

HPLC-DAD를 이용한 평위산 중의 Hesperidin 및 Glycyrrhizin의 동시분석법 확립

이미경¹ · 최옥경¹ · 박진호¹ · 조정희² · 김도훈² · 백주현² · 김효진³ · 이기용⁴ · 김상두⁴ · 김영중⁴ · 성상현^{4,*}
¹주엘컴사이언스 생명과학연구소, ²식품의약품안전청 생약제제과, ³동덕여자대학교 약학대학, ⁴서울대학교 약학대학

Simultaneous Determination of Hesperidin and Glycyrrhizin in Pyungwi-san by HPLC/DAD

Mi Kyeong Lee¹, Jin-Ho Park¹, Jung Hee Cho², Do Hoon Kim², Ju Hyun Baek², Hyo Jin Kim³,
Ki Yong Lee⁴, Sang Du Kim⁴, Young Choong Kim⁴ and Sang Hyun Sung^{4,*}

¹Institute for Life Science, Elcom Science Co. Ltd., Seoul 151-742, Korea

²Herbal Medicine Evaluation Department, Korea Drug & Food Administration, Seoul 122-704, Korea

³College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

⁴College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

Abstract – A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the simultaneous determination of hesperidin and glycyrrhizin was established for the quality control of traditional herbal medicinal preparation, Pyungwi-san (PWS). Separation and quantification were successfully achieved with a Waters XTerra RP18 column (5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 150 mm) by gradient elution of a mixture of acetonitrile and water containing 0.03% phosphoric acid (pH 2.03) at a flow rate of 1.0 ml/min. The diode-array UV/vis detector (DAD) was used for the detection and the wavelength for quantification was set at 230 nm. The presence of hesperidin and glycyrrhizin in this extract was ascertained by retention time, spiking with each authentic standard and UV spectrum. All four compounds showed good linearity ($r^2 > 0.995$) in a relatively wide concentration ranges. The R.S.D. for intra-day and inter-day precision was less than 7.0% and the limits of detection (LOD) were less than 60 ng. The mean recovery of each compound was 99.0–105.6% with R.S.D. values less than 4.0%. This method was successfully applied to the determination of contents of hesperidin and glycyrrhizin in three commercial products of PWS. These results suggest that the developed HPLC method is simple, effective and could be readily utilized as a quality control method for commercial PWS products.

Keywords – Pyungwi-san (PWS), HPLC, quantification, validation

우리나라는 예로부터 질병의 예방이나 치료 목적으로 생약제제를 많이 사용하고 있다. 생약제제는 여러가지 생약으로 구성되어 있으며 이들의 다양한 성분이 복합적으로 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁻³⁾ 따라서 생약제제의 경우 생약의 기원, 재배방법, 채집시기 및 조제방법 등 다양한 요인에 의하여 그 효능이 달라지게 된다.⁴⁻⁷⁾ 이에 대한 약전에서는 생약의 지표성분을 설정하여 이들의 함량을 평가하여 품질을 평가하도록 하고 있다. 그러나 생약제제가 아닌 생약의 성분에 대한 분석법이 설정되어 있어 생약제제 내의 다른 조성 생약의 성분으로 인하여 분석이 영향을

받는 경우가 많이 있다. 또한 생약제제내의 여러 지표 성분들을 각각 분석해야 함으로써 시간적, 경제적 손실이 따르게 된다.

이에 본 연구에서는 식욕부진, 복부팽만 등 소화기계 질환에 사용되는 평위산의 동시분석법을 확립하고자 하였다. 평위산은 창출, 후박, 진피, 대추, 감초, 건강으로 구성되어 있으며, 대한약전에 진피의 hesperidin 및 감초의 glycyrrhizin이 지표성분으로 설정되어 이들의 개별 분석법이 확립되어 있다. 본 연구에서는 HPLC-DAD 방법을 이용하여 평위산의 지표성분인 hesperidin 및 glycyrrhizin에 대한 동시분석법을 확립하였으며, 확립된 방법의 타당성을 검토하였다. 또한 확립된 분석법을 이용하여 시중에 유통되는 평위산 제제

*교신저자 (E-mail): shsung@snu.ac.kr
(FAX): 82 2 887 7859

의 함량을 분석하여 본 분석방법의 응용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

평위산의 조제 - 평위산 [창출 (37.5g), 후박 (22.5g), 진피 (22.5g), 대추 (3.75g), 감초 (10.0g), 건강 (3.75g)]의 조성대로 총 100g의 생약을 칭량한 후 총 생약량의 10배수에 해당하는 물 1000 ml를 추출기에 넣고 표준탕제공정으로 2시간 추출하였다. 추출 후 여액에 물을 가하여 500 ml로 맞춘 후 500 ml의 MeOH를 가하고 membrane filter 후 HPLC 검액으로 사용하였다.

분석법의 확립

기기 HPLC는 Dionex사의 Chromelon™ Chromatography Data System을 사용하였으며, Dionex P680 pump, ASI-100 Automated Sample Injector 및 Dionex UVD340U(DAD) 검출기를 사용하여 분석하였다.

이동상의 최적화 - 이동상으로 Table I에서 보는 바와 같이 AcCN, MeOH 및 water를 그 조성 및 비율을 달리하여 최적의 분리조건을 확립하였으며 최적 농도의 산 (acetic acid 또는 phosphoric acid)을 첨가하여 분리능을 증가시켰다.⁸⁾ 또한 용매 조성을 isocratic 및 gradient로 달리하여 분석시간 및 분리능을 고려한 최적의 분석조건을 위한 이동상을 확립하였다.

검출과장의 최적화 검출과장에 따른 분석능을 검토하여 지표성분에 대한 민감한 분석법을 확립하였다.

확립된 분석법의 검증(Validation)

지표성분의 검량선 작성 및 직선성 검토 - 각 탕제의 지표성분을 각각 정확히 칭량하여 MeOH 혹은 50% MeOH에 녹인 후 표준용액으로 사용하였다. 유의성있는 검량선을 얻기 위해 적어도 5가지 이상의 농도에서 시험을 실시하였으며 regression equation을 $y = ax + b$ (y와 x는 각각 peak 면적과 시료 함량)의 형태로 구하여 검량선을 작성하였다.

작성된 검량선은 R^2 의 값을 통하여 직선성을 판단하였으며 R^2 의 값이 0.99이상인 경우 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

특이성(Specificity) 검토 - 확립된 분석법을 통하여 분리된 지표성분의 피크가 추출물내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 PDA 검출기를 이용하여 피크의 순도를 검토하여 판단하였다. 즉, 각각의 피크에 대하여 여러 점에서 UV 흡수 스펙트럼을 판단하고 이것이 모두 일치하는 경우 피크의 특이성을 인정하였다.

정밀성(Precision) 평가 - Intra-day variability는 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시료를 5회 반복 측정하여 상대표준편차로써 기준에 적합한지

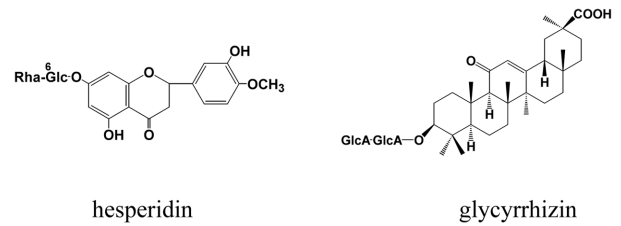


Fig. 1. Structures of marker constituents of PWS.

Table I. Solvent gradient conditions for HPLC-DAD

Final time (min)	Solvent A ^a	Solvent B ^b	Flow rate (ml/min)
0	10	90	1.0
15	20	80	1.0
28	40	60	1.0
36	75	25	1.0
38	10	90	1.0
40	10	90	1.0

Solvent A; Acetonitrile,
Solvent B; 0.03% phosphoric acid (pH 2.03)

평가하였다. Inter-day variability는 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시험일자를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날 5회 실험하여 상대표준편차를 구하여 평가하였다.

정확성(Accuracy) 평가 - 함량이 확인된 탕제 추출물과 농도를 알고 있는 확정 유효성분 용액을 비율을 달리하여 혼합한 후 직선성이 확인된 농도구간에서 3회 측정하여 판단하였다.

확립된 동시분석법을 이용한 탕제의 함량 평가

본 연구를 통하여 확립된 분석법의 효율성을 검토하기 위하여 시판되는 평위산 3종에 대하여 지표성분의 함량평가를 수행하였다.

결과 및 고찰

분석조건 확립 - 평위산의 지표성분인 glycyrrhizin 및 hesperidin에 대한 동시 정량 분석법을 확립하고자 다양한 용매 조성 및 과장에 대하여 분석조건을 검토한 결과 Waters XTerra RP18 column (5 μm, 4.6 mm I.D. × 150 mm) 컬럼을 이용하여 Table I의 용매조건으로 UV 230 nm의 검출과장을 확립하였다. 이 방법을 이용하여 평위산을 분석한 결과 hesperidin 및 glycyrrhizin의 분석이 가능하였다 (Fig. 2). Lee 등(1995)도 Wu-Ji-San 중의 glycyrrhizin, hesperidin을 0.03% phosphoric acid-acetonitrile (0분 95:5; 52분 30:70)의 용매조건으로 UV 254 nm의 검출과장으로 정량 한바 있다.⁹⁾

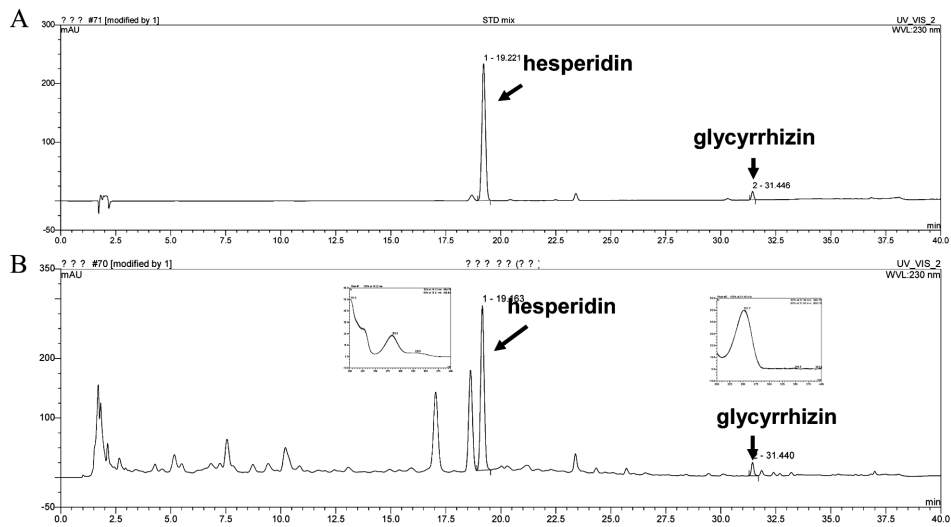


Fig. 2. HPLC chromatogram of standard mixtures (A) and PWS(B).

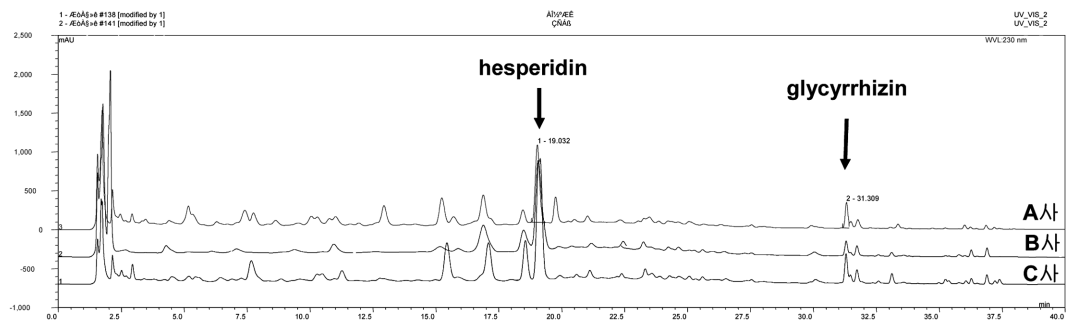


Fig. 3. HPLC chromatogram of three commercial PWS products from different companies, A, B and C.

Table II. Linear ranges, limit of detection (LOD) and characteristic parameters of calibration curves of hesperidin and glycyrrhizin of PWS.

Compound	Linear range ($\mu\text{g/ml}$)	Linear regression equation ^a $y=ax+b$		Correlation coefficient (r^2)	LOD (ng)
		Slope (a)	Intercept (b)		
Hesperidin	3.5 – 700	27.0618	3.0901	0.9952	56.5
Glycyrrhizin	1.5 – 300	3.0319	0.0255	0.9998	4.1

^a y =peak area, x =concentration ($\mu\text{g/ml}$)

평위산의 동시분석법의 검증

지표성분 피크의 순도 (Purity) 평가 – 평위산의 지표성분인 glycyrrhizin 및 hesperidin에 해당하는 피크의 순도는 DAD 검출기에 의해 확인하였으며, 순도는 98% 이상이었다 (Fig. 2).

분석법의 검량선 측정 및 검출한계 (LOD) – 설정 평위산의 지표성분인 glycyrrhizin 및 hesperidin 모두 넓은 범위에서 좋은 직선성 ($r^2 > 0.995$)을 보였으며, 검출한계는 각각 56 ng 및 4 ng으로 미량의 성분까지 검출 가능하였다 (Table 2).

분석법의 정밀성 (precision) 검토 – 확립한 동시분석법

의 정밀성을 검토하기 위하여 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시료를 5회 반복 측정하여 정밀성을 확인한 결과 3농도 모두에서 7.0% 이하의 상대표준편차를 나타내었다. 또한 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시험일자를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날 5회 반복 측정한 결과 7.0% 이하의 상대표준편차를 나타내었다 (Table 3).

분석법의 정확성 (Accuracy/Recovery) 검토 – 함량이 확인된 평위산 시료에 지표성분인 hesperidin (0.7 mg/ml) 및 glycyrrhizin (0.3 mg/ml)을 가한 후 함량을 평가하여 정확성

Table III. Analytical results of intra-day and inter-day variability

Compound	Amount (μg)	Intra-day		Inter-day	
		Detected (μg)	R.S.D. (%)	Detected (μg)	R.S.D. (%)
Hesperidin	3.50	3.58	5.86	3.84	1.43
	1.40	1.48	1.90	1.51	4.71
	0.35	0.31	5.30	0.31	0.28
Glycyrrhizin	1.50	1.61	3.39	1.50	6.51
	0.60	1.66	0.84	0.59	4.35
	0.15	0.14	6.47	0.15	5.24

Table IV. Accuracy for the assay of marker constituents of PWS

Compound	Spiked amount (μg)	Measured amount (μg)	Accuracy (%)	R.S.D. (%)
Hesperidin	1.80	1.80	100.22	1.20
	1.50	1.50	99.02	0.99
	1.30	1.32	102.88	0.13
Glycyrrhizin	0.80	0.84	105.62	2.12
	0.70	0.70	100.81	2.66
	0.60	0.61	101.39	3.52

을 측정된 결과 99.0–105.6 %의 정확성을 나타내었으며 또한 4.0%이하의 상대표준편차를 나타내었다 (Table 4).

분석법을 이용한 유통 평위산의 분석

이와 같이 확립된 분석법을 이용하여 유통 평위산에 대하여 hesperidin 및 glycyrrhizin의 분석을 수행하였다. 3개의 제조사로부터 생산된 평위산에 대하여 본 분석법을 이용하여 분석한 결과 3종의 평위산 모두 hesperidin 및 glycyrrhizin의 피크가 다른 성분에 의하여 간섭받지 않고 분석이 가능하였다 (Fig. 3).

결 론

본 연구를 통하여 유통 소화기계 한약제제인 평위산의 hesperidin 및 glycyrrhizin 대한 동시 분석 정량법을 확립하고 이를 검증하였다. 본 분석법은 당제에 함유되어 있는 여러가지 생약을 고려하여 hesperidin 및 glycyrrhizin의 분석이 다른 성분에 간섭받지 않도록 확립되었다. 또한 평위산에 들어있는 hesperidin 및 glycyrrhizin 2가지 성분을 동시에 분석할 수 있도록 그 조건을 확립함으로써 경제적, 시간

적 및 인력에 대한 효율을 증대시킬 수 있었다. 이와 같이 확립된 분석법을 이용하여 시중에 유통되는 평위산 제제의 함량을 분석한 결과 특별한 전처리 없이 분석이 가능하였으며, 따라서 본 분석법의 평위산의 품질관리에 신속하고 효율적으로 사용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 식품의약품안전청 과제인 생약(한약) 안전관리 연구 중 “생약(한약)제제 표준관리지침연구(II)” (06082생품평208)에 의하여 수행되었음.

인용문헌

- Jiang, W.Y. (2005) Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**: 558-563.
- Normile, D. (2003) Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine. *Science* **299**: 188-190.
- Xue, T.H. and Roy, R. (2003) Studying Traditional Chinese Medicine. *Science* **300**: 740-741.
- Wang, S.Y., Zheng, W. and Galletta, G.J. (2002) Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6534-6542.
- Bennett, J.O., Yu, O., Heatherly, L.G. and Krishnan, H.B. (2004) Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 7574-7579.
- Lund, S.T. and Bohlmann, J. (2006) The molecular basis for wine grape quality-a volatile subject. *Science* **311**: 804-805.
- Anttonen, M.J., Hoppula, K.I., Nestby, R., Verheul, M.J. and Karjalainen, R.O. (2006) Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing Environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 2614-2620.
- Escarpa, A. and González, M.C. (1999) Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A.* **830**: 301-309.
- Lee, Y.-C., Huang, C.-Y., Wen, K.-C. and Suen, T.-T. (1995) Determination of liquiritin, glycyrrhizin, hesperidin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, honokiol and magnolol in the traditional Chinese medicinal preparation Wu-Ji-San by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **692**: 137-145.

(2008년 7월 7일 접수)