생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
40(4) : 298 ~ 302 (2009)

HPLC-DAD를 이용한 사물탕 중 3종 성분의 동시분석법 확립

원진배 · 마진열[1] · 이재훈[1] · 마충제*
강원대학교 생물소재공학전공, [1]한국한의학연구원

Simultaneous Quantification of Three Marker Compounds in Samultang by HPLC/DAD

Jin Bae Won, Jin Yeul Ma[1], Jae Hoon Lee[1] and Choong Je Ma*
Department of Biomaterials Engineering, School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
[1]TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Exporo, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

Abstract – Samultang is one of traditional medicine composed of *Paeonia lactiflora*, *Angelica gigas*, *Rehmannia glutinosa* and *Cnidium officinale*. To develop simultaneous determination of paeoniflorin, decursin and 5-HMF in Samultang, a high performance liquid chromatography with diode array detector was used. To separate three marker components, Dionex C_{18} column (5 μm, 120 Å, 4.6 mm × 150 mm) was used with a gradient elution system of water and methanol. UV wavelength of detector set at 230 nm and 280 nm. This method was validated by linearity, precision test and recovery test. Calibration curves of three standard components were showed good linear regression (R^2>0.9973). LOD and LOQ ranged from 0.08 μg/ml to 0.38 μg/ml and 0.25 μg/ml to 1.16 μg/ml, respectively. The relative standard deviations (RSDs) of data of the inter-day and intra-day experiments were less than 0.54% and 0.89%, respectively. The measured results of recovery test were varied from 93.36 to 107.79 with RSD values 0.01~1.45%. The established method was applied for separation of bio-conversion Samultang sample and compared with control sample.

Key words – Samultang, simultaneous determination, HPLC/DAD, quantification.

한약 제제는 오랜 세월 동안 많은 사람들의 질병 치료 및 예방에 사용되어왔다. 한약 제제는 인간의 몸에 적합하여 부작용이 적으며 한가지 처방으로 여러 가지 질병을 치료할 수 있거나 한 가지 질병에 여러 처방을 사용 할 수 있다.[1)] 따라서 사람들의 한약 제제에 대한 관심이 증가하고 있다. 최근 생약 제제의 효능 강화를 위해서 한약 제제의 생물 전환과 같은 많은 연구가 진행되고 있다. 또한 한약 제제를 이용한 새로운 식품이나 약품의 개발이 증가하고 있다. 이러한 생약 제제의 연구와 생약을 이용한 식품이나 약품을 개발을 위해 생약 제제 안의 성분 또는 생약의 성분을 분석하는 것이 중요하다. 한약 제제는 여러 종류의 생약 성분으로 구성 되어 있기 때문에 다양한 효능을 나타낼 수 있다. 따라서 생약의 채집 시기 및 재배 방법, 전처리 방법 및 추출 과정에 의해 구성 성분의 양과 질의 차이는 약효의 차이로 생겨 날 수 있기 때문에 정확한 품질관리를 위해 효율적인 한약 제제의 분석법이 필요하다.[2)] 현재 생약 제제의 분석법은 대부분 생약의 개별적인 분석법이 적용되고 있다. 하지만 생약 제제는 다양한 성분들이 복잡한 화합물로 구성되어 있기 때문에 이 개별적 분석법은 생약 제제를 분석함에 있어 시간적, 경제적인 측면에서 손실을 일으킨다. 그러므로 생약 제제의 이용, 효능 강화 그리고 한약제제의 품질 관리를 위해 체계적이고 정밀한 생약 제제의 동시 분석법이 요구되고 있다.[3-4)] 본 연구에서는 혈허증과 혈병에 주로 사용되는 생약 제제 중의 하나인 사물탕의 동시 분석법을 확립하였다. 현재 다양한 기기를 통해 생약 제제의 분석 되고 있다. 사물탕의 동시 분석법 확립에는 HPLC를 이용하였다. 사물탕은 *Rehmannia glutinosa* (숙지황), *Paeonia lactiflora* (백작약) *Cnidium officinale* (천궁) *Angelica gigas* (당귀)로 구성되어 있다. 사물탕은 항균 및 항산화능[5)], 뇌허혈로 인한 뇌손상 치료[6)]와 알러지 염증 치료[7)]에 사용되고 있다. 사물탕을 구성하는 여러 가지 성분 중에 숙지황의 지

*교신저자(E-mail) : cjma@kangwon.ac.kr
(Tel) : +82-33-250-6565

표 성분인 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF), 작약의 지표 성분인 paeoniflorin, 당귀의 지표성분인 decursin에 대한 동시 분석법을 연구하였다. 확립한 동시 분석법에 대해 직선성 확인, 정밀성 평가 그리고 정확성 평가를 통해 분석법 validation을 실시하였다. 또한 생물전환 사물탕에 적용하여 세가지 성분의 양의 변화를 control 사물탕과 비교하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준 물질 – 분석에 사용된 지표 물질인 5-HMF은 Sigma-Aldrich사 제품을 사용하였고, paeoniflorin, decursin은 ㈜천연물화학에서 구입하였고, 각 표준 물질의 순도는 98% 이상을 나타냈다 (Fig. 1). HPLC 분석에 이용된 water 와 methanol 은 J.T Baker사의 HPLC급 용매를 사용하였다. Control 사물탕과 생물전환 사물탕은 한국한의학연구원에서 제공받아 사용하였다.

표준용액의 조제 – paeoniflorin, 5-HMF, decursin의 표준용액 조제를 위해 3가지 지표성분들의 무게를 정확히 측정한 후, 60% methanol에 녹여 각각 100 μg/ml, 200 μg/ml, 200 μg/ml의 농도로 만든 후 이를 60% methanol을 이용해 단계적으로 희석하여 검량선의 작성을 위해 혼합하여 이용하였다. 분말 형태의 시중 사물탕 시료는 20.1 mg을 측정한 후 60% methanol 10 ml에 녹여 사용하였다. 모든 시료는 0.45 μm filter로 여과한 후 분석하였다.

기기 및 분석 조건 – HPLC는 Dionex사의 시스템을 사용하였고, 시스템은 pump (LPG 3X00), auto sampler (ACC-3000), column oven, diode array UV/VIS detector (DAD-3000(RS))로 구성 되어있다. Dionex Chromelon™ Chromatography Data System 을 통해 분석되어 나온 Data을 처리하였다. 주로 천연물 분석에 사용되는 column은 역상 column이 사용된다. 본 연구에서는 Dionex C_{18} column (5 μm, 120 Å, 4.6 mm × 150 mm)을 사용하였다. 이동상은 water 와 methanol 에 의해 구성되었고 flow rate는 1.0 ml/min이다. Column oven temperature는 25°C로 유지되었다. UV wavelength는 230 nm, 240 nm, 260 nm 그리고 280 nm을 설정해 분석하였다.

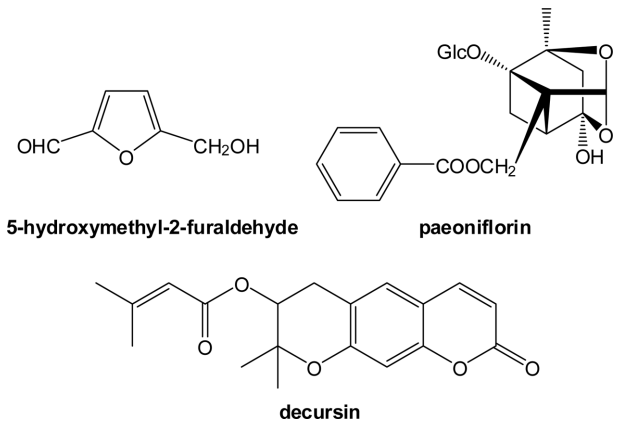

Fig. 1. Chemical structures of three marker constituents in Samul tang.

결과 및 고찰

분석 조건의 확립 – 사물탕의 paeoniflorin, decursin, 5-HMF의 정확하고 체계적인 동시 분석 확립을 위해 최적의 분석 조건을 설정하였다. 물과 메탄올로 구성된 이동상의 조건은 매 분마다 용매의 비율을 변화시키는 gradient elute system을 적용시켜, 물 : 메탄올을 80:20 (0 min), 50:50 (10 min), 20:80 (20 min), 40:60 (35 min), 80:20 (40 min)으로 설정하였다. UV wavelength는 diode array detector(DAD)를 사용하여 각 지표성분의 최대 UV/VIS 흡수 파장을 선택하여 paeoniflorin과 decursin은 230 nm, 5-HMF는 280 nm을 설정하였다. 지표성분의 peak는 retention time과 UV spectra를 비교하여 확인하였다.

동시분석법 validation

Linearity, LOD, LOQ

확립한 동시분석법에 대한 validation을 하기 위해 ICH Guideline을 참고하여 직선성 확인, 정밀성 실험 그리고 정확성 실험을 실시하였다.[8-10] 직선성 확인은 paeoniflorin, decursin 그리고 5-HMF 각각의 표준 물질을 4가지 농도로 희석한 후 (×1/5, ×1/10, ×1/50, ×1/100) 각 농도의 혼합표준물질을 확립한 분석법으로 반복 분석하였다. 분석한 결과를 통해 calibration curve를 작성하였다. 각 지표 성분의 calibration curve를 바탕으로 계산된 liner regression equation (Y = ax + b, a 는 직선의 기울기, b 는 Y 절편, x 는 시료의 농도, Y는 피크의 면적)의 correlation coefficient (R^2) 값을 통해 직선성을 확인하였다. correlation coefficient (R^2)값을 확인한 결과, (R^2>0.9973) 3가지 성분의 calibration curve 모두 탁월한 직선성을 나타내었다. 분석 검출법의 예민도를 나타내는 기준인 검출한계 (LOD) 와 정량 한계 (LOQ)는 Calivration curve를 통해 측정되었다. LOD는 3.3 × SD/S, LOQ는 10 × SD/S (SD - standard deviation of the response, S - slope of calibration curve)로 값을 계산하였다. LOD와 LOQ 값을 측정한 결과, LOD 값은 0.08~0.38 μg/ml 범위를, LOQ 값은 0.25~1.16 μg/ml 범위를 나타내었다. (Table I)

정밀성 평가 (precision test) – 3가지 성분의 표준 물질을 반복 측정하여 결과 값의 편차 정도인 상대표준편차 (RSD%)를 통해 정밀성을 평가하였다. 정밀성 평가를 위해 inter-day와 intra-day test를 실시하였다. Inter-day test는 3가

Table I. The linearity, correlation coefficient (R^2), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the compounds studied

Components	Linear range (μg/ml)	Regression Equation[a]	R^2 (n=5)	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
Paeoniflorin	0.33-33.30	$Y = 0.6496\ x - 0.0972$	0.9996	0.08	0.25
Decursin	0.67-66.70	$Y = 0.2945\ x + 0.0982$	0.9973	0.38	1.16
5-HMF	0.67-66.70	$Y = 3.8922\ x - 2.2665$	0.9999	0.20	0.60

[a]Y : peak area, x : concentration (μg/ml)

Table II. Analytical results of intra- and inter-day test

Components	Concentration (μg/ml)	Inter-day (n=5)		Intra-day (n=3)	
		mean±SD (μg/ml)	RSD (%)	mean±SD (μg/ml)	RSD (%)
Paeoniflorin	10.50	10.68±0.002	0.02	10.64±0.012	0.17
	4.20	4.47±0.001	0.02	4.49±0.008	0.17
	2.10	2.20±0.003	0.14	2.31±0.008	0.33
Decursin	35.00	37.35±0.130	0.35	36.77±0.024	0.22
	24.00	23.58±0.128	0.54	24.47±0.011	0.04
	12.00	12.24±0.021	0.17	12.90±0.009	0.07
5-HMF	35.00	32.96±0.009	0.03	33.03±0.091	0.07
	15.00	15.54±0.004	0.02	16.05±0.069	0.43
	7.50	7.42±0.001	0.02	7.51±0.067	0.89

지 지표물질의 표준 용액을 3가지 농도로 희석하고 각 농도의 혼합용액을 제조하여 하루 간격으로 날짜를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날에 각 농도의 혼합용액을 5회 반복 측정하였다. Intra-day test는 inter-day test와 같은 3가지 농도의 혼합 용액을 하루 동안에 5회 반복 실험하여 측정하였다. Intra-day test와 inter-day test 결과, 각각 0.02~0.54%와 0.04~0.89%의 상대표준편차(RSD%)값을 나타내었다. Inter-day와 intra-day 모두 RSD%가 3% 이하로 분석법의 정밀성을 확인하였다. (Table II)

정확성 평가 (accuracy test) – 사물탕 분석법의 정확성을 평가를 위해 회수율 실험 (recovery test) 을 실시하였다. 회수율 실험은 농도가 확인된 사물탕 시료에 3가지 일정한 농도의 표준물질을 첨가한 후 분석법에 의한 실험을 통해 첨가된 표준 물질의 양을 확인하여 그 정확도를 평가하였다. 동결 건조한 사물탕의 분말 시료를 20.1 mg을 잰 후 60% methanol에 녹인 사물탕 시료에 paeoniflorin, decursin, 5-HMF의 3가지 농도의 혼합용액을 첨가한 후 3회 반복 실험하여 회수율을 측정하여 첨가된 표준물질의 양이 정확하게 회수되는 지를 확인하였다. 또한 상대표준편차(RSD%) 값을 측정하여 정밀성을 평가하였다. 회수율은 90~110%의 값이어야 한다. 회수율 실험을 측정한 결과, paeoniflorin은 93.36~103.43%, decursin은 96.14~102.79% 그리고 5-HMF은 95.77~107.79%의 정확성을 나타내어 좋은 정확성을 나타내었으며 상대표준편차 (RSD%)값은 3가지 지표성분 모두 1.45%이하의 값을 나타내었다. (Table III)

Table III. Analytical results of accuracy test

Components	Spiked Amount (μg)	Measured Amount (μg)	RSD (%)	Recovery[a] (%)
Paeoniflorin	5.50	5.69±0.019	0.34	103.43
	2.20	2.27±0.005	0.20	103.30
	1.10	1.03±0.015	1.45	93.36
Decursin	35.00	33.65±0.016	0.05	96.14
	12.00	12.33±0.015	0.12	102.79
	6.00	6.13±0.021	0.35	102.22
5-HMF	17.50	16.67±0.001	0.01	95.77
	7.50	8.08±0.002	0.03	107.79
	3.75	3.68±0.001	0.01	98.05

[a]Recovery (%) = (amount found – original amount)/amount spiked ×100%

확립된 동시분석법을 통한 생물 전환된 사물탕 시료 분석 – 확립한 동시분석법을 통해 생물전환 사물탕을 분석하

여 control 사물탕과 세가지 지표성분인 paeoniflorin, decursin, 5-HMF의 양을 비교하였다. 생물전환 사물탕은 추출한 사물탕을 고압멸균한 후 다양한 종류의 유산균을 함께 배양하여 제조하였다. 적용 결과, 다른 성분의 영향을 받지 않고 3가지 지표성분인 paeoniflorin, decursin, 5-HMF를 분석할 수 있었다 (Fig. 2). 직접 추출한 사물탕 군과 추출한 사물탕을 고압멸균한 군, 고압멸균 후 다양한 유산균으로 발효시킨 사물탕군에서 3종 화합물의 함량을 비교하였다 (Table IV). 추출한 사물탕을 고압멸균한 경우 각 화합물의 양은 크게 감소하였다. 이러한 결과는 압력과 고열에 의해 화합물의 변성이 일어난 것으로 생각할 수 있다. 일반적으로 발효나 생물전환을 거치게 되면 유산균의 효소에 의하여 배당체에서 당의 일부 또는 전체가 제거되어 배당체의 양이 감소하는 경향이 있다. 그러나, 이번 사물탕의 경우에는 5-HMF를 제외한 두 화합물은 크게 감소되는 경향은 보이지 않았다. 5-HMF 또한 일부 균주에서만 다소 감소하였고, 다른 균주에서는 생물전환 전과 거의 비슷한 수준을 보였다. 5-HMF 의 양이 감소된 것은 유산균 내의 일부 효소에 의해 치환기의 도입, 또는 결합의 분해 등이 그 원인이 될 수 있을 것이다.

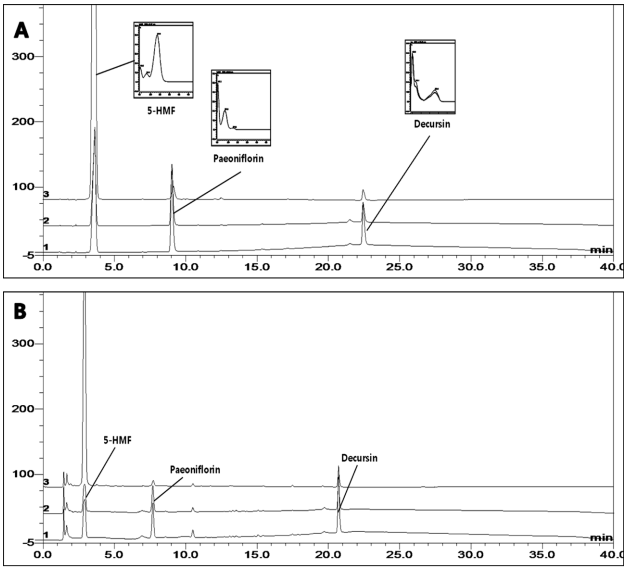

Fig. 2. The HPLC chromatogram of standard mixture (A) and Samul tang sample (B).

결 론

본 실험은 사물탕의 3가지 지표성분인 paeoniflorin, decursin, 5-HMF를 HPLC-DAD를 이용해 동시 분석법을 확립하였다. 분석 조건인 column, 이동상 gradient system, UV wavelength 최적 조건을 확립하였고, HPLC 분석법의 직선성, 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ), 정밀성과 정확성 실험을 실시하여 method validation을 평가하였다. 이를 통해 확립한 HPLC 동시분석법이 정확하고 효율적으로 분석할 수 있다고 판단하였다. 발효처리는 사물탕 내에서 각 지표물질의 함량에 다소 영향을 주었으며, 이러한 화합물의 함량의 변화는 효능의 변화로 이어질 수 있을 것이다.

Table IV. Comparison of amount of three marker compound in control Samultang and bioconversion Samul tang

Sample	Paeoniflorin (μg/mg)	%	Decursin (μg/mg)	%	5-HMF (μg/mg)	%
SM	7.48		10.52		2.02	
SM-con	2.12		5.40		1.38	
SM-127	2.02	-4.66	6.77	25.28	1.05	-24.09
SM-144	2.19	3.55	7.57	40.26	1.22	-12.08
SM-150	2.14	0.88	7.67	42.01	1.44	4.54
SM-161	2.26	6.78	6.16	14.07	0.25	-81.66
SM-166	2.55	20.25	6.91	27.88	1.15	-17.09
SM-217	2.42	13.99	6.25	15.68	1.03	-25.34
SM-227	2.46	16.31	4.54	-15.90	1.08	-21.57
SM-239	2.11	-0.38	8.46	56.59	0.27	-80.19
SM-340	2.51	18.28	6.18	14.37	0.34	-75.19
SM-744	2.11	-0.31	7.00	29.69	0.77	-44.57

SM : Samultang samples before autoclave
SM-con : Samultang after autoclave
SM-No. : Samultang after autoclave and bioconversion with various lactobacilli

사 사

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원 (K09040)에 의하여 수행되었음.

인용문헌

1. Jiang, W.-Y. (2005) Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**: 558-63.
2. Xue, T. H. and Roy, R. (2003) Studying traditional Chinese medicine. *Science* **300**: 740-741.
3. Liu, S., Yi, L.-Z. and Liang, Y.-Z. (2008) Traditional Chinese medicine and separation science. *J. Sep. Sci.* **31**: 2113-2137.
4. Drasar, P. and Moravcova, J. (2004) Recent advances in analysis of Chinese medical pants and traditional medicines. *J. Chromatogr. B.* **812**: 3-21.
5. Choi, M.-A., Kim, M.-L. and Park, C.-S. (2008) The antibacterial and antioxidative activities of Samultang ingredient extracts. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **24**: 52-58.
6. Jeong, D.-Y., Choi, C.-W. and Moon, B.-S. (2009) Effects of Samultang on glutamate-induced apoptosis of hippocampus cells. *J. Kor. Ori. Med.* **30**: 64-75.
7. Kim, E.-Y., Lee, H.-S., Jung, H.-S., Park, S.-K., Sohn, Y.-J. and Sohn, N.-W. (2007) Effect of Samul-Tang on the allergic inflammatory response. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* **21**: 617-625.
8. Liang, X., Zhang, X., Dai, W., Lv, Y., Yan, S. and Zhang, W. (2009) A combined HPLC-PDA and HPLC-MS method for quantitative and qualitative analysis of 10 major constituents in the traditional Chinese medicine Zuo Gui Wan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**: 931-936.
9. Shou, M., Galinada, W. A., Wei, Y. C., Tang, Q., Markovich, R. J. and Rustum, A. M. (2009) Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50**: 356-361.
10. Zhao, J., Wang, D., Duan, S., Wang, J., Bai, J. and Li, W. (2009) Analysis of Fuzhisan and quantitaion of baicalin and ginsenoside Rb_1 by HPLC-DAD-ELSD. *Arch. Pharm. Res.* **32**: 989-996.

(2009년 11월 4일 접수)