

# 신바로 약침의 한약재 확인시험 및 HPLC-DAD를 통한 표준화 연구

이진호, 김민정, 이재웅, 김미령, 이인희, 김은지\*

자생의료재단, 척추관절연구소



## [Abstract]

### A Study on Standardization of *Shinbaro* Pharmacopuncture Using Herbal Medicines Identification Test and HPLC-DAD

Jin Ho Lee, Min Jeong Kim, Jae Woong Lee, Me Riong Kim, In Hee Lee and Eun Jee Kim\*

Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation

**Objectives** : The present study was an evaluation and standardization of herbal components in order to establish the efficacy and safety of *Shinbaro* pharmacopuncture.

**Methods** : Among the raw materials of *Shinbaro* pharmacopuncture, the components *Cibotii Rhizoma*, *Eucommiae Cortex*, and *Ledebouriellae Radix* were assessed through ingredient verification experiments using thin-layer chromatography(TLC) and ultraviolet rays(UV) lamps. In addition, we standardized *Acanthopanax Cortex* and *Achyranthis Radix* through validation using high performance liquid chromatograph-diode array detector(HPLC-DAD).

**Results** : As result appeared a blue-white fluorescence under ultraviolet rays; changed to dark green after adding 1 % ferric chloride solution(due to *Cibotii Rhizoma*), and presented a yellow-green fluorescence when mixed with an ethyl ether under UV lamps by way of the ethyl ether layer, confirming *Eucommiae Cortex*, *Ledebouriellae Radix* was confirmed as dark brown spots at  $R_f$  values of 0.56 and 0.71 using TLC. Additionally, *Acanthopanax Cortex* and *Achyranthis Radix* HPLC test results showed that linearity was  $R^2 \geq 0.99$ , and detection limit and quantitation limit were 0.23 to 1.29  $\mu\text{g/mL}$ , and 0.71 to 3.90  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Furthermore, precision and accuracy were confirmed to have relative standard deviation(RSD) values of 0.10 to 1.89 % and 96.19 to 103.72 %, respectively. *Shinbaro* pharmacopuncture did not have any overlapping or interference from other peaks in detection under the above-mentioned analysis conditions.

**Conclusions** : In conclusion, we confirmed that maintenance of *Shinbaro* pharmacopuncture validity was possible by means of quality control of *Cibotii Rhizoma*, *Eucommiae Cortex*, and *Ledebouriellae Radix* through ingredient identification and *Acanthopanax Cortex* and *Achyranthis Radix* through high performance liquid chromatograph(HPLC) analysis. Further, we hope to contribute to the development strategy of herbal industry acupuncture.

#### Key words :

*Shinbaro*  
 pharmacopuncture;  
 Pharmacopuncture;  
 Standardization;  
 Detection test;  
 HPLC

Received : 2015. 03. 10.

Revised : 2015. 05. 27.

Accepted : 2015. 06. 01.

On-line : 2015. 06. 20.

\* Corresponding author : Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation, 5 Eonju-ro 170-gil, Gangnam-gu, Seoul, 135-896, Republic of Korea  
 Tel : +82-2-3218-2152 E-mail : letmelove57@hanmail.net

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*The Acupuncture* is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (<http://www.TheAcupuncture.org>)

Copyright © 2014 KAMMS, Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

## I. 서 론

신바로약침은 생약복합제인 GCSB-5(청파전)의 근간이 되는 약재들을 바탕으로 개발된 약침이다. 'GCSB-5'는 자생한방병원의 골관절질환 치료한약인 '청파전'에 포함된 6가지 약재(구척·방풍·두충·가피·우슬·대두황권) 혼합물이 정제된 추출물로서 항염증, 신경재생, 연골보호 등의 효과를 보인다고 알려져 있다<sup>1-4</sup>. 이를 바탕으로 신바로약침은 구척(狗脊, *Cibotii Rhizoma*)·식방풍(植防風, *Ledebouriellae Radix*)·두충(杜冲, *Eucommiae Cortex*)·오가피(五加皮, *Acanthopanax Cortex*)·우슬(牛膝, *Achyranthis Radix*)·오공(蜈蚣, *Scolopendra subspinipes mutilans*)·강활(羌活, *Ostericum koraenum(Max) Kitagawa*)·독활(獨活, *Aralia contientalis*), 그리고 작약(芍藥, *Paeonia lactiflora*) 등으로 총 9가지 약재로 만들어졌으며, 이중 GCSB-5(청파전)에서 효능이 있었던 약재들을 이용해 연구를 하였다.

구척은 금모구척(金毛狗脊) *Cibotium barometz* J. SMITH(구척과 Dicksoniaceae)의 뿌리줄기로 냄새가 거의 없으며 맛은 담담하고 약간 뽀다<sup>5</sup>. 주로 뼈와 관절질환 치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 오랫동안 중요한 약재로 사용되어 왔지만 《대한약전》에는 아직까지 구척의 지표성분이나 분석 방법이 수재되어 있지 않다<sup>6</sup>.

식방풍은 갯기름나무 *Peucedanum japonicum* THUNBERG(산형과 Umbelliferae)의 뿌리로 특유한 냄새가 있고 맛은 부드럽고 약간 쓰며, 두통, 중풍, 해열, 신경통에 주요한 효능이 있다<sup>5</sup>. 구성성분은 Coumarin계인 peucedanol-7-O-β-D-glucopyranoside, hyuganin C, 3',4'-disenecioylkhellactone 등의 성분을 함유하고 있어 물추출물은 알레르기 면역반응 매개물질들의 분비를 감소시키고 폐 조직 내 염증반응을 억제함으로써 기관지 천식을 개선하는 효능이 있다<sup>7,8</sup>.

두충은 *Eucommia ulmoides* OLIVER(두충과 Eucommiaceae)의 줄기껍질로서 주피를 제거한 것이므로 정량할 때 환산한 건조물에 대하여 pinoresinol diglucoside 0.05% 이상을 함유하며, 특유한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰다<sup>5</sup>. 두충의 효능은 간과 신장을 보호하며 조골세포의 기능을 향상시키는 동시에 파골세포의 기능을 억제하여 골 흡수와 관련된 질환 예방, 콜레스테롤 저하 및 혈압강하 작용, 진통, 항암, 항산화 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>9-11</sup>.

오가피는 오갈피나무 *Acanthopanax sessiliflorum* SEEMSEN 또는 기타 동속식물(두릅나무과 Araliaceae)의 뿌리껍질 및 줄기껍질로서 특유한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰다<sup>5</sup>. 지질 개

선 및 고지혈증에 대한 개선 효과와 항산화 효과가 있으며, 골다공증 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>12,13</sup>.

우슬은 쇠무릎 *Achyranthes japonica* NAKAI 또는 우슬 *Achyranthes bidentata* BLUME(비름과 Amaranthaceae)의 뿌리이며 약간의 특유한 냄새가 있고 맛은 약간 달고 점성이 있다. 진통, 진경효과, 이뇨, 항알레르기, 항산화, 항관절염 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>14,15</sup>.

이처럼 약침의 원료는 자연조건에서 자라나는 천연물이며, 다양한 한약재가 복합으로 들어있는 복합제제이기 때문에 약효와 관련되는 성분이 분해되거나 변화가 일어날 가능성도 배제할 수 없을 것이다. 그러므로 약침을 조제할 때는 lot 간 동등성, lot 내 균질성 및 동일처방 유사품과의 유사도(similarity)를 확인하는 것이 매우 중요하며, 체계적이고 효율적인 품질관리를 위해 모니터링을 하기 위한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 신바로약침 중 GCSB-5(청파전)에 근간이 되는 대표적인 약재인 구척·식방풍·두충에 대한 한약재 확인시험법과 high performance liquid chromatography-diode array detector(HPLC-DAD)를 통한 오가피와 우슬에 대해 표준화 작업에 대한 연구를 하여 품질관리의 기초자료로 사용하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 신바로약침의 조제방법

신바로약침의 약재인 구척·식방풍·두충·오가피·우슬 등 총 9가지 약재 총 150 g을 넣고 70% 주정을 이용하여 3시간 동안 환류 추출하였다. 이때, 추출에 사용된 물은 water purification system(Model: ABBOTA NEO)을 이용하여 제조된 3차 증류수를 사용하였다. 추출액 여과 후 여액을 감압 농축하였다. 농축된 추출물을 80% 및 90% 주정을 이용하여 알코올 수침을 통해 정제하였으며 정제된 추출물은 여과 후 동결 건조하여 약침의 원료로 사용하였다. 정제된 약침 원료를 정제수에 녹이고 121 °C에서 15분 멸균하여 사용하였다.

### 2. 신바로약침에 대한 물질 확인 시험

신바로약침의 약재 중 구척·두충·식방풍에 대한 확인시험은 《대한약전외한약(생약)규격집》의 각 항목별 확인시

험법을 응용하여 시행하였다<sup>5)</sup>.

### 1) 기기 및 시약

본 연구에서 사용된 methanol, water, ethyl ether, chloroform은 모두 JT Baker(USA)사의 제품을 사용하였다. 또한, sulfuric acid, iron(III) chloride은 Sigma(USA)사의 제품을 구입하였다. 박층크로마토그래프(thin-layer chromatography, TLC)는 TLC silicagel 60 F254(Merck, Germany)를 구입하였으며, 자외선 등(ultraviolet rays(UV) lamp)은 VL- 4,LC(Vilber Lourmat, France)을 구입하여 사용하였다.

### 2) 신바로약침의 약재 중 구척(*Cibotii Rhizoma*)의 확인시험

구척의 확인시험은 두 가지 방법으로 시행하였다.

첫째, 구척 1 g을 methanol 10 mL에 넣고 수욕에서 15분간 가열한 다음 여과하였다. 여액을 여과지 위에 떨어뜨린 다음 자외선(365 nm)을 쬐어 색을 관찰하였다.

둘째, 구척 1 g을 물 10 mL에 넣고 수욕에서 15분간 가열한 다음 여과하고 여액 2 mL에 1 % 염화철(III)(Iron(III) chloride)용액을 떨어뜨려 어두운 녹색으로 변함을 관찰하였다.

### 3) 신바로약침의 약재 중 식방풍(*Peucedani Japonici Radix*)의 확인시험

식방풍 1.0 g에 ethyl ether 10 mL를 넣어 5분간 흔들어서 다음 여과한 ethyl ether층을 자외선 등 아래에서 색을 관찰하였다.

### 4) 신바로약침의 약재 중 두충(*Eucommiae Cortex*)의 확인시험

신바로약침과 두충 1 g에 methanol 10 mL를 넣고 60분간 초음파 추출하고 여과하여 신바로약침 및 두충 표준액으로 하였다. 신바로약침 및 두충 표준액 각각 10  $\mu$ L씩을 TLC용 실리카겔을 써서 만든 박층판에 점적한 후 chloroform · methanol · water 혼합액(10 : 5 : 1)을 전개용매로 하여 약 10 cm 전개하였다. 박층판을 건조시킨 후 묽은 황산(sulfuric acid)시액을 고르게 뿌리고 105  $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 색상 및 R<sub>f</sub>값을 확인하였다.

R<sub>f</sub> values = 출발선과 분리된 물질 사이의 거리 / 출발선과 용매가 이동한 사이의 거리

## 3. High performance liquid chromatography(HPLC) 분석

### 1) 기기 및 시약

본 연구에서 사용된 표준품 acanthoside D(AD)는 APLS(Japan)사, 20-hydroxyecdysone(20E)은 Sigma사(USA)에서 구입하였다. 이들 표준품의 순도는 HPLC 분석급으로 93 % 순도 이상인 것을 사용하였다. 모든 표준품은 메탄올에 녹여 준비하였다. 이동상의 용매인 water(JT Baker, USA)와 acetonitrile(JT Baker, USA) 그리고 methanol(JT Baker, USA)은 모두 HPLC급 용매를 사용하였다. HPLC는 waters사의 waters 600s controller, waters<sup>TM</sup> 626 pump, waters temperature control module, waters In-Line degasser, waters<sup>TM</sup> 717plus autosampler, waters<sup>TM</sup> 996 photodiode array detector(PDA)를 사용하였다.

### 2) 오가피(acanthoside D, AD) 및 우슬(20-hydroxyecdysone, 20E) 분석 조건

컬럼은 TC-C18(2) column(5  $\mu$ m, 4.6 I.D.  $\times$  250 mm, Agilent) 사용하였고, 컬럼 온도는 25  $^{\circ}$ C로 유지하였다. 각각의 약재에 대한 지표물질 분석 조건은 다음과 같다.

- ① 오가피의 지표물질인 AD는 10 % acetonitrile을 이동상으로 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min을 유지하였다. 기기주입량은 20  $\mu$ L이며, UV 205 nm 파장에서 검출할 수 있었다.
- ② 우슬의 지표물질인 20E는 1 % formic acid가 들어간 15 % acetonitrile을 이동상으로 이용하였으며, 유속은 1.0 mL/min을 유지하였다. 기기주입량은 20  $\mu$ L이며, UV 246 nm 파장에서 검출할 수 있었다.

### 3) 밸리데이션 분석 검증

본 실험의 HPLC 분석방법은 유럽 의약청(European Medicines Agency, EMA) guideline에 따라 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 반복실험을 통한 정밀성(precision)확인, 회수율(recovery)실험을 통한 정확성(accuracy)평가를 통해 검증하였다<sup>16)</sup>.

#### (1) 직선성, LOD, LOQ 측정

HPLC 분석 조건에 의하여 5개의 농도(1, 5, 10, 50,

100  $\mu\text{g/mL}$ )별로 3회 반복시험을 하였다. 각 농도별 면적값의 비율을 계산하여 표준품 농도( $x$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )와 피크 면적비( $y$ )에 대한 검량선(calibration curve,  $y=ax+b$ )을 구하였다. 검량선으로부터 직선성의 상관계수(correlation coefficient,  $R^2$ )가 0.99 이상이 되면 적합한 직선성이 있는 것으로 판별하였다. 오가피 및 우슬의 지표물질인 AD와 20E 분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건의 최소 검출한계(LOD)를 확인하기 위해 signal 대비 noise 비율(S/N ratio)이 3.3이 되는 조건과 정량한계(LOQ)는 10이 되는 조건에서 분석을 하였다.

(2) 정밀성(precision) 측정

정밀성 측정은 실험 환경의 변화에 따라 동일한 샘플에 대한 분석 결과의 변화 정도를 확인하기 위하여 상대 표준 편차(relative standard deviation, RSD)를 조사 하였다. 이는 반복성(intra-assay precision), 실험실 내 정밀성(intermediate precision)으로 검토될 수 있다. 따라서, 정밀성 검사는 3가지 농도를 설정을 하여(5, 10, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) 하루 내에 실험을 하여 within-run(intra-assay precision,  $n=4$ 반복/1일)은 4회 반복하여 실험하였으며, 3일에 걸쳐(1, 3, 7일) 각 4회씩 실험을 하여 etween-run(intermediate precision,  $n=3$ 일, 4반복/1일)를 실행했다. 일반적으로 효율적인 상대 표준 편차(RSD, %)는 3% 이내로 기준을 설정하여 평가하였다.

(3) 정확성(accuracy) 측정

표준액 3가지 농도(5, 10, 50  $\mu\text{g/mL}$ )를 각 3회 주입하여 얻은 결과를 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차 정도(recovery, %)로서 정확성을 평가 하였다. 그 범위는 90%에서 110% 사이의 범위를 이상적 범위라고 설정하여 평가 하였다.

(4) 기기 분석을 위한 신바로약침 검액 조제

20 mg 신바로약침 분말을 2 mL 물에 녹이고 syringe filter를 한 후 HPLC 실험에 사용하였다.

### III. 결 과

#### 1. 신바로약침 중 구척·두충·식방풍에 대한 물질 확인 시험

구척은 두 가지 방법으로 확인실험을 진행하였다. Fig. 1a와 같이 신바로약침액과 구척 표준 생약을 여과지 위에 떨어뜨린 후 자외선(365 nm)을 조사하였을 때 두 용액 모두에서 청백색의 형광을 확인하였다. 또 다른 실험법에서는 Fig. 1b와 같이 신바로약침액과 구척 표준 생약액에 1% 염화철(III)(iron(III) chloride) 용액을 떨어뜨리면 두 용액 모두에

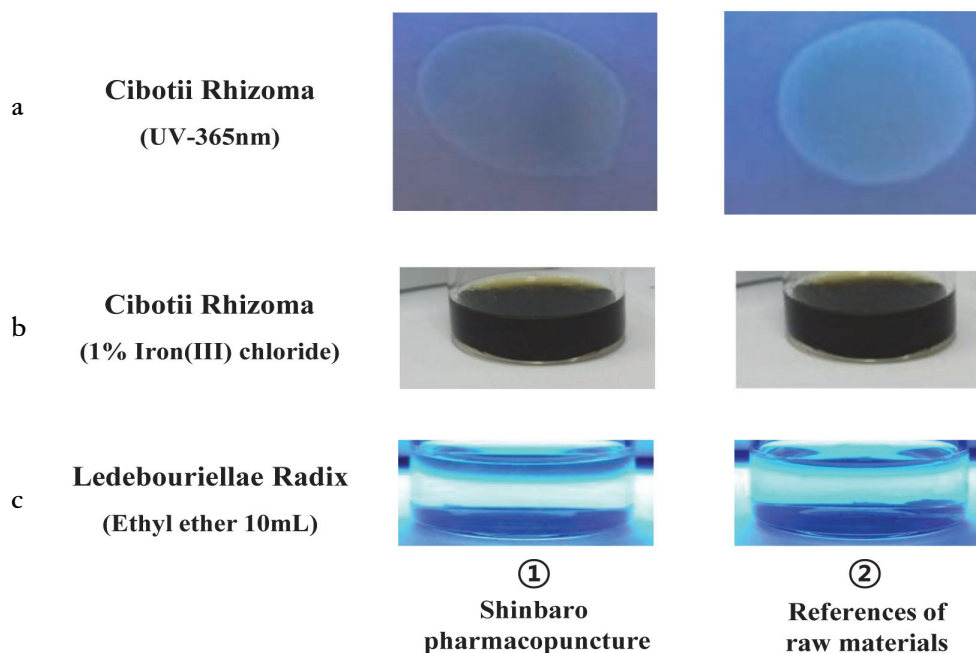
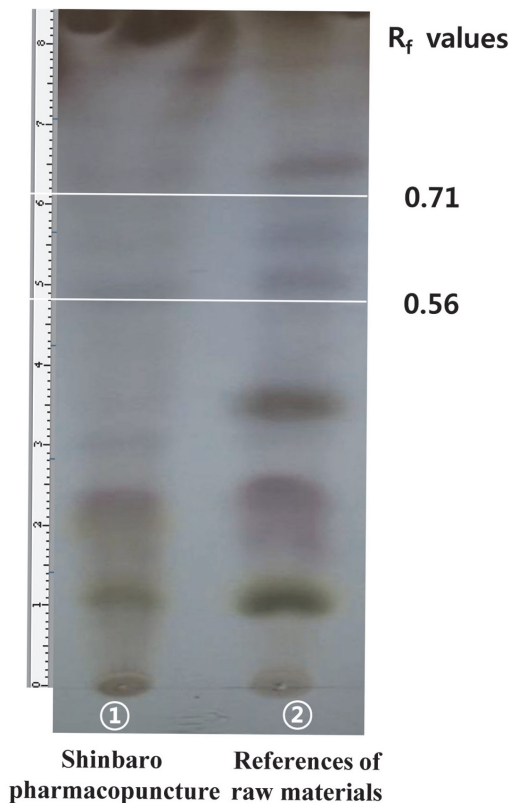


Fig. 1. Identification test of herbal medicine

서 청색으로 변하는 것을 확인하였다. 따라서 이 두 실험을 통해 신바로약침에 구척이 들어 있음을 확인하였다. 식방풍은 Fig. 1c와 같이 ethyl ether층이 자외선 등 아래에서 황록색의 형광을 확인하였다. 두층은 TLC 방법을 이용하여 실험하였다. TLC판을 105 ℃에서 10분간 가열하면 신바로약침액에서 얻은 여러 개의 반점은 두층 표준 생약액에서 얻은 색상 및 R<sub>f</sub>값이 같고, 그 중 R<sub>f</sub>값 0.56(R<sub>f</sub>=5/9) 및 0.71(R<sub>f</sub>=6.4/9) 부근에서 각각 암갈색 반점을 확인하였다 (Fig. 2).



Shinbaro References of pharmacopuncture raw materials  
 Fig. 2. TLC chromatogram of ① Shinbaro pharmacopuncture and ② references of *Eucommiae Cortex*  
 Eluent system : Chloroform: Methanol Water(v/v).

## 2. HPLC-DAD을 통한 밸리데이션 (validation data) 분석 결과

본 연구에서 사용한 HPLC 분석방법은 유럽 의약청 (European Medicines Agency, EMA) guideline에 따라 검증하였다<sup>16)</sup>.

### 1) 직선성, LOD, LOQ

각 표준 물질의 피크 면적(y)에 대한 검량선 표준 농도(x, μg/mL)와 비교하였다. 분석 실험 결과 Fig. 3a와 b처럼 AD와 20E는 각 표준물질을 정량하기 위해 분석 피크의 간섭과 중첩 없이 각각 205 nm, 246 nm 파장에서 검출이 가능하였다. 또한, 검량선 양호한 상관 계수(R<sup>2</sup>)는 0.99 이상의 값을 나타내었다. LOD 및 LOQ값은 AD에서는 각각 0.30 μg/mL의 0.90 μg/mL이었으며, 20E는 각각 0.23 μg/mL의 0.71 μg/mL였다(Table 1).

Table 1. The Linearity, Regression Equation, Correlation Coefficient(R<sup>2</sup>), and LOD and LOQ for Measurement of Standard Components by HPLC

Components	Regression equation	R <sup>2</sup> (n=3)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Acanthoside D	Y=111253x + 54117	0.9998	0.30	0.90
20-hydroxycyclopentane	Y=42691x - 6580	0.9994	0.23	0.71

Y: peak area, x : amount(μg/mL).

LOD : limit of detection, 3.3×(SD of the response/slope of the calibration curve.

LOQ : limit of quantitation, 10×(SD of the response/slope of the calibration curve.

### 2) 정밀성(precision)

각 표준품의 3(5, 10, 50 μg/mL)가지 농도로, within-run(inter-day)은 1일 동안에 4회 반복해서 수행 하였으며 (n=4 반복/1일), Between-run(intra-day)은 1일에 4회 반복을 3일간(1, 3, 7일) 반복 수행하였다(n=3일, 4 반복/1일). 그리고 그 결과는 relative standard deviation(RSD, %) 값을 통하여 평가하였다. 따라서, AD와 20E의 within-run은 각각 0.90 ~ 1.32 %, 0.79 ~ 0.89 %였으며, between-run은 각각 0.10~0.46 %, 0.25~1.42 %였음을 확인하였다. Within-run과 between-run의 RSD %가 3% 미만의 정밀성으로 정당한 분석 조건임을 확인하였다(Table 2).

### 3) 정확성(accuracy)

정확도 평가는 AD와 20E의 검량선을 통해 3(5, 10, 50 μg/mL)가지 농도에서 표준 성분을 검출하고 회수율 (recovery) 확인을 위해 3회 반복하였다. AD의 회수율은 97.90 ~ 103.72 %(RSD% : 0.50 ~ 1.86 %)였으며, 20E의

**Table 2. Within-run and between-run Variations of Standard Materials by HPLC-DAD**

Standard materials	Retention time(min)	Concentration (µg/mL)	Within-run(n=4)		Between-run(n=3)	
			Mean±SD (µg/mL)	RSD(%)	Mean±SD (µg/mL)	RSD(%)
Acanthoside D	108.62	5	5.16 ± 0.22	1.08	5.21 ± 0.02	0.10
		10	9.82 ± 0.52	1.32	9.77 ± 0.14	0.46
		50	50.02 ± 1.81	0.90	50.03 ± 0.52	0.35
20-hydroxycycdysone	22.63	5	5.20 ± 0.19	0.89	5.14 ± 0.22	1.42
		10	9.54 ± 0.30	0.79	9.65 ± 0.08	0.26
		50	50.05 ± 1.72	0.86	50.04 ± 0.38	0.25

RSD(%)=(SD/mean)×100.

**Table 3. Analytical Results of Accuracy Test for Standard Materials by HPLC**

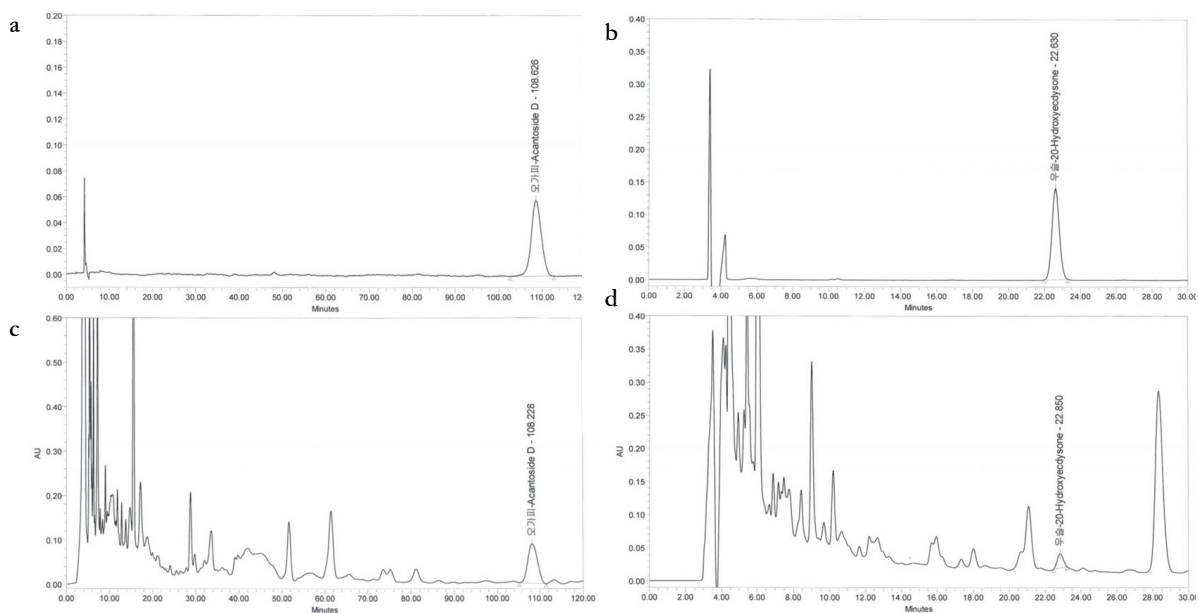
Components	Spiked amount (µg/mL)	Measured amount (µg/mL, n=4)	RSD (%)	Recovery (%)
Acanthoside D	5	5.19	1.02	103.72
	10	9.79	1.86	97.90
	50	50.02	0.50	100.05
20-hydroxycycdysone	5	5.03	0.87	100.55
	10	9.62	0.97	96.19
	50	50.04	0.92	100.08

Recovery(%)=[(amount found-original amount)/amount spiked] ×100 %.

회수율은 96.19 ~ 100.55 %(RSD% : 0.87 ~ 0.97 %)였음을 확인하였다. 회수율 실험을 통해 설정된 분석조건이 정확성(accuracy)이 있음을 확인 할 수 있었다(Table 3).

#### 4) 신바로약침에 적용

신바로약침의 주요 활성 성분들 중 AD 및 20E를 정량 분석하였다. 신바로약침에서 AD와 20E는 다른 피크의 중첩이나 간섭 없이 검출됨을 확인하였다(Fig. 3c, d).



**Fig. 3. HPLC chromatogram by preparation method**

a : acanthoside D at standard(205 nm), b : 20-hydroxycycdysone at standard(246 nm), c : acanthoside D at *Shinbaro* pharmacopuncture(205nm), d : 20-hydroxycycdysone at *Shinbaro* pharmacopuncture(246 nm).

## IV. 고찰 및 결론

신바로약침은 요추간판 탈출증의 치료에 활용함에 봉약침과 유의한 수준의 효과를 내고 부작용이 없으며, 신바로약침과 침치료를 이용한 족저근막염 환자 4례에 대한 효과 등 신바로약침에 관한 논문들이 발표되고 있다<sup>17,18)</sup>. 또한, Hong<sup>19)</sup>은 약침 제제 및 약침의 효과를 설문조사를 통해 살펴보았을 때 임상에서 효과적이며 근골격계 질환에 대응되는 치료기술임을 알 수 있었으나, 과학적인 검증을 통한 치료기술제시의 필요성을 시사하였다. 따라서, 본 연구에서는 신바로약침의 표준화 방안 확립을 위해 구척·식방풍 및 두충은 <대한약전외한약(생약)규격집>에 명시된 방법을 사용하여 빠르고 간편한 확인시험을 시행하였으며, 오가피와 우슬에 대해서는 지표물질을 선정하여 HPLC를 이용해 정량 분석을 하였다.

구척에 대한 많은 연구가 보고되어 있지만, 그 중에서 함량 규격화를 위한 지표성분이 설정되어 있지 않아 국내의 공정서에 기재되어 있지 않는 실정이다. 최근에 생약복합제 GCSB-5의 품질 표준화를 위한 구척의 지표성분을 탐색하는 연구 등 구척의 지표물질 설정에 대한 연구가 진행되고 있지만, 표준화 작업을 하기 위해서는 아직 미비한 상태이다<sup>20,21)</sup>. 따라서 본 연구에서는 <대한약전외한약(생약)규격집>에 나온 방법을 사용하여 2가지 실험을 진행하였다. 첫 번째 실험에서는 신바로약침액과 구척 표준 생약을 여과지 위에 떨어뜨린 다음 자외선(365 nm)을 쬐일 때 두 용액 모두에서 청백색의 형광이 나타남을 확인하였다. 두 번째 실험에서는 구척에 1% 염화철(III)(iron(III) chloride) 용액을 첨가하면 어두운 녹색으로 변하는 것을 확인하였다. 이는 금속이온인 철( $Fe^{3+}$ )이온과 페놀류가 착화물(chelate)을 형성해 발색이 되는 것으로 알려졌으며, 색은 페놀류의 구조에 따라 다르다<sup>22)</sup>. 따라서 신바로약침 중 광화학 반응과 1% 염화철(III)(iron(III) chloride) 용액 확인을 함으로써 다른 생약 성분들과 구별할 빠르고 간편한 방법임을 확인할 수 있었다.

Coumarin계는 항응고제, 항종양, 항바이러스, 항염증 및 항산화 효과뿐만 아니라, 항미생물 및 효소 억제 성질이 있다<sup>23)</sup>. 식방풍에는 coumarin계의 peujaponiside(peucedanol 7-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranoside)이 타 성분에 비하여 다량 함유되어 있으며 UV 발색단이 분자 내에 함유되어 있다<sup>24)</sup>. 이러한 특성을 이용하여 식방풍의 ethyl ether층이 자외선 등(UV lamp)아래에서 황록색의 형광이 나타남을 확인하였다.

두충은 TLC법으로 확인시험을 진행하였다. TLC판을 105 °C

에서 10분간 가열하여 신바로약침액에서 얻은 여러 개의 반점은 두충 표준 생약 표준액에서 얻은 색상 및  $R_f$ 값이 같고 암갈색 반점을 확인하였다.

Son et al<sup>25)</sup>의 연구에 따르면 두충의 확인시험을 위하여 TLC의 전개용매로 클로로포름 : 메탄올 : 물을 70 : 18 : 1 비율로 전개하고, geniposide 표준품과의  $R_f$ 값을 비교하였다. Liu et al<sup>26)</sup>의 연구를 살펴보면 로컬에서 흔히 *Polygonum bistorta*라고 혼용해서 사용하는 *Paris polyphylla*과 *Polygonum paleaceum*을 TLC로 둘을 구분할 수 있었다. 이러한 보고는 TLC법이 확인시험으로 사용되었을 때, 정확하고 신속하게 많은 종류의 추출물을 일상 분석(routine analysis)할 수 있음을 시사한다<sup>27)</sup>.

오가피와 우슬은 HPLC로 약침에서 분석 가능성을 확인하였다. 오가피는 항산화, 항암, 항염증, 멜라닌색소저해 등 여러 약리효능이 있으며 지표성분은 acanthoside D(AD)이다. 이밖에 구성성분으로는 chiisanoside, pimaric acid, stigmaterol, syringing, heparin, caffeic acid, 그리고 liganan계의 sesamin, helioxanthin, savinin, taiwanin C, eleutheroside E 등이 있지만 지표성분인 acanthoside D가 가장 높은 생물학적 효과가 있다고 보고되어 있어 효율적으로 추출하는 연구도 진행이 되었다<sup>28,29)</sup>. 오가피에 대한 AD의 함량을 연구한 논문에서 분석시간이 25분이 채 되지 않았다<sup>30)</sup>. 하지만 본 연구에서 사용된 약침은 복합한약재이기 때문에 분리된 AD의 peak을 얻기 위하여 100분대의 retention time을 설정하고 실험을 진행하였다. 우슬의 지표물질인 20E는 분자구조에  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketone group이 있어 UV detector에 검출이 용이하다<sup>31)</sup>. 또한, HPLC-UV를 이용하여 우슬의 부위별 20E의 정량을 확인하는 연구도 진행되고 있다<sup>32)</sup>. 따라서 본 연구에서는 신바로약침에서 우슬의 지표물질인 20E의 최적 분리능을 설정하여 실험을 진행하였다.

결론적으로 신바로약침은 구척·식방풍·두충의 확인시험과 오가피와 우슬의 HPLC 정량분석실험으로 품질관리 기준 설정이 가능할 것이며, 아울러 한방산업에서의 약침개발 전략에의 기여를 기대한다.

## V. References

- Lee EH, Cha BC. Quantitative analysis of acanthopanax cortex and achyranthis radix for standardization of GCSB-5 preparation. Kor J Pharmacogn. 2008 ; 39(4) : 316-23.

2. Kim JK, Park SW, Kang JW et al. Effect of GCSB-5, a herbal pormulation, on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012 ; 2012 : 730907. Available from : <http://dx.doi.org/10.1155/2012/730907>
3. Chung HJ, Lee HS, Shin JS et al. Modulation of acute and chronic inflammatory processes by a traditional medicine preparation GCSB-5 both in vitro and in vivo animal models. *J Ethnopharmacol.* 2010 ; 130(3) : 450-9.
4. Kim TH, Yoon SJ, Lee WC et al. Protective effect of GCSB-5, an herbal preparation, against peripheral nerve injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 2011 ; 136(2) : 297-304.
5. National Standard of Traditional Medicinal(Herbal and Botanical) Materials Ministry of Food and Drug Safety Seoul 2013.
6. Kim YO, Kim GS, Lee SE et al. Effects of cibotium barometz on RANKL from collagen-induced rheumatoid arthritis mice. *The Acupuncture.* 2007 ; 24(3) : 207-13.
7. Kang SY, Oh TW, Kim JW, Park YK. Effect of the water extract of *Peucedani japonici* radix on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. *Kor J Herbology.* 2013 ; 28(6) : 1-7.
8. Shin KH, Kang SS, Chi HJ. Analysis of the coumarin constituents in peucedanii radix. *Kor J Phrmacogn.* 1992 ; 23(1) : 20-3.
9. Im NK, Kim HJ, Kim MJ, Lee EJ, Kim HI, Lee IS. Effects of medicinal herb extracts on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J Food Sci Technol.* 2010 ; 42(5) : 637-42.
10. Kim HY. Hypocholesterolemic and hypotensive activities of eucommia ulmoides oliver. *Food Industry and Nutrition.* 2000 ; 5(2) : 27-8.
11. Kim JB, Park JR, Jeon JR, Cha MH. Isolation and identification of anticancer compounds from eucommia ulmoides leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2001 ; 30(4) : 732-8.
12. Park YS. Antioxidant effects and improvement of lipid metabolism of acanthopanacis cortex water extract in rats fed high fat diet. *J East Asian Soc Dietary Life.* 2010 ; 20(1) : 37-45.
13. Yim YK, Jeong YT. Effects of the herbal-acupuncture with acanthopanacis cortex extract at KI<sub>10</sub>(*Eumgok*) on osteoporosis in ovariectomized DDY mice. *J Meridian & Acupoint.* 2008 ; 25(1) : 165-96.
14. Park JS, Seong NS, Lee YJ. Comparative study on the anti-oxidative effects of achyranthis japonicae radix, achyranthis bidentatae radix and cyathulae radix. *Kor. J. Herbology.* 2007 ; 22(4) : 155-67.
15. Kim GY, Seong RS, Kim YE et al. Effects of achyranthes radix and electroacupuncture on type II collagen-induced arthritis. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2007 ; 21(2) : 425-31.
16. Committee for Medicinal Products for Human Use(CHMP). Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 : 1-22(cited 2011 August 01). Available from : [www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open\\_document.jsp?webContentId=WC500109686](http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500109686)
17. Park OJ, Kim SG, Lee JJ, Lee SM, Kim SJ, Cho NG. The effect of Shinbaro and bee venom pharmacopuncture in treating lumbar disc herniations. *The Acupuncture.* 2013 ; 30(5) : 41-50.
18. Choi CW, Huh SW, Yun YI et el. The clinical study of the Shinbaro pharmacopuncture and acupuncture treatment on plantar fasciitis. *J Korea CHUNA Med Spine & Nerves.* 2013 ; 8(2) : 151-7.
19. Hong KE. Analysis study of survey for safety and efficacy of pharmacopuncture. *Pharmacopuncture.* 2010 ; 13(3) : 91-102.
20. Cha BC, Lee EH. HPLC analysis and screening of standard compound on cibotii rhizoma for standardization of GCSB-5 preparation. *Kor J Pharmacogn.* 2010 ; 41(1) : 48-53.
21. Kim SH, Kim EY, Whang WK. Anti-oxidant activities and identification of standard compounds from cibotii rhizoma. *Yakhak hoeji.* 2014 ; 58(5) : 314-21.
22. Borji SH, Nasser S, Mahvi AH, Nabizadeh R, Javadi AH. Investigation of photocatalytic degradation of phenol by Fe(III)-doped TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J Environ Health Sci Eng.* 2014 ;



- 12(1) : 101-10.
23. Riveiro ME, De Kimpe N, Moglioni A et al. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Curr Med Chem*, 2010 ; 17(13) : 1325-38.
24. Whang WK, Lee SJ, Kim HH et al. Standardization of peucedani radix. *Kor J Pharmacogn*, 2001 ; 32(4) : 292-6.
25. Son KH, Lee JM, Chang SY, Lee KS. Isolation and quantitative determination of geniposide from the cortex of eucommia ulmoides oliver. *Kor J Pharmacogn*, 2001 ; 32(2) : 89-92.
26. Liu XQ, Du LL, Li WW, Guan HF, Liu F. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of commercial bistorta rhizome and its differentiation from closely related herbs using TLC and HPLC-DAD fingerprinting. *Chem Pharm Bull*, 2008 ; 56(1) : 75-8.
27. Gaikwad PS, Bhope SG, Kuber VV, Patil MJ. Validated TLC method for simultaneous quantitation of kutkoside and picoside-I from Kutki extract. *Phytochem Anal*, 2011 ; 22(1) : 36-41.
28. In SH, Lee BH, Roh SS. The study on chemical components and oriental medical effects of acanthopanax cortex radices. *The Journal of Jeahan Oriental Medical academy*, 2013 ; 11(1) : 27-42.
29. Lee JJ, Lee SH, Park JS, Park CB, Ahn YS, Lee SC. Effect of different fertilizer ratio and planting dates on growth and acanthoside D content of acanthopanax divaricatus and acanthopanax koreanum. *Curr Res Agric Life Sci*, 2013 ; 31(2) : 88-93.
30. Lee JJ, Lee SH, Park JS, Ahn YS, Lee SC. Effect of shading and pinching on growth and acanthoside D content of acanthopanax divaricatus var. albofructus and acanthopanax koreanum nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2013 ; 21(1) : 39-44.
31. Son KH, Hwang JH, Lee SH, Park JH. Isolation and quantitative determination of 20-hydroxyecdysone from achyranthis radix. *Kor J Pharmacogn*, 1999 ; 30(3) : 335-9.
32. Boo KH, Lee DS, Nguyen QV et al. Fluctuation of 20-hydroxyecdysone in individual organs of *Achyranthes japonica* during reproductive growth stage and its accumulation into Seed. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2013 ; 56(3) : 335-8.