

## HPLC/DAD에 의한 보중익기탕 중의 글리시리진산 정량분석법의 확립

백주현 · 김선민 · 안지원 · 조창희\* · 오미현\* · 조정희\* · 이미경\*\* · 김효진#

동덕여자대학교 약학대학, \*식품의약품안전청 생약제제팀, \*\*(주)엘컴사이언스

(Received September 1, 2007; Revised December 10, 2007)

## Validation and Determination of Glycyrrhizic Acid as a Marker Substance in Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang by HPLC/DAD

Ju-Hyun Baek, Sun Min Kim, Ji Won Ahn, Chang Hee Cho\*, Mi Hyune Oh\*,  
Jung Hee Cho\*, Mi Kyeong Lee\*\* and Hyo-Jin Kim#

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

\*Herbal Medicinal Products Team, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

\*\*Institute for Life Science, Elcom Science Co. Ltd., Seoul 152-768, Korea

**Abstract** — A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of glycyrrhizic acid was developed for the quality control of traditional herbal medicinal preparation Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang (BZYQT), which is well-known herbal medicine used as tonic. RP-HPLC analysis was carried out using Capcell pak C<sub>18</sub> MG column (5  $\mu$ , 150 $\times$ 4.6 mm) and a mobile phase consisting of acetonitrile and water containing 0.03% phosphoric acid (pH 2.46) at a flow rate of 1.0 ml/min. The optimum wavelength for the detection of the glycyrrhizic acid was found at 250 nm using diode-array UV/VIS detector. The glycyrrhizic acid in BZYQT shows good linearity ( $r^2 > 0.999$ ) in the range of 15  $\mu$ g/ml to 500  $\mu$ g/ml. The limit of detection (LOD) was less than 5 ng and R.S.D for intra-day and inter-day reproducibility was less than 7%. The mean recovery of the glycyrrhizic acid was 97.3~113.0%. These results suggest that the developed HPLC method is simple and efficient, and could be contributed for the quality control of commercial BZYQT products.

**Keywords** □ Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang, glycyrrhizic acid, HPLC, quantification, validation

보중익기탕은 비위론(脾胃論)<sup>1,2)</sup>에 수재되어 있는 처방으로서 인삼, 백출, 당귀, 진피, 시호, 승마, 감초, 황기로 구성되어 있다. 이것은 평소에 내장평활근이 무력한 사람이 소화불량증이 있고, 담습분비부족으로 식욕이 부진하며, 면역능의 저하로 만성적인 항원항체반응에 의한 도한과 세포에 영양이 부족하여 간질액이 피부 밖으로 빠져나가는 도한 증상과 면역능이 저하되어 염증에 잘 감염되고, 한번 감염되면 잘 낫지 않을 때 사용하며, 내장평활근의 장력의 강화, 소화관의 운동능을 강화하여 소화 흡수 기능 증진, 세포에 영양 공급으로 도한 완화, 면역기능 증강으로 염증의 생성 억제, 체질을 강화시키는 작용을 한다.<sup>1)</sup>

보중익기탕에 대한 연구는 국내에서는 면역증강작용,<sup>3)</sup> 항종양 효과,<sup>4)</sup> 항불안,<sup>5)</sup> 골다공증,<sup>6)</sup> 항산화<sup>7)</sup>에 대한 기전연구 및 효력검

증을 위한 연구가 수행되었다. 국외에서는 일본의 감포 메디신 (Kampo Medicine)을 중심으로 "Hochu-Ekki-To"로 알려진 보중익기탕 처방에 건강 및 대조를 가한 처방에 대한 연구가 주로 수행되었으며, 그 내용은 국내의 연구와 같은 분야의 기전연구 및 효력검증을 위한 연구<sup>8-11)</sup>와 대규모의 임상연구<sup>12,13)</sup>도 수행되는 등 활발한 연구가 수행되고 있다.

한약제제의 경우 다양한 성분이 복합되어 있고, 구성성분인 생약은 그 채취시기 및 지역 등에 따라 구성성분이 차이가 나는 특성을 지니고 있어, 의약품으로서 일정한 효능효과를 나타내기 위해서는 표준화된 제조방법 및 일정한 품질관리방법이 필수적이므로, 정부뿐만 아니라 국제적으로도 이에 대한 지속적인 논의가 이루어지고 있다.<sup>14,15)</sup> 보중익기탕의 구성 생약 중 정량분석이 가능한 성분은 감초 중 글리시리진산, 인삼 중 진세노사이드 Rb1 또는 진세노사이드 Rg1 또는 총 파낙사디올이며, 각 지표물질에 대하여 각 생약에 대한 개별분석법<sup>16-18)</sup>을 적용하고, 이에 대한 연구는 활발히 진행되었으나, 보중익기탕에서의 각 지표물질에

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-940-4305 (팩스) 02-943-9578  
(E-mail) hyojkim@dongduk.ac.kr

대한 정량시험법의 연구는 검토되지 않았다.<sup>19)</sup>

본 연구에서는 실제 보중익기탕을 실험실적으로 추출하여 우선적으로 감초 중 글리시리진산에 대한 정량분석법을 개발하고, 그것의 validation을 통해 분석법을 확립하고자 하였으며, 생약에서의 지표물질의 개별분석법과의 비교 및 유통제제에서의 검증 등을 통해 개발된 정량분석법의 신뢰성을 확보하여 품질관리방법으로서 그것의 정확성 및 효율성을 제고하고자 하였다.

## 실험 방법

### 실험재료 및 기기

감초, 건장, 당귀, 대추, 백출, 승마, 시호, 진피, 황기, 인삼은 규격품을 구매하여 2인의 전문 감별위원으로부터 감별을 받아 진품으로 확인된 생약을 사용하였다. 표준품은 글리시리진산(Wako Chemical Pure Industries, Ltd., Japan)을 구입하여 사용하였다. 실험실적 탕제의 제조는 약탕기(Daewoong, Korea)를 사용하였다. 분석용 칼럼은 octadecyl silicagel 칼럼[Capcell Pak C<sub>18</sub>(5 μm, 150×4.6 mm), Shiseido Fine Chemicals Co., Japan]을 사용하여 분석하였고, 기기는 JASCO HPLC(Tokyo, Japan)를 사용하였다.

### 실험방법

**실험실적 탕제의 조제 및 전처리법** - 보중익기탕의 실험실적 탕제의 조제는 1회 복용량인 감초 0.5 g, 건장 0.17 g, 당귀 1.0 g, 대추 0.67 g, 백출 1.33 g, 승마 0.33 g, 시호 0.67 g, 진피 0.67 g, 황기 1.33 g, 인삼 1.33 g의 총량을 100 g이 되도록 하여 10배인 1l의 물을 가해 2시간 동안 약탕기를 이용하여 표준탕제법<sup>20)</sup>으로 추출하고, 전체를 물을 이용하여 500 ml로 하였다. 3룻트의 보중익기탕을 추출하고, 감초 또는 인삼이 함유되지 않은 탕제 도 동일한 방법으로 조제하여 준비하였다.

표준품, 실험실적 탕제는 메탄올에 녹여 준비하고, 시중에서 구매한 유통제제는 부형제를 약간의 물에 녹인 후, 메탄올에 녹여 준비한 후, 45 μm 멤브레인필터로 여과하여 사용하였다.

시중에서 구매한 유통제제는 구성 생약 중 가장 적은 양으로 함유되어 있는 생약의 함량이 1g 이상이 되도록 정밀하게 단 후, 물 10 ml를 넣어 5분간 흔든 다음 메탄올 100 ml를 넣고 1시간 환류추출 후 그 상정액을 취하였다. 잔류물에 메탄올 100 ml를 넣고 이와 같은 방법으로 2회 반복 추출한 후, 여액을 모아 감압 농축하고, 50% 메탄올에 녹여 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 하였다.

**분석법의 확립 및 Validation<sup>21,22)</sup>** - 동시분석법을 확립하기 위하여 octadecyl silicagel 칼럼과 검출기에 메탄올, 아세트나이트릴 및 물을 이동상으로 하여 최적의 조건을 확립하고자 하였다.

고정상은 다양한 제조사의 octadecyl silicagel(ODS) 칼럼, 길

이, 직경 등을 달리하여 분석시간 및 분석능을 비교하였고, 설정된 최적의 ODS 칼럼에 대해 메탄올, 아세트나이트릴 및 물을 그 조성을 달리하여 최적의 분리조건을 탐색하였으며, 인산을 첨가하여 산도를 조절하여 분리능을 증가시켰다. 또한 용매의 조성을 등용매 조성(isocratic) 및 농도구배(gradient)로 달리하여, 분석시간 및 분리능을 고려한 최적의 분석조건을 확립하고자 하였다. 광다이오드배열 검출기를 사용하여 200~300 nm의 전 파장에 대하여 피크를 측정하였으며, 미량의 성분이 검출 가능하도록 목표성분에 보다 선택적인 파장을 선택하여 보다 민감한 분석법을 확립하고자 하였다.

**가) 검량선의 작성 및 직선성(Linearity) 검토** - 각 탕제의 지표성분을 각각 정확히 칭량하여 메탄올 및 50% 메탄올에 녹인 후 표준용액으로 사용하였다. 유의성 있는 검량선을 얻기 위해 적어도 5가지 이상의 농도에서 실험을 실시하였으며 검량식을  $y=ax+b$ ( $y$ 와  $x$ 는 각각 피크 면적과 시료 함량의 로그값)의 형태로 구하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선은  $R^2$ 의 값을 통하여 직선성을 판단하였으며  $R^2$ 의 값이 0.99 이상인 경우 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

**나) 특이성(Specificity) 검토** - 확립된 분석법을 통하여 분리된 지표성분의 피크가 추출물내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 광다이오드배열검출기를 이용하여 피크의 순도를 검토하여 판단하였다. 즉, 각각의 피크에 대하여 여러 점에서 자외선 흡수 스펙트럼을 판단하고 이것이 모두 일치하는 경우 피크의 특이성을 인정하였으며 각각의 분석조건에서 각 피크를 판단하였다.

**다) 정확성(Accuracy) 검토** - 함량이 확인된 탕제 추출물과 농도를 알고 있는 확정 유효성분 용액을 비율을 달리하여 혼합한 후 직선성이 확인된 농도구간에서 3회 측정하여 회수율을 구하여 판단하였다.

### 라) 정밀성(Precision) 검토

**(1) 반복성(병행정밀성, Repeatability, Intra-assay precision) 검토** - 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시료를 5회 반복 측정하여 정밀성을 확인하며 그 결과가 3가지 농도 모두에서 상대표준편차로써 기준에 적합한지 평가하였다.

**(2) 실험실내 정밀성(Intermediate precision) 검토** - 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 실험 일자를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날 5회 실험하여 피크면적의 상대표준편차를 구하여 평가하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 분석방법의 확립 및 Validation

분석방법은 이동상으로 아세트나이트릴과 pH를 2.46으로 한 0.03% 인산용액을 사용하여 10분까지는 아세트나이트릴과 0.03%

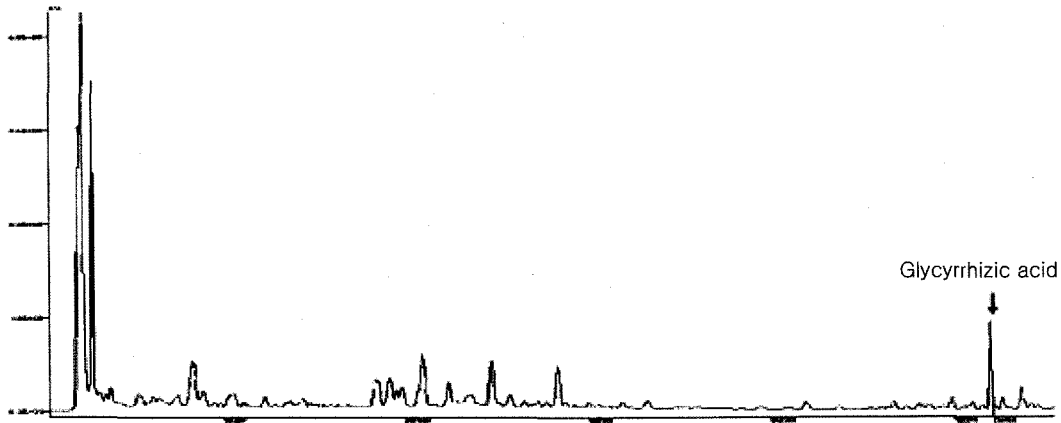


Fig. 1 - HPLC-DAD chromatogram of glycyrrhizic acid in experimentally prepared Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang.

인산용액을 10 : 90에서 15 : 85로, 10분에서 25분까지는 25 : 75로, 40분까지는 30 : 70으로, 55분까지는 50 : 50, 58분에는 다시 10 : 90, 마지막 60분까지는 10 : 90으로 유지하여 총 분리시간은 60분으로 하여 분리되도록 하였다. 이동상은 1.0 ml/min으로 하고, 칼럼온도는 35°C로 하였다. 피크의 검출은 광다이오드배열 검출기를 사용하여 200~300 nm까지의 전 파장에 대하여 측정하였고, 주로 203, 230, 250, 280 nm 파장에서의 피크가 검출되었으며, 최종으로 250 nm의 파장에서의 피크가 글리시리진산을 가장 잘 설명하는 것으로 나타났다. 이것의 표준품 및 탕에서의 분석결과는 Fig. 1과 같은 크로마토그램으로 나타났다.

**검량선의 작성 및 직선성(Linearity) 검토** - 동시분석법의 검량선 측정, 직선성 평가 및 검출한계(LOD)·검량한계(LOQ) 설정 보중익기탕의 지표성분인 글리시리진산은 넓은 범위에서 좋은 직선성을 보였으며, 낮은 검출한계, 검량한계 값을 보였다. 검량곡선은 Fig. 2와 같이 나타났으며, 농도 범위는 15.63~500 µg/ml, R<sup>2</sup>값은 0.999, 검출한계 0.0054 µg, 정량한계는 0.0164 µg

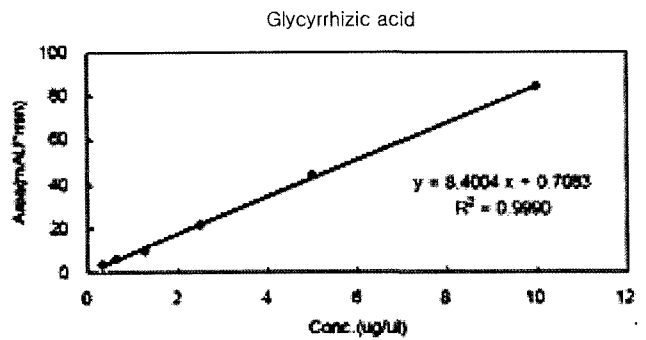


Fig. 2 - Calibration curve of glycyrrhizic acid by a newly developed analytical method.

로 나타났으며, 이것은 Table I에 나타냈으며, 이것의 검량곡선은 Fig. 2와 같다.

**특이성(Specificity) 검토** - 보중익기탕의 지표성분인 글리시리진산에 해당하는 피크의 순도는 광다이오드배열 검출기에 의해

Table I - Linearity, LOD and LOQ of a newly developed analytical method

Compound	Conc. range (µg/ml)	Calibration eq. (Y=aX+b)		R <sup>2</sup>	LOD* (µg)	LOQ** (µg)
		Slope (a)	Intercept (b)			
Glycyrrhizic acid	15.63~500.00	8.4004	0.7083	0.9990	0.0054	0.0164

\*LOD=3.3 × (S.D./slope of calibration curve).

\*\*LOQ=10 × (S.D./slope of calibration curve).

Table II - Precision (Intra-assay precision and Intermediate Precision) of a newly developed analytical method

Spiked amount (µg)	Intra-assay precision (n=3)			Intermediate precision (n=3)		
	Detected amount (µg)	RSD* (%)	Accuracy** (%)	Detected amount (µg)	RSD* (%)	Accuracy** (%)
5.00	4.78±0.31	6.50	104.43	5.14±0.22	4.20	97.26
1.25	1.21±0.05	4.15	102.89	1.28±0.04	2.82	97.67
0.31	0.28±0.007	2.40	109.62	0.27±0.02	6.01	113.03

\*R.S.D. (%)=(S.D./mean) × 100.

\*\*Accuracy (%)=[1-(mean concentration measured-concentration spiked)/concentration spiked] × 100.

**Table III** – Accuracy (Recovery) of a newly developed analytical method

Spiked amount (μg)	Detected amount (μg)	Recovery (%)	RSD (%)
3.93	4.21	107.08±12.47	11.65
5.45	6.00	110.13±2.93	2.66
6.97	7.58	108.76±1.58	1.45

확인하였으며, 순도는 98% 이상이었다.

**정확성(Accuracy) 검토** – 함량이 확인된 보중익기탕 시료에 지표성분인 글리시리진산(500 μg/ml)을 가한 후 함량을 평가하여 정확성을 측정한 결과 Table III에서와 같이 107~111%의 정확성을 나타내었으며 또한 12% 이하의 상대표준편차를 나타내었다.

**정밀성(Precision) 검토** – 확립한 동시분석법의 정밀성을 검토하기 위하여 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시료를 5회 반복 측정하여 정밀성을 확인한 결과 Table II에서와 같이 세농도 모두에서 7% 이하의 상대표준편차를 나타내었다. 또한 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시험 일자를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날 5회 반복 측정한 결과 7% 이하의 상대표준편차를 나타내었다.

#### 새롭게 개발된 분석방법의 적용

실험실적으로 조제된 보중익기탕에 대하여 새로이 개발된 분석방법으로 글리시리진산의 함량을 측정한 결과 Table IV에서와 같이 0.091%였으며, 동일한 시료에 대하여 이전에 적용되었던

**Table IV** – Glycyrrhizic acid contents of a newly developed analytical method compared with individual analytical method in Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang by HPLC

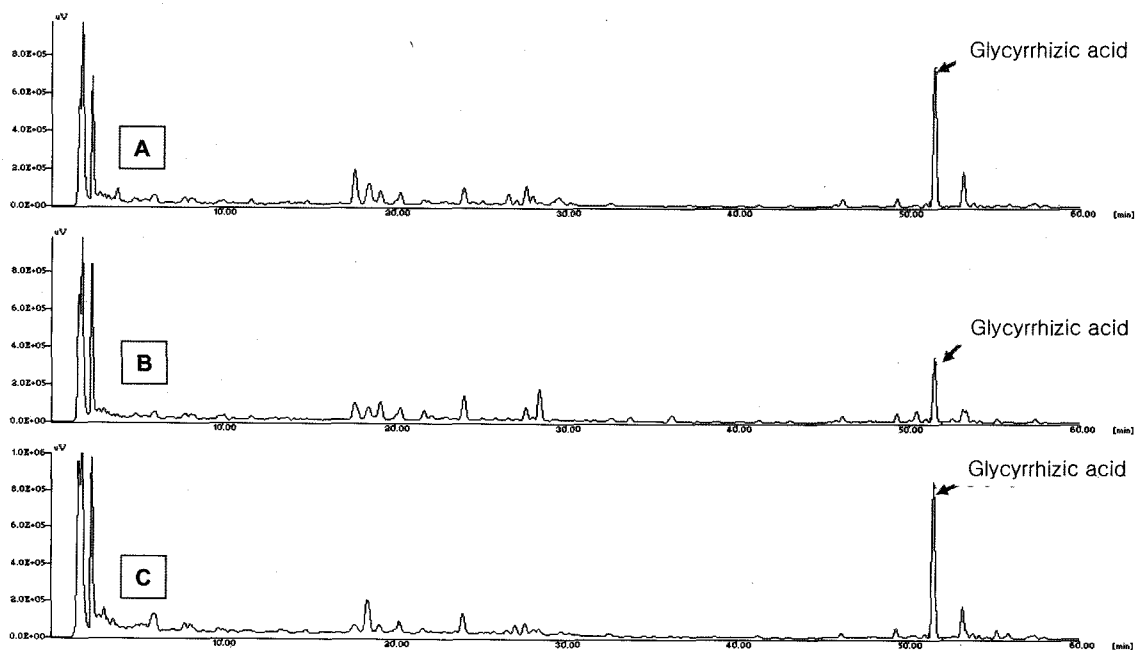
Compound	A newly developed method (%)	Individual analysis method (%)
Glycyrrhizic acid	0.091±0.005	0.093±0.004

감초에 대한 글리시리진산 개별분석법의 전처리법 및 분석법을 적용하여 분석한 결과 0.093%로 측정되어, 두 방법간의 분석결과와의 차이는 오차범위 이내로 나타났다.

시중에 유통되고 있는 3개 회사의 보중익기탕 제품에 대하여 새롭게 개발된 분석방법을 적용하였을 때, Fig. 3에서 보여지는 바와 같이 글리시리진산에 대한 피크가 동일 유지시간에서 다른 주성분 및 부형제에 대한 간섭 없이 좋은 분리능을 가짐을 확인할 수 있었다.

## 결 론

임상적으로 널리 사용되고 있는 보중익기탕의 기존의 품질관리방법은 보중익기탕을 구성하고 있는 개별생약에서 지표물질의 분석방법을 그대로 적용하여 다른 주성분 및 유통체계의 경우 부형제에 의하여 간섭을 받았다. 본 연구에서는 보중익기탕의 품질관리방법 개선의 일환으로서 개별생약에 대한 분석방법이 아닌 보중익기탕에서 각 지표물질에 분석방법을 확립하였고, 우선적으로 보다 분석이 용이하지만, 전처리 방법이 어려운 감초 중 글리시리진산에 대한 분석방법을 확립하였다. 새롭게 개발된 분



**Fig. 3** – HPLC chromatogram of three commercial Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang products by a newly developed analytical method.

석방법을 검증하고자 직선성, 특이성, 정밀성, 정확성의 validation 방법을 적용하여 신뢰성을 높이고자 하였으며, 실험실적 보충익기탕 및 유통제제에서의 분석방법 적용을 통해 분석방법을 확고히 하고자 하였다. 이러한 결과는 추후에 정량이 가능한 인삼 중 진세노사이드 Rb1, 진세노사이드 Rg1 및 총 파낙사디올의 보충익기탕에서의 함량시험법을 확립하고, 글리시리진산과의 동시정량분석법을 확립한다면, 보충익기탕의 품질관리의 효율성을 제고하고, 이의 확립을 통해 보충익기탕을 이용한 다양한 분야의 연구에서 보충익기탕의 일정한 품질관리에 따라 일정한 결과의 확보로 연결될 수 있는 기초연구가 될 것으로 사료된다.

**감사의 말씀**

본 연구는 2006년도 식품의약품안전청의 용역연구개발사업의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

- 1) 박영순 : 한방의 약리해설, 제2판, 아카데미서적, 서울 (2002).
- 2) 한약처방의 종류 및 조제방법에 관한 규정[보건복지부 고시 제 1995-15호, 1995.3.15].
- 3) 김호현 : 보충익기탕 합 향사육근자탕이 복수암 유발 생쥐 비장의 세포성 면역활성에 미치는 영향에 관한면역조직화학적 연구. *한의학연구소 논문집* **3**, 17 (2001).
- 4) 안광무 : 보충익기탕 및 소음인 보충익기탕이 S-180에 대한 항종양효과와 cyclophosphamide에 의한 부작용에 미치는 영향. *동의병리학회지* **3**, 119 (1993).
- 5) 류중훈, 김민선, 황영선, 육창수 : Elevated plus-maze를 이용한 신기환, 보충익기탕 및 사물탕의 항불안 효과. *응용약물학회지* **9**, 125 (2001).
- 6) 엄재원, 정석희, 이종수, 김성수, 신현대 : 보충익기탕과 사물탕이 골다공증에 미치는 임상적 연구. *한국재활의학과학회지* **9**, 59 (1999).
- 7) 박성민 : 보충익기탕과 육미지황탕이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. *대한본초학회지* **18**, 175 (2003).
- 8) Onogi, K., Niwa, K., Tang, L., Yun, W., Mori, H. and Tamaya, T. : Inhibitory effects of Hochu-ekki-to on endometrial carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and 17beta-estradiol in mice. *Oncol. Rep.* **16**, 1343 (2006).
- 9) Kobure, T., Tatsumi, T., Niizawa, A., Fujinaga, H., Shimada, Y. and Terasawa, K. : Population of CD40L-expressing cells was slightly but not significantly decreased in lymphoid tissues of

- collagen-induced arthritic mice treated with Hochu-Ekki-To. *Yakugaku Zasshi* **127**, 547 (2007).
- 10) Kiyohara, H., Nagai, T., Munakata, K., Nonaka, K., Hanawa, T., Kim, S. J. and Yamada, H. : Stimulating effect of Japanese herbal (kampo) medicine, hochuekkito on upper respiratory mucosal immune system. *Evid Based Complement Alternat Med.* **3**, 459 (2006).
- 11) Tajima, S., Bado, M., Yamasawa, H., Ohno, S., Moriyama, H., Takada, T., Suzuki, E., Gejyo, F. and Sugiyama, Y. : Preventive effect of Hochu-ekki-to on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in BALB/c mice. *Lung* **184**, 318 (2006).
- 12) Hamazaki, K., Sawazaki, S., Itomura, M., Huan, M., Shibahara, N., Kawakita, T., Kobayashi, S. and Hamazaki, T. : No effect of a traditional chinese medicine, Hochu-ekki-to, on antibody titer after influenza vaccination in man: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Phytomedicine* **14**, 11 (2006).
- 13) Kuroiwa, A., Liou, S., Yan, H., Eshita, A., Naitoh, S. and Nagayama, A. : Effect of a traditional Japanese herbal medicine, hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang), on immunity in elderly persons. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 317 (2004).
- 14) 한대양 : *생약학*, 10판, 동명사, 서울, p.10 (1998).
- 15) 김효진 : 반하백출천마탕에 대한 HPLC 동시정량법 및 TLC 확인 시험법의 확립. *동덕약학연구지* **10**, 16 (2006).
- 16) Gerritsma, K. W. and van der Vijver, L. M. : The determination of glycyrrhizinic acid content in Radix glycyrrhizae and its compounds. *Pharm. Weekbl.* **101**, 733 (1966).
- 17) Ogawa, S., Yoshida, A. and Mitani, Y. : Analytical studies on the active constituents in crude drugs. I. Determination of glycyrrhizin in Glycyrrhizae radix by high speed liquid chromatography. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **96**, 122 (1976).
- 18) Zhong, C., Jin, Y., Wang, Z., Zhou, H. and Li, H. : Determination of polyamine constituents in radix ginseng by HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **15**, 682 (1990).
- 19) 의약품등 기준 및 시험방법(식품의약품안전청 고시 제2006-56호, 2006.12.6.) [별표6] 한약제제에서의 지표성분 설정 가능한 한약.
- 20) 의약품등 안전성·유효성 심사규정(식품의약품안전청 고시 제 2003-17호, 2003.4.14.).
- 21) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures : Text and Methodology Q2(R1), Step 4 version (2005).
- 22) 식품의약품안전청 : 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인 (2004).