



Original Article / 원저

## HPLC-PDA을 이용한 이진탕 중 6종 성분의 동시분석

김성실·김정훈·신현규·서창섭\*

한국한의학연구원 한약기초연구그룹

### Simultaneous Analysis of Six Compounds in Yijin-tang by HPLC-PDA

Seong-Sil Kim · Jung-Hoon Kim · Hyeun-Kyoo Shin · Chang-Seob Seo\*

Basic Herbal Medicine Research Group,  
Korea Institute of Oriental Medicine

#### ABSTRACT

**Objectives** : Yijin-tang has been used in the treatment of gastrointestinal diseases such as irritable bowel syndrome, gastritis, and gastric ulcer. In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for simultaneous analysis of six compounds, liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin, 6-gingerol, homogentisic acid, and 3,4-dihydroxybenzaldehyde in Yijin-tang, a traditional Korean herbal medicinal preparation.

**Methods** : A Gemini C18 column was used for the separation of six constituents at 40°C. The mobile phase using gradient elution consist of two solvent systems, 1.0% acetic acid in water (A) and 1.0% acetic acid in acetonitrile (B). The flow-rate was 1.0 mL/min and injection volume was 10 µg. The detector was a photodiode array (PDA) detector set at 254 nm and 280 nm.

**Results** : The calibration curves of six compounds showed good linearity in various concentration ranges ( $R^2 \geq 0.9997$ ). The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were 0.028–0.192  $\mu\text{g/mL}$  and 0.093–0.540  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The RSD (%) of the intra and inter day validations were 0.03–0.84% and 0.05–1.00%, respectively. Recovery was 96.14–101.90% and RSD (%) was less than 1.5%.

**Conclusions** : The established simultaneous analysis methods will help management to improve the quality of Yijin-tang.

**Keyword** : Yijin-tang, HPLC-PDA, Validation, Simultaneous determination

## I. 서 론

최근 성분분석 기술의 발달에 힘입어 여러 성분을 동시에 분석하는 방법이 개발되고 있고,<sup>1,2)</sup> 이를 바탕으로 처방 내 존재하는 다양한 성분을 동시에 분석하는 방법이 발전하고 있는 추세이다. 따라서 한약처방에 대한 성분 분석 검증에 대한 필요성이 제기되고 있다.<sup>3,4)</sup> 이에 따라 痰飲으로 인해 기침, 구토, 메스꺼움 및 가슴이 두근거리는 것을 치료하는 처방<sup>5)</sup>인 二陳湯의 성분에 대한 품질관리를 제시하고자 본 실험을 시행하였다.

二陳湯은 『太平惠民和劑局方』<sup>6)</sup>에 최초로 수록된 처방으로 陳皮, 茯苓, 半夏 및 甘草로 구성이 되어 있다. 二陳湯은 소화기관의 운동을 강화시켜 구토와 구역을 완화시키고, 기관지점막의 부종을 완화하여 기침을 멎게하고 가래를 없애주는 것으로 보고되었다.<sup>7)</sup> 최근까지 二陳湯의 연구로는 二陳湯 물 추출물의 위점막 보호, 항염증, 항산화효과, 급성 알콜성 위궤양, 소화기능 향상, 모세혈관 수축작용, 혈압상승작용 및 위액분비억제에 의한 항 위궤양효과 등이 보고되었다.<sup>8-12)</sup>

본 연구에서는 二陳湯의 구성약재 중 반하의 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 진피의 hesperidin, 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 및 생강의 6-gingerol 등 6종 성분에 대하여 광다이오드 어레이 (photodiode array, PDA)

검출기가 결합된 고성능액체크로마토그래피 (high-performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 성분의 정량과 품질관리 방법을 확립하기 위해 동시분석을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 二陳湯의 구성 한약재인 甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)와 半夏 (*Pinellia ternate*)는 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 구입하였다. 生薑 (*Zingiber officinale*), 茯苓 (*Poria cocos*) 및 陳皮 (*Citrus unshiu*)는 (주)옴니허브 (Yeongcheon, Korea)에서 구입하였다. 본 실험에 사용된 二陳湯 구성생약은 전문가의 확인을 받은 후 사용하였으며, 시료는 한국한의약연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

### 2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 표준품 liquiritin과 6-gingerol은 (주)천연물화학 (Daejeon, Korea)과 Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan)에서 각각 구입하였다. Glycyrrhizin과 hesperidin은 Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, China)에서 구입하였으며, homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이들 표준품의 순도는 모두 98.0% 이상이었다.

HPLC 분석을 위한 water와 acetonitrile은 J.T.

\*교신저자 : 서창섭, 대전시 유성구 유성대로 1672 한국한의약연구원 한약기초연구그룹

· Tel : 042-868-9361

· Fax : 042-864-2120

· Email : csseo0914@kiom.re.kr

•접수 2013/04/19 •수정 2013/04/29 •채택 2013/04/30

Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며 acetic acid는 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 분석을 위해 사용한 HPLC는 펌프 (LC-20AT), on-line degasser (DGU-20A3), 컬럼 오븐 (CTO-20A), autosampler (SIL-20AC) 및 PDA 검출기 (SPDM20A)로 구성된 HPLC LC-20A 시스템 (Shimadzu Co, Kyoto, Japan)을 사용하였다. 분석 data처리에는 LCsolution software (Version 1.24, Kyoto, Japan)을 이용하였다.

### 3. 표준액의 조제

Liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin, 6-gingerol, homogentisic acid 및 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 무게를 정확히 칭량하여 methanol에 녹여 사용하였다. 6종 모두 1.0 mg/mL의 농도로 조제하여 냉장보관한 후 사용 전에 희석하여 사용하였다.

### 4. 검액의 조제

二陳湯의 구성약재인 甘草 (1.88 g), 半夏 (7.50 g), 生薑 (3.75 g), 茯苓 (3.75 g) 그리고 陳皮 (3.75 g)를 배합하여 추출기 (Cosmos 660, Inchon, Korea)에 추출하였다. 물의 양은 약재 양의 10배로 첨가하여 100°C에서 2시간 전탕하였다. 전탕 후 동결 건조하여 3.81 g의 시료를 제조하였다 (수율 18.5%). 동시분석을 위해 동결 건조된 二

陳湯 추출물 200 mg을 정확히 칭량하여 물을 넣어 20 mL로 맞춘 후 0.2 µm membrane (Woongki Science, Seoul, Korea)로 여과하여 검액으로 사용하였다.

### 5. 분석조건

二陳湯의 주요 성분인 liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin, 6-gingerol, homogentisic acid 및 3,4-dihydroxybenzaldehyde (Fig. 1)를 분석하기 위하여 Shimadzu사의 LC-20A 시스템을 사용하여 분석하였고 6종 성분의 분리를 위해 Gemini C18 (5 µm, 4.6 × 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였으며 칼럼 온도는 40°C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 하였고 시료는 10 µL주입하였다. 6종 성분의 검출은 PDA 검출기를 이용하여 254 nm와 280 nm의 파장에서 분석하였다. 이동상은 Table 1에서와 같이 기울기용매 조건으로 최적의 분리조건을 확립하였다.

### 6. 분석법 검증

확립된 동시분석법에 대하여 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 재현성, 회수율 및 정밀성 등을 통해서 동시분석법의 검증을 실시하였다.

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계

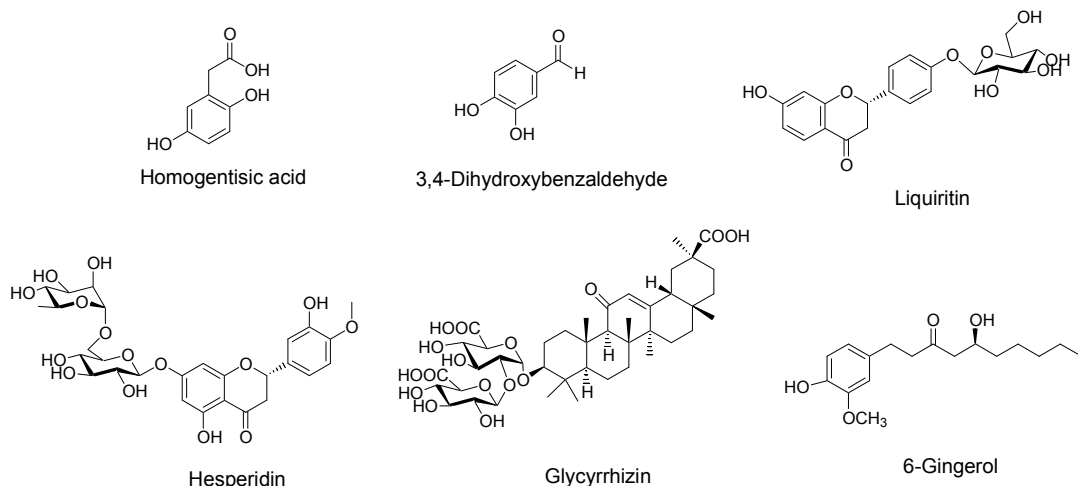


Fig. 1. Chemical structures of six compounds in Yijin-tang.

Table 1. Solvent Gradient Conditions for HPLC-PDA Analysis

Final time (min)	Solvent A*	Solvent B†
0	90	10
35	35	65
45	0	100
50	0	100
55	90	10
70	90	10

\*A: 1.0% acetic acid in water, †B: 1.0% acetic acid in acetonitrile

직선성의 평가를 위해서 표준물질 homogentisic acid는 0.39–50.00 µg/mL, 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 0.16–20.00 µg/mL, liquiritin은 0.78–100.00 µg/mL, hesperidin은 2.34–300.00 µg/mL, glycyrrhizin은 1.56–200.00 µg/mL 및 6-gingerol은 0.16–20.00 µg/mL의 범위에서 3회 반복 실험하였다. 분석된 결과를 토대로 y축은 피크면적, x축은 표준물질의 농도로 검량선을 작성하였다. 검량선 ( $y=ax+b$ )은 면적을 이용하여 계산하였고, 상관계수 ( $R^2$ ) 값을 통해서 직선성을 확인하였다. 검출한계와 정량한계는 분석 물질의 검출 및 정량이 가능한 농도를 확인하기 위해 신호 대 잡음비로 3과 10을 기준으로 계산하였다.

#### (2) 재현성

표준용액을 이용하여 시료 변화에 따른 기계의 변화를 보기 위하여 재현성은 5회 반복 주입을 통해 peak의 면적과 머무름 시간의 재현성을 확인하였다.

#### (3) 회수율 시험

정확성 평가는 회수율 시험을 통해 검증하였으며, 회수율 시험은 二陳湯 시료에 liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin 및 6-gingerol을 3가지 농도로 첨가하여 분석을 통해 평가하였다. 二陳湯 시료 200 mg을 정밀하게 달아 주요성분 liquiritin의 최종 농도 8, 19 및 38 µg/mL, glycyrrhizin의 최종농도 10, 25 및 50 µg/mL,

hesperidin의 최종농도 20, 50 및 100 µg/mL 및 6-gingerol의 최종농도 1, 2 및 4 µg/mL가 되도록 첨가하여 검액과 동일하게 전처리하였다. 회수율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{회수율}(\%) = (\text{표준품 첨가된 시료의 양} - \text{표준품 첨가되지 않은 시료의 양}) / \text{첨가한 시료의 양} \times 100$$

#### (4) 정밀성

동일 시료에 실험 환경 및 기타 외부요인으로 인한 변화 정도를 확인하기 위하여 균일한 검체를 여러 번 반복 측정하여 측정값의 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD)를 구하여 정밀성을 판단했다. 정밀성 평가는 일내와 일간시험을 통하여 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 분석조건의 확립

二陳湯의 구성 약재 중 陳皮의 주요성분인 hesperidin, 甘草의 liquiritin과 glycyrrhizin, 生薑의 6-gingerol 및 半夏의 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde에 대한 동시분석법을 확립하고자 시간대 별로 용매 구성 비율을 달리 하여 6가지 지표성분의 동시 정량 분석법을 확립하였다. 이동상에 1.0% 초산을 첨가하여 꼬리 끌림 (tailing)현상을 줄이고 분리능을 높이고자 하였다. 그 결과 6종의 성분이 35분 이내에 모두 분리되었다. 각 성분의 최적의 PDA 검출 파장으로 254 nm와 280 nm를 선정하여 검출하였다. 각 성분의 peak의 retention time과 UV spectra를 비교하여 6종의 지표성분을 확인하였다. 확립된 분석법에 의해 homogentisic acid는 5.38분, 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 9.17분, liquiritin은 14.45분, hesperidin은 16.75분, glycyrrhizin은 30.39분, 6-gingerol은 31.54분에서 각각 검출되었다 (Fig. 2).

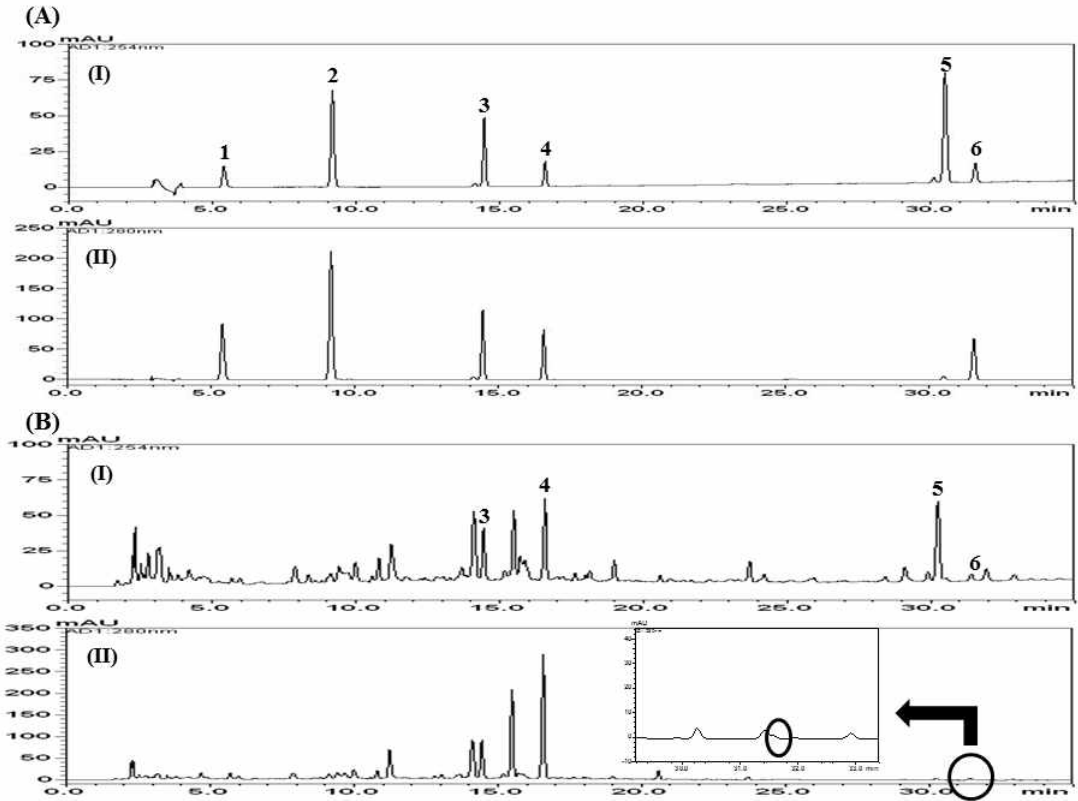


Fig. 2. HPLC chromatogram of a standard mixture (A) and Yijin-tang (B) at 254 nm (I) and 280 nm (II). Homogentisic acid (1), 3,4-dihydroxybenzaldehyde (2), liquiritin (3), hesperidin (4), glycyrrhizin (5), and 6-gingerol (6).

## 2. 二陳湯의 확립된 동시분석법 검증

### (1) 직선성, 검출한계 및 정량한계

확립된 분석법을 토대로 peak area값과 농도를 이용해 검량선을 작성한 결과, 상관계수 ( $R^2$ )는 0.9997 이상으로 매우 양호한 직선성을 보였다. 검출한계와 정량한계는 0.028–0.192  $\mu\text{g/mL}$ 와 0.093–0.540  $\mu\text{g/mL}$ 로 각각 나타났다 (Table 2).

### (2) 재현성 평가

二陳湯의 homogentisic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, liquiritin, hesperidin, glycyrrhizin 및 6-gingerol의 retention time과 peak area 값을 측정된 결과 6종 성분 대한 RSD (%) 값이 0.3% 및 1.05% 이내로 양호한 재현성을 나타냈다 (Table 3).

Table 2. Calibration Curve, UV Wavelength, Linear Ranges, LOD, and LOQ of The Six Compounds

Compound	UV (nm)	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope	Intercept	R2	LOD* ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ† ( $\mu\text{g/mL}$ )
Homogentisic acid	280	0.39-50.00	7617.16	1201.58	1.0000	0.164	0.546
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	280	0.16-20.00	44446.41	2140.37	1.0000	0.028	0.093
Liquiritin	280	0.78-100.00	15843.78	5047.46	1.0000	0.062	0.206
Hesperidin	280	2.34-300.00	17306.90	34306.60	0.9997	0.055	0.184
Glycyrrhizin	254	1.56-200.00	7054.21	4765.25	1.0000	0.144	0.480
6-Gingerol	280	0.16-20.00	5820.81	397.28	1.0000	0.192	0.640

\*LOD: limits of detection, †LOQ: limits of quantification

Table 3. Repeatability of Six Compounds in Yijin-tang

Retention time (min)						
NO. (#)	Homogentisic acid	3,4-Dihydroxybenzaldehyde	Liquiritin	Hesperidin	Glycyrrhizin	6-Gingerol
1	5.381	9.182	14.443	16.567	30.294	31.539
2	5.389	9.168	14.448	16.569	30.377	31.547
3	5.364	9.152	14.451	16.569	30.411	31.540
4	5.396	9.164	14.460	16.581	30.423	31.547
5	5.380	9.164	14.448	16.572	30.424	31.542
Mean	5.38	9.17	14.45	16.57	30.39	31.54
SD	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.00
RSD (%)	0.22	0.12	0.04	0.03	0.18	0.01

Peak area (mAU)						
NO. (#)	Homogentisic acid	3,4-Dihydroxybenzaldehyde	Liquiritin	Hesperidin	Glycyrrhizin	6-Gingerol
1	378777	880075	1570447	5138560	1398561	115519
2	381491	889091	1586619	5191365	1413436	116541
3	385475	901275	1607300	5251360	1431354	118311
4	385754	899334	1602554	5241496	1428181	118148
5	385752	896578	1600608	5229781	1426908	117944
Mean	383449.80	893270.60	1593505.60	5210512.40	1419688.00	117292.60
SD	3177.38	8708.72	15014.39	46215.69	13654.60	1214.88
RSD (%)	0.83	0.97	0.94	0.89	0.96	1.04

(3) 회수율 시험

분석법의 정확성을 측정하기 위해 확인된 표준 물질 (liquiritin, hesperidin, glycyrrhizin 및 6-gingerol)을 3가지의 농도로 성분이 확인된 二陳湯시료에 첨가하여 회수율시험을 시험한 결과, liquiritin은 97.34-99.58%, hesperidin은 96.17-96.43%, glycyrrhizin은 98.57-101.90% 및 6-gingerol은 96.94-99.76% 범위로 나타났다. RSD (%)는 모두 1.5% 이하로 나타났다 (Table 4).

(4) 정밀성 평가

동일한 시료의 변이성과 반복성을 측정하기 위해 직선성의 농도구간 중 시료의 농도 3개를 5회 반복하여 일내와 일간의 정밀성을 평가한 결과, 일내의 RSD (%)는 0.03-0.84%, 일간의 RSD (%) 값은 0.05-1.00%로 나타났다. 일내와 일간의 RSD (%) 값이 모두 1.6% 이하로 양호한 정밀성을 확인하였다 (Table 5).

3. 二陳湯의 HPLC 함량분석

확립된 분석법을 이용해 二陳湯의 6가지 지표 성분에 대하여 동시분석을 수행하여 함량을 확인하였다. 동결 건조된 시료에 대하여 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 검출이 되지 않았으며, liquiritin은 4.22-4.38 mg/g, glycyrrhizin은 6.67-6.70 mg/g, hesperidin은 10.77-10.92 mg/g 및 6-gingerol은 0.10-0.14 mg/g으로 검출되었다 (Table 6).

IV. 결 론

본 연구는 濕痰으로 인한 증상을 치료하는 대표적 처방인 二陳湯의 homogentisic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, liquiritin, hesperidin, glycyrrhizin 및 6-gingerol 등 6종 성분에 대해 HPLC-PDA를 이용하여 동시분석법을 확립하였다. 6종 성분에 대해 UV 최대 흡광도 및 정량 한계농도 등을 고려하여 최적의 UV 파장은 254 nm



Table 4. Recovery of Four Marker Compounds (n=3)

Compounds	Original Conc.* ( $\mu\text{g/mL}$ )	Spiked Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Detected Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	SD	RSD (%)
Liquiritin	44.69	8.00	52.66	99.58	0.69	0.69
		19.00	62.96	97.34	1.32	1.36
		38.00	82.13	98.52	0.34	0.34
Hesperidin	110.52	20.00	129.80	96.37	0.74	0.77
		50.00	158.74	96.43	0.21	0.22
		100.00	206.69	96.17	0.70	0.73
Glycyrrhizin	66.05	10.00	75.90	98.57	1.08	1.10
		25.00	91.06	100.05	0.40	0.40
		50.00	117.00	101.90	0.22	0.21
6-Gingerol	1.53	1.00	2.52.00	99.05	1.65	1.67
		2.00	3.47.00	96.94	0.96	0.99
		4.00	5.52.00	99.76	1.38	1.38

\*Conc: concentration

Table 5. Precision of Four Marker Compounds (n=5)

Compounds	Spiked Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day			Inter-day		
		Observed Conc.* ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	Precision (RSD %)	Observed Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	Precision (RSD %)
Liquiritin	8.00	8.24	0.05	0.63	8.16	0.06	0.74
	19.00	18.57	0.06	0.32	18.64	0.07	0.35
	38.00	38.17	0.02	0.05	38.15	0.02	0.06
Hesperidin	20.00	19.88	0.07	0.33	20.00	0.09	0.46
	50.00	50.19	0.21	0.42	50.09	0.25	0.49
	100.00	99.93	0.12	0.12	99.95	0.13	0.13
Glycyrrhizin	10.00	9.90	0.02	0.21	9.88	0.05	0.51
	25.00	24.68	0.03	0.12	24.74	0.03	0.13
	50.00	50.18	0.02	0.03	50.15	0.02	0.05
6-Gingerol	1.00	1.00	0.01	0.84	1.01	0.01	1.00
	2.00	1.98	0.01	0.45	1.96	0.01	0.62
	4.00	4.01	0.01	0.13	4.02	0.01	0.24

\*Conc: concentration

Table 6. Contents of Six Compounds in Yijin-tang (n=3)

Batch	Compound								
	Homogentisic acid			3,4-Dihydroxybenzaldehyde			Liquiritin		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
1	ND*	-	-	ND	-	-	4.38	0.02	0.37
2	ND	-	-	ND	-	-	4.22	0.01	0.12
3	ND	-	-	ND	-	-	4.35	0.01	0.30

Batch	Compound								
	Hesperidin			Glycyrrhizin			6-Gingerol		
	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
1	10.92	0.01	0.05	6.70	0.01	0.09	0.14	0.00	1.62
2	10.77	0.01	0.08	6.67	0.01	0.11	0.10	0.00	3.52
3	10.89	0.01	0.08	6.70	0.00	0.06	0.13	0.00	3.56

\*ND: Not detected

및 280nm에서 분석을 하였다. 또한, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정밀성 등의 실험을 통하여 분석법에 대한 검증을 실시하였다. 이러한 동시분석법 확립을 통해 한약처방의 품질관리에 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘한약 처방의 과학적 근거기반 구축사업 (K13030)’에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Kang DH, Row KH. Fractionation of soybean phospholipids by preparative high-performance liquid chromatography with sorbents

of various particle size. *J Chromatogr A.* 2002;949:217-23.

- Park YK, Row KH, Chung ST. Adsorption characteristics and separation of taxol from yew tree by NP-HPLC. *Sep Purif Technol.* 2000;19:27-37.
- Choi SM, Chung HJ, Yoon YS, Lee MY, Choi HS, Sung HJ. Studies on the administration of the quality of herbal medicine. *J Korean Oriental Med.* 2000;21:99-112.
- Choi JG. Studies on standard analysis method for herbal (oriental) medicine. *Globalhealth-care Co LTD.* 2009.
- Hur J. *Donguibogam.* Seoul:Namsandang. 2007:134.
- Jin SM. *Taepunhyemin-whajegugbang.* Beijing:People's Medical Publishing House. 1985:141.
- Lee JK, Seo CS, Jung DY, Kang KS, Shin





- HK. Systematic studies on Yijin-tang(Erchen-tang) for establishment of evidence based medicine. *J Orient Neuropsychiatry*. 2010;21:77-86.
8. Ji HC, Baek TH. A comparative study of Pyeongwi-san, Ijin-tang and Pyeongiintang extracts on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in mice. *J Korean Oriental Med*. 2011;32:102-17.
9. Shin IS, Lee MY, Seo CS, Lim HS, Ha HK, Shin HK. Yijin-tang, an oriental herbal formula reduces ethanol-induced acute gastric injury in rats. *J Appl Biol Chem*. 2012;55:197-204.
10. Fumihiko K, Shin I, Yuhki S, Hiroki I, Masaharu T. The effect of nichin-to on plasma gut-regulatory peptide level in healthy human subjects. *J Health Sci*. 2005;51:172-7.
11. Hong ND, Chang IK, Ryu SK, Kim CM. Studies on the efficacy of combined preparation of crude drugs. *Kor J Pharmacogn*. 1985;16:26-31.
12. Hong ND, Chang IK, Kim JW, Ryu SK, Kim NJ. Studies on the efficacy of combined preparation of crude drugs (XXII) - effects of Yijin-tang on the digestive system and isolated uterus. *Kor J Pharmacogn*. 1985;16:73-80.
10. Fumihiko K, Shin I, Yuhki S, Hiroki I, Masaharu T. The effect of nichin-to on plasma gut-regulatory peptide level in healthy human subjects. *J Health Sci*. 2005;51:172-7.