

## 생약복합제 GCSB-5의 품질 표준화를 위한 오가피 및 우슬의 함량 분석

이은희 · 차배천\*

상지대학교 보건과학대학 제약공학과

### Quantitative Analysis of Acanthopanax Cortex and Achyranthis Radix for Standardization of GCSB-5 Preparation

Eun Hee Lee and Bae Cheon Cha\*

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

**Abstract** – In this study, we have investigated the HPLC analysis methods and quantitative analysis of standard compounds for quality standardization of a medicinal crude drug GCSB-5, a herbal formulation consisting of 6 medicinal plants (Acanthopanax Cortex, Achyranthis Radix, Ledebouriellae Radix, Cibotii Rhizoma, Glycine Semen, Eucommiae Cortex) which are used in traditional medicine to treat various bone disorders. HPLC analysis methods of acanthoside D(Acanthopanax Cortex), 20-hydroxyecdysone(Achyranthis Radix) which were known standard compounds among 6 medicinal plants were developed on crude material and product. And validation of HPLC analysis methods were conformed for verification of HPLC methods by check to specificity, linearity, intra-day precision, inter-day precision and accuracy following ICH guideline. Content of acanthoside D and 20-hydroxyecdysone on raw material of GCSB-5 were decided at 0.577-0.578 mg/g and 0.311-0.312 mg/g. And we confirmed that content of acanthoside D and 20-hydroxyecdysone on GCSB-5 preparation were 0.302-0.303 mg/capsule and 0.113-0.115 mg/capsule.

**Key words** – HPLC analysis methods, quantitative analysis, a medicinal crude drug, GCSB-5, acanthoside D, 20-hydroxyecdysone, validation

관절염, 소염, 항경련 및 골세포 퇴행 감소 치료제로 개발되어지고 있는 생약복합제인 GCSB-5는 예로부터 골다공증, 관절염, 디스크 등의 각종 골질환 치료제로 널리 사용되어 오고 있는 추나 약물(양근탕, 청과전 등 자생한방병원 고유 처방)을 바탕으로 한 오가피(Acanthopanax Cortex, *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman), 우슬(Achyranthis Radix, *Achyranthes bidentata* Blume), 방풍(Ledebouriellae Radix, *Saposhnikovia divaricata* Schiskin), 구척(Cibotii Rhizoma, *Cibotium barometz* J. Smith), 흑두(Glycine Semen, *Glycine max* Merrill) 및 두충(Eucommiae Cortex, *Eucommia ulmoides* Oliver)으로 구성된 생약복합제이다.<sup>1)</sup> 이 같이 질병치료를 위해 개발되고 있는 생약복합제가 우수한 약효를 발현하기 위해서는 기본적으로 생약복합제의 품질관리 및 안전성이 확립되어야 하며, 동시에 순도나 품

질이 확보된 생약 또는 한약재가 사용되어야 한다. 그러나 최근 국내 시장에 유통되는 생약 대부분이 기원이 불분명한 중국으로부터 수입되고 있음에도 불구하고 현실적으로 정량 분석을 통해 품질 평가를 할 수 있는 품목은 대한약전 8개정에 수재되어 있는 131 품목과 대한약전의 생약 규격집에 수재되어 있는 한약재 383 품목을 합한 생약 500여 품목 중 50 여종에 불과하여, 551 품목 중 215 여종이 가능한 중국과 비교해 볼 때 유통 생약에 대한 품질 규격화 연구가 너무 부족하다.<sup>2)</sup> 이는 결국 기원이 다른 품목이 유통될 수 있으며 이로 인한 심각한 부작용이 우려된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 생약의 지표 성분에 의한 함량 기준 및 이화학적 규격에 관한 정확한 품질 관리가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 진통 억제 및 항염증 효능의 천연물 신약으로 개발 중인 생약복합제 GCSB-5의 품질 규격화에 따른 유효성과 안전성 확립을 위한 기준 및 시험방법 연구로서, 규격연구와 함께 각각 생약의 약효 성분이나 특이 성분을 지표 물질로 한 정량 분석법 등을 연구하고자 하였

\*교신저자(E-mail): bccha@sangji.ac.kr  
(Tel): 033-730-0554

다. 이를 위해 생약복합제 GCSB-5에 대하여 건조 감량, 회분, 산불용성 회분, 묽은 에탄올 엑스 함량 등의 이화학적 규격 연구와 함께 6종 생약 중 기준 및 시험방법 기준에 준한 최소 2종 이상의 생약 규격 설정을 위해 기존의 연구 논문을 통하여 지표 성분이 밝혀진 4종 생약 중 오가피는 acanthoside D,<sup>3)</sup> 우슬은 20-hydroxyecdysone<sup>4)</sup>에 대해 설정된 지표 성분의 HPLC 조건을 검토하여 정량 분석법을 확립하고자 하였다. 또한 정량 분석법의 검증을 위해서는 ICH 가이드라인에<sup>5)</sup> 따라 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확도(accuracy), 정밀도(precision) 등을 고려한 validation을 수행하였다. 동시에 확립된 정량 분석법을 이용하여 생약복합제 GCSB-5의 원료와 제품에 있어서 각각의 지표 성분의 함량을 측정하여 생약복합제 GCSB-5의 품질 표준화를 확립하였으므로 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용한 2종의 생약인 오가피(Acanthopanax Cortex)와 우슬(Achyranthis Radix), 그리고 6종 생약(오가피 2.143 g, 우슬 2.143 g, 방풍 2.143 g, 구척 1.429 g, 흑두 1.429 g 및 두충 0.714 g의 비율)을 혼합하여 열수 추출 한 후 여과하여 분자량 10000 이하인 분획을 얻고, 이 분획물을 저온 농축한 분말인 생약복합제 GCSB-5의 원료와 1 캡슐(350 mg)당 생약복합제 GCSB-5 원료 300 mg, 부형제인 이산화규소 48.5 mg, 활택제로서 스테아린산 마그네슘 1.5 mg을 혼합하여 제조한 생약복합제 GCSB-5는 한풍제약(한국, 전주)으로부터 제공 받아 사용하였다.

**기기 및 시약** - 실험에 사용된 HPLC는 Varian Prostar Workstation System (USA)을 사용하였으며, column은 Shiseido(Japan)사의 Capcell Pak C<sub>18</sub>(4.6×150 mm, 5 μm, UG 80)과 Thermo (USA)사의 ODS Hypersil (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였다. 표준품인 acanthoside D는 ALPS (Japan)사 제품을, 20-hydroxyecdysone은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였다. HPLC 용매인 acetonitrile과 MeOH은 HPLC용인 J. T. Baker사 제품을 사용하였고, 증류수는 3차 증류수를 여과하여 사용하였으며 그 외에 시료 추출을 위한 용매는 특급 시약을 사용하였다.

### 이화학적 분석

**건조 감량** - 시료 2 g을 취하여 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 달았다. 다시 이것을 105°C에서 건조하여 1시간마다 무게를 측정하여 항량이 될 때의 감량을 건조 감량 (%)으로 하였다.<sup>6)</sup>

**회분 함량** - 미리 도가니를 500~550°C에서 1시간 이상 강열하여 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 달았다. 시료 2 g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 측정 한 후

회화로에 넣어 서서히 온도를 올리면서 500~550°C에서 4시간 이상 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 데시케이터에서 방냉한 다음 그 무게를 측정하여 회분량(%)으로 하였다.<sup>6)</sup>

**산불용성 회분** - 회분에 묽은 염산 25 ml를 넣고 5분간 약한 열로 끓여 불용물을 정량용 여과지로 여과한 후 잔류물을 열탕으로 잘 씻어 여과지와 함께 건조하였다. 회분항과 같은 방법으로 3시간 강열하여 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다. 얻은 값이 규정하는 값보다 클 경우에는 항량이 될 때까지 강열하였다.<sup>6)</sup>

**묽은 에탄올 엑스 함량** - 시료 약 2.3 g을 취하여 적당한 플라스크에 넣고 묽은 에탄올 70 ml를 넣어 때때로 흔들어 섞어 5시간 침출하였다. 다시 16~20시간 방치한 다음 여과하였다. 플라스크 및 잔류물은 여액이 100 ml로 될 때까지 묽은 에탄올로 씻은 다음 여액 50 ml를 수욕에서 증발 건조하고 105°C에서 4시간 건조하여 데시케이터에서 식힌 다음 그 무게를 달고 2를 곱하여 묽은 에탄올 엑스의 양으로 하였다. 건조 감량에서 얻은 값에서 건조물로 환산한 검체량에 대한 엑스 함량(%)을 산출하였다.<sup>6)</sup>

**HPLC 분석을 위한 표준액의 제조** - 각각의 표준품을 MeOH이나 50% MeOH에 녹여 농도를 0.5 mg/ml로 만들었다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 각각 5, 10, 20, 50, 100 μg/ml가 되도록 시료를 만들고, 15초 간 vortexing 한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

### 검액 제조

**원생약의 검액 제조** - 오가피 및 우슬 300 g을 각각 추출 용기에 넣고 H<sub>2</sub>O 700 ml를 첨가하고 수욕 상에서 3시간 2회 환류 추출 한 후, 여과하여 여액을 농축하여 오가피 H<sub>2</sub>O ext.(26.09 g) 및 우슬 H<sub>2</sub>O ext. (25.34 g)를 얻었다. 검체는 각각의 H<sub>2</sub>O ext. 0.3 g을 50% MeOH 10 ml로 녹이고, 15초 간 vortexing 한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다.

**생약복합제 GCSB-5 원료의 검액 제조** - 한풍제약으로부터 제공받은 생약복합제 GCSB-5 원료 0.3 g을 50% MeOH 10 ml로 녹이고, 15초 간 vortexing한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다.

**생약복합제 GCSB-5의 검액 제조** - 한풍제약으로부터 제공받은 생약복합제 GCSB-5의 캡슐 내용물 0.3 g을 취하여 50% MeOH 10 ml로 녹이고, 15초 간 vortexing한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다.

### HPLC 분석

**오가피의 분석 조건** - 오가피는 지표 물질을 acanthoside

D로 선정하여, 연구 보고 되어진 HPLC 분석 방법<sup>3,7,8)</sup>을 기초로 하여 분석 조건을 검토하였다. 칼럼은 Capcell Pak C<sub>18</sub>(4.6×250 mm, 5 μm, Shiseido)을 사용하였고, 칼럼 온도는 40°C, 검출기는 UV 210 nm, 이동상으로는 10% acetonitrile과 30% acetonitrile을 사용하여 gradient profile로 실시하였고, 유속은 1 ml/min을 사용하여 실험하였다.

| Gradient profile | Time (min) | Flow (ml/min) | Mobile phase        |                     |
|------------------|------------|---------------|---------------------|---------------------|
|                  |            |               | A(10% acetonitrile) | B(30% acetonitrile) |
|                  | 0:00       | 1.0           | 90                  | 10                  |
|                  | 5:00       | 1.0           | 85                  | 15                  |
|                  | 15:00      | 1.0           | 85                  | 15                  |
|                  | 20:00      | 1.0           | 90                  | 10                  |
|                  | 30:00      | 1.0           | 90                  | 10                  |

**우슬의 분석 조건** – 우슬은 지표 물질을 20-hydroxyecdysone으로 하여, 보고되어진 HPLC 분석 방법<sup>4,9,10)</sup>을 기본으로 하여 분석 조건을 검토하였다. 칼럼은 ODS Hypersil (4.6×250 mm, 5 μm, Thermo)를 사용하였고, 칼럼 온도는 35°C, 검출기는 UV 254 nm, 이동상으로는 acetonitrile과 물을 사용하여 gradient profile로 하였고, 유속은 1 ml/min을 사용하여 실험하였다.

| Gradient profile | Time (min) | Flow (ml/min) | Mobile phase     |           |
|------------------|------------|---------------|------------------|-----------|
|                  |            |               | A (Acetonitrile) | B (Water) |
|                  | 0:00       | 1.0           | 15               | 85        |
|                  | 8:00       | 1.0           | 15               | 85        |
|                  | 15:00      | 1.0           | 30               | 70        |
|                  | 30:00      | 1.0           | 30               | 70        |

### 분석 방법의 검증(validation)

**특이성(Specificity)** – HPLC 분석법이 어느 정도의 신뢰도와 재현성을 갖는지 검증하기 위해서 ICH (International Conference on Harmonization) 가이드라인<sup>5)</sup>에 의한 분석법 validation을 수행하였다. 그 중 특이성은 불순물, 분해 산물, 기질 물질과 같이 예상할 수 없는 구성 성분의 존재 하에서 분석 물질을 확실하게 분석하는 능력으로, 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는 것에 의해 특이성을 확인하였다.

**직선성(Linearity)** – 각 표준액에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의하여 5개의 농도(5, 10, 20, 50, 100 μg/ml)별로 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(X축)와 피크 면적비(Y축)에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선성의 상

관계수를 구하여 확인하였다.

**정밀성(Precision)** – 일정 농도의 표준액을 일간 및 일내 변동을 알아보기 위해 설정한 5가지 농도를 하루에 5개씩 3일간 반복하여 측정된 결과를 피크 면적비의 변이계수(%)로 검토하였다.

**정확성(Accuracy)** – 표준액 3개 농도를 각 3회 주입하여 얻은 결과를 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차 정도(회수율, %)로서 정확성을 평가하였다.

$$\text{회수율(Recovery, \%)} = \frac{\text{측정농도}}{\text{이론농도}} \times 100$$

**생약복합제 GCSB-5의 원료와 제품에 함유된 지표 성분의 정량 및 이행률** – 생약복합제 GCSB-5의 원료와 제품에 대한 품질 규격화를 확립하기 위하여 생약복합제 GCSB-5의 원료와 제품에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의해 표준액 및 검액을 각각 lot별로 3회씩 분석 한 후, 검량선에 대비하여 각각의 함량을 산출하였다. 동시에 원생약의 함량으로부터 계산된 GCSB-5 원료 중의 지표성분의 함량 이론치와 분석 결과 얻어진 지표성분의 실측치로부터 원생약으로부터 GCSB-5 원료로 이행되어진 지표성분의 이행률을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

관절염이란 부종과 동통, 발적 등의 증상을 특징으로 하는 질환으로 발병 기전이 아직 불분명하므로 통증과 염증을 감소시키는 것이 치료의 주된 목적이다. 이러한 관점에서 관절염에 있어 항염증 및 통증 억제 효능을 가진 천연물질 탐색 연구가 수행되어있으며, 산복사,<sup>11)</sup> 사사자,<sup>12)</sup> 금은화,<sup>13)</sup> 조각자,<sup>14)</sup> 신이,<sup>15)</sup> 당귀, 방풍, 은행엽, 죽엽 등이 관절염에 효과가 있는 것으로 보고되어져 있다.<sup>16)</sup>

이들 단일 생약과는 달리, 관절염, 소염, 항경련 및 골세포 퇴행 감소 치료제로 개발되어 지고 있는 생약복합제 GCSB-5는 오가피, 우슬, 방풍, 구척, 흑두 및 두충의 6종의 생약으로 구성된 복합생약제제이다. 본 연구에서는 생약복합제 GCSB-5의 품질 규격화를 위한 연구의 하나로, 이화학적 분석과 함께 6가지 생약 중에서 오가피와 우슬의 지표성분의 HPLC 분석법 연구와 함께 원료 및 제품에 있어서의 함량 분석 연구를 수행하였다. 오가피는 오갈피과(Araliaceae)에 속하는 오갈피나무(*Acanthopanax sessiliflorum* Seeman) 또는 기타 동속식물의 뿌리, 줄기 및 가지의 껍질로서 관상 또는 반관상으로 특이한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰다. 한방에서 주로 자양, 강장, 신경통, 진경, 근골동통 등의 효능이 있어 주로 강장약으로 신경통, 중풍, 고혈압, 당뇨병 및 류머티스성 관절염 등의 치료에 이용되고 있다.<sup>17,18)</sup> 현재 까지 오가피속 식물의 성분으로는 eleutheroside A, B, B<sub>1</sub>,

B<sub>4</sub>, C, D, E, I, K, L, M과 chlorogenic acid, sesamin, caffeic acid, β-sitosterol, oleanolic acid 등이 알려져 있다.<sup>19,21)</sup> 또한 우슬은 비름과(Amaranthaceae)에 속하는 쇠무릎(Achyranthes bidentata Blume)의 뿌리를 지칭하는 생약으로 한방에서는 이뇨, 진통, 어혈, 요통 등의 치료에 사용하고 있으며 항염증 작용이 보고되어져 있다.<sup>22,23)</sup> 성분에 관한 연구로는 oleanolic acid를 비당부로 하는 saponin<sup>24,25)</sup>과 polysaccharide 및 inokosterone, 20-hydroxyecdysone 등의 phytoecdysteroid에 대한 보고가 있다.<sup>26,27)</sup> 이와 같은 오가피 및 우슬의 원생약과 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품에 있어서 이화학적 분석 및 HPLC 분석법과 함량 분석 연구를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

**이화학적 분석**

**건조 감량** - 오가피와 우슬의 건조 감량을 3회 반복 시험하여 평균치를 Table I에 제시하였다. 우슬의 건조 감량은 평균 10.22%로서 생약규격집 기준인 17% 이하였고, 생약 규격집에 수재되어 있지 않은 오가피는 7.45%로 10% 이하를 나타내었다. 또한 생약복합제 GCSB-5 원료의 건조 감량은 Table I에 나타낸 것과 같이 평균 8.95%로 10% 이하의 건조 감량을 보였다.

**회분 함량** - 오가피와 우슬의 회분 함량을 3회 반복 시험하여 평균치를 Table I에 나타내었다. 우슬은 5.20%로 생약규격집 기준인 10% 이하를 나타내었으며, 생약규격집에 수재되어 있지 않은 오가피는 평균 5.99%로 7% 이하를 나타내었다. 생약복합제 GCSB-5 원료의 회분 함량은 Table I에 제시한 것처럼 평균 8.05%로 10% 이하를 나타내었다.

**산불용성 회분** - 오가피와 우슬의 산불용성 회분을 3회 반복 시험하여 평균치를 제시하였다. Table I에서와 같이 우슬은 0.09%로서 생약규격집에서 규정하는 1.5% 이하를 나타내었고, 오가피는 평균 0.22%로서 기준인 1% 이하를 나타내었다. 또한 Table I에서와 같이 생약복합제 GCSB-5 원료의 산불용성 회분은 평균 0.08%로 1% 이하를 나타내었다.

**뭍은 에탄올 엑스 함량** - 오가피와 우슬의 뭍은 에탄올 엑스함량을 3회 반복 시험하여 평균치를 Table I에 제시하였다. 오가피는 평균 22.80%로서 생약규격집 기준인 8% 이상을 나타내었으며, 생약규격집에 수재되어 있지 않은 우슬

은 평균 54.75%로 50% 이상을 나타내었다. 생약복합제 GCSB-5 원료의 뭍은 에탄올 엑스함량은 Table I에서와 같이 평균 94.03%로 높게 나타났다.

**Acanthoside D의 분석 및 원생약 오가피의 함량 기준** - 표준액 및 검액의 분석을 위하여 기존의 알려진 분석법(3,7,8)을 기초로 오가피의 지표 성분인 acanthoside D의 분석 조건을 검토한 결과 Hong 등<sup>3)</sup>의 방법에서 완전한 형태와 유지 시간이 긴 피크를 14분대로 옮겨 분리하는 새로운 분석 조건을 개발하였다. 그 결과 오가피의 지표 성분인 acanthoside D를 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품에서 다른 피크의 간섭 없이 분리할 수 있는 분석 조건을 확립하였다. 또한 원생약 오가피의 함량 기준 설정을 위해 한풍제약에서 제공한 수종의 산지별 오가피의 acanthoside D 함량을 Hong 등<sup>3)</sup>이 이미 실시한 오가피 함량 모니터링 실험과 동일한 방법으로 실시한 결과 평균이 1.013±0.165 mg/g으로 Hong 등<sup>3)</sup>이 제시한 함량 기준인 0.810±0.058 mg/g보다는 약간 높은 함량을 보였다. 이에 원료의 원활한 수급과 안정적인 함량 확보를 위해 원생약 오가피의 함량 기준은 가장 낮은 함량의 평균치인 0.852 mg/g 이상으로 설정 하였다.

**20-Hydroxyecdysone의 분석 및 원생약 우슬의 함량 기준** - 우슬의 지표 성분인 20-hydroxyecdysone을 표준액 및 검액에서 분석하는 새로운 조건을 개발하기 위하여 기존의 알려진 분석법<sup>4,9,10)</sup>을 참고하여 분석 조건을 검토한 결과, Son 등<sup>4)</sup>의 방법에서 13 분대에서 다른 성분과 겹치던 피크를 17분대로 옮겨 분리하는 분석 조건을 개발하였다. 이 분석법은 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품에서도 다른 피크의 간섭 없이 우슬의 지표 성분 20-hydroxyecdysone 피크가 분리되어 분리능이 우수한 분석법으로 판단되었다. 한편 원생약 우슬의 함량 기준 설정을 위해 한풍제약에서 제공한 수종의 산지별 우슬의 20-hydroxyecdysone 함량을 Son 등<sup>4)</sup>이 이미 실시한 우슬 함량 모니터링 실험과 동일한 방법으로 실시한 결과 평균이 0.645±0.034 mg/g으로 Son 등<sup>4)</sup>이 제시한 함량 기준인 0.931±0.048 mg/g보다는 약간 낮은 함량을 보였다. 이에 원료의 원활한 수급과 함량의 안정한 확보를 위해 원생약 우슬의 함량 기준은 가장 낮은 함량의 평균치인 0.605 mg/g 이상으로 설정 하였다.

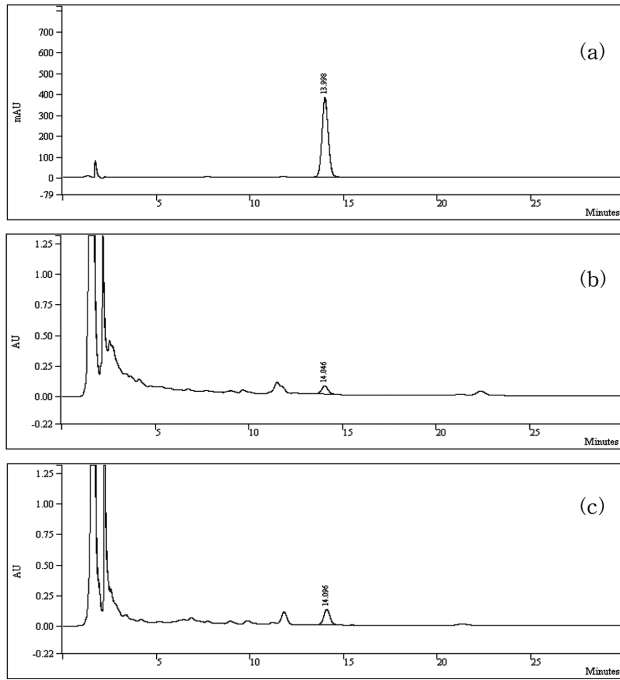
**Table I.** Contents of loss on drying, residue on ignition, residue on acid insoluble ignition and 50% ethanol extract of each medicinal plants and raw material of GCSB-5 preparation

| Sample              | Loss on drying (%) | Residue on ignition (%) | Residue on acid insoluble ignition (%) | 50% Ethanol extract (%) |
|---------------------|--------------------|-------------------------|--|-------------------------|
| Acanthopanax Cortex | 7.45±0.07          | 5.99±0.13               | 0.22±0.03                              | 22.80±0.92              |
| Achyranthis Radix   | 10.22±0.05         | 5.20±0.07               | 0.09±0.01                              | 54.75±0.88              |
| GCSB-5-Raw Material | 8.95±0.31          | 8.05±0.02               | 0.08±0.02                              | 94.03±0.89              |

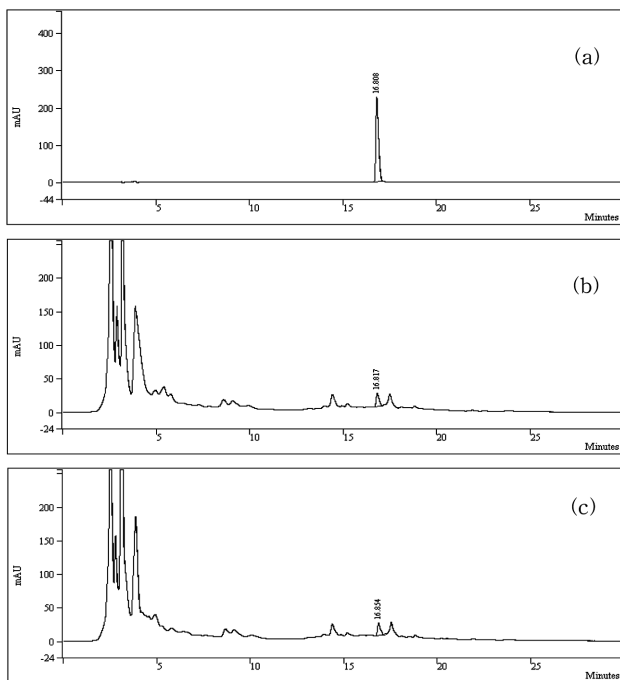
Number of samples, n=3

**분석법의 검증(Validation)**

**특이성** - 확립된 HPLC 조건으로 분석한 오가피의 지표 물질, 생약복합제 GCSB-5의 원료 GCSB-5-R과 제품인 GCSB-5의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. Acanthosdie D의



**Fig. 1.** HPLC chromatogram of acanthoside D(a), GCSB-5-R(b) and GCSB-5(c).



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of 20-hydroxyecdysone(a), GCSB-5-R(b) and GCSB-5(c).

피크 유지 시간은 13.9분대이고, 원료와 제품도 14.0분대로 acanthosdie D가 기타 다른 성분들과 명확히 분리되었고 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인되었다. 우슬에 대해서도 확립된 HPLC 조건으로 분석한 지표 물질, 생약복합제 GCSB-5의 원료인 GCSB-5-R과 제품인 GCSB-5의 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. 20-Hydroxyecdysone의 피크유지 시간은 16.8분대이고, 원료와 제품에서도 16.8분대로 20-hydroxyecdysone이 다른 성분들과 겹침이 없이 분리되었고 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인하였다.

**직선성** - 오가피의 지표 물질인 acanthosdie D를 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml의 농도별로 제조하고 확립된 HPLC 조건으로 분석을 실시하여 x축은 농도, y축은 피크 면적으로 하여 검량선을 작성한 결과, Table II에 나타낸 것과 같이 직선성( $R^2$ )이 0.9996인 상관관계를 나타내었다. 또한 우슬에 있어서도 지표 물질인 20-hydroxyecdysone을 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml의 농도별로 제조하여 확립된 HPLC 분석 조건으로 분석하여 x축은 농도, y축을 피크 면적으로 하여 검량선을 작성한 결과, Table II에 제시한 것과 같이 직선성( $R^2$ )이 0.9999인 상관관계를 나타내어 직선성이 인정되었다.

**정밀성** - 일내 정밀도로서 오가피의 지표 물질인 acanthosdie D의 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml 농도의 표준액을 5회 측정하여 피크의 면적을 구하고, 이로부터 구한 일내 정밀도는 Table III에 나타낸 것과 같이 0.61-0.98%로 양호한 값을 나타내었다. 우슬에 있어서도 지표 물질인 20-hydroxyecdysone의 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml 농도로 제조한 표준액을 5회 측정하여 피크의 면적으로부터 구한 일내 정밀도는 0.06-0.92%로 양호하였으며 그 값을 Table III에 나타내었다.

일간 정밀도에 있어서는 Table III에 나타낸 것과 같이 일내 정밀도를 측정한 동일한 농도의 표준액을 1일 1회 3일간 반복 측정하여 농도에 따른 피크의 면적을 구하고, 이로부터 구한 오가피의 acanthosdie D 일간 정밀도는 0.50-0.74%로 양호하였으며, 우슬의 20-hydroxyecdysone의 일간 정밀도도 0.04-0.82%로 양호한 값을 보여주고 있다.

**정확성** - 오가피의 지표 물질인 acanthosdie D의 5, 20, 100 µg/ml 농도의 표준액을 각각 3회 측정하여 Table II에

**Table II.** Calibration curve equations, LOD and LOQ of acanthosdie D and 20-hydroxyecdysone standard

| Sample             | Equation          | $R^2$  | LOD (µg/ml) | LOQ (µg/ml) |
|--------------------|-------------------|--------|-------------|-------------|
| Acanthoside D      | $y=48111x+9118.2$ | 0.9996 | 0.2         | 0.6         |
| 20-Hydroxyecdysone | $y=11929x-402.77$ | 0.9999 | 0.1         | 0.3         |

LOD:3.3×(SD of the response / slope of the calibration curve)  
 LOQ:10×(SD of the response / slope of the calibration curve)

**Table III.** Precision and accuracy for the determination of acanthoside D and 20-hydroxyecdysone

| Sample concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Precision CV(%) <sup>a</sup> |                 | Accuracy (%) |
|---|------------------------------|-----------------|--------------|
|   | Intra-day (n=5)              | Inter-day (n=5) |              |
| Acanthoside D                             |                              |                 |              |
| 5   | 0.72                         | 0.51            | 95.20        |
| 10  | 0.62                         | 0.52            |              |
| 20  | 0.71                         | 0.70            | 96.90        |
| 50  | 0.98                         | 0.74            |              |
| 100                                       | 0.61                         | 0.50            | 99.11        |
| 20-hydroxyecdysone                        |                              |                 |              |
| 5   | 0.86                         | 0.82            | 93.80        |
| 10  | 0.19                         | 0.11            |              |
| 20  | 0.06                         | 0.04            | 99.80        |
| 50  | 0.92                         | 0.55            |              |
| 100                                       | 0.08                         | 0.05            | 99.70        |

<sup>a</sup>Coefficient of variation =  $100 \times (\text{S.D.}/\text{mean})$

**Table IV.** Contents of acanthoside D on GCSB-5-R and GCSB-5

| Sample     | Acanthoside D                |
|------------|------------------------------|
| GCSB-5-R-1 | 0.577 $\pm$ 0.001 mg/g       |
| GCSB-5-R-2 | 0.577 $\pm$ 0.002 mg/g       |
| GCSB-5-R-3 | 0.578 $\pm$ 0.001 mg/g       |
| GCSB-5-1   | 0.303 $\pm$ 0.001 mg/capsule |
| GCSB-5-2   | 0.302 $\pm$ 0.001 mg/capsule |
| GCSB-5-3   | 0.302 $\pm$ 0.001 mg/capsule |

Number of samples per each lot, n=3

**Table V.** Contents of 20-hydroxyecdysone on GCSB-5-R and GCSB-5

| Sample     | 20-Hydroxyecdysone           |
|------------|------------------------------|
| GCSB-5-R-1 | 0.311 $\pm$ 0.001 mg/g       |
| GCSB-5-R-2 | 0.312 $\pm$ 0.001 mg/g       |
| GCSB-5-R-3 | 0.312 $\pm$ 0.001 mg/g       |
| GCSB-5-1   | 0.113 $\pm$ 0.001 mg/capsule |
| GCSB-5-2   | 0.115 $\pm$ 0.001 mg/capsule |
| GCSB-5-3   | 0.115 $\pm$ 0.001 mg/capsule |

Number of samples per each lot, n=3

제시한 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 오가피의 acanthoside D 분석법의 정확도 평균은 Table III에 나타낸 것과 같이 각각의 농도에서 95-99%로 양호한 수치를 보였다. 우슬에 있어서도 5, 20, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도의 20-hydroxyecdysone 표준액을 각각 3회 측정하여 Table II에 나타낸 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하여 구한 정확도의 평균은 Table III에서와 같이 각각의 농도

에서 93-99%로 양호한 값을 나타내었다.

**생약복합제 GCSB-5의 원료와 제품 중의 지표 성분의 정량 및 이행률** - 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품 중 오가피의 지표 성분의 정량을 원료인 GCSB-5-R과 제품인 GCSB-5를 각각 30 mg/ml로 3개씩 제조한 후 3회 측정하여 Table II에 나타낸 검량선을 이용하여 함량을 측정된 결과, Table IV에 나타낸 것과 같이 원료 GCSB-5-R에서는 acanthoside D가 0.577-0.578 mg/g의 함유량을 나타내 GCSB-5 원료에서 acanthoside D의 기준은 실측치 함유량의 90% 이상을 기준으로 하여 0.519 mg/g 이상으로 하였다. 한편 원생약 오가피의 함량 기준이 0.852 mg/g이었고 GCSB-5의 원료 1 g이 오가피 4.2 g에 해당되는 것으로부터 계산된 이론적 함량치가 3.578 mg/g에 해당됨에 의해 이행률은 16.13-16.15%임을 알 수 있었다. 제품인 GCSB-5에서는 원료의 기준치로부터 계산된 함량기준인 0.156 mg/300 mg (capsule) 이상의 기준에 대하여 0.302-0.303 mg/capsule으로서 기준 보다 높은 acanthoside D를 함유하는 것으로 규격화 하였다. 또한 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품 중 우슬의 지표 성분의 정량을 원료인 GCSB-5-R과 제품인 GCSB-5를 각각 30 mg/ml로 3개씩 제조하여 3회 측정하여 Table II에 나타낸 검량선을 이용하여 함량을 측정하였고, 그 결과 Table V에서와 같이 원료인 GCSB-5-R에서 20-hydroxyecdysone은 0.311-0.312 mg/g의 함량을 보여 GCSB-5 원료에서 20-hydroxyecdysone의 기준은 실측치 함유량의 90% 이상을 기준으로 하여 0.280 mg/g 이상으로 정하였다. 이행률은 원생약 우슬의 함량 기준이 0.605 mg/g이었고 GCSB-5의 원료 1 g이 우슬 4.2 g에 해당되는 것으로부터 계산된 이론적 함량치가 2.541 mg/g에 해당됨에 따라 12.24-12.28%임을 알 수 있었다. 한편 제품인 GCSB-5에서는 원료

의 기준치로부터 계산된 함량기준인 0.084 mg/300 mg(capsule) 이상의 기준에 대하여 기준 보다 높은 0.113-0.115 mg/capsule의 20-hydroxyecdysone을 함유하고 있는 것으로 확인하였다.

## 결 론

최근 건강에 대한 관심의 증대로 생약 및 한약재를 이용한 생약제제, 한약제제 및 기능성 식품 등의 개발이 급속히 증가되고 있다. 이들 제제 및 식품들의 약효와 안전성을 확보하기 위해서는 사용되는 생약 및 한약재의 품질 규격화가 우선적으로 이루어져야 한다. 본 연구에서는 관절염 소염, 항경련 및 골세포 퇴행감소 치료제로 개발 중인 천연물 신약인 생약복합제 GCSB-5의 품질 규격화를 위한 연구의 하나로써 생약복합제 GCSB-5를 구성하는 6종의 생약 중 오가피와 우슬의 함량 규격화 연구를 실시한 결과, 이화학적 분석과 함께 생약복합제 GCSB-5 중 오가피와 우슬의 함량 기준 설정을 위해 오가피는 acanthoside D를 우슬은 20-hydroxyecdysone을 지표 물질로 설정하여 원료 및 제품에서 다른 생약 성분과 겹치지 않는 분석법을 검토하여 타 성분과 완전히 분리되는 분석법을 확립하였다. 계속하여 분석법의 검증을 위해 ICH 가이드라인에 따른 validation 실험에 의해 분석법의 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성의 검토에 의해 분석법을 검증하였다. 최종적으로 확립된 분석법을 사용하여 원생약과 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품에 있어서 오가피의 함량 및 우슬의 함량 기준을 다음과 같이 설정하였다. 원생약 오가피는 acanthoside D의 함량 기준을 0.852 mg/g 이상으로 설정하였고, GCSB-5 원료에서는 0.519 mg/g 이상, 제품인 GCSB-5에서는 0.156 mg/capsule 이상으로 기준을 설정하였다. 또한 우슬의 20-hydroxyecdysone에 대해서도 원생약은 0.605 mg/g 이상, GCSB-5 원료에서는 0.280 mg/g 이상으로 설정하였고 동시에 제품인 GCSB-5에서는 0.084 mg/capsule 이상으로 기준을 정함으로서 천연물 신약으로 개발 중인 생약복합제 GCSB-5의 품질 규격화의 기준 및 시험법의 기초를 마련했다.

## 사 사

본 연구는 (주)녹십자 PBM 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Lee, C. H., Kim, S. H., Lee, J. S., Cho, K. H., Kim, J. S., Cho, S. H. and Lee, S. M. (2005) Evaluation of the antinociceptive properties of GCSB-5, a herbal formulation. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**: 299-304.
- 오미현, 조용, 장승엽, 박주영, 이종필, 성락선, 강인호, 김종환, 김준혁, 김현욱, 육창 수, 박종희 (2004) 생약규격제 · 개정사업(III). 식품의약품안전청연구보고서, **8**: 165-175.
- Hong, S. S., Hwang, J. S., Lee, S. A., Hwang, B. Y., Ha, K. W., Ze, K. R., Seung, R. K., Ro, J. S. and Lee, K. S. (2001) Isolation and quantitative analysis of acanthoside D from *Acanthopanax Cortex*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 316-321.
- Son, K. H., Hwang, J. H., Lee, S. H., Park, J. H., Kang, S. J., Chang, S. Y. and Lee, K. S. (1999) Isolation and quantitative determination of 20-hydroxyecdysone from *Achyranthis Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 335-339.
- 의약품평가부 (2004) 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인. 식품의약품안전청, 5-12.
- 식품의약품안전청 (2002) 대한약전 제8개정. 약업신문, 1654-1656.
- Lee, K. J., Kang, J. H. and Row, K. H. (2001) Extraction and purification of acanthoside-D from *Acanthopanax chilansensis*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 71-75.
- Lee, S. H., Kang, S. S., Cho, S. H., Ryu, S. N. and Lee, B. J. (2005) Determination of Eleutheroside B and E in various parts of *Acanthopanax* species. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**: 70-74.
- Kim, H. K., Lee, H. W., Hwang, S. W. and Ko, B. S. (2002) Quantitative analysis of 20-hydroxyecdysone in *Melandrii herba*. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 96-99.
- Shi, Q., Yan, S., Liang, M., Yang, Y., Wang, Y. and Zhang, W. (2007) Simultaneous determination of eight components in *Radix Tinosporae* by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**: 994-999.
- Choi, J. S., Young, H. S., Lee, T. W., Woo, S. W. and Lee, E. B. (1992) Chemistry and anti-inflammatory activity of *Prunus davidiana* Stems. *Yakhak Hoeji* **36**: 115-119.
- Lee, E. B., Kim, S. M. and Kim, T. H. (1998) Anti-inflammatory activities of *Torilis japonica* Fruit. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 384-390.
- Lee, S. J., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., Park, P. U., Kawk, W. J., Han, C. K. and Kim, H. P. : Development of plant anti-inflammatory agents (1994) Comparison of anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from *Lonicera japonica*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**: 363-367.
- Park, E. H. and Shin, M. J. (1993) Anti-inflammatory activity of aqueous extract from *Gleditsiae spina*. *Yakhak Hoeji* **37**: 124-128.
- Lim, J. P. and Park, Y. S. (2005) Anti-inflammatory activity of ethanol extract from *Magnoliae Flos* on PAR2-mediated Edema. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**: 245-249.
- Yoo, T. M., Yi, S. Y., Chung, S. Y., Seung, S. A., Rheu, H. M., Lee, E. B. and Yang, S. A. (1998) Studies on the and anti-

- inflammatory effects of natural products. *J. Appl. Pharmacol.* **6**: 269-275.
17. 과학백과사전출판사 (1997) 약초의 성분과 이용, 413-414. 일월서각, 서울.
  18. 한의학대사전편찬위원회 (1998) 한의학대사전, 1040-1041. 도서출판 정담, 서울.
  19. Miyakoshi, M., Ida, Y., Isoda, S. and Shoji, J. (1993) 3- $\alpha$ -Hydroxyoleanane-type triterpene glycosyl esters from leaves of *Acnathopanax spinosus*. *Phytochemistry* **34**: 1599-1602.
  20. Sawada, H., Miyakoshi, M., Ida, Y., Isoda, S., Ida, Y. and Shoji, J. (1993) Saponins from leaves of *Acnathopanax sieboldianus*. *Phytochemistry* **34**: 1117-1121.
  21. Ahn, J. K., Lee, W. Y., Oh, S. J., Park, Y. H., Hur, S. D. and Choi, M. S. (2000) The comparison of chlorogenic acid and Eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus*(Rupr. et Maxim.) Hams. *J. Korean For. Soc.* **89**: 211-222.
  22. 안덕균 (1998) 원색 한국본초도감, 294. (주)교학사, 서울.
  23. Ida, Y., Satoch, Y., Katsumata, M., Nagasao, M., Hirai, Y., Kajimoto, T., Katada, N., Yasuda, M. and Yamamoto, T. (1998) Two novel oleanolic acid saponins having a sialyl Lewis X mimetic structure from *Achyranthes fauriei* roots. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 2555-2558.
  24. Han, D. R. and Lee, M. H. (1991) Studies on the constituents of *Achyranthis radix*() oleanolic acid bisdesmoside from the root. *Yakhak Heoji* **35**: 457-460.
  25. Ida, Y., Katsumata, M., Satoch, Y. and Shoji, J. (1994) Glucuronide saponins of oleanolic acid from *Achyranthes fauriei* roots. *Planta Med.* **50**: 286-287.
  26. Takemoto, T., Ogawa, S. and Nishimoto, N. (1967) Studies on the constituents of *Achyranthis radix* . Isolation of the inspect-moulting hormones. *Yakhak Heoji* **87**: 1469-1473.
  27. Takemoto, T., Ogawa, S., Nishimoto, N., Hirayama, H. and Taniguchi, S. (1968) Studies on the constituents of *Achyranthis radix* . The inspect-moulting substance in *Achyranthes* and *Cyathula* genera "supplement". *Yakhak Heoji* **88**: 1293-1297.

(2008년 9월 24일 접수)