

## Anti-thrombotic Activities of Hot-water Extracts Prepared from Various Parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner

Seon-Mi Ahn<sup>1</sup>, Hwa-Jung Sung<sup>1</sup>, Jong-Sik Kim<sup>2</sup>, Jong-Yi-Park<sup>3</sup> and Ho-Yong Sohn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Andong National University, Andong 36729, Korea

<sup>3</sup>Gyeongbuk Institute For Bio-Industry, Andong 36728, Korea

Received May 23, 2018 / Revised August 3, 2018 / Accepted August 8, 2018

To investigate the anti-thrombotic activities of the lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertner), various hot-water extracts were prepared from the leaf, pod of seed (PS), seed, embryo of seed (ES), root, and the node of root (NR) of the lotus. The highest extraction ratio was found in the NR (20.3%), followed by the seed, root, leaf, ES, and PS. These extracts had pH and acidity levels ranging from 5.6~6.5 and 0.06~0.20%, respectively. The seed extract showed 70% brix, whereas the leaf and PS extracts showed less than 0.1% brix. The highest contents of total polyphenol (179.7 mg/g), total flavonoids (161.4 mg/g), and reducing sugar (161.4 mg/g) were observed in the leaf extract, and the highest total sugar content (873.0 mg/g) in the seed extract. Anti-coagulation assay of the extracts of NR, leaf, and PS showed strong activities. In particular, at a concentration of 5 mg/ml, the PS extract had 15-fold extended thrombin, prothrombin, and activated partial thromboplastin times. However, only the ES extract showed activities inhibitory to platelet aggregation, with treatment with 0.25 mg/ml of ES extract decreasing platelet aggregation to 25.1%, a reduction comparable to that effected by aspirin. The extracts other than the seed extract showed no hemolysis activities against human RBC at treatments of up to 1 mg/ml. These results suggest that the NR, PS, seed, and ES, all byproducts of the lotus agriculture industry, have high potential as novel sources of anti-thrombotic agent.

**Key words** : Anticoagulation, anti-platelet aggregation, *Nelumbo nucifera* Gaertner, node of root, pod of seed

### 서 론

인체 내에는 약 13만 km의 혈관이 존재한다. 혈관 속에는 혈장과 다양한 혈구세포로 구성된 혈액이 끊임없이 흐르고 있으며, 혈액은 영양분 공급, 산소전달, 노폐물 제거, 체온유지, 삼투압 조절, 생체 방어 등 생명체에 필수적인 기능을 수행하고 있다[4]. 정상적인 혈액 순환은 체내에서의 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호 보완적으로 조절되어야 가능하며, 이 중 혈액응고는 지혈 작용과 함께 과도한 혈전 생성을 억제하는 응고저해 반응의 상호 조절이 필수적이다[4, 5]. 한편, 혈액응고 반응은 혈관벽의 노출된 collagen에 von willebrand 인자가 결합하여 혈소판의 부착, 응집을 매개하여 1차 혈소판 혈전을 형성한 후[5], 다양한 혈액 응고인자(XII, XI, IX, X 인자 등)의 순차적 활성화, 프로트롬빈 및 트롬빈 효소의

활성화, 생성된 피브린 중합체의 혈소판과 내피세포에 결합 및 XIII 인자에 의해 교차 결합된 피브린 폴리머를 형성하여 안정된 혈전을 생성하는 것으로 알려져 있다[4, 5]. 이후 생성된 혈전은 스트렙토키나아제, 유로키네이즈 등의 혈전용해 효소가 분해하여, 혈액 응고와 혈전 분해가 상호 조절되면서 원활한 혈액순환이 가능하게 된다[11]. 그러나, 혈액내의 혈소판과 혈장의 응고, 섬유소 분해, 응고억제 과정의 조절과 균형이 여러 가지 요인으로 인하여 비정상적인 경우, 과도하게 생성된 혈전은 혈관을 막고 혈액 흐름을 방해하여 뇌경색, 뇌졸중, 심근경색 등 다양한 뇌·심혈관계 질환을 야기하게 된다[5, 10]. 이러한 혈전성 질환은 인구의 고령화, 현대사회의 고도화 및 식생활의 서구화에 의해 발병률이 지속적으로 증가하는 추세이다. 따라서 혈전성 질환을 예방하기 위해서는 혈액응고 저해제, 혈소판 응집저해제 및 생성된 혈전에 대한 용해제가 필요하며, 현재 임상에서는 각각 헤파린, 쿠마린, 아스피린 및 유로키네이즈 등이 사용하고 있다[4, 5, 11]. 그러나 이들은 고가이면서, 경구투여의 한계와 함께 위장장애 등의 부작용으로 인해 그 사용이 제한적이다[2, 9, 11, 27].

한편, 연(*Nelumbo nucifera* Gaertner)은 수련과에 속하는 다년생 부엽성 초본 수생식물로서, 한국, 인도, 중국 및 열대지방이나 아시아 동부 등에서 널리 분포하고 있다[1, 22]. 연은 지상

#### \*Corresponding author

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

E-mail : hysohn@andong.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.

부의 연꽃, 연자방(pod of seed), 연자육(seed), 연잎(leaf) 및 지하부의 연근(root)과 우절(node of root) 등으로 구분할 수 있다. 연은 7~8월경에 흰색 또는 연분홍색의 꽃이 피며, 이후 꽃잎이 떨어지면 연자방만 남게 되고 노란색이었던 연자방은 녹색에서 진한 갈색으로 변하게 된다[1]. 연자방 안에는 연밥이라고 하는 연자육이 들어 있는데 이는 연꽃의 종자로 표면은 연한 황갈색이며 단단한 껍질을 가지고 있으며, 연자육의 안쪽에는 녹색 연자심(배아)이 들어 있다. 한편 지하부의 뿌리줄기는 늪지에서 옆으로 길게 뻗어 자라며, 원주형으로 마디가 많은데, 뿌리줄기를 연근, 마디 부분을 우절이라 한다.

현재까지 알려진 연의 연구는 식용으로 사용되고 있는 연꽃, 연잎 및 연근에 대해 주로 진행되어 왔으며, 연자방, 연자육, 연자심 및 우절에 대한 연구는 제한적인 실정이다[8]. 예로부터 연꽃은 감성, 수렴, 지사, 불면증 등의 치료[12]에, 연잎은 지혈작용, 진정작용 및 해독작용[24]에 사용되어 왔으며, 연잎의 항산화[19, 32], 항균[6, 21] 및 지질대사 조절효과[20, 28], 연근의 항산화[17], 고지혈증 개선[26] 및 항당뇨 활성[14]이 잘 알려져 있다. 최근에는, 연꽃 및 연자육의 항산화 및 멜라닌 생성억제 활성[3, 12, 18, 19, 25], 우절의 뇌혈류량 개선효과[15], 연자방의 항당뇨[16], 항균[21] 및 항산화 활성[23]이 보고된 바 있다. 본 연구에서는 연의 신규 유용활성 발굴을 목적으로 연자방, 연자육, 연자심, 연잎, 연근 및 우절을 대상으로 열수 추출물을 제조하고, 이들의 항혈전 활성 및 용혈활성을 평가하였다. 본 연구를 통해 실제 차로 응용되고 있는 우절, 연자방, 연자육 및 연자심의 항혈전제로서의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 연은 2016년에 경북 문경의 연 재배 농가로부터 부위별로 구입한 것으로, 우절과 연근은 세절 후 3일간 음건 후 마쇄하였으며, 지상부 시료는 건조과정 없이 각각 마쇄하여 시료로 사용하였다(Fig. 1). 이후 마쇄 시료에 대해 10배의 증류수를 가하고 100℃에서 1시간 가열 추출한 후 방냉하고, 다시 상기의 과정을 2회 반복한 후 추출액을 모아 filter

paper (Whatman N0. 2)로 거른 후 감압농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 추출물을 조제하였다[27]. 조제된 다양한 추출물은 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 적당한 농도로 녹여 활성 평가에 사용하였다. 실험에 사용한 6종의 연 부위별 시료는 안동대학교 식품영양학과에 보관하고 있다(voucher specimen 2016-NN1~6).

### 혈액응고 저해활성

다양한 부위의 연 열수 추출물의 혈액응고 저해 활성은 기존 방법과 동일하게 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하여 평가하였다[27]. 실험에 사용된 표준 혈장은 시판되고 있는 control plasma (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)를 사용하였고, PT reagent 및 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)의 분석시약을 사용하였으며, 기타 시약은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 시약급 이상 제품을 구입하여 사용하였다. 활성 대조구로는 aspirin을, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였으며, 각각의 혈액 응고활성은 3회 반복 측정하였다. TT, PT, aPTT 측정시의 혈액 응고저해활성은 시료 첨가후의 각각의 혈액응고 소요시간의 평균값을 DMSO 첨가후의 각각의 혈액응고 소요시간의 평균치의 비로 나타내었다[8].

### 혈소판 응집 저해 활성

다양한 부위의 연 열수 추출물의 혈소판 응집저해 활성은 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, U.S.A)를 사용하여 측정하였다[14]. 이는 혈소판이 부착, 응집됨에 따라 발생하는 전기 저항값의 변화를 측정하는 방법으로, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 50 µl, suspending buffer 147.5 µl, 연의 추출물 시료 5 µl가 포함된 반응 cuvette에 수세된 50 µl의 인간 유래 혈소판(5×10<sup>8</sup> cells/ml)을 첨가하고 3분 동안 37℃로 가온 후, 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 µl를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 Whole Blood Aggregometer의 교반장치를 이용하여 반응액을 500 rpm으로 교반시키면서 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under 를 측정



Fig. 1. Photography of different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner. A: root, B: node of root, C: leaf, D: pod of seed, E: seed and F: embryo of seed.

하여 혈소판 응집을 평가하였다. 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. 혈소판 응집도(PAR: Platelet Aggregation Ratio)는 시료 첨가시의 area under 값과 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under 값의 비를 백분율로 나타내었다[7, 14].

**인간 적혈구 용혈 활성 평가**

다양한 부위의 연 열수 추출물의 인간 적혈구 용혈 활성을 기존의 방법과 동일하게 평가하였다[14, 27]. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%)를 사용하였으며, 활성 대조구로는 적혈구 용혈활성을 가진 triton X-100과 amphotericin B를 사용하였다. 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(450× g)하여 상등액 100 µl를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다. 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.

**pH, brix, 산도, 색차 및 성분분석**

다양한 부위의 연 열수 추출물의 pH 측정은 pH meter (Mettler Toledo INLab R413, UK)로 측정하였으며, brix 측정은 refractometer (Atago N-1E, Japan)로 측정하였다. 산도는 시료 10 ml에 0.1 N NaOH 용액을 가하여 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 그 소비된 양을 acetic acid의 함량(%)으로 환산하여 나타내었다[14]. Total flavonoid (TF) 및 total polyphenol (TP) 함량 측정은 기존의 보고된 방법[29]에 따라 측정하였으며, 각각 rutin과 tannic acid를 표준시약으로 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에

는 DNS 변법을 이용하였다[31]. 색차 분석은 색차계(Super color SP-80 Colormeter, Tokyo Denshoku Co., Japan)를 이용하였으며, 명도(lightness, L), 적색도(redness, a), 황색도(yellowness, b)를 측정하였다. 표준 백색판은 L값이 92.39, a값이 -0.08, b값이 1.39이었으며, 시료당 3회 측정하여 평균값을 구하여 나타내었고 색차(ΔE)는 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$(\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}).$$

**결과 및 고찰**

**다양한 부위의 연 열수 추출물의 이화학적 특성**

부위별로 조제된 연 열수 추출물의 이화학적 특성은 Table 1에 나타내었다. 먼저 pH는 연자심, 연자육, 우절, 연근, 연잎 및 연자방 순으로 6.5~5.6의 범위를 나타내었으며, brix는 연자육에서 70%로 가장 높게 나타난 반면, 연잎과 연자방에서는 분석 한계(0.1%) 이하로 나타났다. 산도의 경우, 부위별로 0.06~0.20%로 다양하게 나타났으며, 연자심의 산도가 0.2%로 가장 높게 나타났다. pH, brix, 산도 분석 결과, 연근과 우절, 연잎과 연자방, 연자육과 연자심에서 각각 유사한 분석값을 나타내었다(Table 1). 이는 연자방이 향후 연잎을 대체할 수 있음을 제안한 최근 연구와 일치하고 있다[21]. 다양한 부위의 연 추출물의 색차를 분석한 결과, 명도는 26.42~69.58, 적색도는 -3.33~8.66, 황색도는 9.94~14.03의 범위를 나타내었으며, ΔE의 경우 적색도나 황색도 보다는 명도 차이에 따라 큰 차이를 나타내었다. 특히 연자방의 낮은 명도, 높은 적색도와 황색도 및 연자심의 낮은 명도, 진한 녹색 및 황색도로 연자방과 연자심의 ΔE는 64.69~66.83의 높은 값을 나타내었다.

**다양한 부위의 연 열수 추출물의 성분 분석**

다양한 부위의 연 열수 추출물의 추출효율은 Table 2에 나타낸 바와 같이, 3.5~20.3%로 다양하게 나타났으며, 연자방을 제외한 모든 부위가 10% 이상의 높은 추출효율을 나타내어 연근, 우절, 연잎, 연자육 및 연자심은 상당량의 수용성 성분을 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 특히, 우절의 경우 20.3%로

Table 1. Physico-chemical properties of the hot water extracts prepared from different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner

Parts	pH	Brix (%)	Acidity (%)	Color differences			
				<sup>1</sup> L	<sup>2</sup> a	<sup>3</sup> b	<sup>4</sup> ΔE
Root	6.1	30	0.06	69.58±0.00 <sup>e</sup>	1.74±0.07 <sup>d</sup>	14.03±0.18 <sup>d</sup>	26.20±0.09 <sup>a</sup>
<sup>5</sup> NR	6.0	22	0.07	59.87±0.03 <sup>d</sup>	3.18±0.06 <sup>c</sup>	11.35±0.01 <sup>c</sup>	34.26±0.02 <sup>ab</sup>
Leaf	5.6	<0.1	0.09	38.42±0.17 <sup>c</sup>	-3.97±0.00 <sup>a</sup>	11.60±0.07 <sup>c</sup>	55.04±0.18 <sup>ab</sup>
<sup>6</sup> PS	5.6	<0.1	0.13	28.91±0.30 <sup>b</sup>	8.66±0.07 <sup>f</sup>	10.56±0.02 <sup>b</sup>	64.69±0.30 <sup>b</sup>
Seed	6.4	70	0.18	59.91±0.78 <sup>d</sup>	0.78±0.21 <sup>c</sup>	9.94±0.27 <sup>a</sup>	33.56±0.68 <sup>ab</sup>
<sup>7</sup> ES	6.5	25	0.20	26.42±0.22 <sup>a</sup>	-3.33±0.04 <sup>b</sup>	11.51±0.17 <sup>c</sup>	66.83±0.20 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>L: degree of lightness (white +100~0 black), <sup>2</sup>a: degree of redness (red +100~-80 green), <sup>3</sup>b: degree of yellowness (yellow +70~-80 black), <sup>4</sup>ΔE: overall color difference (ΔE = √((ΔL)<sup>2</sup> + (Δa)<sup>2</sup> + (Δb)<sup>2</sup>). <sup>5</sup>NR: Node of Root, <sup>6</sup>PS: Pod of Seed, and <sup>7</sup>ES: Embryo of Seed.

Table 2. Yields of the hot water extracts prepared from different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner and their components analysis

Parts	Extraction yield (%)	Content (mg/g)			
		Total polyphenol	Total flavonoid	Total sugar	Reducing sugar
Root	16.3	15.2±0.4 <sup>a</sup>	7.1±0.2 <sup>c</sup>	662.2±4.1 <sup>d</sup>	75.3±6.9 <sup>b</sup>
<sup>1</sup> NR	20.3	102.4±1.6 <sup>c</sup>	4.5±0.1 <sup>b</sup>	212.2±8.0 <sup>c</sup>	136.6±14.0 <sup>c</sup>
Leaf	15.5	179.7±2.9 <sup>d</sup>	68.5±3.1 <sup>e</sup>	215.0±0.5 <sup>c</sup>	161.4±31.2 <sup>c</sup>
<sup>2</sup> PS	3.5	11.1±7.1 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	6.4±0.4 <sup>a</sup>	6.1±0.4 <sup>a</sup>
Seed	13.1	12.4±0.1 <sup>a</sup>	2.3±0.1 <sup>ab</sup>	873.0±4.2 <sup>e</sup>	12.9±7.9 <sup>a</sup>
<sup>3</sup> ES	18.6	36.3±0.0 <sup>b</sup>	25.9±0.3 <sup>d</sup>	20.0±0.1 <sup>b</sup>	17.7±2.3 <sup>a</sup>

Data are means±SD of triplicate determinations. <sup>1</sup>NR: Node of Root, <sup>2</sup>PS: Pod of Seed, and <sup>3</sup>ES: Embryo of Seed.

연자방에 비해 5.8배의 높은 추출효율을 나타내었다. 열수 추출물의 성분분석 결과, TP 함량은 연잎에서 179.7 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 우절에서 102.4 mg/g으로 높게 나타났다. TF 함량 분석결과, 역시 연잎에서 68.5 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 연자심에서 25.9 mg/g을 나타내어 연잎>연자심>연근>우절>연자육>연자방 순으로 확인되었다. 이는 기존 연자방이 연잎보다 높은 폴리페놀 함량을 나타낸다는 보고[21]와는 상반되나, 사용 시료의 차이 및 추출용매의 차이로 인해 기인한 것으로 판단되었다. 총당 함량 분석 결과, 연자육이 873.0 mg/g으로 가장 높았으며, 연자방이 6.4 mg/g으로 가장 낮았다. 연근은 662.2 mg/g 함량을 나타낸 반면, 연근의 마디 부분인 우절은 212.2 mg/g으로 상대적으로 낮은 함량을 보였다. 한편 환원당의 경우 연잎에서 가장 높은 161.4 mg/g, 연자방에서 가장 낮은 6.1 mg/g을 나타내었고, 연근보다 우절 추출물이 1.8배 높은 함량을 나타내었다(Table 2). 따라서 영양적으로는 연근과 연자육이 우수하며, 생리활성 측면에서는 연잎 및 우절이 우수할 것으로 예상되었다.

**다양한 부위별 연 열수 추출물의 혈액응고 저해 활성**

부위별 연 열수 추출물의 항응고 활성을 5 mg/ml 농도에서 평가한 결과, 우절, 연잎 및 연자방 추출물에서 우수한 항응고

활성을 나타내었으며, 특히 연자방의 경우 TT, PT 및 aPTT 평가에서 무처리구에 비해 모두 15배 이상 연장된 응고시간을 나타내었다(Table 3). 우절의 경우 트롬빈 및 응고인자 저해가 강력하여 TT는 15배 이상, aPTT는 8.57배 연장시켰으며, 연잎은 TT만을 15배 이상 연장시켜 트롬빈 특이 저해를 통해 혈전 생성을 억제함을 알 수 있었다. 현재 항혈전제로 사용되고 있는 aspirin이, 1.5 mg/ml 농도에서 무처리구에 비해 TT는 1.38배, PT는 1.29배 및 aPTT는 1.49배 연장시킴을 고려할 때, 연자방 및 우절 추출물은 매우 강력한 항응고 활성을 나타냄을 확인하였다. 한편 연근, 연자육 및 연자심 추출물에서는 항응고 활성이 미미하였으며, 오히려 연근의 경우 TT 단축, 연자육의 경우 PT 단축을 나타내어, 민간에서 연근을 지혈제로 사용되는 근거를 추측할 수 있었다.

**다양한 부위별 연 열수 추출물의 혈소판 응집 저해 활성**

부위별 연 열수 추출물의 혈소판 응집 저해활성을 평가하였으며, 그 결과는 Table 4 및 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 용매 대조구로 사용된 DMSO의 경우 area under 97.1을 나타내었으며, 활성 대조구인 aspirin은 0.25 mg/ml 농도에서 18% 응집도(area under 23.1), 0.125 mg/ml 농도에서 30.8% 응집도(area under 39.5)를 보여 농도 의존적인 강력한 혈소판 응집저

Table 3. Anti-coagulation activities of the hot water extracts prepared from different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner

Samples/Chemicals	Concentration (mg/ml)	Anti-coagulation activity*		
		TT	PT	aPTT
DMSO	-	1.00±0.02 <sup>b</sup>	1.00±0.03 <sup>b</sup>	1.00±0.02 <sup>a</sup>
Aspirin	1.5	1.38±0.03 <sup>e</sup>	1.29±0.00 <sup>c</sup>	1.49±0.11 <sup>a</sup>
Root	5.0	0.89±0.02 <sup>a</sup>	0.96±0.01 <sup>b</sup>	1.07±0.13 <sup>a</sup>
<sup>1</sup> NR	5.0	>15 <sup>f</sup>	1.27±0.11 <sup>c</sup>	8.57±2.40 <sup>b</sup>
Leaf	5.0	>15 <sup>f</sup>	0.98±0.01 <sup>b</sup>	1.51±0.15 <sup>a</sup>
<sup>2</sup> PS	5.0	>15 <sup>f</sup>	>15 <sup>d</sup>	>15 <sup>c</sup>
Seed	5.0	1.28±0.18 <sup>d</sup>	0.82±0.00 <sup>a</sup>	0.85±0.04 <sup>a</sup>
<sup>3</sup> ES	5.0	1.19±0.10 <sup>c</sup>	1.04±0.04 <sup>bc</sup>	1.02±0.04 <sup>a</sup>

\*Anti-coagulation activity is calculated on the clotting time of sample divided by the clotting time of solvent control in blood coagulation assay. The thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) of solvent control (dimethylsulfoximide) were 36.7 sec, 20.4 sec and 103.95 sec, respectively. Data are means ± SD of triplicate determinations. <sup>1</sup>NR: Node of Root, <sup>2</sup>PS: Pod of Seed, and <sup>3</sup>ES: Embryo of Seed.

Table 4. Platelet aggregation inhibitory activities of the hot water extracts prepared from different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner

Samples/ Chemicals	Concentration (mg/ml)	Amplitude ( $\Omega$ )	Slope ( $\Omega$ /min)	Lag time (sec)	Area under	PAR* (%)
DMSO	-	17	2	69	97.1	100.0
Aspirin	0.25	5	1	157	23.1	18.0
	0.125	6	1	50	39.5	30.8
Root	0.25	28	6	16	232.4	161.6
<sup>1</sup> NR	0.25	19	6	6	172.2	134.1
Leaf	0.25	18	4	2	148.9	115.9
<sup>2</sup> PS	0.25	24	7	3	214.9	167.3
Seed	0.25	19	6	2	165.2	128.6
<sup>3</sup> ES	0.25	9	2	316	36.1	25.1

\*PAR: Platelet aggregation ratio. Data are presented as a 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 curve is a calculated area in descent drawing during platelet aggregation. <sup>1</sup>NR: Node of Root, <sup>2</sup>PS: Pod of Seed, and <sup>3</sup>ES: Embryo of Seed.

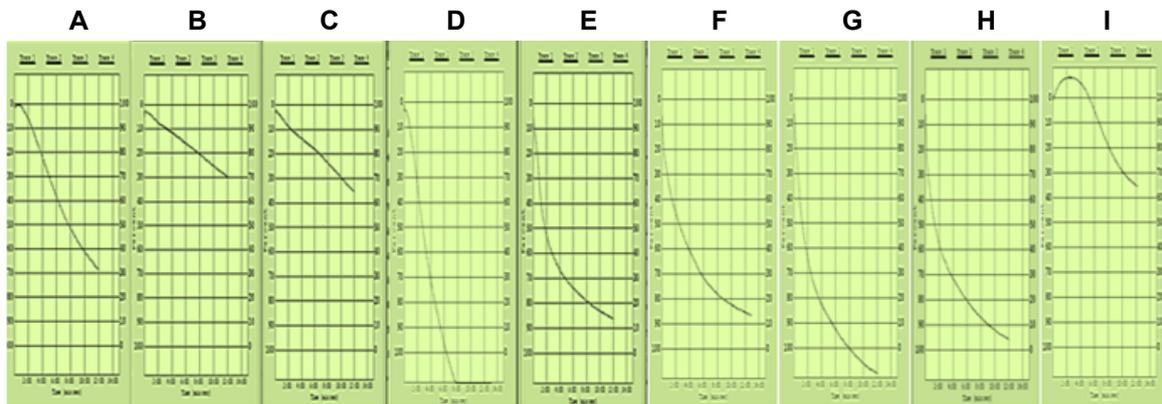


Fig. 2. Diagram of impedance changes during platelet aggregation after addition of aspirin and the hot water extracts of different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner in whole blood aggregometer. (A) DMSO, (B) aspirin (0.25 mg/ml), (C) aspirin (0.125 mg/ml), the hot water extract of (D) root, (E) node of root, (F) leaf, (G) pod of seed, (H) seed and (I) embryo of seed. 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 change for 12 min. The sample concentrations used were 0.25 mg/ml, respectively.

해 활성을 나타내었다[14]. 부위별 연 열수 추출물의 경우, 연자심 열수 추출물 시료에서만 25.1%의 혈소판 응집능을 나타내어 의미있는 응집저해 활성을 나타내었다. 반면 연근, 우절, 연잎, 연자방 및 연자육의 열수 추출물은 0.25 mg/ml 농도에서 혈소판 응집을 저해하지 않았으며, 오히려 연근 및 연자방 추출물의 경우 매우 빠르게 응집이 나타났으며(Fig. 2), 무첨가구에 비해 1.6배 이상의 혈소판 응집촉진 활성을 나타내었다(Table 4).

**다양한 부위별 연 열수 추출물의 적혈구 용혈 활성**

부위별 연 열수 추출물의 항혈전 소재로의 실제적 이용가능성을 검토하기 위해 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 평가하였다. 현재 민간이나 사찰에서는 연잎은 물론 우절, 연자육을 차로 음용하고 있는 실정이다. 먼저 대조구로 사용된 triton X-100 및 amphotericin B는 1 mg/g 및 0.05 mg/g 농도 처리에

의해 각각 100% 및 92.6% 용혈 활성을 나타내었다. 연자육을 제외한 연 추출물 시료는 1.0 mg/ml 농도까지 용혈활성이 전

Table 5. Hemolysis activities of the hot water extracts prepared from different parts of *Nelumbo nucifera* Gaertner against human red blood cell

Samples/Chemicals	Conc. (mg/ml)	Hemolysis (%)
Root	1.0	1.1 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
<sup>1</sup> NR	1.0	0.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
Leaf	1.0	2.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
<sup>2</sup> PS	1.0	2.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
Seed	1.0	6.1 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
<sup>3</sup> ES	1.0	0.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Triton X-100	1.0	100.0 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup>
Amphotericin B	0.05	92.6 $\pm$ 1.4 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>NR: Node of Root, <sup>2</sup>PS: Pod of Seed, and <sup>3</sup>ES: Embryo of Seed.

혀 나타나지 않았으며, 연자육에서만 6.1%의 약한 용혈활성을 나타내었다(Table 5). 따라서 우절, 연잎, 연자방 열수 추출물은 용혈과 관련된 급성독성을 유발하지는 않을 것으로 판단되었다. 이상의 결과는, 연 산업의 부산물로 얻어지는 우절, 연자방, 연자육, 연자심이 강력한 항응고 및 혈소판 응집저해 활성을 나타내어, 위장장애 등의 부작용이 심한 아스피린의 보완 및 경구 투여가 불가능한 항혈전제의 대체제로 이용 될 수 있음을 제시하고 있으며, 향후 활성물질의 정제 및 관련 기작 연구를 통해 상기 미이용 부위를 이용한 혈전성 질환 예방 및 치료용 식의약품 소재 개발이 가능함을 제시하고 있다.

### 감사의 글

본 연구는 2017년도 산업통상자원부 바이오테라피산업기반구축사업(과제번호 N0001805)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### References

- Asokan, S. M., Maraippan, R., Muthusamy, S. and Velmurugan, B. K. 2018. Pharmacological benefits of neferine - A comprehensive review. *Life Sci.* **199**, 60-70.
- Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M. and Podsedek, A. 2011. Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia* **82**, 811-817.
- Chang, M. S., Kim, H. M., Yang, W. M., Kim, D. R., Park, E. H., Ko, E. B., Choi, M. J., Kim, H. Y., Oh, J. H., Shim, K. J., Yoon, J. W. and Park, S. K. 2007. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* on tyrosinase activity and melanogenesis in Clone M-3 melanocyte cells. *Kor. J. Herbology* **22**, 87-94.
- 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. *Thromb. Res.* **131**, 173-177.
- Eikelboom, J. W., Zelenkofske, S. L. and Rusconi, C. P. 2010. Coagulation factor IXa as a target for treatment and prophylaxis of venous thromboembolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 382-387.
- Huh, M. K. and Kim, H. J. 2014. Antibacterial effect on leaf-extract from *Nelumbo nucifera* against oral microorganism. *J. Kor. Soc. Dent. Hyg.* **14**, 117-122.
- 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. H., Kim, S. I. and Sim, K. H. 2012. Antioxidative activity of jeolpyeon containing lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) seed powder. *Kor. J. Food Culture* **27**, 505-511.
- Jung, I. C. and Sohn, H. Y. 2014. Antioxidation, antimicrobial and antithrombosis activities of aged black garlic (*Allium sativum* L.). *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 285-292.
- Kim, M. D., Rhee, S. K. and Seo, J. H. 2001. Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal  $\delta$ -integration. *J. Biotechnol.* **85**, 41-48.
- 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.
- Kim, M. S., Park, Y. J. and Sohn, Y. W. 2010. Antioxidative effect and melanogenesis of *Nelumbo nucifera* stamen extract on cultured human skin melanoma cells injured by hydrogen peroxide. *Kor. J. Plant Res.* **23**, 145-150.
- Kim, M. S. and Sohn, H. Y. 2015. Anti-coagulation and anti-platelet aggregation activity of the mature fruit of *Sorbus commixa*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**, 373-377.
- Kim, O. K. 2014. Ethanol effect of *Nelumbo nucifera* root on carbohydrate metabolism related enzyme activities and antioxidative effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor. Oil. Chem. Soc.* **31**, 509-516.
- Kim, Y. G., Kwon, M. J. and Cho, S. I. 2005. Effect of nodus *Nelumbinis rhizomatis* extract on the regulation of regional cerebral blood flow in rats. *Kor. J. Herbology* **20**, 75-81.
- Kim, Y. H., Choi, K. S. and Shin, K. O. 2016. The effect of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf, stem, and yeonjabang powder extract on the biochemical factors in serum in mice fed a high-fat diet. *Kor. J. Food Nutr.* **29**, 684-691.
- Lee, J. J., Ha, J. O. and Lee, M. Y. 2007. Antioxidative activity of lotus root (*Nelumbo nucifera* G.) extracts. *J. Life Sci.* **17**, 1237-1243.
- Lee, J. Y., Im, K. R., Jung, T. K. and Yoon, K. S. 2013. The inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* Gaertner extract on melanogenesis. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng.* **28**, 137-145.
- Lee, K. S., Kim, M. G. and Lee, K. Y. 2006. Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 182-186.
- Lee, K. S. and Lee, K. Y. 2011. Effect of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf extract on serum and liver lipid levels of rats fed a high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1544-1547.
- Lee, K. W., Kim, Y. H. and Shin, K. O. 2017. In vitro antioxidant activities and antimicrobial activity of lotus (leaf, stem, and seed pod) extracts. *Kor. J. Food Nutr.* **30**, 771-779.
- Lee, S. J., Bose, S., Lee, S. J., Jeong, J. E., Koo, B. S., Kim, D. I. and Kim, H. J. 2013. Effects of fermented lotus extracts on the differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Kor. Med. Obes. Res.* **13**, 74-83.
- Ling, Z. Q., Xie, B. J. and Yang, E. L. 2005. Isolation, characterization, and determination of antioxidative oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2441-2445.
- Moon, J. H., Hong, K. H. and Yoo, S. S. 2016. Antioxidant properties of the lotus leaf powder content of cheongpomuk. *Cul. Sci. Hospital. Res.* **22**, 112-130.
- Park, J. H., Lee, B. G., Byun, G. I. and Kim, D. W. 2010. Antioxidant activities and inhibitory effect on oxidative DNA damage of *Nelumbinis Semen* extracts. *Kor. J. Herbology* **25**, 55-59.

26. Park, S. H, Hyun, J. S, Shin, E. H. and Han, J. H. 2005. Functional evaluation of lotus root on serum lipid profile and health improvement. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **15**, 257-263.
27. 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.
28. Shin, M. K. and Han, S. H. 2006. Effects of lotus (*Nelumbo Nucifera* Gaertner) leaf powder on lipid concentrations in rats fed high fat diet rats. *Kor. J. Food Culture* **21**, 202-208.
29. 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.
30. 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.
31. Valentina, U., Fabcic, J. and Stampar, F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**, 185-192.
32. Yoo, D. H., Joo, D. H., Lee, S. Y. and Lee, J. Y. 2015. Antioxidant effect of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line. *J. Life Sci.* **25**, 1115-1123.

**초록 : 다양한 부위의 연(Lotus) 열수 추출물의 항혈전 활성**

안선미<sup>1</sup> · 성화정<sup>1</sup> · 김종식<sup>2</sup> · 박종이<sup>3</sup> · 손호웅<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>안동대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>안동대학교 생명과학과, <sup>3</sup>경북바이오산업연구원)

연(Lotus)의 항혈전 활성을 평가하기 위해, 연잎, 연자방, 연자육, 연자심, 연근 및 우절로부터 각각 열수 추출물을 제조하고, 이의 성분 분석, 항응고, 혈소판 응집저해 및 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 연의 부위별 추출효율은 우절>연자심>연근>연잎>연자육>연자방의 순으로 나타났으며, 추출물들의 pH는 5.6~6.5, 산도는 0.06~0.20%로 다양하게 나타났다. Brix의 경우 연자육에서 70%로 가장 높게 나타난 반면, 연잎과 연자방에서는 분석한계(0.1%) 이하로 나타났다. TP 및 TF 함량은 연잎에서 179.7 및 68.5 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 총당은 연자육에서 873.0 mg/g, 환원당은 연잎에서 161.4 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 한편 항응고 활성은 우절, 연잎 및 연자방 추출물에서 우수하였으며, 특히 연자방의 경우 TT, PT 및 aPTT 평가에서 무처리구에 비해 모두 15배 이상 연장된 강력한 활성을 나타내었다. 그러나, 혈소판 응집 저해 활성을 평가한 결과 연자심 추출물에서만 0.25 mg/ml 농도에서 무첨가구에 비해 25.1%의 혈소판 응집을 나타내어 강력한 응집저해 활성을 나타내었다. 인간 적혈구에 대한 용혈활성 평가결과, 연자육 추출물에서만 6.1%의 약한 용혈활성을 나타내었고, 나머지 부위 추출물에서는 용혈활성이 나타나지 않았다. 본 연구결과는 연 산업의 부산물인 우절, 연자방, 연자육 및 연자심이 혈전성 질환 예방 및 치료용 식의약품 소재로 개발 가능성을 제시하고 있다.