J of Oriental Neuropsychiatry 2012:23(1):115-130
Original article
http://dx.doi.org/10.7231/JON.2012.23.1.115

백단향추출물의 항산화, 항혈소판 응집 및 혈전 용해능에 관한 연구

송영위, 이지현, 송규주, 구병수, 김근우

동국대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

Preventive Effects of Santalum album L. Extracts on Oxidation, Platelet Aggregation and Thrombosis

Yung-Wei Sung, Jihyun Lee, KyooJu Song, Byung-Soo Koo, Geun-Woo Kim

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

Abstract

Objectives :

To evaluate the in vitro scavenging activity, inhibitory effect of LDL oxidation of pro-oxidant reactive species, anti-platelet aggregative effects and anti-thrombosis effects in response to treatment with SA using various screening methods including biological and non-biological oxidants.

Methods :

The antioxidant activity concerning extract from SA was studied with in vitro methods by measuring the antioxidant activity by TEAC, measuring the scavenging effects on reactive oxygen species (ROS) [superoxide anion, hydroxyl radical] and on reactive nitrogen species (RNS) [nitric oxide and peroxynitrite] as well as measuring the inhibitory effect on Cu^{2+}-induced human LDL oxidation and the inhibitory effect on thrombin-induced platelet aggregation and thrombosis.

Results :

SA extracts were found to have a potent scavenging activity regarding oxidative stress as well as an inhibitory effect towards LDL oxidation, platelet aggregation, and thrombosis.

Conclusions :

The SA extracts have anti-oxidative and anti-atherosclerotic effects in vitro system, which can be used for developing pharmaceutical drugs against oxidative stress and atherosclerosis.

keywords :

Santalum album L., Oxidation, Platelet aggregation, Thrombosis

투고일 : 2012.03.05 수정일 : 2012.03.12 채택일 : 2012.03.14

교신저자 : 구병수, 경기도 고양시 일산구 식사동 814번지 동국대학교 일산한방병원 한방신경정신과
Tel : 031-961-9140, Fax : 031-961-9009, E-mail : koobs@dongguk.ac.kr

이 논문은 2011년 7월 동국대학교 한의학과 신경정신과학전공 석사학위 논문임

I. 서론

현대인의 서구화된 식생활, 흡연, 각종 환경오염물질, 알코올, 약물, 방사선 등 물리·화학적 요인들에 의해 발생하는 체내 활성 산소종의 과다 생성은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 동맥경화, 심근경색, 심장마비 등의 심혈관계 질환, 혈관성 치매, 뇌졸중 및 말초혈관계 질환 등 혈액 순환기계 질환의 발병률을 증가시키고 있는 실정이다[1-3].

순환계 질환을 효과적으로 예방하기 위해서는 LDL (low density lipo-protein; 저밀도 지질단백질) 산화가 매개되어 생성되는 지방반(fatty streak)의 축적을 막아야 하며[4], 혈중 콜레스테롤 조절, 혈소판의 불활성화, 혈액 응고의 억제, 혈관 평활근세포 증식 억제 및 항산화 활성 등이 요구 된다[5]. 또한 혈관 내의 혈전(fibrin clot)은 동맥경화를 비롯한 심혈관질환의 주요 원인이 되며 혈전의 제거는 심혈관질환의 예방과 치료에 중요한 요소이다.[6]

혈전증의 경우 혈전형성을 방지하기 위해 항 혈전제제가 필요하고, 이미 형성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전 용해제가 요구되어 진다[7].

韓醫學에서 혈전은 瘀血의 개념으로서 그 효시는 《內經》의《素問·調經論》에서 "氣血不和, 百病乃變化而生"《素問·脈要精微論》에서 "脈者血之府, 澁則心痛"[8]라 하여 이는 정상적인 생리기능을 상실한 혈액이 凝聚하여 형성된 일종의 病理産物이다. 氣虛, 氣滯, 血熱, 血寒 및 外傷또는 기타 원인으로 발생되며, 일반적으로 固定性刺痛, 腫塊, 出血, 舌質紫暗, 皮膚甲錯, 瘀斑, 脈澁 등의 증상이 나타난다.[9] 또한 瘀血에 대한 명칭이 매우 많아 滯血, 留血, 閉血, 蓄血, 乾血, 老血, 死血, 敗血, 惡血 및 賊血 등이라고 부른다.[10]

천연물인 백단향(白檀香, *Santalum album* L., SA)은 味는 辛하고, 性은 溫하며, 3~5%의 白檀油를 함유하고 있다. 臨床에서는 관상동맥경화증이 氣滯血瘀로 된 證에 常用하여 치료하고 있다.[11]

최근 김[12]은 추출방법에 따른 백단향의 미백효과 및 세포 독성을 연구한 결과는 있으나, 항산화 효과 및 LDL 산화억제효과를 *in vitro*에서 관찰한 연구는 없어, 이에 대한 혈소판 응집 저해 및 혈전 용해 효과에 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 시약

Gallic acid (GA), aspirin, potassium persulfate, ascorbic acid (AA), butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6$), nitro blue tetrazolium (NBT), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), hypoxanthine, xanthine oxidase, sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), hydrogen peroxide (H_2O_2), ferrous sulfate ($FeSO_4$), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), sodium nitroprusside (SNP), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), copper (II) sulfate ($CuSO_4$), glucose, 및 gelatin은 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)와 6-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였으며, Agarose와 Coomassie brilliant blue R-250은 Promega (Madison, WI, USA)에서, Peroxynitrite는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. 2,2'-azinobis-(3- ethylbenzothiazoline-6- ulphonate) (ABTS), sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl),

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, human low-ensity lipoprotein (LDL), fibrinogen, human plasma thrombin, naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), ethanol (E), hexane (H), dichloromethane (DCM), ethylacetate (EA) 및 butanol (B) 은 Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2) 시료 및 시료의 제조

본 실험의 시료로 사용한 백단향(白檀香, *Santalum album* L.; SA)은 서울 거평약업사(2008년 중국산)에서 구입한 후 수치하여 사용하였다.

① 백단향추출물(SA extracts)

시료 300 g에 3 L의 70% Ethanol을 첨가하여 1차 12 hr, 2차 6 hr, 3차 3 hr 동안 실온에서 교반 추출한 뒤 110 mm-pore-size filter를 통해 여과하였다. 이를 rotary vaccum evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland)로 감압 농축한 뒤 동결건조 하여 동결건조분말 시료 10.4 g을 얻었다(수율: 3.47%).

② 백단향 계통분획물의 제조

백단향추출물은 hexane: 70% ethanol extract : H_2O(10:9:1, v/v/v)로 분획하여 hexane 추출물을 얻은 후, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 aqueous의 순으로 계통 분획하여 감압 농축하였다. 이때의 용매 획분별 수율은 hexane extract(H) 1.29%, dichloromethane extract(DCM) 0.33%, ethylacetate extract(EA) 0.10%, butanol extract (B) 0.12%, aqueous extract(A) 0.02%였다.

2. 방법

1) Total phenolics의 측정

백단향 추출물 및 용매별 계통분획물의 Total phenolic compounds 함량은 Folin-Ciocalteus reaction[13]에 의해 gallic acid를 표준품으로 하여 측정하였다. 40 μL의 백단향 추출물 (1 mg/mL)을 200 μL의 Folin-Ciocalteus reagent, 1160 μL의 3차 증류수와 혼합하였다. 혼합물은 3 분간 실온에 방치한 후, 600 μL의 20% sodium carbonate 를 첨가하였다. 실온에서 2 h 동안 shaking한 후, microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total phenolic compounds 함량은 gallic acid equivalents (μg of GA eq/mg)로 나타내었다.

2) TEAC assay에 의한 항산화효과의 측정

백단향추출물 및 용매별 계통분획물의 TEAC 값은 Roberta와 Miller 등[14,15]의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 10 μL의 백단향 추출물 희석용액(2,500 μg/mL) 또는 Trolox standard에 $ABTS^{+}$ 용액 1.0 mL를 첨가하여 1분 후 UV/Visible spectrophotometer (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 6분간 monitoring하였고 1 mM Trolox와 비교하여 흡광도의 저해 백분율(%)을 구한 후 mM trolox equivalents로 나타내었다.

3) DPPH assay에 의한 유리기 소거효과의 측정

백단향의 유리기 소거 효과는 Blois에 의한 방법[16]에 따라 측정하였다. 즉, DPPH (α,α'-diphenyl-β-picryl-hydrazyl) 16 mg을 100 mL의 Ethanol에 녹인 후 100 mL의 증류수를 혼합하여 여과지로 여과한 후 이 여액 2.5 mL에 일정농도의 백단향추출물 0.5 mL을 혼합한 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 528nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

4) NBT assay에 의한 superoxide anion 소거효과의 측정

백단향추출물 및 용매별 계통분획물의 super-

oxide anion 소거 효과는 Gotoh와 Niki의 방법[17]에 따라 측정하였다. 시험관에 30㎕의 백단향추출물, 30 mM의 EDTA (pH 7.4), 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 및 1.42 mM nitro blue tetrazolium (NBT)을 각각 100 ㎕, 10 ㎕, 200 ㎕ 첨가하여 강하게 교반하였다. 상온에서 3분간 반응시킨 혼합물에 0.5 U/mL xanthine oxidase 100 ㎕를 첨가한 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 최종 부피를 3 mL로 조정하였다. 이를 다시 상온에서 20분간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) DCFDA assay에 의한 hydroxyl radical 소거효과의 측정

백단향의 ·OH의 제거능을 측정하기 위하여 6-carboxy-2′,7′-dichlorodihydo- fluorescein diacetate (DCFH-DA) 측정방법[18]을 사용하여 측정하였다. 지용성DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 ′,7′-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 탈아세틸화 되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 일정 농도의 백단향추출물 10 ㎕와 menadione 10 ㎕를 넣고 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 130 ㎕를 넣은 후 ·OH를 생성시킨 후, 125 ㎕M DCFDA에 esterase를 넣어 바꾼 DCFDA를 50 ㎕ 첨가하여 60분간 생성된 형광의 변화를 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

6) DAF-2 assay에 의한 NO radical 소거효과의 측정

백단향추출물 및 용매별 계통분획물의 NO radical 소거 효과는 DAF-2 assay[19]를 이용하여 측정하였다. 특이적인 NO의 indicator인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO양에 의존한다. 1mg의 DAP-2를 550 ㎕의 DMSO에 녹인후, 이것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1 : 400배로 희석하였다. NO 제공물질인 SNP와 DAF-2를 96 well plate에 첨가하였으며, DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 excitation wave length 485 nm 및 emission wave length 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

7) DHR 123 assay에 의한 peroxynitrite 소거효과의 측정

백단향추출물 및 용매별 계통분획물의 peroxynitrite 소거 효과는 Crow의 방법[20]에 따라 측정하였다. 즉, 96-well microplate에 백단향 추출물을 농도별로 취하고 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 ㎕M diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 ㎕M DHR 123를 함유하는 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 가하였다. 이에 10 ㎕M peroxynitrite를 첨가한 후 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) 이용하여 excitation 500 nm, emission 536 nm에서 측정하였다. $ONOO^-$ 생성원으로는 시판되는 peroxynitrite를 직접 사용하여 생성되는 superoxide anion과 nitric oxide의 반응으로 발생하는 $ONOO^-$의 제거 활성능을 검토하였다.

8) Relative electrophoretic mobility (REM) assay

산화된 LDL의 전기적 이동 특성을 이용한 REM

assay는 agarose gel 상에서 측정이 가능하며 이는 다음과 같은 방법으로 실시되었다[21]. Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)에 녹인 LDL (120 μg/mL)을 50 μg/mL의 PR 추출물, 10 μM $CuSO_4$와 혼합하여 37℃에서 12 시간동안 인큐베이션 한 후, 0.7% agarose gel에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, and 1mM EDTA)에서 85 V로 1시간 동안 전기 영동하였다. Gel은 건조하여 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하였고, 샘플의 inhibition ratio (%)는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{migration distance of ox LDL-migration distance of s LDL}}{\text{migration distance of ox LDL-migration distance of n LDL}} \times 100$$

ox LDL: oxidized LDL, s LDL: sample LDL, n LDL: native LDL

9) 혈소판 응집 억제의 측정

백단향의 혈소판 응집 억제를 검색하기 위하여 Chlono Log 사의 aggregometer (Havertown, PA, USA)를 이용하여 혈소판 응집 억제활성을 impedance 법으로 측정하였다. 먼저, 3.8% sodium citrate 항응고제가 포함되어 있는 Becton Dicknson 사의 vaccutainer (Mountain View, CA, USA)를 이용하여 건강한 성인으로 부터 혈액을 채혈한 후, 1,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액 (platelet rich plasma, PRP)을 분리하여 2,300 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 침전물(platelet rich pellet)을 washing buffer (pH 6.5)로 두 번 세척하고, 2,300 rpm에서 10분간 재원심분리 하였다. 상등액(platelet poor plasma, PPP)을 제거한 후, suspending buffer (pH 7.4)로 부유하여 2,300 rpm으로 10분간 세정함으로써 혈소판(washed platelet)을 조제하였다. 혈소판 수를 광학 현미경으로 계측하여 혈소판 수가 $4\sim5\times10^8$ cells/mL가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. Washing buffer의 조성은 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaH_2CO_3, 0.36 mM NaH_2PO_4, 5.5 mM glucose 및 1 mM EDTA이며, suspending buffer의 조성은 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaH_2CO_3, 0.36 mM NaH_2PO_4, 5.5 mM glucose, 0.49 mM $MgCl_2$ 및 0.25% gelatin이다. Cuvette에 PRP 400 μL, agonist (collagen) 50 μL, sample 10~50 μL를 넣고, 항 혈소판응집 효과를 평가하였다. 혈소판 활성화 억제작용은 0.5 U thrombin으로 유도된 aggregation (%)을 대조군 (A)으로, 백단향추출물을 전처리한 후 thrombin으로 유도된 aggregation (%)을 시료군 (B)으로 하여 다음 계산식에 따라 inhibition (%)로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{A-B}}{\text{A}} \times 100$$

A: control aggregation (%), B: sample aggregation (%)

10) Fibrinolytic clear zone의 측정

백단향추출물의 혈전에 대한 분해활성은 human fibrin plate를 이용하여 측정하였다. 60 mm petri dish에 thrombin 용액 (50 unit/mL)을 25 μL 주입한 후, 여기에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)에 0.5% (w/w)가 되도록 녹인 플라즈미노겐 용액 1.25 mL를 주입하고 잘 섞어주었다. 피브린이 굳을 때까지 실온에서 30분간 방치하여 피브린 판을 제작하였다. 제작된 피브린 판의 중앙에 백단향추출물 0.2 mg/mL을 놓고 37℃에서 24 시간동안 반응을 행하며 lysis zone의 생성을 관찰하였다.

11) 통계처리

통계 분석은 SPSS version 14.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) program을 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 산출하고 군 간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 $p<0.05$에서 유의한 차이가 있는 경우, Tukey test를 이용하여 다중 비교하였다.

III. 결과

1) Yield of fraction and total phenolic compounds.

백단향 70% ethanol (E) 추출물의 수율은 10.40 g/300 g 로 3.47%였으며, 용매별 분획물의 경우 H층 (1.29%)〉 DCM층 (0.33%)〉 B층 (0.12%)〉 EA층 (0.10%)〉 A층 (0.02%)의 순으로 나타났다 (Table I).

Folin-Ciocalteu reagent method에 의해 측정한 白檀香의 total phenolics 함량은 223.48 μg GA eq/mg (DCM층)에서 66.48 μg GA eq/mg (A층)의 범위였고, DCM, EA, E, H, B, A층 순으로 함량 감소가 나타났다(Table I).

Table I. Extraction Yields and Contents of Total Phenolics in the Extracts of SA

Sample[1)]	Yield (%)[2)]	Total phenolics (μg GA eq/mg)[3)]
E	3.47	138.83±21.34[c]
H	1.29	128.78±8.74[c]
DCM	0.33	223.48±18.49[a]
EA	0.10	181.85±11.79[b]
B	0.12	80.59±9.56[d]
A	0.02	66.48±8.38[d]

1) E, 70% Ethanol extract; H, Hexane fraction; DCM, Dichloromethane fraction; EA, Ethyl acetate fraction; B, Butanol fraction; A, Aqueous fraction.
2) Extraction yield is expressed as the percentage dry weight of SA.
3) Values are mean±S.D. (n=3).
*a-d Values with different superscripts in the same column are significantly different at p〈0.05 by Tukey test.

2) TEAC에 의한 항산화효과 및 DPPH에 의한 유리기 소거효과

조추출물[1)]인 E층은 0.73 mM Trolox equivalent의 값을 나타내었고, 용매별 분획물은 일반적으로 0.22~1.14 mmol Trolox equivalents 범위의 항산화활성을 보였다. 백단향의 DCM층(1.14 mM Trolox equivalent)과 B층(1.11 mM Trolox equivalent)이 가장 큰 항산화활성을 나타내었으며, 이후 EA층(1.05 mM Trolox equivalent), A층(0.77 mM Trolox equivalent) 및 H층(0.22 mM Trolox equivalent)의 순서로 항산화 활성이 감소되었다. 한편, 대조군으로 사용된 AA 및 BHT는 각각 2.35mM Trolox equivalent 및 2.24mM Trolox equivalent로 나타났다.

DPPH를 이용하여 백단향의 유리기 소거효과를 측정한 결과 조추출물의 경우 IC_{50}값이 3,487.60 μg/mL으로 나타났으며, EA 분획물과 DCM 분획물의 유리기 소거효과는 IC_{50}값이 각각 2,107.63 μg/mL과 2,512.91 μg/mL로써 월등히 우수한 소거효과를 보였다. 또한 다른 용매별 분획물에서는 유리기 소거효과가 다음과 같은 순서로 감소되었다; A 분획물 (IC_{50}=2,826.00 μg/mL)〉 B 분획물 (IC_{50}= 4,487.11 μg/mL)〉 H 분획물 (IC_{50}= 17,506.98 μg/mL). (Table II)

Table II. Antioxidant Activities and Free Radical Scavenging Activities of the SA extracts as Determined by the ABTS·+ assay and DPPH assay

Sample[1)]	TEAC[2)] (mM Trolox equivalent)	Free radical scavenging activites[3)] (IC50=μg/mL)
E	0.73±0.01[f]	3,487.60±19.58[c]
H	0.22±0.01[g]	17,506.98±739.18[a]
DCM	1.14±0.02[c]	2,512.91±37.63[d]
EA	1.05±0.02[d]	2,107.63±32.96[d]
B	1.11±0.02[c]	4,487.11±139.35[b]
A	0.77±0.00[e]	2,826.00±83.85[cd]
AA	2.35±0.01[a]	136.95±1.10[e]
BHT	2.24±0.00[b]	168.03±3.33[e]

1) E, 70% Ethanol extract; H, Hexane fraction; DCM, Dichloromethane fraction; EA, Ethyl acetate fraction; B, Butanol fraction; A, Aqueous fraction; AA, Ascorbic acid; BHT, Butylated hydroxytoluene.
2),3) Values are mean±S.D. (n=3).
*a-g Values with different superscripts in the same column are significantly different at p〈0.05 by Tukey test.

1) 70% 에탄올 추출물

3) ROS (superoxide anion 및 hydroxyl radical) 소거효과

백단향의 superoxide anion 소거 활성을 측정한 결과 DCM fraction의 IC_{50}값이 1,744.13 μg/mL으로써 가장 높게 나타났다. 이후 EA 분획물 (IC_{50}=3,092.18 μg/mL)과 E 분획물 (IC_{50}=5,229.94 μg/mL) 순으로 감소하였으며, 대조군으로 사용된 AA와 비교하여서도 높은 소거효과를 나타내었다.

백단향의 hydroxyl radical 소거 효과를 측정한 결과 DCM 분획물의 IC_{50}값이 238.22 μg/mL으로써 가장 높게 나타났고 EA 분획물 (IC_{50}=282.49 μg/mL), E 분획물 (IC_{50}=379.65 μg/mL), B 분획물 (IC_{50}=774.81 μg/mL) 순으로 항산화 활성이 감소되었다. (Table III)

Table III. ROS (Superoxide Anion and Hydroxyl Radical) Scavenging Activities of the SA extracts

	ROS (IC50=μg/mL)	
Sample[1)]	Superoxide anion[2)]	Hydroxyl radical[3)]
E	5,229.94±97.31[b]	379.65±5.88[b]
H	NA[4)]	NA
DCM	1,744.13±129.70[d]	238.22±11.65[d]
EA	3,092.18±61.96[c]	282.49±8.90[c]
B	NA	774.81±24.97[a]
A	NA	NA
AA	10,445.55±300.00[a]	58.31±0.91[e]
BHT	NA	NA

1) E, 70% Ethanol extract; H, Hexane fraction; DCM, Dichloromethane fraction; EA, Ethyl acetate fraction; B, Butanol fraction; A, Aqueous fraction; AA, Ascorbic acid; BHT, Butylated hydroxytoluene.
2),3) Values are mean±SD (n=3).
*a-e Values with different superscripts in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Tukey test.
4) NA is not active.

4) RNS (NO radical 및 peroxynitrite) 소거효과

조추출물인 E층의 IC_{50}값은 224.16 μg/mL 이었고, 계통 분획물 중에서는 EA 분획물의 IC_{50}값이 14.40 μg/mL으로써 nitric oxide 소거활성이 가장 높게 나타났으며 다음과 같은 순서로 나타났다; DCM 분획물(IC_{50}=23.33 μg/mL)〉 B 분획물 (IC_{50}=66.55 μg/mL)〉 A 분획물 (IC_{50}=80.19 μg/mL). 대조군으로 쓰인 AA의 경우 IC_{50}값이 8.27 μg/mL로 나타난 반면, BHT는 NO 소거 활성이 관찰되지 않았다.

백단향의 peroxynitrite 소거효과를 측정한 결과 조추출물인 E층의 IC_{50}값이 183.45 μg/mL으로 나타났으며 분획물 중에서는 EA 분획물의 IC_{50}값이 9.40 μg/mL으로써 탁월한 peroxynitrite 소거활성을 보였다. 또한 DCM 분획물(IC_{50}=12.66 μg/mL), A 분획물 (IC_{50}=31.95 μg/mL) 및 B 분획물 (IC_{50}=36.07 μg/mL) 순으로 항산화활성이 나타났다. 한편, 대조군으로 쓰인 AA 및 BHT의 경우 IC_{50}값이 각각 2.81 μg/mL, 110.30 μg/mL의 peroxynitrite 소거 활성을 나타내었다. 백단향의 peroxynitrite 소거 활성은 AA보다는 다소 낮은 활성을 보였으나 H와 E 분획물을 제외한 나머지 분획물에서 BHT보다 우수한 소거 활성을 나타냈다. (Table IV)

Table IV. RNS (nitric oxide and peroxynitrite) scavenging activities of the extracts of SA

	RNS (IC50=μg/mL)	
Sample[1)]	Nitric oxide radical[2)]	Peroxynitrite[3)]
E	224.16±12.57[a]	183.45±5.79[a]
H	NA[4)]	NA
DCM	23.33±2.01[d]	12.66±0.32[d]
EA	14.40±0.79[de]	9.40±0.51[de]
B	66.55±1.64[c]	36.07±0.66[c]
A	80.19±2.12[b]	31.95±0.78[c]
AA	8.27±0.23[ef]	2.81±0.08[ef]
BHT	NA	110.30±3.17[b]

1) E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, Ethyl acetate fraction; B, Butanol fraction; A, Aqueous fraction; AA, Ascorbic acid; BHT, Butylated hydroxytoluene.
2),3) Values are mean±SD (n=3).
*a-f Values with different superscripts in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Tukey test.
4) NA is not active.

5) Human LDL 산화 억제효과

Cu^{2+}에 의해 유도되는 LDL 과산화의 REM에 대한 백단향의 효과를 보여주고 있다. E, DCM, EA, B 및 A분획물 50 μg/mL 농도에서 각각 20.00%, 9.33%, 41.67%, 11.33%, 14.67%, 4.67%의 LDL 산화 보호효과를 나타내었으며, 특히 DCM 분획물의 경우 대조군으로 사용된 BHT (51%)와 유사한 억제효과를 보였다. (Fig. 1)

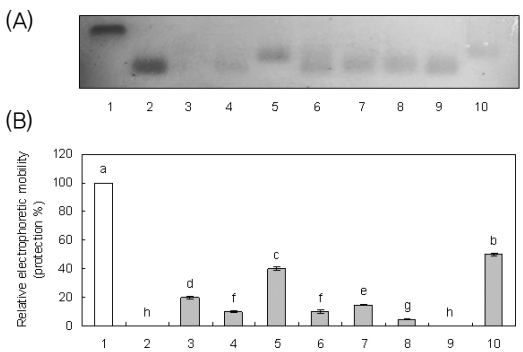


Fig. 1. The relative electrophoretic mobility(REM) of human LDL incubated with Cu^{2+} and with or without SA extracts

LDL (120 μg/mL) was oxidized with 10 μM $CuSO_4$ at 37℃ in the presence of SA extracts for 12 h. (A) Lane 1: native LDL; Lane 2: LDL and Cu^{2+}; Lane 3: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/mL of SA 70% ethanol extract; Lane 4: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/m of SA hexane fraction; Lane 5: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/m of SA dichloromethane fraction; Lane 6: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/m of SA ethyl acetate fraction; Lane 7: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/m of SA butanol fraction; Lane 8: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/m of SA aqueous fraction; Lane 9: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/m of ascorbic acid; Lane 10: LDL and Cu^{2+} and 50 μg/m of butylated hydroxytoluene. (B) Protection rate (%), Each value represents the mean of triplicate measurements. Values are mean±SD (n=3). $^{*a-h}$Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey test.

6) 혈소판 응집억제 효과

혈소판 응집억제활성을 측정한 결과 0.5 U/mL의 thrombin을 처리한 경우 100%의 혈소판 응집률을 보였으며, 항혈소판제제인 ASP를 전처리한 경우 3.5%의 응집률을 보여 약95% 이상의 응집저해율을 나타내었다. 백단향 추출물을 최종 농도 10 μg/mL로 처리했을 때, A (18%), B (26%), EA (27%), DCM (49%), E (59.5%) 및 H 분획물 (69.0%) 순의 응집률을 나타내었다. (Fig. 2)

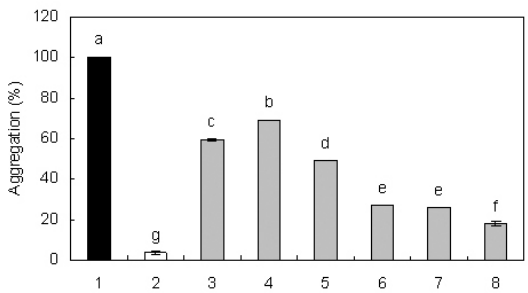


Fig. 2. Effects of the SA extracts on the platelet aggregation induced by thrombin

1: PRP 445 μL+D.W 50 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL); 2: PRP 445 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL)+aspirin 50 μL (100 μg/mL); 3: PRP 445 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL)+SA 70% ethanol extract 50 μL (100 μg/mL); 4: PRP 445 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL)+ SA hexane fraction 50 μL (100 μg/mL); 5: PRP 445 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL)+ SA dichloromethane fraction 50 μL (100 μg/mL); 6: PRP 445 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL)+SA ethyl acetate fraction; (100 μg/mL); 7: PRP 445 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL)+ SA butanol fraction 50 μL (100 μg/mL); 8: PRP 445 μL+thrombin 5 μL (50 U/mL)+ SA aqueous fraction 50 μL (100 μg/mL). Values are mean±SD (n=3). $^{*a-g}$Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey test.

7) 혈전 용해효과

본 연구에서 백단향 추출물의 혈전분해 활성을 fibrin plate 상에서 육안으로 관찰한 결과, A층을 제외한 모든 분획물에서 fibrin clot을 효과적으로 분해하였으며, 특히 E, H, DCM층의 fibrin clot을 분해능이 높게 나타났다. (Fig. 3)

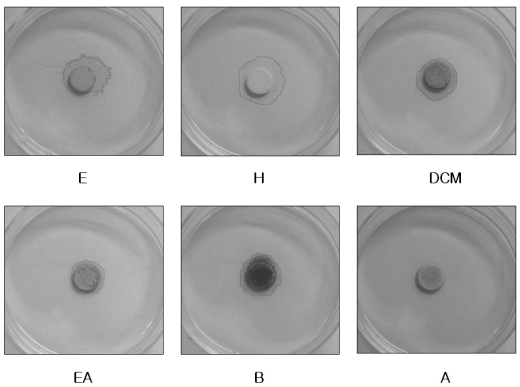


Fig. 3. Fibrinolytic activity of SA by fibrin-plate assay
E, 70% Ethanol extract; H, Hexane fraction; DCM, Dichloromethane fraction; EA, Ethyl acetate fraction; B, Butanol fraction; A, Aqueous fraction.

IV. 고찰

인간을 비롯하여 모든 호기성 생물체들은 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 생성하는 과정에서 발생하는 superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxidem hydroxyl, peroxyl, alkoxyl, hydroperoxyl radical 등과 같은 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS) 과 활성 질소종(reactive nitrogen species; RNS)에 대한 근본적인 자기 방어능을 가지고 있다[22,23]. 체내 활성 산소종의 과다 생성은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 동맥경화, 심근경색, 심장마비 등의 심혈관계 질환을 나타낼 수 있다.

瘀血은 氣血運行이 障碍를 받아 局部의 脈管 또는 臟腑나 脈管외 特定部位에 瘀滯된 것으로《內經》에서 비롯되어 張仲景이 그 토대를 다지고 隋·唐 時代의 醫書인《諸病源候論》,《千金方》,《外臺秘要》및 宋代의 醫書인《聖濟總錄》등 이후에 여러 諸家들이 발전을 시켜 개념을 정립 하였지만, 瘀血을 매우 중시하였거나 전문적으로 기술한 경우는 드물었다. 그러나 淸代에 이르러 상당히 체계적이면서 혁신적인 전문서인《醫林改錯》으로 크게 발전하였다,《醫林改錯》에는 王淸任이 창안한 여덟가지 活血逐瘀 處方 중에 通竅活血湯, 血府逐瘀湯, 膈下逐瘀湯 만으로도 38가지 病症을 治療한다[24].

특히 뇌혈관내의 혈전 및 색전에 의하여 뇌혈류의 막힘과 출혈에 의하여 발생하는 뇌졸중의 80%는 색전증에 의한 경색이 많으며 그 중에서도 약 60%는 색전이고, 나머지 40%는 혈전이 원인이 된다고 한다.[25] 순환기계의 문제는 편마비, 언어장애, 지각 및 감각장애와 보행장애 등의 신체적, 심리적 장애를 동반 하게 되는 뇌졸중이나 알츠하이머와 같은 질환을 유발한다. 韓醫學에서는 이를 痴呆라 하는데 張景岳의《景岳全書.雜證謨》《癲狂篇》[26]에서 '痴獃'라고 처음 기재되어 있으며, 淸代 陳士澤[27]에 의해 서양의학에서 말하는 痴呆의 개념과 유사한 개념으로 기술 되었다. 임상양상에 대하여 《黃帝內經》에서부터 인간의 노화과정을 설명하면서 '喜忘','神氣皆去' 등으로 인지장애의 증상을 기술하였고, 精神呆滯, 沈默不語 , 或喃喃獨語, 話無論次, 或神志恍惚, 呼之不應등의 증상을 보인다고 했으며, 肝腎不足, 氣血虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀등을 原因으로 보았다.[28] 중풍후 腦絡瘀阻는 직접 腦髓를 손상시켜, 氣血津液이 위쪽으로 상승하기 힘들게 하여, 腦가 淸陽의 도움을 잘 받지 못하게 한다. 痰瘀濁氣가 腦髓에 있으면, 淸竅不淸으로 인하여, 元神이 失養하므로 기억력이 떨어지게 되며, 神思遲鈍, 遇事善忘 등 증상을 보이게 된다. 瘀血은 다발성대뇌경색(MID)발병 작용에서, 血瘀氣滯로 인해, 臟腑에서 만들어지는 氣血이 腦에 정상적으로 공급이 되지 않거나, 혹은 血瘀阻滯脈絡으로 인해, 氣血이 腦髓를 오랫동안 潤澤하게 하지 못하면, 癡呆로 된다.[29]

백단향의 辛溫한 藥性은 祛寒, 行散하여 利膈寬胸시키고 行氣止痛하며, 芳香은 醒脾시키고 겸하여 調中和胃시키는 효능이 있어 寒凝氣滯로 인한 胸復疼痛과 胃寒作痛 및 嘔吐淸水 등 證을 치료하는데 응용된다[11]효능은 行氣止痛, 散寒調中 하고 임상에서는 丹蔘飮(丹蔘,檀香,砂仁)[9]의 효과로 항혈

전에 대한 효과를 입증한 바가 있다. 또한 백단향의 정유성분을 이용하여 여러 가지 화장품, 마사지 오일, 아로마 요법 등에 많이 쓰인다. 韓醫學으로는 고대서부터 쑥을 이용한 熏法의 의미와 상당히 유사하다고 한다. 〈素問·金匱眞言論〉에서 '東方靑色 入通於肝 其臭臊, 南方赤色 入通於心 其臭焦, 中央黃色 入通於脾 其臭香, 西方白色 入通於肺 其臭腥, 北方黑色 入通於腎 其臭腐[8]라 하여 五臟과 香臭와의 관계를 밝혀 놓았다. 西洋에서는 향기요법이 면역계를 활성화시키거나 신경계에 작용하여 신체를 건강하게 하고 마음과 정서를 안정시키는 작용이 있다고 한다[31].

페놀화합물(phenol 또는 polyphenol)은 식물에 편재하는 이차적 식물성 대사산물로서, 폴리페놀은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl을 가진 방향족 화합물로 항산화효과를 비롯한 抗癌, 抗炎症 및 抗血栓 작용 등 다양한 생물학적 효능을 지니는 것으로 보고되고 있다[32,33]. 김 등[12]은 백단향에 phenylpropanoid 및 lignan 등의 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있음을 보고하였으며, 이는 백단향이 산화적 스트레스로부터 보호작용을 갖는 예방의학적 페놀물질의 근원으로 이용될 수 있음을 시사한다.

TEAC assay는 ABTS의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 감소되는 원리에 기초한 방법으로 potassium persulfate와 ABTS의 산화에 의해 라디칼을 형성시킨 후 각각의 시료에 의한 라디칼 소거활성을 측정함으로써 각 시료의 항산화능을 확인할 수 있다[34]. 이 방법은 *in vivo*에서의 총항산화능 측정뿐만 아니라 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위해 널리 이용되고 있는데, 734 nm의 긴 최대 흡광도 파장을 가져 때때로 식물성 추출물에서 나타나는 색깔에 의한 간섭을 최소화할 수 있기 때문에 식물의 항산화효과를 평가하기 위해 유용한 것으로 보고되고 있다[35]. 백단향 추출물에서 함량이 높았던 DCM층 및 EA층에서 우수한 항산화 효과를 가지는 것으로 나타나, 백단향에 함유된 페놀 화합물에 의해 TEAC값이 증가된 것으로 사료되었다.

세포가 성장하고 자라면서 발생되는 free radical에 의해 세포가 산화되어 손상되는데 페놀성 화합물은 환원성이 강해서 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 항산화 능력이 있다고 알려져 있다[36]. 전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 尺度로도 이용되고 있다[37,38]. DPPH는 항산화물질로부터 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성함으로써 라디칼을 소거하게 되는데, 이때 고유의 청남색이 엷어지는 특성을 가지고 있어 이 색차를 비색정량하여 전자공여능력을 측정 한다[39].

생체 내 ROS와 RNS는 산소에서 유래된 것들로서 안정한 분자상태인 triplet oxygen ($^3O_2$)이 자외선, 방사선, 화학반응 대사과정을 통하여 생성되며[40,41], superoxide anion radical, hydroxyl radical, peroxyl radical, nitrocoxide radical과 같은 자유라디칼들과 라디칼의 형태가 아닌 singlet oxygen ($^1O_2$), 오존(O_3), hypochlorous acid(HOCl)과 과산화수소 등이 있다[42,43]. 이들 활성 산소에 의한 지질산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러 체내 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기하며, 활성 산소종이 정상적으로 소거되지 않았을 때 잔존하는 자유 라디칼에 의해 산화적 스트레스를 받게 됨으로써 다른 질병의 원인이 되기도 한다[44].

Nitric oxide (NO)는 내피세포, 호중구 등에서 생성되며 L-arginine에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 citruline으로 전환 시에도 생성된다. 또한 NO는 대부분의 기관에서 intercelluar messenger로서 작용하고 혈관의 항상성, 혈관 내피세포에 백혈구나 혈소판의 부착 억제와 혈소판 응집억제 및 신경전달 물질로서 작용한다. 아울러 면역계에서는 대식세포 및 항미생물 방어에 관여

하며 superoxide anion과 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성하기도 한다[45]. 그러나 최근, 과량의 NO 생성은 염증반응, 조직의 파괴 및 면역체계의 이상을 초래하여 신경퇴행성 질환, 만성염증, 패혈증, 고혈압, 혈전증, 신부전증, ARDS (성인호흡곤란 증후군) 등의 질환을 일으킨다고 보고되었다[46]. 특히 우수한 NO 소거능을 보인 EA 및 DCM 분획물의 경우는 장 등[47]의 리기다 소나무 EA 추출물과 열수 추출물 (IC_{50}=50 μg/mL), 민 등[48]의 포도 추출물 (50 μg/mL) 및 지[49]가 보고한 상백피 추출물 (500 μg/mL)의 NO 소거능과 비교하여서도 월등히 높은 소거활성을 나타내었다.

혈소판의 응집은 혈액응고 및 혈전생성으로 이어지는 필수적인 단계로 혈소판 자체의 생리적 활성이 증가하거나 혈장에서의 지질대사가 변하여도 쉽게 영향을 받게 된다[50]. 결국 혈액중의 혈소판이 점착, 활성화, 응집되고 혈액 응고계를 활성화함으로서 혈전을 형성하게 되는 것이다[51]. 항혈소판제는 이러한 혈소판의 역할을 차단하여 뇌경색 및 다른 혈전성 질환의 발생 빈도를 낮추어 주기 때문에 예방 혹은 재발을 막기 위한 목적으로 널리 사용되고 있다. 가장 보편적으로 사용되고 있는 항혈소판제제인 Aspirin과 clopidogrel은 혈소판 감소증, 백혈구 감소증, 간독성, 피부발진과 소화기 장애 등의 부작용을 가지고 있어, 새로운 대체 약물의 개발이 필요하다[52,53] 이상의 실험을 통하여 백단향 추출물이 효과적으로 혈소판 응집을 억제하여 동맥경화 및 고혈압의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 기대 되었다.

본 실험에서 DCM과 EA 추출물에서 높은 항산화효과가 도출되어 효과가 좋다고 되어 있는데 추출물 내 단일 물질에 대한 연구가 추후 필요할 것으로 보인다.

V. 결론

백단향의 항산화 효과 및 LDL 산화 억제효과를 통한 혈소판 응집억제 및 혈전용해효과를 관찰하기 위하여 백단향을 70% 에탄올로 추출하고 이를 용매 극성별로 계통 분획하여 *in vitro* 상에서 TEAC법에 의한 항산화효과, DPPH를 이용한 유리기 소거효과, ROS 및 RNS 소거효과를 알아본 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DCM과 EA 추출물에서 높은 항산화효과가 나타났다. 총 페놀 함량 역시, DCM과 EA 추출물에서 높게 나타났다.
2. Human LDL에 대한 백단향 추출물의 산화억제효과를 검토한 결과, BHT와 비교하여 우수한 효과를 보여 백단향의 산화적 스트레스에 의한 염증반응 및 염증관련 질환의 초기단계를 예방할 수 있을 것이다.
3. 血栓분해 활성을 피브린 판상에서 관찰한 결과, 24시간 경과 후에 유의적으로 피브린 분해량이 증가하는 결과를 확인할 수 있었다.
4. 혈소판 응집억제활성을 측정한 결과, thrombin 유도 혈소판 응집에 대해 유의적인 응집억제효과를 나타내었다.
5. 혈소판 응집 억제 물질인 ASP과 비교하여 효과적으로 혈소판 응집을 억제함으로써 동맥경화 및 고혈압의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Chance, B, Sies, H, Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979; 59: 527-605.
2. Wickens, A.P. Ageing and the free radical theory. *Respir. Physio.* 2001; 128:379-391.
3. Amarowicz, R., Naczk, M. and Shahidi, F. Antioxidant activity of various fractions of non-

tannin phenolics of canola hulls. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 2755-2759.
4. Frank, M.S. and Martijn, K. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoprotein and cardiovascular disease. *Am. J. Med.* 2002;, 113: 13-24.
5. Sang Bae Kim. Development of Thrombo-Q, Food for antithrombotic and hyperlipidemia. The Korean Society of Food Science and Nutrition 2000; 5(1): 57-60.
6. Wolberg, A.S. and Cmpbell, R.A, Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus. Apher. Sci* ,2008; 38(1): 15-23.
7. Verstraeta, M., Lijnen, H.R. and Collen, D. Thrombolytic agents in development. *Drugs* 1995; 50:29-42.
8. Pyong-chol Pae. Kumsok Hwangjenaegyong Somun. Seongbosa; 1999. 533 ; 186; 80-82.
9. Nam In Jo, Seung heon Choi, Kyoo Seok Ahn, Effects of Dansameum and each its components on Intravascular Coagulation Induced by Endotoxin Rats. The journal of K.O.M.S. 1975;12(2):66-77.
10. Dongyeol Kwak, Jae-won Kim. Uirimkaechak-pyongyok. Changjo Munwhasa; 1998. p. 259.
11. Chonguk haniqwa taehak ponchohak kyosu. Ponchohak. Yongnimsa; 1988. 1-813, 362.
12. Tae-Hoon Kim, Antioxidative and Biological Activities of *Santalum album* Extracts by Extracting Methods: The Korean Society of Food Preservation 2008; 15(3): 456-460.
13. Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D. and Pihlaja, K. Phenolic and betacyanins in red beetroot (Beta vulgaris) root: distribution and effects of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J. Agri. Food Chem.*, 2000. p. 48: 5338-5342.
14. Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay., *Free Radical Bio. Med.*, 1999. p. 26: 1231-1237.
15. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A.A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 1993. p. 84: 407-412,
16. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature;* 1958. p. 26: 1199-1200.
17. Gotoh, N. and Niki, E., Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Acta;* 1992. p. 1115: 201-207.
18. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview. *Method Enzymol.*; 1990. p. 186: 1-85.
19. Nagata, N., Momose, K. and Ishida, Y. nhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reactionof 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J. Biochem. (Tokyo);* p. 125: 658-661.
20. Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*, 1997. p. 1: 145-157.
21. Hu, C., Zhang, Y. and Kitts, D.D. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. Henonis leat extract *in virto*. *J. Agric. Food Chem;* 2000. p. 48: 3170-3146.
22. Wiseman, H. Important in protection against oxidative damage and disease. *Nutr. Biochem.*; 1996. p.7: 2-6.
23. Wickens, A.P. Ageing and the free radical therory. Respir. Physiol. 128: 379-391, 2001.
24. Dongyeol Kwak, Jae-won Kim. Uirimkaechak-pyongyok. Changjo Munwhasa; 1998. p. 260-262.
25. Chunwong Huh. Knowing the cause, we can see the prevention of cerebrovascular disease. M.S; 2003. p. 81.
26. Gaebin Zhang. Gyongakjeonseo. Sanghaesanghae Kwahak Kisul Chulpansa 1985. 71-578.
27. Satake Zhin. Byunzheungnok. Seoul: Uisongdang. 241-6, 1989.
28. Jeonkuk Hanigwa Daehak Singyong chongsinkwa Kyogwaso Pyonchan Wiwonhoe .Hani Singyong chongsinkwahak. Kyonggi-do: Chimmundang; 2007. p. 324-333; 237-328.
29. Hangmun Zhang. Chungpung Chimaezheung

Byunggi Tamto. Habseozhungyihakbo. 1997; 20(1) :1-3.

30. Juni Kim, Bongin Kim, Jinkyoung Kim. Study about preference of aroma 2003; 8:158-161.
31. Bong-Jeun An, Man-Jong Bae, Hee-Jin Choi, Yun-Bin Zhang, Tae-Soo Sung and Cheoing Choi. Isolation of Polyphenol Compounds from the Leaves of Korean Persimmon (*Diospyrus kaki* L. Folium): The Korean Society for Applied Biological Chemistry, 45(4): 212-217, 2002.
32. Ahmad, N., Gupta, S. and Mukhtar, H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3- gallate differentially modulates nuclear factor κB in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 376: 338-346, 2000.
33. Hye-Suk Kim, Mi-jeong Hong, In-Yeong Kang, Ji-Youn Jung, Hye-Kyung Kim, Yong-Seub Shin, et al. Radical Scavening Activities and Antioxidant Constituents of Oriental Melon Extract. Journal of Bio-Environment Control 2009; 18(4): 442-447.
34. Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X.L., Prior, R.L. and Cisneros-Zevallos, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6657-6662, 2003.
35. Sanchez, C.S., Gonzalez, A.M.T., Garcia-Parrilla, M.C., Granados, J.J.Q., Serrana, H.L.G. and Martinez, M.C.L. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta.*, 593: 103-107, 2007.
36. Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I. and Nishioka, I. Study on the Inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.*, 56(2):213-222, 1998.
37. Magalhaes, L.M., Segundo, M.A. and Reis, S. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl assay. *Anal. Chinm. Acta.*, 558, 310-318, 2006.
38. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature,* 181: 1199-1200, 1958.
39. Trush, M. A. , Mimnaugh, E.G. and Gram, T.E. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 31: 3335-3346, 1982.
40. Aust, S.D., Morehouse, L.A. and Tomas, C.E. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radicals Biol. Med.,* 1:3-25, 1985.
41. Aruoma, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 32: 671-683, 1994.
42. Davies, K.J. and Goldberg, A.L. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 262: 8227-8234, 1987.
43. Sung-Je Jung, Jin-Hee Lee, Hyo-Nam Song, Nak-sul Seong, Seung-Eun Lee and Nam-In Baek, Screening for Antioxidant Activity of Plant Medicinal Extracts: The Korean Society for Applied Biological Chemistry. 47(1): 135-140, 2004.
44. Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A. and Darley-Usmar, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *BBA-Bioenergetics*, 1411: 385-400, 1999.
45. Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-shiau, S.Y., Chen, C.F. and Lin, J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and relted flavonoids in mouse macrophase. *Carcinogenesis*, 20: 1945-1952, 1999.
46. Min Jung Jang, Bong Jeun An, Chang Eeon Lee, Jin Tae Lee, Byung Guen Lee, Do Hyung Lee. Study on the Anti-oxidant Effect of *Pinus rigida Mill.* inner Bark Extracts. Jour. Korean For. Soc. 2008;97(1):88-94.
47. Hye-Young Min, Eun-jung Park, Sang-Kook Lee, Yong-Jin Cho. Effects of Grape Extracts on Free Radical Scavenging Activity and Inhibition of Pro-Inflammatory Mediator Production in Mouse Macrophage Cells. Korean J. Food SCI. Technol. 2003;35(1):132-137.
48. Sun-Ok Jee. Antioxidant Acivities and Whitening Effect of the Mulberry(*Morus alba* L.) Root Bark Extracts. Korean J. Plant Res 2009; 22(2): 145-151.
49. Moran, N. and Fitzgerald, G. A. 1994. Mechanism of action of antiplatelet drugs. In: Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J. and

Salzman, E.W. (ed.). Hemostasis & Thrombosis, 3rd edition. Philadelphia, JB: Lippincott, pp 1623-1637.

50. Mustard, J.F. and Packham, M.A. Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation. *Pharmacol. Rev.*, 22: 97-137, 1970.

51. Ki Hyun Cho, Sung Min Choi, Byong Chae Kim, Myong Kyoo Kim, Ui Joo Son, Jong Hee Nam.. An Open, Comparative Study of the Inhibitory Effect on Platelet Aggregatino and Safety of Clopidogrel and Aspirin in Patients with Ischemic Stroke. J. of K.S.C.P.T. 2001; 9(2): 197-205.

52. Quinn, M.J. and Fitzgerald, D.J. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation.* 100: 1667-1672, 1999.