



## 도토리화분, 다래화분, 잡화분, 송화분, 부들화분의 항혈전 활성

표수진, 이윤진, 손호용\*

안동대학교 생명과학대학 식품영양학과

### Anti-thrombotic Activities of Different Pollen from Acorn, Darea, Multi-floral, Pine Tree and Cattail

Su-Jin Pyo, Yun-Jin Lee and Ho-Yong Sohn\*

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

#### Abstract

In this study, to develop high-value added products of pollen, anti-thrombosis and hemolytic activities of the pollen extracts were evaluated. Pollen of acorn (PA), darae (PD), mixed flower (PM), pine tree (PP) and cattail (PC) are nutritive and showed calories of 338 to 420 Kcal/100 g. The crude protein contents of pollen were varied from 17.4% (PP) to 35.6% (PD). Entomophilous pollen, such as PA, PD, and PM showed the higher protein content than anemophily fertilized pollen such as PP and PC. A large quantity of polyphenol and flavonoid was found in the hot water extracts of PC (HW-PC) and ethanol extract of PM (E-PM). The HW-PP, HW-PA and E-PM showed strong platelet aggregation inhibition activities, but the HW-PC and E-PC showed rapid and strong activation of platelet aggregation. Potent anti-coagulation activities of the E-PP and E-PC were identified with strong inhibitions of thrombin, prothrombin and coagulation factors. Also, potent hemolytic activities against human RBC of the E-PP and E-PC were observed. Our results suggest that anti-thrombosis and hemolytic activities of pollen are dependent on pollen of plant origins and extraction solvents. Further research on purification and characterization of active compounds and removal of hemolytic factors from pollen extracts are necessary.

#### Keywords

Anti-thrombosis, Anti-platelet, Pollen, Darae, Acorn, Multi-flower, Pine tree, Cattail

### 서론

국내 사망원인 중 1위는 암이며, 그 다음으로 심장 및 뇌혈관 질환으로 나타나고 있다. 인구 10만 명당 남자의 경우 103.6명, 여자의 경우 110.6명으로 성별 구분 없이 심장, 혈관계 질환은 현대사회의 주요 사망원인이며, 치료 및 재활의 어려움으로 사회적 부담이 증가되고 있는 실정이다(통계청, 2018).

혈액은 12만 km의 혈관을 따라 흐르면서, 산소, 영양분, 노폐물의 운반 기능, 체온, 삼투압, 수분 및 액성 조절 기능 및 생체방어 기능을 수행하는 생명현상의 필수적 인자

이다(김 등, 2014). 정상적인 혈액 순환을 위해서는 혈관의 건강성 및 탄력성이 유지되어야 하며, 출혈시 지혈을 위한 혈액응고 반응계와 생성된 혈전을 용해하는 혈전용해 반응계가 상호 보완적으로 작용하여야 한다(Sweeney *et al.*, 1990). 그러나 고지방의 서구화된 식사, 운동 부족, 과도한 스트레스 등에 의한 비정상적인 혈액응고 및 혈소판 응집이 나타나는 경우, 혈관내 혈전이 과도하게 생성되며, 이는 다양한 혈전성 질환 위험성을 증가시키게 된다(Eikelboom *et al.*, 2010). 현재 혈전성 질환의 예방과 치료에 아스피린, 헤파린, 쿠마린, 유로키네이즈 등의 다양한 항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제 등이 임상적으로 사

용되고 있으나 기존 항혈전제들은 가격이 매우 높으며, 출혈성 부작용, 위장장애, 과민반응 및 경구투여의 한계가 알려지면서 안정성이 확보된 천연 약용, 식용식물의 항혈전 활성에 관심이 증가되고 있는 실정이며, 혈관 내의 생성된 혈전을 용해하는 것보다 비정상적인 혈전 생성 자체를 억제하는 항혈전제 개발에 연구가 집중되고 있다(권 등, 2019; 성 등, 2019).

한편 화분은 종자를 만드는 유관속 식물의 생식 기관으로, 곤충, 바람, 물 등에 의해 운반되어 암컷 배우체에 도달하여 수정한 후 종자를 형성한다. 꿀벌 등의 곤충은 화분을 수집하여 타액, 꿀 등이 혼합된 덩어리 형태로 만들고, 이를 꿀벌의 유충 및 성충의 주요 먹이로 이용한다(홍 등, 2014). 화분은 우수한 영양성이 알려져 있으며, 식품, 의약품으로 이용되어 왔으며(Kroyer and Hegedus, 2001), 노화 억제 및 항산화(홍 등, 2014), 항균(최 등, 2007; Abouda *et al.*, 2011), 혈관신생 억제활성(방과 안, 2019), 면역증강 활성(Li *et al.*, 2009), 전립선염 개선(Fang *et al.*, 2008), 항당뇨 및 남성 성기능 개선 효과(Mohamed *et al.*, 2018) 등의 유용 생리활성이 보고되고 있다. 그러나 고부가가치 식의약품 소재로 이용하기 위해서는 인체에서 낮은 소화·흡수율, 일부 섭취자에서의 알러지 유발, 미생물 오염 및 부패 가능성 등의 해결해야 할 문제들이 남아 있다(Hong *et al.*, 2015).

본 연구에서는 화분의 고부가가치화를 위한 기초자료 확보를 위해 국내에서 식용 및 약용으로 판매되고 있는 3종의 층매화분(도토리화분, 다래화분, 잡화분) 및 2종의 풍매화분(송화분, 부들화분)의 영양성을 확인하고, 열수 및 에탄올 추출물을 조제하여 이들의 혈소판 응집저해 활성, 혈액응고 저해 활성, 적혈구 용혈활성을 비교 평가한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 화분 시료 및 시약

분석에 사용된 도토리화분, 다래화분 및 잡화분은 경북 안동에서 각각 2018년 4월, 2018년 6월 및 2018년 7월에 채취한 화분이며, 송화분(2018년, 경북 영천) 및 부들화분(2018년, 대전)은 시판 화분을 구입하여 사용하였으며,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관하면서 사용하였다. 실험에 사

용한 화분은 안동대학교 식품영양학과에 보관하고 있다(voucher specimen 2018-P1~5). 항혈전 활성평가에 사용한 혈장은 시판 control plasma (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)를 사용하였으며, PT reagent와 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)의 분석시약을 사용하여 측정하였다. 기타 시약은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 시약급 이상의 제품을 구입하여 사용하였다.

### 2. 화분의 영양성분 분석

5종 화분시료의 일반성분은 확립된 표준방법(AOAC, 1980)에 의하여 정량하였고, 수분함량은  $105^{\circ}\text{C}$  상압가열 건조법, 회분은  $550^{\circ}\text{C}$ 에서 직접 회화법으로, 조지방 함량은 soxhlet 추출법으로 측정하였다(박 등, 2016). 조단백질은 단백질 분석기(Foss Kjeltec 2460)를 이용하여 분석하였다. 시료에 황산 10 mL, 분해촉진제( $3.5\text{g K}_2\text{SO}_4 + 0.4\text{g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 2개를 넣고  $420^{\circ}\text{C}$ 의 분해장치에서 분해한 후 자동적정기에서 0.1 N HCl 용액을 이용하여 적정하였다. 적정 값은 공시험 값으로 보정하였으며, 질소계수는 6.25를 적용하였다. 탄수화물의 함량은 100에서 수분, 회분, 조지방, 조단백질 함량을 뺀 값으로 나타내었다.

### 3. 화분의 열수 및 에탄올 추출물 조제

화분 열수 추출물은, 화분 중량의 20배의 증류수를 가한 후,  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 추출한 후 추출액을 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)한 후 동결건조(Freeze dryer, FD5508, Ilshin Lab Co. Ltd, Korea)하여 분말로 조제하였다. 화분의 에탄올 추출물은, 화분 중량에 대해 10배의 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)을 가한 후 상온에서 3회 추출한 후 상기와 동일하게 감압농축하여 추출물을 조제하였다. 분말 시료들은 DMSO에 적당한 농도로 녹여, 성분 분석, 및 생리활성 평가에 사용하였다.

### 4. 혈소판 응집저해 활성

5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 혈소판 응집저해 활성은 Whole Blood Aggregometer (Chrono-

log, PA, USA)를 사용하여 impedance 법으로 평가하였다(Sweeney *et al.*, 1990). 먼저 인간 농축 혈소판(platelet rich plasma: PRP)을 전처리 및 수세한 후 최종 혈소판 농도가  $5 \times 10^8/\text{mL}$ 이 되도록 조정하여 사용하였으며, 응집 유도제로 collagen (1 mg/mL)을 사용하였다. 혈소판 응집 반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under를 측정하여 평가하였다(Kim *et al.*, 2016). 이때, amplitude (ohm)는 혈소판에 응집유도제를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집 정도를 나타내며, slope는 응집유도제를 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집 곡선의 기울기를 나타내며, area under는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는 것으로 전기저항 증가에 따른 slope 곡선의 하강면적을 의미한다. 혈소판 응집 저해 활성은 5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물 첨가시의 area under 값과 DMSO를 첨가한 용매 대조구의 area under 값의 비로 나타내었다(권 등, 2019).

### 5. 혈액응고 저해 활성

5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 항응고 활성은 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 각각 측정하여 평가하였다(Eikelboom *et al.*, 2010). TT는 37°C에서 thrombin (0.5 U, Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 50  $\mu\text{L}$ 와  $\text{CaCl}_2$  (20 mM) 50  $\mu\text{L}$ , 다양한 농도의 5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물 10  $\mu\text{L}$ 를 Amelung coagulometer (Amelung, Lemgo, Germany) 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다. PT 측정은 혈장 70  $\mu\text{L}$ 와 다양한 농도의 5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물 10  $\mu\text{L}$ 를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130  $\mu\text{L}$ 의 PT reagent를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다. 내인성 혈전 생성의 지표인 aPTT는, 표준혈장 70  $\mu\text{L}$ 와 다양한 농도의 5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물 10  $\mu\text{L}$ 를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65  $\mu\text{L}$ 의 aPTT reagent를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 65  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균치로 나타내었으며, 각각의 항응고 활성은 시료 첨가시의 응고 시간의 평균치를 무첨가시의 응고시간의 평균치의 비로 나타내

었다(Kim *et al.*, 2016).

### 6. 적혈구 용혈 활성

5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 인간 적혈구 용혈 활성은 PBS로 3회 수세한 적혈구 100  $\mu\text{L}$ 를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 추출물 100  $\mu\text{L}$ 를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100  $\mu\text{L}$ 를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%)를 사용하였으며, 적혈구 용혈을 위한 실험 대조구로는 Triton X-100 (1 mg/mL) 및 amphotericin B를 사용하였다. 용혈 활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다(성 등, 2019).

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

Abs. S: 시료 첨가구의 흡광도,

Abs. C: DMSO 첨가구의 흡광도,

Abs. T: Triton X-100 첨가구의 흡광도.

### 7. 기타 분석 및 통계처리

Total polyphenol (TP) 및 Total flavonoid (TF) 함량 측정은 기존의 보고된 방법(Singleton *et al.*, 1999)에 따라 측정하였으며, 각각 rutin과 tannic acid를 표준품으로 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을 이용하였으며, sucrose를 표준품으로 사용하였다(Pancham *et al.*, 2016). 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타낸 실험 결과는 SPSS 23.0 버전을 사용하여  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 나타내었으며, 각 군 간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 5종 화분의 영양적 특성

3종의 총매화분(도토리화분, 다래화분, 잡화분) 및 2종의 풍매화분(송화분, 부들화분)의 조단백, 조지방, 조탄수화물 및 회분 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 수분함량은 5.8% (다래화분)~12.5% (부

**Table 1.** General compositions of 5 different pollen

Pollen	Content (unit: % wet basis)					Calories (Kcal/100 g)
	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude carbohydrate	Ash	
Acorn	11.5	26.1	12.5	48.0	1.9	408.9
Darae	5.8	35.6	8.1	48.3	2.2	408.5
Mixed	6.2	21.2	10.6	59.8	2.2	419.4
Pine	7.6	17.4	8.4	63.4	3.2	398.8
Cattail	12.5	18.2	1.0	64.1	4.2	338.2

Darae: *Actinidia arguta*; Pine: pine tree; Cattail: *Typha augustifolia* L.

들화분)로 다양하였으며, 조단백 함량 역시 17.4% (송화분)~35.6% (다래화분)로 큰 차이가 나타났다. 화분의 조단백의 경우 기원식물, 채집시기 및 방법에 따라 차이가 있을 수 있으나(홍 등, 2013; 이와 안, 2019), 전체적으로 총매화분(도토리화분, 다래화분, 잡화분)이 풍매화분(송화분, 부들화분)보다 높게 나타났다. 한편 조지방 함량은 부들화분에서는 매우 낮은 1%를 나타내었으나, 기타 4종 화분은 8.1% (다래화분)~12.5% (도토리화분) 함량을 보였다. 회분(ash)의 경우 오히려 부들화분에서 가장 높은 4.2% 함량을 나타내었으며, 도토리화분(1.9%)에서 가장 낮은 함량을 보였다. 회분 함량은, 조단백 함량과는 반대로 풍매화분이 총매화분보다 높게 나타났다. 조탄수화물 함량은 다래 및 도토리화분에서 48.0~48.3%를 나타낸 반면, 풍매화분인 송화분 및 부들화분에서는 63.4~64.1%의 높은 함량을 나타내었다. 최종적으로, 도토리화분, 다래화분, 잡화분은 408.5~419.4 Kcal/100 g을, 송화분과 부들화분은 각각 398.8 및 338.2 Kcal/100 g의 상대적으로 낮은 열량을 나타내었다(Table 1). 이러한 결과는 기존의 다래화분 및 도토리화분의 영양성분 분석 결과와는 매우 유사하나(홍 등, 2013; 홍 등, 2015), 잡화분 분석 결과와는 다소 차이가 있었다(이 등, 1997).

## 2. 5종 화분의 혈소판 응집저해 활성

현재까지 화분 추출물의 혈소판 응집에 미치는 영향은 보고된 바 없다. 따라서 5종 화분 추출물의 혈소판 응집저해 활성을 평가하였다. 먼저 임상에서 혈소판 응집저해제로 사용되고 있는 아스피린은 0.25 및 0.125 mg/mL 농도에서 용매 대조구에 비해 각각 26.1 및 45.4%의 혈소판 응집율을 나타내어 농도 의존적인 강력한 혈소판 응집저

해 활성을 나타내었다(Table 2). 5종 화분의 열수 추출물(0.25 mg/mL) 중에서는 송화분 추출물에서 28.3%의 혈소판 응집이 나타나, 아스피린과 유사한 매우 강력한 응집저해 활성을 확인하였으며, 도토리화분에서도 81.0%의 응집율을 나타내어 혈소판 응집저해를 확인하였다. 특히 송화분의 열수 추출물은 동일농도(0.25 mg/mL)에서 흑마늘, 오미자, 우엉 뿌리, 모링가, 블랙커런트 및 천연 한방약재들의 추출물보다 강력한 혈소판 응집저해를 나타내었다(정과 손, 2014; 김 등, 2014; 김과 손, 2016; 김 등, 2017; 권 등, 2019). 반면 다래화분, 잡화분에서는 혈소판 응집에 미치는 영향이 미미하였으며 부들화분은 154.1% 응집을 보여 오히려 혈전생성을 촉진할 수 있음을 알 수 있었다.

5종 화분의 에탄올 추출물(0.25 mg/mL) 중에서는 도토리화분 및 잡화분 추출물에서 각각 81.4 및 81.2%의 응집율을 보여 혈소판 응집을 미약하게 저해하였으며, 다래화분, 송화분, 부들화분 추출물은 혈소판 응집을 오히려 촉진하였다(Table 2). 이러한 결과는 부들화분이 한방에서 혈전 생성을 촉진하는 지혈제로 사용(박 등, 2009; Yan *et al.*, 2017)되는 근거를 제시하고 있으며, 송화분의 열수 추출물은 아스피린 등의 기존 항혈전제가 나타내는 위장장애와 같은 부작용이 최소화된 혈소판 응집저해제로 개발 가능성을 의미하고 있다.

## 3. 5종 화분의 혈액응고 저해 활성

현재까지 부들화분의 혈액응고 촉진활성은 보고(Yan *et al.*, 2017)된 바 있으나, 다른 식물 유래 화분이 혈액응고 및 혈전 생성에 미치는 영향은 알려진 바 없다. 따라서 5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 혈액응고 저

**Table 2.** Effect of the hot water and ethanol extract of 5 different pollen on human platelet aggregation

Extract/Chemical	Conc. (mg/mL)	Amplitude (ohm)	Slope	Lag time (sec)	Area under	PAA <sup>1</sup> (%)
DMSO	–	24	5	28	194.7	100.8
	–	24	6	31	191.7	99.2
Aspirin	0.25	8	1	44	50.5	<b>26.1</b>
	0.125	13	2	35	87.8	<b>45.4</b>
Hot water	Acorn	0.25	23	5	185.1	<b>81.0</b>
	Darae	0.25	28	7	240.9	105.5
	Mixed	0.25	28	8	243.7	106.7
	Pine	0.25	8	2	64.6	<b>28.3</b>
	Cattail	0.25	28	9	297.7	154.1
Ethanol	Acorn	0.25	20	4	157.3	<b>81.4</b>
	Darae	0.25	28	8	260.3	134.7
	Mixed	0.25	19	4	156.8	81.2
	Pine	0.25	25	8	252.4	130.6
	Cattail	0.25	30	10	615.9	<b>318.8</b>

<sup>1</sup>PAA: Platelet Aggregation Activity. 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.

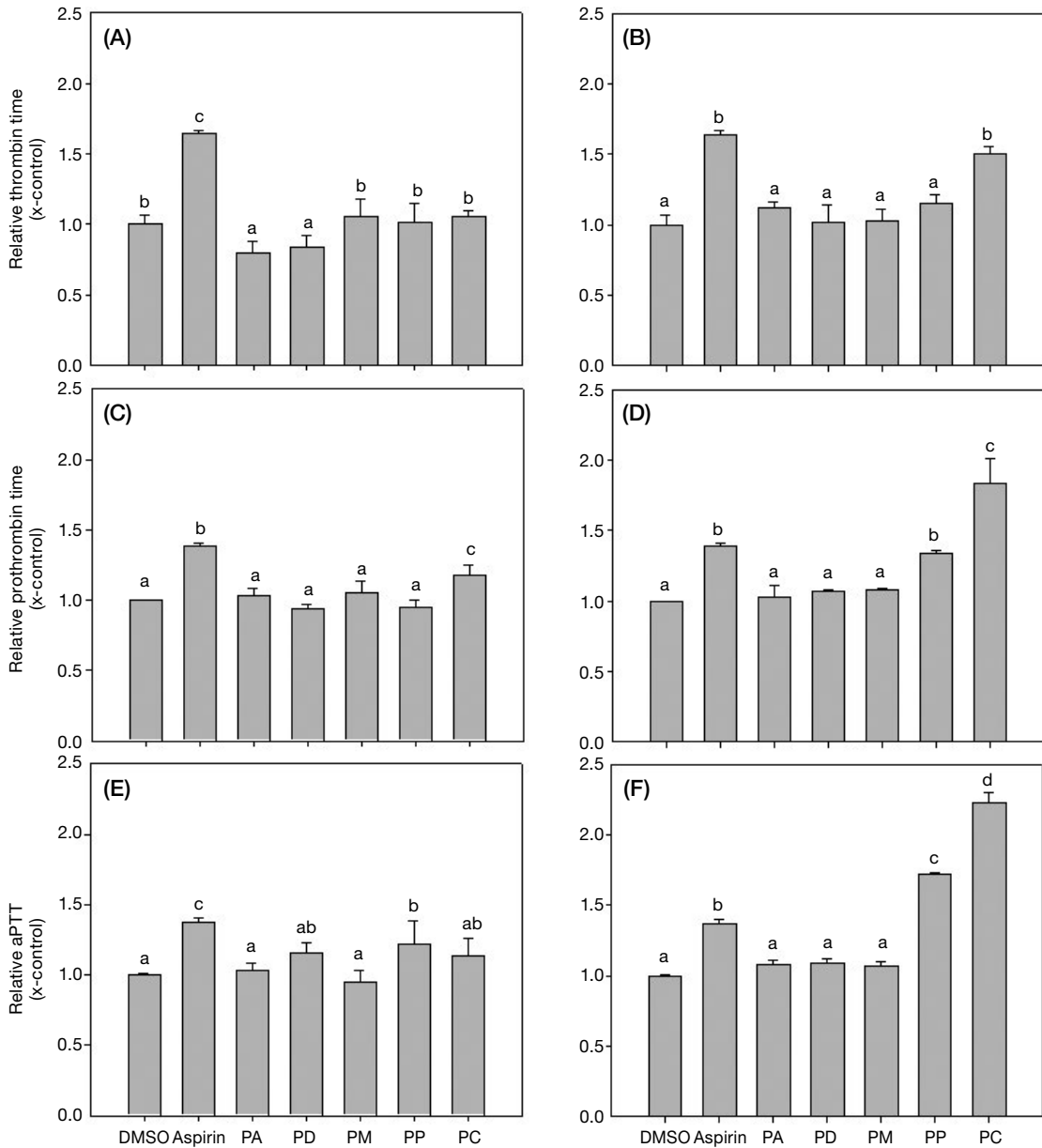
해 활성을 TT, PT, aPTT를 각각 측정하여 평가하였다. 먼저 활성 대조구인 aspirin은 1.5 mg/mL 농도에서 용매 대조구에 비해 TT, PT, aPTT를 각각 1.64, 1.39 및 1.37배 증가시켜 우수한 항응고 활성을 확인하였다. 화분 열수 추출물(5 mg/mL) 중에서는 도토리화분 및 다래화분 추출물의 경우 트롬빈 활성화에 의한 혈액응고 촉진이 확인된 반면, 기타 화분 추출물에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1A). 또한 PT 측정에서도 부들화분 추출물에서만 프로트롬빈 저해에 의한 항응고 활성이 나타났으며, 기타 화분 추출물은 영향이 미미하였다(Fig. 1C). 혈액응고인자에 미치는 영향을 aPTT 측정으로 평가한 결과, 송화분 추출물에서만 유의적인 항응고 활성이 인정되었다(Fig. 1E).

한편 5종 화분 에탄올 추출물(5 mg/mL) 중에서는 부들화분 추출물에서 유의적인 트롬빈 저해 활성이 확인되었으며(Fig. 1B), 송화분 및 부들화분 추출물에서 강력한 프로트롬빈 및 혈액응고인자의 저해가 나타났다(Fig. 1D, 1F). 따라서 송화분 및 부들화분 에탄올 추출물의 농도를 증가시켜 항응고 활성을 평가하였으며, 그 결과 상기 화분 추출물은 농도의존적으로 트롬빈, 프로트롬빈, 혈액응고인자의 저해를 나타냄을 확인하였다(Fig. 2). 특히 부들화분 에탄올 추출물은 7 mg/mL 농도에서 용매 대조구에

비해 TT, PT, aPTT를 각각 2.69, 2.09 및 3.38배 증가시켜 강력한 항응고 활성을 확인하였다. 이러한 항응고 활성은 흑마늘, 오미자, 우엉 뿌리, 모링가, 블랙커런트 등의 항응고 활성(정과 손, 2014; 김 등, 2014; 김과 손, 2016; 김 등, 2017; 권 등, 2019)과 비교할 만하며, 송화분 및 부들화분 추출물을 이용한 항응고제 개발이 가능함을 제시하고 있다. 그러나, 부들화분의 경우 강력한 혈소판 응집활성을 나타내면서, 한편 혈액응고 저해활성을 나타내므로 관련 활성물질의 분리 및 항혈전 기작 연구가 필요하리라 판단된다.

#### 4. 5종 화분의 유용 성분 분석

5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 항혈전 활성과 연관된 활성물질을 추측하기 위해, 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 총당 함량을 분석하였다. 총 폴리페놀의 경우 부들화분의 열수 추출물(29.1 mg/g), 잡화분의 에탄올 추출물(25.4 mg/g)에서 높은 함량을 보였으며, 총 플라보노이드의 경우 부들화분 열수 추출물(19.6 mg/g) 및 다래화분의 열수 추출물(15.3 mg/g)에서 높은 함량을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 추출용매에 따라 폴리페놀 및 플라보노이드 추

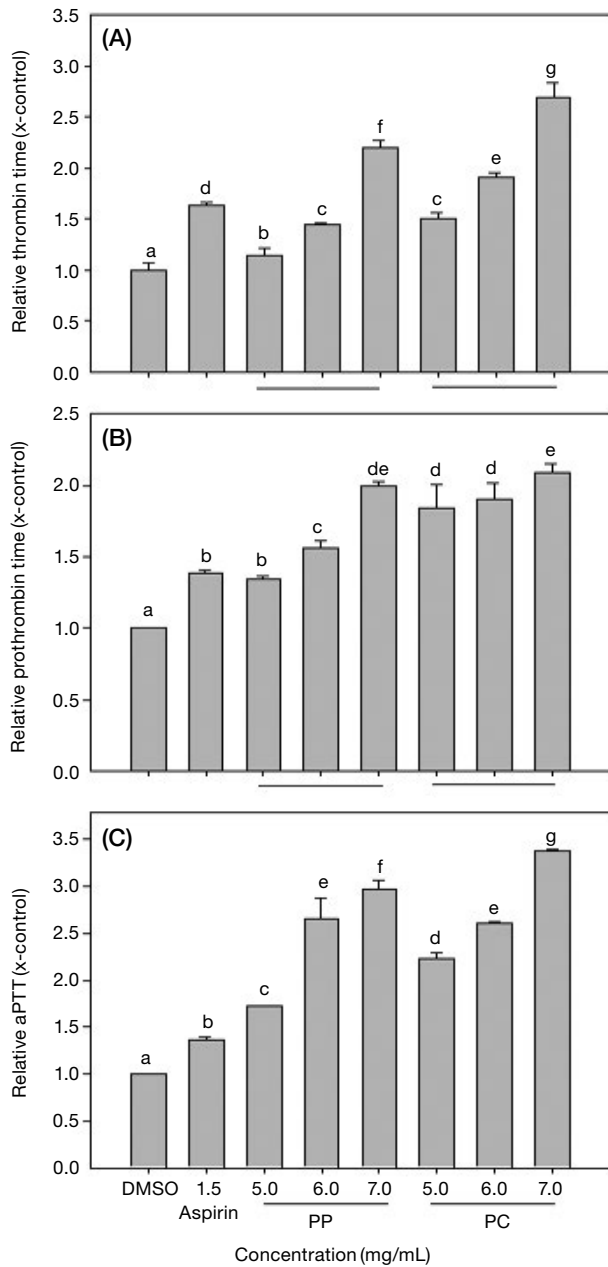


**Fig. 1.** Effect of the hot water and ethanol extract of 5 different pollen on blood coagulation. Anti-coagulation activity is calculated on the clotting time of sample divided by the clotting time of solvent control in blood coagulation assay. The thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) of solvent control (dimethylsulfoximide) were 26.8 sec, 20.1 sec and 83.5 sec, respectively. Data are means  $\pm$  SD of triplicate determinations. Different superscripts (a~d) within a panel differ significantly ( $p < 0.05$ ).

출수율이 달라지며, 화분의 경우 에탄올이 물보다 우수한 추출용매임을 의미한다(Hong *et al.*, 2015). 한편 총당은 총매화분인 도토리화분, 대래화분 및 잡화분의 열수 추출물에서 739~763 mg/g 함량을 보여 풍매화분인 송화분 및 부들화분보다 5.5~6.2배 높은 함량을 보였다. 이상의 결과는 화분의 항혈전 활성은 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드, 총당 함량과는 상관관계가 없음을 제시하고 있다.

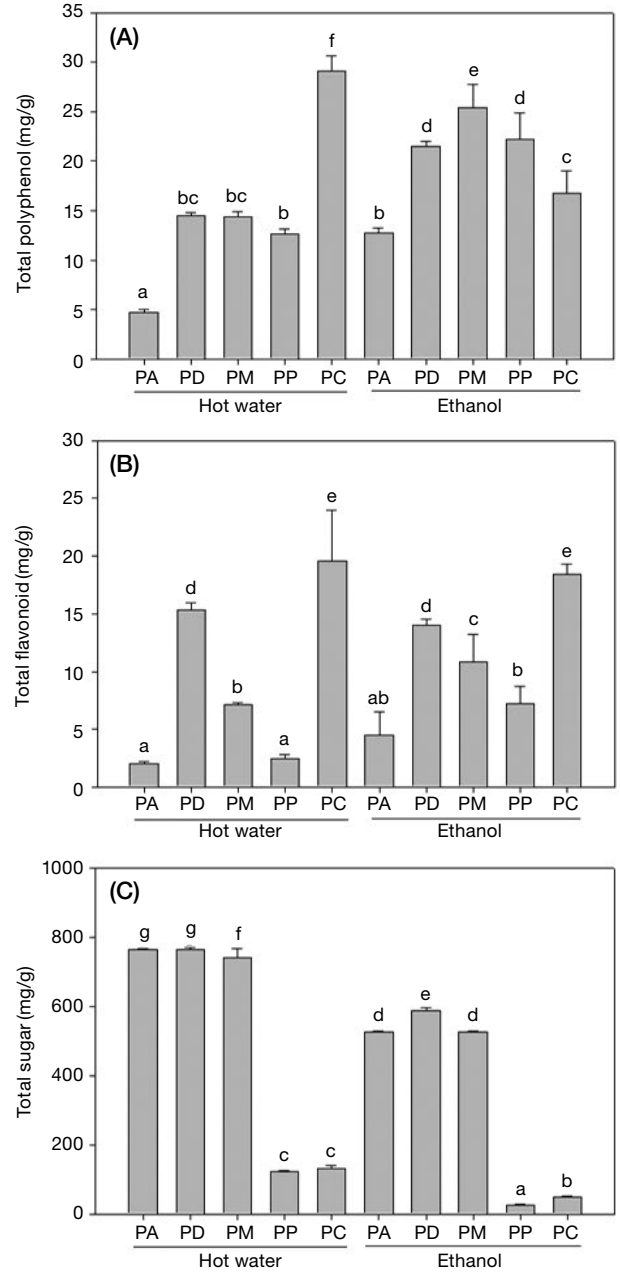
### 5. 5종 화분의 인간 적혈구 용혈 활성

화분의 항혈전제 개발 가능성을 검토하기 위해 5종 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 인간 적혈구 용혈 활성을 평가하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 먼저, 대조구로 사용된 DMSO와 물은 용혈 활성이 없었으며 Triton X-100은 1 mg/mL 농도에서 적혈구를 100%



**Fig. 2.** Concentration-dependent anti-coagulation activities of the ethanol extract of pine tree and cattail pollen. Different superscripts within a panel differ significantly ( $p < 0.05$ ).

용혈시킴을 확인하였다. 또한 항암제, 항진균제로 사용되고 있는 amphotericin B의 경우 0.025 mg/mL 농도에서 59% 이상 적혈구를 용혈시킴을 확인하였다. 5종 화분의 열수 추출물의 경우 1 mg/mL 농도까지 적혈구 용혈이 나타나지 않았으며, 도토리화분, 다래화분 및 잡화분의 에탄올 추출물에서도 용혈이 나타나지 않았다. 그러나, 송화분 및 부들화분의 에탄올 추출물의 경우 각각 96.3 및 82.7%



**Fig. 3.** Component analysis for the 5 different pollen extracts. Different superscripts within a panel differ significantly ( $p < 0.05$ ).

의 용혈활성이 나타났다. 따라서 송화분 및 부들화분을 이용한 항혈전제 또는 지혈제 개발을 위해서는 관련 활성 물질의 분리 및 용혈 활성인자의 제거가 필요하다고 판단된다. 이상의 결과는 식용으로 이용되고 있는 화분을 혈전증 치료 및 예방을 위한 식의약품 소재로 개발이 가능함을 제시하고 있다.

**Table 3.** Hemolytic activities of the hot water and ethanol extract of 5 different pollen against human red blood cells.

Extract/ Chemical	Conc. (mg/mL)	Amplitude (ohm)	
DMSO	-	0.0±2.4	
Triton X-100	1.0	100.0±0.1	
Amphotericin B	0.1	95.8±0.3	
	0.05	80.7±7.3	
	0.025	59.5±6.3	
	0.013	48.2±5.9	
	0.007	38.0±0.7	
	0.003	26.5±9.6	
Hot water	Acorn	1.0	-5.2±0.0
	Darae	1.0	-4.1±0.7
	Mixed	1.0	-6.1±0.4
	Pine	1.0	-6.5±0.4
	Cattail	1.0	-6.4±0.5
Ethanol	Acorn	1.0	-9.4±1.0
	Darae	1.0	-9.6±1.4
	Mixed	1.0	-9.4±0.6
	Pine	1.0	96.3±0.8
	Cattail	1.0	82.7±3.3

## 적 요

화분의 고부가가치화를 위해 국내 시판되는 도토리화분, 다래화분, 잡화분, 송화분 및 부들화분의 영양성을 평가하고, 화분의 열수 추출물 및 에탄올 추출물을 조제하여 이들의 혈소판 응집저해 활성, 항응고 활성, 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 화분 종류에 따라, 조단백 함량은 17.4% (송화분)~35.6% (다래화분)로 큰 차이가 있었으며, 총매화분(도토리화분, 다래화분, 잡화분)이 풍매화분(송화분, 부들화분)보다 높게 나타났다. 화분 함량은, 조단백 함량과는 반대로 풍매화분이 총매화분보다 높게 나타났다. 도토리화분, 다래화분, 잡화분은 408.5~419.4 Kcal/100 g, 송화분과 부들화분은 각각 398.8 및 338.2 Kcal/100 g의 열량을 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 부들화분의 열수 추출물(29.1 mg/g) 및 잡화분의 에탄올 추출물(25.4 mg/g)에서 높았으며, 총 플라보노이드의 경우 부들화분 열수 추출물(19.6 mg/g) 및 다래화분의 열수 추출물(15.3 mg/g)에서 높은 함량을 나타내었다. 혈소판 응집저해 평가 결과, 송화분 및 도토리화분 열수 추출물과 도

토리화분 및 잡화분 에탄올 추출물에서 응집저해가 우수하였다. 반면 부들화분 추출물은 강력한 응집촉진 활성을 보여 지혈제로 사용되는 근거를 확인하였다. TT, PT, aPTT로 확인한 항응고 활성평가에서 송화분 및 부들화분 열수 추출물에서 약한 항응고 활성이 나타난 반면, 송화분 및 부들화분 에탄올 추출물은 농도 의존적인 우수한 항응고 활성을 나타내었다. 적혈구 용혈활성은 도토리화분, 다래화분, 잡화분에서는 1 mg/mL 농도까지 전혀 나타나지 않았으며, 송화분 및 부들화분의 에탄올 추출물에서 각각 96.3 및 82.7%의 용혈활성이 나타났다. 본 연구 결과는, 다양한 화분 추출물은 화분 종류와 추출용매에 따라 항혈전 활성, 혈전생성 촉진(지혈) 활성 및 용혈활성에서 상반된 활성을 나타냄을 제시하고 있으며, 화분을 혈전증 치료 및 예방을 위한 식의약품 소재로 개발하기 위해서는 관련 활성물질의 분리, 정제 및 용혈활성 인자의 제거가 필요함을 제시하고 있다.

## 감사의 글

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

## 인용 문헌

- 권정숙, 성화정, 손호용. 2019. 모링가 지하부의 항혈전 활성. 한국미생물생명공학회지 47: 20-24.
- 김미선, 성화정, 박종이, 손호용. 2017. 오미자 열매, 씨, 착즙후박의 항산화, 항균 및 항혈전 활성 평가. 생명과학회지 27: 131-138.
- 김미선, 손호용. 2016. 블랙커런트의 항산화, 항응고 및 혈소판 응집저해활성. 생명과학회지 26: 1400-1408.
- 김미선, 이예슬, 손호용. 2014. 우엉 뿌리의 항혈전 및 항산화 활성. 한국식품저장유통학회지 21: 727-734.
- 대한민국 통계청. 2018. 국내 사망원인.
- 박성진, 한경순, 유선미. 2016. 산사 영양성분 분석 및 생리활성 탐색. 한국식품영양학회지 25: 413-418.
- 박혜민, 구자형, 오만진. 2009. 부들 화분 혈전 용해효소의 정제와 특성. Korean J. Agricultural Sci. 36: 111-122.
- 방호정, 안목련. 2019. 국내산 화분(Bee pollen)의 항산화 및 혈관신생 억제 활성. 한국양봉학회지 34: 87-97.
- 성화정, 표수진, 박종이, 손호용. 2019. 표고버섯 수확후 배지의 유용생리활성 평가. 생명과학회지 29: 164-172.



- 이길란, 안목련. 2019. 국내산 화분(Bee pollen)의 특성 및 영양 성분 분석에 관한 연구. 한국양봉학회지 34: 73-86.
- 이부용, 최희돈, 황진봉. 1997. 국내산 화분 및 화분 추출물의 성분 분석. 한국식품과학회지 29: 869-875.
- 정인창, 손호용. 2014. 흑마늘의 항산화, 항균 및 항혈전 활성. 한국미생물생명공학회지 42: 285-292.
- 최준혁, 임가영, 장세영, 정용진. 2007. 도토리 화분의 발아 조건에 따른 식품유해균 억제효과. 한국식품저장유통학회지 14: 87-93.
- 홍인표, 우순옥, 한상미, 김세건, 장혜리, 이만영, 최용수, 김혜경, 이명렬. 2016. 벼화분의 영양학적 가치 및 항산화 활성. 한국양봉학회지 31: 219-225.
- 홍인표, 우순옥, 한상미, 김세건, 장혜리, 최용수, 김혜경, 이명렬, 이만영. 2015. 동결건조를 이용한 다래화분의 영양성분 추출효과. 한국양봉학회지 30: 87-94.
- 홍인표, 우순옥, 한상미, 여주홍, 조미란, 주완택, 심하식, 최용수, 김혜경, 이명렬, 이만영. 2014. 도토리화분과 다래화분의 형태 및 항산화 활성. 한국양봉학회지 29: 137-142.
- 홍인표, 우순옥, 한상미, 이미경. 2017. 메밀화분의 성분 특성 및 항산화 활성. 한국양봉학회지 32: 261-268.
- 홍인표, 이만영, 우순옥, 심하식, 최용수, 한상미, 김혜경, 변규호, 이명렬, 김정봉. 2013. 도토리화분과 다래화분의 일반성분, 지방산 분석 및 형태 관찰. 한국잡사곤충학회지 51: 119-122.
- Abouda, Z., I. Zerdani, I. Kalalou, M. Faid and M. T. Ahami. 2011. The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. Res. J. Microbiol. 6: 376-384.
- Eikelboom, J. W., S. L. Zelenkofske and C. P. Rusconi. 2010. Coagulation factor IXa as a target for treatment and prophylaxis of venous thromboembolism. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 30: 382-387.
- Fang, K., Y. N. Wang, T. Q. Yu, L. Y. Zhang, F. Baluska, J. Samaj and J. X. Lin. 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.
- Geng, Y., L. Xing, M. Sun and F. Su. 2016. Immunomodulatory effects of sulfated polysaccharides of pine pollen on mouse macrophages. Int. J. Biol. Macromol. 91: 846-855.
- Hong, I. P., S. O. Woo, S. M. Han, S. G. Kim, H. R. Jang, M. Y. Lee, Y. S. Choi, H. K. Kim and M. L. Lee. 2015. Evaluation of total polyphenol, flavonoid and vitamin content from the crushed pollen of acorn and actinidia. Korean J. Apiculture 30: 225-229.
- Kim, M. S., W. C. Shin, D. K. Kang and H. Y. Sohn. 2016. Anti-thrombosis activity of sinapic acid isolated from the lees of bokbunja wine. J. Microbiol. Biotechnol. 26: 61-65.
- Kroyer, F. and N. Hegedus. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2: 171-174.
- Li, F., Q. P. Yuan and F. Rashid. 2009. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge. Carbohydrate Polymers 78: 80-88.
- Mohamed, N. A., O. M. Ahmed, W. G. Hozayen and M. A. Ahmed. 2018. Ameliorative effects of bee pollen and date palm pollen on the glycemc state and male sexual dysfunctions in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. Biomed. Pharmacol. 97: 9-18.
- Pancham, A., S. L. Godara and M. A. K. Bilma. 2016. Study of biochemical changes viz., total sugars (reducing and non-reducing), proteins and phenols in dry root infected groundnut plant. Annal. Biol. 32: 188-192.
- Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299: 152-178.
- Sweeney, J. D., L. A. Hoerning, A. N. Behrens, E. Novak and R. T. Swank. 1990. Thrombocytopenia after desmopressin but absence of in-vitro hypersensitivity to ristocetin. Amer. J. Clin. Path. 93: 522-525.
- Yan, X., Y. Zhao, J. Luo, W. Xiong, X. Liu, J. Cheng, Y. Wang, M. Zhang and H. Qu. 2017. Hemostatic bioactivity of novel pollen *Typhae carbonisata*-derived carbon quantum dots. J. Nanobiotech. 15: 60.