

Original Article

탕약의 실온과 냉장보관 및 기간별 안정성에 대한 실험적 연구

손진영, 신장우, 손창규

대전대학교 한의과대학 간장면역학 교실

Stability Study for Herbal Drug According to Storage Conditions and Periods

Jin-Young Son, Jang-Woo Shin, Chang-Gue Son

Internal Medicine & Immune Center, Daejeon University

Objectives: This study aimed to investigate the stability of a decoction using three herbal plants and their major components according to the storage conditions and periods.

Materials and Methods: A three-herb mixture (1:1:1) of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer, *Artemisia capillaris* Thunberg, and *Poncirus trifoliata* Rafinesqui was decocted and kept at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) or cold temperature (4°C) for 0, 2, 4 or 8 weeks in liquid form in a plastic pack under dark conditions. At time points given, they were lyophilized. 200 mg of powdered samples were dissolved in 1 mL of 90% methanol and then applied to a high performance thin layer chromatography (HPTLC) with glycyrrhizin, 6,7-dimethoxycoumarin or poncirin for quantitative or qualitative analysis.

Results: There were no gross changes in HPTLC-based compositional band-patterns of the three herbal mixture according to the storage conditions and period. The major components of each herb, glycyrrhizin, 6,7-dimethoxycoumarin and poncirin, showed slight time-dependent reduction in their contents both at room and cold temperature for 8 weeks.

Conclusion: We could conclude that the current herbal decoction is generally safe for the stability at both RT or CT for at least 8 weeks. Nevertheless, we proposed that further advanced studies are required for more multiple herbal mixtures and longer storage periods.

Key Words : Stability, Oriental medicine, Decoction, Storage condition

서론

그동안 한약은 오랜 경험과 한의학의 약리적 이론에 근거하여 응용되어 왔으며, 현대의 약리학적 검증에 대한 필요성이 거의 없었다. 그러나 한약의 이용이 전 세계적으로 확대되면서 한약물의 효능(efficacy)과 안전성(safety) 및 안정성(stability)에 대한 과학적 근거에 대한 사회적 요구가 매우 강해지고 있다^{1,2)}. 그러한 이유로 최근에는 특히 한약물의

유효성과 안전성에 대한 연구와 결과들이 발표되었는데³⁻⁶⁾, 반면에 한약물의 안정성에 대한 데이터는 전혀 없는 실정이다.

약물의 안정성이란 일정한 약물이 일반적인 물리적, 화학적 혹은 생물학적 환경에서도 약효를 잃지 않고 유지될 수 있는 기간을 말하는 것으로 약물의 개발과 생산과정부터 투약의 모든 과정을 통하여 매우 중요한 기본요소이다⁷⁾. 지금껏 한약물은 주로 환제나 분말 및 건조엑스나 탕제의 형태로 사용되었는

• 접수 : 2008년 11월 7일

• 수정 : 2009년 1월 29일

• 채택 : 2009년 2월 27일

• 교신저자 : 손창규(Chang-Gue Son)

대전광역시 중구 대흥동 22-5번지 301-724 대전대학교 한방병원 내과면역센터

Tel : +82-42-257-6397, Fax : +82-42-257-6398, E-mail : ckson@dju.ac.kr

데, 향후 한약의 제형의 다변화가 요구되는 상황에서 한약물의 안정성에 대한 연구는 매우 중요하다.

가장 많이 사용하고 있는 탕제는 대략 10여종 이상의 한약이 복합되어 수많은 물질들이 수용성의 형태로 추출된 것으로서, 임상에서는 보통 2주 ~ 4주 까지 실온 혹은 저온에서 보관하며 복용하도록 권장하고 있다. 그러나 일반적으로 액상형태에서 약물의 안정성이 제일 취약할 수 있다는 사실에서 한약의 보관기간 및 보관 조건에 따른 성분의 함량 변화나 약효성과의 관련성에 대해서는 확신할 수 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 임상에서 흔히 사용되는 탕약의 복약지도와 향후 한약물의 다양한 제형개발과 표준화의 과정에서 필요한 기초데이터 확보를 위하여, 감초, 지실, 인진의 3가지 약물을 선정하여 함께 전탕한 후 보관조건별 약물 구성성분들의 정성과 정량적 안정성에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

재료 및 실험 방법

1. 시험 약재와 지표물질 선정

한약을 구성하는 약재들은 함유성분들의 조합 및 성분비의 차이로 인해 각 약재마다 고유의 high-performance thin layer chromatography (HPTLC) 패턴이 다양하므로, 여러 약재를 동시에 동일한 조건에서 분석하는 데에는 다소 무리가 있다. 또한 동물성 약재의 경우, 식물성 약재보다 보관 기간 동안 부패하기 쉬우므로 시험 약재로 적절할 수 있으나, 추출물의 대부분이 단백질 등의 고분자 물질로서 본 연구의 주요 분석 방법인 HPTLC 시스템에 적용하기 어렵기 때문에 약재 선정에서 제외되었다.

따라서 본 연구에서는, 동일한 HPTLC 조건에서 정성분석이 가능한 감초 (Broiled root of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer), 지실 (Unripe fruits of *Poncirus trifoliata* Rafinesqui), 인진 (Herba of *Artemisia capillaris* Thunberg)과 그들의 지표성분으로 각각 glycyrrhizin, poncirin과 6,7-dimethoxycoumarin을 선정하였다. 대

한약전 및 대한약전의 한약규격주해⁸⁾에 근거하여 약재 및 그 주요성분을 선정하였다.

2. 탕전 및 조건별 보관과 동결건조

혜화건재도매약업사(대전)로부터 구입한 감초, 지실, 인진 각각 50 그램씩을 혼합 후 3리터의 정제수에 넣고 100℃에서 2 시간 동안 가열한 후 무압력상태로 추출하였다. 추출액을 100 mL씩 폴리에틸렌수지의 레토르트 플라스크에 진공포장한 뒤, 보관기간 및 보관온도에 따른 성분변화를 알아보기 위해 2주, 4주, 8주 동안 실온 (23 ± 2℃) 및 냉온 (4℃)의 압소에 각각 보관하였다. 이후 정해진 기간의 시점에 각각 50 mL 튜브에 담아 원심분리 (3000 rpm, 15 min)하여 상층액을 회수한 뒤, 동결건조 하여 실험에 사용 전까지 -80℃에 저장하였다. 추출물의 수율은 8.7 % (w/w)이었다.

3. HPTLC 분석을 위한 시약 및 장비

대한약전의 가이드와 선행 연구자들의 결과에 근거하여 감초, 지실, 인진의 지표물질로 사용하기 위해서 glycyrrhizin (Sigma, USA), 6,7-dimethoxycoumarin (Fluka, USA), poncirin (Fluka, USA)을 구입하였다⁹⁻¹¹⁾. HPTLC 분석을 위한 용매로는 분석용 99.9% methanol (Merck, Germany), 99.0% ethyl acetate (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan), 98% formic acid (Kanto chemical Co., Inc., Japan), 99.5% acetic acid (DC Chemical Co., Ltd., Puerto Rico)를 사용하였으며 *p*-anisaldehyde (Sigma, USA)와 95% sulfuric acid (Daejung Chemicals & Metals co., Ltd., Korea)는 발색제로 사용하였다.

Linomat IV automated sample applicator, Automated Multiple Development 2, Reprostar 3 with Digital Camera, winCATS 4 software, VideoScan으로 구성되어 있는 HPTLC application system (CAMAG, Switzerland)을 이용하였고, Silica Gel 60 F₂₅₄ HPTLC plate (20 cm × 10 cm)는 Merck (Germany)로부터 구입하였다.

4. HPTLC 시험 및 정성과 정량 분석

탕약 내 성분의 패턴 변화 및 정량 분석은 HPTLC system을 이용하였다^{12,13}. 기간 및 온도별로 보관 후 동결 건조된 탕약 200 mg을 1 mL의 90% methanol (w/v)과 혼합하여 잘 섞은 뒤, 초음파발생기에 30 분간 방치하여 고형분으로부터 가용성 물질들의 용출을 용이하게 하였다. 원심분리 (3000 rpm, 5 min) 한 후, 상층액을 회수하여 새로운 1.5 mL eppendorf tube로 옮겨 담아 검액으로 사용하였다. 지표성분인 glycyrrhizin, poncirin 및 6,7-dimethoxycoumarin은 methanol에 녹여 표준액으로 사용하였다.

보관기간 및 온도별 검액 (2 µL)과 각 약재의 표준액 (1 mg/mL glycyrrhizin: 5 µL, 5 mg/mL poncirin: 2 µL, 0.1 mg/mL 6,7-dimethoxycoumarin: 1 µL)을 HPTLC용 Silica Gel 60 F₂₅₄ plate (20 cm × 10 cm)에 점적하였다 (밴드 길이: 8 mm, 간격: 7.2 mm, 점적 속도: 10 sec/µL). 초산에칠·물·개미산·빙초산 혼합액 (79:11:5:5, v/v/v/v)을 전개용매로 하여 약 8 cm 전개한 다음 plate를 바람에 말렸다. 이후

자외선 (주파장 366 nm)이나 *p*-anisaldehyde sulfuric acid로 발색한 후에 백색광하에서의 검액에서 보이는 크로마토그램의 패턴을 0 주째 (보관하기 전)의 크로마토그램과 비교하였다.

정량분석은 보관기간 및 온도별 검액들의 크로마토그램에서 얻은 여러 개의 밴드 중, 표준액에서 얻은 밴드의 색상 및 retention factor (R_f , 시료의 전개거리/용매의 이동거리)값과 비교하여 각 약재의 주요성분을 검출하였으며, 확인된 피크면적은 0 주째 (보관하기 전)의 각 성분피크를 100으로 하였을 때 상대적인 값으로 산출하였다.

결과

1. HPTLC를 이용한 탕약의 보관 조건별 정성적 패턴 비교

3가지 약재로 구성된 혼합 한방제제의 탕약에 대해 실온과 냉온의 보관 조건별, 그리고 0 주에서 8 주까지의 보관 기간별 약재 추출성분들의 기본적인

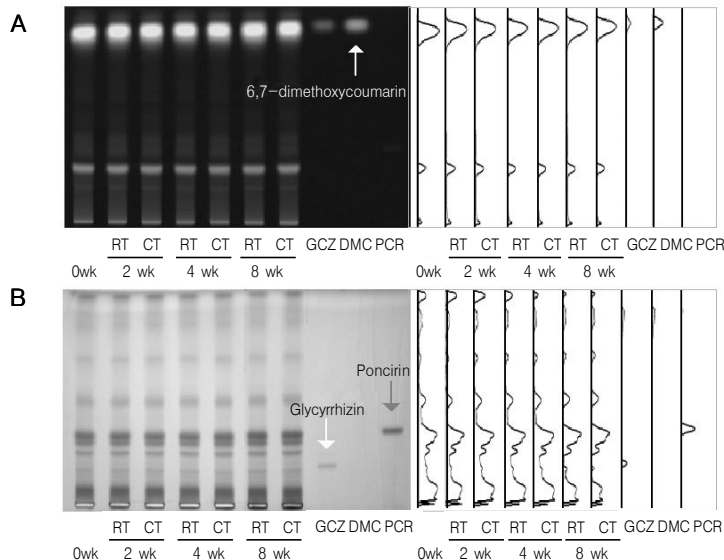


Fig. 1. HPTLC-based chromatogram analysis according to storage condition and period.

Samples from different storage temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ or 4°C) and period (0 to 8 weeks) were separated using HPTLC. They were analyzed under UV 366 nm (A) or white light (B). RT: room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), CT: cold temperature (4°C), GCZ: glycyrrhizin, DMC: 6,7-dimethoxycoumarin, PCR: poncirin.

패턴이 어떻게 변하는지를 알아보았다. 예상대로 모든 샘플에서 glycyrrhizin, poncirin 및 6,7-dimethoxycoumarin의 R_f 값은 거의 동일한 값을 보였으며, 다른 분리된 HPTLC 밴드의 패턴이 0주 ~ 8주 동안 실온 및 냉온에서 보관한 샘플들 간에 큰 변화는 없었다 (Fig. 1). 주파장이 366 nm인 자외선을 조사하였을 경우 보이는 밴드들의 패턴이 거의 일정하였고 (Fig. 1A), 발색 후 백색광을 쬐었을 때 나타나는 여러 밴드의 패턴 또한 큰 차이가 없었다 (Fig. 1B). 이러한 결과들은 최소한 8 주 동안에는 탕약의 보관 온도에 상관없이 어떤 성분이 없어지거나 다른 성분으로 변하는 일은 일어나지 않음을 의미한다.

2. 보관 조건별 주요성분의 함량변화

조합된 3가지 한약제의 지표성분으로 사용된 glycyrrhizin, poncirin 그리고 6,7-dimethoxycoumarin을 이용하여 탕약의 보관 기간별 보관 온도별 정량적 변화를 분석하였다. 보관기간 및 온도별 검액들로부터 각 주요성분들의 정량분석을 지표물질과 비교하여 구한 후에, 0 주째의 양과 비교하여 상대값으로 나타내었다 (Fig. 2).

Glycyrrhizin은 실온 보관의 경우, 0 주째에 비해 2, 4, 8 주간의 보관 기간 동안 98.3%, 82.5%, 90.0%의 함량이 검출되었으며, 냉온 보관의 경우에는 마

찬가지로 0 주째에 비해 77.5%, 88.7%, 76.5%의 함량이 검출되었다. Poncirin은 실온 보관의 경우, 0 주째에 비해 2, 4, 8 주간의 보관 기간 동안 93.5%, 93.6%, 93.3%의 함량이 검출되었으며, 냉온 보관의 경우에는 88.9%, 88.3%, 84.0%의 함량이 검출되었다. 6,7-Dimethoxycoumarin의 경우, 실온 보관했을 경우 0 주째에 비해 2, 4, 8 주간의 보관 기간 동안 97.6%, 92.7%, 99.7%의 함량이 검출되었으며, 냉온 보관의 경우에는 94.8%, 95.0%, 89.8%의 함량이 검출되었다. Glycyrrhizin의 경우, 다른 두 물질에 비하여 실온, 냉온 보관에서 기간별 변화의 차이가 더 크게 나타나며, 냉온 보관의 경우 실온 보관보다 보관 기간이 길어질수록 함량이 감소하는 것으로 확인되었다.

그 밖에 다른 밴드들의 함량 변화도 분석하였으며 0 ~ 8 주간의 보관 기간 또는 보관 온도에 따른 함량 변화가 거의 없거나 위의 결과와 거의 같은 경향을 보였다.

고찰 및 결론

빠르게 진행하고 있는 세계적인 고령화 사회에서 질병의 치료뿐만이 아니라 건강한 수명의 연장이나 삶의 질에 대한 의학적 요구에 따라서 한의학이나

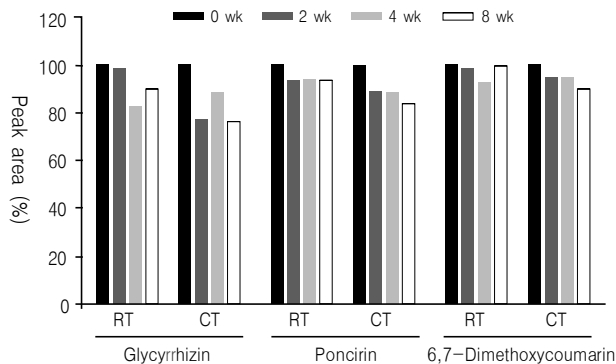


Fig. 2. HPTLC-based quantitative analysis according to storage condition and period.

Quantity of glycyrrhizin, poncirin and 6,7-dimethoxycoumarin was comparatively presented from sample between week 0 and different storage temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ or 4°C) and period (0 to 8 weeks). RT: room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), CT: cold temperature (4°C).

한약물에 대한 수요가 증가하고 있다. 더불어서 지금까지와는 달리 한약물의 효능과 안전성, 안전성 등에 대한 과학적 데이터의 요구는 점차 강해지고 있다^{14,15)}. 이는 현재 전 세계 의학계에서 가장 중요한 과제로 대두되고 있는 증거중심 의학 (evidence-based medicine)이나 증거중심 대체의학 (evidence-based alternative complementary medicine)의 흐름과도 맥을 같이 하는 것이라 하겠다^{16,17)}.

한편, 전 세계적인 한약물의 수요는 지속적으로 증가하고 있는 것에 비하여, 한국에서의 한약관련 시장은 점차 위축되어가고 있다¹⁸⁾. 이러한 이유는 건강보험을 비롯한 제도적인 불합리함과 더불어, 특히 한약물의 표준화와 관련된 과학적 연구의 부족함이 주요한 원이라 하겠다. 일례로, 그동안 한약물을 주로 탕약의 형태로 사용하여 왔음에도 복용하기 위해 달여진 한약물이 얼마나 오랫동안 어떤 조건에서 그 안정성이 유지되는 지에 대한 연구도 전무하였다. 한 가지, 陳皮의 복합처방에 따른 유효성분 추출율의 변화에 대한 연구만이 있을 뿐이다¹⁹⁾. 이러한 한약물의 안정성에 대한 데이터의 확보는 한약에 대한 복약지도와 국민의 신뢰도 향상뿐만이 아니라 향후 한약의 표준화나 제형의 다변화 및 한국 한약의 세계화에 기초적인 자료로서 매우 필요할 것이다.

따라서 우리들은 한약물과 같은 복합약물들의 성분별 변이를 추적하기에 적당한 HPTLC법²⁰⁾을 이용하여 탕약 형태의 한약물에 대한 안정성을 조사하였다. 주요성분을 이용한 정량적 분석을 검하기 위하여 한국 식약청의 고시와 지표성분들의 검출 조건을 고려하여 감초, 지실, 인진의 3가지 한약물의 탕전 상태에서 우선 조사하였다. 위의 결과에서 알 수 있듯이 8 주간 동안에 특이한 성분의 소실이나 새로운 성분의 생성과 같은 변화는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 또한 실온과 냉온의 저장온도 차이에도 불구하고 동일하였다.

다만, 추출된 상태에서 3가지 지표 성분들을 이용한 정량적 변화에서는 열수 추출한 직후에 비하여 시간이 지남에 따라서 약간씩 양이 감소하고 있는 것으로 나타났는데, 대략 5% ~ 20%까지의 변화량

이 보였다. 또한, 이러한 변화가 약간의 기간 의존적으로 증가하였으며 실온보다 냉온 보관의 경우, 변화량이 크게 나타났다. 이러한 데이터는 기존의 한약이 무균상태라면 실온 보관이 냉장 보관보다 더욱 안정하다는 것을 의미하여, 2 주 이상 보관기간이 경과하면 어느 정도의 약효의 손실이 있을 수 있음을 말한다고 하겠다.

따라서 현재 일반적으로 한방의료기관에서 지도하고 있는 기준은 대략 2 주 이내에서 한약이 복용되도록 하고 있으므로 이에 대한 커다란 염려는 없다고 하겠다. 그러나 만약 탕전된 상태에서 오랫동안 보관하면서 장기간 복용을 하는 경우라면 탕전의 형태보다도 안정성이 확보된 새로운 제형의 한약을 고려해야 할 것이다. 이것은 향후 전 세계를 대상으로 하는 한약의 제품화시에는 오랜 유통기간과 다양한 형태의 이동 및 보관을 염두에 두고 한약의 안정성을 확보할 방안의 필요성이 대두 된다고 하겠다.

본 연구에서 우리는 탕제형태의 한약물의 안정성에 대한 결과를 보았는데, 향후는 더 오랜 기간과 다양한 조건 및 더 많은 한약물이 포함된 실험이 필요하며, 더불어 효능의 변화도 함께 평가되어야 하겠다. 우리의 연구결과가 향후 한약물의 과학화와 세계화의 과정에서 일부나마 기여하길 기대한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (B080003).

참고문헌

1. Jang IS, Yang CS, Lee SD, Han CH. A Review of Herbal Medicinal Products Associated with Toxic Events in Korea. *J Korean Oriental Med.* 2007;28(1):1-10.
2. Man SC, Durairajan SS, Kum WF, Lu JH, Huang JD, Cheng CF, Chung V, Xu M, Li M. Systematic review on the efficacy and safety of herbal

- medicines for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008;14(2):209-23.
3. Kim TK, Jung WS, Park SW, Cho KH, Kim YS. Comparison of Efficacy and Safety between *Chunghyul-dan* (HH-333) and Atorvastatin (Lipitor®). *Korean J. Orient Int Med*. 2003;24(4):837-45.
 4. Kim YM, Choi HY, Kim JD. Studies on Oral Toxicity of *Eumcheonyijin-tang* in Rats. *J Korean Oriental Med*. 2000;21(3):199-208.
 5. Wang WH, Park JH. Studies on the Safety of *Artemisiae Capillaris Herba* - With the Perinatal and Lactational Reproductive Toxicity. *J Korean Oriental Med*. 2005;26(2):32-51.
 6. Shi J, Tong Y, Shen JG, Li HX. Effectiveness and safety of herbal medicines in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(3):454-62.
 7. Adessi C, Soto C. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem*. 2002;9(9):963-78.
 8. 지형준, 이상인, 안덕균. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울:한국메디칼인텍스사. 1998: 58-700.
 9. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*. 2008;22(6):709-24.
 10. Xu GH, Kim JA, Kim SY, Ryu JC, Kim YS, Jung SH, Kim MK, Lee SH. Terpenoids and coumarins isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 2008;56(6):839-42.
 11. Hoult JR, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*. 1996;27(4):713-22.
 12. Qian GS, Wang Q, Leung KS, Qin Y, Zhao Z, Jiang ZH. Quality assessment of *Rhizoma et Radix Notopterygii* by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;44:812-17.
 13. Corthout J, Naessens T, Apers S, Vlietinck AJ. Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography densitometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999;21:187-92.
 14. Jang IS. A Review on the Report about Drug-induced Hepatitis published by the National Institute of Toxicological Research. *J Korean Oriental Med*. 2004;25(3):78-89.
 15. Ko SG. Safety and Efficacy of Korean Medicine and Therapeutics. *Korean J Orient Int Med*. 2003;24(3):531-42.
 16. Martin WM, Long HW. Complementary and alternative medicine: opportunities and challenges. *J Health Care Finance*. 2007;34(2):89-104.
 17. Coulter ID. Evidence based complementary and alternative medicine: promises and problems. *Forsch Komplementmed*. 2007;14(2):102-8.
 18. Kim YH, Son CH, Moon OR, Kim SY, Lim S. A Study of Ways of Paying Insurance Benefits and the Range of Insurance Coverage of Health Insurance for Packed Herbal Medicine. *J Korean Oriental Med*. 2007;28(3):244-60.
 19. Hagan RL. High-performance liquid chromatography for small-scale studies of drug stability. *Am J Hosp Pharm*. 1994;51(17):2162-75.
 20. Kim JJ, Cho SO, Lee HY, Ha HK, Oh JH, Yang IC, Choi HS, Lee JH. Varied Flavonoid Contents of *Citri Unshii Pericarpium* Extracted from Several Traditional Herbal Prescriptions. *J Korean Oriental Med*. 2005;26(2):195-200.