목재공학 33(1): 58~62, 2005
Mokchae Konghak 33(1): 58~62, 2005

플라타너스의 베출린산 함량에 대한 계절적 변화*1

김 기 훈*2 · 김 영 균*2†

The Content and Seasonal Changes of Betulinic acid from *Platanus* Species*1

Ki-Hun Kim*2 · Young-Kyoon Kim*2†

요 약

우리나라의 가로수로 널리 분포되어 있는 수종인 플라타너스에 생리활성이 우수한 천연물인 베출린산(BA)을 대량생산할 수 있는지를 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다. 서울과 경기도의 여러지역의 가로수를 대상으로 시료를 계절별로 채집하여 기건하여 분쇄한 시료를 메탄올로 추출하여 그 추출물을 농축하여 얻고 크로로포름으로 분획하여 BA fraction을 얻은 후, HPLC로 베출린산의 함량을 측정하였다. 그 결과, 여러 지역에서 채집하여 분석한 대부분의 플라타너스 수종이 상당량의 베출린산을 함유하고 있으며 11월 말경이 BA를 대량 얻기 위한 최적의 시기로 확인하였다.

ABSTRACT

In order to find out whether BA can be obtained significantly in large scale or not, the research has been conducted. *Platanus* species is one of the most widely spreaded shade-tree on the road side in Korea. To examine BA content in the species, samples were collected from various locations in Seoul and Kyunggi Province at each season. The MeOH extracts were obtained from the air-dried and ground samples. BA fraction was obtained by partitioned with chloroform and water then the BA content was measured in HPLC. Consequently, it has been revealed that most of the *Platanus* species showed to have significant amount of BA all over the examined area and the best season is at the end of November to collect the tree branches for BA.

Keywords: *Platanus*, Betulinic acid, cytotoxicity, triterpenoid

* 1 접수 2004년 11월 15일, 채택 2004년 12월 21일
본연구는 2004년도 국민대학교 연구비 지원사업에 의하여 수행된 연구임
* 2 국민대학교 삼림과학대학 임산공학과 College of Forest Science, Kookmin University Seoul 136-702, Korea
† 주저자(corresponding author) : 김영균(e-mail: ykkim@kookmin.ac.kr)

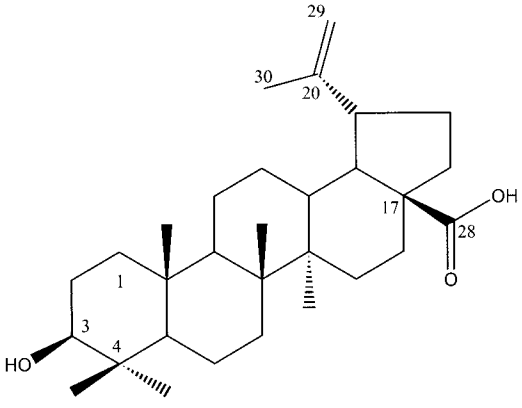

Fig. 1. The structure of Betulinic Acid (BA), 3 β-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid.

1. 서 론

Betulinic acid (BA, Fig. 1), 3β-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid는 최근 여러 연구기관의 임상연구 결과 각종 악성종양 즉, 폐암, 난소암, 흑색종(human melanoma) 등이나 후천성 면역 결핍증 바이러스(HIV)에 대하여 우수한 치료 효과를 가지고 있다고 밝혀진 물질이다(Holz-Smith *et al.*, 2001; Soler *et al.*, 1996; 김 등, 2001).

현재 BA는 대부분 betulin으로부터 합성되어 사용된다(Fulda *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 1999). 그러나 국내에서 한국산 수목의 생리활성물질 탐색과정에서 우리나라의 가로수로 널리 분포되어 있는 플라타너스에 BA가 대량으로 존재함이 밝혀졌다(김, 1999). 한편 플라타너스는 생장이 양호하여 가로수 정비 작업으로 매년 마다 가지치기를 하여 버려지는 잔가지가 지역별로 차이는 있지만 서울시에서만 수십 톤에 달하고 있다. 이러한 자원을 이용하여 BA를 대량생산화 하기 위해서는 어느 계절에 그리고 어느 지역에 있는 플라타너스가 BA를 가장 많이 함유하고 있는가를 정량 분석하여 확인하고, 보다 체계적인 생산조건을 구체적으로 확립함으로써 플라타너스 가로수 정비 작업에서 얻을 수 있는 임산부산물을 활용하여 고가의 생리활성 수목 성분을 얻고자 한다. 이러한 방법은 수목으로부터 천연물을 얻기 위하여 입목 전체를 사용하는 것이 아니라, 가지치기를 하여 파생된 잔가지들을 사용하기 때문에 자원의 지속적인 관리를 비롯하여 지속적으로 원하는 물질을 제공할 수 있다는 것이다.

따라서 본 연구는 서울(성북구)과 수도권 4개 지역(파주, 포천, 양평, 화성)의 도로변에 식재된 플라타너스를 대상으로 하였고, 2000년 8월 말부터 2001년 5월말까지 재료를 채집하여 동일한 조건하에서 실험을 실시하였으며 계절별, 지역별 BA의 함량변화의 차이점을 파악하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

시료는 계절별, 지역별로 경기북서(파주지역 자유로변), 북동(포천지역), 남동(양평지역), 남서(화성지역 국도변), 그리고 서울지역(성북구 도로변)의 가로수를 대상으로 각각 2월말(겨울), 5월말(봄), 8월말(여름), 11월(가을)말에 채집하였다.

수고 4~5 m 내에서 생장한 직경 3 cm 이하의 가지를 채집하였고 보관창고내 상온에서 기건 후 잎과 열매를 제거한 다음 고속분쇄기를 이용하여 20~40 mesh로 분쇄하여 추출재료로 사용하였다.

2.2. 추출 및 용매분획

계절에 따른 5개 지역의 시료 20개를 계절별로 동일조건하에서 추출하였다. 이때에는 자체 제작한 중온추출장치(Mechanical stirrer 이용)를 이용하여 추출하였다. 정량하고자하는 BA가 최대로 추출되도록 하기 위한 추출 조건은 여러 조건하에서 시간별 온도별로 추출한 후 분석하는 방법을 적용하였다(김, 1999).

추출조건은 각 시료 20 g을 95% MeOH 500 mL에 55°C에서 3시간씩 3번 추출하였고 각각의 추출물들을 filter paper를 이용하여 여과한 다음 추출액을 농축하여 조추출물들을 얻었다(Table 1). 또한, 얻어진 조추출물에서 BA를 손실없이 정량분석하기 위하여 분획조건을 최적화 하였다. 최적화된 추출분획방법으로 감압 농축한 각각의 조추출물들을 유기용매($CHCl_3$)와 수층(H_2O)으로 분획하는 방법을 적용하였다. 이

Table 1. Weight (g) of MeOH extracts of *Platanus* species collected from various locations

	PaJu	PoCheon	YangPyung	HwaSung	SungbukGu
Feb.	1.38	1.97	0.92	1.06	0.97
May	1.25	1.78	1.04	3.08	1.66
Aug.	1.16	1.39	1.09	0.81	0.83
Nov.	2.21	2.23	1.13	2.06	1.50

Table 2. Weight (g) of BA-containing $CHCl_3$ fractions

	PaJu	PoCheon	YangPyung	HwaSung	SungbukGu
Feb.	0.33	**0.61**	0.36	0.36	0.35
May	0.46	**0.51**	0.39	0.85	0.55
Aug.	0.49	**0.54**	0.49	0.28	0.36
Nov.	0.47	**0.46**	0.33	0.40	0.39

Table 3. Weight (g) of BA fraction after vacuum chromatography

	PaJu	PoCheon	YangPyung	HwaSung	SungbukGu
Feb.	0.14	0.07	0.06	0.13	0.07
May	0.09	0.20	0.05	0.25	0.13
Aug.	0.17	0.22	0.02	0.14	0.07
Nov.	0.12	0.12	0.09	0.32	0.38

러한 방법으로 $CHCl_3$와 H_2O을 3 : 1 (v/v) 비율로 3회에 걸쳐 BA가 존재하는 $CHCl_3$ 층을 얻었다(Table 2).

2.3. BA의 분리정제 및 정량분석

순수한 BA는 TLC (Silica gel 60 F_{254}) 상에서 $CHCl_3$을 전개용매로 전개시 R_f 값이 0.3 부근에서 나타나며 anisaldehyde 발색시약으로 발색하였을 때 파란색으로 나타난다. 앞절의 방법으로 얻은 $CHCl_3$ 분획물들을 $CHCl_3$을 전개용매로 TLC 상에서 전개하였을 때 나타나는 여러개의 spots들에 대하여 BA가 함유되어 있지 않은 R_f 값이 1.0~0.5 그리고 0~0.2 사이의 화합물들을 분리하기 위해 간단한 Vacuum Column Chromatography (VCC)를 이용하였다. 이때 Column으로는 17G4 filtering funnel을 사용하였으며, 고정상은 silica gel (Merck Co. 400 mesh 이상, 30 g)을 사용하고, 이동상은 $CHCl_3$를 사용하였다. 그리고 VCC로 완벽하게 제거하지 못한 R_f 값이 0.2 근방의 화합물들을 완전히 분리하기 위해서 Flash Column Chromatography를 실시하였다. Column의 크기는 외경이 4.0 cm인 것을 그리고 고정상은 230~400 mesh의 silica gel을 이동상은 $CHCl_3$를 이용하여 분리하였다. 이와 같은 방법을 반복하여 20개의 각 지역의 모든 추출물의 BA 분획물을 얻어 그 양을 정량하였다(Table 3).

이렇게 얻은 BA 분획물에 대하여 이들에 각각 함유되어 있는 BA의 %함량을 계산하기 위해서 HPLC를 실시하였다. 이때 HPLC pump는 Waters 501을 detector는 refraction index (RI, Waters R401)를 사용하였으며, 고정상은 silica gel, 이동상은 $CHCl_3$: MeOH, 40 : 1 (v/v), 유동속도는 0.3 mℓ/min으로 하여 injection volume과 record에 기록되는 전체 peaks 수를 근거로 분획물에 함유된 BA의 양을 계산하였다(Table 4). 또한 분획물에서 순수하게 분리된 BA의 진위를 알아보기 위해서 이미 확보하고 있는

Table 4. Weight (g) of BA

	PaJu	PoCheon	YangPyung	HwaSung	SungbukGu
Feb.	0.09	0.05	0.04	0.08	0.05
May	0.05	0.13	0.04	0.17	0.10
Aug.	0.12	0.17	0.02	0.1	0.05
Nov.	0.10	0.10	0.07	0.19	0.23

Table 5. The yields (%) of BA corrected from total MeOH extracts

	PaJu	PoCheon	YangPyung	HwaSung	SungbukGu
Feb.	0.45	0.25	0.20	0.40	0.25
May	0.25	0.65	0.20	0.85	0.50
Aug.	0.60	0.85	0.10	0.50	0.25
Nov.	0.50	0.50	0.35	0.95	1.15

표품과 co-TLC를 하여 동종의 화합물로 확인하였으며, NMR spectroscopy를 이용하여 아래와 같은 data를 얻음으로서 그와 동일한 화합물임을 확인하였다.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.67~3.04 (43H), 3.19 (1 H, dd, J = 11.5 Hz, J = 4.7 Hz, H-3), 4.61 (1 H, br s, H-29), 4.71 (1 H, br s, H-29).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.7 (C-27), 15.3 (C-24), 16.0 (C-25), 16.1 (C-26), 18.3 (C-6), 19.4 (C-30), 20.8 (C-11), 25.5 (C-12), 27.4 (C-2), 27.9 (C-23), 29.7 (C-21), 30.5 (C-15), 32.1 (C-16), 34.3 (C-7), 37.0 (C-22), 37.2 (C-10), 38.4 (C-13), 38.7 (C-1), 38.8 (C-4), 40.7 (C-8), 42.4 (C-14), 46.8 (C-18), 49.2 (C-19), 50.5 (C-9), 55.3 (C-5), 56.3 (C-17), 78.9 (C-3), 109.6 (C-29), 150.3 (C-20), 180.5 (C-28).

3. 결과 및 고찰

본 연구는 계절별로 여러지역의 플라타너스 가로수의 조출물에 함유되어 있는 BA의 함량을 비교 분석하기 위하여 실시하였다. 그 결과로서 메탄올로 추출한 조출출물의 함량은 가을철(8월말)에 포천지역에서 추출한 시료가 가장 많은 것으로 나타났다(Table 1). 함량에 편차가 크게 나타난 화성지역은 실질적인 함량의 차이라기 보다는 실험오차로 판단된다. BA의 함량을 HPLC로 정량하기 위하여 BA가 포함되어 있는 chloroform 분획을 얻었으며 그 양(Table 2)은 역시 포천지역에서 채집한 시료에서 많이 나타났다. 이 chloroform 분획을 VCC를 통하여 각각의 BA fraction을 얻었다(Table 3). 여기에서 얻은 fraction들에 대한 함량의 차이는 chromatography과정에서 BA를 중심으로 윗부분과 아래부분의 화합물을 일정하지 않게 이 fraction에 포함되기 때문인 것으로 보이며, 이러한 수치는 HPLC로 BA의 함량을 계산할 때 전체적으로 보정하였다. 계절별, 지역별 BA의 수(Table 5)는 전체 MeOH 추출물의 양(Table 1)에 대한 BA의 함량(Table 4)의 비를 백분율로 나타낸 것이다. 수율값은 실제 Table 4에서 나타난 지역별, 계절별 플라타너스 BA의 양(g)과 수치의 차이만 있을 뿐 변화율과 최대값 결정과정은 동일하였다.

계절에 상관없이 지역별 BA 함량이 대체로 높은 곳은 포천지역, 화성지역, 성북구로 나타났으며, 이들 지역의 가로수에서 BA의 함유량이 최대인 계절이 주로 11월(포천, 파주 지역은 8월에 최고치 측정)인 것으로 관찰되었다.

파주지역과 포천지역 플라타너스에서 추출한 BA의 최대량은 8월달에 나타났다. 두 지역의 상대적인 BA 함량 차이로는 포천지역이 전 계절에 걸쳐서 파주지역에 비해 더 많은 양이 얻어진다는 것을 알 수 있다.

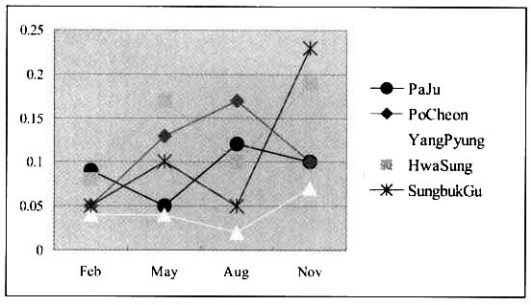

Fig. 2. Regional and sesonal variations of BA content from *Platanus* species.

화성지역은 계절별 편차가 심하며 5월과 11월에 BA의 함량이 최대이다. 반면에 양평지역은 11월에 BA의 함량이 최대지만(0.07 g) 그 양은 화성지역에서 2월에 채집된 시료의 함량(0.08 g) 이하로 나타났다.

전반적으로 볼 때 통계적인 유의성은 관찰되지 않았지만 11월의 BA 함량이 특징적으로 높은 것으로 나타났다. 또한 성북구지역에서 11월에 채집한 시료에서 얻어지는 BA의 함량이 5개 지역 사계절 중 가장 높게 나타났다. 이러한 결과를 근거로 판단하여 볼때 BA는 봄철에 수목의 대사가 왕성함에 따라 여름을 지나 가을까지 수목내 축적이 되었다가 겨울을 지나면서 어느 정도 그 함량이 감소하는 경향을 보이는 것으로 판단된다. 이러한 경향을 볼 때 BA의 함량은 11월경에 플라타너스에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 추정이 되며, 또한 Fig. 2의 전체 지역별, 계절별 BA의 함유량에 대한 변화정도를 볼 때 특정지역의 수종에만 BA가 함유되어 있다고 보기는 어렵다.

따라서 Table 3, 4에 나타난 BA의 함유량을 토대로 위의 5개 지역에서 BA를 많이 함유하고 있는 11월말 경에 플라타너스 시료를 얻는 것이 바람직하다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구는 플라타너스에서 잠재적 효용가치가 높은 천연물질인 BA를 용이한 조작으로 다량 얻을 수 있는 추출 및 분획방법을 제시하였다. 또한 계절별로 서울 및 경기지역의 플라타너스 나무에 함유되어 있는 BA의 함량을 HPLC를 이용하여 정량분석하였다. 그 결과 성북구지역의 11월에 채집한 시료가 최대의 BA를 함유하고 있는 것으로 나타났으나 다른 지역의 재료도 비슷한 수준으로 BA를 함유하고 있었다. 결론적으로 가로수로 널리 사용되고 있는 플라타너스로부터 BA를 얻기 위하여 가로수의 가지치기를 11월말경에 실시하여 원료를 확보하는 것이 적당하다고 본다.

참 고 문 헌

1. 김영균. 1999. 한국산 수목으로부터 생리활성 물질개발과 생리활성 검색자료 전산화. 농림부.
2. 김영균, 고영남. 2001. 플라타너스(*Platanus orientalis* L.)의 계절별 Betulinic acid 함량 및 생리활성. Forest and Humanity. 13: 121~127.
3. Fulda, S., I. Jeremias, H. H. Steiner, T. Pietsch, and K. M. Debatin. 1999. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. Int. J. Cancer. 30; 82(3): 435~441.
4. Holz-Smith, S. L., Sun, I. C., L. Jin, T. J. Matthews, K. H. Lee, and C. H. Chen. 2001. Role of Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 1 envelope in the anti-HIV activity of the betulinic acid derivative IC9564. Antimicrob. Agents Chemother. 45(1): 60~66.
5. Jeong, H. J., H. B. Chai, S. Y. Park, and D. S. Kim. 1999. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19; 9(8): 1201~1204.
6. Soler, F., C. Poujade, M. Evers, J. C. Carry, Y. Henin, A. Bousseau, T. Huet, R. Pauwels, E. De Clercq, J. F. Mayaux, J. B. Le Pecq, and N. Dereu. 1996. Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry. J. Med. Chem. 39(5): 1069~1083.