

## HPLC-DAD를 이용한 자작나무 수피의 Platyphylloside, Aceroside VIII 및 Betulin의 동시분석법 확립

조남기<sup>†</sup> · 김대현<sup>†</sup> · 성상현\*  
서울대학교 약학대학

### Simultaneous Determination of Platyphylloside, Aceroside VIII and Betulin in *Betula platyphylla* bark by HPLC-DAD

NamKi Cho<sup>†</sup>, Dae Hyun Kim<sup>†</sup>, and Sang Hyun Sung\*

College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract** – The simultaneous determination of platyphylloside, aceroside and betulin was established for the quality control of *Betula platyphylla* bark using a high performance liquid chromatography and diode-array UV/Vis detector (HPLC-DAD). Separation and quantification were successfully achieved with a INNO C18 column (5 µm, 4.6 mm I.D.×150 mm) by gradient elution of a mixture of methanol and water at a flow rate of 1.0 ml/min. Validation of the developed method was performed by various factor such as linearity, specificity, precision, accuracy, system suitability and stability. This method was successfully applied to the determination of contents of platyphylloside, aceroside VIII and betulin in three batches of *Betula platyphylla* bark extract. These results suggest that the developed HPLC method is simple, effective and could be utilized as a quality control method for *Betula platyphylla* bark products.

**Key words** – *Betula platyphylla* bark, HPLC-DAD, Validation, Quantification

*Betula platyphylla*는 흔히 자작나무로 불리고, 한국, 일본, 중국 및 시베리아 등지에 분포하고 있다.<sup>1,2)</sup> 별목 없이 자작나무 수액과 자작나무 수피 두 가지가 얻어질 수 있으며 그 중 자작나무 수피는 전통적으로 다양한 염증 관련 질병의 치료제로써 사용되어 왔다.<sup>1)</sup> 자작나무 수피에서 diarylheptanoids와 arylbutanoids가 주요 성분으로써 분석되고 확인된 바 있고,<sup>3)</sup> 자작나무의 외피와 내피에서 각각 betulin을 포함하는 terpenoids와 함께 diarylheptanoids와 arylbutanoids같은 페놀 화합물이 보고되었다.<sup>4,7)</sup> 본 연구에서는 HPLC-DAD 방법을 이용하여 자작나무 수피의 platyphylloside, aceroside VIII 및 betulin에 대한 동시분석법을 개발하였으며, 개발된 방법에 대한 validation을 수행하여 동시분석법의 타당성을 확보하였다. 또한 확립된 분석법을 이용하여 자작나무 수피 추출물 세 배치에 대한 함량을 평가하여 본 분석방법의 응용 가능성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 연구에 사용한 자작나무 수피는 SK임업으로부터 채취 및 제공 되었고, 원료규격화 및 표준화, 동등성에 적합될 수 있도록, 자작나무 수피의 내외수피 부위별, 채취시기를 달리하여 생산하였으며, 서울대학교 농업생명과학대학 양태진교수로부터 감별 받았다. 10배수의 80% 에탄올로 4시간 동안 환류 추출한 후 농축하여 분무 건조된 시료를 사용하였다. 이 분말 20 mg을 메탄올 5 ml에 녹여 20 분간 초음파 추출한 다음 membrane filter 후 HPLC 검액으로 사용하였다. 본 연구에 사용된 platyphylloside, aceroside VIII 및 betulin 은 기존 논문의 분리법을 참조하여 각각 97.2%, 96.8%, 96.3%의 순도로분리 후 얻을 수 있었다.<sup>3)</sup>

**분석법 개발** – HPLC 기기는 Thermo사의 Ultimate 3000 system을 사용하여 분석하였다.

**이동상의 최적화** – 이동상으로 Table I에서 보는 바와 같이 acetonitrile 및 water의 다양한 비율을 적용하여 최적의 분리조건을 개발하였다. 또한 용매조성을 isocratic 및 gradient로 달리하여 분석시간 및 분리능을 고려한 최적의

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*교신저자(E-mail): shsung@snu.ac.kr

(Tel): +82-2-880-7859

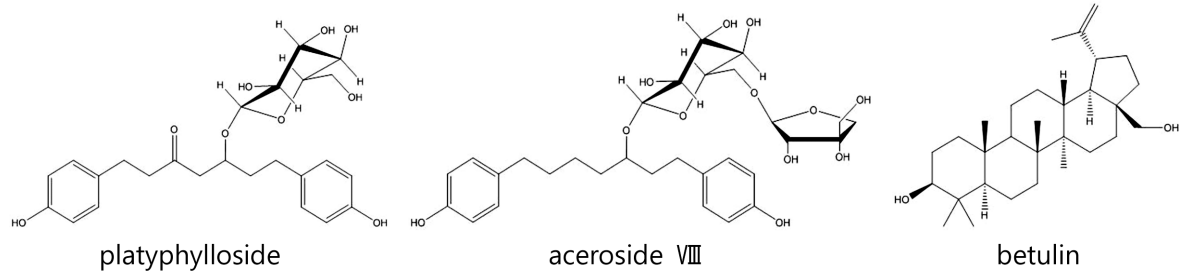


Fig. 1. Structures of marker constituents of *Betula platyphylla* bark.

분석조건을 위한 이동상을 선택하여 세 가지 성분이 모두 분리되는 방법으로 설정하였다. 각 세 가지 성분의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

**검출파장의 최적화** - 세 가지 성분 각각의 파장에 따른 민감도를 고려하여 동시분석법에서 가장 적합한 파장을 선택하였다.

#### 개발된 분석법의 검증(Validation)

**지표성분의 검량선 작성 및 직선성 검토** - 자작나무 수피의 지표성분을 각각 정확히 칭량하여 100% methanol에 녹인 후 표준용액으로 사용하였다. 유의성 있는 검량선을 얻기 위해 6가지 농도에서 실험을 실시하였으며 regression equation을  $y=ax+b$ ( $y$ 와  $x$ 는 각각 peak 면적과 지표성분의 양)의 형태로 구하여 검량선을 작성하였다.

작성된 검량선은  $R^2$ 의 값을 통하여 직선성을 판단하였으며  $R^2$ 의 값이 0.99이상인 경우 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

**특이성(Specificity) 검토** - 확립된 분석법을 통하여 분리된 각각의 지표성분 피크가 추출물 내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 PDA 검출기를 이용하여 피크의 순도를 검토하여 판단하였다. 즉, 각각의 피크에 대하여 여러 점에서 UV 흡수 스펙트럼을 판단하고 이것이 모두 일치하는 경우 피크의 특이성을 인정하였다.

**정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy) 평가** - 표준품의 정밀성은 각각 5가지 농도를 3회 반복 측정하여 상대표준편차로써 기준에 적합한지 평가하였다. Intra-day precision 및 accuracy는 자작나무 수피 추출물에 농도를 알고 있는 표준액을 비율을 달리하여 3가지로 혼합한 시료를 각각 3회 반복하여 상대표준편차를 구하여 평가하였다. Inter-day precision 및 accuracy는 자작나무 수피 추출물에 농도를 알고 있는 표준액을 비율을 달리하여 3가지로 혼합한 시료를 시험일자를 변경하여 3일에 걸쳐 3회 반복하여 상대표준편차로써 평가하였다.

**시스템 적합성(System Suitability) 평가** - 각각 표준품의 유지 시간, 분리도 및 이론단수를 시험일자를 변경하여 3일에 걸쳐 실험하여 유지 시간은 상대표준편차로써 평가하

였고, 분리도는 1.5이상, 이론단수는 2000이상 나오는지를 확인하여 분석법 검증에 사용되는 시스템이 적합한지를 판단하였다.

**안정성 평가** - 용매에 녹여진 용액이 시험법 검증을 수행하는 동안에 변화는 없는지 확인하기 위하여 자작나무 수피 추출물 및 추출물에 농도를 알고 있는 표준액을 비율을 달리하여 3가지로 혼합한 시료 등 총 4가지를 24시간 후에 동일하게 시험하여 회수율이 95~105% 범위에 포함되는 경우 제조한 시료들이 안정성이 있다고 인정하였다.

**확립된 동시분석법을 이용한 자작나무 수피 추출물의 함량 평가** - 본 연구를 통하여 확립된 분석법의 효율성을 검토하기 위하여 자작나무 수피 추출물 3 batch에 대하여 지표성분의 함량평가를 수행하였다.

#### 결과 및 고찰

**분석조건의 확립** - 자작나무 수피의 지표성분인 platyphylloside, aceroside VIII 및 betulin에 대한 동시 정량 분석법을 확립하고자 다양한 용매 조성 및 파장에 대하여 분석조건을 검토한 결과 INNO C18 column(5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$ 150 mm)을 이용하여 Table I의 용매조건으로 UV 200 nm의 검출파장을 확립하였다. 이 방법을 이용하여 자작나무 수피를 분석한 결과 platyphylloside, aceroside VIII 및

Table I. Solvent gradient conditions for HPLC-DAD

Final time (min)	Solvent A	Solvent B	Flow rate (ml/min)
0	85	15	1
15	70	30	1
20	0	100	1
25	0	100	1
30	85	15	1
40	85	15	1

Solvent A; Water  
Solvent B; Acetonitrile

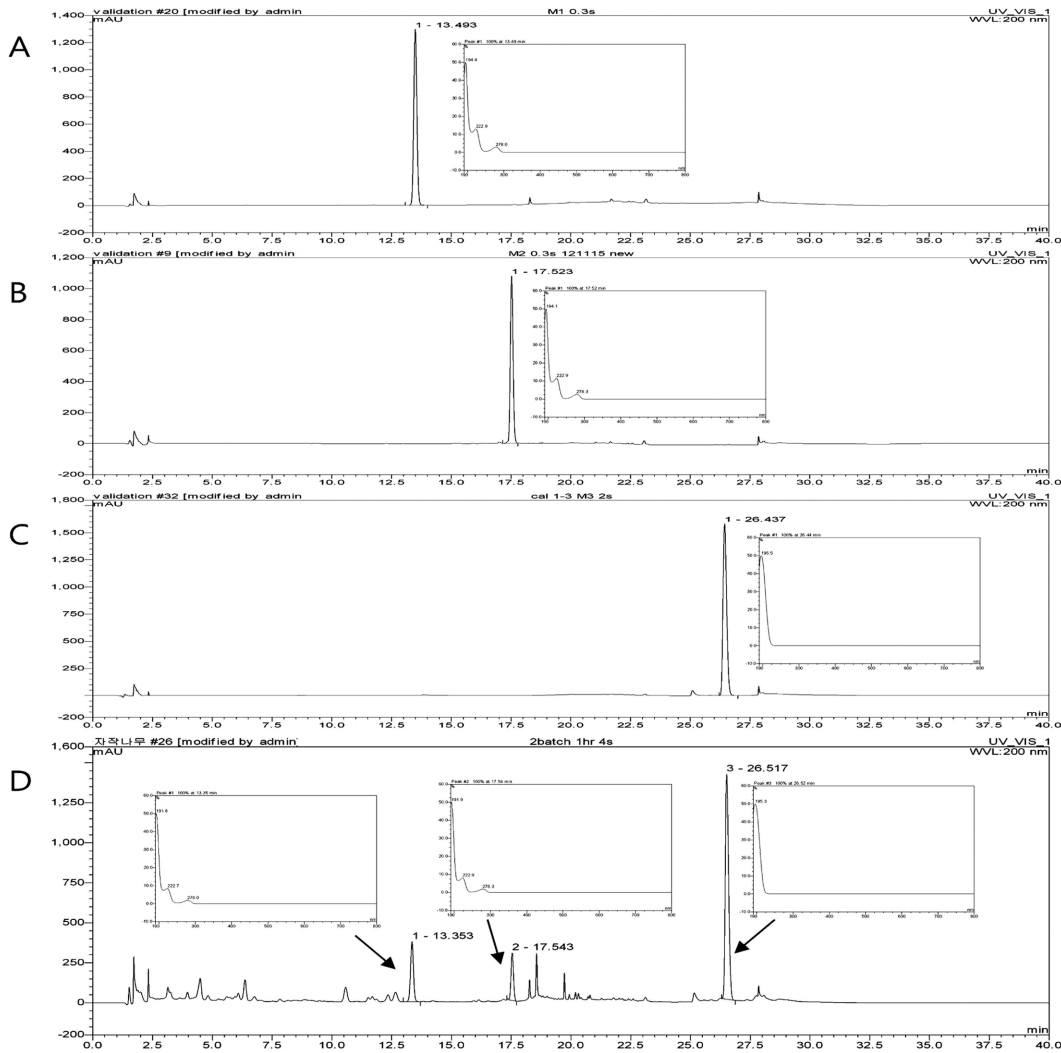


Fig. 2. Chromatogram of platyphylloside (A), aceroside VIII (B), betulin (C) and *Betula platyphylla* bark (D).

betulin의 분석이 가능하였다(Fig. 2). Lee 등(2012)은 platyphylloside와 aceroside VIII으로 자작나무 수피를 분석한 바 있고,<sup>8)</sup> Dehelean 등(2012)은 betulin으로 자작나무 수피를 분석한 바 있다.<sup>9)</sup> 본 논문에서는 자작나무 수피에서 세 가지 compounds에 대한 동시분석법을 확립하여 더 정확한 품질 평가가 가능하도록 하였다.

**자작나무 수피의 동시분석법 검증**

**직선성 검토** - 자작나무 수피의 지표성분인 platyphylloside, aceroside VIII 및 betulin은 넓은 범위에서 좋은 직선성( $R^2 > 0.999$ )을 보였다(Table II).

**분석법의 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy) 검토** - Intra-day precision 및 accuracy는 platyphylloside, aceroside

Table II. Linear range and characteristic parameters of calibration curve of platyphylloside, aceroside VIII and betulin of *Betula platyphylla* bark

Compound	Linear range (µg/µl)	Linear regression equation a $y=ax+b$		Correlation Coefficient ( $R^2$ )
		Slope (a)	Intercept (b)	
Platyphylloside	0.0125-0.2	60.21	0.807	0.9999
Aceroside VIII	0.0218-0.35	44.29	0.342	0.9990
Betulin	0.125-2	14.49	0.835	0.9999

y=peak area, x=concentration (µg/µl)

**Table III.** Analytical result of intra-day and inter-day precision

Compound	Intra-day			Inter-day		
	Conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	STDEV	R.S.D (%)	Conc. (g/ul)	STDEV	R.S.D (%)
Platyphylloside	0.86	0.01	0.67	0.86	0.01	0.68
	1.04	0.02	1.47	1.04	0.01	0.55
	1.28	0.01	0.45	1.28	0.01	0.79
Aceroside VIII	0.60	0.01	0.97	0.60	0.00	0.48
	0.92	0.01	1.26	0.92	0.01	0.62
	1.32	0.01	0.44	1.32	0.01	0.86
Betulin	8.67	0.01	0.07	8.67	0.12	1.31
	10.70	0.00	0.02	10.70	0.11	0.99
	13.30	0.21	1.55	13.30	0.16	1.20

**Table IV.** Analytical result of intra-day and inter-day accuracy

Compound	Intra-day		Inter-day	
	Accuracy (%)	R.S.D (%)	Accuracy (%)	R.S.D (%)
Platyphylloside	98.84	0.69	98.42	0.95
	98.38	1.08	98.54	0.94
	97.93	0.66	97.22	0.96
Aceroside VIII	98.97	0.57	99.61	0.73
	98.60	1.20	100.04	1.32
	96.21	0.31	97.14	1.07
Betulin	97.27	0.04	98.78	1.32
	99.19	0.01	99.22	0.99
	100.08	1.55	99.66	1.19

**Table V.** Analytical result of system suitability

Compound	Replicate	Retention time (min)	Resolution	Theoretical plate number
Platyphylloside	Mean	13.51	19.89	58021
	STDEV	0.00	0.11	971.19
	R.S.D	0.02	0.57	1.67
Aceroside VIII	Mean	17.58	5.07	127101
	STDEV	0.01	0.01	1797.03
	R.S.D	0.03	0.11	1.41
Betulin	Mean	26.55	7.00	121697
	STDEV	0.02	0.17	2815.87
	R.S.D	0.07	2.43	2.31

VIII 및 betulin 모두 2% 이하의 상대표준편차를 나타내었으며, inter-day precision 및 accuracy도 마찬가지로 모두 2% 이하의 상대표준편차를 나타내었다(Table III, IV).

**시스템 적합성(System Suitability) 검토** - 각 성분의 분리도는 4이상, 이론단수는 50000이상으로 분석법 검증에 사용되는 시스템이 적합한 것으로 나타났다(Table V).

**안정성 검토** - 자작나무 수피 추출물 및 추출물에 농도를 알고 있는 표준액을 비율을 달리하여 3가지로 혼합한 시료 등 총 4가지를 24시간 후에 동일하게 시험한 결과 회수율이 98~103% 범위에 포함되는 것으로 나타나 제조된 시료들이 안정성이 있다고 인정되었다(Table VI).

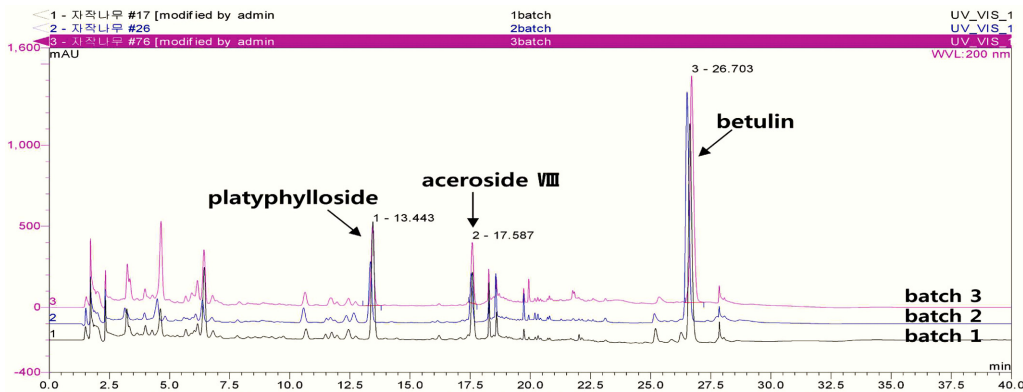


Fig. 3. HPLC Chromatogram of three batches of *Betula platyphylla* bark extract.

Table VI. Analytical result of stability test

Compound	0 hr	24 hr	Recovery (%)
Platyphylloside	0.80	0.80	99.75
	0.86	0.84	98.14
	1.04	1.03	99.69
	1.27	1.26	99.61
Aceroside VIII	0.50	0.50	100.58
	0.60	0.60	100.35
	0.91	0.93	102.27
	1.32	1.35	102.14
Betulin	8.36	8.26	98.81
	8.68	8.79	101.30
	10.70	10.66	99.62
	13.16	13.23	100.53

Table VII. Average contents (%) of platyphylloside, aceroside VIII and betulin from three batches.

Sample	Platyphylloside	Aceroside VIII	Betulin
Batch 1	3.75	2.38	40.88
Batch 2	2.57	2.27	39.52
Batch 3	2.84	2.47	41.77

**확립된 동시분석법을 이용한 세 배치의 지표성분 함량 평가**

본 연구를 통하여 확립된 분석법으로 세 배치에서 platyphylloside, aceroside VIII 및 betulin을 분석하고(Fig. 3), 각각의 함량을 평가하였다. 계산된 함량결과는 각 지표 성분 표준품의 linear range안에 포함되었으며 함량 결과는 Table VII에 나타내었다.

**결 론**

본 연구를 통해 자작나무 추출물의 platyphylloside,

aceroside VIII 및 betulin에 대한 동시 분석 정량법을 확립하고 이를 검증하였다. 자작나무의 지표성분이 설정되었으며, 3가지 성분을 동시에 분석할 수 있도록 그 조건을 확립함으로써 경제적, 시간적 및 인력에 대한 효율을 증대시킬 수 있었으며 본 분석법으로 자작나무 추출물의 품질관리에 신속하고 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

**사 사**

본 연구는 산림청과제인 산림과학기술개발사업 중 “자작나무 부산물을 이용한 인지능력 개선 건기식 소재의 개발”에 의하여 수행되었음.

**인용문헌**

- Huh, J. E., Baek, Y. H., Kim, Y. J., Lee, J. D., Choi, D. Y. and Park, D. S. (2009) Protective effects of butanol fraction from *Betula platyphylla* var. *japonica* on cartilage alterations in a rabbit collagenase-induced osteoarthritis. *J. Ethnopharmacol.* **123**: 515-521.
- Fuchen, S., Jingwen, L., Takayoshi, K. and Shaoquan, N. (2001) Resources of the white birch (*Betula platyphylla*) for sap production and its ecological characteristics in northeast china. *Eurasian J. For. Res.* **2**: 31-38.
- Kim, S. H., Park, J. H., Kim, T. B., Lee, H. H., Lee, K. Y., Kim, Y. C. and Sung, S. H. (2010) Inhibition of antigen-induced degranulation by aryl compounds isolated from the bark of *Betula platyphylla* in RBL-2H3 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**: 2824-2827.
- Matsuda, H., Ishikado, A., Nishida, N., Ninomiya, K., Fujiwara, H., Kobayashi, Y. and Yoshikawa, M. (1998) Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 2939-2944.
- Jiang, H., Shen, Y., Yasuda, E., Chiba, M. and Terazawa, M.

- (2001) Phenolic glucosides from Inner bark of shirakamba birch, *Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* Hara. *Eurasian J. For. Res.* **3**: 49-54.
6. Zhang, Z. and Hong, S. (2004) Determination of betulin content from bark of *Betula platyphylla* Suk by HPLC. *Chemistry and Industry of Forest Products.* **24**: 61-63.
7. Zhang, Y., Yu, T. and Wang, Y. (2003) Extraction of betulin from bark of *Betula platyphylla* by supercritical carbon dioxide extraction. *J Forest Res.* **14**: 202-204.
8. Lee, K. Y., Jeong, E. J., Huh, J. M., Cho, N. K., Kim, T. B., Jeon, B. J., Kim, S. H., Kim, H. P. and Sung, S. H. (2012) Cognition-enhancing and neuroprotective activities of the standardized extract of *Betula platyphylla* bark and its major diarylheptanoids. *Phytomedicine.* **19**: 1315-1320.
9. Dehelean, C., Șoica, C., Ledești, I., Aluș, M., Zupko, I., Gălușcan, A., Pinzaru, S. and Munteanu, M. (2012) Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. *Chem Cent J.* **6**: 137-145.
- (2014. 10. 20 접수; 2014. 11. 12 심사; 2014. 12. 5 게재확정)