

Anti-oxidation and Anti-thrombosis Activities of Polyphenol-enriched Fraction of Acorn Pollen Extract

Yun-Jin Lee¹, Deok-Gyeong Kang¹, Su-Jin Pyo^{1,2} and Ho-Yong Sohn^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²Lee's Biotech Co., 416, C Dong, 17 Techno 4-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34013, Korea

Received March 21, 2022 / Revised April 12, 2022 / Accepted May 15, 2022

Pollen collected from *Quercus* species is abundant in Korea and has been used to treat anemia and inflammation of the prostate gland. It is also used for hemostasis in oriental medicine. In this study, the ethanol extract of the acorn pollen and its subsequent organic solvent fractions using hexane, ethylacetate, butanol, and water residue were prepared, and their antioxidant, anti-thrombosis, and hemolysis activities were evaluated. The ethylacetate fraction of acorn pollen (EF-AP) showed the highest polyphenol content (225.0 mg/g) and strong antioxidant activity among the solvent fractions. The RC_{50} of EF-AP against DPPH, ABTS, and nitrite radicals was 72.2, 27.7, and 62.6 μ g/ml, respectively. The blood coagulation activities of the all-solvent fractions determined by thrombin time, prothrombin time, and activated partial thromboplastin time were negligible up to 5 mg/ml. Platelet aggregation inhibitory activities were observed in the EF-AP, butanol fraction, and water residue, whereas hexane fraction induced strong platelet aggregation. The EF-AP has no hemolysis activity against human RBC up to 1 mg/ml. UPLC/MS/MS analysis of the EF-AP revealed that rutin, isoquercitrin, and astragaloside are major compounds for antioxidant and anti-thrombosis activities. Our results suggest that EF-AP could be developed as a noble antioxidant and anti-thrombosis agent.

Key words : Acorn pollen, anti-oxidant, anti-thrombosis, isoquercitrin, rutin

서 론

도토리(Acorn)는 참나무속에 속하는 나무 열매의 총칭으로, 구체적으로는 상수리나무(*Quercus acutissima*), 굴참나무(*Quercus variabilis*), 돌참나무(신갈나무, *Quercus mongolica*), 갈참나무(*Quercus aliena*), 줄참나무(*Quercus serrata*), 물참나무(*Quercus mongolica* var. *crispula*), 떡갈나무(*Quercus dentata*) 등의 참나무 열매를 말하며, 이러한 참나무속 식물의 꽃으로부터 벌에 의해 생산된 화분을 통칭하여 도토리 화분이라 한다[8]. 도토리 화분은 봄철에 수확되는 국내 주요 화분으로, 탄수화물, 지방, 비타민, 여러 종류의 무기질 등이 골고루 함유되어 있어 영양성분이 우수하다고 알려지면서[7, 13], 최근 건강보조식품으로 주목받고 있다.

한편 도토리 화분의 유용 생리활성으로 민간에서는 빈

혈 방지, 피부 노화 방지, 전립선염 치료 효과가 알려져 있으며[1, 7, 16, 17, 22], 최근에는 도토리 화분에 관한 혈소판 응집 저해 활성[25], 노화 억제 및 항산화[8, 24], 혈관 신생 억제활성[3], 항균 및 항당뇨[5, 24, 33] 등이 보고되어 있다. 그러나 현재까지 도토리 화분을 이용한 고부가가치 식의약품 소재로의 개발은 제한되어 있으며, 주된 이유는 화분 성분이 일부 민감 체질에서 면역 과민반응 물질로 작용하여 알러지, 비염, 천식을 유발하는 문제점과, 자연계에서 화분을 채집하는 과정상 필연적으로 발생하는 미생물 오염에 의한 부패와 낮은 저장성 등이 알려져 있다[7]. 또한 도토리 화분을 포함한 식물의 화분 표면은 sporopollenin이라 불리는 단단한 껍질로 덮여 있어 화분의 가열 및 추출 등의 별도의 전처리 없이 섭취시에는 소화흡수율이 낮아 생체 이용률이 매우 낮다는 문제점도 알려져 있다[6, 7]. 본 연구에서는 국내 다양한 식물 화분의 생리활성 평가 연구의 일환으로, 도토리 화분의 항산화 및 항혈전 소재로 개발 가능성을 검토하고자 도토리 화분 에탄올 추출물과 이의 극성별 용매분획물을 제조하고 이의 항산화, 항응고, 혈소판 응집저해 활성 및 활성 분획물의 적혈구 용혈 활성을 평가하였다. 그 결과 도토리 화분 추출물의 폴리페놀 고함유 에틸아세테이트 분획물이 우수한 항산화 및 항혈전 활성을 나타내어 항산화 및 항혈전제로서의 기능성 식의약품 소재로 개발 가능하

*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.

며, 상기 에틸아세테이트 분획물의 다양한 페놀산 및 플라보노이드 물질을 분석하여 활성물질을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

도토리 화분 및 시약

본 실험에 사용된 도토리 화분은 2019년 봄에 강원도 지역에서 채취 한 화분을 구입하여 -20℃에서 냉동 보관하면서 사용하였다. 도토리 화분은 마쇄기(FoodMix-150W, Angel Electric Co., Bucheon, Korea)로 1분간 1차 미쇄한 후 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)에 침지하여 추출하였다(Fig. 1). Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 Triton X-100은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 시약급 이상의 제품을 구입하여 사용하였다.

도토리 화분의 추출물 및 극성별 유기용매 분획물 조제

도토리 화분의 추출물은 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)을 시료의 20배를 가하고 상온에서 8시간씩 5회 추출하여 조제하였다. 추출액은 filter paper (Whatman No. 2, GE healthcare UK limited, UK)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)하여 분말로 조제하였으며, 이후 추출물을 물에 현탁한 후 n-hexane, ethylacetate 및 butanol을 이용하여 순차적으로 극성별 용매 분획하고, 물 잔류물을 회수하였다. 각각의 분획물들은 감압 농축하여 분말화하였으며, 이후 분말 시료들은 99.9% DMSO 용액에 적당한 농도로 녹여, 항산화 활성, 항혈전 활성, 적혈구 용혈 활성 및 성분 분석 평가에 사용하였다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 항산화 활성

도토리 화분 추출물 및 분획물의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 음이온 소거능[24], ABTS [2,2-azobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 양이온 소거능, nitrite 소거능[10] 및 환원력 측정으로 평가하였다.

DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능 및 환원력의 비교 평가 시 추출물 및 분획물의 최종 농도는 0.5 mg/ml로 조정하였으며, nitrite 소거능의 경우 0.2 mg/ml로 조정하였다. 활성 평가는 기존보고[24]와 동일한 방법으로 측정하였으며, 각각 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 표시하였다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 혈액응고 저해 활성

도토리 화분 추출물 및 분획물의 혈액응고 저해 활성은 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하여 평가하였다[23, 25]. 모든 실험은 3회 반복하여 평균치로 나타내었으며, 각각의 항응고 활성은 시료 첨가 시의 응고 시간의 평균치를 대조구 DMSO 응고시간의 평균치의 비로 나타내었다[12]. 활성 평가에 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 시약은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 시약급 이상의 제품을 구입하여 사용하였다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 혈소판 응집 저해 활성

도토리 화분 추출물 및 분획물의 혈소판 응집저해 활성은 Whole Blood Aggregometer (Chronolog, Havertown, PA, USA)를 사용하여 impedance 법으로 평가하였다[28]. 먼저 인간 농축 혈소판(platelet rich plasma: PRP)을 전처리 및 수세한 후 최종 혈소판 농도가 5×10^8 /ml이 되도록 조정하여 사용하였으며 응집 유도제로 collagen (1 mg/ml)을 사용하였다. 혈소판 응집 반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며, Aggrolink program (Aggrolink 5.2.3, Chrono-log, Havertown, PA, USA)을 사용하여 amplitude, slope, Area Under the Curve (AUC)를 측정하여 평가하였다[23]. 이때 amplitude (ohm)는 혈소판에 응집 유도제를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집 정도를 나타내며, slope는 응집 유도

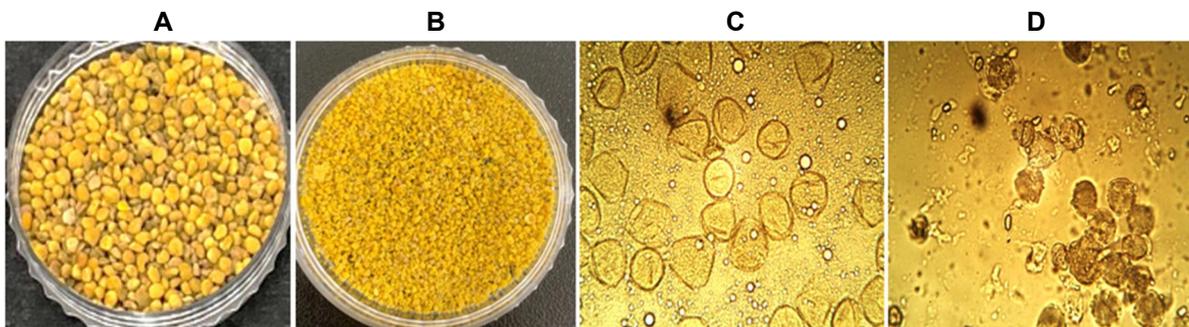


Fig. 1. The representative photographies of (A) acorn pollen, (B) grinded acorn pollen, (C) water-treated acorn (x800) and (D) ethanol treated acorn pollen (x800) used in this study

제를 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집 곡선의 기울기를 나타내며, AUC는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는 것으로 전기저항 증가에 따른 slope 곡선의 하강 면적을 의미한다. 혈소판 응집 저해 활성은 시료 첨가 시의 AUC 값과 DMSO를 첨가한 용매 대조구의 AUC 값의 비로 나타내었다[23]. 활성 대조구로는 aspirin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 적혈구 용혈 활성

도토리 화분 추출물 및 분획물의 인간 적혈구 용혈 활성은 기존 보고된 방법[11]으로 측정하여 평가하였다. 용혈 활성은 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.

도토리 화분의 에틸아세테이트 분획물의 flavonoids 및 phenolic acids 분석

도토리 화분 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 flavonoids 및 phenolic acids를 UPLC/MS/MS를 이용하여 분석하였다[26]. UPLC 분석 조건은 ACQUITY UPLC® BEH

C18 1.7 μm 컬럼, 컬럼온도 40°C, 유량 350 μl/min, 주입량 2 μl, 이동상 용매는 0.1% formic acid가 포함된 증류수와 0.1% formic acid가 포함된 acetonitrile 기울기 용리를 수행하였다(Table 1). MS/MS 분석은 TSQ Quantum ULTRA (Thermo Fisher, Waltham, USA)를 이용하였으며 분석조건은 multiple reaction monitoring (MRM) 방식으로, negative ionization mode로 수소화된 분자이온((M-H)-)을 만들어 각 성분별 precursor ion을 선정하여 tune 작업을 통해 최적의 collision energy 및 product ion을 선택하여 spray voltage 2.0 kV, desolvation gas flow rate 800 l/hr와 cone gas flow rate 1 l/hr, desolvation temperature 450°C로 분석하였다. 분석 표준품은 상업적으로 판매하고 있는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 caffeic acid, cinnamic acid, p-coumaric acid, m-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, gentisic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, salicylic acid, sinapic acid, syringic acid, vanillic acid의 13종의 페놀산과 apiin, astragalin, cosmosiin, fisetin, hyperoside, isoquercitrin, kaempferol, luteolin, myricetin, orientin, quercetin, quercitrin, rutin, vitexin의 총 14종의 플라보노이드 성분을 사용하였다.

기타 분석 및 통계처리

Total polyphenol 및 Total flavonoid 함량 측정은 기존 보고된 방법[27]에 따라 측정하였으며, 각각 rutin과 tannic acid를 표준시약으로 사용하였다. 총당 정량은 phenol-sulfuric acid법[19]을 사용하였으며, 표준 시약은 sucrose를 사용하였다. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다. 실험 결과는 SPSS 23.0 버전을 사용하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 군 간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결과 및 고찰

도토리 화분 추출물의 극성별 용매 분획물 조제 및 이의 성분 분석

식물체의 화분은 외피와 내피로 둘러싸인 단단한 구조로 일반적인 마쇄 또는 용매처리로는 파괴하기 어려운 것으로 알려져 있다[6, 7]. 본 실험에서는 1차 마쇄한 화분을 에탄올을 가하여 상온에서 8시간씩 5회 추출하여 화분 추출물을 조제하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 사용한 도토리 화분은 표면에 과립상 또는 미립상의 돌기가 확인되어 도토리 화분의 특징을 나타내었으며 화분의 균일성을 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 도토리 화분은 증류수에 상기 조건으로 침지한 경우 변화가 없었으나, 에탄올 침지시에는 화분 구조가 대부분 파괴되었음을 확인하였다(Fig. 1D). 이후 도토리 화분 에탄올 추출물을 증류수에 현탁 한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올을 이용하여 극성별 유기용매 분획물을 조제하였으며, 이후 물 잔류물을

Table 1. Conditions of UPLC/MS/MS analysis for acorn pollen extract

Parameters	Conditions		
LC			
Injection volume	2 μl		
Column temperature	40°C		
Flow rate	350 μl/min		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile		
Gradient program	Time (min)		
	A (%)		
	B (%)		
	0	95	5
	0.5	95	5
	2.0	90	10
	4.0	80	20
	5.0	70	30
7.0	10	90	
8.0	10	90	
10.0	95	5	
MS/MS			
Ionization mode	Negative ion mode, positive ion mode		
Type	Multiple reaction monitoring (MRM)		
Source voltage	2.0 kV		
Desolvation temperature	450°C		
Desolvation gas flow rate	800 l/hr		
Cone gas flow rate	1 l/hr		

Table 2. Contents of total polyphenol, total flavonoid and total sugar of the ethanol extract of acorn pollen and subsequent organic solvent fractions

Acorn pollen Extract or fractions	Contents (mg/g)		
	Total polyphenol	Total flavonoid	Total sugar
Ethanol ex ¹	21.5±0.5 ^b	14.0±0.5 ^c	586.5±10.5 ^c
HF-AP ²	22.0±0.4 ^b	11.9±0.8 ^b	25.5±1.7 ^a
EF-AP ³	225.0±2.0 ^d	222.1±16.5 ^e	74.8±1.6 ^b
BF-AP ⁴	32.1±1.0 ^c	27.2±1.0 ^d	957.6±26.5 ^d
Water residue	0.1±0.3 ^a	1.4±0.0 ^a	998.4±85.8 ^d

¹ex: extract, ²HF-AP: Hexane fraction of the acorn pollen extract, ³EF-AP: Ethylacetate fraction of the acorn pollen extract, ⁴BF-AP: Butanol fraction of the acorn pollen extract. Data are presented as the mean ± SD of three determinations. Different superscripts^(a-e) within a column differ significantly ($p < 0.05$).

회수하였다. 분획효율은 부탄올 분획물(64.8%) > 물 잔류물(25.1%) > 헥산 분획물(8.2%) > 에틸아세테이트 분획물(4.9%) 순으로 나타났다. 도토리 에탄올 추출물의 추출효율이 35~40%를 나타내므로, 화분 100 g으로부터 에틸아세테이트 분획물의 경우 1.7~2.0 g을 회수할 수 있었다. 분획물의 유용성분 분석을 위해 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 먼저 에탄올 추출물은 21.5 mg/g의 총 폴리페놀 함량을 나타낸 반면, 유기용매 분획물 중 에틸아세테이트 분획물은 225.0 mg/g로 에탄올 추출물보다 10배 이상 높은 함량을 보였다. 이는 폴리페놀 함량이 높다고 알려진 블랙커런트의 활성 분획물보다 5배 정도 높은 함량이었다 [11]. 한편 물 잔류물에서는 0.1 mg/ml의 매우 낮은 총 폴리페놀 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량 분석에서도 폴리페놀 함량 분석패턴과 유사하게 나타났다. 도토리 화분 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물 수율이 4.9%임을 감안한다면, 에탄올 추출물내의 총 폴리페놀 함량의 47%, 총 플라보노이드 함량의 77%가 에틸아세테이트 분획물에서 확인되며, 물 잔류물의 경우 도토리 화분

에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량의 0.12%만을 포함하고 있음을 알 수 있었다. 한편 분획물들의 총당 함량 분석 결과, 물 잔류물 및 부탄올 분획물에서 957.6~998.4 mg/g을 나타내어 상기 분획물은 주로 당류로 구성되어 있음을 확인하였다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 항산화 활성

도토리 화분 분획물의 항산화 활성을 평가한 결과는 Table 3에 나타내었다. 극성별 유기용매 분획물 중 에틸아세테이트 분획물(0.5 mg/ml)은 각각 82.4% DPPH 음이온 소거능, 87.3% ABTS 양이온 소거능 및 0.754의 환원력을 나타내었으며, 0.2 mg/ml 농도에서 77.2%의 nitrite 소거능을 나타내어, 에탄올 추출물 및 여타의 분획물에 비해 월등히 강력한 항산화능을 보였다. 한편, 각 분획물의 라디칼 소거능을 다양한 농도에서 평가하여 활성 라디칼의 50%를 소거할 수 있는 RC₅₀ 농도를 계산하였으며, 그 결과 도토리 화분의 에틸아세테이트 분획물은 DPPH, ABTS 및 nitrite에 대한 RC₅₀값이 각각 72.2, 27.7 및 62.6 µg/ml를 나타내었으며, 상업용으로 사용되고 있는 항산화제인 vitamin C의 DPPH, ABTS 및 nitrite에 대한 RC₅₀값은 각각 8.6, 6.2 및 15.7 µg/ml로 계산되었다(Table 4). 항산화 활성이 강력하다고 보고된 블랙커런트 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 DPPH, ABTS 및 nitrite에 대한 RC₅₀값이 각각 136.3, 66.2 및 115.5 µg/ml임[11]을 고려하면 도토리 화분 활성 분획물이 정제되지 않은 상태임을 감안하면 상기 활성 분획물을 이용한 천연 항산화제 개발 가능성이 높음을 알 수 있었다. 통상 식물체의 항산화 활성은 폴리페놀 함량과 높은 상관관계를 보이는 것[30]을 고려할 때, 상기의 에틸아세테이트 분획물의 우수한 항산화 활성은 높은 폴리페놀 함량과 연관된 것으로 판단된다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 혈액응고 저해활성

도토리 화분 추출물 및 분획물을 대상으로 각각 TT, PT, aPTT를 측정하여 항응고 활성을 평가하였다. 먼저 임상에서 항혈전제로 사용되고 있는 aspirin은 1.5 mg/ml 농

Table 3. Anti-oxidation activities of the ethanol extract of acorn pollen and its subsequent organic solvent fractions

Acorn pollen extracts or fractions	Radical scavenging activity (%)			Reducing power Abs. 700 nm
	DPPH	ABTS	Nitrite	
Ethanol ex ¹	49.6±1.9 ^c	69.9±2.5 ^d	27.8±3.2 ^d	0.306±0.014 ^c
HF-AP ²	34.7±1.9 ^b	61.3±0.6 ^c	8.9±0.3 ^b	0.303±0.015 ^c
EF-AP ³	82.4±0.4 ^d	87.3±0.0 ^e	77.2±2.0 ^e	0.754±0.049 ^d
BF-AP ⁴	49.4±1.6 ^c	57.3±0.8 ^b	18.5±3.5 ^c	0.192±0.006 ^b
Water residue	0.8±0.0 ^a	6.3±0.5 ^a	6.5±1.3 ^a	0.043±0.005 ^a

¹ex: extract, ²HF-AP: Hexane fraction of the acorn pollen extract, ³EF-AP: Ethylacetate fraction of the acorn pollen extract, ⁴BF-AP: Butanol fraction of the acorn pollen extract. The concentrations used for DPPH, ABTS, and reducing power assay were 0.5 mg/ml, and nitrite scavenging activity assay was 0.2 mg/ml, respectively. Different superscripts within a column differ significantly ($p < 0.05$).

Table 4. Calculated RC₅₀ of the ethanol extract of acorn pollen and its subsequent organic solvent fractions

Acorn pollen extracts or fractions	Anti-oxidant activity (RC ₅₀ : µg/ml)		
	DPPH	ABTS	Nitrite
Ethanol ex ¹	503.8	267.4	446.8
HF-AP ²	695.9	338.3	2571.2
EF-AP ³	72.2	27.7	62.6
BF-AP ⁴	505.7	407.9	733.9
Water residue	-	-	-
Vitamin C	8.6	6.2	15.7

¹ex: extract, ²HF-AP: Hexane fraction of the acorn pollen extract, ³EF-AP: Ethylacetate fraction of the acorn pollen extract, ⁴BF-AP: Butanol fraction of the acorn pollen extract. Vitamin C was used as a positive control. - : Not Determined.

도에서 용매 대조구에 비해 TT는 1.45배, PT는 1.4배, aPTT는 1.64배 연장시켜 우수한 혈액 응고저해 활성을 나타내었다(Table 5). 한편 도토리 화분 추출물의 다양한 분획물의 경우 5 mg/ml 농도에서 트롬빈에 대한 유의적인 저해 활성은 인정되지 않았으나, 헥산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물에서 프로트롬빈 저해활성이 나타났으며, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물에서 혈액 응고인자 저해활성이 확인되었다. 그러나 이는 후생강 및 복분자 추출물에 비해 미약한 활성[12, 15]을 보였으며, 임상에서 항혈전제로 사용되고 있는 아스피린에 비해서도 미약하여 실제적인 항응고 효과를 기대할 수는 없었다. 반면 물 잔류물의 경우 5 mg/ml 농도에서 0.67배의 aPTT 감소를 나타내어 도토리 화분의 수용성 성분에 의한 혈액 응고 촉진현상이 나타날 수 있음을 확인하였다. 상기 결과는 도토리 화분 추출물 및 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물은 혈전 생성에는 영향을 미치지 않을 것으로 판단되며, 물 잔류물의 경우 내인성 혈액 응고반응을 활성화하여 혈전생성을 촉진할 수 있음을 제

시하고 있다[32]. 그러나 혈전 생성에 산화적 스트레스 [18, 19]와 니트로화[4] 반응이 관여되어 있으므로 항산화 활성 및 nitrite 소거능이 우수한 에틸아세테이트 분획물의 경우 활성성분의 단리 이후의 추가적인 항응고 활성 연구가 필요하다고 판단된다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 혈소판 응집 저해활성

도토리 화분 추출물의 분획물의 항혈전 평가를 위해 인간 혈소판 응집저해 활성을 평가하였으며, 그 결과는 Table 6 및 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 임상에서 혈소판 응집 저해제로 사용되고 있는 아스피린[29]은 0.25 및 0.125 mg/ml 농도에서 용매 대조구에 비해 각각 26.1%, 45.4%의 혈소판 응집율을 나타내어 농도 의존적인 혈소판 응집저해 활성을 나타내었다. 한편 도토리 화분의 분획물 중에서는 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 잔류물이 0.25 mg/ml에서 각각 48.3, 50.9, 59.1%의 응집도를 나타내어 아스피린 0.125 mg/ml에 필적하는 혈소판 응집저해 활성이 나타남을 확인하였다. 한편 헥산 분획물은 오히려 동일 농도에서 142.4%의 응집도를 나타내어 혈소판 응집 촉진활성을 보였다(Fig. 2E). 이러한 결과는 도토리 화분의 에탄올 추출물이 다양한 혈소판 응집촉진 및 응집저해 활성 물질을 동시에 함유하고 있으며, 활성물질의 분리 동정시에는 각각 응집촉진을 통한 지혈제, 응집저해를 통한 항혈전제로 개발 가능성을 제시하고 있다.

도토리 화분 추출물 및 분획물의 인간 적혈구 용혈활성

도토리 화분 분획물의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였으며, 결과는 Table 7에 나타내었다. 적혈구 용혈은 빈혈, 조직 사멸 및 혈전성 장애를 유발하며, 대표적으로 봉독의 melitin이 잘 알려져 있다 [2]. 먼저, 대조구로 사용된 DMSO는 용혈 활성이 없었으며, Triton X-100은 1 mg/ml 농도에서 적혈구를 100% 용혈

Table 5. *In-vitro* anticoagulation activity of the ethanol extract of acorn pollen and its subsequent organic solvent fractions

Acorn pollen extracts or fractions	Conc. (mg/ml)	Anti-coagulation (x-control)		
		TT	PT	aPTT
DMSO	1.5	1.00±0.07 ^a	1.00±0.01 ^a	1.00±0.01 ^b
Aspirin	5.0	1.45±0.02 ^c	1.40±0.00 ^c	1.64±0.05 ^c
Ethanol ex ¹	5.0	1.12±0.04 ^{ab}	1.03±0.08 ^a	1.08±0.03 ^b
HF-AP ²	5.0	1.04±0.11 ^a	1.22±0.01 ^b	1.16±0.26 ^b
EF-AP ³	5.0	1.02±0.06 ^a	1.21±0.00 ^b	1.05±0.28 ^b
BF-AP ⁴	5.0	1.07±0.01 ^{ab}	1.13±0.03 ^a	1.05±0.28 ^b
Water residue	5.0	0.97±0.03 ^a	1.11±0.10 ^a	0.67±0.13 ^a

¹ex: extract, ²HF-AP: Hexane fraction of the acorn pollen extract, ³EF-AP: Ethylacetate fraction of the acorn pollen extract, ⁴BF-AP: Butanol fraction of the acorn pollen extract. 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 (dimethylsulfoximide) were 24.0 sec, 18.6 sec and 40.5 sec, respectively. Different letters within a column differ significantly ($p<0.05$)

Table 6. Platelet aggregation activities of the ethanol extract of acorn pollen and its subsequent organic solvent fractions

Acorn pollen extracts or fractions	Conc. (mg/ml)	Amplitude (ohm)	Slope	Lag time (sec)	AUC ⁵	PAA ⁶ (%)
DMSO	-	24	5	28	193.2	100.0
Water	-	27	7	22	228.4	100.0
Aspirin	0.25	8	1	44	50.5	26.1
	0.125	13	2	35	87.8	45.4
Ethanol ex ¹	0.25	20	4	25	157.3	81.4
HF-AP ²	0.25	26	10	4	257.1	142.4
EF-AP ³	0.25	12	2	16	93.4	48.3
BF-AP ⁴	0.25	13	2	32	98.4	50.9
Water residue	0.25	14	3	32	114.2	59.1

¹ex: extract, ²HF-AP: Hexane fraction of the acorn pollen extract, ³EF-AP: Ethylacetate fraction of the acorn pollen extract, ⁴BF-AP: Butanol fraction of the acorn pollen extract. ⁵AUC: Area Under the Curve ⁶PAA: Platelet Aggregation Activity. Data are presented as representative result relative of independent three determinations. Amplitude was expressed as ohms by the maximum extent of platelet aggregation and slope (rate of reaction) was determined by drawing a tangent through the steepest part of the curve. AUC was calculated from the platelet aggregation curve.

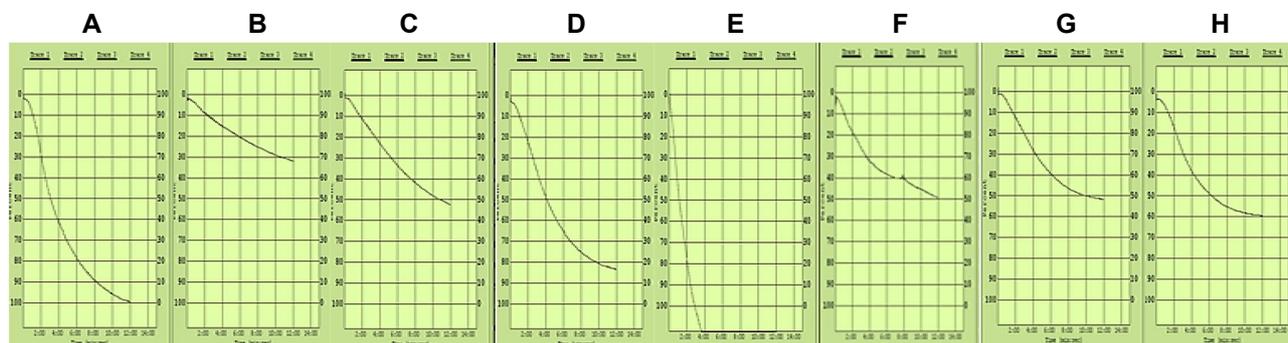


Fig. 2. Diagram of impedance changes during platelet aggregation after addition of aspirin and samples of acorn pollen in whole blood aggregometer. Symbols: (A) DMSO, (B) aspirin (0.25 mg/ml), (C) aspirin (0.125 mg/ml), (D) ethanol extract, (E) HF-AP, (F) EF-AP, (G) BF-AP and (H) water residue. The sample concentrations used were 0.25 mg/ml. Platelet aggregation was induced by addition of 2.5 μ l of collagen (1 mg/ml) into cuvette containing 50 μ l of washed PRP and measured the impedance change for 12 min.

Table 7. Hemolytic activities of the ethanol extract of acorn pollen and its subsequent organic solvent fractions against human red blood cells

Chemicals/Samples (mg/ml)	Conc. (mg/ml)	Hemolysis (%)
DMSO	0	0.0 \pm 2.5 ^b
Triton X 100	1.0	100.0 \pm 0.0 ^d
Ethanol ex ¹	1.0	-9.4 \pm 1.0 ^a
HF-AP ²	1.0	89.9 \pm 1.4 ^c
EF-AP ³	1.0	-1.3 \pm 0.8 ^b
BF-AP ⁴	1.0	-3.2 \pm 1.0 ^b
Water residue	1.0	-1.6 \pm 3.4 ^b

¹ex: extract, ²HF-AP: Hexane fraction of the acorn pollen extract, ³EF-AP: Ethylacetate fraction of the acorn pollen extract, ⁴BF-AP: Butanol fraction of the acorn pollen extract. 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. Different letters within a column differ significantly ($p < 0.05$)

시킴을 확인하였다. 도토리 화분 추출물 및 헥산 분획물을 제외한 다른 분획물은 시료 1 mg/ml 농도까지 용혈 활성이 전혀 나타나지 않았으나 헥산 분획물에서는 89.8%의 강력한 용혈 활성이 확인되었다. 특히 헥산 분획물의 경우 0.5 mg/ml 농도에서 53.5%의 적혈구 용혈 활성을 보여 급성독성 가능성을 확인하였다.

도토리 화분 에틸아세테이트 분획물의 flavonoid 및 phenolic acids 분석

항산화 활성 및 혈소판 응집저해 활성이 우수한 도토리 화분의 에틸아세테이트 분획물을 대상으로 flavonoid 및 phenolic acids 성분을 분석하였다. 그 결과 상기 에틸아세테이트 분획물에서 rutin, isoquercitrin, astragalgin, luteolin, hyperoside의 flavonoid와 4-hydroxybenzoic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid 및 syringic acid의 phenolic acids가 확인되었다(Table 8). 가장 높은 함

Table 8. Flavonoids and phenolic acids identified in the ethylacetate fraction of acorn pollen

Flavonoids	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Phenolic acid	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
Apigenin	-	4-Hydroxybenzoic acid	0.024
Astragalín	15.914	Caffeic acid	0.022
Hyperoside	0.839	Ferulic acid	0.003
Isoquercitrín	73.652	<i>p</i> -Coumaric acid	0.076
Kaempferol	-	Protocatechuic acid	-
Luteolin	1.662	Syringic acid	0.001
Orientin	-	Vanillic acid	0.169
Quercetin	0.234		
Quercitrín	-		
Rutin	1,192.70		
Vitexin	-		

량을 나타낸 성분은 rutin (1192.7 $\mu\text{g/g}$)이었으며, isoquercitrín (73.652 $\mu\text{g/g}$), astragalín (15.914 $\mu\text{g/g}$)도 상당량 확인되었다. 상기 3종 rutin, isoquercitrín, astragalín의 경우 이미 항산화, 항염증, 암세포 생육억제 및 항혈전 활성이 보고된 바 있다[9, 12, 14, 21]. 이상의 결과는 도토리 화분의 폴리페놀 고함유 에틸아세테이트 분획물은 항산화, 항혈전 기능성 소재로 개발가능함을 제시하고 있으며, 현재 도토리 화분으로부터 신규의 항산화, 항혈전 활성물질 분석이 진행중에 있다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 중점연구소 지원사업(NRF-2018R1A6 A1A03024862)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M. and Ahami, M. T. 2011. The antibacterial activity of moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Res. J. Microbiol.* **6**, 376-384.
- Askari, P., Namaei, M. H., Ghazvini, K. and Hosseini, M. 2021. *In vitro* and *in vivo* toxicity and antibacterial efficacy of melittin against clinical extensively drug-resistant bacteria. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **22**, 42.
- Bang, H. J. and Ahn, M. R. 2019. Antioxidant and antiangiogenic activities of bee pollen collected in various regions of Korea. *J. Apiculture* **34**, 87-97.
- Bijak, M., Nowak, P., Borowiecka, M., Ponczek, M. B., Zbikowska, H. M. and Wachowicz, B. 2012. Protective effects of (-)-epicatechin against nitrative modifications of fibrinogen. *Thromb. Res.* **130**, e123-128.
- Choi, J. H., Yim, G. Y., Jang, S. Y. and Jeong, Y. J. 2007. Inhibition effect of the harmful food-born microorganism on germination condition of acorn pollen. *Kor. J. Food Preserv.* **14**, 87-93.
- Fang, K., Wang, Y. N., Yu, T. Q., Zhang, L. Y., Baluska, F., Samaj, J. and Lin, J. X. 2008. Isolation of de-exined pollen and cytological studies of the pollen intines of *Pinus bungeana* Zucc. Ex Endl. and *Picea wilsonii* Mast. *Flora.* **203**, 332-340.
- Hong, I. P., Woo, S. O., Han, S. M., Kim, S. G., Jang, H. R., Lee, M. Y., Choi, Y. S., Kim, H. K. and Lee, M. L. 2015. Evaluation of total polyphenol, flavonoid and vitamin content from the crushed pollens of acorn and actinidia. *J. Apiculture* **30**, 225-229.
- Hong, I. P., Woo, S. O., Han, S. M., Yeo, J. H., Cho, M. R., Ju, W. T., Sim, H. S., Choi, Y. S., Kim, H. K., Lee, M. Y. and Lee, M. L. 2014. Morphology and antioxidant activity in pollens of Korean oak and darae (*Actinidia arguta*). *J. Apiculture* **29**, 137-142.
- Huang, S. H., Xu, M., Wu, H. M., Wan, C. X., Wang, H. B., Wu, Q. Q., Liao, H. H., Deng, W. and Tang, Q. Z. 2018. Isoquercitrín attenuated cardiac dysfunction via AMPK α -dependent pathways in LPS-treated mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **62**, e1800955.
- Kim, D. B., Shin, G. H., Lee, Y. J., Lee, J. S., Cho, J. H., Baik, S. O. and Lee, O. H. 2014. Assessment and comparison of the antioxidant activities and nitrite scavenging activity of commonly consumed beverages in Korea. *Food Chem.* **151**, 58-64.
- Kim, M. S. and Sohn, H. Y. 2016. Anti-oxidant, anti-coagulation, and anti-platelet aggregation activities of black currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Life Sci.* **26**, 1400-1408.
- Kim, M. S., Shin, W. C., Kang, D. K. and Sohn, H. Y. 2016. Anti-thrombosis activity of sinapic acid isolated from the lees of bokbunja wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 61-65.
- Kroyer, F. and Hegedus, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food

- supplement. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2**, 171-174.
14. Kumar, S., Prahalathan, P. and Raja, B. 2011. Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study. *Redox Rep.* **16**, 208-215.
 15. Lee, M. H., Sung, H. J., Kwon, C. S. and Sohn, H. Y. 2018. Anti-coagulation and anti-platelet aggregation activities of black ginger (*Kaempferia parviflora*). *J. Life Sci.* **28**, 1068-1075.
 16. Li, F., Yuan, Q. P. and Rashid, F. 2009. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge. *Carbohydr. Polym.* **78**, 80-88.
 17. Makhlof, F. Z., Squeo, G., Barkat, M., Trani, A. and Caponio, F. 2018. Antioxidant activity, tocopherols and polyphenols of acorn oil obtained from quercus species grown in Algeria. *Food Res. Int.* **114**, 208-213.
 18. Martinez, M., Weisel, J. W. and Ischiropoulos, H. 2013. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 411-418.
 19. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. and Lee, Y. C. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* **339**, 69-82.
 20. Matarrese, P., Straface, E., Pietraforte, D., Gambardella, L., Vona, R., Maccaglia, A., Minetti, M. and Malorni, W. 2005. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J.* **19**, 416-418.
 21. Michalcova, K., Roychoudhury, S., Halenar, M., Tvrda, E., Kovacikova, E., Vasicek, E., Chrenek, P., Baldovska, S., Sanislo, L., Kren, V. and Kolesarova, A. 2019. *In vitro* response of human ovarian cancer cells to dietary bioflavonoid isoquercitrin. *J. Environ. Sci. Health B.* **54**, 752-757.
 22. Papoti, V. T., Kizaki, N., Skaltsi, A., Karayannakidis, P. D. and Papageorgiou, M. 2017. The phytochemical rich potential of acorn (*Quercus aegilops*) products and by products. *Food Sci. Biotechnol.* **27**, 819-828.
 23. Pyo, S. J., Kang, D. G., Jung, C. and Sohn, H. Y. 2020. Anti-thrombotic, anti-oxidant and haemolysis activities of six edible insect species. *Foods* **9**, 401.
 24. Pyo, S. J., Jang, J. S. and Sohn, H. Y. 2020. Evaluation of anti-oxidant, anti-microbial and anti-diabetic activities of five different pollen. *J. Apiculture* **35**, 65-73.
 25. Pyo, S. J., Lee, Y. J. and Sohn, H. Y. 2020. Anti-thrombotic activities of different pollen from acorn, darea, multi-floral, pine tree and cattail. *J. Apiculture* **35**, 55-63.
 26. Pyo, S. J., Lee, Y. J., Park, S. I., Lee, C. I., Park, J. Y. and Sohn, H. Y. 2020. Evaluation of the anti-thrombosis activities of the aerial parts of *Sageretia thea*. *J. Life Sci.* **30**, 443-451.
 27. 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.
 28. 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. *Amer. J. Clin. Pathol.* **93**, 522-525.
 29. Szczeklik, A., Musial, J., Undas, A., Swadzba, J., Gora, P. F., Piwowarska, W. and Duplaqa, M. 1996. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 948-954.
 30. 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.
 31. Wang, J., Xiong, X. and Feng, B. 2014. Aspirin resistance and promoting blood circulation and removing blood stasis: Current situation and prospectives. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, 954863.
 32. Wang, L., Li, L., Wang, H. and Liu, J. 2017. Study on the influence of oxidative stress on the fibrillization of fibrinogen. *Sci. Rep.* **7**, 12429.
 33. Xu, J., Wang, X., Yue, J., Sun, Y., Zhang, X. and Zhao, Y. 2018. Polyphenols from acorn leaves (*Quercus liaotungensis*) protect pancreatic beta cells and their inhibitory activity against α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B. *Molecules* **23**, 2167.

초록 : 도토리 화분 추출물의 폴리페놀 고함유 분획물의 항산화 및 항혈전 활성이윤진¹ · 강덕경¹ · 표수진² · 손호용^{1*}(¹안동대학교 식품영양학과, ²리즈바이오텍)

도토리 화분은 국내에서 가장 많이 생산되는 단일 화분으로, 민간에서는 지혈, 빈혈방지, 전립선염 치료 등에 이용되어 왔다. 본 연구에서는 식물 화분을 이용한 기능성 식의약품 소재 개발 가능성을 검토하고자, 도토리 화분의 에탄올 추출물의 극성별 유기용매 분획물을 제조하고 이의 성분 분석, 항산화, 항응고, 혈소판 응집 저해활성 및 활성 분획물의 적혈구 용혈 활성을 평가하였다. 총 폴리페놀 함량은 도토리 화분 에탄올 추출물 중 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 225.0 mg/g을 나타내었다. 상기 에틸아세테이트 분획은 DPPH, ABTS 및 nitrite에 대한 RC_{50} 값이 각각 72.2, 27.7 및 62.6 $\mu\text{g/ml}$ 를 나타내어 강력한 항산화 활성을 보였다. 한편 도토리 화분의 항혈전 활성 평가를 위해 혈액응고저해 활성 평가 결과, 모든 분획물에서 5 mg/ml 농도까지 특이한 항응고 활성은 나타나지 않았다. 반면 혈소판 응집저해활성 평가 결과, 도토리 화분 추출물의 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 잔류물에서 우수한 응집저해가 나타났으나, 헥산 분획물에서는 오히려 응집촉진 효과를 나타내었다. 항산화 활성 및 혈소판 응집 저해활성이 우수한 도토리 화분 추출물의 에틸아세테이트 분획물은 1 mg/ml 농도까지 인간 적혈구 용혈활성이 없었으며, UPLC/MS/MS 분석결과 rutin, isoquercitrin 및 astragalinal이 주요 활성물질임을 확인하였다. 본 연구는 도토리 화분 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 이용한 새로운 항산화 및 항혈전제로 개발이 가능함을 제시하고 있다.