

## 정공피으로부터 항염증물질의 연구

윤용갑 · 채규윤\* · 이경관\* · 록란잔발\* · 백승화\*\*\*#

원광대학교 한의과대학 방제학교실, \*자연과학대학 생명나노학부, 한의과대학 방제학교실

\*\*한의학전문대학원 한약자원개발학과

(Received August 13, 2009; Revised December 20, 2009; Accepted December 27, 2009)

## Studies on the Antiinflammatory Compounds from *Sorbus Commixta*

Young Gab Yun, Kyu Yun Chai\*, Kyung Kwan Lee\*, Lok Ranjan Bhatt\* and Seung Hwa Baek\*\*\*#

Department of Oriental Medical Prescription, School of Oriental Medicine,

\*Division of Nanobiochemistry, College of Natural Sciences, and \*\*Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

**Abstract** — Sakuranetin, prunetin and dihydroquercetin were isolated from the methanol extract of *Sorbus commixta* by 1D/2D-NMR and LC-MASS spectrometry. Medicating these compounds to RAW264.7 cell that was pre-treated by lipopolysaccharide revealed anti-inflammatory effects that greatly inhibited the production of NO (nitric oxide) and PEG2 (prostaglandin E2), which are well known to cause the expression of iNOS (inducible nitric oxide synthase) and COX-2 (Cyclooxygenase-2). These results suggest that these compounds can be used as stable anti-inflammatory materials.

**Keywords** □ *Sorbus commixta*, sakuranetin, prunetin, dihydroquercetin, anti-inflammatory effects, NO, PEG2

정공피는 장미목 장미과의 낙엽소교목의 일종인 마가목 중 산 마가목의 경피이며, 열매와 나무껍질은 약재로 사용되고 있으며, 鎮咳(진해), 祛痰(거담), 利水(이수), 止渴(지갈), 強壯(강장)의 효능, 咳嗽(해수), 기관지염, 폐결핵, 水腫(수종), 胃炎(위염), 신체허약 등을 치료하는데 사용되어 왔다.<sup>1)</sup> 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 또는 생체의 이물질, 외부물질에 노출되면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응에 원인이 되지 않는 많은 인자를 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속시킨다. 세포는 세균에 함유되어 있는 lipopolysaccharide(LPS)로 자극될 때 cyclooxygenase-2의 발현으로 염증성 매개물질인 prostaglandin E2(PGE2)를 과량으로 생성하게 된다.<sup>2-5)</sup> Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌으며, COX-1, COX-2에 의해 합성된 적은 양의 prostanoid는 nitric oxide(NO)와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다. NO는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능, 혈관확장 및 항균작용 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,

포유동물의 세포에서 생성되는 매우 작은 분자량의 물질이다. 이는 여러 조직과 세포로부터 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해서 합성된다.<sup>2)</sup> 지금까지 알려진 NO 생성 효소로는 constitutive NOS(c-NOS)와 inducible NOS(iNOS)의 두 종류이며, 이중 cNOS는 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin 의존성이며, 단시간 동안 소량의 NO를 생성하여 정상적인 생리기능을 담당하고 있다. 여기에 신경세포에 존재하는 neuronal NOS(nNOS)와 내피세포가 존재하는 endothelial constitutive NOS(eNOS)가 속한다. iNOS는 세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 농도에 비의존성이며, macrophage 및 heaptocyte 등에 존재한다. 대식세포가 interferon-γ(INF-γ) 또는 LPS로 자극할 때, 생체 내에서 감염, 염증 등의 자극에 의해서, L-arginine으로부터 NOS에 의한 대사과정에서 NO를 생성하여, 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면, 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 돌연변이 및 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.<sup>3-5)</sup> 이러한 증상에 대한 치료제의 개발이 요구되어 왔으며, 최근에 천연물로부터 NO 생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다. 이와 동시에 iNOS에 의한 NO 생성을 저해하는 새로운 염증 치료제의 개발에 대한 연구도 활발하게 진행되고

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-850-6225  
(E-mail) shbaek@wonkwang.ac.kr

있는 추세이다. 특히 대식세포는 생체 내에서 감염증 등의 자극에 의해서, L-arginine을 NOS에 의해 대사하여 NO를 생성하여 종양 세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여, 생체를 지키는 중요한 역할을 하고 있다.<sup>6,7)</sup> 본 연구에서는 정공피로부터 생리 활성물질을 분리하여 생물검정을 얻었기에 보고합니다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

정공피 추출 및 open column 분리에서 사용된 용매는 GR 급을 사용하였으며, 물질의 분리에는 25 TLC plastic sheets(20×20 cm) silica gel 60 F254(MERCK), 25 TLC plates 5×10 cm RP-18 F254S(MERCK), silica gel 60(0.015~0.140 mm)(MERCK), silica gel 60(0.040~0.063 mm; MERCK), octadecyl-functioalized silica gel(Aldrich), lipophilic sephadex LH-20(SIGMA) 등 충전제와 Phenomenex사의 Luna 5u C18(2)(250×21.20 mm 5 micron) HPLC column과 YMC사의 Hydrosphere C18(250×20 mm, I. D. S-5 μm, 12 nm) HPLC column, EYEL4 rotary vacuum evaporator, Vision Workstation perspective biosystems HPLC 등을 사용되었다. 순수한 물질의 확인은 ESI-MS를 얻기 위해, Micromass Quatro LC 을 사용하였으며, NMR spectrum은 JEOL Eclipse 500 FT-NMR spectrometer(500 MHz)를 사용하였으며, NMR 용매는 methanol-*d*<sub>4</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>, chloroform-*d* 내부표준물질은 tetramethylsilane (TMS) 를 사용하였다.

### 생리활성물질 분리

정공피 1.2 kg을 methanol 1l에 넣고 일주일 동안 상온에서 추출한 후, 여과하여 추출물 18.84 g(1.6%)을 얻었다. 이를 3차 증류수에 현탁시켜, 노르말 헥산으로 3회 추출하여, 추출물 0.812 g(4.3%)을 얻었으며, 같은 추출방법으로 에틸 아세테이트 추출물 9.406 g(49.9%)을 얻었다. 에틸 아세테이트층(3 g)을 메탄올(5 ml)을 넣어 녹인 후, 실리카 겔(150 g)로 충전된 flash column에 넣어, 에틸 아세테이트, methylene chloridde, 메탄올을 혼합하여 극성이 증가되는 순으로 gradient를 걸어, 분획 1(3.3 mg), 분획 2(30.2 mg), 분획 3(183.6 mg), 분획 4(316.0 mg), 분획 5(54.9 mg), 분획 6(54.6 mg), 분획 7(79.5 mg), 분획 8(1.7 mg), 분획 9(7.3 mg), 분획 10(76.0 mg), 분획 11(49.3 mg), 분획 12(39.8 mg), 분획 13(107.2 mg), 분획 14(515.0 mg), 분획 15(121.0 mg), 분획 16(63.2 mg), 분획 17(34.7 mg), 분획 18(35.7 mg), 분획 19(80.0 mg)을 얻었다. 분획물 중에서 생리활성이 있다고 판단된 분획 3(183.6 mg), 분획 4(316.0 mg), 분획 6(54.6 mg)을 역상 HPLC를 이용하여, 화합물 1, 2 및 3를 얻었다.

ESI-MS과 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR data와 HMBC, HMQC, HMCOSY

를 이용하여, 분자구조를 규명하여, sakuranetin(1),<sup>8-10)</sup> prunetin(2)<sup>11,12)</sup>과 dihydroquercetin(3)<sup>13,14)</sup>을 얻었다.

### 세포배양

생쥐의 대식세포(murine macrophage Raw 264.7 cell line)를 10% FBS(heat inactivated), 1% L-glutamine, nonessential amino acids 및 1% antibiotic/antimycotic(100 U/ml of penicillin, 25.0 μg/ml of amphotericin D, and 100.0 μg/ml of streptomycin) 등이 포함된 RPMI 1640 배지에 넣고 37% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다.

### 세포 생존율 측정

Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin에 대한 RAW 264.7 세포주의 세포 생존율을 MTT(2-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법을 이용하여 분석 하였다. RAW 264.7 세포주를 96-well plate에 well당 1×10<sup>4</sup>가 되도록 seeding한 다음, IFN-γ/LPS 및 약제를 24 시간 처리하고 새로운 배지에 50.0 μg/ml이 되도록, MTT를 첨가하여 2~4시간 동안 반응시켰다. MTT와 생존세포로부터 생성된 보라색 불용성 formazan을 DMSO로 용해하여, 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

### Nitric oxide(NO)의 농도의 측정

Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin을 DMSO에 녹여 저장용액을 만들었으며, Sarcoma 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로서 griess시약(1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)을 이용하여 측정하였다. 이것을 희석하여 측정용액을 만든 후 LPS 를 1 μg/ml 처리하여, 18시간 동안 배양시킨다. 배양액 중 100 μl를 취하고, 동량의 griess시약을 넣고 실온에서 10분간 방치한 다음, ELISA plate reader를 이용하여, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub>는 sodium nitrite를 표준용액으로 측정하였으며, 각 측정치는 5~8 μM의 NO<sub>2</sub>을 함유하는 cell-free 배양액의 흡광도를 이용하여 보정하였다.

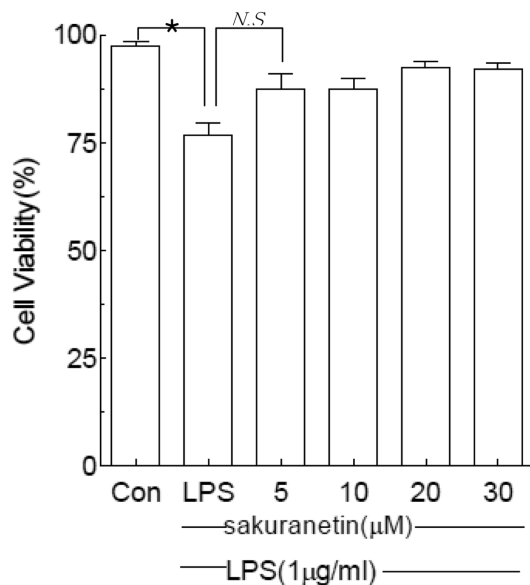
### Western blotting

Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin과 LPS에 의해 자극된 세포를 PBS(phosphatebuffered saline)으로 세척한 다음, cell lysis buffer(50 mM Tris, pH 8.0, 110 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, PMSF 100.0 μg/ml)로 용해시킨 다음, 원심분리하여 단백질 용액을 얻는다. Bradford 분석 방법을 이용하여 정량한 다음, 30.0 μg를 취하여 동량의 sample buffer(125 mM Tris pH 6.8, 4% SDS 20% glycerol, 10% 2-mercaptoet-

hanol)를 혼합한 다음, 95°C에서 5분 동안 가열하여 단백질을 변성을 유도하였다. 변성된 단백질을 12% acrylamide gel에서 전기영동을 수행한 다음, nitrocellulose membrane(Amersham Pharmacia 사)으로 전위시키고, 5% skim milk/TBS-T로 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. Cox-2과 iNOS 및  $\beta$ -actin에 대한 1차 항체(primary antibody)를 3% skim milk/TBS-T에서 1 : 1,000으로 희석하여, membrane과 상온에서 1시간 30분 동안 반응시키고 세척한 다음, Anti-mouse, rabbit 혹은 goat IgG conjugated horseradish peroxidase 이차 항체(secondary antibody)를 1% skim milk/TBST에서 1 : 5,000으로 희석하여, membrane과 상온에서 1시간 동안 반응시킨다. TBS-T로 세척한 다음, ECL reagent kit(Amersham, Buckinghamshire, England)로 발색시킨 다음, X-ray film에 감광시키는 방법으로 분석하였다.

#### Cyclooxygenase-2(COX-2) 농도의 측정

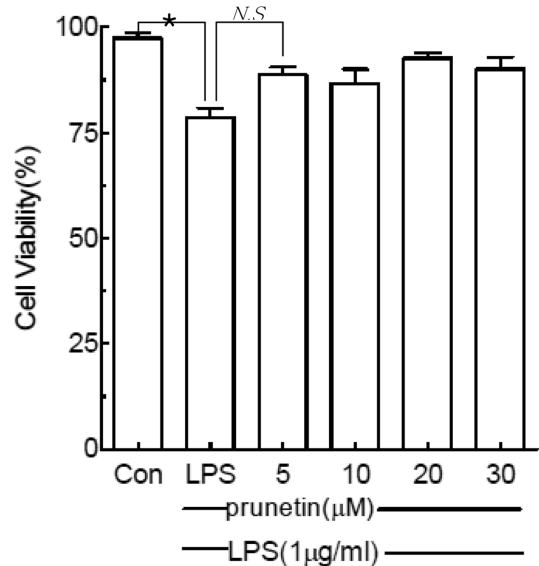
Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin을 농도별로 RAW 264.7 세포에 1시간 전처리 한 다음, LPS로 자극하고 24시간 후에 배양액을 회수하여 후, ELISA kit(enzyme linked immunosorbant assay, R&D System)를 이용하여 분석하였다. 모든 분석과정은 R&D System에서 제공된 방법에 준하여 측정하였다.



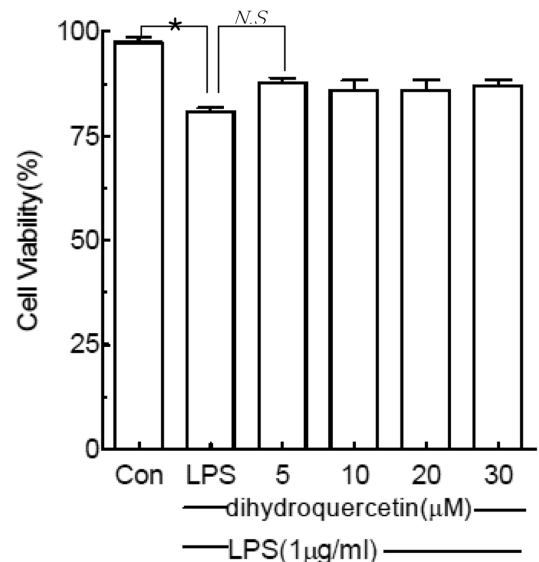
**Fig. 1** – Effects of sakuranetin on the cell viability of in RAW 264.7 cells ( $2.5 \times 10^5$ /ml). Cells were incubated with or without LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 h in the presence or absence of sakuranetin at indicated concentrations. The cell viability was determined by the MTT method. One of three blots is shown and each bar represents the mean  $\pm$ SD from three separate experiments. \* $P < 0.005$ , N.S: not significant.

#### 통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 mean  $\pm$  S.D.



**Fig. 2** – Effects of prunetin on the cell viability of in RAW 264.7 cells ( $2.5 \times 10^5$ /ml). Cells were incubated with or without LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 h in the presence or absence of prunetin at indicated concentrations. The cell viability was determined by the MTT method. One of three blots is shown and each bar represents the mean  $\pm$ SD from three separate experiments. \* $P < 0.005$ , N.S: not significant.



**Fig. 3** – Effects of dihydroqueroetin on the cell viability of in RAW 264.7 cells ( $2.5 \times 10^5$ /ml). Cells were incubated with or without LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 h in the presence or absence of dihydroqueroetin at indicated concentrations. The cell viability was determined by the MTT method. One of three blots is shown and each bar represents the mean  $\pm$ SD from three separate experiments. \* $P < 0.005$ , N.S: not significant.

값으로 표시하였고, 각 실험 결과로부터 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다. 일반적으로, p 값이 0.05 이하인 것만 통계적으로 유의성이 있는 것으로 검증하였다.

**실험결과 및 고찰**

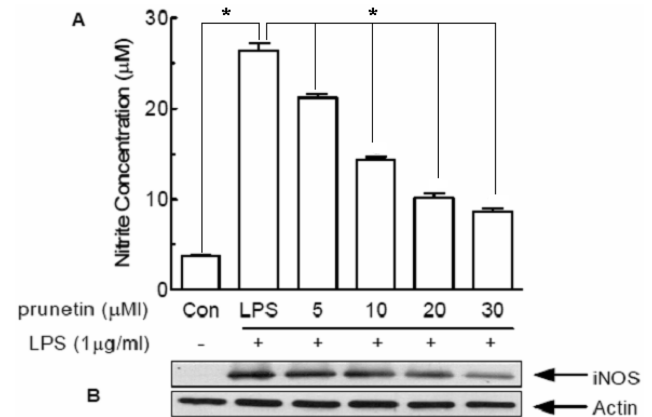
**Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin의 세포 생존률에 미치는 영향**

Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin을 540 nm 파장에서 흡광도를 측정한 결과, 대조군을 100%로 했을 경우, LPS로 자극한 대조군은 75%의 세포 생존률을 나타냈으며, 생리활성물질과 LPS를 처리한 군은 90% 이상의 세포 생존률이 관찰되었다. 5.0~30.0 μM 생리활성물질의 농도 사이에서는 세포 생존률에 큰 영향을 미치지 않는 플라보노이드계열의 화합물임을 확인하였다(Figs. 1, 2와 3).<sup>15)</sup>

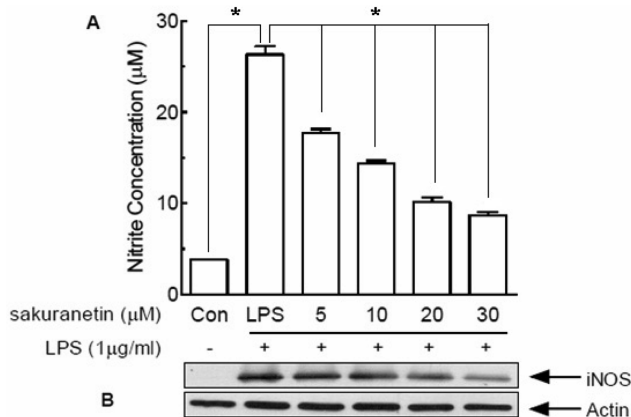
**Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin에 대한 Nitric oxide(NO)의 농도 측정**

Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin 이 RAW 264.7 세포에서 LPS의 유도에 의한 NO 생성에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여, RAW 264.7 세포(1×10<sup>6</sup> cells/ml)를 주입하고, 5 시간 후에 5.0~30.0 μM 생리활성물질의 농도로 2시간 동안 전처리 한 다음, LPS(1.0 mg/ml)를 처리하여 18시간 배양하였다.

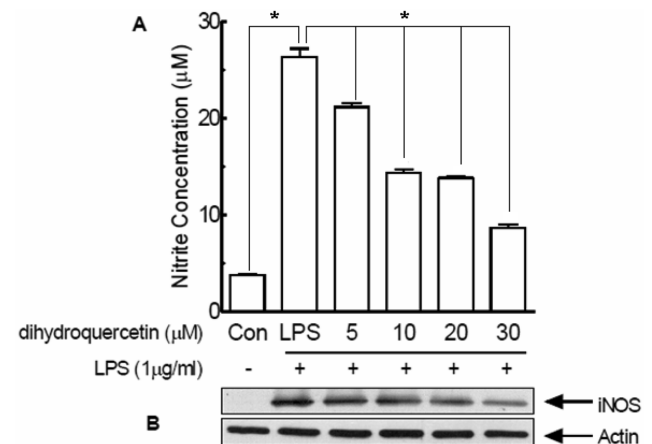
그 결과 생리활성물질이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 23.6 μM의 아질산염을 생성시킨 반면, 5.0~30.0 μM 생리활성물질을 처리한 실험군은 8.0~22.0 μM의 아질산염을 생성시켰다. 이러한 연구결과에 의하면, prunetin, skuranetin 및 dihydroquercetin은 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 억제하는 것으로 판단 된다(Figs. 4, 5과 6).<sup>15)</sup>



**Fig. 5** – Effects of prunetin on NO production and iNOS protein expression in RAW 264.7 cells (2.5×10<sup>5</sup>/ml). (A) Cells were incubated 24 h for NO assay or (B) 18 h for iNOS western blot with medium, NO concentration was determined by griess reagent. For the determination of intracellular iNOS protein, western immunoblot analysis was carried out as described in materials and methods. One of three blots is shown and each bar represents the mean±SD from three separate experiments. \*P<0.005.



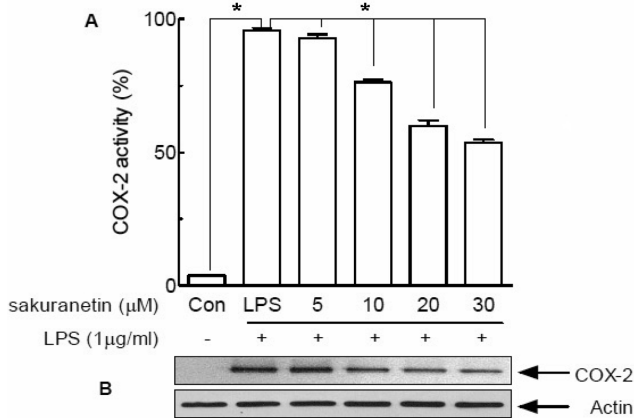
**Fig. 4** – Effects of sakuranetin on NO production and iNOS protein expression in RAW 264.7 cells (2.5×10<sup>5</sup>/ml). (A) Cells were incubated 24 h for NO assay or (B) 18 h for iNOS western blot with medium, NO concentration was determined by griess reagent for the determination of intracellular iNOS protein, Western immunoblot analysis was carried out as described in materials and methods. One of three blots is shown and each bar represents the mean±SD from three separate experiments. \*P<0.005.



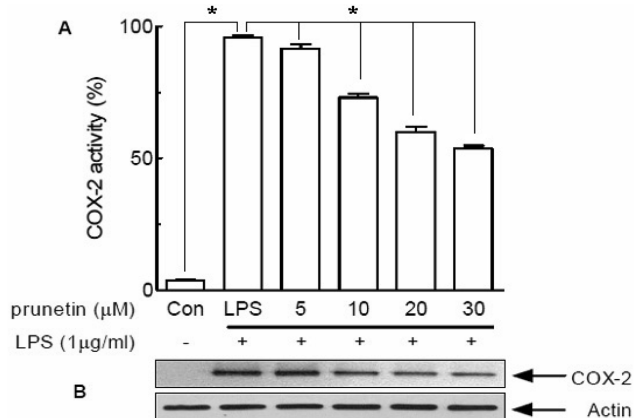
**Fig. 6** – Effects of dihydroquercetin on NO production and iNOS protein expression in RAW 264.7 cells. (A) Cells (2.5×10<sup>5</sup>/ml) were incubated 24 h for NO assay or (B) 18 h for iNOS Western blot with medium, NO concentration was determined by griess reagent. For the determination of intracellular iNOS protein, western immunoblot analysis was carried out as described in materials and methods. One of three blots is shown and each bar represents the mean±SD from three separate experiments. \*P<0.005.

### Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin에 대한 iNOS의 측정

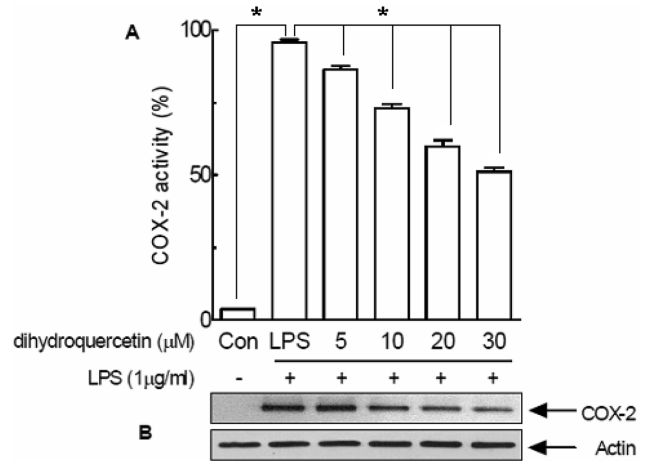
Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin과 1.0 µg/ml LPS가 처리된 RAW 264.7 세포를 용해시킨 후, Bradford 법으로 분석한 결과에 의하면, 농도 의존적으로 감소되는 현상을 관찰할 수가 있었으며, 이들 생리활성물질은 대조군과 비교할때에 30 µg/ml에서 발생하는 NO의 50% 이상 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 연구결과는 prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin이 항



**Fig. 7** – Effects of sakuranetin on (A) COX-2 activity and (B) COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$ /ml). Cells were incubated with or without LPS (1 µg/ml) for 18 h in the presence or absence of sakuranetin. Western immunoblot analysis was carried out as described in materials and methods. One of three blots is shown and each bar represents the mean  $\pm$  SD from three separate experiments. \* $P < 0.005$ .



**Fig. 8** – Effects of prunetin on (A) COX-2 activity and (B) COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$ /ml). Cells were incubated with or without LPS (1 µg/ml) for 18 h in the presence or absence of prunetin. Western immunoblot analysis was carried out as described in materials and methods. One of three blots is shown and each bar represents the mean  $\pm$  SD from three separate experiments. \* $P < 0.005$ .



**Fig. 9** – Effects of dihydroquercetin on (A) COX-2 activity and (B) COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$ /ml). Cells were incubated with or without LPS (1 µg/ml) for 18 h in the presence or absence of dihydroquercetin. Western immunoblot analysis was carried out as described in materials and methods. One of three blots is shown and each bar represents the mean  $\pm$  SD from three separate experiments. \* $P < 0.005$ .

염증제로서 활용될 가치가 있는 것으로 사료된다(Figs. 4, 5과 6).<sup>15)</sup>

### Prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin에 대한 Cyclooxygenase-2(COX-2)의 측정

PGE2 생성에 직접적으로 영향을 미치는 COX-2의 발현을 Western immunoblot analysis 방법과 ELISA 방법으로 조사하였다. 그 연구결과에 의하면, COX-2 단백질 발현이 농도 의존적으로 억제되는 사실을 증명하였으며, LPS로 자극된 대조군을 기준으로 했을 때, 30.0 µM 생리활성물질을 처리했을 때, 50%의 감소율이 관찰되었다. 이러한 연구결과에 의하면, prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin이 항염증제로서 활용될 가치가 있는 것으로 사료된다(Figs. 7, 8과 9).<sup>15)</sup>

## 결론

정공피에서는 처음으로 분리된 prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin은 RAW 264.7 세포에서 농도 의존적으로 iNOS의 발현, NO의 생성과 COX-2의 발현을 억제하여, PGE2 생성이 억제됨을 관찰되었다. 이러한 연구결과에 의하면, prunetin, sakuranetin 및 dihydroquercetin이 염증성 질환을 예방하거나 치료할 가능성을 시사하고 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2008년도 원광대학교 교비연구비 지원에 의하여 이

루어졌으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) Bae, K. : The Medicinal Plants of Korea, Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, Korea, p. 236 (2000).
- 2) Chun, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R. and Kim, Y. M. : Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1075 (2001).
- 3) Brieva, A., Guerrero, A., Alonso-Lebrero, J. L. and Pivel, J. P. : Immunoferon®, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF- $\alpha$  production and inflammatory responses. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1979 (2001).
- 4) Wang, Y., Vodovotz, Y., Kim, P. K., Zamora, R. and Billiar, T. R. : Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**, 415 (2002).
- 5) Galla, H. J. : Nitric oxide, NO, an intercellular messenger. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 378 (1993).
- 6) Narumi, S., Finke, J. H. and Hamilton, T. A. : Interferon gamma and interleukin 2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* **265**, 7036 (1990).
- 7) Cox, G. W., Melillo, G., Chattopadhyay, G., Mullet, D., Fertel, R. H. and Varesio, L. : Tumor necrosis factor-alpha-dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J. Immunol.* **149**, 3290 (1992).
- 8) Lee, S. M. and Lee, C. G. : Isolation and gas chromatographic analysis of lupenone and lupenol from *Sorbus Cortex*. *Anal. Sci. Technol.* **12**, 136 (1999).
- 9) Rakwal, R., Hasegawa, M. and Kodama, O. : A methyltransferase for synthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin in rice leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 732 (1996).
- 10) You, M. J., Kim, B. M., Bhatt, L. R., Chai, K. Y. and Baek, S. H. : Inhibitory effect of sakuranetin on (1,3)- $\beta$ -glucan synthase. *Orien. Pharm. Exp. Med.* submitted.
- 11) Peng, T., Tu, Y. Q., Deng, Y. and Zhang, X. : Studies on chemical constituents of *Primula sikkimensis*. *Zhong Yao Cai.* **31**, 44 (2008).
- 12) de Almeida, J. G., Silveira, E. R. and Pessoa, O. D. : NMR spectral assignments of a new [C--O--C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. *Magn. Reson. Chem.* **46**, 103 (2008).
- 13) Kawaguchi, M., Tanabe, H. and Nagamine, K. : Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2"-glycosidic linkage from green mature acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1130 (2007).
- 14) Tsydendambaev, P. B., Khyshiktyev, B. S., Dutov, A. A., Nikolaev, S. M. and Savin, A. V. : High-performance liquid chromatographic method for the determination of dihydroquercetin in extracts of medicinal plants. *Biomed. Khim.* **53**, 212 (2007).
- 15) Rho, J. R., Jun, C. S., Ha, Y. A., Yoo, M. J., Cui, M. X., Baek, S. H., Lim, J. A., Lee, Y. H. and Chai, K. Y. : Isolation and characterization of a new alkaloid from the seed of *Prunus persica* L. and its antiinflammatory activity. *Bull. Korea Chem. Soc.* **28**, 1289 (2007).