

황련해독탕 중 3종 생리활성 물질의 HPLC-DAD 동시 정량분석법 확립

양혜진 · 원진배 · 마진열* · 마충제#

강원대학교 생물소재공학전공, *한국한의학연구원

(Received September 20, 2010; Revised February 3, 2011; Accepted February 11, 2011)

Simultaneous Analysis of three Marker Components in Hwangryunhaedok-tang by HPLC-DAD

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

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

*TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Abstract — In this study, a high performance liquid chromatography-diode array detector method was established, for simultaneous determination of three compounds, berberine, palmatine and geniposide in Hwangryunhaedok-tang. To develop and validate method, C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm×250 mm) was used with gradient mobile phase, water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and MeOH at the column temperature of 30°C. UV wavelength was set at 230 and 280 nm. Validation of the chromatography method was evaluated by linearity, precision and accuracy test. Calibration curve of standard components showed good linearity ($R^2 > 0.9999$). The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) varied from 0.05 to 0.17 μg/ml and 0.15 to 0.53 μg/ml, respectively. The relative standard deviations (RSDs) data of intra-day and inter-day test were in less than 2.99% and 1.90%, respectively. The results of the accuracy test were in the range of 98.36 to 102.52% with RSDs values 0.32 to 1.98%. The results of validation indicated that this method was a very accurate and sensitive assay.

Keywords □ Hwangryunhaedok-tang, HPLC-DAD, simultaneous determination, validation

한방 제제는 예로부터 축적된 임상 경험을 바탕으로 다양한 질병 치료 및 예방의 목적으로 사용해보면서 그 효능이 검증되었다. 또한 상대적으로 부작용이 적기 때문에 최근 한방 제제에 대한 관심과 수요가 증가함에 따라, 천연물을 이용한 건강 기능성 식품과 같은 의약외품의 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 이와 더불어 천연물 신약 개발 분야에서의 전통적 한방 제제의 중요성이 높아지고 있다. 여러 가지 생약재로 구성되어 있는 한방 제제는 성분이 다양하여 복합적인 효능을 나타내지만 생약재의 기원, 채집 시기 및 산지, 재배 방법 및 공정과정에 따라서 한방 제제의 품질에 변화가 생길 수 있다.¹⁾ 그러므로 한방 제제의 보다 체계적이고 효율적인 품질 관리법의 확립이 요구된다. 최근에 일부 생약재를 중심으로 HPLC를 이용한 각 표준 물질에

대한 개별적인 분석법이 확립되고 있다. 그러나 한방 제제는 다양한 성분이 복합적으로 작용하여 약효가 발현된다.²⁻⁴⁾ 대한약전 수재생약에는 감초의 glycyrrhizin 정량법, 갈근의 puerarin 정량법, 마황의 ephedrine 정량법 등 한방제제가 아닌 구성 생약의 지표성분을 설정하여 개별적으로 분석하고 있다. 이러한 개별적인 분석법은 한가지 구성 생약의 지표성분을 분석하여 품질을 관리할 경우 신속하게 분석할 수 있지만 생약제제에 적용할 경우, 다른 구성 생약의 성분으로 인하여 분석이 영향을 받을 수 있고, 생약제제의 여러 구성 약재의 성분을 각각 분석해야 하므로 시간적, 경제적 손실이 크다. 이에 다양한 성분이 복합적으로 구성된 한방 제제에 대한 다성분 동시분석법이 확립된다면 보다 효율적인 품질 관리를 통해 한방 제제의 품질 향상을 기대할 수 있다.

황련해독탕은 예로부터 열을 내리고 해독작용과 염증치료에 사용된 한방처방으로 중추신경과 교감신경 흥분을 억제하며 항균작용, 진정작용, 혈압강하작용 및 항알러지작용을 한다고 보고되었다.^{5,6)} 황련해독탕의 구성 약재는 황련(*Coptis japonica*), 황

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6565 (팩스) 033-253-6560
(E-mail) cjma@kangwon.ac.kr

금(*Scutellaria baicalensis*) 황백(*Phellodendron amurense*), 그리고 치자(*Schisandra chinensis*)이며, 이들 중 세 가지 구성 약재의 지표 물질인 berberine(황련), palmatine(황백) 및 geniposide(치자)에 대한 효율적인 동시분석법의 확립을 연구하였다. Berberine은 화상치료제, 항균제, 건위제로 이용되며, 뇌신경세포로부터 염증매개 물질 생성억제효과가 보고되었다.⁷⁾ Palmatine은 펠라닌 생합성 억제제의 효과가 보고되었으며 geniposide은 약물성 간중독 및 간보호에 효과가 보고되었다.^{8,9)} 본 연구에서는 HPLC-DAD법을 이용하여 berberine, palmatine, palmatine의 동시분석법을 확립하고 method validation을 통해 유효성을 검증하였으며, 확립한 방법을 황련해독탕 시료의 함량분석에 적용하여 활용가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 시료

본 실험에서 HPLC 분석을 위한 water(J.T. Bake, USA)와

methanol(J.T. Baker, USA)은 HPLC급 용매로 구입하여 사용하였다. 표준 물질로 사용한 berberine과 geniposide는 식품의약품안전청에서 구입하였으며, palmatine은 Sigma-aldrich(USA)에서 구입하였다(Fig. 1). 각 성분은 97% 이상의 순도를 나타냈다.

황련해독탕 조제

황련해독탕은 황련 5g, 황금 5g, 황백 5g, 치자 5g을 총 한약재 무게의 10배에 해당하는 생수에 넣어 1시간 침적한 다음 180분간 열탕 추출 하였다. 황련해독탕 추출물을 농축한 후 동결건조기를 사용하여 분말 형태로 조제하여 분석에 사용하였다.

표준 용액 및 황련해독탕 시료 조제

표준 물질 berberine(310 µg/ml), geniposide(250 µg/ml), palmatine(310 µg/ml)의 무게를 정확히 칭량하여 60% MeOH에 녹인 후 계열 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 또한 황련해독탕 시료(100 mg)는 HPLC 검액으로 사용하기 위하여 정확히 칭량 후 60% MeOH에 녹여 0.45 µm membrane filter 처리 후 분석하였다.

분석 조건의 최적화

시료 분석에 사용된 HPLC(Dionex, Germany) 시스템은 LPG 3X00 pump, ACC-3000 auto sampler, column oven, DAD-3000(RS) diode array UV/VIS detector로 구성되어 있다. 컬럼은 C₁₈ column(5 µm, 4.6 I.D.×250 mm, Phenomenex)이며, 컬럼의 온도는 30°C를 유지하였다. 이동상은 HPLC급 용매로, 0.1% TFA(Trifluoroacetic acid)를 포함한 water(A)와 methanol(B)를 사용하여 분리능을 향상시켰다. 검출기는 UV 230 nm와 280 nm 파장에서 분석하였으며, 유속은 1.0 ml/min로 하였다.¹⁰⁾ 최적화된 이동상 조건은 Table I에 나타내었다.

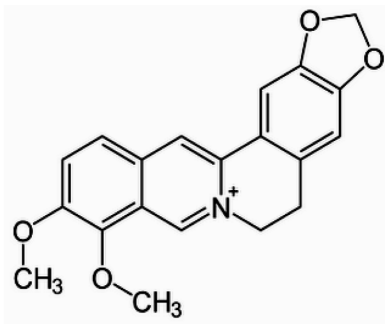
분석법 검증(validation)

본 실험에서 확립된 동시분석법의 검증을 위해 ICH(International Conference on Harmonization) Guideline에 따라 직선성 평가, 검출한계 및 정량한계 측정, 반복 실험을 통한 정밀성 그리고 회수율 시험을 통한 정확성 평가를 실시하였다.¹¹⁻¹³⁾

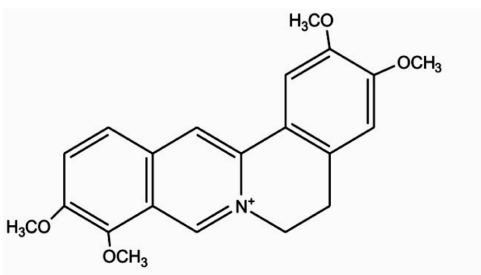
Table I – Gradient elution condition using mobile phase A and B

Time (min)	Solvent	
	A ^a (%)	B ^b (%)
0	80	20
5	70	30
30	65	35
40	60	40
65	70	30
65	80	20

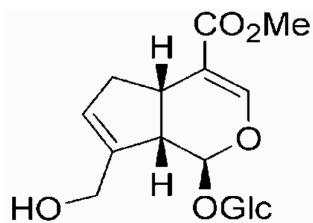
^aA: Water containing 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid).
^bB: MeOH.



Berberine



Palmatine



Geniposide

Fig. 1 – Chemical structures of three bioactive compounds in Hwangryunhaedok-tang.

직선성 평가(Linearity) - 각 표준 용액은 60% MeOH을 사용하여 다섯 가지의 농도($\times 1/5$, $\times 1/10$, $\times 1/20$, $\times 1/40$, $\times 1/80$)로 계열 희석 한 후 혼합하여 HPLC분석을 3회 실시하였다. 분석 결과를 바탕으로 피크 면적(y) 대비 표준 용액의 농도(x, $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 하여 각 표준 물질에 대한 검량선을 작성하였다($y=ax+b$). 작성된 검량선의 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값을 통하여 직선성을 확인하였으며, R^2 값이 0.99 이상인 검량선을 기준으로 지표 성분 함량을 평가하였다.

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 측정 - 대상 분석물질의 최저 검출 농도 및 정량 농도의 확인을 위하여 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 측정하였다. LOD와 LOQ는 각 표준 물질의 표준편차(SD)를 직선의 기울기(Slope)로 나눈 값으로 나타내며, 계산식은 다음과 같다.

$$\text{LOD}=3.3 \times (\text{SD}/\text{slope}), \text{LOQ}=10 \times (\text{SD}/\text{slope}).$$

정밀성 평가(Precision) - 실험 환경 변동에 따른 동일 시료에 대한 분석법의 결과의 변화 정도를 확인하는 것으로, 상대표준편차(RSD%)를 통해 정밀성을 평가한다. 보통 적합한 RSD% 값은 3% 이내이다. 정밀성 평가는 Intra-day test 및 Inter-day test를 통해 검증하였다. Intra-day test는 각 표준 용액을 직선성이 확인된 농도 범위 내의 세 가지 농도로 희석하여 합한 혼합표준용액을 제조 한 후, 하루 내에 5회 반복 측정한 결과의 상대표준편차를 구하여 평가하였다. Inter-day test는 각 표준 용액을 직선성이 확인된 농도 범위 내의 세 가지 농도로 희석하여 합한 혼합표준용액을 제조 한 후 1일, 3일, 5일에 걸쳐 5회씩 반복 측정한 3회 차 결과의 상대표준편차를 구하여 평가하였다.

회수율 시험(Recovery) - 함량이 확인된 시료에 농도를 알고 있는 혼합표준용액을 가한 후 확립된 분석법에 따라 분석하여, 추가된 표준 물질의 양을 확인하는 정확성 평가를 실시하였다. 혼합표준용액을 60% MeOH을 사용하여 직선성이 확인된 구간의 3가지 농도로 희석한 다음 황련해독탕 시료와 혼합한 후, HPLC 분석을 3회 반복 실시하여 추가된 지표 성분의 표준 물질의 회수율을 확인하였다. 회수율의 범위는 90~110%가 이상

적이며, 상대표준편차(RSD%)값을 측정하여 정밀성을 평가하였다.

확립된 동시분석법을 이용한 황련해독탕 시료 분석 - 세 가지 지표 성분인 berberine, palmatine 및 geniposide의 황련해독탕 시료 내 함량 평가에 본 연구에서 확립된 동시분석법을 적용하여, 분석 결과를 바탕으로 효율성을 검증하였다.

결과 및 고찰

최적의 분석 조건 확립

용매의 구성 및 검출 파장에 대한 분석 조건을 검토하여 황련해독탕의 3가지 표준 물질인 berberine, palmatine 및 geniposide에 대한 최적의 동시분석법이 확립되었다. 이동상인 water와 MeOH을 시간대 별로 구성 비율을 달리하고 water에 0.1% TFA를 첨가함으로써 분리능을 높였으며, 검출기 파장은 UV 230 nm, 254 nm, 280 nm 및 330 nm를 적용하였다. 각 표준 물질의 UV spectra 탐색 결과, 최대 UV 흡수 파장을 berberine과 geniposide는 230 nm, palmatine는 280 nm로 설정하여 각 표준 물질의 피크 면적을 측정하였다.

직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

각 표준 물질에 대한 검량선은 피크 면적(y) 대비 표준 용액의 농도(x, $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 하여 작성하였다. 분석 결과 각 표준 물질은 correlation coefficient(R^2)값이 0.9999 이상의 좋은 직선성의 보였으며, 이 직선상의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 각각 0.05~0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.15~0.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위를 나타내어 미량의 성

Table II - The linearity, regression equation, correlation coefficient (R^2), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for three components analyzed by HPLC

Components	Regression equation ^a	R^2 (n=5)	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Berberine	$Y=0.927x-1.279$	0.9999	0.07	0.21
Palmatine	$Y=0.957x-1.028$	1.0000	0.05	0.15
Geniposide	$Y=0.329x-0.076$	0.9999	0.17	0.53

^aY: peak area, x: amount (μg)

Table III - Intra- and inter-day variations of the HPLC method for determination of three marker components

Components	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=3)	
		mean \pm SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD (%)	mean \pm SD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD (%)
Berberine	38.75	37.77 \pm 0.27	0.27	37.38 \pm 0.60	1.60
	19.38	19.12 \pm 0.31	1.62	18.47 \pm 0.20	1.06
	9.69	9.53 \pm 0.15	1.54	9.23 \pm 0.06	0.65
Palmatine	38.75	37.54 \pm 0.05	0.13	38.26 \pm 0.64	1.68
	19.38	18.70 \pm 0.25	1.36	18.77 \pm 0.36	1.90
	9.69	9.44 \pm 0.28	2.90	9.27 \pm 0.05	0.53
Geniposide	25.00	24.27 \pm 0.24	1.00	24.39 \pm 0.37	1.38
	12.50	12.08 \pm 0.07	0.60	12.05 \pm 0.18	1.48
	6.25	6.40 \pm 0.15	2.28	6.24 \pm 0.04	0.62

분까지 검출 및 정량이 가능하였다(Table II).

정밀성 평가

직선성이 확인된 농도 내의 3가지 농도를 기준으로 intra-day test 및 inter-day test를 실시하여, 본 연구에서 확립된 동시분석법의 정밀성을 평가하였다. 분석 결과, intra-day test에서 berberine은 0.27~1.62%, palmatine은 0.13~2.90%, geniposide은 0.60~2.28% 범위의 상대표준편차(RSD%)를 보였으며, inter-day test에서 berberine은 0.65~1.60%, palmatine은 0.53~1.90%, geniposide은 0.62~1.48% 범위의 RSD%를 보였다. 3종 생리활성의 intra-와 inter-day의 RSD%가 3% 이하로 우수한 정밀성을 확인하였다(Table III).

회수율 시험

함량이 확인된 황련해독탕 시료에 농도를 알고 있는 혼합표준 용액을 가한 후 회수율을 평가하였다. 회수율 측정결과, berberine은 98.36~102.52%의 회수율과 1.65~1.98% 이하의 RSD%을, palmatine은 99.07~101.48%의 회수율과 0.86~1.60%의 RSD%

Table IV – Analytical results of accuracy test

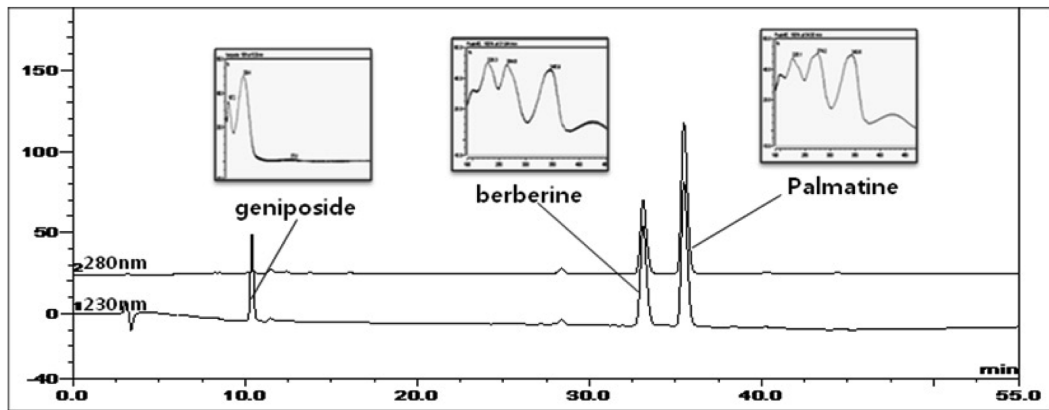
Components	Spiked amount (µg/ml)	Measured amount (µg/ml)	RSD (%)	Recovery ^a (%)
Berberine	19.98	19.29±0.38	1.98	99.57
	10.62	9.93±0.19	1.95	102.52
	5.45	4.76±0.08	1.65	98.36
Palmatine	14.62	19.20±0.16	0.86	99.07
	7.25	9.83±0.19	1.21	101.48
	3.32	4.84±0.08	1.60	99.86
Geniposide	12.7	12.80±0.08	0.63	102.37
	6.07	6.17±0.20	0.32	98.71
	3.06	3.15±0.04	1.39	100.89

^aRecovery (%)=[(amount found-original amount)/amount spiked]×100%

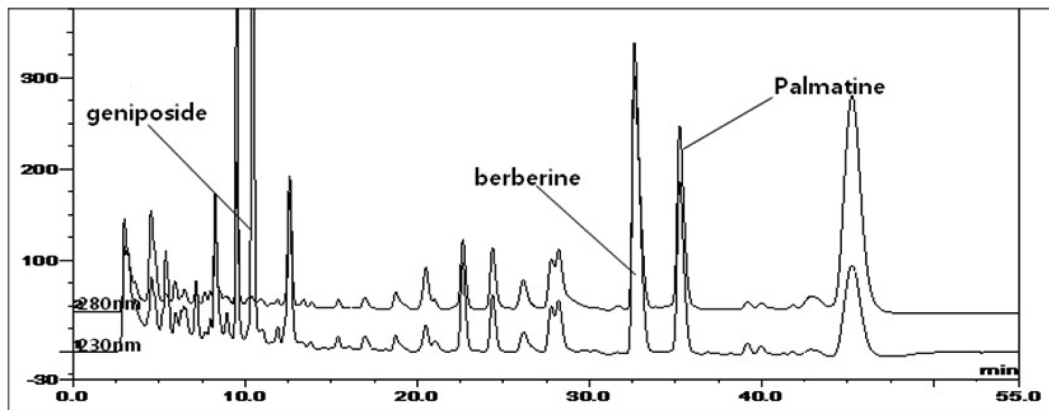
을 나타내었으며, Geniposide은 98.71~102.37%의 회수율과 0.32~1.39%의 RSD% 값을 나타내었다. 회수율 시험을 통해 확립된 분석법이 매우 정확함을 확인하였다(Table IV).

확립된 동시분석법을 이용한 황련해독탕 시료 분석

황련해독탕 시료에 대해 본 연구의 동시분석법을 이용하여 분



(A) Standard mixture



(B) Hwangryunhaedok-tang sample

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

Table V – Contents of three bioactive compounds in Hwangryunhaedok-tang sample

Sample	Contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		
	Berberine	Palmitine	Geniposide
HR ^a	17.42 \pm 0.01	10.08 \pm 0.01	25.12 \pm 0.01

^aHR: Hwangryunhaedok-tang sample.

석한 결과, 황련해독탕의 3가지 지표 성분인 berberine, palmitine 및 geniposide의 피크가 각기 다른 성분들의 피크에 간섭 없이 분석이 가능하였다(Fig. 2). 또한 확립된 동시분석법의 검량선에 근거하여 황련해독탕 시료 내 세 가지 표준 물질의 함량을 모두 확인 할 수 있었다(Table V).

결 론

황련해독탕의 세 가지 표준 물질에 대해 HPLC-DAD를 통한 최적의 동시분석법이 확립되었다. 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정밀성 그리고 회수율 시험을 통하여 본 동시분석법의 효율성 및 정확성을 검증하였다. 또한 확립된 분석법을 황련해독탕 시료에 적용하여 각 표준 물질의 함량을 측정한 결과, 황련해독탕의 세 가지 생리활성 물질인 berberine, palmitine 및 geniposide를 시료 내 다른 성분에 영향 받지 않으면서 동시에 효과적으로 분석 할 수 있었다. 따라서 본 황련해독탕의 동시분석법을 적용함으로써, 기존의 표준 물질들에 대한 개별적인 분석법보다 정확하고 효율적인 품질관리가 가능하게 되었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원(K09040)에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- 1) Normile, D. : Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine. *Science* **299**, 188 (2003).
- 2) Jiang, W.-Y. : Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends. Pharmacol. Sci.* **26**, 558 (2005).
- 3) Wang, Z. G. and Ren, J. : Current status and future direction of Chinese herbal medicine. *Trends. Pharmacol. Sci.* **23**, 347

- (2003).
- 4) Lu, A. P., Jia, H. W., Xiao, C. and Lu, Q. P. : Theory of traditional Chinese medicine and therapeutic method of diseases. *World J. Gastroenterol.* **10**, 1854 (2004).
- 5) Kong, M. J., Ha, N. N., Lee, H. Y., Kim, Y. T., Rho, S. J. and Kim, H. C. : Effect of *Hwangryunhaedok-tang* and its modified prescription on the recovery of spatial cognitive function in the brain ischemia induced by four-vessel occlusion in rats. *Kor. J. Herbology* **19**, 161 (2004).
- 6) Hwang, Y. S., Shin, C. Y., Huh, Y. and Ryu, J. H. : 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**, 2105 (2002).
- 7) Park, Y.-K., Jung, H.-W., Kim, C.-M., Choi, J.-S. and Kim, Y.-S. : Effects of Berberine on the production of inflammatory mediators from LPS-stimulated BV2 microglial cells. *Kor. J. Herbology* **22**, 117 (2007).
- 8) Lee, J.-G., Choi, J.-Y., Oh, J.-S., Jung, H.-W., Choi, E.-H., Lee, H.-S., Kim, J.-A., Chang, T.-S., Son, J.-K. and Lee, S.-H. : Isolation of melanin biosynthesis inhibitory compounds from the phellodendri cortex. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**, 387 (2007).
- 9) Kim, G.-W. and Chung, M.-H. : Protective effects of geniposide and extract of Korean gardeniae fructus - on hepatic injury induced by toxic drugs in rats-. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 368 (1994).
- 10) Klimek, B., Olszewska, M. A. and Tokar, M. : Simultaneous determination of flavonoids and phenylethanoids in the flowers of *Verbascum densiflorum* and *V. phlomidoides* by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **21**, 150 (2009).
- 11) Wei, H., Sun, L., Tai, Z., Gao, S., Xu, W. and Chen, W. : A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schisandra sphenanthera*. *Anal. Chim. Acta.* **662**, 97 (2010).
- 12) Ryu, S. K., Jeon, J.-E., Kang, G. W., Kang, S. S. and Shin, J. H. : Simultaneous analysis of bioactive metabolites from *Lonicera japonica* flower buds by HPLC-DAD-MS/MS. *Yakhak Hoeji* **52**, 446 (2008).
- 13) Cao, X.-Y. and Wang, Z.-Z. : Simultaneous determination of four iridoid and secoiridoid glycosides and comparative analysis of Radix Gentianae Macrophyllae and their related substitutes by HPLC. *Phytochem. Anal.* **21**, 348 (2010).