

황련 중 berberine의 추출효율에 관한 연구

이재성 · 박호균* · 우은란* · 이은주** · 안덕균** · 윤원식** · 신광호**

한국과학기술연구원 특성분석센터

*한국과학기술연구원 응용과학부

**경희대학교 본초학교실

(1996. 7. 26. 접수)

A Study on the Extraction Efficiency of Berberine in *Coptidis Rhizoma*

Jae Seong Rhee, Ho Koon Park*, Eun Ran Woo*, Eun Ju Lee**, Dug Kyun Ahn**,

Won Sik Youn**, Kwang Ho Shin**

Advanced Analysis Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, 156-791., Korea

*Department of Applied Science, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, 156-791, Korea

**Department of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Korea

(Received July 26, 1996)

요약 : 본 연구에서는 황련의 지표물질인 berberine의 추출효율을 측정하기 위하여 추출온도, 추출용매, 추출시간 등의 조건 변화에 따른 최적의 추출조건을 찾았다. 60℃에서 2~3시간 환류 하였을 때 추출효율이 가장 좋았으며, 추출용매로는 메탄올이나 아세트산을 사용하였을 때 각각 추출효율이 우수하였다. 이온쌍 추출법에서 사용되는 sodium lauryl sulfate의 첨가 효과는 추출효율을 오히려 감소시키는 결과를 나타내었다.

Abstract : In this paper, optimum extraction condition for berberine which is the indan component of *Coptidis rhizoma* was examined at various conditions in the aspect of temperature, solvent and time followed by quantitation with reversed phase HPLC. The efficiency for extraction has been shown the best at 60℃ with 2~3 hours reflux time in methanol or acetic acid. Any significant effect can not be shown from the addition of SLS to extraction solvent.

Key words : *Coptidis rhizoma*, berberine, coptisine.

1. 서론

황련은 최초의 본초서인 <신농본초경(神農本草經)> 상품에 '미고한 주열기목통자상읍출명목장벽복통하리 부인음중종통 구복령인불망 일명옥련 생천곡'(味苦寒 主熱氣目通皆傷泣出明目腸澀腹痛下痢婦人陰中腫通

久服令人不忘 一名玉連 生川谷)¹이라 수재된 이래 상한론(傷寒論)에서 심(心), 위경(胃經)에 귀경하는 방제로 처방되었으며²⁻⁴, 이후 입심(入心), 간(肝), 위(胃), 대장(大腸)하여 청열조습 청심제변 사화해독(淸熱燥濕 淸心除煩 瀉火解毒)⁴⁻⁶하는 공능이 있어서, 역대 본초서⁷⁻¹¹에 수록되어 한방 임상에 중요하게 처

방되는 약물 중의 하나이다.

황련에 대한 최근까지의 성분 연구에 의하면 alkaloid와 organic salts, inorganic salts, 그리고 coumarin^{12,13}에 대한 연구가 진행되고 있다. alkaloid성 berberine^{4,6,14,15} 외 9가지 alkaloid^{12,16~19}와 magnoflorine^{23,28}이 밝혀져 있다. 이 중 magnoflorine을 제외하고 모두 berberine형 alkaloid이다(Fig. 1).²³ 그리고 berberine의 변형 물질인 berberrubine이 보고되었다.¹³ 이 중 berberine은 황련의 대표적인 benzyloisoquinoline alkaloid이다. 이 화합물은 매자나무과의 매자나무(*Berberis koreana* Palibin)에 함유되어 있으며, 황백(*Phellodendri cortex*)에서도 berberine형 alkaloid가 함유되어 있어서 성분의 비교 연구도 함께 진행되고 있다.^{14,16,20} 황련의 종류에 따른 성분의 차이에 대한 연구는 sample을 중국의 *C. Chinensis*, *C. deltooides*와 일본의 *C. japonica*를 중심으로 진행되어 berberine, coptisine, palmatine, epiberberine, berberastine, jatrorrhizine의 함량 차이를 비교하였다.^{12,19,21} 그리고 berberine형 alkaloid의 구조에서 N⁺에 결합하는 organic salt(malate, acetate, succinate, citrate, α -ketoglutarate)와 inorganic salt(Zn, Cl, Mn, Cu, S, Ca, Sr, Rb, nitrate, P)에 대한 연구가 황백과 비교하여 보고되었다.^{22,23}

황련의 성분분석 방법에 대한 연구는 partition¹⁹, TLC^{12,18,19,27}, column chromatography^{19,24,25}, HPLC^{20,26}, capillary electrophoresis²⁸ 등의 방법과 기존의 HPLC법을 보완한 ODS-silica gel을 사용한 ion-pair HPLC²⁵의 정량결과가 보고되었다.

본 논문은 역상 HPLC를 이용하여 천황련의 지표물질인 berberine을 추출용매와 온도, 시간 등의 조건에 따른 추출효율을 실험하였다.

2. 실험

2.1. 시료 및 시약

2.1.1. 시료

본 실험에 사용한 천황련은 중국 북경 동인당 집유 남성 비발대루에서 구입하였다. 황련을 음건하고 절단한 후 분쇄기를 사용하여 20mesh 크기로 분쇄한 다음 다시 40mesh 크기 이상으로 세밀분쇄하여 각각의 실험에 사용하였다.

2.1.2. 표준품 및 시약

berberine 표준품은 98.0% 순도의 제품을 Wako사에서 구입하여 사용하였고, 아세트니트릴, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올은 HPLC급으로서 J. T. Baker사의 (Phillipsburg, U. S. A.) 시약을 사용했으며, sodium lauryl sulfate(SLS)는 Vatayama사(Japan)에서 구입하여 사용하였고, 염산, 질산, 아세트산, 과염소산, 인산, 인산칼륨은 Sigma사의 분석 시약급을 사용하였다. HPLC에 사용된 용매는 membrane filter 후 ultrasonicator에서 기포를 제거하여 사용하였다.

2.2 사용 기기

황련을 분석하기 위해 사용된 고성능 액체크로마토그래피는 HP 1050, Hewlett Packard사(U. S. A.)의 diode array detector가 부착된 것으로 190~500nm까지 측정할 수 있으며, UV 감지기로도 확인할 수 있는 장점이 있다. 증류수는 Millipore사(U. S. A.)의 Milli-Q water system을 사용하여 정제하였으며, 한약재는 분쇄기(Thomas사, Philadelphia, U. S. A.)를 사용하여 20~40mesh로 갈아 사용하였고, HPLC column은 C₁₈(Capcell pak, Type UG 120Å, 5µm, 4.6 × 250mm, Shisheido, Japan)을 사용하였다.

2.3. 표준액 제조

berberine 표준품 2.09mg을 정확히 평량하여 10mL 부피 플라스크에 옮긴 후 100% 메탄올로 녹여 정확히 10.0mL로 만든 후 각 실험에서 희석하여 검량선 작성 시 사용하였다.

2.4. 황련 중 berberine의 추출효율

2.4.1. 온도 변화에 따른 추출효율

황련 1.00g을 정확히 측정하여 메탄올과 0.1M 염산을 40:60으로 하여 100mL를 가한 후 환류 추출장치로 상온, 40℃, 60℃, 60℃ 이상의 온도에서 교반하여 주며 매시간 경과 후 용기에서 10µL를 취하여 Table 1과 같은 조건으로 HPLC에 주입하여 온도 변화에 따른 berberine의 함량을 측정하였다. 이 때 berberine 함량은 시료량(gr)에 대한 berberine(gr)의 백분율로 표시하였다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC for *Coptidis Rhizoma*.

Parameter	Conditions
Column	Shisheido, C18, Capcell Pak UG 120Å 4.6 × 250mm, 5μm
Detector	UV detector 254nm
Mobile phase	1/15M KH ₂ PO ₄ /CH ₃ CN/SLS (300:270:3.3)
Flow rate	1 mL/min
Oven temp.	40°C

2.4.2. 유기용매에 따른 추출효율

황련 1.00g을 정확히 측정하여 각각 3% 아세트산 수용액 100mL와 40%의 메탄올, 아세트니트릴, 에탄올, 이소프로판올 수용액을 각각 100mL씩 가하여 환류추출장치로 60°C에서 교반하여 주며 매시간 경과 후 용기에서 10μL를 취하여 HPLC에 주사하여 berberine의 함량을 측정하였다.

2.4.3. 메탄올/탈이온수의 비율에 따른 추출효율

황련 1.00g을 정확히 측정하여 메탄올/탈이온수의 비율을 각각 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100으로 하여 100mL 가하고 환류추출장치로 60°C에서 교반하여 주며 매시간 경과 후 용기에서 10μL를 취하여

HPLC에 주사하여 berberine의 함량을 측정하였다.

2.4.4. 메탄올/0.1M 염산의 비율에 따른 추출효율

황련 1.00g을 정확히 측정하여 메탄올/0.1M 염산의 비율을 각각 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100으로 하여 100mL 가하고 환류추출장치로 60°C에서 교반하여 주며 매시간 경과 후 용기에서 10μL를 취하여 HPLC에 주사하여 berberine의 함량을 측정하였다.

2.4.5. 산의 종류에 따른 추출효율

황련 1.00g을 정확히 측정하여 각각 탈이온수 100mL와, 메탄올과 각각 0.1M 염산, 질산, 인산, 과염소산, 아세트산 수용액을 60:40으로 하여 100mL 가하고 환류추출장치로 60°C에서 교반하여 주며 매시간 경과 후 용기에서 10μL를 취하여 HPLC에 주사하여 berberine의 함량을 측정하였다.

2.4.6. 산의 농도에 따른 추출효율

황련 1.00g을 정확히 측정하여 메탄올과 염산 0M, 0.01M, 0.05M, 0.10M, 0.20M를 40:60으로 하여 100mL 가하고 환류추출장치로 60°C에서 교반하여 주며 매시간 경과 후 용기에서 10μL를 취하여 HPLC에 주사하여 berberine의 함량을 측정하였다.

2.4.7. Sodium lauryl sulfate(SLS)의 함량에 따른

추출효율

황련 1.00g을 정확히 측정하여 sodium lauryl

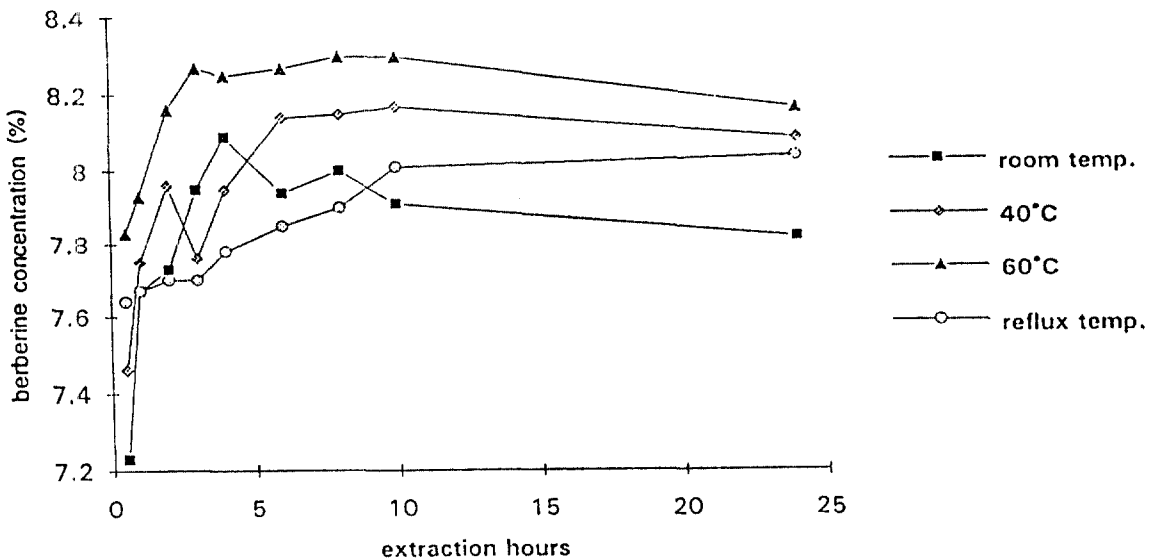


Fig. 1. The effect of reflux temperature on the extraction procedure of berberine in *Coptidis Rhizoma* in methanol/0.1M hydrochloric acid(40:60).

sulfate(SLS)를 0mg, 10mg, 50mg, 100mg, 200mg, 500mg씩 각각 메탄올/탈이온수(40:60) 100mL에 가하여 환류추출장치로 60°C에서 교반하여 주며 매시간 경과 후 용기에서 10 μ L를 취하여 HPLC에 주사하여 berberine의 함량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 황련의 추출효율 비교

3.1.1. 온도 변화에 따른 추출효율

황련을 메탄올과 0.1M 염산을 40:60으로 하여 온도 변화에 따른 berberine의 추출효율을 보면 Fig. 1과 같이 온도가 60°C일 때 효율이 약 8.3%로 가장 좋았으며 용출시간은 2~3시간에서 최대를 보였다. 추출 온도가 60°C 이상이 되어 용매가 끓으면 오히려 용매의 용출효능이 떨어짐을 알 수 있었으며, 추출 시간 2시간 이후로는 추출량이 일정함을 알 수 있었다.

3.1.2. 유기용매에 따른 추출효율

황련을 여러 가지 유기용매로 추출할 경우 Fig. 2와 같이 추출 시간이 2~3시간일 때 3%의 아세트산 수용액에서 8.8%로 추출효율이 가장 높았다. 한편, 추출 시간이 10시간 이상일 경우에는 유기용매로 아세트나이트릴을 사용할 때 추출된 berberine의 함량이 컸다.

3.1.3. 메탄올/탈이온수의 비율에 따른 추출효율

황련을 메탄올/탈이온수의 비율을 변화하여 berberine을 정량하였을 경우 Fig. 3과 같이 60:40의 비율로 하였을 경우 최대의 추출효율을 보이며 시간은 2시간 추출시 berberine이 8.8%로 가장 많이 추출되었다.

3.1.4. 메탄올/0.1M 염산의 비율에 따른 추출효율

황련을 메탄올/0.1M 염산의 비율을 변화하여 추출효율을 측정할 경우 Fig. 4와 같이 80:20일 경우 추출효율이 9.6%로 좋았으며, 0.1M 염산만 용매로 하였을 경우 가장 추출효율이 떨어짐을 알 수 있었다.

3.1.5. 산의 종류에 따른 추출효율

황련을 여러 가지 산으로 추출하였을 경우 Fig. 5와 같이 과염소산의 경우를 제외하고는 추출효율이 유사하게 나타났으나 염산의 경우 추출 8시간에서 8.4%로 가장 좋았다. 과염소산의 경우 침전이 생기는 것으로 보아 과염소산이 berberine의 양이온과 결합하여 침전을 형성하여 추출효율이 떨어지리라 생각된다.

3.1.6. 산의 농도에 따른 추출효율

염산의 농도에 따른 추출효율을 측정할 경우 Fig. 6과 같이 탈이온수만 사용한 경우 추출효율이 가장 낮았으며 0.10M 염산의 경우 3시간에서 추출효율이 8.9%로 가장 좋았다.

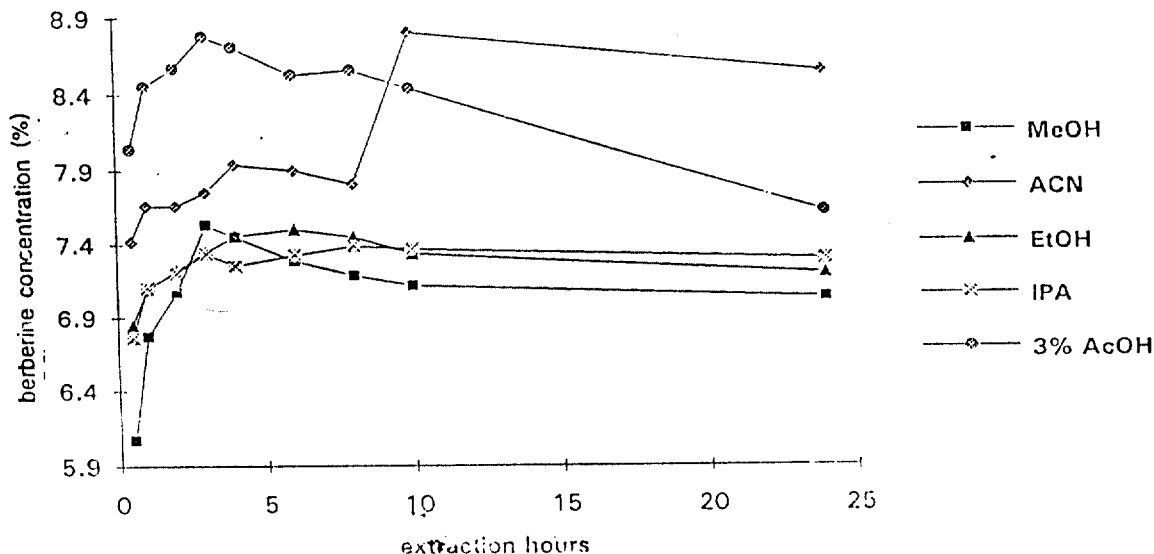


Fig. 2. The effect of organic solvent on the extraction procedure of berberin in *Coptidis Rhizoma* at 60°C according to passage of extraction time. Distilled water were mixed with ① 40% methanol, ② 40% acetonitrile, ③ 40% ethanol, ④ 40% iso-propyl alcohol, ⑤ 3% acetic acid respectively.

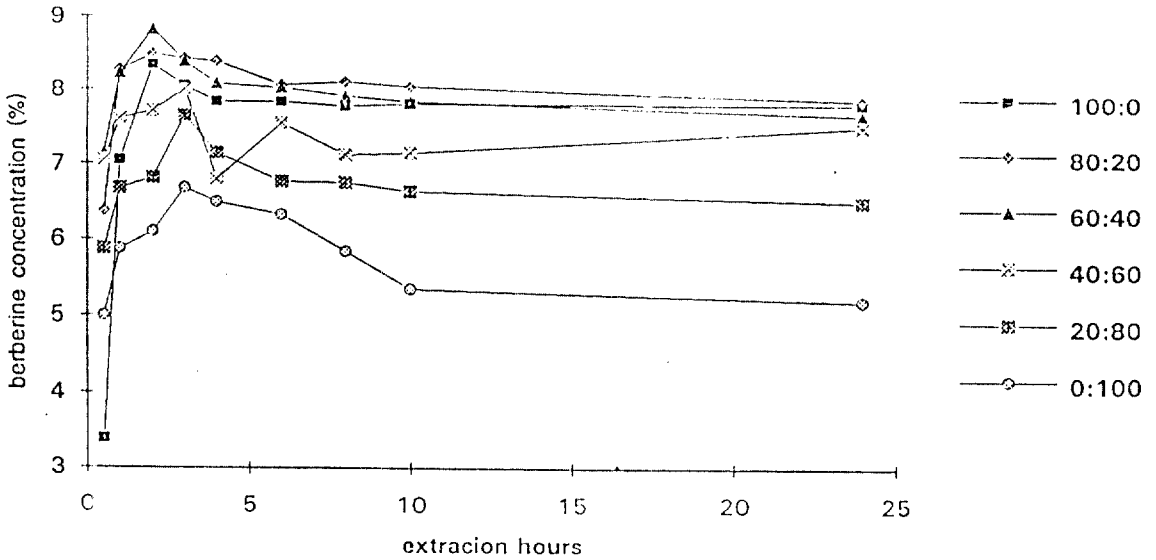


Fig. 3. The effect of methanol on the extraction procedure of berberine in *Coptidis Rhizoma* at 60°C according to passage of extraction time. The ratio represent for the volume between methanol and DI-water.

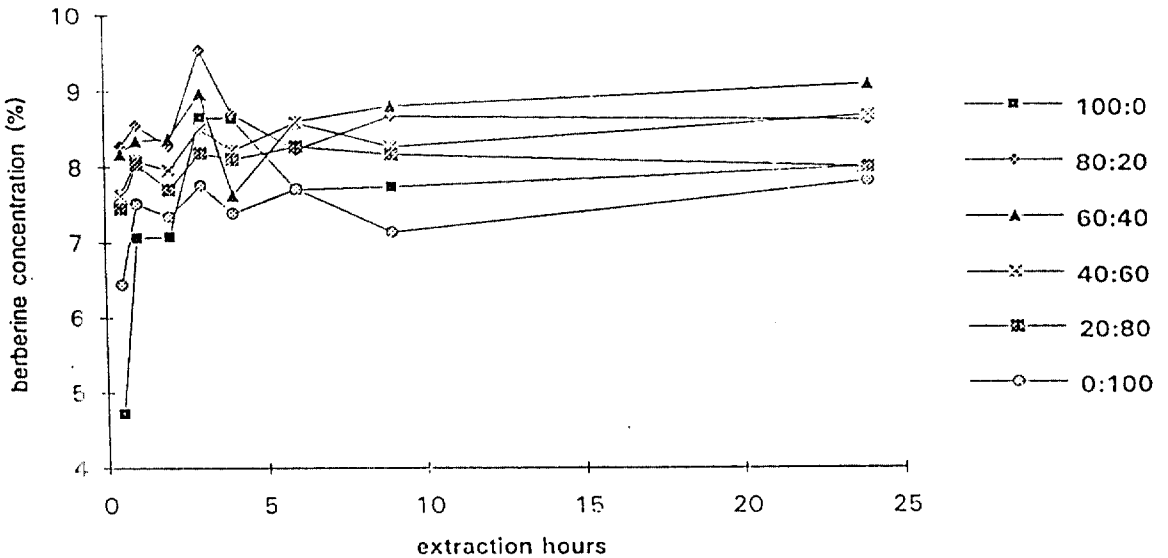


Fig. 4. The effect of 0.1M hydrochloric acid on the extraction procedure berberine in *Coptidis Rhizoma* at 60°C according to passage of extraction time. The ratio represent for the volume between methanol and 0.1M hydrochloric acid.

3.1.7. sodium lauryl sulfate(SLS)의 함량에 따른 추출효율

sodium lauryl sulfate(SLS)의 양의 변화에 따른 berberine의 추출효율을 측정된 결과 Fig. 7과 같이 비교적 양이 적은 0mg, 10mg, 50mg에서는 추출효율이

양호하였고, 특히 10mg(0.01%)에서 추출효율이 약 9%로서 가장 좋았으며, 200mg, 500mg의 경우 효율이 낮았다. SLS를 과량 사용하여 berberine을 추출할 경우 황련 주위에 비누막을 형성하여 용매 침투 및 용출 작용을 방해하여 추출효율이 감소하나, 액체 크로마토

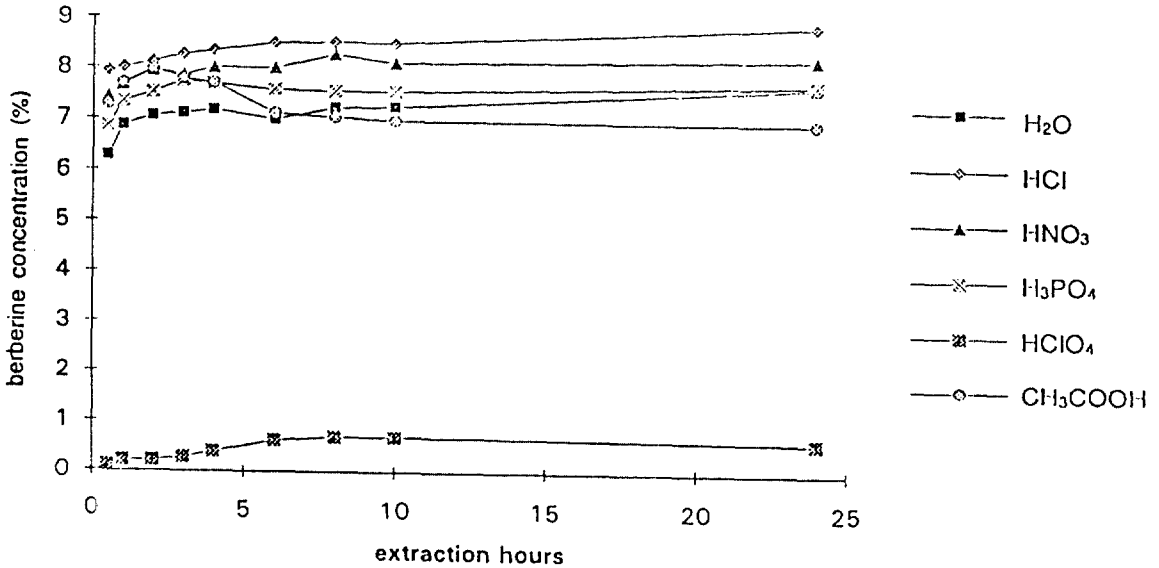


Fig. 5. The effect of various acid(0.1M) on the extraction procedure of berberine in *Coptidis Rhizoma* at 60°C according to passage of extraction time. Methanol solvent with 40% volume ratio were treated to ① 60% H₂O, ② 60% hydrochloric acid, ③ 60% nitric acid, ④ 60% phosphoric acid, ⑤ 60% perchloric acid, ⑥ 60% acetic acid respectively.

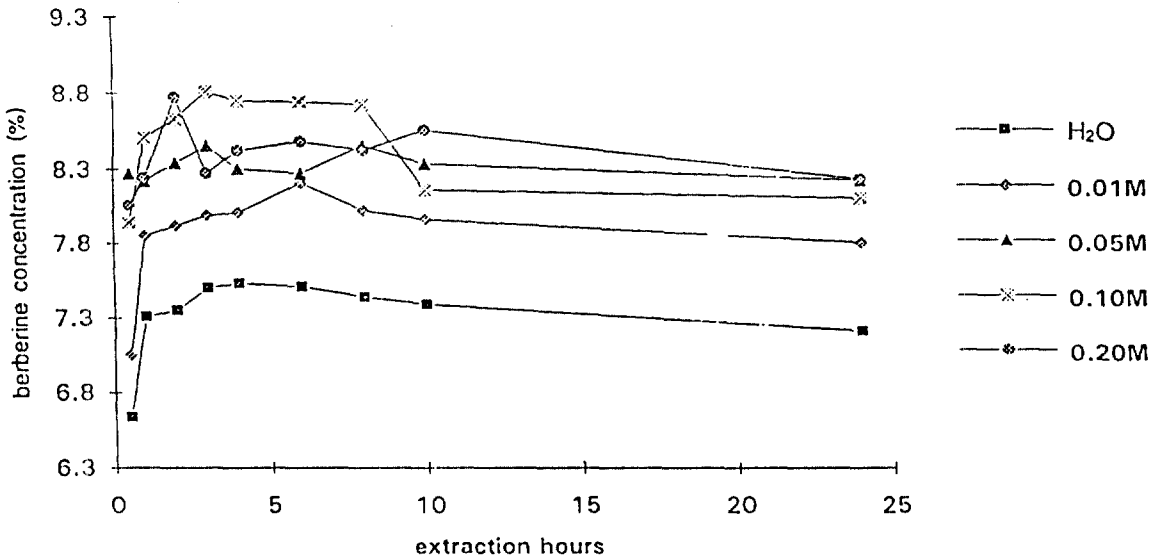


Fig. 6. The effect of acid(hydrochloric acid) concentration on the extraction procedure of berberine in *Coptidis Rhizoma* at 60°C according to passage of extraction time. Methanol solvent with 40% volume ratio were treated to ① 60% H₂O, ② 60% 0.01M, ③ 60% 0.05M, ④ 60% 0.10M, ⑤ 60% 0.20M respectively.

그래피의 이동상에서 SLS는 berberine과 쌍을 이루어 분리가 용이하도록 돕는 역할을 한다.

이제까지의 실험결과를 종합하여 보면, 환류추출 온

도가 60°C로 60% 또는 80%의 메탄올 수용액에서 2~3시간 추출할 경우 berberine의 함량이 약 8% 이상이었으며, 메탄올과 0.1M 염산이 혼합된 용매에서도

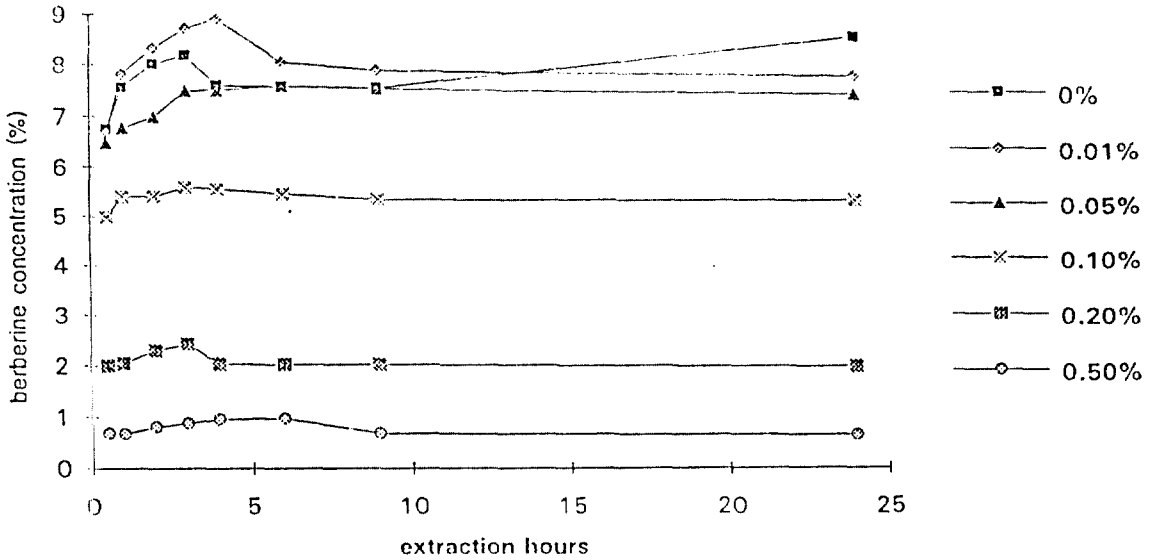


Fig. 7. The effect of sodium lauryl sulfate(SDS) on the extraction procedure of berberine in *Coptidis Rhizoma* at 60°C according to passage of extraction time. The concentration of SLS were adjusted to ① 0mg(0%) ② 10mg(0.01%), ③ 50mg(0.05%), ④ 100mg(0.10%), ⑤ 200mg(0.20%), ⑥ 500mg(0.50%) in 100mL methanol/ H₂O(40/60) respectively.

같은 결과를 보였다. 그리고 0.10M 또는 0.20M의 염산에서 우수한 효율을 보였고, 이 때의 함량은 약 8% 이상이었다.

경우 가장 좋았다.

4. 결론

본 연구는 한약재의 표준화작업의 일환으로 추출 온도, 추출 용매, 추출 시간 등을 변화시키면서 황련의 지표물질인 berberine의 추출효율을 비교하였다.

1. 추출 온도가 60°C, 추출 시간은 2~3시간일 경우 berberine의 추출효율이 가장 높았다.

2. 이온쌍 추출법에 사용되는 SLS를 추출 용매에 사용할 경우 첨가한 양이 많을수록 황련 주위에 비누막을 형성하여 용매침투 및 용출작용을 방해하여 추출효율이 떨어짐을 알 수 있었다.

3. 유기용매(메탄올, 아세트니트릴, 에탄올, 이소프로판올) 중 아세트니트릴의 효율이 좋았고, 아세트산 수용액에서 추출한 경우 가장 우수하였다.

4. 산의 종류에 따른 추출효율은 과염소산의 경우 급격히 감소하였고, 다른 산의 경우(염산, 질산, 인산, 아세트산) 모두 유사한 추출효율을 보였으며, 염산의

참고문헌

1. 王筠默, 王恒芬 輯著, “神農本草經校證”, p. 304, 吉林科學技術出版社, 1988.
2. 鄒潤安, “本經疏證”, p. 63, 旋風出版社, 臺北, 1977.
3. 張仲景, “仲景全書”, p. 213, 264, 大星文化社, 서울, 1980.
4. 江蘇新醫學院編, “中藥大辭典”, p. 2022, 2661, 上海科學技術出版社, 上海, 1982.
5. 全國韓醫科大學 本草學 教授共著, “本草學”, p. 180, 永林社, 서울, 1991.
6. 辛民教, “原色 臨床本草學”, p. 310, 永林社, 서울, 1994.
7. 唐慎微 編著, “重修政和經史證類備用本草”, p. 175, 南天書局有限公司, 1976.
8. 尙志鈞 等 輯校, “吳普本草”, p. 24, 人民衛生出版社, 1987.
9. 李時珍, “本草綱目(上册)”, p. 771, 人民衛生出版社, 1982.
10. 清. 黃宮繡纂, “本草求真”, p. 190, 宏業書局, 1981.
11. 曹元宇 輯注, “本草經輯注”, p. 99, 宏業書局, 1987.
12. K. Yoneda, E. Yamagate, H. Longjin and M.

- Mizuno, *Soyyakugaku Zasshi*, **42**(2), 116-121(1988).
13. M. Mizuno, H. Kojima, M. Inuma, T. Tanaka and K. Goto, *Phytochemistry*, **31**(2), 717-719(1992).
 14. 윈도희 편저, "常用生藥의 成分定量", p. 51, 도서출판 聖恩, 1991.
 15. 難波恒雄, "原色和漢藥圖鑑(上)", p. 156, 保育社, 大阪, 1980.
 16. T. Sawada, J. Yamahara and K. Chinlija, *Soyyakugaku Zasshi*, **27**(1), 12-14(1973).
 17. K. Yoneda, E. Yamagata, M. Miyaura, H. longin and M. Mizuno, *Shoyakugaku Zasshi*, **41**(3), 205-208(1987).
 18. A. Ikuta and H. Itokawa, *Shoyakugaku Zasshi*, **37**(2), 195-197(1983).
 19. A. Ikuta and H. Itokawa, *Journal of Natural Products*, **47**(1), 189-190(1984).
 20. G. Luo, Y. Wnag, G. Zhou and Y. Yu, *Journal of Liquid Chromatography*, **13**(19), 3825-3832(1990).
 21. A. Ikuta, A. Kobayashi and H. Itokawa, *Shoyakugaku Zasshi*, **38**(3), 279-282(1984).
 22. H. Sato, G. Taguchi, H. Fukui and M. Tabata, *Phytometry*, **31**(10), 3451-3454(1992).
 23. Y. Mino, H. Torii and N. Ota, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(7), 1936-1941(1990).
 24. H. Otsuka, H. Fujimura, T. Sawada and M. Goto, *Yakugaku Zasshi*, **101**(10), 883-890(1981).
 25. C. L. Chromatopher, W. W. Beecher, *Journal of Natural Products*, **58**(7), 205-208(1987).
 26. Guo P., Li Z., Hong Z., Liu S., Wu T., *Hua-Hsi-I-Ko-Ta-Hsu-eh-Hsueh-Pao*, **22**(1), 90-92(1991).
 27. T. Mura and T. Tominaga, *Soyyakugaku Zasshi*, **27**(2), 135-137(1973).
 28. Ying-Mei Liu and Shuenn-Jyi Sheu, *Journal of Chromatography*, **623**, 196-199(1992).
 29. T. Misaki, K. Sacara, M. Ojima, S. Kakizawa, T. Oshima, and H. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(1), 354-357(1982).