

## 柴胡 含有 生藥製劑중 甘草 指標成分의 確認 및 定量

崔 康 注 · 高 成 龍 · 田 炳 鮮

韓國人蔘煙草研究所

### Identification and Quantitative Determination of Index Component of Glycyrrhizae Radix from Crude Drug Preparation Containing Bupleuri Radix

Kang Ju Choi, Sung Ryong Ko and Byeong Seon Jeon

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute

**Abstract**—As a part of studies on the quality control of crude drug preparation (*So-Shi-Ho-Tang*), index components of Glycyrrhizae Radix were identified by TLC and quantified by HPLC. Specific red spot ( $R_f=0.47$ ) was identified in acid hydrolysate of glycosidic fraction on silica gel plate with benzene/ethyl acetate (1:1, v/v). The content of glycyrrhizin was determined by quantification of glycyrrhetic acid by HPLC on  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  column with MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (78:19:3, v/v). Its recovery rate in the extract granules, compared to the content in the Glycyrrhizae Radix, was  $83.3 \pm 0.7\%$ .

**Keywords**—Glycyrrhizae Radix · index components · crude drug preparation (*So-Shi-Ho-Tang*) · TLC · HPLC

옛부터 漢方製劑는 주로 수종의 生藥을 배합하여 湯劑로 服用하여 왔으나 最近에는 복용이 간편하도록 제제화되는 추세에 있고 아울러 品質檢査機關에서도 객관성있는 品質管理를 수행하기 위하여 漢方의 科學化에 많은 努力을 경주해오고 있다. 그러나 生藥材는 그 자체의 成分含量差가 클뿐 아니라 抽出 濃縮過程 및 제제화 과정에서 他 生藥成分의 영향 등 여러가지 요인에 의하여 成分含量의 減少를 야기시켜 品質管理에 어려움이 많다고 볼수 있다. 甘草의 경우도 生藥複方劑의 湯液 조제시에 他 生藥劑의 영향으로 最終 湯液중의 glycyrrhizin의 移行量을 減少시킨다고 보고되고 있다.<sup>1-3)</sup> 甘草의 有效指標成分에 대한 品質管理方法으로는 glycyrrhizin이나 또는 glycyrrhizin을 酸加水分解시켜 glycyrrhetic acid을 指標成分으로하여 重量法<sup>4,5)</sup>, 吸光光度法<sup>6,7)</sup>, TLC densitometry,<sup>8)</sup> Rod-TLC-

FID,<sup>9)</sup> GLC<sup>10,11)</sup> 및 HPLC<sup>1,2,12-15)</sup> 分析方法 등이 보고되고 있으나 最近 生藥複方劑중 甘草의 glycyrrhizin 함량에 대한 品質管理는 HPLC分析方法이 통용되고 있는 실정이다. 本 研究에서는 生藥複方劑의 指標成分에 관한 品質管理研究 일환으로 小柴胡湯 試製品중 甘草 指標成分에 대한 TLC 確認 試驗方法을 설정하고 HPLC에 의한 glycyrrhizin의 함량과 그 移行量을 조사하였다.

### 實驗 方法

#### 材 料

- 1) 人蔘 및 生藥材  
前報<sup>16)</sup>와 同一한 原料紅蔘 및 生藥材를 사용하였다.
- 2) 試藥類

Glycyrrhetic acid 標準品은 東京化成工業株式會社 標準品(TCI—G.R., G149)을 사용하였고 silicagel 60 TLC plate(layer thickness 0.2 mm, E. Merck Co., Art. 5553)와 HPLC 分析溶媒類는 E. Merck會社の 製品을 각각 사용하였으며 기타 抽出溶媒類 및 TLC 展開溶媒類는 一級試藥을 사용하였다.

## 方法

### 1) 小柴胡湯 試製品 製造

漢方醫書인 處方分量集<sup>17)</sup>의 小柴胡湯 處方比率에 따라 製造된 前報<sup>16)</sup>와 동일한 小柴胡湯 익기스, 小柴胡湯 顆粒劑 및 小柴胡湯 標準湯液<sup>18)</sup>을 分析用試料로 사용하였다.

### 2) 甘草 指標成分의 TLC 確認

小柴胡湯 試製品 顆粒劑 1일 服用量 10.5 g을 조인트(₩24/40)가 부착된 환저후라스크에 넣고 ethyl ether 100 ml를 가한후 환류냉각기를 부착하여 약 40° 水浴上에서 1時間 還流抽出한 다음 ethyl ether 抽出液을 제거하여 脫脂시켰다. 脫脂된 殘溜物에 水飽和 n-butanol(n-butanol : water=4 : 1 혼합액의 상등액) 100 ml를 加하여 水浴上에서 1時間 加熱抽出한 후 Toyo No. 2 여지로 여과하고, 잔유물에 대하여 같은 조작으로 수포화 n-butanol 50 ml로 1회 추출한 다음 여과하였다. 총 수포화 n-butanol 抽出分劃을 250 ml 분획여두에 넣고 물 25 ml로 반복 세척한 후 n-butanol 抽出分劃(상층)을 分離하여 減압농축시켰다. 여기에 50 ml의 50% ethanol성(性) 7%—H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 첨가하여 3時間 加熱還流시켜 加水分解한후 물 50 ml를 첨가하여 250 ml분획여두에 옮기고 ethyl ether 50 ml로 3회 抽出하였다. 分離된 ethyl ether층을 anhydrous sodium sulfate 로 脫水시키고 減압농축한 다음 ethyl ether 2 ml에 용해하여 TLC검액으로 하였다.

대조검액은 小柴胡湯 1日 服用量 27 g중 甘草 2 g을 제외한 6種 生藥材를 處方대로 배합하여 上記와 동일한 방법으로 抽出 및 加水分解하여 TLC검액으로 하였다. 甘草의 標準檢液은 甘草 1日 服用量 2 g을 上記와 동일한 방법으로 抽出 및 加水分解하여 TLC檢液으로 하였다.

Silicagel 60 plate에 展開溶媒는 benzene/ethyl acetate(1 : 1)의 전개용매 조성으로 전개시킨 다

음 *p*-anisaldehyde-sulfuric acid<sup>19)</sup>을 분무하여 110°에서 10分間 가열하고 다시 20%—sulfuric acid을 분무한후 동일한 방법으로 加溫 發色시켰다.

### 3) Glycyrrhizin의 HPLC定量

甘草粉末 및 小柴胡湯 試製品을 glycyrrhizin으로서 약 30 mg(本製品 1回 服用量)에 해당하는 양을 정밀히 달아 조인트(₩24/40)가 부착된 환저 후라스크에 넣고 물 50 ml를 가한후 水浴上에서 3時間 還流抽出한 다음 3N 황산 50 ml를 넣고 수욕상(98~100°)에서 다시 1時間 환류추출하였다. 抽出液은 Toyo No. 2 여지에 여과하고 다시 25 ml의 증류수로 추출후라스크와 여지를 세척 여과시켜 여액에 합하였다. 여액은 250 ml 분획여두에 넣고 클로로포름 50 ml로 1회 抽出한 다음 클로로포름 25 ml로 2회 반복 추출후 分離하여 소량의 무수 황산나트륨으로 脫水시켰다. 클로로포름 여과액을 減압농축한 다음 잔사(殘渣)를 메탄올에 녹여 100 ml로 定溶하여 검액으로 하였다.<sup>20)</sup> 따로 glycyrrhizin標準品(10~50 mg)을 정밀히 달아 檢液과 같은 방법으로 조작하여 단든 액을 標準液으로 하였다. 이상의 검액 및 표준액으로 다음과 같은 HPLC 分析條件으로 glycyrrhetic acid을 定量하여 glycyrrhizin의 量으로 환산하였다.

上記의 方法으로 제조된 검액을 다음과 같은 HPLC定量方法으로 glycyrrhetic acid을 정량한 다음 glycyrrhizin의 양으로 환산하였다. 이때 사용한 HPLC는 Waters Associates Model 244를, column은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (Waters, ID 3.9 mm × 30 cm), 檢出器는 UV-detector (254 nm)를 사용하였고 mobile phase는 methanol : water : acetic acid(78 : 19 : 3, v/v)을 사용하였다. 한편 HPLC로 分析하여 얻은 glycyrrhetic acid (Fig. 5 참조)의 peak 높이로 작성된 檢量線은 Fig. 1과 같다. 이 검량선의 回歸方程式은  $y=0.6503x+0.4073$ 이며, 직선성을 검정한 결과 그 相關係數가  $r=0.9999$ 로서 1.0에 접근하여 glycyrrhizin의 重量과 peak height ratio간에 直線性이 認定되었다.

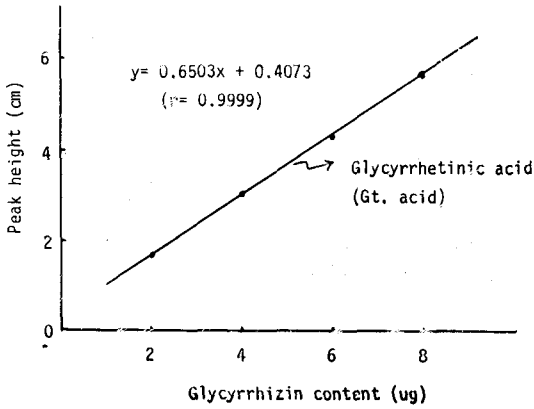


Fig. 1. Calibration curve of glycyrrhizin by analysis of glycyrrhetic acid with HPLC



Fig. 2. Thin layer chromatogram of glycoside fraction of Glycyrrhizae Radix and crude drug preparation (So-Shi-Ho-Tang).

\* Silica gel plate developed in solvent system (CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O=65 : 35 : 10, lower phase), and detected with *p*-anisaldehyde-sulfuric acid

\*\* The samples were GZ: Glycyrrhizin, G1: Glycyrrhizae Radix, SG: So-Shi-Ho-Tang

## 實驗結果 및 考察

### 小柴胡湯 製劑중 甘草 指標成分의 TLC

#### 確認試驗

본시험에서 제조한 小柴胡湯 試製品중 甘草成分의 TLC 確認試驗은 Fig. 3에서 보는바와 같이 小柴胡湯, 小柴胡湯에서 甘草를 뺀 試料 및 甘草를 각각 동일한 방법으로 처리후 TLC로 展開시켜 小柴胡湯 製劑중 甘草 指標成分을 確認하였다. 甘草成分의 확인시험은 甘草의 有效指標成分<sup>21)</sup>으로 glycyrrhizin을 甘草 및 小柴胡湯 配糖體 抽出分割物(脫脂후 水飽和 n-butanol 抽

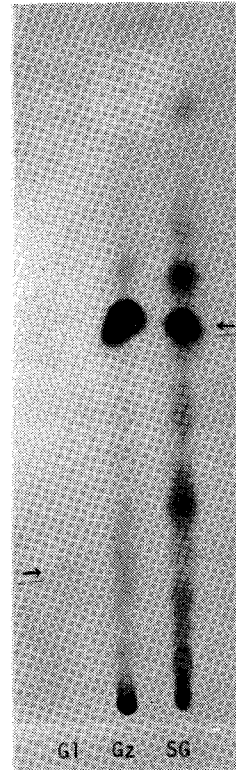


Fig. 3. Thin layer chromatogram of acid-hydrolysate of glycoside fraction of Glycyrrhizae Radix and crude drug preparation (So-Shi-Ho-Tang)

\* Silica gel plate developed in solvent system (benzene : ethyl acetate=1 : 1, v/v), and detected with *p*-anisaldehyde-sulfuric acid

\*\* The samples were ; G1: Glycyrrhetic acid, Gz: Glycyrrhizae Radix, SG: So-Shi-Ho-Tang

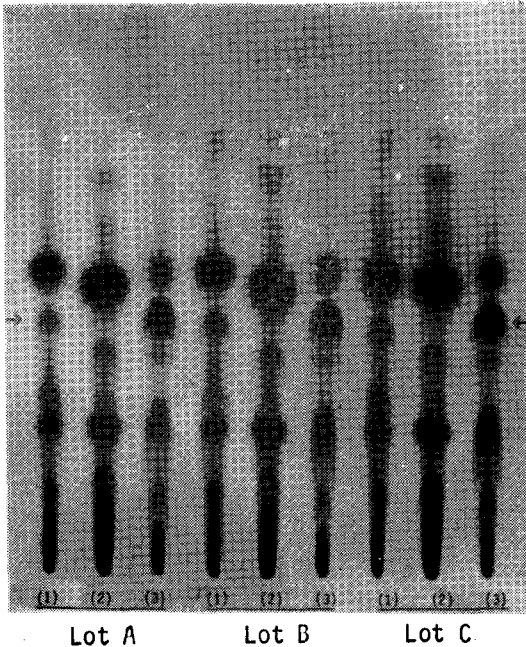


Fig. 4. Thin layer chromatogram of acid-hydrolysate of glycoside fraction of *So-Shi-Ho-Tang* and *Glycyrrhizae Radix*

\* Silica gel plate developed in solvent system (benzene : ethyl acetate = 1 : 1, v/v), and detected with *p*-anisaldehyde-sulfuric acid

\*\* The samples were as follows; (1) *So-Shi-Ho-Tang* granules, (2) *So-Shi-Ho-Tang* extract without *Glycyrrhizae Radix*, (3) *Glycyrrhizae Radix*

出物)에서 TLC로 同定하였으나 Fig. 2에서와 같이 glycyrrhizin은 특이의 棕色反應을 나타내지 않을뿐 아니라 他 成分들과도 뚜렷하게 分離가 되지 않아서 TLC로 甘草成分을 확인 同定하는 指標成分으로는 적합하지 않았다. 그러나 Fig. 3에서 볼수 있듯이 甘草 및 小柴胡湯의 配糖體 抽出物의 酸 加水分解物(抽出方法은 實驗方法에 기재)에서 glycyrrhetic acid<sup>21)</sup>을 指標成分으로 同定하기에는 적합하지 않았으나 甘草成分 特異의 赤色 spot(Rf=0.47)을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 4에서와 같이 甘草와 小柴胡湯에서는 甘草 特異成分으로 赤色 spot을 확실하게 확인할 수 있었으나 小柴胡湯에서 甘草를 제외시킨 경우는 檢出되지 않아서 甘草 特異의 指標成分을 TLC로 品質管理하는데 적합한 成分을 알 수 있었다.

#### 小柴胡湯 製劑중 glycyrrhizin의 HPLC

##### 定量試驗

小柴胡湯중 甘草의 有効指標成分<sup>21)</sup>으로는 定量 回收率<sup>1)</sup>등이 양호한점을 고려하여 glycyrrhizin의 酸加水分解物인 glycyrrhetic acid<sup>1,20)</sup>을 HPLC로 定量하였으며 Fig. 5에서와 같이 分離패턴이 매우 양호하였다. 또한 小柴胡湯중 甘草를 제외한 6種의 生藥劑를 小柴胡湯 比率대로 배합한 抽出物의 HPLC패턴에서는 glycyrrhetic acid의 peak와 retention time이 동일한 成分의

Table I. Recovery contents of glycyrrhizin to *So-Shi-Ho-Tang* preparations (Unit: mg)

Lot No.	Sample	Glycyrrhizae radix (2g)	Standard * preparation	Extract*	Granules*
Lot A	1	97.2	81.5	84.0	80.6
	2	95.1	81.2	81.6	81.8
	3	96.9	83.6	83.7	79.7
	average	96.4	82.1	83.1	80.7
Lot B	1	94.8	80.2	80.4	80.8
	2	95.1	81.1	81.9	79.3
	3	96.0	80.8	81.6	79.6
	average	95.3	80.7	81.3	79.9
Lot C	1	99.6	87.2	85.2	84.3
	2	100.5	83.0	84.3	80.8
	3	100.8	85.1	84.0	83.1
	average	100.3	85.1	84.5	82.7

\* From 27 g of *So-Shi-Ho-Tang* crude drugs

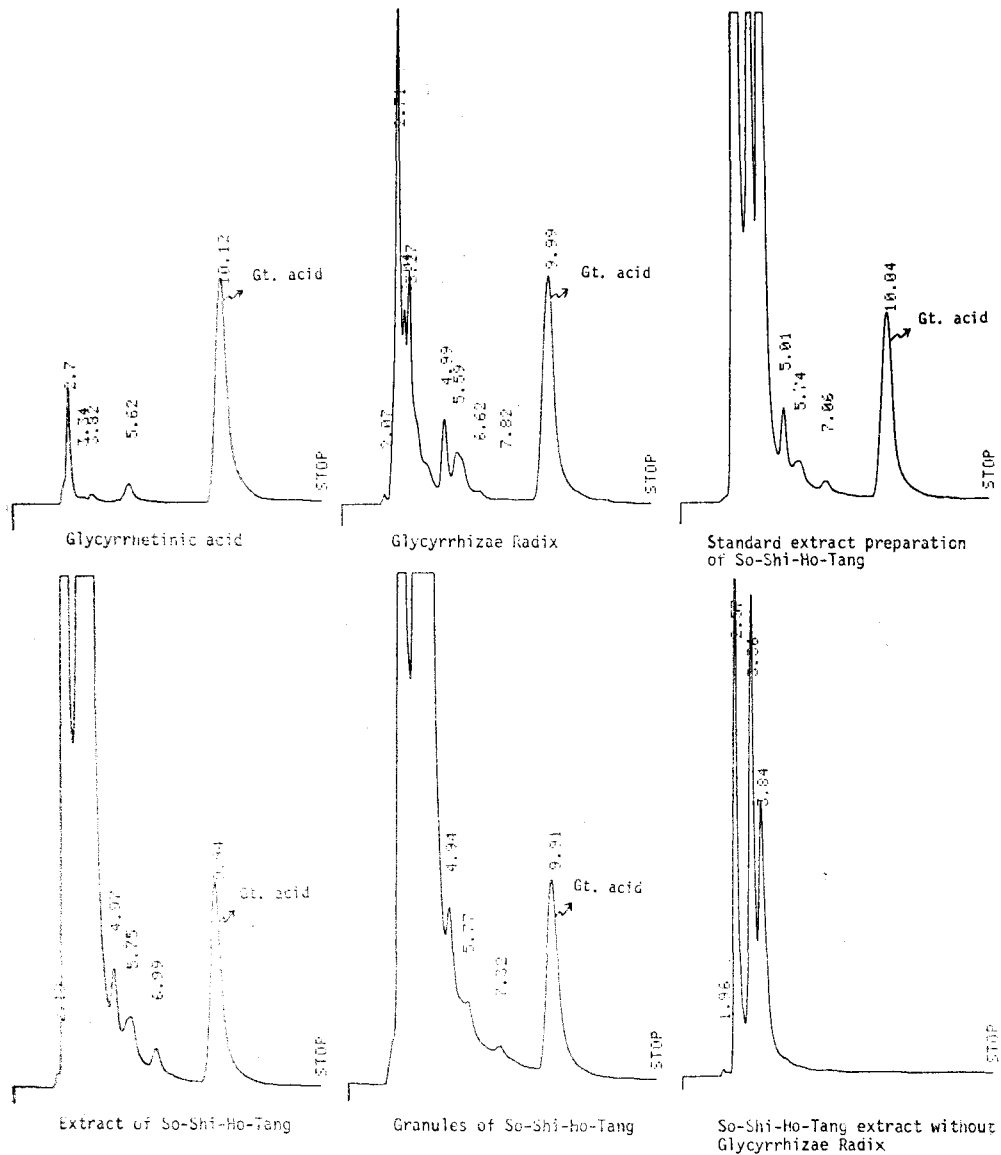


Fig. 5. HPLC patterns of glycyrrhetic acid and acid hydrolyzates of glycoside fraction from Glycyrrhizae Radix and So-Shi-Ho-Tang preparations

peak가 檢出되지 않아서 小柴胡湯중 甘草의 指標成分으로 定量하는데 적합하였다.

본 試製品의 1日量을 기준하여 原料甘草 2g과 小柴胡湯 1日分 原料生藥材 27g에서 抽出된 標準湯液, 액기스 및 最終 顆粒製品중의 glycyrrhizin 함량 分析結果는 Table I과 같다.

小柴胡湯 製劑중 glycyrrhizin을 指標成分으로 하여 glycyrrhetic acid을 HPLC로 定量할 경우 原料甘草로부터 最終 小柴胡湯 製品까지의 品質

管理가 가능하였다. 그리고 原料甘草로부터 最終 小柴胡湯중의 平均 移行率을 볼때 標準湯液은  $84.9 \pm 0.3\%$ , 액기스는  $85.2 \pm 1.0\%$ , 最終 顆粒製品은  $83.3 \pm 0.7\%$ 로 그 移行率은 비교적 양호하였다. 서<sup>1)</sup> 및 이<sup>2)</sup> 등이 生藥複方劑중에서 glycyrrhizin 移行量의 減少를 지적한바와 같이 본 시험에서 제조한 小柴胡湯 試製品의 경우도 他 生藥劑와의 吸着이나 鹽 形成에 의한 沈澱 등 여러 要因에 의하여 glycyrrhizin의 移行

량이 다소 減少됨을 알 수 있었다.

## 結 論

小柴胡湯 製劑중 甘草의 指標成分에 대한 品質管理研究의 일환으로 TLC에 의한 確認條件을 설정하고 HPLC에 의한 glycyrrhizin의 移行量을 조사하였다. TLC 確認은 配糖體 抽出分劃物을 酸加水分解하여 얻은 aglycone 抽出物을 silicagel plate에 benzene/ethyl acetate(1:1, v/v)로 展開시킨 다음 *p*-anisaldehyde-sulfuric acid 으로 발색시켜 甘草 特異의 指標成分으로 赤色 spot ( $R_f=0.47$ )을 확인하였다. HPLC에 의한 glycyrrhizin 移行量 조사는 酸加水分解 抽出物을  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  column에 MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (78:19:3, v/v)을 移動相으로 하여 glycyrrhetic acid을 定量하였으며 小柴胡湯 액기스 顆粒劑중의 平均 移行率은  $83.3 \pm 0.7\%$ 였다.

<1989년 11월 1일 접수: 12월 1일 수리>

## 文 獻

- 서정진: 약학회지, 26, 149 (1982).
- 이규송·제금련·장승화·최복분·김연숙·정애희·김명진: 국립보건원보, 제22권, pp.353-358 (1985).
- 小川俊太郎: 藥學雜誌 96, 1488 (1976).
- Houseman, P.A.: AOAC, 6, 191 (1922).
- Fujita, M., Kobayashi, Y., Shibata, S.: Yakugaku Zasshi 71, 949 (1951).
- Gootjes, J. and Nauta, W.T.: Rec. Trav. Chim. 73, 886 (1954).
- Cundiff, R.H.: Anal. Chem., 36, 1871 (1964).
- Takino, Y., Koshioka, M., Shiokawa, M.: Planta Medica 36, 74 (1979).
- Namba, T., Yoshizaki, M., Tomimori, T.: Yakugaku Zasshi 95, 809 (1975).
- Larry, D., Fuller, M.J., Harril, P.G.: J. AOAC. 53, 698 (1970).
- Ventura, P., Visconti, M., Pifferi, G.: Boll. Chim. Farm. 117, 217 (1978).
- Bell, J.H.: Tobacco Science 24, 126 (1980).
- Paik, N.H., Park, M.K., Park, J.H., Kim, C.S., Suh, J.J.: Yakhak Hoeji 25, 1 (1981).
- Tomimori, T., Yoshimoto, M.: Shoyakugaku Zasshi 34, 138 (1980).
- Hurst, W.J., McKim, J.M. and Martin, Jr. R. A.: J. Agric. Food Chem. 31, 387 (1983).
- 최강주·고성룡·전병선·성현순: 생약학회지 20권, 투고(1989).
- 日藥連漢方專問委員會(趙弼衡譯編): 一般用漢方處方の 拾遺, 大韓科學漢方藥研究會, 서울(1980).
- 日本公正書協會: 醫藥品 製造指針(第2章, 醫藥品의 製造承認), 藥業時報社, 東京(1987).
- 국립보건원: 생약시험방법집(국립보건원 예규 제 283호), pp.3-4 (1986).
- 국립보건원: 생약시험방법집(국립보건원 예규 제 283호), pp.58-59 (1986).
- 柴田承二, 絲川秀治, 三川潮, 庄司順三, 瀧戶道夫: 藥用天然物質, 南山堂, 東京 (1982).