

## 조희풀(*Clematis heracleifolia*) 지하부의 성분과 Acetylcholinesterase 억제 활성

김미애<sup>1</sup> · 김명조<sup>2</sup> · 전완주<sup>3</sup> · 권용수<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 약학대학, <sup>2</sup>강원대학교 농업생명과학대학, <sup>3</sup>강원대학교 의과대학

## Chemical Constituents and Their Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Underground Parts of *Clematis heracleifolia*

Mi Ae Kim<sup>1</sup>, Myong Jo Kim<sup>2</sup>, Wanjoo Chun<sup>3</sup>, and Yongsoo Kwon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>3</sup>College of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract** – To clarify chemical constituents of *Clematis heracleifolia*, isolation and structure elucidation of the underground parts of *C. heracleifolia* were performed. Five compounds were isolated from CHCl<sub>3</sub> and *n*-BuOH soluble fraction of this plant. On the basis of spectral and physico-chemical data, the structure of isolated compounds were identified as coniferyl alcohol (1), scoparone (2), (+)-lariciresinol (3), phytosterols (4), and daucosterol (5), respectively. All compounds are isolated from this plant for the first time. To evaluate anti-acetylcholinesterase activity of the isolated compounds, compounds 1, 2, 3, and 5 were tested inhibition activity against acetylcholinesterase. Among tested compounds, daucosterol (5) showed acetylcholinesterase inhibitory activity with IC<sub>50</sub> value of 6.1 μM.

**Key words** – *Clematis heracleifolia*, Underground parts, Acetylcholinesterase inhibitory activity, Daucosterol

*Clematis*속 식물은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하고 세계적으로 약 355 종이 있으며<sup>1)</sup> 주로 북반구에 분포하고 그 중에서도 아시아의 동부지역과 북아메리카의 동부지역에 밀집되어 분포하고 있는 것으로 보고되었으며,<sup>2)</sup> 우리나라에는 학자마다 조금씩 다르기는 하지만 약 17종의 *Clematis*속 식물이 분포하고 있다.<sup>3)</sup>

조희풀(*Clematis heracleifolia*)은 낙엽성 반관목으로 높이 1 m에 달하고 밑부분은 목질이다. 잎은 대생하고 3개의 소엽으로 구성되며 소엽은 넓은 난형으로 길이 6~15 cm이고 끝이 뾰족하며 양면에 거친 털이 약간 있고 치아모양의 톱니가 있으며 흔히 얇은 결각이 있다. 꽃은 8~9월에 짙은 하늘색으로 피며 짧은 원추화서로 달리고 회피편은 4개이고 통형이며 길이 2~2.5 cm이고 겉에 털이 있으며 뒤로 밀린다. 과실은 수과로 편평한 타원형이며 암술대는 1.5~2 cm이고 백색의 털이 우상으로 난다. 우리나라 전역에 걸쳐 분포하고 만주지역에도 분포하는 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup>

조희풀(*Clematis heracleifolia*)은 병조희풀(*C. tubulosa*), 선목단풀(*C. urticifolia*) 등 다양한 식물명으로도 부르고 있다. 또한, 자주조희풀(*C. heracleifolia* var. *dauidiana*)은 자주선목단풀이라고도 하며 분류하는 학자에 따라 조희풀에 포함을 시키기도 하고 다른 식물로 구분하기도 한다.<sup>3-5)</sup>

조희풀(*C. heracleifolia*)의 전통적인 응용을 보면 중약대사전에서는 뿌리와 줄기를 모란등(牡丹藤)이라 하여 관절염, 통풍 등의 치료제로 사용한다고 하였으며,<sup>6)</sup> 또한 중화본초에서는 전초를 초목단(草木丹)이라하여 풍습성 관절통, 복통설사, 이질, 결핵성 췌양 등의 치료에 이용하고 있다.<sup>7)</sup> 조희풀에 관한 연구는 전초의 MeOH 추출물의 anti-human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)에 대한 효과를 보고한 것 외에는 찾아보지 못하였다.<sup>8)</sup> 그러나, 조희풀을 제외한 *Clematis*속 식물에 대한 연구는 매우 다양하게 이루어져 triterpenoid saponins,<sup>9-14)</sup> flavonoids,<sup>15-20)</sup> alkaloids,<sup>21-23)</sup> lignans,<sup>24,25)</sup> coumarin<sup>26)</sup> 등의 화합물이 보고되었다. Chawla 등<sup>27)</sup>의 조사에 따르면 본 속 식물의 활성으로 analgesic, antiangiogenic, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial,

\*교신저자(E-mail): yskwon@kangwon.ac.kr  
(Tel): +82-33-250-6921

antioxidant, antiviral, apoptosis, cartilage protective, diuretic, hepatoprotective 및, hypotensive effect 등 매우 다양한 활성에 관한 연구가 이루어지고 있음을 알 수 있다. 이상에서 살펴본 바와 같이 *Clematis*속 식물들은 다양하게 연구가 이루어지고 있음에도 불구하고 조희풀(*C. heracleifolia*)에 대한 연구가 거의 이루어지지 않고 있어 저자 등은 조희풀(*C. heracleifolia*)의 성분상을 규명하여 *Clematis*속 식물들과 성분상을 비교함과 동시에 활성연구의 재료로 사용하기 위하여 조희풀의 잎, 줄기 및 지하부에 관한 연구에 착수하였으며 그 결과의 일부로 조희풀의 지하부로부터 약간의 지견을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용한 조희풀(*C. heracleifolia*)의 지하부는 2013년 9월 사명산에서 채집하여 강원대학교 약학대학 권용수교수가 정확하게 감정한 후 음건하여 사용하였다. 확증표본(KNUPH-2013-09-R-01)은 강원대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

**기기 및 시약** -  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra는 Bruker사의 AVANCE 600을 이용하여 측정하였다. Mass spectrum은 AB Sciex사의 API 3200 LC/MS/MS system을 이용하여 negative 또는 positive mode로 측정하였다. UV/Vis spectrophotometer는 Jasco사의 V-530을 사용하였다. Flash column chromatography는 Teledyne Isco사의 CombiFlash<sup>®</sup>

Retrieve<sup>™</sup>를 이용하였고 column은 RediSep<sup>®</sup> 이용하였다. 각 분획의 추출용매 및 column chromatography용 용매는 특급시약을 사용하였다. TLC 전개용매 및 기타 시약은 특급 및 분석용 시약을 사용하였고 Acetylcholinesterase, acetylthiocholine, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)는 Sigma사의 것을 사용하였다. TLC plate는 Merck사의 precoated Kieselgel 60 F254s(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm, Merck Art. No. 5715), RP-18 F254s를 사용하였으며, column chromatography의 충전제는 Merck사의 Kieselgel 60(63-200  $\mu\text{m}$  또는 40-63  $\mu\text{m}$ ) 및 YMC gel ODS-A(150  $\mu\text{m}$ )를 사용하였다. TLC spot 발색은 254 nm UV 및 20% 황산용액을 사용하였다. GC-MS는 Agilent사의 7890 A system을 사용하였으며, column은 HP-5MS capillary column (30 m×0.25 mm)를 사용하였다. Injection 온도는 250°C로 설정하였고 column 온도는 250°C에서 5분간 유지 후 분당 5°C씩 상승하도록 설정하여 300°C까지 설정하였으며 이 온도가 20분간 지속되도록 하였다. Carrier gas는 helium을 사용하였고 flow rate는 분당 1.2 ml로 설정하였다.<sup>28)</sup>

**추출 및 분리** - 채집 후 음건하여 세절한 조희풀(*C. heracleifolia*)의 지하부 1.6 kg을 70% 에탄올 2.5 L에 넣고 85°C에서 4시간씩 4회 환류추출하였다. 추출액은 여지를 이

용하여 여과한 후 여액을 40°C이하에서 감압농축하고 건조엑스 149 g을 얻었다. 얻어진 추출물 145 g을 증류수로 현탁시킨 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH순으로 분획하고 남은 물층을 제거하였다. 각 분획들을 감압농축하여 *n*-hexane 분획 6.5 g, EtOAc 분획 5.9 g, *n*-BuOH 분획 23 g을 각각 얻었다. 얻어진 EtOAc 분획 5.5 g에 대하여 40% MeOH을 용매로 ODS flash column chromatography(RediSep<sup>®</sup>, 130 g)를 실시하고 9개의 소분획(Fr. 1-Fr. 9)으로 나누었다. 이 중 Fr. 2와 Fr. 3(1.0 g)을 대상으로 benzene:EtOAc(2:1)과 *n*-hexane:EtOAc(2:1)을 용매로 silica gel(Merck, 40-63  $\mu\text{m}$ ) column chromatography(3.0×20 cm)를 각각 실시하여 화합물 **1**(27 mg)을 얻었다. 다시 Fr. 4와 Fr. 5(0.9 g)을 대상으로  $\text{CHCl}_3$ :MeOH(19:1)을 용매로 silica gel(Merck, 40-63  $\mu\text{m}$ ) column chromatography(3×20 cm)를 반복 실시하여 화합물 **2**(3.1 mg)와 화합물 **3**(60 mg)을 각각 얻었다.

*n*-BuOH 분획(15 g)을 silica gel(Merck, 63-200  $\mu\text{m}$ ) column(5×50 cm)에 걸어 EtOAc:MeOH을 용매로 19:1에서 1:1까지 극성을 증가시키면서 stepwise gradient chromatography를 실시하여 5개의 분획(Fr. B-1-Fr. B-5)으로 나누었다. 이 중 Fr. B-1(2.0 g)에 대하여  $\text{CHCl}_3$ :MeOH(49:1)과 *n*-hexane:EtOAc(4:1)을 용매로 silica gel column chromatography(Merck, 40-63  $\mu\text{m}$ , 3×50 cm)를 실시하여 화합물 **4**(45 mg)을 얻었다. Fr. B-4(5.2 g)을 대상으로  $\text{CHCl}_3$ :MeOH(7:1)을 용매로 silica gel column chromatography(Merck, 63-200  $\mu\text{m}$ , 3×50 cm)를 실시하고 6개의 소분획(Fr. B-4-1-Fr. B-4-6)으로 나누었다. Fr. B-4-3(0.8 g)을  $\text{CHCl}_3$ :MeOH(9:1)의 용매로 silica gel column chromatography(Merck, 40-63  $\mu\text{m}$ , 3×20 cm)를 실시하여 화합물 **5**(63 mg)을 얻었다.

**화합물 1** - Brown powder;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 3.84 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.18 (1H, dd,  $J=1.0$ , 6.0 Hz, H-9), 6.18 (1H, dt,  $J=15.8$ , 6.0 Hz, H-8), 6.49 (1H, d,  $J=15.8$  Hz, H-7), 6.72 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-5), 6.83 (1H, dd,  $J=8.1$ , 1.6 Hz, H-6), 6.98 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 55.0 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.6 (C-9), 109.1 (C-2), 114.8 (C-5), 119.6 (C-6), 125.6 (C-8), 129.2 (C-1), 130.7 (C-7), 146.1 (C-4), 147.7 (C-3); ESI-MS (negative mode),  $m/z$  179  $[\text{M-H}]^-$ .

**화합물 2** - White needles;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 3.87 (3H, s, 7- $\text{OCH}_3$ ), 3.92 (3H, s, 6- $\text{OCH}_3$ ), 6.26 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-3), 6.98 (1H, s, H-8), 7.13 (1H, s, H-5), 7.88 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-4);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 56.9 ( $\text{OCH}_3$  x 2), 101.0 (C-8), 110.0 (C-3), 113.1 (C-10), 113.6 (C-5), 145.9 (C-4), 148.2 (C-6), 151.3 (C-9), 154.8 (C-7), 163.8 (C-2); ESI-MS (negative mode),  $m/z$  205  $[\text{M-H}]^-$ .

**화합물 3** - Brown powder;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

$\delta$ : 2.38 (1H, m, H-8), 2.47(1H, dd,  $J=13.1, 11.5$  Hz, H<sub>a</sub>-7), 2.72(1H, m, H-8'), 2.91 (1H, dd,  $J=13.1, 4.8$  Hz, H<sub>b</sub>-7), 3.62 (1H, dd,  $J=10.8, 6.3$  Hz, H<sub>b</sub>-9'), 3.71 (1H, dd,  $J=8.4, 5.8$  Hz, H<sub>b</sub>-9), 3.80 (4H, H<sub>b</sub>-9', overlapped, -OCH<sub>3</sub>), 3.82 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.97 (1H, dd,  $J=8.2, 6.7$  Hz, H<sub>a</sub>-9), 4.74 (1H, d,  $J=7.0$  Hz, H-7'), 6.63 (1H, dd,  $J=8.2, 1.7$  Hz, H-6'), 6.71 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5), 6.76 (2H, br. s, H-5, H-6), 6.78 (1H, d,  $J=1.4$  Hz, H-2), 6.90 (1H, br. s, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 32.3 (C-7), 42.5 (C-8), 52.7 (C-8'), 55.0 (OCH<sub>3</sub> x 2), 59.1 (C-9'), 72.1 (C-9), 82.7 (C-7'), 109.3 (C-2'), 112.0 (C-2), 114.6 (C-5'), 114.8 (C-5), 118.4 (C-6'), 120.8 (C-6), 132.2 (C-1), 134.4 (C-1'), 144.4 (C-4), 145.6 (C-4'), 147.6 (C-3, C-3');

ESI-MS (negative mode),  $m/z$  359 [M-H]<sup>+</sup>.

**화합물 4** – White powder (MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.68 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.81 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, 26- or 27-CH<sub>3</sub>), 0.84 (3H, d,  $J=6.7$  Hz, 26- or 27-CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 1.01 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 3.52 (1H, m, H-3), 5.02 (ca 0.3 H, m, H-22, or H-23), 5.15 (ca 0.3 H, m, H-22, or H-23), 5.35 (1H, br. d,  $J=2.9$  Hz, H-6); GC-MS,  $m/z$  peak a (retention time:33.56) 400 [M]<sup>+</sup>, peak b (retention time:33.93) 412 [M]<sup>+</sup>, peak c (retention time:34.70) 414 [M]<sup>+</sup>.

**화합물 5** – White powder (MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$ : 0.63(3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.83 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, 26-CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, d,  $J=6.7$  Hz, 27-CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, t,  $J=6.7$  Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 2.44 (1H, br. t,  $J=11.2$  Hz, H-4<sub>a</sub>), 2.70 (1H, dd,  $J=13.2, 2.4$  Hz, H-4<sub>b</sub>), 3.92 (1H, m, H-5'), 3.95 (1H, m, H-3), 4.02 (1H, t,  $J=8.0$  Hz, H-2'), 4.24 (1H, t,  $J=8.9$  Hz, H-3'), 4.27 (1H, t,  $J=8.8$  Hz, H-4'), 4.38 (1H, dd,  $J=11.8, 5.3$  Hz, H-6'<sub>a</sub>), 4.53 (1H, dd,  $J=11.8, 2.0$  Hz, H-6'<sub>b</sub>), 5.02 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1'), 5.32 (1H, br. d,  $J=2.5$  Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$ : 11.8 (C-18), 11.9 (C-29), 18.8 (C-27), 19.00 (C-21), 19.2 (C-19), 19.8 (C-26), 21.1 (C-11), 23.2 (C-28), 24.3 (C-15), 26.2 (C-23), 28.3 (C-16), 29.3 (C-25), 30.0 (C-2), 31.9 (C-8), 32.0 (C-7), 34.0 (C-22), 36.2 (C-20), 36.7 (C-10), 37.3 (C-1), 39.1 (C-12), 39.7 (C-4), 42.3 (C-13), 45.8 (C-24), 50.1 (C-9), 56.0 (C-17), 56.6 (C-14), 62.6 (C-6'), 71.5 (C-4'), 75.1 (C-2'), 77.9 (C-3'), 78.3 (C-3), 78.4 (C-5'), 102.4 (C-1'), 121.7 (C-6), 140.7 (C-5); ESI-MS (positive mode),  $m/z$  599 [M + Na]<sup>+</sup>.

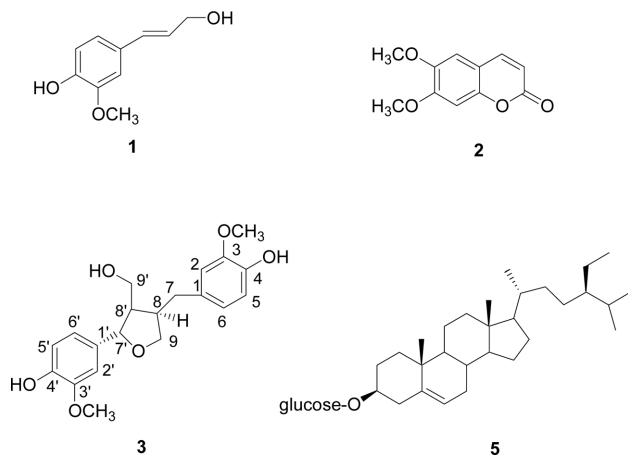
**Acetylcholinesterase 억제 활성의 측정** – Ellman 등<sup>29)</sup>의 방법을 약간 변경하여 실험하였다.

## 결과 및 고찰

화합물 1은 LC-ESI MS를 이용하여 negative mode로 측정 한 분자량이  $m/z$  179[M-H]<sup>+</sup>로 나타나며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 보면  $\delta$  6.98에서 나타나는  $J=1.6$  Hz의 doublet,  $\delta$  6.72에서  $J=8.1$  Hz로 나타나는 doublet 및  $\delta$  6.83에서  $J=8.1$ 과 1.6 Hz로 나타나는 double doublet으로부터 1, 3, 4 번에 치환기가 존재하는 벤젠 환이 존재함을 알 수 있었으며,  $\delta$  6.49에서  $J=15.8$  Hz로 나타나는 doublet과,  $\delta$  6.18에서 나타나는  $J=15.8$ 와 6.0 Hz의 double triplet 및  $\delta$  4.18에서 나타나는  $J=6.0$ 과 1.0 Hz의 준제로부터 이 화합물은 trans-olefinic proton이 존재하는 phenylpropanoid계열의 화합물임을 알 수 있었으며,  $\delta$  3.84에서 나타나는 singlet으로부터 한 개의 methoxyl기가 존재함을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에 의해서도 위의 사실을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 문헌<sup>30)</sup>과 비교하여 화합물 1은 coniferyl alcohol로 동정하였다.

화합물 2는 <sup>1</sup>H-NMR spectrum의  $\delta$  6.26와 7.88에서  $J=9.4$  Hz의 doublet이 각각 나타나고,  $\delta$  6.98과 7.13에서 singlet이 각각 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이 signal들은 그 위치와 coupling constant로 볼 때 coumarin의 6번과 7번 위치에 치환기가 존재하는 화합물임을 알 수 있었다.  $\delta$  3.87과 3.92에서 각각의 methoxyl기에 기인하는 signal이 나타나는 것으로부터 이 화합물에 치환된 치환체는 두 개의 methoxyl기임을 알 수 있었다. LC-ESI MS spectrum의  $m/z$  205에서 [M-H]<sup>+</sup>의 peak가 나타나므로 위의 사실을 확인할 수 있었다. 이 결과를 문헌<sup>31,32)</sup>과 비교하여 화합물 2는 esculetin-6, 7-dimethyl ether 즉, scoparone으로 동정하였다.

화합물 3의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 보면  $\delta$  6.63에서 나타나는  $J=8.0$ 과 1.7 Hz의 double doublet, H-6'),  $\delta$  6.7에서 나타나는  $J=8.0$  Hz의 doublet 그리고  $\delta$  6.90에서 나타나는 broad singlet 및  $\delta$  6.78에서 나타나는  $J=1.7$  Hz의 doublet, 6.76에서 나타나는 2 H 분의 broad singlet으로부터 이 화합물에는 1,2,4-trisubstituted benzene ring이 두 개가 존재하는 것을 확인할 수 있었으며, <sup>13</sup>C-NMR spectrum의  $\delta$  55.0에서 두 개의 methoxyl signal이 나타나는 것을 제외하고 18개의 탄소 signal들을 확인할 수 있었으므로 이 화합물을 lignan계열의 화합물로 추정할 수 있었다. 또한, <sup>1</sup>H-NMR spectrum의  $\delta$  3.62에서 나타나는  $J=10.8$ 과 6.3 Hz의 double doublet 및  $\delta$  3.80에 overlap되어 나타나는 9'의 proton signal들은 HMBC spectrum을 측정하여 correlation을 확인한 결과 7번이나 8번의 탄소와는 상관되어 있지 않았음을 확인할 수 있었으므로 이 화합물은 furan환이 한 개만 존재하는 lignan계열의 화합물임을 알 수 있었고,<sup>33)</sup> LC-ESI로 얻은 분자량이  $m/z$  359 [M-H]<sup>+</sup>에서 나타나므로 이 화합물은 lariciresinol임



**Fig. 1.** Structures of isolated compounds from the underground parts of *C. heracleifolia*.

을 알았다. 또한 선광도 값이 +11.5°로 나타나 positive의 값을 가지므로 이를 문헌<sup>34)</sup>과 비교하여 이 화합물은 (+)-lariciresinol로 동정하였다.

화합물 4는 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 phytosterol의 혼합물로 추정되어 GC-MS로 분석을 한 결과 β-sitosterol, stigmasterol, campesterol이 각각 52.5, 32.7 및 14.8% 함유되어 있는 혼합물임을 알 수 있었다.<sup>35)</sup> 화합물 5는 발표된 문헌<sup>36)</sup>과 비교하여 daucosterol로 동정하였다.

이들 5종의 화합물들과 같이 phenylpropanoids, lignins, coumarins 등의 계열의 화합물들은 *Clematis*속 식물에서 일반적으로 발견되는 성분들이기는 하지만 이 식물에서는 처음으로 분리된 것이며, 이 중에서도 coniferyl alcohol(1), scoparone(2) 및 (+)-lariciresinol(3)은 *Clematis*속 식물에서 처음으로 분리되는 화합물이었다.

이상에서와 같이 분리한 화합물 중 phytosterol의 혼합물을 제외한 4종의 화합물을 대상으로 acetylcholinesterase 억제활성을 측정하여 Table I에 나타내었다. 시험한 화합물 중 coniferyl alcohol(1)과 daucosterol(5)만이 억제 활성을 나타내었으며 IC<sub>50</sub> 값은 각각 288.8과 6.1 μM이었다. 이 중 coniferyl alcohol(1)은 강 등이 최근 소나무 재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)으로부터 얻은 acetylcholinesterase에 대하여 억제활성을 나타내며 본 연구에서와 유사한 결과를 얻은 것으로 발표하였다.<sup>37)</sup> Daucosterol에 대한 활성연구를 살펴보면 최 등이 *Trachelospermum jasminoides*의 항염증 활성 물질로 분리 발표하였으며,<sup>38)</sup> Bouic 등은 human peripheral blood lymphocyte의 proliferation을 자극하는 것으로 보고하였다.<sup>39)</sup> 이 등은 그들의 연구에서 암세포의 migration 억제활성을 보고하였고,<sup>40)</sup> Ju 등은 유방암세포의 증식억제활성에 관한 연구결과를 발표하였다.<sup>41)</sup> 이상과 같이 daucosterol의 활성은 항염증이냐 항암활성에 관한 연구가 주를 이루고 있음을 알 수 있다. Acetylcholinesterase에

**Table I.** Acetylcholinesterase inhibitory activity of compounds 1, 2, 3, and 5 of the underground parts of *C. heracleifolia*

Tested compounds	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/ml)	IC <sub>50</sub> (μM)
1	51.9	288.8
2	>100	- <sup>2)</sup>
3	>100	-
5	3.5	6.1
Berberine <sup>3), 4)</sup>	1.5	4.5

<sup>1)</sup>The inhibitory activity dose that reduced 50% of acetylcholinesterase activity and expressed as mean of two different experiments.

<sup>2)</sup>- means that did not show inhibitory activity.

<sup>3)</sup>A positive control

<sup>4)</sup>Lee, J. H, Lee, K. T., Yang, J. H., Baek, N. I. and Kim, D. K. (2004) Acetylcholinesterase inhibitors from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel, *Arch. Pharm. Res.* **27**: 53-56.

대한 daucosterol의 활성을 살펴보면 Chan 등이<sup>42)</sup> *Salvia nipponica* var. *formosana*의 잎을 대상으로 한 연구에서 β-sitosterol 및 이의 3-O-glucoside인 daucosterol은 anticholinesterase 활성을 나타내지 않는다고 보고가 있을 뿐이다. 그러나 이들의 연구결과와는 다르게 본 연구에서는 비교적 강한 활성을 나타내었고 이와 관련한 다른 연구자들의 연구 결과도 많지 않기 때문에 이 화합물에 대한 추가적인 검토가 필요한 부분으로 생각된다. Scoparone(2)은 유사한 구조를 가지는 scopoletin은 IC<sub>50</sub> 값이 79 μM로 약간의 활성을 보이는 데 반하여<sup>43)</sup> 거의 활성을 나타내지 않음을 알 수 있었는데 이는 coumarin의 7번 OH기가 OCH<sub>3</sub>기로 치환되었기 때문인 것으로 추측된다.

## 결론

조희풀의 함유성분을 규명하여 *Clematis*속 식물의 성분 분류학적 기준을 제공함과 동시에 함유성분들의 활성을 검토하기 위하여 조희풀의 지하부, 잎, 줄기 등을 대상으로 연구에 착수하였으며, 그 중 조희풀 지하부로부터 5종의 화합물을 분리하고 각종 분석기기를 이용하여 그 구조를 밝힌 결과 구조는 각각 coniferyl alcohol(1), scoparone(2), (+)-lariciresinol(3), β-sitosterol, stigmasterol, campesterol의 혼합물(4) 및 daucosterol(5)이었다. 이들 화합물은 모두 이 식물에서는 처음으로 분리된 것이며 이 화합물들 중에서 coniferyl alcohol(1), scoparone(2) 및 (+)-lariciresinol(3)은 *Clematis*속 식물에서는 처음으로 발견된 성분으로서 본 속 식물의 성분분류학적 기준 물질로 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, acetylcholinesterase 억제 활성 실험에서 IC<sub>50</sub> 값이 6.1 μM로 높게 나타난 daucosterol(5)은 다른 연구자들의 실험결과와 많이 다르므로 추가적인 검토가 필요할 것으로 생각된다.

## 사 사

이 연구는 강원대학교의 지원(과제번호:120140318)에 의하여 이루어 졌음.

## 인용문헌

- Jiang, N, Guan, K. Y. and Wang, Z. L. (2007) Species diversity and geographical distribution of *Clematis* (Ranunculaceae) in Yunna. *Acta Bot. Yunna* **29**: 145-154.
- Jones, S. B. Jr. and Luchsinger, A. E. (1979) Plant systematics, 239-240, McGraw-Hill, New York.
- 이영노 (1996) 원색 한국식물도감, 165, 교학사, 서울.
- 이우철 (1996) 원색 한국기준식물도감, 110, 아카데미서적, 서울.
- 이창복 (2003) 원색 대한식물도감(상), 337, 향문사, 서울.
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 (1998) 원역 중약대사전. 1709, 도서출판 정담, 서울.
- 國家中醫藥管理局 <中華本草> 編纂委員會 (1999) 中華本草 3, 201-202, 上海科學技術出版社, 上海.
- Min, B. S., Kim, Y. H., Tomiyama, M., Nakamura, N., Miyashiro, H., Otake, T. and Hattori, M. (2001) Inhibitory effect of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother. Res.* **15**: 481-486.
- Zhao, M., M, N., Qiu, W. L., Tang, H. F., Zhang, Y. and Wen, A. D. (2014) Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argenticulida* and their cytotoxic activity. *Planta Med. in press*.
- Zhao, M., Ma, N., Qiu, F., Tian, X., Zhang, Y., Tang, H. and Liu, X. (2014) Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argenticulida*. *Fitoterapia* **97**: 234-240.
- Li, S. G., Huang, X. J., Li, M. M., Wang, M., Feng, R. B., Zhang, W., Li, Y. L., Wang, Y. and Ye, W. C. (2014) Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis uncinata*. *Chem. Pharm. Bull.* **62**: 35-44.
- Zhang, W., Yao, M. N., Tang, H. F., Tian, X. R., Wang, M. C. and Xi, M. M. (2013) Triterpenoid saponins with anti-myocardial ischemia activity from the whole plants of *Clematis tangutica*. *Planta Med.* **79**: 673-679.
- Tian, X., Feng, J., Tang, H., Zhao, M., Li, Y., Hai, W. and Zhang, X. (2013) New cytotoxic triterpenoid saponins from the whole plant of *Clematis lasiandra*. *Fitoterapia* **90**: 233-239.
- Zhang, W., Wang, X., Tang, H., Wang, M., Ji, L., Wen, A. and Wang J. (2013) Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* and their cardioprotective activities. *Fitoterapia* **84**: 326-331.
- Zhao, M., Tang, H. F., Qiu, F., Tian, X. R., Ding, Y., Wang, X. Y. and Zhou, X. M. (2012) Triterpenoid saponins from *Clematis argenticulida*. *Biochem. Sys. Ecol.* **40**: 49-52.
- Du, Z. Z., Yang, X. W., Han, H., Cai, X. H. and Luo, X. D. (2010) A new flavone C-glycoside from *Clematis rehderiana*. *Molecules.* **15**: 672-679.
- Yesilada, E. and Kupeli, E. (2007) *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects, *J. Ethnopharmacol.* **110**: 504-515.
- Hung, T. M., Thuong, P. T. and Bae, K. H. (2005) Antioxidant effect of flavonoids isolated from the roots of *Clematis trichotoma* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**: 227-232.
- Ham, S. B., Kim, Y. I., Kwon, Y. and Kim, C. M. (1999) Compounds of the stem of *Clematis trichotoma*. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 301-305.
- Kizu, H., Shimana, H. and Tomimori, T. (1995) Studies on the constituents of *Clematis* species. VI. The constituents of *Clematis stans* Sieb. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* **43**: 2187-2194.
- Li, W. T., Yang, B. X., Gong, M. H., Xu, X. D., Lu, X. H., Sun, L. L., Tian, J. K. and Zhang, L. (2013) A new indole alkaloidal glucoside from the aerial parts of *Clematis terniflora*. *Nat. Prod. Res.* **27**: 2333-2337.
- Chen, J. H., Du, Z. Z., Shen, Y. M. and Yang, Y. P. (2009) Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. *Arch. Pharm. Res.* **32**: 3-5.
- Shi, S. P., Tu, P. F., Dong, C. X. and Jiang, D. (2006) Alkaloids from *Clematis mandshurica* Rupr. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **8**: 73-78.
- Xiong, J., Bui, V. B., Liu, X. H., Hong, Z. L., Yang, G. X. and Hu, J. F. (2014) Lignans from the stem of *Clematis armandii* ("Chuan-Mu-Tong") and their anti-neuroinflammatory activities. *J. Ethnopharmacol.* **153**: 737-743.
- Kyung, K. H., Woo, Y. H., Kim, D. S., Park, H. J. and Kim, Y. S. (2007) Antimicrobial activity of an edible wild plant. *Apiifolia Virsin's Bower (Clematis apiifolia DC.)*. *Food Sci. Biotechnol.* **16**: 68-70.
- Li, Y., Wang, S. F., Zhao, Y. L., Liu, K. H., Wang, X. M., Yang, Y. P. and Li, X. L. (2009) Chemical constituents from *Clematis delavayi* var. *spinescens*. *Molecules* **14**: 4433-4439.
- Chawla, R., Kumar, S. and Sharma, A. (2012) The genus *Clematis* (Ranunculaceae) : Chemical and pharmacological perspectives. *J. Ethnopharmacol.* **143**: 116-150.
- Han, J. Y., Kim, M. J., Ban, Y. W., Hwang, H. S. and Choi, Y. E. (2013) The involvement of  $\beta$ -amyrin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* **54**: 2034-2046.
- Ellman, L. G., Courtney, D., Andres, Jr., V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- Kim, H. J., Kang, M. A., Kim, S. H., Yim, S. H. and Lee, I. S. (2011) Bioactive phenolic constituents from the culms of *Phyllostachys bambusoides*. *Nat. Prod. Sci.* **17**: 267-272.
- Steck, W. and Mazurek, M. (1972) Identification of natural coumaris by NMR spectroscopy. *Lloydia* **35**: 418-439.
- Afex, U., Szejnberg, A. and Carmel, S. (1986) 6,7-

- Dimethoxycoumarin, A citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*. *Phytochemistry* **25**: 1855-1856.
33. Huang, W. W., Kong, D. Y. and Yang, P. M. (2003) Studies on lignin constituents of *Clematis armandii* Franch. *Chin. J. Nat. Med.* **1**: 199-203.
34. Park, J. H., Yeon, S. W., Cho, J. G., Lee, D. Y., Kim, Y. S. and Baek, N. I. (2010) Lignans from silkworm droppings and their promotional activities on Heme oxygenase (HO-1). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 734-739.
35. Kim, C. M. and Kang, S. S. (1986) Studies on the constituents of *Echinophora koreensis*. *Yakhak Hoeji* **30**: 139-142.
36. Chang, I. M., Yun - Choi H. S. and Yamasaki, K. (1981) Revision of <sup>13</sup>C NMR assignments of β-sitosterol and β-sitosterol-3-O-β-D-glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.* **12**: 12-24.
37. Kang, J. S., Kim, E., Lee S. H. and Park, I. K. (2013) Inhibition of acetylcholinesterase of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, by phytochemicals from plant essential oils. *Pest. Biochem. Physiol.* **105**: 50-56.
38. Choi, J. N., Choi, Y. H., Lee, J. M., Noh, I. C., Park, J. W., Choi, W. S. and Choi, J. H. (2012) Anti-inflammatory effect of β-sitosterol-β-D-glucoside from *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage. *Nat. Prod. Res.* **26**: 2340-2343.
39. Bouic, P. J. D., Etsemeth, S., Liebenberg, R. W., Albrecht, C. F., Pegel, K. and Van Jaarsveld, P. P. (1996) Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int. J. Immunopharmac.* **18**: 693-700.
40. Lee, D. Y., Lee, S. J., Kwak, H. Y., Jung, L., Heo, J., Hong, S., Kim, G. W. and Baek, N. I. (2009) Sterols isolated from *Nuruk* (*Rhizopus oryzae* KSD-815) inhibit the migration of cancer cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1328-1332.
41. Ju, Y. H. Clause, L. M., Allred K. F., Almad, A. L. and Helferich, W. G. (2004) Beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, and a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *J. Nutr.* **134**: 1145-1151.
42. Chan, H. H., Hwang, T. L., Su, C. R., Reddy, M. V. B. and Wu, T. S. (2011) Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidative constituents from the roots and the leaves of *Salvia nipponica* Miq. var. *formosana*. *Phytomedicine* **18**: 148-150.
43. Lee, J. H., Lee, K. T., Yang, J. H., Baek, N. I. and Kim, D. K. (2004) Acetylcholinesterase inhibitors from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 53-56.
- (2015. 1. 28 접수; 2015. 2. 23 심사; 2015. 3. 2 게재확정)