

Anti-thrombosis Activity of the Aerial Part of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*

Mi-Sun Kim and Ho-Yong Sohn*

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Received February 13, 2014 / Revised March 24, 2014 / Accepted March 31, 2014

The oriental traditional medicine, *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus* (ADK) is used for hemostasis (blood stopping) and the promotion of blood circulation. Recently, the demands of the aerial part of ADK as edible mountain herbs are rapidly increased due to its unique fragrance and bioactivity. In this study, to evaluate the anti-thrombosis activity of ADK, ethanol extract and organic solvent fractions were prepared from aerial parts of ADK, and their anticoagulation and anti-platelet aggregation activities were determined. In an anticoagulation activity assay, the ethanol extract of ADK increased the thrombin time, prothrombin time, and activated partial thromboplastin time (aPTT) 1.4-2.3 times at a concentration of 5 mg/ml. Among the fractions, the ethylacetate fraction showed strong inhibitory effects against blood clotting factors, as shown in an extension of the aPTT. In contrast, the butanol fraction strongly promoted blood clotting. In an anti-platelet aggregation assay, the activity of the ethanol extract was comparable to that of aspirin, a commercial anti-platelet aggregation agent, and the butanol fraction showed 2-fold higher aggregation inhibitory activity than aspirin. The aforementioned ethanol extract and active fractions have ignorable hemolytic activity against human red blood cells up to a concentration of 0.5 mg/ml. Considering the high content of total polyphenol, total flavonoid, and total sugar of the ethylacetate and butanol fractions, the purified active substances have potential as safe and novel anti-thrombosis agents. This report provides the first evidence of anti-thrombosis activity of ADK.

Key words : Anticoagulation, anti-platelet aggregation, *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*

서 론

인체의 혈액은 산소, 영양분 및 노폐물의 운반 기능과 체온 유지, 삼투압 조절 및 이온 평형유지, 수분 일정유지, 액성 조절작용, 혈압의 유지 및 조절작용, 생체방어 등 다양한 중요 기능들을 가지고 있다. 따라서 정상적인 혈액 순환은 생명유지에 필수적이며, 혈액순환의 장애는 다양한 형태의 질병으로 나타난다. 실제, 원활한 혈액순환을 위해서는 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호 보완적으로 조절되어야 하며, 이들 중 혈액 응고 반응계의 기작은 혈관벽에 혈소판이 점착, 응집하여 혈소판 혈전을 형성한 후, 많은 혈액응고인자 및 프로트롬빈, 트롬빈의 활성화를 포함하는 혈액 응고계가 활성화되어 최종적으로 피브린 혈전이 형성되는 것으로 보고되어 있다[2]. 따라서 과다한 혈액응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환 예방을 위해서는 혈액응고에서 중추적 역할을 하는 트롬빈의 저해뿐만 아니라, 외인성 혈전생성에 관련된

프로트롬빈의 저해 및 내인성 혈전생성경로에 작용하는 XII, XI, IX, X 인자와 같은 혈액응고인자의 저해가 필요하다. 현재까지 알려진 혈전성 질환의 예방과 치료제로는 헤파린, 쿠마린, 아스피린, 유로키네이즈 등의 다양한 항응고제, 항혈소판제, 혈전 용해제 등이 사용되고 있으나, 이들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장애 및 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있는 실정이다[15, 19]. 따라서 최근에는 안전성이 확보된 천연물로부터 항혈전제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다[7, 12, 15].

한편 눈개승마(*Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*)는 현화식물문 쌍떡잎식물강 장미목 장미과의 여러해살이풀로서, 한국, 일본, 중국, 유럽, 아메리카의 습한 산악지대에 주로 분포하고 있다. 눈개승마는 삼나물, 죽토자, 눈산승마, 가승마 등으로 불리고 있으며, 한방에서는 진초를 해독, 지혈, 어혈 제거 목적의 약재로 사용하여 왔다[13]. 또한 울릉도에서는 오래 전부터 눈개승마의 지상부(잎 및 줄기)를 식용으로 이용하여 왔으며[17], 최근 눈개승마의 특유한 관능성에 따라 산채자원으로서 중요성이 부각되면서 눈개승마의 재배[16] 및 성분 연구[3, 4, 16]가 시작되었다. 그러나, 눈개승마의 유용성분 및 생리활성에 대한 연구는 아직 초보적인 단계로 전 세계적으로도 학술 문헌이 거의 발표되지 않은 상태이다[5]. 현재까지 눈개승마의 생리활성은 신장 손상억제[1], 항산화 활성[3], 암세포 생육억제 활성[6, 8], 항염증 효능[10], 멜라닌 합성억제[9] 및 피부노화 억제 및 항주름 효과[11, 25], 항균 효과[14] 및 항당뇨 활성

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-820-7804

E-mail : hysohn@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이 알려져 있을 뿐이며, 최근 arunsin A, B 및 aruncide A, B, C 등 순수물질이 분리되어, 이들의 효능평가가 진행 중에 있다[6, 8]. 본 연구에서는 한방에서 지혈 및 어혈제거의 용도로 사용되고 있는 눈개승마의 혈액순환 개선효능을 확인하고자, 울릉도산 눈개승마의 ethanol추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 혈액응고 저해 활성, 혈소판 응집저해 활성, 인간 적혈구 용혈활성을 평가하여 눈개승마 지상부의 강력한 항혈전 효과를 확인하여, 이에 눈개승마의 신규 활성을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 눈개승마는 2012년 4월 경북 울릉도에서 채취한 야생 눈개승마의 앞줄기 부분을 채취하여 사용하였다. 채취 직후 아이스박스에서 담아서 실험실로 수송하였으며, 이후 눈개승마 지상부를 별도의 건조과정 없이 추출에 적합하도록 세절한 후 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)을 시료 무게의 10배 되도록 가하여 상온에서 3회 추출하였다. 이후 추출액은 filter paper (Whatsman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 분말로 조제하였으며, 이후 추출물을 물에 현탁한 후 n-hexane, ethylacetate 및 butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 물 잔류물을 회수하였다[12]. 각각의 분획물들은 감압 건조하여 분말화 하였다. 눈개승마 시료들은 DMSO에 적당한 농도로 녹여, *in-vitro* 항혈전 활성 및 적혈구 용혈 평가에 사용하였다. 항혈전 활성평가에 사용한 혈장은 시판 control plasma (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)를 사용하였으며, PT reagent와 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)의 분석시약을 사용하여 측정하였다. 기타 사용한 시약은 시약급 이상으로 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 눈개승마는 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다(voucher specimen 2012-AD1).

항응고 활성

항혈전 활성중 혈액응고저해 활성은 시료의 트롬빈 타임(thrombin time: TT), 프로트롬빈 타임(prothrombin time: PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하여 평가하였다[15, 19]. 트롬빈 저해 활성은 기존의 보고[19]한 Amelung coagulometer KC-1A (Amelung, Lemgo, Germany)를 이용하여 혈액 응고시간을 측정하여 평가하였다. 37°C에서 0.5 U 트롬빈(Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 50 µl와 20 mM CaCl₂ 50 µl, 다양한 농도의 시료 추출액 10 µl를 coa-

gulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 µl를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 시료 대조군으로는 아스피린(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. 트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 TT 실험의 평균치를 용매 대조군인 DMSO의 TT 평균치의 비율로 나타내었다. PT 측정은 혈장 70 µl와 다양한 농도의 시료액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130 µl의 PT reagent를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 프로트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 PT 실험의 평균치를 용매 대조군인 DMSO의 PT 평균치의 비율로 나타내었다 aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 70 µl와 다양한 농도의 시료액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65 µl의 aPTT reagent를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 65 µl CaCl₂ (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었다[19]. aPTT 연장 활성은 3회 이상 반복한 aPTT 실험의 평균치를 용매 대조군인 DMSO의 aPTT 평균치의 비율로 나타내었다.

혈소판 응집 저해 활성

항혈전 활성 중 혈소판 응집저해 활성은, 미세전극에 혈소판이 부착되어 응집됨에 따라 발생하는 전기저항값의 변화를 측정하는 impedance 법을 사용하여 평가하였다[7]. 혈소판은 건강한 인간의 혈액을 3.2% sodium citrate 용액과 1:9 (v/v)로 혼합한 후 1,100 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 PRP (platelet rich plasma)를 회수하였으며, 이를 적십자로부터 공급받아 사용하였다(생명윤리승인: 안전관리팀-1725호). PRP는 3,000 rpm에서 10분간 더 원심분리하여 상층 혈장을 제거한 후 침전된 혈소판만을 회수한 후, washing buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 1 nM EDTA, pH 6.5) 10 ml를 가하여 고르게 현탁 한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수세된 혈소판을 회수하였다. 상기 수세과정을 2번 더 반복한 후, 수세된 혈소판은 suspending buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 0.49 mM MgCl₂, 0.25% gelatin, pH 7.4)로 희석하여 최종 혈소판 농도가 5×10⁸/ml이 되도록 조정하였다[7]. 혈소판 응집 평가는 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, U.S.A)를 사용해 37°C에서 혈소판 응집을 측정하였다. 즉, 10 mM CaCl₂ 50 µl, suspending buffer 147.5 µl, 시료 5 µl가 포함된 반응 cuvette에 혈소판 50 µl을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 µl를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under 를 측정하여 평가하였다

[7]. 이때, amplitude (ohm)는 혈소판에 응집유도제를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집정도를 나타내며, slope는 응집유도제를 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 나타내며, area under는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는 것으로 전기저항 증가에 따른 slope 곡선의 하강면적을 나타낸다[22]. 시료의 혈소판 응집 저해 활성은 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under값의 비로 나타내었다.

인간 적혈구 용혈 활성 평가

제조된 눈개승마 시료의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다. PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100 µl를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 시료용액 100 µl를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100 µl를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다[19]. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%)를 사용하였으며, 적혈구 용혈을 위한 실험 대조구로는 triton X-100 (0.1%) 및 vitamin C (0.5 mg/ml)를 사용하였다. 용혈활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$(\%) \text{ Hemolysis} = [(Abs. S - Abs. C) / (Abs. T - Abs. C)] \times 100.$$

Abs. S: 시료 첨가구의 흡광도, Abs. C: DMSO 첨가구의 흡광도, Abs. T: triton X-100 첨가구의 흡광도.

기타 분석

눈개승마 지상부의 수분함량은 적외선 수분측정기(HG53 Halogen Moisture Analyzer, Mettler-Toledo International Inc., Zurich, Switzerland)로 측정하였으며, 추출물의 total flavonoid (TF)의 함량 측정은 기존의 보고한 방법[21]에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출검액 400 µl에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 µl를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. Total polyphenol (TP) 함량은 추출검액 400 µl에

50 µl의 Folin-ciocalteau, 100 µl의 Na₂CO₃ 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다[21]. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이용하였다[24]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

통계분석

실험 결과는 SPSS 20.0 버전을 사용하여 mean ± SD 로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결과 및 고찰

눈개승마 지상부의 추출물, 분획물 제조 및 성분평가

울릉도산 눈개승마는 최근 기능성 산채로 그 수요가 급증하고 있으며, 추출물의 성분 및 효능평가가 일부 진행되고 있다. 본 연구에서는 음건 또는 열풍 건조과정중에 눈개승마의 색상 및 향미의 변화가 심하게 나타나므로, 이물질 제거 후 별도의 건조과정 없이 지상부를 추출에 사용하였으며, 95% ethanol추출효율은 6.14%로 나타났다(Table 1). 이는 실험직전 눈개승마 지상부의 수분함량이 47.5±1.5%임을 고려하더라도, 기존보고의 열풍건조후의 70% ethanol추출물의 추출효율 34.5%[25], 음건하여 80% ethanol로 추출한 경우 추출효율29.25%[14]와 비교하면, 건조과정 없이 그대로 추출한 경우에는 추출효율이 다소 낮음을 알 수 있었다. 추출물의 순차적 유기용매 분획 결과, n-hexane, ethylacetate, n-butanol 분획 효율은 각각 32.11, 21.49 및 35.09%로 나타났으며, 물 잔류물은 9.89%였다(Table 1). 이는 기존의 보고된, 음건하여 80% ethanol로 추출한 경우 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 분획 효율 및 물 잔류물의 상대분포가 각각 12.34, 2.25, 12.76, 19.82 및 52.84%로 나타난 결과[14]와 대조적이었다. 즉, 건조과정 없이 추출한 경우 추출물의 분획 후 물 잔류물이 9.89%로 매우 낮은 양을 차지하나, 장시간 음건하여 추출하는 경우 그 물 잔류물이 52.84%로 매우 높게 나타났다. 이러한 결과는 눈개

Table 1. Yields of extraction and fractions, and component analysis of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of aerial part of *Aruncus dioicus*

Extract/ Fraction	Extraction/ Fraction yield (%)	Content (mg/g)			
		Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar
Ethanol ex ¹	6.14	53.90±0.06	109.03±0.30	117.69±0.14	92.19±0.50
Hexane fr ²	32.11	55.41±4.78	69.99±0.51	55.39±1.58	44.51±0.83
Ethylacetate fr	21.49	322.75±0.74	499.50±8.58	181.02±0.37	127.97±0.67
Butanol fr	35.09	34.98±1.30	104.58±5.15	197.20±1.34	129.62±0.33
Water residue	9.89	13.96±0.12	27.41±0.98	156.83±2.68	60.45±2.00

¹ex: extract, ²fr: fraction. Data are presented as the mean ± SD of three determinations.

승마 지상부의 건조과정 동안 수분감소와 함께 성분의 변화가 급격히 나타남을 의미하며, 특히 장시간의 건조과정 중 향미 감소 및 검은색으로 색상 변화와 함께, 지용성 성분(예, n-hexane 분획물)의 감소 및 수용성 물질(예, 물 잔류물)의 증가가 나타남을 알 수 있었다. 따라서 향후 눈개승마의 경우 건조과정 이전에 blanching과 같은 적절한 효소실활 전처리 과정이 필요하다고 판단된다.

눈개승마 ethanol추출물 및 분획물의 성분 조사결과, 추출물에서 109.03 및 53.9 mg/g의 매우 높은 함량의 TP와TF가 확인되었으며, 이의 분획물에서도 높은 함량이 확인되었다 (Table 1). 특히 ethylacetate 분획 및butanol 분획에서는 499.5 및 322.75 mg/g의 TP과 TF및 104.58 및 34.98 mg/g의 TP과 TF가 각각 함유되어 있어, 눈개승마 ethanol 추출물은 물론 이의 분획물은 다양한 유용 생리활성을 나타내리라 판단되었다. 윤 등[25]은 눈개승마 지상부를 열풍건조 후 70% ethanol로 추출한 경우, TP 및 TF함량이 122.6 mg/g 및 36.8 mg/g으로 보고하였으며, 김 등[14]은 음건 후 80% ethanol로 추출한 경우 157.43 mg/g의 TP 함량을 보고하였으며, 이의 ethylacetate 분획물에서 335.88 mg/g의 TP 함량을 보고하였다. 본 실험결과와의 부분적인 차이는, 사용 시료의 건조과정 유무, 가열처리 및 사용된 추출용매의 차이에서 기인하는 차이로 이해되나, 기존의 알려진 식용 및 약용식물들보다 눈개승마 추출물 및 분획물에서는 매우 높은 TP 및 TF 함량을 나타내었다[3, 12, 13, 16]. 한편, 눈개승마 ethanol 추출물의 총당 및 환원당 함량은 각각 117.69 및 92.19 mg/g으로 나타났으며, 분획물의 경우 특이하게도 물 잔류물이 아닌 ethylacetate 및 butanol 분획에서 높은 총당 및 환원당 함량을 나타내었다. 따라서 ethylacetate 및 butanol 분획은 높은 TP, TF, 총당 및 환원당 함량을 동시에 나타내는 특이한 조성을 가진 것으로 판단되었다.

눈개승마 지상부 추출물 및 분획물의 혈액응고저해 활성

눈개승마 시료의 항응고 활성은 TT, PT, aPTT를 측정하여 평가하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 aspirin (1.5 mg/ml)은 무처리구에 비해 TT는 3.2배, PT는 1.6배, aPTT는 2.1배 연장시켜 우수한 혈액응고저해 활성을 나타내었다. 눈개승마 ethanol 추출물의 경우에는 2.5 mg/ml 농도에서는, 무처리구에 비해 aPTT에서 1.4배 연장효과가 나타났으나, TT 및 PT에서는 거의 저해활성이 인정되지 않았으며, 5.0 mg/ml 농도에서는 무처리구에 비해 TT는 1.4배, PT는 1.3배, aPTT는 2.3배 연장효과가 나타나, 눈개승마가 내인성 혈전 생성에 관여하는 혈액응고인자에 대한 저해활성이 우수한 것으로 나타났다. 각각의 분획물(5.0 mg/ml)의 항응고 활성 평가 결과, n-hexane 분획에서는 2.1배의 TT 연장효과가 나타났으며, ethylacetate 분획에서는 각각 3.1배의 aPTT, 2.7배의 PT 및 1.7배의 TT 연장효과가 나타

Table 2. *In-vitro* anticoagulation activity of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of aerial part of *Aruncus dioicus*

Extract/ Fraction	Conc. (mg/ml)	Anticoagulation activity (× control)		
		TT	PT	aPTT
DMSO	-	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a
Aspirin	1.5	3.2±0.1 ^e	1.6±0.1 ^b	2.1±0.1 ^d
Ethanol ex ¹	5.0	1.4±0.0 ^b	1.3±0.1 ^{ab}	2.3±0.0 ^d
	2.5	1.1±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.4±0.1 ^b
Hexane fr ²	5.0	2.1±0.3 ^d	1.3±0.1 ^{ab}	1.3±0.0 ^b
	2.5	1.5±0.3 ^c	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a
Ethylacetate fr	5.0	1.7±0.1 ^c	2.7±0.2 ^d	3.1±0.2 ^e
	4.0	1.3±0.1 ^b	1.7±0.0 ^c	1.6±0.1 ^c
	3.0	1.1±0.0 ^a	1.6±0.1 ^a	1.2±0.0 ^a
	2.5	1.1±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	1.1±0.2 ^a
Butanol fr	5.0	1.3±0.0 ^b	1.2±0.0 ^{ab}	0.6±0.0 ^f
	4.5	1.2±0.1 ^b	1.0±0.1 ^a	0.9±0.1 ^b
	4.0	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.1±0.1 ^a
Water residue	5.0	1.2±0.0 ^b	0.9±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a
	2.5	1.0±0.0 ^a	1.1±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a

¹ex: extract, ²fr: fraction. Data are presented as relative clotting time based on solvent control (× control). The thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) of solvent control (dimethylsulfoximide) were 24.0 sec, 18.6 sec and 40.5 sec, respectively. Different letters within a column differ significantly (p<0.05).

났다. 한편 butanol 분획의 경우 특이하게 무첨가구에 비해 TT 및 PT의 경우에는 약한 연장효과가 나타났으나, aPTT의 경우 0.6배의 연장효과를 나타내어 혈전 생성을 오히려 촉진함을 확인하였다. 이러한 ethylacetate 및 butanol 분획의 각각의 활성은 aPTT평가에서 가장 확실하게 나타났으며, 농도의 존적으로 나타났다. 한편 에탄올 추출물의 9.89%를 차지하는 물 잔류물의 경우 항응고 활성은 인정되지 않았다. 상기의 결과는 눈개승마의 ethylacetate 분획이 우수한 혈액응고 저해활성을 나타내며, butanol 분획은 반대로 지혈효과를 나타낼 수 있음을 의미하며, 민간에서 눈개승마를 지혈 및 어혈제거의 상반된 용도로 사용하는 것과 관계되리라 판단된다. 향후 각각 분획물의 활성물질 정제 및 이들의 항혈전 활성 연구를 진행할 필요가 있다고 판단된다.

눈개승마 지상부 추출물 및 분획물의 혈소판 응집저해 활성

혈소판은 다양한 혈구세포와 함께 혈관을 순환하는 원반형의 작은 세포로서, 핵이 없는 대신 혈관손상보호 및 혈소판 응집과 관련된 다양한 물질을 고농도로 포함하는 cytoplasmic granule을 가지고 있으며, 혈관내벽의 손상이 나타나는 경우 응집인자들을 분비하고, 내피세포의 손상으로 노출된 collagen

Table 3. *In-vitro* anti-platelet aggregation activity of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of aerial part of *Arunacus dioicus*

Samples (mg/ml)	Amplitude (ohm)	Slope	Area under	Relative aggregation (%)
DMSO	22	3	191.5	100.0
Aspirin (0.5)	8	0	40.2	21.0
Aspirin (0.25)	13	2	117.6	61.4
Ethanol ex ¹	12	3	137.7	71.9
Hexane fr ²	24	4	219.8	114.8
Ethylacetate fr	18	4	216.1	112.8
Butanol fr	6	1	58.2	20.4
Water residue	22	3	215.6	112.6

¹ex: extract, ²fr: fraction. Amplitude is expressed as ohms by maximum extent of platelet aggregation, and slope (rate of reaction) is determined by drawing a tangent through the steepest part of curve. Area under is a calculated area in descent drawing during platelet aggregation Data are presented as representative result relative of independent three determinations.

등과 결합하여 1차 지혈 플러그(primary hemostatic plug)를 형성하여 혈전생성을 개시하는 중요한 세포이다[23]. 먼저 혈소판 응집저해제인 아스피린은 0.25 mg/ml 농도에서 혈소판 응집도를 평가한 결과 amplitude 13Ω, area under 117.6으로, 무첨가구 DMSO의 22Ω, 191.5에 비해 각각 59.1% 및 61.4%를 나타내었으며, 이러한 혈소판 응집저해 활성은 농도의존적으로 나타나 아스피린의 강력한 응집저해 활성을 확인하였다 (Table 3, Fig. 1). 한편 0.25 mg/ml 농도에서 눈개승마 시료의 혈소판 응집저해 활성 평가결과, ethanol 추출물에서 amplitude 12Ω,와 area under 137.7의 값을 나타내어, 아스피린

0.25 mg/ml에 필적하는 응집저해 활성이 나타났으며 분획물 중에서는 butanol 분획에서 매우 강력한 혈소판 응집저해 활성이 나타났으며, 기타 분획에서는 혈소판 응집저해 활성은 확인되지 않았다 (Table 3, Fig. 1). 특히 butanol 분획의 경우 0.25 mg/ml 농도에서 amplitude 6Ω, area under 58.2의 값으로 혈소판 응집은 무첨가구에 비해 20.4%의 응집이 나타나, 아스피린 0.5 mg/ml 에 해당하는 활성을 나타내었다. 이는 butanol 분획이 정제되지 않은 상태에서도 아스피린의 2배 이상의 혈소판 응집저해 활성을 나타냄을 의미하며, 활성물질 정제시에는 위장장애 유발 등의 부작용이 있는 아스피린을 대체할 수 있는 혈소판 응집저해제로 개발 가능하리라 판단된다.

눈개승마 지상부 추출물 및 분획물의 적혈구 용혈활성

눈개승마 시료들의 적혈구 용혈활성을 평가한 결과는 Table 4에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 DMSO와 vitamin C는 용혈활성이 없었으며, triton X-100은 0.1% 농도에서 적혈구를 100% 용혈시킴을 확인하였다. 눈개승마 ethanol 추출물은 0.5 mg/ml 농도까지 용혈활성이 없었으며, 이의 분획물 중에서는 n-hexane 분획에서만 0.5 mg/ml 농도에서 22.17% 용혈을 나타내었다. 그러나 n-hexane 분획의 경우 0.25 mg/ml 이하의 농도에서는 5% 이하의 용혈을 나타내며, 기타 분획물에서는 0.5mg/ml 농도까지 용혈현상이 나타나지 않아 (Table 4), 눈개승마의 저농도 사용은 적혈구 용혈의 문제는 나타나지 않으리라 판단되었다. 이상의 결과는 눈개승마 추출물 및 분획물이 다양한 항혈전 활성 물질을 포함하고 있으며, 이를 이용한 건강산채식품, 기능성식품 및 천연물 신약 개발이 가능함을 제시하고 있다. 향후 관련 활성물질의 정제와 작

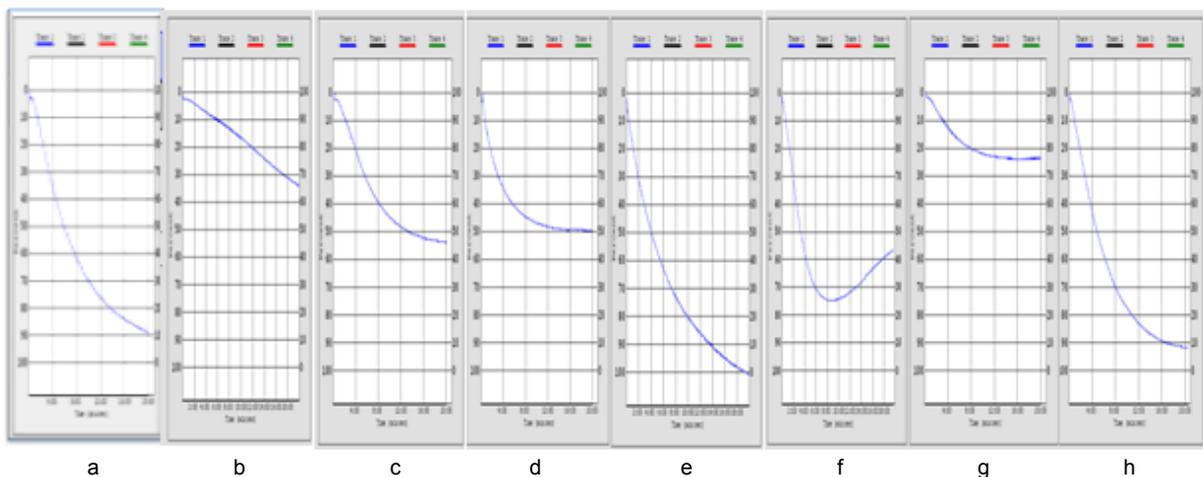


Fig. 1. Diagrams of impedance changes during platelet aggregation after addition of aspirin and the samples of *Arunacus dioicus* in whole blood aggregometer. (a) DMSO, (b) aspirin (0.5 mg/ml), (c) aspirin (0.25 mg/ml), (d) ethanol extract, (e) n-hexane fraction, (f) ethylacetate fraction, (g) butanol fraction, and (h) water residue of the aerial part of *Arunacus dioicus*. Platelet aggregation was induced by addition of 2.5 μl of collagen (1 mg/ml) into cuvette containing 50 μl of washed PRP and measured the impedance change for 12 min.

Table 4. Hemolytic activity of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of aerial part of *Aruncus dioicus*

Chemicals/samples (0.5 mg/ml)	Relative hemolysis (%)	Hexane fraction (mg/ml)	Relative hemolysis (%)
DMSO	0.05±2.17	0.5	22.17±5.35
Triton X-100*	100±0.03	0.25	5.02±2.77
Vitamin C	-1.46±0.43	0.125	3.22±2.63
Ethanol ex ¹	-0.46±0.42	0.063	3.09±0.76
Hexane fr ²	22.17±5.35	0.032	3.19±0.27
Ethylacetate fr	-0.49±3.05	0.012	3.04±0.85
Butanol fr	-3.67±0.21	0.006	3.08±0.45
Water residue	0.05±0.07	0	0.05±2.17

¹ex: extract, ²fr: fraction. Data are presented as the mean ± SD of three determinations. The concentration of triton X-100 used was 0.1%. Hemolytic activity was evaluated using 4% human red blood cell and the relative hemolysis (%) was calculated by following equation. (%) Hemolysis = [(Abs. S - Abs. C)/(Abs. T - Abs. C)] × 100 (For Abs. S, Abs. C and Abs. T, refer the materials and methods).

용기작 규명 연구가 필요하며, 본 연구결과는 눈개승마를 이용한 고부가가치 식품 개발 기본자료로 활용될 것이다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 안동대학교 특별연구지원사업에 의해 수행된 연구입니다.

References

- Baek, H. S., Lim, S. H., Ahn, K. S. and Lee, J. 2012. Methanol extract of goat's-beard (*Aruncus dioicus*) reduces renal injury by inhibiting apoptosis in a rat model of ischemia-reperfusion. *Prev Nutr Food Sci* **17**, 101-108.
- Chen, H., Qi, X., He, C., Yin, Z., Fan, D. and Han, G. Coagulation imbalance may not contribute to the development of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis. *Thromb Res* **131**, 173-177.
- Choi, B. B., Lee, H. J. and Bang, S. K. 2004. Studies on the amino acid, sugar analysis and antioxidative effect of extracts from *Artemisia* sp. *Korean J Food Sci Technol* **17**, 86-91.
- Choi, M. G., Chung, H. S. and Moon, K. D. 2008. Chemical components of *Solidago virgaurea* spp. *Aster glehni* var *hondensis* and *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus* grown on Ulleung island, Korea. *Korean J Food Preserv* **16**, 578-581.
- Colombo, M. L., Bugatti, C., Davanzo, F., Persico, A., Ballabio, C. and Restani, P. 2009. Analytical aspects of diterpene alkaloid poisoning with monkshood. *Nat Prod Commun* **4**, 1551-1552.
- Han, C. R., Jun, D. Y., Woo, H. J., Jeong, S. Y., Woo, M. H. and Kim, Y. H. 2012. Induction of microtubule-damage, mitotic arrest, Bcl-2 phosphorylation, Bak activation, and mitochondria-dependent caspase cascade is involved in human Jurkat T-cell apoptosis by aruncin B from *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus*. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 945-953.
- Hwang, H. J., Kang, M. S., Kim, B. K., Jung, B. M. and Kim, M. H. 2012. The effect of *Opuntia humifusa* seed extracts on platelet aggregation and serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci* **22**, 1680-1687.
- Jeong, S. Y., Jun, D. Y., Kim, Y. H., Min, B. S., Min, B. K. and Woo, M. H. 2011. Monoterpenoids from the aerial parts of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* and their antioxidant and cytotoxic activities. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 3252-3256.
- Kim, D. H., Ah, B. J., Kim, S. G., Park, T. S., Park, G. H. and Son, J. H. 2011. Antimelanogenic effect of *Ligulara fischeri*, *Solidago virga-aurae*, *Aruncus dioicus* extracts from Ulung island in murine melanoma cells. *J Life Sci* **21**, 279-285.
- Kim, D. H., Ah, B. J., Kim, S. G., Park, T. S., Park, G. H. and Son, J. H. 2011. Anti-inflammatory effect of *Ligulara fischeri*, *Solidago virga-aurae*, *Aruncus dioicus* extracts in Raw 264.7 cells. *J Life Sci* **21**, 678-683.
- Kim, D. H., Moon, Y. S., An, B. J. and Son, J. H. 2012. Potent anti-aging activity of *Aruncus dioicus*, a native plant of Ulleung-do, South Korea, in CCD-986sk fibroblasts via suppression of matrix metalloproteinases. *J Nat Med* **66**, 631-636.
- Kim, J. I., Jang, H. S., Kim, J. S. and Sohn, H. Y. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Korean J Microbiol Biotechnol* **37**, 133-139.
- Kim, M. J. and Le, Y. K. 2011. Antioxidative ability of some produces in Ulleungdo and quality characteristics of the taffy made from the produces. *J East Asian Soc Dietary Life* **21**, 60-67.
- Kim, M. S., Kim, K. H., Ko, J. E., Choi, J. J., Kim, Y. J., Kim, J. H., Jang, S. A. and Yook, H. S. 2011. Antioxidative and antimicrobial activities of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus* Hara extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **40**, 47-55.
- Kim, M. S., Oh, I. T., Jun, D. Y., Lee, J. Y., Sohn, H. Y., Kwak, D. Y., Seo, M. C., Woo, K. S., Ko, J. Y., Jung, T. W., Nam, M. H., Woo, M. H. and Kim, Y. H. 2013. Anticoagulant activity and fibrinolytic activities of Hwanggeumchal sorghum *in vitro*. *J Life Sci* **23**, 1460-1470.
- Kwon, J. W., Park, J. H., Kwon, K. S., Kim, D. S., Jeong, J. B., Lee, H. K., Sim, Y. E., Kim, M. S., Youn, J. Y., Chung, G. Y. and Jeong, H. J. 2006. Effect of shading practices on the chemical compounds and antioxidant in *Arucus dioicus*. *Korean J Plant Res* **19**, 1-7.
- Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. G. and Lee, I. S. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J Food Sci Technol* **37**, 233-240.
- Lim, J. H., Kim, B. K., Park, C. E., Park, K. J., Kim, J. C., Jeong, J. W. and Jeong, S. W. 2008. Antioxidative and antimicrobial activities of persimmon leaf tea and green tea. *J East Asian Soc Dietary Life* **18**, 797-804.

19. Ryu, H. Y., Ahn, S. M., Kim, J. S. and Sohn, H. Y. 2010. Evaluation of *in-vitro* anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J Life Sci* **20**, 922-928.
20. Shin, J. W., Lee, S. I., Woo, M. H. and Kim, S. D. 2008. Effect of ethanol extracts of goats beard on streptozotocin induced diabetic symptoms and oxidative stress in rats. *J East Asian Soc Dietary Life* **18**, 939-948.
21. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* **299**: 152-178.
22. Sweeney, J. D., Hoerning, L. A., Behrens, A. N., Novak, E. and Swank, R. T. 1990. Thrombocytopenia after desmopressin but absence of *in-vitro* hypersensitivity to ristocetin. *Am J Clin Pathol* **93**, 522-525.
23. Sweeney, J. D., Hoerning, L. A. and Fitzpatrick, J. E. 1989. Whole blood aggregation in Von willebrand disease. *Am J Hematol* **32**, 190-193.
24. Valentina, U., Fabrice, J. and Stampar, F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem* **107**, 185-192.
25. Youn, J. S., Shin, S. Y., Wu, Y., Hwang, J. Y., Cho, J. H., Ha, Y. G., Kim, J. K., Park, M. J., Lee, S. H., Kim, T. H. and Kim, T. W. 2012. Antioxidant and anti-wrinkling effects of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus* extracts. *Korean J Food Preserv* **19**, 393-399.

초록 : 눈개승마 지상부의 항혈전 활성

김미선 · 손호용*

(안동대학교 식품영양학과)

한방에서 지혈 및 어혈 제거용으로 사용되고 있는 눈개승마는, 최근 약용 산채로 그 수요가 급증하고 있다. 본 연구에서는 눈개승마의 항혈전 활성을 평가하고자 눈개승마 지상부로부터 에탄올 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 이들의 혈액응고 저해활성 및 혈소판 응집저해 활성을 평가하였다. 그 결과, 눈개승마의 에탄올 추출물(0.5 mg/ml)에서 1.4~2.3배의 우수한 TT, PT, aPTT 연장효과를 확인하였으며, 특히 내인성 혈액응고 인자 저해효과가 우수함을 확인하였다. 분획물에서는 ethylacetate 분획에서 가장 우수한 aPTT 연장효과를, butanol 분획에서는 혈액응고 촉진효과를 확인하였다. 혈소판 응집저해 활성평가의 경우, 눈개승마 에탄올 추출물은 임상에서 사용하는 항혈소판제인 아스피린에 필적하는 효과를 나타내었으며, 특히 butanol 분획은 0.25 mg/ml 농도에서 아스피린 0.5 mg/ml 에 해당하는 강력한 혈소판 응집저해능을 나타내었다. 상기의 에탄올 추출물과 활성 분획물들은 0.5 mg/ml 농도까지 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 나타내지 않아, 눈개승마가 천연물 유래의 항혈전제로 개발 가능성을 확인하였으며, 특히 상기 활성분획들이 높은 함량의 total polyphenol, total flavonoid, total sugar를 포함함을 고려할 때, 활성물질의 정제시에는 더욱 강력한 항혈전 활성을 나타내리라 판단된다. 본 연구결과는 눈개승마의 항혈전 활성의 최초 보고이다.