

## 승마, 우슬, 인진호, 목단피 및 빈랑자의 독성연구를 위한 안정성 시험

김승현<sup>1</sup> · 최은정<sup>1</sup> · 김대현<sup>1</sup> · 이기용<sup>2</sup> · 이민아<sup>2</sup> · 백사왕<sup>2</sup> · 곽승준<sup>3</sup> · 강태석<sup>3</sup> · 김영중<sup>2</sup> · 성상현<sup>2,\*</sup>  
<sup>1</sup>주엘컴사이언스 생명과학연구소, <sup>2</sup>서울대학교 약학대학, <sup>3</sup>국립독성과학원 독성연구부

### Stability test of the Extracts of Cimicifugae Rhizoma, Achyranthis Radix, Artemisia Capillaris Herba, Moutan Cortex Radicis and Arecae Semen for Toxicity Study

Seung Hyun Kim<sup>1</sup>, Eun Jung Choi<sup>1</sup>, Dae Hyun Kim<sup>1</sup>, Ki Yong Lee<sup>2</sup>, Mina Lee<sup>2</sup>, Sa Wang Baek<sup>2</sup>,  
Seung Jun Kwack<sup>3</sup>, Tae Suk Kang<sup>3</sup>, Young Choong Kim<sup>2</sup> and Sang Hyun Sung<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Life Science, Elcom Science Co. Ltd., Seoul 151-742, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>3</sup>Department of Toxicological Research, National Institute of Toxicological Research, Seoul 122-704, Korea

**Abstract** – Quantitative methods for the marker compounds of Cimicifugae Rhizoma, Achyranthis Radix, Artemisia Capillaris Herba, Moutan Cortex Radicis and Arecae Semen, respectively, were developed using HPLC-DAD. Using the established methods, each extract of the natural medicines were evaluated. In addition, long term and accelerated stability test in the extracts were examined for six months. No significant change in content of the marker compounds of each extract observed during the time of investigation.

**Keywords** – Accelerated stability test, Achyranthis Radix, Arecae Semen, Artemisia Capillaris Herba, Cimicifugae Rhizoma, Moutan Cortex Radicis, HPLC-DAD

우리나라는 전통적으로 생약 사용에 익숙하고 각종 한약재 이외에도 천연물의약품 및 건강기능성식품의 형태로 많은 생약이 소비되고 있다. 국가적으로 규격을 설정하여 관리하고 있는 생약은 대한약전에 130종<sup>1)</sup>과 생약규격집에 385종<sup>2)</sup>으로 총 515종이나 이들의 인체에 대한 안전성 정보는 매우 미흡한 실정이다. 특히 최근에는 건강에 대한 관심 증가와 수명연장에 따른 질병 예방의 중요성 증대에 따라 생약에 대한 관심 및 이용이 급격히 증가하고 있어 생약에 대한 과학적이고 체계적인 안전성 평가자료 확보가 절실히 필요한 실정이다. 이를 위해 식품의약품안전청에서는 독성물질국가관리사업의 일환으로 생약의 일반독성시험 및 유전독성시험을 진행 중에 있다. 신뢰성 및 재현성 있는 독성시험 결과 및 이에 대한 과학적 근거 확보를 위해서는 시험물질에 대한 정확한 분석자료가 요구된다. 특히, 생약의 경우 산지, 채집시기 등에 따라 원료생약의 품질 차이가 매우 크고, 제조 공정이나 가공법에 따라 차이가 많이 나기 때문에

원료생약에 대한 기준규격시험이 반드시 필요하며 이를 기준으로 규격화된 시료를 독성시험에 이용하여야 한다. 뿐만 아니라 많은 경우 생약을 이용한 의약품 보조제나 치료제가 질병 예방을 위해 장기 복용되는 경우가 많은 만큼 반복투여시험이 반드시 필요하고 이를 위해서는 시료의 안정성 확인 시험이 병행되어야 한다. 이러한 기준 및 시험법 및 장기 보존에 따른 안정성 시험을 거친 시료를 사용할 경우 신뢰할 수 있는 독성시험 자료를 얻을 수 있을 뿐 아니라, 유통 한약제제의 안정성과 관련된 중요한 자료를 얻을 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 승마 (Cimicifugae Rhizoma), 우슬 (Achyranthis Radix), 인진호 (Artemisia Capillaris Herba), 목단피 (Moutan Cortex Radicis) 및 빈랑자 (Arecae Semen)의 5종 생약을 대상으로 하여 HPLC-DAD를 이용하여 효율적이며 체계적인 지표성분 분석법을 확립하고자 하였다. 또한 확립된 분석법을 활용하여 이들 생약의 표준화된 추출물을 확보하고, 가속시험 조건에서 6개월간 지표성분 변화를 확인함으로써 독성 시험에 사용하는 한약재 추출물 시료의 안정성을 확인하고자 하였다.

\*교신저자 (E-mail): shsung@snu.ac.kr  
(FAX): 082-2-877-7859

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 연구에 사용한 5종 생약인 승마, 우슬, 인진호, 목단피 및 빈랑자는 유통되는 생약을 기원별, 산지별로 구입하여 기원, 성장, 관능물질 등을 기준으로 생약감별자문위원회 (부산대학교 약학대학: 박중희 교수; 경희대학교 한의과대학: 최호영 교수; 한국의약품시험연구소: 백완숙 박사)의 감별을 거쳐 선정하였으며 선정된 표본은 서울대학교 약학대학 약초원에 보관되어 있다. 승마, 인진호, 목단피는 중국산을 사용하였으며 우슬은 국산, 빈랑자는 인도네시아산을 사용하였다. 각 생약은 식약청고시 2003-17, 안전성유효성심사규정<sup>3)</sup>에 준한 표준탕제 제조법에 따라 열수추출하고 이를 농축한 후 동결 건조하여 분말화 (생약원료물질) 하였다.

**시약 및 기기** - Isoferulic acid, 20-hydroxyecdysone, chlorogenic acid, caffeic acid, paeonol, paeoniflorin 및 arecoline은 Sigma사 (미국)의 제품을 사용하였다 (Fig. 1). 그 외 분석을 위한  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , triethylamine, formic acid 및 acetic acid는 분석용 특급 시약 및 1급 시약을 사용하였다. 가속시험을 하기 위해 HDPE (high density polyethylene) 보관함과 창신과학의 constant temperature & humidity chamber을 사용하였다.

HPLC 분석을 위한 용매는 Samchun chemical사 (한국)의 HPLC급 시약을 사용하였다. HPLC system은 Rheodyne사

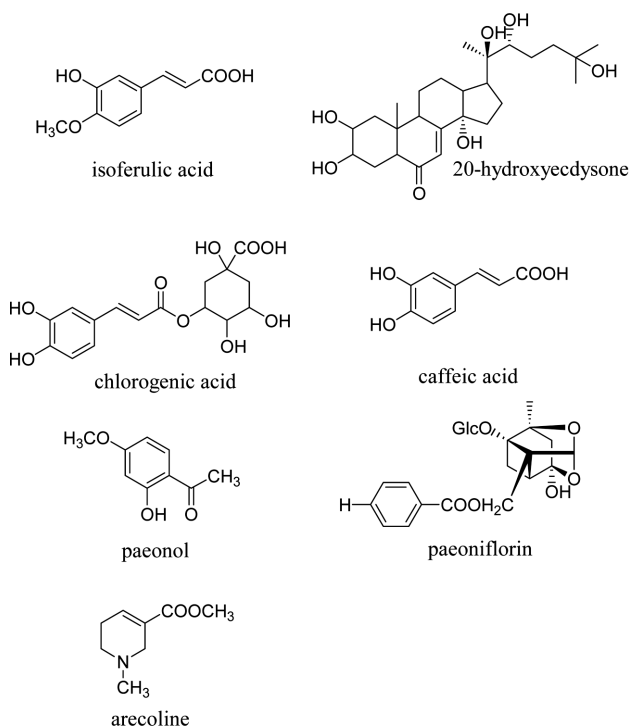


Fig. 1. Chemical structures of marker compounds

(미국)의 injector-ASI-100 automated sampler injector, Dionex (독일)의 photodiode array detector (UVD 340U) 및 pump-P680 (Dionex, 미국)으로 구성되었다.

**생약원료물질의 HPLC 분석용 검액 및 표준액의 조제** -

생약원료물질에 동량의 50% 메탄올을 가하여 최종농도를 100 g 생약원료물질/1000 mL 50% 메탄올로 맞추어 분석용 시료로 사용하였다. Isoferulic acid, 20-hydroxyecdysone, chlorogenic acid, caffeic acid, paeonol, paeoniflorin 및 arecoline 각각 1 mg을 메탄올 1 mL에 녹여 표준액으로 하였다. HPLC용 검액 및 표준액은 membrane filter로 여과한 후 사용하였다.

**생약원료물질의 지표성분 정량** - 문헌 및 각 생약 추출물의 HPLC chromatogram에 근거하여 지표성분을 선정하였다. Table I과 같은 조건으로 분석하였고 지표성분의 검량선을 작성하여 생약 열수추출물 중 지표성분의 함량을 평가하였다.

**생약 열수추출물의 안정성시험** - 5종 생약의 열수추출물을 동결 건조한 분말에 대해 각각의 실험에 대해 일정 양씩 3개의 HDPE 용기에 취하였다. 장기보존시험을 위해  $25 \pm 5$ 의 상온에서 상대습도는  $60 \pm 5\%$ 를 유지하면서 각 시료를 보존하였다. 시험기간은 6개월로 하였으며 처음 실험을 시작할 때를 포함하여 3개월에 1회씩 시료를 취하여 지표성분의 함량을 측정하였다. 가속시험을 위해서는 constant temperature & humidity chamber의 조건을 온도는  $40 \pm 2$ , 상대습도는  $75 \pm 5\%$ 로 설정하였다. 시험기간은 6개월로 하였으며 처음 실험을 시작할 때를 포함하여 2개월에 1회씩 시료를 취하여 지표성분의 함량을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**생약원료물질의 지표성분 정량** - 생약의 지표성분은 그 약리활성을 대표하거나 각 생약의 특이성분을 선정하는 것을 원칙으로 하며, 활성성분이나 특이성분을 설정하기 어려운 경우에는 주성분을 지표성분으로 한다. 본 연구에서는 5종의 생약원료물질의 규격화를 위해 각 생약에 대한 문헌 조사 및 각 생약 추출물의 HPLC chromatogram을 기준으로 적절한 지표성분을 설정하였다. 각 생약의 지표성분은 승마는 isoferulic acid,<sup>4)</sup> 우슬은 20-hydroxyecdysone,<sup>5)</sup> 인진호는 chlorogenic acid 및 caffeic acid,<sup>6)</sup> 목단피는 paeonol 및 paeoniflorin,<sup>7)</sup> 빈랑자는 arecoline<sup>8)</sup>으로 각각 정하였다. Table I의 조건에 따라 각 지표성분의 검량선을 작성한 결과  $R^2$ 이 0.995 이상의 높은 직선성을 나타내었고 PDA 검출기를 통해서 각 지표성분의 peak 특이성을 확인할 수 있었다. 각 지표성분의 검량선과 생약원료물질의 chromatogram은 Table II와 Fig. 2에 각각 나타내었다.

**생약 열수추출물의 안정성시험** - 제조된 생약원료물질에

**Table I.** HPLC conditions for each natural medicine

Cimicifugae Rhizoma	Marker compound: isoferulic acid Column: Gemini C18, 4.6×150 mm, 5 μm Flow rate: 1.0 mL/min, back pressure: ~1300 psi Mobile Phase: Solvent A (Acetonitrile), Solvent B (0.1% Acetic acid) 0 → 5 min: A/B = 10/90 → 20/80; 5 → 15 min: A/B = 20/80 → 35/65; 15 → 25 min: A/B = 35/65 → 50/50; 25 → 32 min: A/B = 50/50 → 10/90 UV Detection: 320 nm
Achyranthis Radix	Marker compound: 20-hydroxyecdysone Column: Xterra C18, 4.6×150 mm, 5 μm Flow rate: 1.0 mL/min, back pressure: ~1300 psi Mobile Phase: Solvent A (Acetonitrile), Solvent B (0.1% Acetic acid) 0 → 5 min: A/B = 10/90 20/80; 5 → 15 min: A/B = 20/80 → 35/65; 15 → 20 min: A/B = 35/65 → 10/90 UV Detection: 250 nm
Artemisiae Capillaris Herba	Marker compounds: chlorogenic acid and caffeic acid Column: Xterra C18, 4.6×150 mm, 5 μm Flow rate: 1.0 mL/min, back pressure: ~1300 psi Mobile Phase: Solvent A (Acetonitrile), Solvent B (0.3% Formic acid) 0 → 10 min: A/B = 10/90 → 18/82; 10 → 20 min: A/B = 18/82 → 35/65; 20 → 25 min: A/B = 35/65 → 10/90 UV detection: 250 nm
Moutan Cortex Radicis	Marker compounds: paeonol and paeoniflorin Column: Shiseido Capcellpak MG, 4.6×150 mm, 5 μm Flow rate: 1.0 mL/min, back pressure: ~1300 psi Mobile Phase: Solvent A (Acetonitrile), Solvent B (0.1% Acetic acid) 0 → 5 min: A/B = 15/85 → 15/85; 5 → 15 min: A/B = 15/85 → 20/80; 15 → 23 min: A/B = 20/80 → 27/73; 23 → 28 min: A/B = 27/73 → 45/55; 28 → 35 min: A/B = 45/55 → 10/90 UV detection: 230 nm
Arecae Semen	Marker compound: arecoline Column: Shiseido Capcellpak UG, 4.6×250 mm, 5 μm Flow rate: 1.0 mL/min, back pressure: ~1300 psi Mobile Phase: Solvent A (50% Acetonitrile + 50% 0.01M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0.01% triethylamine), Solvent B (0.01M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 0 → 5 min: A/B = 15/85 → 15/85; 5 → 15 min: A/B = 15/85 → 20/80; 15 → 23 min: A/B = 20/80 → 27/73; 23 → 28 min: A/B = 27/73 → 45/55; 28 → 35 min: A/B = 45/55 → 10/90 UV detection: 210 nm

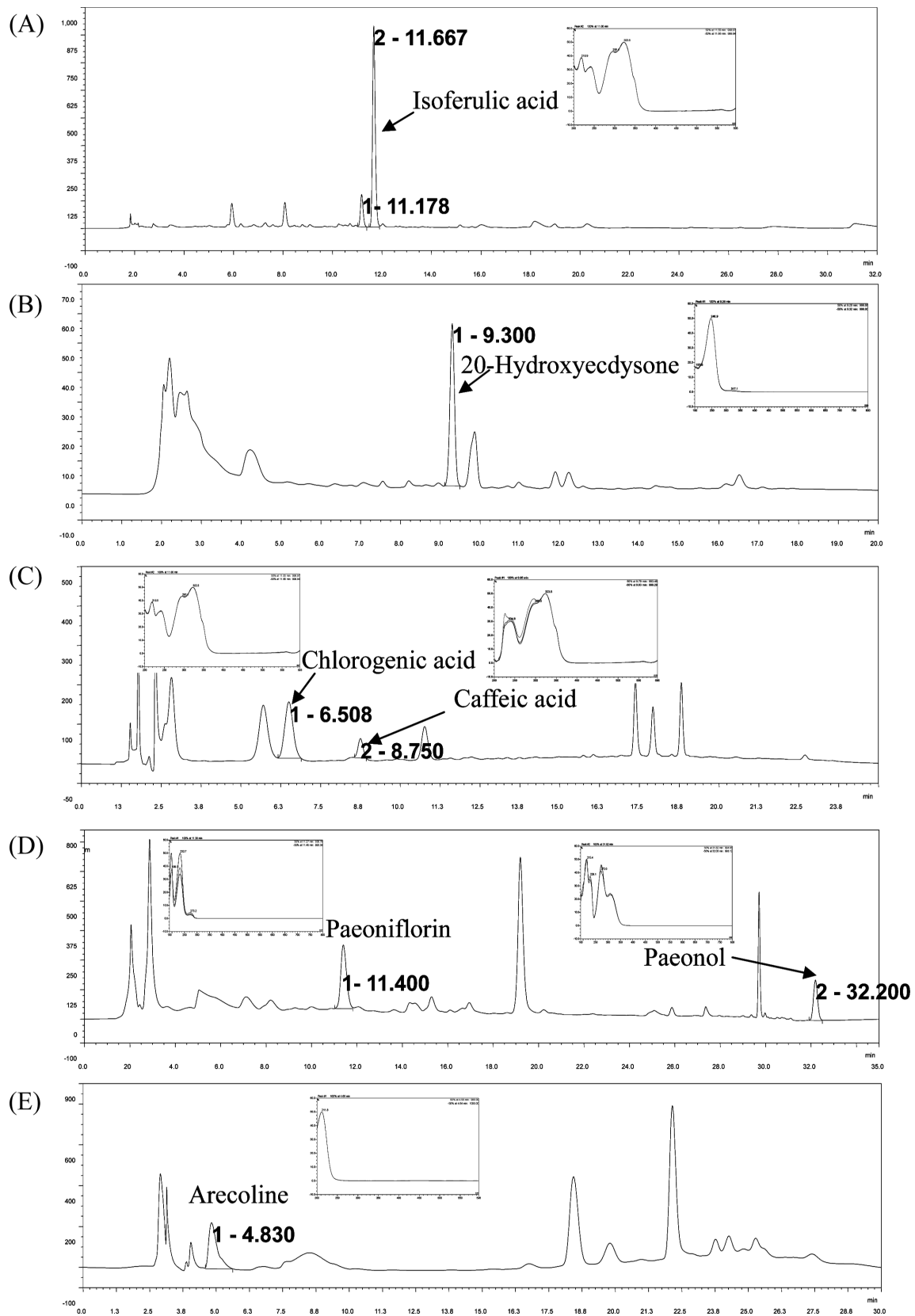
**Table II.** Calibration data of HPLC-DAD quantitation methods

	Marker compound	Regression equation <sup>a)</sup>	Correlation coefficients (r <sup>2</sup> )
Cimicifugae Rhizoma	Isoferulic acid	y = 27.6450x - 1.2513	1.0000
Achyranthis Radix	20-Hydroxyecdysone	y = 10.8180x + 1.7789	0.9984
Artemisiae Capillaris Herba	Chlorogenic acid	y = 38.1810x - 12.7210	0.9958
	Caffeic acid	y = 71.8610x - 3.4631	0.9998
Moutan Cortex Radicis	Paeonol	y = 5.2436x + 0.3494	0.9997
	Paeoniflorin	y = 8.4695x + 0.0149	0.9994
Arecae Semen	Arecoline	y = 30.0525x + 0.2987	0.9996

<sup>a)</sup>y = peak area, x = amount (μg)

대해 장기보존시험 및 가속시험을 수행하여 안정성에 대한 정보를 얻고자 하였다. 각각의 조건에 따른 온도와 습도에 각 생약원료물질을 보관하고 6개월간 일정 기간 간격으로

관찰하고 유효성분 함량평가를 수행하였다. 육안으로 관찰하였을 경우 장기보존시험 조건에서는 별다른 변화를 찾을 수 없었으나 가속시험 조건에서는 HDPE 용기를 사용하였



**Fig. 2.** HPLC chromatogram and UV spectrum of the standardized extracts

(A) Cimicifugae Rhizoma, (B) Achyranthis Radix, (C) Artemisiae Capillaris Herba, (D) Moutan Cortex Radicis, (E) Arecae Semen

**Table III.** Average contents (g/g%) of marker compounds during the period of stability test (n = 3)

Marker compound	Long term test			Accelerated test		
	0 month	3 month	6 month	2 month	4 month	6 month
Cimicifugae Rhizoma						
Isoferulic acid	1.47±0.01	1.40±0.01	1.36±0.01	1.45±0.01	1.49±0.01	1.41±0.01
Achyranthis Radix						
20-Hydroxyecdysone	0.24±0.01	0.22±0.01	0.22±0.01	0.29±0.01	0.26±0.01	0.24±0.01
Artemisiae Capillaris Herba						
Chlorogenic acid	0.77±0.01	0.75±0.01	0.75±0.01	0.77±0.01	0.75±0.01	0.74±0.01
Caffeic acid	0.10±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01
Moutan Cortex Radicis						
Paeonol	1.70±0.03	1.59±0.12	1.28±0.07	1.74±0.03	1.53±0.05	1.70±0.08
Paeoniflorin	2.28±0.01	1.98±0.02	1.93±0.01	2.43±0.07	1.93±0.01	2.03±0.01
Arecae Semen						
Arecoline	3.57±0.09	3.55±0.08	3.65±0.01	3.31±0.03	3.69±0.04	3.74±0.07

음에도 불구하고 2개월이 경과하였을 때부터 우슬의 분말이 흡습하여 딱딱한 고체 상태로 변하는 것이 관찰되었다. 각각의 조건에서 지표성분의 함량 변화는 Table III에 나타내었다. 각각의 지표성분은 시험기간 동안 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 우슬의 경우도 육안으로는 고체상태로 변화하였으나 지표성분 함량은 크게 달라지지 않음을 확인하였다.

## 결 론

본 연구를 통해 동일한 추출공정에 따라 제조되고 지표성분 함량을 기준으로 표준화된 생약원료물질을 공급할 수 있었다. 또한 장기보존시험 및 가속시험을 통해 시료의 안정성 정보를 얻을 수 있었다. 이러한 표준화와 안정성에 대한 정보는 독성시험결과와 신뢰성과 재현성을 확보할 뿐만 아니라 이들 생약의 보급 및 유통 과정의 효율적 품질관리 개선책에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구는 식품의약품안전청 용역연구사업 “KNTP 독성시험을 위한 원료물질 확보 및 분석 연구” (07142독관리575)에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

## 인용문헌

1. 편집부: 대한약전 (제 8개정), 약업신문 (2002)
2. 식품의약품안전청: 대한약전의한약(생약)규격집 (2002)
3. 식약청고시 2003-17, 안전성유효성심사규정
4. He, K., Pauli, G. F., Zheng, B., Wang, H., Bai, N., Peng, T., Roller, M. and Zheng, Q. (2006) *Cimicifuga* species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. *J. Chromatogr. A*, **1112**: 231-254.
5. Banerji, A., Chintalwar, G. J., Joshi, N. K. and Chadha, M. S. (1971) Isolation of ecdysterone from indian plants. *Phytochemistry*, **10**: 2225-2226.
6. Sheu, S. J., Chieh, C. L. and Weng, W. C. (2001) Capillary electrophoretic determination of the constituents of *Artemisia Capillaris Herba*. *J. Chromatogr. A*, **911**: 285-293.
7. Guo, L., Cho, S. Y., Kang, S. S., Lee, S. H., Baek, H. Y. and Kim, Y. S. (2007) Orthogonal array design for optimizing extraction efficiency of active constituents from Jakyak-Gamcho Decoction, the complex formula of herbal medicines, *Paeoniae Radix* and *Glycyrrhizae Radix*. *J. Ethnopharmacol.*, **113**: 306-311.
8. Linskens, H. F. and Jackson, J. F. (1994) *Modern methods of plant analysis: Plant toxin analysis*. Berlin, Germany, Springer-Verlag.

(2008년 8월 8일 접수)