생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
40(1) : 18 ~ 24 (2009)

생약복합제 GCSB-5의 품질 표준화를 위한 흑두 및 두충의 함량 분석

이은희 · 차배천*
상지대학교 보건과학대학 제약공학과

Quantitative Analysis of Glycine Semen Nigra and Eucommiae Cortex 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 – GCSB-5 preparation is a purified extract from a mixture six herbal medicines (Acanthopanacis Cortex, Achyranthis Radix, Saposhnikoviae Radix, Cibotii Rhizoma, Glycine Semen Nigra, Eucommiae Cortex) that have been widely used in traditional medicine to treat various bone disorders. This study was carried out to obtain the HPLC analysis method that can be used to establish quantitative analysis of Glycine Semen Nigra and Eucommiae Cortex for standardization of GCSB-5 preparation. HPLC analysis methods for the simultaneous determination of genistin (Glycine Semen Nigra) and geniposide (Eucommiae Cortex) were established for the quality control of herbal medicinal raw material and preparation. 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. As the result of quantitative analysis, the contents of genistin and geniposide in the raw material of GCSB-5 preparation were 0.0426-0.0427 mg/g and 0.431-0.432 mg/g. And GCSB-5 preparation contained genistin of 0.0202-0.0203 mg/capsule and geniposide of 0.211-0.212 mg/capsule, respectively.

Key words – HPLC analysis methods, quantitative analysis, a medicinal crude drug, GCSB-5, genistin, geniposide, validation

최근 건강에 대한 관심의 증대로 생약 및 생약제제의 수요가 증가되고 있다. 이들 생약 및 생약제제들의 특징은 다양한 종류의 성분들을 함유하고 있고, 동시에 자연에서 생산되는 천연물로부터 가공되어진 약재이기 때문에 그들의 재배 산지 등에 따른 기원에 따라 품질에 상당한 차이가 있다. 따라서 다양한 질병의 예방 및 치료를 위해 개발되어지고 있는 생약 및 생약제제들이 우수한 약효를 발현하기 위해서는 생약의 순도나 품질이 확보된 생약 및 한약재가 사용되어져야 한다. 그러나 최근 국내 생약시장에 유통되는 생약 대부분이 기원이 불분명한 중국으로부터 수입되고 있음에 따라 품질 규격화가 이루어지지 않은 경우가 많다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 생약의 지표 성분에 의한 함량 기준 및 이화학적 규격에 관한 정확한 품질 관리가 필요하다. 이에 최근에는 생약 및 생약제제에 대한 품질 평가 방법의 하나로서 지표 성분에 의한 이화학적 분석 방법에 의해 생약의 품질을 평가하여 궁극적으로는 생약복합제와 같은 생약제제의 품질을 균일화하려는 노력이 계속되고 있다.[1-5]

따라서 본 연구에서는 예로부터 골다공증, 관절염, 디스크 등의 각종 골질환 치료제로 널리 사용되어 오고 있는 추나약물(양근탕, 청파전 등 자생한방병원 고유 처방)을 바탕으로 한 오가피(Acanthopanacis Cortex, *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman), 우슬(Achyranthis Radix, *Achyranthes bidentata* Blume), 방풍(Saposhnikoviae Radix, *Saposhnikovia divaricata* Schiskin), 구척(Cibotii Rhizoma, *Cibotium barometz* J. Smith), 흑두(Glycine Semen Nigra, *Glycine max* Merrill) 및 두충(Eucommiae Cortex, *Eucommia ulmoides* Oliver)으로 구성되어 관절염, 소염, 항경련 및 골세포 퇴행감소 치료제의 천연물 신약으로 개발 중인 생약복합제 GCSB-5[6]의 유효성과 안전성 확립을 위한 품질 규격화를 위해, 전보[7]에 이어 기준 및 시험방법 연구의 하나로 이화학적 규격 연구와 함께 각각 생약의 약효 성분이나 특이 성분을 지표 물질로 한 정확한 정량 분석법 등을 연구하고자 하였다. 이를 위해 생약복합제 GCSB-5의 6종 생약 중 기준 및 시

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

험방법의 기준에 따른 최소 2종 이상의 생약 규격 설정을 위해 기존의 연구 논문을 통하여 지표 성분이 밝혀진 4종 생약 중 흑두는 genistin,[8,9] 두충은 geniposide[10]에 대하여 설정된 지표 성분의 HPLC 조건을 검토하여 정량 분석법을 확립하고자 하였다. 또한 정량 분석법의 검증을 위해서는 ICH 가이드라인에[11] 따라 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확도(accuracy), 정밀도(precision) 등을 고려한 validation을 수행하였다. 동시에 확립된 정량 분석법을 이용하여 생약복합제 GCSB-5의 원료와 제품에 있어서 genistin과 geniposide의 지표 성분의 함량을 측정하여 생약복합제의 품질 표준화를 확립하였음으로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 – 본 실험에 사용한 2종의 생약인 흑두(Glycine Semen Nigra), 두충(Eucommiae Cortex)과 6 종 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, 여액을 UF막을 사용하여 단계적으로 여과하여 분자량 10000 이하인 분획을 얻고 이 분획물을 저온 농축한 분말인 생약복합제GCSB-5의 원료 및 1캡슐(350 mg)당 생약복합제 GCSB-5 원료 300 mg, 부형제인 이산화규소 48.5 mg, 활택제로서 스테아린산 마그네슘 1.5 mg으로 혼합 후 제조된 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_{18} (4.6×150 mm, 5 μm, UG 80)과 Thermo (USA)사의 ODS Hypersil (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였다. 표준품인 genistin은 Sigma (USA)사 제품을 geniposide는 Cogon Bio-tech (China)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.[12]

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 측정한 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.[12]

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.[12]

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.[12]

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 – 흑두 및 두충 300 g을 각각 추출용기에 넣고 H_2O 700 ml를 첨가하고 수욕 상에서 3시간 2회 환류 추출 한 후, 여과하여 여액을 농축하여 흑두 H_2O ext. (21.59 g) 및 두충 H_2O ext. (20.63 g)를 얻었다. 검체는 각각의 H_2O 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-5원료 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

흑두의 분석 조건 – 흑두는 지표물질을 genistin으로 선정하여, Fukutake 등[8]과 Kim등[9] 및 Lee 등[13]의 HPLC 분석 방법을 기초로 하여 분석 조건을 검토하였다. 칼럼은 Capcell Pak C_{18}(4.6×250 mm, 5 μm, Shiseido)를 사용하였

고, 칼럼 온도는 40°C, 검출기는 UV 254 nm, 이동상으로는 1% 초산이 첨가된 50% acetonitrile과 1% 초산이 첨가된 물을 사용하여 gradient profile로 실시하였고, 유속은 1 ml/min을 사용하여 실험하였다.

Gradient profile	Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile phase A (1% acetic acid in 50% acetonitrile)	Mobile phase B (1% acetic acid in water)
	0:00	1.0	30	70
	30:00	1.0	30	70

두충의 분석 조건 – 두충은 지표 물질을 geniposide로 하여, 알려진 HPLC 분석 방법[10,14,15]을 기본으로 하여 분석 조건을 검토하였다. 칼럼은 ODS Hypersil (4.6×250 mm, 5 μm, Thermo)를 사용하였고, 칼럼 온도는 40°C, 검출기는 UV 254 nm, 이동상으로 10% acetonitrile과 30% acetonitrile을 사용하여 gradient profile로 하였고, 유속은 1 ml/min를 사용하여 실험하였다.

Gradient profile	Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile phase A (10% acetonitrile)	Mobile phase B (30% acetonitrile)
	0:00	1.0	90	10
	10:00	1.0	40	60
	15:00	1.0	90	10
	30:00	1.0	90	10

분석 방법의 검증(validation)

특이성(Specificity) – HPLC 분석법의 신뢰도와 재현성을 검증하기 위해서 ICH (International Conference on Harmonization) 가이드라인[11]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 상관계수를 구하여 확인하였다.

정밀성(Precision) – 일정 농도의 표준액을 일간 및 일내 변동을 알아보기 위해 설정한 5가지 농도를 하루에 5개씩 3일간 반복하여 측정한 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 생약복합제GCSB-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 계산하였다.

결과 및 고찰

오가피, 우슬, 방풍, 구척, 흑두 및 두충의 6종 생약으로 혼합하여 관절염, 소염, 항경련 및 골세포 퇴행감소 치료를 위한 천연물 신약으로 개발되어지고 있는 생약복합제 GCSB-5의 품질 규격화를 위한 기준 및 시험방법 연구의 하나로 원생약의 이화학적 분석과 함께, 6가지 생약 중에서 흑두와 두충의 지표성분의 HPLC 분석법 연구와 원료 및 제품에 있어서의 함량 분석 연구를 수행하였다. 흑두는 콩과(Leguminosae)에 속한 1년생 큰 콩(*Glycine max* Merrill)의 검은 종자로서 난원형 또는 구형으로 검거나 얼룩이 있고 광택이 있다. 맛은 달고 성질은 차갑다. 한방에서의 임상적 응용은 부종, 현훈, 자한 등에 사용하며, 민간약으로는 중금속 해독제로 쓰여 왔다.[16,17] 또한 중약대사전의 기록에 의하면 흑두는 황달, 부종에 효능이 있다고 보고되어져 있다.[18] 흑두의 성분에 대해서는 단백질, 지방, 전분, 칼슘, 인, 철 및 vitamin A, B 등이 함유되어 있으며, 이소플라본의 함량이 높은데 이소플라본은 3가지 유도체 genistein, daidzein, glycitein과 이들의 9가지 유도체 daidzin, genistin, glycitin 등 당이 붙어있는 배당체의 형태이다.[19] 두충은 두충나무(*Eucommia ulmoides* Oliver)의 수피를 지칭하는 두충나무과(Eucommiaceae)에 속하는 생약이다. 우리나라의 중남부에서 재배되나 중국이 원산지이며 중국 남부에서 대량 재배되고 있다. 두충의 효능은 강장, 요통, 관절염, 진통, 이뇨 등이 알려져 있으며,[20] 진통 효과가 보고되어져 있다.[21] 성분에 관한 연구로는 aucubin, ajugoside, eucommiol, geniposide 등의 iridoid 유도체와 medioresinol di-O-β-D-glucopyranoside 등의 lignan 배당체가 주성분으로 보고되어져 있다.[22] 이들 흑두 및 두충의 원생약과 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제

Table I. Contents of loss on drying, residue on ignition, residue on acid insoluble ignition and 50% ethanol extract of each medicinal plants

Sample	Loss on drying (%)	Residue on ignition (%)	Residue on acid insoluble ignition (%)	50% Ethanol extracts (%)
Glycine Semen Nigra	8.14±0.18	4.86±0.06	0.15±0.03	17.28±0.82
Eucommiae Cortex	4.88±0.05	6.35±0.13	2.91±0.09	12.08±0.56

number of samples, n=3

품에 있어서 이화학적 분석과 HPLC 분석법 및 함량 분석 결과는 다음과 같다.

이화학적 분석

건조 감량 – 흑두와 두충의 건조 감량을 3회 반복 시험하여 평균치를 Table I에 제시하였다. 생약규격집에 수재되어 있지 않은 흑두는 8.14%로 10% 이하를 나타내었고, 두충은 평균 4.88%로서 생약규격집 기준인 10% 이하를 보였다.

회분 함량 – 흑두와 두충의 회분 함량을 3회 반복 시험하여 평균치를 Table I에 나타내었다. 흑두와 두충은 각각 평균 4.86%와 6.35%로서 생약규격집 기준인 5%, 8% 이하를 나타내었다.

산불용성 회분 – 흑두와 두충의 산불용성 회분을 3회 반복 시험하여 평균치를 제시하였다. Table I에서와 같이 생약규격집에 수재되어 있지 않은 흑두는 0.15%로 1% 이하를 나타내었고, 두충은 평균 2.91%로서 생약규격집 기준인 6% 이하를 보였다.

묽은 에탄올 엑스 함량 – 흑두와 두충의 묽은 에탄올 엑스 함량을 3회 반복 시험하여 평균치를 Table I에 제시하였다. 생약규격집에 수재되어 있지 않은 흑두는 평균 17.28%로 10% 이상을 나타내었고, 두충은 각각 평균 12.08%로서 생약규격집 기준인 9% 이상을 나타내었다.

Genistin의 분석 및 원생약 흑두의 함량 기준 – 흑두의 지표 성분인 genistin을 검액 및 표준액에서 분석하는 새로운 조건을 개발하기 위하여 기존의 보고되어진 분석법[8,9,13]을 기초로 하여 분석 조건을 검토한 결과, Fukutake 등[8]의 방법에서 다른 성분들과 겹치던 피크를 14분대로 이동시켜 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품에서 다른 피크의 간섭 없이 흑두의 지표 성분인 genistin이 분리되는 우수한 분석법으로 판단되었다. 또한 원생약 흑두의 함량 기준 설정을 위해 한풍제약에서 제공한 수종의 산지별 흑두에 대하여 각 원료당 3 lot 그리고 1 lot당의 3회씩 분석한 후 평균과 표준편차를 구하고, 각 원료의 평균치를 이용하여 원료 전체의 평균과 표준편차를 구하는 genistin 함량 분석을 실시한 결과 평균이 0.168±0.021 mg/g으로 Fukutake 등[8]이 제시한 함량인 0.200 mg/g 보다는 약간 낮은 함량을 보였다. 이에 원료의 원활한 수급과 안정적인 함량 확보를 위해 원생약 흑두의 함량 기준은 가장 낮은 함량의 평균치인 0.147 mg/g 이상으로 설정 하였다.

Geniposide의 분석 및 원생약 두충의 함량 기준 – 표준액 및 검액의 분석을 위하여 기존의 알려진 분석법[10,14,15]을 참조하여 두충의 지표 성분인 geniposide의 분석 조건을 검토한 결과 Son 등[10]의 방법에서 6분대로 겹쳐 나오던 피크를 이동상과 비율을 바꾸어 8분대로 옮겨 분리함으로서, 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품에서 두충의 지표 성분인 geniposide가 다른 함유 생약의 성분 피크들과 양호하게 분리되는 우수한 분석법을 확립하였다. 또한 원생약 두충의 함량 기준 설정을 위해 한풍제약에서 제공한 수종의 산지별 두충의 geniposide 함량을 Son 등[10]이 이미 실시한 두충 함량 모니터링 실험과 동일한 방법으로 실시한 결과 평균이 3.33±0.68 mg/g으로 Son 등[10]이 제시한 함량 기준인 2.10±1.20 mg/g보다는 약간 높은 함량을 보였다. 이에 원료의 원활한 수급과 안정적인 함량 확보를 위해 원생약 두충의 함량 기준은 가장 낮은 함량의 평균치인 3.25 mg/g 이상으로 설정 하였다.

분석법의 검증(Validation)

특이성 – 확립된 HPLC 조건으로 분석한 흑두의 지표 물질, 생약복합제 GCSB-5의 원료 GCSB-5-R과 제품인 GCSB-5의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. Genistin의 피크 유지 시간은 14.0분대이고, 원료와 제품에서도 14.0분대로 genistin이 기타 다른 생약 성분들과 명확히 분리되었고 다른 물질과의 간섭이 없음이 확인되었다. 두충에 대해서도 확립된 HPLC 조건으로 분석한 지표 물질, 생약복합제 GCSB-5의 원료인 GCSB- 5-R과 제품인 GCSB-5의 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. Geniposide의 피크 유지 시간은 8.7분대이고, 원료와 제품에서도 8.7분대로 geniposide가 기타 다른 생약의 성분들과 약간의 간섭이 확인되었으나 지표 성분의 함량을 구할 수 있을 만큼 명확히 분리됨을 확인하였다.

직선성 – 흑두의 지표 물질인 genistin을 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 0.9997인 상관관계를 나타내었다. 또한 두충에 있어서도

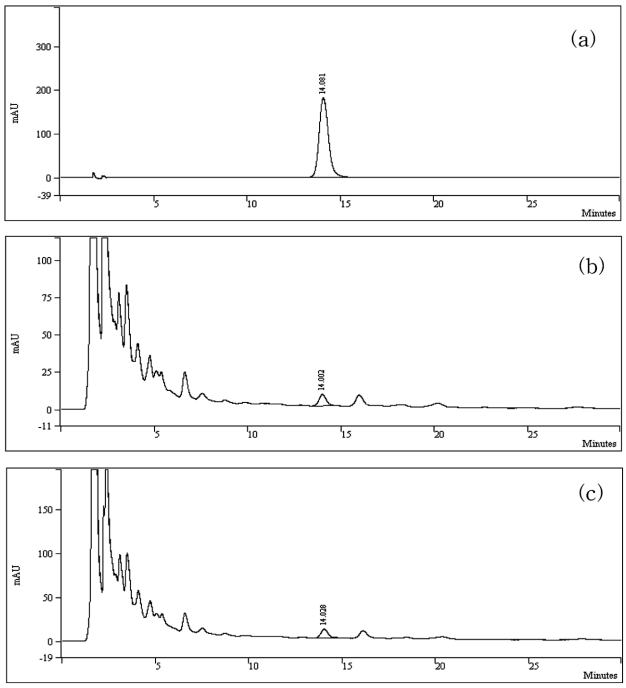

Fig. 1. HPLC chromatogram of genistin(a), GCSB-5-R(b) and GCSB-5(c).

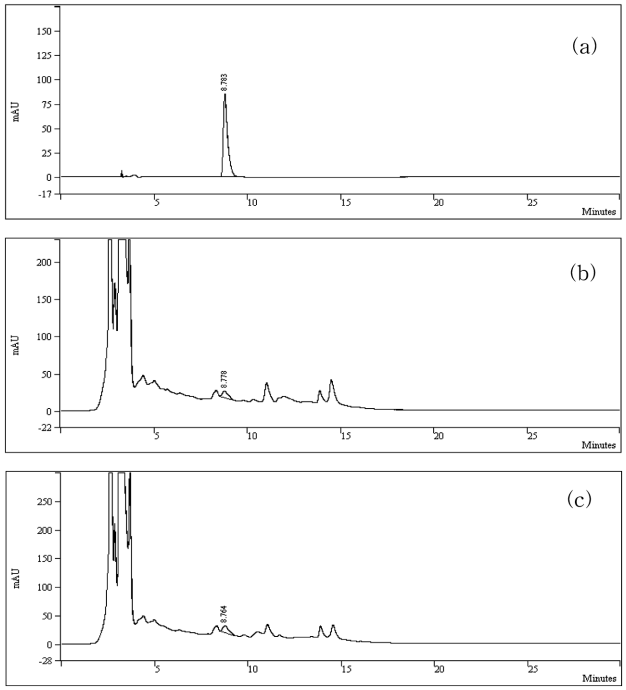

Fig. 2. HPLC chromatogram of geniposide(a), GCSB-5-R(b) and GCSB-5(c).

지표 물질인 geniposide를 5, 10, 20, 50, 100 μg/ml의 농도별로 제조하여 확립된 HPLC 분석 조건으로 분석하여 x축은 농도, y축을 피크 면적으로 하여 검량선을 작성한 결과,

Table II. Calibration curve equations, LOD and LOQ of genistin and geniposide standard

Sample	Equation	R^2	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
Genistin	y = 64754x + 24951	0.9997	0.14	0.41
Geniposide	y = 7193.5x + 5267	0.9996	0.08	0.24

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 genistin and geniposide

Sample concentration (μg/ml)	Precision CV(%)[a]		Accuracy(%)
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	
Genistin			
5	0.10	0.02	95.00
10	0.56	0.44	
20	0.18	0.12	99.85
50	0.09	0.04	
100	0.08	0.03	99.39
Geniposide			
5	0.63	0.18	93.80
10	0.25	0.14	
20	0.31	0.23	99.80
50	0.22	0.13	
100	0.14	0.05	99.70

[a]Coefficient of variation = 100 × (S.D./mean)

Table II에 제시한 것과 같이 직선성(R^2)이 0.9996인 상관관계를 나타내어 직선성이 인정되었다.

정밀성 – 일내 정밀도로서 흑두의 지표 물질인 genistin의 5, 10, 20, 50, 100 μg/ml 농도의 표준액을 5회 측정하여 피크의 면적을 구하고, 이로부터 구한 일내 정밀도는 Table III에 나타낸 것과 같이 0.08-0.56%로 양호한 값을 나타내었다. 두충에 있어서도 지표 물질인 geniposide의 5, 10, 20, 50, 100 μg/ml 농도로 제조한 표준액을 5회 측정하여 피크의 면적으로부터 구한 일내 정밀도는 0.14-0.63%로 양호하였으며 그 값을 Table III에 나타내었다.

또한 Table III에 나타낸 것과 같이 일간 정밀도에 있어서는 일내 정밀도를 측정한 동일한 농도의 표준액을 1일 1회 3일간 반복 측정하여 농도에 따른 피크의 면적을 구하여 이로부터 구한 흑두 genistin의 일간 정밀도는 0.03-0.44%로 양호하였으며, 두충 geniposide의 일간 정밀도도 0.05-0.23%로 양호한 값을 보여주고 있다.

정확성 – 흑두의 지표 물질인 genistin의 5, 20, 100 μg/ml

Table IV. Contents of genistin on GCSB-5-R and GCSB-5

Sample	Genistin
GCSB-5-R-1	0.0427±0.001 mg/g
GCSB-5-R-2	0.0426±0.001 mg/g
GCSB-5-R-3	0.0426±0.002 mg/g
GCSB-5-1	0.0203±0.001 mg/capsule
GCSB-5-2	0.0202±0.002 mg/capsule
GCSB-5-3	0.0203±0.001 mg/capsule

Number of samples per each lot, n=3

Table V. Contents of geniposide on GCSB-5-R and GCSB-5

Sample	Geniposide
GCSB-5-R-1	0.432±0.001 mg/g
GCSB-5-R-2	0.431±0.002 mg/g
GCSB-5-R-3	0.432±0.001 mg/g
GCSB-5-1	0.212±0.002 mg/capsule
GCSB-5-2	0.211±0.002 mg/capsule
GCSB-5-3	0.212±0.002 mg/capsule

Number of samples per each lot, n=3

농도의 표준액을 각각 3회 측정하여 Table II에 나타난 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 흑두의 genistin 분석법의 정확도 평균은 Table III에 나타낸 것과 같이 각각의 농도에서 95-99%로 양호한 수치를 보였다. 두충에 있어서도 5, 20, 100 μg/ml 농도의 geniposide 표준액을 각각 3회 측정하여 Table II에 나타낸 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하여 구한 정확도의 평균은 Table III에서와 같이 각각의 농도에서 93-99%로 양호한 값을 나타내었다.

생약복합제 GCSB-5의 원료와 제품에 함유된 지표 성분의 정량 및 이행률 – 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품 중 흑두의 지표 성분의 정량을 원료인 GCSB-5-R과 제품인 GCSB-5를 각각 30 mg/ml로 3개씩 제조하여 3회 측정하여 Table II에 나타낸 검량선을 이용하여 함량을 측정한 결과, Table IV에 나타낸 것과 같이 원료 GCSB-5-R에는 0.0426-0.0427 mg/g의 함유량을 나타내 GCSB-5 원료에서 genistin의 기준은 실측치 함유량의 90% 이상을 기준으로 하여 0.0383 mg/g 이상으로 하였다. 한편 원생약 흑두의 함량 기준이 0.147 mg/g이었고 GCSB-5의 원료 1 g이 흑두 2.8 g에 해당되는 것으로부터 계산된 이론적 함량치가 0.412 mg/g에 해당됨에 의해 이행률은 10.34-10.36% 임을 알 수 있었다. 제품 GCSB-5에서는 원료의 기준치로부터 계산된 함량기준인 0.0115 mg/300 mg(capsule) 이상의 기준에 대하여 0.0202-0.0203 mg/capsule으로서 기준 보다 높은 genistin을 함유하는 것으로 규격화 하였다. 또한 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품 중 두충의 지표성분의 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-R에는 0.431-0.432 mg/g의 함량을 보여 GCSB-5 원료에서 geniposide의 기준은 실측치 함유량의 90% 이상을 기준으로 하여 0.388 mg/g 이상으로 정하였다. 이행률은 원생약 두충의 함량 기준이 3.25 mg/g이었고 GCSB-5의 원료 1 g이 두충 1.4 g에 해당되는 것으로부터 계산된 이론적 함량치가 4.55 mg/g에 해당됨에 따라 9.47-9.49% 임을 알 수 있었다. 제품인 GCSB-5에서는 원료의 기준치로부터 계산된 함량기준인 0.116 mg/300 mg (capsule) 이상의 기준에 대하여 기준 보다 높은 0.211-0.212 mg/capsule의 geniposide를 함유하고 있는 것으로 확인하였다.

결 론

관절염, 소염, 항경련 및 골세포 퇴행감소 치료제로 개발 중인 천연물 신약인 생약복합제 GCSB-5의 품질 규격화를 위한 연구의 하나로서 생약복합제 GCSB-5를 구성하는 6종의 생약 중 흑두와 두충의 함량 규격화 연구를 실시하였다. 원생약의 이화학적 분석과 함께 생약복합제 GCSB-5 중 흑두와 두충의 함량 기준 설정을 위한 지표물질로서 흑두는 genistin을 두충은 geniposide를 지표 물질로 설정하였고, 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 생약복합제 GCSB-5의 원료 및 제품에 있어서 흑두 및 두충의 함량 기준을 원생약 흑두는 genistin의 함량 기준을 0.147 mg/g 이상으로 설정하였고, GCSB-5 원료에서는 0.0383 mg/g 이상, 제품인 GCSB-5에서는 0.0115 mg/capsule 이상으로 기준을 설정하였다. 또한 두충의 geniposide에 대해서도 원생약은 3.25 mg/g 이상, GCSB-5 원료에서는 0.388 mg/g 이상으로 설정하였고 동시에 제품인 GCSB-5에서는 0.116 mg/capsule 이상으로 기준을 정함으로서 천연물 신약으로 개발 중인 생약복합제 GCSB-5의 품질 규격화의 기초를 마련했다.

사 사

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

인용문헌

1. 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.
2. 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.
3. Park, J. H., Jung, J. H., Kim, J. S. and Park, H. J. (1997) Studies on quality control of crude drugs preparations, chemical analysis of "Gal Gun Tang". *Kor. J. Pharmacogn.* **28**: 42-47.
4. Ohtake, N., Nakai, Y., Yamamoto, M., Sakakibara, I., Takeda, S., Amagaya, S. and Aburada, M. (2004) Separation and isolation methods for analysis of the active principles of Shosaiko-to (SST) oriental medicine. *J. Chromatogr. B.* **812**: 135-148.
5. Ye, M., Guo, G. H., Han, J. and Guo, D. (2006) Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections. *J. Chromatogr. B.* **838**: 86-95.
6. 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.
7. Lee, E. H. and Cha, B. C. (2008) Quantitative analysis of Acanthopanacis Cortex and Achyranthis Radix for standardization of GCSB-5 preparation. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 316-323.
8. Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1996) Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem. Toxicol.* **34**: 457-461.
9. Kim, K. S., Kim, M. J., Park, J. S., Sohn, H. S. and Kwon, D. Y. (2003) Compositions of functional components of traditional korean soybeans. *Food Sci. Biotechnol.* **12**: 157-160.
10. Son, K. H., Lee, J. M., Chang, S. Y. and Lee, K. S. (2001) Isolation and quantitative determination of geniposide from *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 89-92.
11. 의약품평가부 (2004) 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인. 식품의약 품안전청, 5-12.
12. 식품의약품안전청 (2002) 대한약전 제8개정. 약업신문, 1654-1656.
13. Lee, Y. W., Kim, J. D., Zheng, J. and Row, K. H. (2007) Comparisons of isoflavones from Korean and Chinese soybean and processed products. *Biochem. Eng. J.* **36**: 49-53.
14. Wu, H. K., Chuang, W. C. and Sheu, S. J. (1998) Separation of nine iridoids by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **803**: 179-187.
15. Ran, X., Liang, Q., Luo, G., Liu, Q., Pan, Y., Wang, B. and Pang, C. (2006) Simultaneous determination of geniposide, baicalin, cholic acid and hyodeoxycholic acid in rat serum for the pharmacokinetic investigations by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **842**: 22-27.
16. 안덕균 (1998) 원색 한국본초도감, 403. (주)교학사, 서울.
17. 한의학대사전편찬위원회 (1998) 한의학대사전, 1820. 도서출판사정담, 서울.
18. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 (1999) 중약대사전, 5147. 도서출판사정담, 서울.
19. Wang, H. and Murphy, P. A. (1994) Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 1666-1673.
20. 김재길 (1984) 원색 천연물대사전, 439. 남산당, 서울.
21. Hong, N. D., Rho, Y. S., Kim, J. W., Won, D. H., Kim, N. J. and Cho, B. S. (1988) Studies on the general pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**: 102-110.
22. Takeshi, D. (1983) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. I. Isolation of (+)-medioresinol-di-O-β-D-glucopyranoside. *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 2993-2997.

(2009년 1월 7일)