

대추로부터 베틀리닉 산과 알피톨릭 산의 분리 및 정량

배기환* · 이상명 · 이은실 · 이준성 · 강종성

충남대학교 약학대학

(Received April 18, 1996)

Isolation and Quantitative Analysis of Betulinic Acid and Alphitolic Acid from *Zyziphi Fructus*

Ki Hwan Bae*, Sang Myung Lee, Eun Sil Lee, Jun Sung Lee and Jong Seong Kang
College of pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract—Betulinic acid and alphitolic acid, the triterpenoids of *Zyziphi Fructus*, were isolated with silica gel column chromatography and used as the standard substances for the analysis. The compounds were determined with HPLC and HPTLC. They were separated on reversed phase column (Nova-Pak C₁₈) with 0.05 M Na₂HPO₄-methanol (19 : 81) in HPLC and detected at 210 nm. Separation on HPTLC precoated silica gel F₂₅₄ plates was carried out with chloroform-methanol (6 : 1) and the separated compounds were reacted with *p*-anisaldehyde and detected at 540 nm. The contents of betulinic acid and alphitolic acid in *Zyziphi Fructus* from four different regions in Korea were in the range of 2.9~3.8% and 3.2~3.9%, respectively.

Keywords □ *Zyziphi Fructus*, betulinic acid, alphitolic acid, HPLC, HPTLC.

대추(*Zyziphi Fructus*)는 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 대추나무(*Zyziphus jujuba* var. *inermis*)의 열매로서 국내에서 식용 또는 약용으로 쓰이고 있다. 성분으로는 pentacyclic triterpenoid계로 oleanolic acid, maslinic acid, betulinic acid 및 alphitolic acid 등^{1,2)}, dammarane계의 *zyziphus* saponin I, II, III, *jujuboside* 등³⁾이 보고되어 있고, 이외에도, glycoside로 ethyl- α -D-fructofuranoside⁴⁾, *zyzyboside* I, II, *vomifoliol* 6, 8-di-C-glycosyl-2-naringenin 등⁵⁾, alkaloid⁶⁾로 lysicamine, normuciferine, *zyziphusine* 등이, 기타 carbohydrate⁷⁾, scopoletin, cAMP⁸⁾, cGMP⁹⁾ 등이 분리 보고되었다. 약효에 관해서는 물, 에탄올 등의 추출물로부터 항산화작용¹⁰⁾, 항염증작용¹¹⁾, 진정작용⁶⁾, 항알러지작용⁴⁾, 항괴양작용¹²⁾ 등이 보고되어 있고 그중 triterpenoid 성분의 하나인 betulinic acid는

항 HIV 작용^{13,14)}, 항염증작용¹⁵⁾, 강력한 중앙억제작용¹⁶⁾이 있는 것으로 보고되고 있다. 최근들어 대추의 약효에 관심이 높아지고 있는 점과 관련하여 본 연구에서는 대추로부터 triterpenoid계 성분인 betulinic acid와 alphitolic acid를 분리하고 이를 표준물질로하여 HPLC와 HPTLC에 의한 대추의 분석법을 확립하였다. 이 방법에 의해 우리나라 전역에서 판매되는 대추에 함유된 이들 성분의 함량을 비교해 봄으로써, 약용으로 사용되고 있는 대추와 각종 제제에 함유된 대추의 품질평가의 가능성에 대하여도 검토하였다.

실험방법

시료, 시약 및 기기 - 대추는 서로 다른 4개지역(1996년 2월 서울 마포시장, 1995년 11월 충북 청주, 1995년 12월 대전 유성, 1995년 12월 경남 사천)에서 구입하였다. *p*-anisaldehyde는 Aldrich제품, HPLC용 메탄올은 Merck제품을 구입하여 사용하였고, 전개용매

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5925 (팩스) 042-821-5903

류 및 산. 염기는 특급, 물은 3차 증류수를 사용하였다. betulinic acid와 alphitolic acid의 표준품은 대추로부터 이들 성분을 분리하여 TLC 및 HPLC로 순도를 확인한 후 화학구조를 규명한 후 사용하였다. 기기는 IR spectrophotometer (Jasco Report-100), NMR (JEOL JNM-EX90), MS (JEOL JMS DX-303), HPLC pump (Shimadzu, LC-10AD), UV-VIS spectrometer (Shimadzu, SPD-10A), scanner (CAMAG, TLC Scanner 3), 시료점적기(CAMAG, Linomat IV), sprayer(CAMAG, TLC Sprayer), plate heater (CAMAG, TLC Plate Heater III) 등을 이용하였다.

표준품의 분리 - 대추 5 kg을 에탄올로 수욕상에서 3시간씩 2회 환류추출하였다. 추출된 에탄올용액을 여과하고 여액을 감압농축하여 에탄올엑스 (2 kg)를 얻었다. 이를 증류수 1리터에 현탁하여 헥산 1리터로 3회 진탕추출하고 헥산층을 제거한 여액에 에틸아세테이트 1리터로 3회 진탕추출하여 에틸아세테이트층을 얻고 이것을 농축하였다. 에틸아세테이트엑스(375 g)를 에틸아세테이트-아세톤(100 : 1~10 : 1)으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피하여 분획물 1(15 g), 2(3 g), 3(20 g), 4(300 g)를 얻었다. 분획물 2를 다시 실리카겔 컬럼크로마토그래피하여 (벤젠-아세톤=10 : 1) 조결정을 얻고, 클로로포름에서 재결정하여 compound 1을 얻었다. 분획물 3도 실리카겔 컬럼크로마토그래피하여 (벤젠-아세톤=10 : 1) 조결정을 얻고 메탄올에서 재결정하여 compound 2(60 mg)를 얻었다.

Compound 1 - 백색의 침상결정 (250 mg), mp 295~297°C; UV λ_{\max} (EtOH) 202.9 nm; IR ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹) 3450, 1680(C=O), 1640, 880 (C=C). ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.76, 0.83, 0.94, 0.97, 0.98 (each 3H, s, CH₃), 1.69 (3H, s, CH₃-30), 3.01 (1H, m, H-19), 3.18 (1H, dd, J=10.5, 4.4 Hz, H-3), 4.61 (1H, br s, H-29a), 4.74 (1H, br s, H-29b); EI-MS (*m/z*) 456 (M⁺), 438 (M⁺-H₂O), 248, 203 (248-COOH), 207 (M⁺-H₂O-H), 189 (207-H₂O).

Compound 2 - 백색의 침상결정, mp 275~278°C; UV λ_{\max} (EtOH) : 203 nm; IR ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹) : 3400 (OH), 1690 (C=O), 1640, 890 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃) δ , 0.84, 0.88, 0.97, 1.00, 1.04 (each s, -CH₃), 1.74 (3H, s, C₃₀-CH₃), 1.96 (3H, s, Ac), 3.

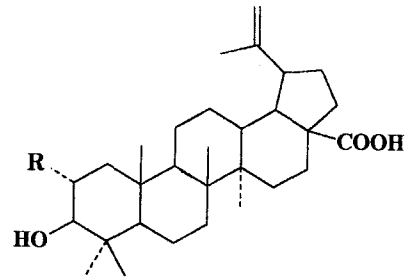


Fig. 1— Structures of betulinic acid (R=H) and alphitolic acid (R=OH).

03 (1H, d, J=10.0, C₃-H), 3.72 (1H, sex, C₂-H), 4.60 (1H, d, C₂₉-H); EI-MS (*m/z*) 472 (M⁺), 454 (M⁺-H₂O), 426 (M⁺-COOH).

함량 분석을 위한 시료의 전처리 - 대추는 과육과 씨를 구분하지 않고 세절하여 구입처별로 각각 항량이 되도록 건조하였다. 건조된 시료 약 100 g씩을 에탄올로 3시간 환류추출하고, 각 추출물을 용량플라스크에 옮긴 후 에탄올을 가해 표선을 맞추고 0.2 μ m 막여과기로 여과한 액을 검액으로 하였다.

HPLC에 의한 성분분석 - Nova-Pak C₁₈ (Waters, 3.9 \times 150 mm)을 고정상으로 0.05 M Na₂HPO₄ (pH 2.5)-메탄올(19 : 81)액을 이동상으로 하여 분석하였다. 이때 검출기파장은 210 nm, 이동상유속은 1 ml/min, 컬럼온도는 30°C, 주입용량은 5 μ l였다.

HPTLC에 의한 성분분석 - 고정상으로 HPTLC precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate (Merck)를 이용하였고, 이동상으로 클로로포름-메탄올(6 : 1)을 이용하였다. 미리 제조된 검액 2 μ l를 각각 시료점적기로 길이 4 mm의 밴드상으로 점적한 후 전개용매로 충분히 포화된 trough전개조 (CAMAG)에서 전개시켰다. plate를 p-anisaldehyde-황산-초산(1 : 2 : 100) 용액에 2초간 담그었다가 plate heater상 110°C에서 10분간 가열후 나타나는 보라색 띠의 흡광도를 scanner로 측정하였다. 이때 측정파장은 540 nm, 측정슬릿의 크기는 3 \times 0.1 mm였다. plate상에서 시료와 표준품의 UV-VIS 스펙트럼을 비교하여 각 밴드에 대한 순도를 확인하였다.

결과 및 고찰

표준품 (Fig. 1)으로 분리한 물질들의 확인 - com-

pound 1은 백색의 침상결정이고, mp 295~297°C, 표준품과의 혼용시험에서 융점강하가 없었다. Libermann-Buchard반응에 양성을 나타냈다. UV spectrum에서는 202.9 nm에서 극대흡수를 나타냈다. IR spectrum에서는 3450 cm⁻¹의 흡수로 OH기의 존재를, 1680 cm⁻¹에서 C=O의 존재를, 1640, 880 cm⁻¹에서 특징적인 exocyclic C=C의 stretching vibration band가 확인되었다. ¹H-NMR spectrum에서, 0.76, 0.83, 0.94, 0.97, 0.98 ppm에서 angular methyl기에 기인하는 6개의 peak가 singlet로 나타났고, 4.61 ppm, 4.74 ppm에서 exocyclic methylene proton에 기인하는 signal이 관찰되는 점으로 보아 lupane계의 triterpenoid임을 추정하였다. Mass spectrum에서 m/z 456에서 molecular ion peak를 확인하였고 proton transfer에 의하여 생성된 fragment ion peak가 m/z 248에서, 이것으로부터 다시 COOH가 떨어져 생성된 ion peak가 m/z 230에서 나타났다. 이상의 물리화학적 성상은 Yagi 등^{1,2)}에 의해서 분리보고된 betulinic acid의 문헌치와 일치하였다. compound 2는 백색의 침상결정이고, mp 275~278°C, Libermann-Buchard반응에 양성을 나타냈다. UV spectrum에서 203 nm에서 극대흡수를 나타냈다. IR spectrum에서 3400 cm⁻¹의 흡수로 OH기의 존재를, 1690 cm⁻¹에서 C=O의 존재를, 1640, 890 cm⁻¹에서 C=C의 stretching vibration band가 확인되었다. ¹H-NMR spectrum에서, 0.84 ppm, 0.88, 0.97, 1.00, 1.04 ppm에서 methyl기에 기인하는 6개의 peak가 singlet로 나타났고, 1.74 ppm에서 C₃₀의 CH₃가 singlet로, 1.96 ppm에서 -COCH₃가 singlet로, 3.03 ppm에서 C₃-H가 doublet로, 3.72 ppm에서 C₂-H가 sextet로, 4.60 ppm에서 C₂₉-H가 doublet로 나타나, olefinic proton이 각각 doublet로 나타나는 것으로 보아 이 화합물이 lupane계 triterpenoid임을 추정하였다. Mass spectrum에서 m/z 472에서 molecular ion peak를 확인하였고, m/z 454에서 M⁺-H₂O의 peak가, m/z 426에서 M⁺-COOH의 peak가 나타났다. 이상의 물리화학적 성상은 Yagi 등^{1,2)}에 의해서 분리보고된 aliphatic acid의 문헌치와 일치하였다.

HPLC에 의한 성분분석 - 실험방법의 조건으로 시료로부터 다른 물질의 방해를 받지않고 betulinic acid와 aliphatic acid를 완전히 분리할 수 있었다. 특히 betulinic acid와 인접한 피크와의 분리도는 컬럼온

Table I - Contents of betulinic acid and aliphatic acid of Zyzipt Fructus purchased in four different regions in Korea. Standard deviations are calculated from every triplicated measurements

sample	betulinic acid (%)		aliphatic acid (%)	
	HPLC	HPTLC	HPLC	HPTLC
1	3.06±0.03	3.38±0.05	3.88±0.06	3.37±0.12
2	3.63±0.06	3.83±0.19	3.50±0.05	3.21±0.10
3	3.35±0.04	3.27±0.12	3.83±0.04	3.53±0.06
4	2.91±0.04	3.05±0.10	3.35±0.05	3.17±0.09

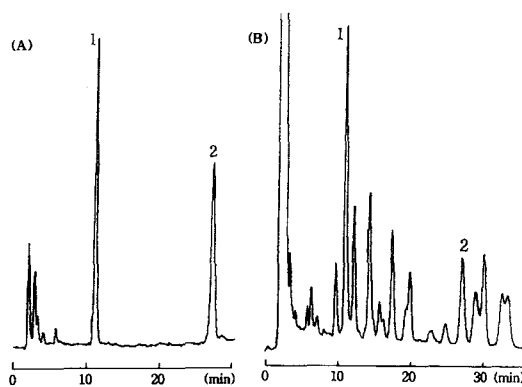


Fig. 2 - Chromatograms of mixture of standards (A), aliphatic acid (1.010 mg/ml) and betulinic acid (2, 0.125 mg/ml), and an extract of zizyphi Fructus (B) separated by HPLC at 30°C column temperature.

도의 영향을 많이 받기 때문에 컬럼온도를 일정하게 유지시키는 것이 중요했다. 온도가 높을수록 분리도가 좋았는데, 30°C정도에서도 충분한 분리도를 보였다. Fig. 2는 HPLC에 의한 표준물질과 시료의 크로마토그램이고, Fig. 3은 피크의 높이로부터 얻어진 두 표준품에 의한 검량선으로 모두 양호한 직선성을 보였다. 직선의 식은 betulinic acid의 경우 $y=34.6x-0.17$ ($r=0.9989$)이었고, aliphatic acid의 경우 $y=86.6x+0.44$ ($r=0.9996$)이었다. HPLC법에 의한 네가지 시료의 betulinic acid와 aliphatic acid 함량은 지역구분 없이 각각 2.91~3.63%, 3.35~3.88%로 나타났다 (Table I).

HPTLC에 의한 성분분석 - 실험방법의 조건으로 시료로부터 aliphatic acid와 betulinic acid를 완전히 분리할 수 있었다. 밴드형태로 점적하는 것이 점형태로 점적하는 것보다 분리면에서 유리하였고, 전개조내를 전개용매로 불충분하게 포화시켰을 경우는 분리도가 좋지 않

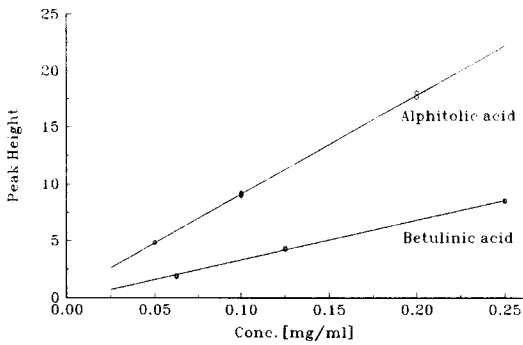


Fig. 3—Calibration curves of betulinic acid and alphitolic acid determined by HPLC.

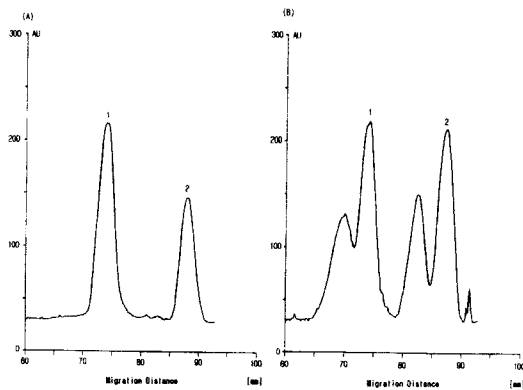


Fig. 4—Chromatogram of standards (A) and extract of Zizyphi Fructus (B) separated by HPTLC. 1: alphitolic acid, 2: betulinic acid.

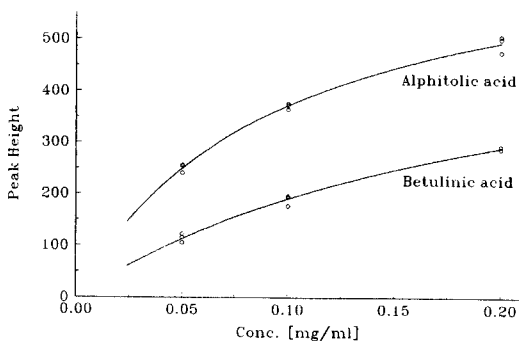


Fig. 5—Calibration curves of betulinic acid and alphitolic acid approximated to Michaelis-Menten equation.

았다. 정색반응은 *p*-anisaldehyde의 경우가 황산이나 $SbCl_5$ 의 경우보다 감도가 좋았으며, 분무하는 것 보다는 담그는것이 감도가 좋았다. Fig. 4는 HPTLC에 의한 표준물질과 시료의 크로마토그램이며, Fig. 5는 피크의 높

이로부터 얻어진 두 표준품에 의한 검량곡선으로 직선성을 벗어난 형태를 보이고 있다. 이러한 모양은 TLC에서 일반적이며 보통 이것을 함수로 직선화하거나 Michaelis-Menten의 근사식을 사용하여 함량을 구하기도 한다.¹⁷⁾ 여기서는 Michaelis-Menten의 근사식을 사용하였는데 betulinic acid의 경우 $y=600.8x/(0.216+x)$ 이었고, alphitolic acid의 경우 $y=728.6x/(0.096+x)$ 이었다. HPTLC법에 의한 네가지 시료의 betulinic acid와 alphitolic acid 함량은 지역구분 없이 각각 3.05~3.83%, 3.17~3.53%로 나타났다(Table I).

네가지 대추시료중의 betulinic acid와 alphitolic acid의 HPLC 및 HPTLC에 의한 함량분석 결과는 Table I과 같다. 구입처에 상관없이 대추중 betulinic acid와 alphitolic acid의 함량은 각각 2.9~3.8%, 3.2~3.9%의 범위에 있다. 이 편차는 산지나 채취시기의 차이에 기인된 것으로 추측된다. HPLC와 HPTLC의 정밀도는 일반적인 경우 서로 비슷한 것으로 보고되는데, 본 논문의 경우와 같이 HPTLC의 정밀도가 낮게 나타난 이유는 HPTLC의 경우 발색단계를 거치는데 이것이 재현성을 감소시키는 요인으로 생각된다. 그러나, 한번에 여러 시료를 동시에 처리할 수 있는 특성때문에 HPTLC의 경우에는 경제적인 이점이 있다고 하겠다.

결 론

대추로부터 triterpenoid 성분인 betulinic acid와 alphitolic acid를 분리하고 이를 표준물질로하여 HPLC와 HPTLC에 의한 대추의 분석법을 확립하였다. HPLC에 의한 분리는 Nova-Pak C_{18} , 0.05 M Na_2HPO_4 (pH 2.5)-메탄올(19 : 81)액에서 이루어졌고, 검출기파장은 210 nm로 하였다. HPTLC에 의한 분리는 HPTLC precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate와 클로로포름-메탄올(6 : 1)을 이용하였다. 전개후 plate를 *p*-anisaldehyde-황산-초산(1 : 2 : 100) 용액으로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 방법으로 분석한 대추시료중의 betulinic acid와 alphitolic acid의 함량은 각각 2.9~3.8%, 3.2~3.9%의 범위였다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 보건복지부 신약개발사업연구비

로 수행되었으며 이에 감사드린다.

문헌

- 1) Yagi, A., Okamura, N., Haraguchi, Y., Noda, K., and Nishioka, I. : Studies on the constituents of *Zizyphi fructus*. I. Structure of Three new *p*-coumarolates of aliphatic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 1798 (1978).
- 2) Yagi, A., Okamura, N., Haraguchi, Y., Noda, K., and Nishioka, I. : Studies on the constituents of *Zizyphi fructus*. II. Structure of new *p*-coumarolytes of maslinic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 3075 (1978).
- 3) Okamura, N., Nohara, T., Yagi, A., and Nishioka, I. : Studies on the constituents of *Zizyphi fructus*. III. Structures of dammarane-type saponins. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 676 (1981).
- 4) Yagi, A., Koda, A., Inagaki, N., Haraguchi, Y., Noda, K., Okamura, N., and Nishioka, I. : Studies on the constituents of *Zizyphi fructus*. IV. Isolation of an anti-allergic component, ethyl α -D-fructofuranoside from EtOH extract of *Zizyphi Fructus*. *Yakugaku Zasshi* **101**, 700 (1981).
- 5) Okamura, N., Yagi, A., and Nishioka, I. : Studies on the constituents of *Zizyphi fructus*. V. Structures of glycosides of benzyl alcohol, vomifoliol and naringenin. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3507 (1981).
- 6) Han, B. H., and Park, M. H. : Sedative activity and its active components of *Zizyphi Fructus*. *Arch. Pharm. Res.* **10**, 208 (1987).
- 7) Tomoda, M., Takahashi, M., and Nakatsuka, S. : Water-soluble carbohydrates of *Zizyphi Fructus*. II. Isolation of two polysaccharides and structure of an Arabinan. *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 707 (1973).
- 8) Cyong, J. C., and Hanabusa, K. : Cyclic adenosine monophosphate in fruits of *Zizyphus jujuba*, *Phytochemistry* **19**, 2747 (1980).
- 9) Cyong, J. C., and Takahashi, M. : Identification of guanosine 3':5'-monophosphate in the fruit of *Zizyphus jujuba*, *Phytochemistry* **21**, 1871 (1982).
- 10) Wang, W., and Chen, W. : Antioxidant activity studies on the meaning of same original of herbal drug and food. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, **11**, 159 (1991)-English abstract from INDEX MEDICUS.
- 11) Huang, L., Ye, W., Cai, B., Li, D., Liu, J., and Liu, M. : A preliminary study on the pharmacology of the compound prescription huang-quin tang and its component drugs. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, **15**, 115 (1990)-English abstract from INDEX MEDICUS.
- 12) Yamahara, J., Chnlja, K., Sawada, T., and Fujimura, H. : Biological active principles of the crude drugs (I). Antiulcerogenic action of the crude drugs. *Shoyakugaku Zasshi* **28**, 33 (1974).
- 13) De Clercq, E. : Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 200 (1995).
- 14) Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Consentino, L. M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I. S., and Lee, K. H. : Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **57**, 243 (1994).
- 15) Recio, M. C., Giner, R. M., Manez, S., Gueho, J., Julien, H. R., Hostettmann, K., Rios, J. L. : Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoides from *Diospyros leucomelas*, *Planta Med.* **61**(1), 9 (1995).
- 16) Yasukawa, K., Takido, M., Matsumoto, T., Takeuchi, M., and Nakagawa, S. : Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology* **48**, 72 (1991).
- 17) Kang, J. S., and Ebel, S. : Identification and quantification of tetracycline antibiotics by cyanophase HPTLC. *J. Planar Chromatogr.* **2**, 434 (1989).