

HPLC 분석법을 이용한 理中湯 제제의 품질평가

하우람[#], 박진형, 윤동인, 이장천, 김정훈^{*}

부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부

Quality Assessment of Ijung-tang Preparations Using a HPLC Analysis

Woo-Ram Ha[#], Jin-Hyung Park, Dong-In Yun, Jang-Cheon Lee, Jung-Hoon Kim^{*}

Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University,
Yongsan, Gyeongnam 50612, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Ijung-tang (IJT) is a traditional herbal formula and has been used to treat digestive diseases such as abdominal pain, vomiting, and diarrhea. IJT consists of four herbal medicines, Ginseng radix, Atractylodis rhizoma alba, Zingiberis rhizoma, and Glycyrrhizae radix et rhizoma, containing various bioactive compounds. Quality assesment of IJT preparations was performed by analytical method for determining marker compounds.

Methods : Determination of seven marker compounds in IJT preparations was quantitatively conducted by high-performance liquid chromatography equipped with a diode-array detector. The marker compounds were separated on a reversed-phase C18 column and the analytical method was successfully validated. Chemometric analysis was performed to compare IJT water extracts and commercial IJT granules.

Results : Limit of detection and limit of quantification values were in the ranges of 0.093-2,649 µg/mL and 0.283-8,027 µg/mL, respectively. Precisions were 0.30-3.87% within a day and 0.23-2.35% over three consecutive days. Recoveries of the marker compounds ranged from 87.35-107.05%, with relative standard deviation (RSD) values < 6.15%. Repeatabilities were < 1.20% and < 1.71% of RSD value for retention time and absolute peak area, respectively. The results from quantitative analysis showed that the quantities of seven marker compounds of IJT samples varied, as were found in principal component analysis and hierarchical clustering analysis.

Conclusions : The analytical method developed in the present study was precise and reliable to simultaneously determine marker compounds of IJT. Therefore, it can be used for the quality assessment of IJT preparations.

Key words : Ijung-tang, Quantitative analysis, Method development, Principal component analysis, Hierarchical clustering analysis

I. 서론

漢代 張仲景의 傷寒論에 최초로 기록되어 있는 理中湯(또는 理中丸)은 藿亂으로 인한 두통 및 발열, 통증 또는 太陰病으로 인한 黃疸, 腹痛, 泄瀉, 無渴 등 胃寒證에 사용하는 처방으로, 人蔘, 白朮, 乾薑, 炙甘草로 구성되어 있으며 寒冷性 위장질환, 즉 泄瀉, 嘔吐, 嘔逆, 消化不良, 食慾不振 뿐만 아

니라 脾胃의 陽氣虛에서 비롯되는 脈弱, 脈沈無力, 胸痺, 胸痞, 腹痛, 四肢逆冷, 陰寒重證 등의 증상을 치료하는데 사용된다¹⁻⁴⁾. 이러한 理中湯은 국민건강보험 급여 한약제제 56종 중 활용 빈도가 높은 처방으로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면, 理中湯은 아토피 발진 억제, 비장 결핍에 의한 신경내분비 면역 증강, 다리 부종 억제 등에 유효하고, 특히 체중감소 및 항 알레르기 및 아토피 피부염에 효과가 있는 등 다방

*Corresponding author : Jung-Hoon Kim,

Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yongsan, 50612, Republic of Korea
· Tel : +82-51-510-8456 · Fax : +82-51-510-8420 · E-mail: kmsct@pusan.ac.kr

#First author : Woo-Ram Ha,

Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yongsan, 50612, Republic of Korea
· Tel : +82-51-510-8456 · Fax : +82-51-510-8420 · E-mail: howram@naver.com

· Received : 12 April 2016 · Revised : 3 May 2016 · Accepted : 16 May 2016

면에서 약리작용 보고가 되고 있다³⁻⁹⁾. 또한, 理中湯에 여러 약재를 가감한 처방을 이용하여 함양작용, 대식세포의 산화분출, 면역력증가, 비염치료에 효과가 있다고 보고되어 있다⁶⁻⁹⁾.

현재 많은 제약회사에서 丸劑, 顆粒劑, 膏劑 등 다양한 제형으로 처방을 공급하고 있으나, 실제 한의사들이 사용하는 한방보험 과립제 생산액은 8.4% 내외로 다소 미비한 실정이다. 특히, 한약제제의 사용 정도를 나타내는 약제비 점유율이 1994년 27.79%에서 2006년에는 1.94%까지 감소하고 있는데, 이는 한의사들이 치료 수단으로 한약제제를 선호하지 않는 것을 의미하는 것으로, 이러한 감소의 원인으로 부형제, 복용량에 대한 불편 또는 약효에 대한 불신 등이 보고되었다¹⁰⁾. 또한 품질의 균질성 역시 한약제제에 대한 신뢰를 회복시키는데 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.

최근, HPLC를 통한 화학적 분석과 chemometric statistics는 한약처방의 품질관리에 널리 쓰이고 있다. Diode-array detector 또는 mass spectrometry 등의 검출기가 결합된 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC)를 통해 처방 내 여러 화합물에 대한 정성 및 정량 분석이 진행되고 있고, 이에 더하여 통계적 기법인 주성분분석(principal component analysis; PCA)와 계층적 군집분석(hierarchical clustering analysis; HCA)을 이용하여 한약 내 존재하는 다양한 성분의 화학특성이 보다 효과적으로 평가되고 있다¹¹⁾.

따라서 본 연구에서는 현재 유통되고 있는 理中湯 과립제의 품질을 비교해보고자 理中湯의 구성약재인 人蔘, 白朮, 乾薑, 甘草의 지표성분인 ginsenoside Rg1, atractylenolide III, 6-gingerol, glycyrrhizic acid, ononin, isoliquiritin, liquiritin 등 총 7종의 성분을 선정하여 HPLC를 이용한 동시분석법을 확립하고 각 성분의 함량 분석을 시행하였다. 그리고 주성분분석(PCA)과 계층적 군집분석(HCA) 등의 통계방법을 활용하여 理中湯 전탕액과 理中湯 과립제의 비교분석을 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

理中湯의 구성 한약재인 人蔘(Ginseng Radix;), 白朮(Atractylodis Rhizoma Alba), 乾薑(Zingiberis Rhizoma), 甘草(Glycyrrhizae Radix et Rhizoma) 등은 광명당제약(울산, 대한민국)에서 규격품을 구입하였다. 理中湯 과립제는 시중에 유통되고 있는 5개 회사의 혼합단미엑스산제를 사용하였다.

2. 시약

HPLC 분석을 위해 지표성분인 glycyrrhizic acid, isoliquiritin, ononin(이상 Chem Faces; Wuhan, Hubei, China), liquiritin, atractylenolide III(이상 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.; Chengdu, Sichuan, China), 6-gingerol, ginsenoside Rg1(이상 Wako Pure Chemical Industries Ltd.; Chuo-Ku, Osaka, Japan) 등을 구입하여 사용하였고, 각 지표성분들의

순도는 모두 98% 이상이었다. 각 지표성분의 화학구조는 Figure 1에 나타내었다.

분석에 사용한 HPLC 등급의 acetonitrile과 water는 J.T. Baker Inc(Center Valley, PA, USA)에서 구입하였고, trifluoroacetic acid(TFA)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

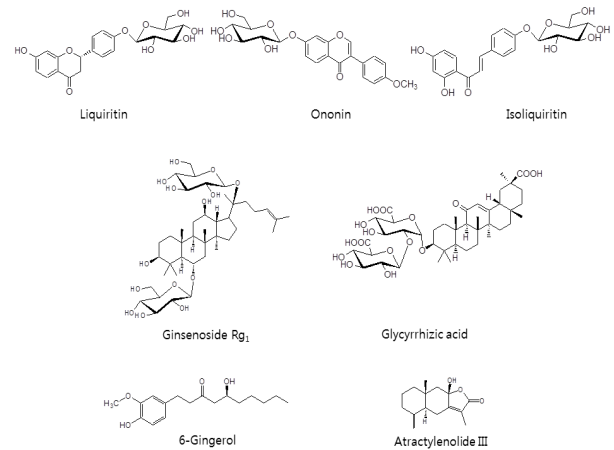


Figure 1. Chemical structures of the 7 standard compounds in liung-tang (JT)

3. HPLC 분석조건

분석에 사용된 HPLC 시스템은 auto-sampler, degasser, quaternary solvent pump, 및 diode-array detector (DAD)로 구성된 Agilent 1200(Agilent Technologies, CA, USA)이다. 컬럼으로는 CAPCELL PAK C18 column(250×4.6 mm, 5 μm; Shiseido, Japan)을 사용하였으며, 온도는 35℃를 유지하였다. 시료의 주입량은 10 μL이었고, UV 검출기의 파장은 205, 230, 250, 280, 360 nm로 설정하였다.

HPLC 분석에서 이동상은 유속 1.0 mL/min로 (A) 0.1% TFA in Water, (B) Acetonitrile을 사용하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Compositions of Mobile Phases for HPLC Analysis

Time (min)	0.1% TFA in Water (%)	Acetonitrile (%)
0	95	5
1	95	5
5	90	10
10	90	10
12	85	15
16	85	15
18	80	20
22	80	20
25	77	23
31	77	23

32	72	28
40	72	28
80	35	65
82	35	65
85	95	5
90	95	5

TFA, trifluoroacetic acid.

4. 표준용액의 조제

Glycyrrhizic acid, isoliquiritin, ononin, liquiritin, atractylenolide III, 6-gingerol, ginsenoside Rg1 등 7종의 표준물질의 무게를 정확하게 측정하고 메탄올에 녹여 모두 1000 µg/mL 농도의 stock solution을 조제하여 4°C에 보관하였다. 사용 전에 희석하여 working solution을 조제하여 사용하였다.

5. 理中湯 전탕액 및 검액의 조제

理中湯 전탕액은 한첩 분량의 구성약재(人蔘 8 g, 白朮 8 g, 乾薑 8 g, 甘草 4 g)를 정확하게 정량하여 300 mL의 1차 증류수와 함께 둥근바닥플라스크에 넣어주고, 외부센서로 온도측정이 가능한 디지털 히팅맨틀(MS-DM, 미성과학기기, 대한민국)에서 100°C에서 2시간동안 환류추출하여 얻었다. 전탕액을 소량 취해 동결건조한 뒤 얻은 추출물 200 mg을 정확히 정량하고 HPLC등급의 water 10 mL를 첨가하여 20 mg/mL의 농도로 조제한 후 0.2 µm syringe filter(BioFact, 대한민국)로 여과하여 검액으로 사용하였다.

5종의 理中湯 혼합단미엑스산제는 400 mg을 정확하게 정량하고 HPLC등급의 water 10 mL를 첨가하여 40 mg/mL 농도로 조제한 후, 2 µm syringe filter(BioFact, 대한민국)로 여과하여 검액으로 사용하였다.

6. 분석법 검증

1) 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection; LOD), 및 정량한계(limit of quantification; LOQ)

직선성(linearity) 및 범위(range)는 7종 지표성분의 농도 범위에 대하여 6가지 농도에 대한 피크면적을 토대로 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선은 상관계수(correlation coefficient, r^2)를 구하여 직선성을 판단하였다.

지표성분의 검출한계(limit of detection; LOD) 및 정량한계(limit of quantification; LOQ)는 다음의 공식을 통해 계산하였다.

$$LOD = 3.3 \times \text{standard deviation of the response/slope of the calibration curve}$$

$$LOQ = 10 \times \text{standard deviation of the response/slope of the calibration curve}$$

2) 정밀성(precision) 측정

정밀성(precision)은 지표성분에 대한 3가지 농도(저농도, 중농도, 고농도)를 기준으로 표준용액을 만들고 HPLC로 분석하여, 측정된 농도에 대한 상대표준편차(relative standard deviation, RSD, %)를 통해 평가하였다. 일내 정밀성(intra-day precision)은 일내에 동일 시료를 3회 이상 반복 측정하여 얻어진 상대표준편차 값으로 표시하였고, 일간 정밀성(inter-day precision)은 동일 시료를 각각 다른 날짜(3일 이상)에 측정 한 상대표준편차 값으로 표시하였다.

3) 회수율(recovery) 측정

회수율(recovery)을 통한 정확성(accuracy) 측정은 각각 서로 다른 2가지 농도의 지표성분(저농도, 고농도)을 시료에 첨가하고 분석 조건에 따라 시료를 분석하여 농도를 측정한다. 농도가 측정된 시료에서 첨가한 지표성분의 농도를 구한 후, 다음의 공식을 통하여 계산하였다.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{[(\text{detected concentration} - \text{initial concentration}) / \text{spiked concentration}] \times 100}{}$$

4) 반복성(repeatability) 측정

피크면적과 머무름 시간에 대한 반복성(repeatability)은 표준용액을 6회 반복 주입하여 면적과 머무름 시간의 반복성을 상대표준편차(relative standard deviation, RSD, %)를 계산하여 확인하였다.

7. 통계분석

주성분분석(principal component analysis, PCA)과 계층적 군집분석(hierarchical clustering analysis, HCA) 등은 통계프로그램인 'R (ver. 3.1.1)'을 이용하여 시행되었다.

III. 결 과

1. 분석조건의 확립

理中湯의 지표성분인 atractylenolide III, ginsenoside Rg1, 6-gingerol, glycyrrhizic acid, isoliquiritin, liquiritin 및 ononin에 대한 동시분석을 실시하기 위해 이동상의 기울기 조건과 종류, UV 검출파장을 최적화하여 분석을 진행하였다.

이동상의 종류는 0.5%(v/v) acetic acid가 함유된 water와 0.1%(v/v) TFA가 함유된 water를 비교한 결과, 각 peak간 분리능이 높은 0.1%(v/v) TFA가 함유된 water를 이동상으로 결정하였다. 기울기 조건은 0.1%(v/v) TFA가 함유된 water, acetonitrile을 이용하여 다양한 시험을 거쳐 결정하였다.

지표성분들의 최대흡광파장을 확인하여 ginsenoside Rg1은 205 nm, atractylenolide III는 230 nm, glycyrrhizic acid와 ononin은 250 nm, 6-gingerol과 liquiritin은 280 nm, isoliquiritin은 360 nm 파장에서 각각 피크면적을 측정하였다.

7개의 지표성분들이 주어진 분석조건에서 완전하게 분리되었으며, 검액의 정량분석을 위해 사용되었다.

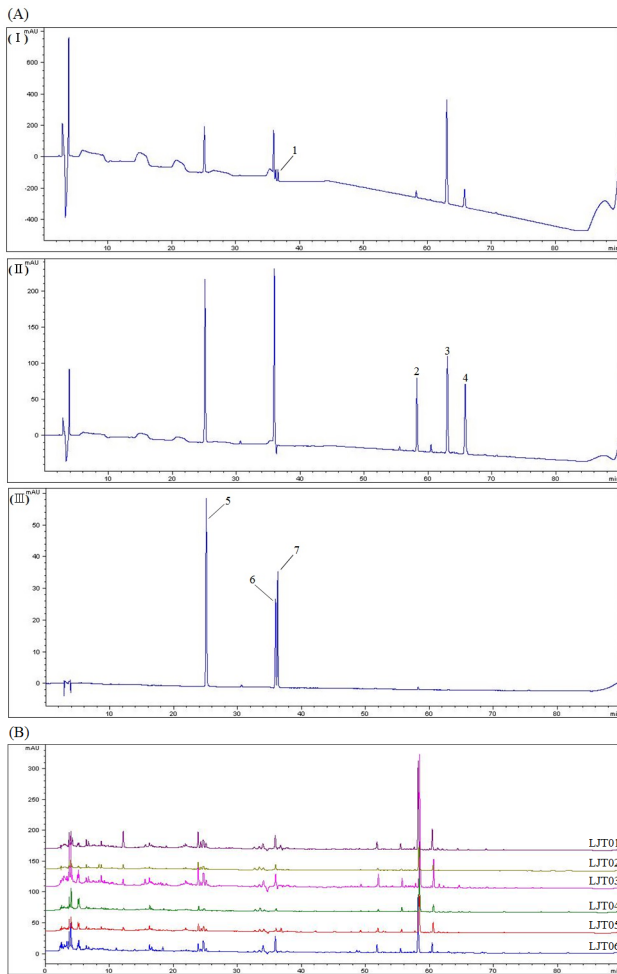


Figure 2. Chromatograms of seven standard marker compounds (A) at 205nm (A-I), 230nm (A-II), and 325nm (A-III), and ljung-tang(JT) samples at a detection wavelength of UV 250nm (B). 1, Ginsenoside Rg1; 2, glycyrrhizic acid; 3, 6-gingerol; 4, atractylenolide III; 5, liquiritin; 6, ononin; 7, isoliquiritin.

2. 분석법 검증

1) 직선성(linearity) · 범위(range) 및 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

7개의 표준물질에 대한 stock solutions을 6개의 농도로 희석하여 검량선을 만들었다. 7개의 표준물질의 검량선에 대한 직선성은 상관계수(r^2)으로 표현되며, 0.9996에서 0.9998의 범위에 있는 것으로 확인되었다.

2) 정밀성(Precision) 평가

각 표준물질에 대한 일내정밀성과 일간정밀성은 상대표준편차(RSD, %)값으로 표현되었고, 일내정밀성은 3개의 농도에 대해 4.0% 이하로 측정이 되었으며, 일간정밀성은 3개의 농도에 대해 모두 3.0% 이하로 측정 되었다.

3) 회수율(Recovery) 평가

각 표준물질의 저농도 및 고농도에서의 회수율은 87.35% -107.05%의 범위로 측정되었으며, 상대표준편차(RSD, %)는 7% 이하로 측정되었다.

Table 2. Linear Equation, Correlation Coefficients (r^2), LOD ,and LOQ for the Marker Compounds in IJT Water Extract

Compound	Wavelength (nm)	Regression equation	Range (µg/mL)	r^2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Liquiritin	280nm	$y = 13,794x - 6,5234$	1,88 - 60,00	0,9997	0,609	1,844
Ononin	250nm	$y = 37,552x - 3,5393$	0,31 - 10,00	0,9998	0,093	0,283
Isoliquiritin	360nm	$y = 11,411x - 2,7027$	0,94 - 30,00	0,9997	0,273	0,827
Ginsenoside Rg1	205nm	$y = 1,7448x + 0,0229$	7,81 - 250,00	0,9998	1,687	5,113
Glycyrrhizic acid	250nm	$y = 4,3135x - 28,79$	15,63 - 500,00	0,9996	2,649	8,027
6-Gingerol	280nm	$y = 8,3951x - 3,7511$	1,88 - 60,00	0,9998	0,700	2,121
Atractylenolide III	230nm	$y = 19,671x - 3,4248$	0,63 - 20,00	0,9997	0,264	0,801

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; y, peak area (mAU); x, concentration of compound (µg/mL).

Table 3. Intra- and Inter-day Precisions of the 7 Marker Compounds in IJT Water Extract

Compound	Test conc. (µg/mL)	Intra-day (n = 3)			Intra-day (n = 3)		
		Observed conc. (µg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)	Observed conc. (µg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Liquiritin	7,50	7,91	2,31	105,46	7,92	2,14	105,58
	15,00	14,39	1,91	95,91	14,37	1,77	95,82
	30,00	30,21	0,30	100,68	30,21	0,28	100,70
Ononin	1,25	1,32	2,66	105,52	1,32	2,35	105,36
	2,50	2,40	2,19	95,86	2,40	1,93	95,98
	5,00	5,03	0,35	100,69	5,03	0,31	100,67
Isoliquiritin	3,75	3,96	2,05	105,67	3,96	1,77	105,72
	7,50	7,18	1,70	95,75	7,18	1,47	95,71
	15,00	15,11	0,27	100,71	15,11	0,23	100,71
Ginsenoside Rg1	31,25	29,71	3,87	95,06	29,72	2,33	95,10
	62,50	64,82	2,66	103,71	64,80	1,60	103,68
	125,00	124,23	0,46	99,38	124,23	0,28	99,39
Glycyrrhizic acid	62,50	64,77	1,11	103,64	64,09	0,68	102,54
	125,00	121,59	0,89	97,27	122,62	0,53	98,09
	250,00	251,14	0,14	100,45	250,79	0,09	100,32
6-Gingerol	7,50	7,84	3,17	104,51	7,90	2,62	105,33
	15,00	14,31	3,32	95,41	14,40	2,15	96,00
	30,00	29,99	2,05	99,96	30,20	0,34	100,67
Atractylenolide III	2,50	2,63	2,38	105,13	2,64	2,19	105,70
	5,00	4,77	2,54	95,34	4,79	1,81	95,72
	10,00	10,02	1,37	100,23	10,07	0,29	100,71

Conc., concentration; RSD, relative standard deviation (%) = (SD/mean) × 100.

Table 4. Recoveries of the 7 Marker Compounds in IJT Water Extract

Compound	Original amount (µg/mL)	Spiked amount (µg/mL)	Detected amount (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Liquiritin	18,74	4.00	3.73	93.32	1.32
		8.00	7.33	91.61	1.83
Ononin	1,19	1.00	0.98	98.45	0.91
		2.00	1.91	95.64	3.37
Isoliquiritin	6,08	2.00	2.01	100.32	0.88
		4.00	3.78	94.40	0.48
Ginsenoside Rg1	36,73	20.00	21.41	107.05	6.15
		40.00	37.47	93.68	3.45
Glycyrrhizic acid	159,19	80.00	72.34	90.42	0.46
		160.00	139.76	87.35	0.32
6-Gingerol	13,76	5.00	4.58	91.62	3.77
		10.00	9.68	96.81	0.94
Atractylenolide III	3,27	2.00	1.90	95.10	1.87
		4.00	4.08	101.96	0.33

RSD, relative standard deviation (%) = (SD/mean) × 100.

4) 반복성(repeatability) 평가

표준물질에 대한 반복성의 평가는 머무름 시간과 절대피크 면적에 대한 상대표준편차(RSD, %)값으로 평가하며, 모두 2.0% 이하로 측정되었다.

Table 5. Repeatability of the 7 Marker Compounds in IJT Water Extract (n=6)

Compound	Repeatability (% RSD)	
	Retention time (n=6)	Absolute peak area (n=6)
Liquiritin	0.12	1.16
Ononin	1.20	1.40
Isoliquiritin	0.08	1.15
Ginsenoside Rg1	0.08	1.71
Glycyrrhizic acid	0.10	0.17
6-Gingerol	0.10	1.14
Atractylenolide III	0.09	1.06

RSD, relative standard deviation (%) = (SD/mean) × 100.

3. 理中湯 전탕액 및 理中湯 과립제에 함유된 지표성분 정량분석

Table 6에 따르면, 理中湯 전탕 추출물(IJT06)에서 7가지 지표성분 중 glycyrrhizic acid가 가장 높은 함량을 보였고, atractylenolide III의 함량이 가장 낮았다. 시판되는 理中湯 과립제(IJT01-IJT05)에서도 역시 glycyrrhizic acid의 함량이

가장 높았고, atractylenolide III는 IJT05를 제외하고 가장 낮은 함량을 보였다. 理中湯 과립제(IJT01-IJT05)에서는 전탕 추출물보다 isoliquiritin과 glycyrrhizic acid를 제외한 모든 성분에서 더 적은 양이 검출되었다.

Table 6. Quantification of the 7 Marker Compounds in IJT Samples

Compound	Content (µg/mg)					
	IJT01	IJT02	IJT03	IJT04	IJT05	IJT06
Liquiritin	0.428 ± 0.002	0.127 ± 0.000	0.483 ± 0.003	0.048 ± 0.000	0.155 ± 0.001	0.529 ± 0.004
Ononin	0.137 ± 0.007	0.050 ± 0.001	0.112 ± 0.001	0.023 ± 0.001	0.023 ± 0.000	0.315 ± 0.003
Isoliquiritin	0.119 ± 0.001	0.035 ± 0.001	0.274 ± 0.000	<LOQ	0.043 ± 0.000	0.120 ± 0.000
Ginsenoside Rg1	1.763 ± 0.065	0.130 ± 0.029	1.898 ± 0.074	1.039 ± 0.021	1.168 ± 0.030	2.393 ± 0.021
Glycyrrhizic acid	8.078 ± 0.004	2.455 ± 0.077	12.111 ± 0.032	5.685 ± 0.005	4.048 ± 0.007	10.280 ± 0.009
6-Gingerol	<LOQ	<LOQ	0.094 ± 0.001	<LOQ	ND	0.902 ± 0.002
Atractylenolide III	<LOQ	<LOQ	0.029 ± 0.001	<LOQ	<LOQ	0.123 ± 0.001

The average content is represented as mean ± SD.

IJT01-05, IJT granules from Korean manufacturers; IJT06, IJT water extract from laboratory;

<LOQ, under the limit of quantification; ND, not detected.

또한, 理中湯 전탕 추출물은 理中湯 과립제와 성분 함량에서 많은 차이를 보였다. Liquiritin은 최소 1.10배~최대 11.02배, ononin은 최소 2.30~최대 13.70배, ginsenoside Rg1은 최소 1.26배~최대 18.41배까지 전탕 추출물에서 높게 측정되었다. Isoliquiritin은 理中湯 과립제 중 IJT03에서 유일하게 전탕 추출물보다 2.28배 높게 측정되었고, IJT04에서는 정량한계(LOQ)이하의 값이 측정되었으며, IJT04를 제외한 나머지 과립제에서는 최소 1.01배~3.43배까지 전탕 추출물에서 높게 측정이 되었다. Glycyrrhizic acid도 과립제 중에서는 유일하게 IJT03에서 전탕 추출물보다 1.18배 높게 측정되었고, 나머지 과립제에서는 최소 1.24배~최대 4.12배까지 전탕 추출물에서 높게 나타났다. 6-Gingerol과 atractylenolide III는 理中湯 과립제 중 IJT03과 IJT06을 제외하고 LOQ이하의 값이 나왔으며, 특히 IJT05의 6-gingerol은 검출되지 않았다.

4. 통계분석

주성분분석(principal component analysis) 결과, principal component 1(PC1) score에 의해 IJT01, IJT03, IJT06은 negative PC1 score를 나타낸 반면, IJT02, IJT04, IJT05는 positive PC1 score를 보였다. Negative PC1 score의 세 가지 理中湯 시료는 PC2 score에 의해 다시 positive PC2 score (IJT01, IJT03)와 negative PC2 score (IJT06)로 나뉘었다. 그리고 negative PC1 score의 분포에 7가지 지표성분이 영향을

미쳤고, 그 중 ginsenoside Rg1, 6-gingerol, liquiritin이 IJT06의 negative PC2 score에, 나머지 성분들이 IJT01과 IJT03의 positive PC2 score에 영향을 미친 것으로 나타났다.

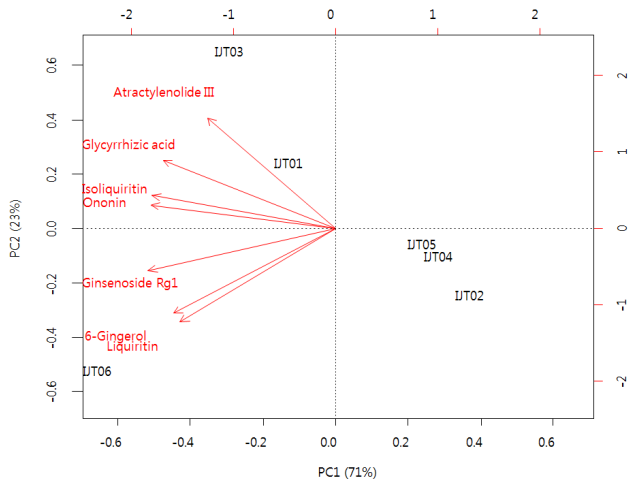


Figure 4. Biplot of principal component analysis of IJT samples.

계층적 군집분석(hierarchical clustering analysis) 결과도 주성분분석의 결과와 마찬가지로 height 4 이하에서 크게 2 그룹(IJT01, IJT03, IJT06/IJT02, IJT04, IJT05)로 나뉘었고, height 2 근처에서 다시 하위그룹(IJT01, IJT06/IJT04, IJT05)로 나뉘었다.

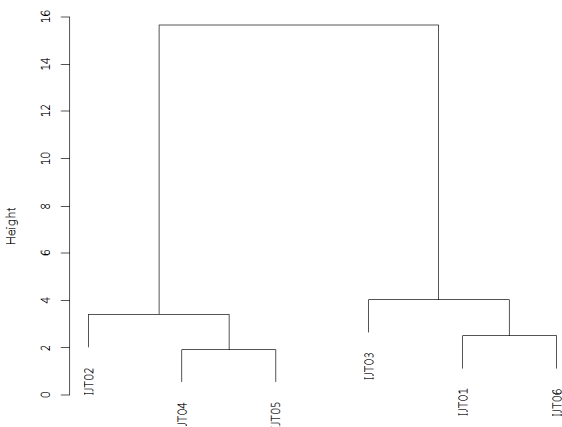


Figure 4. Hierarchical clustering analysis of IJT samples.

IV. 고찰

대한민국약전의한약(생약)규격집(식품의약품안전처고시 제2015-96호)에 의하면 理中湯 혼합단미엑스산 중 人蔘 엑스산 중 ginsenoside Rb1과 甘草 엑스산 중 glycyrrhizic acid의 두 가지 지표성분을 통해 함량을 확인할 수 있는 것으로 기재되어 있다. 본 연구에서는 理中湯 시판 제제의 품질을 평가하기 위해서 대한민국약전의한약(생약)규격집에서 제시한 지표성분을 포함하여 理中湯 구성약재의 지표성분인 甘草의 glycyrrhizic acid, ononin, isoliquiritin, liquiritin, 乾薑의 6-gingerol, 人蔘의 ginsenoside Rg1, 白朮의 atractylenolide III 등에 대해 HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였고, 각 제제별 지표성분

의 함량 상관성을 평가하기 위해 한약의 품질관리에 널리 사용되고 있는 주성분분석과 계층적군집분석 방법을 이용하였다¹²⁾.

함량 분석 결과, 理中湯 전탕 추출물과 시중에 유통되고 있는 理中湯 과립제에서 7개의 표준물질에 대한 함량차이가 크게 나타났다. 대부분의 성분들이 理中湯 전탕 추출물에서 시판 과립제보다 많은 양이 검출되었고, 특히 6-gingerol과 atractylenolide III은 대부분의 과립제에서 LOQ 이하로 낮은 함량을 보이거나 검출되지 않은 것으로 보아 전탕 추출물과의 함량 차이가 큰 것을 확인할 수 있었다. 또한 주성분 분석 결과, 理中湯 시판제제는 모두 근접한 분포를 보인 반면, 理中湯 전탕 추출물은 이들과 상대적으로 떨어져 있는 분포를 보임으로써, 전탕액과 시판 과립제 간 성분 함량의 연관성이 높지 않은 것으로 나타났다¹²⁾. 계층적 군집분석 결과에서는 비록 주성분 분석결과에서처럼 理中湯 전탕 추출물이 다른 시판 과립제에 비해 상대적으로 다른 군집을 형성하는 것은 아니었지만, 주성분 분석의 PC1 score에서 보이는 분포와 마찬가지로 height 4 이하에서 군집이 크게 나뉘었다. 즉, 理中湯 전탕 추출물은 IJT02, IJT04, IJT05와 다른 그룹을 형성함으로써 상대적인 연관성이 낮은 것으로 확인되었다¹³⁾.

의약품은 의학적 효능 및 사회적인 유용성에서 유효성과 안전성을 확보하여 사전허가 단계를 거쳐 적합한 품질을 확보하여 적합한 포장과 의약품의 정보를 실어 제도적으로 유통되어야 한다¹⁴⁾. 즉 의약품으로서 일정한 효능 효과를 나타내기 위해서는 표준화된 제조 방법 및 일정한 품질관리가 필수적이다¹⁵⁾. 한약제제의 경우 다양한 성분들의 복합체인 한약을 원료로 하고 있어 여러 종류의 다양한 성분을 함유하고 있을 뿐 아니라, 기원이 동일한 한약의 경우에도 산지, 재배, 기후, 채집시기 및 조제방법에 따라서 품질에 상당한 차이가 있다¹⁶⁾. 또한 제제화 공정에서도 추출 전 한약의 크기, 잡질 제거 유무, 세척과정 유무 및 압력, 추출 시간 등의 농축, 여과, 건조 방식에 따라 그 성분과 약효가 달라질 수 있는 가능성에 노출되어 있다¹⁷⁾.

본 연구에서도 7개의 표준물질에 대한 정량분석 결과, 理中湯 전탕 추출물과 시판되고 있는 理中湯 과립제 사이에 큰 함량차이가 존재하며, PCA와 HCA를 통해서도 理中湯 전탕 추출물과 시판 과립제 사이의 연관성이 높지 않다는 결과를 통해 사용된 약재의 기원, 추출 방법의 차이 또는 부형제의 유무 등의 원인에 의해 한약제제의 품질균일성에 변화가 발생할 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

그러므로 理中湯 제제의 품질균일성 향상을 위해 정확한 기원 약재의 사용 전/후 엄격한 검정, 표준화된 제조 공정 등 여러 요소들을 반영한 GMP 제도의 개선이 필요하며, 이와 함께 제형을 변화함에 있어서 성분손실을 줄일 수 있는 기술, 방법들에 대한 연구개발도 해나가야 할 것으로 보인다. 이를 통해 유통단계에서 품질 유지 및 향상으로 한약제제의 품질균일성을 확보할 수 있을 것으로 사료된다¹⁸⁾.

V. 결론

본 연구는 한약제제에 대한 품질평가를 위해 현재 시중에 유통되는 理中湯 과립제와 理中湯 전탕 추출물을 대상으로

HPLC를 이용한 7개의 표준물질에 대한 동시분석을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 연구에서 설정한 분석법은 정밀성(precision), 회수율(recovery), 반복성(repeatability)을 충족시켰고, 신뢰성 있게 理中湯 전탕 추출물과 理中湯 과립제에 대한 7개의 표준물질의 정량에 적용될 수 있었다.
2. 理中湯 전탕 추출물과 理中湯 과립제에서 7개의 표준물질에 대한 함량이 차이가 크게 나타났다.
3. PCA와 HCA를 사용하여 理中湯 전탕 추출물과 理中湯 과립제의 관계를 분석하였으며, 이들 간에 연관성이 높지 않은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2014학년도 부산대학교 교내학술연구비(신임교수연구정착금)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Ko MG, Jang MK. Hyundae-Sanghanron. Seoul : Haneuimunhwasa. 2000 ; 647-9.
2. The Bangje-hak textbook committee. Bangjehak. Seoul : Young-Lim Press. 1999 : 232-5.
3. Seo HY, Han JK, Kim YH. Therapeutic effects of Yijungtang on atopic dermatitis-like skin lesions of NC/Nga mouse induced by mite antigen. J Pediatr Korean Med. 2011 ; 25 : 1-27.
4. Zhao N, Zhang W, Guo Y, Jia H, Zha Q, Liu Z, Xu S, Lu A. Effects on neuroendocrinoimmune network of Lizhong pill in the reserpine induced rats with spleen deficiency in traditional Chinese medicine. J Ethnopharmacol. 2011 ; 133 : 454-9.
5. Lee JA, Ha HK, Jung DY, Lee HY, Lee JK, Huang DS, Shin HG. Comparative study of 25 herbal formulas on anti-inflammatory effect. J Korean Obstetrics Gynecol. 2010 ; 23 : 101-11.
6. Ha JY, Lee J. Experiment on the antitumor and immunomodulatory effects of Gagamijungtang in BALB/c mice. J Physiol & Pathol Korean Med. 1998 ; 12(2) : 73-81.
7. Park WS. Effects of red Ginseng-ejung-tang and white Ginseng-ejung-tang water extract on hydrogen peroxide production in RAW 264,7 cells. J Physiol & Pathol Korean Med. 2011 ; 25(1) : 78-83.
8. Kim TG, Park SM, Kang H, Shim BS, Kim SH, Choi SH, et al. Effect of Baekhasuoyijung-tang on mouse T cell cytokines. J Physiol & Pathol Korean Med. 2008 ; 22(4) : 754-61.
9. Lee SM, Choi IH. Therapeutic effects of Lizhongtang plus Baidusan extract in rats with allergic rhinitis. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2004 ; 17(2) : 72-80.
10. Cho SW, Kim EJ, Kim KH, Cho HS, Lee SD, Nam DW, Lee JD, Kim KS. A study on quality evaluation of Ojeok-san extract powders distributed in Korea. The Acupuncture. 2010 ; 27(2) : 105-13.
11. Qin, K, Wang B, Cai H, Li W, Yao Z, Zhang X, Lu T, Cai B. Simultaneous determination of five marker compounds in Xuanfu daizhe Tang by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection for quality control. Pharmacogn Mag. 2012 ; 8 : 250-5.
12. Lu J, Wang JS, Kong LY. Anti-inflammatory effects of Huang-lian-jie-du decoction, its two fractions and four typical compounds. J Ethnopharmacol. 2011 ; 134 : 911-8.
13. Kumooka Y. Hierarchical cluster analysis as a tool for preliminary discrimination of ATR-FT-IR spectra of OPP acrylic and rubber-based adhesives. Forensic Sci Int. 2009 ; 89 : 104-10.
14. Han K, Kwon DY, Lee SG, Park SK, Kim CS, Kim YK. The present state of korean herbal preparation production and possible improvement plan. Herb Fomular Sci. 2006 ; 14(1) : 30-41.
15. Baek JH, Kim SM, Ahn JW, Cho CH, Oh MH, Cho JH, Lee MK, Kim HJ. Validation and determination of glycyrrhizic acid as a marker substance in Bu-zhong-yi-qi-tang by HPLC/DAD. YAKHAK HOEJI. 2008 ; 52(1) : 7-11.
16. Drasar P, Moravcova J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004 ; 812(1-2) : 3-21.
17. Kim EJ, Park HJ, Kim HJ, Kim JH, Ann JY, Lee JH, Kim YK. A monitoring study of marker contents in the Hwangnyeonhaedok-tang Ex preparations on the market. Herb Fomular Sci. 2008 ; 16(1) : 95-107.
18. Shin HK. Study on the direction of policies to manage and develop herbs and their products. J Korean Med. 2000 ; 20(2) : 14-24.