

HPLC를 이용한 옥천산 중 갈근, 감초, 오미자 지표성분의 다성분 동시분석

유정림 · 장대식 · 김진숙*
한국한의학회연구원, *교신저자

Abstract

Quality Evaluation of Herbal Prescription, Oc Chun San, Employing Simultaneous Determination of the Marker Compounds by HPLC

Yoo Jeonglim, Jang Daesik, Kim Jinsook*
Korea Institute of Oriental Medicine
* Corresponding Author

As a part of the quality control of herbal prescriptions which has been used for diabetes and related diseases, a reversed-phase liquid chromatographic method was developed for the simultaneous quantification of the three marker compounds, puerarin (Puerariae Radix), glycyrrhizin (Glycyrrhizae Radix), schizandrin (Schizandrae Fructus) in Oc Chun San.

The HPLC analysis method was validated for parameters such as linearity, Limits of Detection (LOD), quantification (LOQ), repeatability, stability and recovery.

Keywords : HPLC, LOD, LOQ, repeatability, stability, recovery, Oc Chun San

1. 서론

최근 분석기술이 발전함에 따라 한약제제나 탕액에 함유된 지표성분의 분석수준 또한 향상되었다. 그 중, 최근에는 HPLC 분석방법에 의하여 주로 분석되어지고 있는 실정이다¹⁾. 한약제제나 처방에 의한 탕액에는 단일 한약재를 함유하기보

다는 2종 이상의 한약재가 함유되어 있는 경우가 대부분이다. 또한 HPLC로 분석 가능한 지표물질을 함유한 한약제뿐만 아니라 그 이외의 한약제도 포함하는 경우가 많다. 그러므로 분석하고자하는 지표성분 이외의 방해성분을 추출 및 분리과정에 의하여 제거할 필요가 있다. 또한 식품의약품안전청고시²⁾에 기재된 일반시험법 중 생약시험

법은 개별 한약재에 대한 시험법이며, 한약제제나 탕액을 조제할 때 대부분 물로 추출함에 따라 한약의 지표성분들이 물로 이행되지 못하는 경우가 있어 한약제제나 탕액에 대한 지표성분의 함량 확인시험 시, 정확한 분석이 어렵고 지표성분의 함량에 대한 편차가 크게 발생하므로 보다 합리적인 분석방법이 필요하다³⁾. 그러므로 추출 및 분리과정이 지표성분의 HPLC분석을 위하여 합당한 방법인지를 검증하여야 한다⁴⁾.

본 연구에 적용된 옥천산은 소갈병에 두루 쓰이는 통치방이라 할 수 있다.

2. 실험방법

1) 시약 및 기기

지표성분의 표준품 중 puerarin은 한국한의학 연구원 한약제제연구부에서 추출, 정제하여 분석에 사용하였다. glycyrrhizin과 schizandrin은 WACO(Japan) 제품을 사용하였다. 추출과 HPLC 분석에 이용한 methanol, acetonitrile, water는 Fisher ChemAlert[®] (HPLC grade), acetic acid는 Samchun chemicals (special grade)를 사용하였다.

HPLC는 Agilent G1313A, DE43628250 (injector), Agilent G1312A BinPump, DE43613932 (pump), Agilent G1315B DAD, DE43623506 (detector), column은 C-18, Phenomenex (5.0 μ m, 250 \times 4.6 mm)를 사용하였다. 감압농축기는 Buchi Rotavapor R-114,

water bath는 Buchi water bath B-480을 사용하였다. 옥천산의 추출을 위하여 sonicator는 Branson Ultrasonic corporation 8510R-DTH, 환류장치는 Glas-Col사의 Multi-Heating mantle RT-type을 사용하였다. Filter paper는 Advantec toyo (185 mm), syringe filter는 Watman PVDF syringe filter (13 mm, 10 mL), 분쇄기는 Hanil food mixer를 사용하였다.

2) 실험재료

옥천산의 함유한약재인 천화분, 갈근, 맥문동, 생지황, 오미자, 감초, 찹쌀(boiling method에만 적용하였음)를 구입(백제한약, 대전)하였다.

3) 표준용액의 조제

표준물질(puerarin, glycyrrhizin, schizandrin)을 P₂O₅가 들어있는 데시게이터에서 24시간 동안 건조 후 표준물질의 무게를 정확히 측정하여 HPLC 분석을 위한 표준용액을 조제하였다.

Puerarin, glycyrrhizin과 schizandrin을 각각 100 ng/ μ l이 되도록 조제하여 methanol을 이용하여 순차적으로 희석하여 50 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 12.5 ng/ μ l, 6.25 ng/ μ l, 3.125 ng/ μ l, 1.5625 ng/ μ l, 0.7813 ng/ μ l으로 조제하여 개별 한약재의 함량을 확인하였다. 또한 puerarin, glycyrrhizin과 schizandrin 혼합 표준용액 100 ng/ μ l을 조제하여 methanol로 순차적으로 희석하여 50 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 12.5 ng/ μ l, 6.25 ng/ μ l, 3.125 ng/ μ l, 1.5625 ng/ μ l, 0.7813 ng/ μ l으로 조제하여 옥천산 중의 표준물질의 함량을 확인하였다.

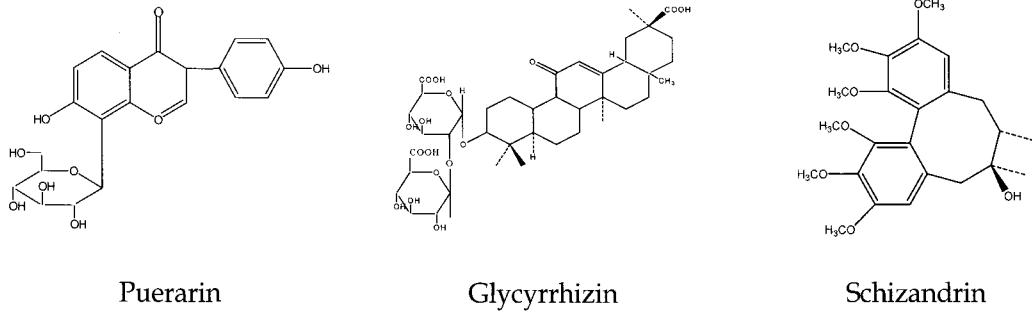


Fig. 1. Structures of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin in Oc Chun San.

4) 검액의 조제

(1) 개별한약재의 검액 조제

옥천산의 수득물과 갈근, 감초, 오미자의 지표 성분 이행율을 확인하기 위하여 각각의 한약재를 추출하여 검액을 조제^{1),4)}하였으며 그 방법은 다음과 같다.

① 갈근의 검액 조제⁵⁾

가루상태의 갈근 2 g에 methanol 100 mL을 처리하고 환류장치를 이용하여 3시간 동안 환류 추출하였다. 이를 100 mL volumetric flask에 넣고 100 mL이 되도록 methanol로 맞춘 후, filter paper를 사용하여 여과하였다. 여과한 검액 중 10 mL을 취하여 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후 methanol로 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다.

② 감초의 검액 조제⁹⁾

가루상태의 감초 2 g을 50% methanol 100 mL을 처리하여 환류장치를 이용하여 3시간 동안 환류 추출하였다. 이를 100 mL volumetric flask에 넣고 100 mL이 되도록 50% methanol로 맞춘 후, filter paper를 사용하여 여과하였다. 여과한 검액 중 10 mL을 취하여 0.45 μ m

syringe filter로 여과한 후 50% methanol로 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다.

③ 오미자의 검액 조제

가루상태의 오미자 2 g을 methanol 100 mL을 처리하여 환류장치를 이용하여 3시간 동안 환류 추출하였다. 이를 100 mL volumetric flask에 넣고 100 mL이 되도록 methanol로 맞춘 후, filter paper를 사용하여 여과하였다. 여과한 검액 중 10 mL을 취하여 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후 methanol로 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다.

(2) 옥천산의 검액 조제

일반적으로 한약재로부터 지표물질은 환류장치, ultra-sonicator를 이용하여 추출한다. 본 연구에서는 앞서 언급한 두가지 방법을 사용하여 옥천산의 추출효율을 확인하였다.

① Reflux extraction method

옥천산의 구성 한약재를 세절, 분쇄하여 round flask에 넣은 후, methanol 100 mL을 처리하고 reflux 장치를 이용하여 3시간동안 가열, 추출하였다. 이를 실온상태에서 filter paper로 여과하여, 감압 농축하였다. 농축된 시료를 100 mL의

methanol에 재용해하여, 용액 중 10 mL을 취하여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 methanol로 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다.

② Ultra-sonication extraction method

옥천산의 구성 한약재를 세절하여 flask에 넣고 methanol 100 mL을 처리하여 1시간 동안 sonicator로 추출하고, 이 과정을 3회 반복하여 추출하고 이를 filter paper를 이용하여 여과한 후 농축한다. 농축한 시료를 100mL의 methanol로 재 용해하여, 용액 중 10 mL을 취하여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 methanol로 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다.

5) 시험방법의 검증

(method validation)^{4),6),7),8)}

(1) Linearity

Puerarin, glycyrrhizin과 schizandrin 혼합 표준용액 100 ng/ μl 을 조제하여 methanol로 순차적으로 희석하여 50 ng/ μl , 25 ng/ μl , 12.5 ng/ μl , 6.25 ng/ μl , 3.125 ng/ μl , 1.5625 ng/ μl , 0.7813 ng/ μl 으로 조제하여 HPLC로 분석 후, r^2 값을 확인하였다.

(2) LOD(Limits of detection)

옥천산 구성 한약재를 세절 및 분쇄하여 무처리 시험구(옥천산 구성 한약재)와 LOD시험구(옥천산 함유 한약재 + 표준용액)를 flask에 넣고 100 mL의 methanol을 처리하여 sonicator를 이용하여 1시간 동안 추출하였으며 이 과정을 3회 반복(3시간, methanol 300mL) 수행하였다. 추출한 시료를 filter paper로 여과하고 감압농축 후, methanol에 재 용해하고 용액 중 10 mL을 취하여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 methanol로 희석하여 HPLC분석에 사용하였다.

(3) LOQ(Limits of quantification)

옥천산 구성 한약재를 세절 및 분쇄하여 무처리 시험구(옥천산 구성 한약재)와 LOQ 시험구(옥천산 구성 한약재 + 표준용액)를 flask에 넣고 100 mL의 methanol을 처리하여 sonicator를 이용하여 1시간 동안 추출하였다. 이 과정을 3회 반복(3시간, methanol 300mL) 수행하였다. 추출한 시료를 filter paper로 여과하고 감압농축 후, methanol에 재 용해하고 용액 중 10 mL을 취하여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 methanol로 희석하여 HPLC분석에 사용하였다.

Table 1. Add concentration of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin for LOD and LOQ

Marker Compound	Add concentration (ng/ μl)	
	LOD	LOQ
Puerarin	2.0	5.0
Glycyrrhizin	2.0	3.0
Schizandrin	0.7	6.0

(4) 반복성 (Repeatability)

일정 농도의 혼합표준용액(puerarin, glycyrrhizin, schizandrin 12.5 ng/ μ l)을 6회 이상, 3일 동안 HPLC 분석하여 측정하였다.

(5) 회수율시험 (recovery test)

옥천산 구성 한약재를 세절 및 분쇄하여 무처리 시험구(옥천산 구성 한약제)와 회수율 시험구(옥천산 구성 한약제 + 표준용액)를 flask에 넣고 100 mL의 methanol을 처리하여 sonicator를 이용하여 1시간 동안 추출하였다. 이 과정을 3회 반복 수행하였다. 추출한 시료를 filter paper로 여과하고 감압농축 후, methanol에 재 용해하고 용액 중 10 mL을 취하여 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후 methanol로 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다. 이때 회수율 시험구의 농도는 LOD 시험을 근거로 하여 설정하였다. 이 때 저농도는 LOD 수준 이상의 농도, 고농도는 표준

용액 농도범위 내에서 저농도처리 시험구보다 높은 농도를 의미한다.

(6) 완건성 (Robustness) 중 시험용액의 안정성 (Stability)

시험용액의 안정성시험은 혼합표준용액(puerarin, glycyrrhizin, schizandrin) 100 ng/ μ l와 옥천산 추출시료가 25°C와 -20°C조건에서 3일(72시간)동안 저장하였다. 시간에 따른 표준용액과 시료의 농도 변화를 확인하기위하여 12시간 간격으로 채취하여 그 변화를 HPLC로 확인하였다.

6) HPLC 분석

(1) 개별 한약재

갈근, 감초, 오미자 각각의 지표성분 함량을 확인하기위하여 다음과 같은 조건으로 HPLC분석을 수행하였다.

Table 2. Add concentration of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin for recovery test

Marker Compound	Add concentration (ng/ μ l)	
	Low	High
Puerarin	5.0	10.0
Glycyrrhizin	3.0	9.0
Schizandrin	6.0	12.0

Table 3. HPLC condition for puerarin, glycyrrhizin and schizandrin

Instrument	Marker compound	Condition			Flow rate (mL/min)
		Acetonitrile	2% Acetic acid %	Water	
Solvent condition	Puerarin	10	90	-	1.5
	Glycyrrhizin	35	65	-	1.5
	Schizandrin	60	-	40	1.0
Injector	Agilent G1313A, DE43628250				
Pump	Agilent G1312A BinPump, DE43613932				
Column	C-18, Phenomenex (5.0 μ m, 250 \times 4.6 mm)				
Detector	Agilent G1315B DAD, DE43623506, 254 nm				

(2) 옥천산

옥천산에 함유된 갈근, 감초, 오미자 각각의 지표성분 함량을 확인하기 위하여 다음과 같은 조건으로 HPLC분석을 수행하였다.

대한약전에 기재된 puerarin(갈근), glycyrrhizin(감초), schizandrin(오미자)의 함량은 각각 2.0%, 2.0% 이상(오미자는 기재되지 않았음)이었다. 본 연구에 사용된 한약재의 지표성분 함량은 puerarin(갈근) 3.42% ± 0.25, glycyrrhizin(감초) 2.31% ± 0.09로서 연구에 적합한 것으로 판단되었다.

3. 결과 및 고찰

1) 개별한약재

Table 4. HPLC condition for mixture standard solvent (puersrin, glycyrrhizin, schizandrin) in Oc Chun San

Instrument	Condition			Flow rate (mL/min)
	Time (min)	Acetonitrile %	2% Acetic acid %	
Solvent condition	18.5	10	90	1.5
	22.0	35	65	
	25.0	35	65	
	35.0	70	30	
	42.0	70	30	
	42.5	10	90	
	45.0	10	90	
Injector	Agilent G1313A, DE43628250			
Pump	Agilent G1312A BinPump, DE43613932			
Column	C-18, Phenomenex (5.0 μm, 250 × 4.6 mm)			
Detector	Agilent G1315B DAD, DE43623506, 254 nm			

Table 5. Content of the marker compounds in Puerariae Radix, Glycyrrhizae Radix and Schizandrae Fructus

Sample	Marker compound	Content (mean [%] ± S.D.)
Puerariae Radix	Puerarin	3.42% ± 0.25
Glycyrrhizae Radix	Glycyrrhizin	2.31% ± 0.09
Schizandrae Fructus	Schizandrin	0.99% ± 0.03

2) 옥천산

HPLC 분석을 위한 한약재의 추출방법에 따른 지표성분의 이행율은 puerarin 52.25%~75.19%, glycyrrhizin 35.19%~58.86%, schizandrin 23.41%~32.02%이었다. 지표성분의 분석을 위한 extraction method 중 ultra-sonic extraction method의 지표성분 이행율은 puerarin (75.19% ± 6.79)과 glycyrrhizin (58.86% ± 1.41), schizandrin(32.02% ± 1.13)로서 reflux extraction method에 비하여 효율적임을 확인하였다. 그러므로 옥천산의 HPLC 동시분석을 위한 추출방법

은 ultra-sonic extraction method를 적용하여 분석방법 검증에 이용하였다. Fig. 3.에서 확인되는 37.5분 부근의 peak은 지표성분의 다성분 분석을 위한 HPLC pump의 이동상 용매의 gradient condition을 적용하였을 때 발생하는 peak으로 사료된다. 이 때 발생하는 peak은 methanol의 분석 시에도 발생되었다.

각각의 지표성분을 함유한 개별한약재를 환류 추출방법으로 추출한 후, 처방전에 대한 각 추출 방법에 따라 처방전 내의 개별한약재의 지표성분에 대한 이행율을 계산하였다.

지표성분의 이행율(%)의 계산방법은 아래와 같다.

$$\text{지표성분 이행율(\%)} = \frac{\text{처방 중 개별한약재 1 g의 표준물질 함량(\%)}}{\text{단독 개별한약재 1 g의 표준물질함량(\%)}} \times 100$$

Fig. 2. Calcation method for shift percentage of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin.

Table 6. Content and shift percentage of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin in Oc Chun San

Extraction method	Marker compound	A			B			C		
		mean (%) ± S.D.			mean (%) ± S.D.			mean (%) ± S.D.		
Reflux	Puerarin	3.42 ± 0.25	1.78 ± 0.07	52.25 ± 2.03	Ultra-sonic	Puerarin	3.42 ± 0.25	2.56 ± 0.23	75.19 ± 6.79	
	Glycyrrhizin	2.31 ± 0.09	0.81 ± 0.02	35.19 ± 0.77		Glycyrrhizin	2.31 ± 0.09	1.35 ± 0.03	58.86 ± 1.41	
	Schizandrin	0.99 ± 0.03	0.23 ± 0.02	23.41 ± 2.11		Schizandrin	0.99 ± 0.03	0.32 ± 0.01	32.02 ± 1.13	

- A : Content of puerarin (in Puerariae Radix), glycyrrhizin (in Glycyrrhizae Radix) and schizandrin (in Schizandrae Fructus)
- B : Content of puerarin (in Puerariae Radix), glycyrrhizin (in Glycyrrhizae Radix) and schizandrin (in Schizandrae Fructus) in Oc Chun San
- C : Shift percentage of Oc Chun San

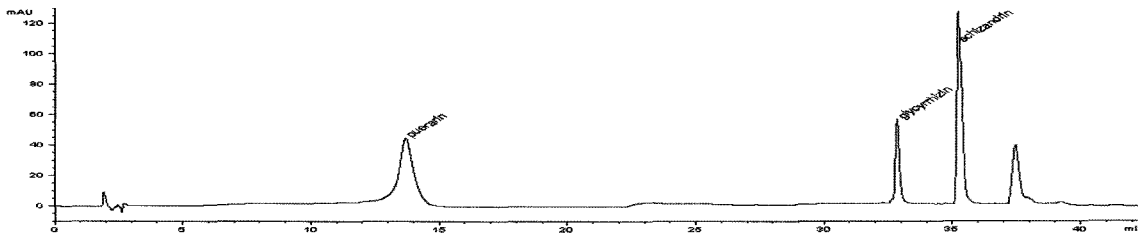


Fig. 3. HPLC chromatograms of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin in mixture standard solution.

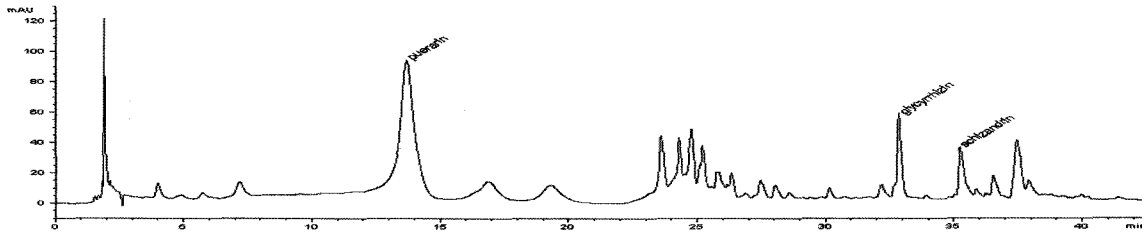


Fig. 4. HPLC chromatograms of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin in Oc Chun San by sonication method.

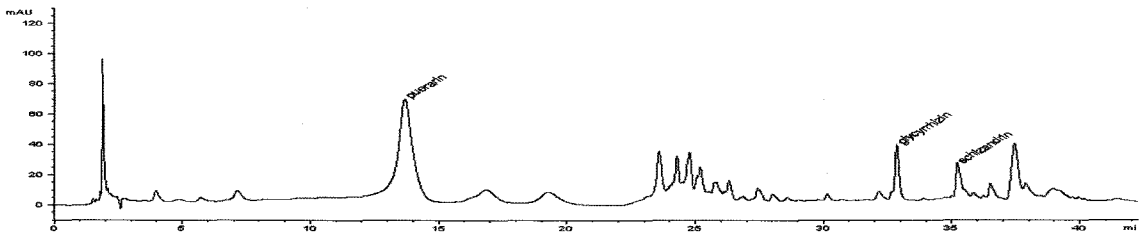


Fig. 5. HPLC chromatograms of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin in Oc Chun San by reflux method.

3) 분석방법의 검증 (Method validation)^{4),6),7),8)}

본 연구에 적용된 처방의 지표성분 추출 및 HPLC 분석방법이 지표성분의 함량 및 이행율의 확인방법으로 합당한지를 확인하기 위하여 “ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures : Methodology Q2B(1996)을 기준으로 하여 옥천산을 이용한 분석법의 검증(method validation)을 수행하였다. puerarin, glycyrrhizin과 schizandrin의 동

시분석 조건의 적용 이전에 각 표준품의 HPLC에 대한 개별 분석조건을 확립한 후, 본 연구의 대상인 갈근, 감초, 오미자를 개별 추출하여 표준품의 지표성분과 갈근, 감초, 오미자의 지표성분이 동일한 물질임을 확인하였다.

앞서 언급한 옥천산의 함량 평가를 위한 reflux extraction method, ultra-sonic extraction method를 수행한 결과, puerarin과 glycyrrhizin, schizandrin은 ultra-sonic extraction method를 이용한 추출방법이 가장 효율적임을 확인하였으므로 method validation에 적용하였다.

(1) 직선성(Linearity)^{4),6),7),8)}

직선성(Linearity)이란 실험방법이 일정범위에 있는 시료 중 분석대상물질(표준물질)의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다. 이때 분석하고자 하는 표준물질의 검량선에 대한 r^2 (correlation coefficient) > 0.999이어야한다.

Puerarin, glycyrrhizin과 schizandrin 혼합 표준용액 100 ng/ μ l을 조제하여 methanol로 순차적으로 희석하여 50 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 12.5 ng/ μ l, 6.25 ng/ μ l, 3.125 ng/ μ l, 1.5625 ng/ μ l, 0.7813 ng/ μ l으로 조제하여 HPLC로 확인한 결과, 혼합표준용액에 함유된 각 표준물질은 모두 $r^2 > 0.999$ 로서 직선성(linearity)을 확인하였다.

(2) LOD(Limits of detection)와

LOQ(Limits of quantification)^{4),6),7),8)}

LOD(Limits of detection), 즉 검출 한계는 시료 중에 존재하는 분석대상물질을 확실히 검출할 수 있는 최저의 농도(기기분석방법 상의 최저 농도)를 확인함으로써 결정된다. 그리고 LOQ(Limits of quantification), 즉 정량 한계란 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 시료 중 분석대상물질의 최소량(실험방법 상의 최소량)이다.⁸⁾

옥천산 처방에 함유된 한약재를 background

로 하여 혼합표준용액(puerarin, glycyrrhizin, schizandrin)이 HPLC에 의하여 검출되는 LOD(Limits of detection), LOQ(Limits of quantification)를 확인하였다. 혼합표준용액(puerarin, glycyrrhizin, schizandrin)의 LOD 값은 각각 2.00 ng/ μ l, 2.00 ng/ μ l, 0.70 ng/ μ l 이었으며, LOQ 값은 각각 5.00 ng/ μ l, 3.00 ng/ μ l, 6.00 ng/ μ l였다.

(3) 반복성(Repeatability)^{4),6),7),8)}

반복성(Repeatability)은 정밀성, 재현성을 확인하기 위한 과정이다. 반복성(repeatability)이란 동일한 실험실 내에서 동일한 시험자가 동일한 장치와 기구, 동일시약, 기타 동일 조 작 조건 하에서 균일한 시료로부터 얻는 복수의 시료를 짧은 시간차로 반복 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말한다.

Intra-day와 inter-day의 변이성 측정하였다. intra-day의 반복성(repeatability)은 하루 동안 일정농도의 표준용액을 HPLC로 6회 분석하여 그 변이성을 측정하였으며 inter-day의 반복성(repeatability)은 intra-day의 과정을 3일 동안 반복하여 그 변이성을 측정하였다.

옥천산의 반복성(repeatability)은 각각의 표준물질에 대하여 intra-day와 inter-day 모두, R.S.D $\leq 5\%$ 로 HPLC 분석의 재현성을 확인하였다.

Table 7. LOD, LOQ and Linear relation between peak area and concentration (n=7)

Marker compound	Regression equation	r^2	Linear range	LOD	LOQ
			ng/ μ l		
Puerarin	$y = 63323x + 4278.7$	0.9998	0.7813 ~ 100.00	2.00	5.00
Glycyrrhizin	$y = 10043x + 626.4$	0.9999	0.7813 ~ 100.00	2.00	3.00
Schizandran	$y = 25922x + 58415.0$	0.9999	0.7813 ~ 100.00	0.70	6.00

Table 8. Intra-day and inter-day repeatability for puerarin, glycyrrhizin, schizandrin in mixture standard solution

Marker compound	Intra-day						Inter-day	
	Day 1		Day 2		Day 3		mean (ng/ μ l) \pm S.D.	R.S.D. (%)
	mean (ng/ μ l) \pm S.D.	R.S.D. (%)	mean (ng/ μ l) \pm S.D.	R.S.D. (%)	mean (ng/ μ l) \pm S.D.	R.S.D. (%)		
Puerarin	12.90 \pm 0.27	2.07	12.78 \pm 0.22	1.71	12.97 \pm 0.27	2.07	12.88 \pm 0.10	0.74
Glycyrrhizin	12.66 \pm 0.33	2.62	12.67 \pm 0.17	1.35	12.72 \pm 0.19	1.53	12.68 \pm 0.03	0.25
Schizandrin	12.98 \pm 0.29	2.20	12.42 \pm 0.16	1.30	12.63 \pm 0.22	1.73	12.67 \pm 0.28	2.24
Total	38.54 \pm 0.89	1.30	37.87 \pm 0.55	1.46	38.32 \pm 3.53	1.38	12.74 \pm 0.12	0.93

Table 9. Recoveries of puerarin, glycyrrhizin, schizandrin in Oc Chun San

Marker compound	Added	Detected	Recovery	R.S.D.
	ng/ μ l		%	
Puerarin	5.00	5.10	101.99	2.25
	10.00	10.49	104.86	2.09
Glycyrrizin	3.00	3.34	111.44	1.50
	9.00	8.26	91.74	1.70
Schizandrin	6.00	5.82	97.0	1.44
	12.00	12.19	101.57	1.99

(4) 회수율(Recovery)^{4),6),7),8)}

회수율(Recovery) 시험은 일정 농도의 표준물질(LOQ값을 가장 낮은 농도로 설정)을 시료(옥천산 처방전의 한약재)에 첨가하여, 그 표준물질이 추출과정을 통하여 회수되는 정도를 확인하기 위한 과정이며, 회수율은 $100 \pm 10\%$, relative standard deviation (R.S.D.) < 5%이어야 한다.

옥천산의 회수율 시험은 puerarin 5 ng/ μ l, 10 ng/ μ l, glycyrrhizin 3.0 ng/ μ l, 9.0ng/ μ l, schizandrin 6.0 ng/ μ l, 12.00 ng/ μ l이 되도록 혼합표준용액을 조제하여 옥천산 처방전에 따른

한약재에 처리한 후 각각의 처리구를 3반복으로 시험하였다. 회수율(recovery)은 $100 \pm 10\%$, R.S.D. $\leq 5\%$ 이내였다.

(5) 완전성(Robustness) 중 시험용액의 안정성(stability)^{4),6),7),8)}

분석법의 완전성(Robustness)이란 시험방법 중 일부 조건이 소규모라도 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 영향을 받지 않는지에 대한 척도를 말한다. 분석법이 통상 사용되는 동안 그 분석법을 얼마나 신뢰할 수 있는지에 대한 지표이다.

분석법의 신뢰 지표는 다수의 분석법에 공통되는 변동인자, 액체크로마토그래프법(HPLC)의 대표적인 변동인자, 기체크로마토그래프법(GC)의 대표적인 변동인자가 있다. 이미, 옥천산의 분석조건 확립을 위하여 추출방법과 method validation 수행과정 중 액체크로마토그래프법(HPLC)의 대표적인 변동인자(이동상의 pH, 이동상의 조성, column의 변경, 유속 등)를 고려한 최상의 분석조건을 확립하였으므로, 본 과정에서는 다수의 분석법에 공통되는 변동인자 중 시험용액의 안정성(stability)에 대한 시험을 수행하였다.

시험용액의 안정성시험은 혼합표준용액과 옥천산 추출시료가 25℃와 -20℃조건에서 3일(72시간)동안 저장하고 시간에 따른 표준용액과 시료의 농도 변화를 확인하기위하여 12시간 간격으로 채취하여 그 변화를 확인하였다. 혼합표준용액의

12시간 단위로 채취한 시료의 평균값은 25℃ 조건에서 $99.52 \text{ ug}/\mu\text{l} \pm 3.83$ (R.S.D. = 3.85), -20℃ 조건에서 $99.40 \text{ ug}/\mu\text{l} \pm 2.91$ (R.S.D. = 2.93)이었다. 옥천산 추출 시료는 안정성시험의 초기단계의 농도값이 $113.36 \text{ ug}/\mu\text{l}$ 였으며 25℃ 조건에서 $119.42 \text{ ug}/\mu\text{l} \pm 3.93$ (R.S.D. = 3.29), -20℃조건에서 $119.71 \text{ ug}/\mu\text{l} \pm 4.27$ (R.S.D. = 3.56)이었다. "ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures : Methodology Q2B(1996)에 시험용액의 안정성에 대한 기준은 기재되어있지 않지만 본 시험 중 반복성(repeatability)과 회수율(recovery)시험에 적용한 R.S.D. $\leq 5\%$ 의 기준을 적용하여 볼 때 비교적 혼합표준용액과 옥천산 추출용액은 25℃와 -20℃ 조건에서 3일 동안 안정한 상태를 유지한다고 판단된다.

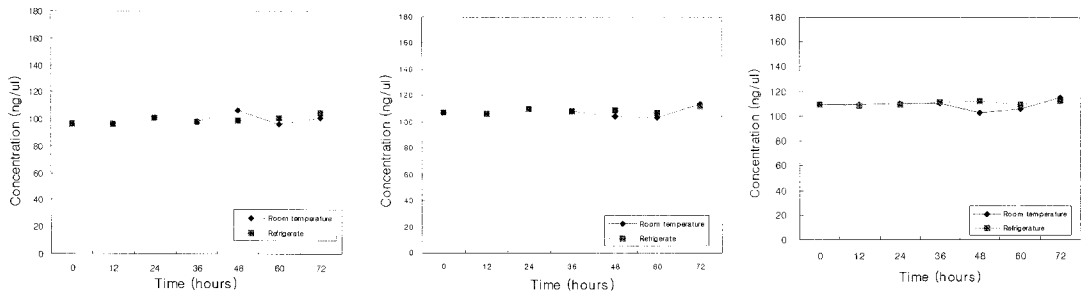


Fig. 6. Stability test of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin in mixture standard solution.

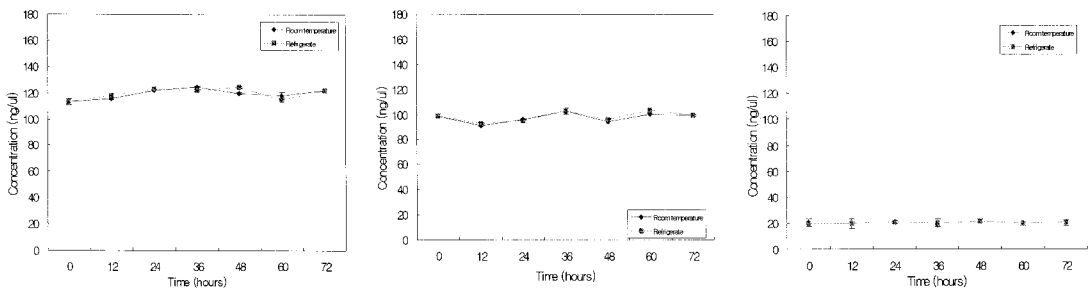


Fig. 7. Stability test of puerarin, glycyrrhizin and schizandrin in Oc Chun San.

4. 결론

본 연구의 목적은 소갈병에 두루 쓰이는 통치방인 옥천산 중 갈근, 감초, 오미자의 지표성분인 puerarin, glycyrrhizin, schizandrin의 효율적인 추출과 HPLC를 이용한 정확한 동시분석방법의 모색이다.

각각의 지표성분이 가장 효율적으로 추출되는 방법을 모색하기 위하여 한약재의 추출방법으로 쓰이는 reflux extraction method, ultra-sonic extraction method를 이용하여 옥천산에 함유된 지표성분을 추출하였다. 그 결과 ultra-sonic extraction method가 reflux extraction method에 비하여 지표성분의 이행율이 가장 높았으므로 옥천산 중의 지표물질 추출 시, ultra-sonic extraction method가 가장 효율적인 추출방법이라고 판단된다.

옥천산 중에 함유된 지표물질의 정확한 정량을 위하여 HPLC분석을 위한 추출 및 정제과정에 대한 검증(method validation)을 위하여 혼합표준용액의 직선성(linearity)의 $r^2 > 0.999$ 임으로 안정된 HPLC 분석조건을 확립하였다고 판단된다. 그리고 ultra-sonic extraction method를 이용한 옥천산 중의 puerarin, glycyrrhizin, schizandrin을 추출할 때 HPLC로 분석 가능한 최저농도인 LOD와 LOQ를 확인하였으며 이 값을 기준으로 하여 회수율(recovery)시험을 수행한 결과, 일반

적으로 원료약품 또는 제제의 정량시험에 적용되는 기준인 시험농도의 80 ~ 120%^{4),8)}의 기준에 합당한 추출방법임을 확인하였다. 그리고 실험방법의 정밀성, 재현성을 확인하기 위한 반복성(repeatability)시험을 수행한 결과, intra-day의 R.S.D.는 2.62(1일차), 1.71(2일차), 2.07(3일차) 이하였으며, inter-day의 R.S.D.는 2.24 이하로서 반복성(repeatability)시험의 기준^{4),6),8)}에 적합한 수준으로서 옥천산에 함유된 puerarin, glycyrrhizin, schizandrin의 분석에 적합한 분석 조건이라고 판단된다. 마지막으로 시험용액의 안정성(stability)시험을 수행하였다. 이 시험은 puerarin, glycyrrhizin, schizandrin의 혼합표준용액과 옥천산 추출용액에 대하여 25°C와 -20°C 조건에서 시험용액의 안정성(stability)시험을 수행한 결과, 12시간 단위로 채취한 혼합표준용액 시료의 평균 R.S.D.는 3.85, -20°C 조건에서 2.93이었으며 옥천산 추출 시료는 25°C 조건의 평균 R.S.D.는 3.29, -20°C 조건에서 3.56으로서 본 시험 중 반복성(repeatability)시험과 회수율(recovery)시험에 적용된 R.S.D. ≤ 5%의 기준을 적용하여 볼 때 혼합표준용액과 옥천산 추출용액은 25°C와 -20°C 조건에서 3일 동안 안정한 상태를 유지한다고 판단된다.

검색어 : 액체크로마토그래프법, 검출한계, 정량한계, 반복성, 안정성, 회수율, 옥천산

참고 문헌

- 1) 생약·한약재의 품질 표준화연구. 식품의약품안전청. 2001:9.
- 2) 식품의약품안전청고시 제 1998-127호. 식품의약품안전청. 1998.
- 3) 생약 및 생약(한약)제제의 품질평가법 연구(II). 식품의약품안전청연구보고서 제 6권. 식품의약품안전청. 2002:620~621.
- 4) ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures. Methodology Q2B, ICH Steering Committee. 1996.
- 5) 대한약전 7개정. 2002:707~708, 752.
- 6) Rong-Xia et al. Simultaneous determination of 10 major flavonoids in *Dalbergia odorifera* by high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005.
- 7) 천연물로부터 성분별 추출과정에 대한 가이드라인 및 생약(한약)제제의 지표성분에 대한 validation. 2003:156~159.
- 8) 의약품 등 분석법의 벨리테이션에 대한 가이드라인. 식품의약품안전청. 2004:1~184.
- 9) 한약추출물제제의 품질확보에 관한 연구. 식품의약품안전청. 2005:26.