30.34$ ,

36.0±8.02, 32.5±7.42의 대장내 총 ACF 수를 나타냈으며, 120 mg/kg의 활나물 추출물 투여군을 제외한 투여군에서 DMH 단독투여군과 비교해 유의성 있는 대장내 총 ACF 수의 감소 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )를 유도하였다 (Table 6, Fig. 13, 14).

**Table 3. Change in body weights of rats treated with DMH alone or in combination with *C. sessiliflora* L. extract.**

Groups	Dose (mg/kg)	Body weights (g)						
		0 wk	1 wk	2 wks	3 wks	5 wks	8 wks	10 wks
Control	0	142.2±5.8	202.9±7.1	259.3±11.0	313.0±16.1	374.4±26.5	424.7±37.7	491.7±33.1
DMH	20	139.4±7.4	198.6±12.7	249.5±18.7	300.5±23.6	372.6±37.0	447.6±46.8	476.3±73.5
	30	143.0±7.9	204.1±12.1	260.4±13.7	312.4±16.4	360.1±21.4	440.8±24.9	535.1±32.3
C. sessiliflora L. Ex.	60	141.6±7.3	202.5±10.2	261.0±16.0	317.4±23.5	372.7±32.9	447.0±54.4	512.1±81.7
	120	138.9±7.0	196.2±10.4	250.0±13.8	300.3±18.3	364.6±30.4	441.1±42.9	519.0±55.9
Bleomycin	0.25	132.2±32.3	199.1±9.8	254.1±11.6	304.6±14.3	382.0±24.0	448.6±38.7	490.2±30.2
MCT	0.5	138.4±8.3	193.1±13.0	248.4±15.8	299.9±18.6	377.0±25.7	438.7±32.1	490.9±41.5

Values are mean and S.D.

Significant differences as compared with control group,  $*p<0.05$

**Table 4. Absolute organ weights of rats treated with DMH and/or *C. sessiliflora* L. extracts.**

Groups	Dose (mg/kg)	Organ weight (g)					
		Liver	Spleen	kidney (Rt.)	Heart	Thymus	Lung
Control	0	10.75±1.41	0.59±0.12	1.33±0.13	1.40±0.08	0.44±0.01	1.58±0.09
DMH	20	12.26±2.62	0.83±0.23	1.40±0.18	1.57±0.20	0.45±0.08	1.67±0.46
C. sessiliflora L Ex.	30	11.41±0.58	0.67±0.06	1.37±0.14	1.38±0.06	0.61±0.17	1.54±0.15
	60	12.89±1.51	0.73±0.14	1.47±0.08	1.58±0.09	0.61±0.14	1.65±0.15
	120	12.03±1.07	0.68±0.16	1.39±0.15	1.53±0.18	0.55±0.15	1.50±0.15
Bleomycin	0.25	11.90±0.07	0.62±0.02	1.33±0.12	1.44±0.05	0.45±0.05	1.72±0.16
MCT	0.5	12.74±1.40	0.87±0.04*	1.42±0.28	1.45±0.18	0.39±0.06	1.80±0.30

Values are mean and S.D.

Significant differences as compared with control group, \* $p < 0.05$

**Table 5. Relative organ weights of rats treated with DMH and/or *C. sessiliflora* L. extracts.**

Groups	Dose (mg/kg)	Organ weight (g%)					
		Liver	Spleen	kidney (Rt.)	Heart	Thymus	Lung
Control	0	2.35±0.30	0.13±0.03	0.29±0.03	0.31±0.02	0.10±0.004	0.35±0.02
DMH	20	2.53±0.71	0.17±0.06	0.29±0.05	0.32±0.05	0.09±0.020	0.35±0.12
C. sessiliflora L Ex.	30	2.14±0.12	0.13±0.00	0.26±0.03	0.26±0.00	0.11±0.027	0.29±0.05
	60	2.53±0.10	0.14±0.01	0.29±0.03	0.31±0.03	0.12±0.010	0.33±0.06
	120	2.35±0.48	0.13±0.05	0.27±0.06	0.30±0.07	0.11±0.031	0.29±0.06
Bleomycin	0.25	2.36±0.03	0.12±0.00	0.26±0.03	0.29±0.01	0.09±0.009	0.34±0.03
MCT	0.5	2.59±0.08	0.18±0.02	0.29±0.03	0.30±0.02	0.09±0.008	0.37±0.03

Values are mean and S.D.

Significant differences as compared with control group, \* $p < 0.05$

Table 6. Effect of *C. sessiliflora* L. extracts on the colonic aberrant crypt foci formation induced by DMH in SD rats

Groups	Dose (mg/kg)	No. of Total ACF		Total ACF/colon
		$\Sigma \leq 3AC$	$\Sigma \geq 4AC$	
DMH	20	94.3 ± 14.31	32.7 ± 4.18	143.3 ± 12.57
<i>C. sessiliflora</i> L Ex.	30	54.3 ± 7.97	16.3 ± 6.12	70.7 ± 12.88*
	60	33.0 ± 9.85*	11.3 ± 2.73*	47.7 ± 15.38**
	120	72.3 ± 21.07	19.3 ± 9.82	91.7 ± 30.34
Bleomycin	0.25	29.7 ± 6.17*	6.3 ± 1.86*	36.0 ± 8.02**
MCT	0.5	25.8 ± 9.20*	6.8 ± 1.80*	32.5 ± 7.42**

Values are mean and S.D.

Significant differences as compared with control group, \*, \*\* :  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$

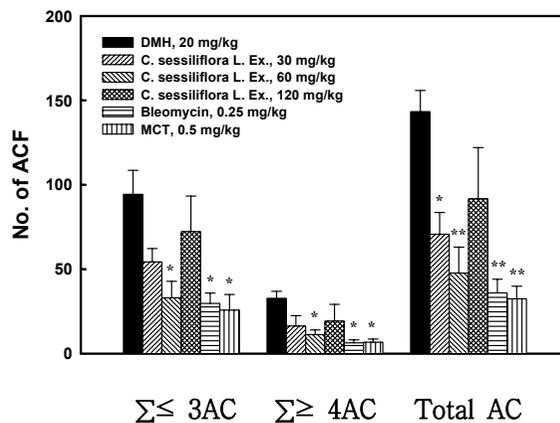


Fig. 13. Effect of *C. sessiliflora* L. extracts on colonic aberrant crypt (AC) formation induced by DMH in SD rats. \*, \*\* : Significantly different from DMH alone at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ .

(A)

(B)

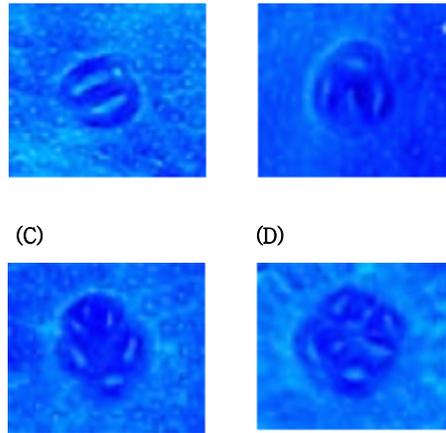


Fig. 14. ACF is observed in the colonic mucosa of rats treated with DMH (methylene blue staining, X40). A, ACF with 2AC; B, ACF with 4AC, C, ACF with 6AC and D, ACF with 8AC.

### 3. 활나물 추출물의 면역기능 증진에 관한 연구 (강제수영부하실험)

마우스를 수조에 넣어 강제 수영을 시도한 결과 수컷의 60 mg/kg와 120 mg/kg 투여군에서 각각  $179.8 \pm 150.08$  초와  $176.2 \pm 96.06$  초로 대조군 ( $365.2 \pm 54.76$  초)과 비교하여 부동시간이 유의성 있게 감소하였다. 암컷의 경우에는 대조군보다 감소하는 추세를 보여주었지만 유의성 있는 변화는 나타내지 않았다 (Table 7, Fig. 15, Fig. 16).

Table 7. Immobility time (Sec.)

Groups	Male	Female
Control	$365.2 \pm 24.49$	$327.4 \pm 48.99$
30 mg/kg	$267.0 \pm 74.76$	$141.4 \pm 67.79$
60 mg/kg	$179.8 \pm 67.12$ *	$163.2 \pm 75.58$
120 mg/kg	$176.2 \pm 42.96$ *	$188.0 \pm 72.27$

\* The differences between control and treatment group were statistically significant (\*  $p < 0.05$ , Mean  $\pm$  SE).

Fig. 15. Immobility time of male group

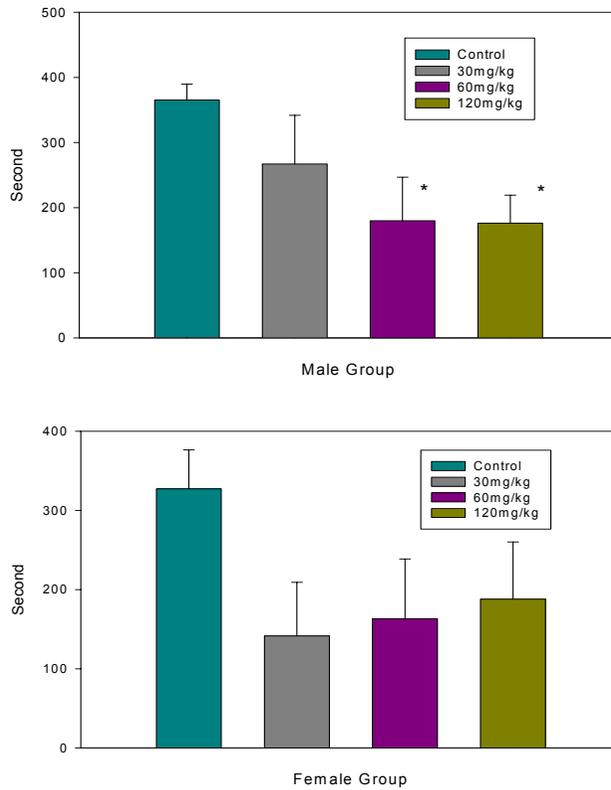


Fig. 16. Immobility time of female group

#### 4. 활나물 추출물의 면역기능 증진에 관한 연구 (Carbon clearance test)

##### 가. Optical density 측정결과

암수 대조군과 시험물질 투여군의 OD를 측정에서 india ink 투여 후 2분과 10분의 탐식능에 의한 차이는 관찰되지 않았다 (Table 8).

**Table 8. Result of mean optical density**

Sex	Time (min)	Dose (mg/kg)			
		Control	30	60	120
Male	2	0.0932±0.00183	0.0864±0.00384	0.0955±0.00542	0.0862±0.00552
	10	0.0970±0.00527	0.0854±0.00548	0.0992±0.00486	0.0902±0.00503
Female	2	0.1010±0.00754	0.0857±0.00392	0.1013±0.01200	0.0892±0.00594
	10	0.0939±0.00808	0.0861±0.00641	0.0936±0.00599	0.0837±0.00783

**Table 9. Result of Corrected phagocytic index "a"**

구 분	Male	Female
Control	2.8513±0.1653	3.1071±0.3298
30 mg/kg	3.1472 ±0.4329	2.8722 ±0.2568
60 mg/kg	3.7680±0.3095 *	3.4431±0.2180
120 mg/kg	3.0658±0.3602	3.1254 ±0.4668

나. Corrected phagocytic index "a" 결과

암수 대조군과 각 시험물질 투여군의 OD값을 이용하여 Phagocytic index K를 계산하고, 동물의 체중과 비장 및 간의 무게를 감안하여 Corrected phagocytic index 계산하였다(Table 9). 수컷의 경우 대조군과 비교하여 60 mg/kg까지는 용량의존적인 증가추세를 보여주었다. 그러나 120 mg/kg 투여군의 경우 오히려 탐식능이 감소된 결과를 보여주었다(Fig. 17). 암컷의 경우 탐식능의 증가나 감소추세를 보이지 않았고, 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다(Fig. 18).

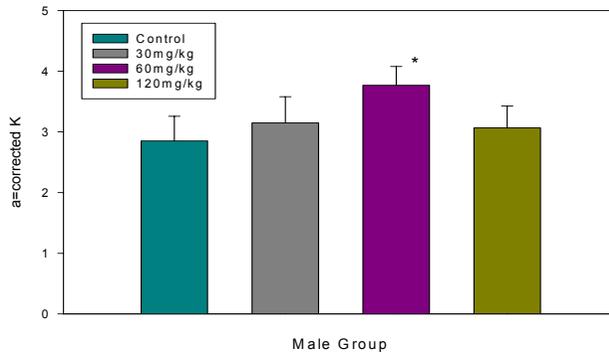


Fig 17. Corrected phagocytic index "a" of male group

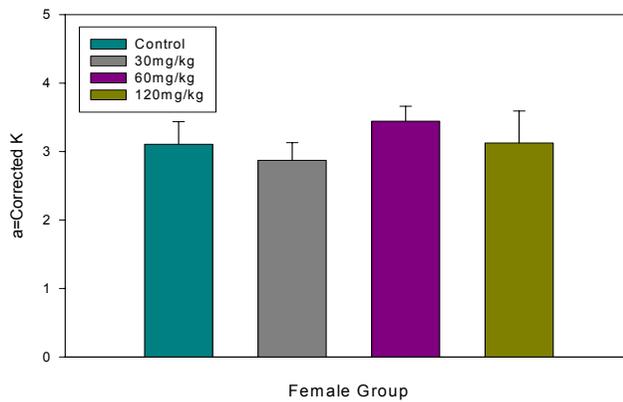


Fig 18. Corrected phagocytic index "a" of female group

## 5. 랫드에 대한 28일 반복경구투여 독성시험

### 가. 사망률, 임상증상 및 체중변화

시험기간 동안 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 특이할 만한

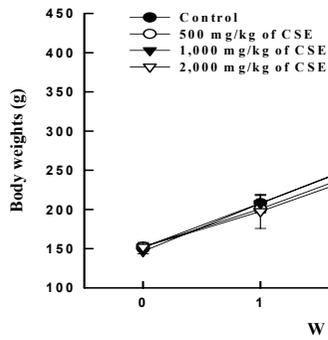
임상증상은 관찰되지 않았으며, 시험기간 동안 폐사 및 빈사동물은 관찰되지 않았다 (Table 10, 11). 대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 체중의 변화는 관찰할 수 없었다 (Fig 19, 20).

**Table 10. Mortality and clinical signs in rats administered orally with *C. sessiliflora* L. extract (CSE) for 28-day**

Drugs	Dose (mg/kg)	No. of animal	Sex	Mortality (%)	Clinical signs
Control	0	5	Male	0% (0/5)*	-
	500	5	Male	0% (0/5)	-
CSE	1,000	5	Male	0% (0/5)	-
	2,000	5	Male	0% (0/5)	-
Control	0	5	Female	0% (0/5)	-
	500	5	Female	0% (0/5)	-
CSE	1,000	5	Female	0% (0/5)	-
	2,000	5	Female	0% (0/5)	-

\*, Values are expressed as number of dead animals/total number of animals.

-, No abnormality detected. CSE, *Crotalaria sessiliflora* L. extract



**Fig. 19. Body weight changes in male rats administered orally with CSE for 28-day. Body weights were measured every 7 days**

after administration of CSE. The results are shown as mean±S.D.

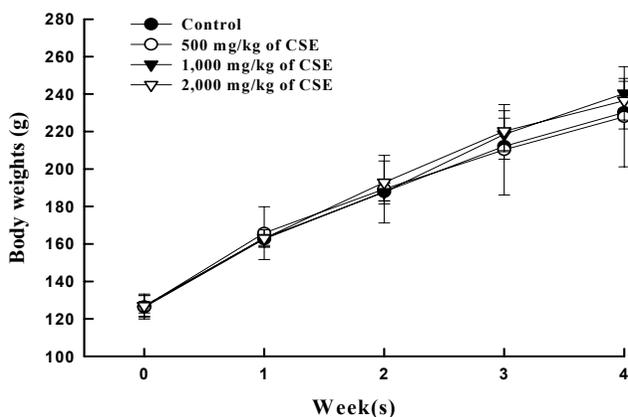


Fig. 20. Body weight changes in female rats administered orally with CSE for 28-day. Body weights were measured every 7 days after administration of CSE. The results are shown as mean±S.D.

Table 11. Evolution of the mean rat body weight during the repeated 28-day toxicity study of CSE

Drugs	Dose (mg/kg)	No. of animal	Sex	Body weight (g)			
				Day 1	Day 28	Increase D1-D28 (%)	
Control	0	5	Male	151.6±4.3	366.8±22.7	242	
	500	5	Male	152.3±5.5	340.3±9.4	223	
	CSE	1,000	5	Male	146.6±3.2	366.9±30.9	250
		2,000	5	Male	152.1±4.8	339.2±37.9	223
Control	0	5	Female	126.2±3.1	230.2±8.9	182	
	500	5	Female	126.6±6.7	227.9±26.7	180	
	CSE	1,000	5	Female	126.7±5.9	240.3±8.0	190
		2,000	5	Female	126.9±5.6	236.5±10.4	186

Day 1 (D1), before administration; Day 28 (D28), 28th days after

administration. Values represent mean±S.D.

나. 장기무게 측정

수컷군의 간, 신장, 비장 암컷군에 비장, 뇌 및 우측신장의 장기무게에서 유의성 있는 변화를 나타냈지만 수컷과 암컷의 상대장기 중량에 있어서는 유의성있는 변화를 나타내지 않았다. 수컷군의 고환 및 뇌하수체의 상대장기무게는 500 mg/kg의 활나물 추출물 투여군에서 유의성 있게 증가하였고, 암컷군의 부신 상대장기무게는 1,000 mg/kg에서 유의성 있게 감소되었다. 그러나 이러한 결과는 농도의존적으로 나타나지 않았다 (Table 12, 13, 14, 15).

**Table 12. Absolute organ weights in male rats administered orally with CSE for 28-day** (Unit; g)

Organs	Dose (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	
Liver	11.23±1.20	9.36±0.42*	10.41±1.87	9.35±1.29*	
Kidney	(left)	1.39±0.07	1.16±0.06**	1.18±0.17*	1.18±0.12**
	(right)	1.40±0.11	1.17±0.12*	1.24±0.22	1.20±0.15*
Spleen	0.75±0.15	0.57±0.06*	0.55±0.03*	0.65±0.15	
Adrenal gland	(left)	0.034±0.005	0.029±0.005	0.027±0.003	0.029±0.003
	(right)	0.034±0.005	0.031±0.006	0.028±0.002	0.029±0.005
Testis	(left)	1.52±0.09	1.55±0.16	1.49±0.06	1.48±0.17
	(right)	1.54±0.09	1.54±0.14	1.46±0.06	1.48±0.18
Brain	2.08±0.06	2.06±0.20	2.13±0.07	2.02±0.10	
Pituitary gland	0.015±0.002	0.012±0.002	0.014±0.004	0.016±0.004	
Lung	1.49±0.13	1.46±0.14	1.37±0.16	1.34±0.15	
Heart	1.22±0.11	1.23±0.08	1.27±0.17	1.29±0.16	
Thymus	0.63±0.10	0.57±0.05	0.59±0.14	0.63±0.06	
Thyroid gland	(left)	0.013±0.005	0.015±0.009	0.013±0.004	0.011±0.003
	(right)	0.013±0.006	0.016±0.011	0.012±0.005	0.011±0.006
Prostate gland	0.58±0.11	0.56±0.06	0.52±0.16	0.50±0.16	
Epididymis	(left)	0.39±0.05	0.40±0.05	0.38±0.05	0.39±0.04
	(right)	0.40±0.06	0.43±0.05	0.38±0.04	0.38±0.06

Values represent mean±S.D. Significant differences as compared with control:  
\*p<0.05, \*\*p<0.01.

**Table 13. Absolute organ weights in female rats administered orally with CSE for 28-day**

(Unit; g)

Organs	Dose (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	
Liver	6.82±0.32	6.95±0.99	7.16±0.45	7.10±0.37	
Kidney	(left)	0.82±0.05	0.85±0.09	0.88±0.05	0.87±0.08
	(right)	0.81±0.05	0.84±0.07	0.89±0.05*	0.88±0.06
Spleen	0.49±0.08	0.52±0.11	0.60±0.08*	0.55±0.05	
Adrenal gland	(left)	0.044±0.008	0.040±0.007	0.035±0.005	0.037±0.002
	(right)	0.039±0.006	0.037±0.009	0.035±0.006	0.035±0.004
Ovary	(left)	0.056±0.021	0.060±0.025	0.054±0.011	0.049±0.012
	(right)	0.055±0.014	0.058±0.021	0.054±0.011	0.056±0.012
Brain	1.96±0.07	2.00±0.12	2.08±0.06*	2.00±0.07	
Pituitary gland	0.158±0.005	0.020±0.015	0.013±0.004	0.019±0.005	
Lung	1.13±0.07	1.06±0.11	1.20±0.06	1.18±0.07	
Heart	0.88±0.08	0.95±0.20	0.96±0.11	0.92±0.06	
Thymus	0.57±0.11	0.57±0.13	0.63±0.13	0.61±0.15	
Thyroid gland	(left)	0.017±0.006	0.012±0.006	0.012±0.002	0.013±0.007
	(right)	0.018±0.008	0.011±0.003	0.012±0.005	0.014±0.005
Uterus	0.39±0.06	0.45±0.17	0.53±0.19	0.50±0.19	

Values represent mean±S.D.

Significant differences as compared with control: \*p<0.05.

**Table 14. Relative organ weights in male rats administered orally with CSE for 28-day**

(Unit; %)

Organs	Dose (mg/kg)			
	0	500	1,000	2,000
Liver	3.03±0.20	2.79±0.08	2.94±0.20	2.81±0.10
Kidney (left)	0.36±0.02	0.35±0.01	0.34±0.04	0.36±0.02
Kidney (right)	0.38±0.04	0.35±0.02	0.35±0.04	0.36±0.03
Spleen	0.20±0.04	0.17±0.02	0.16±0.02	0.20±0.06
Adrenal gland (left)	0.0091±0.0011	0.0086±0.0017	0.0078±0.0016	0.0088±0.0013
Adrenal gland (right)	0.0092±0.0010	0.0094±0.0020	0.0080±0.0012	0.0091±0.0017
Testis (left)	0.41±0.01	0.46±0.04*	0.43±0.06	0.45±0.04
Testis (right)	0.42±0.01	0.46±0.04*	0.42±0.05	0.45±0.04
Brain	0.56±0.03	0.62±0.06	0.61±0.08	0.61±0.06
Pituitary gland	0.0040±0.0005	0.0034±0.0004*	0.0039±0.0009	0.0048±0.0011
Lung	0.40±0.02	0.43±0.03	0.39±0.03	0.41±0.03
Heart	0.33±0.04	0.36±0.01	0.36±0.02	0.39±0.02
Thymus	0.17±0.02	0.17±0.02	0.17±0.04	0.19±0.02
Thyroid gland (left)	0.0036±0.0014	0.0044±0.0025	0.0038±0.0015	0.0033±0.0007
Thyroid gland (right)	0.0036±0.0016	0.0048±0.0029	0.0035±0.0014	0.0033±0.0019
Prostate gland	0.16±0.03	0.17±0.01	0.14±0.04	0.15±0.04
Epididymis (left)	0.105±0.012	0.120±0.015	0.110±0.021	0.116±0.009
Epididymis (right)	0.108±0.014	0.126±0.011	0.108±0.017	0.115±0.012

Values represent mean±S.D.

Significant differences as compared with control: \*p<0.05.

Table 15. Relative organ weights in female rats administered orally with CSE for 28-day

(Unit; %)

Organs	Dose (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	
Liver	2.96±0.09	3.04±0.18	2.98±0.16	3.01±0.14	
Kidney	(left)	0.36±0.02	0.38±0.02	0.37±0.02	0.37±0.03
	(right)	0.35±0.02	0.37±0.04	0.37±0.01	0.37±0.02
Spleen	0.21±0.04	0.23±0.03	0.25±0.03	0.23±0.03	
Adrenal gland	(left)	0.0190±0.0036	0.0175±0.0027	0.0147±0.0024*	0.0155±0.0008
	(right)	0.0171±0.0027	0.0162±0.0037	0.0146±0.0029	0.0149±0.0018
Ovary	(left)	0.024±0.008	0.026±0.009	0.022±0.005	0.021±0.005
	(right)	0.024±0.006	0.025±0.007	0.022±0.005	0.024±0.005
Brain	0.85±0.05	0.88±0.07	0.87±0.03	0.85±0.06	
Pituitary gland	0.0069±0.0020	0.0089±0.0064	0.0054±0.0018	0.0080±0.0020	
Lung	0.49±0.02	0.47±0.03	0.50±0.02	0.50±0.03	
Heart	0.38±0.03	0.41±0.05	0.40±0.05	0.39±0.01	
Thymus	0.25±0.05	0.25±0.03	0.26±0.06	0.26±0.06	
Thyroid gland	(left)	0.0073±0.0031	0.0057±0.0035	0.0051±0.0010	0.0056±0.0027
	(right)	0.0080±0.0040	0.0048±0.0020	0.0051±0.0019	0.0057±0.0021
Uterus	0.17±0.02	0.21±0.10	0.22±0.08	0.21±0.09	

Values represent mean±S.D.

Significant differences as compared with control: \*p<0.05.

#### 다. 혈액학적 변화

암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 유의성 있는 혈액학적 변화는 관찰되지 않았다. 반면에 수컷의 500 mg/kg 투여군에서 백혈구, 호중구 및 단핵구 수치는 대조군에 비해 유의성있게 감소되었다. 또한, 수컷의 500과, 2,000 mg/kg 투여군에서 prothrombin time과 APTT가 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 그러나 이러한 결과는 농도의존적으로 나타나지 않

왔다 (Table 16, 17).

**Table 16. Hematological findings in male rats administered orally with CSE for 28-day**

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
WBC	K/ $\mu$ l	10.12 $\pm$ 2.26	7.36 $\pm$ 0.85*	8.37 $\pm$ 1.42	9.09 $\pm$ 1.79
Neutrophil	K/ $\mu$ l	3.94 $\pm$ 0.77	2.73 $\pm$ 0.74*	3.62 $\pm$ 0.71	3.50 $\pm$ 1.19
Lymphocyte	K/ $\mu$ l	4.15 $\pm$ 1.57	3.12 $\pm$ 0.46	2.90 $\pm$ 0.50	3.81 $\pm$ 1.28
Monocyte	K/ $\mu$ l	2.01 $\pm$ 0.41	1.50 $\pm$ 0.27*	1.81 $\pm$ 0.49	1.76 $\pm$ 0.69
Eosinophil	K/ $\mu$ l	0.020 $\pm$ 0.016	0.020 $\pm$ 0.009	0.020 $\pm$ 0.011	0.017 $\pm$ 0.005
Basophil	K/ $\mu$ l	0.0050 $\pm$ 0.0055	0.0017 $\pm$ 0.0041	0.0033 $\pm$ 0.0052	0.0050 $\pm$ 0.0055
Reticulocytes	%	2.33 $\pm$ 1.03	1.66 $\pm$ 0.53	2.10 $\pm$ 1.07	9.34 $\pm$ 1.64
RBC	M/ $\mu$ l	7.12 $\pm$ 0.48	7.48 $\pm$ 0.31	7.38 $\pm$ 0.49	7.13 $\pm$ 0.87
Hemoglobin	g/dl	16.70 $\pm$ 0.99	15.95 $\pm$ 0.31	15.93 $\pm$ 0.63	15.28 $\pm$ 1.59
Hematocrit	%	47.77 $\pm$ 3.02	47.60 $\pm$ 1.17	47.70 $\pm$ 4.07	46.72 $\pm$ 3.85
MCV	f l	67.13 $\pm$ 1.55	63.67 $\pm$ 1.62	64.58 $\pm$ 2.05	65.95 $\pm$ 4.66
MCH	pg	23.55 $\pm$ 2.15	21.35 $\pm$ 0.87	21.62 $\pm$ 0.72*	21.60 $\pm$ 2.48
MCHC	g/dl	35.07 $\pm$ 2.89	33.52 $\pm$ 0.97	33.53 $\pm$ 1.75	32.85 $\pm$ 4.21
Platelet	K/ $\mu$ l	475.8 $\pm$ 424.3	214.2 $\pm$ 13.9	362.5 $\pm$ 319.6	260.2 $\pm$ 73.4
MPV	f l	4.13 $\pm$ 2.86	3.30 $\pm$ 0.51	3.13 $\pm$ 2.04	2.32 $\pm$ 1.02
Prothrombin time	sec	19.30 $\pm$ 2.34	15.93 $\pm$ 0.42*	14.98 $\pm$ 1.32	15.88 $\pm$ 0.54*
APTT	sec	23.23 $\pm$ 3.33	19.37 $\pm$ 1.53*	19.77 $\pm$ 1.15	19.48 $\pm$ 1.46*

Values represent mean $\pm$ S.D. WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; MCV, mean cell volume; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; MPV, mean platelet volume; APTT, Activated partial thromboplastin time. Significant differences as compared with control: \*p<0.05.

**Table 17. Hematological findings in female rats administered orally with CSE for 28-day**

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
WBC	K/ $\mu$ l	4.57±2.43	4.33±0.84	4.53±1.04	4.91±0.96
Neutrophil	K/ $\mu$ l	1.38±0.75	1.28±0.25	1.43±0.42	1.55±0.51
Lymphocyte	K/ $\mu$ l	2.22±0.99	2.32±0.64	2.13±0.59	2.25±0.46
Monocyte	K/ $\mu$ l	0.97±0.78	0.73±0.17	0.97±0.17	1.10±0.22
Eosinophil	K/ $\mu$ l	0.0100±0.0110	0.0067±0.0082	0.0083±0.0041	0.0050±0.0055
Basophil	K/ $\mu$ l	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Reticulocytes	%	1.70±0.89	1.60±0.66	1.61±0.76	1.65±0.61
RBC	M/ $\mu$ l	6.37±1.14	6.44±0.65	7.17±0.66	7.23±0.38
Hemoglobin	g/dl	15.30±0.90	14.97±0.62	15.34±0.37	15.45±0.32
Hematocrit	%	40.45±8.01	40.45±4.50	45.85±4.21	46.67±2.64
MCV	f l	63.35±3.55	62.75±1.53	64.03±1.89	64.58±1.05
MCH	pg	24.72±5.03	23.40±1.94	21.58±2.10	21.43±1.18
MCHC	g/dl	39.10±8.04	37.23±3.14	33.78±3.34	33.23±1.92
Platelet	K/ $\mu$ l	375.8±404.0	631.8±459.6	544.7±477.8	421.0±393.9
MPV	f l	4.95±3.17	4.57±2.64	3.33±1.61	2.87±1.39
Prothrombin time	sec	15.62±0.93	15.97±0.97	16.05±0.61	16.22±0.29
APTT	sec	16.74±1.26	15.17±1.29	16.62±1.09	16.78±1.17

Values represent mean±S.D. WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; MCV, mean cell volume; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; MPV, mean platelet volume; APTT, Activated partial thromboplastin time.

라. 혈액생화학적 변화

수컷의 500, 2,000 mg/kg 투여군에서 ALP 수치는 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 보였지만 농도의존적인 변화는 아니었다. 암컷의 2,000 mg/kg 투여군에서 GPT, creatinine과 BUN 수치는 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 나타냈다. 그러나 이러한 변화는 병리학적 소견의 부재와 대조군에서도 나타날 수 있는 미약한 변화이므로 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되지 않았다 (Table 18, 19).

**Table 18. Blood biochemical findings in male rats administered orally with CSE for 28-day**

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
ALT	U/ℓ	33.8±4.4	32.3±3.1	30.3±3.3	30.0±3.4
AST	U/ℓ	88.0±7.6	87.3±12.5	90.8±20.5	87.67±9.7
LDH	U/ℓ	267.8±215.4	333.2±275.2	500.7±418.2	419.0±124.3
ALP	U/ℓ	325.0±39.0	460.5±112.1*	259.0±97.2	460.3±40.3*
Total bilirubin	mg/dℓ	0.062±0.032	0.080±0.023	0.072±0.034	0.082±0.031
Glucose	mg/dℓ	147.3±18.5	126.8±16.4	134.5±20.4	132.0±12.2
Total protein	g/dℓ	5.40±0.25	5.38±0.10	5.53±0.21	5.43±0.20
Albumin	g/dℓ	2.32±0.17	2.33±0.05	2.32±0.10	2.35±0.06
Albumin/Globulin	g/dℓ	0.75±0.06	0.78±0.04	0.72±0.04	0.78±0.04
Cholesterol	mg/dℓ	77.7±12.4	87.5±13.1	86.0±23.4	80.5±17.8
Triglyceride	mg/dℓ	64.2±26.45	71.8±19.26	64.7±26.27	63.3±26.0
Creatinine	mg/dℓ	0.52±0.04	0.52±0.04	0.48±0.04	0.48±0.04
BUN	mg/dℓ	10.3±3.5	10.3±1.3	10.8±2.1	9.7±1.6
Calcium	mg/dℓ	9.77±0.36	9.68±0.24	9.95±0.21	9.73±0.20
Sodium	mM	143.5±1.1	143.2±1.2	141.8±1.2	141.7±1.0
Potassium	mM	4.60±1.15	4.01±0.26	4.13±0.27	4.17±0.46
Chloride	mM	105.8±3.3	106.8±1.3	107.7±2.3	108.2±1.0

Values represent mean±S.D. ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotranferase; ALT, Alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; LDH, lactate dehydrogenase. Significant differences as compared with control: \*p<0.05.

**Table 19. Blood biochemical findings in female rats administered orally with CSE for 28-day**

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
ALT	U/ℓ	21.3±2.5	22.0±2.9	23.0±5.5	25.0±2.2*
AST	U/ℓ	87.0±22.1	90.3±17.8	87.5±6.7	92.3±9.1
LDH	U/ℓ	559.2±411.9	645.5±382.8	521.5±195.3	450.0±245.0
ALP	U/ℓ	248.2±63.1	260.2±14.1	280.0±74.9	209.0±54.6
Total bilirubin	mg/dℓ	0.05±0.03	0.06±0.02	0.06±0.03	0.07±0.03
Glucose	mg/dℓ	119.0±20.5	109.2±16.9	114.2±7.9	110.8±6.3
Total protein	g/dℓ	5.88±0.24	5.72±0.23	5.93±0.23	5.88±0.21
Albumin	g/dℓ	2.67±0.10	2.58±0.12	2.63±0.14	2.55±0.16
Albumin/Globulin	g/dℓ	0.80±0.00	0.83±0.05	0.80±0.06	0.77±0.05
Cholesterol	mg/dℓ	74.7±14.2	66.0±9.7	70.0±11.9	83.7±11.3
Triglyceride	mg/dℓ	22.0±13.6	17.7±6.6	20.5±8.3	27.5±14.9
Creatinine	mg/dℓ	0.60±0.06	0.72±0.13	0.58±0.08	0.48±0.04**
BUN	mg/dℓ	15.0±2.9	19.7±6.2	14.8±2.3	11.7±1.3*
Calcium	mg/dℓ	10.1±0.3	10.1±0.2	10.1±0.1	10.1±0.2
Sodium	mM	143.8±1.7	143.7±1.0	144.3±1.5	144.2±1.5
Potassium	mM	3.85±0.17	4.12±0.30	3.91±0.17	4.05±0.30
Chloride	mM	106.7±0.8	108.2±1.2	109.7±2.2	110.3±0.8

Values represent mean±S.D. ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; LDH, lactate dehydrogenase. Significant differences as compared with control: \*p<0.05, \*\*p<0.01.

마. 조직학적 변화

수컷과 암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 명백한 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다 (Table 20).

**Table 20. Histopathological findings in rats administered orally with CSE for 28-day**

Organs			Dose (mg/kg)												
			0 (n=5)			500 (n=5)			1,000 (n=5)			2,000 (n=5)			
			+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	
Male	Heart	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	Liver	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Female	Lung	IP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-

-, No finding; +, Minimal; ++, Slight; +++, Moderate

V, vacuole formation; F, fat globule; IP, interstitial pneumonia.

Values represent as number of specific lesion

### 제 3 절 고찰 및 결론

자생식물 활나물 작물화를 위한 첫단계로 국내 자생지 현황을 조사한 결과 96개 지점에 분포하였으며, 남부해안지역에서 중북부지역까지 전국에 분포하였다. 남부 및 중부지역에서 수집한 유전자원은 수집 지역별로 생육의 차이는 없었다. 국내자생종은 1과1속1종 식물로서 자식성 작물이며, 따라서 지역수집종간에 유전적으로 균일성을 보이는 것으로 판단된다. 수집자원을 증식한 후 활나물 작물화의 가장 큰 장애요인인 낮은 종자 발아율을 높이기 위하여 종자 발아율 향상 연구를 수행한 결과 종자의 발아 적온은 25℃이며, 실내시험에서 종 GA<sub>3</sub> 0.1 mM처리에서 58%로, 저온처리 45%보다 발아율이 높았으며, 실외시험에서는 종피찰상 15분 처리가 48%로 무처리 35%보다 높았다. 작물화를 위한 발아율 향상기술은 실용적인 측면에서 종피찰상처리가 가장 효율적인 방법인 것으로 사료된다. 표준재배기술은 피복재료로는 흑색비닐, 파종기는 5월 20일, 재식밀도는 20×10cm, 질소시비량은 9kg/10a에서 생육이 우수하였다. 활나물 2기작 재배 등 다수확을 위한 요인기술 개발 연구를 수행한 수확적기시험은 종자등숙이 완료된 10월 20일 경이 지상부 생체중이 주당 37.9 g으로 가장 높았으며, 지상부 생체중에서 종자를 포함한 화퇴중이 주당 18.9 g으로 49.8%를 차지하였다. 수확시기별 총 페놀함량은 수확시기별로 차이가 적었으나, DPPH에 의한 전자공여능은 8월 20일 수확한 추출물이 51.95%로 높게 나타났으며, hydroxy radical 소거활성, SOD 유사활성도는 10월 20일에 수확한 추출물에서 가장 높았다. 본시험의 결과 활나물은 수확기별로 생육 및 성분특성에서 차이가 있으나 전반적으로 개화기 전후에 수확 하였을 때 생육과 성분특성에서 종자등숙기보다 불리하였으며, 육묘이식재배 등 생육기간연장 기술을 적용하여 2기작 재배는 가능하나 실용성 및 성분특성에서 문제점이

있는 것으로 판단되었다. 결론적으로 활나물은 직파재배에 의한 1기작 생산기술이 적합한 것으로 사료된다.

활나물의 부위별 이화학적 특성 및 유효성분의 함량을 분석한 결과를 토대로 활성이 좋았던 잎을 선정하여 산화억제 효과를 측정하였다. 활나물의 부위별 일반성분 분석결과 수분은 줄기 19.78%, 잎 9.56%, 뿌리 7.02%, 씨 6.78%로 나타났고, 조지방은 줄기 2.2%, 잎 2.5%, 뿌리 0.6%, 씨 3%로 나타났으며, 조회분은 줄기 10.5%, 잎 10.8%, 뿌리 6.15%, 씨 10.89%로 나타났다. 조단백질은 줄기 5.79%, 잎 8.69%, 뿌리 2.89%, 씨 11.59%로 나타났다. 본 실험의 분석결과 농산물의 생산지, 기후적 특성 및 토양적 차이로 인해 특수 및 일반성분의 차이가 나타난 것으로 보인다. 활나물 잎의 유효성분 추출 및 분리는 잎추출물 100 g을 추출하여 감압농축한 후 지방성분을 제거하고, water와 butanol 용매를 1:1 비율로 혼합하여 분획 추출하였다. butanol 층을 sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 10 (Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5, Fr6, Fr7, Fr8, Fr9, Fr10) 개의 소분획물을 얻었으며, 이중 Fr1, Fr4, Fr6 의 분획물에서 분취한 시료는 methanol : acetonitrile : methylene chloride : hexane (10 : 34 : 50 : 6) 의 전개용매로 TLC를 실시하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(in EtOH)로 발색하여 spot을 확인하였다. 동일한 Rf값을 갖는 형광물질과, 또 다른 2개의 형광물질을 확인할 수 있었다. 이 분획물을 가지고 GC/MS와 NMR구조상에서도 기존의 향암물질로 알려진 Monocrotaline과 유사한 구조를 띠는 것으로 보아 Monocrotaline이 존재한다는 것을 알 수 있었다. 활나물의 전초와 종자부분에 Monocrotaline성분이 많이 존재하지는 않지만, 전초에는 0.02%, 종자에는 0.4%정도 존재하는 것을 확인하였다. 따라서 활나물의 지속적인 연구가 수행된다면 새로운 천연항산화제는 물론

항암제나 만성퇴행성질환의 예방 및 치료를 위한 우수한 소재로서의 이용 가능성을 확인 할 수 있었다.

랫드 및 마우스 대장점막은 쉽게 형태변화를 일으키며 대장암 전암병변인 ACF (Aberrant Crypt Foci)를 형성한다. 이러한 조직적 형태변화들은 대장암을 가지고 있는 사람들의 대장점막에서 공통적으로 나타나며, 선암 종과 악성종양으로 발전할 수 있는 대장암의 전구체로 제안되어져 왔다. 랫드 및 마우스 대장점막의 이상선화소 (ACF)와 이상선화 (AC)를 전암병변 (preneoplastic lesions)의 생체지표 가능성을 제시한 이래로 많은 연구자들이 생약, 또는 그 추출물 등의 대장암 예방효과를 검색하는데 활용되어져 왔다. 발암은 세포수준, 분자수준 및 형태학적 수준으로 일어나는 사건이 복합적으로 다단계 과정 (Initiation-->promotion-->progression stage)을 거쳐서 일어나게 된다. 이에 활나물 추출물을 발암 개시후 단계라 할 수 있는 발암물질의 생체내 주입이 이루어진 뒤에 투여하는 방법으로 실험을 수행하였다. 활나물 추출물의 발암 개시후 단계에서의 투여는 60 mg/kg의 용량에서 유일하게 유의성 있는 감소를 나타냈고 120 mg/kg의 용량에서는 DMH 단독투여군보다 4개 이상의 AC로 이루어진 ACF의 수가 감소하는 경향을 보였지만 유의성 있는 결과는 아니었다. 그러나, 대장내 총 ACF 수에 있어서 활나물 추출물 30과 60 mg/kg의 용량은 농도의 존적인 대장내 총 ACF 수의 유의성 있는 감소를 유도하였고 120 mg/kg의 용량은 DMH 단독 투여군과 비교해 대장내 총 ACF 수의 감소를 나타냈지만 30과 60 mg/kg 용량군에 비해 대장내 총 ACF 수의 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 활나물 추출물 120 mg/kg 용량 자체의 ACF 형성 억제와 유도, 2가지의 작용이 병존하는 것으로 암시했다. 따라서, 현 연구에서 활나물 추출물이 화학 발암제에 의한 세포 변형을 억제하거나 지연시켜 종양 발병률의 감소, 악성암으로의 전환을 억제할 수 있는 최대의 효과농도는 60 mg/kg으로 나타났으며, 활나물 추출물은 DMH에 의한 다단계 발

암과정 중 발암 개시후 단계에서 효과적으로 암발생을 억제시킬 수 있는 것으로 사료되었다. 실험물질인 활나물을 2주간 경구투여한 후 india ink를 미정맥으로 투여하여 탐식능을 비교하기 위하여 투여 후 2분과 10분의 혈액을 채혈하여 OD를 측정하였다. 암수 대조군과 각 실험물질 투여군의 OD값을 이용하여 Phagocytic index K를 계산하고, 동물의 체중과 비장 및 간의 무게를 이용하여 Corrected phagocytic index 계산하였다. Corrected phagocytic index를 계산하여 암수 대조군과 각 실험군에 대하여 student t-test를 실시 비교한 결과 수컷 60 mg/kg 투여군에서 통계적 유의성을 보였으며, 대조군과 비교하여 60 mg/kg까지는 용량의존적인 증가추세를 보여주었다. 그러나 120 mg/kg 투여군의 경우 오히려 탐식능이 감소된 결과를 보여주었다. 이는 실험물질의 과도한 투여용량에 의한 부작용으로 볼 수도 있으며 혹은 특정용량에서 보이는 현상일 수도 있다. 추후 이번 실험보다 더 세밀한 용량단계를 설정하거나 120 mg/kg보다 더 고용량의 투여군을 설정하여 실험할 경우 탐식능과 용량의 관계를 규명하는데 도움을 줄 것으로 사료되었다. 암컷의 경우 탐식지수의 증가 추세나 통계학적으로 유의성있는 차이를 보이지 않았는데, 이는 활나물 투여에 의해 체내의 면역기능 중 탐식능의 증가를 유발하지 않았음을 보여주는 결과로 판단되었다. 이상의 결과로 판단해보면 수컷 마우스에서 활나물 60 mg/kg을 2주간 투여시 대조군보다 탐식능이 증가되는 것으로 사료되었다. 활나물 추출물을 이용하여 실험동물의 생체내 실험으로 체력 혹은 인내력 증강에 의한 면역증진 효과를 검증해볼 수 있는 수영부하실험을 실시하였다. 수컷의 부동시간을 측정결과 중용량과 고용량군에서 통계적으로 유의성있는 수치를 보여주었다. 고용량군의 경우는 중용량군과 거의 유사한 수치를 보여주었는데, 이 결과는 활나물 120 mg/kg의 투여용량이 면역계에 미치는 면역력 증가의 한계점이 될 수도 있음을 시사한다. 또한 평균 부동시간의 용량의존적 감소 추세를 관찰할 수 있었다. 암컷의 경우 대조군과 비교하여 평균부동시간이 감소된 결과를 보여주었으나 오차가 상당히 커서 통계적으로 유의성있는

결과로 이어지지 않았다. 추가적으로 수영부하시험을 실시할 경우 피로관련물질 등 여러 체액 성분들의 변화 관찰에 의한 실제적 면역증진 효과를 파악해 볼 수 있다면 특정 면역세포군 혹은 면역계의 증가를 확인 할 수 있을 것으로 사료된다. 결론적으로 활나물 2주간 투여시 60mg/kg, 30mg/kg 군의 수컷 마우스에서 면역기능증가의 간접적 효과를 확인할 수 있는 부동시간이 증가하는 결과를 보여주어 면역능을 증가 시켜주는 것으로 판단되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2003)	○ 활나물 자원수집 및 농업적 특성조사 ○ 활나물 추출물의 최적 추출방법 확립 및 평가 ○ 활나물 암세포 증식억제 효과 구명	30 30 40
2차년도 (2004)	○ 활나물 안전다수확 재배기술 개발 ○ 미지물질 동정 및 기능성 물질 활용방안 탐색 ○ 활나물 추출물의 암예방 및 면역증강효과 구명	30 30 40
3차년도 (2005)	○ 고품질 활나물 생산기술 개발 ○ 분리체계 확립 및 기능성 소재 개발 ○ 활나물 추출물의 독성유무 구명 및 독성경감물질 선별	30 40 30
최종평가	○ 고품질 활나물 개발 ○ 효능의 과학적 입증 ○ 항암기능성 소재로 발굴	30 40 30

## 제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

1. 신작물의 식품소재원료 안전생산 공급하기 위한 기초생리 및 안전 재배 기술을 확립하였다.
2. 새로운 기능성물질의 분리 동정 및 구조 확인을 통하여 기능성 소재를 발굴하였다.
3. 활나물 함유 성분의 항산화력, 항암효능 및 독성유무의 과학적 접근으로 관련분야의 기초자료로 제공되었다.
4. 새로운 항암물질 발굴 및 기능성 식품의 제품화 관련기술을 개발하였다.
5. 활나물의 기능성 성분의 생체 항산화 및 항암효과를 구명하였고 새로운 항암소재를 개발하였다.
6. 식물유래 천연 항암물질의 분리동정 및 대량생산 시스템 개발로 산업화의 기틀을 마련하였다.

## 제 5 장 연구개발의 활용계획

본 연구 결과는 국내 최초로 활나물에서 대장암 예방 및 치료를 위한 기능성 소재를 발굴한 사례라고 판단된다. 자생식물인 활나물을 원료로 한 항암관련 기능성 소재를 탐색하였으므로, 제품개발과 관련된 신기술을 참여기업인 (주)수진바이오텍과 연계하여 기능성 식품의 개발 및 생산에 적극 활용할 것이며, 현재 시제품을 생산 중에 있다. 또한, 고품질의 원료생산을 위한 안전 다수확재배 기술, 고품질 우량종의 선발 및 육성보급이 가능하므로 농가의 새로운 수요창출원으로 적극 응용할 수 있으며, 국가기관인 작물과학원과 지속적으로 협력하여 활나물의 재배, 농업적 특성, 항암효과, 면역증강효과 및 항산화효과에 대한 기초자료를 토대로 새로운 적응증 연구개발에 이용할 것이다.

### ■ 학술지 및 관련홍보 매체에 게재

1. 우나리아, 김태수, 박춘근, 박희운, 성하정, 강명화 : 최적 추출방법에 의해 추출된 활나물 (*Crotalaria Sessiliflora L.*) 추출물의 항산화 효과 및 항균활성, 한국약용작물학회 2003.
2. 김태수, 우나리아, 강명화, 박춘근, 박희운, 성하정 : 활나물 (*Crotalaria Sessiliflora L.*)의 추출방법 최적화와 항산화 효과 검증, 동아시 식생활학회 2004.
3. 김태수, 강명화, 박수진, 우나리아, 성하정, 고상범, 박춘근, 박희운 : Hep3B cell line에서 활나물 (*Crotalaria Sessiliflora L.*) 추출물의 항암효과, 한국식품과학회 2004.
4. 김태수, 강명화, 우나리아, 성하정, 고상범, 박춘근, 박희운, 이은상 : 활나물 (*Crotalaria Sessiliflora L.*)의 추출방법 최적화와 항산화 효과, 한국식품과학회 2004.

5. 우나리아, 김태수, 강명화 : 활나물 추출물의 항산화성 및 항균성에 관한 연구, 동아시아 식생활학회 2004.
6. 김태수, 강명화, 고상범, 성하정, 박춘근, 박희운 : MTT Assay에서 활나물 (*Crotalaria Sessiliflora L.*)추출물의 부위별, 용매별 항암효과 검증 한국식품영양과학회 2004.
7. 김태수, 김인구, 강명화, 성하정, 고상범, 박춘근, 박희운 : 활나물 (*Crotalaria Sessiliflora L.*)추출물로부터 항암물질 분리, 한국식품영양과학회 2005.
8. 김태수, 강명화, 성하정, 고상범, 박희운, 박춘근 : 활나물로부터 항산화 물질의 구조 및 분리 동정, 한국약용작물학회 2006.
9. 김태수, 김인구, 조세환, 강명화, 박희운, 박춘근, 성하정, 고상범 : 활나물 (*Crotalaria Sessiliflora L.*)의 수확,시기별 추출물의 생리활성 효과 측정, 한국식품과학회 2006.
10. 우나리아, 김태수, 박춘근, 성하정, 고상범, 강명화 : 활나물 부위별 추출물의 유지에 대한 항산화 효과 및 항균성에 관한 연구, 한국식품영양과학회지 : 34(7), 948-953
11. 우나리아, 김태수, 박희운, 박춘근, 성하정, 고상범, 정진우, 강명화 : 활나물 부위별 추출물의 항산화 활성 비교, 한국식품영양과학회지 : 34(9), 1297-1301

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

## 제 7장. 참고문헌

AOAC. Official Methods of Analysis. 14th ed. Washington, D.C. 876 (1980).

AOCS. 1990. *Official and Tentative Methods cd 8-53*. 4th ed. American Oil Chemists Society, Illinois.

AOCS. 1990. *Official and Tentative Methods Ti-la-64*. 4th ed. American Oil Chemists Society, Illinois.

Ahn MS. 1984. Effects of reaction temperature, time and presence of organic acids or their salts on the antioxidant activity of caramelization mixture. *PhD Dissertation*. Korea University.

Baskin, C.C. and J.M. Baskin. 1998. A geographical perspective on germination ecology : Tropical and subtropical zones. p. 239-329. In C.C. Baskin and evolution of dormancy and germination. Academic press ltd., 525 B Street, Suite 1900, SanDiego, California 92101-4495, USA.

Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 26: 1199-1204 (1954).

Bewley, J.D. and M. Black. 1994. Dormancy and the control of germination. p. 199-271. In J.D. Bewley and M. Black (ed.). *Seeds : Physiology of Development and Germination* (2nd ed.). Plenum Press, 233 Spring Street, New York, NY 10013 USA.

Choi CS, Song ES, Kim JS, Kang MH. 2003. Antioxidative

activities of *Castanea Crenata Flos*. Methanol extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1216-1220.

Chung SK. 1997. Hydroxy radical scavenging effects of speices and scavengers from brown mustard. *Biosci Biotech Biochem* 61: 118-123.

Davision PM, Parish ME. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol* 1: 148.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82. 47-95 (2002).

Jang, J.K., Han, J.Y., The antioxidant ability of grape seed extractd. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(3): 524-528 (2002).

Kang, M.H., Park, C.G., Cha, M.S., Seong, N.S., Chung, H.K., Lee, J.B. Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of glycyrrhizia uralensis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(1): 138-142 (2001).

Kang, M.H., Park, C.G., Cha, M.S., Seong, N.S., Chung, H.K. and Lee, J.B. Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of glycyrrhizia uralensis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(1). 138-142 (2001).

Kang, M.H., Choi, C.S., Kim, J.S., Chung, H.K., Min, K.S., Park, C.K. and park, H.W. Antioxidative Activities of Ethanol Extract Prepared from Leaves, Seed, Branch and Aerial Part of *Crotalaria Sessiflora* L. *Lorean J. Food Sci. Technol* 34(6). 1098-1102 (2002).

Kang MJ, Shin SR, Kim KS. 2002. Antioxdative and free radical scavenging activity of water extract from dandelion(*Taraxacum*

*officinale*). *Korean J Food Preser* 9: 253-259.

Kim YC, Chung SK. 2002. Relative oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. *Food Sci Biotechnol* 11: 407-411.

Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrate scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.

Kim, Y.C., Chung, S.K. Reactive oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. *Food Sci. Biotechnol.* 11:407-411 (2002).

Kim, T.Y., Park, J.R. and Kim, J.H. Electron Donating Abilities, Nitrite Scavenging Effects and Antimicrobial Activities of Smilax china Leaf. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* 33(4). 621-625 (2004).

Muller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. *Microbio. Hyg.* 259: 151-155.

Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.

Park, K.W., G.P. Lee, K.W. Park, and J.C. Jeong. 1998. Seed morphology of thirty Korean Wild species and effect of seed stratification on germination. *J. Korean. Soc. Hort. Sci.* 39(2) : 129-134.

Reimenschneider RW. 1975. The antioxidative rancidity and antioxidants. In *Handbook Food and Agriculture*. Blank CF, ed.

Reinhold Publishing Corp., New York, USA.

Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The oxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* (omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.

Ra, K.S., Suh, H.J., Chung, S.H., Son, J.Y. Antioxidant activity of solvent extract onion skin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 595-600 (1997). Yoo, M.A., Chung, H.K. and Kang, M.H. Optimal Extract Methods of Antioxidant Compounds from Coat of Grape Dreg. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(1): 134-140 (2004).

Yoo MA, Chung HK, Kang MH. 2004. Evaluation of Physicochemical Properties in Different Cultivar Grape Seed Waste. *J Korean Soc. Food Sci.* 13: 26-30.

강진호, 김유진, 전병삼. 2001. 저온, GA<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> 및 Acetone 처리가 활나물 종자발아에 미치는 영향. *한국약용작물학회지* 9(2) : 124 - 129.

美濃眞, 老化, 化學人, 東京.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.