

## HPLC-UV를 이용한 중마황의 (+)-Pseudoephedrine과 (-)-Ephedrine의 동시분석법 개발

정비량<sup>1</sup> · 윤유식<sup>2</sup> · 신순식<sup>3</sup> · 권용수<sup>1</sup> · 양희정<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 약학대학, <sup>2</sup>중앙대학교 의과대학, <sup>3</sup>동의대학교 한의과대학

### Simultaneous Determination of (+)-Pseudoephedrine and (-)-Ephedrine in *Ephedra intermedia* by HPLC-UV

Birang Jeong<sup>1</sup>, Yoosik Yoon<sup>2</sup>, Soon Shik Shin<sup>3</sup>, Yong Soo Kwon<sup>1</sup>, and Heejung Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

<sup>2</sup>College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea

<sup>3</sup>College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan 47227, Republic of Korea

**Abstract** – Ephedra alkaloids, (-)-ephedrine, (+)-pseudoephedrine, (-)-N-methylephedrine, (+)-N-methylpseudoephedrine, (-)-norephedrine and (+)-norpseudoephedrine, from ephedra herb are sympathomimetic agonists causing an increase of metabolism, blood pressure and perspiration. In this study, we developed the validation method of (+)-pseudoephedrine and (-)-ephedrine, two major ephedra alkaloids in *Ephedra* spp., by high-performance liquid chromatography-ultraviolet spectrometer (HPLC-UV). HPLC analysis was performed using a HECTOR-M C18 column operating at 35°C, and UV detection at 215nm. The mobile phase used a gradient flow with 25 mM SDS in water (A) and acetonitrile (B).

**Keywords** – HPLC analysis, *Ephedra intermedia*, Ephedrine, Pseudoephedrine, Method validation

마황(*Ephedra herba*)은 마황과에 속하는 다년생초본으로 초마황(*Ephedra sinica*)과 동족식물로 중마황(*E. intermedia*), 목적마황(*E. equisetina*)이 대한약전 11개정에 같이 등재되어 있으며, 초질경을 약재로 사용한다.<sup>1)</sup> 마황은 에페드라 알칼로이드 계열의 물질을 함유하고 있으며 주성분으로 (-)-ephedrine, (+)-pseudoephedrine이 알려져 있고 그밖의 성분으로는 (-)-norephedrine, (+)-norpseudoephedrine, (-)-methylephedrine, (+)-methylpseudoephedrine 등이 알려져 있다.<sup>2,3)</sup> 이러한 에페드라 알칼로이드 계열의 물질들은 adrenaline과 유사한 작용으로 체내에서 교감 신경을 흥분시키는 작용이 보고되어 있으며 이로 인하여 식욕이 억제되고 몸에서 열이 나는 등 신진대사 기능을 촉진하는 작용을 하며, dopamine과 유사한 작용으로 중추신경흥분 작용과 기관지 평활근 이완작용과 이노작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>2,3)</sup>

본 연구에서는 마황의 (+)-pseudoephedrine(1)과 (-)-ephedrine(2)은 부분입체이성질체로서 HPLC-UV를 이용한 동시 분석법 개발을 하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에서 ‘(주)화림제약’에서 구입한 파키스 탄산 중마황(*E. intermedia*)의 마른 줄기를 사용하였고, 이는 동의대학교 신순식 교수로부터 감별 후 3 kg을 제공 받았다. 이는 강원대학교 약학대학 표본실에 보관하였다(KNUP-EI-1).

**시약 및 기기** – HPLC 분석에 사용된 용매와 시약은 HPLC용 물, acetonitrile, methanol(TEDIA, Fairfield, OH, USA)와 SDS(Bio-Rad, Hercules, California, USA)을 사용하였다. 추출에 사용된 용매로는 2차 증류수와 시약용 용매(대정화금(주), 시흥, 경기도, 한국)을 사용하였다. 화합물 1과 2는 서울대학교 약학대학의 정상현교수 연구실로부터 제공 받았다. HPLC system은 Agilent 1260 series(Agilent, Santa, CA, USA)를 사용하였으며 UV detector는 Agilent 1260 MWD를 사용하였고, 분석용 컬럼은 HECTOR C18-M51002546 4.5 μm(4.6×250 mm)을 사용하였다.

**시료 준비** – 마황 2 g에 70% EtOH을 10 mL을 넣어 65°C에 4시간 동안 증탕 추출한 뒤 추출물을 여과하여 농

\*교신저자(E-mail): heejyang@kangwon.ac.kr  
(Tel): +82-33-250-6919

축 한 후 완전히 동결건조하여 가루 상태로 만든 뒤, 그 가루를 10 mg을 70% MeOH을 1 mL 넣어 녹인 후 0.45  $\mu\text{m}$  시린지 필터로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 하였다.

**분석조건** - HPLC 이동상으로 A(25mM SDS)와 B(아세트니트릴)을 이용하여 A:B(60:40) 비율로 40분간 유속 1 mL/min으로 실험을 진행하였다. 컬럼의 온도는 35°C로 설정하였고 자외선 검출파장은 215 nm를 설정하였으며 주입용량은 10  $\mu\text{L}$ 으로 설정하였다.

**분석법의 검증(Validation)** - 분석법에 대한 검증으로 직선성, 검출한계와 정량한계, 정확성, 정밀성, 특이성을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.

1. **직선성(Linearity)** - 화합물 1과 2을 100% MeOH에 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도로 녹여 200, 100, 50, 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 5개의 농도로 검량선을 작성하였고 이에 대한 상관관계수( $R^2$ )를 통하여 직선성을 측정하였다.

2. **검출한계와 정량한계(Limit of Detection and Limit of Quantitation)** - ICH guide line에 따라  $\text{LOD} = 3.3 \times (\sigma/S)$ ,  $\text{LOQ} = 10 \times (\sigma/S)$  계산식을 이용하여 계산하였다.  $\sigma$ 는 검량선의 직선 방정식의 y축 값의 표준편차이며 S는 검량선의 직선 방정식의 기울기 값이다. 검출한계는 분석 시 기기에서 검출 될 수 있는 지표물질의 최소값을 나타내고, 정량한계는 검출한계의 3배값으로 기기에서 정량 할 수 있는 최소값을 의미한다.

3. **정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy) 평가** - 마황의 지표물질을 3가지 농도로 제조한 후 시료에 첨가하여 일 내에 3회 반복 측정하여 나온 면적값의 상대표준편차값을 구하여 일내 정밀성(intraday precision)을 측정하였고, 마황 시료를 하루에 1회 3일 간격으로 3회 반복 측정하여 나온 값의 상대표준편차를 구하여 일간 정밀성(interday precision)을 측정하였다. 정확성은 마황 시료에 각 지표물질을 3개의 농도를 선택하여 첨가하여 검량선을 근거로 피크의 면적값을 계산하고 이를 3회 반복 측정하여 피크의 면적값을 구하여 원래의 농도로 환산하여 시료의 회수율을 구하고 그에 대한 상대표준편차값(RSD)을 구하여 측정하였다.

4. **특이성(Specificity)** - PDA 검출기를 이용하여 마황의 지표물질의 자외선 흡수 스펙트럼을 측정하고 마황 시료의 크로마토그램 내에서 지표물질 피크의 자외선 흡수 스펙트럼을 측정하여 각 스펙트럼을 비교하여 지표물질의 특이성을 판단하였다.

## 결과 및 고찰

마황의 에페드라 알칼로이드 계열의 물질들은 그 효능이 강력하여 지나치게 많이 복용하게 될 시 불면증, 고혈압, 심계항진 등과 같은 부작용을 나타낼 수 있다.<sup>2,3</sup> 따라서 마황이나 마황을 함유한 소재 내에서 에페드라 알칼로이드 함

량을 평가하기 위한 분석법의 개발이 중요하다. 본 실험에서는 기존의 마황 내 에페드라 알칼로이드 분석법을 응용하여, HPLC-UV를 이용한 마황의 지표물질인 (-)-ephedrine(1)과 (+)-pseudoephedrine(2)의 동시분석법을 개발하고 개발한 분석법에 대한 검증을 수행하였다.

1. **분석조건의 확립** - 마황의 지표물질인 화합물 1과 2는 수산기의 절대 배향이 다른 부분입체 이성질체의 관계로 HPLC 분석에서 보통의 물과 MeOH이나 물과 acetonitrile의 조건으로는 분리가 되지 않는다(Fig. 1). 용매 내 에페드라 알칼로이드의 양성 이온화되는 성질을 차단하여 컬럼 내 두 물질 간의 분리도를 높이고자 25 mM SDS를 버퍼로 하였다. 이는 SDS가 화합물 1과 2의 음성전위를 중성화(neutralization)하여 C18 column 내에서 원활하게 분리가 되도록 하는 성질을 이용한 것이다.<sup>4)</sup>

2. **HPLC 분석** - 이동상으로 25 mM SDS water와 acetonitrile을 등용매용리(isocratic) 조건으로 40분간 실험을 진행하여 화합물 1과 2를 확인하였다. 화합물 1이 28.4분에 검출되었고 화합물 2는 30.8분에 검출되어 상호 피크간의 간섭 없이 분리된 단일피크로 검출되었다(Fig. 2).

3. **직선성(Linearity)** - 표준물질을 100% MeOH에 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도로 녹여 200, 100, 50, 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 5개의 농도를 선택하여 검량선을 작성한 결과, 상관관계수( $R^2$ )가 화합물 1은 1.0000을 나타내었고 화합물 2은 0.9997을 나타내어 높은 직선성을 나타냄을 확인하였다. 그에 대한 직선 방정식으로는 화합물 1은  $y = 16,094.8252x - 1.0821$ 의 식을 나타내었고 화합물 2은  $y = 12,072.2485x + 65.3639$ 의

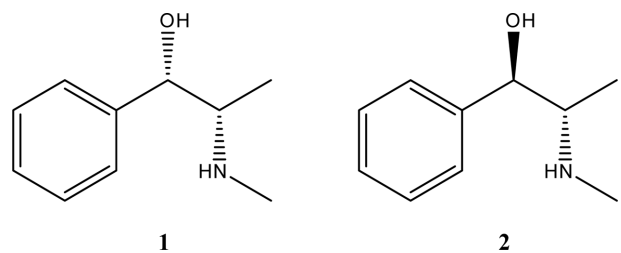


Fig. 1. Structures of (+)-pseudoephedrine (1) and (-)-ephedrine (2), respectively.



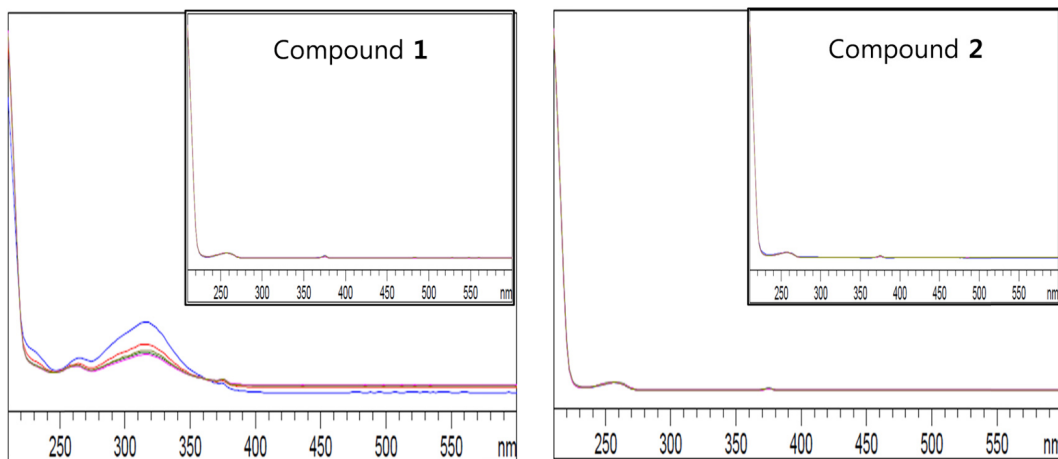
Fig. 2. HPLC Chromatograms of compounds 1, 2 and *Ephedra intermedia*. (a) (-)-ephedrine, (b) (+)-pseudoephedrine and (c) *Ephedra intermedia*.

**Table I.** Calibration curves, LODs and LOQs of compounds **1** and **2** in *E. intermedia*

Compounds	Retention time	Linear regression equation	R <sup>2</sup>	LOD (µg)	LOQ (µg)
<b>1</b>	28.4	y = 16,094.8252x - 1.0821	1.0000	0.0015	0.0044
<b>2</b>	30.8	y = 12,072.2485x + 65.3639	0.9997	0.0021	0.0063

**Table II.** Precision and accuracy results of compounds **1** and **2** in *E. intermedia*

Compounds	Precision				Accuracy		
	Intra day		Inter day		Spiked amount (µg/ml)	Accuracy (%)	RSD(%)
	Amount (µg/ml)	RSD(%)	Amount (µg/ml)	RSD(%)			
<b>1</b>	0.540	0.153			0.531	101.71	0.153
	0.134	0.561	0.065	4.605	0.129	103.19	0.561
	0.084	0.484			0.081	103.57	0.484
<b>2</b>	0.799	0.646			0.767	104.11	0.646
	0.404	2.676	0.543	1.359	0.367	109.99	2.676
	0.321	0.974			0.324	99.09	0.974



**Fig. 3.** UV spectra of compounds **1** and **2**.

식을 나타내었다(Table I).

**4. 검출한계와 정량한계** – 검량선의 직선 방정식의 y절편 값의 표준편차와 직선 방정식의 기울기를 이용하여 ICH guide line에 따라 계산한 결과, 화합물 **1**의 검출한계는 0.0015 µg을 나타내었고 정량한계는 0.0044 µg을 나타내었으며 화합물 **2**의 검출한계는 0.0021 µg을 나타내었고 정량한계는 0.0063 µg을 나타내어 미량의 성분까지 검출 및 정량이 가능함을 검증하였다(Table I).

**5. 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)** – 화합물 **1**과 **2**의 일내 정밀성(intraday precision)과 일간 정밀성(interday precision)를 측정된 결과, 모두 4.605%이하를 나타내었다(Table 2). 분석법의 정확성은 화합물 **1**의 3 가지 농도에서 회수율의 RSD 값은 0.153, 0.561, 0.974%였으며 화합물 **2**

의 회수율의 RSD값은 0.646, 2.676, 0.974%로 3% 이하의 순수한 RSD값을 나타내었다(Table II).

**6. 특이성(Specificity)** – 마황 시료에서 나타내는 지표물질의 피크와 화합물 **1**과 **2**의 피크에 대한 자외선 흡수 스펙트럼을 측정하였다(Fig. 3). 그에 대한 결과 화합물 **1**과 **2**의 흡수 스펙트럼과 같은 위치에 나타난 마황의 지표물질의 흡수 스펙트럼이 동일한 것을 확인하여 높은 특이성을 확인하였다.

## 결 론

본 연구에서는 ICH 가이드라인에 따라 HPLC-UV를 이용하여 마황의 (+)-pseudoephedrine과 (-)-ephedrine의 동시분

석법을 개발하고 이에 대한 검증을 하였다. 본 연구의 분석법과 검증에 근거하여 마황 및 마황을 함유한 제제의 정확한 분석 및 정량분석에 대한 연구에 기초연구자료로 활용될 수 있으며 또한 마황의 품질 검증에 연구자료로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

## 사 사

본 연구는 보건복지부 재원으로 한국보건산업진흥원의 양한방융합기반기술개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: HI15C0075).

## 인용문헌

1. 식품의약품안전처 (2014) 대한약전 제11개정, 식품의약품안전처, 서울
2. White, L. M., Gardner, S. F., Gurley, B. J., Marx, M. A., Wang, P. L. and Estes, M. (1997) Pharmacokinetics and cardiovascular effects of ma-huang(*Ephedra sinica*) in normotensive adults. *J. Clin. Pharmacol* **22**: 116-122.
3. Yamada, I., Goto, T., Takeuchi, S., Ohshima, S., Yoneyama, K., Shibuya, T., Kataoka, E., Segawa, D., Sato, W., Dohmen, T., Anezaki, Y., Ishii, H. and Ohnishi, H. (2007) Mao(*Ephedra sinica* Stapf) protects against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic failure. *Cykokine* **41**: 293-301.
4. Pellati, F. and Benvenuti, S. (2000) Determination of ephedrine alkaloids in *Ephedra* natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 254-263.

(2017. 2. 15 접수; 2017. 3. 14 심사; 2017. 3. 16 게재확정)