

현초에서 분리된 페놀성 화합물들의 흰쥐 수정체 유래 알도즈 환원효소 및 갈락티톨 생성 억제 효과

최세진* · 김진규** · 장재만** · 임순성***†

*한림대학교 식품영양학과, **한림대학교 천연의약연구소

Inhibitory Effect of the Phenolic Compounds from *Geranium thunbergii* on Rat Lens Aldose Reductase and Galactitol Formation

Se Jin Choi*, Jin Kyu Kim**, Jai Man Jang** and Soon Sung Lim***†

*Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea.

**Institute of Natural Medicine, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea.

ABSTRACT : We evaluated the inhibitory effects of extracts and components of *Geranium thunbergii* on aldose reductase (AR) and galactitol formation in rat lenses with high levels of galactose as a part of our ongoing search of natural sources for therapeutic and preventive agents for diabetic complications. The inhibitory effects of water, methanol and ethanol extracts of *G. thunbergii* on rat lens AR (RLAR) were determined. Comparing inhibitory effects of various solvent extracts, ethanol extract showed RLAR inhibitory activity (IC₅₀ values, 5.24 and 6.39 µg/ml, respectively). The ethanol extract was fractionated to chloroform, ethyl acetate and water. Of these, the ethyl acetate fraction from ethanol extract of *G. thunbergii* exhibited RLAR inhibitory activity (IC₅₀ value, 2.64 µg/ml). In order to identify the bioactive components of ethyl acetate soluble fraction of ethanol extract from *G. thunbergii*, eight compounds, namely gallic acid (1), protocatechuic acid (2), *p*-hydroxybenzoic acid (3), brevifolin carboxylic acid (4), geraniin (5), ellagic acid (6), kaempferol-3-*O*-arabinofuranosyl-7-*O*-rhamnopyranoside (7), kaempferitrin (8) were isolated. The isolates were subjected to *in vitro* bioassays to evaluate their inhibitory activity on RLAR and galactitol formation in rat lenses. The ellagic tannins (5, 6) and flavonoid (7) exhibited strong inhibitory effects on RLAR. Also, these three compounds (5, 6 and 7) suppressed galactitol accumulation in rat lens under high galactose conditions, demonstrating the potential to prevent galactitol accumulation *ex vivo*. These results suggest that the extracts and components of *G. thunbergii* are a promising agent in the prevention or treatment of diabetic complications.

Key Words : *Geranium thunbergii*, Aldose Reductase, Galactitol Accumulation, Ellagic Acid, Geraniin

서 언

당뇨병은 신체 내에서 혈당 조절에 필요한 인슐린의 분비나 작용 부족으로 인해 발생된 고혈당을 특징으로 하는 대사성 질환이다. 당뇨병으로 인한 만성적 고혈당은 신체 각 기관의 손상과 기능 부전을 초래하게 된다. 특히, 망막, 신장, 신경, 심혈관계에 심각한 합병증을 유발하게 된다(Choi *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010).

고혈당으로 인한 합병증의 발생 원인으로서는 당화반응(glycation)으로 알려진 비효소적 당화, 폴리올 경로(polyol pathway)의 활성화, 지질대사 이상, 산화에 의한 손상 증가 등이 거론되고 있다(Kato *et al.*, 2009). 신경, 신장, 망막, 수정

체 같은 인슐린 비의존형 조직의 경우에는 혈액 내에 존재하는 포도당이 세포 내로 이동하는 과정에 인슐린이 관여하지 않으므로 혈액 중에 존재하는 높은 농도의 포도당은 바로 세포 내 포도당의 농도를 증가시킨다. 정상상태에서는 세포 내에 존재하는 포도당은 헥소카이나제(hexokinase)에 의하여 glucose-6-phosphate로 변환되어 해당과정(glycolysis pathway)으로 들어가게 되지만, 비정상적으로 세포 내에 과다하게 존재하는 포도당은 헥소카이나제를 포화시켜 알도즈(aldose)를 기질로 하는 알도즈 환원효소(aldose reductase; AR)에 의해 솔비톨(sorbitol)로 변환되어 폴리올 경로를 활성화 시킨다(Constantino *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2010).

솔비톨은 솔비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase)에 의하

†Corresponding author: (Phone) +82-33-248-3075 (E-mail) limss@hallym.ac.kr
Received 2012 May 8 / 1st Revised 2012 June 4 / 2nd 2012 July 18 / Accepted 2012 July 23

여 프룩토오스(fructose)로 변환되어 세포막의 투과가 가능한 형태로 전환되며 과다한 포도당에 의해 생성된 폴리올은 그 활성이 AR의 5%밖에 되지 않는 솔비톨 탈수소효소를 포화시키기 때문에 프룩토오스로 변환되지 못하고 세포 내에 축적되며 축적된 폴리올은 세포막을 투과하지 못하여 세포 내 삼투압을 증가시킨다. 삼투압의 증가에 따라 팽윤현상이 일어나고 세포막의 안정성을 파괴하여 심한 경우에는 세포가 사멸에까지 이르게 된다. 즉, 폴리올 경로의 활성화에 의해 schwann 세포와 모세혈관에 솔비톨이 과다 축적되면 삼투압 증가로 인한 수초(myelin sheath)의 부종, 괴사 및 붕괴가 발생할 수 있고, 지속적으로 증가한 삼투압으로 인하여 수분이 인입되어 당뇨 합병증으로 진행된다(Carper *et al.*, 1995).

아직도 당뇨병성 합병증을 효과적으로 예방하거나 진행을 억제할 수 있는 약제는 개발되지 않아 천연물로부터 당뇨합병증 예방 및 치료 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Corns, 2003; Tapsell *et al.*, 2006). 최근 보고에 의하면 고과(*Momordica charantia*)의 열매 추출물은 당뇨병성 백내장 진행 억제효과를 나타내었고, 한방에서 진통제로 쓰이는 현호색(*Corydalis turtschaninovi*)의 dehydrocorydalin 성분은 AR 억제제를 통한 항백내장 효과가 보고되는 등 다양한 천연물 소재로부터 당뇨합병증 치료제 개발이 시도되고 있다(Srivastava *et al.*, 1988; Kubo *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2011). 이는 천연물이 당뇨 합병증 예방에 새로운 후보 물질로써의 가능성이 큼을 의미한다.

현초(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.)는 쥐손이풀목(Geraniales) 쥐손이풀속(*Geranium*) 쥐손이풀과(Geraniaceae)에 속하는 다년생초본이다. 현초는 고(苦), 신(辛), 미온(微溫)의 성미를 나타내며, 항돌연변이, 항염증 및 항산화 효과가 있다고 보고되어져 있다(Ushio *et al.*, 1991). 현초의 전초는 tannin과 flavonoid가 주성분이며 tannin은 잎에 약 20%, 전초에 약 5%가 함유되어 있다. 현재까지 현초의 성분연구를 보면 tannin 계열과 flavonoid 계열 화합물의 분리와 항산화 및 항균실험이 있다고 보고되었을 뿐(Liu *et al.*, 2006), 현초에 대한 생리활성이나 당뇨합병증에 대한 연구는 미미한 상황이다.

본 연구진은 천연물로부터 당뇨 및 당뇨합병증 억제 소재 개발을 진행해왔으며, 대표적으로 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)의 뿌리로부터 semilicoisoflavone B를 분리하여 AR을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 그 외에 상황버섯(*Phellinus linteus*)의 davallialactone, hypholomine B, ellagic acid 성분이 AR 억제 효과를 보인다는 것을 입증한 바 있다(Lee *et al.*, 2008, 2010, 2011). 이에 본 연구는 현초의 당뇨합병증 억제 활성물질을 확인하기 위해 AR의 억제 활성 및 당뇨병성 합병증의 주요 발현 인자인 수정체내의 폴리올 생성 억제 활성에 대한 연구를 실시하고 그 활성화합물의 화학적 구조를 규명하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 현초는 강원도 춘천 소재의 대광약업사에서 구입하여 외부형태를 비교 조사한 후 사용하였다. 실험에 사용된 현초는 한림대학교 생명과학관 5층 천연물화학실험실(No. NP101130)에 보관되어 있다.

2. 시약 및 기기

본 연구에서 추출, 분획 및 컬럼크로마토그래피용 용매, 즉 dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc), ethanol (EtOH), methanol (MeOH) 등은 국산제품을 사용하였다. HPLC 분석에 사용된 acetonitrile (MeCN), MeOH은 HPLC급으로 Fisher scientific (Fair Lawn, NJ, USA)으로부터, trifluoroacetic acid (TFA)는 HPLC급으로 Applichem GmbH (Darmstadt, Germany)으로부터 구입하여 사용하였다. 물질 분리를 위한 column chromatography용 RP-18은 Merck (LiChroprep RP-18, 40-63 μm , Merck, Darmstadt, Germany)사에서 구입하여 사용하였다. HPLC는 Thermo Electron Spectra HPLC system (Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA)을 사용하였으며, FT-IR은 JASCO FT/IR-4100 (Anthelie, SECOMAM, France)를 사용하였다. $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectra는 Bruker의 DPX-400과 AVANCE-600을 이용하여 측정하였다. Bovine serum albumin (BSA), β -nicotinamide adenosine nucleotide phosphate (NADPH, reduced form), quercetin dehydrate, dl-glyceraldehyde dimer는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

3. 추출 및 분획

현초의 최적 추출용매를 확보하기 위해 MeOH, 95% EtOH, H_2O 로 각각 추출하였다. 건조된 현초 1.5 kg을 분말(20-30 mesh)로 만든 후 각 용매 15 l를 가하고 H_2O 추출은 100°C 에서 MeOH과 95% EtOH추출은 50°C 에서 3시간 동안 온침한 후 여과하여 여액과 잔사를 얻었고, 이 잔사를 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출·여과하였다. 얻어진 각 추출물들은 감압 농축 혹은 동결건조하여 MeOH, 95% EtOH, H_2O 의 각 용매별 추출물을 얻었다. 각 추출물의 생리활성 실험을 실시한 결과 95% EtOH 추출물에서 우수한 활성 결과가 확인되어, 95% EtOH 추출물을 증류수에 완전히 현탁시킨 후 동량의 CH_2Cl_2 과 EtOAc로 극성에 따라 순차분획을 실시하였고 얻어진 각 분획물들을 감압 농축 혹은 동결건조하여 분석 시료로 사용하였다(Fig 1).

4. EtOAc 분획물로부터 활성 성분의 분리

현초의 95% EtOH 추출물로부터 얻은 EtOAc 분획물 3 g

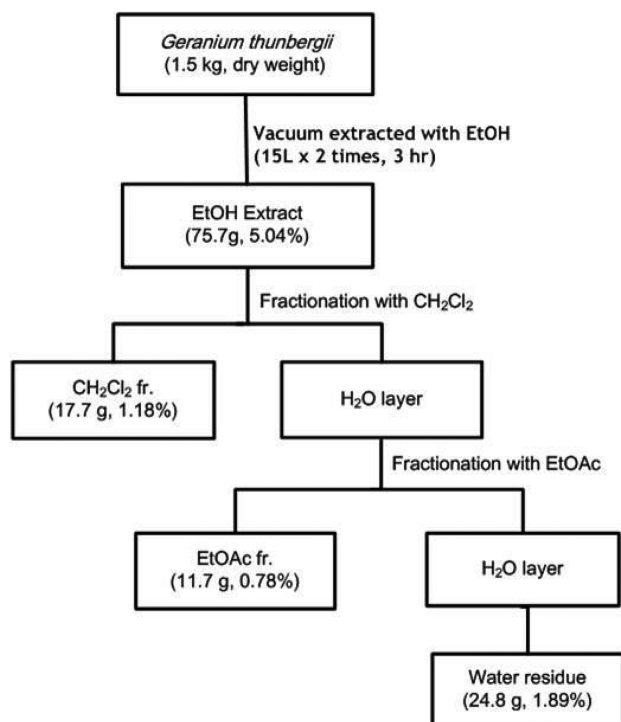


Fig. 1. Work flow of the extraction and fractionation process of *Geranium thunbergii*.

을 RP-18을 충전 시킨 컬럼(36 × 460 mm, glass column)에 로딩한 후, 5% aqueous acetic acid/MeCN을 사용하여 MeCN 비율(0% → 100% MeCN)을 순차적으로 높여가며 MPLC (medium pressure liquid chromatography)를 실시하였다. 용출액을 약 70 ml씩 나누어 받았으며, 분리 여부의 판단은 HPLC chromatogram 양상을 비교하여 총 8개의 화합물을 분리하였다. 이들 화합물은 MeOH로 재결정하여 아래와 같이 구조분석을 위한 이화학적, 광학적 자료를 확보하였다.

Compound 1 - EI-MS (m/z): 170 [M]⁺, 153 [M-OH]⁺, 125 [M-COOH]⁺; IR max cm^{-1} : 3238 (OH), 1693 (COOH), 1540, 1446 (C=C); UV (MeCN, λ max nm): 223, 268; ¹H-NMR (400 MHz, δ , DMSO- d_6): 6.91 (2H, s, H-2, 6); ¹³C-NMR (100 MHz, δ , DMSO- d_6): 167.5 (C-7), 145.5 (C-3, 5), 138.0 (C-4), 128.8 (C-1), 108.8 (C-2, 6).

Compound 2 - EI-MS (m/z): 154 [M]⁺, 109 [M-COOH]⁺; IR v_{max} cm^{-1} : 3240 (OH) and 1681 (COOH); UV (MeCN, λ max nm): 223, 258 (max), 293; ¹H-NMR (600 MHz, δ , DMSO- d_6): 7.34 (1H, d, J =1.45 Hz, H-2), 7.28 (1H, dd, J =8.2, 1.2 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J =8.2 Hz, H-5); ¹³C-NMR (150 MHz, δ , DMSO- d_6): 167.7 (-COOH), 150.4 (C-4), 145.3 (C-3), 122.3 (C-6), 122.0 (C-1), 116.9 (C-2), 115.5 (C-5).

Compound 3 - EI-MS (m/z): 138 [M]⁺; IR max cm^{-1} :

3381 (OH), 1671 (COOH), 1594 and 1509 (C=C); UV (MeCN, λ max nm): 229, 254 (max); ¹H-NMR (600 MHz, δ , DMSO- d_6): 7.79 (1H, d, J =8.5 Hz, H-2,6), 6.81 (1H, d, J =8.5 Hz, H-3,5); ¹³C-NMR (150 MHz, δ , DMSO- d_6): 172.2 (C-7), 167.6 (C-4), 131.9 (C-2,6), 121.8 (C-1), 115.6 (C-3,5).

Compound 4 - EI-MS (m/z): 291 [M-H]⁺; 247 [M-COOH]⁺; IR v_{max} cm^{-1} : 3230 (OH), 1698, 1600 (α , β -unsaturated lactone moieties), 1391, 1903, 1198, 1088, 1032; UV (MeCN, λ max nm): 225, 278 (max), 358; ¹H-NMR (600 MHz, δ , DMSO- d_6): 7.30 (1H, s, H-8), 4.37 (1H, d, J =6.0, H-3'), 3.00 (1H, d, J =18.6, H-2'), 2.42 (1H, d, J =18.6, H-2'); ¹³C-NMR (150 MHz, δ , DMSO- d_6): 193.3 (C-1'), 173.4 (C-4'), 160.2 (C-1), 149.5 (C-6), 145.7 (C-3), 143.9 (C-5), 140.2 (C-4), 139.0 (C-7), 115.1 (C-10), 113.0 (C-9), 108.0 (C-8), 42.5 (C-3'), 37.4 (C-2').

Compound 5 - EI-MS (m/z): 951 [M-H]⁺; IR v_{max} cm^{-1} : 3329 (OH), 1704 (C=O), 1606 (C=C), 1515, 1446, 1314, 1192, 1030, 968; UV (MeCN, λ max nm): 229, 271; ¹H-NMR (600 MHz, δ , DMSO- d_6): **A type** - 7.03 (1H, s, H-3), 7.01 (1H, s, H-Gal. 2,6), 6.76 (1H, s, H-HHDP3), 6.44 (1H, s, H-HHDP3'), 6.36 (1H, s, H-G1), 6.34 (1H, s, H-3'), 5.38 (1H, br s, H-G2), 5.33 (1H, br s, H-G4), 5.21 (1H, br s, H-G3), 4.87 (1H, s, H-1'), 4.63 (1H, m, H-G5), 4.68 (1H, m, H-G6) 4.34 (1H, d, J =2.7 Hz, H-G6), **B type** - 7.10 (1H, s, H-3), 7.00 (1H, s, H-Gal. 2,6), 6.71 (1H, s, H-HHDP3), 6.42 (1H, s, H-HHDP3'), 6.34 (1H, s, H-G1), 6.14 (1H, s, H-3'), 5.38 (1H, br s, H-G2), 5.21 (1H, br s, H-G4), 5.31 (1H, br s, H-G3), 4.59 (1H, s, H-1'), 4.63 (1H, m, H-G5), 4.51 (1H, m, H-G6) 4.36 (1H, d, J =2.7 Hz, H-G6); ¹³C-NMR (150 MHz, δ , DMSO- d_6): **A type** - 191.85 (C-E4'), 168.13 (C-C7), 165.86 (C-B7), 164.89 (C-E7'), 164.67 (C-D7), 164.32 (C-A7), 152.85 (C-E2'), 146.17 (C-A3,5), 145.97 (C-D4), 145.47 (C-C4), 145.37 (C-B6), 144.75 (C-C6), 144.51 (C-B4), 143.39 (C-D6), 140.06 (C-A4), 138.93 (C-D5), 137.61 (C-B5), 135.76 (C-C5), 128.51 (C-E3'), 123.69 (C-C2), 123.01 (C-B2), 119.59 (C-A1), 119.51 (C-D2), 118.19 (C-B1), 115.37 (C-D1), 115.27 (C-C1), 112.10 (C-D3), 109.77 (C-A2,6), 108.64 (C-B3), 107.03 (C-C3), 96.22 (C-E5'), 92.18 (C-E6'), 91.48 (C-Glc-1), 72.99 (C-Glc-5), 70.95 (C-Glc-2), 65.89 (C-Glc-4), 63.83 (C-Glc-6), 62.61 (C-Glc-3), 45.46 (C-E1'), **B-type** d: 194.77 (C-E4'), 168.10 (C-C7), 165.70 (C-B7), 164.89 (C-E7'), 164.64 (C-D7), 164.32 (C-A7), 147.43 (C-E2'), 146.17 (C-A3,5), 147.10 (C-D4), 146.13 (C-C4), 145.47 (C-B6), 145.43 (C-

C6), 144.45 (C-B4), 147.10 (C-D6), 139.96 (C-A4), 136.76 (C-D5), 137.61 (C-B5), 135.76 (C-C5), 125.15 (C-E3'), 123.40 (C-C2), 122.72 (C-B2), 119.59 (C-A1), 116.65 (C-D2), 116.73 (C-B1), 119.59 (C-D1), 115.27 (C-C1), 112.07 (C-D3), 109.65 (C-A2,6), 108.64 (C-B3), 107.61 (C-C3), 91.88 (C-E5'), 91.88 (C-E6'), 91.65 (C-Glc-1), 74.15 (C-Glc-5), 72.19 (C-Glc-2), 67.12 (C-Glc-4), 63.09 (C-Glc-6), 60.99 (C-Glc-3), 51.35 (C-E1').

Compound 6 - EI-MS (m/z): 302 [M]⁺, 109 [M-COOH]⁺; IR max cm⁻¹: 3100 (OH), 1692 (C=O), 1616-1 (C=C); UV (MeCN, λ_{max} nm): 251; ¹H-NMR (300 MHz, δ, DMSO-*d*₆): 7.5 (2H, *s*, H-5, and H-5); ¹³C-NMR (75 MHz, δ, DMSO-*d*₆): 159.7 (C-7), 148.7 (C-4), 140.2 (C-3), 137.0 (C-2), 113.0 (C-1), 111.0 (C-5), 108.3 (C-6).

Compound 7 - EI-MS (m/z) 563 [M-H]⁻; IR ν_{max} cm⁻¹: 3330 (OH), 1651 (aromatic, C=O), 1594 (C=C), 1347 (CH₃), 1120-964 (C-O); UV (MeCN, λ_{max} nm): 260, 350; ¹H-NMR (600 MHz, δ, CD₃OD): 7.94 (2H, *d*, *J*=8.7 Hz, H-2', 6'), δ 6.91 (2H, *d*, *J*=8.7 Hz, H-3', 5'), 6.71 (1H, *d*, *J*=2.0, H-8), 6.42 (1H, *d*, *J*=2.0, H-6), 5.56 (1H, *s*, H-1'''), 5.51 (1H, *s*, H-1''); ¹³C-NMR (150 MHz, δ, CD₃OD): 180.4 (C-4), 163.9 (C-7), 163.2 (C-5), 162.1 (C-4'), 160.2 (C-2), 158.4 (C-9), 135.7 (C-3), 132.5 (C-2', 6'), 122.9 (C-1'), 116.9 (C-3', 5'), 110.1 (C-1'), 107.7 (C-1''), 101.0 (C-1'''), 100.2 (C-6), 96.0 (C-8), 88.4 (C-4''), 83.8 (C-2''), 79.1 (C-3''), 74.0 (C-4''), 72.5 (C-2''), 72.1 (C-3'''), 71.7 (C-5''), 62.9 (C-5''), 21.3 (C-6'''), 18.51 (C-6''').

Compound 8 - EI-MS (m/z): 577 [M-H]⁻; IR ν_{max} cm⁻¹: 3383 (OH), 1658 (C=O), 1603 (C=C), 1347 (CH₃), 1204-916 (C-O); UV (MeCN, λ_{max} nm): 260, 347; ¹H-NMR (600 MHz, δ, CD₃OD): 7.79 (2H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-2', 6'), δ 6.93 (2H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-3', 5'), 6.73 (1H, *s*, H-8), 6.46 (1H, *s*, H-6), 5.56 (*br s*), 5.40 (*br s*); ¹³C-NMR (150 MHz, δ, CD₃OD): 178.2 (C-4), 162.0 (C-7), 161.2 (C-5), 160.5 (C-4'), 157.1 (C-9), 156.4 (C-2), 134.8 (C-3), 131.0 (C-2', 6'), 120.6 (C-1'), 115.8 (C-3', 5'), 106. (C-10), 102.2 (C-1''), 99.8 (C-1'''), 98.7 (C-6), 94.9 (C-8), 71.9 (C-4''), 71.4 (C-4'''), 71.0 (C-3''), 70.5 (C-2''), 70.4 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 70.4 (C-5'), 70.1 (C-5'''), 18.2 (C-6''), 17.8 (C-6''').

5. Rat lens aldose reductase (RLAR) 억제 활성

RLAR 실험은 Hayman의 실험을 변형하여 실시하였다 (Hayman and Kinoshita, 1965; Lim *et al.*, 2006). 효소원의 조제는 흰쥐의 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 10배의

phosphate buffer를 가하고 homogenizer를 이용하여 균질화하였다. 이를 4°C에서 원심 분리한 후 상등액을 취하고 ammonium sulfate 용액으로 40%까지 포화시키고, 다시 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액은 70%가 되도록 ammonium sulfate 용액으로 포화시킨 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 고형물을 얻었다. 얻어진 고형물을 최소량의 phosphate buffer로 현탁시키고 24시간 동안 투석을 실시한 후 효소원으로 사용하였다. 위에서 조제한 효소원과 dl-glyceraldehyde를 기질로 하여 반응시키고 340 nm에서 조효소인 NADPH 흡광감소율을 측정하였다. 양성대조물로 AR 억제제로 알려진 quercetin을 사용하여 효능을 비교하였다.

6. *ex vivo*에서 수정체 내의 갈락티톨 생성 억제 활성

수정체 내의 갈락티톨(galactitol) 생성 억제 활성을 측정하기 위해 10 주령의 수컷 Wistar rat을 구입하여 수정체를 적출하여 사용하였다. 적출한 수정체는 TC-199 medium에 15% fetal bovine serum과 100 units/ml의 penicillin, 0.1 mg/ml의 streptomycin을 첨가한 후, 3 그룹으로 나누어 시료군과 대조군에는 5 mM의 글루코오스와 30 mM의 갈락토오스를, blank군에는 5 mM의 글루코오스와 30 mM의 만니톨(mannitol)을 첨가하여 6일 동안 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 수정체 내에 생성된 갈락티톨 측정은 수정체를 PBS buffer에 넣은 후 homogenizer를 이용하여 균질화시킨 후 11,000 × g에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 얻고, 그 상등액을 benzoylation시킨 후 HPLC를 사용하여 288 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 quercetin을 사용하여 활성을 비교하였다(Son *et al.*, 2005).

결과 및 고찰

1. 분리화합물들의 구조 결정

Compound 1은 EI-MS에서 m/z 170 [M]⁺ molecular ion peak가 확인되었으며, m/z 153 [M-OH]⁺, 125 [M-COOH]⁺의 ion peak가 관찰되었다. 또한 IR spectrum에서 3238 cm⁻¹에서 hydroxy기, 1693 cm⁻¹에서 aromatic ring의 carbonyl기에 기인한 흡수대와 1540 cm⁻¹, 1446 cm⁻¹에서 aromatic C=C의 흡수대를 관측할 수 있었다. ¹H-NMR에서 δ 6.91에서 singlet peak가 나타났으며, 이는 aromatic ring에 존재하는 대칭되는 두 개의 proton에 기인한 것으로 추정된다. ¹³C-NMR spectrum에서 δ 145.5 (C-3, 5), 108.8 (C-2, 6)에서 단일 signal이 나타났다. 또한 167.5 (C-7)의 carbonyl group signal을 비롯하여 총 다섯 개의 signal이 관찰되었다. 또한, gallic acid 표준품과의 HPLC 비교에서 동일한 UV 패턴과 retention time을 확인하였고, 이와 같은 모든 spectral data 및 기준에 보고된 문헌(Saijo *et al.*, 1990)과 비교하여 compound 1은 분자

식 $C_7H_6O_5$ 를 갖는 gallic acid (3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid)로 동정하였다.

Compound 2는 EI-MS spectrum에서 m/z 154 $[M]^+$ molecular ion peak가 나타났으며, COOH기가 제거된 m/z 109의 ion peak가 관찰되었다. IR spectrum에서 3240 cm^{-1} 에서 OH에 기인하는 broad band가 관찰되었으며, 1681 cm^{-1} 에서의 흡수로 COOH 존재가 관찰되는 것으로 보아 compound 2는 benzoic acid 계열 화합물임을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 7.34 (1H, d, $J=1.45\text{ Hz}$, H-2), 7.28 (1H, dd, $J=8.2, 1.2\text{ Hz}$, H-6), 6.78 (1H, d, $J=8.2\text{ Hz}$, H-5)에서 세 개의 catechol 구조를 가지고 있는 proton peak를 관찰할 수 있었으며 이것은 전형적인 방향족환 proton들의 1, 3, 4 치환임을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 δ 167.7 (C-7)에서 carbonyl carbon signal과 150.4 (C-4), 145.3 (C-3), 122.3 (C-6), 122.0 (C-1), 116.9 (C-2), 115.5 (C-5)에서 여섯 개의 aromatic carbon peak가 관찰되었다. 이와 같은 모든 spectral data 및 기존에 보고된 문헌(Park *et al.*, 1993)과 비교하여 compound 2는 분자식 $C_7H_6O_4$ 를 갖는 protocatechuic acid로 동정하였다.

Compound 3은 EI-MS에서 m/z 138 $[M]^+$ 의 molecular ion peak가 확인되었으며, IR spectrum에서 3380 cm^{-1} 에서 hydroxyl기, 1671 cm^{-1} 에서 aromatic ring의 carbonyl기에 기인한 흡수대와 1594 cm^{-1} , 1509 cm^{-1} 에서 aromatic C=C의 흡수대가 관측되어 OH기와 C=O기가 존재하는 aromatic 화합물임을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.79, δ 6.81에서 관측된 doublet peak는 $J=8.5\text{ Hz}$ 로 ortho coupling하여 H-2, 6 및 H-3, 5로 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 carbonyl기의 carbon에 기인한 peak가 δ 167.6에서 관찰되었고, benzene ring에 기인한 peak가 5개 관측되어 benzoic acid 유도체임을 알 수 있었다. 이와 같은 모든 spectral data 및 기존에 보고된 문헌(Kwon *et al.*, 1999)과 비교하여 compound 3은 분자식 $C_7H_6O_3$ 를 갖는 *p*-hydroxybenzoic acid로 동정하였다.

Compound 4는 ESI-MS spectrum에서 m/z 291 $[M]$ 의 molecular ion peak가 확인되었으며, IR spectrum에서 3230 cm^{-1} 의 broad band는 hydrogen bonded OH가 있음을 나타내며, 1698 cm^{-1} 와 1600 cm^{-1} 에서의 흡수로 α , β -unsaturated lactone moieties의 존재를 알 수 있었다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 에서 δ 4.37 (1H, δ , $J=6.0$, H-3') peak는 인접한 곳에 carboxyl기와 double bond가 있음을 나타내고, δ 3.00 (1H, d, $J=18.6$, H-2')와 δ 2.42 (1H, d, $J=18.6$, H-2')의 peak는 carbonyl group에 인접한 proton으로 서로 nonequivalent한 proton의 geminal coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. 한편, $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 13개의 carbon signal이 관찰되었으며, δ 193, 173, 160의 3개 peak는 carbonyl기의 carbon으로 추정

되며, 이중 δ 193의 peak는 ketone group의 carbon, δ 173의 peak는 carboxyl group의 carbon, δ 160의 peak는 ester group의 carbon으로 예상하였다. 또한 aromatic 영역에 phenol group의 6개 peak외에 δ 149.5과 δ 140.2에 이중결합(C=O)의 peak가 나타남으로써 benzene핵에 -C=C- group이 결합되어 있음을 추정하였다. 또한 δ 40.76의 peak는 carboxylic acid와 olefine group에 연결된 carbon으로 추정되며, δ 37.4의 peak는 2' 위치에 furan ring의 geminal proton이 인접해 있음을 추정하였다. 이와 같은 모든 spectral data 및 기존에 보고된 문헌(Kitagawa *et al.*, 1989)과 비교하여 compound 4는 분자식 $C_{13}H_8O_8$ 을 갖는 brevifolin carboxylic acid로 동정하였다.

Compound 5는 ESI-MS spectrum에서 m/z 951의 $[M-H]$ molecular ion peak가 확인되었으며, IR spectrum에서 3329 cm^{-1} (OH), 1704 cm^{-1} (C=O), 1606 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} (aromatic C=C) 및 1030 cm^{-1} (glycosidic C-)에서 강한 흡수대를 관찰할 수 있어 이 화합물은 ellagitannin 계열임을 추정할 수 있었다. 또한 이 화합물은 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 통해 equilibration에 의한 structural transformation을 한다는 것을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 aliphatic field에 있어서 1개의 hexose에서 유래하는 proton signal 외에 δ 4.87에 benzyl methine proton 및 δ 6.79에서 olefinic proton의 signal을 나타내어 분자내에 6원환 및 5원환의 hemiacetal 평형의 DHHDP기가 존재하는 것으로 추정할 수 있었으며, δ 6.36에서 glucose anomeric signal이 나타났다. 이와 같이 compound 5는 glucose에 1개의 galloly기, 1개의 HHDP기, 1개의 DHHDP기가 ester 결합한 화합물로 추정되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 equilibration에서의 현상으로 각각의 carbon spectrum이 2개의 peak로 관찰되었고, 특히 ring D와 E의 carbon resonance의 equilibration으로 chemical shift가 변하는 것을 확인할 수 있었다. δ 45.46의 A-type의 methine carbone peak는 equilibration 상태에서 B-type의 51.35로 나타남이 관찰되었고, A-type에서 3개의 ketone중 하나는 δ 191.85에서, hydrated ketone (hemiacetal)의 두 peak는 각각 δ 96.22와 92.88에서 나타났다. 또한 equilibration 상태에서의 ring E에서의 C-6 carbon signal의 δ 92.18에서 109.65로의 large down field shift는 pyranose에서 furanose로의 transformation과 관련됨을 추정할 수 있었다. 이와 같은 모든 spectral data 및 기존에 보고된 문헌(Yisida *et al.*, 1992)과 비교하여 compound 5는 분자식 $C_{41}H_{28}O_{27}$ 을 갖는 geraniin으로 동정하였다.

Compound 6은 EI-MS spectrum에서 m/z 302 $[M]^+$ 의 molecular ion peak와 m/z 109 $[M-COOH]^+$ 의 ion peak가 관찰되었다. 또한 IR spectrum에서 3100 cm^{-1} 에서의 hydroxyl기와 1692 cm^{-1} 에서의 흡수로 carbonyl가 존재함을 알 수 있었

다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 aromatic field 위치인 δ 7.47에서 H-5, H-5'의 2개의 proton이 singlet으로 나타났다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 hydroxyl group이 결합되어 있는 C-4, 4', C-3, 3'의 carbon이 각각 δ 148.0과 δ 139.48에서 catechol 형태의 구조로 나타났다. 또한, δ 159.05에서 ester 결합을 하고 있는 C-7, 7'의 signal이 나타났다. 이와 같은 모든 spectral data 및 기존에 보고된 문헌(Nawwar *et al.*, 1994)과 비교하여 compound 6은 분자식 $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$ 을 갖는 ellagic acid로 확인 동정하였다.

Compound 7은 ESI-MSⁿ분석에 의해 m/z 563의 [M-H]⁻ molecular ion peak가 확인되었으며, m/z 563을 MS/MS를 실시한 결과 m/z 431, 285를 갖는 fragment ion이 관찰되었다. 이를 바탕으로 기존의 문헌과 비교해 kaempferol에 1개의 rhamnose와 1개의 pentose가 결합되어 있음을 잠정적으로 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 meta-coupling하는 proton signals (δ 6.79, δ 6.42) 그리고 A₂B₂ type의 B-ring의 proton signals [δ 7.94 (2H, δ , J=8.7 Hz, H-2', 6'), δ 6.91 (2H, δ , J=8.7 Hz, H-3', 5')]이 관찰되었다. 그리고 δ 5.56 (1H, s), δ 5.51 (1H, s)에서 당의 anomeric proton이 관찰되어 이 화합물은 kaempferol 배당체로 추정하였다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 107.7 (C-1'), 101.0 (C-1'')에서 2개의 anomeric carbon signal이 나타났으며, 각각의 signal로부터 rhamnose와 arabinose임을 확인할 수 있었다. 그리고 이들의 구조를 명확히 하기 위해 HSQC, HMBC를 측정하였으며, HMBC spectrum에서 δ 5.51 (H-1'')과 135.7 (C-3)의 correlation이 관찰되었고, 101.0 (C-1'')과 163.9 (C-7)의 correlation이 관찰되어 arabinose는 3번 위치에, rhamnose는 7번 위치에 결합되어 있음을 확인하였다. 이와 같은 모든 spectral data 및 기존에 보고된 문헌(Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2008)과 비교하여 compound 7는 분자식 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$ 의 kaempferol-3-O-arabinofuranosyl-7-O-rhamnopyranoside로 동정하였다.

Compound 8의 ESI-MS spectrum에서 분자량 577의 [M-H]⁻ ion peak가 관찰되었으며, MS/MS를 실시한 결과 431 [M-rhamnosyl], 285 [M-dirhamnosyl]의 fragment ion이 관찰되어 잠정적으로 kaempferol에 2분자의 rhamnose가 결합되어 있음을 추정하였다. 단리된 화합물의 IR spectrum에서 3383 cm^{-1} 의 broad band는 OH기, 1658 cm^{-1} C=O, 1594 cm^{-1} C=C, 1347 cm^{-1} CH₃, 1204-916 cm^{-1} 에서 C-O의 존재를 확인하였다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 분석결과, δ 5.56 (br, s)과 δ 5.40 (br, s)의 anomeric proton signal 2종과 3H 분의 methyl기 proton (δ 1.27, δ , J=6.0 Hz; δ 0.94, δ , J=6.0 Hz) 2종이 각각 관찰되었으며, δ 4.23~3.37에서 관찰된 4H 분의 signal의 분열 패턴으로부터 2분자의 rhamnose가 함유되어 있을 가능성이 시사되었다. 그리고 δ 7.79 (2H, δ , J=8.5 Hz, H-2',

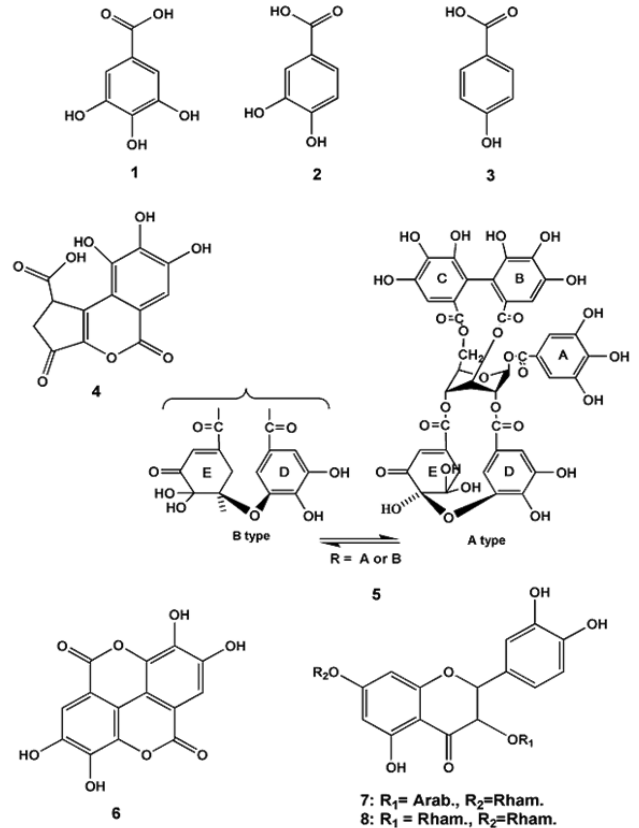


Fig. 2. The structures of the compounds isolated from ethyl acetate soluble fraction of *Geranium thunbergii*.

6')와 δ 6.93 (2H, δ , J=8.5 Hz, H-3', 5')에 각각 2H 분의 등가 proton signal 및 δ 6.73 (1H, s, H-8)과 δ 6.46 (1H, s, H-6)의 각각 1H 분의 broad singlet의 sp³ 탄소 proton의 chemical shift 및 분열패턴이 kaempferol일 가능성이 강하게 시사되었다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에 있어서도 a-L-rhamnose에 귀속되는 6종의 signal에 더하여 15종의 sp² 탄소 signal이 관찰되었다. 이들 각각의 signal을 HSQC 분석에 의해 귀속한 후 HMBC 분석을 통하여 각 proton과 탄소간의 연결을 확인한 결과, 당의 anomeric proton으로부터 kaempferol 3과 7번 탄소에 cross peak가 관찰되었다. 이와 같은 모든 spectral data 및 기존에 보고된 문헌(Mulinacci *et al.*, 1995)과 비교하여 compound 8은 분자식 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$ 의 kaempferitrin (kaempferol-3,7-O-a-L-dirhamnopyranoside)로 동정하였다(Fig 2).

2. Rat lens aldose reductase (RLAR) 억제활성

현초의 용매별 추출물과 95% EtOH 추출물의 순차적 분획물의 RLAR 억제활성에 대한 결과를 IC₅₀값으로 표현하여 Table 1에 나타내었다. 이때 양성대조물로는 AR 억제제로 잘 알려진 quercetin을 사용하여 그 활성을 함께 비교하였다

(Varma *et al.*, 1975). 현초의 용매별 추출물에 대한 RLAR 억제 활성 결과, 현초 MeOH 추출물은 10 µg/ml의 농도에서 34.49%의 억제 효과를 보였고, 물, 95% EtOH 추출물은 IC₅₀ 값이 각각 5.24, 6.39 µg/ml로 나타났다. 또한 95% EtOH 추출물을 이용한 순차적 분획물 모두에서 처리농도에 따라 농도의존적으로 RLAR 억제 활성이 증가함을 보였으며, EtOAc (2.64 µg/ml) > CH₂Cl₂ (8.69 µg/ml) > H₂O (> 10 µg/ml)의 순서로 RLAR 억제 활성이 나타났다. 양성대조물로 사용된 quercetin의 IC₅₀ 값이 2.00 µg/ml인 것과 비교했을 때 EtOAc 분획물이 quercetin에 상응하는 RLAR 억제 활성을 갖는다는 것을 확인하였다.

95% EtOH 추출물의 EtOAc 분획물로부터 분리된 8개의 화합물에 대한 RLAR 억제 활성을 측정하여 Table 2에 나타내었다. Ellagic acid (6)의 IC₅₀ 값이 1.29 µM로 양성대조물로 사용된 quercetin의 IC₅₀ 값이 5.40 µM인 것과 비교했을 때 ellagic acid는 강력한 RLAR 억제제로 확인 되었다. Lee 등 (2008)의 연구에서 상향버섯으로부터 분리된 화합물의 RLAR 실험에서 양성대조물로 사용된 quercetin의 IC₅₀ 값이 2.91 µM이며, ellagic acid의 IC₅₀ 값이 0.63 µM로 보고하였으며, 이는 본 실험과 유사한 경향이 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 geraniin (5)과 kaempferol-3-O-arabinofuranosyl-7-O-rhamnopyranoside (7)도 IC₅₀ 값이 각각 8.54, 9.18 µM로 quercetin과 비교될 만한 효능을 갖는 것으로 나타났으며, 현재까지 geraniin과 kaempferol-3-O-arabinofuranosyl-7-O-rhamnopyranoside의 AR 억제 활성에 대해 보고된 바는 없다. 이와 같이 현초의 성분들은 AR에 대한 유력한 억제 활성을 가짐으로써 당뇨병 예방 및 치료를 위한 우수한 소재로서의 가능성이 입증되었다.

3. *ex vivo*에서 수정체내의 galactitol 생성 억제 활성

Fatmawati 등(2009)의 연구에 따르면 갈락토오스는 글루코오스 보다 AR 기질로서 우수하며, 그 이유로 갈락토오스는 조직에서 글루코오스 보다 쉽게 흡수되고 AR에 의해 갈락티톨

로 빠르게 전환되기 때문이라고 하였다. 이렇게 생성된 갈락티톨은 폴리올 경로의 두 번째 효소인 솔비톨 탈수소효소의 기질로 사용되지만 이 효소반응은 비교적 천천히 일어나기 때문에 갈락티톨은 조직에서 솔비톨 보다 빠르게 축적된다고 보고하였다. 이처럼 천연물 및 생약을 이용한 AR 억제에 대한 연구로는 Shin 등(1994)이 구릿대 ether 추출물에서 RLAR 활성을 억제하며 동시에 갈락토오스혈증(galactosemic) rat의 백내장 형성을 억제함을 보고한 바 있다.

본 연구 중 RLAR 억제 실험에서 현초 95% EtOH 추출물의 EtOAc 분획물로부터 분리된 화합물 중 geraniin (5), ellagic acid (6), kaempferol-3-O-arabinofuranosyl-7-O-rhamnopyranoside (7)가 AR 활성을 현저히 억제함을 관찰하였다. 이러한 결과를 토대로 *ex vivo*에서 3개의 성분을 이용하여 당뇨병성 백내장의 주요 발현 인자인 수정체 내의 갈락티톨 생성 억제 효과를 양성대조물인 quercetin과 100 µg/ml의 동일한 농도에서 비교 측정하여 Table 3에 나타내었다. 100 µg/ml의 농도에서 ellagic acid (6)의 갈락티톨 생성 억제 효과는 42.47%로 나타났으며, quercetin은 46.83%의 억제 효과가 나타났으며, 이를 비교했을 때 ellagic acid는 quercetin과 유사한 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, geraniin (5)과 kaempferol-3-O-arabinofuranosyl-7-O-rhamnopyranoside (7)도 마찬가지로 각각 39.87%, 39.86%의 갈락티톨의 생성이 억제되었다.

포도당은 에너지원으로서 중요한 물질로 정상 시에는 세포 내에 흡수된 후에 대부분 해당과정으로 대사되고, 폴리올 경로를 거쳐 대사되는 것은 불과 수 %에 지나지 않는다. 그러나 세포내로의 포도당 유입은 인슐린 비의존형 조직의 경우 포도당의 세포막투과는 세포외의 포도당 농도에 의존하므로 당뇨병으로 인해 고혈당 상태가 오래 지속되면 세포내 포도당 농도는 상승하고, 폴리올 경로의 핵심 효소인 AR에 의하여 포도당 대사가 향진되어 솔비톨이 과잉 생성되고, 그 결과 솔비

Table 2. Inhibitory effects of the compounds (1-8) isolated from ethyl acetate-soluble fractions of *Geranium thunbergii* extract on rat lens aldose reductase.

Compounds	IC ₅₀ (µM) [†]
Gallic acid (1)	-
Protocatechuic acid (2)	156.04
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (3)	82.83
Brevifolin carboxylic acid (4)	15.41
Geraniin (5)	8.54
Ellagic acid (6)	1.29
Kaempferol-3-O-arabinofuranosyl-7-O-rhamnopyranoside (7)	9.18
Kaempferitrin (8)	45.69
Quercetin [‡]	5.40

Table 1. Inhibitory effects of the crude extracts and fractions of *Geranium thunbergii* on rat lens aldose reductase.

Extracts and Fractions	IC ₅₀ (µg/ml) [‡]
H ₂ O ext.	5.24
MeOH ext.	>10
EtOH ext.	6.39
CH ₂ Cl ₂ fr.	8.69
EtOAc fr.	2.64
H ₂ O fr.	>10
Quercetin [‡]	2.00

[†]The IC₅₀ value was defined as the concentration of the 50% inhibition.

[‡]Positive control.

[†]The IC₅₀ value was defined as the concentration of the 50% inhibition.

[‡]Positive control.

Table 3. Inhibitory effects of the phenolic compounds from the *Geranium thunbergii* extract on the galactitol accumulation in rat lenses incubated with high galactose.

Compounds	Galactitol content [$\mu\text{g}/\text{lens wet weight}$ (g)] [†]	Inhibition (%)
Blank (galactose-free)	-	100
Control	844.05 \pm 20.29	0
Geraniin (5)	507.49 \pm 23.17	39.87
Ellagic acid (6)	485.59 \pm 33.71	42.47
Kaempferol-3-O-arabinofuranosyl-7-O-rhamnopyranoside (7)	504.64 \pm 26.23	39.86
Quercetin [‡]	448.81 \pm 26.41	46.83

[†]Means of analysis (means \pm standard deviation) of galactitol in the rat lenses (n = 5) with samples at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
[‡]Positive control.

톨이 축적되는 부위의 발병증상에 따라서 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경장애, 당뇨병 신증 등의 당뇨병 합병증을 일으키게 된다(Dvornik *et al.*, 1973).

AR이 촉매하는 포도당의 폴리올로의 환원반응은 그 평형에서 역반응을 일으키지 않는다. 솔비톨 탈수소효소의 활성이 AR의 활성보다 낮기 때문에 솔비톨에서 프룩토오스로의 변환은 소량이며, 결과적으로 폴리올 경로의 항진은 솔비톨을 축적시킨다(Collins and Corder, 1977). 당뇨병에 의하여 수정체 내의 포도당 농도가 상승하면 AR에 의하여 솔비톨의 생성이 항진되고, 솔비톨의 축적은 세포내 삼투압을 상승시켜 수정체 내로의 수분유입을 촉진하여 세포의 팽화를 일으킨다. 이 팽화는 수정체섬유세포의 투과성을 항진하고, Na⁺, Cl⁻의 유입과 K⁺, 아미노산, 단백질, ATP, myo-inositol 등의 유출을 일으킨다. Na⁺이나 K⁺ 등의 전해질의 평형파괴는 삼투압을 더욱 상승시키고, 세포의 팽화를 한층 촉진하여 세포막은 정상유지할 수 없게 된다. 그와 동시에 세포내 단백질변성이 진행되어 수정체가 혼탁하게 되는데 이와 같이 수정체가 혼탁해져 나타나는 백내장 증상을 당뇨병 진행과정의 한 지표로 사용한다(Gabbay and O'Sullivan, 1968). 따라서 솔비톨의 생성을 억제하는 물질이 당뇨병성 백내장의 발병을 억제하게 된다는 것이며, 이론적으로는 솔비톨을 생성하는 효소인 AR을 저해하므로써 가능하게 된다는 것이다.

이처럼 본 실험의 결과는 *in vitro* 수준에서 현초의 성분이 lens의 AR에 대한 억제활성을 가짐을 규명한 새로운 결과로써, 현초의 ellagic산 계열의 탄닌류와 플라보노이드 성분은 당뇨병 합병증 억제 효과를 가진다는 것이 확인되었으며, 향후 당뇨병에 대한 전임상 효능연구와 안전성 확보를 통하여 당뇨병 예방 및 치료를 위한 신소재로의 가능성이 있다고 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학 중점연구소 지원사업으로 수행된 연구(2011-0030750)이며, 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 광역경제권 선도산업 인재양성사업의 일부 연구결과로 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

Carper DA, Hohman TC and Old SE. (1995). Residues affecting the catalysis and inhibition of rat lens aldose reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1246:67-63.

Choi HJ, Jeong YK, Kang DO and Joo WH. (2008). Inhibitory effects of four solvent fractions of *Alnus firma* on α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Life Sciences*. 18:1005-1010.

Collins JG and Corder CN. (1977). Aldose reductase and sorbitol dehydrogenase distribution in substructures of normal and diabetic rat lens. *Investigative Ophthalmology Visual Science*. 16:242-243.

Constantino L, Rastelli G, Vianello P, Cignarella G and Barlocco D. (1999). Diabetes complications and their potential prevention: aldose reductase inhibition and other approaches. *Medical Care Research Review*. 19:3-23.

Corns CM. (2003). Herbal remedies and clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry*. 40:489-507.

Dvornik E, Simard-Duquesne N, Krami M, Sestanjk K, Gabbay KH, Kinoshita JH, Varma SD and Merola LO. (1973). Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science*. 182:1146-1148.

Fatmawati S, Kurashiki K, Takeno S, Kim YU, Shimizu K, Sato M, Imaizumi K, Takahashi K, Kamiya S, Kaneko S and Kondo R. (2009). The inhibitory effect on aldose reductase by an extract of *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research*. 23:28-32.

Gabbay KH and O'Sullivan JB. (1968). The sorbitol pathway: Enzyme localization and content in normal and diabetic nerve and cord. *Diabetes*. 17:239-243.

Hayman S and Kinoshita J. (1965). Isolation and properties of lens aldose reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 240:877-882.

Jeon YH, Moon JM, Kweon HJ, Jeoung YJ, An CS, Jin HL, Hur SJ and Lim BO. (2010). Effects of *Lycii fructus* and *Astragalus membranaceus* mixed extracts on immunomodulators and prevention of diabetic cataract and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes rat model. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:15-21.

Kato A, Yasuko H, Goto H, Hollinshead J, Nash RJ and Adachi I. (2009). Inhibitory effect of rhesinine isolated from *Evodia rutaecarpa* on aldose reductase activity. *Phytomedicine*. 16:258-261.

Kim JK, Lee YS, Kim SH, Bae YS and Lim SS. (2011). Inhibition of aldose reductase by phenylethanoid glycoside isolated from the seeds of *Paulownia coreana*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 34:160-163.

- Kim SH, Kim JK, Lee YS and Lim SS.** (2010). Inhibitory effect of quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside from *Chamaecyparis obtuse* on aldose reductase and sorbitol accumulation. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:305-310.
- Kitagawa K, Kawamoto T, Futaki S, Kiyama S, Akita T, Moritoki H and Kiso Y.** (1989). Solution syntheses of two enkephalin-containing peptides E and dynorphin(1-24), using Nin-(2,4,6-triisopropylphenylsulfonyl) tryptophan. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 37:2631-2638.
- Kubo M, Matsuda H, Tokuoka K, Kobayashi Y, Ma S and Tanaka T.** (1994). Studies of anti-cataract drugs from natural sources. I. Effects of a methanolic extract and the alkaloidal components from *Corydalis tuber* on in vitro aldose reductase activity. Biological Pharmaceutical Bulletin. 17:458-459.
- Kwon OG, Kim SH, Chun BY, Park DK and Son KH.** (1999). Isolation of anti-microbial components from *Montan* cortex. Journal of Korean Pharmaceutical. 30:340-344.
- Lee YS, Kang YH, Jung JY, Kang IJ, Han SN, Chung JS, Shin HK and Lim SS.** (2008). Inhibitory constituents of aldose reductase in the fruiting body of *Phellinus linteus*. Biological Pharmaceutical Bulletin. 31:765-768.
- Lee YS, Kim SH, Jung SH, Kim JK, Pan CH and Lim SS.** (2010). Aldose reductase inhibitory compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. Biological Pharmaceutical Bulletin. 33:917-921.
- Lee YS, Kim JK, Bae YS, Won MH, Kang IJ and Lim SS.** (2011). Inhibitory effect of glucodistylin from the bark of *Quercus acutissima* on human recombinant aldose reductase and sorbitol accumulation. Archives Pharmacol Research. 34:211-215.
- Lim SS, Jung YJ, Hyun SK, Lee YS and Choi JS.** (2006). Rat lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbo nucifera* stamens. Phytotherapy Research. 20:825-830.
- Liu QH, Jeong JE, Choi EJ, Moon YH and Woo ER.** (2006). A new furofuran lignan from *Geranium thunbergii* sieb. et zucc. Archives Pharmacol Research. 29:1109-1113.
- Mulinacci N, Vincicieri FF, Baldi A, Bambagiotti AM, Sendi A and Wagner H.** (1995). Flavonol glycosides from *Sedum telephium* subspecies maximum leaves. Phytochemistry. 38:531-533.
- Nawwar MAM, Hussein SSM and Merfort I.** (1994). NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. Phytochemistry. 36:793-768.
- Park WY, Lee SC, Ahn BY and Lee SH.** (1993). Phenolic compounds from *Acalypha australis* L. Journal of Korean Pharmaceutical. 24:20-25.
- Saijo R, Nonaka GI and Nishioka I.** (1990). Gallic acid esters of bergenin and norbergenin from *Mallotus japonicus*. Phytochemistry. 29:267-270.
- Shin KH, Chung MS and Cho TS.** (1994). Effects of furanocoumarins from *Angelica dahurica* on aldose reductase and galactosemic cataract formation in rats. Archives of Pharmacol Research. 17:331-336.
- Son KH, Pak UN, Chinmoy S and Ranjan B.** (2005). A sensitive assay of red blood cell sorbitol level by high performance liquid chromatography: potential for diagnostic evaluation of diabetes. Clinica Chimica Acta. 354:41-47.
- Srivastava Y, Venkatakrishna-Bhatt H and Verma Y.** (1988). Effect of *Momordica charantia* Linn. pomous aqueous extract on cataractogenesis in murrin alloxan diabetics. Pharmacological Research Communication. 20:201-209.
- Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Patch CS, Sullivan DR, Fenech M, Roodenrys S, Keogh JB, Clifton PM, Williams PG, Fazio VA and Inge KE.** (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. Medical Journal of Australia. 185:S4-24.
- Ushio Y, Okoda T and Abe H.** (1991). Effects of geraniin on morphology and function of macrophages. International Archives of Allergy and Immunology. 96:224-230.
- Varma SD, Mikuni I and Kinoshita JH.** (1975). Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. Science. 188:1215-1216.
- Yisida T, Itoh H, Matsunaga S, Tanaka R and Okuda T.** (1992). Tannins and related polyphenols of euphobiaceous plants. Hydrolyzable tannins with ¹C-glucose core from *Phyllanthus flexuosus* Muell. Arg. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 40:520-521.
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E and Saito, K.** (2008). Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding genome-metabolite correlations in *Arabidopsis*. The Plant Cell. 20:2160-2176.