

## 高速液體크로마토그래피에 의한 生藥製劑中の 桂皮酸 및 桂皮알데히드의 定量

柳 庚 秀 · 宋 保 完

慶熙大學校 藥學大學

### Quantitative Analysis of Cinnamic Acid and Cinnamic Aldehyde in Traditionally Preparations by High Performance Liquid Chromatography

Kyung-soo RYU and Bo-wan SONG

College of Pharmacy, Kyung-hee University

The decoctions and extracts were prepared on the traditionally prescribed four kinds (*Kejigamcho-tang*, *Kejibanha-tang*, *Keji-tang*, *Kejiinsam-tang*) of preparations containing *Cinnamoni Raulus*. The contents of cinnamic acid and cinnamic aldehyde in these preparations were determined by high performance liquid chromatography using reverse phase partition column, and 12% MeOH as eluting solvent. The sample was determined using the two wave length, 254nm and 280nm. This method was sucessfully applied to the analysis of cinnamic acid and cinnamic aldehyde of various preparations containing Cinnamons.

### 緒 論

저자들은 국내에서 유통되는 桂枝 및 桂皮등의 桂皮類 生藥에 함유된 cinnamic acid 및 cinnamaldehyde의 함량<sup>1)</sup>을 검토한 바 있다. Hagiwa<sup>2)</sup>등은 계피류 생약의 성분으로 cinnamic acid를 비롯한 30여종의 성분을 단리하여 보고하였다. 성분분석법은 Schralz<sup>3)</sup>이 GLC를 이용하여 17종의 정유성분과 녹나무과(Lauraceae)에 속한 식물의 정유성분 함량등을 검토한 바 있다. Ross<sup>4)</sup>는 고속액체크로마토그래프(HPLC)를 이용하여 桂皮類 및 桂葉중의 cinnamic aldehyde 및 eugenol의 함량을 측정 비교하였고, 그 후 Wulf<sup>5,6)</sup>은 HPLC 및 spectrophotometer를 사용하여 의약품중의 cinnamic acid 및 benzoic acid 등의 phenolic acid類를 정량하였으며, 宋<sup>7)</sup>은 최근에 逆相分配法을 적용한 HPLC로써 국산 芍藥

중의 benzoic acid 및 paeoniflorin의 함량을 측정 비교한 바 있다.

저자들은 근래 생약제제의 공업화가 이루어지고 있으나 신뢰성이 높은 품질평가법의 개발이 요청되고 있어서 근래 식물성분의 신속하고 효율적인 분석기법의 하나로 응용되어지고 있는<sup>8)</sup> HPLC를 계피류 생약제제중의 성분분석에 적용하고자 본 실험에 착수하였다.

이 논문에서는 桂枝를 함유한 桂枝湯과 이에 관련된 네가지 方劑의 湯液과 그 엑기스를 제조하여 그중에 함유된 cinnamic acid와 cinnamic aldehyde를 HPLC에 의하여 同時定量한 바를 보고하고자 한다.

### 實 驗

#### 가) 材料

桂枝를 비롯한 처방구성 생약 8품목의 재료는

Table I. Prescriptions of erude drug preparations containing *Cinnamomi Raulus* in daily doses<sup>13,14)</sup>

Crude drug Preparation	Prescription							
	1. <i>Kejigamchu-tang</i> (桂枝甘草湯)		2. <i>Kejibanha-tang</i> (桂枝半夏湯)		3. <i>Keji-tang</i> (桂枝湯)		4. <i>Kejiinsam-tang</i> (桂枝人蔘湯)	
<i>Cinnamomi Raulus</i> (桂枝)	4r	7g	2r	4g	3r	6g	4r	6g
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	2	4	2	4	2	4	4	6
<i>Pinelliae Tuber</i> (半夏)			2	4				
<i>Zingiberis Rhizoma</i> (生薑)					3	6	3	6
<i>Paeoniae Radix</i> (芍藥)					3	6		
<i>Ziziphi Fructus</i> (大棗)					12p	6		
<i>Ginseng Radix alba</i> (白蔘)							3	6
<i>Atractylodes Rhizoma</i> (白朮)							3	6
Total amount	11g		12g		28g		30g	

r: Original weight unit ryang(兩), p: piece(片)

각 문헌<sup>9-12)</sup>에 의거한 규격적합품을 선별하여 소  
절하여 건조기속에 보관한 것을 사용하였다.

나) 測定裝置와 試藥

HPLC: Waters Associates Model 440

Column;  $\mu$ -Bondapak/C<sub>18</sub>

( $\phi$  4mm $\times$ 30cm)

UV detector: Waters Associates

Recorder: Huston instrument(strip chart)

Standards: Cinnamic acid(E. Merck), cinnamic  
aldehyde(Kanto Chem.)

다) 處方의 構成

본 실험에 사용한 桂枝 含有湯劑의 처방은 桂  
枝甘草湯, 桂枝半夏湯, 桂枝湯 및 桂枝人蔘湯이  
며 原方<sup>13)</sup>에는 용량이 兩, 片등으로 기재되어  
있어 漢法處方學<sup>14)</sup>의 중량에 의거 환산하였으며  
그 구성내용은 Table I과 같다.

라) 湯液 및 엑기스의 製造

原湯液(I): 환류병각기를 달은 플라스크에 처  
방재료가 30g내외가 되게 桂枝甘草湯(33g), 半  
夏湯(36g), 桂枝湯(28g), 桂枝人蔘湯(30g)을 취  
하여 각각에 약 20배량의 증류수를 넣고 끓는 수  
욕중에서 1시간 가온추출하고 잔사를 증류수로  
세척하여 여액을 각각 처음의 용량으로 조절하  
여 각각을 原湯液(I)의 시료 1~4로 하였다.

在來湯液(II): 옹기로 만든 1.8l용량의 재래식  
약탕관에서 앞의 방법에서와 같이 약제와 물을

넣고 각각 한지(韓紙)로 마개를 덮은 다음 직화  
로 50분간 가열하고 슝으로 여과한 후 잔사를  
온수로 세척하여 각 여액이 처음 넣은 물의 질  
반이 되게 조절하여 在來湯液(II)의 시료 1~4  
로 하였다.

엑기스(III, IV): 湯液(I)의 시료 1~4와 原湯  
液(II)의 시료 1~4를 각각 등분하고 60°이하에  
서 감압증류하여 유동성이 없을때까지 간고시켜  
I에서 얻은 엑기스를 엑기스 III의 시료 1~4,  
II에서 얻은 것은 엑기스 IV의 시료 1~4로 하  
였다.

對照液: 湯液 I, II와 엑기스 III, IV의 제조에  
사용한 재료의 桂枝를 20g씩 정밀히 취하여 20  
배의 용량이 되게 물을 넣고 시료 I~IV을 제  
조할 때와 같은 조건으로 각 대조액을 만들었  
다.

마) 試料의 調製

試料(I, II): 여과하여 얻은 I의 1~4와 II  
의 1~4의 각 湯液을 水室에서 30분 이상 냉  
각한 후 정밀히 等分하고 그 半分에 Et<sub>2</sub>O 60ml  
씩으로 각각 3회 진탕추출하였다. 추출한 용매  
를 합하여 물로 씻고 무수망초로 탈수한 후 용  
매를 서서히 유기한 잔류물에 MeOH 50ml씩을  
넣어 용해시킨 후 각각의 시료로 하였다.

對照液의 試料—桂枝의 에틸엑기스는 본 실험  
에 사용한 桂枝를 中末로한 桂枝 10g을 Soxhlet

장치에서 Et<sub>2</sub>O로 5시간 추출한 후 용매를 유거한 다음 그 잔류물을 MeOH에 용해시켜 100ml로 하였다. 湯液 I, II와 엑기스 III, IV의 대조시료는 앞에서 얻은 I~IV의 시료조제와 같은 조건에서 같은 방법으로 대조시료를 만드렸다.

위에서 얻은 모든 시료의 MeOH용액은 HPLC 주입전에 0.3μ여지(Millipore Co.)로 여과한 후 사용하였다.

바) 定量法

Eluting solvent로 MeOH를 선택하였고 이 용매에 있어서 농도가 30%이상일때는 cinnamic acid와 cinnamic aldehyde의 peak는 거의 근접되었으며 낮은 농도에서는 두 성분의 분리는 좋았으나 retention time이 길어지고 peak가 broad하게 나타났으므로 용매를 12% MeOH로 함과 동시에 retention time 및 peak의 상태를 고려하여 peak reagent인 1-pentane sulfonic acid 및 1-heptane sulfonic acid를 첨가하였던 바 분리능(分離能)이 좋았으므로 Table II와 같은 조건에서 정량하였다.

Table II. Measuring condition in HPLC method

Column: reverse phase partition colum( $\phi$ )
Eluate: 12% MeOH-PIC B-5*-PIC B-7** (100:1:1)
Flow rate: 2ml/min.
Detector: UV 280 or 254nm
Sensitivity: 0.05 AUFS
Chart speed: 0.1 inch/min.
Injection volume: 3~5μl
*1-pentane sulfonic acid **1-heptane sulfonic acid

實驗結果

가) 檢量線

Cinnamic acid 25.00mg 및 cinnamic aldehyde 31.44mg을 정밀히 달아 MeOH에 녹여 모액으로 하고 모액의 2, 4, 8, 16배의 희석액을 column에 주입하여 앞의 정량법에서와 같이 측정하고 주입량과 peak면적과의 관계를 UV detector(254 nm, 280nm)에서 각각 검량하였다.

254nm cinnamic acid:  $y=4.29x$ , cinnamic

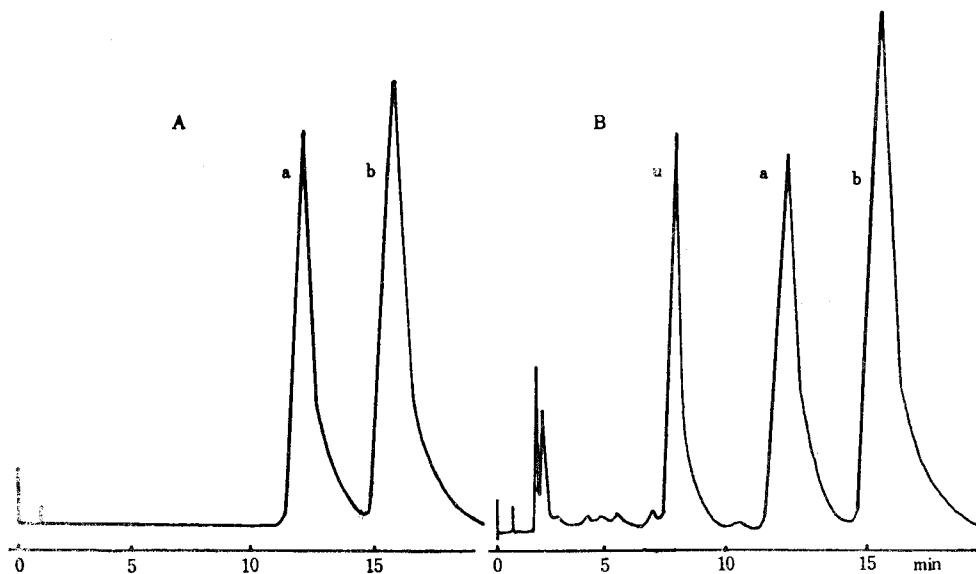


Fig. 1. Chromatogram of standard solution and ether extract from *Cinnamoi Raulus*.

A: Standard solution: cinnamic acid 25mg and cinnamic aldehyde 15.72mg in MeOH 100ml.  
 B: *Cinnamoi Raulus* powder(10g) was extracted with ether from Soxhlet apparatus  
 a: cinnamic aldehyde b: cinnamic acid u: unknown

aldehyde:  $y=1.6x$

280nm cinnamic acid:  $y=6.92x+0.039$ , cinnamic aldehyde:  $y=11.82x-0.128$

로써 모두 직선성을 나타내었다.

나) Cinnamic acid 및 cinnamic aldehyde의 회수율

桂枝湯 1일분(Table I)을 실험방법 4의 原湯液제조에서의와 같이 桂枝湯 原湯液을 만들어 4등분하고 그 1부는 그대로, 다른 3부는 각각에 cinnamic acid 50mg, cinnamic aldehyde 3, 144mg을 MeOH 20ml에 녹인 용액 2ml, 4ml, 5ml를 넣고 Et<sub>2</sub>O 100ml씩으로 각각을 세번 추출한 후

용매를 서서히 유거하고 잔사를 MeOH에 녹여 100ml로 하여 검액으로 하여 시행한 두 물질의 회수율은 Table III와 같다.

다) 原湯液(I)과 在來湯液(II)과의 比較

Cinnamic aldehyde에 있어서는 原湯液이 在來湯液보다 25~30배 가량 높은 수치를 나타내었고 cinnamic acid는 거의 대등한 함량을 나타냈다(Table IV).

라) 原湯액기스(III)와 在來湯액기스(IV)와의 比較

Table V와 같으며 原湯액기스보다 在來湯액기스는 두성분이 모두 적게 나타났다.

Table III. Recovery rates of cinnamic acid and cinnamic aldehyde added to "Keji-tang" in HPLC method decoction.

Experiment No.	Cinnamic acid				Cinnamic aldehyde			
	added(mg)	found(mg)	average	rate(%)	added(mg)	found(mg)	average	rate(%)
1.	5,000	4,913~5,072	4,864	97.28	3,144	3,082~3,242	3,102	98.66
2.	10,000	9,736~9,914	9,748	97.48	6,288	6,073~6,240	6,132	97.52
3.	12,500	12,350~12,416	12,130	98.22	7,860	7,352~7,520	7,462	94.93
Average				97.03				97.66

Table IV. Cinnamic acid and aldehyde contents in decoctions of crude drug preparations containing *Cinnamoni Raulus*

Part	Preparation No.	Content of <i>Cinnamoni Ralus</i> (g)	Cinnamic acid			Cinnamic aldehyde		
			measured (mg)	average (mg)	rate/control (%)	measured (mg)	average (mg)	rate/control (%)
I	Control	10	13.16~14.47	13.71	100.00	89.49~96.03	92.42	100.00
	1.	7	8.94~9.88	9.49	98.89	58.37~64.22	62.88	97.20
	2.	4	5.22~5.85	5.58	101.75	32.46~36.74	34.68	93.81
	3.	6	7.74~8.20	8.04	97.74	52.88~63.06	54.02	97.42
	4.	6	7.78~8.12	7.88	95.79	53.12~59.74	52.46	94.60
II	Control	10	12.53~13.74	13.10	100.00	3.28~3.48	3.35	100.00
	1.	7	8.78~9.23	9.01	98.26	2.15~2.38	2.22	94.67
	2.	4	4.88~5.25	5.10	97.33	1.32~1.59	1.40	104.48
	3.	6	7.78~8.23	8.05	102.42	1.64~1.95	1.89	94.03
	4.	6	7.72~8.16	7.88	100.25	2.04~2.30	2.11	104.98

I : Extracted for one hour with water on the boiling water bath under reflux.

II : Extracted for fifty minutes in domestic drugpot without condenser.

Preparation No. 1: *Kejigamchou-tang*, No. 2: *Kejibanha-tang*, No. 3: *Keji-tang* No. 4: *Kejiinsam-tang* (daily doses).

**Table V.** Cinnamic acid and aldehyde contents in water extracts\* of crude drugs preparations containing *Cinnamoni Raulus*

Part	Preparation No.	Content of <i>Cinnamoni Raulus</i> (g)	Cinnamic acid			Cinnamic aldehyde		
			measured (mg)	average (mg)	rate/control (%)	measured (mg)	average (mg)	rate/control (%)
III	Control	10	9.82~11.06	10.60	100.00	0.98~1.10	1.03	100.00
	1.	7	7.16~ 7.84	7.47	100.87	0.65~0.79	0.73	101.25
	2.	4	3.94~ 4.28	4.15	97.88	0.31~0.45	0.37	89.81
	3.	6	5.68~ 6.56	6.34	99.69	0.58~0.66	0.62	100.32
	4.	6	5.86~ 6.33	6.16	96.86	0.60~0.72	0.67	108.41
IV	Control	10	9.02~ 9.83	9.66	100.00	0.70~0.79	0.74	100.00
	1.	7	6.02~ 6.56	6.43	95.09	0.38~0.51	0.46	88.80
	2.	4	3.78~ 4.45	4.04	104.55	0.27~0.38	0.32	108.11
	3.	6	5.24~ 6.18	5.98	103.17	0.32~0.46	0.40	90.09
	4.	6	5.51~ 5.96	5.72	98.69	0.36~0.46	0.42	94.59

Quantities of crude drugs were equal to those described in Table I and IV

III: Extrats of Part I in Table IV, IV:Extracts of Part II in Table IV\* evaporated to dryness.

**考察 및 結論**

桂枝를 함유한 生藥複合製劑인 桂枝甘草湯, 桂枝半夏湯, 桂枝湯 및 桂枝人蔘湯 등 4方的 湯劑 및 엑기스劑에 함유된 cinnamic acid 및 cinnamic aldehyde를 정량하였다. 桂皮類 生藥의 cinnamic acid 및 cinnamic aldehyde의 정량에 대한 보고는 있으나 이들 계피류 생약을 배합한 복합제제중의 위 두물질의 동시정량에 대한 보고는 아직 접한 바 없어 HPLC를 써서 湯劑 및 엑기스중 두 물질의 정량법을 설정, 비교검토하였다. HPLC를 이용한 cinnamic acid와 cinnamic aldehyde의 분리는 reverse phase column에서 MeOH을 eluting solvent로 사용하였을 때 12%에서 분리능이 양호하였고, peak reagent로 1-pentane sulfonic acid등을 첨가하면 위의 두물질의 동시측정에 있어 방해물질에 대한 장애가 별로 없었으며, 회수율에 있어서 두 물질 모두 97%이상을 제시하였으므로(Table III) 내부표준 물질을 사용하지 않아도 좋았다. 제조한 湯劑 8종, 엑기스劑 8종에 대한 실험결과는 Table IV, V와 같다. 환류냉각기를 달고 끓인 原湯液 I의

1~4에 있어서 대조액에 比한 각 측정치는 桂皮酸(이하 acid) 95.79~101.75%, 桂皮알데히드(이하 aldehyde) 93.81~97.42%를 나타내었으며, 약탕관에서 끓인 在來湯液인 II의 1~4는 acid 97.33~102.42, aldehyde 94.03~104.98%였다(Table IV).

原湯液 I의 1~4 및 在來湯液 II의 1~4를 각각 엑기스화한 III, IV의 1~4의 각 엑기스제제에 있어 前者는 acid 96.86~100.87, aldehyde 89.81~108.41%이었고 後者는 acid 95.09~104.55, aldehyde 88.80~108.11%로 나타났다(Table V).

본 측정치로 미루어 볼 때 acid는 在來湯液을 엑기스화한 桂枝甘草湯엑기스가 가장 낮은 95.09%를 나타내었고 桂枝半夏湯엑기스가 104.55%인 높은 수치를 제시하였으며 aldehyde의 함량은 위에서와 같은 桂枝甘草湯의 재래탕액의 엑기스가 가장 낮은 88.8%였고 桂枝人蔘湯의 환류냉각기를 달고 추출한 원탕액의 엑기스가 가장높은 108.41%를 제시하였다.

측정치의 폭은 acid가 95.09~104.55%이고 aldehyde는 88.80~108.41%이었다.

桂枝含有方劑의 湯液 및 엑기스중의 두 물질

Table VI. Comparison of cinnamic acid and aldehyde content between each decoctions and extrats of *Cinnamoni Raulus*(10g).

Group No.	Sample	Cinnamic acid			Cinnamic aldehyde		
		average (mg)	rate/control (%)	rate/I (%)	average (mg)	rate/control (%)	rate/I (%)
	Et <sub>2</sub> O extract	19.86	100.00	144.86	307.56	100.00	332.79
I.	Reflux decoction	13.71	69.03	100.00	92.42	30.05	100.00
II.	Drugpot decoction(without reflux)	13.10	65.96	95.55	3.35	1.09	3.62
III.	Reflux extract(evaporated dryness)	10.60	53.37	77.32	1.03	0.33	1.11
IV.	Drugpot extrat(evaporated dryness)	9.66	48.64	70.46	0.74	0.24	0.80

의 정량은 쉽게 동시측정을 할 수 있었으나揮發性이며 물에 不溶性인 aldehyde는 예상한 대로 그 實測值에 있어 큰 차이의 손실됨을 나타내었으며, 환류냉각기를 달은 湯液이 가장 두 성분의 손실이 적었고 약탕관에 의한 在來湯液 및 각 엑기스가 매우 컸음을 알 수 있었다.

材料 桂枝의 에틸엑기스와 환류냉각기를 달고 추출한 桂枝만의 原湯液中的 acid 및 aldehyde 두 물질의 함량을 각각 基準으로 하여 각 對照液인 桂枝만의 在來湯液, 原湯液엑기스 및 在來湯液엑기스의 比率는 Table VI과 같다.

Acid 및 aldehyde의 총량이 함유되었다고 할 수 있는 材料 桂枝의 에틸엑기스중의 두 물질을 기준으로 하였을 때 aldehyde는 대조액인 桂枝만의 原湯液의 3.3배, 在來湯液의 92배, 原湯액기스의 거의 300배, 在來湯액기스의 416배의 측정치를 제시하였으며 桂枝만의 原湯液을 기준으로 하면 在來湯液은 1/28, 原湯액기스는 1/90, 在來湯액기스는 무려 1/125 크게 손실되었음을 알 수 있다.

Acid에 있어서는 위의 aldehyde에 비해 그 감소율은 그리 크지 않았음을 제시하였다.

이와같은 결과는 天然物의 제제화에 있어 흔히 있을 수 있는 煎湯 및 엑기스화 過程, 配劑되는 생약의 종류 및 量 등에 따라 揮發·消長·分解·酸化 및 제 3 물질의 生成 등과 같은 이화학적 변화가 야기될 것이라 함은 예측되었으나 本報에서는 이를 충분히 검토하지 못했다.

HPLC에 의한 cinnamic acid 및 cinnamic aldehyde의 同時定량에 있어서의 測定值의 誤差보

다는 前述한 煎湯法 및 엑기스제조과정에 따라서 측정치가 크게 좌우됨을 알 수 있었다. 이러한 補完點을 改善한다면 현재 문제점으로 대두되고 있는 生藥複合製劑의 迅速하고 효율적인 評價方法의 하나로 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

桂枝湯을 비롯한 傳承方劑의 湯劑 및 엑기스화 등의 劑型改善은 제조과정의 補完과 더불어 湯劑以外的 다른 용매에 의한 추출법의 안출 및 生物學的인 活性 등에 대한 보다 廣範圍한 檢討가 뒤따라야 현대의약품에 대등한 製劑開發이 이루어질 것이라 展望된다.

## 文 獻

1. 柳庚秀·宋保完: 경희약대논문집 8, 27 (1980)
2. Haginiwa et al: *Yakugaku Zasshi*, 82, 1441 (1962)
3. Schralz, E. et al: *Planta. Media.*, 25, (1974)
4. Ross, M.S.F.: *J. Chrom.*, 118, 273 (1976)
5. Wulf, E.W. et al.: *J. Chrom.*, 118, 171 (1976)
6. El-Masry, S.: *AOAC*, 62, 82 (1979)
7. 宋保完: 경희약대논문집 8, 21 (1980)
8. Erni, F. and Frei, R.W.: *J. Chrom.*, 130, 169 (1977)
9. 보건사회부: 대한약전 제 3개정판 p.57 (1976)
10. 중앙화학연구소: 생약규격집 p.1 (1959)
11. 보건사회부: 국립보건원원보 4, 7 (1967~70)
12. 柳庚秀 등: 생약학회지 6, 219 (1975)
13. 朴憲泳 譯: 金匱要略 p.214 (1978) 書苑堂 서울
14. 杉原德行: 漢方處方學 傷寒論篇 p.52(1974)