

[별지 제5호 서식]

최 종
연구보고서

플라타너스나무에서 베출린산과 그 유도체의
생산기술

Mass Production Technique of Betulinic acid and
its derivatives from *Platanus orientalis* L.

연구기관
국민대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “플라타너스나무에서 베출린산과 그 유도체의 생산기술”에 관한 연구의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 7 월 30 일

주관연구기관명 : 국민대학교

총괄연구책임자 : 김 영 균

세부연구책임자 : 김 석 찬

연 구 원 : 김 성 식

연 구 원 : 신 금

연 구 원 : 고 영 남

연 구 원 : 문 성 희

연 구 원 : 김 정 기

연 구 원 : 김 기 훈

요 약 문

I. 제 목

플라타너스나무에서 베출린산과 그 유도체의 생산기술

II. 연구개발의 목적 및 필요성

플라타너스나무는 우리나라에서 전국적으로 가로수로 가장 많이 쓰이고 있는 수종 중에 하나이다. 본 연구진은 그 동안 플라타너스나무의 추출성분에 대한 연구를 통하여 본 수종의 MeOH 추출물이 항암효과를 나타냄을 확인하였다. 여기에서 이 나무의 항암활성에 대한 유효성분으로 베출린산 (betulinic acid)을 분리하였으며, 이것이 주성분임을 확인하였다. 따라서 betulinic acid의 유용성을 개발하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

일반적으로 베출린산은 나무에 비교적 널리 존재하고 있는 성분으로 이 물질 자체는 오래 전부터 알려져 오고 있다. 그러나 90년대 중반 들어 여러 가지 천연 물질에 대한 생리활성 연구가 체계적으로 진행되면서 그 효과가 세계적으로 인정되고 있는 물질이다.

지금까지 알려진 베출린산의 생리활성효과는 대표적으로 항암효과이다. 베출린산의 암세포에 대한 작용기전 (mechanism)은 apoptosis (programmed cell death)이며, 비교적 일반적인 세포에 대하여 독성을 나타내는 taxol보다도 암세포에 특이적으로 작용하여 항암제로서 보다 더 우수하다. 실질적으로 베출린산은 암치료에 대한 화학요법제인 camptothecin, ellipticine, methramycin A, etoposide, vinblastine, 그리고 vincristine등과 비교해서 보다 특이적으로 암세포에 작용하는 물질이다.

베출린산은 또한 syncytia (cellular aggregates)의 형성을 방지하게 함으로서, AIDS를 유발시키는 HIV-1 바이러스감염의 진행과정을 저지하는 항바이러스효과도 가지고 있다.

베출린산의 위와같은 항암, 항바이러스효과 뿐만아니라, *Staphylococcus aureus* 와 *Escherichia coli*. 의 성장을 억제하는 항박테리아 효과도 가지고 있는 물질이다. 따라서 경기 북서, 북동, 남동, 그리고 남서 지역과 서울지역의 플라타너스나무 가로

수를 대상으로 채집하여 잔가지에 함유되어 있는 betulinic acid의 함량을 정량분석하여 최대 함량수목종을 알아내고자 하였다. 또한, 이 연구는 최적추출조건 및 분리정제하는 방법을 연구하여 베출린산을 대량생산화 할 수 있는 기술을 개발한다. 또한, 이 물질의 유도체를 합성하여 세포독성을 연구하고 활용할 수 있게 하도록 하고자 본 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리 나라의 대표적인 가로수종의 하나인 플라타너스나무에서 중요한 생리활성 물질인 베출린산을 정량적으로 분석하고 대량생산공정을 확립하였다. 이를 위하여 경기도의 북동지역, 북서지역, 남동 그리고 남서지역과 서울지역을 대상으로 플라타너스 가로수를 봄, 여름, 가을 그리고 겨울의 계절별로 채집하여 추출물의 양을 정량하고 특히 이들 추출물에 함유되어 있는 베출린산의 계절별 함량을 정량분석하였다. 또한 베출린산을 이용하여 이것으로부터 합성할 수 있는 유도체를 합성하였으며, 베출린산과 이들 유도체들의 생리활성 효과를 검정하였다. 그리고 베출린산을 산업적으로 대량생산하기 위한 대량생산공정을 확립하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 관심을 가지고 연구를 수행한 betulinic acid는 항암효과 및 항바이러스효과가 우수한 물질로서 이것을 이용한 신약개발의 연구가 여러 각도에서 진행되고 있는 물질이다. 본 연구진은 따라서 2년동안 국내의 대표적인 가로수종의 하나인 플라타너스나무에 함유되어 있는 betulinic acid의 함량을 분석하고 이 성분을 효율적으로 생산할 수 있는 기술을 개발하고자 실시하였다. 이 결과 플라타너스나무의 잔가지를 겨울철에 채집하여 말린 후 추출을 통하여 betulinic acid를 용이하게 대량정제 생산할 수 있는 방법을 본문에 기술한 바와 같이 개발하였다. 각 지역에서 플라타너스나무는 지역에 관계없이 그리고 계절적인 변화에 차이가 없이 다량 함유되어 있는 것을 확인함으로써 우리나라의 가로수로 널리 분포되어 있는 플라타너스나무를 계절에 상관없이 채집하여 (사실 현실적으로 동절기에 채집하는 것이 효율적이라고 판단됨) betulinic acid를 생산할 수 있다는 것을 발견하였다. 또한 본 연구를 통하여 플라타너스나무에서 betulinic acid를 효율적으로 대량 생산할 수 있는 공정을 개발하였다.

따라서 본 물질을 이용한 제품을 개발하고자 할 때 싼 원료를 이용하여 저렴한 생산비로 용이하게 생산할 수 있는 기반을 마련하였다. 또한 betulinic acid를 이용하여 그것의 여러 가지 유도체를 생산할 수 있으며 이들 유도체는 특히 항바이러스 효과가 매우 우수하여 미국에서 신약으로서의 개발과정에 있는 물질이다. 따라서 본 물질과 그 유도체를 이용하여 최우선적으로는 기능성 화장품을 만드는 원료로 보다 구체적인 산업화방안을 모색할 수 있을 것이다. betulinic acid의 유도체들은 지금 현재에는 항바이러스와 항암제에 초점을 맞추어서 연구를 진행하고있지만 이들은 분명히 다양한 세포종에 active하게 작용하고 있으며, 특히 박테리아에도 활성이 있다고 보고되었기 때문에 항바이러스 뿐 아니라 항박테리아분야의 제품개발에 대한 연구를 사용하는데 적용시켜볼 필요가 있는 물질이라고 판단된다.

본 연구를 통하여 직접적으로는 우리가 일상적으로 흔히 접할 수 있는 수목에서 고가의 의약품원료를 생산한다면, 일반 국민들의 수목에 대한 관심을 보다 높게 하고 임업인들에게는 경제적인 고소득을 얻을 수 있는 자본으로 우리의 자원을 육성할 수 있게 할 필요성이 있다.

끝으로 수목을 포함한 각종 식물들은 인류가 생명 현상을 유지하기 위하여 활용하고 있는 거의 대부분의 자원들을 공급하여 주고 있는 최대의 천연 보고라고 할 수 있다. 앞으로 우리나라의 주요 수목들에 대하여서도 지속적으로 그리고 체계적으로 여러 가지 성분들을 연구하여 본다면 이 중에는 틀림없이 플라타너스나무보다 더 훌륭한 의약품의 자원이 될 수 있는 수종 혹은 수목물질들이 있을 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY

I. Tilte

Mass Production Technique of Betulinic acid and its derivatives from *Platanus orientalis* L.

II. The Purpose of the Research and its Importance

Platanus species is one of the most wide spread shade tree by the road side in our country. It has been evaluated by our research group that the MeOH extract of the Platanus species showed cytotoxic activities on various tumor cell lines. As an active ingredient in the species for the cytotoxic event, we isolated a triterpenoid, betulinic acid (BA) which is also a main constituent of the extract. Therefore, in order to further develop the utility of BA this research was conducted.

In general, BA itself is well known for a long time and exists in various woody species. BA has been gained its acknowledgement from the early 90's while systematically biological activities has been conducted for the various natural products.

Sofar the best well-known biological activity for BA is of anti-tumor. The mode of the action of BA for the tumor cell is apoptosis and is more specifically act on tumor cells than taxol which has strong toxic effect on normal cells. Substantially, it is known that BA acts more specifically on the tumor cells than already known chemotherapeutic agents such as camptothecin, ellipticine, methramycin A, etoposide, vinblastine and vincristine. BA also has anti-viral effect by interfering the development of HIV-1 viral infection that causes AIDS.

BA has effectiveness not only for tumor and virus but also has anti-bacterial effect by showing inhibition for the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Therefore, this research had been conducted to find species that contain most abundant BA content by quantitative examination collected from northwestern, southwestern, northeastern, and southeastern parts of Gyunggi province and from the inside of Seoul area. And another purpose of this research is to develop a mass production technique of BA by finding best extracting condition and separation and purification method. Also in this research we synthesized BA's derivatives and examined their cytotoxicities to evaluate their usefulness.

III. The Scope and the Contents of Research

Through this research we analysed the content of BA quantitatively that contained in the Platanus species and established a mass production process. In order for this task, the tree branches of the Platanus species were collected from various area such as northwestern, southwestern, northeastern, and southeastern parts of Gyunggi province and from the inside of Seoul. Especially the seasonal content of BA which contained in the extract was evaluated quantitatively. Synthesis of its derivatives were carried out by using BA and their biological activities were evaluated. Finally, mass production process was established in order for industrial manufacturing.

IV. Results and Comments

BA which has attained our primary concern to conduct research has very prominent anti-tumor and anti-viral activities and various researches in the worldwide have been carried out to develop a new drug by using it. Therefore, for 2 years, this research was carried out to analyse the content of BA in which contained platanus species and to develop a best yielding technique.

As the result, through the series of process like collect the branches in winter and drying them followed by extract, mass purification method of betulinic acid was formulated as described in the content.

We confirmed that the branches collected from various location contain relatively even amount of BA. This result suggest that seasonal variation is not directly related to the BA content in the tree. So we can conclude that, if it is allowed, anyone can obtain BA from Platanus tree in any season from any where in our country (In fact, collection of branches in winter is more effective than in any other seasons). Also through a series of crystalizations we developed mass manufacturing process to produce BA effectively. For whom wants develop a commercial product that contains BA, we established the basis of manufacture with relatively simple process and low cost.

We can synthesize various derivatives from BA and these derivatives are especially so effective to HIV-1 virus that are in the state of develop as a new drug in the United States. So anyone who is groping for commercialization most preferentially can develop BA as a raw material for functional cosmetics. Although researchs about betulinic acid derivatives are at present focused at the anti-viral and anti-tumoral aspects, special attention is necessary to apply for the product development in anti-bacterial area since they have positive activity for various cells.

If we can produce valuable raw materials for medicines from trees which we can see in every daily life, we can foster trees to the public and we can recommend to bring up forest resources as economically high income capital.

Finally, various natural resources including woody plants are sources for the most of our daily products and are the utmost natural reservoir for the future. If we continuously and systematically investigate, we will find trees that make more valuable compounds than Platanus produces and we can utilize forest resources better in the future.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction.....	10
Chapter 2 The current state of research.....	13
Chapter 3 The contents and Results of Research.....	15
3.1 Collection and Extraction of samples.....	15
3.2 Partitioning of Crude Extract and Separation of Betulinic Acid.....	17
3.3 Seasonal and Regional Quantitative Analysis of Betulinic Acid of Platanus species.....	21
3.4 Mass Production of Betulinic Acid	27
3.5 Synthesis of Betulinic Acid Derivatives.....	33
3.6 Biological Assay for Betulinic Acid and its Derivatives.....	39
Chapter 4 Goal Achievement Degree and Contribution to Related Fields	47
Chapter 5 The Plan for the Future Application of Results.....	49
Chapter 6 Foreign Scientific Information Gathered During Research.....	50
Chapter 7 References.....	53

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	10
제 2 장	국내의 기술개발 현황.....	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	15
	1절 시료의 채집 및 추출.....	15
	2절 조 추출물의 분획 및 베히롤린산의 분리.....	17
	3절 계절별, 지역별 플라타나스나무의 betulinic acid 함량의 정량 분석.....	21
	4절 Betulinic Acid 대량생산공정	27
	5절 베히롤린산 유도체의 합성.....	33
	6절 betulinic acid와 그 유도체의 생리활성검정.....	39
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	47
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	49
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	50
제 7 장	참고문헌.....	53

제 1 장 연구개발과제의 개요

플라타너스나무는 우리나라에서 전국적으로 가로수로 가장 많이 쓰이고 있는 수종 중에 하나이다. 본 연구진은 그 동안 “한국산 수목으로부터 생리활성 물질개발과 생리활성 검색자료 전산화”의 연구수행과정에서 플라타너스나무의 추출성분에 대한 연구를 통하여 본 수종의 MeOH 추출물이 항암효과를 나타냄을 관찰하였다. 여기에서 이 나무의 항암활성에 대한 유효성분으로 베출린산 (betulinic acid)을 분리하였으며, 이것을 주성분임을 확인하였다⁽¹⁾. 따라서 betulinic acid의 유용성을 개발하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

일반적으로 베출린산은 나무에 비교적 널리 존재하고 있는 성분으로 이 물질자체는 오래 전부터 알려져 오고 있다. 그러나 90년대 중반 들어 이 물질에 대한 생리활성 연구가 체계적으로 진행되면서 그 효과가 세계적으로 인정되고 있는 물질이다.

지금까지 알려진 베출린산의 기능을 간단히 요약하면 다음과 같다.

항암효과--베출린산의 암세포에 대한 작용기전 (mechanism)은 apoptosis (programmed cell death)이며, 비교적 일반적인 세포에 대하여 독성을 나타내는 taxol 보다도 암세포에 특이적으로 작용하여 항암제로서 보다 더 우수하다. 실질적으로 베출린산은 암치료에 대한 화학요법제인 camptothecin, ellipticine, methramycin A, etoposide, vinblastine, 그리고 vincristine등과 비교해서 보다 특이적으로 암세포에 작용하는 물질이다⁽²⁾.

항바이러스효과--베출린산은 syncytia (cellular aggregates)의 형성을 방지하게 함으로써, AIDS를 유발시키는 HIV-1 바이러스감염의 진행과정을 저지한다⁽³⁾.

베출린산의 위와같은 항암, 항바이러스효과 뿐만 아니라, *Staphylococcus aureus* 와 *Escherichia coli*. 의 성장을 억제하는 항박테리아 효과도 가지고 있는 물질이다.

결론적으로, 지금까지 알려진 사실로서 베출린산은 독성이 적으며, 상대적으로 가격이 저렴하며, 자작나무에서 추출하는 베출린 (betulin)으로부터 합성할 수 있는 물질로서, 현재 전임상 (preclinical)실험을 하고 있는 물질이다⁽⁴⁾.

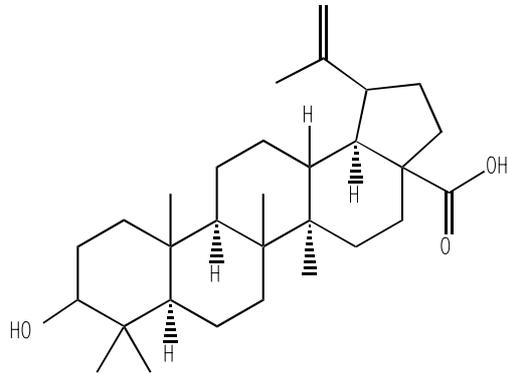


그림 1-1. 베출린산 (betulinic acid)의 화학구조

화학적인 측면에서 베출린산은 오환의 (pentacyclic) triterpenoid 화합물로서 3번위의 hydroxyl group과 28번위의 carboxyl group 그리고 22번의 exo-methylene group 을 가지고 있는 비교적 nono-polar한 천연물질이다. 이와 유사한 구조를같은 triterpenoids는 천연자원에 -특히, 각종 수목에- 비교적 광범위하게 존재하고 있으나 이들 대부분의 수종들에 있는 베출린산의 함량은 아주 적은 실정이며, 실제로 베출린 산을 산업적 혹은 의약품 생산제조 목적에 적합한 수종으로는 자작나무(birch), 산대 추나무 등으로 그 이용가능한 수종이 매우 제한되어 있다.

한편, 우리 나라 가로수의 상당 부분을 차지하고 있는 플라타너스나무는 양 버즘나무 (*Platanus occidentalis* L.)와 버즘나무(*Platanus orientalis* L.)로서 이들은 높이 15m 정도의 낙엽성 교목으로 그 성장속도가 매우 빨라 가로수의 역할을 수행할 수 있는 일정 크기에 도달하는데 불과 3-4년 안팎의 세월이 소요되며 이후 이들은 지속적으로 성장하여 오히려 많은 낙엽을 만들어 내고 각종 해충들의 온상이 되는 등 여러 가지 부작용이 야기되고 있는 실정이다. 이러한 문제점을 해소하기 위하여 현재 우리 나라에서는 해마다 낙엽이 진 이후 가을부터 이듬해 봄에 걸쳐 집중적인 가지치기 작업을 실시하고 있으며 이와 같은 대규모의 플라타너스나무 가지치기작업은 엄청난 양의 잔가지 쓰레기를 양산하는 결과를 초래하고 있다. 이들 쓰레기는 일부 소각 처리 되거나 매립되기도 하지만 대부분의 경우 그냥 산야에 방치되는 실정이다. 본 연구은 이러한 플라타너스나무를 계절별로 봄 (5월), 여름 (8월), 가을 (11), 겨울 (2월)에 그리고 지역별로 경기 북서, 북동, 남동, 그리고 남서 지역과 서울지역의 가로수를 대상으로 채집하여 잔가지에 함유되어 있는 betulinic acid의 함량을 정량분석하여

최대 함량시기를 알아내고 최적추출조건 및 분리정제하는 방법을 연구하여 베출린산을 대량생산화 할 수 있는 기술을 개발하고 이 물질의 유도체를 합성하여 세포독성을 연구하고 활용할 수 있게 하도록 하고자 한다.

우리 나라에 자생하고 있는 수목들의 대부분은 공익적인 가치를 제외할 때 목재로서의 재료 또는 관상용 이상의 가치를 가지고 있는 경우는 극히 일부 수종에 지나지 않는다. 그 이유는 이들 수목에 대한 체계적이고 과학적인 성분연구가 미진 혹은 전무하였던 결과에 기인한다고도 말할 수 있다.

수목을 포함한 각종 식물들은 인류가 생명 현상을 유지하기 위하여 활용하고 있는 거의 대부분의 자원들을 공급하여 주고 있는 최대의 천연 보고라고 할 수 있다.

앞으로 우리 나라의 주요 수목들에 대하여도 지속적으로 그리고 체계적으로 여러 가지 성분들을 연구하여 본다면 이 중에는 틀림없이 플라타너스나무보다 더 훌륭한 의약품의 자원이 될 수 있는 수종 혹은 수목물질들이 있을 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구를 통하여 직접적으로는 우리가 일상적으로 흔히 접할 수 있는 수목에서 고가의 의약품원료를 생산한다면, 일반 국민들의 수목에 대한 관심을 보다 높게 하고 임업인들에게는 경제적인 고소득을 얻을 수 있는 자본으로 우리의 자원을 육성할 수 있게 한다.

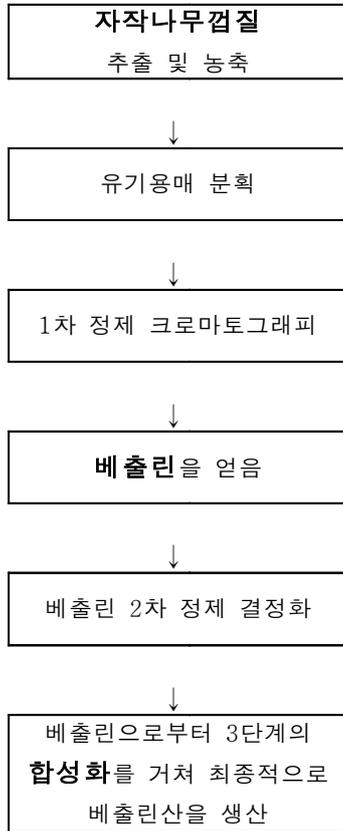
제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근 베출린산과 관련된 미국의 특허 등록을 보면 1996년부터 2002년 현재까지 52건이 등록되어 있다 (6장 참조). 현재 베출린산의 이용에 관한 연구는 미국의 NIH 및 시카고의 일리노이대학 그리고 독일에서 활발히 연구가 되고 있다.

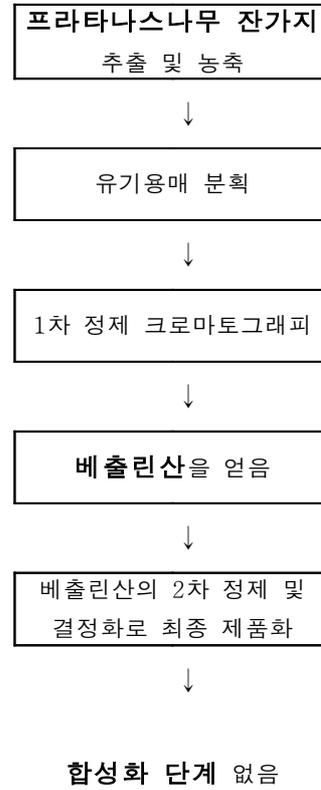
이들 특허 목록에서 보는 바와 같이 베출린산의 생산기술에 관해서는 자작나무에서 생산기술이 1998년 특허로 되어 있다. 또한 이 특허기술은 자작나무에서 베출린 (betulin)을 얻은 후 3번 -OH group을 선택적으로 protect 한 후 28번 -OH group을 oxidation시켜 carboxyl group으로 전환시킨 후 다시 3번 -OH group을 deprotect 하는 과정을 거친다. 그러나 본 연구는 이러한 화학적 처리가 없이 우리나라에 널리 존재하는 수목에서 직접 베출린산을 대량 얻는 방법으로, 국내에는 본인의 연구에 의한 플라타너스나무에서 베출린산의 생산기술이외에 보고된바가 없다.

따라서 미국에서 베출린산의 생산기술과 본 연구진의 생산기술을 간단히 비교 살펴 보면, 다음장의 도식 2-1에서 보는 바와 같이 생산과정에서 어려운 합성과정이 없으므로 생산단가를 절감하여 외국과의 경쟁력을 갖출 수 있다고 판단된다.

외국의 베출린산
생산과정



본 연구진에 의한
생산기술



도식 2-1. 베출린산의 합성과정과 정제과정의 흐름도

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 시료의 채집 및 추출

연구시작 단계부터 계절별로 플라타너스나무를 계절별로 봄, 여름, 가을, 겨울에 그리고 지역별로 경기 북서, 북동, 남동, 그리고 남서 지역과 서울지역의 가로수를 대상으로 가지를 채집하였다. 채집현황의 모습을 그림3-1에 나타냈으며 채집시는 미관을 해치지 않는 범위에서 가급적 넓은 범위에 걸쳐 채집하였다. 각 지역별로 1회 채집량의 5-10kg 정도를 하였다.



그림 3-1. 플라타너스나무의 잔가지의 채집장면

채집한 지역은 경기도의 남서지역으로 화성군일대, 경기남동지역으로 양평군일대 북동지역으로 포천지역그리고 북서지역으로 파주시근방에서 채집하였다. 그리고 서울지역으로는 성북구일대를 선정하여 채집하였다. 원활한 채집을 위하여 협조하여주시는 각군청의 공원녹지과과 시청 구청의 관계자여러분께 지면을 통해 감사함을 전한다. 위의 sample 들 채집되어서 잎을 제거한 후 그늘진 곳에서 기건한 후 고속분쇄기를

통해 분쇄하였다. 채집부위는 나무의 잔가지를 대상으로하며, 다발의 형태 (그림 3-2)로 트럭으로 이송하였다.



그림 3-2. 채집한 플라타너스 가지의 형태

채집된 원료는 잘게 부순 후 3일간 기건하였다. 각지역에서 채집한 시료들의 보관형태에 대하여는 표 3-1에 나타내었다.

표 3-1. 채집한 시료들의 보관형태

계절	지역 보관형태	남서지역	남동지역	북동지역	북서지역	서울지역
		(화성군)	(양평군)	(포천일대)	(과주지역)	(성북구)
여름 (8월하순)	분말	2 packs	1,1/2	2	1, 1/2	1, 1/2
	묶음	1 bundle	2	4	4	1
가을 (11월하순)	분말	fine 1	rough 1	rough 1	rough 1	rough 1
	묶음	2 bundle	5~6	3	3	3
봄 (5월하순)	분말	rough 1				
	묶음
겨울 (2월하순)	분말	rough 1, fine 1				
	묶음

기건된 시료를 잘게 부수어 추출용 재료로 하였다. 추출방법은 최대의 추출량을 얻을 수 있도록 MeOH에 함침한 후, 50-60°C로 중탕냄비에서 Mechanical stirrer로 저어 주면서 1시간 가량 추출하였다.

추출액이 식기 전에 Buchner funnel을 이용하여 여과하고 여과액은 rotary vacuum evaporator에서 농축하였다.

농축물은 갈색병에 옮겨 담아 -40°C deep freezer에서 다음 사용때 까지 보관하였다. 위의 방법에 의하여 연구시료를 확보한 후, betulinic acid의 함량과 분석에 대한 연구를 크게 4 개의 과정으로 나누어 진행하였다.

우선 첫 번째는 플라타너스의 가지부분에 존재하는 베출린산(Betulinic Acid, BA)을 분리해내는 방법(HPLC 에 의한 정량분석에 적합한 Fr을 얻는것)과 그 과정에 적합한 solvent system을 찾아내는 것이다.

두 번째 실험은 각 지역별, 계절별 sample을 동일조건에서 추출하여 BA의 성분비율을 알아내는 정량적인 비교분석 실험이다. 결과를 토대로 BA생산에 가장 알맞은 계절과 지역을 살펴보는데 초점을 두었다.

세 번째는 첫 번째, 두 번째 실험을 토대로 BA의 대량생산에 초점을 둔 단계로서 실험실적인 실험단계에서 벗어나 산업화에 적용될 수 있는 DATA을 얻기 위해서 이루어진 실험단계이다.

네 번째는 세 번째의 실험의 연장선으로서 좀더 생산적이고 능률적이며 경제적으로 이끌기 위한 방법과 유도체를 합성하는 단계로서 행하였다.

2절 조 추출물의 분획 및 베출린산의 분리

1. 조 추출물의 분획

다양한 혼합물질중에서 순수한 물질을 얻기 위하여 먼저, 혼합물을 다음의 순서에 의하여 분획하였다.

- ① 조 추출물 일정량을 MeOH에 녹인 (혹은 현탁시킨) 후,
- ② 이 MeOH액을 separatory funnel에 옮겼다.
- ③ 사용된 MeOH의 1/3의 양에 해당하는 Hexane을 separatory funnel에 섞은 다음, 마개를 닫고 세게 흔들어 준 다음
- ④ 일정 시간 후에 분리된 상층의 hexane 액을 분리해 내었다.
- ⑤ 모액인 MeOH층을 다시 separatory funnel에 넣고 다시 hexane으로 추출하였다.
- ⑥ 또 다시 일정시간동안 방치한 후 분리된 상층부를 이미 얻은 hexane 액과 합하였다.

- ⑦ 위의 ⑤와 ⑥을 반복하여 얻은 hexane 층을 합한 후 rotary evaporator에서 농축하였다.
 - ⑧ 나머지 MeOH층을 다시 rotary evaporator에서 농축한 후, 물에 현탁시킨후,
 - ⑨ 사용된 물의 1/3의 양에 해당하는 CH₂Cl₂을 separatory funnel에 섞은 다음, 마개를 막고 세게 흔들어 주었다.
 - ⑩ 일정 시간 후에 분리된 하층의 CH₂Cl₂액을 분리해 내었다.
 - ⑪ 모액인 MeOH층에 다시 CH₂Cl₂으로 추출하였다.
 - ⑫ 또 다시 일정시간동안 방치한 후 분리된 하층부를 이미 얻은 CH₂Cl₂ 액과 합하였다.
 - ⑬ 다시 반복하여 얻은 CH₂Cl₂ 층을 합한 후 rotary evaporator에서 농축하였다.
 - ⑭ 비슷한 방법으로 EtOAc fraction, BuOH fraction, 그리고 수층을 얻었다.
- MeOH 로 추출후 농축한 조추출물의 TLC 상은 아래 그림3-3과 같다.



그림 3-3. 플라타너스나무에서 추출농축한 조추출물과 순수한 베출린산의 TLC 형태.

Vacuum chromatography를 위하여 CHCl_3 로 현탁을 시킨 후 걸러내었다.
 걸러낸 후 TLC결과 CHCl_3 에 녹지 않은 것은 BA가 함유 되어 있지 않았다.

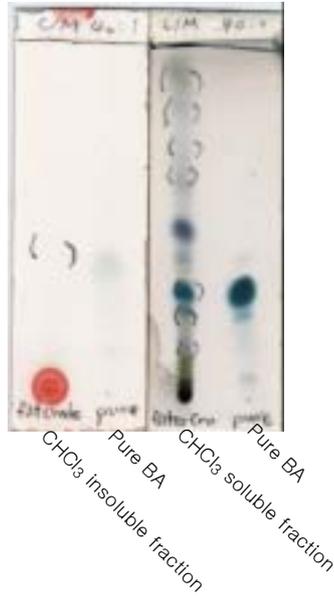


그림 3-4. 조초출물의 CHCl_3 가용부와 불용부의 TLC 형태.

2. 베출린산의 정량분석

베출린산의 정량분석은 앞의 1 항에서 얻은 각 분획을 대상으로 실시하였다. 각 분획을 베출린산과 co-TLC 하여 베출린산을 함유하고 있는 분획을 얻었다. 베출린산을 함유하고 있는 분획을 Vacuum Column Chromatography를 하였다. 분획의 양에 따라 filtering funnel의 크기를 17G4에서 26G3중 선택한 후, 분획의 양과 silica gel의 비율을 1:20 정도로 선택한 filtering funnel에 silica gel을 충전하였다. filtering funnel에 silica gel을 충전한 후, pump로 vacuum을 걸어 silica gel을 촘촘히 충전하고, 용출용매인 CHCl_3 를 filtering funnel에 채웠다. silica gel과 CHCl_3 간 평형이 이뤄지면, 베출린산 분획을 filtering funnel에 투입하여, 크로마토그래피를 실시하였다. 베출린산을 함유하고 있는 분획을 HPLC를 통해 정량분석을 하였다.

3. 베출린산의 대량생산공정개발

현재까지 진행된 생산기술은 아래와 같으며 이를 근거로 대량생산체제를 확립할 수 있는 연구하고자하였다.

<방법 1>

· 메탄올 추출물 240g을 12L 증류수에 현탁 시킨 후 3L 분액여두에 여러 개에 나누어 옮기고 각각 동량의 메틸렌클로라이드(CH_2Cl_2)를 가하여 흔들어준 후 3시간 이상 방치하여 물층과 메틸렌클로라이드층을 따로따로 취하였다.

· 물층은 다시 동량의 메틸렌클로라이드를 가하여 흔들어준 후 3시간 이상 방치하여 물층과 메틸렌클로라이드층을 나누고 메틸렌클로라이드층을 모두 합하여 30 °C 수욕상에서 감압농축하여 최종적으로 메틸렌클로라이드분획 62g을 얻는다.

· 이 메틸렌클로라이드분획에서 베출린산을 얻기 위하여 크로마토그래피를 실시한다. 즉, 메틸렌클로라이드분획 10g을 취하여 메탄올 500 ml에 녹인 후 건조 실리카겔 100g을 가한 후 30 °C 수욕상에서 감압농축하고 여지위에 펼쳐놓고 메탄올 냄새가 더 이상 나지 않을 때까지 잘 말린다(overnight).

· 헥산과 에틸아세테이트를 3:1 비율로 섞은 혼합용매로 미리 충전시켜 안정화되어 있는 Silica (400g) column ((O = 8.0 x 120 cm)상단에 잘 흡착, 건조시킨 메틸렌클로라이드분획을 부어넣고 헥산과 에틸아세테이트를 3:1 비율로 섞은 혼합용매를 계속하여 공급하여준다.

· 컬럼을 통과하여 나온 용매는 100ml씩 따로따로 분취한다. 용출용매가 약 1500 ml을 초과한 후부터는 용출용매를 헥산과 에틸아세테이트를 2:1 비율로 섞은 혼합용매로 바꾸어준다. 이후 약 2L -3L을 이 용출용매로 계속 용출시키고 이들을 합하여 약 500ml가 될 때까지 30 °C 수욕상에서 감압농축한다.

· 이때 석출하는 침상 결정은 glass funnel로 여과하고 헥산과 에틸아세테이트를 3:1 비율로 섞은 혼합용매 100ml로 세척한다. 여액과 세척액은 농축한 후, 헥산과 에틸아세테이트를 3:1 비율로 섞은 혼합용매 100ml에 녹인 후, 상온에 하루밤 방치하여 생성되는 침상결정을 glass funnel로 재차 여과한다.

· 침상결정을 모아 통풍이 잘되는 장소에서 건조시켜 정제된 베출린산을 얻는다.

<방법2>

· 플라타너스를 잘게 부순(파쇄기이용) sample 4kg을 대형 Extracter를 이용하여 추출을 한다.

· MeOH 12L×3 Hours×3 Time 조건으로 추출을 하는데 두 번째 추출부터는 Recycle MeOH을 이용한다.

· 회수율은 9-10L정도이며 마지막으로 한번 더 추출을 한다. Crude를 270g 얻었다.

· CHCl_3 에 : Water = 3 : 1 비율(정확히 해서 2400:800, 2000, 2000, 2000)로 4차까지 분획한다. 4차 분획에서는 Betulinic acid가 거의 존재치 않는다. 이와 같은 방법으

로 얻어지는 CHCl_3 분획은 215g 이다.

· CHCl_3 분획 215g을 가지고 결정화를 시도했지만 215g을 완전히 녹인 상태로 하기에 한계가 있고 너무 많은 solvent가 사용된다. 또한 너무 많은 물질들이 분획에 존재하기 때문에 결정화가 이루어지지 않는다. 따라서 용매분획을 이용하여 물질을 분리하기로 하였다.

· Hexane/MeOH = 500 : 250 (ml)으로 용매분획 실시하여 TLC 해본 결과 2개의 분획에 거의 동일하게 물질들이 존재하였다. EtOAc/Water = 500 : 300 (ml)으로 용매분획 실시한 것은 어느정도 spot 주위의 물질들이 분리됨을 알수 있었다. 그러나 Betulinic acid는 명확하게 분리되지는 않았다. EtOAc와 물을 이용하여 4번에 걸쳐 용매분획을 실시하였다. EtOAc 분획 49g을 얻었다.

· 용매분획을 하여 얻은 분획을 Vacuum Column Chromatography(VCC)를 하였다. filtering funnel 26G2 size에서 solvent를 CHCl_3 로 사용하여 실시하였다. VCC하여 Betulinic acid 분획을 22g 얻었다.

· Betulinic acid를 결정화시키기 위해서 MeOH/ CHCl_3 =1:1 (v/v)비율로 완전히 녹인 후 어느정도 농축한후(solvent를 날려버린후) 무압력하에서 water bath 온도는 55-60도 정도로 해서 solvent의 온도를 올려준다. 상온에서 over night 한후 냉각시킨 MeOH 와 CHCl_3 로 침전물을 washing 한다. 결정을 모아 통풍이 잘되는 장소에서 건조시켜 Betulinic acid를 얻는다.

· 이와 같은 방법을 계속 적으로 반복하여 Betulinic acid를 얻을 수 있다.

<방법3>

· <방법2>에서 crude를 얻는 방법은 동일 하다.

CHCl_3 분획을 <방법2>에서 용매분획을 하지 않고 VCC를 통해 완전히 분리하는 방법이 있다. 이 방법은 결정화를 시키지 않고 크로마토그래피를 이용하여 순수한 Betulinic acid를 얻는 방법이다.

3절 계절별, 지역별 플라타나스나무의 betulinic acid 함량의 정량 분석

1. 실험재료

계절별, 지역별 Betulinic acid 함량변화를 관찰하기 위해서 경기북서(파주지역), 북동(포천지역), 남동 (양평지역), 남서(화성지역), 그리고 서울지역(성북구) 가로수를 대상으로 각각 2(겨울), 5(봄), 8(여름), 11월(가을)말 경에 채집하였다. 직경 3cm 이하의

가지를 채집, 상온에서 완전건조 후 잎과 열매를 제거한 다음 고속분쇄기를 이용하여 20~40 mesh 정도의 추출용 시료화 하였다.

2. 추출

- 5지역×4계절=20개 시료를 계절별 기준에 따라, 5개 시료씩 자체 제작한 중온추출 장치(Mechanical stirrer이용)를 이용하여 추출하였다(봄, 여름, 가을, 겨울)
- 각 시료 20g 을 90% MeOH 500mL로 50℃에서 3시간씩 3번 추출하였고 여과한 추출액을 농축하여 조추출물들을 얻었다.

3. 분획

- 농축된 조추출물들을 CHCl_3 : H_2O = 150ml ×3 : 50ml 로 분획하여 각각의 CHCl_3 Layer을 얻는다.
- water fr.은 보관하지 않았고 CHCl_3 fr.의 weight를 측정하였다.

4. VCC (vacuum column chromatography)

- Target compound인 Betulinic acid 정량 분석을 위해서 Vacuum Column Chromatography를 실시하였다.
- Betulinic acid 보다 nonpolar compound는 VCC로 분리하여 제거하였다.(짙은 색 소물질)
- Betulinic acid 보다 polar한 compound는 VCC로 broad 하게 분리하였다.
(단 BA compound 가 존재하지 않아야 함)
- solvent system CHCl_3 , 17G4 filtering funnel, silica gel 400mesh 이상

5. Fresh Column Chromatography

- CHCl_3 fr.의 양이 많을수록 polar, nonpolar 물질의 분리가 점점 어려워진다.
(overlap이 되어서 층의 분리가 이루어지기 전에 물질들이 모두 섞여나옴)
- VCC 시 BA compound 가 polar, nonpolar 물질에 섞여나올 경우 완전하게 Betulinic acid을 분리하기 위해 FCC를 한차례 더 실시함.
- solvent system CHCl_3 , silica gel 60(230-400mesh) . Column height 12cm, 4.0 OD.

6. BA 정량분석

- 20개의 BA Fr.에 함유되어 있는 Betulinic acid을 정량측정 하기 위해서 HPLC

system을 이용하였다.

- HPLC는 Waters 501 pump system 과 Waters R401(RI) detector를 사용하였다.
Column은 Prep Nova-Pak HR silica를 사용하였다.
- 용매는 CHCl_3 : MeOH = 40 : 1을 사용하였으며, 용매 유동속도는 0.3ml/min으로 하였다.

7. 결과 및 고찰

가. 지역별 계절별 플라타너스 추출, 분획한 양(g)

MeOH 추출물 양은 표 3-2에 나타난 바와 같이 지역에 관계없이 사계절 중 11월(가을)에서 가장 많이 얻었으며 지역으로는 계절에 상관없이 포천지역에서 많은 양을 얻었다. MeOH 추출물을 CHCl₃/H₂O 로 분획하여 얻은 CHCl₃ fraction의 양은 표 3-3에 나타난 바와 같이 MeOH추출물양과 비례적인 관계는 보이지 않았다. 단지 지역별로는 계절에 관계없이 포천지역의 분획량이 대체로 많았으며 계절별로는 특정 계절에서 많은 양을 얻었다고 결정될 만큼의 분획량의 편향이 나타나지 않았다. 5월 화성지역의 높은수치는 수피 20g 만으로 추출하여 다량의 CHCl₃ 를 사용하여 분획한 양이기 때문에 비교적다량의 CHCl₃ fraction을 얻었다.

표 3-2. 지역별, 계절별 플라타너스 MeOH 추출물의 양(g)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
2 월	1.375	1.972	0.916	1.055	0.969
5 월	1.249	1.777	1.039	3.080	1.664
8 월	1.157	1.394	1.090	0.811	0.828
11 월	2.214	2.228	1.127	2.057	1.495

표 3-3. 지역별, 계절별 플라타너스 CHCl₃ fraction의 양(g)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
2 월	0.333	0.606	0.364	0.356	0.348
5 월	0.456	0.508	0.387	0.849	0.548
8 월	0.487	0.536	0.488	0.278	0.364
11 월	0.467	0.459	0.333	0.395	0.387

아래의 표 3-4에 나타낸 것은 각지역에서 얻은 CHCl₃ fraction을 5항과 6항의 분석 방법에 의하여 얻어진 ebtulinic acid를 다량함유하는 fraction의 양을 나타낸 것이며 표 3-5는 betulinic acid를 HPLCfhh 정량분석한 결과를 나타낸 것이다. 이들 표에 나타낸 바와 같이 각 지역과 계절변화에 따른 betulinic acid의 함량에는 특이한 변화는

보이지 않았다. 즉, betulinic acid의 생산은 계절과 지역에 상관없이 플라타너스나무의 잔가지를 이용하여 생산할 수 있다는 것을 말한다. 또한 , 계절별로 각지역의 플라타너스나무의 추출물 백분율을 표 3-5-1에서 3-5-4에 나타내었다. 이들 표에서 나타나듯이 양평지역이 입교적 적은양의 betulinic acid를 함유하는 것을 제외하고는 기타지역은 역시 계절에 상관없이 비교적 고농도의 betulinic acid를 함유하고 있음을 보여 주었다.

표 3-4. 지역별, 계절별 플라타너스 Betulinic acid fraction의 양(g)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
2 월	0.135	0.072	0.063	0.131	0.067
5 월	0.088	0.2	0.051	0.245	0.133
8 월	0.173	0.216	0.024	0.141	0.066
11 월	0.123	0.115	0.092	0.322	0.384

표 3-5. 지역별, 계절별 플라타너스 Betulinic acid의 양(g)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
2 월	0.09	0.05	0.04	0.08	0.05
5 월	0.05	0.13	0.04	0.17	0.1
8 월	0.12	0.17	0.02	0.1	0.05
11 월	0.1	0.1	0.07	0.19	0.23

표 3-5-1. 2월 수율(%)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
총 Crude(g)	1.375	1.972	0.916	1.055	0.969
BA fr.(g)	0.135	0.072	0.063	0.131	0.067
BA (%)	65	67	70	61	72
BA(g)	0.09	0.05	0.04	0.08	0.05
수율(%)	0.45	0.25	0.2	0.4	0.25

표 3-5-2. 5월 수율(%)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
총 Crude(g)	1.249	1.777	1.039	3.080	1.664
BA fr.(g)	0.088	0.2	0.051	0.245	0.133
BA (%)	60	65	80	70	75
BA(g)	0.05	0.13	0.04	0.17	0.1
수율(%)	0.25	0.65	0.2	0.85	0.5

표 3-5-3. 8월 수율(%)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
총 Crude(g)	1.157	1.394	1.090	0.811	0.828
BA fr.(g)	0.173	0.216	0.024	0.141	0.066
BA(%)	60	70	68	69	80
BA(g)	0.12	0.17	0.02	0.1	0.05
수율(%)	0.6	0.85	0.1	0.5	0.25

표 3-5-4. 11월 수율(%)

	자유로	포천	양평	화성	성북구
총 Crude(g)	2.214	2.228	1.127	2.057	1.495
BA fr.(g)	0.123	0.115	0.092	0.322	0.384
BA(%)	81	85	73	60	60
BA (g)	0.10	0.10	0.07	0.19	0.23
수율(%)	0.5	0.5	0.35	0.95	1.15

4절 Betulinic Acid 대량생산공정

1. 목 적

가장 적은 양의 solvent와 가장 간결한 절차를 통해서 얻을수 있는 BA의 최대치를 얻고자 실시하였다. 가급적 실험실에서 최대량을 소화시킬 수 있는 범위내에서 시험하였다.

2. 실험재료 : 일회 추출할 수 있는 적정량으로 목분은 약 4kg에서 5kg씩 사용하였다.

3. 추 출

시료를 추출기에 넣고 MeOH 12L×4×3 times 추출하였다. 이 때 recycle MeOH는 약 9-10L정도가 회수되었다. 추출물을 filter paper filtering 한후 농축. 시료 4kg시 270g의 crude가 얻어졌다.

4. 분 획

- CHCl_3 : water = 3 : 1
- 1차 : 2400 : 800ml, 2-4차 CHCl_3 2000ml
- CHCl_3 fr. 215g 얻어짐

※ 분획시에도 4번째에는 BA가 거의 추출되어 나오지 않는다.



- 1 : 1차 분획물
- 2 : 2차 분획물
- 3 : 3차 분획물
- 4 : 4차 분획물

그림 3-5. MeOH추출물의 CHCl_3 분획에 대한 TLC 형태.

5. 실험방법 설정

CHCl_3 fr. 215g을 가지고 결정화를 시도했지만 215g을 완전히 soluble 한 상태로 하기에 한계가 있으며 또한 너무 많은 solvent가 필요로 한다. 너무 많은 물질들이 섞여 있어서 결정화가 이루어지지 않았다.

CHCl_3 fr. 215g을 40-50g 으로 4-5등분하여서 이를 가지고 각기 다른 방법들로 결정화를 시도하였다. 그중 가장 빠르고 경제적인 방법을 모색하였다.

가. 실험과정 1

1) re-partition에 의한 spot 제거방법

CHCl_3 fr. 49g을 CHCl_3 로 녹였다. 26G3, 400mesh이상(두께 5cm, 약 100g)으로 filtering하였으나, filter가 막혀서 분리가 되지 않았다. 그래서 MeOH로 완전히 녹인 다음 내린후 silica 위의 불용성 황색물질을 제거한 후 다시 filtering을 시도하였으나 마찬가지로 partition에 의한 분리가 이루어지지 않았다. spot 주위의 물질을 제거하기 위해서 Hexan/MeOH 와 EA/water 로 partition을 1차만 시도하였으나, 각 fraction에 분포되는 물질이 같았다. 비슷한 방법으로 EA/water 2:1(500:300ml)으로 분획하였을 때, 어느 정도 spot 주위 물질이 분리가 되었다. 하지만 betulinic acid는 명확한 분리가 이루어지지 않았다.

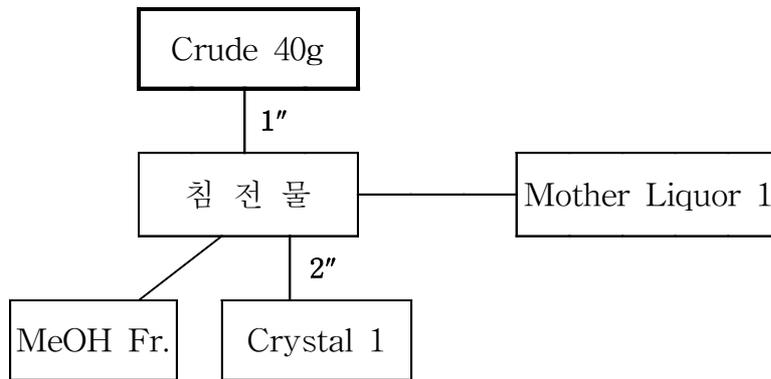
2) VCC

- CHCl_3 fraction 49g을 EA/water 분획하여 얻은 EA fr.을 농축하여 CHCl_3 로 완전히 녹인다음 vacuum을 실시하였다

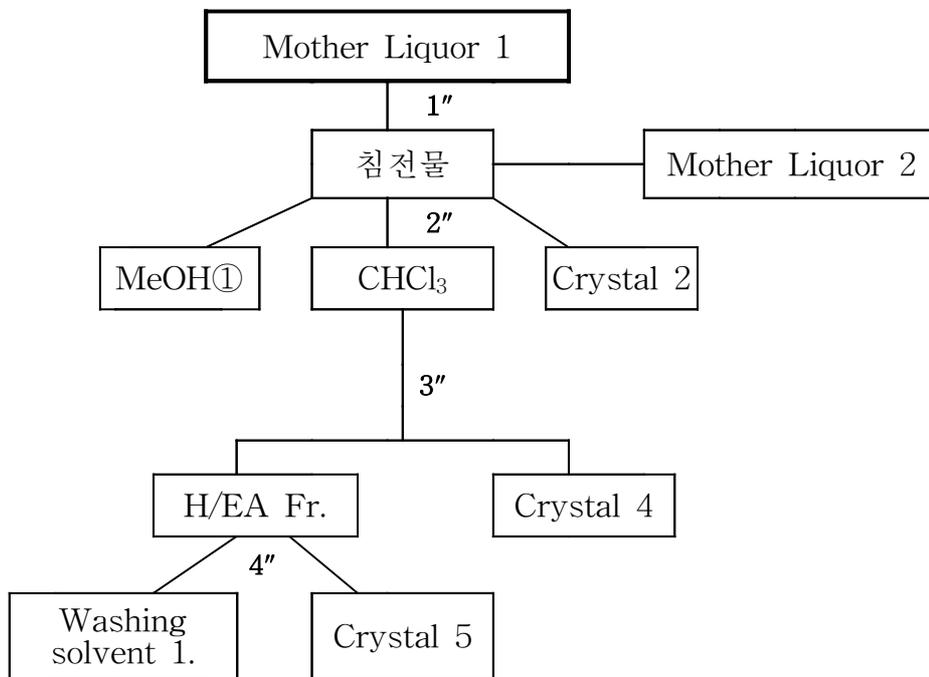
3) Crude Crystalization

BA fr.(22.73g)을 결정화 시도하였다. Solvent 혼합한 후(MeOH/ CHCl_3 =1:1) Vacuum 없이 water bath를 온도 50-55 $^{\circ}\text{C}$ 로 고정 후 rotary 시키면서 녹였다.

녹인 후 이 액을 상온에 방치하고, 이 과정에서 생긴 침전물을 가지고 결정화를 유도하였으며, 이 때 얻은 것을 crystal 1 이라 하고 또한 모액 (Mother liquor 1)과 MeOH soluble fraction을 얻었다. 모액에 함유되어 있는 betulinic acid를 얻기 위한 일련의 결정화 과정을 다음과 같이 도식화하여 나타내었다.



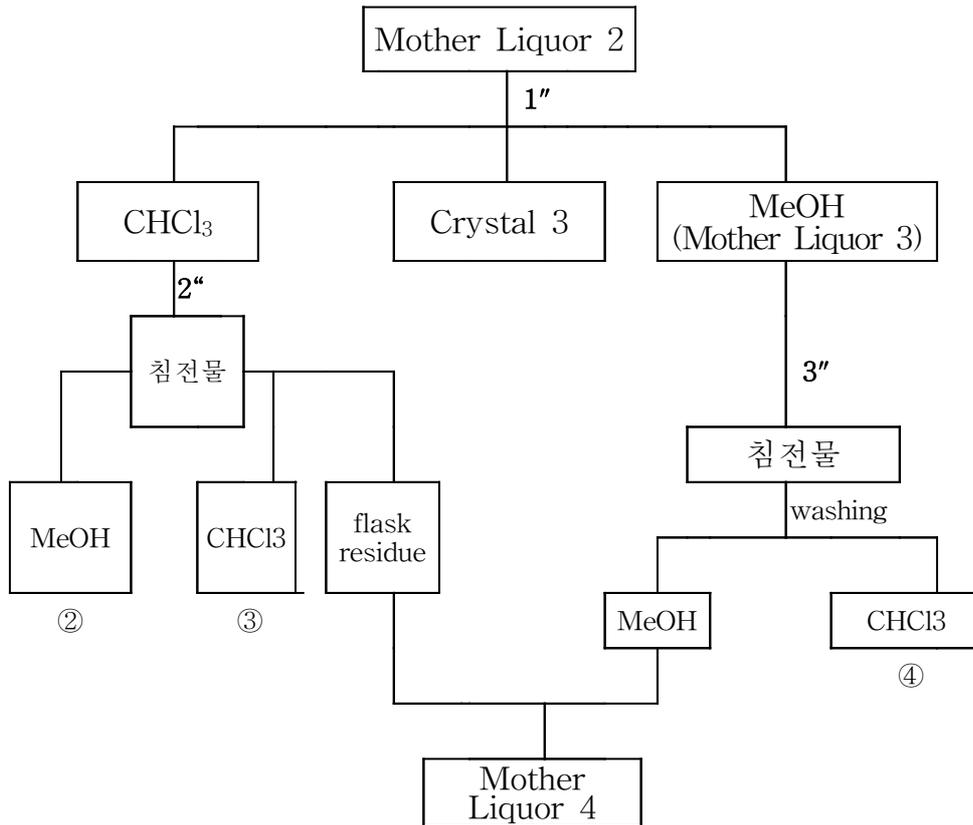
도식 3-1. 조추출물을 이용한 결정화 과정



- 1" 결정화 solvent system = MeOH 과 소량의 CHCl₃
- 2" = MeOH 과 소량의 CHCl₃
- 3" 결정화 solvent system = H/EA 3:1 (100ml) , washing solvent, He/EA system
- 4" = H/EA 3:1 (25ml) , washing solvent, MeOH

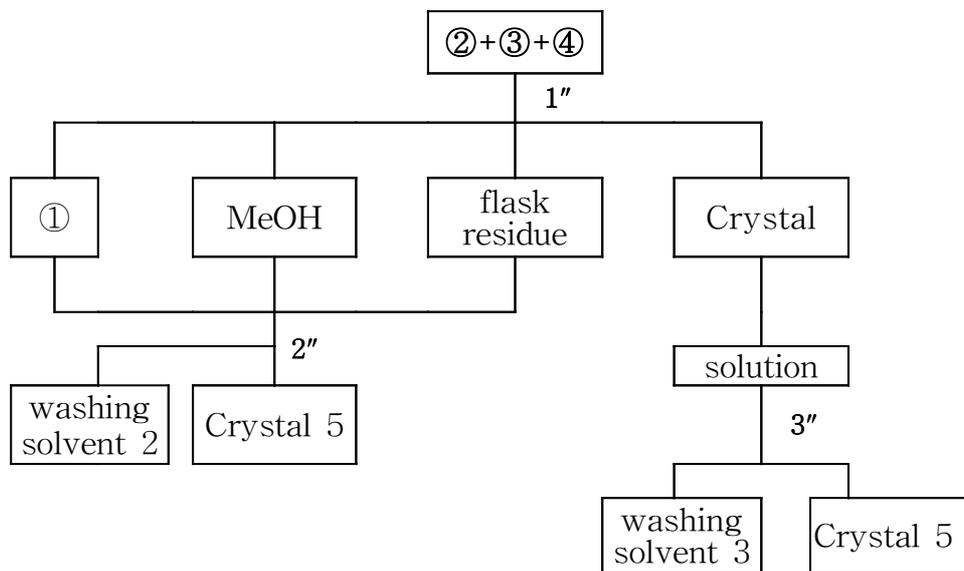
도식 3-2. 모액 (mother liquor 1)을 이용한 결정화 과정

Mother liquor 1에서 1차, 2차 결정화를 통해 얻은 BA와 아래 1차만 거쳐서 얻은 BA 간에는 약간의 차이가 존재하였다. Mother liquor 1에서 1차 때는 순백색의 crystal을 얻지 못해서 2차를 통해서 얻은 반면 아래에 도식한 모액 2를 이용한 결정화 과정에서는 1차 때는 처음의 solvent washing 만으로도 거의 순수한 BA를 얻었다.



도식 3-3. 모액 2를 이용한 결정화 처리과정

결정을 얻은후 냉각 MeOH로 washing 한후 CHCl₃로 다시 washing 하면 결정이 대부분 녹아버리기 때문에 결정화가 계속 반복하였다. 따라서 2', 3', 4' VCC 과정에서의 BA 포함 Frs. 들을 결정화 하였다 MeOH 와 소량의 CHCl₃ 으로 녹인 후 약간의 감압상태조건에서 evaporation 시킴으로CHCl₃ 를 제거하였다. over night 시킨 후 초자 funnel에 filter paper(90mm) 이용하여 감압하여 filtering 하여 Crystal을 얻었으며 상온에서 건조 시켜 백색분말의 crystal을 얻었다 (도식 3-4). 위의 1차 Crystalization의 Mother liquor에서 2차 결정화를 유도하여 위의 방법과 동일한 방식으로 Crystal을 더 확보할 수 있었다.



도식 3-4. 잔류모액 (mother liquor 2,3,4)으로부터 결정화과정

7. 대량생산공정에 대한 결과 및 요약

여러 가지 조건에서 얻은 실험결과 betulinic acid를 대량생산하기위한 최적조건은 다음과 같이 요약할 수 있다.

가. 추출기를 이용시시료가 용약에 충분히 잠기도록한다. 추출은 3번 3시간 하는 것이 적당하였다.

나. 농축시 filter paper vacuum filtering 하여 농축 실시한다. (recycle을 할 수있다.)

다. Partition은 $\text{CHCl}_3/\text{water}$ 3:1 정도로 3차례 실시한다. 물 fr.에 spot 물질이 함유되므로 가급적 water fr.을 완전히 제거하도록 한다.

라. CHCl_3 fr.을 농축하여 EA/water 분획을 실시한다. (4 : 1 정도비율) C/M, 50 : 1 or 45 : 1 로 VCC을 실시하여 spot 부분을 제거해도 되지만 시간과 solvent가 다량 소요된다. EA/water 분획은 1차례만 실시하여 water 층의 polar 물질을 제거한다. 비록 소량의 BA역시 EA층에 존재하지만 정량분석이 아닌 대량생산이라면 나중에 다시 water 층을 recycle 할 수 있다. VCC 시에도 BA는 polar 와 nonpolar fr. 부분에 섞여나온다.

마. EA fr.을 농축하여 결정화 조건에 맞춰서 solvent을 선택하고(MeOH) 완전 녹여야 한다. (소량의 solvent로 crude를 완전히 녹여야 한다.) 대량으로 실험시 농축하면 덩어리형태로 존재한다. 이를 완전하게 녹이는 것이 중요하다. 소량의 CHCl_3 을 넣어서 완전히 녹이도록 한다. 완전히 녹인후 결정화조건을 위해 한번 더 filtering 하면 좋다. (먼지등과 같은 불순물 제거, 결정화에 방해됨)

※ 결정화 할 때 CHCl_3 가 존재하면 nonpolar(색소물질)도 함께 결정화에 섞여서 색을 띄게 된다.

바. 완전히 녹인후 감압에서 CHCl_3 을 모두 제거한 다음 과량으로 들어간 MeOH를 농축시킨다.(연속 과정) 이때 solvent에 결정물질(부유물질)이 생기기전까지 농축을 실시하도록 한다. 약간 MeOH의 양이 충분하도록 조절하면 침상형의 결정이 생길 것이다.

사. 최적의 solvent 가 남게되면 압을 제거하고 water bath의 온도를 50-60℃로 올려 rotation 시킨다. 그렇게 함으로서 solvent의 온도를 높이고 아직 녹지 않은(눈에 보이지 않는) 물질을 완전히 녹이도록 한다.

아. Hood에서 상온조건하 Crystalization을 실시한다. 최소 6시간에서 3일까지 결정화를 시킨다.

자. 초자 funnel(filter paper 설치)에 생성된 결정을 filtering 한다. 이때 washing solvent로는 냉각 MeOH(Deep Freezer)을 이용한다. 가급적 소량을 이용하며 색을 띠는 결정부위에 pipet으로 떨어뜨리면서 washing 한다. 색을 제거하기 위해 CHCl_3 을 사용시 생성된 결정을 다수 녹이므로 가급적 사용을 하지 않는다.

차. 상온에서 초자 funnel에 filter한 결정을 건조한다.(건조기 사용금지) vial 보관시 filter paper가 색을 띄고 있으므로 이를 다시 녹여서 농축하여 끓여모아 함께 보관하지 않도록 한다. 아래 그림3-6은 결정화는 침상의 betulinic acid이다. 오직 결정만 보관하도록 한다.

타. Betulinic acid 가 잘 녹는 solvent는 C/M 혼합 solvent로서 40:1을 기준으로 CHCl_3 의 양이 많을수록 잘 녹는다. 단 한가지 solvent로는 완전히 녹지 않는다.



그림 3-6. 결정상태의 betulinic acid

5절 베출린산 유도체의 합성

현재 anti-HIV 화합물로 인정되어 있으며 베출린산보다 효과가 우수한 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-betulinic acid 는 3번 hydroxyl group에 dimethyl succinic acid 로 esterification 시켜 합성하였고, 기타 다른 유도체에 대하여도 합성된 것 ⁽⁵⁾에 대한 합성조건과 수율을 아래에 나타내었으며 합성된 유도체의 정제는 합

성반응 후, 통상적인 재가-up 과정을 거친 후, column chromatography를 통하여 분리 정제하였다.

1. Betulinic acid benzyl ester 합성

① 50mg BA와 0.1ml의 benzyl bromide, 20mg의 Cs₂CO₃, 30mg의 K₂CO₃를 준비한다.

② ①에서 준비한 것들과 무수의 acetone 10ml를 플라스크에 넣고 reflux 하면서 10시간 가열 반응시킨다.

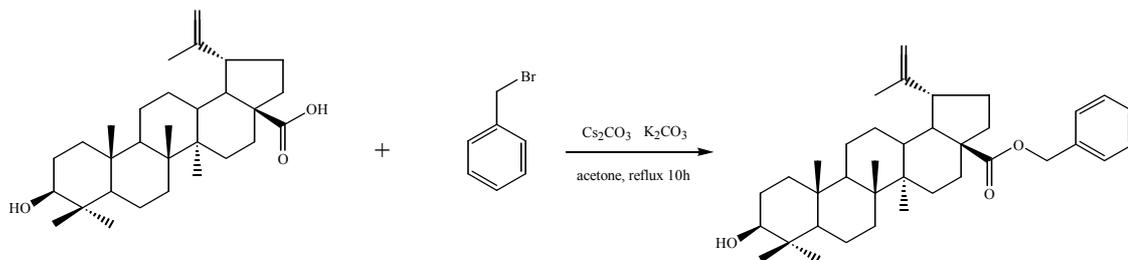
③ 반응이 끝난 후 감압하여 용매를 날려보낸다.

④ 남은 반응물을 아래의 크로마토그래피 조건으로 분리한다.

Stationary Phase : Silica gel

Mobile Phase : Pet. ether/ EtOAc, 99:1

⑤ 98% 수율의 Benzyl ester를 얻는다.



2. Neo-18 α -Olean-3(5)-en-28 \rightarrow 19 β -olide(28-oxyallobetulin), neo-lup-3 (5)-en-28 \rightarrow 19 β -olide와 neo-18 α -taraxast-3(5)-en-28 \rightarrow 19 β -olide의 합성

① BA 53.6mg과 K10 40mg과 CHCl₃ 5cm³을 플라스크에 혼합한다.

② 열을 가하며 3시간 동안 저으며, refluxing 한다.

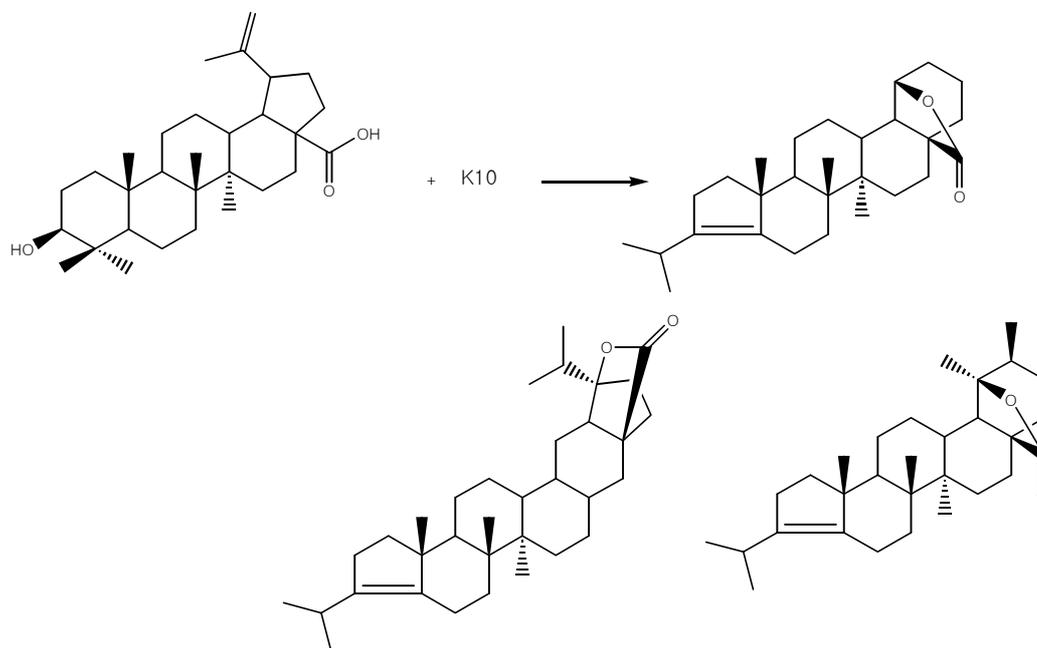
③ 반응 후 촉매를 여과하여 제거한다.

④ 용매는 evaporate 한다.

⑤ 반응물은 10% AgNO₃가 첨가된 silica gel column chromatography 한다.

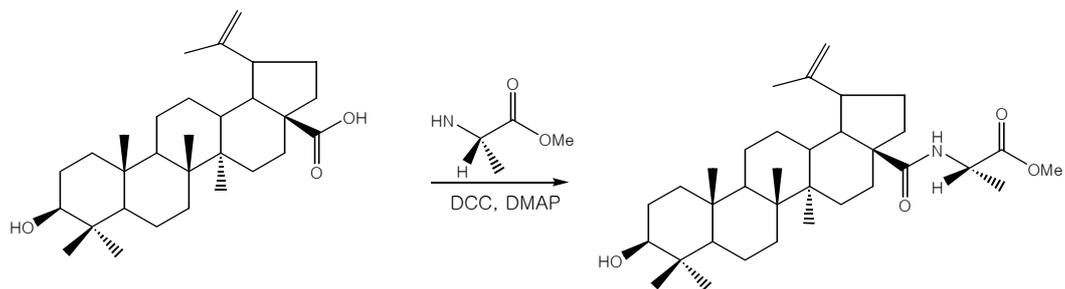
이동상은 Pet. ether/ DM, 30:1

⑥ 3개의 합성물질을 각각 30%, 25%, 28%씩 얻는다.



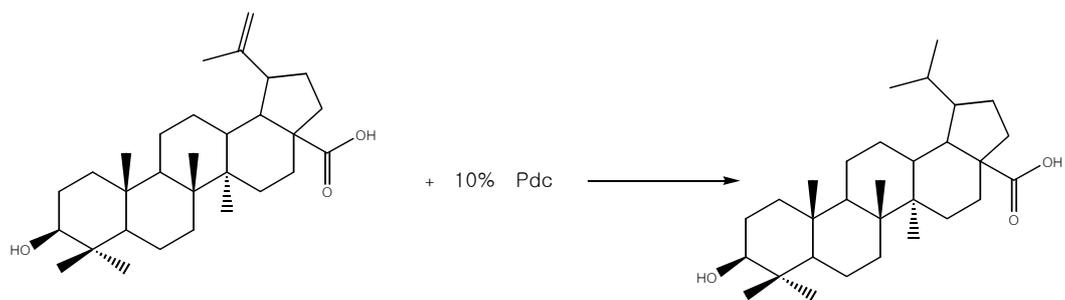
3. Glycine methyl ester betulinic acid의 합성

- ① 플라스크에 10ml methylenechloride를 넣고, BA 100mg을 넣는다.
- ② 혼합한 플라스크에 glycine methly ester 50mg 과 DCC, DMAP 각각 54mg 15mg을 첨가한다.
- ③ 실온 상태에서 저어주며 반응시킨다. 질소가스 상태에서 24시간 반응시킨다.
- ④ 반응이 끝나면 50ml의 EtOAc와 동량의 H₂O를 첨가한다.
- ⑤ 유기용매 즉 EtOAc층을 분리한다.
- ⑥ MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 용매는 감압상에서 날려보낸다.
- ⑦ 반응물을 Silica gel 크로마토그래피 한다. 이동상은 Pet. ether/ EtOAc, 2:1
- ⑧ glycine methyl ester 된 BA를 얻는다.



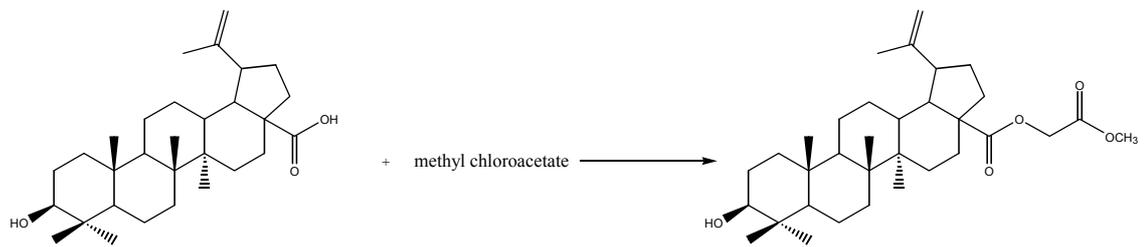
4. Dihydrobetulinic acid의 합성

Betulinic acid	10% PdC		yield (%)
60mg	20mg	AcOEt 10ml, H ₂ overnight	97



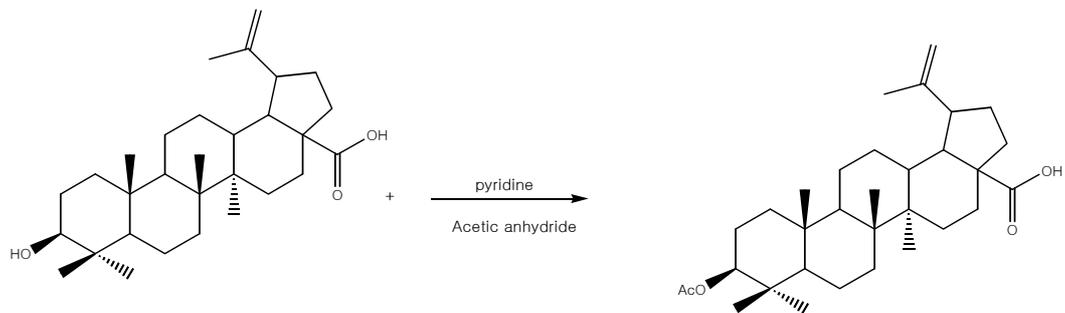
5. Betulinic acid 28-O-carboxymethylmethylate의 합성

Betulinic acid	NaH	methyl chloroacetate	yield (%)
60mg	20mg	DMF 10ml, overnight	85



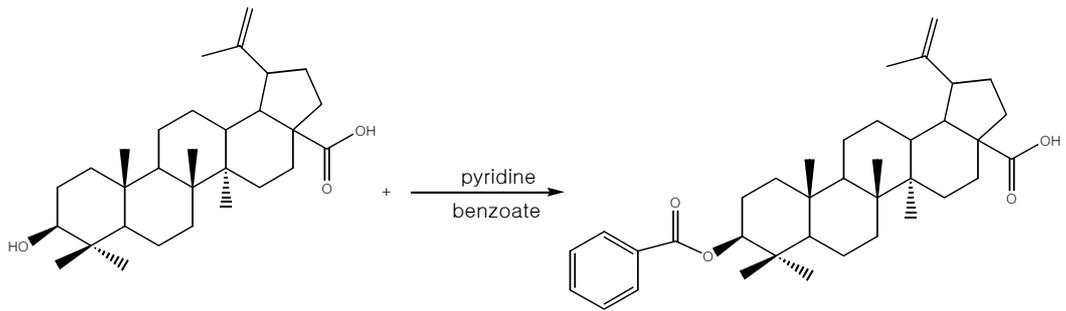
6. Betulinic acid 3-O-acetate의 합성

Betulinic acid	pyridine		yield (%)
60mg	2ml	Ac ₂ O 10ml, overnight	95



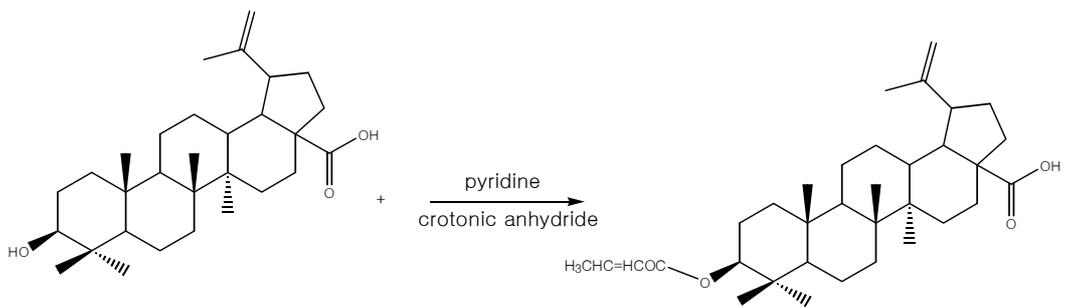
7. Betulinic acid 3-O-benzoate의 합성

Betulinic acid	pyridine	bezoyl chloride		yield (%)
60mg	5ml	0.5ml	overnight	90



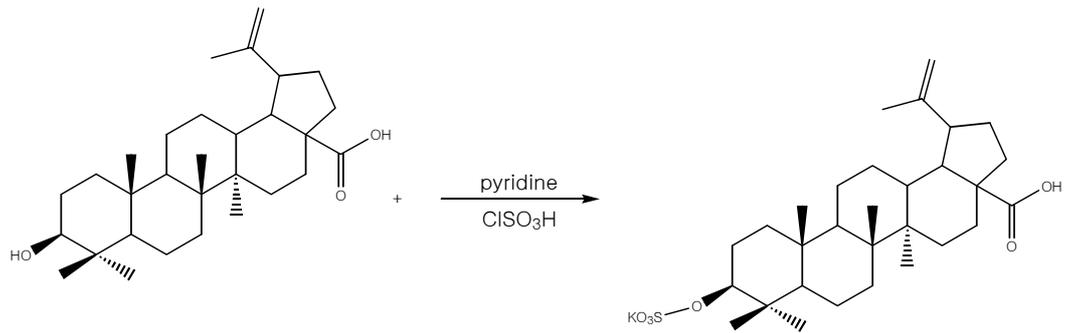
8. Betulinic acid 3-O-crotonate의 합성

Betulinic acid	pyridine	crotonic -anhydride		yield (%)
60mg	5ml	2.5ml	overnight	80



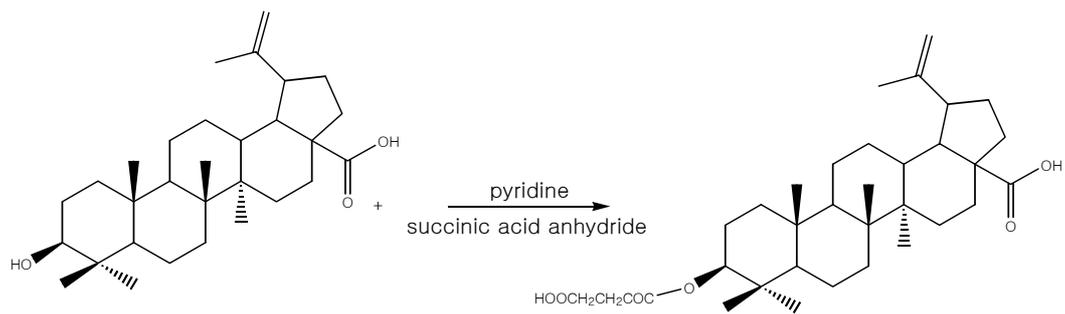
9. Betulinic acid 3-O-sulfonate potassium salt의 합성

Betulinic acid	pyridine	$ClSO_3H$		yield (%)
90mg	5ml	0.5ml	overnight	55



10. Betulinic acid 3-O-succinate의 합성

Betulinic acid	pyridine	succinic acid anhydride		yield (%)
100mg	2ml	200mg	overnight 80-90°C	65



6절 betulinic acid와 그 유도체의 생리활성검정

위 절에서와 같은 방법에 의하여 분리, 정제 그리고 합성된 주요물질에 대하여 이들의 직접적인 활용성을 평가하기 위하여 다음과 같은 생리활성효과를 각 성분에 대하여 다음과 같은 방법으로 생리활성을 측정하였다.

1. SRB method에 의한 항암활성측정

본 연구에서 활용한 생리활성측정법은 시험관 내에서 항암작용을 간편하게 측정할 수 있는 SRB (sulfrhodamine B) 방법으로서 미국 NCI 및 여러 검정기관에서 가장 폭넓게 사용하는 방법이며 자세한 실험prototol은 다음과 같다.

가) 계대중의 암세포들을 typsin-CDTA 용액으로 처리하여 용기 부착면으로부터 분리 시키고, 96-well flat bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 세포수가 각각 5×10^3 (A549, HCT15), 1×10^4 (SK-MEL-2, XF498), 2×10^4 (SK-OV-3)이 되도록 희석하여 분주한다. 이들을 CO₂ incubator속에서 24시간 배양하여 cell이 well의 바닥면에 부착(anchor)되도록 한 후 aspirator로 media를 제거하고 media에 녹여둔 검체를 농도별로 각각의 well 속에 넣어주고 48시간동안 계속 배양한다.

검체용액을 조제할 때는 검체를 media만을 사용하여 녹이는 (dissolve) 것을 원칙으로 하지만 경우에 따라서는 특히 검체가 난용성일 경우에는 소량의 EtOH 혹은 DMSO (dimethylsulfoxide)를 가하여 줄수도 있으나 EtOH 혹은 DMSO의 최종농도가 1%를 초과하지 않아야 한다. 또 검체용액을 암세포에 가할때는 미리 filter로 여과하여 무균상태를 유지시켜준다.

나) 48시간동안의 배양을 마친후 각 well속의 media를 aspiration으로 제거하고 10% trichloroacetic acid (TCA)용액을 각 well당 10 μ l 씩 가하고 1 시간동안 상온에서 방치하여 세포들을 고정시킨 다음 물로 5-6회 세척하여 과잉의 TCA용액을 완전히 제거하고 건조시킨다.

다) 각 well당 100 μ l 씩의 SRB 염색용액 (0.4% sulforhodamine in 1% acetic acid)을 가하여 30분간 염색하고 과잉의 염색액은 1% acetic acid로 5-6회 반복 세척하여 제거한 후 상온에서 건조시킨다.

라) 각 well당 100 μ l 씩의 10mM Trisma base (unbuffered) 용액을 가한후 titer plate shaker로 10분간 진탕하여 cell에 염색된 염색액을 용출시키고 microplate reader를 이용하여 520nm의 흡광도치 (absorbance)를 측정한다.

마) 검체용액을 넣어준 검체군의 암세포증식율 (% cell growth, 항암활성의 역)는 다음 수식에 따라 산출한다. 즉 검체용액 대신 동량의 media를 넣어준 대조군의 세포수 (C)와 zero time의 세포수(Tz) 및 검체군의 세포수(T)를 각각 각군의 흡광도치로부터 환산한다. 검체군의 암세포 증식율(% cell growth)는 $Tz > T$ 인 경우에는 $[(T-Tz)/(C-Tz)] \times 100$ 으로, $Tz < T$ 인 경우에는 $[(T-Tz)/Tz] \times 100$ 의 수식으로 계산한다.

바) 각각의 농도에서 측정한 검체군의 암세포증식율을 바탕으로하여 LOTUS program의 data regression을 사용하여 검체가 해당암세포의 성장을 50% 저해하는

농도 (ED₅₀)를 계산하고 이 ED₅₀ 치를 기준으로 하여 각 검체의 항암효과의 potency 를 상호 비교하는 지표로 삼았다.

위에 기술한 방법에 의한 betulinic acid와 여러 유도체들에 대한 항암활성효과를 표 3-6에 나타내었다.

표 3-6. Betulinic acid와 그 유도체들의 암세포 성장억제효과

	ED ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
CH₂Cl₂ Fr.	9.5±0.3 ^b	15.4±0.3	20.4±0.3	20.5±0.4	8.2±0.3
betulinic acid	2.0±0.1	3.8±0.2	2.5±0.2	3.4±0.3	3.7±0.2
Betulinic acid 3-O-succinate	5.0±0.7	9.6±0.5	12.5±0.4	18.5±0.6	16.6±0.3
Betulinic acid 3-O-acetate	10.5±0.3	15.3±0.3	20.2±0.6	13.4±0.2	25.6±0.7
Betulinic acid 3-O-benzoate	8.7±0.4	6.4±0.1	2.5±0.2	3.4±0.3	3.7±0.2
Betulinic acid benzyl ester	4.2±0.3	3.6±0.3	4.6±0.2	4.5±0.3	4.4±0.3
cisplatin	1.4±0.1	0.9±0.3	0.8±0.2	0.9±0.3	2.2±0.4

a. ED₅₀ value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration that caused 50 % inhibition of cell proliferation in vitro.

b. Data are mean±S.E.M. of three distinct experiments.

표에서 보는 바와 같이 betulinic acid는 사용된 여러 세포에서 전반적으로 강한 세포 독성을 나타내 보였다. 그러나 합성된 유도체들은 오히려 betulinic acid보다 효과가 약한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 이들 유도체가 어떻게 생리활성을 나타내고 있는지에 대한 해답을 주기에는 불분명한 상태이다. 그러나 앞으로 기타 다른 여러 가지 유도체의 합성과 그들의 생리활성검정으로 부작용이 적고 보다 암세포에 선택적으로 독성이 강한 물질을 만들 수 있을 것으로 판단된다.

2. 항바이러스 (HIV) 활성 검정

항Herpes바이러스약효검색을 위하여 일차로 Vero세포체계에서 HSV-1과 HSV-2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였다. AIDS치료제 개발 가능성을 조사하기 위하여 MT-4 세포체계를

이용하여 HIV에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법으로 함께 조사하였다. 또한 일부시료에 대하여 HeLa 세포체계에서 RNA virus인 PV, CoxB와 VSV에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행하였다.

가) 세포

세포는 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입한 Vero세포 (African green monkey kidney cell) (ATCC CCL 81)와 HeLa세포(human cervix epitheloid carcinoma cell) 를 사용하였다. MT-4 (human T-cell transformed by co-cultivating with leukemia lymphocytes harbouring HTLV-1) ^(6,7)는 일본 동경의 과·치과대학교의 N. Yamamoto교수로부터, H9 (human cutaneous T-cell)은⁽⁸⁾ 'MRC AIDS Reagent Project'에 의하여 영국 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)로 부터 기증받았는데 원 제공자는 R. Gallo교수로서 'the NIH NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program'에 의하여 제공되었다.

나) 바이러스

시험에 사용된 human herpesvirus 들은 다음과 같다.

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain F (ATCC VR-733)

Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain MS (ATCC VR-734)

시험에 사용된 HIV는 다음과 같으며, 'MRC AIDS Reagent Project'에 의하여 영국의 NIBSC로부터 분양받았다.

HIV-1 strain IIIB [HIV-1 (IIIB)] : 1983년 미국에서 분리됨⁽⁸⁾

HIV-2 strain CBL-20 [HIV-2 (CBL20)]: 1988년 Gambia에서 분리됨⁽⁹⁾

원제공자 Dr. R. Weiss

시험에 사용된 RNA virus 중 enterovirus들은 다음과 같다.

Poliovirus type 1 (PV-1) strain Brunhilde

Coxsackie B virus type 3 (CoxB-3) strain Nancy

Rhabdovirus에 속하는 vesicular stomatitis virus (VSV) strain Indiana도 시험에 이용되었다.

다) 시험물질 및 표준약물

시험물질로는 우리 나라 180여종 수목들의 MeOH 추출물들이었다. 표준약물로서

이용된 화합물들의 이름과 약칭과 제조회사 및 대상바이러스를 Table 4-1에 표시하였다. 그중 ACV와 AZT는 삼천리제약으로 부터 기증받았으며 나머지는 구매하였다. 시료와 표준약물들을 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 20 mg/ml로 녹인 후 필요에 따라 배양액으로 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

가) 세포배양

Vero세포와 HeLa세포를 지름 10 cm petri dish에 4 μ g/ml gentamycin (Gm)(Sigma)과 5%의 열처리된 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle (DME) (Gibco)배지(DME/5% FBS)에서 세포단층이 형성될 때까지 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 증식시켰다. Vero와 HeLa세포는 3 -4 일, HEL 299세포는 일주일 간격으로 trypsin처리를 하여 계대하였다. MT-4세포와 HIV에 감염된 H9세포의 경우 배양면적이 25 cm² (T25-flask)이거나 75 cm² (T75-flask)인 플라스크에 10%의 열처리된 FBS와 4 μ g/ml Gm이 첨가된 RPMI 1640 배지(RPMI/10% FBS)를 이용하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 증식시켰다. 세포배양 후 3 - 4 일 간격으로 세포를 원심분리 시킨 다음, 세포수가 3 x 10⁵ 개/ml이 되도록 희석하여 계대배양하였다.

나) 바이러스의 증식

HSV-1과 HSV-2는 Vero세포에서, RNA virus들은 HeLa세포에서 증식되었다. 즉, T75-flask에 숙주세포단층이 형성되면 배양액을 제거하였다. 바이러스를 DME/2% FBS 에 희석하여 1.5 ml 바이러스 희석액에 세포 한개마다 0.1 M.O.I (multiplicity of infection)이 되도록 접종하였다. 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 1 시간 동안 (RNA 바이러스의 경우 30분) 흡착시킨 후 배양액을 제거함으로써 세포에 흡착되지 못한 바이러스들을 제거하였다. DME/2% FBS 를 6 ml 첨가한 후 70%의 세포가 CPE (cytopathic effect)를 나타낼 때까지 계속 배양하였다. 세포와 배양액을 회수하여 시험관에 넣었다. -70 $^{\circ}$ C에서 얼리고 37 $^{\circ}$ C에서 녹이는 작업을 세번 시행한 후 4 $^{\circ}$ C, 5000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상등액을 소량 씩 용기에 분주한 후 -70 $^{\circ}$ C에 바이러스 종균액으로서 보관하였고, 실험직전에 바이러스를 37 $^{\circ}$ C에서 신속히 녹여 사용하였다.

HIV는 바이러스에 영구감염된 H9 세포를 T75 flask에 배양하여 회수하였다. 세포를 원심분리시켜 상등액을 제거한 후 바이러스를 세포에 접종시킨 후 세포수가 3 x

105 개/ml이 되도록 RPMI/10% FBS를 첨가한 다음 필요에 따라 계속 계대하였다. 바이러스 회수는 세포배양액을 4 °C, 2,000 rpm으로 10분간 원심분리 시킨 다음 상등액을 1 ml씩 나누어 분주한 후 액체질소 또는 -70 °C에 바이러스 중균액으로서 보관하였고, 실험직전에 바이러스를 37 °C에서 신속히 녹여 사용하였다.

다) 바이러스 역가측정

바이러스중균액의 역가를 알기 위하여 1:10으로 연속 희석한 후 96-well plate에 confluent하게 배양된 세포단층에 well당 100 ul씩 접종하였다. HSV-1과 HSV-2는 1시간, RNA 바이러스들의 경우는 30 분 동안 흡착시킨 후 100 ul의 배양액을 첨가하였다. HSV-1과 HSV-2의 경우 3일간, RNA virus의 경우 2일 간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법 (실험방법 차)항 참조)을 이용하여 역가를 측정하였다. HIV 중균액의 역가를 알기 위하여 RPMI/10% FBS로 중균액을 1:10으로 연속 희석한 다음, 96-well plate에 well당 100 ul 넣어 주고, 1 x 10⁵ cells/ml로 희석된 MT-4세포 100 ul를 첨가하였다. 5 일간 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 다음 현미경관찰과 MTT시험법⁽¹⁰⁾을 병행하여 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)값을 구하였다.

라) 항herpes simplex virus 약효검색

약효검색은 virus-induced cytopathic effect (CPE) 저해법을 이용하였다 (Table 4-2 참조). 즉, 96-well plate에 Vero세포를 증식시킨 다음 DME/2% FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100 ul씩 접종하고 1시간동안 37 °C에서 흡착시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate로 각 well에 100 ul씩 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 3일 배양한 다음 MTT검색법 (실험방법, 차)항 참조)으로 50%의 세포를 살아남도록 한 약물의 농도를 EC₅₀ (50% effective concentration)로 결정하였다. 약효평가결과에서 약물의 독성에 의한 영향을 알 수 있도록 바이러스 접종시 바이러스가 첨가되지 않은 배양액을 세포에 더해준 다음 (mock-infected) 바이러스로 접종된 세포와 같은 방법으로 처리되었다. 즉, 한시간 배양 후 배지가 제거되었고 배양액에 희석된 약물이 duplicate로 첨가되었다. 3일 배양 후 MTT검색법으로 약물이 첨가된 각 well의 살아남은 세포수를 약물이 첨가되지 않은 세포 control well과 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 약물의 농도를 CC₅₀ (50% cytotoxic concentraion)로 결정하였다.

마) 항human immunodeficiency virus (anti-HIV) 약효검색

약효검색은 96-well plate를 이용한 CPE저해법을 이용하였다. 시료를 RPMI/10% FBS에 시험농도의 2배로 희석시키고, plate의 각 well당 100 ul 씩 세로로 6 개의 well에 넣었다 [2 well은 항HIV-1(III B)검색용, 2 well은 항HIV-2(CBL20), 2 well은 mock-infected용]. 테두리 well들은 blank로서 이용하였다. Cell control, virus control 과 blank를 위한 well에는 배양액만을 넣었다. MT-4 세포를 원심분리한 다음 mock-infected는 그대로, 항HIV검색용에는 100 CCID₅₀의 바이러스 중균액을 넣어준 다음 배양액을 더하여 세포수가 ml 당 1.0 X 10⁵개가 되도록 희석하였다. Blank를 제외한 모든 well에 세포만, 또는 HIV에 감염된 세포들을 100 ul 씩 넣어준 다음 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 5 일간 배양하였다. MTT검색법을 이용하여 시료의 항바이러스 효과에 의하여 항HSV약효검색과 같이 하여 EC₅₀와 CC₅₀를 결정하고, 시료의 SI를 계산하였다.

바) 항poliovirus 약효검색

접종량이 100 CCID₅₀로 희석된 바이러스를 96-well plate의 HeLa세포에 앞에 기술한 항HSV-1과 HSV-2약효검색법과 같이 시행하였는데, 2 일간 배양한 다음 약효를 판정하였다.

사) 항coxsackie B virus 약효검색

앞에 기술된 항poliovirus 약효검색방법과 같이 시험하였다.

아) 항vesicular stomatitis virus 약효검색

앞에 기술된 항poliovirus 약효검색방법과 같이 시험하였다.

자) 세포독성검사

약물이 세포에 끼치는 독성을 세포성장에 주는 영향조사 (cell growth test)와 성장이 멈춘 세포를 죽이는 독성조사 (cell viability test)의 두가지 측면에서 조사할 수 있다. 항HIV약효검색에서의 mock-infected 실험은 전자에 대하여, 나머지 바이러스들에 대한 약효검색시 mock-infected는 후자에 대한 조사였다.

차) MTT검색법

이 검색법은 살아남은 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 노란색을 띠는 MTT를 보라색을 지닌 formazan으로 환원시키고, 이 생성물을 유기용매로 녹여 흡광도를

측정하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 상대적으로 비교하는 것이다.⁽¹⁰⁾ 배양이 끝난 Vero세포의 배양액을 제거하고 DME/2% FBS에 3 mg/ml로 희석된 MTT (Sigma)액을 96-well plate의 well당 50 ul씩 넣어준 후 37 °C CO₂ 배양기에서 두시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100액을 100 ul 씩 각 well에 넣어준 후 교반기를 이용하여서 formazan결정들이 완전히 녹도록 하였다. Microplate reader (Vmax, Molecular Devices)를 이용하여 540 nm와 690 nm에서의 흡광도를 읽었다. A540과 A690의 흡광편차에서 blank값을 뺀 다음 cell control과 virus control과 비교하였다. 즉, 세포독성은

$$\frac{\text{cell control 흡광도} - \text{시료만 첨가된 흡광도}}{\text{cell control 흡광도} - \text{blank 흡광도}} \times 100(\%) \text{로서,}$$

$$\frac{\text{시료와 바이러스가 첨가된 흡광도} - \text{virus control 흡광도}}{\text{cell control 흡광도} - \text{virus control 흡광도}} \times 100 (\%) \text{로서}$$

계산했다. 항바이러스값으로 부터 EC₅₀와 세포독성 값으로 부터 CC₅₀를 구한 후 selectivity index (SI) (CC₅₀/EC₅₀) 를 구하였다.

위에 열거한 여러 가지 방법에 의한 betulinic acid와 그 유도체들에 대한 항바이러스효과는 betulinic acid의 세포독성효과로 인하여 항바이러스효과가 분명하게 나타나지 않았다. 그러나 Fujioka⁽¹¹⁾와 Kashiwarda⁽¹²⁾등에 의하면 betulinic acid와 그 유도체인 3-O-(3',3'-Dimethylsuccinyl)-betulinic acid는 H9 cell에서의 항바이러스효과가 강하게 나타난다고 보고하였고 (표 3-7), 이러한 것과 여러 가지를 근거로 이들물질들에 대한 항바이러스제로의 연구를 진행하고 있다.

표 3-7. Betulinic acid와 dimethylsuccinyl)-betulinic aciddml 항 바이러스효과

Compounds	Cell	Strain	EC ₅₀	IC ₅₀	Units	T1
betulinic acid	H9	HIV-1 (IIIB)	1.4	13	μM	9.3
3-O-(3',3'-Dimethylsuccinyl)-betulinic acid	H9	HIV-1 (IIIB)	<0.00035	7	μM	>20000

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구 “플라타너스나무에서 베출린산과 그 유도체의 생산기술개발”과 관련해서 달성하고자 하는 연구 목표는 우리나라의 가로수로 널리 분포되어 있는 플라타너스나무의 잔가지에서 베출린산을 대량으로 생산할 수 있는 기술을 개발하고 베출린산을 이용하여 이것의 유도체 물질인 다른 생리활성물질을 합성해내는 것을 연구하는 것이다.

세부연구내용은

여러지역에 분포하고 있는 플라타너스나무를 계절별로 봄 (5월), 여름 (8월), 가을 (11), 겨울 (2월)에 그리고 지역별로 경기 북서, 북동, 남동, 그리고 남서 지역과 서울 지역의 가로수를 대상으로 채집하여 베출린산의 함량을 정량적으로 분석한다. 본 연구는 1년간의 사전검토를 위한 계절별채집을 비롯하여 2년간에 걸쳐 지역별로 수목을 채집하여 이들의 함량을 평균하여 계산하였다.

둘째, 분리 정제된 베출린산을 이용하여 이 물질의 유도체를 효율적으로 합성할 수 있는 합성과정을 확립하고자 하였다.

셋째, 베출린산 및 이 유도체를 이용하여 이들 물질의 생리활성효과를 점검하고자 하였다.

마지막으로 넷째, 베출린산의 추출정제를 비롯하여 이 물질의 대량생산을 위한 경제적인 대량생산공정을 확립하고자 하였다.

이러한 세부연구내용에 대한 목표달성은 3장에 기술한바와 같이 전반적으로 충실히 이루어 졌다.

먼저 베출린산의 성분함량분석을 위하여 서울을 중심으로 경기도의 동북부, 서북부, 남동부와 남서부의 여러지역을 대상으로 계절별로 시료를 채집하여 건조 후 여러 가지 다양한 분석조건에서 betulinic acid의 정확한 함량을 분석하기 위한 실험을 하였으며 매우 재현성있게 각지역과 계절별로 플라타너스나무에 함유되어 있는 betulinic acid의 함량을 측정하였다.

두 번째 연구목표인 베출린산의 유도체 합성내용은 betulinic acid의 기본골격을 유지하면서 3번의 hydroxy group의 위치와 28번의 carboxyl group 위치에 변화를 주는 방식으로 간단한 유도체들을 합성할 수 있었다. 또한 이들 유도체들은 참고문헌에 있는 것과 그 양상이 같음을 확인하였다.

또한, betulinic acid와 그들 유도체의 생리활성검정결과를 보면 암세포에 대한 세포독성효과는 betulinic acid와 여러 유도체들이 그 효과를 뚜렷이 나타냄을 확인 할 수 있

었다. 그러나 항바이러스에 대한 검정결과는 이들의 효과에 대한 유의성을 충분히 확인 할 수 없었다.

Betulinic acid의 대량생산공정에 관하여는 현재의 실험실의 규모 때문에 최고 5kg의 시료를 1회에 처리 할 수 있는 추출공정에 기반을 두고 확립하였다. 대량생산기반은 생산단가를 줄이고 단시간에 고순도의 물질을 얻고자 하였다. 이리 위하여 대량추출 후 solvent partitioning에 의하여 betulinic acid가 함유되어 있는 fraction을 얻고 보다 betulinic acid의 함량이 높은 fraction을 얻기 위하여 간단한 방법으로 vacuum chromatography를 하여 최소량의 silica gel과 용매의 사용하는 조건을 확립하였다. 여기서 얻은 betulinic acid 분획r을 결정화 시켜서 반복적으로 고순도의 betulinic acid를 얻을 수 있도록 하였다. 이러한 방법은 무엇보다도 생산 scale을 보다 확대한 다하여도 충분히 적용시킬 수 있는 방법으로 판단된다.

현재 천연물을 이용하여 제품화할 수 있는 분야는 대표적으로 의약품분야, 기능성 식품분야, 화장품분야를 비롯하여 그 적용범위가 매우 다양하다. 이들 각분야에서 그 제품의 유효성분의 함량을 높이고 불순물을 제거하는 방식은 이 들 제품의 가격에 상당한 영향을 미치고 있다. 따라서 본 연구진이 개발한 방법을 다른 천연물을 이용한 제품개발에 적용시킨다면 제품의 원가부분을 최소화하면서 고품질의 제품을 제조할 수 있을 뿐 아니라 제품의 품질관리를 용이하게 할 수 있다는 측면에도 크게 기여 할 수 있으리라 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 관심을 가지고 연구를 수행한 betulinic acid는 항암효과 및 항바이러스효과가 우수한 물질로서 이것을 이용한 신약개발의 연구가 여러 각도에서 진행되고 있는 물질이다. 본 연구진은 따라서 2년동안 국내의 대표적인 가로수중의 하나인 플라타너스나무에 함유되어 있는 betulinic acid의 함량을 분석하고 이 성분을 효율적으로 생산할 수 있는 기술을 개발하고자 실시하였다. 이 결과 플라타너스나무의 잔가지를 겨울철에 채집하여 말린 후 추출을 통하여 betulinic acid를 용이하게 대량정제 생산할 수 있는 방법을 개발하였다. 각 지역에서 플라타너스나무에는 지역에 관계없이 그리고 계절적인 변화에 차이가 없이 다량 함유되어 있는 것을 확인함으로써 우리나라의 가로수로 널리 분포되어 있는 플라타너스나무를 계절에 상관없이 채집하여 (사실 현실적으로 동절기에 채집하는 것이 효율적이라고 판단됨) betulinic acid를 생산할 수 있다는 것을 발견하였다. 또한 본 연구를 통하여 플라타너스나무에서 betulinic acid를 효율적으로 대량 생산할 수 있는 공정을 개발하였다. 따라서 본 물질을 이용한 제품을 개발하고자 할 때 싼 원료를 이용하여 저렴한 생산비로 용이하게 생산할 수 있는 기반을 마련하였다. 또한 betulinic acid를 이용하여 그것의 여러 가지 유도체를 생산할 수 있으며 이들 유도체는 특히 항바이러스 효과가 매우 우수하여 미국에서 신약으로서의 개발과정에 있는 물질이다. 따라서 본 물질과 그 유도체를 이용하여 최우선적으로는 기능성 화장품을 만드는 원료로 보다 구체적인 산업화방안을 모색할 수 있을 것이다. betulinic acid의 유도체들은 지금 현재에는 항바이러스에 초점을 맞추어서 연구를 진행하고 있지만 이들은 분명히 다양한 세포중에 active하게 작용하고 있으며, 특히 박테리아에도 활성이 있다고 보고되었기 때문에 항바이러스 뿐 아니라 항박테리아 분야의 제품개발에 대한 연구를 사용하는데 적용시켜볼 필요가 있는 물질이라고 판단된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Betulinic acid는 오래 전에서부터 알려져오나 있으나 그 효용성에 관해서는 최근들어 매우 활발히 연구가 되고 있는 실정이다. 현재까지 1975년도부터 betulinic acid에 관한 연구발표는 수백편에 달하고 있다. 본 연구진은 이미 국내에 betulinic acid의 생산 공정에 관하여 특허를 출원해 놓은 상황이다. 독일에서도 1990년대 후반에 betulinic acid의 생산에 관한 특허를 독일에서 취득해 놓은 상황이다. 아래 자료는 1996년부터 현재까지 미국의 특허청에 등록되어 있는 betulinic acid에 관한 특허 등록현황을 나타내었다. 아래 자료에서 볼 수 있는 바와 같이 미국에서는 최근 수년간 매년 10개 정도의 betulinic acid 관련 특허를 확보하고 있다. 이러한 상황에 비추어볼 때 우리도 우리나라에서 효율적으로 대량생산이 가능한 귀중한 자원에 관하여 보다 심도있고 다양하게 연구를 진행하여 betulinic acid에 관한 특허를 확보함으로써 향후 이들을 이용한 제품개발시 살아 남을 수 있는 국가경쟁력을 가질 수 있도록 하는 것이 바람직하다고 사료된다.

USpatent database

Results of Search in 1996-2002 db for:

"betulinic acid": 52 patents.

PAT. NO.	Title
1 6,407,270	Methods for manufacturing betulinic acid
2 6,403,816	Betulinic acid derivatives having antiangiogenic activity, processes for producing such derivatives and their use for treating tumor associated angiogenesis
3 6,392,070	Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark
4 6,369,109	Betulinic acid and derivatives thereof useful for the treatment of neuroectodermal tumor
5 6,369,101	Therapeutic method to treat herpes virus infection
6 6,342,611	Fluorogenic or fluorescent reporter molecules and their applications for whole-cell fluorescence screening assays for capsases and other enzymes and the use thereof

- 7 6,338,855 Cleansing articles for skin and/or hair which also deposit skin care actives
- 8 6,335,429 Fluorogenic or fluorescent reporter molecules and their applications for whole-cell fluorescence screening assays for caspases and other enzymes and the use thereof
- 9 6,303,589 Pentacyclic triterpenes
- 10 6,280,778 Process for preparing natural product derivatives from plants in a single step
- 11 6,271,405 Method for manufacturing betulinic acid
- 12 6,267,957 Attaching agents to tissue with transglutaminase and a transglutaminase substrate
- 13 6,264,998 Extracting betulinic acid from *Ziziphus jujuba*
- 14 6,232,481 Method for manufacturing betulinic acid
- 15 6,228,850 Antiangiogenic activity of betulinic acid and its derivatives
- 16 6,225,353 Method and composition for selectively inhibiting melanoma
- 17 6,217,886 Materials and methods for making improved micelle compositions
- 18 6,214,814 Use of betulinic acid derivatives for inhibiting cancer growth
- 19 6,214,350 Process for preparing an anti-viral medicinal product from plant extracts
- 20 6,207,711 Photoaging inhibitor and skin-care preparation
- 21 6,190,678 Cleansing and conditioning products for skin or hair with improved deposition of conditioning ingredients
- 22 6,183,761 Compositions for regulating skin appearance
- 23 6,175,035 Method of producing betulinic acid
- 24 6,172,110 Acylated betulin and dihydrobetulin derivatives, preparation thereof and use thereof
- 25 6,153,208 Cleansing and conditioning article for skin or hair
- 26 6,124,362 Method for regulating hair growth
- 27 6,080,877 Taxanes
- 28 6,071,898 Asiatic acid derivatives having modified A-ring
- 29 6,048,847 Use of betulinic acid and its derivatives for inhibiting cancer growth and a method of monitoring this
- 30 6,013,646 Indolocarbazole derivatives useful for the treatment of

neurodegenerative diseases and cancer

31 5,989,556 Compositions of matter useful in the treatment of viral infections derived from plant extracts

32 5,985,300 Delivery of skin benefit agents via adhesive strips

33 5,977,395 Ester syntheses and transesterifiable xanthate reactants therefor

34 5,962,527 Method and composition for treating cancers

35 5,935,596 Delivery of skin benefit agents via adhesive strips

36 5,919,815 Taxane compounds and compositions

37 5,916,919 Retrovirus protease inhibitors

38 5,906,825 Polymers containing antimicrobial agents and methods for making and using same

39 5,869,535 Method and composition for selectively inhibiting melanoma

40 5,837,257 Use of plant extracts for treatment of HIV, HCV and HBV infections

41 5,804,575 Methods of manufacturing betulinic acid

42 5,795,909 DHA-pharmaceutical agent conjugates of taxanes

43 5,750,578 Use of betulin and analogs thereof to treat herpesvirus infection

44 5,679,828 Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives and uses therefor

45 5,667,793 Skin care compositions for treating cellulite

46 5,658,947 Method and composition for selectively inhibiting melanoma using betulinic acid

47 5,643,884 Lupane triterpenoid derivatives

48 5,637,722 Ester syntheses and transesterifiable xanthate reactants therefor

49 5,589,182 Compositions and method of treating cardio-, cerebro-vascular and alzheimer's diseases and depression

50 5,536,499 Cosmetic compositions for reducing or preventing signs of cellulite

51 5,529,769 Cosmetic compositions containing betulinic acid

52 5,523,090 Skin treatment composition

제 7 장 참고문헌

- 1 김영균, 1999, 한국산 수목으로부터 생리활성 물질개발과 생리활성 검색자료 전산화, 농림부
2. Jeong HJ; Chai HB; Park SY; Kim DS, Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* 1999 Apr 19;9(8):1201-4
3. Soler F, Poujade C, Evers M, Carry JC, Henin Y, Bousseau A, Huet T, Pauwels R, De Clercq E, Mayaux JF, Le Pecq JB, Dereu N J. *Med. Chem.* 39 (5):1069-83, 1996, Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry.
4. Fulda S; Jeremias I; Steiner HH; Pietsch T; Debatin KM, Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* 1999 Jul 30;82(3):435-41
5. Hashimoto, F., Kashiwada, Y., Cosentino, L.M., Chen, C.H., Garrentt, P.E., Lee, K.H., Anti-AIDS agents-XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorg Med. Chem.* 5(12):2133-2143 (1997)
6. Diana GD, Pevear DC: Antipicornavirus drugs: current status. *Antiviral Chemist Chemotherapy* 8: 401-408, 1997
7. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y: type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukemic T cells. *Nature* 294: 770-771, 1981
8. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC: Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500, 1984

9. Schultz TF, Whitby D, Hoad JG, Corrah T, Whittle H, Weiss RA: Biological and molecular variability of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Gambia. *J Virol* 64: 5177–5182, 1990
10. 13. Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E: Rapid and automated tetrazolium- based colorimetric assay for the detection of anti HIV compounds. *J Virol Methods* 20:309–321, 1988.
11. Fujioka, T, Kashiwada, Y., Kilkuskie, R.E., Cosentino, L.M., Ballas, L.M., Jiang, J.B., Janzen, W.P., Chen, I.S., Lee, K.H., Anti-AIDS agents II, Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum* and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids, *J. Nat. Prod.* 57(2):243–247 (1994).
12. Kashiwada, Y., Hashimoto, F., Cosentino, L.M., Chen, C.H., Garrett, P.E., K.H., Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem* 39(5):1016–1017 (1996).

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.