

다래나무 추출물의 HIV-1 효소억제활성과 구조활성상관(QSAR)예측

유영범^{#*}

한국한의학연구원 한약제제연구부

Inhibitory Effects of *Actinidia arguta* on HIV-1 Reverse transcriptase,
HIV-1 Protease and alpha-glucosidase *in vitro* and *in silico*

Young-Beob Yu^{#*}

Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Jeonmin-dong
461-24, Yuseong-gu, Daejeon 305-810, Rep. of Korea

ABSTRACT

Objectives : For the purpose of developing new anti-HIV agents from natural sources, the extracts of *Actinidia arguta* were tested for their inhibitory effects on essential enzymes as the reverse transcriptase (RT), protease and α -glucosidase. And we predicted inhibition activity of major compounds of *Actinidia arguta* using Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR).

Methods : In this assay the activity of HIV-1 reverse transcriptase is measured as the formation of a strand of copy-DNA (cDNA) using RNA as a template. The activity of HIV-1 protease is measured as the cleavage of an oligopeptide by HIV-1 protease.

Results : In the anti-HIV-1 RT using Enzyme Linked Oligonucleotide Sorbent Assay (ELOSA) method, water extracts (100ug/ml) of stem and leaf showed strong activity of 93.9% and 91.9%, respectively. In the HIV-1 protease inhibition assay, aqueous stem extract inhibited the activity of the enzyme to cleave an oligopeptide, resembling one of the cleavage sites in the viral polyprotein which can only be processed by HIV-1 protease with 56.8%. In the α -glucosidase inhibition assay, aqueous stem extract showed activity of 73.1%.

Conclusion : We found out this result, for these samples it is possible that the inhibition of the viral replication *in vitro* is due to the inhibition at least one of RT and α -glucosidase. It would be of great interest to identify the compounds which are responsible for this inhibition, since all therapeutically useful agent up to date are RT, PR and α -glucosidase inhibitors.

Key words : *Actinidia arguta*, HIV-1 essential enzymes, QSAR

#*제1저자, 교신저자: 유영범, 한국한의학연구원 한약제제연구부

· Tel: 042-868-9463 · E-mail: ybyu@kiom.re.kr

· 접수 : 2006년 11월 8일 · 수정 : 2006년 11월 19일 · 채택 : 2006년 12월 19일

서 론

에이즈 치료제 개발을 위한 천연물 소재 발굴 연구가 광범위하게 이루어지고 있다^{1,5)}. 본 연구에서는 다래나무의 줄기 및 잎 추출물을 이용하여 에이즈의 원인 바이러스인 HIV-1의 주요 효소인 reverse transcriptase, protease 와 alpha-glucosidase의 in vitro 억제활성을 살펴보았다. 그리고 활성 인자를 QSAR을 이용한 in silico 방법으로 예측하였다.

다래나무 (*Actinidia arguta*)의 열매는 미후도(彌猴桃)라 하여 성미는 감(甘), 한(寒)하고 귀경은 신(腎), 위(胃), 양명(陽明)이며, 지폭갈(止暴渴), 해번열(解煩熱), 압단석(壓丹石) 등의 효능이 알려져 있다⁶⁾. 다래의 화학성분으로는 kaempferol과 quercetin 그리고 이들의 배당체등 flavonoid 성분이 oleanolic acid 등을 식물 sterol 등이 보고되어 있다. 다래나무 약리활성으로는 다래나무줄기의 항암효과, 면역증강 효과가 보고되어 있으며, 항산화 활성등이 보고되어 있으나 다래나무의 HIV 억제 활성에 관한 보고는 발견되지 않았다⁷⁾.

본 연구에서는 다래나무 잎과 줄기의 물 및 메탄올 엑스를 이용하여 HIV-1 기원의 효소인 reverse transcriptase 억제활성을 ELOSA (Enzyme Linked Oligonucleotide Sorbent Assay) 방법으로 실험하였고, HIV-1 protease 억제활성을 기질 분해를 HPLC로 검출하는 방법으로, 그리고 α -glucosidase의 억제활성은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside의 분해를 spectrophotometer로 각각 측정하였다. 그리고 이들의 활성인자를 구조활성상관(Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR) 방법으로 예측하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

시료로 사용한 다래나무는 전남 순천시 순천대학교 부설농장에서 채취한 후 순천대학교 한약자원학과에서 동정한 후 잎, 줄기를 통통이 잘되는 곳에서 음건 세절하여 추출용 시료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

용매는 특급 및 1급 시약을 사용하였다. Microplate washer는 Immowash model 1250(Biorad, Nippon Biorad KK, Tokyo,

Japan)을, microplate reader는 Biorad 3550-UV(Biorad, Nippon Biorad KK, Tokyo, Japan)를, HPLC는 [System controller: Shimadzu SCL-6B, Pump: Shimadzu LC-9A, Detector: Shimadzu SPD-6A(UV spectrophotometric detector), Recorder & integrator: Shimadzu C-R6A Chromatopac.]을 각각 이용하였다.

3. 시료의 추출

시료 5 g을 각각 물(100 ml) 또는 메탄올(100 ml)로 3시간씩 열수 추출한 후 감압농축하여 메탄올의 최종농도가 2%가 넘지 않게 동결건조하여 활성실험의 재료로 사용하였다. 시료는 활성실험시에 멸균된 증류수나 DMSO에 100 μ g/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

4. HIV-1 reverse transcriptase 활성 억제

Reverse transcriptase(RT) 억제활성 실험은 Dupont사로부터 구입한 RT-DetectTM kit NEK-070A (Dupont medical products, Boston, MA, USA)를 이용한 ELOSA 방법으로 4°C 이하에서 저장하면서 assay 조건을 설정하였다. 효소는 유전자 재조합에 의해 생산된 HIV-1 RT (10 U/ μ l, 100 mM potassium phosphate, pH 7.1, 1 mM dithiothreitol, 50% glycerol)를 효소완충액[100mM Tris-HCl, pH 8.0, 160 mM KCl, 1 mM EDTA, 3 mM dithiothreitol, 0.3% (v/v) Triton X-100, and 10 % (v/v) glycerol]에 0.005 U/ μ l로 희석하여 사용하였고 반응혼합물(reaction mixture)은 primer가 부착된 RNA template와 triphosphate-DNA nucleosides를 반응혼합물 완충액(reaction buffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM MgCl₂)에 희석하여 사용하였다. 역전사 효소의 활성억제는 10 μ l 반응혼합물 완충액, 20 μ l 반응혼합물, 4 μ l 식물추출물, 5.2 μ l 효소완충액을 500 μ l test tube (ependorf)에 넣고 37°C에서 4분간 예비배양한 후 효소 0.8 μ l를 가해 37°C에서 1시간동안 역전사시키고 90°C에서 1분간 반응을 정지시켰다. 반응을 마친 RNA template를 알카리용액(5.62% potassium hydroxide, 94.38% water)으로 37°C 에서 15분간 가수분해한 후, 완충액(13.6% sodium phosphate, monobasic monohydrate, 86.4 % water)으로 중화하였다. ELOSA 반응을 위해 중화시킨 반응액 50 μ l를 streptavidin-coated microplate well에 옮기고, horseradish peroxidase(HRP)-labeled

detector probe와 biotin-labeled capture probe를 포함하는 ELOSA 용액 50 µl 첨가하여 37°C에서 2시간동안 배양하였다¹³⁾. 반응을 마치고 microplate well에 남은 시약이나 가수분해된 RNA를 제거하기 위해 세척액(2-chloroacetamide 용액 20X)을 DW로 희석하여 3회 세척하였다. 세척한 microplate에 형광검출액(3',5'-tetramethylbenzidine substrate 용액) 100 µl를 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 정지액(2.2% citric acid, 1.5% HCl, 1.5% sulfuric acid and 94.8% water) 100 µl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(\text{Activity}_{\text{control}} - \text{Activity}_{\text{sample}})}{\text{Activity}_{\text{control}}} \times 100$$

5. HIV-1 protease 활성 억제

유전자 재조합으로 생산된 HIV-1 protease에 의해 기질의 cleavage를 HPLC로 측정하였고 효소원은 Kusumoto 등의 방법⁵⁾에 의해 준비하였다. 즉 HIV-1 protease (PR)의 DNA를 나타내는 JM 105 *Escherichia coli* 에서 생산된 HIV-1 protease를 ([50 mM NaOAc(pH 5.0), 1 mM EDTA-2Na, 2mM 2-Mercaptoethanol]:Glycerol)=75:25 용액에 희석하여 사용하였고, 기질은 oligopeptide{His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-(pNO₂-Phe)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂ (M.W. 1315)}를 (주) 단백질연구소(Osaka, Japan)로부터 구입하여 완충액 (50 mM NaOAc, pH 5.0)에 2 mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 항 HIV-1 protease 반응은 완충액 1 µl, 기질 1.0 µl, 식물추출물 1 µl, 효소용액 2 µl을 각각 가하여 전량 5 µl의 반응혼합물을 조제하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 90°C에서 60초간 가열하여 효소 반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 증류수 35 µl로 희석한 후 HPLC 분석을 행하였으며 HPLC 분석 조건으로 column은 LiChrospher 100 RP-18 (column size, 250 x 4 mm, Merck, Darmstadt, FRG)을, 용매는 0.1% TFA와 acetonitrile(20%-50% gradient)로 하였으며, 유속은 1.0 ml/min로 하면서 UV 280 nm에서 분석하였다(Fig. 1).

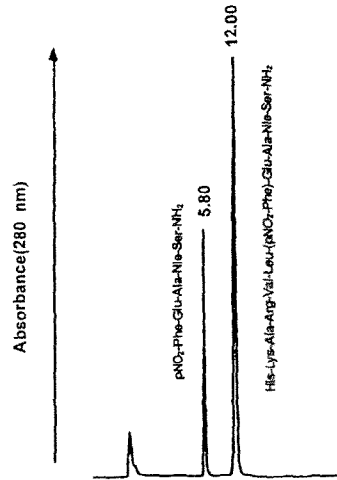


Fig. 1. HPLC profile of the reaction mixture of HIV-1 protease. The substrate and its hydrolysate were detected 280nm and their retention times were 12.00 and 5.80 min. respectively.

6. α-glucosidase 억제 활성

α-glucosidase에 의해 p-nitrophenyl-α-D-glucoside의 cleavage를 spectrophotometer로 측정하는 방법을 이용하였다. 실험에 사용한 효소원은 *Saccharomyces sp.*에서 얻은 α-glucosidase(Toyobo Company, Osaka, Japan)를 완충액(10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 20% glycerol)에 0.5 U/ml가 되도록하여 사용하였으며, 기질은 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside(Nacalai Tesque Inc., Osaka, Japan)를 평균 증류수에 10 mM이 되도록하여 사용하였다. 항 α-glucosidase 반응액의 조성은 50 µl 완충액(100 mM Sodium phosphate, pH 7.0), 100 µl 기질용액과 20 µl 식물추출물로 하고 37 °C에서 5분간 예비배양한 후 30 µl 효소를 첨가하여 37°C에서 10분간 배양하였다. 그리고 140 µl 정지액(0.2 M sodium carbonate)으로 반응을 정지시킨 후 microplate well에 옮겨 405 nm에서 흡광도를 측정하였고 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(\text{Activity}_{\text{control}} - \text{Activity}_{\text{sample}})}{\text{Activity}_{\text{control}}} \times 100$$

7. QSAR (정량적 구조활성 상관관계)를 이용한 활성인자 추적

다래나무의 HIV-1 주요 효소에 대한 활성인자를

추정하기 위하여 QSAR (MDL QSAR, USA)을 활용한 부분최소자승법 (PLS, Partial Least Squares Regression)으로 예측식을 수립하였다. 그리고 모델의 적합정도를 결정계수(R^2)로 확인하였으며 모델의 예측능력척도를 Q^2 값으로 확인하였다. 그리고 다래나무의 주요성분을 문헌적으로 검색하여 3차구조를 만들고 이들의 활성을 PLS 식에 대입하여 추정하였다.

결과 및 고찰

천연물을 이용한 AIDS 치료약물 개발이 활성화되고 있으며 해양 천연 알카로이드인 pyrido[4,3-*m*]thiazolo[5,4-*b*]acridine³, tannin⁴, flavonoid 등의 항 HIV-1 억제활성이 보고되었고, 또한 천연물엑스의 광범위한 screening이⁵ 행해지고 있다.

에이즈(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)의 병인학적 원인 인 HIV-1(human immunodeficiency virus type 1)은 RNA를 유전적 모태로 하는 레트로 바이러스이다^{8,9}. HIV-1은 RNA를 숙주 세포에 삽입하고 reverse transcriptase (RT)¹⁰에 의해 viral DNA로 전사되어 host chromosome에 proviral DNA 형태로 존재한다. 숙주세포에서 잠복기를 거쳐 protease(PR)에¹¹, glucosidase(GL)등의 작용으로^{12,13} mature virion으로 budding된다. 이렇듯 virus가 복제하는 과정에서 host cell을 파괴하므로써 인간의 면역기전에 심각한 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다.

다래나무 추출물의 HIV-1 억제활성을 검색한 결과 다래나무 잎, 줄기의 물 추출물은 역전사 효소 억제 활성이 90%이상 나타났으며, 다래나무 줄기의 물 추출물은 alpha-glucosidase에 대해서도 70%이상의 높은 억제활성을 나타내었다. 다래나무 줄기의 메탄올 추출물은 100 μ g/ml 농도에서 86.1%의 HIV 역전사 효소 억제와 52.7%의 alpha-glucosidase억제 활성을 나타내었다(Fig. 2, 4). 그리고 재조합 HIV-1프로테아제 억제활성 실험에서는 다래나무 추출물중 줄기의 물추출물이 100 μ g/ml의 농도에서 56.8%로 나타나 가장 억제 활성이 높은 추출물임을 알 수 있었다(Fig. 3.)

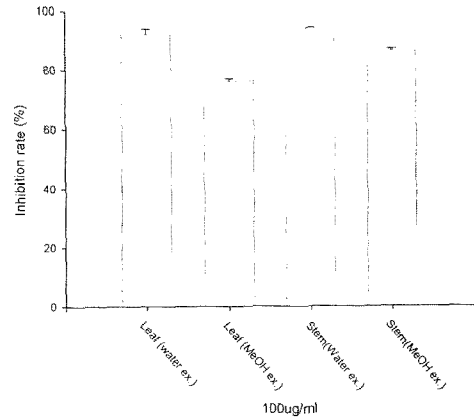


Fig. 2. Inhibition rates of *Actinidia arguta* on HIV-1 reverse transcriptase

The values are given as mean (S.D. n=2 for anti-reverse transcriptase activity)

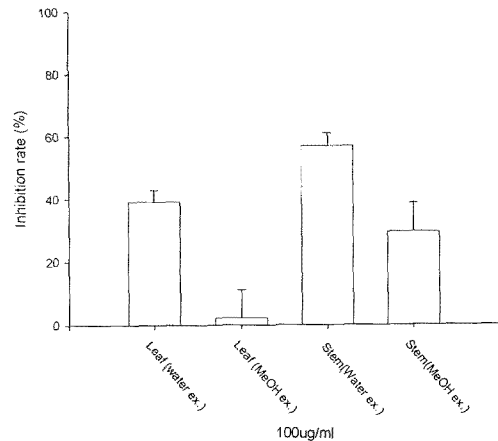


Fig. 3. Inhibition rates of *Actinidia arguta* on HIV-1 protease

The values are given as mean (S.D. n=3 for anti-protease activity)

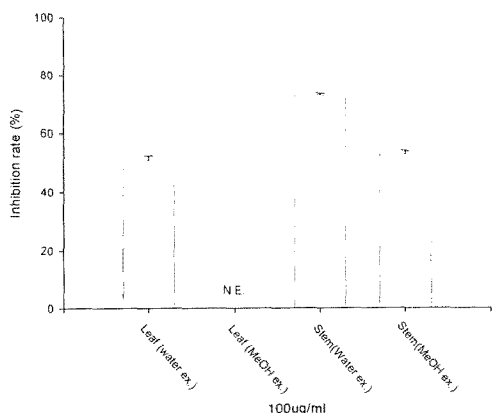


Fig. 4. Inhibition rates of *Actinidia arguta* on α -glucosidase
The values are given as mean (S.D. n=4 for anti α -glucosidase activity)

다래나무 줄기의 물추출물이 높은 역전사효소, HIV-1 프로테아제, 및 α -glucosidase 가지고 있었다. 물추출물에서 효소억제나 바이러스 복제억제에 높은 활성을 나타내는 것은 식물 중 고분자 활성 물질인 tannin, polysaccharide, protein등이 물 추출물에 다량 함유되어 있어 효소결합능력이 탁월하고, 바이러스 표면의 당단백에 결합이 용이하므로 강한 활성을 보이는 것으로 추정된다^{14, 15}. 또한 다래나무 엑스의 활성요인은 다양한 복합분자들이 분포되어 있어 효소 억제 작용, virus-cell 융합 억제^{16,17}, 감염된 세포로부터 virus분자의 방출억제¹⁸ 등에도 관여하는 것으로 생각되어 진다.

이같은 *in vitro* 실험결과와 원인물질을 탐색하기 위하여 QSAR기법을 활용한 *in silico*실험을 실시하였다. 다래나무 추출물들이 HIV-1 RT에 높은 억제 활성을 나타내어, 천연물 성분의 역전사 효소억제와 관련된 문헌을 검색하여¹⁹ 활성화합물과 구조와의 상관성을 부분최소자승법으로 하여 활성예측식을 수립하였다 (Inhibition rate (%) = 0.1704*tp1 + 0.2704*tp2 + 0.2651*tp3 + 0.1026*tp4 + 0.1512*tp5 + 0.05398*tp6 + 0.05754*tp7 + 0.06988*tp8 + 0.03486*tp9). 예측식의 적합정도 나타내는 결정계수(R²)가 0.9957이었으며, 모델의 예측능력척도인 Q² 값은 0.9603이었다. 따라서 다래나무 성분들을 문헌적으로 검색하였으며 이들의 3차원 화학구조를 database화(ISIS base, MDL, USA)하고 활성을 검색하였다. 그 결과 다래나무의 flavonoid성분들 중에서도 비당체 flavonoids에서 높은 활성이 예

측되었으며 특히 비당체 부분의 hydroxyl group가 증가할 수 록 활성이 높아지는 것을 확인하였다. 이같은 결과는 단지 예측에 불과 하므로 추후 활성물질을 직접 분리하여 그 구조를 밝히고 활성실험을 실시하여 예측결과를 검증할 계획이다.

결 론

다래나무 추출물을 이용한 HIV-1 주요효소억제실험 실시하였다. 역전사효소억제활성을 ELOSA 방법으로 실험한 결과 다래나무 줄기의 물추출물이 100 μ g/ml 농도에서 93.9%의 높은 활성을 나타내었고, 56.8%의 HIV-1 protease 억제활성 나타내었다. 그리고 다래나무 줄기의 메탄올 추출물에서도 86.1%의 높은 항 역전사 효소 억제활성이 나타났다. 이들의 활성인자를 QSAR 방법으로 예측한 결과 다래나무의 비당체 flavonoids 성분들이 HIV-1 역전사 효소의 억제활성에 기여하는 것으로 예측되었다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 전략적테마연구사업의 일부 지원으로 수행하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yang, S. S., Cragg, G. M., Newman, D. J., Bader, J. P. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of Natural Products*. 2001; 64(2): 265-277.
2. 유영범, 박종철, 이종호, 김경업, 조성기, 변명우, Hirotsu Miyashiro, Masao Hattori. Human Immunodeficiency Virus Type I 에대한 수종 식물 추출물의 억제활성 검색. *생약학회지*. 1998; 29(4): 338-346.
3. Taraporewala, I.B., Cessac, J.W., Chanh, T.C., Delgado, A.V. and Schinazi, R.F. HIV-1 neutralization and tumor cell proliferation inhibition *in vitro* by simplified analogues of pyrido[4,3,2-mn]thiazolo[5,4-b]acridine marine alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1992;35(15): 2744-2752.

4. Nakashima, H., Murakami, T., Yamamoto, N., Sakagami, H., Tanuma, S., Hatano, T., Yoshida, T. and Okuda, T. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Research*. 1992;18: 91-103.
5. Kusumoto, I.T., Nakabayashi, T., Kida, H., Miyashiro, H., Hattori, M., Namba T. and Shimotohno, K. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. *Phytotherapy Research*. 1995;9: 180-184.
6. 중국중의약관리국 <중화본초> 편집위원회. 중화본초. 북경: 상해과학기술출판사. 1999;(3) 535.
7. 임현우, 심재걸, 최형균, 이민원. 국내산 다래나무 수피의 페놀성 화합물의 항산화 및 Nitric Oxide 생성 억제 활성. *생약학회지*. 2005; 36(3): 245-251
8. Kaminchik, J., Margalit R, Yaish S., Drummer H, Amit B, Saver N, Gorecki M and Panet A. Cellular distribution of HIV type 1 nef protein: Identification of domains in nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *Aids Research and Human Retroviruses*. 1994;10: 1003-1010.
9. Peliska, J.A. and Benkovic, S. J. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reversetranscriptase. *Science*. 1992;258: 1112-1118.
10. Prasad, V.R. and Goff, S.P. Linker insertion mutagenesis of human immunodeficiency virus reversetranscriptase expressed in bacteria: definition of the minimal polymerase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86: 3104-3108.
11. Katz, R.A. and Skalka, A.M. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem*. 1994;63: 133-173.
12. Taylor, DL, Kang, MS, Brennan, TM, Bridges, CG, Sunkara, PS and Tyms, AS. Inhibition of alpha-glucosidase I of the glycoprotein-processing enzymes by 6-O-butanoyl castanospermine (MDL 28,574) and its consequences in human immunodeficiency virus-infected T cells. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 1994;38 (8): 1780-1787.
13. Mohan, P. Anti-AIDS drug development: challenges and strategies. *Pharmaceutical Research*. 1992;9 (6): 703-714.
14. Kakiuchi, N, Hattori, M and Namba T. Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. *Journal of Natural Products*. 1985;48 (4): 614-621.
15. Batinic, D. and Robey, R.A. The V3 region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 binds sulfated polysaccharides and CD4-derived synthetic peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267: 6664-6671.
16. Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W. and De clercq, E. The mannose-specific plants lectins from *Cymvidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)_n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Res*. 1992;18: 191-207.
17. Mayaux, J.F., Bousseau, A., Pauwels, R., Huet, T., Henin, Y., Dereu, N., Evers, M., Soler, F., Poujade, C., De Clercq, E. and Le Pecq J.B. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91: 3564-3568.
18. Rossmann, M.G. Antiviral agents targeted to interact with viral capsid proteins and a possible application to human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988;85: 4625-4627.
19. Kusumoto, I.T., Hattori, M., Miyaichi, Y., Tomimori, T., Hanaoka, M. and Namba, T. Effects of flavonoids and alkaloids on reverse transcriptase. *Shoyakugaku Zasshi* 1991; 45: 240-254

Table 1. Establishment of prediction equation using partial least squares regression.

| Molecules Name | Inhibition (exp. %) | Inhibition (calc. %) | Residual |
|--------------------------|---------------------|----------------------|----------|
| Acacetin | 48 | 45.3 | 2.7 |
| Apigenin-7-O-rutinoside | 23.2 | 25.7 | -2.5 |
| Cirsimaritin | 50.9 | 48.5 | 2.4 |
| Daidzin | 32.3 | 32.3 | 0.0 |
| Galangin | 42.1 | 40.7 | 1.4 |
| Hyperoside | 38.3 | 35.8 | 2.5 |
| Isoliquiritigenin | 34.4 | 34.1 | 0.3 |
| Liquiritin | 13.1 | 13.3 | -0.2 |
| Myricetin | 82.5 | 81.5 | 1.0 |
| Myricetin-3-O-rhamnoside | 62.6 | 62.5 | 0.1 |
| Ponkanetin | -8.6 | -8.4 | -0.2 |
| Procyanidin B4 | -2.6 | -2.7 | 0.1 |
| Rhamnetin | 50.8 | 53.8 | -3.0 |
| Robinin | 2 | -0.2 | 2.2 |
| Rutin | 23.2 | 24.5 | -1.3 |
| Scutellarin | 92.1 | 92.2 | -0.1 |
| Tamarixetin | 59.7 | 60.9 | -1.2 |
| Trifolin | 23.4 | 24.8 | -1.4 |
| Wogonin | 36.8 | 39.6 | -2.8 |

Table 2. Prediction of inhibition activity of *Actinidia arguta* using QSAR

| Molecular Name | Inhibition rate (%) |
|--|---------------------|
| (+)-catechin | 16.6 |
| Kaempferol | 52.3 |
| Kaempferol-3-O-(alpha-rhamnopyranosyl-(1-4)-3-O-acetyl-alpha-rhamnopyranosyl-(1-6)-beta-galactopyranoside) | 14.9 |
| Kaempferol-3-O-(alpha-rhamnopyranosyl-(1-4)-alpha-rhamnopyranosyl-(1-6)-beta-glucopyranoside) | -2.5 |
| Kaempferol-3-O-[alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-4)-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-beta-D-galactopyranoside] | -2.6 |
| Kaempferol-3-O-[alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-4)-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-beta-D-glucopyranoside] | 0.2 |
| Kaempferol-3-O-[alpha-rhamnopyranosyl-(1-4)-alpha-rhamnopyranosyl-(1-6)-beta-galactopyranoside] | 0.7 |
| Quercetin | 63.4 |
| Quercetin-3,4'-di-methyl ether | 44.0 |
| Quercetin-3-beta-D-(2-O-beta-D-xylopyranosyl)-6-O-alpha-L-rhamnopyranosylglucopyranoside | -0.2 |
| Quercetin-3-O-[alpha-rhamnopyranosyl(1-4)alpha-L-rhamnopyranosyl(1-6)beta-D-galactopyranoside] | 9.5 |
| Quercetin-3-O-[alpha-rhamnopyranosyl-(1-4)-alpha-rhamnopyranosyl-(1-6)-beta-galactopyranoside] | 14.9 |
| Quercetin-3-O-beta-D-galactopyranoside | 35.8 |
| Quercetin-3-O-glucopyranoside | 37.2 |