

생약제제의 이화학적 품질평가에 관한 연구 葛根湯의 분석

박종희* 정지형, 김진수, 박희준¹

부산대학교 약학대학, ¹상지대학교 자원식물학과

Studies on Quality Control of Crude Drugs Preparations, Chemical Analysis of "Gal Gun Tang"

Jong-Hee Park,* Jee H. Jung, Jin-Soo Kim and Hee-Juhn Park¹

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea; and

¹Department of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – The prescription of Gal Gun Tang, which has been used for treatment of cold, fever, and muscular pain in Chinese herb medicine, is produced in the form of decoction. However, the storage problem for this dosage form remains unsettled. Using HPLC and GC, we examined quantitative change of major constituents caused by time-progress and temperature-change. Nine major constituents, such as cinnamaldehyde, cinnamic acid, ephedrine, puerarin, paeoniflorin, daidzin, benzoic acid, glycyrrhizin and liquiritin, were selected as references. The content of cinnamaldehyde significantly decreased by the increase of temperature, while that of cinnamic acid increased. Benzoic acid showed the most significant change of the content in three months at 40°C. It is suggested that most of constituents are considerably stable when kept frozen.

Key words – Gal Gun Tang : quantitative evaluation : HPLC : GC.

최근 사람들이 건강에 대한 관심이 증가됨에 따라 생약제제의 수요가 증가하는 추세에 있다. 생약은 그 특징의 하나로서 다양한 성분을 함유하고 있으므로 생약제제는 더욱 많은 종류의 성분을 함유하고 있다고 하겠다. 또한, 생약은 천연물로부터 가공되었으므로 그것의 기원이 같다고 해도 산지, 재배 방법, 기후, 채집시기 및 조제방법에 따라서 품질에 상당한 차이가 있다. 이러한 이유 등으로 생약제제에 대한 품질평가법은 제대로 확립되어 있지 않은 상태이다. 대한약전 및 대한약전 외 한약규격집에도 형태학적 및 관능적 방법으로 평가하거나 주요한 알칼로이드, 정유 및 회분 등을 측정하는 것 등에 국한하여 수록되어 있다. 그러나, 최근에는 생약 및 생약

제제에 대한 품질평가의 수단으로서 지표성분에 의하여 이화학적으로 생약의 품질을 평가하여 궁극적으로 생약제제의 품질을 균일화하려는 노력이 계속되고 있다.¹⁻⁶⁾

저자들은 한방제제로서 감기, 두통, 근육통 등의 치료에 널리 사용되고 있는 갈근탕⁷⁻⁹⁾을 대상으로 하여 보존온도와 시간적 변화에 따른 주요성분의 안정성에 관하여 검토하였다. 갈근탕 중의 구성생약에 대한 품질평가법으로 갈근 중의 daidzin,^{9,10)} 작약 중의 paeoniflorinA,⁹⁾ 감초 중의 glycyrrhizin⁹⁾ 등에 대하여 HPLC에 의한 정량법이 보고되어 있다. 본 실험에서는 HPLC를 이용하여 갈근탕 중의 puerarin, daidzin(이상 갈근 성분), paeoniflorin, benzoic acid(이상 작약 성분), cinnamaldehyde, cinamic acid(이상 계지 성분) 및 gly-

*교신저자 : Fax 051-513-6754

cyrrhizin, liquiritin(감초 성분), 그리고 GC를 이용하여 갈근탕 중의 **ephedrine**(마황 성분) 등 9종 성분에 관하여 내부표준법에 의한 동시 정량법을 확립하였다. 이 방법은 갈근탕 중의 9종 성분에 대하여 간편하고 신속한 미량분석법으로 이점이 있을 뿐만 아니라, 추출액을 전처리 없이 그대로 시료로 사용하므로 갈근탕에 대한 품질평가법의 하나로써 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러므로, 갈근탕의 보존시 온도와 시간적 변화에 따라 위의 9종의 지표성분에 대한 함량의 변화를 HPLC 및 GC의 방법으로 평가하였다.

재료 및 방법

갈근탕의 조제-대한약전 규격생약 葛根 8g, 麻黄 4g, 大棗 4g, 芍藥 3g, 甘草 2g, 乾薑 1g, 대한약전 외 규격생약 桂枝 3g (성인 1일 복용량: 부산대학교 약학대학 생약학 교실 소장품)¹¹⁾을 취하여 정제수 500 ml와 함께 약탕기에서 가열하였다. 물의 양이 약 절반까지 되도록 가열한 다음 식기 전에 여과한 후 갈색병에 넣었으며 각각 25℃, 40℃ 및 -20℃의 조건에 보존하였다.

기기-음점은 柳本 디지털 음점 측정장치 MP-3D를 사용하여 측정하였고, ¹³C-NMR spectrum은 日本電子製 JEOL FX-90(90 MHz)의 기종으로 TMS를 내부 표준물질로 하여 측정하였다. 또한, 질량 스펙트럼은 島津製作所製 Auto GCMS-6020형을 사용하여 측정하였고, HPLC는 島津製作所製 LC6A, GC는 島津 GC-5A를 사용하였다.

표준품 및 시약-표준품 daidzin은 본 실험실에서 추출, 분리 및 단리하여 사용하였으며, paeoniflorin, cinnamaldehyde 및 liquiritin은 일본 富山醫科藥科大學 和漢藥研究所의 難波恒雄 교수로부터 분양받아서 사용하였고, puerarin, glycyrrhizin, cinnamic acid, benzoic acid 및 ephedrine은 Sigma사 제품을 사용하였다. MeOH, AcOH는 특급시약을 CH₃CN은 액체 크로마토그래피용을 사용하였다.

Daidzin의 분리-부산의 시장품 갈근 1kg을 MeOH로 냉침한 추출액을 50℃ 이하에서 감압농축하여 그 추출물 200 g을 얻었다. 이것을 n-BuOH-H₂O로서 분배하였으며 n-BuOH 층을 60℃에서 감

압농축하여 n-BuOH 분획 124 g을 얻었다. 이것을 소량의 CHCl₃-MeOH(95:5)를 전개제로 한 silica gel column chromatography에서 전개하여 fr. 1과 fr. 2를 얻었다. fr. 2를 silica gel column chromatography에서 CHCl₃-MeOH-H₂O(9:1:0.1)로 전개하여 fr. 2b를 얻었다. 이를 CHCl₃-MeOH 혼합용매로 재결정하여 daidzin(수득량 1.3 g)을 얻었다.

Daidzin-Mp 226-229℃, 무색침상결정; EIMS: m/z 254(M-Glc)⁺, ¹³C-NMR(pyridine-d₅)δ: 175.57(s), 162.29(s), 158.93(s), 157.89(s), 152.62(d), 130.82(d), 127.79(d), 125.19(s), 123.48(s), 119.90(s), 116.20(d), 115.93(d), 104.40(d), 101.99(d), 78.99(d), 78.36(d), 74.75(d), 71.36(d), 62.54(t).

갈근탕 중의 paeoniflorin, puerarin, daidzin, benzoic acid 및 liquiritin의 정량-갈근탕 煎液을 -20℃, 실온, 40℃에 각각 따로 보관하여 1개월 및 3개월 지나서 시료로 사용하였다. 시료를 정확히 2 ml 취하고 내부 표준물질로서 *p*-hydroxyacetophenone의 에탄올용액(0.025 → 50)을 정확히 2 ml 가하고 10 분간 초음파를 작동시킨 후 여과한 것을 시료용액으로 하였다. 표준물질로서 paeoniflorin, puerarin, daidzin, benzoic acid 및 liquiritin을 각각 0.4 mg, 0.4 mg, 0.2 mg, 0.5 mg, 0.3 mg을 MeOH 50 ml에 용해한 것에 내부표준액을 정확히 2 ml 가하여 표준용액으로 하였다. (분석조건: column: TSK-Gel 410(2.1φ×500 mm), flow rate: 0.6 ml/min, chart speed: 2.0 mm/min, pressure: 100 kg/cm², eluent: CH₃CN-H₂O-AcOH(14:86:0.6), UV: 240 nm, range: 0.32-0.16 Auf)

갈근탕 중의 cinnamic acid 및 cinnamaldehyde의 정량-갈근탕 40 ml를 정확히 취하고, 1N HCl 3 ml를 가하여 n-hexane 30 ml로 3회 추출하였다. 추출액을 합하여 anhydrous sodium sulfate로 건조한 후 저온에서 농축하여 정확히 10 ml로 하였다. 그 중에서 1 ml를 정확히 취하고 내부 표준물질로서 aspirin의 에탄올용액(0.05 → 100)을 2 ml 가하여 시료용액으로 하였다. 표준물질로서 cinnamic acid 및 cinnamaldehyde를 각각 0.015 mg, 0.10 mg을 에탄올 10 ml에 용해

한 것에 내부표준액을 정확히 2 ml 가하여 표준용액으로 하였다.

[분석조건: column: TSK-Gel 410(4.6 ϕ ×250 mm), flow rate: 1.0 ml/min, chart speed: 2.0 mm/min, pressure: 70 kg/cm², eluent: 28% CH₃CN-1.3% CH₃COOH, UV: 270 nm, range: 0.04-0.16 AUs]

갈근탕 중의 glycyrrhizin의 정량-갈근탕 15 ml를 정확히 취하고, 내부표준 물질로서 p-hydroxybenzoic acid butylester의 에탄올용액(0.06 → 100)을 2 ml 가하여 시료용액으로 하였다. 표준물질로서 glycyrrhizin ammonium 5 mg을 50% 에탄올 100 ml에 용해한 것에 내부표준액을 정확히 2 ml 가하여 표준용액으로 하였다.

[분석조건: column: TSK-Gel 410(4.6 ϕ ×250 mm), flow rate: 1.1 ml/min, chart speed: 2.0 mm/min, pressure: 70 kg/cm², eluent: 2% CH₃COOH-37% CH₃CN, UV: 254 nm, range: 0.08-0.16 AUs]

갈근탕 중의 ephedrine의 정량-갈근탕 70 ml를 정확히 취하고, 암모니아 시액 5 ml를 가하여 에틸 30 ml로 3회 추출하였다. 추출액을 합하여 anhydrous sodium sulfate로 건조한 후 완전히 농축하여 무수초산 및 피리딘을 각각 2 ml씩 가하여

90℃에서 30분간 가열하였다. 내부 표준물질로서 p-benzylphenol의 chloroform용액(0.05 → 100) 2 ml를 정확히 가하여 시료용액으로 하였다. 표준물질로서 dt-ephedrine HCl 14 mg을 물 10 ml에 용해한 것을 같은 방법으로 조작하여 표준용액으로 하였다.

[분석조건: column: silicone DC-1, 5% OF-1(3 m), carrier gas: N₂ 50 ml/min, injection temp.: 230℃, column temp.: 180℃, detector: FID, sensitivity: 128×10³]

결과 및 고찰

시판품 갈근으로 부터 얻어진 화합물 1은 용점 및 NMR data가 daidzin의 문헌치와 동일하였으므로 이를 HPLC 분석을 위한 지표물질의 하나로 사용하였다. 본 실험 중 갈근탕의 함량분석은 총 9종의 성분을 대상으로 하여 HPLC 및 GC에 의하여 그 함량이 분석되었다.

먼저 puerarin, daidzin, paeoniflorin, liquiritin 및 benzoic acid에 관한 HPLC 분석조건과 여기서 얻어진 HPLC chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다. 여기서 puerarin이 가장 먼저 용출됨을 알 수 있고 또 피크 높이가 가장 크게 나타났

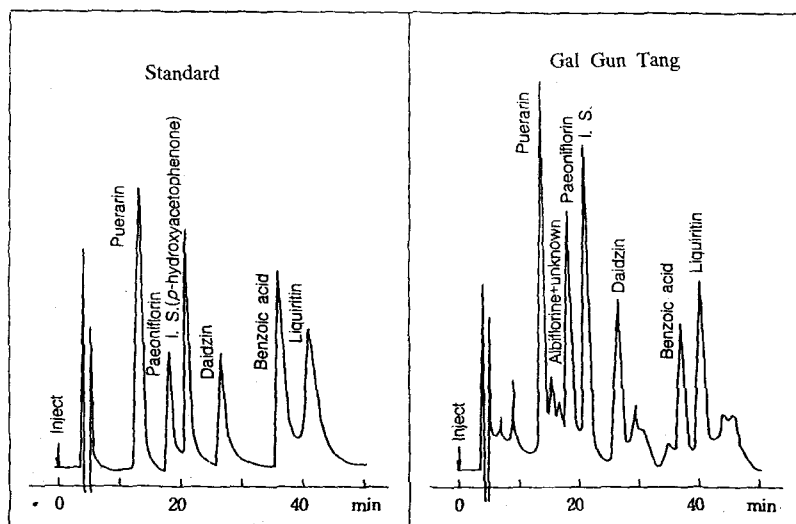


Fig. 1. Chromatogram of Puerarin, Daidzin, Paeoniflorin, Liquiritin and Benzoic acid in "Gal Gun Tang" by HPLC.

Analytical Conditions: Column: TSK-GEL 410(2.1 ϕ ×500 mm), Flow rate: 0.6 ml/min, Chart speed: 2.0 mm/min, Pressure: 100 kg/cm², Eluent: CH₃CN:H₂O:AcOH(14:86:0.6), UV: 240 nm, Range: 0.32-0.16 AUs.

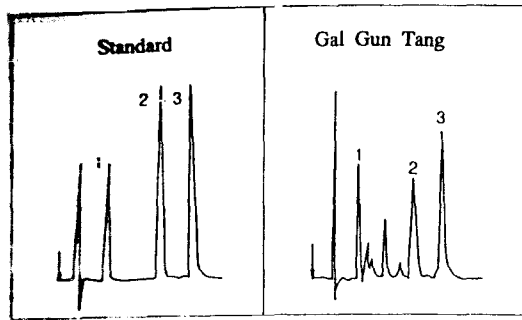


Fig. 2. Chromatogram of Cinnamic acid, Cinnamaldehyde in "Gal Gun Tang" by HPLC.

Analytical Conditions: Column: TSK-GEL 410 (4.60 × 250 mm). Eluent: 28% CH₃CN-1.3% CH₃COOH. Flow rate: 1.0 ml/min. Pressure: 70 kg/cm². UV 270 nm. Chart speed: 2.0 mm/min. Range: 0.04-0.16 AUs. Peak Ident.: 1. I.S. (Aspirin), 2. Cinnamic acid, 3. Cinnamaldehyde.

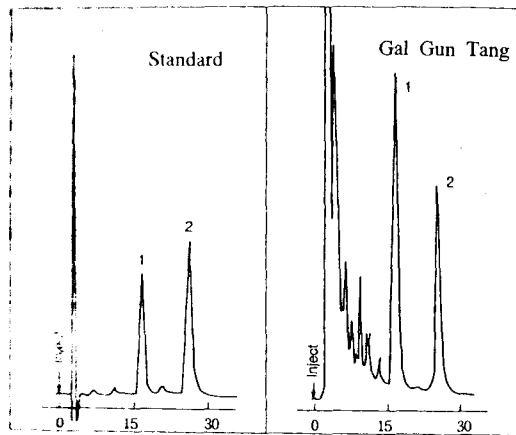


Fig. 3. Chromatogram of Glycyrrhizin in "Gal Gun Tang" by HPLC.

Analytical Conditions: Column: TSK-GEL 410 (4.60 × 250 mm). Flow rate: 1.1 ml/min. Eluent: 2% CH₃COOH-37% CH₃CN. Pressure: 70 kg/cm². UV: 254 nm. Range: 0.08-0.16 AUs. Peak Ident.: 1. Glycyrrhizin, 2. I.S. (*p*-hydroxybenzoic acid *n*-butylester).

다. Fig. 2에서는 갈근탕 중 cinnamic acid, cinnamaldehyde 성분들의 HPLC 분석조건과 여기서 얻어진 HPLC chromatogram을 나타내었다. 갈근탕 중의 glycyrrhizin에 대한 HPLC 분석조건과 그 chromatogram을 Fig. 3에 나타내었다. Ephedrine은 GC에서 분석하였으며 분석조건과 GC chromatogram은 Fig. 4에 나타내었다.

갈근탕 추출물을 9종의 지표물질로서 초기에 함

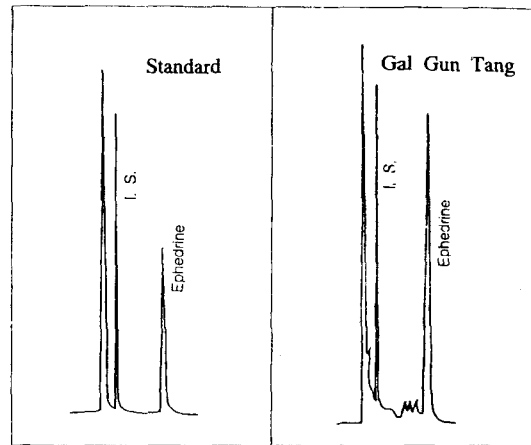


Fig. 4. Chromatogram of Ephedrine in "Gal Gun Tang" by G.C.

Analytical Conditions: Column: Silicone DC-1, 5% OF-1 (3 m) Carrier gas: N₂ 50 ml/min. injection temp: 230°C. Column temp: 180°C. Detector: FID. Sensitivity: 128 × 10³.

량을 평가하였을 때 glycyrrhizin이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타나고 두번째로 puerarin이 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다(Table I). Cinnamic acid와 cinnamaldehyde는 각각 0.23 ± 0.03 및 2.49 ± 0.03 mg/daily으로 나타나 비교적 적은 양으로 함유되어 있는 것으로 나타났다. Cinnamaldehyde는 -20°C에서는 1개월 혹은 3개월이 지나도 함량의 변화가 없었다. 그러나 25°C 및 40°C에서 보존된 시료는 초기 함유량(2.49 ± 0.03 mg/daily)보다 훨씬 적은 함유량을 나타내었다. 특히, 3개월 40°C 조건하의 것은 0.17 ± 0.13 mg/daily를 나타내어 가장 적은 cinnamaldehyde의 함유량을 나타내었다. 따라서 cinnamaldehyde는 높은 온도에서 함유량의 변화가 있음을 알 수 있고, 이러한 조건하에서 시간이 경과할수록 그 함유량이 더욱 감소한다고 생각된다. 이것은 아마도 cinnamaldehyde가 aldehyde 관능기를 가지기 때문에 높은 온도에서 보다 용이하게 산화되기 때문인 것으로 추측된다.

Cinnamic acid의 경우는 -20°C에서 보존하면 함유량의 변화가 거의 없었다. 그러나 25°C 및 40°C의 조건에서는 1개월 경우와 3개월 경우 함유량변화의 유의성이 인정되었다. 특히 3개월, 40°C의 경우 cinnamic acid의 함유량이 가장 높게 나타났다(0.30 ± 0.02 mg/daily). 이와 같은 cinnamic acid

Table I. Quantitative Variations of Major Constituents of "Gal Gun Tang" in the Different Storage (unit : mg/daily dosage)

Compound	Initial	1 month			3 months		
		F	r.t.	40°C	F	r.t.	40°C
Cinnamaldehyde	2.49±0.03 ^a	2.47±0.08	1.20±0.04*	0.27±0.03*	2.47±0.07	0.82±0.02*	0.17±0.13*
Cinnamic acid	0.23±0.03	0.25±0.02	0.27±0.02	0.27±0.03*	0.25±0.02	0.27±0.01	0.30±0.02*
Ephedrine	17.57±0.74	17.08±0.84	16.60±0.60	16.72±0.03*	7.68±0.44	18.40±0.35	16.58±0.02*
Puerarin	80.28±1.50	80.24±1.59	79.72±1.04	80.96±0.96	7.98±0.93*	78.40±1.06*	76.18±0.79*
Paeoniflorin	68.28±0.88	68.44±1.43	67.62±1.57	68.02±0.87	6.84±0.73*	67.60±0.86	62.00±0.64
Daidzin	19.36±1.02	21.72±1.12*	21.40±0.70	19.10±0.78	7.22±0.34*	19.86±0.50	22.50±0.43*
Benzoic acid	32.82±0.92	30.74±1.23*	30.76±0.63	29.72±0.60	7.48±0.63	27.52±0.56	50.36±1.13
Glycyrrhizin	100.66±1.50	105.46±1.36*	107.0±0.82	105.16±1.76*	102.72±1.12*	102.40±1.05*	99.08±1.37
Liquiritin	36.46±1.28	39.12±0.81*	37.34±0.81	38.52±1.04	5.72±0.90*	37.26±0.43	35.16±0.83*

Abbreviations, F: Freezing, r.t.: room temp. *Significantly different from the initial group (p<0.05).
^aValues are mean±S.D. for five measurements.

의 함유량 증가는 부분적으로 cinnamaldehyde의 산화로부터 유래하는 것으로 추측되었다.

Ephedrine은 시간과 온도에 의한 그 함유량의 변화가 극히 미약하였는데 이는 alkaloid화합물인 ephedrine의 화학적 안정성과 관련이 있는 것으로 추측되었다. Puerarin, paeoniflorin, daidzin, glycyrrhizin 및 liquiritin의 경우는 온도와 시간의 경과에 의한 함유량의 변화가 크다고 할 수 없으나, 3개월 40°C 처리군에서는 유의성 있는 함유량 변화가 나타났다. 이 중 daidzin은 3개월, 40°C 처리군에서는 22.50±0.43 mg/daily으로서 함유량의 증가가 뚜렷하였다.

Benzoic acid는 1개월이 지나면 유의성 있는 함유량의 감소가 관찰되고 각 처리군 간에는 함유량의 차이가 별로 관찰되지 않았다. 3개월 지나서 benzoic acid에 대한 함유량을 다시 측정하였을 때 40°C 처리군에서는 그 함유량이 현저히 증가하였다.

이상의 결과를 전반적으로 고찰하면 40°C에서 3개월 보존한 것은 대부분 초기의 함유량과 큰 차이를 나타내었다. 그러나, -20°C에서 보관한 것은 초기와 통계적인 차이를 나타내기도 하였으나 전체적으로 우려할 만한 수준은 아니라고 생각된다. 40°C에서 1개월 보존한 것도 같은 온도에서 3개월 보존한 것과 유사한 결과를 나타내나 그 차이는 40°C에서 3개월 보존한 것만큼 크게 나타내지 않았다.

결 론

갈근탕의 처방을 물로 추출하여 액제로 보관할 때

에 높은 온도에서 보관할수록 성분의 변화가 크게 나타난다. 이 조건에서 장기간 보관할수록 주요성분의 함량은 더욱 크게 변화한다. Cinnamaldehyde와 cinnamic acid는 aldehyde와 carboxylic acid의 관계에 있고, paeoniflorin과 benzoic acid는 에스테르와 carboxylic acid 관계에 있으므로 그 함량의 증감과 서로 관련이 있는 것 같으며, 특히 benzoic acid가 40°C에서 함량이 증가하는 것은 paeoniflorin을 비롯한 유사에스테르화합물에서 유리된 것으로 사료된다. Ephedrine, glycyrrhizin, liquiritin과 같이 물질의 안정성이 크다고 판단되는 화합물의 경우는 그 함유량의 변화가 크게 일어나지 않았다. 또, 갈근탕의 물 추출액을 냉동해서 보관한다면 불안정한 화합물의 변화를 어느 정도 막을 수 있다고 보여지므로 약효도 좀더 지속적으로 유지할 수 있다고 생각된다.

인용문헌

- Shimizu, M., Hashimoto, T., Ishikawa, S. and Morita, N. (1979) Analysis of constituents in crude drug by high-speed liquid chromatography I. *Yakugaku Zasshi* 99: 432-436.
- Akada, Y., Kawano, S. and Tanase, Y. (1979) High-speed liquid chromatographic analysis of drugs V. *Yakugaku Zasshi* 99: 858-862.
- Nitta, A., Tani, S., Sakamaki, E. and Saito, Y. (1984) On the source and evaluation of benzoin. *Yakugaku Zasshi* 104: 592-597.
- Hayakawa, J., Noda, N., Yamada, S. and Uno.

- K. (1984) Studies on physical and chemical evaluation of crude drugs preparation II. *Yakugaku Zasshi* 104: 57-62.
5. Namba, T. (1977) The commentary on Chinese crude drugs containing saponins. *Wakan-Yaku* 10: 1-10.
6. Namba, T., Yoshizaki, M., Tomimori, T. and Hase, J. (1974) Fundamental studies on the crude drugs III. *Yakugaku Zasshi* 94: 252-256.
7. 厚生省薬務局 (1984) 一般用漢方処方の手引き, 36. 薬業時報社, 東京.
8. 大塚敬節 (1985) 臨床應用 傷寒論解説, 45. 創元社, 大阪.
9. 原田正敏 (1989) 常用生薬の成分定量, 75, 94, 208. 廣川書店, 東京.
10. 齊藤 保, 柴田承人 (1985) 葛根湯の分析. 千葉大會講演要旨集 23. 日本生薬學學會.
11. 日本藥劑師會編 (1982) 漢方業務指針, 36. 薬業時報社, 東京.

(1997년 2월 27일 접수)