

## 자작나무수피로부터 Betulin의 단리<sup>1</sup>

조재현<sup>2</sup> · 이상현<sup>3</sup> · 황병호<sup>2</sup>

### Isolation of Betulin from the bark of *Betula platyphylla*<sup>1</sup>

Jae Hyun Cho<sup>2</sup>, Sang Hyun Lee<sup>3</sup> and Byung Ho Hwang<sup>2</sup>

#### 요 약

자작나무 수피를 일반적으로 백화피(白樺皮)라하며 한방에서는 이뇨·진통·해열에 쓰이고 있다. 이 수피의 화학성분이 주로 Betulin으로 되어 있다는 보고에 따라 한국산 자작나무 수피로부터 Betulin과 그 관련화합물을 단리동정하여 항산화작용, 항HIV성을 알아내기 위하여 본 연구를 실시하였다.

실험 결과 betulin의 수율이 6.9%로 우리나라에서는 처음으로 다량 단리하였으며, 에틸아세트 용성에서 3,4-dihydrobenzoic acid를 단리하였다. 이후 betulin 관련 유도체를 합성제조하여 각종 실험 시료로써 활용하고자 한다.

#### ABSTRACT

White birch bark is being called baekhwapi usually and is used urination, travail, removal of fever in Oriental medicine.

Betulin had been known as main chemistry ingredient of white birch bark.

So, in an experiment that see betulin and connection inorganic compounds separation and enforced to recognize antioxidative activity and anti HIV.

Betulin's yield separated vast quantity for the first time in Korea by 6.9%, and 3,4-dihydrobenzoic acid in ethylacetate soluble as experiment result.

Wish to utilize betulin connection derivative as each kind experiment sample ore because do composition making since.

1. 접수 2002년 8월 31일 Received August 31, 2002

2. 강원대학교 산림과학대학 임산공학과 Dept. of Wood Science & Technology, College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

3. 강원대학교 의과대학 대학원 Dept. of Medicine, College of Medicine, Graduate School of Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

## 서 론

자작나무(*Betula platyphylla* var. japonica HARA)는 자작나무과의 낙엽교목으로써 깊은 산 양지쪽에서 자라며, 높이 20m에 달하고 나무껍질은 흰색이며 옆으로 얇게 벗겨지고 작은가지는 자줏빛을 띤 갈색이며 지점(脂點)이 있다. 한국(중부 이북) 일본에 분포하며, 잎은 어긋나고 삼각형 달걀 모양이며 가장자리에 불규칙한 톱니가 있다. 뒷면에는 지점과 더불어 맥액(脈液)에 털이 있다. 암수한그루로서 꽃은 4-5월에 피고 자웅동주이며 암꽃은 위를 향하며 수꽃은 이삭처럼 아래로 늘어진다. 열매이삭은 밑으로 처지며 깊이 4cm 정도이고 포조각의 옆갈래조각은 중앙갈래조각 길이의 2~3배 정도이다. 자작나무 껍질은 종이처럼 얇게 벗겨지는데, 겉면은 흰 빛의 기름기 있는 밀랍 가루 같은 것으로 덮여있고 안쪽은 밝은 갈색이며 불에 잘 타면서도 습기에 강하며 천년이 지나도 썩지를 않기 때문에 쓸모가 많다. 자작나무 껍질에는 부패를 막는 성분이 들어 있어서 썩도 슬지 않고 곰팡이도 피지 않는다. 간혹 수백 년 또는 수천 년 전에 땅속에 묻혔던 자작나무는 완전히 썩어 없어졌을지라도 껍질은 생생하게 남아 있는 것이 많다. 나무껍질이 아름다워 정원수·가로수·조림수로 심는다. 목재는 가구를 만드는데 쓰며, 한방에서는 나무껍질을 백화피(白樺皮)라고 하여 이뇨·진통·해열에 쓴다. 천마총에서 출토된 그림의 재료가 자작나무껍질이며, 팔만대장경도 이 나무로 만들어졌다.

약리작용으로는 폐결핵, 위염, 황달 기관지염 등에 효험이 있다. 이전의 연구로는 Seiji Ohara 등은 자작나무 수피에서 betulinic acid 3-caffeate를 추출한바 있으며, Hirouki. Fuchino 연구팀은 자작나무 추출물에서 dammarane, diarylheptanoid 등과 flavonoid 등의 화합물을 분획하였고, 북해도대학 市川 曉雄 연구팀은 자작나무 주요추출 성분인 betulin과 subelin 등을 단리한 바 있다.

본 실험은 한국산 자작나무 추출성분의 효율적 이용에 관한 연구의 일환으로 자작나무의 수피부의 추출성분 등을 분획하고 화학구조를 규명함으로써 자작나무에 대한 화학적, 약리적 이용에 관한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 2.1 공시재료

본 실험은 강원도 춘천시 사농동에 소재한 강원도산림개발 연구원에서 벌채한 7-9년생의 자작나무의 수피부를 기건상태로 건조하여 분쇄기(Willy mill)에서 분쇄한 후 수피시료 1.5kg을 메탄올에 24시간 동안 침적 시키고 이를 3회 반복한 후 얻어진 메탄올 추출액을 공시재료로 사용하였다.

### 2.2 함수율

함수율은 목재분석법에 의해 실시하였다. 칭량병에 자작나무 수피 2g을 칭량한 후 항온건조기에서 105±3℃ 정도의 온도로 약 1시간 건조시킨 후 데시케이터에 넣어 실온까지 냉각시킨 후 무게를 측정하여 이 조건을 함량에 달할 때까지 반복하여 실험하여 함수율을 측정하였다.

### 2.3 추출물의 분리

메탄올 추출액을 Figure 1.에서 보는 바와 같이 분획할때기상에서 H<sub>2</sub>O와 CHCl<sub>3</sub>을 사용하여 클로르포름용성과 불용성으로 분리하였다. 그리고 불용성 부분은 다시 헥산을 이용하여 헥산용성과 불용성으로 분리하였고, 그 다음 에틸아세테이트를 사용하여 에틸아세테이트용성과 불용성으로 분리하였다. 각각의 분리된 부분들은 농축한 후 동결건조하여 분말상으로 보관하였다.

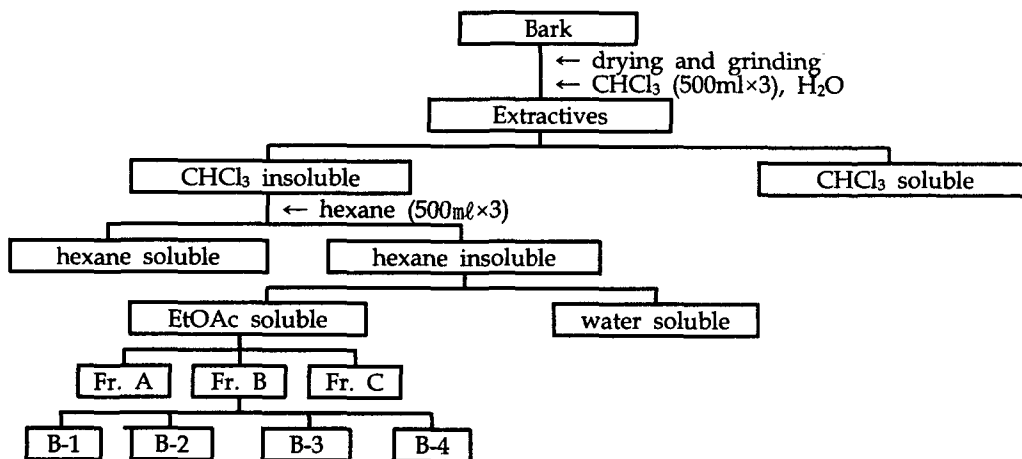


Figure 1. Fractionation scheme of the birch bark.

분획물은  $\text{CHCl}_3$  용성 87.4g, 헥산용성 1.39g, 에틸아세테이트용성 3.71g, 수용성 1.25g의 추출물을 얻었다.

## 2.4 추출물의 단리

### 2.4.1 재결정법

추출물을 분획하는 과정에서  $\text{CHCl}_3$ 과  $\text{H}_2\text{O}$ · $\text{MeOH}$ 부분에서 백색의 결정을 얻었다. 이것을 모아  $\text{MeOH}$ 에 녹인 후 재결정하여 결정 화합물을 얻었다.

### 2.4.2 칼럼크로마토그래피(Column chromatography)

혼합물을 분리하기 위하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였으며 유리칼럼을 사용하였고, 충전물질로는 Silica gel을 사용하였다. 에틸아세테이트용성 화합물을 칼럼에 주입하고 용매의 비율을 달리하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. 칼럼을 통하여 떨어지는 용액은 분취기(Fraction collector)를 사용하여 시험관에 순차적으로 받았다. 화합물의 분리 여부를 판별하기 위하여 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography)를 병행하였는데 전개 용매로는  $t\text{-BuOH-HOAc-H}_2\text{O}(3:1:1)$ , TBA를 전개시켜 화합물의 전개위치를 확인하였다.

### 2.4.3 박층크로마토그래피

(Thin layer chromatography)

TLC판은 Merck사의 Silica gel 60  $F_{254}$ 와 cellulose F를 사용하였고, 혼합물의 분리단계에서는 1차원 TLC를 실시하였으며 단리된 물질의 예비동정을 위하여 2차원 박층크로마토그래피를 실시하였고 전개용매는 TBA와 6% HOAc을 사용하였다.

### 2.4.4 분석기기

분리된 화합물의 구조를 분석하기 위하여 강원대학교 공동실험실습관에 있는 NMR (Bruker DPX-400MHz)와 질량분석기 (Autospec. M363)를 사용하였다.

## 2.5 추출물의 구조 분석

### 2.5.1 화합물 I

수피 추출물을 감압농축시키는 과정에서 얻어진 백색결정물질을 메탄올로 재결정하여 화합물을 단리하였다. 단리된 화합물을 용매 클로르포름에 용해시켜 NMR 분석을 실시하였다.

단리된 화합물의  $^1\text{H-NMR}$  과  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼은 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0.76, 0.82, 0.98, 1.02(3H $\times$ 5, s, 23, 24, 25, 26, 27-Me), 1.68(3H, s, 30-Me), 3.34, 3.82(2H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ , 28-H), 4.59, 4.68(2H, br s, 29-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 14.9(C-27), 15.4(C-24), 16.1(C-25 and C-26), 19.1(C-30), 20.8(C-11), 25.2(C-12), 27.1(C-15), 27.4(C-2), 28.0(C-23), 29.2(C-16), 29.8(C-21), 34.0(C-22), 34.2(C-7), 37.2(C-13), 37.3(C-10), 38.9(C-1 and C-4), 41.0(C-8), 42.7(C-14), 47.8(C-17 and C-19), 48.8(C-18), 50.4(C-9), 55.3(C-5), 60.6(C-28), 79.0(C-3), 109.6(C-29), 150.4(C-20).

2.5.2 화합물 II

에틸아세테이트 용성부분은 Column chromatography를 실시하였다. 충전물질로는 Silica gel을 사용하였고, 용출용매로는  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{H}_2\text{O}$ (1:2 $\rightarrow$ 1:3)을 순차적으로 실시하여 Fraction A-C 세 개의 부분으로 분리하였다.

이 중 Fraction B를 다시 Column chromatography를 실시하였으며 이때 사용한 충전물질은 Sephadex LH-20, 용출용매는 EtOAc : MeOH (1:1)을 사용하여 4개의 Fraction을 얻었다.

단리된 화합물II의  $^1\text{H-NMR}$  과  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼은 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{MeOH-}d_4$ )  $\delta$  : 6.8(2H, d,  $J=8.0$ , 5-H), 7.4(2H, dd,  $J=2.2$ ,  $J=2.0$  2-H and 6-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{MeOH-}d_4$ )  $\delta$  : 115.7(C-2), 117.7(C-5), 123.7 and 123.8(C-1 and C-6), 146.0(C-3), 151.3(C-4), 170.7(-COOH)

결과 및 고찰

3.1 함수율 및 Betulin의 수율

자작나무 수피에 대한 함수율과 단리한 betulin의 함수율은 6.67%이었으며, 메탄올 추

출물의 수율은 6.69%를 얻었다.

3.2 Betulin(화합물 I)

자작나무 수피부를 메탄올로 추출하여 고형분과 클로르포름용성, hexan용성, 에틸아세테이트용성 및 수용성으로 분획하였으며, 분획하는 과정에서  $\text{H}_2\text{O} \cdot \text{MeOH}$  부분에서 백색결정 물질을 얻었다.

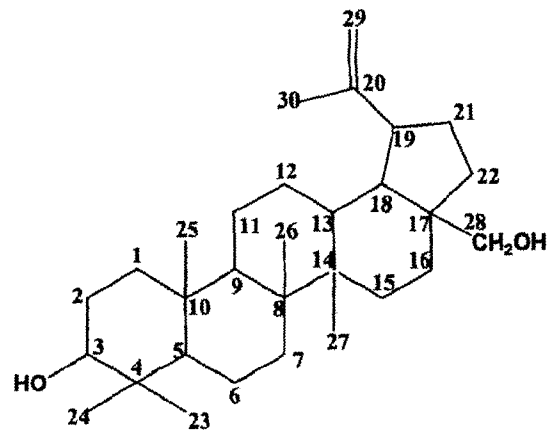


Figure 2. The structure of betulin.

화합물 II에서 0.76-1.02ppm에서 5개의 singlet signal은 문헌값과 비교하여 betulin의 23, 24, 25, 26, 27위의 methyl기의 프로톤으로 귀속된다. 1.68ppm의 singlet signal은 30위의 methyl기로 귀속된다. 3.32ppm과 3.82ppm에서 보이는 두 개의 doublet signal은 28위의 methylene기의 프로톤에 귀속된다. 4.58ppm과 4.68ppm에 보이는 2개의 넓은 singlet signal은 29위의 methylene기의 프로톤에 귀속된다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum의 각 signal은 betulin의 문헌 값과 일치하는 것을 보여주고 있다.

FAB-MS에서도  $M^+$  m/z 442로 base ion m/z 425로 betulin의 분자량과 일치하므로 화합물 I 을 betulin으로 동정하였다.

### 3.3 3,4-dihydroxybenzoic acid(화합물 II)

에틸아세테이트용성 부분을 Column chromatography를 실시하여, 갈색결정을 얻었다. 2D-TLC의 결과  $R_f$ 값은 TBA에서 0.76, 6% HOAC에서 0.5로 나타났으며,

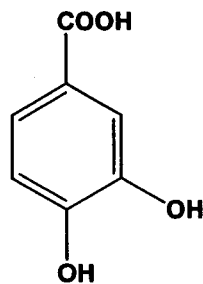


Figure 3. The structure of 3,4-dihydroxybenzoic acid.

화합물 II의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 6.8ppm은 5번 위의 프로톤과 7.4ppm 부근에서는 2번과 6번 위의 프로톤이 귀속된 것을 알 수 있었다. 화합물 II의  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 115.7에서는 2번 위 탄소, 117.7ppm에서는 5번 위 탄소, 123.8ppm과 123.9ppm에서는 1번과 6번 위의 탄소가 귀속되는 것을 보여 주고 있으며 170.7ppm에서는 -COOH 기의 탄소가 귀속되는 것을 보여주고 있다.

이상의 결과 화합물 II를 3,4-dihydroxybenzoic acid로 동정할 수 있었다.

## 결론

자작나무 수피부의 MeOH추출 결과에서 자작나무 수피의 주요성분으로 알려진 betulin을 약 6.9%의 수율로 얻을 수 있었으며 에틸아세테이트 용성의 분획물에서 3,4-dihydroxybenzoic acid로 분리 동정하였다.

최근 betulin 유도체의 제조 및 그 유용성에

관한 연구들이 진행되면서 betulin의 항 HIV(Human Immunodeficiency Virus)제로서의 이용 가능성이 높아지고 있다.

그러나 betulin은 아직까지는 천연물로부터 얻어지는 물질이고, 천연물로 얻어지는 물질은 비교적 양이 적고 얻어지는 양이 일정하지 않기 때문에 앞으로 betulin의 추출 및 유용성 연구와 더불어 천연물로부터 betulin을 보다 효율적으로 얻을 수 있는 방법 그리고 betulin의 생합성 연구가 앞으로 병행되어야 할 것이다.

## 참고문헌

1. 市川曉雄. ツラカソバ樹皮抽出成分に関する研究
2. S. Ohara, M. Yatai and Y. Hayashi. 1986. Utilization of Wood Extractives I. Mokuzaigakkaishi. 32(4):266-273
3. H. Fuchino, S. Korishi, T. Satoh, A. Yagi, K. Saitsu, T. Tatumi and N. Tanaka. 1996. Chemical Evaluation of Betula Species in Japan II. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 44(5):1033-1038
4. 박은수, 신민교, 송호준. 1998. 자작나무 및 벗나무 껍질추출물의 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지 13(2):57-58
5. 황병호. 1987. 목재화학. 영남대출판부. pp. 284-286