

비파엽 품질 비교 분석을 위한 Triterpenic Acid의 추출 방법

이경인^{1,4*} · 박문영² · 표병식³ · 김선민³

¹동신대학교 생물자원산업화지원센터, ²전남농업기술원 난지과수시험장,
³동신대학교 한약재산업학과, ⁴조선대학교 바이오신약개발학과

Development of an Effective Extraction Method for the Quality Control of *Eriobotryae Folium* : Determination of Triterpenic Acids

Kyoung-In Lee^{1,4*}, Moon-Young Park², Byoung-Sik Pyo³ and Sun-Min Kim³

¹Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju 520-811, Korea

²Jeollanamdo Agricultural Research and Extension Services, Haenam 536-824, Korea

³Dept. of Oriental medicine materials, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

⁴Dept. of Bio New Drug Development, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract – In result of analysis for the content determination of ursolic acid(UA) and oleanolic acid(OA) in extract of *Eriobotryae folium* using HPLC with UV detector, UA in chloroform extract of Moo-mok variety was showed highest content(2.7843 mg/g). And OA in ethyl acetate extract of Dae-bang variety was showed highest content(0.5898 mg/g). These result suggest that direct extraction using organic solvent(chloroform or ethyl acetate) was useful method for rapid quantitative analysis of UA and OA without preprocessing such as drying or fractionation.

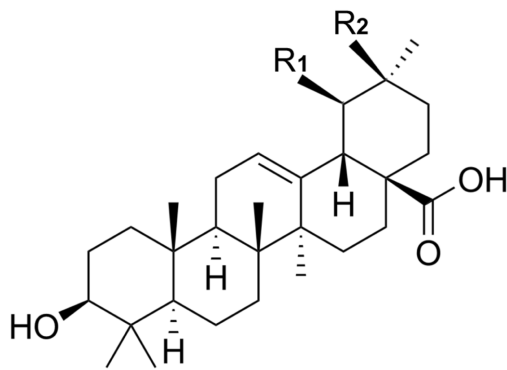
Key words – Ursolic acid, Oleanolic acid, *Eriobotrya japonica*, Triterpenic acid, HPLC analysis

비파엽은 대한약전 수재 생약으로 장미과의 비파나무 잎이다. 상록성 교목으로 잎은 연한 갈색이고 섬모가 밀생한다. 한방 관련 의서에는 성미가 微寒하고 맛이 쓴 약재로 정의하고 있으며, 清肺止咳, 和胃降逆, 風熱咳嗽, 鎮咳, 祛痰, 健胃 등의 효능이 있는 것으로 전하고 있다.¹⁾ 비파엽에 함유되어 있는 성분으로는 ursolic acid, oleanolic acid, amygdalin를 비롯하여 여러 가지 유기산류 및 tannin이 알려져 있다. 대한약전의 시험법에서 비파엽은 약품으로서 ursolic acid를 포함하여야 하는 것으로 정해져 있다. 그러나 박층크로마토그래피(TLC, thin layer chromatography)법에 의한 정성 시험법으로만 되어있어 그 함량에 따른 품질을 확인하기 어려운 것이 현실이다. 실제로 ursolic acid와 이성질체인 oleanolic acid는 여러 가지 생리활성을 나타내는 물질로 보고되고 있으므로 비파엽에서 이들 성분의 함량은 중요한 지표가 된다. Oleanolic acid는 항생제인 vancomycin에 내성을 가진 균주를 비롯한 병원성 미생물에

대한 항균활성을 비롯하여 기억력이나 학습능력 향상 등의 활성을 가지는 것으로 보고되고 있다.^{2,4)} Ursolic acid의 경우 oleanolic acid와 마찬가지로 여러 가지 병원성 미생물에 대한 항균활성과 함께 항암활성, 항경련효과 등 oleanolic acid보다 다양한 활성이 알려지고 있다.⁵⁻¹¹⁾

이와 같이 여러 가지 활성을 가지는 oleanolic acid와 ursolic acid는 구조적으로 pentacyclic triterpenoid로 Fig. 1에서 보는 바와 같이 실제로 분자량이 동일하고 구조가 거의 유사한 화합물에서 실제로 두 물질이 함께 존재하였을 경우 분리 분석이 쉽지 않았다. 그러나 최근 연구에서 UV-검출기가 장착된 HPLC만으로도 동시에 분석이 가능한 방법이 소개되었다.¹²⁻¹³⁾ 본 연구에서는 이러한 분석법을 활용할 수 있도록 비파엽의 주요 성분으로 알려진 ursolic acid와 이성질체인 oleanolic acid의 추출을 보다 간단하고 효율적으로 실시할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 특히 전남이나 경남, 제주 등지에서 다양한 품종의 비파가 재배되고 있으며, 여러 가지 신규 품종들이 육종되어지고 있다는 점은 이와 같은 비교 분석 방법의 개발이 필요한 중요한 원인이 된다. 품종에 따른 비파엽의 ursolic acid와 oleanolic

*교신저자(E-mail): kilee@bic.re.kr
(Tel): +82-61-336-3118



	R ₁	R ₂
OA	CH ₃	H
UA	H	CH ₃

Fig. 1. Structures of oleanolic acid(OA) and ursolic acid(UA).

acid의 함량을 비교적 신속한 방법으로 분석할 수 있는 방법을 정립하기 위해 조지방 추출에 사용되는 soxhlet 추출기를 이용한 추출법을 적용하여 대방, 미황, 무목, 전중 등 4가지 품종의 비파엽의 성분을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료 - 실험에 사용된 비파엽은 전라남도농업기술원의 난지과수재배시험장에서 2010년 1월에 채취한 것으로 품종은 대방, 무목, 미황, 전중 등 4종을 시료로 사용하였다.

시료의 선별 및 전처리 - 성분의 추출과 수분측정에 사용될 품종별 비파엽은 이물질을 제거한 후 잎의 중량이 5±1 g 이고 외부 손상이 없는 것을 선별하여 사용하였다. 선별된 잎은 추출시 사용되는 원통용지에 잘 들어갈 수 있도록 가로, 세로가 일정한 크기가 되도록 절제하였으며, 그 크기는 1 cm가 넘지 않도록 하였다.

시약 및 기기 - 실험에 사용된 HPLC는 Shimadzu(Japan)의 LC-10Avp를 사용하였으며, 추출기는 Büchi(Switzerland)의 B-811을 사용하였다. 표준물질의 ursolic acid와 oleanolic acid는 Sigma(USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외의 추출과 이동상 시약은 HPLC grade 또는 특급시약을 사용하였다.

수분 분석 - Oleanolic acid와 ursolic acid 함량의 변수로 작용할 수 있는 수분의 측정은 105°C 상압가열건조법으로 분석하였다.

표준용액 제조 및 검량곡선 작성 - Ursolic acid와 oleanolic acid 표준품을 methanol에 용해시켜 농도가 각각 20, 40, 60, 80, 100 ppm이 되도록 표준용액을 만들고 0.2 µm syringe filter로 여과한 후 HPLC에 주입하여 얻은 농도별 피크면적으로 검량곡선을 작성하였다.

Ursolic acid, oleanolic acid 추출 및 분석 - 추출은 일반적인 조지방 함량분석을 위하여 사용되는 soxhlet 추출기를 이용하여 2시간씩 실시하였으며, 추출물은 60°C에서 추출용매를 완전히 증발시킨 후 methanol에 재용해시켜 ursolic acid와 oleanolic acid 분석용으로 사용하였다. 0.2 µm syringe filter로 여과한 각각의 추출물의 UA와 OA 함량 분석을 다음과 같은 조건에서 실시하였다. Column은 ODS(4.6×250 mm)를 사용하였고, column oven 온도는 40°C, detector는 UV 210 nm, 이동상은 methanol과 10 mM phosphate buffer를 88:12의 비율로 조제하여 0.6 ml/min의 유속으로 분석하였다.

통계처리 - 추출은 각 품종 및 용매별로 2회씩 실시하였고 각 추출물은 2회씩 반복하여 분석을 실시하였다. 성분 분석의 결과는 평균값±표준편차(mean±SD) 형태로 표시하였으며, 각 실험군 간의 평균값에 대한 통계학적인 비교는 windows용 SPSS 12.0의 one-way ANOVA를 실행하여 신뢰구간 p<0.05에서 유의성을 부여하였다.

결과 및 고찰

Ursolic acid 및 oleanolic acid 함량 - 선행연구에서 비파엽 에탄올 추출물을 일정량의 증류수에 재용해한 후 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol을 사용하여 순차적으로 분획을 실시하여 분석을 실시한 결과, chloroform분획에 ursolic acid와 oleanolic acid가 가장 높은 농도로 존재함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 분석의 목적이 되는 물질을 용이하게 검출 및 정량하기 위한 방법의 하나로 추출단계에서 선택성이 좋은 용매를 적용하는 것이 유리할 수 있음을 보여주는 것으로 분석에 필요한 시간이나 노력을 줄일 수 있으며, 추출과 분획 등으로 이어지는 과정에서 발생할 수 있는 시료의 손실이나 변화를 최소화시킬 수 있는 방안이 될 것으로 판단된다. 이에 저자들은 추출용매로 chloroform과 함께 극성이나 끓는점 등 물리적 특성이 chloroform과는 다른 petroleum ether와 ethyl acetate 등 3종의 용매를 이용한 성분 추출을 실시하였다. Petroleum ether의 경우 끓는점은 35~52°C로 사용 용매 중 가장 낮고, 비극성인 용매이다. Chloroform은 끓는점이 61°C이고 극성의 세기(ε°)가 0.31정도이며, ethyl acetate는 끓는점 77°C, 극성의 세기 0.48인 용매이다.

본 실험에서 실시한 분석조건으로 100 ppm 농도로 조제된 표준물질 ursolic acid와 oleanolic acid를 동시에 분석한 chromatogram을 Fig. 2에 나타냈다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 분자량이 동일하고 구조가 매우 유사한 화합물인 두 물질을 UV detector가 장착된 HPLC로 분석이 가능한 수준으로 분리가 이루어졌으며, 실제 시료 분석에서도 Fig. 3과 같이 비파엽 추출물에 존재하는 ursolic acid와 oleanolic acid

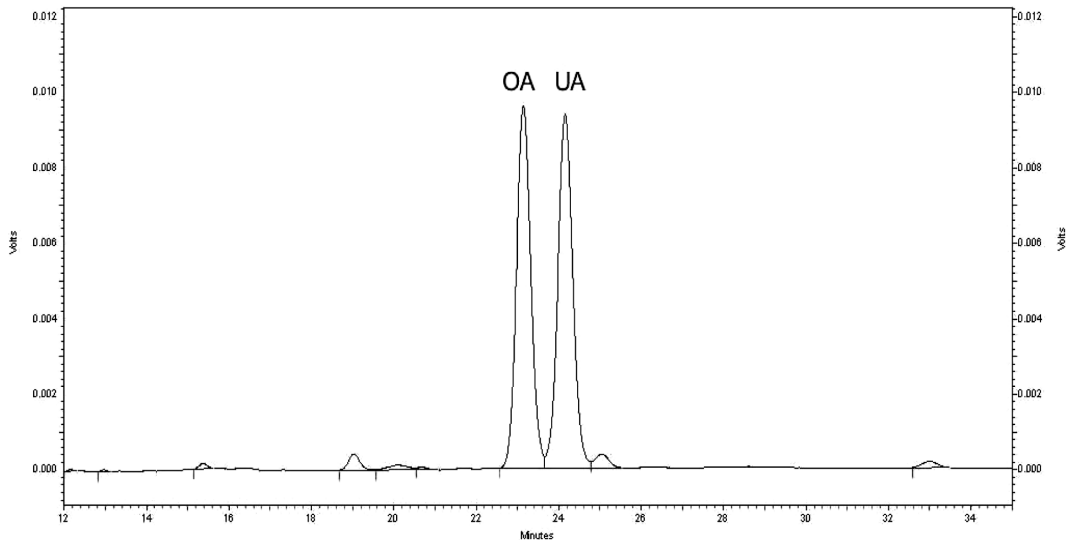


Fig. 2. Chromatogram of oleanolic acid(OA) and ursolic acid(UA).

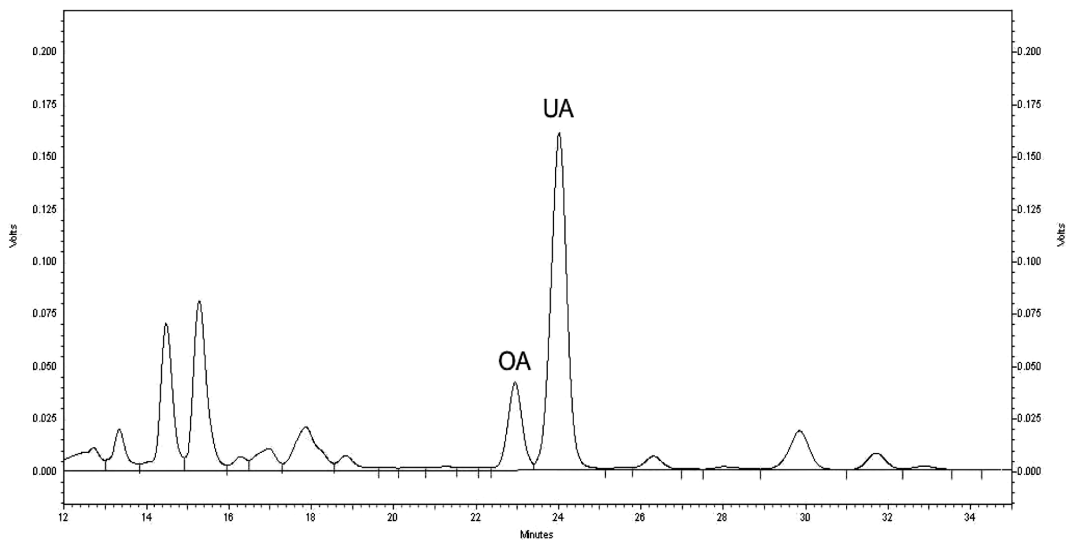


Fig. 3. Chromatogram of extract from Eriobotryae folium.

의 분석이 가능함을 확인하였다.

Ursolic acid와 oleanolic acid의 농도별 표준용액의 피크 면적을 기준으로 검량곡선을 작성한 결과, Table I에 나타난 것과 같이 각 성분의 직진성(R^2)이 0.9961과 0.9973으로 대체로 높게 나타났다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 비파엽의 추출용매별 ursolic acid 함량을 분석한 결과, ethyl acetate와 chloroform으로 추출한 시료의 ursolic acid 함량이 petroleum ether로 추출한 시료의 함량보다 월등히 높게 나타났다. Oleanolic acid의 경우에도 Fig. 5에서와 같이 petroleum ether를 이용하여 추출한 경우보다 ethyl acetate와 chloroform을 용매로 추출한 경우에 높은 함량을 나타냈다. 특히 chloroform을 용매로 사용한 경우 품종별로 ursolic acid와 oleanolic acid의 함량 경향이 유사하게 나타남으로써

Table I. Calibration curve equations of ursolic acid and oleanolic acid

Samples	Equation	R^2
Ursolic acid	$y=2475.2x+10011.0$	0.9961
Oleanolic acid	$y=2457.9x+7103.4$	0.9973

분석에 보다 유리할 것으로 판단되었다. 각각의 품종별로 함량을 보면 ursolic acid의 경우 chloroform을 용매로 사용한 무목(Moo-mok) 품종에서 2.7843 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타냈고, oleanolic acid는 ethyl acetate를 용매로 사용한 대방(Dae-bang) 품종이 0.5898 mg/g으로 가장 높은 함량을 보였다. Ursolic acid와 oleanolic acid 함량을 합산해보

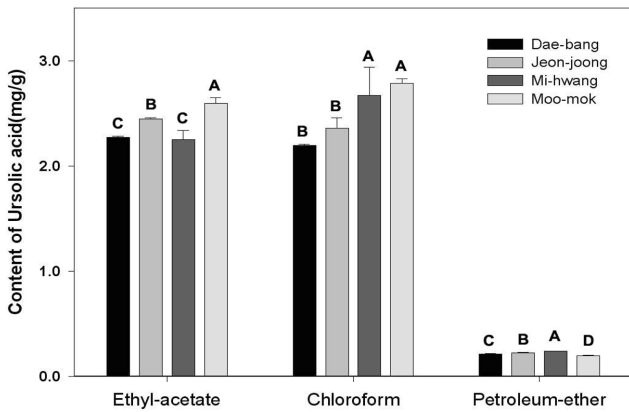


Fig. 4. Comparison of ursolic acid contents in various Eriobotryae folium. Values are mean±SD(n=4). Different superscript letters in the same solvent show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

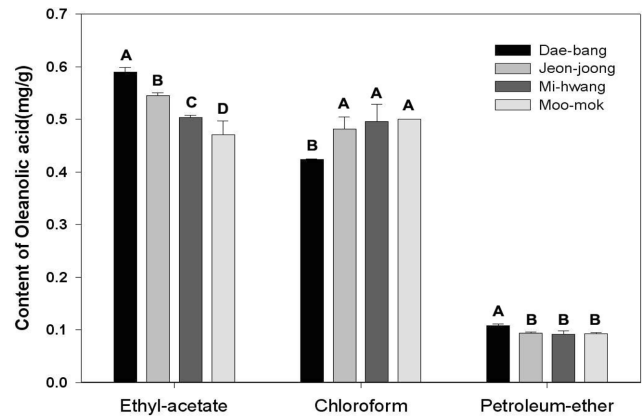


Fig. 5. Comparison of oleanolic acid contents in various Eriobotryae folium. Values are mean±SD(n=4). Different superscript letters in the same solvent show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

면 chloroform 추출물에서 2.6187~3.2844 mg/g, ethyl acetate 추출물에서는 2.8609~3.0647 mg/g으로 두 용매에서 유사한 함량을 보였다. Chloroform 추출물의 경우 ursolic acid 함량의 17.96~20.44%에 해당하는 oleanolic acid가 존재하는 것으로 나타났고, ethyl acetate 추출물에서는 ursolic acid 함량의 18.15~25.97%에 해당하는 oleanolic acid가 포함되어 있는 것으로 나타나 용매별로 추출되는 물질의 비율도 달라짐을 알 수 있었다.

품종 및 용매별 추출수율 - Table II에서와 같이 전체적인 추출 수율은 ethyl acetate를 용매로 사용한 경우가 3.2493~4.3119%로 가장 높지만, 용매별 추출물 중 ursolic acid와 oleanolic acid의 비율을 살펴보면 chloroform을 용매로 사용했을 때 각각 12.1655~18.5665%와 2.3493~3.4457%

로 다른 추출용매에 비해 월등히 높음을 알 수 있다. 한편 성분함량에 영향을 줄 것으로 추측되어 측정된 각 품종별 비파엽 수분 함량은 49.23~52.84%의 범위로 나타났으며, ursolic acid와 oleanolic acid 함량에는 영향을 주지 않은 것으로 나타났다. 그러나 채엽 후 보관이나 운반 과정 중에 발생할 수 있는 수분의 변화는 성분의 함량에 영향을 미치는 요인이므로 분석 과정에 참고적으로 비교할 필요가 있을 것이다.

결론

열수나 알콜을 용매로 하는 일반적인 추출법으로는 거의 검출되지 않았거나 분획단계를 거쳐야 검출될 정도로 낮게

Table II. Extraction yields and proportions of triterpenic acids in extract

Solvents	Samples	Yields(%)	Proportions in extract(%)		
			Ursolic acid	Oleanolic acid	Amount
Ethyl acetate	Dae-bang	4.3119 ¹⁾	5.2672	1.3677	6.6349
	Jeon-joong	3.3588	7.2745	1.6222	8.8967
	Mi-hwang	3.2493	6.9196	1.5480	8.4676
	Moo-mok	3.3978	7.6342	1.3855	9.0197
Chloroform	Dae-bang	1.8041	12.1655	2.3493	14.5148
	Jeon-joong	1.5896	14.8320	3.0316	17.8636
	Mi-hwang	1.4387	18.5665	3.4457	22.0122
	Moo-mok	1.5619	17.8266	3.2020	21.0286
Petroleum ether	Dae-bang	0.4822	4.3321	2.2241	6.5562
	Jeon-joong	0.4195	5.3149	2.2337	7.5486
	Mi-hwang	0.4700	5.0124	1.9413	6.9537
	Moo-mok	0.5177	3.7262	1.7772	5.5034

¹⁾Values are mean(n=2).

나왔던 비파엽의 활성성분인 ursolic acid나 oleanolic acid를 비교적 높은 농도로 추출할 수 있는 조건을 탐색하였다. 특히 건조 등의 전처리를 거치지 않고 직접 추출을 시행함으로써 분석까지 소요되는 시간이 상대적으로 짧아 품종이나 산지, 채엽 시기 등 다양한 조건의 비파엽 품질을 평가 및 비교할 수 있는 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서 사용한 추출용매 중에서는 chloroform을 용매로 하여 추출한 후 분석하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단되었으며, ethyl acetate의 경우 ursolic acid나 oleanolic acid 이외의 성분이 상당량 동시에 추출되는 것으로 나타났다. 또한 chloroform 추출물 중 ursolic acid와 oleanolic acid의 함량을 합산한 결과, 최대 22.0122% 까지 포함됨이 밝혀짐에 따라 생약재의 가공이나 정제 단계에도 응용이 가능할 것으로 보여진다. 다만 독성을 유발할 수 있는 유기용매가 사용되므로 최종 추출물에서의 용매 잔류량과 유해성 등에 대해서는 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

인용문헌

1. 정보섭, 신민교 (2003) 圖解 鄉藥(生藥)大事典, 610-612, 영림사, 서울.
2. Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T. and Tsuchiya, T. (2007) Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant Enterococci(VRE). *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1147-1149.
3. Park, Y. S., Jang, H. J. and Paik, Y. S. (2005) Prolyl endopeptidase inhibitory activity of ursolic acid and oleanolic acid from Corni Fructus. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**: 207-212.
4. Tanachatchairatana, T., Bremner, J. B., Chokchaisiri, R. and Suksamrarn, A. (2008) Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 194-198.
5. Shai, L. J., McGaw, L. J., Aderogba, M. A., Mdee, L. K. and Eloff, J. N. (2008) Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia detata*(Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J. Ethnopharmacol.* **119**: 238-244.
6. Min, S. W., Jung, S. H., Cho, K. H. and Kim, D. H. (2008) Antihyperlipidemic effects of red ginseng, *Crataegii Fructus* and their main constituents ginsenoside Rg3 and ursolic acid in mice. *Biomolecules & Therapeutics.* **16**: 364-369.
7. Kim, B. H., Park, K. W., Kim, J. Y., Jeong, I. Y., Yang, G. H., Cho, Y. S., Yee, S. T. and Seo, K. I. (2004) Purification and characterization of anticarcinogenic compound from Corni Fructus. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 1001-1007.
8. Hah, J. C., Rhew, T. H., Choe, E. S., Chung, H. Y. and Park, K. Y. (1992) Antitumor effect of ursolic acid against inbred hepatoma in CBA/J mouse. *J. Kor. Cancer.* **24**: 790-794
9. Kim, D. Y., Choi, J. W., Park, J. C. and Lee, C. K. (1998) Anticonvulsant effect of Uncariae Ramulus et Uncus. III. Effects of ursolic acid and hyperin on neurotransmitters related components in brain tissue *in vitro*. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 187-192.
10. Lee, D. Y., Jung, L., Lyu, H. N., Jeong, T. S., Lee, Y. H. and Baek, N. I. (2009) Triterpenoids from the fruits of *Cornus kousa* Burg. as human acyl-CoA : Cholesterol acyltransferase inhibitors. *Food Sci. Biotechnol.* **18**: 223-227.
11. Lee, Y. S., Jin, D. Q., Beak, S. M., Lee, E. S. and Kim, J. A. (2003) Inhibition of ultraviolet-A-modulated signaling pathways by asiatic acid and ursolic acid in HaCaT human keratinocytes. *European J. Pharmacology.* **476**: 173-178.
12. Kontogianni, V. G., Exarchou, V., Troganis, A. and Gerothanassia, I. P. (2009) Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-comparison with HPLC methods. *Analytica Chimica Acta* **635**: 188-195.
13. Lee, M. K., Ahn, Y. M., Lee, K. R., Jung, J. H., Jung, O. S. and Hong, J. K. (2009) Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae Spica* : Determination of triterpenic acids. *Analytica Chimica Acta* **633**: 271-277.

(2010년 3월 2일 접수)