생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
49(4) : 336 ~ 340 (2018)

효소분해에 따른 물오리나무 Diarylheptanoid 화합물의 함량 변화

왕혜수 · YIN JUN · 황인혁 · 이민원*
중앙대학교 약학대학

Variation of Diarylheptanoid from *Alnus sibirica* Fitch. Ex Turcz. Processed Enzymatic Hydrolysis

Hye Soo Wang, JUN YIN, In Hyeok Hwang, and Min Won Lee*
Laboratory of Pharmacognosy and Natural Product Derived Medicine, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea

Abstract – *Alnus sibirica* Fisch. ex Turcz.(AS) geographically distributes in Korea, Japan, Northeast China and Russia. The bark of *Alnus* species have been used as traditional medicine for the treatment of allergic skin diseases. The content evaluation of compounds which were isolated from the barks of *A. sibirica* processed enzymatic hydrolysis(EAS); hirsutanonol(**1**), 5-*O*-methylhirsutanonol(**2**), rubranol(**3**), hirsutenone(**4**) and muricarpone B(**5**) was conducted using HPLC. Consequently, in EAS, the content of glycoside was decreased considerably. But the aglycones(**1**, **3** and **4**) were increased highly and **2**, **5** were formed newly.

Keywords – *Alnus sibirica*, Hirsutanonol, Hirsutenone, Enzymatic hydrolysis, HPLC

Alnus 속 식물 중 국내 자생식물인 물오리나무*(Alnus sibirica,* AS)는 한국, 중국, 일본 그리고 러시아에서 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 이 물오리나무의 수피는 전통적으로 외상성 손상, 비출혈 등에 널리 이용되어 왔다.[1] 또한 AS가 함유하고 있는 diarylheptanoids,[2,3] triterpenoids,[4] flavonoids[5]와 같은 페놀성 화합물들은 항산화, 항염증 등과 같은 생리활성을 갖고 있으며,[6-8] 이전 연구를 통해서 물오리나무의 수피 발효물에 대한 항아토피 활성을 확인하였다.[9]

효소는 생물학적 촉매제이며 배당체(glycoside)에 결합된 당을 수소원자로 대체하여 비당체(aglycone)로 분해한다. 화합물에 당이 연결될수록 친수성이 높아지며 화학적 활성이 낮아진다.[10] 따라서 생물학적 활성을 높이기 위해 가수분해 효소는 생물전환의 중요한 역할을 맡고 있으며, 이는 다양한 산업적 용도로 널리 이용되고 있다.[11] 본 연구에 이용된 효소는 α-amylase로 *Aspergillus oryzae*로부터 생성된 것이다.

본 연구에서는 EAS로부터 분리한 diarylheptanoid 화합물들에 대하여 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 사용하여 밸리데이션 및 함량평가를 실시하였다.

*교신저자(E-mail) : mwlee@cau.ac.kr
(Tel) : +82-2-820-5602

재료 및 방법

기기 및 시약 – 밸리데이션과 함량분석에 사용된 High-Performance Liquid Chromatography(HPLC) 기기는 Waters 600E Multi-solvent Delivery System(Waters, USA) 모델을 이용하였으며, 컬럼은 Hector C18 column(5 μm, 250×4.6 mm)을 이용하였다. HPLC 분석 용매는 acetonitrile, acetic acid, water(Honey well, USA)를 이용하였으며, 모든 표준용액과 검액의 조제는 Whatman® Membrane filters(0.45 μm, diam. 47 mm)로 여과하여 사용하였다. 본 연구에 이용된 효소는 α-amylase로 *Aspergillus oryzae*로부터 생성된 것이며 Novozyme사의 'Fungamyl super AX'을 이용하였다.

재료 – 본 실험에 사용된 AS가지의 소재는 서울특별시 동작구 국사봉(2015. 01)에서 채집하였다. 채집한 AS가지는 김성식 연구관(국립수목원)의 검증을 받았다. 확증표본은 AS-2015-01이며, 중앙대학교 약학대학 표본실에 보관되어 있다. 3일간 건조시킨 AS 수피(2.8 kg)을 분쇄 후, 실온, 80% prethanol-A 용매 조건으로 3일씩 3회 반복 추출 하여 추출물 121 g을 확보하였다. 효소가수분해는 추출물:효소:증류수를 1:3:1 비율로 섞어 실온에서 3일간 반응 시켰다. 그리고 화합물은 이전 연구를 통해 확보된 것을 사용하였다.[12]

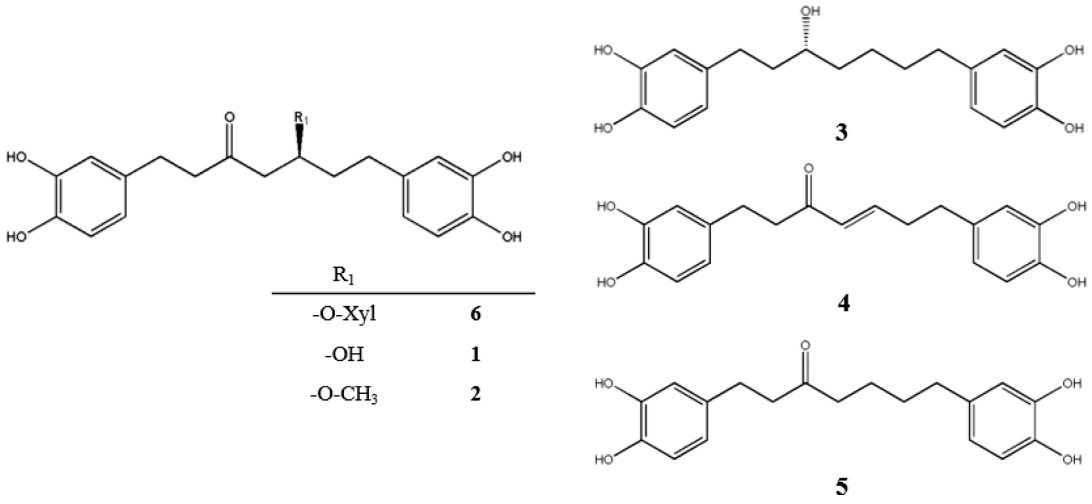

Fig. 1. The structures of **1-5** isolated from EAS.

표준용액과 검액의 조제 – Hirsutanonol(**1**), 5-*O*-methylhirsutanonol(**2**), rubranol(**3**), hirsutenone(**4**), muricarpon B (**5**)를 70% MeOH에 녹여 stock solution을 조제했다. Hirsutanonol 표준용액의 농도는 2300, 1150, 575, 287.5 μg/mL로 조제하였으며, 나머지 화합물들의 표준용액의 농도는 1000, 500, 250, 125 μg/mL로 조제하였다.

검액은 AS, EAS 추출물 5 mg을 취해 70% MeOH 1 mL에 녹여 sample로 이용하였다.

HPLC 조건 – 화합물들(**1-5**)의 정량은 HPLC를 이용하였다. 분석조건은 flow rate 1 mL/min, 이동상으로 A line; 0.2% Acetic acid-H_2O, B line; Acetonitrile을 이용하여 Table I과 같은 조건으로 각 시료에 대한 함량분석을 실시하였다(Table I).

분석에 이용한 UV 파장은 280 nm로 설정하여 함량분석을 하였고, injection volume은 10 μL로 하였다.

특이성(Specificity) – 지표성분이 효소가수분해 물오리나무 추출물 내 다른 물질과 간섭 없이 분리가 되는 것에 의해 특이성을 확인한다.

Table I. HPLC analysis condition

HPLC condition			
Flow rate	1 mL/min		
UV detection	280 nm		
Gradient	Time (min)	A(%) 0.2% Acetic acid – H_2O	B(%) Acetonitrile
	0 min	95	5
	20 min	75	25
	35 min	60	40
	38 min	0	100
	48 min	0	100

직선성(Linearity) – 직선성 평가를 위한 검량선을 얻기 위해 화합물들(**1-5**)을 70% MeOH로 희석하여 각 4 개의 농도가 되도록 용액을 만들어 실험을 진행하였다. Linear regression equation(y = ax+b y: peak 면적, x: 시료 농도 a: 직선의 기울기, b: y절편)을 구하였으며 상관계수(R^2)의 값을 통해 직선성을 확인하였다. R^2의 값이 0.999이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

정량한계(LOQ) – 분석물질의 정량 가능한 최저농도 확인을 위하여, 정량한계(LOQ)를 측정하였다. 정량한계(LOQ)는 QL=10×σ/S(σ: 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)의 식을 이용해 계산하였다. 기울기 S는 분석물질의 검량선으로부터 구하였으며, 회귀직선에서 y절편의 표준편차를 표준편차 σ로서 활용하였다.

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) – 동일 농도의 시료에 대하여 일간 및 일내 변동을 알아보기 위해 정밀성 및 정확성 평가를 실시하였다. 화합물들(**1-5**)의 표준용액을 시료 농도당 3일간 반복성 시험, 일내 3회 반복성 시험을 하였다. 각 농도 범위는 hisutanonol은 2300, 1150, 575, 287.5 μg/mL이었고 나머지 화합물들의 농도 범위는 모두 1000, 500, 250, 125 μg/mL의 농도로 진행하였다. 정확성은 표준값과 측정값 간의 일치되는 정도로 확인하였으며, 정밀성은 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 측정값들 사이의 근접성으로 측정하였다.

함량분석 – 화합물(**1-5**)의 함량은 linear regression equation을 이용해 계산하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석조건 확립 – 지표성분(**1-5**)의 최적 분석법을

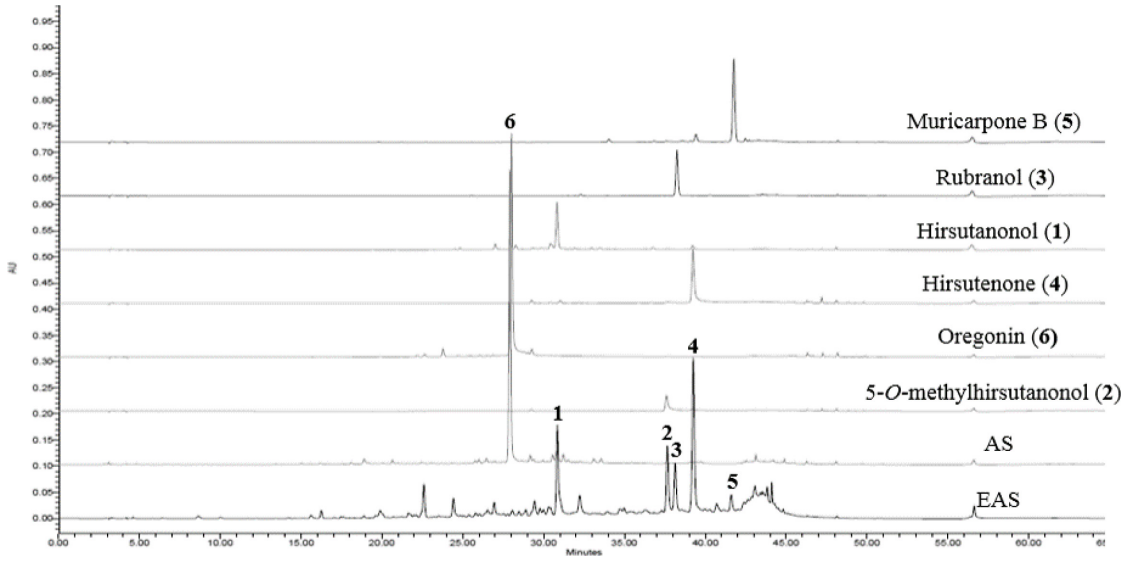

Fig. 2. HPLC chromatograms of AS, EAS at 280 nm.

Table II. Contents of compounds (**1-5**)

		Contents(%)				
	Compound	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
EAS	Extract	27.43	5.35	5.78	6.99	2.72
	Original plant	1.10	0.21	0.23	0.28	0.11
AS	Extract	0.98	-	1.13	0.42	-
	Original plant	0.04	-	0.05	0.02	-

확립하였다. Flow rate 1 mL/min, 이동상 용매 A: 0.2% Acetic acid-H_2O, B: acetonitrile을 선정하여 각각 gradient elution을 적용하였다. 이를 통해 검액의 피크를 다른 물질의 간섭 없이 명확하게 분리할 수 있었다(Fig. 2).

특이성(Specificity) – HPLC를 이용해 EAS 추출물의 chromatogram을 비교해 화합물들(**1-5**)의 retention time(RT)을 확인한 결과, 각 hirsutanonol(**1**)의 피크는 30.81분, 5-*O*-methylhirsutanonol(**2**)의 피크는 37.62분, rubranol(**3**)의 피크는 38.11분, hirsutenone(**4**)의 피크는 39.21분, muricarpone B(**5**)의 피크는 41.56분에서 다른 물질의 간섭 없이 성분의 피크가 분리된 것을 확인하였다. 표준용액의 RT은 (**1**); 30.82분, (**2**); 37.63분, (**3**); 38.24분, (**4**); 39.02분, (**5**); 41.76분으로 표준용액의 피크 유지기간과 효소가수분해 물오리나무 추출물 내의 피크 유지기간이 거의 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증하였다(Fig. 2).

직선성(Linearity) – 검량선의 Linear regression equation은 다음과 같았다. (**1**)Y=1309.1X-143570이며, 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9997, (**2**)Y=5539.9X-396070이며, R^2는 0.9998, (**3**)Y= 3092.1X-146577이며, 검량선의 상관계수(R^2)는 1, (**4**)Y= 9222.2X-341971이며, 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9998, (**5**)Y= 3437.6X-202672이며, 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9997이다. 함량분석 결과, 모든 화합물의 검량선 모두 R^2가 0.9990 이상으로 나타나 높은 직선성을 보이고 있음을 확인하였다(Table III).

정량한계(LOQ) – 정량한계(LOQ)는 공식을 이용하여 그 값을 구하였다. hirsutanonol(**1**)은 155.37 μg/mL, 5-*O*-methylhirsutanonol(**2**)은 27.25 μg/mL, rubranol(**3**)은 40.39 μg/mL, hirsutenone(**4**)은 20.68 μg/mL, muricarpon B(**5**)은 27.90 μg/mL으로 측정되었다. 이를 통해 미량도 정량 가능함을 확인하였다(Table III).

정확성(Accuracy) **및 정밀성**(Precision) – Hirsutanonol (**1**)의 정확성은 94.18~101.34% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.74~1.31%로 양호한 값을 나타내었다. 5-*O*-methylhirsutanonol(**2**)의 정확성은 95.54~102.59% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.44~1.31%로 양호한 값을 나타내었다. Rubranol(**3**)의 정확성은 97.56~101.32% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.72~1.30%로 양호한 값을 나타내었다. Hirsutenone(**4**)의 정확성은 95.90~101.51% 이내로 확인하였

Table III. Linear ranges, linear regression equation and LOQ of compounds (**1-5**)

Compounds	Linear range (μg/mL)	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient (R^2)	LOQ (μg/mL)
1	287.5~2300	1309.1	-143570	0.9997	155.37
2	125~1000	5539.9	-396070	0.9998	27.25
3	125~1000	3092.1	-146577	1	40.39
4	125~1000	9222.2	-341971	0.9998	20.68
5	125~1000	3437.6	-202672	0.9997	27.90

Table IV. Precision and accuracy for the determination of compounds (**1-5**)

Compounds	Conc. (μg/mL)	Accuracy(%)		Precision(c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
1	2300	0.89	0.80	99.94	99.63
	1150	1.10	1.31	100.03	101.32
	575	0.84	0.74	101.38	101.35
	287.5	0.93	1.02	97.55	94.18
2	1000	1.02	1.31	99.78	99.87
	500	0.15	0.44	100.69	101.06
	250	0.66	0.56	101.94	102.59
	125	0.48	0.50	95.09	95.54
3	1000	0.42	0.72	99.94	99.94
	500	0.42	0.80	99.86	100.08
	250	1.76	1.21	102.49	101.32
	125	0.70	1.30	96.05	97.56
4	1000	0.50	0.53	99.70	99.66
	500	0.54	0.74	101.34	101.51
	250	0.47	0.66	100.02	100.38
	125	0.71	0.75	96.78	95.90
5	1000	0.48	1.12	99.71	99.63
	500	0.58	1.02	101.13	101.57
	250	0.50	0.79	101.27	101.06
	125	1.97	0.89	95.25	94.60

으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.53~0.75%로 양호한 값을 나타내었다. Muricarpon B(**5**)의 정확성은 94.60~101.57% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.79~1.12%로 양호한 값을 나타내었다(Table IV).

함량분석 – Table I의 HPLC 조건을 적용해 검체의 피크를 분리하였다(Fig. 2). Hirsutanonol(**1**), 5-*O*-methylhirsutanonol (**2**), rubranol(**3**), hirsutenone(**4**), muricarpon B(**5**)의 함량은 EAS prethanol 추출물 대비 각 27.43%, 5.35%, 5.78%, 6.99%, 2.72%가 함유되어 있음을 확인하였다. 또한, 원소재의 건조 중량 대비 화합물(**1-5**)의 함량은 각 1.10%, 0.02%, 0.23%, 0.28%, 0.11%로 확인되었다.

AS의 주요 화합물인 oregonin(**6**)의 5번 탄소에 붙어있는 xylose가 효소에 의해 분해 되고 산화, 환원 반응에 의해 비당체(**1-5**) 화합물이 새로 생성되거나 증가하였다. AS와 EAS의 추출물 함량을 비교하였을 때 (**1**)은 0.98%에서 27.43%로, (**3**)은 1.13%에서 5.78%로, (**4**) 0.42%에서 6.99%로 크게 증가하였으며, (**2**), (**5**)의 peak는 새로 생성되었다(Fig. 2, Table II).

결 론

Hirsutanonol(**1**), 5-*O*-methylhirsutanonol(**2**), rubranol(**3**), hirsutenone(**4**), muricarpon B(**5**)를 지표성분으로 이용한 밸

리데이션 실험에 의해 분석법의 특이성, 직선성, 정량한계, 정밀성, 정확성을 검토하여 분석법을 검증하였다.

확립한 분석을 이용하여 함량분석을 시행한 결과, EAS 추출물에는 hirsutanonol(**1**), 5-*O*-methylhirsutanonol(**2**), rubranol(**3**), hirsutenone(**4**), muricarpon B(**5**)이 각 27.43%, 5.35%, 5.78%, 6.99%, 2.72%가 함유되어 있음을 확인하였다. 또한, 원소재의 건조 중량 대비 화합물(**1-5**)의 함량은 각 1.10%, 0.02%, 0.23%, 0.28%, 0.11%로 확인되었다. 연구의 결과로 EAS추출물에 존재하는 화합물의 함량분석에 있어서 중요한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발 사업의 지원을 받아 연구되었음(117046-3).

인용문헌

1. Pui-hay, B. P. and Sung, C. K. (2001) International collation of traditional and folk medicine. 606-607, World scientific publishing company, Singapore.
2. Nomura, M., Tokoroyama, T. and Kubota, T. (1981) Biarylheptanoids and other constituents from wood of *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **20**: 1097-1104.
3. Lee, M., Pak, M., Jeong, D., Kim, K., Kim, H. and Toh, S. (2000) Diarylheptanoids from the leaves of *Alnus hirsuta* Turcz. *Arch. Pharm. Res.* **23**: 50-53.
4. Suga, T., Ohta, S., Ohta, E. and Aoki, T. (1986) A C31-seco-dammarane-type triterpenic acid, 12-deoxy alnustic acid, from the female flowers of *Alnus pendula*. *Phytochemistry* **25**: 1243-1244.
5. Suga, T., Iwata, N. and Asakawa, Y. (1972) Chemical constituents of the male flower of *Alnus pendula* (*Betulaceae*). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **45**: 2058-2060.
6. Choi, E. J., Ko, H. H., Lee, M. W., Bang, H. and Lee, C. S. (2008) Inhibition of activated responses in dendritic cells exposed to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid by diarylheptanoid oregonin. *Int. Immunopharmacol.* **8**: 748-755.
7. Lee, M., Kim, N., Park, M., Ahn, K., Toh, S., Hahn, D., Kim, Y. and Chung, H. (2000) Diarylheptanoids with in vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsuta*. *Planta Med.* **66**: 551-553.
8. Choi, S., Park, K., Jeong, M., Kim, H., Lee, D., Joo, S., Lee, C., Bang, H., Choi, Y. and Lee, M. (2011) Effect of *Alnus japonica* extract on a model of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J. Ethnopharmacol.* **136**: 406-413.
9. Yin, J., Yoon, S. H., Ahn, H. S. and Lee, M. W. (2018) Inhibitory Activity of Allergic Contact Dermatitis and Atopic Dermatitis-Like Skin in BALB/c Mouse through Oral Administration of Fermented Barks of *Alnus sibirica*. *Molecules* **23**: 450.
10. Sun, H., Chen, L., Wang, J., Wang, K. and Zhou, J. (2011) Structure–function relationship of the saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* for hemolytic and adjuvant activity. *Int. Immunopharmacol.* **11**: 2047-2056.
11. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**: 309-316.
12. Le, T. T., Yin, J. and Lee, M. (2017) Anti-Inflammatory and anti-oxidative activities of phenolic compounds from *Alnus sibirica* stems fermented by *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis*. *Molecules* **22**: 1566.

(2018. 10. 30 접수; 2018. 11. 14 심사;
2018. 11. 29 게재확정)