

착체 생성에 의한 황련 알칼로이드의 분리 및 정량

임소연 · 김대근 · 신대용 · 임종필 · 엄동옥*

우석대학교 약학대학

(Received April 18, 2002; Revised August 10, 2002)

Isolation and Determination of Alkaloids in *Coptis Rhizome* by Forming Complex

So-Yun Lim, Dae-Keun Kim, Tae-Yong Shin, Jong-Pil Lim and Dong-Ok Eom*

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

Abstract — The *Coptis Rhizome* is known for containing a number of isoquinoline type alkaloids. Berberine, coptisine and palmatine are the major constituents of alkaloids. The alkaloids were isolated and determined by forming complex from *Coptis japonica* (Ranunculaceae). For the determination of these alkaloids, a new spectrophotometric method was developed with a simple and selective sample clean-up using thiocyanatocobaltate[II] complex ion. The absorbance of alkaloidal complex in 1,2-dichloroethane solution was measured at 625 nm. A calibration curve for the alkaloids isolated from *Coptis Rhizome* was linear over the concentration range of 0.2~0.3 mg/ml. The method proved to be rapid, simple and reliable for the isolation and the determination of the alkaloids in *Coptis Rhizome*.

Keywords □ *Coptis Rhizome* alkaloids, isolation, determination, spectrophotometric method

황련(*Coptis Rhizome*)은 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)의 황련(*Coptis japonica*) 또는 기타 동속식물의 뿌리를 거의 제거한 뿌리줄기로 삼황사심탕이나 황련탕 등의 과립제, 산제, 탕제, 환제에 배합되며 성분은 이소퀴놀린계 알칼로이드의 프로토펙베린인 베르베린, 팔마틴, 콕티신과 기타의 알칼로이드를 함유하고있다.¹⁾ 정량은 황련 또는 제제 중 베르베린의 미생물정량법,²⁾ TLC 법,^{3,4)} 흡광도측정법⁵⁻⁹⁾과 세파텍스 G-25,¹⁰⁾ CM-세파텍스,¹¹⁾ 엠버리트 XAD-2¹²⁾로 분리한 베르베린의 흡광도측정법 및 HPLC 법¹³⁾이 있다. 또한 프로토펙베린을 정량한 TLC 법¹⁴⁾과 베르베린, 팔마틴 등을 동시 정량한 HPLC 법¹⁵⁻¹⁷⁾도 있다. 그러나 이상의 방법은 황련 및 제제 중 베르베린과 팔마틴을 정량하는 방법으로 베르베린과 팔마틴의 함량이 황련이나 제제의 기준설정과 품질의 평가를 대표할 수는 없으므로 황련과 그 제제의 기준설정과 품질의 평가를 위하여 프로토펙베린 알칼로이드와 총알칼로이드의 함량도 필요하여 저자 등은 황련의 프로토펙베린 알칼로이드가 사치오시안산코발트[III]의 착이온¹⁸⁾과 물에 녹지 않는 착체를 만들고 이 착화합물을 1,2-디클로로에탄으로 추출하면

625 nm에 새로운 극대흡수과장¹⁹⁾이 나타나므로 이를 이용하여 황련 중 알칼로이드를 분리하였다. 그리고 분리한 알칼로이드를 표준품으로 황련과 제제 중 알칼로이드를 간편하고 재현성 있게 정량할 수 있는 방법을 설정하여 보고한다.

실험방법

재료 및 시약

황련은 중국산의 시판품을 무주읍에서 구입하여 가루로 만들었다. 염화베르베린 3 수화물, 염화팔마틴 3 수화물, 질산코발트(II) 6 수화물, 치오시안산암모늄은 Sigma Co.(미국)제품을, 1,2-디클로로에탄(DCE로 표기함)은 Wako Chem. Co.(일본) 제품을, 기타의 시약은 시판특급을 사용하였다. 알칼로이드 용액은 황련에서 분리한 알칼로이드 25 mg에 0.1 mM 염산을 넣고 60°C로 가온하며 초음파 처리로 녹인 후 0.1 mM 염산을 가하여 50 ml로 만들었다. 1 mM 베르베린 용액은 염화베르베린 3 수화물 42.00 mg을 물에 녹여 100 ml로 만들었고 프탈산수소칼륨 용액은 프탈산수소칼륨 1.021 g을 물에 녹여 100 ml로 만들었다. 1 mM 치오시안산코발트 시액은 치오시안산코발트[III] 17.5 mg과 치오시안산암모늄 15.3 mg을 물에 녹여 100 ml로 만들었으며 암모늄치오시안산코발트 시액(TCR로 표기함)은 질산코발트(II)

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-290-1568 (팩스) 063-290-1567
(E-mail) doeom@core.woosuk.ac.kr

6 수화물 5 g과 치오시안산암모늄 20 g을 물에 녹여 100 ml로 만들었다.

7 기

Spectronic 20D⁺(Milton Roy Co.), UV/Visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1601), FT-IR spectrophotometer(Shimadzu 8201 PC), HPLC(Shimadzu Class LC 10)를 사용하였다.

베르베린 착화합물

합성 - 염화베르베린 2.000 g에 0.1 mM 염산 1 l를 넣고 60°C에서 녹였다. 잘 저으면서 TCR 50 ml를 넣어 침전을 완결시키고 여과한 잔사를 클로로포름 10 ml에 녹인 후 방치하여 베르베린 착화합물을 만들었다.

자외·가시부 극대흡수파장 - 염화베르베린과 베르베린 착화합물을 DCE에 녹여 250~700 nm의 파장변화에 따른 극대흡수파장을 측정하였다.

적외부 흡수스펙트럼 - 염화베르베린과 베르베린 착화합물을 브롬화칼륨 정제법으로 조제하여 4000~650 cm⁻¹의 파수변화에 따른 흡수밴드를 측정하였다.

물 비법 - 1 mM 베르베린 용액 8 ml를 6 개의 시료병에 넣고 1 ml 치오시안산코발트 착이온 시액 1, 2, 4, 6, 8, 10 ml와 프탈산수소칼륨 용액 5 ml, TCR 2 ml 및 DCE 10 ml를 각 시료병에 가한 후 정량법에 따라 조작하여 베르베린 착체의 흡광도를 측정하였다.

알칼로이드의 단리 - 황련 20 g에 0.1 mM 염산 300 ml와 TCR 200 ml를 넣어 10분동안 방치하고 DCE 1.5 l를 가한 후 다시 1 시간동안 방치하였다. 가아제로 여과한 잔사에 DCE 1 l를 넣어 같은 방법으로 4회 조작하였다. 여액을 모두 합하여 방치한 후 분리된 DCE를 취하여 무수황산나트륨 10 g을 놓은 여지로 여과하였다. 여액을 감압건조한 잔사를 헥산으로 세척하여 알칼로이드 착화합물을 만들었다. 이 착화합물에 DCE 1 l를 가하여 녹인 후 0.1% 암모니아 시액 1 l를 넣고 청녹색이 황·적색으로 될 때까지 혼든 후 방치하였다. 분리된 DCE를 취하여 세액에서 치오시안산이온이 검출되지 않고(황산제 2 철암모늄 시액) 알칼리성이 없어질 때까지 물로 세척한 후 무수황산나트륨 10 g을 놓은 여지로 여과하였다. 여액을 감압건조한 잔사를 실리카겔을 충전한 칼럼에 넣고 n-부탄올 : 물 : 빙초산(7 : 2 : 1)의 혼합액 100 ml로 세척한 후 에탄올로 재결정하여 알칼로이드 분말을 단리하였다.

HPLC - 황련에서 분리한 알칼로이드용액에 염화베르베린과 염화팔마틴의 표준액을 첨가하여 아래의 HPLC 조건에서 분리한 크로마토그램으로 황련에서 단리한 알칼로이드의 종류를 확인하였다.

column; μ -Bondapak C₁₈ Waters

mobile phase; acetonitrile : Methanol : Water (2.5:2.5:5)
potassium dihydrogen phosphate
2 g/l mobile phase
detector; UV detector(345 nm)
column temp.; 40°C
flow rate; 1.2 ml/min

극대흡수파장 - 0.1 mM 염산 10 ml, 프탈산수소칼륨 용액 10 ml, TCR 5 ml를 혼합하여 DCE 20 ml로 추출한 DCE와 알칼로이드용액 8 ml를 추출한 DCE 및 황련 20 mg을 정량법에 따라 조작한 알칼로이드 착체의 DCE를 250~700 nm의 파장변화에 따라 극대흡수파장을 측정하였다.

추출 및 경시변화 - 수용액에 생성된 알칼로이드 착화합물을 DCE, 클로로포름, 디클로로메탄, 벤젠, 메칠이소부틸케톤 또는 에틸에 전용시키려고 추출의 정도를 확인하였다. 또한 알칼로이드 착화합물이 생성되는 수용액에 일정량의 Clark-Lubs, McIlvaine, Sørensen 완충액(pH 3.0~7.0)을 가하여 정량법에 따라 조작한 후 흡광도를 측정하여 알칼로이드 착체의 생성과 유기용매의 전용을 확인하고 실온에 방치하며 경시변화를 검토하였다.

검량선 - 알칼로이드 용액 2, 4, 6 ml를 3 개의 시료병에 취하여 프탈산수소칼륨 용액 5 ml, TCR 3 ml와 DCE 10 ml를 각 시료병에 가하고 정량법에 따라 조작한 후 625 nm의 극대흡수파장에서 알칼로이드 착체의 흡광도를 측정하여 검량선(회귀식)을 만들었다.

정량법 - 황련 20~40 mg을 달아 0.1 mM 염산 5 ml, 프탈산수소칼륨 용액 5 ml, TCR 2 ml 및 DCE 10 ml를 가하고 30분 동안 초음파로 처리한 후 탈지면으로 여과하였다. 여액을 잠시 방치하여 분리된 DCE를 취하고 3분 동안 원심분리한 후 625 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선의 회귀식으로 황련 알칼로이드를 정량하였다.

재현성 및 회수시험

황련 20 mg을 달아 정량법에 따라 조작하여 황련 중 알칼로이드를 정량하였다. 같은 방법으로 3 회 조작하여 설정한 정량법의 정확도와 정밀도로 재현성을 확인하였으며 황련 20 mg에 알칼로이드 용액 2 ml(알칼로이드 1 mg)를 가하여 정량법에 따라 조작하였다. 같은 방법으로 3회 조작하여 황련 중 이종성분과 공존물질로 인한 알칼로이드의 회수율을 검토하였다.

실험결과 및 고찰

베르베린 착화합물

합성 - 염화베르베린 2.000 g으로 베르베린 착화합물(청녹색 분말) 6.018 g을 만들었다.

자외·가시부 극대흡수파장 - 염화베르베린의 DCE 용액은 271, 355 및 447 nm에 극대흡수파장이 있었다. 그러나 베르베린 착체의 DCE 용액은 271, 355, 447 nm와 625 nm에 극대흡수파장이 있었다.

적외부 흡수스펙트럼 - 염화베르베린은 수화물로 3550~3200 cm^{-1} 에 광범위하고 강한 흡수밴드가 있었지만 베르베린 착화합물은 없었다. 그리고 베르베린 착화합물은 치오시안산이온의 3 중결합으로 2080 cm^{-1} 에 강한 신축진동의 흡수밴드가 있었다.

물 비법 - 1 mM 베르베린 용액 8 ml에 1 mM 치오시안산코발트(III) 착이온 시액 1 ml를 넣은 후 정량법으로 조작하여 측정 한 베르베린 착체의 흡광도는 0.136이고, 2 ml 넣은 후 조작하여 측정 한 흡광도는 0.270이었다. 그러나 4 ml 이상을 넣어 조

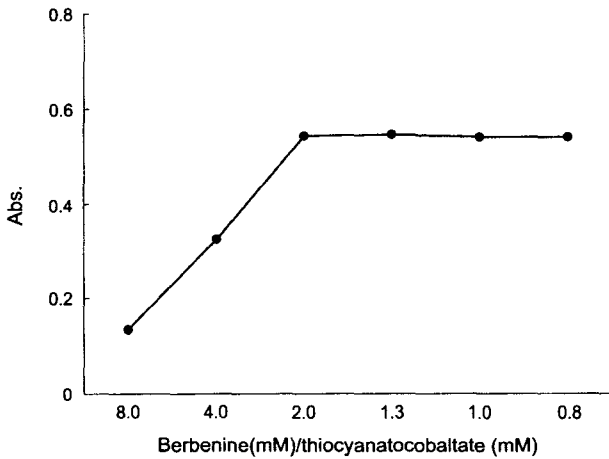


Fig. 1 - mM ratio of berberine-cobalt thiocyanate complex.

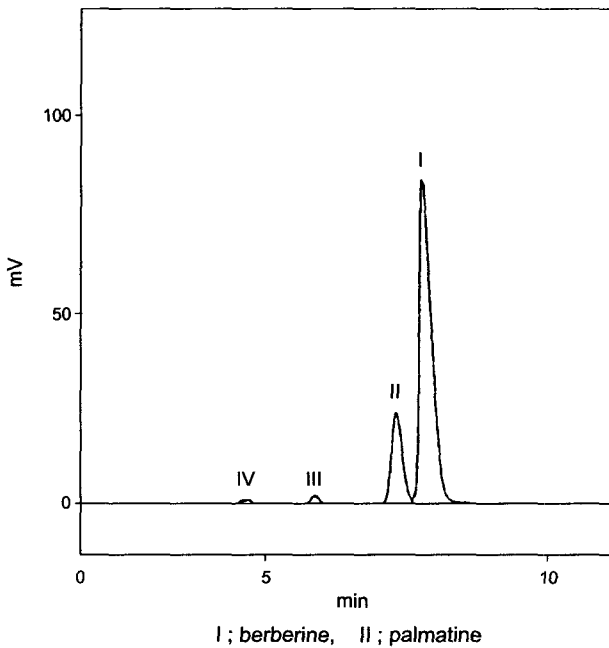


Fig. 2 - HPLC Profile of the isolated alkaloids from Coptis Rhizome.

작한 흡광도는 0.542로 Fig. 1과 같이 [베르베린] : [치오시안산코발트(III)]가 [2] : [1]을 보였다.

알칼로이드의 단리 - 황련 20 g으로 알칼로이드 착화합물(청녹색 분말) 2.8409 g을 만들었으며 알칼로이드 착화합물로 알칼로이드 0.9153 g(황색 분말)을 분리하였다.

HPLC - 황련에서 분리한 알칼로이드의 크로마토그램은 Fig. 2와 같았으며 I의 크로마토그램은 베르베린이고 II는 팔마틴이었다.

극대흡수파장 - 0.1 mM 염산, 프탈산수소칼륨 용액과 TCR의 혼합액을 추출한 DCE는 245 nm 이하에, 그리고 알칼로이드용액을 추출한 DCE는 271, 355, 447 nm에 극대흡수파장이 있었다. 그러나 염화베르베린 착체의 DCE 용액, 알칼로이드 착체의 DCE 용액 및 황련을 정량법에 따라 조작한 황련 알칼로이드 착체의 DCE 용액은 Fig. 3과 같이 271, 355, 447 nm 및 625 nm에 극대흡수파장이 있었다.

추출 및 경시변화 - 수용액에 생성된 알칼로이드 착체는 DCE, 클로로포름 또는 디클로로메탄에 양호하게 추출되었지만 이 용매 중 수용액과 분리가 용이하고 비점이 높은 DCE를 추출용매로 선정하였다. 벤젠은 흡광도가 현저히 적었고 메칠이소부틸케톤과 에텔은 TCR까지 추출되어 청색을 보였다. 또한 Clark-Lubs, McIlvaine, Sørensen 완충액 모두 pH 4.0~5.0에서 알칼로이드

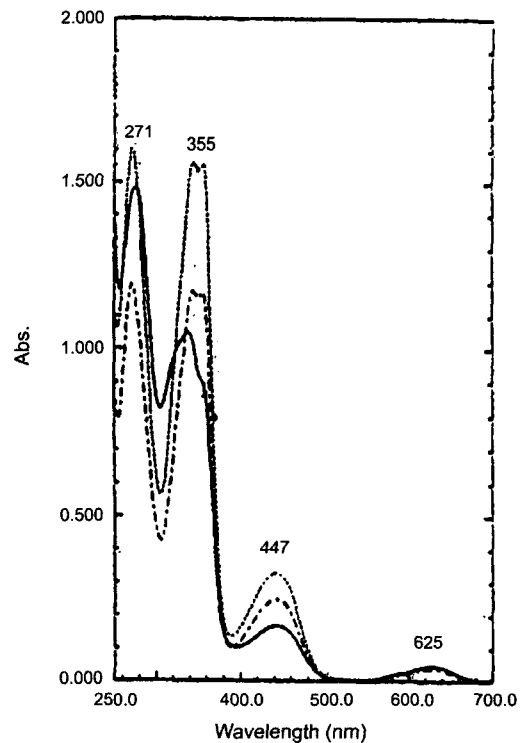


Fig. 3 - The absorption spectrum of ultraviolet and visible regions.
 —: Complex DCE solution of berberine chloride
 ----: Complex DCE solution of Isolated alkaloids from Coptis Rhizome
 -.-: Complex DCE solution of Coptis Rhizome alkaloids

Table 1 - Reproducibility and Recovery test

Sample No.	Reproducibility test		Recovery test	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1.	1.80	9.0	2.74	94.0
2.	1.83	9.2	2.81	98.0
3.	1.79	9.0	2.74	95.0
4.	1.82	9.1	2.79	97.0
m.	1.81	9.1	2.77	96.0
SR%		1.10		1.90

착체가 DCE로 잘 전용되었고 안정성도 증대되었으며 실온에 72 시간까지 방치하여도 흡광도의 변화가 없었다.

검량선 - 알칼로이드 용액(알칼로이드) 2 ml(1 mg), 4 ml(2 mg), 6 ml(3 mg)을 정량법에 따라 4회 조작하여 측정된 흡광도의 평균값은 0.21, 0.40, 0.61로 원점을 지나는 직선이 되었다. 이때의 상대표준편차($S_{R\%}$)는 1.18, 1.09, 0.55로 알칼로이드의 농도가 증가됨에 따라 감소되었으며 회귀식은 $Y(Abs.)=2.016X(mg)+0.003$, ($r^2=0.999$)이었다.

재현성 및 회수시험 - 황련 20 mg을 4회 정량한 알칼로이드의 평균함량은 Table 1과 같이 1.81 mg(9.1%)이고 상대표준편차는 1.10%이었다. 또한 황련 20 mg에 알칼로이드용액 2 ml(알칼로이드 1 mg)를 가하여 4회 정량한 알칼로이드의 평균값은 2.77 mg 이고 첨가한 알칼로이드 1 mg에 대한 회수율은 0.96 mg(96.0%)으로 상대표준편차는 1.90%이었다.

결 론

베르베린으로 합성한 베르베린 착화합물은 염화베르베린 : 치오시안코발트(III)의 결합비가 [2] : [1]이며 물에 녹지 않고 DCE 나 클로로포름, 디클로로메탄에 녹았다. 황련 알칼로이드를 메탄올 등의 용매로 추출하지 않고 황련의 알칼로이드를 착화합물로 만든 후 이 착화합물을 분해하여 알칼로이드로 분리하였으며 분리한 알칼로이드는 베르베린과 소량의 팔마틴 등이었다. 또한 알칼로이드 착체의 DCE 용액은 625 nm에 새로운 극대흡수파장이 있었다. 이를 이용하여 분리한 알칼로이드를 표준품으로 황련 증 알칼로이드를 흡광도 측정법으로 정량하였다. 이 때 검량선의 회귀식은 $Y(Abs.)=2.016X(mg)+0.003$, ($r^2=0.999$)이고 황련의 알칼로이드 함량은 9.1%이며 첨가한 알칼로이드 1 mg에 대한 회수율은 96.0%로 이중성분에 대한 영향 없이 간편하고 재현성 있게 정량할 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 우석대학교 학술연구조성비로 연구되었으므로, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Namba, T. : *The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with Color Picture*, I, Hoikusha, p. 154 (1993).
- 2) Sawada, T., Yamahara, J., Ohashi, N. and Tutihashi, H. : Studies on the Evaluation of Crude Drugs by Bioassay (V). The Microbiological Assay for Berberine (3). *Syoyakugaku Zasshi*, **26**, 12 (1972).
- 3) Mura, T. and Tominaga, T. : Studies on the Quantitative Analysis by Thin Layer Chromatography II. On the Quantitative Analysis of Berberine in Coptidis Rhizoma. *Syoyakugaku Zasshi*, **27**, 135 (1973).
- 4) Hashimoto, Y., Ando, K. and Mizuno, M. : Determination of Berberine in Crude Drugs by Fluorometric Densitometry. *Syoyakugaku Zasshi*, **30**, 127 (1976).
- 5) Hattori, T., Inoue, M. and Hayakawa, M. : Analytical Studies on the Active Constituents in Crude Drugs. I. Determination of Berberine in Coptidis Rhizoma with Tetrabromophenolphthalein Ethyl Ester using Thin-Layer Chromatography. *Yakugaku Zasshi*, **97**, 1263 (1977).
- 6) Sakai, T. : Spectrophotometric determination of berberine by solvent extraction. *Bunseki Kagaku*, **24**, 135 (1975).
- 7) Sakai, T. : Application of Thermochromism in Spectrophotometric Analysis: Selective Determination of Berberine in Pharmaceuticals by Solvent Extraction. *J. Pharm. Sci.*, **68**, 875 (1979).
- 8) El-Masry, S., Korany, M. A. and Abou-Donia, A. H. A. : Colorimetric and Spectrophotometric Determination of Hydrastis Alkaloids in Pharmaceutical Preparations. *J. Pharm. Sci.*, **69**, 597 (1980).
- 9) Sakai, T. : Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Quaternary Ammonium Salts in Drugs by Ion-pair Extraction with Bromphenol Blue and Quinine. *Analyst*, **108**, 608 (1983).
- 10) Kimura, K., Noro, Y. and Handa, S. : Rapid Determination for Berberine-type Alkaloids in Crude Drugs. A New Method with Sephadex G-25 Column. *Syoyakugaku Zasshi*, **26**, 141 (1972).
- 11) Sawada, T., Yamahara, J. and Morika, E. : The Assay of Berberine-Alkaloids by CM-Sephadex (II); The Quantitative Analysis of Berberine in Crude Drug Preparations. *Syoyakugaku Zasshi*, **27**, 106(1973).
- 12) Sawada, T., Yamahara, J. and Shintani, Y. : The Assay of Berberine-type Alkaloids by Amberlite XAD-2. *Syoyakugaku Zasshi*, **28**, 150 (1974).
- 13) Yoneda, K., Yamagata, E., Miyaura, M., Longjin, H. and Mizuno, M. : Quantitative Analysis of Berberine type Alkaloids and Japanese Coptis Rhizome. *Syoyakugaku Zasshi*, **41**, 205 (1987).
- 14) Ikuta, A., Kobayashi, A. and Itokawa, H. : Studies on the Quantitative Analysis of Protoberberine Alkaloids in Japanese,

- Chinese and Other Countries Coptis Rhizomes by Thin Layer Chromatograph-Densitometry. *Syoyakugaku Zasshi*, **38**, 279 (1984).
- 15) Ishikawa, O., Hashimoto, T., Nakajima, T., Tanaka, O. and Itokawa, H. : Application of High-speed Liquid Chromatography to Analysis of Crude Drugs: Quaternary Alkaloids of Coptidis Rhizoma and Phellodendri Cortex. *Yakugaku Zasshi*, **98**, 976 (1978).
- 16) Misaki, T., Sagara, K., Ojima, M., Kakizawa, S., Oshima, T. and Yoshihawa, H. : Simultaneous Determination of Berberine, Palmatine and Coptisine in Crude Drugs and Oriental Pharmaceutical Preparations by Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 354 (1982).
- 17) Lee, H. S., Eom, Y. E. and Eom, D. O. : Narrowbore high performance liquid chromatography of berberine and palmatine in crude drugs and pharmaceuticals with ion-pair extraction using cobalt thiocyanate reagent. *J Pharm Biomed Anal.*, **21**, 59 (1999).
- 18) Philip, W. W. and Charles, G. D. : Nature of the Cobalt Thiocyanate Reaction. *Anal. Chem.*, **23**, 334 (1951).
- 19) Leonard, I. K. and Elizabeth, G. : Spectrophotometric Studies of Cobalt (II) Thiocyanate Complexes in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5659 (1950).