

물오리나무 유래 고함량 Oregonin 추출방법 및 생리활성 연구

최선은*

광주여자대학교 미용과학과

Extraction Method and Physiological Activity of High Content Oregonin Derived from Plant of *Alnus sibirica* Fisch. ex Turcz

Sun Eun Choi*

Department of Beauty Science, Kwangju Women's University

Abstract – Oregonin is known as a representative active substance of plants of the *Alnus* species. In this study, we will show the results of establishing a method for extracting trace amounts of useful substances in plants. Additionally, a variety of physiological activity studies were conducted with extracts containing high content of useful substances. In this study, anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of supercritical fluid residue 60% EtOH extracts of *Alnus sibirica* (ASCFR) were investigated *in vitro*. To explore anti-oxidant and anti-inflammatory characteristics of supercritical extract, DPPH radical scavenging, and ABTS radical scavenging activity, inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and β -hexosaminidase release in IgE-stimulated RBL-2H3 cells were examined, respectively. Results showed a concentration-dependent increase in DPPH and ABTS radical scavenging activity. Cells stimulated with LPS produced more nitric oxide than normal control cells. However, cells treated with supercritical fluid residue 60% EtOH extract decreased production in a concentration-dependent manner. In anti-allergic activity studies, ASCFR showed concentration-dependent anti-allergic activity. Based on results and strong antioxidant activity, ASCFR has potential as basic research materials for development of therapeutic supplements-based medicines or functional cosmetics related to chronic inflammatory skin immunity diseases.

Keywords – *Alnus* species, Supercritical extraction residue, Oregonin, Anti-oxidative, Anti-allergic

Betulaceae(자작나무과)에 속하는 오리나무 속(*Alnus spp.*) 식물은 한국, 미국, 일본, 중국 등 북반구에 분포하며 국내에는 오리나무(*Alnus japonica* Steudel)를 포함하여 17종이 자생하는 것으로 알려져 있다.^{1,2)}

*Alnus*속 식물의 가장 특징적인 화합물은 diarylheptanoid 계열의 화합물이 존재하고 있다는 점이 많은 연구자들에 의해서 밝혀진 바 있다. *Alnus*속(*A. rubra*, *A. hirsuta*, *A. japonica*)의 나무를 절단하였을 때 적갈색으로 변색하는 물질을 추적하여 diarylheptanoid의 배당체인 oregonin을 분리하여 구조를 결정한 다수의 보고를 비롯하여, 세계 많은 연구자들에 의해서 *Alnus*속 식물의 화학적계통분류 연구로서 oregonin을 지표물질로 한 연구 보고도 다수 발표된바 있다.³⁻¹⁶⁾

한편, *Alnus*속 식물에서 분리된 diarylheptanoid류에는 항

산화작용, 설사 및 항암효과, mouse melanoma cell line B16-F10에 대해 증식억제 효과 NO생성을 억제, cyclooxygenase-2 inhibitory effect, 5-lipoxygenase inhibitor로써 작용하여 dermal inflammation에 효과, 혈소판 응집억제 작용, PKC alpha inhibitor, anti-tumor promoting activity, prostaglandin 생합성에 각종 효소작용 저해, 항균, 간보호 등의 효과가 보고된 바 있으며, 최근에는 항아토피 효능에 대한 *in vitro* 생리활성 연구와 NC/Nga 마우스를 활용한 생리활성 연구가 보고되었고, 인체 모유두 세포로부터 산화적 스트레스를 유발하여 세포사멸(apoptosis)을 유도한 후 oregonin이 세포사멸 조절 능력을 검증한 항탈모 효능 등이 밝혀진 바 있음에 따라서 *Alnus*속 식물의 유효물질이나 지표물질의 대표 화합물을 diarylheptanoid계열 중에서도 유독 oregonin을 특징적으로 주목하는 견해에 대해서는 전 세계 많은 연구자들의 관심이 높다고 할 수 있다.¹⁷⁻²⁷⁾

이처럼 다양한 생리활성 효능이 밝혀져 있고, 유용 작물로 평가되고 있는 diarylheptanoid의 배당체인 oregonin을 고

*교신저자(E-mail): oregonin@kwu.ac.kr
(Tel): +82-62-950-3675

함량으로 새롭게 추출하는 방법을 연구하여 유용자원 활용을 극대화 하고자 이번 연구를 수행 하게 되었다.

한편, 본 연구자는 최근 국내 자생 느릅나무 가지를 초임계 추출하여 항산화, 항균, 항염증 등의 다양한 생리활성을 보고한 바 있다.²⁸⁾ 그리고 느릅나무 초임계 추출박 60%주정 추출물을 대상으로 다양한 생리활성을 연구를 발표한 바 있었다.²⁹⁾ 이처럼 선행 연구를 통해서 초임계 추출박을 재 활용하는 연구의 결과 중 기존에 통상적인 추출물들과는 다른 우수한 생리활성과 더불어 높은 폴리페놀 화합물의 존재를 확인한 경험을 토대로 *Alnus*속 식물을 초임계 추출 후에 남은 자원 즉, 초임계 추출박의 자원 재활용의 가치를 검증하기 위해서 물오리나무 초임계 추출박을 60%주정 추출하여 항산화, 항염증, 항알러지 활성 연구를 수행하였다. 또한, 기존에 잘 알려진 추출방법인 열수추출과 주정 추출물과의 함량비교 분석 실험을 실시하여 새롭게 제시되는 추출방법의 유용성과 그 추출물의 생리활성에 대한 새로운 효능을 제시하여 향후 신규의 천연물 유래 기능성 신소재로서의 가능성을 객관적으로 검토해 보고자 본 연구를 수행 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 - 물오리나무(*A. sibirica* Fisch. ex Turcz)는 2019년 4월 서울약령시장 천지가약초에서 구입을 하였고, 경기도 포천시에 위치한 국립수목원에서 진혜영 연구관(국립수목원)으로부터 식물학적 감정한 후 실험에 사용하였으며, 표준품은 광주여자대학교 천연 기능성 소재 연구실에 보관하고 있다(AS2019-05).

기기 및 시약 - ^1H 및 ^{13}C -NMR spectra는 JEOL-JNM-AL300(300MHz, 75MHz)로 측정하였다. High pressure liquid chromatography(HPLC)는 Waters 2695 system(USA)을 이용하였으며, 세부적으로는 2487 dual rhamda absorbance detector, guard column은 Phenomenex KJ0-4282 guard column을 사용하였고, column은 SkyPak C18(5 μm , 250 \times 4.6 mm)을 사용하였으며, column oven temperature는 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였고, mobile phase는 다음과 같이 즉, 1% distilled water(D.W.)(A), acetonitrile(B)로 구성하였으며, data system은 Empower 2 softwaer(Waters Co., USA)를 각각 이용하였다. LC/MS는 Shimadzu prominence UFLC-MS system, pump A는 LC-30AD, pump B는 LC-30AD, detector는 SPD-20A, auto sampler는 SIL-20A XR, column oven은 CTO-20A, communications bus module은 CBM-20A, MS는 ESI-IT-TOF MS를 이용하였으며, LC condition은 각각 다음과 같다. 즉, column은 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C18 2.1 \times 150 mm, 1.7 μm , column oven temperature는 35 $^{\circ}\text{C}$, UV detector 설정은 280 nm, injection volume은

1 μL , flow는 0.21 mL/min, solvent A는 water in 0.1% formic acid, solvent B는 acetonitrile, solvent condition이며, MS condition은 nebulizing gas flow는 1.5 L/min, CDL temperature는 200 $^{\circ}\text{C}$, heat block temperature는 200 $^{\circ}\text{C}$ 를 각각 설정하여 실험에 활용하였다.²⁷⁾

Thin layer chromatography(TLC) plate는 pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ plate(Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. 항산화활성 측정용 시약인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), L-ascorbic acid는 Sigma Aldrich(Milw., WI, USA)에서 구입하였고, potassium persulfate(Samchun, Korea), 99.5% ethanol은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 각각 구입하여 사용하였다. 흡광도는 ELISA reader(TECAN, Salzburg, Austria)를 사용하여 측정하였다.²⁷⁾

초임계추출장비는 초임계유체추출연구용장비(ISA-SEFE-0500-0700-080, Ilsin Autoclave, Daejeon, Korea)와 초임계유체추출시험생산장비(SCFE-P400, Ilsin Autoclave, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 사용한 물오리나무 가지를 서울약령시장에서 구입하여 이물질 제거하고 세척한 후, 음건하여 실험재료로 사용하였다. 건조된 시료 100 kg을 200 mesh의 분쇄망을 통과하도록 분쇄하고, 분쇄된 물오리나무 가지를 추출조의 온도를 50 $^{\circ}\text{C}$ 로 조절하여 온도를 유지시켰다. 온도가 안정화되면 물오리나무 가지 시료를 넣고 CO₂ 가스를 등압으로 유지시킨 후, 고압펌프를 이용하여 line을 통해 실험압력 조건인 400 bar에 도달할 때까지 control valve를 조절하여 주입하였다. 설정 압력에 도달 후 추출조 하부로 에탄올(HPLC grade)을 분당 3 mL씩 60분 동안 총 180 mL를 투입하여 추출을 진행하였으며, 시료에 남아있는 잔존 에탄올을 제거하기 위해 설정된 압력과 온도로 30 min 동안 고압펌프를 이용하여 CO₂를 흘려보내며 추출을 완료 하였다.²⁷⁾

이상과 같이 수피를 포함한 물오리나무 가지를 초임계 추출을 하고 난 후의 물오리나무 초임계 추출박 시료 중 79.97 kg을 음건하여 60% 주정으로 실온에서 1회 추출하여 여과하였다. 그 추출액을 감압농축 및 동결건조를 실시해 최종 1.84 kg을 확보한 후 실험에 사용 하였다.

추출 및 분리 - 수피를 포함한 물오리나무 가지를 각각 1kg을 절단한 후 60% EtOH으로 실온에서 1회 추출하여 여과하였다. 그 추출액을 감압 농축과 동결건조를 통해 최종 66.1g을 확보 하였고, HPLC loading용으로 정량하여 실험에 사용하였다.

또한, 열수 추출물은 100 $^{\circ}\text{C}$ 로 4시간을 가열하여 1회 추출 및 여과하여 그 추출액을 감압 농축 및 동결건조를 통해 최종 36.6g을 확보 하였고, HPLC loading용으로 정량하여 실험에 사용하였다.

초임계 추출박 60% 주정 추출물과 기존에 전통적인 추출 방식인 60% 주정 추출과 열수추출을 각각 실험용으로 조

제하여 HPLC 분석용 실험에 사용하였다.

기준에 실험실에서 보유중인 오리나무 수피로부터 분리, 정제한 표품인 oregonin(1)을 1 mg을 정확히 취해 80% MeOH를 가하여 전체량이 1 mL가 되도록 하여 stock solution(1000 ppm)을 조제하였다. 이 stock solution을 희석하여 100, 250, 500, 1000 ppm 농도의 표준용액을 조제하였다. 표준용액을 20 mL 씩 취하여 표준용액이 잘 분리되는 HPLC chromatogram을 얻었다. 또한 실험의 재현성을 위해 반복실험을 통해서 표준용액과 물오리나무 가지 추출물 미지검액의 retention time(RT)의 평균과 표준오차를 구하였다.

표품의 분석조건을 아래와 같이 설정한 다음, 반복정제를 통해서 oregonin 표준품과 동일한 RT값을 나타내는 peak를 수집하여 단일 화합물을 확보하여 NMR과 LC/MS데이터를 측정하였다.

HPLC 분석조건 - 이동상의 조건은 Solvent A(H₂O)와 Solvent B(CH₃CN)를 각각 혼합하여 사용하였으며, 용매 혼합의 비율은 다음과 같다. 즉, 10% Solvent B로 시작하여, 12min까지 25% Solvent B, 24min까지 40% Solvent B, 25min부터 40min까지 10% Solvent B를 gradient system을 적용하였고, 유량은 1 mL/min, wavelength는 280 nm, inject volumn은 20 µL, total run time은 40 min, column oven 온도는 25°C로 분석조건을 적용하였으며, guard column은 Phenomenex KJ0-4282 Guard column을 사용하였고, 분석용 column은 SkyPak C18(5 µm, 250×4.6 mm)를 사용하여 분석을 하였다.²⁷⁾

LC/MS 분석조건 - LC 조건은 다음과 같이 설정하여 수행하였다. column은 Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 2.1×150 mm, 1.7 µm, column oven의 온도는 35°C, UV detector는 254 nm, injection volume은 1 µL, 유량은 0.21 mL/min 으로 각각 설정하여 분석을 시행하였으며, Solvent A(0.1% Acetic acid-H₂O)와 Solvent B(CH₃CN)를 각각 혼합하여 사용하였으며, 용매 혼합의 비율은 다음과 같다. 즉, 5% Solvent B로 시작하여, 20 min까지 60% Solvent B, 24 min까지 60% Solvent B, 25 min부터 30 min까지 5% Solvent B를 gradient system을 적용하였다. 한편, MS 조건은 nebulizing gas flow는 1.5 L/min, CDL temperature는 200°C, heat block temperature는 200°C로 각각 설정하여 분석에 적용하였다.²⁷⁾

Oregonin (1) Brown amorphous powder, Positive LC/MS *m/z* : 501 [M+Na]⁺, Negative LC/MS *m/z*: 477 [M-H]⁻

¹H-NMR (300MHz, DMSO-*d*₆+D₂O): δ6.61-6.53(4H in total, H-2', 2", 5', 5"), 6.42-6.37(2H in total, H-6", 6'), 4.25(1H, brd, *J*=7.8Hz, xyl-1), 4.13 (1H, m, H-5), 3.72 (1H, dd, *J*=11.4, 6Hz xyl-5e), 3.27(1H, m, xyl-4), 3.07-

2.50 (8H in total, H-1,2,4,7), 1.66-1.59 (2H in total, m, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆+D₂O) : δ 28.4 (C-1), 30.3 (C-7), 39.7 (C-6), 44.9 (C-2), 47.2 (C-4), 65.8 (xyl-5), 69.5 (xyl-4), 74.3 (xyl-2), 76.6 (C-5, xyl-3), 102.6 (xyl-1), 115.4 (C-2', C-2"), 115.6 (C-5'), 115.7 (C-5"), 118.8 (C-6', C-6"), 132.9 (C-1'), 133.0 (C-1"), 143.1 (C-4', C-4"), 145.8 (C-3'), 145.9 (C-3"), 209.0 (C-3)

DPPH 프리 래디칼 소거작용의 측정 - Hatano *et al.*³⁰⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 즉 시료를 각 농도별로 조제한 용액 100 µL(control : 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액(99.5% ethanol) 1.9 mL를 가한다. 각 시료는 5가지 농도로 조제하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation 시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 L-ascorbic acid를 5가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 IC₅₀ 치(DPPH 래디칼 형성을 50%로 억제하는 데 필요한 농도)로 나타내었다.

ABTS 프리 래디칼 소거작용의 측정 - ABTS 래디칼 소거 활성은 Re *et al.*³¹⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. ABTS(Sigma Co. USA) 시약을 증류수에 용해하여 7.0 mM의 농도로 준비하고, potassium persulfate(Sigma Co. USA)를 증류수에 용해하여 2.45 mM 농도로 준비하여 두 용액을 1:1 비율로 섞어서 12~16시간 동안 암실상태로 방치하여 radical stock solution을 제조하고 제조된 solution을 PBS buffer(pH 7.4)로 희석하여 750 nm에서 흡광도를 측정하여 0.7~1.0 사이의 흡광값이 나오도록 희석하여 준비하였다.

농도별로 시료를 준비하여 96 well plate에 sample:ABTS 반응 비율을 1:9로 맞춰서 30분동안 암실에서 반응을 시키고, 반응이 끝난 후 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Mouse Macrophage RAW 264.7 cell 배양 - Mouse macrophage RAW 264.7 cell은 한국 세포주 은행에서 동결 상태로 구입하였으며 cell이 들어있는 앰플을 미온수(30-40°C)에 바로 녹여 10% FBS(fetal bovine serum), penicillin G(100 IU/mL), streptomycin(100 µg/mL)을 포함한 DMEM 배지를 이용하여 동결 과정에서 넣어준 DMSO를 제거하고, DMSO를 제거한 RAW 264.7 cells에 DMEM을 5 mL 넣어, 온도 37°C와 5%의 CO₂를 유지하면서 incubator에서 배양하였으며, 1-2일마다 세포의 성장 정도에 따라 계대 배양하였다.

RBL-2H3세포 배양 - RBL-2H3세포는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)로부터 구매하였으며, 15% Fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)과 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin(Gibco, USA)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, USA)에 2 mM L-glutamine(Gibco, USA)를 첨가한 배지에서 배양하

었다. 성장배지는 2-3일 마다 교환해 주었으며, 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다.

MTT Assay – 본 실험에서 RAW 264.7 cells과 RBL-2H3 cells에 대한 물오리나무 가지 초임계 추출박 주정 추출물의 세포 독성 및 실험 시 처리 농도를 결정하기 위해 MTT assay를 실행하였다.³²⁾

Nitric Oxide 생성 억제 작용 측정 – Nitric oxide 생성 억제 작용은 Griess의 방법^{33,34)}으로 측정하였다. 즉, Griess reagent(1% sulfanilamine, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄)는 NO를 산화시켜 NO₂로 변화시키며 생성된 NO₂는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 그 농도를 NaNO₂의 검량선을 이용하여 구하였다. 즉, RAW 264.7 cell을 DMEM으로 medium 1 mL 당 5×10⁴개 만큼 배양시킨 다음, 1 mL 당 1×10⁴개로 희석하여 96 well에 160 μL씩 넣고 2시간 동안 배양해서 cell들이 부착되도록 한 다음 LPS(1 μg/mL) 10 μL을 포함한 각각의 시료를 20 μL씩 넣고 20시간 배양시킨 후, 배양액에 생성되어 있는 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 정량하였다.

β-Hexosaminidase Assay – Cell seeding은 RBL-2H3 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 24 well plate에 2×10⁵ cells/mL의 세포수가 되도록 분주하였다. Cell sensitization은 세포 분주 후 500 ng/mL 농도의 anti-DNP(dinitrophenol) Ig E로 감작하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 배양하였다. Cell activation은 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH7.2)로 2번 세척한 다음 각 well당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA가 포함된 Siraganian buffer에 추출물을 농도별로 첨가한 후 30분 동안 37°C, 5%, CO₂ incubator에서 배양하고, dinitrophenol-conjugated human serum albumin(DNP-HSA)-specific IgE의 농도가 100 ng/mL이 되도록 처리하여 10분 동안 반응시킨 후, ICE bath에 10분 동안 방치하여 반응을 종결시켰다. 얻어진 상등액은 3분간 3,000 rpm에서 원심분리 시킨 후, 상등액 30 μL를 96 well plate에 옮기고 동량의 substrate buffer(1 mM 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 0.1 M citrate buffer pH 4.5)를 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 0.1 M carbonate buffer 200 μL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader(TECAN, Salzburg, Austria)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.³⁵⁾

통계 처리 – 본 연구의 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균값±표준편차로 나타내었으며, 각 실험 농도 별 표준차이를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며, 유의성이 발견된 경우 Tukey's HSD test³⁶⁾에 의해 농도 간의 유의성을 분석하였다. 모든 자료의 통계처리는 SPSS(Statistical Package for Science, version 24.0 SPSS Inc, Chicago, IL,

USA)를 사용하여 처리하였고, 유의수준 α=0.05로 하였다.

결과 및 고찰

Oregonin의 구조동정 – TLC plate상에서 10%-H₂SO₄ 및 FeCl₃ 용액에 의한 발색과 ¹H, ¹³C-NMR, MS spectrum data를 기존 문헌³⁷⁾과 비교하여 각각 일치함을 확인하여 oregonin으로 최종 동정하였다(Fig. 1).

추출물별 Oregonin 함량분석 – Oregonin을 추출 방법별로 함량의 변화를 HPLC를 이용한 정량 분석은 다음과 같이 실시 하였다.

본 실험에서는 C₁₈ 역상 column을 사용하여, 전계 분리되는 최적용매조건을 찾기 위하여 이동상으로 H₂O와 acetonitrile을 여러 가지 혼합비율로 혼합하여 그 분리능을 측정 검토한 결과, 용매조건은 H₂O : acetonitrile = 90 : 10의 조성에서 시작하여 24분후 H₂O : acetonitrile = 60 : 40인 gradient mode에서 분석이 잘 되었으며, 파장은 280 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었다. 이러한 조건에서 oregonin 표준용액을 100-1000 ppm 다양한 농도의 시료가 유의성 있게 retention time이 확인이 되었고, 확보된 HPLC chromatogram(Fig. 2)을 근거로 여기서 얻은 peak area와 농도의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 100-1000 ppm의 농도범위에서 회귀 직선방정식은 y = 2485.5x - 19996이고, R-square값이 0.9987로서 1.0에 근접하여 그 직선성이 인정 되었다.

또한 표품인 oregonin의 retention time과 추출물별 분석 시료의 retention time이 거의 동일함을 확인할 수 있었다 (Table I).

HPLC분석에 의한 추출물별 chromatogram으로부터 수피를 포함한 물오리나무 가지에서 분리된 oregonin의 표준용액 검량선에 의하여 함량을 결정하였으며, 열수추출물은 131.82±0.17 ppm, 60% 주정 추출물은 280.27±0.14 ppm으로 각각 확인할 수 있었다. 끝으로 초임계 추출박 60% 주정 추출물에서 oregonin을 함량 분석을 한 결과에서는 810.13±0.15 ppm으로 확인이 되어, 열수추출물 대비 614.57%

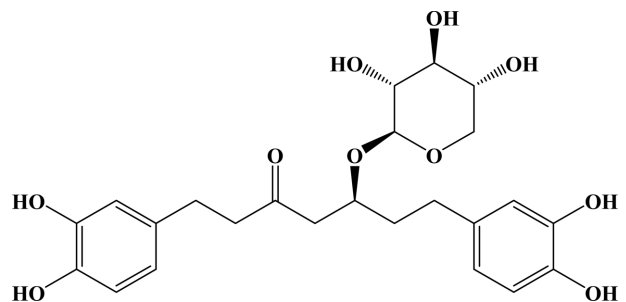
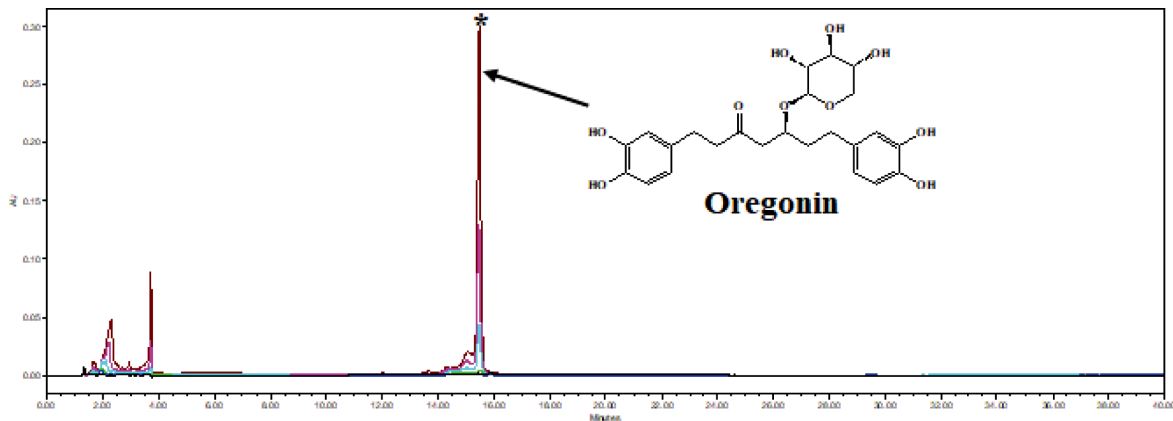


Fig. 1. The structure of oregonin (1).



* Oregonin detected 15.462±0.19 min.

Fig. 2. Chromatogram of oregonin (100-1000ppm) by HPLC.

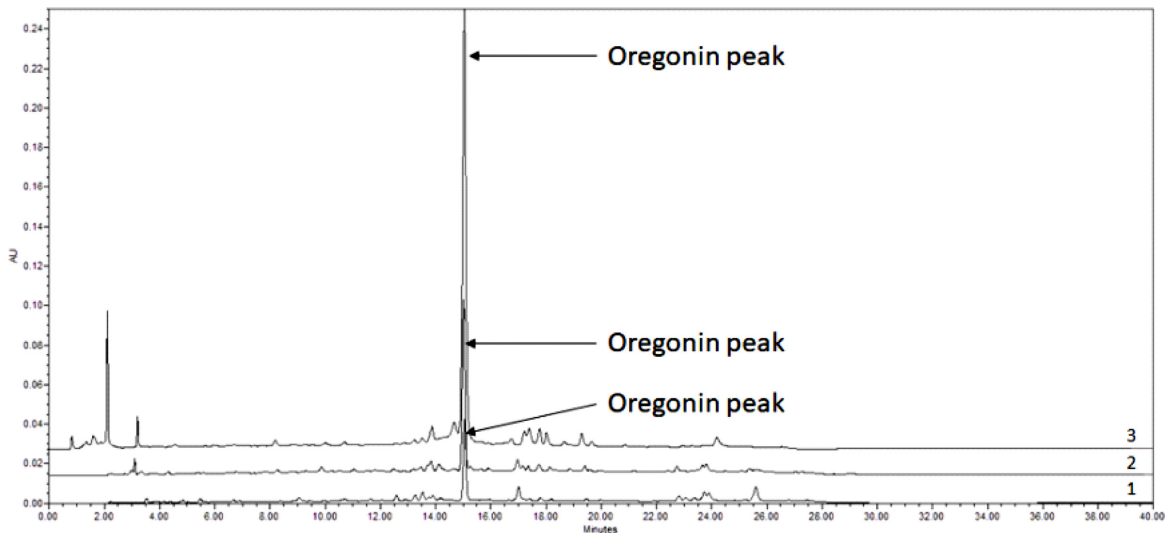


Fig. 3. Chromatogram of *A. sibirica* 60% how water (1), 60% EtOH (2), supercritical fluid residue 60% EtOH (3) extracts by HPLC.

Table I. Retention time of oregonin from branch (with barks) of *A. sibirica* Fisch. ex Turcz according to the kinds of extract

Samples	Retention Time (min)
Oregonin	15.462±0.19
<i>A. sibirica</i> hot water extract	15.050±0.15
<i>A. sibirica</i> 60% ethanolic extract	15.129±0.14
<i>A. sibirica</i> Supercritical fluid extract residue 60% EtOH extract	15.094±0.12

The results are expressed as means±S.D (n=3).

항상, 일반적인 60% 주정 추출물 대비 289.05% 향상된 oregonin 함량이 확인되어 기존 추출방법 대비 매우 높은 고

함량 oregonin 추출 방법이라는 것을 과학적으로 검증 되었다(Fig. 3, Table II).

초임계 추출을 실시한 이후에는 원물에 포함되어 있는 지용성 성분의 물질들이 고압의 이산화탄소 가스와 보조용매인 주정의 상호작용들로 인해서 oregonin 화합물의 함량이 기존에 전통적인 추출방법들에 비해 높은 함량이 확인되었다고 사료된다. 이는 천연물 연구 방법에서 흔히 활용되는 activity guided isolation 방법 중 용매분획을 실시할 때 유용폴리페놀 화합물이 헥산이나 에테르로 지용성 성분을 제거한 후 에틸아세테이트나 부탄올 용매분획층에서 쉽게 발견되는 것과 유사한 논리라고 사료된다. 다만, 기존의 용매분획에서 항상 동반되는 유기용매의 위해성과 낮은 효율 그리고 폐유기용매의 처리 및 잔존용매의 염려 등에서부터

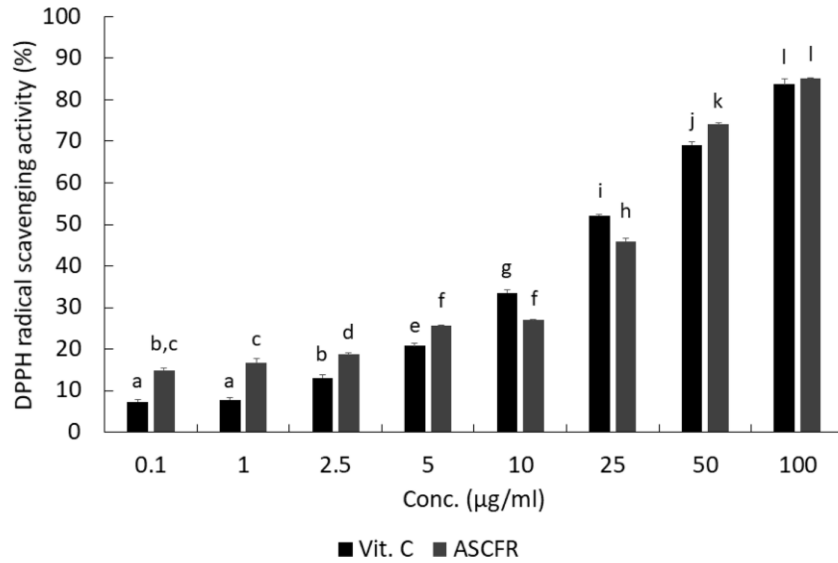


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of supercritical fluid residue 60% EtOH extracts of *Alnus sibirica* (ASCFR). Values were expressed as mean±S.D. of three determinations. Values were expressed as mean±S.D. of at least three determinations. Values bearing different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test (a>b>c>d>e>f>g>h>i>j>k>l).

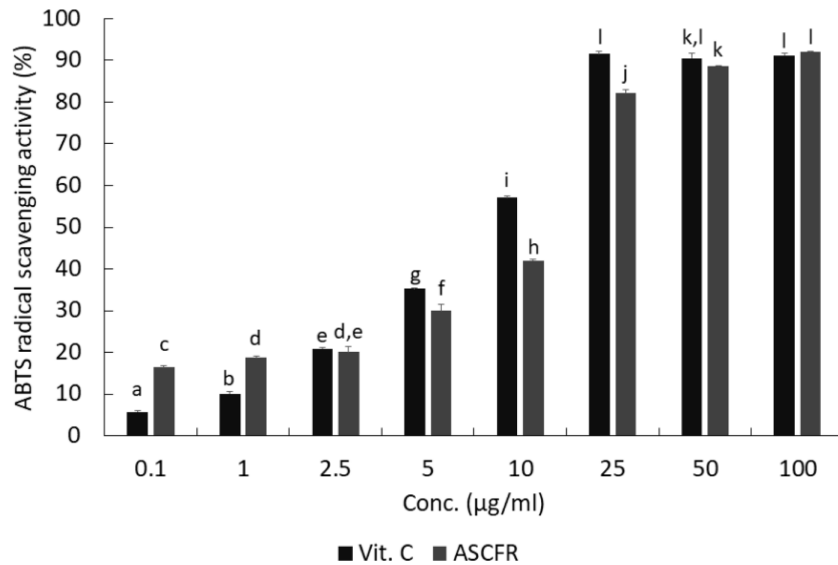


Fig. 5. ABTS radical scavenging activities of supercritical fluid residue 60% EtOH extracts of *Alnus sibirica* (ASCFR). Values were expressed as mean±S.D. of three determinations. Values were expressed as mean±S.D. of at least three determinations. Values bearing different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test (a>b>c>d>e>f>g>h>i>j>k>l).

진보된 추출방법이 초임계 유체 기술을 활용하는 방법이라고 사료된다.

DPPH, ABTS 프리라디칼 소거능 활성 - 수피를 포함한 물오리나무 가지 초임계 추출액 60% 주정 추출물의 항산화 활성을 검정하기 위해서 두가지 실험 방법인 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능 측정법을 통해서 항산화 활성을 양성대조군으로 잘 알려진 강력한 항산화제인 Vitamin C와 비교하여 실험을 수행한 결과 IC₅₀를 각각 비

교하였을 때, 물오리나무 가지 초임계 추출액 60% 주정 추출물은 DPPH 라디칼 소거능은 28.62±0.32 µg/ml, ABTS 소거능은 12.82±0.17 µg/ml로 각각 측정 되었으며, 양성대조군인 Vitamin C의 DPPH 라디칼 소거능은 15.87±0.25 µg/mL, ABTS 소거능은 8.35±0.15 µg/mL로 각각 측정된 결과 값이 나왔으며, 각 실험에서 사용한 농도 범위에서 DPPH 라디칼 소거능은 실험 최고 농도인 100 µg/mL에서는 양성대조군과 실험군의 실험 결과값이 통계적으로 유의적인 차

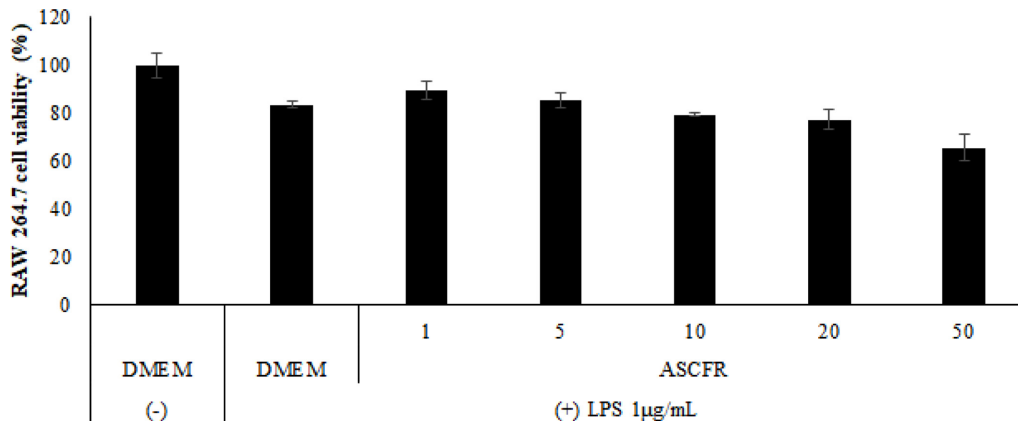


Fig. 6. Effects of supercritical fluid residue 60% EtOH extracts of *Alnus sibirica* (ASCFR) on the viability of mouse RAW 264.7 macrophage cells. The cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance. Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table II. Contents of oregonin in branch (with barks) of *A. sibirica* Fisch. ex Turcz according to the kinds of extract

Samples	Contents (mg/g)
<i>A. sibirica</i> hot water extract	131.82±0.17
<i>A. sibirica</i> 60% ethanolic extract	280.27±0.14
<i>A. sibirica</i> Supercritical fluid extract residue 60% EtOH extract	810.13±0.15

이가 나지 않았으며, ABTS 라디칼 소거능에서는 실험 농도 중 50, 100 µg/mL 두가지 농도에서는 양성대조군과 실험군에서 통계적인 유의적인 군간 비교가 되지 않음이 각각 확인되어서 고농도로 갈수록 양성대조군과 동등이상의 매우 강력한 항산화 활성이 확인할 수 있었다(Fig. 4, 5). 또한, 최근 본 연구자가 발표한 오리나무 가지 60%주정 추출물과 그로부터 분리정제한 oregonin을 각각 항산화 활성을 연구한 결과와 이번 연구결과를 비교해 보면, 오리나무 가

지 60% 주정 추출물의 DPPH 라디칼 소거능의 IC₅₀는 57.64±0.62 µg/mL, ABTS 소거능의 IC₅₀는 13.18±0.11 µg/mL로 각각 측정되어 이번 실험 결과인 물오리나무 초임계 추출물 60% 주정 추출물의 항산화능이 기존의 결과 보다 항산화능이 높아진 것을 각각 확인할 수 있었다.

한편, 기존에 발표한 연구결과에서 oregonin은 DPPH 라디칼 소거능의 IC₅₀는 14.46±0.08 µg/mL, ABTS 소거능의 IC₅₀는 4.05±0.04 µg/mL로 각각 측정되어 *Alnus*속 식물의 항산화능을 기반으로 한 다양한 생리활성의 근거 지표물질로서 oregonin 함량이 차이에 따른 생리활성의 차이가 나는 것에 대한 근거자료로 판단할 수 있다고 사료된다.²⁷⁾

Nitric Oxide(NO) 소거능 - 인체에서 과도하게 생성된 NO에 의해서 인체에 다양한 염증성 질환 특히, 류마티스 관절염, 아토피피부염 등과 같은 난치성 면역 질환의 염증반응이 악화시키므로 유해한 작용을 나타내게 된다. 염증 반응에 의한 NO생성의 저해는 만성염증성 질환에서 치료적

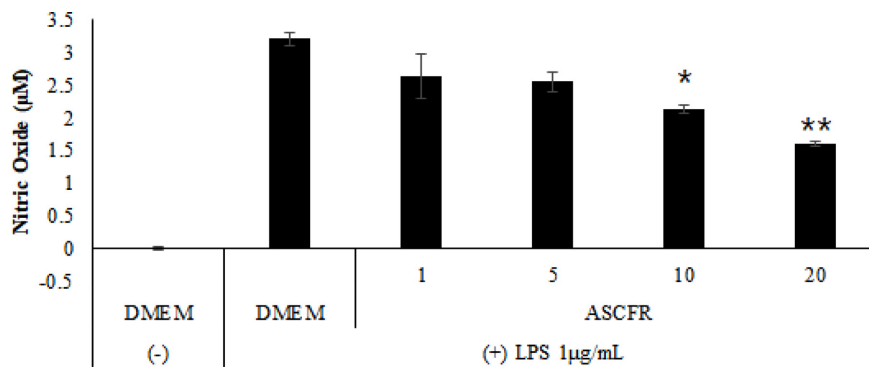


Fig. 7. NO contents of supercritical fluid residue 60% EtOH extracts of *Alnus sibirica* (ASCFR) in LPS stimulated mouse RAW 264.7 macrophage cells. Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

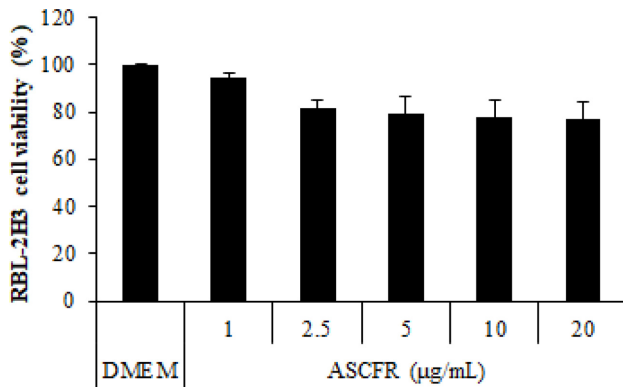


Fig. 8. Effects of supercritical fluid residue 60% EtOH extracts of *Alnus sibirica* (ASCFR) on the viability of mouse RBL-2H3 cells. The cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance. Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

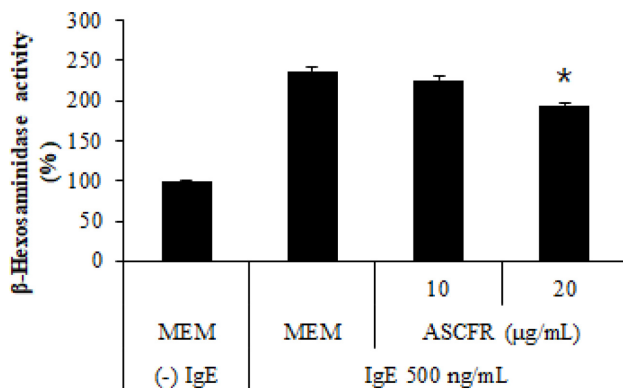


Fig. 9. Effects of supercritical fluid residue 60% EtOH extracts of *Alnus sibirica* (ASCFR) on β -hexosaminidase release. Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

방법으로 중요한 영역으로 알려져 있다.³⁸⁾ 물오리나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물의 난치성 면역 질환 천연 신소재로서 활용 가능성을 확인하기 위해서 Raw 264.7 macrophage cell line에서 LPS로 유도된 NO 생성 억제능을 실험하기에 앞서 실험에 사용된 농도 1-50 $\mu\text{g/mL}$ 모든 농도에서 MTT assay를 통해서 세포 독성을 확인해 본 결과는 Fig. 6에서와 같이 모든 실험군에서 통계적으로 유의성 있는 세포독성은 확인되지 않았지만, 실험 최고 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 세포독성의 경향을 감안하여 NO 측정 실험에서는 1-20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위에서 NO 소거능을 확인해 본 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 즉, 실험에 사용된 농도 중 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 음성 대조군인 LPS 유도군에 비해서 통계적

으로 유의성 있게 NO 소거능이 확인이 되었으며, Normal 대조군과 비교하였을 때 물오리나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물은 NO 소거능이 매우 강한 것으로 확인되어, 신규 천연물 유래 항염증 활성 천연 신소재로 개발이 가능할 것으로 사료되며, 특히 만성 염증성 면역 질환에 적용 가능한 기능성 소재로 활용할 것으로 기대된다.

β -Hexosaminidase 탈과립 억제에 의한 항알러지 효능 평가 - 물오리나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물의 항알러지 효능 검정을 위해서 RBL-2H3 세포를 대상으로 최소농도 1 $\mu\text{g/mL}$ 부터 최고농도 20 $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포독성을 MTT assay를 통하여 검정한 결과는 Fig. 8과 같이 확인이 되었다. 그에 따라서 β -hexosaminidase assay를 수행한 각각의 실험 농도에서는 RBL-2H3 세포에 어떠한 독성도 없음을 확인할 수 있었다. 세포독성이 없는 실험 농도를 가지고, β -hexosaminidase assay를 수행한 결과는 Fig. 9와 같이 확인이 되었다. 물오리나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물은 세포 독성이 없는 농도 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 두 농도에서 normal control군과 negative control군 두 개 군과 비교하였을 때, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 통계적으로 유의성 있게 β -hexosaminidase 분비를 억제하는 것이 확인이 되었다. 이상의 결과를 보아 물오리나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물은 β -hexosaminidase 분비 억제능이 통계적으로 유의성 있게 확인이 되어 향후 알러지성 질환과 관련된 천연물 유래 신소재로 개발 가능성이 높을 것으로 사료된다.

결 론

환경오염과 인체 유해성으로부터 최대한 벗어나 있는 친환경 추출 공법으로 알려져 있는 초임계 추출 기술을 새로운 활용 방안인 초임계 추출후 발생하는 추출박의 생약학적 자원의 고부가 가치성 및 자원 활용의 유용성을 과학적으로 검증하기 위해서 수피를 포함한 물오리나무 초임계 추출박을 60% 주정 추출을 실시하여 천연물 유래 신기능성 소재로서의 가능성을 향산화, 항염증, 항알러지 활성 및 HPLC를 활용한 oregonin 함량 분석을 각각 실시하였다.

DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능 실험으로 확인한 향산화 활성 검증에서는 기존에 연구 보고했던 오리나무 추출물과 양성대조군인 비타민 C와 비교하였을 때 매우 강력한 향산화 활성을 각각 나타났음을 확인할 수 있었다.²⁷⁾

본 실험에서 항염증 실험으로 확인한 방법인, NO 소거능 실험을 통해서 물오리나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물의 향산화 활성을 기반으로 한 유의성 있는 항염증 활성이 확인이 되었다.

또한, RBL-2H3 세포를 대상으로 β -hexosaminidase 분비 억제능으로서 항알러지 효능을 실험한 결과 통계적으로 유

의성 있는 항알러지 효능이 확인되었다.

끝으로, *Alnus*속 식물의 다양한 생리활성의 주된 유효물질이자 지표 화합물질로 주목되고 있는 oregonin을 HPLC를 활용하여 함량분석을 실시한 결과 기존에 생약 연구 및 관련 산업계에서 널리 활용하고 있는 추출방법인 열수와 60%주정 추출 대비 현저하게 증가된 고함량 oregonin 추출물 제조에 대한 명확한 근거를 제시되었으며, 이번 연구에서 실시한 다양한 생리활성에서 검증한 항산화, 항염증 및 항알러지 활성이 매우 강력하고 우수한 근거가 확인이 되었다.

이상의 실험 결과를 종합하면 수피를 포함한 물오리나무 가지 초임계 추출 후에 발생하는 추출박의 주정추출물은 강력한 항산화 활성과 통계적으로 유의성 있는 항염증 및 항알러지 효능을 기반으로 하여 산화적 스트레스 관련 질환과 만성 염증성 질환, 알러지성 질환 중 특히 난치성 면역질환과 더불어 최근에 본 연구팀에서 발표한 oregonin 유래 항탈모²⁷⁾에 적용이 가능한 천연물 유래 신소재로서 적용이 충분히 가능한 소재로 기대된다.

사 사

이 논문 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. NRF-2017R1C1B5016051)이며, 일부의 연구결과는 2019 학년도 광주여자대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음(과제번호: KWUI19-017).

인용문헌

- Lee, Y. N. (1997) Flora of Korea, Kyohak Publishing, Seoul.
- Lee, W. C. (1996) Lineamenta florae Koreae, Academy Publishing, Seoul, p154.
- Karchesy, J. J. and Laever, A. M. L. (1974) Structure of oregonin, a natural diarylheptanoid xyloside. *J. C. S. Chem.* **16**: 649-650.
- Choi, S. E. (2013) Chemotaxonomic significance of oregonin in *Alnus* species. *Asian J. Chem.* **25**: 6989-6990.
- Asakawa, Y. (1971) Chemical constituents of *Alnus sieboldiana*(Betulaceae) II. The isolation and structure of flavonoids and stilbenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **44**: 2761-2766.
- Lee, M. W., Tanaka, T., Nonakr, G. I. and Nishioka, I. (1992) Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **31**: 2835-2839.
- Lim, H. W., Kim, M. K., Kim, H. J., Shim, J. G., Kim, G. H., Choi, H. K. and Lee, M. W. (2004) Quantitative determination of diarylheptanoid compounds from Korean *Alnus*, *Kor. J. Pharmacogn.* **35**: 384-387.
- Lee, K. K., Bahler, B. D., Hofmann, G. A., Mattern, M. R., Johnson, R. K. and Kingston, D. G. I. (1998) Isolation and structure elucidation of new PKC α inhibitor from *Pinus flexilis*. *J. Nat. Prod.* **61**: 1407-1409.
- Ohta, S., Aoki, T., Hirata, T. and Suga, T. (1984) The structures of four diarylheptanoid glycosides from the female flowers of *Alnus serrulatoidea*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **8**: 1635-1642.
- Suga, T., Ohta, S., Hirata, T. and Aoki, T. (1982) The absolute configuration of diarylheptanoid xyloside, oregonin, isolated from the female flowers of *Alnus serrulatoidea*. *Chem. Lett.* **11**: 895-898.
- Karchesy, J. J., Laver, M. L., Barofsky, D. F. and Barofsky, E. (1974) Structure of oregonin, a natural diarylheptanoid xyloside. *Chem. Commun.* **16**: 649-650.
- Guz, N. R., Lorenz, P. and Metraux, J. P. (2002) Oregonin from the bark of European *Alnus* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**: 471-474.
- Aoki, T., Ohta, S. and Suga, T. (1990) Triterpenoids, diarylheptanoids and their glycosides in the flowers of *Alnus* species, *Phytochemistry* **23**: 3611-3614.
- Choi, H. N., Joung, S. W., Jin, H. Y. and Choi, S. E. (2016) Oregonin from the barks and xylems of Chinese *Alnus* species. *J. Chem. Pharm. Res.* **8**: 295-298.
- Choi, S. E., Park K. H., Kim, M. H., Song, J. H., Jin, H. Y. and Lee, M. W. (2012) Diarylheptanoids from the Bark of *Alnus pendula* Matsumura. *Nat. Prod. Sci.* **18**: 106-110.
- Ko, E. K., Choi, H. N., Jin, H. Y. and Choi, S. E. (2015) Oregonin from the stems and leaves of Korean *Alnus* species (Betulaceae). *J. Chem. Pharm. Res.* **7**: 234-238.
- Sin, S. J. and Ahn, W. Y. (1991) Some triterpenoids in bark of Korean water alder, *Alnus Hirsuta* Ruprecht. *J. Kor. For. En.* **11**: 36-44.
- Sheth, K., Bianchi, E., Wiedhopf, R. and Cole, J. R. (1973) Antitumor agents from *Alnus oregonia* (Betulaceae). *J. Pharm. Sci.* **62**: 139-140.
- Kawai, N., Ando, Y. U., Ando, Y. O. and Nishibe, Y. (1990) Extraction of antitumor tannins from *Alnus firma* plant. *Patent-Japan Kokai Tokyo Koho-O2* **117**: 685.
- Saxena, G., Farmer, S., Hancock, R. E. W. and Towers, G. H. N. (1995) Antimicrobial compounds from *Alnus rubra*. *Int. J. Pharmacogn.* **33**: 33-36.
- Lee, D. I., Chang, J. K., Lee, M. W. and Hong, S. G. (1998) Effects of oregonin, diarylheptanoid derivative from plant on antitumor. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **12**: 67-72.
- 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 nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsuta*. *Planta. Med.* **66**: 551-553.
- Lee, M. W., Kim, J. H., Jeong, D. W., Ahn, K. H., Toh, S. H. and Surh, Y. J. (2000) Cyclooxygenase-2 inhibitory effect of diarylheptanoids from the barks of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*. *Bio. Pharm. Bull.* **23**: 517-518.

24. Lee, Y. A., Jeong, D. W., Kim, K. H., Kim, J. S., Kim, S. W. and Lee, M. W. (2000) Antioxidant activity of diarylheptanoids from the leaves of *Alnus hirsuta*. *Yakhak Hoeji* **47**: 193-196.
 25. Yamazaki, R., Aiyama, R., Matsuzaki, T., Hashimoto, S. and Yokokura, T. (1998) Anti-inflammatory effect of YPE-01, a novel diarylheptanoid dervative, on dermal inflammation in mice. *Inflamm. Res.* **47**: 182-186.
 26. Choi, S. E., Jeong, M. S. Kang, M. J., Lee, D. I., Joo, S. S., Lee, C. S., Bang, H., Lee, M. K., Myung, S. C., Choi, Y. W., Lee, K., Seo, S. J. and Lee, M. W. (2010) Effect of topical application and intraperitoneal injection of oregonin on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.* **19**: 37-43.
 27. Lee, G. H., Park, K. H. and Choi, S. E. (2018) Modulative effect of human hair dermal papilla cell apoptosis by oregonin from the braches of *Alnus japonica*. *Korean J. Plant Res.* **31**: 322-329.
 28. Seo, J. H., Lee, Y. J., Jo, Y. I., Ko, J. Y., Mun, M. J., Park, K. H. and Choi, S. E. (2018) Anti-fungal, anti-oxidant, and anti-inflammatory effects of supercritical fluid extracts from *Ulmus davidiana*. *Journal of The Korea Convergence Society* **9**: 225-233.
 29. Mun, M. J., Park, K. H. and Choi, S.E. (2018) Biological activity of supercritical extraction residue 60% ethanolic extracts from *Ulmus davidiana*. *Journal of Convergence for Information Technology* **8**: 29-36.
 30. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., and Okuda, T. (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and ralated polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl radical, *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2016-2021.
 31. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231-1237.
 32. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63.
 33. Feelisch, M. and Stamler, J. (1996) Methods in nitric oxide research, United Kingdom : John Wiley & Sons, Chichester, 492-497.
 34. Park, S. Y., Hong, S. S., Han, X. H., Ro, J. S. and Hwang, B. Y. (2005) Inhibitory constituents of LPS-induced nitric oxide production from *Arctium lappa*, *Nat. Prod. Sci.* **11**: 85-88.
 35. Matsubara, M., Masaki, S., Ohmori, K., Karasawa, A. and Hasegawa, K. (2004) Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochemical Pharmacology* **67**: 1315-1326.
 36. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980) Principle and procedures of statistics. 1st ed. Kogakusha, Tokyo, Japan : McGraw-Hill 187- 221.
 37. Kim, H. J., Kim, K. H., Yeom, S. H., Kim, M. K., Shim, J. G., Lim, H. W. and Lee, M. W. (2005) New diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* Steudel, *Chin. Chem. Lett.* **16**: 1337-1340.
 38. Kharitonov, S. A., Yates, D., Robbins, R. A., Logan-Sinclair, R., Shinebourne, E. A. and Barnes, P. J. (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *The Lancet* **343**: 133-135.
- (2019. 7. 25 접수; 2019. 8. 12 심사; 2019. 9. 11 게재확정)