

## 산사자의 Monoamine Oxidase 활성 저해 성분

홍성수 · 황지상 · 이선아 · 한향화 · 노재섭 · 이경순\*  
충북대학교 약학대학

### Inhibitors of Monoamine Oxidase Activity from the Fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge

Seong Su Hong, Ji Sang Hwang, Seon A Lee, Xiang Hwa Han, Jai Seup Ro and Kyong Soon Lee\*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract** – From the fruits of *Crataegus pinnatifida* BUNGE, ursolic acid (1), quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (2), (-)-epicatechin (3), quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside (4) and quercetin (5) have been isolated and identified on the basis of their physicochemical properties and spectroscopic evidences in comparison with authentic samples. Among isolated compounds, quercetin showed significant inhibitory effect against MAO.

**Key words** – *Crataegus pinnatifida* BUNGE, ursolic acid, (-)-epicatechin, quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside, quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside, quercetin, MAO

산사나무(*Crataegus pinnatifida* BUNGE)는 우리나라 각처의 개울, 뚝, 마을부근에 나는 낙엽교목으로 장미과(Rosaceae)의 산사나무속(*Crataegus*)에 속한다. 산사자(山楂子)는 산사나무 및 동속 근연식물의 열매로 지름 7~15 mm, 황~적갈색을 띠는 구형의 과실이다.<sup>1-3)</sup> 민간에서는 消化不良, 下痢와 瘀血에 의한 疼痛에 사용하였다.<sup>4)</sup>

*Crataegus*속 식물의 성분에 관한 연구로는 Zhang<sup>5-10)</sup> 등이 *C. pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.의 잎으로부터 8-C- $\beta$ -D-(2"-*O*-acetyl)glucofuranosyl apigenin, 3"-*O*-acetyl vitexin, pinnatifin C, D, I, quercetin, 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl quercetin, 3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl quercetin, 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -L-rhamnosyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl quercetin, 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -L-rhamnosyl quercetin, kaempferol, 7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl kaempferol, pinnatifinoside-A, B, C, D를 보고하였고, Ding<sup>11)</sup> 등이 quercetin, hyperin, vitexin, rhamnosylvitexin, sorbitol, diethylamine-HCl 및 2-(4-hydroxybenzyl)malic acid를 보고하였다. Park<sup>12)</sup> 등이 *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa*의 과실로부터 ursolic acid, corosolic acid, euscaptic acid,  $\beta$ -sitosteryl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside 및 hyperin을 보고하였다. Zhang<sup>13)</sup> 등이 *C. pinnatifida*의 잎

으로부터 pinnatifida A, B, vitexin, 6"-*O*-acetyl-vitexin, 2"-*O*-acetyl-vitexin 및 2"-*O*-rhamnosyl-vitexin를 보고하였고, Wang<sup>14)</sup> 등이 *C. pinnatifida* bge. var. *major* N. E. Br.의 씨로부터 protocatechuic acid, gallic acid, catechol 및 *p*-hydroxybenzoic acid를 보고하였다.

*Crataegus*속 식물의 생리활성에 관한 연구로는 Jeong<sup>15)</sup> 등이 ursolic acid의 chitin synthase II 저해 활성을, Min<sup>16,17)</sup> 등이 *C. pinnatifida*로부터 cytotoxic triterpene과 HIV-I protease 저해효과를 보고하였다.

MAO는 중추신경계와 말초에 다양하게 분포되어 있고, 중추신경계의 신경활동에 중요한 역할을 하며, 신경전달물질들의 신경세포 내 함량은 이 효소의 작용으로 조절된다. 장관, 혈소판, 간장 등에서는 외인성 amine 류를 대사, 분해하여 생체 방어기구로서의 역할을 할 것으로 생각되고 있다.<sup>18)</sup> 중추성 MAO의 활성은 우울증 등의 정신질환과 말초에서는 고혈압 등의 질환과 관련이 되어 있다. MAO 저해제는 뇌 중 dopamine 함량을 상승시키고 L-DOPA로부터 생합성된 dopamine의 약리작용을 증대시킨다고 보고되었으며,<sup>19)</sup> depression, alcoholism, schizophrenia 등의 병인으로 비정상적인 MAO 활성이 작용할 수도 있다고 생각되고 있다.<sup>20,21)</sup> 또한, 임상에 적용한 예로서는 deprenyl 및 L-DOPA 병용에 의하여 Parkinson 질환의 치료에 응용되었으며, tyramine과 MAO 저해제 병용에 의하여 기립성 저혈압 치료에 응용되

\*교신저자(E-mail) : jsroh@chungbuk.ac.kr

고 있다.<sup>22)</sup>

본 연구에서는 천연자원으로부터 MAO 활성 저해작용을 가진 새로운 화합물을 개발하고 이 물질을 항 우울 등의 중추신경계 질환의 치료제로 응용하기 위한 연구의 일환으로 MAO 활성 저해 효과를 나타낸 산사자의 MeOH 엑스로부터 5종의 물질을 분리하였으며, 이 중 quercetin이 유의적인 MAO 활성 저해 효과를 나타내었기에 보고한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 2001년 10월에 충북대학교 학내에서 자생중인 산사자를 채집하여 음건한 후 세절하여 실험재료로 사용하였다. 식물표본은 식물학적 감정을 마친 후 충북대학교 약학대학 표본실(CBNU-00126)에 보관하였다.

**실험 기기 및 시약** - 용점은 Büchi (Model B-540, Switzerland)사의 용점 측정기를 사용하였으며 보정하지 않았다. UV는 JASCO V500 UV/VIS spectrophotometer (Model LE 599, U.K.)를, IR은 Perkin-Elmer spectrophotometer (Model LE599, U.K.)를, EI-MS는 Hewlett-Packard, MS Engine-5989A를, FAB-MS는 JMS HX-110/110A (JEOL, Japan)를 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR은 Bruker (Model AMX-500, Germany)를 사용하여 측정하였다.

Column chromatography용 담체는 silica gel 60 (70-230 mesh, Merck) 및 Sephadex LH-20(20-100 μ, Pharmacia Fine Chemical Industries Co.)을 TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plate(0.2 mm, Merck)를 UV lamp는 Model UVGL-25 (UVP, U.S.A)를 사용하였으며, MAO 저해 활성은 fluorescence spectrophotometer(Perkin-Elmer LS50B, USA)을 사용하여 측정하였다. 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

**추출 및 분리** - 음건하여 세절한 산사자 2.0 kg을 80% MeOH로 실온에서 3회 반복 추출하여 얻은 추출액을 여과, 감압농축하여 MeOH 엑스(350 g)를 얻었다. 이 MeOH 엑스를 상법에 따라 분획하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 엑스(18.5 g), EtOAc 엑스(30.4 g) 및 BuOH 엑스(20.4 g)를 각각 얻었다. 이 중 MAO 활성 저해작용을 나타낸 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획(13.5 g)에 대하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→MeOH 혼액으로 기울기 용리시켜 silica gel column chromatography를 실시하여 6개 (MC1~MC6)의 분획을 얻었다. 다시 MC3을 n-hexane→acetone 혼액으로 기울기 용리시켜 silica gel column chromatography를 반복 실시하여 compound 1(18.5 mg)을 얻었다. 역시 MAO 활성 저해작용을 나타낸 EtOAc 분획(25.4 g)에 대하여 Sephadex LH-20 column chromatography (10% MeOH MeOH)를 시행하여 6개의 분획(EA1~EA6)으로 나누고, EA2 분획에 대

하여 MCI-gel CHP 20P column chromatography (50% MeOH)를 실시하여 compound 2(22.3 mg)와 compound 3(45.1 mg)을 EA4 및 EA5 분획으로부터 compound 4(21.2 mg)와 compound 5(15.2 mg)를 각각 분리하였다.

**Compound 1** - White powder; Liebermann-Bürchard reaction : positive; m.p. 288-289°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3440 (OH), 2920 (CH), 1690 (COOH), 1030 (C-O); EI-MS (*m/z*) : 456 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  : 0.72, 0.75, 0.86, 0.92, 0.95, 1.03, 1.09 (each, 3H, s, Me), 2.93 (1H, d, *J*=4.8 Hz, H-18), 3.72 (1H, d, *J*=10.3 Hz, H-3), 5.23 (1H, m); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  : 38.7 (C-1), 27.7 (C-2), 79.7 (C-3), 38.7 (C-4), 55.8 (C-5), 18.03 (C-6), 33.5 (C-7), 39.6 (C-8), 47.6 (C-9), 37.6 (C-10), 16.8 (C-11), 125.7 (C-12), 138.4 (C-13), 42.7 (C-14), 28.1 (C-15), 24.1 (C-16), 48.3 (C-17), 51.2 (C-18), 39.1 (C-19), 38.7 (C-20), 30.4 (C-21), 35.9 (C-22), 28.1 (C-23), 15.4 (C-24), 15.5 (C-25), 16.8 (C-26), 24.0 (C-27), 181.0 (C-28), 24.1 (C-29), 21.5 (C-30).

**Compound 2** - Yellow powder; m.p. 214~215°C; FeCl<sub>3</sub>, Mg-HCl test : positive; IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3413 (OH), 2938 (CH), 1658 (C=O), 1559, 1504 (C=C), 1061 (glycosidic -OH); FAB-MS(*m/z*) : 611 [M+H]<sup>+</sup>, 465 [M-rha+H]<sup>+</sup>, 303 [M-rha-glc+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$  : 7.58 (2H, dd, *J*=1.9, 8.3 Hz, H-2',6'), 6.88 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.42 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-8), 6.23 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-6), 5.38 (1H, d, *J*=7.2 Hz, anomeric H), 4.37 (1H, s, anomeric H); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz)  $\delta$  : 177.3 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.6 (C-9), 156.4 (C-2), 148.4 (C-4'), 144.7 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.6 (C-6'), 121.2 (C-1'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.9 (C-10), 101.2 (C-1''), 100.7 (C-1'''), 98.7 (C-6), 93.6 (C-8), 76.4 (C-3''), 76.4 (C-5''), 75.9 (C-2''), 74.1 (C-4''), 71.8 (C-4'), 70.5 (C-2'''), 70.4 (C-3'''), 68.2 (C-5'''), 67.0 (C-6''), 17.7 (C-6''').

**Compound 3** - Pale red crystal; m.p. 234~236°C; FeCl<sub>3</sub> test : positive; IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3282 (OH), 1628 (C=C), 1522, 1471 (aromatic C=C), 820 (aromatic ring); EI-MS (*m/z*) : 290 [M]<sup>+</sup>, 272 [M-H<sub>2</sub>O], 152 [B ring], 139 [A ring], 123 [B ring-CHO]; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$  : 4.77 (1H, s, H-2), 4.04 (1H, d, *J*=3.6 Hz, H-3), 2.52 (1H, dd, *J*=3.3, 16.5 Hz, H-4), 2.72 (1H, dd, *J*=4.3, 16.5 Hz, H-4), 5.76 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6), 5.93 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-8), 6.69 (1H, dd, *J*=1.8, 8.2 Hz, H-5'), 6.71 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-6'), 6.93 (1H, brs, H-2'), 8.75, 8.84,

8.93, 9.14 (each, 3'-OH, 4'-OH, 7-OH and 5-OH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 155.8 (C-7), 156.2 (C-5), 156.5 (C-9), 144.5 (C-3'), 144.4 (C-4'), 130.6 (C-1'), 117.9 (C-6'), 114.9 (C-5'), 114.7 (C-2'), 98.5 (C-10), 95.0 (C-6), 94.1 (C-8), 78.0 (C-2), 64.9 (C-3), 28.2 (C-4).

**Compound 4** – Yellow powder; m.p. 225~227°C;  $\text{FeCl}_3$ , Mg-HCl test : positive; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3358 (OH), 1660 (C=O), 1598, 1497 (C=C), 1080, 1011 (glycoside-OH); FAB-MS ( $m/z$ ): 465  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 303  $[\text{M}-\text{glc}+\text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 5.42 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, glc-1), 6.24 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-6), 6.45 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-8), 6.86 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 7.71 (1H, dd,  $J=2.0, 8.0$  Hz, H-6'), 7.57 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2');  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 156.3 (C-2), 133.5 (C-3), 177.5 (C-4), 161.2 (C-5), 98.7 (C-6), 164.1 (C-7), 93.9 (C-8), 156.3 (C-9), 103.9 (C-10), 121.1 (C-1'), 115.2 (C-2'), 144.8 (C-3'), 148.5 (C-4'), 115.9 (C-5'), 121.1 (C-6'), 101.8 (C-1''), 71.2 (C-2''), 75.8 (C-3''), 67.9 (C-4''), 73.2 (C-5''), 60.1 (C-6'').

**Compound 5** – Yellow powder; m.p. 311~313°C;  $\text{FeCl}_3$ , Mg-HCl test : positive; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3350 (OH), 1685 (C=O), 1615, 1505 (C=C); EI-MS ( $m/z$ ): 302  $[\text{M}]^+$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 6.22 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 6.44 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8), 6.92 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 7.58 (1H, dd,  $J=2.0, 8.5$  Hz, H-6'), 7.71 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 12.53 (1H, s, 5-OH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 146.8 (C-2), 135.7 (C-3), 175.8 (C-4), 160.7 (C-5), 98.1 (C-6), 163.9 (C-7), 93.3 (C-8), 156.1 (C-9), 103.0 (C-10), 121.9 (C-1'), 115.0 (C-2'), 145.0 (C-3'), 147.7 (C-4'), 115.6 (C-5'), 119.9 (C-6').

**MAO 효소원의 부분정제** – MAO 시료는 Naoi의 방법에 준하여 부분정제 하였다.<sup>23)</sup> Mouse를 단두하고 뇌를 분리하여 (8.8 g) 세절한 후 ice bath상에서 10 mM  $\text{K} \cdot \text{PO}_4$  buffer를 함유한 0.25 M sucrose 용액(pH 7.4) 3배량을 가하고 homogenizer를 사용하여 1단계 속도로 30초간 4~6회 균질화시켰다. Homogenate를 1,200 g로 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 다시 16,000 g로 20분간 원심분리하여 얻은 침전의 농도가 100~300 mg/ml가 되도록 10 mM  $\text{Na} \cdot \text{PO}_4$  buffer (pH 7.4)를 넣고 현탁시켜 MAO 효소원으로 하였으며  $-70^\circ\text{C}$  보관하였다.

**기질용액의 제조** –  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관된 kynuramine을 수용액에 500  $\mu\text{M}$ 이 되도록 녹인 후 ice bath 상에서 보관하여 사용하였다. 반응 용기상에서의 최종농도는 100  $\mu\text{M}$ 이었다.

**MAO 활성측정** – MAO의 활성은 Kraml의 방법에 준하

여 측정하였다.<sup>24)</sup> 반응용기에 0.2 M  $\text{K} \cdot \text{PO}_4$  buffer(pH 7.4) 720  $\mu\text{l}$ , 효소원 30  $\mu\text{l}$ , 시료 MeOH Ext. 또는 단일 활성성분 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 5분간 방치하였다. Kynuramine (500  $\mu\text{M}$ ) 200  $\mu\text{l}$ 를 가하여 효소반응을 진행시키고 30분 후 10%  $\text{ZnSO}_4$  250  $\mu\text{l}$ 와 1 N NaOH 50  $\mu\text{l}$ 를 가하여 종결하였다. 반응액을 3,000 $\times$ g로 5분간 원심분리하고 상등액 350  $\mu\text{l}$ 에 1 N NaOH 700  $\mu\text{l}$ 를 가한 다음, 상등액 150  $\mu\text{l}$ 를 취하여 반응생물 4-hydroxyquinoline의 농도를 형광광도계 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ : 315 nm/380 nm)로 측정하였고, 이를 표준곡선을 사용, 정량하여 MAO 활성을 측정하였다.

**단백질 함량 측정** – 단백질 함량은 표준품 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry<sup>25)</sup> 등의 방법으로 측정하였다.

**통계처리** – 실험결과는 동일시료에 대해 반복하여 얻은 결과를 통계처리하여 means $\pm$ SEM으로 나타내었다. 시료에 의한 효과는 Student's *t*-test를 사용하여 유의차 검정을 하였다.

## 결과 및 고찰

**Compound 1**은 백색분말로서 Liebermann-Bürchard 반응에 양성을 나타내었고, IR spectrum의 3440, 2920 및 1690  $\text{cm}^{-1}$ 에서 각각 OH기와 aliphatic proton 및 COOH로 추정되는 흡수 band를 나타내었다. Mass spectrum에서는 molecular ion peak가  $m/z$  456에서 관찰되었고, retro-Diels Alder fragmentation에 의한 base peak인  $m/z$  248 및  $m/z$  207의 fragmentation과 여기에서 COOH가 떨어진  $m/z$  203 fragment ion이 관찰되어  $\Delta^{12}$ 계열의 triterpenic acid로 추정되었다.<sup>26)</sup>  $^1\text{H}$ -NMR spectrum은 0.70~1.10 사이에서 7개의 methyl signal과  $\delta$  5.23에서 olefinic proton이 관찰되었고,  $\delta$  3.72에서  $J=10.3$  Hz의 H-3 methine proton이 관찰되어 OH가  $\beta$ 결합되어 있다고 추정하였으며,  $\delta$  2.93에서는  $J=4.8$  Hz의 H-18이 doublet으로 나타나는 점과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum의 C-12, C-13의 olefinic carbon이  $\delta$  125.7 및  $\delta$  138.4에서 나타나는 것으로서 urs-12-ene type의 triterpenic acid임을 알 수 있었다.<sup>27,28)</sup> 이상의 기기분석 결과 및 문헌<sup>29,30)</sup>과의 비교로 **compound 1**은 분자식  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ 인 ursolic acid로 확인, 동정하였다. **Compound 2**는 미황색 분말상 결정으로  $\text{FeCl}_3$  test에서 오록색, Mg-HCl test에서 홍색을 각각 나타냈다. IR spectrum을 보면 3413  $\text{cm}^{-1}$ 에서 OH, 2938  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C-H, 1658  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C=O, 1599, 1504  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C=C, 1061  $\text{cm}^{-1}$ 에서 glycosidic OH의 결합을 나타내는 흡수대가 나타났고 UV spectrum을 보면 258 및 359 nm에서 흡수극대를 나타내어 flavonol 유도체로 추정할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼 중 aromatic field의  $\delta$  6.23 (1H, d,  $J=1.9$  Hz), 6.42 (1H, d,  $J=1.9$  Hz)에서 flavonoid A환의 H-6 및 H-8의 전형적인

*m*-coupling이 관찰되며,  $\delta$  6.88 (1H, d,  $J=8.3$  Hz), 7.58 (2H, dd,  $J=1.9, 8.3$  Hz)에서 B환의 H-5', H-2', 6'의 signal을 나타내었으며, 당의 anomeric proton이  $\delta$  4.37에서 singlet으로 나타나 당이  $\alpha$ 체임을 또 다른 당의 anomeric proton이  $\delta$  5.38에서  $J=7.2$  Hz의 doublet으로 나타나 당이  $\beta$ 체임을 각각 추정할 수 있었다. FAB-MS spectrum에서는  $m/z$  611에서  $[M+H]^+$  ion peak를  $m/z$  465 및 303에서 각각 hexose 및 methylpentose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있어 flavonol 모핵에 1개의 methylpentose와 1개의 hexose가 결합된 화합물로 추정할 수 있었다. 또 당의 결합위치를 알기 위하여  $^{13}C$ -NMR 스펙트럼에서 quercetin과 비교했을 때 C-2가  $\delta$  9.6, C-4가  $\delta$  1.5 저자장으로 shift되어 관찰되고, C-3가  $\delta$  2.4으로 고자장 shift되어 나타나므로 C-3에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다. 또한  $\delta$  177.3에서 C-4의 carbonyl기를 추정할 수 있었고,  $\delta$  144.7에서 C-3'의 carbon signal,  $\delta$  148.4에서 C-4'의 carbon signal이 각각 확인되어 C-3' 및 C-4' 위치에 proton이 hydroxyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었다.  $\delta$  101.2에서 glucose의 anomeric carbon signal을  $\delta$  100.7에서 rhamnose의 anomeric carbon signal을 확인할 수 있었으며, glucose의 C-6"가  $\delta$  67.0으로  $\delta$  7.0 저자장 shift되어 있어 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었다. 이상의 기기 분석 결과 및 문헌<sup>31,32</sup>과의 비교로 compound 2는  $C_{27}H_{30}O_{16}$  (M.W.=610)의 분자식을 갖는 quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside 즉, rutin으로 확인, 동정하였다.

Compound 3은 미적색 결정으로  $FeCl_3$  반응에 양성이며, IR spectrum에서 3282 (OH), 1628 (C=C), 1522, 1471 (aromatic C=C), 820 (aromatic ring) $cm^{-1}$  등에서 강한 흡수대가 나타나 flavanol 유도체로 추정할 수 있었고, EI-MS spectrum에서는  $m/z$  290에서  $[M]^+$  molecular ion peak를 관찰할 수 있어서 flavan-3-ol로 추정할 수 있었다.  $^1H$ -NMR spectrum에서는 H-5'의 signal이  $\delta$  6.69에서  $J=1.8, 8.3$  Hz인 double doublet으로 추정되어 H-6'와 *o*-coupling하고 있고, H-6'의 signal은  $\delta$  6.71에서  $J=8.2$  Hz인 doublet으로 동정되었다.  $\delta$  5.76,  $\delta$  5.93에서 coupling constant  $J=2.1$  Hz로서 H-6과 H-8이 서로 *m*-coupling함을 추정할 수 있었고,  $\delta$  2.52과  $\delta$  2.72에서 H-4에 기인하는 signal double doublet으로 나타났으며, H-2가 B ring에 의해 singlet으로  $\delta$  4.77에서 나타났고,  $\delta$  4.04에서 H-3의  $J=3.6$  Hz인 doublet signal을 나타내었다. H-2와 H-3의 coupling constant (broad singlet) 및 C-2 (78.0), C-3 (64.9)의 carbon chemical shift로 보아 2,3위치는 cis type인 (-)-epicatechin과 동일한 pattern을 보여주고 있다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서는 carbon signal이 15개이고, 특

히 C-3이  $\delta$  64.9에서, C-3'와 C-4'가 각각  $\delta$  144.5,  $\delta$  144.4에서 동정되어 C-3'와 C-4'가 OH기로 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 기기 분석 결과 및 문헌<sup>33</sup>과의 비교로 compound 3은 분자식  $C_{15}H_{14}O_6$ 인 (-)-epicatechin으로 확인, 동정하였다.

Compound 4는 황색분말로  $FeCl_3$  반응에서 오록색, Mg-HCl Test에서 홍색을 나타내었다. IR spectrum의 경우 3358 (OH), 1660 (C=O), 1598, 1497 (C=C), 1080, 1011 (glycosidic-OH)  $cm^{-1}$  등에서 강한 흡수대를 나타내므로 flavonoid glycoside로 추정하였고, UV spectrum에서 258, 360 nm에서 흡수극대가 나타나므로 flavonol 유도체로 추정할 수 있었다. FAB-MS(positive) spectrum에서는  $m/z$  465에서  $[M+H]^+$ 의 molecular ion peak,  $m/z$  303에서 hexose가 탈락된 fragment ion peak를 각각 관찰할 수 있어 quercetin 모핵에 1분자의 hexose가 결합된 화합물로 추정할 수 있었다.  $^1H$ -NMR spectrum에서는  $\delta$  6.24 및  $\delta$  6.45에서  $J=1.5$  Hz인 doublet을 H-6, 8로, 6.86에서  $J=8.0$  Hz인 doublet을 H-5'로 동정하여 H-6'와 *o*-coupling함을 알 수 있었다.  $\delta$  7.71에서 H-6'의 proton signal이  $J=2.0, 8.0$  Hz의 double doublet으로 관찰되었고,  $\delta$  7.57에서 H-2'의 proton signal이  $J=2.0$  Hz의 doublet으로 관찰되었으며,  $\delta$  5.42에서 glucose anomeric proton이  $J=7.5$  Hz인 doublet signal로 나타나므로 당이  $\beta$ 체임을 알 수 있었다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서는 quercetin과 비교할 때 C-2가  $\delta$  9.3, C-4가  $\delta$  1.7 저자장으로 shift되어 관찰되고, C-3이  $\delta$  2.2 고자장으로 shift되어 관찰되므로 C-3에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다.  $\delta$  177.5에서 C-4의 carbonyl기를 관찰할 수 있었고,  $\delta$  144.8,  $\delta$  148.5에서 C-3', 4' carbon signal이 관찰되어 C-3', 4' 위치의 proton이 hydroxyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었다.  $\delta$  101.8에서 당의 anomeric carbon signal을 확인할 수 있었으며, 당으로부터 기인하는  $\delta$  71.2,  $\delta$  75.8,  $\delta$  67.9,  $\delta$  73.2,  $\delta$  60.1의 signal이 관찰할 수 있었으며 산가수분해에 의하여 당을 표준품과 같이 TLC를 한 결과 결합한 당이 D-galactose임을 알 수 있었다. 이상의 기기 분석 결과 및 문헌<sup>31,32</sup>과의 비교로 compound 4는 분자식  $C_{21}H_{20}O_{12}$ 인 quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside 즉, hyperoside으로 확인, 동정하였다.

Compound 5는 미황색 분말로  $FeCl_3$  반응에서 오록색, Mg-HCl test에서 홍색을 나타내는 등 flavonoid 확인 반응에 양성을 나타내었다. IR spectrum에서는 3350  $cm^{-1}$ 에 hydroxy기, 1685  $cm^{-1}$ 에 carbonyl기에 의한 흡수가 관찰되었고, EI-MS spectrum에서는  $m/z$  302에서  $[M]^+$  molecular ion peak를 관찰할 수 있었다.  $^1H$ -NMR spectrum에서는 aromatic field에서  $\delta$  6.22과  $\delta$  6.44에  $J=1.8$  Hz로 각각 *m*-coupling하

**Table I.** Effects of the various compounds from *Crataegi fructus* on monoamine oxidase (MAO) activity in mouse brain

Compounds	Concentration(μM)	MAO activity (% of control) (nmol/min/mg protein)	IC <sub>50</sub> (μM)
Control		0.882±0.033 (100)	
1	100	0.724±0.023 (82.0)	> 1000
2	100	0.608±0.007 (68.9)	177.8
3	100	0.660±0.015 (74.7)	269.5
4	100	0.603±0.008 (68.3)	233.9
5	100	0.331±0.012 (34.9)***	62.0

The control of MAO activity was taken as 0.882 nmol/min/mg protein. The percent of control activity was shown in parenthesis. The data were expressed as mean±SEM for 4 experiments. Significantly different from the control value: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (Student's *t*-test)

고 있는 flavonoid A환의 H-6 및 H-8의 proton에 의한 doublet signal을 나타내고, δ 6.92에 *J*=8.5 Hz로 *o*-coupling 하고 있는 doublet, δ 7.58에 *J*=2.0, 8.5 Hz로 *o*- 및 *m*-coupling하고 있는 double, doublet, δ 7.71에 *J*=2.0 Hz로 *m*-coupling하고 있는 doublet signal 등 3치환 benzene 환에 의한 proton signal이 관찰되어 B 환의 H-3' 및 H-4'가 치환된 것을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 δ 90–165 사이에서 14개의 sp<sup>2</sup> carbon signal이 관찰되었다. 이상의 기기분석 결과 및 문헌<sup>34,35</sup>과의 비교로 compound 5는 분자식 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>인 quercetin으로 확인, 동정하였다.

**MAO 활성의 저해작용** – 산사자의 분획 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc 및 BuOH에 대하여 200 μg/ml 용량에서 각각 대조군의 51%, 40%, 98%로 나타났다. 이들 분획 중 활성이 인정된 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획의 MC3 및 EtOAc 분획의 EA2, EA4, EA5에 대하여 5개의 단일성분을 분리, 정제하여 MAO 활성에 미

치는 영향을 검색한 결과 이 중 compound 5는 유의적인 MAO 활성 저해작용을 나타내었다(Table I).

**결론**

천연물로부터 MAO 활성 저해 작용물질을 분리할 목적으로, 유의한 활성을 나타낸 산사나무 과실의 메탄올 엑스를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc 및 수포화 BuOH로 용매분획하고, 이들 분획 중 MAO 활성 저해작용을 나타낸 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>과 EtOAc의 분획에 대하여 silica gel column chromatography와 Sephadex LH-20 및 MCI-gel CHP 20P column chromatography를 반복 실시하여 5종의 화합물을 순수단리 하였다. 이들 화합물에 대한 각종 물리화학적 성상, 표품과의 비교시험, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS, IR 등의 spectral data를 검토한 결과 다음과 같이 구조를 동정하였다.

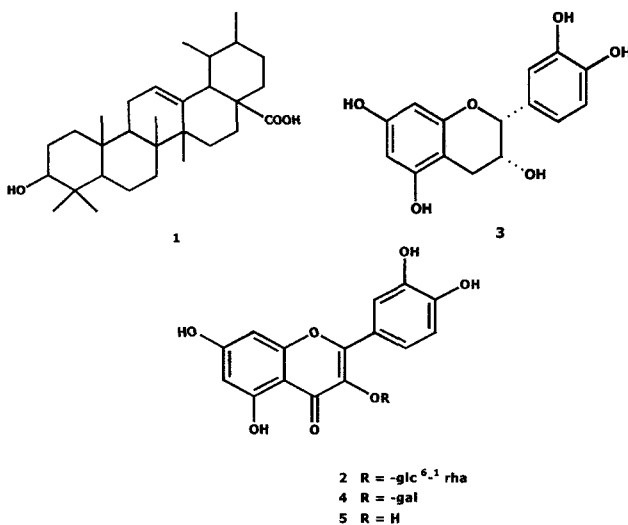
Compound 1은 ursolic acid, compound 2는 quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, compound 3은 (-)-epicatechin, compound 4는 quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside 그리고 compound 5는 quercetin으로 확인 동정하였으며, 이들 성분에 대한 MAO 활성 저해 작용을 검색한 결과 quercetin이 유의적인 MAO 활성억제 효과를 나타내었다.

**사사**

본 연구는 2001년도 충북대학교 발전기금재단의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

**인용문헌**

1. 李永魯(1997) 原色韓國植物圖鑑, (株)敎學社, 서울, 349.
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순(1997) 완역 中藥大辭典



**Fig. 1.** Structures of Compounds 1-5 from the Fructus of *C. pinnatifida*.

- 도서출판 정담, 서울, 2659.
3. 李昌福(1980) 大韓植物圖鑑, 東亞出版社, 서울, 572.
  4. 金泰姬, 李京淳, 陸昌洙, 黃完均, 文永熙, 朴鐘喜(1998) 亞細亞 本草學, 癸丑文化社, 서울, 602.
  5. Zhang, P. C. and Xu, S. X. (2002) Two new C-glucoside flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. *Chinese Chemical Letters*. **13**(4): 337-340.
  6. Zhang, P. C., Zhou, Y. J. and Xu, S. X. (2001) Two novel flavonoid glycosides from *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. BR. *J. of Asian Natural Products Res.* **3**(1): 77-82.
  7. Zhang, P. C. and Xu, S. X. (2001) Chemical constituents of leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. *Yaoxue Xuebao*. **36**(10): 754-757.
  8. Zhang, P. C. and Xu, S. X. (2001) Flavonoid ketohexose-furanosides from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. *Phytochemistry* **57**(8): 1249-1253.
  9. Zhang, P. C. and Xu, S. X. (2000) A new flavonoid ketohexofuranoside from leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. *Chinese Chemical Letters* **11**(10): 895-896.
  10. Zhang, P. C. and Xu, S. X. (1999) Two new flavonoids from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. *Shenyang Huagong Xueyuan Xuebao* **13**(3): 236-237.
  11. Ding, X., Jiang, Y., Zhong, Y. and Zuo, C. (1990) Chemical constituents of the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **15**(5): 295-7.
  12. Park, S. W., Yook, C. S. and Lee, H. K. (1994) Chemical components from the fruits of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**(4): 328-335.
  13. Zhang, P. C. and Xu, S. X. (1999) Isolation and structural identification of new flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi* **9**(3): 214-215.
  14. Wang, X., Che, Q., Li, Y. and He, Y. (1999) Study on chemical constituents in seeds of *Crataegus pinnatifida* bge. var. *major* N. E. Br. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **24**(12): 739-740.
  15. Jeong, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Bae, K. H., Bok, S. H. and Kim S. U. (1999) Chitin synthase inhibitory activity of ursolic acid, isolation from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* **65**(3): 261-263.
  16. Min, B. S., Jung, H. J., Lee, J. S., Kim, Y. H., Bok, S. H. and Bae, K. H. (1999) Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinnatifida* HIV- protease. *Planta Med.* **65**(4): 374-375.
  17. Min, B. S., Kim, Y. H., Lee, S. M., Jung, H. J., Lee, J. S., Na, M. K., Lee, C. O., Lee, J. P. and Bae, K. H. (2000) Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. *Arch. Pharm. Res.* **23**(2): 155-158.
  18. Nissinen, E. (1984) Determination of monoamine oxidase B activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **309**: 156-159.
  19. Riederer, P. and Youdim, M. B. H. (1986) Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with l-deprenyl. *J. Neurochem.* **46**: 1359-1365.
  20. Naoi, M. and Nagatsu, T. (1986) Quinoline and quinaldine as naturally occurring inhibitors specific for type A monoamine oxidase. *Life Sci.* **40**: 1075-1082.
  21. Cross, A. J. and Joseph, M. H. (1981) The concurrent estimation of the major monoamine metabolites in human and non-human primate brain by HPLC with fluorescence and electrochemical detection. *Life Sci.* **28**: 499-505.
  22. Kinemuchi, H. and Kamijo, K. (1980) ミトコンドリア・モノアミン酸化酵素の多様性について. 蛋白質核酸酵素 **25**: 1069-1085.
  23. Naoi, M. and Nagatsu, T. (1988) Inhibition of type A monoamine oxidase by methylquinolines and structurally related compounds. *J. Neurochem.* **50**: 1105-1110.
  24. Kraml, M. (1965) A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **14**: 1683-1685.
  25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  26. Ogunkoya, L. (1987) Application of Mass Spectrometry in Structural Problems in Triterpenes. *Phytochemistry* **20**: 121-126.
  27. 강삼식(1987) Amyrin계 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**(3): 151-167.
  28. Silverstein, R. M., Bassler, G. C. and Morrill, T. C. (1991) Spectrometric Identification of Organic Compounds. Jhon Wiley & Sons Inc. 229.
  29. 박시우, 육창수, 이형규(1994) 좁은잎 산사나무 열매의 화학성분. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**(4): 328-335.
  30. 정세준, 고용석, 안년혈, 김윤철(1998) 조구둥의 Hyaluronidase 저해물질. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**(3): 169-172.
  31. Markham K.R. and Ternai T. (1976) <sup>13</sup>C-NMR of flavonoids: Flavonoids other than flavones and flavonol aglycones., *Tetrahedron*, **32**: 2607-2612
  32. Choi, Y. H., Park, W. Y., Hwang, B. Y., Oh, G. J., Kang, S. J., Lee, K. S. and Ro, J. S. (1998) Phenolic compounds from the stem bark of *Cornus walteri* Wanger., *Kor. J. Pharmacogn.* **29**(3): 217-224
  33. Do, J. C., Son, K. H. and Kang, S. S. (1988) Studies on the Constituents of the Roots of *Rubus parvifolius*(I). *Kor. J. Pharmacogn.* **19**(3): 170-173.
  34. Kang, S. S. (1981) Flavonoids from the leaves of *Ploygonum sachalinense* Fr. Schm. (I). *Kor. J. Pharmacogn.* **12**(4): 208-210.
  35. 강삼식, 신국현, 정순간, 조의환(1988) 음양곽의 Flavonoid 성분에 관한 연구. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**(1): 93-96.

(2002년 10월 21일 접수)