

## GC/MS 에 의한 tropane alkaloids 의 분석 및 흰쥐의 생체내 분포

임미애<sup>#</sup> · 백승경 · 이주선 · 박세연

국립과학수사연구소 법과학부 약독물과

(Received August 31, 1999)

### Tissue Distribution of Tropane Alkaloids in Rats and its Determination by GC/MS After the Oral Administration of Scopolia Rhizome

Mieae Lim<sup>#</sup>, Seungkyung Baeck, Juseon Lee and Sehyoun Park

National Institute of Scientific Investigation, Drug-Toxicology Div., Forensic Science Department

**Abstract**— Scopolia rhizome is mistaken as an atractylodes rhizome because of their similarities in shape. That is why atractylodes rhizome imported from China sometimes contain scopolia rhizome, which is very toxic. 8 persons were intoxicated after taking imported atractylodes rhizome which is tainted. In kampo medicine prepared with such imported atractylodes rhizome, the level of tropane alkaloids ranged from 1.12~4.34 mg/dose. In this study, we tried to investigate the tissue distribution of scopolia rhizome in rats. The extracts of scopolia was administered orally to rats (a single dose of 10 mg/kg, 20 mg/kg and 7days repeated dose of 10 mg/kg). Their blood was collected at 0.5, 1, 2, 4, 6 hrs, and liver, kidney, lung and spleen were collected after 6 hrs. The tissue homogenate was applied to solid phase extraction column for the determination of tropane alkaloids. After the oral administration of 20 mg/kg scopolia extracts, *l*-hyoscyamine was detected in rat blood to 2 hrs after dosing. The concentration of tropane alkaloids was the highest in liver followed by lung, kidney and spleen. However, lung, kidney and spleen were similar in amount.

**Keywords** □ *l*-Hyoscyamine, scopolamine, GC/MS, scopolia rhizome extract, distribution in rat.

*l*-hyoscyamine은 가지과(Solanaceae)의 여러 식물, 특히 낭탕근의 근경에 많이 존재하는 tropane alkaloid이다. 근경의 모양이 불규칙하며, 다소 구부러 지기도 한 형태로 겉의 색깔이 회갈색~흑갈색이며, 외 형이 창출과 아주 많이 유사한데,<sup>1,2)</sup> 특히 중국에서 수입되는 창출에는 상당히 많은 양의 낭탕근이 섞여 있어 대개 수입 창출은 전문적으로 선별되어 약재로 사용되어지고 있다. 창출은 삽주(*Atractylodes japonica*)의 근경으로 우리나라에서는 전국 각지에 야생하며, 지리적으로는 중국, 일본, 만주 등에 분포하고 있다. 주성분은 atractylon으로 알려져 있으며, 소화관과 피하조

직중에 나타나는 수분대사부전에 이노, 발한을 촉진하고, 모든 수독을 제거하는 약효가 있어, 다른 약과 배합되어 건위, 정장, 이노, 발한의 효력을 나타낸다. 낭탕근은 미치광이풀(*Scopolia parviflora*)의 근경으로 주성분은 *l*-hyoscyamine, atropine, scopolamine 등의 tropane alkaloid가 약 0.3% 함유되어 있으며, 부교감 신경 억제작용이 있어 위산과다, 위통, 위경련, 십이지장궤양, 경련성 변비, 소화액 분비억제 등의 작용을 나타낸다.<sup>1)</sup>

약재로 사용시의 약용량을 보면 보통 창출은 3~9g 이 사용되며, 낭탕근은 극량이 1일 0.3g으로 사용량에 있어서 창출과 큰 차이가 있으므로<sup>1)</sup> 낭탕근이 섞여있는 창출을 그대로 사용할 경우 낭탕근이 과량복용이 되어, 이로 인한 중독증상이 나타날 수 있는데 그의

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-2600-2301 (팩스) 02-2600-2304

중독증상으로는 구갈, 연하곤란, 피부점막건조, 두통, 어지럼증, 심박빈삭, 동공산대, 배뇨곤란, 정신혼미, 혈압강하 등의 증상이 나타날 수 있으며, 심하면 사망할 수도 있는 것으로 문헌에 보고되어 있다.<sup>3)</sup> 실제로 창출에 섞여있는 낭탕근으로 인하여 집단중독된 예에서 중국에서 수입된 창출에 낭탕근이 섞여 있었는데 이를 창출만으로 오인하여 그대로 사용함으로써 낭탕근의 중독증상을 나타내었다. 이에 본 연구에서는 시료가 남아있는 4종의 한약액을 분석하여 실제 환자가 복용한 양을 추정하였다. 분석방법으로는 HPLC,<sup>4-7)</sup> GC/MS<sup>8-10)</sup> LC/MS<sup>11,12)</sup> 등이 알려져 있는데 본 실험에서는 GC/MS법을 사용하였다. 또한 낭탕근 추출액을 흰쥐에 10 mg/kg 1회 경구투여군, 20 mg/kg 1회 경구투여군, 10 mg/kg 7회 경구투여군으로 나누어 투여한 후 0.5~6시간에 걸쳐 혈액을 채취하여 시간에 따른 분포를 보았으며, 6시간후 주요장기인 간, 신장, 폐, 비장을 채취하여 *l*-hyoscyamine 및 scopolamine의 함량을 측정하였다.

**Case History** - 의뢰 관서의 사건 개요에 의하면 한약방에서 치료목적과 보약의 용도로 8명이 한약을 지어먹은 9세~67세의 환자중 6명은 처음 복용후 30분 이내에 어지러움, 사지 무기력증, 눈 충혈 및 환상이 보이는 등의 증상을 호소하였다. 그 가운데 2명은 상태가 심각하여 말을 잘 못하는 등의 부작용을 나타내었고, 1명은 2차 복용후 15분후에 열이 나고 숨이 차는 부작용을 일으켰으며, 나머지 1명은 큰 부작용은 나타나지 않았다. 그 환자들중 4명이 복용하였던 각각 4종의 한약추출액과 한약조제시 사용된 길경, 중국창출, 한국창출등이 성분 검사를 위해 의뢰되었다.

### 실험방법

**시약 및 재료** - *l*-hyoscyamine, scopolamine 및 bromhexine은 Sigma사 제품을 사용하였고, 기타 시약은 시판되고 있는 특급시약을 사용하였다.

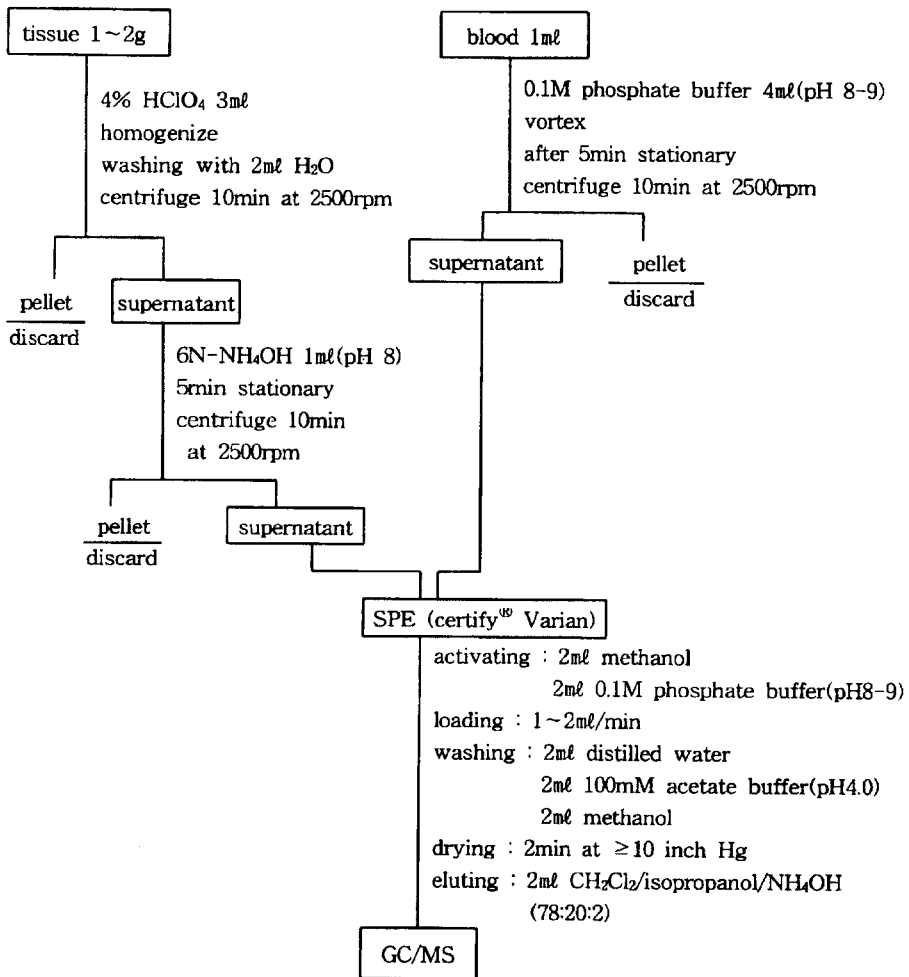
**기기 및 기구** - 가스크로마토그래프/질량분석기(GC/MS)는 미국 Finnigan사의 Finnigan MAT GCQ를 사용하였다. 그 외 homogenizer(IKA Labortechnik, U.S.A), vortex mixer(Thermolyne, U.S.A), vacuum evaporator(Büchi, Swiss) 등을 사용하였다. 시료추출용 solid phase extraction(SPE) column으로는 certify®(Varian, U.S.A)를 사용하였다.

**표준용액의 조제 및 검량선** - *l*-hyoscyamine 및 scopolamine은 먼저 methanol에 녹여 1 mg/ml의 표준용액으로 조제한 후 이를 다시 10 µg/ml로 희석하여 표준용액으로 하였으며, 내부표준물질(IS)로 사용한 bromhexine도 역시 10 µg/ml의 methanol 용액으로 조제하여 150 µl(1.5 µg)를 사용하였다. 검량선은 *l*-hyoscyamine 및 scopolamine을 각각 0.15 µg, 0.3 µg, 0.6 µg가 되게 하였으며, IS를 넣은 후 약 30 µl로 농축하여 이를 GC 및 GC/MS로 분석하였는데 column은 DB-5MS capillary(0.25 mm i.d.×15M, J&W Scientific, U.S.A)를 사용하였고, column온도는 120°C에서 1분간 유지후 260°C까지 분당 20°C씩 상승시킨 후 260°C에서 10분간 유지시켰다. Transferline 온도는 270°C이었으며, EM voltage 1400V로 하여 분석하였다.

**한약액 시료중 alkaloids의 함량시험** - 한약액 시료를 20배 희석하여 그중 1ml를 취하여 1N-NH<sub>4</sub>OH 1ml로 pH 약 8이 되게한 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5ml를 넣고 vortex mixer에서 30초간 격렬히 추출, 원심분리후 용매층을 분취하여 농축한 다음 IS용액을 넣어 앞에서의 조건에 따라 GC/MS로 분석하였다.

**시험용액의 조제 및 동물실험** - 시판되고 있는 낭탕근을 구입하여 약탕기에 넣어 한약액으로 추출하였으며, 이를 *l*-hyoscyamine으로서 10 mg/ml가 되도록 조제하였다. 실험동물은 체중 150~180g(5주령)의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 식품의약품안전청 실험동물실에서 분양받아 온도 20~25°C, 습도 60~70%의 동물실에서 1주일 이상 사육하면서 환경에 적응시켜 실험에 사용하였다. 실험동물을 3군으로 나누어 group I은 시험용액을 20 mg/kg으로 1회 경구투여하고, group II는 10 mg/kg을 1회 경구투여하였으며, group III은 10 mg/kg을 1주일동안 반복 경구투여하였다. 투여후 0.5, 1, 2, 4, 6시간에 안와정맥을 통해 혈액을 채취하였으며, 6시간후 장기조직으로는 간, 신장, 폐, 비장을 채취하여 함량시험을 할 때까지 -40°C에서 보관하였다.

**혈액 및 장기조직에서의 함량시험** - Scheme 1에서와 같은 방법으로 추출하여 혈액 및 조직에서의 alkaloids를 GC/MS로 분석하였다. 흰쥐의 조직중 alkaloid의 추출은 먼저 각 장기조직 1~2g을 정밀히 취하여 perchloric acid 침전법에 따라 단백질을 침전 제거한 후 상정액을 취해 6N-NH<sub>4</sub>OH 1ml로 pH 약 8이 되게하고 5분간 방치후 다시 2500 rpm으로 10분



**Scheme 1** – Procedure for extraction of *l*-hyoscyamine & scopolamine.

간 원심분리하였다. 상정액을 취하여 혈액에서와 같이 SPE에 의해 추출하였다.

### 실험결과 및 고찰

**Tropane alkaloids의 분석** - 한약액 및 한약의 원료로 사용된 중국창출, 한국창출, 길경종의 독성성분을 분석하기 위해 산성과 알칼리성에서 유기용매로 추출하여 예비시험으로서 박층크로마토그래피(TLC)로 분석하였는데 이때 한약액 및 중국창출의 알칼리 추출물에서 알칼로이드의 일반정색시약인 dragendorff reagent와 iodoplatinate reagent에 정색되어 GC 및 GC/MS로 알칼로이드를 분석하였다.

먼저 GC로 분석하였을 때 9.0분의 큰 피크와 10.6

분의 작은 피크가 검출되었다. 이들 피크의 성분을 확인하기 위해 GC/MS로 분석하였는데 6.38분의 큰 피크와 여러개의 작은 피크를 관찰할수 있었다. 먼저 6.38분에서 검출되는 피크의 질량 스펙트럼을 보면  $m/z$  124의 기준 봉우리와  $m/z$  289, 94, 82가 관찰되었는데 이는 *l*-hyoscyamine의 분자 이온인  $m/z$  289와 중심에 위치한 ester 다음의 C-O결합의 분열에 의해 생성되는 tropane의  $m/z$  124로서 *l*-hyoscyamine임을 확인하였고, 다음 7.12분의 질량 스펙트럼은 scopolamine의 분자 이온으로서  $m/z$  303과 수소 라디칼과 ester의 토막 내기와 이어지는 tropane핵의 균열로 생성되는 N-methylpyridinium의  $m/z$  94로 확인되었다. 그외 5.57분의 질량 스펙트럼은 *l*-hyoscyamine과 유사하게 ester 다음의 C-O결합의 분열에 의해 생성

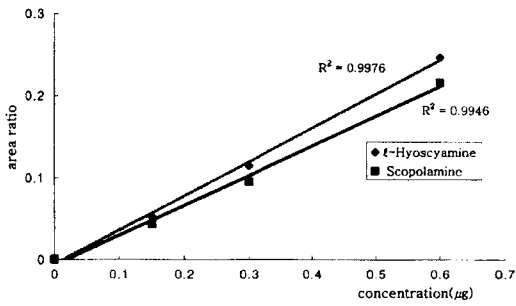


Fig. 1 - Calibration curve of l-hyoscyamine and scopolamine.

되는 tropane의  $m/z$  124와 분자 이온인  $m/z$  271로서 apoatropine으로 확인되었는데 이는 미량 검출되며, 또한 표준품의 구입이 어려워 본실험에서는 l-hyoscyamine과 scopolamine에 대해 합량시험을 하였다.

내부표준물질로는 l-hyoscyamine, scopolamine과의 검출시간이 가까운 bromhexine을 선택하였으며, 검량선은 l-hyoscyamine 및 scopolamine을 각각 0.05~0.6  $\mu\text{g}$ 으로 하여 작성하였는데 Fig. 1에서 보는 바와 같이 각각  $R^2=0.9976$  과  $0.9946$ 으로 직선성을 나타

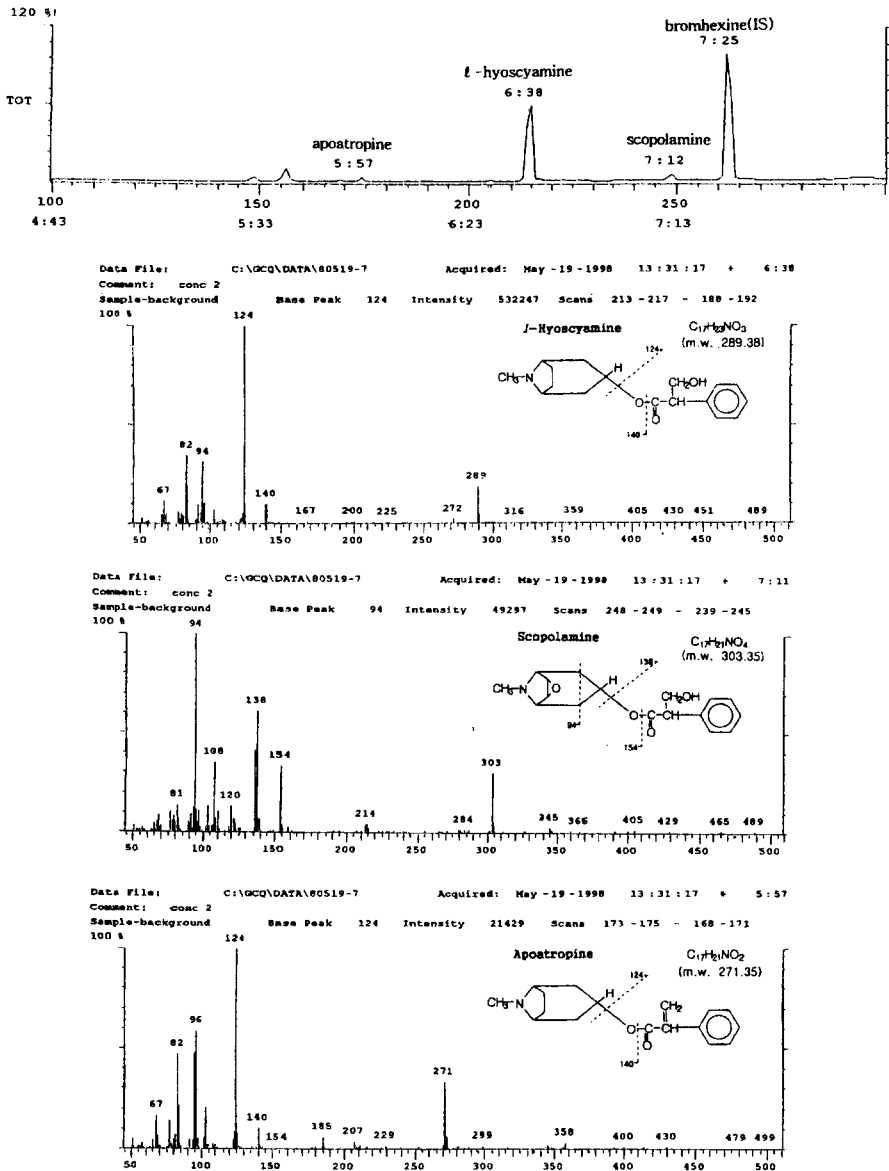


Fig. 2 - Total ion chromatogram and mass spectra of tropane alkaloids in sample.

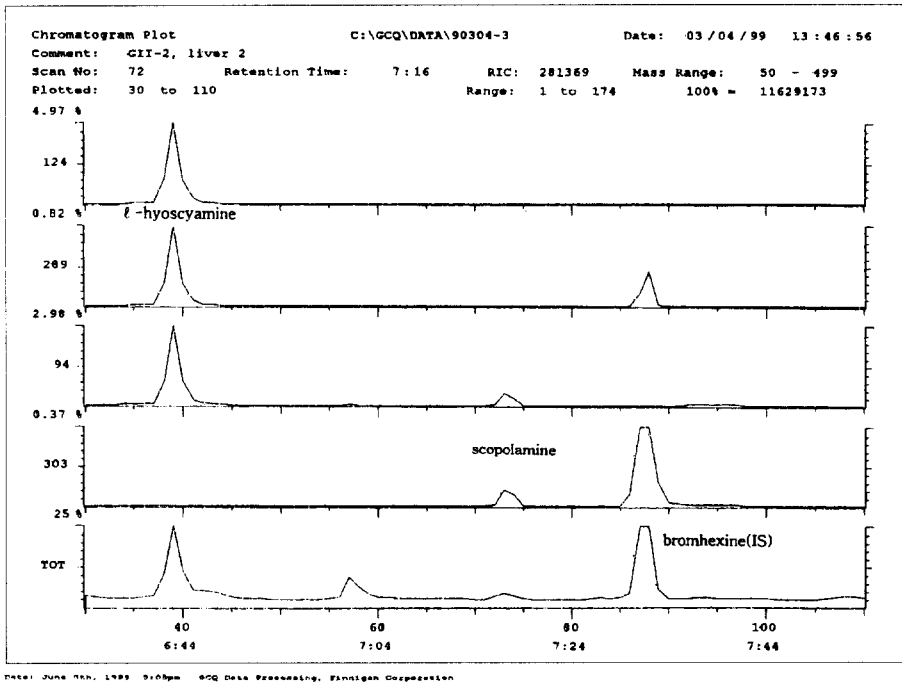


Fig. 3 – Selected ion monitoring of m/z 124, 289 for l-hyoscyamine (scan number 39) and m/z 94, 303 for scopolamine (scan number 73) in rat liver.

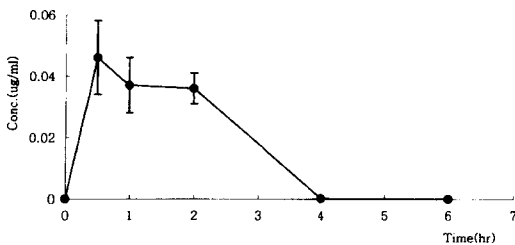


Fig. 4 – The time profile of l-hyoscyamine concentration in blood.

내었다.

**추출조건의 검토** – 먼저 시료중 알칼로이드의 분석 효율을 보기 위하여 NaOH 강알칼리와 NH<sub>4</sub>OH 약알칼리, 추출용매로서 ethyl acetate를 사용하여 비교하여 보았는데 l-hyoscyamine의 pKa가 9.8로서 NH<sub>4</sub>OH 약알칼리가 추출효율에서 더 우수하였다. 다음에는 liquid/liquid extraction(LLE)과 SPE를 비교 검토하였는데 그 중 SPE의 추출효율이 좋아 이를 적용하였으며, SPE column으로는 Varian사의 certify 를 사용하였고 용출 용매로는 methylene chloride/isopropanol/NH<sub>4</sub>OH 혼합용매를 사용하였다.

**한약액중 alkaloids의 함량** – 한약액중 알칼로이드로서 주성분인 l-hyoscyamine과 scopolamine을 앞에서의 추출조건과 검량선에 따라 정량하였는데 그 함량은 Table I에서 보는 바와 같이 l-hyoscyamine이 8.94~33.12 µg/ml, scopolamine이 0.30~1.60 µg/ml으로 검출되었다. 이를 증거물의 양(복용한 용량)을 참고하여 1회 복용량을 추정하여볼 때 alkaloid의 양은 1.12~4.34 mg가 되었다. 통상 tropane alkaloid의 1회 극량이 1mg이며, 1일 3mg을 초과하지 말아야 하므로,<sup>13)</sup> 실제 복용자는 극량의 1.12~4.34배의 alkaloid를 복용한 것으로 추정되며, 치사량은 어린이인 경우 10mg 이고 보통 성인의 경우 5~10mg이상의 농도에서 독성을 나타낸다고 문헌에<sup>3)</sup> 소개되어 있어 이들이 복용한 양은 치사량에는 훨씬 못미치나 충분히 독성을 나타낼수 있는 양인 것으로 생각되며, sample 3은 알칼로이드의 함량이 가장 함량은 낮으며, 환자중 연령대나 보약으로 복용된 약의 용도 등으로 볼 때 거의 부작용이 발현되지 않은 것으로 추정된다.

**Rat blood 및 tissue중의 tropane alkaloids의 분포** – 낭탕군 추출액을 l-hyoscyamine으로서 20 mg/kg 1회 경구투여(group I), 10 mg/kg 1회 경구투여

**Table I** – Concentration of *l*-hyoscyamine and scopolamine in kampo medicine tainted with scopolia root and estimated amount(mg) of tropane alkaloid which was absorbed in human

	Age	Use of Drug	Symptom manifestation time	Concentration (mg/ml)		Dose (ml)	estimated absorbed amount (mg) in human		Total amount (mg) of alkaloid
				<i>l</i> -hyoscyamine	scopolamine		<i>l</i> -hyoscyamine	scopolamine	
sample 1	48	vertigo, pain of mouth dryness	30 min	33.12	1.60	125.00	4.14	0.20	4.34
sample 2	9	discouragement	30 min	24.14	0.75	80.00	1.93	0.06	1.99
sample 3	36	a restorative medicine	-	0.01	0.30	130.00	1.30	0.04	1.34
sample 4	57	vertigo	30 min	10.01	0.30	130.00	1.30	0.04	1.34

**Table II** – Concentration of *l*-hyoscyamine and scopolamine at rat tissue

group	<i>l</i> -hyoscyamine (mg/g)				scopolamine (μg/g)			
	live	lung	kidney	spleen	liver	lung	kidney	spleen
Group I (20 mg/kg/1 day)	0.412 ± 0.075(8) <sup>a)</sup>	0.091 ± 0.034(7)	0.118 ± 0.069(77)	0.117 ± 0.070(7)	0.084 ± 0.040(6)*	0.014 ± 0.002(2)	0.050 ± 0.037(6)	0.017 ± 0.005(2)
Group II (10 mg/kg/1 day)	0.312 ± 0.077(7)	0.071 ± 0.022(4)	0.109 ± 0.123(5)	tr. <sup>b)</sup>	0.031 ± 0.008(7)	0.018 ± 0.005(3)	0.041 ± 0.008(4)	-
Group III (10 mg/kg/7 day)	0.299 ± 0.094(80)	0.045 ± 0.013(4)	0.058 ± 0.062(6)	0.066 ± 0.032(6)	0.033 ± 0.013(7)	0.024 ± 0.005(2)	0.018 ± 0.006(4)**	0.042 ± 0.001(2)

a) represents the Mean ± S.D. of each value and the number of rats.

b) means trace amount.

\* significantly (P<0.01) different from the value for the Group II liver.

\*\* significantly (P<0.01) different from the value for the Group II kidney.

(group II) 및 10 mg/kg 7일 경구투여(group III)로 하여 투여량에 따른 조직중의 분포도를 비교하여 보았는데, Table II에서 보는 바와 같이 가장 많은 양이 투여된 group I의 조직중 함량분포가 가장 높았으며, 조직간의 분포는 간조직에서 가장 높게 나타났으며, 그 외 조직은 간조직에 비해 현저히 낮게 검출되었는데 이 결과로 부터 *l*-hyoscyamine으로 인한 독성여부 시험을 위한 조직으로는 간조직이 가장 적합함을 알수 있었다. Group I는 group II에 비해 두배 용량이 투여되었으나 조직중의 분포가 용량에 비례하여 증가하지는 않았으며, scopolamine은 간에서의 농도가 group I이 group II에 비해 약 2배정도 높게 검출되었으나 그 외 폐나 신장에서는 특별한 차이를 보이지 않았다.

같은 용량을 1회투여한 군과 7일간 반복 투여한 군을 비교하여 볼 때 *l*-hyoscyamine은 간, 폐, 신장 및 비장 모두 유의성 있는 변화는 없었다. 이는 투여기간으로 비교하기에는 짧았던 것으로 생각되며, scopolamine은 간, 폐, 비장에서는 *l*-hyoscyamine가 마찬가지로 별 변화가 없었으나, 신장에서는 현저하게 감소

됨을 나타내었는데 이것이 반복투여에 의한 결과인지 여부에 대하여는 여러 가지 용량으로 다양한 투여기간을 설정하여 추후 시험해 보아야 할 것으로 생각된다.

혈액에서의 분포도는 20 mg/kg투여군에서만 함량을 측정할수 있었으며, 이 때 투여후 30분에 가장 높은 분포를 보였으나, 1시간후에는 약간 감소하여 2시간까지 거의 비슷한 농도를 유지하였으며, 그 이후에는 검출되지 않았는데 이는 경구 투여로 인해 정맥주사와 같은 급격한 농도변화를 보이지 않은 것으로 추정되며, 최대 혈중농도는 6시간후 간에서의 농도에 비해 약 1/10로 검출되었다.

## 결 론

GC/MS의 SIM을 이용하여 *l*-hyoscyamine 및 scopolamine의 분석에서 표준품은 각각 0.05~0.6 μg의 농도에서  $r^2=0.9976$  및 0.9946으로 직선상을 나타내었으며, perchloric acid 침전법과 고상추출법에 의해 조직에서의 검출한계 10 ng으로 양호하게 분석되었다. 낭탕근이 혼재된 창출로 조제된 한약액 4개 시료중의

알칼로이드의 함량은 1회 복용량이 1.12~4.34 mg으로 사람에게서 독성을 일으킬수 있는 양으로 사료되며, 낭탕근 추출액을 흰쥐에 경구투여한 후, 시간에 따른 혈중농도변화는 20 mg/kg투여군에서만 2시간까지 *l*-hyoscyamine만 검출되었으며 6시간후 조직중 분포도는 간에서 가장 많이 검출되었고, 폐, 신장, 비장은 유사하게 미량 검출되었다. 낭탕근 추출액을 *l*-hyoscyamine으로서 10 mg/kg 1회투여하였을 때와 7일 반복투여했을 때를 비교한 결과, 투여기간에 따른 조직간의 농도변화가 없었으며, scopolamine은 신장에서만 7일 반복투여군이 현저하게 감소되었다.

## 문 헌

- 1) 대한약전 제 7개정 p. 1070 (1998).
- 2) 육창수 : 원색한국약용식물도감 p. 488 & p. 531 (1997).
- 3) Dreisbach, R. H. and Robertson, W. O. : Handbook of Poisoning 12th ed. p. 345 (1987).
- 4) Okuda, T., Nishida, M. and Sameshima, I. : Determination of atropine in biological specimens by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **567**, 141 (1991).
- 5) Smith, E. A., Meloan, C. E., Pickell, J. A. and Oehme, F. W. : Scopolamine poisoning from homemade 'Moon Flower' wine. *J. Anal. Toxicol.* **15**, 216 (1991).
- 6) Oshima, T., Sagara, K., Tong, Y. Y., Zhang, G. and Chen, Y. H. : Application of ion-pair high performance liquid chromatography for analysis of hyoscyamine and scopolamine in Solanaceous crude drugs. *Chem. Pharm. Bull.* **37(9)**, 2456 (1989).
- 7) Pennington, L. J. and Schmidt, W. F. : Belladonna alkaloids and phenobarbital combination pharmaceuticals analysis I: High performance liquid chromatographic determinations of hyoscyamine-atropine and scopolamine. *J. Pharmaceu. Sci.* **71(8)**, 951 (1982).
- 8) Kehe, C. R., Lasseter, K. C., Miller, N. C., Wick, K. A., etc. : Comparative absorption of atropine from a metered-dose inhaler and an intramuscular injection. *Ther. Drug Monitoring* **14**, 132 (1992).
- 9) Saady, J. J. and Poklis, A. : Determination of atropine in blood by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **13**, 296 (1989).
- 10) Vitale, A. A., Acher, A. and Pomilio, A. B. : Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *J. Ethnopharm.* **49**, 81 (1995).
- 11) Xu, A., Havel, J., Linderholm, K. and Hulse, J. : Development and validation of an LC/MS/MS method for the determination of *l*-hyoscyamine in human plasma. *J. Pharmaceu. Biomed. Anal.* **14**, 33 (1995).
- 12) Auriola, S. and Martinsen, A. : Analysis of tropane alkaloids with thermospray high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **562**, 737 (1991).
- 13) Sticht, G., Kaferstein, H. and Staak, M. : Results of toxicological investigations of poisoning with atropine and scopolamine. *Acta. Med. Leg. Soc.(Liege)*. **39(2)**, 441 (1989).