

최 종
연구보고서

여우구슬로부터 항관절염 한방 바이오 소재 개발

Development of Anti-arthrits Nutraceuticals from *Phyllanthus
urinaria* L.

연구기관
국립원예특작과학원

농림수산식품자료실



0017733

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “여우구슬로부터 항 관절염 한방 바이오 소재 개발”의 보고서로 제출합니다.

2009년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 국립원예특작과학원
주관연구책임자 : 박 춘 근
세부연구책임자 : 박 춘 근
협동연구기관명 : 호 서 대 학 교
협동연구책임자 : 강 명 화
협동연구기관명 : 한국화학시험연구원
협동연구책임자 : 고 상 범

요 약 문

I. 제 목

여우구슬로부터 항 관절염 한방 바이오 소재 개발 이용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종 개발목표는 여우구슬(*Phyllanthus urinaria L.*) 안전 다수확 재배기술 확립을 통한 고품질 여우구슬을 개발하고, 여우구슬에 함유된 항 관절염 활성 물질의 탐색 및 항 관절염 효능을 평가하여 여우구슬을 이용한 항 관절염 관련 기능성식품의 개발이다. 항 관절염 치료제 개발은 한약재 유래 신약으로 자생 한방병원과 천연물과학연구소에서 CBB-13, SK제약의 조인스정, 구주제약은 벌독을 이용한 제품을 개발하였으나, 이러한 생물학적인 제제는 그 치료비용이 미국에서 1년간 약 15,000불정도 소요된다. 국내에서도 1000만원 이상의 비용이 발생하여 경제적인 부담이 매우 크고, 항 관절염 치료제는 부작용이 많으므로 부작용 치료약품이 개발되고 있으나 부작용의 종류가 다양하고 또한 치료제 자체의 부작용도 간과할 수 없으므로 부작용 없는 저렴한 기능성 성분의 개발이 절실 요구된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 여우구슬 안전생산기술 개발

여우구슬 유전자원은 국내 유전자원은 남부, 중부 등 권역별로, 국외 유전자원은 2007년 상반기 남미 브라질, 파라과이에서 수집하였으며, 수집시 토성, 고도 등 자생지 환경을 조사하였다. 수집자원의 향산화 활성 및 식물형태적 특성을 조사 하였다. 유망자원을 선발하여 작물화를 위한 기초 자료를 구축 하였다. 여우구슬 작물화를 위한 기초연구를 받아 적온, 저장 방법 등 발아율 증진 기술을 구명 하였다. 여우구슬 안전생산기술 개발연구는 표준재배기술개발과 기 개발 된 표준재배기술을 종합 적용하여 수량성 증대를 위한 연구를 수행 하였다. 표준재배 기술개발은 피복재료 선발, 적정 파종기 및 재식밀도, 질소 시비적량 수확시기, 건조조건 구명 연구를 수행 하였다.

2. 여우구슬 함유 항 관절염 물질의 분리기술 확립

여우구슬 유효성분의 추출·분리를 위해 전초, 종자 추출물을 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol로 분획 후 활성이 좋았던 ethyl acetate 층을 이용하여 unknow peak1으로 추정되는 플라보노이드 계통의 물질인 saponarin을 분리·정제 중에 있으며, 염증 및 항 관절염에 효과가 있는 것으로 알려진 β -Sitosterol의 성질을 이용하여 chloroform 분획 물로부터 성분을 분리하기 위하여 Silica gel column chromatography 에 sephadex LH-20을 4 x 50 cm까지 충전 시키고, chloroform 분획물중 2 g을 loading하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol (100 : 10)을 사용하여 전개하였다. 컬럼으로부터 용리하면서 60ml씩 분획을 수집하고 이들을 TLC((Toluene : Ethyl acetate : Formic acid (4: 5 : 1)) 전개 후 UV 254 nm, 334 nm에서 확인 후 A-E 까지 분리 하였으며, 95%-H₂SO₄로 발색시킨 후 유사분획끼리 통합하여 4개의 소

분획 (Fr.1-Fr.4)으로 나누었다. 즉, Fr.1은 1-20 분획물을 농축한 것이며 같은 방법으로 Fr.2는 21번부터-23번의 것, Fr.3는 24-27번의 것, 그리고 Fr.4는 20번-30번까지의 것을 각각 농축하였다. 이중 Fr.1을 hexane에서 재결정화를 수행하였을 때 무색의 침상정을 얻을 수 있었으며 이를 화합물 I이라 하였고, 254 nm, 334 nm 파장에서 확인 할 수 있었던 F(Rf=0.65)를 HPLC(μ -Bondapak C₁₈ 3.9x300 mm ; flow rate 0.8 ml/min ; inject vol., 20 μ l ; detector, 280 nm)를 통해 Compound I을 분리·정제 하였다. compound I의 ¹H-NMR spectrum은 Varian Unity Inova 300MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, CHCl₃-d₆용매를 사용 하였고 ppm 단위로 나타내었다. ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) 측정결과 δ : 0.68(3H, s, 18-CH₃), 0.81(6H, d, J =6.9Hz, 26-CH₃ and 27-CH₃), 0.84(3H, d, J =6.3Hz, 29-CH₃), 0.92(3H, d, J =6.6 Hz 21-CH₃), 1.01(3H, s, 19-CH), 3.52(1H, m, H-3), 5.36(1H, br, s, H-6)을 갖는 것으로 proton 이 29개 관찰 되어, 지표물질인 β -Sitosterol 로 확인 되었다. 정량분석 결과 초임계 추출물에서 β -Sitosterol 의 함량이 높게 나타났다. 이외에 Saponarin으로 추정되는 unknow peak1의 물질은 전초와 씨 분획물 중 ethyl acetate 층에서 가장 높은 함량을 보였으며, 식물성 스테롤의 추출에 유용했던 초임계 추출방법에서는 unknow peak1은 검출 되지 않았다. 현재 이물질을 구조·동정 중에 있다. 이물질이 구조·동정 된다면 β -Sitosterol 과 saponarin의 상관관계를 구명 할 예정이며, 이 식물에서는 처음으로 saponarin을 구조·동정 하는 것이다. 따라서 여우구슬의 지속적인 연구가 수행된다면 새로운 천연항산화제는 물론 항 관절염의 예방 및 치료를 위한 우수한 소재로서의 이용가능성을 확인 할 수 있었다.

3. 여우구슬 추출물의 항 관절염 및 독성에 미치는 영향

여우구슬추출물의 항염효과 평가를 위하여 20분 후에 evans blue를 마우스의 꼬리 정맥으로 주입하고 복강내로 유출되는 extravasation을 620 nm 흡광도를 측정하였다. Branch Ex. extracted with CHCl₃:MeOH(3:1)의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비해 용량 의존적인 감소를 나타냈으며, 200 mg/kg 투여군의 경우 통계학적으로 유의성있는 결과(p<0.05)를 보였다. Seed Ex. extracted with 80% MeOH의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 대조군과 비교해 용량 의존적인 감소를 나타냈으며, 200 mg/kg 투여군의 경우 통계학적으로 유의성있는 결과(p<0.01)를 보였다. 따라서, 여우구슬 추출물 중 Branch Ex. extracted with CHCl₃:MeOH(3:1)과 Seed Ex. extracted with 80% MeOH가 200 mg/kg에서 항염효과가 있는 것으로 판단되었다.

여우구슬추출물의 항관절염 효과 평가를 FCA로 유도된 관절염 랫드 모델에서 8주간의 여우구슬 추출물들을 1일 1회 경구투여 후 염증성 족부종의 억제효과를 검색하였다. 여우구슬의 지표물질인 beta-sitosterol 투여군(G2)은 대조군(G1)의 부종을 현저하게 억제하였으며, 500 mg/kg의 여우구슬1추출물 투여군(G4) 및 250, 500 mg/kg의 여우구슬2추출물 투여군(G5, G6)에서 역시 대조군에 비해 현저한 부종의 감소를 유도하였다. AST 수치에서 G2, G3, G4 및 G6 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다. 염증으로 인한 세포 및 근육 손상의 유무를 판별하기 위하여 Lactate dehydrogenase(LDH) 및 creatinine kinase(CK)를 측정한 결과, LDH 수치는 G2, G3, G4, G7 및 G8 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈으며, CK 수치는 G2, G3, G4 및 G6 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다. 따라서, 여우구슬2 추출물이 면역세포의 조절과 염증 억제작용에 대한 실험적 유효성을 확인할 수 있었으며 임상적 응용이 가능할 것으로 사료된다.

SD 랫드에 대한 여우구슬추출물(PUE)의 4주 반복 경구투여 독성시험을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 농도로 설정하여 주7회 반복 경구 투여 후 나타나는 전신적 독성변화와 무해용량을 파악하기 위하여 실시하였다.

시험기간 동안 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 시험기간 동안 폐사 및 빈사동물은 관찰되지 않았다. 대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 체중의 변화는 관찰할 수 없었다. 암컷 및 수컷의 절대 및 상대장기무게에 있어서 대조군과 비교해 유의성 있는 변화는 나타내지 않았다. 수컷 및 암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 유의성 있는 혈액학적 변화는 관찰되지 않았다. 혈액생화학적 측정에서, 수컷 및 암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 유의성 있는 혈액생화학적 변화는 관찰되지 않았다. 조직학적 변화에서, 시험물질투여군과 대조군 사이에 차이를 보이는 표적장기는 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 여우구슬추출물(PUE)을 500, 1,000, 및 2,000 mg/kg/day 용량으로 4주간 경구로 반복 투여하였을 때, 유의할 만한 독성이 유발되지 않았으므로 무해용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)은 2,000 mg/kg/day 이상으로 판단되었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 국내 자생식물 여우구슬의 작물화를 위한 유전자원 수집 및 재배기술 개발 결과를 요약하면 아래와 같다.

여우구슬은 우리나라 35개 지역에 분포 하였으며, 여우구슬 종자 발적온은 25℃ 처리가 우수하였다. 여우구슬 작물화를 위한 표준재배기술은 피복재료는 흑색비닐, 파종기는 5월 10일, 재식밀도는 20×10cm, 질소시비량은 6kg/10a에서 생육이 우수하였다. 여우구슬 추출물은 FCA로 유도된 염증을 완화시키면서 염증세포의 침윤을 억제하는 것으로 판단된다. 류마티오이드 관절염에 미치는 영향을 관절의 부종 및 외형변화, 체중의 변화, 염증성 과립백혈구의 활성화 및 조직학적 변화 등을 관찰한 결과, 여우구슬추출물이 면역세포의 조절과 염증 억제작용에 대한 실험적 유효성을 확인할 수 있었으며, 임상적 응용이 가능할 것으로 사료된다. 그 활성성분은 베타시토스테롤로 밝혔다. 이러한 결과는 향후 식물유래 천연 항 관절염기능소재 및 제품개발에 이용될 수 있을 것이다.

Summary

I. Title

Development of Anti–arthritis Nutraceuticals from *Phyllanthus urinaria*

II. Objective and necessity of research and development

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

III. Contents and scope of research and development

1. Development of cultural practice in *Phyllanthus urinaria L.*

For a crops of domestic native plant "*Phyllanthus urinaria L.*", it was summarized a collection resources and cultivation technics as followings. The distribution of *Phyllanthus urinaria L.* ranged in our country 35 areas, the lifestyle of collection resources at individual the area have a difference. The optimal temperature of seed germination is 25°C, The optimal Storage period is 10month and and The optimal Storage temperature is 25°C. The standard cultivation technique for crop, it was excellent for growth to condition that clothing material is the black vinyl, sowing time is May 10th and planting density is 20×10 cm, and amount of fertilized nitrogen is 6kg/10a. The optimal harvest time of *a Phyllanthus urinaria* crop was on October 20th when completed flowering time on this time, Yield of *Phyllanthus urinaria* is 562kg/10a

2. Isolation and identification of Anti–arthritis substance from *Phyllanthus urinaria L*

For separation of *Phyllanthus urinaria L* bead active component total exclusive of seed and seed extract nature of β – Sitosterol that is separating and refine saponarin that is material of flavonoid system assumed by unknow peak1 because uses ethyl acetate layer which vitality was good after demarcation by chloroform, n–hexane, ethyl acetate, butanol, and is known as that effect is in inflammation and clause arthritis use . From the decompressed and concentrated chloroform layer, 4 small fractions (Fr1, Fr2, Fr3, Fr4) were obtained using a column chromatography filled with sephadex LH–20. TLC was done with a mixed solvent system of Toluene : Ethy acetate : Formic acid (4: 5 : 1 by volume). The

TLC spots were detected by visualizing them with a UV lamp and 5% H₂SO₄ (in EtOH). That is, Fr.1 concentrates 1–20 fraction and Fr.2 concentrated each thing from 21 times–thing of 23 times, Fr.3 is thing of 24–27 times, and Fr.4 20 times – to 30 times by same method. Fr.1 could get colorless needle crystal when achieved recrystallization in hexane and F (rate of flow = 0.65) that this could was known as compound I, and confirm in 254 nms, 334 nm waves separates and refined Compound I through HPLC (μ -Bondapak C 18 3.9x300 mm ; Flow rate 0.8ml/min ; Inject vol . 20 μ l ; Detector, 280 nms). ¹H-NMR spectrum of compound I measured by Varian Unity Inova 300MHZ (Varian Inc . Palo Alto, CA . USA), and used CHCl₃-d₆ solvent and appeared by parts per million. This analysis result of compound with NMR is as follows : ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ : That have 0.68 (3H, s, 18-CH₃), 0.81 (6H, d, J = 6.9Hz, 26-CH₃ and 27-CH₃), 0.84 (3H, d, J = 6.3Hz, 29-CH₃), 0.92 (3H, d, J = 6.6Hz 21-CH₃), 1.01 (3H, s, 19-CH), 3.52 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, br, s, H-6) proton these 29 β - Sitosterol Ro that is surface of the earth material being observed confirm . β - Sitosterol relationship content appeared high in quantitative analysis wave and supercritical extract. In addition, material of unknow peak1 assumed by Saponarin was shown the highest content at ethyl acetate floor of Hoekmul total exclusive of seed and seed minute, and unknow peak1 was not detected in supercritical abstraction method that was useful in abstraction of vegetable property sterol. Is rescuing and sympathize now alien substance. Is going to investigate interrelation of β - Sitosterol course saponarin if alien substance rescues and is sympathized, and rescue and sympathize saponarin for the first time in this plant. All these results suggest that further studies of *Phyllanthus urinaria*.. will reveal its availability as both a natural antioxidant and an anticancer agent and its potential for prevention and treatment of anti-inflammatory.

3. Anti-arthritis effect and toxicity of *Phyllanthus urinaria*

To examine anti-inflammatory effect of *Phyllanthus urinaria* extract (PUE), evans blue was injected into tail vein of mouse. Then, extravation of evans blue in abdominal cavity was measured the absorbance at 620 nm. 50, 100 and 200 mg/kg of Branch Ex of *P. urinaria* extracted with CHCl₃:MeOH(3:1) showed a dose-dependent decrease of extravation compared to control group. 200 mg/kg of Branch Ex. of *P. urinaria* extracted with CHCl₃:MeOH(3:1) showed a significant decrease of extravation compared to control group. 50, 100 and 200 mg/kg of Seed Ex. of *P. urinaria* extracted with 80% MeOH showed a dose-dependent decrease of extravation compared to control group. 200 mg/kg of Branch Ex. of *P. urinaria* extracted with 80% MeOH showed a significant decrease of extravation compared to control group. Therefore, it is suggested that 200 mg/kg of branch ex. and 200 mg/kg of seed ex. of *P. urinaria* have an anti-inflammatory effect.

To examine anti-arthritis effect of *P. urinaria*, it was administered orally for 8 weeks in FCA-induced arthritis rat model. Then, inhibitory effect of inflammatory paw edema investigated in FCA-induced arthritis rat. Beta-sitosterol, a ingredient of *P. urinaria*,

inhibited significantly FCA-induced paw edema. Also 500 mg/kg of PUE1 (group 4) and 250 and 500 mg/kg of PUE2 (group5 and group6) induced a significant decrease of paw edema. In AST level, group2, group3, group4 and group6 showed a significant decrease of paw edema. To examine tissue damage and inflammation, lactate dehydrogenase(LDH) and creatinine kinase(CK) was measured. LDH level was decreased significantly in group2, group3, group4, group7 and group8 compared to control group. CK level was decreased significantly in group2, group3, group4 and group6 compared to control group. Therefore, PUE2 exhibited a beneficial activity of arthritis and these findings may provide the pharmacological basis of the clinical usage of PUE in treatment of arthritis.

Finally, the repeated 28-day toxicity study was performed to evaluate the safety for three dosages (250, 500 and 1,000 mg/kg) of PUE orally administered to rats. There were no treatment-related effects on mortality, clinical signs, body weights, organ weights, hematology, blood biochemistry, necropsy, and histopathology of all animals in both sexes. Based on these results, it was concluded that the repeated oral administration of PUE for 28-day might have no toxic effect in rats. In the condition of this present study, the no-observed-adverse effect level (NOAEL) was considered to be over 1,000 mg/kg/day for both sexes.

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

For a crops of domestic native plant "*Phyllanthus urinaria* ", it was summarized a collection resources and cultural practice as followings. The distribution of *Phyllanthus urinaria* L. ranged in our country 35 areas, the lifestyle of collection resources at individual the area have a difference. The optimal temperature of seed germination is 25°C, The optimal Storage period is 10month and and The optimal Storage temperature is 25°C. The standard cultivation technique for crop, it was excellent for growth to condition that clothing material is the black vinyl, sowing time is May 10th and planting density is 20×10 cm, and amount of fertilized nitrogen is 6kg/10a. The optimal harvest time of *a Phyllanthus urinaria* crop was on October 20th when completed flowering time on this time, Yield of *Phyllanthus urinaria* is 562kg/10a. In the *Phyllanthus urinaria* extracts(PUE) and beta-sitosterol treated group, the paw edema was decreased. In the 500 mg/kg of *Phyllanthus urinaria* extracts and beta-sitosterol treated group, neutrophil, lymphocyte and monocyte level were decreased significantly compared to control group. These results suggest that inflammatory reaction of arthritis induced by adjuvant could be inhibit by 500 mg/kg of PUE and beta-sitosterol in rats. Therefore, these findings may provide the pharmacological basis of the clinical usage of PUE in treatment of inflammation.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the project	10
Section 1. Objectives of the project	10
Section 2. Importance of the project	12
Chapter 2. Current status of related research developed in Korea and other countries	13
Chapter 3. Research contents and results	14
Section 1. Material and method	14
Section 2. Results	28
Section 3. Discussion and conclusion	78
Chapter 4. Achievement and contribution	81
Section 1. Achievements of research aims	81
Section 2. Contribution of research field	82
Chapter 5. Application plan of results	83
Chapter 6. Knowledge from foreign countries	84
Chapter 7. References	85

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	10
제 1 절 연구개발의 필요성	10
제 2 절 연구개발의 목적 및 범위	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	14
제 1 절 연구수행 방법	14
제 2 절 연구수행 결과	28
제 3 절 고찰 및 결론	78
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	81
제 1 절 목표달성도	81
제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도	82
제 5 장 연구개발의 활용계획	83
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	84
제 7 장 참고문헌	85

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

천연소재에서의 생리활성물질 탐색 연구는 현재 다양하게 진행 중에 있으며, 그 정도가 포화 상태에 이르렀다고 할 수 있다. 따라서 효능이 입증된 신소재를 응용제형연구를 통해 제품화·실용화시킬 수 있는 연구가 중요시 되고 있다. 즉, ‘생리활성이 입증된 소재’에 ‘초미세분말’, ‘초임계 추출’, ‘캡슐화’ 등의 첨단과학기술을 적용시켜 이러한 방법의 변화에 따른 물리·화학적인 특성 규명, 생리활성 및 흡수효율을 증진여부에 관한 기초 데이터 수립에 관한 필요성 또한 대두되고 있는 실정이다. 따라서, 신약개발에 필수적인 전임상시험 및 약리실험 등이 완료되고 새로운 한방 신소재 신약이 난치성 면역질환의 시장에 도입되게 될 경우 한방신약개발의 모델이 되어 개발 기술을 전수할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

류마티스성 관절염의 환자수는 전 인구의 약 1%정도로 매우 많고 남성보다는 여성이 2-3 배정도 많으며, 환경변화와 노령화 사회로 진입하면서 그 환자 수가 계속 증가고 있으며, 관절염의 시장은 2002년 155억불이고, 2011년에는 270억불로 예상되는 매우 큰 의약품 시장군을 형성하고 있다. 류마티스성 관절염은 자기면역질환으로 주로 33-55세에서 발병되고, 이 시점은 사회적 활성이 왕성한 시기이나, 통증 및 치료 기간에 따른 작업시간의 감소, 능률 저하 등 사회적 비용이 매우 크다.

류마티스성관절염은 대표적인 면역 질환으로 일반적으로 MHC haplotype 등 유전적 요인 (Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM 참조)과 감염 등 환경요인의 결합에 의하여 발병하는 난치성 질환이다. 이들 질환은 비스테로이드성 소염진통제(NSAID)와 항염작용이 있는 부신피질 호르몬계, 그리고 질환완화 항류마티스제(Disease modifying antirheumatic drug : DMARDs) 계통의 치료제가 있다.

비스테로이드성 소염진통제는 진통억제 효과는 우수하나 치료 효과는 낮고, 질환의 진행, 연골 손상 등은 억제하지 못한다. 최근에는 위장장애가 없는 COX 2로 Vioxx, Bextra, Celebrex등이 개발되어 큰 시장을 형성하고 있다. 또한 DMARDs는 관절 손상을 감소시키고, 예방 및 치료 효과를 갖고 있으며, Hydroxychloroquine, Sulfasalazine(SSZ), Methtraxata(MTX) 등이 사용되었으나 부작용이 있을 뿐 아니라 고가 의약품, 재발 등의 문제가 있어 획기적인 치료제가 요구되고 있는 실정이다.

최근, 류마티스관절염 생물학적 제제의 개발이 이루어져 Enbrel, Remicade 두 약물이 2003 년도에 각각 15억불의 시장을 형성하였다.

국내에서 치료제 개발은 한약재 유래 신약으로 자생 한방병원과 천연물과학연구소에서 CBB-13, SK제약의 조인스정, 구주제약은 벌독을 이용한 제품을 개발하였으나, 이러한 생물학적인 제제는 그 치료비용이 미국에서 1년간 약 15,000불정도 소요되고, 국내에서도 1000만원이상의 비용이 발생하여 경제적인 부담이 매우 크다.

세계적으로 Well-being의 열풍, 화학적 약품의 부작용 발생 등의 원인으로 인해 기존 질병 치료 수단 외에 대체의학에 대한 관심이 증가하면서 herbal medicine이 차지하는 판매비율이 매년 증가하고 있으며 향후 지속적인 증가를 보일 것으로 예상된다. 또한 각국의 전통 약물을 바탕으로 이로부터 추출된 물질이 여러 질환에서 기존의 제제보다 탁월한 효능을 나타내는 것으로 보고 된 예가 무수히 많다.

따라서 본 연구는 여우구슬로부터 항 관절염 의약품 또는 보조제로 개발하기 위하여 기능성물질의 추출 및 무독화 하는 시스템을 개발하여 생체내 효능을 높일 수 있는 관련 연구와 여우구슬의 재배생산기술을 개발하여 원료 생산 기반을 확고히 하고 농가 소득 작물로 활용하고자 한다.

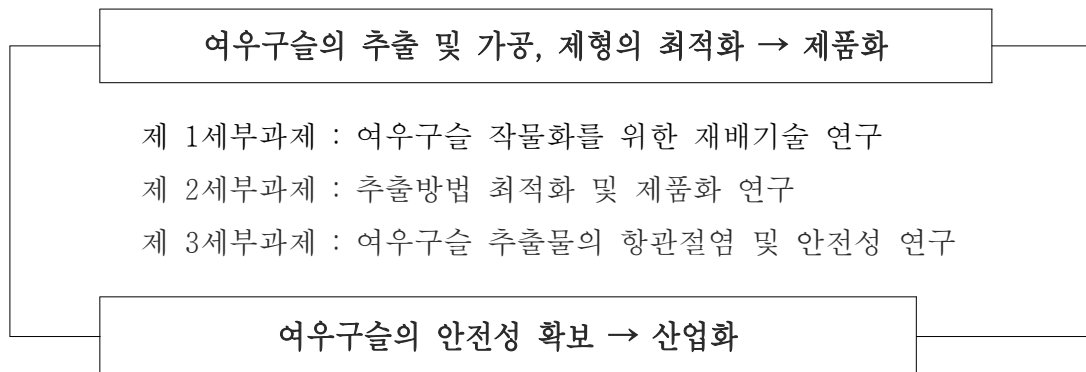
3. 사회·문화적 측면

류마티스관절염은 전 세계적으로 1% 정도의 유병률을 보이며, 우리나라는 정확한 유병율이 집계되고 있지 않지만, 미국과 유럽의 발생율인 2.5 ~ 3% 내외가 이 질환으로 고통 받고 있는 것으로 추정되고 있다. 류마티스 관절염에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있지만 아직까지도 뚜렷한 방안을 제시하지 못하고 있는 불치병으로써 환자와 가족의 정신적 고통과 경제적 손실이 크고, 최근 항 관절염효과가 있다고 알려진 물질들이 많이 개발되고 있으나 그 효과와 항 관절염 작용에 대한 과학적 검증이 없이 유통되는 경우도 있어 소비자의 불안과 사회적으로 문제가 되는 실정이다. 야생초인 여우구슬은 진주초 라고 불리우며, phenol성분과 triterpenes 성분이 함유되어 있으며 『중약대사전』 『상용중초 약수책』, 『복건민간초약』, 『생초약성비요』, 『귀주민간약물』, 『동양의학대사전』에서는 ‘간을 다스리고 열을 제거하여 해독효능이 있다’ 라고 소개하였고, 예로부터 민간에서 ‘염증관련 치료’ 약초로 사용되어 왔다. 그러나 여우구슬에 함유되어 있는 β -Sitosterol과 Saponarin의 약효성분에 대한 과학적인 해석이 매우 부족하며 독성 및 여우구슬 함유 항 관절염성분등에 관한 자세한 연구가 매우 필요하다. 이 연구가 성공적으로 마무리되면 여우구슬로부터 천연 항산화물질의 개발과 동시에 항 관절염 치료에 널리 활용될 것으로 기대된다.

제 2절 연구개발의 목적 및 범위

본 연구는 우리나라 자생식물인 여우구슬을 원료로 한 항 관절염 관련 기능성 물질을 개발하여 새로운 수요를 창출하고, 고품질의 원료생산을 위한 안전 다수확재배 기술, 고품질 우량종의 선발 및 육성 보급하고자 한다.

또한 기능성 약리성분의 물리·화학적 특성, 품종 및 환경 변이를 구명하여 품질이 우수한 품종의 개발로 여우구슬의 소비를 촉진시키고 약리작용을 구명하고 건강 기능성 식품을 개발하여 국민 건강에 이바지 하고자 한다. 구전으로 내려오는 항 관절염에 좋은 약초로 알려진 여우구슬로부터 생리활성 물질을 추출하고 간암 모델 동물에게 직접 투여하여 항 관절염효과를 구명하며, 부작용 또는 독성을 검정하여 부작용 없고 안전한 기능성 식·의약품 및 첨가소재로 개발하고자 한다.



제 2 장 국내·외 기술개발 현황

류마티스성 관절염의 환자수는 전 인구의 약 1%정도로 매우 많고 남성보다는 여성이 2-3 배정도 많으며, 환경변화와 노령화 사회로 진입하면서 그 환자 수가 계속 증가하고 있다. 최근 여우구슬 중 β -Sitosterol이라는 특정성분이 간염, 염증에 효과를 나타내는 것으로 알려졌으나 β -Sitosterol이라는 성분이 항 관절염효과에 대한 연구가 초기 단계에 불과하다.

류머티스성관절염은 대표적인 면역 질환으로 반적으로 MHC haplotype등 유전적 요인 (Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM 참조)과 감염 등 환경요인의 결합에 의하여 발병하는 난치성 질환이다. 이들 질환은 비스테로이드성 소염진통제(NSAID)와 항염작용이 있는 부신피질 호르몬계, 그리고 질환완화 항류마티스제(Disease modifying antirheumatic drug : DMARDs) 계통의 치료제가 있다.비스테로이드성 소염진통제는 진통억제 효과는 우수하나 치료 효과는 낮고, 질환의 진행, 연골 손상 등은 억제하지 못한다. 최근에는 위장장애가 없는 COX 2로 Vioxx, Bextra, Celebrex등이 개발되어 큰 시장을 형성하고 있다. 또한 DMARDs는 관절 손상을 감소시키고, 예방 및 치료 효과를 갖고 있으며, Hydroxychloroquine, Sulfasalazine(SSZ), Methtraxata(MTX)등이 사용되었으나 부작용이 있을 뿐 아니라 고가 의약품, 재발 등의 문제가 있어 획기적인 치료제가 요구되고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 이런 문제점의 해결을 위하여 국내 자생 식물인 여우구슬로부터 항 관절염 성분을 추출하여 주사제 또는 의약품으로 개발하여 생체내 작용을 명확히 밝혀 이들 자원을 계속적으로 보존하면서 의약품 및 항 관절염 관련제품을 영구적으로 개발하고자 한다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

[제 1세부과제] 여우구슬 작물개발 및 안전 생산기술 연구

1. 여우구슬 유전자원 수집 및 특성조사

여우구슬 유전자원 수집은 기존의 분포도 연구결과를 기초로 하여 위도별로 조사하였으며, 다시 기초 분포도를 기준으로 권역별로 유전자원 수집 및 수집지의 자생지 환경을 조사 하였다. 국내 유전자원은 남부, 중부 등 권역별로, 국외 유전자원은 2007년 상반기 남미 브라질, 파라과이에서 수집하였으며, 수집시 토성, 고도 등 자생지 환경을 조사하였다. 수집한 종자는 작물과학원 인삼약초과 및 국립원예특작과학원 인삼특작부 시험포장에 증식한 후 생육특성을 조사하였다. 수집자원의 항산화 활성은 여우구슬 전초를 80% MeOH로 추출, 여과지에 거른 후 감압 농축하여 용매를 완전히 제거시킨 후 동결 건조기를 이용하여 각 추출물의 수율을 계산 후 총 페놀성 함량, Superoxide dismutase(SOD) 유사활성, DPPH에 의한 전자공여능, Hydroxyl radical 소거활성, Hydrogen peroxide 소거활성을 측정 하였다.

국내 여우구슬 유전자원의 식물형태적 특성비교 연구는 기존 연구 된 도감류를 기준과 본 연구 광학현미경으로 검경하여 비교 하였다.

2. 여우구슬 종자 발아율 향상 연구

발아 시험용 종자는 제주도에서 수집한 자원을 증식, 수확 후 상온에서 저장한 종자 중에서 미숙종자를 제거한 후 이용하였다. 발아율 향상을 위한 발아적온구멍 시험은 직경 9cm의 petri dish에 흡습지 2매를 깔고 반복당 100립씩 4반복으로 15, 20, 25, 30℃에 온도조건의 암상태에서 수행하였으며, 여우구슬 종자 저장조건 구멍 시험은 각각의 저장기간별 저온 및 상온 조건에서 일정기간을 경과한 후 순차적으로 저장한 종자를 적출하여 직경 9cm의 petri dish에 흡습지 2매를 깔고 반복당 100립씩 4반복으로 수행 하였다. 발아율조사는 유근이 1mm 이상 돌출한 것을 발아개체로 하여 매일 발아조사 하였다.

3. 여우구슬 안전 생산기술 개발

여우구슬 안전생산기술 개발연구는 표준재배기술개발과 기 개발 된 표준재배기술을 종합 적용하여 수량성 증대를 위한 연구를 수행 하였다. 표준재배기술개발은 2007년부터 2009년까지 3년간 작물과학원 인삼약초과 시험포장에서 수행하였다, 피복재료 선발시험, 파종기 시험, 재식 밀도 시험은 4월 20일경에 사양토 토성의 포장에 6-7-8-2,000kg/10a(N-P₂O₅-K₂O-퇴비/10a)를 전량 기비로 시용한 후 조건 20cm에 주간 10cm로 파종하였다. 피복재료선발 시험은 짚, 흑색비닐, 무피복 등 3처리, 파종기 시험은 4월중순, 4월하순, 5월상순, 5월중순 5처리, 재식밀도 시험

은 조간 20cm에 주간 10, 15, 20cm와 조간 30cm에 주간 10, 15, 20cm인 6처리, 질소 시비량 시험은 0, 3, 6, 9, 12kg/10a 등 5처리로 하여 자생식물 활나물 작물화를 위한 표준재배기술 개발 연구를 수행하였다. 여우구슬 수량성 제고를 위한 재배기술 개발은 2기작 재배 가능성을 검정하기 위하여, 실생 및 육묘이식재배, 피복재료 선발, 수확시기, 건조조건 구명 연구를 수행하였다. 시험별 생육특성은 처리별 20 주씩 3반복으로 조사하였다.

[제2협동과제] 여우구슬 함유 향 관절염 물질의 분리기술 확립

1. 여우구슬 전초, 종자의 이화학적특성 및 생리활성

가. 여우구슬의 공시재료

본 실험에 사용된 여우구슬은 수원 농촌 진흥청 작물과학원(National Crop Experimental Station) 약용작물 시험포장에서 2006년 재배된 것을 수확하여 전초와 종자부분을 분류하여 세척한 후 그늘에서 자연 건조하여 공시재료로 각종 분석에 이용하였다.

나. 방 법

(1) 여우구슬의 이화학적 특성

(가) 일반성분 분석

여우구슬을 전초와 종자부분으로 분류하여 수분, 조회분, 조단백질 및 조지방 함량은 AACC의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 수분함량(AACC 44-15a)은 105°C 건조법, 조단백은 Kjeldahl법(AACC 46-10), 조회분은 회화법(AACC 08-01)으로 측정하였다. 지방산 조성은 종자를 초임계 450/65의 조건에서 추출 한 것과 n-hexane 을 가하여 추출 후 40°C에서 감압농축 한 다음, 시료 0.1g에 n-hexane 5 ml 첨가 섞은 후 2N-KOH methanol 100 μ l 첨가하여 3000 rpm에서 10분 원심분리 후 상층액을 사용하여 gas chromatography로 분석하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다. 무기질 조성은 0.5 g의 시료에 9 ml HNO₃ 1 ml H₂O₂를 가한 후 microwave digestion system(MPR-300/12S, Milestone Co., Italy)에서 산분해하여 전 처리 한 시료를 증류수로 50 ml 정용 후 ICP(Inductively Coupled Plasma, Thermo Jarrell Ash Co., USA)로 분석하였고, Ca, Mg, Na, P, Fe, Zn, K, Se 등의 ICP 표준시약(AnApex Co., Ltd, Korea) 으로 표준곡선을 작성 후 계산하였다.

Table 1. Operating conditions of gas chromatography for analysis fatty acid composition of *Phyllanthus urinaria* seed dried by different methods

Items	Conditions
Instrument	Hewlett Packard Series II 5890
OVEN	180°C(5 min)-10°C-230°C(5 min)
Injection temp	230°C
Detector temp	250°C
Column	Innowax(30 x 0.25 x 0.1)
Analysis time	15min

(나) 여우구슬의 전초, 종자의 생리활성 측정

① 여우구슬 전초, 종자의 추출물 제조

다양한 방법으로 여우구슬의 전초, 종자를 Shaking incubater(NB-205V, N-Biot다 INC. Korea), sonificator(JAC 4020, Jinwoo, Korea), Water bath, Heating mantle을 기기로 사용하여 추출하였다. 여우구슬 전초, 종자 100 g을 80% MeOH, CHCl₃ : MeOH(3 : 1)혼합용매 2000 ml를 가하여 Shaking incubater에서 25°C, 40°C 온도 조건에서 추출하였고, sonificator 의 온도를 25°C로 고정 후 추출하였으며, Water bath 60°C, Heating mantle 80°C에서 각각 추출하였다. 모든 과정은 4시간씩 3반복에 걸쳐 수행하였다. 초임계 추출물은 압력 450바 온도 65°C에서 추출 하였으며, 추출 한 시료를 여과(Whatman No.2)후 40°C에서 감압농축(Rotary evaporator N-1,000, EYELA)하여 용매를 완전히 제거시킨 후 동결 건조기를 이용하여 건조 후 각 추출물의 수율을 계산 하였으며, 건조된 시료를 methanol을 사용하여 mg/ml로 조제 후 0.45 μm membrane filter로 재 여과한 다음 각종 분석에 사용하였다.

Phyllanthus urinaria L.

(Total exclusive, Seed)

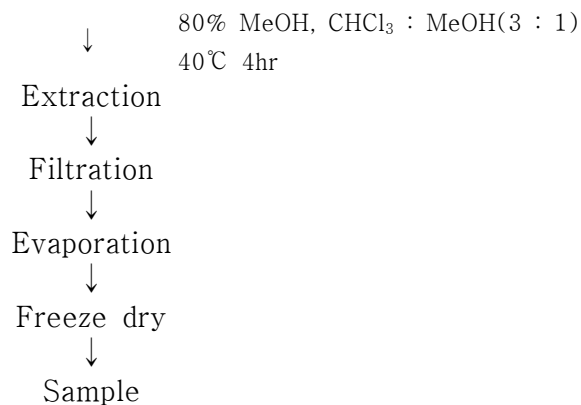


Fig 1. Schematic procedure for extraction of *Phyllanthus urinaria* L.

(2) 항산화능 측정

(가) 페놀성 화합물 정량

페놀 함량은 AOAC의 Folin-Denis법을 이용하여 비색정량 하였다. 여우구슬 전초, 종자 추출물을 methanol을 이용하여 mg/mL로 녹인 후 분석시료로 이용하였다. 시료 0.1 mL에 2% Na₂CO₃를 2.0 mL 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0-1.0 mg/mL의 농도의 catechin을 이용하여 시료의 페놀성 화합물 정량을 위한 검량선을 작성하였으며, 모든 과정은 3회 반복 실험하였다.

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

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

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

A: 시료 첨가군의 흡광도

B: 시료 무첨가군의 흡광도

(다) SOD-liked activity

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

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

(라) Hydroxyl radical 소거능

FeSO₄/EDTA 용액, 2-deoxyribose, 각 분획물, phosphate-buffer, H₂O₂를 혼합, 2시간 동안 반응시킨 후 TCA(trichloro acetic acid)용액과 TBA(thiobarbituric acid)용액을 넣고 15분 가열한 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 비교하였다.

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

A : 시료 무첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

(마) Lecithin oxidation system

일정량의 lecithin을 chloroform에 녹인 후 질소가스를 이용하여 용매를 완전히 제거한 한 추출물, 2 mM FeSO₄, 2 mM ascorbic acid를 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 30분간 incubating 한 후 과산화 지질을 TBARS법(2-thiobarbutric acid relative substance)에 의하여

측정하였다.

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

A : 시료 무첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

(3) 여우구슬 전초, 종자 추출물의 유지에 대한 항산화 효과 측정

일반 식용유(10ml)에 여우구슬 각각의 추출물을 1% 첨가하여 60°C 건조기에 보관하면서, 1일 간격으로 지방의 산패도(산가, TBARS)를 4일간 실시하였다. 또한, 산패가 일어나는 정도를 알아보기 위해 1주일 간격으로 28일간 지방의 산패도를 분석하였다.

2. 여우구슬 추출물의 Sephadex LH-20분획 및 생리활성 측정

가. 여우구슬 추출물의 Sephadex LH-20분획

여우구슬의 전초, 종자를 80% MeOH, CHCl₃ : MeOH(3 : 1) 혼합용매, 초임계 추출물 450/65로 각각 추출 후 수율 및 활성을 비교하여 수율 및 높은 활성을 보였던 80% MeOH을 용매로 가하여 shaking incubator에서 4시간씩 3반복 추출하였다. 추출된 시료는 여과 후 감압농축한 다음 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol에 의해 순차적으로 분획하였다.

나. 항산화능 측정

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

다. 유효 성분 물질 분리

여우구슬의 전초, 종자 추출물을 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol로 분획 후 활성이 좋았던 ethyl acetate 층을 이용하여 unknow peak1으로 추정되는 플라보노이드 계통의 물질인 saponarin을 분리·정제 중에 있으며, 염증 및 항 관절염에 효과가 있는 것으로 알려진 β-Sitosterol의 성질을 이용하여 chloroform 분획 물로부터 성분을 분리하기 위하여 Silica gel column chromatography에 sephadex LH-20을 4 x 50 cm까지 충전 시키고, chloroform 분획물중 2 g을 loading하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol (100 : 10)을 사용하여 전개하였다. 컬럼으로부터 용리하면서 60ml씩 분획을 수집하고 이들을 TLC((Toluene : Ethyl acetate : Formic acid (4 : 5 : 1)) 전개 후 UV 254 nm, 334 nm에서 확인 후 A-E 까지 분리하였으며, 95%-H₂SO₄로 발색시킨 후 유사분획끼리 통합하여 4개의 소분획 (Fr.1-Fr.4)으로 나누었다. 즉, Fr.1은 1-20 분획물을 농축한 것이며 같은 방법으로 Fr.2는 21번부터-23번의 것, Fr.3는 24-27번의 것, 그리고 Fr.4는 20번-30번까지의 것을 각각 농축하였다. 이중 Fr.1을 hexane에서 재결정화를 수행하였을 때 무색의 침상정을 얻을 수 있었으며 이를 화합물 I이라 하였고, 254 nm, 334 nm 파장에서 확인 할 수 있었던 F(Rf=0.65)를 HPLC(μ-Bondapak C₁₈ 3.9x300 mm ; flow rate 0.8 ml/min ; inject vol., 20ul ; detector, 280 nm)를 통해 Compound I을 분리·정제 하였다.

(나머지 Fr은 분리·정제 중에 있으며, 활성이 높은 ethyl acetate와 butanol 분획층을 이용하여 open column chromatography, TLC, HPLC를 통해 활성물질을 분리·정제 중임, 특히 unknow peak1으로 추정되는 플라보노이드 계통의 물질인 saponarin은 전초와 씨 모두 ethyl acetate에서 가장 높은 함량을 보여, 이층을 이용하여 분리·정제 중에 있음.)

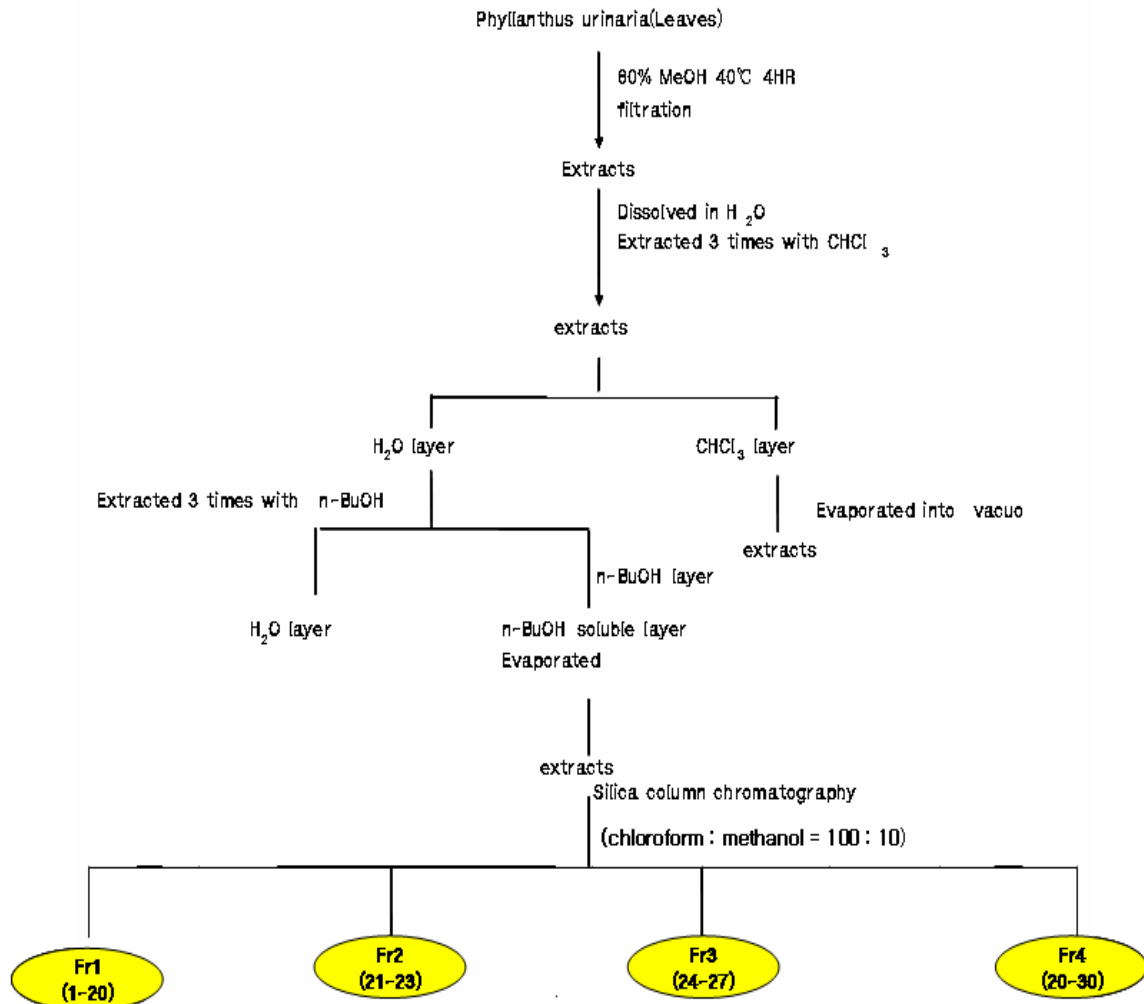


Fig 2. Scheme of extraction and solvent fractionation of chloroform extract from *Phyllanthus urinaria L.* (Total exclusive seed)

라. TLC 분석

TLC 전개용매 및 기타시약은 특급 및 분석용 시약을 사용하였고, TLC plate는 Merck사의 precoated kieselgel 60 F254(layer thickness 0.25mm, 20x20 cm, Merck Art. No. 5715)를 사용하였다. Compound I은 Toluene : Ethyl acetate : Formic acid (4: 5 : 1, v/v/v)조건에서 전개하여 확인하였다. 물질은 UV 254 nm, 334 nm에서 확인하였고, 5% 황산용액을 도포 후 발색하여 확인하였다.

마. HPLC 분석

활성물질 정량을 위해 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)조건은 다음 Table 2의 조건으로 분석하였다. 즉, mobile phase는 methanol : water(80 : 20)에서 μ Bondapak

C₁₈(3.9 x 300 mm) 컬럼을 사용하였으며, 280 nm에서 20분간 측정하였다.

Table 2. Operating conditions of HPLC for analysis Compound I from *phyllanthus urinaria* total exclusive extracts

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	μBondapak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Mobile phase	methanol : water = 80 : 20
Detector	UV 280nm
Flow rate	0.8 mL/min

3. 분리정제 및 구조 동정

가. 재 료

(1) 분획별 추출물 제조

여우구슬 전초 100 g을 2000 mL 의 증류수로 40°C water bath에서 4시간 동안 추출한 후 농축하였다. β-Sitosterol의 성질을 이용하여 chloroform 분획 물로부터 성분을 분리하기 위하여 Silica gel column chromatography 에 sephadex LH-20을 4 x 50 cm까지 충전 시키고, chloroform 분획물중 2 g을 loading하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol (100 : 10)을 사용하여 전개하였다. 컬럼으로부터 용리하면서 60ml씩 분획을 수집하고 이들을 TLC((Toluene : Ethy acetate : Formic acid (4: 5 : 1)) 전개 후 UV 254 nm, 334 nm에서 확인 후 A-E 까지 분리 하였으며, 95%-H₂SO₄로 발색시킨 후 유사분획끼리 통합하여 4개의 소분획 (Fr.1-Fr.4)으로 나누었다. 즉, Fr.1은 1-20 분획물을 농축한 것이며 같은 방법으로 Fr.2는 21번부터-23번의 것, Fr.3는 24-27번의 것, 그리고 Fr.4는 20번-30번까지의 것을 각각 농축하였다. 이중 Fr.1을 hexane에서 재결정화를 수행하였을 때 무색의 침상정을 얻을 수 있었으며 이를 화합물 I이라 하였고, 254 nm, 334 nm 파장에서 확인 할 수 있었다.

(2) HPLC 분취

Preparative reverse-HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Table 3의 조건으로 분취하였다. 즉, mobile phase는 methanol : water(80 : 20) 에서 μBondapak C18(3.9 x 300 mm) 컬럼을 사용하였으며, 280 nm에서 20분간 측정하였다.

Table 3. Operating conditions of HPLC for analysis Compound I from *phyllanthus urinaria* total exclusive extracts

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	μ Bondapak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Mobile phase	methanol : water = 80 : 20
Detector	UV 280nm
Flow rate	0.8 mL/min

(3) GC/MS 분석

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

Table 4. Operating conditions of GC/MS.

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

(4) NMR 구조분석 및 동정

¹H-NMR spectrum은 Varian Unity Inova 300MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, CDCl₃-d₆용매를 사용 하였고 ppm 단위로 나타내었다.

4. 통계학적 분석

본 연구의 결과는 SAS system을 이용하여 ANOVA분석 후 $\alpha = 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다.

[제3세부과제] 여우구슬 추출물의 항 관절염 및 안전성 연구

1. 모세혈관 투과억제도 측정

가. 공시재료 : 여우구슬 추출물은 호서대학교로부터 아래와 같이 5종을 제공받아 사용하였다.

- 1) Total Ex. extracted with CHCl₃:MeOH(3:1)
- 2) Branch Ex. extracted with supercritical fluid
- 3) Branch Ex. extracted with CHCl₃:MeOH(3:1)
- 4) Seed Ex. extracted with 80% MeOH
- 5) Total Ex. extracted with 80% MeOH

나. 시험원리

Colorimetric assay(정맥투여한 evans blue가 염증반응에 의해 복강내로 투과되는 정도에 미치는 영향을 지표로 항염증작용을 평가)

다. 검색능력

Multi-Screen System : 96 well plate format

라. 재료 및 장비

(1) 실험동물

ICR계 Mouse, male 5주령, 180마리

(2) 시약 및 장비

실험장비 : Elisa reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Centrifuge (Hanil Co., Korea)

시약 : Evans blue(Fluka Co., Swiss), Acetic acid(Sigma Co. U.S.A.)

마. 시험방법

(1) 하룻밤 절식시킨 ICR계 마우스에 여우구슬 추출물 50, 100, 200 mg/kg을 경구투여한 후 생리식염수에 녹여 제조한 4% evans blue를 0.1 ml/10g b.w. 용량으로 꼬리 정맥내로 정맥 주사하였다.

(2) 20분 후 생리식염수에 희석하여 제조한 0.6% acetic acid를 0.1ml/10g b.w. 용량으로 복강내 주사하였다.

(3) 20분 후 경추 탈골법으로 실험동물을 도태시킨 후 개복하여 복강내로 투과된 evans blue 를 취하기 위하여 5ml의 생리식염수를 복강에 가하고 복부를 가볍게 흔들어준 후 세척액을 취하였다.

(4) 2,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 Elisa reader를 사용하여 630 nm 에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

바. 평가기준

흡광도치를 대조군과 비교하여 Student's t-test로 통계처리하고 P<0.05인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

2. 여우구슬 추출물의 in vivo 항류마티스 관절염 효과 구명

가. 공시재료 : 여우구슬 추출물은 참여기업인 주)유맥스로부터 아래와 같이 3종을 제공받아 사용하였다.

- 1) 여우구슬1추출물
- 2) 여우구슬2추출물
- 3) 여우구슬3추출물

나. 시험원리

Freund's complete adjuvant(FCA) 피하주사로 유도된 염증반응에 대하여 발부종윤에 미치는 영향을 지표로 항염증제의 효능검색

다. 검색능력

Simple-Screen System: Single format

라. 재료 및 장비

(1) 시험계

SD Rats, male 5주령, 72마리

(2) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 5일 동안 안전성평가본부의 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화를 시키고 일반 건강상태를 관찰한 후 건강한 개체를 시험에 사용하였다.

(3) 사육환경

① 환경

본 시험의 환경은 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 $50\pm 20\%$, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(오전8시~오후8시) 및 조도 200~300 Lux의 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육환경 모니터링

시험기간 중 동물실의 온습도는 자동 측정기에 의하여 매 30분마다 측정되었으며, 조도 등

의 환경조건은 정기적으로 측정되었다. 동물실의 환경 측정결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

③ 사육조건

순화 및 시험기간 중 랫드용 폴리카보네이트 케이지에 1마리씩 넣어 사육하였다.

④ 사료 및 음용수

사료는 방사선 멸균 처리된 실험동물용 쥐사료(퓨리나코리아)를, 물은 자외선 살균처리된 음용수를 자유섭취 시켰다. 음용수에 대하여 본 한국화학시험연구원에서 오염물질의 검사를 실시한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

(4) 시험군의 구성 및 개체식별

① 시험군의 구성

본 시험물질(여우구슬1추출물, 여우구슬2추출물, 여우구슬3추출물)은 1일 1회, 28일 동안 경구투여되었다.

투여물질	시험군	동물번호	투여량 (mg/kg, oral)
멸균생리식염수	G1	1101-1109	0
beta-sitosterol	G2	1201-1209	50
여우구슬1추출물	G3	1301-1309	250
	G4	1401-1409	500
여우구슬2추출물	G5	1501-1509	250
	G6	1601-1609	500
여우구슬3추출물	G7	1701-1709	250
	G8	1801-1809	500

② 개체식별

개체식별은 꼬리에 유성매직을 사용하여 일련번호로 표시하였으며, 사육상자에는 시험번호, 성별, 군번호, 투여량, 시험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였다.

마. 시험방법

(1) 일반증상 및 사망률

전 동물에 대하여 매일 1회 이상 투여 후 8주 동안 일반증상 및 사망개체를 관찰하였다.

(2) 체중 측정

체중은 시험물질 투여 개시 직전, 투여 개시 후 주1회 측정되었다.

(3) 발 부피 측정

랫드의 오른쪽 뒷발의 발목 관절부위를 유성펜으로 표시한 후 Plethysmometer를 사용하여 발의 부피를 측정하였다.

(4) 혈청생화학적 변화

부검시 랫드의 복대동맥으로부터 전혈을 채혈 후 일부는 혈액분석을 실시하고, 나머지 일부는 혈청을 분리 후 혈청생화학적 변화를 측정하였다.

(5) 관절의 외형변화 관찰

실험 종료시, 관절염으로 인한 실험군의 발목 관절 부위의 외형변화를 확인하고, 사진 촬영을 통해 기록을 남겼다.

(6) 관절의 조직학적 변화

관절내 연골의 파괴 정도를 평가하기 위하여 Hematoxylin & eosin stain을 실시하였다.

바. 평가기준

모든 자료는 대조군과 비교하여 Student's t-test로 통계처리하고 P<0.05인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

3. 여우구슬 추출물의 안전성 평가 연구

가. 시험물질

유맥스(주)로부터 제공된 여우구슬 추출물(*Phyllanthus urinaria* extract, PUE)을 실험에 사용하였다

나. 실험동물

실험동물로는 암/수 랫드 각각 50마리씩을 오리엔트(주)로부터 구입하여 약 1주간 순화시킨 후 그 기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물 암/수 각각 40마리씩을 실험에 사용하였다.

다. 사육환경

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

라. 투여약량 수준 설정 및 시험 물질조제

[시험군의 구성]

군 (mg/kg)		성별	투여액량 (ml/kg)	마리수	개체번호
대조군	0	Male	10	10	1101~1110
		Female	10	10	2101~2110
여우구슬 추출물	500	Male	10	10	1201~1210
		Female	10	10	2201~2210
	1,000	Male	10	10	1301~1310

		Female	10	10	2301~2310
	2,000	Male	10	10	1401~1410
		Female	10	10	2401~2410

마. 투여방법

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

바. 관찰항목

(1) 사망률 및 임상증상 관찰

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

(2) 체중측정

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

(3) 부검소견 및 병리학적 검사

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

(4) 혈액학적 검사

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

가) 총적혈구수(Total erythrocyte count : RBC)

나) 혈색소량 (Hemoglobin concentration (Hb)

다) 헤마토크리트치 (Hematocrit : Hct,PCV)

라) 적혈구지수 (RBC indices)

마) 평균적혈구용적 (Mean cell volume : MCV)

바) 평균적혈구헤모글로빈량 (Mean cell hemoglobin : MCH)

사)평균적혈구헤모글로빈농도 (Mean cell hemoglobin concentration : MCHC)

아) 총백혈구수 (Total leucocyte count : WBC)

자) 혈소판 (Platelet : PLT)

차) 감별백혈구수 (Differential WBC count)

카) 프로트롬빈시간 (Prothrombin time : PT)

타) 부분활성트롬보플라스틴시간 (Activated partial thromboplastin time : APTT)

(5) 혈액생화학적 검사

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

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

(6) 장기중량 측정 및 육안소견

모든 동물에 대해 부검시 육안적 검사를 실시한 후에 심장(Heart), 간(liver), 신장(kidney), 부신(adrenal gland), 비장(spleen), 고환(testis), 난소(ovary), 부고환(epididymis), 흉선(thymus), 자궁(uterus) 및 폐(lung)에 대한 무게를 측정하였다.

사. 자료의 통계처리

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

제 2 절 연구수행 결과

[제 1세부과제] 여우구슬 작물개발 및 안전 생산기술 연구

1. 여우구슬 유전자원 수집 및 특성조사

가. 국내 여우구슬 유전자원 지리적 분포조사

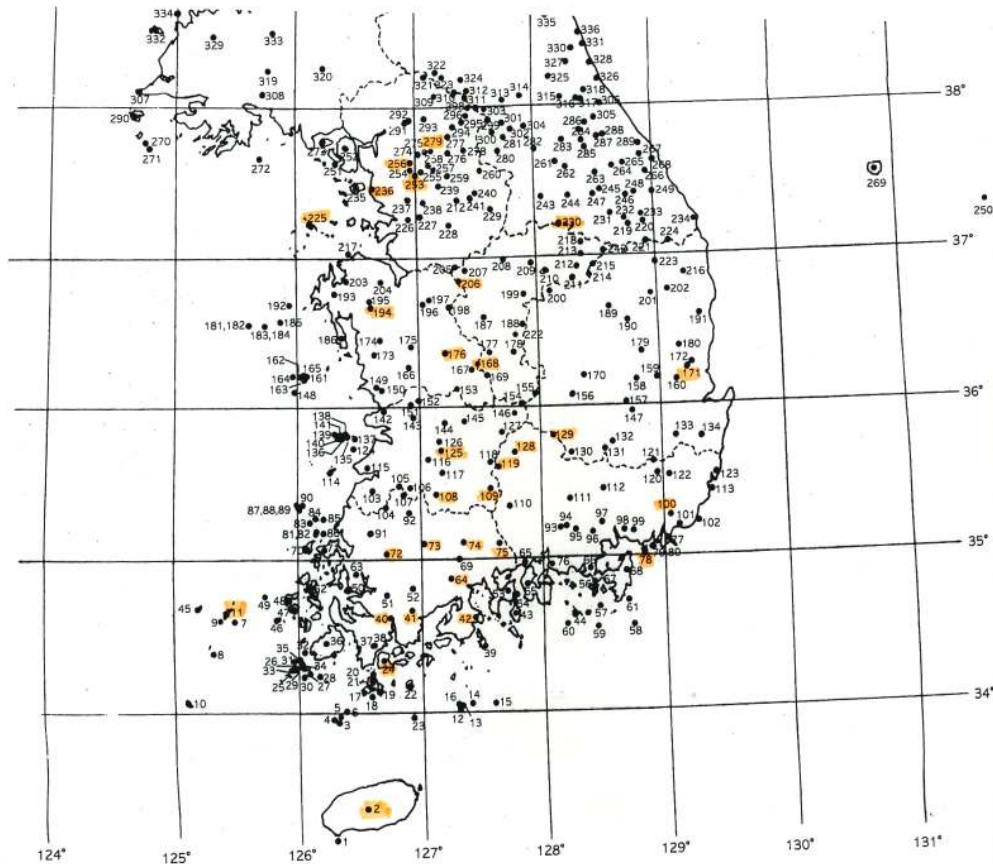


Fig 1. Status of distribution in *Phyllanthus urinaria* L.

여우구슬(*Phyllanthus urinaria* L.)은 대극과의 1년생 초본으로 세계적으로 인도, 중국, 필리핀, 브라질 등 광범위한 지역에 자생하고 있으며, 지역적으로 종 차이를 보이고 있으며 우리나라에 자생하는 여우구슬은 *Phyllanthus urinaria* L.이다.

표1, 그림1은 우리나라 여우구슬 지리적 분포를 조사한 결과로서 국내 여우구슬의 자생지는 남부 제주도부터 중북부 강원 지역까지 우리나라 전국에 분포하고 있으며 분포 지점수는 35개 지역이었다.

Table 1. Status of distribution in *Phyllanthus urinaria* L.

Location	The number of plant distribution
N33°-34°, E126° -127°	1
N34°-35°, E125° -126°	1
N34°-35°, E126° -127°	3
N34°-35°, E127° -128°	2
N34°-35°, E128° -129°	1
N35°-36°, E126° -127°	1
N35°-36°, E127° -128°	8
N35°-36°, E128° -129°	1
N35°-36°, E129° -130°	1
N36°-37°, E126° -127°	1
N36°-37°, E127° -128°	8
N36°-37°, E129° -130°	1
N37°-38°, E126° -127°	4
N37°-38°, E127° -128°	1
N37°-38°, E128° -129°	1
Total	35

나. 유전자원 수집 및 자생지 환경조사

Table 2. Expenditure of collection resources and environment in *Phyllanthus urinaria* L.

Collection site	Collection place	Environment of collection site	
		Height(m)	Earthiness
Korea	3	125 - 253	Sandy loam
Brazil	7	213 - 300	Sandy soil
Paraguay	5	236 - 350	Sandy loam

여우구슬 작물화를 위한 연구의 첫 단계로 국내 자생 여우구슬 유전자원 수집은 그림 1의 여우구슬 분포도를 참조하여 우리나라 남부지역인 제주도와, 중부 지역인 수원에서 유전자원 종자 2점을 수집하였다. 국외 유전자원은 남미의 브라질, 파라과이 2개국에서 2종 12점의 유전자원 종자를 수집하였다(표 2).

유전자원 수집시 여우구슬 자생지 환경은 해발이 낮은 사토, 사양토 토양에 자생하고 있었으며 양지, 음지, 습지 등 다양한 식생지에 자생하고 있어, 작물화를 위한 기초 자료 정립에 활용할 수 있었다.

다. 여우구슬 수집자원 특성조사

(1) 국내 수집 여우구슬 유전자원 형태적 특성

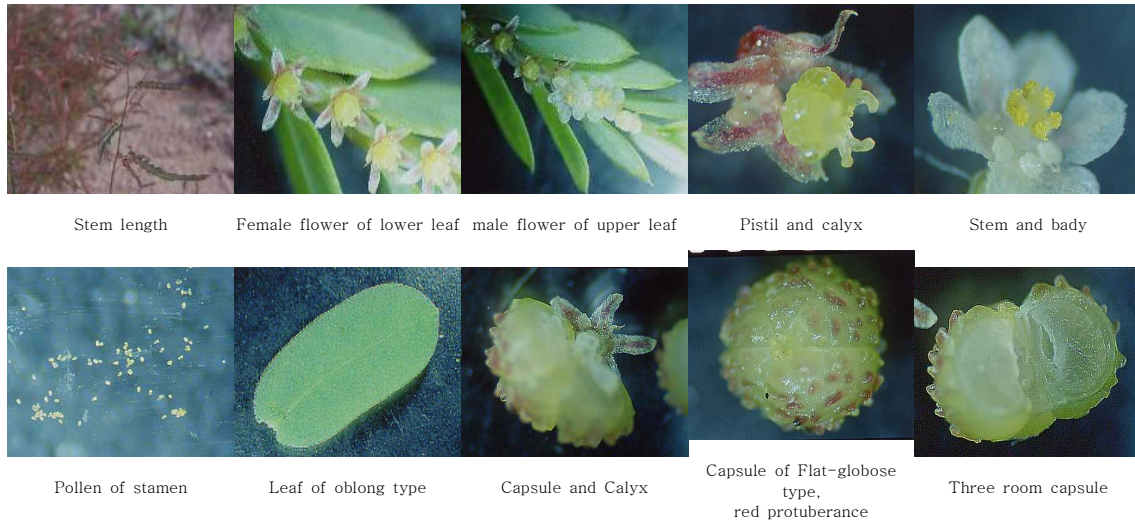


Fig 2. Morphological charater of in *Phyllanthus urinaria* L.

국내 식물도감에서 여우구슬의 식물학적 형태적 특징에 대하여 기록이 상이하거나 잘못 기재하고 있어 여우구슬 특성평가에 애로점이 되고 있다.

그림2는 국내 자생 여우구슬 유전자원을 증식한 후 광학현미경 및 실체현미경을 이용, 여우구슬의 엽형, 화형 및 열매 형태를 관찰, 촬영한 결과 기존도감에서의 형태적 특성 기록내용//본 연구에서의 수정·보완내용을 요약하면 아래와 같다. **식물체 높이** : 15-40cm, 20cm내외, 10-40cm, 10-30cm// 직립하며 10-30cm, 전체적으로 붉은색이 많이 나고 털은 없음. **엽크기** : 7-17/3-7mm, 5-10mm, 5-15/2-5mm, 5-10/2-5mm 등// 길이5-10mm 너비2-5mm. **엽형** : ㉠엽두-둔두,, 단예두, 원두, 예두, 끝이 뾰족 등 ㉡엽저-원저 등 ㉢엽연-전연, 전연(거친털) 등// 장타원형에 ㉠엽두는 단예두 ㉡엽저는 원저 ㉢엽연은 전연. **엽병** : 거의없음, 극단병, 아주짧음, 짧거나 거의없음 등// 극단병(엽병이 있으나 매우 짧음). **화서** : 액생, 엽액, 잎짚 등// 액생. **화형** : 1가화, 자웅1가, 단성 등// 자웅1가, 화관이 없음. **화색** : 적갈색, 붉은밤색 등// 암꽃의 흰색 꽃받침잎에 중앙에 붉은색 줄이 선명함. 이를 보고 적갈색 꽃이라고 표현한 듯 함. 화관이 없기 때문에 화색을 언급할 수 없음. **암꽃** : 단립, 잎밑부분에 붙음, 2줄 착생 등// 잎의 아래부분에 붙음, 2줄착생으로 보기 어려움. **암술** : 1개, 3실 등// 상위자방, 3실, 암술대가 3갈래지고 다시 2열로 분리된 형임. **수꽃** : 모여남, 가지 윗부분에 2-3개 모여남 등// 암꽃이 붙은 이후로 잎위쪽에 3-4개정도 1열로 남, 선체는 따로 분리됨, 수술 3개가 아래는 합생하며 위에는 서로 떨어져 있는 듯 보임. 암꽃이 붙은 이후로 잎위쪽에 3-4개정도 1열로 남, 선체는 따로 분리됨, 수술 3개가 아래는 합생하며 위에는 서로 떨어져 있는 듯 보임. **꽃받침** : 암꽃,수꽃 6개 등// 암꽃 6개, 흰색에 중앙에 붉은선이 선명, 수꽃 6개 중앙에 아주 얇은 분홍색 선이 있음. **개화기** : 7-8월, 7-9월, 7-10월 등// 7-8월. **과형** : 삭과, 편구형, 옆으로 주름, 3열, 적갈색 주름, 튀는열매, 둥글고 도드라기 등// 삭과, 3열로 열개, 편구형이며, 처음에는 노란색의 편구형열매에 적색의 돌기가 나 있는 듯 하나 점차 적갈색으로 익어감. 성숙시 열매는 적색의

편구형모양에 표면에 돌기가 있음. **열매크기** : 지름2.5mm, 1-2mm, 3mm 등// 지름 2-3mm. **종자모양** : 달걀모양 삼각형, 난상 삼각형 등// 난상 삼각형. **뿌리형태** : 언급이 없고 대부분 그림으로 표현// 주근계 형성으로 요약 할수 있었다. 기존도감에서 여우구슬에 대하여 잘못된 부분은 수정하고 내용을 보완하였으며 이 결과는 여우구슬 작물화를 위한 유전자원의 종 판별 등의 기초연구에 활용하고자 한다.

(2) 여우구슬 유전자원의 작물학적 특성

표1의 유전자원 15점 중에서 수집국별 선발 자원 3점의 작물학적 생육특성을 조사한 결과이다. 국내 수집종은 초장이 42 - 43cm로 낮고 경색은 자색이며 분지수가 많은 특성을 보였으며, 브라질 수집종은 초장이 70cm 이상으로 크고, 경색은 연녹색이며 분지수가 많았으며, 파라과이 수집종은 초장이 64 - 67 cm로 수집자원 중에서 중간 크기이며, 경색은 연녹색이고, 1차분지수가 한국 및 브라질 수집종 보다 적은 특성을 나타내었다(표3, 그림3)

Table 3. Growth characteristics of collection resources in *Phyllanthus urinaria* L.

Collection site	Plant height (cm)	No. of branch	Leaf length (cm)	Leaf color
Korea	41.4	19.8	10.65	Green
Brazil	90.7	3.3	18.5	Dark green
Paraquai	80.1	5.5	10.5	Dark green



Fig 3. Growth characteristics of collection resources in *Phyllanthus urinaria* L.

(3) 여우구슬 유전자원 항산화 활성

표 3의 선발 유전자원 항산화 활성은 총 페놀성 함량은 파라과이 수집종이 1.93 mg/ml로 가장 높게 나타났으며, 브라질이 1.65 mg/ml), 한국이 1.49 mg/ml로 가장 낮은 함량을 나타내었다. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성은 파라과이 78.38%로 가장 높은 활성을 나타내었고, 브라질 58.67%), 한국 46.81% 순이며, 녹차 추출물의 SOD 유사활성이 85.3%인 보고서 결과와 비교하여 볼 때 여우구슬의 추출물이 녹차 추출물의 SOD 유사활성에 비해 다소 낮은 경향을 나타내었다.

Table 4. Antioxidation effects of *Phyllanthus urinaria* extract prepared by mixture solvent

Collection site	Total phenolic acid contents (mg/mL)	SOD-like activity (%)	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging (%)	Hydrogen radical scavenging (%)
Korea	1.743±0.003	45.652±0	64.772	84.627±0.043	52.915±0.941
Brazil	1.743±0.003	45.652±0	64.772	84.627±0.043	52.915±0.941
Paraguay	1.723±0.004	61.805±0.982	92.160	94.719±1.358	23.790±0.400

여우구슬의 추출물에 대한 DPPH에 의한 전자공여능을 측정한 결과 파라과이 67.27%, 한국 50.88%, 브라질 34.80%이며 한국 약용 및 식물자원의 항산화성 식물탐색에 대한 결과에 의하면 포도씨와 음양곽을 제외한 식물자원이 20%미만의 활성을 보인 바와 비교하면 아주 높은 전자공여능을 보여주고 있다. Hydroxyl radical 소거활성 파라과이 95.80%, 브라질 81.64%, 한국 81.54%이며 한국산 약초 잎에 대한 항산화 효과를 검색한 결과 삼나무, 삼주, 오갈피 잎들은 hydroxy radical 소거능이 90% 이상이었다는 결과와 비교할 때 여우구슬 추출물의 hydroxy radical 소거활성은 유사하거나 높은 결과를 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거활성은 브라질 36.27%, 한국 36.07%, 한국 33.66%이며 Yoo 등의 포도 과피의 항산화 활성 55.6 - 66.6%와 비교할 때 다소 낮은 경향을 나타내었다.

2. 여우구슬 종자 발아특성

여우구슬 식과는 편구형이며 직경 3mm이고 식과내에 3 - 6립의 종자를 함유한다. 종자는 삼능형이며, 길이 1.05 - 1.3mm이고 천립중은 0.29g 내외이다.

Table 5. Germination rate to temperature condition in *Phyllanthus urinaria* L.

Temperature condition	15°C	20°C	25°C	30°C
Germination rate(%)	12	32	68	54

여우구슬종자의 발아적온은 25-30°C 범위에서 54-68%의 발아율을 보였으며, 출아 50% 도달 일수는 5일 정도 소요 되었다. 따라서 여우구슬의 파종시기는 4월상,중순의 조파보다는 5월 이후의 만파가 적합할 것으로 판단 되었다(표 5).

Table 6. Germination rate to Storage period and temperature in *Phyllanthus urinaria* L.

Storage period and temperature	Control	5month		10month		15month	
		15-25°C	5°C	15-25°C	5°C	15-25°C	5°C
Germination rate(%)	65.8	35.9	62.2	2.1	50.7	0.6	15.6

여우구슬 종자의 천립중은 0.29g 내외로 미세종자에 속하며, 미세종자 발아생리에서 보편적으로 저장수명이 짧은 경향이 있다. 표4는 여우구슬 종자의 저장기간, 방법을 구명하고자 5°C 및 15-25°C에서 각각 5, 10, 15개월 저장 후 파종한 결과, 종자의 발아율은 15-25°C 저장, 10개월 이후에는 발아율이 2% 이하로 급격히 저하 되었다. 상온에서 종자 저장수명은 10개월 미만인 것으로 판단되며, 종자 저장한계조건은 5°C, 10개월 일 것으로 판단 된다(표 6).

3. 여우구슬 안전 생산기술 개발

(1) 적정 파종시기 구명

Table 7. Growth characteristics to sowing time in *Phyllanthus urinaria* L.

Sowing time	Emergence rate (%)	Plant height (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	Index
Apr. 20	52	54.5	26.1	49.8	110.7	161	100
Apr. 30	69	57.5	27.3	51.6	123.1	213	132
May 10	89	50.3	24.1	50.7	84.3	285	177
May 20	89	46.6	22.0	43.0	123.2	252	156
May 30	90	40.7	19.3	34.9	47.9	221	137

표7은 2006년 10월 채종한 종자를 2007년 작물과학원 시험포장에 재식거리 30 × 15cm, 시비량(kg/10a) : 7-4-3-2,000(N-P-K-퇴비)를 사용한 후 파종시기별로 4월 중순, 하순, 5월 상, 중, 하순에 각각 파종한 후 생육 및 수량을 조사한 결과이며, 파종시기별 생육은 5월상, 중순이 우수하였으며, 이는 표3의 결과에서 여우구슬 종자의 발아적온이 25- 30°C로 고온발아성 종자이며, 따라서 4월 파종보다는 기온이 상승하여 여우구슬 발아적온과 외부기온이 유사한 5월 이후가 입모율이 높아 수량이 증수 된 것으로 판단 된다.

(2) 재식밀도 구명

Table 8. Growth characteristics to planting density in *Phyllanthus urinaria* L.

Planting density (cm)	Plant height (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	Index
20 × 10	57.8	28.3	53.6	144.4	506	184
20 × 15	53.8	28.0	51.5	134.9	409	149
20 × 20	52.4	27.4	47.2	144.6	392	143
30 × 10	42.0	22.7	34.8	158.8	348	127
30 × 15	47.7	24.8	44.8	169.8	334	121
30 × 20	45.3	26.3	37.9	138.8	274	100

표8은 여우구슬의 적정재식밀도를 구명하기 위하여 5월중순에 시비량(kg/10a) : 7-4-3-2,000(N-P-K-퇴비)를 사용한 후 재식밀도 20 × 10, 15, 20cm, 30 × 10, 15, 20cm 로 각각 파종한 후 생육 및 수량을 조사한 결과이며, 단위면적당 수량은 소식구인 30 × 20cm에서 밀식 할수록 수량은 높아졌으며, 재식밀도 20 × 10cm에서 수량은 506kg/10a로 소식구(30 × 20 cm)보다 84% 증수 되었다.

(3) 질소 시비적량 구명

표 7은 여우구슬의 적정재식밀도를 구명하기 위하여 5월 중순에 재식거리 30 × 15cm에 질소 비료를 0, 3, 6, 9, 12kg/10a 각각 사용 후 생육 및 수량을 조사한 결과, 질소 6kg/10a 사용구에 단위면적당 수량이 376kg/10a로 무비구보다 80% 증수 되었다.

Table 9. Growth characteristics to amount of fertilized nitrogen in *Phyllanthus urinaria* L.

Nitrogen application (kg/10a)	Plant height (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	Index
0	39.4	20.9	34.2	53.2	209	100
3	48.2	26.2	46.1	118.3	284	136
6	50.7	28.8	47.9	132.6	376	180
9	45.7	25.0	41.3	125.9	274	131
12	40.7	22.9	36.2	103.3	262	125

(4) 이식 및 피복재배기술

현대 농작물재배에서 피복재배가 보편화 되어 있으며, 피복재배는 작물 재배시 가장 문제가 되고 있는 잡초 발생을 효율적으로 억제 할 수 있으며, 또한 피복재배 효과로 토양수분보존으로 인한 입모율 향상 및 생육촉진 효과가 인정 되고 있다.

여우구슬은 자원식물로서 재배기술이 개발되지 않았으며, 표 10은 여우구슬 재배시 적합한 피복재료 선별과 각 피복재료별 생육특성을 조사한 결과이다. 피복재료별 생육은 흑색비닐피복 재배가 입모율이 88.6%로 무피복 및 짚피복 재배보다 높았으며, 초장, 분지수, 분지장 등 농업형질의 생육이 우수한 것으로 나타났다. 수량은 흑색비닐피복 재배가 입모율 및 생육이 우수하여 무피복 재배보다 57% 증수되는 결과를 보였다.

Table 10. Growth characteristics to mulching materials in *Phyllanthus urinaria* L.

Treatment	Emergence rate (%)	Plant height (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	Index
Black PE mulching	88.6	58.9	27.5	50.2	132.6	412	157
Straw mulching	83.5	54.3	25.4	48.7	127.8	378	144
Non mulching	65.3	52.7	21.5	46.0	121.6	262	100

Table 11. Comparison of growth characteristics between seedling and transplanting in *Phyllanthus urinaria* L.

Treatment	Emergence rate (%)	Plant height (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	Index
Seedling	65.3	46.4	21.5	40.6	134.5	385	100
Transplanting	99.6	59.5	27.0	48.0	192.7	468	122

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

마. 수확시기별 수량 및 건조조건 구명

표 12는 여우구슬 수확시기별로 생육을 조사한 결과이며, 개화기 전인 8월 20일 수확구는 초장, 경경 등 지상부 생육이 부진하였으며, 개화기 직후인 9월 20일 수확구, 10월 20일 수확구 등 수확시기가 늦을 수록 전초 수량은 증가 하였다.

Table 12. Growth characteristics of harvesting time in *Phyllanthus urinaria* L.

Harvesting times	Plant height (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Shoot weight (g/plant)	Yield (kg/10a)	Index
Aug. 20	58.9	26.5	40.2	132.6	412	100
Sep. 20	58.9	28.4	49.7	147.8	478	116
Oct. 20	58.9	31.5	52.0	161.6	562	136

그림4는 여우구슬 지상부를 원적외선 건조기 40, 45, 50, 55℃ 조건에서 건조감모율을 조사한 결과 최고 감모율 29.5% 도달일수는 55℃ 2일, 45-50℃ 3일, 40℃에서는 7일이 소요 되었다.

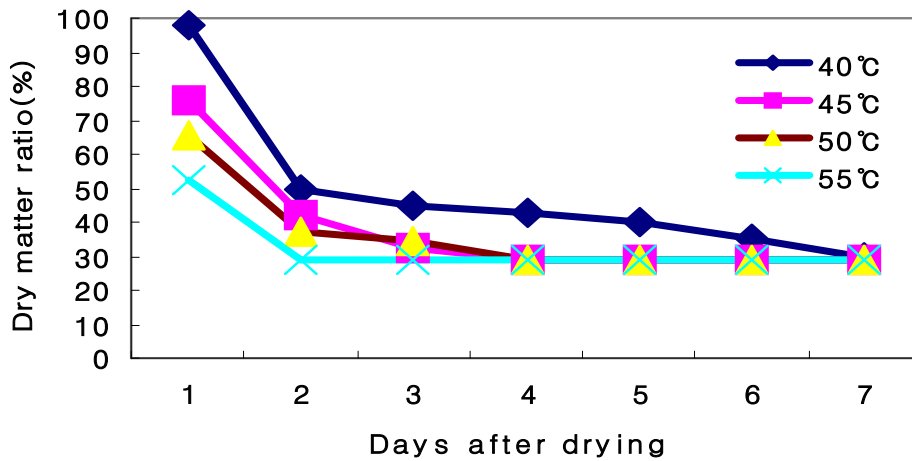


Fig. 4. Dry matter ratio by temperature condition in *Phyllanthus urinaria* L.

[제2협동과제] 여우구슬 함유 항 관절염 물질의 분리기술 확립

1. 여우구슬 종자, 전초의 이화학적특성 및 생리활성

가. 여우구슬 전초, 종자의 이화학적 특성

여우구슬의 전초와 종자의 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. 수분함량은 전초 7.3%, 종자 6.3%로 부위별에 따른 수분의 함량에 차이가 있음을 알 수 있었다. 조회분 함량은 전초 9.17%, 종자 8.12%, 조지방 함량은 전초 12.27%, 종자 21.37%, 조단백질 함량은 전초 5.25%, 종자 3.89%로 나타났다. 무기질 함량의 경우 처리방법을 달리한 여우구슬의 전초, 씨의 Al, B, Ba, Ca, Cd, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Si, Zn 함량을 ICP를 사용하여 측정한 결과는 Table 2,3 과 같다. 지방산 조성의 분석 결과는 초임계 추출의 경우 여우구슬 종자를 초임계 450/65의 조건에서 추출하여 원심분리 하여 수분 층을 제외하고 실험에 사용 하였다. 일반 시험 항목(산가, 비중, 굴절율, 요오드가, 수분, 조지방) 및 기기분석 항목은 식품공전에 있는 방법에 따라 시행하였다.

여우구슬 종자의 일반성분, 지방산 및 스테롤류를 분석 하였을 시 아래 결과와 같은 값을 얻었으며, 여우구슬 종자의 경우 특별한 기준 규격이 없어 참기름의 기준을 비교 결과에 첨부하였다. 여우구슬 종자의 경우 참기름과 비교시 요오드 값과 linolenic acid 함량이 높았으며, 불포화 지방산 함량이 매우 높게 나타났다. 초임계와 hexane 추출결과 비교시 hexane 추출물의 경우 산가가 높았으며, 비중, 굴절율, 요오드가, 지방산의 경우는 비슷한 수치를 나타내었으나 스테롤의 경우 그 함량이 절반 가까이 낮아지는 것을 확인 하였다. 따라서 식물성 스테롤의 함량이 높은 초임계 추출 방법이 더 좋은 추출방법으로 평가 된다.

Table 1. Proximate composition of *Phyllanthus urinaria L.* (%)

	Moisture	Crude fat	Crude ash	Crude protein
	(%)			
Total, exclusive seed	7.3	12.27	9.17	5.25
Seed	6.3	21.37	8.12	3.89

Table 2. Mineral contents of *Phyllanthus urinaria* seed by different methods (Unit : mg%)

미세분말	시료량	Al	B	Ba	Ca	Cd	Fe	K
	3.1017	8.812	1.447	1.559	813.2	1.657	4.913	1051.4
mg/kg	최종값	142.1	23.3	25.1	13108.9	26.7	79.2	16948.8
일반분말	시료량	Al	B	Ba	Ca	Cd	Fe	K
	3.6675	7.266	1.591	1.542	952.4	0.1263	5.143	1280.8
mg/kg	최종값	99.1	21.7	21.0	12984.3	1.7	70.1	17461.5
씨	시료량	Al	B	Ba	Ca	Cd	Fe	K
	4.5363	48.02	0.3625	1.196	411.6	0.008	39.14	221.6
mg/kg	최종값	529.3	4.0	13.2	4536.7	0.1	431.4	2442.5

Table 3. Mineral contents of *Phyllanthus urinaria* seed by different methods (Unit : mg%)

미세분말	시료량	Mg	Mn	Na	P	Si	Zn	Hg
	3.1017	211.4	4.37	8.577	159.92	12.23	2.849	
mg/kg	최종값	3407.8	70.4	138.3	2577.9	197.1	45.9	0.0824
일반분말	시료량	Mg	Mn	Na	P	Si	Zn	
	3.6675	250.8	4.211	6.331	194.92	11.7	3.168	
mg/kg	최종값	3419.2	57.4	86.3	2657.4	159.5	43.2	0.0619
씨	시료량	Mg	Mn	Na	P	Si	Zn	
	4.5363	169.7	5.047	2.391	276	11.44	3.498	
mg/kg	최종값	1870.5	55.6	26.4	3042.1	126.1	38.6	0.0159

Table 4. Proximate composition (%)

	Moisture (%)	Crude Fat (%)	Extracts yield of oil (%)		
Total, exclusive seed	6.08	2.40	CO2	Total, exclusive seed	62.09
				Stem	-
Stem	5.39	0.86	CO2+EtOH	Total, exclusive seed	79.59
				Stem	-

Table 5. 초임계 유체를 이용한 여우구슬 종자의 일반성분 분석

	수분					
여우구슬 종자	4.2					
	산가 (KOH mg/g)	비중	굴절율	요오드가	수분(%)	조지방(%)
참기름 기준	4.0 ↓	0.914~0.921	1.471~1.474	103~118	0.1 ↓	—
여우구슬 SCF	1.31	0.927	1.481	196	0.1667	16.8
여우구슬 Hexane	2.25	0.931	1.48	193	0.0718	20.1

Table 6. 초임계 유체를 이용한 여우구슬 종자의 지방산 분석

	조지방(%)							
여우구슬 종자	19.7							
	지방산(%)					스테롤류(mg/100g)		
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	campaster ol	stigmaste rol	β-sitoster ol
참기름 기준	7.0~12.0	3.5~6.0	35.0~50. 0	35.0~50. 0	0.5 ↓	—	—	—
여우구슬 SCF	6.4	6.2	11.4	16.8	59.1	0.9	68.8	45.6
여우구슬 Hexane	6.5	6.0	11.2	17.4	58.9	0.4	30.2	22.2

2. 여우구슬 전초, 종자 추출물의 생리활성

가. 전초, 종자 추출물의 항산화능

(1) 수율

여우구슬의 80%MeOH, CHCl₃ : MeOH (3 : 1) 혼합용매, 초임계 추출(CO₂, Alcohol), 미세, 초미세 분말에 의하여 부위별로 추출한 결과는 80%MeOH에서 전초 26.69%, 종자 6.60%, CHCl₃ : MeOH (3 : 1)에서 전초 10.25%, 종자 21.16%, 초임계 추출(전초 1.50%), 미세, 초미세 분말(전초 29.94%, 36.99%)로 용매의 추출방법과 온도조건에 따라서 수율에 큰 차이가 나타났다.

Table 7. Yield and contents of *Phyllanthus urinaria*

		Yield(%)
Total, exclusive seed	80%MeOH	26.69
	CHCl ₃ : MeOH(3 : 1)	10.25
Seed	80%MeOH	6.60
	CHCl ₃ : MeOH(3 : 1)	21.16

Table 8. Yield and contents of *Phyllanthus urinaria* (treatment of S.F)

	Yield (%)
CO ₂	1.50
Alcohol	2.17

(2) 처리방법 별 추출물의 항산화능

Table 9. Antioxidantive Effect of *Phyllanthus urinaria*

	Total phenolic acid contents	SOD-liked activity	EDA	Hydroxyl radical scavenging	Lecithin oxidation
	(mg/mL)	(%)			
W.B(T.60℃)	1.997±0.004	63.090±0.598	92.026	94.884±0.330	27.509±0.144
W.B(S.60℃)	1.442±0.006	59.846±1.446	42.226	95.434±0.343	31.597±0.359
S.N(T.25℃)	1.723±0.004	61.805±0.982	92.160	94.719±1.358	23.790±0.400
S.N(S.25℃)	1.429±0.004	66.867±0.851	53.015	94.251±0.333	23.601±1.715
S.K(T.25℃)	1.692±0.019	50.893±0.022	89.145	95.682±0.265	23.233±0.140
S.K(T.40℃)	1.934±0.015	78.379±1.172	67.273	95.804±0.172	36.073±2.018
S.K(S.40℃)	2.244±0.009	75.431±0.212	35.584	95.740±0.277	35.682±1.466
S.K(S.25℃)	1.704±0.001	60.714±1.010	69.447	95.562±0.126	26.022±0.136
H.M(T.80℃)	1.962±0.000	57.694±0.167	92.377	95.792±0.082	23.789±0.926
H.M(S.80℃)	1.443±0.001	55.990±1.629	34.103	95.187±0.333	26.762±1.436

① 총 페놀함량

총 페놀성 함량은 전초 W.B(60°C) 추출조건에서 종자는 S.K(80°C)추출조건에서 가장 높게 나타났으며, 전초 S.K(25°C), 종자 S.N(25°C) 추출조건에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 페놀 화합물은 식물자원에 함유되어 있는 천연물질로써 다양한 구조와 생리활성 기능을 가지고 있다. Kang 등의 연구보고서에 의하면 활나물을 에탄올 용매로 추출한 경우 부위에 따른 페놀함량은 0.71-0.99mg/ml로 측정된 것과 비교하여 볼 때 추출방법과 온도조건에 의한 페놀함량이 다르게 측정됨을 알 수 있었다.

② 전자공여능(Electron donating activity)측정

여우구슬의 추출물에 대한 DPPH에 의한 전자공여능을 측정한 결과는 전초 H.M(80°C) 92.37%, 종자 S.K(25°C) 69.44% 로 높은 전자공여능을 보였으며, S.K(25°C) 89.14% ,종자 H.M(80°C) 34.10% 로 가장 낮은 활성을 나타내었다.

③ Hydroxyl radical 소거능

여우구슬의 추출물에 대한 hydroxy radical 소거활성은 H.M(80°C) 95.79%, 종자 S.K(25°C) 95.56% 로 가장 높았으며, 전초, 종자 모두 S.N(25°C) 94.71%, 94.25%로 가장 낮은 결과를 보여 주었다. 한국산 약초 잎에 대한 항산화 효과를 검색한 결과 삼나무, 삼주, 오갈피 잎들은 hydroxy radical 소거능이 90% 이상이었다는 결과와 비교할 때 여우구슬 추출물의 hydroxy radical 소거활성은 유사하거나 높은 결과를 나타내었다.

④ Hydrogen peroxide 소거능

여우구슬의 hydrogen peroxide 소거활성은 전초, 종자 모두 W.B(60°C) 27.50%, 31.59% 로 hydrogen peroxide 소거활성이 높게 나타났으며, 전초S.K(25°C) 23.23%, 종자 S.N(25°C) 23.60%로 가장 낮은 활성을 보였다. 여우구슬의 추출물에 대한 hydrogen radical 소거능은 Yoo 등(11)의 포도 과피의 항산화 활성 55.6 - 66.6%와 비교할 때 다소 낮은 경향을 나타내었다.

⑤ SOD-liked activity

SOD 유사활성은 전초에서는 W.B(60°C) 추출조건에서 ,종자는 S.N(25°C) 추출조건에서 높은 활성을 나타내었고, 전초 S.K(25°C), 종자 H.M(80°C) 추출조건에서 낮은 활성을 보였다. 녹차 추출물의 SOD 유사활성이 85.3%인 보고서 결과(13)와 비교하여 볼 때 여우구슬의 추출물이 녹차 추출물의 SOD 유사활성에 비해 다소 낮은 경향을 나타내었다.

(3) 추출방법별 여우구슬의 생리활성

① 총 페놀 함량

폴리페놀 화합물 중 flavonoid는 1O_2 나 O_2^- 와 반응하며 안정한 complex를 형성하여 이들의 소거작용을 가지고 있어 지질의 과산화에 대한 항산화제로 잘 알려져 있다.

총 페놀성 함량은 천연항산화제인 Sesamol 에서 가장 높게 나타났으며, P.U.S(CHCl₃:MeOH 3:1) 에서 가장 낮은 함량을 나타내었고, 유효성분인 β -Sitosterol은 1.122 mg/ml의 함량을 나타내었다.

페놀화합물의 함량과 항산화 효과와는 밀접한 관계가 있다는 보고와 비교하여 볼때, 총 페놀화합물의 함량이 높은 것이 뛰어난 항산화 효과를 가지고 있을 것으로 예상된다.

Table 10. Contents of extracts from phyllanthus urinaria

	Total phenolic acid contents (mg/mL)	SOD-like activity (%)	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging (%)	Lecithin oxidation (%)
P.U(80% MeOH)	2.522±0	78.380±1.172	67.273	94.162±0.004	67.080±0.329
P.U.S(80% MeOH)	2.242±0.002	75.431±0.212	35.584	94.825±0.066	63.865±2.574
P.U(CHCl ₃ :MeOH 3:1)	1.273±0.002	89.440±0.661	14.918	90.402±0.069	56.042±0.931
P.U.S (CHCl ₃ :MeOH 3:1)	0.983±0.002	86.362±0.551	51.049	61.964±0.101	24.438±0.602
S.F(Alcohol)	1.128±0	91.308±0.602	4.038	90.270±0.131	21.727±1.698
S.F(CO ₂)	1.023±0.002	88.604±0.680	4.711	90.757±0.682	70.837±0.493
Sesamol	5.408±0.003	54.372±1.898	84.779	91.243±0.005	75.097±0.164
Tocopherol	2.254±0.005	82.919±0.200	89.204	92.835±0.130	84.431±0.657
BHA	4.395±0.002	23.352±4.015	91.150	92.835±0.130	84.973±0.329
β-Sitosterol	1.122±0.003	89.456±0	2.242	91.685±0.005	49.070±1.041

② Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 S.F(Alcohol) 추출에서 높은 활성을 나타내었고, 합성항산화제인 BHA에서 가장 낮은 활성을 보였으며, 유효성분인 β-Sitosterol은 89.456%로 높은 활성을 나타내었다.

③ 전자 공여능

여우구슬의 추출물에 대한 DPPH에 의한 전자공여능을 측정한 결과는 합성항산화제인 BHA에서 가장 높은 전자공여능을 보였으며, 유효성분인 β-Sitosterol 이 2.242% 로 가장 낮은 활성을 나타내었다.

④ Hydroxyl radical 소거활성 측정

여우구슬의 추출물에 대한 hydroxyl radical 소거활성은 P.U.S(80% MeOH) 추출물에서 가장 높았으며, P.U.S(CHCl₃:MeOH 3:1) 추출물에서 가장 낮은 결과를 보여 주었고, 유효성분인 β-Sitosterol은 91.685%로 높은 활성을 보여, 여우구슬에는 항 관절염 뿐 만 아니라, 항산화 활성이 높은 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 생각되어 진다.

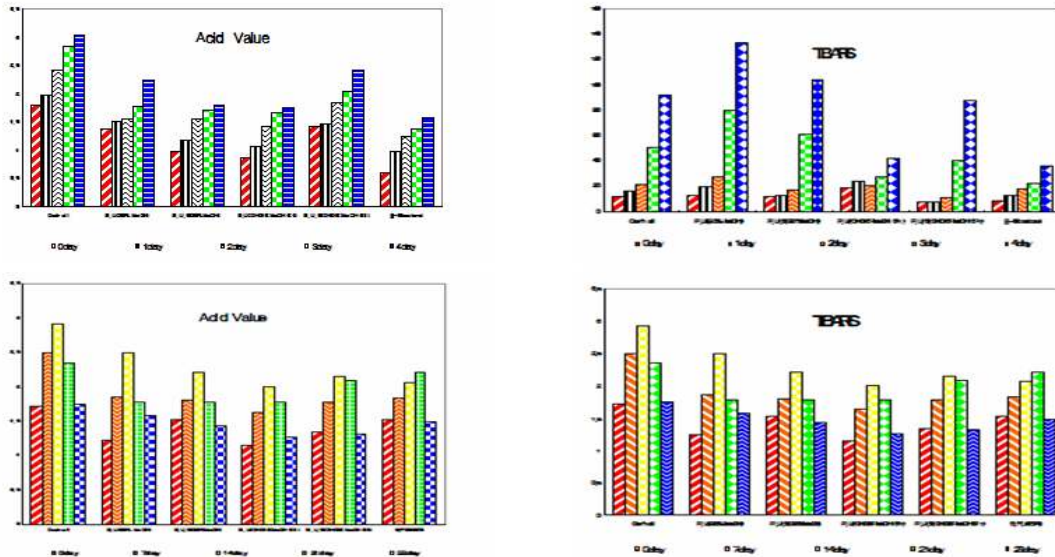
⑤ Hydrogen peroxide 소거활성 측정

여우구슬의 hydrogen peroxide 소거활성은 합성항산화제인 BHA에서 hydrogen peroxide 소거활성이 가장 높게 나타났으며, S.F(Alcohol) 추출물에 가장 낮은 활성을 보였다. 유효성분인 β-Sitosterol은 49.070%의 활성을 나타내었다.

나. 여우구슬 전초, 종자 추출물의 유지에 대한 항산화 효과

일반 식용유(10ml) 에 여우구슬 각각의 추출물을 1% 첨가하여 60°C건조기에 보관하면서, 1일 간격으로 지방의 산패도(산가, TBARS) 를 4일간 실시하였다. 또한, 산패가 일어나는 정도를 알아보기 위해 1주일 간격으로 28일간 지방의 산패도를 분석하였다. 산패도에 대한 결과는 아래와 같다.

실험결과 여우구슬 추출물을 첨가한 유지의 항산화력 이 매우 높게 측정되었다. 이러한 결과로 볼 때, 유효성분인 β -Sitosterol의 함유 정도에 따른 결과로 사료된다.



Changed of Acid Value in Soybean oil by added 1% Phyllanthus urinaria each extracts.

TBARS formation effects of Soybean oil by added 1% Phyllanthus urinaria each extracts.

다. 가공처리방법별 유용성분 비교 - 초임계 분산성 및 입자크기별: 미세분말, 초미세분말

건조된 여우구슬을 기류식분쇄기를 사용하여 미세 분말화 한 후 유용성분 분석을 한 결과는 아래그림과 같다.

초미세분말의 입도 분석결과, 50%에 해당되는 입자의 크기는 24.99 μm 이었다. 일반 파우더와 초미세분말의 추출 수율 비교 결과, 일반 파우더에 비해 초미세분말의 추출수율이 높음을 확인할 수 있었으며, 추출물을 육안으로 관찰한 결과, 초미세분말 추출물의 색이 더 진함을 확인할 수 있었다. 초미세 분말 화 하였을 때, 영양소, 색상의 파괴가 낮으며, 용해도가 일반 건조 분말에 비해 높음을 육안으로 확인할 수 있었다.

Particle size cumulative distribution of U.P (μm)

X ₁₀	X ₁₆	X ₅₀	X ₈₄	X ₉₀	X ₉₉
6.55	9.36	24.99	62.53	78.65	145.10

Yield (%)

	Yield(%)
G.P*	29.94
U.P**	36.99

* : General powder of *Phyllanthus urinaria*
 ** : Ultrafine-powder of *Phyllanthus urinaria*

G.P ext.



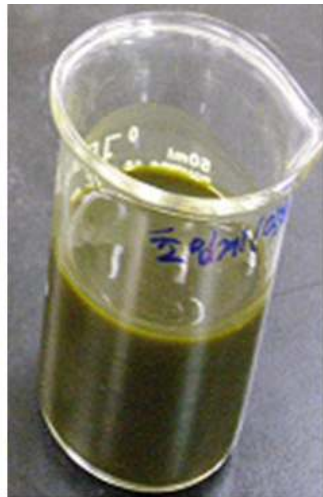
U.P ext.

초임계 추출물의 분산성 실험결과 이산화탄소에 보조용매인 알코올 처리를 한 추출이 분산도가 더 높음을 육안으로 확인 할 수 있었다.

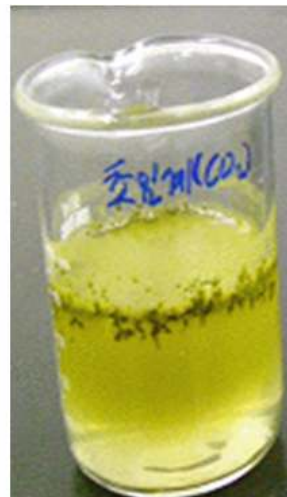
초임계 고수율 추출 및 유효성분 분리 방법을 위해 초임계를 이용하여 추출상태를 모색하기 위해 물질을 넣고 추출한 결과는 아래와 같다.



S.F (CO2)



S.F (Alcohol)



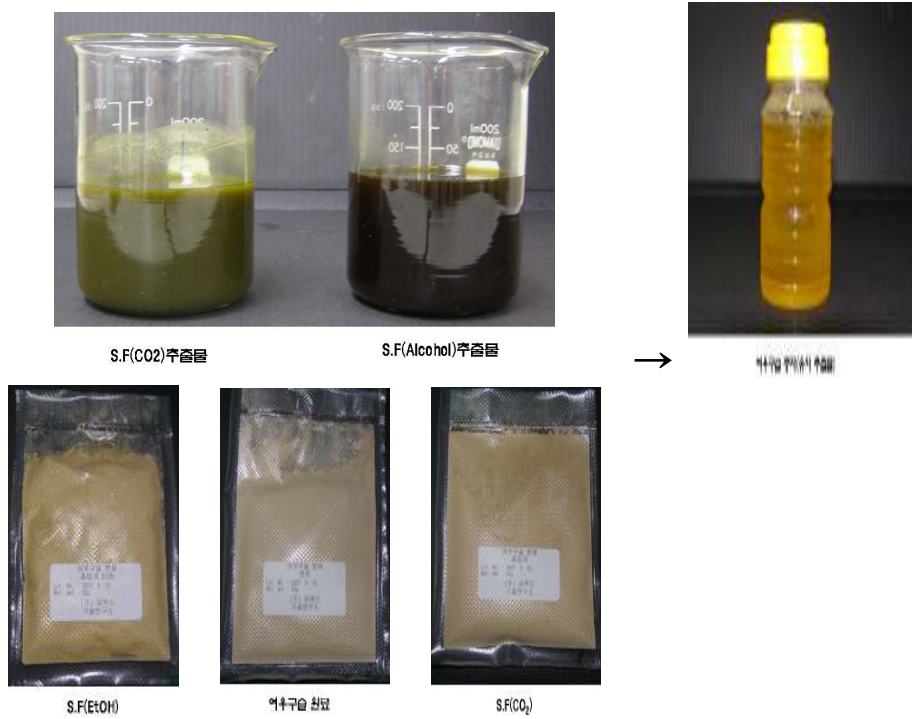
S.F (CO2) + water



S.F (Alcohol) + water

초임계 추출물

**분산성 실험
(초임계 추출물 + 물)**



3. 여우구슬 추출물의 Sephadex LH-20분획 및 생리활성 측정

가. 여우구슬 추출물의 Sephadex LH-20분획에 의한 분획물 제조

수율 및 높은 활성을 보였던 80% MeOH을 용매로 가하여 shaking incubator에서 4시간씩 3반복 추출하였다. 추출된 시료는 여과 후 감압농축 한 다음 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol에 의해 순차적으로 분획하였다. 염증 및 항 관절염에 효과가 있는 것으로 알려진 β -Sitosterol의 성질을 이용하여 chloroform 분획 물로부터 성분을 분리하기 위하여 Silica gel column chromatography 에 sephadex LH-20을 4 x 50 cm까지 충전 시키고, chloroform 분획물중 2 g을 loading하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol (100 : 10)을 사용하여 전개하였다. 컬럼으로부터 용리하면서 60ml씩 분획을 수집하고 이들을 TLC((Toluene : Ethyl acetate : Formic acid (4: 5 : 1)) 전개 후 UV 254 nm, 334 nm에서 확인 후 A-E 까지 분리 하였으며, 95%-H₂SO₄로 발색시킨 후 유사분획끼리 통합하여 4개의 소분획 (Fr.1-Fr.4)으로 나누어 감압 농축한 후 시료로 사용하였다.

나. 분획별 항산화능 측정

전초 분획물의 페놀함량을 측정한 결과 Sesamol(0.77mg/mL), BHA(0.60mg/mL), BuOH(0.46mg/mL)순으로 나타났으며, Hexane과 Water 층에서 (0.008mg/mL, 0.061mg/mL)로 가장 낮게 나타났으며, 씨 분획물은 Sesamol(0.90mg/mL), BHA(0.72mg/mL), EtOA(0.51mg/ml)순으로 나타났으며, Hexane층에서 (0.069%)로 가장 낮게 나타났다.

SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide anion의 활성을 억제 시킬 수 있는 유사물질의 활성능을 측정한 결과 Tocopherol(98.62%), CHCl₃(97.22%), Hexane(96.83%)순으로 나타났으며, BHA(11.81%)가 가장 낮은 활성을 나타내었다. 씨분획물의 경우 Tocopherol(95.30%), EtOA(84.34%), BuOH(73.33%)순으로 나타났으며, BHA(32.05%)가 가장 낮은 활성을 나타내었다.

DPPH와 여우구슬 추출물의 분획물을 반응시켜 DPPH scavenger 활성을 측정한 결과 EtOA(91.51%), BHA(90.39%),로 높은 전자공여능을 보였으며, Hexane층에서(18.84%)로 가장 낮은 활성을 보였다. 씨 분획물은 EtOA(89.80%), BuOH(83.25%)층에서 높은 전자공여능을 보였으며, CHCl₃(17.79%)층에서 가장 낮은 활성을 나타내었다.

여우구슬 분획층의 Hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과, BHA(98.52%), Water(98.40%), Tocopherol(97.93%), BuOH(97.90%), EtOA(97.34%)로 순으로 나타났으며, Sesamol이(94.49%)로 가장 낮은 활성을 보였다. 씨 분획물의 경우 Tocopherol(97.09%), Water(97.05%), BuOH(96.89%) 순으로 나타났으며, Sesamol(90.25%)이 가장 낮은 활성을 나타내었다. 여우구슬 추출물의 분획층이 높은 수준의 hydroxy radical 소거활성을 보이는 것으로 보아 여우구슬 추출물에는 항산화 활성이 높은 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 생각되어진다.

Hydrogen radical 소거활성은 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜주는 능력을 측정하는 것으로 본 실험결과 BHA (57.27%), Tocopherol(50.37%), Sesamol(42.91%), Hexane(34.73%), BuOH(31.09%), EtOA(30%)순으로 기존의 항산화제 보다는 다소 낮은 경향을 나타냈으며, CHCl₃ 층에서 가장 낮은 활성을 보였다. 씨 분획물의 경우 BHA(88.60%), Tocopherol(83.78%), Sesamol(82.07%), BuOH(76.84%)의 활성을 보였으며, CHCl₃층에서 (56.09%)로 가장 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때, 여우구슬에는 분리·동정 중에 있는 β -Sitosterol 뿐만 아니라, 여러 가지 기능성 물질이 많이 존재할 것으로 사료된다.

Table 11. Antioxidant Effect of fraction of P.U.(80%)

	Total phenolic acid contents	SOD–liked activity	EDA	Hydroxyl radical scavenging	Lecithin oxidation
	(mg/mL)	(%)			
CHCl ₃	0.140±0.004	97.216±0.284	43.356	96.901±0.002	24.178±1.676
Hexane	0.008±0.002	96.826±0.346	18.836	97.221±0.037	34.727±0.079
EtOA	0.276±0.011	82.743±1.906	91.507	97.344±0.071	29.996±1.646
BuOH	0.461±0.020	66.670±2.096	86.712	97.909±0.036	31.092±0.417
Water	0.062±0.00	59.503±2.274	41.978	98.401±0.036	18.365±0.352
Tocopherol	0.222±0.005	98.622±0.135	87.414	97.934±0.071	50.366±1.030
Sesamol	0.766±0.018	40.064±2.267	82.918	94.491±0.066	42.907±0.808
BHA	0.602±0.011	11.806±0.982	90.387	98.524±0.001	57.269±1.505

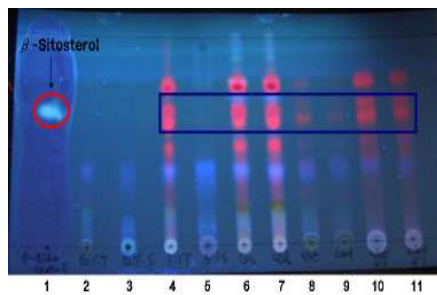
Table 12. Antioxidant Effect of fraction of P.U.S.(80%)

	Total phenolic acid contents	SOD–liked activity	EDA	Hydroxyl radical scavenging	Lecithin oxidation
	(mg/mL)	(%)			
CHCl ₃	0.139±0.001	71.183±0.978	17.789	95.591±0.057	56.087±0.044
Hexane	0.055±0.000	72.931±0.288	18.596	94.903±0.114	57.271±0.248
EtOA	0.508±0.000	84.337±0.578	89.801	94.498±0.229	75.041±0.115
BuOH	0.358±0.000	73.332±0.279	83.254	96.885±0.172	76.839±0.351
Water	0.219±0.000	70.968±0.000	48.264	97.047±0.286	72.631±0.052
Tocopherol	0.224±0.000	95.306±0.061	39.038	97.087±0.000	83.783±0.367
Sesamol	0.905±0.000	47.815±1.070	79.762	90.251±0.172	82.067±0.215
BHA	0.718±0.000	32.051±1.813	86.558	95.510±0.172	88.603±0.084

다. TLC 분석

TLC 분석은 추출방법별, 용매추출별, 분획별 추출물을 가지고 β -Sitosterol - Hexane : EtOA(65 : 35, v/v), Saponarin - EtOA : MethylEthyl Ketone : Fomic acid : Water(50 : 30 : 10 : 10, v/v/v/v) 를 전개용매로 TLC를 실시하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 5% H₂SO₄로 각각 발색하여 spot을 확인 하였다. TLC 결과 분획 추출물에서 공통적으로 Rf치가 같은 동일선상의 물질을 확인할 수 있었다. 확인된 물질이 항산화 활성이 있는 β -Sitosterol 로 추정되며, 그 외에도 많은 기능성 물질들이 존재함을 확인 하였으며, 지금 여러 가지 물질을 분리·동정 중에 있다.

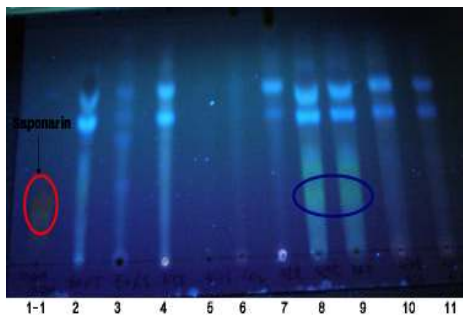
특히, Fr.1을 hexane에서 재결정화를 수행하였을 때 무색의 침상정을 얻을 수 있었으며 이를 화합물 I이라 하였고, silica gel TLC 상의 Rf값은 0.65(EtOA : Toluene : Fomic acid = 5: 4: 1, v/v/v)) 로 나타났다.



추출방법별, 용매별 TLC패턴

Mobile Phase

Hexane : EtOA(65 : 35, v/v)



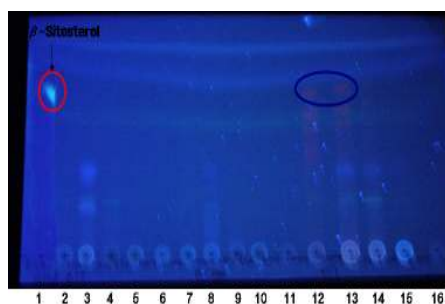
추출방법별, 용매별 TLC패턴

Mobile Phase

EtOA : MethylEthyl Ketone :
Fomic acid : Water(50 : 30 : 10
: 10, v/v/v/v)

Fig 1. TLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

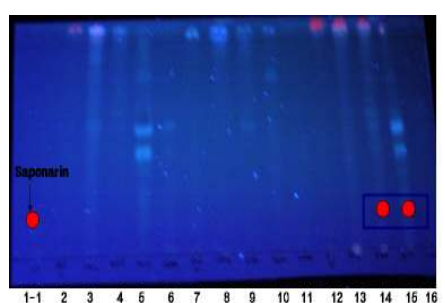
- * 1. : β -Sitosterol, 1-1 : Saponarin
- * 2. : P.U(80% MeOH)
- * 3. : P.U.S(80% MeOH)
- * 4. : P.U(CHCl₃:MeOH 3:1)
- * 5. : P.U.S(CHCl₃:MeOH 3:1)
- * 6. : S.F(CO₂)
- * 7. : S.F(Alcohol)
- * 8. : NANO-P(MP)-80%MeOH
- * 9. : NANO-P(UP)-80%MeOH
- *10. : NANO-P(MP)-CHCl₃:MeOH 3:1
- *11. : NANO-P(UP)-CHCl₃:MeOH 3:1



분획별 TLC패턴

Mobile Phase

Hexane : EtOA(65 : 35, v/v)



분획별 TLC패턴

Mobile Phase

EtOA : MethylEthyl Ketone :
Fomic acid : Water(50 : 30 : 10
: 10, v/v/v/v)

Fig 2. TLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

- * 1. : β -Sitosterol, 1-1 : Saponarin
- * 2. : P.U(80% MeOH) - Hexane층
- * 3. : P.U(80% MeOH) - CHCl_3 층
- * 4. : P.U(80% MeOH) - EtOA층
- * 5. : P.U(80% MeOH) - BuOH층
- * 6. : P.U(80% MeOH) - Water층
- * 7. : P.U.S(80% MeOH) - Hexane층
- * 8. : P.U.S(80% MeOH) - CHCl_3 층
- * 9. : P.U.S(80% MeOH) - EtOA층
- *10. : P.U.S(80% MeOH) - BuOH층
- *11. : P.U.S(80% MeOH) - Water층

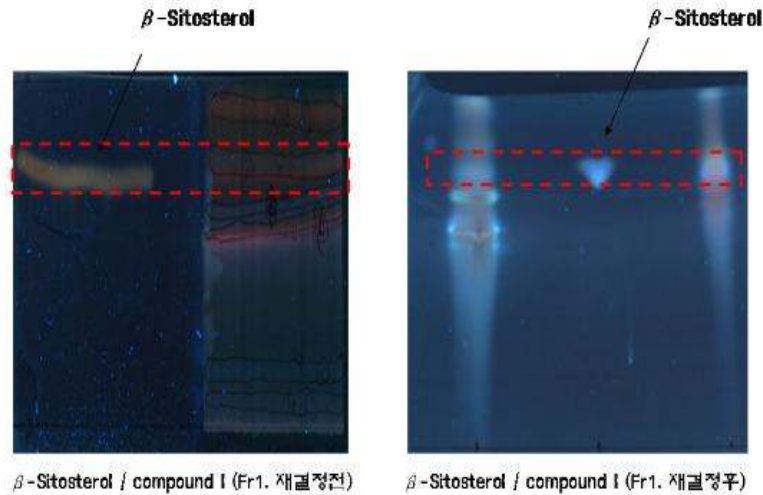


Fig. 3. TLC pattern of Compound I

※ Mobile Phase(EtOA : Toluene : Fomic acid = 5: 4: 1, v/v/v)

라. HPLC 분석

HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 다음 의 조건으로 분석하였다. 즉, mobile phase는 methanol : H₂O(80 : 20) 에서 (μ -Bondapak C₁₈ 3.9×300 mm) 컬럼을 사용하였으며, 280 nm에서 20분간 측정하였다.

- un no peak1 은(분자량이 595.5 정도) 되는 플라보노이드 계통의 물질 saponarin으로 추정되며, 정량분석 결과 전초와 씨 분획물 중 ethyl acetate 층에서 가장 높은 함량을 보였으며, HPLC 상 4분대에서 검출 되었다. 현재 물질 분리·동정 중에 있음. 이물질이 구조·동정 된다면 β -Sitosterol 과 saponarin의 상관관계를 구명 할 예정이며, 이 식물에서는 처음으로 saponarin을 구조·동정 하는 것임.)

- un no peak2 는 분자량이 (414.7)인 지표물질 β -Sitosterol 로 밝혀졌으며, TLC로 물질의 패턴을 확인 후, sephadex LH-20 column chromatography를 통해 얻은 Fr.1을 hexane에서 재결정화를 수행하였을 때 무색의 침상정을 얻을 수 있었으며 이를 화합물 I이라 하였다. 이 화합물 I을 MeOH : H₂O = 80 : 20을 이동상으로 μ -Bondapak C₁₈ (3.9×300 mm) Prep-HPLC를 실시하여 compound I을 순수 분리·정제 하였다.

unknown peak1, β -Sitosterol(unknown peak2)로 추정되는 지표물질의 HPLC패턴

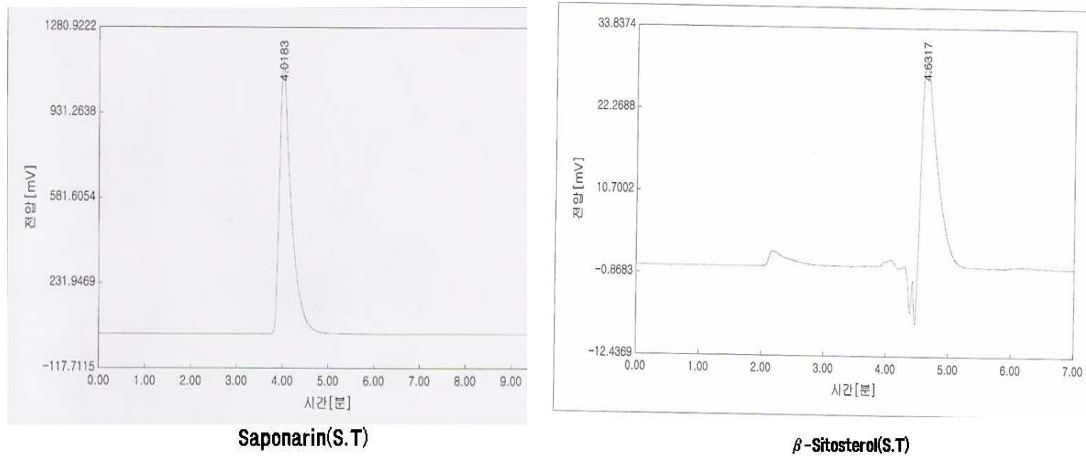


Fig 4. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

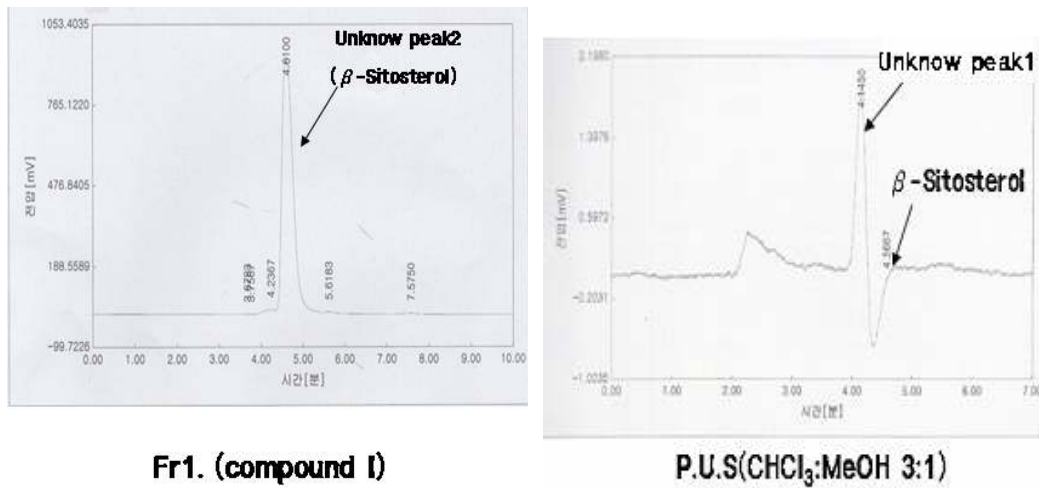


Fig 5. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

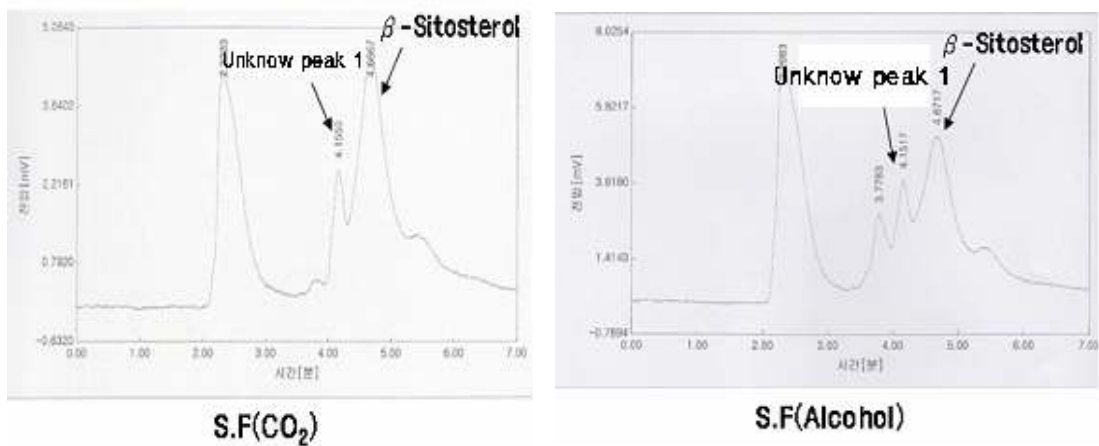


Fig 6. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

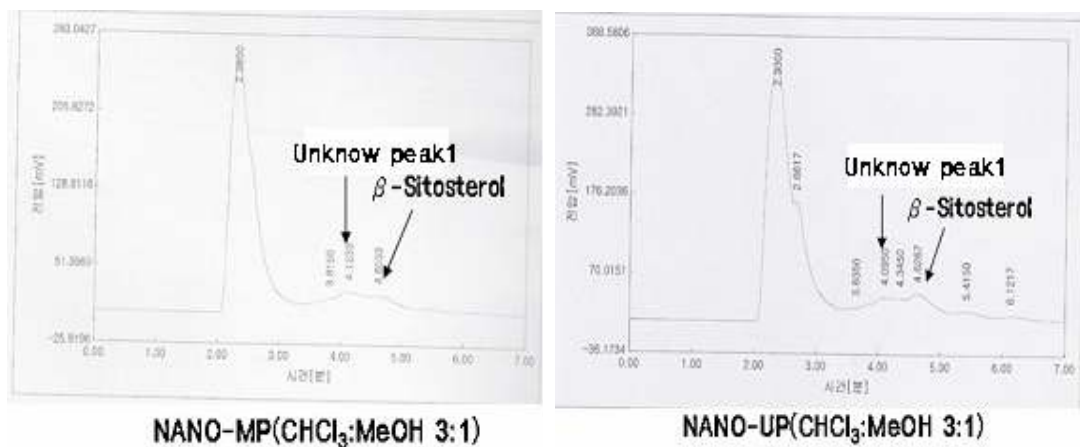


Fig 6. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

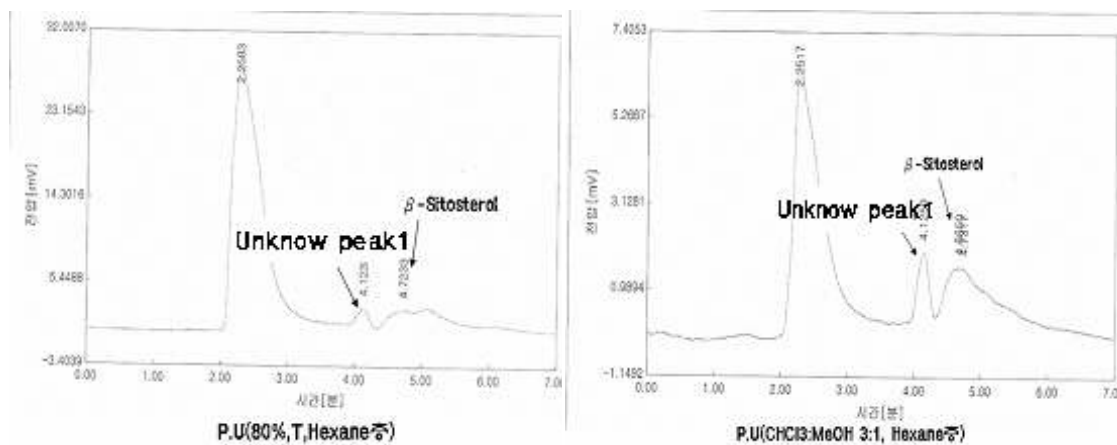


Fig 8. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

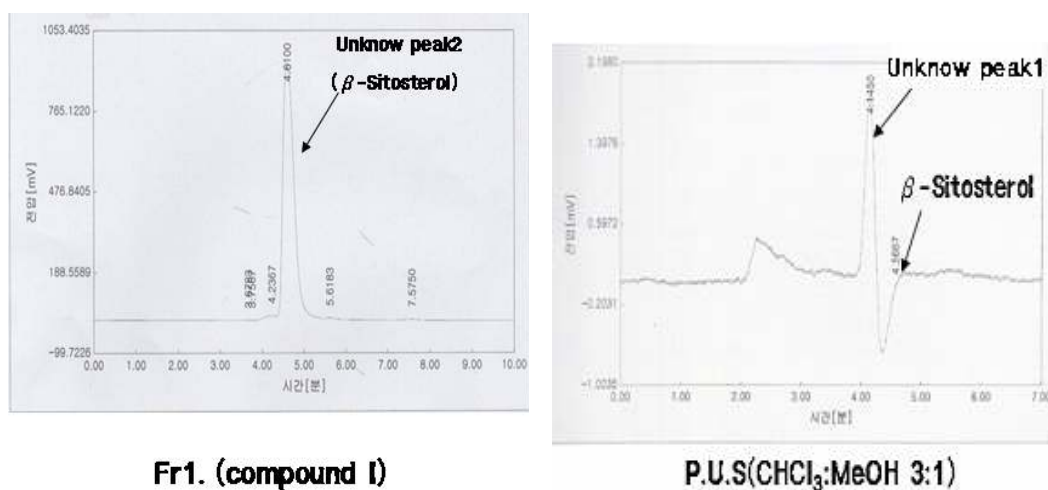


Fig 9. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

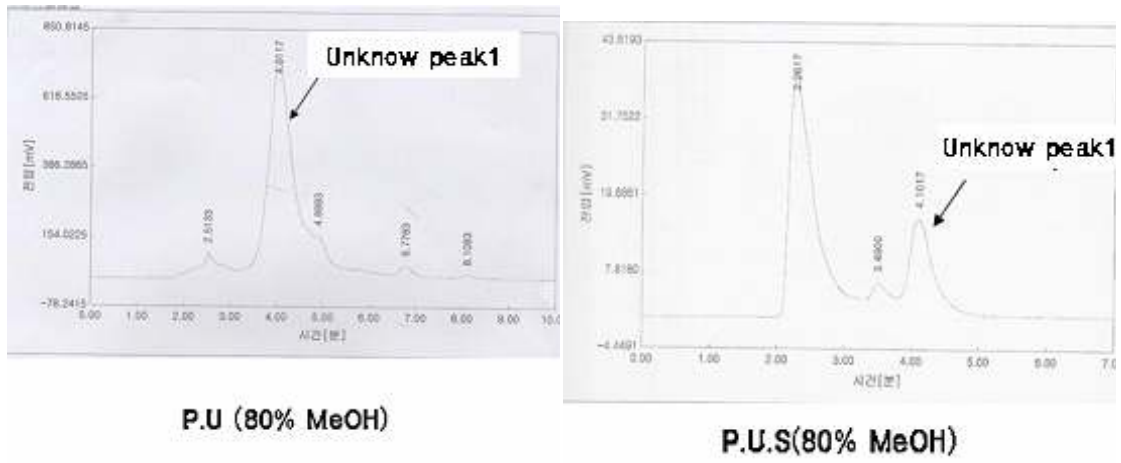


Fig 10. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

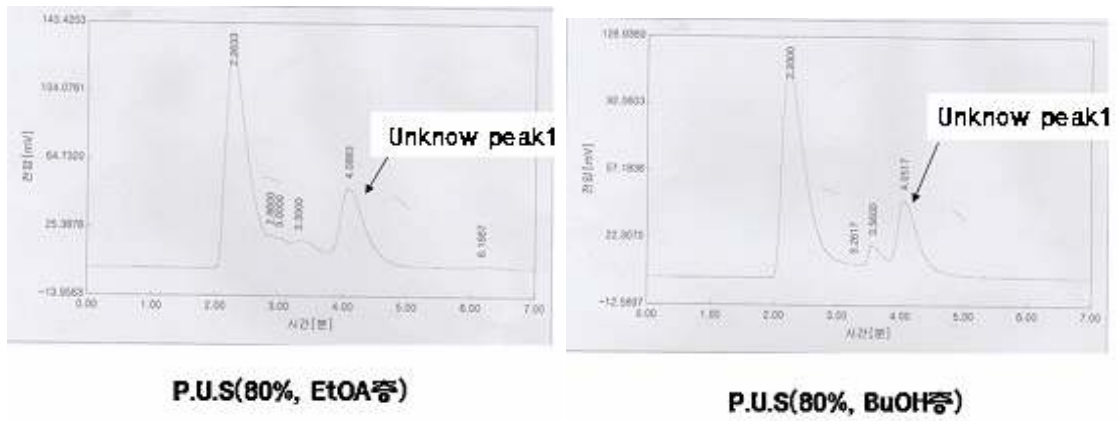
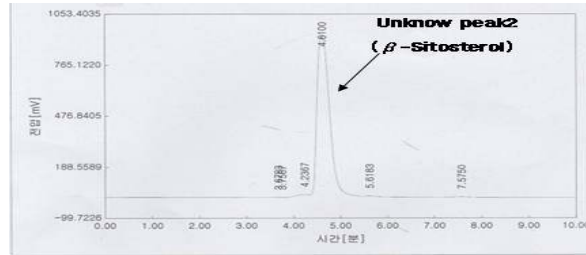


Fig 11. HPLC pattern of *Phyllanthus urinaria*

4. 분리정제 및 구조 동정

가. HPLC를 이용한 피크 분리·정제

여우구슬로부터 최종적으로 지표물질로 알려진 β -Sitosterol 을 분리 정제 하였으며, Pre-HPLC를 이용하여 화합물을 분취하였다.



Fr1. (compound I)

Fig 12. HPLC chromatogram of isolated from Compound I.

나. LC·GC/MS분석

LC·GC/MS로 분자량과 피크의 분리를 확인하기 위해서 전자에 충격을 주어서 fragmentation을 확인한 결과 문헌에 나와 있는 adipate와 91%의 유사성을 가지고 있는 것을 확인 할 수 있었다

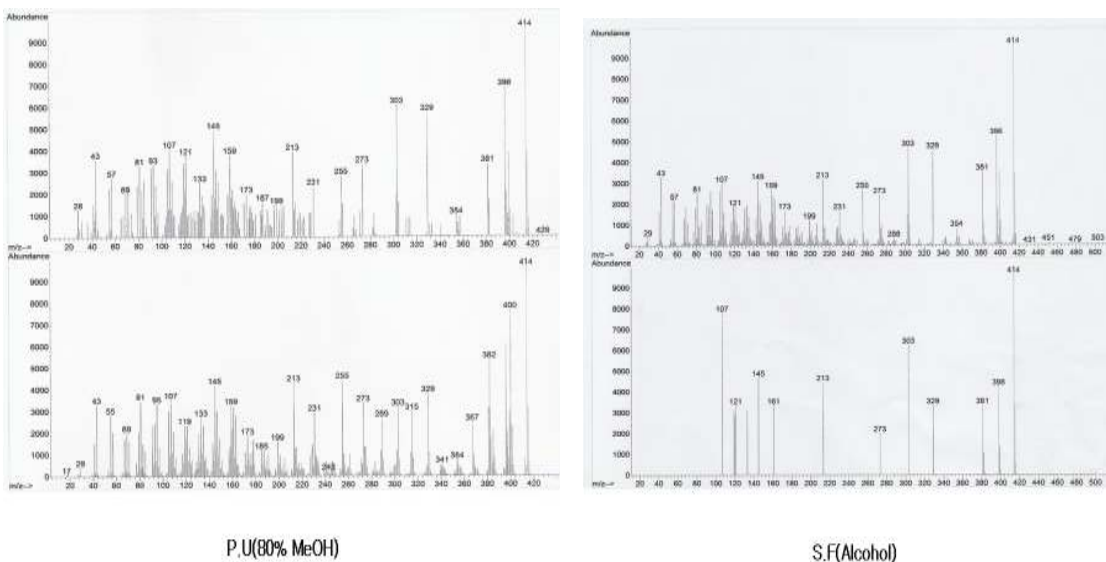
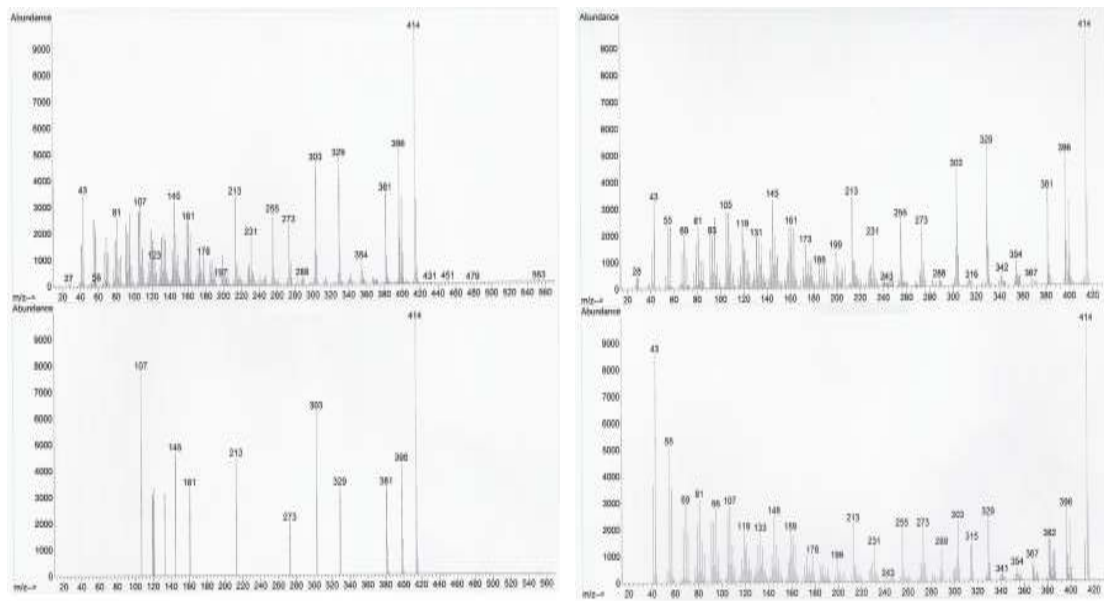


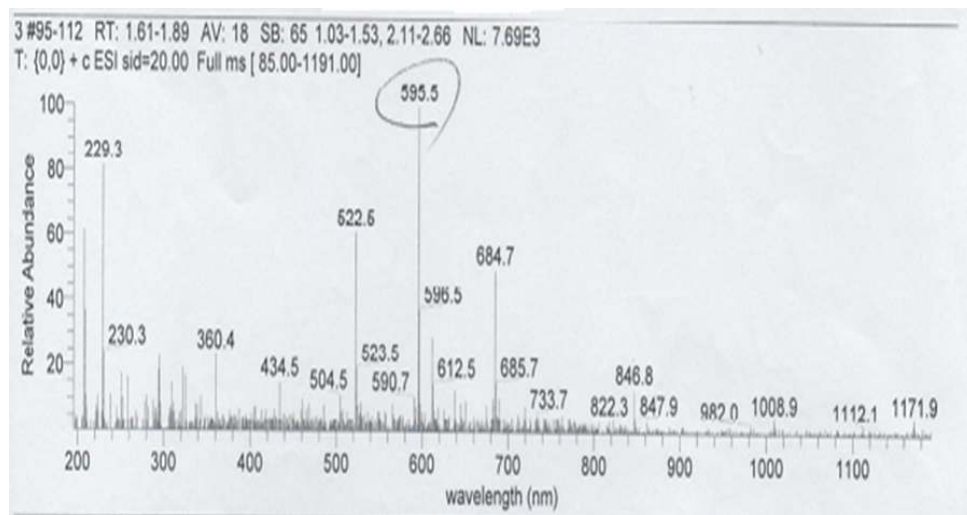
Fig 13. GC/MS chromatogram of *Phyllanthus urinaria*



S.F(CO₂)

NANO-P(MP)

Fig 14. GC/MS chromatogram of *Phyllanthus urinaria*



Phyllanthus urinaria
(플라보노이드 계통의 물질인 Saponarin으로 추정)

Fig 15. LC/MS chromatogram of *Phyllanthus urinaria*
(unknown peak1)

다. NMR 구조분석 및 동정

분자량을 측정한 Compound I 은 분자량이 (414.7)인 지표물질 β -Sitosterol 로 밝혀졌으며, TLC상으로 물질의 패턴을 확인 후, sephadex LH-20 column chromatography를 통해 얻은 Fr.1을 hexane에서 재결정화를 수행하였을 때 무색의 침상정을 얻을 수 있었으며 이를 화합물 I이라 하였다. 이 화합물 I을 MeOH : H₂O = 80 : 20을 이동상으로 μ -Bondapak C₁₈ (3.9×300 mm) Prep-HPLC를 실시하였으며, Compound I을 순수 분리·정제 하였다. Compound I의

$^1\text{H-NMR}$ spectrum은 Varian Unity Inova 300MHz(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정하였으며, $\text{CHCl}_3\text{-d}_6$ 용매를 사용 하였고 ppm 단위로 나타내었다.

(1) 미지물질의 구조 결정(Compound I)

(가) 미지물질(Compound I)의 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 측정결과 δ : 0.68(3H, s, 18-CH₃), 0.81(6H, d, $J=6.9\text{Hz}$, 26-CH₃ and 27-CH₃), 0.84(3H, d, $J=6.3\text{Hz}$, 29-CH₃), 0.92(3H, d, $J=6.6\text{Hz}$ 21-CH₃), 1.01(3H, s, 19-CH₃), 3.52(1H, m, H-3), 5.36(1H, br, s, H-6)을 갖는 것으로 proton이 29개 관찰 되었다.($^1\text{H-NMR}$ 데이터 Proton은 확인이 되었으나, 물질의 양이 충분치 않아 물질을 계속 동정 중이며 물질을 좀 더 정제하고 있음.)

(나) unknow peak1 은(분자량이 595.5 정도) 되는 플라보노이드 계통의 물질 saponarin으로 추정되며, Melting point는 229-231°C의 범위이며, ($[\alpha]_{25\text{D}} -33$ ($c=0.50$, DMSO-d_6)), positive ion에서 LC/MS상 분자량 측정결과 595.5의 분자량을 갖는 것으로 나타났다.

(Saponarin으로 추정되는 un know peak1은 정량은 진행이 되었고, 물질을 동정 중에 있음.)

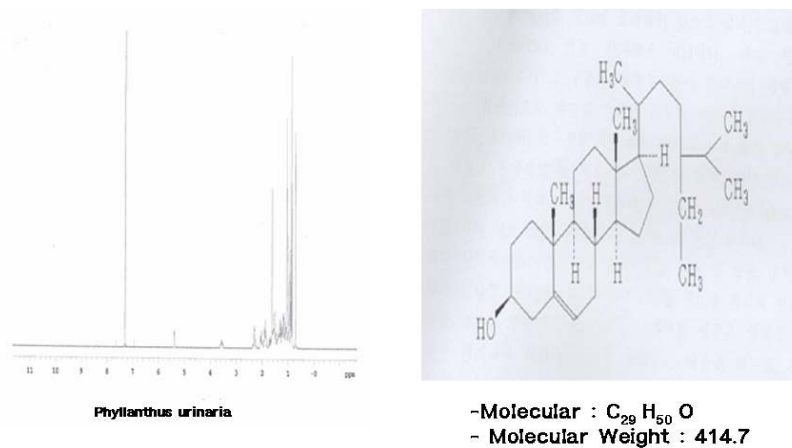


Fig 16. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) spectrum of Compound I / Structure of β -Sitosterol

(unknow peak1 = 플라보노이드계통의 물질인 saporarin으로 추정

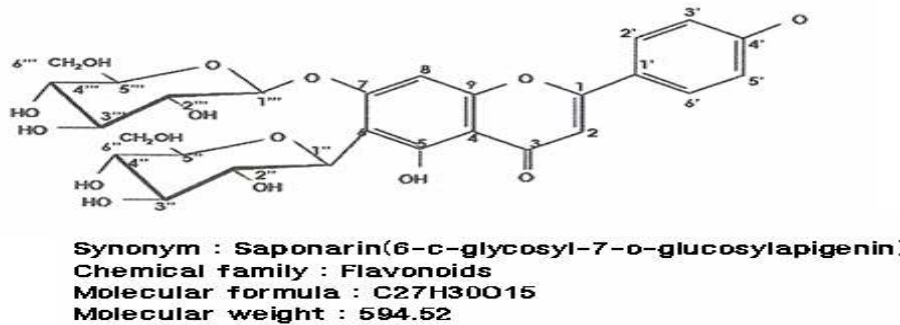


Fig 17. Structure of Saporarin

Table 13. $^1\text{H-NMR}$ chemical shift of the compound-I isolated of chloroform fraction from *Phyllanthus urinaria* L. (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$) - Compound -I

Proton (δ H)
0.68(3H, s)
0.81(6H, d, $J=6.9$)
0.84(3H, d, $J=6.3$)
0.92(3H, d, $J=6.6$)
1.01(3H, s)
3.52(1H, m)
5.36(1H, s)

라. 초임계 추출방법에 따른 여우구슬 추출물의 활성과 유효성분의 활성

(1) Compound-I의 생리활성

초임계 추출방법에 따른 여우구슬 추출물의 활성과 유효성분의 활성을 측정한 실험결과 유효성분인 β -Sitosterol은 대체적으로 높은 활성을 나타내었다.

Table 14. Antioxidant activity of Compound-I

	Total phenolic acid contents (mg/mL)	SOD-liked activity (%)	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging (%)	Lecithin oxidation (%)
S.F(Alcohol)	1.128 \pm 0	91.308 \pm 0.602	4.038	90.270 \pm 0.131	21.727 \pm 1.698
S.F(CO_2)	1.023 \pm 0.002	88.604 \pm 0.680	4.711	90.757 \pm 0.682	70.837 \pm 0.493
Sesamol	5.114 \pm 0.025	61.243 \pm 3.755	87.027	49.020 \pm 3.865	46.453 \pm 0.596
Tocopherol	2.268 \pm 0.018	97.350 \pm 0.130	90.130	83.333 \pm 4.160	42.718 \pm 0.197
BHA	4.237 \pm 0.018	56.328 \pm 5.768	85.599	67.647 \pm 4.159	55.500 \pm 2.166
BHT	4.174 \pm 0.013	97.094 \pm 0.136	90.503	62.745 \pm 2.773	47.436 \pm 0.864
β -Sitosterol(compound I)	1.122 \pm 0.003	90.389 \pm 0.951	8.504	72.549 \pm 2.773	49.070 \pm 1.041

총 페놀성 함량은 천연항산화제인 Sesamol 에서 가장 높게 나타났으며, 유효성분인 β -Sitosterol은 1.122 mg/ml의 함량을 나타내었다. 페놀 화합물은 식물자원에 함유되어 있는 천연물질로써 다양한 구조와 생리활성 기능을 가지고 있다.

페놀화합물의 함량과 항산화 효과와는 밀접한 관계가 있다는 보고와 비교하여 볼때, 총 페놀화합물의 함량이 높은 것이 뛰어난 항산화 효과를 가지고 있을 것으로 예상된다.

SOD 유사활성은 천연항산화제인 Tocopherol 에서 97.350%로 가장 높은 활성을 나타내었고, 합성항산화제인 BHA에서 가장 낮은 활성을 보였으며, 유효성분인 β -Sitosterol(compound I)은 90.389%로 높은 활성을 나타내었다. 따라서, Compound-I은 superoxide anion 제거능이 높은 물질을 함유하고 있음을 예상할 수 있다.

여우구슬의 추출물에 대한 DPPH에 의한 전자공여능을 측정한 결과는 합성항산화제인 BHT에서 90.503%로 가장 높은 전자공여능을 보였으며, S.F(Alcohol) 추출물이 4.038% 로 가장 낮은 활성을 나타내었다. 밤꽃 추출물의 전자공여능을 비교한 결과 17.22% 이었으며, 한국 약용 및 식물자원의 항산화성 식물탐색에 대한 결과에 의하면 포도씨와 음양곽을 제외한 식물 자원이 20%미만의 활성을 보고한 바와 비교하면 다소 낮은 전자공여능을 보여주고 있다.

여우구슬의 추출물에 대한 hydroxyl radical 소거활성은 S.F(CO₂) 추출물에서 90.757%로 가장 높았으며, Sesamol 추출물에서 49.020%로 가장 낮은 결과를 보여 주었고, 유효성분인 β -Sitosterol(compound I)은 72.549%로 높은 활성을 보였다. 한국산 약초 잎에 대한 항산화 효과를 검색한 결과 삼나무, 삼주, 오갈피 잎들은 hydroxy radical 소거능이 90% 이상이었다는 결과와 비교할 때 여우구슬 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 비슷하거나 다소 낮은 결과를 나타내었다.

여우구슬의 hydrogen peroxide 소거활성은 S.F(CO₂)에서 70.837%로 hydrogen peroxide 소거활성이 가장 높게 나타났으며, 천연항산화제인 Tocopherol 에서 42.718%로 가장 낮은 활성을 보였다. 유효성분인 β -Sitosterol(compound I)은 49.070%의 활성을 나타내었다. 여우구슬의 추출물에 대한 hydrogen radical 소거능은 Yoo 등(11)의 포도 과피의 항산화 활성 55.6 - 66.6%와 Kang 등의 활나물 잎 추출물 29.75% 와 비교할 때 비교할 때 높거나 다소 낮은 경향을 나타내었다.

마. HPLC분석기기를 이용한 β -Sitosterol, Saponarin 정량

Table 15. Contents of β -Sitosterol in *Phyllanthus urinaria* extracts prepared from different methods

	(un no peak2) β -Sitosterol(mg%)
P.U.S(CHCl ₃ :MeOH 3:1)	717.91±0.017
S.F(CO ₂)	765.73±0.017
S.F(Alcohol)	1068.0±0.015
NANO-MP(CHCl ₃ : MeOH 3:1)	1127.70±0.015
NANO-UP(CHCl ₃ : MeOH 3:1)	4070.08±0.000
P.U(80% MeOH, Hexane층)	795.09±0.017
P.U(CHCl ₃ : MeOH 3:1, Hexane층)	762.22±0.017

Table 16. Contents of Saponarin in *Phyllanthus urinaria* extracts prepared from different methods

	(un no peak1) Saponarin (mg%)
P.U(80% MeOH)	1.08±0.025
P.U(80% MeOH, EtOA층)	4.85±0.188
P.U(80% MeOH, BuOH층)	1.32±0.070
P.U.S(80% MeOH)	2.08±0.003
P.U.S(80% MeOH, EtOA층)	8.54±0.127
P.U.S(80% MeOH, BuOH층)	2.17±0.013
S.F(CO ₂)	-
S.F(Alcohol)	-
NANO-MP(80% MeOH)	0.99±0.057

[제3세부과제] 여우구슬 추출물의 항 관절염 및 안전성 연구

1. 모세혈관 투과억제도 측정

가. 여우구슬 추출물별 모세혈관 투과도 억제 측정

각각의 여우구슬 추출물들 (① Total Ex. extracted with CHCl_3 :MeOH(3:1); ② Branch Ex. extracted with supercritical fluid; ③ Branch Ex. extracted with CHCl_3 :MeOH(3:1); ④ Seed Ex. extracted with 80% MeOH; ⑤ Total Ex. extracted with 80% MeOH)을 20분 후에 evans blue를 마우스의 꼬리 정맥으로 주입하고 복강내로 유출되는 extravasation을 620 nm 흡광도를 측정한 결과, Total Ex. extracted with CHCl_3 :MeOH(3:1)의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 흡광도가 각각 1.0383 ± 0.0980 , 1.4457 ± 0.1885 와 1.4567 ± 0.2583 으로 대조군(1.3144 ± 0.0980)과 비교해 용량 의존적인 감소를 나타내지 못했다 (Fig. 1). Branch Ex. extracted with supercritical fluid의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 흡광도가 각각 2.1638 ± 0.0521 , 2.0020 ± 0.0973 과 2.0258 ± 0.1822 로 대조군(1.3144 ± 0.0980)과 비교해 용량 의존적인 감소를 나타내지 못했다 (Fig. 2). Branch Ex. extracted with CHCl_3 :MeOH(3:1)의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 흡광도가 각각 2.0099 ± 0.0868 , 1.2275 ± 0.1983 과 0.8628 ± 0.2465 로 대조군(1.3144 ± 0.0980)과 비교해 용량 의존적인 감소를 나타냈으며 200 mg/kg 투여군의 경우 통계학적으로 유의성있는 결과($p < 0.05$)를 보였다 (Fig. 3). Seed Ex. extracted with 80% MeOH의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 흡광도가 각각 1.1741 ± 0.2492 , 0.8859 ± 0.2506 과 0.4883 ± 0.0468 로 대조군(1.3144 ± 0.0980)과 비교해 용량 의존적인 감소를 나타냈으며 200 mg/kg 투여군의 경우 통계학적으로 유의성있는 결과($p < 0.01$)를 보였다 (Fig. 4). Total Ex. extracted with 80% MeOH의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 흡광도가 각각 1.0383 ± 0.0549 , 1.4457 ± 0.18856 과 1.4567 ± 0.2583 으로 대조군(1.3144 ± 0.0980)과 비교해 용량 의존적인 감소를 나타내지 못했다 (Fig. 5). 따라서, 여우구슬 추출물 중 Branch Ex. extracted with CHCl_3 :MeOH(3:1)과 Seed Ex. extracted with 80% MeOH가 200 mg/kg에서 항염효과가 있는 것으로 판단되었다.

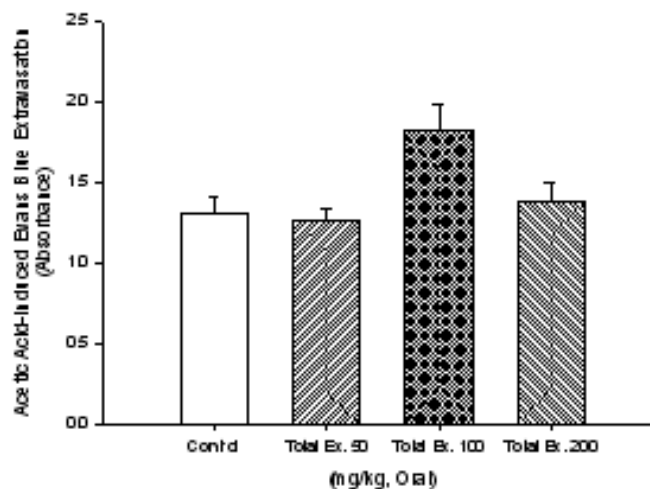


Fig. 1. Extravasation of intravenously given Evans blue toward the peritoneal cavity for Total Ex. extracted with CHCl_3 :MeOH(3:1).

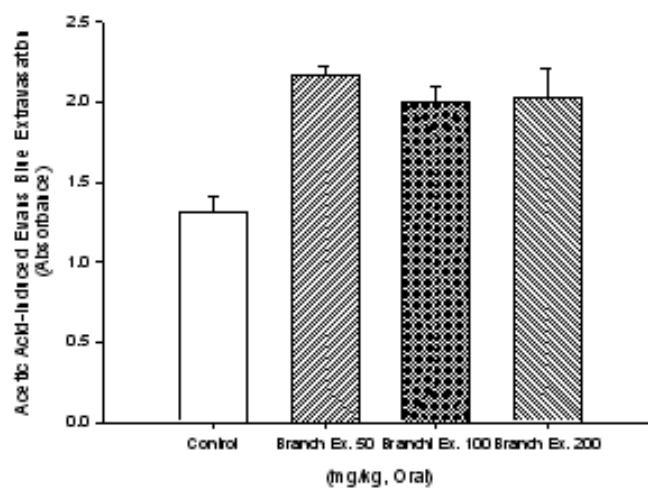


Fig. 2. Extravasation of intravenously given Evans blue toward the peritoneal cavity for Branch Ex. extracted with supercritical fluid.

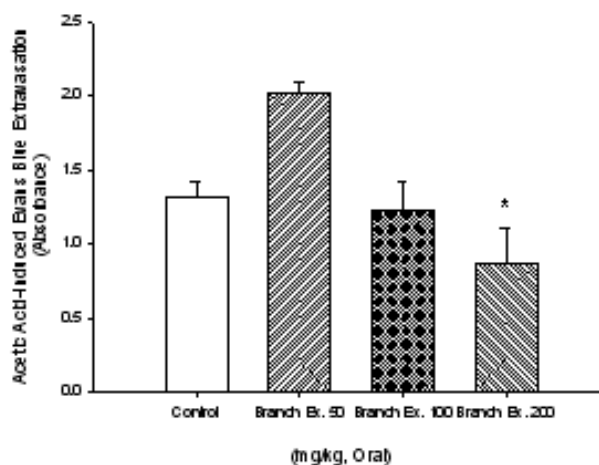


Fig. 3. Extravasation of intravenously given Evans blue toward the peritoneal cavity for Branch Ex. extracted with $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}(3:1)$.

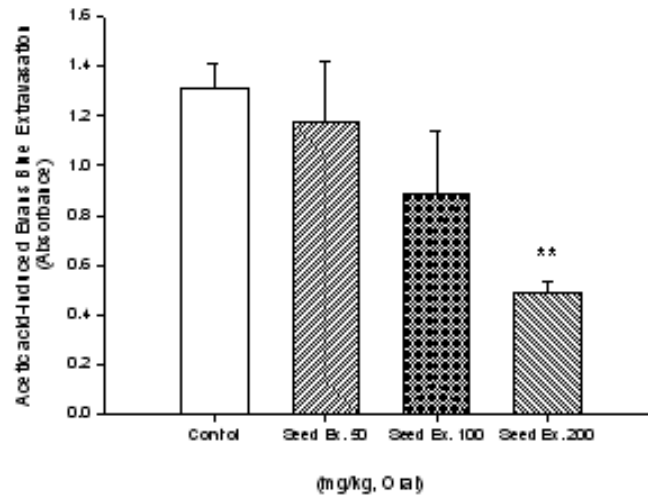


Fig. 4. Extravasation of intravenously given Evans blue toward the peritoneal cavity for Seed Ex. extracted with 80% MeOH.

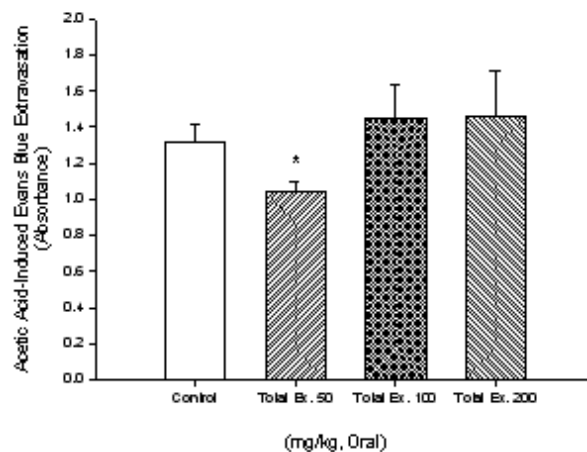


Fig. 5. Extravasation of intravenously given Evans blue toward the peritoneal cavity for Total Ex. extracted with 80% MeOH.

2. 여우구슬 추출물의 in vivo 항류마티스 관절염 효과 구명

만성관절염 중에서 류마티드 관절염은 퇴행성 관절염 다음으로 흔히 볼 수 있는 질환으로 연골과괴, 관절통, 관절 변형, 기능소실 및 발열 등의 관절 증상뿐만 아니라, 피부발진, 체중감소, 폐, 혈관, 심장, 눈의 염증성 변화 등의 장기 조직에 병변을 유발하는 전신성 질환이다.

본 실험에서는 FCA로 유도된 관절염 랫드 모델에서 8주간의 여우구슬 추출물들을 1일 1회 경구투여 후 염증성 즉부종의 억제효과를 검색하였다.

모든 개체에서 FCA와 시험물질 투여에 기인된 특이한 일반증상 및 사망개체는 관찰되지 않았으며, 체중변화에서 대조군 및 투여군 모두 체중의 지속적인 증가를 나타냈으며 관절염 발병에 따른 체중의 저하와 시험물질에 기인한 체중의 감소경향은 관찰되지 않았다. 따라서, 관절

염 발병 및 시험물질 투여의 연관성은 없는 것으로 생각되었다(Table 1, 2).

관절의 외형변화에 있어서 대조군(G1)은 관절부위의 부종이 심해진 것을 확인할 수 있었다. 더불어 발가락 관절이 휘어지는 경우도 있었다. 이러한 부종 및 외형변화는 개체마다 약간의 차이가 있었지만, G2 투여군의 경우 대조군에 비하여 현저한 부종의 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

족부종 측정 결과, 여우구슬의 지표물질인 beta-sitosterol 투여군(G2)은 대조군(G1)의 부종을 현저하게 억제하였으며, 500 mg/kg의 여우구슬1추출물 투여군(G4) 및 250, 500 mg/kg의 여우구슬2추출물 투여군(G5, G6)에서 역시 대조군에 비해 현저한 부종의 감소를 유도하였다(Fig. 7).

AST 수치에서 G2, G3, G4 및 G6 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다. 이는 면역력 저하에 의한 간기능의 저하를 여우구슬추출물이 어느 정도 보호효과를 나타내는 것으로 판단된다. 염증으로 인한 세포 및 근육 손상의 유무를 판별하기 위하여 Lactate dehydrogenase(LDH) 및 creatinine kinase(CK)를 측정한 결과, LDH 수치는 G2, G3, G4, G7 및 G8 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈으며, CK 수치는 G2, G3, G4 및 G6 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다. 따라서, 여우구슬추출물의 투여는 염증으로 인한 세포 및 근육손상을 완화시키는 효과가 있는 것으로 판단된다(Fig. 8 and 9).

백혈구 중에서 neutrophil, lymphocyte 및 monocyte는 lysosome 효소를 방출하여 활액세포의 파괴와 염증반응 및 면역반응과 관련된다. 따라서 염증 억제 정도를 판단하기 위하여 혈중 백혈구 수치를 측정한 결과, monocyte는 G2, G4와 G5 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냈으며, neutrophil은 G4, G5 및 G6 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냈고, lymphocyte는 G4 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냈다. 즉, 여우구슬추출물의 투여는 FCA로 유도된 염증을 완화시키면서 염증세포의 침윤을 억제하는 것으로 판단된다(Fig. 10, 11 and 12).

조직학적 소견에서 대조군(G1)의 경우 과도한 연골세포의 파괴 및 활액낭의 염증세포 침윤으로 인한 공간 축소화가 관찰되었으며 G2 투여군은 이러한 연골세포의 파괴를 억제하였고 미약한 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이와 마찬가지로 G4, G5 및 G6 투여군에서 염증세포 침윤으로 인한 활액낭의 공간 축소화는 대조군(G1)에 비하여 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 G3, G7 및 G8 투여군에서는 대조군(G1)과 비교해 확연한 활액낭의 공간 축소화는 관찰할 수 없었다.

따라서, 류마티드 관절염에 미치는 영향을 관절의 부종 및 외형변화, 체중의 변화, 염증성 과립백혈구의 활성화 및 조직학적 변화 등을 관찰한 결과, 여우구슬2 추출물이 면역세포의 조절과 염증 억제작용에 대한 실험적 유효성을 확인할 수 있었으며 임상적 응용이 가능할 것으로 사료된다.

Table 1. Mortality and clinical signs

Group	Week(s) after treatment									Mortality
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
G1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a
G2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a
G3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a
G4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a
G5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a
G6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a
G7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a
G8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/9 ^a

– : No death

^a : No. of dead animals/No. of total animals

Table 2. Body weight changes

Group	Body weights (g)				
	Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
G1	258.9±2.8	308.7±4.9	350.0±6.4	385.1±7.9	412.9±9.7
G2	258.3±2.9	304.4±5.4	346.8±7.6	384.4±9.3	413.2±11.8
G3	259.0±3.0	309.3±4.5	350.7±4.8	389.5±6.4	416.1±8.0
G4	259.1±2.8	305.4±3.1	339.5±5.4	377.7±5.9	402.0±6.5
G5	258.6±3.0	311.2±7.0	347.2±11.7	391.7±15.2	421.7±16.1
G6	259.2±2.8	306.6±5.8	346.4±8.7	379.1±10.2	406.0±9.8
G7	259.1±2.9	305.8±4.9	343.3±6.4	380.7±7.5	405.5±7.8
G8	260.1±3.1	311.1±4.6	352.3±6.6	390.0±9.0	421.6±10.0

Group	Body weights (g)			
	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
G1	441.1±10.5	458.2±11.1	477.2±11.5	490.7±11.2
G2	443.3±10.9	458.2±12.1	483.3±13.2	495.9±14.4
G3	444.8±8.9	457.9±8.7	480.0±8.9	492.0±9.8
G4	429.4±6.6	445.9±7.2	465.2±7.6	476.7±10.7
G5	452.0±16.2	471.0±16.9	493.0±17.9	509.3±18.2
G6	434.9±9.1	453.4±10.0	478.5±10.6	494.2±11.8
G7	431.4±8.5	441.1±6.9	463.1±9.5	476.7±10.3
G8	448.2±11.1	464.1±12.0	484.3±13.0	495.4±13.4

Values are mean±SEM

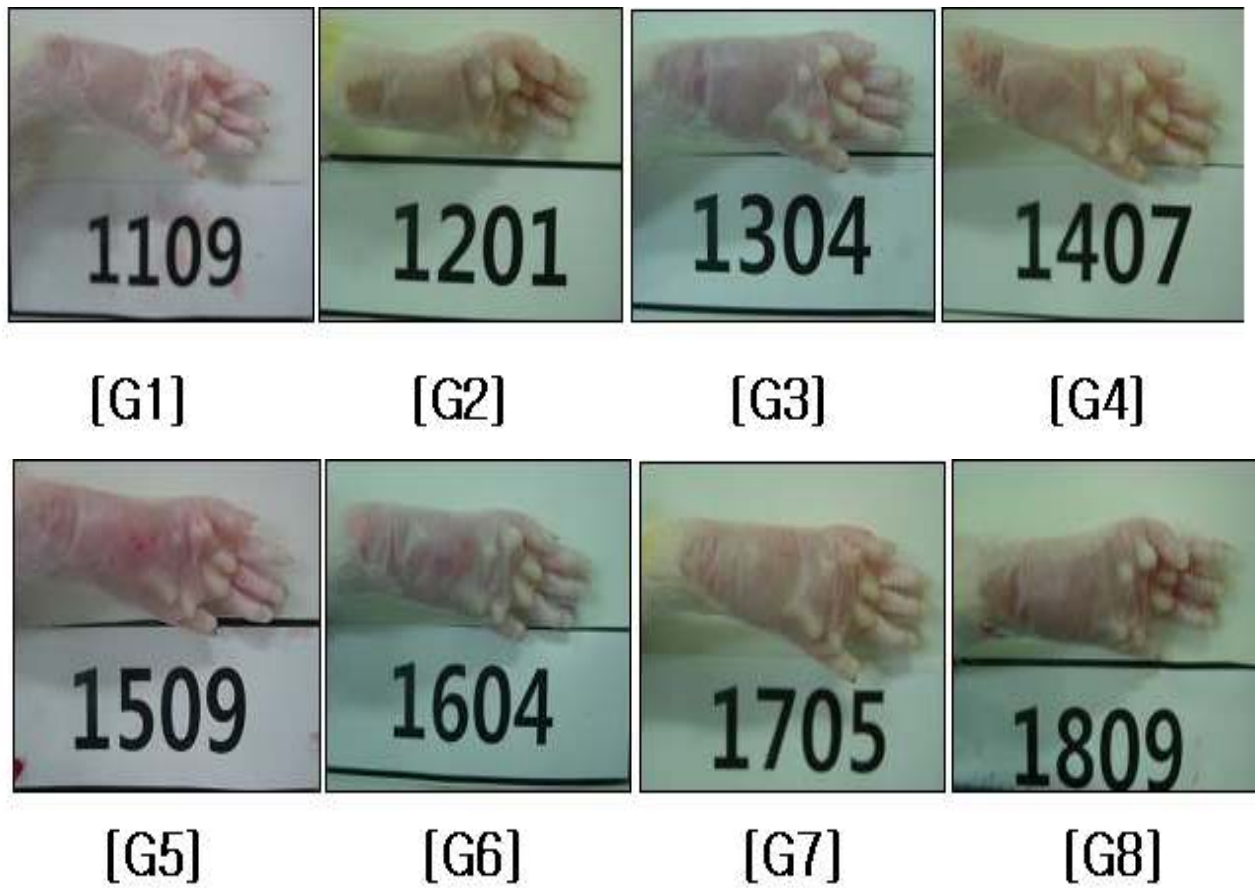


Fig. 6. Photographs of paw joint

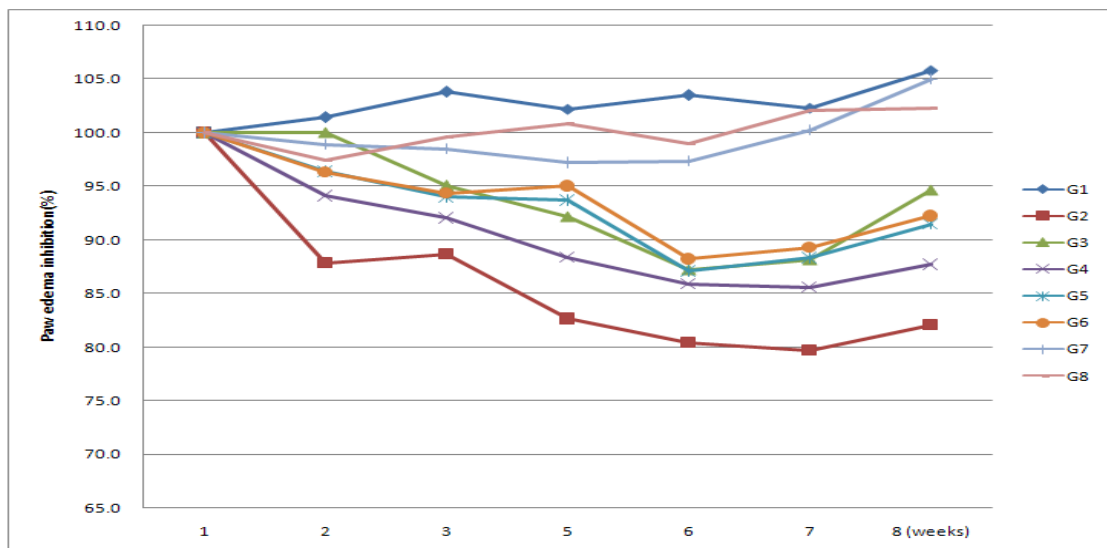


Fig. 7. Paw edema inhibition after test items on FCA-induced rheumatoid arthritis rats for 8 weeks

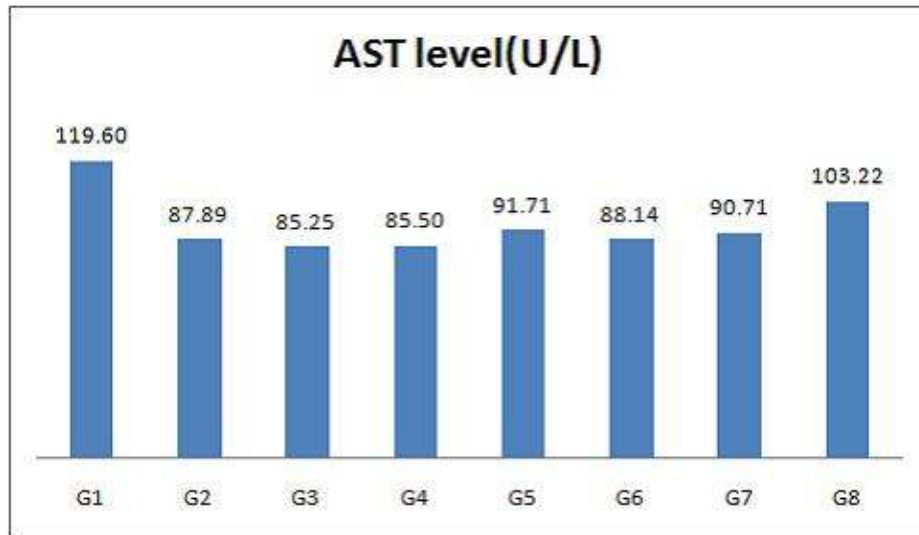


Fig. 8. AST level after test items on FCA-induced rheumatoid arthritis rats for 8 weeks



Fig. 9. LDH level after test items on FCA-induced rheumatoid arthritis rats for 8 weeks

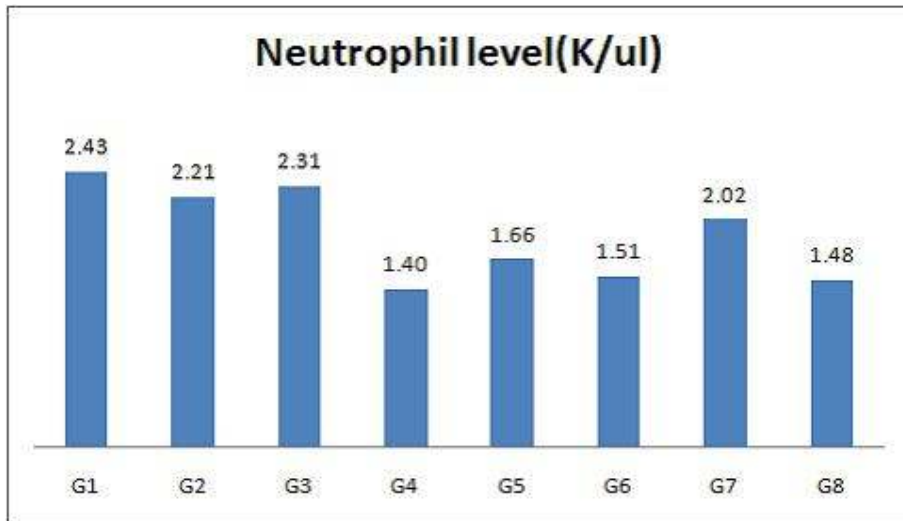


Fig. 10. Neutrophil level after test items on FCA-induced rheumatoid arthritis rats for 8 weeks

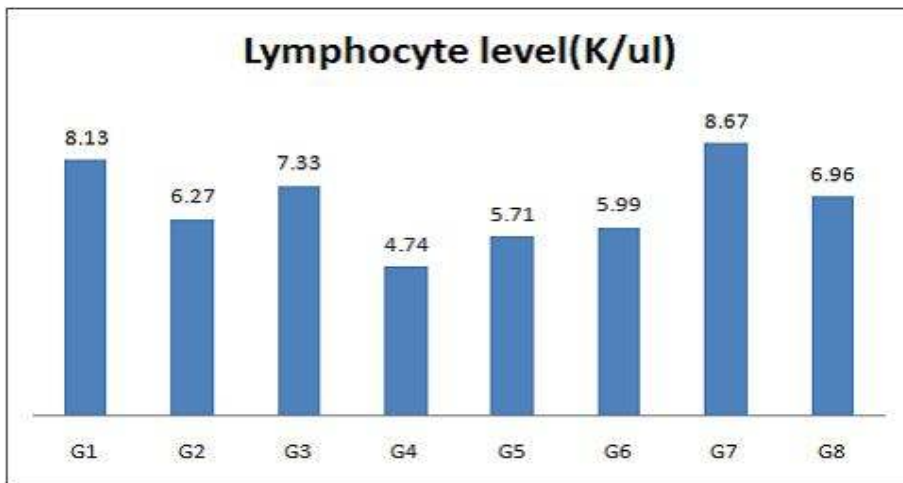


Fig. 11. Lymphocyte level after test items on FCA-induced rheumatoid arthritis rats for 8 weeks

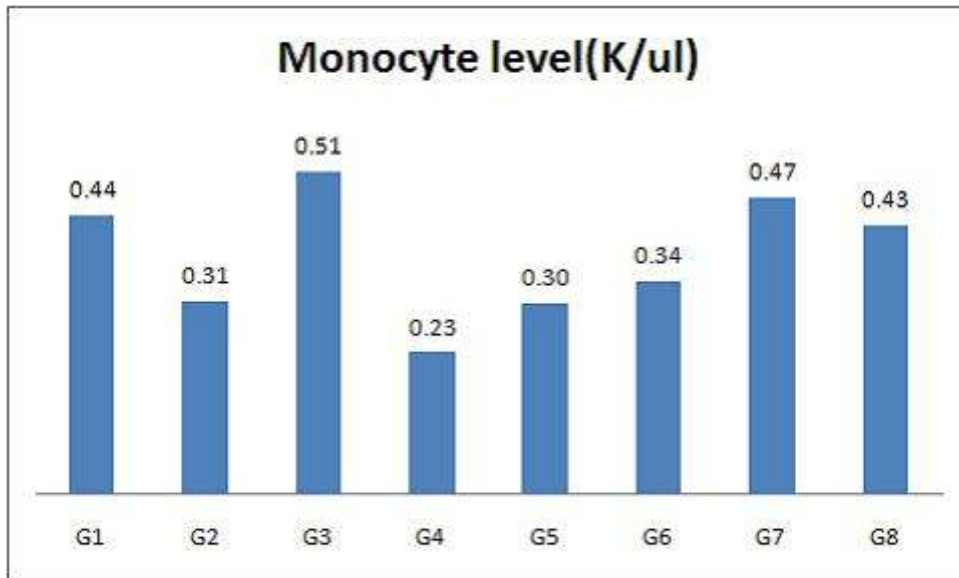


Fig. 12. Monocyte level after test items on FCA-induced rheumatoid arthritis rats for 8 weeks

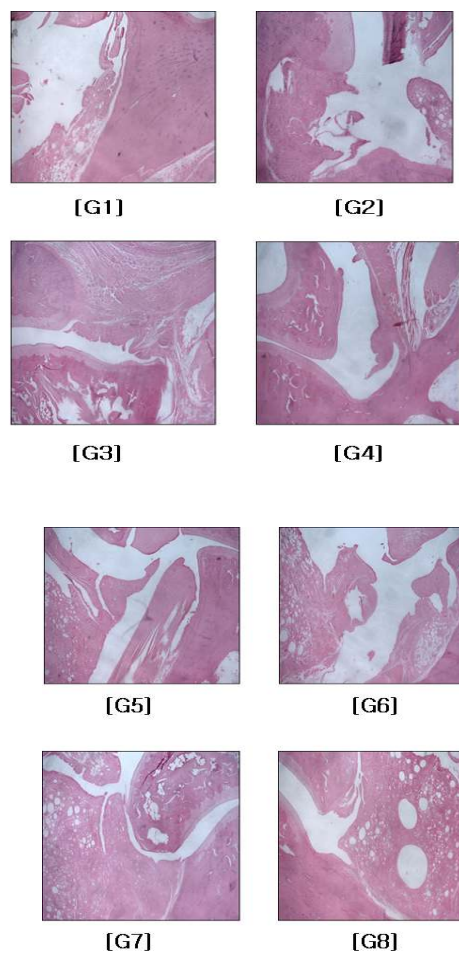


Fig. 13. Histological analysis of paw joint after test items on FCA-induced rheumatoid arthritis rats for 8 weeks

3. 여우구슬 추출물의 안전성 평가 연구

SD 랫드에 대한 여우구슬추출물(PUE)의 4주 반복 경구투여 독성시험을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 농도로 설정하여 주7회 반복 경구 투여 후 나타나는 전신적 독성변화와 무해용량을 파악하기 위하여 실시하였다.

시험기간 동안 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 시험기간 동안 폐사 및 빈사동물은 관찰되지 않았다 (Table 3). 대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 체중의 변화는 관찰할 수 없었다 (Table 4). 암컷 및 수컷의 절대 및 상대장기무게에 있어서 대조군과 비교해 유의성 있는 변화는 나타내지 않았다 (Table 5-8). 수컷 및 암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 유의성 있는 혈액학적 변화는 관찰되지 않았다. (Table 9, 10). 혈액생화학적 측정에서, 수컷 및 암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 유의성 있는 혈액생화학적 변화는 관찰되지 않았다. (Table 11, 12). 조직학적 변화에서, 시험물질투여군과 대조군 사이에 차이를 보이는 표적장기는 관찰되지 않았다. 주요 배경병변으로는 암컷과 수컷 모두 대조군과 투여군에서 간장에서 염증성 세포침윤소, 심근의 염증성 세포침윤소, 신장에서 세뇨관의 국소성 퇴행성, 재생성 변성 및 피질세뇨관 상피의 공포형성이 관찰되었다. 비장의 골수의 조혈 및 혈철소 침착, 부신의 미약한 국소성 피질 공포화, 전립선의 간질성 염증세포 침윤, 췌장의 국소성 염증이 관찰되었다. 또한 일부 개체의 폐에서 기관지주변 림프조직의 증생이 관찰되었다. 이들 배경병변은 대조군과 시험군간 빈도의 유의성 차이가 없으며 장기간 반복투여 독성시험에서 흔히 관찰되는 병변이다 (Table 13).

이상의 결과를 종합해 볼 때, 여우구슬추출물(PUE)을 500, 1,000, 및 2,000 mg/kg/day 용량으로 4주간 경구로 반복 투여하였을 때, 유의할 만한 독성이 유발되지 않았으므로 무해용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)은 2,000 mg/kg/day 이상으로 판단되었다.

Table 3. Mortality and clinical signs in rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day

Drugs	Dose (mg/kg)	No. of animal	Sex	Mortality (%)	Clinical signs
Control	0	10	Male	0% (0/10*)	—
	500	10	Male	0% (0/10)	—
PUE	1,000	10	Male	0% (0/10)	—
	2,000	10	Male	0% (0/10)	—
Control	0	10	Female	0% (0/10)	—
	500	10	Female	0% (0/10)	—
PUE	1,000	10	Female	0% (0/10)	—
	2,000	10	Female	0% (0/10)	—

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

—, No abnormality detected.

Table 4. Rat body weight during the repeated 28-day toxicity study of *P. urinaria* extract(PUE)

Drugs	Dose (mg/kg)	No. of animal	Sex	Body weight (g)				
				0 week	1 week	2 week	3 week	4 week
Control	0	10	Male	229.2±10.1	283.2±12.2	340.7±22.5	393.9±32.9	420.1±40.8
	500	10	Male	228.9±10.0	281.1±14.3	337.0±16.1	383.8±20.0	409.3±24.0
PUE	1,000	10	Male	227.6±9.8	276.6±15.2	329.1±28.8	379.1±39.9	404.5±43.5
	2,000	10	Male	228.0±9.5	277.6±12.7	334.8±22.4	387.8±30.0	415.2±34.1
Control	0	10	Female	183.6±5.8	193.0±8.6	207.3±10.5	221.8±14.2	234.3±12.1
	500	10	Female	183.5±5.4	181.9±57.6	217.2±9.9	236.6±13.0	249.9±15.5
PUE	1,000	10	Female	183.8±5.4	200.4±6.5	216.1±9.6	233.0±14.3	243.3±14.8
	2,000	10	Female	183.7±6.0	199.9±8.1	220.7±12.8	239.1±16.6	250.0±17.3

Values represent mean±S.D.

Table 5. Absolute organ weights in male rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day (Unit; g)

Organs	Dose (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	
Liver	11.80±1.86	11.39±1.17	10.98±1.57	11.43±1.43	
Kidney	(left)	1.53±0.16	1.43±0.18	1.40±0.15	1.45±0.12
	(right)	1.52±0.16	1.44±0.15	1.41±0.13	1.48±0.12
Spleen	0.68±0.13	0.74±0.15	0.64±0.09	0.76±0.12	
A d r e n a l gland	(left)	0.04±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01
	(right)	0.03±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00	0.03±0.01
Testis	(left)	1.63±0.13	1.67±0.14	1.58±0.09	1.59±0.15
	(right)	1.65±0.12	1.51±0.34	1.59±0.09	1.59±0.13
Lung	1.52±0.16	1.50±0.14	1.48±0.18	1.59±0.10	
Heart	1.33±0.20	1.31±0.13	1.25±0.12	1.32±0.12	
Thymus	1.00±0.12	0.97±0.17	0.97±0.20	1.01±0.17	
Prostate	0.43±0.09	0.44±0.06	0.44±0.08	0.42±0.12	

Values represent mean±S.D.

Table 6. Absolute organ weights in female rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day (Unit; g)

Organs	Dose (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	
Liver	6.33±0.67	6.44±0.65	6.31±0.77	6.37±0.51	
Kidney	(left)	0.84±0.11	0.85±0.08	0.82±0.05	0.86±0.06
	(right)	0.86±0.04	0.86±0.08	0.84±0.06	0.88±0.07
Spleen	0.47±0.09	0.47±0.09	0.46±0.06	0.42±0.14	
A d r e n a l gland	(left)	0.04±0.01	0.03±0.00	0.04±0.01	0.04±0.01
	(right)	0.04±0.01	0.03±0.00	0.03±0.01	0.04±0.01
Ovary	(left)	0.075±0.016	0.072±0.021	0.071±0.010	0.067±0.019
	(right)	0.069±0.013	0.072±0.012	0.066±0.015	0.060±0.009
Lung	1.16±0.13	1.15±0.11	1.14±0.08	1.20±0.19	
Heart	0.87±0.07	0.87±0.37	0.88±0.12	0.89±0.10	
Thymus	0.36±0.08	0.37±0.07	0.36±0.06	0.37±0.14	
Uterus	0.50±0.07	0.52±0.18	0.52±0.08	0.56±0.17	

Values represent mean±S.D.

Table 7. Relative organ weights in male rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day (Unit; %)

Organs	Dose (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	
Liver	2.85±0.20	2.83±0.17	2.77±0.17	2.82±0.18	
Kidney	(left)	0.37±0.03	0.36±0.03	0.36±0.03	0.36±0.02
	(right)	0.37±0.03	0.36±0.02	0.36±0.03	0.37±0.02
Spleen	0.16±0.02	0.18±0.03	0.16±0.02	0.19±0.03	
A d r e n a l gland	(left)	0.009±0.002	0.008±0.002	0.008±0.002	0.009±0.002
	(right)	0.008±0.001	0.008±0.002	0.009±0.001	0.009±0.002
Testis	(left)	0.40±0.03	0.41±0.03	0.40±0.03	0.39±0.04
	(right)	0.40±0.04	0.38±0.08	0.40±0.03	0.40±0.04
Lung	0.37±0.02	0.37±0.03	0.38±0.03	0.40±0.02	
Heart	0.32±0.04	0.33±0.02	0.30±0.03	0.33±0.02	
Thymus	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.01	0.10±0.03	
Prostate	0.24±0.04	0.24±0.04	0.25±0.06	0.25±0.05	

Values represent mean±S.D.

Table 8. Relative organ weights in female rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day (Unit; %)

Organs	Dose (mg/kg)				
	0	500	1,000	2,000	
Liver	2.78±0.34	2.70±0.17	2.71±0.20	2.64±0.10	
Kidney	(left)	0.37±0.05	0.36±0.02	0.35±0.03	0.36±0.02
	(right)	0.38±0.04	0.36±0.02	0.36±0.03	0.37±0.03
Spleen	0.20±0.03	0.20±0.04	0.20±0.03	0.18±0.06	
A d r e n a l gland	(left)	0.027±0.037	0.014±0.001	0.016±0.003	0.015±0.002
	(right)	0.017±0.003	0.014±0.001	0.015±0.004	0.015±0.003
Ovary	(left)	0.033±0.007	0.030±0.008	0.031±0.005	0.045±0.050
	(right)	0.030±0.005	0.030±0.005	0.028±0.007	0.025±0.005
Lung	0.51±0.05	0.48±0.04	0.49±0.04	0.50±0.08	
Heart	0.38±0.03	0.37±0.03	0.38±0.06	0.37±0.03	
Thymus	0.16±0.04	0.16±0.03	0.16±0.02	0.15±0.05	
Uterus	0.22±0.03	0.22±0.08	0.22±0.03	0.23±0.06	

Values represent mean±S.D.

Table 9. Hematological findings in male rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
WBC	K/ μ l	6.88 \pm 1.61	7.13 \pm 2.42	7.16 \pm 2.36	7.54 \pm 1.61
Neutrophil	K/ μ l	1.23 \pm 0.45	1.23 \pm 0.53	1.13 \pm 0.56	1.18 \pm 0.32
Lymphocyte	K/ μ l	5.35 \pm 1.15	5.58 \pm 2.22	5.71 \pm 2.11	5.99 \pm 1.51
Monocyte	K/ μ l	0.17 \pm 0.07	0.18 \pm 0.06	0.19 \pm 0.08	0.21 \pm 0.06
Eosinophil	K/ μ l	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.04	0.06 \pm 0.03	0.08 \pm 0.04
Basophil	K/ μ l	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
RBC	M/ μ l	7.53 \pm 0.28	7.52 \pm 0.28	7.69 \pm 0.28	7.61 \pm 0.35
Hemoglobin	g/dl	14.5 \pm 0.6	14.6 \pm 0.5	14.6 \pm 0.6	14.7 \pm 0.6
Hematocrit	%	41.9 \pm 1.6	42.6 \pm 1.2	42.6 \pm 1.6	42.7 \pm 1.6
MCV	fL	55.7 \pm 1.7	56.7 \pm 1.6	55.3 \pm 2.1	56.2 \pm 1.5
MCH	pg	19.2 \pm 0.7	19.5 \pm 0.7	19.0 \pm 0.8	19.3 \pm 0.4
MCHC	g/dl	34.4 \pm 0.5	34.4 \pm 0.9	34.4 \pm 0.4	34.4 \pm 0.3
Platelet	K/ μ l	1139 \pm 85	1213 \pm 89	1168 \pm 101	1186 \pm 120
MPV	fL	8.5 \pm 1.5	8.3 \pm 1.2	8.2 \pm 1.2	8.3 \pm 1.1
Prothrombin time	sec	17.2 \pm 0.4	17.1 \pm 0.6	16.8 \pm 0.4	16.9 \pm 0.6
APTT	sec	20.6 \pm 0.9	21.0 \pm 2.4	18.3 \pm 5.5	19.7 \pm 1.9

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

Table 10. Hematological findings in female rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
WBC	K/ μ l	6.19 \pm 2.36	5.41 \pm 1.50	5.65 \pm 2.38	5.88 \pm 2.03
Neutrophil	K/ μ l	0.70 \pm 0.25	0.62 \pm 0.40	0.79 \pm 0.37	0.76 \pm 0.30
Lymphocyte	K/ μ l	5.19 \pm 2.39	4.57 \pm 1.40	4.60 \pm 2.01	4.89 \pm 1.80
Monocyte	K/ μ l	0.14 \pm 0.07	0.12 \pm 0.04	0.12 \pm 0.06	0.11 \pm 0.04
Eosinophil	K/ μ l	0.09 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02	0.08 \pm 0.05	0.07 \pm 0.02
Basophil	K/ μ l	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
RBC	M/ μ l	7.81 \pm 0.34	7.69 \pm 0.30	7.51 \pm 0.44	7.52 \pm 0.32
Hemoglobin	g/dl	14.9 \pm 0.6	14.7 \pm 0.8	14.6 \pm 0.7	14.6 \pm 0.5
Hematocrit	%	42.8 \pm 1.5	42.3 \pm 2.5	42.0 \pm 2.4	41.9 \pm 2.0
MCV	fL	54.7 \pm 1.1	55.1 \pm 2.4	55.9 \pm 1.2	55.7 \pm 2.3
MCH	pg	19.0 \pm 0.5	19.2 \pm 0.7	19.4 \pm 0.3	19.5 \pm 0.6
MCHC	g/dl	34.8 \pm 0.4	34.8 \pm 0.6	34.8 \pm 0.8	35.0 \pm 0.7
Platelet	K/ μ l	1175 \pm 169	1288 \pm 145	1257 \pm 205	1300 \pm 140
MPV	fL	9.3 \pm 1.0	9.2 \pm 1.1	9.2 \pm 1.3	9.5 \pm 1.1
Prothrombin time	sec	16.5 \pm 1.4	16.8 \pm 0.4	16.8 \pm 0.5	16.9 \pm 0.4
APTT	sec	18.1 \pm 1.0	18.9 \pm 0.7	18.9 \pm 1.6	18.1 \pm 1.0

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

Table 11. Blood biochemical findings in male rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
ALT	U/L	26.5±4.1	27.0±6.0	28.4±4.6	29.5±5.1
AST	U/L	88.2±12.3	100.2±23.6	108.7±27.7	105.9±22.1
ALP	U/L	459.4±55.9	446.4±89.7	523.6±86.1	491.5±66.0
Total bilirubin	mg/dl	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
Glucose	mg/dl	160.8±24.3	149.6±15.0	153.8±18.9	152.1±19.2
Total protein	g/dl	5.6±0.3	5.6±0.1	5.6±0.2	5.6±0.2
Albumin	g/dl	2.4±0.1	2.4±0.1	2.5±0.1	2.4±0.1
Albumin/Globulin	g/dl	0.7±0.0	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1
Total Cholesterol	mg/dl	54.2±7.2	60.2±4.7	64.5±8.0	62.3±4.6
Triglyceride	mg/dl	51.7±31.8	58.3±31.9	61.0±38.1	55.5±38.5
Creatinine	mg/dl	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0
BUN	mg/dl	10.1±1.1	10.2±1.4	10.7±1.4	10.4±1.2
Calcium	mg/dl	9.9±0.3	9.9±0.2	9.9±0.2	10.0±0.2
Sodium	mM	142.2±1.4	141.8±1.3	141.6±1.2	142.1±0.9
Potassium	mM	4.3±0.2	4.3±0.3	4.3±0.2	4.3±0.4
Chloride	mM	107.1±1.8	107.1±1.7	106.6±1.6	106.8±1.0

Values represent mean±S.D. ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen.

Table 12. Blood biochemical findings in female rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day

Parameters	Unit	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
ALT	U/L	21.4±4.8	18.4±2.6	21.0±8.5	21.2±3.3
AST	U/L	101.0±19.7	106.0±20.4	92.6±26.5	104.9±32.2
ALP	U/L	328.9±67.8	242.0±111.3	272.4±62.0	287.3±52.5
Total bilirubin	mg/dl	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
Glucose	mg/dl	134.0±25.3	131.4±13.1	139.2±20.7	138.3±11.6
Total protein	g/dl	6.4±0.2	6.2±0.3	6.4±0.3	6.3±0.3
Albumin	g/dl	2.9±0.2	2.9±0.1	3.0±0.2	2.9±0.2
Albumin/Globulin	g/dl	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.0	0.9±0.1
Total Cholesterol	mg/dl	70.4±14.8	68.5±13.4	75.8±11.5	68.7±11.5
Triglyceride	mg/dl	41.6±60.8	11.7±3.8	14.7±7.8	12.9±8.6
Creatinine	mg/dl	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1
BUN	mg/dl	12.3±1.5	13.4±2.0	12.0±2.2	14.0±2.4
Calcium	mg/dl	10.3±0.3	10.1±0.3	10.3±0.3	10.3±0.3
Sodium	mM	140.1±1.4	141.0±1.3	140.4±1.0	140.6±1.0
Potassium	mM	4.2±0.3	4.4±0.4	4.3±0.4	4.3±0.4
Chloride	mM	105.8±2.4	105.5±2.1	106.4±2.4	106.7±1.9

Values represent mean±S.D. ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen.

Table 13. Histopathological findings in rats administered orally with *P. urinaria* extract(PUE) for 28-day

Organs	Signs	Dose (mg/kg)			
		0 (n=10)	500 (n=10)	1,000 (n=10)	2,000 (n=10)
Male/Female	perivascular / inflammatory cells, Liver Fatty change, Peribile ductular inflammatory cells	+	+	+	+
	Heart Myocardial inflammatory cells	+	+	+	+
	Kidney Cortical vacuolation, Cortical tubular basophilica, Inflammatory cells	+	+	+	+
	Spleen Extra medullary hematopoiesis, Hemosiderosis	+	+	+	+
	Adrenal gland Cortical vacuolation	+	+	+	+
	Prostate gland Interstitial inflammatory cells	+	+	+	+
	Pacreas Inflammatory cells in acinar	+	+	+	+
	Lung Peribronchiolar BALT	+	+	+	+

제 3 절 고찰 및 결론

본 연구에서 국내 자생식물 여우구슬의 작물화를 위한 유전자원 수집 및 재배기술 개발 결과를 요약하면 아래와 같다. 여우구슬은 우리나라 35개 지역에 분포 하였으며, 여우구슬 종자 발적온은 25℃ 처리가 우수하였다. 여우구슬 작물화를 위한 표준재배기술은 피복재료는 흑색비닐, 파종기는 5월 10일, 재식밀도는 20×10cm, 질소시비량은 6kg/10a에서 생육이 우수하였다.

여우구슬의 전초와 종자의 일반성분 분석결과는 다음과 같다. 수분함량은 전초 7.3%, 종자 6.3%로 부위별에 따른 수분의 함량에 차이가 있음을 알 수 있었다. 조회분 함량은 전초 9.17%, 종자 8.12%, 조지방 함량은 전초 12.27%, 종자 21.37%, 조단백질 함량은 전초 5.25%, 종자 3.89%로 나타났다. 지방산 조성의 분석 결과는 초임계 추출의 경우 여우구슬 종자를 초임계 450/65의 조건에서 추출하여 원심분리 하여 수분 층을 제외하고 실험에 사용 하였다. 일반 시험 항목(산가, 비중, 굴절율, 요오드가, 수분, 조지방) 및 기기분석 항목은 식품공전에 있는 방법에 따라 시행하였다. 여우구슬 종자의 경우 특별한 기준 규격이 없어 참기름의 기준을 비교 결과에 첨부하였다. 여우구슬 종자의 경우 참기름과 비교시 요오드 값과 linolenic acid 함량이 높았으며, 불포화 지방산 함량이 매우 높게 나타났다. 초임계와 hexane 추출결과 비교시 hexane 추출물의 경우 산가가 높았으며, 비중, 굴절율, 요오드가, 지방산의 경우는 비슷한 수치를 나타내었으나 스테롤의 경우 그 함량이 절반 가까이 낮아지는 것을 확인 하였다. 따라서 식물성 스테롤의 함량이 높은 초임계 추출 방법이 더 좋은 추출방법으로 평가 된다.

여우구슬 유효성분의 추출·분리는 전초, 종자 추출물을 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol로 분획 후 활성이 좋았던 ethyl acetate 층을 이용하여 unknow peak1으로 추정되는 플라보노이드 계통의 물질인 saponarin을 분리·정제 중에 있으며, 염증 및 항 관절염에 효과가 있는 것으로 알려진 β -Sitosterol의 성질을 이용하여 chloroform 분획 물로부터 성분을 분리하기 위하여 Silica gel column chromatography 에 sephadex LH-20을 4 x 50 cm까지 충진 시키고, chloroform 분획물중 2 g을 loading하였으며, 전개용매는 chloroform : methanol (100 : 10)을 사용하여 전개하였다. 컬럼으로부터 용리하면서 60ml씩 분획을 수집하고 이들을 TLC((Toluene : Ethy acetate : Formic acid (4: 5 : 1)) 전개 후 UV 254 nm, 334 nm에서 확인 후 A-E 까지 분리 하였으며, 95%-H₂SO₄로 발색시킨 후 유사분획끼리 통합하여 4개의 소분획 (Fr.1-Fr.4)으로 나누었다. 즉, Fr.1은 1-20 분획물을 농축한 것이며 같은 방법으로 Fr.2는 21번부터-23번의 것, Fr.3는 24-27번의 것, 그리고 Fr.4는 20번-30번까지의 것을 각각 농축하였다. 이중 Fr.1을 hexane에서 재결정화를 수행하였을 때 무색의 침상정을 얻을 수 있었으며 이를 화합물 I이라 하였고, 254 nm, 334 nm 파장에서 확인 할 수 있었던 F(Rf=0.65)를 HPLC(μ -Bondapak C₁₈ 3.9x300 mm ; flow rate 0.8 ml/min ; inject vol., 20 μ l ; detector, 280 nm)를 통해 Compound I을 분리·정제 하였다. compound I의 ¹H-NMR spectrum은 Varian Unity Inova 300MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, CHCl₃-d₆용매를 사용 하였고 ppm 단위로 나타내었다. ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) 측정결과 δ : 0.68(3H, s,

18-CH₃), 0.81(6H, d, $J=6.9\text{Hz}$, 26-CH₃ and 27-CH₃), 0.84(3H, d, $J=6.3\text{Hz}$, 29-CH₃), 0.92(3H, d, $J=6.6\text{ Hz}$ 21-CH₃), 1.01(3H, s, 19-CH), 3.52(1H, m, H-3), 5.36(1H, br, s, H-6)을 갖는 것으로 proton 이 29개 관찰 되어, 지표물질인 β -Sitosterol 로 확인 되었다. 정량분석 결과 초임계 추출물에서 β -Sitosterol 의 함량이 높게 나타났다. 이외에 Saponarin으로 추정되는 unknow peak1의 물질은 전초와 씨 분획물 중 ethyl acetate 층에서 가장 높은 함량을 보였으며, 식물성 스테롤의 추출에 유용했던 초임계 추출방법에서는 unknow peak1은 검출 되지 않았다. 현재 이 물질을 구조·동정 중에 있다. 이 물질이 구조·동정 된다면 β -Sitosterol 과 saponarin의 상관관계를 구명 할 예정이며, 이 식물에서는 처음으로 saponarin을 구조·동정 하는 것이다. 따라서 여우구슬의 지속적인 연구가 수행된다면 새로운 천연항산화제는 물론 항 관절염의 예방 및 치료를 위한 우수한 소재로서의 이용가능성을 확인 할 수 있었다.

여우구슬추출물의 항염효과 평가를 위하여 20분 후에 evans blue를 마우스의 꼬리 정맥으로 주입하고 복강내로 유출되는 extravasation을 620 nm 흡광도를 측정하였다. Branch Ex. extracted with CHCl₃:MeOH(3:1)의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비해 용량 의존적인 감소를 나타냈으며, 200 mg/kg 투여군의 경우 통계학적으로 유의성있는 결과($p<0.05$)를 보였다. Seed Ex. extracted with 80% MeOH의 50, 100, 200 mg/kg 투여군은 대조군과 비교해 용량 의존적인 감소를 나타냈으며, 200 mg/kg 투여군의 경우 통계학적으로 유의성있는 결과($p<0.01$)를 보였다. 따라서, 여우구슬 추출물 중 Branch Ex. extracted with CHCl₃:MeOH(3:1)과 Seed Ex. extracted with 80% MeOH가 200 mg/kg에서 항염효과가 있는 것으로 판단되었다.

여우구슬추출물의 항관절염 효과 평가를 FCA로 유도된 관절염 랫드 모델에서 8주간의 여우구슬 추출물들을 1일 1회 경구투여 후 염증성 족부종의 억제효과를 검색하였다. 여우구슬의 지표물질인 beta-sitosterol 투여군(G2)은 대조군(G1)의 부종을 현저하게 억제하였으며, 500 mg/kg의 여우구슬1추출물 투여군(G4) 및 250, 500 mg/kg의 여우구슬2추출물 투여군(G5, G6)에서 역시 대조군에 비해 현저한 부종의 감소를 유도하였다. AST 수치에서 G2, G3, G4 및 G6 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다. 염증으로 인한 세포 및 근육 손상의 유무를 판별하기 위하여 Lactate dehydrogenase(LDH) 및 creatinine kinase(CK)를 측정 한 결과, LDH 수치는 G2, G3, G4, G7 및 G8 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈으며, CK 수치는 G2, G3, G4 및 G6 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다. 따라서, 여우구슬2 추출물이 면역세포의 조절과 염증 억제작용에 대한 실험적 유효성을 확인할 수 있었으며 임상적 응용이 가능할 것으로 사료된다.

SD 랫드에 대한 여우구슬추출물(PUE)의 4주 반복 경구투여 독성시험을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 농도로 설정하여 주7회 반복 경구 투여 후 나타나는 전신적 독성변화와 무해용량을 파악하기 위하여 실시하였다.

시험기간 동안 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 시험기간 동안 폐사 및 빈사동물은 관찰되지 않았다. 대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 체중의 변화는 관찰할 수 없었다. 암컷 및 수컷의 절대 및 상대장기무게에 있어서 대조군과 비교해 유의성 있는 변화는 나타내지 않았다. 수컷 및 암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 유의성 있는 혈액학적 변화는 관찰되지 않았다. 혈액생화학적 측정에서, 수컷 및 암컷의 대조군 및 모든 투여군에서 유의성 있는 혈액생화학적 변화는 관찰되지 않았다. 조직학적 변화에서, 시험물질투여군과 대조군 사이에 차이를 보이는 표적장기는 관찰되지 않았다. 이상의 결

과를 종합해 볼 때, 여우구슬추출물(PUE)을 500, 1,000, 및 2,000 mg/kg/day 용량으로 4주간 경구로 반복 투여하였을 때, 유의할 만한 독성이 유발되지 않았으므로 무해용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)은 2,000 mg/kg/day 이상으로 판단되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2006)	○ 여우구슬 자원수집 및 농업적 특성조사	30
	○ 여우구슬 추출물의 최적 추출방법 확립	30
	○ 여우구슬 모세혈관 투과억제도 효과 구명	40
2차년도 (2007)	○ 여우구슬 안전다수확 재배기술 개발	30
	○ 미지물질 동정 및 기능성 물질 활용방안 탐색	30
	○ 여우구슬 추출물의 in vivo 항류마티스 관절염 효과 구명	40
3차년도 (2008)	○ 고품질 여우구슬 생산기술 개발	30
	○ 분리체계 확립 및 기능성 소재 개발	40
	○ 여우구슬 추출물의 독성유무 구명	30
최종평가	○ 고품질 여우구슬 개발	30
	○ 효능의 과학적 입증	40
	○ 항 관절염기능성 소재로 발굴	30

제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

1. 신작물의 식품소재원료 안전생산 공급하기 위한 기초생리 및 안전 재배기술을 확립하였다.
2. 기능성물질의 분리 동정 및 구조 확인을 통하여 기능성 소재를 발굴하였다.
3. 여우구슬 함유 성분의 항산화력, 항 관절염효능 및 독성유무의 과학적 접근으로 관련분야의 기초자료로 제공되었다.
4. 항 관절염물질 발굴 및 기능성 식품의 제품화 관련기술을 개발하였다.
5. 여우구슬의 기능성 성분의 생체 항산화 및 항 관절염효과를 구명하였고 항 관절염소재를 개발하였다.
6. 식물유래 천연 항 관절염물질의 분리·동정 및 대량생산 시스템 개발로 산업화의 기틀을 마련하였다.

제 5 장 연구 개발성과 및 성과 활용계획

제 1절. 연구 개발 성과

1. 논문 및 학술대회 발표 업적

- Sang B. Kor, Tae s. Kim, Myung H. Kang, Chun G. Park, Hee W. Park, Ha J. seong, Young M. Cho : Effects of Various *Phyllanthus urinaria* Extract on the Evans Blue Extravasation Evoked by Acetic Acid in Mice, JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION 2007.
- Tae S. Kim, Myung H. Kang, Chun G. Park, Hee W. Park, Young M. Cho, Sang B. Kor, Ha J. seong : Optimal extract methods for antioxidant compound from *Phyllanthus urinaria* L.. JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION 2007.
- Tae S. Kim, Myung H. Kang, Chun G. Park, Hee W. Park, Sang B. Kor, Ha J. seong : ANALYSIS OF GENERAL COMPOUNDS OF PHYLLANTHUS URINARIA SEED FROM SUPERCRITICAL AFLUID AND ACTIVITY LEVEL OF ITS EXTRACT ADDED OIL. FOOD Science & Technology 2008.
- Tae S. Kim, Myung H. Kang, Chun G. Park, Hee W. Park, Young M. Cho, Sang B. Kor, Ha J. seong : Preventive effects of *Phyllanthus urinaria* extract on paw edema in adjuvant-induced arthritis rats EXPERIMENTAL BIOLOGY 2008.
- 김태수, 박소이, 강명화, 성하정, 고상범, 박춘근, 박희운 : 여우구슬(*Phyllanthus urinaria*) 추출물로부터 항염증 물질의 구조-동정, 한국식품과학회 2009.예정
- Tae s. Kim, Myung H. Kang, Chun G. Park, Hee W. Park, Sang B. Kor, Ha J. seong : optimal extraction methods of β -Sitosterol from *Phyllanthus urinaria* L. 미국학회. 2009
- 김태수, 강명화, 조세환, 김인구, 강창수, 박희운, 박춘근, 성하정, 고상범, 주영운 : 여우구슬 80%메탄올 추출물의 생리활성 탐색. 식품영양과학회 2006.
- 김태수, 강명화, 조세환, 김인구, 문은영, 박희운, 박춘근,, 성하정, 고상범, 주영운 : 여우구슬 에탄올 추출물의 생리활성 효과. 식품과학회. 2006.
- 특허출원증: 여우구슬 추출물을 유효성분으로 하는 관절염 예방 조성물

제 2절. 실용화·산업화 및 기술 확산 계획

본 연구 결과는 국내 최초로 여우구슬에서 항 관절염 예방 및 치료를 위한 기능성 소재를 발굴한 사례라고 판단된다. 자생식물인 여우구슬을 원료로 한 항 관절염관련 기능성 소재를 탐색하였으므로, 제품개발과 관련된 신기술을 참여기업인 (주)유맥스와 연계하여 기능성 식품의 개발 및 생산에 적극 활용할 것이며, 현재 시제품을 생산 중에 있다. 또한, 고품질의 원료생산을 위한 안전 다수확재배 기술, 고품질 우량종의 선발 및 육성보급이 가능하므로 농가의 새로운 수요 창출원 으로 적극 응용할 수 있으며, 국가기관인 작물과학원과 지속적으로 협력하여 여우구슬의 재배, 농업적 특성, 항 관절염효과, 모세혈관투과억제효과 및 항산화효과에 대한 기초자료를 토대로 새로운 연구개발에 이용할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

(해당사항 없음)

제 7 장 참고문헌

1. AACC. 1990. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 8thed., American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota, USA 08-01, 10-10b, 38-10, 44-15A, 46-10, 50-11, 54-21, 54-30, 56-81B
2. AOAC. Official Methods of Analysis. 14th ed. Washington, D.C. 876 (1980)
3. Kang, M.H., Park, C.G., Cha, M.S., Seong, N.S., Chung, H.K. and Lee, J.B. Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of glycyrrhizia uralensis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(1). 138-142 (2001)
4. Kang, M.H., Choi, C.S., Kim, J.S., Chung, H.K., Min, K.S., Park, C.K. and park, H.W. Antioxidative Activities of Ethanol Extract Prepared from Leaves, Seed, Branch and Aerial Part of *Crotalaria Sessiflora* L. *Lorean J. Food Sci. Technol* 34(6). 1098-1102(2002)
5. Chung SK. 1997. Hydroxy radical scavenging effects of speices and scavengers from brown mustard. *Biosci Biotech Biochem* 61: 118-123
6. Muller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidese medium. *Microbio. Hyg.* 259: 151-155
7. SAS (2000) *User's guide*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
8. Choi CS, Song ES, Kim JS, Kang MH. 2003. Antioxidative activites of *Castanea Crenata Flos*. Methanol extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1216-1220
9. Kang MJ, Shin SR, Kim KS. 2002. Antioxdative and free radical scavenging activity of water extract from dandelion(*Taraxacum officinale*). *Korean J Food Preser* 9: 253-259
10. Kim YC, Chung SK. 2002. Relative oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. *Food Sci Biotechnol* 11: 407-411
11. Yoo MA, Chung HK, Kang MH. 2004. Evaluation of Physicochemical Properties in Different Cultivar Grape Seed Waste. *J Korean Soc. Food Sci.* 13: 26-30
12. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismmutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474
13. Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrate scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632

14. Ra, K.S., Suh, H.J., Chung, S.H., Son, J.Y. Antioxidant activity of solvent extract onion skin. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 595-600 (1997)
15. Kang, M.H., Park, C.G., Cha, M.S., Seong, N.S., Chung, H.K., Lee, J.B. Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of glycyrrhiza uralensis. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30(1): 138-142 (2001)
16. 美濃眞, 老化, 化學人, 東京 pp27 (1967)

최 종
연구보고서

여우구슬로부터 항관절염 한방 바이오 소재 개발

Development of Anti-arthritis Nutraceuticals from *Phyllanthus
urinaria* L.

연구기관
국립원예특작과학원

농 립 부

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.