

원 저

High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector(HPLC-DAD)에 의한 가미홍화탕 (KH-19)의 지문 분석

유영범¹⁾, 윤유식, 조기호²⁾

한국한의학연구원 의료연구부¹⁾, 경희대학교 한의과대학 심계내과학교실²⁾

Fingerprint of Marker Substances in *Gami-Honghwa-Tang*(KH-19) by HPLC-DAD

Young-Beob Yu¹⁾, Yoo-Sik Yoon¹⁾, Gi-Ho Cho²⁾

Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine,¹⁾

Department of Cardiovascular & Neurologic Diseases (Stroke Center), College of Oriental Medicine, Kyunghee University²⁾

Objectives : This study was aimed to evaluate marker substances in *Gami-Honghwa-Tang* (KH-19) by high performance liquid chromatography-photodiode array detector (HPLC-DAD). *Gami-Honghwa-Tang* is composed of nine crude herbs, *Rehmanniae Radix Preparata*, *Angelicae Gigantis Radix*, *Cnidii Rhizoma*, *Paeoniae Radix*, *Corni Fructus*, *Moutan Cortex Radicis*, *Lycii Fructus*, *Carthami Flos* and *Glycyrrhizae Radix*.

Methods : The separation was performed on an Aquasil C18 (4.6X 250mm) column by gradient elution with 0.05% TFA in H₂O - 0.05% TFA in acetonitrile (0 min 100:0, 20 min 90:10, 40 min 70:30, 60 min 50:50, 80 min 0:100, 90 min 100:0) as the mobile phase at a flow-rate of 1.0 ml/min with detection at 190-800nm. Also we examined the contents for bacteria, pesticide residue and harmful heavy metals.

Results : HPLC-DAD was employed to determine the quantities and the qualities of several marker substances such as 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF), paeonol, loganin, paeoniflorin, glycyrrhizin, and decursin in the KH-19. There were no bacterial contents, pesticide residues, or harmful heavy metals.

Conclusions : We suggest these results could be a useful evidence for quality control of KH-19. This method permits fingerprints of selected individual marker substances from herbal prescriptions without derivatization, multiple purification steps, or lengthy separation times.

Key Words: *Gami-Honghwa-Tang*, HPLC-DAD, marker substance, fingerprint.

서 론

· 접수 : 2004년 6월 26일 · 논문심사 : 2004년 7월 21일
· 채택 : 2004년 8월 2일
· 교신저자 : 유영범, 대전시 유성구 전민동 461-24, 한국한의학연구원 의료연구부
(Tel, 042-868-9487, Fax 042-868-9464 e-mail: ybyu@kiom.re.kr)

한약을 연구 개발하는 과정에서 우선적으로 고려해야 할 사항은 단미와 복합처방의 활성성분을 정량, 정성분석하여 약효발현물질을 균일화하고 안정성을 확보하여 그 약리기전을 밝히는 것이다¹⁾. 한약재 단

미에 대한 표준화는 국내외에서 많은 연구가 수행되고 있으며, 대한약전²⁾, 대한약전의 한약(생약)규격집³⁾ (제8개정), 조선민주주의인민공화국 약전 (제5판)⁴⁾, 일본약국방해설서(제14개정)⁵⁾, 중화인민공화국약전 (2000년판1부)⁶⁾ 등 각국 약전과 WHO monograph⁷⁾에서 그 상세한 기준을 제시하고 있다. 그러나 한약처방이나 천연물 복합물질의 기준은 그 관리가 아직 부족하고, 식품의약품안전청에서도 그 기준이 없이 회사의 자가기준에 의존하여 기존의 허가사항과 비교하여 허가를 하고 있는 실정이다. 일본의 경우 몇몇 제약회사에서 그 기준을 정하여 실험법을 확립하고 제품관리에 응용하고 있으며⁸⁾ 이들 한방처방제 품들은 품질관리의 우수성을 인정받아 기초 임상시험 시 그대로 적용이 가능하여 실험결과가 국제학술지에 다수 투고 되고 있는 실정이다⁹⁾. 이 실험법은 High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (HPLC-DAD)를 활용한 방법으로 처방내의 유효성분을 3차원 chromatogram으로 분석하여 UV-spectral data를 비교하므로써 정성, 정량분석이 가능하다. 이에 본 연구에서도 암치료 보조제로 개발된 가미홍화탕(KH-19)의 기준시험법과 HPLC-DAD를 이용하여 3차원 fingerprint 분석법을 정립하여 보고하고자 한다. 가미홍화탕(KH-19)은 간장과 신장을 보하고 저하된 혈액의 양을 증가시키는 신 처방으로 사물탕에 산수유, 구기자, 목단피, 홍화, 감초를 가한 처방이다. 사물탕의 구성한약재인 당귀, 작약, 숙지황은 각각의 지표성분으로 decursin¹¹⁾, paeoniflorin¹²⁾, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF)¹³⁾를 설정하였고, 산수유의 loganin¹⁴⁾, 목단피의 paeonol¹⁵⁾, 감초의 glycyrrhizin¹⁶⁾을 지표성분으로 하여 정량, 정성분석을 시도하였다. 사물탕은 우리나라 임상한의학의 기본방으로 그 처방 빈도가 매우 높고 산수유, 목단피, 감초 또한 중요약재로 이용되며, 이들 모두 지표물질 설정이 용이하므로 이의 분석이 중요한 의미를 가질 것으로 사료되어 본 논문의 소재로 다루게 되었다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

HPLC 분석에 사용한 Acetonitrile, methanol 등은 Merck사 HPLC용 용매를 사용하였고, 분석용 초자류는 특급(Pyrex, USA)을, 잔류농약 시험에 사용한 표준품은 Sigma(USA)사 제품을, 미생물시험용 배지는 Difco사의 제품을 각각 사용하였다. 그 외에 실험에 사용한 모든 시약은 특급 혹은 1급을 사용하였으며, 물은 3차증류수를 멸균 혹은 여과 (pore size 0.2um, Sartorius, Germany)하여 사용하였다.

2. 시료의 제조

가미홍화탕(KH-19)의 조성과 구성약재 및 기원은 Table 1. 에 표시하였다. 가미홍화탕의 전임상실험과 최종 제품생산에 용이하게 적용할 수 있도록 연조엑스 시제품을 (주)대한뉴팜(한국, 경기도) 공장에서 제작하였다. 먼저 숙지황(약전규격, 중국산) 133g, 당귀(약전규격, 국산) 100g, 천궁(약전규격, 중국산) 100g, 작약(약전규격, 국산) 100g, 산수유(약전규격, 중국산) 67g, 목단피(약전규격, 중국산) 33g, 구기자(약전규격, 중국산) 33g, 홍화 (약전규격, 중국산) 13g, 감초(약전규격, 중국산) 20g을 정제수 5400mL를 가하여 95℃의 온도에서 환류추출기를 이용하여 6시간 가온 추출한 다음 200 메쉬체로 여과하여 75℃에서 진공 농축기를 이용하여 연조 엑스를 얻었다. 이 추출 및 농축방법을 10회 반복하여 추출액을 모아 혼합하였다.

3. 건조감량

칭량병을 미리 105℃에서 30 분간 건조하여 식힌 다음 질량을 정밀하게 측정하였다. 이 약 2.5g을 달아 칭량병에 넣고 이것을 건조기에 넣고 105℃에서 4시간 건조하였다. 건조한 다음 건조기에서 칭량병을 꺼내어 데시케이터 (실리카겔) 속에서 방치하여 식힌 다음 그 질량을 정밀하게 달아 감량된 양을 건조감량(%)으로 하였다.

4. 미생물한도시험법

(1)세균, 진균

본제 1g을 각각 3개씩 취하여 완충식염펩톤수(pH 7.0) 9mL에 넣고 Vortex mixer로 녹였다. 세균용 배지는 Difco 사의 대두카제인소화한천배지 (Tryptic soy agar)(TSA) 배지를 카제인제 펩톤(15.0g), 대두제 펩톤(5.0g), 염화나트륨(5.0g), 한천(15.0g)량으로 물(1000mL)에 넣어 녹이고 121℃에서 20분간 고압증기멸균한 다음의 pH가 7.2이 되도록 조정 한 후 45℃에 식혀 보관하였다. 진균용배지는 Difco 항생물질첨가사부로포도당한천배지 (Sabouraud dextrose agar)를 카제인제 펩톤(10.0g), 포도당(20.0g), 한천(15.0g)을 물(1000mL)에 넣어 녹이고 121℃에서 20분간 고압증기멸균한 다음의 pH가 5.6이 되도록 조정하여 45℃에 식혀 보관하였다. 그리고 사용직전에 벤질페니실린칼륨 0.10g과 테트라사이클린 0.10g을 멸균용액으로서 넣었다. 위에서 조제한 검액을 9cm 페트리 접시에 1mL씩 넣고 위의 배지를 15mL씩 넣어 잘 혼합하여 굳혔다. 세균은 33℃에서 5일간 배양하여 세균의 집락수를 측정하였고 진균은 23℃에서 7일간 배양하여 진균의 집락수를 측정하였다.

(2)특정세균

대장균: Difco 배지 LB를 제조사의 조제방법에 따라 멸균하여 식혔다. 여기에 본제 10g을 취하여 배지에 넣고 33℃에서 24시간 배양하여 검액으로 하였다. 이를 다람발효관을 넣어 만든 LB배지에 10mL를 접종하여 33℃에서 48시간 배양하여 가스발생여부를 관찰하였다.

녹농균, 황색포도구균: Difco 배지 TSB를 제조사의 지시에 따라 조제 멸균하여 식혔다. 여기에 본제 10g을 취하여 완충식염펩톤수 90mL에 넣고 36℃에서 4시간 배양한 다음 이를 10 mL 취하여 위의 TSB 배지에 넣고 33℃에서 48시간 배양하여 발육을 관찰하였다.

살모넬라: Difco 배지 TTB를 제조사의 지시에 따라 조제 멸균하여 식혔다. 여기에 본제 10g을 취하여 LB배지 90mL에 36℃에서 4시간 배양한 다음 이를 10mL 취하여 위의 TTB 배지에 넣고 33℃에서 24시간 배양하여 발육을 관찰하였다.

5. 잔류농약시험

이약을 생약의 잔류농약 허용기준 및 시험 방법¹⁷⁾에 따라 시험액을 처리하여 다음의 조건에 따라 시험하였다. Shimadzu GC-2010, Detector - ECD, Column - SUPELCO SPB-608 30m × 0.25mm, 0.25 μm film, capillary, Carrier gas- He, Injector temperature - 280℃, Detector temperature - 280℃, Oven temperature - 180℃, Injector - split mode, Split ratio - 20, Pressure - 200kpa, Run time - 55 minutes.

6. 중금속 허용시험

생약 등의 중금속허용기준 및 시험방법¹⁸⁾에 따라 다음과 같이 시행하였다. 이 약 약 1g을 취하여 사기 도가니에 넣고 처음에는 조심하여 약하게 가열한 다음 강열하여 회화하였다. 식힌 다음 왕수 1mL를 넣어 수욕에서 증발건고하고 잔류물을 염산 3 방울로 적시고 열탕 10mL를 넣어 2분간 가온하였다. 다음에 페놀프탈레인시액 1 방울을 넣고 암모니아시액을 액이 옅은 적색이 될 때까지 적가하고 묽은초산 2mL를 넣어 필요하면 여과하고 물 10mL로 씻었다. 여액과 씻은 액을 네슬러관에 넣어 물을 넣어 50mL로 하여 검액으로 하였다. 비교액은 왕수 1mL를 수욕에서 증발건고하여 이하 검액의 조제법과 같은 방법으로 조작하여 납표준액 3.0mL 및 물을 넣어 50mL로 하였다. 이를 비교하였을 때 검액은 비교액의 색도를 관찰하였다.

7. HPLC-DAD에 의한 지표성분 분석

(1) 지표물질

지표물질 중 5-HMF, paeonol, loganin은 Sigma (USA)와 Wako (Japan)에서 구입하였으며, paeoniflorin, glycyrrhizin, decursin과 decursinol angelate은 silicagel, C18, Sephadex LH-20, Diaion HP20 column chromatography를 실시하여 직접분리하고 ¹H-NMR, ¹³C-NMR (Bruker Advance 400 MHz)등 분광학적 방법으로 그 구조를 동정한 후 실험에 사용하였다.

(2) 지표물질의 준비

Table 1. The Botanical Origins of Crude Drugs of *Gami-Honghwa-tang*(KH-19).

Korean name	Scientific name	Latin name	Markersubstance ((%)criterion on KP, KHP)	(g/day)
熟地黄	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i> Makino (Scrophulariaceae)	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	5-HMF (0.1)	13.33
当归	<i>Angelica gigas</i> Nakai (Umbelliferae)	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	decursin	10
川芎	<i>Cnidium officinale</i> Makino (Umbelliferae)	<i>Cnidii Rhizoma</i>		10
芍药	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas(Paeoniaceae)	<i>Paeoniae Radix</i>	paeoniflorin (2.0)	10
山茱萸	<i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini (Cornaceae)	<i>Corni Fructus</i>	loganin (0.5)	6.67
牡丹皮	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews (Paeoniaceae)	<i>Moutan Cortex Radicis</i>	paeonol (1.0)	3.33
枸杞子	<i>Lycium chinense</i> Miller (Solanaceae)	<i>Lycii Fructus</i>	betaine (0.5)	3.33
红花	<i>Carthamus tinctorius</i> Linne(Compositae)	<i>Carthami Flos</i>		1.33
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer (Leguminosae)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	glycyrrhizin (2.5)	2
				59.99

a) The botanical origins are based on 『The Korean Pharmacopoeia, The Korean Herbal Pharmacopoeia』

Table 2. Analytical Condition of Marker Substances in *Gami-Honghwa-tang* (KH-19).

Pump	Shimadzu LC-10AD vp
Detector	Shimadzu SPD-10A vp UV-VIS detector
Column	Aquasil C18 (4.6X 250mm)
	5-HMF : 283nm
	loganin : 237nm
Wavelength	paeoniflorin: 232nm
	paeonol : 274nm
	glycyrrhizin: 251nm
	decursin : 328nm
Column temp.	Room temperature
Solvent system	(A= 0.05% TFA in H ₂ O : B=0.05% TFA in acetonitrile0min)
	(0min 100:0, 20min, 90:10, 40min 70:30, 60min 50:50, 80min 0:100, 90min 100:0)
Flow rate	1 ml/min

Table 3. Pharmaceutical Evaluation of *Gami-Honghwa-tang* (KH-19).

test item	criterion on KP, KHP*	KH-19
Microorganism	Bacteria: under 100,000 per gram	8 ± 1
	Fungus: under 100 per gram	8 ± 1
	<i>Escherichia coli</i>	ND
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND
Residue of pesticide	<i>Salmonella</i>	ND
	BHC : under 0.2 ppm	ND
	DDT: under 0.1 ppm	ND
Heavy Metal	Aldrin, Dieldrin, Endrin : under 0.01 ppm	ND
	under 30 ppm	ND
Yield	25.01%	

* KP: The Korean Pharmacopoeia, KHP: The Korean Herbal Pharmacopoeia

Table 4. Retention Times and Contents of Marker Substance in *Gami-Honghwa-tang*(KH-19).

Analytes	Retention time(min)	$\mu\text{g/g}$	Contents(%)
5-HMF	19.08	1354	0.14
Loganin	34.51	1738	0.17
paeoniflorin	37.26	9706	0.97
Paeonol	59.73	34	0.003
glycyrrhizin	60.27	572	0.06
Decursin	74.31	324	0.03

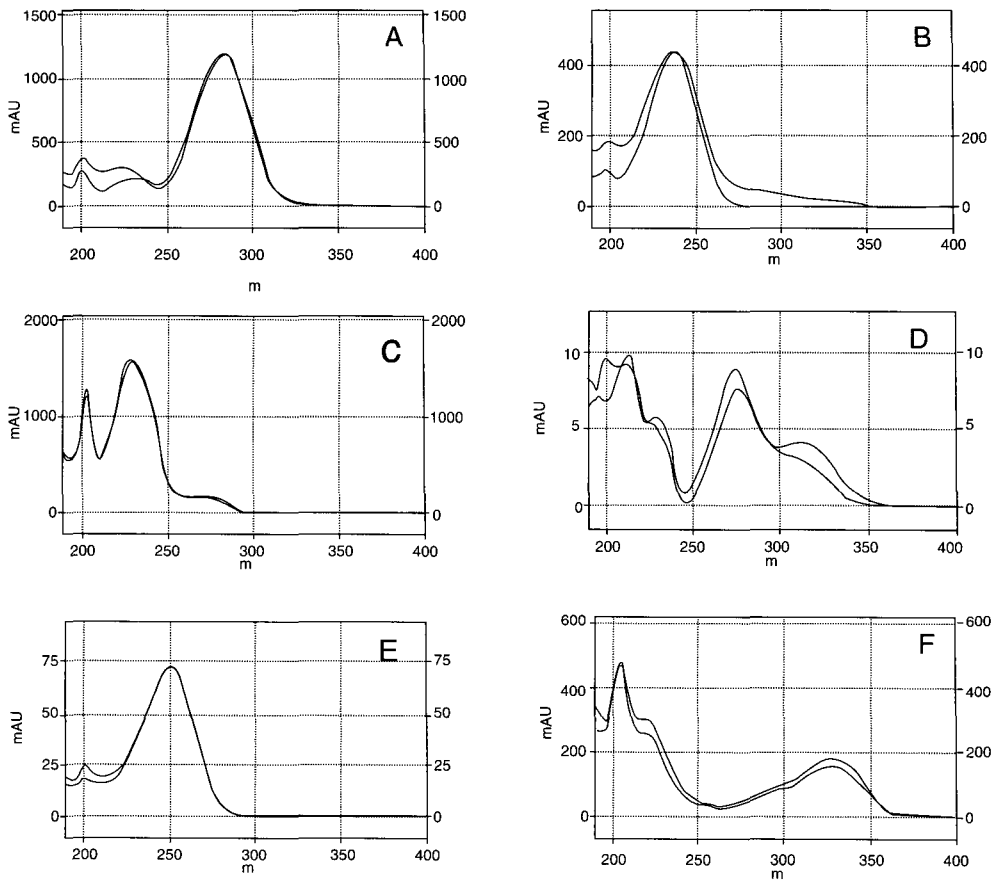


Fig 1. UV-spectra(190-400nm) compared with maker substance in *Gami-Honghwa-tang* (KH-19) and standard components in data library. A: 5-HMF, B:loganin, C: paeoniflorin, D: paeonol, E: glycyrrhizin, F:decursin

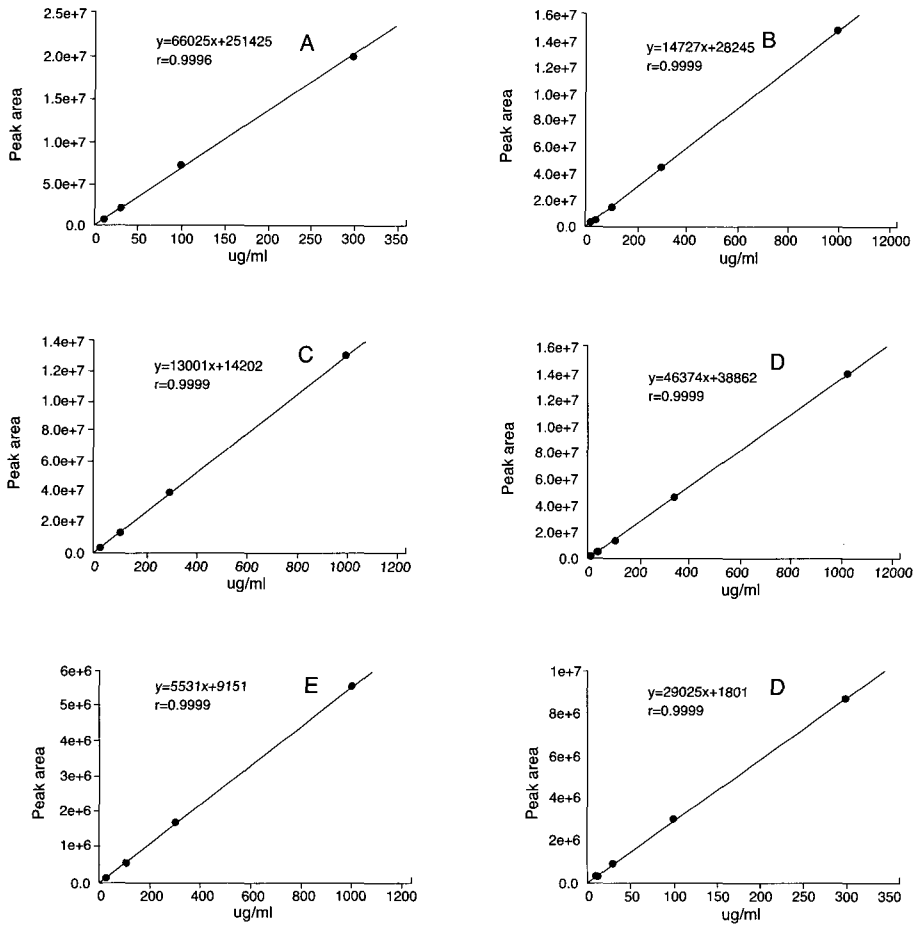


Fig 2. Calibration curve of standard components. A: 5-HMF, B:loganin, C: paeoniflorin, D: paeonol, E: glycyrrhizin, F:decursin

5-HMF, loganin, paeoniflorin, paeonol, glycyrrhizin 과 decursin 을 정확히 측정하여 1~1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도로 70% methanol에 용해하였다. Calibration graphs는 시료의 농도에 따른 peak 면적비에 대한 회기방정식과 상관계수에 의해 구하였다.

(3) 표준 Sample의 준비

가미홍화탕(KH-19) 분석용 시료의 조제는 (주)대한뉴팜으로 공급받은 시제품을 동결건조하여 500mg

을 100% MeOH 10 ml에 넣고 10분간 초음파 추출한 후 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 0.45um syringe filter로 여과한 것을 HPLC에 10 μl 를 주입하였다.

(4) HPLC-DAD분석

시료 중의 지표물질의 분석은 Table 2의 방법으로 실시하였으며, chromatogram에서 표준물질의 머무름 시간과 photo diode array detector (190-800 nm)에서

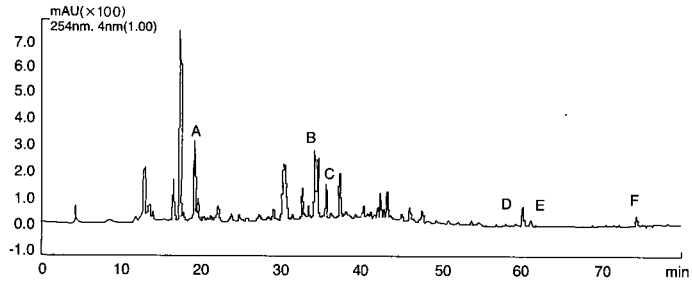


Fig 3. Calibration curve of standard components. A: 5-HMF, B:loganin, C: paeoniflorin, D: paeonol, E: glycyrrhizin, F:decursin

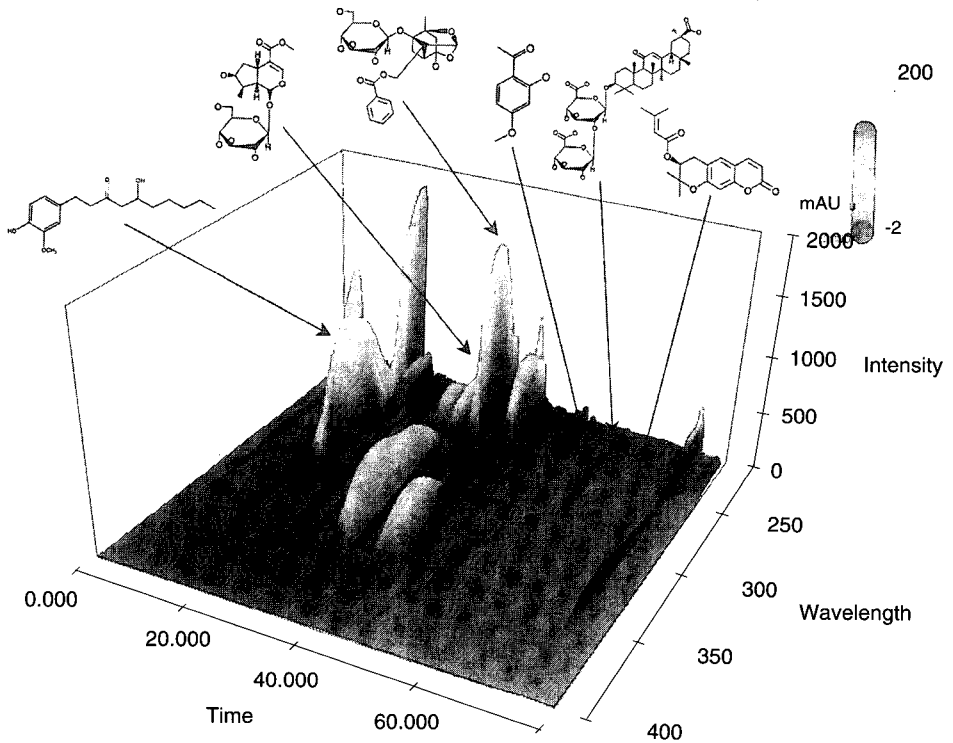


Fig. 4. 3-dimension chromatogram of *Gami-Honghwa-tang*(KH-19) by HPLC-DAD

얻어진 UV spectra의 pattern을 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

한약을 연구개발의 소재로 사용하기 위해서는 한약재의 GAP (good agricultural practices)와 한약제제의 GMP (good manufactural practices) 그리고 임상에 있어서의 GCP (good clinical practices)를 이루는 일이 선행 과제이다. 한약단미의 표준화에 관한 규정은 대한약전과 대한약전외 한약(생약)규격집 등에 상세히 기록되어 있고, 1998년 WHO 에서는 28종 한약의 품질, 유효성, 안전성에 대한 기준을 제시하였는데, 특히 GAP, GMP의 기준이 되는 품질에 관해서는 식물의 기원, 현미경 관찰, 확인시험, 미생물한도시험, 잔류농약, 잔류방사성물질, 회분함량, 중금속 등과 함께 HPLC 등에 의한 성분함량을 기재토록 하고 있다⁷⁾. 그러나 한약처방의 표준화는 아직까지 공정서 수준의 기준서가 존재하지 않는 실정이며 일본의 몇몇 유수의 제약회사들이 그 표본을 제시하고 있다. 이에 본 실험에서도 암환자의 방사선요법이나 화학요법에 의한 부작용 경감 목적으로 구성된 한약조성물인 가미홍화탕(KH-19)의 표준화를 위하여 대한약전기준의 시험법 HPLC-DAD에 의한 fingerprint 분석을 실시하였다.

가미홍화탕(KH-19)의 전임상시험과 최종 제품생산에 용이하게 적용할 수 있도록 연조엑스 시제품을 (주)대한유팜(한국, 경기도) 공장에서 제작하고 제품규격기준을 설정을 위한 실험을 실시하였다. 그 결과 성상은 갈색의 연조엑스를 형성하였으며, 건조감량은 46.76%, 연조엑스의 고형분함량은 53.24% 이었고, 건조엑스로서의 수득율은 25.01% 이었다. 그리고 한천평판회색법을 이용한 미생물한도시험에서 세균은 g당 10⁶개 이하 이며, 진균은 g당 100개이하로 모두 대한약전 일반시험법에 따른 기준치를 넘지 않았고, 대장균, 녹농균, 황색포도구균, 살모넬라 등의 특정미생물시험에서도 모두 발육이 관찰되지 않았다. 잔류농약시험에서도 BHC , DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin 등이 전혀 검출되지 않아 잔류농약에 의한 위

해성은 배제되었다⁸⁾. 생약 등의 중금속허용기준 및 시험방법에 따라 시행중금속 함량시험은 30ppm이하로 나타나 기준치⁹⁾를 초과하지 않았다(Table 3). 이상의 결과는 가미홍화탕(KH-19)이 전임상시험, 임상시험용 표준제품으로서의 최소의 안전성을 확보한 것으로 생각되었다.

한약의 단미나 처방이 의약품으로서의 기능을 수행하기 위한 최소 조건으로 제제내의 유효성분, 혹은 지표성분의 함량에대한 기준설정이 절실한 과제로 남아 있다. 이에 본 연구에서는 한약제제의 품질관리 방법의 일환으로 가미홍화탕(KH-19)의 HPLC fingerprint 분석법을 실시하였다.

가미홍화탕(KH-19)의 유효성분 혹은 지표성분의 fingerprint 분석조건을 수립하기 위하여 buffer의 종류를 달리하여 분석한 결과 Table 2의 분석조건이 가장 우수하였으며, ammonium acetate buffer등에서는 분석물질이 중첩이 일어났다. Library(표준물질의 spectrum) match test에서 표준품의 UV (190-400 nm) spectrum과 머무름 시간으로 library를 만들고 가미홍화탕(KH-19)에 포함된 지표물질을 동정한 결과 5-HMF, loganin, paeoniflorin, paeonol, glycyrrhizin과 decursin의 spectra와 머무름 시간이 모두 표준품과 일치하였다 (Fig. 1). 가미홍화탕(KH-19) 지표물질의 분석을 실시하여 좋은 분리능을 가진 크로마토그램을 얻었으며 (Fig. 3), 표준품들의 검량선은 1~1000 ug/ml 농도에서 회귀직선방정식과 0.9996~0.9999까지의 상관계수를 나타내었다 (Fig. 2). 가미홍화탕(KH-19)에 포함된 지표물질의 함량은 paeoniflorin이 0.97%로 가장 많이 함유되어 있었고, loganin(0.17%), 5-HMF (0.14%), glycyrrhizin(0.06%), decursin(0.03%), paeonol (0.003%) 순서로 함유 되어 있었다 (Table 4). 5-HMF의 경우 숙지황 단일약재에 0.1% 이상이 약전기준으로 설정되어 있는데 처방구성에 많은 양이 검출된 것을 볼 수 있다. 지황의 경우 제법이 다양하고 시중에 나와 있는 제품마다 그 질이 상이하니 이¹⁰⁾등의 실험결과에 따라 살펴보면 9종의 경우 5-HMF가 최대 0.6%까지 생성되는 것을 알 수 있다. 5-HMF는 당이나 cellulose의 가열에 의해 생성되는

것을 고려한다면 충분이 이해할 만한 함량으로 생각된다⁹⁾.

한약의 표준화나 약리활성물질 분석의 유용한 도구가 되고 있는 HPLC (high performance liquid chromatography)는 UV/visible, RI (refractive index), fluorescence, ECD (electrochemical detector) 등 검지기의 발달로 천연물, 의약품, 단백질, DNA 등의 분리와 분석에 널리 사용되고 있다. HPLC 검지기들의 특성이 정량분석을 목적으로 활용되어 왔으며 이들의 2차원 크로마토그램은 천연물, 한약제제, 기능성식품 등 복합제제의 분석시 부정확성이 매우 높았던 것이 사실이다. 그 이유는 다성분이 함유되어 있어 분석시 중첩 등 혼화가 일어날 가능성이 높아 분석자가 원하는 물질의 정량에 매우 불리하였다. 1980년대에 들어서 UV 검지기의 개량된 기술로 PDA (photo diode array) 기술이 도입되어 기존의 문제를 일부 해소할 수 있게 되었다. 이는 190-800nm 파장을 동시에 검출할 수 있는 검지기로 UV spectra를 제공하여 분석자가 원하는 물질을 표준품과 비교할 수 있으므로 분석물질의 동정에 유용하게 활용되고, 이를 바탕으로 다성분 분석시 중첩에 따른 분석오차를 줄일 수 있다 20,21). 본 실험에서도 DAD 방법을 이용하여 가미홍화탕(KH-19)을 분석하였고, 다성분들간의 중첩이 발생되지 않는 분석 조건을 수립하여, 향후 가미홍화탕(KH-19)의 전임상, 임상실험시 품질관리방법으로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

결 론

방사선 치료 보조제인 가미홍화탕(KH-19)의 제품화를 위한 조건으로 전 임상실험과 최종 제품생산에 용이하게 적용할 수 있도록 연조엑스 시제품을 (주) 대한뉴팜(한국, 경기도) 공장에서 제작하고 제품규격 기준을 설정을 위한 실험을 실시하였다. 그 결과 성상은 갈색의 연조엑스를 형성하였으며, 건조감량은 46.76%, 건조엑스로서의 수득율은 25.01% 이었다. 그리고 미생물한도 시험에서 세균과, 진균은 모두 약전 일반시험법에 따른 기준치를 넘지 않았고, 잔류농약

시험에서도 BHC, DDT Aldrin, Dieldrin, Endrin도 기준치를 초과한 물질은 발견되지 않았다. 생약 등의 중금속허용기준 및 시험방법에 따라 시행중금속 함량시험은 30ppm이하로 나타나 기준치를 초과하지 않았다. HPLC-DAD 분석에서 5-HMF, loganin, paeoniflorin, paeonol, glycyrrhizin, decursin을 UV-spectra library data의 비교에 의해 동정을 할 수 있었으며, 정량 분석결과 paeoniflorin이 0.97%로 가장 많이 함유되어 있었다. 이상의 실험결과는 추후 가미홍화탕(KH-19)의 품질관리의 기준으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) 日本防菌防黴學會. 21世紀の生薬 漢方製劑. 大阪: 纖維社. 1999: 1-120.
- 2) 식품의약품안전청. 대한약전 제 8개정. 서울: 식품의약품안전청고시 제 2002-15호. 2002.
- 3) 식품의약품안전청. 대한약전의한약(생약)규격집. 서울: 식품의약품안전청고시 제 2004-17. 2004.
- 4) 조선민주주의인민공화국 보건부 약전위원회. 조선민주주의인민공화국 약전(제5판). 평양: 의학과학출판사. 1996.
- 5) 일본약국방해설서 편집위원회. 일본약국방해설서(제 14개정). 동경: 광천서림. 2001.
- 6) 국가약전위원회. 중화인민공화국약전(2000년판1부). 북경: 화학공업출판사. 2000.
- 7) WHO. WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva: WHO. 1998:1-20.
- 8) 医療用漢方薬エキス製劑の品質評価 - 3次元 HPLC fingerprint技術の応用 - 쓰무라 기술보고서 21.
- 9) 服部尚子 · 他 : 第19回和漢医薬學會要旨집. 千葉: 일본화한의약학회. 2002: 123.
- 10) Saiki I, Yamaura T, Ohnishi Y, Hayakawa Y, Komatsu Y, Nunome S. HPLC analysis of juzen-taiho-to and its variant formulations and their antimetastatic efficacies. Chem Pharm Bull. 1999;47(8):1170-4.
- 11) Yu Y.B., Jo S.K. Evaluation on the Safety of gamma-

- irradiated *Angelica gigas* Nakai: Stability of Active components and safety in genotoxicity test. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2000;29(2): 300-6.
- 12) He JX, Akao T, Tani T. Development of a simple HPLC method for determination of paeoniflorin-metabolizing activity of intestinal bacteria in rat feces. *Chem Pharm Bull.* 2002;50(9):1233-7.
- 13) Lee J.H., Koh J.A., Hwang E.Y. Hong S.P. Quantitative Determination of 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde from *Rehmanniae Radix Preparata* according to Various Processings. *Kor. J. Herbology.* 2002; 17(2): 145-9.
- 14) Wang SF, Chen XG, Hu ZD, Ju Y. Analysis of three effective components in *Fructus corni* and its preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2003;17(5):306-11.
- 15) Zhao X, Sun Y. Analysis of *Paeoniae Radix* by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal Sci.* 2003 ;19(9):1313-5.
- 16) Jiang Y, Lu HT, Chen F. Preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of liquorice using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 2004;1033(1):183-6.
- 17) 식품의약품안전청. 생약의 잔류농약 허용기준 및 시험 방법. 식품의약품안전청고시 제2001-50호. 2001.
- 18) 식품의약품안전청. 생약 등의 중금속허용기준 및 시험 방법. 식품의약품안전청고시 제2001-51호. 2001.
- 19) Haghghat Khajavi S, Kimura Y, Oomori T, Matsuno R, Adachi S. Decomposition kinetics of maltose in subcritical water. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68(1):91-5.
- 20) Hanai T. HPLC. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 1999: 1-80.
- 21) Ahuja S. Selectivity and detectability optimizations in HPLC. New York: Wiley. 1989: 1-65.