

3·4급 알칼로이드의 검출에 의한 현호색의 확인

엄동옥*, 김대근, 김기덕¹

우석대학교 약학대학, ¹한양대학교 부속병원

The Identification of Corydalis Tuber by Detecting of Tertiary and Quaternary Alkaloids

Dong-Ok Eom*, Dae-Keun Kim and Ki-Duck Kim¹

College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye, 565-701, Korea and

¹Hanyang University Hospital, Seoul, 133-792, Korea

Abstract—A method using coloric and spectrophotometric detection have been developed for the identification of the tertiary or quaternary alkaloids contained in Corydalis tuber and its preparations. The principle is based on the formation or decomposition of complex compounds. The complex compound of the tertiary and quaternary alkaloids have been formed by adding tetrathiocyanatocobaltate (II) ion to the test soln. Diverse crude drugs were screened using this method and the results indicated that isoquinoline, aconitine-type alkaloids in crude drugs can be readily detected. The method is simple, convenient, reproducible and applicable to the verification of the crude drug Corydalis tuber and its preparations.

Key words—Identification: tertiary or quaternary alkaloids; Corydalis tuber; complex compounds; coloric and spectrophotometric detection; TLC.

현호색(*Corydalis tuber*)은 들현호색(*Corydalis ternata* Nakai) 또는 그 밖의 동속식물(*Papaveraceae*)의 덩이줄기로 국내는 물론 중국, 일본 등의 산야에 널리 자생하거나 집단적으로 재배한다. 현호색을 질병의 치료에 사용한 최초의 기록은 본초습유(진장기)에서 찾을 수 있지만, 그 후의 본초서에는 현호색으로 수록되어 있다. 질병의 치료는 부인병약에 주로 처방되지만, 안중산, 우슬산, 절충흙 등에서 진통, 진경의 목적으로도 배합된다¹⁾. 성분은 glaucine, *f-corydaline* 등의 3급 alkaloids^{2,3)}와 *corydalmine*, *berberine* 등의 4급 alkaloids^{4,5)}이다. 공정법(K.P.VII)에서의 확인은 Meyer 시액에 대한 침전반응을 이용하고 있으나 이 방법은 alkaloids

의 일반적인 검출법으로 현호색의 3·4급 alkaloids만을 확인하는 독특한 방법이 아니다. 기타 UV spectroscopy,^{2,6)} TLC,^{2,7)} GC⁷⁾ 및 HPLC⁸⁾ 등으로 3·4급 alkaloids를 정량하면서 확인하는 방법이 있다. 이상의 방법은 성분 화합물의 동정이나 정량을 위한 성분의 분리조작이 번거롭고 제제에의 적용이 어려울 뿐 아니라 약효성분을 규명하지 못한 한가지 성분만의 검출은 의미가 없을 수도 있다. 때문에 저자 등은 현호색의 성분화합물 중 3·4급 alkaloids를 착화합물로 만들고^{9,10)} 이 착화합물을 서로 다른 용매로 전용시킬 때 발색되는 정색반응, UV/vis spectroscopy 및 TLC로 3·4급 alkaloids를 검출하여 단일제제에서 “현호색” 혹은 복합제제에서 “현호색이 포함된 제제임”을 확인할 수 있는 간편한 방법을 설정하였으므로 보고한다.

*교신저자 : Fax 0652-290-1567

재료 및 방법

실험재료 - 제제 1(현호색): 충남 논산시 은진면 탑정리의 야산에서 1997년 4월 상순에 채집한 피근을 건조하여 가루로 만들었다. 제제 2: 이 약은 현호색, 모려 각 2.66 g, 계지 3.34 g, 회향, 사인, 복령, 감초 각 1.34 g, 그리고 곶상강 0.66 g을 온침(35~45℃)하여 얻은 엑스의 과립이다. 제제 3: 이 약은 향부자 11.0 mg, 당귀, 백작약, 복령, 숙지황, 진피, 천궁 각 5.6 mg, 백출 4.4 mg, 사인 3.3 mg, 감초, 건강, 목단피, 오수유, 육계, 현호색 각 2.2 mg, 소회향, 아교 각 1.1 mg을 분말로 하여 만든 환제이다.

시약 및 기기 - Glaucine, berberine, palmatine, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 NH_4SCN 는 Sigma Co. 제품을, 1,2-dichloroethane(이하 DCE라 칭함)은 화광순약제품을, 그리고 기타 시약과 용매는 특급시약을 사용하였다. Tetrathiocyanatocobaltate(II) reagent(이하 TCR 시액으로 칭함) $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g과 NH_4SCN 20 g에 물을 넣어 100 ml로 만들고 충분한 양의 NaCl을 가하여 포화용액으로 만들어 사용했으며, 황산제2철암모늄시액으로 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ 8 g을 물에 녹여 100 ml로 만든 다음 2 ml를 취하여 1 mol/l HCl 1 ml와 물을 넣어 100 ml로 만들어 사용했다. 사용기기는 Spectronic 20D⁺(Milton Roy Co.)는 흡광도 측정, Spectrophotometer(Shimadzu UV-1601)는 흡수파장 측정, 그리고 FT-IR Spectrophotometer(Shimadzu 8201 PC)는 불순물 확인에 이용하였다.

3급 alkaloids의 확인 - 현호색 또는 제제의 일정량(현호색으로 약 2.00 g 이상)에 5%-ammonia water와 Et_2O 를 가하여 20분간 sonication한 후 여과하고 잔사는 충분한 양의 Et_2O 로 세척한다. 여액과 세액을 합하여 phenolphthalein(이하 P.P.)시액 1방울을 넣고 홍색이 없어질 때까지 물로 세척한 후 Et_2O 를 증발건조한다. 잔사에 10^{-4} mol/l HCl을 넣어 녹인 HCl 용액으로 3급 alkaloids를 검출한다. 정색반응은 HCl 용액에 TCR 시액과 DCE를 넣고 혼든 후 잠시 방치하면 아래의 DCE층이 청색으로 발색된다. Vis. 흡수 spectrum의 측정은 청색인 DCE 용액을 분취하여 합성지오라이트를 놓은 여지로 여과한 여액의 일부를 DCE로 희석한 다음 흡광파장을 측정하면 625.50(-622.50) nm의 영역에 흡광

이 있다. UV 흡수 spectrum 측정은 청색의 DCE 용액에 황산제2철암모늄시액을 넣고 혼든 후 잠시 방치한다. 분리된 DCE층을 합성지오라이트를 놓은 여지에서 여과한 후 여액을 DCE로 희석하여 흡광파장을 측정하면 285.50(-283.50) nm의 영역에 흡광이 있다. TLC에 의한 분리는 Glaucine(R.S.) 표준품의 DCE 용액과 Vis. 또는 UV 흡광 spectrum을 측정된 DCE 용액으로 다음의 조건에서 co-TLC하여 glaucine(Rf: 0.44, 0.79, 0.89)과의 Rf치를 비교한다.

TLC plate: Pre-coated silicagel 60 F₂₅₄(0.25 mm, Merck)

전개용매: $\text{C}_6\text{H}_6:\text{CHCl}_3:(\text{Et})_2\text{NH}(15:4:1)$

전개시간: 100 mins.

검출방법: UV-light(365 nm) and Dragendorff reagent

3·4급 alkaloids의 확인 - 현호색 또는 제제의 일정량(현호색으로 1.00 g 이상)에 MeOH을 가하여 20분간 sonication한 후 여과하고 잔사는 MeOH로 세척한다. 여액과 세액을 합하여 MeOH을 증발건조한 잔사에 10^{-4} mol/l HCl을 넣어 녹인 HCl 용액으로 3·4급 alkaloids를 검출한다. 정색반응은 HCl 용액에 TCR 시액과 DCE를 넣고 혼든 후 잠시 방치하면 아래의 DCE층이 청록색으로 발색된다. Vis. 흡수 spectrum의 측정은 청록색의 DCE 용액을 분취하여 합성지오라이트를 놓은 여지로 여과한다. 여액의 일부로 흡광파장을 측정하면 625.50(-623.50)와 445.50(-435.50) nm의 영역에 흡광이 있다. UV 흡수 spectrum의 측정은 청록색인 DCE 용액의 일부에 황산제2철암모늄시액을 넣어 혼든 후 잠시 방치한다. 분리된 DCE층을 합성지오라이트를 놓은 여지로 여과한 후 여액을 DCE로 희석하여 흡광파장을 측정하면 339.00(-332.00), 284.50(-280.50), 275.00(-270.50) nm의 영역에 흡광이 있다. TLC에 의한 분리는 청록색인 DCE 용액과 berberine 및 palmatine(표준품)의 DCE 용액을 다음의 조건으로 조작하여 Rf치(berberine, 0.42, palmatine, 0.38)를 비교한다.

TLC plate: Pre-coated silicagel 60 F₂₅₄(0.25 mm, Merck)

전개용매: n-butanol:H₂O:AcOH(7:2:1)

전개시간: 3 hrs.

검출방법: UV-light(254 and 365 nm) and Dragendorff reagent

결과 및 고찰

Glaucine(표준품) - Glaucine(m.w., 355.42) 17.8 mg을 DCE에 넣어 50 ml로 만들었다(0.356 mg/ml, 1.0 mmol/l). 일부를 취하여 흡광파장을 측정하니 284.50nm의 영역에서 흡수를 보였다. 이 glaucine의 DCE 용액을 정색반응(3급 alkaloids의 확인법)의 조작에 따라 청색의 DCE 용액을 만든 후 일부를 취하여 흡광파장을 측정하니 623.00 nm, 285.00 nm의 영역에서 흡수가 있었다. 청색인 DCE 용액의 비흡광도는 glaucine으로 $E_{1cm}^{1\%}$ (624.00 nm): 6.60~6.80 이었다. 나머지 청색의 DCE 용액에 황산제2철시액을 넣고 혼든 다음 잠시 방치하였다. 분리된 DCE층을 취한 후 합성지오라이트를 놓은 여지로 여과하여 흡광파장을 측정하니 284.50 nm의 영역에 흡수가 있었으며, glaucine(표준품)의 DCE 용액과 흡광파장이 일치되었다.

Berberine(표준품) - Berberine(m.w., 336.37) 16.8 mg에 DCE를 넣어 50 ml로 만들었다(0.336 mg/ml, 1.0 mmol/l). 이 DCE 용액 20 ml를 취하여 DCE를 넣어 1000 ml로 만든(2.0×10^{-2} mmol/l) 다음 3·4급 alkaloids의 확인과 같은 방법으로 조작하여 만든 berberine 착화합물의 흡광파장은 625.50 nm, 442.50, 356.00, 344.00과 271.00 nm의 영역에 흡수가 있었다. 이어서 berberine 착화합물의 DCE 용액은 3·4급 alkaloids의 확인과 같이 황산제2철암모늄 처리로 착화합물을 분해한 DCE 용액의 흡광파장은 620.50 nm의 흡수가 없고 나머지의 흡광파장은 berberine 착화합물과 모두 일치되었다. Berberine 착화합물의 비흡광도는 berberine으로 $E_{1cm}^{1\%}$ (624.00 nm): 25.0~25.4와 $E_{1cm}^{1\%}$ (442.00 nm): 181.00~183.0였다.

추출 및 분리 - Et₂O은 3급 alkaloids만 추출되고 4급 alkaloids는 추출되지 않았다. 그러나 MeOH은 3·4급 alkaloids가 모두 추출되었으므로 본 시험에서 3급 alkaloids는 Et₂O로, 3·4급 alkaloids는 MeOH로 20분 동안 온침하면서 sonication으로 추출하였다. 또한 Et₂O과 MeOH로 추출한 잔사에 10^{-4} mol/l HCl과 TCR 시액으로 만들어진 3급과

4급 alkaloids의 착화합물은 DCE층으로 양호하게 전용되었다. 착화합물의 전용용매는 CHCl₃이나 dichloromethane도 쓸 수 있었지만 휘발성이 적은 DCE를 사용하였다. 또한 DCE층으로 미량 전용되는 수분, 수지, 점액질 등을 합성지오라이트를 놓은 여지로 제거하였다.

TLC - 3급과 4급 alkaloids의 양호한 분리를 위하여 pre-coated silicagel 60 F₂₅₄(0.25 mm)의 박층판에서 다음 용량비의 용매로 전개하였다. C₆H₆:CHCl₃:(Et)₂NH(15:4:1), C₆H₁₂:AcOEt:(Et)₂NH(16:3:1), n-butanol:H₂O:AcOH(4:5:1, 7:2:1), AcOEt:CHCl₃:EtOH:(Et)₂N(14:3:2:1)의 혼합용매 중 3급 alkaloids의 분리는 C₆H₆:CHCl₃:(Et)₂NH(15:4:1)의 조성비가 양호하였지만, n-butanol:H₂O:AcOH(4:5:1 또는 7:2:1)의 조성비도 사용할 수 있었다. 그리고 3·4급 alkaloids의 분리는 n-butanol:H₂O:AcOH(4:5:1 또는 7:2:1)의 조성비가 양호하게 분리되었다.

제제의 3급 alkaloids - 제제 1, 2, 3을 실험방법의 확인과 같이 조작한 3급 alkaloids의 정색반응은

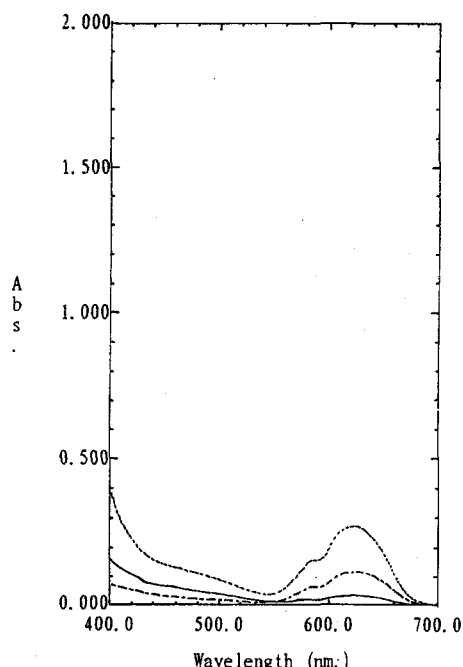


Fig. 1. Visible absorption wavelength of tertiary alkaloids
A : — Preparation 1 B : - - - Preparation 2
C : ··· Preparation 3

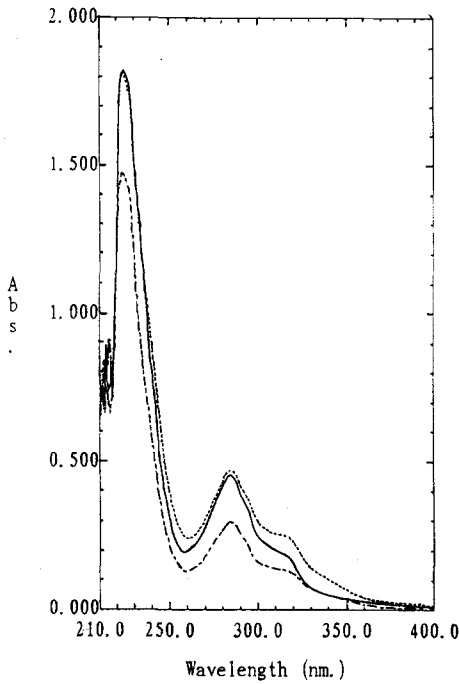


Fig. 2. UV-absorption wavelength of tertiary alkaloids.

A : — Preparation 1 B : Preparation 2
C : - · - Preparation 3

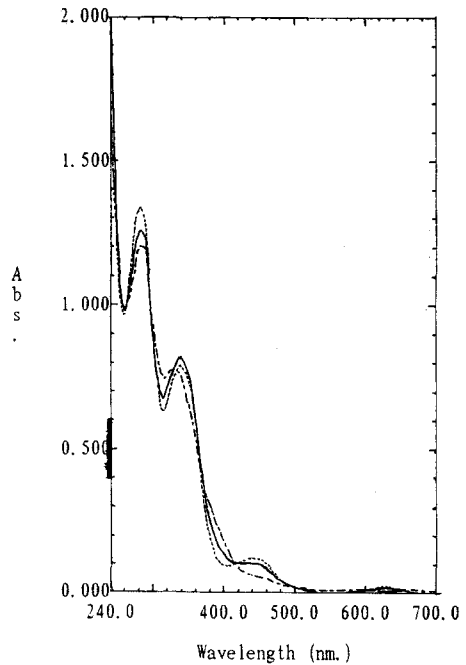


Fig. 3. UV/Vis. absorption wavelength of tertiary and quaternary alkaloids

A : — Preparation 1 B : Preparation 2
C : - · - Preparation 3

DCE층에서 모두 청색을 보였다. Vis. 흡수 spectrum은 Fig. 1의 A,B,C와 같이 625.00 nm의 흡수파장에서 흡수를 보였으며, UV 흡수 spectrum도 Fig. 2의 A, B, C와 같이 284.20 nm에서 흡수를 보였다. 또한 Glaucine을 표준품으로 한 TLC의 분리도 동일한 Rf치로 분리되었다.

제제의 3·4급 alkaloids-제제 1, 2, 3을 실험방법의 확인에 따라 조작한 3·4급 alkaloids의 정색 반응은 DCE층에서 모두 청록색을 보였다. Vis. 흡수 spectrum은 Fig. 3와 같이 624.50과 435.50 nm에서, 그리고 UV 흡수 spectrum은 281.50 nm에서 흡수를 보였다. 또한 berberine과 palmatine을 표준품으로 한 TLC의 분리도 동일한 Rf치로 분리되었다.

결론

Et₂O로 추출한 현호색과 제제의 3급 alkaloids는 TCR 시액으로 물층에서 착화합물을 만들고

DCE층으로 쉽게 전용되면서 청색을 보였다. 그리고 전용된 DCE 용액은 625.50(-623.50)와 285.50(-283.50) nm의 파장영역에서 흡수가 있었고 착화합물의 TLC 분리는 C₆H₆:CHCl₃:(Et)₂NH(15:4:1)의 혼합용매로 전개했을 때 glaucine의 반점 외에 여러개의 반점이 나타났다. 그리고 Dragendorff 시액으로 발색되지 않고 UV-lamp(264, 365 nm)로 연한 청색 혹은 황록색으로 보이는 반점들도 있었다.

MeOH로 추출한 제제의 3·4급 alkaloids도 TCR 시액으로 물층에서 착화합물을 만들고 DCE층으로 전용되면서 청록색을 보였다. 전용된 청록색의 DCE 용액은 625.50(-623.50), 445.50(-435.50), 339.00(-332.00), 284.50(-280.50), 275.00(-270.50) nm의 파장영역에서 흡수가 있었다. 착화합물의 TLC 분리는 n-butanol:H₂O:AcOH(7:2:1, 5:1:4)의 혼합용매로 분리했을 때 berberine과 palmatine 외에 여러개의 반점이 관찰되었다. 이상의 방법으로 생약 또는 제제에서 “현호색”이나 “현호색이 함유되어 있음”을 간편하게 확인할 수 있었다.

사 사

본 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 難波恒雄 (1993), 和漢藥百科圖鑑(I), 83-86. 保育社, 大阪.
2. Kaneko, H., Naruto, S. and Ikeda, N. (1967) Studies on the constituent of *Corydalis* spp. III. Studies on the tertiary phenolic base of Korean *Corydalis*. *Yakugaku Zasshi* 87(11): 1382-1386.
3. Takemoto, T., Kondo, K. and Kondo, Y. (1964) Studies on the constituents of *Corydalis*. I. Constituents of Korean *Corydalis*. (1). *Yakugaku Zasshi* 84(8): 721-724.
4. Imaseki, I. and Taguchi, H. (1962) Studies on the components of *Corydalis* spp. I. Alkaloids of the Chinese *Corydalis*. On the new bases corydalmine and dehydrocorydalmine. *Yakugaku Zasshi* 82(9): 1214-1219.
5. Iwasa, J., Naruto, S. and Ikeda, N. (1966) Studies on the constituent of *Corydalis* spp. II. Studies on the quaternary base of *Corydalis bulbosa* D.C. *Yakugaku Zasshi* 86(5): 437-441.
6. Kitabatake, Y., Ito, K. and Tajima, M. (1963) Studies on effect of *Corydalis* and their component on small intestine and uteri in mice. *Yakugaku Zasshi* 84(1): 73-77.
7. Iwasa, J., Naruto, S. and Utsui, Y. (1966) Studies on the constituent of *Corydalis* spp. I. Application of thin-layer and gas-chromatography to *Corydalis* alkaloids *Yakugaku Zasshi* 86(5): 396-399.
8. Yasuda, M., Konoshima, M. and Kano, Y. (1986) Pharmacognostical and botanical studies on the crude drugs in Hokkaido (IV). Determination of tertiary alkaloids in *Corydalis ambigua* by high performance liquid chromatography. *Shoyakugaku Zasshi* 40(1): 61-64.
9. Tanaka, T. (1972) Analytical studies on thiopyrazolone derivatives. X. Metal complexes of thiopyrine. *Yakugaku Zasshi* 92(10): 1252-1262.
10. Philip, W. W. and Charles, G. V. (1951) Nature of the cobalt thiocyanate reaction. *Analytical Chemistry* 23(2): 334-337.

(1998년 11월 2일 접수)