

물오리나무에서 분리된 Diarylheptanoid의 항산화작용

이연아 · 조수민 · 김광호 · 김준식 · 김세원 · 이민원[#]

중앙대학교 약학대학

(Received March 21, 2000)

Antioxidative Effects of Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta*

Yeon-Ah Lee, Kwang-Ho Kim, Jun-Sik Kim, Soo-min Cho
Sae-Won Kim and Min-Won Lee[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea.

Abstract — Four diarylheptanoids oregonin, hirsutanonol, 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-xylopyranoside and 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-glucopyranoside isolated from *Alnus hirsuta* were evaluated for their antioxidative effects with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and lipid peroxidation generation system mediated by addition of H₂O₂ and/or Fe²⁺ to rat liver homogenate. All these diarylheptanoids showed significant inhibitory activities against the DPPH radical and demonstrated strong activities in preventing the lipid peroxidation induced by H₂O₂.

Keywords □ *Alnus hirsuta*, Antioxidative effect, DPPH, Lipid peroxidation inhibition, Diarylheptanoid.

물오리나무(*Alnus hirsuta*)는 자작나무과(Betula-ceae)의 오리나무속(屬)에 속하는 식물로 17종 이상이 우리나라에 자생하는 것으로 알려져 있다.¹⁾

민간 및 한방에서는 오리나무 *Alnus japonica*의 수피를 적양(赤楊)이라 부르며, 청열(淸熱), 강화(降火)하는 작용이 있어 비출혈(鼻出血) 등의 목적에 쓰였고,²⁾ 그외 민간적으로 숙취해소등의 목적에도 응용한 것으로 나타나 있다.³⁾ *Alnus*속 식물에는 diarylheptanoid 계열을 비롯한 flavonoid, tannin등 페놀성 화합물이 함유된 것으로 알려져 있으며,⁴⁻¹⁴⁾ 최근에는, 이 중 diarylheptanoid화합물에 대한 NO생성억제 효과등을 비롯한 다양한 생리활성에 대해서 보고가 이어지고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾

본 연구에서는 물오리나무(*Alnus hirsuta* Turcz)에서 분리된 4종의 diarylheptanoid화합물의 항산화작용과 과산화물 생성에 미치는 영향을 조사하여 유의성

있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

시료물질

본 실험에서 사용한 diarylheptanoid 화합물(Fig. 1), 1-4는 물오리나무(*Alnus hirsuta*, 3 kg)에서 분리한바 있는 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-3-one-5-O- β -D-xylopyranoside(1, oregonin), 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxyheptane-3-one(2, hirsutanonol), 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-xylopyranoside (3), 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-glucopyranoside (4)를 사용하였다.¹⁸⁾

시약 및 기기

항산화효력 측정용 시약인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), L-ascorbic acid, 2-thiobarbituric acid는 Sigma에서 구입하였고, 99.5% ethanol은 Merck, trichloroacetic acid는 ACROS에서 구입하여

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5602 (팩스) 02-822-9778

사용하였다.

기타용매는 1급 시약을 사용하여 실험하였다. 흡광도는 Opron-3000PC UV/Vis spectrophotometer(Hanson)를 사용하여 측정하였고, 저온고속원심분리기는 Union 32R(Hanil)을 사용하였다.

항산화작용측정

라디칼 소거작용의 측정 - Hatano *et al*의 방법에 의하여¹⁹⁾ 시료를 각 농도별로 조제한 용액 100 μ l (control : 99.5% ethanol) 에 0.1 mM DPPH 용액 (99.5% ethanol) 1.9 ml을 가한다. 각 시료는 7가지 농도로 조제하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation 시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 L-ascorbic acid를 7가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 IC₅₀치(DPPH 라디칼 형성을 50%로 억제하는데 필요한 μ l 농도)로 나타내었다.

Liver homogenate의 조제 - Rat를 ether로 가볍게 마취시키고 해부하여 간문맥을 통하여 ice-cold KCl 0.15 M 용액을 관류시켜 간내의 혈액을 제거하고 간을 적출하였다. 간 무게를 재고 ice-cold 0.9% NaCl로 용액을 세척한 후 신속히 간무게의 9배량의 ice-cold 0.9% NaCl을 가하여 간을 세절한 후 glass homogenizer를 이용하여 homogenization 하여 사용하였다.²⁰⁾

과산화지질억제 활성의 측정 - Thiobarbituric acid (TBA)-reactive substances의 정량은 Buege와 Aust²¹⁾의 방법을 약간 변형한 방법을 이용하였다. 반응액은 phosphate buffer(50 mM, pH 7.4) 0.8 ml에 liver homogenate 0.5 ml(단백질 15 mg과 동량), H₂O₂ 용액(30 mM) 0.3 ml 및/또는 FeSO₄(3.3 mM)시료의 ethanol 용액을 각 농도별로 가한다.

위의 혼합액을 cap test tube에서 20분간 incubation 시키고, stop solution으로 TBA/trichloroacetic acid (TCA/HCl)(0.375% TBA, 15% TCA, 0.25N HCl)을 각 tube에 가하고 100°C에서 15분간 가열한다. Ice-water에 10분간 냉각시킨 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 항산화활성을 log-dose inhibition curve를 작성하여 IC₅₀를 구하여 활성을 비교하였다.

실험결과 및 고찰

라디칼 소거에 미치는 영향 - oregonin (1), hirsutananol (2), 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-xylopyranoside (3), 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-glucopyranoside (4)의 DPPH radical 소거법에 의한 항산화활성을 검색한 결과 1, 2, 3 및 4가 DPPH radical에 대하여 억제 활성을 나타내었으며, IC₅₀가 대조약물인 L-ascorbic acid(113.6 μ g/ml)에 비하여 hirsutananol (2) (65.2 μ g/ml), 1,7-bis-(3,4-dihydroxy phenyl)-heptane-5-O- β -D-xylopyranoside (3) (92.0 μ g/ml), oregonin(1) (95.0 μ g/ml)의 순으로 활성이 높은 것으로 나타났다(Table I).

지질과산화에 대한 억제효과

H₂O₂에 의해 유도된 지질과산화에 대한 억제효과에 대해서 4종의 모든 diarylheptanoid가 억제 활성을 나타내었다. 특히 oregonin (1)과 hirsutananol (2)이 각각 IC₅₀ 0.7, 4.2 μ g/ml로 강한 억제활성을 보였다. 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-xylopyranoside (3), 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O- β -D-glucopyranoside (4)는 각각 IC₅₀ 29.3, 59.0 μ g/ml로 앞의 두 compound에 비해서는 비교적 억제활성이 낮은 것으로 나타났다(Table II).

Table I - IC₅₀ (μ g/ml) values of diarylheptanoids against the DPPH radical

Compound	IC ₅₀ (μ g/ml)
L-Ascorbic acid	113.6
1	95.0
2	65.2
3	92.0
4	140.1

Each value represents the mean value of a duplicate determination

Table II - IC₅₀ (μ g/ml) values of diarylheptanoids tested in superoxidation reactions

Treatment	Compound		
	H ₂ O ₂	FeSO ₄	H ₂ O ₂ + FeSO ₄
1	0.7	256.0	334.6
2	4.2	242.9	498.0
3	29.3	∞	∞
4	59.0	∞	∞

Each value represents the mean value of a duplicate determination.

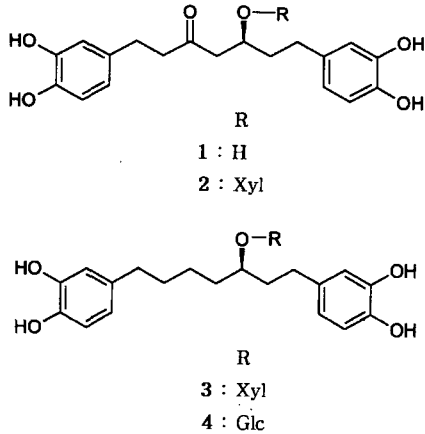


Fig. 1. Structures of diarylheptanoid compounds.

Fe²⁺에 의해 유도된 지질과산화에 대한 억제효과에 대해서 Table II에 보이는 것처럼 oregonin (1) (IC₅₀ 256.0 µg/ml)과 hirsutanonol (2) (IC₅₀ 242.9 µg/ml) 이 억제활성을 나타내었다.

H₂O₂+Fe²⁺에 의해 유도된 지질과산화에 대한 억제 효과에서도 Table II에 나타난 것처럼 oregonin (1) (IC₅₀ 334.6 µg/ml)과 hirsutanonol (2) (IC₅₀ 498.0 µg/ml) 이 과산화지질 억제 활성을 보였다.

결 론

국내에 자생하는 약용자원식물의 하나인 물오리나무에서 분리된 diarylheptanoid 4종에 대하여 항산화작용 및 과산화지질억제활성을 검색하였다.

1. DPPH radical-generating system 으로 항산화작용을 평가하였을때, 실험한 4종의 diarylheptanoid 모두 free-radical scavenger 인 것으로 나타났다. 특히, hirsutanonol (2), 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-β-D-xylopyranoside (3), oregonin (1)은 L-ascorbic acid 보다 강력한 항산화작용을 나타내었다.

2. Rat liver homogenate에 H₂O₂ 및/또는 Fe²⁺를 가하여 산화를 유도하여 실험한 lipid peroxidation generation system 에서 모든 diarylheptanoid가 과산화지질 억제활성을 나타내었다. 특히 H₂O₂에 의해 유도된 지질과산화에 대한 억제효과에 대해서는 oregonin (1)과 hirsutanonol (2) 이 각각 IC₅₀ 0.7 µg/ml, 4.2 µg/ml 로 높은 활성을 보였다.

이상의 결과로 물오리나무에서 분리한 diarylhep-

tanoid는 강력한 항산화제이며 지질과산화 억제제로 작용함을 알 수 있었으며 물오리나무잎은 매우 유용한 약용자원식물이 될 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) 한국식물명고, p.154 (1996).
- 2) 中藥大辭典 (3권), 小學館, p.3042 (1985).
- 3) Lee, S. J., Korean Folk Medicine, p.40 (1966).
- 4) Terazawa, M., Okuyama, H. and Miyake, M. : Isolation of Hirsutanonol and Hirsutenone, Two new diarylheptanoids from the green bark of keyamahannoki, *Alnus hirsuta* Turcz, *Mokuzai gakkai-shi*, **19**, 45 (1974).
- 5) Karches., J. J., Laever, M. L., Barofsky, D. F. and Barofsky, E. : Structure of oregonin, a Natural Diarylheptanoid Xyloside, *J. C. S. Chem. Comm.*, **649** (1974).
- 6) Lee, M.-W., Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Hirsunin, an ellagitannin with a diarylheptanoid moiety from *Alnus hitsuta* var. *microphylla*, *Phytochemistry*, **31**, 967 (1992).
- 7) Tori, M., Hashimoto, A., Hirose, K. and Asakawa, Y. : Diarylheptanoids, flavonoids, stilbenoids, sesquiterpenoids and a phenanthrene from *Alnus maximowiczii*, *Phytochemistry*, **40**, 1263 (1995).
- 8) Wada, H., Tachibana, H., Fuchino, H. and Tanaka, N. : Three new diarylheptanoid glycosides from *Alnus japonica*, *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1054 (1998).
- 9) Gonzalez-Laredo, R. E., Chem, J., Karchesy, Y. M. and Karchesy, J. J. : Four New Diarylheptanoid Glycosides from *Alnus Rubra* Bark *Nat. Prod. Lett.*, **13**, 75 (1999).
- 10) Suga, T., Iwata, N. and Asakawa, Y. : Chemical constituents of the male Flower of *Alnus pendula* (Betulaceae), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 2058 (1972).
- 11) Asakawa, Y. : Chemical constituents of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae) II. The isolation and structure of flavonoids and stilbenes, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **44**, 2761 (1971).
- 12) Stikhin, V. A., Ban'kovskii, A. I., Glyzin, V. I. and Kir'yanova, I. A. : Quercetin-3-sophoroside from *Alnus glutinosa* and *Fraxinus lanceolata* pollens, *Chem. Nat. Comp.*, **10**, 526 (1974).
- 13) Lee, M.-W., Jeong, D.-W., Lee, Y.-A., Park, M.-S. and

- Toh, S.-H. : Flavonoids from the Leaves of *Alnus hirsuta*, *Yakhak Hoeji*, **43**, 547 (1999).
- 14) Ahn, K.-W., Toh, S.-H., Jeong, D.-W., Kim, J.-S., Cho, S.-M. and Lee, M.-W. : Flavonoids from the Leaves of *Alnus maximowiczii* Call, *Yakhak Hoeji*, **44**, 41 (2000).
- 15) Lee, M.-W., Kim, N.-Y., Park, M.-S., Ahn, K.-H., Toh, S.-H., Hahn, D.-R., Kim, Y.-C. and Chung, H.-T. : Diarylheptanoids with *In vitro* Inducible Nitric Oxide Synthesis Inhibitory Activity from *Alnus hirsuta*, *Planta Med.*, *in press*.
- 16) Lee, M.-W., Kim, J.-H., Jeong, D.-W., Ahn, K.-H., Toh, S.-H. and Surh, Y.-J. : Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression by Diarylheptanoids from the Bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*, *Biol. Pharm. Bull.* *in press*.
- 17) Lee, D.-I., Chang, J.-K., Lee, M.-W. and Hong, S.-G. : Effects of Oregonin, diarylheptanoid derivative from plant on antitumor, *Chung-Ang J. Pharm. Sci.*, **12**, 50 (1998).
- 18) Lee, M.-W., Park, M.-S., Jeong, D.-W., Kim, K.-H. and Toh, S.-H. : Diarylheptanoids from the Leaves of *Alnus hirsuta* Turcz, *Arch. Pharm. Res.*, **23**, 50 (2000).
- 19) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
- 20) Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
- 21) Yokozawa, T., Dong, E., Liu, Z. W. and Oura, H. : Antiperoxidation Activity of Traditional Chinese Prescriptions and their Main Crude Drugs *In vitro*, *Natural Medicines*, **51**, 92 (1997).