생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
33(3) : 182 ~ 186 (2002)

흡광도측정법에 의한 제제 중 황련 알칼로이드의 정량

임소연 · 김성은 · 김대근 · 신태용 · 임종필 · 엄동옥*
우석대학교 약학대학

Determination of Coptidis Rhizoma Alkaloids in Preparations by Spectrophotometric Method

So-Yun Lim, Sung-Eun Kim, Dae-Keun Kim, Tae-Yong Shin, Jong-Pil Lim, and Dong-Ok Eom*
College of Pharmacy, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea

Abstract – The Coptidis rhizoma is known for containing protoberberine alkaloids. Berberine, coptisine and palmatine are the major constituents of protoberberine alkaloids. The alkaloids were isolated and determined by forming complex compounds from Coptidis rhizoma in preparation I(Sam-Hwang-Sa-Sim-Tang) and II(Hwang-Ryen-Tang). For the determination of these alkaloids, a new spectrophotometric method was developed with a simple and selective sample clean-up using thiocyanatocobaltate[II] complex compound ion. The absorbance of alkaloidal complex compounds in 1.2-dichloroethane solution was measured at 625 nm. Calibration curve for the alkaloids isolated from Coptidis rhizoma was linear over the concentration range of 0.2~0.3 mg/m*l*. The method was proved to be rapid, simple and reliable for the isolation and the determination of the alkaloids in Coptidis rhizoma preparation I and II.

Keywords – Sam-Hwang-Sa-Sim-Tang, Hwang-Ryen-Tang, Coptidis rhizoma alkaloids, spectrophotometric method, determination

건위 및 지사작용이 있는 황련(Coptidis rhizoma)은 단일로 쓰지 않고 삼황사심탕 또는 황련탕 등의 탕제나 환제에 배합되었다. 그러나 근래는 제제학적 기술의 발달로 산제, 환제, 정제 또는 엑스제로 제제화하고 있으므로 황련 중 알칼로이드에 대한 성분의 종류와 함량의 규정이 제제의 기준설정과 품질관리를 위하여 필요하다. 황련의 성분은 berberine, palmatine 등의 protoberberine 알칼로이드와 기타의 알칼로이드[1]이고 정량은 제제 중 berberine[2-5] 또는 berberine과 palmatine을 동시정량[6-10]하였으며 총 알칼로이드[11]를 분리정량한 보고가 있다. 그러나 이상의 방법은 제제 중 berberine과 palmatine을 정량한 방법으로 제제에서 berberine과 palmatine의 함량이 황련을 대표할 수 없다. 따라서 제제의 기준설정과 시험 및 황련의 품질을 평가할 때 berberine과 palmatine의 함량 뿐 아니라 protoberberine 알칼로이드와 총 알칼로이드의 함량설정도 필요하므로 저자 등은 황련 알칼로이드와 thiocyanatocobalt[II] complex 이온[12]의 전하이동으로 착화합물을 만들고[13] 1,2-dichloroethane으로 추출하면 625 nm에 새로운 극대흡수파장이 나타나므로 이를 이용하여 황련에서 단리한 알칼로이드를 표준품으로 제제 I(삼황사심탕)과 제제 II(황련탕) 중 황련 알칼로이드를 간편하고 재현성 있게 정량할 수 있는 방법을 설정하여 보고한다.

*교신저자(E-mail) : doeom@woosuk.ac.kr

실험방법

재료 및 시약

황련은 남원시에서 중국산 시판품을 구입하였으며 제제 I은 황련과 황금 각 0.500 g, 대황 0.670 g을 혼합(1.670 g)하였고 제제 II는 황련, 백삼, 감초, 대추, 건강, 반하 각 1.000 g을 혼합(6.000 g)하여 각각을 가루로 만들었다. berberine chloride trihydrate, palmatine chloride trihydrate, cobaltous nitrate hexahydrate, ammonium thiocyanate는 Sigma Co.(미국)제품을, 1,2-dichloroethane(DCE로 표기함)은 Wako Chem. Co.(일본) 제품을, 기타의 시약은 시판특급을 사용하

였다. 알칼로이드 용액은 황련에서 단리한 알칼로이드 25 mg에 0.1 mM 염산을 넣고 60°C로 가온하며 초음파 처리로 녹인 후 0.1 mM 염산을 가하여 50 ml로 만들었다. Potassium biphthalate 용액(PHP로 표기함)은 potassium hydrogen phthalate 1.021 g을 물에 녹여 100 ml로, thiocyanatocobalt [II] complex 용액(TCR로 표기함)은 cobaltous nitrate hexahydrate 5 g과 ammonium thiocyanate 20 g을 물에 녹여 100 ml로 만들었다.

기기

Spectronic 20D$^+$(Milton Roy Co.), UV/Visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1601), HPLC(Shimadzu Class LC 10), pump(dual LC 10 AT), column oven(CTO 10 A), detector(UV-Vis detector, SPD 10 A), integrator(communications bus module CBM 10 A)를 사용하였다.

알칼로이드의 단리

황련 20 g에 0.1 mM 염산 300 m*l*와 TCR 200 m*l*를 넣어 10분동안 방치하고 DCE 1500 m*l*를 가한 후 다시 1시간동안 방치하였다. 가아제로 여과한 잔사에 DCE 1000 m*l*를 넣어 같은 방법으로 4회 조작하였다. 여액을 모두 합하여 방치한 후 분리된 DCE를 취하여 무수 sodium sulfate 10 g을 놓은 여지로 여과하였다. 여액을 감압건조한 잔사를 헥산으로 세척하여 알칼로이드의 착화합물을 만들었다. 착화합물에 DCE 1000 ml를 가하여 녹인 후 0.1% ammonia 시액 1000 ml를 넣고 청녹색이 황·적색으로 될 때까지 흔든 후 방치하였다. 분리된 DCE를 취하여 세액에서 thiocyan 이온이 검출되지 않고(ammonium ferric sulfate 시액) 알칼리성이 없어질 때까지 물로 세척한 후 무수 sodium sulfate 10 g을 놓은 여지로 여과하였다. 여액을 감압건조한 잔사를 실리카겔을 충진한 칼럼에 놓고 *n*-butanol:water:acetic acid glacial(7:2:1)의 혼합액 100 m*l*로 세척한 후 ethanol로 재결정하여 알칼로이드를 단리하였다.

추출 및 경시변화

수용액에 생성된 알칼로이드 착화합물을 DCE, chloroform, dichloromethane, benzene, methylisobutylketone 또는 ether에 전용시키려고 추출의 정도를 확인하였다. 또한 알칼로이드 착화합물이 생성되는 수용액에 일정량의 Clark-Lubs, McIlvaine, Sφrensen 완충액(pH 3.0~7.0)을 가하여 정량법에 따라 조작한 후 흡광도를 측정하여 알칼로이드 착화합물의 생성과 유기용매의 전용을 확인하고 실온에 방치하며 경시변화를 검토하였다.

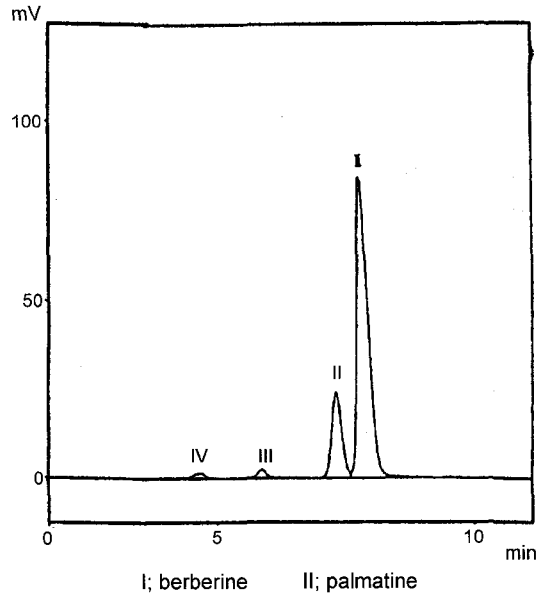

Fig. 1. HPLC Profile of the isolated alkaloids from Coptidis rhizoma.
column; μ-Bondapak C_{18} Waters, mobile phase; acetonitrile: Methanol: Water (2.5:2.5:5), potassium dihydrogen phosphate 2 g/*l* mobile phase detector ;UV detector(345 nm), column temp.; 40°C, flow rate; 1.2 ml/min.

HPLC

황련에서 단리한 알칼로이드용액에 berberine chloride와 palmatine chloride 표준액을 첨가하여 Fig. 1의 HPLC 조건으로 분리된 크로마토그람의 유지시간과 피크폭의 변화로 알칼로이드의 종류를 확인하였다.

극대흡수파장

알칼로이드 용액을 추출한 DCE, 황련 20 mg, 제제 I 66.8 mg, 제제 II 120 mg을 각각 취하여 정량법에 따라 조작한 알칼로이드 착화합물의 DCE 용액으로 250~510 nm의 파장변화에 따른 극대흡수파장을 측정하였다. 또한 황련과 제제 I 및 제제 II의 극대흡수파장도 510~700 nm의 파장에서 측정하였다.

검량선

알칼로이드 용액 2, 4, 6 ml를 3개의 시료병에 취하여 PHP 5 ml, TCR 3 ml와 DCE 10 ml를 각 시료병에 가하고 정량법에 따라 조작한 후 625 nm의 극대흡수파장에서 흡광도를 측정하여 검량선(회귀식)을 만들었다.

정량법

2개의 시료병에 제제 I은 60~130 mg, 제제 II는 120~

240 mg을 취하여 0.1 mM HCl 5 ml, PHP 5 ml, TCR 2 ml 및 DCE 10 ml를 가하고 30분 동안 초음파로 처리한 후 탈지면으로 여과하였다. 여액을 잠시 방치하고 분리된 DCE를 취하여 3분 동안 원심분리 한 후 625 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선의 회귀식으로 제제 I 및 II 중 황련 알칼로이드를 정량하였다.

재현성시험

황련 20 mg, 제제 I 66.8 mg, 제제 II 120 mg을 3개의 시료병에 취한 후 정량법에 따라 조작하여 황련 알칼로이드와 제제 I, II 중의 황련 알칼로이드를 정량하였다. 같은 방법으로 3회 조작하여 설정한 정량법의 정확도와 정밀도의 재현성을 확인하였다.

회수시험

제제 I, 66.8 mg, 제제 II, 120 mg을 2개의 시료병에 취하여 각 시료병에 알칼로이드용액 2 ml를 가한 후 정량법에 따라 조작하여 첨가한 알칼로이드용액 2 ml(알칼로이드 1 mg) 중 알칼로이드를 정량하였다. 같은 방법으로 3회 조작하여 제제 I과 II 중 이종성분과 공존물질에 의한 알칼로이드의 회수율을 검토하였다.

실험결과 및 고찰

알칼로이드의 단리

황련 20 g으로 알칼로이드 착화합물(청녹색 분말) 2.8409 g을 만들었으며 알칼로이드 착화합물로 알칼로이드(황색 분말) 0.9153 g을 단리하였다.

추출 및 경시변화

수용액에 생성된 알칼로이드 착화합물은 DCE, chloroform 또는 dichloromethane에 양호하게 추출되었지만 수용액과 분리가 용이하고 비점이 높은 DCE를 추출용매로 선정하였다. benzene은 흡광도가 현저히 적었고 methylisobutylketone과 ether은 TCR까지 추출되어 청색을 보였다. 또한 Clark-Lubs, McIlvaine, Sφrensen 완충액 모두 pH 4.0~5.0에서 알칼로이드 착화합물이 DCE로 잘 전용되었고 안정성도 증대되었으며 실온에 72시간까지 방치하여도 흡광도의 변화는 없었다.

HPLC

황련에서 단리한 알칼로이드용액의 크로마토그람은 Fig. 1과 같았으며 알칼로이드용액에 berberine과 palmatine표준액을 첨가하여 나타나는 크로마토그람의 유지시간과 피크 폭의 변화 없이 I이 berberine이고 II가 palmatine이었다.

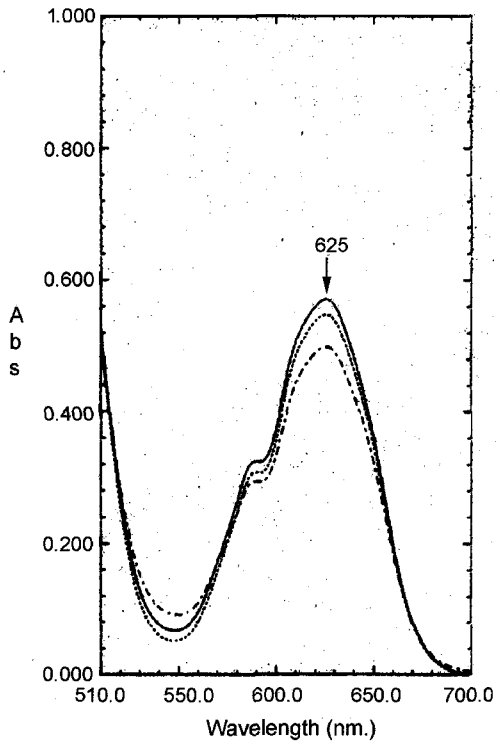

Fig. 2. The absorption spectrum of visible regions.
——— : Complex DCE solution of isolated alkaloids from Coptidis rhizoma
-------- : Complex DCE solution of Coptidis rhizoma alkaloids in Sam-Hwang-Sa-Sim-Tang
—·— : Complex DCE solution of Coptidis rhizoma alkaloids in Hwang-Ryen-Tang

극대흡수파장

알칼로이드 용액을 추출한 DCE, 황련, 제제 I 및 II를 정량법으로 조작하여 추출한 DCE는 250~510 nm의 파장범위 중 271, 355 및 447 nm에 극대흡수가 모두 있었고 510~700 nm의 파장범위 중 Fig. 2와 같이 625 nm에 극대흡수가 모두 있었다.

검량선

알칼로이드 용액(알칼로이드) 2 ml(1 mg), 4 ml(2 mg), 6 ml(3 mg)을 취한 후 정량법에 따라 4회 조작하여 측정한 흡광도의 평균값은 0.21, 0.40, 0.61로 원점을 지나는 직선이 되었다. 이 때의 상대표준편차(SR%)는 1.18, 1.09, 0.55로 알칼로이드의 농도가 증가됨에 따라 감소되었으며 회귀식은 Y(Abs.)=2.54X(mg), (r^2=0.997)이었다.

재현성시험

황련 20 mg, 제제 I 66.8 mg, 제제 II 120 mg을 취하여 4회 정량한 황련 알칼로이드의 평균값은 황련이 1.81 mg

Table I. Reproducibility test

Sample No.	Preparation I		Preparation II	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1.	1.73	8.7	1.73	8.7
2.	1.74	8.7	1.71	8.6
3.	1.75	8.8	1.72	8.6
4.	1.74	8.7	1.71	8.6
m.	1.74	8.7	1.72	8.6
SR%		0.7		0.7

Table II. Recovery test

Sample No.	Preparation I		Preparation II	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1.	2.71	97.0	2.70	98.0
2.	2.72	98.0	2.69	97.0
3.	2.71	97.0	2.71	99.0
4.	2.73	99.0	2.70	97.0
m.	2.72	97.8	2.70	98.0
SR%		1.3		1.0

(9.1%), 상대표준편차는 1.1%이고 Table I과 같이 제제 I이 1.74 mg(8.7%), 상대표준편차는 0.7%, 제제 II가 1.72 mg (8.6%)으로 상대표준편차는 0.7%이었다.

회수시험

제제 I 66.8 mg, 제제 II 120 mg에 알칼로이드 용액 2 ml를 가하여 4회 정량한 알칼로이드의 평균값은 Table II와 같이 제제 I이 2.72 mg, 제제 II가 2.70 mg이었다. 첨가한 알칼로이드 용액 2 ml(알칼로이드 1 mg)에 대한 회수율은 제제 I이 0.98 mg(97.8%)이며 상대표준편차는 1.3%이고 제제 II는 0.98 mg(98.0%)이며 상대표준편차는 1.0%이었다.

결 론

제제 I 및 II에서 황련 알칼로이드를 메탄올 등의 용매로 추출하지 않고 직접 알칼로이드 착화합물로 만든 후 DCE로 추출하였으며 이 방법으로 황련에서 단리한 알칼로이드를 표준품으로 제제 I과 II에서 황련 알칼로이드를 흡광도 측정법으로 정량하였다. 황련에서 단리한 알칼로이드는 berberine, palmatine 등이었으며 알칼로이드 착화합물은 DCE에 녹아 625 nm에서 극대흡수파장이 있었고 검량선의 회귀식은 Y(Abs.)=2.54X(mg), (r^2=0.997)이었다. 제제 I과 제제 II 중 황련 알칼로이드의 함량은 I이 1.74 mg으로 8.7%이고 II는 1.72 mg으로 8.6%이었다. 또한 알칼로이드 용액 2 ml(알칼로이드 1 mg)의 첨가에 대한 회수율은 제제 I이 0.98 mg(97.8%)이고 제제 II는 0.98 mg(98.0%)이었다.

감사의 말씀

이 논문은 우석대학교 학술연구조성비로 연구되었으므로, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Namba, T. (1993) The Encyclopedia pf Wakan-Yaku(Traditional Sino-Japanese Medicines) with Color Picture vol. I, p. 154-158. Hoikusha, Osaka.
2. Sakai, T. (1979) Application of Thermochromism in Spectrophotometric Analysis: Selective Determination of Berberine in Pharmaceuticals by Solvent Extraction. *J. Pharm. Sci.* 68: 875-877.
3. El-Masry, S., Korany, M. A. and Abou-Donia, A. H. A. (1980) Colorimetric and Spectrophotometric Determination of Hydrastis Alkaloids in Pharmaceutical Preparations. *J. Pharm. Sci.* 69: 597-598.
4. Akada, Y., Kawano, S. and Tanase, Y. (1980) High-speed liquid chromatographic analysis of drugs. X. Simultaneous determination of acrinol and berberine chloride in pharmaceutical preparation. *Yakugaku Zasshi* 100: 766-770.
5. Sawada, T., Yamahara, J. and Morika, E. (1973) The Assay of Berberine-Alkaloids by CM-Sephadex(II); The Quantitative Analysis of Berberine in Crude Drug Preparations. *Syoyakugaku Zasshi* 27: 106-109.
6. Misaki, T., Sagara, K., Ojima, M., Kakizawa, S., Oshima, T. and Yosihzawa, H. (1982) Simultaneous Determination of Berberine, Palmatine and Coptisine in Crude Drugs and Oriental Pharmaceutical Preparations by Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 354-357.
7. Lee, H. S., Eom, Y. E. and Eom, D. O. (1999) 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: 59-63.
8. Lin, S. J., Tseng, H. H., Wen, K. C. and Suen, T. T. (1996) Determination of gentiopicroside, mangiferin, palmatine, berberine, baicalin, wogonin and glycyrrhizin in the traditional Chinese medicinal preparation Sann-Joong-Kuey-Jian-Tang by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A* 730: 17-23.
9. Okamura, N., Miki, H., Ishida, S., Ono, H., Yano, A., Tanaka, T., Ono, Y. and Yagi, A. (1999) Simultaneous Determination of Baicalin, Wogonoside, Baicalein, Wogonin, Berberine, Coptisine, Palmatine, Jateorrhizine and Glycyrrhizin in Kampo Medicines by Ion-Pair High-Performance Liquid

Chromatography. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 1015-1021.
10. Chen, Y. R., Wen, K. C. and Her, G. R. (2000) Analysis of coptisine, berberine and palmatine in adulterated Chinese medicine capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Chromatography A* 866: 273-280.
11. Sakai, T. (1983) Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Quaternary Ammonium Salts in Drugs by Ion-pair Extraction with Bromphenol Blue and Quinine. *Analyst* 108: 608-614.
12. Philip, W. W. and Charles, G. D. (1951) Nature of the Cobalt Thiocyanate Reaction. *Anal. Chem.* 23: 334-337.
13. Leonard, I. K. and Elizabeth, G. (1950) Spectrophotometric Studies of Cobalt(II) Thiocyanate Complexes in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 72: 5659-5662.

(2002년 4월 6일 접수)