

송악의 페놀성 물질의 간 보호효과

김경숙 · 송지영* · 이인란*

이화여자대학교 약학대학 약학과, *원자력 병원 면역학 연구실

(Received March 9, 1998)

Protective Effects of the Phenolic Compounds from the Leaves of *Hedera rhombea* on Hepatic Injury

Kyoung Sook Kim, Jie Young Song* and Ihn Rhan Lee*

College of Pharmacy, Ewha Women's University, Seoul 120-750, Korea

*Laboratory of Immunology, Korea Cancer Center Hospital, KAERI, Seoul 139-240, Korea

Abstract — *Hedera rhombea* (HR) has been used for treatments of hemorrhage, chronic catarrh, jaundice, lithiasis and convulsion. This study was done to isolate active compounds that have protective effect on liver damage. BuOH and EtOAc fractions of HR recovered serum glutamic pyruvic transaminase (GPT), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) activities in CCl₄ treated rats. We isolated 7 phenolic compounds from BuOH and EtOAc fractions, which were identified as 3-caffeoyl quinic acid, 3, 4-di-*O*-caffeoyl quinic acid, 3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid, 4, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid, caffeic acid, methyl 3, 4-di-*O*-caffeoyl quinic acid and methyl 3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid by chemical and spectral analysis. These compounds reduced significantly serum GOT and GPT elevated by CCl₄ treatment in rats, and 3-caffeoyl quinic acid, 3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid and caffeic acid also showed mild inhibitory activity against human immunodeficiency virus.

Keywords □ *Hedera rhombea*, Araliaceae, 3-caffeoyl quinic acid, 3, 4-di-*O*-caffeoyl quinic acid, 3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid, 4, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid, caffeic acid, methyl 3, 4-di-*O*-caffeoyl quinic acid, methyl 3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid, S-GOT, S-GPT, antiviral activity.

송악(常春藤) *Hedera rhombea* Bean. (*Hedera rhombea* Sieb et. Zucc. 또는 *Hedera tobleri* Nakai.)은 담장나무라고도 불리며, 오가피과(Araliaceae)에 속하는 상록활엽관목으로 우리나라 남부 및 제주와 일본, 중국에 자생한다. 잎은 卵形으로 三角形과 비슷하고 3~5개로 얇게 갈라지며革質이다. 果實은 球形의 核果이고 겨울에 검게 익는다.^{1,2)} 주로 약용으로 사용하는 부위는 莖葉과 果實로써 莖葉은 鎮靜作用, 眞菌生長抑制作用이 있고, 果實은 祛風, 利濕, 平肝, 解毒의 效能이 있으며 류머티스性 關節炎, 肝炎, 日眩, 顏面神經麻痺症, 鼻出血, 打撲傷, 狂犬咬傷을 치료하고^{3,4)} 민

간약으로는 지혈, 육혈, 만성카타르성 질환, 황달, 결석증, 동맥경화증 등을 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있다.⁵⁾

송악의 약리학적 연구로는 1988년 대만산 *H. nepalensis* K. Koch에서 Pant 등⁶⁾에 의해 nepalin의 spermicidal activity, 항염작용, 항경련작용⁷⁾이 보고되었다. 본 연구실에서는 *H. rhombea* 잎의 진통, 소염활성을 규명하였으며⁸⁾ 항암활성이 강한 nortriterpene인 rhombenone, dihydro-rhombenone을 신물질로 밝힌 바 있으며,⁹⁾ 또한 2종의 페놀성 물질과 3,5-di-*O*-caffeoyl quinic acid¹⁰⁾ 및 dammarane계열 triterpene인 Kizuta saponin K₅가 보고되었다.¹¹⁾ 이러한 물질들은 임상적으로 응용되고 있는 기존의 간장약 cynarin과 화학 구조상 유사성이 있으므로 손상된 간

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-360-3023 (팩스) 02-361-3051

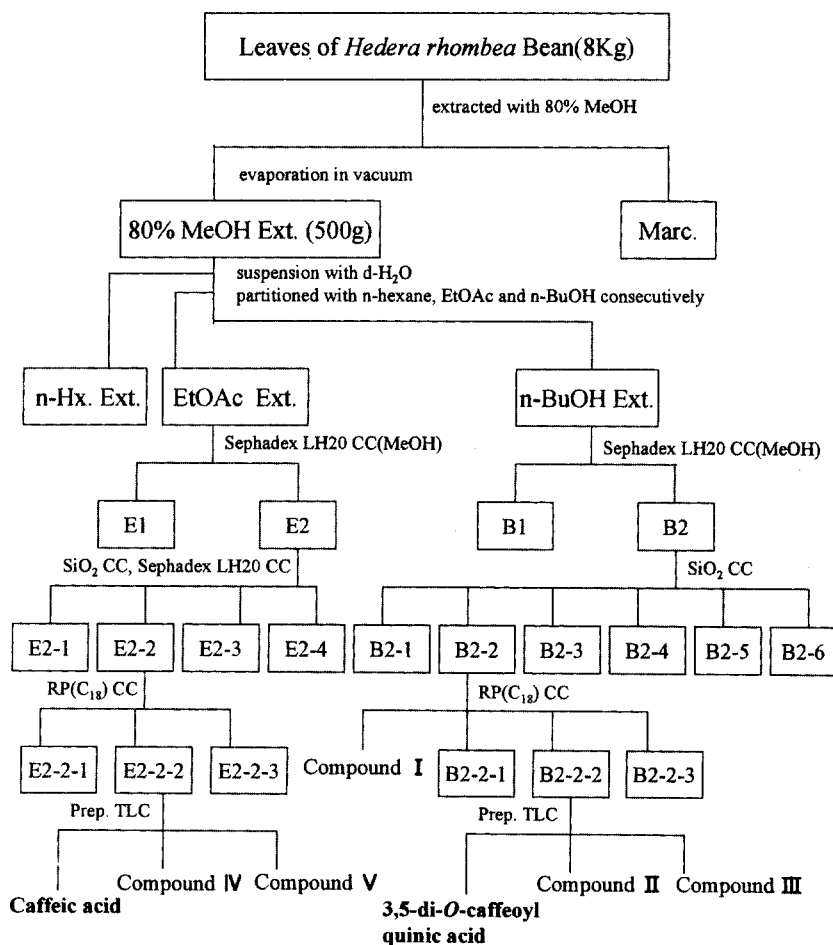
장 기능의 치유 효과가 있을 것으로 유추되어 본 연구에서는 송약잎의 *n*-BuOH 및 EtOAc 분획으로부터 사염화탄소 유발 간 독성에 대한 유의성과, 지방간에 대한 개선 효과를 나타내는 물질을 분리하여 di-*O*-caffeoyl quinic acid계열의 물질임을 밝혔고 또한 항바 이러스 작용을 관찰하였기에 이를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 - 실험에 사용한 송약잎은 1993년 10월부터 94년 9월에 걸쳐 제주도, 전라남북도, 거제도에서 자생하는 송약잎(8 kg)을 채취하여 음건세절한 것을 사용하였다.

시약 및 기기 - 컬럼 크로마토그래피는 Kieselgel 60(230~400 mesh, Merck), Sephadex LH-20(bead

size 25~100 μm, Sigma), Lichroprep RP-18(40~63 μm, 11447 EM)을 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ 및 RP-18 F₂₅₄(Merck)를, 발색시약으로는 anisaldehyde-H₂SO₄, 10% H₂SO₄, FeCl₃, MgCl₂, ZnCl₂시약을 이용하였다. 추출용 용매와 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다. 분석용 기기의 경우 용점은 Mettler F962, UV로 Shimadzu UV-265, IR은 Perkin Elmer 1710 spectrophotometer, Polarimeter는 Jasco DIP-360 digital polarimeter, MS는 Hewlett Packard 5988(ED), NMR은 Bruker AMX-500 spectrometer를 이용하였다. 활성 시험에 사용된 원심분리기는 Vision scientific centrifuge (VS-6000CF), spectrophotometer는 DU-Series 600을, 혈청중 효소 활성도와 혈청지질 함량 측정용 시약은 아산제약(주)의 glutamic oxaloacetic transamina-



Scheme 1 - Isolation of phenolic compounds from the leaves of *Hedera rhombea*.

se(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT), γ -glutamyltranspeptidase(γ -GTP), triglyceride(TG) 측정용 kit 시약을, 표준품 및 기타 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

송약의 추출 및 분리 - 송약의 건조엽(8.0 kg)을 80% MeOH로 70°C에서 3회 추출, 감압농축하여 MeOH 엑스(500 g)를 얻었고 이를 증류수에 현탁한 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH의 순서로 계통적으로 분획하였다. *n*-BuOH층(200 g)을 100% MeOH로 Sephadex LH20 column chromatography(이하 CC)를 실시하여 2개 분획으로 나눈 다음 2번 분획을 CHCl₃:MeOH:H₂O:formic acid=9:3:0.2:0.1을 용매로 silica gel CC하여 6개로 분획하였다. B2-2 분획을 RP(C₁₈) CC를 실시하여 3개 분획과 compound I(200 mg)을 얻었으며, 그 중 B2-2-2 분획을 preparative TLC를 실시하여 3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid¹²⁾와 compound II(420 mg), III(390 mg)를 얻었다. EtOAc층은 Sephadex LH20 CC를 실시하여 2개 분획으로 나누었으며 E2 분획을 다시 Sephadex LH20 CC와 silica gel CC(CHCl₃:MeOH:H₂O:HCOOH=8:4:0.3:0.3)를 실시하여 4개 분획으로 나누었다. 이 중 E2-2분획을 RP(C₁₈) CC를 실시하여 3개로 나누었으며 preparative TLC(benzene:ethyl formate:formic Acid=1:7:1)를 하여 caffeic acid와 compound IV(306 mg), V(360 mg)를 얻었다(Scheme 1 참조).

Compound I - 백색 분말, mp 208°C, $[\alpha]_D = -35.2^\circ(c, 2.8 \text{ in MeOH})$, UV $\lambda_{\max} \text{ nm} : 329, 229, 244, 222, 354$. IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1} : 3500 \sim 2400(\text{OH, COOH}), 1650(\text{C=O}), 1520, 1100(\text{C-O})$. MS(ED) $m/z : 354 [M]^+$. ¹H-NMR(500MHz, CD₃OD) $\delta : 7.54(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 3\text{-H}), 7.02(1\text{H}, d, J=2.0 \text{ Hz}, 5\text{-H}), 6.92(1\text{H}, dd, J=8.0, 2.0 \text{ Hz}, 9\text{-H}), 6.72(1\text{H}, d, J=8.0 \text{ Hz}, 8\text{-H}), 6.23(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 2\text{-H}), 5.18(1\text{H}, dt, 3\text{-H}), 4.18(1\text{H}, dt, 5\text{-H}), 3.65(1\text{H}, dd, 4\text{-H}), 2.29(2\text{H}, m, 2\text{-H}), 2.20(1\text{H}, dd, 6\text{-H})$. ¹³C-NMR(125MHz, MeOH-d₄) $\delta : 180.10(\text{s, COOH}), 169.38(\text{s, C-1}), 150.21(\text{s, C-7}), 148.55(\text{s, C-3}), 147.21(\text{s, C-6}), 128.32(\text{s, C-4}), 123.55(\text{d, C-9}), 117.15(\text{s, C-8}), 115.65(\text{d, C-5}), 115.11(\text{d, C-2}), 77.99(\text{s, C-1}), 77.52(\text{d, C-4}), 72.05(\text{d, C-5}), 70.55(\text{d, C-3}), 39.25(\text{t, C-2}), 38.55(\text{t, C-6})$.

Compound II - 담황갈색 분말, mp 142°C, $[\alpha]_D = -170$, UV $\lambda_{\max} \text{ nm} : 328, 242, 217$. IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1} : 3500 \sim 2400(\text{OH, COOH}), 1650(\text{C=O}), 1600, 1520(\text{olefin, aromatic}), 1120(\text{C-O})$, MS(ED) $m/z : 516[M]^+, 515[M-1]^+, 504, 503$. ¹H-NMR(500MHz, CD₃OD) $\delta : 7.50(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 3\text{-H}), 7.42(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 3'\text{-H}), 6.95(1\text{H}, d, J=2.0 \text{ Hz}, 5\text{-H}), 6.93(1\text{H}, d, J=2.0 \text{ Hz}, 5'\text{-H}), 6.80(1\text{H}, dd, J=8.0, 2.0 \text{ Hz}, 9\text{-H}), 6.79(1\text{H}, dd, J=8.0, 2.0 \text{ Hz}, 9'\text{-H}), 6.68(1\text{H}, d, J=8.0 \text{ Hz}, 8\text{-H}), 6.66(1\text{H}, d, J=8.0 \text{ Hz}, 8'\text{-H}), 6.20(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 2\text{-H}), 6.08(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 2'\text{-H}), 5.68(1\text{H}, dt, J=10.0 \text{ Hz}, \text{H-5}), 5.20(1\text{H}, dd, J=10.0, 3.0 \text{ Hz}, \text{H-4}), 4.45(1\text{H}, dt, J=10.0, 5.0 \text{ Hz}, \text{H-3}), 2.29(1\text{H}, dd, J=14.0, 3.0 \text{ Hz}, 6\text{-Hax}), 2.20(2\text{H}, m, 2\text{-H}), 2.02(1\text{H}, dd, J=14.0, 6.0 \text{ Hz}, 6\text{-Heq})$. ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) $\delta : 179.10(\text{s, COOH}), 169.52(\text{s, C-1}), 168.22(\text{s, C-1}), 149.75(\text{s, C-7' and C-7}), 147.66(\text{d, C-3}), 147.29(\text{d, C-3}), 147.00(\text{s, C-6' and C-6}), 128.22(\text{s, C-4}), 128.10(\text{s, C-4'}), 123.20(\text{d, C-9' and C-9}), 116.22(\text{s, C-8' and C-8}), 115.86(\text{d, C-5' and C-5}), 115.76(\text{d, C-2 and C-2'}), 74.96(\text{s, C-1}), 72.50(\text{d, C-4}), 72.29(\text{d, C-5}), 70.06(\text{d, C-3}), 35.09(\text{t, C-2}), 30.98(\text{t, C-6})$.

Compound III - 황갈색 분말, mp 178°C, $[\alpha]_D = -218^\circ(c, 0.13 \text{ in MeOH})$, UV $\lambda_{\max} \text{ nm} : 328, 242, 217$. IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1} : 3500 \sim 2400(\text{OH}), 1650(\text{C=O}), 1600, 1520(\text{olefin, aromatic C=C}), 1120(\text{C-O})$, MS(ED) $m/z : 516 [M]^+, 515[M-1]^+, 504, 503$. ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD) $\delta : 7.51(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 3\text{-H}), 7.39(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 3'\text{-H}), 6.93(1\text{H}, d, J=2.0 \text{ Hz}, 5\text{-H}), 6.90(1\text{H}, d, J=2.0 \text{ Hz}, 5'\text{-H}), 6.83(1\text{H}, dd, J=8.0, 2.0 \text{ Hz}, 9\text{-H}), 6.82(1\text{H}, dd, J=8.0, 2.0 \text{ Hz}, 9'\text{-H}), 6.68(1\text{H}, d, J=8.0 \text{ Hz}, 8\text{-H}), 6.62(1\text{H}, d, J=8.0 \text{ Hz}, 8'\text{-H}), 6.19(1\text{H}, d, J=16.0 \text{ Hz}, 2\text{-H and 2'\text{-H}), 5.61(1\text{H}, dt, J=10.0, 5.0 \text{ Hz}, 3\text{-H}), 5.02(1\text{H}, dd, J=10.0, 3.0 \text{ Hz}, 4\text{-H}), 4.25(1\text{H}, dd, J=3.0, 2.5 \text{ Hz}, 5\text{-H}), 2.29(1\text{H}, dd, J=14.0, 3.0 \text{ Hz}, 6\text{-Hax}), 2.20(2\text{H}, m, 2\text{H}), 2.02(1\text{H}, dd, J=14.0, 6.0 \text{ Hz}, 6\text{-Heq})$. ¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD) $\delta : 180.10(\text{s, COOH}), 169.38(\text{s, C-1}), 169.26(\text{s, C-1}), 150.32(\text{s, C-7' and C-7}), 148.37(\text{d, C-3 and C-3'}), 147.46(\text{s, C-6' and C-6}), 128.46(\text{s, C-4}), 128.40(\text{s,$

C-4'), 123.87(*d*, C-9' and C-9), 117.20(*s*, C-8' and C-8), 115.80(*d*, C-5' and C-5), 115.43(*d*, C-2 and C-2'), 74.96(*s*, C-1), 72.50(*d*, C-4), 71.45(*d*, C-5), 70.11 (*d*, C-3), 35.05(*t*, C-2), 30.48(*t*, C-6)

Compound IV - 농황갈색 무정형 분말, mp 157°C, $[\alpha]_D = -210$ (*c*, 0.13 in MeOH), UV $\lambda_{max}nm$: 330, 305, 250, 215. IR $\nu_{max}cm^{-1}$: 3500 2400(OH, COOH), 1650(C=O), 1600, 1520(olefin, aromatic), 1120(C-O). MS(EI) *m/z*: 530 [M]⁺, 467, 439. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.52(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 3-H), 7.48(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 3'-H), 6.98(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, 5-H), 6.96(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, 5'-H), 6.88(1H, *dd*, *J*=8.0, 2.0 Hz, 9-H), 6.86(1H, *dd*, *J*=8.0, 2.0 Hz, 9'-H), 6.70(2H, *d*, *J*=8.0 Hz, 8-H and 8'-H), 6.23(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 2-H), 6.12(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 2'-H), 5.30(1H, *dt*, *J*=13.0, 7.0 Hz, 3-H), 5.22(1H, *dd*, *J*=9.0, 3.0 Hz, 5-H), 3.89(1H, *dt*, *J*=5.5, 3.0 Hz, 4-H), 3.63(3H, *s*, OCH₃), 2.23(1H, *dd*, *J*=14.0, 3.0 Hz, 6-H_{ax}), 2.21(2H, *m*, 2-H), 2.20(1H, *dd*, *J*=14.0, 6.0 Hz, 6-H_{eq}). ¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD) δ : 175.91(*s*, COOCH₃), 169.23(*s*, C-1), 168.74(*s*, C-1'), 150.35(*s*, C-7' and C-7), 148.43(*d*, C-3' and C-3), 147.37(*s*, C-6' and C-6), 128.40(*s*, C-4), 128.25(*s*, C-4'), 123.90(*d*, C-9' and C-9), 116.23(*s*, C-8' and C-8), 115.95(*d*, C-5' and C-5), 115.43(*d*, C-2), 115.28(*d*, C-2'), 74.20(*d*, C-1), 72.96(*d*, C-4), 72.29(*d*, C-3), 70.06(*d*, C-5), 53.31(*q*, OCH₃), 37.05(*t*, C-2), 30.68 (*t*, C-6).

Compound V - 농황갈색 분말, mp 178°C, $[\alpha]_D = -210$ (*c*, 0.13 in MeOH), UV $\lambda_{max}nm$: 305, 250, 215. IR $\nu_{max}cm^{-1}$: 3500 2400(OH), 1650(C=O), 1600, 1520(olefin, aromatic), 1120(C-O). MS(EI) *m/z*: 530[M]⁺, 467, 439. ¹H-NMR(500MHz, CD₃OD) δ : 7.50(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 3-H), 7.40(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 3'-H), 6.92(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, 5-H), 6.91(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, 5'-H), 6.81(1H, *dd*, *J*=8.0, 2.0 Hz, 9-H), 6.80(1H, *dd*, *J*=8.0, 2.0 Hz, 9'-H), 6.68(2H, *d*, *J*=8.0 Hz, 8-H and 8'-H), 6.19(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 2-H), 6.08(1H, *d*, *J*=16.0 Hz, 2'-H), 5.45(1H, *dt*, *J*=10.0, 5.0 Hz, 3-H), 5.02(1H, *dd*, *J*=10.0, 3.0 Hz, 4-H), 4.26(1H, *dd*, *J*=10.0, 3.0 Hz, 5-H), 3.63(3H, *s*, OCH₃), 2.29(1H, *dd*, *J*=14.0,

3.0 Hz, 6-H_{ax}), 2.20(2H, *m*, 2-H), 2.02(1H, *dd*, *J*=14.0, 6.0 Hz, 6-H_{eq}). ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) δ : 175.98(*s*, COOCH₃), 169.53(*s*, C-1), 168.24(*s*, C-1'), 150.75(*s*, C-7' and C-7), 149.25(*d*, C-3' and C-3), 147.10(*s*, C-6' and C-6), 128.25(*s*, C-4), 128.25(*s*, C-4'), 123.01(*d*, C-9' and C-9), 116.22(*s*, C-8' and C-8), 115.22(*d*, C-5' and C-5), 115.15(*d*, C-2), 115.15(*d*, C-2'), 74.96(*s*, C-1), 72.50(*d*, C-4), 72.29(*d*, C-3), 70.06(*d*, C-5), 53.30(*q*, OCH₃), 37.98 (*t*, C-2), 30.96(*t*, C-6).

실험동물 - 본 실험에 사용한 실험동물로는 중앙동물의 Sprague-Dawley계 체중 180~220 g의 숫컷흰쥐를 사용하였으며 삼양유지(주)의 고행사료로 사육하였고 물을 자유로이 공급하면서 일주일 이상 실험실 환경에 순응시킨 후에 사용하였다.

간세포 독성에 대한 저해 활성 측정 - SD계 흰쥐에 CCl₄와 olive oil을 1:1로 혼합하여 간 독성을 유발하였으며 시료처리는 polyethylene glycol 400에 적정 용량으로 녹여 복강내 투여하였다. 혈청중 GOT 및 GPT의 효소 활성도는 혈청 transaminase 측정용 시약(GOT·GPT)을 사용하여 Reitman-Frankel법¹²⁾에 준하여 측정하였다. γ -glutamyl-transpeptidase 측정은 Orłowski법을 변형한 γ -glutamyl-p-nitroanilide 기질법으로 조제된 kit를 사용하여 측정하였고 혈청중 triglyceride함량은 중성지방 측정용 시약(Cleantech TG-S)을 사용하여 효소법^{13,14)}에 준하여 실험하였다.

항 바이러스 작용 - 바이러스는 Herpes simplex virus type 1(HSV-1) strain F(ATCC VR-733), Herpes simplex virus type 2(HSV-2) strain MS(ATCC VR-734), HIV-1 strain III_B [HIV-1(III_B)], HIV-2 strain RF [HIV-2(RF)]를 사용하였으며, 시험물질과 표준약물인 acyclovir(삼천리제약), arabinocytosine(Ara-C, Sigma), AZT(Sigma)를 100% DMSO(dimethoxy sulfoxide)에 20 mg/ml로 녹인 다음 최종함량이 2.5%를 넘지 않도록 희석하여 처리하였다. 약효검색은 virus-induced cytopathic effect(CPE)저해법을 이용하였다.¹⁵⁾ 바이러스의 역가를 측정하기 위하여 96 well plate에 배양된 Vero 세포(ATCC CRL15, HSV실험용)나 MT-4세포(ATCC CRL15, HIV실험용)단층에 희석된 바이러스 부유액을 0.1 ml씩 접종하고 1시간 감염시킨 후 배지를 첨가하였다. 바이러스에 의한 CPE가 나타날 때까지 5% CO₂배양기에서 2일간 배양한 다음

배양액을 제거하고 MTT로 염색한 후 세척하였다. 세포 단층에 CPE에 의해 50% 파괴된 바이러스의 희석 배수를 결정하여 50% cell culture infective dose(CCID₅₀)/mL로 바이러스의 역가를 표시하였다. 항 바이러스 작용은 세포가 단층 배양된 96 well plate의 각 well에 100 CCID₅₀가 되는 0.1 mL의 바이러스로 접종하고 1시간 감염시킨 후 시료 및 표준 약물을 0.1 mL넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간(HSV측정), 또는 5일간(HIV측정) 배양하였다. 배양액을 제거하고 세포를 고정, 염색시킨 후 CPE를 나타낸 약물농도를 계산하여 EC₅₀값을 구하였다. 약물 자체의 세포 독성을 검사하기 위하여 바이러스를 감염시키지 않은 세포와 약물이 처리된 세포를 3일간 배양한 후 trypan blue exclusion법으로 세포수를 계산하여 CC₅₀(50% cytotoxic concentration)을 구하였다.

% Cytotoxicity =

$$\frac{\text{대조군 세포수} - \text{시험 약물의 세포수} \times 100}{\text{대조군 세포수}}$$

이상의 결과치로부터 항 바이러스활성의 EC₅₀와 세포독성의 CC₅₀로 Selectivity index(SI) CC₅₀/EC₅₀을 구하였다.

통계처리 - 실험자료는 평균±표준편차로 표시하였고 실험군간의 유의성은 student t-test를 이용하여 통계학적으로 검정하였다.

실험결과 및 고찰

구조 확인

Compound I-은 백색 분말로 FeCl₃에 오록색, ZnCl₂에 적색을 나타내어 phenol성 물질임을 알 수 있었다. IR spectrum(cm⁻¹)에서 3500~2400(br)의 OH, COOH를, 1650에서 α, β-unsaturated C=O를, 1100에서 C-O band를 확인할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서는 6.23(1H, J=16.0 Hz)과 7.54(1H, J=16.0 Hz)ppm은 carbonyl group에 연결된 olefin의 두 수소 signal을 나타내며 coupling constant가 16.0 Hz이므로 *trans* 형태임을 알 수 있었다. 6.92(1H, *dd*, J=8.0, 2.0 Hz)의 피크는 6.72(1H, *d*, J=8.0 Hz)와 *ortho*-결합을 하고 있으며 또한 7.02(1H, *d*, J=2.0 Hz)ppm의 수소와 *meta* 위치로 결합되어 있으므로 3, 4위치가 치환된 aryl group을 지니고 있음을 알 수

있었다. IR과 ¹H-NMR spectrum으로부터 compound I은 α, β-unsaturated carbonyl group, 특히 carboxylic acid와 3, 4위치가 치환된 aryl group을 갖고 있는 caffeic acid계열의 물질로 추정할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서 caffeoyl기의 C-1, C-7, C-3, C-6, C-4를 나타내는 169, 150, 148.6, 147, 128 ppm과, C-9, C-8, C-5, C-4의 123.6, 117, 115.7, 115 ppm의 4개 피크를 확인할 수 있었으며 나머지 7개 피크는 OH기로 치환된 cyclohexane ring임을 예상하였다. 180 ppm의 탄소 signal은 COOH기의 존재를 나타내며 78.0, 77.5, 72.1, 70.6 ppm의 4개 피크는 OH기에 결합된 탄소임을 나타내었다. 나머지 39.3과 38.6 ppm의 signal은 2개의 methylene기를 지니고 있음을 나타내었다. 천연물로부터 분리된 quinic acid^{16,17}의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum과 비교 분석한 결과 compound I은 quinic acid의 3번 hydroxyl기에 caffeic acid가 결합된 분자식이 C₁₆H₁₈O₉인 3-caffeoyl quinic acid로 동정하였다.

Compound II~V - 모두 TLC plate상에서 FeCl₃에 오록색으로 발색됨으로 phenol성 compound임을 알 수 있었다. Compound II의 IR spectrum과 UV spectrum은 compound I과 매우 유사하므로 caffeic acid유도체임을 추정할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서는 aromatic region의 여러 proton signal이 compound I과 유사하였으나 그 수가 2배 많았으므로 2개의 caffeic acid group을 가지고 있을 것으로 생각되었다. 또한 ¹³C-NMR상의 전체 탄소수는 25개였으며 169.5와 168 ppm의 두 피크는 2개의 carbonyl ester를 갖고 있음을 나타냈다. 179.1 ppm의 peak는 carboxylic acid의 탄소 signal이며, 70~75 ppm에 보이는 4개의 peak들은 hydroxyl이 붙은 carbon임을, 30~40 ppm의 두 peak는 aliphatic carbon임을 알 수 있었다. Caffeoyl ester 형으로 식물에서 보고된 물질은 caffeoyl glucose와 chlorogenic acid를 비롯한 caffeoyl quinic acid 등이 있고 caffeic acid가 두개 붙은 것으로 isochlorogenic acid가 보고된 바 있는데, compound II도 두개의 caffeoyl moiety가 quinic acid에 연결되었으리라 보고, gallic acid가 붙은 quinic acid의 ¹³C-NMR과 비교해 본 결과 3, 5치환체와 quinic acid moiety가 아주 유사하였다. 또한, quinic acid의 1, 3, 4, 5번 탄소 위치의 OH기에 대한 di치환체(1, 3-, 1, 5-, 3, 4-, 4, 5-, 3, 5-) 형상시 ¹H-

NMR spectrum 상에서 각각 뚜렷한 특징을 가지므로 이들과 compound II의 ¹H-NMR spectrum을 비교한 결과, 두 개의 caffeoyl moiety가 quinic acid의 3, 5위치에 치환된 것을 알 수 있었다. MS spectrum에서 m/z 515[M-1]⁺, 516[M]⁺ molecular ion peak가 나타난 것으로 보아 분자량이 516임을 알 수 있었고, 또한 산 가수분해를 실시하여 caffeic acid와 quinic acid를 확인할 수 있었다. 이상의 data를 종합하고 문헌치¹⁸⁾와 비교 분석하여 compound II는 4, 5-di-O-caffeoyl quinic acid로 동정하였다.

Compound III – IR, UV, MS spectrum을 통해 compound II와 마찬가지로 분자량 516의 caffeic acid유도체임을 추정할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 aromatic region 6.2~7.5 ppm 사이의 double bond peak와 ¹³C-NMR spectrum에서 115~169 ppm, 180 ppm으로 나타난 탄소 피크로 보아 compound II의 구조 이성체임을 확인할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 5.62(1H, dt, J=13.0 Hz, 3-H),

5.02(1H, dd, 4-H), 4.25(1H, dt, 5-H)ppm의 수소 signal로 quinic acid와 caffeic acid가 3, 4- 치환체를 형성하였음을 알 수 있었고, 문헌치^{17,19)}를 비교하여 compound III을 3, 4-di-O-caffeoyl quinic acid로 동정하였다.

Compound IV – UV spectrum에서 caffeic acid의 특징적인 305nm의 shoulder 피크를 나타냈으며, IR spectrum과 ¹H, ¹³C-NMR에서 dicaffeoyl quinic acid임을 확인할 수 있었다. 그러나 MS spectrum에서 m/z 530[M⁺]으로 분자량이 530임을 알 수 있었고, ¹H-NMR의 3.63 ppm, ¹³C-NMR에서 53.3 ppm의 signal은 methoxyl기가 존재함을 나타냈다. 또한 isochlorogenic acid의 quinic acid의 C-1 signal은 180 ppm인데 비해 compound IV에서는 175.97 ppm으로 upfield shift된 peak가 나타난 것으로 보아 이 물질은 C-1에 methyl기가 치환된 methyl-quinic acid형임을 알 수 있었으며 ¹³C-NMR spectrum과 DEPT에서 carbon수가 26개인 것을 확인하였다. 따라서 문헌

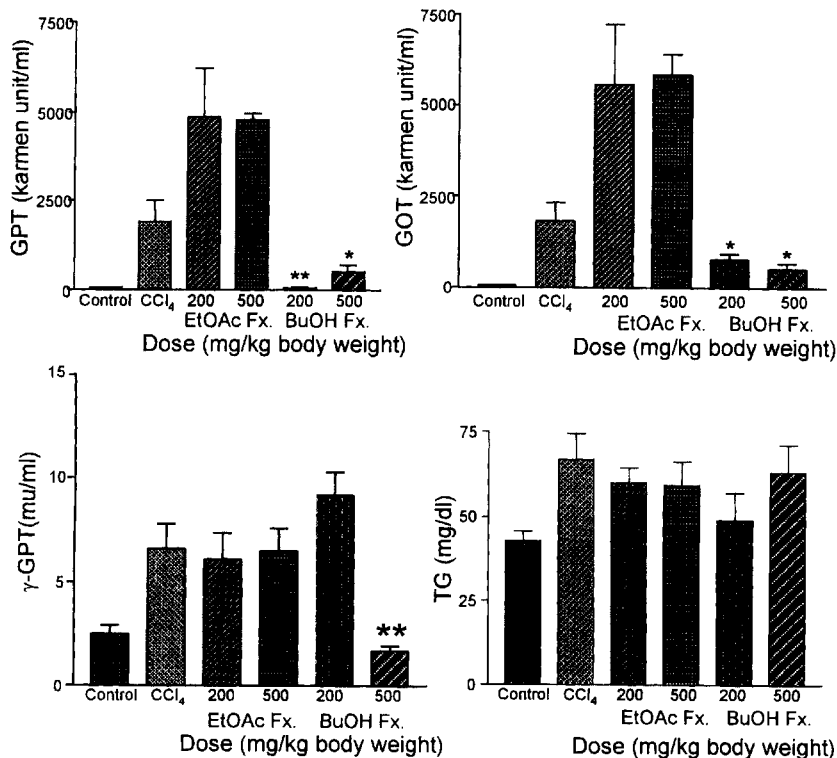


Fig. 1 – Effects of EtOAc, *n*-BuOH fractions on serum GOT, GPT, γ-GTP and TG activities in CCl₄-treated rats. Each value represents mean ± S.D. for 5 or 6 rats and each compound (200 or 500 mg/kg) were injected intra-peritoneally. Significantly different from the CCl₄-treated group (*p<0.05,**p<0.01).

치²⁰상의 data를 비교하여 compound IV는 분자식이 $C_{26}H_{26}O_{12}$ 인 methyl-3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid로 동정하였다.

Compound V - compound IV와 마찬가지로 분자량 530의 dicaffoyl quinic acid 계열로 ¹H-NMR에서 3.62 ppm 피크와 ¹³C-NMR spectrum에 나타난 53.6 ppm 피크로 보아 quinic acid의 COOH가 COOCH₃가 된 것을 알 수 있으며, upfield shift한 carboxylic acid의 175.7 ppm signal도 관찰되었다. 위에서와 마찬가지로 산 가수분해를 하여 caffeic acid와 quinic acid를 확인하였고, quinic acid의 OH에 caffeic acid가 연결된 위치를 ¹H-NMR spectrum으로 확인해본 결과 5.48(1H, *dt*, *J*=13.0 Hz, 3-H), 5.03(1H, *dd*, 4-H), 4.26(1H, *dt*, 5-H)ppm으로 나타난 것을 보아 3, 4 위치의 OH와 결합한 것을 알 수 있었다. 문헌치^{19,21})와 비교 분석하여 compound V는 분자식이 $C_{26}H_{26}O_{12}$ 인 methyl-3, 4-di-*O*-caffeoyl quinic acid로 동정하였다.

간세포 독성에 대한 효소 저해 활성

EtOAc 엑스 200 mg/kg, 500 mg/kg 투여군은 GOT, GPT, γ -GTP, TG 활성도에 대해서 유의성 있는 감소가 관찰되지 않았다. *n*-BuOH 엑스 200 mg/kg, 500 mg/kg 투여군에서는 GPT 활성도가 대조군(1896.33 \pm 603.94)에 비해 각각 61.00 \pm 8.54(96.7%), 510.5 \pm 181.94(73.1%), GOT 활성도는 대조군(1817.20 \pm 484.05)에 비해 780.20 \pm 149.11(57%), 521.83 \pm 152.33(71%)으로, γ -GTP 활성도는 500 mg/kg 투여군에서 대조군(6.62 \pm 0.70)에 비해 1.71 \pm 0.23(74.3%)으로 현저하게 감소되었다(Fig. 1).

3, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid는 100 mg/kg에서 2881.87 \pm 691.6(45%), 300 mg/kg에서 1761.71 \pm 454.37(66.4%)로 나타났으며, compound II는 100 mg/kg에서 2814.78 \pm 2264.01(44%)로, compound III은 100 mg/kg에서 2493.36 \pm 1216.76(52.4%), 300 mg/kg에서 653.11 \pm 480.03(87.5%)로 CCl₄ 단독 투여군보다 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. Compound IV,

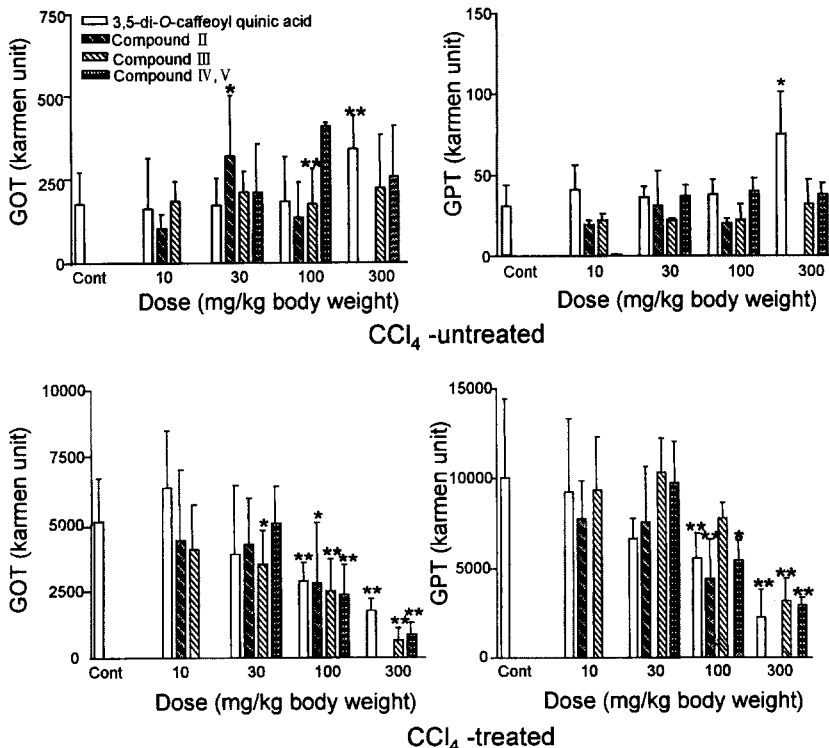


Fig. 2 - Effects of phenolic compounds on serum GOT and GPT activities in CCl₄-treated mice. Each compound (10, 30, 100, 200, or 300 mg/kg) were injected intraperitoneally and each value represents mean \pm S.D. for 5 or 6 mice. Significantly different from the CCl₄-treated group (**p*<0.05, ***p*<0.01).

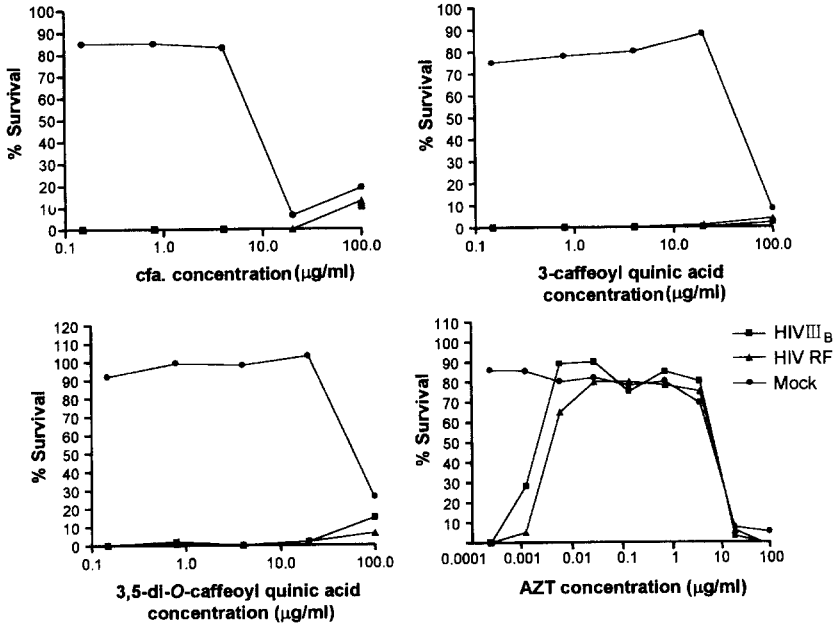


Fig. 3 – Dose response curve for phenolic compounds against HIV-1 or HIV-2. cfa.=caffeic acid.

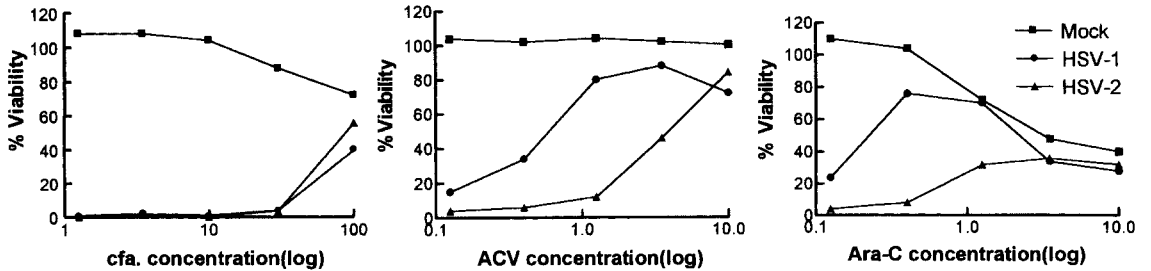


Fig. 4 – Dose response curve for caffeic acid against HSV-1 or HSV-2. cfa.=caffeic acid, ACV=acyclovir, Ara-C=vidarabin.

V투여군에서 GOT활성도는 CCl_4 대조군(5241.24 ± 1601.06)에 비해 100 mg/kg에서 2373.26 ± 1125.83 (54%), 200 mg/kg에서 882.96 ± 443.12 (83.2%)로 나타났다(Fig. 2). 또한, GPT활성도는 대조군(10036.98 ± 4377.32)에 비해 3, 5-di-O-caffeoyl quinic acid는 100 mg/kg에서 5547.26 ± 1435.48 (44.7%), 300 mg/kg에서 2236.67 ± 1556.16 (77.7%)로 농도 의존적으로 CCl_4 단독 투여군보다 억제 효과가 나타났으며, compound II는 100 mg/kg에서 4422.28 ± 2204.64 (68.5%)로, compound III는 300 mg/kg에서 3159.19 ± 1266.44 (68.5%)로 억제효과를 보였다. Compound IV, V를 100 mg/kg 투여한 군에서 5423.73 ± 1150.54 (46.0%), 200 mg/kg에서 2902.94 ± 431.53 (71.0%)로

나타난 반면, 3, 5-di-O-caffeoyl quinic acid 300 mg/kg을 단독 투여한 군에서는 정상군의 GOT, GPT를 유리시키는 세포 독성을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

항 바이러스 활성

Compound II, IV, V는 HIV 저해 활성이 유의적으로 나타나지 않았고, caffeic acid가 $EC_{50} > 7.98$, selectivity index < 1 , compound I은 $EC_{50} > 42.26$, selectivity index < 1 로, 3, 5-di-O-caffeoyl quinic acid는 $EC_{50} > 58.48$, selectivity index < 1 로 저해활성이 나타났다. 이 결과는 대조군 AZT의 $CC_{50} = 65$, $EC_{50} = 0.00234$ 와 비교했을 때, 약한 저해 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3). HSV-1 F에 대한 저해 활성은 유의

성이 관찰되지 않았으며, HSV-2 MS에 대해 caffeic acid가 $EC_{50}=88.97$, se-lectivity index>1.12로 약한 저해 활성을 나타내었다(Fig. 4).

결 론

송악잎의 80% MeOH 추출물을 각종 컬럼 크로마토그래피를 통하여 7종의 페놀성 화합물을 분리, 구조를 규명하였고 각각의 화합물을 사염화탄소 유발 간세포 독성 실험, 항바이러스 활성 실험을 통하여 생리활성을 규명하였다.

1. 에칠 아세테이트와 부탄올 가용분획에서 페놀성 물질인 황갈색 분말상의 compound I~V를 단리하였고, compound I은 3-caffeoyl quinic acid, compound II는 4, 5-di-O-caffeoyl quinic acid, compound III는 3, 4-di-O-caffeoyl quinic acid, compound IV는 methyl 3, 5-di-O-caffeoyl quinic acid, compound V은 methyl 3, 4-di-O-caffeoyl quinic acid로 동정하였다.

2. 사염화탄소 유발 간 독성에 대한 효소 활성은 n-BuOH 분획에서 대조군과 비교시 GOT, GPT활성도가 $p<0.01$ 로 유의성 있게 감소되었으며, 분리된 모든 페놀성 화합물에서 저해활성이 관찰되었다. 혈중 GOT 활성도는 대조군과 비교시 3, 4-di-O-caffeoyl quinic acid가, GPT 활성도는 4, 5-di-O-caffeoyl quinic acid가 $p<0.01$ 로 손상된 간에 대한 보호효과가 가장 우수하게 나타났다. 항 바이러스 작용은 HIV에 대해 3-caffeoyl quinic acid, 3, 5-di-O-caffeoyl quinic acid, caffeic acid가 약하게 저해 활성을 나타내었고, HSV-2에 대한 저해 활성은 caffeic acid에서 미약하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 이화여자대학교 약학연구소 연구비에 의하여 일부가 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 정태현 : 한국식물도감 식물편(목초본), 삼화출판사, p. 878 (1965).
- 2) 송주택 : 한국자원식물, p. 728 (1983).
- 3) 정보석, 신민교 : 향약대사전(식물편), 영림사, p. 436 (1990).
- 4) 新文豊出版公司 : 中藥大辭典, 中編, p. 1723 (1982).
- 5) 江蘇新醫學院 : 中藥大辭典, 下編, p. 2103 (1982).
- 6) Pant, G., Panwar, M. S., Rawat, M. S. and Negi, D. S. : Spermicidal glycosides from *H. nepalensis* K. Koch (Inflorescence). *Pharmazie* **43**, 294 (1988).
- 7) 榮田承二, 絲川秀治, 三川潮, 庄司順三, 瀧戸道夫, 藥用天然物質, 南山堂, p. 402.
- 8) Lee, I. R., Kim, J. S. and Lee, S. H. : Pharmacological activities of the leaves of *Hedera rhombea* bean. *Korean J. Pharmacognosy* **23**, 34 (1991).
- 9) Kim, K. S., Choi, Y. H. and Lee, I. R. : A novel nortriterpene from *Hedera rhombea*. *Arch. Pharm. Res.* **20**, 191 (1997).
- 10) Lee, I. R., Lee, M. S., Choi, K. A. and Seo, E. K. : Pharmacological activities and the constituents of the leaves of *Hedera rhombea* (II): On the constituents of the leaves. *Arch. Pharm. Res.* **16**(4), 331 (1993).
- 11) Kizu, H., Koshijima, H. and Tomimori, T. : Studies on Nepalese crude drugs. III. On the saponins of *Hedera nepalensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3376 (1985).
- 12) Reitmann, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 5663, (1957).
- 13) Sardesa, V. M. and Manning, J. A. : The determination of triglyceride in plasma and tissue, *Clin. Chem.*, **14**, 156 (1968).
- 14) Van Handel E. and Silversmit D. B. : Micromethod for the determination of serum triglyceride, *J. Lab. and Clin. Med.* **50**, 152 (1957).
- 15) Clercq, E. De., Descamps, J., Verhesst, G., Walker, R. T., Jones, A. S., Torrence, P. E. and Shugar, D. : Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus, *J. Inf. Dis.* **141**, 563 (1980).
- 16) Saizo Reiko, Doctoral Thesis "Chemical Studies on Tannin and its related compounds of *M. japonicus*, *M. repandus* and *M. philippinensis*, Euphorbiaceae", KyuShu University, Japan (1990).
- 17) Rumero-Sanchez, A. and Vazquez, P. : Quinic acid esters from *Iseria haenkeana*, *Phytochemistry*, **30**,

- 311 (1991).
- 18) Morishita, H., Iwahashi, H., Osaka, N. and Kido, R. : Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **315**, 253 (1984).
- 19) Shigetoshi, R. Tsuneo, N. : Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 655 (1996).
- 20) Timmermann, B. N., Hoffmann, J. J., Jolad S. D., Schram, K. H., Klenck, R. E. and Bates, R. B. : Constituents of *Chrysothamnus paniculatus* 3, 3, 4, 5-tricaffeoylquinic acid (A new shikimate prearomatic) and 3, 4-, 3, 5-and 4, 5-dicaffeoyl quinic acids. *J. Nat. Prod.* **46**, 365 (1985).
- 21) Kielley, C. J., Harruff, R. C. : The polyphenolic acids of *Lithospermum ruderae* II. Carbon-13-nuclear magnetic resonance of lithospermic and rosmarinic acids. *J. Org. Chem.* **41**, 449 (1976).