

## HPLC-DAD를 이용한 갈근탕 중 4종 성분의 동시분석법 확립

원진배<sup>1</sup> · 전원경<sup>2</sup> · 마진열<sup>2</sup> · 마충제<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>강원대학교 생물소재공학전공, <sup>2</sup>한국한의학연구원

### Simultaneous Determination of Four Bioactive Constituents in Galgeun Tang by HPLC/DAD.

Jin Bae Won<sup>1</sup>, Won Kyung Jeon<sup>2</sup>, Jin Yeul Ma<sup>2</sup> and Choong Je Ma<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomaterials Engineering, School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea,

<sup>2</sup>TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Exporo, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** – For the quality control of traditional herbal medicine, Galgeun tang, simultaneous determination of glycyrrhizin, paeoniflorin, puerarin, 6-gingerol was established by using a high performance liquid chromatographic (HPLC) method with diode array detector. To separate five four constituents, DIONEX C<sub>18</sub> column (5 μm, 120 Å, 4.6 mm×150 mm) was used with gradient elution system of water and methanol. Validation of the chromatography method was evaluated by linearity, recovery, and precision test. Calibration curve of standard components showed excellent linearity (R<sup>2</sup>>0.9906). Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) varied from 0.15 to 0.52 μg/ml and 0.27 to 0.80 μg/ml, respectively. The relative standard deviations (RSDs) of data of the intra-day and inter-day experiments were less than 2.88% and 1.21%, respectively. The results of recovery test were ranged from 96.71 to 106.29% with RSD values 0.01-0.80%.

**Key words** – Galgeun tang, high performance liquid chromatography (HPLC), DAD, marker constituents, validation

우리나라는 예로부터 다양한 종류의 질병의 치료에 여러 가지 한약 및 생약재의 혼합물인 생약제제를 사용하여 왔다. 생약제제는 오랜 기간의 경험에 근거하여 효능이 검증되어 있고, 부작용이 적기 때문에 많이 이용되고 있다. 특히, 최근에는 의학기술의 발달로 인간의 수명이 연장되었고, 치료위주보다 예방위주의 생약제제의 이용이 크게 늘어나고 있으며, 천연물에 대한 관심과 사용이 크게 증가하고 있다. 이러한 생약제제는 여러 가지 한약재 및 생약재로 구성되어 있기 때문에 다양한 성분의 복합효과로서 보다 광범위한 효능을 나타낼 수 있다. 하지만, 다양한 구성 성분으로 이루어져 있기 때문에 성분의 조성이 약효 및 효능에 크게 영향을 줄 수가 있다. 따라서, 생약재의 기원, 채집시기 및 산지, 재배방법, 전처리 방법, 추출조건 등의 요인에 따라 생약의 구성성분 양의 변화가 생길 수 있으며 그에 따른 효능의 저하도 일어날 수 있다.<sup>1-5)</sup> 이렇게 생약의 채집환경과 생약의 추출조건에 따라 생약제제의 효능과 품질의 차

이가 있을 수 있기 때문에 효율적인 한약제제의 품질관리법의 개발이 절실히 요구된다. 현재 한약제제의 품질관리는 그 구성 생약의 개별적인 분석법에 의존하고 있어 시간적, 경제적 측면에서 많은 손실을 일으키고 있다. 이러한 이유로 한약제제 안에 포함된 생약의 지표성분에 대해 동시 분석법을 확립하게 될 수 있다면 효율적인 품질관리를 통하여 시간과 비용을 절약 할 수 있게 된다.

이에 본 연구에서는 갈근탕의 동시분석법을 확립하고자 하였다. 동시분석법의 확립을 위하여 HPLC/DAD법을 이용하였다. HPLC법은 분자량의 제한이 없고 용매를 다양하게 선택 할 수 있어 다양한 응용이 가능하다. 갈근탕은 감기의 다양한 증상완화, 면역력 증강, 해열 등에 사용되어져 왔고, 최근 항산화작용과 자유라디칼을 제거하는 효과가 있음이 보고되었으며, 갈근(*Pueraria lobata*), 계피(*Cinnamomum cassia*), 마황(*Ephedra sinica*), 작약(*Paeonia lactiflora*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 생강(*Zingiber officinale*), 대추(*Zizyphus jujuba*)로 구성되어 있다.<sup>6-8)</sup> 이들 약재의 지표성분 중 4가지 생약의 지표성분인 glycyrrhizin (감초), puerarin

\*교신저자 (E-mail): cjma@kangwon.ac.kr  
(Tel): +82-33-250-6565

(갈근), paeoniflorin (작약), 6-gingerol (생강)에 대한 동시분석법을 연구하였으며, 확립된 방법에 대하여 ICH 가이드라인에 근거한 validation을 실시하여 타당성을 검토하였다. 또한 확립된 분석법을 이용하여 시중에 유통되는 갈근탕 제제의 함량을 분석하여 본 분석방법의 응용가능성을 검토하였다.

**재료 및 방법**

**시약 및 표준 물질** - HPLC 분석을 위한 water와 methanol은 J.T Baker사의 HPLC급 용매를 구입하여 사용하였다. 지표물질인 glycyrrhizin, paeoniflorin, 6-gingerol는 (주)천연물화학에서 구입하였고, puerarin은 식품의약품안전청에서 구입하였다. 각 표준 물질의 순도는 98% 이상을 나타냈다. (Fig. 1)

**표준 용액의 조제** - Glycyrrhizin, paeoniflorin, 6-gingerol, puerarin 의 무게를 정확히 잰 후 60% methanol로 녹여 각 250 µg/ml, 100 µg/ml, 100 µg/ml, 100 µg/ml 의 농도로 한 후 이를 methanol로 단계적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

**기기 및 분석 조건** - HPLC는 Dionex사의 시스템을 사용하였고, 시스템은 pump (LPG 3X00), auto sampler (ACC-3000), column oven, diode array UV/VIS detector (DAD-3000(RS))로 구성 되어있다. Column은 C18 column (5 µm, 120 Å, 4.6 mm×150 mm, Dionex)이고 column temperature는 25°C를 유지하였다. UV-wavelength는 230 nm, 254nm,

260 nm, 280 nm에서 분석하였다. 이동상은 HPLC 분석용 water 와 methanol을 이용하였고, flow rate는 1.0 ml/min으로 하였다. 최적 이동상 조건은 Table I에 제시되어 있다. 모든 시료는 0.45 µm filter로 여과한 후 20 µl를 주입하여 분석하였다.

**동시분석법 Validation** - ICH Guideline을 바탕으로 확립한 동시분석법에 대해 측정값에 대한 직선성, 반복적인 실험을 통한 정밀성과, 회수를 시험을 통해 정확성을 판단하여 분석방법을 검증하였다.<sup>9-10)</sup>

**직선성 확인 (Linearity)** - 분석 방법이 분석할 지표물질의 농도에 대한 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 것을 확인하기 위해 직선성을 검토하였다. 각각의 4가지 표준용액을 60% methanol을 통해 단계적(×1/5, ×1/10, ×1/50, ×1/100) 희석한 후 혼합하고 HPLC로 분석하였다. 분석한 결과에 따라 calibration curve를 작성하여 통계 프로그램을 이용하여 liner regression equation ( $Y = ax + b$ , a 는 직선의 기울기, b 는 Y 절편, x는 시료의 농도, Y는 피크의 면적)을 계산하고 correlation coefficient ( $R^2$ ) 값을 통해 직선성을 확인하였다. 또한 정량한계(LOD)를 통해 분석대상물의 검출이 가능한 최저 농도를 확인하였고 검출한계(LOQ)를 통해 분석대상물의 정량이 가능한 최저 농도를 확인하였다. LOD는  $3.3 \times SD/S$ , LOQ는  $10 \times SD/S$  (SD는 표준편차, S는 직선의 기울기)로 값을 계산하였다.

**정밀성 평가 (Precision)** - 확립한 분석법의 실험 환경의 변화에 따른 결과의 변이 정도를 것으로 상대표준편차(RSD%)를 통해 정밀성을 판단한다. 정밀성 평가는 inter-

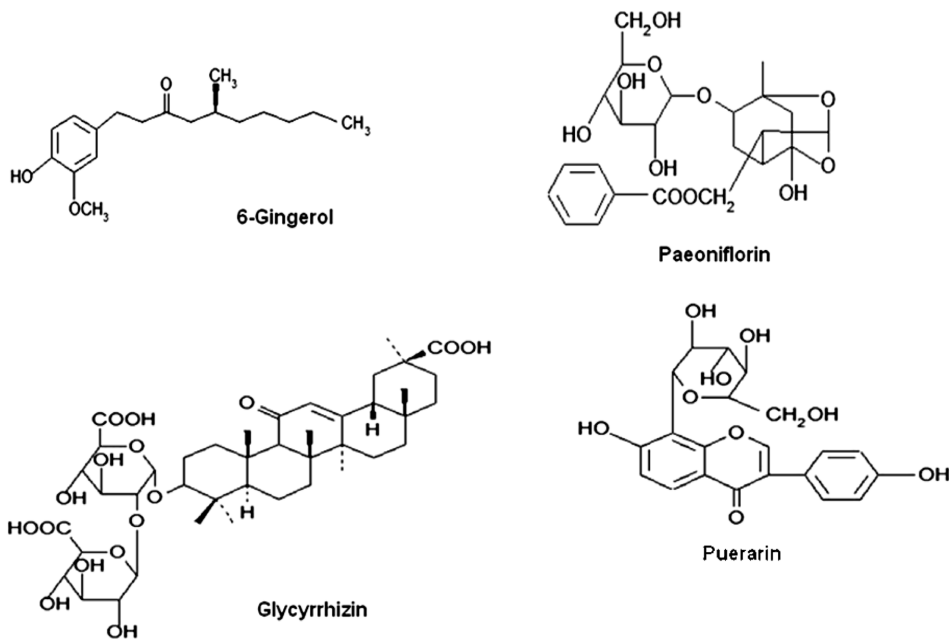


Fig. 1. Chemical structures of four marker constituents in Galgeun tang.

**Table I.** Mobile phase condition of chromatographic separation

Time (min)	Water (%)	MeOH (%)	Flow rate (mL/min)
0	75	25	1.0
10	70	30	1.0
30	50	50	1.0
40	30	70	1.0
50	30	70	1.0
60	75	25	1.0
65	75	25	1.0

day test와 intra-day test 를 통하여 검증되었다. Inter-day test 는 표준용액을 각각 3가지 농도로 희석해 혼합표준용액으로 제조하여 시험 날짜를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날, 3회 반복실험을 하여 상대표준편차를 구하여 평가하였다. Intra-day test 는 3가지 농도의 혼합표준용액을 하루 동안에 5회 반복실험을 하여 얻은 결과의 상대표준편차를 구하여 평가하였다.

**회수율 시험 (Recovery)** – 정확성 평가를 위해 회수율 시험을 수행하였다. 회수율 시험은 농도가 확인된 시료에 측정하고자 하는 지표물질의 일정 농도를 첨가 한 후 실험을 통해 추가된 지표성분의 양을 확인 하는 방법을 사용하였다. 동결 건조 한 갈근탕 가루를 20 mg 을 정확히 잰 후 60% methanol에 녹인 갈근탕 시료 에 희석된 3가지 다른 농도의 혼합표준용액을 혼합한 후 3회 반복 실험하여 회수율을 측정하여 추가된 지표성분의 양이 정확하게 회수되는지를 확인하였다. 회수율 시험의 농도는 LOD의 결과값을 근거로 설정하였다. 회수율은 90~110% 이어야 한다. 또한

상대표준편차(RSD%)값을 측정하여 정밀성을 확인하였다.

**확립된 동시분석법을 이용한 갈근탕의 함량 평가** – 본 연구를 통하여 확립된 분석법의 적용을 위하여 시중에서 시판되는 갈근탕 한방제제 2종에 대한 지표성분의 함량평가를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

**분석 조건의 확립** – 갈근탕의 4가지 지표성분 glycyrrhizin, paeoniflorin, 6-gingerol, puerarin의 동시분석법을 위해 분석 조건을 확립하였다. 이동상은 water와 methanol로 구성하였고 매 분마다 용매 조성을 달리하여 분해능을 높여 이동상 조건을 확립하였다 (Table I). DAD detector의 파장 조건은 230 nm, 254 nm, 260 nm, 280 nm 을 적용하였고, 이 중 각 지표성분의 UV spectra를 참고하여 최대 UV흡수 파장 값을 고려해서 paeoniflorin과 6-gingerol은 230 nm, glycyrrhizin과 puerarin은 254 nm로 설정하여 각 지표성분의 해당되는 파장의 peak area 를 측정하였다.

**Table II.** The linearity, correlation coefficient (R), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the compounds studied

Components	Regression Equation <sup>a</sup>	R <sup>2</sup> (n=5)	LOD (µg)	LOQ (µg)
Paeoniflorin	$Y = 0.5164x + 0.2485$	0.9906	0.31	0.43
6-Gingerol	$Y = 0.2099x + 0.0863$	0.9912	0.15	0.27
Puerarin	$Y = 0.183x + 0.1346$	0.9913	0.52	0.80
Glycyrrhizin	$Y = 1.4989x + 0.3876$	0.9983	0.25	0.48

<sup>a</sup>Y: peak area, x: amount (µg)

**Table III.** Analytical results of intra- and inter-day test

Components	Concentration (µg/ml)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=3)	
		Mean±SD (µg)	RSD (%)	Mean±SD (µg)	RSD (%)
Paeoniflorin	10.00	8.77±0.013	0.15	9.00±0.161	1.79
	4.00	3.59±0.021	0.58	3.99±0.065	1.62
	0.40	0.53±0.005	0.95	0.37±0.011	2.88
6-Gingerol	10.00	9.55±0.115	1.21	9.80±0.118	1.20
	2.00	2.09±0.006	0.30	2.51±0.014	0.54
	0.60	0.60±0.005	0.84	0.67±0.019	2.76
Puerarin	10.00	8.53±0.002	0.02	10.17±0.198	1.95
	4.00	3.30±0.002	0.07	4.13±0.014	0.34
	2.00	1.47±0.001	0.07	2.11±0.011	0.50
Glycyrrhizin	20.00	19.0±0.058	0.31	18.50±0.405	2.19
	4.00	3.93±0.006	0.16	4.12±0.026	0.63
	2.00	2.24±0.016	0.70	1.90±0.015	0.77

**분석방법의 직선성과 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ)** - 측정된 peak area 결과에 따라 작성된 calibration curve를 통해 5가지 지표성분의 correlation coefficient ( $R^2$ )값을 확인한 결과, ( $R^2 > 0.9906$ ) 좋은 직선성을 나타내었다. 이 직선 상 안에서의 검출한계 (limit of detection)와 정량한계 (limit of quantification)를 측정된 결과, 4가지의 지표성분은 0.15~0.52  $\mu\text{g/ml}$  범위의 검출한계를, 0.27~0.80  $\mu\text{g/ml}$  범위의 정량한계를 나타내었다 (Table II).

**정밀성 평가** - 직선성을 나타내는 구간 안의 일정한 3가지 농도에서 하루 동안 측정된 inter-day와 3일 동안 측정된 intra-day test 결과, inter-day는 0.18~2.88%를, intra-day는 0.02~1.21%의 상대표준편차 (RSD%)를 나타낸 것으로 나타나 LOD와 LOQ의 RSD%가 3% 이하의 높은 정밀성을 확인할 수 있었다 (Table III).

**회수율 시험** - 갈근탕 시료에 기지 농도로 단계적으로 희석한 혼합표준물질을 첨가한 후 회수율을 시험한 결과, 4가지 지표물질의 회수율은 각각 96.71%에서 106.29%의 범위를 나타내어 매우 정확함을 나타내었으며, 상대표준편차 (RSD%)는 0.80% 이하의 값을 나타내었다 (Table IV).

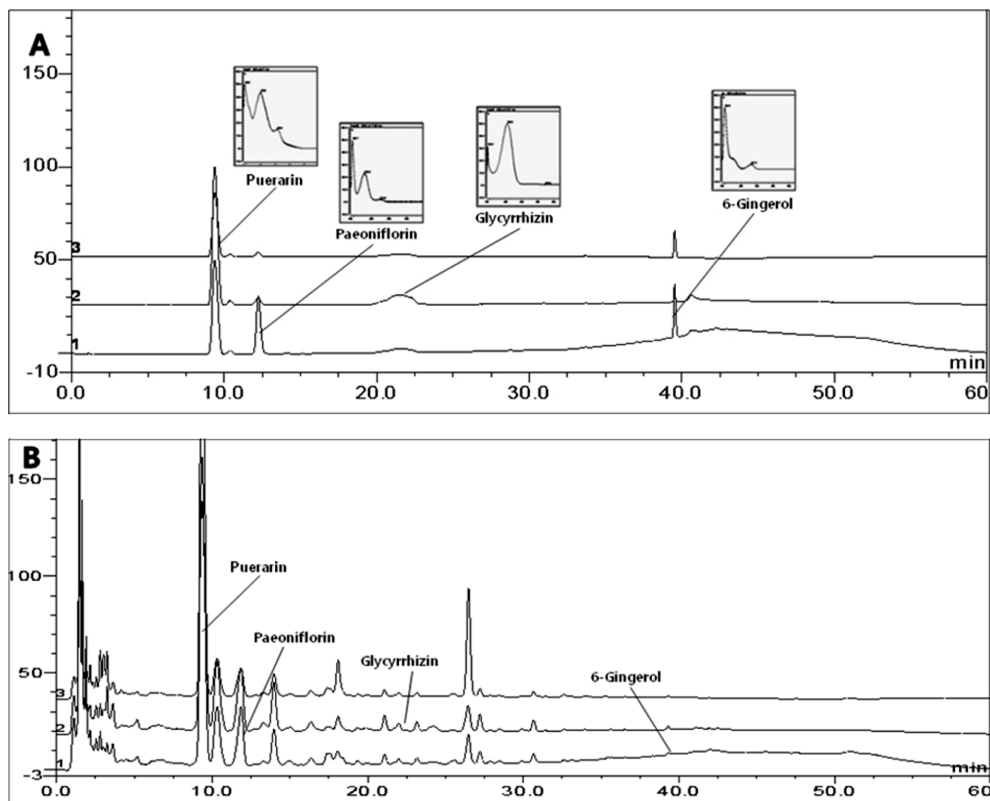
**확립된 동시분석법을 통한 갈근탕 시료 분석** - 확립된 동시분석법을 이용하여 시중에서 시판되고 있는 갈근탕 제제를 분석하여 분석법의 적용가능성을 검토하였다. 4가지 지

표성분들의 피크가 각각 다른 성분들의 피크에 간섭을 받지 않고 분석이 가능하였다 (Fig. 2). 시판 갈근탕 제제의 분석결과는 Table V에 정리하였다. 시판 갈근탕 제제의 분석결과, 2종의 시판 제제간의 지표물질 함량의 차이가 매우

**Table IV.** Analytical results of accuracy test

Components	Spiked amount ( $\mu\text{g}$ )	Measured amount ( $\mu\text{g}$ )	RSD (%)	Recovery <sup>a</sup> (%)
Paeoniflorin	3.80	3.67±0.016	0.18	96.71
	3.50	3.39±0.030	0.33	96.91
	2.00	2.13±0.028	0.38	106.29
6-Gingerol	5.00	5.24±0.005	0.42	104.88
	2.00	1.98±0.005	0.80	98.85
	1.00	1.06±0.003	0.72	105.72
Puerarin	8.00	8.17±0.003	0.01	102.17
	5.00	5.23±0.013	0.03	104.64
	4.00	4.23±0.019	0.04	105.71
Glycyrrhizin	5.00	5.02±0.005	0.25	100.40
	2.50	2.61±0.003	0.25	104.33
	2.00	2.00±0.004	0.34	99.94

<sup>a</sup>Recovery (%) = (amount found - original amount) / amount spiked × 100%



**Fig. 2.** The HPLC chromatogram of standard mixture (A) and Galgeun tang sample (B)

**Table V.** Contents of five marker compounds in commercial Galgeun tang samples

Sample	Content (mg/g)			
	Paeoniflorin	6-Gingerol	Puerarin	Glycyrrhizin
GGT <sup>a</sup> (A)	9.48±1.04	nd <sup>b</sup>	33.24±2.08	2.80±0.22
GGT (B)	0.43±0.02	nd	0.67±0.01	nd

<sup>a</sup>GGT: Commercial Galgeun tang samples made by two different pharmaceutical companies

<sup>b</sup>nd: Not detected

크게 나타났으며 두 제제 모두에서 6-gingerol은 검출되지 않았다. 이러한 결과는 시판제제의 품질관리가 허술함을 나타내며 특히 생강이 포함되지 않았을 수도 있음을 시사한다.

## 결 론

본 연구에서 갈근탕의 4가지 지표성분인 paeoniflorin, 6-gingerol, puerarin, glycyrrhizin에 대해 HPLC-DAD를 통한 동시분석법을 확립하였다. 이 동시분석법에 대해 직선성, 정밀성, 회수율 시험을 통한 정확성 평가의 결과로 유효성을 확인하였고, 시판 갈근탕 제제에 대해 적용한 결과, 다른 성분과의 간섭 없이 효과적인 분석이 이루어 졌다. 따라서 확립된 동시분석법은 갈근탕 정량분석에 있어서 시간적, 경제적 손실을 줄이고 각각의 지표성분을 효율적으로 분석할 수 있는 방법임을 시사한다.

## 사 사

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원 (K09040)에 의하여 수행되었음.

## 인용문헌

- Normile, D. (2003) Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine. *Science* **299**: 188-190.
- Jiang, W.-Y. (2005) Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**: 558-63.
- Xue, T. H. and Roy, R. (2003) Studying traditional Chinese medicine. *Science* **300**: 740-741.
- Ye, J., Zhang, X., Dai, W., Yan, S., Huang, H., Liang, X., Li, Y. and Zhang, W. (2009) Chemical fingerprinting of Liuwei Dihuang Pill and simultaneous determination of its major bioactive constituents by HPLC coupled with multiple detections of DAD, ELSD and ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**: 638-645.
- Baek, J.-H. ., Kim, S. M., Ahn, J. W., Cho, C. H., Oh, M. H., Cho, J. H., Lee, M. K. and Kim, H.-J. (2008) Validation and determination of glycyrrhizic acid as a marker substance in Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang by HPLC/DAD. *J. Pharm. Soc. Kor.* **52**: 7-11.
- Chang, Q., Sun, L., Zhao, R. H., Chow, M. S. and Zuo, Z. (2008) Simultaneous determination of ten active components in traditional Chinese medicinal products containing both Gegen (*Pueraria lobata*) and Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **19**: 368-375.
- Shin, J. M., Kim, Y. O. and Baek, S. H. (2008) Free radical scavenging activity and kinetic behavior of the Galgeuntang water extract. *Ori. Pharm. Exp. Med.* **8**: 32-38.
- Wang, Y., Yao, Y., An, R., You, L. and Wang, X. (2009) Simultaneous determination of puerarin, daidzein, baicalin, wogonoside and liquiritin of GegenQinlian decoction in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogra. B.* **877**: 1820-1826.
- Shou, M., Galinada, W. A., Wei, Y. C., Tang, Q., Markovich, R. J. and Rustum, A. M. (2009) Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50**: 356-361.
- Sarkar, M., Khandavilli, S. and Panchagnula, R. (2006) Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms. *J. Chromatogra. B.* **830**: 349-354.

(2009년 8월 12일 접수)