

매자나무중 Berberine含量的 季節的 變化에 관한 研究

劉 承 兆 · 李 京 馥* · 郭 宗 煥

成均館大學校 藥學大學 · *아이오와대학교 약학대학

Studies on the Seasonal Variation of Berberine Contents in *Berberis koreana*

Seung Jo Yoo, Kyung Bok Lee* and Jong Hwan Kwak

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170, Korea and

*College of Pharmacy, University of Iowa, IO 52241, U.S.A

Abstract—The determination of berberine in *Berberis koreana* was examined by the high performance liquid chromatography using μ -Bondapak C₁₈ column and CH₃CN/phosphate buffer (pH 5.2) (60/40) as a mobile phase. The seasonal variations of berberine contents in *Berberis koreana* were as follows; 1) In roots, the average berberine content was 0.94% with the highest level of 1.32% in October. 2) In stems, their average berberine content was about 0.1% and in March, April, October and November, the contents were relatively high. 3) In leaves, however, the content was as low as 0.005%. According to the experimental results obtained, we found that *Berberis koreana* roots can serve as the useful natural plant resources for the berberine and October is the optimal season for the collection.

Keywords—*Berberis koreana* · berberine · HPLC · seasonal variation

Berberine은 健胃, 整腸, 止瀉, 血壓降下, 緩和, 消炎, 止血作用 및 各種 病原微生物 특히 腸內細菌에 대하여 강한 殺菌作用^{1,2)}이 있음이 널리 알려져 있다. 또한 新藥에서 berberine은 複合劑로서 많은 製劑들이 整腸, 止瀉 등의 目的에 사용되고 있다.³⁾

이러한 berberine의 國內 資源植物로서 黃柏 (Phellodendri Cortex)이 잘 알려져 있고 또한 黃連(Coptidis Rhizoma)이 輸入되고 있으며 製藥用으로 berberine이 多量 輸入되고 있는 實情이다. 그러나 黃柏의 資源의인 枯渴과 黃連, berberine이 輸入되는 점에서 볼 때 國內의 berberine代替 資源의 開發이 절실히 요구된다고 할 수 있다.

매자나무 *Berberis koreana* Palbin (Berberidaceae)는 산딸나무, 삼동나무 또는 朝鮮小藥이라고 불리는 韓國特産植物^{4,5)}로 대체로 널리 分布하며, 그 成分에 關해서는 이미 李 등⁶⁾에 의해서 보고된 바 있다. 그러나 國內의 중요한 berberine資源植物이 될 수 있는 매자나무의 berberine含量에 關한 보고는 아직 理化學的方法⁶⁾뿐이며 berberine의 季節的 含量變化에 대해서는 보고된 바 없다.

Berberine의 定量法에 關해서는 微生物에 의한 試驗法⁷⁻⁹⁾, 生物學的 試驗法¹⁰⁾, Sephadex G-25 또는 CM-Sephadex 등을 이용한 column chromatography法¹¹⁻¹⁴⁾, 重量法¹⁵⁾, 吸光度法¹⁶⁾, thin layer chromatography法¹⁷⁻²⁰⁾, gas chromatogr-

aphy法^{21,22}), ion交換 chromatod滴定法²³), 高速液體 chromatography法²⁴⁻²⁶) 등의 보고가 있다.

著者들은 매자나무의 berberine 月別 含量變化를 根, 地上莖, 葉으로 나누어서 HPLC를 사용한 機器分析的 方法을 적용하여 berberine含量에 따른 적절한 採集時期를 검토해 본 結果, 약간의 知見을 얻었기에 이를 報告하고자 한다.

實驗 方法

1. 材料 및 試藥

1) 材 料

매자나무는 1984年 6월부터 1986年 1월까지 매월 중순 경기도 포천군 진접면의 一定 場所에서 採取하여 陰乾한 후 一定 部位를 細切하여 實驗材料로 사용하였다.

2) 試 藥

Berberine chloride의 표준품은 東京化成(Japan) 製를 사용하였으며 HPLC에 사용된 용매는 모두 WAKO社(Japan)의 HPLC用을 사용하였다. 그의 抽出 및 調製用은 一級試藥을 사용하였다.

2. 實驗方法

1) 試料溶液의 調製

매자나무의 根, 地上莖, 葉 각각을 40°C 以下에서 乾燥하여 곱게 분쇄한 후 각각 5g을 정밀히 取하여 soxhlet抽出器에 넣고 1(w/v) % citric acid MeOH 100ml를 써서 通管中の 抽出液이 엷은 黃色 내지 無色이 될 때까지 抽出한다.¹⁵⁾ 抽出液을 水浴上에서 濃縮하여 생긴 殘留物에 熱 MeOH를 加하여 용해하고 冷後 20分間 원심분리하여 상등액을 取한다. 다시 침전물에 熱 MeOH를 加하여 全量을 100ml로 하고 0.45 μ m millipore filter로 濾過한 다음 試料溶液으로 하였다.

2) HPLC에 의한 分析

試料溶液 5 μ l를 注入한 다음 Table I의 條件으로 分析하였다.

3) 檢量線 作成

Berberine chloride 표준품 30mg을 MeOH에 용해, 全量을 100ml로 하여 0.3mg/ml의 표준용액을 만들었다. 이 표준용액 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l를 각각 注入하여 나타난 peak amount와 注入

Table I. HPLC analytical condition

Instrument	Waters Associate Model ALC/GPC-244 equipped with Data Module System
Column	μ -Bondapak C ₁₈ (4mm \times 30cm)
Mobile phase	CH ₃ CN/Phosphate buffer (pH 5.2) (60/40)
Flow rate	1.0ml/min.
Detector	UV at 254nm (0.5 Aups)
Chart speed	0.5cm/min.
Injection volume	5 μ l

한 量과의 關係를 구하여 檢量線을 作成하였다.

4) 再現性 및 回收率

HPLC조작상의 誤差 및 cross contamination을 확인하기 위해 표준용액 4 μ l씩 4회 注入하여 再現性을 측정하였고 回收率은 berberine chloride 10mg을 添加하여 soxhlet抽出 이후 조작과 같이 하여 5 μ l씩 5회 注入하였을 때, 추가한 量과 注入한 量을 비교·검토하였다.

結果 및 考察

1. 分離度 및 檢量線

Berberine 定量은 公定試驗法¹⁵⁾에 의하면 重量法으로 측정하게 되어 있으나 그 조작이 복잡하고 시간이 오래 걸리므로 HPLC를 이용한 berberine定量法을 적용하였다.

Reverse phase인 μ -bondapak C₁₈ column과 CH₃CN/phosphate buffer (pH 5.2) (60/40)의 mobile phase를 사용하는 Table I의 條件²⁴⁾下에서 berberine chloride 표준용액 8 μ l을 注入하였을 때의 chromatogram은 Fig. 1과 같으며 berberine chloride는 5.2分 以內에 양호한 分離能을 나타내었다.

Berberine chloride 표준용액 (0.3mg/ml) 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l을 각각 注入하였을 때 나타나는 peak amount를 이용하여 얻은 檢量線은 Fig. 2와 같으며 r(상관계수)=0.9999의 양호한 直線性을 나타내었다.

2. 매자나무의 berberine 月別 含量

매자나무 根, 地上莖, 葉의 月別 各 試料溶液

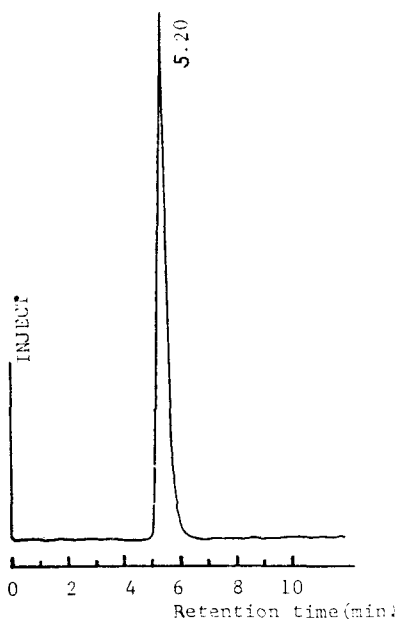


Fig. 1. Chromatogram of standard berberine chloride (Injection volume: 8.0 μ l)

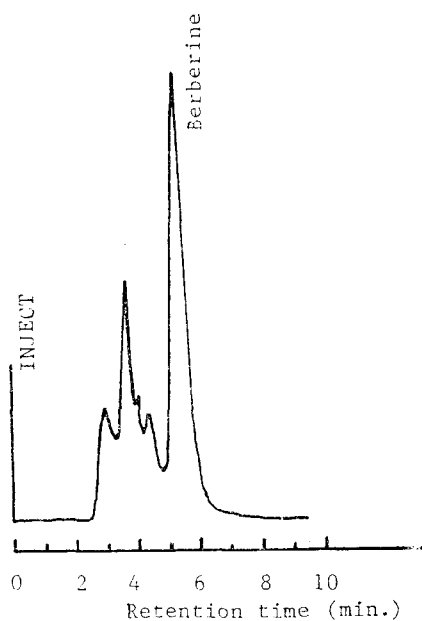


Fig. 3. Chromatogram of *Berberis koreana* root (Sept.).

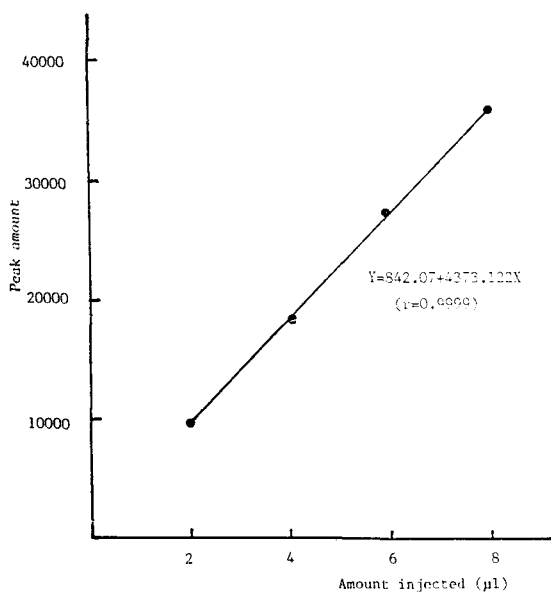


Fig. 2. Calibration curve of berberine chloride.

에 대한 HPLC 分析(chromatogram)의 一部는 Fig. 3, 4, 5와 같다.

檢量線을 이용하여 얻은 매자나무의 根, 地上莖, 葉에 대한 月別 berberine含量은 Table II, III, IV와 같고 根, 地上莖에서의 berberine含量 變化 傾向은 Fig. 6, 7과 같다.

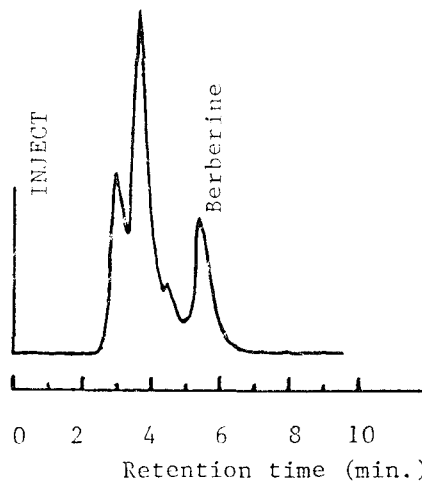


Fig. 4. Chromatogram of *Berberis koreana* stem (Dec.).

1) 根의 berberine含量은 평균 0.94%로서 10월에 1.32%로 가장 높게 나타났고 6월에 0.69%로 가장 낮게 나타났다.

2) 地上莖에서의 berberine 평균 含量은 약 0.1%이고 3, 4月과 10, 11月에서 많았다.

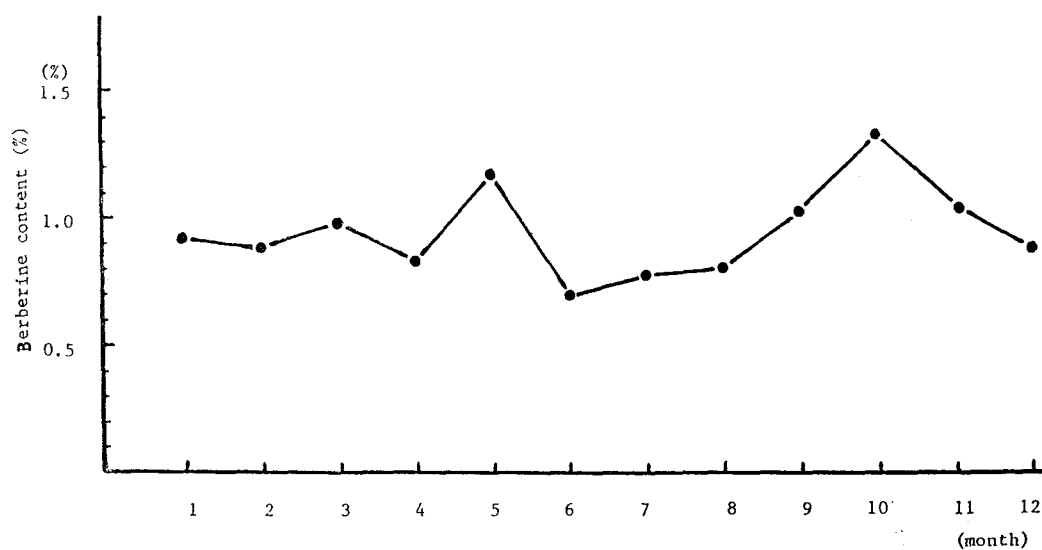
3) 葉의 berberine含量은 0.005% 以下の 극소량으로 나타났으며 그 中에서 8月이 높게 나타났다.

Table II. Berberine contents in *Berberis koreana* (Root)

Month	Berberine	
	Found(mg)	Content(%)
1	46.11	0.92
2	44.09	0.88
3	49.04	0.98
4	41.29	0.83
5	58.51	1.17
6	34.36	0.69
7	38.68	0.77
8	39.88	0.80
9	50.82	1.02
10	66.08	1.32
11	51.38	1.03
12	43.61	0.87

Table III. Berberine contents in *Berberis koreana* (Stem)

Month	Berberine	
	Found(mg)	Content(%)
1	3.82	0.076
2	4.15	0.083
3	8.34	0.167
4	8.66	0.173
5	5.98	0.120
6	2.28	0.046
7	3.19	0.064
8	5.41	0.108
9	5.91	0.118
10	8.08	0.162
11	7.10	0.142
12	5.74	0.115

Fig. 5. Chromatogram of *Berberis koreana* leaf (Aug.).Fig. 6. The periodic variation of berberine content in *Berberis koreana* Palbin (Root).

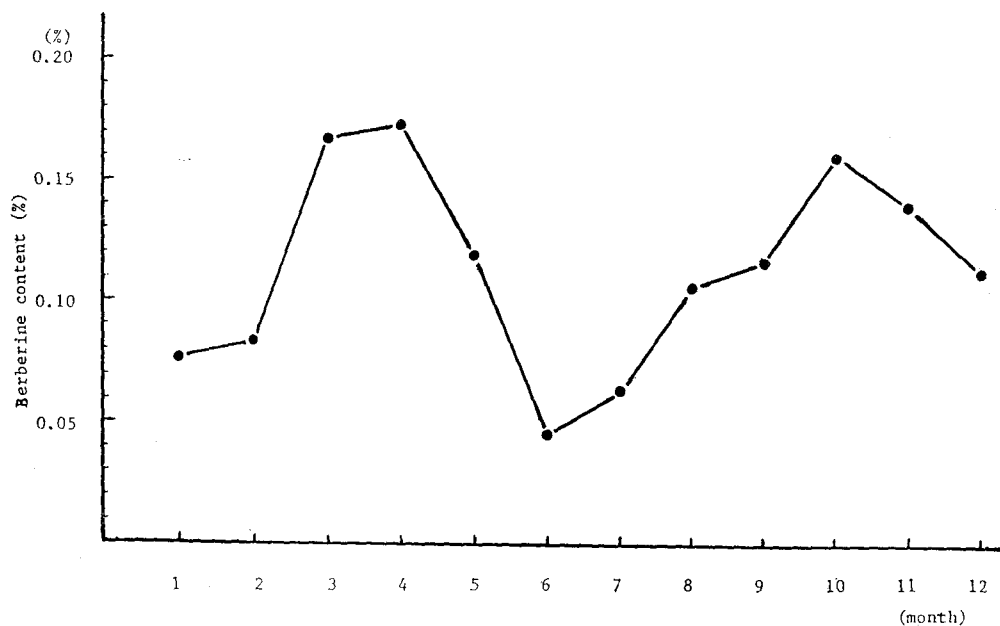


Fig. 7. The periodic variation of berberine content in *Berberis koreana* Palbin (Stem).

Table IV. Berberine contents in *Berberis koreana* (Leaf)

Month	Berberine	
	Found(mg)	Content(%)
5	trace	
6	0.22	0.0044
7	0.24	0.0048
8	0.26	0.0052
9	0.20	0.0040
10	trace	

3. 再現성과 回收率

표준용액 4μl씩 4회 注入하여 定量한 結果 98.33±1.05%로서 再現성이 양호하였다.

5μl씩 5회 注入하여 追加한 量과 注入한 量을 비교·검토한 回收率 또한 98.73±2.35%로서 양호한 結果를 보여 주었다.

結 論

1) μ-bondapak C₁₈ column과 mobile phase로 CH₃CN/phosphate buffer (pH 5.2) (60/40)을 사용한 HPLC法으로 매자나무中の berberine을 短時間 內에 양호하게 分離·定量할 수 있었다.

2) 매자나무의 berberine含量變化를 조사한 結果 根의 berberine含量은 평균 0.94%였으며 10月에서 1.32%로 가장 높았다. 地上莖에서는 평균 약 0.1%含量이었고 3, 4, 10, 11月에서 높은 값을 나타내었다. 葉의 berberine含量은 0.005% 以下の 微量으로서 8月에서 높았다.

위의 結果로 볼 때 매자나무 根은 berberine含量이 약 1%로서 重要 berberine資源植物로 사용이 가능하리라 생각되며 그 採集時期로는 10月 頃이 가장 적합한 것으로 생각된다.

謝辭—本 研究의 一部는 1985年度 文敎部 學術研究助成費에 의하여 수행된 것으로 이에 감사를 드리는 바이다. 試料의 採取와 機器分析에 적극적으로 협력해 주신 성균관대학교 송경식 前 조교와 인삼연초연구소 박종대 연구원에게 깊은 사의를 포함하는 바입니다.

<1986년 5월 15일 접수: 6월 5일 수리>

文 獻

- 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男: 和漢藥物學, p. 92, 南山堂 (1982).
- 赤松全芳: 新訂和漢藥, p. 455, 醫齒藥出版社 (1970).

3. *Medical Index (4th ed.)*, p. 319, Medical Index Company (1985).
4. 鄭台鉉: 韓國植物圖鑑(上), p. 44, 新志社 (1957).
5. 李春寧, 安鶴洙: 韓國植物名鑑 p. 52, 范學社 (1963).
6. 李容柱 等: 成均館大學論文集, 12, 85 (1967).
7. Sawada, T., Yamahara, J. and Yang, Rui-Ling: *Syoyakugaku Zasshi* 24, 69 (1970).
8. *idem.*: *ibid.* 24, 73 (1970).
9. Sawada, T., Yamahara, J., Ohashi, N. and Tutihashi, H.: *Syoyakugaku Zasshi* 26, 12 (1972).
10. Yamahara, J., Kawakita, J., Kuraba, K. and Sawada, T.: *Syoyakugaku Zasshi* 26, 84 (1972).
11. Sawada, T., Yamahara, J. and Iwao, C.: *Syoyakugaku Zasshi* 26, 15 (1972).
12. Kimura, K., Noro, Y. and Handa, S.: *Syoyakugaku Zasshi* 26, 141 (1972).
13. Sawada, T., Yamahara, J. and Morioka, E.: *Syoyakugaku Zasshi* 27, 106 (1973).
14. Sawada, T., Yamahara, J. and Shintani, Y.: *Syoyakugaku Zasshi* 28, 150 (1974).
15. 대한약전해설(제 4 개정), p. 838, 분성사 (1984).
16. Yamaguchi, K., Tabata, T. and Ito, H.: *Yakugaku Zasshi* 73, 1189 (1953).
17. Mura, T. and Tominaga, T.: *Syoyakugaku Zasshi* 27, 63 (1973).
18. *idem.*: *ibid.* 27, 135 (1973).
19. Noguchi, M. and Mochida, K.: *Syoyakugaku Zasshi* 30, 47 (1976).
20. Hashimoto, Y., Ando, K. and Mizuno, M.: *Syoyakugaku Zasshi* 30, 127 (1976).
21. 野呂延男: 第 2 回 生藥分析討論會 講演要旨, 3 (1973).
22. 野呂延男: 日本藥學會講演要旨, II-235 (1977).
23. Watanabe, H.: *J. Chem. Soc. Jpn.* 83, 54 (1962).
24. Hattori, T., Kamiya, N., Inoue, M. and Hayakawa, M.: *Yakugaku Zasshi* 97, 1305 (1977).
25. Akada, Y. and Tanase, Y.: *Yakugaku Zasshi* 97, 940 (1977).
26. Akada, Y., Kawano, S. and Tanase, Y.: *Yakugaku Zasshi* 100, 766 (1980).