

甘草 製劑中 Glycyrrhizin의 定量

徐 廷 珍

柳韓洋行 研究部

(Received April 4, 1982)

Jung-Jin Suh

Department of Research, Yuhan Corporation, Secul 151, Korea

Determination of Glycyrrhizin in Crude Drug Preparations

대부분의 漢方製劑는 類種의 生藥을 配合하여, 煎劑로 하여 服用하든지, 물등의 溶劑로 抽出하여 製劑化하여 使用하는 경우가 보통이다.

그런데 生藥은 그 自體에도 成分의 含量에 차이가 있고, 특히 抽出이나, 製劑化하는 課程에서 他生藥이나, 成分의 影響을 받는 경우가 많아 製品을 일정하게 製造管理하기는 매우 어려운 실정이다.

그러나 근래에는 漢方의 科學化에 많은 努力이 경주되고 있는 趨勢이므로 生藥成分간의 相互作用을 檢討하여, 生藥製品의 規格化 및 品質管理에 기여코자, 漢方製劑에서 가장 많이 使用되는

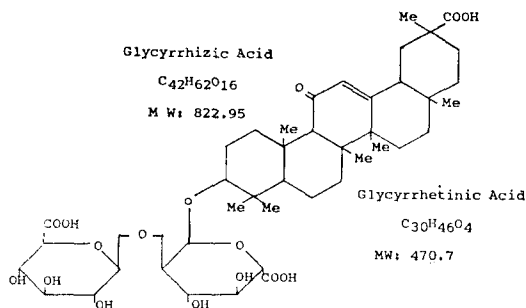


Fig. 1—The structure of glycyrrhizin.

Table I—Comparison of glycyrrhizin content in *Glycyrrhizae Radix* with several methods.

Method	Glycyrrhizin content	
	Cut(%)	Pluv.(%)
H.P.L.C. (c.v.=0.81%, n=6)	5.16	4.45
D.E.A.E.* (c.v.=2.01%, n=7)	7.22	5.73
T.L.C. (c.v.=2.77%, n=7)	7.36	5.98
G.C. (c.v.=2.49%, n=6)	5.14	4.41

* Diethylaminoethyl cellulose

生藥中の 하나인 甘草와 甘草를 含有한 製劑에 있어서 甘草主成分인 glycyrrhizin의 定量과 甘草와 他生藥과의 配合時의 影響에 대하여 檢討하고, 方向을 提示하고자 한다.

Glycyrrhizin의 定量法—Glycyrrizin(G)은 Fig. 1과 같이 2개의 glucuronic acid와 glycyrrhetic acid로 되어 있다. G의 定量은 G나, 그 鹽의 形態로, 또는 G를 加水分解하여, glycyrrhetic acid(GHeA)나, glucuronic acid로서 定量할 수 있다. 定量法에는 重量法,¹⁻²⁾ 中和滴定法,³⁾ 吸光度法,⁴⁻⁵⁾ chromatography法 등이 있으며, chromatography法에는 T.L.C.⁶⁻⁵⁾ (Densitometry,⁸⁾ Rod-TLC-FID,⁹⁾ Gas Chromatography(G.C.),¹⁰⁻¹²⁾ High Pressure Liquid Chromatography. (H.P.L.C.)¹³⁻¹⁸⁾가 있으며 근래에는 甘草나 甘草製劑中 G의 定量에 Rod-TLC-FID, G.C., H.P.L.C. (Ion exchange, partion)등이 가장 많이 利用되는 傾向이 있다.

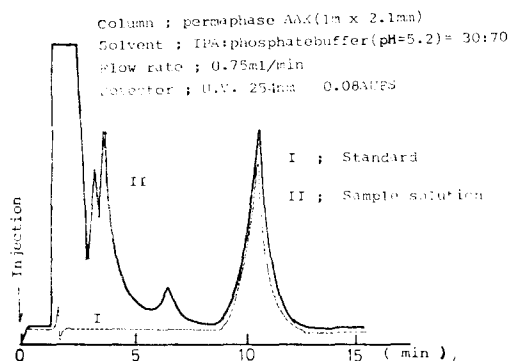


Fig. 2—Chromatogram of glycyrrhizin and *Licorice* extract.

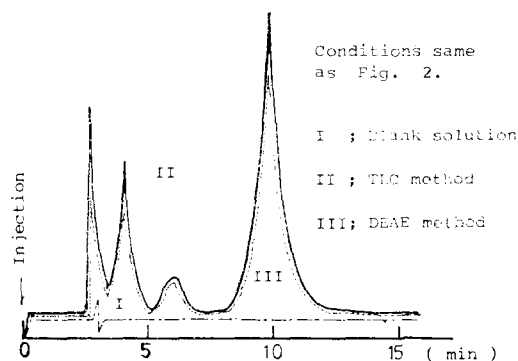


Fig. 3—Chromatogram of glycyrrhizin fraction separated by TLC and DEAE method.

甘草中 Glycyrrhizin 定量法の 比較 —일반적으로 많이 이용되고 있는 H.P.L.C.法(ion exchange), D.E.A.E. (diethylaminoethyl cellulose)와 T.L.C.法, G.C.法에 의한甘草中 G의 定量結果를 比較하면 Table 1과 같다.

甘草細切 및 甘草末에서 H.P.L.C.와 G.C.의 分析結果가 거의 동일하였고, D.E.A.E.와 T.L.C.의 分析結果가 類似하였으나, D.E.A.E.와 T.L.C.의 경우가 H.P.L.C.와 G.C.의 경우보다 G의 含量에 있어서 細切에서는 2% 末에서는 약 1.5%가 높은 수치로 나타났다. D.E.A.E.와 T.L.C.의 경우에 含量이 높게 나타나는 原因을 糾明하기 위하여 각각의 spot를 抽出하여, H.P.L.C.에 의하여 分析한 結果는 Fig. 2, Fig. 3과 같다. 共히 G이외의 成分을 含有하는 것을 알 수 있으며, 이것이 含量增加로 나타난 것으로 볼 수 있다. 그러므로 甘草의 定量法으로는 H.P.L.C.와 G.C.의 分析法이 他方法보다 比較的 精確하다고 생각된다.

甘草中 Glycyrrhizin의 分析例^{11,14)}—各國의 甘草中 G를 H.P.L.C.로 分析한 結果는 Table II와 같이, G를 4~8% 含有하고, 產地別 甘草 및 甘草 extract를 分析한 結果는 Table 3과 같이, 甘草의 경우 3~6%이고, 甘草 extract의 경우 8.5~21%로 含量上 差異가 많은 것을 알 수 있다.

Table II—Glycyrrhizin contents in various origin of *Licorice* (H.P.L.C.).

Sample	Assay(%) (as dry base)	Loss on drying (105, 6 hrs)
Italy	4.46	7.52
Afghanistan	4.47	8.46
Spanish	4.21	9.06
Turckish	7.10	9.00
Iran	8.19	7.82
Pakistan	4.53	8.36
Soviet	7.63	9.31
China	6.04	8.30
Japan	3.98	8.25

Table III—Determination of glycyrrhizin in *Glycyrrhizae Radix* and extract.

Sample	Assay(%) (as dry base)
<i>Glycyrrhizae</i> III from northeastern China	6.37
<i>Glycyrrhizae</i> II from northeastern China	5.54
<i>Glycyrrhizae</i> III from northwestern China	3.09
<i>Glycyrrhizae</i> III from northeastern China, Methanol extract	20.96
<i>Glycyrrhizae</i> II from northeastern China, Methanol extract	19.57
<i>Glycyrrhizae</i> III from northwestern China, Methanol extract	8.51

Table IV—Recovery of glycyrrhizin in crude drug preparations (I).

Rx	Glycyrrhizin content(%)	Recovery(%)	C.V.(%) n=6
감초견강탕	5.74	99.3	2.18
계지감초탕	5.83	100.9	1.85
작약감초탕	5.81	100.5	1.26
길경탕	5.77	99.8	1.03
영계출감탕	5.70	98.6	2.33
영강출감탕	5.64	97.6	1.79
복령감초탕	5.71	98.8	3.01

Glycyrrhizin content in *Glycyrrhizae Radix* used is 5.78%

Table V—Recovery of glycyrrhizin in crude drug preparations(II).

Sample	Glycyrrhizin content(%)	Recovery(%)	C.V.(%) n=6
소청룡탕	4.11	71.1	1.03
마황탕	5.17	89.4	2.76
사역탕	5.28	91.3	1.27
반하사심탕	5.17	89.4	2.05
소시호탕	4.99	86.3	1.53
시호계지탕	4.90	84.8	1.61
황금탕	5.17	89.4	2.36

Glycyrrhizin content in *Glycyrrhizae Radix* used is 5.78%

甘草製劑中 Glycyrrhizin의 分析例¹⁵⁾—甘草을 含有한 漢方製劑中 G를 H.P.L.C.(ion exchange)로 分析한 結果는 Table IV 및 Table V와 같다.

Table IV의 處方은 成分이 2~4가지로 比較的 간단한 處方으로서 양호한 分析結果를 얻었으나 Table 5의 경우는 生藥成分이 많이 含有된 處方으로서 G의 回收率이 떨어지고 있다. 이것은 他生藥에 의한 影響으로 含量이 減少된 것으로 推定된다.

甘草中 Glycyrrhizin 定量時 他生藥의 影響¹⁹⁾—甘草中 G의 定量時 他生藥의 影響을 檢討하기 위하여 H.P.L.C. (reverse phase)을 利用하여 G自體를 定量하는 方法(方法 1)과 加水分解하여 Glycyrrhetic Acid 상태로 定量하는 方法(方法 2)을 檢討하였고, 또 甘草와 他生藥을 1:1로 配合抽出하였을 때의 G量의 變化를 檢討하였다.

1. Glycyrrhizin으로 定量할 경우(方法 1)—甘草末 200mg을 精稀하여 250ml 둥근 flask에 넣고, 물 30ml을 3시간 동안 reflux시킨 다음 이것을 100ml 容量 flask에 옮기고 둥근 flask를 EtOH 100ml씩으로 3번 세척하여 합한 다음 물로 容量 flask의 표선을 채운다. 이 액을 0.45 μ m

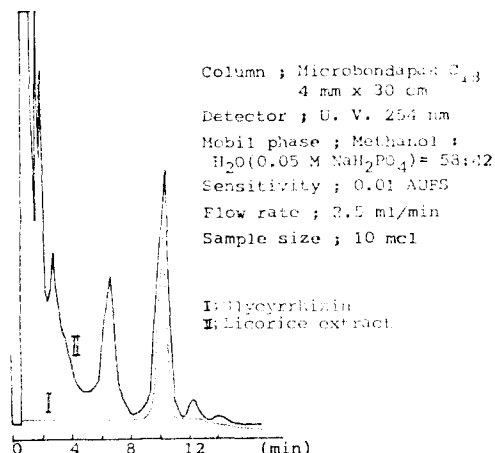


Fig. 4—Chromatogram of glycyrrhizin and Licorice extract.

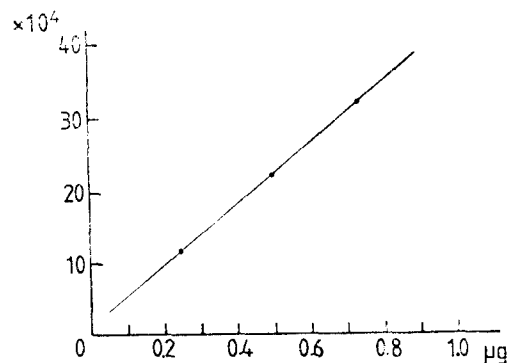


Fig. 5—Calibration curve of glycyrrhizin.

filter로 여과하여 Fig. 4와 같은 條件에서 chromatogram을 얻고, 標準品 G를 같은 條件에서 따로 조작하여 얻은 peak area로 作成한 檢量線(Fig 5)으로부터 G의 含量을 求한다.

2. **Glycyrrhetic Acid**로 定量할 경우(方法 2)—甘草末 200mg에 물 30ml를 가하여, 3시간 동안 reflux시키고 1.5N-H₂SO₄ 30ml를 가한 다음 계속해서 1시간 reflux시켜 加水分解하고 冷却한다. 여기에 chloroform 30ml를 가하고 다시 30분간 reflux시킨 다음 chloroform층을 둥근 flask에 옮기고 다시 chloroform 30ml로 2회 抽出하여 chloroform층을 합한다. Chloroform을 감압증발시킨 후 殘渣를 EtOH에 녹여 100ml로 한 다음 Millipore filter로 濾過하여 Fig. 6와 같은 條件에서 chromatogram을 얻고 따로 標準品 G를 시료와 같게 조작하여 檢量線을 作成하고 含量을 구한다.

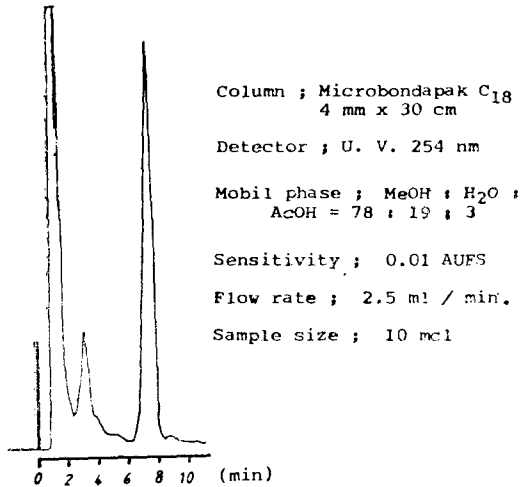


Fig. 6—Chromatogram of glycyrrhetic acid(after hydrolysis).

3. Glycyrrhizin의 定量時 他生藥의 影響

—甘草 및 他生藥을 1 : 1(각 200mg)로 配合抽出하여 方法 1과 方法 2의 두가지로 定量한 경우의 G 含量과 回收率은 Table 6과 같다.

方法 1과 方法 2에서의 G 含量을 比較할 때 方法 2로 定量했을 경우가 더 높게 나타났다. 또한 方法 1로 定量했을 경우 桂皮, 熟地黃, 芍藥, 當歸는 甘草中の G量에 負(-)의 영향을 주는 것으로 나타났고 이를 加水分解하여 方法 2로 定量했을 경우 桂皮, 熟地黃은 여전히 負(-)의 영향을 주는 것으로 나타났으나 芍藥 및 當歸는 별로 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며 茯苓은 어느 경우에도 별로 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

Table VI—Analytical result of glycyrrhizin.

Sample	Method 1		Method 2	
	Content	Recovery	Content	Recovery
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.32	100.0	4.40	100.0
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Cassiae Cortex</i>	3.85	89.1	4.21	95.7
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Rhemaniae Rhizoma</i>	3.48	80.5	4.00	91.0
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Pachymae Fungus</i>	4.19	97.0	4.37	99.3
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Paeoniae Radix</i>	3.88	89.8	4.53	102.0
<i>Glycyrrhizae Radix</i> + <i>Angelicae Radix</i>	3.63	83.9	4.55	103.5

甘草中の Glycyrrhizin과 配合生藥에 의한 影響²⁰⁾—湯液調製過程에서 生藥成分의 영향을 檢討하기 위하여 model시험으로서 甘草에 他生藥을 1 : 1로 配合한 경우 煎液中 G量의 配合生藥의 種類에 따른 變化를 檢討하였다.

1. 甘草에 他生藥을 配合한 경우 煎液中의 Glycyrrhizin量의 變化—일반적으로 漢方의 湯液은 處方に 記載한 一日量의 生藥에 물 400~600ml를 가하여 약한 불에 끓여서 半量이 될 때 濾過

Table VII—Glycyrrhizin content in decoction of *Glycyrrhizae Radix* mixed with other crude drugs.

Sample	Glycyrrhizin in decoction		
	Content (%)	Relative content	pH
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6.2	100	5.50
<i>Magnoliae Cortex</i>	7.2	116	5.38
<i>Alismatis Rhizoma</i>	6.7	108	5.42
<i>Zizyphi Fructus</i>	6.6	106	5.26
<i>Cnidii Rhizoma</i>	6.0	97	5.57
<i>Ginseng Radix</i>	5.0	81	5.45
<i>Pinelliae Tuber</i>	4.5	73	5.58
<i>Armeniacae Semen</i>	4.0	65	5.59
<i>Rhei Rhizoma</i>	4.0	65	4.98
<i>Scutellariae Radix</i>	3.4	55	5.46
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	3.2	52	5.50
<i>Ephedrae Herba</i>	2.9	47	5.38
<i>Coptidis Rhizoma</i>	2.7	44	5.49

Glycyrrhizae Radix containing 8.0% glycyrrhizin was used

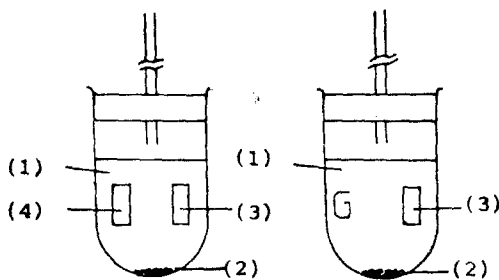


Fig. 7—Distribution test of glycyrrhizin in decocting crude drugs.

- (1); Decoction
- (2); Precipitation
- (3); Crude drug
- (4); *Glycyrrhizae Radix*
- G: Glycyrrhizin NH₄ Salt

하여 조제하므로 model시험으로서 甘草와 他生藥을 각 300mg에 3배량의 물(18ml)을 가하고 공기 냉각기를 부착하여 1시간, 1회 끓인후 원심분리하여 polyamide column을 통과시켜 檢液을 만든후 Rod-TLC-FID法으로 G를 定量하였다.

甘草(甘草 300mg을 30배량의 물로 3회 추출하여 정량한 結果는 G : 8.0%)만을 上記條件에서 조제한 경우 煎液中の G의 移行率은 78% (G : 6.2%)을 나타냈고, 이것을 기준으로 配合生藥의 影響을 比較한 結果는 Table VII과 같다.

厚朴은 G의 移行率을 增加(relative content > 110) 시켰고 澤瀉, 大棗, 川芎은 큰 變化가 없었고, (110 ≥ relative content > 90), 人蔘, 半夏, 杏仁, 大黃등은 減少시켰으며 (90 > relative content > 60) 黃芩, 芒硝, 麻黃, 黃連등은 현저하게 減少되었다. (60 > relative content). 各 煎液의 pH와 G의 移行率의 相關關係는 없는 것으로 예측된다.

2. G量의 移行率을 현저하게 減少시키는 生藥과의 減少機構²⁰⁾—甘草에 黃芩, 芒硝, 麻黃 및 黃連을 각각 配合한 경우 煎液中の G量을 현저하게 減少시키는 것을 糾明하기 위하여 Fig 7과 같은 장치로 다음과 같은 실험을 하였다.

(1) 甘草와 生藥 各 300mg을 별도로 濾紙袋에 넣고(芒硝의 경우는 不要) 煎液을 조제하여 煎液中の G를 定量한다.

(2) 煎液중에 沈殿을 生成하는 芒硝 및 黃連의 경우 沈殿과 濾液을 分離하여 G를 定量한다.

(3) 殘渣는 G의 吸着을 檢討하기 위하여 再抽出하여 G를 定量한다.

(4) 甘草대신에 G-monoammonium salt 18.6mg(甘草 300mg을 1시간, 1회 煎液으로 하였을 경우 G量에 해당)을 사용하여 1)~3)의 方法으로 甘草中の G 및 添加한 G의 分布를 시험한 結果는 Table 8 및 Table 9와 같다.

甘草(G)에 黃芩 및 麻黃을 配合한 경우에는 煎液중에 沈殿을 生成하지는 않았으나, G量의 減少가 일어났으며, 상당하는 G가 黃芩 및 麻黃에서 抽出되었다. 그러므로 煎液中 G의 減少는 일

Table VIII—Distribution of glycyrrhizin in decocting crude drugs together with *Glycyrrhizae Radix*.

Sample	Decoction(1)	Precipitation(2)	Sample(3)	Glycyrrhizae Radix(4)	Total (%)
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	77.5	—	—	22.5	100.0
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	40.3	27.2	—	25.6	93.1
<i>Ephedrae Herba</i>	36.4	no ppt	27.7	26.0	90.1
<i>Coptidis Rhizoma</i>	34.1	35.2	not det	23.3	92.6
<i>Scutellariae Radix</i>	42.6	no ppt	24.1	26.1	92.8

Table IX—Distribution of glycyrrhizin in decocting crude drugs together with glycyrrhizin (NH₄ Salt).

Sample	Decoction(1)	Precipitation(2)	Sample(3)	Total(%)
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	44.8	55.0	—	99.8
<i>Ephedrae Herba</i>	71.1	no ppt	24.1	95.2
<i>Coptidis Rhizoma</i>	48.4	48.4	not det	96.8
<i>Scutellariae Radix</i>	65.9	no ppt	28.8	94.7

단 용출된 G의 일부가 黃芩이나 麻黃에 吸着된 것으로 생각된다. 甘草(G)에 芒硝를 配合한 경우에는 沈澱을 生成하였고 煎液中の G의 量은 減少하였다. 이때 침전은 대부분이 G이었다. G의 減少는 甘草에서 용출된 G가 共存하는 芒硝에 의하여 鹽析되는 것으로 생각된다. 甘草(G)에 黃連을 配合한 경우는 沈澱을 生成하고, G量이 減少하였다. 주로 G와 berberime 및 관련 alkaloid에 의한 鹽形成에 기인하는 것으로 판단된다.

結 論

甘草中の G의 定量은 G.C.나 H.P.L.C. (ion exchange, reverse phase) 등으로 양호하게 分離定量할 수 있다.

甘草製劑中 G을 定量하는 경우에는 比較的 간단한 處方에서는 별 영향이 없었으나, 복잡한 處方에서는 G의 回收率이 떨어지는 것으로 나타났다. 이러한 結果는 配合生藥에 의한 相互作用으로 생각되며 甘草와 同量의 他生藥을 配合檢討한 結果, 數種의 生藥은 G의 含量에 負(-)의 영향을 주는 것으로 나타났다. 특히 G의 移行率을 현저하게 減少시키는 生藥의 減少機構는 吸着(黃芩, 麻黃), 鹽析(芒硝), 鹽形成에 의한 沈澱(黃連) 등으로 생각되며 경우에 따라서는 分析上 방해요인도 있을 수 있다. 이러한 점을 고려할 때 甘草中 G의 定量은 문제점이 없겠으나, 甘草製劑中 G의 定量은 他生藥의 相互作用을 받는 경우가 많으므로 品質管理上 일률적인 分析結果를 요구하기는 어려우므로 제제의 處方に 따른 回收率등, 全般的 研究가 이루어져 Model에 따른 含量規制가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

文 獻

1. M. Fujita, Y. Kobayashi, S. Shibata, *Yakugaku Zasshi*, **71**, 949(1951).
2. 大韓藥典 第三改正
3. I.A. Muravev, V.D. Ponomarev, *Med. Prom.*, **16**, 43 (1962).
4. R.H. Cundiff, *Anal. Chem.*, **36**, 1871 (1964).

5. V.K. Srivastava, S.K. Mukerjee, M.L. Maheshwari, *Indian Drugs*, **14**, 80 (1977).
6. 昭和 48年度 厚生科學 研究報告, p.277, 291, 331 (1973).
7. G. Kurono, S. Sasaki, *Yakugaku Zasshi*, **90**, 497 (1970).
8. Y. Takino, M. Koshioka, M. Shiokawa, *Planta Medica*, **36**, 74 (1979).
9. T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tomimori, *Yakugaku Zasshi*, **95**, 809 (1975).
10. D. Larry, M.J. Fuller, P.G. Harril, *J. AOAC.*, **53**, 698(1970).
11. 昭和 49年度 厚生科學 研究報告, p.186, 196, 207.
12. P. Ventura, M. Visconti, G. Pifferi, *Boll. Chim. Farm.*, **117**, 217 (1978).
13. S. Ogawa, A. Yoshida, Y. Mitani, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 122 (1976).
14. Y. Akada, Y. Tanase, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 1035 (1976).
15. S. Ogawa, Y. Sakiya, S. Kawano, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 124, (1978).
17. O. Sticher, F. Soldati, *Pharm. Acta Helv.*, **53**, 46 (1978).
18. T.H. Beasley, H.W. Ziegler, A.D. Bell., *J. Chromat.* **175**, 350 (1979).
19. N.H. Paik, M.K. Park, J.H. Park, C.S. Kim, J.J. Suh, *Yakhak Hoeji*, **25**, 1, (1981).
20. T. Tomimori, M. Yoshimoto, *Shoyakugaku Zasshi*. **34**, 138 (1980).