

動物性 天然物 藥品 劑製의 品質 管理

HPLC 및 GC에 의한 鹿茸製劑의 確認 및 定量法

朴 萬 基

서울대학교 藥學大學

(Received July 20, 1982)

Man Ki Park

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Quality Control for Preparation of Natural Animal Drugs

Determination and Identification of Deer Horn Preparation by HPLC and GC

最近 天然物 醫藥品の 洋藥製劑化와 더불어 그 製劑의 確認 및 含量檢討를 僞한 公正法이 날로 그 必要性을 더해 가고 있다. 天然物 醫藥品은 一般 洋藥製劑와는 달리 그 組成이 複雜하고 大部分은 그 成分조차 把握되고 있지 못한 實情이다. 더구나 一部 그 組成이 밝혀진 天然物조차 그 品種, 部位, 또는 產地등에 따라 組成이 매우 多様하므로 含量을 檢討하는데는 많은 問題點을 안고 있다.

演者は 이러한 問題點을 改善하는 方法의 하나로 鹿茸製劑를 對象으로 그 確認 및 含量 試驗法을 研究하였다. 鹿茸은 아직까지 그 有效成分이 確實히 밝혀진 바가 없으므로 本 實驗에서는 鹿茸中 amino acid의 pattern分析 및 glycine의 含量을 檢討함으로써 確認 및 定量法을 研究하였다.

實驗 方法

裝置—HPLC는 Hitachi 638-50型을 使用하였고 UV detector는 Hitachi 635-M型을 使用하였다. GC는 Pye Unicam 104型을, Detector는 FID를 使用하였다.

試料—시베리아產 상대 鹿茸丸 製劑 및 시베리아產 상대 鹿茸을 使用하였다.

試藥—抽出溶媒로 탈이온수 및 EtOH E. Merck特級을, HPLC UV Detector Derivative試藥으로 phenylisothiocyanate E. Merck特級을, GC TMS試藥으로 BSTFA (1% TMCS) Pierce社 제품을 各各 使用하였다.

試料處理—가. HPLC에 의한 方法

1) 抽出 및 濃縮

a) 丸劑의 處理: 잘게 粉碎한 丸劑 5g을 取하여, 300ml-round botton flask에 넣고, 70% EtOH 100ml를 加하여 2時間 reflux하였다. 30分間 遮光狀態에서 放置하여 冷却시킨 후 定量用 濾過紙로 濾過한 液을 rotary evaporator로써 減壓 濃縮하여 약 20ml로 하였다(加熱溫度: 70°C)

위 濃縮液을 實溫에서 12시간 放置하고(25°C) 遠心分理管에 옮겨, 10분간 遠心分理(3,000×G) 하였다. 상등액을 다시 減壓濃縮하여 10ml의 濃縮液으로 하였다. 위 濃縮液을 2ml取하여 20ml-

screw cap culture tube에 넣고 6N-HCl 4ml를 추가하였다. N₂ gas로 tube상부의 공기를 置還한 후 teflon tape로 密封하였다(以下 A tube검역이라 함)

b) 鹿茸의 處理: 鹿茸 3g을 300ml-round bottom flask에 넣고, 丸劑와 同一한 方法으로 處理하여 검역 B로 하였다.

c) 空試驗의 處理: 70% EtOH 2ml 및 6N-HCl 4ml를 screw cap culture tube에 넣어 檢역 C로 하였다.

2) 加水分解: 檢역 A, B 및 C를 同時に silicon oil bath에서 12시간 가수분해하였다(反應溫度: 130°C)

3) PTH反應: 가수분해한 檢역 A, B 및 C를 冷却후, NaOH를 各各 加하여 pH가 약 8.0이 되게 하였다. 여기에 5% phenylisothiocyanate pyridine용액 2ml씩을 加하여 teflon으로 密封한 후 70°C에서 2시간 반응시켰다. 또한 標準 amino acid 18종류(必須 amino acid)를 各各 screw cap culture tube에 0.05mM씩 넣고 脫 ion水 2ml씩 加한 후 다시 5% phenylisothiocyanate pyridine液을 2ml씩 加하여, 이하 A, B 및 C tube 檢역과 동일한 方法으로 處理하여 反應시켰다.

4) Benzene處理 A, B 및 C 檢역과 標準品 amino acid 反應 tube에 各各 benzene 5ml씩 加하여 未反應의 phenylisothiocyanate 및 有機物을 抽出하였다. HPLC에는 水層을 取하여 injection하였다.

나. GLC에 의한 方法

1) 蛋白質 抽出: 鹿茸 및 丸劑를 잘게 粉碎한 후 各各 5g씩 取하여 300ml-Round bottom flask에 넣은 다음, 탈이온 수 100ml를 加하여 2시간 reflux하였다. 이 抽出液 10ml를 取하여 遠心分離(3,000×G)한 후 상등액에 MeOH를 加하여 70%溶液으로 하여 沈澱시켰다. 同一조작으로 3차 遠心分離 후 蛋白質沈澱을 얻었다.

2) 蛋白質의 加水分解: 위 方法으로 얻어진 蛋白質沈澱을 screw cap culture tube에 넣고, 6N-HCl 5ml를 加하여 silicon oil bath에서 12시간 가수분해하였다(溫度: 130°C)

3) Sililation: 가수분해한 各各의 檢역의 HCl을 加熱하여 揮發시키고, CH₂Cl₂ 0.5ml를 加하여 70°C에서 N₂ gas로 purge하여 水分을 除去하였다.

위 試料에 dry pyridine 500μl 및 BSTFA(1% TMCS) 500μl을 各各 加하여, silicon oil bath에서 2시간 反應시켜서 檢體로 하였다(溫度: 150°C)

HPLC 및 GC에 의한 分離 및 同定試驗(가) HPLC에 의한 方法

1) 分離 條件

Column : Bondapak C₁₈, 4mm(φ)×30cm

Mobile phase : 용매 I (5% CH₃CN, pH=4.0) 용매 II (90% CH₃CN, pH=4.0)

Gradient : I → II (+1.5% II /min) Detector : UV 250nm

Injection vol. : 10μl (each) Temperature : Ambient

Sensitivity : ×0.64~×0.08 Chart speed : 0.25cm/min

2) 標準品에 의한 amino acids의 peak確認: Fig. 1은 鹿茸, Fig. 2는 丸劑는 HPLC에 의한 分離結果의 chromatogram이다. 確認된 amino acids는(標準品과 同一한 HPLC 條件下에서 retention time으로써 확인하였다.) Table I과 같다.

His.의 peak보다 짧은 retention time의 peak들은 空試驗에서도 觀測된다.

나) GLC에 의한 方法

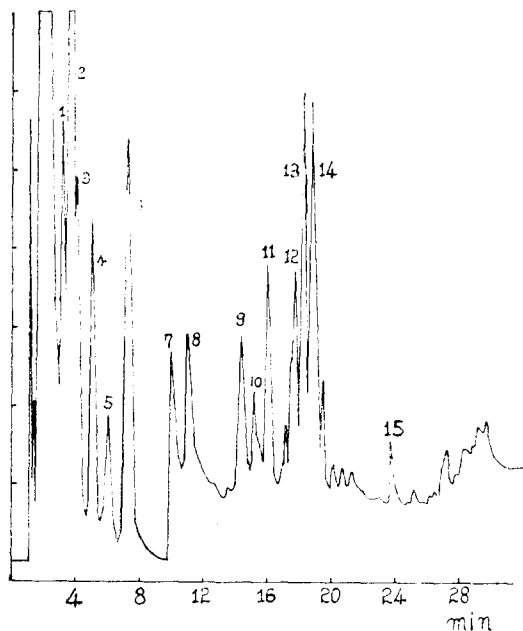


Fig. 1- Chromatogram of deer horn extract by HPLC.

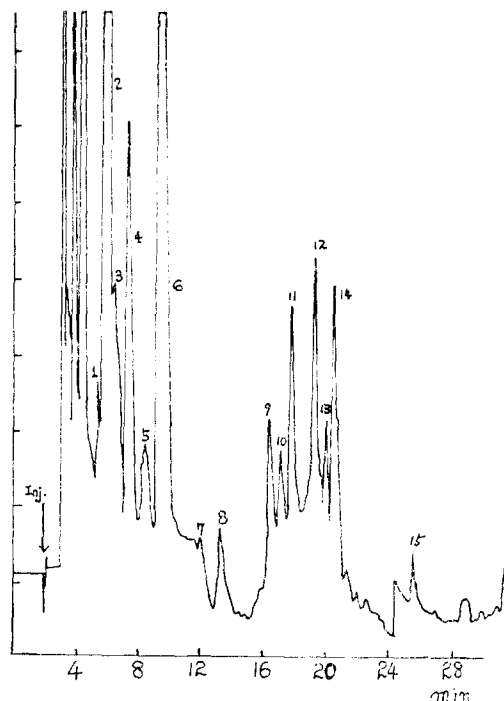


Fig. 2- Chromatogram of deer horn preparation extract by HPLC.

Table I- Identification of amino acids.

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Amino acids	His	Gly	Thr	Arg.	*	Ala	*	*	*	Val	*	Leu Ile	*	Met	*

(* Unknown compounds)

1) 分離 條件

Column : 3% OV-17 (80~100 mesh shimalite W)

: 4mm(φ)×210cm (Borosilicate glass column)

Temperature: Injection port (250°C). Column (180°C~230°C+10°C/min). FID (250°C)

Flow rate : N₂ (30ml/min) H₂(60ml/min), Air(880ml/min)

Attenuation : 3.2×10⁻¹⁰ ampere full scale. Injection vol.: 2μl. Chart speed: 0.5cm/min.

2) 標準品에 依한 amino acids의 peak 確認

Retention time에 依하여 確認한 結果 Table II와 같이 最少 8種의 amino acids가 檢출되었다. 이 8種의 amino acids들의 peak pattern들을 比較할 때 1,2의 peak가 製劑 및 鹿茸의 두 chromatogram에서 優勢하게 나타났으며, 그 외의 6種의 amino acids들도 거의 類似한 組成比를 나타내고 있다. Fig. 3과 Fig. 4는 각각 녹용과 녹용제제의 gas-chromatogram이다.

HPLC에 依한 鹿茸製劑의 定量法—鹿茸丸製劑 및 原料鹿茸을 完全粉碎하여 2g씩을 각각 round bottom flask에 取하여 遠心分離하여 上澄液을 각각 2ml씩 screw cap culture tube에 옮겨 MeOH

Table II- Identification of amino acids.

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8
Amino acids	Ala	Val	Gly	Pro	Leu Ile	Thr	Glu	Met

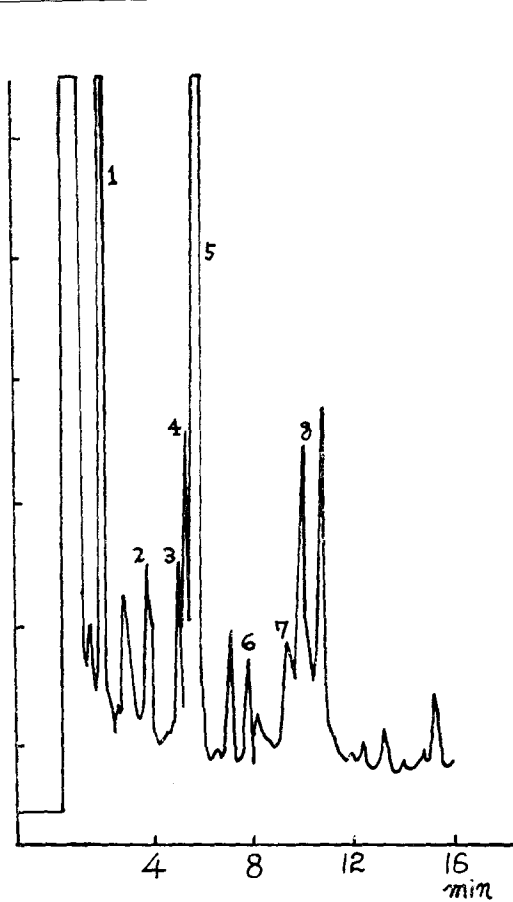


Fig. 3- Chromatogram of deer horn extract by GC.

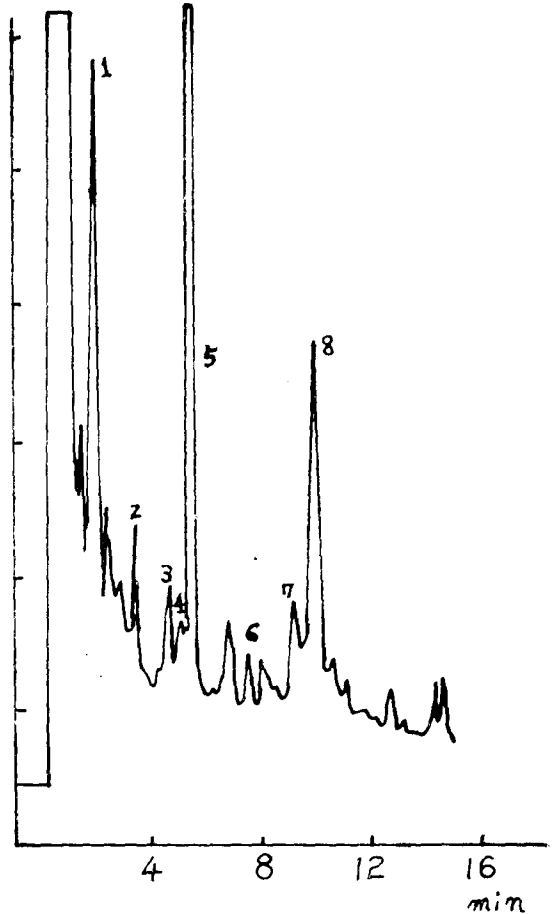


Fig. 4- Chromatogram of deer horn preparation extract by GC.

5ml씩 加하여 蛋白質을 沈澱시킨 후 遠心分離하여 沈澱을 다시 6N-HCl 2ml를 加하여 12시간동안 加水分解 하였다(130°C)

여기에 다시 6N-NaOH 2ml를 加하여 中和시킨 후 PTH試藥 (5%) 2ml를 加하여 water bath上에서 溫度 70°C를 維持하면서 2시간 동안 反應시켜 이를 HPLC검체로 使用하였다. 定量은 鹿茸 amino acids중 가장 많은 %를 차지하는 glycine의 peak를 鹿茸丸製劑와 原料鹿茸을 比較하여 計算하였다.

含量 計算—鹿茸의 平均량 : A, 丸製의 平均량 : P, 鹿茸의 glycine peak area: S_A , 丸製의 glycine peak area: S_P

$$\frac{S_P}{S_A} \times \frac{A}{P} \times 100 = \text{절대 함량\%}$$

$$\frac{S_P}{S_A} \times \frac{A}{P} \times \frac{100(\%)}{\text{표시량}(\%)} \times 100 = \text{표시량에 대한 함량\%}$$

市販 鹿茸製劑에의 適用 市販 鹿茸製劑를 HPLC法에 의해 定量한 結果는 아래와 같다.

丸劑의 平均량 : 1706.4mg

鹿茸의 平均량 : 1800mg

丸劑의 glycine peak height: 31×0.32

鹿茸의 glycine peak height: 33×1.28

丸劑中 실제 鹿茸量 : $1800(\text{mg}) \times \frac{31 \times 0.32}{33 \times 1.28} = 422.73\text{mg}$

丸劑中 鹿茸의 絕對含量 : $\frac{422.73\text{mg}}{1706.4\text{mg}} \times 100\% = 24.77\%$

標示量에 대한 含量 : $\frac{24.77}{58} \times 100\% = 42.7\%$

實驗 結果 및 考察

HPLC 및 GC의 시베리아產 鹿茸丸 抽出液 및 空試驗 結果의 chromatogram에서 알 수 있듯이, HPLC에서는 8종의 amino acids, GLC에서는 8종의 amino acids가 確認되었다.

또한 그 성분들의 含量들간의 相互 chromatogram에서의 比率도 거의 비슷하여 製劑와 鹿茸間의 成分同定이 可能하다고 思料된다

確認된 amino acids이외의 peak들을 考察할 때, HPLC chromatogram에서 5, 8, 9 및 15의 未確認 peak가 서로 一致하며 그 相互間의 比率도 거의 같은 형태이다. 또한 14 peak와 15 peak사이의 여러 peak들의 형태도 비슷한 pattern을 이루고 있다.

GLC chromatogram에서 8종의 amino acids의 peak들이외의 다른 미확인 peak들을 考察할 때, 5peak와 6 peak사이의 미확인된 peak가 서로 一致하며 8번 이후의 여러 peak들의 pattern이 서로 같음을 觀測할 수 있다.

이상, HPLC와 GLC의 chromatogram들에서 시베리아 상대 鹿茸丸 抽出液은 서로 同種의 物質들의 混合液임을 結論지을 수 있다고 思料된다.

또한 市販製劑 分析에 있어 含量이 42.7%밖에 되지 않는 것은 製造課程中 鹿茸添加量이 실제 不足하거나 또는 鹿茸部位에 다른 含量 差異로 看做할 수 있다.

本 實驗에서는 直接 包含하지는 않았으나 質이 떨어지는 하대 鹿茸을 使用하여 含量을 檢討하면 그 含量이 100%以上이 되는 境遇의 實驗結果도 얻을 수 있으므로 含量實驗에는 同一產地, 品種, 採取部位가 一旦 認定되어야 含量實驗의 意義가 있을 것으로 思料된다.

結 論

위 實驗의 結果 HPLC 및 GC에 依한 amino acid의 pattern分析은 製劑와 鹿茸 自體의 chromatogram이 一致하므로 同一物質로 認定할 수 있으며 이는 鹿茸이외에 다른 天然物 醫藥品의 確認에도 適用될 수 있을 것으로 思料된다. 또한 含量分析에 있어서 그 分析의 先行條件으로 產地, 品種, 採取部位, 時期가 同一한 物質임이 確認된다면 天然物의 含量試驗은 어느정도 確定될 수 있으리라 思料된다. 또한 分析에서는 藥理活性物質 및 有效成分이 아니라해도 그 生藥을 분명히 確認할 수 있는 成分이면 品質管理에는 重要하게 利用될 수 있음을 알 수 있다.