

## 산수유 씨의 최종당화산물 생성저해활성 성분

이가영 · 장대식 · 이윤미 · 김영숙 · 김진숙\*

한국한의학연구원 한약제제연구부

Constituents of the seeds of *Cornus officinalis* with Inhibitory Activity on the Formation of Advanced Glycation End Products (AGEs)

Ga Young Lee, Dae Sik Jang, Yun Mi Lee, Young Sook Kim, and Jin Sook Kim\*

Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Received September 8, 2008; Accepted October 9, 2008

Ten compounds, (+)-pinoresinol (1), (-)-balanophonin (2), gallicin (3), vanillin (4), 4-hydroxybenzaldehyde (5), coniferaldehyde (6), betulinic acid (7), ursolic acid (8), 5-hydroxymethyl furfural (9), and malic acid (10), were isolated from a EtOAc-soluble fraction of the seeds of *Cornus officinalis*. The structures of these compounds were elucidated by spectroscopic methods as well as by comparison with reported values. Compounds 1, 2, and 4-7 were isolated from this species for the first time. All the isolates (1-10) were subjected to an *in vitro* bioassay to evaluate their inhibitory activity against advanced glycation end products (AGEs) formation. Among these, compounds 2 and 3 showed the significant inhibitory activity on AGEs formation with IC<sub>50</sub> values of 27.81 and 18.04  $\mu$ M, respectively.

**Key words:** advanced glycation end products (AGEs), (-)-balanophonin, Cornaceae, *Cornus officinalis*, diabetic complications, gallicin

## 서 론

당뇨합병증은 장기간의 당뇨병으로 인해 고혈당 이외에 이로 인한 여러 가지 인자에 의해 유발되는 질환이다. 당뇨합병증의 발병 기전으로는 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)의 생성증가,<sup>1)</sup> polyol pathway flux의 활성화,<sup>2)</sup> protein kinase C isoform의 활성화 및 hexosamine pathway flux의 증가를 들 수 있다.<sup>3)</sup> 특히 혈당이 정상으로 회복이 되더라도, 일단 생성된 최종당화산물은 분해가 되지 않고 수명이 다할 때까지 존재하며 다른 단백질과 cross-link하여 치명적인 합병증을 유발한다.<sup>1,4)</sup> 최종당화산물의 생성억제제인 aminoguanidine이 당뇨병성 혈관합병증을 완화한다고 보고되어 있다.<sup>5,6)</sup> 따라서 glycation cascade 저해제 개발은 당뇨합병증의 예방 또는 치료 등을 위한 접근방법 중의 하나로 볼 수 있다.<sup>1,4)</sup> 그러나 aminoguanidine의 임상 실험에서 독성이 드러나면서, 보다 안전하고 우수한 효능을 가진 새로운 물질의 발굴을 위해 많은 연

구들이 진행되고 있다.<sup>7,8)</sup> 한약을 이용하여 보다 안전하고 효능이 우수한 당뇨합병증 예방 또는 치료제 개발을 위한 연구의 일환으로, 최종당화산물의 생성저해 효능 검색에서 우수한 활성을 나타낸 산수유 씨의 EtOAc-가용성 분획물(IC<sub>50</sub> 값: 1.52  $\mu$ g/ml)을 심층 연구의 대상으로 선정하였다.

산수유나무(*Corus officinalis* Sieb. et Zucc.)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽교목으로 중부 이남지역과 경기도 지역의 산지에서 자생하며, 열매는 산수유(山茱萸) 혹은 산수육(山茱肉)이라 하며, 한방과 민간에선 월경과다, 보익, 음위, 수검, 조경, 다뇨, 이명, 두풍, 신경쇠약, 강정 등의 치료 목적으로 사용되어 왔다.<sup>9,10)</sup> 산수유의 성분연구로는 gallic acid,<sup>11)</sup> malic acid, furfural 화합물,<sup>12)</sup> flavonol 화합물,<sup>13)</sup> tannin 화합물,<sup>14-16)</sup> iridoid 배당체,<sup>17,18)</sup> triterpenoid 화합물<sup>19)</sup> 및 정유성분<sup>20)</sup> 등이 보고되었으며, 산수유의 생리 활성에 관한 연구로는 항알러지,<sup>21)</sup> 항균 및 항산화 효과<sup>22)</sup> 그리고 항암효과<sup>23)</sup> 등이 보고되어 있지만, 산수유 씨에 대한 성분연구나 생리활성에 대한 연구는 항당뇨 효과<sup>24)</sup>에 대한 실험을 제외하고는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 산수유 씨의 EtOAc 가용성 분획물로부터 4종의 phenolic 화합물, 2종의 lignan 화합물, 2종의 triterpene 화합물, 1종의 furan 화합물, 1종의 organic acid를 분리하여 화학적 구조를 동정하였고, 분리된 화합물의 최종당화산물 생성 저해효능을 검색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

\*Corresponding author

Phone: +82-42-868-9465; Fax: +82-42-868-9471

E-mail: jskim@kiom.re.kr

## 재료 및 방법

**실험재료.** 본 실험재료는 2006년 11월 전남 구례군 상위마을에서 채집하였고, 대전대학교 생명과학부 김주환교수의 감정을 거친 후 실험재료로 사용하였으며 증거표본은(# KIOM-COOF1) 한국한의학연구원 한약제제연구부의 표본실에 보관 중이다.

**기기 및 시약.** 추출, 분획 및 column chromatography(CC)용 용매는 1급 시약을, 기타 시약은 1급 또는 특급을 각각 사용하였다. CC용 충전제는 Kiesel gel(Merck, Darmstadt, Germany; 70~230 및 230~400 mesh), Sephadex LH-20(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), reversed-phase silica gel(YMC Co, Kyoto, Japan; ODS-A 12 nm S-150  $\mu$ m)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> pre-coated plate(Merck, 105715)와 RP-18 plate(Merck, 115389)를 사용하였으며 발색시약으로는 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. NMR은 Bruker(Karlsruhe, Germany)의 DRX-300 또는 AVANCE 500 FT-NMR을 사용하여 측정하였다.

**추출 및 분리.** 과육을 제거하고 음건한 씨 5 kg을 분쇄한 후 100% MeOH로 실온에서 3일간 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과하여 40°C 이하에서 감압 농축하여 건조된 추출물 951 g을 얻었다. MeOH 추출물 936 g을 증류수에 현탁 시킨 후 용매 극성에 따라 *n*-hexane, EtOAc, 및 *n*-BuOH 을 이용하여 순차적으로 분획하여 *n*-hexane 분획물(11 g), EtOAc 분획물(283 g), *n*-BuOH 분획물(384 g) 및 H<sub>2</sub>O 분획물(258 g)을 얻었다.

**화합물의 분리 및 정제.** EtOAc 분획물 283 g중 277 g을 취하여 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/water(4:1:0.1→5:4:1→0:1:0) 조건으로 극성을 높여가며 silica gel CC(11×50 cm)를 실시하여 10개의 분획물로 나누었다(F01-F10). 분획물 F01(17 g)을 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(7:2.5:0.5→6:3:0.5)를 용매조건으로 silica gel CC(5.5×40 cm)를 실시하여 화합물 7(2.8 g, 흰색분말)과 화합물 4(40 mg, 무색침상결정)를 얻었다. 분획물 F02(5.4 g)를 CHCl<sub>3</sub>/MeOH(2:3) 조건으로 Sephadex LH-20 CC(4.6×72 cm) 실시하여 3개의 소분획물로 나누었다(F02A-F02C). 소분획물 F02B(1.5 g)를 CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH(5:1:0→1:1:2) 조건으로 silica gel CC(4.5×40 cm)를 실시하여 화합물 8(30 mg, 흰색분말)을 얻었다. 소분획물 F02C(728 mg)는 다시 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc(1:0→0:1)를 유출용매로 silica gel CC(4.5×46 cm)를 실시하여 11개의 소분획물로 나누었다(F02C01-F02C11). 소분획물 F02C02를 다시 MeOH/water(1:1→3:2)를 유출 용매로 한 YMC CC(4×48 cm)를 실시하여 화합물 5(47 mg, 백색분말), 6(1.2 mg, 황색 oil), 1(7.3 mg, 무색 oil)을 얻었고, 동일한 조건으로 CC를 실시하여 소분획물 F02C10에서 화합물 9(8.2 mg, 미황색 oil)를 분리하였다. MeOH을 유출용매로 Sephadex LH-20 CC(3×50 cm) 실시하여 소분획물 F02C09에서 화합물 2(13.4 mg, 미황색 oil)를 얻었다. 화합물 3(74 mg)은 CHCl<sub>3</sub>/MeOH(2:3)을 유출용매로 한 Sephadex LH-20 CC(4.5×72 cm) 실시에 의해 분획물 F03(9 g)으로부터 옅은 갈색 분말형태로 분리되었다. 또한 분획물 F06(8.8 g)을 100% MeOH을 유출용매로 한 Sephadex LH-20 CC(4.6×64 cm)를 실시한 후 MeOH를 이용한 재결정법에 의해 무색 침상결정의 화합물 10(90 mg)을 분리하였다.

**화합물 1** [(+)-Pinosin].  $[\alpha]_D^{25} = +72.7$  ( $c=0.4$ , CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.91 (2H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2, 2'), 6.89 (2H, d,  $J=8.1$  Hz, H-5, 5'), 6.84 (2H, dd,  $J=8.1, 1.8$  Hz, H-6, 6'), 5.61 (2H, s, OH), 4.75 (2H, d,  $J=4.5$  Hz, H-7, 7'), 4.26 (2H, dd,  $J=7.0, 6.9$  Hz, H-9b, 9b'), 3.91 (3H, s, OMe), 3.88 (2H, dd,  $J=9.0, 3.6$  Hz, H-9a, 9a'), 3.11 (2H, m, H-8, 8'); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  146.9 (C-3, 3'), 145.5 (C-4, 4'), 133.1 (C-1, 1'), 119.2 (C-6, 6'), 114.5 (C-5, 5'), 108.8 (C-2, 2'), 86.1 (C-7, 7'), 71.9 (C-9, 9'), 56.2 (OMe), 54.4 (C-8, 8').

**화합물 2** [(-)-Balanophonin].  $[\alpha]_D^{25} = -150$  ( $c=0.2$ , CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.64 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-9'), 7.42 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-7'), 7.14 (1H, s, H-6'), 7.05 (1H, s, H-2'), 6.87~6.91 (3H, overlapped, H-3, 5, 6), 6.61 (1H, dd,  $J=15.9, 8.4$  Hz, H-8'), 5.64 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, H-7), 3.97 (2H, m, H-9), 3.94 (3H, s, 3'-OMe), 3.87 (3H, s, 3-OMe), 3.68 (1H, m, H-8); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  193.8 (C=O), 153.3 (C-4'), 151.8 (C-7'), 147.0 (C-3), 146.2 (C-4), 145.1 (C-3'), 132.5 (C-1), 119.6 (C-6), 114.7 (C-5), 112.6 (C-2'), 128.4 (C-1'), 118.4 (C-6'), 129.4 (C-5'), 126.7 (C-8'), 109.0 (C-2), 89.2 (C-7), 64.2 (C-9), 56.4 (3'-OMe), 56.2 (3-OMe), 53.2 (C-8).

**화합물 3** (Gallicin). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.05 (2H, s, H-2, 6), 3.81 (3H, s, OMe); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  169.2 (C=O), 146.6 (C-3, 5), 139.9 (C-4), 121.6 (C-1), 110.2 (C-2, 6).

**화합물 4** (Vanillin). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.83 (1H, s, -CHO), 7.43 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2), 7.42 (1H, dd,  $J=1.8, 8.4$  Hz, H-6), 7.05 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, H-5), 6.13 (1H, s, OH), 3.97 (3H, s, OMe); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  191.2 (-CHO), 152.0 (C-5), 147.4 (C-4), 130.1 (C-1), 127.7 (C-6), 114.7 (C-5), 109.1 (C-2), 56.4 (OMe).

**화합물 5** (4-Hydroxybenzaldehyde). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.85 (1H, s, -CHO), 7.84 (2H, d,  $J=8.7$  Hz, H-2, 6), 7.00 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  191.1 (-CHO), 164.0 (C-4), 132.9 (C-2, 6), 130.6 (C-1), 116.8 (C-3, 5).

**화합물 6** (Coniferaldehyde). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  9.57 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, -CHO), 7.58 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-7), 7.25 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2), 7.17 (1H, dd,  $J=2.1, 8.1$  Hz, H-6), 6.85 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-5), 6.64 (1H, dd,  $J=15.9, 7.8$  Hz, H-8), 3.91 (3H, s, OMe); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  196.3 (C=O), 156.7 (C-7), 153.7 (C-4), 150.1 (C-3), 127.0 (C-8), 126.2 (C-6), 125.7 (C-1), 117.2 (C-5), 112.3 (C-2), 56.0 (OMe).

**화합물 7** (Betulinic acid). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  4.96 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, H-29b), 4.78 (1H, d,  $J=0.9$  Hz, H-29a), 3.55 (1H, m, H-19), 3.47 (1H, dd,  $J=7.5, 7.5$  Hz, H-3), 1.81 (3H, s, 30-CH<sub>3</sub>), 1.24 (3H, s, 27-CH<sub>3</sub>), 1.09 (3H, s, 26-CH<sub>3</sub>), 1.08 (3H, s, 23-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 25-CH<sub>3</sub>),

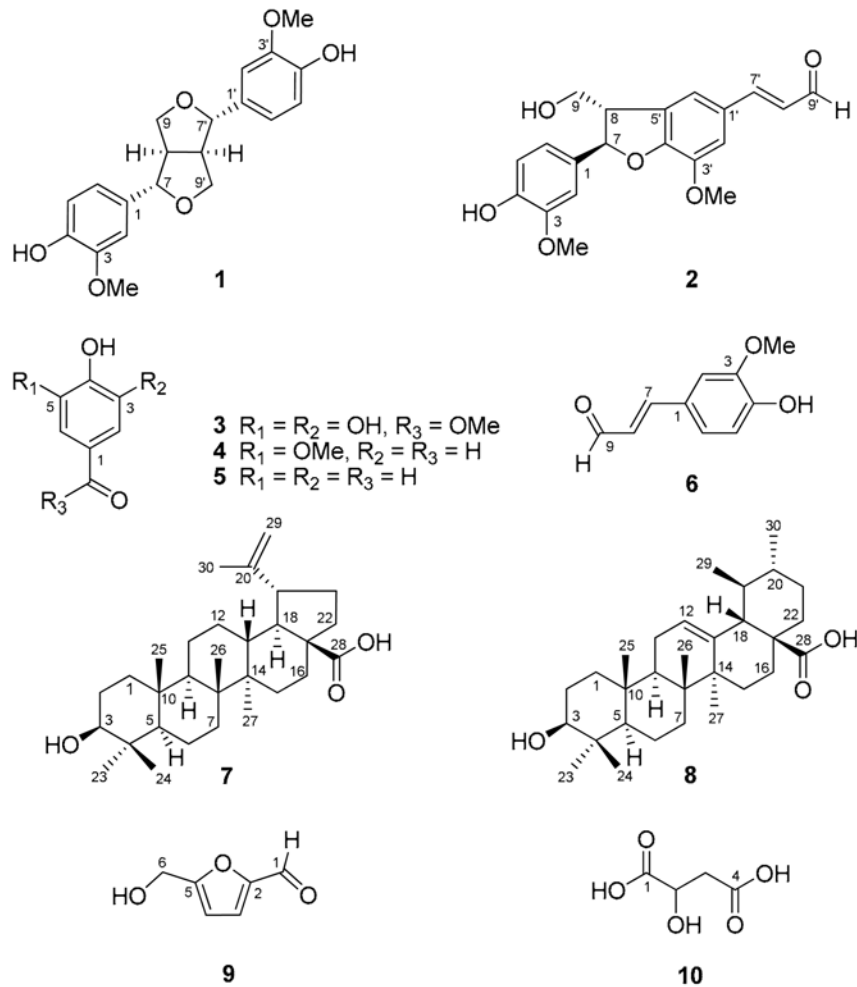


Fig. 1. The structure of compounds 1-10 isolated from the seeds of *Cornus officinalis*.

0.84 (3H, s, 24-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ: 179.2 (C=O), 151.7 (C-20), 110.3 (C-29), 78.5 (C-3), 57.0 (C-17), 56.3 (C-5), 51.4 (C-9), 50.2 (C-19), 48.2 (C-18), 43.2 (C-14), 41.5 (C-8), 39.9 (C-4), 39.7 (C-1), 39.0 (C-13), 38.0 (C-22), 37.9 (C-10), 35.2 (C-7), 33.3 (C-16), 31.6 (C-21), 30.7 (C-15), 29.1 (C-23), 28.7 (C-2), 26.5 (C-12), 21.6 (C-11), 19.9 (C-30), 19.2 (C-6), 16.8 (C-24, 26), 16.7 (C-25), 15.3 (C-27).

화합물 8 (Ursolic acid). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ 5.52 (1H, s, H-12), 3.48 (1H, dd, *J*=8.7, 7.2 Hz, H-3), 2.66 (1H, d, *J*=11.4 Hz, H-18), 1.27 (3H, s, H-23), 1.26 (3H, s, H-27), 1.08 (3H, s, H-25), 1.05 (3H, s, H-24), 1.03 (3H, d, *J*=7.8 Hz, H-29), 0.99 (3H, d, *J*=8.1 Hz, H-30), 0.92 (3H, s, H-25); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ: 180.3 (C-28), 139.7 (C-13), 126.1 (C-12), 78.5 (C-3), 56.2 (C-18), 54.0 (C-5), 48.5 (C-9, 17), 42.9 (C-14), 40.4 (C-4), 39.9 (C-8), 39.8 (C-19), 39.8 (C-1), 39.5 (C-20), 37.8 (C-22), 37.7 (C-10), 34.0 (C-7), 31.5 (C-15), 29.2 (C-27), 29.1 (C-21), 28.5 (C-11), 25.3 (C-2), 24.3 (C-23), 24.0 (C-16), 21.4 (C-30), 19.2 (C-6), 17.9 (C-29), 17.9 (C-25), 17.0 (C-24),

16.1 (C-26).

화합물 9 (5-Hydroxymethyl furfural). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ 9.59 (1H, s, -CHO), 7.36 (1H, d, *J*=3.6 Hz, H-4), 6.57 (1H, d, *J*=3.6 Hz, H-3), 4.64 (2H, s, H-6), 3.23 (1H, br s, OH); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) δ 178.2 (C-1), 163.0 (C-2), 153.6 (C-5), 123.8 (C-3), 110.3 (C-4), 57.7 (C-6).

화합물 10 (Malic acid). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.98 (1H, dd, *J*=8.7, 4.8 Hz, H-2), 2.53 (1H, dd, *J*=15.6, 4.5 Hz, H-3b), 2.35 (1H, dd, *J*=15.6, 4.8 Hz, H-3a); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 176.2 (C-1), 172.1 (C-4), 66.2 (C-2), 41.2 (C-3).

*In vitro* 최종당화산물 생성저해 실험. Vinson과 Howard의 방법을 변형하여 실시하였다.<sup>25)</sup> 즉 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 용해된 10 mg/ml의 우혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 ml와 한약재 추출물을 혼합하여 총 용량을 1 ml로 하였다. 이를 37°C에서 14일간 각각 당화 반응을 시켰다. 이 때 0.02% sodium azide를 넣어 배양 기간 동안 박테리아 생성을 예방하였다. Standard AGEs inhibitor로 알려진 aminoguanidine을 양성대조군으로 사

용하여 효능 정도를 비교하였다. 배양 후에는 spectorfluorometric detector(Bio-TEK, Synergy HT, USA)를 이용하여 형광도를 측정하였다(Ex: 350, Em: 450 nm).

## 결과 및 고찰

화합물 3, 8-10은 본 식물에서 이미 분리 보고된 화합물이며 식물에서 흔히 알려진 성분들이다. 이들 성분의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼 자료를 문헌과 비교하여 화합물 3은 gallicin,<sup>11)</sup> 화합물 8은 ursolic acid,<sup>24)</sup> 화합물 9는 5-hydroxymethyl furfural,<sup>13)</sup> 화합물 10은 malic acid<sup>12)</sup>로 각각 동정하였다.

화합물 1은 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 1,2,4-trisubstituted benzene moiety의 전형적인 한 세트의 ABX-type signal( $\delta$  6.91-6.84)과  $\delta$  3.91에서 1개의 aromatic methoxyl group에 의한 signal이 관찰되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 총 10개의 signal들이 관찰되었다. 또한  $\delta$  86.1, 71.9, 54.4에서 3개의 signal들이 추가로 관찰되었는데, 이로부터 furfuran ring의 존재를 추정할 수 있었다. 이상의 자료로부터 화합물 1은 3-methoxy-4-hydroxyphenyl group을 가진 대칭구조의 furfuran type lignan인 pinoresinol로 예상하였으며, 문헌치  $\{[\alpha]_D^{20} = +51.5(c=0.336, \text{CHCl}_3)\}$ <sup>20)</sup>와 비교하였을 때 이 화합물은 (+)-pinoresinol임을 확인할 수 있었다.

화합물 2는 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta$  9.64(d,  $J=7.5$  Hz)에서 aldehyde proton signal과  $\delta$  6.61(dd,  $J=15.9, 8.4$  Hz)에서 aldehyde proton과 coupling하고 있는 olefinic proton signal 및  $\delta$  7.42(1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-7)에서 vicinal coupling하고 있는 proton signal이 관찰되었다. 또한  $\delta$  7.14, 7.05, 6.87~6.91에서 5개의 aromatic signal을 관찰하였고, aliphatic 영역에서는  $\delta$  5.64(d,  $J=7.2$  Hz)에서 oxymethine proton signal, 그리고  $\delta$  3.94와 3.87에서 2개의 methoxyl signal을 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는  $\delta$  56.4와 56.2에서 2개의 methoxyl기,  $\delta$  64.2에서 1개의 methylene과  $\delta$  193.8에서 1개의 aldehyde carbon, 그리고 9개의 methine을 확인하였다. 이상의 자료로부터 neolignan계열인 balanophonin으로 예상되고, 문헌치  $\{[\alpha]_D^{20} = -120(c=0.2, \text{CHCl}_3)\}$ <sup>27)</sup>와 비교하였을 때 이 화합물은 (-)-balanophonin임을 확인할 수 있었다.

화합물 4는 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta$  3.97에서 3개의 수소에 해당하는 methoxyl기의 단일 피크가 강하게 나타났으며,  $\delta$  9.83에서 aldehyde의 단일 피크를 확인하였으며,  $\delta$  7.05(d,  $J=8.7$  Hz, H-5), 7.43(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2), 7.42(1H, dd,  $J=1.8, 8.4$  Hz, H-6) 피크로부터 ABX system으로 3-치환된 벤젠고리의 존재를 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 aldehyde의 carboxyl기에서 기인한  $\delta$  191.2의 피크를 확인할 수 있었다. 따라서 화합물 4는 vanillin으로 동정하였다.<sup>28)</sup>

화합물 5의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는  $\delta$  9.85에서 aldehyde의 단일 피크와  $\delta$  7.84와 7.00에서 각각 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>형태의 ortho coupling (2H, d,  $J=8.7, 8.4$  Hz)이 관찰되었다. 전형적인 para-disubstituted benzene ring의 coupling pattern을 보여주는 이 화합물은 4-hydroxybenzaldehyde임을 확인하였다.<sup>28)</sup>

화합물 6은 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta$  9.57(d,  $J=7.8$  Hz, H-

9)에서 aldehyde proton signal과  $\delta$  6.64(1H, dd,  $J=15.9, 7.8$  Hz, H-8)에서 aldehyde proton과 coupling 하고 있는 olefinic proton signal 및  $\delta$  7.58(1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-7)에서 vicinal coupling하고 있는 proton signal을 보여주었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는  $\delta$  196.3에서 aldehyde기를 그리고  $\delta$  56.0에서 methoxyl기를 확인하였다. 따라서 이 화합물은 coniferaldehyde로 동정하였다.<sup>29)</sup>

화합물 7은 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 6개의 methyl group외에 exomethylene group으로 보여지는 2개의 proton signal들이  $\delta$  4.96(d,  $J=2.1$  Hz)와 4.78(d,  $J=0.9$  Hz)에서 나타나는 것으로 보아 lupane계 triterpenoid 화합물로 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는  $\delta$  151.7, 110.3 및 19.9에서 2-propenyl기의 특징적인 signal들이 나타났고,  $\delta$  78.5에서 oxymethine기,  $\delta$  179.2에서 carboxyl기의 특징적인 signal들을 확인할 수 있었다. 이상의 자료를 종합하여 문헌과 비교한 결과 betulinic acid임을 확인하였다.<sup>30)</sup> 화합물 1, 2, 4-7은 산수유에서는 처음으로 분리하였다.

본 연구에서 분리한 10종의 화합물에 대한 최종당화산물 생성저해 효능을 검색한 결과, (-)-balanophonin(IC<sub>50</sub>값 27.81  $\mu$ M)과 gallicin(IC<sub>50</sub>값 18.04  $\mu$ M)이 비교양성대조군인 aminoguanidine(IC<sub>50</sub>값 974.59  $\mu$ M)보다 훨씬 우수한 활성을 보였다. (-)-Balanophonin과 gallicin에 대한 AGEs 생성억제효능은 본 연구에서 처음으로 보고한다. 그러나 이 두 가지 화합물이 산수유 씨 EtOAc-기용성 분획물의 활성(IC<sub>50</sub>=1.52  $\mu$ g/ml)을 대표한다고 보기는 어렵기에 향후 활성성분에 대한 구체적인 연구가 요구된다. 본 연구결과는 보다 안전하고 우수한 최종당화산물의 생성저해 효능을 가지는 새로운 선도 화합물의 발굴을 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 산수유 씨의 식물화학 성분에 대한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 초 록

과육을 제거한 산수유 씨의 MeOH 추출물의 EtOAc 분획물로부터 이용하여 10종의 화합물을 분리하였다. 이들 중에서 (+)-pinoresinol, (-)-balanophonin, vanillin, 4-hydroxybenzaldehyde, coniferaldehyde, betulinic acid는 이 식물에서 처음으로 분리된 물질들이다. 본 연구에서 분리된 10종의 화합물에 대한 *in vitro* 최종당화산물(AGEs) 생성억제효능 실험결과, (-)-balanophonin(화합물 2)과 gallicin(화합물 3)이 각각 IC<sub>50</sub> 값 27.81과 18.04  $\mu$ M로 비교양성대조군인 aminoguanidine(974.59  $\mu$ M)보다 훨씬 우수한 효능을 나타내었다.

**Key words:** advanced glycation end products (AGEs), (-)-balanophonin, Comaceae, *Cornus officinalis*, diabetic complications, gallicin

## 사 사

본 연구는 한국한의학연구원 일반사업비(L08010)의 지원으로 수행되었으며, 실험재료의 감정을 도와주신 대전대학교 생명과

학부의 김주환교수께 감사드립니다. 또한 NMR 측정에 도움을 주신 기초과학지원연구원(KBSI)에 감사 드립니다.

### 참고문헌

- Sakurai, T. and Tsuchiya, S. (1988) Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett.* **236**, 406-410.
- Shinohara, R., Mono, T., Nagasaka, A., Sawai, Y., Uchimura, K., Hayashi, R., Hayakawa, N., Nagata, M., Makino, M., Kakizawa, H., Itoh, Y., Nakai, A. and Itoh, M. (1998) Effects of thyroid hormone on the sorbitol pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 577-586.
- Larkins, R. G. and Dunlop, M. E. (1992) The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia* **35**, 499-504.
- Forbes, J. M., Cooper, M. E., Oldfield, M. D. and Thomas, M. C. (2003) Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, S254-S258.
- Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R. and Nawroth, P. (1998) AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetic mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* **37**, 586-600.
- Brownlee, M. (1996) Advanced glycation endproducts in diabetic complications. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **3**, 291-297.
- Rahbar, S. and Figarola, J. L. (2003) Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **419**, 63-79.
- Yokozawa, T., Nakagawa, T. and Terasawa, K. (2001) Effects of Oriental medicines on the production of advanced glycation endproducts. *J. Trad. Med.* **18**, 107-112.
- Chang, I.-M. (2003) Treatise on Asian Herbal Medicines. Seoul National University Hak Sool Pyun Soo Gwan, Seoul, Korea.
- Bae, K. H. (2000) Medicinal Plants of Korea. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, Korea.
- Tian, G., Zhang, T., Yang, F. and Ito, Y. (2000) Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* **886**, 309-312.
- Mitsuo, M., Jun, A., Jun, F. and Yukio, I. (2003) Insecticidal compounds against drosophila melanogaster from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Nat. Prod. Res.* **17**, 337-339.
- Kim, D. K. and Kwak, J. H. (1998) A furan derivative from *Cornus officinalis*. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 787-789.
- Okuda, T., Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R. and Matsuda, M. (1984) Cornusiiin A, a dimeric ellagitannin forming four tautomers, and accompanying new tannins in *Cornus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 4662-4665.
- Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R., Yasuhara, T. and Okuda, T. (1989) Tannins of cornaceous plants. I. Cornusiiins A, B and C, dimeric monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2083-2090.
- Hatano, T., Yasuhara, T., Abe, R. and Okuda, T. (1990) A galloylated monoterpene glucoside and a dimeric hydrolyzable tannin from *Cornus officinalis*. *Phytochemistry* **29**, 2975-2978.
- Endo, T. and Taguchi, H. (1973) Study on the constituents of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Yakugaku Zasshi* **93**, 30-32.
- Soren R. J., Anders K. and Bent J. N. (1973) Loniceroside (secologanin) in *Cornus officinalis* and *C. mas*. *Phytochemistry* **12**, 2064-2065.
- Kim, D. K., Kwak, J. H., Ryu, J. H., Kwon, H. C., Song, K. W., Kang, S. S., Lee, S. H., Lee, E. A., Kwon, N. S., Lee, K. R. and Zee, O. P. (1996) A component from *Cornus officinalis* enhances hydrogen peroxide generation from macrophages. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 101-104.
- Miyazawa, M. and Kameoka, H. (1989) Volatile flavor components of *Corni fructus*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3337-3340.
- Seo, Y. B., Kil, G. J., Lee, Y. K. and Lee, Y. C. (2002) Study on the effects of *Corni fructus* about the anti-allergic action. *Kor. J. Herbology.* **17**, 1-12.
- Seo, K. I., Lee, S. W. and Yang, K. H. (1999) Antimicrobial and Antioxidative Activities of *Corni fructus* extracts. *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.* **6**, 99-103.
- Kim, B. H., Park, K. W., Kim, J. Y., Jeong, I. Y., Yang, G. H., Cho, Y. S., Yee, S. T. and Seo, K. I. (2004) Purification and characterization of anticarcinogenic compound from *Corni fructus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 1001-1007.
- Park, Y. K., Whang, W. K. and Kim, I. H. (1995) The antidiabetic effects of from *Cornus officinalis* seed. *Chung-ang J. Pharm. Sci.* **9**, 5-11.
- Vinson, J. A. and Howard, T. B. (1996) Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 659-663.
- Whang, J. I., Moon, H. I. and Zee, O. P. (2000) Phytochemical constituents of *Actinidia arguta*. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**, 357-363.
- Hong, S. S., Han, D. I., Hwang, B. Y., Choi, W. H., Kang, H. S., Lee, M. K., Lee, D. K., Lee, K. S. and Ro, J. S. (2001) Chemical components from the stem bark of *Kalopanax septemlobus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 302-306.
- Kwon, C. H., Hong, N. D. and Kim, N. J. (1988) Studies on the constituents of *Bambusae Caulis* in taeniam. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**, 188-192.
- Sy, L. K. and Brown, G. D. (1999) Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* **50**, 781-785.
- Robinson, F. P. and Martel, H. (1970) Betulinic acid from *Arbutus menziesii*. *Phytochemistry* **9**, 907-909.