

고삼의 Matrine 성분분석

강삼식[†] · 김주선

[†]서울대학교

I. 서 언

생약 또는 한약은 질병의 치료 또는 그 예방을 목적으로 생명을 건강하게 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 그 품질을 적정하게 유지하는 것은 유효성 및 안전성과 함께 의약품이 갖추어야 할 필수사항이다. 최근 생약을 비롯한 생약제제의 수요가 증가함에 따라 생약·한약재는 물론 관련 제품에 대한 품질관리의 필요성이 대두되고 있으며, 생약의 품질 평가에 이용되는 관능검사로 인한 주관적인 평가에 의존하지 않고 보다 과학적이고 객관적인 이화학적 규격을 설정하는 것이 시급한 실정이다. 따라서 생약·한약재의 품질 표준화를 위한 연구가 진행되고 있는데 여기서는 그 하나의 예로서 이뇨, 이질, 해열, 습진, 위출혈 등에 쓰이는 생약재인 고삼(苦蔘, *Sophorae Radix*)의 품질 표준화를 위해 약전에 규정되어 있는 각종 이화학적 시험과 주성분의 하나인 matrine을 분리하여 이를 지표물질로한 분석법의 개발을 소개하고자 한다.

고삼(苦蔘, *Sophorae Radix*)은 도둑놈의 지팡이 *Sophora flavescens* Aiton (콩과 Leguminosae)의 주피를 거의 벗긴 뿌리로 이뇨, 이질, 해열, 습진, 위출혈 등에 쓰이는 생약재이다. 이 약의 성상은 원주형을 이루고 길이 5~20 cm, 지름 2~3 cm, 바깥면은 어두운 갈색~황갈색이며 세로 주름이 뚜렷하고 짧은 피목이 있다. 주피를 벗긴 것은 황백색이며 껍은면은 약간 섬유성이다. 횡단면은 피부의 두께가 약 1 mm이며 사부 부근은 약간 어두운 색을 띠고 목부와와의 구별이 뚜렷하다. 특이한 냄새가 있고 맛은 매우 쓰며 잔류성이다.¹⁻⁴⁾ 산지는 우리 나라와 중국, 일본 등지이며 성분으로는 수종의 quinolizidine alkaloid, flavonoid, saponin 등이 보고되어 있다.⁵⁻¹⁰⁾

II. 분석방법

1. 검체

1999년 국내에서 시판되고 있는 고삼을 지역별로 40여 개를 구입하여 이중 20개를 선별하였다. 선별된 고삼 약 50 g 씩을 마쇄한 후 검체로 사용하였다.

[†]Corresponding author: (Phone) + 82-2-740-8925, (E-mail) sskang@snu.ac.kr

2. 이화학적 시험

대한약전에 따라 다음과 같이 이화학적 실험을 실시하였다.

1) 확인 시험

검체 0.5 g에 묽은 초산 10 ml을 넣고 때때로 흔들며 섞으면서 수욕중에서 3분간 가열하여 식힌 다음 여과하였다. 여액 5 ml에 드라켄돌프시액 2~3방울을 넣어 등황색의 침전이 생기는지 확인하였다.

2) 회분

사기제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2 g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 도가니의 뚜껑을 열어 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 올려 500~550°C에서 4시간 이상 강열하여 회화한 후 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔류물을 항량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 회분량(%)으로 하였다. 방냉은 데시케이터(실리카겔)에서 하였다.

3) 산불용성 회분

회분에 묽은염산 25 ml을 조심하여 넣고 5분간 가만히 끓여 불용성물을 정량용여과지를 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분에서와 같은 조작으로 무게를 미리단 사기제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터(실리카겔)에서 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

3. Matrine의 분리

채집한 고삼뿌리 3.65 kg을 MeOH로 추출하여 얻은 MeOH엑스를 CH₂Cl₂, EtOAc 및 H₂O 분획으로 나누었다. 이중 CH₂Cl₂ (128.4 g)분획을 silica gel (No. 7734, Merck) column에 걸쳐 CH₂Cl₂-MeOH 용매로 기울기 용리(0 → 10%)시켜 43개의 소분획을 얻었다. 이중 소분획 No. 33 (SRC-33)을 silica gel (No. 7734, Merck) column에 걸쳐 benzene-EtOAc (3:2) 용매로 용리시켜 소분획 38개를 얻었다. 이중 소분획 No. 13 (SRC-33-13)을 silica gel (No. 7729, Merck) column에 걸쳐 EtOAc 용매로 용리시켜 소분획 No. 8 (SRC-33-13-08)로부터 표준물질인 matrine을 분리 하였다.

mp 77°C, IR ν_{\max} (KBr, cm⁻¹) 3405 (N-H), 2936 (C-H), 2865, 2800, 2700 (*trans*-quinolizidine), 1605 (lactam C=O); EI-MS, m/z 248 (M⁺), 247, 220, 219, 206, 205, 192, 177, 150, 148, 138, 137, 136, 120, 98, 96; ¹H-NMR (300 MHz, benzene-d₆) δ : 2.07 (1H, ddd, $J=5.4, 10.8, 16.9$ Hz, H-14 α), 2.38 (1H, dt, $J=4.4, 16.2$ Hz, H-14 ϵ), 3.03 (1H, dd, $J=12.6, 12.6$ Hz, H-17 α), 3.56 (1H, ddd, $J=5.7, 9.4, 9.5$ Hz, H-11 α), 4.73 (1H, dd, $J=4.2, 12.6$ Hz, H-17 ϵ); ¹³C-NMR

(75.5 MHz, benzene- d_6) δ : 19.3 (C-8), 21.0 (C-9), 21.5 (C-3), 26.6 (C-4), 27.2 (C-12), 28.2 (C-13), 33.3 (C-14), 35.9 (C-5), 41.5 (C-17), 43.5 (C-7), 53.0 (C-11), 57.4 (C-2), 57.5 (C-10), 63.9 (C-6), 168.0 (C-15).

4. HPLC 분석조건

Column: LiChrosorb Si 60 (5 μ m)(250 \times 4.6 mm I.D.), detector: UV 220 nm, mobile phase: 25% methanol in diethyl ether-5% ammonia solution (25:1, v/v), flow rate: 0.5 ml/min, sensitivity: 0.1 AUFS, chart speed: 0.5 cm/min.

5. 검액의 조제

마쇄한 고삼 검체 2.0 g에 75% MeOH 50 ml을 가하여 40°C에서 20분 씩 3회 초음파 추출한 후 얻어진 엑스의 농축액을 10% HCl로 pH 2~3으로 산성화 시켜 CH₂Cl₂로 2회 분획하였다. CH₂Cl₂층은 제거하고 수층을 K₂CO₃로 pH 10 정도의 알칼리성으로 만든 후 CH₂Cl₂로 2회 분획하여 얻은 CH₂Cl₂분획을 10 ml로하여 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 검액으로 사용하였다.

6. 표준 검량선의 작성

Matrine 2.0 mg을 정밀하게 달아 CH₂Cl₂ 10 ml로 정용하여 200 μ g/ml의 stock solution을 만들고 이를 CH₂Cl₂로 희석시켜 100, 50, 25, 12.5 μ g/ml 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 μ l를 취하여 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 면적을 구한 후 이들 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다(Fig. 1). 이때 회귀 직선 방

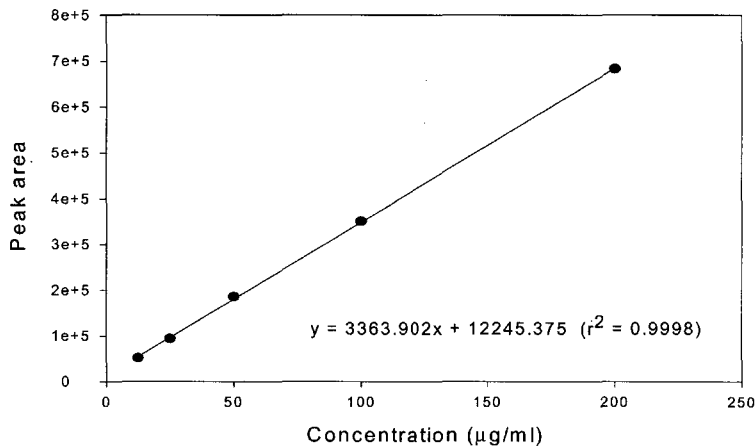


Fig. 1. Matrine의 표준검량선

정식은 $y = 3363.902x + 12245.375$ ($r^2 = 0.9998$) 이었다.

7. 결과 및 고찰

국내에서 시판되고있는 고삼을 지역별로 40여 검체를 구입하여 그중 20개 검체를 선별하였다. 선별된 검체들이 약전규격에 적합한지를 평가하기 위하여 약전에 명시된 회분량과 산불용성회분량을 대한약전내 생약시험법에 따라 각각의 함량을 분석하였다. 선별된 고삼 검체에 대한 확인시험결과 20개 검체 모두 양성으로 확인되었으며, 회분량과 산불용성회분량은 20개 검체중 1개 검체만이 대한약전에 명시된 기준 함량을 초과하는 것으로 나타났다. 20개 검체의 평균 회분량은 $5.00 \pm 1.18\%$, 산불용성회분량은 $0.48 \pm 0.29\%$ 로 나타나(Table I 참조) 대한약전의 기준함량인 회분량 6.0% 이하, 산불용성회분량 1.5% 이하라는 규정에 적합하였다. 다음 채집한 고삼을 재료로 추출, 분획 및 column chromatography를 실시하여 표준물질인 matrine을 단리 하였다. 이 화합물의 IR data를 보면 3405 cm^{-1} 에서 N-H, 2936 cm^{-1} 에서

Table I. 고삼의 확인시험, 회분함량, 산불용성회분함량 및 matrine 함량

Sample No.	확인시험	회분함량 (%)	산불용성회분함량 (%)	Matrine 함량 (%)
GS-01	(+)	5.49	0.58	0.11
GS-16	(+)	3.94	0.24	0.18
GS-25	(+)	5.31	0.44	0.12
GS-27	(+)	4.95	0.12	0.11
GS-30	(+)	5.39	0.60	0.05
GS-31	(+)	4.59	0.43	0.17
GS-32	(+)	5.57	0.46	0.10
GS-33	(+)	4.94	0.12	0.13
GS-34	(+)	5.52	0.22	0.11
GS-35	(+)	5.82	0.39	0.09
GS-37	(+)	3.63	0.14	0.29
GS-38	(+)	4.48	0.55	0.16
GS-39	(+)	3.31	0.35	0.00
GS-41	(+)	5.23	0.76	0.11
GS-42	(+)	4.51	0.74	0.14
GS-43	(+)	4.57	0.62	0.09
GS-44	(+)	8.94	1.36	0.26
GS-45	(+)	5.58	0.74	0.09
GS-46	(+)	3.49	0.42	0.09
GS-47	(+)	4.83	0.24	0.11
Average		5.00 ± 1.18	0.48 ± 0.29	0.13 ± 0.06

C-H에 기인한 흡수 band 외에 2800~2700 cm^{-1} 에 multiple peak들은 *trans*-quinolizidine에 특징적인 band이며 이 외에도 1605 cm^{-1} 에서 lactam C=O에 기인하는 강한 흡수 band가 나타나고 있다.^{11,12)} 다음 mass data는 분자이온 peak가 m/z 248에서 base peak로 나타나고 $[M-1]^+$ 의 peak 강도가 77%로 매우 강하게 나타나며, 이 외에도 matrine의 특징적인 peak들이 각각 m/z 219, 205, 192, 177, 150, 137, 136 및 96에서 나타나고 있음을 알 수 있었다.^{13,14)} $^1\text{H-NMR}$ 에서 δ 2.07 (1H, ddd, $J=5.4, 10.8, 16.9$ Hz)에서 C-14 axial proton이 나타나고, δ 2.38 (1H, dt, $J=4.4, 16.2$ Hz)에서 doublet of triplets 형태로 C-14 equatorial proton이 나타나고 있으며, δ 3.03 (1H, dd, $J=12.6, 12.6$ Hz)에서 C-17 axial proton이 나타나고 있고, δ 3.56 (1H, ddd, $J=5.7, 9.4, 9.6$ Hz)에서 C-11 axial proton이 나타나고, δ 4.73 (1H, dd, $J=4.2, 12.6$ Hz)에서 C-17 equatorial proton이 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ data가 문헌에 보고된 내용과 완전히 일치함을 알 수 있었다.¹³⁾ 따라서 이 화합물은 matrine임을 확인하였다. 이상과 같이 분리 확인된 matrine을 지표물질로하여 함량분석을 시도하였다. 고삼으로부터 matrine의 분석법에 관하여 지금까지 보고된 분석법에 관한 문헌조사 결과 TLC법¹⁵⁾, HPLC법¹⁶⁻¹⁸⁾ 및 모세관 전기영동법^{19,20)} GLC법²¹⁾ 등이 보고되었다. 이들을 검토한 결과 Saito 등의¹⁶⁾ 방법에 따라 HPLC법으로 분석하는 것이 적합하였으므로 이들의 분석조건으로 HPLC를 실시한 결과 Fig. 2와 같은 chromatogram을 얻을 수 있었으며 spike test 결과 matrine

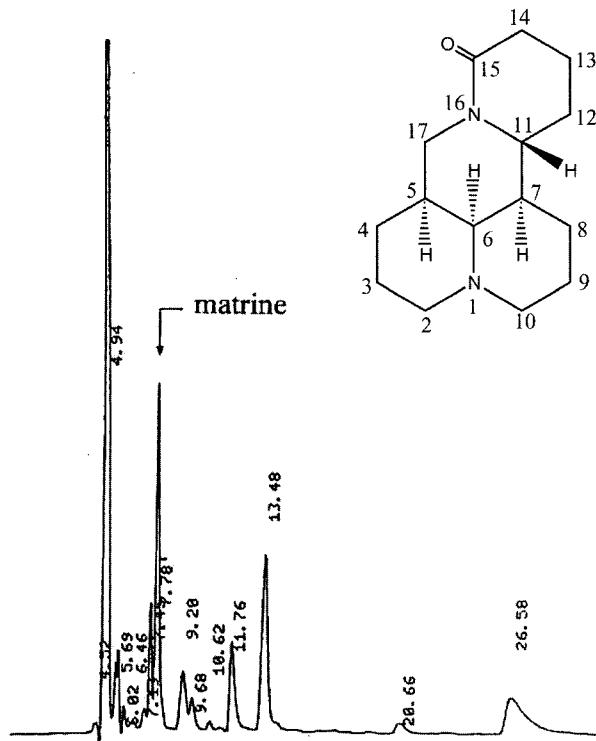


Fig. 2. 고삼 alkaloid 분석의 HPLC chromatogram (GS-34)

은 $t_R = 7.78$ 분대에서 나타나는 peak와 일치함을 알았다. 이어 표준검량선을 작성하였다(Fig. 1). 이때 회귀직선 방정식은 $y = 3363.902x + 12245.375$ 이었으며 상관계수 r^2 값은 0.9998로 양호한 직선성이 인정되었다. 마쇄한 고삼 검체 2.0 g으로부터 추출하여 얻은 엑스에 함유된 matrine의 함량분석을 위하여 HPLC를 실시하였다. 얻어진 chromatogram으로부터 matrine의 peak 면적을 구한 후 상기 회귀직선방정식으로부터 그 함량을 분석하여 결과를 Table I에 나타내었다. Matrine의 평균함량은 $0.13 \pm 0.06\%$ 로 나타나 고삼의 matrine 함량은 0.05% 이상으로 규정한 약전규정이 적합함을 확인하였다. 그러나 Table I에서 볼 수 있는 바와 같이 matrine의 함량변이가 매우 심한 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 이들 검체에 관하여 TLC를 실시하여 얻은 chromatogram상에서도 확인할 수 있었다. 이와 같은 변이는 채집지역^{17,18,20} 또는 채집시기 및 보존기간^{22,23} 등에 따라 lupine alkaloid의 함량에 차이가 있다는 보고들과 일치하는 것으로 고삼의 품질유지를 위하여 반드시 고려해야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 韓大錫. 1988. 生藥學, 東明社, 서울. pp. 194-196.
2. Perry, L.M. and J. Metzger. 1980. Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses, The MIT Press, London. p. 226.
3. Huang, K.C. 1993. The Pharmacology of Chinese Herbs, CRC Press, Boca Raton. pp. 63-66.
4. 약전분과회. 1999. 대한약전(제7개정 해설서), 문성사, 서울. p. 1031.
5. Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. Chinese Drugs of Plant Origin, Springer-Verlag, Berlin. pp. 931-943.
6. Ryu, S.Y., H.S. Lee, Y.K. Kim, and S.H. Kim. 1997. Determination of Isoprenyl and Lavandulyl Positions of Flavonoids from *Sophora flavescens* by NMR Experiment. *Arch. Pharm. Res.* 20: 491-495.
7. Wu, L.J., T. Miyase, A. Ueno, M. Kuroyanagi, T. Noro, and S. Fukushima. 1985. Studies on the Constituents of *Sophora flavescens* AITON. II. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3231-3236.
8. Wu, L.J., T. Miyase, A. Ueno, M. Kuroyanagi, T. Noro, S. Fukushima, and S. Sasaki. 1985. Studies on the constituents of *Sophora flavescens* Ait. IV. *Yakugaku Zasshi* 105: 1034-1039.
9. Yagi, A., N. Fukunaga, N. Okuzako, I. Mifuchi, and F. Kawamoto. 1989. Antifungal Substances from *Sophora flavescens*. *Shoyakugaku Zasshi* 43: 343-347.
10. Woo, E.-R., J.H. Kwak, H.J. Kim, and H.K. Park. 1998. A New Prenylated Flavonol from the Roots of *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* 61: 1552-1554.
11. Eliel, E. L., N.L. Allinger, S.J. Angyal, and G.A. Morrison. 1966. Conformational Analysis in Ring Systems Other than Cyclohexane, in *Conformational Analysis*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc. pp. 251-255.
12. Okuda, S., I. Murakoshi, H. Kamata, Y. Kashida, J. Haginiwa, and K. Tsuda. 1965. Studies on Lupine Alkaloids. I. The Minor Alkaloids of Japanese *Sophora flavescens*. *Chem. Pharm. Bull.* 13: 482-487.
13. Ohmiya, S., K. Saito, and I. Murakoshi. 1995. Lupine Alkaloids, in *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (ed. by Cordell, G.A.), Vol. 47, Chapter 1, Academic Press, London. pp. 1-114.

14. Negrete, R., B.K. Cassels, and G. Eckhardt. 1983. (+)-9 α -Hydroxymatine from *Sophora macrocarpa*. *Phytochemistry* 22: 2069-2072.
15. Zhu, Y., X.M. Tan, X.S. Yu, Y.S. Liu, G.C. Xu, and Y. Gao. 1998. Matrine, Oxymatine, Oxsophocarphine Contents in Total Alkaloid Injection of Kushen and its Homogeneity in Preparations. *J. Shenyang Pharm. Univ.* 15: 204-205.
16. Saito, K., K. Kobayahi, S. Ohmiya, H. Otomasu, and I. Murakoshi. 1989. Analysis of Lupine Alkaloids in Plants by High-Performance Liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 462: 333-340.
17. Ota, N. and Y. Mino. 1979. Pharmacognostical Studies on the Chinese Crude Drug "Sophorae Radix" (I). High-Speed Liquid Chromatographic Studies on the Alkaloid Constituents of "Sophorae Radix". *Shoyakugaku Zasshi* 33: 140-145.
18. Jin, L.X., Y.Y. Cui, and G.D. Zhang. 1993. HPLC analysis of Alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. *Acta Pharm. Sin.* 28: 136-139.
19. Luo, M., P. He, and M.C. Wu. 1999. Determination of matrine and oxymatine by HPCE. *Zhongcaoyao* 30: 261-263.
20. Song, J.-Z., H.-X. Xu, S.-J. Tian, and P. P.-H. But. 1999. Determination of quinolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal drugs by nonaqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 857: 303-311.
21. Wink, M. and L. Witte. 1991. Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genistae* (Homoptera: Aphididae) *Entmol. Gener.* 15: 237-254.
22. Ueno, A., K. Morinaga, S. Fukushima, Y. Itaka, Y. Koiso, and S. Okuda. 1979. Studies on lupin alkaloids. VI. Isolation and structure of (+)-isomatrine. *Chem. Pharm. Bull.* 23: 2560-2566.
23. Sekine, T., K. Saito, R. Minami, N. Arai, H. Suzuki, Y. Koike, and I. Murakoshi. 1993. A new lupin alkaloid, (-)-leontalbinine *N*-oxide, in *Sophora flavescens* var. *angustifolia* seeds and its synthesis by biomimetic transformation from (+)-matrine *N*-oxide. *Yakugaku Zasshi* 113: 53-62.

Isolation and Quantitative Determination of Matrine from Sophorae Radix

Sam Sik Kang[†] and Ju Sun Kim

*Natural Products Research Institute and College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 110-460, Korea
+82-2-740-8925, sskang@snu.ac.kr; +82-2-740-8926, jusunkim@snu.ac.kr*