

부자류 생약의 성분인 아코니틴과 관련 알칼로이드의 정량

엄동옥*# · 한상욱 · 신현덕

우석대학교 약학대학

(Received November 11, 1999)

Determination of Aconitine and Related Alkaloids in Processed Buza

Dong-Ok Eom*#, Sang-Wook Han and Hyun-Duck Shin

College of Pharmacy, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea

Abstract — Determination of Aconitum alkaloids in processed Buza (Cho-O, Salted Buza, Moist-heating Buza, Limed Buza), which had been prepared from the raw tubers of *Aconitum chisanense* (Ranunculaceae), was established using visible spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC) method especially for Aconitine analysis. Aconitum alkaloids were reacted with tetra-thiocyanatocobalt(III) complex ion to form a stable ion pair. The reaction product was insoluble in water but freely soluble in several organic solvents. 1,2-Dichloroethane was the best extracting solvent among the examined solvents. Spectrophotometry of Aconitum alkaloids at λ_{max} 625 was carried out. The HPLC method for aconitine was carried out using Radial PAK-CN column with gradient solvent system by solvent mixture of acetonitrile and phosphate buffer (pH 3.0) at 40°C and λ 254 nm. Linear relationship was found between absorbance response and concentration of aconitine in range of 0.45 mM~0.9 mM ($r^2=0.9949$) by spectrophotometry and 0.3 mM~1.2 mM ($r^2=0.9983$) by HPLC method. These methods have been found to be suitable and reproducible for routine analysis of Aconitum alkaloids and its pharmaceutical preparations.

Keywords □ Processed Buza, aconitine, Aconitum alkaloids, determination, spectrophotometry, HPLC method.

부자류 생약은 *Aconitum*속 식물의 괴근을 건조한 초오(Aconiti ciliare Tuber)와 다양한 방법으로 수치(가공)한 부자(Prepared Aconitie)가 있다. 그러나 부자류 생약의 기원식물, 산지, 수치방법에 따라 이름이 다르다.¹⁾ 성분인 아코니틴과 관련 알칼로이드는 질소가 있는 디테르펜 골격으로 아실옥시기가 결합된 아코니틴형 알칼로이드와 아코니틴형 알칼로이드에 스테로일 등의 지방산 잔기가 결합된 리포아코니틴형 알칼로이드가 있다.²⁾ 그리고 메톡실기가 없는 아티신형 알칼로이드가 있지만 성분의 종류와 함량은 기원식물, 산지, 채집시기 및 가공방법의 차이에 따라서 현저히 다르다.³⁾ 아코니

틴형 알칼로이드는 독성이 강하며 주요 화합물과 aconitine, hypaconitine, jesaconitine, mesaconitine과 이들의 리포형 화합물이 있다. 그러나 아티신형 알칼로이드는 독성이 적으며 주요 화합물은 atisine, apelline, songorine, ignavine, kobusine 등이 있다.⁴⁾ 또한 아코니틴형 알칼로이드와 리포아코니틴형 알칼로이드는 민감하게 탈아세틸화되면서 벤조일아코니틴형 알칼로이드와 리포벤조일아코니틴형 알칼로이드^{5,6)}로 가수분해되고 양은 적지만 일부가 탈벤조일화되면서 아코니틴형 알칼로이드와 리포아코니틴형 알칼로이드로 다시

가수분해되어 독성이 현저히 감소된다.^{7,8)} 아코니틴과 관련 알칼로이드의 정량에 관한 보고는 Neutralimetry,⁷⁾ MbPC-spectrophotometry,⁹⁾ UV-spectrophotometry,¹⁰⁾ Gas-Liquid Chromatograph 법,^{7,10,11)} TLC

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0652-290-1568 (팩스) 0652-290-1567

법^{7,10} 및 HPLC 법¹²⁻¹⁵이 있다. 저자 등은 아코니틴과 관련 알칼로이드가 $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ 이온^{16,17}과 물에서 청색의 불용성 착화합물¹⁸을 만들고 1,2-디클로로에탄으로 전용되어 분리되므로 별도의 추출조작 없이 *Aconitum*속 식물의 괴근이나 부자류 생약을 추출할 때 동시에 추출되는 이중 성분의 영향을 피하면서 Spectrophotometry와 HPLC법으로 간편하고 재현성 있게 정량할 수 있어 보고한다.

실험방법

재료 및 시약

초오(Cho-O)는 전북 무주군의 고산지대에서 채취한 지리바꽃(*Aconitum chiisanense*)의 건조근을, 염부자(Salted Buza)는 중부지방에서 재배된 *Aconitum*속 식물의 괴근을 포화식염수에 6일동안 침적한 건조근을, 습열부자(M-H Buza)는 초오를 120°C에서 40분간 습열처리⁷한 건조근을, 석회부자(Limed Buza)는 초오를 포화석회수에 6일간 침적한¹ 건조근을 미세말로 만들어 5산화2인의 제습기에 보관하면서 실험에 사용하였다(이상의 초오와 가공부자를 시료로 칭함).

Aconitine(m.w: 642.70, approx. 95% HPLC)과 Co(NO₃)₂ · 6H₂O 및 NH₄SCN은 Sigma Co.(미국)제품을, 1,2-dichloroethane은 Wako Chem. Co.(일본) 제품을, 기타의 시약과 시액은 특급을 사용하였다. 아코니틴표준액은 aconitine 52.7 mg을 달아 0.1M HCl 10 ml를 넣어 녹인 후 0.1 mM HCl 적량과 0.5M NaOH 2 ml를 가하여 정확히 50 ml로 만들었다. Potassium hydrogen phthalate 시액은 C₈H₅KO₄ 1.021g을 달아 물을 넣어 정확히 100 ml로 만들었다.

Tetrathiocyanatocobalt[III] 시액은 Co(NO₃)₂ · 6H₂O 5g과 NH₄SCN 20g에 물을 넣어 정확히 100 ml로 만들었다(pH 4.64).

기기

Spectronic 20*(Milton Roy Co.), Spectrophotometer(Shimadzu UV-1601), HPLC(Shimadzu Class LC 10), Ultra Sonic Clearers(Bransonic 2210), Centrifuge(Hanil science industrial MF 80), pH meter(Orion Reserch EA 920)를 사용하였다.

극대파장 (λ_{max})

아코니틴표준액 1 ml에 Tetrathiocyanatocobalt[III] 시액 3 ml potassium hydrogen phthalate 시액 5 ml 및 1,2-dichloroethane 10 ml를 넣고 흔들어 방치한 다음 분리된 1,2-dichloroethane을 취하여 무수황산 나트륨 0.5g을 넣고 흔든 후 2분간 원심분리하여 250~700 nm의 파장변화에 따른 흡광의 λ_{max} 을 측정하였다. 또한 정량법의 시료량을 취하여 0.1M HCl 10 ml를 넣고 60분간 초음파처리 후 0.5M-NaOH 2 ml를 가하였다. 여기에 potassium hydrogen phthalate 시액 10 ml와 Tetrathiocyanatocobalt[III] 시액 5 ml 및 1,2-dichloroethane 20 ml를 넣어 같은 방법으로 조작한 후 1,2-dichloroethane으로 희석하여 흡광의 λ_{max} 을 측정하였다.

HPLC 법의 측정조건

다음의 조건에서 시료 중 아코니틴과 관련 알칼로이드를 HPLC로 분리하였다.

Stationary phase	: Radial PAK-CN column
Mobile phase	: acetonitrile-pH 3.0 phosphoric acid buffer(70:30)
Flow rate	: 1.0 ml/min
Detector	: 254 nm
Sensitivity	: 0.02 Auf

아코니틴과 관련 알칼로이드의 안정성

아코니틴표준액과 시료의 λ_{max} 을 측정한 1,2-dichloroethane을 실온에서 24, 48, 72 시간동안 방치하면서 λ_{max} 와 크로마토그램 면적의 변화를 검토하였다.

검량선 (회귀식)

흡광도측정법-아코니틴용액 1, 3, 6 ml를 3개의 시료병에 취하여 potassium hydrogen phthalate 시액 10 ml와 Tetrathiocyanatocobalt[III] 시액 5 ml 및 1,2-dichloroethane 10 ml를 넣고 흔든 후 잠시 방치하였다. 분리된 1,2-dichloroethane을 취하여 무수황산 나트륨 0.5g을 넣고 흔든 후 2분간 원심분리하여 λ_{max} 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 방법으로 4회 조작하여 흡광도의 평균값으로 검량선의 회귀식을 작성하고 상대표준편차(이하 SR%로 칭함)를 구하였다.

HPLC 법 - 아코니틴표준액 2, 4, 8 ml를 3개의 시료병에 취하여 potassium hydrogen phthalate 시

액 10 ml와 Tetrathiocyanatocobalt(II) 시액 5 ml 및 1,2-dichloroethane 10 ml를 넣고 흔든 후 잠시 방치하였다. 분리된 1,2-dichloroethane을 취하여 무수황산나트륨 0.5g을 넣고 흔든 후 2분간 원심분리 하여 10 μ l를 주입하였다. 같은 방법으로 4회 조작하여 얻은 크로마토그램에서 면적의 평균값으로 검량선의 회귀식을 작성하고 SR%를 구하였다.

정량법

흡광도측정법 및 HPLC 법 - 일정량의 시료를 칭량하여 시료병에 넣고 0.1M HCl 20 ml를 가하여 60분간 초음파처리한 후 0.5M NaOH 4 ml를 넣었다. 여기에 Tetrathiocyanatocobalt(II) 시액 5 ml와 potassium hydrogen phthalate 시액 10 ml 및 1,2-dichloroethane 20 ml를 정확히 넣어 흔들고 탈지면으로 여과하여 잠시 방치하였다. 분리된 1,2-dichloroethane을 취하여 무수황산나트륨 0.5g을 넣고 흔든 후 2분간 원심분리하여 625 nm에서 흡광도를 측정하고 20 μ l를 HPLC에 주입하였다.

측정된 흡광도로 아코니틴과 관련 알칼로이드를 아코니틴으로 정량하고 크로마토그램의 면적으로 아코니틴을 정량하였다.

초오는 1.5g을, 습열부자는 2.0g을, 염부자는 15.0g을 칭량하여 0.1M HCl 20 ml를 넣고 0.5M-NaOH 4 ml로 중화하였으며 석회부자는 5.0g을 칭량하여 pH 4.2~4.8이 될 때까지 0.01M HCl을 넣었다.

재현성시험

정량법과 같은 양의 시료를 4회 칭량하여 흡광도측정법과 HPLC 법으로 아코니틴과 관련 알칼로이드 및 아코니틴의 함량을 측정하여 정량법의 정확도와 정밀도를 확인하였다.

회수시험

정량법과 같은 양의 시료를 4회 칭량하여 아코니틴 용액 2 ml씩을 넣고 흡광도측정법과 HPLC 법으로 아코니틴과 관련 알칼로이드 및 아코니틴을 정량하여 공존물질의 방해로 인한 회수율을 검토하였다.

실험결과 및 고찰

극대파장 (λ_{max})

아코니틴과 관련 알칼로이드의 λ_{max} 을 측정하기 위

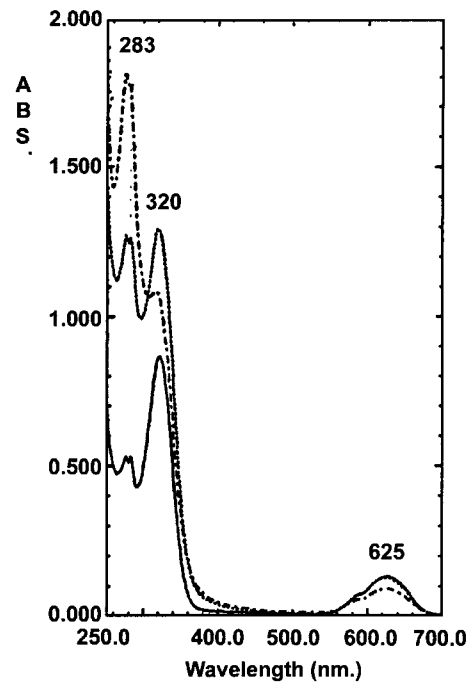


Fig. 1 - Spectrum of $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ of aconitine and its alkaloids —; Saltd Buza, ···; Moist-heating Buza ---; Limed Buza.

하여 250~700 nm의 파장변화에 의한 흡광도를 측정하니 Fig. 1과 같이 276, 283, 320, 625 nm에서 λ_{max} 가 있어 625 nm를 흡광도측정법의 측정파장으로 선택하였다. 초오의 극대파장은 276, 283, 320, 625 nm로 아코니틴용액과 염부자의 극대파장과 같았다. 또한 습열부자의 극대파장은 염부자와 같았지만 320 nm에서의 흡광이 적었던 반면 276과 283 nm의 흡광은 증가되었으며 석회부자는 이러한 현상이 더욱 증대되어 276과 283 nm에서 많은 흡광이 있었다.

HPLC 법의 파장선택에서 320과 624 nm는 크로마토그램의 감응이 없었고 276과 283 nm는 감도가 적어 254 nm를 HPLC의 측정파장으로 선택하였다.

HPLC 법의 측정조건

크로마토그램의 양호한 분리를 위하여 300 mm×4 mm i.d.(TSK GEL LS 410 ODS SIL 5 μ m)의 column(Toyo Soda)과 tetrahydrofuran(THF)-0.05M phosphate buffer(85:15),¹²⁾ (89:11)¹⁴⁾을, 300 mm×15 mm i.d.(LC·ODS-30K)의 column(Wakogel) 및 250 mm×4 mm i.d.(packed with Nucleosil 5 C₁₈

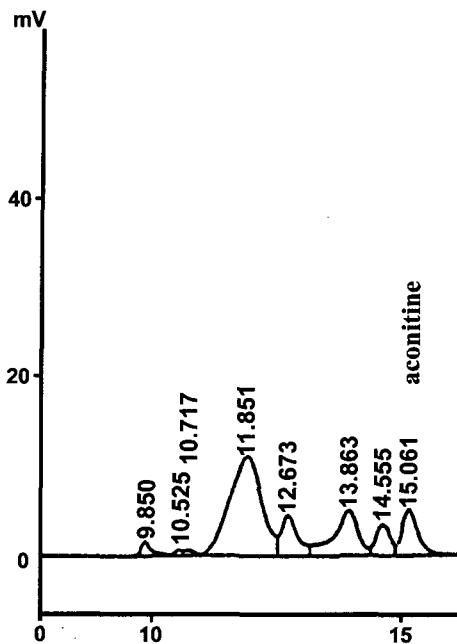


Fig. 2 - HPLC profile of aconitine alkaloids.

의 column(Nagel Co.)과 water-acetonitrile-methanol-acetic acid-triethylamine(40:20:5:0.5:1.2), water-THF-acetonitrile-citric acid(80:15:5:1)¹³⁾을 Radial PAK-CN column(Waters Co.)과 acetonitrile-phosphate(80:20),¹⁴⁾ (70:30), (55:45)¹⁵⁾의 혼합용매로 분리한 결과 Radial PAK-CN column과 acetonitrile-phosphate(70:30)의 사용이 양호하였다(Fig. 2).

아코니틴과 관련 알칼로이드의 안정성

아코니틴표준액과 λ_{max} 를 측정 한 1,2-dichloroethane은 72 시간 이후까지 λ_{max} 와 흡광도의 변화가 없었다. 그러나 아코니틴수용액과 아코니틴의 메탄올, 아세트니트릴용액은 24 시간 이후부터 아코니틴 크로마토그램의 면적은 감소되고 유지시간 13분에서 나타나는 크로마토그램의 면적은 증가되었다.

검량선 (회귀직선식)

흡광도측정법 - 4회 측정 한 흡광도의 평균값은 0.184, 0.445, 0.810이고 SR%은 2.59, 0.18, 0.10으로 1,2-dichloroethane 중 아코니틴의 농도가 흡광도에 비례하였다. 회귀식은 $Y=1.3245X+0.0286(r^2=0.9949)$ 으로, 이 식을 이용하여 시료 중 아코니틴과 관련 알칼로이드의 함량을 아코니틴량으로 환산하여 정량하였다.

HPLC 법 - 4회 조작으로 15분 이후에서 얻은 크로마토그램의 면적의 평균값은 127262, 234367, 445759이고 SR %은 0.34, 0.18, 0.07로 1,2-dichloroethane 중 아코니틴의 농도가 크로마토그램의 면적에 비례하였다. 회귀식은 $Y=552059X+8626(r^2=0.9983)$ 으로, 이 식으로 시료 중의 아코니틴을 정량하였다. 아코니틴용액 10 ml까지 크로마토그램의 면적이 비례되었지만 이 농도는 꼬리 끌기 현상이 나타났다.

재현성시험

Table I과 같이 흡광도측정법으로 정량한 아코니틴

Table I - Reproducibility Test*

Processed	Spectrophotometry			HPLC methods		
	mg	%	S _R %	mg	%	S _R %
Cho-O	6.72 ± 0.12	0.450 ± 0.013	1.86	3.66 ± 0.09	0.244 ± 0.006	1.25
Salted Buza	7.99 ± 0.09	0.053 ± 0.002	0.78	5.24 ± 0.06	0.035 ± 0.001	0.99
M-H Buza	3.99 ± 0.05	0.200 ± 0.003	1.15	3.08 ± 0.18	0.154 ± 0.004	2.52
Limed Buza	3.52 ± 0.08	0.070 ± 0.002	2.20	3.49 ± 0.05	0.070 ± 0.001	1.31

*Average of four measurements

Table II - Recovery* of Aconitine

Processed	Spectrophotometry			HPLC methods		
	mg	S _R %	recovery (%)	mg	S _R %	recovery (%)
Cho-O	8.62 ± 0.06	0.62	95	5.60 ± 0.09	1.25	97
Salted Buza	9.81 ± 0.06	0.52	97	7.17 ± 0.06	0.86	97
M-H Buza	5.91 ± 0.17	2.71	96	5.01 ± 0.03	1.61	97
Limed Buza	5.45 ± 0.09	1.25	97	5.41 ± 0.05	0.77	96

*Average of four measurements

과 관련 알칼로이드의 함량은 초오(1.5g)가 가장 많았고(0.450±0.013%) 염부자(15.0g)가 가장 적었으며(0.053±0.002%), SR%는 석회부자가 가장 컸고(2.20) 염부자가 가장 작았다(0.78).

HPLC 법으로 정량한 아코니틴의 함량은 초오가 가장 많았고(0.244±0.006%) 염부자가 가장 적었으며(0.035±0.001%), SR%는 습열부자가 가장 컸고(2.52) 염부자가 가장 작았다(0.99).

회수시험

Table II와 같이 흡광도측정법은 95~97%이고 HPLC 법은 96~97%를 보였다.

결 론

1. 지리바꽃(*Aconitum chiisanense*)의 건조근을 초오, 염부자, 습열부자, 석회부자로 가공(수치)하여 알칼로이드를 methanol, chloroform 또는 ether로 추출하지 않고 아코니틴과 관련 알칼로이드는 흡광도측정법으로, 아코니틴은 HPLC 법으로 정량하는 간편하고 재현성있는 방법을 설정하였다.

2. 회귀식은 흡광도측정법이 $Y=1.3245X+0.0286$ ($r^2=0.9949$)이고 HPLC법은 $Y=552059X+8626$ ($r^2=0.9983$)였다.

3. 아코니틴과 관련 알칼로이드 및 아코니틴의 함량(%)은 초오가 가장 많았으며 염부자가 가장 적었다.

감사의 말씀

본 논문은 1999년도 우석대학교 학술연구구성비에 의하여 연구되었으므로, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 失數道明, 伊藤清夫, 長澤元夫: 附子の研究. 附子異名考. 總合漢法研究會編. 大坂. p. 70 (1979).
- 2) I. Kitagawa, M. Yoshikawa, Zhao L. C., and K. Kobayashi : Four New Lipo-Alkaloids From Aconiti Tuber. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 758 (1982).
- 3) I. Kitagawa, Zhao L. C., M. Yoshihara, and M. Yoshikawa : Chemical Studies on Crude Drug Processing. II. Aconiti Tuber(1), On the Constituents of "Chuan-wu", the Dried Tuber of *Aconitum carmichaeli* D_{EBX}. *Yakugaku Zasshi*. **104**, 848 (1984).
- 4) 岡本敏彦 : トリカブト屬アルカロイドの構造. 化學と工業. **14**, 792 (1961).
- 5) 鈴木康之, 早川由紀, 尾山力, 磯野智子, 大宮雄司, 池田孔己, 淺見明俊, 野口將道: 修治ブシのアルカロイド成分ベンゾイルメサコニンの鎮痛作用について. 日藥理誌. **102**, 399 (1993).
- 6) I. Kitagawa, Zhao L. C., M. Yoshihara, K. Kobayashi, M. Yoshikawa, N. Ono, and Y. Yoshimura: Chemical Studies on Crude Drug Processing. III. Aconiti Tuber(2), On the Constituents of "Pao-fuzi", the Processed Tuber of *Aconitum carmichaeli* D_{EBX}. and Biological Activities of Lipo-alkaloids. *Yakugaku Zasshi*. **104**, 858 (1984).
- 7) H. Hikino, C. Yamada, K. Nakamura, H. Sato, Y. Ohizumi and K. Endo : Change of Alkaloid Composition and Acute toxicity of Aconitum Roots during Processing. *Yakugaku Zasshi*. **97**, 359 (1977).
- 8) H. Hikino, H. Sato, C. Yamada, C. Konno, Y. Ohizumi and K. Endo : Pharmacological Actions of Aconitum Roots. *Yakugaku Zasshi*. **99**, 252 (1979).
- 9) H. Yoshida, S. Kuwano, T. Tamura, Y. Matsunaga, and S. Takagi : Micro-determination of Aconitine in Tubers of Aconitum Spp. *Yakugaku Zasshi*. **85**, 709 (1985).
- 10) F. Kurosaki, T. Yatsunami, T. Okamoto, and Y. Ichinohe: Separation and Quantitative Analysis of Diterpene Alkaloids in Japanese Aconitum Roots. *Yakugaku Zasshi*. **98**, 1267 (1978).
- 11) S. Takagi, T. Katagi, and K. Takebayashi: Gas-Liquid Chromatography of Alkaloids. IV. Separation of Some Aconitum Alkaloids. *Yakugaku Zasshi*. **88**, 1242 (1968).
- 12) H. Hikino and C. Konno, H. Watanabe and C. Konno: Determination of Aconitine Alkaloids by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*. **211**, 123 (1981).
- 13) 中野道晴, 山岸喬 : 高速液體クロマトグラフィによる附子及び烏頭中のアコニチン系アルカロイドの定量. 道衛研所報. 第32集, 21 (1982).
- 14) H. Hikino, M. Murakami, C. Konno and H. Watanabe : Determination of Aconitine Alkaloids in Aconitum Roots. *Planta medica*. **48**, 67 (1983).
- 15) I. Kitagawa, Z. L. C., M. Yoshihara, and M. Yoshikawa:

- Chemical Studies on Crude Drug Processing. IV. Aconiti Tuber(3), Quantitative Determination of Aconitine Alkaloids in Aconiti tuber by Means of High Performance Liquid Chromatography. *Yakugaku Zasshi*. **104**, 867 (1984).
- 16) O. R. Howell and A. Jackson : The Absorption Spectrum of Potassium Cobaltous Thiocyanate. *J. Chem. Soc.* 621 (1937).
- 17) P. W. West and C. G. Devries : Nature of the Cobalt-Thiocyanate Reaction. *Anal. Chem.* **23**, 334 (1951).
- 18) L. I. Katzin and E. Gebert: Spectrophotometric Studies of Cobalt Thiocyanate Complexes in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 5659 (1950).