

최 중
연구보고서

선학초 순화재배법 확립과 부가가치 향상을
위한 기능성물질 탐색 및 제품개발

Domestication, optimization of cultivation technique of
Agrimonia pilosa and development of high value
product by exploitation of functional component

연 구 기 관

경 상 대 학 교

농림수산식품부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “선학초 순화재배법 개발과 부가가치 향상을 위한 기능성물질 물질 탐색 및 제품개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 김 희 규

세부연구책임자 : 이 상 경

연 구 원 : 강 진 호

연 구 원 : 신 성 철

연 구 원 : 배 동 원

연 구 원 : 한 기 수

연 구 원 : 이 정 한

연 구 원 : 김 태 형

연 구 원 : 유 은 애

연 구 원 : 김 수 남

연 구 원 : 하 동 신

연 구 원 : 배 성 진

협동연구기관명 : (주)바이오 허브

부설연구소

협동연구책임자 : 전 병 삼

요 약 문

I. 제 목

선학초 순화재배법 확립과 부가가치 향상을 위한 기능성 물질 탐색 및 제품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구의 필요성

선학초(仙鶴草; *Agrimonia pilosa*)는 장미과에 속하는 다년생 숙근초로서 용아초(龍牙草), 황화초(黃花草) 등으로도 불리며, 식물명으로 짚신나물이라고도 한다. 키는 15~60센티미터쯤 자라고 전체에 흰털이 있으며 버들 잎 모양 또는 긴 타원 꼴의 쪽 잎이 어긋나게 붙는다. 미국, 중국, 일본, 한국 등지에 널리 분포하고 있으며, 우리나라에서는 태백산, 오대산, 덕유산, 지리산등 전국각지의 산야지에 자생하는 식물로서 해발 1000m이하의 산 정상부터, 초원지 구릉지, 늪지대까지 분포하고 있다. 이(2001)는 해발 1460m의 노고단에서부터 20-50m의 예천, 강화 등지까지, 지역별로는 경기, 충청남북, 경남북, 전남북에 걸쳐 자생하고 있다.

선학초 추출물은 민간요법에서 암환자 치료에 이용되고 있는데 전통적인 연구 자료를 살펴보면 다음의 세 가지 특성이 있다. 첫째는 암세포에 대하여 다른 항암 성분을 가진 약물보다 강한 암세포 성장 억제작용이 있다는 것이고, 둘째는 정상적인 세포는 손상시키지 않으면서 회복을 도와준다는 것이며, 셋째는 뚜렷한 진통작용이 있다는 것이다. 따라서 통증이 심한 골수암, 간암, 췌장암 등의 치료에 항암작용과 함께 진통제로서 사용될 수 있다고 한다.

선학초는 거의 섭취시 독성이 없는 약용식물로 알려져 있는데 예로부터 우리나라 민간에서는 지혈, 소염, 진통, 혈당강하, 조혈제로 사용하여 왔다고 한다. 선학초는 또한 영양분이 풍부하여 배추나 상추와 견주어 보면 단백질 4배 이상, 지질 5배 이상, 당질 4배, 섬유질 15배, 회분 6배, 철분 10배 이상 많고, 특히 비타민 C는 상추보다 13배 이상 많다. 이 밖에도 아그리모닌, 아그트리몬라이트, 타닌, 유기산, 사포닌, 비타민 K 등이 들어 있다. 특히 짙은 맛 성분인 타닌은 뿌리 9%, 줄기 6.5%, 잎 6.4% 함유되어 있다. 식용으로는 여러 가지 영양성분이 풍부하여 나물로도 일부 이

용되고 있다.

최근 국내에서 암 환자의 발생이 매년 늘어 사망 순위 1위로 큰 사회적 문제가 되고 있다. 따라서 천연물로부터 개발되어 부작용이 없으면서 항암 효과가 우수하고 기존 약제와 시너지효과를 가지는 천연물 유래 고부가가치 기능성 소재의 발굴이 필요하게 되었다. 본 선학초의 대량생산 기술개발, 기능성물질의 동정 및 효능검증을 통하여 경제성이 큰 천연자원의 산업화 기술개발로 글로벌 경쟁시대에서 생명공학 산업의 발전을 통한 국내 수요는 물론 외국으로 수출도 가능 할 것이다.

지리산을 중심으로 한 선학초 등 토종작물자원의 대량 생산지 기반확충으로 항암 및 항당뇨 치료제와 기초의약품 원료 개발은 저가의 대체의약품 생산이 가능해짐으로써 새로운 약리 활성의 기능성 물질의 발굴을 통하여 국민건강 증진에 기여하고 FTA협정 등 농산물 자유무역시대에 농가 대체 소득원으로 이바지 할 것이다.

2. 연구의 목적

첫째, 자생약초인 선학초의 대량생산을 위한 순화재배기술을 개발하고, 선학초에 발생하는 식물병의 종류와 피해 및 이들을 방제할 수 있는 친환경적 기술을 개발한다. 나아가 선학초의 미미한 시장 점유율을 획기적으로 제고하고, 생약제 수입을 대체하며 대량생산의 기반을 조성하고 농가 소득 증진에 기여한다.

둘째, 지금까지 밝혀지지 않은 선학초가 함유한 생리활성물질 중에서 항암 물질의 추출, 분리하여 화학구조를 밝히고, 이에 관련된 다양한 유도체 물질을 합성한다.

셋째, 선학초에 함유된 기능성 물질을 탐색, 동정하고 이들의 항암 효능을 증명한다. 이들 생리활성 물질을 이용한 기능성식품과 기초의약품 원료를 생산한다.

선학초의 재배기술 개발 및 친환경적 병해방제 - 선학초 생리활성물질 추출, 분석, 구조확인- 생리활성물질 및 항암 물질연구를 연계구축함으로서 생명과학 관련 기초 및 응용 연구의 학제간 연구팀의 구성을 더욱 발전시킴으로서 국내외적으로 경쟁력을 겸비한 생명과학 분야의 연구진 육성은 물론 생약제 유래 신약개발 잠재력육성에 주력한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 선학초 순화재배 및 병해 방제 연구

선학초의 순화재배법의 연구를 위해서 전국 각지에서 선학초를 수집하였고, 유전 자원을 보존하며, 그 특성을 연구하여 순화재배에 적합한 계통을 선발하였다. 또한 재배법 연구를 통하여 이제까지 알려진 재배적 특성과 더불어 더욱 발전시키고자 종자의 최적 발아환경과 시비법 및 차광정도에 따른 선학초의 생장을 조사와 나물생산을 위한 최적 환경을 조성하고자 하였다. 병해방제연구를 위해서는 재배되는 선학초에 발생하는 식물병을 분리 및 동정하였고, 그 우선순위를 결정하여 가장 피해가 큰 병해인 흰가루병에 대해서 친환경적으로 방제를 목적으로 실험을 진행하였다.

2. 선학초에서 생리활성물질의 분리와 구조확인 및 합성방법연구

본 연구는 직접 재배한 선학초를 건조 후 여러 가지 조건하에서 추출을 진행하여 본 연구에 필요한 추출물을 확보할 뿐만 아니라 제 3과제에 필요한 추출물을 제조하였다. 컬럼 크로마토그래피법과 HPLC를 이용하여 유효성분을 분리하였다. 또한 유효성분 대량 확보를 위해 분리방법을 최적화하였으며 분리 되어진 유효성분에 대해서는 IR, NMR, Mass등의 분석 장비를 활용하여 구조동정을 하였다. 유효성분의 대량확보를 위한 합성 방법에 대해서도 연구하였고 용매별, 부위별, 시기별 추출물에 대해서 여러 가지 생리활성 연구를 진행하였다.

3. 선학초로부터 분리된 유효 활성물질의 항암 효능연구

본 연구는 우리나라 3대 항암 약초로 알려져 있는 선학초 추출물의 독성 및 안전성 실험, 세포독성 검토 그리고 항암 효능을 연구하여 시제품을 개발하였다. 독성 및 안전성 실험은 식품의약품안전청의 독성시험기준 (식품의약품 안전청 고시 제 1999-61호, '99. 12. 22.)에 준하여 실험동물을 이용한 임상생화학적 검사를 실시하였다. 암수 ICR mouse를 이용하여 안전성 실험을 한 결과 각종 자극에 대한 반응, 운동(행동), 호흡, 경련, 피모 및 피부, 배설물 등의 상태를 관찰한 결과 특별한 이상 현상은 나타나지 않았으며, mouse를 부검하여 혈청학적분석, 조직병리학적분석 등 일반적인 안전성 test를 통해 안전하다는 것을 확인하였다. 암세포를 이용한 세포독성 효과는 선학초 추출물을 암세포에 주입하여 암세포의 생육저해 효과를 검토하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

가. 선학초 순화재배법 및 병해 방제연구

전국각지에서 선학초 70여종을 수집하여 유전자원을 보존하였으며, 보존된 유전자원 중 21계통을 선발하여 그 특성을 연구하였다. 계통은 염색체 수 조사를 통하여 *Agrimonia pilosa*와 *Agrimonia coreana*로 크게 구분하였으며, 계통 중 조생으로 분류된 CA07는 84.4cm로서 매우 장간이었고, CA10은 흰가루병에 감수성을 나타내지만 개화가 늦은 만생종으로서 개화 이전에 수확하는 선학초의 특성상 가장 재배에 적합한 2계통으로 판명된다. 종자발아의 최적환경은 20일간 저온층적처리후에 20-25°C서 가장 발아율이 좋았으며, 선학초의 생장은 차광을 하지 않았을때 가장 좋았고, 시비량은 N-P₂O₅-K₂O의 비율이 22-10-10일때 가장 생장이 좋았고, 또한 총 페놀화합물량도 무차광과 N-P₂O₅-K₂O의 비율이 22-10-10일때 가장 많은 양을 나타내었다. 최적 짚신나물 생산을 위해서는 종자발아법을 통해 발아한 종자를 포장에 이식 2년후에 초기 보온과 35%차광을 통해서 생산성을 극대화 할 수 있다. 짚신나물에 발생하는 병해는 흰가루병으로 병원균(*Sphaerotheca aphansis*)을 확인하였고, 그 친환경적 방제를 위해서는 발병초기에 난황유를 7일 간격으로 2회 이상 처리하면 방제할 수 있다.

나. 선학초에서 생리활성물질의 분리와 구조확인 및 합성방법연구

컬럼 크로마토그래피를 통해 알려지지 않는 물질 1개와 생리활성이 있는 것으로 알려진 스테로이드계 물질 2개를 분리하였으며 HPLC를 통해 생리활성이 있는 것으로 알려진 폴리페놀류 화합물 9개를 분리하였다. 각 용매별, 월별 및, 각 부위별 추출물에 대한 생리활성을 실험하여서 본 보고서에 보고하였으나 각 유효성분에 대한 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하며 알려지지 않는 여러 물질들의 생리활성 실험도 병행되어야 할 것으로 사료된다. 단일 화합물이 특이한 생물활성을 보일 경우 라)에 따라서 합성을 하면 대량확보가 가능하다.

다. 선학초로부터 분리된 휴효활성물질의 항암효능연구

정상세포인 293과 암세포인 HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7 cell의 생존율을 조사한 결과 4일째 293, HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7의 생존율은 각각 70.46,

16.72, 8.26, 7.17, 27.64, 5.35% 로 암세포의 대부분이 사멸되는 것이 확인되었다. 선학초 추출물의 항암효능은 BALB/c mouse에 종양 세포주인 Sarcoma 180을 서혜부에 주입하여 고형암을 유발시킨 후 선학초 추출물을 섭이하여 종양의 크기변화를 관찰하였다. 5주 후 mouse를 부검하여 종양 크기를 확인한 결과 control에 비하여 선학초 추출물 섭이군의 종양크기는 25.87% 감소하였다. 최종적으로 암세포의 생육저해 및 종양질환모델 동물에서 항종양 효과가 입증된 선학초 추출물을 원료로 하여 건조, 살균 과정을 거쳐서 분말, 과립, 환 등의 시제품을 개발하였다.

2. 연구결과 활용에 대한 건의

본 연구를 수행함으로써 도출된 결과들은 다양하게 활용될 것이다.

첫째, 연구결과들은 논문으로 발표될 것이다.

짚신나물 흰가루병에 관련한 논문을 한국약용작물학회 투고중에 있으며, 재배적인 기술에 관한 논문을 준비 중이다. 또한 각 용매별, 월별 및, 각 부위별 추출물에 대한 생리활성 확인에 관한 논문과, 짚신나물의 안정성과 나물 생산에 관련한 논문이 2008년도에 발표 될 것이다. 또한 후속 연구가 진행 중인 결과들도 빠른 시일 내에 논문으로 발표될 것이다.

둘째, 농민의 짚신나물 재배를 장려하기 홍보 및 재배기술 전파를 할 것이다.

산청군 약초생산조합과 연계하여 짚신나물의 효용성을 알리기 위한 강연을 개최하고, 확보된 유전자원을 분양하고, 재배기술을 이전하여 현장에서 짚신나물의 재배 시 생길 수 있는 애로사항들을 해결해 나갈 수 있도록 할 것이다. 또한 대규모 재배시 문제가 되는 병해 방제에 관련하여 본 연구에서 실행한 방법으로 친환경적으로 방제법을 전파함으로써 짚신나물의 부가가치 향상을 위한 노력을 할 것이다.

셋째, 짚신나물의 안정적인 생산과 소득 증진을 위한 제품개발에 주력할 것이다.

건강식품으로 산업화를 위해서는 제품의 고급화가 필요하고, 원료의 확보를 위해서는 재배법의 보완과 수집한 계통간에 약효성분 함량에 변이가 있을 것이므로 그에 대한 추가 조사를 수행하고 선학초의 재배 후 야생에서 채집한 것과의 약효성분 비교 비교할 것이다. 시제품 개발하였으나 경제성 맞는 실용화 제품의 개발에 노력하

고 대규모 생산을 위한 재배기술을 확립하고 선학초 중 생산성, 기능이 우수한 계통을 증식하여 국립 종자원에 품종등록을 하고, 경제성 분석을 하여 농가소득이 높을 경우 대량 생산기술, 소비확대를 위한 추가적인 연구를 수행하여 약품개발보다 농민에게 홍보하여 식용재배를 우선시 할 것이다. 제품화를 위한 경제성 분석을 수행할 것이다.

넷째, 후속연구를 위한 기초자료로 활용될 것이다.

본 과제에서 도출한 주요 결과는 초기 연구결과는 관련 전문가에게 넘겨져 생물활성(항산화, 항암, 항미생물) 효과에 대한 보다 체계적이고 심층적인 연구로 연결어야 할 것이며 새로운 의약품 개발하는 데 활용될 것이다. 또한 관련한 후속 연구를 위한 기초자료 및 다른 작물에도 연구법을 적용될 것이다.

SUMMARY

1. Domestication, optimization of cultivation technique and disease control of *Agrimonia pilosa*

Agrimonia pilosa L. has been used as a medicinal plant in traditional folk remedy, and it shows increasing tendency at various sections such as medicine-marking material, functional food, and agricultural chemicals using plant or extract. Since 2005, We've been involved in collection and domestication of *Agrimonia pilosa*. The optimum temperature for germination of *A. pilosa* seed was 20~25°C after stratification at 4°C for 20 days. Stratification increased germination rate with all experimented temperature showing reduced days for germination as compared to non-treated seed. Fertilizing combination of N-P₂O₅-K₂O by 22-10-10 kg per 10a promoted plant growth as compared to other ones. We observed powdery mildew caused by *Sphaerotheca aphanis* which was the only disease developed so far in the field plot. The mildew developed bimodally in May to June and mid August to September throughout whole surface of *A.pilosa* plants, ie leaves, stem and floral part. We attempted the cooking oil & egg-yolk (COY) to control the powdery mildew. Control value of COY was 27.0% by single spray, which was improved up to 81.8% and 82.7% by double or triple sprays at weekly interval, respectively. Upon the first spray, powdery appearance of mildew fungi disappeared in three days, which persisted for 7 days only. Thereafter powdery mildew started to develop again. However, for double to triple sprays, powdery mildew symptom was suppressed as long as 28 days after final treatment. Therefore, it is concluded that weekly double spray of COY should provide excellent control over powdery mildew of *Agrimonia pilosa*

2. Isolation of biologically active material, structure identification and synthetic study of *A. pilosa* .

We obtained a crude extracted materials from *A. pilosa* with MeOH and used for the isolation and supported to the theme III. The major research of theme II are isolation of new and known compounds from the MeOH extracts, structure identification and research of biological activities. Isolation of new and known compounds from the MeOH extracts were proceeded by column and high pressure chromatography. Isolation of new and known compounds from the MeOH extracts were proceeded by IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and Mass

spectroscopy. The biological activities were searched by checking of DPPH free radical scavenging activity of MeOH extracts of *A. pilosa*.

Biologically active 9 compounds were isolated by column and high pressure column chromatography from MeOH extracts of *A. pilosa*. Among them, 9 compounds were classified as polyphenols, 2 compounds were classified as steroids and 1 compound was not identified with spectroscopy. We examined biological activity of extracts from different solvents, harvested month and different sections of *A. pilosa*. We determined good anti-microbiological and highly anti-oxidants activity from the extracts of *A. pilosa*, but we have not been able to work on the activities of each separated compounds because the limited research periods and grants. The necessities and importance on the research of *A. pilosa* were emphasized, farther should be encouraged research for the activities of each separated compounds

3. Cytotoxic activity in human cancer cell lines, and toxicity test and antitumor effect of the extracts of *Agrimonia pilosa*

We performed to investigate the cytotoxic activity of the extracts of *Agrimonia pilosa* on human cancer cell lines, and toxicity test and antitumor effect. *A. pilosa* extracts showed significantly inhibitory effects against cell growth of human cervix (HeLa), gastric (AGS), hepatoma (HepG2), colon (HCT-15) and breast (MCF-7) cancer cells in MTT assay, a cytotoxicity test, and by microscopic observation. In vitro tests were performed against 293 human normal epithelial kidney cells and various human cancer cell lines including HeLa, AGS, HepG2, HCT-15 and MCF-7. *A. pilosa* extracts indicated higher antiproliferating effect than untreated cancer cells. HeLa, AGS, HepG2, HCT15 and MCF7 cells growth were reduced for 83.28%, 91.74%, 92.83%, 72.35% and 94.65%, respectively, compared with untreated control for 96 hours. *A. pilosa* extracts was proved safe through toxicity test done by oral administration for 4 weeks on male and female ICR mice. Solid tumors were induced by Sarcoma-180 inoculation (1×10^8 cell/mouse) in the right groin of BALB/c mice. *A. pilosa* extracts were oral administered (10 mg/d/mouse). After 39 days, the tumors picked out and weighed. The tumor inhibition rate was 25.87% in comparison with control group. In conclusion, *A. pilosa* extracts were biologically effect tide such that growth inhibition in human cancer cell line *in vitro* and tumor bearing mice *in vivo* without any toxicity.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	12
Section 1 Object of research.....	12
Section 2 Significance of research.....	15
Section 3 Scope of research.....	16
Chapter 2 Research Background	17
Section 1 Trend of domestic and foreign study.....	17
Section 2 Prospects.....	19
Chapter 3 Contents and Results	20
Section 1 Domestication, optimization of cultivation technique and disease control of <i>Agrimonia pilosa</i>	20
Section 2 Isolation of biologically active material, structure identification and synthetic study of <i>A. pilosa</i>	43
Section 3 Cytotoxic activity in human cancer cell lines, and toxicity test and antitumor effect of the extracts of <i>Agrimonia pilosa</i> .	90
Chapter 4. Achievement and Contribution	116
Section 1 Achievement.....	116
Section 2 Contribution.....	118
Chapter 5. Application Plan of Results	119
Chapter 6. Information on Foreign Technology	120
Chapter 7. References	121

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 1 절 연구개발의 목적.....	12
제 2 절 연구개발의 필요성.....	15
제 3 절 연구개발의 범위.....	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점	17
제 2 절 앞으로의 전망.....	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1 절 선학초 순화재배와 병해방제 연구.....	20
제 2 절 선학초에서 생리활성물질의 분리와 구조확인 및 합성방법연구	43
제 3 절 선학초로부터 분리된 유효활성물질의 항암효능연구.....	90
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	116
제 1 절 목표달성도.....	116
제 2 절 관련분야 기여도.....	118
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	119
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	120
제 7 장 참고문헌	121

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

최근 식생활의 서구화로 인하여 암, 고혈압, 당뇨병, 비만 등 생활습관병이 계속 증가하는 추세에 있다. 특히 암은 우리나라 사망원인 중 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, 2003년 건강보험통계연보에 따르면 1995년에 비해 대장암 4.2배, 유방암 3.9배, 갑상선암 3.9배, 췌장암 2.7배 증가한 것으로 발표되었다. 또한 2004년 우리나라가 경제협력개발기구(OECD) 30개 회원국 가운데 당뇨병 질환 사망자가 인구 10만 명당 34.7명으로 회원국 평균 13.4명의 2.5배에 달하여 “당뇨병=국민병”이라 할 정도로 매우 심각한 실정이다. 그러나 건강에 대한 관심증가와 화학약제의 오남용에 따른 심각성과 대체의학에 대한 기대 및 치료보다는 예방에 대한 관심이 증대되고 있는 사회적 분위기이다.

약용식물은 기능성식물의 자원으로서 이를 보존, 이용하려는 노력이 국내외적으로 집중되고 있고 국제간의 교역활동도 증가하고 있다. 한편 국제기구에서는 희귀 동·식물의 국제간거래를 규제하는 등 세계적 자원보존 차원에서 관심을 보이고 있다. 따라서 약용식물의 대부분을 수입에 의존하고 있는 우리로서는 우리나라 토종작물자원의 보존 및 활용에 관한 연구가 진행되어야 할 필요성이 있다.

국내의 약용작물 실태는 成(2003a)에 의하면 지리산에 109개과 975종의 약용식물이 자생하며 이들 중 한국특산은 희귀하다고 한다. 한약재의 종류는 국내에서 재배되는 것이 60-70여종에 이르며 정부의 정식통계자료는 40여종으로 약 10,187ha에서 30,387톤을 생산하여 조수익은 4,500억원에 이른다(成, 2003). 이중에서 **3대 항암 약초로 삼백초, 어성초, 선학초**가 알려져 있는데 이중에서 유일하게 재배면적 및 생산에 관하여 통계에 잡히지 않을 정도로 선학초(아래 사진 제시)의 재배생산은 미미한 상태에 있는 실정이다.



약용작물은 계절변화가 뚜렷한 우리나라 재배적지에서 생산한 것이 2차 대사산물의 집적량이 높다. 천연물화학 발달에 따른 기능성 물질탐색에 대한 국제 간 경쟁이 치열하므로 국가 경쟁력 강화차원에 동 분야의 연구개발이 필수적이다. 또한 약용작물은 재배 특성상 한계농경지 활용이 가능 할 뿐만 아니라 고부가가치 작물이므로 농가 소득작물로써 육성되어야 할 필요성이 있다.

선학초(仙鶴草; *Agrimonia pilosa*)는 장미과에 속하는 다년생 숙근초로서 용아초(龍牙草), 황화초(黃花草) 등으로도 불리며, 식물명으로 쥘신나물이라고도 한다. 키는 15~60센티미터쯤 자라고 전체에 흰털이 있으며 버들 잎 모양 또는 긴 타원 꼴의 쪽 잎이 어긋나게 붙는다. 미국, 중국, 일본, 한국 등지에 널리 분포하고 있으며, 우리나라에서는 태백산, 오대산, 덕유산, 지리산등 전국각지의 산야지에 자생하는 식물로서 해발 1000m이하의 산 정상부터, 초원지 구릉지, 늪지대까지 분포하고 있다. 이(2001)는 해발 1460m의 노고단에서부터 20-50m의 예천, 강화 등지까지, 지역별로는 경기, 충청북, 경남북, 전남북에 걸쳐 자생하고 있다.

선학초 추출물은 민간요법에서 암환자 치료에 이용되고 있는데 전통적인 연구 자료를 살펴보면 다음의 세 가지 특성이 있다. 첫째는 암세포에 대하여 다른 항암 성분을 가진 약물보다 강한 암세포 성장 억제작용이 있다는 것이고, 둘째는 정상적인 세포는 손상시키지 않으면서 회복을 도와준다는 것이며, 셋째는 뚜렷한 진통작용이 있다는 것이다. 따라서 통증이 심한 골수암, 간암, 췌장암 등의 치료에 항암작용과 함께 진통제로서 사용될 수 있다고 한다.

선학초는 거의 섭취시 독성이 없는 약용식물로 알려져 있는데 예로부터 우리나라 민간에서는 지혈, 소염, 진통, 혈당강하, 조혈제로 사용하여 왔다고 한다. 선학초는 또한 영양분이 풍부하여 배추나 상추와 견주어 보면 단백질 4배 이상, 지질 5배 이상, 당질 4배, 섬유질 15배, 회분 6배, 철분 10배 이상 많고, 특히 비타민 C는 상추보다 13배 이상 많다. 이 밖에도 아그리모닌, 아그트리몬라이트, 타닌, 유기산, 사포닌, 비타민 K 등이 들어 있다. 특히 짙은 맛 성분인 타닌은 뿌리 9%, 줄기 6.5%, 잎 6.4% 함유되어 있다. 식용으로는 여러 가지 영양성분이 풍부하여 나물로도 일부 이용되고 있다.

최근 국내에서 암 환자의 발생이 매년 늘어 사망 순위 1위로 큰 사회적 문제가 되고 있다. 따라서 천연물로부터 개발되어 부작용이 없으면서 항암 효과가 우수하고 기존 약제와 시너지효과를 가지는 천연물 유래 고부가가치 기능성 소재의 발굴이 필요하게 되었다. 본 선학초의 대량생산 기술개발, 기능성물질의 동정 및 효능검증을

통하여 경제성이 큰 천연자원의 산업화 기술개발로 글로벌 경쟁시대에서 생명공학 산업의 발전을 통한 국내 수요는 물론 외국으로 수출도 가능 할 것이다.

지리산을 중심으로 한 선학초 등 토종작물자원의 대량 생산지 기반확충으로 항암 및 항당뇨 치료제와 기초의약품 원료 개발은 저가의 대체의약품 생산이 가능해짐으로써 새로운 약리 활성의 기능성 물질의 발굴을 통하여 국민건강 증진에 기여하고 FTA협정 등 농산물 자유무역시대에 농가 대체 소득원으로 이바지 할 것이다.

요약하면 본 연구의 목적은 **선학초의 재배기술 개발 및 친환경적 병해방제 - 선학초 생리활성물질 추출, 분석, 구조확인- 생리활성물질 및 항암 물질연구를 연계구축** 함으로서 생명과학 관련 기초 및 응용 연구의 학제간 연구팀의 구성을 더욱 발전시킴으로서 국내외적으로 경쟁력을 겸비한 생명과학 분야의 연구진 육성은 물론 생약제 유래 신약개발 잠재력육성에 주력하는데 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 가. 대량생산을 위한 집단재배 또는 서식지를 조성할 필요성이 크다.
- 나. 각종 식물병이 발생하게 되고 만연대책 수립이 요청 될 것이다.
- 다. 약용작물은 재배가 까다롭고, 자금 회수기간이 길고 생산비 투입이 많다.
- 라. 현재 사용되고 있는 암 치료제는 대부분 고가의 수입품으로 환자에게 큰 경제적인 부담을 주고 있으며 의료비 재정압박의 원인이 되고 있다.
- 마. 따라서 본 연구를 통하여 항암 활성 성분을 스크리닝하여 유효물질을 분리·동정하고, 효능을 검증하여 경쟁력 있는 기능성제품 개발에 활용할 필요성이 있다.
- 바. 부작용이 없으면서 효능이 우수한 저가의 항암 효과를 가진 기능성 소재의 개발 필요성 이 있다.

2. 경제, 산업적 측면

- 가. 농민 소득 증대 및 소비자의 경제적 이익 증대가 중요하다.
- 나. 지속적으로 저가로 공급이 가능한 기능성 소재의 개발이 요구된다.
- 다. 생명공학 제품의 국산화율 증대 시급.

3. 사회 문화적 측면

- 가. 농가의 소득 향상을 위한 고 부가가치 작물의 개발이 중요하다.
- 나. 암은 1983년 한국인 사망원인 1위에 오른 이후 사망률과 발생율이 모두 꾸준히 증가.
 - 1) 한국인 암발생 현황을 보면 사망자 4명 중 1명은 암환자로, 정부에서도 암 관련 법규를 만들어 이에 적극 대처하고 있다(통계청, 2003).
 - 2) 최근 암 발생 추이는 사회적으로 가장 왕성한 활동을 하는 40-50 대에 증가 되는 경향을 보이고 있어 사회적 손실이 더욱 심각하다(Ahmedzai SH, 2000). 특히 국내에서 남성은 위암(24%), 폐암(16%), 간암(15%) 및 대장암(12%) 순이며, 여성은 유방암(17%), 위암(15%), 자궁암(9%)이 암 발생률 수위를 점하고 있음을 볼 때 국내 천연 약용 식물들이 전통적으로 위암, 자궁암, 간암 등에 효과가 알려진 점은 본 연구의 성공 가능성을 크게 하고 있다.
 - 3) 암 치료법은 현재로는 단기간에 특효약의 개발이 어려우므로 끊임없는 항암 소재의 개발이 필수적이다(Rosenberg SA, 1997).

제 3 절 연구개발의 범위

1. 선학초 순화재배와 병해 방제 연구

- 가. 야생선학초의 채집 및 계통 선발
- 나. 선학초의 재배법 개발 및 기능성 물질 생성·증대기술 개발
- 다. 선학초에 발생하는 각종 식물병원체 분리 동정 및 병해 방제 기술개발
- 마. 대량 생산체계 모델 제시

2. 선학초에서 생물활성 물질의 분리와 구조확인 및 합성방법 연구

- 가. 선학초로부터 극성 및 저극성 약리성분의 함량확인 및 생리활성 물질확인
- 나. 선학초에 포함된 화합물들에 대한 정확한 정성적, 정량적분석에 의한 데이터 확립
- 다. 상기의 연구결과에 근거한 합리적인 신규 생리활성물질(응용연구 대상물질) 제시

3. 선학초로부터 분리된 유효활성 물질의 항암 효능연구

- 가. 선학초로부터 분리된 유효활성 물질의 독성 및 안정성 실험
- 나. 세포 및 동물실험을 통한 유효활성 물질의 항암 효능 연구
- 다. 항암 유효활성물질 함유 기능성식품 소재개발 및 산업화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황과 문제점

선학초는 다년생 초본으로 들이나 길가에 흔히 자라며 전국에 자생한다. 줄기는 곧게 자라고 6-7월에 개화하고 8-9월중 종자가 성숙한다. 종자는 두꺼운 종피로 둘러싸여 있고, 종피에 발아 억제 물질과 쿠마린이 함유되어있는 것으로 알려졌다. 이 등(2000)은 4℃에서 20일간 저온층적 처리를 하면, 휴면이 타파되며 발아적온은 20℃ 발아율은 86%에 달하였고 다른 처리보다 발아 기간이 약 30일 단축되었고 발아율도 20%이상 높았으며, 초장 옆수도 증가하였고 개화기간도 단축되었음을 보고한바 있다. 이(2001)는 40종을 수집하였고, 형태적 특성을 비교 조사하였고, 이 등(2001)은 25종의 수집 종에 대한 genomic profile을 RAPD분석법에 의하여 유연관계를 분석하여, 크게 2대 group으로 구분하였다.

그러나 대량생산을 위하여 집단으로 재배하게 되면 각종 식물병이 발생하게 되는데 국내에서 이루어진 것은 신과 나(1992)가 우리나라 미기록 종 흰가루병 목록에 선학초 흰가루병균을 *Sphaerotheca aphansis*를 추가하였고, 이어서 신(2000)은 균학적 특성을 상술한바 있다. 그리고 방제에 관한 연구는 이 등(2000)에 의한 흰가루병 발생에 목초액 살포효과에 관하여 언급한 것이 전부이다. 외국에서도 *Agrimonia* 속 기주 9종에 발생하는 난균강에 의한 노균병(*Peronospora potentillae*), 자낭균에 의한 흰가루병(*Sphaerotheca macularis*), 녹병균강에 의한 녹병(*Pucciniastrum agrimoniae*), 총생균강에 의한 점무늬병(*Cercospora sp.*), 뿌리썩음병(*Phymatotrichopsis omnivora*), 유각균강에 의한 점무늬병(*Phoma exigua*), 줄기마름병(*Phoma herbarum*), 잎에 발생하는 *Phyllosticta sp.*, 점무늬병(*Septoria agrimoniae*, *S. agrimoniae-eupatoriae*) 등의 발생이 기록되어 있을 뿐이며(Farr 등 1989), 각 식물병의 발생생태, 피해 등에 관한 연구결과는 보고된 바 없는 실정이다.

선학초의 기능성에 관한 국내연구결과는 선학초 전초추출액을 흰쥐(Rat)에 경구투여한 결과 백혈구 및 혈소판의 수가 증가하는 경향(이 등, 2002)과 추출물의 농도가 0.5%일 때 50%이상의 대장균성장억제 효과가 있었고, 시료채취적기는 7월이며, 잎추출액이 줄기 추출액보다 억제효과가 높았다(이 & 서, 2003). 132개 약용식물을 screening 한 결과 선학초 등 11종의 메탄올 추출물이 heparinase 활성억제효과(안

등, 2002)가 있었으며, 항 HIV-1 활성이 높으며(민 등, 2001), tumor cell-ECM adhesion 억제활성이 높다(Lee 등, 2002)는 결과가 발표된 바 있다.

국의 연구동향으로는 야마기 등(1989)은 선학초로부터 항세균물질을 분리 phloroglucinol 유도체 4종을 동정하였고 이어서 포도상구균 *Staphylococcus aureus*에 대하여 천연 phloroglucinol과 합성물질 효과를 비교하였다(야마기 등, 1994). 카사이 등(1992)은 선학초로부터 항세균성 카테킨 유도체를 동정하고 포도상구균에 대한 활성을 보고하였다. 대만의 Hsu & Cheng(1992)는 선학초 전초추출물의 실험동물 혈당치 강화효과를, Faug 등(2002)은 flavonoid 추출조건을, Li 등(2002)은 열추출물의 정상쥐에 대한, 에탄올 추출물은 alloxan diabetic mice에 대한 혈당치 강화효과를 보고하였다.

Pei and Zhu(1990)은 선학초의 흡지(吸枝)로부터 agrimonolide, tormetic acid, ellagic acid 그리고 신물질인 4-O-β-D-xylanopyranoside of ellagic acid의 구조를 동정하였다. 이에 따라 우리나라에서도 식물병 연구를 강화하여 청정약초 생산에 주력하면서 특히 기능성 물질을 동정하고 전(前)임상 연구를 통하여 효능을 검증하여 동분야 연구잠재력을 개발하여 국제 경쟁력을 키워나가야 할 것이다. 소비자 입장에서 볼 때 암은 국내외에서 사망원인 1위를 점하는 주요 질환이고 심장병 등의 타 질환은 지난 50년간 사망률이 절반까지 감소하였는데 암에 의한 사망률은 오히려 증가하는 추세이다 (Parker, et al., 1996).

암 치료에서 흔히 화학요법을 사용하지만 항암화학요법의 부작용으로 치료를 계속할 수 없는 경우가 많다. 이에 따라 항암제와 병용 투여 시 효능을 증진시키는 항암 보조제에 대한 모색에 있어 기생충약인 levamisol, 엽산유도체인 leukovorin이 개발되어 국내외에서 상당한 효과를 보이고 있다. 특히 leukovorin은 항암 증진 효과 외에 정상세포 보호 작용이 있어 대장암, 골수암 등에는 항암제와 함께 표준 치료약이 되었다. 그러나, 암 환자수가 증가되고 있고 진단되는 암의 종류가 다양해지는 만큼, 여러 천연물로부터 항암제 및 항암보조제를 개발하는 연구의 필요성이 절실한 실정이다.

선학초의 재배화에 따른 각종 기능성 물질의 생성 변화에 관한 연구는 수행된바가 없으므로 또한 기능성 물질을 증대시킬 수 있는 각종의 연구가 수행되어야 할 것이다. 따라서, 이러한 약용식물들의 약리 효능에 관한 과학적인 연구를 수행하고 기능성 소재를 개발하면 비교우위를 점할 수 있다.

제 2 절 앞으로의 전망

1. 선학초의 기능성 물질을 최대한으로 생산할 수 있는 재배법이 개발되어야 한다.
2. 선학초 재배 시에 발생하는 병의 종류 및 발생생태를 파악할 수 있을 것이다.
3. 환경 친화적 지속 가능한 병 방제기술이 개발되어 청정 선학초 생산을 가능하게 할 것이다.
4. 선학초로부터 항암 효능 및 부작용 감소 성분을 분리/정제하여 구조를 동정하고, 부작용이 없는 천연물 유래 항암 치료 소재를 개발하여 암세포 및 동물 실험에서 그 효능이 밝혀질 것이다. 얻어진 결과물은 국가자원화로 이어져 국익 창출을 도모할 수 있다.
5. 항암 치료 소재 개발에 의한 효능과 메카니즘을 규명 (세포실험, 동물실험)하고, 활성성분이 분리, 동정될 것이다.
6. 개발된 천연물 생리활성 소재를 베이스로 하여 기능성 제품 및 기초의약품 원료가 개발될 것이다(캡슐, 타블렛, 고농축엑기스, 응용제품 등).
7. 학제간 및 산학간 연구협력강화로 학문발전에 기여하여 국제간 경쟁우위가 확보 될 것이다.
8. 지리산 권역을 중심으로 한 토착작물자원의 개발을 통한 산업화는 국민복지 및 건강증진은 물론 새로운 소득작목 개발로 농민 소득증대에도 기여할 것이다.
9. 원료의 대량생산 시스템 구축에 의한 저가의 원료공급을 통하여 지속적으로 저렴한 가격의 항암제 생산 공급이 가능하게 됨으로써 지역산업의 활성화를 도모할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 선학초 순화재배와 병해 방제 연구

1. 선학초 수집 및 계통선발

가. 선학초 수집

본 연구에 사용된 짚신나물 수집종은 경상남도 농업기술원에서 짚신나물 연구를 위하여 수집하였으나, 불가피한 사정으로 연구가 중단되어 후속연구를 계속하고자 짚신나물 수집종 35종을 분양받아 연구에 활용하였으며, 별도로 채집지를 달리하여 35종의 짚신나물을 수집하였다. 수집지역은 분양받은 수집종의 수집지와 중복되지 않는 범위 내에서 경남 일대(함안, 밀양, 창녕), 강원도 남동부 및 경북 북부 지역(태백, 봉화, 삼척, 청송) 및 전북과 전남 지방을 중심으로 수집하였다. 수집시기 및 조건은 짚신나물 군락지 예상지역을 대상으로 2005년도 5월~7월까지 짚신나물이 절간생장을 하여 모양을 갖추어서 그 형태를 식별 가능 할 때 채집하였다. 수집지의 토양은 반음지, 양지, 저습지, 적습지, 분지, 개울, 능선 등 여러 환경에서 존재하였다. 채집한 짚신나물은 뿌리가 수분을 충분히 공급한 후에 유전자원 보존을 위한 포장으로 조성한 경상대학교 농장에 이식하여 본 시험에 활용하였다.

Table1. 선학초 자생종의 수집현황

No	수집지	비고	No	수집지	비고
1	매화산	분양	36	삼척근덕면	수집(2005)
2	영주부석사	"	37	울진평해읍	"
3	중산리	"	38	삼척 산질면	"
4	비탄재	"	39	함안 군북	"
5	지리산 노고단	"	40	광양	"
6	덕유산	"	41	순천 성주읍	"
7	불모산	"	42	하동 양보재	"
8	가야산백운암	"	43	진안 마이산	"
9	청학동	"	44	고창읍성	"
10	남해 금산	"	45	창녕 유어면	"
11	거제 노자산	"	46	밀양 얼음골	"
12	경기용인	"	47	양산 통도사	"
13	와룡산	"	48	함안 범수면	"
14	우두령	"	49	석남사	"
15	속리산	"	50	김해 대동	"
16	황석산	"	51	창녕읍	"
17	나동 유수리	"	52	밀양 청도면	"
18	보령 주포	"	53	내장산	"
19	경기 이천	"	54	순창	"
20	삼장사	"	55	무주 구천동	"
21	순천 송광사	"	56	완주군	"
22	강화읍	"	57	선운사	"
23	공주 유구	"	58	남원 대강면	"
24	예천읍	"	59	충남 추부	"
25	해산서원	"	60	장수 장계면	"
26	육십령	"	61	라제 통문	"
27	충남 금산읍	"	62	장수 천천면	"
28	충남 대둔산	"	63	청송진보	"
29	광양백운산	"	64	영양읍	"
30	대청댐	"	65	태백 통리	"
31	월아산	"	66	안동인월	"
32	홍부마을	"	67	삼척도계	"
33	도산서원	"	68	태백시	"
34	남원수분재	"	69	봉화 노루재	"
35	봉화읍	"	70	영양 수비면	"

나. 짚신나물의 구분을 위한 염색체 비교

수집종은 짚신나물(*Agrimonia pilosa*)과 산짚신나물(*Agrimonia coreana*)로 먼저 분류되었다. 형태적 특징은 잎과 줄기 꽃모양 등은 차이점을 발견할 수 없으나, 줄기에서 잎이 돌아나는 자리에 있는 잎받침의 모양이 짚신나물과와 산짚신나물로 구분되는 것을 확인 할 수 있었다. 짚신나물의 경우 그 모양이 두갈래의 뾰족한 씨기 모양으로서 끝부분에 이를 때까지 돌기가 없이 일자형의 모양이지만 산짚신나물의 잎받침은 둥근 톱니모양을 하고 있었다(Fig. 1.). 산짚신나물은 강원도 태백지역에서 처음 채집되었으나, 그 개체수가 많지 않고 짚신나물과 같이 발견되는 사례가 많았다. 수집된 자원을 정확히 분류해 보기 위해 뿌리 끝 성장점을 잘라서 염색해서 염색체수를 비교하였다. 재료의 동정과 염색은 다음과 같이 하였다.



Agrimonia pilosa

Agrimonia coreana

Fig. 1. 짚신나물과 산짚신나물의 형태적 비교

- ① 0.002mol 8-hydroxyquinoline으로 18℃에서 2시간 전처리
- ② Ethanol:Acetic acid = 3:1로서 5시간 처리로 동정
- ③ 2% Aceto-orcein으로 2~3일 처리하여 염색.
- ④ 광학현미경을 이용하여 염색체 관찰.

위와 같은 방법으로 2종의 염색체를 비교해본 결과 짚신나물은 $2n=56$ 로서 산짚신나물의 염색체수인 $2n=28$ 의 2배체 인 것으로 확인할 수 있었다 (Fig. 2.). 이 실험 결과로서 생약재 선학초는 짚신나물과 산짚신나물의 2중으로 생산될 수 있다. 짚신나물과 산짚신나물은 서식지가 겹치고 두종사이의 염색체가 근연관계에 있는 것으로 보아서 중간 잡종도 의심된다.

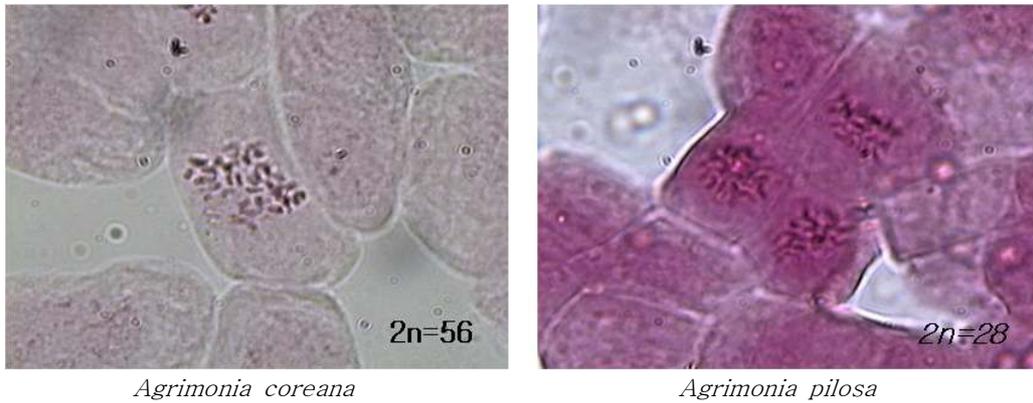


Fig.2. 짚신나물과 산짚신나물의 염색체 비교

다. 수집종의 계통별 특성 조사

1) 시험수행방법 및 처리내용

계통별 특성을 조사하기 임의로 수집종에 번호(CA No.)를 부여한 후 다른 특성을 보이는 것을 선발하여 실험에 사용하였다. 선발은 비슷한 특성을 보이는 수집종 중 가장 기준이 되는 계통을 선택하여 70여 계통 중에 21계통을 선발하여, 각각의 수집종의 개화 개시 시점을 기준으로 6월 개화개시는 조생종, 7월 개화는 중생종, 8월 개화는 만생종으로 구분하였고, 또한 수집된 식물자원에서 관찰된 가장 심각한 병해인 흰가루병에 대한 감수성 조사는 아래 그림과 같이 저항성(-)과 감수성은 병이 든 정도에 따라 (+), (++) , (+++)의 단계로 구분하여 조사하였다. 염색체의 수를 비교 분석하여 *Agrimonia pilosa*와 *Agrimonia coreana*로 구분하였다.

(2) 시험결과

수집종 21계통을 선발하여 특성을 조사하였다. 우선 개화 개시 시점을 기준으로 6월 개화는 조생, 7월 개화는 중생, 8월 개화는 만생으로 구분하였다. 조생종으로 분류되는 것은 총 21계통중 9계통이었고, 중생종은 7계통, 만생종은 5계통으로 분류되었다. 초장은 평균적으로 75-80cm의 범주에 속했으나 CA26의 경우 특이적으로 초장이 63.4cm으로서 매우 짧고, 조생으로 분류된 CA07의 경우에는 84.4cm로서 매우 장간을 이었다. 선학초에서 조사된 식물병은 흰가루병이 유일한데 흰가루병은 각각의 계통별로 병에 대한 저항성과 감수성을 나타냈었다. 흰가루병에 대한 감수성과 저항

성 비율은 거의 비슷하였다. 하지만 CA10과 CA56의 경우에는 다른 계통에 비해서 흰가루병 발생이 심하여 감수성으로 판단되어 진다.(Table 2)

Table 2. 선학초의 계통별 특성

계통	구분 ^{a)}	초장(cm)	흰가루병 감수성	수집지	분 류
CA02	조생	76.7	+	경북 영양	<i>A. coreana</i>
CA04	조생	79.6	+	경북 봉화	<i>A. coreana</i>
CA05	만생	78.4	-	전북 장수	<i>A. pilosa</i>
CA07	조생	84.4	+	전북 완주	<i>A. pilosa</i>
CA08	조생	74.3	+	충남 금산	<i>A. pilosa</i>
CA10	만생	78.4	+++	전북 남원	<i>A. coreana</i>
CA23	중생	76.3	+	홍부 마을	<i>A. pilosa</i>
CA25	중생	75.3	-	경남 김해	<i>A. pilosa</i>
CA26	조생	63.4	-	경북 울진	<i>A. coreana</i>
CA32	중생	73.4	+	대청댐	<i>A. pilosa</i>
CA34	중생	74.3	-	전남 광양	<i>A. pilosa</i>
CA39	중생	78.4	-	충남 공주	<i>A. pilosa</i>
CA45	만생	74.2	-	경남 거제	<i>A. pilosa</i>
CA48	중생	76.2	-	경남 진주	<i>A. pilosa</i>
CA52	만생	77.1	-	경남 산청	<i>A. pilosa</i>
CA53	조생	75.4	-	경남 합천	<i>A. pilosa</i>
CA56	조생	74.6	+++	경남 거창	<i>A. coreana</i>
CA57	만생	74.9	+	경남 하동	<i>A. pilosa</i>
CA60	조생	76.8	++	전남 구례	<i>A. coreana</i>
CA61	조생	74.6	-	충북 보은	<i>A. pilosa</i>
CA62	중생	77.1	-	전남 순천	<i>A. pilosa</i>

^{a)} 조생: 6월 개화, 중생: 7월 개화, 만생: 8월 이후 개화

라. 요약

전국 각지에서 선학초 70여종을 수집하여 유전자원을 보존하였으며, 보존된 유전자원중 21계통을 선발하여 그 특성을 연구하였다. 계통은 염색체 수 조사를 통하여 *Agrimonia pilosa*와 *Agrimonia coreana*로 크게 구분하였으며, 계통 중 조생으로 분류된 CA07는 84.4cm로서 매우 장간이었고, CA10은 흰가루병에 감수성을 나타내지만, 후속연구에서 흰가루병의 친환경적 방제가 가능하고, 개화가 늦은 만생종으로서 개화 이전에 수확하는 선학초의 특성상 가장 재배에 적합한 2계통으로 판명된다.

2. 선학초의 재배법 개발 및 기능성 물질 생성·증대기술 개발

가. 재배법 개발

1) 종자 발아 조건

종자의 발아는 종자 자체와 종자 외적인 조건 즉, 환경의 영향을 많이 받는다고 할 수 있다. 종자자체의 발아능을 자발적 휴면과 과중후 환경 조건 등과 밀접한 관계가 있다 (Salisbury et al., 1992). 짚신나물은 자연 조건에서는 8월중순~9월중순 낙종한 후 이듬해 봄에 발아하는 생육상을 보이므로 자발적 휴면기간은 2개월 이상이라 할 수 있다. 또한 두꺼운 종피로 둘러 싸여있고 종피에 발아억제물질인 쿠마린 이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Moon, 1991). 이에 선학초의 자연 발아율은 상당히 불량하다. 또한 대량 증식을 하기 위해서는 종자발아가 필수적이므로 선학초 종자의 발아율을 인위적으로 높힐 필요가 있다. 이렇게 종자의 발아능을 최대로 하기 위한 처리는 여러 가지가 있으나, 다음 몇 가지로 요약할 수 있다.

휴면타파를 위한 층적 처리는 3~5℃의 습윤상태에서 1~4개월 저장하는 것이 효과적으로 알려져 있으며 (Hartmann & Kester, 1983) 저온처리에 의한 생화학적 변화는 ABA의 감소와 특정 당과 효소가 증가되며 이러한 기작에는 산소의 공급이 필요한 것으로 보고되고 있다 (Hartmann & Kester, 1983; Pitel et al., 1989). 발아억제물질은 수용성 물질이므로 유수에 침종할 경우 효과적으로 제거 될 수 있으며(Jo & Kim., 1993), GA 3는 저온처리의 대체효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며 (Rowe et al., 1983), 적정온도가 야생식물에서는 재배작물보다 높은 것으로 보고되었다(Yang & Kim, 1993).

본 실험에서는 선학초의 종자 발아능 향상에 영향을 줄 것으로 생각되는 몇 가지 처리를 이용하여 최적 종자 발아 조건을 규명하고자 시행되었다.

가)시험수행방법 및 처리내용

전북 남원의 자생지에서 수집한 계통인 CA10의 종자를 재료로 사용 하였다.

저온층적처리에 따른 선학초 발아율을 조사하기 위해서 얇은 망사자루에 종자를 넣은 후 흐르는 수돗물에 이틀간 방치하여 유수처리를 하였다. 그리고 사각상자에 모래와 유수처리한 종자를 혼합하여 물을 충분히 준 다음 4℃냉장고에 5, 10, 15, 20, 25일간 보관한다. 이때 표면이 마르지 않도록 5일 간격으로 수분을 공급하였다. 각각의 처리된 종자를 20℃에서 발아율을 측정하였다(Fig. 3.).

발아에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위해서 20일 동안 저온층적처리후에 각각

의 온도에서 발아율을 측정하였다.

발아에 미치는 다른 요인에 대하여 알아보기 위해서 다음과 같이 처리한 후에 발아율을 측정하였다. 종피과열은 날카로운 물체를 사용하여 선학초 종자의 종피를 벗긴 후 처리하였고 종피연화는 두꺼운 종피를 제거하기 위해서 95% H₂SO₄를 사용하여 태운 다음 처리하였다. 성장조절제는 GA3에 종자를 침지하여 처리하였고, 유수처리는 흐르는 물에 이틀간 침지한 후 처리하였다. 저온처리는 이틀간 유수처리한 종자를 젖은 신문지에 싼 후 4℃ 냉장고에서 이틀간 처리하였다.

각각의 종자발아를 위한 처리와 다른 방법들을 혼용 처리 하였을때 나타나는 종자 발아율을 알아보기위해서 다음과 같이 처리하였다. 종피연화와 성장조절제처리, 종피연화와 저온처리, 종피연화와 성장조절제 그리고 저온처리를 혼합하여 처리하였다. 종자처리 후 발아실험은 흡습지에 멸균수를 적신 페트리디쉬에 종자를 30립씩 3반복으로 치상하여 20℃에 배양하고 5mm이상 유근이 돌출한 것을 발아로 간주 하였다.

나) 시험결과

저온층적처리 기간이 발아에 미치는 영향을 조사한 결과 20일 동안 저온층적처리한 것이 발아 처리 10일 만에 80%이상의 발아율을 나타 내었고, 다른 기간동안 처리한(5,10,15일) 것에 비해 단기간에 현저히 높은 발아율을 나타내었다. 그러므로 선학초의 저온층적처리 기간은 20일이 가장 적합한 것으로 판단된다(Fig. 3).

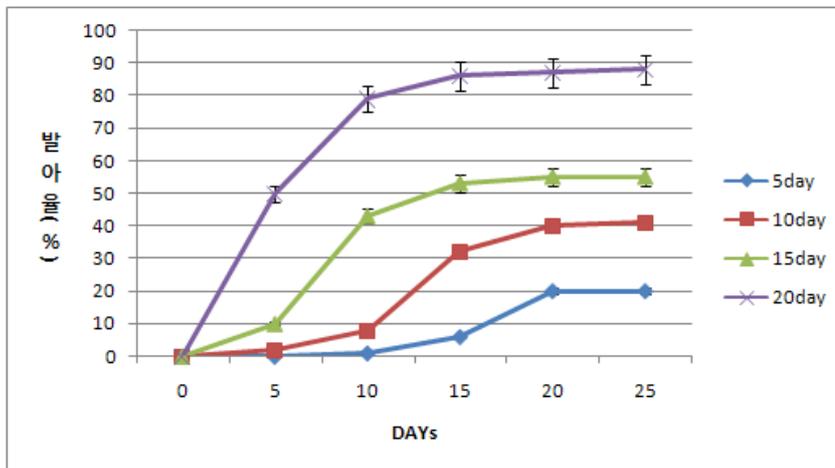


Fig. 3. Germination rate of *Agrimonia pilosa* as affected by cold-stratification for 5, 10, 15 and 20day respectively.

저온층적처리 후 선학초 종자의 발아에 미치는 온도의 영향은 처리 3일 경과 후 전체적으로 발아율이 상승하였으나, 25°C에서 단시간 내에 가장 높은 발아율을 보였다. 그러나 12일 경과 후에는 15~25°C가 비슷한 발아율을 보였으므로 저온층적처리 적정온도는 15~25°C로 비교적 넓은 범위를 가지는 것으로 판단된다(Fig. 4.).

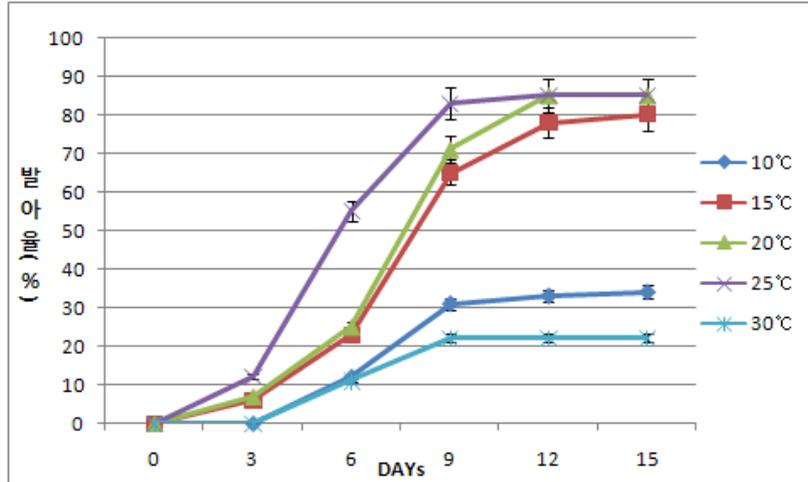


Fig. 4. Influence of temperature on the seed germination of *Agrimonia pilosa* after stratification treatment at 4 °C for 20 days.

저온층적처리는 장기간이 소요되므로 다양한 처리를 통하여 노력과 시간을 줄일 수 있는 방법이 모색되어야 할 것이며, 이에 대한 유수, 저온, GA3, 종피연화, 종피 과열처리에 따른 종자의 발아율을 저온 층적 처리와 비교하여 실험한 결과 10일경과 후, 저온층적처리를 제외한 다른 방법들에서는 종자 발아가 되지 않았으나, 저온층적 처리는 무처리에 비해 발아가 20일이상 단축되었으며 발아율 또한 80%이상으로 높았다. 30일이 경과 하였을 때, 여타 개별처리들이 발아율을 보이긴 하였으나, 저온 층적처리에 비해 현저히 낮은 발아율을 나타냈다(Fig. 5).

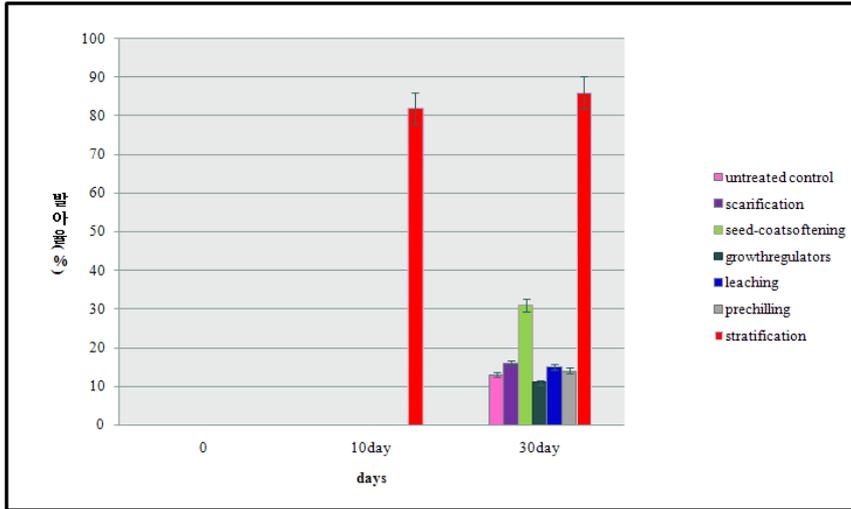


Fig. 5. Germination rate of *Agrimonia pilosa* as affected by untreated control, stratification, scarification, seed-coatsoftening, growthregulators, leaching and prechilling treatment.

발아 촉진을 위한 종자처리법을 2가지 이상 혼합하여 처리하였을 경우 종자발아에 미치는 영향은 무처리에 비해서 전체적으로 발아율이 상승하였으나, 저온층적처리가 다른 혼용처리에 비해서 단시간내에 높은 발아율을 보였다. 10일 경과 후 저온층적 처리는 80%이상의 높은 발아율을 보였지만 나머지 혼용처리들은 발아하지 않았다. 15일 후 부터는 혼용처리도 발아율이 상승하였으나, 저온층적처리에 비해서는 낮은 발아율을 보였다(Fig. 6).

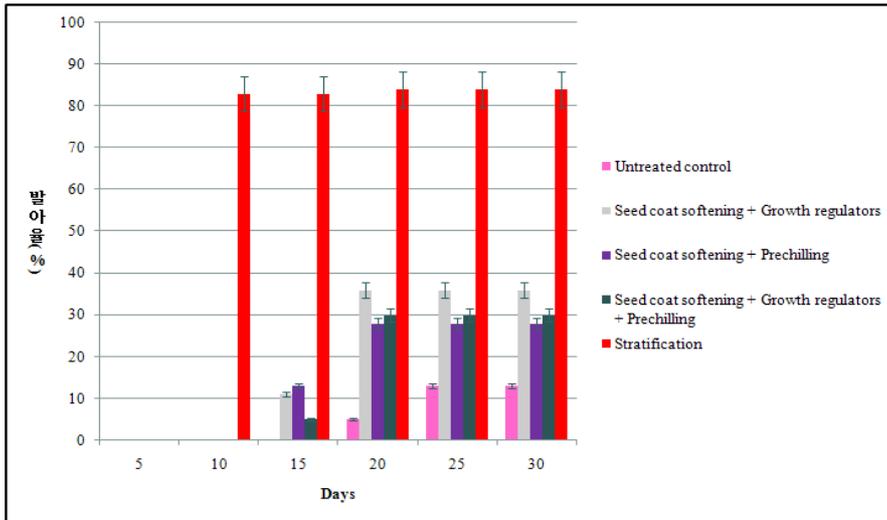


Fig. 6. Germination rate of *Agrimonia pilosa* as affected by sequential treatment

다) 요약

이러한 시험 결과로서 선학초의 최적 종자 발아 조건은 다음과 같이 요약된다.

선학초 종자를 저온층적처리시 적정기간은 20일, 발아적온은 15~25℃이고, 저온층적 처리는 여타 종자 발아를 위한 방법에 비해 발아기간이 짧으며 발아율 또한 50% 이상 높았다. 종자처리방법을 혼합하여 처리하였을때 seed coat softening 과 growth regulators를 함께 처리한 경우 여타 혼용처리보다 발아율이 높았지만 단일 저온층적 처리에 비해서는 발아율이 현저히 낮았다. 이와 같은 결과로 저온층적처리가 여타 처리에 비해 선학초의 발아력을 높이는 최적의 종자처리법이라고 판단된다.

나. 최적 재배 조건 및 기능성 물질 조사

1) 선학초의 성장조사

전국 각 지역에서 수집한 선학초를 재배하여 수집지 별로 7종을 무작위로 선정하여 시험포장에서 시기별로 성장을 조사하였다. 성장조사는 1년차에 이식한 선학초의 분아를 분주하여 포장에 심고 1개월의 간격을 두고 식물체의 키를 측정하여 나타내었다.

선학초의 재배시기별 성장을 알아보기 위해서 몇가지 계통에서 4월부터 7월까지 1개월씩 간격을 두고 식물체의 체장을 조사한 결과 계통간의 특성에 의해서 키의 차이를 보이는 것이 있으나 대체적으로 4월 17일에는 8.8cm, 5월 16일 16.5cm, 6월 17일에는 45.3cm, 7월 18일에는 76.2cm이었다. 선학초의 생장은 5월 이후에 생장이 급격히 빨라지는 것으로 보아서 나물로서 이용하기 위해서는 5월 이전에 채취하는 것이 바람직하다. 5월 이후에 채취하였을 때는 줄기 생장이 시작되고, 잎도 거세어져 식미감이 떨어진다.(Table 3)

Table 3. 선학초 수집종의 월별 성장량

계 통	Plant height(cm)			
	Apr. 17	May. 16	Jun. 17	Jul. 18
CA02	9.2	15.4	42.3	76.7
CA05	7.6	17.2	44.2	78.4
CA08	9.4	15.7	48.3	74.3
CA10	9.6	15.9	44.2	78.4
CA25	6.7	14.2	41.8	75.3
CA32	9.5	19.3	49.2	73.4
CA52	9.7	17.9	47.4	77.1
Average	8.8	16.5	45.3	76.2

2) 나물생산을 최적 증식방법

최적 증식 방법을 실험하기 위해서 선학초를 종자를 이용한 파종과 선학초 분아를 이용한 분주하는 분주법등의 2종의 실험방법을 통하여 선학초 생산량을 측정하였다. 선학초의 종자는 저온층적처리를 통하여 발아시킨 후 50일동안 Pot에서 재배하여 3-4엽이 되었을때 처리하였고, 분주법은 분아가 발아하여 5엽에 이르는 3월 10일경

에 채취하여 개개로 분주하여 시험에 사용하였다. 재식거리는 이(2001)에 의해 밝혀진 선학초 재배에 최적의 재식거리인 30×30으로 증식하여 시험하였다. 조사를 위한 시료는 지상부는 화대가 올라오기 전인 증식 후 58일후에 채취하였고, 용아수를 비교하기 위한 지하부위 채취는 이듬해 2월경에 하였다.

시험결과 종자 발아법과 분주법을 비교하여 보았을때 초장은 60cm내외로 거의 비슷하였으나 가지수와 엽수, 용아수, 건물중에서 차이를 보였다. (Table 4)

Table 4. 증식방법에 따른 선학초의 생장 비교

구분	초장(cm)	가지수(No.)	엽수(No.)	용아수(No.)	건물중(kg/10a)
종자 발아법 ^{a)}	58.4	3.5	44.3	3.2	320.6
분주법 ^{b)}	59.2	4.3	58.2	5.6	488.4

^{a)}; 저온층적처리 발아 후 pot 재배 50일 후 3~4 엽기, ^{b)}; 분아가 발아 후 5엽기에 분주하여 공시, 재식거리 30×30cm; 생장조사 시기는 재식 58일 후(화대출연전); 용아 조사는 이듬해 2월경

Table4의 결과로 증식방법 중 종자발아법과 분주법간의 생장차이가 있음을 보고 나물생산을 위한 최적 증식법을 알아보고자 증식 후 3년 동안 용아수와 나물생장량을 조사한 결과 아래 그림과 (Fig. 7, Fig. 8.)같이 나타났다. 용아수는 1년차(2006년)에는 분주법으로 증식한 것이 종자발아법에 비해 그의 2배 가까이 많았으나 2년차(2007년), 3년차(2008년)로 재배년도가 계속될수록 그 격차가 적어지는 것을 알 수 있었다. 또한 나물생산량도 1년차(2005년)에는 생산량의 차이가 있었으나 연차가 지날수록 용아수와 마찬가지로 그 격차가 좁혀졌다.

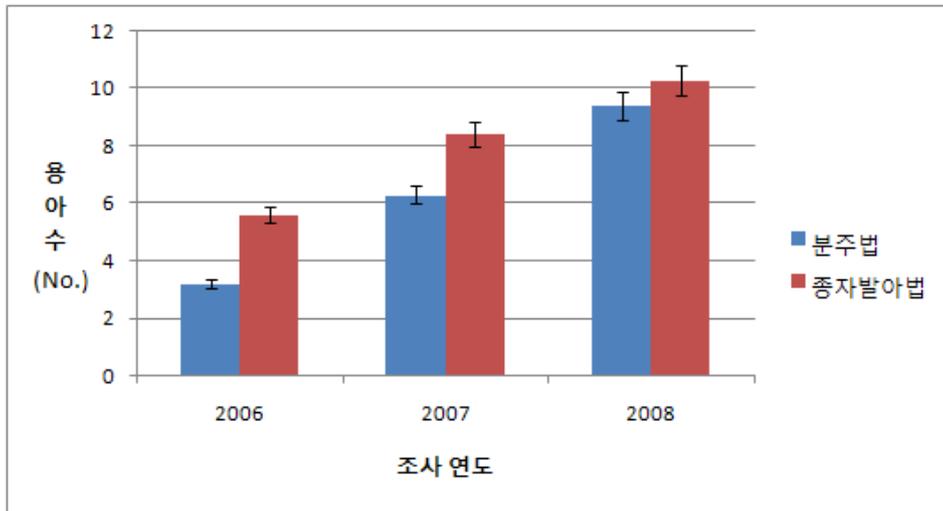


Fig. 7 증식방법에 따른 개체별 용아수의 변화

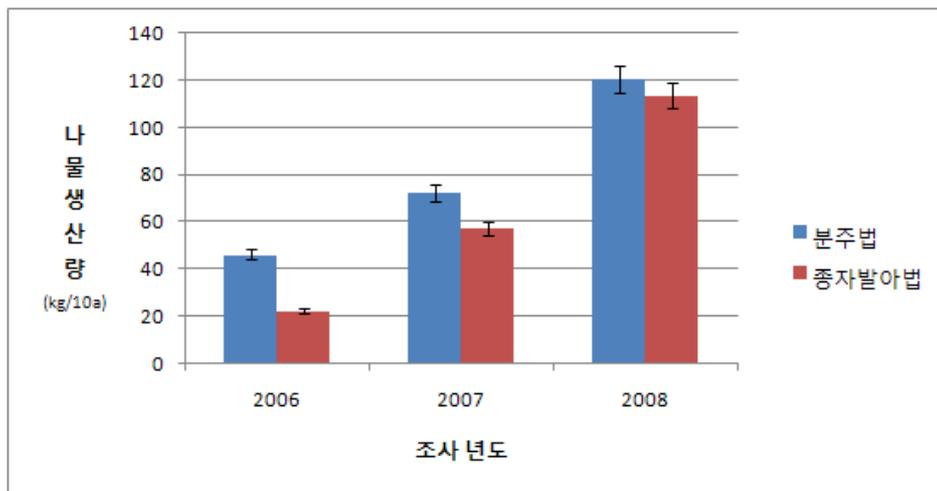


Fig. 8 증식방법에 따른 나물생산량(kg/10a)

3) 시비량에 따른 선학초의 생장

선학초의 시비량에 따른 생장조사는 선학초 종자를 발아시켜 50일간 pot에서 생육 후 잎이 3-4엽이 되었을 때 포장에 30cm x 30cm의 간격으로 이식하여 다른 약용작물에서 사용되는 성분비율을 바탕으로 임의로 선정한 질소(N)과 인산(P₂O₅) 그리고 칼륨(K₂O)의 성분비율(N-P₂O₅-K₂O)을 처리한 후에 선학초의 생장량을 측정하였다.

질소, 인산, 칼륨의 비율에 의한 선학초의 생장량을 알아보기 위하여 수행된 실험에서 각 시비수준은 무처리와 비교하여 조사하였는데 N-P₂O₅-K₂O의 비율이 22-10-10일때 가장 생장율이 좋았다. 특히 질소질 비료의 효용성은 12-10-10과 비교하였을 때 월등한 생장량을 나타내었다. 하지만 다른 요소들인 인산과 칼륨의 경우 비교 처리된 양이 반으로 줄어들어도 생장량은 낮아졌지만 질소보다는 덜 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 또한 선학초는 수확물이 있을 포함한 줄기 부분이기 때문에 주로 질소질 비료의 효용성이 큰 것으로 판단된다.(Table 5)

Table 5. 시비량에 의한 선학초의 생장비교

처리량 (N-P ₂ O ₅ -K ₂ O)	초장(cm)	싹수(No.)	엽수(No.)	건물중 (kg/10a)
Control	21.3	2.4	24.8	140.7
12-10-10	54.6	3.1	49.4	632.0
22-10-10	59.2	3.6	68.7	821.2
12-20-10	56.1	3.6	49.3	632.8
12-10-5	51.7	3.4	38.7	541.1
22-5-10	52.1	3.3	52.9	686.4

4) 차광에 따른 선학초의 생장

차광정도가 선학초의 생장에 미치는 영향을 파악하여 선학초의 재배 가능성을 탐색하고자 선학초의 종자를 임의로 발아시켜 파종하고, 유묘가 5엽이 될 때까지 30일간 키운 후에 증식하여 최종 수확까지 흑색 차광막을 이용하여 직사광의 35, 55, 75, 95%로 차광하거나 직사광을 그대로 받는 대조구 무차광으로 구분하여 처리하였다.

선향초의 수확은 일반적으로 화대가 나오기 직전으로 60일 동안 성장시켜 분석하였다.

시험결과 차광정도가 증가함에 따라 선향초의 엽수와 경직경, 생체중은 줄어들었다. 하지만 초장은 차광정도에 영향을 받지 않았다. 특히 차광율이 높을때는 성장초기에 웃자람 현상이 나타나서 선향초의 초장은 무차광과 비교하여 빨리 자랐으나 엽수와 경직경 자체가 훨씬 작아서 지상부 생체중 자체에서 상당한 차이를 보였다.

Table 6. 차광정도에 따른 선향초의 성장 비교

차광율(%)	초장	엽수	경직경	생체중
무차광	47.3	42.4	5.33	44.7
35%	48.2	36.3	4.22	36.4
55%	49.3	29.3	2.44	33.3
75%	47.2	18.9	1.91	26.4
95%	52.1	12.1	1.42	22.3

5) 나물생산을 위한 보온 및 차광효과

위의 결과에서 얻은 최적 시비량인 N-P₂O₅-K₂O의 비율이 22-10-10일 때와 무차광에서 보이는 성장량의 최대화는 생약재료인 선향초의 생산을 위한 수확을 기준으로 측정하였으므로 나물생산을 위해서는 다른 기준이 필요하였다. 이에 본 연구진은 나물생산을 위해서는 초기 보온 및 차광을 이용하여 나물생산의 수율을 높이기 위한 연구를 진행하였다. 초기 보온방식은 종자발아법을 통하여 발아시킨 후 50일간 육묘기간을 거쳐 2006년도 4월 20일에 정식한 식물체를 1년간 재배 수확 후 이듬해 짚신 나물의 용아가 땅속에서 싹을 튀우는 시기인 2007년 2월 20일에 가온을 위한 비닐터널을 설치하여 조사하였고, 차광은 무차광에 비해 생약재의 생산량은 적었지만 나물로 이용할 때 식미감이 좋고, 생약재 생산량의 차이가 적은 차광율 35%에서 나물생산량을 조사하였다. 차광율 35%에서의 나물생산방법은 보온처리와 같은 방식으로 정식 후 이듬해 식물체가 지상부 성장을 시작하는 시점인 2007년 3월 18일에 포장에 검은색 차광막(차광율35%)을 씌워서 나물생산량을 조사하였다. 나물 수확은 2007년 4월 1일부터 10일로 간격으로 절간성장 전까지 수확하였다.

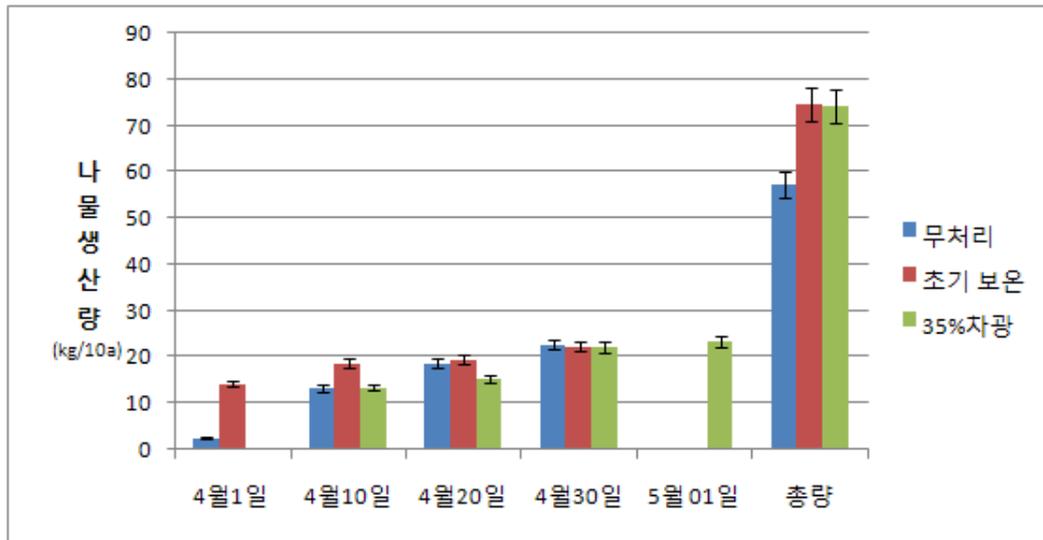


Fig. 9. 초기보온 및 차광효과가 나물생산에 미치는 영향

시험결과 첫 수확시기인 4월 1일에는 초기가온을 가한 포장에서 생산량이 월등히 높았으나 35%차광에서는 무처리에 비해 광량이 적은 이유에서인지 초기 생장이 좋지 않아 수확물을 얻을수 없었다. 그러나 다음 수확한 4월10일, 20일, 30일까지는 차츰 차이가 좁혀져서 4월 30일 경에는 무처리와 비슷한 성장량을 보였다. 하지만 5월 1일경에는 초기보온과 무처리는 벌써 절간생장을 시작하여 나물을 생산할 수 없었으나, 35%차광에서는 약간의 절간생장이 있었지만 나물로 활용 가능한 수확물을 얻을 수 있었다. 또한 총 생산량에서도 초기가온과 35%차광을 한 포장에서 무처리보다 더 많은 나물을 생산할 수 있었다.

이상의 결과로 짙신나물의 용아가 땅속에서 싹을 튀우는 시기인 2월 20일경에 보온을 위한 비닐터널을 설치하여 지온을 높혀 주고, 식물체가 지상부 성장을 시작하는 3월 18일경에 35% 차광을 하여 재배하면 짙신나물 생산성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

6) 기능성물질 함량

선학초에 존재하는 기능성물질은 주로 폴리페놀화합물로서 제 2세부과제에서 분리되었고, 각각 부위별과 생장 시간에 함량분석도 제 2세부과제에서 되었지만, 선학초의 재배 시 차광과 비료성분비에 따른 페놀화합물의 함량변화를 분석하고자 시험을 수행하였다.

시험방법은 페놀성화합물의 분석은 Folin-ciocalteau 방법에 따라 10ml의 시험관에 시료 1ml와 증류수 5ml을 첨가하고 여기에 1ml Folin-ciocalteau시약을 넣어 혼합하고 3분간 정치시킨다음 10% Na₂CO₃용액 1ml을 가하여 혼합한 후 적정배율로 희석하여 1시간 방치하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출을 위한 용매는 MeOH를 사용하였고, 차광과 비료성분비율이 다르게 재배한 선학초를 대상으로 무처리와 비교하여 페놀화합물의 함량을 측정하였다.

시험결과 시비성분비율(N-P₂O₅-K₂O)중 가장 생장이 좋았던 22-10-10(N-P₂O₅-K₂O)에서 페놀화합물 함량이 가장 높았지만, 뚜렷한 차이는 없었다. 하지만 차광정도를 달리하여 재배한 경우에는 차광 정도가 증가 할수록 차광을 하지 않았을 때보다 페놀화합물의 함량이 줄어드는 경향을 나타내었다. 특히, 무차광과 35%차광에서는 페놀화합물의 양의 차이가 많이 발생하지 않았으나 55%이상의 차광에서는 총 페놀화합물의 양이 현저히 줄어들었다.

Table 7. 시비량에 따른 총 페놀화합물 함량

시비량(N-P ₂ O ₅ -K ₂ O)	Total phenolics(mg/100g)
	MeOH ext.
12-10-10	1,352.94
22-10-10	1,402.33
12-20-10	1,381.21
12-10-5	1,365.48
22-5-10	1,362.41

Table 8. 차광정도에 따른 총 페놀화합물의 함량

차광율	Total phenolics(mg/100g)
	MeOH ext.
CK	1,422.35
35%	1,342.94
55%	946.86
75%	854.37
95%	712.11

다. 요약

이상의 시험결과로서 선학초의 생장은 4월까지의 절간생장을 하지 않아서 나물로 이용하기 용이하나 5월부터는 절간생장이 시작됨으로서 식미감이 떨어져 나물로 이용하기 위해서는 4월 이전에 채취하는 것이 좋다. 5월 이후 생약재로서 이용하고자 할 때는 무차광일때 가장 생장이 좋았고, 시비량은 N-P₂O₅-K₂O의 비율이 22-10-10일때 가장 좋았다, 또한 총 페놀화합물량도 무차광과 N-P₂O₅-K₂O의 비율이 22-10-10일때 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

또한 나물로서 활용하기 위해서는 협동과제에서 실험된 안정성 실험에서 독성이 없다는 결과를 얻을 수 있었으며, 나물로 활용하는데 전혀 결격의 사유가 없음이 밝혀졌다. 이에 나물생산을 위한 최적 재배기술을 시험한 결과 증식방법은 종자발아법이 분주법에 비해 재배 초기 1~2년간은 용아수나 나물생산량이 적었지만 3년이상 재배 시에는 비슷한 수준으로 접근함을 알 수 있었다. 또한 종자를 이용한 번식은 분주법에 비해서 대규모 포장 형성에 유리하고 한 것으로 생각된다. 이에 짚신나물의 나물생산을 위한 최적 증식 방법은 종자를 저온층적처리(4℃, 20days)후에 20~25℃에서 발아시켜 50일 이상 육묘한 것을 재배포장으로 이식하여 3년 이상 재배하면 안정적인 나물의 생산이 가능하다. 포장 조성 후 재배 시에는 짚신나물의 용아가 땅속에서 싹을 튀우는 시기인 2월 20일경에 가온을 위한 비닐을 설치하여 지온을 높혀주고, 식물체가 지상부 생장을 시작하는 3월 18일경에 35% 차광을 하여 재배하면 짚신나물 생산성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

3. 병해 방제 기술 개발

가. 식물병 발생 생태

1) 흰가루병의 특성

짚신나물 흰가루병은 장마 전의 가뭄기인 5월에서 6월 사이와 8월 말부터 9월 사이에 주로 발생되었다. 흰가루병은 줄기와 종피에 발생하기도 하나 주로 잎에 발생하며, 처음에는 군사가 발달한 후 분생포자경위에 연쇄상의 무딘 톱날 같은 표면을 가진 (Crenate) 분생포자를 형성하며, 내부에 전형적인 Fibrosin 체가 존재하였다. 발병초기에는 표면에 소량의 흰가루가 밀생하며, 진전되면 잎 전체가 흰가루로 뒤덮였다. 오래된 병반상에서는 흰가루가 회백색으로 변하고, 병든 잎은 고사한다. *Sphaerotheca aphansis*는 진균계의 자낭균문에 속하는 순 활물기생균 (절대기생체)으로 인공배양이 되지 않으며 병원균은 분생포자와 자낭포자를 형성하지만 짚신나물에서는 자낭세대가 확인되지 않았다 (Fig. 1). 짚신나물 다량재배시 관찰되는 유일한 병인 흰가루병의 병원균 *Sphaerotheca aphansis*는 세잎양지꽃 (*Potentilla freyniana*)에서 관찰되는 발병형태 (Shin & La, 1992)와 본 시험에서 관찰된 자낭구에 발달한 부속사의 길이, wall-cell의 크기, 부속사의 수를 비교분석한 결과 기주식물만 다른 동종의 병원균으로 동정되었다.

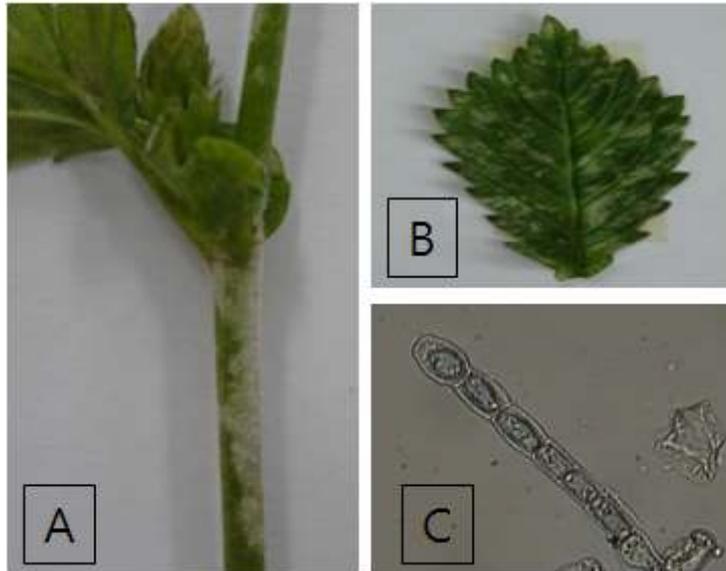


Fig. 10. Powdery mildew of *Agrimonia pilosa* and morphological characteristics of *Sphaerotheca aphansis*. Symptom on stem (A), leaf (B) and conidia (C)

나. 식물병의 친환경적 방제

1) 연구수행내용 및 방법

가) 재배 관리 및 흰가루병의 확인

시험에 이용된 짚신나물은 2005년 전남 광양 백운산에서 채집하여 경상대학교 부속농장에 정식하여 2년간 증식한 후에 2006년 3월 22일에 분주하여 재배하였다. 시험포장은 물빠짐이 극히 좋은 사양토이었으며, 관수는 정식 직후 7일간은 매일, 그 후부터는 20일간은 5일 간격으로 행하였다. 시험구 배치는 난괴법 3반복으로, 처리구의 면적은 10 m²이었다. 흰가루병은 발생초기 육안으로 먼저 병징을 확인한 후에 이병 식물체를 광학현미경으로 검경하여 병원균 (*Sphaerotheca aphans*)을 확인하였다.

나) 난황유 제조 및 처리

난황유의 제조는 지 등(2008)의 방법에 의하여 식용유인 유채기름(카놀라유)을 계란노른자로 유화시켜 만들었다. 물 100 ml에 계란노른자 1개를 넣고 혼합기로 2~3분간 혼합한 것에 식용유 60 ml을 첨가하여 다시 5분 이상 충분히 혼합시킨 다음 식용유가 0.5% 농도가 되도록 물로 희석하여 조제하였다. 이렇게 제조된 난황유는 흰가루병 발생 초기 짚신나물의 모든 경엽에 고루 살포하였다. 난황유의 처리는 1회, 2회 및 3회로 각각 나누어 실시하였는데, 1회 처리는 2007년 8월 30일, 2회 처리는 8월 23일과 30일, 3회 처리는 8월 16일, 23일과 30일 7일 간격으로 처리하였다.

다) 발병도 평가

짚신나물에 대한 발병정도 평가는 경엽에 나타난 흰가루병의 병반면적지수로 산출하였다. 병반의 형성 정도에 따라 발병도를 0에서 5까지 부여하였으며, 0은 전혀 감염되지 않은 경우, 1은 경엽에 흰가루병 병반이 1~5개, 2는 흰가루병 병반이 6~10개, 3은 흰가루병 병반이 11~15개, 4는 흰가루병 병반이 16~30개, 5는 흰가루병 병반이 30개 이상 형성된 경우를 기준으로 조사하였다. 흰가루병에 감염된 짚신나물의 잎을 상위에서 30개씩을 3회 반복하여 무처리와 난황유 1회 처리구, 2회처리구, 3회 처리구로 나누어 조사하였다. 짚신나물 흰가루병 방제효과는 최종 처리 7일 후에 시작하여 7일 간격으로 처리 후 28일까지 조사하였다.

2) 시험결과

가) 난황유 처리에 의한 짚신나물 흰가루병 방제 효과

난황유 처리에 의한 짚신나물에 발생하는 흰가루병의 방제효과를 알아 보기위해 7

일 간격으로 난황유 처리횟수를 달리할 때 처리별 방제효과는 Table 1과 같다. 흰가루병의 발생은 무처리구에서 2.08 정도로 난황유의 처리효과를 평가하기에 충분하였다. 난황유 처리로 인한 흰가루병의 방제 효과는 무처리와 비교하여 1회 처리시에 27.0%의 방제율을 나타내었고, 2회 81.8%, 3회 82.7%를 각각 나타내었다. 이상의 시험결과로 부터 짚신나물의 흰가루병을 방제하기 위한 난황유의 처리는 무처리와 비교 하였을때 1회 처리구에는 27%의 방제가를 나타내어 방제효율이 낮은 반면, 2회 이상 처리구에서는 80% 이상의 높은 방제가를 보였다. 따라서 짚신나물의 흰가루병 방제는 난황유를 7일 간격으로 2회 이상 살포하는 것이 효과적인 방법으로 사료된다.

Table 9. Control efficacy of COY-treated *Agrimonia pilosa* on the powdery mildew.

Treatment	Disease incidence*				Control value (%)
	I	II	III	Mean	
Single	1.52	1.44	1.59	1.52b**	27.0
Double	0.30	0.24	0.66	0.40c	81.8
Triple	0.22	0.41	0.44	0.36c	82.7
Untreated	2.16	1.89	2.19	2.08a	-

COY was prepared as follows: One egg yolk was added to 60ml H₂O, which was mixed for 2–3min; add 100 ml cooking oil to above preps and mixing for 5min to fully emulsified; The preps were fully diluted up to the final volume of 20 liter. COY was sprayed to the Agrimonia plant just enough to the drop flows from surface. Spray schedule was single spraying, double and triple spraying at weekly interval.

*Disease incidence was rated 7days after final treatment.; Disease index; 0, no symptom; 1, disease spots 1–5; 2, disease spots 6–10; 3, disease spots 11–15; 4, disease spots 16–29; 5, disease spot 30 overing most of leaf surface.

**Means followed by the same letter within the column are not significantly different at LSD.

0.5

나) 난황유 처리가 짚신나물 흰가루병의 억제 지속 효과

난황유 처리가 짚신나물의 흰가루병의 방제에 미치는 지속적인 영향을 알아보기 위해 1회, 2회, 3회로 처리회수를 달리하여 처리한 후 28일까지 발병도를 조사한 결과 Fig. 2와 같다. 처리 모두 처리 후 7일까지는 흰가루병이 억제되는 경향을 보였지만, 1회 처리 시에는 7일 이후 발병이 증대된 반면, 2회 및 3회 반복 처리하였을 시에는 최종처리 후 28일 후 까지도 발병이 억제 되는 경향을 보였다.

짚신나물은 우리나라 전역에 분포되고 있으나, 현재까지 그 잠재적 가치에 대해서는 관심을 갖지 못하였다. 최근 들어 기능성식품 자원으로서 짚신나물을 보존·이용하려는 노력이 국내외적으로 집중되고 있을 뿐만 아니라 국내 기초단체들에서도 이의 대량생산을 시도하고 있다. 이와 같이 대량생산체계가 도입되면 식물 병·해충의 발생은 불가피할 뿐만 아니라 경제적 손실도 클 것이다. 특히 흰가루병은 흰가루병균과 (*Erysipheaceae*)에 속하는 균류로서 모든 식물에 피해를 끼치는 병원균이다 (Shin, 2000). 이러한 흰가루병의 방제는 최근 일본에서 potassium silicate가 필수염류는 아니지만 딸기 양액재배시 공급하면 식물체내에 집적되어 딸기 흰가루병 발생 억제 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나 (Kauto *et al.*, 2004), 국내에서는 선학초에 목초액을 살포한 결과 방제효과가 미미한 것으로 보고되고 있다 (Lee, 2001). 그러나 짚신나물은 약용 또는 채소로서 이용되기 때문에 양액 재배보다는 자연 토양에서 재배하는 것이 바람직하고 또한 병해 방제도 친환경적이어야 할 필요가 있다. 이상의 시험결과로부터 짚신나물에 발생하는 흰가루병의 방제를 위해서는 농약에 의존하는 것보다는 발병초기 난황유를 7일 간격으로 2회 처리하는 것이 가장 바람직한 방제방법으로 사료된다.

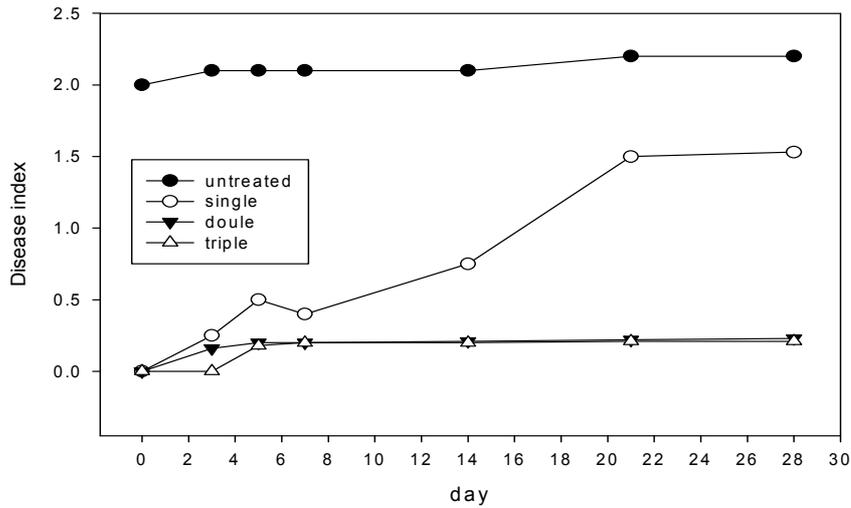


Fig. 11. Disease progress as affected by COY-treatment. Disease rating was done at indicated number of days up four weeks after final spray. Refer to footnote of Table1. for the details.

다. 요약

약용작물인 짚신나물에 발생하는 흰가루병의 병원균은 *Sphaerotheca aphanis*이고, 장마전 건조기인 5~6월과 8월 말에서 9월까지 2차례 발병하였다. 흰가루병은 잎, 줄기 및 종자 모두에서 관찰 되었다. 난황유 처리에 의한 흰가루병 방제는 무처리와 비교하여 1회 처리시에 27.0%, 2회 81.8%, 3회 82.7%의 방제율을 보였다. 처리 회수에 관계없이 처리 직후에는 흰가루병의 방제 효과가 뚜렷하였으나 1회 처리시에는 처리 7일 후에는 다시 증가하였던 반면, 2회 및 3회 처리시에는 처리 후 28일까지도 발병이 억제 되는 경향을 보였다. 따라서 짚신나물 흰가루병은 난황유를 7일 간격으로 2회 이상 처리하는 것이 바람직한 방제 방법이라고 할 수 있다.

제 2 절 선학초로부터 생물활성 물질의 분리와 구조 확인 및 합성방법 연구

1. 약효물질 대량 확보 방법 확립

가. 추출물 제조

1) 식물체 재료

본 실험에 사용된 쑥신나물은 대한식물도감(이창복 1989) 등을 참고로 하여 경상대학교 실험농장에서 재배하여 채취하였으며, 그늘에 말려 급게 간 후 실험재료로 사용하였다.



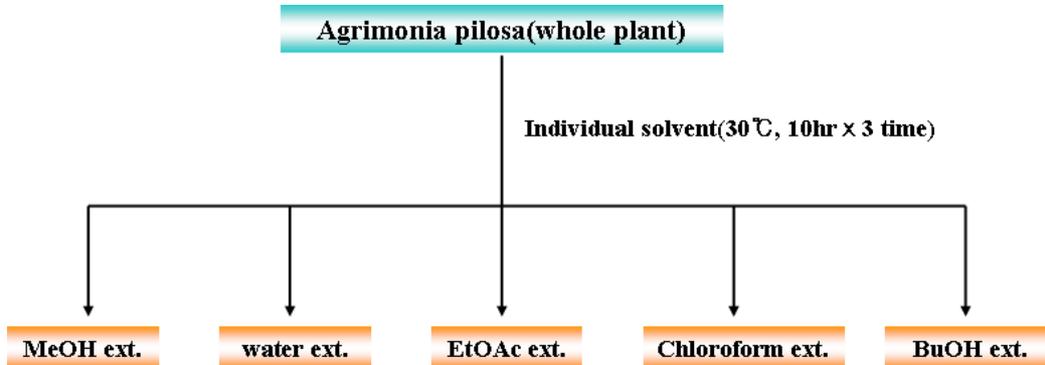
2) 시약

식물체의 추출 및 유효성분의 분리에 사용된 CHCl_3 , CH_2Cl_2 , EtOH, MeOH, ethyl acetate, diethyl ether 와 *n*-Hexane 등의 용매는 특급 또는 일급을 정제하지 않고 사용하였다.

3) 시료추출

선학초는 제 1세부과제에서 재배한 것과 공동으로 채취하여 분류한 것을 활용하여 실험을 진행하였다. 선학초로부터의 추출은 물, 메탄올, 에틸아세테이트, 다이클로로메탄, 헥산의 4 가지 극성 용매와 비극성인 헥산에 의하여 수행되었으며 5 가지 용매 모두 다음의 일반적인 방법에 의하여 이루어졌다.(Park 등 1991) 재배 및 채취된 선학초 건조 시료 각 1Kg 씩을 추출과 분석을 위해 잘게 썰어서 분쇄하였다. 분말

형태로 분쇄한 시료를 각 용매 (3 L)에 현탁시키고 5시간 동안 50°C로 가열하여 뷔흐너 깔대기의 바닥에 여과지를 깔고, 그 위에 celite를 깔아서 걸른 다음 용매를 날려서 추출물을 얻었다. 이 실험을 두 번 수행하여 모두 합쳐서 추출물의 총량을 계산하였다.



추출물의 양은 메탄올이 가장 많았으며 물, 에틸아세트, 클로로포름, 부탄올의 순서였으며, 추출물은 모두 공기 중에서 검은색의 고체 형태로 얻어졌다(Park 등 1991).

4) 시료특성확인

혼합물로 되어 있는 추출물의 순수 시료를 얻기 위하여 먼저 대략적으로 혼합물 상태의 화합물의 성질을 알아두는 것이 그 물질을 취급하는데 도움이 된다. 그러므로 일반적인 물성을 확인하였다.

선학초의 추출물은 아세톤, 에틸아세테이트, 메탄올 추출물에서 거의 비슷한 성질을 나타낸다. 물, 에탄올 및 기타 극성 유기용매로부터 추출된 선학초 추출물은 대부분 진한 녹색의 슬러지 형태이다. 모두 공기 중에 방치하면 쉽게 고체화되어 딱딱한 검은색 물질이 되며, 고체화 된 다음에는 쉽게 찬물에 녹지 않는다. 그러나 따뜻한 물에서 계속 저어주게 되면 모두 녹게 된다.

검은색의 물질을 물에 희석시키면 진한 연두색의 슬러지가 되며(30분간 교반), 이를 필터페이퍼를 이용하여 거르면 맑은 주황색으로 된다. 이 주황색 수용액을 이용하여 액성(산성 혹은 염기성)을 측정하고 몇 가지의 작용기(히드록시기, 케톤, 알데히드, 카르복시산)를 확인하였다.

작용기를 확인하는 실험은 알려진 간단한 방법을 이용하였으며 알코올, 아민, 알데

히드, 카르복시산 작용기의 유무를 확인하였다. 이들 작용기의 확인에서 알코올과 아민, 카르복시산의 경우 가장 간단한 방법이 분광학에 의한 것이다. 고체화된 추출물을 KBr 디스크로 만들어 IR을 측정하였다.

물에 희석된 선학초의 추출물에 pH 페이퍼를 넣으면 노란색으로 변하게 되며 이로서 수용액은 산성으로서 pH가 4 정도임을 알 수 있다.

산성 화합물의 확인을 위하여 10ml 의 선학초 수용액에 1 N NaOH 수용액을 적가하여 당량점을 찾아보았다. 1N NaOH 2 ml이 들어가니 지시약으로 사용된 메틸블루의 색상이 진한 녹색으로 변함을 알 수 있었으며 이 결과에 의하면 상당량의 산성 물질이 포함된 것으로 판단된다.

그리고 수용액의 맛을 보면 대부분 신맛과 함께 진한 쓴맛을 느낄 수 있다. 신맛은 산성에 의한 결과인 것으로 판단하며 쓴맛은 추출물 속에 포함된 상당량의 탄닌에 의한 것으로 판단된다. 문헌에 알려진 바에 의하면 상당량의 탄닌 성분이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 맛을 통해 탄닌의 존재를 확인할 수 있다.

나. 유효성분 분리방법 최적화

1) 칼럼크로마토그래피를 이용한 화합물 분리

가) 시 약

칼럼크로마토그래피용 실리카 겔 60 (70 ~ 230, 230 ~ 400 mesh, Merck 사), precoated silica gel 60 GF254 TLC 판 (20 × 20 cm, 0.25 mm, glass)은 Merck 사, NMR용 CDCl₃와 피리딘은 Aldrich 사 제품을 사용하였다. TLC에 흡착된 물질 중 UV에 확인이 불가능한 시료의 확인을 위하여 발색시약으로 phosphomolybdic acid (PMA)를 사용하였다.

나) 기기

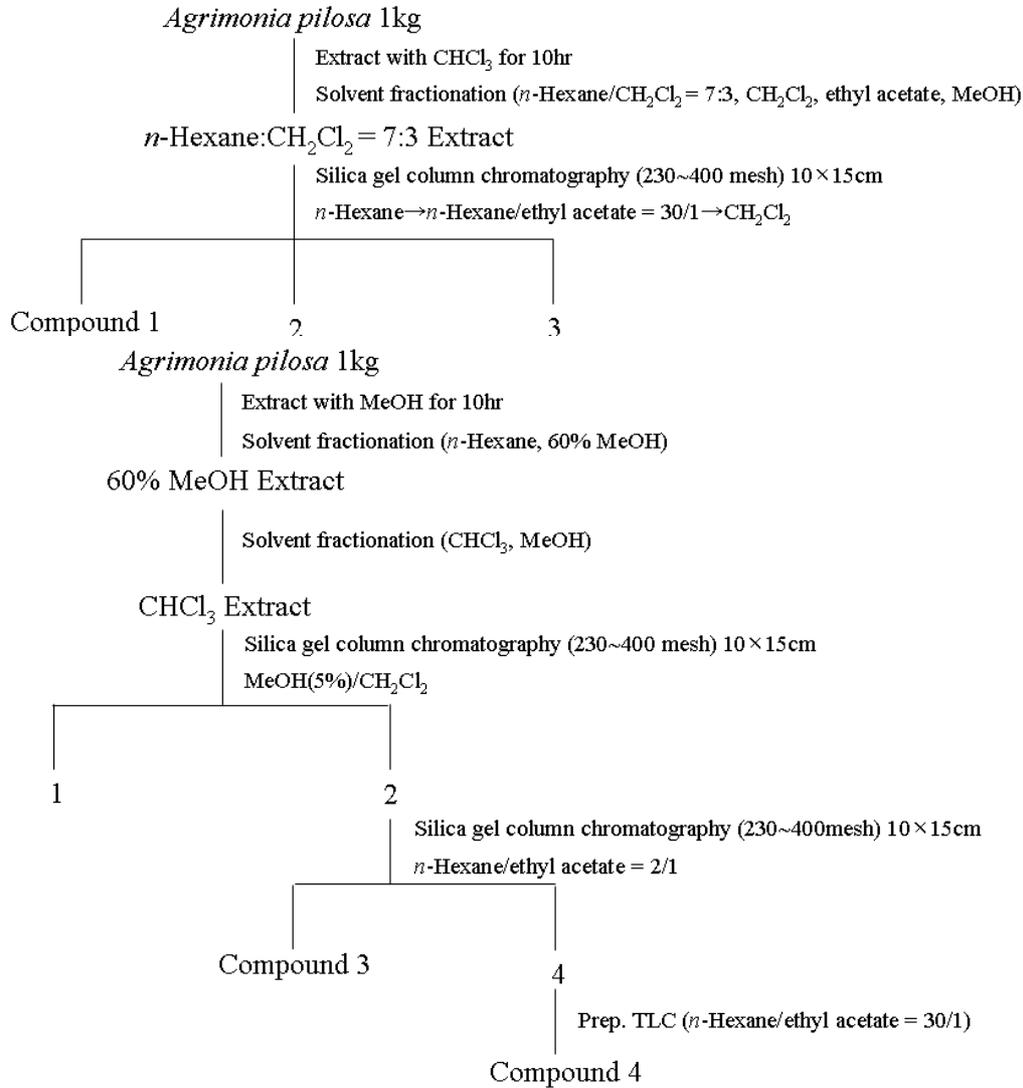
본 실험에서 유효성분의 분리 사용된 기기는 다음과 같다. Rotary evaporator (W-2011, EYLA), heating mantle (미성과학, E106), UV lamp (USA/AD20, Dionex)

다) 분리방법

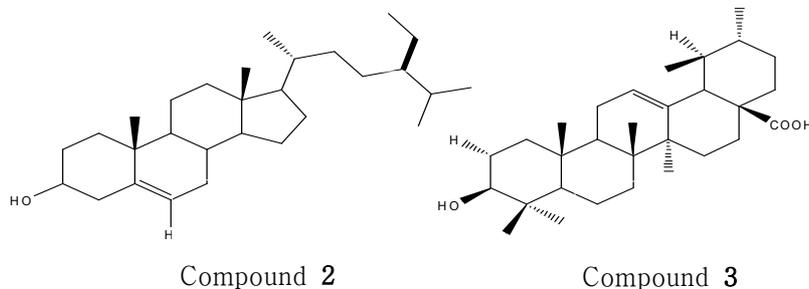
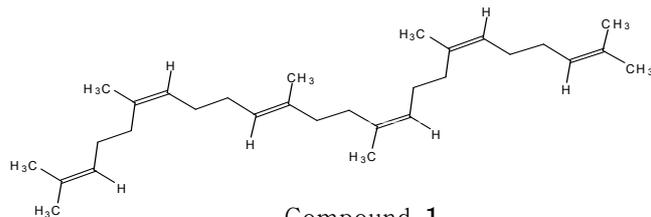
짚신나물 전초 1 Kg을 50℃에서 CHCl₃ 또는 MeOH 용매 2 L로 3회 반복하여 추출한 후 감압 회전증발기로 감압·농축하여 추출물을 얻었다. 이 추출물을 여러 가지 용매조합으로 실리카 겔 칼럼크로마토그래피를 이용하여 분리하였다. 분리전에 추출물을 TLC로 전개하였으며, TLC 전개양상에 따라 얻어진 각 분획물에 포함되어 있

는 물질들 중에서 UV_{254nm} 조사와 PMA로 발색시켰을 때 발색되는 반점들을 목표물질로 하여 분리하였다.

Scheme 1. Isolation of compounds from *Agrimonia pilosa*



Scheme 2. Isolation of compounds from *Agrimonia pilosa*



화합물 1 분리 : 짚신나물 전초로부터 얻은 CHCl_3 추출물 (30 g)을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 1.5 kg)로 충전시킨 칼럼 (8×35 cm)에 로딩(loading)하였다. *n*-Hexane / CH_2Cl_2 (7:3, v/v) 혼합 용매에서 용매의 극성을 높여가며 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{EtOAc} \rightarrow \text{MeOH}$) 칼럼 크로마토그래피 하였다. 용출액은 250 ml씩 분획 회수하였으며, 분획물의 분류기준은 TLC 판을 사용하여 상승 1차원 법으로 전개시킨 후 $\text{UV}_{254\text{nm}}$ 조사와 PMA로 발색시켜서 나타나는 TLC 형태에 따라 모아진 용출액을 4개의 분획물로 나누었다. 4개의 분획물 중에서 $\text{UV}_{254\text{nm}}$ 에서 나타나며, PMA에 발색이 되는 TLC 전개용매 *n*-Hexane / EtOAc (30/1, v/v)에서 R_f 가 0.6인 화합물을 분리하기 위해 *n*-Hexane / CH_2Cl_2 (7/3, v/v) 분획물을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh)을 충전시킨 칼럼 (1.2×20 cm, 100 g) 하였다. 그리고 *n*-Hexane을 용매로 사용한 칼럼 크로마토그래피 하여, 무색의 액상 물질 화합물 4 (30 mg)을 분리하였다.

화합물 2 분리 : 짚신나물 전초로부터 얻은 MeOH 추출물 (80 g)을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 1.5 kg)로 충전시킨 칼럼 (8×35 cm)에 로딩하였다. 그리고 *n*-Hexane에서 60 % MeOH로 용매의 극성을 달리하여 칼럼 크로마토그래피 하였다. 용출액은 1 L씩 분획 회수하였으며, 2개의 분획물로 나누었다. 2개의 분획물 중에서 60 % MeOH 분획물을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 100 g)로 충전시킨 칼럼 (8×35 cm)에 로딩하였다. 그리고 CHCl_3 에서 MeOH로 칼럼 크로마토그래피 하였다. 용출액은 1 L씩 분획 회수하였으며, 2개의 분획물로 나누었다. 그리고 2개의 분획물 중에서 CHCl_3 분획물을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh)을 충전시킨 칼럼 ($1.2 \times$

20 cm)에 로딩하였다. 그리고 MeOH (5 %) / CHCl₃으로 칼럼 크로마토그래피 하였다. 용출액은 50 ml씩 분획 회수하였으며, 3개의 분획물로 나누었다. 그리고 3개의 분획물 중에서 분획물 2를 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 100 g)으로 충전시킨 칼럼 (8 × 35 cm)에 로딩하였다. 분획물 2에서 UV_{254nm}에서는 나타나지 않으며, PMA에 발색이 되는 TLC 전개용매 *n*-Hexane / EtOAc (2/1, v/v)에서 R_f가 0.5인 화합물을 분리하고자 하였다. 용매로서 *n*-Hexane / EtOAc (2:1, v/v)을 사용하여 칼럼 크로마토그래피 하여, 무색의 액상 물질 화합물 5 (30 mg)을 분리하였다

화합물 3 분리 : 짙신나물 전초로부터 얻은 MeOH 추출물 (80 g)을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 1.5 kg)로 충전시킨 칼럼 (8 × 35 cm)에 로딩하였다. 그리고 *n*-Hexane에서 60 % MeOH로 용매의 극성을 달리하여 칼럼 크로마토그래피 하였다. 용출액은 1 L씩 분획 회수하였으며, 2개의 분획물로 나누었다. 2개의 분획물 중에서 60 % MeOH 분획물을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 1.5 kg)로 충전시킨 칼럼 (8 × 35 cm)에 로딩하였다. 그리고 CHCl₃에서 MeOH로 칼럼 크로마토그래피 하였다. 용출액은 1 L씩 분획 회수하였으며, 2개의 분획물로 나누었다. 그리고 2개의 분획물 중에서 CHCl₃ 분획물을 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 100 g)을 충전시킨 칼럼 (1.2 × 20 cm)에 로딩하였다. 그리고 MeOH (5 %) / CHCl₃으로 칼럼 크로마토그래피 하였다. 용출액은 50 ml씩 분획 회수하였으며, 3개의 분획물로 나누었다. 그리고 분획물 2에서 UV_{254nm}에서는 나타나지 않으며, PMA에 발색이 되는 TLC 전개용매 *n*-Hexane / EtOAc (2/1, v/v)에서 R_f가 0.4인 화합물을 분리하기 위해 실리카 겔 (230 ~ 400 mesh, 100 g)을 충전시킨 칼럼 (1.2 × 20 cm)에 로딩하였다. 그리고 *n*-Hexane / EtOAc (2/1, v/v)로 칼럼 크로마토그래피 하였다. 최종적으로 *n*-Hexane / EtOAc (2/1, v/v) 전개 용매로 분리용 TLC를 사용하여 무색의 액상 물질 화합물 6 (20 mg)을 분리하였다.

2) HPLC를 이용한 화합물 분리

(1) 시약

유효성분의 분리에 사용된 formic acid, MeOH, acetonitrile, water 와 등의 용매는 특급 또는 일급을 정제하지 않고 사용하였다.

(2) 기기

ChemStation woftware, model G1322 A 기체제거기, G1312A 두상 그래디언트 펌프, a model G1329/1330A의 열 자동시료 채취기, a model G1316 컬럼오븐, 다이오

드 배열 흡광 검출기가 장착된 Agilent HPLC, series 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany)를 사용하여 분석되었다.

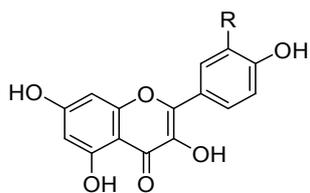
(3) HPLC 이동상 조건

HPLC 실험에서 최상의 peak를 얻기 위해서는 이동상의 조건이 중요하다. 이동상의 선택에 따라 천연물에서 분리할 수 있는 유효성분의 개수가 틀러지기 때문이다.

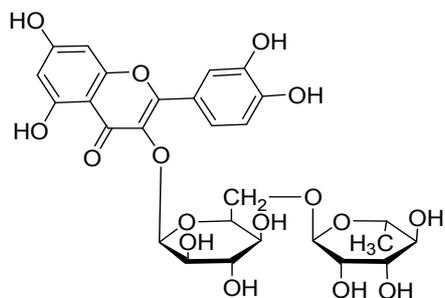
이동상 이동상 조성	컬럼의 종류
A Acetonitrile : 0.025M KH ₂ PO ₄ (30:70)	Z O R B O X
B Acetonitrile : 0.025M KH ₂ PO ₄ (30:70)	S B - C 1 8
C (A) 50mM ammonium dihydrogn phophatep H2.6 (B) 0.2mM ortho-phosphoric acid pH1.5 (C) 20% solvent A in 80% acetonitrile	Z O R B O X
D (A) 50mM ammonium dihydrogn phophatepH2.6 (B) 20% solvent A in 80% acetonitrile (C) 0.2mM ortho-phosphoric acid pH1.5	S B - C 1 8
E (A) 1% formic acid (B) acetonitrile	4.6×250mm
F solvent gradient (A) 0.1% formic acid (B) acetonitrile with 0.1% formic acid	
G (A) 0.1% formic acid(v/v) in water (B) 0.1% formic acid(v/v) in acetonitrile	
H (A) water/acetonitrile/acetic acid (980:20:5 v/v, pH 2.68) (B) acetonitrile/acetic acid(1000:5 v/v)	
I acetonitrile/1% formic acid in water(20:80)	

(4) HPLC를 이용한 유효성분 분리

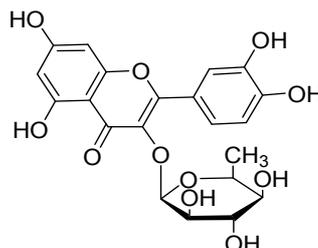
폴리페놀과 폴리페놀의 배당체 화합물들은 녹색식물에 널리 분포되어 있는 부류의 화합물들이다. 이들은 항산화 작용, 활성산소의 제거 또는 중금속 킬레이트로 작용하고(M. Satterfield 등 2000, K. Robards 등 2003) 항 박테리아 및 항바이러스, 알레르기 억제효과, 고혈압, 관절염, AIDS 등의 건강에 유익한 영향을 가져다주기 있기 때문에 많은 관심을 끌고 있다.(H. M. Merkin, 2000) 본 연구에서 관심을 가지는 생리활성을 나타내는 폴리페놀에는 Gallic acid, 4-hydrxylbenzoic과acidagricon이라고 부르는 kaempferol 및 quercetin (1)이 있다.(Park 등 1991, Park 등 1989, Park 등 2000)



R = H
1; R = OH

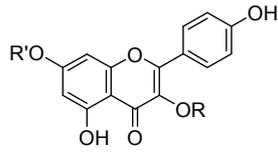


2. rutin

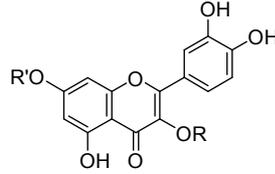


3. quercitrin

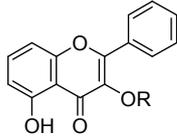
폴리페놀 배당체들에는 Quercitrin(2), rutin(3), kaempferol-3-O-β-D-glucoside (4), kaempferol-3-O-β-D-galactoside (5), kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside (6), 3-O-α-L-rhamnosyl-7-O-β-D-glucosylkaempferol (7), quercetin-3-O-β-D-glucoside (8), quercetin-3-O-α-L-rhamnoside (9), quercetin-7-O-β-D-glucoside (10), flavonol-3-O-D-lyxoside (11), cynaroside (12)등 의 11종이 있다.



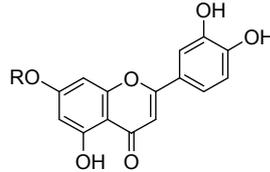
- 4; R = β -D-glucosyl, R' = H
 5; R = β -D-galactosyl, R' = H
 6; R = α -L-rhamnosyl, R' = H
 7; R = α -L-rhamnosyl, R' = α -D-glucosyl



- 8; R = β -D-glucosyl, R' = H
 9; R = α -L-rhamnosyl, R' = H
 10; R = H, R' = α -D-glucosyl



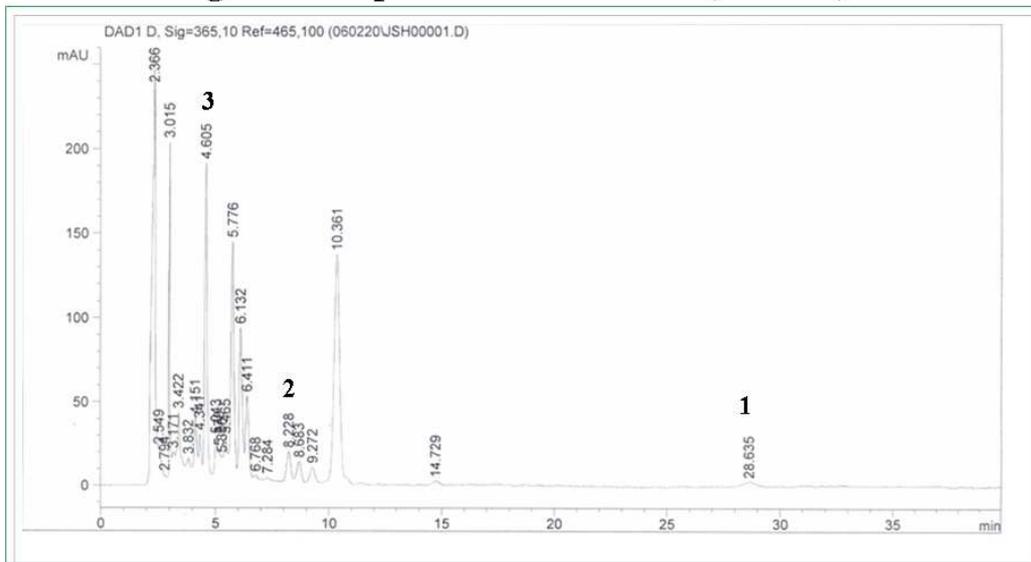
- 11; R = D-lyxosyl

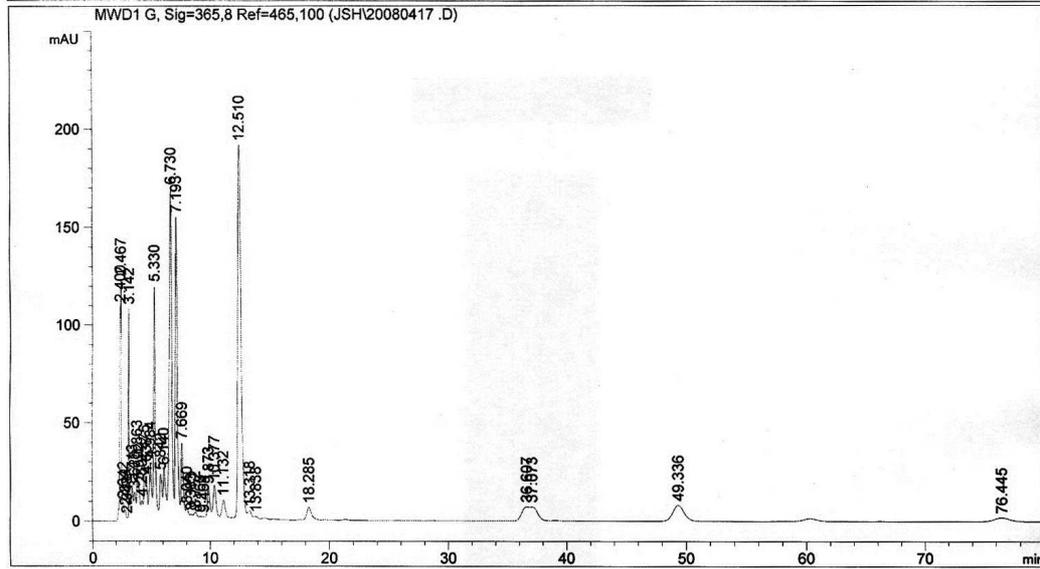
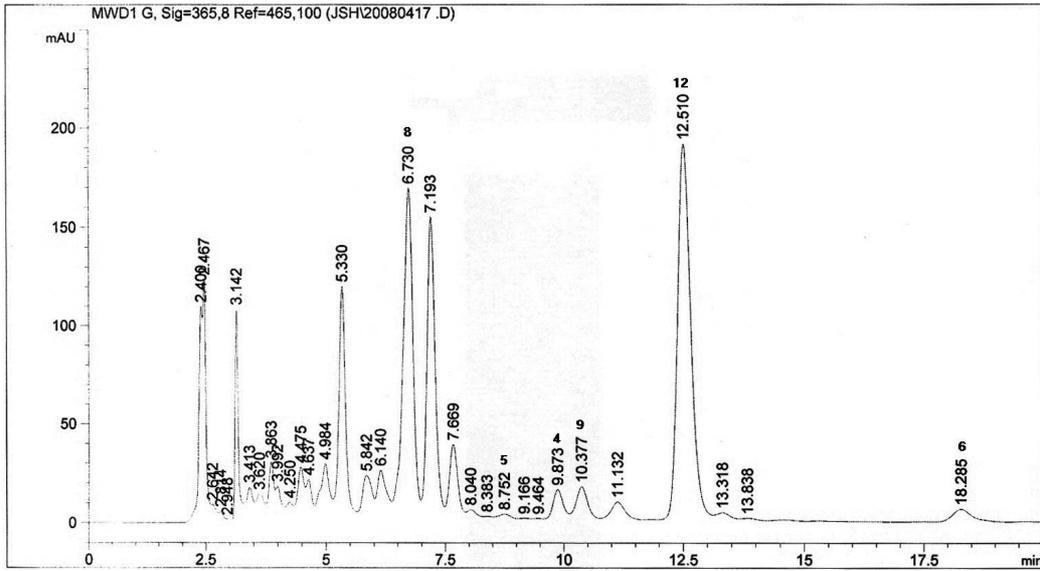


- 12; R = β -D-glucosyl

본 연구에서는 폴리페놀 표준물질 4종은 구입하여서 HPLC 실험을 수행하였다. 폴리페놀 배당체 중 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12의 표준물질 8종은 알려진 방법을 따라 자연산 선학초로부터 HPLC를 이용하여 분리하였다.

Agrimonia pilosa HPLC data(365nm)



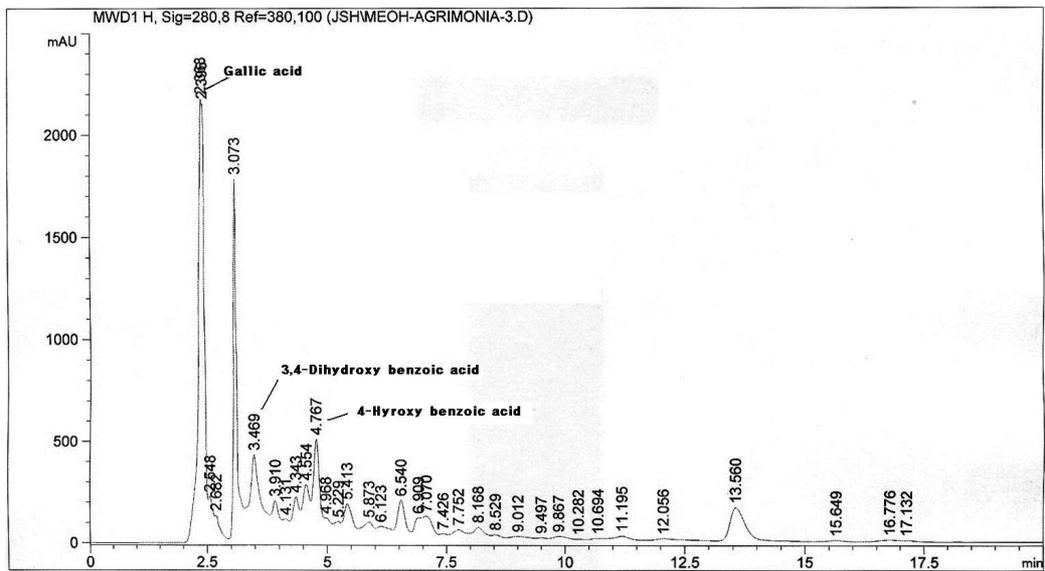
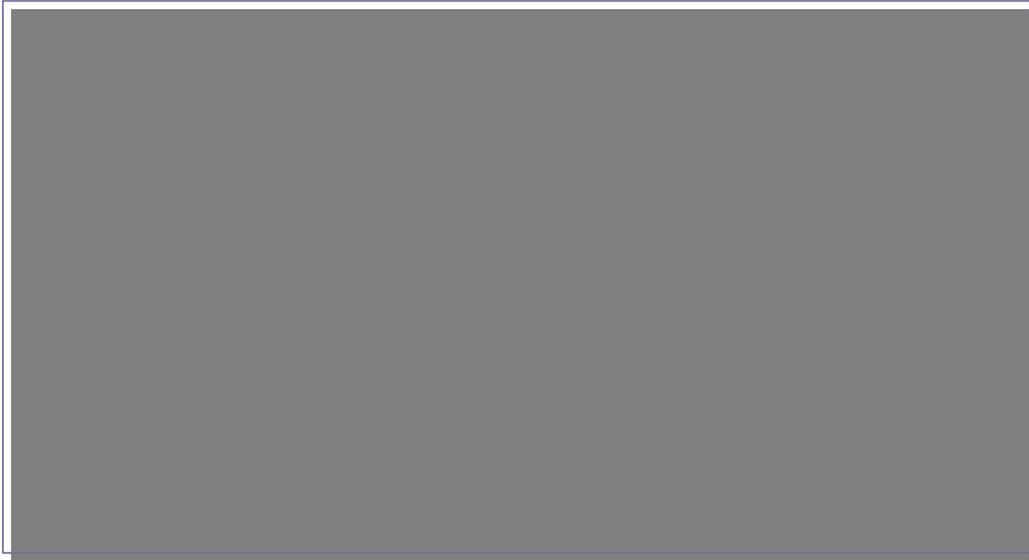


Signal 1: MWD1 G, Sig=365,8 Ref=465,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.400	BV	0.0738	544.35846	109.86734	3.2211
2	2.467	VV	0.0709	603.24475	123.67426	3.5696
3	2.642	VV	0.1048	68.85222	9.25357	0.4074
4	2.814	VV	0.0934	38.93541	5.87076	0.2304
5	2.948	VV	0.0815	11.59782	1.84045	0.0686
6	3.142	VV	0.0715	516.33063	108.48976	3.0553
7	3.413	VV	0.1371	174.87204	18.03638	1.0348
8	3.620	VV	0.1749	167.41547	14.47521	0.9906
9	3.863	VV	0.1127	236.22163	30.37273	1.3978
10	3.992	VV	0.1175	154.30629	18.47283	0.9131
11	4.250	VV	0.1409	103.87513	10.36354	0.6147
12	4.475	VV	0.1424	273.47034	27.89950	1.6182
13	4.637	VV	0.1249	184.35818	21.74757	1.0909
14	4.984	VV	0.1893	415.01523	29.65366	2.4558
15	5.330	VV	0.1481	1194.45251	120.01092	7.0679
16	5.842	VV	0.2288	350.40039	23.66413	2.0734
17	6.140	VV	0.2024	384.04294	26.30130	2.2725
18	6.730	VV	0.2171	2514.48828	169.48456	14.8790
19	7.193	VV	0.1847	1896.02661	154.95888	11.2193
20	7.669	VV	0.1986	520.76227	39.28804	3.0815
21	8.040	VV	0.2370	108.44724	6.48786	0.6417
22	8.383	VV	0.1774	37.47522	3.00715	0.2218
23	8.752	VV	0.3378	95.72492	4.10898	0.5664
24	9.166	VV	0.2281	33.79945	2.05289	0.2000
25	9.464	VV	0.2006	27.80538	1.90164	0.1645
26	9.873	VV	0.2399	264.89398	16.44399	1.5675
27	10.377	VV	0.2759	332.69287	17.81585	1.9686
28	11.132	VV	0.3512	246.18713	10.14224	1.4568
29	12.510	VV	0.2992	3760.15454	191.37460	22.2499
30	13.318	VV	0.3345	106.29664	4.65339	0.6290
31	13.838	VV	0.3505	43.56268	1.79924	0.2578
32	18.285	BB	0.4232	177.72282	6.29905	1.0516
33	36.607	BV	0.6310	302.47345	7.12951	1.7898
34	37.073	VB	0.6731	314.59396	7.04342	1.8615
35	49.336	BB	0.9945	533.07507	8.11367	3.1544
36	76.445	BB	1.0576	161.69940	1.85392	0.9568

Totals : 1.68996e4 1353.95279

Agrimonia pilosa HPLC data(280nm)



Signal 1: MWD1 H, Sig=280,8 Ref=380,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.368	BV	0.0763	1.20069e4	2179.28979	14.8089
2	2.396	VV	0.0558	7728.60986	2156.07129	9.5322
3	2.548	VV	0.0952	1553.59790	228.79031	1.9162
4	2.682	VV	0.1094	1107.58374	135.42337	1.3661
5	3.073	VV	0.0719	8856.37891	1784.46655	10.9231
6	3.469	VV	0.2233	7478.80908	433.53442	9.2241
7	3.910	VV	0.1551	2357.34985	206.66847	2.9075
8	4.131	VV	0.1274	1018.77887	114.97141	1.2565
9	4.343	VV	0.1434	2259.71362	224.64023	2.7871
10	4.554	VV	0.1502	2943.68384	285.80994	3.6306
11	4.767	VV	0.1451	5108.83594	509.01498	6.3011
12	4.968	VV	0.1288	1081.29712	120.31890	1.3336
13	5.229	VV	0.1410	1055.01965	101.71653	1.3012
14	5.413	VV	0.2123	2638.52246	189.66203	3.2543
15	5.873	VV	0.2628	1828.99695	99.33498	2.2558
16	6.123	VV	0.2685	1549.50757	79.12506	1.9111
17	6.540	VV	0.1891	2671.65918	206.31021	3.2951
18	6.909	VV	0.1421	1130.35730	119.73535	1.3941
19	7.070	VV	0.2472	2163.23804	127.97480	2.6681
20	7.426	VV	0.1584	454.70609	41.31037	0.5608
21	7.752	VV	0.2794	1184.72229	60.24170	1.4612
22	8.168	VV	0.2846	1522.90588	72.63435	1.8783
23	8.529	VV	0.2277	563.02527	35.37812	0.6944
24	9.012	VV	0.4259	890.40240	27.63739	1.0982
25	9.497	VV	0.2267	322.07120	20.34645	0.3972
26	9.867	VV	0.3995	709.58978	26.92062	0.8752
27	10.282	VV	0.1957	186.11026	13.59443	0.2295
28	10.694	VV	0.2733	311.59991	16.42434	0.3843
29	11.195	VV	0.4395	881.24915	27.38362	1.0869
30	12.056	VV	0.6552	776.65826	15.37723	0.9579
31	13.560	VB	0.3383	3696.55811	165.68730	4.5592
32	15.649	BV	0.3483	122.90372	5.38510	0.1516
33	16.776	VV	0.4108	273.12183	9.51856	0.3369
34	17.132	VV	0.3001	122.57549	6.16187	0.1512
35	21.000	VV	0.5056	77.57594	2.20960	0.0957
36	22.474	VB	0.4509	290.59290	10.00369	0.3584
37	28.981	VV	0.6095	257.53845	6.40015	0.3176
38	30.245	VB	0.6692	77.94155	1.70537	0.0961
39	33.029	BB	0.6640	199.58322	4.58377	0.2462
40	39.015	BV	0.7559	121.06264	1.91917	0.1493
41	40.557	VB	0.7316	238.19312	5.00175	0.2938
42	55.656	BB	1.1150	1049.23901	14.59016	1.2941
43	68.056	BB	1.2919	210.25061	2.07890	0.2593

Totals : 8.10790e4 9895.35268

나) 약효성분을 가진 화합물의 구조 확인

(가) 유효성분 구조 분석

1) 시약

IR용 KBr의 Fluka 사 제품을 사용했고 NMR용 CDCl_3 와 피리딘은 Aldrich 사 제품을 사용하였다.

2) 기기

IR (FTIR-8400S, SHIMADZU), MS (JMS, DX300), NMR (Bruker, AW300, AW500), Hybrid tandem mass spectrometer[Applied Biosystems MIDS SCIEX. API QSTAR PULSAR 1(CANADA)]

3) 화합물의 구조 확인

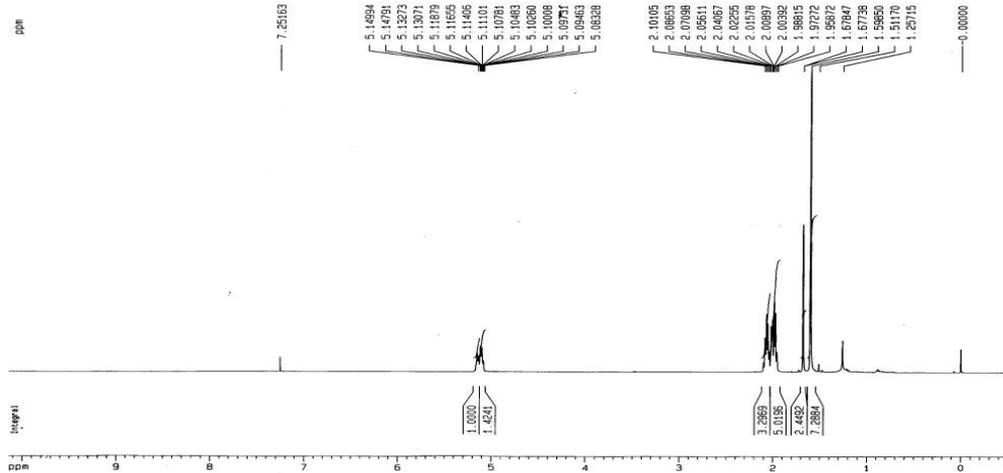
(1) 컬럼크로마토그래피를 이용하여 분리한 화합물의 구조동정

- 화합물 1의 구조동정

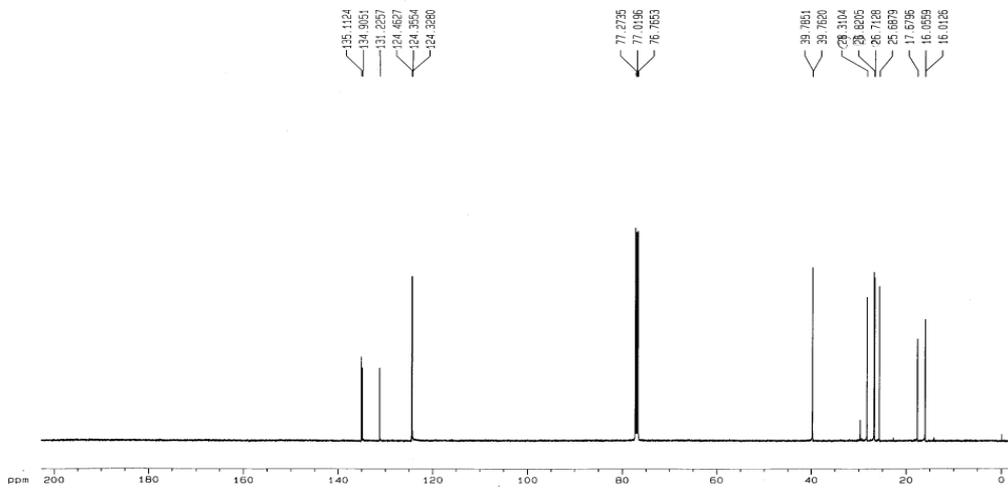
화합물 1은 무색의 액상 물질로서 적외선 스펙트럼에서 3048 cm^{-1} 부근의 전형적인 알켄의 $=\text{C}-\text{H}$ 흡수띠, 2963 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} 과 2852 cm^{-1} 에서 3개의 알케인의 $-\text{C}-\text{H}$ 흡수띠, 1667 cm^{-1} 에서 알켄의 $\text{C}=\text{C}$ 피이크가 존재하고 있음을 알 수 있었다. 질량 스펙트럼에서는 분자 이온 (M^+)의 피이크가 $m/e = 410$ 에서 관찰되었고, $m/e = 69$ ($\text{M}^+ - 341, 100$)는 분자이온으로부터 이탈된 2-methyl-2-butenyl로서 가장 안정한 분자 조각임을 알 수 있었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 탄소수가 15개라는 것을 알 수 있었으며, 화학적 이동값 δ 135.1, 134.9, 131.2, 124.5, 124.4, 124.3 ppm의 피이크로부터 3개의 바이닐기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. 39.8 (2 peak), 28.3, 26.8, 26.7, 25.7, 17.7, 16.1, 16.0 ppm의 피이크로부터 9개의 알킬기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. DEPT 90과 135 스펙트럼에서는 4개의 CH_3 ($3\text{H} \times 4 = 12\text{H}$), 5개의 CH_2 ($2\text{H} \times 5 = 10\text{H}$), 3개의 CH ($1\text{H} \times 3 = 3\text{H}$) 그리고 3개의 4차 탄소가 존재하고 있음을 알 수 있었다. ^1H -NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 25개의 수소가 존재함을 알 수 있었다. 5.15 - 5.11 ppm과 5.10 - 5.09 ppm의 피이크는 $=\text{C}-\text{H}$ 임을 확인 할 수 있었다. 2.09 - 2.04 ppm와 2.02 - 1.96 ppm의 피이크로 $(\text{C}_3)\text{C}-\text{H}$ 가 존재한다는 것을 알 수 있었고, 1.60 ppm의 피이크로 $-\text{CH}_2-$ 의 존재를 확인 할 수 있었다.

$^{13}\text{C}-^1\text{H}$ COSY (HMQC) 스펙트럼에서 아래와 같은 상관관계(cross peak)를 찾았다. ^1H NMR의 1.68, 1.60 ppm 피이크가 ^{13}C NMR의 17.7, 16.1, 16.0 ppm 피이크

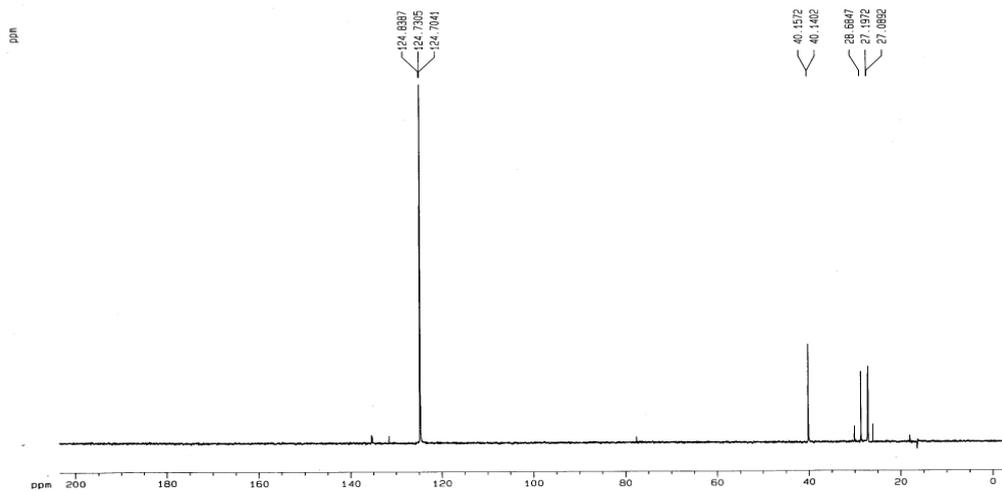
와의 상관관계를 보이면서 $-\text{CH}_2-$ 의 존재를 확인시켜주었으며, ^1H NMR의 2.09 - 2.04, 2.02 - 1.96 ppm 피이크가 ^{13}C NMR의 39.8 (2 peak), 28.3, 26.8, 26.7, 25.7 ppm 피이크와의 상관관계를 보이면서 $(\text{C}_3)\text{C}-\text{H}$ 의 존재를 확인시켜주었다. ^1H NMR의 5.15 - 5.11 ppm, 5.10 - 5.09 ppm의 피이크는 ^{13}C NMR의 124.5, 124.4, 124.3 ppm 피이크와의 상관관계를 보였으며 $=\text{C}-\text{H}$ 가 존재함을 알 수 있었다. 이러한 분광학적 결과로 사슬형 triterpene의 한 종류임을 알 수 있었다.



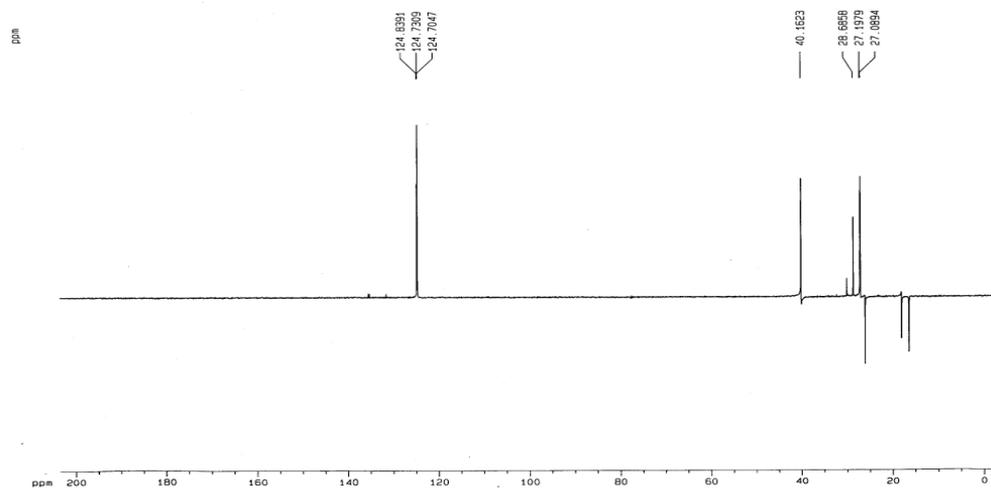
^1H NMR spectra of compound 1.



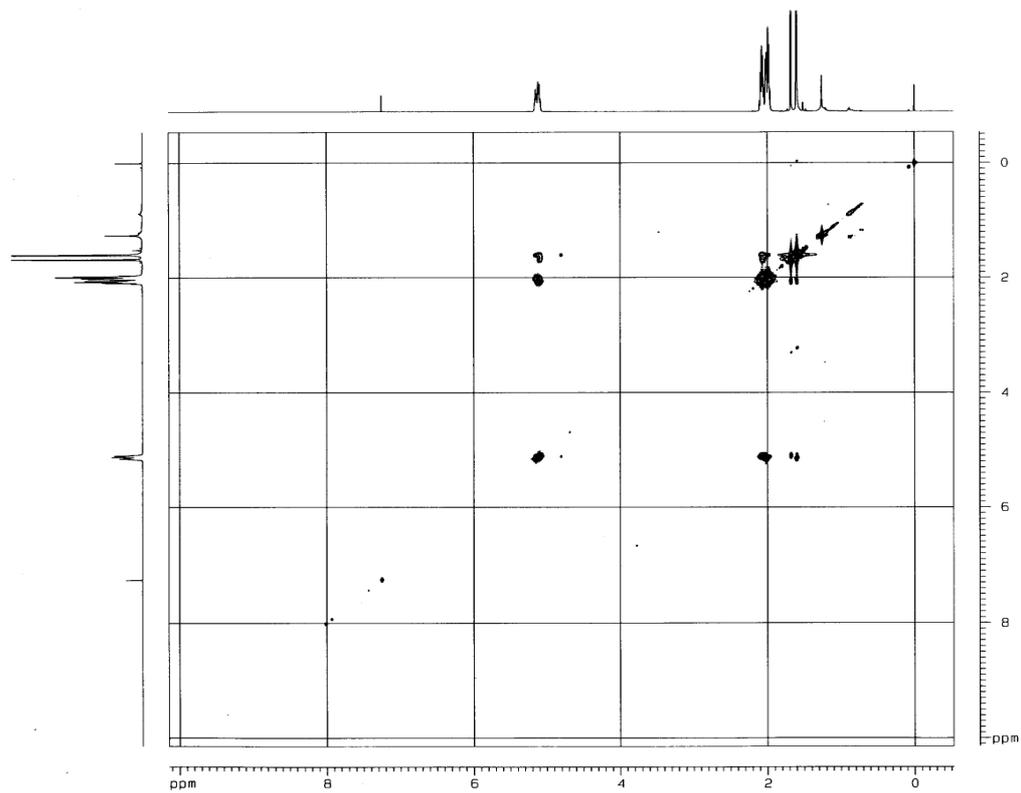
^{13}C NMR spectra of compound 1.



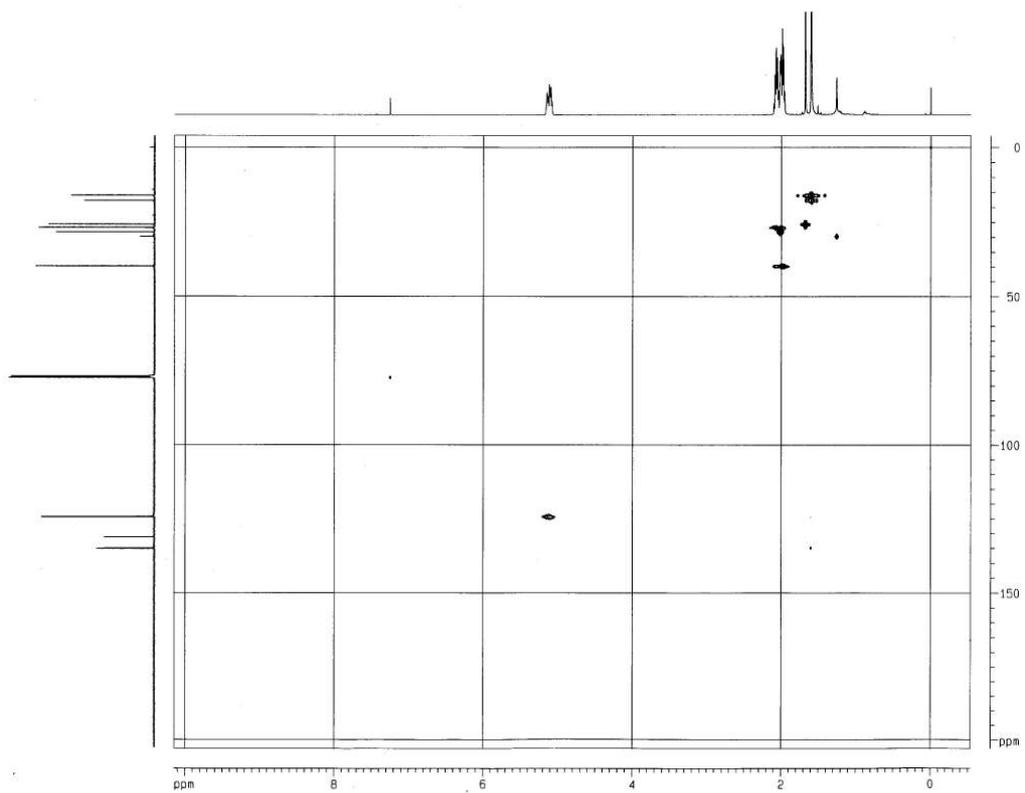
DEPT 90 spectra of compound 1.



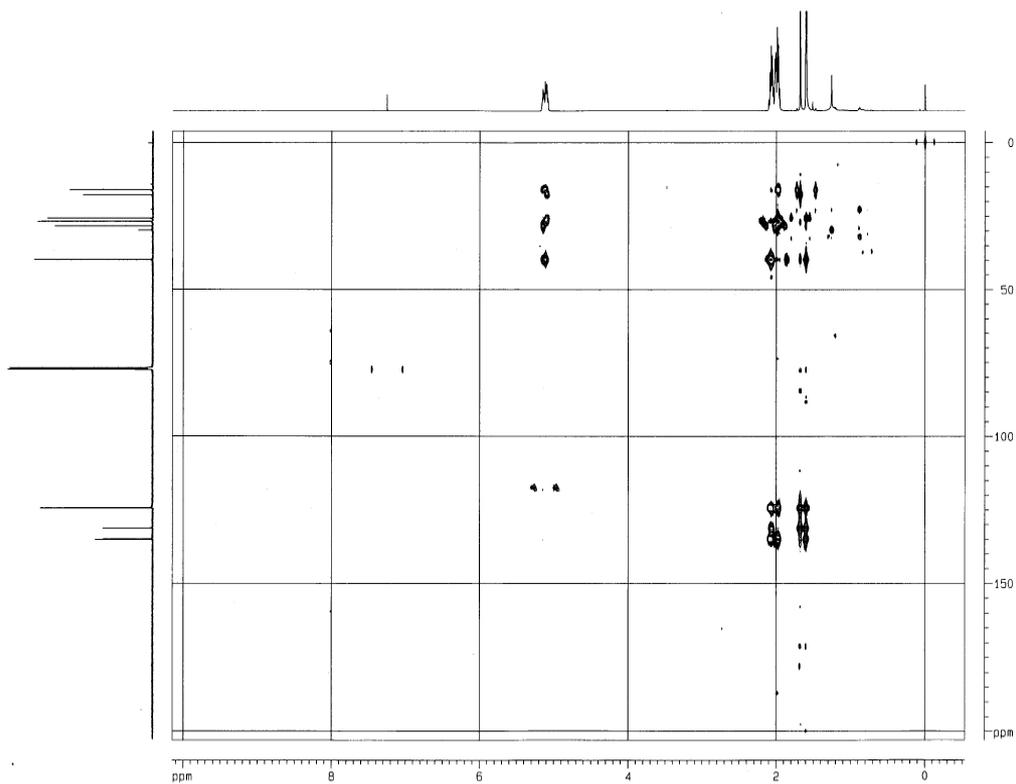
DEPT 135 spectra of compound 1.



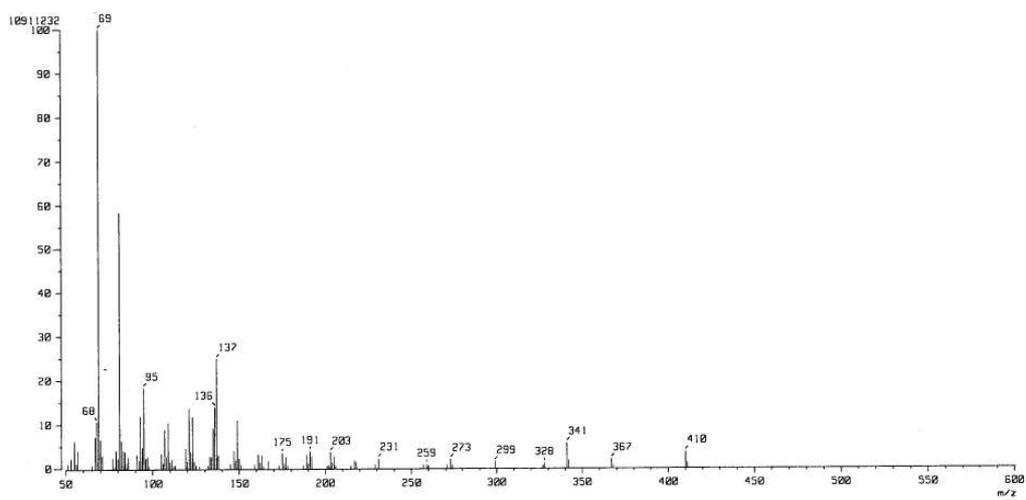
HOMO COSY spectra of compound 1.



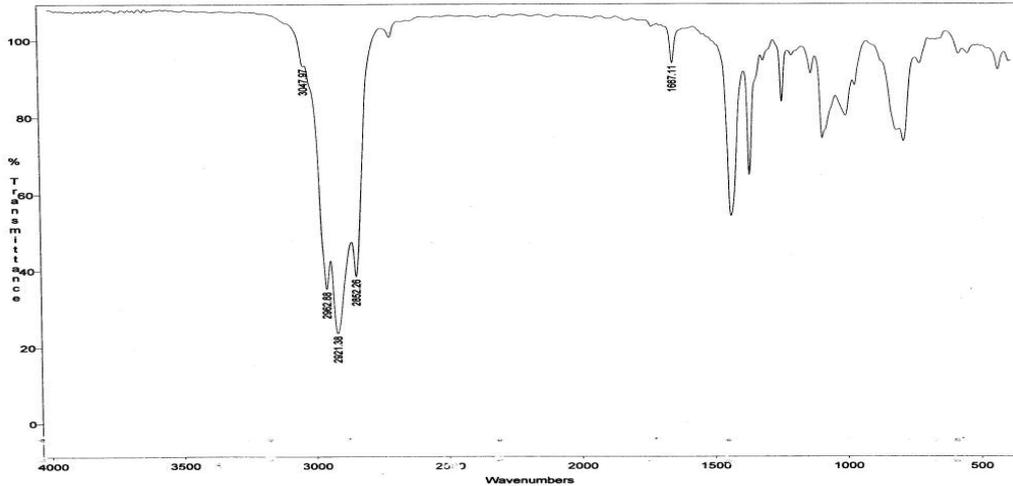
HETERO COSY spectra of compound 1.



HMBC spectra of compound 1.



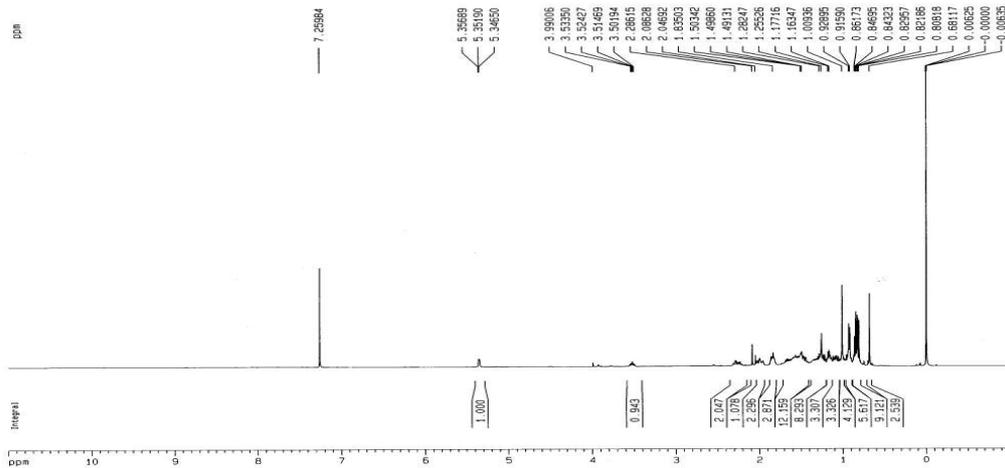
MASS spectra of compound 1.



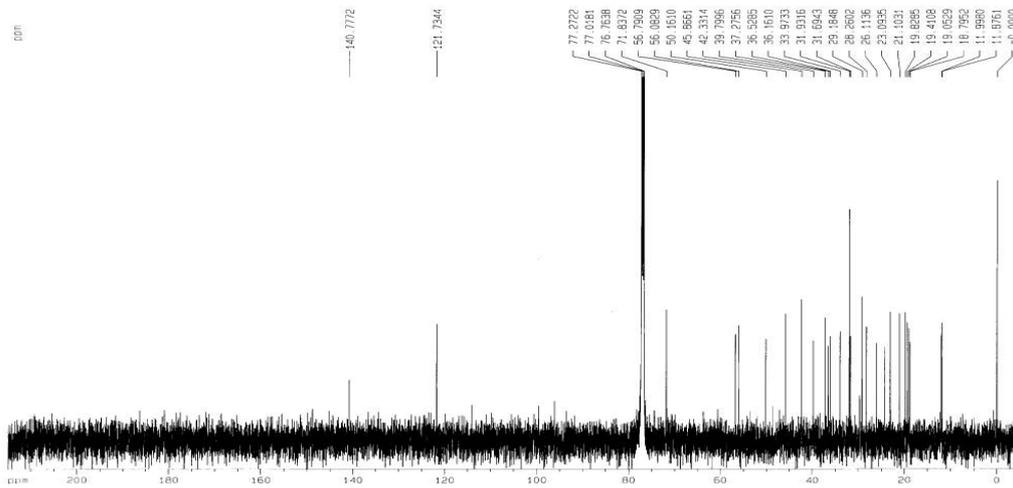
IR spectra of compound 1.

- 화합물 2의 구조동정

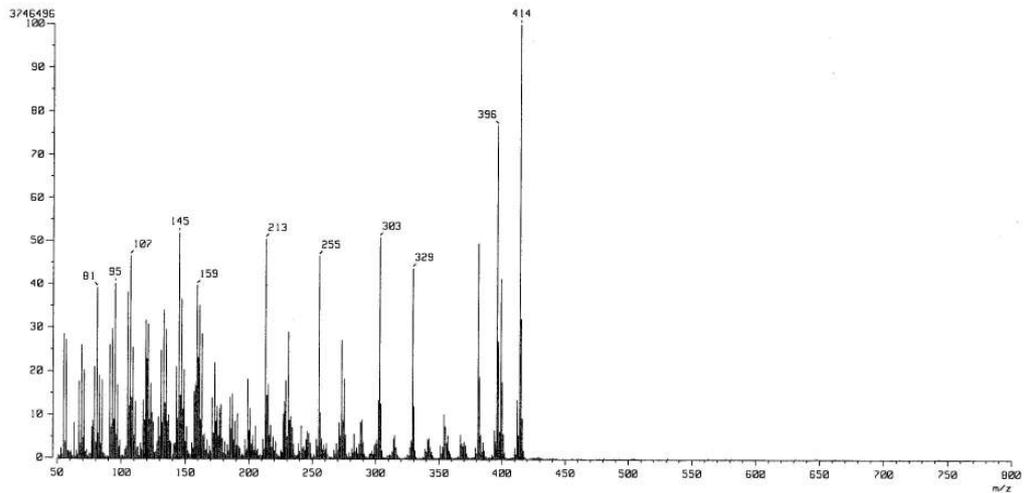
화합물 2은 무색의 액상 물질로서 적외선 스펙트럼에서 3418 cm^{-1} 부근의 전형적인 하이드록시 $-OH$ 흡수띠, 2933 cm^{-1} 에서 알켄의 $=C-H$ 흡수띠, 2867 cm^{-1} 에서 전형적인 알케인의 $-C-H$ 피이크가 존재하고 있음을 알 수 있었다. 질량 스펙트럼에서는 분자 이온(M^+)의 피이크가 $m/e = 414$ 에서 관찰되었다. 질량 스펙트럼의 $m/e = 399$ ($M^+ - 15$)는 $-CH_3$ 기의 이탈, $m/e = 396$ ($M^+ - 18$)은 $-OH$ 기의 물 분자로의 이탈, $m/e = 329$ ($M^+ - 85$)는 1-ethyl-2-methylpropyl이 이탈된다는 것을 알 수 있었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 탄소수가 25개라는 것을 알 수 있었으며, 화학적 이동값 δ 140.8, 121.7 ppm의 피이크로부터 1개의 알켄기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. 71.8 ppm의 피이크로부터 1개의 하이드록시기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. 56.8, 56.1, 50.2, 45.9, 42.3, 39.8, 36.5, 36.1, 34.0, 31.9, 31.7, 29.2, 28.3, 26.1, 23.1, 21.1, 19.8, 19.4, 19.1, 18.8, 12.0, 11.9 ppm의 피이크로부터 22개의 알킬기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. 1H -NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 49개의 수소가 존재함을 알 수 있었다. 이러한 분광학적 결과는 참고문헌⁷의 β -sitosterol과 일치하였다



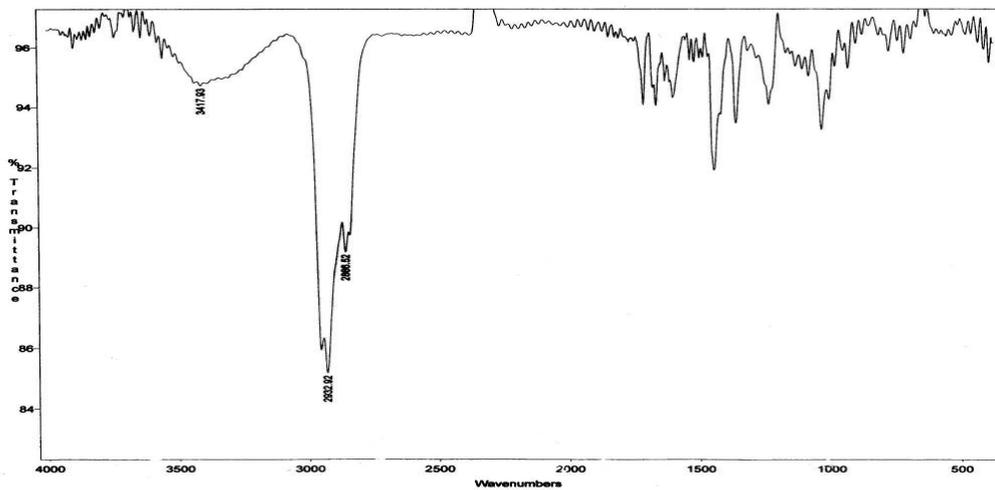
^1H NMR spectra of compound 2.



^{13}C NMR spectra of compound 2.



MASS spectra of compound 2.



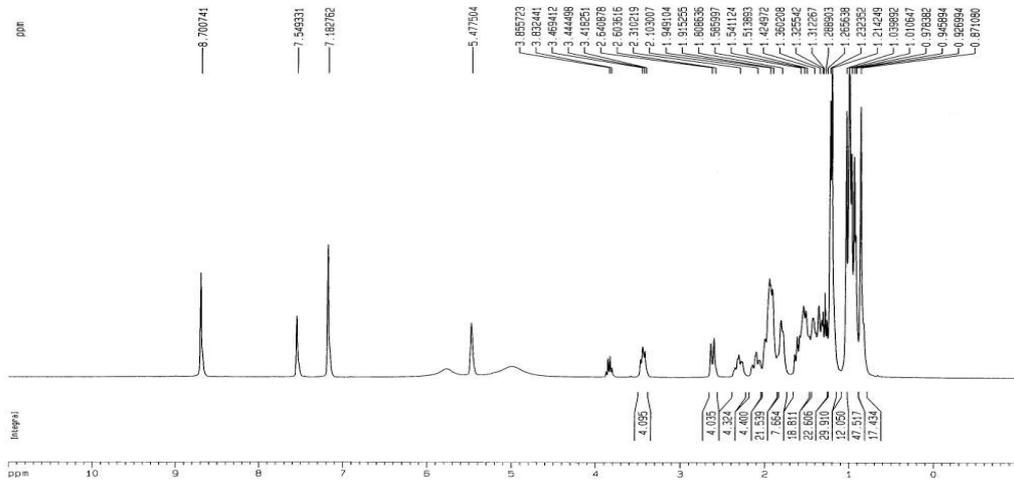
IR spectra of compound 2.

- 화합물 3의 구조동정

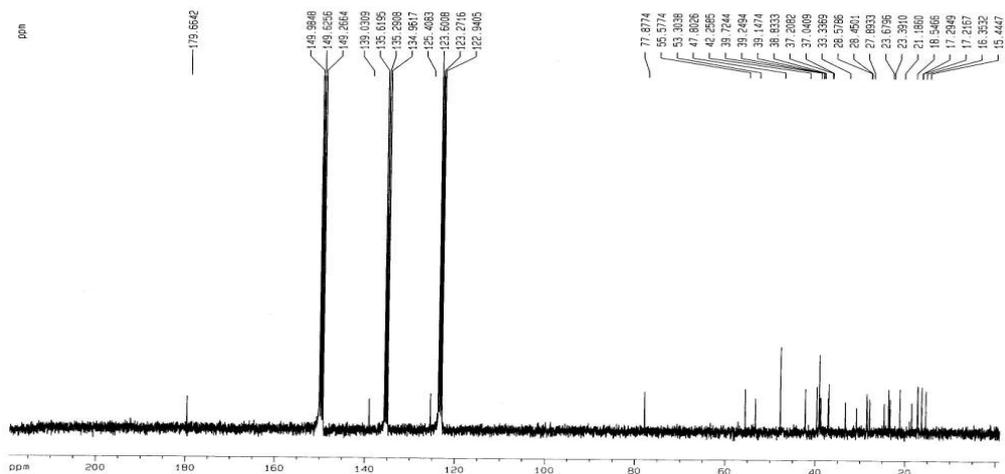
화합물 3는 무색의 분말형으로, 적외선 스펙트럼에서 3521 cm^{-1} 부근의 카복시산의 하이드록시 $-\text{OH}$ 흡수띠와 3413 cm^{-1} 부근의 전형적인 하이드록시 $-\text{OH}$ 흡수띠를 보였다. 3212 cm^{-1} 부근 알켄의 $=\text{C}-\text{H}$ 흡수띠, 2933 cm^{-1} 와 2867 cm^{-1} 에서 전형적인 알케인의 $-\text{C}-\text{H}$ 피이크가 존재하고 있음을 알 수 있었고, 1687 cm^{-1} 부근에서 알켄의 $\text{C}=\text{C}$ 피이크의 존재를 확인 할 수 있었다. 질량 스펙트럼에서는 분자 이온

(M⁺)의 피이크가 m/e = 456에서 관찰되었다.

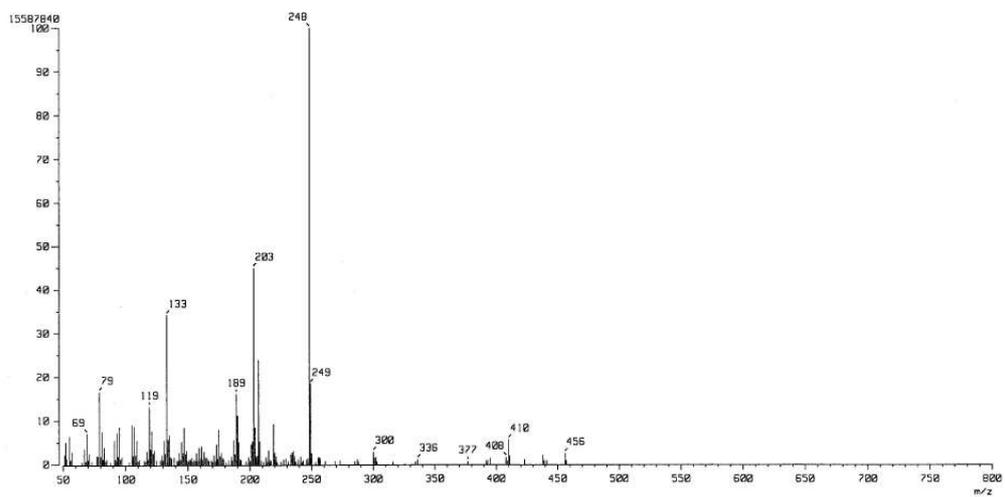
10 % 이하의 질량 존재비 이긴 하지만 m/e = 410 (M⁺-46, 8), m/e = 438 (M⁺-18, 4)은 -COOH, -OH가 분자이온으로부터 이탈되며 m/e = 240 (M⁺-108, 100)은 -COOH, -OH가 이탈된 다음 고리위의 세 개의 메틸기가 이탈된 것임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 탄소수가 27개라는 것을 알 수 있었으며, 화학적 이동값 δ 179 ppm의 피이크로부터 1개의 카르보닐기를 확인 할 수 있었다. 139.0, 125.4 ppm의 피이크로부터 1개의 알켄기가 존재한다는 사실을 알 수 있었고, 77.9 ppm의 피이크로부터 1개의 하이드록시기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. 55.6, 53.3, 47.8, 42.3, 39.7, 39.2, 39.1, 38.8, 37.2, 37.0, 33.3, 28.6, 28.5, 27.9, 23.7, 23.4, 21.2, 18.5, 17.3, 17.2, 16.4, 15.4 ppm의 피이크로부터 23개의 알킬탄소가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. ¹H-NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 47개의 수소가 존재함을 알 수 있었다. 이러한 분광학적 결과는 참고문헌⁷의 ursolic acid와 일치하였다.



¹H NMR spectra of compound 3.



¹³C NMR spectra of compound 3.



MASS spectra of compound 3.

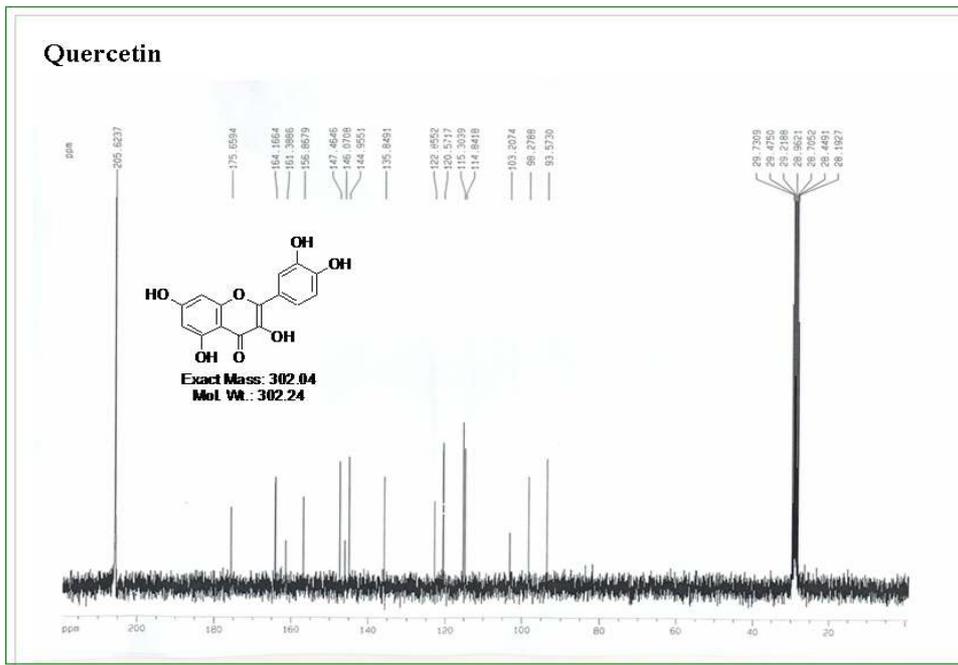


그림 C. Quercetin ^{13}C NMR 스펙트럼: 모두 15개의 탄소 피크가 확인 되었으며, 이중 175 ppm의 피크는 전형적인 카르보닐 피크임을 알 수 있다. 나머지 14개의 피크는 12개의 방향족 탄소와 2개의 알켄성의 탄소임을 알 수 있다.

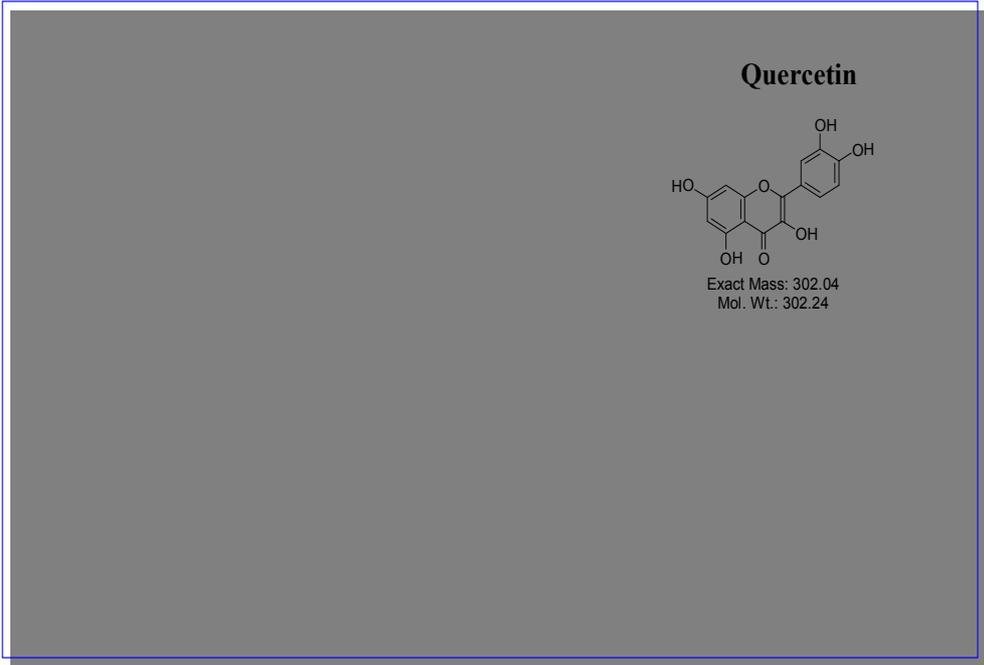


그림 D. Quercetin Mass 스펙트럼: EI-mass에 의하여 Quercetin 분자량 302가 base 피크로 나타났다.

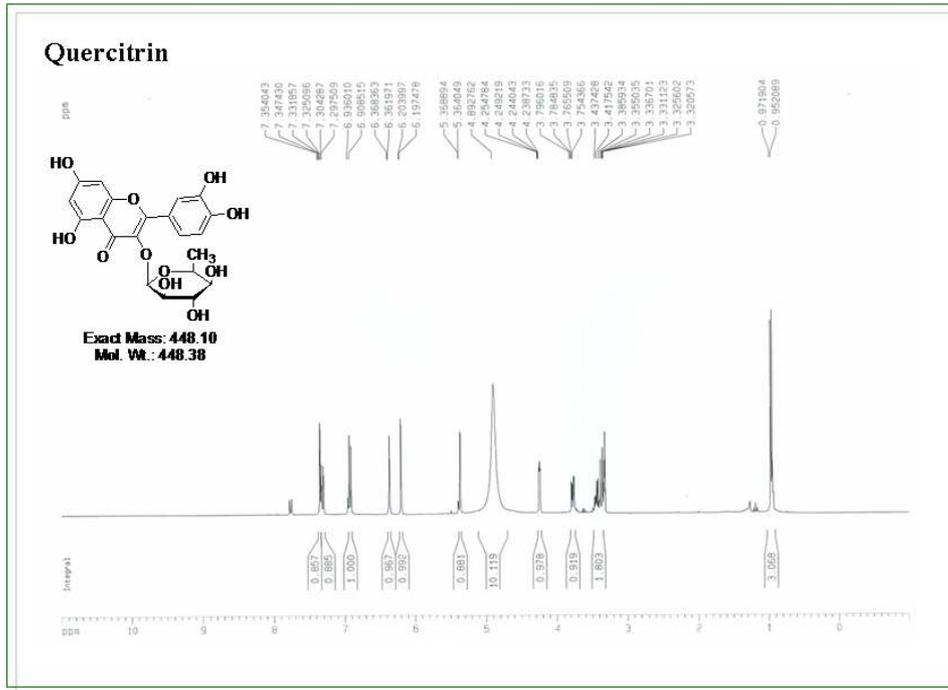


그림 F. Quercitrin $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼: 방향족 피크가 6.2-7.3 ppm 사이의 넓은 범위에서 나타나며, 이로부터 모두 5개의 양성자 피크가 있다는 것을 알 수 있다. 0.96 ppm에서 나타나는 이중선의 피크는 당의 고리위에 있는 3 개의 양성자가 이웃한 양성자 1개와 짝지움하여 나타나는 피크이다. 6.1 ppm 과 6.9 ppm에 나타나는 이중선은 당의 아노머 탄소의 양성자로서 확인된다. 3.3ppm으로부터 5.3 사이의 피크는 당의 탄소위에 있는 피크들과 -OH 기에 의한 피크로서 적분값으로부터 모두 11개의 양성자임을 알 수 있다.

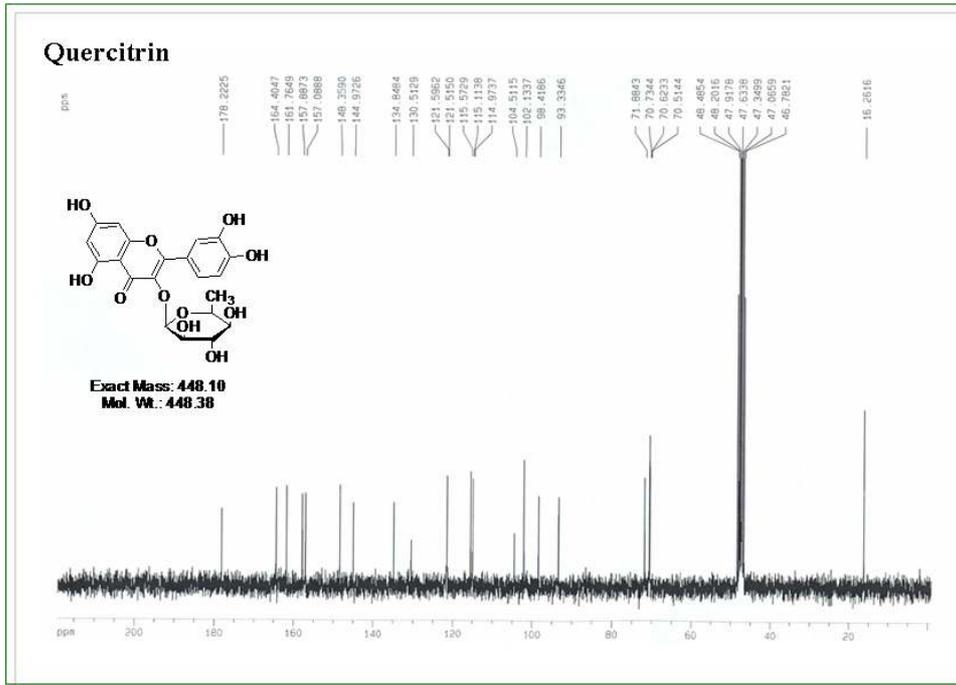


그림 G. Quercitrin ^{13}C -NMR 스펙트럼: 화합물에는 모두 19 개의 탄소가 있음에도 스펙트럼에서는 모두 23 개의 탄소 피크가 확인되었다. 아마도 약간의 불순물로 인해서 70 ppm 부근의 피크가 나타난 것으로 판단된다. 이중 175 ppm의 피크는 전형적인 카르보닐 피크임을 알 수 있으며 16.2 ppm의 피크는 당의 고리위에 있는 메틸 탄소이다. 나머지 14개의 피크는 12개의 방향족 탄소와 2개의 알켄성의 탄소임을 알 수 있다.

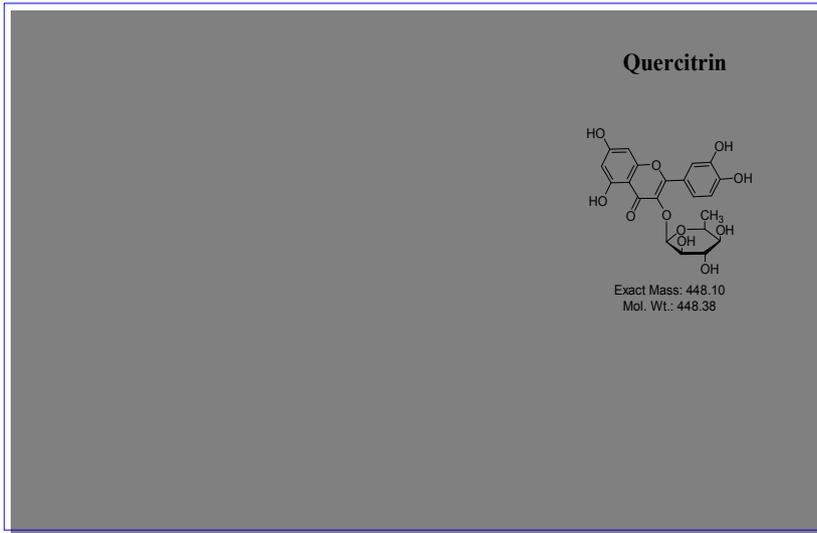


그림 H. Quercitrin Mass 스펙트럼: Quercitrin 분자량 448이 mass 스펙트럼에서 나타날 것으로 기대하였으나 EI-mass에 의하여 당이 이탈된 M-146의 피크인 302가 base 피크로 나타났다.

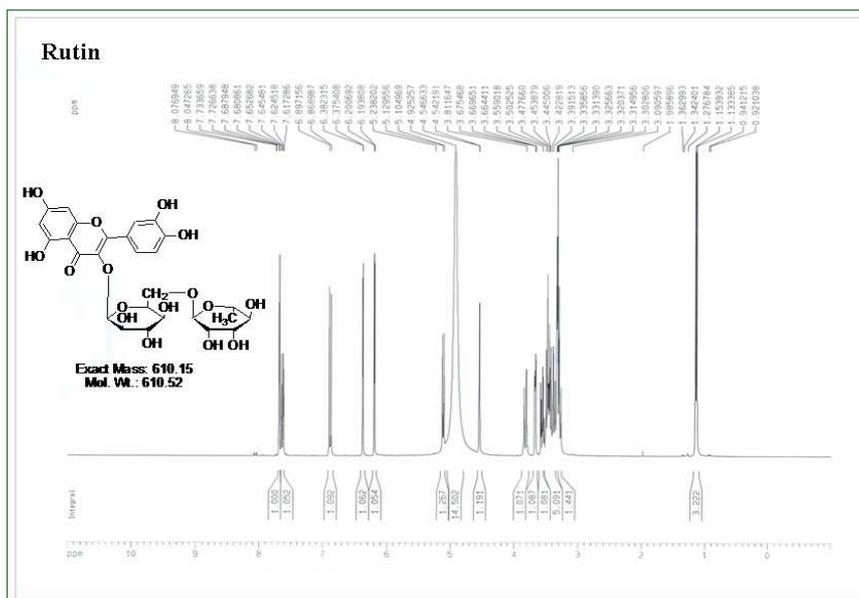


그림 J: Rutin ¹H-NMR 스펙트럼: 6.1-8.0 ppm 사이에서 방향족의 5개 양성자가 나타나며, 3.0-6.0 ppm 사이에 당의 고리위의 피크들이 나타난다. 그리고 당의 두 개의 아노머 탄소에 결합된 양성자가 각각 5.1 ppm과 4.5 ppm에서 이중선으로 나타난다. 0.9 ppm에서 당의 탄소위에 있는 메틸의 피크가 나타난다.

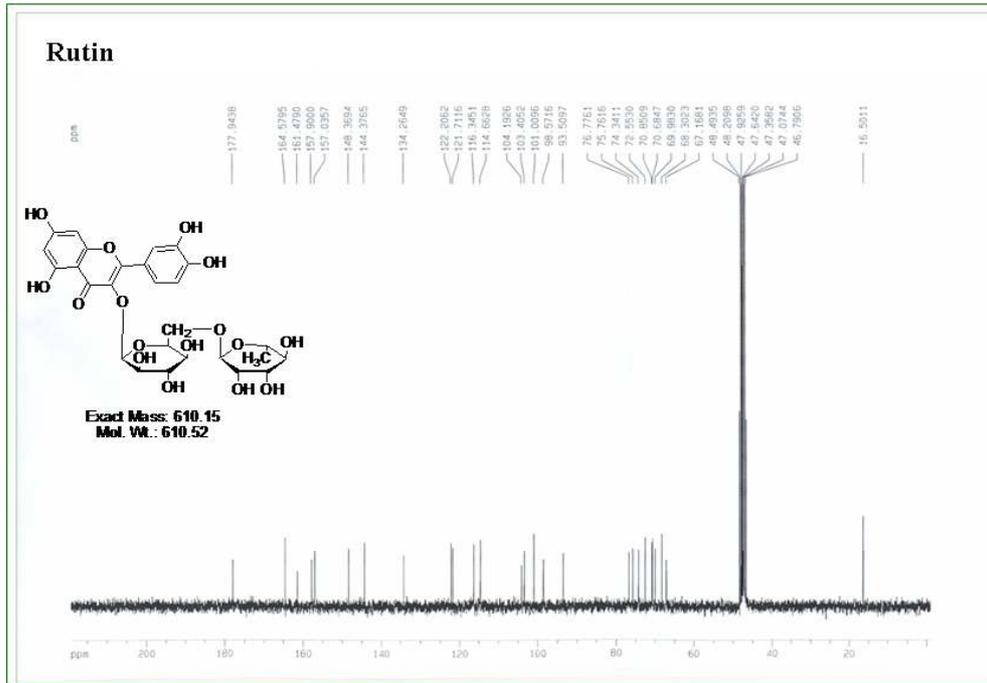


그림 K : Rutin ^{13}C -NMR 스펙트럼: 모두 27개의 탄소 피크가 나타난다. 177 ppm의 피크는 카르보닐의 탄소 피크이며, 16 ppm의 피크는 당의 고리위에 있는 메틸의 탄소 피크이다. 방향족 및 일반적인 당의 고리위에 있는 탄소들의 피크들이 넓은 범위에 걸쳐서 나타난다.

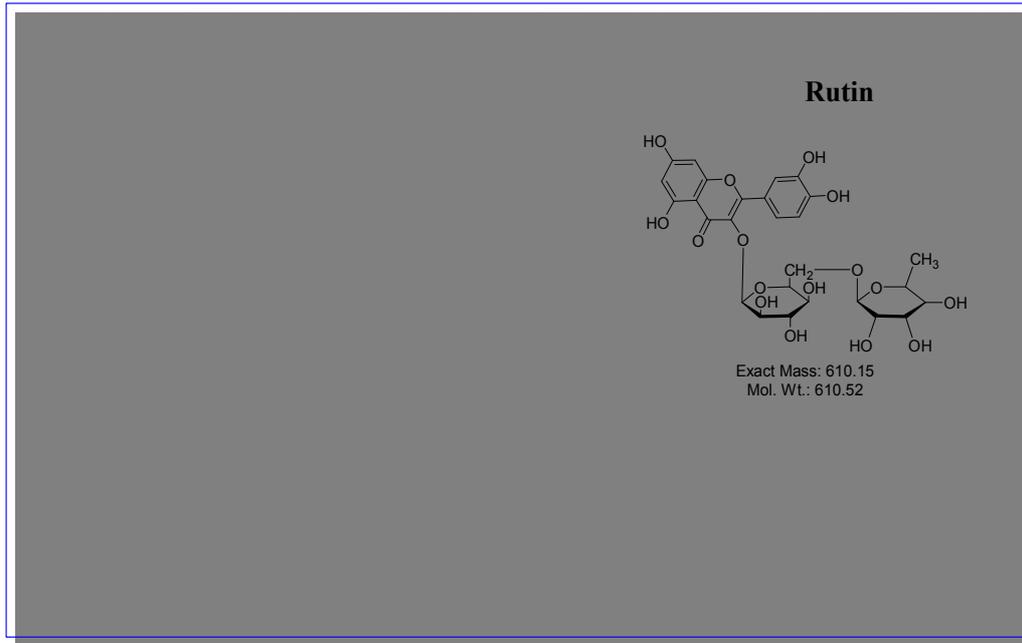
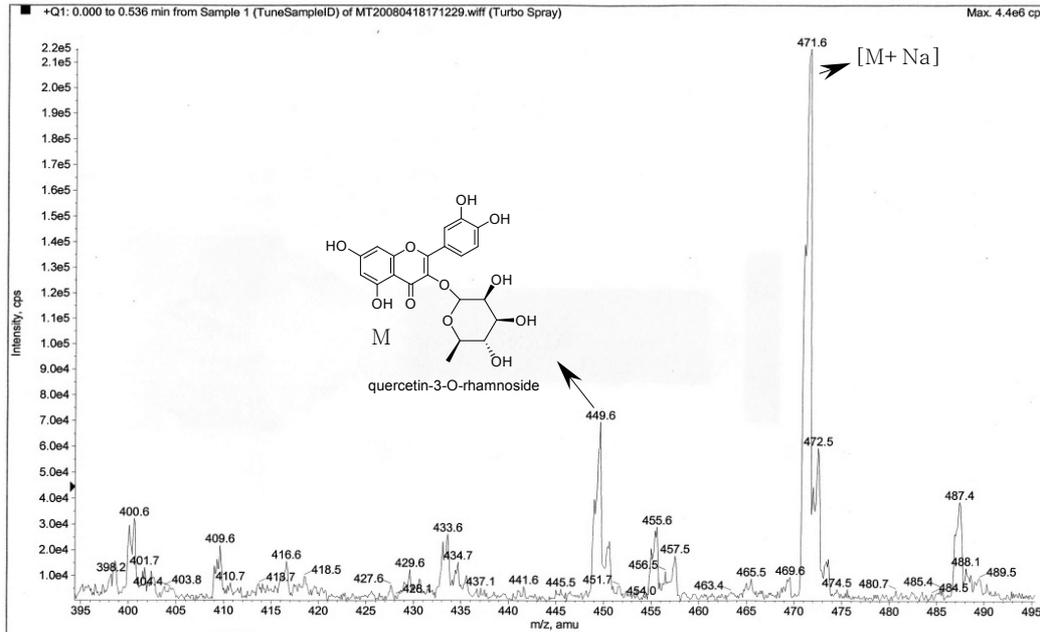


그림 L : Rutin Mass 스펙트럼: Rutin 분자량 610이 mass 스펙트럼에서 나타날 것으로 기대하였으나 EI-mass에 의하여 당이 이탈된 M-308의 피크인 302가 base 피크로 나타났다.

HPLC로 분리한 quercetin 유도체(2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12)들을 Hybrid tandem mass spectromete을 이용하여 구조 동정하였다. 여기서는 quercetin 유도체중 하나인 quercetin-3-O-rhamnoside(9)만의 Hybrid tandem mass spectrometer 데이터를 나타내었다.



다) 생리활성 연구

1) 페놀화합물의 함량

(1) 기기 및 시약

Folin & Ciocalteu's phenol 시약은 Sigma Chemical Co (USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 그 밖에 시중의 특급 용매와 시약을 사용하였다.

(2) 실험방법

페놀성 화합물의 분석은 Folin-Ciocalteu 방법에 따라 10 ml의 시험관에 시료 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 여기에 1 ml Folin-Ciocalteu 시약을 넣어 혼합하고 3분간 정치시킨 다음 10 % Na_2CO_3 용액 1 ml를 가하여 혼합한 후 적정배율로 희석하여 1시간 방치하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다.(Gutfinger, T 1981) 이때 표준곡선은 caffeic acid를 0 ~ 100 mg/100ml의 농도로 조제하여 $y = 1.0098x + 0.0104$ ($R^2 = 0.9994$)에서 작성하여 검량하였다.

(3) 결과

페놀화합물은 구조식에 hydroxyl groups을 소유하며 공명 안정화된 구조로써, 전자를 수용하는 기작으로 항산화 반응에 직접적으로 기여하면서, 다양한 식물계에

서 발견되는 중요한 성분으로 알려져 있다.(Hatano, T, 1989) 채취시기별 (4월, 5월, 6월, 7월), 부위별(7월 채취분) 짚신나물의 추출물을 ml당 1000 μ g의 농도로 첨가하여 페놀화합물 함량을 실험하였다.

여러 가지 용매를 사용하여 추출 효율을 비교한 예비실험에서 MeOH 용매를 이용한 경우가 가장 효과적이었기 때문에 모든 추출 실험을 MeOH 용매에서 수행하였다.

채취시기별 (4월, 5월, 6월, 7월)에 따른 짚신나물 MeOH 추출물의 페놀화합물 함량 분석 결과 (Table 1), 7월 채취분이 1538.56 \pm 0.02 mg/100ml로 가장 높았고, 6월 채취분이 추출물은 942.78 \pm 0.02 mg/100ml이었다. 나머지 4, 5월에 채취분은 771.12 \pm 0.01 mg/100ml, 757.65 \pm 0.02 mg/100ml으로, 5월의 채취분이 가장 낮은 함량을 보였다.

부위별 (7월 채취분)에 따른 짚신나물 MeOH 추출물의 페놀화합물 함량 분석 결과 (Table 2), 꽃에서 3548.16 \pm 0.12 mg/100ml로 가장 높았고, 뿌리에서 2551.27 \pm 0.10 mg/100ml이었다. 나머지 잎과 줄기는 1527.96 \pm 0.08 mg/100ml, 1181.35 \pm 0.04 mg/100ml의 함량을 보였다.

따라서 페놀화합물의 양이 짚신나물 추출물이 항산화 활성 및 항균활성 등의 생리활성이 높을 것으로 생각된다.

Table 1. Content of total phenolics in different months of *A. pilosa*

채집시기	Total phenolics (mg/100 g)
	MeOH ext.
April	771.12 \pm 0.01
May	757.65 \pm 0.02
June	942.78 \pm 0.02
July	1538.56 \pm 0.02

Table 2. Content of total phenolics in different sections of *A. pilosa*

채 집부위	Total phenolics (mg/100 g)
	MeOH ext.
root	2551.27 ± 0.10
Branch	1181.35 ± 0.04
Leaf	1527.96 ± 0.08
Flower	3548.16 ± 0.12

2) DPPH 라디칼 소거 활성

(1) 기기 및 시약

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma Chemical Co (USA)제품을 구입하여 사용하였다. 그 밖에 시중의 특급 용매와 시약을 사용하였다.

(2) 실험방법

각종 화합물의 항산화 활성은 DPPH법인, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 환원성을 이용하여 UV/Vis-spectrophotometer로 측정하였다.(Bolois, M. S 1958) DPPH 30 mg을 100 ml 무수 EtOH에 용해한 후 여과지 (Whatman No.1)로 여과하였다. 이 여액 2 ml에 각종 용매 추출물 2 ml를 가한 후, vortex mixer로 5초간 진탕하고 분광광도계를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 시료대신에 시료를 녹인 용매 2 ml를 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내었다.

$$\text{Free radical 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{시료무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

(3) 결과

DPPH의 라디칼 소거 활성은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식품중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 인체내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용으로 이용되며, 아스코르빈산, 토코페놀, polyhydroxy 방

향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 라디칼 소거능 측정이 가능하다.(Peter, F. S 1975)

짚신나물의 채취시기별, 부위별에 따른 용매별 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 실험하였다. 여러 가지 용매를 사용하여 추출 효율을 비교한 예비실험에서 MeOH 용매를 이용한 경우가 가장 효과적이었기 때문에 모든 추출 실험을 MeOH 용매에서 수행하였다.

채취시기별 (4월, 5월, 6월, 7월)에 따른 짚신나물 MeOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거작용을 분석한 결과 (Table 3), 7월 채취분이 88.79 ± 0.01 %로 가장 높았고, 6월 채취분이 81.15 ± 0.03 %이었다. 나머지 4, 5월에 채취분은 51.69 ± 0.07 %, 69.15 ± 0.03 %로, 4월의 채취분이 가장 낮은 함량을 보였다.

부위별에 따른 짚신나물 MeOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 분석한 결과 (Table 4), 줄기에서 95.20 ± 0.01 %, 뿌리에서 95.10 ± 0.01 %로 가장 높았다. 나머지 잎과 꽃은 94.82 ± 0.01 %, 94.26 ± 0.01 %의 함량을 보였다.

천연항산화제인 아스코르빈산과 BHT (합성항산화제)는 DPPH 라디칼 소거 활성이 51.12 ± 0.02 %과 89.18 ± 0.01 %로 짚신나물 MeOH 추출물이 더 높은 항산화 작용을 나타내었다. 천연 항산화제는 대부분 식물 기원의 항산화성 화합물로서 식물의 모든 부분에 존재하고 있으며, 이들은 주로 페놀 화합물로서 지질의 자동산화 조건에 의해 생성된 유리라디칼의 생성을 지연시키거나 활성을 저해하여 항산화 물질로서의 역할을 한다.(이종욱 1996)

이상의 결과로 짚신나물의 높은 항산화활성은 높은 페놀성 화합물의 함량 때문이라 생각된다.

Table 3. DPPH free radical scavenging activity of the methanol extract from different months of *A. pilosa*.

채집시기	Free radical scavenging activity (%)
	MeOH ext.
April	51.69 ± 0.07
May	69.15 ± 0.03
June	81.15 ± 0.03
July	88.79 ± 0.01
ASA ¹⁾	51.12 ± 0.02
BHT ²⁾	89.18 ± 0.01

¹⁾ASA: Ascorbic acid, ²⁾BHT: Butylated hydroxytoluene

Table 4. DPPH free radical scavenging activity of the methanol extract from different sections of *A. pilosa*.

채집부위	Free radical scavenging activity (%)	
	MeOH ext.	
root	95.10 ± 0.01	
Branch	95.20 ± 0.01	
Leaf	94.82 ± 0.00	
Flower	94.26 ± 0.01	
ASA ¹⁾	51.12 ± 0.02	
BHT ²⁾	89.18 ± 0.01	

¹⁾ASA: Ascorbic acid, ²⁾BHT: Butylated hydroxytoluene

3) 항미생물 활성

(1) 배지 및 미생물 균주

항미생물 활성측정에 사용된 배지로써 Muller-Hinton II (Difco, USA) 배지를 사용하였다. 그람양성균으로 *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. diphtheriae*, *S. mutans*, *S. epidermidis*, 그람음성균으로 *S. paratyphi A*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *S-typhi*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. vulgaris*를 각각 사용하였다.

(2) 항미생물 활성측정

순수 분리된 각 균주의 단락집락을 취해 5 ml의 균 생육 액체배지에 접종하여 각각 균주의 생육적온에서 18 ~ 24시간씩 3회 배양한 후 항균활성 시험균주로 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각의 15 %의 한천이 첨가된 생육배지를 멸균하여 petridish에 17 ml씩 분주하여 기층용 배지를 응고시키고, 중층용 배지를 각각 3 ml씩 시험관에 분주하여 멸균한 후, 각종 시험균액 0.2 ml을 무균적으로 가하여 잘 혼합한 다음 기층용 배지 위에 분주한 다음 고르게 도말하여 2중의 균접종 중층배지를 만들어 사용하였다. 짚신나물 추출물의 항균활성 검색은 한천배지 확산법 (disc diffusion method)으로 측정하였다.(Piddocket, 1990, Bauer, A. W 1996) 즉, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/ml 농도의 짚신나물 추출물을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 제공한 다음 멸균된 filter paper disc (6 mm)에 50 μl씩 흡착시킨 후, 추출용매를 무균적으로 풍건하여 완전히 날려보내고 각각 균의 생육적온에서 24 ~ 48시간 동안 배양한 다음 paper disc 주변에 형성된 clear zone의 직경을 측정하여 항균활성을 비교하였다. 이때 각 시료를 녹이기 위해 사용한 용매에 대한 대조구 실험을 실시하였다.

(3) 최소성장 저해농도 (MIC) 측정

항균효과는 한천배지 희석법(Victor-Lorian 1991, Koneman, E. W, 1992)을 약간 변형하여 박테리아의 성장 저해효과 (MIC)를 측정하였다. 한천이 첨가된 생육 배지를 멸균한 것에 쥘신나물 추출물을 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/ml의 농도로 무균적으로 가하여 잘 혼합한 다음 petridish에 20 ml씩 분주한 다음 고르게 응고시켜 추출물이 첨가된 항생배지를 만들어 사용하였다. 그리고 각 균주의 단일집락을 10 ml의 액체배지에 접종하여 각각 균의 최저생육온도에서 12시간씩 액체배지에서 2회 계대배양한 배양액을 생균수가 1.5×10^8 CFU/ml가 되도록 적절하게 희석하여, 농도별로 추출물이 첨가된 항생배지와 대조구에 도말하여 균 생육적온에서 24시간 동안 배양하였다. MIC의 판정은 육안으로 검사하여, 육안으로 검사하기 힘든 well의 고체배지를 50 μ l씩 취하여 평판배지에 도말한 후 배양하여 집락형성 유무로 결정하였다. 이때 각 시료를 녹이기 위해 사용한 용매에 대한 대조구 실험을 실시하였다.

(4) 결과

- 항미생물 활성

쥘신나물의 용매별 추출물을 각종 병원성균에 적용시켜 그람양성균 5종과 그람음성균 7종에 대해 항균활성을 측정한 결과를 Table 5에 나타내었다. 그 결과 disk에 점적한 추출물의 농도가 증가할수록 항균활성이 크게 나타났다. 즉 농도가 증가할수록 항균 활성이 증가하여 70 % MeOH 추출물의 경우 *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. diphteriae*, *S. epidermidis*에 대해 25 mg/ml 농도에서 7 ~ 8 mm의 억제 효과를 나타내었다. 따라서 쥘신나물 70 % MeOH 추출물은 그람양성균에 대해 넓은 항균력을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 이 중에서 *S. aureus*, *B. subtilis*에서 가장 민감하게 반응하여 70 % 메탄올 추출물 6.25 mg/ml 농도를 투여하였을 때 6 ~ 7 mm의 억제효과를 나타내었다. 이에 반해 *n*-BuOH 추출물은 *S. aureus*, *B. subtilis*에 대해서만 25 mg/ml 농도에서 7 ~ 8 mm의 항균활성을 보였고, EtOAc 추출물과 CHCl_3 추출물은 *C. diphteriae*를 제외하고는 70 % MeOH 추출물과 유사한 균들에 대한 항균력을 나타내었다.

Lee 등(Lee, H. Y. 1992)은 페놀성 물질이 미생물의 공격을 막아 식물자체를 보호한다고 보고 하였으며, Song 등(Song, J. H 1998)은 청미래 덩굴 뿌리를 메탄올로 추출하여 항균성을 검색하고 페놀성 화합물이 항균활성에 관여한다고 보고하였다. 본 연구에서도 쥘신나물 용매별 추출물에 함유된 페놀성 물질의 함량에 따라서

항균활성의 차이가 나타남을 알 수 있었다. 이상과 같은 결과로 보아 짚신나물의 용매별 추출물의 항균활성은 페놀성 물질의 함량에 따라서 차이가 나타났으며, 페놀성 물질의 함량이 높을수록 항균활성이 높아 천연항균제로서의 사용 가능성이 높은 것으로 생각된다.

Table 5. Antibacterial activities of *A. pilosa*

Microorganisms	Conc. (mg/ml)	Size of inhibition zone (mm) ¹⁾			
		70% MeOH	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	CHCl ₃
<i>S. aureus</i>	0.625	6	7	6	7
	1.25	7	7	6	7
	2.50	8	8	7	7
<i>B. subtilis</i>	0.625	7	7	7	7
	1.25	7	7	7	7
	2.50	8	7	8	7
G (+) <i>C. diptheriae</i>	0.625	- ²⁾	-	-	-
	1.25	6	-	-	-
	2.50	7	-	-	-
<i>S. mutans</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	6	6	6	6
<i>S. epidermidis</i>	0.625	-	7	-	6
	1.25	7	7	-	6
	2.50	7	7	-	7
<i>C. freundi</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-
<i>S. paratyphi A</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-
G (-) <i>E. coli</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-
<i>S-typhi</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	0.625	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-
	2.50	-	-	-	-

¹⁾In diameter (mm), ²⁾Not detected.

- 최소성장 저해농도 (MIC)

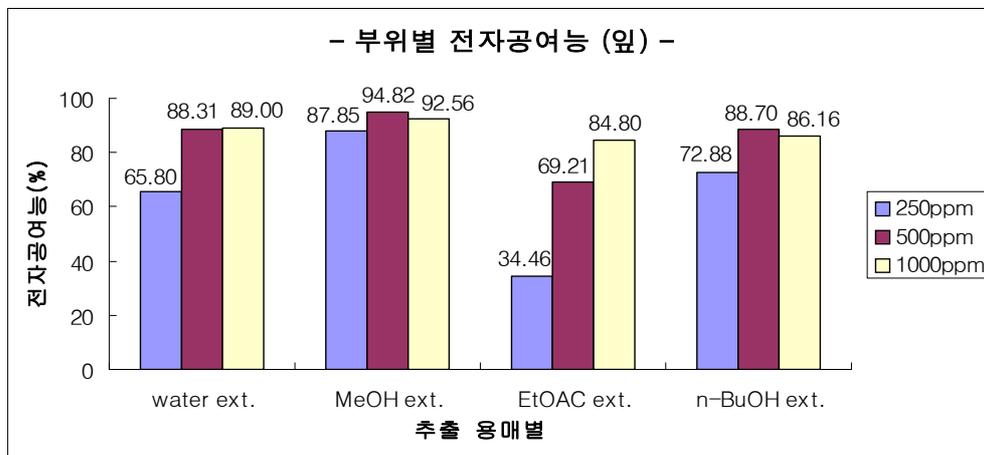
항균활성이 높게 나타난 짚신나물의 70 % 메탄올 추출물의 시험균에 대한 최소발육 저해농도를 측정한 결과를 Table 6에 나타내었다. 70 % 메탄올 추출물에 대한 그람 양성균과 그람 음성균의 최소저해농도는 *B. subtilis*와 *C. diptheriae*, *S. epidermidis*에서는 0.625 mg/ml로 비교적 낮은 농도에서 생육이 억제되었으나 *S. aureus*, *S. mutans*에서는 2.5 mg/ml로 나타났고, *S. paratyphi A*와 *E. coli*, *E. aerogenes*, *S-typhi*, *K. pneumoniae*같은 그람음성균의 경우 10 mg/ml로 가장 고농도로 나타났으며, *C. freundi*, *P. vulgaris*에서는 항균활성을 보이지 않았다. 이와 같이 그람 양성균이 그람음성균보다 각각의 농도에서 최소저해농도의 효과가 더 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Nakamura 등이 보고한 바와 같이 그람양성균의 세포벽은 peptidoglycan 층이 표면에 노출되어 항균활성 물질의 공격을 받기 쉽지만 그람음성균은 lipopolysaccharide를 주성분으로 하는 외막이 peptidoglycan 층을 항균활성 물질의 공격으로부터 보호하는 역할을 하기 때문이라고 생각되어진다.

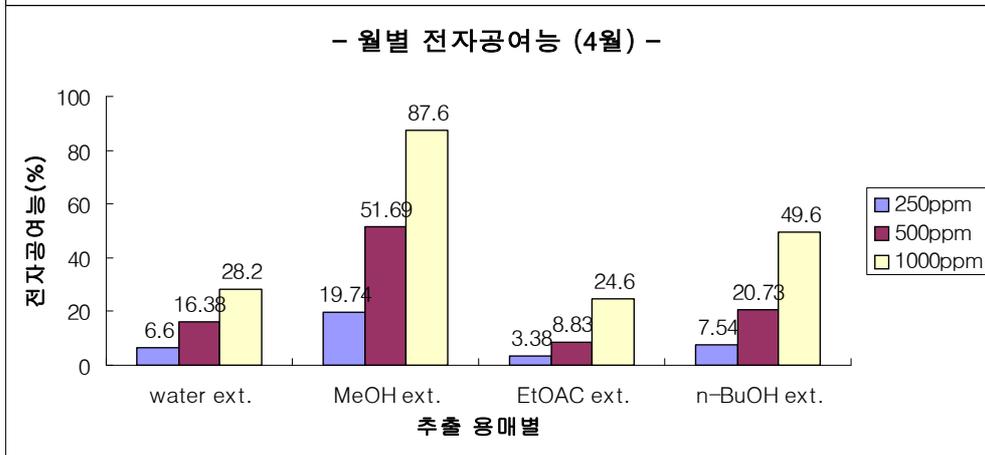
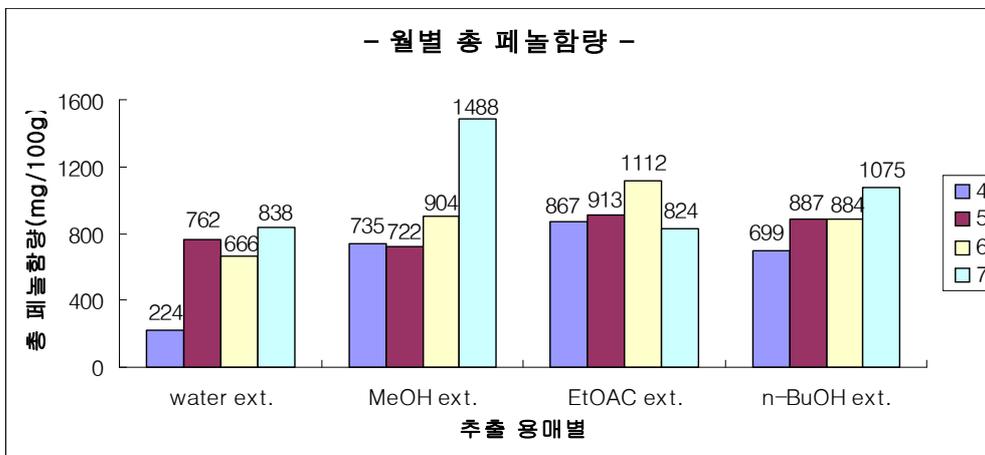
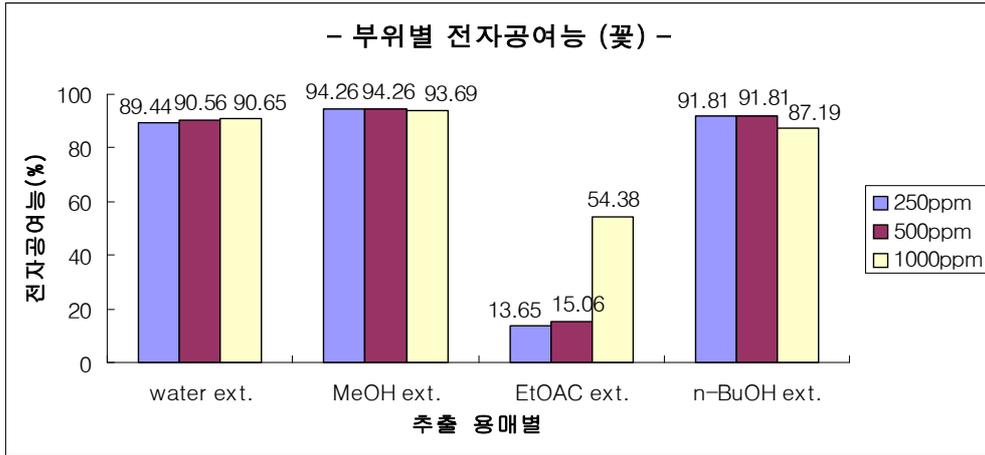
천연식물의 항균작용에 대해서는 오래 전부터 천연보존제에 대한 많은 연구가 이루어져왔으며, 특히 식중독과 관련된 항균효과에 대한 연구결과에 의하면 천연식품을 섭취함으로써 식품중에 함유되어 있는 페놀성 화합물과 유기산이 항균작용에 관여한다고 보고하였다.(Chuyen, N. V 1982) 짚신나물 70 % MeOH 추출물의 최소저해농도는 2.5 ~ 10 mg/ml로, 2.5 ~ 30 mg/ml의 유백피 추출물과 5 ~ 10 mg/ml의 삼백초 추출물 보다는(Koh, M. S 2004)높게 나타났다. 이러한 결과로써 짚신나물 70 % MeOH 추출물이 천연보존제로서 사용 가능성이 매우 높은 것으로 생각된다.

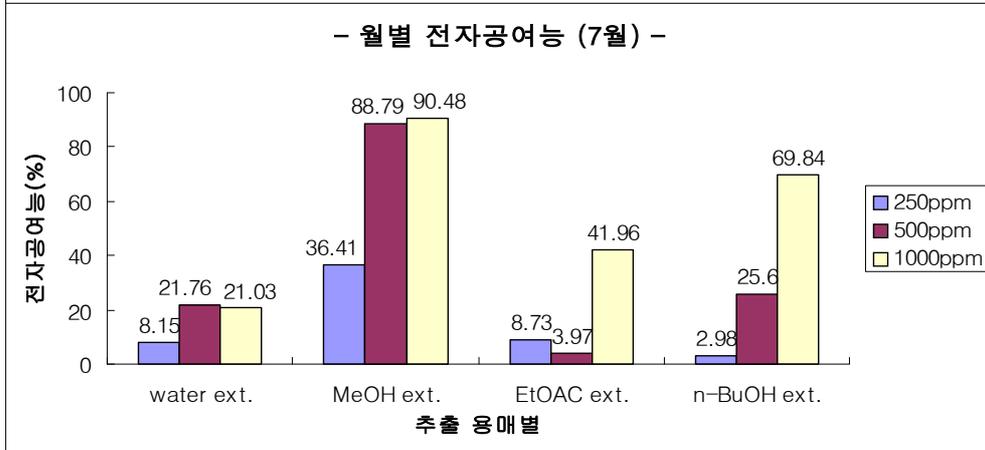
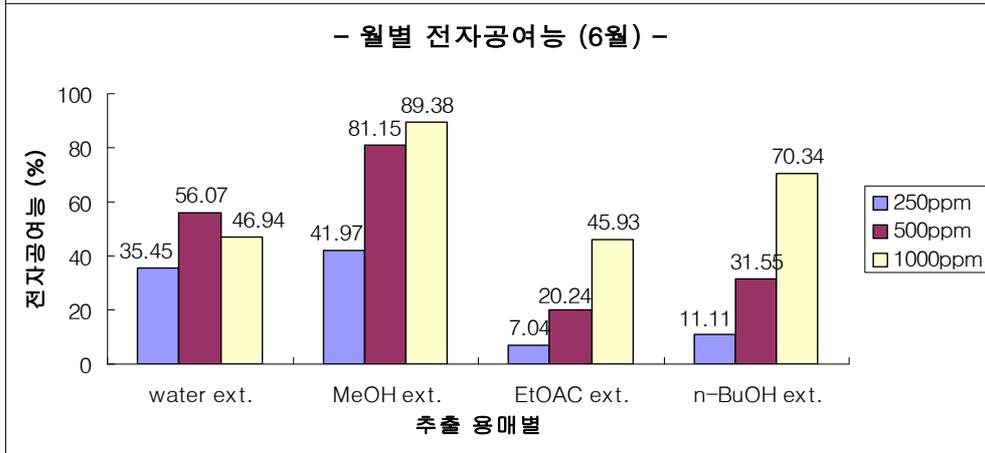
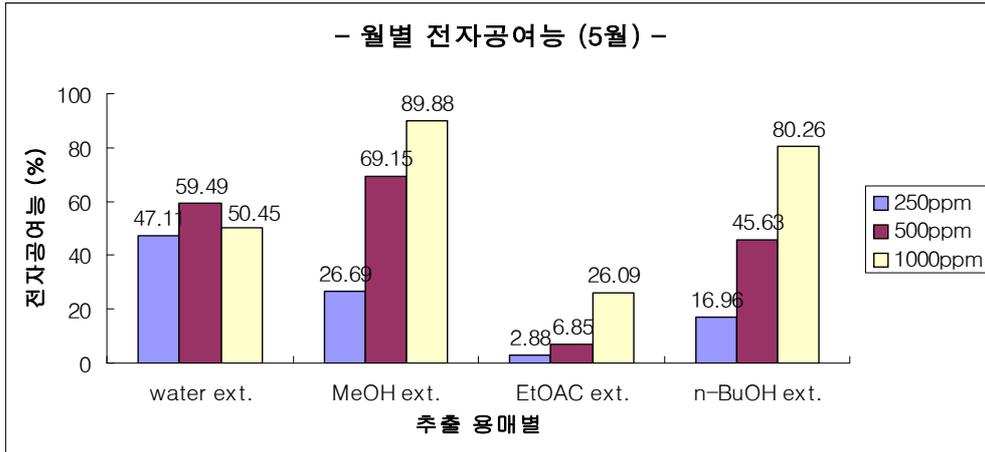
Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *A. pilosa*

Microorganisms	Growth at concentration (mg/mL)						MIC (mg/mL)
	0	0.625	1.25	2.5	5	10	
<i>S. aureus</i>	+	+	+	±	-	-	5
<i>B. subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	0.625
G (+) <i>C. diphtheriae</i>	+	±	-	-	-	-	1.25
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	±	-	10
<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	-	-	-	0.625
<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. paratyphi A</i>	+	+	+	+	+	-	10
G (-) <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	-	10
<i>E. aerogenes</i>	+	+	+	+	+	-	10
<i>S-typhi</i>	+	+	+	+	+	-	10
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	-	10

¹⁾No growth or MIC > 10mg/mL





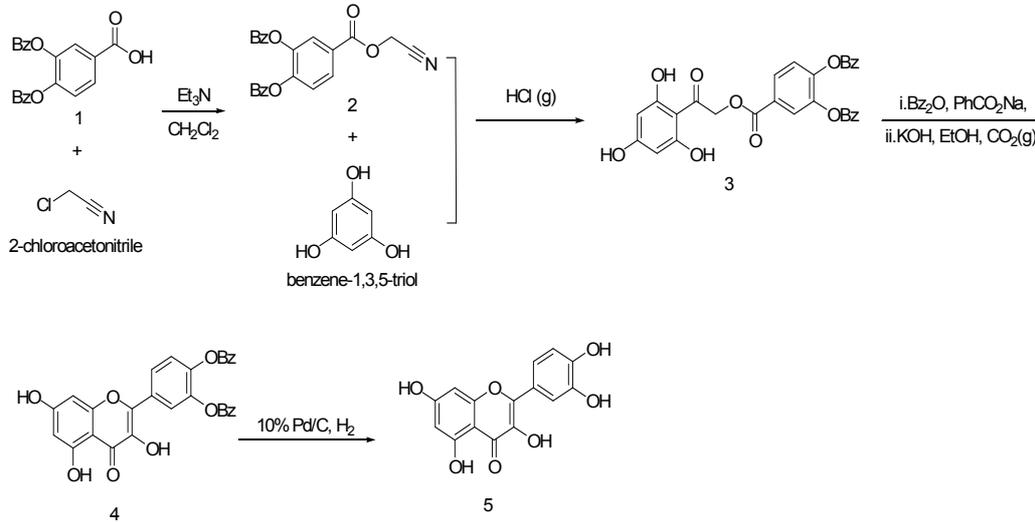


라) 유효성분 합성방법 연구

1) Quercetin 및 유도체의 합성

(1) Quercetin의 합성

Quercetin 및 유도체들의 합성방법은 여러 가지가 있을 수 있지만 아래와 같은 방법이 가장 효율적일 것으로 판단된다.(Chen, J. J. 1987)



3,4-Bis(benzoyloxy)benzoic acid (1)와 2-chloroacetonitrile을 CH₂Cl₂용매 조건에서 Et₃N을 염기로 사용하여 반응시키면 benzoic acid의 산성수소가 Et₃N에 의해 제거되어 음이온이 생성되며 화합물 1의 산소음이온이 2-chloroacetonitrile의 2번 탄소를 공격하여 치환반응으로 4-((cyanomethoxy)carbonyl)-1,2-phenylene dibenzoate (2)가 만들어진다.

화합물 2를 benzene-1,3,5-triol과 HCl(g) 조건에서 반응시키면 benzene-1,3,5-triol의 히드록시기 사이의 탄소에 화합물 2의 시아노기가 환원되어 만들어진 탄소가 결합하여 4-((2-oxo-2-(2,4,6-trihydroxyphenyl)ethoxy)carbonyl)-1,2-phenylene dibenzoate (3)을 얻을 수 있다. 이 과정은 Chen's method(Lili Chen 2006)로 알려진 반응이며 이를 이용하여 화합물 3이 합성 될 수 있을 것으로 사료된다.

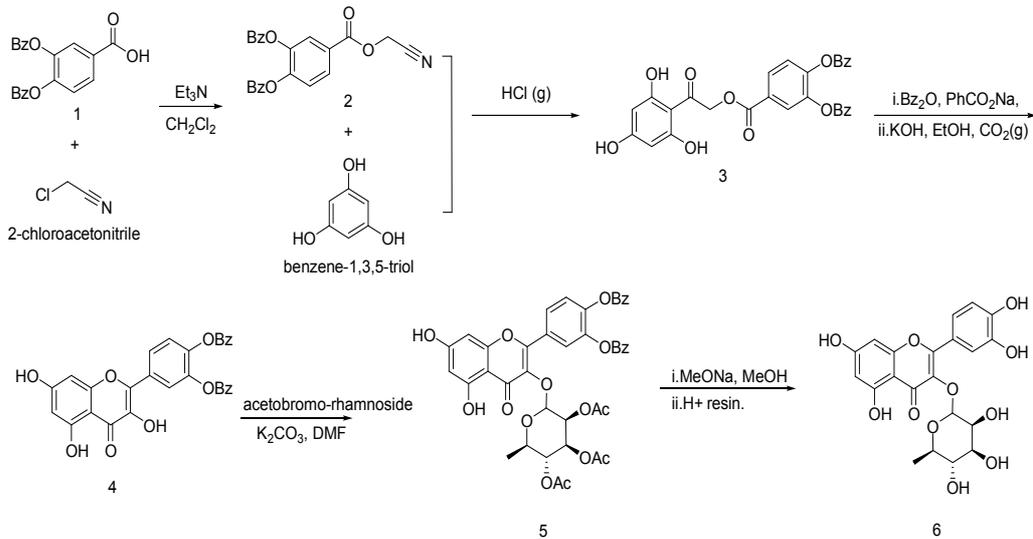
위의 반응을 통하여 얻어진 화합물 3에 benzoic anhydride와 benzoic acid의 sodium염인(sodium benzoate)를 사용하여 메탄올을 용매로 염기조건에서 고리화반

응을 이용하여 화합물 4-(3,5,7-trihydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-1,2-phenylene dibenzoate (4)를 합성한다.

다음 단계로는 얻어진 화합물 4의 보호기인 benzoyl기를 제거하기 위하여 Pd/C에 H₂조건에서 benzoyl기를 제거하면 최종 화합물인 quercetin이 합성될 것으로 사료된다.

위와같은 합성 과정을 바탕으로 하여 다른 quercetin유도체들의 합성을 아래에 도시해 보았다.

(2) Quercetin-3-rhamnoside 의 합성(Han-Wei Chu 2004)



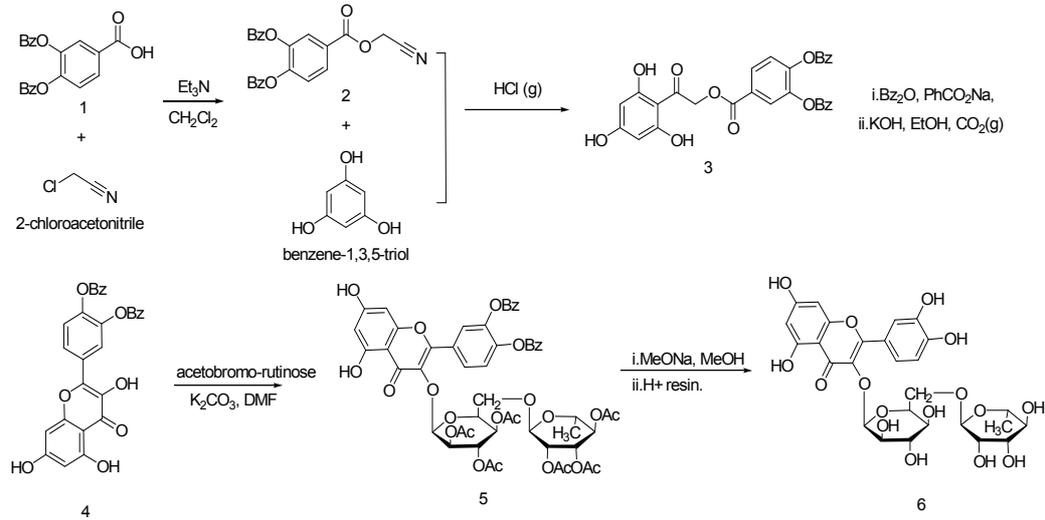
(1)에서 소개한 Quercetin의 합성방법을 이용하여 Quercetin의 다른 유도체인 quercetin-3-rhamnoside의 합성방법을 연구해 보았다.

Quercetin-3-rhamnoside는 Quercetin의 3번 탄소에 5탄당인 rhamnos가 결합된 형태를 취하고 있어 먼저 (1)에서 소개한 방법으로 quercetin을 합성한 후 quercetin의 3번 탄소에 당분자인 rhamnose를 도입하면 쉽게 합성이 가능할 것으로 사료된다. 방법은 화합물 4를 합성한 후 quercetin의 3번 탄소에 결합된 히드록시기에 rhamnoside(당)를 도입하기 위하여 acetyl기로 보호된 rhamnoside를 도입하여야 한다. 실제적인 방법은 K₂CO₃를 염기로 사용하고 acetobromo-rhamnoside를 DMF 용매조건에서 반응시켜 4-(5,7-dihydroxy-4-oxo-3-((3S, 4S, 5R, 6R)-3,4,5-triacetoxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-4H-chromen-2-yl)-1,2-phenylene dibenzoate (5)가 합성된다.

다음단계로 화합물 5의 보호기를 제거하기 위하여 메탄올 용매조건에서 MeONa (소듐 메톡시드)를 사용하여 acethyl기를 제거하여 당의 히드록시기에 O⁻를 생성시킨 후 resis산으로 H⁺를 제공해 주면 당분자에 있는 O⁻가 히드록시기로 생성되어 최종화합물인 quercetin 3-rhamnoside (6)를 합성 할 수 있을 것으로 사료된다.

아래에는 유사한 방법으로 다른 유도체를 합성하는 과정을 나타내었다.

(3) Rutin(Quercetin유도체)



Rutin(Quercetin-3-rutinoside)는 Quercetin의 3번 탄소에 rutinoside가 결합된 형태를 취하고 있어 먼저 (1)에서 소개한 방법으로 Quercetin을 합성한 후 Quercetin의 3번 탄소에 당분자인 rutinoside를 도입하여 rutin을 합성한다.

화합물 4를 상기 방법으로 합성한 후 quercetin의 3번 탄소에 결합된 히드록시기에 rutinoside(당)를 도입하기 위하여 acethyl기로 보호된 rutinoside를 도입하여야 한다.

K₂CO₃를 염기로 사용하고 acetobromo-rutinoside를 DMF 용매조건에서 반응시키면 최종 화합물의 골격구조에 당의 히드록시기가 보호된 화합물인 4-(5,7-dihydroxy-4-oxo-3-((2R,3S,4R,5R)-3,4,5-triacetoxy-6-(((2S,3R,4R,5R)-3,4,5-triacetoxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)methyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-4H-chromen-2-yl)-1,2-phenylene dibenzoate (5)가 합성된다.

다음단계로 (2)에서 소개한 방법으로 화합물 5의 보호기를 제거하여 최종화합물인 Quercetin 3-rutinoside (6)를 합성 할 수 있을 것으로 사료된다.

위와 같이 quercetin유도체들은 기본골격인 quercetin을 합성한 후 필요한 다른 작용기를 도입하는 방법으로 다른 유도체들은 합성이 가능할 것이다.

작용기의 종류에 따라 quercetin의 합성 중간과정에서 보호기 도입이 필요한 경우도 있을 것이며 탄소 골격형성이나 당을 도입하는 과정에서도 당분자를 합성에 필요한 부분에 선택적으로 보호기를 도입하는 과정 등 여러 가지 어려움이 있을 것으로 여겨지나 위와 같은 방법으로 quercetin유도체들을 합성 할 수 있을 것으로 사료된다.

마) 제 2과제 연구 후 결론

컬럼 크로마토그래피를 통해 알려지지 않는 물질 1개와 생리활성이 있는 것으로 알려진 스테로이드계 물질 2개를 분리하였으며 HPLC를 통해 생리활성이 있는 것으로 알려진 폴리페놀류 화합물 9개를 분리하였다. 각 용매별, 월별 및, 각 부위별 추출물에 대한 생리활성을 실험하여서 본 보고서에 보고하였으나 각 유효성분에 대한 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하며 알려지지 않는 여러 물질들의 생리활성 실험도 병행되어야 할 것으로 사료된다. 단일 화합물이 특이한 생물활성을 보일 경우 라)에 따라서 합성을 하면 대량확보가 가능하다.

제 3 절 선학초로부터 분리된 유효 활성 물질의 항암효능 연구

1. 선학초 추출물의 독성 및 안전성 실험

가. 선학초 추출물

선학초 추출물은 증류수에 선학초 건재 10%를 첨가하여 50℃에서 10시간 추출한 것을 제2세부과제 연구팀으로부터 제공받아서 3M filter paper로 여과하여 불순물을 제거한 후 다시 8,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 침전물을 제거한 상등액을 121℃에서 30분간 멸균하여 실험 재료로 사용하였다.

나. 박층크로마토그래피법 (Thin layer chromatography, TLC)

선학초 추출물의 다당체를 확인하기 위하여 박층 크로마토그래피법을 사용하였다. 박층 크로마토그래피는 silica gel plate (25DC-Alufohlen Kieselgel 60, Merck Co., ltd.) 상에 1, 2, 3, 5, 10% 선학초 추출물을 spot하여 전개용매인 1-butanol/ethanol/water (5:5:3)로 전개시켰다. 전개가 완료된 plate를 완전히 건조시킨 후 methanol에 3% 황산을 첨가하여 만든 발색 용액을 살포한 후 100℃ 이상의 hot plate 위에 놓고 10분간 가열하여 발색하였다. 그 결과 고분자 및 저분자량의 다당체가 혼재되어 있는 것이 확인되었다 (Fig. 1). 이때 사용한 표준물질은 standard malto-oligosaccharide (G1-G7) 으로서 G1, G2, G3, G4, G5, G6 및 G7은 각각 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose 및 maltopeptaose 이었다.

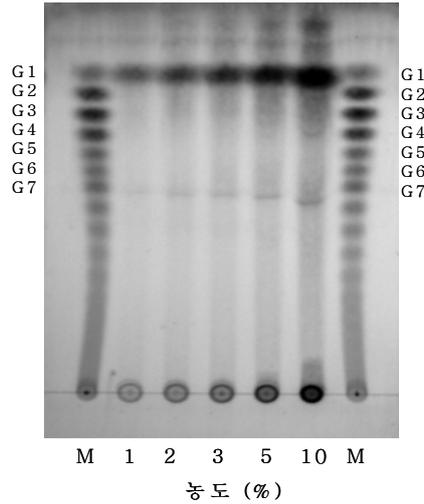


Fig. 1. Thin-layer chromatography of *A. pilosa* extracts.

The *A. pilosa* extracts (8 μ l) were analyzed by thin-layer chromatography, followed by staining with H_2SO_4 in methanol. M, standard malto-oligosaccharides (G1-G7); G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7, glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose, respectively.

다. 단백질량 측정

선학초 추출물의 단백질 농도는 5배 희석한 Bio-Rad 사의 protein assay reagent 를 사용한Bradford 법으로 측정하였다 (Bradford, M. M., 1976). Standard curve는 bovine serum albumin (Sigma)을 이용하여 측정하였다. 단백질 함량은 7.5 ug/ml 였다.

라. 전당량 측정

선학초 추출물의 전당량은 phenol-sulfuric acid 법으로 측정하였다 (Dubois, M. et. al., 1956). 즉 시험관에 선학초 추출물과 표준용액을 1 ml 씩 각각 분주하여 5% 정제 페놀수를 1 ml 첨가하여 잘 혼합시키고, 여기에 진한 황산 5 ml을 첨가하여 발 열반응에 의하여 발색시켜 30분경과 후 470 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 총당 함량을 계산하였다. 전당 함량은 17 mg/ml 였다. 표준곡선은 glucose를 이용하였다.

마. 실험동물

설치류인 mouse는 대구의 효창사이언스로부터 6주령을 구입하여 사용하였다. 선학초 추출물의 안전성 실험에 암수 ICR mouse를 사용하였다. 구입한 mouse는 정상 식이를 공급하여 1주일간 순화시킨 후, 군당 분배하여 케이지에 넣은 후 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기 12시간 (명기: 07:00~19:00, 암기: 19:00~07:00)으로 자동 제어되는 동물 사육실에서 사육하였다.

바. 신규 다당체의 독성시험

선학초 추출물의 안전성평가를 위한 독성시험은 식품의약품안전청의 독성시험기준 (식품의약품 안전청 고시 제1999-61호, '99. 12. 22.)에 준하여 실시하였다.

독성시험의 1차 실험으로 급성독성 효과를 보기 위해 암수 ICR mouse ($n=10$)에 선학초 추출물 1 ml을 사료에 혼합하여 4주간 매일 투여하였다. 식이 당일 12시간까지 매시간 동물의 시료에 대한 거부반응 등 외형적인 일반 행동을 관찰하였으며, 선학초 추출물 식이 다음날부터 3주간 매일 2회 (오전, 오후) 동물의 일반상태 등을 주의 깊게 관찰하였고 상세히 기록하였다. 이를 위해서는 투여 후, 수 시간은 연속해서, 그 후는 1일 2회 (오전, 오후) 이상 관찰하였다. 일반상태의 관찰에서는 각종 자극에 대한 반응, 운동 (행동), 호흡, 경련, 피모 및 피부, 배설물 등의 상태를 관찰한 결과 특별한 이상 현상은 나타나지 않았다. Mouse의 체중변동을 주 3회 측정하고 결과 4주간의 평균 증가량은 Control male (CM) 3.47 g, control female (CF) 3.08 g, *A. pilosa* extracts male (APM) 3.26 g, *A. pilosa* extracts female (APF) 2.05 g 이었다 (Table 1, Fig. 2). 또한 실험 기간 중에 사망한 동물은 없었으며, 활동성에서도 차이가 거의 없었다. 실험 종료 후 모든 mouse를 부검하고, 혈액과 장기를 적출하였다. 적출한 장기의 무게 측정결과에서도 각 군간의 차이는 큰 변화가 없었다 (Table 2).

Table 1. Changing body weight after oral administration of *A. pilosa* extracts on normal ICR mice for 4 weeks.

Day	CM	CF	APM	APF
1	35.56±1.528	27.08±0.696	34.91±1.008	27.58±1.122
3	35.65±1.83	26.99±0.568	35.57±0.916	27.45±1.186
6	36.62±1.636	27.7±0.72	36.03±1.52	27.64±1.021
8	37.28±1.496	27.9±0.84	36.29±1.462	28.44±1.076
10	37.76±1.35	28.67±0.79	36.87±1.929	28.61±0.937
13	37.41±1.388	28.94±1.068	36.96±1.936	29.12±1.456
15	37.78±1.491	28.46±1.78	37.18±1.849	29.28±1.649
17	37.78±1.314	28.64±1.188	37.25±1.922	29.13±1.834
20	38.16±1.306	28.84±0.9	37.59±2.062	29.45±1.368
22	38.58±1.353	29.3±1.08	37.69±2.261	29.22±1.252
24	38.49±1.609	29.78±1.38	37.59±1.843	29.58±1.347
27	38.83±1.644	30.21±1.692	38.45±2.269	29.41±1.172
29	39.03±1.726	30.16±1.66	38.17±2.147	29.63±1.248

* CM; control male, CF; control female, APM; *A. pilosa* extracts male, APF; *A. pilosa* extracts female. n=10.

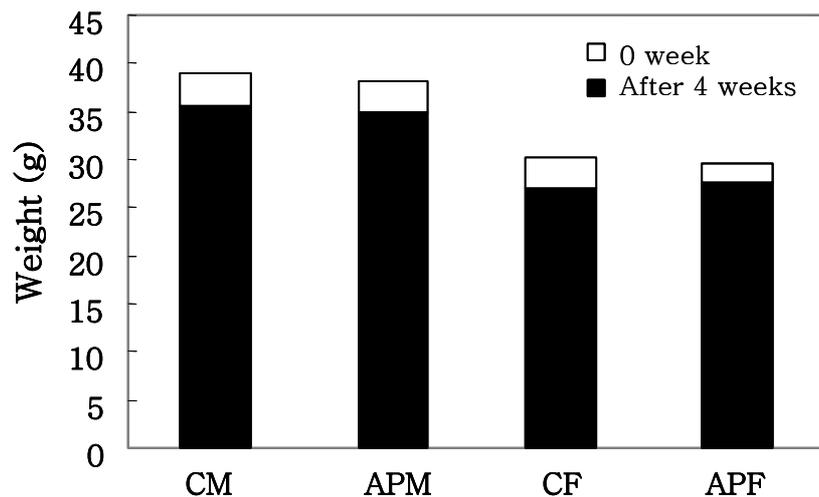


Fig. 2. Changing body weight after oral administration of *A. pilosa* extracts on normal ICR mice for 4 weeks. CM; control male, CF; control female, APM; *A. pilosa* extracts male, APF; *A. pilosa* extracts female. n=10.

Table 2. Measurement of internal organs weight after oral administration of *A. pilosa* extracts on normal ICR mice for 4 weeks.

	Weight	Liver	Stomach	Heart	Spleen	Kidney	Testis
CM	39.03±1.726	1.7±0.195	0.6±0.129	0.23±0.039	0.19±0.029	0.67±0.053	0.32±0.051
CF	30.16±1.66	1.29±0.136	0.58±0.082	0.2±0.027	0.15±0.015	0.43±0.037	–
APM	38.17±2.147	1.71±0.161	0.53±0.141	0.21±0.042	0.18±0.028	0.6±0.053	0.28±0.035
APF	29.63±1.248	1.24±0.011	0.55±0.102	0.15±0.023	0.14±0.018	0.44±0.017	–

Weight : g, CM; control male, CF; control female, APM; *A. pilosa* extracts male, APF; *A. pilosa* extracts female. n=10.

각 group에서 분리한 혈액에서 혈청을 분리하여, 간의 손상 지표인 GOT, GPT와 혈청의 단백질 중 대략 60%를 차지하고 세포에 단백 영양 공급원인 albumin, 내분비계 질환의 지표인 cholesterol, 중성지방 등의 측정을 통해 폐사 등의 가시적인 변화 외에도 생화학적 수치의 변화 등을 측정하였다. 그 결과 control과 비교해 볼 때 통계학적으로 의미 있는 수치적 차이를 보이지는 않았다 (Table 3). 즉, 선학초 추출물의 식이는 mouse의 혈청학적인 이상을 일으키지 않는 것으로 확인되었으며, 선학초 추출물의 안전성은 재확인 되었다.

Table 3. Measurement of serum parameters after oral administration of *A. pilosa* extracts on normal ICR mice for 4 weeks.

	GOT (U/L)	GPT (U/L)	TCHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	CRE (mg/dL)	BUN (mg/dL)	ALB (g/dL)	ALP (U/L)	LDH (U/L)
CM	129.83	53.33	153.33	161.17	0.2	30.62	3.17	31.5	2935.5
CF	158.83	66.5	104.67	144.33	0.12	19.72	3.53	56.33	2989.33
APM	126	56.5	128.5	137.17	0.18	49.6	2.85	34	2529.5
APF	110.5	33.83	103.5	130.5	0.18	27.95	3.55	54.17	2140.83

CM; control male, CF; control female, APM; *A. pilosa* extracts male, APF; *A. pilosa* extracts female. n=10.

실험동물의 외형과 해부한 장기를 육안으로 관찰했을 때 별다른 이상 징후를 발견할 수 없었으며, 조직 병리학적 검사를 위해 적출한 장기중에서 간을 formalin에 고정 후, 5 µm 단위로 절편을 만든 후, H.E (hematoxylin and eosin) stain 하여 관찰한 결과 각 group에서 별다른 손상이 관찰되지 않았다 (Fig 3).

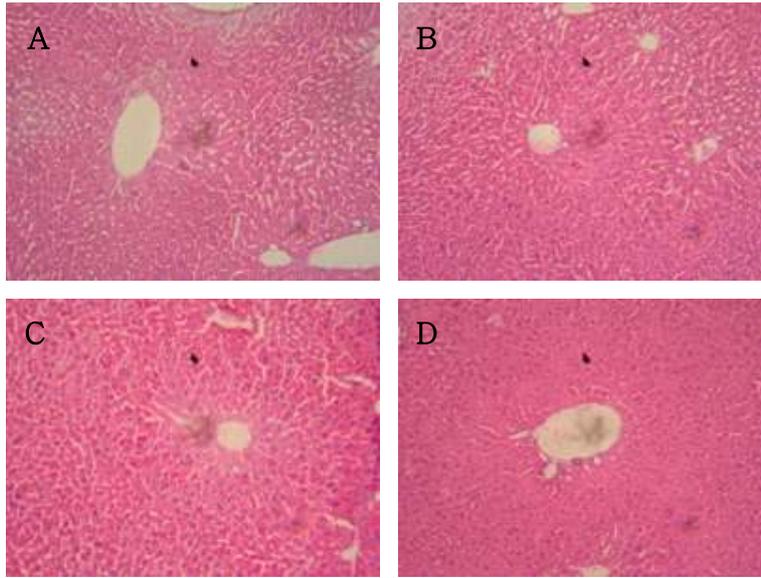


Fig 3. Liver hematoxylin and eosin staining in oral administration of *A. pilosa* extracts for 4 weeks on normal ICR mice.
 A; control male (CM), B; control female (CF), C; *A. pilosa* extracts male (APM), D; *A. pilosa* extracts female (APF). n=6.

이상의 결과에서 선학초 추출물은 설치류 (ICR mouse)에서 경구 투여한 결과 외 관상의 소견과 혈청학적 분석, 조직병리학적 분석 등 일반적인 안전성 테스트 방법을 통해 그 안전성을 확인한 결과 매우 안전하였으며, 생리적으로 영향을 미치지 않는 것으로 판명되었다.

2. 선학초 추출물의 세포독성 검토

가. 항산화 활성 측정

선학초 추출물의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Wako) 법을 이용하여 측정하였다 (Lee, J. H., et al., 2004). DPPH법은 자유라디칼이 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 전자공여능으로 항산화 효과를 측정하는 방법으로 항산화제 탐색에 일반적으로 이용된다.

DPPH 시약 16 mg을 100 ml 에탄올에 녹인 후, 증류수 100 ml을 첨가하여 Whatman paper로 필터 한 용액 5 ml 에 농도별로 희석한 sample과 표준시약인 BHT (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, Sigma)를 각각 1 ml (0.5% 선학초 추출물과 0.05% BHT용액을 100, 300, 600, 1000ul 씩 취하여 증류수로 final volume을 1 ml 로 맞춤) 씩 첨가하여 혼합한 후 30분간 상온에서 방치한 뒤, 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아무것도 첨가하지 않은 DPPH용액을 100으로 보고 라디칼이 소거되는 정도를 백분율로 나타낸 그래프로 선학초 추출물의 항산화 활성을 확인하였다 (Fig. 4). 선학초 추출물과 표준시약의 농도의 차이는 있었지만 대표적인 항산화제인 BHT의 항산화 활성에 못지않은 높은 활성을 보였다.

$$* \text{EDA (electron donating ability=\%)} = \left(1 - \frac{\text{시 료 의 흡 광 도}}{\text{대 조 구 의 흡 광 도}}\right) \times 100$$

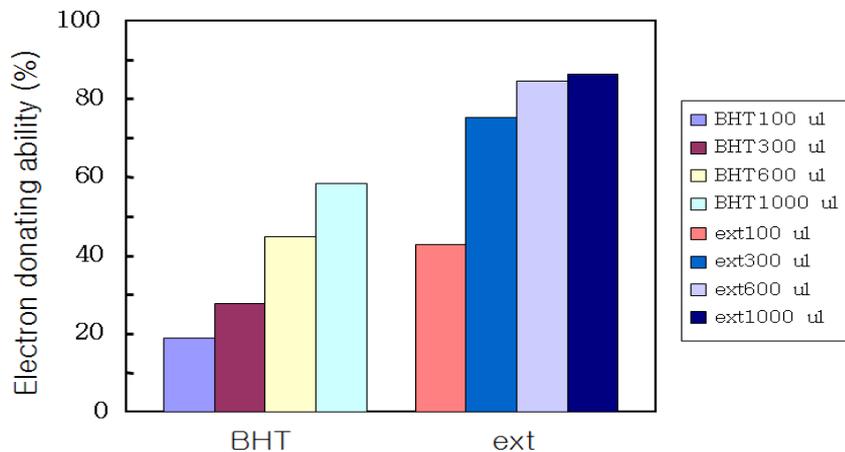


Fig. 4. Electron donating ability of *A. pilosa* extracts.

C; control (DPPH), BHT; 0.005% BHT, ext; 0.5% *A. pilosa* extracts

일반적으로 항산화 활성이 높은 물질은 항암에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 위와 같이 선학초 추출물의 항산화 활성을 확인함으로써 항암제로서의 가능성을 기대하여 정상세포 및 암세포에 대한 증식억제와 마우스에 대한 고형암의 생장억제 실험을 진행하였다.

나. 암세포 및 정상세포의 증식억제 검토

Human normal cell 과 cancer cell을 이용하여 선학초 추출물의 세포 생육저해 효과를 검토하였다.

1) 세포 및 실험재료

인체 자궁암 세포인 HeLa cell, 위암 세포인 AGS cell, 간암 세포인 HepG2, 대장암 세포인 HCT15, 유방암 세포인 MCF7 및 정상 세포주인 293 cell은 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하여 계대배양 하면서 사용하였다. 이들 세포주의 생육을 위한 배양배지인 RPMI-1640과 Fetal bovine serum (FBS) 은 BioWhittaker 제품, trypsin-EDTA는 Gibco (Grand Island, New York) 제품, penicillin-G는 Wako 제품, streptomycin은 Sigma 제품을 사용하였다. 그 외, PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)를 사용하였다.

2) 세포배양

인체 위암 세포주인 AGS, 자궁암 세포주인 HeLa, 간암 세포인 HepG2, 대장암 세포인 HCT15, 유방암 세포인 MCF7 및 정상 세포주인 293은 RPMI 배지에 10% FBS, penicillin G (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험에 제공될 세포수가 되기까지 약 1주일간 배양하고, 배지는 2~3일에 한번씩 교환하였다.

3) 세포증식 및 저해율 측정

AGS, HeLa, HepG2, HCT15, MCF7 및 293 세포를 2×10^5 cells/ml 농도가 되도록 조절하여 6 well culture dish 에 각각 0.5 ml씩 분주하고 배양배지 2.5 ml을 첨가하여 37°C, 5% CO₂incubator에서 4시간 동안 배양하여 세포를 plate 바닥에 부착시킨 후, 선학초 추출물 500 µg/ml 을 첨가하였다. 이를 4일간 배양하면서 시간대별

(24, 48, 72, 96 시간)로 세포수를 측정하였다. 이 때 모든 세포는 3회 반복 측정하였으며, 살아있는 세포수를 조사하기 위하여 trypan blue dye exclusion 법을 이용하여 염색되지 않은 세포의 수를 계산하였다 (trypan blue를 이용하여 cell을 염색할 경우 dead cell은 침투성을 띄게 되어 trypan blue로 염색되고 viable cell은 염색되지 않는다). 배양세포에 1 ml의 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 dish 바닥에서 부유시킨 후 10 ml의 PBS buffer로 씻어 원심분리하고 상층액을 제거한 후 PBS buffer에 재부유된 세포 50 μ l를 0.4% trypan blue stain (Gibco, USA) 50 μ l에 넣어 섞고, 1분후 hemocytometer로 세포수를 측정하였다 (Fig. 5). 이때 시료를 첨가시키지 않는 대조구의 세포수를 기준으로 시료첨가군의 증식억제 효과를 세포 증식율로 산출하는데, 증식율과 사멸율 (%)은 초기 세포수보다 증식된 경우 대조구 세포수를 100%로 정하고 상대적인 증감율을 구하여 효과를 판정하였다. 정상세포인 293과 암세포인 HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7 cell의 생존율을 조사한 결과는 Fig. 5에 나타낸 것처럼 4일째 293, HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7의 생존율은 각각 70.46, 16.72, 8.26, 7.17, 27.64, 5.35% 로 암세포의 대부분이 사멸되는 것이 확인되었다. 특히 MCF7은 24시간내에 약 80% 이상의 세포사멸을 나타내었다. 그러나 정상세포인 293 cell에서도 많은 세포성장 저해 (29.54%)를 보였다 (Fig. 6).



Fig. 5. Cell count of normal and cancer cell used hemocytometer.

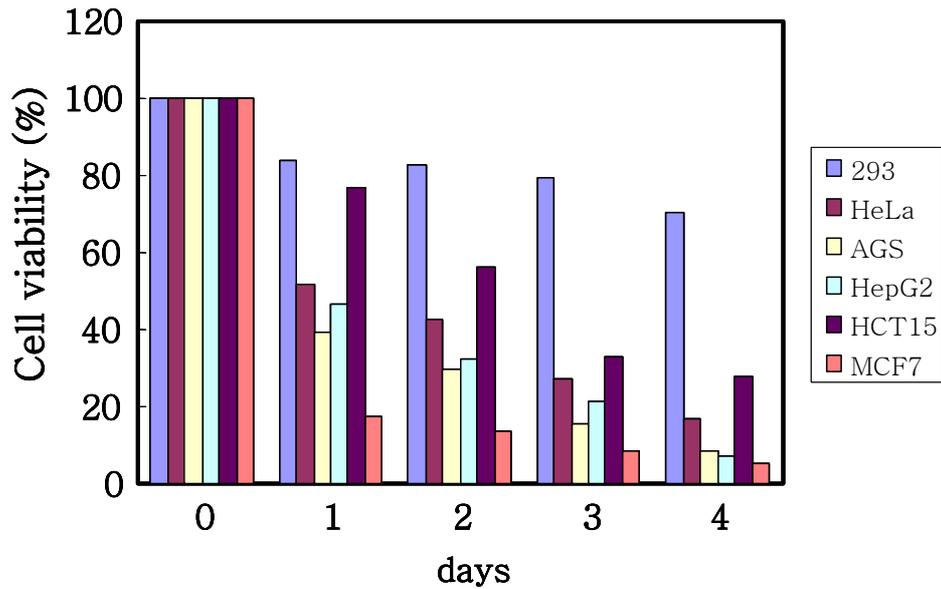


Fig. 6. Cell viability of normal and cancer cell treated with *A. pilosa* extracts.

4) 현미경 관찰

위상차 현미경 (inverted microscope)을 이용하여 세포 사멸을 확인하였다. 정상 세포인 293은 control에 비하여 어느 정도 감소되었으나, 암세포인 HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7 세포에서는 선학초 추출물 (500 μ g)을 처리한 결과 세포수가 상당히 사멸되는 것으로 나타났다 (Fig. 7). 특히 AGS, HepG2 와 MCF7은 약 90% 이상의 세포사멸 효과를 나타내었다, 그러므로, 선학초 추출물은 정상세포의 생육에도 어느 정도 영향을 미치지만 암세포를 사멸시킬 수 있는 항종양 효과는 나타난 것으로 확인되었다.

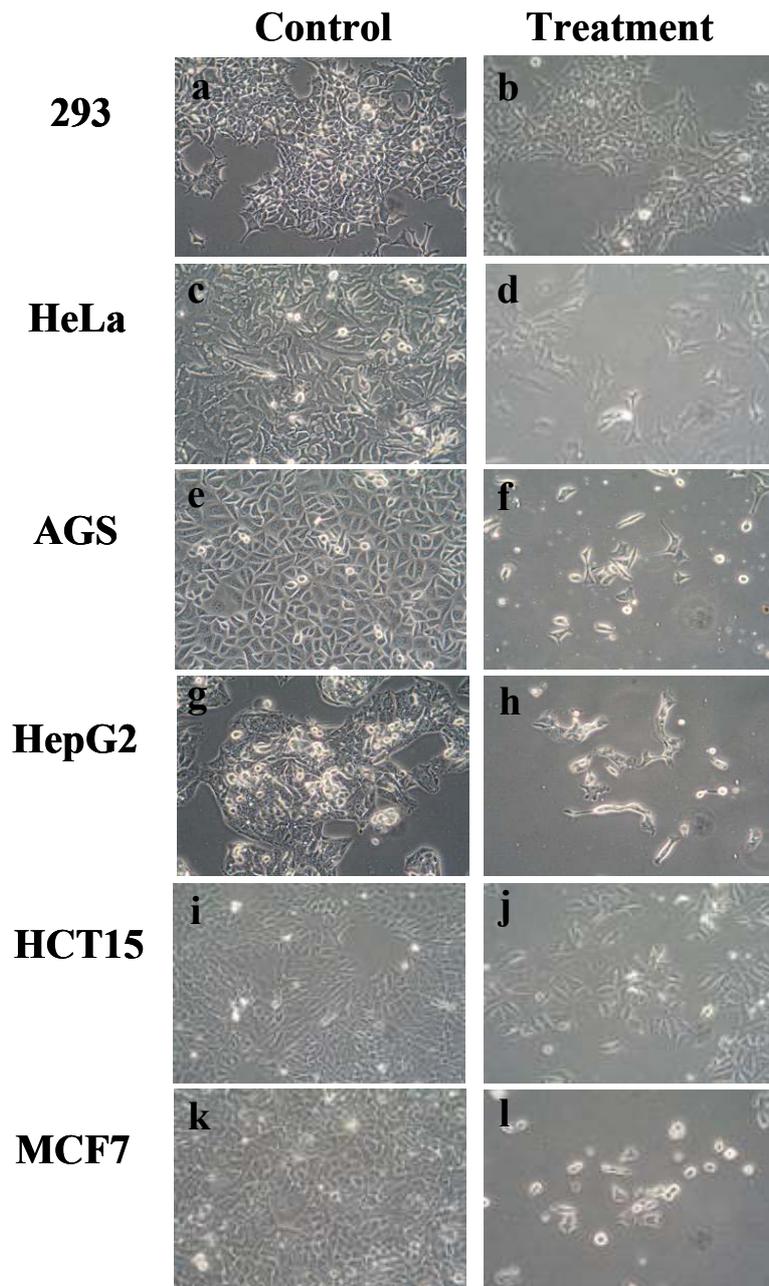


Fig. 7. Optical microscopy of normal (293) and cancer cells (HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7) growth for 4 days. $\times 200$.

a, c, e, g, I, k; overview of control monolayer, b, d, f, h, j, l; treated with *A. pilosa* extracts (500 μg).

5) MTT assay

MTT (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma chemical Co., Louis, Mo., USA)는 대사과정이 온전한 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 불용성 formazan을 생성한다. 이렇게 생성된 formazan을 용해시켜 그 발색 정도를 흡광도로 측정함으로써 살아있는 세포의 농도를 계산할 수 있다. 본 실험에서는 2×10^5 cells/ml 농도가 되도록 조절한 세포를 96 well plate에 100 μ l씩 분주하고 이것을 37°C, 5% CO₂incubator에서 6시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 0, 20, 40, 80, 160, 240 μ g 농도로 선학초 추출물을 첨가하였다. 4일간 37°C, 5% CO₂incubator에서 배양시킨 후, PBS buffer로 희석한 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 각 well 당 10 μ l씩 넣고 37°C, 5% CO₂incubator에서 4시간 동안 방치하였다. 생성된 MTT formazan을 용해하기 위해 solubilization solution (0.04 N HCl in isopropanol)을 각 well당 100 μ l씩 첨가하고, dark blue crystal을 피펫트만을 이용하여 용해시킨 후 ELISA-reader (Bio-Rad Model 550 Microplate Reader, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 293, HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7 세포의 생존율은 Fig. 7에 나타내었다. 이러한 결과는 trypan blue 법을 이용한 세포 생존율 실험 결과와 동일한 경향으로서 선학초 추출물의 항종양 효과를 재확인 할 수 있었다.

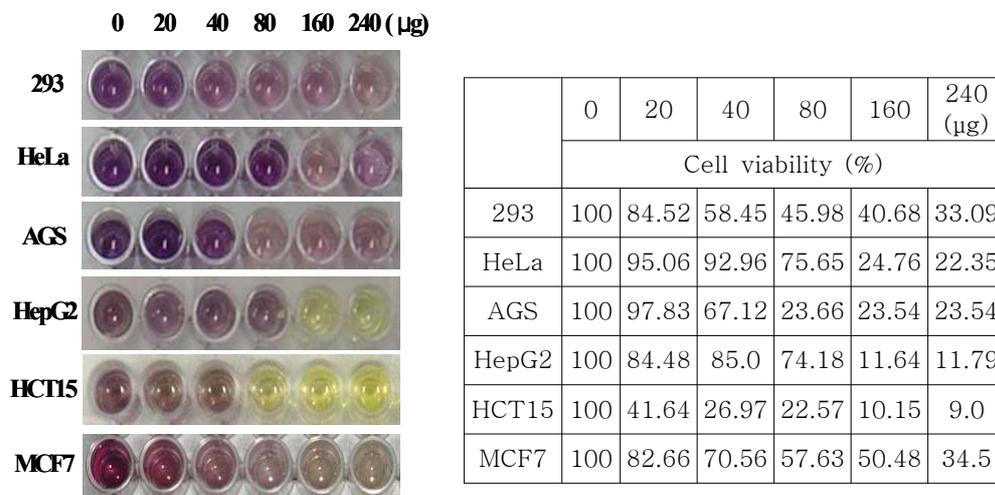


Fig. 8. MTT assay of normal and cancer cell treated with *A. pilosa* extracts.

6) 종양세포주의 DNA 단편화의 검출

세포사 (apoptosis)의 생화학적인 측정법으로서 DNA의 nucleosome 단위로의 단편화를 관찰하는 것이 일반적으로 알려져 있다.

HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7 및 293 세포를 2×10^6 cells/ml 농도가 되도록 조절하여 100 mm tissue culture dish에 분주하고 37°C, 5% CO₂incubator에서 6시간 동안 배양하여 세포를 plate 바닥에 부착시킨 후, 선학초 추출물 500 µg/ml을 첨가하였다. 4일간 배양한 세포의 상층 배지를 제거하고, 배양세포에 1 ml의 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 dish 바닥에서 부유시킨 후 10 ml의 PBS buffer로 씻어 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 20배의 HMW-proteinase K (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1% SDS, 100 µg/ml proteinase K) buffer를 첨가하여 55°C에서 90분간 반응시켜 세포를 용해시켰다. 세포 용해액에 동량의 phenol을 처리하여, 원심분리에 의하여 남아있는 세포막과 단백질 등을 제거하고, 2배의 에탄올을 가한 후 glass병으로 DNA를 회수하였다. 70% 에탄올로 세척, 건조 후 TE buffer에 녹여서 OD 260 nm로 DNA 양을 측정하여 전기영동 하였다. Fig. 8에 나타낸 것처럼 lane 1, 2의 대조군인 293 세포에는 선학초 추출물 처리전후에 별다른 변화가 없으나, 암세포인 HeLa와 AGS 세포에서는 선학초 추출물을 처리한 결과 DNA가 조금씩 분해되어 단편화되는 것처럼 보였다 (Fig. 8, lane 4, 6). 그러나 HeLa와 AGS 세포의 control 에서도 DNA가 분해되는 것이 나타나므로 이것은 세포사에 의한 DNA 단편화가 아니고 자연적인 necrosis 화에 의한 결과로 사료되어졌다 (Fig. 9, lane 3, 5). 이상의 결과 Fig. 5, 6, 7에서 나타난 세포사멸은 DNA 붕괴에 의한 apoptosis가 원인이 아니고 signal transduction 또는 전사 조절 등에 관련 되어지는 것으로 사료되어 졌다.

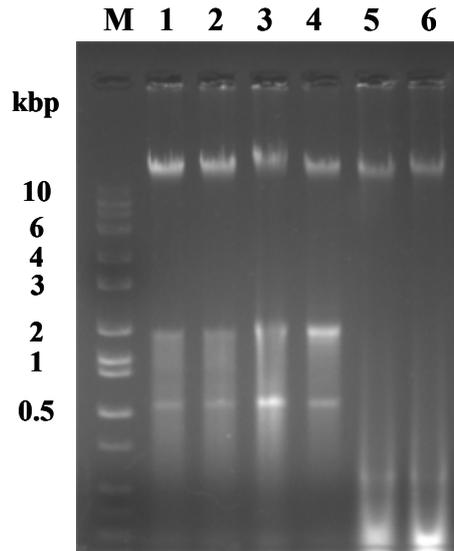


Fig. 9. DNA fragmentation of 293, HeLa and AGS cells. Cells were treated with *A. pilosa* extracts for 4 days. Genomic DNA was extracted, electrophoresed in 1% agarose gel containing 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide and visualized by UV illumination. Lane 1; 293 control cell, lane 2; 293 cells after *A. pilosa* extracts treatment, lane 3; HeLa control cell, lane 4; HeLa cells after *A. pilosa* extracts treatment, lane 5; AGS control cell, lane 6; AGS cells after *A. pilosa* extracts treatment.

다. 종양세포주 단백질의 이차원 전기영동

선학초 추출물 처리를 한 배양 세포의 단백질 패턴을 비교하기 위하여 이차원 전기영동으로 분석하였다. 실험은 정상세포인 293과 자궁암 세포인 HeLa 세포를 이용하였다. 나머지 세포는 세포가 잘 죽어버리고, 단백질량이 너무 적어서 실험결과가 나오지 않았다. 배양한 종양 세포주를 원심분리하여 세포만을 모으고, lysis buffer (9.5 M Urea, 4% CHAPS, 35 mM Tris, 65 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.01% SDS, 1 mM PMSF, 3 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A and 0.5% ampholite 3/10)를 이용하여 용해시켰다. 용해된 sample은 원심분리하여 soluble protein 만을 회수하고, Bradford 방법 (Bradford, MM., 1976)에 따라 단백질을 정량하여 two-dimensional electrophoresis (2-DE)를 시행하였다. 2-DE는 정량된 sample 100 μg 을 고정화된 IPG strip (Bio-Rad)을 이용하여 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15시간 동안 rehydration 하여, Bio-Rad사의 Protein

IEF cell을 이용하여 rehydration한 IPG strip을 isoelectric focussing 하였다. Isoelectric focussing이 끝난 IPG strip은 equilibration buffer I (6 M Urea, 0.375 M Tris pH 8.8, 2% SDS, 20% glycerol, 2% (w/v) DTT)과 equilibration buffer II (6 M Urea, 0.375 M Tris, pH 8.8, 2% SDS, 20% glycerol, 2.5% (w/v) iodoacetamide)를 이용하여 평행화 시키고, SDS-PAGE gel (12%) 위에 strip을 놓고 전기영동 한 후, silver staining 법으로 염색하여 확인하였다.

Staining 방법으로는 gel을 고정액 (50% methanol, 12% acetic acid, 0.5 ml 37% formaldehyde/L)에 1시간 반 이상 고정한 후, 첫 번째는 50% ethanol, 두 번째는 삼차 증류수로서 각각 20분간 세척했다. 전처리 용액으로 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L)로서 1분간 반응 및 20초간 3회 증류수로 세척하고, AgNO_3 (2 g/L)에 0.75 ml 37% HCOH/L 에 넣어서 30분간 정치 후 20초간 3회 증류수로서 세척하였다. 발색용액 [Na_2CO_3 (60 g/L), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 mg/L), 0.5 ml 37% HCOH/L] 으로 발색 시킨 후, 20초간 3회 증류수로 세척하였다. 정지용액 (50% MetOH, 12% AcOH)으로 반응을 정지시켜, 50% methanol로 세척하여 Image analyzer로 분석하였다 (Fig. 10). 분석 결과, 미묘한 단백질의 차이는 여러 곳에서 나타났으나, 정확하게 어떤 단백질에 의하여 세포사가 유발되었다고 생각되어지는 단백질은 검출되지 않았다.

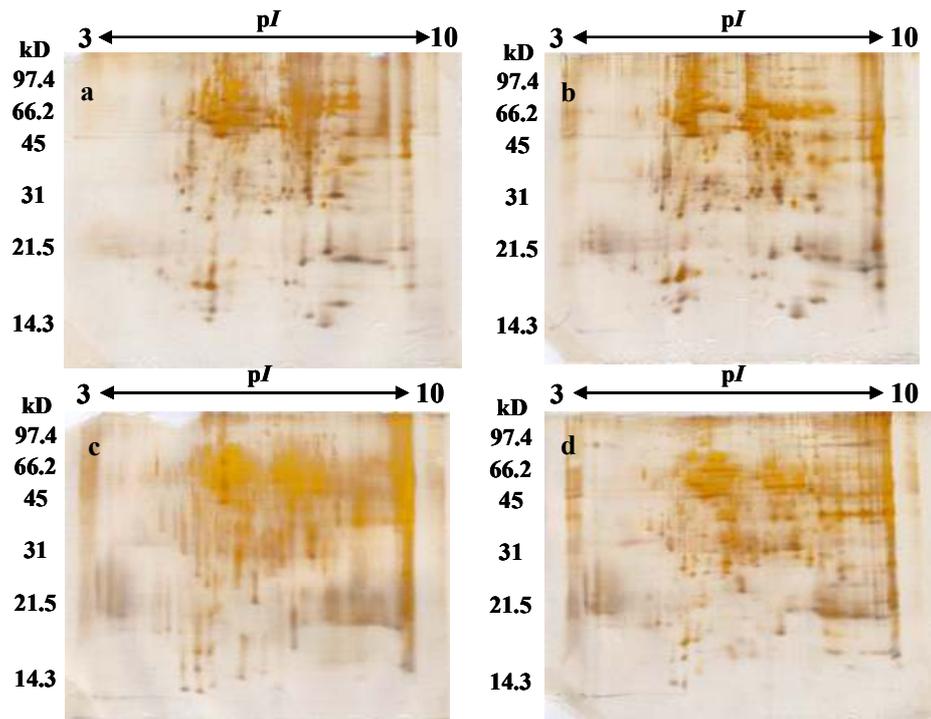


Fig. 10. Two-dimensional gel electrophoresis of the soluble proteins (100 μ g) of 293 and HeLa cells. Proteins were separated on an IPG strip of 3–10 pH range and subsequently on a 12% SDS–PAGE gel; detected by silver staining. (a) 293 control cell, (b) 293 cells after *A. pilosa* extracts treatment. (c) HeLa control cell, (d) HeLa cells after *A. pilosa* extracts treatment.

3. 선학초 추출물의 항암 효능 연구

가. 재료 및 방법

1) Sarcoma 180 세포의 배양

Mouse에 고형암을 유발시키기 위하여 종양 세포주인 Sarcoma 180을 이용하였다 (Kim, H. Y., 1991). 세포 배양 배지는 RPMI 1640 medium (Gibco) 에 10% 되게 FBS를 첨가하여, 5% CO₂, 37°C가 유지되는 세포 배양용 배양기에서 배양하였다.

2) 종양 질환모델동물 작제

효창 사이언스로부터 구입한 6주령의 BALB/c mouse (male) 20 마리를 사육실에서 1주일간 순화시킨 후 mouse 한 마리당 1×10^8 개의 배양 세포를 100 μ l의 PBS에 현탁하여 mouse의 서혜부에 주입하였다 (Kim, J. S. and Lee Y. S., 1989). 종양세포 주입 후, mouse를 무작위로 2군 (Control; 세포주 주입, AP; 세포주 주입 후 종양 발생을 확인 후 선학초 추출물 섭이, 각 group n=10)으로 분류하여 각각 다른 케이지에 넣고 사육하였다.

나. 항종양 효과 검토

1) 관찰 및 측정

종양 세포주 주입 후 12시간까지 매시간 동물의 활동성과 외부 반응을 관찰하고, 주사 다음날부터 5주간 mouse의 체중 변동과 종양의 성장 (tumor volume (mm³); 장경 \times [단경]² \times 1/2)을 측정하였다 (Takaku, T. et. al., 2001). 실험기간동안 육안적인 관찰에서도 종양 발생시 활동성이 떨어지는 것이 확인되었다. 종양세포주를 주입하고 5주간 주 3회 체중을 측정한 결과 평균 증가량은 control 6.64 g, AP 7.62 g 으로 각각 25, 29%의 증가를 보여 체중의 증가량에서의 별다른 차이를 보이지 않았다 (Fig. 11).

최종 실험 종료시에 종양 보유율은 control과 AP 모두 가지고 있었으나, 종양 주입 3주일 후부터 선학초 추출물을 섭이한 AP의 경우에는 종양의 성장이 control에 비해 통계적으로 유의 있게 감소하는 것이 확인되었다 (Fig. 12). 그러므로 선학초 추출물은 종양 세포의 성장억제에 효과가 있음을 알 수 있었다.

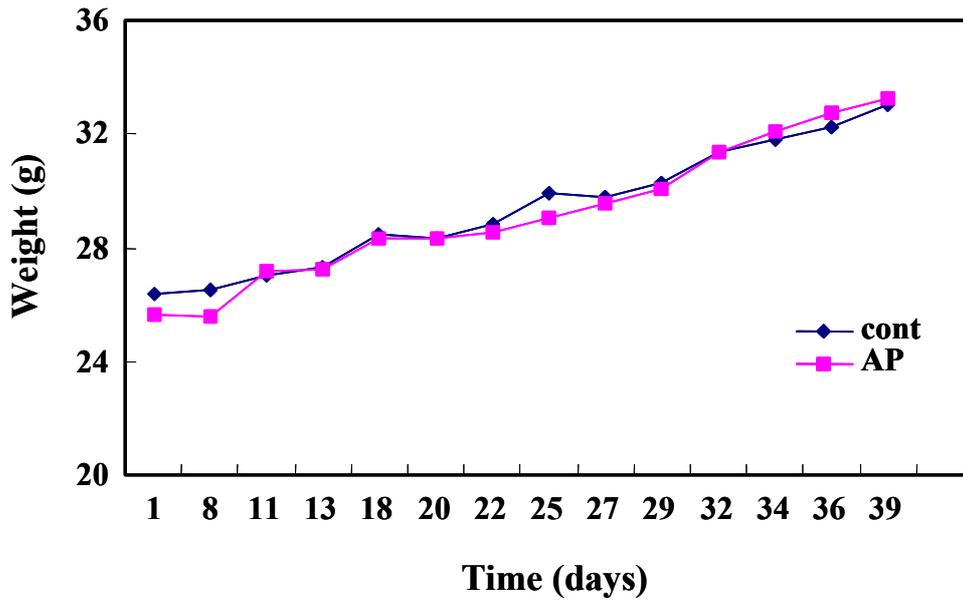


Fig 11. Changing body weight after oral administration of *A. pilosa* extracts on sarcoma 180 bearing mice for 5 weeks.

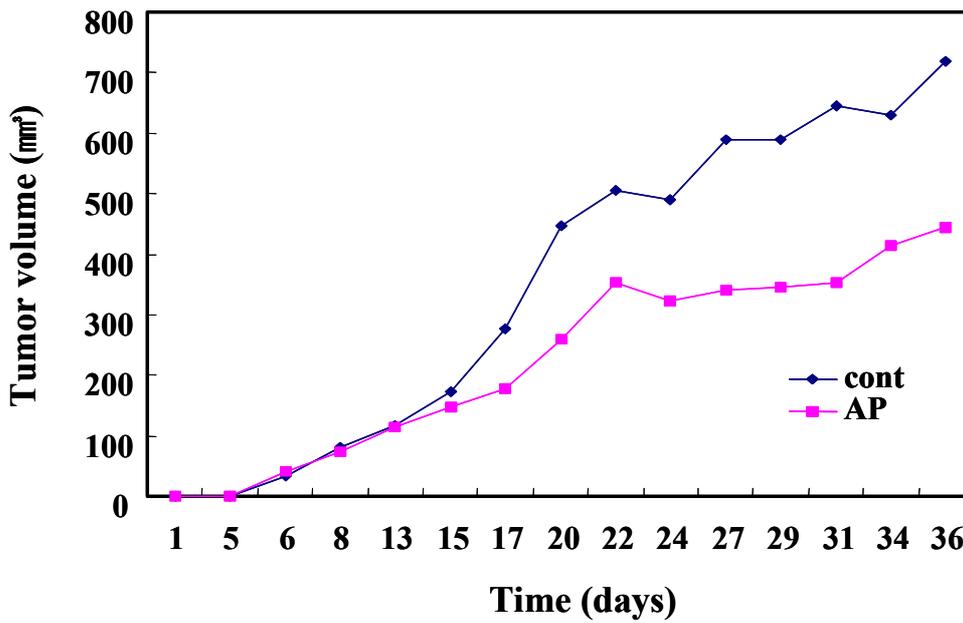


Fig 12. Effects of oral administration of *A. pilosa* extracts on tumor volume in sarcoma 180 bearing mice for 5 weeks.

종양 주입 5주 (39일) 후 모든 mouse를 부검하고 혈액과 종양을 분리 적출하였다. 실험 도중에 control과 AP 섭취군에서 각각 2마리씩 사망하였으며 사망 이유는 육안으로 볼 때 서혜부의 종양이 거대해지면서 항문 주위가 막혀버렸기 때문으로 사료되었다. 적출한 종양은 Fig 12, 13 에 나타내었으며, 각 group에서의 종양의 무게 평균은 control 7.736, AP 5.735 g으로 나타났으며, AP 섭취군의 종양 크기는 control에 비하여 약 25.87% 감소하였다. 따라서 선학초 추출물을 섭취한 실험군에서 발생된 종양의 크기 및 무게가 대조군에 비해 감소한 것으로 보아, 어느 정도의 항암 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

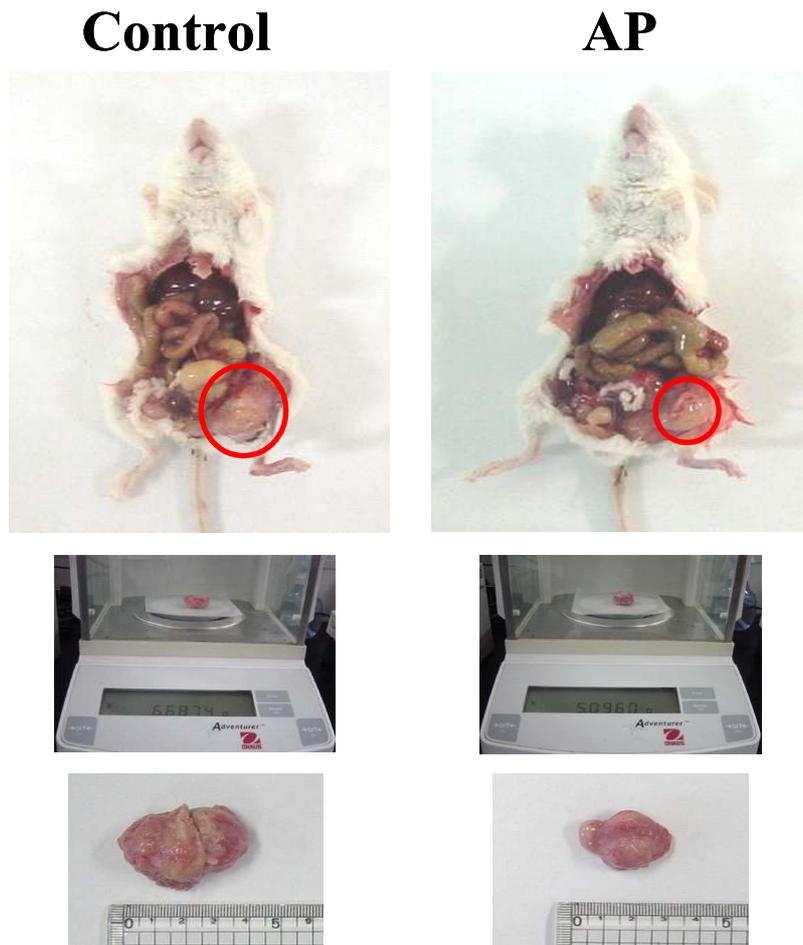


Fig 13. Confirm of solid tumor and decrease tumor volume with oral administration of *A. pilosa* extracts in sarcoma 180 bearing mice.



Fig. 14. Confirm of solid tumor and decrease tumor volume with oral administration of *A. pilosa* extracts in sarcoma 180 bearing mice.

적출된 종양의 무게를 기준으로 inhibition rate를 구한 결과 AP 섭취군의 종양 저해율은 25.87%로 확인되었다 (Table 4) (Lee, W. Y. et. al., 1988).

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{mean tumor weight of treated mice}}{\text{mean tumor weight of control mice}} \right) \times 100$$

Table 4. Effect of control and AP on the growth of sarcoma 180 bearing mice

Group	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)	Tumor incidence of recipient mice
control	7.736	0	8/8
AP	5.735	25.87	8/8

2) 혈청 임상 생화학적 검사

각 group에서 분리한 혈액에서 혈청을 분리하여, GOT, GPT, albumin, cholesterol, 중성지방 등의 측정을 통해 고형암의 크기 등의 가시적인 변화 외에도 혈청 생화학적 수치의 변화 등을 측정하였다. 그 결과 control과 비교해볼 때 선학초 추출물의 식이에 의해 간기능 지표인 GOT, GPT 수치는 control에 비하여 각각 2.5%, 34% 감소하였다. Total cholesterol 은 0.53% 높게 나타났으나, 중성지질은 10.8% 낮게 나타났다. 신장기능장애의 지표로 사용되는 creatinine은 37.5% 감소, 신장애, 부신피질 기능부전 등에 관련이 있는 BUN은 3% 감소하였다. 혈청 단백질인 albumin은 2.7% 감소하였다. 뼈, 간, 담관의 질환이나 악성종양, 임신 등의 상태에서 현저하게 늘어나는 혈청 ALP 수치는 23.8% 감소 하였으며 악성종양, 간 질환, 심장질환, 혈액질환 등에서 고 활성을 나타내는 LDH의 수치는 control에 비하여 0.75% 낮게 나타났다. 이러한 결과는 정상 mouse의 혈청학적 수치와 비교해 볼 때 종양 발생에 의해 간에서의 손상이 야기되고, 선학초 추출물 식이에 의하여 간 손상 등이 회복되어지는 것으로 사료되어졌다 (Table 5).

Table 5. Measurement of serum parameters after oral administration of *A. pilosa* extracts in sarcoma 180 bearing mice for 5 weeks.

	Control	AP
GOT (U/L)	326.67	318.5
GPT (U/LD)	125.33	82.83
TCHO (mg/dL)	105.44	106
TG (mg/dL)	156.56	139.67
CRE (mg/dL)	0.24	0.15
BUN (mg/dL)	30.6	29.7
ALB (g/dL)	2.6	2.53
ALP (U/dL)	47.22	36
LDH (U/dL)	1870	1856

결론적으로 선학초 추출물은 sarcoma 180에 의한 고형암 발생 동물 모델에서 고형암이 발생된 후에 식이 하더라도 25.87%의 억제 효과를 보였다. 이는 선학초 추출물에 의해 sarcoma 180이 mouse의 서혜부에 부착된 이후에도 고형암의 성장이 어느 정도 억제 될 수 있다는 것을 의미하였다.

현재 사용되는 항암제의 수는 작용기전, 성분, 세포주기 등에 따라 50여 가지가 된다. 하지만 이들 항암제 사용의 가장 큰 문제점은, 다른 약물과 달리 특이성이 없는 것이다. 즉 항암제는 분열이나 증식이 빠른 세포에는 모두 작용하므로 정상적으로 세포분열이 왕성한 세포 (골수세포, 위 장관 상피세포, 모낭)에도 피해를 입혀 정도의 차이는 있으나 골수억제, 위장장애, 탈모 등의 부작용이 거의 모든 환자에서 발생한다. 또한, 항암효과 이외에 면역성을 억제하는 작용이 있어 장기이식 수술 후 거부 반응을 억제시킬 목적으로도 사용되나 암 환자에서는 면역성을 저하시켜 감염의 위험이 된다. 이러한 이유로 천연물 유래의 안전성이 우수한 항암 요법제에 대한 연구가 꾸준히 진행 되어왔고, 많은 유용한 물질들을 함유한 제품이 시판되고 있다. 예를 들면, 인삼의 사포닌 (Lee, W. Y. et. al., 1988) 및 버섯 다당체 유래의 Lentinan, Schizophyllan, Grifolan, Flammulian 제품 등이 있다.

본 연구에서 개발한 선학초 추출물도 종양세포 및 종양질환모델 동물에서 특별한 부작용 없이 우수한 항종양 효과를 보임으로써 항암제로서의 가능성을 확인하였으며, 제형의 다양화를 통하여 신규 제품 개발이 가능할 것으로 보인다.

다. 시제품 개발

Human cancer cell의 생육저해 및 증양질환모델 동물에서 항종양 효과가 입증된 선학초 추출물을 원료로 하여 건조, 살균 과정을 거쳐서 분말, 과립, 환 등의 시제품을 개발하였다.

분말



과립



환



라. 제품화를 위한 경제성 분석

1) 국내의 항산화·항노화에 관련된 기능성 식품은 피크노제놀, 폴리페놀, 베타카로틴, 알로에, 프로폴리스, 클로렐라 등의 천연물 유래 성분을 이용한 제품이 주종을 이루고 있으며, 국외에서는 자몽, 오렌지, 레몬 등에서 추출한 Citrus bioflavonoid와 소나무 껍질과 포도씨에서 추출한 피크나제놀이 가장 활발하게 연구되고 있다. 최근 캘리포니아계 CreAgri사에서 개발된 올리브 오일에서 추출한 polyphenol계 올리브 추출물은 동맥경화증, 암, 그리고 항균 활성에 강력한 작용을 보였으며 면역시스템을 향상시키는 것으로 보고되고 있다. 항암제는 화학요법제 보다 점차 생물학적 제제로 바뀌어져 가고 있으며 면역요법, 유전자치료, 신생혈관형성 억제 등에서 최근에는 효능 및 부작용이 개선된 사이토카인이 가장 성공적인 개발품목으로 평가받고 있다. 그리고 기존 기술의 임상적 적용을 위한 기술 개발과 새로운 약물전달기술개발, 특허보호 등의 방법으로 기존의 개발 제품을 차별화하여 시장 위치를 강화하려는 방향으로 전개되고 있다. 또한 특정 종양에만 작용하는 ‘표적치료제’ 등이 점차적으로 높은 성장률을 보이고 있다.

2) 선학초 추출물은 민간요법에서 암 환자 치료에 이용되고 있으며, 국내의 약용

식물 중 삼백초, 어성초와 더불어 3대 항암 약초로 알려져 있다. 본 연구결과에서 선학초의 항산화 및 항암효과는 입증되었으며, 항산화 및 항암 유효 활성 물질을 함유한 일반식품, 기능성 식품 및 기초의약품 소재 개발을 위하여 1차적으로 분말, 과립, 환 등의 시제품을 제작하였다. 현재 시판되는 선학초는 생초 1 kg에 15,000원, 건조 1 kg에 40,000~100,000원 (명진건강원, 강원약초), 삼백초는 건조 500 g이 5,000원, 삼백초 환 150 g이 10,000원 (제천학들영농조합 법인), 어성초는 건조 1 kg에 29,000원, 분말 1 kg에 30,000원 (제주한라원) 으로 판매되고 있다. 그러나 선학초는 아직 환이나 과립 등의 제품으로는 판매되지 않고 있으며, 본 사는 제품의 구매의욕 고취와 기능성을 강조할 수 있는 포장 및 디자인 등을 선택하고 각종 기자재 및 추출 정제 등의 부대비용을 포함 하여 150g~250g 정도의 과립 및 환 등을 조제하여 약 50,000원~100,000원 정도의 제품을 출시 할 것으로 예상하고 있다. 제품의 판매는 본 사의 영업망을 최대한 활용하거나 전국적인 유통판매망을 가진 대리점 등에 납품할 예정이다. 최종적인 경제성 분석은 SWOT 분석 등 여러 가지 요인이 필요하므로 현재로서는 예측이 불가능한 상태이다.

3) 최근 산업의 급격한 발달, 지구 생태계 및 식생활의 변화 등으로 암, 고혈압, 당뇨병, 비만 등 생활습관병이 계속 증가하는 추세에 있다. 특히 암은 우리나라 사망원인 중 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, 2003년 건강보험통계연보에 의하면 1995년에 비해 대장암 4.2배, 유방암 3.9배, 갑상선암 3.9배, 췌장암 2.7배 증가한 것으로 발표 되었다. 세계 암 발생률은 매년 7~8% 씩 증가하고 있으며, 암에 대한 발생기전이 불명확하여 난치성 질병으로 알려져 있고, 다양한 항암제가 개발되어 있으나 독성에 의한 부작용이 나타나기 때문에 암 치료의 문제점으로 지적되고 있으므로 부작용이 없으면서 효능이 우수한 저가의 항암 효과를 가진 천연물 유래의 기능성 소재의 개발이 절실하게 요구되고 있다. 그러므로 전통적인 민간요법에서 알려져 있는 암환자 치료 효과와 본 사의 연구결과에서 밝혀진 강력한 항암 작용을 가진 선학초는 마케팅 면에서도 유리한 입지를 가진다고 볼 수 있다.

4) 국내 건강기능성 식품시장은 바이오벤처 중심의 약리적, 과학적 근거에 의한 고급기술을 기반으로 노화억제, 면역증강, 비만 및 당뇨 등 만성적 질환개선 등의 연구 분야가 활발하게 진행되면서 매년 10% 이상의 성장을 지속하고 있다. 따라서 건강기능식품법 시행으로 소비자들에게 정확한 제품정보를 제공하게 됨으로써 시장 활성화를 기대하고 있다. 특히 우리나라 식품산업은 원재료 70%이상을 수입에 의존하고 있으나 건강기능식품 산업은 우리 벤처기업들의 선진기술을 바탕으로 국내자생식

물 유래의 원료만으로 개발이 가능하기 때문에 국내 식품산업의 구조개선 전략분야로 인식되어 제조 및 국가적 지원체계와 규모가 대폭 확대될 것으로 전망된다.

라. 기술개발 결과

1) 학술대회발표

Cell growth inhibitory effects against cancer cells of a extracts from *Agrimonia pilosa*. 한국 분자·세포생물학회 추계학술대회, 2007. 10.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 선학초 순화재배 및 병해방제 연구

선학초의 순화재배법의 연구를 위해서 전국 각지에서 선학초를 수집하였고, 유전자원을 보존하며, 그 특성을 연구하여 순화재배에 적합한 계통을 선발하였다. 또한 재배법 연구를 통하여 이제까지 알려진 재배적 특성과 더불어 더욱 발전시키고자 종자의 최적 발아환경과 재배시 시비법 및 차광정도에 따른 선학초의 생장을 조사하였다. 병해방제연구를 위해서는 재배되는 선학초에 발생하는 식물병을 분리 및 동정하였고, 그 우선순위를 결정하여 가장 피해가 큰 병해인 흰가루병에 대해서 친환경적으로 방제를 목적으로 실험을 진행하였다. 전국각지에서 선학초 70여종을 수집하여 유전자원을 보존하였으며, 보존된 유전자원중 21계통을 선발하여 그 특성을 연구하였다. 계통은 염색체 수 조사를 통하여 *Agrimonia pilosa*와 *Agrimonia coreana*로 크게 구분하였으며, 계통중 CA10은 흰가루병에 강한 저항성을 나타내고 개화가 늦은 만생종으로서 개화 이전에 수확하는 선학초의 특성상 가장 재배에 적합한 품종으로 판명된다. 종자발아의 최적환경은 20일간 저온층적처리후에 20-25℃서 가장 발아율이 좋았으며, 선학초의 생장은 차광을 하지 않았을때 가장 좋았고, 시비량은 N-P2O5-K2O의 비율이 22-10-10일때 가장 생장이 좋았고, 또한 총 폐놀화합물량도 무차광과 N-P2O5-K2O의 비율이 22-10-10일때 가장 많은 양을 나타 내었다. 흰가루병은 병원균(*Sphaerotheca aphansis*)을 확인하였고, 그 친환경적 방제를 위해서는 발병초기에 난황유를 7일 간격으로 2회 이상 처리하면 방제 할 수 있다. 위의 연구결과로 선학초의 대량생산을 위한 모델을 구축할수 있었고, 또한 대량생산시 가장 문제가 되는 식물병을 친환경적으로 방제할 수 있는 방법을 마련함으로써 목표에 충분히 달성되었다고 판단된다.

2. 선학초에서 생리활성물질의 분리와 구조확인 및 합성방법연구,

본 연구는 직접 재배한 선학초를 건조 후 여러 가지 조건하에서 추출을 진행하여 본 연구에 필요한 추출물을 확보할 뿐만 아니라 제 3과제에 필요한 추출물을 제조하였다. 컬럼 크로마토그래피법과 HPLC를 이용하여 유효성분을 분리하였다. 또한 유효성분 대량 확보를 위해 분리방법을 최적화하였으며 분리 되어진 유효성분에 대해서는 IR, NMR, Mass등의 분석 장비를 활용하여 구조동정을 하였다. 유효성분의 대

량확보를 위한 합성 방법에 대해서도 연구하였고 용매별, 부위별, 시기별 추출물에 대해서 여러 가지 생리활성 연구를 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피를 통해 알려지지 않는 물질 1개와 생리활성이 있는 것으로 알려진 스테로이드계 물질 2개를 분리하였으며 HPLC를 통해 생리활성이 있는 것으로 알려진 폴리페놀류 화합물 9개를 분리하였다. 각 용매별, 월별 및, 각 부위별 추출물에 대한 생리활성을 실험하여서 본 보고서에 보고하였으나 각 유효성분에 대한 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하며 알려지지 않는 여러 물질들의 생리활성 실험도 병행되어야 할 것으로 사료된다. 단일 화합물이 특이한 생물활성을 보일 경우(라)에 따라서 합성을 하면 대량확보가 가능하다. 이러한 연구 결과로부터 추구하였던 목표는 달성 되었다고 할 수 있다.

3. 선학초로부터 분리된 유효 활성물질의 항암 효능연구

본 연구는 우리나라 3대 항암 약초로 알려져 있는 선학초 추출물의 독성 및 안전성 실험, 세포독성 검토 그리고 항암 효능을 연구하여 시제품을 개발하였다. 독성 및 안전성 실험은 식품의약품안전청의 독성시험기준 (식품의약품 안전청 고시 제 1999-61호, '99. 12. 22.)에 준하여 실험동물을 이용한 임상생화학적 검사를 실시하였다. 암수 ICR mouse를 이용하여 안전성 실험을 한 결과 각종 자극에 대한 반응, 운동(행동), 호흡, 경련, 피모 및 피부, 배설물 등의 상태를 관찰한 결과 특별한 이상 현상은 나타나지 않았으며, mouse를 부검하여 혈청학적분석, 조직병리학적분석 등 일반적인 안전성 test를 통해 안전하다는 것을 확인하였다. 암세포를 이용한 세포독성 효과는 선학초 추출물을 암세포에 주입하여 암세포의 생육저해 효과를 검토하였다. 정상세포인 293과 암세포인 HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7 cell의 생존율을 조사한 결과 4일째 293, HeLa, AGS, HepG2, HCT15, MCF7의 생존율은 각각 70.46, 16.72, 8.26, 7.17, 27.64, 5.35%로 암세포의 대부분이 사멸되는 것이 확인되었다. 선학초 추출물의 항암효능은 BALB/c mouse에 종양 세포주인 Sarcoma 180을 서혜부에 주입하여 고형암을 유발시킨 후 선학초 추출물을 섭이하여 종양의 크기변화를 관찰하였다. 5주 후 mouse를 부검하여 종양 크기를 확인한 결과 control에 비하여 선학초 추출물 섭이군의 종양크기는 25.87% 감소하였다. 최종적으로 암세포의 생육저해 및 종양질환모델 동물에서 항종양 효과가 입증된 선학초 추출물을 원료로 하여 건조, 살균 과정을 거쳐서 분말, 과립, 환 등의 시제품을 개발하였다. 위의 연구 결과로 협동과제에서 하고자 하는 목표는 달성 되었다.

제 2 절 관련분야에서의 기여도

1. 선학초 순화재배 및 병해방제 연구

국내의 약용작물 실태는 成(2003a)에 의하면 지리산에 109개과 975종의 약용식물이 자생하며 이들 중 한국특산은 희귀하다고 한다. 한약재의 종류는 국내에서 재배되는 것이 60-70여종에 이르며 정부의 정식통계자료는 40여종으로 약 10,187ha에서 30,387톤을 생산하여 조수익은 4,500억원에 이른다(成, 2003). 이중에서 3대 향암 약초로 삼백초, 어성초, 선학초가 알려져 있는데 이중에서 유일하게 재배면적 및 생산에 관하여 통계에 잡히지 않을 정도로 선학초의 재배생산은 미미한 상태에 있는 실정이다. 이에 선학초의 유전자원을 수집하여 보존할수 있게 되었으며, 순화재배법을 연구함으로써 재배시 더욱 많은 수확량을 가질수 있으며, 병해 방제법을 개발함으로써 대량 재배를 가능케 할 것이다. 또한 이 연구에서 밝혀진 방법들을 다른 약용작물에 이용함으로써 우리나라 약용작물 생산에 이바지 할 것이다.

2. 선학초에서 생리활성물질의 분리와 구조확인 및 합성방법연구

선학초는 거의 섭취시 독성이 없는 약용식물로 알려져 있는데 되고 약용작물은 계절변화가 뚜렷한 우리나라 재배적지에서 생산한 것이 2차 대사산물의 집적량이 높다. 천연물화학 발달에 따른 기능성 물질탐색에 대한 국제 간 경쟁이 치열하므로 국가 경쟁력 강화차원에 동 분야의 연구개발이 필수적이다. 이에 선학초의 생리활성물질을 분리하고 구조를 확인함으로써 선학초를 건강식품으로 개발하는 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. 또한 선학초의 항미생물 효과 및 항암효과에 대한 초기 연구 결과는 관련 전문가에게 넘겨져 이들 효과에 대한 보다 체계적이고 심층적인 연구로 연결어야 할 것이며 새로운 의약품을 개발하는 데 활용되어야 할 것으로 판단된다.

3. 선학초로부터 분리된 유효 활성물질의 항암 효능연구

국내에서 암 환자의 발생이 매년 늘어 사망 순위 1위로 큰 사회적 문제가 되고 있다. 따라서 천연물로부터 개발되어 부작용이 없으면서 항암 효과가 우수하고 기존 약제와 시너지효과를 가지는 천연물 유래 고부가가치 기능성 소재의 발굴이 필요하게 되었다. 본 선학초의 대량생산 기술개발, 기능성물질의 동정 및 효능검증을 통하여 경제성이 큰 천연자원의 산업화 기술개발로 글로벌 경쟁시대에서 생명공학 산업의 발전을 통한 국내 수요는 물론 외국으로 수출도 가능 할 것이다. 본 연구에서 선학초의 독성과 항암효과를 다각도에서 분석함으로써 건강식품 개발의 자료로 활용될 수 있을 것이고, 또한 여러 제형화를 통해서 실제로 제품이 생산 가능할 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 수행함으로써 도출된 결과들은 다양하게 활용될 것이다.

첫째, 연구결과들은 논문으로 발표될 것이다.

짚신나물 흰가루병에 관련한 논문을 한국약용작물학회 투고중에 있으며, 재배적인 기술에 관한 논문을 준비 중이다. 또한 각 용매별, 월별 및, 각 부위별 추출물에 대한 생리활성 확인에 관한 논문과, 짚신나물의 안정성과 나물 생산에 관련한 논문이 2008년도에 발표 될 것이다. 또한 후속 연구가 진행 중인 결과들도 빠른 시일 내에 논문으로 발표될 것이다.

둘째, 농민의 짚신나물 재배를 장려하기 홍보 및 재배기술 전파를 할 것이다.

산청군 약초생산조합과 연계하여 짚신나물의 효용성을 알리기 위한 강연을 개최하고, 확보된 유전자원을 분양하고, 재배기술을 이전하여 현장에서 짚신나물의 재배 시 생길 수 있는 애로사항들을 해결해 나갈 수 있도록 할 것이다. 또한 대규모 재배시 문제가 되는 병해 방제에 관련하여 본 연구에서 실행한 방법으로 친환경적으로 방제법을 전파함으로써 짚신나물의 부가가치 향상을 위한 노력을 할 것이다.

셋째, 짚신나물의 안정적인 생산과 소득 증진을 위한 제품개발에 주력할 것이다.

건강식품으로 산업화를 위해서는 제품의 고급화가 필요하고, 원료의 확보를 위해서는 재배법의 보완과 수집한 계통간에 약효성분 함량에 변이가 있을 것이므로 그에 대한 추가 조사를 수행하고 선학초의 재배 후 야생에서 채집한 것과의 약효성분 비교 비교할 것이다. 시제품 개발하였으나 경제성 맞는 실용화 제품의 개발에 노력하고 대규모 생산을 위한 재배기술을 확립하고 선학초 중 생산성, 기능이 우수한 계통을 증식하여 국립 종자원에 품종등록을 하고, 경제성 분석을 하여 농가소득이 높을 경우 대량 생산기술, 소비확대를 위한 추가적인 연구를 수행하여 약품개발보다 농민에게 홍보하여 식용재배를 우선시 할 것이다. 제품화를 위한 경제성 분석을 수행할 것이다.

넷째, 후속연구를 위한 기초자료로 활용될 것이다.

본 과제에서 도출한 주요 결과는 초기 연구결과에 관련 전문가에게 넘겨져 생물활성(항산화, 항암, 항미생물) 효과에 대한 보다 체계적이고 심층적인 연구로 연결어아 할 것이며 새로운 의약품을 개발하는 데 활용될 것이다. 또한 관련한 후속 연구를 위한 기초자료 및 다른 작물에도 연구법을 적용될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

국의 연구동향으로는 야마기 등(1989)은 선학초로부터 항세균물질을 분리 phloroglucinol 유도체 4종을 동정하였고 이어서 포도상구균 *Staphylococcus aureus*에 대하여 천연 phloroglucinol과 합성물질 효과를 비교하였다(야마기 등, 1994). 카사이 등(1992)은 선학초로부터 항세균성 카테킨 유도체를 동정하고 포도상구균에 대한 활성을 보고하였다. 대만의 Hsu & Cheng(1992)는 선학초 전초추출물의 실험동물 혈당치 강화효과를, Faug 등(2002)은 flavonoid 추출조건을, Li 등(2002)은 열추출물의 정상쥐에 대한, 에탄올 추출물은 alloxan diabetic mice에 대한 혈당치 강화효과를 보고하였다.

Pei and Zhu(1990)은 선학초의 흡지(吸枝)로부터 agrimonolide, tormetic acid, ellagic acid 그리고 신물질인 4-O-β-D-xylanopyranoside of ellagic acid의 구조를 동정하였다. 이에 따라 우리나라에서도 식물병 연구를 강화하여 청정약초 생산에 주력하면서 특히 기능성 물질을 동정하고 전(前)임상 연구를 통하여 효능을 검증하여 동분야 연구잠재력을 개발하여 국제 경쟁력을 키워나가야 할 것이다. 소비자 입장에서 볼 때 암은 국내외에서 사망원인 1위를 점하는 주요 질환이고 심장병 등의 타 질환은 지난 50년간 사망률이 절반까지 감소하였는데 암에 의한 사망률은 오히려 증가하는 추세이다 (Parker, et al., 1996).

암 치료에서 흔히 화학요법을 사용하지만 항암화학요법의 부작용으로 치료를 계속할 수 없는 경우가 많다. 이에 따라 항암제와 병용 투여 시 효능을 증진시키는 항암보조제에 대한 모색에 있어 기생충약인 levamisol, 엽산유도체인 leukovorin이 개발되어 국내외에서 상당한 효과를 보이고 있다. 특히 leukovorin은 항암 증진 효과 외에 정상세포 보호 작용이 있어 대장암, 골수암 등에는 항암제와 함께 표준 치료약이 되었다. 그러나, 암 환자수가 증가되고 있고 진단되는 암의 종류가 다양해지는 만큼, 여러 천연물로부터 항암제 및 항암보조제를 개발하는 연구의 필요성이 절실한 실정이다. 따라서, 이러한 약용식물들의 약리 효능에 관한 과학적인 연구를 수행하고 기능성 소재를 개발하면 비교우위를 점할 수 있다.

제 7 장 참고문헌

- Ahmedzai, S. H. and Walsh, D. 2000. Palliative medicine and modern cancer care. *Semin. Oncol.* 27(1):1-6
- Ahn SoonCheol et al. 2002. Screening of inhibitory activity of medicinal plants against heparinase. *Korean Journal of Pharmacognosy.* 33(2):144-150.
- Anonymous. 1960. Index of Plant Diseases in the United States. U. S. Dept. Agric. Handbook. No. 156 Washington, D.C. 531p.
- Brenckle, J. F. 1918. North Dakota fungi-II. *Mycologia* 10:199-221
- Cooke, W. B 1975. The 1970 Indiana foray. *Mycologia* 67:1065-1071.
- Domingos S. Nunes, Armin Haag and Hans-Jurgen Bestmann, 1989. Two Proanthocyanidins from the bark of *dalbergia monetaria*, pytochemistry. 28(8):2183-2186.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28, 350-356
- Fang GuiZhen, Wang HongJiang, Sun Xiaoyi. 2002. Extraction technology of total flavanoids in *Agrimonia pilosa*. *Chemistry and Industry of Forest Products.* 22(3):62-64.
- Fang Gui Zhen, Wang Hong Jiang, Su Wen Qing, 2002. Optimum extracting of the druggery composition in *Agrimonia pilosa* Dedeb. *Journal of Northeast Foresry University.* 30(1):36-39.
- Farr, David F. et al. 1989 *Fungi.on plant and plant products in the U.S* APS Press. St. Paul. Minn. USA 1522pp.

- Hiratsuka, N. 1958. Revision of taxonomy of the Pucciniastreae. Tokyo, Japan 167p
- Horikawa, K. et al. 1994. Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo [a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs.
- Hsu, F et al. 1992. Investigation in rats of the antihyperglycaemic effect of plant extracts used in Taiwan for the treatment of diabetes mellitus. *Phytotherapy Research*. 6(2):108–111.
- Kartashova, G. S., Gravel', I. V., Taran, E. G., 1991. The content of tannins in *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Rastitel'nye Resursy*. 27(1):139–143.
- Kartashova G. S., Kerasheva S. I., Romanova G. V. 1998, Antibacterial activity of dry extract from the above-ground part *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Rastitel'nye Resursy*. 34(3):100–103.
- Kazumi Horikawa, Takami Mohri, Yoshito Tanaka and Hiroshi Tokiwa. 1994. Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs. *Mutagenesis*. 9(6):523–526.
- Kasai, S. et al. 1992. Antimicrobial catechin derivatives of *Agrimonia pilosa*. *Phytochemistry*. 31(3):787–789.
- Kim, H. Y., Bae, H. S. and Baek, Y. J. 1991. In vivo antitumor effects of lactic acid bacteria on Sarcoma 180 and mouse lewis lung carcinoma. *J. kor. cancer* **23**, 188–196
- Kim, J. S. and Lee Y. S. 1989. Effects of *Ganoderma lucidum* extract on the development of rat liver preneoplastic lesions. *Korea J. Toxicology* **5**, 135–149

- Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, K., Okamoto, A., Saito, M., and Yamamoto, T. 1986. Studies on Chinese medicines used for cancer. III. Cytotoxic constituent against HeLa cells in the fruit of *Trapa bispinosa* Roxb. *Yakugaku Zasshi* 106(2): 183–185
- Lai Yeap Foo. 1989. Flavanocoumarins and flavanophenylpropanoids from *Phyllocladus trichomanoides*. *Phytochemistry*. 28(9):2477–2481.
- Lee, L., Huang, Y., Kandaswami, C., and Lee, M. 2001. Flavonoids inhibit the invasive potential of tumor cells via the modulation of focal adhesion kinase. *Proc AACR* 42: 4274
- Lee, Sang Myung et al. 2000. Inhibitory activity of plants extracts on cell–ECM adhesion. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 31(4):394–400.
- Li WeiLin et al. 2002. Effect of Chinese traditional medicinal plant on lowering blood glucose level to mice. *Journal of Plant Resources and Environment*.11(2):29–32.
- Lee, W. Y., Shim, W. N., Kim, J. D., Koh, E. H., and Kim, B. S. 1988. Restoration of adriamycin and vincristine dependent tumoricidal activity by Ginseng saponin in mice with implanted tumor cells. *J. kor. cancer* **20**, 126–132
- Min Byung Sun et al. 2001. Inhibitory effects of Korean plant on HIV–1 activities. *Phytotherapy Research*. 15(6):481–486.
- Mix, A. J. 1954. Report of the 1952. foray. *Mycologia* 46:112–123.
- Parker, S. L., et al. Cancer statistics, 1996 *CA Cancer J. Clin.* 46: 5

- Pei, Y. H., Zhu, T. T. 1990. Studies on the structure of a new ellagic acid glycoside from the root-sprouts of *Agrimonia polosa* Ledeb. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 25(10):798–800.
- Rahman, M. M., Mosaddik, M. A., Wahed, M. I. I., and Haque, E. 2000. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Trapa bispinosa*. *Fitoterapia* 71: 704–706
- Rosenberg, S. A. 1997. Principles of cancer management: Biological therapy. *In*: DeVita VT, editor *Cancer: Principles and practise of oncology* ed 5. Philadelphia: Lippincott–Raven p. 349
- Satoshi Morimoto, Hisako Tanabe, Gen–Ichiro Nonaka and Itsuo Nishioka. 1988. Prenylated flavan–3–ols and procyanidins from *illicium anisatum*. *Phytochemistry*. 27(3):907–910.
- Shin, Hyeon–Dong 2000. *Sphaerotheca aphanis* U. Braun. pp216–220. in *Erysiphaceae of Korea*. Nat. Inst. Agric. Sci. Tech, Suwon, Korea 320pp.
- Shizuo Kasai. Sayaka Watanabe, Jun Kawabata, Satoshi Tahara and Junya Mizutani. 1992. Antimicrobial catechin derivatives of *Agrimonia pilosa*. *Pytochemistry*. 31(3):787–789.
- Takaku, T., Kimura, Y. and Okuda, H. 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei murill* and its mechanism of action. *J. Nutr.* **131**, 1409–1413
- Yamaki, M., Kashihara, M., Ishiguro, K., Takagi, S. 1989. Antimicrobisl principles of Xian He Cao(*Agrimonia pilosa*). *Planta Medica*. 55(2):169–170.

- Yamaki, M., Miwa, M., Ishiguro, K., Tadagi, S. 1994, Antimicrobial activity of naturally occurring and synthetic phloroglucinols against *Staphylococcus aureus*. 8(2):112-114.
- 김태정, 1996. 한국의 자원 식물II 150.
- 성낙술 2003. 약용작물의 농업적 배경 및 전망. 지리산 약초 국제경쟁력 향상을 위한 2003 국제약초산업발전심포지엄. pp5~23. 산청군, 경상남도 농업기술원. 152pp.
- 성환길 2003a. 지리산의 약용식물 자원생약. “우리나라 자생약초의 개발과 활용” 경상대학교 생명과학연구소 약초연구센터 심포지엄 proceeding. pp.93-129.
- 신현동, 나용준 1992. 한국산 흰가루병균의 미기록 기주식물 후보. 한국식물식물병리학회지 8(1):57-60.
- 안순철, 김보연, 오원근, 이명선, 배은영, 강대욱, 안종석. 2002. 수종 생약의 Heparinase 저해활성 검색. 생약학회지 33(2):144-150.
- 이건세, 안형식, 이영성, 구범환. 1998. 암 환자의 대체 요법 실태. 대한암학회지. 30(2): 203-213
- 이용호 등 2000. 선학초의 종자처리에 따른 발아와 생육 Korean J. Medicinal Crop Sci. 8(2):129-133
- 이용호 2001. 선학초(*Agrimonia pilosa* L.) 수집종의 유연관계분석과 재배법 및 효능. 동아대학교 대학원, 박사학위 논문 99pp
- 이용호 등 2002. 仙鶴草 추출액이 흰쥐의 生理活性에 미치는 효과 Korean J. Medicinal Crop Sci. 10(3):167-170

이용호 등 2002b. RAPD를 이용한 짚신나물(*Agrimonia pilosa* L.) 수집종 유연관계 분석. 한국자원식물학회지 15(3):250-259

이은숙 서부일 2003. 짚신나물 *Agrimonia pilosa* Leded. 추출물에 의한 *Escherichia coli* KCTC 2441의 생육억제 Kor. J. Herbology 18(1):15-20

이상명, 이호재, 이충환, 안인파, 나민균, 배기환, 고영희, 2000. 암세포에 대한 식물 추출물의 세포의 기질 접착저해 활성. 생약화학회지. 31(4):394-400.

정경숙, 김윤식, 2000. 한국산 짚신나물속(*Agrimonia*)의 분류학적 연구. Kor. J. Plant Tax. 30(4):315-337.

정보성. 1984. 원색 천연약물 대사전. 서울:남성당, p. 271

鄧元錐. 1976. 中草藥治療癌腫. 北京:藥要書刊, p. 103

주 의

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