

시판 오수유로부터 evodiamine의 분리 및 함량분석

황석연 · 황방연 · 주혜경 · 박정일¹ · 손건호² · 이승호³

장승엽⁴ · 강신정⁴ · 노재섭 · 이경순*

충북대학교 약학대학, ¹서울대학교 약학대학, ²안동대학교 식품영양학과,

³영남대학교 약학대학, ⁴식품의약품안전청

Isolation and Quantitative Analysis of Evodiamine from Evodiae Fructus

Suk Yeon Hwang, Bang Yeon Hwang, Hei Kyoung Ju, Jeong Hill Park¹,
Kun Ho Son², Seung Ho Lee³, Seung Yeup Chang⁴, Shin Jung Kang⁴,
Jai Seup Ro and Kyong Soon Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763,

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742,

²Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749,

³College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, 4KFDA, Seoul 122-704, Korea

Abstract – Evodiae Fructus has been used in traditional medicine for the treatment of gastro-intestinal disorders, headache and migraine, and as a cardiotoxic and analgesic. For the quality control of this crude drug, evodiamine was isolated from the methylene chloride extract of *Evodia officinalis* (Rutaceae) and identified by the spectroscopic evidences. A quantitative analysis of evodiamine using HPLC method exhibited that the average contents of evodiamine were $0.84 \pm 0.60\%$ in 53 samples collected throughout the various regions of Korea.

Key words – Evodiae Fructus, Rutaceae, quantitative analysis, evodiamine, HPLC method.

오수유는 대한약전 및 한약규격집에 오수유나무 *Evodia officinalis* Dode 또는 *Evodia rutaecarpa* Benth(산초과 Rutaceae)의 열매로서 규정되어 있다. 중국약전에서는 *Evodia rutaecarpa* Benth, *Evodia rutaecarpa* Benth. var. *officinalis*, *Evodia rutaecarpa* Benth. var. *bodinieri*의 건조과실로 규정되어 있다. 성상은 건조한 과실로 편평한 구형으로 5개의 능(稜)이 있으며, 직경이 2~5 mm이다. 표면은 어두운 갈색~회갈색이고 유실에 의한 오목한 작은점이 많이 있고 그 가운데에 회주의 잔기가 있으나 흔히 떨어져 있다. 뒷면은 5각상 별모양으로 갈라진 틈이 있고, 밑

부분에는 꽃받침과 과병이 있으며 길이 2~5 mm이고 회록색의 털이 밀생한다. 횡단면을 보면 씨방은 5실 이고 각 실마다 연한 황색 또는 갈색~흑갈색을 띤 종 자가 1~2개씩 들어있다. 특이한 냄새가 짙으며 맛은 맵고 나중에는 잔류성의 쓴맛이 있다. 오수유는 건위, 진통, 진토, 제산, 이뇨, 항균, 살충제 등으로 사용되어 왔으며, 오수유탕, 당귀사역가오수유생강탕 등에 사용되어져 왔다.^{1,2)}

오수유에 관한 성분연구로는 indole alkaloids로서 evodiamine을 비롯한 dehydroevodiamine, rutaecarpine, rhesifine와 quinolone alkaloids, limonoid등이 분리 보고된 바 있다.³⁻¹³⁾ 또한 이들 성분에 대한 약 리작용 및 생물활성에 관한 연구도 활발히 이루어졌

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

다. Evodiamine의 V-79, KB 및 P388에 대한 세포 독성작용, 체온유지작용, 강심작용, rutaecarpine의 항무산소증작용, 자궁수축작용, 대뇌혈류 증강작용과 evodiamine, rutaecarpine 및 dehydroevodiamine의 혈관확장작용이 있음이 최근에 보고되었다.^{9,14-22)}

현재 시판되고 있는 오수유에 대한 지표성분의 분석법이 제대로 되어있지 않은 실정으로 이들 성분에 대한 지표성분의 설정 및 정량법에 대한 검토가 필요하다. 따라서, 오수유의 특이성분으로 함량이 비교적 많고, 각종 약리활성이 보고된 evodiamine을 지표성분으로 하여 HPLC법에 따라 정량하여 오수유의 품질관리 기준을 설정함으로써, 우수 한약재의 유통에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 연구에 사용한 오수유는 1998년 전국각지 53개 지역에서 구입하여 분쇄기로 마쇄한 다음 시료로 사용하였다.

시약 및 기기 - ¹H- 및 ¹³C-NMR은 Varian Unity-300 spectrometer를 사용하였고, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine-5989A를 사용하였다. UV는 JASCO V500 UV/VIS spectrophotometer(Model LE 599, U.K.)를, IR은 FT/IR 300E(JASCO) spectrometer를 사용하여 측정하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel (70-230 mesh, Merck)을, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate(0.2 mm, Merck)를 사용하였다. 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였고, HPLC용 용매는 HPLC grade를 사용하였다. 발색시약으로는 Dragendorff reagent를 사용하였다.

확인시험 - 검체 가루 1.0 g에 메탄올 20 ml를 넣고 수욕상에서 5분간 가열하고 식힌 다음 여과하였다. 여액을 증발건고하고 잔류물에 묶은 초산 3 ml를 넣어 수욕상에서 2분간 가온하고 식힌 다음 여과한 여액을 검액으로 하여 다음 시험을 하였다.

1) 검액 1방울을 여과지위에 떨어뜨리고 바람에 말린 다음 Dragendorff 시약을 뿌려 방치할 때 색깔을 관찰하였다.

2) 검액 0.2 ml에 묶은 초산 0.8 ml를 넣은 액에 p-디메칠아미노벤즈알데히드시약 2 ml를 조용히 넣고 수욕중에서 가온할 때 접제면의 색깔을 관찰하였다.

건조감량시험 - 분석용 검체 3 g을 미리 무게를 단

칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터(실리카 겔)에서 방냉하고 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 이것을 105°C에서 건조하고 1시간마다 무게를 정밀하게 달아 함량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 백금제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 3 g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 500~550°C에서 4시간 동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 함량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 달아 회분량(%)으로 하였다.

지표성분의 분리정제 - 오수유 5.2 kg을 MeOH (8L)로 실온에서 2회 반복 추출한 후 여과, 농축하여 MeOH 엑스 909 g을 얻었다. 이것을 methylene chloride(MC)와 물로 분획한 후 MC층 240 g을 hexane : EtOAc=10:1, 5:1, 2:1, 1:1의 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 subfraction으로 나누었다. 이중 Fr. 5를 MeOH 용액 중에서 재결정하여 evodiamine 1.2 g을 얻었다. 순수분리된 evodiamine을 silica gel TLC plate에 점적한 후 hexane : ethyl acetate=3:2의 전개용매로 전개시켰을 때 0.45에서 R_f 값을 나타내었다.

Evodiamine - yellow needles, mp 270~272°C; UV, λ_{max} (MeOH) nm (log ε): 268 (3.9), 281 (3.8), 290 (3.7), 336 (3.5); IR, ν_{max}^{KBr} 1630, 1600, 1510 cm⁻¹; EI-MS, m/z 303 [M]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.79 (1H, dd, J=15.4, 4.7 Hz, H-5a), 2.89 (3H, s, N-CH₃), 2.91 (1H, m, H-5b), 3.20 (1H, m, H-6a), 4.64 (1H, dd, J=12.9, 3.9 Hz, H-6b), 6.12 (1H, s, H-3), 6.96-7.81 (8H, m, Ar-H), 11.06 (1H, s, NH); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 19.44 (t, C-6), 36.38 (q, N-CH₃), 40.80 (t, C-5), 69.70 (d, C-3), 111.46 (s, C-7), 111.60 (d, C-12), 117.41 (d, C-16), 118.15* (d, C-18), 118.83* (d, C-9), 119.24 (s, C-20), 120.21** (d, C-11), 121.79** (d, C-10), 125.92 (s, C-8), 127.94 (d, C-19), 130.53 (s, C-2), 133.36 (d, C-17), 136.45 (s, C-13), 148.74 (s, C-15), 164.17 (s, C-21), *, **Chemical shifts may be interchangeable

HPLC의 분석조건 - HPLC는 YOUNG-LIN HPLC

9600 System으로서 M930 Solvent Delivery Pump, M720 UV-VIS Absorbance Detector, Autochro-WIN Data System을 사용하였다. Column은 TSKgel ODS-120T_M(150×46 mm I.D.)를 사용하였고, 이동상으로는 acetonitrile : water=50:50을 사용하였다. HPLC는 실온에서 실시하였고, 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector의 파장은 254 nm에서 고정하여 실시하였다.

검액의 조제 - 오수유 검체 1.0 g을 정확히 취하고 MeOH 15 ml를 가한 후 실온에서 24시간 추출하여 여과하고 정확히 15 ml로 하였다. 이를 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

표준액의 조제 및 검량선의 작성 - 오수유로부터 순수분리한 evodiamine 10 mg을 MeOH 10 ml에 용해하고 이것을 MeOH로 희석하여 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml의 농도로 만들어 검량선용 표준용액으로 하였고, 각각의 표준용액을 취하여 3회 반복하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 사이의 검량선을 작성하였다.

Evodiamine의 함량분석 - 전 항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회 반복 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 검량선에서 구한 회귀직선 방정식으로부터 각각 evodiamine의 함량을 구하였다. 이 때 evodiamine의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였으며, t_R 은 7.6 min이었다.

결과 및 고찰

약전 및 생약규격집에 수재되어 있으며 현재 한방에서 널리 이용되고 있는 오수유에 대한 표준화 연구의 일환으로, 오수유의 주성분으로 다양한 생리활성이 보고된 evodiamine을 지표물질로 선정하였다. 표준품 확보를 위하여 오수유를 MeOH로 추출한 후, CH₂Cl₂과 H₂O로 fractionation하고, CH₂Cl₂ layer에 대해 column chromatography를 실시하여 지표물질을 순수 분리 정제하였다. 순수하게 단리된 물질은 yellow needle crystal로 mp 270~272°C를 나타내었으며, Dragendorff시액에 양성반응을 나타내어 alkaloid로 추정하였다. ¹H-NMR spectrum에서는 δ 2.89에서 3H분의 singlet signal로 N-CH₃ proton, δ 2.79, 2.91에서 각각 1H분으로 5번 proton 및 δ 3.20, 4.64에서 각각 1H분으로 6번 proton signal을 관찰할 수 있었다. 또한, δ 6.12에서 singlet으로 3번 proton과 δ 6.96~7.81

에서 8H분의 aromatic proton signal이 관찰되었으며, δ 11.06에서 1H분의 singlet으로 1번 NH signal을 관찰할 수 있었다. ¹³C-NMR 및 DEPT spectrum에서는 총 19개의 carbon signal을 확인할 수 있었으며, δ 19.44, 40.80에서 C-6, C-5의 methylene을, δ 36.38에서 N-CH₃ carbon 및 δ 69.70에서 3번 carbon을 관찰할 수 있었다. 또한, δ 164.17에서 C-21의 carbonyl carbon을 관찰할 수 있었다. EI-MS spectrum에서는 m/z 303에서 molecular ion peak를 나타내었다. 이상의 각종 물리화학적 성상과 spectral data를 문헌과 비교 검토하여 evodiamine으로 구조를 동정하였다.^{9,11,17)}

전국 각 지역으로부터 구입한 53종의 시료 모두에서 Dragendorff시액에 노란색으로 발색되어 alkaloid 반응에 양성을 나타내었으며, 묶은 초산과 p-dimethylaminobenzaldehyde 시약에 의해 접계면에 적갈색을 나타내어 indole alkaloid 반응에 양성을 나타내었다. 또한 silica gel TLC plate에 점적한 후 hexane : ethyl acetate=3:2의 전개용매로 전개시킨 후 Dragendorff 시액으로 발색시켰을 때 표준품인 evodiamine과 같은 위치에서 노란색의 반점을 나타내었으며 0.45에서 R_f 값을 나타내었다. 건조감량 시험에서는 평균 9.45±1.91%(n=53)를 나타내었으며, 12% 이하로 규정하는 것이 적합하다고 사료되었다. 회분함량 시험에서는 평균 6.89±0.93%(n=53)를 나타내었으며, 53종의 시료 모두 약전규정인 8.0% 이하에 적합하였다 (Table I).

Evodiamine은 오수유의 주성분으로 각종 생리활성이 보고되어 있으며, HPLC를 이용하여 쉽게 정량할 수 있으므로 지표성분으로 설정하여 53종의 시료에 대하여 evodiamine의 함량을 추정하였다. Column으로는 ODS를 사용하였고, 여러 용매계를 이용하여 HPLC chromatogram을 얻고 가장 분리능이 양호한 용매계로서 acetonitrile : water=50:50을 사용하였으며, 또한 검출파장으로는 254 nm를 사용하였다. 이 조건에서 표준품인 evodiamine은 t_R 7.6 min에서 나타났으며, 다른 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석 조건임을 알 수 있었다. 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 회귀직선 방정식은 $y=1321.7x-31.6$ ($r=0.999$)로 나타났으며, 직선성이 인정되었다.

전국각지에서 구입한 53종의 오수유(OS01~OS53)에 대해 3회 반복 실험하여 상기 회귀직선 방정식으로부터 건조중량(g)중의 evodiamine의 함량(mg)을 구하여 %를 산출하였다(Table I). 오수유 중의 evodia-

Table I. Contents of evodiamine, loss on drying and ash in Evodiae Fructus

Sample	evodiamine (%)	Loss on Drying (%)	Ash (%)	구입처
OS-01	0.732	10.80	6.50	서울
OS-02	0.275	10.43	6.50	서울
OS-03	0.171	10.23	7.20	서울
OS-04	0.465	9.90	5.40	서울
OS-05	0.727	11.53	2.35	서울
OS-06	0.201	11.07	6.90	서울
OS-07	0.144	3.47	5.05	서울
OS-08	0.108	17.73	7.30	서울
OS-09	0.268	11.60	7.05	서울
OS-10	0.171	10.77	6.95	서울
OS-11	0.164	11.23	6.70	서울
OS-12	1.091	9.60	6.95	경기
OS-13	1.401	9.77	6.75	경기
OS-14	0.532	9.50	6.65	경기
OS-15	0.493	10.90	6.85	경기
OS-16	0.573	8.80	7.95	경기
OS-17	1.086	9.30	6.15	경기
OS-18	1.643	9.63	6.85	경기
OS-19	0.788	9.17	6.35	경기
OS-20	0.685	9.77	6.95	경기
OS-21	0.849	9.47	5.70	경기
OS-22	1.318	6.77	7.00	경기
OS-23	0.394	3.00	5.15	경기
OS-24	0.392	10.73	6.95	청주
OS-25	0.633	9.30	7.75	청주
OS-26	0.945	8.73	6.65	대전
OS-27	0.159	8.77	6.60	유성
OS-28	0.637	9.33	6.60	공주
OS-29	1.459	9.30	7.35	충주
OS-30	1.168	9.07	7.15	천안
OS-31	0.265	9.43	6.70	대구
OS-32	2.349	9.47	7.95	대구
OS-33	1.251	9.37	7.25	대구
OS-34	0.563	9.27	7.65	경북
OS-35	0.429	10.07	6.95	경북
OS-36	2.249	8.33	7.25	대구
OS-37	2.021	7.83	7.65	대구
OS-38	1.661	9.40	7.20	광주
OS-39	1.058	10.33	7.95	광주
OS-40	0.624	9.27	7.90	광주
OS-41	0.366	8.83	6.95	광주
OS-42	1.308	9.17	7.30	부산
OS-43	0.534	9.30	6.55	부산
OS-44	1.389	9.27	7.70	부산

Table I. Continued

Sample	evodiamine (%)	Loss on Drying (%)	Ash (%)	구입처
OS-45	0.358	9.77	7.90	부산
OS-46	0.644	9.43	6.30	부산
OS-47	0.419	9.53	6.35	부산
OS-48	1.343	7.37	7.65	부산
OS-49	1.550	9.33	7.70	원주
OS-50	0.347	9.47	7.50	춘천
OS-51	1.706	9.20	7.70	영주
OS-52	0.207	8.67	7.50	안동
OS-53	1.977	9.17	7.60	안동
Average ±S.D.	0.84±0.60	9.45±1.91	6.89±0.93	

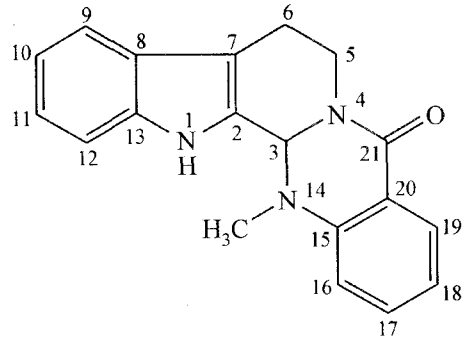


Fig. 1. Chemical structure of evodiamine.

mine 함량은 평균 0.84±0.60%(n=53)을 나타내었으며, 시료에 따라 편차가 심했다. 이것은 오수유의 산지에 따른 차이 및 유통과정에서 오래된 것일수록 evodiamine의 함량이 적게 나타나는 보고도 있으므로 검토가 요구된다.²⁴⁾ 따라서, 오수유의 표준화를 위해서는 evodiamine의 함량기준을 0.2% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 1998년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 한국약학대학협의회 약진분과회(1998) 대한약전 제7 개정, 1079, 문성사, 서울.

2. 지형준, 이상인(1988) 대한약전외 한약(생약) 규격집 주해서, 575-576, 한국메디칼인텍스사, 서울.
3. Nakasato, T., Asada, S. and Marui, K. (1962) Dehydroevodiamine, Main Alkaloid from the Leaves of *Evodia rutaecarpa*. *Yakugaku Zasshi* **82**: 6119-6126.
4. Yamazaki, M. and Kawana, T. (1967) Isolation of Hydroxyevodiamine (Rhetsinine) from the Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Yakugaku Zasshi*, **87**: 608-610.
5. Kamikado, T., Murakoshi, S. and Tamura, S. (1978) Structure Elucidation and Synthesis of Alkaloids Isolated from Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1515-1519.
6. Sugimoto, T., Miyase, T., Kuroyanagi, M. and Ueno, A. (1988) Limonoids and Quinolone Alkaloids from *Evodia rutaecarpa*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 4453-4461.
7. Shoji, N., Umeyama, A., Iuchi, A., Saito, N. and Takemoto, T. (1988) Isolation of a New Alkaloid from *Evodia rutaecarpa*. *J. Nat. Prod.* **51**: 791-792.
8. Sugimoto, T., Ueno, A., Kadota, S., Cui, C. and Kikuchi, T. (1988) New 5-H Limonoids from *Evodia rutaecarpa*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 1237-1240.
9. Itokawa, H., Inamatsu, M. and Takeya, K. (1990) A Cytotoxic Principle from *Evodia rutaecarpa*. *Shoyakugaku Zasshi* **44**: 135-137.
10. Arisawa, M., Horiuchi, T., Hayashi, T., Tezuka, Y., Kikuchi, T. and Morita, N. (1993) Studies on the Constituents of *Evodia rutaecarpa* (Rutaceae). I. Constituents of the Leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 1472-1474.
11. Lee, S. W., Hwang, B. Y., Kim, S. E., Kim, H. M., Kim, Y. H., Lee, K. S., Lee, J. J. and Ro, J. S. (1995) Isolation of Modulators for Multidrug Resistance from the Fruits of *Evodia officinalis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 344-348.
12. Tang, Y. Q., Feng, X. Z. and Huang, L. (1996) Studies on the Chemical Constituents of *Evodia rutaecarpa*. *Acta Pharm. Sinica* **31**: 151-155.
13. Shin, H. K., Do, J. C., Son, J. K., Lee, C. S., Lee, C. H. and Cheong, C. J. (1998) Quinolone Alkaloids from the Fruits of *Evodia officinalis*. *Planta Med.* **64**: 764-765.
14. King, C. L., Kong, Y. C., Wong, N. S., Yeung, H. W., Fong, H. H. S. and Sankawa, U. (1980) Uterotonic Effect of *Evodia rutaecarpa* Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **43**: 577-582.
15. Perrett, S. and Whiffeld, P. J. (1995) Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an Alkaloid with Anthelmintic Activity from the Chinese Medicinal Plant, *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* **61**: 276-280.
16. Kano, Y., Zong, Q. and Komatsu, K.-I. (1991) Pharmacological Properties of Galenical Preparation. XIV. Body Temperature Retaining Effect of the Chinese Traditional Medicine, Goshuyu-to (吳茱萸湯) and Component Crude Drugs. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 690-692.
17. Shoji, N., Umeyama, A., Takemoto, T., Kajiwara, A. and Ohizumi, Y. (1986) Isolation of Evodiamine, a Powerful Cardiotonic Principle from *Evodia rutaecarpa* (Rutaceae). *J. Pharm. Sci.* **75**: 612-613.
18. Yamahara, J., Yamada, T., Kitani, T., Naitoh, Y. and Fujimura, H. (1989) Antianoxic Action and Active Constituents of *Evodiae Fructus*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1820-1822.
19. Haji, A., Momose, Y., Takeda, R., Nakanishi, S., Horiuchi, T. and Arisawa, M. (1994) Increased Feline Cerebral Blood Flow Induced by Dehydroevodiamine Hydrochloride from *Evodia rutaecarpa*. *J. Nat. Prod.* **57**: 387-389.
20. Yang, May C. M., Wu, S.-L., Kuo, J.-S. and Chen, C.-F. (1990) The Hypotensive and Negative Chronotropic Effects of Dehydroevodiamine. *Eur. J. Pharmacol.* **182**: 537-542.
21. Wong, K.-K. (1996) Lack of Calcium-antagonizing Activity of Dehydroevodiamine on the Chronotropic and Inotropic Activities of Mouse Isolated Atria. *Planta Med.* **62**: 246-249.
22. Xu, S. B., Huang, Y. M., Lau, Christine N. B., Wat, Carcia K. H. and Kong, Y. C. (1982) Hypotensive Effect of Dehydroevodiamine from *Evodiae Fructus*. *Am. J. Chin. Med.* **10**: 75-85.
23. Chiou, W.-F., Liao, J.-F. and Chen, C.-F. (1996) Comparative Study on the Vasodilatory Effects of Three Quinazoline Alkaloids Isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J. Nat. Prod.* **59**: 374-378.
24. Kano, Y., Yasuda, M., Saito, K. and Komatsu, K. (1989) Simultaneous and Quantitative Analysis of Alkaloids in *Evodia* Fruit. *Shoyakugaku Zasshi* **43**: 339-342.

(2001년 3월 20일 접수)