

산사자 추출물의 트롬빈 저해활성

류희영 · 김영관 · 권인숙 · 권정숙 · 진익렬¹ · 손호용*

안동대학교 식품영양학과, ¹경북대학교 미생물학과

Received February 3, 2007 / Accepted April 2, 2007

Thrombin Inhibition Activity of Fructus Extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge. Hee Young Ryu, Yung Kwan Kim, In Sook Kwun, Chong Suk Kwon, Ing Nyol Jin¹ and Ho Yong Sohn*. Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea, ¹Dept. of Microbiology, School of Life Science and Biotechnology Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – The fructus of *Crataegus pinnatifida* Bunge has been used as medicinal and food source in worldwide. In this study, a strong direct thrombin inhibition and antithrombosis activity were identified from the methanol extract of *C. pinnatifida* Bunge fructus. The solvent fractionation of fructus extract using hexane, ethylacetate, butanol revealed that the butanol fraction has a prominent antithrombin activity. Thrombin time (blood-clot formation time) and activated partial thromboplastin time (aPTT) extended to 835% and 315% by addition of the butanol fraction at concentration of 1.25 mg/mL, whereas thrombin time extended to 287% by addition of aspirin at concentration of 1,25 mg/mL. The butanol fraction showed anthrone-positive and weak ninhydrine-positive reaction. The thrombin inhibitory activity was not related to previously reported flavonoids or polyphenols. The activity was maintained against acid treatment (0.5 N HCl for 120 min), but rapidly lost by heat-treatment (100°C for 30 min). Our results suggested that fructus of *C. pinnatifida* Bunge with non-heat treatment process could be developed as a natural source of antithrombosis.

Key words – activated partial thromboplastin time, antithrombosis, Fructus of *Crataegus pinnatifida* Bunge, thrombin time

서 론

현대의 정밀산업 및 화학합성산업의 발달로 인해, 다양한 합성의약품, 합성첨가물들이 개발되어 이용되고 있으나, 보다 안전성이 우수한 새로운 의약품, 식품첨가물의 개발에 지속적인 연구가 이루어지고 있다. 다양한 자생 약용 및 자생 식용자원을 이용하여, 새로운 부가가치 소재로 이용하려는 연구는, 석유자원을 전적으로 수입에 의존하고 있으며, 또한 한약재 및 의약품 원료의 공급 역시 안정적이지 못한 우리나라의 경우에는 필수적으로 육성하여야 할 분야이다.

산사자는 장미과에 속한 낙엽교목인 산사나무의 성숙한 과실로 이가위, 이가배, 적과자, 산과자, 짙광이, 질구배 등의 다른 이름으로 불리기도 한다. 중국, 일본의 각지에서 많이 생산되며 우리나라에서는 주로 지리산 이북의 전북, 경북, 강원 등에서 생산된다. 산사자는 시고 단맛을 가지며, 8%의 조단백질과 5%의 조지질을 함유하여[11], 국내에서는 떡, 잼, 청량음료 및 전통 발효주의 원료로도 이용되고 있으며, 한방에서는 음식을 잘 소화하게 하며, 혈압을 낮추는 작용, 혈액순환을 도와 허혈을 없애는 작용 및 지질 용해작용을 한다고 알려져 있다[3,19]. 국내에서는 조충구제 및 세균성이질 치료

용으로 다양한 제품이 제약회사에서 판매되고 있으며, 또한 최근에는 혈액순환장애에 의한 제증상 완화 및 현기증을 대상으로 하는 일반의약품으로서의 산사, 은행 및 마늘유 혼합 제품이 개발, 판매되고 있다.

산사자의 약리성분으로는 ursolic acid, corosolic acid, euscatic acid, oleanolic acid, cratagolic acid, hyperin, vitexin, caffeic acid, procatechuic acid 및 pyrogallol 등의 다양한 페놀성 화합물들이 보고되어 있으며[11,18], 생리활성으로는 항세균 활성[4], 내피세포 의존성 혈관이완 활성[3], 고지혈증 개선 및 항 우울증 효과[7,14], 항염증효과[10] 및 알콜성 장해 간보호 효과[13,19], 세포사멸 활성[1,17], 항산화 활성[2] 등이 보고되어 있으며, 또한 chitin synthase II 저해활성[8], HIV-I protease 저해활성[16] 및 matrix metalloproteinase-1 저해활성[15]이 알려져 있다. 최근에는 산사자 뿐만 아니라, 산사나무 잎에서도 유사한 약리성분이 보고되어 있으며, quercetin 배당체, myricetin 배당체, apigenin 배당체와 epicatechin 등이 함유되어 강력한 항산화 활성이 확인되어 있다[6,25,26].

본 연구에서는, 산사자의 유용 생리활성 검토를 위한 연구의 일환으로, 산사자 추출물 및 분획물을 조제하여 혈액내의 혈전 생성에 직접 관여하는 인간 트롬빈의 저해활성 및 aPTT 증가활성을 평가하여, 산사자 추출물의 butanol 분획물에서 강력한 항혈전 활성을 확인하였으며, 트롬빈 저해 활

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-823-1625

E-mail : hysohn@andong.ac.kr

성물질의 특성을 검토하였다. 이러한 연구는, 산사자 추출물이 혈액 순환 장애 및 혈관계 질환의 예방, 치료제로 사용됨에 있어 유용한 정보를 제공하게 될 것이다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 조제

실험에 사용한 산사자는 경북 안동에서 건조된 한국산 산사자를 구입하여 사용하였다. 수분함량은 18% (w/w)이었으며, 4°C에서 냉장보관하여 사용하였다. 산사자 메탄올 추출물의 조제는 시료 200g에 메탄올 1리터를 가하여 24시간 상온 추출하였으며, 3회 반복한 후 추출액은 50°C에서 1시간 감압 농축하여 분말로 제조하여 사용 전까지 저온 밀봉 보관하였다. 산사자 물 추출물 조제는 시료 200g에 증류수 1리터를 가하고, 30°C 실온에서 24시간 추출하거나, 100°C에서 1시간 추출한 후, 추출액을 50°C에서 1시간 감압 농축하여 분말로 제조하였다. 메탄올 추출물의 경우에는 물에 현탁한 후, n-hexane, ethylacetate, butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고, 물 잔류물을 회수하였다. 준비된 시료는 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여 thrombin time (TT) 측정, activated partial thromboplastin time (aPTT) 측정, 열 및 산 안정성 평가에 사용하였다. 혈장은 최근 1개월동안 약물투여를 받지 않은 지원자의 전혈로부터 조제하였으며, 채혈 후 즉시 4°C에서 5,000 g로 5분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 냉동한 상태로 보관하였으며 (신선동결혈장), 필요시 상온에서 해동하여 사용하였다.

항혈전 활성

항혈전 활성은 시료의 TT 및 aPTT를 측정하여 평가하였다. 트롬빈 저해 활성은 기존의 보고한 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)를 이용하여 혈액 응고시간을 측정하여 평가하였다[12,21-24]. 37°C에서 0.5 U 트롬빈 (Sigma Co., USA) 50 µl와 20 mM CaCl₂ 50 µl, 다양한 농도의 시료 추출액 10 µl를 coagulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 µl를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 시료 대조군으로는 아스피린(국산화학, Japan)과 heparin (Sigma Co.)을, 용매 대조군으로는 시료 대신 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 평균 33.1초의 응고시간을 나타내었다. 열 안정성 평가의 경우에는 1 mg/ml의 산사자 추출물의 부탄올 분획물을 100°C에서 일정시간 열처리한 후, 40°C에서 냉각하여 잔존활성을 측정하였다. 산 안정성 평가를 위해서는, 0.5 N HCl 용액에 일정시간 동안 실온에서 반응시킨 후, 1 N NaOH 용액으로 pH 7로 보정하여 잔존 활성을 측정하였다. 트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 실험의 평균치±표준오차 (mean±SD)로 나타내었다. 한편 aPTT 측정[12,21-24]의 경우에는, 혈장 100 µl와 다양한 농도의 시

료 추출액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온한 후, 50 µl의 aPTT reagent (Sigma, ALEXIN™)를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 50 µl CaCl₂ (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다. 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였으며, 이 경우 55.2초의 응고시간을 나타내었다. aPTT의 결과는 3회 반복한 실험의 평균치±표준오차 (mean±SD)로 나타내었다.

기타 분석

총 flavonoid의 함량 측정은 Davis 방법[5]에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출검액 400 µl에 90% diethylene glycol 4 mL를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 µl를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 Singleton 등의 방법[20]에 따라 추출검액 400 µl에 50 µl의 Folin-ciocalteu, 100 µl의 Na₂CO₃ 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. TLC의 경우에는, silica gel plate (Silica gel 60F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, 클로로포름:메탄올:물(52:28:8 v/v/v)을 전개용매로 하여 전개 후, 10% 황산용액을 분무하여 확인하였다.

결과 및 고찰

산사자를 메탄올 및 증류수로 추출한 각각의 추출물의 항혈전 활성을 측정하였다. 먼저 100°C 및 30°C 물 추출물의 경우, 추출 효율은 각각 48.1% 및 36.7%로 산사자가 많은 수용성 물질을 포함함을 알 수 있었으며, 각각의 추출물의 농도 증가에 따른 TT와 aPTT의 증가가 비례적으로 나타나지는 않았다(Table 1). 그러나 5 mg/ml 농도의 100°C 및 30°C 물 추출물에서 각각 136%, 149%의 TT 증가 및 123%, 164%의 aPTT 증가를 나타내었다. 한편 메탄올 추출물의 경우에는 농도의존적인 트롬빈 저해 활성과 aPTT 증가를 나타내었으며, 2.5 mg/ml의 농도에서 164%의 TT 증가, 160%의 aPTT 증가를 나타내었고, 5 mg/ml의 농도에서는 각각 1,390% 및 450% 이상의 증가가 확인되었다. 이는 항혈전제로 이용되는 아스피린이 1.25 mg/ml의 농도에서 287%의 TT 증가를 나타냄[23]을 고려할 때 산사자의 항혈전 활성이 매우 강력함을 의미하며, 일반적으로 항혈전 활성이 우수한 것으로 보고 [12]된 우산나물, 참나물, 붉나무 잎 등의 약용 및 식용 산채류 추출물보다도 강력한 활성을 나타내었다.

메탄올 추출물의 순차적 유기용매 분획물의 항혈전 활성은 Table 2에 나타내었다. Hexane, ethylacetate, butanol 각 분획물의 회수율은 각각 1.0%, 5.1%, 20.9%이었으며, 물 잔류

Table 1. Extraction yields of fructus of *Crataegus pinnatifida* Bunge and the anti-thrombosis activity

Extraction ¹ solvents	Extraction yields (%)	Anti-thrombin activity		
		concentration (mg/ml)	TT ² (sec)	aPTT ³ (sec)
methanol	40.4±1.1	5.0	> 460	> 250
		2.5	54.2±7.1	87.9±3.5
		0	33.1±2.2	55.2±1.4
water (30°C)	36.7±0.2	5.0	49.5±4.8	90.9±4.5
		2.5	26.8±6.5	ND
		0	33.1±2.2	55.2±1.4
water (100°C)	48.1±0.5	5.0	45.0±5.6	68.2±5.1
		2.5	25.8±7.1	ND
		0	33.1±2.2	55.2±1.4

Extractions¹ were conducted at 30°C for 24 hr or 100°C for 1 hr.

TT²: thrombin time, aPTT³: activated partial thromboplastin time.

Table 2. Sequential organic solvent fraction of the methanol extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge and the anti-thrombosis activity

Fractionation solvents	Fractionation yields (%)	Anti-thrombin activity		
		concentration (mg/ml)	TT ¹ (sec)	aPTT ² (sec)
n-hexane	1.0	2.5	48.6±3.1	66.7±7.4
		1.25	40.3±4.2	64.9±2.9
		0	33.1±2.2	55.2±1.4
ethylacetate	5.1	2.5	206.8±17.8	116.1±5.8
		1.25	38.1±10.6	74.4±6.5
		0	33.1±2.2	55.2±1.4
butanol	20.9	2.5	> 460	174.1±10.1
		1.25	276.5±16.7	94.1±4.2
		0	33.1±2.2	55.2±1.4
water residue	72.2	2.5	37.9±6.6	73.0±4.8
		1.25	35.4±5.8	65.5±4.4
		0	33.1±2.2	55.2±1.4

TT¹: thrombin time, aPTT²: activated partial thromboplastin time

Table 3. The contents of total flavonoid, polyphenol, reducing sugar, total sugar and protein in fructus extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge

Solvents	Anthrone	Ninhydrin	Content (mg/g)		
			total flavonoid	polyphenol	total sugar
methanol ex.	strong	-	0.0055	7.17	111.13
n-hexane fr.	strong	-	0.0180	1.33	104.69
ethylacetate fr.	strong	weak	0.0096	22.99	295.96
butanol fr.	strong	weak	0.0013	14.62	169.97
water residue	strong	-	0.0034	0.78	131.37

-; negative reaction

물이 72.2%를 차지하여 대부분이 수용성 물질로 확인하였다. 각 분획물의 농도별 활성 측정 결과 대부분의 활성은 butanol 분획에서 나타났으며, 1.25 mg/ml의 농도에서 835%의 TT 증가, 315%의 aPTT 증가를 보여 아스피린보다 훨씬 강력한 항혈전 활성을 나타내었다. 한편 ethylacetate 분획에서는 2.5 mg/ml의 고농도에서 625%의 TT 증가 및 210%의 aPTT 증가를 나타내어 butanol 분획보다 상대적으로 미약한 활성을 나타내어, 산사자 추출물의 항혈전 활성물질이 ethylacetate 분획 및 butanol 분획에 다양하게 존재하며, 특히 butanol 분획물이 주요 활성물질을 포함하고 있음을 의미한다. 이러한 결과는, 최근 항트롬빈 활성이 보고된 메밀종자 주정 추출물의 활성물질이 ethylacetate 및 butanol 분획물에서 나타나며, 특히 butanol 분획물에서 강력한 활성이 나타나는 것과 그 특성이 유사하였다[23].

산사자의 메탄올 추출물과 각각의 분획물의 총 플라보노이드, 폴리페놀 및 총당을 분석한 결과 (Table 3), 분석 물질들과 트롬빈 저해 활성의 특이한 상관관계는 나타나지 않았다. Ethylacetate 분획에서는 높은 총 플라보노이드 함량 및 폴리페놀 함량, 총당 함량을 나타내었으며, butanol 분획에서는 ethylacetate 분획 다음으로 높은 폴리페놀 및 총당량을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량은 1.3 µg/g의 매우 낮은 수치를 나타내었다. 또한 butanol 분획은 강한 anthrone 반응과 약한 ninhydrin 반응을 나타내어, 그 주성분이 당 함유 고분자 물질로 추측되었다. 이미 보고한 메밀종자 추출물의 butanol 분획물의 활성 성분은 30 kD 이상의 고분자 다당체로 확인되었으나, 환원당은 거의 검출되지 않았다[23]. 그러나 산사자의 butanol 분획물은 ethylacetate 분획물보다 환원당 함량은 낮았으나, 여전히 높은 169 mg/g의 환원당 함량을 나타내어 다당류보다는 당이 결합된 고분자 구조로 추측되며, 이러한 결과는 실제 항혈액 응고 의약품으로 사용되고 있는 헤파린이 뮤코다당체임을 고려할 때, 산사자의 butanol 분획물의 활성물질이 헤파린과 유사한 구조 및 유사한 항응고 작용기작을 나타내리라 추측된다. 또한 이러한 결과는 산사자의 주요 활성물질로 보고된 quercetin, myricetin 등이 산사자의 항트롬빈 활성에 관여하지 않음을 제시하며, 실제 butanol 분획물의 항트롬빈 활성을 측정 결과, 기존의

보고된 quercetin, kaempferol, myricetin 및 rutin 등의 혈관계 질환의 예방효과가 보고된 물질들[23]과는 트롬빈 저해활성에서 다른 양상을 나타내었다(Fig. 1). 또한 TLC에 의한 분석 결과 butanol 분획에서 다양한 물질들이 검출되었으나, quercetin, kaempferol, myricetin 및 rutin은 거의 검출되지 않아(Fig.2), 산사자의 항혈전 활성이 기존의 산사자 및 산사 앞에서 보고된 물질에 의해 나타나지 않음을 확인하였다.

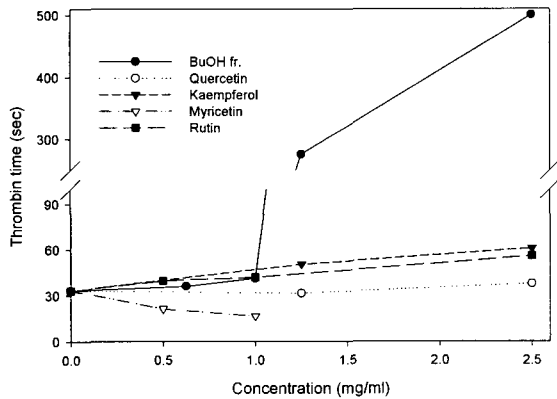


Fig. 1. Thrombin inhibitory activities of methanol extract and solvent fraction layers of fructus of *Crataegus pinnatifida* Bunge.

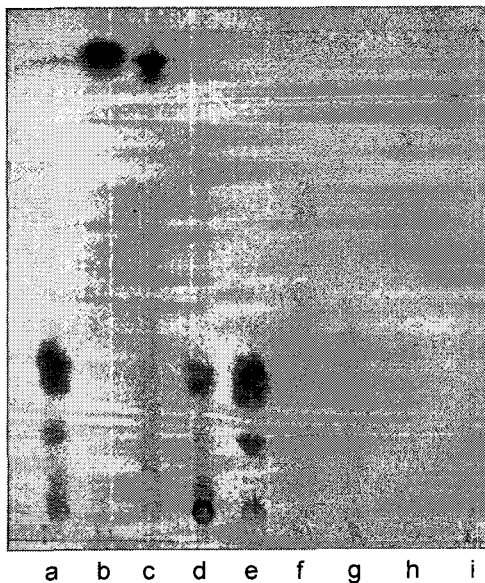


Fig. 2. Thin-layer chromatography of methanol extract and its solvent fraction layers of fructus of *Crataegus pinnatifida* Bunge. The extract (5 µg), fraction layers (5 µg) and 2 µg of standard sample (myricetin, rutin, quercetin and kaempferol) were loaded to silica gel 60F₂₅₄, and then developed with chloroform:methanol:water (52:28:8 v/v/v), and stained by spraying 10% H₂SO₄. Symbols: a, methanol extract; b, hexane fraction; c, ethylacetate fraction; d, butanol fraction; e, water residue; f, myricetin; g, rutin; h, quercetin; and i, kaempferol.

Table 4. The stability of thrombin inhibition activity of the butanol fraction of *Crataegus pinnatifida* Bunge against (a) acid treatment or (b) heat treatment

Treatment	Treatment time (min)	Thrombin time	Relative activity (%)
Acid treatment (0.5 N HCl)	0	166.9±9.5	100.0
	60	163.9±15.3	98.2
	120	172.4±8.7	103.3
Heat treatment (100°C)	0	166.9±9.5	100.0
	30	27.5±2.2	16.5
	60	22.4±5.1	13.4

The concentrations of butanol fraction of *Crataegus pinnatifida* Bunge used were 1 mg/ml, respectively. And the thrombin time of DMSO as a solvent control in this study was 19.9±2.4 min.

산사자의 항혈전 활성성분의 식품가공 적성 평가를 위해 butanol 분획물의 산 안정성과 열 안정성을 검토한 결과 (Table 4), 100°C, 30분 열처리에도 85% 이상의 활성소실이 나타난 반면, 0.5 N HCl 처리에는 120분 이상 안정한 것으로 나타났다. 항혈전제로 사용되고 있는 아스피린이 뛰어난 산 안정성 및 열 안정성을 나타냄[21,23, 24]을 고려할 때, 산사자를 이용한 기능성 식품 제조에는 비가열처리가 필수적인 것으로 판단되며, 고온 추출은 부적합할 것으로 판단된다. 실제 산사자와 유사하게 강력한 항트롬빈 저해 활성을 나타내는 메밀 종자 추출물의 butanol 분획물의 경우, 0.5 N HCl 1 시간 처리 및 100°C, 30분의 열처리시 급격히 항트롬빈 활성을 소실[23]하여, 식품가공 공정 개발의 어려움이 있었으나, 산사자의 경우 우수한 내산성이 있어, 소화 흡수에 용이 하리라 생각되며, 산사 발효주와 같은 효모 발효식품에 첨가 시에 우수한 활성을 유지할 수 있으리라 추측된다. 현재 산사자 추출물의 butanol 분획 활성성분의 정제와, 비열 처리의 산사자 가공공정 및 식품형태 개발이 진행되고 있다.

요 약

식용 및 약용으로 광범위하게 이용되고 있는 산사자의 유용 생리활성 검토를 목적으로 산사자 추출물 및 분획물을 조제하여, 혈액내의 혈전 생성에 직접 관여하는 인간 트롬빈의 thrombin time(TT) 및 activated partial thromboplastin time(aPTT) 증가 활성을 측정하여 항혈전 활성을 평가하였다. 산사자의 항혈전 물질은 물 추출보다는 메탄올 추출이 적합하며(추출효율 40.4%), butanol 분획에서 가장 강력한 활성을 나타내었다. 산사자의 butanol 분획물은 1.25 mg/ml의 농도에서 835%의 TT 증가, 315%의 aPTT 증가를 보여 아스피린보다 2.9배 이상의 강력한 항혈전 활성을 나타내었다. 이러한 항혈전 활성은 기존의 보고된 quercetin, kaempferol, myricetin 및 rutin과는 무관하였다. 또한 산사자의 활성물질

은 0.5 N HCl 처리시 120분 이상 안정하였으나, 100℃, 30분 열처리에는 85% 이상의 활성소실이 나타나 열에 매우 민감한 물질로 확인되었다. 본 연구결과는, 비열 처리와 적합한 가공 공정이 가능하다면 산사자 추출물이 혈액순환 장애 및 혈관계 질환 예방 및 치료제로 개발 가능성을 제시하고 있다.

참 고 문 헌

- Ahn, K. S., M. S. Hahm, E. J. Park, H. K. Lee and I. H. Kim. 1998. Corosolic acid isolated from the fruit of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* is a protein kinase C inhibitor as well as a cytotoxic agent. *Planta Med.* **64**, 468-470.
- An, B. J., B. Y. Kang and J. T. Lee. 2002. Development of cosmetic material from Korean *Crataegi fructus* extract. *Kor. J. Herbology* **17**, 39-50.
- Bae, M. H. and H. H. Kim. 2003. Mechanism of *Crataegi fructus* extract induced endothelium-dependent vasorelaxation in rabbit carotid artery. *Kor. J. Herbology* **18**, 169-180.
- Choi, O. K., Y. Kim, G. S. Cho and C. K. Sung. 2002. Screening for antimicrobial activity from korean plants. *Kor. J. Food. Nutr.* **15**, 300-306.
- Chae S. K., G. S. Kang, S. J. Ma, K. W. Bang, M. W. Oh and S. H. Oh. 2002. *Standard Food Analysis*. Jigu-Munwha Sa, Seoul p 381-382.
- El-Mousallamy, A. M. D. 1998. Chemical investigation of the constitutive flavonoid glycosides of the leaves of *Crataegus sinaica*. *Natural Prod. Sci.* **4**, 53-57.
- Hong, S. S., J. S. Hwang, S. A. Lee, X. H. Han, J. S. Ro and K. S. Lee. 2002. Inhibitors of monoamine oxidase activity from the fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**, 285-290.
- Jeong T. S., E. I. Hwang, H. B. Lee, E. S. Lee, Y. K. Kim, B. S. Min, K. H. Bae, S. H. Bok and S. U. Kim. 1999. Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* **65**, 261-263.
- Kang, I. H., J. H. Cha, S. W. Lee, H. J. Kim, S. H. Kwon, I. H. Ham, B. S. Hwang and W. K. Whang. 2005. Isolation of anti-oxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**, 121-128.
- Kao, E. S., C. J. Wang, W. L. Lin, Y. F. Yin, C. P. Wang and T. H. Tseng. 2005. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. *J. Agric. Food. Chem.* **53**, 430-436.
- Kim, J. S., G. D. Lee, J. H. Kwon and H. S. Yeon. 1993. Antioxidative effectiveness of ether extract in *Crataegus pinnatifida* Bunge and *Terminalia chebula* Rets. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **36**, 203-207.
- Kwon, C. S., Y. S. Kwon, Y. S. Kim, G. S. Kwon, I. Jin, G. C. Ryu and H. Y. Sohn. 2004. Inhibitory activities of edible and medicinal herbs against human thrombin. *J. Life Sci.* **14**, 509-513.
- Kwon, H. J., Y. Y. Kim and S. Y. Choung. 2005. Amelioration effects of traditional chinese medicine on alcohol-induced fatty liver. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5512-5516.
- Lee, H. J. and M. S. Choi. 1998. Changes of plasma and hepatic lipids, hydroxy-methyl-glutaryl CoA reductase activity and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by supplementation of hot water extracts from *Rosa rugosa*, *Crataegus pinnatifida* and *Polygon*. *J. Food. Sci. Nutr.* **3**, 344-350.
- Lee, S. Y., J. H. An, H. Chun and H. Y. Cho. 2003. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 60-65.
- Min, B. S., H. J. Jung, J. S. Lee, Y. H. Kim, S. H. Bok, C. M. Ma, N. Nakamura, M. Hattori and K. Bae. 1999. Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinnatifida* on HIV-1 protease. *Planta Med.* **65**, 374-375.
- Min B. S., Y. H. Kim, S. M. Lee, H. J. Jung, J. S. Lee, M. K. Ma, C. O. Lee, J. P. Lee and K. Bae. 2000. Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 155-158.
- Park, S. W., C. S. Yook and H. K. Lee. 1994. Chemical components from the fruits of *Crataegus pinnatifida* var *psilosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 328-335.
- Seo, B. I. 2005. Preventive effects of water extracts from on *Crataegi fructus* on hyperlipiderma and liver damage induced by alcohol. *Kor. J. Herbology.* **20**, 35-43.
- 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-Ciocalcau reagent. *Methods Enzymol* **299**, 152-178.
- Sohn, H. Y., H. Y. Ryu, Y. S. Kwon, E. J. Kum, C. S. Kwon, G. S. Kwon, G. W. Kim and K. H. Son. 2005. Screening of thrombin inhibitors from medicinal and wild plants (II). *Kor. J. Pharmacogn.* **36**, 263-272.
- Sohn, H. Y., Y. S. Kwon, Y. S. Kim, H. Y. Kwon, G. S. Kwon, G. J. Kim, C. S. Kwon and K. H. Son. 2004. Screening of thrombin inhibitors from medicinal and wild plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**, 52-61.
- Sohn, H. Y., C. S. Kwon, K. H. Son, G. S. Kwon, H. Y. Ryu, and E. J. Kum. 2006. Antithrombin and thrombosis prevention activity of Buckwheat seed, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 132-138.
- Sohn, H. Y., C. S. Kwon, K. H. Son, G. S. Kwon, Y. S. Kwon, H. Y. Ryu and E. J. Kum. 2005. Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 593-598.
- Zhang, P. C. and S. X. Xu. 2001. Flavonoid ketohexosefuranosides from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge var. *major* N. E. Br. *Phytochemistry* **57**, 1249-1253.
- Zhang, P. C. and S. X. Xu. 2002. Two new C-glucoside flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge var. *major* N. E. Br. *Chinese Chem. Lett.* **13**, 337-340.