

## 유백피의 항혈전 활성 분획 및 유효성분에 관한 연구

김동선<sup>#</sup>, 양원경, 성운영, 임선미, 김호경<sup>\*</sup>

한국한의학연구원 한약자원그룹

### Antiplatelet fraction from Ulmi cortex and its active components

Dong-Seon Kim<sup>#</sup>, Won-Kyung Yang, Yoon-Young Sung, Sun Mi Lim, Ho Kyoung Kim<sup>\*</sup>

Herbal Resources Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea.

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to identify active fraction and components from antiplatelet Ulmi cortex extract.

**Methods** : The 70% ethanol extract of Ulmi cortex was subjected to column chromatography over D101 resin and eluted with an 20% (W1), 30% (W2), 40% (W3), 50%(W4), 70% (W5), and 100% ethanol (W6) to yield 6 fractions. W6 was further fractioned and its active components were purified using semi-preparative HPLC. The isolated compounds were identified by MS and NMR, and their contents were simultaneously analyzed using HPLC/UV. Antiplatelet aggregation activities of the fractions and the compounds were evaluated using rat platelet-rich plasma in presence of collagen (5 µg/ml), arachidonic acid (0.05 U/ml), or thrombin (100 µM).

**Results** : Among six fractions, W3 prominently inhibited platelet aggregation. At the concentration of 200 µg/ml, W3 strongly inhibited arachidonic acid- and collagen-induced platelet aggregations by 78.2% and 65.9%, respectively, and weakly inhibited thrombin-induced platelet aggregation by 32.6%. Catechin, epicatechin, and catechin-7-O-β-D-glucopyranoside were isolated from W3 and their contents were revealed to be 15.1%, 0.87%, and 0.32%. Catechin and epicatechin at the concentrations of 100 µM strongly inhibited collagen-induced platelet aggregation by 79.9% and 86.6%, respectively, but weakly inhibited arachidonic acid- and thrombin-induced platelet aggregations.

**Conclusions** : A main active principle of antiplatelet Ulmi Cortex extract is W3 fraction, of which main active component is catechin considering its antiplatelet activity and content.

**Key words** : Ulmi cortex, thrombosis, antiplatelet aggregation, catechin, epicatechin.

## 서론

현대인에게 있어 고혈압, 동맥 경화증, 고지혈증, 심근경색, 혈전증은 계속 증가하고 있으며, 선진국에서 전체 사망률의 36~39%를 차지하는 심혈관 관련 질환이 증가하여 사회적으로 문제가 되어오고 있다<sup>1)</sup>. 심혈관 관련 질환 중 혈전증의 시작은 세월이 지남으로 진행되는 혈관벽의 죽상경화지만, 혈관 중의 혈소판 응집력의 항진에 의한 혈전 형성이 직접적 원인이 된다<sup>2)</sup>. 우리의 인체에서 혈액은 혈장 및 혈구세포로 구성되어 신체 각 조직으로 산소와 영양분을 공급하고 세포내

대사로 인해 생성된 노폐물들을 제거함으로써 각 조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당한다. 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있어 정상적인 상태에서는 출혈이나 혈전 등에 의해 흐름이 방해 받지 않는다. 그러나 다양한 원인에 의해 혈관벽이 손상을 받게 되면 이러한 평형 상태가 깨지고 혈액 중의 혈소판이 점착, 활성화, 응집되고 혈액 응고계를 활성화하여 급속한 혈전을 형성하게 된다<sup>3)</sup>. 이러한 혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장 등 순환기계 어느 곳에서도 발생할 수 있으며 대표적인 심혈관계 질환인 동맥경화증은 심근경색이나 뇌경색을 일으키는 매우 위험한 질

\*교신저자 : 김호경, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약자원그룹  
· Tel : 042-868-9502 · FAX : 042-863-9434 · E-mail : hkkim@kiom.re.kr  
#제1저자 : 김동선, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약자원그룹  
· Tel : 042-868-9639 · FAX : 042-863-9434 · E-mail : dskim@kiom.re.kr  
· 접수 : 2013년 4월 22일 · 수정 : 2013년 5월 20일 · 채택 : 2013년 5월 23일

환이다.

유백피 (*Ulm Cortex*)는 느릅나무과에 속하는 왕느릅나무 (*Ulmus macrocarpa* Hance)의 껍질을 건조한 것으로 동의 보감에는 임병, 불면, 대소변이 안 나오는 것을 치료하기 위하여 사용한다고 되어 있다<sup>4)</sup>. 유백피에 관한 연구는 소염, 진통, 항암, 항균작용 등에 관한 보고가 있다<sup>5-7)</sup>.

최근에 본 연구실에서는 유백피의 혈전억제활성에 관한 효능을 나타냄을 보고하였고<sup>8)</sup>, 계속적인 연구로 활성성분을 추적, 규명하기 위한 연구를 진행하여 왔다. 하지만 활성 성분을 추적하기 위한 용매분획 및 각종 칼럼크로마토그래피를 실시한 과정에서 활성이 소실되거나, 오히려 어떤 분획물은 혈소판 응집을 유도하기도 하였다. 따라서 본 연구에서는 최적의 혈소판 응집 저해활성을 갖는 분획방법 및 분획을 도출하고, 이에 대한 유효성분을 확인한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Phosphate buffered saline(PBS)은 Gibco(USA)에서 구입하였다. Collagen, arachidonic acid 및 thrombin은 Chrono-Log(Havertown, USA)의 제품을 사용하였다. 동물의 마취를 위해 사용한 ethyl ether는 삼전화학(Korea)에서 구입하였다. Cell Counting Kit-8는 Dojindo(Japan) 제품을 사용하였다. HPLC분석을 위한 methanol과 water는 HPLC 용 특급용매로 J. T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서, 지표 및 함량분석을 위해 사용된 Catechin과 epicatechin은 모두 순도 98%이상으로 Sigma (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Catechin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside는 직접분리 (순도 97%)하여 사용하였다.

### 2. 약재 및 추출

본 실험에 사용한 유백피(*Ulmus macrocarpa* Hance)는 정도생약(경기도 구리, 한국)에서 구입하여 한국한의학연구원 한약자원그룹에서 검정하고 정선한 것을 사용하였다. 약재 200 g에 10 배량의 70%의 에탄올을 가한 다음 2시간씩 2회 환류 냉각 추출하였다. 추출액을 여과한 후 45 °C에서 감압 농축 하여 35.2 g의 유백피 추출물을 얻었다.

### 3. 실험기기

HPLC 분석은 Waters 2695 및 996 photodiode array 검출기에 의하여 수행되었다. 물질의 구조분석을 위한 NMR 스펙트럼은 Varian사의 INOVA system (<sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C, 각각 400 MHz 및 100 MHz)을, ESI-MS data는 Shimadzu사의 ESI-IT-TOFMS에 의하여 얻어졌다.

혈소판 활성화 작용 및 응집억제 활성 측정은 aggregometer (model 700, Chrono-log Co., U.S.A), 혈액응고 작용 활성 측정은 Automated Coagulation Laboratory 7000 (Instrumentation Laboratory, Milano, Italy)을 사용하였

다. Serotonin 분비량 측정과 세포 생존도 측정은 ELISA microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다)를 사용하였다.

### 4. 혈소판 응집억제 활성

실험에 사용된 혈액은 수컷 SD-rat을 동물사육실에서 1주 일간 순화시킨 다음 ethyl ether로 마취하고, 채혈시의 항응고제로는 3.8% sodium citrate가 1:9의 비율이 되도록 하여, 복대동맥으로부터 채혈하였다. Low speed centrifuge (Gyrozen, Incheon, Korea) 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액의 platelet rich plasma (PRP)는 혈소판 계수를  $4.0 \times 10^8$  platelet/mL이 되도록 조정하여 혈소판 응집 억제능 검사에 사용하고, 계속하여 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻어 실험에 사용하였다.

혈소판 응집은 Aggregometer를 사용하여 Turbidity method<sup>9)</sup>로 측정하였다. Washed platelet suspension은 1000rpm으로 37 °C에서 교반하면서 실험시료를 첨가하였다. 약 2분간 실험시료를 먼저 넣고 교반하면서 incubation시킨 후 agonist를 첨가한 후 혈소판 응집실험을 실시하였다. Collagen 5  $\mu$ g/ml로, thrombin 0.05 unit/ml로, arachidonic acid 100  $\mu$ M로 혈소판 응집을 유도시켰다. 빛 투과도의 변화로서 측정되는 응집결과는 최대 10분간 측정하였다.

### 5. 분획물의 제조

유백피 70%에탄올 추출물 10.0 g을 D101 resin 500 g으로 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. 이때 이동상으로는 물과 에탄올 혼합용매로 하여 에탄올 함량을 증가시켜 용출하고 감압건조하여 20% 에탄올 용출분획 (W1) 1.74 g, 30% 에탄올 용출분획 (W2) 2.32 g, 40% 에탄올 용출분획 (W3) 2.80 g, 50%에탄올 용출분획 (W4) 1.13 g, 70% 에탄올 용출분획 (W5) 0.64 g 및 100% 에탄올 용출분획 0.41 g을 얻었다.

### 6. 유백피 분획물 W3로부터 활성성분의 분리

분획물 W3를 메탄올에 50 mg/ml의 농도로 용해하여 분취용 HPLC로 분리하였다. HPLC를 사용한 분취는 Supleco C18 column (10  $\mu$ m, 25 mm x 280 mm)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼의 온도는 30°C로 유지하였고, 검출은 PDA detector를 사용하였다. 유속은 15 ml/min, 주입량은 2 ml로 하였다. 이동상으로는 메탄올과 물을 사용하였다.

10% 메탄올로 10분간, 이후 80분 동안 메탄올 함량이 50%가 되도록 gradient로 증가시켜 용출하면서 2분 간격 및 특정피크를 중심으로 분취하여 활성을 측정하고, 결과로 21분대에서 compound 1을, 34분대에서 compound 2를, 45분대에서 compound 3을 얻었다.

#### Compound 1.

Brown powder; ESI-MS  $m/z$  453 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 6.72 (1H, d, J=1.8Hz, H-2'), 6.68 (1H, dd, J=8.0, 1.8Hz, H-5'), 6.60 (1H, dd, J=8.0, 1.8Hz, H-6'), 6.09 (1H, d, J=2.0 Hz,

H-8), 5.98 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 4.70 (1H, d, J=7.6Hz, H-2), 4.55 (1H, d, J=7.2Hz, H-1"), 3.87 (1H, m, H-3), 3.20-3.70 (5H, m, H-2", H-3", H-4", H-5", H-6"), 3.12 (1H, dd, J=16.2, 5.0Hz, H-4eq), 2.65 (1H, dd, J=16.2, 8.4 Hz, H-4ax); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ : 156.88 (C-7), 156.20 (C4), 155.31 (C-9), 145.00 (C-2', C-4'), 130.47 (C-1'), 118.44 (C-6'), 115.22 (C-5'), 114.50 (C-2'), 101.99 (C-1"), 100.54 (C-10), 96.25 (C-6), 94.66 (C-8), 81.15 (C-2), 76.98 (C-3"), 76.63 (C-5"), 73.27 (C-2"), 69.69 (C-4"), 66.11 (C-3), 60.73 (C-6"), 28.04 (C-4).

**Compound 2.**

White powder; ESI-MS *m/z* 291 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ : 6.83 (1H, d, J=1.8 Hz, H-2'), 6.75 (1H, dd, J=8.0, 1.8 Hz, H-5'), 6.71 (1H, dd, J=8.0, 1.8 Hz, H-6'), 5.92 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 5.84 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 4.55 (1H, s, H-2), 3.95 (1H, m, H-3), 2.84 (1H, dd, J=16.2, 5.0Hz, H-4eq), 2.50 (1H, dd, J=16.2, 8.4 Hz, H-4ax); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ : 157.87 (C-7), 157.72 (C-5), 157.03 (C-9), 146.37 (C-3'), 146.33 (C-4'), 132.28 (C-1'), 120.24 (C-6'), 116.21 (C-5'), 115.42 (C-2'), 100.89 (C-10), 96.37 (C-6), 95.63 (C-8), 82.97 (C-2), 68.88 (C-3), 28.56 (C-2)

**Compound 3.**

White powder; ESI-MS *m/z* 291 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 6.87 (1H, d, J=1.6Hz, H-2), 6.66 (1H, d, J=8.1Hz, H-5'), 6.65 (1H, dd, J=1.8, 8.0Hz, H-6'), 5.88 (1H, d, J=2.0Hz, H-8), 5.70 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 4.70 (1H, d, J=7.6 Hz, H-2), 4.00 (1H, m, H-3), 2.70 (1H, dd, J= 16.4, 5.4 Hz, H-4eq), 2.50 (1H, dd, J=16.1, 8.0 Hz, H-4ax); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ : 156.65 (C-5), 156.32 (C-7), 155.88 (C-9), 144.61 (C-3'), 144.54 (C-4'), 130.74 (C-1'), 118.09 (C-6'), 114.99 (C-2'), 114.88 (C-5'), 98.64 (C-10), 95.19 (C-6), 94.21 (C-8), 78.16 (C-2), 65.02 (C-3), 28.33 (C-4).

**7. 유백피 분획물 중 활성성분들의 HPLC 동시 분석**

HPLC 분석에는 Photodiode array (PDA) 검출기가 부착된 Waters 2695 system (Waters Co, Milford, MA, USA) 이 사용되었다. 컬럼은 Luna C18 column (250mm x 4.6 mm; particle size 5 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였고, 컬럼 온도는 30℃를 유지하였다. 이동상은 HPLC용 물과 메탄올의 혼합용매의 비율을 변화시킨 gradient solvent system (10%→50%메탄올, 시간: 40분, 유속: 1ml/min)을 사용하였고, 유백피 분획물들은 50% 메탄올에 녹여 50 mg/mL의 농도로 조제하였으며, 0.45μm filter

로 여과한 후 10 μl를 주입하여 분석하였다. 이때, PDA 검출기의 정량을 위한 검출파장은 280 nm였다.

표준품들은 모두 50% 메탄올에 용해하여 제조하였고, Catechin은 400, 200, 100, 50, 25 μg/ml의 농도로, catechin-7-O-β-D-glycopyranoside 및 epicatechin은 40, 20, 10, 5, 2.5 μg/ml 농도로 제조하여 표준용액으로 사용하였다.

**8. 통계분석**

본 연구에서 얻어진 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, Ver. 19, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package 프로그램을 이용하여 통계분석 하였으며, 각 군의 결과 값에 대해 one-way ANOVA(analysis of variance) 분석 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

**결 과**

**1. 유백피 분획물들의 혈소판응집 억제효과**

유백피 70%에탄올 추출물을 D101 resin에 흡착하고 에탄올의 함량을 증가시켜 6개의 분획물들(W1 - W6)을 제조하였다. 각 분획물을 200 μg/ml로 처리하여 collagen으로 응집유발에 따른 혈소판 응집 억제효과를 측정된 결과 W1 - W6 분획물들은 각각 13.2%, 18.7%, 56.8%, 26.9%, 15.7% 및 17.2%로 분획물 W3에서 활성이 가장 높게 나타났다 (Fig. 1).

따라서 W3 분획물의 농도별, 응집유도시약별 억제효능을 평가하였다. Arachidonic acid로 혈소판 응집을 유도하였을 때 분획물 W3 50 μg/ml, 100 μg/ml 및 200 μg/ml 농도에서 각각 25.5%, 52.7% 및 78.2%의 농도의존적 억제율을 나타냈다. Collagen으로 혈소판 응집을 유도 하였을 때, 분획물 W3 50 μg/ml, 100 μg/ml 및 200 μg/ml 농도에서 각각 7.5%, 16.0% 및 65.9%의 억제율을 나타냈으며, thrombin 유도시에는 각각 8.0%, 15.6%, 32.6%의 약한 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

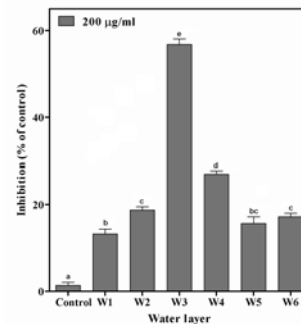


Fig 1. Effects of the fractions from Ulmi cortex extract on washed platelet aggregation. The platelet suspension was incubated at 37° C in an aggregometer with stirring at 1,000 rpm. After preincubation with the fractions for 3 min, platelet aggregation was induced by addition of collagen (5 μg/ml). The aggregation percentages are expressed as percentage of maximum aggregation by the respective inducers. The vertical bars represent mean±SD (n=3), and those with different alphabetical letters are significantly different by Duncan's multiple test (p<0.05).

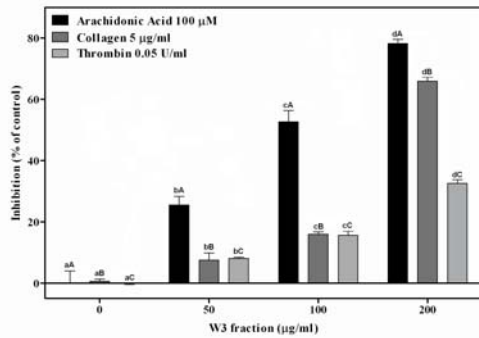


Fig 2. Effects of the W3 fraction from Ulmi cortex extract on washed platelet aggregation. The platelet suspension was incubated at 37° C in an aggregometer with stirring at 1,000 rpm. After preincubation with W3 fraction for 3 min, platelet aggregation was induced by addition of collagen (5 µg/ml), thrombin (0.05 U/ml) and AA (100 µM). The aggregation percentages are expressed as percentage of maximum aggregation by the respective inducers. The vertical bars represent mean±SD (n=3) and those with different small alphabetical letters within inhibition activities induced by the same agonist are significantly different by Duncan's multiple test (p<0.05).

## 2. 활성성분의 분리

W3 분획으로부터 분취용 HPLC로 활성성분을 추적, 분리한 결과 화합물 1, 2 및 3 이 분리되었다 (Fig. 3).

화합물 2는 <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 aromatic 영역에서 5개의 proton에 해당하는 피크들이 관찰되었고, 이중 δ H 6.71(1H, dd, J=8.0, 1.8 Hz, H-6'')의 proton이 6.75(1H, dd, J=8.0, 1.8 Hz, H-5')과 *ortho*-(J=8.0 Hz) coupling을 6.83(1H, d, J=1.8 Hz, H-2')의 proton과 *meta*-(J=1.8 Hz) coupling 하는 것으로 보아 3, 4번 위치가 치환된 phenyl ring이 존재함을, δ H 5.92 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 5.84 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6)의 서로 *meta*-(J=1.8 Hz) coupling 하는 것으로 보아 2, 3, 5번 위치가 치환된 또 하나의 phenyl ring이 추정되었다. Aliphatic 영역에서는 4.55 (1H, d, J=7.6 Hz, H-2), 3.95 (1H, ddd, J=8.4, 7.6, 5.0 Hz, H-3), δ H 2.84 (1H, dd, J=16.2, 5.0Hz, H-4eq), 2.50 (1H, dd, J=16.2, 8.4 Hz, H-4ax)에서 4개의 C-ring proton을 관찰하였는데, 서로 geminal coupling (J=16.2 Hz)하고 있는 δ H 2.84와 2.50의 proton들이 δ H 3.95의 proton과 각각 coupling (J=5.0, 8.4 Hz)하며, 이 proton은 δ H 4.55의 proton과 coupling하는 것으로 보아 C-3위치에 수산기가 치환되어 있는 것을 예상 하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 전체 15개의 탄소가 존재함이 확인되었고, phenyl ring에 hydroxyl group이 치환된 5개의 δ 157.87 (C-7), 157.72 (C-5), 157.03 (C-9), 146.37 (C-3'), 146.33 (C-4')에서의 탄소들, 산소가 치환된 δ 82.97 (C-2), 68.88 (C-3) 에서의 2개의 탄소들로부터 flavanol의 catechin으로 추정되었고, 질량분석결과 분자량 290과 문헌의 NMR 값과 비교하여 catechin으로 그 구조를 동정하였다.

화합물 3은 UV spectrum에서 화합물 1과 동일하게 277 nm에서 최대흡광도를 나타내었고, 분자량 또한 290으로 동일하였고, <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR 또한 매우 유사하여 용이하게

catechin 이성질체로 추정하고, 참고문헌<sup>10)</sup>의 NMR 값과 비교하여 epicatechin으로 확인 하였다.

화합물 1은 aromatic 영역에서의 δ 6.72 (1H, d, J=1.8Hz, H-2'), 6.68 (1H, dd, J=8.0, 1.8Hz, H-5'), 6.60 (1H, dd, J=8.0, 1.8Hz, H-6'), 6.09 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 5.98 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6)을 비롯한 aliphatic 영역의 δ 4.70 (1H, d, J=7.6Hz, H-2), 3.12 (1H, dd, J=16.2, 5.0Hz, H-4eq), 2.65 (1H, dd, J=16.2, 8.4 Hz, H-4ax)의 peak가 compound 1 및 2와 유사하게 나타났고 δ 3.20-3.70 (5H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'')에서의 5개의 proton과 δ 4.55 (1H, d, J=7.2Hz, H-1'')에서의 anomeric proton으로부터 catechin 배당체임이 용이하게 추정 되어, <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR 자료를 참고문헌<sup>11,12)</sup>과 비교하여 catechin-7-O-β-D-glucopyranoside로 동정되었다.

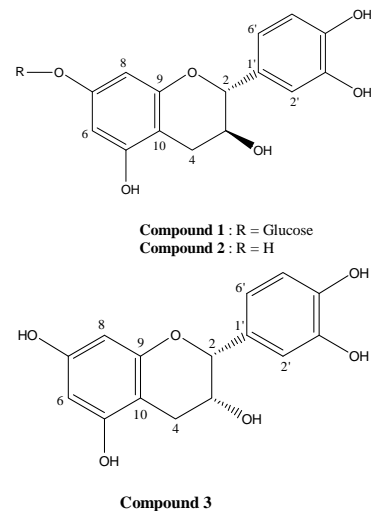


Fig 3. Structures of compounds isolated from the W3 fraction of Ulmi cortex extract.

## 3. 유백피 활성 분획물 중 분리된 성분들의 HPLC 동시분석

분획물 W3 중 분리된 3종 성분들의 함량을 동시분석 하기 위하여 HPLC/PDA를 사용하여 동시분석조건을 확립하였다 (Fig. 4). Catechin-7-O-β-D-glycopyranoside는 10.86분에서, catechin은 17.96분에서, epicatechin은 24.12분에서 나타났다.

Catechin-7-O-β-D-glycopyranoside, catechin 및 epicatechin의 HPLC 정량을 위한 검량선의 상관관계는 0.999 이상으로 매우 적합하였다. Catechin-7-O-β-D-glycopyranoside에 대한 검량선은 Y=18129X + 56.1, R<sup>2</sup> = 0.9996이었으며, Catechin에 대한 검량선은 Y = 29154X + 35.8, R<sup>2</sup> = 0.9998이었으며, epicatechin의 검량선은 Y = 28975X + 27.5, R<sup>2</sup> = 0.9999 이었다 [Y = 피크면적, X = 표준품의 함량 (mg/ml)]. 분석결과 W3분획물에서 카테킨 함량은 15.1%, 에피카테킨은 0.87%, catechin-7-O-β-D-glucopyranoside는 0.32%로 나타났다.

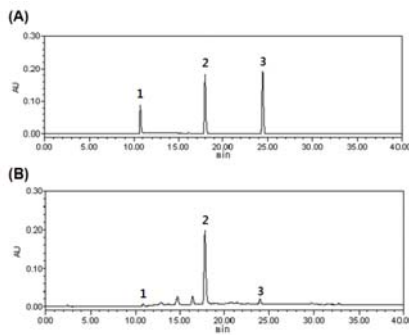


Fig 4. HPLC chromatograms of standard mixture (A) and the W3 fraction from Ulmi cortex extract (B) at 280 nm. Catechin-7-O-β-D-glucopyranoside (1), catechin (2) and epicatechin (3) were appeared at a retention time of approximately 10.86 min, 17.96 min and 24.12 min, respectively.

#### 4. 유백피 활성 분획물 중 분리된 성분들의 HPLC 동시분석

W3 분획물의 농도별, 응집시약별 억제율 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml의 농도로 확인한 결과 아라키돈산으로 유도하였을 때 25.5%, 52.7%, 78.2%의 억제율을 나타냈다. 콜라겐 유도시 각각 7.5%, 16.0%, 65.9%의 억제율을 나타냈으며, 트롬빈 유도시에는 각각 8.0%, 15.6%, 32.6%의 억제율을 보였다. 모든 농도, 모든 응집시약에서 농도 의존적 유의성 있는 결과를 나타냄을 확인하였다.

#### 5. 유백피 W3 분획 성분들의 혈소판 응집억제효과

Collagen으로 혈소판응집을 유도하였을 때, catechin, epicatechin 및 catechin-7-O-β-D-glucopyranoside은 각각 79.9%, 86.0%, 5.1%의 응집 억제활성을 나타내었으며, arachidonic acid로 유도하였을 때에는 14.9%, 11.5% 및 12.8%, thrombin으로 유도하였을 때에는 3.3%, 18.7% 및 31.1%의 응집 억제활성을 나타내었다 (Table I).

Table I. Effects of compounds from the W3 fraction of Ulmi cortex extract, on washed platelet aggregation

Compound	Agonist		
	Collagen	Arachidonic acid	Thrombin
Catechin	79.9±5.2	14.9±1.7	3.3±0.6
Epicatechin	86.0±6.4	11.5±1.5	18.7±1.8
Catechin-7-O-β-D-glucopyranoside	5.1±0.8	12.8±1.2	31.1±2.0
Aspirin	48.7±3.5	63.1±4.1	3.5±0.7

The platelet suspension was incubated at 37 °C in an aggregometer with stirring at 1,000 rpm. After preincubation with compounds (100 µg/ml) or aspirin (50 µg/ml) as a positive control for 3 min, platelet aggregation was induced by addition of collagen (5 µg/ml), thrombin (0.05 U/ml) and AA (100 µM). The aggregation percentages are expressed as percentage of maximum aggregation by the respective inducers. Data are expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

### 고찰

유백피 추출물로부터 D101 resin을 사용하여 에탄올의 함

량을 증가시켜 얻어진 6개의 분획물들(W1 - W6)에 대한 혈소판 응집억제 효과를 측정된 결과 40% 에탄올 용출 분획물인 W3에 억제효능이 뚜렷하게 집중된 결과를 얻었다. Arachidonic acid, collagen, thrombin으로 혈소판 응집을 유도한 모두에서 W3 분획물은 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하였으며 특히 collagen과 arachidonic acid로 유도한 혈소판 응집을 강하게 억제하였다.

활성분획물 W3로부터 활성성분을 추적하여 3종류의 카테킨 성분들이 분리, 동정 되었다. 이들 성분들에 대한 혈소판 응집억제 효과를 측정된 결과 arachidonic acid로 유도하였을 때, 100 µg/ml 농도에서 catechin과 epicatechin은 둘다 유사한 수준 (각각 79.9%, 86.0%)으로 강한 억제효과를 나타내었다. 반면에 이들은 collagen과 thrombin으로 유도시에는 약한 활성을 나타내었고, 함께 분리된 catechin-7-O-β-D-glucopyranoside는 arachidonic acid로 유도하였을 때 다소의 활성을 나타내었다.

HPLC 분석결과 분획물 W3에서 catechin 함량은 15.1%로서, epicatechin 0.87%, catechin-7-O-β-D-glucopyranoside 0.32%와 비교하여 월등히 높은 함량으로 나타났다. 따라서 유백피 및 유백피 분획물 W3의 collagen 유도에 의한 혈소판 응집억제효과에 대한 주요 활성원리는 catechin에 의한 것으로 결론지을 수 있다. 녹차 등으로부터 catechin의 항혈전 효과는 이미 보고되었으나<sup>13)</sup>, catechin이 유백피의 항혈전 효과의 주요 원리임을 밝힌 보고는 처음이다.

분획물 W3에서 arachidonic acid 및 thrombin 억제활성 성분의 분리를 위하여, 다양한 칼럼크로마토그래피를 시도하여 추적하였으나, 분획이 진행될수록 활성이 소실되었다. 따라서 현재연구결과로는 분획물 W3는 유백피로부터 얻을 수 있는 최적의 항혈전 물질로 고려된다.

Catechin은 같은 flavonoid 성분인 quercetin과 복합했을 때, 혈소판 응집억제에 있어 시너지 효과를 갖는다는 연구보고가 있다<sup>14)</sup>. 따라서 W3분획물로부터 활성성분을 분리하는 과정에서 활성의 소실은 다른 flavonoid 성분들과의 시너지 효과의 감소에 따른 가능성을 고려할 수 있다.

본 연구에 사용된 D101 resin은 실리카겔보다 가격이 저렴하고, 재활용이 가능하여 건강식품이나 화장품이 원료를 위한 고순도의 사포닌 및 폴리페놀류의 성분들을 제조하는데 많이 활용되고 있다. 분획물의 제조에 있어서 용매 또한 물과 에탄올을 사용하였으므로, 유백피 분획물 W3는 심혈관관련 식품의약이나 천연물의약품으로 활용을 기대할 수 있다.

### 결론

유백피로부터 최적의 혈전억제 분획물 및 유효성분을 확인하고자 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유백피 추출물로부터 최적의 혈소판응집억제 분획물은 추출물을 D101 resin에 흡착한 후 30% 에탄올로 용출 분획물을 제거하고, 이후 40%에탄올로 용출하면 효율적으로 수득할 수 있다.
2. 유백피 추출물의 혈소판응집억제 활성에 주요 유효성분으

로는 높은 함량과 활성 결과를 고려하여 catechin이다.

3. 분획물에 비하여 활성성분들의 활성이 탁월하지 않으므로, 유백피를 항혈전 및 심혈관 관련 식품의약 또는 천연물의 약품으로의 활용을 위하여 단일성분 보다는 분획물 또는 추출물 형태가 효율적이다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원 (K13202)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Kim YW, Kim DC. Evaluation of thrombolytic effect of streptokinase-dextran conjugate in a rat model of arterial thrombosis. *Korean J Pharm Sci.* 1999 ; 29 : 211-6.
2. Yun YP, Kang WS, Lee MY. The antithrombotic effect of green tea catechins. *Korean J Food Hyg Safety.* 1996 ; 11 : 77-82.
3. Lee HS. How safe is the readministration of streptokinase? *Drug Saf.* 1995 ; 13 : 76-80.
4. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. *Nutr Rev.* 1999 ; 57 : 104-13.
5. Yang GH, Choi SY. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J Food Sci Technol.* 1982 ; 14 : 283-8.
6. Ito N, Fukushima S, Tsuda H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit Res Toxicol.* 1985 ; 15 : 109-50.
7. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem.* 2001 ; 49 : 5165-70.
8. Yang WK, Lee JJ, Sung YY, Kim DS, Myung CS, Kim HK. Extract of *Ulmus macrocarpa* Hance Prevents Thrombus formation by Antiplatelet Activity. *Int J Mol Med.* 2013 ; 31 : in press.
9. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J Physiol.* 1962 ; 162 : 67-8.
10. Kim JK, Lee SK, Ham YH, Bae YS. Extractives from barks of *Quercus acutissima* and *Quercus variabilis*. *J Kor For En.* 2002 ; 21 : 41-8.
11. Ce'cile CO, Wieruszkeski JM, Emmanuel M, Christian R. Catechin and epicatechin deprotonation followed by <sup>13</sup>C-NMR. *Tetrahedron Lett.* 2002 ; 43 : 4545-9.
12. Kwon YM, Lee JH, Lee Mw. Phenolic compounds from barks of *Ulmus macrocarpa* and its antioxidative activities. *Kor J Pharmacogn.* 2002 ; 33 : 404-10.
13. Sagesaka-Mitane Y, Miwa M, Okada S. Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea. *Chem Pharm Bull.* 1990 ; 38 : 790-3.
14. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr.* 2000 ; 72 : 1150-5.