

고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 마황 및 월비가출탕 전탕액에서 에페드린류의 동시분석

송미영 · 김정옥¹ · 임현희¹ · 김호준²

더리셋한의원, ¹한국한의학진흥원, ²동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Simultaneous Determination of Ephedrine Alkaloids in *Ephedra sinica* and *Wolbigachul-tang* by High Performance Liquid Chromatography

Miyoung Song, Jung-Ok Kim¹, HyunHee Leem¹, Hojun Kim²

The Reset Korean Medicine Clinic, ¹National Institute for Korean Medicine Development, ²Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University

Received: November 6, 2020
Revised: December 12, 2020
Accepted: December 14, 2020

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, 27, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2020 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: *Ephedra sinica* and *Wolbigachul-tang* which contains *Ephedra sinica* are used to treat obesity in Korean medicine. The aim of this study was to analyze the quantities of ephedrine alkaloids by high-performance liquid chromatography.

Methods: The analysis was performed using a YMC-Triat C18 column with operating at 25°C, and UV detection at 210 nm. The mobile phase used a gradient flow with 0.1% H₃PO₄ in water and acetonitrile. Specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection, and limit of quantification were measured for validation analysis. This method was applied to analyze the quantities of ephedrine alkaloids in *Ephedra sinica* and *Wolbigachul-tang*.

Results: The concentration per *Ephedra sinica* (gram) of ephedrine and pseudoephedrine in *Ephedra sinica* decoction are 4.74±0.22 mg and 2.19±0.10 mg, respectively and in *Wolbigachul-tang* decoction are 6.39±0.34 mg and 2.97±0.21 mg, respectively. The retention time of ephedrine was 23.6 min and that of pseudoephedrine was 25.8 min, and norephedrine and methylephedrine were not detected.

Conclusions: In conclusion, analyzed the concentration of ephedrine alkaloids in *Ephedra sinica* and *Wolbigachul-tang* by the developed validation method.

Key Words: *Ephedra sinica*, *Wolbigachul-tang*, Ephedrine, Pseudoephedrine, High pressure liquid chromatography

서론

마황은 발한산한(發汗散寒), 이수소종(利水消腫), 선폐평천(宣肺平喘)의 효능을 가진 약재로서¹⁾, 한방 비만 처방에서 다빈도로 사용되는 약물 중 하나이다²⁾. 마황의 주성분은 ephedrine-type alkaloids (ETA)로서 전체의 0.5~2.5%를 차지하는데 이 중 ephedrine이 총 alkaloids의 30~90%로 가장 많으며, 그 외 pseudoephedrine, methylephedrine, methylpseudoephedrine, norephedrine 및 norpseudoephedrine

이 있다. 이들 ETA는 구조적으로도 유사하며 약리학적으로도 비슷한 성질을 지닌다³⁾.

마황의 항비만 효능은 국내외 여러 임상 연구를 통해 확인되었으며⁴⁻⁶⁾, 비만 한의임상진료지침에서도 비만 치료 목적으로 마황을 처방하는 것에 대해 권고등급 B로 나타난 바 있다¹⁰⁾. Ephedrine은 교감신경 활성을 통해 여러 작용을 나타내는데 항비만 효능의 기전과 관련해서는 대뇌 식욕 포만 중추에 대해 α 교감신경을 자극하고, 간접적으로는 dopamine 활성을 통해 식욕을 억제시킨다²⁾.

또한 β 교감신경자극을 통해 갈색 지방세포에서 열 발생을 촉진시킴으로써 에너지 소비를 촉진시키는 효능도 나타낸다¹¹⁾.

마황은 전문적으로 처방되어야 하는 약물이므로, 미국 FDA는 마황 또는 에페드린의 건강기능식품으로서 사용을 금지한 바 있으며²⁾, 마황은 국내에서는 전문한의약품으로서 한의사에 의해 처방되고 있다.

한방비만학회에서는 비만치료제로서 마황 사용에 대한 임상진료지침에 대한 연구 결과를 발표한 바 있지만¹²⁾, 마황의 안전성과 관련하여 대규모 임상 연구 및 마황 전당액의 ephedrine 성분 분석에 관한 연구는 이뤄지지 못하였다. 본 연구에서는 비만 치료 목적으로 마황 처방 시 마황 용량 기준과 관련한 기반 연구로서 마황 전당액 및 마황이 포함된 대표 비만처방인 월비가출탕에서 에페드린류 성분분석을 위한 동시분석법을 확립하고 이를 이용하여 함량 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 약물 조제

마황은 옴니허브(Omniherb, Daegu, Korea)에서 초마황으로 구입하였으며, 석고, 창출, 생강, 대추, 감초는 태원당(Taewondang, Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 마황 전당액과 월비가출탕 전당액은 동국대학교 일산한방병원에 의뢰하여 탕전 기기, 가열 시간 및 물의 양을 동일하게 하였으며 일반적인 한약의 전당법과 동일한 조건에서 추출하고자 하였다. 마황 전당액은 마황 108 g을, 월비가출탕 전당액은 마황 24 g, 석고 32 g, 생강 12 g, 대조 16 g, 감초 8 g, 창출 16 g (총 108 g, 1일 분량: 마황 12 g, 석고 16 g, 생강 6 g, 대조 8 g, 감초 4 g, 창출 8 g 기준)을 각각 옹기 탕전기(Choeunnara, Seoul, Korea)에 물 1,200 cc와 함께 넣고 2시간 동안 가열하여 추출하였다. 이상과 같은 방법으로 총 3회씩 추출하여 마황 전당액 및 월비가출탕 전당액에서 각각 3종의 추출물을 획득하였다. 또한 월비가출탕의 구성 약재인 석고, 생강, 대조, 감초 및 창출 각 50 g을 각각 물 600 cc에 넣고 옹기 탕전기에 2시간 동안 가열하여 추출하였다.

이들 추출물을 filter paper (Whatman No. 3; Whatman, Maidstone, UK)를 통해 여과한 후에 회전식 진공 농축기 (Tokyo Rikakikai Co, Ltd., Tokyo, Japan)로 농축한 다음

동결건조기(Ilshin BioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)를 이용하여 동결건조물로 제조하여 실험에 사용하였다. 수율은 마황 전당액 추출물이 14.2±0.2%, 월비가출탕 전당액 추출물이 18.2±0.4%이었다.

2. 표준액 및 검액 조제

표준물질로 사용한 ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine 및 methylephedrine은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 각 표준물질을 정밀하게 취한 후 50% 메탄올에 녹여 1 mg/mL의 농도로 표준원액을 조제하고 이를 일정한 농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 또한 마황 전당액(0.03 g) 및 월비가출탕 전당액(0.1 g)을 각각 취하여 50% 메탄올 50 mL를 첨가하고 30분간 초음파 추출한 다음 여과하여 사용하였다.

3. High performance liquid chromatography 분석 조건

분석 조건 확립을 위하여 대한민국약전에 근거한 마황 정량 분석법¹³⁾에 따라 분석을 실시한 후 이의 문제점 보완을 위해 방법을 수정하여 2회에 걸쳐 순차적으로 분석을 실시하였다. Table 1과 같은 수정된 방법으로 1차 분석 후 다시 2차 수정된 분석 방법을 통해 분석 조건을 확립할 수 있었다. 최종적으로 확립된 동시 분석 조건에서는 고정상은 YMC-Triat C18 (5 μ m, 4.6×250 mm; YMC, Kyoto, Japan) 칼럼을 이용하였고, 이동상은 0.1% phosphoric acid가 함유된 물과 아세트니트릴을 사용하여 시간에 따라 조성을 변화시키는 기울기 용리를 사용하였다(Table 1).

4. 분석법 밸리데이션

의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인에 따라 분석법 밸리데이션을 실시하였다. Ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine 및 methylephedrine 표준액을 사용하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 범위(range), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)을 측정하여 분석법의 타당성을 확보하였다.

1) 특이성(specificity)

분석법이 성분에 대하여 특이적이고 식별성을 가진 방법임을 검증하기 위해 피크가 명확하게 분리됨을 확인하

Table 1. HPLC Analytical Conditions

Classification	Condition	Explanation		
1st condition	Instrument	Agilent 1260 series		
	Column	Phenyl-Hexyl column		
	Oven temperature	25°C		
	Wave length	UV 254 nm		
	Injection volume	20 μ L		
		A: 0.1% Trifluoroacetic acid in H ₂ O B: Acetonitrile		
		Time (min)	A (%)	B (%)
		0	92	8
		15	92	8
	Mobile phase	20	90	10
	25	90	10	
	80	53	47	
	85	40	60	
	90	40	60	
2nd condition	Instrument	Agilent 1260 series		
	Column	YMC-Triat C18 (5 μ m, 4.6×250 mm)		
	Oven temperature	25°C		
	Wave length	UV 210 nm		
	Injection volume	20 μ L		
		A : 0.1% H ₃ PO ₄ in H ₂ O B : Acetonitrile		
		Time (min)	A (%)	B (%)
		0	95	5
		35	95	5
	Mobile phase	40	85	15
	50	85	15	
	70	55	45	
	75	0	100	
	90	0	100	

였으며, photodiode array로 성분의 단일성 여부도 확인하였다.

2) 직선성(linearity) 및 범위(range)

Ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine 및 methyl-ephedrine은 6.25~100 μ g/mL의 농도로 표준액을 제조하고, 이를 확립된 동시분석법을 이용하여 작성하였으며, 검량선으로부터 직선식의 상관계수(correlation coefficient, R²)를 구하였다.

3) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계 및 정량한계는 반응의 표준편차와 검량선의

기울기에 근거하는 방법으로 각 표준물질의 표준편차(standard deviation, σ)를 검량선의 기울기(slope, S)로 나눈 값으로 계산하였다.

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S, LOQ = 10 \times \sigma/S$$

4) 정확성(accuracy)

정확성은 회수율 시험법(recovery test)으로 측정하였으며 마황 전탕액 및 월비가출당 검액에 표준용액을 각각 저, 중, 고 3가지 농도(12.5, 50, 80 μ g/mL)로 첨가한 뒤 혼합한 후 3회 반복 분석하여 첨가된 표준물질의 회수율로 확인하였다.

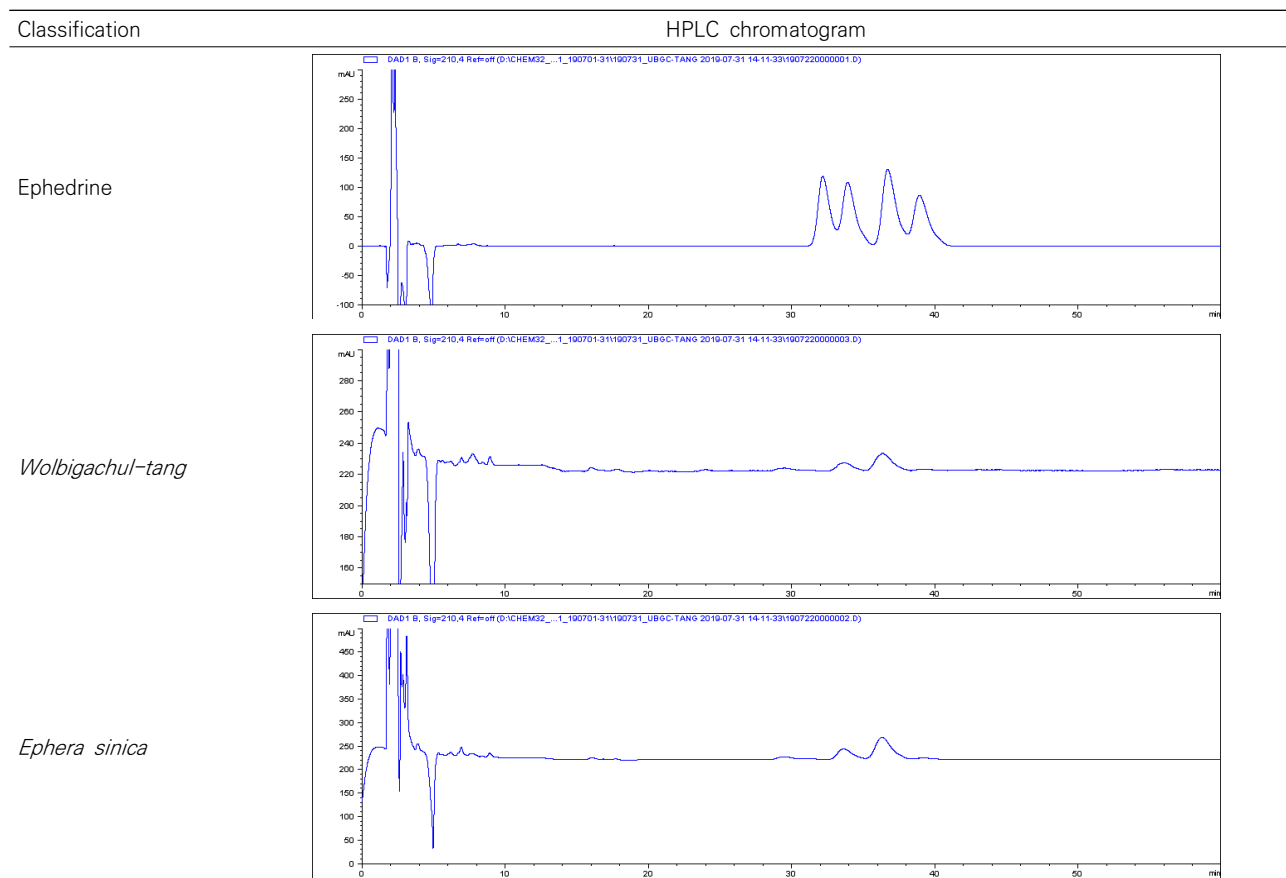


Fig. 1. HPLC chromatogram of a standard mixture according to the method in Korean pharmacopoeia. HPLC: high-performance liquid chromatography.

5) 정밀성(precision)

정밀성은 동일한 시료를 확립된 방법에 따라 반복 측정하였을 때 각각의 측정값들의 오차를 측정하는 반복 정밀성으로 확인하였다. 즉 각 표준용액을 직선성이 확인된 농도 범위 내의 3가지 농도의 혼합 표준용액을 제조한 후 전 조작을 6회 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시하여 얻은 결과의 상대표준편차(relative standard deviation, %RSD)로 확인하였다.

6) 지표성분 동시분석

각각의 표준액과 마황 전탕액, 월비가출탕 전탕액을 확립된 동시분석법으로 분석하고 면적 대비법으로 함량을 산출하였다.

결과

1. 분석조건 확립

마황 전탕액과 월비가출탕 전탕액의 에페드린류 벨리테이션을 위하여 대한민국의약품의 마황 정량 분석법에 따라 분석을 실시한 결과 표준품의 분리능이 낮고 시료의 감도 및 재현성이 확보되지 않았다(Fig. 1). 상기 단점이 보완하기 위하여 분석조건을 개선하여 실험하였으나 구성 약제 성분의 일부가 표준시료와 중복되어 간섭피크가 발생하는 문제점이 발견되었다(Fig. 2). 이에 분석용 산으로써 사용된 trifluoroacetic acid (UV cut off: 254 nm)을 H₃PO₄ (UV cut off: 210 nm)으로 조건을 변경하여 최종적으로 분석 조건을 확립하였다(Fig. 3).

2. 특이성

확립된 분석조건을 통해 에페드린 표준액, 마황 전탕액 및

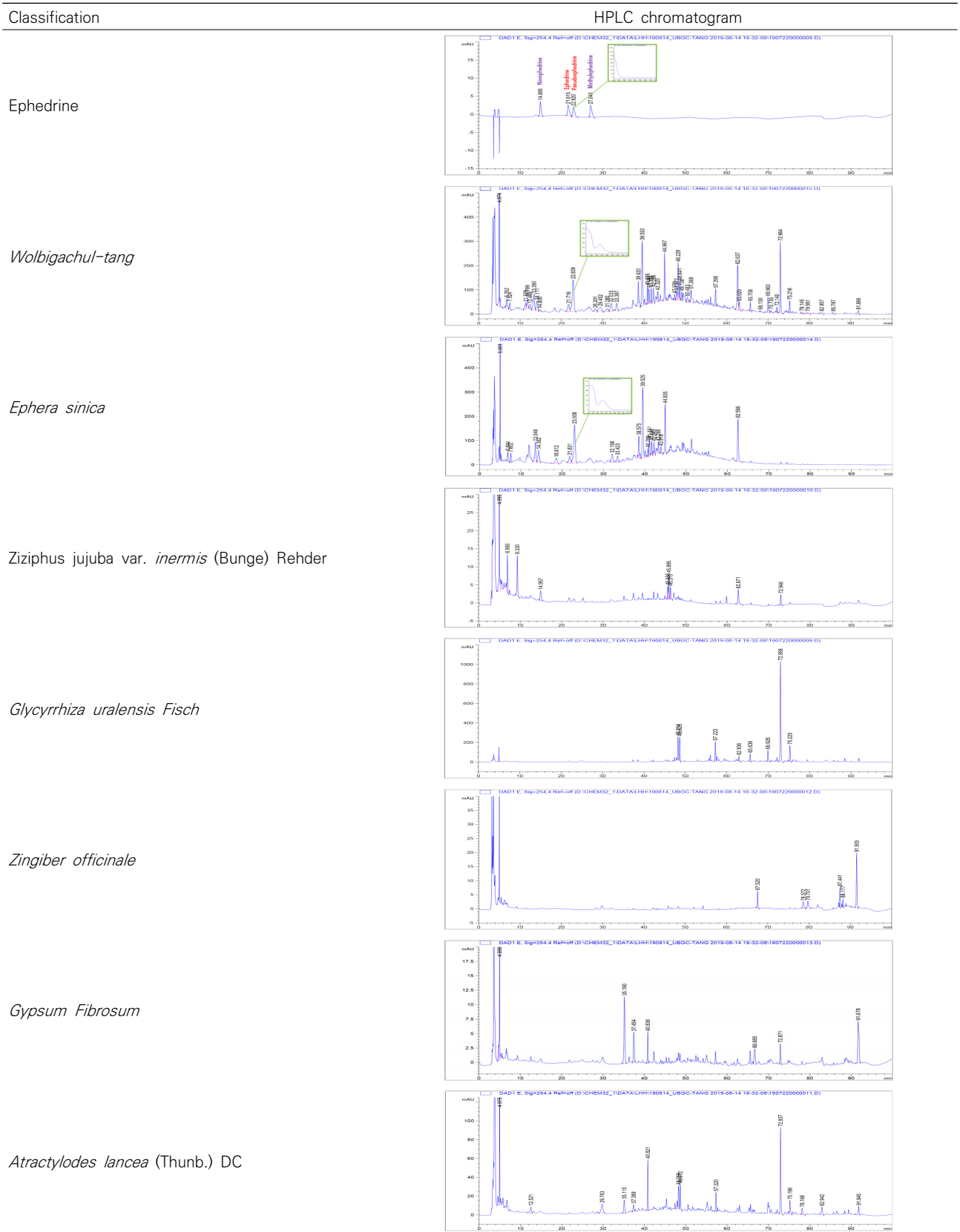


Fig. 2. HPLC chromatogram of a standard mixture according to the 1st modified method. HPLC: high-performance liquid chromatography.

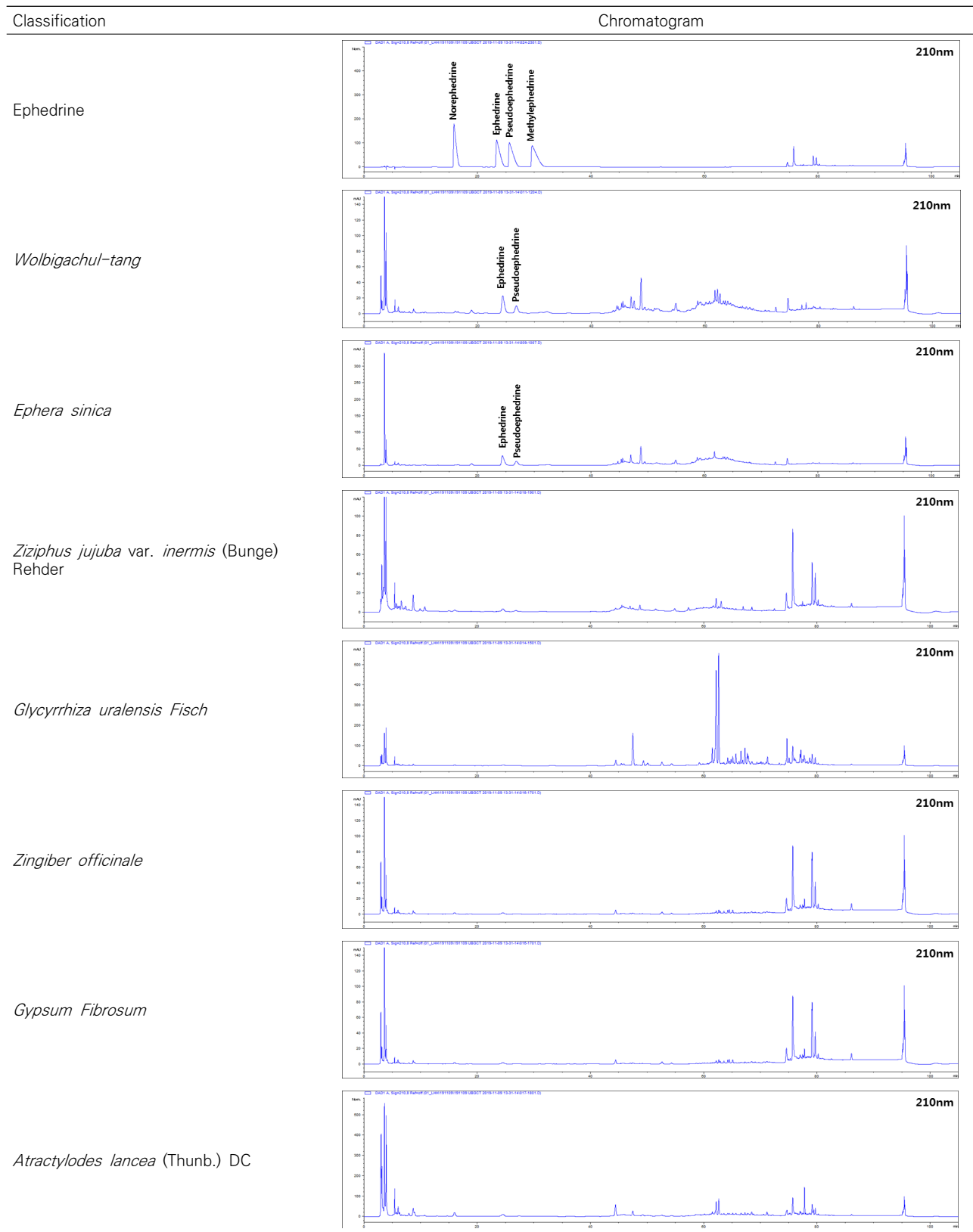
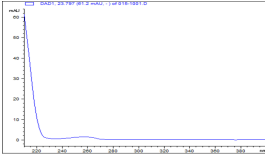
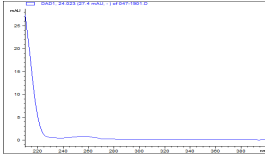
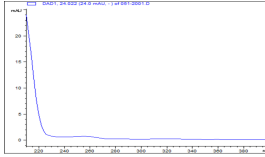
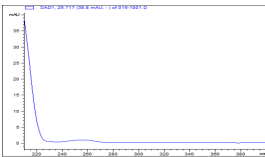
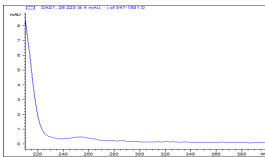
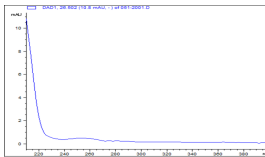


Fig. 3. HPLC chromatogram of a standard mixture according to the 2nd modified (established) method. HPLC: high-performance liquid chromatography.

Table 2. UV Spectrum Analysis

Compunds	RT (min)	UV spectrum		
		Standard	<i>Ephera sinica</i>	<i>Wolbigachul-tang</i>
Ephedrine	23.6			
Pseudoephedrine	25.8			

RT: retention time

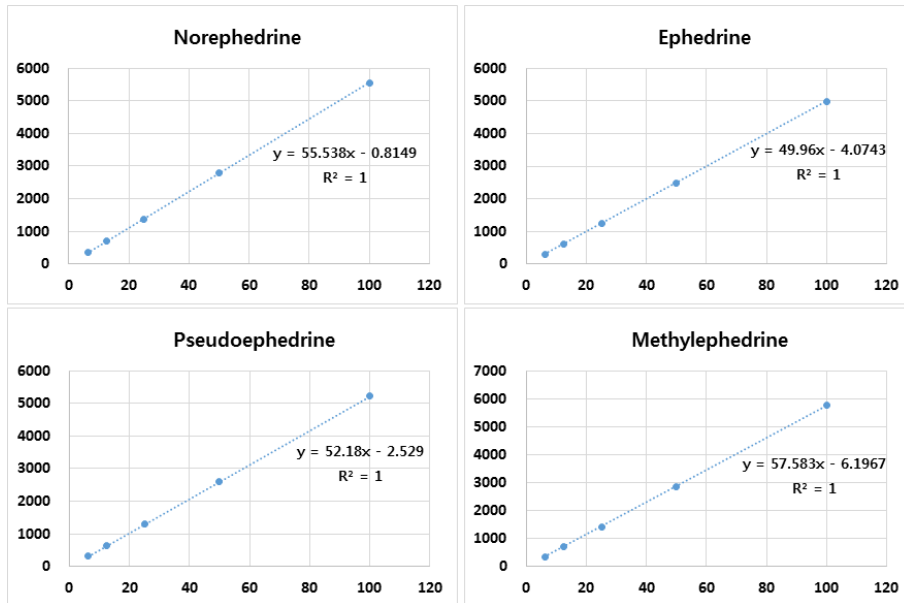


Fig. 4. Calibration curve of four kinds of markers.

월비가출탕에서 동일한 유지시간을 가지는 각 피크의 UV spectrum을 비교하여 동일 성분임을 확인하였다(Table 2).

3. 직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

확립된 분석조건을 이용하여 농도에 따른 피크 면적비로 지표성분 4종에 대한 검량선을 작성한 결과 상관계수 (R^2) 값이 1로 매우 높은 직선성을 나타냈다(Fig. 4). 또한 4종 지표성분에 대한 검출한계는 0.002~0.005 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 0.006~0.015 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Table 3).

4. 일내 및 일간 정밀성

분석오차를 의미하는 정밀성을 확인하기 위하여 실험 일내 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시한 결과 상대 표준편차(%RSD)는 1.30% 이내로 우수한 정밀성을 나타내었다(Table 4).

5. 정확성

마황 전탕액 및 월비가출탕 전탕액 검액에 표준용액을 각각 저농도, 중농도 및 고농도로 첨가한 뒤 회수율을 측

Table 3. The Linearity, Correlation Coefficient, LOD, and LOQ

Components	Linear range (μg/mL)	Slope	y intercept	R ² (n=6)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Norephedrine	6.25~100	55.538	-0.8149	1.0000	0.005	0.014
Ephedrine	6.25~100	49.960	-4.0743	1.0000	0.002	0.006
Pseudoephedrine	6.25~100	52.180	-2.529	1.0000	0.004	0.011
Methylephedrine	6.25~100	57.583	-6.196	1.0000	0.005	0.015

LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification, R²: correlation coefficient.

Table 4. Analytical Results of Intra- and Inter-day Test

Components	Concentration (μg/mL)	Intra-day				Inter-day			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)	Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Norephedrine	12.5	12.66	0.06	0.48	98.73	12.65	0.04	0.31	98.82
	50	50.46	0.26	0.51	99.08	50.37	0.14	0.28	99.27
	80	80.60	0.30	0.38	99.25	80.86	0.84	1.04	98.93
Ephedrine	12.5	12.68	0.15	1.19	98.60	12.62	0.12	0.94	99.03
	50	50.41	0.32	0.64	99.19	50.31	0.14	0.27	99.38
	80	80.61	0.41	0.51	99.24	80.80	0.74	0.91	99.01
Pseudoephedrine	12.5	12.73	0.17	1.30	98.18	12.63	0.14	1.09	99.00
	50	50.66	0.34	0.67	98.70	50.48	0.21	0.41	99.05
	80	80.85	0.49	0.61	98.95	80.95	0.77	0.95	98.82
Methylephedrine	12.5	12.73	0.04	0.31	98.20	12.71	0.05	0.41	98.33
	50	50.41	0.34	0.68	99.20	50.31	0.14	0.29	99.38
	80	80.69	0.41	0.51	99.15	80.85	0.76	0.94	98.95

SD: standard deviation, RSD: relative standard deviation.

Table 5. Analytical Result of Recovery Test

Sample	Peak	Spiked concentration (μg/mL)	Measured concentration (μg/mL)	SD	RSD (%)	Recovery (%)
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	12.5	13.85	0.070	0.50	110.77
		50	52.18	0.058	0.11	104.35
		80	85.74	0.191	0.22	107.18
	Pseudoephedrine	12.5	13.78	0.107	0.78	110.21
		50	52.89	0.044	0.08	105.78
		80	87.00	0.161	0.18	108.75
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	12.5	13.14	0.083	0.63	105.09
		50	52.45	0.011	0.02	104.90
		80	84.32	0.066	0.08	105.40
	Pseudoephedrine	12.5	13.18	0.035	0.27	105.44
		50	52.97	0.024	0.05	105.94
		80	84.76	0.108	0.13	105.95

SD: standard deviation, RSD: relative standard deviation.

정한 결과 104.35~110.77% (상대표준편차 0.011~0.191%)의 회수율을 나타내었다(Table 5).

6. 반복성

유지시간과 피크면적에 대한 반복성은 표준용액을 가지고 시간의 변화에 따른 기계의 변화 정도를 보기 위하

Table 6. Analytical Results of Repeatability

Sample	Peak	Retention time (min)						Avg.	SD	%RSD
		1	2	3	4	5	6			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	24.06	24.09	24.07	24.09	24.07	24.07	24.08	0.010	0.04
	Pseudoephedrine	26.41	26.44	26.41	26.44	26.42	26.43	26.42	0.013	0.05
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	24.10	24.12	24.11	24.12	24.12	24.10	24.11	0.008	0.04
	Pseudoephedrine	26.44	26.45	26.45	26.45	26.43	26.42	26.44	0.012	0.04

Sample	Peak	Peak area (mAU)						Avg.	SD	%RSD
		1	2	3	4	5	6			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	880.95	844.75	849.29	863.97	886.27	918.90	874.02	27.50	3.15
	Pseudoephedrine	413.15	399.93	407.99	408.36	415.57	432.05	412.84	10.83	2.62
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	811.12	731.64	763.47	774.38	722.43	737.09	756.69	33.19	4.39
	Pseudoephedrine	379.40	347.54	357.80	362.92	343.03	351.89	357.10	13.02	3.65

Sample	Peak	Relative retention time						Avg.	SD	%RSD
		1	2	3	4	5	6			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	1.097	1.098	1.097	1.098	1.098	1.098	1.098	0.000	0.017
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	1.097	1.097	1.097	1.096	1.096	1.096	1.097	0.000	0.034

Sample	Peak	Relative peak area						Avg.	SD	%RSD
		1	2	3	4	5	6			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	0.469	0.473	0.480	0.473	0.469	0.470	0.472	0.004	0.917
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	0.468	0.475	0.469	0.469	0.475	0.477	0.472	0.004	0.883

Avg.: average, Stdv: standard deviation, %RSD: relative standard deviation.

여 6회 주입하여 피크 시간과 피크면적을 측정하였으며 (Table 6), 실험실의 정밀성에 대해서 피크시간과 피크면적을 연속 3일간 측정하였다(Table 7). 상기 항목 모두 상대표준편차를 계산하여 확인한 결과 5.0% 이내의 반복성을 가지는 것으로 확인되었다.

7. 동시분석 결과

마황 전탕액과 월비가출탕 전탕액에 대해 각각 4가지 지표성분(ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine 및 methylephedrine) 중 검출된 두 가지 성분인 ephedrine과 pseudoephedrine에 대하여 확립된 분석법을 이용하여 함량분석을 실시하였으며 그 결과를 원료 약재 마황 1 g을 기준으로 나타내었다.

마황 1 g당 마황 전탕액의 경우 ephedrine 및 pseudoephedrine이 4.74±0.22 mg 및 2.19±0.10 mg 함유되어 있었으며, 월비가출탕 전탕액은 ephedrine 및 pseudoephedrine

이 6.39±0.34 mg 및 2.97±0.21 mg 추출되었음을 확인할 수 있었다(Table 8).

고찰 및 결론

마황 또는 마황이 함유된 복합 처방의 성분분석에 대한 기존 연구에서 마황 산지에 따라¹⁴⁾, 마황 물 추출물을 만드는 전탕 조건에 따라¹⁵⁾ ephedrine 농도가 상이하게 측정됨을 알 수 있었다. 특히 마황 전탕 시에 배합된 물의 양, 전탕 시간에 따라 추출되는 ephedrine 함량이 다르기 때문에¹⁵⁾, 국내 한방 의료기관에서 사용하는 일반적인 전탕방법을 기준으로 추출된 마황 성분의 분석 결과가 필요하다. 한편 한의학에서는 마황 단독만을 전탕하여 처방하는 경우는 거의 없으며, 대부분 마황과 여러 약제가 배합된 복합처방으로 전탕을 하는데, 기존 연구에서 마황과 배합된 약물에 따라서 ephedrine 함량이 다르게 추출된

Table 7. Analytical Results of Intermediate Precision

Sample	Peak	Retention time			Avg.	SD	%RSD
		Day 1	Day 2	Day 3			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	24.08	24.05	24.18	24.10	0.065	0.27
	Pseudoephedrine	26.42	26.40	26.55	26.55	0.079	0.30
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	24.11	24.06	24.29	24.29	0.122	0.51
	Pseudoephedrine	26.44	26.38	26.66	26.66	0.146	0.55

Sample	Peak	Peak area			Avg.	SD	%RSD
		Day 1	Day 2	Day 3			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	874.02	893.60	901.43	889.68	14.12	1.59
	Pseudoephedrine	412.84	432.20	447.26	430.77	17.25	4.00
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	756.69	778.37	779.30	771.45	12.80	1.66
	Pseudoephedrine	357.10	368.09	378.17	367.79	10.54	2.87

Sample	Peak	Relative retention time			Avg.	SD	%RSD
		Day 1	Day 2	Day 3			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	1.098	1.098	1.098	1.098	0.000	0.000
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	1.097	1.097	1.097	1.097	0.001	0.047

Sample	Peak	Relative peak area			Avg.	SD	%RSD
		Day 1	Day 2	Day 3			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	0.472	0.484	0.496	0.484	0.012	0.025
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
	Pseudoephedrine	0.472	0.473	0.485	0.477	0.007	1.561

Avg: average, Stdv: standard deviation, %RSD: relative standard deviation.

Table 8. Contents of Ephedrine and Pseudoephedrine in *Ephera sinica* and *Wolbigachul-tang*

Sample	Compounds	Contents (mg/g, <i>Ephera sinica</i>)			Avg.	SD	%RSD
		No. 1	No. 2	No. 3			
<i>Ephera sinica</i>	Ephedrine	4.63	4.61	4.99	4.74	0.22	4.57
	Pseudoephedrine	2.14	2.13	2.31	2.19	0.10	4.76
<i>Wolbigachul-tang</i>	Ephedrine	6.03	6.70	6.45	6.39	0.34	5.25
	Pseudoephedrine	2.79	3.20	2.93	2.97	0.21	7.04

Avg.: average, SD: standard deviation, %RSD: relative standard deviation.

것으로 보고된 바 있다. 마황탕, 마황감석탕, 마황의감탕, 의이인탕, 소청룡탕, 계마각반탕, 갈근탕 및 갈근가신이 천궁탕을 같은 전탕 조건하에서 추출했을 때 마황탕을 기준으로 마황감석탕을 제외한 다른 처방들은 마황탕과 비슷하거나 약간 낮은 수준으로 ephedrine 함량이 측정되었으나, 마황감석탕은 마황탕보다 ephedrine 함량이 더 높게 측정되었다. 마황감석탕에 포함된 석고의 주성분이 황산

칼슘인데, 황산칼슘과 같은 무기염 성분이 ephedrine 추출 농도 증가와 관련된 것으로 생각된다⁶⁾.

본 연구에서는 비만 처방에서 많이 사용되는 마황과 마황이 포함된 복합 처방에서 에페드린류 동시분석법을 확립하고 이를 통해 함량을 분석하고자 하였다. 마황이 포함된 복합 처방 선정 시 비만치료에 다용되는 처방이며 효율적인 밸리데이션을 위하여 포함된 약물의 개수가 많지 않

은 처방을 우선적으로 고려하였다. 이러한 조건에 해당되는 처방 중 마황이 석고와 함께 배합되었을 때 ephedrine 성분이 보다 높게 추출되었던 이전 연구 결과¹⁶⁾를 참고하여 석고와 배합된 처방에 더욱 관심을 갖게 되었으며, 그 결과 복합 처방 실험 약물로 월비가출탕을 선택하게 되었다. 또한 동국대학교 일산한방병원에 전탕을 의뢰하여 한방 의료기관에서 일반적으로 실시하는 전탕법과 동일한 조건에서 추출하였다.

대한민국약전의 마황 정량 분석법에 따라 벨리데이션 분석을 실시한 결과 표준품의 분리능이 낮고 시료의 감도 및 재현성이 확보되지 않았기에 동시분석법 확립을 위하여 조건을 변경하면서 여러 차례 수정 보완 실험을 한 결과 분석법을 확립할 수 있었다. 확립된 분석법에 대한 검증으로 특이성, 정확성, 직선성, 검출한계, 정량한계 및 정밀성의 측정을 통하여 신뢰성을 검증하여 분석법의 타당성을 확보하였다.

마황 전탕액과 월비가출탕 전탕액의 성분 분석 결과 4 가지 지표성분 중 norephedrine과 methylephedrine은 검출되지 않았다. Ephedrine과 pseudoephedrine에 대하여 확립된 분석법을 이용하여 함량분석을 실시하였으며 원료 한약재 마황 1 g 중 마황 전탕액의 경우 ephedrine 및 pseudoephedrine이 4.74±0.22 mg 및 2.19±0.10 mg으로 각각 함유되어 있었으며, 월비가출탕은 6.39±0.34 mg 및 2.97±0.21 mg으로 각각 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구는 특정 1개의 마황 원료 약재를 통한 분석이므로 성분 분석 결과의 대표성을 갖기 위해서는 한방의료기관으로 공급되고 있는 마황 샘플을 보다 다양화하여 분석할 필요가 있다.

한편 의약품에서 ephedrine과 pseudoephedrine은 진해거담제, 비충혈완화제 등으로 사용되고 있다. 허용용량은 ephedrine은 1일 150 mg 이내, pseudoephedrine은 1일 240 mg 이내이며^{17,18)}, 이들 두 성분의 병용 투여 시 용량 기준은 제시된 바가 없다. Ephedrine과 pseudoephedrine 및 기타 ETA 성분이 인체에서 유사한 작용을 나타내므로 ephedrine과 pseudoephedrine을 합하여 총 알칼로이드 함량을 산출해보면 마황 전탕액에는 마황 1 g 중 약 6.93 mg, 월비가출탕 전탕액에는 마황 1 g 중 약 9.36 mg의 총 알칼로이드가 함유되어 있다. 이를 ephedrine 의약품 1일 허용용량 150 mg을 기준으로 계산하면 마황 전탕액은 1일 기준 마황 약 21.64 g까지 허용용량 내에 해당되며, 월

비가출탕 전탕액은 마황 약 16.02 g이 허용용량 내로 추측할 수 있다. 그러나 이는 호흡기계 질환 치료 목적으로 보통 단기간 처방되는 ephedrine 제제를 기준으로 한 산출이기 때문에 다이어트 치료제로서 장기 복용 시 허용용량에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

구체적으로는 비만 치료제로서 마황이 함유된 추출물의 1일 마황 허용량을 보다 근거 있게 제시하기 위해서는 용량별 안전성, 유효성 확증을 위한 체계적인 임상 시험 수행이 필요할 것이다. 또한 식물의 기원, 산지에 따라 총 alkaloids의 함량이 변할 가능성이 크므로 마황 품질 및 추출과정의 표준화 작업 역시 필요하다.

References

1. Association of Professors of Herbology in Korean Medicine. Herbology. Seoul : Younglimsa. 1998 : 121-3.
2. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Review of literature on herbal medicines for the treatment of obesity in Korea -Mainly papers since 2000. J Korean Med Rehabil. 2006 ; 16(3) : 65-82.
3. Andraws R, Chawla P, Brown DL. Cardiovascular effects of ephedra alkaloids: a comprehensive review. Prog Cardiovasc Dis. 2005 ; 47(4) : 217-25.
4. Kim HJ, Park JM, Kim JA, Ko BP. Effect of herbal Ephedra sinica and Evodia rutaecarpa on body composition and resting metabolic rate: a randomized, double-blind clinical trial in Korean premenopausal women. J Acupunct Meridian Stud. 2008 ; 1(2) : 128-38.
5. Boozer CN, Daly PA, Homel P, Solomon JL, Blanchard D, Nasser JA, et al. Herbal ephedra/caffeine for weight loss: a 6-month randomized safety and efficacy trial. Int J Obes Relat Metab Disord. 2002 ; 26(5) : 593-604.
6. Boozer CN, Nasser JA, Heymsfield SB, Wang V, Chen G, Solomon JL. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. Int J Obes Relat Metab Disord. 2001 ; 25(3) : 316-24.
7. Coffey CS, Steiner D, Baker BA, Allison DB. A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of a product containing ephedrine, caffeine, and other ingredients from herbal sources for treatment of overweight and obesity in the absence of lifestyle treatment.

- Int J Obes Relat Metab Disord. 2004 ; 28(11) : 1411-9.
8. Greenway FL, de Jonge L, Blanchard D, Frisard M, Smith SR. Effect of a dietary herbal supplement containing caffeine and ephedra on weight, metabolic rate, and body composition. *Obes Res* 2004 ; 12: 1152-7.
9. Hackman RM, Havel PJ, Schwartz HJ, Rutledge JC, Watnik MR, Noceti EM, et al. Multinutrient supplement containing ephedra and caffeine causes weight loss and improves metabolic risk factors in obese women: a randomized controlled trial. *Int J Obes (Lond)*. 2006 ; 30(10) : 1545-56.
10. Korea Institute of Oriental Medicine. Obesity, Korean medicine clinical practice guideline. Seoul : Elsevier Korea. 2016 : 84-90.
11. Bukowiecki L, Jahjah L, Follea N. Ephedrine, a potential slimming drug, directly stimulates thermogenesis in brown adipocytes via beta-adrenoreceptors. *Int J Obes*. 1982 ; 6(4) : 343-50.
12. Kim H, Han CH, Lee EJ, Song YK, Shin BC, Kim YK. A clinical practice guideline for Ma-huang(Ephedra sinica) prescription in obesity. *J Korean Med Obes Res*. 2007 ; 7(2) : 27-37.
13. Korea Food and Drug Administration. The Korean pharmacopoeia. 12th ed. Seoul : The Research Foundation for Pharmaceutical Quality. 2019.
14. Kazuhiko S, Toshiyuki O, Tetsuo M. A simultaneous determination of norephedrine, pseudoephedrine, ephedrine and methylephedrine in Ephedrae Herba and oriental pharmaceutical preparations by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull*. 1983 ; 31(7) : 2359-65.
15. Lee MK, Cheng BW, Che CT, Hsieh DP. Cytotoxicity assessment of Ma-huang (Ephedra) under different conditions of preparation. *Toxicol Sci*. 2000 ; 56(2) : 424-30.
16. Okamura N, Miki H, Harada T, Yamashita S, Masaoka Y, Nakamoto Y, et al. Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 1999 ; 20(1-2) : 363-72.
17. Package Information of Primatene[®] Tablets [Internet]. Maryland: Wyeth Consumer Healthcare LLC; 2019 [cited Feb 17 2020]. Available from: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=9005482c-25ae-d365-33d1-29269532c74d&type=display>.
18. Package Information of SUDAFED[®] Sinus Congestion [Internet]. Maryland: Johnson & Johnson Consumer Inc; 2019 [cited Feb 17 2020]. Available from: <https://www.sudafed.com/products/sudafed-sinus-congestion>.