

최 종
연구 보고서

**야생 식용 및 약용 식물에서 기능성 신작물
개발 및 이용**

Development of Crop Plants from Wild Edible Herbs

건위 및 정장효과
Gastro-intestinal Protecting Action

간장 기능 및 종양활성에 미치는 영향
Hepato-protecting Activity

성인병 및 난치병 예방효과
Preventive Effect against Chronic Adult Disease

식물자원의 수집과 증식에 관한 연구
Collection and Propagation of Wild Edible Herbs

서울대학교 농화학과
계명대학교 식품가공학과
서울대학교 천연물과학 연구소
서울대학교 원예학과

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “야생 식용 및 약용 식물에서 기능성 신작물 개발 및 이용” 과제 (제1세부과제 “야생 식용 및 약용 식물에서 기능성 신작물 개발 및 이용,” 제2세부과제 “야생 식용 및 약용 식물이 간장 기능 및 종양활성에 미치는 영향,” 제3세부과제 “야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병 예방효과,” 제4세부과제 “야생 식용 및 약용 식물자원의 수집과 증식에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. .

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 김 수 언

연 구 원 : 김 영 식

연 구 원 : 김 기 선

협동연구기관명 : 계명대학교

협동연구책임자 : 이 인 선

요 약 문

I. 제 목

야생 식용 및 약용 식물에서 기능성 신작물 개발 및 이용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

야생 식용 및 약용식물에서 우리나라에서 빈발하는 위장관질환, 간장질환, 순환계질환 등을 중심으로 예방 및 치료할 수 있는 인자를 검색하고, 식용식물을 중심으로 활성이 우수한 식물자원을 작물화하며 이 작물을 건강식품으로 이용하고 의약품 원료로서 이용 가능성을 검토하고자 한다.

우리나라 야생 식용자원 3,200여종 중 식용 및 약용으로 이용되어온 1,500여종 중 일부만이 재배화되었다. 따라서 이들 중 대다수가 과학적으로 약리성분과 효능 연구 대상으로 남아 있다. 국외 (특히 일본과 미국)에서는 소위 "기능성 식품" 또는 "nutraceutical"이라는 이름으로 식품의 영양이외 삼차 기능에 대한 연구가 매우 활발하다. 이들 국내 야생 식물자원을 UR을 맞은 농민들의 소득원으로 개발하기 위하여는 재배·식물학적 연구와 함께, 이들 식물의 생리효과 (소위 식품의 삼차기능)와 함께 약리 작용을 밝혀야만 충분한 소비자의 요구를 창출할 수 있으며, 기능성 소재로서 상업적 작물화가 장기적으로 가능하다고 판단된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구 개발은 내용은 다음 다음 네 범주로 대별되며, 연구의 성공 가능성을 높이기 위하여 가급적 많은 생물활성 검정을 같은 시료로서 하도록 설계하였다. 이를 위하여 세 연구진과 식물 수집 및 증식연구를 위하여 한 연구진으로 구성하였다.

(1) 시료 수집과 식물 증식, (2) 추출물 제조, (3) 생물활성 검정; 정장 및 진위효과, 간장기능 및 종양활성에 미치는 영향, 성인병 및 난치병 예방, (4) 활성 물질의 분리 및 구조 동정.

연구개발 범위는 일차년도에 식물자원을 검색하고 생물활성 검정계를 확립한 후 이차년도부터 상기 범주에 대하여 활성을 검정하고 가능하면 동물실험까지 실시하며, 물질을 분리하여 특허를 추진하고자 하였다. 한편 식물 수집과 증식에서는 활성 검정에 이용할 식물재료를 수집 제공하고 대량 증식과 재배조건을 확립하고자 하였다.

IV. 연구·개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구 개발 결과

1) 야생 식용작물의 추출

제 4 연구자인 김기선 교수로부터 받은 산채 식물과 시장에서 구입한 자생식용 식물 67종을 각각 약 1 kg을 5 liter의 MeOH로 추출한 후 농축하고 물을 가한 후 동일량의 hexane, ethyl acetate로 순차적으로 추출 농축하여 시료로 하였다. 이들 200여 분획 시료들은 각 세부연구자에게 제공하여 각각 활성 검색에 이용하게 하였다. 그 외에도 각 세부 연구자가 수집한 식물 20여종의 분획도 생물활성 검정자들이 공유하였다.

2) 진위 및 정장효과 - 장내 미생물에 대한 효과 및 항 진균 효과

위장 질환의 주원인 균인 *Helicobacter pylori* 요소분해효소에 대한 활성을 가진 식물은 그 수가 적었고, 단리하였을 때 조 추출물보다 활성이 감소하는 경향이였다.

*Clostridium perfringence*과 *Bifidobacterium adolescentis*에 대한 활성을 검정한 결과 썩 hexane, 부추 ethyl acetate, 창출 hexane, 쥐오줌풀 hexane 분획에서 활성이 나타났으나 정제할 수록 활성을 잃었다. 그러나 잔대 ethyl acetate 분획에서는 활성물질로

p-hydroxycinnamic acid methyl ester을 분리할 수 있었다. 그러나 이 물질은 *Bifidobacteria*와 *Closteridium*에 모두 항균활성을 보이므로 특이성을 인정할 수 없었다. 그러므로 이들 식물을 섭취하여 장내 미생물을 활성화하는 효과를 얻으려면 전 식물이나 조추출물 상태에서는 복합성분의 작용으로 활성을 기대할 수 있으나 물질을 단리하여 이용하는 것은 바람직하지 않다고 판단된다.

3) 간장 기능 및 종양활성에 미치는 영향

MTT test에서는 권백(부처손), 쑥, 달래, 냉이, 두릅, 머위, 참나물 등에서 세포독성이 강하게 나타났으며, 특히 쑥 및 참나물에서 1% 농도에서 morphology의 변화를 관찰할 수 있었다. 어수리, 곰취, 참취, 수리취, 전호, 땅두릅 미역취등에서 promotion 억제효과를 관찰하였다.

P53발현과 세포주기 arrest 연구에서는 잔대가 G1, 냉이가 G2 arrest 활성을 보였다. Apoptosis의 signal을 전달하는 Fas 항원이 발현되는 Jarket 세포를 이용하여 DAPI(핵염색)을 한 결과 쑥, 달래에서 강한 단편화를 관찰하였다. 이들 추출물의 세포생물학적 작용기작을 밝히기 위해 세포주기와 암화에 관련된 단백질의 response를 western blotting으로 조사한 결과에서 c-jun 과 c-fos가 현저히 증가되면서 과발현 시료로서는 달래와 냉이, 그리고 c-jun에서는 시금치(E), 질경이(E), 배초향(E), 백년초(E), 비듬(E) 등에서 과발현 되었다.

Wistar Rat를 준비하여 발암제로서 MNNG를 투여하고 생물활성검정계로 확립한 단기화학적 발암모델의 실험에서 부처손 투여군에서 유의성을 보였다 ($p < 0.05$). 따라서 부처손은 발암예방물질로서 기능성 식품이나 약품으로서의 개발이 가능하다고 판단된다.

4) 야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병 예방효과

Cyclooxygenase 활성억제 검색: 천연물을 이용한 생리활성 검색법으로 장기 복용에 안전한 소염진통제 개발에 최종 목표를 두고 150종의 자원 식물에서 cyclooxygenase 활성억제를 검색한 결과 8종류의 분획에서 활성을 확인하였다. 이들에서는 분획을 통하여 물질을 단리하고 있다.

조직인자 저해작용 검색 및 저해성분 분리: 식용채소로부터 조직인자 저해제를

찾고자 Prothrombin time을 연장시키는 정도에 따라 조직인자 저해작용을 측정하였다. 그 결과 쉐나물에서 활성이 크게 나타났으며 여기에서 echinocystic acid와 oleanolic acid를 aglycone으로하여 당이 여러개 붙어있는 매우 극성이 큰 사포닌을 활성 성분으로 확인하였다.

항응고 활성 및 세포증식 작용에 미치는 영향: 이 연구에서는 초기에 활성이 나타난 수수 (*Sorghum bicolor*)에 집중하였다. 여기에서 단리한 물질은 heparin과 작용 기작이 유사하거나 또는 제2의 heparin cofactor인 heparin cofactor II와 결합하여 thrombin 저해작용을 보이는 물질이라고 판단하였다. 또한 수수 추출물에서는 세포 증식 저해작용을 보임을 알고 계속 연구중이다.

5) 야생 식용 및 약용 식물자원의 수집과 증식에 관한 연구

문헌탐색 및 전문가 초청 자문을 통하여 500여종의 자생식물에 대하여 Data base를 구축하였으며, 전문가 자문을 기초로 하여 94종을 선정하여 이들을 서울대학교 농생대 수집포에 수집하여 번식 및 보존을 하였다. 이들 중 70여종 식물은 다량 채집하여 생물활성 시료로 제공하였다. 이외에도 미역취를 비롯한 수십종 식물의 번식과 재배환경 규명을 위한 실험 수행하였다.

6) 활용에 대한 건의

이상의 결과는 몇 가지 식물은 건강식품이나 의약품으로 개발될 가능성이 있음을 보여 주었다. 또한 이들 식물은 그대호 식품으로 소비하여도 기대한 다양한 생리활성을 기대할 수 있으므로 더욱 재배와 증식에 관한 연구를 거친 후 작물로서 개발할 가치가 있다고 생각한다.

S U M M A R Y

I. Title of the Study

Development of Crop Plants from Wild Edible Herbs

II. Objective and Significance of the Study

The objective of this study is to develop new crop plants from traditionally consumed edible herbs in Korea by demonstrating pharmacological activity of the plants. The screening systems were developed to find preventive activity towards gastro-intestinal and circulatory diseases, and hepatoprotective activity. The wild plants thus shown to possess activity could be expected to be added as a new cash crop for use in health food and pharmacological industries.

Among the 3,200 recorded plants growing in Korea about 1,500 have been used as food and in the traditional medicine. However, only handful of these herbs was cultivated as crop in agricultural practice. Most of the remaining edible herbes need to be examined for their pharmacological activity, and to establish their cultivation method.

III. Scope of Research

The scope of the research is summarized in the following four categories: (1) collection and propagation of plants (2) preparation of extracts, (3) screening of useful bioactivities (gastro-intestinal and hepato-protective activity, and activity against chronic adult disease). To improve the chance of finding useful activities, as many bioassay systems as possible were included in the study. The research was designed to start with establishment of screening system in the first year and systematic screening, isolation of

active principles and in vivo experiments in the ensuing years.

IV. Results and Further Application

1. Results

1) Preparation of extracts

Sixty seven kinds of the wild edible herbs collected by Professor KS Kim and purchased from local market were fractionated as follows. The plants were initially extracted with MeOH and the extracts were further fractionated with hexane and EtOAc. The resulting 200 fractions including water fraction submitted to the bioassay systems. Another twenty fractions prepared by the individual researchers were also shared among the participating researchers.

2) Activity towards gastro-intestinal microbes

Activity towards intestinal microflora: Plants showing activity against urease from *Helicobacter pylori*, the causative agent of ulcer and gastric ulcer and cancer, were few. Further fractionation of the active fraction reduced specific activity.

Activities towards *Clostridium perfringence* and *Bifidobacterium adolescentis* were shown in *Artemisia princeps*, *Allium odoratum*, *Atractylodes lancea*, *Valeriana amurensis* hexane fractions, and the activity was lost in further fractionation. *Adenophora radiatifolia*, however, yielded an active pure compound, *p*-hydroxycinnamic acid methyl ester, which was active against both *Clostridium* and *Bifidobacterium*. Therefore, only crude extract or whole plant could be used to suppress *Clostridia* while activating *Bifidobacteria*.

3) Hepato-protecting and anti-tumor activities

Primary MTT test yielded the highest cytotoxicity with *Selaginella* extract.

Inhibition of tumor-promotion activity was detected in *Aster* species. *A. triphylla* also revealed G2 cell-cycle arresting activity. Apoptosis signal transducing activity was determined by DAPSI to reveal *Artemisia* and *Allium* as most potent plants. Western blotting of c-jun and c-fos has shown that over-expression was observed with *Allium odoratum* and *Plantago asiatica* extracts among others.

In a short-term carcinogenesis model experiment using MNNG treatment to Wistar rat showed that the *Selaginella* extract had shown activity ($p < 0.05$). Therefore, this plant has high potential to be developed into health food or pharmaceutical.

4) Preventive activity towards chronic adult disease

Cyclooxygenase inhibitory activity: Eight fractions from 150 plants showed the inhibitory activity. Isolation of the active principle is in progress.

Anti-thrombin and tissue factor activity: *Aster scaber* showed most potent activity to prolong prothrombin time. Saponins of echinocystic acid and oleanolic acid were active principle. *Sorghum bicolor* fraction was shown to contain a heparin-like compound. This compound either had heparin-like mechanism or seemed to bind to heparin cofactor II.

5) Collection and propagation of wild edible herbs

A data base of 500 wild edible herbs was established through literature survey. Among them, 94 species most widely consumed were collected and preserved in the herbal garden of College of Agriculture and Life Sciences, SNU. Also about seventy herbal samples were collected to be used for bioactivity assay. Propagation and cultivation studies were done on several tens of plants.

6) Further application

This study showed that several edible herbs have high potential to be developed as a health food or a pharmaceutical. However, extensive study including elucidation of active principle and animal study would be needed for this end.

C O N T E N T S

Preface	1
Summary (in Korean)	2
Summary	6
Contents	9
Contents (in Korean)	10
Chapter 1. Introduction	11
Section 1. Objectives of the Study	11
Section 2. Significance of the Study	12
Chapter 2. Gastro-intestinal Protecting Action	13
Section 1. Introduction	13
Section 2. Preparation of Plant Extracts	13
Section 3. Materials and Methods	17
Section 4. Results and Discussion	20
Chapter 3. Hepato-protecting Activity	25
Section 1. Introduction	25
Section 2. Materials and Methods	25
Section 3. Results and Discussion	26
Section 4. Conclusion	35
Chapter 4. Preventive Effect against Chronic Adult Disease: Inhibition of Cyclooxygenase	36
Section 1. Introduction	36
Section 1. Materials and Methods	37
Section 3. Results and Discussion	39
Section 4. Conclusion	47
Chapter 5. Preventive Effect against Chronic Adult Disease: Anti-thrombin Activity	48
Section 1. Introduction	48
Section 2. Materials and Methods	48
Section 3. Results and Discussion	50
Section 4. Conclusion	56
Chapter 6. Preventive Effect against Chronic Adult Disease: Inhibition of Tissue Factor	57
Section 1. Introduction	57
Section 2. Materials and Methods	57
Section 3. Results and Discussion	65
Section 4. Conclusion	89
Chapter 7. Collection and Propagation of Wild Edible Herbs	91
Section 1. Introduction	91
Section 2. Materials and Methods	91
Section 3. Results and Discussion	93

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	6
CONTENTS	9
목차	10
제 1 장 서 론	11
제 1 절 연구개발 목적과 범위	11
제 2 절 연구 개발의 중요성	12
제 2 장 야생식용 및 약용식물의 건위 및 정장효과	13
제 1 절 서설	13
제 2 절 야생 식용작물의 추출	13
제 3 절 재료 및 방법	17
제 4 절 결과 및 고찰	20
제 3 장 야생식용 및 약용식물이 간장기능 및	25
제 1 절 서설	25
제 2 절 재료 및 방법	25
제 3 절 결과 및 토의	26
제 4 절 결론	35
제 4 장 야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병 예방효과: Cyclooxygenase 활성억제 검색	36
제 1 절 서설	36
제 2 절 재료 및 방법	37
제 3 절 결과 및 고찰	39
제 4 절 결론	47
제 5 장 야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병 및 예방효과: 항응고 활성 및 세포증식 작용에 미치는 영향	48
제 1 절 서설	48
제 2 절 재료 및 방법	48
제 3 절 결과 및 고찰	50
제 4 절 결론	56
제 6 장 야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병 예방효과: 조직인자 저해 활성 인자 검색	57
제 1 절 서설	57
제 2 절 재료 및 방법	57
제 3 절 결과 및 고찰	65
제 4 절 결론	89
제 7 장 야생 식용식물 자원의 수집과 증식에 관한 연구	91
제 1 절 서설	91
제 2 절 재료 및 방법	91
제 3 절 결과 및 고찰	93

본 문

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발 목적과 범위

1. 연구 개발의 목적

야생 식용 및 약용식물에서 우리나라에서 빈발하는 위장관질환, 간장질환, 순환계질환 등을 중심으로 예방 및 치료할 수 있는 인자를 검색하고, 식용식물을 중심으로 활성이 우수한 식물자원을 작물화하며 이 작물을 건강식품으로 이용하고 의약품 원료로서 이용 가능성을 검토하고자 한다.

2. 연구개발 내용 및 범위

연구 개발은 내용은 다음 다음 네 범주로 대별되며, 연구의 성공 가능성을 높이기 위하여 가급적 많은 생물활성 검정을 같은 시료로서 하도록 설계하였다. 이를 위하여 세 연구활성 연구진과 식물 수집 및 증식연구를 위한 한 연구진으로 다음과 같이 구성하였다.

(1) 시료 수집과 식물 증식, (2) 추출물 제조, (3) 생물활성 검정; 정장 및 건위효과, 간장기능 및 종양활성에 미치는 영향, 성인병 및 난치병 예방, (4) 활성 물질의 분리 및 구조 동정.

연구개발 범위는 일차년도에 식물자원을 검색하고 생물활성 검정계를 확립한 후 이차년도부터 상기 범주에 대하여 활성을 검정하고 가능하면 동물실험까지 실시하며, 물질을 분리하여 특허를 추진하고자 하였다. 한편 식물 수집과 증식에서는 활성 검정에 이용할 식물재료를 수집 제공하고 대량 증식과 재배조건을 확립하고자 하였다.

제 2 절 연구 개발의 중요성

우리나라 야생 식용자원 3,200여종 중 식용 및 약용으로 이용되어온 1,500여종 중 일부만이 재배화 되었다. 따라서 이들 중 대다수가 과학적으로 약리성분과 효능연구 대상으로 남아 있다. 국외 (특히 일본과 미국)에서는 소위 "기능성 식품" 또는 "nutraceutical"이라는 이름으로 식품의 영양이외의 삼차 기능에 대한 연구가 매우 활발하다. 이들 국내 야생 식물자원을 UR을 맞은 농민들의 소득원으로 개발하기 위하여는 재배·식물학적 연구와 함께, 이들 식물의 생리효과 (소위 식품의 삼차기능)와 함께 약리 작용을 밝혀야만 충분한 소비자의 요구를 창출할 수 있으며, 기능성 소재로서 상업적 작물화가 장기적으로 가능하다고 판단된다.

제 2 장

야생식용 및 약용식물의 건위 및 정장효과

제 1 절 서설

위장질환은 우리나라에서 성인질환중 상당 부분을 차지하고 있다. 최근 위장 질환중 위궤양과 위암은 대부분 *Helicobacter pylori*라는 원인균에 의하여 시발됨이 밝혀졌다. 한편 인체에 공생하는 장내 미생물 균총은 건강 유지와 질병발생에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이렇게 인체 건강에 중요한 역할을 담당하는 미생물을 제어할 수 있는 물질을 야생 식용식물에서 검색하고, 이를 건강식품으로 개발할 기초 자료를 얻는데 목적이 있다.

*H. pylori*는 산성인 위장내 환경에서 생존하기 위하여 *urease*를 분비하여 환경을 자신에게 유리하도록 전환한다고 알려져있다. 그러므로 이 연구에서는 *H. pylori ureas*를 저해할 수 있는 물질을 검색 목표로하였다. 한편 장내 미생물 균총 *Bifidobacteria*와 *Clostridia*가 가장 중요하다. 일반적으로 *Bifidobacteria*는 유익한 반면, *Clostridia*는 유해한 물질을 분비한다고 알려져 있다. 이 연구에서는 선택적으로 *Bifidobacteria*를 활성화하고 *Clostridia*를 저해하는 활성을 검색하였다. 한편 이와 함께 인체 병원성 진균류를 제어할 수 있는 활성도 아울러서 검색하였다.

이 연구진은 제 4 연구과제를 통하여 수집한 식물 자원에서 추출액과 분획을 제조하여 각 활성검정 연구자에게 제공하는 역할도 함께 담당하였다.

제 2 절 야생 식용작물의 추출

제 4 분야 연구자인 김기선 교수로부터 받은 산채 식물과 시장에서 구입한 자생식용 식물 67종 각각 약 1 kg을 5 liter의 MeOH에 2일동안 침지한 후 추출하고 MeOH 추출액을 Whatman filter paper (No. 4)를 이용하여 여과한 후 감압 농축하였다. 추출은 3회 이상 식물에 기원한 색이 더 이상 없을 때까지 계속하였

다. 농축물은 물에 녹인 다음 동일량의 hexane, ethyl acetate로 순차적으로 추출하고 농축하여 생물활성 검정시료로 하였다. 물층은 잔류 유기용매를 감압 증류한 후 냉동건조 하였다 (Table 2-1). 이렇게 얻은 시료는 각 연구자에게 생물활성 검정 시료로 제공하였다.

Table 2-1. List of plant extracts and their activity against intestinal microbes.

No ^a	Plant Name	Yield	Growth ratio compared to control (%)	
			<i>C. perfringens</i>	<i>B. adolescentis</i>
1-1	더덕	0.1415	195	126
1-2		0.529	52	112
1-3		1.4968		
2-1	취나물	0.728	32	58
2-2		10.102	62	63
2-3		13.9674		
3-1	도라지	4.9151	120	114
3-2		0.203	31	79
4-1	부추	2.0703	30	30
4-2		1.0154	18	47
4-3		15.4905		
5-1	쑥	7.474	147	78
5-2		0.965	32	115
5-3		25.518		
6-1	달래	2.8731	41	41
6-2		0.4154	35	127
7-1	냉이	0.8294	30	42
7-2		1.022	184	32
8-1	원추리	2.611	89	127
8-2		0.226	44	121
9-1	속세	2.905	87	109
9-2		1.768	35	115
9-3		22.767		
10-1	두릅	2.158	43	109
10-2		0.607	87	111
11-1	머위	1.584	40	99
11-2		1.268	34	70
11-3		13.785		
12-1	참나물	1.204	166	74
12-2		0.6269	94	205
12-3		11.4811		
13-1	들나물	1.230	105	80
13-2		0.7042	98	71

No.	Plant Name	Yield (g)	Growth ratio(%) compared to control	
			<i>C. perfringens</i>	<i>B. adolescentis</i>
14-1	연근	0.327	85	102
14-2		0.548	230	110
14-3		20.921		
15-1	토란	0.647	90	109
15-2		0.193	89	52
15-3		18.659		
16-1	잔대(사삼)	1.753		
16-2		0.2912		
16-3		15.214		
17-1	마	0.7739		
17-2		0.5359		
17-3		15.2734		
18-1	시금치	1.6154		
18-2		0.5576		
19-1	고들빼기	2.2829		
19-2		1.307		
20-1	미나리	1.559		
20-2		0.4402		
21-1	비름	2.0649		
21-2		0.266		
22-1	부지깽이	0.3202		
22-2		1.9557		
23-1	명이	5.6944		
23-2		4.7142		
24-1	산당귀	4.3791		
24-2		13.4791		
25-1	산딸기	1.247		
25-2		1.497		
25-3		0.5711		
26-1	참매실		100	102
26-2				
27-1	갯잎		89	90
27-2				
28-1	씀바귀		94	106
28-2				
29-1	민들레	2.1194	76	123
29-2				
30-1	땅두릅	0.1393	76	120
30-2		0.6750		
31-1	창출	7.800	28	99
31-2		5.8892		
32-1	질경이	5.2781	97	102
32-2		2.2099		
33-1	종지나물	2.5264	76	108
33-2		1.3101		

No.	Plant Name	Yield (g)	Growth ratio(%) compared to control	
			<i>C. perfringens</i>	<i>B. adolescentis</i>
34-1	별개미취		76	100
34-2				
35-1	쇠비름	1.2571		
35-2				
36-1	쇠뜨기	7.966		
36-2		8.4145		
37-1	아욱	1.8069		
37-2		0.8776		
38-1	겨우살이	2.1487	100	105
38-2		3.6108		
39-1	생강나무	1.4061		
39-2		1.2483		
40-1	배초향	0.7612		
40-2		0.8823		
41-1	백년초	0.2186		
41-2		0.8264		
42-1	큰애기나리	1.7983	99	100
42-2		1.9101		
43-1	꼭두서니		99	102
43-2				
44-1	퀴오좁풀	1.2294	95	103
44-2		0.8702		
45-1	낭탕	1.2653	92	99
45-2		0.2623		
46-1	방가지뚱	1.4195	95	98
46-2		0.4084		
47-1	피나물			
47-2				
48-1	애기뚱풀		91	105
48-2				
49-1	익모초	3.7259	91	108
49-2		1.2831		
50-1	사철쑥	2.6645	91	99
50-2		3.1697		
51-1	우슬			
51-2				
52-1	금낭화	2.4197		
52-2		1.3042		
53-1	승마	2.3114		
53-2		4.8678		
54-1	애기나리	2.5287	76	106
54-2		1.3204		
55-1	감국꽃	4.2121	76	101
55-2		1.9554		

No.	Plant Name	Yield (g)	Growth ratio(%) compared to control	
			<i>C. perfringens</i>	<i>B. adolescentis</i>
56-1	감국잎	7.0669	76	104
56-2		2.0664		
57-1	아우제비꽃	1.2516	98	100
57-2		0.6887		
58-1	고삼	2.1998	89	98
58-2		12.6698		
59-1	방기	1.2928	88	96
59-2		0.8153		
60-1	마늘	0.1779	97	98
60-2		0.0957		
61-1	생강	1.4192	98	99
61-2		1.0857		
62-1	풋고추	0.5375	96	101
62-2		0.3504		
63-1	갈퀴나물		100	103
63-2				
64-1	양지꽃		99	111
64-2				
65-1	감초		98	83
65-2				
66-1	등굴레		100	101
66-2			.	
67-1	단풍마	0.8350	96	90
67-2		0.6330		

^a Fraction-1, Hexane; -2, EtOAc; -3, Water.

제 3 절 재료 및 방법

1. *Clostridium perfringens*에 대한 항균활성

이 실험에 사용된 균은 *Clostridium perfringens* ATCC 13124와 *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703이며 -80℃에서 Eggerth-Gatnon Liver Extract-Field(EGLF) slant에 보관하였다. EG broth를 혐기적 조건을 유지하며 2ml 씩을 각각 anaerobic test tube에 나누어 후 autoclave를 하여 멸균하였다. EGLF와 EG broth의 구성은 EGLF는 lab-lemco power 2.4 g, proteose peptone No. 3 10.0 g, yeast extract 5.0 g, Na₂HPO₄ 4.0 g, glucose 1.5 g, starch soluble 0.5 g, L-cysteine 0.2 g, anti-foam 1.0

ml, bacto-agar 15.0 g, 0.1% resazurin 1.0 ml, liver extract 75 ml, fildes solution 40 ml, 그리고 4% Na₂CO₃ 100 ml 넣고 pH 7.6-7.8로 조정후 증류수로 최종 1000 ml이었다. EG broth는 beef extract 2 g, proteose peptone No. 3 10 g, yeast extract 5 g, Na₂HPO₄ 4 g, soluble starch 0.5 g, glucose 1.5 g, silicon antifoamer (100x dilution) 0.25 ml, Tween 80 0.5 g, 10% resazurin solution 4 ml를 pH 7.6으로 조정하고 최종 1000 ml가 되게 하였다.

각 식물의 MeOH 추출물을 항균활성을 검정하여 활성을 갖는 것을 먼저 hexane, EtOAc, H₂O층으로 분리하고 2mg/100 μ l의 농도가 되도록 DMSO와 물에 녹였다. Hexane, EtOAc추출물은 DMSO에 녹이고, H₂O 추출물은 물에 같은 농도로 녹였다. 각각의 배지에 혐기적 조건을 유지하기 위해 CO₂와 H₂를 계속 흘려주면서, 위에 기술한 추출물을 용액 2% (2 ml broth에 20 μ l)가 되도록 첨가하고 미리 배양한 *C. perfringens* 와 *B. adolescentis*를 동일한 양으로 첨가 후 밀봉하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 *C. perfringens*는 10시간, *B. adolescentis*는 20시간이 지난 후 성장 상태를 HP8453A diode-array spectrometer로 600nm에서 흡광도를 측정하여 control과 비교하였다. 식물 추출물 농도는 1,000 ppm 수준이었다. Control로는 식물 추출물이 들어가 있지 않은 용매를 같은 농도 (2 %)로 사용하였다. 경우에 따라서는 Coulter counter를 이용하여 미생물 성장을 측정하였다.

2. *Helicobacter pylori* Urease에 대한 저해활성 검색

이 실험에 사용된 활성 검정 방법은 0.2 μ M이하의 urea 유무를 확인할 수 있을 정도로 매우 예민한 indophenol assay를 사용하였다. 우선 *H. pylori* urease 효소액은 다음과 같이 얻었다. 150 μ g/ml ampicilin과 1 mM NiCl을 함유한 LB broth에 1일동안 배양한 *H. pylori* Urease의 ure 유전자를 가지는 *E. coli*를 질소 공급이 제한된 M9 broth 100 ml(멸균된 증류수 78 ml와 X5 M9 배지 20ml)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 3일간 키운 후 5000 rpm에서 원심분리하여 모은 세포를 PEB (100 mM sodium phosphate, 10 mM EDTA, pH 7.4)에 녹이고, 이를 초음파 파괴하고 15,000 rpm에서 원심분리하여 상층을 urease 조효소액으로 얻었다. X5 M9 배지는 Na₂HPO₄·7H₂O 64 g, KH₂PO₄ 15 g, NaCl 2.5 g, NH₄Cl 5 g, 20% glucose 2

ml, 10% L-arginine 2 ml, 2.5% thiamine-HCl 8 μ l, 1 M MgSO₄ 100 μ l, 1 M CaCl₂ 10 μ l, 1 mM NiCl 100 μ l를 각각 혼합하여 20 ml를 만들었다. 이 효소액은 BSA (bovine serum albumin)를 표준액으로 하여 Bradford method를 이용해 농도를 구하고, 최종 총 1 mg protein /ml가 되게 희석하였다.

DMF에 녹인 각 식물 분획의 urease 저해 활성은 indophenol assay 방법을 사용하여 측정하였다. 이 때 사용한 phenol/nitroprusside reagent 그리고 alkaline hypochlorite solution의 조성은 다음과 같다. Phenol/nitroprusside reagent는 증류수 500 ml에 phenol 5 ml, sodium-nitroprusside 25 mg을 녹인 것이고, alkaline hypochlorite reagent는 증류수 500 ml에 NaOH 2.5 g, 13% NaOCl 2.5 ml로 만든 것이었다.

H. pylori Urease assay를 위해 Eppendorf tube에 urease solution 50 μ l, 10X PEB 60 μ l, DMF에 녹인 식물 추출물 30 μ l, PEB에 녹인 urea solution 40 μ l, 그리고 증류수 420 μ l를 혼합하고, 37°C에서 반응을 시킨 후 시간 별로 시료를 채취하였다. 이 때 효소액은 마지막으로 가하였다. 한편 별도의 시험관에 alkaline hypochlorite solution 300 μ l를 미리 넣고 효소 assay solution 150 μ l, 그리고 발색 반응을 위한 phenol nitroprusside solution 300 μ l를 시험관에 넣은 후 10, 20, 그리고 30분씩 50°C에서 반응을 시킨 후 식힌 다음 625 nm에서 흡광도를 측정하였고, control로는 boiled enzyme을 사용하여 비교하였다.

3. 항진균활성 검정

PDA 배지 10 ml씩 넣은 Petri dish에 paper disk 방법으로 28°C에서 진균을 1-2 일 배양후 균의 성장을 측정하였다. 사용한 균주는 인체 병원성 진균인 *Geotrichum candidum*, *Candida albicum*, *Aspergillus fumigatis* 그리고 환경 미생물인 *Fusarium oxyporium*이었다. Control로는 식물 추출물을 녹인 용매를 동일한 양으로 처리하였고, 저지환 측정에서는 균의 성장 속도를 감안하여 *G. candidum*은 12 시간에서, *C. albicans*은 24 시간에서, *F. oxyporium*, *A. fumigatis*은 24 시간 이후 36 시간 이내에 저지환 직경을 측정하고 control과 비교하여 식물 추출물의 활성 정도를 판단하였다. 활성이 있다고 생각되는 추출물은 활성 분획을 얻기위해

vacuum liquid chromatography를 이용하여 분리하고 여기에서 얻은 분획을 다시 위에서와 같은 방법으로 활성을 검색하였다.

제 4 절 결과 및 고찰

1. *C. perfringens*에 대한 활성

식물 67종 MeOH 추출물에 대해서 *C. perfringens*에 대한 활성을 측정하였다 (Table 2-1). 그 결과 *C. perfringens*의 생장을 50% 이상 저해하나 *B. adolescentis*의 생장에 무관하거나 촉진하는 활성을 나타내는 식물은 쑥, 잔대(사삼), 원추리, 부추, 창출, 쥐오줌풀이었다. 이중 쑥, 잔대, 원추리, 부추에서 hexane, EtOAc, H₂O 분획을 얻고, H₂O층은 XAD-2를 이용하여 pass-through 분획과 XAD-absorbed 분획으로 분리하였다. 이후 활성 분획을 추적하며 vacuum liquid chromatography (VLC)와 flash column chromatography, radial chromatography (Chromatotron), 그리고 HPLC 순으로 정제하였다.

Table 2-1. EC₅₀ values of crude MeOH extract of edible plants and the most active VLC fractions against *C. perfringens*. Note that the VLC fractions have higher values.

	EC ₅₀ against <i>C. perfringens</i> , ppm	
	Crude MeOH extract	Most Active VLC fraction
쑥H	150	450
원추리E	290	600
부추E	480	621
창출H	351	650
쥐오줌풀H	450	764

그 결과 쑥 hexane, 부추 ethyl acetate, 창출 hexane, 쥐오줌풀 hexane 분획은 정제할 수록 활성을 잃었다. 그러나 잔대 ethyl acetate 분획은 상당히 강한 항균 활성을 보였고, 다른 식물과 다르게 분획하면 할수록 EC₅₀가 감소하여 활성물질의 존재를 알 수 있었다 (Table 2-1). 잔대 ethyl acetate 분획을 hexane과 acetonitrile로 재분획한 후 acetonitrile 분획을 VLC를 통하여 분리한 CH₂Cl₂/EtOAc

(0-10%) 분획을 radial chromatography를 이용하여 분리하고, hexane/CH₂Cl₂ (5:95) 분획을 HPLC로 최종 정제하여 NMR과 MS로 동정한 결과, *p*-hydroxycinnamic acid methyl ester를 확인할 수 있었다 (Table 2-2).

이 물질은 항균 물질로 잘 알려진 기지의 물질이었다. 그러므로 이상의 결과로 보아 이들 식물은 전체를 식품으로 섭취하였을 때에는 *Bifidobacteria*의 활성화와 *Clostridia*의 저해를 기대할 수 있겠으나 단리 물질으로는 이러한 결과를 기대하기 어려운 것으로 평가하였다.

Table 2-2. Purification of active principle from *Adenophora stricta*

Steps	Eluent condition	EC 50 to <i>C. perfringens</i>
EtOAc fraction	Whole fraction	235 ppm
MeCN fraction	Whole fraction	
VLC	CH ₂ Cl ₂ /EtOAc (0-10%)	120 ppm
Chromatotron	hexaneane/CH ₂ Cl ₂ (5:95)	40 ppm
HPLC	CH ₂ Cl ₂	not determined

2. *Helicobacter pylori* Urease에 대한 저해활성 검색

식물 54종 128분획에 대해서 1,000 ppm과 500 ppm에서 *Helicobacter pylori* urease 저해활성을 검색하였다. 그 결과 더덕 hexane, 취나물 hexane, 부추 hexane, 부추 EtOAc, 쪽 EtOAc, 달래 hexane 분획이 활성을 보였다. 위 분획을 VLC를 통하여 재분획을 하였다. VLC column chromatography로 hexane 분획에서는 hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, acetone 순서로 용출하여 분획을 얻었고, EtOAc 분획은 EtOAc, acetone, MeOH의 순서로 분획하였다. 이 각각의 분획들은 TLC로 검정하고, 적절히 모은 다음 활성을 검정하였다. 그러나 이 과정에서 subfraction들은 특이한 활성이 나타나지 않았다 (Table 2-3).

Table 2-3. Relative activities of *H. pylori* urease when incubated with the crude MeOH extract of edible plants and the most active VLC fractions

No.	Plant Name	Relative HP urease activity(% of control)		
		Crude MeOH extract		Active VLC fraction
		1000ppm	500ppm	500ppm
1-1	더덕	37	52	95
1-2		98	230	
2-1	취나물	69	150	
2-2		19	40	88
3-1	도라지	118	215	
3-2		51	120	
4-1	부추	37	70	108
4-2		39	75	120
5-1	쑥	42	130	
5-2		4	40	90
6-1	달래	20	56	113
6-2		120	180	
7-1	냉이	54	109	
7-2		70	143	
8-1	원추리	122	195	
8-2		74	165	
9-1	속세	77	150	
9-2		62	130	
10-1	두릅	107	213	
10-2		48	99	
11-1	머위	80	148	
11-2		60	150	
12-1	참나물	98	208	
12-2		86	165	
13-1	돌나물			
13-2				
14-1	연근	80	211	
14-2		76	197	
15-1	토란	124	256	
15-2		88	178	
16-1	잔대(사삼)	83	166	
16-2		95	234	
17-1	마	79	189	
17-2		60	182	
18-1	시금치	96	168	
18-2		106	213	
19-1	고들빼기	86	182	
19-2		110	228	
20-1	미나리	76	133	
20-2		58	114	
21-1	비름	91	188	
21-2		107	264	
22-1	부지깽이	112	276	
22-2		79	173	

23-1	명이	89	180
23-2		78	169
25-1	산딸기	114	
25-2		127	
26-1	참매실	89	204
26-2		100	
27-1	갯잎	87	193
27-2		85	182
28-1	씀바귀	154	
28-2		120	
29-1	민들레	120	220
29-2		98	194
30-1	땅두릅	196	395
30-2		150	368
31-1	창출	96	263
31-2		65	195
33-1	종지나물	107	312
33-2		74	218
38-1	겨우살이	70	189
38-2		122	346
42-1	큰애기나리	69	193
42-2		110	240
44-1	취오좁풀	80	247
44-2		60	216
45-1	낭탕	80	265
45-2		86	290
46-1	방가지뚱	98	302
46-2		114	359
49-1	익모초	88	270
49-2		90	300
50-1	사철쑥	120	360
50-2		85	288
52-1	금낭화	63	250
52-2		80	269
56-1	애기나리	88	293
56-2		100	310
57-1	국화꽃	90	290
57-2		75	245
58-1	아우제비꽃	78	240
58-2		83	280
59-1	고삼	90	295
59-2		87	290

*Fraction-1, Hexane; -2, EtOAc

3. 항진균활성 검정

본 실험 결과 100 μg 수준에서도 *G. candidum*에 대해 활성을 갖는 것이 토란 EtOAc, 토란 H₂O, 잔대 hexane, 부지깽이 EtOAc, 산당귀 hexane, 쑥 hexane, 참나물 hexane 분획에서 *C. albicans*에는 두릅 hexane, 풋고추 EtOAc, 산딸기 hexane, EtOAc, H₂O, 시금치 EtOAc, 마늘 EtOAc, 마 EtOAc, 민들레 hexane, 땅두릅 hexane, 땅두릅 EtOAc, 생강나무 hexane, 창출 hexane, 산당귀 hexane, 산당귀 EtOAc, 토란 EtOAc, 참나물 hexane 분획이 활성을 보였다. *Fusarium*에 대해서는 500 μg 수준에서만 고삼 hexane, 고삼 EtOAc, 승마 hexane, 아욱 hexane, 마늘 hexane, 마늘 EtOAc 분획이 활성을 보였다. 그러나 *Aspergillus*에 대한 항진균활성은 검색 식물 분획에서는 찾아볼 수 없었다. 활성이 있는 분획은 대부분 24시간 이상 더 배양하여도 저지환이 뚜렷이 남아 있었다.

Table 2-4. Diameter of the inhibition zones against some pathological fungi against human (*Candia* and *Geotrichum*) and plants (*Fusarium*)

	Diameter of inhibition zone (mm), [Assayed with 500 μg (100 μg)]		
	<i>C. albicans</i>	<i>G. candidum</i>	<i>F. oxysporium</i>
토란E	12 (10)	12 (10)	
토란W		14 (10)	
잔대H		12 (10)	
부지깽이E		14 (12)	
산당귀H		12 (10)	
쑥H		14 (14)	
참나물H		12 (12)	
참나물E	18 (14)*		
원추리E		12 (10)	
두릅H	16 (12)	12 (-)	
풋고추E	12 (10)		
산딸기H	12 (10)	14 (-)	
산딸기E	16 (12)	14 (-)	
산딸기W	14 (10)		
시금치E	14 (12)		
마늘H		14 (-)	12 (-)
마늘E	14 (-)	14 (-)	12 (-)
마 E	14 (12)		
민들레H	14 (10)	12 (-)	
땅두릅H	12 (10)		
땅두릅E	12 (12)	10 (-)	
아욱H			10 (-)

제 3 장

야생식용 및 약용식물이 간장기능 및 종양활성에 미치는 영향

제 1 절 서설

약용식물에만 국한한 전통적 약리 기능성 성분의 연구에서 탈피하여 야생 식용식물을 대상으로 체계적인 생리활성 연구를 통해 이들을 신기능성 대체 작목으로 개발하여 농업 기반 유지와 안정된 기술을 확립하기 위하여 이 연구를 수행하였다. 특히 이 연구에서는 야생 식용 및 약용 식물에서 식품의 3차 기능인 생리효과를 검정하고 간장 질환의 예방효과, 생체의 기능증진 효과등을 유전자 및 분자생물학적인 *in vitro*와 새로운 동물 모델링을 통한 새로운 생물활성 검색제로 확립하고자 하였다. 간 질환과 암질환은 우리나라 성인에서 많이 발견되는 질병이므로 발암원 물질이나 바이러스성 감염으로 야기되는 간장기능이나 소화기 계통의 종양활성을 감소하게 하는 물질을 검색하고자 하였다. 이 연구는 후보 물질을 도출하고 효과적 생물활성 검정법을 확립하며 표적장기 및 물질에 따른 동물 실험계 적용 확립하는데 일차적 목적이 있었다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 연구개발의 내용 및 범위

1차년에는 간장기능을 증진하고 종양활성을 감소하게 하는 물질을 검색하고자 생물활성계를 확립하고, 2차년에는 검색된 물질을 중심으로 동물모델 실험계의 검색계를 개발하고, 3차년에는 새로운 동물모델 실험을 통하여 동물세포수준에서의 면역화학적, 분자생물학적, 병리조직학적 검토를 통해서 신기능성 물질 검색으로 새로운 작물의 개발이나 기능성식품으로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

2. 식물자원의 검색

공동연구를 통하여 총 50여종 이상의 식용식물을 구입하거나 채집하였으며, 산지와 채취시기를 고려하여 같은 식물이라도 중복 수집하였다.

3. 효과적인 생물활성검정법 확립

- 1) MTT를 이용한 세포독성검사를 이용하여 10여종의 식물 (부처손, 쪽, 달래, 냉이, 두릅, 머위, 참나물등)을 1차로 선정하였다.
- 2) EBV를 이용한 anti-promotion의 검색을 통하여 7여종의 야생식용식물 (어수리, 곰취, 참취, 수리취, 전호, 땅두릅)을 선정하였다.
- 3) P53발현과 관련하는 세포주기 검색법을 개발하여 동물실험계의 단기 screening 방법으로 이용할 수 있었다.

4. 동물제실험

1) 간장보호효과

HBV DNA polymerase 억제능과 galactosamine 유발 rat를 이용한 혈청중의 GPT, GOT, alkaline phosphatase, bilirubine 등의 측정으로 간장보호효과를 검색하였다.

2) 발암물질 유도에 의한 단기 동물모델실험 개발

표적장기에 따른 발암물질 투여와 발암 initiation-promotion 단계의 경시적인 관찰로 가장 효과적인 실험일수를 정하여 단기 동물실험의 검색계를 확립하였다. 또한 표적장기의 biomarker로서 phase I enzymes와 phase II enzymes 으로서 검색하여 분자생물학적으로 확인하였다.

3) 물질분리

특히 가능한 신물질 도출 및 기능성 식품 또는 약품으로 제품화 가능성을 모색하였다. 잔대, 냉이, 달래등에서 항종양 효과 확인과 산딸기 등에서 간장 보호 효과가 있었음을 확인하고 이들을 분획하고 있다.

제 3 절 결과 및 토의

1. 암세포주의 배양 및 활성검색

종양발생 부위별 암세포주 (human tumor cell line; U937, A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, xF-498, HCT-15) 를 1×10^5 cells/ml의 농도에서 DMSO에 용해시킨 농도별 시료액을 첨가한 실험군과 시료를 첨가하지않은 대조군을 각각 37도, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하여 세포생존율을 계산하여 독성 및 활성을 검색하였다.

그 결과, 권백 (부처손), 쑥, 달래, 냉이, 두릅, 머위, 참나물 등에서 세포독성이 강하게 나타났으며, 특히 쑥 및 참나물에서 1 % 농도에서 morphology의 변화를 관찰할 수 있었다. 부추(W), 비듬(H), 생강나무(H), 질경이(H)등에서도 이 변화가 관찰되었다 (Table 3-1).

2. 발암 promotion검색

Human B 임파구에 Epstein-Barr virus를 감염시킨 세포주 모델 에서 환경전반에서 일어나는 initiation 단계를 차단할 수 없는 상황이므로 2차 단계인 promotion 억제능을 promotor인 teleocidin-4B를 첨가하고 제1항체, 제2항체에의 결합정도를 형광 현미경으로 관찰하여 탐색하였다. 그 결과, 어수리, 곰취, 참취, 수리취, 전호, 땅두릅 미역취 등에서 promotion 억제효과를 관찰하였다. 화학적 발암예방 동물모델실험에서 시료로서 전호를 선정하였다.

3. 암억제 유전자(p53)와 세포주기 해석(G1 arrest)을 통한 항종양 효과 검색

암억제유전자(P53) 에 대한 cell signal 정도 검색: 세포는 70% EtOH에 고정하고 DNA를 propidium acetate로 염색한 다음 BD fluorescence activated cell-analyzer로 3반복 분석하였다. Fas 항원을 이용한 DAPI 염색으로 현미경학적 단편화를 확인하였고 p53 유전자 발현과 G1 arrest의 정도를 검색하고 western blotting을 이용하여 p53 관련 유전자들의 변동을 확인하였다.

1) 시료의 추출물 가운데서 hexane 층과 ethyl acetate층의 결과

p53 gene expression과 세포주기의 G1 arrest 정도 검색 결과: p53 발현 의

존적이며 시료 가운데 No.16 (잔대)에서 p53 check point 로서 G1 arrest가 강하게 일어났으며 No.6 (냉이)에서 G2 arrest가 일어남을 관찰하였다 (Table 3-2, -3, -4).

Fas 항원 발현: Jarket세포를 이용하여 Fas (Apoptosis의 signal을 전달하는 세포표층 수용체 단백질) 항원 발현을 조사하기 위하여 DAPI(핵염색)을 한 결과 5 (쑥), 달래(6)에서 강한 단편화를 관찰하였다 (Figure 3-1).

세포생물학적 기작: 세포주기와 암화에 관련된 단백질의 response를 western blotting으로 조사 (c-jun, c-myc, c-fos, cyclin-cdks, p21, p53, pRB등)한 결과에서 c-jun 과 c-fos 가 현저히 증가되면서 과발현 시료로서는 No.6 (달래)와 No.7 (냉이) 그리고, c-jun에서는 시금치(E), 질경이(E), 배초향(E), 백년초(E), 비듬(E) 등에서 과발현 되었다 (Figure 3-2).

4. 간장기능 동물실험

시료 추출물을 HBs 항원 양성 형체과의 침강반응 및 HBV DNA polymerase 활성도 억제능 실험으로 선정한 후, 150g 전후의 Rat를 이용한 galactosamine 유발 단독투여군과 galactosamine유발 및 시료투여군으로 나누어 혈청중의 GPT, GOT, alkaline phosphatase, 그리고 bilirubin등을 측정하였다.

HBs항원 양성 혈청 사용 실험: 농도 10mg/ml에서 장군풀, 산딸기, 오이풀, 가자등에서 결합력을 보였으나 사삼, 오매, 차전자 등에서는 결합하지 않았다. HBV DNA polymerase 억제능을 조사한 결과에서도 오이풀, 장군풀, 산딸기 등에서 효과가 높았고 galactosamine으로 유발 간손상 실험에서는 산딸기만 보호 효과가 있었고 간기능 검사상 특별한 보호작용은 관찰되지 않았다 (Table 3-5).

5. 발암물질 유도에 의한 동물모델 실험

동물실험계를 이용한 장기실험을 기초로 단기 screening 법을 정립하고 개발하였다. Rat를 이용하여 MNNG로 발암을 유도하고 difluoromethylornithine (DFMO)를 항종양효과 물질로 투여한 후 1일, 2일, 4일, 그리고 7일후에 각각 해부하여 간장과 위장의 Phase I, II enzyme을 측정하고 proliferation cell nuclea antigen (PCNA)의 표지율을 immunohistochemistry로 세포증식의 정도를 시기별로 관찰 비교하였다. 이 PCNA는 세포주기의 G1후기, S기, G2기에 현저치 증가하는 단백질

로서 DNA의 복제와 관련이 있고 DFMO는 ornithine 생합성계의 polyamine 생성에서 속도 결정단계 효소인 ornithine decarboxylase (ODC)의 합성을 방해하는 analogue물질임으로 발암예방의 기지물질로서 사용하여 검색계를 개발하였다.

그 결과, 5주령된 rat에 발암물질로서 MNNG를 투여하고 발암 initiation-promotion에 효과가 있다고 알려진 DFMO를 병용투여하고 1일, 2일 4일, 그리고 7일 후에 간장과 위장의 biomarker로서 phase II enzyme인 GSH의 변동과 PCNA의 표지율로서 세포증식의 정도를 병리 조직면역학적으로 확인하였다. 표적장기인 위장을 위저부와 유문부로 나누어서 관찰하였다. 결과에서 MNNG 단독 투여군에서는 PCNA의 세포증식율이 증가하나 MNNG/DFMO의 병용 투여군에서는 유의성 있게 감소하였고 2일에서 가장 현저한 변동을 보임으로서 동물모델계의 단기 screening검색 방법을 확립하였다 (Table 3-6, -7).

6. 동물모델을 이용한 biomarker 검정과 면역조직학적 검토

Wistar rat를 준비하여 발암제로서 MNNG를 투여하고 생물활성 검정계로 확립한 단기 화학적 발암모델의 실험을 실시하여 표적장기의 PCNA 표지율의 검정을 행하였다. 새로운 동물모델 검정계를 이용하여 후보 물질로는, 양배추의 성분인 phethylisothicyanate (PEITC), Oltipraz (pyrazine 유도체), 약용식물인 부처손 (*Selaginella tamariscina*), 야생 식용식물인 전호 (*Anthriscus sylvestris*) 등을 사용하였다. 이어서, 사삼(잔대)의 동결건조분말과 EtOAc 층의 분획도 사용하였다. 특히, 위장관의 위저부와 유문부를 나누어 조사하고 간장등의 GSH, GSSG, GST 등의 phase II enzyme의 수준을 조사하였다.

48시간후에 해부하여 Biomarker실험과 병리조직학적 검토한 결과, biomarker 실험중에서 phase II 효소인 GSH에 대해서 간장과 위장에 대한 변동을 조사하여 유의성 있는 결과를 보였다 (Table 3-8, -9). 그리고, PCNA 표지율의 결과에서 위장 pyloric epithelia에서 대조군에 비해서 양배추 성분인 PEITC 투여군과 Oltipraz 투여군에서 유의성 있는 ($p < 0.01$) 세포증식의 감소를 보였고 부처손 투여군에서 유의성 ($p < 0.05$)을 보였다 (Table 3-10).

7. 병리조직학적 검토

표적장기의 이형정도나 erosion등을 조사하고 HE 염색 및 PCNA의 면역조직 화학적 검사하여 조직병리학적 진단을 행하였다. 그 결과를 Figure 3-3에 보였다.

Table 3-1. MTT results with HeLa Cells.

Sample	Cell Viability (%)			Morphology
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	100	10	1	
1. 더덕	30	80	95	
2. 취나물	38	85	96	
3. 도라지	42	90	9	
4. 부추	32	83	93	
5. 쑥	20(*)	60	80	Apoptosis
6. 달래	19(*)	55	75	
7. 냉이	26	59	88	
8. 원추리	30	61	78	
9. 속세	32	75	92	
10. 두릅	20(*)	52	81	
11. 머위	25	58	79	
12. 참나물	19(*)	48	70	Apoptosis
13. 연근	40	85	97	
14. 토란	33	70	94	
15. 잔대(사삼)	35	69	92	

* Strong activity

Table 3-2. The cell-cycle dependency of hexane extracts of Korean edible plants on p53 expression in human ovary carcinoma A2780.

Sample ID	Activities		
	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	G1	G2/M
1	95.0	63.0	11.2
2 (취나물)	33.8	30.1	21.9
3	47.0	51.1	8.2
4	50.0	66.7	12.4
5	100.0	59.7	9.5
6	30.0	49.1	8.6
7	46.0		
8	38.5	51.3	13.3
9	40.0	51.3	14.5
10 (두릅)	46.3	82.1	6.0
11 (머위)	35.0	81.2	6.1
12 (참나물)	120.0	84.9	6.4
13			
14	27.5	51.8	11.8
15	35.0	56.7	9.9
16	84.0	56.7	7.1
control		44.3	8.9

*Strong activity **The mutant cell (human colon carcinoma HT-29) data are not shown.

Table 3-3. The cell-cycle dependency of ethyl acetate extracts of Korean edible plants on p53 expression in human ovary carcinoma A2780, a P53 wild type cell.

Sample ID	Activities			
	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	GI	S	G2/M
1	95.0	60.1	29.3	10.8
2	33.8	64.5	25.2	10.4
3	47.0	72.9	18.8	8.5
4	50.0	54.0	31.2	14.8
5	100.0	51.2	34.6	14.3
6	30.0	55.0	34.0	11.1
7	46.0	59.5	17.6	23.0
8	38.5	50.0	40.9	9.2
9	40.0	55.6	28.4	16.0
10	46.3	52.9	33.0	14.2
11	35.0	62.0	25.9	12.2
12	120.0	55.2	32.2	12.7
13				
14	27.5	67.1	25.0	7.9
15	35.0	73.4	17.9	8.7
16	84.0	81.09	12.4	6.7
control		42.9	47.5	9.6

Table 3-4. The cell-cycle dependency of ethyl acetate extracts of Korean edible plants on p53 expression human colon cancer HT-29, P53 wild type cell.

Sample ID	Activities			
	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	GI	S	G2/M
1	95.0	60.4	36.7	6.0
2	33.8	53.7	35.6	10.7
3	47.0	59.7	30.5	9.9
4	50.0	58.9	31.6	9.7
5	100.0	56.4	33.3	10.4
6	30.0	56.6	31.8	11.7
7	46.0	56.9	33.4	9.8
8	38.5	57.5	34.0	8.5
9	40.0	57.4	38.2	4.5
10	46.3	63.1	32.2	4.7
11	35.0	55.4	35.5	9.2
12	120.0	57.4	34.7	8.0
13				
14	27.5	54.2	35.3	10.6
15	35.0	49.1	43.4	7.6
16	84.0	51.9	35.0	13.3
Control		47.8	44.7	8.0

Table 3-5 Effect of 10 herbal medicines on the liver function test of the galactosamine-induced hepatitis in rat.^a

Botanical names	SGOT(ku/ml)		SGPT(ku/ml)		ALP(KAU/ml)		Bilirubin(mg/dl)	
	before	after	before	after	before	after	before	after
Control	26.5±2.65	468.2±22.88	17.2±2.24	680.6±24.94	92.4±4.02	81.4±11.92	0.7±0.02	4.2±0.56
GalNH ₂ with								
오이풀	38.4±2.68	510.9±23.46	16.2±2.42	680.6±24.61	97.2±4.33	73.5±12.10	0.4±0.03	4.5±0.71
가자	38.0±2.84	435.9±23.34	15.3±2.34	562.8±23.70	103.2±3.94	72.1±13.01	0.3±0.05	3.9±0.58
산딸기	99.1±2.46	510.2±20.19	19.8±2.45	208.5±23.21 ^b	79.9±4.12	109.1±12.31	0.1±0.04	1.5±0.67
장군풀	78.1±2.52	529.4±22.15	18.8±2.28	597.4±24.21	74.9±3.91	91.2±12.24	-	2.5±0.74
정향	46.4±2.04	486.7±25.92	18.0±2.28	509.7±21.05	109.5±4.05	72.2±12.29	0.3±0.05	6.5±0.63
빈랑	78.6±2.35	534.1±20.98	19.2±2.45	529.6±24.10	102.5±3.69	156.8±12.43	0.2±0.04	3.6±0.52
산수유	79.0±2.52	494.2±21.67	26.3±2.67	520.7±22.48	91.6±3.58	96.3±12.25	-	2.9±0.65
소방목	123.1±2.11	694.3±23.75	21.9±2.52	462.8±23.32	96.5±4.02	139.2±12.33	0.1±0.04	0.6±0.28
마황	70.1±2.65	528.2±25.01	22.0±2.44	623.6±25.01	55.7±3.92	68.9±12.46	-	3.1±0.75
모과	37.2±2.01	440.6±22.5	19.5±2.33	517.9±24.81	87.4±3.79	104.2±11.96	0.3±0.05	2.9±0.73

^a Number of samples (n=3)

^b Mean ± S.D., Significantly different from control at p<0.01

Table 3-6. PCNA-labeling indices for the fundic epithelia of rats treated with MNNG and/or DFMO.

Days	MNNG alone	MNNG/DFMO
1 day	9.74±2.75	5.99±1.01*
2 day	13.33±2.30	6.37±1.97**
4 day	7.76±1.88	3.25±0.80**
7 day	5.39±1.08	1.94±1.46**
control	3.45±0.56	3.96±0.56

Animals are male Wistar rats, 5-week-old; Number of samples (n=5); Mean ± S.D., Significantly different from control at *, p<0.05, **, p<0.01; 2000 ppm DFMO in drinking water; 150mg/kg MNNG/4ml DMSO by gavage

Table 3-7. PCNA-labeling indices for the pyloric epithelia of rats treated with MNNG and/or DFMO.

Days	MNNG alone	MNNG/DFMO
1 day	18.87±5.37	7.54±2.06**
2 day	23.38±2.44	3.97±2.91**
4 day	15.28±3.15	3.65±2.27**
7 day	8.55±1.46	1.42±0.54**
control	7.00±1.21	9.48±1.19

Animals are male Wistar rats, 5-week-old; Number of samples (n=5); Mean ± S.D.: Significantly different from control at **, p<0.01; 2000 ppm DFMO in drinking water; 150mg/kg MNNG/4ml DMSO by gavage

Table 3-8. Effect of MNNG and/or test samples on gastric GSH levels.

Test samples	Percentage of MNNG(-) / basal diet
Oltipraz (H)	126
Oltipraz (L)	137*
PEITC (H)	118
PEITC (L)	121
<i>S. tamariscina</i> (H)	85
<i>S. tamariscina</i> (L)	101
<i>A. sylvestris</i> (H)	103
<i>A. sylvestris</i> (L)	84
Basal diet	110
Basal diet/ (MNNG -)	100

*P < 0.05; H, high dose; L, low does

Table 3-9. Effect of MNNG and/or test samples on hepatic GSH levels.

Test samples	Percentage of MNNG(-) / basal diet
Oltipraz (H)	95
Oltipraz (L)	108
PEITC (H)	102
PEITC (L)	108
<i>S. tamariscina</i> (H)	113
<i>S. tamariscina</i> (L)	117
<i>A. sylvestris</i> (H)	119*
<i>A. sylvestris</i> (L)	108
Basal diet	102
Basal diet/ (MNNG -)	100

*P < 0.05; H, high dose; L, low does

Table 3-10. PCNA-labelling indices for the pyloric epithelia of rats treated with MNNG and/or test samples.

Test samples	PCNA-labeling indices(%)
Oltipraz (H)	14.11 ± 1.89 **
Oltipraz (L)	26.22 ± 2.11
PEITC (H)	19.55 ± 3.72 **
PEITC (L)	25.97 ± 4.24
<i>S. tamariscina</i> (H)	24.26 ± 4.90
<i>S. tamariscina</i> (L)	22.36 ± 4.32 *
<i>A. sylvestris</i> (H)	24.98 ± 5.03
<i>A. sylvestris</i> (L)	23.14 ± 2.67
Basal diet	30.74 ± 6.01
Basal diet/ (MNNG -)	17.53 ± 2.09

H ; high dose, L ; low does. Animals are male Wistar rats, 5-week-old; Number of samples (n=5). Mean ± S.D., Significantly different from control at *; p<0.05, **; p<0.01. 150mg/kg MNNG/4ml DMSO by gavage; Test samples are 800 or 400ppm oltipraz in diet, 1000 or 500ppm phenethyl isothiocyanate(PEITC) in diet, 5% or 1% *Selaginella tamariscina* (ST) in diet, 2.5% or 0.5% *Anthriscus sylvestris* (AS) powder in diet.

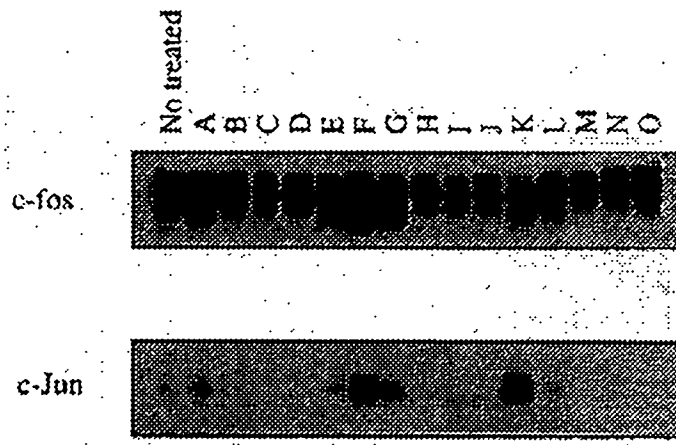


Figure 3-1. Increased level of apoptosis-responsive proteins, c-Jun and c-fos in HcLa cells treated with ethyl acetate extracts of Korean edible wild plants.

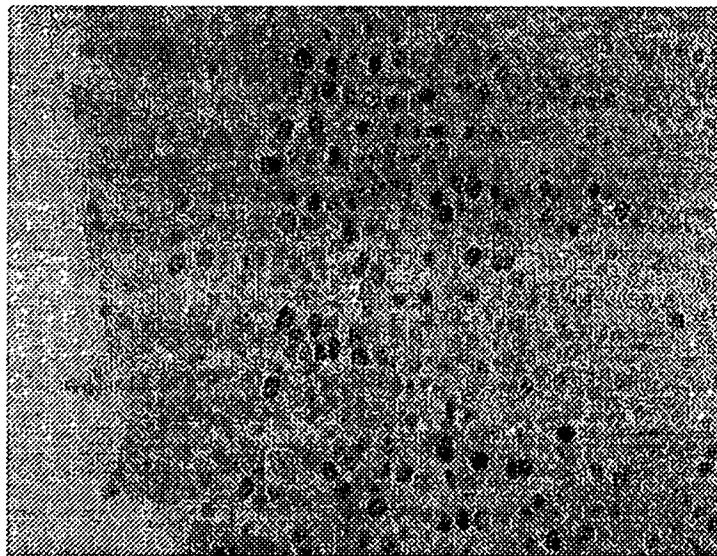


Figure 3-2. Immunohistochemical photomicroscope of PCNA. The picture shows the tissue after MNG where brown spot shows nuclear cellular proliferation.

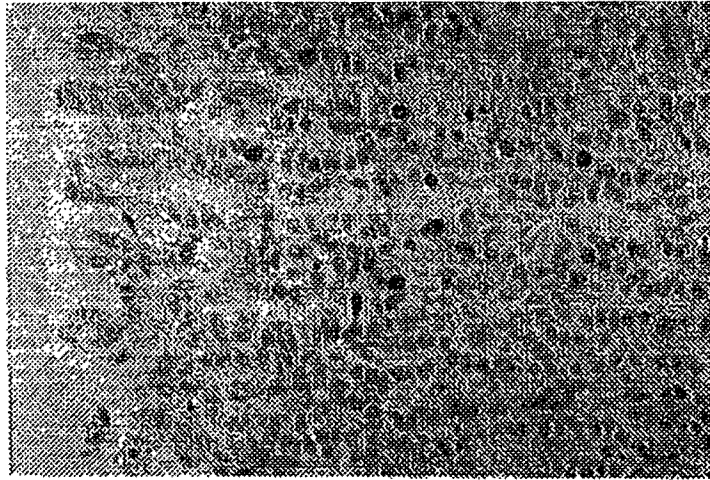


Figure 3-3. Immunohistochemical photomicroscope of PCNA with extract of *Selaginella tamariscina*. The picture shows the tissue after MNNG where brown spot shows reduced nuclear cellular proliferation compared to Figure 6-2.

제 4 절 결론

이상의 연구를 통하여 부처손을 비롯한 몇 가지 식물은 건강식품이나 신약으로 개발될 가능성을 보여주고 있다 따라서 일본 등지의 상품화 여부와 정보를 수집해서 기능성 식품으로 개발하고, 이에 따라 이들 식물을 생산하기 위한 작물화 연구가 필요하다.

그러나 이 연구는 2-3년간의 연구가 지속적으로 필요하다. 이 기간에는 기능성 식품이나 약품으로서의 사용에서 필요한 동물모델의 중·장기 실험을 통하여 기능성 식품으로서 유의성 있는 결과를 얻어야 할 것이며 물질에 대한 독성의 여부나 섭취량을 정하기 위해 동물실험 불가피할 것이다. 또한 이러한 실험에는 동물실험에 필요한 다량의 시료 확보와 시료의 계절에 따른 수급 문제 등의 어려움을 극복하여야 할 것이다.

제 4 장

야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병

예방효과: Cyclooxygenase 활성억제 검색

제 1 절 서설

현재 전세계적으로 사용되고 있는 비스테로이드성 항염제는 소염, 해열 및 진통의 목적으로 가장 많이 사용되고 있는 약제중의 하나이지만 심한 위장장애로 인해 사용에 제한을 받아왔다. 이 때문에 비스테로이드성 항염제의 대표적인 부작용인 위장장애를 해결할 목적으로 위 흡수를 방해하기 위한 *ecotrin caplet^R*의 개발, 주사로 인한 약물의 투여, 간에서 대사된 후 활성화되는 *prodrug*의 개발 혹은 *misoprostol (Cytotec^R)* 같은 *prostaglandin* 유도체의 개발 등이 시도되어져 왔으나 이중 어느 방법도 위와 같은 부작용의 발생빈도를 줄이는데 큰 효과를 거두지 못하고 있다.

본 연구에서는 비스테로이드성 약물의 부작용을 해결하고자 천연물을 이용한 생리활성 검색법으로 활성물질을 검색하고, 활성물질에 대해서는 단일 활성성분을 분리하여 이를 이용한 부작용이 적고 장기 복용에 안전한 소염진통제 개발에 최종 목표를 두고 다음과 같은 기사를 이용한 실험을 하였다.

*Prostaglandin H2 synthase (PGHS)*의 대사물인 *prostaglandin* 류는 탄소수 20개의 *prostanic acid*를 기본구조로 하며 C-8과 C-12사이에 5개의 탄소로 된 고리를 가진 불포화 지방산으로 건선증, 흉막염, 복막염, 관절염, 연골연화등 주로 만성 염증질환에 관여하는 화학전달 물질이며, 또한 천식등의 알러지성 질환에서도 대량 관찰된다. 이러한 *prostaglandin metabolism*의 주효소인 *cyclooxygenase (COX)*의 기질인 *arachidonic acid*가 *prostaglandin G₂*로 변화될때 소모되는 O_2 를 *polarographic measurement assay*를 통하여 *enzyme activity*를 측정함으로써 확보된 식물 분획의 활성을 검색하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 기기 및 시약

본 실험에서 사용한 기기는 Homogenizer (Sorvall omni-mixer), Centrifuge (Sorvall RT 6000 Centrifuge), Ultracentrifuge (Sorvall OTD 65B), Rotary evaporator (Buchi RE 111), Biological oxygen monitor (YSI 5300) 이었다.

2. 시약 및 기타 재료

본 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 유기용매는 동양화학제품을 사용하였다. Cyclooxygenase 추출을 위해 사용한 bovine seminal vesicle은 독산동 도축장에서 직접 구입하여 사용하였다.

3. 자원식물의 확보 및 추출

식물자원을 구매와 직접채집, 그리고 총괄연구책임자 제공에 의하여 확보하였으며, 확보된 식물은 Figure 4-1과 같은 방법에 의하여 3가지 종류 (EtOAc층, Hexane층, Aqueous층)로 분리/추출하여 활성검색을 위한 시료로 사용하였다.

4. Cyclooxygenase purification

정제에 사용한 시약은 다음과 같다. Buffer I [0.05M Tris-HCl, 5mM EDTA2Na, 5mM diethyldithiocarbamate (DDC)], Buffer II (0.05M Tris-HCl, 0.1M sodium perchlorate, 1mM EDTA2Na, 0.1mM diethyldithiocarbamate (DDC), Buffer III (0.05M Tris-HCl, 0.1mM EDTA2Na, Tween 20). 모든 완충액은 pH를 8.0으로 하였다.

구입한 bovine seminal vesicles에서 connective tissue와 fat을 제거한 후 중량을 측정하였다. 중량의 2~3배정도의 Buffer I을 넣고 homogenizer를 이용하여 30초간 6회 균질화한 후 13,000 rpm으로 30분간 2회 원심분리하였다. Pellet을 제거하고 상정액은 53,000 rpm으로 45분간 원심분리하고 모은 pellet을 균질화한 후 pellet량의 2~3배가 되도록 Buffer II를 넣고 다시 53,000 rpm으로 45분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상정액은 제거하고 pellet만을 균질화한 후 pellet량의 0.5배가 되

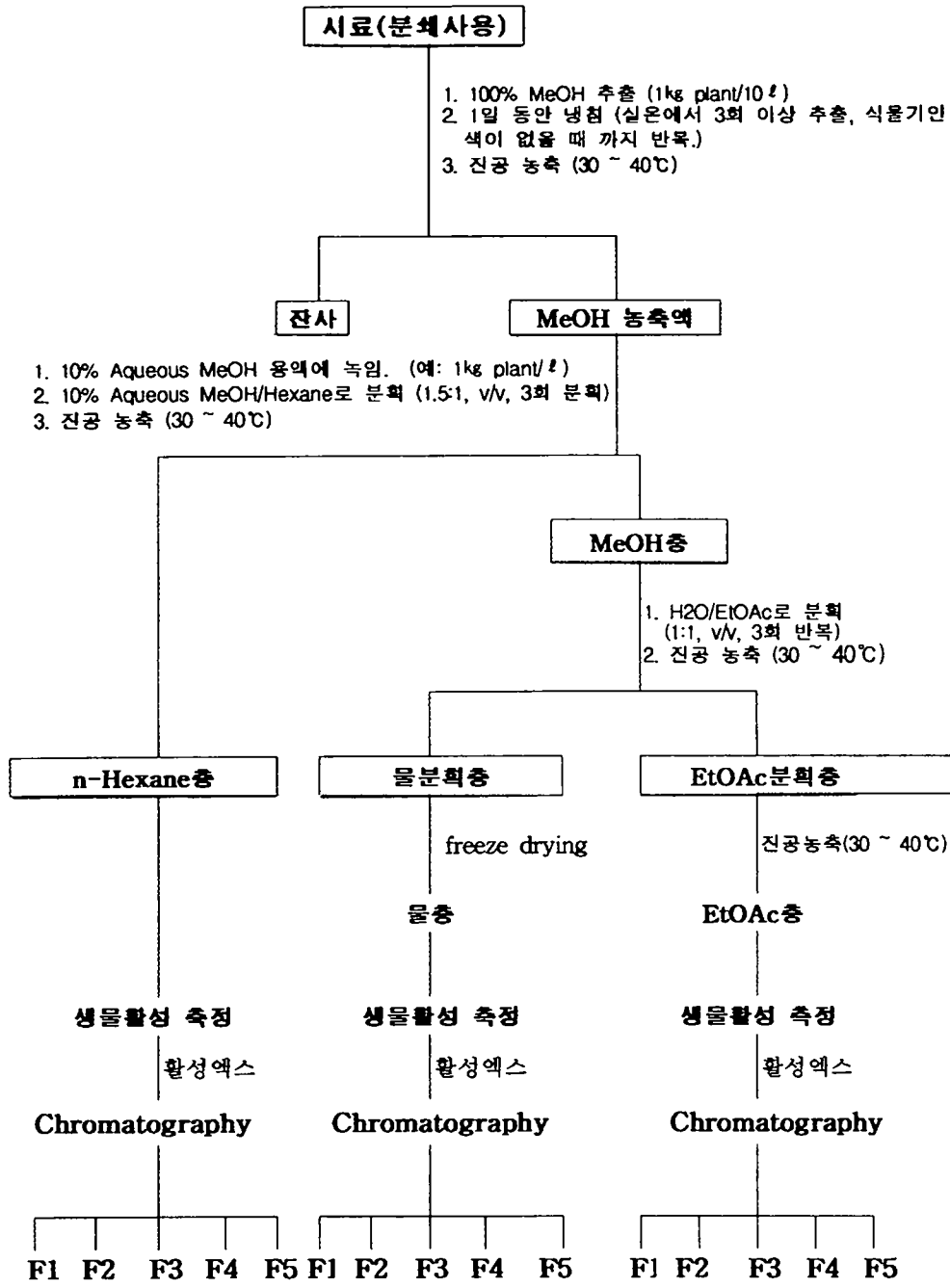


Figure 4-1. Procedure for extraction and fractionation of plants materials.

도록 Buffer III를 넣고 53,000 rpm으로 60분간 원심분리하였다. 이 때 모아진 pellet이 cyclooxygenase이므로 여기에 30%의 glycerol을 첨가하여 microcentrifuge tube에 일정량 씩 분주한 후 -80℃에 보관하여 사용하였다.

5. Cyclooxygenase 활성억제검색

Prostaglandin metabolism의 주요소인 cyclooxygenase의 기질인 arachidonic acid가 prostaglandin G₂로 변화될때 소모되는 O₂를 polarographic measurement assay를 통하여 효소활성을 측정함으로써 식물 분획에 대한 활성을 검색하였다. 검색방법은 Standard bath stirrer assembly의 온도를 37℃로 맞춘다음 3 μM hematin, 0.4 mM hydroquinone, 0.3mM arachidonic acid를 포함한 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 반응액을 incubation cell 에 넣고 oxygen monitor를 안정화한 다음 효소액 20 μl (2.5 mg/ml)를 첨가하면서 반응을 시작하였다. O₂ 소모는 oxygen monitor를 이용하여 측정하였다. 실험에 사용한 cyclooxygenase는 bovine seminal vesicle에서 추출하였으며, cyclooxygenase의 저해효과는 DMSO의 값을 control로 보고 % of control을 이용하여 IC₅₀으로 나타내었다.

6. 활성성분의 분리

Cyclooxygenase 활성억제 효과가 확인된 시료의 활성성분 분리를 위해서 silica gel column chromatography법을 실시하여 각각의 시료에 대한 sub-fraction을 얻었고 단일 활성물질에 대해서는 IR/MS/NMR 등을 이용한 구조분석을 통하여 활성 물질을 밝힐 예정이다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 자원식물의 확보 및 추출

현재 총 150종의 식물자원을 구입 및 채집에 의하여 확보하였으며, 이들 확보된 자원식물을 활성인자 검색 시료에 적합하도록 메탄을 냉침법을 이용하여 3종류 (Figure 4-1; EtOAc층, Hexane층, Aqueous층)로 분리/추출하여 활성검색을 위한 시료로 사용하였다.

2. Cyclooxygenase 활성억제검색

추출 및 분획된 시료 150종에 대한 cyclooxygenase 활성억제 효과 검색을 완료하였으며, 검색한 결과 S0011E (IC₅₀, 125.2 µg/ml), S0018H (IC₅₀, 104.6 µg/ml), M0006E (IC₅₀, 25.95 µg/ml), M0016A (IC₅₀, 104.6 µg/ml), M0021E (IC₅₀, 27.16 µg/ml), M0025E (IC₅₀, 95 µg/ml), C0012E (IC₅₀, 49.8 µg/ml), C0025E (IC₅₀, 10.98 µg/ml) 등 8종류의 분획에서 활성이 확인되었다 (Table 4-1).

3. Cyclooxygenase 활성억제 성분의 분리

Cyclooxygenase 활성억제 효과가 확인된 시료 중 상대적으로 활성이 우수한 M0006E, C0012E, C0025E 시료의 활성 성분의 분리를 위해서 silica gel column chromatography법을 이용하여 각각 6개, 12개, 5개의 sub-fraction을 얻었으며, 이들 sub-fraction에서 계속 활성물질을 분리 중에 있다.

Figure 4-2는 M0006E 시료와 sub-fraction인 M0006E-F04 시료가 cyclooxygenase 활성을 농도 의존적으로 억제함을 나타내고 있으며, Figure 4-3과 Figure 4-4는 C0012E 시료와 C0012E-F07 시료, C0025E 시료와 C0025E-F03 시료가 Figure 4-5는 M0021E의 시료가 cyclooxygenase 활성억제를 나타내고 있다. M0006E, C0012E, C0025E 시료에 대한 sub-fraction들의 cyclooxygenase 활성억제 검색 결과는 Table 4-2, 4-3, 4-4와 같다. 또한 M0021E 시료에 대해서는 sub-fraction을 진행 중에 있다.

4. 연구결과 집계

항 목	식물 자원수	분획수
식물자원확보	150종	409분획
활성 검색	150종	409분획
활성 확인된 시료	8종	8분획
sub-fraction 분리	3종	23분획
sub-fraction 분리중	1종	

Table 4-1. Effects of plant extracts on cyclooxygenase activity.

Plant Code	IC ₅₀ (µg/ml)	Plant Code	IC ₅₀ (µg/ml)	Plant Code	IC ₅₀ (µg/ml)
SU001H	>100	SU026A-2	>100	S0012E	>100
E	>100	SU027H	>100	A	>100
SU002H	>100	SU028H	>100	S0013E	>100
E	>100	E	>100	A	>100
SU003H	>100	SU029H	>100	S0014H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
SU004H	>100	SU030H	>100	A	>100
E	>100	E	>100	S0015H	>100
SU005H	>100	SU031H	>100	E	>100
E	>100	E	>100	A	>100
SU006H	>100	SU032E	>100	S0016H	>100
E	>100	SU033A	>100	E	>100
SU007H	>100	SU034A	>100	A	>100
E	>100	SU035E	>100	S0017H	>100
SU008H	>100	SU036A	>100	E	>100
E	>100	S0001H	>100	A	>100
SU009H	>100	E	>100	S0018H	>100
E	>100	A	>100	E	104.6
SU010H	>100	S0002H	>100	A	>100
E	>100	E	>100	S0019H	>100
SU011H	>100	A	>100	E	>100
E	>100	S0003H	>100	A	>100
SU012H	>100	E	>100	S0020H	>100
E	>100	A	>100	E	>100
SU014H	>100	S0004H	>100	A	>100
E	>100	E	>100	S0021H	>100
SU015H	>100	A	>100	E	>100
E	>100	S0005H	>100	A	>100
SU016H	>100	E	>100	S0022H	>100
E	>100	A	>100	E	>100
SU017H	>100	S0006H	>100	A	>100
E	>100	E	>100	S0023H	>100
SU018H	>100	A	>100	E	>100
E-1	>100	S0007H	>100	A	>100
E-2	>100	E	>100	S0024H	>100
SU019H	>100	A	>100	E	>100
E	>100	S0008H	>100	A	>100
SU020H	>100	E	>100	S0025H	>100
E	>100	A	>100	E	>100
SU021H	>100	S0009H	>100	A	>100
E-1	>100	E	>100	S0026H	>100
E-2	>100	A	>100	E	>100
SU022A	>100	S0010H	>100	A	>100
SU023H	>100	E	>100	S0027H	>100
E	>100	A	>100	E	>100
SU024H	>100	S0011H	>100	A	>100
E	>100	E	>100	S0028H	>100
SU025A	>100	A	125.2	E	>100
SU026A-1	>100	S0012H	>100	A	>100

Table 4-1. Continued

Plant Code	IC ₅₀ (µg/ml)	Plant Code	IC ₅₀ (µg/ml)	Plant Code	IC ₅₀ (µg/ml)
S0029H	>100	S0045H	>100	M0006H	>100
E	>100	E	>100	E	25.95
A	>100	A	>100	A	>100
S0030H	>100	S0046H	>100	M0007H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0031H	>100	S0047H	>100	M0008H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0032H	>100	S0048H	>100	M0009H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0033H	>100	S0049H	>100	M0010H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0034H	>100	S0050H	>100	M0011H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0035H	>100	S0051H	>100	M0012H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0036H	>100	S0052H	>100	M0013H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0037H	>100	S0053H	>100	M0014H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0038H	>100	S0054H	>100	M0015H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0039H	>100	S0055H	>100	M0016H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	104.6
S0040H	>100	M0001H	>100	M0017H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0041H	>100	M0002H	>100	M0018H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0042H	>100	M0003H	>100	M0019H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0043H	>100	M0004H	>100	M0020H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
S0044H	>100	M0005H	>100	M0021H	>100
E	>100	E	>100	E	27.16
A	>100	A	>100	A	>100

Table 4-1. Continued

Plant Code	IC ₅₀ (μg/ml)	Plant Code	IC ₅₀ (μg/ml)	Plant Code	IC ₅₀ (μg/ml)
M0022H	>100	C0013H	>100	C0029H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
M0023H	>100	C0014H	>100	C0030H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
M0024H	>100	C0015H	>100	C0031H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
M0025H	>100	C0016H	>100	C0032H	>100
E	95.0	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
C0001H	>100	C0017H	>100	C0033H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
C0002H	>100	C0018H	>100	C0034H	>100
E	>100	E	49.8	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
C0003H	>100	C0019H	>100	C0035H	>100
E	>100	E	>100	E	>100
A	>100	A	>100	A	>100
C0004H	>100	C0020H	>100		
E	>100	E	>100		
A	>100	A	>100		
C0005H	>100	C0021H	>100		
E	>100	E	>100		
A	>100	A	>100		
C0006H	>100	C0022H	>100		
E	>100	E	>100		
A	>100	A	>100		
C0007H	>100	C0023H	>100		
E	>100	E	>100		
A	>100	A	>100		
C0008H	>100	C0024H	>100		
E	>100	E	>100		
A	>100	A	>100		
C0009H	>100	C0025H	>100		
E	>100	E	10.98		
A	>100	A	>100		
C0010H	>100	C0026H	>100		
E	>100	E	>100		
A	>100	A	>100		
C0011H	>100	C0027H	>100		
E	>100	E	>100		
A	>100	A	>100		
C0012H	>100	C0028H	>100		
E	49.8	E	>100		
A	>100	A	>100		

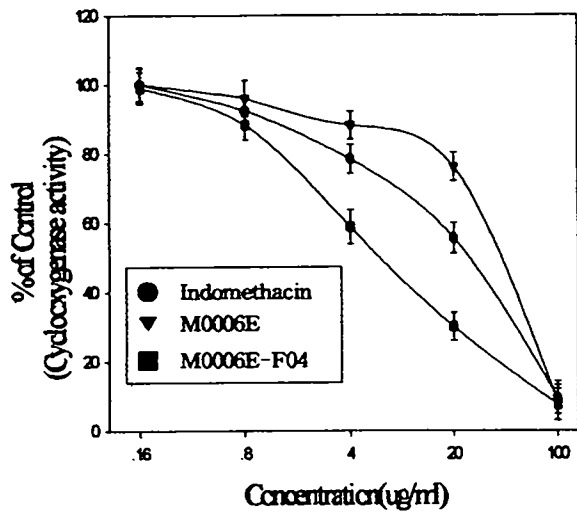


Figure 4-2. Inhibitory effects of M0006E and -F04 on cyclooxygenase activity.

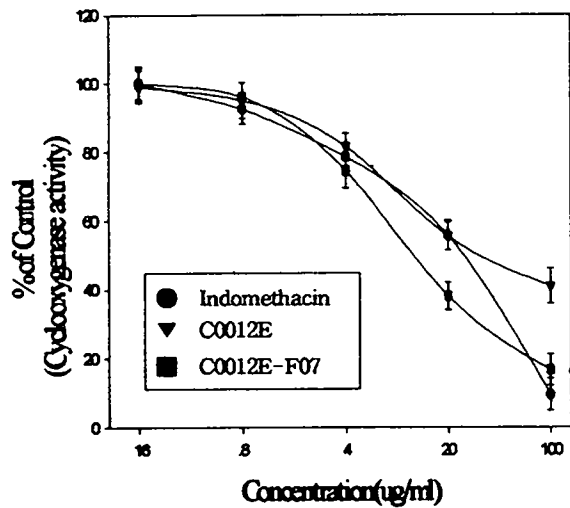


Figure 4-3. Inhibitory effects of C0012E and -F07 on cyclooxygenase activity

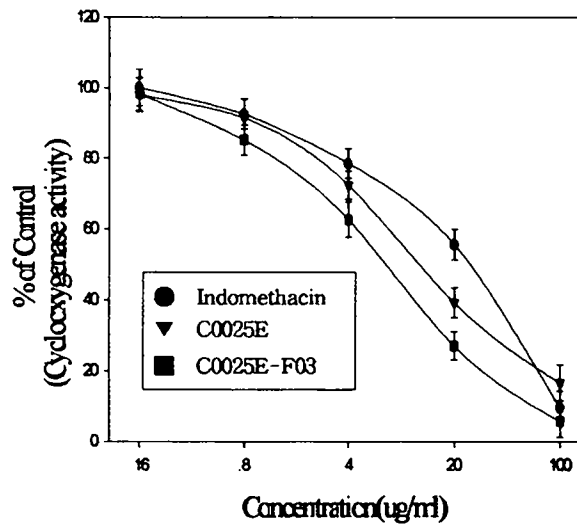


Figure 4-4. Inhibitory effects of C0025E and C0025E-F03 on cyclooxygenase activity

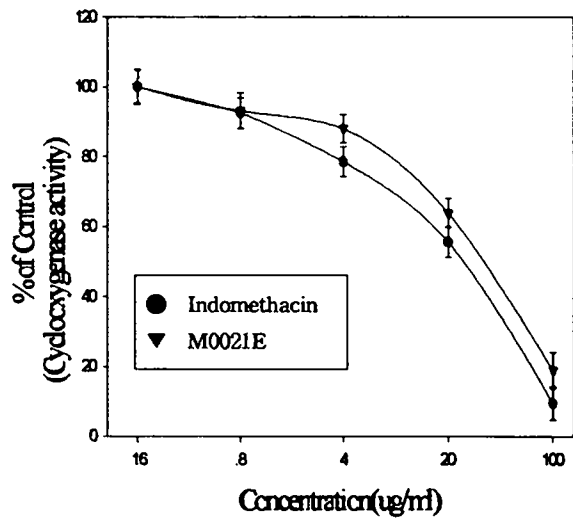


Figure 4-5. Inhibitory effects of M0021E on cyclooxygenase activity.

Table 4-2. Inhibitory effects of subfractions of M0006E on cyclooxygenase activity

Fraction	Inhibition of cyclooxygenase activity	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
M0006E	25.95	
M0006E-F01	>100	
M0006E-F02	>100	
M0006E-F03	15.0	
M0006E-F04	6.26	
M0006E-F05	30.0	
M0006E-F06	77.7	

Table 4-3. Inhibitory effects of subfractions of C0012E on cyclooxygenase activity.

Fraction	Inhibition of cyclooxygenase activity	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
C0012E	49.8	
C0012E-F01	>100	
C0012E-F02	>100	
C0012E-F03	>100	
C0012E-F04	>100	
C0012E-F05	38.2	
C0012E-F06	38.2	
C0012E-F07	11.8	
C0012E-F08	47.7	
C0012E-F09	>100	
C0012E-F10	>100	
C0012E-F11	>100	
C0012E-F12	>100	

Table 4-4. Inhibitory effects of subfractions of C0025E on cyclooxygenase activity

Fraction	Inhibition of cyclooxygenase activity	
	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
C0025E	10.98	
C0025E-F01	>100	
C0025E-F02	>100	
C0025E-F03	5.8	
C0025E-F04	37.7	
C0025E-F05	52.6	

제 4 절 결론

우리나라 야생 식물자원은 약 3,200종이 알려져 있지만 이중 일부만이 식용 및 약용으로 이용되고 있는 실정으로 이용되고 있지 않는 식물자원에 대해서는 약리 성분 등이 아직 규명되지 않은 실정이라고 할 수 있다. 이러한 관계로 향후 잘 알려져 있지 않은 식물자원에 대한 본격적인 탐구 및 검색이 이루어져야 할 것이다.

따라서 본 연구는 야생으로 자생하는 식용 및 약용식물들을 구입 및 채집하여 국내 식물자원으로써 확보를 하고, 이들을 *mechanism-based screening* 방법인 *cyclooxygenase assay*를 이용한 *in vitro* 방법으로 *prostaglandin metabolism*의 주효소인 *cyclooxygenase*를 이용하여 *cyclooxygenase* 활성억제 효과를 검색하고, 활성물질에 대해서는 단일 활성성분을 분리하고 이를 이용하여 부작용이 없는 소염제를 개발하는데 이용할 수 있도록 지속적인 연구가 필요하겠다.

제 5 장

야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병

예방효과 - 항응고 활성 및 세포증식 작용에 미치는 영향

제 1 절 서 설

야생 식용 및 약용식물에서 순환계질환을 예방 및 치료할 수 있는 인자를 검색하고, 식용식물을 중심으로 활성이 우수한 식물자원을 작물화하며 이 작물을 건강식품으로 이용하고 의약품 원료로서 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 기기

총 50여종이상의 식용식물을 구입하거나 채집하였다. 산지와 채취시기를 고려하여 같은 식물이라도 중복 수집하였다. 응고시간의 측정은 Beckton-Dickenson의 fibrometer를 이용하였다. Microplate reader는 미국 Molecular Device 제품을 사용하였다.

2. 수수 물 추출물의 제조

수수 (*Sorghum bichlor*)의 물 추출물 분획에서 용량에 따른 항응고 활성이 증가함을 관찰하였다. 이러한 점에 착안하여 수수 20g을 methanol에 냉침하여 우선 유기용매에 녹는 성분을 제거하였다. 다음 잔사를 건조시킨 후 물에 냉침시켜 추출하였다. 물추출액을 동결 건조시켜서 연한 흰색의 물질 11.5 g을 얻을 수 있었다. 이러한 추출물 (1 g)을 물 200 ml의 물에 용해시켜 원심분리 후 상침액에 대하여 ultrafiltration을 이용하여 분자량을 3,000 이상과 3,000 이하로 나누었다.

이것을 시료로 사용하였다.

3. aPTT test 및 Thrombin time (TT) test

혈장 100 μl 와 시료 50 μl 을 잘 섞어 이 중 100 μl 를 취하여 정확히 1 분간 incubation한 후 미리 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 가온한 aPTT reagent를 100 μl 를 넣고 다시 정확히 3 분간 incubation하고 0.03 M 염화칼슘 100 μl 을 취하여 넣은 후 Fibrometer를 이용하여 clotting time을 측정하였다. TT test는 thrombin과 시료를 1:1로 잘 섞은 후 정확히 2 분간 incubation한(1) 후 1% fibrinogen 용액 (0.2 M Borate buffer) 250 μl 을 정확히 3 분간 incubation한(2) 후 (1)을 50 μl 을 취하여 (2)에 넣고 clotting time을 측정. 시료중 물층은 5% DMSO에 용해하였으며, ethyl acetate층은 100% DMSO에 용해하여 사용하였다. 또한, 위의 두 분획과 분자량이 3,000 이상인 분획에 대하여 O-sulfation을 시킨 후 aPTT, thrombin time, ATIII의존성 thrombin 저해 활성을 측정하였다.

4. 비장세포에 대한 영향

96 well multiplate에 세포를 RPMI 1640 배지를 이용하여 $1.0 \times 10^5/\text{well}/100\mu\text{l}$ 로 깔아주고 시료를 final 농도가 0.1mg/ml, 0.01mg/ml로 넣어주었다. 다음 ConA 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LPS가 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 각각 넣어준 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 에서 72 시간 배양하였다. Brdu labeling reagent를 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ 넣고 10시간 더 incubation 한 후 흡광도를 Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 읽었다. 마찬가지로 SCC13 (squamous cell carcinoma) cell을 96 well에 5,000 cell/well/200ul 농도로 깔고 5일 간 배양한 후 시료를 넣고 다시 24시간 배양한 후 Brdu kit로 assay 하였다. 각 시료는 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.004 mg/ml의 4 농도로 각 농도는 3 반복 처리하였다. ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 박층크로마토그래피를 이용한 당조성 분석

2~5mg 의 시료를 2N CF_3COOH 에 녹이고 질소 가스를 충전한 후 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 가스분해한 후 원심분리후에 침전을 제거하고 상층액을 모아 감압하에 날려보냈다. 건조 잔사를 증류수 500 μl 에 녹여서 박층 크로마토그래피를 실

시하였다. MeCN:ethyl acetate:1-PrOH:물 = 85:20:20:15로 포화시킨 챔버내에서 실시하였다. 약 1시간 전개시켜 플레이트를 공기 중에서 말린 후 다시 한 번 반복하여 처리한 후 아닐린-프탈레이트 용액으로 분무시켜 100℃에서 10분간 가온하여 나타나는 반점을 표준품과 비교하여 확인하였다.

6. 고속 액체크로마토그래피를 이용한 당 조성분석.

수 마이크로그램의 시료를 6N 염산의 100 μ l에 녹여 6시간 동안 98℃에서 가열하고 또한 같은 양의 시료를 2.5N CF₃COOH에 녹여 2.5시간 동안 가열하여 분해하였다. 아미노 당은 0.45 μ m 막을 통과시킨 후 고속 액체크로마토그래프에서 분석하였다. 중성당은 Sep-Pak Light Accel Plus (QMA+CM) 을 통과시킨 후의 액체를 분석하였다. 칼럼은 TSK gel SCX (4.6 mm \times 150 mm) 와 Shodex Sugar SP0810 (8.0 mm \times 300 mm)을 이용하여 각각 분리하였다. 칼럼을 통과하여 나온 용출액을 1% 2-cyanoacetamide와 반응시켜 형광검출기를 이용하여 여기 파장 331 nm, 방출 파장 383 nm에서 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

약 50종의 야생 식물 및 약초로부터 트롬빈 저해제 시험으로서 농도를 변화시키면서 얻은 결과를 Table 5-1, -2, -3에 제시하였다. 결과로부터 가장 활성이 높은 것은 5E와 13A 및 13E로서 비교적 농도 의존적으로 트롬빈 저해 작용이 나타났다. 5는 취나물 종류이고 13A와 E는 시금치의 물 추출물과 EtOAc 추출물이었다. 그러나, 대조군으로 사용한 헤파린에 비해서 워낙 활성이 낮아 물질 분석을 더 이상 시도하지 않았다. 위의 결과와 별도로 곡류중 물 추출물로서 이용할 수 있는 것으로 수수 시료를 선택하였다.

물추출물 1 g을 ultrafiltration을 이용하여 나누었을 때 분자량 3,000이하와 3,000이상의 분획으로 나누었다. 이 때 얻은 양은 무게비로 3,000이하가 41%이고 3,000이상이 50%이었다. 산성당은 정량하였지만 거의 무시할 수 있는 양이었고 또한 Agarose gel에서도 거의 염색이 되지 않았다. 이러한 점은 수수의 물 추출물의 당이 산성당으로 구성되어 있거나 또는 다른 산성기가 치환되지 않았음

을 보여주고 있다. 당조성물 분석에서 TLC나 HPLC 모두로 glucose만이 검출되어 glucose로 이루어진 glucan으로 볼 수 있다 (Fig. 5-1 and -2). 그러므로 전분과 유사하다고 할 수 있다. 그러나, 일단 sulfation하면 약 분자량의 범위가 광범위하게 퍼져 있음을 알 수 있었다. Sulfation하였을 때 Azure A에 의한 염색이 뚜렷한 점으로서 -OH기에 sulfate기가 치환되어 있음을 증명할 수 있었다. 이러한 물질에 대하여 항응고 작용과 세포증식에 대한 영향을 검토하였다. 항응고작용은 aPTT, thrombin time 및 antithrombin III (ATIII) 의존성 thrombin 저해 측정방법을 이용하였다. 항응고작용에 대한 결과를 Table 5-4에 정리하였다. 물 추출물의 분획은 활성에 거의 영향을 주지 않았지만 sulfation 후에 활성이 증가하는 것으로 sulfate기가 항응고 활성에 영향을 미칠 수 있다는 것을 제시하고 있다. 이것은 heparin의 glucosamine 내에 있는 3-O-sulfate기가 ATIII와 특이적으로 작용하여 활성을 보이는 점에 비추어 이와 유사하거나 또는 제2의 heparin cofactor인 heparin cofactor II와 결합하여 thrombin 저해작용을 보일 수 있다고 보인다.

면역 조절에 대한 영향을 관찰하기 위하여 Balb/c 생쥐 비장 세포를 사용하였다. Fig. 5-3에서 나타난 결과에서 수수 물 추출물 황산화 유도체가 0.1 mg/ml 농도에서 lipopolysaccharide (LPS) 자극물질을 넣어준 (2 μ g/ml) 그룹에서 Blank에 비하여 어느 정도의 증식을 보였으며 통계학적으로 유의적이었다 ($P < 0.05$). 이러한 점은 수수 추출물 황산화 유도체가 B 세포 증식과 항체 생성 능력에 대해 작용할 것으로 기대된다.

세포증식에 대한 영향으로서 사용한 세포주는 피부암 세포주의 일종이다. Figure 5-4에서 나타낸 결과에서 heparin이나 수수 물 추출물의 분자량 3,000이상 분획의 높은 농도 (0.5 mg/ml)에서는 세포 증식에 저해작용을 보여주고 있지만 0.1 mg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 약 2배에서 3배 정도의 증가를 보여주고 있다. 이러한 점은 세포증식에 필요한 성장인자 (growth factor)와 관련이 있는 것처럼 보인다. 이러한 성장인자의 대표적인 것으로는 acidic fibroblast growth factor와 basic fibroblast growth factor가 보고되고 있는데 앞으로 sulfate기가 치환된 당과의 활성도 같이 비교를 하게 되면 sulfate의 영향도 같이 검토할 수 있을 것이다.

Table 5-1. Thrombin time assay using the plant extracts

Sample ID*	Thrombin Time (Sec)				Remarks
	Concentration (mg/ml)				
	1	3	5	10	
Cont.	34.4	49.2	78.7	143.6	
1E	44.8	56.7	57.2	213.9	
4E	44.8	52.7	52.9	155.0	
5E	45.9	67.9	107.0	311.4	most active
8E	44.4	63.9	91.3	145.0	
11E	47.9	56.4	60.4	218.3	
Cont.	29.8	30.2	37.9	35.3	
1A	45.5	33.9	42.3	36.6	
4A	35.8	34.4	41.2	34.5	
5A	31.9	35.9	38.8	58.4	
8A	33.4	27.4	44.4	45.1	
11A	39.3	48.9	44.2	141.0	

*E; Dissolved in 100 DMSO at 10mg/ml, and diluted with water to the specified concentration. A; Dissolved in 5 DMSO at 10mg/ml, and diluted with water to the specified concentration.

Table 5-2. Determination of aPTT and TT at 1 mg/ml of various plant extracts.

aPTT Assay (1mg/ml)				Thrombin time Assay (1mg/ml)			
S0002A	76.4	S0002E	91.8	S0002A	45.5	S0002E	45.4
S0003A	70.9	S0003E	67.8	S0003A	46.3	S0003E	47.4
S0006A	72.8	S0006E	82.9	S0006A	47.3	S0006E	46.4
S0007A	62.8	S0007E	70.4	S0007A	50.4	S0007E	46.9
S0009A	64.9	S0009E	79.9	S0009A	48.9	S0009E	46.8
S0010A	70.9	S0010E	82.3	S0010A	49.4	S0010E	48.4
S0012A	70.9	S0012E	85.4	S0012A	50.8	S0012E	49.3
S0013A	400	S0013E	83.8	S0013A	50.8	S0013E	53.9
S0014A	67.1	S0014E	70.4	S0014A	51.9	S0014E	51.3
S0015A	61.8	S0015E	68.9	S0015A	49.9	S0015E	45.8
S0016A	69.8	S0016E	71.4	S0016A	52.4	S0016E	47.3
S0018A	71.4	S0018E	77.3	S0018A	44.8	S0018E	47.3
S0001A	64.4	S0001E	96.5	S0001A	45.5	S0001E	44.8
S0004A	62.3	S0004E	84.4	S0004A	35.8	S0004E	44.8
S0005A	61.4	S0005E	104.4	S0005A	31.9	S0005E	45.9
S0008A	57.9	S0008E	83.4	S0008A	33.4	S0008E	44.4
S0011A	73.4	S0011E	79.4	S0011A	39.3	S0011E	47.9

Table 5-2. Continued.

S0013A; EC ₅₀ = 44.95 µg/ml				
S0013E; IC ₅₀ = 7.49 µg/ml				
TT	1mg/ml	3mg/ml	5mg/ml	10mg/ml
S0013E	53.9	146.4	276.9	>400

Table 5-3. Thrombin Inhibition assay.

	Original extract ^{a)} (10mg/ml)	Diluted (1:5) (2 mg/ml)	Diluted (1:10) (0.1 mg/ml)	1:50 (0.02 mg/ml)
시금치 (H)	383.8	96.3	76.9	55.8
고들빼기 (H)	286.2	81.4	68.9	60.0
질경이 (H)	250.8	67.4	72.4	57.4
명이 (H)	231.9	76.8	70.9	70.3
대조군	146.9	63.4	77.0	49.9

^{a)}Original Extract: As DMSO solution.

Table 5-4. Anticoagulant activity of water extracts from *Sorghum blocher*

Activity Compounds	APTT (units/mg) ¹⁾	Thrombin Time (sec) per 1 mg/ml of samples	ATIII mediated thrombin inhibition (units/mg) ²⁾
<i>S. blocher</i> <3,000	3	39.97	12
<i>S. blocher</i> >3,000	3	38.97	11
Sulfated compound	44	257.3	117
Heparin	150	77.97	150

^{1), 2)} The activity was expressed as units/mg compared to heparin.

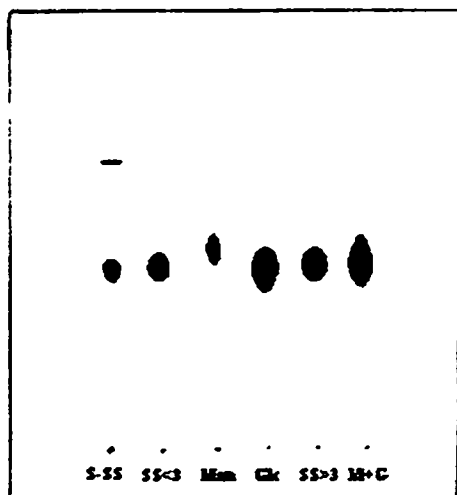


Figure 5-1. Compositional sugar analysis of the hydrolysate of water extracts from *Sorghum bicolor* by TLC method. S-SS, Sulfonated water extract; SS<3, Water extract with molecular weight below 3,000; SS>3, Water extract with molecular weight above 3,000; Man, Mannose; Glc, Glucose; M+G, Mannose + Glucose.

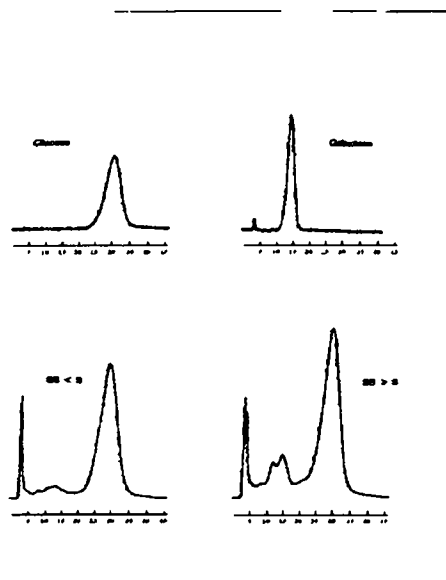


Figure 5-2. HPLC analysis of neutral sugars in the hydrolysate of water extracts from *Sorghum bicolor* after postcolumn derivatization

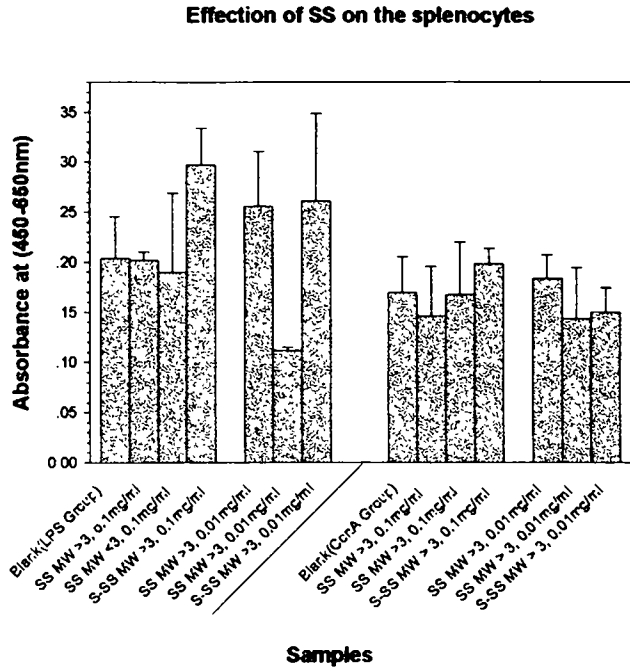


Figure 5-3. Effects on splenocyte of water extracts from *Sorghum bicolor*.

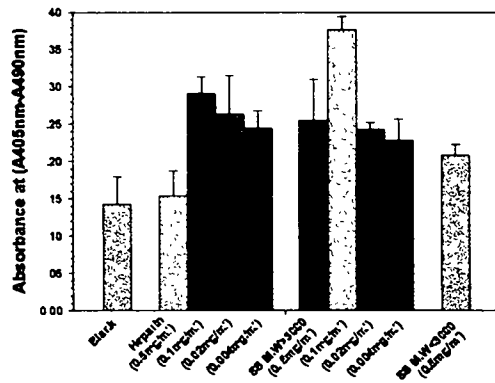


Figure 5-4. Effects on cell proliferation of water extracts from *Sorghum bicolor*.

제 4 절 결론

약 50종 이상의 식용 식물과 야생 식물로부터 유기 용매와 수용액을 이용한 추출액을 제조하여 트롬빈 저해 작용을 수행하였다. 대부분의 시료에서 거의 두드러진 활성을 관찰할 수가 없었다. 이에 곡류 중 수수를 선택하여 물 추출물을 제조하여 분자량에 따라 나누었다. 나눈 시료에 대해서 당 분석을 하였을 때 전적으로 *glucose*로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 다당류에 대하여 *O-sulfonation*을 시켰을 때 항응고 작용이 증가됨을 관찰할 수 있었고 또한 세포 성장에도 영향을 줄 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 *sulfonation*이 이루어진 다당류에 대하여 항바이러스 효과나 면역조절작용에 대한 연구의 가치가 있다고 사료된다.

제 6 장

야생 식용 및 약용 식물의 성인병 및 난치병

예방효과: 조직인자 저해 활성 인자 검색

제 1 절 서설

식용채소로부터 조직인자 저해제를 찾고자 조직인자 저해작용을 검색한 바 저해작용이 우수한 시료에서 그 저해성분을 분리하여 확인하고 건강식품이나 의약품 원료로 이용 가능성을 연구하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 조직인자 저해작용 검색

본 실험에서 사용한 기기는 다음과 같다. Homogenizer, Sorvall omni-mixer/Eyela DC-stirrer, Centrifuge, Sorvall RT 6000 Centrifuge (rotor: H 1000B); Ultracentrifuge, Sorvall OTD 65B (rotor: T 865); Rotary evaporator, Buchi RE 111; UV/Visible spectrophotometer, Philips PU 8625.

2. 시료 추출

총 147종의 시료에 대해 조직인자 저해작용을 검색하였으며 검색을 위한 시료는 슈퍼마켓에서 구입하여 추출에 이용하였다. 생 식물은 각각 20g 씩 취하여 유발에서 마쇄한 뒤 200ml의 MeOH를 가하여 2주일 이상 냉침 하였다. 건조 식물은 10g을 취하여 잘게 자른 뒤 250ml 의 80% MeOH을 가하고 2주일 이상 냉침 하고, Buchner funnel 에 여지로 여과하여 여액을 rotary evaporator로 완전 농

측 하였다.

추출물 중 엽록소가 적은 것은 20ml 의 50% EtOH을 가하여 잘 녹인 후 검색에 사용하였고, 엽록소가 많은 것은 20ml의 50% EtOH을 가하여 섞은 후 동량의 hexane 으로 추출한 후 50% EtOH 층 만을 검색에 사용하였다.

3. 조직인자 (Tissue Factor) 의 분리

Sprague-Dawley rat (흰쥐) 수컷의 폐 조직 5 g에 20 ml 의 0.15 M NaCl 용액 (saline solution) 을 가하고 ice bath 속에서 2 분간 glass-Teflon homogenizer로 마쇄하였다. 조직 마쇄액을 2000 rpm, 4°C 에서 20분간 원심분리하여 상정액을 다시 ultracentrifuge 로 31,000 rpm (105,000 x g), 4°C 에서 1시간 초원심 분리하고, 침전부분을 초원심 분리한 후의 상정액과 같은 부피의 saline 용액으로 homogenize (glass-teflon) 하여 이것을 tissue factor (TF) stock solution으로 사용하였다. 이때 TF의 회수율을 측정하기 위하여 2,000 rpm 상정액 (S₁), 31,000 rpm 침전용액 (ppt₂), 그 상정액 (S₂)을 각각 조금씩 시료로 취하여 TF activity와 단백질을 정량하였다.

4. 조직인자 활성 측정

혈장: 흰쥐를 ethyl ether로 마취한 후 3.13 % sodium citrate 1 ml 를 미리 넣어둔 주사기로 심장에서 혈액을 채취하여 10 ml 되도록 하였다. 채취한 혈액을 플라스틱 시험관에 옮겨 2,500 rpm 에서 15분간 원심분리한 후 상층의 혈장 (citrated plasma) 부분만을 조심스럽게 취하여 플라스틱 시험관에 옮겼다.

One-Stage clotting assay: Citrated plasma를 사용하여 prothrombin time을 측정하여 TF 의 활성을 평가하였다. 플라스틱 시험관을 37°C 수욕에 담가두고 plasma 100 μ l, TF stock을 saline 용액으로 희석한 것 100 μ l (saline 만 100 μ l 넣은 것을 Blank로 함)를 가하고 25 mM CaCl₂ 100 μ l를 넣고 섞은후 시험관을 수욕에서 꺼내 가만히 기울여보고 다시 담그고 하면서 CaCl₂를 첨가한 후 부터 응고할 때까지의 시간 (prothrombin time)을 재었으며 모두 2회 반복 실시하였다.

표준곡선: 5회에 걸쳐 흰쥐 25마리의 폐의 TF를 조제하고 이것을 여러 농도로 희석하여 흰쥐 9 마리에서 얻은 혈장에 대하여 one-stage clotting assay 를 실

시하였다. 혈장 응고시간이 18초가 될 때를 100 % TF activity 로 정하고, TF를 넣지 않고 saline 만 넣은 혈장의 응고시간을 0 % activity 로 하여 각 농도에 따른 clotting acceleration % 를 다음 Eq. 1 에 의해 계산하였다.

$$\text{clotting acceleration (\%)} = \frac{\text{BL-A}}{\text{BL-18}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

여기에서 BL은 TF를 넣지않고 saline만 넣었을 때의 prothrombin time, A 는 TF를 넣었을 때의 prothrombin time이다. 농도를 log scale로 x 축에, clotting acceleration %를 y 축에 표시하여 standard curve를 그렸으며 이 graph에서 50 % TF activity 가 되는 TF 의 양을 임의로 1 unit 으로 정하였다.

단백질 정량: Lowry 법에 의해 정량하였다. 시료용액 0.4 ml에 2 ml의 알카리 동용액 (50ml의 2 % Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH, 1 ml 의 1 % sodium tartrate, 1 ml의 0.5 % CuSO₄·5 H₂O 를 측정 직전에 새로 섞어서 사용)을 가하고 섞은 후 실온에 10분 이상 방치하였다가 0.2 ml의 Folin-Ciocalteu phenol reagent 를 가하고 1-2초 내에 완전히 섞고 30분이상 방치한후 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. bovine serum albumin (BSA) 용액 0.1 mg/ml - 0.5 mg/ml에 대하여 동시에 실시하여 표준 정량곡선으로 사용하였다.

5. 조직인자 저해작용의 검색

시료의 농도를 그 작용강도에 따라 1 - 1/16 까지 50% EtOH 로 희석하여 사용하였다. 플라스틱 시험관을 37°C 수욕에 담가두고 혈장 100 μl를 취하고, TF stock을 saline 용액으로 적절히 희석한 것과 검색 하고자하는 시료 용액을 90 : 10 의 비율로 미리 섞어 놓은것 100 μl, 그리고 25 mM CaCl₂ 100 μl를 가하고 섞은 후 시험관을 수욕상에서 꺼내어 가만히 기울여보고 다시 담그고 하면서 CaCl₂ 첨가한 후부터 응고할 때 까지 시간을 재었으며 2회 반복 실시하였다. Prothrombin time을 단축시키는 정도에 따라 앞의 Eq. 1 (여기에서 BL은 TF를 넣지않고 시료 또는 50% EtOH 만 넣었을 때의 prothrombin time, A는 TF와 시료 또는 50% EtOH를 함께 넣었을 때의 prothrombin time이다)에 의해 clotting acceleration %를 계산한 후 표준곡선을 이용하여 이때의 TF unit을 계산하고 TF

의 저해율 I (%) 는 다음 Eq. 2 에 의해 계산하였다.

$$I (\%) = \frac{Bu - Au}{Bu} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

여기에서 Au 는 TF와 시료를 함께 넣었을 때의 TF unit이며 Bu는 TF만 넣었을 때의 TF unit 다. 구한 저해율 I (%)로부터 TF 1 unit 당 IC₅₀을 구하였다.

6. 취나물의 조직인자 저해성분 분리

사용한 기기는 다음과 같다. Rotary evaporator, Buchi RE 111, Eyela NE; Fraction collector, 2110 Fraction collector (Bio-rad); TLC 용 UV lamp 254 nm; IR, Jasco FT/IR-5300; NMR, Bruker AM 300 NMR spectrophotometer, UV, UV/VIS spectrophotometer Hitachi U-3210.

시약은 다음과 같다. Column chromatography용 실리카겔, Kieselgel 60 (70-230mesh 7734), Kieselgel 60 (230 mesh 7729), Sephadex LH-20 (Sigma); Lichroprep RP-18 (particle size 40-63 μm); Thinlayer chromatography 용, Kieselgel 60 F254 (Merck art 5715), Cellulose F (Merck art 5718), RP-18 F254s (Merck art 15389). 시료 추출은 공업용 시약을 사용하였고 분석용은 특급 시약을 사용하였다.

1) 시료 추출 및 분획

Lot 1에서는 충남 부여군에서 1996년에 생산된 참취 (*Aster scaber*)를 사용하였으며, Lot 2에서는 부여군에서 1997년에 생산된 참취를 사용하였다. 생 참취와 건조 취, 삶은 취의 비교에 사용된 참취는 슈퍼마켓에서 구입하였으며 정확한 산지를 알 수 없었고, 미역취는 울릉도 산이었다.

Lot 1에서는 참취나물 약 40 kg을 음건하여 추출통에 넣고 메탄올로 2주 이상 2회 반복 추출하였다. 메탄올 추출물을 농축한 후 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 가용성 분획을 얻어 각각 농축하였다. 각 분획에 대해 조직인자 저해활성을 측정된 결과 부탄올 가용성 분획에서 가장 작용이 강하였으므로 에틸아세테이트 가용성 분획을 부탄올 가용성 분획과 합하여 농축하고 부탄올 가

용성 분획에 대하여 활성성분 분리를 실시하였다.

Lot 2 에서는 참깨 40 kg을 음건한 후 부탄올 포화 물로 3회 추출한 다음 추출통에 에탄올을 부어 약 50 % 에탄올이 되도록 하여 2회 더 추출하였다. 부탄올 포화 물 추출물 1,400 g, 에탄올 추출물 105 g을 얻었고, TF 저해작용의 total activity가 훨씬 큰 부탄올 포화 물 추출물에 대해 분리를 실시 하였다.

2) 메탄올 추출물의 부탄올 가용분획으로부터 조직인자 저해활성 물질 분리

부탄올 가용 분획의 크로마토그래피: 부탄올 가용 분획 약 200g을 silica gel 7734 에 반죽하여 건조한 후 silica gel column 위에 얹고 클로로포름:메탄올 10:1, 3:1, 클로로포름:메탄올:물 3:1:0.1, 15:10:2.5 그리고 메탄올로 차례로 용출시켰다. TLC 해본 결과에 따라 5개의 fraction으로 나누어 각각의 저해활성을 측정하였다.

부탄올 가용분획 5개 중 저해활성이 큰 Fr. IV 를 메탄올 용매로 Sephadex LH-20 chromatography를 3회 반복하였고 작용이 큰 Fr.IV-1을 에틸아세테이트:메탄올:물:초산 10:2:1:1, 7:2:1:1, 5:2:1:1, 3:2:1:1 용매로 silica gel 7729 column 상에서 용출시켜 얻은 Fr.A-K 의 11개 분획중 Fr. F 가 저해작용이 강하여 Fr. F를 다시 30 % 에탄올 용매로 Sephadex LH-20 chromatography하여 저해활성이 강한 물질 “라” 를 얻었다.

Fr. G의 acetylation: Fr. G 3.26 g을 pyridine 30 ml에 녹이고 acetic anhydride 20 ml을 가한 후 하루 밤 방치하였다. 이때 소량의 Fr. “라”도 함께 acetylation하여 TLC할 때 standard로 삼았다. Acetylation된 Fr. G 를 silica gel 7734 에서 chloroform, CM 100:1- 10:1, methanol 용매로 chromatography하여 “라” 와 같은 물질을 얻고자 하였다.

Fr. 라의 methylation: 40% KOH 와 ethyl ether가 담긴 플라스크에 nitrosomethylurea를 넣고 60℃에서 증류하여 얻은 diazomethane을 시료에 가하여 methylation 시켰다.

3) 메탄올 추출물의 부탄올 가용 분획의 산 가수분해에 의한 aglycone 분리

부탄올 분획 37 g 에 60% 1,4-dioxane 240 ml 과 진한 염산 40 ml 을 가하고

100℃ 에서 4 시간 환류 시키면서 반응 시켰다. 이것을 농축하여 ethyl acetate 와 물로 분획하고, ethyl acetate 분획을 silica gel 7734 column 으로 2회 반복하여 분리 시켰다.

4) 메탄올 추출물의 물 가용분획에 대한 Amberlite XAD-2 hydrophobic column chromatography

메탄올 추출물의 물 가용분획을 Amberlite XAD-2 에 흡착시킨후 물, 50% MeOH, 90% MeOH, 100% MeOH, acetone 순으로 용출시켜 각 분획의 작용을 보았다.

5) 부탄올 포화 물 추출물로부터 조직인자 저해작용 성분의 분리

부탄올 포화 물 추출물의 용매분획: 부탄올 포화 물 추출물을 아세톤:물 3:1, 8 l를 가해서 침전 (Fr.Ⅲ)과 가용성 부분을 얻었고 가용성부분에 다시 아세톤:물 8:1, 2.25 l를 가하여 가용성 부분 (Fr. I)과 침전을 얻었다 (Scheme 1). 이 침전의 메탄올 가용이며 에테르 침전성 물질 (Fr. II : 209 g)에 대해 저해작용을 측정한 결과 Fr. II가 저해작용이 컸다. Fr. II를 30 % 에탄올 용매로 Sephadex LH-20 chromatography를 4회 반복 실시하여 TF를 첨가하지 않은 혈장의 응고시간을 연장시키는 2개의 분획 (BL1:37g, BL2:15g)과 TF를 저해하는 2개의 분획 (ACT1:9.6g, ACT2:8.2g)을 얻었고 BL1과 ACT1에 대해 먼저 분리를 시도하였다.

ACT 1의 분리; ACT1은 TLC와 작용을 확인 하면서 50 % 에탄올 용매로 Sephadex LH-20 chromatography와, 클로로포름:메탄올 5:1부터 점차 극성을 높여가면서 클로로포름:메탄올:물 15:10:2.5까지 용매로 하여 silica gel 7729 chromatography한 후, 다시 클로로포름:메탄올:물:초산 60:30:2:10 용매로 silica gel 7729 chromatography하여 TF를 첨가하지 않은 혈장의 응고시간을 연장시키는 물질 (BL)과 TF저해작용이 있는 물질 (ACT)을 얻을 수 있었다. Silica gel 7729 chromatography에서 얻은 BL과 ACT 분획을 농축하다가 물을 첨가하여 흰 침전을 얻었고 이 것을 다시 50 % 메탄올 용매로 Sephadex LH-20 chromatography하여 BL로부터 TLC 상에서 단일로 보이는 물질 "L₁"을 얻어 이에대해 IR과 NMR 분석을 실시 하였다.

BL 1 의 분리; BL1은 클로로포름:메탄올 5:1부터 점차 극성을 높여가면서 클로로포름:메탄올:물 15:10:2.5 까지 용매로하여 silica gel 7734 column chromatography와, 50% 에탄올과 50% 메탄올 용매로 각각 silica gel LH-20 chromatography를 실시 하여 plasma recalcification time을 연장시키는 물질 (L₂)을 얻었다.

6) ACT1 에서 분리된 작용물질 L₁의 methylation

ACT1 에서 분리된, TF 를 첨가하지않은 plasma recalcification time을 연장시키는 물질 (L₁)을 위의 물질“라” 와 같은 방법으로 methylation 시켰다.

7) L₂의 산가수해에 의한 당의 확인

물질 L₂ 소량을 앞에서와 같은 방법으로 가수분해한 후 물을 가하고 여과하여 상징액에 Ag₂CO₃를 가하여 중화시켰다. 여과하여 여액을 농축하여 50% 메탄올을 가하고 다시 여과하여 여액을 당 표준품과 함께 cellulose plate에서 pyridine:EtOAc:HAc:H₂O 36: 36:7:21 용매에서 TLC한 후 aniline-phthalate로 발색하여 확인하였다.

8) L₂, BL2, ACT2 의 부분가수분해

L₂ 소량에 1N NaOH 를 가하고 95℃에서 30분간 환류하며 가열한 후 pH 3 으로 맞추고 부탄올로 추출하여 농축하고 메탄올 가용부분을 얻었다. 앞에서 분리해 놓았던 BL2 와 ACT2 fraction 도 소량 취하여 같은 방법으로 가수분해하였다.

9) BL2 부분가수분해물의 methylation

BL2 와 ACT2 를 위와 같이 부분가수분해한 후 메탄올 용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하고 이들을 각각 methylation하여 CM 10:1 용매와 EtOAc:MeOH:H₂O 8:1:0.3 용매로 실리카 겔 칼럼크로마토그래피를 실시한 후 acetonitrile:MeOH:H₂O 1:1:0.5 용매로 크로마토그래피 하여 두 major spot의 분리 정제를 시도하였다.

10) 생 참취, 건조 취, 삶은 취의 비교

생 참취 (100g), 건조 참취 (46g), 삶은 참취 (100g), 삶은 미역취 (100g), 건조 미역취 (100g, 삶아서 건조한 것)를 메탄올 (건조 참취와 건조 미역취는 80 % 메탄올)로 냉침하여 추출물을 클로로포름, 부탄올, 물로 분획하여 각 시료의 부탄올 분획에 대해 TF 저해작용을 측정하고 TLC pattern을 비교하였다.

7. 비름나물의 조직인자 저해성분 분리

1) 기기 및 시약

기기 및 시약은 참취의 분리에 사용된 것과 동일하다. 시료는 하남에서 생산된 눈비름 (*Amaranthus deflexus L.*)을 사용하였다.

2) 시료의 추출 및 분획

예비실험으로 눈비름 약 54.4 g을 음건하여 메탄올로 3회 반복 추출한 후 농축하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 가용성 분획을 얻어 각각 농축하였다. 각 분획에 대하여 조직인자 저해활성을 측정한 결과 물 가용성 분획에서 가장 작용이 강하였으며 부탄올 층에서도 작용이 강한 결과를 보였다. 예비실험의 결과에 따라 하남산 눈비름 37.5 kg을 음건하여 추출통에 넣고 부탄올 포화물로 2주이상 3회 반복 추출 후 농축하여 부탄올 가용성 및 수용성 분획을 얻어 각각의 분획에 대하여 활성성분 분리를 실시하였다.

3) 부탄올 가용분획으로부터 조직인자 저해활성 물질 분리

메탄올 가용물질과 침전의 분리: 부탄올 가용성 분획 약 101 g에 메탄올 1L를 가하여 용해한 후 여과하여 상징액과 침전층을 분리하였다. 얻어진 상징액에 다시 메탄올을 가하여 여과하는 과정을 반복한 후 상징액 및 침전의 활성을 측정하여 작용이 강한 메탄올 가용성 상징액을 농축하여 분리를 진행하였다 (Fr. I-1).

실리카겔 크로마토그래피: 메탄올 가용성 분획 (Fr. I-1) 약 80 g을 silica gel 7734에 반죽하여 건조한 후 silica gel column에 얹고 클로로포름:메탄올 20:1,

10:1, 5:1, 클로로포름:메탄올:물 3:1:0.1, 70:30:4, 15:10:2.5, 10:15:2.5 및 80% 메탄올로 차례로 용출시켰다. TLC 결과에 따라 5개의 fraction으로 나눈 후 각각의 저해활성을 측정하여 총활성이 가장 높은 클로로포름:메탄올 5:1 및 클로로포름:메탄올:물 70:30:4 분획의 분리를 진행하였다.

Sephadex LH-20 크로마토그래피; 실리카겔 크로마토그래피의 결과 얻어진 여러 분획중 총활성이 가장 높은 클로로포름:메탄올 5:1 및 클로로포름:메탄올:물 70:30:4 분획의 Sephadex LH-20 크로마토그래피를 실시하였다.

4) 수용성 분획으로부터 저해활성 성분 분리

메탄올 가용성물질과 침전의 분리: 수용성 분획에 4배량의 메탄올을 가하여 정치한 후 여과하여 상징액과 침전층을 분리하였다. 얻어진 상징액 (Fr. II-1)과 침전 (Fr. II-2)에 각각 다시 메탄올을 가하여 여과하는 과정을 반복한 후 Fr. II-1 및 Fr. II-2 각각의 상징액 및 침전의 활성을 측정하여 작용이 강한 메탄올 가용성 상징액 (Fr. II-1a 및 Fr. II-2a)을 각각 농축하여 분리를 진행하였다.

실리카겔 크로마토그래피: 수용성 분획의 상징액의 메탄올 가용성 분획 (Fr. II-1a) 약 353 g을 silica gel 7734에 반죽하여 건조한 후 silica gel column에 얹고 클로로포름:메탄올 5:1, 클로로포름:메탄올:물 3:1:0.1, 70:30:4, 15:10:2.5 및 80% 메탄올로 차례로 용출시켰다. TLC 결과에 따라 5개의 fraction으로 나눈 후 각각의 저해활성을 측정하여 총활성이 가장 높은 클로로포름:메탄올:물 70:30:4 분획으로 분리를 진행하였다.

세파덱스 LH-20 크로마토그래피; Fr. II-1a의 실리카겔 크로마토그래피의 결과 얻어진 여러 분획중 총활성이 가장 높은 클로로포름:메탄올:물 70:30:4 분획의 Sephadex LH-20 크로마토그래피를 실시하였으며 또한 Fr. II-2a 약 116g도 같은 조건에서 Sephadex LH-20 크로마토그래피를 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 조직인자 저해작용 검색

총 147종의 식용식물 검색결과는 다음 Table 6-1 - 6와 같았고, 조직인자에 대한 저해활성이 매우 강한 것은 IC_{50}/TF unit 이 생 시료 무게를 기준으로 쉰나물 0.124 mg, 근대 0.159mg, 당귀 0.202mg, 깻잎 0.250mg, 아욱 0.277mg, 생죽순 0.417mg 과 추출물의 무게를 기준으로 비름나물의 에틸아세테이트 분획 1.39 μ g 이었다. 이 중에서 쉰나물과 비름나물에 대해 작용성분 분리를 시도하였다.

2. 쉰의 조직인자 저해성분 분리

1) 메탄올 추출물의 분획

메탄올 추출물 1 l를 농축한 후 클로로포름 가용성, 에틸아세테이트 가용성, 부탄올 가용성 및 수용성 분획으로 나눈후 각 분획들의 조직인자 저해활성을 측정한 결과는 다음 Table 6-7과 같다. 저해활성은 부탄올 가용 분획에서 가장 크게 나타났으며 그 다음이 EtOAc 가용분획이었다.

2) 부탄올 가용분획의 저해활성 성분 분리

부탄올 가용분획의 크로마토그래피: 부탄올 가용분획을 실리카겔 column chromatography하면 chloroform:methanol:water 15:10:2.5 용매에서 용출되고 (Table 6-8) Sephadex LH-20 (methanol 용매)에서는 초기에 용출된다 (Table 6-9). 이것은 이어서 silica gel 7729에서 에틸아세테이트:메탄올:물:초산 10:2:2:1, 7:2:2:1, 5:2:2:1, 3:2:2:1 용매로 크로마토그래피 하면 7:2:2:1 과 5:2:2:1 용매에서 용출되었다 (Table 6-10). Fr. A-K 의 11개 분획중 TF 저해작용은 E-J 에서 비교적 크게 나왔고 Fr. F가 가장 작용이 컸으며, F-J 에서는 TF를 첨가하지않은 혈장의 응고시간 (plasma recalcification time)도 연장효과가 있었고 그중 Fr. H 가 가장 연장효과가 컸다 ($EC_{50}=29\mu\text{g}/100\mu\text{l plasma}$). Fr. H에서 TF 저해작용이 나오지 않은것은 이 연장효과가 TF 저해작용을 가리는 효과 때문으로 생각된다. 그중 가장 작용이 강한 Fr. F 를 Sephadex LH-20 으로 chromatography (30% EtOH) 하여 TLC 상에서 단일로 보이는 물질 “라” 를 얻었다. 이 물질은 TLC 하면 CMW 15:10:2.5 용매에서 R_f 치 0.4 정도에 나오며 부탄올:초산:물 3:1:1 용매에서는 R_f 치 0.5 정도에서 나왔다. Liebermann-Burchard 반응양성이며 UV 흡수는 없고 요오드 발색이 되는 물

질이었다. 또한 이 물질의 TF 저해작용은 $IC_{50}=0.55\mu\text{g}/\text{TF unit}$ 이었고 동시에 TF를 첨가하지않은 혈장의 응고시간 (plasma recalcification time)도 연장시키고 이때 50% 연장 (elongation)시키는 농도 $EC_{50}=27\mu\text{g}/100\mu\text{l plasma}$ 이었다 (Table 11). “라”의 IR 및 $^1\text{H-NMR}$ 분석결과는 Chart 1~2 와 같다.

Fr. G, fr. 라의 acetylation 및 methylation: Fr. G 도 작용이 상당히 있었으므로 G 를 acetylation시킨 후, acetylation시킨 “라”의 major와 같은 물질을 silica gel column 로 분리하여 GA8을 얻었고 이의 IR 및 $^1\text{H-NMR}$ 분석 결과는 chart 3~4 와 같다. PMR에서는 $\delta 2.0$ ppm 부근에서 acetyl 기가 나왔으므로 acetylation 된것으로 확인되었다. “라”는 methylation이 잘 되지않았으며 이것은 “라”가 메탄올에 잘 녹지 않고 약간의 물이 포함되어야만 잘 녹으므로 metylation 시킬 때 에테르와 잘 섞이지 않기 때문인 것으로 생각되었다. “라”는 acetylation이 잘 되었으며 acetylation된 후 TLC해 보니 여러 개의 spot이므로 실리카 겔 크로마토그래피 실시 후 major spot을 다시 methylation 켜 본 결과와 NMR data로 미루어 보아 “라”는 순수하지 않음을 알 수 있었다.

메탄올 추출물의 부탄올 가용 분획의 산 가수분해: 작용성분인 “라”가 사포닌으로 판단되므로 부탄올 가용분획 일부를 산 가수분해 하여 그 aglycone 을 확인하고자 하였다. 산 가수분해 후 에틸아세테이트 층으로 이행되는 물질을 CM 혼합용매로 silica gel 7734 column으로 분리하여 oleanolic acid와 echinocystic acid standard와 함께 TLC하니 CM 30:1 용매에서 oleanolic acid와 이에 뒤이어 echinocystic acid가 용출되었고 이들과 함께 다른 4 개의 major spot이 존재함을 알 수 있었다. 이 중 oleanolic acid 보다 더 비극성인 두 개의 spot 들은 aglycone 이 아닌 것으로 생각되고, echinocystic acid 바로 밑의 spot은 메탄올 용매로 Sephadex LH-20, hexane:EtOAc 1:1 용매로 실리카겔 칼럼, 메탄올 용매로 역상 (RP-18) 크로마토그래피 하여 순수분리 하였고 NMR 분석결과 hydrocarbon chain 구조를 보임으로서 aglycone이 아니고 지방산으로 추정되었다. 또한 CM 10:1 에서 용출되는 비교적 극성이 큰 aglycone 은 TF 저해작용이 있었으며 이것을 다시 CM 혼합용매로 silica gel 7734 column으로 분리하여 작용물질을 분리하였으며 이

물질의 $IC_{50}=34.9\mu\text{g}/\text{TF unit}$ 이었다. 이 물질은 CM 5:1 용매로 TLC할 때 R_f 치 0.5 부근에 나타났다.

3) 메탄올 추출물의 물 분획의 Amberlite XAD-2 hydrophobic column chromatography

메탄올 추출물의 물 가용 분획은 상당히 저해작용이 있었으므로 Amberlite XAD-2에 흡착시킨 후 물, 50%, 90%, 100% 메탄올, 아세톤으로 용출시켰을 때 상당량이 흡착되지 않고 초기에 물에 용출되어 나왔고 나머지는 90%메탄올에서 가장 많이 용출되었다 (Table 6-12).

4) 부탄올 포화 물 추출물로부터 조직인자 저해작용 물질의 분리

아세톤 용액으로 분획: Lot 1에서 참취의 메탄올 추출물의 부탄올 분획에서 Tissue Factor (TF) 저해작용이 나타났으며 이를 silica gel 과 Sephadex LH-20 chromatography에 의해 TLC 상에서 단일로 보이는 극성이 큰 saponin으로 추정되는 TF 저해물질 ($IC_{50}=0.55\mu\text{g}/\text{TFunit}$, $EC_{50}=27\mu\text{g}/100\mu\text{l plasma}$)을 분리하였으나 이를 methylation 시켜본 결과 단일물질이 아님을 알 수 있었다. 물 분획에서도 상당히 TF 저해작용이 나타났으며, 따라서 Lot 2에서는 부탄올 포화 물 추출을 하여 극성이 큰 사포닌을 많이 얻고자 하였다. 부탄올 포화 물 추출한 후의 잔사를 다시 에탄올 추출하였을 때, 부탄올 포화 물 추출물의 TF 저해활성 IC_{50} 은 $30\mu\text{g}$, total inhibitory activity unit은 4.67×10^7 이었고 에탄올 추출물의 저해활성 IC_{50} 은 $21.6\mu\text{g}/\text{TF unit}$, total inhibitory activity unit은 5.0×10^6 이었으므로 total activity가 큰 물 추출물에 대해 분리를 시도하였다 (Table 6-13).

부탄올 포화 물 추출물 중 아세톤:물 3:1에 가용성이며 아세톤:물 8:1에 침전하는 분획 (Fr. II) (Scheme 1)에서 TF 저해작용이 크게 나타났고 (Table 6-14) 이 용매 분획 단계에서 아세톤 가용성 물질들, 탄닌 성분, 무기염들이 많이 제거 된 것으로 생각 된다. Fr. II를 30 % 에탄올용매로 Sephadex LH-20 chromatography하니 TF를 첨가하지 않은 혈장의 응고 시간을 연장시키는 2개의 분획 (BL1:37 g, BL2:15g)과 TF를 저해하는 2개의 분획 (ACT1:9.6g, ACT2:8.2g)을 얻었고 (Fig. 6-1), BL1과 ACT1에 대해 먼저 분리를 시도하였다.

ACT 1 의 분리: 저해 작용성분 ACT1은 50 % 에탄올 용매로 Sephadex LH-20 chromatography하여 다시 TF를 첨가하지않은 혈장의 응고시간을 연장시키는 물질(BL)과 저해작용 물질 (ACT)이 분리되었고 ACT를 클로로포름:메탄올 5:1 부터 점차 극성을 높여가면서 클로로포름:메탄올:물 15:10:2.5까지 용매로 하여 silica gel 7729 chromatography한 결과 CMW 15:10:2.5 용매로 elution한 분획에서 total activity의 약 70%가 회수되었다 (Table 15). 이 분획을 클로로포름:메탄올:물:초산 60:30:2:10 용매로 silica gel 7729 chromatography 하여, BL 과 ACT 를 분리하였으며 BL 과 ACT는 silica gel plate에서 부탄올:초산:물 3:1:1 용매로 TLC 하였을 때 각각 R_f 치 0.5 부근에서 매우 근접하게 나타나고 BL은 chromatography를 실시 할 때마다 계속 BL과 ACT 두 물질로 다시 분리되는 것으로 보아 둘 중의 어느 한 물질이 다른 물질로 변하는 가능성도 있다고 생각된다. BL과 ACT는 농축하다가 물을 첨가하니 흰 침전을 형성하였고 원심분리하였을 때 겔을 형성하였다. 이 흰 침전중 BL을 50 % 메탄올로 Sephadex LH-20 chromatography하여 다시 정제하여 TLC 상에서 단일로 보이는 물질 "L₁"을 얻어 저해작용을 측정하니 $IC_{50}=0.37 \mu\text{g}/\text{TF unit}$, TF를 첨가하지 않은 혈장의 응고시간을 연장시키는 정도 $EC_{50}(\text{elongation concentration})=29\mu\text{g}/100\mu\text{l plasma}$ 으로 TF 저해 작용도 강하게 나타냈으므로 IR과 NMR 분석을 실시하여 구조를 동정하고자 하였다 (Chart 5~7). CMR 분석결과를 Nagao 등이 보고한 echinocystic acid glycoside 분석결과와 비교하여 30 개의 aglycone 탄소가 모두 존재함을 확인하였다 (Table 6-16). 또한 PMR 결과로 볼 때 당이 여러 개 붙어있음을 알 수 있었다.

BL 1 의 분리: 실리카겔 7734로 크로마토그래피 하였을 때 CMW 15:10:2.5 용매에서 용출되었고 두 개의 major spot 을 보였다. 이 둘은 ACT 1에서 분리된 ACT와 BL과 같은 것으로 생각되었다. 이 분획을 2회 반복하여 Sephadex LH-20 에서 50% 메탄올 용매로 용출시키니 두개의 spot이 분리되었다. 이때 얻은 plasma recalcification time 연장물질 "L₂"의 PMR 과 CMR spectrum 은 chart 8~10 과 같고 L₁ 과 L₂ 사이에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 L₂는 plasma recalcification time 연장효과가 컸고 ($EC_{50}=22\mu\text{g}/100\mu\text{l plasma}$) TF 저해작용은 거의 나타나지 않았다. 따라서 ACT1 에서 얻은 L₁ 은 TF 저해작용과 plasma

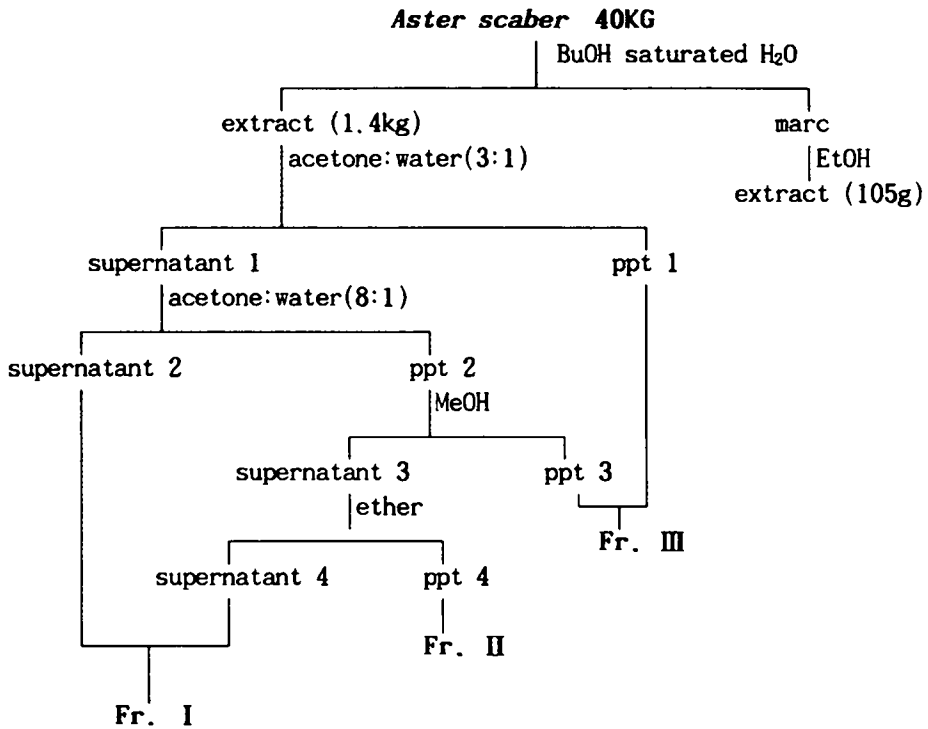
recalcification time 연장작용 두가지 모두 나타냈으나, BL1 에서 얻은 L₂ 는 plasma recalcification time 연장작용만 나타내므로 L₁ 과 L₂ 도 단일물질이 아니거나, 또는 L₁ 과 L₂ 는 같은 물질이 아닐 가능성도 있다.

L₁ 의 methylation; L₁을 diazomethane으로 methylation해 보니, silica gel plate에서 CMW 70:30:4 용매로 전개시켰을 때 R_f치가 0.5 정도에 붙어있는 2개의 물질로 보여 methylation된 것을 다시 순수 분리하는 것이 필요하나 이 사포닌들은 분리 단계를 거칠 때마다 계속 두 개의 물질로 분리되는 것으로 보아 유사한 여러 사포닌들이 같이 존재하거나 그 중 하나가 다른 하나로 변하는 가능성이 있는 것으로 생각되고 순수분리에 어려움이 있었다.

L₂ 의 산가수분해: L₂를 산 가수분해 후 oleanolic acid 와 echinocystic acid 표준품과 함께 TLC해 본 결과 aglycone은 echinocystic acid로 판단되었다. 또한 당 표준품과 함께 당부분을 TLC해 본 결과 구성당은 rhamnose, xylose, 그리고 arabinose 또는 mannose가 확인되었고 glucuronic acid 위치에서도 뚜렷하지는 않지만 약간의 흔적이 보였으므로 glucuronic acid가 분해되었을 가능성이 있다고 보인다.

BL2, ACT2 의 부분가수분해: L₂, BL2, ACT2를 부분 가수분해 한 것의 TF 저해작용은 각각 IC₅₀=0.13 μ g/TF unit, 0.084 μ g/TF unit, 0.54 μ g/TF unit 이었고 CMW 70:30:4 용매로 TLC해 보니 L₂, BL2, ACT2 에서 모두 같은 R_f=0.25 정도의 두개의 major spot이 나타났다.

BL2 와 ACT2 부분 가수분해물의 methylation: TF 저해작용이 사포닌의 부분 가수분해후 증가하므로 BL2와 ACT2 부분 가수분해물로부터 작용물질을 분리하고자, BL2와 ACT2를 메탄올용매로 Sephadex LH-20 chromatography를 하여 정제한 후 methylation시키고, CM 10:1 용매로 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 두개의 major spot A와 C를 분리하였고 EtOAc:MeOH:H₂O 8:1:0.3 용매로 다시 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 ACT2 부분 가수분해물에서는 C가 다시 B와 C로 분리되었다. A와 C를 Acetonitrile:MeOH:H₂O 1:1:0.5 용매로 역상 칼럼 크로마토그래피하여 정제하였다.



Scheme 1. Extraction and solvent fractionation of *Aster scaber*

Table 6-1. Tissue factor inhibitory activities of some samples

Sample	IC_{50} (μ g)/TF unit
1. strong activity	
갯잎 (raw) ^a	0.250
달래 (raw) ^a	0.848
배추 (raw)	0.565
시금치 (raw) ^a	0.340
아욱 (raw) ^a	0.277
취 (raw) ^a	0.124
케일 (raw) ^a	0.620
2. weak activity	
냉이 (raw) ^a	1.33
당근 (raw)	4.55
더덕 (raw, peeled)	1.07
도라지 (raw, peeled)	1.27
무순 (raw) ^b	2.3
물미역 (raw) ^a	1.0
생강 (raw)	1.83

Table 6-1. Continued.

Sample	IC ₅₀ (μ g)/TF unit
토마토 (raw)	1.43
파슬리 (raw) ^a	9.5
3. no activity	
다시마 (dry)	NI ^b
무우 (raw)	NI
셀러리 (raw) ^a	NI
수삼 (raw)	NI
숙주 (raw)	NI
쑥갓 (raw) ^a	NI
연근 (raw)	NI
우엉 (raw)	NI
죽순 (boiled)	NI
치커리 (raw) ^a	NI
콩나물 (raw)	NI

* Weight as plant material itself.

^a Hexane layer was separated and removed from 50% ethanol layer.

^b NI : no inhibition detected.

Table 6-2. Tissue factor inhibitory activities of some samples

Sample	IC ₅₀ (mg) ^a /TF unit
1. strong activity	
근대 (raw) ^a	0.159
당귀 (raw)	0.202
생죽순 (raw)	0.417
2. no activity	
양파 (raw)	NI ^b
고추잎 (raw) ^a	NI
부추 (raw) ^a	NI
비듬나물 (raw) ^a	NI

* Weight as plant material itself.

^a Hexane layer was separated and removed from 50% ethanol layer.

^b NI : no inhibition detected.

Table 6-3. Tissue factor inhibitory activities of some samples.

Sample ^a	Fraction	IC ₅₀ (μ g)/TF unit
strong activity		
비듬	EtOAc ^a	1.39
weak activity		
돌나물	EtOAc ^a	110.7
딸기	수층	785.7
no activity		
산당귀	수층	NI ^b
아욱	수층	NI ^b
참나물	수층	NI ^b
부추	수층	NI ^b
원추리	수층	NI ^b
비듬	Hexane ^c	NI ^b
승마	수층	NI ^b
승마	Hexane ^c	NI ^b
마	수층	NI ^b
쇠뜨기	Hexane ^c	NI ^b
부지깽이	Hexane ^c	NI ^b
산당귀	EtOAc ^a	NI ^b
백련초	EtOAc ^a	NI ^b
백련초	Hexane ^c	NI ^b
고들빼기	EtOAc ^a	NI ^b
고들빼기	Hexane ^c	NI ^b
겨우살이	EtOAc ^a	NI ^b
겨우살이	Hexane ^c	NI ^b
생강나무	EtOAc ^a	NI ^b
생강나무	Hexane ^c	NI ^b
질경이	EtOAc ^a	NI ^b
질경이	Hexane ^c	NI ^b
명이	EtOAc ^a	NI ^b
명이	Hexane ^c	NI ^b
시금치	EtOAc ^a	NI ^b
시금치	Hexane ^c	NI ^b
배초향	EtOAc ^a	NI ^b
배초향	Hexane ^c	NI ^b

^a EtOAc : Ethyl Acetate Fraction. ^b NI : no inhibition detected.

^c Hexane : Hexane Fraction.

Table 6-4. Tissue factor inhibitory activities of some legume, cereal, and seaweeds

Sample ^a	Fraction	IC ₅₀ (μ g)/TF unit
strong activity		
수수	MeOH ^a	0.71
weak activity		
수수	66% MeOH ^a	833.3
no activity		
밤콩	66% MeOH ^a	NI ^b
밤콩	MeOH ^a	NI ^b
약콩(지누리)	66% MeOH ^a	NI ^b
약콩	MeOH ^a	NI ^b
백태	66% MeOH ^a	NI ^b
백태	MeOH ^a	NI ^b
서리태	66% MeOH ^a	NI ^b
서리태	MeOH ^a	NI ^b
흑태	66% MeOH ^a	NI ^b
흑태	MeOH ^a	NI ^b
강낭콩	66% MeOH ^a	NI ^b
속청	66% MeOH ^a	NI ^b
속청	MeOH ^a	NI ^b
동부	66% MeOH ^a	NI ^b
보리쌀	66% MeOH ^a	NI ^b
수수	BuOH ^c	NI ^b
수수	EtOAc ^d	NI ^b
현미	66% MeOH ^a	NI ^b
차조	66% MeOH ^a	NI ^b
기장	66% MeOH ^a	NI ^b
녹두	66% MeOH ^a	NI ^b
적두	66% MeOH ^a	NI ^b
적두	MeOH ^a	NI ^b
참쌀	66% MeOH ^a	NI ^b
흑미	MeOH ^a	NI ^b
찰옥수수	66% MeOH ^a	NI ^b
마른미역	MeOH ^a	NI ^b
툇	MeOH ^a	NI ^b
파래	MeOH ^a	NI ^b

^a MeOH : Extraction solvent.

^c BuOH : Butyl Alcohol Fraction.

^b NI : no inhibition detected.

^d EtOAc : Ethyl Acetate Fraction.

Table 6-5. Tissue factor inhibitory activities of some samples

Sample code	IC ₅₀ / TF unit (μg)	Remarks
S00013A	0.82	B
S000 9E	0.90	B
4E	7.5	C
14E	6.0	C
S00013E	3.6	C
S00016E	6.5	C
8E	10.0	D
15E	40.0	D
12E	10.0	D
9H	10.0	D
1E	20.0	D
5E	11.0	D
6E	13.0	D
2E	50.0	D
10E	20.0	D
9E	20.0	D
11E	50.0	D
16E	80.0	D
6H	55.0	D
8H	20.0	D
16H	70.0	D
10H	20.0	D
S00015E	20.0	D
S00014A	70.0	D
S0002A	50.0	D
S0001E	15.0	D
S0004E	20.0	D
S0005E	20.0	D
S0002E	30.0	D
S0006E	35.0	D

Activity >100

1H/ 4H / 5H / 12H / 15H / S0005AE/ S00014E

No Inhibition

3E/ 7E/ 2H/ 3H/ 7H/ 11H/ 14H/ S0003AI/ S0001AI/
 S0004AI/ S0006AI/ S0007AI/ S0008AI/ S0003E/ S0007E/
 S0008E/ S00011E/ S00012E/ S00018E/ S0009A/ S00010A/
 S00011A/ S00012A/ S00015A/ S00016A/ S00018A

Table 6-6. Tissue factor inhibitory activities of samples.

Sample	IC ₅₀ (μ g)/TF unit
weak activity	
SU006E	4.12
SU008E	3.09
SU014E	2.71
no activity	
SU001E/ SU001H/ SU002E/ SU002H/ SU003E/ SU003H/ SU004E/ SU004H/ SU005E/ SU005H/ SU006H/ SU007E/ SU007H/ SU009E/ SU009H/SU010E/ SU010H/ SU011E/ SU011H/ SU012E/ SU012H/ SU014H/ SU015E/ SU015H/ SU016E/ SU016H	

Table 6-7. Tissue factor inhibitory activities of the fractions from methanolic extracts of *Aster scaber*.

Fractions	CHCl ₃	EtOAc	BuOH	H ₂ O
extract weight (g)	2.08	0.6	3.52	9.39
IC ₅₀ /TF unit (μ g)	47.2	25	10.3	54.8
total inhibitory activity (IU) ^a	0.44×10^5	0.24×10^5	3.42×10^5	1.71×10^5
specific activity (IU/g)	0.21×10^5	0.4×10^5	0.97×10^5	0.18×10^5

^a 1 unit of inhibitory activity (IU) was arbitrarily defined as the amount of inhibitor that inhibits 50% of 1 unit tissue factor.

Table 6-8. Tissue factor inhibitory activities of the fractions separated from the column chromatography of the butanolic fraction.

Fractions	BuOH	I	II	III	IV	V
weight (g)	200	0.5	34	66	100	1.5
IC ₅₀ /TF unit (μ g)	10.3	- ^b	34.6	-	7.6	-
total inhibitory activity (IU) ^a	1.94×10^7	-	9.83×10^5	-	1.32×10^7	-
specific activity (IU/g)	9.7×10^4	-	2.89×10^4	-	1.32×10^5	-

^a 1 unit of inhibitory activity (IU) was arbitrarily defined as the amount of inhibitor that inhibits 50% of 1 unit tissue factor.

^b no inhibitory activity detected

Table 6-9. Sephadex LH-20 Column Chromatography of fr.IV

	Weight(g)	IC ₅₀ /TF unit(μ g)	Total IU	Specific activity(IU/g)
IV-1	3.84	3.5	10×10^9	2.86×10^7
IV-2	1.61	-	-	-
IV-3	4.09	-	-	-
IV-4	0.3	-	-	-

Table 6-10. Silica gel 7729 column chromatography of fr.IV-1

	Weight (g)	IC ₅₀ /TF unit (μg)	Total IU	Specific activity (IU/g)	Activity Recovery (%)	EC ₅₀ (μg/100μl plasma)
A	0.57	-	-	-	-	-
B	0.51	-	-	-	-	-
C	0.38	22.7	0.17 × 10 ³	4.5 × 10 ⁴	0.17	800
D	1.3	13	1.0 × 10 ³	7.7 × 10 ⁴	1.0	1000*
E	2.06	5.4	3.8 × 10 ³	18.4 × 10 ⁴	3.8	250
F	2.19	0.9	24.3 × 10 ³	111.0 × 10 ⁴	24.3	42
G	3.26	2.45	13.3 × 10 ³	40.8 × 10 ⁴	13.3	84
H	0.84	-	-	-	-	29
I	4.08	1.55	26.3 × 10 ³	64.4 × 10 ⁴	26.3	66
J	1.01	2.7	3.74 × 10 ³	37.0 × 10 ⁴	3.7	44
K	0.72	13.8	0.52 × 10 ³	7.2 × 10 ⁴	0.52	2000*

Table 6-11. Sephadex LH-20 column chromatography of fr.F

	Weight (g)	IC ₅₀ /TF unit (μg)	Total IU	Specific activity (IU/g)	Recovery (%)	EC ₅₀ (μg)
가	-	-	-	-	-	-
나	0.19	-	-	-	-	-
다	0.03	-	-	-	-	-
라	0.59	0.55	1.07 × 10 ⁰	1.81 × 10 ⁰	44.0	27
마	0.46	1.59	0.29 × 10 ⁰	0.63 × 10 ⁰	11.9	26
바	0.16	0.89	0.18 × 10 ⁰	1.13 × 10 ⁰	7.4	35
사	0.07	-	-	-	-	-

Table 6-12. Hydrophobic column chromatography with Amberlite XAD-2 for aqueous fraction

	Weight(g)	IC ₅₀ /TF unit(μg)	Total IU	Specific activity (IU/g)
Total applied			10.7 × 10 ⁰	
50%MeOH	5.61	2.16	2.6 × 10 ⁰	0.46 × 10 ⁰
90%MeOH	3	0.63	4.76 × 10 ⁰	1.59 × 10 ⁰
100%MeOH	1.9	1.4	1.36 × 10 ⁰	0.72 × 10 ⁰
acetone	0.09	0.77	0.12 × 10 ⁰	1.33 × 10 ⁰

Table 6-13. TF inhibitory activity of *Aster scaber* extract.

	Weight(g)	IC ₅₀ /TF unit(μ g)	Total IU
BuOH-sat-H ₂ O	1400	30	4.67×10^7
50% EtOH	105	21.6	4.86×10^8

Table 6-14. TF inhibitory activity of butanol-saturated-water extract of *Aster scaber*.

	Weight(g)	IC ₅₀ /TF unit(μ g)	Total IU	Specific activity (IU/g)
Fr. I	95	5.3	17.9×10^8	0.188×10^8
Fr. II	209	5.2	40.2×10^8	0.19×10^8
Fr. III	about 500 ml	-	-	-

Table 6-15. Silica gel 7729 Column Chromatography of act 1

	Weight (g)	IC ₅₀ /TF unit (μ g)	Total IU	Specific activity (IU/g)	Recovery (%)
act1	2	0.73	2.74×10^8	1.37×10^8	
CM4:1	0.14	18.1	0.0077×10^8	0.055×10^8	0.28
CM3:1	0.19	0.89	0.21×10^8	1.1×10^8	7.66
CMW3:1:0.1	0.2	0.84	0.24×10^8	1.2×10^8	8.76
CMW15:10:2.5	1.47	0.76	1.93×10^8	1.31×10^8	70.4

Table 6-16. ^{13}C -NMR chemical shifts L_1 compared to the aglycone moieties of echinocystic acid

Carbon number	Nagao <i>et al.</i>	compound L_1
1	38.8	39.9
2	26.6	26.9
3	89.1	90.8
4	39.5	40.2
5	55.9	57.1
6	18.4	19.3
7	33.5	33.7
8	40.0	40.8
9	47.1	49.0
10	36.9	37.9
11	23.8	24.5
12	122.7	123.8
13	144.3	144.5
14	42.0	42.6
15	36.1	36.4
16	73.9	74.0
17	49.4	50.3
18	41.4	42.1
19	47.1	47.6
20	30.8	31.3
21	35.9	34.2
22	32.1	31.8
23	28.1	28.6
24	16.9	17.2
25	15.6	16.2
26	17.4	17.9
27	27.0	27.3
28	175.7	177.0
29	33.1	33.4
30	24.6	25.2

Table 6-17. Solvent fractionations of *Aster scaber* and *Solidago virga-aurea* var

	Boiled A.S.	Boiled S.V.	Raw AS.	Boiled-Dried S.V.	Dried A.S.
	100g	100g	100g	100g	46g
extraction solvent	MeOH	MeOH	MeOH	80% MeOH	80% MeOH
extract wt.(g)	2.66	1.62	3.38	29.59	12.28
CHCl_3 fr.(g)	0.46	0.4	0.41	4.2	1.03
BuOH fr.(g)	0.39	0.45	0.96	2.32	2.32
H_2O fr.(g)	1.59	0.83	2.52	22.28	8.93
IC_{50}/TF unit (μg)	-	-	9.3	29.8	3.3

Table 6-18. Tissue factor inhibitory activities of solvent fractions from methanol extract of *Amaranthus deflexus* L.

layer	wt. (g)	IC ₅₀ /unit (μg)	total activity (X 10 ⁶)
Chloroform	4.27	-	-
Ethyl acetate	1.08	-	-
Butanol	2.65	36.60	0.72
Water	6.81	21.95	3.10

Table 6-19. Tissue factor inhibitory activities of solvent eluates of butanol fraction from silica gel column.

eluent	vol. (L)	wt (g)	IC ₅₀ /unit wt.(μg)	total activity (X 10 ⁶)
a CM 20:1	3	16.59	-	-
b CM 10:1	3.5	20.0	-	-
c CM 5:1	9.5	29.17	7.11	4.10
d CMW 75:25:2.5	10	19.5	8.68	2.25
e CMW 70:30:4	9	5	1.37	3.65
f CM 1:1	11	3	2.80	1.07
g CMW 10:15:3	3.5	6.39	185.7	0.03
h 80% MeOH	-	-	-	-

Table 6-20. Tissue factor inhibitory activities of solvent eluates of aqueous fraction from silica gel column.

eluent	vol. (L)	wt. (g)	IC ₅₀ /unit (μg)	total activity (X 10 ⁶)
CM 20:1	1.8		-	-
CM 5:1	12.4	23.7	110	0.230
CMW 75:25:2.5	15.5	40.85	45	0.908
CMW 70:30:4	19.5	103.58	20	5.179
CMW 15:10:2.5	9.5	91.7	28	3.275
80% MeOH	3.0	64	-	-

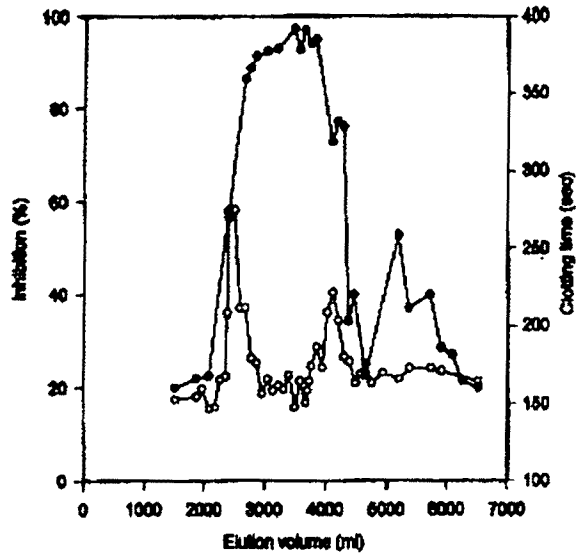


Fig. 1 Sephadex LE-20 chromatography of Fraction B.
 ● : Tissue factor inhibition(%)
 ○ : Plasma recalcification time (sec) without adding tissue factor

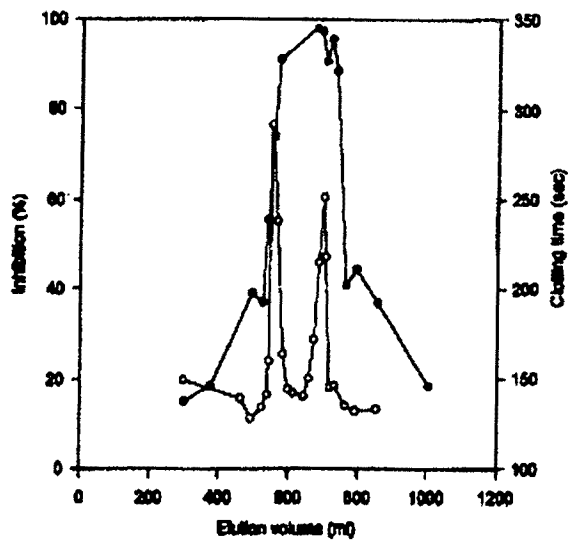
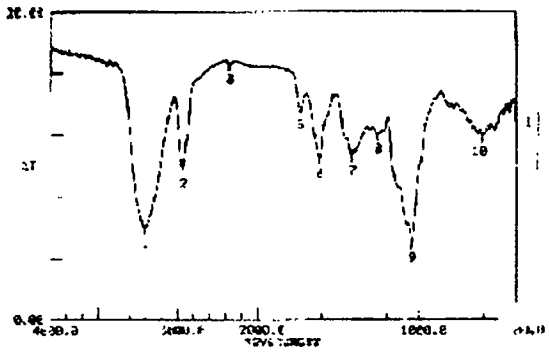


Fig. 2 Sephadex LE-20 chromatography of ACT L.
 ● : Tissue factor inhibition(%)
 ○ : Plasma recalcification time (sec) without adding tissue factor

INCO FT-IR-5338
 Date: 198-00/80 04172
 File No: 1
 Sample Name: H62
 Description: 4
 (GAIN: 1.0)
 Gain: 1.0
 Resolution: 0.8



EXAMINATION
 UPPER: 20.00 LOWER: 0.00 DEPTH: 2.00

Peak table

11	3411.740	6.60	21	2937.850	9.50	31	1517.910	10.00
12	3220.850	16.80	22	1773.620	13.40	32	1416.500	13.40
13	3117.790	10.70	23	1255.770	12.10	33	1047.280	3.00
14	1607.650	12.00						

Chart 1. IR spectrum of Pt. #

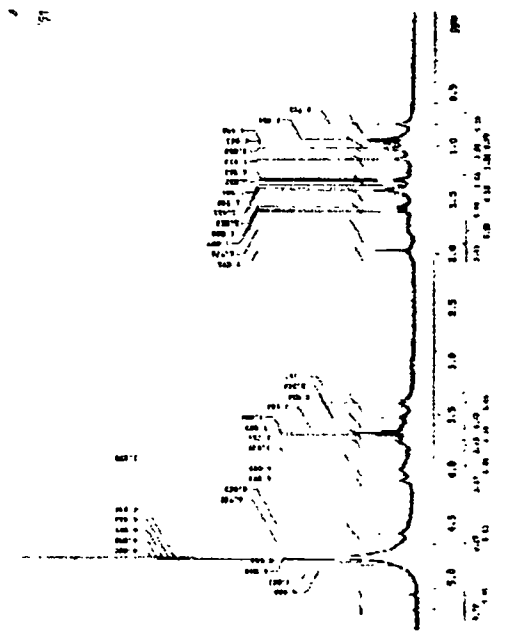
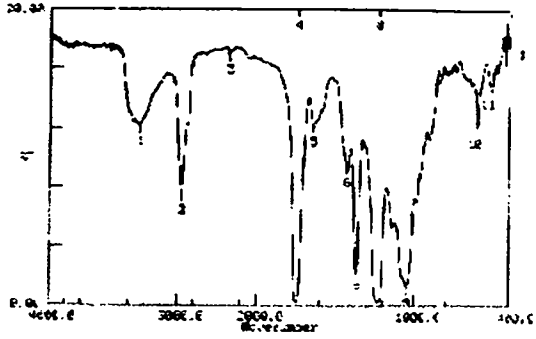


Chart 2. IR spectrum of Pt. #

JACC FT-IR-3530
 Date 4 20/90-80 08:25
 File Name 1
 Sample Name 6300285
 Resolution 4
 Slows 8.16
 Bars 8.10
 Acquisition 23



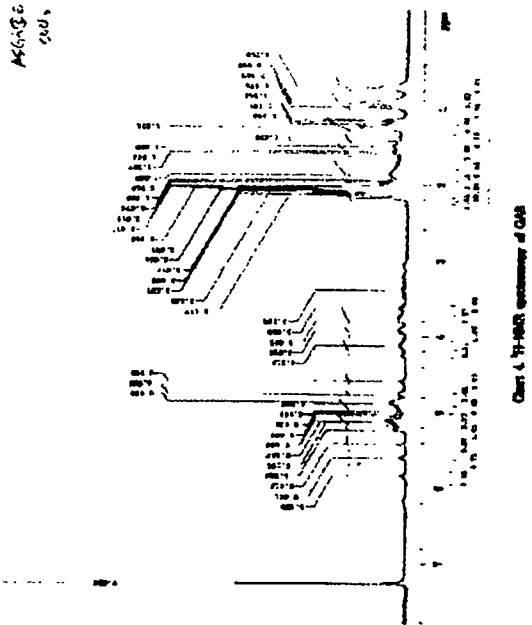
CONDITION

Time	20.00	Lower	0.00	Upper	2.00
------	-------	-------	------	-------	------

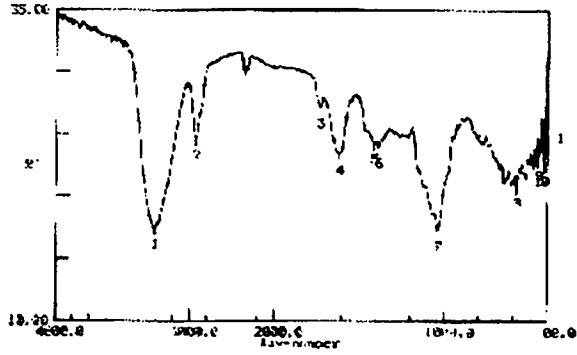
Peak table

1	3479.52	13.1	2	2947.50	7.5	3	2854.15	16.9
4	1747.43	8.2	5	1671.22	12.1	6	1474.22	11.1
7	1277.14	3.1	8	1174.44	3.2	9	1118.57	1.2
10	611.24	12.0	11	528.22	14.7			

Chart 2. IR spectrum of GAB



JRSCO FT IR-5M
 Date : 10/16/80 09:34
 File Name :
 Sample Name : L4
 Resolution :
 Scans : 16
 Gain : 10
 Repetitions : 05



Condition
 upper 25.00 lower 10.00 both 2.00

1721 scale

1	3423.96	17.4	2	2937.85	24.6	3	1720.50	27.2
4	1610.42	23.4	6	1515.88	24.3	7	1508.87	24.8
5	1047.53	17.3	8	586.48	28.5	9	498.24	23.2
10	410.59	22.5						

Chart 5. IR spectrum of L4

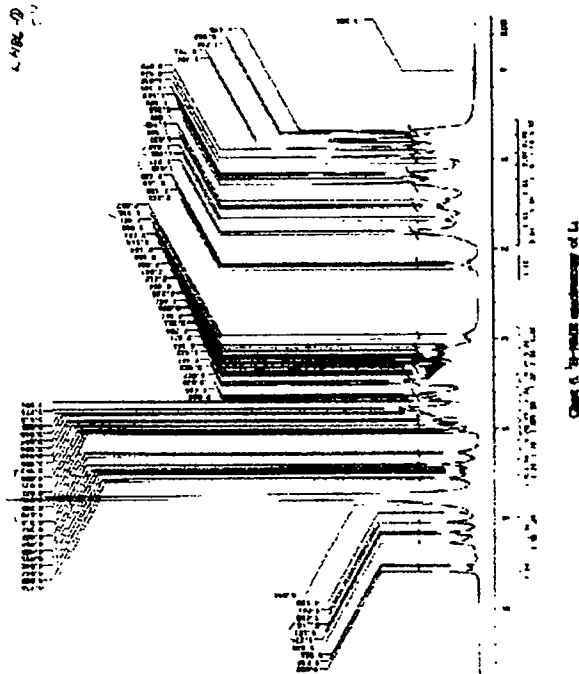


Chart 6. IR spectra of L4

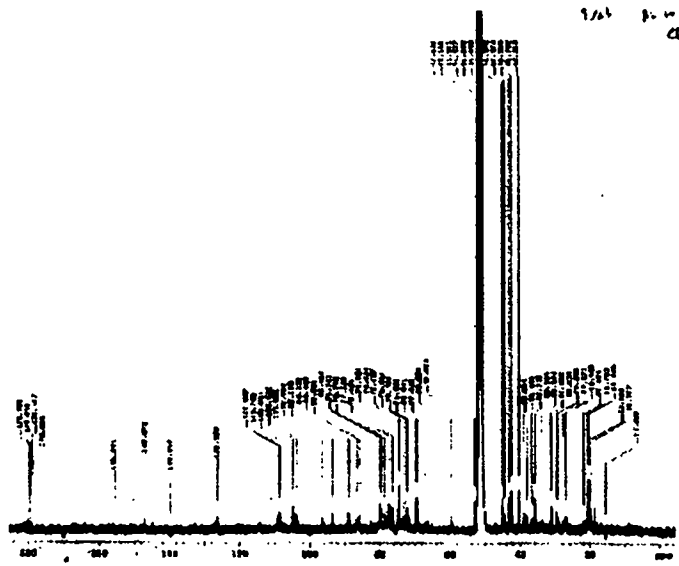


Chart 6. IR-MSR spectrum of Li

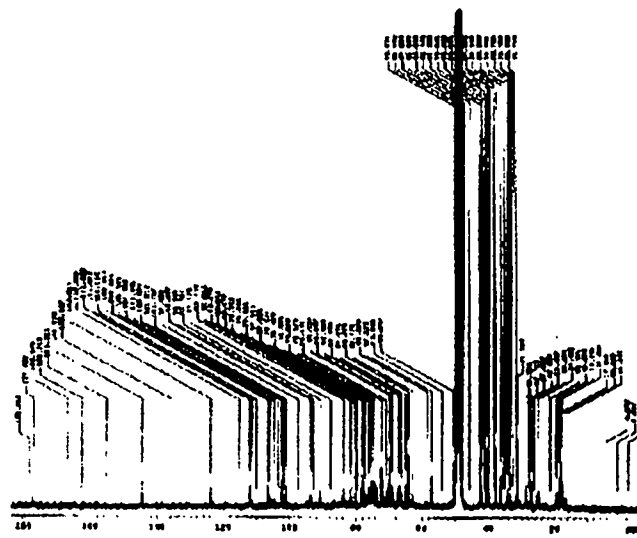


Chart 7. IR-MSR spectrum of Li

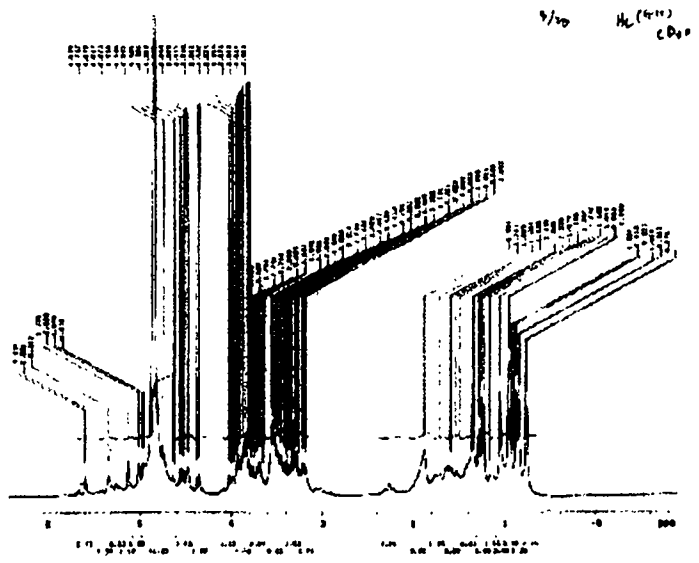


Chart 10. ¹³C-NMR spectrum of Li

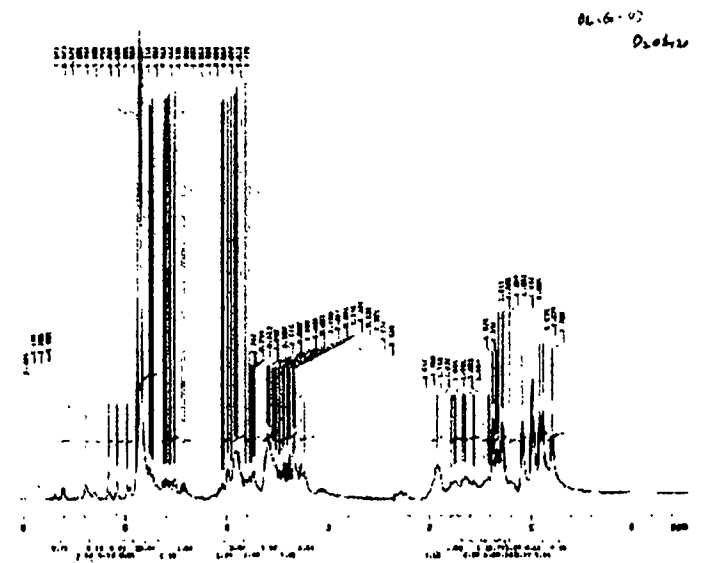


Chart 9. ¹³C-NMR spectrum of Li (with D₂O)

5) 생 참취, 건조 취, 삶은 취의 비교

각 시료의 추출물의 양은 Table 6-18 과 같다. 삶은 취의 경우는 다른 시료보다 물 분획의 양이 상대적으로 적었고 TLC 에서도 부탄올 분획을 CMW 70:30:4 에서 R_f 치 0.5 이하의 극성이 큰 물질들이 생 참취나 건조 참취의 경우에 비해 상대적인 양이 매우 적게 나타났다. 각 시료의 부탄올 분획의 TF 저해작용은 삶은 참취와 삶은 미역취의 경우는 저해작용이 거의 없었고 IC_{50} 이 생 참취는 $9.3 \mu\text{g}/\text{TF unit}$, 건조 참취는 $3.3 \mu\text{g}/\text{TF unit}$, 건조 미역취는 $29.8 \mu\text{g}/\text{TF unit}$ 으로 건조 참취가 건조 미역취보다 작용이 좋게 나타났으나 건조 미역취는 삶아서 건조한 것이므로 비교할 수는 없었고 단지 삶은 것은 상당히 TF 저해작용이 소실된다는 결과를 얻을 수 있었다.

3. 비름나물의 조직인자 저해성분 분리

1) 메탄올 추출물의 분획

메탄올 추출물을 농축한 후 클로로포름 가용성, 에틸아세테이트 가용성, 부탄올 가용성 및 수용성 분획으로 나눈 후 각 분획들의 조직인자 저해활성을 측정 한 결과는 다음 Table 6-18과 같다. 저해활성은 수용성 분획에서 가장 크게 나타났으며 부탄올 가용성 분획이 그 다음이었다.

2) 부탄올 가용성 분획의 저해활성 성분 분리

부탄올 가용성 분획에 메탄올을 첨가하여 정치시킨 후 여과한 상징액 부분을 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 얻어진 여러 분획들의 조직인자 저해활성을 각각 측정한 결과는 다음 Table 6-19와 같다. 총활성이 가장 높은 클로로포름:메탄올 5:1 및 클로로포름:메탄올:물 70:30:4 분획으로 세파덱스 LH-20 크로마토 그래피를 각각 실시하였으며 그 결과 두 개의 피크가 얻어졌고 현재 계속 분리 중에 있다.

3) 수용성 분획으로부터 저해활성 성분 분리

수용성 분획에 메탄올을 첨가하여 정치시킨 후 여과한 상징액의 실리카겔

크로마토그래피를 실시하여 얻어진 여러 분획들의 조직인자 저해활성을 측정한 결과는 다음 Table 6-20와 같다. 실리카겔 크로마토그래피의 결과 얻어진 여러 분획중 총활성이 가장 높은 클로로포름:메탄올:물 70:30:4 분획을 두 번에 나누어 세파텍스 LH-20 크로마토그래피를 실시한 결과 세 개의 피크가 얻어졌으며 현재 계속 분리중이다.

수용성 분획에 메탄올을 첨가하여 정치시킨 후 여과했을 때 침전 부분 286 g을 85% 메탄올에 용해시킨 후 정치시켜 여과하여 상징액을 얻는 과정을 여러번 반복하였다. 최종적으로 얻어진 약 116 g을 세 번에 나누어 세파텍스 LH-20 크로마토그래피를 실시한 결과 세 개의 피크가 얻어졌으며 현재 계속 분리중이다.

제 4 절 결론

1. 국내산 참취 (*Aster scaber*)의 TF 저해작용 성분을 분리 하고자 하였으며 작용 성분은 용매 분획하였을 때 부탄올 분획으로 가장 많이 이행되며 물 분획으로도 상당량 이행된다. 아세톤으로 분획시에는 아세톤:물 3:1의 가용부분이며 아세톤:물 8:1의 침전 부분으로 이행되는 사포닌이다.
2. 참취의 작용성분은 TF 저해작용 물질과, TF를 첨가하지 않은 혈장의 *recalcification time* 자체를 연장시키는 작용물질의 두 가지 물질군이며 이것이 각각 다른 물질에 의한 것인지 한가지 물질이 동시에 두가지 작용을 나타내는 것인지는 확실히 결론 짓기 어려우나 참취의 TF 저해작용은 하나의 물질이 아니며 유사한 구조를 가진 여러 사포닌들의 복합작용인 것으로 보인다.
3. *Pasma recalcification time* 자체를 연장시키는 작용물질 L_2 은 $EC_{50}=22\mu g/100\mu l$ plasma 이었으며 *echinocystic acid*의 *glycoside*로서, 구성당은 *rhamnose*, *xylose*, 그리고 *arabinose* 또는 *mannose*, 그 밖에도 *glucuronic acid*가 붙어 있을 가능성이 있는 극성이 매우 큰 사포닌으로 추정된다.
4. L_2 는 부분가수분해후 두개의 *major spot*을 보였고, TF 저해작용이 부분가수

분해 전에는 거의 나타나지 않았으나 부분가수 분해후 훨씬 증가하여 $IC_{50}=0.13 \mu\text{g}/\text{TF unit}$ 이었고, 부분 가수분해 전에 나타났던 plasma recalcification time 연장 작용은 소실되었다.

5. Fr. BL2 의 부분 가수분해물은 TF저해작용이 $IC_{50}=0.084 \mu\text{g}/\text{TF unit}$ 이었고 methylation한 후 분리한 2개의 물질 A, C 는 methylation 전보다 다소 작용이 떨어지기는 했으나 TF 저해작용이 남아있었고 각각 $IC_{50}=8.2 \mu\text{g}/\text{TF unit}$, $IC_{50}=1.7 \mu\text{g}/\text{TF unit}$ 이었다. A와 C의 구조가 결정되면 TF 저해 활성과 참취의 여러 유사 사포닌들의 구조와의 상관 관계를 밝히는데 좋은 자료가 될 것으로 보인다.

제 7 장

야생 식용 및 약용 식물자원 수집과 증식

제 1 절 서설

우리나라에서 자생하고 있는 3,500여 종의 식물 중에서 약용 및 식용으로 쓰인 식물은 약 1,500종이나 된다. 그러나 이중에서 작물로서 재배되는 것은 소수에 불과하다. 이 연구에서는 일부 약용식물을 포함한 야생 식용식물을 채집하여 보존하고, 증식하여 약리효과 평가를 위한 재료로 제공하고는 것이 일차적 목표이다. 이를 위해 우선 한국에 자생하고 있는 식물을 대상으로 고문헌(古文獻)과 민속식물 전문가를 활용하여 이들에 대한 데이터 베이스를 작성하고, 약리 평가를 바탕으로 활성이 우수한 식물자원을 작물로서 재배할 수 있는 기반 기술을 확립하여 농가소득의 향상을 꾀하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 자원식물 조사

문헌탐색 및 전문가 초청 자문을 통하여 500여종의 자생식물의 분포지, 생육적지, 용도, 개화기, 이용부위, 번식방법 등에 대하여 데이터 베이스를 구축하였으며, 전문가 자문을 기초로 하여 94종을 선정하여 이들을 수집하고 번식 및 보존을 하였다. 이들 목록은 Table 7-1에 제시하였다.

문헌탐색에 사용된 도서는 대한식물도감, 한국농식물자원도감, 약용작물재배, 한국의 자원식물, 한국의 자생식물, 한국의 약용식물도감, 약용식물의 이용과 신재배 기술, 약초재배와 이용법, 한국민속채소의 이용과 효능, 약이 되는 야생초, 한국식물 도감, 한국원예식물도감, 중국본초도감, 꽃길사진여행, 야생화촬영, 한국의 자원 CD-ROM, 쉽게 찾는 우리꽃 등이다.

2. 자원식물 수집, 번식 및 보존

가. 식물 보존포와 증식포: 서울대학교 농생대 농원예학관 남단에 보존포장 330㎡를 확보하였고, 이외에 증식용 플라스틱 하우스 (서울대 농생대 농장내, 245㎡, 중 플라스틱 피복, 2중 측창 환기, 차광막, 자동 미스트, 관수 장치)를 설치하였다. 보존포에는 100여종의 식용 및 약용 자생 식물을 보존하고 있다. 또한 자생 식물의 수집량이 증가함에 따라서 포장이 협소하여 보존포 측면에 15m × 10m의 포장을 조성하고, 각 2m×1m의 폭으로 번식용 베드를 조성하였으며, 5m × 6m의 포장을 별도로 조성하여 식용 감국을 증식식재 하였다.

3. 자생 국화류 및 제비꽃 유전자원 보존포 조성

자생 국화류와 제비꽃은 관상용이나 화훼류로만 생각하기 쉬우나 고문헌이나 민간요법에서는 이들을 약용과 식용으로 사용되어 왔으므로 유전자원의 보존측면에서 매우 중요하다. 따라서, 유전자원을 보존하고자 자생국화 및 제비꽃 포장을 조성하여 국내에서 수집한 자생 국화류와 제비꽃류를 모두 보존하고 있다.

4. 자생 식물 자생지 자원조사 및 채집

강원도 평창군 횡계면 제왕산, 강원도 문막, 강원도 발왕산, 충북 단양군 소백산, 강원도 설악산, 농촌진흥청 작물시험장 특용작물과, 서울대 농생대 수목원, 광릉수목원, 한택식물원, 강원도 태백산, 무안군 승달산, 목포시 유달산, 진도군, 완도군, 전주수목원 일대, 남해군, 고성군, 김해, 포함시 해변가, 포함시 기청산 식물원 일대, 경기도 남양주시 천마산 일대, 전북 임실군 운암면 일대, 강원도 횡성군· 양양군 일대, 강원도 평창군 가리왕산 일대, 충남 태안군 안면 창기리, 안면도 일대, 강원도 춘천시 삼악산, 오봉산 일대, 경기도 가평군 명지산 일대의 자생 식물을 조사하고 수집하여 보존하고 있다.

5. 분석용 시료의 공급

개오동, 쪽동백, 때죽나무, 쉼뚝나무, 장딸기, 등골나물, 곤달비, 등근바위솔, 들단풍, 단풍마, 금마타리, 물레나물, 꽃머느리밥풀, 더위지기, 아욱제비꽃, 양지꽃, 애

기나리, 둥글레, 승마, 금낭화, 쥐오줌풀, 둥글레, 족도리풀, 개취땅나무, 쇠뜨기, 갈퀴나물, 감국, 더위지기, 우슬(쇠무릎) 등이며 이들은 제 2 장에 별표로 제시되어 있다.

6. 증식 및 재배환경 실험

종자발아실험을 통한 증식방법의 개발을 행하였으며, **growth chamber** 내에서 종자발아에 필요한 광조건, 온도조건, 저온처리 등에 관한 실험을 행하였다. 또한 후숙이 필요한 종자의 경우 층적저장을 통한 후숙실험을 행하였으며, 이를 바탕으로 실제 토양조건하에서 파종을 행하여 증식을 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 연구내용

37종의 종자발아실험을 수행하여, 발아율과 발아세를 조사하였으며, 이를 바탕으로 추가 실험을 수행하였다. 이외에 삼목 번식실험, 재배환경 규명을 위한 내음성 실험을 수행하였다.

2. 발아력 실험

가. 맥문동

채종 후 바로 파종하면 발아력이 떨어지며, 곰팡이의 발생에 의하여 발아력이 현저하게 떨어졌다. 곰팡이의 발생을 억제하는 **hypochloride 4%** 용액에 1분간 침지하고, 4℃(30일 이상) 저온 처리시 발아력 향상되었다. 또한 광의 유무에 관계없이 발아를 하였다.

나. 금낭화

자생지 환경에서는 발아가 잘 이루어지지만 인공 토양이나 **petri dish**에서는 발아가 이루어지지 않는다. 실험수행 결과로 이는 금낭화 종자의 후숙에 의한 것

으로 파악되었으며, 후숙에는 25℃에서 60일 정도를 경과해야 하며 이후 저온을 조우해야만 발아를 하였다. 따라서 금낭화의 종자는 채종 후에 바로 층적 저장을 행한 후에 이듬해에 파종하는 것이 발아에 최적조건이 되었다.

다. 나리류

털중나리와 하늘말나리를 제외하고는 종자의 임실율이 낮아 발아율이 매우 낮았으며, 곰팡이를 발생으로 인한 발아력이 현저하게 하락하였다. 하늘말나리는 파종 후 30일 이후에 발아가 시작되어 다른 나리류에 비해 발아속도가 늦었으며, 광조건하에서 암조건보다 발아율이 다소 높았고, 광주기(16시간 광, 8시간 암) 조건에서는 발아율이 광조건보다 높게 나타났다.

참나리는 주로 주아나 인편삼을 통해서 번식하는 것이 유리하였으며, 그 이유는 참나리가 3배체를 이루고 있어서 종자를 형성하지 않기 때문이다. 또한 2배체인 경우도 있기 때문에 이 경우에는 종자로 번식하기도 한다. 주아는 수발아를 하거나 토양에 떨어져서 발아가 이루어져 유근이 돌출하지만, 유엽이 형성되어 지상부로 출현하기 위해서는 반드시 저온을 필요로 하였다.

라. 도라지

도라지는 광·암조건에 관계없이 발아가 이루어졌으며, 광주기 (16시간 광, 8시간 암조건) 하에서는 발아율이 더욱 향상되었다.

마. 산마늘

산마늘은 민간에서 나물(잎)로서 많이 사용하는 식물로써 분주와 실생에 의해서 번식한다. 분주를 이용하는 경우에는 번식률이 높지 않으나 종자로 번식하는 경우에는 종자의 저장기간이 증가함에 따라 발아율이 현저하게 저하하게 되므로 채종 후 즉시 파종하면 발아율의 향상을 꾀할 수 있었다.

바. 원추리류

왕원추리는 4배체로써 종자가 맺히지 않아 종자번식을 할 수 없었으며, 포기 나누기를 통해서 번식을 하지만 2-3년에 한 번정도 할 수 있다. 원추리나 각시원

추리, 골잎원추리는 4℃, 30일 이상 처리 시에 발아율이 향상되었으며, 120일 이상 저온 처리 시에는 발아율이 떨어졌다.

사. 구절초류

동해안과 울릉도에 자생하는 해국과 섬쑥부쟁이, 갯쑥부쟁이 그리고 개울가에 자생하는 가새쑥부쟁이, 쑥부쟁이는 발아율이 10일내 90% 정도로 발아율이 높았으나, 내륙지역에 자생하는 종들은 비교적 발아율이 낮게 나타났다.

아. 구릿대, 두메부추

항온, 변온에 관계없이 발아율이 매우 낮았다. 추후 실험이 필요한 식물로서, 미나리와 같이 후숙을 통해서 배의 성숙이 진행되어 발아가 이루어질 것으로 추정되므로 층적처리 후 저온처리를 행할 필요가 있을 것으로 보인다.

사. 배쪽나리

변온조건 (25/15℃)에서 10일째 55% 정도로 발아율이 높기 때문에 특별히 발아력을 높이기 위한 실험은 필요로 하지 않았다.

자. 쥐똥나무의 발아실험

발아율이 매우 낮아 거의 이루어지지 않았으며, 종피 제거 시에는 발아율이 다소 상승하였으며, 종피에 의한 산소와 수분의 유입이 방해되기 때문으로 추정하여 종피처리 (화학약제, 물리적 상처)를 행하였으나 발아율은 향상되지 않았다. 따라서 종피에 발아억제물질이 존재하는 것으로 추정되었으며, 이를 구명하기 위한 실험을 수행중이다.

차. 우산나물, 울릉미역취

우산나물은 발아율도 매우 낮았으며, 종자의 형태적 특성으로 인한 소독이 어렵고, 곰팡이의 발생율이 높아 종자수명에도 좋지 않은 결과를 나타냈다.

카. 개미취아족

종자발아와 더불어 근삽 (2-3마디) 번식이 잘 되었고, 효율도 높게 나타났다. 구절초의 삼목 번식에는 vermiculite 배지를 이용하는 것이 토양내의 수분유지력이 좋아서 발근에 효과적이었다. 그러나, 한라구절초, 울릉구절초, 서흥구절초 등은 왜성으로 절간이 짧기 때문에 삽수를 확보하기가 어려운 단점이 있었다. 따라서 인위적인 종자발아법이나 조직 배양을 통한 번식을 행할 필요가 있었다.

3. 재배환경규명 실험

가. 송악과 수호초의 차광율에 따른 생육율

송악은 35%~75%에서 생육이 양호하였으며, 수호초 또한 5% 차광 지역을 제외한 곳에서는 전반적으로 생육이 양호하였다. 일반적인 자생식물들의 자생지는 몇몇 종들을 제외하고는 수림지에서 자라는데, 이들을 채집한 후 곧바로 양지에서 생육을 시키게 되면 생육이 억제 되어 자라게 된다. 또한 고산성 식물들을 식재하는 경우에도 동일한 결과를 나타내는데, 이 경우에는 종자파종을 통해서 유묘 단계에서 순화과정을 거치면, 생육에 지장이 없었다.

나. 해국의 월동 가능성 탐구

해국은 해안가에 위치하여 상륙성을 지니며, 내한성이 약하여 내륙지방에서의 식재와 재배가 어려울 것으로 추정되었으나, 이들을 식재하여 월동시킨 결과 수원 지방에서는 월동이 충분히 가능한 것을 확인하였으나, 상륙성의 유지는 어려웠다. 따라서 겨울철에 어느 정도의 온실조건이면 어느 곳에서도 높은 연료비를 투자하지 않고도 재배가 가능할 것으로 보인다.

Table 7-1. List of Korean wild edible plants collection by Professor KS Kim at Department of Horticulture, Seoul National University as of December 1998.

Plant name	family name	Scientific name	English common name
뜸 풀	국화과	<i>Achillea siberica</i> Ledeb.	한택, 지피식물원
우산나물	"	<i>Syneilesis palmata</i> Max.	"
곰 귀	"	<i>Ligularia fischeri</i> Tubrcz.	"
딱지꽃	"	<i>Potentilla chinensis</i>	한택, 지피식물원
감국	국화과	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	"
질경이	질경이과	<i>Plantago major</i> L.	교내
하늘나리	"	<i>Lilium concolor</i> var. <i>partheneion</i>	한택, 지피식물원
술나리	"	<i>Lilium cernuum</i> Komarov.	"
땅나리	"	<i>Lilium callosum</i>	"
털중나리	"	<i>Lilium amabile</i>	"
참나리	"	<i>Lilium lancifolium</i> Thunb.	"
애기나리	"	<i>Disporum smilacium</i>	"
뼈쪽나리	"	<i>Tricyrtis dilatata</i>	"
맥문동	"	<i>Liriope platyphylla</i>	"
치녀치마	"	<i>Heloniopsis orientalis</i>	문막
은방울꽃	"	<i>Convallaria keiskei</i>	한택, 지피식물원
하늘말나리	"	<i>Lilium tsingtauense</i>	대관령
원추리	"	<i>Hemerocallis fulva</i> L.	지피식물원
왕원추리	"	<i>Hemerocallis fulva</i> var. <i>kwanso</i> .	한택식물원
फल잎원추리	"	<i>Hemerocallis lilioasphodelus</i>	"
등굴레	"	<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> .	문막
종지나물	제비꽃과	<i>Viola sororia</i> Willd.	
애기기린초	돌나물과	<i>Sedum middendorffianum</i> Max.	한택식물원
돌나물	"	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge.	"
기린초	"	<i>Sedum kamschaticum</i> Fisch.	"
등근잎평의비름	"	<i>Sedum rotundifolium</i>	"
금낭화	양귀비과	<i>Dicentra spectabilis</i> .	문막
노랑매미꽃	"	<i>Hylomecon vernale</i>	한택식물원
초롱꽃	초롱꽃과	<i>Campanula punctata</i>	지피식물원
섬초롱꽃	"	<i>Campanula punctata</i> var. <i>takesima</i>	울릉도
더덕	"	<i>Codonopsis lanceolata</i> Trautv.	문막
도라지	"	<i>Platycodon grandiflorum</i>	한택, 지피식물원
수호초	회양목과	<i>Pachysandra terminalis</i>	"
송악	매자나무과	<i>Hedera rhombea</i>	교내
삼지구엽초	"	<i>Epimedium koreanum</i>	문막
앵초	앵초과	<i>Primula sieboldi</i>	지피식물원
큰앵초	"	<i>Primula jesoana</i>	"
족도리	취방울덩굴과	<i>Asarum sieboldii</i>	오대산근처의 야산
개족도리	"	<i>Asarum maculatum</i>	"
노루오줌	범의귀과	<i>Astilbe chinensis</i> var. <i>davidii</i>	문막

돌단풍	"	<i>Asterphylla rossii</i>	지피식물원
범의귀	"	<i>Saxifraga furumii</i>	"
금꿩의 다리	미나리아재비과	<i>Thalictrum rochebrunianum</i>	문막
복수초	"	<i>Adonis amurensis</i>	한택식물원
매발톱꽃	"	<i>Aquilegia buergeriana</i> var. <i>oxysepala</i>	"
하늘매발톱꽃	"	<i>Aquilegia flabellata</i> var. <i>pumila</i>	"
백작약	"	<i>Paeonia japonica</i>	"
으아리	"	<i>Clematis mandshurica</i>	"
할미꽃	"	<i>Pulsatilla koreana</i>	"
동의나물	"	<i>Caltha palustris</i> var. <i>membranacea</i>	"
노루귀	"	<i>Hepatica asiatica</i>	오대산
섬노루귀	"	<i>Hepatica maxima</i>	한택식물원
부처꽃	부처꽃과	<i>Lythrum anceps</i>	"
백리향	꿀풀과	<i>Thymus quinquecostatus</i>	지피식물원
섬백리향	"	<i>Thymus quinquecostatus</i> var. <i>japonica</i>	한택식물원
용머리	"	<i>Dracocephalum argunense</i>	"
층꽃나무	마편초과	<i>Caryopteris incana</i>	"
광릉갈퀴	콩과	<i>Vicia venosa</i> var. <i>cuspidata</i>	"
땅비싸리	"	<i>Indigofera kirilowii</i>	"
마삭줄	협죽도과	<i>Trachelospermum asiaticum</i>	"
훈아비꽃대	훈아비꽃대과	<i>Chloranthus japonicus</i>	대관령
용담	용담과	<i>Gentiana scabra</i> var. <i>buergeri</i>	오대산근처 야산
술패랭이	석죽과	<i>Dianthus superbus</i> var. <i>longicalycinus</i>	지피식물원
동자꽃	"	<i>Lychnis cognata</i>	"
범부채	"	<i>Belamcanda chinensis</i>	작물시험장
줄사철	노박덩굴과	<i>Euonymus fortunei</i> var. <i>radicans</i>	한택식물원
미역줄나무	"	<i>Celastrus orbiculatus</i>	"
머루	포도나무과	<i>Vitis coignetiae</i>	문막
삼백초	삼백초과	<i>Saururus chinensis</i> Baill.	지피식물원
속새	속새과	<i>Equisetum hyemale</i> L.	"
줄방제비꽃		<i>Viloa acuminata</i> L.	지리산, 가야산, 유명산
태백제비꽃		<i>V. alboda</i> P.	설악산
등근털제비꽃		<i>V. collina</i> B.	지리산
금강제비꽃		<i>V. damantiaca</i> N.	중양산
간도제비꽃		<i>V. dissecta</i> L.	백두산
남산제비꽃		<i>V. dissecta</i> var. <i>chaerophylloides</i> M.	광릉, 지리산
단풍제비꽃		<i>V. dissecta</i> var. <i>takahashii</i> T.	광릉, 지리산
낙시제비꽃		<i>V. grypoceras</i> A.	광릉, 관악산
좁낙시제비꽃		<i>V. grypoceras</i> var. <i>exilis</i> N.	한라산
흰털제비꽃		<i>V. hirtipes</i> S.	관악산
아욱제비꽃		<i>V. hondoensis</i> W.	울릉도
화엄제비꽃		<i>V. ibukana</i> M.	울릉도, 지리산
광릉제비꽃		<i>V. kamabayashi</i> N.	광릉
잔털제비꽃		<i>V. keiskei</i> M.	울릉도, 중양산

큰줄방제비꽃		<i>V. kusanoana</i> M.	울릉도
흰젓제비꽃		<i>V. lactiflora</i> L.	강화도
제비꽃		<i>V. mandshurica</i> W.	광릉, 지리산, 수원
노랑제비꽃		<i>V. orientalis</i> B.	한라산
긴잎제비꽃		<i>V. ovato-oblonga</i> M.	보길도, 한라산
흰제비꽃		<i>V. patrinii</i> D.	수원
털제비꽃		<i>V. phalacrocarpa</i> M.	한라산
고깔제비꽃		<i>V. rossii</i> H.	광릉, 칠보산
외제비꽃		<i>V. selkirkii</i> P.	
서울제비꽃		<i>V. seoulensis</i> N.	
길오징어나물		<i>V. sieboldiana</i> M.	
미국제비꽃		<i>V. sororia</i> W.	
섬제비꽃		<i>V. takeshimana</i> N.	
알록제비꽃		<i>V. variegata</i> F.	
콩제비꽃		<i>V. verecunda</i> A.	
왕제비꽃		<i>V. websteri</i> H.	
호제비꽃		<i>V. yedoensis</i> M.	
구절초	국화과	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> subsp. <i>latilobum</i> Kitamura	대관령의 10곳
낙동구절초		<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>naktongense</i> Y. Lee	고 양
바위구절초		<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> Kitamura	오 대 산 가 남 산
포천구절초		<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>temusectum</i> Kitamura	포 천
서흥구절초		<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>leiophyllum</i> T. Lee	고 성 군
감 국		<i>C. indicum</i> Nakai	대 관 령 수 원
산 국		<i>C. boreale</i> Nakai	대 관 령
벌개미취		<i>Gymnaster koraiensis</i> Kitamura	농대수목원 천 등 산 대 관 령
가새쑥부쟁이		<i>Kalimeris incisa</i> Kitamura	왕 방 산 강 화 도
쑥부쟁이		<i>K. yomena</i> Kitamura	왕 방 산 강 화 도
웅긋나물		<i>Aster fastigiatus</i> Kitamura	왕 방 산 신 갈
개 미 취		<i>A. tataricus</i> L.	대 관 령 농대수목원 이영주농장 하 진 부
좁개미취		<i>A. maackii</i> Kitamura	원예연구소
해 국		<i>A. spathulifolius</i> Kitam.	양 양
각시원추리	백합과	<i>Hemerocallis dumortieri</i> Morren.	경기도 문막
아욱제비꽃	제비꽃과	<i>Viola hodoensis</i> W. Beck et. H. Boiss.	경기도 문막
은난초	난과	<i>Cephalanthera erecta</i> Blume.	경기도 용인 88 CC 야산
천남성	천남성과	<i>Arisaema amurense</i> Max var. <i>serratum</i> Nakai.	강원도 계방산

바람꽃	미나리아재비	<i>Anemone narcissiflora</i> L.	강원도 대관령
양지꽃	장미과	<i>Potentilla fragarioides</i> L. var. <i>major</i> Max.	경기도 유명산
등글레	백합과	<i>Polygonatum odoratum</i> Druce. var. <i>pluriflorum</i> Ohwi.	경기도 용문산
애기나리	백합과	<i>Disporum smilacum</i> A. Gray	경기도 명지산
갈퀴나물	콩과	<i>Vicia amoena</i> Fischer.	강원도 건봉산
참취	국화과	<i>Aster scaber</i> Thunberg.	강원도 발왕산
큰애기나리	백합과	<i>Disporum viridescens</i> Nakai.	강원도 계방산
꼭두서니	꼭두서니과	<i>Rubia akane</i> Nakai.	경기도 용문산
취오줌풀	마타리과	<i>Valeriana fauriei</i> Briquet.	경기도 유명산
미치광이풀	가지과	<i>Scopolia parviflora</i> Nakai.	강원도 대관령
방가지동	국화과	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	경기도 문막
피나물	양귀비과	<i>Hylomecon hylomeconoides</i> Y. Lee.	울릉도
애기똥풀	양귀비과	<i>Chelidonium majus</i> L. var. <i>asiaticum</i> Ohwi.	소백산
사철쭉	국화과	<i>Artemisia capillaris</i> Thunberg.	소백산
쇠무릎	비름과	<i>Achyranthes japonica</i> Nakai.	건봉산
엉겅퀴	국화과	<i>Cirsium maackii</i> Max.	명지산
큰엉겅퀴	국화과	<i>Cirsium pendulum</i> Fischer.	발왕산
난쟁이붓꽃	붓꽃과	<i>Iris usflora</i> Pallas.	유명산
참평의다리	미나리아재비	<i>Thalictrum actaeifolium</i> Seb. et Zucc. var. <i>brevistylum</i> Nakai.	계방산
금평의다리	미나리아재비	<i>Thalictrum rochebrunianum</i> Franch. et Savat.	용문산
금낭화	양귀비과	<i>Dicentra spectabilis</i> L.	대관령
천문동	백합과	<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merr.	유명산
까치수영	앵초과	<i>Lysimachia barystachys</i> Bunge.	명지산
구절초	국화과	<i>Chrysanthemum zawadskai</i> Herb. ssp. <i>latilobum</i> (Maxim.) Kitagawa	경남 남해 서면 경남 고성 동해면
남구절초	국화과	<i>Chrysanthemum zawadskai</i> Herb. ssp. <i>yezoense</i> (Maekawa) Y. Lee comb. nov.	경남 고성 동해면, 포항 기창산식물원
한라구절초	국화과	<i>Chrysanthemum zawadskai</i> Herb. ssp. <i>coreanum</i> (Nakai) Y. Lee stat. nov.	포항 기창산식물원
산국	국화과	<i>Chrysanthemum boreale</i> (Makino) Makino	경남 남해군 서면
석창포	천남성과	<i>Acorus gramineus</i> Solander	경남 남해군 서면
갯개미취	국화과	<i>Aster tripolum</i> Linné	경남 고성군 동해면
금창초(금란초)	꿀풀과	<i>Ajuga decumbens</i> Thunberg	경남 고성군 동해면
기린초	돌나물과	<i>Sedum kamschatcicum</i> Fischer	경남 고성군 동해면
함등골나물	국화과	<i>Eupatorium chinensis</i> Linné for, <i>tripartitum</i> Hara	경남 고성군 동해면
배초향(방아풀)	꿀풀과	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. et Meyer) O. Kunze	경남 고성군 동해면
삼주	국화과	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.	경남 고성군 동해면
이질풀	쥐손이풀과	<i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	경남 고성군 동해면
잔대	초롱꽃과	<i>Adenophora triphylla</i> (Thub.) A. DC. var. <i>japonica</i> (Regel) Hara	경남 고성군 동해면
참취	국화과	<i>Aster scaber</i> Thunberg	경남 고성군 동해면
인동명굴	인동과	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg	부산 기장군 연화리
번행초	석류풀과	<i>Tetragonia tetragonoides</i> (Palls) O. Kunze	부산 기장군 연화리
천문동	백합과	<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Marr.	부산 기장군 연화리

얇은부채	천남성과	<i>Symplocarpus renifolius</i> Schott et Miquel	남양주시 천마산
복수초	미나리아재비	<i>Adonis amurensis</i> Regel et Raddde	"
미치광이풀	가지과	<i>Scopolia parviflora</i> Nakai.	"
얼레지	백합과	<i>Erythronium japonicum</i> Decne.	"
완판나물	백합과	<i>Disporum sessile</i> D. Don ssp. <i>flavens</i> Kitagawa	전북 임실군 운암면
참나리	백합과	<i>Lilium lancifolium</i> Thunberg.	"
자주괴불주머니	양귀비과	<i>Corydalis incisa</i> Pers.	"
익모초	꿀풀과	<i>Leonurus sibiricus</i> Linne.	"
괘이밥	괘이밥과	<i>Oxalis corniculata</i> Linne.	"
광대수염	꿀풀과	<i>Lamium album</i> var. <i>barbatum</i>	"
참취	국화과	<i>Aster scaber</i> Thunberg.	강원도 횡성, 양양군
도라지	초롱꽃과	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC	"
더덕	초롱꽃과	<i>Codonopsis lanceolata</i> Trautv.	"
꿀풀	꿀풀과	<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>asiatica</i> Hara	"
향유	꿀풀과	<i>Elsholtzia ciliata</i> Hylander	"
꽃향유	꿀풀과	<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai et F. Maekawa	"
배초향	꿀풀과	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntze	"
털중나리	백합과	<i>Lilium amabilis</i> Palbin	"
말나리	백합과	<i>Lilium distichum</i> Nakai et Kamibayashi	"
죽대아재비	백합과	<i>Streptopus amplexifolius</i> L. var. <i>papillatus</i> Ohwi	울릉도
큰천남성	천남성과	<i>Arisaema ringens</i> Schott.	울릉도
왕송대	백합과	<i>Smilacina japonica</i> A. Gray var. <i>mandshurica</i> Max.	울릉도
얼레지	백합과	<i>Erythronium japonicum</i>	소백산
지리바꽃	미나리아재비	<i>Aconitum chiisanense</i> Nakai.	발왕산
참나물	산형과	<i>Pimpinella brachycarpa</i> Nakai.	발왕산
노루귀	미나리아재비	<i>Hepatica asiatica</i> L.	울릉도
용등굴레	백합과	<i>Polygonatum involucreatum</i> Max.	용인 88cc 야산
마타리	마타리과	<i>Patrinia scabrusaeifolia</i> Jussieu	강원도 가리왕산 일대
금마타리		<i>Patrinia sanculaefolia</i> Hemsley	"
큰고깔제비꽃	미나리아재비과	<i>Delphinium maackianum</i> Regel	"
괘의비름	돌나물과	<i>Sedum spectabile</i> Boreau	"
기린초		<i>Sedum kamschaticum</i> Fischer	"
애기기린초		<i>Sedum muddendorffianum</i> Max.	"
단풍마	마과	<i>Dioscorea quinqueloba</i> Thunberg.	"
더위지기	국화과	<i>Artemisia iwayomogi</i> Kitamura	"
꽃머느리발풀	현삼과	<i>Melampyrum roseum</i> Max.	"
부처손	부처손과	<i>Selaginella tamariscina</i> Spring	"
돌단풍	국화과	<i>Acenophyllum rossi</i> Enlger	"
산부추	백합과	<i>Allium thunbergii</i> G. Don	"

좁쌀풀	앵초과	<i>Lysimachia vulgaris</i> L.	"
참좁쌀풀		<i>Lysimachia koreana</i> Nakai	"
애기원추리	백합과	<i>Hemerocallis minor</i> Miller	"
물레나물	물레나물과	<i>Hypericum ascyron</i> L.	"
넓은잎잔대	초롱꽃과	<i>Adenophora divaricata</i> Frach et. Kitagawa	"
삼주	국화과	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.	"
은대난초	난과	<i>Cephalanthera longibracteata</i> Blume	"
애기노루발	노루발과	<i>Pyrola denticulata</i> Koidz.	"
솔나리	백합과	<i>Lilium cernuum</i> Komarov	"
비짜루	백합과	<i>Asparagus schobenioides</i> Kunth	"
좁개미취	국화과	<i>Aster maackii</i> Regel	"
등골나물	국화과	<i>Eupatorium chinensis</i> L.	"
등근바위솔	들나물과	<i>Orostachys malacophyllus</i> Fisch	"
천문동	백합과	<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merr.	충남 안면도 일대
줄방제비	제비꽃과	<i>Viola acuminata</i> Ledebour	"
까마중	가지과	<i>Solanum nigrum</i> L.	"
산국	국화과	<i>Chrysanthemum boreale</i> M	"
쑥부쟁이	국화과	<i>Kalimeris yomena</i> Kitam.	"
모식대	초롱꽃과	<i>Adenophora remotiflora</i> Miquel.	"
등글레	백합과	<i>Polygonatum</i>	"
숨나물	국화과	<i>Leibnitzia anandria</i> Nakai	"
해국	국화과	<i>Aster spathulifolius</i> Maximowicz	"
산부추	백합과	<i>Allium thunbergii</i> G. Don	"
바위솔	들나물과	<i>Orostachys japonicus</i> Berger	"
기린초	들나물과	<i>Sedum kamschaticum</i> Fischer	춘천시 삼악산
향유(종자)	꿀풀과	<i>Elsholtzia cilaliada</i> Hylander	"
금낭화	양귀비과	<i>Dicentra spectabilis</i> Lemaire	"
투구꽃	미나리아재비과	<i>Aconitum jaluense</i> Komarov	"
남산제비꽃	제비꽃과	<i>Viola dissecta</i> Ledeb. var. <i>chaerophylloides</i>	"
알록제비꽃	제비꽃과	<i>Viola variegata</i> Fischer var. <i>nipponica</i>	"
큰괘이밥	괘이밥과	<i>Oxalis obtriangulata</i> Max.	"
산부추	백합과	<i>Allium thunbergii</i>	춘천시 오봉산
구절초	국화과	<i>Chrysanthemum zawadaskii</i>	"
우산나물	국화과	<i>Syneilesis palmata</i> Max.	"
까치수염(종자)	앵초과	<i>Lysimachia acroadenia</i> Max.	"