

단삼 메탄올 추출물의 항혈전 및 항산화 효과

양선아 · 임남경¹ · 이인선*

계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR) 센터, ¹계명대학교 식품가공학 전공

Effects of Methanolic Extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on *in vitro* Antithrombotic and Antioxidative Activities

Seun-Ah Yang, Nam-Kyung Im¹, and In-Seon Lee*

The Center for Traditional Microorganism Resources (TMR), Keimyung University

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University

Abstract *Salvia miltiorrhiza* Bunge is known to potentially prevent arteriosclerosis and hypertension, but its effects on platelet function are not clear. In this study, we evaluated the *in vitro* antithrombotic activities of the edible plant extract. Methanol extract of *S. miltiorrhiza* Bunge exhibited about 70% fibrinolytic activity compared to the plasmin control, and inhibited ADP- and collagen-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 0.42 and 0.07 mg/mL, respectively. *S. miltiorrhiza* Bunge extract significantly prolonged the activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) compared with control. Moreover, 0.05 mg/mL *S. miltiorrhiza* Bunge extract contained 87.3% 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity. In conclusion, *S. miltiorrhiza* Bunge seemed to enhance antithrombotic activity due to its radical scavenging activity. Based on these data, further examination is required to determine the mechanism of platelet-dependent antithrombosis and the effect of polyphenols on platelet function.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, antithrombosis, platelet, fibrinolysis, antioxidant

서 론

인간은 상처부위의 치료와 혈액의 손실을 막기 위한 생체 시스템을 가지고 있으며 이것은 혈소판과 혈장의 응고, 섬유소 분해, 그리고 응고억제라고 하는 복잡한 과정의 조절과 균형으로 이루어진다. 그러나 여러 가지 요인으로 이러한 평형상태가 깨지면 혈액의 흐름이 방해를 받아 심혈관계 질환 등의 혈전질환이 생긴다(1). 이러한 혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장 등 순환기계 어느 곳에서도 발생할 수 있으며 대표적인 심혈관계 질환이 동맥경화증은 심근경색이나 뇌경색을 일으키는 매우 위험한 질환이다. 혈전의 초기단계는 상처부위의 과도한 지혈작용과 혈관 내피세포의 손상 등의 원인에 의해 혈소판이 점착, 활성화, 응집되면서 시작되며, 혈액응고계를 활성화시키면서 급속히 촉진된다(2,3). 정상의 혈관 내피세포는 nitric oxide(NO)와 prostacyclin (PGI₂)과 같은 억제인자를 방출하여 혈관벽을 보호함으로써 혈소판의 부착과 활성화를 억제하는 작용을 하지만 내피세포가 손상되면 혈관내피 세포 아래쪽에 위치하고 있는 collagen이 노출되어 von Willebrand factor들이 먼저 collagen에 붙고 혈소판이 GP Ib/IX라는 수용체를 이용하여 그 위에 붙는다. 이 과정에서 혈소

판은 활성화되고 혈소판내의 granule로부터 ADP와 thromboxane A2(TXA₂) 등이 분비되어 혈소판은 더욱 활성화되며, 활성화된 혈소판의 막에 존재하는 GP IIb/IIIa 수용체와 fibrinogen이 결합하여 혈소판 응고가 촉진된다. 현재 혈전질환의 예방과 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 형성된 혈전을 치료하기 위한 혈전용해제 등이 사용되고 있으나, 대표적인 항혈소판제인 아스피린은 효과는 뛰어나지만 위장관 출혈과 소화성궤양 등의 부작용을 일으키며(4), 그 외의 항응고제나 고지혈증 치료제로 쓰이는 약물들은 가격이 너무 고가인 문제가 있다. 따라서 혈전형성의 예방을 위하여 혈소판의 활성화 및 응고의 억제, 혈전의 용해 활성을 가진 천연물 성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

단삼(Danshen, *Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생식물로 한방에서 부인의 생리불순, 생리통, 산후복통 및 어혈성의 심복부동통, 타박상의 치료와 불면증, 피부발진 등의 약재로 쓰인다(5). 단삼의 주요 화학성분으로는 tanshinone I, IIA, IIB 등을 포함하는 diterpene 화합물과, danshensu(salvianic acid A), protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B 등을 포함하는 phenolic 화합물들, 그 외에 baicaline, b-sitosterol, ursolic acid, vitamin E와 tannin 등이 알려져 있다(6). 단삼의 밝혀진 생리활성으로는 항균(7), 항산화(8), 항암(9), 항돌연변이(10), 단삼유래 magnesium salvianolate(magnesium lithospermate)의 간염에의 효과(11)가 알려져 있으며, 항혈전 효능에 대해서는 항응고제로 많이 사용되는 warfarin의 작용을 증진시키는 것이 시사되었으나(12) 기전에 관한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 실험에서는, 천연물질로서 한방에서 많이 이용되고 있는 단삼 메탄올 추출물의 항산화능이 항혈전 활성에 미치는 영

*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, 1000 Sindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea
 Tel: 82-53-580-6449
 Fax: 82-53-580-6447
 E-mail: seunahy@kmu.ac.kr
 Received October, 10, 2006; accepted December 5, 2006

향을 체계적으로 검토하고 그 기전을 연구하기 위하여, 먼저 전반적인 항혈전 및 항산화 효과를 *in vitro*에서 살펴보기 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 단삼(*Danshen, Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 대구광역시 약령시장에서 원산지는 중국인 건조된 것을 구입하였으며, 건조 중량의 10배(w/v)의 80% methanol을 넣어 3회 추출, 여과(Whatman NO. 3, England)하고 vacuum evaporator(R-3000, Buchi, Switzerland)로 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

실험동물

본 실험에 사용된 Sprague-Dewley rat은 (주)오리엔트바이오에서 분양 받아 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 스트레스를 최소화하고, 몸무게 250-300 g의 male을 실험에 사용하였다.

Washed platelet의 조제

Rat를 ethyl ether로 마취하고, 항응고제 0.15 M sodium citrate를 혈액과 1:9(v/v)의 비율이 되도록 함유한 주사기로 복대동맥으로부터 채혈하였다. Platelet rich plasma(PRPP)는 200 × g에서 10분간 원심분리하여 상등액의 PRP를 얻었고, 계속하여 800 × g에서 15분간 원심분리하고, 침전된 혈소판을 washing buffer(137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)로 2회 세척한 후 suspension buffer(137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)에 혼탁시켜서 washed platelet로 하였다(13). 혈소판 응집 억제능에 사용한 washed platelet는 cell counter(Hema-vet HV950FS, Drew Scientific, USA)를 이용하여 혈소판 수를 계측하고 buffer로 희석하여 혈소판이 3 × 10⁸ platelet/mL이 되도록 조정하였다. 혈소판은 저온에서 응집되므로 이상의 실험은 상온에서 실행하였다.

혈소판응집 억제능 측정

Rat의 혈소판 응집 억제능은 Aggregometer(Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA, USA)를 이용한 탁도 측정법으로 측정하였다(14). Washed platelet를 37°C에서 3분간 incubation 시킨 후 농도별로 시료를 처리하고 2분후 혈소판 응집을 유도하는 물질 ADP(6 μM), collagen(2 μg/mL)로 응집을 유도하였으며, 10분간 측정한 후 억제정도를 계산하였다. 억제정도(%)는 시료를 처리하지 않은 것을 control로 하여, 아래와 같은 방법으로 구하였다.

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

A: control의 aggregation %

B: sample 처리시의 aggregation %

혈액응고(PT, APTT) 활성 측정

혈액응고 억제 활성 중 내인성 경로(intrinsic pathway)에 기인하는 활성트롬빈 플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time; APTT)과 외인성 경로(extrinsic pathway)에 기인하는 프로트롬빈시간(prothrombin time; PT)을 Thompson과 Harker의 방법(15)에 따라 혈액응고 자동분석기(CLOT-2S, SEAC SRL., Italy)를 사용하여 측정하였다. APTT 측정시 사용한 PRP는 SD-rat male에

서 혈액을 채취한 후 분리하여 사용하였다. APTT 측정은 APTT reagent(Dade Behring, Germany)를 사용하여, citrated plasma 0.1 mL, APTT reagent 0.1 mL 및 시료를 처리하고, 37°C에서 미리 incubation 한 후 25 mM CaCl₂ 0.1 mL를 넣고 응고시간을 측정하였다. PT 측정은 PT reagent(Dade Behring, Germany)를 사용하여, citrated plasma 0.1 mL를 넣고 PT reagent 0.2 mL 및 시료를 처리한고, 37°C에서 미리 incubation 한 후 25 mM CaCl₂ 0.1 mL를 넣고 응고시간을 측정하였다.

혈전용해활성의 측정

혈전용해활성은 Astrup과 Mullertz의 방법(16)을 응용한 fibrin plate method(17)를 사용하여 측정하였다. Fibrin plate는 최종농도 0.5%가 되도록 fibrinogen(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 완전히 용해시킨 후 10 mL당 thrombin(Sigma) 10 unit를 첨가하여 충분히 혼합한 후 상온에서 30분간 방치하여 응고 시켰다. 시료를 원심 침강하여 상층액 20 μL을 fibrin plate에 점적하여 37°C에서 2시간 반응 후 형성된 투명 환의 크기를 측정하였으며, 대조군으로 5 unit/mL human plasmin(Sigma, USA)을 20 μL 사용하여 효소활성을 비교하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 널리 사용되고 있는 Folin-Denis(18)법을 응용한 방법(19)에 따라 측정하였다. 먼저 시료 1 mg을 중류수 1 mL에 녹이고, 10배와 100배 희석한 희석액 2 mL에 2배로 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하고 3분간 반응시킨 후 Na₂CO₃를 서서히 가하였다. 이를 실온에서 1시간 반응시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Nieve 등(20)의 방법을 응용(19)하여 측정하였다. 각 시료 0.1 mL를 80% ethanol 0.9 mL에 희석한 후 0.1 mL를 취하여 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다, 이때 total flavonoid 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

DPPH Free Radical-Scavenging 활성 측정

시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 환원력을 측정한 것으로, 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 0.8 mL와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH(Sigma) 용액 0.2 mL를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(21). 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다. 이때 상대활성의 비교를 위하여 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복 측정하였다.

결과 및 고찰

혈소판응집

혈소판의 응고 촉진제로 사용된 ADP와 collagen에 의해서 rat의 washed platelet의 응고가 유도되었으며, 혈소판을 단삼 추출

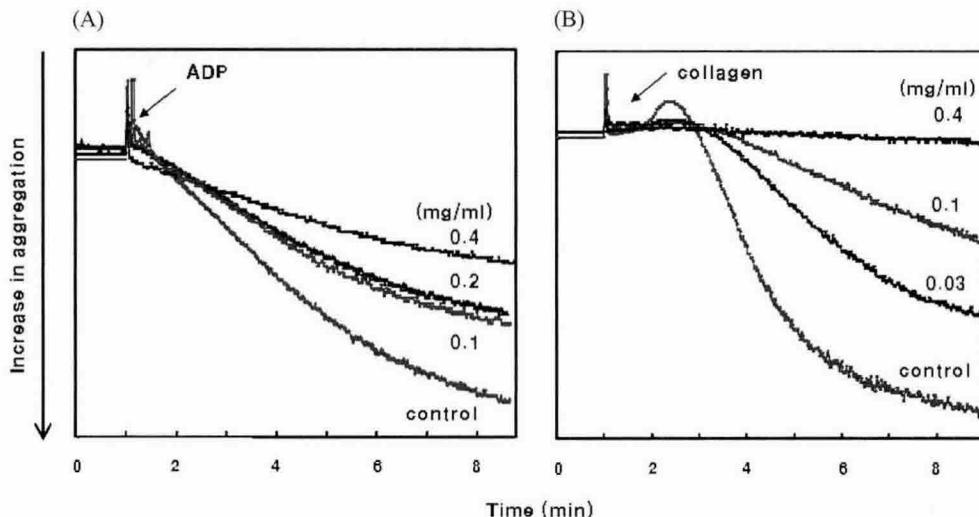


Fig. 1. Effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract on the aggregation of rat washed platelets induced by ADP (A) and collagen (B) during 8 min. Control represents the full aggregating dose of ADP (6 μ M) and collagen (2 μ g/mL). The platelet pretreated with different concentration of *S. miltiorrhiza* Bunge extract for 2 min were challenged with the agonists and the effects were recorded. The IC_{50} values calculated at 5 min from these experiments ($n = 3-5$) are given in Table 1.

물과 2분간 전처리한 후 ADP(6 μ M)와 collagen(2 μ g/mL)로 응고를 유도하면 시료의 농도 의존적으로 응고가 억제되는 것을 관찰하였다(Fig. 1). 단삼은 ADP와 collagen에 의한 응고에서 서로 다른 IC_{50} 값을 나타내었으며(Table 1), ADP 보다 collagen에 대하여 확실한 응고 억제효과를 나타내었다.

혈액응고

혈액응고계는 여러 가지 응고인자들이 연속적으로 활성화되어, 마지막으로 fibrinogen을 fibrin으로 변화시킴으로서 clot을 만드는 과정이다. 여기에는 혈관벽 손상 등으로 인한 내인계 경로와 외상 등에 의해 유발되는 외인계 경로가 존재하여 clot을 형성한다(22). 기능성 식품성분이 coagulation cascade의 내인계 또는 외인계에 영향을 주는지를 각각 APTT와 PT를 이용하여 평가할 수 있다. 단삼의 추출물에 의해 혈액응고가 일어나는지 또는 어느 인자가 억제되는지를 알아보기 위해 혈액응고 시간의 변화를 측정하였다. Table 2에 나타낸 것과 같이 단삼 추출물에 의하여 PT, APTT 모두 시료처리를 하지 않은 control과 비교하여 농도 의존적으로 연장되었으며, APTT는 시료의 농도 12.5 mg/mL에서 60.2 sec로 대조군의 20.5 sec 보다 약 3배 연장되었다. PT의 경우도 대조군(14.9 sec)과 비교하여 시료 농도와 함께 연장되는 효과를 나타내어 25.0 mg/mL의 농도에서는 55.5 sec로 대조군에 비해 약 4 배 연장된 PT가 측정되었다. 이 결과로부터 단삼 추출물은 외인계와 내인계 인자 모두에 대해 효과를 나타내어, APTT 연장에 효과가 큰 heparin과는 다른 방식으로 항혈전 효능을 갖는 것으로 사료된다. 현재, 이러한 APTT와 PT를 연장시키는 효과가 응

고인자의 감소에 의한 것인지 또는 thrombin 활성의 억제에 의한 것인지의 정확한 기전을 규명하기 위하여 추출물을 분리하여 연구를 진행 중이다.

혈전용해

Table 3은 단삼 추출물의 혈전용해 활성을 나타내었다. Fibrin plate를 이용한 측정법에서는 fibrin이 가수분해되어 투명해지는 면적을 측정하며, 대조군으로 이용된 plasmin의 농도(0.31-5.0 unit/mL)가 증가하면 투명부위의 면적도 비례하여 증가하였다(data not shown). 단삼 추출물(2 mg)은 control인 0.1 unit plasmin의 70% 정도의 활성을 나타내었다.

Table 2. Anticoagulant activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract

Extract	Concentration	APTT (sec)	PT (sec)
Control	Vehicle	20.5 \pm 0.6	14.9 \pm 1.7
	6.5	27.0 \pm 1.3	-
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge (mg/mL)	12.5	60.2 \pm 0.2	18.4 \pm 0.6
	18.8	76.4 \pm 9.6	27.6 \pm 1.4
	21.5	-	35.9 \pm 1.4
	25.0	211.2 \pm 33.9	55.5 \pm 2.2
Heparin (Unit/mL)	50.0	NC	31.5 \pm 2.1
	83.3	NC	40.8 \pm 3.9

APTT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time. NC, no coagulation. Results are expressed as means \pm SD ($n = 3$).

Table 1. IC_{50} values of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract on the aggregation of rat washed platelets induced by ADP and collagen

Agonist	IC_{50} (mg/mL)
	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge
ADP	0.42 \pm 0.01
Collagen	0.07 \pm 0.01

Table 3. Effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract on fibrinolytic activity

Sample	Clear zone ¹⁾ (cm)
Plasmin (0.1 unit)	15 \pm 0 ²⁾
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	11 \pm 1

¹⁾Average diameter of clear zone.

²⁾Each value is mean \pm SD ($n \geq 3$).

Table 4. Total contents of polyphenols and flavonoids in the *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract

	Total polyphenols ¹⁾ (mg/g)	Total flavonoids ²⁾ (mg/g)
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	77.58 ± 8.30	5.11 ± 0.65

¹⁾Milligrams of total polyphenol content/g of plants based on tannic acid as standard.

²⁾Milligrams of total flavonoid content/g of plants based on quercetin as standard.

³⁾Each value is mean ± SD (n ≥ 3).

Table 5. Effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract on DPPH radical-scavenging activity

Sample	Concentration (μg/mL)	Scavenging effect (%)	RC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	50	87.30 ± 9.21 ²⁾	
	25	60.91 ± 4.48	18.71 ± 6.53
	10	33.35 ± 7.80	
	2.5	68.60 ± 0.83	
Ascorbic acid	1	36.54 ± 0.41	1.76 ± 0.12
	0.5	21.77 ± 4.07	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH (150 mM) at 30 min after starting the reaction.

²⁾Each value is mean ± SD (n ≥ 3).

총 polyphenol과 flavonoids 함량 및 DPPH radical 소거능

식물의 폴리페놀 및 플라보노이드와 항혈전 효과와의 연관성을 알아보기 위하여 단삼 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드의 함량을 측정하였으며, 이 추출물의 직접적인 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH의 radical 감소를 측정함으로서 시료의 free radical-scavenging 활성을 조사하였다. Table 4에 나타낸 것과 같이 총 폴리페놀은 77.58 mg/g, 총 플라보노이드의 함량은 5.11 mg/g으로 측정되었다. 국내 시판 차류의 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 측정한 결과를 살펴보면 인삼차와 녹차의 폴리페놀 함량은 각각 28.3과 94.9 mg/g이고, 플라보노이드 함량은 3.3과 6.7 mg/g으로 보고되었다. 이 결과와 비교해 볼 때 단삼의 메탄올 추출물은 높은 함량의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있는 것을 알 수 있다(23). 식물의 폴리페놀과 플라보노이드가 항혈전능에 미치는 영향에 관한 연구는 많지 않으나, cyclooxygenase-2 활성의 억제(24), 혈소판내의 cAMP농도의 감소, TXA₂의 억제 및 PGI₂의 증가(25,26) 등의 arachidonate cascade의 초기 과정을 조절하는 것으로 나타났다. 또한 시료의 free radical-scavenging 활성을 측정하는 것으로 DPPH는 수소공여체와 반응할 때 상응하는 hydrazine으로 환원된다(27). 단삼 메탄올 추출물은 사용된 범위 내에서 농도 의존적으로 radical-scavenging 효과를 나타냈으며, RC₅₀값은 18.71 μg/mL로 대조구로 사용된 ascorbic acid 보다는 효과가 적었으나, 조추출물로서는 비교적 높은 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다(Table 5). 이와 같이 항산화 효과를 나타내는 단삼의 경우, 생리활성을 나타내는 폴리페놀화합물의 연구를 수행하여 주요 폴리페놀의 항혈전에 미치는 영향을 알아보고, 그 기전을 알아볼 필요가 있다.

요약

단삼 메탄올 추출물의 항혈전 및 항산화 효과를 확인하기 위하여 혈소판의 응고 억제효과, 혈장응고시간의 연장, 혈전용해 활성으로 항혈전 효과를 고찰하였으며 DPPH radical 소거능을 측정하여 항산화 효과를 검토하였다. 그 결과, 단삼의 메탄올 추출물은 항혈전과 항산화에 효과가 있는 것으로 나타났다. 이 추출물은 혈소판응고 억제, 혈액응고시간 연장 및 혈전용해 활성에 모두 효과가 좋은 것으로 나타났으며, 폴리페놀 함량이 높고 DPPH radical 소거능도 매우 좋았다. 이로서 단삼의 높은 DPPH radical 소거능이 항혈전 효과에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 정확한 효과 및 혈소판의 기능을 조절하는 기전에 대한 연구는 이 결과들을 바탕으로 현재 진행 중에 있다.

문헌

- Lefevre M, Kris-Etherton PM, Zhao G, Tracy RP. Dietary fatty acids, hemostasis, and cardiovascular disease risk. *J. Am. Diet. Assoc.* 104: 410-419 (2004)
- Mustard JF, Packham MA. Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation. *Pharmacol. Rev.* 22: 97-187 (1970)
- Longenecker GL, Swift IA, Bowen RJ, Beyers BJ, Shah AK. Kinetics of ibuprofen effect on platelet and endothelial prostanoïd release. *Clin. Pharmacol. Ther.* 37: 343-348 (1985)
- Miwa K, Kambara H, Kawai C. Effect of aspirin in large doses on attacks of variant angina. *Am. Heart J.* 105: 351-355 (1983)
- Kim JK. Illustrated natural drugs encyclopedia, Namsandong Publishers, Seoul, Korea. p.160 (1989)
- Fugh-Berman A. Herbs and dietary supplements in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Prev. Cardiol.* 3: 24-32 (2000)
- Mok JS, Park UY, Kim YM, Chang DS. Effects of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae* Radix (*Salvia miltiorrhiza*) extract. *J. Food Sci. Nutr.* 23: 1001-1007 (1994)
- Kang HS, Chung HY, Byun DS, Choi JS. Further isolation of antioxidative (+)-1-hydroxy pinoresinol-1-O-β-D-glucoside from the rhizome of *Salvia miltiorrhiza* that acts on peroxynitrite, total ROS and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Arch. Pharm. Res.* 26: 24-27 (2003)
- Kim OK, Chung SY, Park MK, Rheu HM, Yang JS. Anticancer activity of natural products including *Salvia miltiorrhiza*. *J. Appl. Pharmacol.* 7: 29-33 (1999)
- Ahn BY, Kim DG, Choi DS. Antimutagenic effect of Tansen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 197-202 (1999)
- Hase K, Kasimu R, Basnet P, Kadota S, Namba T. Preventive effect of lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza* on experimental hepatitis induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Planta Med.* 63: 22-26 (1997)
- Chan TY. Interaction between warfarin and danshen (*Salvia miltiorrhiza*). *Ann. Pharmacother.* 35: 501-504 (2001)
- Durand P, Bloy C, Peltier-Pujol F, Blache D. *In-vitro* and *ex-vivo* inhibition of blood platelet aggregation by naftazone. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 566-572 (1996)
- Veiga AB, Pinto AF, Guimaraes JA. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.* 111: 95-101 (2003)
- Poller L. Activated partial thromboplastin time (APTT) and Prothrombin time (PT). pp. 37-61. In: Laboratory techniques in thrombosis-A manual-2nd revised edition of ECAT assay procedures. Jespersen J, Bertina RM, Haverkate E (eds). Springer, London,

- UK (1999)
16. Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40: 346-351 (1952)
 17. Oh SM, Kim CS, Lee SP. Functional properties of soybean curd residue fermented by *Bacillus* sp. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 115-120 (2006)
 18. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249 (1912)
 19. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidant activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 128-134 (2006)
 20. Nieva MM, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114 (2000)
 21. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200 (1958)
 22. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310-1312 (1964)
 23. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 723-727 (2003)
 24. Fawzy AA, Vishwanath BS, Franson RC. Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A₂ by retinoids and flavonoids. Mechanism of action. *Agents Actions* 25: 394-400 (1988)
 25. Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res.* 64: 91-100 (1991)
 26. Lanza F, Beretz A, Stierle A, Corre G, Cazenave JP. Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors prevent aggregation of human platelets by raising cyclic AMP and reducing cytoplasmic free calcium mobilization. *Thromb. Res.* 45: 477-484 (1987)
 27. Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, Tillement JP, Labidalie S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Le Ridant A. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Bio. Med.* 25: 113-120 (1998)