

## 市販 膽汁 生藥중 主要 膽汁酸의 分離에 관한 研究

朴 鍾 大 · 劉 承 兆

成均館大學校 藥學大學

Studies on the Separation of Major Bile Acids in Commercial Crude Bile Drugs

Jong Dae PARK and Seung Jo Yoo

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170, Korea

**Abstract**—High performance liquid chromatographic separation is described for the analysis of bile acids after hydrolysis in seven commercial crude bile drugs and ox and pig galls. They are simultaneously separated with HPLC mobile phase of acetonitrile/0.5% ammonium carbonate (pH 6.7) (25.5 : 74.5) at a flow rate (1.0→1.5ml/min.) and differential refractometer. The linearity of calibration curve and recovery test are good by using the method. The analysis of major bile acids in seven commercial crude bile drugs using the described method is presented. Sample no. 1 of them is similar to separation pattern of ox gall. Sample no. 6 of them is supposed to be genuine bear gall on the basis of identification of ursodeoxycholic acid. Sample no. 2~5 and 7 of them are supposed to be pig gall on the basis of identification of hyodeoxycholic acid which is a characteristic component of pig gall.

**Keywords**—HPLC · Bile acid · gall · Fel Ursi · ox · pig · ursodeoxycholic acid · hyodeoxycholic acid

動物의 膽囊을 乾燥하여 藥用으로 供用하는 膽汁生藥은 古代로부터 많이 쓰여왔었다<sup>1)</sup>. 우리나라에서도 熊膽, 猪膽등의 名稱으로 市販되고 있는 膽汁生藥이 있으나 그 基源이나 品質등에 관한 調査研究은 극히 드문 現狀이다<sup>2)</sup>. 따라서 市販 膽汁生藥에 관한 簡便하고 비교적 精確한 品質評價方法의 研究가 時急하게 되어, 外國에서 報告된 結果를 適用하여 現實에 적합한 方法으로 特히 貴重視되고 偽造品이 많은 熊膽을 中心으로 하여 市販 膽汁生藥중에 含有된 主要 膽汁酸을 分離 定量할 수 있는 品質評價法을 追求하였다.

熊膽의 主成分인 ursodeoxycholic acid는 固有의 膽汁酸으로서 1927年 Shoda<sup>3)</sup>가 分離했으며, 다른 動物膽으로서 是代用할 수 없다하여

珍貴하게 여기고 있다. 이밖에 含有 膽汁酸으로서는, 1936年 Iwasaki<sup>4)</sup>등에 의해 기타 chenodeoxycholic acid, cholic acid등이 證明됐으며, 이들 膽汁酸은 一般의으로 taurine 또는 glycine과 peptide結合을 한 抱合酸으로서 存在하고 있다.

이러한 膽汁酸의 分離에는 여지크로마토그래프法<sup>5)</sup>, 박층크로마토그래프(TLC)法<sup>6)</sup>, TLC를 이용한 densitometry法<sup>7~9)</sup>, TMS化<sup>10,11)</sup> 또는 TFA化<sup>12~14)</sup>시켜 分離하는 가스크로마토그래프法, 適當한 誘導體에 의한 UV labeling<sup>15~19)</sup>을 만들거나 直接 分析할<sup>20,21)</sup> 수 있는 고속액체크로마토그래프(HPLC)法 등의 機器를 이용한 分析法이 개발되었으나 前 處理를 해야하며, 直接 分析한다 할지라도 ursodeoxycholic acid, cholic acid, hyodeoxycholic acid의 分離能이 良好하지

못하거나, 아니면 分離 途中 溶媒組成을 바꾸어 주어야 하는등 定量的인 면에서 實用度가 낮은 방법들이었다.

이에 著者들은 抱合膽汁酸을 加水分解한 다음 HPLC에 使用할 移動相의 溶媒로 acetonitrile/0.5% ammonium carbonate (pH 6.7)의 比率을 適當히 變更시켜, ursodeoxycholic acid, cholic acid, hyodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid를 同時에 分離 定量하였고 이러한 分析條件을 應用하여 熊膽이라고 市販되고 있는 膽汁生藥을 돼지의 쓸개(豚膽), 소의 쓸개(牛膽)와 比較하여 良好한 分離成積을 얻었으며, 主成分의 含有量에 의해 眞否 判定의 基礎를 이룰 수 있었고 이에 관한 약간의 知見을 얻었기에 報告하고자 한다.

實驗 方法

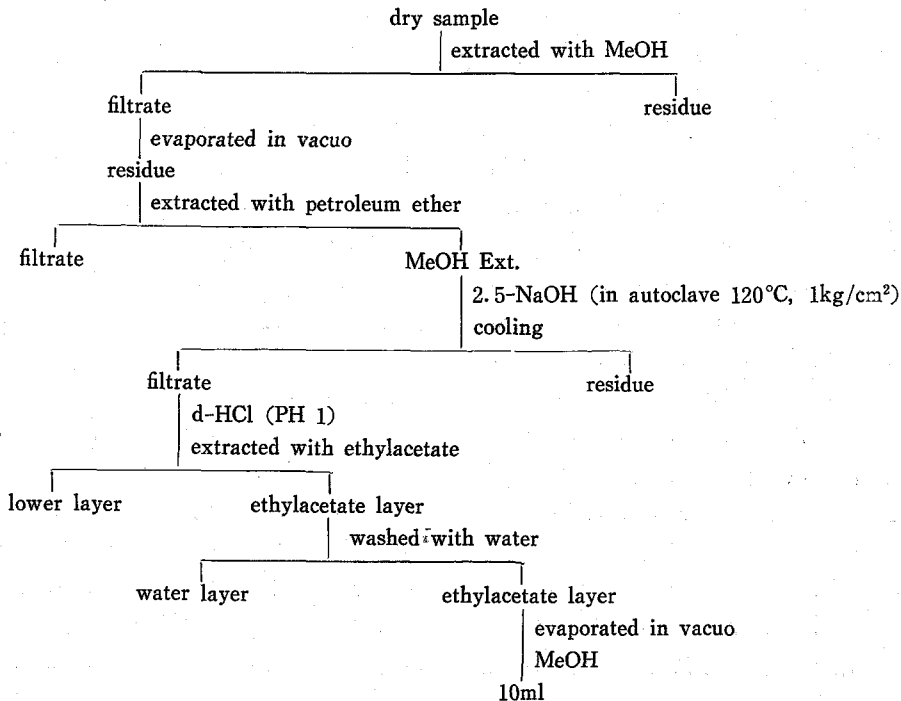
材料 및 試驗 — 膽汁生藥은 市販되고 있는 黃褐色~黑褐色의 塊狀 및 粉末狀의 7종류(No. 1~7, 구입한 順序대로 번호를 정하였다) 1~2g 정도 구입하였으며 豚膽 및 牛膽은 서울

近郊 屠殺場에서 쓸개를 구입하여 膽汁을 減壓 濃縮하여 사용하였다. 표준품인 ursodeoxycholic acid(UDCA), cholic acid(CA), hyodeoxycholic acid(HDCA), chenodeoxycholic acid(CDCA), deoxycholic acid(DCA)는 東京化成製를, acetonitrile, distilled water는 和光純藥製의 HPLC用 試藥으로, ammonium carbonate, ethylacetate는 純正化學製의 一級試藥을 사용하였다.

機器 — High performance liquid chromatograph는 Waters Associate ALC/GPC 244형을 사용하였으며, recorder는 two-pen omniscrite recorder를 autoclave는 국제화학의 Type AC-M을 사용하였다.

標準溶液의 調製 — UDCA, CA, HDCA, CDCA, DCA의 標準品 각각 50mg을 精密히 取하여 MeOH에 溶解, 全量을 10ml로 하여 5mg/ml의 標準溶液을 만들었다.

加水分解에 의한 試料溶液 調製 — 乾燥한 市販 膽汁生藥 및 豚膽, 牛膽 각각 1g을 精密하게 取하여, 細切한 후 250ml round bottom flask에 넣은 다음, 水浴上에서 MeOH 30ml로 1시간씩 3회 還流抽出하여 濾過하고, 濾液을 80°C에서



Scheme I. Extraction procedure

減壓濃縮하여 殘渣를 석유 ether 20ml로 1시간씩 3회 還流抽出하여 濾過, 濾液을 除去하고 殘留物인 MeOH Ex.를 얻었다. 이중 MeOH Ex. 100mg을 取해 100ml의 마개달린 삼각 flask에 넣고, 2.5N NaOH 10ml을 가해 密封하여 autoclave에서 溫度 120°C, 壓力 1kg/cm<sup>2</sup>으로 4시간 加水分解한 후 실온에서 放置 冷却하고, 濾過하여 濾紙를 물로 수회 洗滌한다. 洗滌한 洗液과 濾液을 합쳐 d-HCl을 加해 pH를 1로 調節한 후 ethylacetate 20ml로 3회 抽出한다. 抽出液을 물로 수회 洗滌, 水層을 除去하고, ethylacetate 層을 80°C에서 減壓濃縮하여 殘渣를 MeOH에 溶解, 全量을 10ml로 하여 0.45μm millipore filter로 濾過한 후 試料溶液으로 하였다(Scheme I).

**HPLC에 의한 分析**—標準溶液 및 試料溶液을 각각 40μl씩 注入한 다음 Table I과 같은 條件으로 分析하였다.

**Table I.** HPLC analytical condition

Instrument	Waters Associate Model ALC/GPC 244
Column	μ-Bondapak C <sub>18</sub> (4mm×30cm)
Mobile phase	(pH 6.7) CH <sub>3</sub> CN : 0.5% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (25.5:74.5)
Flow rate	30min 1.0ml/min → 1.5ml/min
Detector	RI(differential refractometer)
Sensitivity	8X
Chart speed	2.5mm/min
Injection volume	40μl

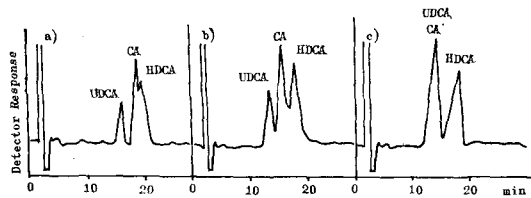
**檢量線 作成**—標準溶液 2ml, 4ml, 6ml, 8ml을 각각 取하여, MeOH를 가해 全量을 10ml로 稀釋하고 40μl을 HPLC에 注入하였을 때 나타난 peak높이와 注入한 量과의 關係를 구해 檢量線을 作成하였다.

**回收率**—HPLC 操作상의 誤差 및 cross contamination을 確認하기 위해 市販 膽汁生藥 No. 1, No.6 및 豚膽의 MeOH Ex. 100mg을 精密히 取해 No.1에는 CA, DCA 각각 10mg을, No.6에는 UDCA, CA, CDCA 각각 10mg을, 豚膽에는 HDCA, CDCA 10mg을 添加하여 試料溶液조제 방법중 加水分解 以下 과정과 같이 한 후

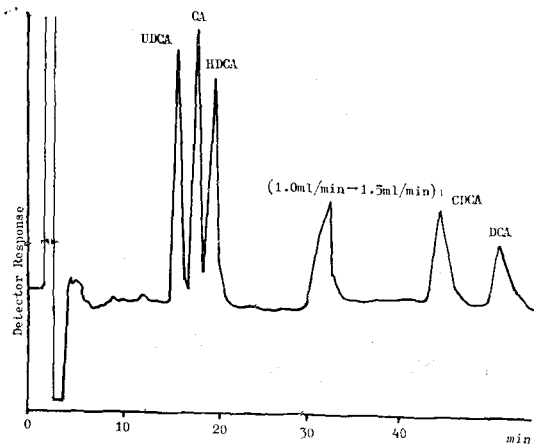
HPLC에 40μl씩 5회 注入하였을 때 追加한 量과 回收한 量을 比較 檢討하였다.

**結果 및 考察**

**HPLC 移動相의 溶媒條件 選擇**—Column은 逆相 chromatography用인 μ-Bondapak C<sub>18</sub>을 사용하였으며, 지금까지 報告된 여러 移動相으로서 UDCA, CA, CDCA, DCA는 分離를 할수 있지만 UDCA, HDCA, CA가 거의 分離가 되지않는 短點을 發見할 수 있었다. 따라서 이들의 分離를 良好하게 할 目的으로 Baba<sup>18)</sup>, Goto<sup>20)</sup> 등이 사용한 acetonitrile/0.5% ammonium carbonate (pH6.7)의 組成比率를 25 : 75, 26 : 74, 27 : 73으로 適當히 變更시켜 얻어진 結果를 Fig. 1에서 볼 수 있었다.



**Fig. 1.** Effect of various composition of mobile phase\* on separation of bile acids by HPLC. \*acetonitrile/0.5% ammonium carbonate(pH 6.7) Composition of mobile phase: a) 25 : 75 b) 26 : 74 c) 27 : 73



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of the standard bile acid mixture composition of mobile phase: acetonitrile /0.5% ammonium carbonate (pH 6.7) (25.5 : 74.5)

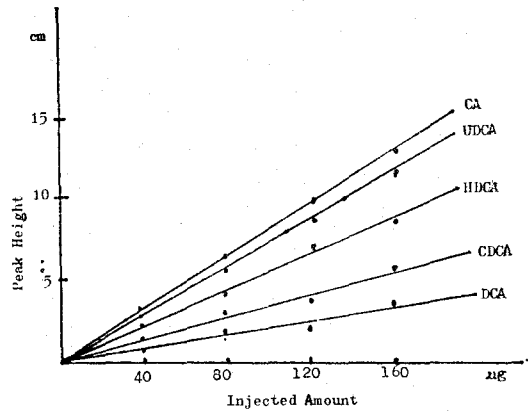
**Table II.** The retention time of bile acids by HPLC

Bile acid	retention time (min.)
Ursodexychoic acid	16
Cholic acid	17.8
Hyodeoxycholic acid	19.7
Chenodeoxychoic acid	42.5
Deoxycholic acid	48.3

移動相 溶媒 比率 25 : 75에서는 CA와 HDCA가 겹쳐 나타나고, 27 : 73에서는 UDCA와 CA가 겹쳐 나타나며, 26 : 74에서는 分離가 되지 않으나 良好하지 못함을 觀察할 수 있었다. 따라서 25.5 : 74.5로 하였을 때 Fig. 2에서 보는 바와 같이 良好한 分離를 얻을 수 있었고 이러한 組成을 移動相 溶媒로 選擇하였다.

流速은 分離時間을 短縮시키기 위하여 注入부터 30분까지는 1.0ml/min.으로, 30분후 1.5ml/min.으로 상승시켰으며, 이때 각각의 標準品の retention time은 Table II와 같다.

檢量線 및 回收率—detector의 linearity를 確認하기 위하여 標準溶液을 稀釋, 40 $\mu$ l씩 注入하



**Fig. 3.** Calibration curve of each standard by HPLC.

였을 때 檢量線은 Fig. 3에서 보는바와 같이 良好한 直線性을 나타내었다.

回收率에 있어서 각각의 標準品 10mg을 市販 膽汁生藥 No. 1, No. 6, 豚膽의 MeOH Ex.에 添加하여 加水分解 후 40 $\mu$ l씩 5회 HPLC에 注入하여 定量하였을 때 回收率은 Table III에 나타난 것처럼 良好한 結果를 보여주었다.

**Table III.** Recovery test of bile acids

Crude bile drug	Bile Acid	Amount in MeOH Ex.	Added	Found (mg)	Recovery		
					mg	%	Mean $\pm$ SD (%)
No. 1	Cholic acid	18.7mg	10mg	28.0	9.3	93	97.2 $\pm$ 2.9
				28.3	9.6	96	
				28.5	9.8	98	
				28.5	9.8	98	
				28.8	10.1	101	
	Deoxycholic acid	9.6mg	10mg	19.1	9.5	95	96.4 $\pm$ 1.8
				19.4	9.8	98	
				19.3	9.7	97	
				19.0	9.4	94	
				19.4	9.8	98	
No. 6	Ursodeoxycholic acid	9.6mg	10mg	19.8	10.2	102	99.8 $\pm$ 2.6
				19.9	10.3	103	
				19.4	9.8	98	
				19.5	9.9	99	
				19.3	9.7	97	

	Cholic acid	23.1mg	10mg	32.5	9.4	94	97.8±2.9
				33.1	10.0	100	
				32.7	9.6	96	
				33.2	10.1	101	
				32.9	9.8	98	
	Chenodeoxycholic acid	5.5mg	10mg	15.3	9.8	98	99.2±2.2
				15.7	10.2	102	
				15.6	10.1	101	
				15.2	9.7	97	
				15.3	9.8	98	
Pig gall	Hyodeoxycholic acid	25mg	10mg	34.3	9.3	93	98.0±4.3
				35.3	10.3	103	
				35.2	10.2	102	
				34.5	9.5	95	
				34.7	9.7	97	
	Chenodeoxycholic acid	15.3mg	10mg	24.9	9.6	96	100.0±3.4
				25.5	10.2	102	
				25.7	10.4	104	
				25.4	10.1	101	
				25.0	9.7	97	

**HPLC에 의한分離 및 定量**—市販 膽汁生藥 No. 1~7 및 豚膽, 牛膽의 試料溶液 40 $\mu$ l을 각각 HPLC에 注入하였을 때 chromatogram은 Fig. 4~8과 같다.

첫째, 分離 pattern을 比較해 보면 No. 1은 牛膽과 같이 CA, DCA의 peak를 確認할 수 있으며 (Fig. 4, 8), No. 6에서는 UDCA, CA, DCA를 確認할 수 있었다 (Fig. 6). No. 2~5, 7에서는 豚

膽과 類似하게 豚膽의 特有成分인 HDCA<sup>22)</sup>와 CDCA의 peak 및 아주 微細한 CA의 peak도 確認할 수 있었다 (Fig. 5, 7). 또한 retention time 12分대와 22分대에서 豚膽과 같이 未知의 peak도 確認할 수 있었는데 그중 하나는 hyocholic acid<sup>23)</sup>로 推定할 수 있었다.

둘째, 각각의 膽汁酸의 含量과 MeOH Ex.收得率을 比較해 보면 No. 1에서는 MeOH Ex.收

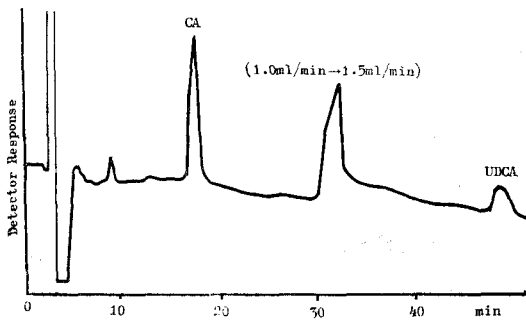


Fig. 4. HPLC chromatogram of commercial crude bile drug No. 1.

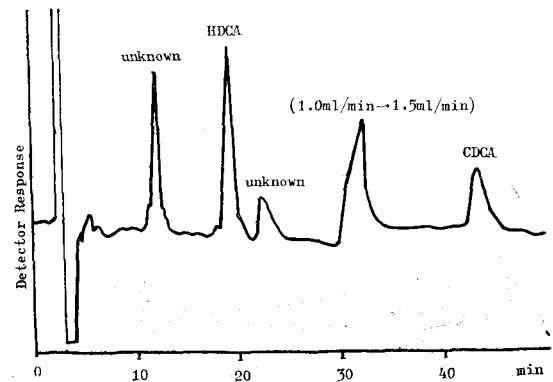


Fig. 5. HPLC chromatogram of commercial crude bile drug No. 2-5, 7.

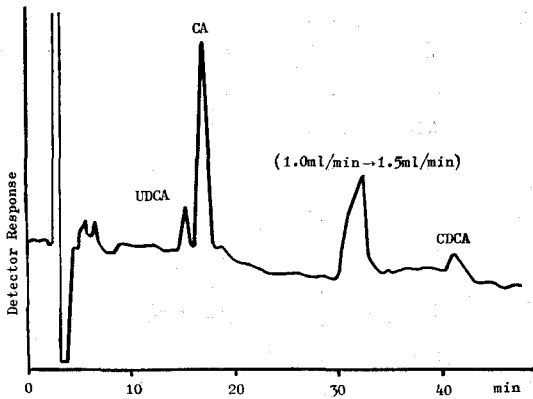


Fig. 6. HPLC chromatogram of commercial crude bile drug No. 6.

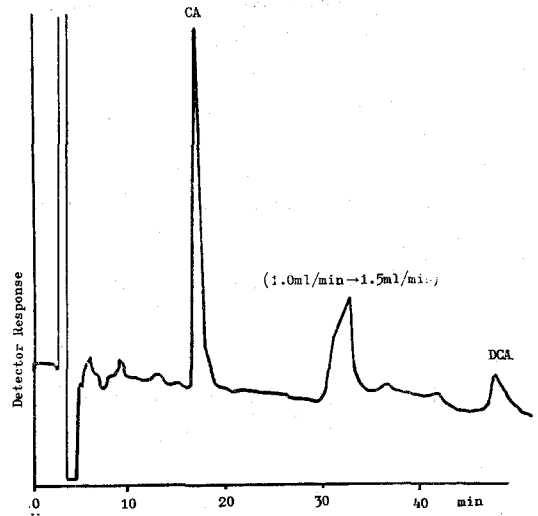


Fig. 8. HPLC chromatogram of ox gall.

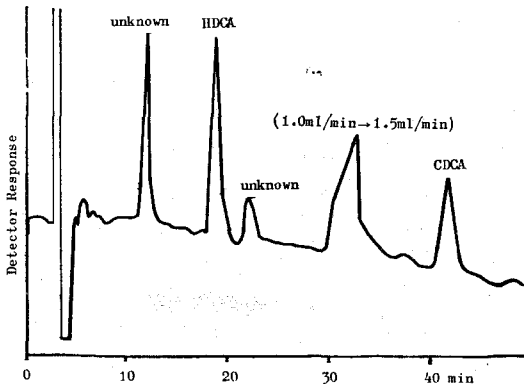


Fig. 7. HPLC chromatogram of pig gall.

得率(%)이 56.53%로 아주 낮았으며, 또한 CA 10.5%, DCA 5.4%로 함유도 낮은 분포를 보여주었

다. 반면에 牛膽에서는 MeOH Ex. 收得率(%)이 73.4%로 相對的으로 높았고, CA 38.4%, DCA 13.3%로 높은 함유량을 보여주었다. No. 6,에서는 MeOH Ex. 收得率(%)이 84.4%이며 UDCA 5.1%, CA 19.5%, CDCA 4.6%로 UDCA의 함유량은 비교적 낮게 나타났다. No. 2~5, 7에서는 MeOH Ex. 收得率(%)이 82.8~98.4%로 높으며, HDCA가 20.6~27.2%, CDCA가 9.9~14.8%이며, 豚膽에서도 MeOH Ex. 收得率(%)이 86.2%이고 HDCA가 21.6%, CDCA가 13.2%로 收得率 및 함유량면에서 서로 類似하게 나타났다(Table IV).

Table IV. Bile acids in commercial crude bile drugs and pig and ox galls.

No.	Color	Yield of MeOH Ext. (%)	Bile Acids Content in galls (%)					Total(%)
			UDCA	CA	HDCA	CDCA	DCA	
1	Yellow brown	56.53%	—	10.5	—	—	5.4	15.9
2	Dark brown	98.4 %	—	+	27.2	14.8	—	42.0
3	Dark brown	87.11%	—	+	23.8	13.1	—	36.9
4	Dark brown	84.9 %	—	+	22.4	13.7	—	36.1
5	Dark brown	85.5 %	—	+	22.0	13.5	—	35.5
6	Dark brown	84.4 %	5.1	19.5	—	4.6	—	29.2
7	Dark brown	82.8 %	—	+	20.6	9.9	—	30.5
Pig	Dark brown	86.2 %	—	+	21.6	13.2	—	34.8
Ox	Dark brown	73.4 %	—	38.4	—	+	13.3	51.7

The data are expressed as amounts (%) of the bile acids in galls determined by means of HPLC. Mark + indicates a very small amount of the acid only expected from the chromatogram

셋째, 이러한 분리 pattern 및 함유, MeOH Ex. 收得率을 總括적으로 檢討해 볼 때 No. 1에서는 분리 pattern이 牛膽과 類似하였지만, MeOH Ex. 收得率 및 CA와 DCA의 함유면에서 差異가 난다는 점이 興味있는 일이다. Uji<sup>11)</sup>에 의하면 猪膽의 MeOH Ex. 收得率が 46.7%, CA 11.2%, DCA 5.2%로 報告한 것에 比較해 볼 때 No. 1과 類似한 점이 있었고, 한편 Kurozumi 등에 의하면 UDCA가 없고 CA와 DCA만이 存在하는 熊膽도 있는 것으로 報告한 사실이 있다. 그들에 의하면, 熊膽의 採取時期, 產地別에 따라 UDCA의 含有量에 變化가 있으며 특히 冬眠期에 採取한 熊膽은 UDCA가 아주 微量이거나 存在하지 않는 것으로 報告하고 있다. 이러한 사실을 미루어 보면 No. 1은 熊膽의 眞品에 疑心을 할 수도 있고, 한편 猪膽으로 推定할 수도 있지만 確實하게 判定할 수는 없는 것 같다.

No. 6은 豚膽, 牛膽과는 분리 pattern이 特異하였고 또한 熊膽 特有成分인 UDCA 및 CDCA, CA가 確認되었으며 따라서 熊膽의 眞品으로 推定할 수가 있었다.

No. 2~5, 7은 豚膽과 분리 pattern이 類似하였고, 豚膽 特有成分인 HDCA가 確認되었으며 MeOH Ex. 收得率 및 함유면에서도 類似한 점으로 미루어 豚膽으로 推定할 수가 있었다.

그러나, 현재까지 確實하고 信憑性있는 資料가 없기 때문에 사실상 곰의 쓸개를 直接 採取하지 않고는 熊膽의 眞否를 가리키는 어렵고, 이러한 分析方法을 應用, 產地別 採取時期에 따라 出處가 確實한 熊膽 및 여러 관련 動物膽에 대해 綜合的인 data를 樹立한다면 市販 膽汁生藥 중 熊膽의 眞否 判定에 크게 도움이 될 것이다.

## 結 論

市販중인 여러 膽汁生藥 및 豚膽, 牛膽의 加水分解후의 MeOH Ex.를 HPLC를 이용하여 分離, 比較하였다.

1. HPLC의 移動相의 溶媒로서 acetonitrile/0.5% ammonium carbonate (pH 6.7) (25.5 : 74.5)를 사용했으며, 流速은 1.0ml→1.5ml/min.으로 檢出器는 differential refractometer를 사용

했을 때 UDCA, CA, HDCA, CDCA, DCA를 동시에 分離할 수 있었고 檢量線의 直線性 및 回收率도 良好하였다.

2. 上記方法에 따라 膽汁生藥 및 豚膽, 牛膽 중의 主要 膽汁酸을 分離한 結果, 7종류의 市販 膽汁生藥 중 No. 1은 본 실험에서 牛膽의 分離 pattern과 類似하였고, No. 6은 熊膽의 眞品으로, No. 2~5, 7은 豚膽으로 推定할 수 있었다.

3. 이 實驗方法은 膽汁生藥 및 膽汁酸 製劑의 品質評價에 應用할 수 있다고 사료된다.

〈1984년 5월 30일 접수 : 6월 26일 수리〉

## 文 獻

1. Namba, T., Nunome, S., Hattori, M., Higashide, S. and Maekubo, T.: *Yakugaku Zasshi*, **102**, 768(1982).
2. 朴萬基, 第30回 大韓藥學會 學術發表 Symposium (1981).
3. Shoda, M.: *J. Biochem.*, **7**, 505 (1927).
4. Iwasaki, T.: *Z. physiol. Chem.*, **244**, 181 (1936).
5. Sjövall, J.: *Acta. Chem. Scand.*, **6**, 1552 (1952).
6. Kimura, M. and Osadu, E.: *Yakugaku Zasshi*, **87**, 801 (1967).
7. Uji, A.: *Yakugaku Zasshi*, **95**, 214 (1975).
8. Beke R. De, G. A., Barbier, W.F.: *J. Chromatog.*, **193**, 504 (1980).
9. Hara, S., Takeuchi, M., and Tachibana, M.: *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 483(1964).
10. Uij, A. and Takiura, K.: *Yakugaku Zasshi*, **95**, 114 (1975).
11. Uji, A.: *Syoyakugaku Zasshi*, **29**, 22 (1975).
12. Van Berge, Hanegouwen, G.P., Ruben, A., and Brandt, K.H.: *Clin. Chim. Acta*, **54**, 249 (1974).
13. Musial, C.B. and Williams, C.N.: *J. Lipid. Res.*, **20**, 78 (1979).
14. Tones, D.C., Melchiorand, G.W. and Watkins, M. J.: *J. Lipid. Res.*, **17**, 273 (1976).
15. Mingroneand, G. and Grevo, A.V.: *J. Chromatog.*, **183**, 277 (1980).
16. Okuyama, S. and Vemura, D.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **52**, 124 (1979).
17. Shaikh, B. J. and Pontzer, N.J.: *Anal. Biochem.*, **85**, 47 (1978).

18. Baba, S. and Benoyma, R.: *Kobe J. Med. Sci.*, **26**, 89 (1980).
19. Arisue, K., Ogawa, Z. and Kohda, K.: *Japan. J. Clin. Chem.*, **9**, 124 (1980).
20. Goto, J., Kato, H. and Nambara, T.: *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 645 (1980).
21. Shaw, R., and Elliott, W.H.: *Anal. Biochem* **74**, 273 (1976).
22. Haslewood, G.A.D.: *Biochem. J.*, **62**, 637 (1956)
23. Tokyo *Tanabe Quarterly*, **31**, 21 (1980).
24. Kurozumi, K., Harano, T., and Yamasaki, K *J. Biochem.*, **7**, 489 (1973).