생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
35(4) : 384 ~ 387 (2004)

국내산 오리나무속 식물로부터 Diarylheptanoid계열 화합물의 함량분석

임현우 · 김민기 · 김현정 · 심재걸 · 김광호 · 최형균 · 이민원*
중앙대학교 약학대학

Quantitative Determination of Diarylheptanoid Compounds from Korean *Alnus*

Hyun-Woo Lim, Min-Kee Kim, Hyun-Jung Kim, Jae-Geul Shim, Gwang-Ho Kim, Hyung-Kyoon Choi, and Min-Won Lee*
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract – Genus *Alnus* are deciduous board-leaved trees or shrubs found in the damp place and mountain and more than 17 species are growing in Korea. The bark of *Alnus japonica* has been used for the treatment of fever, hemorrhage and diarrehea in oriental traditional medicine. Quantitative analysis of diarylheptanoids which were characteristic components of *Alnus* species (*A. japonica, A. hirsuta,* and *A. hirsuta* var. *sibirica*), has been conducted by HPLC. The results showed that these plants were rich source of diarylheptanoids and the amount of oregonin and hirsutanonol which were major diarylheptanoids showed seasonal variation.

Key words : *Alnus* species, diarylheptanoid, oregonin, hirsutanonol, HPLC

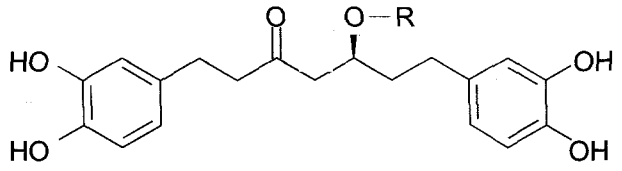
자작나무과(Betulaceae)에 속하는 오리나무의 수피는 한방에서는 적양(赤楊)이라 부르며 청열(淸熱), 강화(降火)하는 작용이 있어서 비출혈(鼻出血), 설사, 외상출혈에 쓰였으며[1] 민간에서는 숙취해소의 목적에 사용되었다.[2] 본 연구자들은 국내 자생하는 *Alnus*속 식물의 diarylheptanoid계열[3,4]을 비롯한 flavonoid[5,6] 및 tannin[7,8]등 페놀성화합물에 대하여 보고한 바 있다. 또한 본 연구자들은 물오리나무(*Alnus hirsuta* Turcz)로부터 분리한 diarylheptanoid glycoside인 oregonin이 B16-F10 mouse melanoma cell line의 발육을 억제하는 멜라닌 억제활성을 확인한 바 있으며,[9] 물갬나무(*Alnus hirsuta* var. *sibirica*) 수피로부터 분리한 diarylheptanoid인 oregonin과 hirsutanonol이 TPA-induced immortalized human breast epithelial MCF10A cell에서 phorbol ester induced cyclooxygenase-2 expression을 억제하는 효과,[10] 물오리나무(*Alnus hirsuta*)에서 분리한 diarylheptanoid의 interferon-γ와 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7cell에서 NO의 합성을 억제하는 것을 보고한 바 있다.[11] 또한 Alnus속 식물에서 분리된 diarylheptanoids의 항산화 작용과 이들의 구조상관적 활성에 대하여 보고한 바 있다.[12,13] 즉, 이상과 같은 diarylheptanoid계열 화합물들은 Alnus속 식물의 주요 생리활성 물질로 판단된다. 이에 본 연구자들은 이들 성분들의 자원적 연구의 측면에서 오리나무속 식물중 국내 주요한 자생종들인 오리나무(*Alnus japonica*), 물오리나무(*Alnus hirasuta*) 및 물갬나무(*Alnus hirsuta* var. sibirica)의 수피로 부터 주성분으로 판단되는 oregonin (**1**)과 hirsutanonol (**2**)의 함량을 조사하였다.

*교신저자(E-mail) : mwlee@cau.ac.kr
(FAX) : 02-822-9778

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에서 사용한 오리나무(*Alnus japonica*, 2002년, 11월), 물오리나무(*Alnus hirsuta*, 2002년, 11월), 물갬나무(*Alnus hirsuta* var. *sibirica*, 2004년 6월 및 11월)의 수피를 청계산에서 채집하여 건조후 사용하였다.

기기 및 시약 – Instrument : Waters 600 HPLC system (Waters Co., USA), Data system : AutochroWin 2.0 plus (Young-Lin Instrument, Korea), Detector : Waters 486 Turnable Absorbance Detector(UV/VIS) (Waters Co., USA),



	R
1	Xylose
2	H

Scheme 1. The structures of oregonin (**1**) and hirsutanonol (**2**).

Column : YMC J'sphere ODS-H80(150×4.6 mm, S-4 μm, 80A) (YMC Co., Japan).

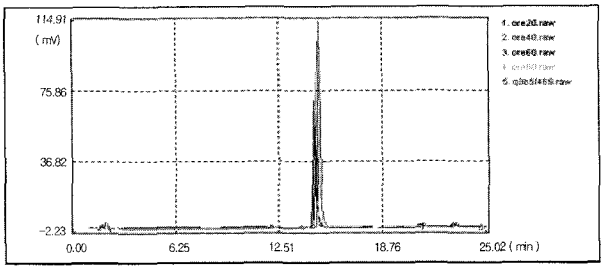
실험방법 – 오리나무, 물오리나무, 물갬나무수피를 건조하여 가루로 분쇄하고 각각 2 g 씩 취하여 80% MeOH 50 m*l* 로 2~3시간씩 3회 가온 추출 하여 이를 합한 후 여과하여 농축하고 그 농축액을 정확히 50 m*l*(80% MeOH)에 녹여 미지검액으로 하였다. 단, 6월에 채집한 물갬나무수피의 경우 oregonin과 hirsutanonol의 농도가 검량선에 포함되도록 이미 조제한 미지검액을 각각 30배와 2배 희석하여 미지검액으로 사용하였다. 물갬나무의 수피로부터 분리, 정제한 표품인 oregonin과 hirsutanonol을 각각 2 mg 을 정확히 취해 80% MeOH를 가하여 전체량이 20 m*l*가 되도록 하여 stock solution(100 ppm)을 조제하였다. 이 stock solution을 희석하여 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액을 20 μ*l*씩 취하여 HPLC chromatogram을 얻었고, 여기서 얻은 농도에 따른 peak area를 바탕으로 검량선을 작성하였다. 표품 oregonin과 hirsutanonol의 분석조건을 아래와 같이 설정한 다음, 이 분석조건에 따라 각각의 시료중 oregonin (**1**)과 hirsutanonol (**2**)의 정량을 실시하였다.

- mobile phase : Gradient solvent system-Solvent A (H_2O), Solvent B (CH_3CN)
- temperature : room temp.
- flow rate : 1.0 m*l*/min
- wavelength : 280 nm
- column : YMC J'sphere ODS-H80(150×4.6 mm, S-4 μm, 80A)

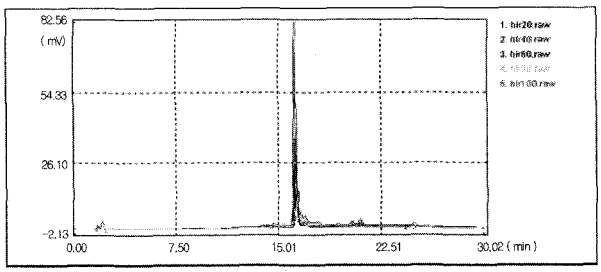
	0 min	12 min	24 min
Solvent A (H_2O)	90	75	60
Solvent B (CH_3CN)	10	25	40

결과 및 고찰

우리나라의 오리나무속 식물의 주된 자생종인 오리나무 *A. japonica*, 물오리나무 *A. hirsuta* 및 물갬나무 *A. hirsuta* var. *sibirica*의 수피로부터 주 diarylheptanoid인 oregonin (**1**)과 그의 aglycone인 hirsutanonol (**2**)을 HPLC에 의해 분석하였다. 본 실험에서는 C_{18} 역상 column을 사용하여, 전개분리되는 최적용매조건을 찾기 위하여 이동상으로 H_2O와 acetonitrile을 여러 가지 혼합비율로 혼합하여 그 분리능을 측정 검토한 결과, 용매조건은 H_2O : acetonitrile=90 : 10의 조성에서 시작하여 24분후 H_2O : acetonitrile=60 : 40인 gradient mode에서 분석이 잘 되었으며, 파장은 280 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었다. 이러한 조건에서 **1**과 **2**의 각 표준용액을 20 μ*l* 씩 취하여 HPLC chromatogram을 얻



oregonin (1)



hirsutanonol (2)

Fig. 1. HPLC chromatograms of standard oregonin (**1**) and hirsutanonol (**2**).

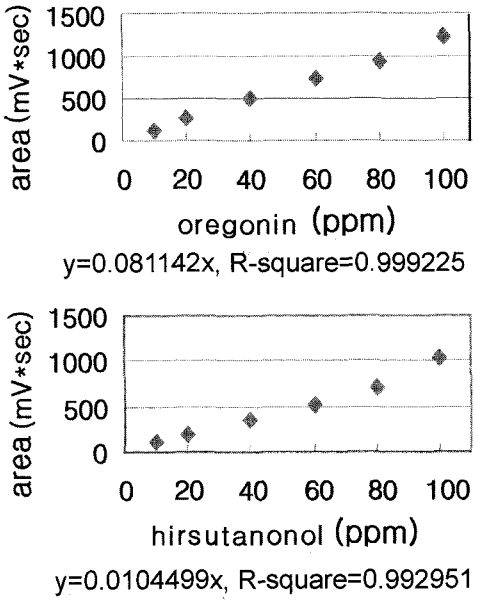


Fig. 2. Standard calibration curves of **1** and **2**.

었고(Fig. 1), 여기서 얻은 peak area와 농도의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 10-100 ppm의 농도범위에서 희귀 직선방정식은 1과 2가 각각 y=0.081142x, y=0.0104499x이고, R-square값이 각각 0.999225, 0.992951로서 1.0에 근접하여 그 직선성이 인정되었다(Fig. 2).

또한 표품 1과 2의 retention time과 미지검액중의 **1**과 **2**

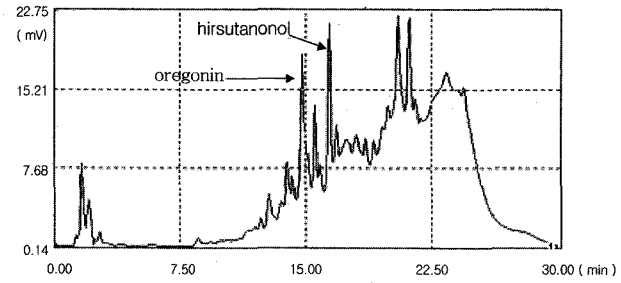


Fig. 3. HPLC Chromatogram of **1** and **2** from the barks of *Alnus japonica* (collected in Novemver, 2004).

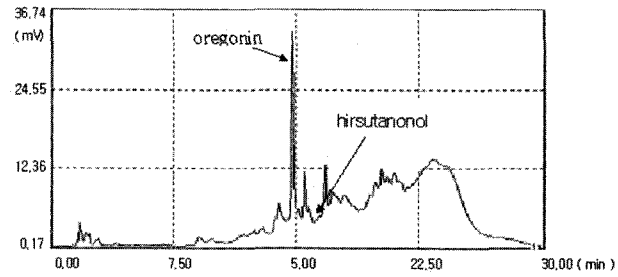


Fig. 4. HPLC Chromatogram of **1** and **2** from the barks of *Alnus hirsuta* (collected in Novemver, 2004).

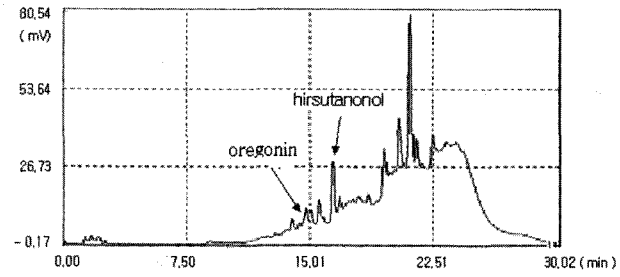


Fig. 5. HPLC Chromatogram of 1 and 2 from the barks of *Alnus hirsuta* var. *sibirica* (collected in Novemver, 2004).

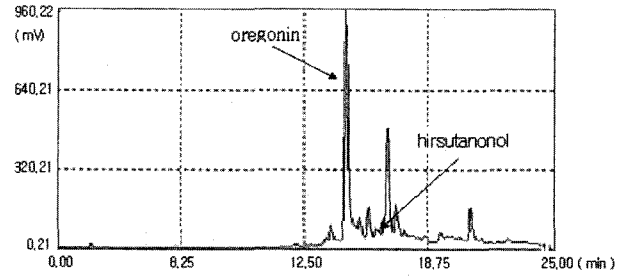


Fig. 6. HPLC Chromatogram of **1** and **2** from the barks of *Alnus hirsuta* var. *sibirica* (collected in June, 2004).

Table I. Quantitative determination of **1** and **2** from barks of *A. japonica* (November), *A. hirsuta* (November), *A. hirsuta* var. *sibirica* (November and June, 2004)

Material	Content of Diarylheptanoids (Mean±1.96×S.E.%)	
	oregonin	hirsutanonol
A. japonica (November)	0.054±0.000	0.093±0.002
A. hirsuta (November)	0.090±0.002	0.027±0.002
A. hirsuta var. *sibirica* (November)	0.038±0.011	0.122±0.002
A. hirsuta var. *sibirica* (June)	7.063±0.011	0.433±0.016

의 retention time이 동일함을 확인할 수 있었으며 HPLC분석에 의한 각 미지검액의 chromatogram으로부터 얻은 오리나무, 물오리나무, 물갬나무의 수피에서의 1과 2의 평균 peak area를 각각의 표준용액 검량선에 의하여 함량을 결정하였다(Fig. 3~6, Table I).

그 결과, Alnus속 식물중 오리나무 및 물갬나무(11월채집)는 2 의 함량(0.093±0.002%, 0.127±0.002%)이 **1**의 함량(0.054±0.000%, 0.038±0.011%)보다 많았으며, 물오리나무(11월채집)에서는 **1**의 함량(0.090±0.002%)이 2의 함량(0.027±0.002%)보다 많았다. 또한 물갬나무는 6월에 채집한 것은 배당체인 **1**의 함량(7.063±0.011%)이 aglycone인 **2**의 함량(0.433±0.016%)보다 월등히 많았으나, 11월에 채집한 것은 oregonin의 함량(0.038±0.011%)이 hirsutanonol의 함량(0.122±0.002%)보다 적어 이는 계절적인 요인에 의한 것으로 판단된다.

결 론

현재 많은 흥미있는 생리활성이 보고되고 있는 diarylheptanoid glycoside인 oregonin (**1**)과 그의 aglycone인 hirsutanonol (**2**)의 *Alnus*속 식물중 오리나무(*Alnus japonica*), 물오리나무(*Alnus hirsuta*), 물갬나무(*Alnus hirsuta* var. *sibirica*)의 수피중의 함량을 HPLC를 통하여 검토한 결과 diarylheptanoid glycoside인 oregonin (**1**)의 함유량은 11월에 0.038~0.093%, hirsutanonol (**2**)은 0.027~0.122%에 이르는 높은 함유상태를 나타내었으며 oregonin (**1**)의 경우 물오리나무의 수피가, hirsutanonol (**2**)은 물갬나무가 자원적측면에서 우수하게 나타났다. 특히, 물갬나무의 경우로 볼 때 이들 diarylheptanoid는 11월보다는 6월에 더욱 높은 함량으로 함유된 것으로 파악되었으며 배당체인 oregonin (**1**)이 상대적으로 많이 함유된 것으로 나타났다.

인용문헌

1. (1985) 中藥大辭典(3권), p3042(1985) 小學館, 東京

2. Lee, S. J. (1966) 40, Korean Folk Medicine, 서울
3. Lee, M. W., Park, M. S., Jeong, D. W., Kim, K. H., Kim, H. H. and Toh, S. H. (2000) Diarylheptanoids from the leaves of *Alnus hirsuta* Turcz. *Arch. Pharm. Res.*, **23**: 50-53.
4. Jeong, D.W., Kim, J. S., Cho, S. M., Lee, Y. A., Kim, K. H., Kim, S. W. and Lww, M. W. (2000) Diarylheptanoids from the stem barks of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*. *Kor. J. Phamacog.*, **31**: 28-33.
5. Lee, M. W., Jeong, D. W., Lee. Y. A., Park, M. S., Jeong, D. W. and Toh, S. H. (1999) Flavonoids from the leave of *Alnus hirsuta*. *Yakhak Hoeji*, **43**: 547-552.
6. Ahn, K. W., Toh, S. H., Jeong, D. W., Kim, J.S., Cho, S. M. and Lee, M. W. (2000) Flavonoids from the leave of *Alnus maximowiczii* Call. Yakhak Hoeji, **44**: 41-46.
7. Lee, M, W., Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1992) Hirsunin, an ellagitannin with a diarylheptanoid moiety from *Alnus hirsuta var. microphylla*. *Phytochemistry*, **31**: 967-970.
8. Lee, M, W., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. (1992) Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*. *Phytochemistry*, **31**: 2835-2839.
9. Cho, S. M., Kwon, Y. M., Lee, J. Yon, K. H. and Lee, M. W. (2002) Melanogenesis inhibitory activities of diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* Turcz in B16 mouse melanoma cell. *Arch. Pharm. Res.*, **25**: 885-888.
10. Lee, M. W., Kim, J. H., Jeong, D. W., Ahn, K. H., Toh, S. H. and Surh, Y. J. (2000) Inhibitory of cyclooxygenase-2 expressione by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**: 517-518.
11. 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. (2000) Diarylheptanoids with *in vitro* inducible nitiric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsuta*. *Planta. Med.*, **66**: 551-553.
12. Lee, Y. A., Jeong, D. W., Kim, K. H., Kim, J. S., Kim, S. W. and Lee, M. W. (2000) Antioxidant effect of diarylheptanoids from *Alnus hirsuta*. *Yakhak Hoeji*, **47**: 193-196.
13. Lee., J. H., Yeom, S. H., Kim, M. K., Kim, H. J., Shim, J. G. and Lee M. W. (2003) Antioxidative activity of diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* and their structural relationship. *Kor. J. Pharmacog.* **34**: 190-192.

(2004년 12월 10일 접수)