

## *Smilax riparia* 잎의 항산화 성분

조은선 · 김정일 · 김호현 · 전인주 · 함인혜 · 황완균<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received June 15, 2003; Revised September 30, 2003)

### The Anti-oxidative Compounds of *Smilax riparia* Leaves

Eun-Sun Cho, Jung-Il Kim, Hohyun Kim, In-Ju Chon, Inhye Ham and Wan-Kyunn Whang<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chung Ang University 221 Heukseok-dong Dongjak-gu Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — Rhizoma of *Smilax china* has been used as anti-inflammatory and analgesic, antiedemic agent in Korean folk medicine. In order to investigate the efficacy of anti-oxidative activity, the activity-guided fractionation and the isolation were performed. Each fractions (H<sub>2</sub>O fraction, 20%, 40%, 60%, 100% MeOH fractions and CHCl<sub>3</sub> fraction) was examined anti-oxidant activity by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging potential. It was revealed that 40%, 20% MeOH fractions and H<sub>2</sub>O fractions have significant anti-oxidative activity. From 40% and 20% MeOH fractions two flavonoid glycosides and one procyanidin were isolated and elucidated apigenin-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside, apigenin-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside and catechin(4 $\alpha$  $\rightarrow$ 6)epicatechin through their physicochemical data and IR, FAB-MS, <sup>13</sup>C-NMR, and <sup>1</sup>H-NMR analysis with authenticals, respectively. The isolated compounds were examined by DPPH method. Apigenin-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside and catechin (4 $\alpha$  $\rightarrow$ 6)epicatechin showed powerful radical scavenging activities on DPPH radical among three compounds.

**Keywords** □ smilax, antioxidant activity

밀나물(*Smilax riparia*)은 백합과(Liliaceae)에 속하는 덩굴성 다년초로 가시가 없고, 줄기에 능선이 있다. 잎은 호생, 난형 또는 난상 타원형이며 길이 5~15 cm, 폭 2.5~7 cm, 맥은 5~7개, 가장자리에 톱니가 없으며, 표면은 털이 없고, 뒷면 맥 위에 잔 털이 있는 것도 있으며, 잎자루는 길이 5~30 mm, 밑부분에 턱잎이 변한 덩굴손이 있다. 열매는 둥근 모양으로 장과이며 검게 익는다. 개화기는 5~7월이고 결실기는 8~9월이며, 어린순은 식용으로 한다. 우리나라의 전역과 일본, 만주, 중국동북부, 우수리 등지에 넓게 분포한다.<sup>1,2)</sup>

중국의 본초서에는 우미채(牛尾菜)라 하여 기허부종, 근골통통, 반신불수, 편옹, 두훈, 두통, 해수, 토혈, 골결핵, 백대하의 치료에 사용하고 있으며, 그 외에도 우리나라 한방이나 민간에서 줄기와 근경을 골수염, 매독, 보비, 보신, 임질, 타박상, 소화불량, 설사, 풍습, 혈액순환 등에 사용하고 있다.<sup>3)</sup>

*Smilax*속 식물의 성분에 관한 연구는 1960년 Nakaoki 등<sup>4)</sup>이

*S. china*와 *S. medica*의 잎으로부터 rutin 등의 flavonoid 화합물과, 근경으로부터 parillin, smilacin 등의 saponin 성분을 분리하였고, 1966년 Kawasaki 등<sup>5)</sup>이 같은 식물의 근경으로부터 diosgenin과 이것의 배당체인 3종의 *Smilax* saponin A, B, C를 분리하였으나, 그 구조는 결정하지 못하였으며, 1974년 *Smilax* saponin B가 methyl protodioscin임을 보고하였다.<sup>6)</sup> 1982년 Takanori 등<sup>7)</sup>은 *S. china*의 근경으로부터 Isoseryl S-methyl cysteamine sulfoxide를 분리하였고, 1984년 3종의 glutamic acid를 분리하였다.<sup>8)</sup> 또한 1988년 김 등<sup>9)</sup>은 같은 식물의 근경으로부터 dioscin, gracillin, methyl protogracillin, methyl protodioscin 및 이것의 22-hydroxy 유도체를 분리하여 구조를 밝혔다. 또한 1992년 Sashida 등<sup>10)</sup>이 *S. riparia*의 근경으로부터 2개의 새로운 neotiogenin glycosides를 분리하였고, *S. china*의 근경에서는 하나의 새로운 isonarthogenin 및 다수의 steroidal saponins를 분리하였다. 최근 1996년 Chen 등<sup>11)</sup>이 *S. glabra*의 근경으로부터 isoengenitin, isoastilbin, astilbin 등의 3종의 flavonol glycosides를 분리하였고, 1999년 Chen 등<sup>12)</sup>은 같은 식물의 근경으로부터 1종의 새로운 flavanone인 smitilbin과 6종의 기지 물질인 engeletin, astilbin, dihydroquercetin, eurryphin, resveratrol,

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5611 (팩스) 02-820-5611  
(E-mail) whang-wk@cau.ac.kr

5-O-caffeoyl shikimic acid를 분리하였다.

*Smilax*속 식물의 약리 작용에 관한 연구는 1973년 Furusawa 등<sup>13)</sup>은 항trypsin 및 항염증 작용이 있는 것으로 추정되는 63종의 약용 식물 중에서 현저한 작용을 나타내는 5종의 식물 중 *S. china*는 항trypsin 작용이 95%임을 보고하였으며, 1980년 Perry 등<sup>14)</sup>은 통풍(痛風), 선명(腺痔), 매종(痔腫), 월경통(月經痛) 등에 유효하다고 보고하였다. 또한 1985년 Kosuge 등<sup>15)</sup>은 *S. china*의 수층 엑스가 Ehrlich 복수담암(腹水擔癌) 세포를 이용한 *in vivo* 시험에서 세포 성장을 25% 미만으로 억제하였다고 보고하였으며, 1989년 Ageel 등<sup>16)</sup>은 사우디아라비아에서 전통적으로 류마티스관절염, 통풍 등의 염증 질환에 사용되어 왔던 생약들의 에탄올 침출액을 가지고 carrageenan으로 염증을 유발시킨 rats로 항염증 효과를 실험한 결과, *S. sarsaparilla*는 25% 억제효과가 있는 것으로 보고하였다.

한편 flavonoid 화합물은 화학 구조상의 phenol기에 의한 항산화 작용 및 free radical scavenger로서의 작용이 알려지면서, 항산화제, 항암제, 항알러지제 및 항바이러스제 등으로의 개발 가능성이 때문에 주목 받기 시작하였다.<sup>17,18)</sup>

여부터 밀나물 등 *Smilax*속 식물의 어린잎을 나물로 식용하고 있으나 이에 대한 천연물 화학 및 생리 활성에 관한 연구가 거의 이루어져 있지 않음에 착안하여, *Smilax*속 식물 중 국내에 자생하는 밀나물의 잎을 사용한 약의 자원의 개발을 위하여 본 실험을 실시하였다.

한편 항산화와 관련된 문헌을 조사하는 과정에서 flavonoid 화합물이 항산화 및 항염 효과가 우수하다는 연구 결과에 착안하여, 저자는 신선한 밀나물 잎의 메탄올 추출물의 각 분획에 대

한 항산화적 효과를 검색하고, 각각의 항산화 효과가 있는 활성 분획으로부터 천연물 약품 화학적 방법으로 생리활성 성분의 분리를 시도하여 3종의 물질을 분리하고 그 화학구조를 확인, 동정하여 의약품 자원으로 개발 가능성을 평가하고자 본 연구를 착수하였다.

실험방법

기기 및 시약

본 실험에 사용한 밀나물(*Smilax riparia*)은 2002년 5월 소백산 다리안 계곡에서 채집하여 식물학적 감정을 거친 후 신선한 상태의 지상부를 사용하였다.

분석기기로는 Galaxy FT-IR spectrophotometer(USA), Hewlett Packard 8452A(USA), GC-MS/MS-DS TSQ 700(USA), VG 70-VSEQ(England), Varian Gemini 2000, 300 MHz(USA), Bruker AMX-500, 500 MHz(Germany), Varian Gemini 2000, 75 MHz(USA), Bruker AMX-500, 125 MHz(Germany)를 사용하였다. 항산화능 측정을 위한 Chemical Reagent로 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)(Sigma, USA), L-Ascorbic acid(Sigma, USA), 99.5% Ethanol(Merck, USA)를 사용하였다.

추출 및 분리

신선한 재료 840 g을 메탄올로 상온에서 냉침법으로 3회 추출 여과하고, 감압 농축 하여 메탄올 엑스 60 g를 얻었다. 여기에 증류수를 넣어 현탁시키고, 클로로포름을 넣고 진탕 반복 추출하

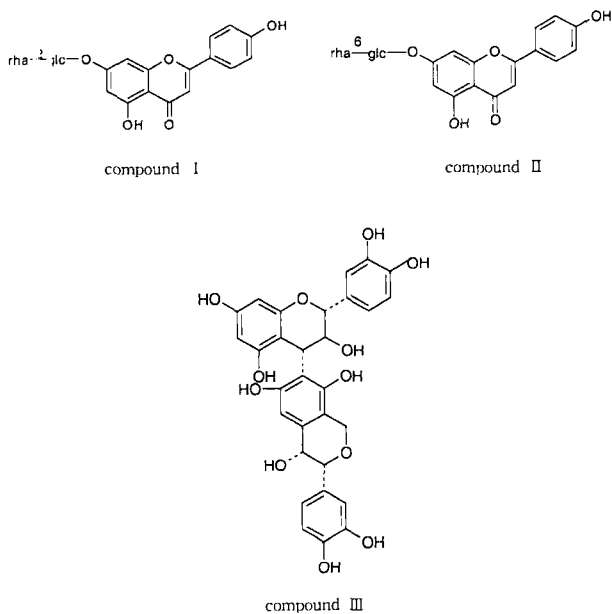
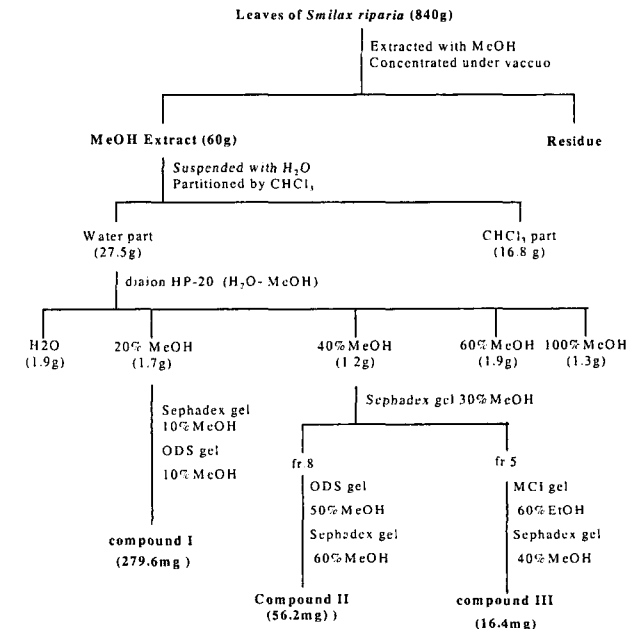


Fig. 1 – Structures of Compound I~III.



Scheme 1 – Extraction and isolation compound I~III from *Smilax riparia* leaves.

여 클로로포름 엑스 16.8 g과 물 엑스 27.5 g을 얻었다. 이렇게 얻은 물엑스를 diaion HP-20 column chromatography(전개용매: H<sub>2</sub>O→MeOH gradient type)를 실시하여 물 분획물(1.9 g), 20% MeOH 분획물(1.7 g), 40% MeOH 분획물(1.2 g), 60% MeOH 분획물(1.9 g), 100% MeOH 분획물(1.3 g)을 각각 얻었다(Scheme 1).

#### Compound I, II, III의 단리

Compound I은 Scheme 1의 방법으로 처리하여 얻은 20% MeOH 분획물을 Sephadex LH-20 column chromatography(전개용매: 10% MeOH)를 실시하여 fraction 1~9를 얻었다. 이 중 fraction 7을 ODS gel column chromatography(전개용매: 10% MeOH)를 실시하여 Compound I을 분리하여 농축시킨 후, MeOH로 재결정하여 황색의 물질 Compound I(279.6 mg, yield: 0.16%)을 얻었고, compound II는 Scheme 1의 방법으로 처리하여 얻은 40% MeOH 분획물(1.2 g)을 Sephadex LH-20 column chromatography(전개용매: 30% MeOH)를 실시하여 얻은 fraction 1~9 중 fraction 8을 ODS gel column chromatography(전개용매: 50% MeOH)를 실시하고 다시 Sephadex LH-20 column chromatography(전개용매: 60% MeOH)를 실시하여 단일로 나타나는 fraction 2를 농축시킨 후, MeOH 용액으로 재결정하여 황갈색 분말의 Compound II(56.2 mg, yield: 0.03%)를 얻었으며, compound III는 Scheme 1의 방법으로 처리하여 얻은 40% MeOH 분획물(1.2 g)을 Sephadex LH-20 column chromatography(전개용매: 30% MeOH)를 실시하여 얻은 fraction 1~9 중 fraction 5를 MCI gel column chromatography(전개용매: 60% EtOH)와 sephadex LH-20 column chromatography(전개용매: 40% MeOH) 차례로 실시한 다음 감압농축 후 MeOH로 재결정하여 적갈색의 결정 Compound III(16.4 mg, yield: 0.009%)를 얻었다.

#### Compound I - m.p : 251~253°C

IR cm<sup>-1</sup>: 3385(OH), 1655(conjugated C=O), 1604, 1501 (aromatic C=C), 1046(glycosidic OH)

(-)FAB-MS(m/z): 577[M-H]<sup>+</sup>, 431[M-(rha+H)]<sup>+</sup>, 269[M-(rha+glc+H)]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ : 7.95(2H, d, J=8.7 Hz, H-2', H-6'), 6.94(2H, d, J=9.0 Hz, H-3', H-5'), 6.88(1H, s, H-3), 6.80(1H, d, J=2.1 Hz, H-8), 6.38(1H, d, J=1.8 Hz, H-6), 5.24(1H, d, J=7.2 Hz, glc anomeric H), 5.14(1H, s, rha anomeric H), 1.20(3H, d, J=6.3 Hz, rha CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δppm (Table I 참조)

#### Compound II - m.p : 251~253°C

IR cm<sup>-1</sup>: 3358(OH), 1656(conjugated C=O), 1601, 1501 (aromatic C=C), 1063(glycosidic OH)

(-) FAB-MS (m/z): 577[M-H]<sup>+</sup>, 431[M-(rha+H)]<sup>+</sup>, 269[M-(rha+glc+H)]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ : 7.96(2H, d, J=8.7 Hz, H-2', H-6'), 6.96(2H, d, J=8.4 Hz, H-3', H-5'), 6.87(1H, s, H-3), 6.78(1H, d, J=1.8 Hz, H-8), 6.46(1H, d, J=1.8 Hz, H-6), 5.24(1H, d, J=7.2 Hz, glc anomeric H), 4.56(1H, s, rha anomeric H), 1.08(3H, d, J=6.0 Hz, rha CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>), δppm (Table I 참조)

Compound III - IR cm<sup>-1</sup>: 3440(OH), 1601, 1502, 1430(aromatic C=C)

(+) FAB-MS (m/z) : 579[M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR : 500 MHz(Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>), δ : 7.27{1H, d, J=1.9 Hz, H-2'(u or t)}, 7.03{1H, d, J=1.9 Hz, H-2'(u or t)}, 6.91{1H, dd, J=1.9 Hz, 8.0 Hz, H-6'(u or t)}, 6.87{1H, dd, J=1.9 Hz, 7.9 Hz, H-6'(u or t)}, 6.85{1H, d, J=7.9 Hz, H-5'(u or t)}, 6.82{1H, d, J=8.0 Hz, H-5'(u or t)}, 6.08(1H, s, H-6t), 5.89(1H, d, J=2.4 Hz, H-8u), 5.87(1H, d, J=2.4 Hz, H-6u), 4.70(1H, d, J=7.8 Hz, H-2u), 4.60(1H, dd, J=7.7 Hz, 9.7 Hz, H-3u), 4.55(1H, s, H-2t), 4.47(1H, d, J=9.7 Hz, H-4u), 4.08(1H, m, H-3t)

Table I - <sup>13</sup>C-NMR spectral data of compounds

Carbon No.	δ (ppm)		Carbon No.	δ(ppm)
	I	II		
C-2	164.6	164.8	C-2u	83.9
C-3	103.3	103.1	C-2t	78.9
C-4	182.3	182.3	C-3u	73.5
C-5	161.4	161.3	C-3t	66.8
C-6	99.5	99.9	C-4u	38.1
C-7	162.8	163.0	C-4t	29.0
C-8	94.6	95.0	C-5u, 5t, 7u,	154.7
C-9	157.2	157.2	7t, 9u, 9t	-158.2
C-10	105.6	105.5	C-6u	97.8
C-1'	121.2	121.1	C-6t	107.9
C-2'	128.8	128.9	C-8u	96.8
C-3'	116.2	116.3	C-8t	97.3
C-4'	161.7	161.5	C-10u	106.4
C-5'	116.2	116.3	C-10t	101.3
C-6'	128.8	128.9	C-1'	131.8
C-1''	97.9	99.7	C-2'	115.4
C-2''	76.4	73.1	C-3'	145.1
C-3''	77.1	75.5	C-4'	145.0
C-4''	70.6	70.7	C-5'	116.5
C-5''	77.3	76.2	C-6'	119.6
C-6''	60.5	65.9		
C-1'''	100.6	100.5		
C-2'''	70.5	70.3		
C-3'''	69.7	69.6		
C-4'''	72.0	72.1		
C-5'''	68.4	68.3		
C-6'''	18.1	17.6		

<u : upper unit, t : terminal unit>

<sup>13</sup>C-NMR: 125 MHz(Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>), δppm (Table I 참조)

**Compound I과 II의 가수분해**

Compound I과 II를 60% 1,4-dioxane 5 ml와 c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 혼합 용액에 녹여 수욕 상에서 3시간 반응시킨 다음, 반응액에 냉수를 가하고 ethylacetate로 분획하여 감압 농축한 후, Sephadex LH-20 column chromatography(전개 용매: Ethanol)를 실시하여 황색의 aglycone 결정을 얻었으며, 모액은 mixed bed resin TMD-8로 중화시킨 후, 표품과 같이 TLC를 하여 당을 확인하였다.

[실험 조건]

Absorbent: Kieselgel 60 F<sub>254</sub>(Merck, Germany)

Solvent: n-BuOH : pyridine : H<sub>2</sub>O (6 : 4 : 3)

Detecting Agent: 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

표품의 Rf: 0.42 (D-glc), 0.64 (L-rha)

[결과]

Compound I: 0.42(D-glc), 0.65(L-rha)

Compound II: 0.42(D-glc), 0.65(L-rha)

**항산화능 측정(DPPH assay)**

Hirano의 방법<sup>19,20)</sup>에 의하여 각 sample을 조제한 후, 각 용액 100 μl에 0.1 mM DPPH용액(99.5% ethanol에 용해) 1.9 ml를 가하고, Vortex mixer로 10초간 진탕한 후, 37°C에서 30분 동안 incubation시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조 약물은 L-ascorbic acid를 25, 50, 100, 200, 400 ppm(99.5% ethanol)의 5가지 농도별로 농시조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)과 IC<sub>50</sub>치(DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한 농도)로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

Sample O.D.=시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D.=시료대신 Ethanol을 가한 시험액의 흡광도

**결과 및 고찰**

**분획의 활성**

밀나물 잎의 각각의 분획을 농도별로(600~3,000 ppm)로 조제하여 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)과 IC<sub>50</sub>치로 측정된 결과, 40%, 20% MeOH 분획, H<sub>2</sub>O 분획 순으로 항산화 효과를 나타내었고, 이러한 항산화 효과는 농도 의존적으로 증가하였으며, 그 결과는 Table II와 같다.

**Table II** - IC<sub>50</sub> Values of fractions against the DPPH radical

Sample	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
L-Ascorbic acid	6.14
H <sub>2</sub> O Fr.	103.09
20% MeOH Fr.	86.05
40% MeOH Fr.	82.35
60% MeOH Fr.	237.04

**Compound I의 동정**

Compound I은 황색 분말상의 결정으로 FeCl<sub>3</sub> 반응과 Mg+HCl 반응에 양성이며 IR spectrum에서 3385(OH), 1655(conjugated C=O), 1604, 1501(aromatic C=C), 1050(glycosidic OH)cm<sup>-1</sup> 등에서 강한 흡수대를 나타내고 있어 flavonoid 화합물로 추정하였다.

(-)-FAB-MS spectrum에서는 m/z577에서 [M-H]<sup>-</sup>의 molecular ion peak가 관찰되었고, m/z 431에서 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak가, m/z 269에서 glucose와 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak가 관찰되는 것으로 보아 flavonoid 모핵에 glucose와 rhamnose가 결합된 물질로 추정할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ7.95ppm에서 2H에 해당하는 doublet signal은 J=8.7 Hz으로 apigenin B-ring의 H-2'와 H-6'으로 ortho-coupling하고 있으며, δ6.94 ppm에서 2H에 해당하는 doublet signal은 J=9.0 Hz으로 B-ring의 H-3'와 H-5'로 ortho-coupling하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 δ6.88 ppm에서 1H에 해당하는 singlet signal은 H-3로 추정할 수 있었으며, δ6.80 ppm에서 1H에 해당하는 J=2.1 Hz의 doublet signal은 H-8으로, δ6.38 ppm에서 1H에 해당하는 J=1.8 Hz의 doublet signal이 관찰되는 것으로 보아 H-6으로 추정할 수 있었다. 아울러 δ1.20 ppm에서 3H에 해당하는 J=6.4 Hz의 doublet signal은 rhamnose angular methyl기로 확인되었고, δ5.14 ppm에서 1H에 해당하는 singlet signal은 rhamnose anomeric proton으로 확인할 수 있었으며, δ5.24 ppm에서 1H에 해당하는 J=7.2 Hz의 doublet signal은 glucose의 anomeric proton으로 β 결합하고 있음을 추정할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 당으로부터 기인하는 δ97.9, 76.4, 77.1, 70.6, 77.3, 60.5, 100.6, 70.5, 69.7, 72.0, 68.4, 18.1 ppm으로 나타나는 12개의 carbon signals을 통해 2 mole의 당이 결합되어 있음을 알 수 있었다. 특히 glucose의 2번 탄소가 δ76.4 ppm으로 약 3.3 ppm downfield shift하는 것으로 보아 rhamnose가 glucose의 2번 탄소에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 비당부의 carbon signals이 15개이고, C-7이 δ162.8 ppm으로 upfield shift되어 관찰되므로 C-7의 hydroxyl group에 당이 결합되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

Compound I은 산가수분해 시켜 sugar part를 표품과 같이 TLC로 전개하여 D-glucose와 L-rhamnose임을 확인할 수 있

었다.

이상의 기기 분석 결과와 문헌 data의 비교로 Compound I은 m.p.251~253°C인 apigenin-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.<sup>26-29)</sup>

### Compound II의 동정

Compound II는 황갈색 분말상의 결정으로 FeCl<sub>3</sub> 반응과 Mg+HCl 반응에 양성이며 IR spectrum을 실시한 결과 3358 (OH), 1656(conjugated C=O), 1601, 1501(aromatic C=C), 1063(glycosidic OH)cm<sup>-1</sup> 등에서 강한 흡수대를 나타내므로 flavonoid 화합물로 추정하였다.

(-)FAB-MS spectrum에서는 m/z 577에서 [M-H]<sup>-</sup>의 molecular ion peak가 관찰되었고, m/z 431에서 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak가, m/z 269에서 glucose와 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak가 관찰되는 것으로 보아 flavonoid 모핵에 glucose와 rhamnose가 결합된 물질로 추정할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta$ 7.96 ppm에서  $J=8.7$  Hz인 2H에 해당하는 doublet signal은 apigenin B-ring의 H-2'와 H-6'이 ortho-coupling하고 있으며,  $\delta$ 6.96 ppm에서 2H에 해당하는 doublet signal은  $J=8.4$  Hz로 apigenin B-ring의 H-3'와 H-5'이 ortho-coupling하고 있음을 알 수 있었다. 또한  $\delta$ 6.87 ppm에서 1H에 해당하는 singlet signal은 H-3으로 추정할 수 있었으며,  $\delta$ 6.78 ppm에서 1H에 해당하는  $J=1.8$  Hz의 doublet signal이 관찰되는 것으로 보아 H-8로,  $\delta$ 6.46 ppm에서 1H에 해당하는  $J=1.8$  Hz의 doublet signal은 H-6임을 확인할 수 있었다. 그리고  $\delta$ 1.08 ppm에서 3H에 해당하는  $J=6.0$  Hz의 doublet signal은 rhamnose angular methyl기로 확인되었고,  $\delta$ 4.56 ppm에서 1H에 해당하는 singlet signal은 rhamnose anomeric proton으로 추정할 수 있었으며,  $\delta$ 5.24 ppm에서 1H에 해당하는  $J=7.2$  Hz의 doublet signal은 glucose의 anomeric proton으로 당이  $\beta$  결합하고 있음을 추정할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 당으로부터 기인하는  $\delta$ 99.7, 73.1, 75.5, 70.7, 76.2, 65.9, 100.5, 70.3, 69.6, 72.1, 68.3, 17.6 ppm으로 나타나는 12개의 carbon signals을 통해 2 mole의 당이 결합되어 있음을 알 수 있었다. 특히 glucose의 6번 탄소가  $\delta$ 65.9 ppm으로 약 5.1 ppm downfield shift 하는 것으로 보아 rhamnose가 glucose의 6번 탄소에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 또한 비당부의 carbon signals이 15개이고, C-7이  $\delta$ 163.0 ppm으로 약 1.1 ppm upfield shift되어 관찰되므로 C-7의 hydroxyl group에 당이 결합되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

Compound II는 산가수분해 시켜 sugar part를 표품과 같이 TLC로 전개하여 D-glucose와 L-rhamnose임을 확인할 수 있었다.

이상의 기기 분석 결과와 문헌 data의 비교로 Compound II는 m.p.251~253°C인 apigenin-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.<sup>26-29)</sup>

### Compound III의 동정

Compound III은 적갈색 분말상의 결정으로 FeCl<sub>3</sub> 시약에 의해 청색으로 변색되며, IR spectrum을 실시한 결과 3440(OH), 1601, 1502, 1430(aromatic ring)cm<sup>-1</sup>에서 강한 흡수대를 나타냈으며, positive FAB-MS spectrum에서는 m/z 579에서 [M+H]<sup>+</sup>의 molecular ion peak가 관찰되는 것으로 보아 procyanidin 화합물로 추정할 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 procyanidin 화합물에서 주로 나타나는 현상인 rotational isomerism에 의한 resonance의 duplication 및 line-broadening이 발생하여 복잡한 양상의 spectrum을 나타내었다.  $\delta$ 4.55 ppm에서 관찰되는 terminal unit인 H-2 signal은  $\delta$ 4.99 ppm에서 관찰되는 procyanidin B<sub>4</sub> [Catechin(4 $\alpha$  $\rightarrow$ 8)epicatechin]의 terminal unit에 위치한 H-2 signal과 비교했을 때, upfield shift되어 관찰되는 것으로 보아 procyanidin B<sub>4</sub>보다 upper unit의 영향을 적게 받는 것을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물의 결합 위치는 4 $\alpha$  $\rightarrow$ 6 결합으로 추정할 수 있었으며,  $\delta$ 4.70 ppm에서 관찰되는  $J=7.7$  Hz인 doublet signal은 upper unit의 H-2로,  $\delta$ 4.60 ppm에서 관찰되는  $J=7.7$  Hz, 9.7 Hz인 doublet signal은 upper unit의 H-3으로,  $\delta$ 4.47 ppm에서 관찰되는  $J=9.7$  Hz인 doublet signal은 upper unit의 H-4로 추정할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서도 <sup>1</sup>H-NMR spectrum과 같이 procyanidin 화합물에서 주로 나타나는 현상인 rotational isomerism이 나타나 매우 복잡한 양상을 나타내었다.  $\delta$ 83.9, 78.9 ppm에서 나타나는 signal은 C-2로,  $\delta$ 73.5, 66.8 ppm에서는 C-3으로,  $\delta$ 38.1, 29.0 ppm에서는 C-4로,  $\delta$ 97.8, 107.9 ppm에서는 C-6로,  $\delta$ 96.8, 97.3 ppm에서는 C-8로,  $\delta$ 106.4, 101.3 ppm에서 나타나는 signals은 C-10에 의한 것으로 확인되었다. 특히 upper unit의 C-4는 38.1 ppm에서 관찰되는 것으로 보아 약 10 ppm downfield shift 되었음을 확인할 수 있었고, terminal unit의 C-6은 약 11.1 ppm downfield shift 되어  $\delta$ 107.9 ppm에서 관찰되는 것으로 보아 catechin(4 $\alpha$  $\rightarrow$ 6)epicatechin 구조임을 확인할 수 있었다.

이상의 기기 분석 결과와 문헌 data의 비교로 Compound III은 procyanidin 화합물인 catechin(4 $\alpha$  $\rightarrow$ 6)epicatechin으로 확인 동정하였다.<sup>21-25)</sup>

### 분리 성분의 항산화 활성

우수한 radical scavenging activity를 보인 40%, 20% MeOH 분획에서 분리한 3종의 compounds에 대하여 각각의 radical scavenging activity를 측정하였다. 각각의 compound를 농도별로

**Table III** – IC<sub>50</sub> values of fractions against the DPPH radical

Sample	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
L-Ascorbic acid	6.14
Compound I	155.32
Compound II	≥1000
Compound III	174.77

(600~3,000 ppm) 조제하여 DPPH에 대한 전자 공여능(EDA %)과 IC<sub>50</sub>치를 측정된 결과, compound I, III은 항산화 효과를 나타내었으나, compound II는 항산화에 대한 활성이 없는 것으로 나타났다(Table III).

**결 론**

생체 내에서 활성 산소는 면역계의 인자를 손상시키고, 특히 세포 생체막의 불포화 지방산의 지질 과산화를 일으켜 노화 및 성인병 등 각종 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있으며, 이에 따라 항산화 효과가 우수한 천연물에 관한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 *Smilax*속 식물 중 우리나라에 풍부하게 자생하는 밀나물의 잎에 관한 성분 및 활성에 관한 연구가 활발하지 않음에 착안하여 밀나물의 의약자원 개발가능성과 chemotaxonomy 일환으로서 본 실험을 실시하였다.

이 실험 연구에서는 밀나물 잎의 메탄올 추출물의 각 분획(H<sub>2</sub>O 분획, 20% MeOH 분획, 40% MeOH 분획, 60% MeOH 분획, 100% MeOH 분획, CHCl<sub>3</sub> 분획)에 대하여 DPPH를 이용한 항산화 효과를 측정된 결과, 40% MeOH 분획, 20% MeOH 분획, H<sub>2</sub>O 분획 순으로 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

이상의 활성 실험의 결과를 통해 항산화 효과가 우수한 40% MeOH 분획, 20% MeOH 분획으로부터 3종의 compound를 분리하였다. 이들의 각종 물리 화학적 성상과 기기 분석 IR, FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등의 소견을 종합한 결과 Compound I은 apigenin-7-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside, Compound II는 apigenin-7-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, Compound III은 procyanidin 화합물인 catechin:4α→6) epicatechin으로 확인 동정하였으며, 이들 성분 중 Compound I, III은 항산화 효과가 우수한 화합물로 학문적 의의가 있다고 사료된다. 특히 활성이 나타난 Compound I과, 활성이 없는 Compound II는 aglycone 및 결합된 당은 같으나, 당과 당간의 결합 위치가 다르므로 활성의 차이점을 보이는 것으로 사료되어 앞으로 당과 당간의 결합 위치에 따른 활성 시험에 좋은 아이디어를 제공해 줄 것으로 사료된다.

**감사의 글**

본 연구는 2002년도 대조생약에 관한 연구(식품의약품안전청)

의 지원에 의하여 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

- 1) 이영노 : 원색한국식물도감, 교학사 p. 939 (1997).
- 2) 이우철 : 원색한국기준식물도감, 아카데미서적 p. 401.
- 3) 이경순 외 : 중약대사전, 정담출판사 p. 4158.
- 4) Nakaoki, T. and Morita, N. : Flavonoids of the leaves of *Smilax china* and *S. medica*. *Yakugaku Zasshi* **80**, 1473 (1960).
- 5) Kawasaki, T., Nishioka, I., Tsukamoto, T. and Mihashi, K. : Saponins of *Smilacis chinae* rhizoma. *Yakugaku Zasshi* **86**, 673 (1966).
- 6) Kawasaki, T., Komori, T., Miyahara, K., Nohara, T., Hosokawa, I. and Mhashi, K. : Furostanol bisglycosides corresponding to dioscin and gracillin. *Chem. Pharm. Bull.* **22**(9), 2164 (1974).
- 7) Takanori, K. and Sadao, S. : Isoseryl S-methylcysteamine sulfoxide, a new amide in the tubers of sarutori-ibara (*Smilax china*). *Agric. Biol. Chem.* **46**(6), 1613 (1982).
- 8) Takanori, K., Tsuyoshi, N., Yoshinari, S. and Sadao, S. : Several 4-substituted glutamic acid derivatives and small peptides in soma liliaceae plants. *Agric. Biol. Chem.* **48**(9), 2271 (1984).
- 9) Kim, S. W., Chung, K. C., Son, K. H. and Kang, S. S. : Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilax china*. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**(2), 76 (1989).
- 10) Sashida, Y., Kubo, S., Mimaki, Y., Nikaido, T. and Ohmoto, T. : Steroidal saponins from *Smilax riparia* and *S. china*. *Phytochemistry* **31**(7), 2439 (1992).
- 11) Cen, G., Shen, L. and Jiang, P. : Flavonol glucosides of *Smilax glabra*. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* **21**(6), 355 (1996).
- 12) Chen, Y., Li, J., Cao, J., Xu, Q., Komatsu, K. and Namba, T. : A new flavanone isolated from rhizoma smilacis glabrae. *Planta Med.* **65**(1), 56 (1999).
- 13) Furusawa, Y., Kurosawa, Y. and Chuman, I. : Studies on trypsin inhibitor in oriental drug plants and its antiinflammatory effects. *Japan. J. Arr. Chem. Soc.* **47**, 359 (1973).
- 14) Perry, L. M. : Medicinal plants of east and southeast asia. *The MIT Press* 240 (1980).
- 15) Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, K. and Yamamoto, T. : Studies on antitumor activities and antitumor principles of chinese herbs. *Yakugaku Zasshi* **105**(8), 791 (1985).
- 16) Ageel, A. M., Mossa, J. S., Yahya, M. A., Said, M. S. and Tariq, M. : Experimental studies on antirheumatic crude drugs used in saudi traditional medicine. *Drugs Exp Clin Res.* **15**(8), 369 (1989).
- 17) 梶本五郎 : 抗酸化劑の理論과 實際(抗酸化劑의 種類). 三秀書房 4 (1959).
- 18) 김영중 : Flavonoids in new drug development. 강원대학교 종합 약학연구소, "94 심포지움 발표 논문 초록집" 12 (1994).
- 19) Bindoli, A., Cavallini, L. and Siliprandi, N. : Inhibitory action of

- sylimarin of lipid peroxide formation in rat mitochondria and microsomes. *Biochem. Pharmacology* **26**, 2405 (1977).
- 20) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatus, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
- 21) Markham, K. L. : Techniques of Flavonoid Identification, *Academic Press*, London 89 (1982).
- 22) Agrawal, P. K. : Carbon-13 NMR of flavonoids. *Elaevier* **132**, 294 (1989).
- 23) Harbone, J. B. and Mabry, T. J. : The flavonoids advances in research. *Chapman and Hall Ltd.* 61 (1982).
- 24) Harbone, J. B. and Mabry, T. J. : The flavonoids advances in research. *Chapman and Hall Ltd.* 487 (1994).
- 25) Newman, R. H., Porter, L. J., Foo, L. Y., John, S. R. and Willing, R. I. : High-Resolution  $^{13}\text{C}$ -NMR studies proanthocyanidin polymers (condensed tannines). *Magn. Reson. Chem.* **25**, 118 (1987).