

복방서양산사60%에탄올엑스 · 은행엽엑스 · 마늘유캡슐의 기준 및 시험법과 규격 설정

조창희* · 김지선¹ · 황지상 · 백주현¹ · 박주영 · 심영훈
성락선 · 김동섭 · 이종필¹ · 이주현¹ · 손수정
식품의약품안전평가원, ¹식품의약품안전청

Development of the Standard Analytical Methods for Compound Hawthorn Berry 60% Ethanol Extract, *Ginkgo Biloba* Leaf Extract and Garlic Oil Capsules

Chang Hee Cho, Ji Sun Kim¹, Ji Sang Whang, Ju Hyun Baek¹, Ju Young Park, Young Hoon Shim, Rack Seon Seong, Dong Sup Kim, Jong Phill Lee¹, Joo Hyeun Lee¹ and Su Jung Sohn

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea

¹Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Abstract – In the recent version of the Korea Pharmacopoeia(KP) and the Korean Herbal Pharmacopoeia(KHP), there are 563 items(181 in KP, 381 in KHP) of herbal medicines including finished drugs. Also, approximately 507 items including herbal extracts and herbal medicinal products was published in the 3th edition of Korea Pharmaceutical Codex (KPC). These items help the persons working in the pharmaceutical manufacturing field to register the drug and in research fields to develop the new drug considering as a standard specifications. This study was carried out to establish standard analytical methods for ‘Compound Hawthorn Berry 60% Ethanol Extract, *Ginkgo Biloba* Leaf Extract and Garlic Oil Capsules’ in the 3th edition of Korea Pharmaceutical Codex. Ginkgo flavonoid and terpene lactone were employed as reference compounds for analytical method. Analytical methods established in this study could be applied to a reasonable and unified quality control of *G. biloba* leaf extract and hawthorn berry extract.

Key words – Korean Pharmaceutical Codex, Compound Hawthorn Berry 60% Ethanol Extract, *Ginkgo Biloba* Leaf Extract and Garlic Oil Capsules, Hawthorn berry extract, *Ginkgo biloba* leaf extract, Melisa leaf extract, garlic oil

의약품의 품질관리 기본서인 대한약전(Korea Pharmacopoeia, KP) 및 대한약전의한약(생약)규격집(Korean Herbal Pharmacopoeia, KHP)은 다양한 연구정보를 바탕으로 지속적으로 개정하고 있으며 최근의 과학기술을 반영하여 대한약전은 현재 9 개정에 이르고 있고, 대한약전의한약(생약)규격집은 2007 년판이 발간되어 배포되었다. 우리나라 뿐 만 아니라 각국은 의약품 원료의 규격 및 제품의 제제학적 평가 기준 및 시험방법을 지속적으로 업데이트하고 있어 과학기술의 진보에 따라 시기적절하게 의약품의 각 품목별 기준 및 시험방법 관리가 요구되고 있다. 현재 대한약전 및 대한약전의한약(생약)규격집에는 563 품목[KP 181(제제 16)품목,

KHP 381품목]의 생약 및 생약(한약)제제가 수록되어 있다. 한편, 식품의약품안전청 고시인 대한약전의의약품등기준(Korean Pharamceutical Codex)에는 507 품목의 생약추출물과 생약(한약)제제가 수재되어 의약품 허가에서는 신고대상으로, 또한 의약품의 품질관리에서는 기준 및 시험방법으로 적부판정 등의 기준이 되며, 신제품 개발시에는 이를 응용하여 기준 및 시험방법을 설정하고 있다. 의약품의 기준 및 시험방법은 의약품 산업의 발전과 양질의 의약품을 제공하는 기본사항으로 지속적인 정비가 요구되고 있다. 따라서 생약 및 생약(한약)제제에 대한 연구정보를 바탕으로 복합제제인 생약(한약)제제의 기준및시험방법을 검토하여 합리적이고 과학적인 확인시험, 지표성분에 의한 함량시험 등이 재정비되고 있다. 본 연구에서는 KPC(제3개정 후보1)에 수

*교신저자 (E-mail): choch@korea.kr
(Tel): +82-2-380-1892

재되어 있는 '복방서양산사60%에탄올엑스·은행엽엑스·마늘유캡슐'의 기준 및 시험방법 중 정량법을 재검토하고자 하였다. 동 품목은 스위스 Codex Galenica(1992)의 Arterosan plus가 근거처방으로써, 식약청고시 의약품등기준및시험방법 제2개정 후보2에 처음 수재되었다.¹⁾ 산사(山査)는 서양에서는 2,000 년전에 이미 Dioscorides의 시대부터 소개된 긴 역사를 가진 약물로 혈액순환, 강심제, 이노제, 건위작용 등의 약리효과를 가진 민간약으로 널리 사용되어왔다.²⁻⁶⁾ 동양에서는 중국의 화북, 강소, 호남, 하남에 주로 분포하며, 3,000년 이상의 재배역사를 가지고 있다. 산사는 전세계적으로 유럽(특히 독일, 프랑스, 스위스 등), 북미, 일본 등에서 의약품으로 사용되고 있으며, 그 사용예가 점차 증가하고 있다. 특히 서양산사는 독일, 프랑스, 스위스, 헝가리, 미국, 중국 등의 국가약전에 등재되어 있는 등 세계적으로 그 유효성과 안전성이 널리 인정되어 현재 세계적으로 300 여 품목 이상 판매되고 있다.⁷⁾ 비혈초(鼻血草)인 Melissa는 남부유럽이 원산지이고 미국을 비롯하여 소아시아, 북아프리카 등에 분포되어 있고, 중국에서는 서남부 및 동부에 걸쳐 분포되어 있습니다. 키는 60 cm 정도 되고 톱니 모양의 잎으로 되어 있고, 희거나 핑크빛의 꽃잎이 핀다. 예로부터 지통, 지혈 작용이 있는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹¹⁾ 마늘유(Garlic oil)는 전통적으로 거담, 발한, 살균 및 이노제로 사용되어져 왔고 최근에는 항균 및 지질저하, 섬유소 용해, 항암 작용이 있다.¹²⁻¹³⁾ 은행잎은 뇌혈관 순환장애에 따른 운동장애, 의식장애, 편마비 증상 개선작용 있다.¹⁴⁾

'복방서양산사60%에탄올엑스·은행엽엑스·마늘유캡슐' 중 서양산사60%에탄올엑스는 현재 총 하이페로시드유도체를 지표성분으로 하여 함량기준 및 시험방법이 설정되어 있으며, 은행엽엑스는 총 킵라본배당체 및 총 테르펜락톤을 지표성분으로 하여 함량기준 및 시험방법이 설정되어 있다. 그러나, 은행엽엑스와 서양산사60%에탄올엑스 중 플라보노이드가 특이한 별개성분이 아닌 유사한 물질로 이루어져 있어, 각각의 확인과 함량시험법 설정이 무의미한 실정이다. 이에 따라 제제의 특징적인 확인시험법과 함량시험법을 재설정하여 안정적인 품질관리를 돕는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 연구에 사용한 서양산사엑스, 은행엽엑스는 국내에 유통되고 최종 의약품에서 실제 사용되는 원료 의약품을 해당 제조사로부터 확보하여 사용하였다. 실험재료로 국내에서 유통되고 있는 복방서양산사60%에탄올엑스·은행엽엑스·마늘유캡슐 5 품목을 시장에서 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기 - Ginkgo flavonoid 표준품인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin과 terpene lactone 표준품인

bilobalide, ginkgolide A, B, C는 Sigma사(USA)을 사용하였다. HPLC 분석을 위한 용매는 Merk 사의 HPLC급 용매를 사용하였고 그 외 시료 추출과 분석을 위한 시약은 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. HPLC system은 Agilent technology(USA)의 automated sampler injector (G1319A), Waters alliance 1200, photodiode array detector (G1315D) 및 Pump-G1312ABIN로 구성되었다.

Evaporative Light Scattering Detector는 Alltech Associates (미국)의 ELSD2000ES를 사용하였다.

표준액의 조제

1) 확인법: Chlorogenic acid 1 mg, rutoside 3 mg을 메탄올·물 (8 : 2) 10 mL에 녹여 사용하였다.

2) 정량법

가) 플라보노이드: quercetin, kaempferol 및 isorhamnetin 표준품을 메탄올에 넣어 각각 0.125 mg/mL, 0.125 mg/mL 및 0.03 mg/mL의 농도로 맞추어 사용하였다.

나) 테르펜락톤: bilobalide, ginkgolide A, B 및 C를 메탄올에 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml의 농도로 맞추어 사용하였다.

검액의 조제

1) 확인법: 제제 중 은행엽엑스로서 10 mg 해당량을 취하고, 메탄올·물 (8 : 2) 10 mL을 넣고 흔들어 추출하였다. TLC 분석조건은 Table I과 같다.

2) 정량법

가) 플라보노이드: 은행엽엑스 및 서양산사엑스인 경우 약 50 mg를, 제제인 경우 제제 중 은행엽엑스로서 약 50 mg을 정밀하게 달아 250 mL 플라스크에 넣고 에탄올·물·염산 혼합액 (50 : 20 : 8) 78 mL을 넣어 180 분간 환류추출하고 식힌 다음 물을 넣어 100 mL로 맞추었다.

나) 테르펜락톤: 은행엽엑스 및 서양산사엑스인 경우 약 50 mg를, 제제인 경우 제제 중 은행엽엑스로서 120 mg에 HPLC 용 90% 메탄올을 뚜껑이 있는 유리병에 넣고 녹이고 밀봉한 다음 90°C에서 30 분간 가열하여 혼합한다. 다시 90°C에서 30 분간 가열한 다음 실온에서 냉각하여 0.45 μm 필터로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다.

HPLC 분석조건

1) Flavonoid: 사용한 HPLC장치는 Agilent alliance 1200

Table I. TLC conditions for identification

Stationary Phase	TLC Silica gel 60
Mobile phase	ethyl acetate methyl ethyl ketone water formic acid (50 : 30 : 10 : 10)
Reagent	1% methanolic diphenyl boric acid 2-aminoethylester solution →→ 5% methanolic PEG400
Wavelength	365 nm

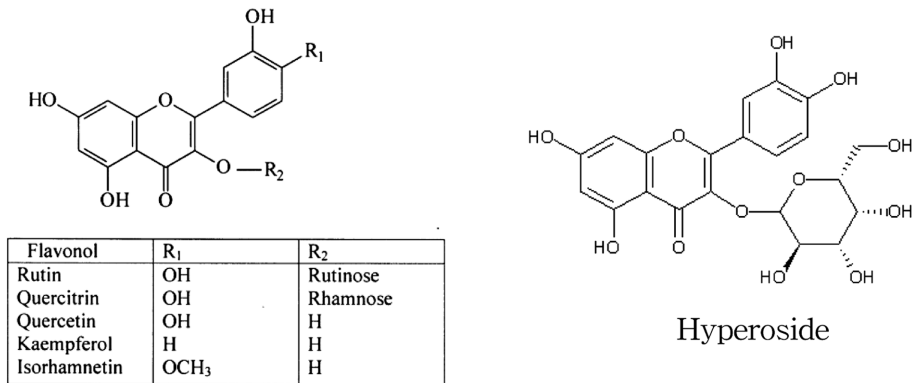


Fig. 1. Flavonoid compounds of hawthorn berry extract and *Gingko biloba* extract.

(Agilent technology, USA)이었으며, 컬럼은 Capcellpack C₁₈ (Shiseido, UG120 5 μm, 4.6×250 mm, Japan)을 사용하였다. 이동상은 메탄올·물·인산 (100 : 100 : 1)을 사용하였으며, 전개온도는 실온이었으며 유속은 분당 1.2 mL이었다. 크로마토그램은 자외부흡광도계(측정파장 257 nm)를 이용하여 검출하였다. 표준액과 검액을 가지고 함량결과를 계산한 식은 다음과 같다.

$$\text{각 flavonoid의 함량(\%)} = 10 \times 2.51 \times \frac{C}{W} \times \frac{A_T}{A_S} \times \text{표준품순도}$$

- 2.51 : 평균분자량계수
 - C : 표준액의 농도(mg/mL)
 - W : 검액 중 엑스 무게(g)
 - A_T : 검액의 피크면적
 - A_S : 표준액의 피크면적
- 총 flavonoid의 함량(\%) = 각 flavonoid 함량의 합

2) Terpene lactone: 사용한 HPLC장치는 Agilent alliance 1200 (Agilent technology, USA)이었으며, 컬럼은 Capcellpack C₁₈ (Shiseido, UG120 5 μm, 4.6×250 mm, Japan)을 사용하였다. 이동상은 메탄올을 사용하였으며, 전개온도는 실온이었으며 유속은 분당 1.0 mL이었다. 크로마토그램은 증기화 관산관 검출기 (ELSD ALLTECH 2000ES, USA)를 이용 하여 draft tube의 온도는 95°C이며, 기체유속은 2.5 mL/min에서 검출하였다. 이동상의 조건은 90% 메탄올이었다. 표준액과 검액을 가지고 함량결과를 계산한 식은 다음과 같다.

$$\text{각 테르펜락톤의 함량(\%)} = 2000 \times \frac{C}{W}$$

- C : 검액 중 해당 성분의 농도
- W : 검액 중 엑스의 무게

결과 및 고찰

KPC(제3개정)에 수재되어 있는 ‘복방서양산사60%에탄올엑스·은행엽엑스·마늘유캡슐’의 기준 및 시험방법 중 확

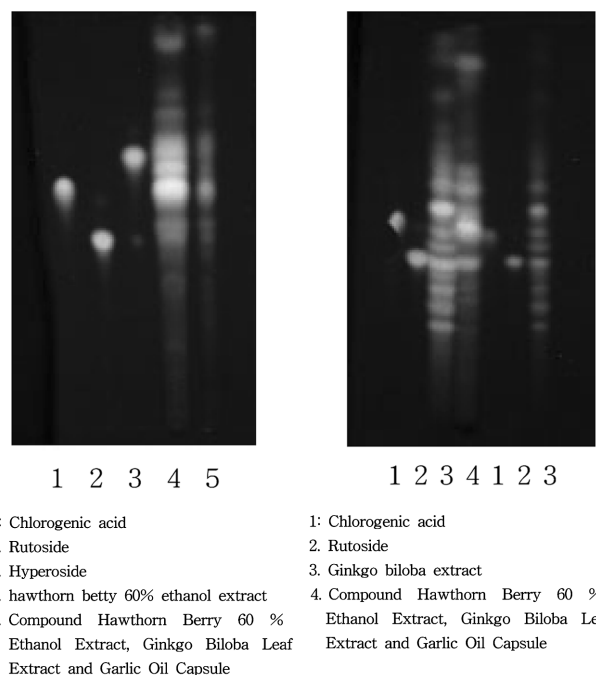


Fig. 2. Comparative results of the TLC chromatogram between hawthorn berry extract and a combination capsule.

인시험과 정량법은 서양산사엑스와 은행엽엑스 등 각 성분을 개별적으로 분석하는 방법으로 설정되어있다. 즉, 그 함량기준은 현재 “이 약은 정량할 때 서양산사 60% 에탄올엑스 중 총 하이페로시드유도체 2.0% 이상, 은행엽엑스 중 총 킵로플라본배당체(퀘르세틴배당체, 캄페롤배당체 및 이소람네틴배당체) 22.0~27.0%, 및 총 테르펜락톤[빌로발라이드(C₁₅H₁₈O₈), 킵콜라이드 A (C₁₅H₁₈O₉), 킵콜라이드 B (C₁₅H₁₈O₁₀) 및 킵콜라이드 C (C₁₅H₁₈O₁₁)의 총량으로서]은 5.4 ~ 12.0%, 마늘유 중 알리신 (C₆H₁₀OS₂ : 162.27) 0.1% 이상을 함유한다.” 되어 있다. 그러나, 생약제제 특히 복합제제의 주성분인 생약추출물 또한 단일성분이 아닌 복합물질로 구성되어 있어 제제의 특성에 맞는 분석법이 더욱 효과적이다. 특히 은행엽엑스와 서양산사60%에탄올엑스 중

flavonoid는 Fig. 1.과 같이 유사한 물질들이 함유되어 있어 제제의 특징에 맞는 분석법으로 품질관리를 할 경우 중복 실험을 지양할 수 있으리라 사료된다. Fig. 2.는 은행엽엑스와 서양산사60%에탄올엑스를 함유하고 있는 복합제제의 확인시험법을 제안하기 위해 검토된 확인시험법으로써 chlorogenic acid와 rutoside가 공통적으로 확인됨을 알 수 있었다. 발색제를 뿌린 다음 자외선(365 nm)를 쬐이면 검액 및 표준액의 크로마토그램 최하단 중간정도에 황갈색 형광의 rutoside band가 나타나고 그 위에 담청색 형광의 chlorogenic acid과 강한 황갈색~등색 형광의 hyperoside band가 나타났다. 검액의 hyperoside band 아래에 유색의 형

광밴드가 나타나고 전개용매 선단부근에 담청색의 형광밴드가 나타났다.

이러한 제제에 따른 확인시험 결과를 규격시험에 적용하면 기존의 방법보다 명확하고 간단하게 실험할 수 있으며, 패턴이 표준액 및 각 엑스와 동일함을 확인할 수 있었다.

동 제제에 함유된 은행엽엑스의 테르펜락톤의 분석법 적합성을 검토하였다. 기존 KPC 후보 1에 수제되어 있는 은행엽엑스의 테르펜락톤 분석법에 따라 실험한 결과 Fig. 2.~Fig. 6.에서와 같이 단일성분 표준품으로 조제한 표준액(Fig. 3.)과 은행엽엑스(Fig. 4.) 및 은행엽엑스 단일제제(Fig. 5.)에서는 총테르펜락톤(빌로발라이드, 킱콜라이드 A, 킱콜라이드 B, 킱콜라이드 C)의 총량피크가 분리가 잘되는 것을 알 수 있으나, 복합서양산사60%에탄올엑스·은행엽엑

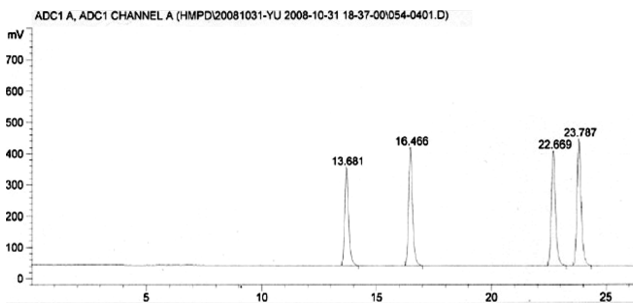


Fig. 3. HPLC chromatogram of terpenolactone (from left : bilobalide, ginkgolide C, ginkgolide A and ginkgolide B) in a standard solution.

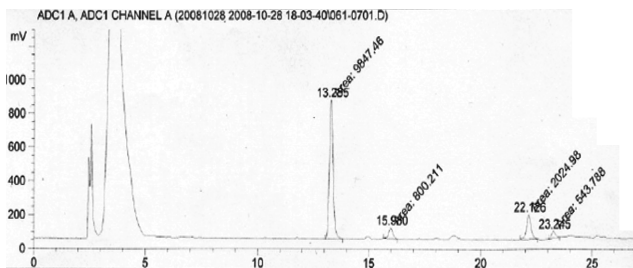


Fig. 4. HPLC chromatogram of terpenolactone (from left : bilobalide, ginkgolide C, ginkgolide A and ginkgolide B) in a *Ginkgo biloba* leaf extract solution.

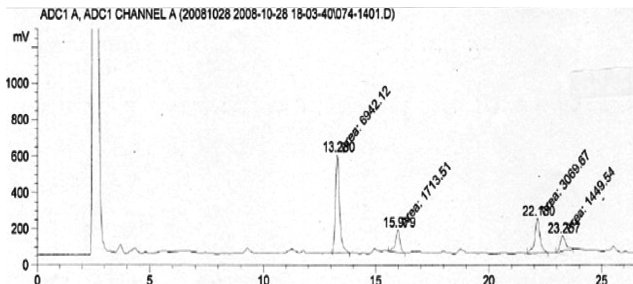


Fig. 5. HPLC chromatogram of terpenolactone (from left bilobalide, ginkgolide C, ginkgolide A and ginkgolide B) in single *Ginkgo biloba* leaf extract drug.

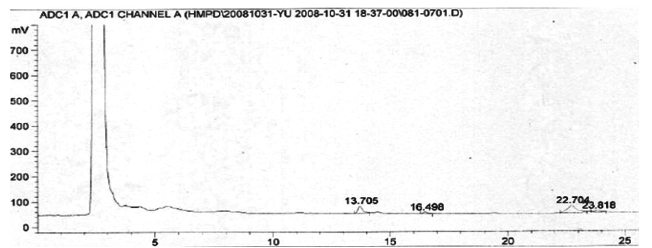
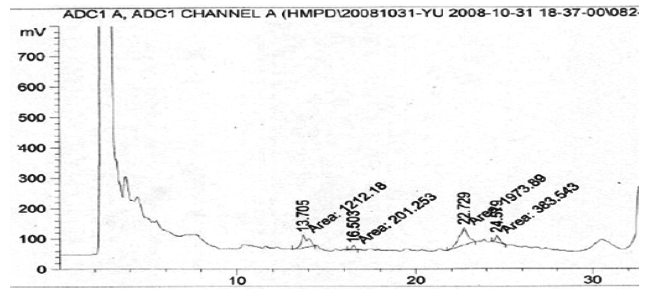
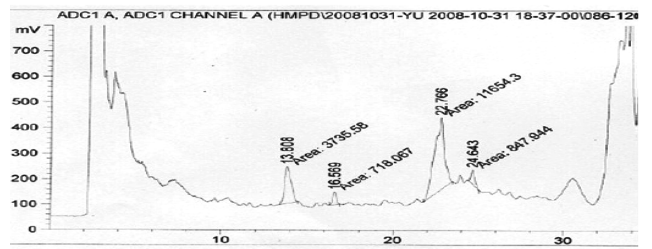
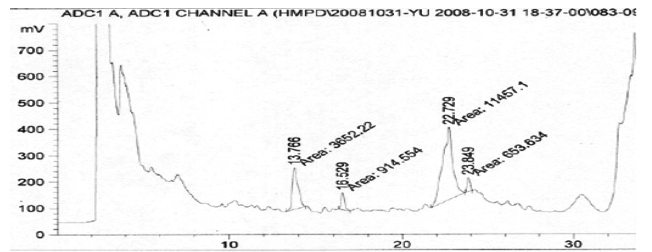


Fig. 6. HPLC chromatogram of terpenolactone (from left : bilobalide, ginkgolide C, ginkgolide A and ginkgolide B) detected from complex drugs containing a *Ginkgo biloba* leaf extract and a hawthorn berry extract solution.

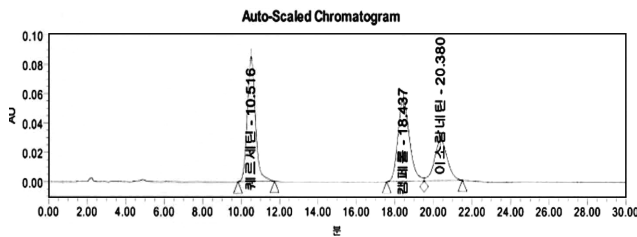


Fig. 7. HPLC chromatogram of flavonoid (from left :quercetin, kaemperol and isorahmnetin) in a standard solution.

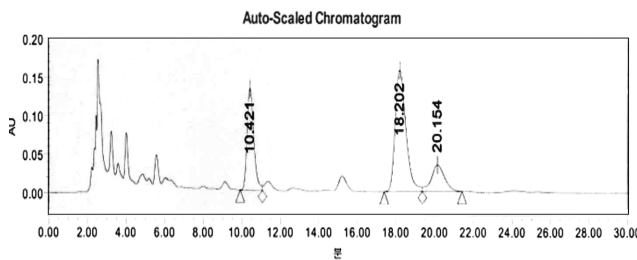


Fig. 8. HPLC chromatogram of flavonoid (from left :quercetin, kaemperol and isorahmnetin) in a *Ginkgo biloba* leaf extract solution.

스 · 마늘유캡슐에서는 KPC에 수채된 시험법에 따라서 실험한 결과 terpene lactone 피크들이 정확하게 분리되지 않음을 알 수 있다. 이는 복합제제의 타 성분들 즉, 서양산사엑스 및 멜리사엽엑스 등이 빌로발라이드와 킵콜라이드 A, B, C 피크에 간섭현상을 일으키는 것으로 사료된다. 한편 동 제제의 은행엽엑스의 분량이 매우 낮아 검체를 90 캡슐 이상 취해야 하는 문제가 있음을 확인하였다. 따라서 복합제제 중 terpene lactone을 개별적으로 정량하는 것은 차후 시험법 등의 개선이 필요할 것으로 사료된다.

이와 같은 결과로부터, 서양산사60%에탄올엑스 · 은행엽엑스 · 마늘유캡슐에서는 빌로발라이드를 제외한, 킵콜라이드 A, B, C는 피크가 분리 되지 않아, 은행엽엑스의 ‘총테르펜락톤의 량’으로 기준을 적용할 수 없다고 판단된다.

기존 KPC 후보 1에 수채되어 있는 은행엽엑스의 플라보노이드 분석법에 따라 실험한 결과 Fig. 7.~Fig. 10.에서와 같다. 단일성분 표준품으로 조제한 표준액(Fig. 7.)과 은행엽엑스(Fig. 8.)에서의 quercetin, kaemperol and isorahmnetin 피크가 서양산사엑스(Fig. 9.)에서도 동 분석법에 따라 관찰되었다. 따라서 복합제제에서는 quercetin, kaemperol and isorahmnetin를 기준으로 플라보노이드를 규격화할 때 서양산사엑스 중에 함유된 양도 고려하지 않는다면 현재 함량 기준치인 22.0~27.0%를 초과하는 결과가 나타남을 알 수 있었다. 따라서, 서양산사60%에탄올엑스와 은행엽엑스 함유 플라보노이드 함량을 총량으로 관리하는 기준안 마련이 타당한 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 확립된 복합서양산사60%에탄올엑스 · 은행엽엑스 · 마늘유캡슐의 분석법 및

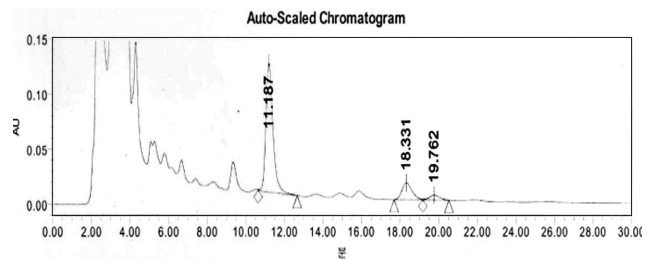


Fig. 9. HPLC chromatogram of flavonoid (from left :quercetin, kaemperol and isorahmnetin) in a hawthorn berry extract solution.

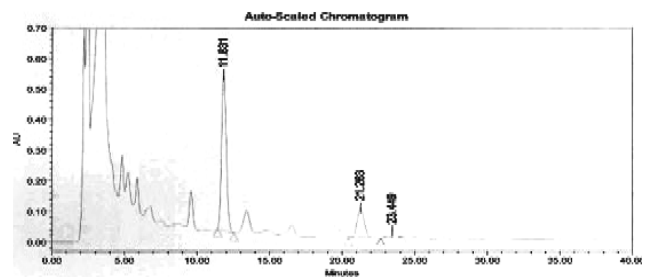


Fig. 10. HPLC chromatogram of flavonoid (from left :quercetin, kaemperol and isorahmnetin) in a compound Hawthorn Berry 60 % Ethanol Extract, *Ginkgo biloba* leaf extract and a garlic oil capsule.

함량규격은 국내에서 사용되는 동 제제에 대한 기준 및 시험법 및 규격으로 활용됨으로써 효율적인 품질관리에 기여할 것으로 기대된다.

인용문헌

1. 식품의약품안전청 (2007) 의약품등기준및시험방법 제2개정 후보2.
2. Yao, M., Ritchie, H. E. and Brown-Woodman, P. D. (2008) A reproductive screening test of hawthorn. *J. Ethnopharmacol.* **118**(1): 127-132.
3. Long, S. R., Carey, R. A., Crofoot, K. M., Proteau, P. J. and Filtz, T. M. (2006) Effect of hawthorn (*Crataegus oxycantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine* **13**(9-10): 643-650.
4. Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Huang, Y., Ho, W. K. K. and Chen, Z. Y. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits (2001) *J. Nutr. Biochem.* **12**(3): 144-152.
5. Pittler, M., Schmidt, K. and Ernst, E. (2003) Hawthorn extract for treating chronic heart failure: meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Med.* **114**(8): 665-674.
6. Degenring, F. H., Suter, A., Weber, M. and Saller, R. (2003) A randomised double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh *Crataegus berries* (*Crataegus*

- gisan®) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II, *Phytomedicine* **10**(5): 363-369.
7. Jamison, J. (2003) Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*), *Clinical Guide to Nutrition & Dietary Supplements in Disease Management* 569-572.
 8. Kennedy, D. O., Scholey, A. B., Tildesley, N. T. J., Perry, E. K., Wesnes, K.A. (2002) Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm), *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72**(4): 953-964.
 9. Ersoy, S., Orhan, I., Turan, N. N., Sahan, G., Ark, M. and Tosun F. (2008) Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta, *Phytomedicine* **15**(12): 1087-1092.
 10. Bolkent, S., Yanardag, R., Karabulut-Bulan, O. and Yesilyaprak B. (2005) Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study, *J. Ethnopharmacol.* **99**(3): 391-398.
 11. Guginski, G., Luiz, A. P., Silva, M. D., Massaro, M., Martins, D. F., Chaves, J., Mattos, R. W., Silveira, D., Ferreira, V. M. M., Calixto, J. B. and Santos, R. S. (2009) Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice, *Pharmacol. Biochem. Beh.* **93**(1): 10-16.
 12. Liu, C. T., Hse, H., Lii, C. K., Chen, P. S. and Sheen, L. Y. (2005) Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats, *Eur. J. Pharmacol.* **516**(2): 165-173.
 13. Liu, C. T., Wong, P. L., Lii, C. K., Hse, H. and Sheen, L. Y. (2006) Antidiabetic effect of garlic oil but not diallyl disulfide in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Food and Chem. Toxicol.* **44**(8): 1377-1384.
 14. Kim, S. H., Kim, D.H., Park, J. H. and Sung, S. H. (2008) Development of the Standard Analytical Methods for Ginkgo biloba Leaf Extract, *Kor. J. Pharmacogn.* **39**(3): 218-222.

(2009년 11월 15일 접수)