

## Anti-thrombosis and anti-oxidative activity of the root of *Arctium lappa* L.

Mi-Sun Kim, Ye-Seul Lee, Ho-Yong Sohn\*

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

### 우엉 뿌리의 항혈전 및 항산화 활성

김미선 · 이예슬 · 손호용\*

안동대학교 식품영양학과

#### Abstract

To investigate anti-thrombosis and anti-oxidation activities of the root of *Arctium lappa* L (RALL), which has been used as foodstuff and oriental medicine in Korea, the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of the RALL were prepared. The yield of ethanol extraction was 10.94%, and the content of total polyphenol and total sugar of ethanol extract were 5.01 and 694.53 mg/g, respectively. The fraction yields of n-hexane, ethylacetate (EA), butanol and water residue were 1.62, 0.42, 5.98 and 85.38%, respectively. In anticoagulation activity assay, the ethanol extract of RALL did not show significant changes in thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), whereas the EA fractions showed 13 folds extended TT, PT, and aPTT respectively. Interestingly, the water residue showed strong activation effect against blood clotting factors with shortened aPTT, which might provide the evidence of coagulation agent of RALL in folk remedy. In anti-platelet aggregation assay, the activity of the ethanol extract and its fractions were comparable to that of aspirin. Especially the EA fraction showed 2-folds higher inhibitory activity than aspirin. In anti-oxidation activity assay, the EA fraction also showed strong in DPPH, ABTS and nitrite scavenging activity, and reducing power activity. The extract and fractions of RALL have ignorable hemolytic activity against human RBC up to 0.5 mg/mL concentration. Our results suggest that the EA fraction of RALL have potentials as safe and novel anti-thrombosis agent.

**Key words :** *Arctium lappa* L, anticoagulation, anti-platelet aggregation, anti-oxidation

### 서 론

인체의 혈액은 심장과 혈관의 순환계를 흐르고 있는 액체로 다양한 혈구 세포와 혈장으로 구성되어 있으며, 산소, 영양분 및 노폐물의 운반 기능과 체온유지, 삼투압 조절, 이온 평형유지, 수분 일정유지, 액성 조절작용, 생체 방어, 혈압의 유지 및 조절작용 등 다양한 중요 기능들을 수행하고 있다(1). 따라서 정상적인 혈액 순환은 생명유지에 필수적 요건이며, 이러한 혈액순환은 혈액 응고 반응계와 혈전 용해반응계가 상호 보완적으로 작용하여 항상성을 유지하고 있다. 한편, 혈관 상처 또는 혈관 내피세포 이상 등에 의해 나타나는 혈액 응고반응은 혈관벽에 혈소판이 점착,

응집하여 혈소판 혈전을 형성한 후, 많은 혈액응고인자 및 prothrombin, thrombin을 포함하는 혈액 응고계가 활성화되어 최종적으로 피브린 혈전이 형성되는 것으로 보고되어 있다(2). 따라서 과도한 혈액응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환 예방을 위해서는 혈액응고에서 중추적 역할을 하는 thrombin의 저해뿐만 아니라, 외인성 혈전생성에 관련된 prothrombin의 저해 및 내인성 혈전생성경로에 작용하는 혈액응고인자의 저해 및 혈소판 응집 저해가 필요하다. 현재까지 알려진 혈전성 질환의 예방과 치료제로는 헤파린, 쿠마린, 아스피린, 유로키네이즈 등의 다양한 혈액 응고 저해제, 혈소판 응집 저해제 및 혈전 용해제 등이 사용되고 있으나, 이들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장애 및 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있는 실정이다(3,4). 따라서 최근에는 안전성이 확보된 식

\*Corresponding author. E-mail : hysohn@anu.ac.kr  
Phone : 82-54-820-5491 Fax : 82-54-820-5491

용 한약재(5), 허브 및 베리류(6) 및 해조류(7) 등의 천연물로부터 항혈전제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편 우엉(*Burdock*, *Arctium lappa*)은 쌍떡잎 식물 초롱꽃목 국화과의 두해살이풀로, 원산지는 유럽이나 시베리아, 중국, 한국 등에 널리 분포하며, 국내에서는 경상남도를 중심으로 대량 재배되고 있다. 우엉은 조단백 9.72%, 조지방 0.52%, 총 식이섬유 46.7%, 다량의 비타민 및 미네랄을 함유하여 영양적으로 매우 우수하며, 특유의 향기가 있고 씹는 맛이 좋아 어린 순을 삶아 먹거나 뿌리를 소금에 절이거나, 식초에 데친 것, 또는 간장에 졸인 것을 식용하고 있다(8). 한방에서는 우엉의 열매, 뿌리 및 줄기를 각각 우방자, 우방근 및 악실경으로 부르며, 지혈, 변비 치료, 빈혈 및 당뇨 개선, 생리통 완화 및 강장효과에 사용하고 있으며, 분만 촉진작용과 자궁흥분작용이 있어 임신 중의 과도한 내복은 피해야 한다고 알려져 있다. 현재까지 우엉에 대한 주요 연구로는 재배(9), 신선편이 및 갈변억제 연구(10,11) 등이 있으며, 가공식품 개발로는 우엉김치(12) 및 우엥가루 첨가 머핀(13) 등의 연구가 보고되어 있다. 우엉의 유용 기능성으로는 우엉 추출물의 레디컬 소거효과(14), 라드의 열산화 및 자동산화 방지효과(15), 항염증 활성(16-18), 간독성 억제활성(19), 신우염 억제활성(20), 돌연변이 억제활성(21,22) 및 암세포 생육저해 활성(23) 등이 보고되어 있으며, 최근에는 우엉 ethanol 추출물의 butanol 분획물의 항알러지 효과(24) 및 우엉에서 분리된 arctigenin의 유방암(25), 위암(26) 및 폐암세포 사멸효과(27), arctiin의 세포주기 조절효과(28), 우엉 추출 lignin의 nitric oxide 생성억제 효과(29,30), caffeoylquinic acid의 항산화 활성(31) 등 우엉의 활성분획 및 정제물질에 대한 효능도 보고되고 있다.

본 연구에서는 우엉의 혈전 및 항산화 관련 효능을 평가하고자, 우엉 뿌리의 ethanol 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 혈액응고 저해 활성, 혈소판 응집저해 활성, 인간 적혈구 용혈활성 및 항산화 활성을 평가하였으며, 그 결과 우엉 지하부의 에틸아세테이트 분획물에서 신규의 강력한 항혈전 효과를 확인하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 우엥 뿌리 시료의 조제

본 실험에 사용된 우엥은 2012년 7월 경북 안동에서 재배한 우엥의 지하부를 구입하여 사용하였으며, 수세, 거피 후 별도의 건조과정 없이 추출에 적합하도록 세절한 후 95% ethanol을 시료 무게의 10배가 되도록 가하여 상온에서 3회 추출하였다. 이후 추출액은 filter paper(Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)하여 분말로 조제하

였으며, 이후 추출물을 물에 현탁한 후 n-hexane, ethylacetate 및 butanol 을 이용하여 순차적으로 분획하고 물 잔류물을 회수하였다(6). 각각의 분획물들은 감압 건조하여 분말화 하였으며, 이후 분말시료들은 DMSO에 적당한 농도로 녹여, *in-vitro* 항혈전 활성, 적혈구 용혈 활성 및 항산화 활성 평가에 사용하였다. 항혈전 활성평가에 사용한 혈장은 시판 control plasma(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, Huayuan, China)를 사용하였으며, PT reagent와 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis(MD Pacific Technology Co., Ltd., China)의 분석시약을 사용하여 측정하였다(5). 기타 사용한 시약은 시약급 이상으로 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 우엥 시료는 안동대학교 식품영양학과(Andong, Korea)에서 보관하고 있다(voucher specimen 2012-AL7).

### 항응고 활성

항혈전 활성 중 혈액응고저해 활성은 시료의 thrombin time(TT), prothrombin time(PT) 및 activated partial thromboplastin time(aPTT)을 측정하여 평가하였다(5,7). TT는 37°C에서 0.5 U thrombin(Sigma Chemical Co.) 50  $\mu$ L와 20 mM CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ L, 다양한 농도의 시료 10  $\mu$ L를 Amelung coagulometer KC-1A(Amelung, Lemgo, Germany)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100  $\mu$ L를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 시료 대조군으로는 아스피린(Sigma Co.)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. Thrombin 저해 활성은 3회 이상 반복한 시료 TT 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 TT 평균치의 비로 나타내었다(5). 한편 PT 측정은 혈장 70  $\mu$ L와 다양한 농도의 시료 10  $\mu$ L를 coagulometer의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130  $\mu$ L의 PT reagent를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, prothrombin 저해 활성은 3회 이상 반복한 시료 PT 실험의 평균치를 DMSO의 PT 평균치의 비로 나타내었다(5). aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 70  $\mu$ L와 다양한 농도의 시료 10  $\mu$ L를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65  $\mu$ L의 aPTT reagent를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 65  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>(35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, aPTT 연장 활성은 3회 이상 반복한 시료 aPTT 실험의 평균치를 DMSO의 aPTT 평균치의 비로 나타내었다(5,7).

### 혈소판 응집 저해 활성

항혈전 활성 중 혈소판 응집저해 활성은, 미세전극에 혈소판이 부착되어 응집됨에 따라 발생하는 전기 저항값의 변화를 측정하는 impedance 법을 사용하여 평가하였다

(32,33). 농축 혈소판(platelet rich plasma: PRP)은 적십자로부터 공급받았으며 PRP 를 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 NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 1 mM EDTA, pH 6.5) 10 mL를 가하여 고르게 현탁한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수세하였다. 상기 수세과정을 2번 더 반복한 후, 수세된 혈소판은 suspending buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25% gelatin, pH 7.4)에 현탁하여 최종 혈소판 농도가  $5 \times 10^8$ /mL이 되도록 조정하였다(32). 혈소판 응집능은 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, U.S.A)를 사용해 37°C에서 측정하였으며, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ L, suspending buffer 147.5  $\mu$ L, 시료 5  $\mu$ L 가 포함된 반응 cuvette에 혈소판 50  $\mu$ L을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen(1 mg/mL)을 2.5  $\mu$ L를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under 를 측정하여 평가하였다(33). 이때, amplitude( $\Omega$ )는 혈소판에 응집유도제를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집 정도를 나타내며, slope 는 응집유도제를 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 나타내며, area under는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는 것으로 전기저항 증가에 따른 slope 곡선의 하강면적을 나타낸다(2). 시료의 혈소판 응집 저해 활성은 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under값의 비로 나타내었다(33).

#### 인간 적혈구 용혈 활성 평가

우영 추출물 및 분획물의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다. PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100  $\mu$ L를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 시료용액 100  $\mu$ L를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100  $\mu$ L를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다(5). 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. 용혈 활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

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

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

#### 항산화 활성 평가

우영 추출물 및 분획물의 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) anion scavenging activity(DSA),

ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] cation scavenging activity(ASA), nitrite scavenging activity(NSA) 및 환원력 측정으로 평가하였다(34). DSA 측정의 경우, 다양한 농도로 희석한 시료 20  $\mu$ L에 99.5% ethanol 에 용해시킨  $2 \times 10^{-4}$ M DPPH용액 380  $\mu$ L를 넣고 혼합하여 37°C에서 30 분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader(Asys Hitech, Expert96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, DSA(%)는 시료 첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였다(34). ASA 측정의 경우, 7 mM ABTS (Sigma Chemical Co.) 5 mL와 140 mM potassium persulfate 88 mL를 섞은 후 상온에서 16 시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰으며, 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 ethanol로 희석하였다. 조제된 희석용액 190  $\mu$ L와 시료 10  $\mu$ L를 혼합한 후 상온에서 6 분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 ASA(%)를 결정하였다(34).

$$\text{ASA} (\%) = \frac{[(C-S)/C] \times 100, C: \text{DMSO 첨가시 흡광도}, S: \text{시료 첨가시 흡광도}.$$

한편 NSA 측정의 경우, 아질산염 용액(1 mM)에 시료용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정된 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Griess reagent(Sigma Chemical Co.)를 가하고 혼합하였다. 이후 15 분간 실온에서 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 nitrite 양을 측정하였으며, NSA(%)는 다음의 식에 의해 계산하였다(34).

$$\text{NSA} (\%) = \frac{[1-(A-C)/B] \times 100,$$

A: 1 mM nitrite 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도,

B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도, C: 우영 시료의 흡광도.

환원력 평가의 경우 Oyaizu등의 방법을 변형하여 측정하였으며(34), ethanol에 용해한 시료 2.5 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 10% potassium ferricyanide 2.5 mL를 첨가하고 50°C에서 20 분간 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가하여 반응을 종료하고 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 증류수로 2배 희석한 후, 신선하게 조제된 0.1% ferric chloride 용액과 5:1(v/v) 비율로 혼합하고 700 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다. 상기의 항산화 실험에서 대조구로는 vitamin C(Sigma Chemical Co.)를 사용하였으며, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다. 각각의 활성 평가는 각각 3회 반복한 실험의 평균과 표준편차로 표시하였다.

### 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량 분석

Total flavonoid(TF)의 함량 측정은 기존의 보고된 방법(35)에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18 시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출액 400  $\mu$ L에 90% diethylene glycol 4 mL를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 1 시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. Total polyphenol(TP) 함량은 시료 400  $\mu$ L에 50  $\mu$ L의 Folin-Ciocalteu, 100  $\mu$ L의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>포화용액을 넣고 실온에서 1 시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다(34). 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다.

### 총당 및 환원당 함량 측정

총당 함량은 phenol-sulfuric acid법, 환원당 함량은 DNS 변법을 이용하여 측정하였다(36). 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 표준편차로 나타내었다.

### 통계분석

실험 결과는 SPSS 21.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 버전을 사용하여 mean $\pm$ SD 로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 우영 지하부의 ethanol 추출물 및 이의 활성 분획물 제조

세척 후 껍질을 벗긴 우영 뿌리의 ethanol 추출효율은 10.94%로 나타났으며(Table 1), 이는 Predes 등(23)이 보고한 4.45% 보다 높은 추출효율을 나타낸 반면, 70% ethanol 추출효율 10.25%와 유사하였다. 이러한 차이는 실험에 사용한 우영의 품종 및 수분함량의 차이에서 기인한 것으로 판단되며, 국내 유통되는 한약재의 평균 추출효율 5.27%(5)

**Table 1. Yields of extraction and fractions, and component analysis of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of root of *Arctium lappa* L**

Extract/ Fraction	Extraction/ Fraction yield (%)	Content (mg/g)			
		Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar
Ethanol ex <sup>1)</sup>	10.94	0.96 $\pm$ 0.04	5.01 $\pm$ 0.05	694.53 $\pm$ 18.58	271.24 $\pm$ 1.38
Hexane fr <sup>2)</sup>	1.62	3.25 $\pm$ 0.42	3.48 $\pm$ 0.01	161.05 $\pm$ 5.86	41.81 $\pm$ 0.92
Ethylacetate fr	0.42	47.36 $\pm$ 2.89	45.9 $\pm$ 4.51	85.23 $\pm$ 0.45	68.74 $\pm$ 1.38
Butanol fr	5.98	8.16 $\pm$ 0.44	8.51 $\pm$ 0.05	675.02 $\pm$ 5.63	494.51 $\pm$ 2.29
Water residue	85.38	0.57 $\pm$ 0.03	2.27 $\pm$ 0.04	532.85 $\pm$ 25.34	229.05 $\pm$ 4.13

<sup>1)</sup>extract, <sup>2)</sup>fraction. Data are presented as the mean $\pm$ SD of three determinations.

및 해조류 추출효율 5.9%(7)에 비해 우영의 ethanol 추출효율은 상당히 높음을 알 수 있었다. 추출물의 순차적 유기용매 분획 결과, n-hexane, ethylacetate, n-butanol 분획 수율은 각각 1.62, 0.42 및 5.98%로 나타났으며, 물 잔류물은 85.38%이었다(Table 1).

### 우영 지하부 추출물의 성분 분석

우영 ethanol 추출물의 성분 조사결과, 5.01 및 0.96 mg/g의 낮은 함량의 TP와 TF가 확인되었으며, 총당과 환원당 함량은 각각 694.53 및 271.24 mg/g을 나타내어 상당량의 당류가 포함되어 있음을 확인하였다. 이러한 조성은, 분획물의 대부분을 차지하는 물 잔류물에서도 유사하게 나타나 0.57 및 2.27 mg/g의 낮은 함량의 TP와 TF, 532.85 및 229.05 mg/g의 총당과 환원당 함량을 확인하였다(Table 1). 순차적 유기용매 분획물 중 ethylacetate 분획물은 45.9 및 47.36 mg/g의 높은 함량의 TP와 TF, 상대적으로 낮은 총당과 환원당 함량을 나타내어 다양한 유용 활성이 강력하게 나타나리라 예상되었다. 특히 ethylacetate 분획 수율이 0.42% 임을 고려한다면 특정 생리활성물질이 존재하는 경우, 상기 ethylacetate 분획은 우영 유래의 활성물질을 효율적으로 정제할 수 있는 조분획물로 이용 가능하리라 판단된다.

### 우영 지하부 추출물 및 분획물의 혈액응고저해 활성

현재 우영 마쇄액을 민간요법의 지혈제로 사용하고 있으나, 이에 대한 과학적 연구는 수행된 바 없으며, 우영의 항혈전 활성은 거의 알려져 있지 않은 상태이다. 따라서, 우영 시료의 항응고 활성은 TT, PT, aPTT를 각각 측정하여 평가하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 aspirin(1.5 mg/mL)은 무처리구에 비해 TT는 2.7 배, PT는 1.8 배, aPTT는 2.1 배 연장시켜 우수한 혈액응고저해 활성을 나타내었다. 우영 ethanol 추출물의 경우에는 최대 5 mg/mL 농도에서도 무처리구에 비해 TT, PT 및 aPTT에서 거의 저해활성이 인정되지 않았으며, 물 잔류물에서는 5.0 mg/mL 농도에서는 무처리구에 비해 TT는 1.3 배 연장되었으나, aPTT는 오히려 0.7 배로 감소되었다. 따라서 우영 추출물의 대부분을 차지하는 물 잔류물의 경우 혈액응고인자 활성화를 통해 혈전 생성을 촉진할 수 있음을 나타내며, 민간에서 우영을 지혈제로 사용하는 근거로 예상된다. 분획물 중, hexane 분획물은 5 mg/mL의 고농도에서 TT는 13 배 이상 연장시켰으며, PT는 2.5 배 연장시켰으나, 혈액응고인자 저해와 관련된 aPTT의 경우 무첨가구에 비해 변화가 없었다. Butanol 분획물(5 mg/mL)의 경우 혈액응고저해 활성이 인정되었으나 아스피린에 비해 미미하였다. 반면 ethylacetate 분획은 2.5 mg/mL 농도에서 아스피린보다 강력한 혈액응고저해를 나타내었으며, 특히 아스피린의 1/3~1/6의 농도(0.25~0.5 mg/mL)에서 아스피린에 필적하는 TT 연장효과를 나타내었으며, 농도 의존적인 혈액응고저

해를 나타내었다. 상기의 결과는 우영의 ethylacetate 분획은 우수한 혈액응고 저해활성을 나타내며, 물 잔류물은 혈액응고인자 활성화를 통해 지혈효과를 나타낼 수 있음을 제시하고 있으며, 향후 각각 분획물의 활성물질 정제 및 이들의 항혈전 활성 연구를 진행할 필요가 있다고 판단된다.

**Table 2. In-vitro anticoagulation activity of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of root of *Arctium lappa* L**

Extract/ Fraction	Conc. (mg/mL)	Anticoagulation activity (x control)		
		TT	PT	aPTT
DMSO	-	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>
Aspirin	1.5	2.7±0.1 <sup>d</sup>	1.8±0.1 <sup>c</sup>	2.1±0.1 <sup>d</sup>
Ethanol ex <sup>1)</sup>	5.0	1.1±0.0 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>
	2.5	1.0±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>
Hexane fr <sup>2)</sup>	5.0	> 13.0 <sup>e</sup>	2.5±0.4 <sup>c</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>
	2.5	1.5±0.1 <sup>b</sup>	1.5±0.2 <sup>b</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>
	5.0	> 13.0 <sup>f</sup>	> 13.0 <sup>f</sup>	> 13.0 <sup>f</sup>
Ethylacetate fr	2.5	> 13.0 <sup>f</sup>	2.1±0.2 <sup>d</sup>	2.7±0.3 <sup>e</sup>
	1.2	> 13.0 <sup>f</sup>	1.5±0.1 <sup>b</sup>	1.5±0.1 <sup>b</sup>
	0.5	4.0±0.3 <sup>e</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	1.3±0.1 <sup>ab</sup>
	0.25	2.4±0.1 <sup>c</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>	1.3±0.1 <sup>ab</sup>
Butanol fr	0.12	1.5±0.1 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>
	5.0	1.7±0.1 <sup>bc</sup>	1.2±0.0 <sup>a</sup>	1.7±0.1 <sup>c</sup>
	2.5	1.2±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>
Water residue	5.0	1.3±0.0 <sup>ab</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>g</sup>
	2.5	1.2±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>

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

#### 우영 지하부 추출물 및 분획물의 혈소판 응집저해 활성

혈소판은 다양한 혈구세포와 함께 내피세포의 손상으로 노출된 collagen 등과 결합하여 1차 지혈 플러그(primary hemostatic plug)를 형성하여 혈전생성을 개시하는 중요한 세포이다(1). 우영 시료의 혈소판 응집능을 평가하기 위해, 먼저 혈소판 응집저해제인 아스피린(0.25 mg/mL)을 첨가하여 혈소판 응집도를 평가한 결과 amplitude 8Ω, area under 56.4로, 무첨가구 DMSO의 14Ω, 94.7에 비해 각각 57.1% 및 59.5%의 결과를 나타내었으며, 이러한 혈소판 응집저해 활성은 농도 의존적으로 나타나 아스피린의 강력한 응집저해 활성을 확인하였다(Table 3, Fig. 1). 한편 우영 ethanol 추출물(0.25 mg/mL)은 amplitude 6Ω,와 area under 50.3의 값을 나타내어, 동량의 아스피린보다 강력한 혈소판 응집저해 활성을 가짐을 확인하였다. 이의 분획물들 역시 22.2~45.6%의 혈소판 응집능을 나타내어, 아스피린보다 강

력한 혈소판 응집저해 활성을 나타내었으며, 특히 ethylacetate 분획물의 경우 용매 대조구에 비해 12%의 혈소판 응집만이 나타나, 가장 강력한 혈소판 응집저해 활성이 나타남을 확인하였다. 이는 ethylacetate 분획이 정제되지 않은 상태에서도 아스피린의 2배 이상의 혈소판 응집저해 활성을 나타남을 의미하며, 활성물질 정제시에는 위장장애 유발 등의 부작용이 있는 아스피린을 대체할 수 있는 강력한 항혈전제로 개발 가능하리라 기대된다.

**Table 3. In-vitro anti-platelet aggregation activity of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of root of *Arctium lappa* L**

Samples (mg/mL)	Amplitude (ohm)	Slope	Area under	Relative Aggregation (%)
DMSO	14	4	94.7	100.0
Aspirin (0.5)	5	1	21.7	22.9
Aspirin (0.25)	8	2	56.4	59.5
Ethanol ex <sup>1)</sup> (0.25)	6	1	47.6	50.3
Hexane fr <sup>2)</sup> (0.25)	4	0	21.0	22.2
Ethylacetate fr (0.25)	2	0	11.4	12.0
Butanol fr (0.25)	8	1	37.5	39.4
Water residue (0.25)	8	1	43.2	45.6

<sup>1)</sup>extract, <sup>2)</sup>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.

#### 우영 지하부 추출물 및 분획물의 적혈구 용혈활성

우영 시료들의 적혈구 용혈활성을 평가한 결과는 Table 4에 나타내었다. 대조구로 사용된 DMSO와 vitamin C는 용혈활성이 없었으며, triton X-100은 0.1% 농도에서 적혈구를 100% 용혈시킴을 확인하였다. 우영 ethanol 추출물은 0.5 mg/mL 농도까지 용혈활성이 없었으며, 이의 분획물 중에서는 ethylacetate 분획에서만 7.78%의 미약한 용혈을 나타내었다. 그러나 ethylacetate 분획 역시 0.25 mg/mL 이하의 농도에서는 3% 이하의 용혈을 나타내어, 우영 시료의 저농도 사용은 적혈구 용혈의 문제는 나타내지 않으리라 판단되었다.

#### 우영 지하부 추출물 및 분획물의 항산화 활성

우영 시료의 항산화 활성은 DPPH, ABTS 및 nitrite 소거능을 평가하여 각각의 라디칼에 대해 50% 소거능을 나타내는 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였으며, 그 결과는 Table 5에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 vitamin C의 DPPH, ABTS 및 nitrite 소거능의 IC<sub>50</sub>는 각각 15.2, 5.3 및 15.8 μg/mL로 강력한 항산화 활성을 나타내었다. 한편, 우영 ethanol 추출물, hexane 분획물, 물 잔류물들은 매우 미약한 소거능을 나타내었으며, butanol 분획에서 약한 DPPH 음이온 소거능과

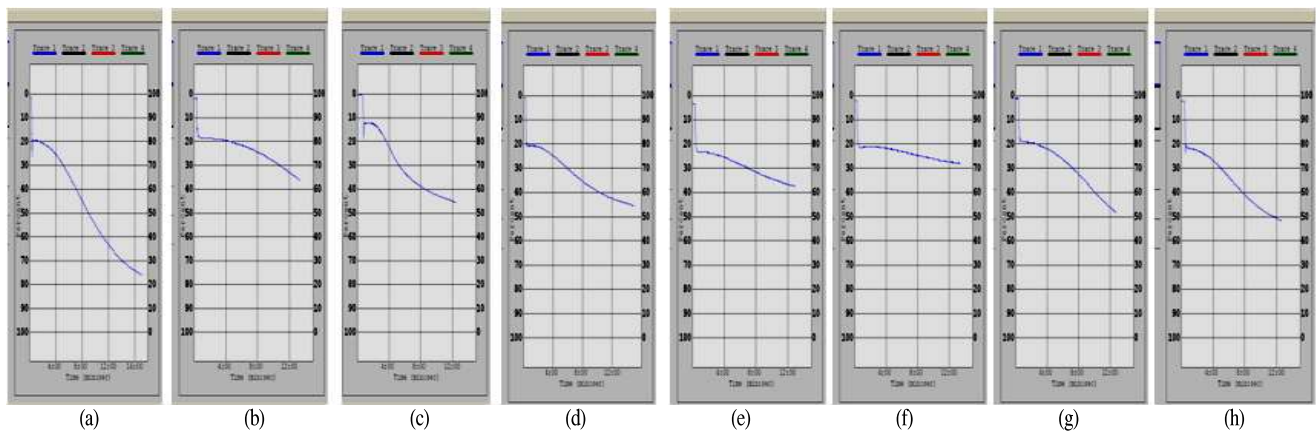


Fig. 1. Diagrams of impedance changes during platelet aggregation after addition of aspirin and the samples of *Arctium lappa* L. in whole blood aggregometer.

X axis : Time (min), Y axis : Percent of aggregation. (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 *Arctium lappa* L. Platelet aggregation was induced by addition of 2.5  $\mu$ L of collagen (1 mg/mL) into cuvette containing 50  $\mu$ L of washed PRP and measured the impedance changes for 12 min.

Table 4. Hemolytic activity of the ethanol extract and its subsequent organic solvent fractions of root of *Arctium lappa* L.

Chemicals/samples (0.5 mg/mL)	Relative hemolysis (%)
DMSO	0.01 $\pm$ 0.17
Triton X-100*	100 $\pm$ 0.04
Vitamin C	-1.52 $\pm$ 0.26
Ethanol ex <sup>1)</sup>	-1.27 $\pm$ 1.11
Hexane fr <sup>2)</sup>	1.52 $\pm$ 3.53
Ethylacetate fr	7.78 $\pm$ 0.07
Butanol fr	3.33 $\pm$ 0.12
Water residue	1.47 $\pm$ 1.80

<sup>1)</sup>extract, <sup>2)</sup>fraction. Data are presented as the mean $\pm$ 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)]  $\times$  100 (For Abs. S, Abs. C and Abs. T, refer the materials and methods).

우수한 ABTS 소거능을 나타내었다. 그러나 ethylacetate 분획에서는 DPPH, ABTS 및 nitrite 소거능의 IC<sub>50</sub>가 각각 51.6, 17.8 및 26.6  $\mu$ g/mL를 나타내어 우영 시료에서의 항산화 활성은 주로 ethylacetate 분획에서 기인함을 알 수 있었다 (Table 5). 한편 환원력 측정의 경우에도 ethylacetate 분획 및 butanol 분획에서만 유의적인 활성이 나타났으며, 특히 ethylacetate 분획에서는 50  $\mu$ g/mL농도에서 vitamin C의 34%의 환원력을 나타내었다(Fig. 2). 이상의 결과는 우영 추출물 및 분획물이 다양한 항혈전 활성 물질 및 항산화 물질을 포함하고 있음을 제시하며, 특히 ethylacetate 분획물은 강력한 항혈전 및 항산화 활성을 나타내어 이를 이용한 건강 기능성식품 및 천연물 신약 개발이 가능함을 제시하고 있다. 특히 ethylacetate 분획물의 수율이 0.42%임을 감안한다

면, 향후 관련 활성물질의 정제와 작용기작 규명 연구가 필요하다고 판단된다.

Table 5. Radical scavenging activities (IC<sub>50</sub>s) of the ethanol extracts and their organic solvent fractions of *Arctium lappa* L.

Samples/ Chemicals	Extract/fr. <sup>1)</sup>	Radical scavenging activity: IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL $\rightarrow$ mL)		
		DPPH	ABTS	Nitrite
	Ethanol extract	>500	>500	>100
	n-Hexane fr.	>500	>500	>100
Samples	Ethylacetate fr.	51.6	17.8	26.6
	Butanol fr.	472.4	255.4	>100
	Water residue	>500	>500	>100
	Vitamin C	-	15.2	5.3

<sup>1)</sup>fraction

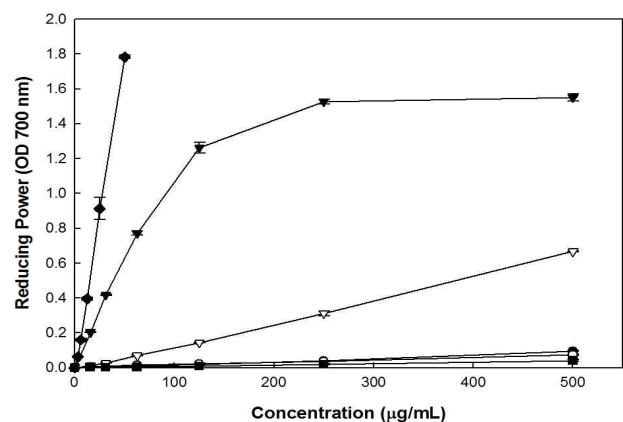


Fig. 2. Reducing power of the ethanol extracts and their organic solvent fractions of *Arctium lappa* L.

Symbols: ●: ethanol ex., ○: hexane fr., ▼: ethylacetate fr., ▽: butanol fr., ■: water residue and ◆: vitamin C, respectively.

## 감사의 글

본 연구는 2012년도 안동대학교 산학연구비 지원사업에 의해 수행된 연구입니다.

## 요 약

식용 및 약용으로 이용되고 있는 우영 지하부의 혈전 관련 활성과 항산화 활성을 평가하고자, 우영의 ethanol 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 혈액응고 저해 활성, 혈소판 응집저해 활성, 인간 적혈구 용혈활성 및 *in-vitro* 항산화 활성을 평가하였다. 먼저 우영 추출 수율은 10.94%로 다른 식용 및 약용식물보다 높았으며, ethanol 추출물의 경우 total polyphenol 함량은 5.01 mg/g으로 낮았으나, 694.53 mg/g 의 높은 총당 함량을 나타내었다. 순차적 유기용매 분획의 경우, n-hexane, ethylacetate(EA), n-butanol 분획 수율은 각각 1.62, 0.42 및 5.98%로 나타났으며, 물 잔류물은 85.38%였다. 우영 시료들의 혈액응고 저해활성을 TT, PT, aPTT를 측정된 결과, ethanol 추출물에서는 유의적인 활성이 나타나지 않았으나, EA 분획에서 강력한 TT, PT, aPTT 연장효과를 확인하였으며, 농도 의존적 혈액응고 저해활성을 확인하였다. 한편 물 잔류물에서는 내인성 혈액응고인자 활성화에 의한 aPTT 감소효과를 확인하여 혈전생성 촉진효과가 있음을 확인하였다. 혈소판 응집저해 활성평가의 경우, 우영 ethanol 추출물 및 분획물들은 임상에서 사용하는 항혈소판제인 아스피린보다 강력한 저해효과를 나타내었으며, 특히 EA 분획은 정제되지 않은 상태에서 아스피린의 2배 이상의 강력한 혈소판 응집저해능을 나타내었다. 또한 항산화 활성 평가 결과, EA 분획물은 DPPH 음이온, ABTS 양이온, nitrite에 대해 우수한 소거능 및 환원력을 나타내었다. 또한 우영 추출물과 분획물들은 0.5 mg/mL 농도까지 인간 적혈구에 대한 특이한 용혈활성을 나타내지 않았다. 상기 결과들은, 우영 EA 분획물이 천연물 유래의 안전한 항혈전제로 개발 가능성을 제시하고 있다.

## References

- Sweeney JD, Hoerning LA, Fitzpatrick JE (1989) Whole blood aggregation in Von willebrand disease. *Amer J Hematol*, 32, 190-193
- Sweeney JD, Hoerning LA, Behrens AN, Novak E, Swank RT (1990) Thrombocytopenia after desmopressin but absence of in-vitro hypersensitivity to ristocetin. *Amer J Clin Path*, 93, 522-525
- Kim MS, Oh IT, Jun DY, Lee JY, Sohn HY, Kwak DY, Seo MC, Woo KS, Ko JY, Jung TW, Nam MH, Woo MH, Kim YH (2013) Anticoagulant activity and fibrinolytic activities of Hwanggeumchal sorghum *in-vitro*. *J Life Sci*, 23, 1460-1470
- Kim JI, Jang HS, Kim JS, Sohn HY (2009) Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 37, 133-139
- Ryu HY, Ahn SM, Kim JS, Sohn HY (2010) Evaluation of *in-vitro* anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J Life Sci*, 20, 922-928
- Ahn SM, Ryu HY, Kang DK, Jung IC, Sohn HY (2009) Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prinusaviium* L. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 37, 371-376
- Ahn SM, Hong YK, Kwon KS, Sohn HY (2010) Evaluation of *in-vitro* anticoagulation activity of 35 different seaweed extracts. *J Life Sci*, 20, 1640-1647
- Han SJ, Koo SJ (1993) Study on the chemical composition in bamboo shoot, lotus root and burdock - free sugar, fatty acid, amino acid and dietary fiber contents. *Korean J Soc Food Sci*, 9, 82-87
- Lee MY, Shin SL, Park SH, Kim NR, Chang YD, Lee CH (2009) Development of optimal cultivation conditions and analysis of antioxidant activities of *Arctium lappa* sprout vegetables. *J Korean Plant Res*, 22, 281-363
- Chung HS, Seong JH, Moom KD (2012) Effects of processing temperature and browning inhibitor on quality properties of fresh-cut burdock roots. *Korean J Food Preserv*, 19, 31-36
- Lim JH, Jeong MC, Moon KD (2005) Purification and characterization of polyphenol oxidase from (Burdock, *Arctium lappa* L.). *Korean J Food Preserv*, 12, 489-495
- Cheigh MJ, Han JS, Rhee SH, Park KY (1998) Standardization of ingredient ratios of Wooung (Burdock, *Arctium lappa* L.) kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 27, 618-624
- Kim MK, Kim WM, Lee HJ, Choi EY (2010) Optimization of muffin preparation by addition of dried burdock (*Arctium lappa* L.) powder and oligosaccharide by response surface methodology. *Korean J Food Cookery Sci*, 26, 575-585
- Chen FA, Wu AB, Chen CY (2004) The influence of different treatment on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chem*, 86, 479-484.



15. Kim M, Choe E (2004) Effects of burdock (*Arctium lappa* L.) extracts on autooxidation and thermal oxidation of lard. *Food Sci Biotechnol*, 13, 460-466
16. Kim YJ, Kang SC, Namkoong S, Choung MG, Sohn EH (2012) Anti-inflammatory effects by *Arctium lappa* L. root extracts through the regulation of ICAM-1 and nitric oxide. *Korean J Plant Res*, 25, 1-6
17. Kou XS, Dai QW, Luo L, Yin Z (2011) Arctigenin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression in RAW264.7 cells through suppressing JAK-STAT signal pathway. *Int Immunopharmacol*, 11, 1095-1102
18. Lin CC, Lu JM, Yang JJ, Chuang SC, Ujiie T (1996) Anti-inflammatory and radical scavenge effects of *Arctium lappa*. *American J Chin Med*, 24, 127-137
19. Lin SC, Lin CH, Lin CC, Lin YH, Chen CF, Chen JC, Wang LY (2002) Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* L. on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride tetrachloride. *J Biomed Sci*, 9, 401-409
20. Wu JG, Wu JZ, Sun LN, Han T, Du J, Ye Q, Zhang H, Zhang YG (2009) Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats. *Phytomedicine*, 16, 1033-1041
21. Morita KY, Nishijima Y, Kada T (1985) Chemical nature of a desmutagenic factor from burdock (*Arctium lappa* L.). *Agric Biol Chem*, 49, 925-932
22. Ryu BH, Lee BH, Ha MS, Kim DS, Sin DB, Nam KD (1986) Desmutagenic effect of legumes and plant crude saponins in *Salmonella typhimurium* TA98. *Korean J Food Sci Technol*, 18, 345-350
23. Predes FS, Ruiz AL, Carvalho JE, Foglio MA, Dolder H (2011) Antioxidative and *in vitro* antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. *BMC Complement Altern Med*, 11, 25-29
24. Sohn EH, Jang SA, Joo H, Park S, Kang SC, Lee CH, Kim SY (2011) Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. *Clin Mol Allergy*, 9, 4-15
25. Hsieh CH, Kuo PL, Hsu YC, Huang YF, Tsai EM, Hsu YL (2013) Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation. *Free Rad Biol Med*, 67, 159-170
26. Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS (2011) Arctigenin induces cell cycle arrest by blocking the phosphorylation of Rb via the modulation of cell cycle regulatory proteins in human gastric cancer cells. *Int Immunopharmacol*, 11, 1573-1577
27. Susanti S, Iwasaki H, Inafuku M, Taira N, Oku H (2013) Mechanism of arctigenin-mediated specific cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cell lines. *Phytomedicine*, 21, 39-46
28. Matsuzaki Y, Koyama M, Hitomi M, Yokota T, Kawanaka M, Nishikawa A, Germain D, Sakai T (2008) Arctiin induces cell growth inhibition through the down-regulation of cyclin D1 expression. *Oncol Rep*, 19, 721-727
29. Park SY, Hong SS, Han X, Hwang, Lee D, Ro JS, Hwang BY (2007) Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. *Chem Pharm Bull*, 55, 150-152
30. Park SY, Hong SS, Han XH, Ro JS, Hwang BY (2005) Inhibitory constituents of LPS-induced nitric oxide production from *Arctium lappa*. *Nat Product Sci*, 11, 85-88
31. Maruta Y, Kawabata J, Niki R (1995) Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). *J Agric Food Chem*, 43, 2592-2595
32. Hwang HJ, Kang MS, Kim BK, Jung BM, Kim MH (2012) The effect of *Opuntia humifusa* seed extracts on platelet aggregation and serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci*, 22, 1680-1687
33. Kim MS, Sohn HY (2014) Anti-thrombosis activity of the aerial parts of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*. *J Life Sci*, 24, 515-521
34. Kim MS, Lee YS, Kwon HY, Kim JS, Sohn HY (2014) Antioxidative, antimicrobial, and anti-proliferative activities of the floret and stalk of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Korean J Microbiol Biotechnol*, 42, 58-66
35. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178
36. Valentina U, Fabcic J, Stampar F (2007) Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem*, 107, 185-192