

황련해독탕제제의 지표성분 동시 분석을 통한 품질비교

지은혜 · 김혜진 · 정세희 · 문정현 · 장영표*
경희대학교 약학대학

Assessment of the Quality Variance among Commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang by Simultaneous Analysis of Characterizing Compounds

Eun Hye Jee, Hye Jin Kim, Se Hee Jeong, Jung Hyun Moon and Young Pyo Jang*
Division of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract – A study was performed to assess the quality equivalence of commercially available Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang granules from various vendors in terms of the contents of characterizing compounds. ‘Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang’(or ‘Huanglian Jiedu Tang’) is the complex medicinal herbal product which is composed of four different herbal drugs; Scutellariae Radix, Coptidis Rhizoma, Phellodendri Cortex and Gardeniae Fructus. Using a high performance liquid chromatography and direct analysis in real time mass spectrometer (DART-MS), five characterizing compounds such as baicalin, baicalein, berberine, palmatine, and geniposide were analyzed to compare the variance of the contents between the products from four different vendors. Although five characterizing compounds were all successfully detected from all the products, the contents of each compound were shown to have significant difference among vendors. For real time monitoring of characterizing compounds in medicinal herbal products, DART-MS can be successfully adopted as a powerful analytical tool.

Key words – Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang, Huanglian Jiedu Tang, characterizing compounds, DART-MS, HPLC

한약제제는 오랜 임상적 경험을 통해 입증된 안전성과 다양한 효능 외에도 여러 종류의 성분들로 구성되어 있어 단일제제로 다양한 약물작용점에 대해 약효를 발휘 할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 점은 현재의 약물치료로 한계를 겪는 각종 난치성 질환 및 퇴행성 질환에 대한 새로운 치료제로서의 한약제제의 가능성이 새롭게 조명되고 있는 원인으로 평가될 수 있다. 그러나 이러한 난치성 및 만성 질병을 치료할 수 있는 잠재성을 지녔음에도 불구하고, 기원이 불명확한 한약재들로부터 제조된 한약제제의 유통에 따른 안전성과 유효성에 대한 문제들이 지속적으로 제기되고 있는 것도 사실이다. 또한, 산지 및 채집시기, 재배 방법의 차이 등으로 함유성분의 함량이 서로 다른 제품들이 생산·유통되고 있음에도 불구하고 이를 효과적으로 관리할 수 있는 품질관리 기준 및 시험법이 확립되어 있지 않아 국내 생산 한약제제의 품질관리가 어려운 실정이다.

이러한 현실은 미래의 고부가가치산업 및 신성장 동력산

업으로 평가될 수 있는 한약산업의 발전을 저해하는 큰 걸림돌 중의 하나가 되고 있다. 그러므로 국내 한약산업의 육성과 나아가 국내 한약제제의 글로벌 시장 진출을 위한 국제경쟁력 강화를 위해서는 일관된 종류와 함량의 성분이 함유된 한약제제의 생산 및 공급이 필수적이며, 이를 위해 체계적인 품질관리를 통해 한약의 안전성과 유효성을 확보할 표준화 기술의 확립이 절실히 요구되고 있다.

본 연구에서는 한약제제의 품질관리에 대한 새로운 기준을 확립하는데 도움을 주고자 현재 시중에서 판매되고 있는 대표적인 한약제제를 대상으로 지표성분의 함량에 기초한 회사별 품질 차이를 살펴보고자 하였다. 대표적인 한약제제로 황련해독탕 (黃連解毒湯, Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang or Huanglian Jiedu Tang)을 선정하였으며 시중에서 구입할 수 있는 4개 제약회사 제품을 확보하여 시험을 진행하였다.

황련해독탕은 황금 (Scutellariae Radix), 황련 (Coptidis Rhizoma), 황백(Phellodendri Cortex), 치자 (Gardeniae Fructus)로 구성된 대표적인 빈용 한약처방으로 사화해독 (瀉火解毒)하는 효능이 있어 열병을 수반한 하리 (下痢), 습열황달(濕熱黃疸), 토혈(吐血), 불면(不眠) 등의 증상에 사용한다.¹⁾ 또

*교신저자(E-mail): ypjang@khu.ac.kr
(Tel): +82-2-961-9421

한 위장장애, 염증, 뇌허혈로 인한 뇌손상치료와 일시적인 허혈상태로 인한 기억력 및 학습장애에 효과가 있다고 보고되었다.²⁻⁵⁾ 황련해독탕을 구성하는 여러 가지 성분들 중 4개 생약의 지표성분들인 황금의 baicalin, baicalein, 황련 및 황백의 berberine, palmatine, 치자의 geniposide에 대해 HPLC 분석을 이용하여 지표성분 확인 및 함량을 확인하였다. 또한, 추출 정제 등의 전처리 없이 시료의 표면으로부터 직접 함유성분의 분자량을 분석할 수 있는 DART(direct analysis in real time)-MS를 이용하여 과립제로부터 직접 지표성분들을 분석하여 실시간으로 한약제제의 품질을 평가할 수 있는 새로운 방법의 가능성에 대해서도 살펴보았다.

재료 및 방법

시약 및 표준물질 - HPLC 분석을 위해 HPLC grade methanol과 phosphoric acid를 덕산화학 (Ansan, South Korea) 으로부터 구입하였고, HPLC용 물은 water purification system (Model : ABBOTA NEO)을 이용하여 제조된 3차 증류수를 사용하였다. 지표물질인 geniposide는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), baicalein은 Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI)로부터 각각 구입하였으며, baicalin, berberine chloride와 palmatine은 식품의약품안전청으로부터 분양된 표준품을 사용하였다. 실험에 사용된 표준품의 화학구조는 Fig. 1에 나타내었다. 분석에 이용된 황련해독탕은 시중에 유통되는 4개 제약회사(A, B, C, D)의 과립제 제품을 제조사별로 3개씩 구입하여 실험하였다.

표준용액 및 샘플의 조제 - Geniposide, baicalin, baicalein, berberine, palmatine의 표준용액 조제를 위해 각각의 지표성분의 무게를 정확하게 측정하여 100% methanol에 녹이고 단계적으로 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm으로 희석하여 검량선 작성에 이용하였다. 황련해독탕 과립제는 각각 1g을 100% methanol 20ml에 용해시켜 30분간 초음파 추출하여 여과하였다.

HPLC 분석 조건 - HPLC는 W600 pump, 717 auto sampler, 996 PDA로 구성된 Waters system을 사용하였고, Empower[®]

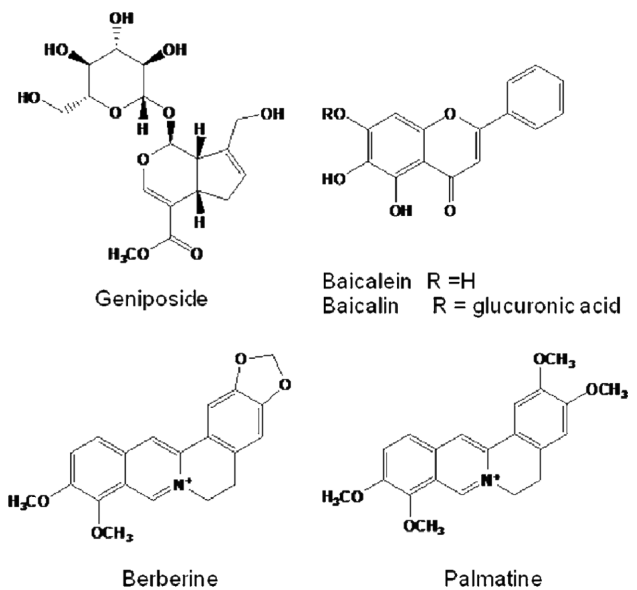


Fig. 1. Chemical structures of five characterizing compounds in Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang.

software를 통해 크로마토그램 data를 처리하였다. 분석에는 Atlantis C18 column (3 μ m, 4.6 mm \times 150 mm)이 사용되었다. 이동상은 methanol과 0.5% phosphoric acid를 포함한 물을 사용하였고 flow rate 1.0 ml/min의 조건에서, methanol을 25%(0-10 min), 25-30%(10-15 min), 30-40%(15-30 min), 40-55%(30-40 min), 55-90%(40-50 min), 90-100%(50-55 min)로 변화시키는 gradient elution system을 적용하였다. UV 검출기의 파장은 254 nm에서 확인하였으며 모든 시료는 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과한 후 10 μ l를 주입하여 분석하였다.

지표성분의 정량 - 5가지의 지표물질의 농도를 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 결과에 따라 calibration curve를 작성하였다. Linear regression equation ($y = ax + b$, a는 직선의 기울기, b는 y절편, x는 시료의 농도, y는 피크의 면적)을 계산하고 correlation coefficient (R^2)를 통해 직선성을 확인하였으며, 검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOQ)는 calibration curve를 통하여 계산하였다 (Table I). 지표성분

Table I. The linear regression equation and correlation coefficient (R^2), limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) of characterizing compounds of Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang

Characterizing compound	Regression Equation ^a	R^2 (n=3)	LOD (μ g/ml)	LOQ (μ g/ml)
Geniposide	$y = 8210x + 12436$	0.994	0.04	0.11
Berberine	$y = 35850x - 67383$	0.998	0.39	1.20
Palmatine	$y = 34218x - 64316$	0.998	0.14	0.42
Baicalin	$y = 20317x + 48009$	0.999	0.36	1.09
baicalein	$y = 40310x + 16383$	0.999	0.22	0.68

^ay : peak area, x : amount (μ g/ml)

함량의 경우 각 성분의 최대 흡수파장을 설정하여 geniposide는 238 nm, berberine과 palmatine은 345 nm, baicalin과 baicalein은 277 nm에서 각각의 피크 면적을 확인하였다. 정밀성을 위하여 분석시료는 하루 동안 3회 반복 분석하였고, 날짜를 변경하여 3회 반복실험을 하여 inter-day와 intra-day의 표준오차를 구하였다.

DART-TOF-MS 분석 조건 - JMS-T100TD와 결합된 DART ion source(Ion Sense, Saugus, MA, USA)를 이용하여 positive ion mode에서 분석하였다. 분석조건은 needle voltage 3200V, electrode 1, 2 voltage 100V, helium gas flow 3 L/min, temperature 250°C, the first orifice lens 15V, ring lens voltage 5V로 각각 설정하였다. 분석을 통해 얻은 분자량 피크는 polyethylene glycol 600(PEG 600)으로 값을 보정하였다. 모든 한약제제 시료는 특별한 전처리 과정 없이 granule을 직접 분석하였다.

결과 및 고찰

황련해독탕 제제의 동시분석 비교 - 알려진 농도의 표준

품을 사용하여 실측된 HPLC UV chromatogram 상의 해당 피크 면적의 결과에 따라 calibration curve를 작성하여 5가지 지표성분에 대한 correlation coefficient (R^2)값을 확인한 결과, 5가지 성분 모두에서 $R^2 > 0.994$ 의 높은 직선성을 나타내었다. 시중에 판매되고 있는 황련해독탕 제제를 동시분석법을 적용하여 본 연구에서 최적화한 조건으로 분석한 결과, geniposide, berberine, palmatine, baicalin, baicalein의 순서로 유출되었으며, 다른 성분들의 피크에 특별한 중첩 등의 간섭 없이 동시 분석이 가능하였다 (Fig. 2).⁷⁻⁸⁾ 시판 황련해독탕 제제의 분석 결과 intra-day 0.30~4.88%, inter-day 0.30~5.01%의 상대표준편차 (RSD%)를 각각 나타내어 통계적으로 신뢰성 높은 결과를 확인할 수 있었으며, 4종의 제제 모두 5가지의 지표물질을 모두 함유하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 개별 성분에 대한 제조회사간의 함량비교에 있어 baicalin을 제외한 3개 성분 모두에서 가장 높은 함량의 제제과 가장 낮은 제제과의 차이가 2배 이상 나타나는 결과를 나타내었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 주요 지표성분의 함량에 따라 생물학적 활성의 차이가 초래된다는 가정하에서는 서로 활성이 상당히 다를 수 있는 제품들이 동

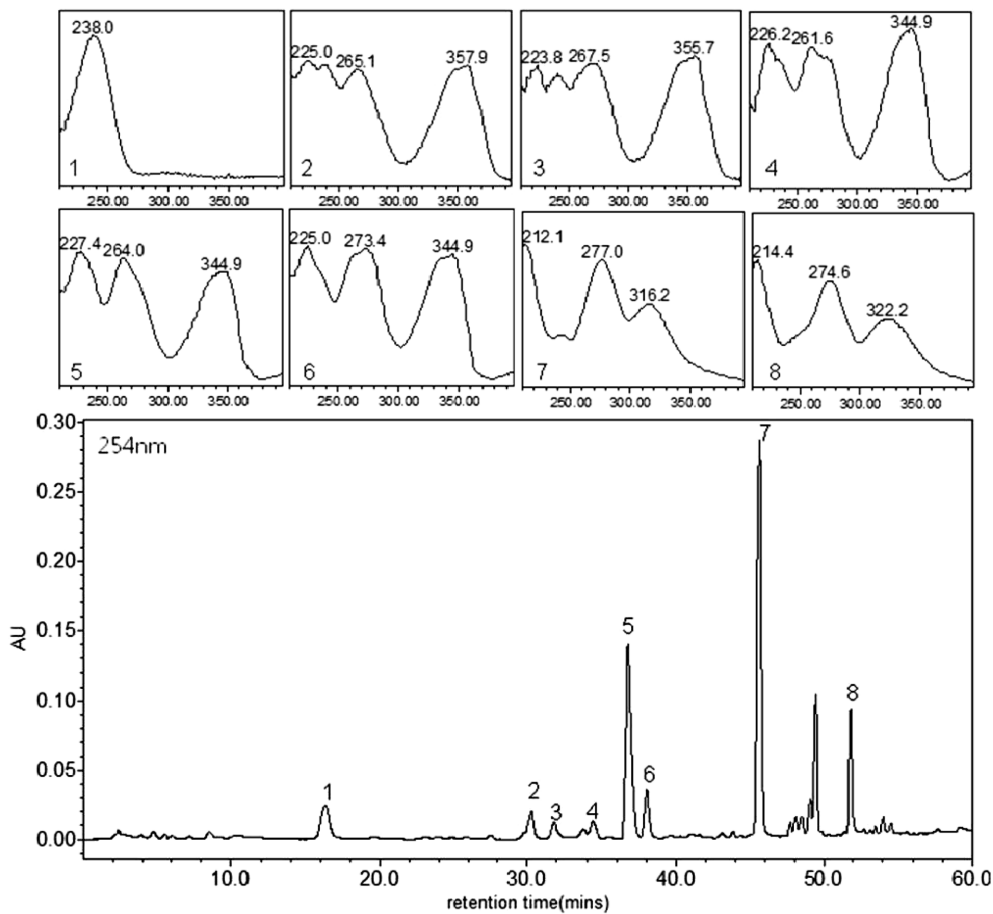


Fig. 2. Representative HPLC chromatogram of Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang. Peak assignment: 1 - geniposide, 2-4 - protoberberine alkaloids, 5 - berberine, 6 - palmatine, 7 - baicalin, 8 - baicalein.

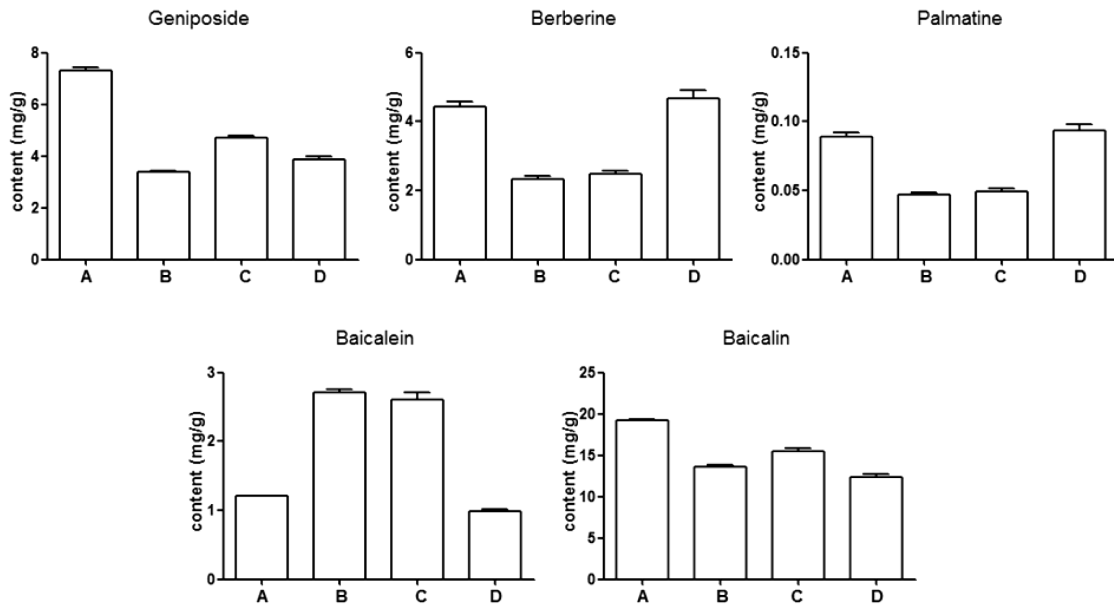


Fig. 3. Contents of five characterizing compounds in commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang from four different vendors.

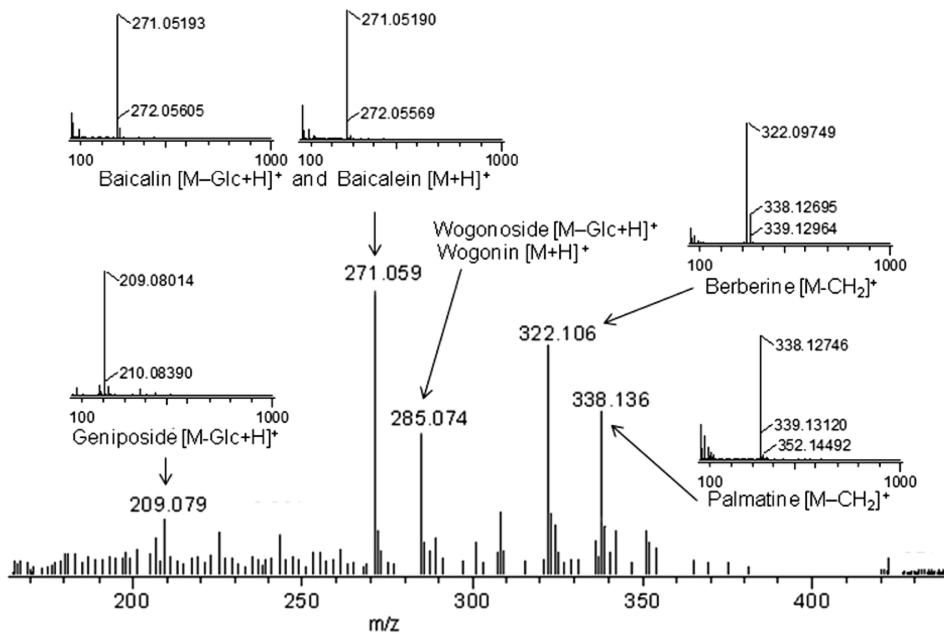


Fig. 4. DART-MS spectra of characterizing compounds and representative DART-MS spectrum of Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang granule.

일한 한약제제로 유통되고 있다는 것을 의미하며, 활성에 관한 대전제를 배제하더라도 주요성분 및 지표성분의 함량이 유의성 있는 차이를 나타내는 제품들이 동일 제제로 유통되고 있는 현실을 보여준다 하겠다. 또한 황백과 황련의 지표성분으로 두 생약에 동시에 함유된 berberine과 palmatine이 설정되어 있어 황련해독탕과 같은 한약제제의 품질관리에 있어 그 정확한 기원을 밝히기 어려운 문제가 발생하게 된다. 이러한 문제들은 황련에만 선택적으로 함유

된 성분을 새로운 지표성분으로 설정하는 등의 새로운 확인시험법의 확립을 통해 해결할 수 있을 것이다. 예를 들어, 황련해독탕의 전체 HPLC 크로마토그램 (Fig. 2)에서 peak 2-4 번에 해당하는 성분들이 기존의 문헌에서 보고된 유출 순서와 해당 UV spectrum의 비교를 통해 jateorrhizine, epiberberine, coptisine임을 알 수 있어 황련의 본 제제생산에 있어서의 사용여부를 확인할 수 있지만 보다 정확한 함량비교를 위해선 coptisine 등의 성분에 대한 표준품 확보를

통해 정량실험이 추가로 진행되어야 할 것이다.⁹⁾

DART-MS를 이용한 황련해독탕 제제로부터 지표성분의 실시간 분석 - 대기압 하에서 별다른 시료의 전처리 없이 시료의 표면으로부터 함유성분을 실시간으로 분석할 수 있는 기기인 DART-MS는 비교적 최근에 개발된 분석기기이다.¹⁰⁾ 정확한 정량적 분석에 취약한 특징을 가지지만, 전수 조사와 같은 다량의 시료에 대한 high-throughput analysis의 장점은 어느 분석기기에서도 구현될 수 없는 DART-MS만의 장점으로 평가되고 있다. 이러한 DART-MS의 특징을 활용하여 시판되는 한약제제의 품질을 실시간으로 평가할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 하였다. 서로 다른 제약회사로부터 제조된 황련해독탕 과립으로부터 각각의 지표성분에 대한 분자량 peaks를 분석한 결과, geniposide ($[M-Glc+H]^+ = 209.079$), baicalin ($[M-Glc+H]^+ = 271.059$), baicalein ($[M+H]^+ = 271.059$), berberine ($[M-CH_2]^+ = 322.106$), palmatine ($[M-CH_2]^+ = 338.136$)의 분자량 peaks를 실시간으로 확인할 수 있었으며 wogonoside ($[M-Glc+H]^+ = 285.074$)와 그 aglycone인 wogonin ($[M+H]^+ = 285.074$)의 존재를 확인할 수 있었다. DART-MS의 이온화 과정도 ESI ion source와 같은 soft한 ionization method에 속하지만 mono-glycoside의 탈락이나 methoxyl group으로부터의 CH_3 가 탈락된 경우가 다른 MS 분석에서 종종 발견되므로,¹¹⁾ 본 실험에서 사용한 조건에서는 이러한 부분적인 fragmentation이 관찰됨도 또한 확인할 수 있었다. (Fig. 4). DART-MS 분석만을 통해서도 실제로 baicalin과 baicalein의 구별, 그리고 wogonoside와 wogonin의 구별이 현실적으로 어렵지만, 다양한 시료로부터 실시간으로 주요 지표성분들의 함유여부를 확인함으로써 제조원료, 제조과정 및 제품상에서의 실시간 품질관리를 위한 분석법으로서의 활용이라는 측면에서는 DART-MS가 강력한 경쟁력을 가짐을 알 수 있다.

결 론

본 실험에서는 시중에 유통되고 있는 황련해독탕 제제를 HPLC-PDA법과 DART-MS 분석법을 통하여 그 지표성분을 확인 및 정량하였다. 그 결과 4개의 서로 다른 제약회사에서 생산되는 황련해독탕의 제품에서 5개의 지표물질의 함량 차이가 유의성 있게 나타났으며, 이를 통해 지표성분의 함량이 서로 균일하지 않는 제품이 동일한 상품으로 유통되고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 최신 분석기기인 DART-MS를 활용하여 다량의 시료로부터 실시간으로 지표성분을 성공적으로 분석할 수 있음을 확인하였고 한약제제 제조과정 전과정에서의 실시간 품질관리를 위한 새로운 분석법으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 서울시 산학협력사업 (10524)의 지원을 통해 수행되었습니다.

인용문헌

1. 김상보, 김선희, 노승현, 박선동, 박성규, 서당일, 서영배, 신순식, 이상인, 이장천, 이태희, 주영승, 최호영 (1999) 방제학, 180. 영림사, 서울.
2. Hwang, Y. S., Shin, C. Y., Huh, Y. and Ryu, J. H. (2002) Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats. *Life Sci.* **71**(18): 2105-2117.
3. Ohta, Y., Kobayashi, T., Nishida, K., Sasaki, E. and Ishiguro, I. (1999) Preventive effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) Extract on the development of stress-induced acute gastric mucosal lesions in rats. *J. Ethnopharmacol.* **67**(3): 377-84.
4. Wang, L. M. and Mineshita, S. (1996) Preventive effects of unsei-in and oren-gedoku-to, Chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**(3): 327-31.
5. Fujiwara, M. and Iwasaki, K. (1993) Toki-shakuyaku-San and Oren-Gedoku-To improve the disruption of spatial cognition induced by cerebral ischemia and central cholinergic dysfunction in rats. *Phytotherapy Res.* **7**: S60-2.
6. Kim, H. J. and Jang, Y. P. (2008) Direct Analysis of Curcumin in Turmeric by DART-MS. *Phytochem. Anal.* **20**(5): 372-377.
7. Kovács, Gy., Kuzovkina, I. N., Szoke, É. and Kursinszki, L. (2004) HPLC Determination of Flavonoids in Hairy-Root Cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chromatographia* **60**: S81-S85.
8. Sun, J., Ma, J. S., Jin, J., Wang, H. S., Wen, Q. H., Zhang, H. G. and Zhou, Q. L. (2006) Qualitative and quantitative determination of the main components of huanglianjiadu decoction by HPLC-UV/MS. *Yao Xue Xue Bao* **41**(4): 380-384.
9. Huang, X. P., Li, L. Y., Qu, X. Y. and Cui, G. L. (2007) Fingerprints of Rhizoma Coptidis from Shizhu by HPLC. *Zhong Yao Cai.* **29**(7): 666-669.
10. Cody, R. B., Laramée, J. A. and Durst, H. D. (2005) Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.* **77**: 2297-2302.
11. Wu, W., Song, F. R., Yan, C. Y., Liu, Z. Q. and Liu, S. Y. (2005) Structural analyses of protoberberine alkaloids in medicine herbs by using ESI-FT-ICR-MS and HPLC-ESI-MSn. *J. Pharmaceutic. Biomed. Anal.* **37**: 437-446

(2010. 8. 18 접수; 2010. 8. 26 심사; 2010. 9. 8 게재확정)