

HPLC-DAD를 이용한 귀비탕 중 6종 생리활성 물질의 동시분석법 확립

양혜진 · 원진배 · 마진열¹ · 마충제*
강원대학교 생물소재공학전공, ¹한국한의학연구원

Simultaneous Determination of Six Bioactive Components in Guibi-tang by HPLC-DAD

Hye Jin Yang, Jin Bae Weon, Jin Yeul Ma¹ and Choong Je Ma*

Department of Biomaterials Engineering, Division of Bioscience and Biotechnology,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Exporo, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

Abstract – Guibi-tang, a traditional herbal medicine, is used for anti-oxidant, anti-osteoporosis, hemostasis and gastroprotection. To develop an analysis method of simultaneous determination of six compounds, swertisin, decursinol, glycyrrhizin, 6-gingerol, costunolide and decursin in Guibi-tang, a high performance liquid chromatography was used with diode array detector. Six bioactive components were separated on a SHISEIDO C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm I.D.×250 mm) with column temperature 30°C. The gradient elution was composed of water with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and acetonitrile. UV wavelength was set at 230 nm, 254 nm and 330 nm, respectively. Calibration curve showed good linear regression ($R^2 > 0.9999$). The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) ranged in 0.03 - 0.23 μg/ml and 0.08 - 0.70 μg/ml, respectively. The RSD values of intra- and inter-day test were in the range of 0.03 ~ 0.96% and 0.01 ~ 1.46%, respectively. The evaluated results of accuracy test were varied from 92.28% ~ 105.14% with RSD < 1.60%. In conclusion, this developed simultaneous determination method was accuracy and sensitive to the quality evaluation of Guibi-tang.

Key words – Guibi-tang, Simultaneous determination, High performance liquid chromatography (HPLC), Validation

우리나라는 오랜 세월 동안 다양한 종류의 질병 치료 및 예방의 목적으로 생약 제제를 사용해왔다. 생약 제제는 오랜 활용 경험을 바탕으로 효능이 검증되었고 부작용이 적기 때문에, 생약제제에 대한 관심이 높아지면서 최근 천연물신약 개발에 있어서 전통적 생약 제제의 중요성이 크게 증가하고 있다. 또한 생약 제제는 여러 가지 생약재로 구성되어 있기 때문에 성분이 다양하여 복합적인 효능을 나타내지만, 생약의 기원, 채집시기 및 재배 방법, 생약제제의 공정 과정 등으로 인하여 성분의 조성 및 효능에 큰 영향을 주어 생약제제의 품질 변화가 일어날 수 있다.¹⁻³ 그러므로, 보다 합리적이고 효율적인 생약제제의 품질관리법의 확립이 시급히 요구된다. 하지만 현재의 생약제제의 품질관리는 대부분이 생약제제 자체보다는 생약제제를 구성하고 있는 단일 생약제에 대한 개별적인 분석법을 주로 사용하고 있어 경제적, 시간적 손실이 크다. 이러한 측면에서 생약제제

의 지표성분에 대한 유의적인 동시분석법을 확립한다면, 보다 효율적인 품질관리를 기대할 수 있다.⁴⁻⁵

이에 본 연구에서는 HPLC-DAD법을 이용하여 생약제제 중의 하나인 귀비탕의 동시분석법을 확립하고자 하였다. 귀비탕은 조혈작용을 하고, 뇌세포에 영양공급과 심장과 신경의 기능을 강화하여 체력증진효과가 있다고 알려져 왔다.⁶ 귀비탕은 황기 (*Astragalus membranaceus*), 인삼 (*Panax ginseng*), 백출 (*Atractylodes macrocephala*), 복령 (*Poria cocos*), 당귀 (*Angelica gigas*), 원지 (*Polygala tenuifolia*), 산조인 (*Zizyphus jujuba*), 용안육 (*Dimocarpus longan*), 생강 (*Zingiber officinale*), 대추 (*Zizyphus zizyphus*), 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*), 목향 (*Inula helenium*)으로 구성되어 있으며, 각 구성 생약의 지표성분인 황기의 astragaloside, 인삼의 ginsenoside Rb1과 Rg1, 당귀의 decursin과 decursinol, 산조인의 swertisin, 생강의 6-gingerol, 대추의 c-AMP(cyclic adenosine monophosphate), 감초의 glycyrrhizin, 목향의 costunolide 중 6가지의 지표 성분인 swertisin, decursinol,

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

glycyrrhizin, 6-gingerol, costunolide 및 decursin에 대한 동시분석법을 연구하였다. 확립된 방법에 대한 타당성은 ICH Guideline에 근거한 validation을 실시함으로써 검증하였다.

재료 및 방법

시약 및 시료 - 본 실험에 사용된 water와 acetonitrile은 HPLC급 용매로 J.T. Baker에서 구입하였다. 지표 성분인 swertisin과 costunolide은 Chromadex에서, decursin, glycyrrhizin, 6-gingerol은 식품의약품안전청에서 구입하였으며, decursinol은 (주)엘컴사이언스에서 구입하였다 (Fig. 1). 각 성분은 98% 이상의 순도를 나타냈다. 귀비탕 시료는 한국 한의학 연구원으로부터 확보하여 사용하였다.

표준 용액 조제 및 귀비탕 시료 조제 - 실험에 사용된 지표 성분, swertisin (180 µg/ml), decursinol (105 µg/ml), glycyrrhizin (128 µg/ml), 6-gingerol (106 µg/ml), costunolide (170 µg/ml), decursin (112 µg/ml) 을 정확히 칭량하여 60% methanol에 녹인 후 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 귀비탕 시료 (170.1 mg)을 정확히 칭량 후 60% methanol에 녹인 후 0.45 µm membrane filter 후 HPLC 검액으로 사용하였다.

분석 조건 - HPLC는 Dionex사의 시스템을 사용하였으며, LPG 3X00 pump, ACC-3000 auto sampler, column oven, DAD-3000(RS) diode array UV/VIS detector로 구성되어 있다. 분석에 사용된 컬럼은 C₁₈ column (5 µm, 4.6 I.D.×250 mm, SHISHEDO)으로, 컬럼 온도는 30°C를 유지하였다.

Table I. Gradient elution system using mobile phase A and B

Time (min)	Solvent	
	A ^a (%)	B ^b (%)
0	85	15
10	85	15
20	80	20
35	65	35
40	60	40
50	50	50
60	47	53
65	45	55

^aA: 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) water

^bB: Acetonitrile

UV detector는 230 nm, 254 nm와 330 nm 파장에서 분석하였다. 이동상은 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)를 포함하는 water (A)와 acetonitrile (B)를 사용하여 분리능을 향상시켰으며, 유속은 1.0 ml/min로 하였다.⁷⁾ 최적화된 이동상 조건은 Table I에 제시되어 있다.

분석법 검증 (Validation) - ICH Guideline에 기초하여 확립된 동시분석법에 대한 검증으로써 직선성 확인, 검출한계 및 정량한계 측정, 반복 실험을 통한 정밀성, 그리고 회수를 시험을 통한 정확성 평가를 실시하였다.^{8,9)}

직선성 확인 (Linearity) - 유의성 있는 검량선을 얻기 위하여 각 표준 용액을 60% methanol을 사용하여 5가지의 농도 (×1/5, ×1/10, ×1/20, ×1/40, ×1/80)로 순차적으로 희석

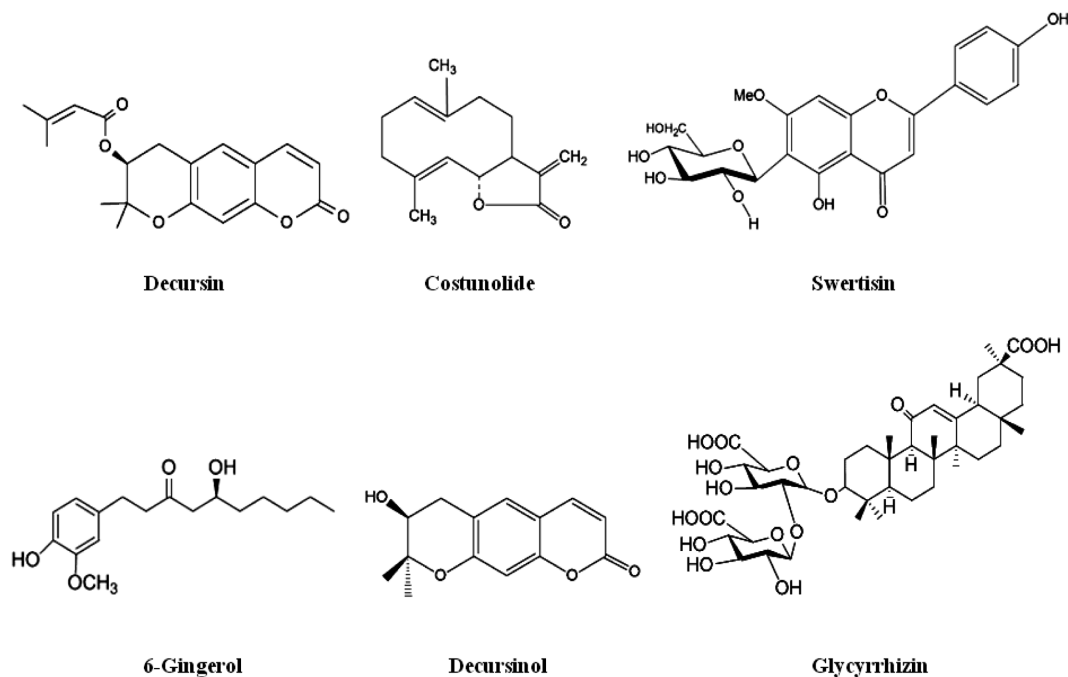


Fig. 1. Chemical structures of six marker components in Guibi-tang.

한 후 혼합하여 HPLC분석을 실시하였다. 분석 결과에 따라 검량선을 작성하여 $y=ax + b$ (y 는 피크 면적, x 는 시료 농도, a 는 직선의 기울기) 형태의 linear regression equation을 계산하였다. 작성된 검량선은 correlation coefficient (R^2) 값을 통하여 직선성을 확인하였으며 R^2 값이 0.99 이상인 경우 지표 성분 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

검출한계(LOD)·정량한계(LOQ) 측정 - 대상 분석물의 검출 및 정량이 가능한 최저 농도를 확인하기 위하여 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)를 측정하였다. LOD와 LOQ는 각 표준물질의 표준편차 (SD)를 직선의 기울기 (Slope)로 나눈 값으로 계산한다. $LOD = 3.3 \times (SD \text{ of the response} / \text{slope of calibration curve})$, $LOQ = 10 \times (SD \text{ of the response} / \text{slope of calibration curve})$.

정밀성 평가 (Precision) - 동일한 시료에 대해 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 확인하는 것으로, 상대적 표준편차 (RSD%)를 통해 정밀성을 판단하며 RSD% 값은 2%이내가 적합하다. Intra-day test는 직선성이 확인된 농도 범위 내의 3가지 농도로 표준 용액을 희석하여 혼합표준용액을 제조 한 후, 하루 이내에 5회 반복 측정된 결과의 상대적 표준편차를 구하여 평가하였다. Inter-day test는 직선성이 확인된 농도 범위 내의 3가지 농도로 표준 용액을 희석하여 혼합표준용액을 제조한 후 1일, 3일, 5일째 되는 날 5회씩 반복 측정된 3회 차 결과의 상대적 표준편차를 구하여 평가하였다.

회수율 시험 (Recovery) - 회수율 시험은 함량이 확인된 시료에 농도를 알고 있는 지표 성분을 혼합한 후 분석을 통해 추가된 지표 성분의 양을 확인하는 방법으로, 정확성 평가를 위하여 실시하였다. 직선성이 확인된 구간의 3가지 농도의 혼합표준용액을 60% methanol에 녹인 귀비탕 시료와 혼합한 후 3회 반복 측정하여 추가된 지표 성분의 회수율을 확인하였다. 이상적인 회수율은 90-110% 범위이며, 상대적 표준편차(RSD%)값을 측정하여 정밀성을 평가하였다.

확립된 동시분석법을 이용한 귀비탕 시료 분석 - 본 연구를 통해 확립된 동시분석법의 효율성을 검증하기 위하여 귀비탕 시료에 대한 6가지 지표 성분인 swertisin, decursinol,

glycyrrhizin, 6-gingerol, costunolide, decursin의 함량 평가를 실시하였다.

결과 및 고찰

분석 조건 확립 - 용매의 구성 비율을 시간대 별로 달리 하여 분리능을 높인 이동상 조건으로, 귀비탕의 6가지 지표 성분인 swertisin, decursinol, glycyrrhizin, 6-gingerol, costunolide 및 decursin에 대한 동시분석법이 확립되었다. UV 파장 조건은 230, 254, 280, 330 nm를 적용하였으며, 각 지표 성분의 UV spectra를 통해 각 지표성분의 최대 UV 흡수 파장을 확인하여 측정파장을 확립하였다. 6-gingerol과 costunolide는 230 nm, glycyrrhizin은 254 nm, swertisin, decursin과 decursinol은 330 nm의 파장에서의 피크 면적을 측정하였다.

직선성 및 검출한계(LOD)·정량한계(LOQ) - 분석 결과에 따라 y 축을 피크면적, x 축을 표준 용액의 농도로 하여 작성된 검량선을 통해 지표 성분의 correlation coefficient (R^2)값을 확인한 결과, 좋은 직선성 ($R^2 > 0.9999$)을 보였다. 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)는 각각 0.03~0.23 $\mu\text{g/ml}$ 및 0.08~0.70 $\mu\text{g/ml}$ 범위로 미량의 성분까지 검출 및 정량이 가능하였다 (Table II).

정밀성 평가 - 확립된 동시분석법의 정밀성 평가를 위해 intra-day test와 inter-day test를 실시한 결과 intra-day test는 0.03~0.96%를, inter-day test는 0.01~1.46%의 상대적 표준편차 (RSD%)를 보여 RSD%가 2% 이하의 높은 정밀성을 확인할 수 있었다 (Table III).

회수율 시험 - 함량이 확인된 시료에 농도를 알고 있는 지표 성분을 혼합한 후 회수율을 평가한 결과, 각 지표 성분의 회수율은 92.28~105.14%의 범위 내에서 나타났으며, 상대적 표준편차 (RSD%)는 1.6% 이하로 매우 정확함을 확인하였다 (Table IV).

확립된 동시분석법을 이용한 귀비탕 시료 분석 - 귀비탕 시료를 분석하여 확립한 동시분석법의 효율성을 검증하였다. 귀비탕 시료에 대하여 본 연구의 분석법을 이용하여 분

Table II. The linearity, regression equation, correlation coefficient (R^2), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of calibration curve of components

Components	Regression Equation ^a	R^2 (n=5)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Swertisin	$Y = 0.4592x - 0.0300$	1.0000	0.08	0.24
Decursinol	$Y = 0.8876x - 0.0359$	0.9999	0.06	0.17
Glycyrrhizin	$Y = 0.1017x - 0.0114$	1.0000	0.12	0.36
6-Gingerol	$Y = 0.1589x - 0.0238$	0.9999	0.23	0.70
Costunolide	$Y = 0.1438x - 0.0042$	1.0000	0.05	0.15
Decursin	$Y = 0.4855x - 0.0563$	0.9999	0.03	0.08

^aY : peak area, x : amount ($\mu\text{g/ml}$)

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

Components	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=5)	
		Mean \pm SD ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)
Swertisin	30.00	31.06 \pm 0.01	0.32	31.06 \pm 0.04	0.14
	15.00	15.95 \pm 0.08	0.50	15.69 \pm 0.17	1.06
	7.50	7.86 \pm 0.03	0.33	7.91 \pm 0.07	0.83
Decursinol	17.50	17.36 \pm 0.01	0.03	17.29 \pm 0.02	0.01
	8.75	8.62 \pm 0.01	0.09	8.58 \pm 0.04	0.42
	4.38	4.39 \pm 0.01	0.11	4.41 \pm 0.01	0.20
Glycyrrhizin	21.34	21.62 \pm 0.08	0.36	21.94 \pm 0.05	0.22
	10.67	11.35 \pm 0.11	0.96	11.14 \pm 0.13	1.18
	5.33	5.31 \pm 0.05	0.90	5.24 \pm 0.03	0.56
6-Gingerol	17.67	17.82 \pm 0.06	0.32	17.85 \pm 0.02	0.14
	8.83	9.14 \pm 0.06	0.66	8.85 \pm 0.07	0.74
	4.42	4.44 \pm 0.04	0.90	4.30 \pm 0.03	0.79
Costunolide	28.34	28.07 \pm 0.10	0.37	28.12 \pm 0.01	0.04
	14.17	14.28 \pm 0.06	0.39	14.18 \pm 0.17	1.18
	7.08	7.05 \pm 0.04	0.50	7.22 \pm 0.11	1.46
Decursin	18.67	18.74 \pm 0.07	0.39	18.70 \pm 0.04	0.20
	9.33	9.28 \pm 0.05	0.55	9.20 \pm 0.10	1.12
	4.67	4.41 \pm 0.01	0.30	4.39 \pm 0.03	0.77

Table IV. Analytical results of accuracy test

Components	Spiked Amount ($\mu\text{g/ml}$)	Measured Amount ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	Recovery ^a (%)
Swertisin	15.00	15.77 \pm 0.03	0.19	105.14
	7.50	7.37 \pm 0.09	1.24	98.36
	3.75	3.73 \pm 0.02	0.50	99.47
Decursinol	8.75	8.80 \pm 0.01	0.11	100.58
	4.38	4.45 \pm 0.04	0.87	101.82
	2.19	2.21 \pm 0.01	0.16	100.96
Glycyrrhizin	10.67	10.36 \pm 0.04	0.40	97.13
	5.33	5.42 \pm 0.04	0.68	101.68
	2.67	2.60 \pm 0.01	0.32	97.31
6-Gingerol	8.83	8.61 \pm 0.12	1.39	97.48
	5.33	5.37 \pm 0.07	1.25	100.64
	2.68	2.79 \pm 0.03	1.00	104.49
Costunolide	14.17	14.01 \pm 0.06	0.44	98.86
	7.08	7.06 \pm 0.04	0.51	99.63
	3.54	3.70 \pm 0.04	0.95	104.55
Decursin	9.33	8.61 \pm 0.08	0.95	92.28
	4.66	4.45 \pm 0.07	1.60	95.41
	2.33	2.42 \pm 0.01	0.48	103.66

^aRecovery (%) = (amount found – original amount)/amount spiked \times 100%

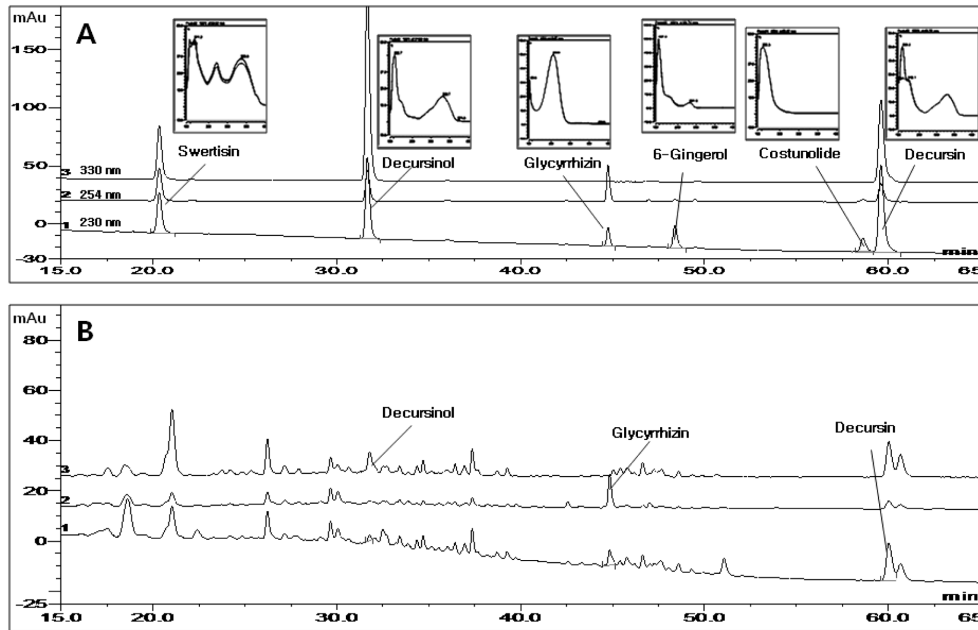


Fig. 2. The HPLC chromatogram of standard mixture (A) and Guibi-tang sample (B).

Table V. Contents of six marker components in Guibi-tang sample

Sample	Contents (µg/mg)					
	Swertisin	Decursinol	Glycyrrhizin	6-Gingerol	Costunolide	Decursin
GB ^a	nd ^b	0.181	1.597	nd	nd	0.609

^aGB: Guibi-tang sample

^bnd : not detect

석한 결과, 귀비탕의 6가지 지표 성분 swertisin, decursinol, glycyrrhizin, 6-gingerol, costunolide 및 decursin의 피크가 각기 다른 성분들의 피크에 영향을 받지 않고 분석이 가능하였으며 (Fig. 2), 확립된 동시분석법의 검량선을 통해 귀비탕 시료의 6가지 지표 성분의 함량을 모두 확인하였다. (Table V).

결론

본 연구에서 귀비탕의 6가지 생리활성 물질인 swertisin, decursinol, glycyrrhizin, 6-gingerol, costunolide 및 decursin에 대해 HPLC를 통한 최적의 동시분석법을 확립하고, 동시분석법에 대한 직선성, 정밀성 및 회수율 시험을 통한 정확성 평가를 실시하여 효율성을 검증하였다. 또한 귀비탕 시료에 분석법을 적용하여 각 지표 성분의 함량을 측정 한 결과, 각 성분들의 피크가 시료 내 다른 성분에 의한 간섭 없이 효과적으로 분석되었고, 6가지 지표 성분을 동시에 분석할 수 있게 되었다. 따라서 본 동시분석법을 이용하면 시간적·경제적 손실을 줄이고 보다 효율적인 생약제제의 품질관리를 기대할 수 있다.

사사

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원 (K09040)에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

1. Normile, D. (2003) Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine. *Science* **299**: 188-190.
2. Xue, T. H. and Roy, R. (2003) Studying traditional Chinese medicine. *Science* **300**: 740-741.
3. Jiang, W.-Y. (2005) Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends. Pharmacol. Sci.* **26**: 558-563.
4. Wang, Z. G. and Ren, J. (2002) Current status and future direction of Chinese herbal medicine. *Trends. Pharmacol. Sci.* **23**: 347-8.
5. Weon, J. B., Jeon, W. K., Ma, J. Y. and Ma, C. J. (2009) Simultaneous determination of five bioactive constituents in Galgeun Tang by HPLC/DAD. *Kor. J. Pharmacogn.* **40(3)**: 224-8.
6. Oh, M. S., Huh, Y., Bae, H., Ahn, D. K. and Park, S. K.

- (2005) The multi-herbal formula Guibi-tang enhances memory and increases cell proliferation in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **379**: 205–208
7. Song, J., Han, Q., Qiao, C., Yip, Y. and Xu, H. (2007) Simultaneous determination of multiple marker constituents in concentrated Gegen Tang granule by high performance liquid chromatography. *Chin. Med.* **20**: 2-7.
8. Klimek, B., Olszewska, M. A. and Tokar, M. (2009) Simultaneous Determination of Flavonoids and Phenylethanoids in the Flowers of *Verbascum densiflorum* and *V. phlomoides* by High-performance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* **21**: 150-156.
9. Fan, L. L., Tu, P.F., Chen, H. B. and Cai, S. Q. (2009) Simultaneous quantification of five major constituents in stems of *Dracaena* plants and related medicinal preparations from China and Vietnam by HPLC-DAD. *Biomed. Chromatogr.* **23(11)**: 1191-200.
- (2010. 8. 24 접수; 2010. 11. 6 심사; 2010. 11. 10 게재확정)