

흡광도 측정법에 의한 오수유탕 중 오수유 알칼로이드의 정량

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

Determination of Evodiae Fructus Alkaloids in O-Su-You-Tang by Spectrophotometric Method

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 Evodiae Fructus is known for containing a number of indolquinazoline and quinoline type alkaloids. Evodiamine, evocarpine and rutaecarpine are the major constituents of alkaloids. These alkaloids were isolated and determined by forming complex compounds from Evodiae Fructus in O-Su-You-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. The method proved to be rapid, simple and reliable for the isolation and the determination of the alkaloids in O-Su-You-Tang.

Key words – Evodiae Fructus, O-Su-You-Tang, determination, spectrophotometric method

오수유탕의 약효성분인 오수유(Evodiae Fructus)는 *Evodia officinalis* 또는 *E. rutaecarpa*와 기타 동속·근연식물(산초나무과)의 덜 익은 열매이다.¹⁾ 성분은 indolquinazoline²⁾과 quinolone type 알칼로이드 외에 synephrine과 미량의 염기 성분도 있다.^{3,4)} 오수유 또는 오수유탕 중 알칼로이드의 정량은 HPLC 법이 보고⁵⁻⁹⁾되었으나 흡광도측정법으로 정량한 보고는 없다. 저자 등은 indolquinazoline 및 quinolone type 알칼로이드가 산성에서 ion pair를 형성하면 thiocyanatocobaltate complex ion¹⁰⁾과 물에 녹지 않는 청 녹색의 착 화합물¹¹⁾을 만들고 이 착 화합물을 1,2-dichloroethane으로 추출하면 파장 625 nm에 새로운 극대흡수가 나타나 오수유에서 분리한 알칼로이드¹²⁾를 표준품으로 오수유탕 중 알칼로이드를 정량할 수 있어 보고한다.

재료 및 방법

재료 및 시약 – 오수유와 기타의 생약은 전북 남원시에서 시판되고 있는 것을 구입하여 공동실험자인 임종필 교

수님과 김대근 교수님이 감정한 것을 사용하였다. 백삼 1.00 g, 생강 2.00 g, 대추 1.33 g을 혼합한 후 세말로 만들어(4.33 g) 제습기에 보관하면서 시료량을 취할 때마다 세말 4.33 g에 오수유 1.33 g의 비로 첨가하여 사용하였다(오수유탕이라 함). Cobaltous nitrate, ammonium thiocyanate는 Sigma Co.(미국)제품을, 1,2-dichloroethane (DCE라 함)은 Wako Chem. Co.(일본) 제품을, 기타의 시약은 특급을 사용하였다. Potassium hydrogen phthalate 시액(PHP라 함)은 potassium hydrogen phthalate 1.021 g을 물에 녹여 100 ml로 만들었고 thiocyanatocobaltate[II] 시액(TCR이라 함)은 cobaltous nitrate 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 분리 – 오수유탕 212.7820 g(오수유 50 g)을 취하여 물 400 ml를 넣고 20분 동안 가운하였다. 방치하여 식힌 후 1 mM 염산 10 ml와 TCR 50 ml를 넣어 흔들고

*교신저자(E-mail) : doeom@core.woosuk.ac.kr
(FAX) : 063-290-1567

chloroform 100 ml를 가한 다음 1시간 동안 방치하였다. 거즈로 여과한 잔사에 chloroform 70 ml를 넣고 같은 방법으로 2회 더 조작하였다. 여액을 합하여 분리된 chloroform을 취한 후 무수 황산나트륨 1 g을 놓은 여지로 여과하였다. 여액을 60°C에서 감압건조한 후 hexane으로 세척하여 알칼로이드 착 화합물을 만들었다. 이 착 화합물을 chloroform 100 ml에 녹이고 0.01% 암모니아수 100 ml를 가하여 청 녹색이 황색으로 될 때까지 흔든 후 방치하였다. 분리된 chloroform을 취하여 무수 황산나트륨 1 g을 놓은 여지로 여과한 여액을 감압건조한 후 petroleum ether로 세척하여 오수유탕 중 오수유 알칼로이드를 분리하였다(알칼로이드라 함).

추출 및 경시변화 - 오수유탕에 TCR을 넣어 수용액에 생성된 알칼로이드의 착 화합물을 유기용매로 전용하기 위하여 DCE, chloroform, benzene, methylisobutylketone, ether 일정량을 넣고 추출한 후 흡광도를 측정하였다. 또한 수용액에 Clark-Lubs, McIlvaine, Sørensen 완충액을 넣어 pH 3.0~7.0 범위에서 알칼로이드 착 화합물의 추출과 추출된 착 화합물의 안정성을 확인하였고 극대흡수파장을 측정 한 착 화합물의 chloroform과 DCE 용액을 실온에 방치 하면서 경시변화를 확인하였다.

HPLC - 오수유탕을 조제하기 위하여 가온할 때 오수유 알칼로이드의 변화를 검토하기 위하여 알칼로이드와 오수유에서 분리한 알칼로이드를 이동상에 녹인 후 HPLC의 조건¹²⁾으로 조작하여 분리되는 크로마토그램의 유지시간을 비교하였다.

극대흡수파장 - 오수유탕과 오수유를 취하여 정량법에 따라 조작한 후 500~700 nm의 파장변화에 따른 극대흡수 파장을 측정하였다.

정량법 - 일정량(알칼로이드로 3.5~5.0 mg)의 오수유탕을 달아 시료병에 넣고 0.1 mM HCl 3 ml, PHP 5 ml, TCR 2 ml 및 DCE 10 ml를 가하여 60분 동안 흔들었다. 잠시 방치하여 분리된 DCE를 취한 후 3분 동안 원심분리하고 625 nm의 극대흡수파장에서 흡광도를 측정하여 검량선의 회귀식 $y = 0.127x - 0.01 (r^2 = 0.998) \rightarrow x = (y + 0.01)78.74$ (y = 흡광도, x = 알칼로이드의 mg)¹²⁾으로 오수유탕 중 알칼로이드를 정량하였다.

재현성 시험 - 오수유탕 1276.7 mg을 시료병에 넣고 정량법에 따라 조작하여 알칼로이드를 정량하였다. 같은 방법으로 오수유탕 중 알칼로이드를 3회 정량하여 설정한 정량법의 정확도와 정밀도를 확인하였다.

회수시험 - 오수유탕 1276.7 mg을 시료병에 넣고 알칼로이드 10 mg을 가하여 정량법에 따라 조작하였다. 같은 방법으로 3회 조작하여 오수유탕에 첨가한 알칼로이드 10 mg의 회수율을 검토하였다.

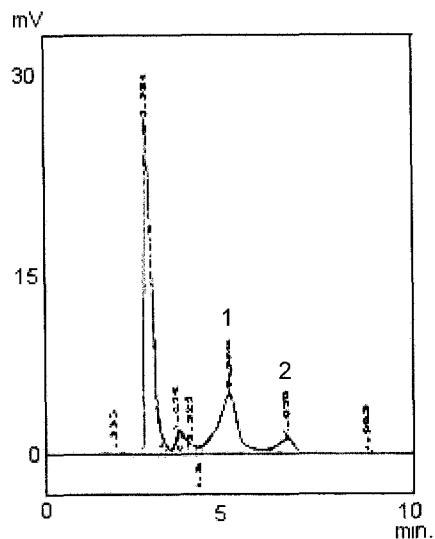
결과 및 고찰

알칼로이드의 분리 - 오수유탕 212.7820 g으로부터 청녹색의 착화합물 0.7917 g을 만들었으며 이 착화합물을 분해하여 연한 황갈색 알칼로이드 분말 0.3015 g을 분리하였다.

추출 및 경시변화 - 수용액에 생성된 알칼로이드 착 화합물의 추출용매는 DCE, chloroform이 양호하였다. 따라서 추출용매로 오수유탕 중 알칼로이드는 chloroform을, 그리고 정량법은 DCE를 사용하였다. benzene은 흡광도가 현저히 적었으며 methylisobutylketone과 ether은 TCR도 전용되어 쓸 수 없었다. 또한 Clark-Lubs, McIlvaine, Sørensen 완충액의 pH 4.0~5.0 범위에서 수용액의 착 화합물이 chloroform 및 DCE에 잘 전용되었으며 착 화합물의 안정성도 증대되었고 착 화합물의 chloroform과 DCE 용액은 실온에서 72시간 이후까지 흡광도의 변화가 없었다.

HPLC - 알칼로이드의 HPLC 크로마토그램은 evodiamine과 rutaecarpine의 유지시간이 Fig. 1과 같이 evodiamine이 5.42분, rutaecarpine이 7.11분에서 분리되어¹²⁾ 오수유탕을 제조하기 위한 20분 동안의 가온으로 오수유 알칼로이드의 변화가 없었다.

극대흡수파장 - 오수유 및 오수유탕 중 알칼로이드의 착 화합물은 Fig. 2와 같이 625 nm와 660 nm에서 극대흡수파



1 : evodiamine (5.42 min.) 2 : rutaecarpine (7.11 min.)

Fig. 1. HPLC profile of the isolated alkaloids from O-Su-Yu-Tang. conditions column; 7 μm-octadecyl silylic silica gel (i.d. 4 mm, l. 25 cm) mobile phase; CH₃CN:H₂O:85% Phosphoric acid (60:40:0.1, pH 2.5-2.8) detector : UV detector (344 nm) flow rate; 1.0 ml/min. column temperature; 40°C.

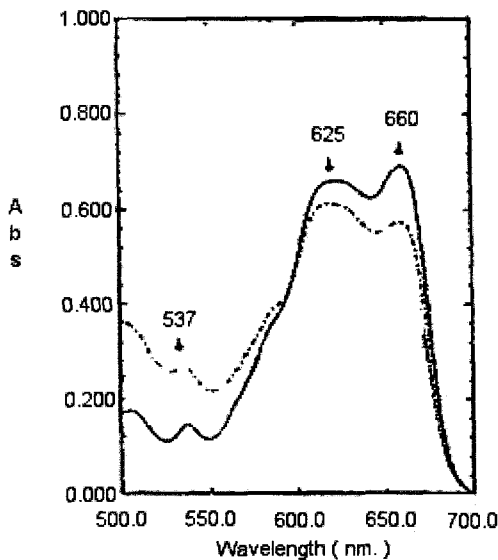


Fig. 2. The absorption spectrum of visible regions.

————— : Complex DCE solution of Evodiae Fructus alkaloids maximum absorption wavelength 625 and 660 nm.
 : Complex DCE solution of O-Su-You-Tang alkaloids maximum absorption wavelength 625 and 660 nm.

Table I. Reproducibility and recovery test

	Reproducibility test		Recovery test	
	mg	%	mg	%
1	44.14	14.72	9.53	95.3
2	43.23	14.41	9.45	94.5
3	42.91	14.30	9.84	98.4
4	44.57	14.86	9.76	97.6
m	43.94	14.65	9.69	96.9
S _R %		2.09		1.98

장을 보였으며 오수유탕을 제조하기 위한 20분 동안의 가온으로 극대흡수파장의 변화가 없었다. 그러나 오수유탕에서 660 nm의 극대흡수파장의 흡광도가 적어 정량법의 극대흡수파장을 625 nm로 선택하였다.

재현성시험 - 오수유탕 1276.7 mg 중 알칼로이드의 함량은 Table I과 같이 평균치가 43.94 mg으로 14.65%이었다. 이 때의 상대표준편차는 2.09로 오수유탕 중 공존생약으로 인한 이종성분은 정량법의 정확도와 정밀도에 영향이 없었다.

회수시험 - 오수유탕에 첨가한 알칼로이드 10 mg의 회수율은 Table I과 같이 4회의 평균치가 9.69 mg으로 96.9%이었다. 이 때의 상대표준편차는 1.98로 오수유탕 중 공존생약으로 인한 이종성분은 정량법의 회수율에 영향이 없었다.

결 론

오수유탕을 제조할 때 가온에 의한 오수유 알칼로이드의 변화가 없음을 HPLC 법으로 확인하였으며 분리한 오수유 알칼로이드를 표준품으로 오수유탕 중 알칼로이드를 흡광도측정법으로 정량하였다. 재현성시험은 오수유 중 알칼로이드의 평균함량이 14.65%로 상대표준편차는 2.09이고 첨가한 알칼로이드 10 mg에 대한 회수율은 96.9%로 상대표준편차는 1.98이었다.

사 사

이 논문은 우석대학교 학술연구조성비로 연구되었으므로, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Namba, T. (1993) The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with Color Picture vol. I, 233-235. Hoikusha, Osaka.
- 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.
- Kamikado, T., Chang, C. F., Murakoshi, S., Sakurai, A., and Tamura, S. (1976) Isolation and structure elucidation of three quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa*. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 605-609.
- Tang, Y. Q., Feng, X. Z., and Huang, L. (1996) Quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa*. *Phytochemistry* **43**: 719-722.
- Kano, Y., Yasuda, M., Saito, K., and Komatsu, K. (1989) Simultaneous and quantitative analysis of alkaloids in *Evodia Fruit*. *Shoyakugaku Zasshi* **43**: 339-342.
- Peng Y. T., Shum A. Y., Tasi T. H., Lin L. C., and Chen C. F. (1993) High-performance liquid chromatography of the quinazolinocarboline alkaloid dehydroevodiamine. *J. Chromatogr. B* **617**: 87-93.
- Ko, H. C., Tsai, Y. H., Chou, C. J., Hsu, S. Y., Li, S. Y., and Chen C. F. (1994) High-performance liquid chromatographic determination of rutaecarpine in rat plasma; application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* **655**: 27-31.
- Jeng, K. F., Lin, Y. H., Lin, L. C., Chou, C. J., Tsai, T. H., and Chen, C. F. (1995) High-performance liquid chromatographic determination of evodiamine in rat plasma; application to a pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B* **668**: 343-345.
- Ueda, J., Momma, N., Yamauchi, Y., Yoshie, F., and Ohsawa, K. (1996) A simultaneous determination of evodiamine and rutaecarpine in oriental pharmaceutical decoctions containing

- Evodia fruit by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi* **116**: 59-64.
10. Philip, W. W. and Charles, G. D. (1951) Nature of the cobalt thiocyanate reaction. *Anal. Chem.* **23**: 334-337.
 11. Leonard, I. K. and Elizabeth, G. (1950) Spectrophotometric studies of cobalt(II) thiocyanate complexes in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **72**: 5659-5662.
 12. S. E. Kim, D. K. Kim, T. Y. Shin, J. P. Lim, and D. O. Eum (2003) Isolation and Determination of Alkaloids in *Evodiae Fructus* by forming Complex Compound. *Kor. J. Pharmacogn* **34**: 206-209

(2004년 2월 12일 접수)