

메밀 종자의 항트롬빈 활성과 혈전증 예방효과

손호용^{1*} · 권정숙¹ · 손건호¹ · 권기석² · 류희영¹ · 금은주¹

¹안동대학교 식품영양학과

²안동대학교 생명자원과학부

Antithrombin and Thrombosis Prevention Activity of Buckwheat Seed, *Fagopyrum esculentum* Moench

Ho-Yong Sohn^{1*}, Chong-Suk Kwon¹, Kun-Ho Son¹, Gi-Seok Kwon²,
Hee-Young Ryu¹ and Eun-Joo Kum¹

¹Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²The School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Abstract

Direct thrombin inhibitor, which is effective to prevent or cure the thrombosis, has been investigated in worldwide. In this study, we tried to screen antithrombosis agent from edible or medicinal plant. A strong antithrombin activity was identified from methanol or 95% ethanol extract of buckwheat seeds. The solvent fractionation of buckwheat extracts using hexane, ethylacetate, butanol revealed that the butanol fraction has a prominent antithrombin activity. Thrombin time (blood-clot formation time) exceeded to over 2,000% by addition of the butanol fraction at concentration of 312.5 µg/mL, whereas thrombin time extended to 336% by addition of aspirin at concentration of 1,500 µg/mL. The butanol fraction showed anthrone-positive and ninhydrine-negative reaction. The active components were heat-labile, acid-unstable non-proteinous macromolecules (>30 KD). In vivo analysis using ICR male mouse showed that the buckwheat extract was superior than the aspirin in pulmonary thrombosis, KCN-induced coma and death. Our results suggest that the buckwheat is a potential as an antithrombosis agent and medicinal food.

Key words: antithrombosis, buckwheat seed, *Fagopyrum esculentum* Moench, KCN-induced coma and death, pulmonary thrombosis

서 론

생체 구성성분으로 혈액은 산소, 영양분, 노폐물의 운반 기능과 완충작용, 체온유지, 삼투압 조절 및 이온 평형유지, 수분 일정유지, 액성 조절작용, 혈압의 유지 및 조절, 생체방어 등 다양한 중요 기능을 가지고 있다. 따라서 혈액의 기능적 이상 및 혈액 순환 이상은 다양한 혈관계 질환을 유발하게 되며, 이러한 기능 및 순환 장애가 뇌 및 심장 등에서 나타나는 경우, 생명에 치명적이 되며, 그 후유증 또한 심각하다(1,2). 현재, 서구화된 식생활, 고도로 분화된 사회의 발달과 인구의 고령화에 따라, 뇌졸중, 심근경색 등의 혈관계 질환은 급속히 증가되고 있으며, 혈관계 질환의 사망률 합계는 악성종양에 의한 사망률 전체를 상회하고 있어, 그 대책이 시급한 실정이다(2). 정상적인 혈액 순환은 체내에서의 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호보완적으로 조절되면서 혈액 순환을 용이하게 하며, 이들 중 혈액 응고

반응계의 기작은 혈관벽에 혈소판이 점착, 응집하여 혈소판 혈전을 형성한 후, 혈액 응고계가 활성화되어 혈소판 응집과를 중심으로 피브린 혈전이 형성되는 것으로 보고되어 있다(1). 트롬빈은 혈액 응고에 중추적 역할을 수행하는데, 피브리노겐을 피브린으로 전환하고, 교차 결합된 피브린 혈전을 생성시키며, 혈소판, V인자, VII인자들을 활성화시켜 혈액 응고반응을 촉진시키게 한다. 따라서 과다한 트롬빈의 활성화는 혈전증을 유발하게 되며, 트롬빈 활성 저해물질은 혈액 응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환에 매우 유용한 예방 및 치료제로 사용될 수 있다.

현재까지 혈전성 질환의 예방과 치료에 헤파린, 쿠마린, 아스피린, 유로키네이즈 등의 다양한 항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제 등이 사용되고 있으나, 이들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장애 및 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있는 실정이다(3-5). 따라서, 안전성이 우수한 트롬빈 직접 저해제 개발을 목표로, 식용 및 약용

*Corresponding author. E-mail: hysohn@andong.ac.kr
Phone: 82-54-820-5491. Fax: 82-54-823-1625

식물로부터 트롬빈 저해제 탐색 연구가 국내외에서 지속적으로 이루어지고 있다(6-10).

한편, 메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench)은 쌍자엽 식물의 마디풀과에 속하며 원산지는 동북아시아 또는 중앙아시아로 알려져 있으며 오랫동안 구황식량으로 이용되어 온 작물중의 하나로 분류학상 곡류와는 구별되지만 그 낱알의 조성이 곡류와 비슷하여 일반적으로 잡곡으로 취급되며(9), 2004년 약 2,000톤이 국내에서 생산되었다. 메밀은 전통적으로 홍역, 폐양성 위장병 등 내과적 치료용과 타박상, 악성종기 등 외과적 치료용으로 사용되어 왔으며, 기력을 도와주며, 독소를 해독시키며 노폐물을 제거하는 생리적 기능이 보고되어 있다(11). 또한 메밀은 혈압강화 효능을 가진 루틴을 많이 함유하여, 동맥경화증, 폐출혈, 폐양성 질환, 동상, 치질, 감기치료 등에 그 효과가 인정되어 임상적으로 이용되고 있다(11,12). 메밀 추출물에 대한 보고로는, 항고혈압기능, 혈당조절, 소화효소 저해 활성, ACE 저해활성, 항돌연변이원성 연구, 항산화, 알러지 유발 억제 활성 등(12-18)이 있으며, 이러한 다양한 유용 생리기능의 효능을 증대시키기 위하여 다양한 전처리 방법이나 가공방법들이 시도되고 있다(12). 그러나 메밀의 항혈전활성 및 인간 트롬빈 효소의 저해를 통한 혈전생성저해 효과는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 안전성이 우수한 식용자원인 메밀 종자의 강력한 트롬빈 저해활성을 확인하였으며, 활성성분의 혈전증 예방 및 치료효과를 검증하였다. 이러한 연구결과는 메밀의 유용성분을 포함하면서, 상시복용이 가능하고 안전한 혈행 개선용 건강기능식품 개발을 위한 기초 자료로 이용될 것이다.

재료 및 방법

시료의 제조 및 시약

본 실험에서 사용한 메밀 종자는 강원도 평창군에서 재배되어 봉평농협에서 2005년 6월에 구입한 것으로 메밀껍질의 도정 후, 정선된 것을 사용하였다. 먼저 도정 후 정선된 메밀 종자를 정제수로 세척한 다음 건조하여, 메밀종자 100 g씩 칭량하여 헥산, 메탄올, 주정, 물(30°C), 열수(100°C)를 각각 1 L 가하고 상온에서 14시간 동안 추출하였으며, 추출액은 여과 후 50°C에서 감압·농축하여 분말로 조제하였다. 시료의 대량 조제를 위해서는 메밀종자 70 kg에 400 L 주정을 가하고 60°C에서 40시간 추출한 다음, 다시 주정 200 L를 가해 동일조건에서 2차 추출한 다음 여과하였다. 여과 추출액은 회전감압증발기(Rotavapor R-220, BUCHI)로 시간당 5 L씩 농축하고, 다시 50°C, 650 mmHg의 감압하에서 3일간 진공 건조시켜 메밀 종자 추출물 분말을 수득하였다. 한편 추출물의 분획과정은 먼저 조제된 분말을 증류수에 현탁한 후, 이를 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순서로 분획하고 이후 물 잔류물을 회수하였으며, 각각의 분획물 및 물 잔류물은 상기와 동일한 방법으로 분말을 조제하였다. 준비된 시료

는 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여 트롬빈 저해활성, activated Partial Thromboplastin Time(aPTT) 측정, 열 및 산 안정성 평가에 사용하였다. 실험에 사용한 트롬빈, 아스피린, 헤파린, aPTT reagent, 콜라겐, 에피레프린, rutin 및 tannic acid는 Sigma Co.(USA)로부터 구입하였으며, TLC를 위한 silica gel plate는 Merck Co.(Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

신선동결혈장의 조제

혈장은 최근 1개월 동안 약물투여를 받지 않은 지원자의 전혈로부터 조제하였으며, 채혈 후 즉시 4°C에서 5,000×g로 5분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 냉동한 상태로 보관하였으며(신선동결혈장), 필요시 상온에서 해동하여 사용하였다.

In vitro 항혈전 활성

Thrombin time(TT) : TT 측정의 경우, 기존에 보고(6, 7,10,19,20)된 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)를 이용하여 혈액 응고시간을 측정하여 평가하였다. 37°C에서 0.5 U 트롬빈 50 μL와 20 mM CaCl₂ 50 μL, 다양한 농도의 시료 추출액 10 μL를 coagulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 μL를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 시료 대조구로는 아스피린과 heparin을, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 33초의 응고시간을 나타내었다. TT 결과는 3회 반복한 실험 결과를 SPSS program(version 10.0)을 이용하여 mean±SD로 나타내었으며, 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다(6,7,10,19).

activated Partial Thromboplastin Time(aPTT) : aPTT 측정은 혈장 100 μL와 다양한 농도의 시료 추출액 10 μL를 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온한 후, 50 μL의 aPTT reagent(Sigma, ALEXINTM)를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 배양하였다. 이후 50 μL CaCl₂(35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다(6,7,10). 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였으며, 이 경우 55초의 응고시간을 나타내었다. aPTT의 결과는 3회 반복한 실험 결과를 SPSS program(version 10.0)을 이용하여 mean±SD로 나타내었으며, 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다(6,7,10,19).

항혈전 활성의 안정성 평가 : 메밀의 트롬빈 저해물질의 열 안정성 평가의 경우, 100°C에서 30분 동안 열처리한 후 40°C에서 냉각하여 잔존활성을 측정하였으며, 산 안정성 평가를 위해서는 0.5 N HCl용액에 1시간 동안 실온처리 후, 0.5 N NaOH 용액으로 pH 7로 보정하여 잔존활성을 측정하였다.

In vivo 항혈전 활성

급성독성 평가 : (주)중앙실험동물을 통해 10주령의 웅

성 ICR 마우스를 공급받아 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, $150 \sim 300$ Lux의 조도로 12시간 간격(8시~20시)으로 조절되는 동물실험실에서 14일간 순화시킨 후, 10마리씩 구분하여 각각 주정 추출물 및 이의 부탄올 분획물의 단회경구 독성을 평가하였다. 시료는 올리브 오일(0.2 mL)에 녹인 후, 1,000 mg/kg의 농도로 경구투여하였으며, 일주일간 생존여부와 병적 이상증후를 관찰하였으며, 이후 부검하여 각종 장기의 출혈 및 혈청 생화학적 검사를 실시하였다. 대조구로는 올리브 오일만을 경구투여하였다.

폐색전 실험: 하룻밤 절식시킨 20주령의 웅성 ICR 마우스에 시료(50~150 mg/kg)를 올리브 오일에 현탁 후 경구투여하였으며, 1시간 후 혈전유발 주사액[콜라겐 56.4 $\mu\text{g/mL}$, 에파레프린 6.5 $\mu\text{g/mL}$, CaCl_2 1 mM을 녹인 Hanks' balanced salt solution(Sigma Co., USA)] 0.2 mL를 꼬리 정맥에 주사하여 혈전을 유발하였다(20). 대조구로는 아스피린(150 mg/kg)을 사용하였으며, 주사 후 경련지속 및 뒷다리 마비시간을 측정하였다. 각각의 실험구당 흰쥐는 12마리를 사용하였다.

전뇌 허혈성 혼수유발 실험: 상기 폐색전 실험과 동일한 조건의 흰쥐에 시료 농도가 25, 50, 150 mg/kg되도록 경구투여하고, 1시간 후 비치사량인 1.87 mg/kg 농도로 KCN을 꼬리정맥을 통해 주사하였다(20). 대조구로는 아스피린(150 mg/kg)을 경구투여하였으며, 용매 대조구로는 올리브 오일만을 경구투여한 흰쥐를 사용하였다. 실험결과를 정향만 사소실 후 회복하여 원활한 움직임을 보일 때까지의 시간을 측정하였다. 각각의 실험구당 흰쥐는 8마리를 사용하였다.

전뇌 허혈성 치사유발 실험: 상기 전뇌 허혈성 실험과 동일한 조건의 흰쥐에 시료(50 mg/kg)를 경구투여하고 1시간 후, 치사량인 2.5 mg/kg 농도로 KCN을 꼬리정맥을 통해 주사하였으며, 30분 후 치사율을 측정하였다(20). 각각의 실험구당 흰쥐는 30마리를 사용하였다. 대조구로는 아스피린(150 mg/kg)을 경구투여하였으며, 용매 대조구로는 올리브 오일만을 경구투여한 흰쥐를 사용하였다.

기타 분석

총 flavonoid의 함량 측정은 Davis 방법(21)에 따라 측정

하였으며, 각각의 시료를 18시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출검액 400 μL 에 90% diethylene glycol 4 mL를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 μL 를 넣고 37°C 에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 Singleton 등의 방법(22)에 따라 추출검액 400 μL 에 50 μL 의 Folin-ciocalteau, 100 μL 의 Na_2CO_3 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. TLC의 경우에는, silica gel plate(Silica gel 60F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, 클로로포름:메탄올:물(52:28:8 v/v/v)을 전개용매로 하여 전개 후, 10% 황산용액을 분무하여 확인하였다.

통계처리

시료의 산 및 열안정성 실험결과 및 동물실험결과는 SPSS program(version 10.0)을 이용하여 mean \pm SD로 나타내었으며, one-way ANOVA 분석 및 Duncan's multiple range test를 수행하여 그룹간의 유의적 차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

다양한 용매를 이용한 메밀 종자 항혈전 활성성분의 추출
다양한 용매를 이용하여 메밀 종자의 항혈전 활성 성분의 추출을 검토하였다. 추출효율은 열수 추출(6.95% w/w)에서 가장 우수하였으며, 물, 메탄올, 주정, 헥산에서 각각 2.46%, 2.15%, 0.64% 및 0.64%를 나타내었다. 각각의 추출물의 트롬빈 타임을 측정한 결과, 메탄올 및 주정 추출물에서 강력한 트롬빈 저해 활성이 확인되었으며, 동일농도의 아스피린 처리보다 혈전 생성이 각각 2.4배 및 4.6배 지연되었다(Table 1). 한편, 물(30°C , 100°C) 추출물은 128.7~156.5%의 비교적 낮은 트롬빈 저해활성을 보여, 항혈전 활성성분의 추출에는 효과적이지 않음을 알 수 있었다. 따라서 메밀의 항혈전 활성성분 추출에는 메탄올 또는 주정이 효율적임을 알 수 있으며, 수열면에서 메탄올 추출이, 활성물질의 정제 및 식품으로의 이용성 측면에서는 주정 추출이 유리함을 확인하였다.

Table 1. Thrombin inhibition activity of buckwheat seed extracts prepared by different solvents

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Heparin	Aspirin	Thrombin Inhibition (%)				
			Extraction solvent ¹⁾				
			Hexane	Methanol	95%-Ethanol	Water (30°C)	Hot water (100°C)
0	100.0 \pm 1.1	100.0 \pm 1.1	100.0 \pm 1.1	100.0 \pm 1.1	100.0 \pm 1.1	100.0 \pm 1.1	100.0 \pm 1.1
1	125.4 \pm 31.2	- ²⁾	-	-	-	-	-
1.5	>2,000	-	-	-	-	-	-
500	>2,000	136.7 \pm 16.3	110 \pm 4.3	147.6 \pm 35.2	258.4 \pm 40.8	121.7 \pm 5.5	107.2 \pm 2.9
1,250	>2,000	287.5 \pm 45.4	130.8 \pm 3.6	696.5 \pm 215.2	1,328.4 \pm 294	156.5 \pm 9.5	128.7 \pm 1.9

¹⁾Extractions, except for hot water, were conducted at 30°C for 14 hr. For hot water, buckwheat seeds were extracted at 100°C for 30 min.

²⁾Not determined.

Table 2. Thrombin inhibition activity and contents of total flavonoid and polyphenol in the organic solvent fractions from methanol extract of buckwheat seeds

Fraction	Thrombin Inhibition (%)			Total flavonoid (mg/g)	Total polyphenol (mg/g)	Ninhydrin reaction	Anthrone reaction
	Concentration (µg/mL)						
	312.5	625	1,250				
Aspirin	136.7±16.3	ND	287.5±45.4	ND ¹⁾	ND	ND	ND
Hexane	105.21±3.12	164.57±11.27	196.53±4.31	13.56	60.88	- ²⁾	+
EtOAc	186.46±4.22	222.43±0.49	1,058.65±194.12	5.08	17.89	-	+
BuOH	145.34±3.77	453.74±106.67	1,960.78±63.54	18.59	91.40	-	+
Water	ND	105.63±3.24	110.4±4.8	12.75	62.91	-	+

¹⁾ND: not determined. ²⁾-: negative, +: positive.

메밀 종자 메탄올 추출물의 활성분획 및 분획물의 항혈전 활성

메밀종자 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올의 순으로 순차적 유기용매 분획을 실시한 결과, 헥산 분획물 31.26%, 에틸아세테이트 분획물 5.19%, 부탄올 분획물 17.16%을 얻었으며, 물 잔류물은 42.78%를 얻었다. 항혈전 활성은 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서 강하게 나타났으며, 특히 부탄올 분획의 경우 625 및 1,250 µg/mL 농도에서 각각 453.7%, 1,960%의 높은 트롬빈 저해 활성을 보여 혈액응고에 소요되는 시간이 각각 4.5 배 및 19.6배 지연되어 트롬빈 활성 및 혈전생성을 효율적으로 저해함을 알 수 있었다(Table 2). 에틸아세테이트 분획과 부탄올 분획은 다투린 반응에는 음성, 안트론 반응에는 각각 양성을 나타내어 비단백질 성분으로 확인되었으며, 각각의 분획물의 총 플라보노이드 함량 및 폴리페놀 함량을 측정된 결과, 에틸아세테이트 분획의 경우 5.08 mg/g, 17.89 mg/g으로 나타났으며, 부탄올 분획의 경우 각각 18.59 mg/g, 91.4 mg/g으로 활성성분과의 상관관계는 인정되지 않았다.

메밀 종자 항혈전 활성성분의 대량 조제

메밀 종자의 항혈전 활성성분의 대량 조제를 수행하였다. 주정을 이용한 추출효율은 1.34%(w/w)였으며, 추출물의 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물과 물 잔류물 각각의 회수율은 61.19%, 16.42%, 7.46% 및 14.93%이었다. 각각의 분획물의 항혈전 활성 측정 결과, 부탄올 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 강력한 트롬빈 저해 활성을 나타내었으며, 특히, 부탄올 분획은 156.25 µg/mL의 낮은 농도에서 225.95%의 저해활성을 가지며, 312.5 µg/mL에서는 2,000% 이상의 활성을 보여, 대조구인 아스피린보다 훨씬 강력한 혈전생성 억제활성을 나타내었다(Fig. 1). 한편 부탄올 분획물의 aPTT 측정 결과, 312.5 µg/mL의 농도에서 1,000% 이상의 혈액응고 지연효과를 나타내었다. 메밀 종자의 항혈전 성분의 식품 가공 적성평가를 위해 부탄올 분획물의 산 안정성과 열 안정성을 측정된 결과, 0.5 N HCl 용액에 1시간 처리한 경우 급격한 활성 소실이 나타났으며, 100°C에서 30분간의 열처리에 의해서도 60% 정도의 활성을 소실하였다(Fig. 2). 반면 아스피린은 동일한 산처리 및 열처리에 활성감소는 나타나지 않

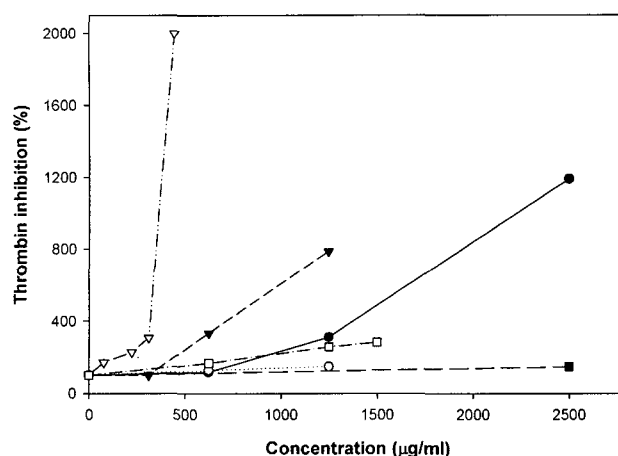


Fig. 1. Thrombin inhibition activity of 95%-ethanol extract and solvent fraction layer of buckwheat seeds.

Thrombin inhibition (%) was determined by measuring of thrombin time of sample and DMSO, as described in materials and methods.

●, ethanol (95%) extract; ○, hexane fraction; ▼, ethylacetate fraction; ▽, butanol fraction; ■, water residue; □, aspirin.

았으며, 약간의 증가가 확인되었다. 따라서 메밀 종자의 항혈전 활성 성분은 산과 열에 비교적 안정하지 못한 특성을 가지므로, 활성성분의 효율적인 이용을 위해서는 비열처리, 비산처리 등의 가공 공정이 필요함을 알 수 있었다. 한편 기존의 메밀 종자의 주요 생리활성물질로 알려진 rutin, ferulic acid 및 myricetin에 의해 항혈전 활성이 나타나는지를 확인하였다. 메밀의 rutin, ferulic acid 및 myricetin 등이 혈관 투과성 증대, 고혈압, 동맥경화, 뇌출혈과 같은 심혈관계 질환의 예방 효과가 보고(23,24)되어 있으나, rutin과 ferulic acid는 아스피린의 50% 정도의 트롬빈 저해 및 항혈전 효과를 나타내었으며, myricetin의 경우 트롬빈 저해효과가 인정되지 않았다(Fig. 3). 또한 TLC 분석 결과, 메밀 추출물 및 활성분획물에서, rutin 및 ferulic acid에 상응하는 물질이 확인되지 않았다(Fig. 4). 또한 부탄올 활성 분획물의 건조물을 70% 에탄올에 용해시킨 후 Amicon YM-30(CENTRICON®, USA)으로 여과한 결과, 트롬빈 저해 활성물질은 분자량 30 K 이상의 고분자 물질임을 확인하였다. 현재 항혈전 활성물질의 순수분리가 진행 중이다.

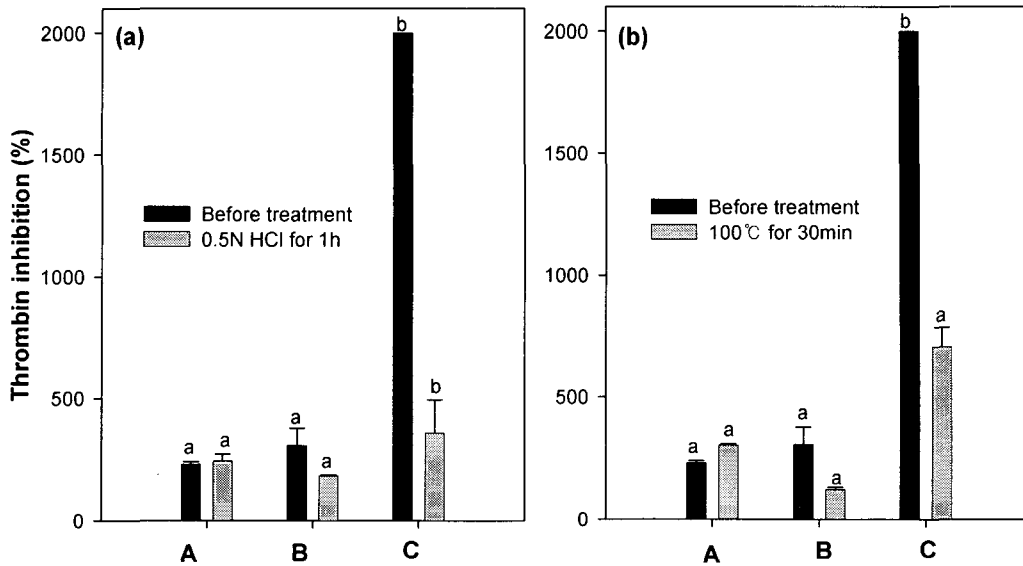


Fig. 2. The stability of thrombin inhibition activity of aspirin and the butanol fraction of buckwheat seeds against (a) acid treatment or (b) heat treatment. A, aspirin (1,250 µg/mL); B, the butanol fraction of buckwheat seeds (225 µg/mL); C, the butanol fraction of buckwheat seeds (312 µg/mL). Means with the same lettered superscripts in a figure are not significantly different at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

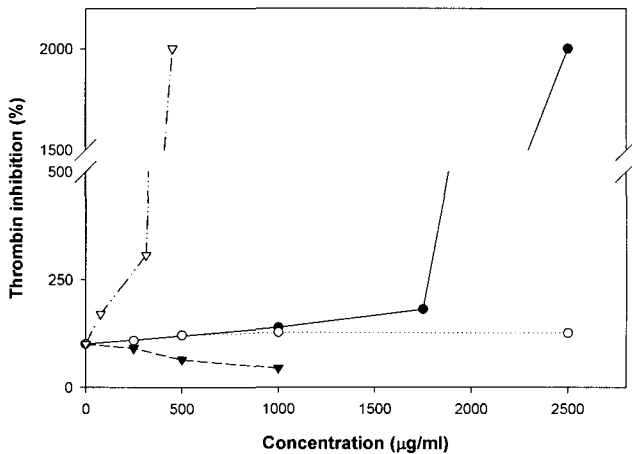


Fig. 3. Thrombin inhibition activity of rutin (○), ferulic acid (●), myricetin (▼), and the butanol fraction of buckwheat seeds (▽). Thrombin inhibition (%) was determined by measuring of thrombin time of sample and DMSO, as described in materials and methods.

동물실험을 통한 메밀 종자 항혈전 활성의 검증

식용으로 사용되고 있는 메밀 종자의 안전성은 확보되어 있으나, 동물실험을 위한 추출물의 농도 결정을 위한 급성 독성평가를 실시하였다. 메밀 종자의 주정 추출물 및 부탄올 분획물을 1,000 mg/kg 단회 경구투여한 경우, 병적 이상 징후나 장기 출혈이 관찰되지 않았으며, 혈청 생화학적 검사 역시 대조군과 비교하여 유의점은 확인되지 않았다. 따라서, 항혈전 활성 검증을 위한 폐색전 유발실험 및 KCN 주사에 의한 전뇌 허혈성 실험 및 치사 유발실험을 위한 부탄올 분



Fig. 4. Thin-layer chromatogram of rutin, ferulic acid, the 95%-ethanol extract and solvent fraction layer of buckwheat seeds.

The extract (6.25 µg), fraction layers (6.25 µg), rutin (2.5 µg) and ferulic acid (2.5 µg) were loaded to silica gel 60F₂₅₄, and then developed with chloroform:methanol:water (52:28:8 v/v/v), and stained by spraying 10% H₂SO₄. a, 95%-ethanol extract; b, hexane fraction; c, ethylacetate fraction; d, rutin; e, ferulic acid; f, butanol fraction; and g, water residue.

획물 시료농도는 25, 50, 150 mg/kg의 농도로 사용하였다. 폐색전 유발실험의 경우, 대조군인 아스피린 투여군(150 mg/kg) 및 무처리군의 평균 경련지속시간은 15.37±6.61분 및 17.27±7.55분이었으나, 메밀 부탄올 분획물(150 mg/kg)

Table 3. Effect of aspirin and the butanol fraction of buckwheat seeds on spasm-lasting time, requirement of active movement, and KCN-induced mortality

Samples (mg/kg)	Spasm-lasting time (min)	Requirement of active movement (sec)	KCN-Induced mortality (%)
Control	17.27 ± 7.55 ^{2)a5)}	514 ± 232 ^{3)a}	82.7 ⁴⁾
BFBS ¹⁾	25	— ⁶⁾	—
	50	—	30.0
	150	8.85 ± 5.84 ^b	—
Aspirin	15.37 ± 6.61 ^{ab}	372 ± 101 ^{ab}	40.0

¹⁾BFBS: the butanol fraction of buckwheat seeds.

²⁾Mean ± SD (n=12).

³⁾Mean ± SD (n=8).

⁴⁾Single experiment (n=30).

⁵⁾Means with the same lettered superscripts in a same column are not significantly different at the p<0.05 level by Duncan's multiple range test.

⁶⁾Not determined.

투여의 경우에는 평균 8.85 ± 5.84분 후 경련을 멈추어, 경련 지속시간이 2배 이상 단축됨을 확인하였다(Table 3). 또한 전뇌 허혈성 혼수유발 실험에서는 아스피린 투여구 및 무처리구에서 372 ± 101초 및 514 ± 232초 동안 움직이지 못한 반면, 메밀 부탄올 분획물 25 mg/kg 투여시에는 279 ± 167초, 50 mg/kg 투여시에는 179 ± 127초, 150 mg/kg 투여시 320 ± 187초 후 원활한 움직임을 나타내어 아스피린 투여구나 대조구보다 우수함을 확인하였다. 그러나 메밀 부탄올 분획물의 경우 50 mg/kg 투여한 경우 25 mg/kg 또는 150 mg/kg 경구투여보다 우수한 효과를 나타내었는데, 이는 사용된 실험동물의 수가 8마리로 한정되어 나타나는 문제로 판단되며, 보다 많은 실험동물의 수가 필요하리라 예상된다. 한편 전뇌 허혈성 치사유도실험에서는 30마리씩의 무처리구에서 82.7%의 치사율을 나타낸 반면, 대조구인 아스피린 처리구에서는 40%의 치사율을 나타내어 아스피린의 우수성을 확인할 수 있었다. 메밀 부탄올 분획물의 경우, 전뇌 허혈성 혼수유발 실험에서 우수한 활성을 보인 50 mg/kg 농도로 경구투여하였으며, 그 결과 30마리씩의 치사유도실험에서 30%의 낮은 치사율을 나타내었다. 이러한 결과는, 메밀 종자의 항혈전 활성성분이 기존의 항혈전제를 대체할 수 있으며, 안전성이 우수한 혈행 개선제로 개발될 수 있음을 시사한다. 현재 활성성분의 정제와 비열처리의 메밀 가공공정 개발 및 식품형태의 개발이 진행되고 있다.

요 약

혈전성 질환을 예방 및 치료할 수 있는 트롬빈 직접 저해제 개발은 전 세계적으로 지속적으로 이루어지고 있다. 본 연구에서는 안전성이 확보된 식용 및 약용 식물로부터 트롬빈 직접저해제를 탐색하였으며, 그 결과 메밀 종자의 메탄올 추출물 및 주정 추출물에서 강력한 트롬빈 저해활성을 확인하였다. 메탄올 추출물의 순차적 유기용매 분획 결과 부탄올 및 에틸아세테이트 분획물에서 가장 우수한 트롬빈 저해활성을 나타내었다. 특히 주정 추출물의 부탄올 분획의 경우

312.5 µg/mL의 낮은 농도에서도 2,000% 이상의 트롬빈 저해활성을 나타내어, 아스피린보다 매우 효율적으로 혈전 생성을 억제함을 확인하였다. 활성성분은 30 KD 이상의 고분자 비단백질 성분임을 확인하였으며, 산 및 열처리에 의해 급격한 활성감소가 나타나, 활성물질의 효율적인 이용을 위해서는 메밀 종자의 비열, 비산 처리공정이 필요하리라 추측되었다. 또한 활성 분획물은 ICR 마우스를 이용한 폐색전 실험, 전뇌 허혈성 실험 및 치사유발실험에서 아스피린보다 우수한 혈전성 마비 억제, 혼수방지 및 치사억제 활성을 보여, 혈행 개선제 및 항혈전제로 개발 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 경상북도 바이오산업기술개발 사업의 지원(G03-16)에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Butenas S, Mullertz S. 2002. Blood coagulation. *Biochemistry (Moscow)* 67: 3-12.
2. Korea National Statistical Office. 2000. A study on causes of death for 1999.
3. Lee SS, Kim SM, Park UY, Kim HY, Shin IS. 2002. Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce. *Korean J Food Sci Technol* 34: 283-289.
4. Weitz JI, Crowther M. 2002. Direct thrombin inhibitors. *Thrombosis Res* 106: 275-284.
5. Gwak HS, Chun IK. 2000. Formulation study of aspalatone, a new antithrombotic agent. *J Appl Pharmacol* 8: 332-337.
6. Sohn HY, Kwon YS, Kim YS, Kwon HY, Kwon GS, Kim GJ, Kwon JS, Son KH. 2004. Screening of thrombin inhibitors from medicinal and wild plants. *Kor J Pharmacogn* 35: 52-61.
7. Kwon JS, Kwon YS, Kim YS, Kwon GS, Jin IN, Ryu GC, Sohn HY. 2004. Inhibitory activities of edible and medicinal herbs against human thrombin. *J Life Sci* 14: 509-513.
8. Yun YP, Kang WB, Lee MY. 1996. The antithrombotic effects of green tea catechins. *J Fd Hyg Safety* 11: 77-82.
9. Choi HS, Chung KS, Kim MH, Oh JH. 1995. Antithrombotic

- effects of some traditional plant medicines. *Kor J Pharmacogn* 26: 154-158.
10. Sohn HY, Kwon CS, Son KH, Kwon GS, Kwon YS, Ryu HY, Kum EJ. 2005. Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 593-598.
 11. Lee JS, Ra KS, Son HS. 1995. Extraction and component sugar analysis of polysaccharides from buckwheat. *Korean J Food Sci Technol* 27: 860-865.
 12. Lee GD, Yun SL, Kim JO, Heo SS, Seo GI. 2004. Monitoring on the tea with steaming and drying process of germinated buckwheat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 212-217.
 13. Jung SL, Heung SS, Young SM, Yu KC, Jin SJ. 1994. Effects of buckwheat on organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 831-838.
 14. Choi YS, Kim BR, Jin LH, Lee BH, Shim TH, Lee SY. 2000. In vitro screening of dietary factors on buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) influencing the regulation of blood pressure, glucose and cholesterol level. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 280-287.
 15. Ham SS, Choi KP, Choi YS, Lee SY. 1994. Studies on antimutagenic and lipotropic action of flavonoids of buckwheats - desmutagenic activity of buckwheat leaf extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 698-703.
 16. Kim YE, Oh SW, Kwon EK, Han DS, Kim IH, Lee CH. 2004. Effects of green tea, buckwheat and grape leaves extracts on lipid metabolism, antioxidative capacity, and antithrombotic activity in rats fed high cholesterol diets. *Korean J Food Sci Technol* 36: 979-985.
 17. Tomomi M, Buxiang S, Aya I. 2001. Antioxidant activities of buckwheat hull extract toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull* 24: 209-213.
 18. Kim CD, Lee WK, No KO, Park SK, Lee MH, Lim SR, Roh SS. 2003. Anti-allergic action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain extract. *Int Immunopharmacol* 3: 129-136.
 19. Lee HJ, Kim JS, Heo GY, Lee KB, Rhee IK, Song KS. 1999. Inhibitory activities of basidiomycetes on prolyl endopeptidase, acetylcholine esterase and coagulation. *J Korean Soc Agri Chem Biotechnol* 42: 336-343.
 20. Lee MS, Roh SS, Lim RC, Song HC, Shin SS, Kim SH. 2000. Antithrombotic activity and protective effects of hexane fraction of Kamihyulbuchukeotang (KHBCT) on brain injury by KCN and MCA occlusion. *Kor J Pharmacogn* 31: 373-382.
 21. Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH. 2002. *Standard Food Analysis*. Jigu-Munwha Sa, Seoul. p 381-382.
 22. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalcau reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
 23. Griffith JQ, Couch JF, Lindauer MA. 1995. Effect of rutin on increased capillary fragility in man. *Proc Soc Exp Bio Med* 55: 228-229.
 24. Lee MH, Son YK, Han YN. 2004. Tissue factor inhibitory sesquiterpene glycoside from *Eriobotrya japonica*. *Arch Pharm Res* 27: 619-623.

(2005년 11월 15일 접수; 2006년 1월 10일 채택)