

薄層크로마토그래피법에 의한 生藥製劑의 規格化

池 亨 浚

서울대학교 生藥研究所

Standardization of Oriental Drug Preparations by Thin Layer Chromatography

Hyung Joon CHI

Natural Products Research Institute, Seoul National University
Seoul, Korea

天然性 醫藥品인 生藥(또는 漢藥材)은 製藥原料, 輸出用 및 投藥用등으로 그 需要가 增加一路에 있다. 더우기 國產 天然資源을 利用한 生藥製劑의 開發이 活潑하여짐에 따라서 이들 生藥의 品質管理를 위하여 理化學的 試驗法에 의한 規格制定의 必要性이 切實히 要請되고 있는 實情이다.

現在까지 大部分의 生藥은 形態學的 試驗과 生藥 一般試驗法에서 엑시스와 灰分의 含量등을 規定하여 品質管理되었고 有效成分이나 主成分이 밝혀져 있어서 理化學的 試驗法이나 生物學的 試驗法에 의하여 品質管理되어지고 있는것은 一部 品目に 지나지 않는다. 더우기 生藥製劑에 있어서는 配合된 生藥中 몇가지를 確認試驗하고 있다.

生藥은 野生品을 採取하여 供用하는것이 大多數이며 栽培生産하는 것은 一部에 지나지 않는다. 따라서 品質이 均一하지 못하고 醫藥品인 生藥을 農產物 取扱함으로서 일어날수있는 차질을 없애고 科學的으로 品質이 좋은 生藥만을 取扱하기 위하여서는 生藥의 確認, 鑑別, 有效成分 또는 主成分의 定量法등을 確立할 必要가 있다.

生藥을 鑑別하고 그品質을 評價하는데 있어서 바람직한 手段의 하나로서 薄層크로마토그래피法(以下 TLC로 略함)을 들수 있다. TLC는 微量物質의 分析에 適合하고 比較的 간단한 裝置로서 迅速하게 試驗할수 있

고 分離能力이 좋으며 無機薄層(silica gel, alumina)을 쓸것같은 腐蝕성이 강한 發色試藥으로서도 呈色시킬수 있다는 長點이 있는것이다. 現今에 이르러서는 天然 有機化合物의 分離, 合成 및 生合成등의 研究에 배울수 없는 手段으로 應用되고 있다.

TLC에 의한 鑑別의 對象이되는 生藥의 形態는 全形 또는 切斷生藥中 모양, 색깔, 냄새, 맛등 만으로는 鑑別하기 어려운것과 粉末生藥, 엑시스, 칭크類등을 들수 있다. 또한 TLC에 의한 確認과 成分定量은 모든 全形 또는 切斷 生藥을 對象으로할수 있는 것이다.

TLC의 條件은 두가지 方向으로 選定되어야 할것이다. 즉 各種 生藥이 含有한 特殊成分에 對하여 最適條件을 찾는것과 生藥이 含有한 多成分系를 分離하여 生藥 個個에 對한 特有한 TLC-pattern을 얻는 것으로 大別할 수 있을 것이다.

試料의 檢體調製에 있어서도 이와같은 目的에 따라서 特定成分이 脂溶性物質이면 無極性溶媒로 抽出하고 水溶性物質이면 極性溶媒로, 未知成分인 경우에는 系統的 抽出法을 應用하여 溶媒의 極성과 pH, 分子量등을 考慮하여야 할것이다.

TLC의 理論과 應用에 關하여서는 많은 書籍과 實驗例가 報告되어 있으나 基本的인것을 略述하고자 한다.¹⁻³⁾

薄層의 種類 薄層은 silica gel과 活性 alumina가 가

* This was presented at the Symposium on Standardization of Oriental Drug Preparations, Seoul, Korea on June 2, 1973.

장담이 쓰이며 固着劑로 燒石膏 (5~15%)를 넣은 것과 螢光劑를 添加한 것이 있다. 酸性에서 쓸 때에는 oxalic acid나 boric acid 등의 處理를 하고 알칼리성에서 쓸 때에는 KOH 등으로 浸漬한다. 이외에 buffer solution 이나 $AgNO_3$ 등으로 固定相이나 展開相에 어떠한 形態의 連續的 變化를 갖게 한 gradient TLC ($AgNO_3$ 0%~5%)도 近來에 와서 應用되기 始作하여 分離能을 더욱 良好하게 하고 있으며 paraffin, silicon oil 및 polyethylen glycol 등을 浸漬하는 特殊한 方法도 있다. 또한 硅藻土, 結晶 cellulose (Avicel), polyamide, 珪酸 magnesium, ion-exchange cellulose, cepadex, 및 活性炭素 등도 쓰이고 있으며 固着劑가 들어있는 것은 吸濕되지 않도록 密封하여 保存할 必要가 있다.

薄層의 製作 普通 濕式으로 薄層을 만들며 有機質 以外에는 加熱(105°, 30min)에 의하여 活性化하며 때에 따라서는 乾式으로 薄層을 만들기도 한다. 薄層의 두께는 250 μ 이며 乾燥된 薄層은 150 μ 으로 縮少된다.

Spotting 檢液의 spotting은 硝子로 된 capillary, mess-pipett, micro-sringe 로서 點狀 또는 帶狀으로 하며 帶狀 spotting이 分離能力을 좋게 하는 경우도 있다. 帶狀이나 薄層表面을 傷하지 않고 spotting 하기 위하여 glass-wool로 만든 붓을 쓰기도 한다.

展開 展開法은 一次元展開가 主로 쓰이지만 二次元이나 多重展開도 有效하게 쓰여질 때가 있다. 上昇法과 下降, 水平, 扇形, 圓形, 圓錘 등의 展開法이 있으나 上昇法이 그 裝置가 간단하며 많이 쓰여지고 있다. 展開槽는 硝子製를 쓰는 것이 좋고 槽周圍에 濾紙를 붙혀 溶媒蒸氣의 飽和가 잘 되도록 한다.

展開溶媒 developer system 은 單一 또는 混合系로서 混合系는 無極性과 極性溶媒를 適當히 配合한 2~4 성분系가 많이 쓰여지고 있다. 展開溶媒는 純粹한 것이 必要하며 蒸溜·精製한 것을 써야 한다. 酸과 alcohol로 된 混合系는 放置하면 ester化되며 揮發性이 높은 溶媒는 蒸發하여 混合系의 組成이 變하므로 長期間의 反復再使用은 不可하다. 酸化되기 쉬운 試料가 展開中에 變化되는 것을 防止하기 위하여 展開溶媒에 抗酸化劑를 添加하기도 한다. 한편 酸性物質의 分離에는 HAc, HCOOH 등을 少量 添加하고 alkali 性物質에는 diethylamine, ammonia 水 등을 添加하여 分離能을 좋게 한다.

檢出 chromatogram의 檢出은 試料에 對하여 特異的인 試藥을 噴霧하여 檢出한다. 有色物質은 自然光에서, 無色物質이라도 紫外線下에서 螢光을 發하는 것은 非破壞的인 確認法으로 檢出이 可能하다. 光源은 長波長(3650Å)과 短波長(2536Å)의 紫外線燈이 쓰여지며 暗

所에서 檢出하도록 한다. 發色試藥은 無機質의 薄層에 對하여서는 腐蝕性試藥을 쓸수 있으며 加熱發色시켜 確認하거나 紫外線下에서 生成된 物質의 螢光을 檢査하도록 하면 더욱 銳敏한 檢出이 可能하다. 發色試藥으로서는 黃酸을 steroid類와 有機化合物의 檢出에 쓰며 噴霧한 후 100~120°로 加熱하거나 黃酸에 0.5%의 aldehyde類 (*p*-dimethyl-aminobenzaldehyde, vanillin, anisaldehyde)를 加한 것은 冷時에도 強하게 呈色되며 加熱하면 더욱 뚜렷히 나타난다. 한편 20%(NH_4) $_2$ SO $_4$ 溶液과 黃酸의 混合液은 加熱에 의하여 黃酸과 같은 結果를 나타내며 刺戟性 亞黃酸gas가 發生하지 않으므로 많이 利用되고 있다. 其他 窒酸은 芳香族化合物에 $KMnO_4$ -H $_2$ SO $_4$, $K_2Cr_2O_7$ -H $_2$ SO $_4$ 과 같이 腐蝕性發色試藥으로 쓰인다. iodine는 密封된 容器 바닥에 iodine 結晶을 넣어 加溫하여 주어 iodine蒸氣를 發生케 하여 呈色시킨다. 大部分의 有機化合物은 褐色의 spot가 나타나며 iodine과의 反應은 一般的으로 可逆的이므로 放置하면 脫色된다. $SbCl_5$ 의 $CHCl_3$ 飽和溶液은 terpenoid, steroid등과 特異하게 發色한다. 이외에 phosphotungstic acid, $FeCl_3$, ninhydrine, dragendorff reagent, brom cresol green 등이 그目的에 따라서 應用된다.

Rf值의 測定 分離한 試料의 檢出, 確認이 되면 移動率을 測定하고 擔體, 展開劑의 種類, 溫度 등의 實驗條件을 記錄한다. Rf值는 다음式에 따라서 算出한다.

(Rf值=試料의 spot와 原點間的 距離/展開溶媒의 先端과 原點間的 距離) 溶媒의 展開前線이 鮮明하지 않을 경우에는 따로 標準物質을 定하여 算出할 수도 있다. chromatogram의 記錄은 dressing paper上에 描寫하거나 直接 寫眞으로 撮影한다. 着色像이 長期間 安定한 것은 sandwich하여 保存하는 方法도 있다.

移動率의 再現性 TLC에 있어서 Rf值의 再現性이 있어야 한다. 따라서 展開槽의 모양, 操作法, 溶媒蒸氣의 飽和狀態를 一定하게 하는 것들이 큰 影響을 미친다. 또한 吸着薄層의 活性도와 濕度, 試料의 spotting量, 位置, 薄層의 두께, 展開溫度, 溶媒의 組成 등을 一定하게 하므로서 再現性을 높여야 한다. 한편 適當한 色素나 標準品과 併行展開하여 이들과의 移動距離를 試料의 移動距離와의 比로 表示하는 것도 바람직한 일이다.

定量分析 paper partition chromatography와 같이 TLC도 定量分析을 할 수 있다. 定量하고자 할 때에는 chromatography 操作에 嚴密한 注意를 하여야 하나 特히 薄層에 spotting 하는 試料量을 正確히 할 必要가 있다. 微量의 試料를 正確히 spotting 하기 위하여서는 檢定된 毛細管, pipett 나 micro-syringe를 쓰며 試料量이 많

을 때에는 帶狀으로하기 위하여 여러가지 方法과 裝置가 考案되어있다. 定量하는 方法은 發色된 spot를 抽出하지 않고 直接 定量하는 簡單한 操作과 spot를 끊어내어 抽出하여 比色또는 分光分析등에 의하여 定量하는 方法이 있는데 後者が 誤差가 적다. chromatogram上에서 直接定量하는데는 spot의 面積을 比較하거나 標準試料를 一定하게 稀釋하여 spotting하고 確認限界를 定하고 檢體도 같이 稀釋하여 比較하는 方法이 있으나 이것은 誤差가 큰것이 缺點이다. 近來에는 發色시킨 chromatogram을 densitometry에 의하여 定量하는 densitometer가 有效하게 쓰여진다. chromatogram上에 發色된 spot를 抽出할때에는 試料의 分布가 spot中心에 많고 均一하지 않으므로 試料에 對한 試藥의 濃度は 各點에서 다르며 發色變化된 試料는 普通抽出法으로는 困難하며 背景에 남은 着色部分은 盲檢值를 크게 할뿐아니라 發色에 의한 化學變化는 抽出後 gas chromatography 등의 適用에 妨害要因이된다. 따라서 spot의 位置를 可逆의인 方法(UV, iodine)으로 定하고 薄層을 끊어내어 適當한 溶媒로 抽出하면 95%程度의 回收가 可能함으로 이를 濾過하여 發色시킨후 比色定量하는 方法을 應用하는것이 좋다.

이외에 gas chromatography에 의하여 定量하거나 TLC의 chromatogram을 加熱昇華시키거나, mass-spectrophotometer와 連結하는 方法등도 있다.

TLC를 生藥檢定에 應用한 實例를 紹介할것같은 다음과 같은것을 들수있다.

1969年 Belgium의 VANHAELLEN⁴⁾ Belgium 藥典收載 生藥 및 Galenus製劑의 確認에 있어서 94種의 生藥類를 含有成分에 따라서 anthraquinone, alkaloid, flavonoid, cardiac glycoside, saponin, essential oil 및 resin 등으로 分類하여 이들에 適合한 抽出法과 展開溶媒를 採用하여 藥典各條에서 採用될수 있는 chromatogram의 pattern를 提示하였다.

輸出生藥에 對한 TLC를 利用한 定性的鑑別法은 著者등에⁵⁾ 依하여 輸出生藥 및 漢藥材로서 需要가 높은

50餘種의 生藥을 選定하여 이들을 chemotaxonomy의 知見에서 alkaloid, essential oil, saponin, anthraquinone, nitril-glycoside, coumarin, steroid, flavonol, triterpenoid, organic acid, plant pigment 등의 群으로 나누어 藥典規定에 準하여 Et₂O-ext. alcohol-ext, water-ext.를 만들어 각 extract를 MeOH에 溶解하여 silica gel-plate에서 展開하고 適當한 展開溶媒相, 發色法 및 標準品을 써서 그 chromatogram의 pattern을 描寫하여 報告한바 있다. 이와같은 結果로서 이 方法에 依하여 定性的確認이 可能한 것은 coumarin 誘導體를 基準으로 하며는 미나리科에 屬하는 當歸, 羌活, 白芷, 前胡, 藥木 防風 및 川芎등이 鑑別되고 saponin類를 含有한 도라지科의 桔梗, 蔓蔘, 沙蔘, anthraquinone 誘導體를 含有한 여러科의 土大黃, 和大黃, 羊蹄根, 赤何首烏등과 alkaloid 含有生藥, flavonol 含有生藥, triterpenoid 含有生藥 및 精油含有生藥등이 特히 有意義한 結果를 얻었다. 그러나 이와같은 結果는 試料의 調製, 展開溶媒, 發色劑등에 關하여 더욱 檢討되어야 할 餘地가 있다.

한편 이 方法은 藥典規定의 生藥試驗法中 엑기스含量分析用試料를 그대로 TLC用試料로 應用하여서도 特異性있는 TLC-pattern을 얻을수있으며 極少量의 試料로서도 能히 個個의 生藥을 定性的으로 確認할 수 있고 이 基本 TLC-pattern을 應用하면 生藥複合製劑中에 含有된 個個의 生藥도 檢출할수 있는 基礎資料가 된다고 思料된다.

문 헌

1. 石川幸, 原昭二, 古谷力, 中澤泰男: 薄層크로마토그래피, 基礎와 應用, 南山堂(1963).
2. 橋本庸平, 薄層크로마토그래피, 廣川書店(1963).
3. 今井俊司: 第1回 生藥分析討論會 要旨集(1972).
4. M. VANHAELLEN: *J. Pharm. Belg.* 24, 87 (1969).
5. 池亨浚, 元道喜: 生藥학회지 3, 199~204 (1972).