

## HPLC/DAD를 이용한 대황의 Sennoside A와 Rhaponticin 동시분석

김옥희<sup>#</sup> · 곽재은 · 정삼주 · 김동규 · 한은정 · 한창호 · 김복순 · 최병현 · 김민영

서울시보건환경연구원

(Received September 28, 2009; Revised November 18, 2009; Accepted November 18, 2009)

### The Simultaneous Analysis of Sennoside A and Rhaponticin in Rhei Rhizoma using Liquid Chromatography-Diode Array Detector

Ouk-Hee Kim<sup>#</sup>, Jae-Eun Kwak, Sam-Ju Jung, Dong-Gyu Kim, Eun-Jung Han,  
Chang-Ho Han, Bok-Soon Kim, Byung-Hyun Choi and Min-Young Kim

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gwacheon 427-070, Korea

**Abstract** — The objective of this study was to analyze sennoside A and rhaponticin simultaneously according to sennoside A of Rhei Rhizoma determination in Korean Pharmacopoeia. NaHCO<sub>3</sub> solution in KP was compared with methanol which usually used as solution to extract rhaponticin in Rhei Rhizoma. The method was validated through the guidelines of linearity, LOD, LOQ, specificity and accuracy. Two solution weren't different about validation parameter and passed. So this method were applied to the determination of 6 commercial Rhei Rhizoma samples and 2 samples were suitable for the legal standards.

**Keywords** □ Rhei rhizoma, sennoside A, rhaponticin, HPLC, NaHCO<sub>3</sub> solution

대황은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하였으며 약리학적으로 크게 금문계(Palmatum) 대황과 토대황계(Rhaponticum) 대황으로, 금문계 대황에는 장엽대황(Rheum palmatum), 당고특대황(Rheum tanguticum), 약용대황(Rheum officinale), 장군풀(Rheum corearum) 등이 포함되었고 토대황계 대황에는 종대황(Rheum undulatum), 인도대황(Rheum emodi), 파엽대황(Rheum franzebachii) 등이 있다.<sup>1)</sup> 대한약전에 수록된 세 가지 식물인 금문계 대황의 장엽대황, 당고특대황, 약용대황은 중국의 사천성, 청해성, 감숙성의 해발 2000~3000 m 고지에서 자생하였으며 뿌리의 횡단면에 금문이 있는 것이 특징이었고,<sup>2,3)</sup> 효능은 사하활성으로<sup>4)</sup> 한방에서 소염, 해열, 진정, 발열성 감염질환, 상반신의 혈열, 구내염, 화농성질환, 변비 등의 치료에 사용되었다.<sup>5)</sup> 종대황은 우리나라 충청, 강원, 경북 등의 저지대에서 재배되었고,<sup>2)</sup> 구어혈작용으로 혈소판응집을 강력히 억제하였으며,<sup>2,6)</sup> 항알러지 작용<sup>7)</sup>을 나타내는 등 기원종에 따라 재배지나 약리학적으로 인체에 대한 작용 및 활성이 달라 생약으로 사용될 때 반드시 구

분되어 사용되어야 한다.

그러나 실제 우리나라에서 시판되는 대부분의 대황은 종대황이었으며 대황에서 존재해서는 안 되는 라폰티신(Rhaponticin)이 검출되었고 지표성분인 센노사이드 A(Sennoside A)의 함량도 미달이었다.<sup>4,8)</sup> 이것은 대황 품질규격에서 센노사이드 A 함량 기준이 0.25% 이상으로 개정된 이후 수입된 대황에서 함량이 부족한 경우가 많아지자, 센노사이드 A 함량과 관계없이 수입할 수 있는 종대황으로 대량 수입한 후 시중 유통되는 과정에서 대황으로 둔갑되기 때문이라고 보고되었다.<sup>9)</sup> 그러므로 유통 생약시장의 신뢰성을 회복 유지하고 의약품으로서 원하는 효능을 나타내기 위해 품질규격 관리가 절실하게 필요했다.

대황과 종대황을 구분하는 방법에는 형태학적 품질평가, 이화학 분석, 패턴분석 방법이 있었는데 형태학적 품질평가는 전형생약이나 절단생약인 경우에만 가능하였고,<sup>9)</sup> 이화학 분석 방법은 주요성분을 분리, 정제, 정량함으로써 기원종에 따라 특이적으로 차이를 보이는 성분의 확인 및 함량으로 분류할 수 있었다고 보고되었다.<sup>10-13)</sup> Schnelle 등<sup>14)</sup>은 형태학적 및 조직학적 특성과 주요성분들을 분석한 결과를 비교하여 분류에 적용하기도 하였고, 근래에는 대황의 동정이나 품질관리에 다수 성분을 이용하는 패턴분석 등 다양한 연구가 이루어지고 있었다.<sup>15-18)</sup>

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-968-5096 (팩스) 02-964-8174  
(E-mail) ukismart@seoul.go.kr

대황에서 분리된 주요성분은 유리 안트라퀴논(*free anthraquinone*)류의 크리소파놀(*chrysophanol*), 이모딘(*emodin*), 알로에-이모딘(*aloe-emodin*), 레인(*rhein*) 등과 디안트론(*dianthrone*)류로 센노사이드 A~F가 있었고 스틸벤(*stilben*) 배당체로 라폰티신(*rhaponticin*), 라온티제닌(*rhaontigenin*) 등과 탄닌 배당체인 글루코갈린(*glucogallin*) 등이 보고되었다.<sup>10</sup> 최근 연구에서는 액체크로마토그래피 질량분석기를 이용하여 종류별로 대황의 주요성분의 함량을 비교하였고,<sup>16,19</sup> 한국, 중국, 일본 등 각 나라별로 다르게 설정되어 있는 법적 규제 성분들인 센노사이드 A, 센노사이드 B, 알로에-이모딘, 레인, 이모딘, 크리소파놀에 대한 분석연구<sup>8</sup>) 등을 토대로 기원별로 대황을 분류할 수 있는 성분들을 선별하고자 하는 노력이 계속되었다.<sup>10</sup> 결과 금문 대황류와 종대황을 구별할 수 있는 성분은 센노사이드 A와 라폰티신으로, 금문 대황류에 속한 대황들은 센노사이드 A가 함량의 차이를 보이기는 하였으나 모두 검출되었고, 종대황에서는 검출되지 않았다.<sup>11,12</sup> 또한 라폰티신은 금문대황에서는 검출되지 않았으나 종대황에서는 다량 함유되어 두 물질의 존재여부에 따라 종간의 구분이 가능하였다고 보고되었다.<sup>19</sup>

대한약전 9개정판에서도 센노사이드 A의 함량과 라폰티신 검출 유무를 확인하여 대황의 품질관리를 하도록 규정해져 있었다.<sup>20</sup> 그러나 이 방법은 센노사이드 A 정량시험과 라폰티신 확인시험을 각각 시행해야 하므로 많은 시료를 검사할 때 함량시험과 확인시험의 전처리를 따로 함으로서 시간과 비용이 많이 소요되었고, 라폰티신 존재여부를 박층 크로마토그래피로 반점으로 확인하기 때문에 실험자에 따라 결과관독에 오차가 생길 수 있었다. 일반적으로 많은 시료를 단순반복적으로 검사를 할 때 생약의 품질평가방법으로 활용되고 있는 여러 지표성분을 동시에 정량하는 방법이 적용되고 있었다.<sup>21,22</sup> 동시에 여러 물질을 분석할 때에는 각 물질마다 다른 극성을 고려하여 효과적으로 추출할 수 있는 용매를 선택하는 것이 중요하였다.<sup>23</sup> 그래서 각각의 용해도를 살펴보면, 센노사이드 A는 탄산수소나트륨 용액에 잘 녹았으며 메탄올, 아세톤에는 약간 녹았고 물, 벤젠, 에테르, 클로로포름에는 녹지 않는 특성을 가지고 있었다.<sup>24</sup> 반면 라폰티신은 희석된 알콜, 따뜻한 아세톤과 물에 녹았으며 에테르, 아세톤, 차가운 물에 약간 녹았고 벤젠, 석유 에테르, 클로로포름에 녹지 않았다.<sup>25</sup> 각 연구들의 정량시험법 중 추출용매를 살펴보면, 대한약전에서는 대황의 센노사이드 A를 추출하는 용매로 탄산수소나트륨 용액을 사용하였고,<sup>20</sup> 그 밖에 대황 중 센노사이드 A와 라폰티신의 분석 시 메탄올을 사용하는 연구들이 다수 있었다.<sup>13,16,26</sup>

그러므로 본 연구에서는 이미 벨리테이션이 입증된 대한약전의 센노사이드 A 정량방법으로 센노사이드 A와 라폰티신을 동시에 분석하고자 다른 여러 연구 등에서 대황의 라폰티신 분석 시 사용된 메탄올과 대한약전의 탄산수소나트륨 용액을 사용했을 때와 방법 타당성 검증 파라미터에 따라 비교·확인하였다.

그리고 실제 시중 유통되는 대황 중 센노사이드 A와 라폰티신을 분석하여 대황의 품질관리에 적용하였다.

## 실험방법

### 실험재료, 기기 및 시약

실험재료인 대황은 전문 감별위원으로부터 확인한 장엽대황, 약용대황, 당고특대황(티벳), 당고특대황(청해산)과 시중에서 유통되는 대황 6건을 준비하였다. 분석에 사용된 고속액체크로마토그래피는 Agilent 1100 series(USA)로 가스제거기(*degasser*, G1379A, Japan), 자동주입기(*autosampler*, G1313Am ALC, Germany), 펌프(*pump*, G1312A, Germany), 컬럼 온도조절기(*column temperature controller*, G1336A, Germany) 및 검출기(*detector*, G1314B, Germany)였고 컬럼은 Agilent eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 4.6 mm×150 mm, 5 μm(PN 993967902, USA)을 사용하였다. 증류수는 초순수제조장치(Milipore, USA)를 이용하여 18 MΩ 이상인 것으로 사용하였고 추출시 사용된 진탕기는 strong shaker(SR-20W, Japan)였다. 표준품으로 센노사이드 A(*Senenoside A*)는 순도 99.8%의 Wako제품(Japan)이었고 라폰티신(*Rhaponticin*)은 순도 99.2%의 Chromadex Inc(CA, USA)제품을 사용하였다. 시약은 HPLC grade로 아세토니트릴(*Acetonitrile*, Merck, Darmstadt, Germany)과 아세트산(*Acetic acid*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Germany)을 사용하였고 표준품 건조 시 데시케이터에 들어간 오산화인(*Phosphorus pentoxide*, Wako, Japan)과 표준품 제조 시 사용된 시약은 탄산수소나트륨(*Sodium Hydrogen Carbonate*, Kanto chemical, Kyoto, Japan)과 메탄올(*Methanol*, Merck, Darmstadt, Germany)이었다.

### 표준품 제조

오산화인이 들어있는 데시케이터에서 12시간 이상 건조한 표준시약 센노사이드 A와 라폰티신을 각각 약 10 mg을 정확하게 칭량한 후 탄산수소나트륨용액(1→1000)과 메탄올에 각각 녹여 표준원액을 만들었고 단계 희석하여 각각 약 5, 10, 20, 40, 80 mg/l 농도로 표준용액으로 정밀히 조제하였다.

### 전처리방법 및 기기 분석법

조말상태로 분쇄한 대황 0.5 g을 정확히 칭량한 후 추출용매로 탄산수소나트륨용액(1→1000)과 메탄올을 각각 50 ml씩 넣고 30 분간 진탕기로 추출하여 0.2 μm 막필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

동시 기기분석 조건은 대한약전 방법<sup>20</sup>)에 따라 센노사이드 A가 약 15분에 나오도록 하기 위한 액체크로마토그래피 이동상 용매조성을 희석시킨 아세트산(1→80)과 아세토니트릴을 84:16 비율로 분석하였으며, 컬럼온도는 40°C, 유량은 0.8 ml/min였다.

자외부 흡광광도계(Diode-array detector) 측정파장은 340 nm였고 자외선 스펙트럼은 190~400 nm 범위로 정하였다.

**동시분석법 밸리데이션<sup>27,28)</sup>**

분석법의 타당성은 의약품 등 분석법 밸리데이션에 대한 지침 및 ICH(International Communitie of Harmonization)의 가이드 라인에 따라 각 성분의 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정밀성, 특이성, 정확성을 검증하였다.

**직선성(Linearity), 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 검증**

직선성은 각 표준용액의 5단계 농도로 검량선을 작성하여 검량선의 r<sup>2</sup>으로 직선성을 평가하였는데 0.998 이상을 기준으로 적합한 분석가능범위를 결정하였다. 검출한계(Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantification)는 반응의 표준편차와 검량선 기울기에 근거하는 방법에 따라 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정된 평균값으로 검량 y를 작성하여 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$LOD=3.3 \times \sigma/S$$

$$LOQ=10 \times \sigma/S$$

여기서  $\sigma$ 는 반응의 표준편차, S는 검량선의 기울기였다.

**정밀성(Precision) 검토**

정밀성은 여러 가지 요인 중 실험일을 변동요인으로 정하여 실험일 내 정밀성(Repeatability)은 검량선을 그린 5단계 농도의 표준용액을 각각 실험일 내 3회 반복 측정하여 각 농도별 상대 표준편차(Relative standard deviation, R.S.D.(%)=(S.D./mean×

100)를 구하였고 실험일 간 정밀성(Intermediate precision)은 7일 후 다시 5단계 농도의 표준용액을 측정하여 일간 피크면적의 상대표준편차 값을 구하였다.

**특이성(Specificity) 및 정확성(Accuracy) 검토**

특이성은 HPLC 기기 chamstation에서 표준물질 중 센노사이드 A 및 라폰티신의 자외선-스펙트럼과 표준물질을 첨가한 대황 시험용액에서 각각의 스펙트럼을 비교하여 일치도와 순도로 검증하였으며, 정확성은 시험용액에 3단계 농도의 표준용액을 첨가하여 직선성 분석범위 내에서 3회 측정하였고 표준용액의 이론적인 농도와 실제 측정된 값과의 비교하여 회수율(Recovery, %)을 구하였다.

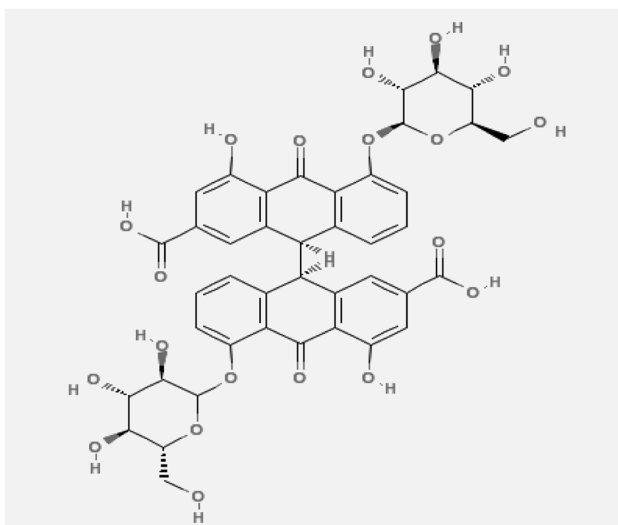
**시판되는 대황의 센노사이드 A와 라폰티신 동시 분석**

장엽대황, 약용대황, 당고특대황(티벳), 당고특대황(청해산) 및 시중에 유통되는 대황 6건의 센노사이드 A와 라폰티신을 대한 약전의 센노사이드 A 정량법인 탄산수소나트륨 용액으로 전처리한 후 HPLC로 정량하였다.

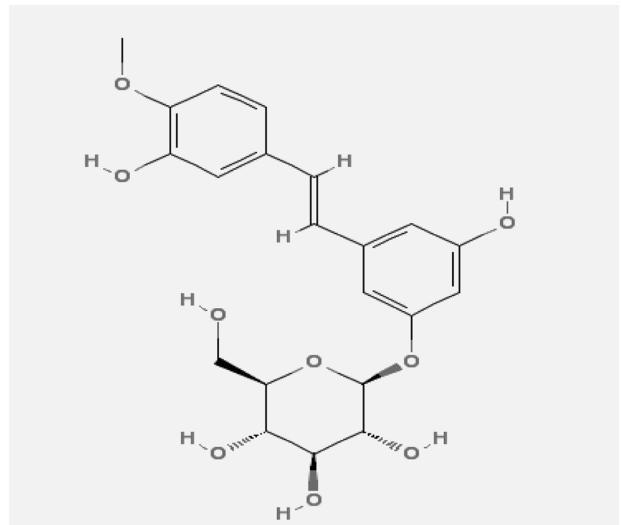
**실험결과 및 고찰**

**표준물질과 대황 시험용액의 크로마토그램**

Fig. 1은 센노사이드 A와 라폰티신 표준물질의 분자구조이고, 이것을 탄산수소나트륨용액에 녹여 HPLC로 분석한 크로마토그램, 약용대황과 당고특대황(청해산)을 각각 탄산수소나트륨용액으로 전처리한 후 분석한 크로마토그램과 약용대황 전처리한 시험용액에 표준물질을 첨가한 크로마토그램은 Fig. 2와 같았다.



A) Sennoside A: threo(10,10'-trans)



B) Rhaponticin

**Fig. 1** – Structures of sennoside A and rhaponticin.

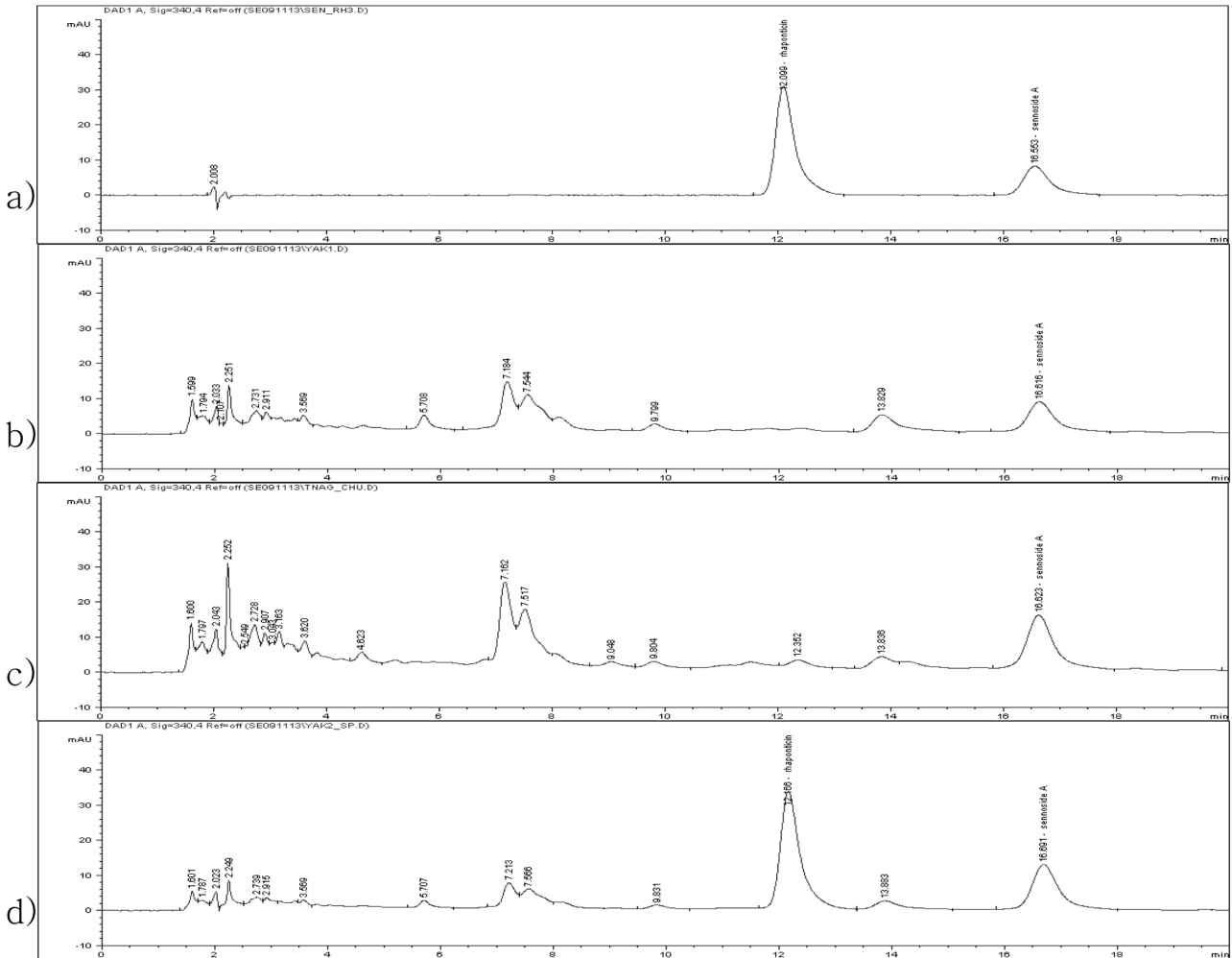


Fig. 2 – Chromatogram of (a) standard (sennoside A and rhaponticin), (b) *R. officinale*, (c) *R. tanguticum* (Chinahai)) (d) *R. officinale* added standard by  $\text{NaHCO}_3$  solution extract.

이 등<sup>8)</sup>은 HPLC 크로마토그래피 상 센노사이드 A와 라폰티신의 머무름시간이 매우 비슷하여 라폰티신 피크를 센노사이드 A로 오인할 수 있다고 보고하였으나, 본 연구에서는 센노사이드 A와 라폰티신의 머무름시간이 각각 16.553분, 12.099분으로 확실히 구분할 수 있었다. 이번에는 메탄올에 녹여 각각의 표준물질을 분석한 크로마토그램 및 약용대황 및 당고특대황(청해산)을 메탄올로 전처리하여 얻은 크로마토그램과 약용대황 전처리한 시험용액에 표준물질을 첨가한 크로마토그램은 Fig. 3과 같이 HPLC 상 분리에는 문제가 없었다.

#### 분석범위, 직선성, 검출한계, 정량한계 타당성 검토

용매별 각 분석물질의 직선성 상관계수  $r^2$ 값이 0.99 이상인 분석범위 및  $r^2$ 값은 Table I과 같았다. 센노사이드 A는 탄산수소나트륨 용액에서 5.19~83.00 mg/l 범위에서  $r^2$ 값이 0.9998로 좋은 직선성을 보였으며 검출한계와 정량한계도 각각 0.16, 0.49 mg/l

였다. 그러나 메탄올에 녹였을 경우 센노사이드 A의 용해도가 떨어져 83 mg/l 농도에서 약간의 침전물이 생겼으므로 분석범위를 5.72~45.75 mg/l로 좁혀 검량선을 작성하였다. 이 때  $r^2$ 값이 0.9970으로 분석범위와 직선성면에서 센노사이드 A는 용매로써 메탄올보다 탄산수소나트륨용액이 더 적합한 것으로 생각되었다. 그러나 Koyama 등의 연구<sup>26)</sup>에서는 센노사이드 A를 메탄올로 녹였을 때 5~200  $\mu\text{g/ml}$  범위에서  $r^2$ 이 1.000이었고, 검출한계는 0.1 mg/l였다. 또한 Lin 등의 연구<sup>15)</sup>에서는 70% 메탄올로 녹여 8.0~144.0 mg/l 범위로 검량선을 그렸을 때  $r^2$ 값이 0.9995로 본 연구에서 메탄올로 녹였을 때 분석범위가 좁아졌던 것과 다른 결과였으며 검출한계는 3.2 mg/l로 다소 차이를 보였다.

라폰티신은 탄산수소나트륨용액에 녹였을 때 5.00~80.00 mg/l 범위에서  $r^2$ 값이 0.9995였고 검출한계와 정량한계는 각각 0.36, 1.18 mg/l였으며, 메탄올의 경우도 5.78~92.50 mg/l에서 비슷한 결과인  $r^2$ 은 0.9989, 검출한계 0.53 mg/l와 정량한계 1.62 mg/l로

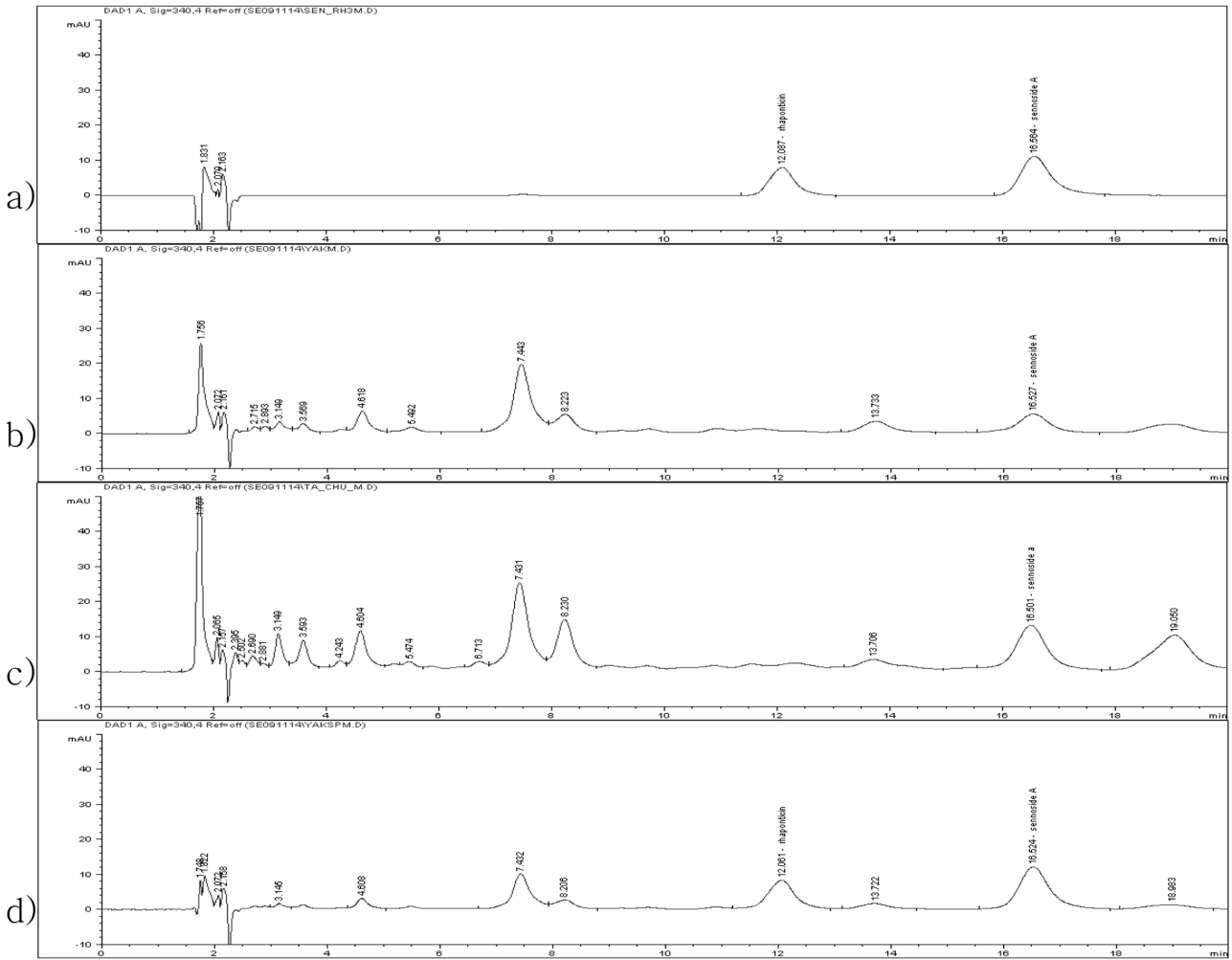


Fig. 3 – Chromatogram of (a) standard (sennoside A and rhaponticin), (b) *R. officinale*, (c) *R. tanguticum* (Chinahai) (d) *R. officinale* added standard by Methanol extract.

Table I – The calibration curves (range, regression equation and  $r^2$ ), LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantification) of sennoside A and rhaponticin dissolved each two solvent<sup>1)</sup>

Compound	Solvent	Range (mg/l)	Regression equation <sup>2)</sup>	$r^2$	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
Sennoside A	NaHCO <sub>3</sub>	5.19~83.00	Y=9.71X-6.36	0.9998	0.16	0.49
	Methanol	5.72~45.75	Y=5.55X+9.45	0.9970	0.77	2.34
Rhaponticin	NaHCO <sub>3</sub>	5.00~80.00	Y=17.36X-34.10	0.9995	0.36	1.18
	Methanol	5.78~92.50	Y=21.59X+3.24	0.9989	0.53	1.62

1) : HPLC condition is according to Korean pharmacopia's method

2) : Y=peak-area, X=compound concentration

나타나 두 용매 간에 차이가 없었다. 이것은 Lina Xu 등의 연구<sup>29)</sup>에서 라폰티신을 메탄올에 녹였을 때 1.75~112.00 mg/l 범위에서  $r^2$  0.9998, 검출한계 0.45 mg/l 및 정량한계 0.95 mg/l라고 보고된 것과 비슷한 결과였다.

**정밀성 타당성 검토**

각 표준물질별로 검량선을 그린 5단계 농도로 실험일 내 3회

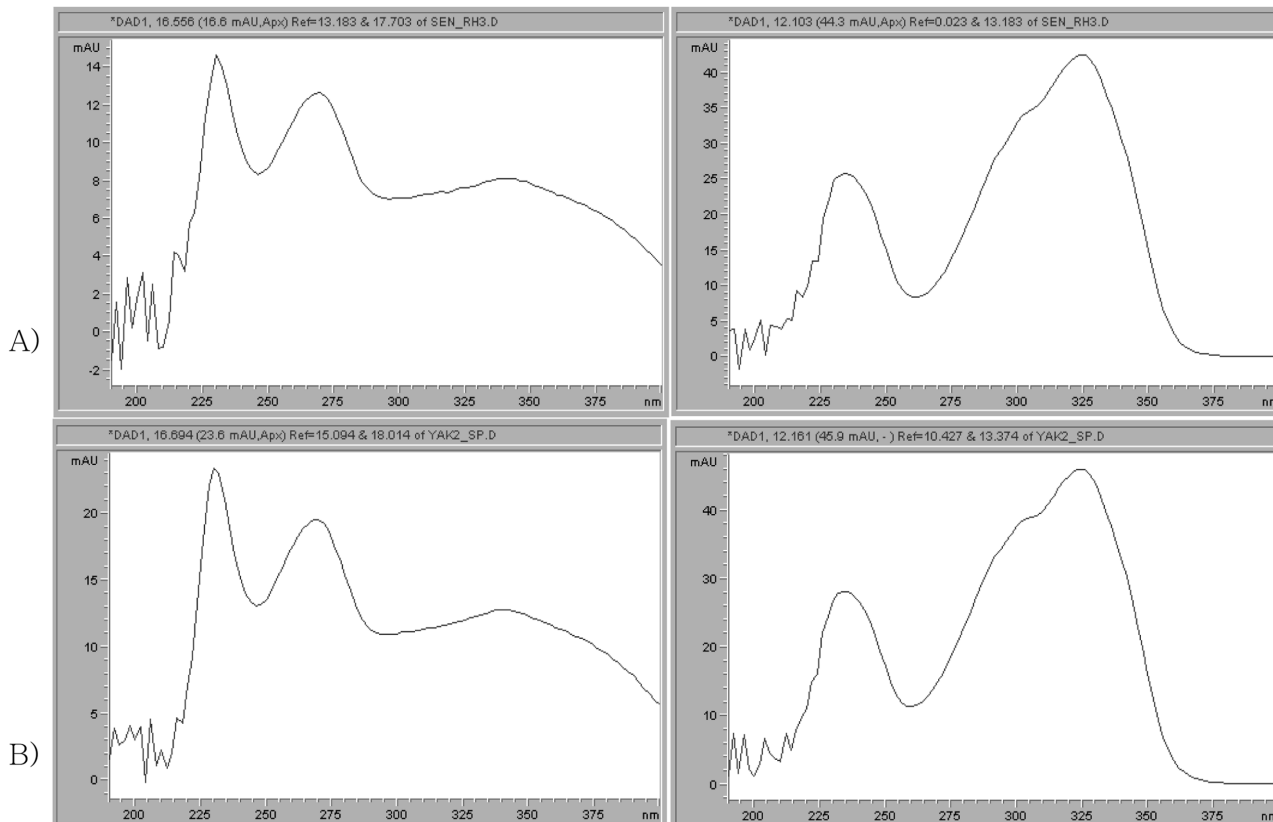
반복 측정하여 얻은 정밀성(Repeatability)과 7일 후 실험일 간의 5회 반복 측정한 정밀성(Intermediate precision)을 살펴본 결과는 Table II와 같았다. 탄산수소나트륨 용액에 녹인 센노사이드 A는 실험일 내 및 실험일 간의 농도별 피크면적의 상대표준편차 값(RSD,%)이 각각 0.11~0.48%, 0.22~1.36%였고, 메탄올에 녹였을 때 직선성을 보이는 분석범위인 45.75 mg/l까지 정밀성을 평가했을 때 실험일 내 상대표준편차가 5.72 mg/l에서 2.11%로

Wang 등<sup>30)</sup>이 제시한 허용기준인 상대표준편차 2% 이내에는 벗어났으나 이 등의 연구<sup>31)</sup>에서 언급한 일반적으로 요구되는  $\pm 15\%$  이내에 적합하였다.

라폰티신은 녹이는 용액과 상관없이 실험일 내 및 실험일 간 상대표준편차가 모두 1.72% 이내로 위에서 언급한 기준 내였다.

**Table II** – Precision of sennoside A and rhaponticin dissolved each two solvent

Compound	Solvent	Conc. (mg/l)	Intra-day (n=3)		Inter-day (7 day, n=5)	
			mean $\pm$ SD (abundance)	RSD (%)	mean $\pm$ SD (abundance)	RSD (%)
Sennoside A	NaHCO <sub>3</sub>	5.19	51.05 $\pm$ 0.06	0.12	52.26 $\pm$ 0.71	1.36
		10.72	87.72 $\pm$ 0.42	0.48	88.39 $\pm$ 1.10	1.25
		20.75	195.72 $\pm$ 0.25	0.13	197.17 $\pm$ 1.49	0.76
		41.50	399.72 $\pm$ 0.43	0.11	400.04 $\pm$ 0.89	0.22
		83.00	798.57 $\pm$ 1.69	0.21	800.05 $\pm$ 2.87	0.36
	MeOH	5.72	36.41 $\pm$ 0.77	2.11	37.85 $\pm$ 0.71	1.88
		11.44	72.85 $\pm$ 0.20	0.27	73.54 $\pm$ 0.56	0.77
		22.88	146.92 $\pm$ 0.07	0.05	146.38 $\pm$ 0.84	0.57
		45.75	258.76 $\pm$ 0.80	0.31	259.14 $\pm$ 0.89	0.34
Rhaponticin	NaHCO <sub>3</sub>	5.00	59.03 $\pm$ 0.36	0.60	58.79 $\pm$ 0.46	0.78
		10.00	159.87 $\pm$ 0.46	0.29	159.63 $\pm$ 0.48	0.30
		20.00	297.44 $\pm$ 1.46	0.49	295.53 $\pm$ 1.64	0.55
		40.00	636.54 $\pm$ 3.14	0.49	634.10 $\pm$ 4.14	0.65
		80.00	1367.86 $\pm$ 15.15	1.11	1353.19 $\pm$ 23.25	1.72
	MeOH	5.78	115.54 $\pm$ 1.48	1.28	116.02 $\pm$ 0.96	0.83
		11.56	234.11 $\pm$ 3.01	1.29	234.98 $\pm$ 2.44	1.04
		22.13	498.82 $\pm$ 1.13	0.23	498.09 $\pm$ 1.64	0.33
		45.25	1064.05 $\pm$ 1.49	0.14	1062.22 $\pm$ 3.73	0.35
		92.50	1973.73 $\pm$ 3.76	0.19	1973.70 $\pm$ 3.76	0.19



**Fig. 4** – Spectrum of sennoside A and rhaponticin (A) standard (B) *R. officinale* added standard by NaHCO<sub>3</sub> solution extract.

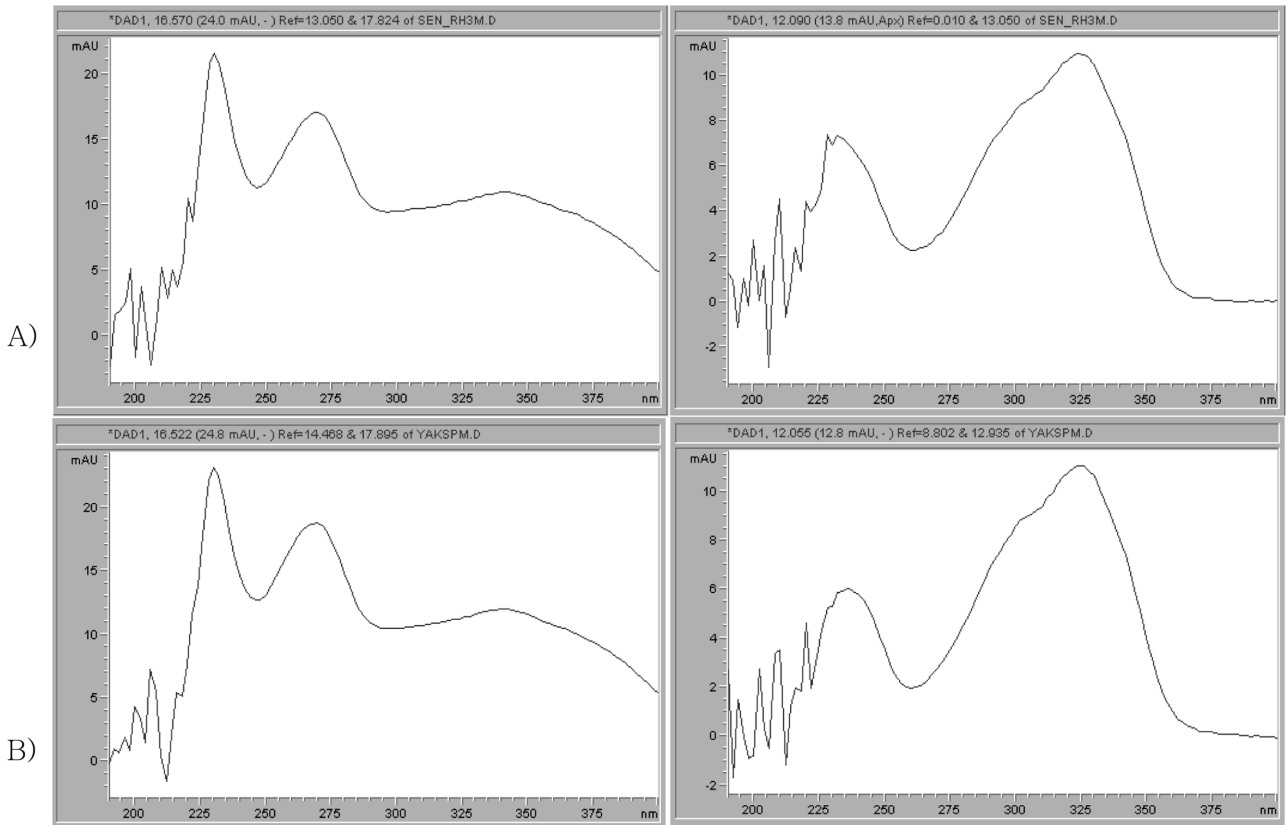


Fig. 5 – Spectrum of senoside A and rhaponticin (A) standard (B) *R. officinale* added standard by Methanol extract.

**특이성 및 정확성 타당성 검증**

특이성(Specificity)이란 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로, 크로마토그램 상 분석대상물질의 피크가 다른 성분들로부터 유래하지 않는다는 것을 입증하기 위해서는 다이오드 어레이(Diode array)나 질량분석기 등을 검출기로 피크순도를 체크하였다.<sup>27)</sup> 대황 시험용액 중 센노사이드 A와 라폰티신 각 피크의 순도는 역치 이상이었으며 각 표준물질의 190~400 nm 스펙트럼과 비교하여 99% 이상의 일치도를 보여 원료 생약 대황의 다른 성분들 사이에서 두 성분이 분리되었음이 검증되었다. 탄산수소나트륨용액으로 녹인 센노사이드 A와 라폰티신의 스펙트럼, 같은 용액으로 추출한 약용대황 시험용액 중 두 물질의 스펙트럼은 Fig. 4와 같았고 메탄올로 녹인 경우의 각각의 스펙트럼은 Fig. 5과 같았다.

정확성을 검증하기 위해 대황 시료를 탄산수소나트륨 용액으로 추출한 시험용액에 탄산수소나트륨 용액으로 녹인 센노사이드 A를 5.19, 10.72, 20.75 mg/l 3단계 농도로 최종 첨가하여 회수율을 검정한 결과는 Table III와 같이 99.42~100.22%(상대표준편차 0.39~0.78%)의 회수율을 보였고 메탄올로 추출한 시험용액의 경우에도 탄산수소나트륨 용액과 차이가 없는 101.28~

Table III – Accuracy of senoside A and rhaponticin dissolved each two solvent

Compound	Solvent	Spiked conc. (mg/l)	Recovery (%)	RSD (%)
Senoside A	NaHCO <sub>3</sub>	5.19	100.01	0.49
		10.72	100.22	0.39
		20.75	99.42	0.78
	MeOH	5.72	101.28	0.49
		11.44	104.02	0.67
		22.88	104.07	0.16
Rhaponticin	NaHCO <sub>3</sub>	5.19	90.41	1.29
		11.44	86.26	0.93
		22.88	103.33	1.04
	MeOH	5.78	110.00	0.89
		11.56	104.31	0.68
		23.13	106.87	0.18

104.07%(상대표준편차 0.16~0.67%)의 회수율을 보였다. 그러나 라폰티신의 경우 탄산수소나트륨 용액으로 추출한 시험용액에 5.78, 11.56, 23.13 mg/l 농도로 최종 첨가되었을 때 회수율이 86.26~103.33%(상대표준편차 0.96~1.29%)였으나 메탄올에서는 104.31~110.00%(상대표준편차 0.18~0.89%)을 나타내 추출용매로서 메탄올을 사용했을 때가 탄산수소나트륨용액보다 더 좋은 회수율을 보였다. 그러나 정확성 검증 결과가 모두 일반적 방법

타당성 검증의 정확성 기준인 실측값의  $\pm 15\%$  이내라는 기준에는 적합하였으므로<sup>31)</sup> 탄산나트륨용액을 추출용매로 사용하여도 무방한 것으로 생각되었다.

#### 대황의 센노사이드 A와 라폰티신 동시분석방법으로 시판되는 대황 분석

대황의 센노사이드 A와 라폰티신을 동시에 분석하기 위해 탄산수소나트륨용액과 메탄올로 용매를 달리해 분석법 타당성 검증으로 비교해 본 결과 모두 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성, 특이성, 정확성 파라미터에서 적합하였으나, 메탄올에 녹인 센노사이드 A의 직선성 범위가 탄산수소나트륨 용액의 경우보다 좁았고 정확성면에서는 라폰티신에서 메탄올로 추출하는 것이 회수율이 조금더 좋았다. 그러므로 본 연구의 목적인 센노사이드 A에 대해, 대한약전의 벨리데이션이 이미 검증된 정량법으로 라폰티신을 동시에 검사하기에 적합함을 실험법 벨리데이션으로 검증하였고, 라폰티신을 메탄올로 추출했을 때와 비교해 큰 차이가 없음을 입증하였다.

이 방법으로 기원이 확인된 장엽대황, 약용대황과 재배지가 다른 티벳산 및 청해산 당고특대황과 시중에 판매되고 있는 대황에서 센노사이드 A와 라폰티신을 분석한 결과는 Table IV와 같았다. 장엽대황, 약용대황, 당구트대황(티벳산), 당구트대황(청해산)은 라폰티신은 검출되지 않았고, 다른 연구들에서도 금문대황계에서는 라폰티신이 없었다는 것과 같은 결과였다.<sup>19)</sup> 앞의 분석한 대황 각각의 센노사이드 A 함량은 0.081%, 0.231%, 0.368%, 0.411%로 장엽대황과 약용대황은 대한약전의 센노사이드 A의 함량 0.25% 이상에 미달되었다. 이와 같은 결과는 이 등의 연구<sup>8)</sup>에서 장엽대황은 센노사이드 A의 함량이 0.06~0.1%였고 최 등의 연구<sup>12)</sup>에서 장엽대황의 센노사이드 A가 0.10~0.15%였다는 보고와 일치하였으며, 약용대황의 센노사이드 A 함량도 0.17~1.08%로 제품에 따라 함량차이가 커 기준에 적합한 경우와 부적합한 경우가 있었다. 그러나 고 등의 연구<sup>19)</sup>에서는 장엽대황의 센노사이드 A 함량이  $0.612 \pm 0.003\%$ 로 다른 연구결과와

달랐다. 당고특대황은 다른 기원 대황에 비해 센노사이드 함량이 높았고 Katsuko 등의 연구<sup>16)</sup>에서도 당고특대황 청해산의 센노사이드 A는 0.433~8.71%였다.

시중에 유통되는 대황 6건을 분석해 본 결과 4건이 센노사이드 A 함량이 대한약전 기준에 미달되었고 그 중 2건은 라폰티신이 검출되어 총 4건이 부적합하였다. 본 연구의 경북 의성군 한국산 대황(8)은 라폰티신이 1.183%, 센노사이드 A는 검출되지 않아 토대황계열임을 알 수 있었고, 중국산 대황(7)은 라폰티신 함량이 1.168%였고 센노사이드 A가 0.068%로 미량 검출되었다. 종대황의 라폰티신 함량은 한국산이 22.424%, 중국산이 26.912%, 27.408%라고 보고되었고<sup>19)</sup> Shang 등<sup>32)</sup>은 몽골리안 대황에서 라폰티신 함량이 0.075%라고 보고하는 등 종류에 따라 라폰티신의 함량차이가 컸다. 문헌상 감속에서 재배된 대황의 기원이 장엽대황이라는 보고가 있었는데,<sup>33)</sup> 본 연구에서도 중국산 감속산 대황(10)의 센노사이드 A 함량이 0.125%였고 재배지는 표시되지 않았지만 중국산 대황(9)도 0.073%였으며, 다른 연구에서 감속산 대황 중 센노사이드 A의 함량은 0.079~0.298% 범위였다.<sup>16)</sup>

## 결론

우리나라 시판되는 대황이 함량미달 제품 및 종대황이 혼재되어 판매되고 있는바 건전한 유통 관리를 위하여 많은 시료를 짧은 시간과 적은 비용으로 품질관리를 할 수 있도록 대황의 기원 중간 특이 지표성분인 센노사이드 A와 라폰티신의 동시분석방법하고자 하였다. 방법으로 대한약전의 센노사이드 A 정량법으로 적용하고자 방법 타당성 검증을 통해 신뢰성을 확보하였다. 결과 분석법의 타당성이 검증된 대한약전의 대황 중 센노사이드 A 정량방법으로 라폰티신의 존재 여부와 정량까지 동시에 가능함에 따라 대황의 품질관리의 효율성을 높여 일선 시장의 제품관리에 유용한 자료로 활용될 것이라 기대되었다. 실제 대황의 센노사이드 A와 라폰티신 함량을 분석한 결과 대황의 기원에 따라 센노사이드 A의 함량이 달랐으며 시중 유통되는 대황 6건 중 4건이 대한약전 기준에 부적합하였는데 2건은 센노사이드 A 함량 미달, 2건은 라폰티신 검출 및 센노사이드 A 함량이 미달했고, 2건만이 적합하여 지속적인 대황 품질 모니터링이 필요하였다.

## 참고문헌

- 1) 김호철 : 한약약리학, 집문당, 경기도, p. 174 (2001).
- 2) Ko, S. K., Lee, S. M. and Whang, W. K. : Effects of Rheum plants on blood platelet aggregation. *Yakhak Hoeji* **43**, 233 (1999).
- 3) Kang, J. S., Park, K. J., Wu, E., Lee, E. S., Hwang, G. S., Lee, H. S. and Kim, Y. H. : Comparative study of the Rhei Rhizoma by pattern analysis. *Kor J. Pharmacogn.* **39**, 179 (2008).

**Table IV** – The place of origin, company and contents of components in Rhei Rhizoma

No	Classification	The place of origin	Contents (w/w%)	
			Sennoside A	Rhaponticin
1	<i>R. palmatum</i>	-	0.081	0
2	<i>R. officinale</i>	-	0.231	0
3	<i>R. tanguticum</i>	Tibet, China	0.368	0
4	<i>R. tanguticum</i>	Chinghai, China	0.411	0
5	-	China	0.329	0
6	-	China	0.672	0
7	-	China	0.068	1.168
8	-	Uiseong, Korea	0	1.183
9	Palmata	China	0.073	0
10	-	Gansu, China	0.125	0



- 4) Kim, J. Y., Choi, G. Y., Kim, H. J. and Ju, Y. S. : The external and internal morphological standards of original plants and herbal states in two kinds of Rhei Rhizoma. *Korean Journal of Oriental Medicine* **12**, 39 (2006).
- 5) 생약학교재편찬위원회 : 생약학. 동명사, 서울, p. 225 (2008).
- 6) Ko, S. K., Shin, C. G., Lee, H. S., Han, S. T., Yang, B. W., Im, B. O. and Chung, S. H. : Effect of stilbene derivatives from *Rheum undulatum* on carrageenan-induced acute edema in rats. *Kor J. Pharmacogn.* **35**, 171 (2004).
- 7) Matsuda, H., Tomohiro, N., Hiraba, K., Harima, S., Ko, S. K., Matsuo, K., Yoshikawa, M. and Kubo, M. : Study on anti-Oketsu activity of rhubarb. Anti-allergic effects of stilbene components from *Rhei undulati Rhizoma*. (dried Rhizome of *Rheum undulatum* cultivated in Korea) *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 264 (2001).
- 8) Lee, Y. M., Lee, S. W., Cho, J. H. and Kim, J. S. : Quality evaluation of *Rhei Rhizoma* which are sold in Korea, China and Japan. *Korean Journal of Oriental Medicine* **10**, 101 (2004).
- 9) Kim, S. J., Han, S. H. and Lee, Y. J. : A study on a morphological identification of kinds of *Rhei Rhizoma*. *Kor. J. Herbology* **21**, 171 (2006).
- 10) Kim, M. W., Chang, S. Y., Lee, J. H., Ko, S. K. and Yook, C. S. : Studies on determination of sennoside A and sennoside B in *Rheum* spp.. *Bull. K. H. Pharma. Sci.* **28**, 115 (2000).
- 11) Kim, S. Y. : Study on the major component of *Rhei Rhizoma* and *Rhei Unduratai Rhizoma*. Graduate school of Kyung Hee University, Seoul, Feb (2006).
- 12) Choi, S. K. : Quantitative analysis of sennoside A and free-antraquinones in various *Rhei Rhizoma* from current market. Graduate school of Kyung Hee University, Seoul, July (2007).
- 13) Ye, M., Han, J., Chen, H., Zheng, J. and Guo, D. : Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 82 (2007).
- 14) Schnelle, F. J. and Schratz, E. : Differences in occurrence of anthraquinone aglycons and rhaponticin in *Rheum* species. *Planta Medica* **14**, 194 (1966).
- 15) Lin, C. C., Wu, C., Lin, C. L. and Sheu, S. J. : Determination of 19 rhubarb constituents by high-performance liquid chromatography-ultraviolet-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **29**, 2584 (2006).
- 16) Komatsu, K., Nagayama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Cai, S. Q., Omote, T. and Meselhy, M. R. : Comparative study of chemical constituents of rhubarb from different origins. *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 1491 (2006).
- 17) Komatsu, K., Nagayama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Cai, S. Q., Omote, T. and Meselhy, M. R. : Development of a high performance liquid chromatographic method for systematic quantitative analysis of chemical constituents in rhubarb. *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 941 (2006).
- 18) Komatsu, K., Yang, D. Y., Fushimi, H. and Cai, S. Q. : Authentication of *Rhei Rhizoma*. *J. Trad. Med.* **22**(Suppl.1), 70 (2005).
- 19) Ko, S. K., Han, S. T., Yang, B. W., Shin, C. G., Hahm, Y. T., Cho, S. H. and Whang, W. K. : Quantitative analysis of anthraquinone and stilbene derivatives in various rhubarbs. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**, 257 (2005).
- 20) 식품의약품안전청 : 대한약전. 9개정, 신일북스, 서울 (2008).
- 21) Yoo, J. L., Jang, D. S. and Kim, J. S. : Quality evaluation of herbal prescription, Oc Chun San, employing simultaneous determination of the marker compounds by HPLC. *Korean J. Oriental Medicine* **11**, 167 (2005).
- 22) Feng, C., Cai, Y. L. and Ruan, J. L. : Simultaneous determination of 10 active components in traditional chinese medicine "YIGONG" capsule by RP-HPLC-DAD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 442 (2008).
- 23) Xie, Y., Jiang, Z. H., Zhou, H., Cai, X., Wong, Y. F., Liu, Z. Q., Bia, Z. X., Xu, H. X. and Liu, L. : Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 204 (2007).
- 24) O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., Obenchain Jr., J. R., Gallipeau, J. A. R. and Darecca, M. A. : The merck index. Merck & Co., inc., 13th, p. 8526 (2001).
- 25) O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., Obenchain Jr., J. R., Gallipeau, J. A. R. and Darecca, M. A. : The merck index. Merck & Co., inc., 13th, p. 8259 (2001).
- 26) Koyama, J., Morita, I. and Kobayashi, N. : Simultaneous determination of anthraquinones in rhubarb by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1145**, 183 (2007).
- 27) 식품의약품안전청 : 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인 (2004)
- 28) ICH harmonized tripartite guideline. Validation of analytical procedures. Methodology Q2B, ICH steering committee (1996)
- 29) Xu, L., Han, X., Qi, Y., Xu, Y., Yin, L., Peng, J., Liu, K. and Sun, C. : Multiple compounds determination and fingerprint analysis of lidanpaishi tablet and keli by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **633**, 136 (2009).
- 30) Wang, J., Li, H., Jin, C., Qu, Y. and Xiao, W. : Development and validation of a UPLC method for quality control of rhubarb-based medicine: Fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 765 (2008).
- 31) Lee, G. W., Kim, A. R. and Cho, J. S. : HPLC analysis of organic acids, phenol and benzopyrene in wood vineger. *Yakhak Hoeji* **52**, 12 (2008).

- 32) Shang, X. and Yuan, Z. : Determination of six components in rhubarb by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography using a mixed micellar system of sodium cholate and sodium taurocholate. *Anal. Chim. Acta* **456**, 183 (2002).
- 33) Kashiwada, Y., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Studies on rhubarb (Rhei Rhizoma). XV. Simultaneous determination of phenolic constituents by high-performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 999 (1989).