약제학회지(2010), 제 40 권 제 1 호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 40, No. 1, 59-61 (2010)

서양칠엽수종자엑스 기준및시험법 비교 및 규격 설정

김승현[1] · 김대현[1] · 박진호[1] · 조창희[2] · 이종필[3] · 강신정[3] · 이민아[4] · 성상현[4†]
[1](주)엘컴사이언스 생명과학연구소, [2]식품의약품안전평가원 생약연구과,
[3]식품의약품안전청 생약제제과, [4]서울대학교 약학대학
(2010년 1월 12일 접수 · 2010년 1월 30일 수정 · 2010년 2월 11일 승인)

Standardization of *Hippocastani Semen* Extract

Seung Hyun Kim[1], Dae Hyun Kim[1], Jin Ho Park[1], Chang hee Cho[2], Jong pill Lee[3], Shin Jung Kang[3], Mina Lee[4] and Sang Hyun Sung[4†]
[1]*Institute for life science, Elcom Science Co. Ltd., Seoul 151-742, Korea*
[2]*Herbal Medicine Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea*
[3]*Herbal Medicinal Products Division, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea*
[4]*College of pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*
(Received January 12, 2010 · Revised January 30, 2010 · Accepted February 11, 2010)

ABSTRACT – This study was carried out to establish standard analytical method of *Hippocastani Semen* extract. Each standard analytical methods were covered for exact and efficient analytical method. Consequently, analytical method of Deutsches Arzneibuch has been adopted for *Hippocastani Semen* extract. Analytical methods established in this study could be applied to a reasonable and unified quality control of *Hippocastani Semen* extract.

Key words – *Hippocastani Semen*, standard analytical method

서양칠엽수의 기원식물은 *Aesculus hippocastanum*로 그 종자 (Hippocastani semen)를 에탄올로 추출하여 엑스로 만든다. 유럽에서는 전통적으로 이 나무의 종자를 치질 · 자궁출혈 등에 대한 치료약으로 사용해 왔다. 최근에는 응용 범위가 더욱 넓어져서 동맥경화증 · 혈전성 정맥염 및 외상에 의한 종창 등의 치료와 예방에 사용하고 있다.[1-4] 우리나라에서도 서양칠엽수종자엑스를 주원료로 한 제제 27 품목이 허가되어 있을 정도로 널리 사용되고 있다. 최근 생약에 대한 관심 증가와 생약을 원료로 한 제제 시장 규모의 확대로 유럽 등지로부터 생약제제 및 생약엑스의 수입이 급증하고 다양한 제제가 유통되고 있는 추세이다. 이에 따라 현재 국내에서 널리 사용되는 서양칠엽수종자엑스도 마찬가지로 해외로부터 수입이 증가하고 있지만 각 제제업체별로 대한약전외의약품등기준 및 별도규격 등 각기 다른 규격을 적용하고 있다. 기준이 다양하고 품질관리 체계가 상이하기 때문에 저품질 원료의 수입 가능성을 배제할 수 없고 규격이 비합리적인 경우도 많아 일정한 약효 또한 기대하기 어려운 실정이다. 따라서 빈용되고 있는 서양칠엽수종자엑스의 원료의약품에 대한 합리적이고 효율적인 규격이 필요한 상황이다. 서양칠엽수는 saponin 계열 화합물들이 주성분이며 특히 주활성성분은 triterpene saponin인 aescin으로 알려져 있다. 이밖에 quercetin, kaempferol 등의 flavonol 계열 화합물 및 tannin을 함유하며[5-8] Korean Pharmaceutical Codex (KPC)에서는 에스신에 대한 정량분석법 및 기준이 수록되어 있었으나 상당히 길고 복잡한 실험과정에서 검액 농도가 너무 낮아 결과적으로 함량기준에 맞추기 어렵다는 단점이 있었다. 이에 반해 Deutsches Arzneibuch (DAB) 방법에서는 함량이 기준에 적합한 결과를 보이지만 번역본에서 시액제조방법이 명시되어 있지 않고 시약이 잘못 표기되어 있는 등 정확한 실험이 어렵다는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 다양한 서양칠엽수종자엑스를 확보한 후 규격 비교를 통하여 정확한 실험을 위한 방법 및 시액 등을 설정하고 수정할 사항들을 보완하기 위해 이 실험이 행해졌다. 최종적으로 서양칠엽수종자엑스에 대한 가장 합리적이고 타당한 규격을 설정하여 통일된 기준을 마련함으로써 이 제제의 약효를 기대함과 동시에 안정적인 품질관리를 돕는데 목적을 두었다.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)880-7859, E-mail : shsung@snu.ac.kr
DOI : 10.4333/KPS.2010.40.1.059

실험 방법

실험재료

본 연구에 사용한 서양칠엽수종자엑스는 국내에 유통되고 최종의약품에서 실제 사용되는 원료의약품을 각 제조사로부터 제공받아 사용하였다.

시약 및 기기

Aescin는 Sigma사 (미국, 미주리, 세인트루이스) 제품을 사용하였고, 시료 추출과 UV 분석을 위한 시약은 Samchun chemical사의 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. UV system은 Tecan(스위스)의 infinite M200을 사용하였다.

Aescin의 각 규격에 따른 비교 및 검액과 표준액의 조제

KPC (Korean Pharmaceutical Codex) 및 DAB (Deutsches Arzneibuch)의 각 약전에 따른 방법을 이용하여 규격을 비교하였다.[9-10] 서양칠엽수종자엑스와 aescin의 검액 및 표준액의 조제는 각 약전 규격에 따라 시행하였다. KPC 방법의 검액은 트리테르펜배당체(aescin으로서) 약 20 mg에 해당하는 양의 시료를 달아 0.1몰 염산 30 mL와 함께 분액깔때기에 취하고 n-프로판올 20 mL와 클로로포름 50 mL로 추출 분리하여 하층을 취하였다. 따로 섞은 0.1몰 염산 30 mL, n-프로판올 20 mL 및 클로로포름 50 mL의 혼액으로 상기 추출 분리한 상층을 다시 추출하였다. 하층을 모두 합하여 수욕상에서 증발 건조하였다. 건조한 잔류물을 에텔로 수회 씻고 이 잔류물은 빙초산 10 mL에 녹이고 빙초산을 넣어 정확하게 50 mL가 되도록 하여 검액으로 하였다. 표준액은 aescin 표준품을 100°C에서 4시간 건조품을 데시게이터 중에서 방냉준품을 약 20 mg을 정밀하게 달아 빙초산에 녹여 정확하게 50 mL로 하여 사용하였다. DAB 방법의 검액은 0.25 g을 플라스크에 정밀하게 달아 0.1몰 염산 20 mL를 넣어 5분 동안 흔든 다음 250 mL 분액깔대기에 넣어 여과하였다. 플라스크와 필터는 각각 5 mL 0.1몰 염산으로 2번 씻은 을 이 액을 합하여 1-프로판올 20 mL와 클로로포름 50 mL을 넣고 5분 동안 강하게 흔들었다. 분액깔대기에서 하층액은 버리고 상층액에 0.1몰 염산 30 mL, 1-프로판올 20 mL 및 클로로포름 50 mL의 혼합액의 하층액을 넣어 2분 동안 강하게 흔들었다. 합친 추출액(하층액)은 플라스크 속에서 1.5 kPa~2.5 kPa 압력에서 농축하였다. 잔류물은 에테르 10 mL로 2회 씻고, 에테르는 여과시키고, 필터는 에테르 10 mL로 씻었다. 남은 에테르를 제거한 다음 잔류물은 각각 무수초산 10 mL을 3회 넣어, 그 용액들은 이전에 사용한 건조된 필터를 통해서 100 mL 용량 플라스크 속으로 여과시켰다. 플라스크와 필터는 무수초산으로 씻고, 세정액은 용량플라스크 속으로 여과시키고, 합친 여과액들은 무수초산으로 100 mL가 되게 하였다. 이 용액 1 mL는 밀봉 가능한 시험관 안에서 4 mL 철(III)-염화물(chloride)-초산-시약과 합하여 밀봉한 상태로 방향을 바꿔서 60°C의 중탕용기에서 25분동안 가열하고 흐르는 물에서 실온으로 냉각시켜 검액으로 하였다. 표준액은 aescin 9.0 mg, 18.0 mg, 27.0 mg을 각각 무수초산 50 mL에 녹였다. 이 용액 1 mL를 취하여 4 mL 철(III)-염화물(chloride)-초산-시약과 합하여 검액과 동일한 조건에서 조작한 후 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 두 가지 방법 모두 UV법을 이용한 정량방법이며 KPC방법은 검액과 표준액의 흡광도로부터, DAB방법은 3개의 농도를 가진 표준액을 이용하여 작성한 검량선으로부터 검액 중 트리테르펜배당체의 함량을 계산하였다. 에스신의 구조는 Figure. 1에 나타내었다.

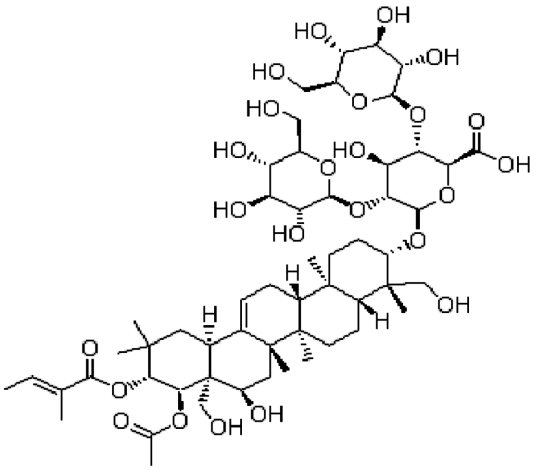

Figure 1–Structure of aescin

결과 및 고찰

각 기준및시험법에 따른 Aescin 분석 결과

KPC 방법과 DAB 방법은 모두 염산에 시료를 녹였고 n-프로판올과 클로로포름으로 추출한 하층을 농축한 후 에테르로 씻고 빙초산에 녹여 검액을 준비하였다. 그러나 KPC 방법에서는 시료의 양을 aescin으로서 약 20 mg을 사용하게 되어 있어 250 mg의 시료를 사용하는 DAB 방법에 비해 사용되는 시료의 양이 적다. 실험 결과적은 양의 시료를 사용하는 KPC 방법은 DAB 방법과 표준액의 농도 및 시험방법이 유사하기 때문에 계산법이 다르다고는 하나 함량이 낮은 것으로 나와 기준에 미치지 못했다. 반면 KPC 방법보다 높은 농도의 검액을 사용하는 DAB 방법에서는 모든 시료

Table I–*Comparison of each method*

	KPC	DAB	Modified method
Calculation method	STD(mg) × A_T/A_S	Calibration curve	Calibration curve
Test result	Aescin 8.2~9.9% : not complies to standard (16.0~20.0%)	Aescin 16.0~19.6% : complies to standard (16.0~20.0%)	complies to standard (16.0~20.0%)
Reagent manufacturing method	Presented	Not presented	Presented

[a)] A_T: Absorbance of test solution, A_S: Absorbance of standard solution

가 함량기준에 적합한 것으로 나타났다. 그러나 내용이 잘못되거나 모호한 부분이 많았다. 녹이는 용매를 무수초산에서 빙초산으로 변경해야 하고 (무수초산을 이용하여 실험시 반응이 일어나지 않았음) 또한 철(III)-염화물(chloride)-초산-시약의 명칭을 염화제이철시액으로 바꾸고, KPC방법과 같이 시액 제조법을 첨가하여야 정확한 실험이 가능하였다 (철(III)-염화물(chloride)-초산-시약의 명칭이 모호하여 염화철(III) 초산 시액 등으로 실험해 본 결과 염화제이철시액을 첨가할 경우에만 반응이 일어났음).[11-12] 이 사항들을 수정할 경우 함량이 기준에 맞는 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 각 기준 및시험법 및 수정된 방법에 대한 비교와 KPC, DAB 방법의 시험 결과는 Table I에 나타내었다.

결 론

KPC방법은 시험법대로 시행한 결과 함량 결과가 많이 미달하여 기준에 적합하지 않은 결과가 나왔다. DAB방법은 함량이 기준에 적합하나 번역본에서 잘못되거나 모호한 부분이 많아 전반적으로 수정하였다. 이상의 결과는 고시에 반영되어 서양칠엽수종자엑스가 KPC에서 삭제되고 DAB를 따르게 하였으며, 수정된 번역본으로서 서양칠엽수종자엑스의 타당한 분석법을 제안하였다. 수정된 내용은 정량법에 표기되어 있는 모든 무수초산을 빙초산으로 변경하였고, 시액 제조법을 첨가하였다 (염화제이철시액 : 염화제이철 75 mg을 96% 빙초산 50 mL에 녹이고 황산 50 mL를 식히면서 천천히 넣고 섞은 액). 본 연구를 통해 확립된 서양칠엽수종자엑스의 분석법 및 함량규격은 국내에서 사용되는 서양칠엽수종자엑스 원료 및 제제에 대한 기준 및 시험법으로 활용됨으로써 이들의 효율적인 품질관리에 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. H. Matsuda, Y. Li, T. Murakami, K. Ninomiya, N. Araki, M. Yoshikawa and J. Yamahara, Antiinflammatory effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from horse chestnut, the seeds of Aesculus hippocastanum L, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, 1611-1616 (1997).
2. F. Senatore, A.K. Mrugasiewicz and P. Gorecki, Steroidal constituents and anti-inflammatory activity of the horse chestnut (Aesculus hippocastanum L.) bark, *Boll Soc Ital Biol Sper*., 65, 137-141 (1989).
3. R.M. Facino, M. Carini, R. Stefani, G. Aldini and L. Saibene, Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from Hedera helix, Aesculus hippocastanum, and Ruscus aculeatus: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency, *Arch Pharm (Weinheim)*., 328, 720-724 (1995).
4. L. Jasiuleviciute, A. Keturkiene and L. Leonaviciene, Influence of treatment with the tincture of Aesculus hippocastanum L. on zinc and magnesium content in live and kidney of rats with adjuvant arthritis, *Acta medica lituanica*, 9, 269-272 (2002).
5. C.R. Sirtori, Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile, *Pharmacological Research*, 44, 183-193 (2001).
6. D. Bässler, S. Okpanyi, A. Schrödter, D. Loew, M. Schürer and H.U. Schulz, Bioavailability of β-aescin from horse chestnut seed extract: Comparative clinical studies of two galenic formulations, *Advances in Therapy*, 20, 295-304 (2003).
7. P. Profumo, P. Gastaldo, A.M. Caviglia and S. Carli, Callogenesis, somatic embryogenesis and active principles from explants of Aesculus hippocastanum L, *Cytotechnology*, 11, 170-171 (1993).
8. G. M. Xiao and J. Wei, Effects of β-Aescin on the expression of nuclear factor-b and tumor necrosis factor-a after traumatic brain injury in rats, *J Zhejiang Univ Sci B*., 6, 28-32 (2005).
9. Korean Pharmaceutical Codex, 1097-1098 (2007).
10. Deutsches Arzneibuch (2007).
11. B. Benthin, H. Danz and M. Hamburger, Pressurized liquid extraction of medicinal plants, *J chromatography A*., 837, 211-219 (1999)
12. R. Barr, L. Magree and F. L. Crane, Quinone distribution in horse chestnut chloroplasts, *Amer. J. Bot*., 54, 365-374 (1967)