

물오리나무 수피의 Diarylheptanoid*¹

황 병 호*² · 조 재 현*² · 이 태 성*³ · 배 영 수*^{2†}

Diarylheptanoids from Bark of *Alnus hirsuta* Turcz.*¹

Hwang Byung-Ho*² · Cho Jae-Hyun*² · Lee Tae-Seong*³ · Bae Young-Soo*^{2†}

요 약

본 연구는 우리나라 전역에 분포하고 있는 물오리나무의 추출성분으로부터 유용한 항산화 물질을 탐색하기 위해 수행되었다. 물오리나무 수피를 70% acetone 수용액으로 추출하여 분획한 후 ethyl acetate 분획과 수용성 분획을 Sephadex LH-20으로 충전된 column으로 chromatography를 수행하여 혼합물을 정제하고 두 개의 diarylheptanoid 화합물을 얻었다. 단리된 화합물은 ¹H, ¹³C-NMR 및 2D-NMR 분석을 통하여 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-3-one-5-O-β-D-xylopyranoside (1, oregonin)와 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-β-D-xylopyranoside (2)로 구조를 규명하였다. 두 개의 diarylheptanoid 화합물과 oregonin 가수분해물에 대한 항산화 활성(DPPH)을 측정된 결과 세 화합물 모두 높은 활성을 보였으며, 특히 oregonin 가수분해물의 항산화 활성은 IC₅₀이 2.6으로 높은 활성을 보였다.

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the valuable antioxidative compound from extracts of *Alnus hirsuta* Turcz. which has a nationwide distribution. The bark (2 kg) was extracted with 70% aqueous acetone and fractionated, and the ethyl acetate and H₂O fractions, separately, were chromatographed on a Sephadex LH-20 column to purify the mixture and to give two diarylheptanoid compounds. The isolated compounds were analyzed by NMR spectroscopy, including ¹H, ¹³C and two-dimensional NMR, and identified as oregonin (1) and 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-β-D-xylopyranoside (2). The antioxidative activity was evaluated by DPPH method using two diarylheptanoids and acid-hydrolyzed oregonin derivative which

*¹ 접수 2008년 11월 24일, 채택 2009년 1월 2일

*² 강원대학교 산림환경과학대학 임산공학과. Department of Wood Science & Engineering of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

*³ (주)화진화장품 기술연구소. Hwajin Cosmetics Co. Institute of Research

† 주저자(corresponding author) : 배영수(e-mail : bae@kangwon.ac.kr)

indicated higher activity potential. Of those the acid-hydrolyzed oregonin derivative showed highly active potential with the value of 26 of IC₅₀.

Keywords: Diarylheptanoid, Oregonin, *Alnus hirsuta*

1. 서 론

물오리나무(*Alnus hirsuta* Turcz.)는 자작나무과(Betulaeaceae)에 속하며 산오리나무라고도 한다. 낮은 산지에서 자라며 한국, 일본, 중국, 동북부, 시베리아, 사할린 등지에 분포한다. 높이는 20 m에 달하고 나무 껍질은 검은빛이 도는 짙은 갈색이고 회색의 피복이 있다. 어린 가지는 털이 뺏뺏이 있고, 겨울눈에 털이 있다(이, 1996).

민간에서는 오리나무(*Alnus japonica*) 껍질을 달여 산후피멧이약, 위병약으로 먹으며 눈염증, 류머티즘, 목구멍염증, 선병에 씻거나 입가심용으로 사용하기도 하였다(문, 1999).

오리나무 속에는 diarylheptanoid 계열 화합물을 포함한 flavonoids, tannin 등 페놀성 화합물이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1999; Jie *et al.*, 1998; Kuroyanagi *et al.*, 2005).

그러나 국내에서는 diarylheptanoid계 화합물에 대한 연구가 미진한 실정이다. 본 연구에서는 물오리나무 수피의 ethyl acetate와 수용성 분획을 대상으로 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 diarylheptanoid 화합물을 분리하고 NMR 등의 기기분석을 실시하여 구조를 동정하고 또한 그 화합물에 대한 가수분해를 수행하여 그 분해산물의 항산화 활성을 측정하여 물오리나무 추출성분의 기능적 이용 가능성을 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

2008년 1월 강원대학교 구내림에서 벌채한 28년생 물오리나무를 박피한 후 그 수피를 실온에서 건조, 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2.2. 사용기기 및 시약

NMR은 Bruker Avance DPX 400 MHz spectrometer (Germany)를 사용하여 ¹H (400 MHz), ¹³C-NMR (100 MHz) 및 2D-NMR (HMQC)을 측정하였으며 분석용매로는 CD₃OD를 사용하였다. Column 충전물질은 lipophilic Sephadex LH-20 (Sigma, Sweden), TLC plate는 DC-plastikfolien Cellulose F (Merck, Germany)를 사용하였으며, 전개용매는 TBA [(*t*-butanol : AcOH : H₂O (3:1:1, v/v/v)]와 6% acetic acid를 사용하였고, FeCl₃ 발색제를 분무하여 TLC의 반응하는 색을 관찰하였다.

항산화효능 측정용 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma사 제품을 사용하였으며, ethanol (99.5%, Merck사)과 trichloroacetic acid (ACROS사)를 사용하였다.

2.3. 추출물의 조제 및 분리

건조된 수피 5 kg을 70% acetone 수용액에 침적하여 상온에서 72시간 추출하고 이러한 과정을 3회 반복하여 감압농축하였다.

추출물은 separatory funnel에서 hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate 및 수용성 부분으로 분획한 후 유기용매를 제거하고 동결건조하였다.

2.4. 추출물의 분리 및 단리

Ethyl acetate 분획(14.4 g)을 Sephadex LH-20으로 충전한 칼럼(5 × 70 cm)에서 50% MeOH 수용액을 용리용매로 사용하여 chromatography를 실시하고 6개의 분획(AHBE-1~6)으로 나누었다. 그 중에서 AHBE-3 (1.4 g)을 Sephadex LH-20 column

에서 MeOH 수용액(1 : 6 및 1 : 3, v/v)으로 다시 크로마토그래피를 수행하여 5개의 분획(AHBE-31~35)으로 나눈 후 화합물 1 (AHBE-32, 498 mg)을 분리하였다.

또한 수용성 분획(15.7 g)을 Sephadex LH-20 column에서 50% MeOH 수용액으로 크로마토그래피를 실시하여 7개의 분획(AHBW-1~7)을 얻었다. 그 중 AHBW 2 (4.3 g)를 다시 크로마토그래피 (MeOH : H₂O = 1 : 4, v/v) 하여 화합물 2 (1.1 g)를 분리하였다.

2.5. Compound 1의 산가수분해

화합물 1 (300 mg)을 300 ml 플라스크에서 60% dioxane-2N H₂SO₄ (8 ml)와 혼합하여 넣어 1시간 동안 환류냉각시켜 가수분해를 실시하였다. 반응물을 ethyl acetate로 추출하고, ethyl acetate 층은 물로 세척한 후 시럽상태까지 감압농축하였다. 농축된 반응물은 Sephadex LH-20 column에서 chromatography (MeOH : H₂O = 1 : 1, v/v)를 실시하여 정제하였다.

화합물 1 (oregonin) : brown amorphous powder ; R_f : 0.46 (TBA)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 1.71 (1H, m, H-6), 2.45-2.77 (8H, H-1,2,4 and 7), 3.13 (1H, dd, J=8.9, 7.5 Hz, xyl-2), 3.52 (1H, m, xyl-4), 3.86 (1H, dd, J=11.43, 5.3 Hz, xyl-5), 4.07 (1H, m, H-5), 4.21 (1H, d, J=7.6 Hz, xyl-1), 6.47 (2H, d, J=8.01, 6' and 6''), 6.62-6.68 (4H, m, H-2', 2'', 5' and 5'').

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 212.8 (C-3), 146.5 (C-3''), 146.4 (C-3'), 144.8 (C-4''), 144.5 (C-4'), 135.7 (C-1''), 134.6 (C-1'), 121.4 (C-6''), 121.3 (C-6'), 117.2 (C-5''), 117.2 (C-5'), 117.0 (C-2''), 116.8 (C-2'), 104.7 (xyl-1), 78.3 (xyl-3), 76.9 (C-5), 75.6 (xyl-2), 71.7 (xyl-4), 67.4 (xyl-5), 49.0 (C-4), 46.8 (C-2), 38.9 (C-6), 32.2 (C-7), 30.5 (C-1)

화합물 2 (1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-β-D-xylopyranoside) : brown amorphous powder ; R_f : 0.70 (TBA)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 1.67-1.79 (2H, m, H-2), 2.41-2.78 (8H, H-1,2,4 and 7), 3.16 (1H, dd, J=10.9, 9.62 Hz, xyl-2), 3.85 (1H, dd, J=5.37, 5.32, xyl-5), 4.08 (1H, m, H-5), 4.21 (1H, d, J=7.6 Hz, xyl-1), 6.47 (2H, d, J=6.8, 6' and 6''), 6.61 (2H, d, J=2.26 Hz, H-5' and 5''), 6.65 (2H, d, J=6.65 Hz, H-2' and 2'').

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 144.7 (C-3''), 144.6 (C-3'), 143.0 (C-4''), 142.7 (C-4'), 138.1 (C-1''), 132.7 (C-1'), 119.4 (C-6''), 119.3 (C-6'), 115.3 (C-5''), 115.2 (C-5'), 115.1 (C-2''), 114.9 (C-2'), 102.9 (xyl-1), 76.5 (xyl-3), 75.0 (C-5), 73.7 (xyl-2), 69.9 (xyl-4), 65.6 (xyl-5), 48.1 (C-4), 45.0 (C-2), 37.2 (C-6), 30.4 (C-7), 28.7 (C-1), 24.2 (C-3).

화합물 1a (1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-3-one-5-ol) : brown amorphous powder ; R_f : 0.72 (TBA)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 1.44-1.47 (4H in total, m, H-3 and 2), 1.52-1.55 (2H, m, H-4), 1.63-1.66 (2H, m, H-6), 2.43-2.61 (4H, m, H-1,7), 3.53-3.54 (1H, m, H-5), 6.48-6.52 (2H, m, H-6' and 6''), 6.67-6.72 (4H, m, H-2', 2'', 5' and 5'')

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 212.0 (C-3), 146.5 (C-3''), 146.4 (C-3'), 144.8 (C-4''), 144.5 (C-4'), 133.4 (C-1''), 134.2 (C-1'), 121.4 (C-6''), 121.3 (C-6'), 117.2 (C-5''), 117.2 (C-5'), 117.0 (C-2''), 116.8 (C-2'), 68.4 (C-5), 51.4 (C-4), 46.5 (C-2), 40.6 (C-6), 32.0 (C-7), 29.9 (C-1)

2.6. 항산화 활성 시험(DPPH법)

DPPH radical 소거능은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 96 well micro plate에 시료

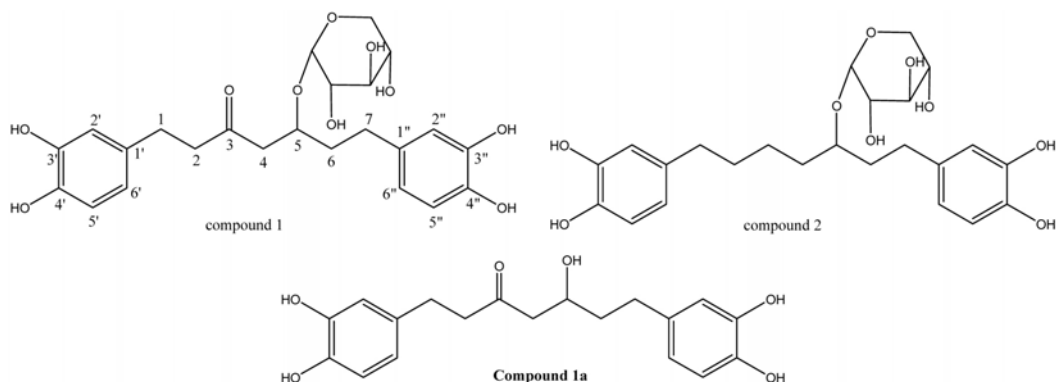


Fig. 1. Chemical structure of compounds 1, 2 and 1a.

를 희석(31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2, 1 ppm)하여 100 μ l씩 넣은 후 0.2 mM DPPH용액을 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 micro plate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무첨가 대조군은 시료대신 EtOH를 첨가하여 같은 방법으로 측정하였으며, 시료의 색을 보정하기 위한 blank 시험은 0.2 mM DPPH 용액 대신 ethanol을 넣어 실험하였다.

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{무첨가 대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

3. 결과 및 고찰

화합물 1은 TLC plate에서 FeCl_3 를 분무하였을 때 청색을 띄며, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 3개의 methylene group이 δ 1.71에서 나타나며, 다른 2개의 methylene group이 δ 2.45~2.77에서 나타나고 있다. Aromatic ring 1, 3, 4 위치에 결합된 두쌍의 시그날이 δ 6.47~6.69에 나타나고 있다. δ 4.21의 시그날은 xylose의 aromatic proton으로 J값이 7.6 Hz인 것으로 보아 β -D-xylose임을 알 수 있었고, 나머지 당의 시그날은 δ 3.13 (1H, dd, $J=8.9, 7.5$ Hz, xyl-2), 3.52 (1H, m, xyl-4), 3.86 (1H, dd, $J=11.43, 5.3$ Hz, xyl-5), 4.21 (1H, d, $J=7.6$ Hz, xyl-1)에서 복잡하게 나타나고 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙

트럼에서 5개의 methylene group의 시그날이 δ 30.5 (C-1), 32.2 (C-7), 38.9 (C-6), 48.6 (C-2), 49.0 (C-4)이 나타나며, 산소와 결합된 methine 시그날이 δ 76.9 (C-5)의 저자장에 나타나며, carbonyl group의 시그날이 δ 212.8에서 나타나고 있다. Aromatic ring의 시그날들은 δ 146.5 - 116.6에서 나타나고 있다. 전형적인 xylopyranosyl group의 시그날은 δ 104.7 (xyl-1), 78.3 (xyl-3), 75.6 (xyl-2), 71.7 (xyl-4), 67.4 (xyl-5)에 나타나는 것을 알 수 있었다(Kuroyanagi *et al.*, 2005). 이것으로 화합물 1은 3번 위치에 carbonyl 기를 가지고 5번 위치에 β -D-xylopyranoside가 결합된 oregonin으로 규명하였다(Lee *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1998).

화합물 2는 화합물 1과 같이 FeCl_3 를 분무하면 청색을 띄며, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 시그날이 화합물 1 (oregonin)과 거의 일치하는 것을 알 수 있었으며, 3번 위치의 carbonyl group이 없는 화합물로서 oregonin의 3번 위치의 시그날이 upfield되어 δ 24.2에 나타나는 것을 알 수 있었다. 그것으로 화합물 2는 화합물 1 (oregonin)의 3번 위치에 carbonyl group이 없고, 5번 위치에 β -D-xylopyranoside가 결합된 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-xylopyranoside으로 규명하였다(Lee *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005).

가수분해물인 화합물 1a의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 5개의 methylene, 3,4-dihydroxyphenyl group과 carbonyl group의 시그날이 나타

Table 1. Antioxidative activities (IC₅₀) of the compounds isolated and acid hydrolysis

Compound	Radical scavenging activity (%)						IC ₅₀ (µg/ml)
	313 ppm	156 ppm	7.8 ppm	3.9 ppm	2 ppm	1 ppm	
1	90.7	90.7	90.0	55.5	29.9	15.0	4.18
2	91.1	90.4	88.5	49.4	27.4	3.0	4.00
1a	90.9	90.9	90.0	88.5	51.2	32.8	2.26

나는 것을 알 수 있었다. 화합물 1의 ¹³C-NMR 스펙트럼과 비교하여 그것의 배당체임을 알 수 있었다.

화합물 1 (oregonin), 화합물 2 (1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-β-D-xylopyranoside), 화합물 1의 가수분해물인 화합물 1a에 대한 항산화 활성 측정(DPPH assay)은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 적용하였다.

Diarylheptanoid 화합물의 항산화 활성은 이전의 연구들에서 매우 높은 활성을 보였다(Lee *et al.*, 2000; Kuroyanagi *et al.*, 2005)

물오리나무 수피 추출물의 항산화 활성을 측정된 결과 Table 1과 같이 화합물 모두 7.8 ppm 이상에서 90%에 가까운 활성을 보였으며, 특히 가수분해물인 화합물 1a는 IC₅₀이 2.26으로 가수분해하기 전의 4.00보다 상당히 좋은 활성을 보였다.

4. 결 론

물오리나무(*Alnus hirsuta*) 수피부의 ethyl acetate 분획과 수용성 분획을 Sephadex LH-20을 사용한 column chromatography를 실시하여 diarylheptanoid 화합물인 oregonin과 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-β-D-xylopyranoside를 분리하였다.

화합물 1, 화합물 2 및 화합물 1의 가수분해물에 대한 항산화 활성(DPPH assay)를 실시한 결과 화합물 모두 좋은 활성을 보였으며, oregonin의 가수분해물의 경우 IC₅₀이 2.26으로 매우 좋은 활성을 보였다.

사 사

본 논문은 강원대학교 2007년도 연구년교수 연구

비(관리번호 2007057)의 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. 문관심. 1999. 약초의 성분과 이용. 일월서각. pp. 168~169.
2. 이영노. 1996. 한국식물도감. 교학사. p. 64.
3. 배춘일, 공재명, 오정완, 김현종, 오갑진, 박시경, 정순간, 조의환. 1997. 산오리나무의 세포독성 성분연구. 약학회지. 41(5): 559~564.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 25: 1199~1120
5. Chen, J., J. J. Karchesy, and F. G. L. Fuben. 1998. Phenolic Diarylheptenones from *Alnus rubra* Bark. Planta Med. 64: 74~75.
6. Kuroyanagi, M., M. Simomae, Y. Nagashima, N. Muto, T. Okuda, N. Kawahara, T. Nakane, and T. Sano. 2005. New Diarylheptanoids from *Alnus Japonica* and Their Antioxidative Activity. Chem. Pharm. Bull. 53(12): 1519~1523.
7. Lee, M. W., D. W. Jeong, Y. A. Lee, M. S. Park, and S. H. Toh. 1999. Flavonoids from Leaves of *Alnus hirsuta*, Yakhak Hoeji. 43(5): 547~552.
8. Lee, M. W., M. S. Park, D. W. Jeong, K. H. Kim, and S. H. Toh. 2000. Diarylheptanoids from the Leaves of *Alnus hirsuta* Turcz. Arch. Pharm. Res. 23(1): 50~53.
9. Ruben F. G. L and J. J. Karchesy. 1994. Structure and Significance of Natural Diarylheptanoids. UBAMARI. 32: 15~31.