

## 국내산 다래나무 수피의 페놀성 화합물의 항산화 및 Nitric Oxide 생성 억제 활성

임현우 · 심재걸 · 최형균 · 이민원\*  
중앙대학교 약학대학

### Phenolic Compounds from Barks of *Actinidia arguta* Planchon Growing in Korea and its Anti-Oxidative and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities.

Hyun-Woo Lim, Jae-Geul Shim, Hyung Kyoon Choi, and Min-Won Lee\*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** – Phytochemical examination of the barks of *Actinidia arguta* led to the isolation of five flavonoids. Structures of compounds were elucidated as catechin (1), (–)-epicatechin (2), quercetin (3), quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (4), quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (5) by comparison with previously reported spectral evidences. To investigate the anti-oxidative effect and nitric oxide (NO) production inhibitory activity of these compounds, DPPH radical scavenging activity and nitric oxide production inhibitory activity in IFN-γ, LPS stimulated RAW 264.7 cell were examined. The IC<sub>50</sub>s were determined as follows : 1 IC<sub>50</sub> = 26.61 μg/ml, 2 IC<sub>50</sub> = 25.30 μg/ml, 3 IC<sub>50</sub> = 20.41 μg/ml, 4 IC<sub>50</sub> = 18.23 μg/ml, 5 IC<sub>50</sub> = 30.46 μg/ml, 6 IC<sub>50</sub> = 28.03 μg/ml and 7 IC<sub>50</sub> = 27.24 μg/ml. These NO production inhibitory effects were significantly different compared with the positive control, L-NMMA (IC<sub>50</sub> = 20.77 μg/ml), respectively. Compound 1 (IC<sub>50</sub> = 6.19 μg/ml), 2 (IC<sub>50</sub> = 8.98 μg/ml), 3 (IC<sub>50</sub> = 7.30 μg/ml) and 4 (IC<sub>50</sub> = 7.64 μg/ml) also showed potent antioxidative activities similar level to ascorbic acid (IC<sub>50</sub> = 9.22 μg/ml). These results suggest that barks of *A. arguta* have a potent anti-oxidative and anti-inflammatory activity.

**Key words** – *Actinidia arguta*, flavonoids, nitric oxide, antioxidative activity

옛부터 다래나무의 열매는 미후도 (彌猴桃)라 하여 번열, 소갈증, 황달, 소화불량의 치료에 쓰였으며, 뿌리는 미후도근 (彌猴桃根)이라 하여 급성 간염, 수종, 소화불량, 구토, 타발상, 관절통 등의 치료에 쓰였다. 또한 잎은 미후리 (彌猴梨)라 하여 식도암, 황달, 설사, 외상에 의한 출혈의 치료 등에 쓰였다.<sup>1)</sup> *Actinidia* 속 식물에 대한 성분 연구로는 1980년 Sakai 등은<sup>2)</sup> *A. polygama*의 과실로부터 휘발성분인 iridane type의 monoterpene lactone인 dihydroponepetalactone 의 6종의 화합물을 분리하였고, 1986년 Huang 등은<sup>3)</sup> *A. eriantha*의 뿌리에서 daucosterol, ursolic acid, β-sitosteol과 2α, 3α, 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 2α, 3α-dihydroxy-24-acetyl-urs-12-en-28-oic acid 등의 triterpene를 보고하였다. Li 등은<sup>4)</sup> 1989년 *A. kolomikta*의 잎에서 kaempferide-7-O-

rhamnoside, kaempferide-3-O-rutinoside-7-O-rhamnoside를 분리하였고 과실에서는 다량의 ascorbic acid가 함유되었음을 보고하였다. Rosemary 등은<sup>5,6)</sup> 1990년 *A. arguta*, *A. eriantha*와 *A. polygama*의 열매에서 kaempferol, quercetin, kaempferol 3-O-[α-rhamnopyranosyl-(1-4)-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-glucopyranoside]와 kaempferol 3-O-[α-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-glucopyranoside]와 kaempferol 3-O-[α-rhamnopyranosyl-(1-4)-3-O-acetyl-α-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-galactopyranoside]를 분리하였고, 1991년 *A. arguta*에서 quercetin 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1-2)-O-β-D-glucopyranoside를 보고하였다. Sasida 등은<sup>7,8)</sup> 1992년 *A. polygama*의 fruit gall로부터 2α, 3α, 23, 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid 등 5종의 triterpene을 분리하였고, 1994년 callus tissue로부터 ursolic acid 외 8종의 화합물을 분리하였다. 2000년 Whang 등은<sup>9)</sup> *A. arguta*의 뿌리에서

\*교신저자(E-mail) : mwlee@cau.ac.kr  
(FAX) : 02-822-9778

catechin과 epicatechin, triterpenes인 tormentoside와 uscaphic acid-28-O-β-D-glucopyranoside, lignan인 pinoresinol, medioresinol과 syringaresinol을 분리하였다. 2002년 Hirsch 등은<sup>10)</sup> *A. deliciosa*와 *A. chinensis*의 줄기와 열매에서 coumarin인 fraxin과 esculin을 분리하였다.

한편, *Actinidia* 속 식물의 활성에 관한 연구로는 *A. chinensis*의 종자, 잎, 목부 및 줄기 추출물이 항균작용을 나타냄을 보고하였고,<sup>11)</sup> *A. argura* 줄기의 다당류를 암 유발 마우스에 투여한 결과 종양의 증식을 억제하였고 암에 걸린 마우스의 생존율이 증가하여 anti-tumor effect가 있음이 보고되었다.<sup>12)</sup> 또, *Actinidia* 속의 수용성 추출물 (PG102)을 OVA-sensitized murine mice에 11일 동안 경구투여한 결과 Th2 cytokines, IL-4, IL-5와 IL-10의 level이 낮았고, Th1 cytokines, IL-12와 IFN-γ의 수치가 증가하여 다양한 알러지의 치료에 대한 경구 면역 조절제로서의 큰 가능성이 있음이 보고되었다.<sup>13)</sup> *A. argura* 줄기의 메탄을 추출물과 여기에서 분리한 (+)-catechin과 (-)-epicatechin은 1~100 mg/ml의 범위에서 농도 의존적으로 myeloid colonies 형성을 자극하였고 골수세포배양에서 colony forming-units의 수를 증가시키는 IL-3을 증가시키며 bone marrow의 기능이 저하된 모델 mouse에 (+)-catechin을 1-100 mg/kg의 범위에서 경구 투여한 결과, bone marrow cells의 colony forming-units의 수를 증가시키는 IL-3이 증가되어 bone marrow cell에 대한 증식 자극작용이 있음이 보고되었다.<sup>14)</sup> *A. argura*로부터 분리된 (+)-catechin을 mouse에 경구투여한 결과 백혈구 및 혈소판이 회복이 증대되었고, 골수세포와 비장세포 수가 증가하였으며, 혈액, 비장 및 골수에서 Gr-1<sup>+</sup> cell과 골수세포에서 CD11b<sup>+</sup> cell이 현저하게 회복됨을 보여주어 myelosuppression에 대한 예방효과가 있음이 보고된 바 있다.<sup>15)</sup>

본 연구에서는 자생 자원식물에 대한 항산화 및 항염증 소재의 개발연구<sup>16,17)</sup>의 일환으로 자생 다래나무 수피에 대한 유효 성분 분리를 시도하였으며, 각각의 분리 성분에 대하여 항산화 및 항염증 활성에 관련된 실험으로서 DPPH를 이용한 free radical 소거능과 NO 생성 억제 활성을 연구하였다.

## 재료 및 방법

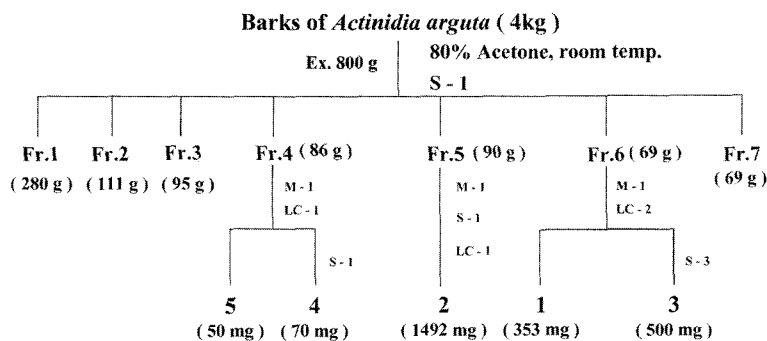
**실험재료** - 본 실험에서 사용한 다래나무 (*A. argura*, 4 Kg)의 수피는 2004년 6월 경북 영천시 완산동에서 채집하여 중앙대학교 약학대학 생약실에서 식물학적 검정을 거친 후 음건하여 사용하였다.

**기기 및 시약** - IR Spectrophotometer : JASCO FT-IR (Japan), UV spectrophotometer : Human TU-1800PC (1800SPC) (Korea), Mass spectrometer : API 3000 triple quadrupole mass spectrometry (Canada), <sup>1</sup>H-NMR

spectrometer : Varian Gemini 2000, 300 MHz (USA), <sup>13</sup>C-NMR spectrometer : Varian Gemini 2000, 75 MHz (USA), TLC Adsorbent : Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Germany), TLC Solvent(v/v) : benzene : Ethyl formate : Formic acid = 1 : 7 : 1, CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 6 : 4 : 1, TLC Detection : Ethanolic-FeCl<sub>3</sub> solution, 10%-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol (heating), UV-lamp (254 nm), Chromatographic gels: Sephadex LH-20 (25-100 μm, Pharmacia, Sweden), MCI gel CHP20P (75-150 μ. Mitsubishi. Japan), YMC-gel ODS-A (230/70, 400/230, 500/400 mesh, YMC. Japan), RAW 264.7 cell : 한국세포주은행 (Korea), Penicillin-Streptomycin, FBS, Trypsin-EDTA, Antibiotics : Gibco BRL (USA), DMSO, MTT, DMEM medium, RPMI 1640 medium, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), murine recombinant IFN-γ, Lipopolysaccharide (*E. coli* 055 : B5), Griess reagent, EDTA, Sodium Diethyldithiocarbamate hydrate : Sigma (USA), Centrifuge : Eppendorf (German), CO<sub>2</sub> incubator, Water Bath : Vision Sci. Co. (Korea), Microscope : Olympus (Japan), ELISA reader : BIO-RAD (Japan), UV/VIS spectrometer : TU-1800PC (USA).

**추출 및 분리** - 음건한 재료 4 Kg을 절단하여 80% aqueous acetone으로 실온에서 3회 추출하여 여과하였다. 그 추출액을 감압 농축한 후 H<sub>2</sub>O에 현탁하여 여과한 후 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피 (H<sub>2</sub>O→MeOH)를 실시하였다. 용매는 물에서부터 메탄올을 10%씩 올려 100%까지 농도를 높였으며, TLC를 실시하여 7개의 subraction (Fr. 1~7)으로 나누었다. Fr.4를 MCI-gel CHP-20P 컬럼크로마토그래피 (H<sub>2</sub>O→MeOH)를 실시하여 5 (90 mg)을 얻었고, 이어서 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피 (H<sub>2</sub>O→MeOH)를 실시하여 4 (70 mg)을 얻었다. 또한, Fr. 5를 MCI-gel CHP-20P 컬럼크로마토그래피 (H<sub>2</sub>O→MeOH), Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피 (H<sub>2</sub>O→MeOH)를 반복 실시하였으며, Low Pressure 컬럼크로마토그래피 (H<sub>2</sub>O→MeOH)를 실시하여 compound 2 (1492 mg)를 얻었다. 또한 Fr. 6을 MCI-gel CHP-20P 컬럼크로마토그래피 (H<sub>2</sub>O→MeOH) 및 Low Pressure 컬럼크로마토그래피 (20%→100% MeOH)를 실시하여 compound 1 (353 mg)을 얻었으며, Sephadex LH-20 (40%→100% MeOH)를 실시하여 compound 3 (500 mg)를 얻었다 (Scheme 1).

**화합물 1** - Brown amorphous powder, IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3400 (OH), 1570, 1520 (aromatic C=C); Negative FAB MS : *m/z* 289 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : δ 2.35 (1H, dd, *J* = 16.2, 8.1 Hz, H-4ax), 2.62 (1H, dd, *J* = 16.2, 5.1 Hz, H-4eq), 3.82 (1H, m, H-3), 4.48 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-2), 5.69 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 5.88 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.60 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, H-6'),



**Scheme 1.** Extraction and isolation of compounds (**1-5**) from barks of *Actinidia arguta* Chromatography gel : (S : Sephadex LH 20, M : MCI-gel CHP 20P, O : YMC ODS gel (500-400 mesh), LC : Low Pressure Liquid Chromatography, Solvent system : (1 : H<sub>2</sub>O-100% MeOH, 2 : 20%-100% MeOH, 3 : 40%-100% MeOH).

6.69 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.72 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 27.9 (C-4), 66.4 (C-3), 81.1 (C-2), 94.0 (C-8), 95.3 (C-6), 99.2 (C-10), 114.7 (C-2'), 115.3 (C-5'), 118.6 (C-6'), 130.8 (C-1'), 145.1 (C-3'4'), 155.6 (C-7), 156.4 (C-5), 156.7 (C-9).

**화합물 2** - Brown amorphous powder, IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3400 (OH), 1570, 1520 (aromatic C = C); Negative FAB MS :  $m/z$  289 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  2.47 (1H, dd,  $J = 16.2, 8.1$  Hz, H-4ax), 2.68 (1H, dd,  $J = 16.2, 5.1$  Hz, H-4eq), 4.00 (1H, m, H-3), 4.73 (1H, s, H-2), 5.72 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.89 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.66 (1H, dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, H-6'), 6.69 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.89 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 28.3 (C-4), 65.0 (C-3), 78.2 (C-2), 94.3 (C-8), 95.3 (C-6), 99.7 (C-10), 115.0 (C-2'), 115.1 (C-5'), 118.2 (C-6'), 130.9 (C-1'), 144.7 (C-3'), 144.7 (C-4'), 156.0 (C-5), 156.5 (C-9), 156.8 (C-7).

**화합물 3** - Yellow amorphous powder, IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3284 (OH), 1679, 1520 (aromatic C = C); Negative FAB MS :  $m/z$  301 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) :  $\delta$  6.18 (1H, m, H-6), 6.40 (1H, m, H-8), 6.88 (1H, m, H-6'), 7.54 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 7.67 (1H, m, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : Table I.

**화합물 4** - Yellow amorphous powder, IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3440 (OH), 1660, 1550 (aromatic C = C), 1070 (glycosidic OH); Negative FAB MS :  $m/z$  463 [M-H]<sup>-</sup>, 301 [M-Glc-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  5.47 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, anomeric H Glc.), 6.20 (1H, m, H-6), 6.40 (1H, m, H-8), 6.84 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-5'), 7.58 (1H, m, H-6'), 7.59 (1H, m, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) : Table I.

**화합물 5** - Yellow amorphous powder, IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3298 (OH), 1570 cm<sup>-1</sup>, 1512 cm<sup>-1</sup> (aromatic C = C), 1094

(glycosidic OH); Negative FAB MS :  $m/z$  463 [M-H]<sup>-</sup>, 301 [M-Gal-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  5.28 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, anomeric H Gal.), 6.20 (1H, m,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 6.40 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.82 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 7.53 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.67 (1H, dd,  $J = 2.1, 8.4$  Hz, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O) : Table I.

**Mouse macrophage RAW 264.7 cell 배양** - Mouse macrophage RAW 264.7 cell은 한국세포주은행에서 동결상태로 구입하였으며 cell이 들어있는 앰플을 미온수에 바로 녹여 10% FBS (fetal bovine serum), penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)을 포함한 RPMI 1640 배지를 이용, 온도 37°C와 5%의 CO<sub>2</sub>를 유지하면서 incubator에서 배양하였다.

**MTT assay** - RAW 264.7 cell에 대한 compound **1-7**과 엑스의 세포독성 및 실험시 처리 농도를 결정하기 위해 Mosmann의 방법<sup>18)</sup>을 변형하여 세포독성 실험을 하였다. RAW 264.7 cell을 RPMI 1640 medium (10% fetal bovine serum, 5% antibiotics)으로 medium 1 ml당  $5 \times 10^5$ 개 만큼 배양시킨 후, 1 ml당  $1 \times 10^6$ 개로 희석하여 96 well에 180  $\mu$ l ( $10^5$ 개)씩 넣고 2시간 동안 배양하여 cell이 부착되도록 하고, 부착된 cell 배양액에 각각의 시료를 20  $\mu$ l씩 넣은 후 24시간 동안 배양한다. 24시간 배양 후, 새로운 medium으로 교체하고 미리 조제한 MTT를 최종 농도가 0.5 mg/ml가 되게 첨가한 후, 보라색으로 생성된 formazan의 양을 정량한다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례하므로 세포의 생존율을 측정할 수 있다.

**IFN- $\gamma$  및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 억제 활성 측정** - IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) 및 LPS (lipopolysaccharide)를 이용 RAW 264.7 cell에서 nitric oxide synthase enzyme을 발현시키고 생성된 NO의 양을 Griess의 방법<sup>19)</sup>으로 측정하였다. Griess reagent (1% sulfanilamine, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride,

Table I.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of Compound 3, 4 and 5

Carbon No.	3	3a	4	4a	5	5a
C-2	147.1	147.5	156.4	156.5	156.3	156.3
C-3	136.1	136.5	133.3	133.7	133.5	133.8
C-4	176.2	176.5	177.5	177.6	177.5	177.5
C-5	161.1	161	161.3	161.3	161.3	161.2
C-6	98.6	99.5	98.5	98.8	98.8	98.6
C-7	164.3	164.5	164.4	164.2	168.3	164
C-8	93.7	94.5	93.5	93.6	93.6	93.4
C-9	156.5	156.7	156.2	156.5	156.4	156.3
C-10	103.4	104	103.9	104.2	103.9	104
C'-1	122.3	123	121.6	121.4	121.1	121.3
C'-2	115.4	116	115.2	115.2	116	115.2
C'-3	145.4	145.7	144.9	144.8	144.9	144.7
C'-4	148.1	148.1	148.5	148.5	148.5	148.5
C'-5	115.9	116.5	116.1	116.5	115.2	116.2
C'-6	120.3	121	121.7	121.6	122.1	121.8
Sugar			Glc	Glc	Gal	Gal
C-1			101.4	101.4	101.9	102.3
C-2			74.1	74.3	71.3	71.4
C-3			77.6	77.5	73.2	73.4
C-4			69.9	70.3	67.9	68
C-5			76.5	76.8	75.9	75.8
C-6			61.4	61.3	60.2	60.2

3a (quercetin), 4a (quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside), 5a (quercetin-3-O- $\beta$ -D-topyranoside); authentic standard data in the reference.

2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )는 NO를 산화시켜  $\text{NO}_2$ 로 변화시키며 생성된  $\text{NO}_2$ 는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 그 농도를  $\text{NaNO}_2$ 의 검량선을 이용하여 구하였다. 즉, RAW 264.7 cell을 RPMI 1640 medium (10% fetal bovine serum, 5% antibiotics)으로 medium 1 ml 당  $5 \times 10^5$ 개 만큼 배양시킨 다음, 1 ml당  $1 \times 10^6$ 개로 희석하여 96 well에 160  $\mu\text{l}$  ( $10^5$ 개)씩 넣고 2시간 동안 배양해서 cell이 부착되도록 한 다음 IFN- $\gamma$  (200 IU/ml) 10  $\mu\text{l}$ 와 LPS (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 10  $\mu\text{l}$  및 (+) control인 L-NMMA (NO synthesis inhibitory agent)을 포함한 각각의 시료를 20  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 16시간 배양시킨 후, 배양액에 생성되어 있는 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 정량하였다.

DPPH를 이용한 free radical 소거능 측정 - Hatano의 방법<sup>20)</sup>에 의하여 시료를 각 농도별로 조제한 용액 100  $\mu\text{l}$  (control : 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액 (99.5% ethanol) 1.9 ml를 가하였다. 각 시료는 4가지 농도로 조제하였다. vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation 시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 ascorbic acid를 4가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은  $\text{IC}_{50}$ 치 (DPPH 라디칼 형성을 50%로 억제 하는데

필요한 농도)로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

화합물 1은 갈색 분말로서  $\text{FeCl}_3$ 와 anisaldehyde sulfuric acid 시액에 양성이고 IR 스펙트럼에서 3400  $\text{cm}^{-1}$ 에서 OH 기, 1570  $\text{cm}^{-1}$ , 1520  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic C=C의 흡수가 나타나 flavan 3-ol 화합물임을 추정할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 B ring의 H-2", 5", 6"의 수소가 각각  $\delta$  6.72 (1H, d,  $J=1.8$  Hz), 6.67 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), 6.61 (1H, dd,  $J=9.9$  Hz, 1.8 Hz) 나타났고 meta coupling 하는 H-8과 H-6이 각각  $\delta$  5.88 (1H, d,  $J=2.4$  Hz), 5.69 (1H, d,  $J=2.4$  Hz)에서 나타났으며 C ring의 H-3과 H-4ax, 4eq이 각각  $\delta$  3.81 (1H, m), 2.36 (1H, dd,  $J=16.2$ , 8.4 Hz), 2.61 (1H, dd,  $J=16.2$ , 5.4 Hz)에서 나타나 flavan 3-ol 화합물임을 알 수 있었고, 특히 H-2는  $\delta$  4.49에서 doublet ( $J=7.5$  Hz)으로 나타나 (+)-catechin임을 알 수 있었으며 문헌 및 표준과의 비교를 통해 화합물 1을 (+)-catechin 으로 확인, 동정하였다.<sup>21,22)</sup>

화합물 2는 갈색 분말로서  $\text{FeCl}_3$ 와 anisaldehyde sulfuric

acid 시액에 양성이고 IR 스펙트럼에서  $3400\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH기,  $1570\text{ cm}^{-1}$ ,  $1520\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic C=C의 흡수가 나타나 flavan 3-ol 화합물임을 추정할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 B ring의 H-2", 5", 6"의 수소가 각각  $\delta$  6.93 (1H, d,  $J=1.8$  Hz), 6.73 (1H, d,  $J=8.1$  Hz), 6.66 (1H, dd,  $J=8.1, 1.8$  Hz)에서 나타났고 meta coupling 하는 H-8과 H-6이 각각  $\delta$  5.94 (1H, d,  $J=2.4$  Hz), 5.81 (1H, d,  $J=2.4$  Hz)에서 나타났으며 C ring의 H-3이  $\delta$  4.07 (1H, m)에서, H-4ax, 4eq이  $\delta$  2.49 (1H, dd,  $J=20.7, 3.6$  Hz) 및  $\delta$  2.70 (1H, dd,  $J=20.7, 7.2$  Hz)에서 나타나 flavan 3-ol 화합물임을 알 수 있었으며 특히 H-2가  $\delta$  4.79에서 singlet으로 나타나 (-)-epicatechin임을 알 수 있었으며 문헌의 data 및 표품과의 비교를 통해 화합물 2를 (-)-epicatechin 으로 확인, 동정하였다.<sup>21,22)</sup>

화합물 3은 황색 분말이며 TLC에서  $\text{FeCl}_3$  분무에 의해서 흑색으로, 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 분무하고 가열시 짙은 갈색으로 나타난다. IR spectrum에서 3284 (OH), 1520 (aromatic C=C), 1679 (C=O) 등의 흡수대를 보이고 있어 방향족 화합물임을 추정하였다. Negative FAB-MS spectrum에서  $m/z$  301의  $[\text{M-H}]^-$ 의 peak를 관찰할 수 있었으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  6.18과  $\delta$  6.40의 H-6과 H-8 signal과  $\delta$  12.64에서 5-OH에 의한 singlet signal이 나타나 A-ring은 5,7-dihydroxylation pattern을 확인할 수 있었으며, B-ring은  $\delta$  6.88과 7.54 및  $\delta$  7.67 (1H, d,  $J=7.1$  Hz)에서 ABX type의 signal이 나타나 3은 3', 4', 5', 7-tetrahydroxyflavonol (quercetin)로 추정되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 문헌의 quercetin의 signal과 동일했다. 이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교 등을 통해 화합물 3를 quercetin으로 동정하였다.<sup>21,22)</sup>

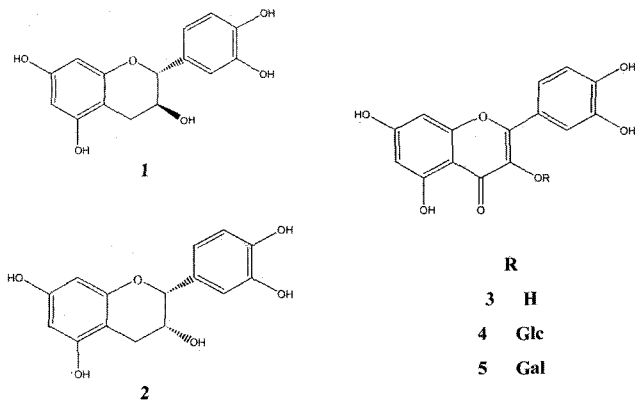
화합물 4는 짙은 황색의 무정형 분말로서 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  발색에서 황색을 보였으며  $\text{FeCl}_3$  반응에 양성을 나타내었고, IR 스펙트럼에서  $3400\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH기,  $1505\text{ cm}^{-1}$ ,  $1660\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic C=C의 흡수가 나타나 방향족 화합물임을 추정할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 화합물 3과 유사한 시그널 패턴이 나타났다. 즉,  $\delta$  7.59 (1H, m)과  $\delta$  7.58 (1H, m)에서 H-2'와 H-6'의 signal이 나타나고,  $\delta$  6.84 (1H, d,  $J=9.0$  Hz)에서 H-5'의 signal이 나타나 flavonoid의 B-ring이 ABX type인 것을 알 수 있었으며  $\delta$  6.40 (1H, m)과  $\delta$  6.20 (1H, m)에서 H-6과 H-8의 signal이 나타났다. 한편,  $\delta$  5.47의  $J=7.2\text{ Hz}$ 의 doublet signal은 당의 anomeric proton의 signal로  $\beta$ 체임을 알 수 있었으며 화합물 4는 quercetin의 배당체로 추정되었다. 또한  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 quercetin과 비교했을 때 C-3이 3.2 ppm 가량 고자장으로 shift되어 관찰되었고, C-2가 8.9 ppm 크게 저자장으로 shift하여 나타나고 C-4 역시 1.0 ppm 저자장 shift하여 나타나, quercetin의 3번 위치에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할

수 있었다. 또한  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서  $\delta$  101.4, 77.6, 76.5, 74.1, 69.9, 61.4에서 1 mol glucose의 signal을 관찰하여 화합물 4를 quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside임을 알 수 있었다. 이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교 등을 통해 화합물 4를 quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.<sup>21,22)</sup>

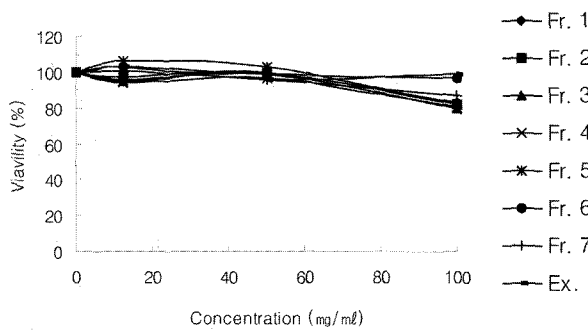
화합물 5는 황색 분말로서  $\text{FeCl}_3$ 에 양성이고 IR 스펙트럼에서  $3298\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH기,  $1512\text{ cm}^{-1}$ ,  $1665\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic C=C의 흡수가 나타나 방향족 화합물임을 추정할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 화합물 5는 4와 매우 유사한 시그널 패턴을 나타내었다. 즉,  $\delta$  6.20 (1H, m,  $J=2.1$  Hz) 및  $\delta$  6.40 (1H, d,  $J=2.1$  Hz)에서 H-6과 H-8이 나타나고,  $\delta$  6.82 (1H, d,  $J=8.4$  Hz)에서 H-5'가 H-6'와 ortho-coupling 하여 나타났고,  $\delta$  7.67 (1H, dd,  $J=2.1, 8.4$  Hz)에서 H-6'의 proton이 H-2', H-5'와 각각 meta, ortho coupling 하여 double doublet으로 관찰되었고,  $\delta$  7.53 (1H, d,  $J=2.1$  Hz)에서 H-2'의 proton signal이 H-6'와 meta-coupling하고 있음을 확인하였다. 한편,  $\delta$  5.28 (1H, d,  $J=8.1$  Hz)에서 anomeric proton이 관찰되었고 당은  $\beta$ 체임을 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 quercetin과 비교했을 때 C-2가 8.8 ppm, C-4가 3.0 ppm 저자장으로 shift되어 관찰되었고, C-3이 1.0 ppm 고자장으로 shift되어 관찰되므로 quercetin의 3번 위치에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다. 또한,  $\delta$  101.9, 71.3, 73.2, 67.9, 75.9, 60.2에서 1 mol galactose signal이 관찰되어 화합물 5는 quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactoside임을 알 수 있었다. 이상의 물리화학적 성상과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통해 화합물 5를 quercetin 3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside로 확인, 동정하였다.<sup>21,22)</sup>

MTT assay - 엑스, Fraction 1~7 및 compound 1~5의 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성을 평가하기 위한 MTT assay 결과 모두 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서 유의성 있는 세포독성을 나타내지 않아서 실험결과에서 나타난 NO 생성량의 변화가 세포 독성에 의한 영향과는 무관함을 증명하였다 (Fig. 2, 3).

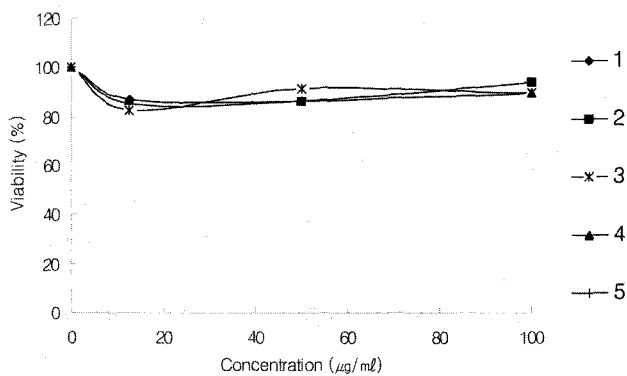
IFN- $\gamma$  및 LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 억제 활성 측정 결과 - 엑스와 Fr. 1~7의 NO 생성 억제 효과를 평가한 결과 모든 fraction 들이 양성 대조군인 L-NMMA보다는 효과가 뛰어나지는 않지만 고농도로 갈수록 억제 효과가 나타났으며, Fr. 2~Fr. 6에서 자극제만 첨가한 대조군보다는 억제효과가 뚜렷이 나타났다 (Fig. 3). 또한 Compound 1~5의 NO 생성 억제 효과를 평가한 결과 양성 대조군인 L-NMMA ( $\text{IC}_{50} = 20.77\text{ }\mu\text{g/ml}$ )과 비교하여 flavan 3-ol 화합물인 1 ( $\text{IC}_{50} = 26.61\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), 2 ( $\text{IC}_{50} = 25.30\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), flavonol 화합물인 3 ( $\text{IC}_{50} = 30.46\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), 4 ( $\text{IC}_{50} = 28.03\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 그리고 5 ( $\text{IC}_{50} = 27.24\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 화합물



**Fig. 1.** The structures of compounds (1-5) isolated from bark of *Actinidia agruta*.



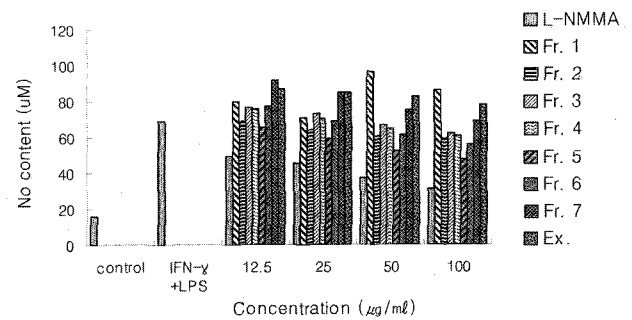
**Fig. 2.** Effect of Extract and Fraction 1~7 on the viability of RAW 264.7 cells. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance.



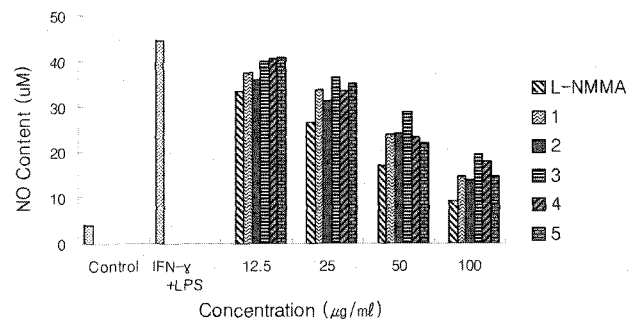
**Fig. 3.** Effect of Compound 1~5 on the viability of RAW 264.7 cells. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance.

모두 대체적으로 완화된 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 4).

DPPH를 이용한 free radical 소거능 측정 결과 Fr. 2~Fr. 7에서 양성대조군인 L-ascorbic acid 보다는 낮지만 어느정도 완화된 효과를 보이고 있으며, flavan 3-ol 화합물인 compound 1 ( $IC_{50} = 6.19 \mu\text{g/ml}$ )과 2 ( $IC_{50} = 8.98$



**Fig. 4.** NO synthesis inhibitory effect of Extract and Fraction 1~7 on nitric oxide synthase activity in IFN- $\gamma$ , LPS stimulated RAW 264.7 cells.  $\text{NO}_2^-$  content were measured at 540 nm. Results were expressed as NO content and data mean  $\pm$  S.D. of three determinations.



**Fig. 5.** NO synthesis inhibitory effect of Compound 1~5 on nitric oxide synthase activity in IFN- $\gamma$ , LPS stimulated RAW 264.7 cells.  $\text{NO}_2^-$  content were measured at 540 nm. Results were expressed as NO content and data mean  $\pm$  S.D. of three determinations.

**Table II.** Antioxidative Activity of Extract, Fraction 1~7 and Compound 1~5

Fractions	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Compounds	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	None	1	6.19
2	22.45	2	8.98
3	19.45	3	10.10
4	19.42	4	9.82
5	18.25	5	9.40
6	15.93	Ascorbic acid	9.22
7	15.24		
Extract	28.80		
Ascorbic acid	7.16		

$\mu\text{g/ml}$ ) 화합물이 양성대조군인 L-ascorbic acid ( $IC_{50} = 9.22 \mu\text{g/ml}$ ) 와 비교하여 우수한 효과를 나타내었다. 그 외의 flavanol 화합물인 3 ( $IC_{50} = 10.10 \mu\text{g/ml}$ ), 4 ( $IC_{50} = 9.82 \mu\text{g/ml}$ ), 5 ( $IC_{50} = 9.40 \mu\text{g/ml}$ ) 화합물도 L-ascorbic acid과 비

숙한 free radical 소거 효과를 보였다 (Table II).

## 결 론

다래나무 수피로부터 2종의 flavan-3-ol 화합물과 3종의 flavonol 화합물을 분리하였으며, 각종 기기분석을 통하여 각각을 catechin (1), (-)-epicatechin (2), quercetin (3), quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (4), quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (5)으로 확인 동정하였다. 이들 5종의 화합물에 대한 iNOS 생성 억제 활성을 조사한 결과 양성 대조군인 L-NMMA (IC<sub>50</sub> = 20.77 μg/ml)과 비교하여 모든 화합물이 대체적으로 완화된 억제 효과를 나타내었다. 또한 DPPH radical 소거능을 실험한 결과 flavan-3-ol 화합물인 1 (IC<sub>50</sub> = 6.19 μg/ml)과 2 (IC<sub>50</sub> = 8.98 μg/ml) 화합물이 ascorbic acid 과 비교하여 우수한 항산화 활성을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 다래나무 수피는 flavonoid 를 풍부하게 함유하고 있으며, 이들 flavonoid가 iNOS 생성 억제 및 DPPH radical 소거능 실험에서 우수한 효과를 나타냄으로써 앞으로 항산화제 및 항염증제로 개발될 가능성이 있는 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- 김창민 외 3인 (1998) 증약대사전, 4권 1895-1899: 도서출판 정담. 서울.
- Sakai, T., Nakajima, K., and Sankan, T. (1980) New monoterpene lactones of the iridane type from *Actinidia polygoma*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**: 3683-3686.
- Huang, C., Li, G., Fan, H., Zhang, Z., and Zhou, J. (1986) A new triterpene from roots of *Actinidia eriantha*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu.* **8**: 489-491.
- Li, S., Zhang, S., Ma, B., Song, X., Tian, L., and Xiao, G. (1989) Chemical constituents of *Actinidia kolomikta*. *Baiqium Yike Daxue Xuebao.* **15**: 474-475.
- Rosemary F. Webby and Kenneth R. Markham (1990) Flavonol 3-O-triglycosides from *Actinidia species*. *Phytochemistry*, **29**: 289-292.
- Rosemary F. Webby (1991) A flavonol triglycoside from *Actinidia arguta* var. *giraldii*. *Phytochemistry*, **30**: 2443-2444.
- Sashida, Y., Ogawa, K., Mori, N., and Yamanouchi, T. (1992) Triterpenoids from the fruit falls of *Actinidia polygoma*. *Phytochemistry*, **31**: 2801-2804.
- Sashida, Y., Ogawa, K., and Yamanouchi, T. (1994) Triterpenoids from the callus tissue of *Actinidia polygoma*. *Phytochemistry*, **2**: 377-380.
- Wang, J. I., Moon, H. I., and Zee, O. P. (2000) Phytochemical Constituents of *Actinidia arguta*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **31**: 357-363.
- Hirsch, A. M., Longeon, A., and Guyot, M. (2002) Fraxin and esculin: two coumarins specific to *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* (kiwifruit). *Biochemical systematics and ecology*, **30**: 55-60.
- Hou, F., Chen, F., Lu, Y., and Sun, J. (1995) Anti-infective and antitumor effects of *Actinidia arguta* stem polysaccharide. *Baiqiu Yike Daxue Xuebao.* **21**: 472-475.
- Basile, A., Vuotto, M., L., Violante, U., Sorbo, S., Martone, G. and Castaldo-Cobianchi, R. (1997) Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. *I. J. of Antimicrobial Agents*, **8**: 199-203.
- Park, E., Kim, B., Jong, H. Son, M., Kim, S., and Jin, M. Jin (2004) Control of IgE and allergy-related Th1 and Th2 cytokines by PG102, a water-soluble extract from *Actinidia sp.* *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* **113**: S323.
- Takano, F., Tanaka, T., Tsukamoto, E., Yahagi, N., and Fushiya, S. (2003) Isolation of (+)-catechin and (-)-epicatechin from *Actinidia arguta* as bone marrow cell proliferation promoting compounds. *Planta Med.* **61**: 321-326.
- Fumihide T., Tomoaki, T., Jiro, A., Nobuo, Y., and Shinji, F. (2004) Protective effect of (+)-catechin against 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice. *Toxicology.* **201**: 133-142.
- Hyun-Jung-Kim, Seung-Hwan Yeom, Mim-Kee Kim, Jea-Geul Shim, In-Na Peak and Min-Won Lee (2005) Nitric Oxide and Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis Inhibitory Activitied of Diarylheptanoids from the Barks of *Alnus japonica* Strudel. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 177-179
- Hyun-Jung-Kim, Min-Kee Kim, Jea-Geul Shim, Seung-Hwan Yeom, Suk-Hyung Kwon, young-Wook Choi, Keun-Sung Kim and Min-Won Lee (2004) Anti-oxidative Phenolic Compounds from Sophorae Fructus. *Nat. Prod. Sci.* **10**: 330-334
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival. *J. Immun. Methods.* **65**: 55.
- Feelisch, M., Stamler, J. (1996) Methods in nitric oxide research. *John Wiley & Sons*, 492-497.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**: 2016.
- Agrawal, P. K. (1989) Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier, 444-446.
- Harborne, J. B. and Mabry, T. J. (1982) The flavonoids, Chapman and Hall, 91-92, 126.

(2005년 9월 8일 접수)