

UHPLC를 이용한 새로운 한약제제 HPL-1의 품질관리법 개발

김세건[#], 라미차네 라마칸타, 이경희, 정현주^{*}

원광대학교 한약학과

Development of Quality Control Method for a Novel Herbal Medicine, HPL-1 using UHPLC

Se-Gun Kim[#], Ramakanta Lamichhane, Kyung-Hee Lee, Hyun-Ju Jung^{*}

Department of Oriental Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

ABSTRACT

Objectives : HPL-1, a novel herbal medicine which is composed of five herbs such as Kalopanax Cortex, Chaenomelis Fructus, Raphani Semen, Atractylodis Rhizoma and Pulvis Aconiti Tuberis Purificatum, was developed for treatment of osteoarthritis. This study is aimed to develop analytical method for consistent quality control of HPL-1 and validate chromatographic method.

Methods : Chromatographic analysis was performed using ultra-high performance liquid chromatography - diode array detector (UHPLC-DAD) equipped with RP-amide column, column oven, and auto sampler. Marker compounds [protocatechuic acid, chlorogenic acid, liriodendrin, 3,5-dicaffeoylquinic acid, β -D-(3-O-sinapoyl)-fructofuranosyl- α -D-(6-O-sinapoyl)glucopyranoside and benzoylmesaconine] were separated by step gradient elution of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid/water. The method validation was evaluated by quantitative validation parameters of linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) according to KFDA guideline.

Results : An optimized method for six marker compounds in HPL-1 was established by UHPLC-DAD. The correlation coefficient (R^2) with each calibration curve was greater than 0.99. The LOD and LOQ were within the range of 0.008-0.090 and 0.023-0.274 μ g/mL, respectively. The relative standard deviation (RSD) of intra- and inter-day variability were less than 4.0%. The result of recovery test was range from 93.3-106.3% with RSD < 4.0%.

Conclusions : These results suggest that the quantitative UHPLC method is precise, accurate, effective for quality evaluation of HPL-1. The method may also contribute to improve quality of crude drug preparations used for treatment of various diseases.

Key words : Herbal medicine, quality control, UHPLC-DAD

서론

의료기술의 발달과 생활수준의 향상 등으로 인하여 평균수명이 증가되어 2026년에는 우리나라의 65세 이상 노인인구가 전체 인구 비중의 20%정도 달할 것으로 전망되고 있다¹⁾. 고령화 사회로 접어들면서 치매, 중풍, 골관절염과 같은 노인성 질환의 발생이 증가되어 사회적 문제로 인식되고 있으며, 특히 골관절염(osteoarthritis)은 관절의 노쇠로 인하여 연골이 파괴되어 심한 통증과 관절의 경직을 유발하고 삶의 질을 떨어뜨리는 대표성 질환으로 외과적 수술, 약물요법 등으로 치료가 행해지고 있으나²⁾ 수술 후에 강직, 강염 등이 발생하고 치료를 위한 비스테로이드성 소염제, 스테로이드성 제제, 항류마티스 조절제 등은 위장관 관련, 면역체계 교란 등의 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다^{3,4)}. 이에 합성의약품에서 나타나는 부작용을 최소화하면서 장기간 복용하여도 안전성과 유효성을 기대할 수 있는 천연물을 소재로 선택하여 골관절염 치료제를 개발하였다. HPL-1은 급성 골관절염 동물모델에서

어뜨리는 대표성 질환으로 외과적 수술, 약물요법 등으로 치료가 행해지고 있으나²⁾ 수술 후에 강직, 강염 등이 발생하고 치료를 위한 비스테로이드성 소염제, 스테로이드성 제제, 항류마티스 조절제 등은 위장관 관련, 면역체계 교란 등의 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다^{3,4)}. 이에 합성의약품에서 나타나는 부작용을 최소화하면서 장기간 복용하여도 안전성과 유효성을 기대할 수 있는 천연물을 소재로 선택하여 골관절염 치료제를 개발하였다. HPL-1은 급성 골관절염 동물모델에서

*Corresponding author : Hyun-Ju Jung, Department of Oriental Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
· Tel : +82-63-850-6814 · E-mail : hyun104@wku.ac.kr

#First author : Se-Gun Kim, Department of Oriental Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
· Tel : +82-10-9505-2597 · E-mail : kimsegun@gmail.com

· Received : 27 April 2015 · Revised : 26 May 2015 · Accepted : 27 May 2015

골관절염 치료제로 사용되는 셀레코시브(celecoxib)보다 진통 및 소염효과가 우수한 복합한약제제로⁵⁾ 신경통 및 관절염 치료에 사용한 海桐皮(Kalopanax Cortex), 비위(脾胃)를 조화시키며 습(濕)을 제거하는 木瓜(Chaenomeles Fructus), 신장의 양기(陽氣)를 보하는 精製附子(Pulvis Aconiti Tuberos Purificatum), 기(氣)를 통하게 하고 체한 것을 내려가게 하는 萊菔子(Raphani Semen), 건위(健胃)작용을 하는 蒼朮(Atractylodis Rhizoma) 등⁶⁾ 5가지 한약재로 구성되어 있다. 본 연구에서는 HPL-1 한약제제의 일관된 약효를 기대할 수 있는 품질평가법을 개발하고자 제제를 구성하는 한약재마다 지표성분을 설정하여 UHPLC(ultra-high performance liquid chromatography)를 통한 분석법을 확립하고자 하였으며 분석법 밸리데이션을 실시하여 타당성을 확보하는 동시에 천연물 추출물을 소재로 개발된 의약품의 품질관리를 위한 방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

분석시험에 사용한 MeOH, MeCN 및 H₂O는 Burdik & Jackson(Muskegon, MI, USA)사의 HPLC급 용매를 사용하였고 protocatechuic acid(1), chlorogenic acid(2), 및 3,5-dicaffeoylquinic acid(4)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사, benzoylmesaconine(6)은 Chromadex(Irvine, CA, USA)사에서 구입하였으며 lirodendrin(3)은 충남대학교 약학대학 김영호 교수로부터 공급받아 사용하였다. β-D-(3-O-sinapoyl)fructofuranosyl-α-D-(6-O-sinapoyl)glucopyranoside(5)는 萊菔子 메탄올 추출물을 ODS column chromatography(이동상; MeOH : H₂O = 50 : 50)와 silica gel column chromatography(이동상; CHCl₃ : MeOH : H₂O = 73 : 27 : 10, 하층)를 실시하여 화합물을 정제하였으며 화합물의 화학적 구조는 문헌⁷⁾과 비교하여 동정한 후 지표성분으로 사용하였다. 지표성분으로 사용된 화합물의 화학적 구조는 Figure 1과 같다.

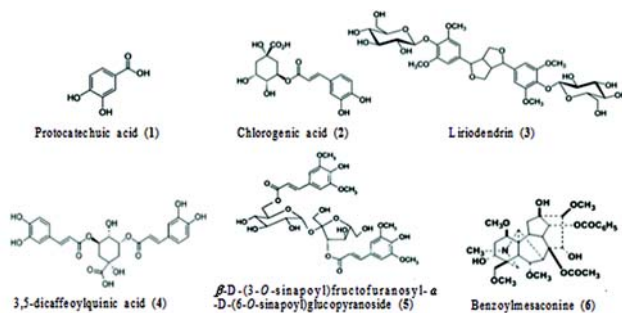


Fig. 1. Chemical structures of six marker compounds (1-6).

2. 분석기기 및 조건

HPL-1 제제분석을 위하여 Agilent(Santa clara, CA, USA)사의 auto sampler, column oven 및 diode array detector가 장착된 UHPLC 1290 infinity 모델을 사용하였으며 Advanced materials technology(Wilmington, DE, USA)사의 Halo

RP-amide(2.7 μm, 4.6 × 150 mm) 컬럼을 사용하였다. 지표성분 1-5의 UHPLC 분석조건은 유속 1.3 mL/min, 주입량 4 μL, 검출파장 210 nm, 컬럼온도 45°C이었으며, 이동상은 (A)0.1% H₃PO₄, (B)MeCN의 용매를 사용하여 (A)96-95% : 0-7분, 95-94% : 7-16 분, 94-90% : 16-17분, 90-86% : 17-30분, 86-80% : 30-42분, 80% : 42-45분으로 분석하였다. 지표성분 6은 유속 1.5 mL/min, 주입량 4 μL, 검출파장 230 nm, 컬럼온도 45°C이었으며, 이동상은 지표성분 1-5의 분석에 사용한 동일한 용매로 (A)95-88% : 0-4 분, 88% : 4-10분, 88-80% : 10-25분으로 설정하였다.

3. HPL-1의 제조

HPL-1을 구성하는 5가지 한약재 중 海桐皮(Kalopanax Cortex), 木瓜(Chaenomeles Fructus), 精製附子(Pulvis Aconiti Tuberos Purificatum) 3가지 한약재는 4(400 g) : 4(400 g) : 1(100 g)의 중량비로 혼합하여 50%EtOH로 추출하였으며, 나머지 萊菔子(Raphani Semen)와 蒼朮(Atractylodis Rhizoma)은 2(200 g) : 1(100 g)의 중량비로 혼합하여 물로 추출하였다. 각 추출물은 25 μm 필터로 여과하여 섞은 후 60°C 이하에서 감압농축하여 HPL-1 건조엑스를 제조하였으며 분석시료는 (유)한풍제약(Jeonju, Korea)으로부터 공급받아 시험에 사용하였다.

4. 분석시료 및 표준액의 제조

HPL-1 제제와 지표성분 1-5는 50% MeOH을 사용하여 각각 20 mg/mL, 1 mg/mL의 농도가 되도록 만들고 초음파를 이용하여 60분간 추출한 후 0.45 μm PTFE membrane 필터를 이용하여 여과하였으며, 지표성분 6의 분석은 HPL-1 제제 15 g을 3% 암모니아수로 50°C에서 60분간 초음파 추출한 후 CH₂Cl₂로 분획하여 감압 농축한 후 5 mg/mL (MeOH)로 만들어 분석에 사용하였다. 표준품으로 사용한 1-6은 5가지 농도로 희석하여 분석에 사용하였다.

5. 분석법 검증(Method validation)

HPL-1 제제분석법의 타당성을 검토하기 위하여 식품의약품안전처의 '생약/한약제제의 성분 프로파일 설정 가이드라인'에 따라 지표성분(1-6)의 5가지 농도구간으로부터 작성된 검량식의 상관계수(R²)로 직선성(linearity)을 검증하였고, 분석대상물질과 표준품의 UV 스펙트럼을 비교하여 특이성(specificity)을 평가하였다. 정밀성(precision)은 직선성 범위 내 3가지 농도에서 일내(intra day) 및 일간(inter day) 함량변화를 측정하여 상대표준편차(RSD%)로 계산하여 평가하였으며, 정확성(accuracy)은 시료에 3가지 농도를 첨가하여 회수율(recovery)로 평가하였다. 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \sigma/S$$

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma/S$$

(σ: 회귀직선에서 y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

결 과

1. 분석법 최적화

HPL-1 제제 내 지표성분은 UV에 잘 검출되거나 항염증 활성을 가지는 화합물을 기준으로 하여 제제를 구성하는 5종의 한약재 중 木瓜로부터 protocatechuic acid(1)⁸⁾, 蒼朮로부터 chlorogenic acid(2)⁹⁾, 海桐皮로부터 liriodendrin(3)¹⁰⁾, 3,5-dicaffeoylquinic acid(4)¹¹⁾, 萊菔子로부터 β -D-(3-O-sinapoyl)fructofuranosyl- α -D-(6-O-sinapoyl)glucopyranoside(5)¹²⁾, 精製附子로부터 benzoylmesaconine(6)¹³⁾을 지표성분으로 설정하여 일관된 품질생산을 위한 정량분석법을 개발하고자 MeOH, MeCN 등의 유기용매와 pH 변화를 준 buffer 등의 다양한 용매조성 및 C18, RP-amide가 충전된 컬럼 등을 사용하여 이상적인 분석조건을 검토하였다. 지표성분 1-5는 RP-amide(2,7 μ m, 4.6 \times 150 mm) 컬럼을 45 $^{\circ}$ C로 유지하고 이동상으로서 MeCN과 0.1% H_3PO_4 를 사용하였을 때 검출파장 210 nm에서 인접한 피크와 1.5 이상의 우수한 분리능을 확인할 수 있었으며 1-5의 머무름 시간은 각각 4.8분, 15.1분, 25.1분, 38.9분, 39.6분이었다(Fig. 2A, 2B). 지표성분 6은 알칼로이드계 화합물로 1-5의 분석 조건에서는 검출되지 않아 3% 암모니아수를 이용한 알칼로이드 추출법을 사용하여 분석시료를 제조하였으며 1-5 분석조건인 컬럼, 컬럼온도를 동일하게 설정한 후 MeCN과 0.1% H_3PO_4 를 이동상으로 사용하여 6의 최대 흡수파장인 230 nm로 설정하였을 때 지표성분 6은 13.6분에 검출되었으며 우수한 분리도를 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 2C, 2D). 또한 HPL-1 분석법은 제제를 구성하는 5가지 한약재 추출물 내에서 지표성분을 양호하게 분리하여 구성 한약재의 정성 및 정량분석이 가능하였다(Fig. 3). 지표성분 1-6의 순도는 분석대상물질(HPL-1)과 표준품의 UV spectrum(200-400 nm)을 비교하여 흡수파장의 일치여부를 확인하였으며, 모든 지표성분에서 동일한 spectrum으로 나타났다(Fig. 4).

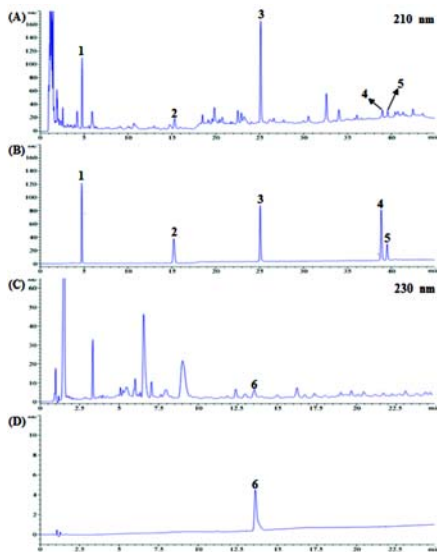


Fig. 2. UHPLC chromatograms of HPL-1 extract (A), standard mixture (B), CH_2Cl_2 fraction of HPL-1 extract (C), and benzoylmesaconine (D), protocatechuic acid (1), chlorogenic acid (2), liriodendrin (3), 3,5-dicaffeoylquinic acid (4), β -D-(3-O-sinapoyl)-fructofuranosyl- α -D-(6-O-sinapoyl)glucopyranoside (5), and benzoylmesaconine (6).

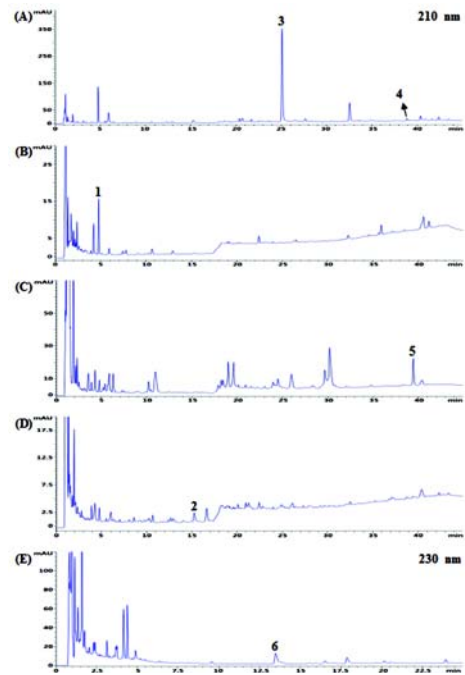


Fig. 3. UHPLC chromatograms of individual plant extract of HPL-1. Kalopanax Cortex (A), Chaenomelis Fructus (B), Raphani Semen (C), Atractylodis Rhizoma (D), and Pulvis Aconiti Tuberos Purificatum (E)

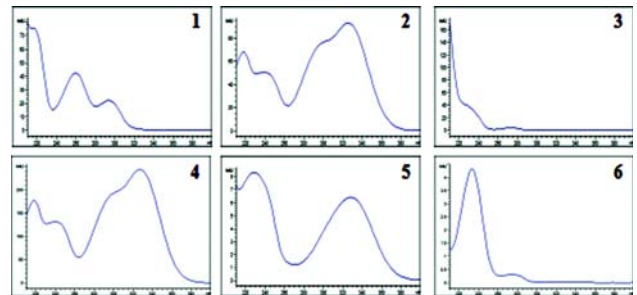


Fig. 4. UV spectra of six marker compounds (1-6).

2. 분석법검증(Method validation)

1) 직선성(Linearity), 검출한계(Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantification)

HPL-1 제제 20 mg/mL에서 검출되는 분석대상물질의 피크 면적을 고려하여 지표성분 1-6의 농도범위를 각각 3.13-50, 6.25-100, 12.5-200, 2.5-50, 3.13-50, 3.9-125 μ g/mL로 설정하여 검량선을 작성한 후 검량선으로부터 산출된 상관계수(R^2) 값을 측정하여 직선성을 평가하였다. 그 결과 모든 지표성분에서 0.9996 이상의 우수한 직선성을 나타냈으며 HPL-1 제제 내 지표성분을 정량할 수 있는 일차방정식($y = ax + b$, y : 피크면적, a : 기울기, x : 분석대상물질의 농도, b : y절편)을 작성하였다. 지표성분 1-6의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 0.008-0.090 μ g/mL, 0.023-0.274 μ g/mL의 범위로 나타내어 미량의 농도에서도 검출 및 정량이 가능한 것으로 확인되었다(Table 1).

Table 1. Linearity regression, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for six marker compounds in HPL-1.

Marker compound	Regression equation [*]	R ² †	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
1	Y = 43,30x - 8,90	0,9998	0,008	0,023
2	Y = 3,44x + 5,01	0,9997	0,014	0,042
3	Y = 20,30x + 22,42	0,9999	0,087	0,263
4	Y = 2,16x + 1,42	0,9996	0,055	0,166
5	Y = 9,82x + 1,77	0,9999	0,075	0,227
6	Y = 1,55 + 3,55	0,9996	0,090	0,274

^{*}Y, peak area; x, standard concentration (µg/mL); [†]R², correlation coefficient; protocatechuic acid (1), chlorogenic acid (2), liriiodendrin (3), 3,5-dicaffeoylquinic acid (4), β-D-(3-O-sinapoyl)-fructofuranosyl-α-D-(6-O-sinapoyl)glucopyranoside (5), and benzoylmesaconine (6)

2) 분석법의 정밀성(Precision)

지표성분 1-6의 직선성 범위 내 3가지 농도(5-100 µg/mL)를 설정하여 일내 정밀성(intra day precision)과 일간(inter day precision) 정밀성을 평가하였다. 그 결과 지표성분들의 일내변화 및 일간변화는 상대표준편차 0.04-3.53%와 0.18-3.64% 정도로 4% 미만의 값으로 측정되어 HPL-1 분석조건은 우수한 정밀성을 나타내는 것으로 확인되었다 (Table 2).

Table 2. Precision data of each analyte in different concentrations

Marker compound	Conc. [*] (µg/mL)	Intra day		Inter day	
		Mean ± SD	RSD(%) [†]	Mean ± SD	RSD(%)
1	25	24,52 ± 1,51	0,14	24,789 ± 0,20	0,81
	12,5	12,38 ± 0,75	0,14	12,46 ± 0,03	0,27
	6,25	6,33 ± 2,41	0,81	6,29 ± 0,02	0,65
2	50	48,28 ± 3,53	1,06	49,59 ± 0,40	0,80
	25	28,40 ± 1,97	1,15	24,82 ± 0,17	0,70
	12,5	10,97 ± 2,22	2,59	12,97 ± 0,47	3,64
3	100	102,95 ± 1,46	0,07	99,81 ± 0,18	0,18
	50	52,05 ± 0,47	0,04	49,40 ± 0,60	1,21
	25	29,37 ± 3,23	0,52	25,38 ± 0,38	1,52
4	25	24,47 ± 0,58	1,06	24,65 ± 0,34	1,41
	10	10,08 ± 0,66	2,58	10,05 ± 0,05	0,56
	5	4,73 ± 0,06	0,50	5,07 ± 0,07	1,51
5	25	26,30 ± 1,20	0,46	25,50 ± 0,50	1,97
	12,5	12,17 ± 1,07	0,88	12,28 ± 0,22	1,79
	6,25	5,83 ± 0,36	0,64	6,07 ± 0,17	2,92
6	62,5	64,28 ± 0,49	0,48	63,48 ± 0,98	1,55
	31,3	29,81 ± 1,35	2,70	31,81 ± 0,56	1,76
	15,6	13,97 ± 0,97	3,85	15,87 ± 0,25	1,59

^{*}Conc: concentration; [†]RSD: relative standard deviation.

3) 분석법의 회수율(Recovery)

알고 있는 지표성분(1-6)의 농도를 HPL-1에 첨가하여 회수율으로써 정확성(Accuracy)을 평가하였다. 그 결과 지표성분(1-6)의 회수율은 93,8-106,3%의 범위로 측정되었으며 상대표준편차는 4% 미만의 값으로 측정되어 양호한 정확성을 나타냈다(Table 3).

Table 3. Accuracy result of six marker compounds in HPL-1

Marker compound	Spiked amount(µg/mL)	Measured amount(µg/mL)	RSD (%)	Recovery (%)
1	8,00	8,42 ± 0,22	2,60	105,3
	4,00	4,15 ± 0,08	1,87	103,8
	2,00	1,94 ± 0,03	1,46	97,1
2	15,00	14,07 ± 0,45	3,20	93,8
	7,50	7,00 ± 0,24	3,45	93,3
	3,75	3,99 ± 0,12	3,07	106,3
3	25,00	26,00 ± 0,51	1,97	104,0
	12,50	13,05 ± 0,28	2,16	104,4
	6,25	5,92 ± 0,16	2,75	94,7
4	6,00	5,95 ± 0,02	0,40	99,2
	3,00	2,93 ± 0,04	1,21	97,6
	1,50	1,44 ± 0,03	2,04	96,0
5	6,00	5,95 ± 0,02	0,42	99,2
	3,00	2,99 ± 0,01	0,22	99,6
	1,50	1,47 ± 0,02	1,13	97,8
6	8,00	8,34 ± 0,17	2,04	104,2
	4,00	4,20 ± 0,10	2,41	104,9
	2,00	2,01 ± 0,01	0,32	100,6

3. HPL-1 제제 내 지표성분의 함량평가

UHPLC를 이용하여 확립 및 검증된 분석방법으로 HPL-1 제제 내 지표성분으로 설정한 1-6을 분석하고 직선성에 도출된 회귀방정식을 이용하여 각 성분의 함량을 평가하였다. 그 결과 제제 내 지표성분 1-6은 0,61, 2,96, 2,97, 1,91, 0,63, 0,05 mg/g으로 각각 계산되었다(Table 4).

Table 4. Content of six marker compounds in HPL-1

Sample	Content (mg/g of extract)					
	1	2	3	4	5	6
HPL-1	0,605 ± 0,021	2,960 ± 0,267	2,972 ± 0,098	1,910 ± 0,049	0,634 ± 0,012	0,050 ± 0,004

고찰

한약재는 기원이 같다고 해도 재배방법, 채취시기, 재배 환경, 제조공정 등에 의하여 구성성분의 변화가 일어날 수 있으며 이는 한약재 추출물을 소재로 개발되는 한약제제의 약효를 저해시키는 원인이 되기도 한다¹⁴⁾. 한약의 품질평가는 관능검사, 형태학적검사, 크로마토그래피에 의한 성분 분석 등이 그 수단으로 사용되고 있으며¹⁵⁾, 특히 HPLC와 같은 크로마토그래피장치에 UV/Vis(ultraviolet/visible), MS (mass spectrometer), RI(refractive Index), ELS(evaporative light scattering) 등과 같은 검출기를 부착하여 한약의 품질평가에 널리 사용되고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 질병치료를 목적으로 한약을 이용한 연구가 활발히 진행되어 그 우수성이 입증되고 있으며 단일한약재 및 2가지 이상의 한약재를 혼합한 한약제제들도 개발되고 있다. 이러한 한약제제들은 다양한 성분들이 포함되어 성분 간의 상호작용에 의하여 약효를 나타내는 것으로 알려져 있지만 구성약재별로 지표성분 설

정 없이 알려진 일부 성분에 대한 정량측정법으로 품질관리가 이루어지고 있어 일정한 약효를 기대하기 어려운 실정하기에 한약제제의 일관된 품질생산 및 관리를 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. Kim 등²⁰⁾은 불면증 치료에 사용되는 황련해독탕(黃連解毒湯)의 4가지 구성약재로부터 6가지 지표성분의 설정과 다성분 동시분석법을 개발하여 각 추출법에 따른 함량변화를 측정하였으며, 발열오한에 사용되는 한약처방인 구미강활탕(九味羌活湯)²¹⁾에서 HPLC를 이용하여 품질분석법을 제시하였다. 본 연구에서는 골관절염 치료제로 개발된 HPL-1 제제의 5가지 구성약재로부터 지표성분을 각각 설정하고 분석조건을 최적화를 위하여 UHPLC를 이용하였다. UHPLC는 고압력의 펌프와 2 μm 정도의 작은 입자로 충전된 컬럼을 사용하고 HPLC보다 짧은 시간 내에 성분들을 분석할 수 있는 기기로서, Miranda 등²²⁾은 말라리아 치료제로 사용되는 chloroquine과 primaquine의 분석을 UPLC (ultra performance liquid chromatography)를 사용하여 HPLC보다 신속하게 분석법을 최적화하였으며, HPL-1의 정량분석은 UHPLC에 알칼리 완충액을 사용하지 않고 알칼로이드계 화합물을 분리할 수 있는 동시에 페놀성 화합물의 분석 또한 가능한 RP-amide 컬럼을 사용하여²⁰⁾ 조건을 최적화 하였다. 또한 직선성, 정밀성, 정확성의 분석법 검증을 통한 HPL-1 제제의 UHPLC-DAD 분석법은 한약재 추출물을 소재로 개발되는 한약제제의 일관된 품질생산 및 약효를 기대할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

결론

골관절염 치료제로 개발된 HPL-1 제제의 protocatechuic acid (1), chlorogenic acid(2), liriodendrin(3), 3,5-dicaffeoylquinic acid(4), β-D-(3-O-sinapoyl)fructofuranosyl-α-D-(6-O-sinapoyl) glucopyranoside(5) 및 benzoylmesaconine(6)에 대한 UHPLC-DAD 분석결과는 아래와 같다.

1. RP-amide 컬럼과 ACN/0.1% H₃PO₄의 이동상을 사용하였을 때 지표성분 1-6은 1.5 이상의 우수한 분리도를 나타내어 분석조건을 최적화를 확립하였다.
2. 확립된 분석법은 직선성(0.99 이상), 일내 및 일간 정밀성(5% 이내), 회수율(93.8-106.3%) 시험을 통하여 검증되었다.
3. 확립 및 검증된 분석법을 적용하여 함량평가를 실시한 결과 해당피의 liriodendrin(3)이 2.97 mg/g으로 HPL-1 제제 내 가장 많이 함유되어 있었다.

References

1. Jhun HJ, Ahn K, Lee SC. Estimation of the prevalence of osteoarthritis in Korean adults based on the data from the fourth Korea national health and

- nutrition examination survey. *Anesth Pain Med*, 2010 ; 5(3) : 201-6.
2. Peat G, McCarney R, Croft P. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann Rheum Dis*, 2001 ; 60(2) : 91-7.
3. Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, Clark BM, Dieppe PA, Griffin MR, Moskowitz RW, Schnitzer TJ. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. *American College of Rheumatology, Arthritis Rheum*, 1995 ; 38(11) : 1541-6.
4. Behrens F, Shepard N, Mitchell N. Alterations of rabbit articular cartilage by intra-articular injections of glucocorticoids. *J Bone Joint Surg Am*, 1975 ; 57(1) : 70-6.
5. Hanpoong pharmaceutical company. Herbal composition for treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 10-1321754, 2013 : 1-21.
6. Herbal medical professor coeditorship. Herbal medicine. Seoul : Younglimsa, 1999 : 1-775.
7. Ko BS, Kang EJ, Kim HK. Isolation of sinapic acid esters from Raphani semen. *Kor J Pharmacogn*, 2000 ; 31(4) : 434-7.
8. Wang Y, Zhou J, Fu S, Wang C, Zhou B. Preventive Effects of Protocatechuic Acid on LPS-Induced Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts via Activating PPAR-γ. *Inflammation*, 2015 ; 38(3) : 1080-4.
9. Chen WP, Wu LD. Chlorogenic acid suppresses interleukin-1β-induced inflammatory mediators in human chondrocytes. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014 ; 7(12) : 8797-801.
10. Jung HJ, Park HJ, Kim RG, Shin KM, Ha J, Choi JW, Kim HJ, Lee YS, Lee KT. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriodendrin isolated from the stem bark of *Acanthopanax senticosus*. *Planta Med*, 2003 ; 69(7) : 610-6.
11. Park KH, Park M, Choi SE, Jeong MS, Kwon JH, Oh MH, Choi HK, Seo SJ, Lee MW. The anti-oxidative and anti-inflammatory effects of caffeoyl derivatives from the roots of *Aconitum koreanum* R. *RAYMOND, Biol Pharm Bull*, 2009 ; 32(12) : 2029-33.
12. Cho N, Huh J, Yang H, Jeong EJ, Kim YC, Kim J, Sung SH. Chemical constituents of *Polygala tenuifolia* roots and their inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2012 ; 27(1) : 1-4.
13. Suzuki Y, Oyama T, Ishige A, Isono T, Asami A, Ikeda Y, Noguchi M, Omiya Y. Antinociceptive mechanism of the aconitine alkaloids mesaconitine and benzoylmesaconine. *Planta Med*, 1994 ; 60(5) : 391-4.

14. Jo JE, Lee AY, Kim HS, Moon BC, Choi G, Ji Y, Kim HK. Content Comparative Analysis and Classification for *Piniellia ternate*, *P. pedatisecta* and *Typhonium flagelliforme* by HPLC-PDA analysis. *Kor J Herbol*, 2013 ; 28(5) : 95-101.
15. Park JH, Jung JH, Park SI, Park SS. Studies on physical and chemical quality evaluation of crude drugs preparations analysis of So Cheong Ryong Tang. *Kor J Pharmacogn*, 1998 ; 29(1) : 35-9.
16. Kim OS, Seo CS, Shin HK. Simultaneous Determination of Gumiganghwal-tang and Its Anti-atherosclerotic Effect. *Kor J Orient Pre Med Soc*, 2013 ; 17(3) : 165-76.
17. Seo CS, Kim OS, Shin HK. Quantitative Determination and Antioxidant Effects of Cheonwangbosimdan. *Kor J Pharmacogn*, 2014 ; 45(4) : 300-14.
18. Kwon YJ, Jang GC, Rha HH, Kim YH, Rhee MS. The study of sugar analysis in licorice extract by HPLC. *J Kor Soc Tobacco Sci*, 2005 ; 27(1) : 114-9.
19. Ko J, Lee MS, Kwak BM, Ahn JH, Park JS, Kwon JH. Determination of Isomaltooligosaccharides in Yoghurts by Using HPLC-ELSD. *Korean J Food Sci An*, 2013 ; 33(3) : 417-24.
20. Kim SG, Poudel A, Kim YK, Jo HK, Jung HJ. Development of simultaneous analysis for marker constituents in Hwangryunhaedok-tang and its application in commercial herbal formulas. *J Nat Med*, 2013 ; 67(2) : 390-8.
21. Kim OS, Seo CS, Shin HK. Simultaneous Determination of Gumiganghwal-tang and Its Anti-atherosclerotic Effect. *Kor J Orient Pre Med Soc*, 2013 ; 17(3) : 165-76.
22. Miranda TA, Silva PH, Pianetti GA, César IC. Simultaneous quantitation of chloroquine and primaquine by UPLC-DAD and comparison with a HPLC-DAD method. *Malar J*, 2015 ; 14(1) : 29.