

梔子の 규격 기준 모니터링 및 HPLC 표준크로마토그램 연구

김경희^{1#}, 김선미¹, 신승훈¹, 이영종², 백완숙^{1*}

1 : 한국의약품시험연구원, 2 : 가천대학교 한의과대학 본초학교실

Quality Monitoring of Specification Standard of Gardeniae Fructus in the Korean Pharmacopoeia and Studies HPLC Standard Chromatogram

Kyoung Hee Kim^{1#}, Sun Mi Kim¹, Seung Hoon Shin¹, Young Jong Lee², Wan Sook Baek^{1*}

1 : Korea Pharmaceutical Test & Research Institute, Seoul, Republic of Korea,

2 : Department of Herbol, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : Gardeniae Fructus is a ripe fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis, which has been used as traditional medicines for anti-inflammatory, diuretic, antipyretic, and antibacterial activity. The aim of this study was to compare of Gardeniae Fructus in South Korea collected during three years according to the standards in monographs of the Korean Pharmacopoeia Eleventh edition (KP11).

Methods : 30 items of Gardeniae Fructus from two cultivation regions were classified into dried(n=15) & steamed (n=15) and tested according to the standards in monographs of the KP11. Gardeniae Fructus was carried out identification(comparison of colors, thin layer chromatography), heavy metals, residual pesticides, total ash, and assay registered at KP11. Add to we tested loss on dry, contents of ethanol-soluble extracts, and HPLC profiling.

Results : In TLC chromatogram of identification test, the spot of gardenoside and geniposide were observed at R_f value of about 0.3 and 0.5. Heavy metals and residual pesticides met the requirements of the standards for all samples. The results of total ash of each samples are measured maximum 4.87 %. According to HPLC for assay, the samples contain 4.80~6.10 % of geniposide and 0.45~1.83 % of gardenoside.

Conclusion : We have verified the current specification standard of Gardeniae Fructus and standard that is not set. By the results, it is proposed a new draft of loss on drying and confirmed the content of gardenoside revised. HPLC standard chromatogram of Gardeniae Fructus is proposed. We hope that it will help the standardization of Gardeniae Fructus.

Key words : Gardeniae Fructus, Quality control, Pharmacopoeia, Geniposide, Gardenoside

I. 서 론

梔子(Gardeniae Fructus, Gardenia Fruit)는 대한민국약전(KP11)¹⁾, 일본약국방(JP17)²⁾과 중화인민공화국약전(ChP2015)³⁾에 “치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis(꼭두서니과 Rubiaceae)의 열매”로 되어있다. 우리나라 공정서에는 KP2⁴⁾에 “치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis 및 동속 식물의 열매”로 처음 수재되었다.

梔子は 일반적으로 소염, 이노, 해열, 지혈, 진정, 항균작용이 있다고 알려져 있으며, 담즙분비, 간장염치료, 황달이나 토혈을 다스리는 데에 쓰이고 진정약으로 응용되기도 한다. 최근 梔子の 항염증, 항산화 작용에 관한 연구가 차츰 이루어지면서 각 효능을 나타내는 성분에 대한 연구가 진행되고 있다⁵⁾. 특히 최근에는 치자 추출물의 항염증 및 항산화효능에 대한 관심이 높아지면서 해당 작용을 하는 성분을 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다⁶⁻⁹⁾. 생체 노화는 물론, 암을

*Corresponding author : Wan Sook Baek, Korea Pharmaceutical Test & Research Institute, Seoul, Republic of Korea.
· Tel : +82-2-962-5141 · E-mail : curcuma@hanmail.net

#First author : Kyoung Hee Kim, Korea Pharmaceutical Test & Research Institute, Seoul, Republic of Korea.
· Tel : +82-2-967-4676 · E-mail : kimkh@kptr.or.kr

· Received : 10 February 2017 · Revised : 28 February 2017 · Accepted : 15 March 2017

비롯한 동맥경화, 뇌졸중, 파킨슨병과 같이 활성산소가 인체에 미치는 영향이 연구됨에 따라¹⁰⁾ 항산화작용 등 활성산소 소거제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 butylated hydroxytoluene(BHT)나 butylated hydroxyanisole(BHA)와 같은 합성 활성산소 소거제보다는 비교적 인체에 안전한 천연 활성산소소거제로서 梔子에 관한 연구가 이루어지고 있다¹¹⁾. 그 밖에도 치자 추출물은 담즙분비를 촉진하고¹²⁾, 약물성 간장애에 대한 보호작용¹³⁾, 혈청트리글리세라이드, 인지질, 지질과산화물, 혈당, 유리지방산의 감소에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며¹⁴⁾, 동맥경화 예방 효과에 대한 연구가 발표되고 있다¹⁵⁾. 식품 착색제나 면직물 염료 등에 치자를 쓰는 경우에는 치자에 포함되어 있는 크로신(crocin)이라는 황색계열의 수용성 색소를 이용하여 노란색의 물을 들이거나¹⁶⁾ 치자로부터 비색소성분인 geniposide를 분리·정제한 후 β -glucosidase로 가수분해하여 얻은 genipin을 아미노산과 반응시켜 수용성 청색소로 전환하여 사용하기도 한다¹⁷⁻¹⁸⁾. 치자를 써서 단무지, 국수 등 식품의 착색제로 쓰는 경우, 식품의 보존성이 높아지고 변색을 방지하여 신선도 및 품질을 장기간 유지할 수 있으며, 피부에 닿는 면직물의 염색에서 쓰는 경우, 합성염료의 염색물에 비해 색상이 자연스럽고, 항균작용을 나타낸다¹⁹⁾.

梔子は 묘목을 이식하여 재배하는 것이며 주생산지역은 남해안 일원인 고흥, 완도, 진도 해남 등이다. 이 지역 이상의 위도에서 재배할 경우 겨울한파시 동해가 우려된다. 일반적으로 10월 중순이후 가을 늦서리가 내린 후에 열매가 주황색으로 변했을 때 수확해야한다. 수확한 열매는 과병, 꽃받침을 제거하고 하루정도 건조하기도 하고 솔 위에 물에 닿지 않는 장치를 하고 치자를 넣고 증기를 쐬어 준 후 이것을 꺼내어 서늘한 곳에서 건조하는 증숙건조방법이 있다. KP9²⁰⁾에서 “치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis 의 잘 익은 열매로서 그대로 또는 끓는 물에 데치거나 찢 것”으로 개정되었으며 현재 KP11에도 동일하다. ChP2015의 정의에는 “9~11월 종자가 성숙하여 주황색을 띠 때 채취하여 과경과 이물질을 제거하고 찌거나 끓는 물에 살짝 데친 후 건조한다.”라고 하였다.

이 연구에서는 국내의 주요산지 2곳에서 재배한 梔子를 수집하여 그대로 건조한 것과 끓는 물에 데치거나 찢 것을 가지고 KP11¹⁾중 일부 개정²¹⁾된 내용에 따라 확인시험, 순도시험(중금속, 잔류농약), 회분 및 정량법(Table 1)을 검토 평가함으로써 국내 치자의 품질을 확인하고, KP11의 미설정규격인 건조감량과 엑스함량은 재배품과 국내에서 유통되는 국내산 규격품을 모니터링한 결과를 발표하고 치자의 성분의 확인을 위한 HPLC 표준크로마토그램 결과를 제안하고자 한다.

Table 1. Comparison of Specification Standard of *Gardeniae Fructus* in Pharmacopoeia

Pharmacopoeia	The Origin	Identification	Purity	Loss on drying (%)	Total ash (%)	Extract content (%)	Assay (%)
KP11	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	1) Comparison of colors 2) TLC(<i>Gardeniae Fructus</i> reference drug-geniposide)	1) Heavy metal 2) Residual pesticide 3) Sulfur dioxide	Non	6.0	Non	Geniposide 3.0 Gardenoside 1.8*
JP17	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	1) Comparison of colors 2) TLC(geniposide)	Non	13.0	6.0	Non	Geniposide 3.0
ChP2015	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	TLC(<i>Gardeniae Fructus</i> reference drug, geniposide)	Non	8.5	6.0	Non	Geniposide 1.8

* Gardenoside 1.8 % has been removed from KP11 revision²¹⁾

II. 재료 및 방법

1. 재료

국내 주생산지인 전라남도 지역의 고흥군, 경상남도 지역의 남해군(Figure 1)에서 재배하는 치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis. 열매를 가공방법에 따라 온풍 건조기를 이용하여 60 °C에서 12시간 건조한 것(이하 생건(dried)이라 함. n=15)과 원통형 찜기를 이용하여 증기로 익을 때까지 찌고 온풍 건조기를 이용하여 60°C에서 12시간 건조한 것(이하 증건(steamed)이라 함. n=15)을 구분하여 재배품 30개 시료를 대상으로 하였다(Table 2). 따로 국내에서 유통되는 국내산 규격품 (이하 유통품이라함, n=15)를 수집하여 KP11 미설정 규격인 건조감량과 엑스함량 모니터링에만 적용하였다. 전 경희대학교 육창수, 안덕균교수가 기원을 감별하였고 한국 의약품시험연구원에 보관하고 있다. 잘 섞어 가루로 하여 분석용 검체를 조제하였다.



Figure 1. Collection area of *Gardeniae Fructus*

Table 2. Sample Information

Dried Samples	Jeonam Goheung	1	2	3	4	5	
	Jeonam Goheung	6	7	8	9	10	
	Gyeongnam Namhae	11	12	13	14	15	
	Jeonam Goheung	16	17	18	19	20	
	Jeonam Goheung	21	22	23	24	25	
	Gyeongnam Namhae	26	27	28	29	30	
	Domestic Distribution Samples		31	32	33	34	35
			36	37	38	39	40
			41	42	43	44	45

2. 시약 및 기기

확인시험에 사용된 시약은 국내·외 특급 및 일급시약을 구입하여 사용하였고 박층크로마토그래피에는 시판되고 있는 Silica gel 60 F254를 써서 만든 박층판(230-400 mesh, 0.25 mm, Merck, USA) 을 사용하였다. 기기분석에 사용한 용매 메탄올, 아세트니트릴은 액체크로마토그래프용 (Burdick

& Jackson, USA)으로 구입하였고 물은 Milli-Q apparatus (Millipore, MA, USA)를 사용하여 3차 증류수 제조 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 사용하였다. 치자표준생약 (Gardenia fruit Reference medicinal plants materials)은 치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis로서 식품의약품안전처에서 분양받았으며 표준품은 Geniposide(Wako, Japan),

Gardenoside (TAUTO, China)를 구입하여 사용하였다. 추출에는 Ultrasonic DH.D300H(DAIHAN, Korea)를 사용하였고 TLC 촬영장치는 CAMAG REPROSTAR3(Camag, Germany)을 사용하였으며, 전기건조기는 ON-21(Sanyo, Japan), 회화로는 F48010(Thermolyne, USA)을 사용하였다. 저울은 PB303-S(Mettler-Toledo, Switzerland)를 사용하여 계량하였다. 증금속시험에 사용된 Microwave는 MARS-5(CEM, USA)이며 기기는 Optima 7300DV(Perkin Elmer, USA)와 MA-2(NIC, Japan)를 사용하였고, GC는 Agilent 6890A(USA), GC-MS는 Agilent 5973i(USA)를 사용하였다. 그리고 HPLC 프로파일링에 사용된 장비는 Agilent 1200 series(USA)의 Diode Array Detector로 구성된 HPLC system을 사용하였으며 Chemstation software를 통해 크로마토그램 data를 처리하였다. HPLC column은 Shiseido capcell pak(C18, 4.6 × 250mm, 5 μ m, Japan)과 Waters symmetry(C18, 3.9 × 150 mm, 4 μ m, USA)을 사용하였다.

3. 방법

1) 확인시험

KP11에 설정되어 있는 중크롬산칼륨액을 비교액으로 색의 비교법에 따라 시험하였고 따로 박층크로마토그래프법(TLC)은 KP11에 따라 치자표준생약을 표준품으로 하고 반점의 성분을 확인하기 위하여 geniposide, gardenoside를 표준품으로 추가하여 시험하였다.

① 색의 비교방법

분석용검체를 미리 실리카겔데시케이터에서 24 시간 건조하였다. 그 약 1 g을 달아 60 ~ 70℃의 물 100 ml를 넣고 때때로 흔들어서 섞으면서 60 ~ 70℃에서 30분간 가온한 다음 식혔다. 이 액을 여과하여 여액 1 ml에 물을 넣어 10 ml로 한 다음 비교액과 색을 비교하였다. 비교액은 중크롬산칼륨 2 mg을 달아 물에 녹여 정확하게 10 mL로 만들어 사용하였다.

② 박층크로마토그래프법(TLC)

분석용검체 1 g 및 치자표준생약을 달아 각각 메탄올 20 ml를 넣고 수욕에서 3분간 가온하고 식힌 다음 여과하여 여액을 검액 및 치자표준생약표준액으로 하였다. 검액 및 치자표준생약표준액 10 μ l씩을 박층크로마토그래프용실리카겔을 써서 만든 박층판에 점적한 다음에 아세트산에틸·메탄올 혼합액(3 : 1)을 전개용매로 하여 약 10 cm 전개한 다음 박층판을 바람에 말렸다. *p*-아니스알데히드·황산시액을 고르게 뿌린 다음 105℃에서 10 분 간 가열하였다. 추가로 검출된 반점의 성분을 확인을 위하여 표준품으로 geniposide, gardenoside를 각각 5 mg을 달아 메탄올 1mg에 녹여 표준액으로 하였다. 또한 발색할 때 자외선을 쬐어 확인하였다.

2) 순도시험

① 증금속

KP11 생약시험법의 증금속항에 따라 시험하였다. 납, 비소, 카드뮴은 분석용 검체 0.5 g을 정확하게 달아 극초단파분해법으로 분해하여 ICP-MS를 사용하여 측정하였고 수은은 분

석용 검체 100 mg을 정확하게 달아 자동수은분석기로 측정하였다.

② 잔류농약

KP11 생약시험법의 잔류농약항에 따라 시험하였다. 총디티어(p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT 및 p,p'-DDT의 합계), 디엘드린, 총비에이치씨(총BHC : α , β , γ 및 δ -BHC의 합계), 알드린, 엔드린 성분으로 분석용검체 5 g을 정확하게 달아 균질기로 분쇄하고 실리카겔카트리지를 이용하여 정제한 액을 가지고 시험하였다.

3) 건조감량

분석용 검체 약 3 g을 정밀하게 달아 KP11 생약시험법의 건조감량항에 따라 시험하였다

4) 회분

분석용 검체 약 3 g을 정밀하게 달아 KP11 생약시험법의 회분항에 따라 시험하였다

5) 엑스함량 : 묽은에탄올엑스

분석 검체 약 2.3 g을 정밀하게 달아 적당한 플라스크에 넣고 묽은에탄올 70 ml를 넣어 때때로 흔들어 섞어 5시간 침출하였다. 다시 16~20시간 방치한 다음 여과하여 플라스크 및 잔류물을 여액이 100 ml로 될 때까지 묽은에탄올로 씻었다. 여액 50 ml를 수욕에서 증발건고하고 105℃에서 4시간 건조하여 데시케이터(실리카겔)에서 식힌 다음 그 질량을 정밀하게 달아 엑스함량(%)을 산출하였다.

6) 정량법

분석용검체 약 1.0 g을 정밀하게 달아 희석시킨 메탄올(7 → 10) 50 ml를 넣고 1시간 초음파추출한 다음 여과하여 각각의 검액으로 하였다. 따로 geniposide 표준품과 gardenoside 표준품 약 1.0 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 메탄올(7 → 10)을 넣어 정확하게 1 ml로 하여 표준액으로 하고 액체크로마토그래프법으로 시험하였다. 생약제제의 성분 프로파일 설정 가이드라인²²⁾을 참고하였다. 분석조건은 Table 3,와 같다.

Table 3. HPLC Analytical Conditions

Instrument	Agilent 1100 HPLC-DAD	
Wavelength	UV 254 nm	
Column	SHISEIDO CAPCELL PAK C18 (5 μ m, 4.6 mm × 250 mm)	
Column temperature(℃)	35℃	
	A : 1% acetic acid in water B : acetonitrile · acetic acid (99 : 1)	
	Time (min)	Solution B (%)
Mobile Phase	0	10
	8	15
	20	15
	21	15
	80	90
Flow Rate	1.0 ml/min	

Ⅲ. 결 과

1. 확인시험

1) 색의 비교방법

각 시험액의 색은 노란색이고 증크롬산칼륨의 비교액의 노란색보다 연하지 않았다(Figure 2).

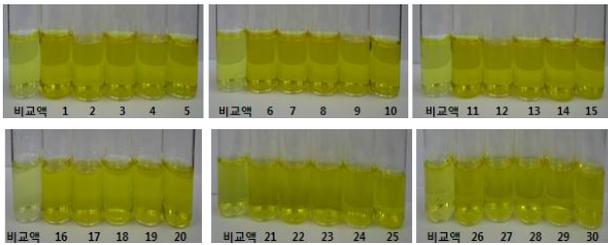


Figure 2. Comparison of colors
control solution : potassium bichromate in water,
1 ~ 15 : dried 16 ~ 30 : steamed

2) 박층크로마토그래프법(TLC)

p-아니스알데히드 · 황산시액을 발색제로 하여 시험 할 때 검액에서 얻은 여러 개의 반점은 치자표준생약표준액에서 얻은 반점과 색상 및 R_f 값이 같았고, 그 중 R_f 값 0.3 부근에서 gardenoside, R_f 값 0.5 부근에서 geniposide의 반점을 각각 확인할 수 있었다. 추가로 365 nm 파장의 자외선을 쬐었을 때보다 254 nm 파장의 자외선을 쬐었을 때 geniposide 반점을 확인할 수 있었다(Figure 3).

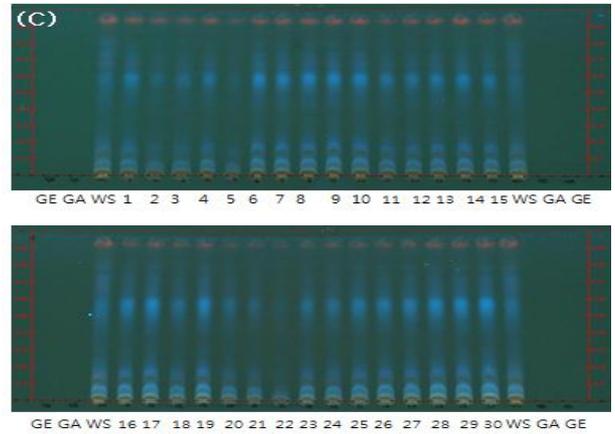
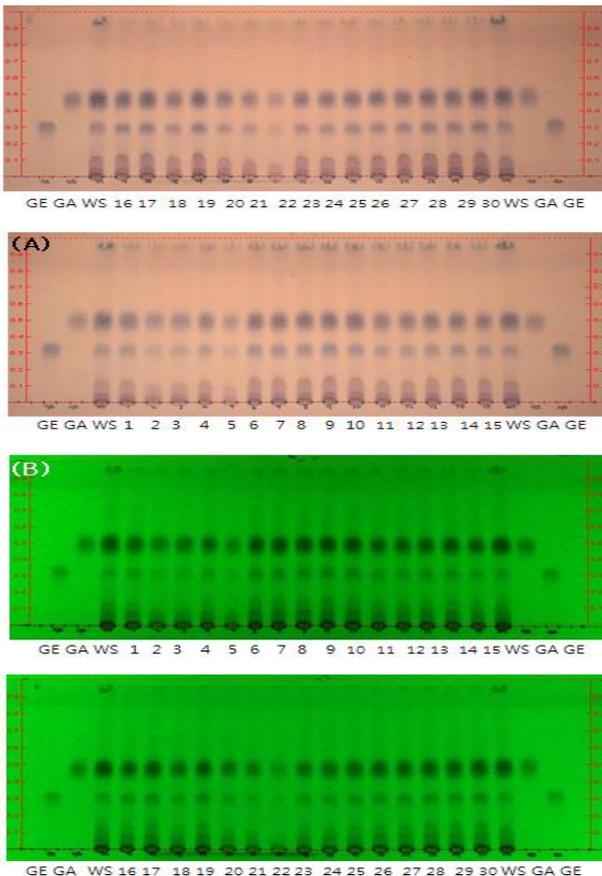


Figure 3. Thin layer chromatogram
GE : geniposide, GA : gardenoside,
WS : Gardenia Fructus reference medicinal plant materials,
1 ~ 15 : dried, 16 ~ 30 : steamed,
(A) : p-anisaldehyde-sulfuric acid TS,
(B) : UV (254 nm), (C) : UV (365 nm)

2. 순도시험

1) 중금속

KP11 규격에서 梔子の 중금속 기준은 납 5 ppm, 카드뮴 0.3 ppm, 비소 3 ppm, 수은 0.2 ppm 이하 설정되어 있으며, 시험결과 납은 0.0~0.5 ppm(0.2±0.09), 카드뮴은 0.04~0.08 ppm(0.1±0.008), 비소는 0.0~0.1 ppm(0±0), 수은은 0.00~0.02 ppm(0.0±0.01)으로 30개 시료 모두 기준 미만으로 나타났다.

2) 잔류농약

총DDT(p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT 및 p,p'-DDT의 합계) 0.1 ppm 이하, Dieldrin 0.01 ppm 이하, 총 BHC(α, β, γ 및 δ-BHC의 합계), 0.2 ppm 이하, Aldrin 0.01 ppm 이하, Endrin 0.01 ppm 이하로 규정하고 있다. 시험결과 모든 시료에서 농약 성분이 검출되지 않았다.

3. 건조감량

KP11에 설정되어 있지 않고 JP17의 규격은 13.0 % 이하, ChP2015의 경우 8.5 % 이하로 규정하고 있다. 생건은 4.47~5.69%(4.98±0.38), 증건은 5.98~6.86%(6.48±0.26), 유통품은 4.37~11.24%(7.28±1.91)로 모든 시료가 ChP2015 기준인 8.5 % 이하로 적용하면 총 45개 중 유통품 6개가 기준을 초과하는 것으로 나타났으나 JP17 기준인 13.0 %에 대해서는 모두 기준보다 낮게 나타났다. 전체 평균은 6.25 %이고 RSD가 23.52 %로 50 % 미만이었다(Figure 4).

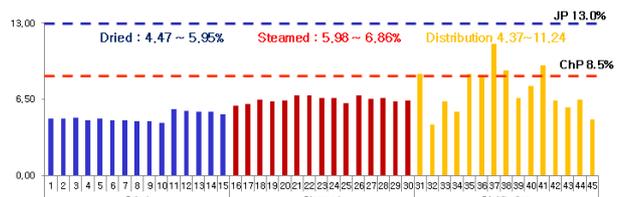


Figure 4. Results of loss on drying of Gardeniae Fructus

4. 회분

생건의 경우 4.36~4.55 % (4.45±0.07), 증건의 경우 4.48~4.87 % (4.66±0.13) 로 가공방법에 상관없이 KP11 규격인 6.0 % 미만으로 비슷한 결과값을 나타냈다(Figure 5).

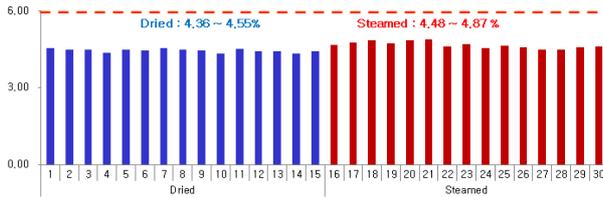


Figure 5. Results of total ash of Gardeniae Fructus

5. 엑스함량 : 묽은에탄올엑스

KP11에 설정되지 않은 항목으로 생건은 33.53~41.93% (39.36±2.37), 증건은 38.07~42.17 % (40.97±1.83)로 균일하게 나타났으나 유통품의 경우 18.34~40.35 % (33.92±6.11)로 편차가 있게 나타났다(Figure 6).

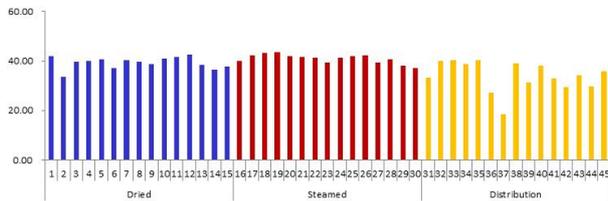


Figure 6. Contents of dilute ethanol-soluble extract of Gardeniae Fructus

6. 정량법

1) 표준품의 확인

geniposide, gardenoside 및 geniposidic acid 표준액을 가지고 설정한 분석조건(Table 3)에 따라 시험하였을 때 서로 간섭없이 분리되고 geniposidic acid, gardenoside, geniposide 순으로 유출됨을 확인하였다(Figure 7).

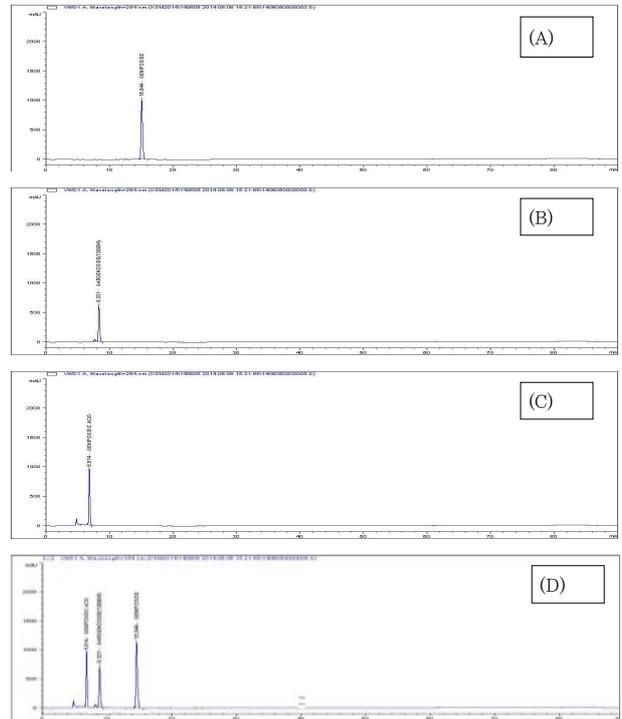


Figure 7. Chromatogram of reference standards (A) geniposide (B) gardenoside (C) geniposidic acid (D) STD mixture

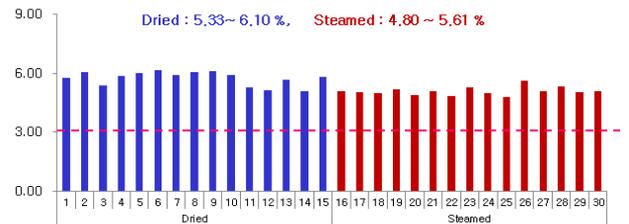
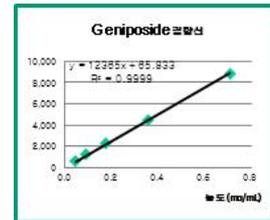


Figure 8. Calibration curve of geniposide and contents of geniposide in sample of Gardeniae Fructus

2) 지표성분의 함량(Assay)

재배품 30개 시료에 대해 지표물질인 geniposide 와 gardenoside를 표준품으로 검량선법과 액체크로마토그래프 법에 따라 시험한 결과 geniposide 함량은 생건의 경우 5.33 ~6.10 % (5.74±0.35), 증건의 경우 4.80~5.61 % (5.09±0.20)로 지역별, 건조방법별 차이가 없었으며 KP11 규격 3.0 %보다 모두 높게 나타났다(Figure 8).2)

KP11 개정¹⁹⁾ 으로 gardenoside 함량이 삭제되었으며 모니터링 결과 생건은 1.00~1.83 % (1.51±0.32)이고 고흥지역(1~10)이 남해지역(11~15)보다 함량이 높게 나타났다. 증건은 0.45~0.78 % (0.57±0.09)로 지역간 차이 없이 낮게 검출되었다(Figure 9). 차자열매를 찌서 말리는 방법으로 건조한 것이 그대로 건조한 차자보다 gardenoside 함량이 감소됨을 알 수 있었다. 건조방법에 따라 함량의 차이가 크게 나타남을 알 수 있었다.

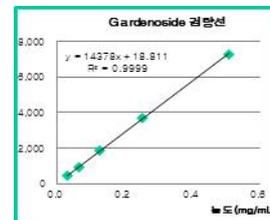


Figure 9. Calibration curve of gardenoside and contents of gardenoside in sample of Gardeniae Fructus

3) 표준크로마토그램 제시 및 평가

분석조건에 따라 80분 동안 분석하였을 때 생건, 증건 모두에서 20분안에 geniposidic acid, gardenoside, geniposide로 피크가 유출되었다. 표준크로마토그램은 30분까지의 크로마토그램을 확대하여 제시하였다(Figure 10). 생건, 증건 30개 크로마토그램에서 주피크 6개의 유지시간(RT)과 상대유지시간(RRT)를 비교하였더니 표준편차와 상대표준편차가 1% 이하로 확인되었다(Table 4). 또한 크로마토그램을 건조방법별 중첩하여 확인한 결과 품목간의 패턴 차이없이 피크들이 반복적으로 검출됨을 알 수 있다(Figure 11).

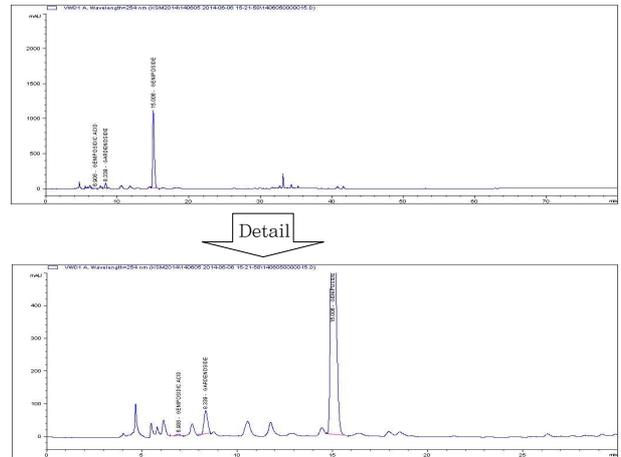


Figure 10. Chromatogram of Gardeniae Fructus(up) and enlargement of Gardeniae Fructus(down)

Table 4. Repeatability of RT and RRT of Gardeniae Fructus

RT	Dried						RT	Steamed					
	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6		Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6
1	8,739	10,980	15,726	36,399	36,901	38,666	16	8,788	11,021	15,825	36,416	36,982	38,763
2	8,704	10,943	15,686	36,362	36,893	38,662	17	8,780	11,069	15,835	36,479	37,044	38,801
3	8,779	11,008	15,759	36,431	36,952	38,722	18	8,841	11,093	15,879	36,475	37,050	38,811
4	8,695	10,983	15,737	36,416	36,955	38,722	19	8,750	11,073	15,871	36,427	36,997	38,769
5	8,794	11,080	15,878	36,450	37,005	38,767	20	8,853	11,116	15,883	36,495	37,063	38,822
6	8,860	11,134	15,877	36,477	37,026	38,792	21	8,735	11,022	15,843	37,030	37,939	38,795
7	8,788	11,047	15,869	36,484	37,030	38,804	22	8,750	11,050	15,845	36,424	37,009	38,783
8	8,738	11,078	15,942	36,478	37,025	38,782	23	8,760	11,034	15,812	36,438	37,016	38,786
9	8,802	11,090	15,892	36,504	37,057	38,815	24	8,739	11,081	15,861	36,433	37,021	38,790
10	8,820	11,018	15,748	36,430	36,978	38,735	25	8,772	11,064	15,838	36,431	37,007	38,784
11	8,788	11,019	15,760	36,398	36,975	38,756	26	8,888	11,076	15,841	36,452	37,067	38,841
12	8,762	10,983	15,711	36,393	36,966	38,753	27	8,910	11,097	15,839	36,442	37,074	38,853
13	8,810	11,033	15,764	36,432	37,011	38,794	28	8,912	11,117	15,893	36,443	37,079	38,856
14	8,766	11,019	15,786	36,429	37,025	38,811	29	8,911	11,106	15,867	36,469	37,101	38,879
15	8,755	11,021	15,775	36,419	37,009	38,800	30	8,903	11,089	15,870	36,486	37,108	38,886
AVG	8,77	11,03	15,79	36,43	36,99	38,76	AVG	8,82	11,07	15,85	36,49	37,10	38,81
SD	0,04	0,05	0,08	0,04	0,05	0,05	SD	0,07	0,03	0,02	0,15	0,23	0,04
RSD	0,50	0,45	0,49	0,11	0,13	0,13	RSD	0,80	0,28	0,15	0,42	0,63	0,10
RT	Dried						RT	Steamed					
	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6		Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6
1	0,556	0,698	1,000	2,315	2,346	2,459	16	0,555	0,696	1,000	2,301	2,337	2,449
2	0,555	0,698	1,000	2,318	2,352	2,465	17	0,554	0,699	1,000	2,304	2,339	2,450
3	0,557	0,699	1,000	2,312	2,345	2,457	18	0,557	0,699	1,000	2,297	2,333	2,444
4	0,553	0,698	1,000	2,314	2,348	2,461	19	0,551	0,698	1,000	2,295	2,331	2,443
5	0,554	0,698	1,000	2,296	2,331	2,442	20	0,557	0,700	1,000	2,298	2,334	2,444
6	0,558	0,701	1,000	2,297	2,332	2,443	21	0,551	0,696	1,000	2,337	2,395	2,449
7	0,554	0,696	1,000	2,299	2,333	2,445	22	0,552	0,697	1,000	2,299	2,336	2,448
8	0,548	0,695	1,000	2,288	2,322	2,433	23	0,554	0,698	1,000	2,304	2,341	2,453
9	0,554	0,698	1,000	2,297	2,332	2,442	24	0,551	0,699	1,000	2,297	2,334	2,446
10	0,560	0,700	1,000	2,313	2,348	2,460	25	0,554	0,699	1,000	2,300	2,337	2,449
11	0,558	0,699	1,000	2,310	2,346	2,459	26	0,561	0,699	1,000	2,301	2,340	2,452
12	0,558	0,699	1,000	2,316	2,353	2,467	27	0,563	0,701	1,000	2,301	2,341	2,453
13	0,559	0,700	1,000	2,311	2,348	2,461	28	0,561	0,699	1,000	2,293	2,333	2,445
14	0,555	0,698	1,000	2,308	2,345	2,459	29	0,562	0,700	1,000	2,298	2,338	2,450
15	0,555	0,699	1,000	2,309	2,346	2,460	30	0,561	0,699	1,000	2,299	2,338	2,450
AVG	0,56	0,70	1,00	2,31	2,34	2,45	AVG	0,56	0,70	1,00	2,30	2,34	2,45
SD	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	SD	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00
RSD	0,53	0,22	0,00	0,39	0,39	0,42	RSD	0,78	0,20	0,00	0,44	0,66	0,13

RT: Retention time RRT: Related Retention time, Peak 1 : gardenoside, Peak 3 : geniposide, Peak 2 , Peak 4-Peak 6 : unknown

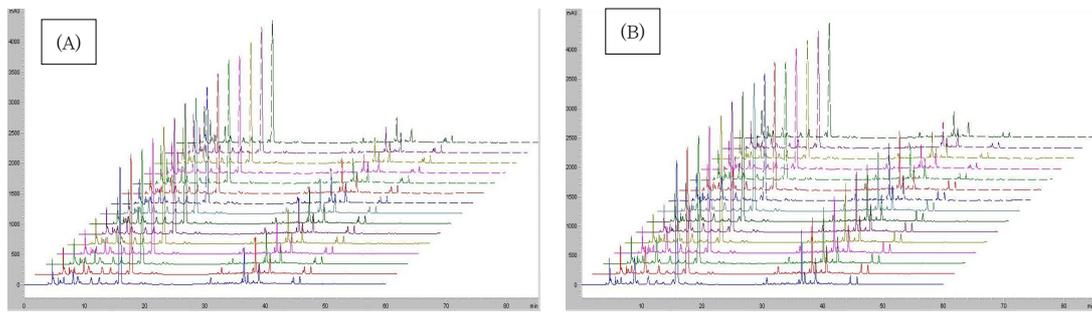


Figure 11. Repeatability of chromatogram of Gardeniae Fructus (UV 254nm) (A) dried, (B) steamed

IV. 고찰

KP11에 설정되어 있는 梔子の 확인시험 ① 색의 비교방법은 중크롬산칼륨액을 비교액으로 하여 크로신 색소를 확인하는 것으로 생건, 증건시료 모두 비교액보다 진한 노란색을 나타내어 차이가 없었으며 박층크로마토그래프법에 따른 확인시험 ② 박층크로마토그래프법(TLC)은 식약처에서 분양받은 치자 표준생약, 그대로 건조한 생건과 찌서 말린 증건 시료를 가지고 gardenoside 표준품 및 geniposide 표준품과 비교 시험한 결과 검액에서 얻은 반점은 치자표준생약표준액에서 얻은 반점과 색상 및 R_f 값이 같고, 그 중 R_f 값 0.3 부근에서 gardenoside 및 R_f 값 0.5 부근에서 geniposide 의 반점임을 각각 확인할 수 있었다. 중금속 시험결과 납, 비소, 카드뮴 및 수은의 오염도는 매우 낮은 것으로 나타났으며 잔류농약 시험결과 KP11에서 규정하고 있는 총DDT등이 검출되지 않았다. 회분시험결과 4.46~4.87 %로 건조방법의 구분없이 KP11 규격기준인 6.0 %를 만족하였다. 정량법 시험결과 geniposide 함량은 생건의 경우 5.33~6.10 %(5.74±0.35), 증건의 경우 4.80~5.61 %(5.09±0.20)로 지역별, 건조방법별 차이가 없었으며 KP11 규격 3.0 %보다 모두 높게 나타났다 gardenoside 함량은 생건은 1.00~1.83 %(1.51±0.32)로 나타났고 고흥지역이 남해지역보다 함량이 높게 나타났다. 증건은 0.45~0.78 %(0.57±0.09)로 지역간 차이 없이 낮게 검출되었다. 치자열매를 찌서 말리는 방법으로 건조한 것이 그대로 건조한 치자보다 gardenoside 함량이 감소됨을 알 수 있었다.

KP11 미설정규격인 건조감량의 경우 생건은 4.47~5.69 %(4.98±0.38), 증건은 5.98~6.86 %(6.48±0.26), 유통품은 4.37~11.24 %(7.28±1.91)로 모든 시료가 ChP2015 기준인 8.5 % 이하로 적용하면 총 45개 중 유통품 6개가 기준을 초과하는 것으로 나타났으나 JP17 기준인 13.0 %에 대해서는 모두 기준보다 낮게 나타났다. 통계처리 결과값과 JP17의 기준을 참고로 하여 건조감량을 13.0 % 이하로 신규 설정을 제안하고자 한다. 엑스함량의 경우 생건은 33.53~41.93 %(39.36±2.37), 증건은 38.07~42.17 %(40.97±1.83)로 균일하게 나타났으나 유통품의 경우 18.34~40.35 %(33.92±6.11)로 편차가 있게 나타났다. 정량법이 설정되어 있으므로 현행과 같이 설정하지 않음이 바람직하다고 사료된다.

V. 결론

국내산 재배 梔子を 주산지 2개 지역에서 수집하여 건조방법을 생건과 증건으로 구별하여 30개에 대해 KP11 설정 규격인 확인시험, 중금속, 잔류농약, 회분 및 정량법 항목과 미설정 규격인 건조감량, 엑스함량 및 HPLC 표준크로마토그램 검토한 결과와 국내에 유통되는 규격품 15개에 대해 KP11 미설정 규격인 건조감량과 엑스함량을 함께 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 확인시험중 정성시험을 통해 크로신 색소를 확인하는 것으로 모든 시료가 중크롬산칼륨 비교액보다 진한 노란색을 나타냈으며, 박층크로마토그래프법에 따라 실시하여 그대로 건조한 것과 찌서 말린 치자에서 R_f 값 0.3 부근에서 gardenoside 및 R_f 값 0.5 부근에서 geniposide 의 반점임을 각각 확인할 수 있었다.
2. 순도시험중 중금속의 경우 납은 0.0~0.5 ppm(0.2±0.09), 카드뮴은 0.04~0.08 ppm(0.1±0.008), 비소는 0.0~0.1 ppm(0±0), 수은은 0.00~0.02 ppm(0.0±0.007)으로 30개 시료 모두 기준 미만으로 나타났다. 잔류농약의 경우 총 DDT(p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT 및 p,p'-DDT의 합계), Dieldrin, 총 BHC (α , β , γ 및 δ -BHC의 합계), Aldrin, Endrin 농약 성분이 검출되지 않았다.
3. 건조감량의 경우 생건은 4.47~5.69 %(4.98±0.38), 증건은 5.98~6.86 %(6.48±0.26), 유통품은 4.37~11.24 %(7.28±1.91)로 나타났다.
4. 회분의 경우 생건은 4.36~4.55 %(4.45±0.07), 증건은 4.48~4.87%(4.66±0.13)로 가공방법에 상관없이 KP11 규격인 6.0 % 미만으로 비슷한 결과값을 나타냈다.
5. 엑스함량중 묽은에탄올엑스함량의 경우 33.53~41.93 %(39.36±2.37), 증건은 38.07~42.17 %(40.97±1.83)로 균일하게 나타났으나 유통품의 경우 18.34~40.35 %(33.92±6.11)로 편차가 있게 나타났다.
6. 정량법 시험결과 geniposide 함량은 생건의 경우 5.33~6.10 %(5.74±0.35), 증건은 4.80~5.61 %(5.09±0.20)

로 지역별, 건조방법별 차이가 없었으며 KP11 규격 3.0 %보다 모두 높게 나타났다. 참고로 gardenoside 함량은 생건은 1.00~1.83 %(1.51±0.32), 증건은 0.45~0.78 %(0.57±0.09)로 건조방법에 따라 함량의 차이가 크게 나타났다.

7. 치자의 HPLC 표준크로마토그램은 geniposidic acid, gardenoside 및 geniposide 성분에 해당하는 peak가 각각 7.0 min, 8.7 min, 15.7 min에서 서로 간섭없이 관측되었으며 생건, 증건 30개 크로마토그램에서 주피크 6개의 유지시간(RT)과 상대유지시간(RRT)를 비교하였더니 표준편차와 상대표준편차가 1% 이하로 확인되었다. 건조방법별 각각 15개의 크로마토그램을 중첩한 결과 유사하게 나타남을 확인하였다.

국내에서 재배하고 있고 치자열매를 수집하여 공정서의 가공방법에 따라 가공한 梔子에 대한 현행 공정서인 KP11의 규격 및 미설정 규격을 모니터링하고 JP, ChP의 규격 기준과 비교 검토한 자료이고 유통품 梔子에 대해 KP11 미설정 규격을 모니터링한 결과와 표준크로마토그램 연구 결과는 梔子の 품질관리의 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, The Korean Pharmacopoeia, 11th ed. The Society of Official Compendium for Public Health, 2015 : 1876-1877.
2. The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japanese Pharmacopoeia, 17th ed. English Ver, 2016 : 1854, Available from : URL : <http://jpdn.nihs.go.jp/jp17e>
3. Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the people's republic of China, People's Medical Publishing House, 2015 : Vol, 1 : 248.
4. Woo JH, Seo SH, Kim JW, Hong SW, Kim KH, Kim SK, Lee YJ, Ryong JY, Do JH, Kim JB, Choi HM, Yoo YJ, Hong SO, Jeong WT, Kwon TH, The Korean Pharmacopoeia 2nd Applicational Commentary, Moon seong sa, 1975 : Part 1 : 249
5. Lee YS, Lee YM, Kim DI, Cho SH, Chun SM, Park HK, Lee HJ, Investigation of DPPH Radical Scavenging and Prolyl Endopeptidase Inhibitory Activities of Plant Extracts, Korean J. Community Living Science, 2005 ; 16(4) : 95-102.
6. Yang HJ, Lee HS, Park MJ, Antimedication Activities and Components of Gardenia jasminoides, Korean J. Food Sci. Technol, 2011 ; 43(1) : 51-57.
7. Shon DH, Chio DW, Kim MH, Improvement of Anti-Inflammation Activity of Gardeniae Fructus Extract by the Treatment of β -Glucosidase, Korean J. Food Sci. Technol, 2012 ; 44(3) : 331-336.
8. Kim ST, Lee JC, Lee BK, Lee KS, Lyu JH, Lee YC, Comparison of Geniposide quantification and antioxidant effect among the various parts of Gardeniae Fructus, Kor. J. Herbology, 2013 ; 28(4) : 17-23.
9. KIST, Gardeniae Fructus Extract and Compounds Isolated Therefrom and their use, 2003 : KOREA patent A61K31/70 : 1020030036482.
10. Jeong HY, Aging Free radial Arteriosclerosis, Life Science, 1991 ; 1(1) : 2-14.
11. Choe SY, Yang KH, Toxicological Studies of Antioxidants, Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Butylated Hydroxyanisole(BHA), Korean J. Food Sci. Technol, 1982 ; 14(3) : 283-288.
12. Yamauchi K, Sakuragi R, Kuwano S, Inouye H, Biological and Chemical Assay of Geniposide, a New Laxative in the Fruit of Gardenia, Plant Med, 1974 ; 25(3) : 219-225.
13. Kim GW, Chung MH, Protective Effects of Geniposide and Extract of Korean Gardeniae Fructus-On Hepatic Injury Induced by Toxic Drugs in Rats, Korean Journal of Pharmacognosy, 1994 ; Vol,1 : 368-381
14. Kimura Y, Okuda H, and Arichi S, Effects of Geniposide isolated from Gardenia Jasminoides on Metabolic Alterations in High Sugar Diet-fed Rats, Chem. Pharm. Bull, 1982 ; 30(12) : 4444-4447.
15. Nishizawa M, Izuhara R, Kaneko K, and Fujimoto Yasuo, 3-Caffeoyl-4-Sinapoylquinic acid, A Novel Lipooxygenase Inhibitor from Gardeniae Fructus, Chem. Pharm. Bull, 1987 ; 35(5) : 2133-2135.
16. Cho SS, Soung SH, Kim BH, The Dye ability properties of some yellow Natural Dyes(I) - Extracted from Gardenia-, J. of the Korean Soc. of Dyers and Finishers, 1998 ; 10(1) : 1-10.
17. Ko HR, Study on the Dye ability of Cotton Fabrics Dyed with Natural Gardenia Blue Powder, Textile Coloration and Finishing, 2011 ; 23(1) : 21-27.
18. Shin HJ, A Trend in Research and Development of Natural Gardenia Pigments, Korean J. Biotechnol, Bioeng, 2007 ; 22(5) : 271-277.
19. Oh HJ, The Dye ability, Antibacterial Activity and Deodorization of Gardenia, Family and Environment Research, 2002 ; 40(11) : 131-140.
20. Korea Association of Official Compendium for Public Health, Korea Food and Drug Administration, The Korean Pharmacopoeia 9th ed, 2010 : 979-980.
21. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, The Korean Pharmacopoeia 11th ed, Revision, 2016 : No 2016-147 : 20-21.
22. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Guideline for chemical profiling of herbal medicinal product, 2010.