

## 흡광도측정법에 의한 황백과 제제 중 프로토베르베린 알칼로이드의 정량

엄동옥<sup>#</sup> · 정윤철

우석대학교 약학대학

(Received July, 2000; Revised December 21, 2000)

## Determination of Protoberberine Alkaloids in Phellodendri Cortex and Preparation by Spectrophotometric Method

Dong-Ok Eom<sup>#</sup> and Yun-Cheol Jeong

College of Pharmacy, Woosuk University, Chonju, 565-701, Korea

**Abstract** — The Phellodendri Cortex of *Phellodendron amurense* (Rutaceae) is known to contain a number of isoquinoline alkaloid, and berberine, palmatine, jateorrhizine, phellodendrine and magnoflorine are the major constituents of protoberberine alkaloids. For the determination of protoberberine alkaloids from Phellodendri Cortex and berberine chloride from the preparation, the new spectrophotometric method was developed with a simple and selective sample clean-up using thiocyanatocobaltate[III] complex ion. Samples were extracted with 0.1 mM hydrochloric acid, potassium biphthalate reagent, thiocyanatocobaltate reagent and 1,2-dichloroethane for 60 min. The absorbance of protoberberine alkaloid complexes in 1,2-dichloroethane solution was measured at 625 nm. Calibration curve for berberine was linear over the concentration range of 0.05~0.30 mg/ml 1,2-dichloroethane. The method proved to be rapid, simple and reliable for the determination of protoberberine alkaloids from Phellodendri Cortex and berberine chloride from the preparation.

**Keywords** □ Phellodendri Cortex and preparation, protoberberine alkaloid, berberine chloride, spectrophotometric method

황백(Phellodendri Cortex)은 산초나무과(Rutaceae)의 황백나무(*Phellodendron amurense*) 또는 기타 동속식물의 수피이고 동북아시아가 산지이며 국내는 북한에서 주로 생산된다. 그러나 시판품에는 베르베린의 함량이 적어 약전규정에 적합하지 못한 것도 있지만 껍질이 두텁고 황색이 짙으면 프로토베르베린 알칼로이드의 함량이 많기 때문에 보통 우량품으로 간주된다.<sup>1)</sup> 성분은 프로토베르베린 알칼로이드인 베르베린과 팔마틴이고 phellodendrine, magnoflorine 등도 규명되었다. 정량법은 황백<sup>2-4)</sup> 혹은 제제<sup>5-7)</sup>중의 베르베린을 정량하거나 베르베린과 팔마틴을 동시정량<sup>8-12)</sup>하였고 프로토베르베

린 알칼로이드<sup>13)</sup> 혹은 총 알칼로이드<sup>14)</sup>를 정량한 보고도 있다. 저자 등은 프로토베르베린 알칼로이드가 thiocyanatocobaltate 착이온<sup>15)</sup>과 물에 녹지 않는 청녹색의 착화합물을 만들고 이 착화합물이 1,2-디클로로에탄에 추출<sup>17)</sup>되면 프로토베르베린 알칼로이드용액에서 볼 수 없던 625 nm의 극대파장이 있음을 알았다. 이를 이용하여 황백 중 프로토베르베린 알칼로이드와 시판품의 제제 중 베르베린을 간편하고 재현성 있게 정량할 수 있어 보고한다.

### 실험방법

#### 재료 및 시약

황백은 남원시에서 시판되고 있는 경북 거창산을 세

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 063-290-1568 (팩스) 063-290-1567

말로 만들었고 후라베린은 염화베르베린 0.380 g, 스크 폴리아엑스 0.170 g, 아크리놀 0.180 g, 탄닌산알부민 2.270 g을 혼합하였다. Berberine chloride(H<sub>2</sub>O content 3 mol/mol)와 palmatine chloride(H<sub>2</sub>O content 3 mol/mol), cobaltous nitrate, ammonium thiocyanate는 Sigma Co.(미국)제품을, 1,2-dichloroethane(DCE)은 Wako Chem. Co.(일본) 제품을, 기타의 시약과 시액은 특급을 사용하였다. 베르베린용액은 berberine chloride · 3H<sub>2</sub>O 126.6 mg(베르베린 100 mg)에 물을 넣어 100 ml로, 프탈산수소칼륨 시액(PHP)은 potassium hydrogen phthalate 1.021 g에 물을 넣어 100 ml로, 치오시아나토코발트 시액(TCR)은 cobaltous nitrate 5 g과 ammonium thiocyanate 20 g에 물을 넣어 100 ml로 만들었다.

**기기**

Spectronic 20<sup>+</sup>(Milton Roy Co.), spectrophotometer(Shimadzu UV-1601), ultra sonic clearers(Bransonic 2210), centrifuge(Hanil science industrial MF

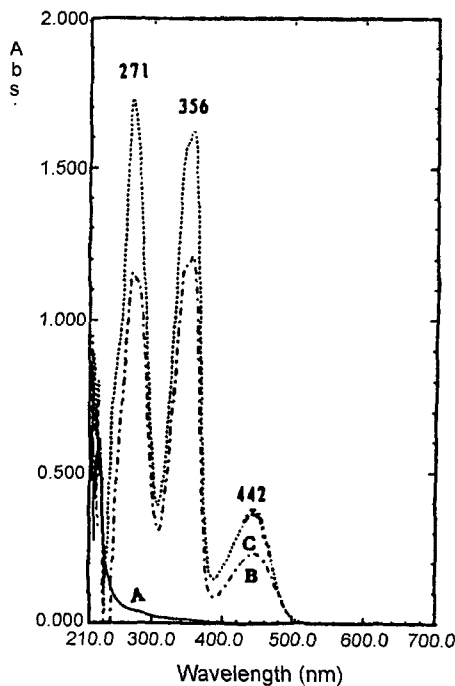
80), pH meter(Orion Reserch EA 920)를 사용하였다.

**극대파장 (λ<sub>max</sub>)**

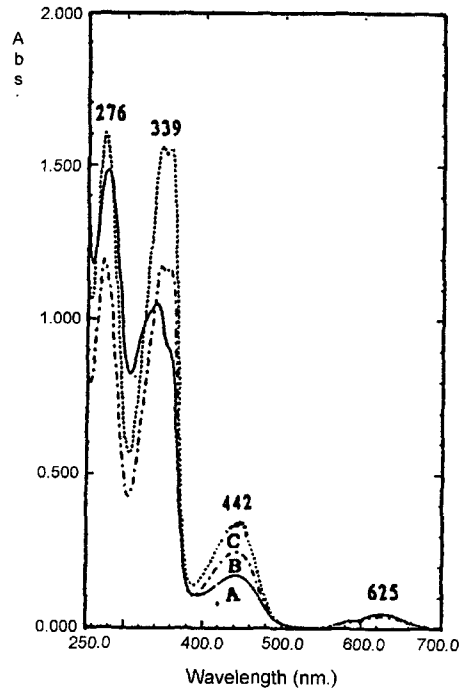
0.1 mM HCl, PHP, TCR의 혼합액을 추출한 DCE, 베르베린과 팔마틴의 DCE 용액을 210~700 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 1-A, B, C). 또한 황백, 제제, 베르베린용액을 시료병에 취한 다음 정량법에 따라 조작하여 프로토티베르베린 착화합물의 DCE 용액을 만든 후 250~700 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 2-A, B, C). 그리고 대한약전 제7개정에서 수재된 각 생약을 같은 방법으로 조작하여 625 nm의 극대파장이 있는 생약을 확인하였다.

**추출 및 경시변화**

물 층에 생성된 프로토티베르베린 착화합물을 유기용매 층으로 전용시키려고 DCE, chloroform, dichloromethane, benzene, methylisobutylketone, Et<sub>2</sub>O의 일정량으로 추출하여 전용을 확인하였다. 또한 Clark-Lubs, McIlvaine, Sørensen 완충액으로 pH 3.0~7.0



**Fig. 1** - The absorption spectrum of ultraviolet and visible regions.  
 A : --- DCE extracted from complexing agent  
 B : ··· DCE solution of berberine chloride  
 C : ·-· DCE solution of palmatine chloride



**Fig. 2** - The absorption spectrum of ultraviolet and visible regions.  
 A : --- DCE solution of Phelloderi Cortex  
 B : ··· DCE solution of furaberine complex  
 C : ·-· DCE solution of berberine complex

의 범위에서 프로토펙베린 착화합물의 전용성과 안정성을 확인하고 극대파장을 측정한 DCE 용액을 실온에 방치하며 경시변화를 검토하였다.

#### 검량선

베르베린용액 1, 3, 6 ml를 시료병에 취하여 PHP 10 ml, TCR 5 ml, DCE 20 ml를 넣고 정량법에 따라 조작한 후 625 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선의 회귀식을 만들었다.

#### 정량법

베르베린으로 3.0~6.0 mg에 해당하는 황백 또는 제제를 시료병에 취하여 0.1 mM HCl 10 ml, PHP 10 ml, DCE 20 ml를 가한 후 60분 동안 초음파로 처리하였다. 내용물을 탈지면으로 여과하여 잠시 방치하고 분리된 DCE를 취하여 무수황산나트륨 0.5 g을 넣고 흔든 후 3분 동안 원심분리하여 625 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 재현성 시험

황백 450 mg 또는 제제는 30 mg을 시료병에 취하여 정량법에 따라 조작하였다. 같은 방법으로 프로토펙베린 알칼로이드와 베르베린을 4회 정량하여 정량법의 정확도와 정밀도를 확인하였다.

#### 회수시험

황백 450 mg 또는 제제 30 mg을 시료병에 취하여 베르베린용액 2 ml를 넣고 정량법에 따라 조작하였다. 같은 방법으로 4회 조작하여 황백 중의 이중성분과 제제 중의 공존물질로 인한 베르베린의 회수율을 검토하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 극대파장 ( $\lambda_{max}$ )

0.1 mM HCl, PHP, TCR의 혼합액을 추출한 DCE(Fig. 1-A)는 250 nm 이하에 흡광이 있었고 베르베린(Fig. 1-B)과 팔마틴(Fig. 1-C)의 DCE 용액은 271, 356, 442 nm에 흡광이 있었다. 또한 황백(Fig. 2-A), 제제(Fig. 2-B), 베르베린 표준액(Fig. 2-C)으로 만든 프로토펙베린 착화합물의 DCE 용액은 276, 339, 442, 625 nm에 흡광이 있어 Fig. 1에서 흡광이

없는 625 nm의 극대파장에서 정량하였다. 대한약전 제 7개정 수재 생약 중 황련, 현호색, 방기, 부자, 오수유, 개자가 625 nm에서 흡광이 있었다.

#### 추출 및 경시변화

물 층에 생성된 프로토펙베린 착화합물의 추출용매로 DCE, chloroform, dichloromethane이 양호하였다. 이 중 비점이 높은 DCE를 추출용매로 하였고 benzene은 흡광도가 현저히 적었으며 methylisobutylketone과 Et<sub>2</sub>O은 TCR도 전용되어 추출용매로 쓸 수 없었다. Clark-Lubs, McIlvaine, Sørensen 완충액의 pH 4.0~5.0 범위에서 프로토펙베린 착화합물이 잘 전용되고 안정성도 증대되었으며 프로토펙베린 착화합물의 DCE 용액은 실온에서 72시간까지 흡광도의 변화가 없었다.

#### 검량선

베르베린 1, 3, 6 mg으로 4회 조작하여 측정된 흡광도의 평균값은 0.126, 0.379, 0.761로 원점을 지나는 직선으로 되었으며 상대표준편차( $S_R\%$ )는 0.615, 0.774, 0.855로 산출되었다. 이 때의 회귀식은  $y=2.537x(\text{mg})-0.001(r^2=1.000)$ 이고 DCE 20 ml로 추출한 착화합물 중 베르베린 또는 프로토펙베린의 함량(목적성분량)은  $x(\text{mg})=y \times 7.88$ 을 이용하였다.

#### 재현성시험

황백 450 mg 중 프로토펙베린 알칼로이드의 평균 함량은 3.28 mg으로 백분율은 0.73%이고  $S_R\%$ 는 1.37이었다. 제제 30 mg 중 베르베린의 평균함량은 2.98 mg으로 베르베린 3 mg에 대한 백분율은 99.33%이고  $S_R\%$ 는 1.29이었다.

Table 1 - Reproducibility test

Sample No.	CP hellodendri Cortex		furaberine	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1.	3.33	0.74	2.94	98.00
2.	3.26	0.72	2.96	98.67
3.	3.29	0.73	3.01	100.33
4.	3.22	0.72	3.04	101.33
5.	3.31	0.74	2.95	98.33
m.	3.28	0.73	2.98	99.33
$S_R\%$		1.37		1.29

Table II - Recovery of berberine

Sample No.	Phellodendri		Cortex furaberine	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1.	5.25	98.5	4.89	95.5
2.	5.23	97.5	4.95	98.5
3.	5.25	98.5	4.96	99.0
4.	5.27	99.5	4.99	100.5
5.	5.21	96.5	4.92	97.0
m.	5.24	98.1	4.94	98.1
S <sub>R</sub> %		1.16		1.96

회수시험

재현성 시험에서 황백 450 mg 중 프로토펙베린 알칼로이드의 평균함량은 3.28 mg으로 베르베린용액 2 ml를 첨가하면 5.28 mg이다. 이를 5회 정량한 평균값은 5.24 mg으로 첨가된 베르베린 2 mg은 1.96 mg으로 정량되었고 백분율은 98.1%이며 S<sub>R</sub>%는 1.16이었다. 제제 30 mg 중 베르베린은 평균함량은 2.98 mg으로 베르베린 2 mg을 첨가하면 4.98 mg이다. 이를 5회 정량한 평균값은 4.94 mg으로 첨가된 베르베린 2 mg은 1.96 mg으로 정량되었고 백분율은 98.1%이며 S<sub>R</sub>%는 1.96이었다.

결 론

황백에서 프로토펙베린 알칼로이드를, 제제에서 염화베르베린을 MeOH 등의 유기용매로 추출하지 않고 청녹색의 불용성 착화합물로 만든 후 DCE로 추출하여 625 nm의 극대파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 검량선의 회귀식은  $y=2.537x-0.001(r^2=1.000)$ 이고 DCE에 추출된 베르베린 또는 프로토펙베린 착화합물의 농도는 베르베린으로 0.15~0.30 mg/ml의 범위(abs.0.380~0.759)에서 정량할 수 있었다. 황백 중 프로토펙베린 알칼로이드의 함량은 0.73%이며 제제 중 염화베르베린의 재현성은 99.33%이고 베르베린 2 mg에 대한 회수율은 황백과 제제 모두 98.1%이었다. 황백중의 이중성분이나 제제중의 공존물질에 대한 영향없이 간편하고 재현성있게 정량할 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 우석대학교 학술연구조성비로 연구되었으므로, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 難波恒雄 : 和漢藥百科圖鑑[III], 保育社, 147(1993).
- 2) Tetsuo Mura and Toshio Tominaga : Studies on the Quantitative Analysis by Thin Layer Chromatography I, On the Quantitative Analysis of Berberine in Phellodendron bark. *Syoyakugaku Zasshi*. **27**, 63 (1973).
- 3) Tokunosuke Sawda, Johji Yamahara and Yoshiko Shintani : The Assay of Berberine-type Alkaloids by Amberlite XAD-2. *Syoyakugaku Zasshi*. **28**, 150 (1974).
- 4) Yohei Hashimoto, Keiko Ando and Mizuo Mizuno : Determination of Berberine in Crude Drugs by Fluorometric Densitometry. *Syoyakugaku Zasshi*. **30**, 127 (1976).
- 5) Tadao Sakai : Spectrophotometric determination of berberine by solvent extraction. *Bunseki Kagaku*. **24**, 135 (1975).
- 6) Tadao Sakai : Application of thermochromism in Spectrophotometric Analysis, Selective Determination of Berberine in Pharmaceuticals by Solvent Extraction. *J. Pharm. Sci.* **68**, 875 (1979).
- 7) Akada Y., Kawano S. and Tanase Y. : High-speed liquid chromatography analysis of drugs. X. Simultaneous determination of acrinol and berberine chloride in pharmaceutical preparations. *Yakugaku Zasshi*. **100**, 766 (1980).
- 8) O. Ishikawa, T. Hashimoto, T. Nakajima, O. Tanaka and H. Itokawa : Application of High-speed Liquid Chromatography to Analysis of Crude Drugs, Quaternary Alkaloids of Coptidis Rhizoma and Phellodendri Cortex. *Yakugaku Zasshi*. **98**, 976 (1978).
- 9) Lee H. S., Eom Y. E. and Eom D. O. : Narrowbore high performance liquid chromatography of berberine and palmatine in crude drugs and pharmaceuticals with ion-pair extraction using cobalt thiocyanate reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 59 (1999).
- 10) S. El-Masry, M. A. Korany and A. H. Abou-Donia : Colorimetric and Spectrophotometric Determination of Hydrastis Alkaloids in Pharmaceutical Preparations. *J. Pharm. Sci.* **69**, 597 (1980).
- 11) Tadao Sakai : spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Quaternary Ammonium Salts in

- Drugs by Ion-pair Extraction with Bromophenol Blue and Quinine. *Analyst*. **108**, 608 (1983).
- 12) Lin S. J., Tseng H. H., Wen K. C. and Suen T. T. : Determination of gentiopicoside, mangiferin, palmatine, berberine, baicalin, wogonin and glycyrrhizin in the traditional Chinese medicinal preparation sann-joong-huey-jian-tang by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. **730**, 17 (1996).
- 13) Drost-Karbowska K., Kowalewski Z. and Szauffer M. : Determination of protoberberine alkaloids in *Berberis vulgaris* L. *Acta Polon. Pharm.* **31**, 683 (1974).
- 14) 일본약국방 제8개정 제1부해설서, 광천서점, C-506 (1971).
- 15) Philip W. West and Charles G. Devries : Nature of the Cobalt Thiocyanate Reaction. *Anal. Chem.* **23**, 334 (1951).
- 16) Leonard I. Katzin and Elizabeth Gebert : Spectrophotometric Studies of Cobalt(II) Thiocyanate Complexes in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 5659 (1950).