

Anti-coagulation and Anti-platelet Aggregation Activities of Black Ginger (*Kaempferia parviflora*)

Man-Hyo Lee¹, Hwa-Jung Sung², Chong Suk Kwon² and Ho-Yong Sohn^{2*}

¹Gyeongbuk Institute For Bio-Industry, Andong 36728, Korea

²Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received May 15, 2018 / Revised July 3, 2018 / Accepted July 17, 2018

Kaempferia parviflora, an herbaceous plant in the family Zingiberaceae, is popular in many tropical regions. It is called as black ginger or krachaidum in Thailand and Laos, and its raw or dried root have been used as spices and teas. The rhizomes also have been traditionally used to treat gastrointestinal disorders, ulcers, gout, dysentery, allergies and to improve physical work capacity. Recently, its anti-obesity, anti-oxidant, anti-inflammatory and blood clot-lysis activities were reported. In this study, the anti-thrombosis activity of black ginger was investigated, since improvement in blood fluidity leads to the prevention of various lifestyle-related diseases. The hot water and ethanol extract and their subsequent solvent fractions (hexane, ethylacetate, butanol fractions and water residue) were prepared, and their anti-coagulation and platelet aggregation inhibitory activities were determined, respectively. Among the black ginger extracts and their fractions, the ethylacetate fraction (EAF) of ethanol extract only showed significant extensions of blood coagulation time determined by thrombin time (TT), prothrombin time (PT), and activated partial thromboplastin time (aPTT). At 5 mg/ml concentration, TT, PT and aPTT were extended to 1.22, 1.49 and >15-folds compared to non-treatment. The EAFs of ethanol and hot water extract showed strong inhibitions against collagen-induced platelet aggregations, which are comparable to inhibitions of aspirin. Also the EAFs from black ginger did not show any hemolysis activity against human RBC up to 0.5 mg/ml. Our results suggest that the EAF of black ginger has a potential as novel anti-coagulation and anti-platelet aggregation agent. This report provides the first evidence of anti-coagulation activity of black ginger.

Key words : Anti-coagulation, anti-platelet aggregation, black ginger, hemolysis, *Kaempferia parviflora*

서 론

인체에서 혈액은 골수의 조혈모세포로부터 생산되어 다양한 세포로 분화된 혈구와 혈장의 집합체이며, 12만km의 혈관을 지속적으로 순환하고 있다. 따라서 혈액은 인체의 생명현상에서 필수적인 산소, 영양분 및 노폐물의 운반, 체온유지, 삼투압 조절 및 이온 평형유지, 일정 수분 유지, 액성 조절, 혈압 유지 및 조절 및 생체 방어에 필수 불가결한 요소이다[20, 23]. 실제 심·뇌혈관에 혈전이 생겨 혈액순환이 원활하지 못한 경우에는, 심근경색증이나 뇌졸중과 같은 심각한 질병이 발생하게 된다. 국내에서는 2016년 심·뇌혈관계 질환에 따른 사망률이 전체 사망률의 20%를 넘고 있으며, 연간 5만명 이상이 사망하고 있다[12].

혈액이 정상적으로 순환되기 위하여는 체내 혈액응고 반응계와 혈전용해 반응계가 상호 보완적으로 조절되어야 한다. 혈액응고에는 응고 촉진 및 혈전 생성 억제의 상호 조절이 필수적이다. 즉, 혈관 손상과 혈액 손실을 막는 지혈 작용 및 과도한 혈전 생성을 억제하는 응고저해 반응이 지속적으로 조절되어야 한다. 혈액응고 반응계의 기작은 혈관벽의 노출된 collagen에 von willebrand 인자가 결합하여 혈소판의 부착, 응집을 매개하여 1차 혈소판 혈전을 형성하며, 이는 순차적으로 혈액 응고계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[5]. 혈액응고 반응에서는 다양한 혈액 응고인자(XII 인자, XI 인자, IX 인자, X 인자 등)의 순차적 활성화, 프로트롬빈 및 트롬빈 효소의 활성화로 나타나며, 최종적으로 피브리린 중합체가 혈소판과 내피세포에 결합하게 되며 XIII 인자에 의해 교차 결합된 피브리린 폴리머를 형성하여 안정된 혈전을 생성하는 것으로 알려져 있다[4, 5]. 이때 트롬빈은 혈소판, V 인자, VII 인자들을 활성화시켜 혈액 응고 반응을 촉진시키는 등 혈전 생성에 중추적 역할을 담당한다.

한편 조절되지 않은 과도한 혈전 생성은 스트렙토키나아제, 유로키네이스 등의 혈전용해 효소로 분해되어야 한다. 그러나, 생성된 혈전 분해보다는 혈전 생성 자체를 조절하는 것이 훨씬 효과적이며 경제적이므로, 많은 연구가 안전하면서도 효

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-820-6281

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.

과적인 트롬빈 저해제, 프로트롬빈 저해제 및 혈액응고인자 저해제 및 혈소판 응집저해제 개발에 집중되어 있다[4, 10, 20]. 그러나, 현재까지 개발된 항혈전제들은 출혈성 부작용, 위장장애 및 과민 반응 등의 부작용으로 그 사용이 제한적이다.

한편 흑생강(*Kaempferia parviflora*)은 태국 자생의 생강과 초본성 뿌리줄기 식물로, 흑생강의 지하부는 특유의 향과 약간의 매운맛을 가지고 있으며, 채집 후 바로 잘랐을 때 안쪽이 보라색 또는 검은색을 나타낸다. 흑생강은 흔히 태국에서 대량재배, 유통되면서 태국인삼으로 알려져 있으며, 심신의 안정과 안정된 혈압을 유지하는데 도움을 주고, 이질을 치료하며 북통에도 효과가 있다고 알려져 있다[9, 30]. 동남아시아에서 흑생강은 통풍, 알레르기 및 위장 장애 치료뿐만 아니라 구강건조, 위장장애, 냉, 세균성 이질 같은 질병 치료에 이용되고 있다[21]. 실제 일본에서는 흑생강은 위장장애 치료 및 진통제로 사용되어 왔으며, 지질대사 이상의 개선활성을 가진 건강기능 식품 원재료로 이용되고 있다[15]. 흑생강에 대해 보고된 생리활성으로는 생체에너지 소비 증대[13], 성적 능력 향상[24], 항산화 활성[16], 항비만 효과[6], 돌연변이 억제 활성[2], 항염증 활성[25, 27], 항알러지 활성[11], 나아가 UV-B 광노화에 대한 보호 효과[17]이 보고되어 있으며, 인지기능 개선[28], 항 케양 활성[19], 간보호 활성[14], 항세균 활성[8], 항진균 및 항원충 활성[30], 암세포 증식억제활성[3, 7, 29], acetylcholinesterase 저해활성 및 α -glucosidase 저해 활성[2] 등 다양한 활성도 보고되어 있다.

한편 흑생강의 혈액순환 관련 연구로는 생성된 fibrin을 분해하는 fibrinolysis 효과에 의해 혈액흐름이 증가된다는 Murata 등의 보고[15]가 알려져 있으나, 이는 생성된 혈전의 분해와 관련된 연구이며, 현재까지 혈액응고 저해 및 혈소판 응집저해에 따른 예방적 측면에서의 흑생강의 항혈전 활성에 대한 보고는 알려져 바 없다. 본 연구에서는 다양한 유용생리활성을 가진 흑생강의 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물의 항혈전 활성을 평가한 결과, 폴리페놀 고함유 분획물에서 강력한 혈액응고 저해 활성 및 인간 혈소판 응집저해 활성을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험의 흑생강 시료는 2015년 태국에서 재배, 수확한 지하부를 사용하였으며, 흐르는 물에 수세하여 이물질을 제거한 후, ethanol추출물 및 열수 추출물 제조에 사용하였다. Ethanol추출물 조제시에는 흑생강 시료에 대해 10배의 에탄올을 가하고, 상온에서 4회 반복 추출한 후 추출액을 모아 filter paper (Whatsman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 분말로 조제하였다. 열수 추출물의 경우에도 동일하게 흑생강

시료에 대해 10배의 증류수를 가하고 100°C에서 1시간 가열 추출한 후 방냉하고, 다시 상기 과정을 3회 반복한 후 추출액을 모아 필터링한 후, 감압 농축하여 분말로 제조하여 열수 추출물을 제조하였다. 이후, 조제시료를 증류수에 현탁한 후 hexane, ethylacetate (EA), butanol로 순차적 분획하였으며, 최종적으로 물 잔류물을 회수하였다. 조제된 추출물과 분획물은 DMSO또는 증류수에 적당한 농도로 녹여, 성분분석, 혈액응고 저해, 혈소판 응집저해, 적혈구 용혈활성 평가에 사용하였다. 실험에 사용한 흑생강 시료는 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다(voucher specimen 2015-KP).

혈액응고 저해활성

흑생강의 혈액응고 저해 활성은 기존의 보고한 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하여 평가하였다[11, 20]. 각각의 혈액응고활성은 3회 반복 측정하였으며, thrombin, prothrombin, 혈액응고인자 저해활성은 시료 첨가시의 TT, PT 및 aPTT의 평균값을 용매 대조구인 DMSO첨가시의 TT, PT 및 aPTT 평균값의 비로 각각 나타내었다[11]. 이때 시료 대조군으로는 aspirin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였으며, 흑생강 시료에 대한 각각의 실험결과는 3회 반복실험의 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

혈소판 응집 저해 활성

혈소판 응집저해 활성은 수세된 농축 혈소판에 흑생강 시료를 첨가한 후, Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, U.S.A)의 미세전극에 혈소판이 부착, 응집됨에 따라 발생하는 전기 저항값의 변화를 측정하여 평가하였다[23]. 보다 자세하게는 10 mM CaCl₂ 50 μ l, suspending buffer 147.5 μ l, 흑생강 시료 5 μ l 가 포함된 반응 cuvette에 50 μ l의 인간 유래 혈소판 (5×10^8 cells/ml)을 첨가하고 3분 동안 37°C로 가온 후, 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 μ l를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 Whole Blood Aggregometer의 교반장치를 이용하여 반응액을 500 rpm으로 교반시키면서 collagen 첨가 후 12분간 측정하였다. 이후 얻어진 응집곡선으로부터 amplitude, slope, area under 를 측정하여 혈소판 응집을 평가하였다[10]. 이때, amplitude (Ω)는 응집유도제를 첨가하였을 때 일어나는 혈소판의 최대 응집도를 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[10, 23]. 최종적으로 흑생강의 혈소판 응집도 (PAR: Platelet Aggregation Ratio)는 시료 첨가시의 area under 값과 용매대조구인 DMSO 첨가시의 area under값의 비를 백분율로 나타내었다[10].

인간 적혈구 용혈 활성 평가

흑생강의 인간 적혈구 용혈 활성은, 기존의 보고한 방법[20]과 동일하게 평가하였다. 먼저 PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 (4%) 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. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%)를 사용하였으며, 활성 대조구로는 triton X-100과 amphotericin B를 사용하였다. 용혈활성은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

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

S: 시료 첨가구의 흡광도, C: DMSO 첨가구의 흡광도, T: triton 첨가구의 흡광도.

기타 분석

흑생강 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 기존의 보고된 방법[22]에 따라 측정하였으며, 각각 rutin과 tannic acid를 표준시약으로 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이용하였다[26]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

통계분석

실험 결과는 SPSS 23.0 버전을 사용하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결과 및 고찰

흑생강 추출물 및 이의 분획물의 제조 및 이들의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총당 및 환원당 분석

흑생강의 ethanol 및 열수 추출물을 조제하고 이의 순차적 분획물을 조제하였다. 흑생강의 경우 ethanol 추출효율은 3.2%로 낮았으나, 열수 추출의 경우 12.5%의 추출효율을 나타내어 약 4배 높은 수율을 보였다. 또한 열수 추출물의 경우 44.7%가 butanol 분획물, 46.2%가 물 잔류물로 이행되었으며, EA 분획물은 추출물의 6.1%를 차지하였다. 그러나, ethanol 추출물의 경우 52.3%가 EA 분획물, 42.1%가 butanol 분획물로 이행되었으며, 헥센 분획물과 물 잔류물은 각각 2.5% 및 3.6%를 차지하여, 추출 용매에 따른 분획물의 수율도 큰 차이를 나타내었다(Fig. 1). 조제된 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 분석결과, 열수 추출물이 ethanol 추출물보다 높은 함량을 보여 통상의 추출물과는 차이가 있었으며, ethanol 추출물의 경우 물 잔류물, EA 분획, butanol 분획, 헥센 분획의 순으로,

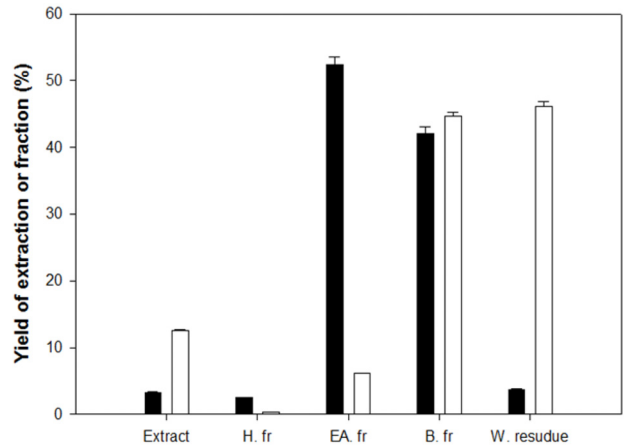


Fig. 1. Yields of ethanol and hot-water extraction and their subsequent organic solvent fractions of black ginger (*Kaempferia parviflora*). ■: ethanol extract, □: hot-water extract, H. fr: hexane fraction, EA. fr: ethylacetate fraction, B. fr: butanol fraction, and W. residue: water residue, respectively.

열수 추출물의 경우 물 잔류물 EA 분획, butanol 분획, 헥센 분획의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 즉 각각의 추출물 모두에서 순차적 유기용매 분획후의 물 잔류물이 가장 높은 총 폴리페놀 함량(34.3~42.4 mg/g)을 나타내었다. 흑생강 추출물의 경우, 아로니아, 블랙커런트 등의 베리류보다는 총 폴리페놀 함량이 낮았으나, 통상의 한약재들[20] 및 체리[1]보다는 총 폴리페놀 함량이 높았다. 한편 총 플라보노이드 함량 분석 결과, ethanol 추출물이 열수 추출물보다 약 1.5배 높았으며, 각각 EA 분획에서 가장 높은 함량(23.5~26.3mg/g)을 나타내었다. 반면 총당 및 환원당은 butanol 분획 및 물 잔류물에서 함량이 높았다(Table 1).

흑생강 추출물 및 이의 분획물의 항응고 활성

흑생강 추출물 및 이의 분획물의 항혈전 활성 평가의 일환으로 항응고 활성을 평가하였다. 먼저 항응고 활성 대조구인 아스피린은 5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT를 모두 15배 이상 연장시켰으며, 1.5 mg/ml 농도에서는 각각 1.68, 1.40, 1.38배 연장효과를 나타내어 우수한 항응고 활성을 나타내었다(Table 2). 흑생강 ethanol 추출액의 경우 5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT를 각각 1.07, 0.96, 1.24배, 열수 추출물은 각각 1.07, 1.39, 1.19배 연장시켜, ethanol 추출물의 경우 혈액응고 인자 저해, 열수 추출물의 경우 prothrombin저해에 의한 혈액응고저해 활성을 나타냄을 확인하였다. 한편 ethanol 추출물의 EA 분획물의 경우 5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT를 각각 1.22, 1.49 및 15배 이상 연장시켜 강력한 항응고 활성을 나타내었으며, 물 잔류물의 경우에도 우수한 혈액응고인자 저해 활성을 나타내었다. 열수 추출물의 EA 분획물의 경우에는 5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT를 각각 1.01, 1.30 및 1.30배

Table 1. Component analysis of ethanol and hot-water extract and their subsequent organic solvent fractions prepared from black ginger (*Kaempferia parviflora*)

Extract/Fraction		Contents (mg/g)			
		Total polyphenol	Total flavonoid	Total sugar	Reducing sugar
Ethanol extract	Extract	26.5±1.5 ^c	17.4±0.2 ^e	193.0±3.4 ^e	123.9±6.9 ^d
	Hexane fr. ¹	7.2±2.0 ^a	6.9±1.2 ^a	16.9±0.3 ^a	15.2±0.9 ^a
	Ethylacetate fr.	24.7±0.9 ^{bc}	26.3±1.0 ^g	41.1±0.3 ^b	69.9±0.1 ^{bc}
	Butanol fr.	23.3±1.4 ^b	9.1±0.7 ^b	438.4±6.3 ^h	378.3±25.1 ^g
	Water residue	42.4±1.5 ^f	11.6±0.9 ^c	564.6±20.5 ⁱ	343.4±18.8 ^f
Hot-water extract	Extract	29.4±0.5 ^d	11.3±0.2 ^c	251.6±25.8 ^f	212.0±10.4 ^e
	Hexane fr.	8.4±0.4 ^a	7.7±0.1 ^{ab}	14.1±0.1 ^a	13.2±1.9 ^a
	Ethylacetate fr.	33.1±0.1 ^e	23.5±1.3 ^f	60.8±0.2 ^c	31.6±1.5 ^a
	Butanol fr.	22.2±0.0 ^b	7.4±0.4 ^a	364.3±2.2 ^g	59.5±12.5 ^b
	Water residue	34.3±1.6 ^e	14.2±0.6 ^d	156.1±9.3 ^d	86.1±2.3 ^c

¹fr: fraction. Different letters within a column differ significantly ($p < 0.05$)

Table 2. Anti-coagulation activities of ethanol and hot-water extract and their subsequent organic solvent fractions prepared from black ginger (*Kaempferia parviflora*)

Chemicals/Samples		Concentration (mg/ml)	Anti-coagulation activity (x control)		
			TT ¹	PT ²	aPTT ³
DMSO		-	1.00±0.01 ^a	1.01±0.01 ^a	1.00±0.09 ^a
Aspirin		5.0	>15.0 ^f	>15.0 ^f	>15.0 ^f
		2.5	7.21±0.12 ^e	>15.0 ^f	3.66±0.21 ^e
		1.5	1.68±0.05 ^d	1.40±0.05 ^d	1.38±0.04 ^c
Ethanol extract	Extract	5.0	1.07±0.01 ^{ab}	0.96±0.03 ^a	1.24±0.05 ^b
	Hexane fr. ⁴	5.0	1.10±0.01 ^{ab}	1.43±0.11 ^d	1.39±0.08 ^c
	Ethylacetate fr.	5.0	1.22±0.00 ^c	1.49±0.07 ^e	>15 ^f
	Butanol fr.	5.0	1.20±0.01 ^{bc}	1.21±0.02 ^{bc}	1.04±0.06 ^a
	Water residue	5.0	1.09±0.01 ^{ab}	1.01±0.01 ^a	1.65±0.10 ^d
Hot-water extract	Extract	5.0	1.07±0.04 ^{ab}	1.39±0.03 ^d	1.19±0.00 ^b
	Hexane fr. ⁴	5.0	1.18±0.02 ^b	1.30±0.04 ^c	1.20±0.06 ^b
	Ethylacetate fr.	5.0	1.01±0.06 ^a	1.30±0.01 ^c	1.30±0.01 ^{bc}
	Butanol fr.	5.0	1.11±0.03 ^{ab}	1.26±0.02 ^c	1.58±0.05 ^d
	Water residue	5.0	1.13±0.01 ^{ab}	1.13±0.02 ^b	1.15±0.06 ^{ab}

Anti-coagulation activity is calculated by divide the clotting time of sample by the clotting time of solvent control (DMSO). Data are presented as the mean ± SD of three determinations. The thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) of solvent control were 20.1 sec, 18.5 sec and 40.2 sec, respectively. Different letters within a column differ significantly ($p < 0.05$)

¹TT: thrombin time, ²PT: prothrombin time, ³aPTT: activated partial thromboplastin time, and ⁴fr: fraction.

이상 연장시켜 상대적으로 약한 항응고 활성을 나타내었으나, 아스피린(1.5 mg/ml)의 PT 및 aPTT와 유사한 의미 있는 혈전 생성 저해 활성을 나타내었다(Table 2). 따라서 ethanol 추출물의 EA 분획물이 가장 우수한 항응고 활성을 나타내며, 특히 내인성 혈전 생성의 경우 아스피린(상품명: 프로텍트)과 비교할 만한 강력한 항응고 활성을 나타냄을 확인하였다. 이는 통상의 혈액순환 개선활성이 있다고 알려진 한약재들보다 우수한 항응고 활성으로[20], 흑생강이 내인성 혈전 생성을 억제하여 심혈관계 질환의 예방에 도움이 될 수 있음을 제시하고 있으며, 현재 사용한 추출물 및 활성 분획물이 정제되지 않은

상태임을 고려한다면, 차후 활성물질의 정제시에는 5 mg/ml 농도보다 낮은 농도에서 항응고 활성이 나타나리라 판단된다.

흑생강 추출물 및 이의 분획물의 혈소판 응집저해 활성

흑생강 추출물 및 이의 분획물의 항혈전 활성 평가를 위해 인간 혈소판 응집저해능을 평가하였다. 혈소판은 혈관 손상보호 및 혈소판 응집과 관련된 다양한 물질을 고농도로 포함하는 cytoplasmic granule을 가지고 있으며, 혈관내벽의 손상이 나타나는 경우 응집인자들을 분비하고, 내피세포의 손상으로 노출된 collagen 등과 결합하여 1차 지혈 플러그를 형성하여

혈전생성을 개시하는 중요한 세포이다. 따라서 혈소판 응집저해는 혈전 생성을 방지하는 매우 중요한 활성이다[23]. 먼저 활성 대조구로 사용된 아스피린은 농도 의존적으로 혈소판 응집을 저해하였으며, 0.125 mg/ml 농도에서 무처리구에 비

해 47.2%, 0.25 mg/ml 농도에서 36%의 응집도를 나타내었다. 후생강의 경우 0.25 mg/ml 농도에서 ethanol 추출물은 22.0%의 응집도, 열수 추출물은 114.5%의 응집도를 나타내어, 에탄올 추출물에서만 강력한 응집저해 활성을 나타내었다. 그러나

Table 3. Platelet aggregation inhibitory activities of ethanol and hot-water extract and their subsequent organic solvent fractions prepared from black ginger (*Kaempferia parviflora*)

Chemicals/Samples (mg/ml)	Amplitude (Ω)	Slope (Ω/min)	Lag time (sec)	Area under	PAR ¹ (%)	
DMSO	18	2	46	120.7	100	
Aspirin (0.25)	8	1	71	43.5	36.0	
Aspirin (0.125)	8	1	30	57.0	47.2	
Ethanol extract	Extract	4	1	50	26.6	22.0
	Hexane fr. ²	7	2	20	58.2	48.2
	Ethylacetate fr.	3	1	25	22.3	18.5
	Butanol fr.	12	2	4	81.1	67.2
	Water residue	26	7	4	256.3	212.3
Hot-water extract	Extract	20	3	32	138.3	114.5
	Hexane fr. ²	2	0	56	17.5	14.5
	Ethylacetate fr.	2	0	75	16.7	13.8
	Butanol fr.	27	5	8	225.7	186.9
	Water residue	27	8	2	266.0	220.3

¹PAR: Platelet Aggregation Ratio. ²fr: fraction.

The concentration of black ginger samples was 0.25 mg/ml. Data are presented as representative result relative of independent three determinations. 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.

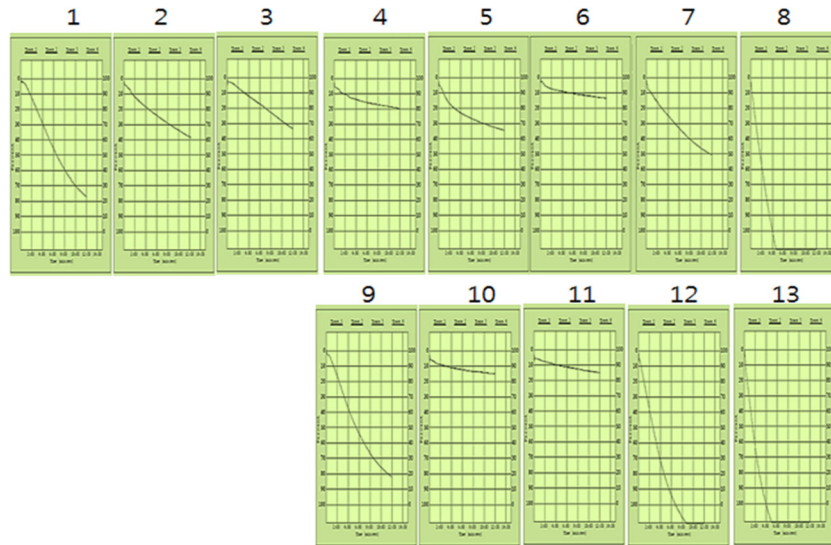


Fig. 2. Impedance changes during platelet aggregation by addition of the black ginger extracts and their subsequent organic solvent fractions measured by whole blood aggregometer. Platelet aggregation was induced by addition of 2.5 μl of collagen (1 mg/ml) into cuvette containing 50 μl of washed PRP and measured the impedance changes for 12 min. The concentration of black ginger samples was 0.25 mg/ml, respectively. 1: DMSO, 2: aspirin (0.125 mg/ml), 3: aspirin (0.25 mg/ml), 4: ethanol extract of black ginger (EBG), 5: hexane fraction of EBG, 6: ethylacetate fraction of EBG, 7: butanol fraction of EBG, 8: water residue of EBG, 9: hot-water extract of black ginger (HWBG), 10: hexane fraction of HWBG, 11: ethylacetate fraction of HWBG, 12: butanol fraction of HWBG, 13: water residue of HWBG, respectively.

분획물의 경우, 추출용매에 관계없이 헥센 및 EA 분획에서 13.8~48.2%의 응집도를 나타내어 흑생강의 지용성 성분이 혈소판 응집저해활성과 관련됨을 알 수 있었으며, 특히 ethanol 및 열수 추출물의 EA 분획물이 가장 우수한 혈소판 응집저해활성을 나타내었다(Table 3, Fig. 2). 이러한 응집저해 활성은 임상에서 항혈전제로 사용되고 있는 아스피린보다 강력하므로, 흑생강의 EA 분획으로 위장장애 등의 부작용을 나타내는 아스피린을 대체할 수 있는 항혈전제로 개발함이 가능할 것으로 판단된다. 한편 흑생강 추출물들의 물 잔류물은 오히려 혈소판 응집을 강하게 촉진하여, 흑생강을 항혈전제로 개발하고자 하는 경우 EA 분획물을 이용하여야 함을 확인하였다.

흑생강 추출물 및 이의 분획물의 인간 적혈구 용혈 활성

흑생강 추출물 및 이의 분획물의 급성독성 평가를 위해 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 용매 대조구로 사용된 DMSO는 용혈활성이 없었으며, 활성대조구로 사용된 triton X-100과 amphotericin B는 1.0 및 0.02 mg/ml 농도에서 적혈구를 각각 100% 및 85.3% 용혈시킴을 확인하였다. 흑생강의 경우, 헥센 분획물을 제외한 시료에서는 0.5 mg/ml 농도까지 용혈활성은 전혀 나타나지 않았으며, 헥센 분획물은 14.9%의 약한 용혈활성을 나타내었다.

Table 4. Hemolytic activities of ethanol and hot-water extract and their subsequent organic solvent fractions prepared from black ginger (*Kaempferia parviflora*) against human red blood cell (hRBC)

Chemicals/Samples (mg/ml)		Hemolysis against hRBC (%)
DMSO		0.0±1.4 ^a
Triton-X 100 (1.0).		100±0.4 ^d
Amphotericin B (0.02)		85.3±3.4 ^c
Ethanol extract	Extract	- ² , ^a
	Hexane fr. ¹	14.9±4.4 ^b
	Ethylacetate fr.	- ^a
	Butanol fr.	- ^a
	Water residue.	- ^a
Hot-water extract	Extract	- ^a
	Hexane fr.	- ^a
	Ethylacetate fr.	- ^a
	Butanol fr.	- ^a
	Water residue.	- ^a

¹fr: fraction. ²- : No hemolysis (hemolysis is less than 1%). The concentration of black ginger samples used was 0.5 mg/ml. Data are presented as the mean ± SD of three determinations. 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). Different letters within a column differ significantly (p<0.05)

기존의 흑생강 추출물 및 이의 methoxyflavone 화합물에 의한 혈전 용해활성이 보고[15]된 바 있으나, 본 연구 결과는 흑생강의 혈전 생성 억제 활성에 대한 최초의 보고이며, 흑생강의 EA 분획이 인간 적혈구 용혈활성 없이 강력한 항응고 및 혈소판 응집저해 활성을 나타내어 신규의 항혈전제로 이용 가능성을 제시하고 있다. 향후 활성물질의 분리 및 관련 기작 연구를 통해 내인성 혈액응고 저해제 및 혈소판 응집저해제로 개발이 가능하리라 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 안동대학교 연구비에 의하여 연구되었음.

References

- Ahn, S. M., Ryu, H. Y., Kang, D. K., Jung, I. C. and Sohn, H. Y. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prunus avium* L. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 195-200.
- Azuma, T., Kayano, S. I., Matsumura, Y., Konishi, Y., Tanaka, Y. and Kikuzaki, H. 2011. Antimutagenic and α-glucosidase inhibitory effects of constituents from *Kaempferia parviflora*. *Food Chem.* **125**, 471-475.
- Banjerdpongchai, R., Suwannachot, K., Rattanapanone, V. and Sripanidkulchai, B. 2008. Ethanolic rhizome extract from *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker induces apoptosis in HL-60 cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **9**, 595-600.
- Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podsedek, A., Golanski, J. and Nowak, P. 2011. Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia* **82**, 811-817.
- Chen, H., Qi, X., He, C., Yin, Z., Fan, D. and Han, G. 2013. Coagulation imbalance may not contribute to the development of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis. *Thrombosis Res.* **131**, 173-177.
- Horikawa, T., Shimada, T., Okabe, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Miyamoto, K., Ichinose, K., Takahashi, K. and Aburada, M. 2012. Polymethoxyflavonoids from *Kaempferia parviflora* induce adipogenesis on 3T3-L1 preadipocytes by regulating transcription factors at an early stage of differentiation. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 686-692.
- Hossain, M. A., Wongsrikaew, N., Yoo, G. W., Han, J. H. and Shin, C. G. 2012. Cytotoxic effects of polymethoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **55**, 471-476.
- Jeong, D. N., Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H. S., Lee, S. K., Kim, H. S., Yim, J. H., Song, K. Y., Kang, I. B., Kim, Y. J., Park, J. H., Jang, H. S., Kang, S. H., Kim, S. K. and Seo, K. H. 2016. Antibacterial effect of crude extracts of *Kaempferia parviflora* (Krachaidam) against *Cronobacter* spp. and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in various dairy foods: A preliminary study. *J. Milk Sci. Biotechnol.* **34**,

- 63-68.
9. Kang, S. H., Kim, S. K., Kim, D. H., Kim, H. S., Lee, S. K., Song, K. Y., Yim, J. H., Kim, Y. J., Kang, I. B., Jeong, D. N., Park, J. H., Jang, H. S., Chon, J. W., Kim, H. S. and Seo, K. H. 2016. Manufacture of functional yogurt supplemented with crude materials extracted from *Kaempferia parviflora*. *J. Milk Sci. Biotechnol.* **34**, 181-186.
 10. Kim, M. S. and Sohn, H. Y. 2014. Anti-thrombosis activity of the aerial parts of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*. *J. Life Sci.* **24**, 515-521.
 11. Kobayashi, S., Kato, T., Azuma, T., Kikuzaki, H. and Abe, K. 2015. Anti-allergenic activity of polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *J. Funct. Foods* **13**, 100-107.
 12. Korea National Statistical Office. 2018. 2016-Cause of death statistics.
 13. Mami, M., Takeshi, Y., Sayuri, A., Tomoyasu K., Nobutaka, K., Kazuya, Y., Kinya, T., Toshimitsu, T., Hiroki, S. and Masayuki, S. 2015. *Kaempferia parviflora* Extract increases whole-body energy expenditure in humans: Roles of brown adipose tissue. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **61**, 79-83.
 14. Mekjaruskul, C., Jay, M. and Sripanidkulchai, B. 2012. Modulatory effects of *Kaempferia parviflora* extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *J. Ethnopharmacol.* **141**, 831-839.
 15. Murata, K., Deguchi, T., Fujita, T. and Matsuda, H. 2013. Improvement in blood fluidity by *Kaempferia parviflora* rhizome. *J. Nat. Med.* **67**, 719-724.
 16. Nguyen, P. T., Bui, T. T. L., Lee, S. H., Jang, H. D. and Kim, Y. H. 2016. Anti-osteoporotic and antioxidant activities by rhizomes of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker. *Nat. Prod. Sci.* **22**, 13-19.
 17. Park, J. E., Pyun, H. B., Woo, S. W., Jeong, J. H. and Hwang, J. K. 2014. The protective effect of *Kaempferia parviflora* extract on UVB induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **30**, 237-245.
 18. Promthep, K., Eungpinichpong, W., Sripanidkulchai, B. and Chatchawan, U. 2015. Effect of *Kaempferia parviflora* Extract on physical fitness of soccer players: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Med. Sci. Mon. Basic Res.* **21**, 100-108.
 19. Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. and Pojanagaroon, S. 2005. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* **102**, 120-122.
 20. 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.
 21. Shimada, T., Horikawa, T., Ikeya, Y., Matsuo, H., Kinoshita, K., Taguchi, T., Ichinose, K., Takahashi, K. and Aburada, M. 2011. Preventive effect of *Kaempferia parviflora* ethyl acetate extract and its major components polymethoxyflavonoid on metabolic diseases. *Fitoterapia* **82**, 1272-1278.
 22. 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. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
 23. Sweeney, J. D., Hoerning, L. A. and Fitzpatrick, J. E. 1989. Whole blood aggregation in Von willebrand disease. *Amer. J. Hematol.* **32**, 190-193.
 24. Temkitthawon, P., Hinds, T., Beavo, J., Viyoch, J., Suwanborirux, K., Pongamornkul, W., Sawasdee, P. and Ingkaninan, K. 2011. *Kaempferia parviflora*, a plant used in traditional medicine to enhance sexual performance contains large amounts of low affinity PDE5 inhibitors. *J. Ethnopharmacol.* **137**, 1437-1441.
 25. Tewtrakul, S. and Subhadhirasakul, S. 2008. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 81-84.
 26. 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.
 27. Wattanapitayakul, S. K., Suwatronnakhorn, M., Chularojmontri, L., Herunsalee, A., Niumsakul, S., Charuchongkolwongse, S. and Chansuvanich, N. 2007. *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 559-562.
 28. Welbat, J. U., Chaisawang, P., Chaijaroonkhanarak, W., Prachaney, P., Pannangrong, W., Sripanidkulchai, B. and Wigmore, P. 2016. *Kaempferia parviflora* extract ameliorates the cognitive impairments and the reduction in cell proliferation induced by valproic acid treatment in rats. *Ann. Anat.* **206**, 7-13.
 29. Wongsrikaew, N., Kim, H. J., Vichitphan, K., Cho, S. M. and Han, J. H. 2012. Antiproliferative activity and polymethoxyflavone composition analysis of *Kaempferia parviflora* extracts. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **55**, 813-817.
 30. Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V. and Kittakoop, P. 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* **75**, 89-92.

초록 : 흑생강(*Kaempferia parviflora*)의 항응고 및 혈소판 응집저해 활성이만효¹ · 성화정² · 권정숙² · 손호웅^{2*}(¹경북바이오산업연구원, ²안동대학교 식품영양학과)

흑생강은 생강과 초본과 뿌리식물로 태국 및 라오스에서는 크라차이담으로 불리며, 뿌리는 향신료와 차로 이용되어 왔다. 말린 뿌리는 위장장애, 통풍, 이질, 알러지 치료 및 강장용으로 전통적으로 이용되어 왔으며, 최근에는 항비만, 항산화, 항염증, 혈전 용해 활성 등의 다양한 유용 생리활성이 보고되어 있다. 본 연구에서는 흑생강의 혈액순환 개선 활성을 확인하기 위해, 흑생강 지하부의 ethanol 추출물 및 열수 추출물을 조제하고 각각 이의 순차적 유기용매 분획물인 hexane 분획물, ethylacetate (EA) 분획물, butanol 분획물 및 물 잔류물을 조제하여 각각의 성분을 분석하였고, 혈전 생성과 관련된 항응고 활성, 혈소판 응집저해 활성 및 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 그 결과, ethanol 추출물의 EA 분획물 5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT를 각각 1.22, 1.49 및 15배 이상 연장시켜 강력한 항응고 활성을 나타냄을 확인하였으며, ethanol 및 열수 추출물의 EA 분획물 모두에서 동량의 아스피린보다 강력한 혈소판 응집저해 활성을 확인하였다. 또한 상기 EA 분획물들은 0.5 mg/ml 농도까지 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 나타내지 않았다. 본 연구 결과는 흑생강의 혈전 생성 억제 활성에 대한 최초의 보고이며, 흑생강의 EA 분획물이 인간 적혈구 용혈활성 없이 강력한 항응고 및 혈소판 응집저해 활성을 나타내어 신규의 항혈전제로 이용 가능성을 제시하고 있다.