약학회지 제37권 제5호 453~457(1993)
Yakhak Hoeji Vol. 37, No. 5

Protocatechuic acid 및 Gallic acid 유도체들의 항 혈전작용

윤혜숙# · 강삼식 · 김문희 · 정기화*
서울대학교 천연물과학연구소, 덕성여자대학교 약학대학*

(Received July 28, 1993)

Anti-thrombotic Effects of Analogs of Protocatechuic Acid and Gallic Acid

Hye Sook Yun-Choi#, Sam Sik Kang, Moon Hee Kim and Ki Hwa Jung*
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea
**College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea*

Abstract—Platelet anti-aggregating activities were tested with analogs of protocatechuic acid and gallic acid. Six of them which showed comparable inhibitory effects with aspirin against collagen induced platelet aggregation were selected and their anti-thrombotic effects were evaluated in the mouse thrombosis model and compared with those of aspirin and paeonol. At the dose of 50 mg/kg, p.o., ethyl gallate(**13**) treated group showed higher % of recovery within 6 min of thrombotic challenge and lower mortality within 5 min than aspirin treated group.

Keywords □ anti-platelet, anti-thrombotic, ethyl gallate, aspirin, paeonol.

지혈반응(hemostasis)은 손상된 혈관으로 부터의 출혈을 방지하기 위한 응급성 생체 방어기전으로서 일련의 생화학적 반응이 관여되고 있다. 즉 파손된 혈관 내피세포로부터 노출된 collagen fiber에 혈소판들이 점착(platelet adhesion)하며 ADP, thromboxane A_2(TXA_2), thrombin, serotonin 등이 생성/유리되는 혈소판 방출(platelet release)로 이어진다. 유리된 serotonin은 혈관벽을 수축시키고, ADP, TXA_2 등은 혈소판응집(platelet aggregation)을 유도하면서 연쇄반응을 일으켜 혈소판 응집괴(platelet plug)를 형성하며, 뒤따른 혈장응고계의 활성화에 의한 섬유소 형성에 의하여 지혈과정(hemostatic plug formation)이 완성된다. 이러한 지혈반응은 혈관 내피세포로부터의 endothelium derived relaxing factor(EDRF)의 방출, prostacyclin(PGI)의 생성, bradykinin의 유리, 섬유소 용해계의 활성화등과 신속한 균형을 이루어 순환혈액의 유동성을 유지시키면서 진행된다.

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

혈전증(thrombosis)이라함은 폐쇄혈관내에서 지혈기전의 과민반응 또는 혈관벽의 이상등의 원인에 의하여 혈소판들이 활성화 되면서 점착, 방출 및 응집이 일어나 혈전(thrombus)이 생성되며 이에 의하여 혈액의 원활한 흐름이 방해를 받는 상태를 칭한다. 이러한 혈전들은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장등 순환기계의 어느곳에도 발생할 수 있어 심근경색증, 뇌졸증, 폐동맥경색증 등의 심각한 혈전성 질환으로도 발전되며, 또한 미세혈전들은 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병 등의 성인병의 발현에도 관여되고 있음이 밝혀지고 있다.[1)]

동양의 전통의학에서는 "어혈"증상이라 하여 체내 혈액이 일정한 부위에서 정체됨으로서, 혈액의 공급이 원활하지 못하고 혈행의 조화가 깨어짐으로서 심혈관성 질환 뿐 아니라 각종 만성질환의 원인이 되는 것으로 설명하고 있고, 대표적인 혈전성 질환의 하나인 뇌졸증의 각종 증상을 "풍증"으로 분류하는 등 혈전관련 질환들의 증상의 개선 또는 치료 목적으로 다양한 종류의 천연약물들을 사용하여왔다. 저자등은

이러한 관련질환에 사용되어 온 식물생약 50종에 대하여 혈소판응집 억제작용을 갖는가를 검색하였으며 이들 중 오가피, 작약 등 생약으로부터 조제한 11개의 용매분획이 혈소판응집에 대하여 강력한 억제작용을 가짐을 발표하였으며,[2,3] 오가피로 부터는 3,4-dihydroxybenzoic acid(protocatechuic acid)와 추출, 분리 과정에서 생성된 artefact인 3,4-dihydroxybenzoic acid ethyl ester를 항 혈소판 작용물질로서 보고하고 30종의 관련 유도체들의 혈소판응집 억제작용을 검색한 바 있다.[4] 또한 최근 저자등은 gallic acid(3,4,5-trihydroxybenzoic acid) methyl ester을 작약의 항 혈소판 작용성분 분획으로부터 분리 보고하였다.[5]

Gallic acid(GA)와 protocatechuic acid(PA)는 C_5 위치의 -OH group의 존재 유무만이 다른 매우 유사한 구조를 가지며, 또한 항혈전 작용 약물로서 임상에 응용되고 있는 aspirin과도 구조적으로 매우 유사하다. 따라서 본 연구에서는 수종의 GA 및 PA 유도체들의 항혈전작용을 검토하였다.

실험방법

실험기기－융점은 Mitamura Riken apparatus(미보정), NMR은 Varian FT-80A(80 MHz), Mass는 Hewlett Packard 5985B GC/MS system, IR은 Jasco FT/IR-5300로 측정하였으며, 원심분리는 E.I. Du Pont De Nemours Sorvall RT6000 (swing bucket), 혈소판수 측정은 Texas International PLT-4, 혈소판 응집 측정은 Chrono-Log 500Vs Whole Blood Lumi-Aggregometer로 시행하였다.

시약－ADP(adenosine 5′-diphosphate) dicyclohexylammonium salt는 Sigma Chem. Comp., collagen은 Chrono-Log로부터 구입하였으며, gallic acid, protocatechuic acid 및 이들의 유도체들은 따로 언급이 없는 한 기존의 방법에 의하여 오가피 또는 작약으로부터 분리하였거나 Aldrich Chem. Comp.로 부터 구입하여 사용하였다.

Vanillic acid 및 gallic acid의 ethylation－Acid 500 mg를 EtOH 30 ml에 용해시킨 후 HCl 5 ml를 가하고 약 5시간 가열 환류시켜 반응을 진행시켰다. 용매를 감압증류시킨 후 H_2O를 가하고 ether로 추출하여 얻은 ether층을 d-$NaHCO_3$용액으로 세척하고, 무수 망초로 탈수시킨 후 감압농축하여 ester을 얻었으며 aqueous EtOH로 재결정 하였다. Ethyl vanillate ; mp, 40～42℃ (lit,[6] 44℃) ; IR,ν_{max}(KBr) 1691(ester), MS, m/z 196(M^+), 168, 151 ; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6)δ 1.28(3H, t, J=7.1 Hz, CH_3), 3.80(3H, s, OCH_3), 4.25(2H, q, J=7.1 Hz, OCH_2), 6.86(1H, d, J=8.7 Hz), 7.34(1H, d, J=1.9 Hz), 7.47(1H, dd, J=1.9, 8.7 Hz) ; Ethyl gallate : mp, 151-153℃ (lit,[7]155℃), IR, ν_{max}(KBr) 1707(ester), MS, m/z 198(M^+), 170, 153, ^{1}H-NMR (DMSO-d_6),δ 1.25(3H, t, J=7 Hz, CH_3), 4.29(2H, q, J=7 Hz, CH_2), 6.93(2H, s).

혈소판응집 억제작용 검색－Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(200± 20 g)를 $CHCl_3$으로 마취시키고 심장으로부터 2.2% trisodium citrate를 넣은 프라스틱 주사기로 혈액과 citrate의 비율이 9 : 1이 되도록 혈액을 채취하여 200×g에서 10분간 원심분리하여 상층액 혈소판 혈장(Platelet Rich Plasma, PRP)을 분리하고, 남은 층은 계속하여 700×g에서 30분간 원심분리하여 혈소판 제거 혈장(Platelet Poor Plasma, PPP)을 얻었으며 기존의 방법에 준하여 실험하였다.[5,8] PRP의 혈소판수를 측정하고 PPP로 희석하여 혈소판수를 500×10^6/ml로 맞추고 혈소판응집 측정기를 이용하여 PRP를 1,000 rpm으로 stirring하면서 37℃ 에서 incubation시키면서 실험하였다. 시료는 PPP에 녹여 사용하였으며 시료를 가하고 1분 후 ADP($2\sim3\times10^{-6}$ g/ml) 또는 collagen($6\sim10\times10^{-6}$g/ml)을 가하여 응집을 유도함으로 시료에 의한 혈소판 응집억제 작용을 검색하였다.

Collagen과 epinephrine동시투여에 의한 치사－ICR계 생쥐 (20± 2 g)에 시료 (또는 용매) 50 mg/25 ml/kg)을 경구 투여하고 3시간 후 collagen과 epinephrine혼합액 (900 ug collagen plus 90 ug epinephrine/5 ml/kg)을 꼬리정맥에 주사한 후 15분간 관찰하여 마비의 지속여부, 마비로부터의 회복 또는 사망여부를 관찰하였다.[9]

결과 및 고찰

오가피의 성분인 protocatechuic adid(**1**, PA)가 혈소판 응집억제 작용을 가지며 오가피로부터 PA의 분리과정에서 artefact로 얻은 PA ethyl ester(**9**)이 PA보다 혈소판 응집억제 작용이 우수함이 보고된 바 있으며,[4] 앞에 언급한 바와 같이 최근 작약의 항 혈

소판 작용 분획으로부터 GA methyl ester(**12**)을 분리하였기에[5] 13종의 GA 및 PA의 유도체들을 확보하여 이들이 항혈전 작용을 갖는가를 검색하였다. 이들 중 9종(**1**～**9**)에 대하여는 혈소판 응집억제 작용을 가지는가를 혈소판혈장 도말표본 검색법(modified smear method)에 의하여 검색하여 보고한 바 있으나[4] 위의 방법은 정량적인 비교가 어려운 단점이 있어 혈소판 혈장 혼탁도 검색법(turbidimetric method)에 의하여 13종의 유도체들의 항 혈소판 작용을 비교하여 그 결과를 Table I에 종합하였다. **1**～**13** 모두가 ADP에 의하여 유도된 혈소판 응집에 대하여는 양성대조로 사용한 aspirin과 유사하거나 작용이 낮았으며 collagen에 의하여 유도된 혈소판 응집에 대하여는 **1, 3, 7, 9, 10** 및 **13**의 IC_{50}가 2.5～8.5×10^{-4} M로서 aspirin의 7.2×10^{-4}M과 유사함을 보여주었다. 이에 이들 6종의 화합물이 마우스의 혈전증 모델에서 항혈전 작용을 갖는가를 검토하였다. 즉 생쥐에 collagen과 epinephrine의 혼합용액을 정맥주사할 때 폐동맥내에 혈전이 형성되고 이에 의하여 폐동맥이 폐색됨으로서 1분이내에 대부분이 마비되어 움직이지 못하게 되고, 동공이 커지며 호흡이 곤란하게 되고 경련이 뒤따르며, 5분 이내에 약 70%의 생쥐가 사망하고 나머지도 대부분 15분 이상 마비가 계속됨을 관찰하게 된다.[9] 생쥐에 시료를 경구투여한 후 collagen과 epinephrine의 혼합용액을 정맥주사할 때 생쥐를 관찰하여 위와 같은 혈전증상이 경감되는가를 관찰하였다. Collagen과 epinephrine의 혼합용액만을 정맥주사 하였을때 5분 이내에 68.8%가 사망하였으며 15분 이내에 회복 되어 자유로 움직인 생쥐는 6.3%인 반면, 양성대조 약물인 aspirin 50 mg/kg을 투여한 경우 주사후 5분 이내에 26%가 사망하였으며 15분 이내에 회복된 생쥐는 47.8%로서 혈전증상이 상당히 경감되었음을 알 수 있었다. 검색시료 **3** 및 **10**투여군에서는 혈전증상의 개선효과를 볼 수 없었으며, **9**투여군에서는 15분 이내에 25%가 회복되어 대조군에 비하여 상당한 회복증가를 보였으나 aspirin 투여군에는 미치지 못하였다. **1** 및 **7** 투여군에서는 15분이내 회복된 생쥐의 증가 및 5분 이내 사망한 생쥐의 감소등 대조군에 비하여 상당한 개선효과를 보였으나 역시 aspirin 투여군에는 미치지 못하였다. Ethyl gallate (**13**)투여군에서는 6분이내에 28%가 회복되었으며 15분이내에 56%가 회복되었고 5분이내의 치사율 또한 16%로서 대조군에 비하여 월등한 감소를 보여 항혈전 작용이 있음을 보였으며 양성대조군인 aspirin투여군에 비교하여 6분이내에 월등한 회복효과를 볼 수 있었다. Paeonol은 혈소판 응집억제 작용을 가짐이 보고된 바 있으며,[10,11] 저자들 또한 작약으로부터 항혈소판 작용 성분으로서 methyl gallate(**12**)와 함께 paeonol을 분리하였으며[12] 그 화학구조 또한 매우 간단한 방향족 ketone으로서 GA 및 PA 유도체 또는 aspirin과 유사하여 본 실험에 포함시켰다. 그 결과 paeonol투여군의 6분 이내 및 15분이내 회복율이 **13**투여군과 유사하였으나 5분이내 사망율은 **13**투여군보다 높았으며 aspirin투여군 보다도 높았다.

실험한 13종의 GA 또는 PA유도체와 paeonol중 ethyl gallate (**13**)와 paeonol이 양성대조 약물로 사용한 aspirin과 비교할 때 혈전유도 물질 투여후 15분이내의 회복율은 유사하였으나 6분이내의 회복율이 aspirin보다 높아 혈전증상의 개선효과가 우수함을

Table I—Platelet anti-aggregating activities of GA and PA analogs

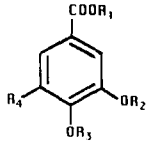

Table I—Platelet anti-aggregating activities of GA and PA analogs

Comp.	R_1	R_2	R_3	R_4	IC_{50} (mM) ADP	collagen
1	H	H	H	H	2.2	0.79
2	H	H	Me	H	4.7	1.0
3	H	Me	H	H	>5.0	0.83
4	H	Me	Me	H	>5.0	>1.0
5	H	Et	Et	H	3.5	>1.0
6	Me	H	H	H	2.7	>1.0
7	Me	Me	H	H	3.0	0.66
8	Me	Me	Me	H	>5.0	1.0
9	Et	H	H	H	2.3	0.25
10	Et	Me	H	H	3.0	0.37
11	H	H	H	OH	3.4	>1.0
12	Me	H	H	OH	3.7	1.0
13	Et	H	H	OH	3.2	0.85
aspirin					2.0	0.72

Table II—Protection of mice from thrombotic challenge with oral administration of GA or PA analogs

	total no. of mice tested	recovered within 6 min		recovered** within 15 min		killed within 5 min	
		no.	%	no.	%	no.	%
control	32	0	0	2	6.3	22	68.8
1	15	1	6.7	5	33.3	5	33.3
3	16	2	12.5	3	18.8	8	50.0
7	18	1	5.6	7	38.9	6	33.3
9	16	1	6.3	4	25.0	9	56.3
10	15	1	6.7	2	13.3	9	60.0
13	25	7	28.0	14	56.0	4	16.0
paeonol	25	6	24.0	12	48.0	11	44.0
aspirin	23	0	0	11	47.8	6	26.0

* 50 mg/kg, p.o. of each compound was given 3 hrs prior to the thrombotic challenge(900 ug collagen plus 90 ug epinephrine/kg, i.v.)

** The number of mice included those recovered within 6 min.

보였으며 특히 **13**투여군에서는 aspirin투여군에 비하여 5분이내의 사망율 또한 낮음을 보였다. Aspirin은 항 혈소판 작용, 파종성 혈관내 응고증(DIC)증상의 개선등의 경우 일정용량 이상을 투여하였을 경우 오히려 작용이 저하됨이 보고 되고 있어[13] 앞으로 aspirin, ethyl gallate (**13**) 및 paeonol의 항혈전 작용을 다양한 투여 용량 및 다양한 투여시간대에서의 비교검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건사회부로부터 1992년도 신약개발지원 연구비의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사하는 바이다.

참고문헌

1) Hladovec, J. : *Antithrombotic Drugs in Thrombosis Models,* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1989).

2) Yun-Choi, H.S., Kim, S.O., Kim, J.H. and Lee, J.R. : Midified Smear Method for Screening Potential Inhibitors of Platelet Aggregation from Plant Sources, *J. Nat. Prod.*, **48**, 363-370 (1985).

3) Yun-Choi, H.S., Kim, J.H. and Lee, J.R. : Screening of Potential Inhibitors of Platelet Aggregation from Plant Sources(II), *Kor. J. Pharmacon.*, **17**, 19-22 (1986).

4) Yun-Choi, H.S., Kim, J.H. and Lee, J.R. : Potential Inhibitors of Platelet Aggregation from Plant Sources, III, *J. Nat. Prod.*, **50**, 1059-1064 (1987).

5) Kang, S.S., Kim. J.S., Kim, E.M. and Yun-Choi, H.S. : Platelet Anti-Aggregation of *Paeony Root, Kor. J. Pharmacon.*, **22**, 215-218 (1991).

6) *Handbook of Chemistry and Physics,* CRC Press Inc. West Palm Beach, Fl.

7) Dhar, D.N. and Munjal, R.C. : Chemical Examination of the Seeds of *Bombax malabaricum, Planta Medica,* **29**, 148-150 (1976).

8) Born, G.V.R. and Gross, M.J. : The Aggregation of Blood Platelets, *J. Pharmacol,* **168**, 178-195 (1963).

9) Dimino, G. and Silver, M.J. : Mouse Antithrombotic Assay : A Simple Method for the Evaluation of Antithrombotic agents *in vivo.* Potentiation of Antithrombotic Activity of Ethyl Alcolhol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **225**, 57-60 (1983).

10) Kubo, M., Matsuda, H., Izumi, S., Tani, T., Arichi, S., Yoshikawa, M. and Kitagawa, I., Studies on Mouthan Cortex(VI), Inhibitory Effects on the In travascular Coagulation, *Shoyakugaku Zasshi,* **36**, 70-77 (1982).

11) Hirai, A., Terano, T., Hamazaki, T., Sajiki, J., Saito, H., Tahara, K., Tamura, Y. and Kumagai, A. : Studies on the Mechanism of Antiaggregatory Effect of Mouthan Cortex, *Thrombosis Research,* **31**, 29-40 (1983).

12) Kang, S.S., Kim, J.S., Yun-Choi, H.S. and Han, B.H. : Phytochemical Studies on Paeoniae Radix, *Kor. J. Pharmacon.*, **24**, 247-250 (1993).
13) Yoshikawa, T., Murakami, M., Furukawa, Y., Takemura, S. and Kondo, M. : Effects of Ticlopidine and Aspirin on Endotoxin-induced Disseminated Intravascular Coagulation in Rats. *Thromb. Haemostas (Stuttgart)*, **49**, 190-192 (1983).