

# 가미삼황산(加味三黃散) 분획물(SH-21-B)의 지표성분 정량과 구조활성상관(QSAR) 예측

유 영 법

한국한의학연구원 한약제제연구부

## HPLC analysis of *Gami-Samhwang-San* and prediction of active compounds using QSAR

Young-Beob Yu

*Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Jeonmin-dong 461-24,  
Yuseong-gu, Daejeon 305-810, Rep. of Korea*

**Objective:** *Gami-Samhwang-San*, a herbal prescription for obesity treatment, is composed of seven crude herbs such as Ephedrae Herba, Scutellariae Radix, Acori Gramineri Rhizoma, Polygalae Radix, Typhae Pollen, Armeniacae Semen, Nelumbo Folium. This study was aimed to evaluate marker substances in n-butanol fraction (SH-21-B) from *Gami-Samhwang-San* by high performance liquid chromatography (HPLC). And we predicted inhibition activity of major compounds of *Gami-Samhwang-San* using Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR).

**Methods:** The separation was performed on a YMC J,sphere-H80 C18(250×4.6 mm I.D) column by gradient elution with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> buffers in acetonitrile as the mobile phase at a flow-rate of 1.0ml/min.

**Results:** HPLC was employed to determine the quantities and the qualities of several marker substances such as ephedrine, pseudoephedrine, baicalin, β-asarone, tenuifoliside, naringenin, amygdalin and hyperoside in the SH-21-B.

**Conclusion:** We suggest this results could be a useful evidence for quality control of SH-21-B.

Key words: HPLC, marker substance, QSAR, *Gami-Samhwang-San*

---

교신저자: 유영법,

한국한의학연구원 한약제제연구부

Tel: 042-868-9463 E-mail: ybyu@kiom.re.kr

## I. 緒 論

한약재에 대한 표준화는 대한약전<sup>1)</sup>, 대한약전의 한약(생약)규격집<sup>2)</sup> (제8개정), 조선민주주의인민공화국 약전 (제5판)<sup>3)</sup>, 일본약국방해설서(제14개정)<sup>4)</sup>, 중화인민공화국약전 (2000년판1부)<sup>5)</sup> 등 각국 약전과 WHO monograph<sup>6)</sup>에서 그 상세한 기준을 제시하고 있다. 그러나 한약처방이나 천연물 복합물질의 표준화에 대한 기준은 제도적 장치가 미비하고, 연구단계에서 시행되고 있는 것이 현실이다. 최근 국내·외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품의 개발이 관심의 대상이 되고 있으며 전통 한약재 외의 허브류나 천연물 기능성식품의 수입이 증가하는 추세에 있으나 제품에 대한 품질평가 기술은 많이 개발되어 있지 못하고 있다.

일본의 경우 몇몇 제약회사에서 한약 복합제제들의 품질관리법을 확립하였고<sup>7,8)</sup> 이들 제제는 품질관리의 우수성을 인정받아 한약 기초실험과, 임상시험 연구에 적용되고 있는 실정이다<sup>9)</sup>.

저자 등도<sup>10,11)</sup> 한약처방의 지표성분 혹은 유효성분 정량화를 위한 연구를 지속적으로 시행하고 있으며, 본 연구에서는 비판개선 효과가 인정된 삼황산 (三黃散) 가미방을 용매추출법을

이용하여 n-butanol로 분획한 분획물로서 (SH-21-B), 마황의 ephedrine, pseudoephedrine, 황금의 baicalin, 석창포의  $\beta$ -asarone<sup>12)</sup>, 원지의 tenuifoliside<sup>13)</sup>, 포황의 naringenin, 행인의 amygdalin, 박하의 hyperoside을 지표성분으로 하여 정량분석을 시도하였다. 그리고 이들의 활성을 정량적구조활성상관분석(Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR)에 의해 예측하여 보았다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

본 실험에서 사용한 재료는 한국한의약연구원 약제실에서 입수하여 분쇄 후 실험에 사용하였다. 삼황산 (三黃散) 가미방의 구성약재 및 기원은 Table 1. 에 표시하였으며 이를 혼합하여 2kg의 혼합물에 10L의 정제수를 가하고 10 $^{\circ}$ C에서 3시간 추출하였다. 이것을 여과하여 감압농축한 후 10L의 n-butanol을 가하여 2회 분획 추출한 후 감압 농축하여 56g의 황갈색 분

Table 1. The botanical origins of crude drugs in SH-21-B.

Herbal name	Pharmaceutical name	Marker substance ((%)criterion on KP, KHP)	Amount (g)
麻黃	Ephedrae Herba (EH)	total alkaloids[ephedrine, pseudoephedrine], >0.7%	KP 3
黃芩	Scutellariae Radix (SR)	baicalin, >10%	KP 3
石菖蒲	Acori Gramineri Rhizoma (AG)		KHP 3
遠志	Polygalae Radix (PR)		KP 2
蒲黃	Typhae Pollen (TP)		KHP 3
杏仁	Armeniaca Semen (AS)	amygdalin, >3%	KP 3
荷葉	Nelumbo Folium (NF)		KP 2

KP: Korean Pharmacopoea, KHP: Korean Herbal Pharmacopoea

말인 SH-21-B를 얻어 실험용 시료로 사용하였다.

J,sphere-H80 C18, S-4 $\mu$ m, 12nm, 250 $\times$ 4.6 mm I.D.을 각각 사용하였다.

## 2) 試藥 및 機器

표준품 ephedrine (aldrich), pseudoephedrine (aldrich), baicalin (nakalai),  $\beta$ -asarone(Roth), naringenin (Roth), amygdalin (Sigma), hyperoside (Roth), tenuifoliside[ $\beta$ -D-(3-O-sinapoyl) fructofuranosyl- $\alpha$ -D-(6-O-sinapoyl) glucopyranoside] 을 각각 시약 회사로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 용매는 acetonitrile (AcCN, B&J), methanol (MeOH, B&J), phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 85%, Wako), triethylamine (TEA (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, Junsei Chemical Co.)을 각각 사용하였으며, 그 외의 시약은 HPLC용 혹은 특급시약을 구입하여 사용하였다. 분석기기는 agilent 1100series 를 그리고 column은 YMC

## 2. 方法

### 1) 검액 제조

마황, 황금, 석창포, 원지, 행인, 하엽 은 검액품 100mg을 정밀히 달아 10ml 메스플라스크에 넣고 50%(v/v) 메탄올 수용액으로 표선을 맞춰 녹인 후 0.45 $\mu$ m 여과지로 여과하여 검액으로 하였다. 포황의 검액 제조는 분석용 시료 200mg을 30% 에탄올 수용액 40ml에 현탁시킨 후 동량의 dichloromethane을 이용하여 2번 분획하였다. Dichloromethane 분획층을 50  $^{\circ}$ C에서 감압 농축하였고, 진공 오븐에서 용매를 완전히 제거하여 건조하여 검액품을 제조 하였다. 액품에 메탄올을 첨가하여 최종 농도가 10mg/ml이

**Table 2.** Analytical Condition of Marker Substances in SH-21-B.

Marker substances	ephedrine, pseudoephedrine (EH)	baicalin(SR), $\beta$ -asarone(AG), tenuifoliside(PR)	naringenin (TP)	amygdalin (AS)	hyperoside (NF)
flow rate			1.0 ml/min		
Injection vol.			10.0 $\mu$ l		
Column Temp.			30 $^{\circ}$ C( $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)		
detector	UV 210nm	UV 210nm (baicalin, $\beta$ -asarone) UV 330nm (tenuifoliside)	UV 290nm	UV 210nm	UV 210nm
Mobile Phase	50mM(H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ), 25mM TEA(A) :ACN(B)	0.1N(H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )(A):ACN(B)	0.1N(H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )(A):A CN(B)	0.1N(H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) (A):ACN(B)	0.1N(H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )(A): ACN(B)
Analytical conditions	A:B(100:0)0min. $\rightarrow$ A:B(0:100)40 min.	A:B(90:10)0min.,(60:40)60min,(50:50)70min.,(50:50)80min.,(0:100)81,(0:100)100min.	A:B(90:10)0min.,(60:40)60min,(50:50)70min.,(50:50)80min.,(0:100)81,(0:100)100min.	A:B(94:6)0min.,(91:9)60min,(0:100)61min,(0:100)80min.	A:B(95:5)0min.,(70:30)60min,(0:100)80min,(0:100)100min.

되게 맞춰 녹인 후 0.45 $\mu$ m 여과지로 여과하여 검액으로 하였다.

## 2) 표준액의 제조

제조하고자 하는 농도에 맞추어 표준품 무게를 정밀히 달아 10ml 메스플라스크에 넣고 메탄올로 표선을 맞춰 녹인 후 0.45 $\mu$ m 여과지로 여과하여 표준액으로 하였다.

## 3) HPLC 분석

HPLC 분석은 Table 2의 방법에 따라 각각 시행하였다.

## 4) 함량 계산

각 농도별 표준액의 면적을 측정하여, X 축을 표준액의 농도로 Y 축을 peak의 면적으로 설정하여 검량선을 작성하였다. 추세선 및 수식을 설정한 후 검액의 면적을 수식에 대입하여 검액에 함유되어 있는 표준품의 양을 계산하였다.

## 3. QSAR (정량적 구조활성 상관관계)를 이용한 활성인자 추적

가미삼황산의 경우 비만억제에 활용되는 처방으로 본 연구에서는 지방분해효소 억제활성을 예측을 하여 보았다. 지방분해효소 lipase를 억제하는 가미삼황산의 활성인자를 예측하기 위하여 QSAR (MDL QSAR, USA)을 활용한 부분최소자승법 (PLS, Partial Least Squares Regression)으로 예측식을 수립하였다. 그리고 모델의 적합정도를 결정계수( $R^2$ )로 확인하였으며 모델의 예측능력척도를  $Q^2$  값으로 확인하였다. 그리고 가미삼황산의 주요성분을 문헌적으로 검색하여 3차구조를 만들고 이들의 활성을 PLS 식에 대입하여 추정하였다.

## III. 結果 및 고찰

삼황산 (三黃散)의 n-butanol 분획인 SH-21-B의 유효성분 혹은 지표성분의 정량법을 수립하기 위하여 buffer의 종류를 달리하여 분석한 결과 Table 2의 분석조건이 가장 적절하였다. 마황의 ephedrine, pseudoephedrine을 210nm에서 분석하였고(Fig. 1), 황금, 석창포, 원지의 baicalin(210nm),  $\beta$ -asarone(210nm), tenuifolioside(330nm)을 동시에 분석하였으며(Fig. 2), 포황의 naringenin을 290nm에서(Fig. 3), 행인의 amygdalin(210nm)(Fig. 4), 하엽의 hyperoside(210nm)(Fig. 5)를 각각 dual wavelength UV detector에서 분석하였다. 연속동시 분석법을 고려하였으나, 각각의 최대흡수파장이 다양하여

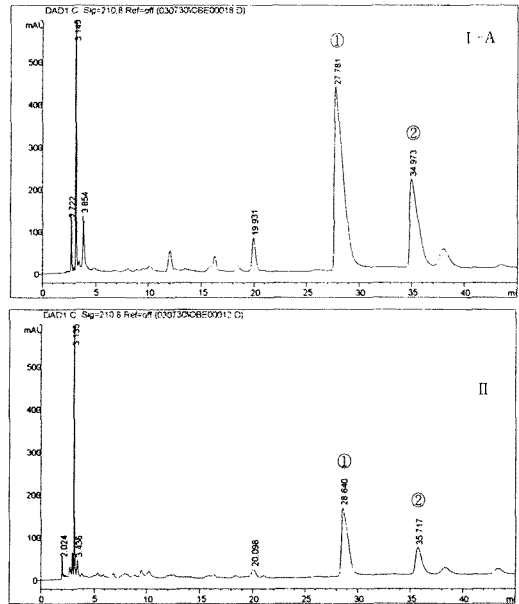


Fig. 1. I: HPLC chromatogram of marker substances of single curde drugs, I-A: Ephedrae Herba, II: HPLC chromatogram of marker substances of SH-21-B. ①: ephedrine, ②: pseudoephedrine.

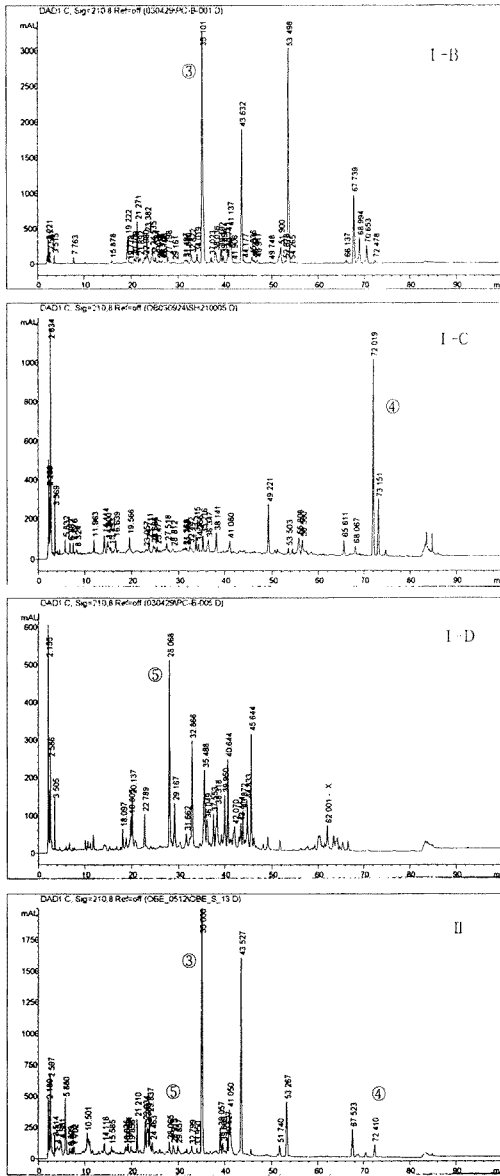


Fig. 2. I : HPLC chromatogram of marker substances of single crude drugs. I-B : Scutellariae Radix, I-C : Acori Gramineri Rhizoma, I-D : Polygalae Radix. II : HPLC chromatogram of marker substances of SH-21-B. ③ : baicalin, ④ :  $\beta$ -asarone, ⑤ : tenuifolioside.

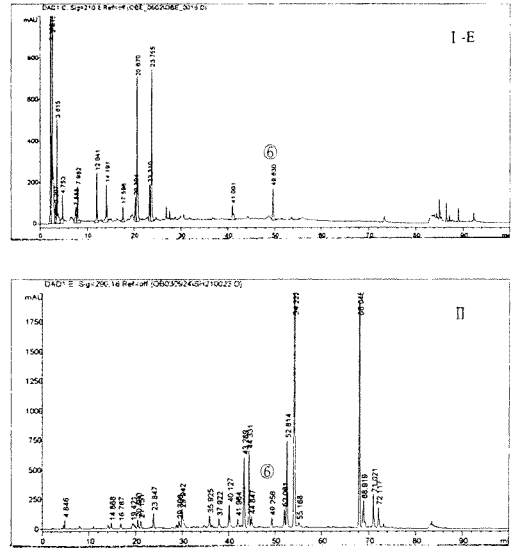


Fig. 3. I : HPLC chromatogram of marker substances of single crude drugs. I-E : Typhae Pollen. II : HPLC chromatogram of marker substances of SH-21-B. ⑥ : naringenin

검지기의 한계가 있었으며, 성분들 간의 중첩도 동시분석을 어렵게 하는 요소였다. SH-21-B에 포함된 지표성분들의 정성분석은 표준물질의 머무름 시간과 비교하여 확인하였으며 또한 단일 생약내의 지표성분과 비교하여 동정하였다. SH-21-B의 지표물질의 분석을 실시하여 좋은 분리능을 가진 크로마토그램을 얻었으며 (Fig. 1,2,3,4,5), 표준품들의 검량선은 0.05~2mg/ml 농도에서 회귀직선방정식과 0.9959~0.9999까지의 상관계수를 나타내었다 (Table. 3).

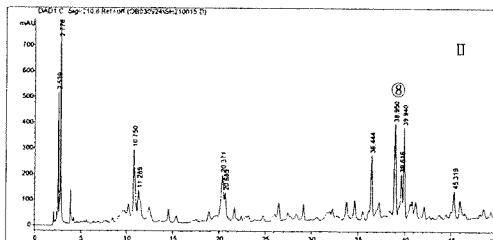
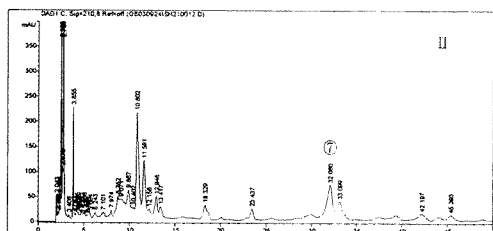
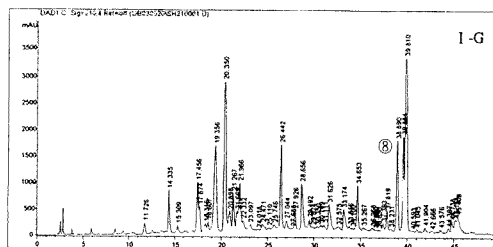
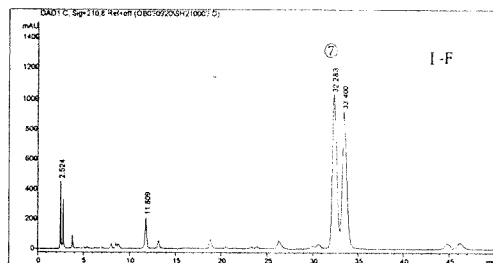


Fig. 4. I: HPLC chromatogram of marker substances of single curde drugs. I-F : Armeniaca Semen. II: HPLC chromatogram of marker substances of SH-21-B. ⑦ : amygdalin.

Fig. 5. I: HPLC chromatogram of marker substances of single curde drugs. I-G : Nelumbo Folium. II: HPLC chromatogram of marker substances of SH-21-B. ⑧ : hyperoside.

Table 3. Average migration times, relative standard deviations and correlation coefficients of calibration graphs (n=3).

Analytes	Migration time(min)	Linear Range (mg/ml)	Slope	Intercept	Correlation coefficients of calibration graphs( $r^2$ )
ephedrine	29.020	0.1~0.8	33146	625.3	0.9997
pseudoephedrine	36.182	0.1~0.8	36045	133.67	0.9999
baicalin	35.820	0.25~2	29445	4199.4	0.9959
$\beta$ -asarone	72.075	0.125~0.5	72667	1807.6	0.9999
tenuifoliside	29.480	0.125~1	21338	506.42	0.9971
naringenin	49.256	0.05~0.4	31075	-10.039	0.9999
amygdalin	32.058	1~4	7832.6	1163.1	0.9994
hyperoside	38.839	0.1~0.5	76024	-2324.6	0.9990

이상의 분석결과에서 황금의 지표성분인 baicalin이 15.92%로 가장 많이 함유되어 있었으며, 행인의 amygdalin(6.57%), 마황의 ephedrine(2.49%), pseudoephedrine(1.02%)순서로 함유되어 있었다. 석창포의  $\beta$ -asarone은 0.06% 함유되어 있었으나 변동계수(coefficient of varia-

tion)의 값이 95%로 너무 커서 정량분석에는 적합하지 않은 것으로 생각되었다. 한방 의료에서 사용되는 약물들의 선진화를 위한 기본과제로 한약재의 GAP (good agricultural practices), 한약제제의 GMP (good manufacturing practices)가 선결과제이며, 이를통해서 GCP (good clinical

**Table 4.** Quantitative analysis of marker substances in SH-21-B(n=3)

Analytes	Contents (%)	S.D.	C.V.(%)
ephedrine	2.49	0.16	6.42
pseudoephedrine	1.02	0.16	15.82
baicalin	15.92	1.76	11.05
β-asarone	0.06	0.06	95.45
tenuifoliside	0.65	0.17	25.90
naringenin	0.07	0.02	27.19
amygdalin	6.57	2.10	32.02
hyperoside	0.91	0.12	13.27

practices)가 이루어 진다면 과학화의 길에 진일보 했다 할 것이다. HPLC (high performance liquid chromatography)는 UV/visible, RI (refractive index), fluorescence, ECD (electrochemical detector) 등 검지기의 발달로 천연물, 의약품, 단백질, DNA 등의 분리와 분석에 널리 사용되고 있다. 특히 HPLC 검지기들은 목적에 따라 사용범위가 다양한데 천연물의 경우 UV 검지기가 사용되는 것이 대다수 이다. Single, dual UV 검지기의 사용은 천연물, 한약 제제, 기능성식품 등 복합제제의 다성분 분석시 그 유용성이 낮은 것이 사실이다. 그 이유는 다성분이 함유되어 있어 분석시 중첩 등 혼화가 일어날 가능성이 높아 분석자가 원하는 물질을 정성하기 어렵고, 분석물질의 최대흡수파장이 다양하여 분석물질을 동시에 검지할 수 없기 때문이다. 1980년대에 들어서 UV 검지기의 개량된 기술로 PDA (photo diode array) 기술이 도입되어 기존의 문제를 일부 해소할 수 있게 되었다. 이는 190-800nm 파장을 동시에 검출할 수 있는 검지기로 UV spectra를 제공하여 분석자가 원하는 물질을 표준품과 비교할 수 있으므로 분석물질의 정성분석에 유용하게 활용되고, 이를 바탕으로 다성분 분석시 중첩에 따른 분석 오차를 줄일 수 있다<sup>14,15)</sup>. 본 연구에서도 제품 하나에 포함된 지표성분 혹은 유효성분 분석을 위하여 수회에 걸쳐 분석하여 매우 번거로운 절차

를 거쳤으며, 연구목적의 표준화에는 가능한 분석법이나, 실제 생산단계에서의 품질관리는 현실적으로 어렵다 할 것이다. 이러한 점을 개선하기 위해서 HPLC-DAD 방법이 권장되고 시행되고 있다.

이같은 HPLC에 의한 주요성분의 분석과 함께 가미삼황산의 비만활성인자를 QSAR기법을 활용하여 예측하였다. 천연물 성분의 지방분해 효소억제 (lipase)와 관련된 문헌을 검색하여<sup>16)</sup> 활성화합물과 구조와의 상관성을 부분최소자승법으로 하여 활성예측식을 수립하였다 ( $IC_{16}$ , micro M) =  $0.1701*tp1 + 0.2277*tp2 + 0.06958*tp3 + 0.06022*tp4 + 0.04653*tp5 + 0.07254*tp6 + 0.1195*tp7 + 0.05282*tp8$ ). 그리고 예측식의 적합정도 나타내는 결정계수( $R^2$ ) 1로 매우 우수하였다. 따라서 가미삼황산의 성분들을 문헌적으로 검색하였으며 이들의 3차원 화학구조를 database 화(ISIS base, MDL, USA)하고 활성을 검색하였다. 그 결과 가미삼황산 주요성분인 hyperoside에서 높은 활성이 예측되었다. 이같은 결과는 단지 예측에 불과 하므로 추후 활성물질을 직접 활용하여 활성실험을 실시하여 예측결과를 검증할 계획이다 (Table 5, 6).

**Table 5.** Establishment of prediction equation using partial least squares regression.

Molecules	IC <sub>16</sub> (micro M, exp.) <sup>b</sup>	IC <sub>16</sub> (micro M, cal.)
Trigonelline	6800	6800
Digitonin	5.9	5.90005
3-Hydroxyflavone	1100	1100
5-Hydroxyflavone	450	450
(±)-Catechin	830	830
Kaempferol	280	280
Aspidospermine	630	630
Rescinnamine	2.3	2.3
Reserpine	110	110

b: Inhibitory concentrations (IC) 16% calculated from the inhibition vs. inhibitor concentration curves.

**Table 6.** Prediction of inhibition activity of marker substances in Gami-Samhwang-San using QSAR

Molecules Name	IC <sub>16</sub> (micro M, pred.)
Pseudoephedrine	1479.9
Naringenin	395.16
Hyperoside	340.99
Amygdalin	2239.9
beta-Asarone	1881.8
Tenuifolioside A	1956.6
Ephedrine	1463.9
Baicalin	868.28

## V. 結 論

비만개선효과가 확인된 한약처방 가미삼황산(加味三黃散)의 n-butanol 분획물(SH-21-B)의 지표성분 정량분석을 HPLC로 실시하고 활성인자를 예측하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 표준품들의 검량선은 0.05~2mg/ml 농도에서 회귀직선방정식을 얻을 수 있었으며 0.9959~0.9999까지의 상관계수를 나타내어 좋은 분석조건을 수립하였다.
2. SH-21-B에는 황금의 지표성분인 baicalin이 15.92%로 가장 많이 함유되어 있었으

며, 행인의 amygdalin(6.57%), 마황의 ephedrine(2.49%), pseudoephedrine(1.02%) 순서로 함유되어 있었다.

3. 석창포의 β-asarone은 0.06% 함유되어 있었으나 변동계수(coefficient of variation)의 값이 95%로 너무 커서 정량분석에는 적합하지 않은 것으로 생각되었다.
4. 황금, 석창포, 원지의 baicalin(210nm), β-asarone(210nm), tenuifolioside(330nm)은 동시 분석이 가능하였다.
5. QSAR을 활용한 활성예측에서 가미삼황산의 주요성분 중 hyperoside가 지방분해효소억제율이 가장 높게 예측되었다.

이번 연구결과는 한약 복합처방의 정량법을 수행하는데 많은 시사점을 제공하였으며 이를 바탕으로 SH-21-B의 동시분석법 개발을 위해 다양한 방법들이 고려되고 있다. 또한 향후에는 주요성분들의 활성을 직접 실험을 통하여 실시하고 예측모델과의 일치성을 검증할 계획이다.

## 참고문헌

1. 식품의약품안전청. 대한약전 제 8개정. 서울: 식품의약품안전청고시 제 2002-15호.



- 2002.
2. 식품의약품안전청. 대한약전의한약(생약)규격집. 서울: 식품의약품안전청고시 제 2004-17. 2004.
  3. 조선민주주의인민공화국 보건부 약전위원회. 조선민주주의인민공화국 약전(제5판). 평양: 의과학출판사. 1996.
  4. 일본약국방해설서 편집위원회. 일본약국방해설서(제14개정). 동경: 광천서림. 2001.
  5. 국가약전위원회. 중화인민공화국약전(2000년판1부). 북경: 화학공업출판사. 2000.
  6. WHO. WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva: WHO. 1998:1-20.
  7. 医療用漢方액기스製劑의品質評價 - 3次元HPLC fingerprint技術의應用 - 쓰무라 기술보고서 21.
  8. 服部尙子·他: 第19回和漢醫藥學會要旨집. 千葉:일본화한의약학회 2002; 123.
  9. Saiki I, Yamaura T, Ohnishi Y, Hayakawa Y, Komatsu Y, Nunome S. HPLC analysis of juzen-taiho-to and its variant formulations and their antimetastatic efficacies.Chem Pharm Bull. 1999;47(8):1170-4.
  10. 유영범, 윤유식, 조기호. High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector(HPLC-DAD)에 의한 가미홍화탕(KH-19)의 지문분석. 대한한의학회지. 2004; 25(3): 45-54.
  11. Yu YB, Sung HJ, Yoon YS. Acute oral toxicity study of standardized Gami-Honghwa-Tang(KH-19) in Rats and Beagle Dogs. J. Toxicol. Pub. Health. 2005; 21(1): 63-70.
  12. Cho J, Kim YH, Kong JY, Yang CH, Park CG. Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus*. Life Sci. 2002; 21;71(5):591-9.
  13. Yong J, Tu PF. Studies on the chemical constituents in root bark of *Polygala tenuifolia* (II). Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2004; 29(8):751-3.
  14. Hanai T. HPLC. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 1999: 1-80.
  15. Ahuja S. Selectivity and detectability optimizations in HPLC. New York: Wiley. 1989: 1-65.
  16. Ruiz, C.; Falcochio, S.; Xoxi, E.; Villo, L.; Nicolosi, G.; Pastor, F.I. J.; Diaz, P.; Saso, L. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids. Journal of molecular catalysis b-enzymatic. 2006;40: 138-143