

## 生藥中の甘草에 관한 研究(I)

### HPLC에 의한 Glycyrrhizin 및 Glycyrrhetic acid의 定量

白南豪 · 朴萬基 · 朴政一 · 金重善\* · 徐廷珍\*

서울대학교 藥學大學, 柳韓洋行\*

(Received January 20, 1981)

Nam Ho Paik, Man Ki Park, Jeong Hill Park,  
Chung Sun Kim and Jung Jin Suh

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151 and Yuhan Corporation\* Seoul 150, Korea

### Studies on Licorice in Drug Preparations(I)

#### Determination of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid by HPLC.

**Abstract**—Glycyrrhizin (GA) content in licorice was determined by a couple of methods using HPLC, respectively. In Method(I), GA content itself was determined from the licorice aqueous extract, while in Method(II) glycyrrhetic acid (GHeA: the aglicone of GA) content corresponding to the quantity of GA was measured from the chloroform extract of the hydrolyzed product of licorice aqueous extract. A reverse phase column Hibar® Lichrosorb RP-18 (E. Merck) was used as the stationary phase. As the mobile phase MeOH : H<sub>2</sub>O (0.05M-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)=58 : 42 solution in Method (I), and MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH=78 : 19 : 3 solution in Method (II) were suitable, respectively. The value obtained by Method (II) appeared slightly higher than that by Method (I). The effect of some other herbal drugs on the assay of GA quantity in mixed sample was also observed in both above two methods. By Method (I) *Cassiae Cortex*, *Rehmaniae Rhizoma*, *Paeoniae Radix*, and *Angelicae Radix* gave the subtractive effect on the amount of GA compared with the value from licorice alone. In the case of Method (II) *Cassiae Cortex* and *Rehmaniae Rhizoma* appeared to have subtractive effect but *Paeoniae Radix* and *Angelicae Radix* scarcely showed any influence. *Pachymae Fungus* did not affect the GA content at all. It seems that glycyrrhizin in licorice interacts with certain components of other herbal drugs.

대부분의 漢藥은 몇가지 生藥을 混合하여 다려서 그 抽出液을 服用하도록 處方된다. 이때 이들 生藥中の 各 成分이 다른 成分과 어떻게 相互作用하는지에 대해서는 잘 알려지지 않고 있다. 著者등은 이러한 生藥成分들끼리의 相互作用을 규명하여 漢方의 科學化와 最近에 많이 나오고 있는 生藥製品的 規格化및 品質管理에 기여코자 漢方에서 가장 많이 사용되는 生藥中の 하나인 甘草의 主成分 glycyrrhizin과 그 aglycone인 glycyrrhetic acid에 대하여 HPLC에 의한 定量法을 確立하고 甘草와 다른 生藥의 混合抽出時 glycyrrhizin量의 變化를 檢討하였다.

Glycyrrhizin은 Fig. 1과 같이 2개의 glucuronic acid와 glycyrrhetic acid로 되어 있다. 이 glycyrrhizin의 定量法은 크게 세가지로, 첫째, glycyrrhizin이나 그 鹽의 形態로 定量하는 方法과, 둘째, glycyrrhizin을 加水分解하여 glycyrrhetic acid로서 定量한 다음 glycyrrhizin의 量으로 換算하는 方法, 셋째, glucuronic acid로서 定量하는 方法이 있다<sup>1)</sup>.

Glycyrrhizin 상태로 定量하는 방법에는 中和滴定法<sup>2)</sup>, TLC로 분리후 UV로 定量하는 법<sup>3~4)</sup>, TLC-densitometry<sup>5)</sup>, TLC-FID法<sup>6)</sup> 및 HPLC를 利用한 방법<sup>7~12)</sup> 등이 있으며, 加水分解하여 glycyrrhetic acid로서 定量하는 방법에는 vanillin 發色試藥을 利用한 吸光度法<sup>13~14)</sup>, methylene blue와의 反應을 이용한 比色法<sup>15)</sup>, TLC로 분리후 UV 吸光度를 이용한 定量法<sup>16)</sup>, 加水分解후 glycyrrhetic acid의 silyl 유도체를 만들어 GC로 定量하는 방법<sup>17~20)</sup> 등이 있으며, glucuronic acid로 定量하는 방법에는 重量法<sup>20~21)</sup>이 있다.

또 몇몇 甘草含有 複合生藥製劑에서 glycyrrhizin의 양이 減少된다는 報告<sup>9~18)</sup>가 있어 glycyrrhizin이 다른 生藥의 어떤 成分과 相互作用하지 않는가 하는 추측을 불러 일으키고 있다. 著者 등은 이러한 점에 着眼하여 HPLC를 利用, 甘草中の glycyrrhizin을 glycyrrhizin 자체로 定量하는 방법 (방법 I)과 加水分解하여 glycyrrhetic acid 상태로 定量하는 방법 (방법 II)에 의해 定量하고, 또 甘草와 몇몇 生藥을 1:1로 混合抽出하였을 때의 glycyrrhizin양의 變化를 檢討하였다. 그 結果 몇몇 生藥이 甘草中の glycyrrhizin양에 負(-)의 영향을 주었고, 방법 (I)에 의해 定量한 경우보다 방법 (II)에 의해 定量한 경우의 含量이 더 높게 나타났다.

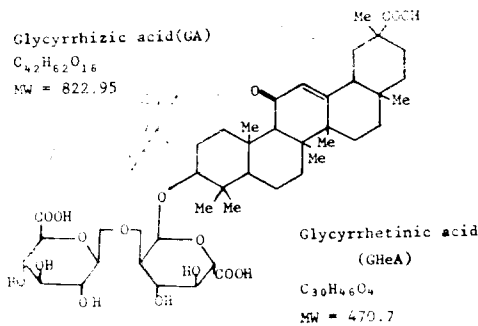


Fig. 1 The structure of glycyrrhizin.

## 實驗方法

**試料 및 試藥**—甘草는 시판 감초를 상온에서 건조하여 中末로 하여 사용하였다.

桂皮, 熟地黃, 茯苓, 芍藥, 當歸 등은 모두 시판품을 사용하였고 熟地黃을 제외하고는 甘草와 같이 中末로 하여 사용하였으며 熟地黃은 粗節로 하여 사용하였다.

試藥으로는 glycyrrhizin (유한양행 제공, 98%), glycyrrhetic acid (E. Merck 제품), methyl alcohol (E. Merck 제품, absolute methanol, chromatography 용), acetic acid (E. Merck 제품)을 使用하였으며 기타試藥은 和光純藥製 特級試藥을 사용하였다.

淨製水는 증류수를 Millipore Super-Q system을 통과시켜 그 저항치가 3mΩ·cm 이상인 것을 사용하였다.

**機器**—Pump는 Waters Model 6000A Solvent Delivery System을 detector는 Waters Model 440 Absorbance Detector를, column은 Hibar Lichrosorb RP-18 (10μm) (E. Merck 제품), 4 mm i. d. × 25cm 그리고 integrator는 Pye Unicam DP101 Computing Integrator를 使用하였다.

**定量條件**—1) Glycyrrhizin의 定量條件: 固定相으로 reverse phase인 Hibar Lichrosorb RP-18 (10μm) column을 사용하고 移動相으로 MeOH/H<sub>2</sub>O 혼액을 사용하여 甘草 extract를 column에 注入시켰다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 이동상의 H<sub>2</sub>O 함량이 높을 수록 glycyrrhizin (GA)의 retention time이 증가하였다. 이동상에 소량의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하여 MeOH : 0.05M—NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 수용액=60 : 40으로 한 결과 Fig. 3의 (a)와 같이 GA의 peak가 3개로 갈라졌고 MeOH : 0.05M—NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 수용액=55 : 45로 한 결과 Fig. 3의 (b)처럼 3개의 peak가 완전히 분리되었다. 이동상의 조건을 여러가지로 바꾸어 검토한 결과 MeOH : 0.05M—NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 수용액=58 : 42 용액이 glycyrrhizin의 定量에 가장 적당하였다.

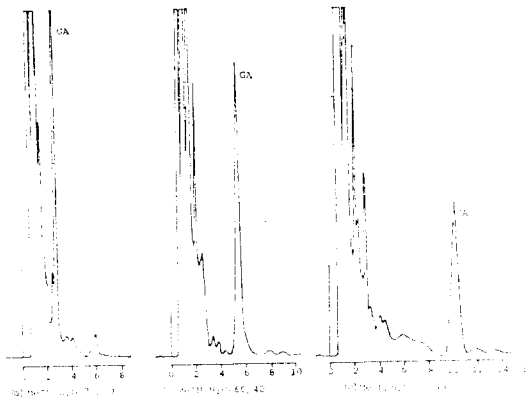


Fig. 2—Chromatogram of licorice extract.

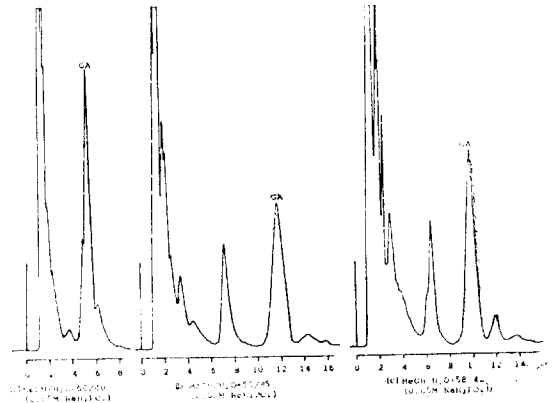


Fig. 3—Chromatogram of licorice extract.

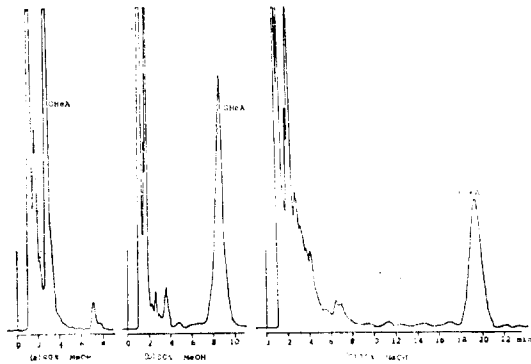
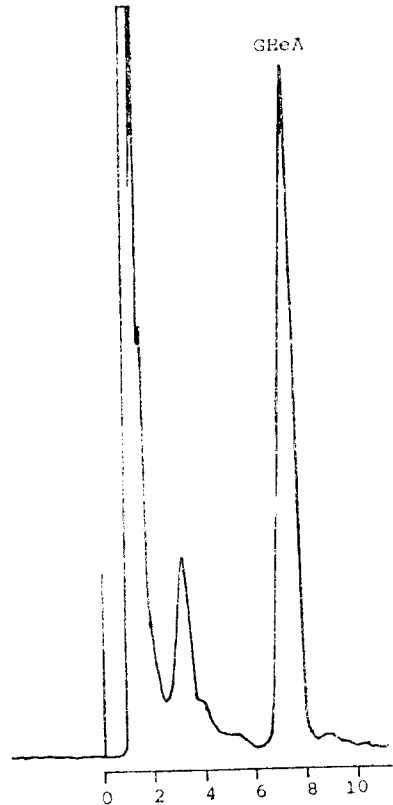


Fig. 4—Chromatogram of licorice (after hydrolysis and  $\text{CHCl}_3$  extraction).

2) Glycyrrhetic acid의 定量 條件 : 甘草 extract에 酸을 가하여 가수분해하고 chloroform으로 glycyrrhetic acid를 추출하여 column에 주입시켰다. Fig. 4는 이동상의  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 비를 여러가지로 변화시켰을 때의 chromatogram을 보인 것이다.  $\text{H}_2\text{O}$ 의 함량비가 많아질수록 glycyrrhetic acid (GHeA)의 retention time이 길어졌다. 여기에 소량의 acetic acid를 가하여  $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{AcOH}$ 의 비율을 여러가지로 바꾸어 본 결과 Fig. 5에서 처럼  $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{AcOH}$ 의 비율을 78 : 19 : 3으로 하였을 때가 retention time도 짧고 분리도 양호하였다.

實驗操作——1) Glycyrrhizin으로 定量할 경



column : Lichrosorb RP-18  $10\mu\text{m}$  25cm $\times$ 4mm  
 eluant :  $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{AcOH}$  (78 : 19 : 3)  
 flow rate : 2.5ml/min pressure : 1300psi  
 detector : UV 254nm sample : licorice after hydrolysis and  $\text{CHCl}_3$  extraction.

Fig. 5—Chromatogram of licorice extract (after hydrolysis and chloroform extraction).

우 (방법 I) : 甘草末 200mg을 精秤하여 250ml 둥근 flask에 넣고 정제수 30ml를 가한 다음 heating mantle上에서 3시간 동안 reflux시켰다. 이것을 100ml 용량 flask에 옮기고 둥근 flask를 EtOH 10ml씩으로 3번 헹구어 EtOH를 용량 flask에 합한다음 H<sub>2</sub>O로 용량 flask의 표선을 채웠다. 이 액을 0.45 $\mu$ m filter로 여과하여 Table I의 조건에서 column에 주입시켰다.

Table I — Conditions of HPLC.

Column	Hibar Lichrosorb RP-18(10 $\mu$ m) 4mm i. d. $\times$ 25cm
Integrator	Pye Unicam DP 101 Computing Integrator (peak width 10, slope sensitivity 150)
Detect	UV 254nm
Mobile phase	Method I ; MeOH : H <sub>2</sub> O (0.05M—NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) = 58 : 42 Method II ; MeOH : H <sub>2</sub> O : AcOH = 78 : 19 : 3
Flow rate	2.5ml/min
Sensitivity	0.01 AUFS
Sample size	10 $\mu$ l

2) 加水分解하여 glycyrrhetic acid로 定量할 경우 (방법 II) :

a) 試料處理—Glycyrrhizin으로 定量할 경우와 같이 甘草末 200mg에 정제수 30ml를 가하여 3시간동안 환류시키고 여기에 3N—H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30ml를 가한 다음 계속해서 1시간 동안 환류시켜 가수분해를 완결시키고 냉각하였다. 여기에 chloroform 30ml를 가하고 다시 30분간 환류시킨 다음 200ml 분액깔대기에 옮겼다. Chloroform층을 둥근 flask에 옮기고 다시 분액깔대기에 chloroform 30ml를 가하고 강진탕한 다음 방치하여 상이 분리되면 chloroform층을 먼저의 chloroform과 합했다. 수층을 chloroform 30ml씩으로 한번 더 추출하여 chloroform층을 모두 합한 다음 감압으로 chloroform을 날려보냈다. 잔사를 EtOH에 녹여 100ml로 한 다음 Millipore filter로 여과하여 Table I의 조건으로 column에 주입시켰다. 따로 표준품 glycyrrhizin을 시료와 동일 조작하여 검량선을 작성하였다.

b) 加水分解 酸의 농도에 의한 영향—甘草 extract를 가수분해시킬 때 산의 농도에 따른

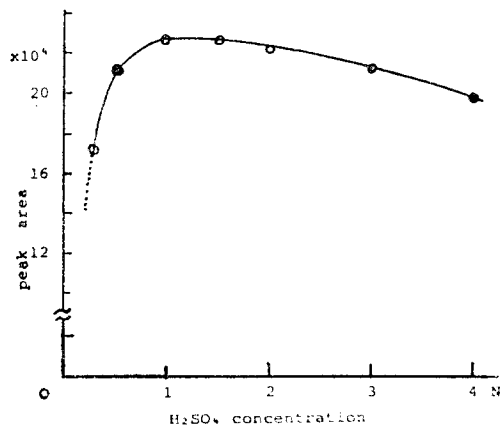


Fig. 6—Effect of acid concentration in the hydrolysis of licorice extract.

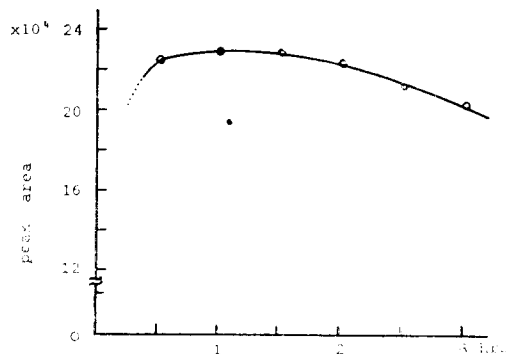


Fig. 7—Effect of hydrolyzing time in the hydrolysis of licorice extract.

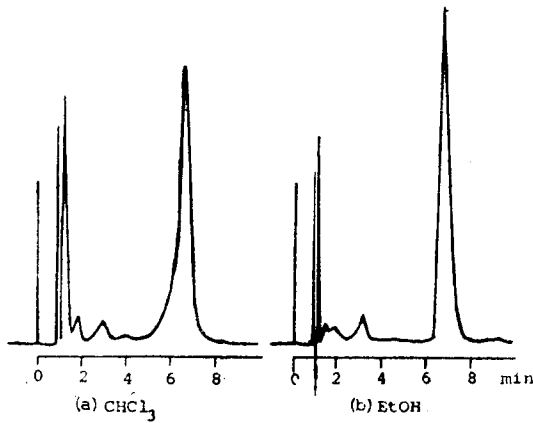


Fig. 8—Effect of solvents in sample extraction. (I) (glycyrrhetic acid).

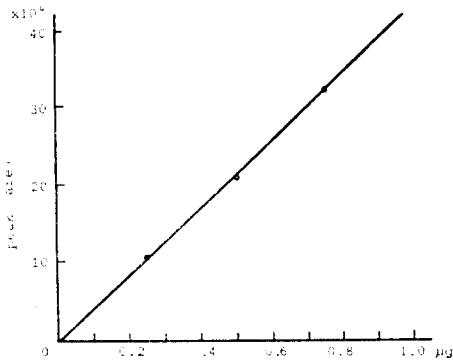


Fig. 10—Calibration curve of glycyrrhizic acid.

해했을 때가 가장 양호하였고 2시간 이상에서는 peak intensity가 감소하였다. 따라서 본실험에서는 1시간 가수분해시켰다.

d) 試料溶媒에 따른 Chromatogram—표준품 glycyrrhetic acid를 각각 chloroform과 ethanol에 녹여 Table I의 조건에서 column에 주입해 본 결과 Fig. 8에서와 같이 chloroform에 녹였을 경우에는 peak의 모양이 좋지 않았고 peak의 앞부분에 leading이 나타났으나 ethanol에 녹였을 경우에는 이러한 현상이 나타나지 않았다. 이러한 solvent effect는甘草 extract의 경우도 마찬가지였고(Fig. 9) 따라서 본실험에서는 가수분해한甘草 extract를 chloroform으로 추출한 다음 chloroform을 날려 보내고 잔사를 ethanol에 녹여 측정하였다. 그러나 어느 경우에도 peak의 면적에는 큰 차이가 없었다.

檢量線—표준품 glycyrrhizin을 Table I의 조건에서 column에 주입시켜 Computing Integrator에서 계산되어 나온 peak area로 검량선을 작성한 결과 Fig. 10과 같이 양호한 직선성을

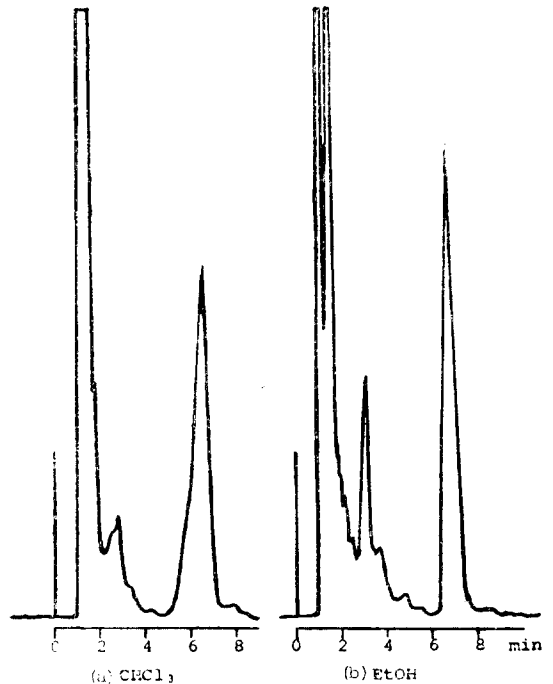


Fig. 9—Effect of solvents in sample extraction. (after hydrolysis and extraction).

Glycyrrhetic acid의 peak intensity의 변화를 검토하였다. Fig. 6에서와 같이  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 농도를 1~2N로 하였을 때가 가장 양호하였고, 본실험에서는 1.5N로 하였다.

c) 加水分解 時間에 의한 영향—황산의 농도를 1.5N로 하여 가수분해 시간에 따른 glycyrrhetic acid의 peak intensity의 변화를 검토하였다. Fig. 7에 나타난바와 같이 1시간 정도 가수분

나타내었다. 또한 표준품 glycyrrhizin을 앞의 glycyrrhetic acid로서 정량할 경우와 같이 처리하여 column에 주입시켜 검량선을 그렸을 경우에도 양호한 직선성을 나타내었다.

### 實驗 結果 및 考察

본실험에서 사용한 甘草中の glycyrrhizin 함량은 glycyrrhizin으로 정량했을 경우 (방법 I)에는 4.32%, 가수분해하여 glycyrrhetic acid로 정량했을 경우 (방법 II)에는 4.40%였다. (본실험에 사용한 감초에서 유리 glycyrrhetic acid는 검출되지 않았다). 또한 감초와 다른 생약을 1:1 (각 200mg)로 혼합추출하여 방법 (I)과 방법 (II)의 두가지 방법으로 정량한 경우의 glycyrrhizin 함량과 회수율 및 변이계수 (coefficient of variation)는 Table II와 같다. (I)의 방법과 (II)의 방법에서의 glycyrrhizin 함량을 비교해 볼때 (II)의 방법으로 정량했을 경우가 더 높게 나타났다. 또한 (I)의 방법으로 정량했을 경우 桂皮, 熟地黄, 芍藥, 當歸 등은 甘草中の glycyrrhizin양에 負(-)의 영향을 주는 것으로 나타났고 이를 가수분해하여 (II)의 방법으로 정량했을 경우 桂皮, 熟地黄은 여전히 負(-)의 영향을 주는 것으로 나타났으나 芍藥 및 當歸는 별로 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며 茯苓은 어느 경우나 별로 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 두가지 방법으로 정량했을 경우 각각의 변이계수를 비교할때 (II)의 방법이 (I)의 방법에 비해 재현성이 더 좋은 것으로 나타났다.

Table II—Analytical results of glycyrrhizin.

Sample	*GA content		**Recovery(%)		C. V (n=6)		Ratio
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)	Conteat (II/I)
<i>Glycyrrhizae Radix</i> only	4.32	4.40	100.0	100.0	0.06	0.03	1.02
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Cassiae Cortex</i>	3.85	4.21	89.1	95.7	0.08	0.05	1.09
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Rehmaniae Rhizoma</i>	3.48	4.00	80.5	91.0	0.07	0.05	1.15
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Pachymae Fungus</i>	4.19	4.37	97.0	99.3	0.07	0.01	1.04
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Paeoniae Radix</i>	3.88	4.53	89.8	102.0	0.08	0.04	1.17
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Angelicae Radix</i>	3.63	4.55	83.9	103.5	0.08	0.02	1.26

\* content (I) : determined by Method (I)

content (II) : " " " (II)

\*\*The amount of glycyrrhizin in licorice was assumed as 100%.

### 結 論

1) 甘草中の glycyrrhizin을 HPLC를 이용하여 정량하는데는 固定相으로 reverse phase인 Hibar LiChrosorb RP-18 column이 적합하였다. 移動相으로는 glycyrrhizin 상태로 정량할 경우 MeOH : H<sub>2</sub>O (0.05M—NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)=58 : 42 용액, 가수분해하여 glycyrrhetic acid로 정량할 경우 MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH=78 : 19 : 3 용액이 가장 적합하였고, 이 경우 glycyrrhizin 0.1 $\mu$ g 까지 양호하게 분리 정량할 수 있었다.

2) 甘草中の glycyrrhizin을 두가지 방법으로 정량한 결과 가수분해하여 glycyrrhetic acid로서 정량한 경우가 glycyrrhizin 함량이 더 많게 나타났고 再現性이 더 좋았다.

3) 甘草와 몇몇 生藥을 1:1로 혼합추출한 결과 glycyrrhizin으로 정량했을 경우 桂皮, 熟黃, 芍藥, 當歸 등은 glycyrrhizin양에 負(-)의 영향을 주는 것으로 나타났다. 또 가수분해하여 glycyrrhetic acid로 정량했을 경우 桂皮, 熟地黃은 여전히 負(-)의 영향을 주는 것으로 나타났으나 當歸, 芍藥은 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

### 文 獻

1. Th. Vondenhof, K.W. Glombitza and M. Steiner, *Sci. Pharm.*, **41**, 155(1973).
2. I. A. Muravév and V. D. Ponomarev, *Med. Prom.*, **16**, 43(1962).
3. 昭和 48年度 厚生科學 研究報告 p.277, 291, 331(1973).
4. G. Kurono and S. Sasaki, *Yakugaku Zasshi*, **90**, 497(1970).
5. Y. Takino *et al.*, *Planta Medica*, **36**, 74(1979).
6. T. Namba *et al.*, *Yakugaku Zasshi*, **95**, 809(1975).
7. S. Ogawa, A. Yoshida and Y. Mitani, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 122 (1976).
8. Y. Akada and Y. Tanase, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 1035 (1976).
9. S. Ogawa, A. Yoshida and Y. Mitani, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 1488(1976).
10. Y. Akada *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1240(1978).
11. O. Sticher and F. Soldati, *Pharm. Acta Helv.*, **53**, 46(1978).
12. T. H. Beasley, H. W. Ziegler and A. D. Bell, *J. Chromat.* **175**, 350(1979).
13. R. H. Cundiff, *Anal. Chem.*, **36**, 1871(1964).
14. V. K. Srivastava, S. K. Mukerjee, and M. L. Maheshwari, *Indian Drugs*, **14**, 80(1977).
15. A. A. M. Habib, N. A. El-Sebakhy and H. AKadry, *J. Pharm. Sci.* **68**, 1221(1979).
16. P. Pohl and W. Hädrich, *Deutsche Apotheker-Zeitung*, **116**, 625(1976).
17. D. Larry, M. J. Fuller and P. G. Harrill, *J. AOAC.*, **53**, 698(1970).
- 昭和 49年度 厚生科學 研究報告, p.186, 196, 297.
19. P. Ventura, M. Visconti and G. Pifferi, *Boll. Chim. Farm.*, **117**, 217(1978).
20. 藤田路一等, 藥學雜誌, **71**, 949(1951).
21. 大韓藥典 第3改正