

생약 복합제제의 품질평가에 관한 연구(제 2 보) 生脈散의 품질평가 방법에 관하여

홍남두 · 김종우 · 원도희* · 江潤祥** · 김남재 · 주수만

경희의료원, 국립보건원*

香港中文大學**

(1987년 1 월 17일 접수)

Studies on Quality Evaluation of Crude Drug Preparation (II) Analysis of Saengmaek-san by Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography

N.D. Hong, J.W. Kim, D.W. Won*, Y.C. Kong**, N.J. Kim and S.M. Joo

Medical Center, Kyung-Hee University, National Institute of
Health* and Chinese University of Hong Kong**

(Received January 17, 1987)

Evaluation method of crude drug preparations was studied in Saengmaek-san. Zig-zag TLC scanning profiles and high performance liquid chromatograms were obtained from Saengmaek-san and its each crude drug. A method using TLC densitometry and high performance liquid chromatography was established for the precise determination of ginsenoside Rb₁ in Saengmaek-san containing *Ginseng Radix*. Consequently, ginsenoside Rb₁ content was 0.45-0.48 mg per g of Saengmaek-san. This method was found to be useful for the quality evaluation of oriental medicinal preparations.

생약 복합제제는 여러가지 성분을 갖고 있는 생약이 2 종 이상으로 구성된 제제로서 다양한 활성을 나타낼 뿐만 아니라 이 제제를 규격화 내지는 균일화하는 데에는 많은 어려운 점이 있다.

따라서 저자 등은 생약 복합제제 품질평가에 관한 연구의 일환으로 일정한 조건하에서 얻어지는 chromatogram은 각 재제에 따라 각각 특이하기 때문에 그 고유의 chromatogram pattern을 비교 분석함으로써 간편하고 용이하게 품질관리를 할 수 있다는 점에 착안하여 生脈散을 선정하여 본 실험에 착수하였다¹⁻⁵⁾.

生脈散은 方藥合編⁶⁾의 “暑月常服代熱水飲之”하는 효능을 갖는 생맥산에 黃芪, 甘草, 香薷, 白片 豆를 가미한 처방으로 元氣不足, 脈無力者의 효능

을 갖고 있어, 주로 여름에 음료로 널리 응용되고 있는 생약 복합제제 중의 하나이다⁷⁾.

처방을 구성하고 있는 개개 생약중에서 감초성분인⁸⁻¹⁰⁾ glycyrrhizin, liquiritin, 인삼 성분인¹¹⁻¹⁵⁾ ginsenoside 계열의 saponin 등 특유성분 또는 유효성분의 확인 및 정량에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해서 보고되었으나 이들의 복합제제인 생맥산에 관한 품질평가 방법에 관한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 저자 등은 생맥산 역기스과립제, 생맥산 점조역기스 및 구성생약의 zig-zag TLC scanning profile과 HPLC chromatogram의 pattern 분석을 통하여 정성적인 확인과 처방중 고가생약인 인삼성분인 ginsenoside Rb₁ 및 Rg₁을 지표로 하여 품질관리의 가능성에 대한

몇가지 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

재료

본 실험에서 사용한 재료는 서울시내 건재약국에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며 생맥산의 처방은 아래와 같다.

麥門冬(*Liriope Tuber*) 5.0g, 人蔘(*Ginseng Radix*), 草果(*Amomi meddi Fructus*), 香薷(*Elscholtziae Herba*), 白片豆(*Dolichi Semen*), 黃芪(*Astragali Radix*), 甘草(*Glycyrrhizae Radis*) 각 2.0g.

시료의 조제

상기의 실험 재료들을 세절하여 상법에 따라 개개 생약의 수성점조 엑기스와 생맥산 수성점조 엑기스를 만들었으며, 생맥산 엑기스과립은 경희의료원 제약실의 자가제조시설을 사용하여 엄격한 제조공정하에서 제조된 것을 사용하였다.

검액의 조제

생맥산을 구성하는 개개 생약의 수성엑기스, 생맥산 수성엑기스 및 생맥산 엑기스과립 각각 10g씩 취하여 methanol 100ml을 가하여 methanol 가용부를 취하여 감압농축한 다음 methanol 5ml을 가하여 정성시험용 검액으로 하였다.

또 인삼 수성엑기스, 생맥산 수성엑기스 및 생맥산 엑기스과립 각각 20g을 취하여 일반적인 saponin 추출방법에 준하여 추출하였다. 즉 90% methanol 용액 250ml로 1시간씩 3회 환류추출여과하고 여액을 감압농축하여 얻은 잔사에 증류수 200ml를 가하여 용해시키고 석유에틸 300ml씩 3회 추출하여 탈지시켰다. 수층을 *n*-butanol 100ml씩 3회 추출하여 butanol 층을 모아 소량의 증류수로 2회 세척한 다음 butanol 층을 감압농축하였다. 잔사에 methanol 5ml를 정확히 가하여 함량시험용 검액으로 하였다.

표준액의 조제

ginsenoside Rg₁(이하 Rg₁) 및 ginsenoside Rb₁(이하 Rb₁)은 공히 和光純藥(株)의 시약을 사용하여 0.1% methanol 용액을 만들어 표준액으로 하였다.

TLC Chromatogram의 Pattern 분석

Table I—Analytical Conditions for HPLC.

Factor	Condition
Instrument	Waters Associate Co.
Column	μ -Bondapak C ₁₈
Mobile phase	50% Acetonitrile/H ₂ O (pH 3.0 adjusted by phosphoric acid)
Flow rate	1.0ml/min
Sample size	10 μ l
Detector	UV 280nm
Sensitivity	0.2 AUFS

TLC plate는 silicagel 60F₂₅₄(E. Merck)의 pre-coated plate(0.2mm)을 사용하여 상법에 따라 정성시험용 검액을 점적하고, 전개용매로 MeOH·*n*-BuOH·H₂O·CHCl₃ 혼합액(4:1:0.5:6)을 사용하여 TLC를 행한 후 발색시켰다. 발색시약으로 50% 황산시액을 사용하여 105°C에서 15분간 가열하여 발색시키고 발색된 TLCplate를 zig-zag dual wavelength TLC scanner (Shimadzu CS-910, Japan)으로 파장 λ_R 700nm, λ_S 420nm에서 scanning 하였다.

HPLC Chromatogram의 Pattern 분석

정성시험용 검액을 Millipore 여과지로 여과하고 여액을 20배 희석하여 Table I과 같은 조건에서 실험을 행하였다.

TLC에 의한 Rg₁과 Rb₁의 확인 및 Pattern 분석

TLC plate는 silicagel 60F₂₅₄의 pre-coated plate를 사용하여 함량시험용 검액 및 표준액을 각각 10 μ l씩 점적하고, 전개용매로 CHCl₃·MeOH·H₂O 혼합액(65:35:10)의 하층을 이용하여 상법에 따라 TLC를 행한 후 발색시켰다. 발색시약으로 50% 황산시액을 분무하고 105°C에서 15분간 가열하여 발색시키고 발색된 TLC plate를 TLC scanner로 파장 λ_R 700nm, λ_S 500nm에서 scanning 하였다.

한편 생맥산 엑기스과립의 butanol 추출액에 Rg₁ 및 Rb₁ 표준액 각각 2.5, 5.0 및 10.0 μ g을 첨가하여 TLC를 행한 후 pattern을 비교 관찰하였다.

생맥산 역기스과립중 Rb₁의 정량

시료용액의 조제—함량시험용 검액 1.0 ml를 silicagel 60G로 코팅한 TLC plate(20×20 cm)에 preparative TLC 방법에 따라 전개용매 CHCl₃·MeOH·H₂O 혼합액(65:35:10)의 하층을 사용하여 TLC를 행한 후 Rb₁의 Rf치 부분을 긁어 모아 열 methanol 5 ml씩 3회 추출하여 얻은 methanol 추출액을 감압농축하였다. 잔사에 methanol 1.0 ml를 정밀히 가하여 정량용 시료용액으로 하였다.

TLC densitometry법에 의한 정량—표준액 Rb₁을 2.5, 5.0 및 10.0가 되도록 methanol로 희석하여 각각 10 μl씩 TLC plate(pre-coated plates, silicagel 60 F₂₅₄, E. Merck)에 점적한 후 전개용매 n-BuOH·EtOAc·H₂O 혼합액(4:1:5)의 상층을 사용하여 상법에 따라 TLC를 행하고 50% 황산시액을 분무하고 105°C에서 15분간 가열하여 발색시킨 다음 λ_R 700 nm, λ_S 420 nm에서 TLC scanning을 행하였다. profile에서 얻어진 Rb₁ peak 높이로부터 검량선을 작성하였다.

따로 정량용 시료용액 10 μl를 TLC plate에 점적하고 상기 검량선의 작성에서의 동일한 방법으로 실험을 행하였다. 여기서 얻어진 Rb₁의 peak 높이를 검량선에 도입하여 검액중의 Rb₁ 함량을 산출하였다. 또한 정량 결과는 동일한 조작을 5회 반복하여 그 평균치를 나타내었다.

정량용 시료용액에 Rb₁ 표준액 25 및 50 μg을 각각 정밀히 첨가한 후 상기 검량선의 작성방법에 준하여 실험을 행하여 회수율을 산출하였다.

HPLC에 의한 Rb₁의 정량—Rb₁ 표준액을 0, 25, 0.5 및 1.0 μg/10 μl가 되도록 methanol로 희석하여 Table I과 같은 조건에서 실험하여 검량선을 작성하였다.

따로 정량용 시료용액을 Millipore 여과지로 여과하고 여액을 20배 희석하여 Table I과 같은 조건에서 실험을 행하고 검량선으로부터 검액중의 Rb₁ 함량을 산출하였다. 또한 정량 결과는 동일한 조작을 5회 반복하여 평균치로 나타내었다.

정량용 시료용액에 Rb₁ 표준액 25 및 50 μg을 정밀히 가하여 상기 정량법과 동일한 방법으로 실험을 행하여 회수율을 산출하였다.

실험결과 및 고찰

TLC에 의한 Pattern 분석

생맥산 역기스과립제, 생맥산 점조액기스 및 구성생약의 methanol 추출물을 MeOH·n-BuOH·H₂O·CHCl₃ 혼합액(4:1:0.5:6)으로 전개하여 각각의 구성성분을 양호하게 분리하였으며 황산시액으로 발색시킨 결과를 Fig.1에 나타내었다. 발색된 plate를 2 파장 TLC scanner로 λ_R 700 nm, λ_S 420 nm에서 측정된 결과를 Fig.2에 나타내었다. 각 시료마다 고유의 pattern을 갖고 있음을 알 수 있었고, 특히 개개의 구성생약과 생맥산과의 pattern 차이를 인정할 수 있었으며, 생맥산 역기스과립제와 생맥산 점조액기스의 차이는 제조 공정 또는 기타 다른 요인에 의한 것으로 사료된다.

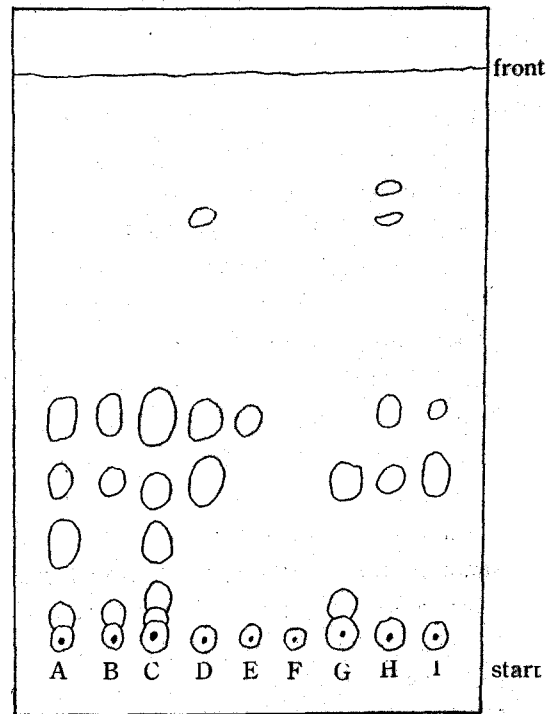


Figure 1—TLC chromatogram of MeOH fraction of Sangmaek-san and each herb.

Key: A, Saengmaek-san Granule; B, Saengmaek-san Ex; C, *Liriodopsis Tuber*; D, *Ginseng Radix*; E, *Amomi meddi Fractus*; F, *Elscholtziae Herba*; G, *Dolichi Semen*; H, *Glycyrrhizae Radix*; I, *Astragali Radix*.

HPLC Chromatogram 의 분석

생맥산 시료용액의 HPLC chromatogram 을 Fig.3에 표시하였다. 역시 TLC chromatogram 에서와 마찬가지로 고유의 pattern 을 갖고 있음을 알 수 있었다.

TLC 에 의한 생맥산 및 인삼 Butanol 추출물

중 Rb₁, Rg₁의 확인 및 Pattern 분석

일반적으로 saponin 추출방법에 따라 얻은 butanol 추출물을 Yip 등¹⁵⁾의 방법에 따라 실험한 바 양호한 분리능을 얻었고(Fig.4), 발색된 plate 를 2 파장 TLC scanner 로 λ_R 700 nm, λ_S 500 nm 에서 측정한 결과를 Fig.5에 나타낸 바와 같이

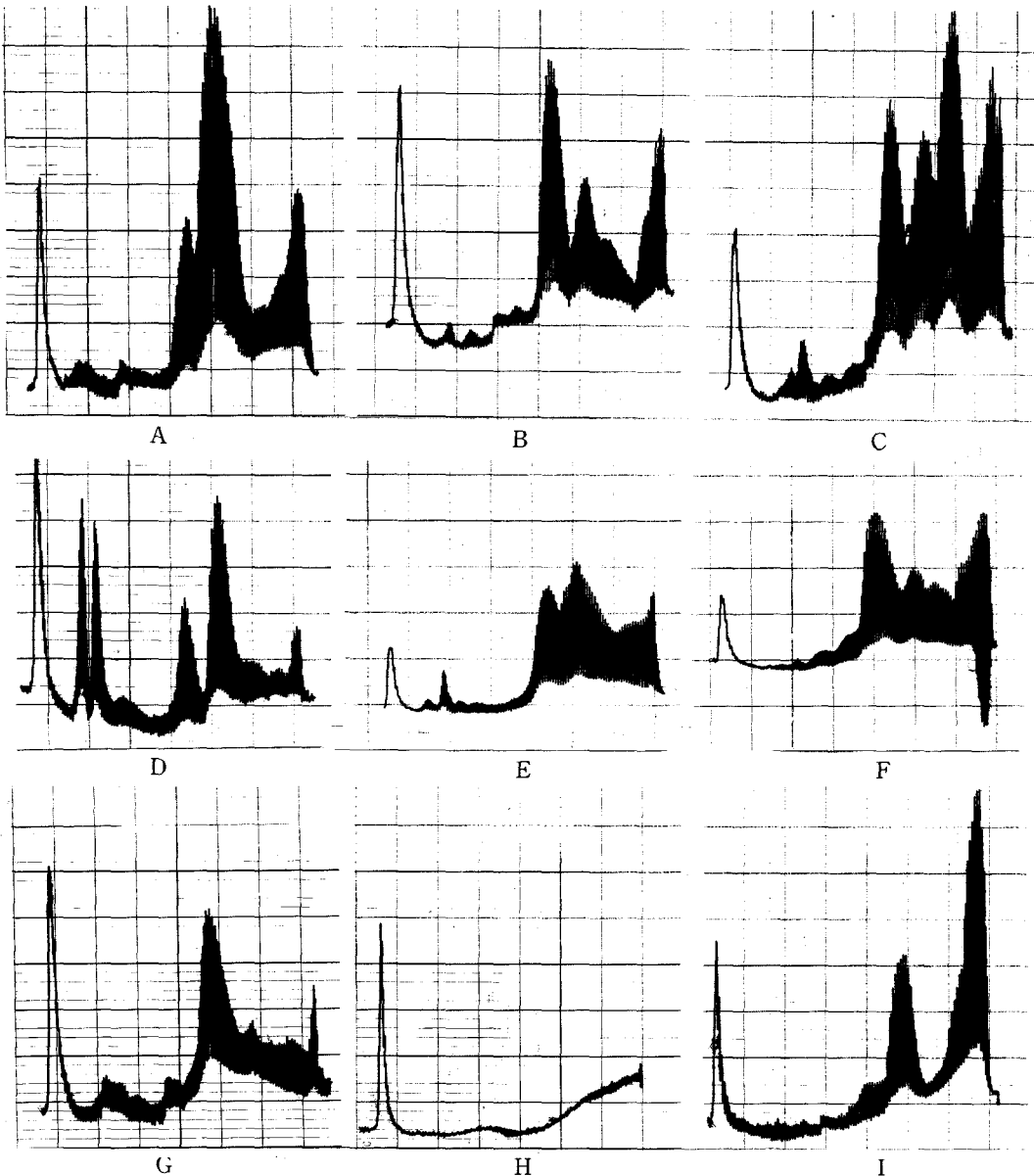


Figure 2—Zig-zag TLC scanning profile of MeOH fraction of Saengmaek-san and each herb(sample -II).

Key: A, Saengmaek-san Ex.; B, Sangmaek-san granules; C, *Astragali Radix*; D, *Glycyrrhizae Radix*; E, *Ginseng Radix*; F, *Liriopsis Tuber*; G, *Amomi meddi Fructus*; H, *Escholtziae Herba*; I, *Dolichi Semen*.

생맥산 엑기스과립제, 생맥산 점조엑기스 및 인삼 각 시료는 고유의 pattern을 갖고 있었고 Rb₁ 및 Rg₁을 각각 Rf 0.53 및 0.84에서 확인할 수 있었다. 또한 시료에 Rb₁ 및 Rg₁ 표준액을 첨가하였을 때 각 peak가 증가됨을 나타내었다(Fig.6, 7).

TLC Densitometry법에 의한 생맥산 엑기스 과립제중 Rb₁의 정량

검량선은 Fig.8에 표시한 바와 같이 5.0~20.0 μg 범위에서 양호한 직선성을 얻었고, 직선식은 $y=0.18x+0.2$ 이었다. 반면에 butanol 추출물을 사용하여 Rb₁을 정량함에 있어서는 방해물질 등의 영향때문에 혼란하여 preparative TLC법을 이용하였다. 시료용액의 2 파장 TLC scanner로 λ_R 700 nm, λ_S 420 nm에서 측정된 바 Rb₁을

정도 좋게 검출할 수 있었고, 정량결과를 Table II에 나타내었다. 그 결과 생맥산 엑기스과립제 중

Table II—Contents of Ginsenoside Rb₁ in Saengmaek-san by TLC densitometry.

Sample	Ginsenoside Rb ₁ (mg/g)
1	0.41
2	0.47
3	0.53
4	0.30
5	0.45
\bar{x}	0.45
S. D.	0.05

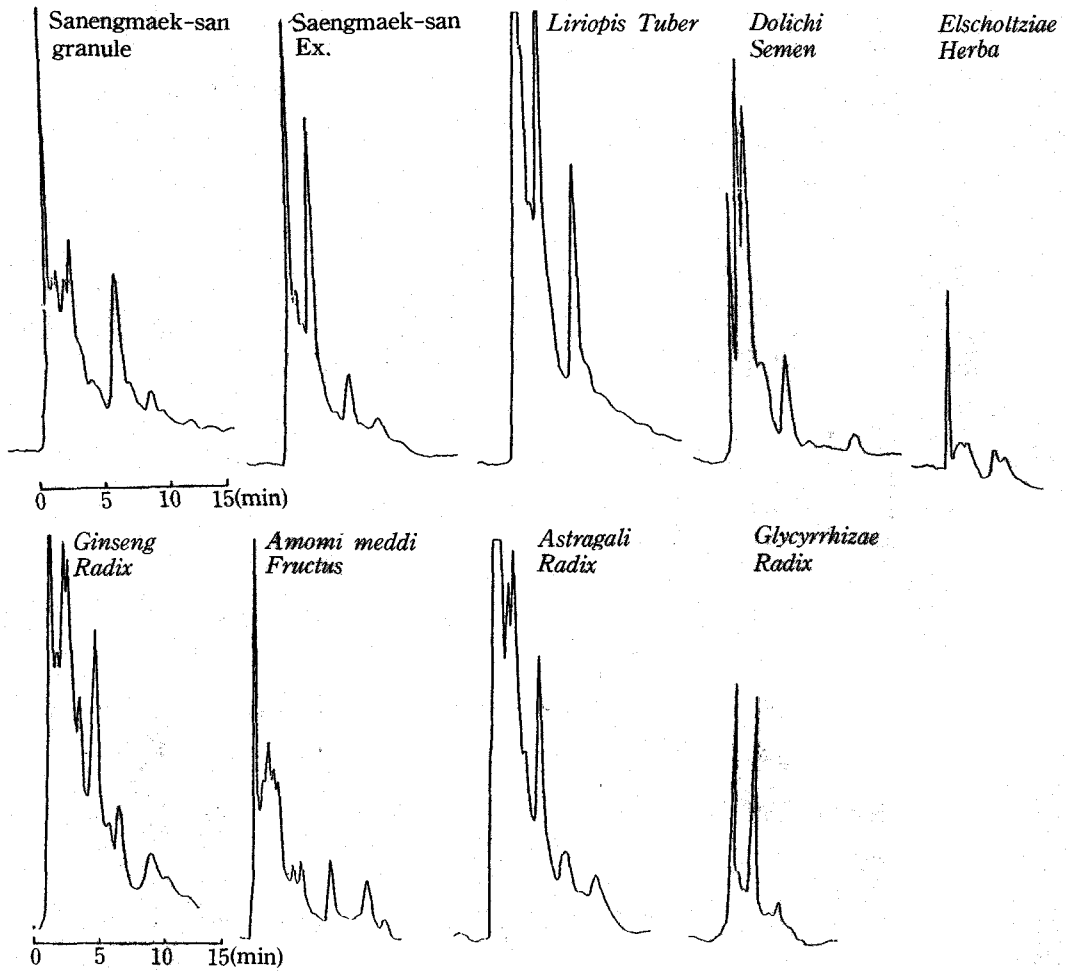


Figure 3—HPLC chromatograms of MeOH fraction of Saengmaek-san and each herb(Sample-II).

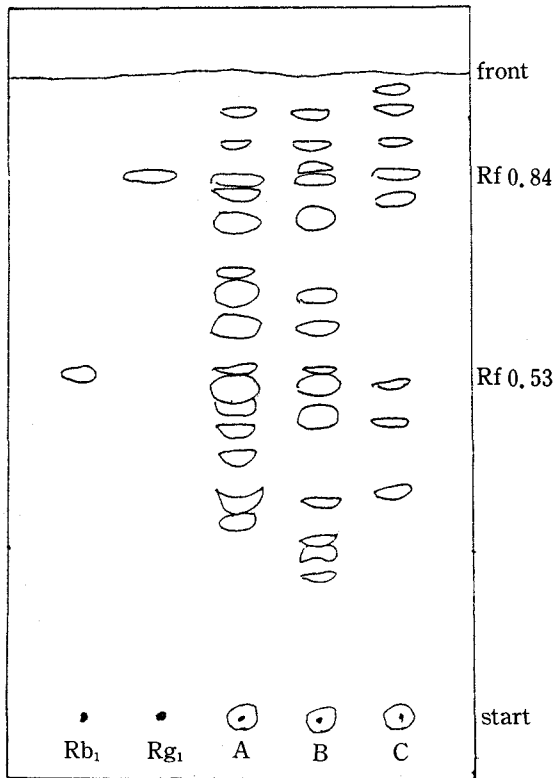


Figure 4—TLC chromatogram of BuOH fraction of Saengmaek-san and *Ginseng Radix*.
Key: A, Ginseng radix; B, Saengmaek-san granule; C, Saengmaek-san Ex.

Table III—Recovery of Ginsenoside Rb₁ after Addition to Saengmaek-san by TLC Densitometry.

Sample	Contents in sample (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
1	180	25	210	97.7
2	180	25	203	194.4
3	180	50	231	100.4
4	180	50	233	01.3
\bar{x}				98.5
S. D.				2.69

Table IV—Contents of Ginsenoside Rb₁ in Saengmaek-san by HPLC.

Sample	Ginsenoside Rb ₁ (μg/g)
1	0.43
2	0.54
3	0.57
4	0.41
5	0.47
\bar{x}	0.48
S. D.	0.06

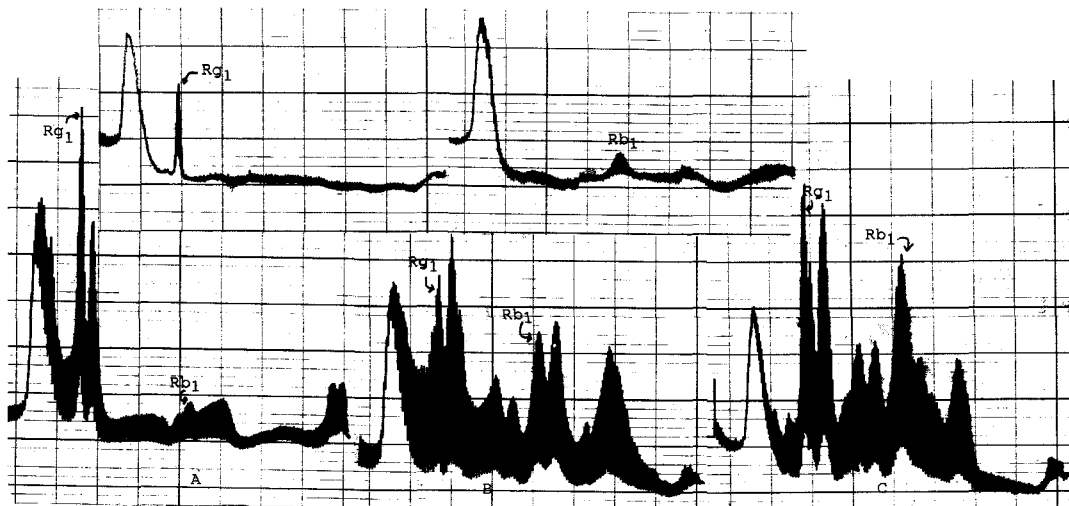


Figure 5—Zig-zag TLC scanning profile of butanol fraction of Saengmaek-san *Ginseng Radix* and ginsenoside Rg₁, Rb₁.
Key: A, ginsenoside Rg₁; B, ginsenoside Rb₁; C, Saengmaek-san; D, Saengmaek-san Granule; E, *Ginseng Radix*.

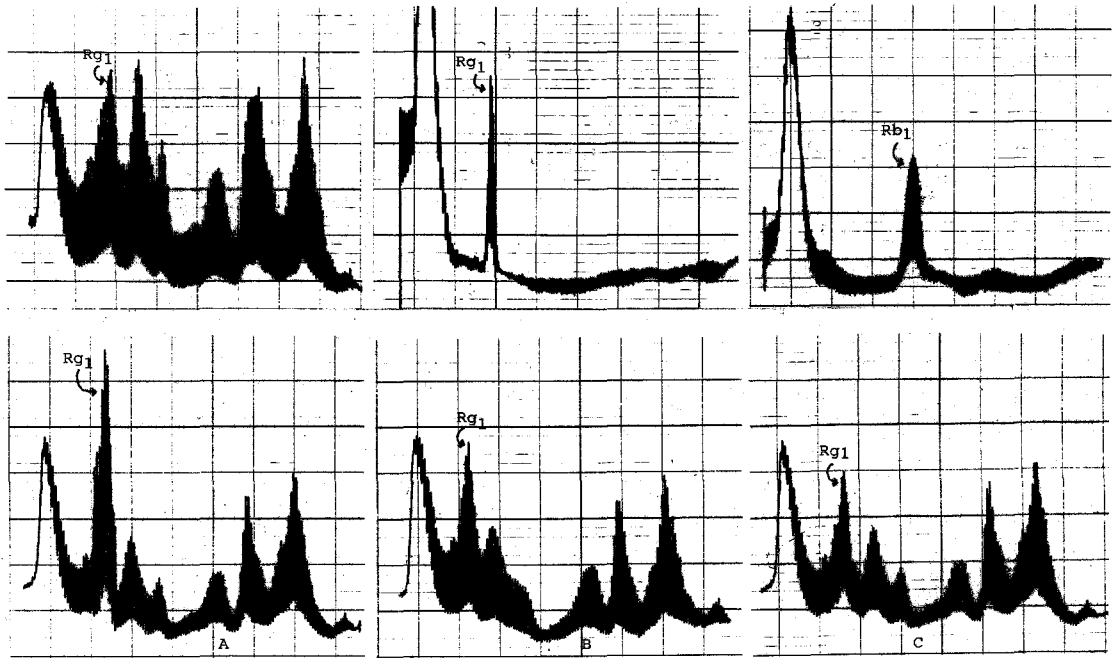


Figure 6—Zig-zag TLC scanning profiles by addition of ginsenoside Rg₁ to butanol fraction of Saengmaek-san.
Key: A, 10 µg; B, 5.0 µg; C, 2.5 µg.

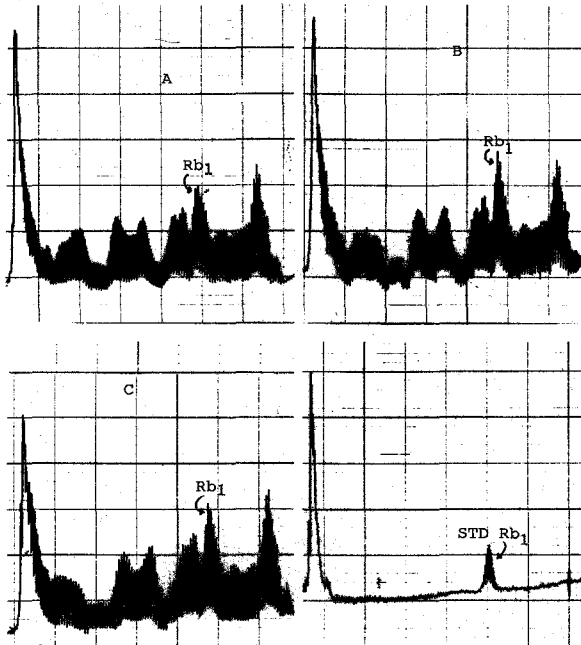


Figure 7—Zig-zag TLC scanning profiles by addition of ginsenoside Rb₁ to butanol fraction of Saengmaek-san.
Key: A, 10 µg; B, 5.0 µg; C, 2.5 µg.

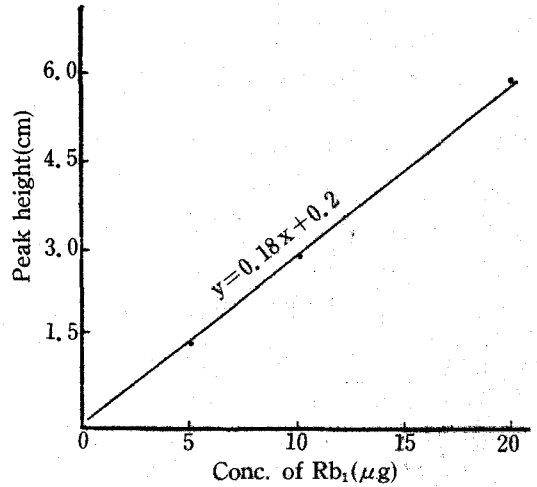


Figure 8—Calibration curve for ginsenoside Rb₁ by TLC densitometry.

의 Rb₁은 0.45±0.05 mg/g이었다. 시료에 Rb₁ 표준품 25 및 50 µg을 첨가하여 회수시험을 행한 바 98.5%의 회수율을 나타내었다(Table III).

HPLC에 의한 생맥산 엑기스과립제중 Rb₁의 정량

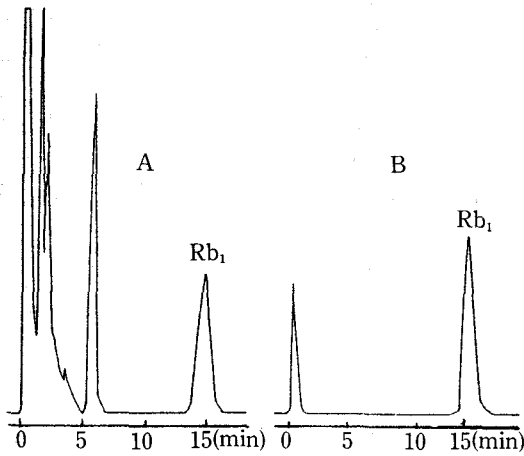


Figure 9—HPLC chromatograms of ginsenoside Rb₁ and Saengmaek-san. Column, μ -Bondapak C₁₈; eluent, 25% acetonitrile/H₂O 90% and 100% acetonitrile 10%; flow rate, 1.0 ml/min; sample size, 10 μ l; detector, UV 203 nm. Key: A, Saengmaek-san; B, Standard of ginsenoside Rb₁.

Fig.9에 Rb₁ 표준액 및 생맥산 엑기스과립제로부터 얻은 HPLC chromatogram을 나타낸 바와 같이 ginsenoside Rb₁은 retention time 14.8분에서 sharp한 peak를 얻을 수 있었다. 또한 검량선은 2.5-10.0 μ g 범위에서 양호한 직선성을 얻었고, 그 직선식은 $y=0.86x-0.2$ 로 나타났다 (Fig.10). preparative TLC법에 의하여 얻어진

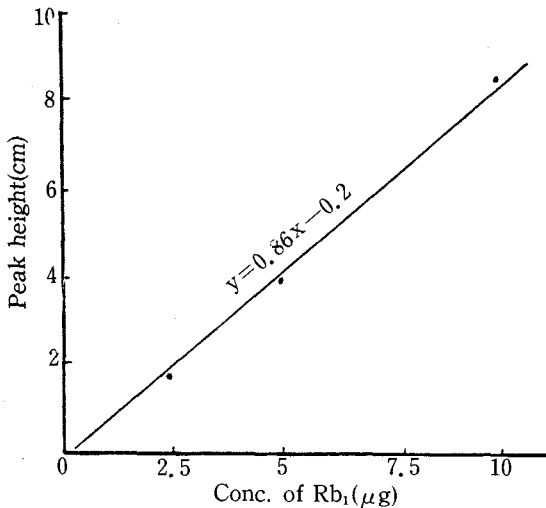


Figure 10—Calibration curve for ginsenoside Rb₁ by HPLC.

Table V—Recovery of Ginsenoside Rb₁ after Addition to Saengmaek-san by TLC Densitometry

Sample	Contents in sample (μ g)	Added (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)
1	192	25	210	96.8
2	192	25	213	98.2
3	192	50	245	101.2
4	192	50	236	97.5
\bar{x}				98.4
S. D.				1.68

시료용액중의 Rb₁의 함량은 생맥산 엑기스과립제 1g 당 0.48 ± 0.06 mg을 함유하고 있음을 알 수 있었다 (Table IV). 또한 시료용액에 Rb₁ 표준품 25 및 50 μ g을 첨가하여 회수시험을 한 바 98.4%의 회수율을 나타내었다 (Table V).

결론

생맥산 및 구성생약의 zig-zag TLC scanning profile 및 HPLC chromatogram의 pattern을 비교 분석한 바 각 검체의 고유 pattern을 얻을 수 있었다. 또한 생맥산 butanol 추출물의 zig-zag TLC scanning profile을 검토한 바 인삼의 성분인 ginsenoside Rb₁ 및 ginsenoside Rg₁의 peak를 확인할 수 있었고 고유한 pattern을 얻었다.

생맥산중 ginsenoside Rb₁의 정량은 TLC densitometry 및 HPLC를 이용하여 양호하게 정량할 수 있었다. 따라서 생맥산의 품질평가의 한 방법으로 응용할 수 있을 것으로 생각되며 앞으로 계속해서 다른 지표성분을 사용하는 방법도 추구하고자 한다.

감사의 말씀

이 논문에 소요되는 경비의 일부는 경희의료원의 연구비 지원으로 이루어 졌으며 이에 심심한 사의를 표하는 바이다.

문 헌

- 1) 洪南斗, 金鍾禹, 金南宰, 孫楨坤, 생약학회지, 12, 119 (1981)
- 2) 河內敬朝, 若官忠弘, 黒田純夫, 生薬分析の技法(I), 大阪生薬協会, 大阪, p.513 (1978).
- 3) 山路 昭 前田義美, 廣谷芳彦, 紀氏汎恵, 大西 昇, 平岡榮一, 米田該典, 薬剂学, 43, 175 (1983)
- 4) 黃永植, 元道喜, 尹泰輔, 趙貞姬, 盧希元, 국립보건의원보, 21, 341 (1984)
- 5) 早川順子, 野田直布, 山田貞二, 宇野圭一, 薬学雑誌, 104, 50 (1984)
- 6) 黃道淵, 大方藥合編, 杏林出版社, p.107 (1977)
- 7) 慶熙醫療院 漢方病院, 漢方製劑解説集(第 2 集), 慶信, p.79 (1982)
- 8) 小川俊太郎, 吉田昭義, 三谷洋子, 薬学雑誌, 96, 1488 (1976)
- 9) 宮田一好, 梅田貴文, 三宮昌樹, 水口和生, 病院薬学, 9, 410 (1983)
- 10) 早坂正孝, 鈴木 満, 草野源次郎, 水柿道直, 薬剂学, 45, 127 (1985)
- 11) S. Sanda, J. Shoji and S. Shibata, *Yakugaku Zasshi*, 98, 1048 (1978)
- 12) T. Nagasawa, T. Yokozawa, Y. Nishino. and H. Oura, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 2059 (1980)
- 13) J. Lui and E. Staba, *J. Nat. Prod.*, 43, 340 (1980)
- 14) 지형준, 김현수, 생약학회지, 16, 171 (1985)
- 15) T.T. Yip, C.N.B. Lau, P.P.H. But and Y.C. Kong, *Am. J. Chinese Med.*, 13, 77 (1985)