

市販 生藥 液劑類中的 保存劑 含量

林 鍾 弼

全州 又石大學 藥學科

Liquid Chromatographic Determination of Preservatives in Commercial Herb Liquid Preparations

Jong Pil Lim

Department of Pharmacy, Jeonju Woo-Suk University, Jeonju 520-75, Korea

Abstract—The preservatives in 32 commercial liquid preparations of crude drugs have been analyzed by using high performance liquid chromatography. Benzoic acid (BA) and *p*-hydroxybenzoates were separated with mobile phase of MeOH-H₂O (70:30) (pH 7.0) at a flow rate of 0.9ml/min. BA, sorbic acid and dehydroacetic acid were separated with mobile phase of MeOH-H₂O (40:60) (pH 4.5) at a same flow rate. In addition, the pH values of the preparations were investigated. It was found that BA was used in most of the preparations.

Keywords—Preservatives · liquid preparations · crude drugs · HPLC

最近 生藥에 대한 關心이 높아지면서 生藥製劑 開發에 많은 研究가 이루어지고 있다. 그 중에서도 가장 關心을 끌고 있는 것 중의 하나는 生藥 液劑類이다. 이것은 우선 利用者들로 하여금 끓여서 湯으로 만드는 번거로움이나 服藥을 위하여 따로 飲料水를 준비하지 않고서도 바로 投藥이 가능하기 때문이다. 그러나 이러한 便利한 점 대신 生藥 液劑類는 溫度, 液性, 기타 保存條件에 따라 微生物의 汚染에 의하여 變質하기 쉬운 短點이 있는 것이다. 이러한 生藥 液劑類는 製造 過程 및 分割 投與時 細菌 및 眞菌의 增殖으로 變質되기 쉬우므로 이를 防止하기 위하여 製造 過程에서 保存劑를 添加하게 되어 保存劑의 過量使用 및 濫用의 憂慮가 생기게 되었다.

保存劑의 過量使用으로 인한 急性毒性으로는 惡心, 嘔吐, 腹痛, 下痢 등의 消化管 障礙 및 運動失調症, 痲痺, 우울증 등이 報告되고 있으

며¹⁻³⁾, 또한 長期服用으로 인한 慢性疾患으로는 肝肥大, 細胞變化, 成長抑制 등이 報告되고 있다.⁴⁾

Nishimoto 등⁵⁾은 食品에서의 添加物 使用問題를 重視하고 數種의 保存劑에 대하여 分離方法을 檢討하였고, Clarke 등⁶⁾은 肉類製品에 添加된 benzoic acid含量을 測定하였으며, Coelho 등⁷⁾은 肉類에 添加된 benzoic acid 및 *p*-hydroxybenzoates의 가스크로마토그래프法에 의한 分離定量法을 研究하여 報告한 바 있다. 最近 Junge 등⁸⁾은 強心利尿劑인 theophylline製劑에 添加된 *p*-hydroxybenzoates를 高速液體크로마토그래프法을 利用하여 分離定量하는데 成功하였다.

또한 白 등⁹⁾은 가스·크로마토그래프법을 이용하여 液劑 醫藥品의 保存劑 含量을 비교 조사하여 보고한바 있다.

이와 같이 部分的인 保存劑 定量 報文은 상당히 있으나 醫藥品에 많이 쓰이는 7種의 保存劑

를 同時 定量한 報文은 아직 없었다. 著者는 生藥製劑中 微生物 汚染이 가장 쉬운 液劑類에서 保存劑 使用 現況을 觀察하고 그 防腐效果를 檢討하기 위하여 高速液體 크로마토그래프法을 利用하여 醫藥品에 주로 使用되는 7種의 保存劑에 대한 分離定量實驗을 實施한 結果, 몇가지 知見을 얻게 되어 이를 報告하고자 한다.

實驗 方法

1. 實驗材料

本 實驗에 使用한 材料로는 生藥 液劑類로서 市中 藥局에서 出庫 1年 以內의 製品을 購入, 精選하여 液劑, 시럽劑, 현탁劑 등 모두 32種을 使用하였다.

2. 試藥 및 機器

本 實驗에 使用한 試藥으로서는 benzoic acid (BA), methyl *p*-hydroxybenzoate(MP), ethyl *p*-hydroxybenzoate (EP), propyl *p*-hydroxybenzoate(PP), butyl *p*-hydroxybenzoate(BP), sorbic acid(SoA), dehydroacetic acid(DHA) (Tokyo Kasei Chem. Co., Japan) 등 7種을 標準品으로 使用하였으며, 分析溶媒로는 CH_3CN , EtOH (E. Merck Co., Germany), 抽出溶媒로는 Et_2O , CHCl_3 (E. Merck Co., Germany)을 使用하였다.

使用機器로는 Ultraviolet Spectrophotometer (Shimazu Co., Model UV-250, Japan), High Performance Liquid Chromatography(Water's Co., Model 244, U.S.A.), pH Meter(Fisher Scientific Co., Model 600, U.S.A.)이었다.

3. 標準溶液의 調製

BA標準品 50mg을 精密히 취하여 EtOH에 녹여 全量 100ml(0.05w/v%)로 한다. 以下 같은 方法으로 하여 MP, EP, PP, BP, SoA는 0.01%로, DHA는 0.1% EtOH溶液으로 만들어 使用하였다.

4. 試料溶液의 調製

試料는 市販 生藥 液劑類를 대상으로 漢方 湯劑類, 人參 強壯劑類, 消化 液劑類, 鎮咳 祛痰劑類 등으로 分類하여 實驗하였다.

먼저 試料를 각각 10ml씩 취하고 dil. HCl 2ml

를 加하여 酸性으로 한후 Et_2O 20ml씩으로 2回 抽出하고 Et_2O 층을 취하여 水浴上(50°C 以內)에서 증발건고시킨 다음 EtOH 10ml에 溶解한 후 0.5 μm FH type organic millipore로 여과하여 使用하였고, 현탁劑는 抽出溶媒로서 CHCl_3 를 使用하였으며 기타 조작은 液劑와 同一하게 하였다.

5. HPLC分析條件

BA, MP, EP, PP, BP, SoA 및 DHA를 각각 25mg/l의 농도로 EtOH에 溶解하여 UV spectrophotometer로 220~300nm의 吸光度를 測定한 結果 BA는 272nm, *p*-hydroxybenzoates는 256nm, SoA는 252nm, DHA는 290nm에서 最大흡수를 보였으므로 Detector는 254nm의 filter를 使用하였다(Fig. 1).

HPLC分離條件은 reverse phase chromatography의 原理를 利用하여 column, solvent, flow rate, pH 등을 여러가지로 변경하면서 BA 및 *p*-hydroxybenzoates의 分離를 위한 1차 分離에서는 4가지, BA, SoA 및 DHA의 分離를 위한 2차 分離에서도 4가지 分析方法을 施行하여 그 중 最適條件은 column을 μ -Bondapak C_{18} , 용매는 MeOH:H₂O(70:30) (pH 7.0)이나 (40:60) (pH 4.5) flow rate는 0.9ml/min.임을 알았다.

6. 檢量線 作成

BA, MP, EP, PP, BP, SoA 및 DHA의 20, 40, 60, 80, 100mg/ml의 EtOH標準溶液을 各各 만들어 2 μl 씩을 HPLC에 注入 하였을 때 나타난 peak 면적과 注入한 농도와 關係를 구하여 檢量線을 作成하였다.

7. 回收率

HPLC 操作上의 誤差를 確認하기 위하여 檢

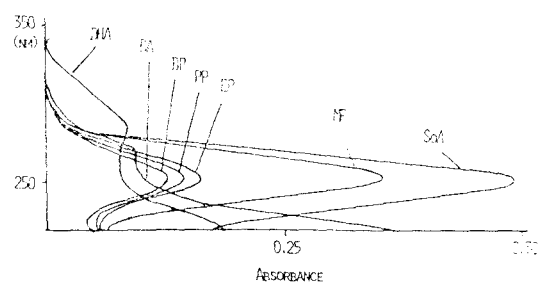


Fig. 1. Ultra-violet spectra of 7 preservatives by spectrophotometer.

劑, 시럽劑, 현탁劑에서 1種씩 택하고 BA는 5 mg, MP, EP, PP, BP, SoA는 각 1mg씩, DHA는 10mg을 精密히 취하여 試料 10ml에 加하여 준 다음 試料溶液 調製方法에 따라 만든 試液을 HPLC에 2 μ 씩 注入하여 追加한 量과 回收한 量을 比較 檢討하였다.

結果 및 考察

1. HPLC分析條件

가장 빈번히 使用되는 BA 및 *p*-hydroxybenzoates의 分離를 위한 1차 分離에서는 Radus 等¹⁰⁾의 方法에 따라 移動相으로서 CH₃CN-H₂O (30:70) (pH 7.0)의 混合溶媒와 固定相으로서 μ -Bondapak C₁₈(4mm \times 30cm)을 使用했을때 HPLC에 試料注入후 2.92분에 용매인 EtOH peak가 나타났고 BA peak가 4.95분에 나타났으나 *p*-hydroxybenzoates는 分離되지 않고 9.12분에 單一 peak를 나타냈다(Fig. 2-A).

Nelson¹¹⁾의 方法에 따라 Sod. borate 및 sod. nitrate 等の 원충액을 移動相에 追加한 結果 溶媒 自體의 吸光度가 0.2 以上の 높은 수치를 나타냄으로써 base line이 不安定하였다. 移動相은 그대로 유지하고 固定相을 Radial PAK CN (5mm \times 10cm)으로 교체한 結果 *p*-hydroxybenzoates가 分離되어 MP가 4.90分, EP가 5.90分, PP가 7.45分, BP가 9.75분에 各各 peak를 나타냈으나 peak가 비교적 넓게 나타남으로써 retention time이 길고 peak分離가 完全하지 못하였다(Fig. 2-B).

移動相을 MeOH-H₂O(70:30)混合溶媒로 교체하고 固定相을 그대로 유지시켰을 때 BA의 peak

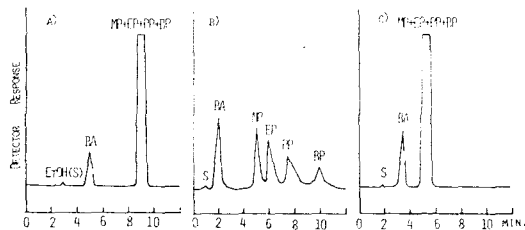


Fig. 2. HPLC chromatograms of the standard preservative mixtures by various methods in the 1st separation.

가 3.40분에 나타났고 *p*-hydroxybenzoates가 5.15분에 單一 peak로 나타나 Fig. 2-A와 거의 同一한 양상을 보여 주었다(Fig. 2-C).

移動相을 MeOH-H₂O(70:30) 混合溶媒로 유지하면서 固定相을 다시 μ -Bondapak C₁₈로 교체한 結果(Method 1) BA peak가 1.93分, MP가 3.98分, EP가 4.56分, PP가 5.55分, BP가 7.18분에 各各 나타나서 BA capacity factor가 1.84이고 BP의 capacity factor가 6.84로써 가장 양호한 分離樣相을 보여 주었다(Fig. 3).

이 方法에 의한 1차 分離中 SoA나 DHA가 함께 존재할 경우 BA와 peak가 完全히 分離가 되지 않고 높은 單一 peak를 나타내거나 끝만 약간 갈라진 peak가 나타난다(Fig. 4-D).

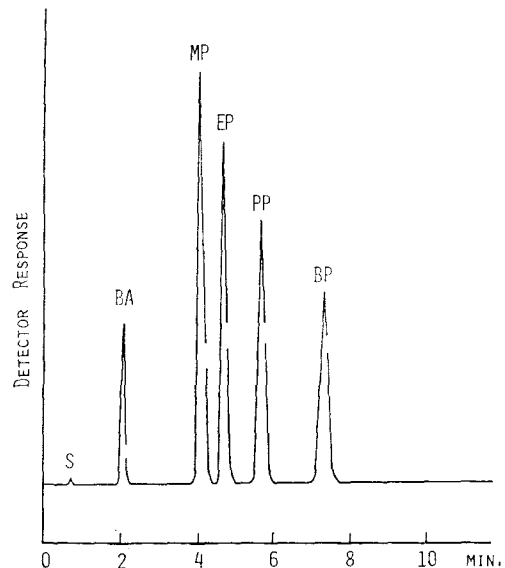


Fig. 3. HPLC chromatogram of the standard preservative mixtures by method 1 in the 1st separation.

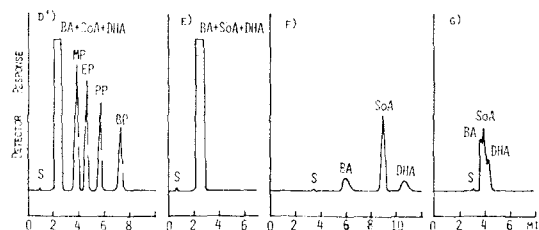


Fig. 4. HPLC chromatograms of the standard preservative mixtures by various methods in the 2nd separation.

따라서 BA, SoA 및 DHA의 分離를 위한 2차 分離에서는 適正條件을 찾기 위해 移動相으로서 MeOH-H₂O(30:70) (pH 7.0) 混合溶媒를 사용하고 固定相으로 μ -Bondapak C₁₈을 사용했을때 HPLC에 試料注入後 0.74분에 EtOH peak가 나타났고 BA, SoA 및 DHA가 2.25분에 單一 peak로 나타났다(Fig. 4-E).

移動相은 MeOH-H₂O(30:70)에서 pH만 4.5로 바꾼 결과 BA는 5.95分, SoA는 8.95分, DHA는 10.65분에 각기 peak가 나타나 分離는 잘 되나 retention time이 너무 길었다(Fig. 4-F).

移動相을 MeOH-H₂O(70:30)으로 한 결과 BA가 3.75分, SoA는 3.95分, DHA는 4.17분에 각기 peak가 나타나 分離가 良好하지 못하였다(Fig. 4-G).

移動相을 MeOH-H₂O(40:60) (pH 4.5)으로 한 결과(Method 2) EtOH peak가 3.55분에 나타났고, BA는 5.32分, SoA는 6.05分, DHA는 6.55분에 각각 peak가 나타났으며 BA의 capacity factor가 1.50, DHA의 capacity factor는 1.85로서 良好한 分離를 이루었다(Fig. 5).

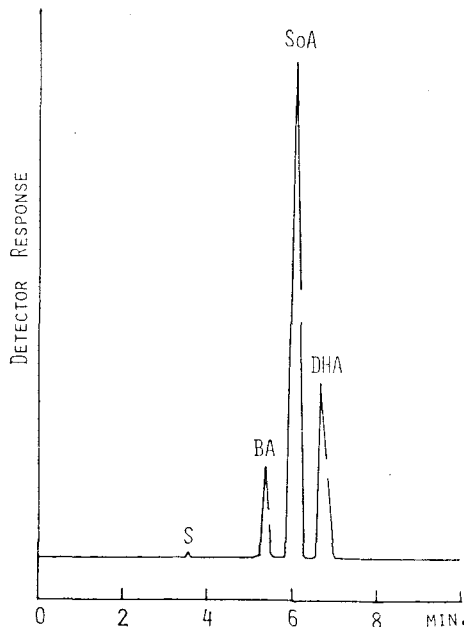


Fig. 5. HPLC chromatogram of the standard preservative mixtures by method 2 in the 2nd separation.

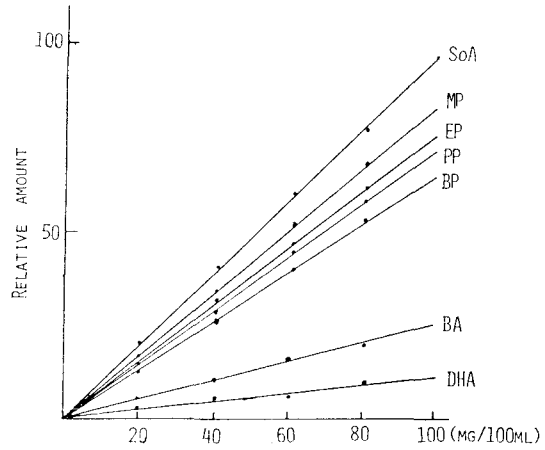


Fig. 6. Calibration curve of each standard by HPLC.

2. 檢量線

Method 1 및 Method 2에 따라 各 保存劑의 標準溶液을 2 μ 씩 注入하여 檢量線을 作成한 結果 10mg~100mg/100ml농도 (EtOH용액)에서 7種 모두 1직선을 이루었으며 SoA에서 relative amount 98.6으로 가장 높은 수치를 나타냈고 MP, EP, PP, BP, BA순으로 낮아졌으며 DHA는 11.6으로 가장 낮은 수치를 나타냈다(Fig. 6).

3. 回收率

液劑, 시럽劑, 현탁劑中에서 各各 1種씩을 택하여 回收率을 調査한 結果 모두 96.5% 以上으로 모두 良好한 成績을 보여 주었으며 제형별로는 液劑쪽이 시럽劑나 현탁劑보다 良好한 回收率을 보였다. 특히 현탁劑에서는 Et₂O보다는 CHCl₃쪽에서 成分抽出이 良好하였다(Table I).

4. 保存劑 含量

藥品의 保存劑에 對하여는 「國立保健院 例規」(第217號, 第3條, 第一項, 第二號; 醫藥品用防腐劑 및 그 使用範圍; 1983. 4. 23 改正)에 그 使用範圍가 明示되어 있다.

上記 「國立保健院 例規」에 따라 그 使用範圍를 살펴보면 BA는 有效濃度 0.1%이하 (pH 5 이하), *p*-hydroxybenzoates는 有效濃度 0.1% 이하(pH 3~7), SoA는 有效濃度 0.2%(pH 5 이하), DHA는 0.1~0.05%(pH 5 이하)로 規定되어 있으며 2種 이상의 保存劑를 配合하는 경우에는 제형별 단일성분 최대량을 초과할 수 없도

Table I. Recovery test of preservatives by HPLC

No.	Preservatives	Solution	Syrup	Suspension	Mean±SD(%)	
1	BA	Added(mg)	5.00	5.00	5.00	98.7±0.6
		Found(mg)	4.96	4.94	4.90	
		Recovery(%)	99.2	98.8	98.0	
2	MP	Added(mg)	1.00	1.00	1.00	98.7±3.1
		Found(mg)	1.02	0.96	0.98	
		Recovery(%)	102.0	96.0	98.0	
3	EP	Added(mg)	1.00	1.00	1.00	98.0±2.0
		Found(mg)	1.00	0.98	0.96	
		Recovery(%)	100.0	98.0	96.0	
4	PP	Added(mg)	1.00	1.00	1.00	96.7±1.2
		Found(mg)	0.98	0.96	0.96	
		Recovery(%)	98.0	96.0	96.0	
5	BP	Added(mg)	1.00	1.00	1.00	98.7±3.1
		Found(mg)	1.02	0.98	0.96	
		Recovery(%)	102.0	98.0	96.0	
6	SoA	Added(mg)	1.00	1.00	1.00	96.7±1.2
		Found(mg)	0.98	0.96	0.96	
		Recovery(%)	98.0	96.0	96.0	
7	DHA	Added(mg)	10.00	10.00	10.00	96.7±1.1
		Found(mg)	9.79	9.62	9.58	
		Recovery(%)	97.9	96.2	95.8	
Recovery : Mean±SD(%)		99.6±1.8	97.0±1.2	96.5±1.0		

Table II. Contents of the preservatives in various type of liquid herb preparations

Preparation type	Sample No.	Main ingredient	Manuf.	pH of sample	Contents of preservative (%)							Remarks
					BA	MP	EP	PP	BP	SoA	DHA	
Herb liquid "tang"	1	Ex. Paconiae	A	4.4	0.068	—	—	—	—	—	—	—
	2	Ex. Paconiae	B	5.0	0.165	—	—	—	—	—	—	—
	3	Ex. Paconiae	C	4.0	0.130	—	—	—	—	0.039	—	—
	4	Ex. Paconiae	D	4.1	0.124	—	—	—	—	0.152	—	—
	5	Ex. Paconiae	E	4.2	0.032	—	—	—	—	—	—	—
	6	Ex. Puerariae	F	5.1	0.042	0.071	—	—	—	—	—	—
Ginseng tonic drink	1	Ex. Ginseng	A	3.2	+	—	—	—	—	—	—	—
	2	Ex. Ginseng	B	3.5	0.048	0.035	—	—	—	—	—	—
	3	Ex. Ginseng	C	3.4	0.093	0.010	—	—	—	—	—	—
	4	Ex. Ginseng	D	3.6	0.051	—	—	—	—	—	—	—
	5	Ex. Ginseng	E	3.5	0.039	—	—	—	—	—	—	—
	6	Ex. Ginseng	F	3.5	0.035	—	—	—	—	—	—	—
	7	Ex. Ginseng	G	3.0	0.110	—	—	—	—	—	—	—

Herb liquid digestive preparation	1	Oleum Caryophilli	A	4.0	0.015	—	—	—	—	—	—	•
	2	Ex. Aurantii	B	3.5	0.067	—	—	—	—	—	0.037	
	3	Gambir	C	5.4	0.083	—	—	—	—	—	—	
	4	Oleum Foeniculi	D	9.5	0.151	0.040	0.048	—	—	—	—	•
	5	Ex. Aurantii	E	4.1	0.071	—	—	—	—	—	—	
	6	Ex. Hoelen	F	5.3	0.096	—	—	—	—	—	—	
	7	Ex. Phellodendri	G	4.4	0.089	—	—	—	—	—	—	
	8	Ex. Cinnamomi	H	5.2	0.114	—	—	—	—	—	—	
	9	Ex. Rhei	I	3.5	0.101	—	—	—	—	—	0.036	•
	10	Ex. Corydalis	J	5.2	0.034	—	—	—	—	—	—	
	11	Ex. Zingiberis	K	3.1	0.052	—	—	—	—	—	—	
	12	Ex. Corydalis	L	3.3	0.132	—	—	—	—	—	—	
	13	Ex. Machili	M	4.5	0.100	—	—	—	—	0.160	0.080	•
	14	Oleum Caryophilli	N	7.8	0.078	—	—	—	—	—	—	
Herb liquid antitussive and expectorant	1	Ex. Cimicifugae	A	5.3	0.097	—	—	—	—	—	—	
	2	Ex. Thymi	B	4.2	0.036	0.059	—	0.016	—	—	—	
	3	Ex. Ephedrae	C	3.9	0.091	—	—	—	—	—	—	
	4	Ex. Thymi	D	6.7	0.100	0.020	—	—	0.013	—	—	•
	5	Ex. Thymi	E	7.5	0.020	0.074	—	—	—	—	—	

Symbol: • ; Products inscribed with the kind and contents of the preservatives.

특 規定하고 있다.

漢方 湯劑類는 pH의 範圍가 4.1~5.1이며 대
부분 BA를 사용하였다.

人蔘 強壯劑類에서는 pH範圍가 3.0~3.6으로
거의 비슷했으며 대부분 BA를 사용하였다. 역
시 pH가 3.0~3.6이므로 BA가 적당하다고 생
각된다.

消化 液劑類는 pH범위가 3.1~9.5로 다양했
고 대부분 BA를 사용하였으며 몇가지는 복합적
으로 보존제를 사용하였다. 일반적으로 생약재
제는 pH범위가 다양함으로 넓은 pH에서 적용
되는 *p*-hydroxybenzoates를 사용함이 바람직하
다고 생각된다.

鎮咳 祛痰劑類는 pH가 3.9~7.5였고 대부분은
BA를 사용하였으며 몇가지는 복합적으로 保存
劑를 사용하였다.

이상에서 본 바와 같이 生藥 液劑類에 대한
保存劑 使用 基準에 적합하나, 생약성분 중에는
방부작용을 나타내는 것이 많이 있으므로 이들
성분이 함유된 제제는 保存劑의 첨가량을 줄일
수 있는 방향으로 연구되어야 할 줄 안다. 또한
藥品の pH에 따른 保存劑 選擇에 신중을 기할

필요가 있다고 생각된다.

結 論

市販 生藥液劑類 32種의 保存劑에 대하여 HP-
LC를 利用한 分析結果는 다음과 같다.

Benzoic acid와 *p*-hydroxybenzoates를 分離하
기 위하여 移動相으로는 MeOH-H₂O(70:30) 混
合溶媒(pH 7.0)를 使用하고 固定相으로는 μ -
Bondapak C₁₈을 선택하여 flow rate를 0.9ml/
min.으로 하였을때 가장 양호한 분리가 이루어
졌으며 BA가 SoA 및 DHA와 함께 존재하여 완
전히 분리가 되지 않을때는 移動相을 MeOH-
H₂O(40:60) 混合溶媒(pH 4.5)로 바꾸면 양호
한 분리가 이루어 졌다. 또한 保存劑 分析結果
BA가 가장 많이 사용되었다.

〈1985년 8월 13일 접수: 10월 12일 수리〉

文 獻

1. 日本公定書協會: 日本藥局方解説書, 第十改正, 廣
川書店, 東京, C117(1981).

2. Neidig, C.P. and Burrell, H.: *Drug Cosmetic Ind.*, **54**, 408(1944).
3. Marthew, C. and Davidson, J.: *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **45**, 260(1956).
4. Tarr, H.L.A.: *Nature*, **147**, 417(1941).
5. Nishimoto, T. and Uyeta, M.: *Japan. J. Nutr.*, **6**, 231(1965).
6. Clarke, E.G.C. and Humphreys, D.J.: *J. Analyst.*, **97**, 433(1972).
7. Coelho, R.G. and Nelson, D.L.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 209(1983).
8. Junge, E.C. and Gurka, D.F.: *J. Pharm. Sci.*, **70**, 589(1981).
9. 백덕우, 원도희, 조정희 : 國立保健院報, **15**, 387 (1978).
10. Rados, J.P. and Gyr. G.: *J. Pharm. Sci.*, **72**, 221(1983).
11. Nelson, J.J.: *J. Chromatogr. Sci.*, **11**, 28(1973).