생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
40(2) : 103 ~ 108 (2009)

생약복합제 GCSB-5의 품질 표준화를 위한 방풍의 지표성분 탐색 및 HPLC 분석

차배천* · 이은희
상지대학교 보건과학대학 제약공학과

HPLC Analysis and Screening of Standard Compound on Saposhnikoviae Radix for Standardization of GCSB-5 Preparation

Bae Cheon Cha* and Eun Hee Lee
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 of 6 medicinal plants(Acanthopanacis Cortex, Achyranthis Radix, Saposhnikoviae Radix, Cibotii Rhizoma, Glycine Semen Nigra, Eucommiae Cortex) that have been widely used for the treatment of various bone disorders. The aim of this study was to investigate HPLC analysis method and screening of standard compound on Saposhnikoviae Radix for quality standardization of a medicinal crude drug GCSB-5. Standard compound of Saposhnikoviae Radix was decided with cimifugin by isolation and instrumental analysis such as NMR. HPLC analysis method for the simultaneous determination of cimifugin was established for the quality control of the medicinal plants of Saposhnikoviae Radix species, GCSB-5 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.

Key words – HPLC analysis method, A medicinal crude drug, GCSB-5, Saposhnikoviae radix, *Saposhnikovia divaricata* Schiskin, Cimifugin, Validation.

예로부터 골다공증, 관절염, 디스크 등의 각종 골질환 치료제로 널리 사용되어 오고 있는 추나약물(양근탕, 청파전 등 자생한방병원 고유 처방)을 바탕으로 한 GCSB-5는 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 구성된 생약복합제로서 현재 관절염, 소염, 항경련 및 골세포 퇴행감소 치료를 위한 천연물 신약으로 개발 중이다.[1] 이와 같이 다수의 생약으로 구성되어진 생약복합제들에 있어서는 약효의 유효성과 제품의 안전성 확립을 위해 함유되어진 생약들에 대한 품질 규격화 연구가 필요하다. 이에 본 연구자들 GCSB-5에 함유된 6 종의 생약 중 지표 성분이 보고되어진 오가피,[2,3] 우슬,[4,5] 흑두[6,7] 및 두충[8,9]에 대해서는 생약의 품질 표준화를 위해 이들 지표 성분에 대하여 GCSB-5원료 및 GCSB-5에 있어서 HPLC 분석법 및 함량분석을 실시하여 그 결과를 보고하였다.[10,11] 그러나 GCSB-5에 대해 보다 완전한 품질 관리를 위해서는 6 종의 생약 중 지표 성분이 보고되어져 있지 않은 2 종의 생약인 방풍과 구척에 대해서도 지표 성분의 설정과 함께 지표 성분의 HPLC 분석법과 원료 및 제품에 있어서의 함량 분석도 이루어져야 한다. 따라서 본 연구에서는 지표 성분이 보고되어져 있지 않은 방풍과 구척의 2 종 생약 중 먼저 방풍에 대하여 GCSB-5의 품질 표준화를 위한 기준 및 시험방법 연구의 하나로 방풍으로부터 지표 성분의 선정과 함께 지표 성분의 HPLC 분석법 등을 연구하고자 하였다. 이에 방풍으로부터 column chromatography에 의해 방풍 특이의 성분 또는 주성분인 지표 성분을 분리한 후 기기 분석 등에 의한 구조 결정 연구를 실시하여 방풍의 지표 성분을 선정하였다. 계속하여 설정된 지표 성분에 대한 HPLC 분석 조

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

건을 검토하여 원생약, GCSB-5 원료 및 GCSB-5에 있어서의 HPLC 분석법을 확립하고자 하였으며, 유사 방풍류들의 분석을 통해 확보된 방풍의 지표 성분이 방풍 유사 생약들과 구분되어지는 지표 성분 및 분석법인지를 확인하였다. 또한 정량 분석법의 검증을 위해서는 ICH 가이드라인에[12] 따라 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확도(accuracy), 정밀도(precision) 등을 고려한 validation을 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료 – 본 실험에 사용한 GCSB-5 원료는 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 80-100°C의 열수로 3시간 추출 한 후 여액을 UF막을 사용하여 단계적으로 여과하여 분자량 10000 이하인 분획을 얻고 이를 저온 농축하여 5.1%로 수율로 얻어지는 분말이며, GCSB-5는 1캡슐(350 mg)당 GCSB-5 원료 300 mg, 부형제인 이산화규소 48.5 mg, 활택제로서 스테아린산 마그네슘 1.5 mg으로 혼합 후 제조된 생약복합제이다. 이들 GCSB-5 원료와 GCSB-5 그리고 원생약인 방풍(Saposhnikoviae Radix)과 방풍 유사 생약들은 한풍제약(한국, 전주)으로부터 제공 받아 사용하였다.

기기 및 시약 – 실험에 사용된 HPLC는 Varian Prostar Workstation System(USA)을 사용하였으며, column은 Thermo(USA)사의 ODS Hypersil (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였다. FT-NMR은 Varian Mercury 300 MHz(USA)를 이용하여 TMS를 내부 표준물질로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ unit로 나타내었다. 융점은 Mettler FR-5 융점 측정기를 사용하였고 보정은 하지 않았다. FT-IR은 Nicolet Impact 420을 사용하여 KBr법으로 측정하였고, UV는 Milton-Roy Spectronic Genesys-5 분광계를 사용하였다. 질량 분석은 JEOL JMSAX 505-WA 질량 분석계를 사용하여 측정하였다. 지표 성분 분리를 위한 순상 column chromatography용 silical gel은 Kiesel gel 60(particle size 70-230 mesh. ASTM. Merck)을 사용하였고, 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel $60F_{254}$(ART. 5715, Merck)를 사용하였다. HPLC 용매인 MeOH은 HPLC용인 J. T. Baker사 제품을 사용하였고, 증류수는 3차 증류수를 여과하여 사용하였으며, 그 외에 시료 추출을 위한 용매는 특급 시약을 사용하였다.

지표 성분의 분리 – 지표 성분이 미 설정된 방풍에 대하여 지표 물질을 확보하기 위하여 성분 분리를 실시하였다. 음건한 방풍 300 g에 증류수 700 ml를 가하여 수욕 상에서 3 시간 2회 환류 추출하고, 여과 후 농축하여 방풍 H_2O ext.(23.9 g)를 얻었다. 이 H_2O ext.를 $CHCl_3$: MeOH = 20 : 1에서 5 : 1로 단계적으로 극성을 높인 용출 용매를 사용한 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 소분획인 fraction 1(4.3 g), fraction 2(2.5 g), fraction 3(1.2 g) 및 fraction 4(10.4 g)로 나누었으며, 성분 확인에 의해 지표 성분이 함유된 fraction 3을 $CHCl_3$: MeOH = 10 : 1에서 3 : 1에 의한 분리 및 $CHCl_3$: MeOH = 7 : 1에서 2 : 1에 의한 두 차례의 정제 과정을 통해 방풍의 지표 성분인 화합물 **1**(0.12 g)을 얻었다.

화합물 1 – Light yellow powder; m.p. : 107-109°C ; UV max(MeOH) : 223, 251, 294 nm, $IRv^{KBr}_{max}(cm^{-1})$ 3354(OH), 1718(C=O), 1472, 1432(C=C); ^{1}H-NMR(CD_3OD) δ: 6.58(1H, s, H-8), 6.21(1H, s, H-3), 4.74(1H, t. *J*=8.8Hz, H-2'), 4.42(2H, s, 2-CH_2OH), 3.92(3H, s, -OCH_3), 3.32(2H, d. *J*=8.8Hz, H-3'), 1.29, 1.22[each 3H, s, *gem*-$(CH_3)_2$]; ^{13}C-NMR(CD_3OD) δ: 178.6(C-4), 167.6(C-2), 165.9(C-5), 159.9(C-7), 155.8(C-8a), 117.2(C-6), 111.1(C-4a), 108.0(C-3), 93.4(C-8), 91.4(C-2'), 71.0(C-4'), 59.9(-OCH_3), 59.8(2-CH_2OH), 27.6(C-3'), 24.2[*gem*-$(CH_3)_2$]; EI-MS m/z 306 $[M]^+$

HPLC 분석을 위한 표준액의 제조 – 방풍으로 분리한 지표 성분인 화합물 **1**을 표준물질로 하여 MeOH로 용해시켜 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

방풍 및 방풍 유사 생약들의 검액 제조 – 방풍으로부터 지표 성분을 분리하기 위해 방풍 ext.를 얻는 실험법과 동일하게 각 생약을 추출 및 농축에 의해 방풍 및 방풍 유사 생약의 H_2O ext.를 얻고, 검체는 방풍 및 방풍 유사 생약들의 H_2O ext. 0.3 g을 각각 취한 후 50% MeOH 10 ml에 녹이고, 15초 간 vortexing 한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다.

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

GCSB-5의 검액 제조 – 한풍제약으로부터 제공받은 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 조건 – 방풍으로 분리한 화합물 **1**을 지표 물질로 하여 Renmin 등[13]과 김과 권[14]의 HPLC 분석 방법을 기초로 하여 분석 조건을 검토하였다. 칼럼은 ODS Hypersil(4.6×250 mm, 5 μm, Thermo)를 사용하였고, 칼럼 온도는 40°C, 검출기는 UV 254 nm, 이동상으로는 메탄올과 물을 사용하여 gradient profile로 실시하였고, 유속은 1 ml/min를 사용하여 실험하였다.

Gradient profile	Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile phase	
			A(MeOH)	B(Water)
	0:00	1.0	40	60
	10:00	1.0	50	50
	20:00	1.0	70	30
	30:00	1.0	40	60

분석 방법의 검증(Validation)

특이성(Specificity) – HPLC 분석법이 어느 정도의 신뢰도와 재현성을 갖는지 검증하기 위해서 ICH(International Conference on Harmonization) 가이드라인[12]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.

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

결과 및 고찰

추나약물을 바탕으로 하여 관절염, 소염, 항경련 및 골세포 퇴행감소 치료제로 개발되어지고 있는 GCSB-5는 오가피, 우슬, 방풍, 구척, 흑두 및 두충의 6 종 생약으로 구성된 생약복합제로 본 연구에서는 GCSB-5의 품질 규격화를 위한 연구의 하나로 6 가지 생약 중 지표 성분이 알려져 있지 않은 방풍에 대하여 지표 성분의 분리와 구조 결정 및 지표 성분의 HPLC 분석법을 연구하였다.

방풍은 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 식물로서 진방풍, 산방풍, 병풍나물, 산방풍나무, 방풍나무 뿌리 등으로 불리며,[15] 한방에서 양음청폐, 거담저해제로 쓰이는 약재이다. 방풍으로 사용되는 생약으로는 중국산의 방풍(*Saposphnikovia divaricata*)과 한국에서 자생하거나 재배하는 해방풍(*Glehnia littoralis*), 식방풍(*Peucedanum japonicum*)이 있다.[16] 식방풍은 갯기름나물(*Peucedanum japonicum* Thunberg)의 뿌리를 약용으로 하며, 원추형 또는 방추형의 형태로 회갈색 또는 옅은 갈색을 띄고 두통, 중풍, 해열, 신경통에 응용되고 있다.[17] 성분으로는 bergapten, peujaponiside, psolalen, peucedanol umbelliferone 등 대부분 coumarin계 성분이 보고되어 있으며,[18-20] peujaponiside를 지표 물질로 품질 표준화에 관한 연구가 이루어져 있다.[18] 해방풍은 갯방풍(*Glehnia littoralis* Schmdit et Miquel)의 뿌리 및 뿌리 줄기를 약용으로 하며, 거의 원주형의 형태로 엷은 황갈색 또는 적갈색을 띄고 한방에서는 고혈압이나 뇌졸중으로 발병하는 중풍을 비롯해 해열, 진통, 신경통에 자주 이용되고 있다.[21] 성분으로는 imperatorin, bergapten, β-sitosterol, psoralen, umbelliferone, petroselinic acid 등이 보고되어 있으며, 해방풍을 통칭 원방풍이라 하여 유통되기도 한다.[22,23] 공정서에 명시되어 있는 방풍(*Ledebouriella seseloides* Wolff = *Saposhnikovia divaricata* Schiskin)도 역시 미나리과에 속하며, 뿌리를 약용으로 사용하며 원주상을 이루고 엷은 갈색 또는 회갈색을 띄며 감기, 두통, 거담제로 사용한다.[24] 성분으로는 psoralen, bergapten, imperatorin, phelloptern 등 coumarin계 성분을 함유하고 있다.[17] 이와 같이 해방풍 및 식방풍과 같은 방풍 유사 생약들과 구별할 수 있는 지표 성분의 방풍으로부터의 분리와 NMR 등의 기기 분석에 의한 구조 결정, 지표 성분의 HPLC 분석 및 HPLC 분석법의 검증을 위한 validation 실험과 함께 방풍과 방풍 유사 생약, GCSB-5 원료 및 GCSB-5에 있어서의 지표 성분의 분석 연구를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

지표 성분의 분리 및 구조 확인 – 방풍은 현재 국내에서는 지표 물질이 알려져 있지 않으므로 방풍의 유사 생약인 해방풍의 주성분인 isoimperatorin을[14] 지표 물질로 하여 방풍 H_2O ext.에 대하여 확립된 HPLC 조건으로 분석한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 isoimperatorin의 18.0분대 피크가 방풍 H_2O ext.에서는 나타나지 않아 방풍의 지표 물질로 설정 할 수 없음이 확인되어 지표 물질을 단리 하였다. 방풍 H_2O ext.를 silica gel 60을 이용하여 $CHCl_3$과 MeOH 용매계에서 극성을 높여 column chromatography를 실시하여 주성분인 화합물 **1**을 분리하였다. 화합물 **1**은 IR spectrum에 있어 3354 cm^{-1}에서 -OH에 의한 흡수대가 나타나고, 1718 cm^{-1}에서 C=O에 의한 흡수대, 1472, 1432 cm^{-1}에서 이중 결합에 의한 흡수대가 나타나며, UV spectrum에서 223, 251, 294 nm 에서 흡수 극대가 나타났다. 또한, ^{1}H-NMR spectrum의 δ 6.58과 6.21에서 singlet 피크가 각각 나타나는 것으로 보아 화합물은 chromone 계열임을 추정할 수 있었다. ^{1}H-NMR의 δ 6.58과 6.21에서 나타나는 각각의 singlet 피크는 H-8과 H-3에 기인하는 것임을 알 수 있으며, δ 4.74에서 나타나는 J=8.8 Hz의 triplet과 δ 3.32 ppm에서 나타나

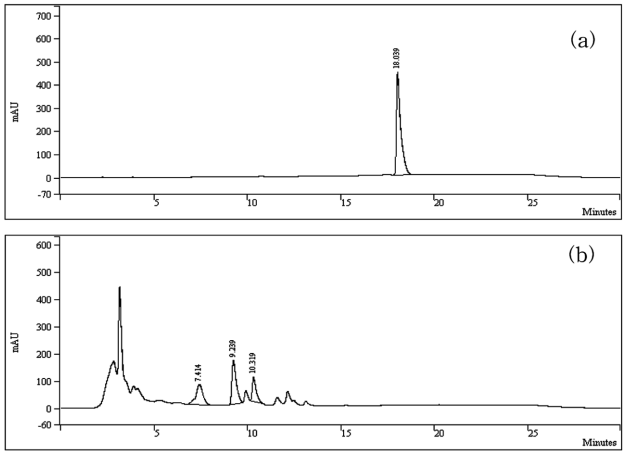

Fig. 1. HPLC chromatogram of isoimperatorin(a) and H_2O extract of *Saposhnikovia divaricata*(b).

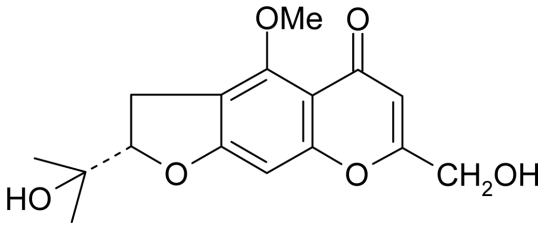

Fig. 2. Structure of cimifugin(compound **1)** isolated from H_2O extract of *Saposhnikovia divaricata*.

는 *J*=8.8 Hz의 doublet은 dihydrofuran이 존재하고 있음을 알려주고 있다. δ 3.92에서 나타나는 1개의 methoxyl기는 5번 위치에 hydroxyl기가 methylation되어 있음을 알 수 있었다. 또한, δ 4.42에서 나타나는 2H에 해당하는 singlet 피크와 ^{13}C-NMR spectrum의 δ 59.8에서 나타나는 signal로부터 2번 위치에 CH_2OH가 존재함을 알 수 있었다. ^{1}H-NMR의 δ 1.29와 1.22에서 나타나는 geminal methyl에 의한 signal과 ^{13}C-NMR의 δ 71.0과 24.2에서 나타나는 signal들로부터 dihydrofuran의 2'위치에 isopropyl기가 존재함을 알 수 있었다. 이상의 기기 분석치를 문헌치[25-27]의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 **1**의 구조는 Fig. 2에 나타낸 것과 같이 cimifugin으로 동정하였다.

HPLC 분석 – 표준액 및 검액의 분석을 위하여 기존의 알려진 분석법[13,14]을 기초로 ODS Hypersil(4.6×250 mm, 5 μm, Thermo) 칼럼과 40°C의 칼럼 온도, UV 254 nm 파장, 1 ml/mln의 유속에서 메탄올과 물의 이동상을 이용한 gradient 시스템에서 방풍의 지표 성분인 cimifugin의 분석 조건을 검토한 결과 기존의 분석 방법에서는 피크 유지 시간이 길고, 겹치던 피크를 이동상의 비율과 시간을 바꾸어 9분대로 옮겨 분리하는 새로운 분석 조건을 개발하였다. 그 결과 방풍의 지표 성분인 cimifugin을 GCSB-5 원료 및 GCSB-5에서

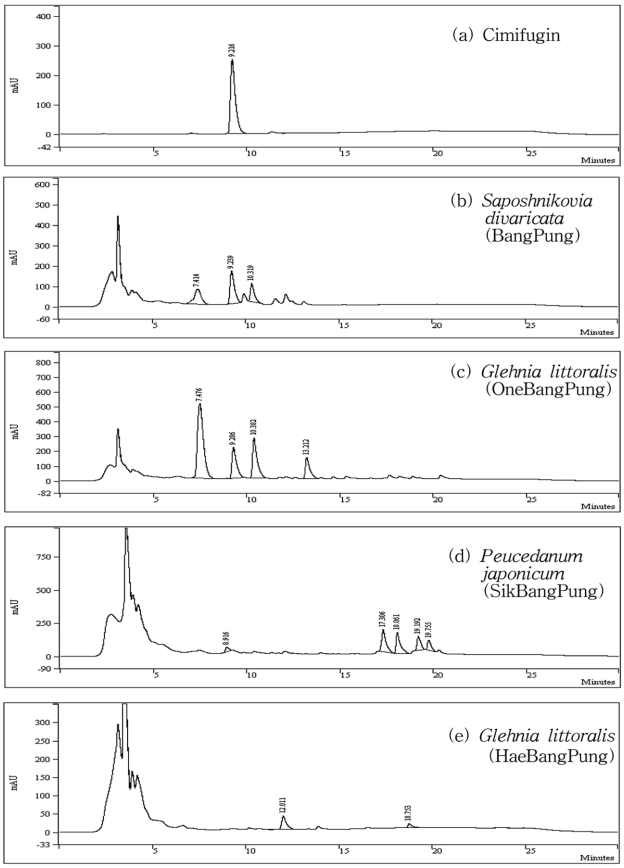

Fig. 3. HPLC chromatogram of cimifugin(a) and H_2O extract of Bang Pung species.

다른 피크의 간섭 없이 분리할 수 있는 분석 조건을 확립하였다. 또한 GCSB-5의 원료로 사용된 방풍과 유통품 원방풍, 식방풍, 해방풍의 H_2O ext.를 확립된 HPLC 조건으로 분석을 실시한 결과, Fig. 3에 나타낸 것과 같이 cimifugin의 9.2분대의 피크가 원방풍 H_2O ext.에서만 나타났으며, 이는 원방풍은 HPLC 패턴분석 실험에서 원료로 사용한 방풍과 유사하다고 판명할 수 있었다. 그러나 cimifugin이 확인되지 않는 식방풍과 해방풍은 그들의 지표 성분이 식방풍은 peujaponiside,[18] 해방풍은 isoimperatorin[14]으로 알려져 있으므로, 방풍에서 분리한 cimifugin은 향후 방풍과 방풍 유사품을 구별하는 중요한 지표 성분으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

분석법의 검증(Validation)

특이성 – 확립된 HPLC 조건으로 분석한 방풍의 지표 물질, GCSB-5 원료인 GCSB-5-R과 GCSB-5의 크로마토그램은 Fig. 4과 같다. Cimifugin의 피크유지 시간은 9.2분대이고, GCSB-5 원료와 GCSB-5도 9.2분대로 cimifugin가 다른 성분들과 명확히 분리되었고 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인하였다.

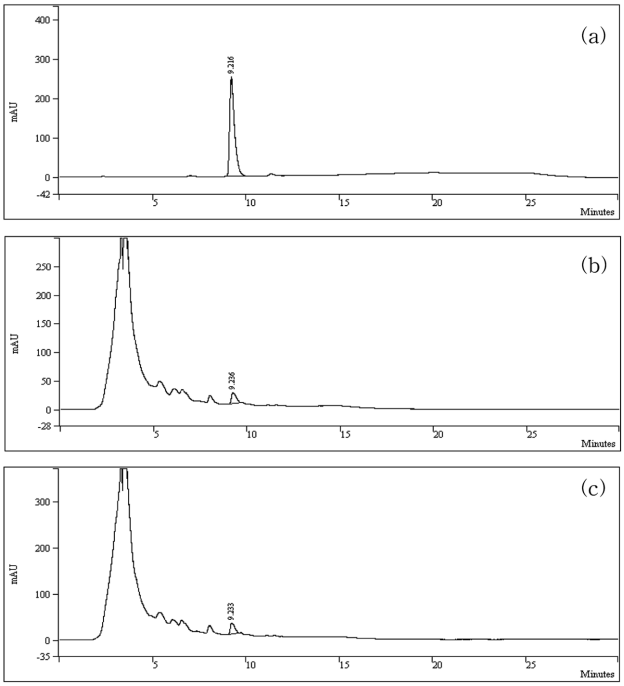

Fig. 4. HPLC chromatogram of cimifugin(a), GCSB-5-R(b) and GCSB-5(c).

직선성 – 방풍의 지표 물질인 cimifugin을 5, 10, 20, 50, 100 μg/ml의 농도별로 제조하고 확립된 HPLC 조건으로 분석을 실시하여 x축은 농도, y축은 피크 면적으로 하여 검량선을 작성한 결과, Table I에 나타낸 것과 같이 직선성(R^2)이 1.000인 상관관계를 나타내어 직선성이 인정되었다.

정밀성 – 일내 정밀도로서 방풍의 지표 물질인 cimifugin의 5, 10, 20, 50, 100 μg/ml농도의 표준액을 5회 측정하여 피크의 면적을 구하고, 이로부터 구한 일내 정밀도는 Table II에 나타낸 것과 같이 0.03-0.33%로 양호한 값을 나타내었다.

일간 정밀도에 있어서는 일내 정밀도를 측정한 동일한 농도의 표준액을 1일 1회 3일간 반복 측정하여 농도에 따른 피크의 면적을 구하고, 이로부터 구한 방풍의 cimifugin 일간 정밀도는 0.02-0.11%로 양호하였으며 Table II에 나타내었다.

정확성 – 방풍의 지표 물질인 cimifugin의 5, 20, 100 μg/ml 농도의 표준액을 각각 3회 측정하여 Table I에 나타낸 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 방풍의 cimifugin 분석법의 정확도 평균은 Table II에 나타낸 것과 같이 각각의 농도에서 92-99%로 양호한 수치를 보였다.

Table I. Calibration curve equations, LOD and LOQ of cimifugin

Sample	Equation	R^2	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
Cimifugin	y = 23983x - 4836.1	1	0.07	0.20

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

Table II. Precision and accuracy for the determination of cimifugin

Cimifugin concentration (μg/ml)	Precision CV(%)[a]		Accuracy(%)
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	
5	0.10	0.09	92.20
10	0.13	0.06	
20	0.33	0.11	99.80
50	0.06	0.02	
100	0.03	0.02	99.56

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

결 론

GCSB-5 생약복합제에 있어 6 종의 구성 생약 중 지표 성분이 규정되어 있지 않은 방풍에 대하여 방풍 유사 생약인 식방풍 및 해방풍과 구별되는 지표 성분의 설정을 위해 주성분의 추출, 분리 정제 및 구조 동정에 의해 cimifugin을 지표 성분으로 선정하였다. 선정된 cimifugin을 지표 물질로 하여 HPLC 분석과 validation을 실시한 결과, 피크 유지 시간은 9.2분대로 방풍 유사 생약인 식방풍 및 해방풍에는 존재하지 않는 특이 성분이었으며 GCSB-5 원료와 GCSB-5에 있어서도 다른 물질과의 간섭이 없는 특이성을 나타내었다. 또한 상관계수는 1.000으로 직선성을 나타내었으며 1% 이하의 일내 정밀도와 일간 정밀도 90% 이상의 정확도를 나타내었다. 따라서 cimigugin은 천연물 신약으로 개발중인 GCSB-5에 있어서 방풍의 확인 및 정량에 활용될 수 있는 지표 성분으로 규정하였고, 원료 및 제품에서의 HPLC 분석법도 확립하였다.

사 사

본 연구는 상지대학교 2007년 교내 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 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.
2. 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.
3. 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 Acanthopanacis Cortex. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 316-321.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Lee, E. H. and Cha, B. C. (2009) Quantitative analysis of Glycine Semen Nigra and Eucommiae Cortex for standardization of GCSB-5 preparation. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 18-24.
11. 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.
12. 의약품평가부 (2004) 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인. 식품의약 품안전청, 5-12.
13. Renmin, L., Aifeng, L. and Ailing, S. (2004) Preparatuve isolation purfication of coumarins from *Angelica dahurica*(Fish. ex Hoffm) Benth, et Hook. f(Chinese traditional medical herb) by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1052**: 223-227.
14. 김창민, 권용수 (2000) 생약·한약재의 품질표준화 연구 과제 보고서(식품의약품안전 청보고서); 해방풍(*Glehnia littoralis*)의 품질표준화에 관한 연구. 식품의약품안전청, 59-69.
15. Kim, S. J., Chin, Y. W., Yoon, K. D., Ryu, M. Y., Yang, M. H., Lee, J. H. and Kim, J. W. (2008) Chemical Constituents of *Saposhnikovia divaricata*. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 357-364.
16. 지형준, 이상인 (1988) 한약규격집 주해서, 237. 한국메디칼인덱스사, 서울.
17. Kim, M. K., Kim, M. J., Kim, E. Y., Lyoo, K. Y., Lee, E. M., Jang, W. H. and Hwang, S. H. (1998) Comparative investigation of Bang Pung. *Hoysung Yakhak Hoeji* **4**: 63-70.
18. Whang, W. K., Lee, S. J., Kim, H. H., Cho, H. K., Lee, K. S., Kang, I. H. and Ham, I. H. (2001) Standarzation of Peucedani Radix. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 292-296.
19. Shin, K. H., Kang, S. S. and Chi, H. J. (1992) Analysis of coumarin constituents in Peucedani Radix. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**: 20-23.
20. Kim, C. W. (1975) Studies on the constituents of *Peucedanum japonicum* Thunberg. *Research Bull.* **16**: 571-578.
21. Kim, S. M., Shin, D. I., Song, H. S., Kim, S. K. and T. Y. (2005) Geographical distribution and habitat characteristics of *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt in south korea. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**: 171-177.
22. Seo, Y. K. (1977) Study on the constituents in the root of *Glehnia littoralis*. *Bill. KH Pharma. Sci.* **5**: 77-82.
23. Seo, Y. K. and Ryu, K. S. (1977) Study on the components of Glehniae Radix. *Kor. J. Pharmacogn.* **7**: 233-235.
24. 안덕균 (1998) 원색 한국본초도감, 26. (주)교학사, 서울.
25. Zheng, M. S., Jin, W. Y., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., Bae, K. W. and Kang, S. S. (2005) The comstituents isolated from *Peucedanum japonicum* Thunb. and their cyclooxygenase (cox) inhibitory activity. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**: 75-79.
26. Okuyama, E. Hasegawa, T., Matsushta, T., Fujimoto, H., Ishimashi, M. and Yamazaki, M. (2001) Analgesic components of Saposhnikovia root(*Saposhnikovia divaricata*). *Chem. Pharm. Bull.* **49**: 154-160.
27. Kwon, Y. S., In, K. K. and Kim, C. M. (2000) Chemical comstituents from the roots of *Ostericum koreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 284-287.

(2009년 4월 28일 접수)