

RP-HPLC를 이용한 반하백출천마탕에서 12종 지표성분의 동시분석

이광진¹, 양혜진¹, 마진열^{1*}

¹한국한의학연구원 한의신약개발그룹

Simultaneous analysis of 12 kind maker components in Banhabaekchulchhonma-tang by RP-HPLC

Kwang Jin Lee¹, Hye Jin Yang¹, Jin Yeul Ma^{1*}

¹Korea Institute of Oriental Medicine(KIOM), KM-Based Herbal Drug Development Group

요약 반하백출천마탕은 다양한 약리활성을 가진 전통한방처방이다. 본 연구는 한방처방의 품질관리를 위한 기초자료로서, 고성능액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)을 이용한 반하백출천마탕에서 12종 지표성분 Homogentisic acid, Hesperidin, Naringin, Alisol A, Atractylenolide II, Atractylenolide III, Ginsenoside Rg1, Formononetin, Gastrodin, Berberine, Palmatine, 6-gingerol를 동시분석 하였다. 표준액은 상업용 C₁₈ 역상 컬럼과 이동상으로 물(0.1% TFA)과 아세토나이트릴을 사용하여 기용기용매조성법인 유속은 1.0mL/min, 주입부피는 10 μ L, 컬럼오븐 온도 40 $^{\circ}$ C, 파장 200, 220, 280, 340nm에서 수행되었다. 이 결과 모든 표준성분의 검량선은 우수한 직선성 $r^2 > 0.999$ 으로 나타내었다. 또한 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 0.012~0.878 μ g/mL 및 0.009~0.290 μ g/mL, 정밀성 intra-day와 inter-day는 0.07~1.21% 및 0.20~0.90%, 회수율은 97.17~108.40%, 각각의 함량은 매우 미미한 변화를 나타내었다. 이 연구결과는 실험적으로 입증된 동시분석법의 확립에 따라 반하백출천마탕의 품질평가를 효율적으로 보여주었다.

Abstract Banhabaekchulchhonma-tang is a traditional Korean herbal prescription with a range of pharmacological activities. In this study, the simultaneous analysis of 12 kinds of marker components, Homogentisic acid, Hesperidin, Naringin, Alisol A, Atractylenolide II, Atractylenolide III, Ginsenoside Rg1, Formononetin, Gastrodin, Berberine, Palmatine and 6-gingerol, in Banhabaekchulchhonma-tang was performed using high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The standard sample of commercial C₁₈ reversed phase-column using water (0.1% TFA) and acetonitrile as the mobile phase with a step gradient elution mode. The flow rate (1.0mL/min), injection volume (10 μ L) and column oven temperature (40 $^{\circ}$ C) at a 200, 220, 280 and 340nm wavelength was conducted. All calibration curves of the standard components showed good linearity ($r^2 > 0.999$). In addition, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) ranged from 0.012 to 0.878 μ g/mL and 0.009 to 0.290 μ g/mL. The precision intra-day and inter-day were ranged from 0.07 to 1.21% and 0.20 to 0.90%, respectively. The recoveries ranged from 97.17 to 108.40%. Each sample amount showed a very small change. These results highlight the efficient quality evaluation of Banhabaekchulchhonma-tang.

Key Words : Banhabaekchulchhonma-tang, Medicinal herbs, RP-HPLC, Simultaneous analysis.

1. 서론

한의학의 대표적인 처방으로 동의보감에 수록된 반하

백출천마탕은 반하, 진피, 맥아, 백출, 신곡, 창출, 인삼, 황기, 천마, 백복령, 택사, 건강, 황백, 생강으로 구성된 전통한방처방이다[1]. 오늘날 한방처방은 과학적 근거를 바

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원(K14050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

*Corresponding Author : Jin Yeul Ma(KIOM)

Tel: +82-42-868-9466 email: jyema@kiom.re.kr

Received March 21, 2014

Revised April 22, 2014

Accepted July 10, 2014

탕으로 한 질환 치료와 삶의 의존도를 개선시키고 나아가 고부가가치의 맞춤형 서비스 산업으로 적용하기 위한 응용산업에 높은 관심이 증가되고 있다[1,2]. 반하백출천마탕의 효능 및 효과를 살펴보면 혈청지질의 감소작용, 중추성 지통작용, 진통, 근이완, 수면시간 연장, 진정, 진경작용, 장관이완, 항암효과 등에 대한 다양한 임상연구 결과가 보고되었고[3], 기능성 위장장애, 만성 위염, 위하수 등의 소화기 질환뿐만 아니라 고혈압, 저혈압, 만성피로증후군 등의 질환에 폭넓게 사용되고 있다[3,4]. 하지만 한방의료기관 한약제제 구비율과 사용빈도가 높은 처방에 비하여 과학적 접근법이 미흡한 상태이다[5]. 현대과학은 생명공학 신성장 동력에 있어서 융·복합의 신개념의 이해와 과학화의 지속적 노력, 세계화의 전략적 발굴이 필요하다. 이중에서 한약재 다빈도 처방 및 약재 사용에 있어서 많은 기술적 호환은 데이터베이스의 체계화가 반드시 이루어져야 할 것이다[6].

이처럼 한방융합 원천기술은 저해물질을 탐색하고 유용성분을 분리·분석 및 구조를 규명하고 활성에 대한 저해기작을 확인함으로써 의약품, 기능성 식품, 화장품 소재의 다양한 확보가 가능하다[7]. 기술적 동향을 보면 유용성분을 효율적으로 얻기 위한 방법으로 생물전환을 통한 발효기법, 전통적인 용매추출법, 다양한 추출시스템의 적용이 소개되었다[8]. 분리·분석방법으로는 크로마토그래피 공정의 기술뿐만 아니라 생산을 위한 품질관리의 체계화를 위하여 사용되고 있다[9,10]. 한약재는 빈용 생약이라고 하면 대부분이 대한약전(이하 약전)이나 한약규격집(이하 규격집)에 수록되어 있고 이화학적 확인시험법 또는 규격 및 정량법 등이 제시되어 있으며 식물학적 감정·감별법도 유력한 품질평가법의 하나로 인정되고 있다[11]. 이러한 한방처방은 다양한 성분들의 복합체로서 기원이 동일한 생약의 경우에도 산지, 재배방법, 기후, 채집시기 및 조제 방법에 따라서 품질에 상당한 차이가 있다. 이러한 이유 등으로 한약재에 체계적인 품질평가법 확립의 필요성이 제기된다.

본 연구는 한방의료기관에서 사용빈도가 높은 처방 중 하나인 반하백출천마탕을 선정하여 12종 지표성분인 Homogentisic acid, Hesperidin, Naringin, Alisol A, Atractylenolide II, Atractylenolide III, Ginsenoside-Rg1, Formononetin, Gastrodin, Berberine, Palmatine, 6-gingerol을 대상으로 RP-HPLC-DAD를 이용한 다성분 동시 정량법의 확립과 분석법에 대한 검증을 실시하

여 한약처방의 품질관리를 위한 기초 자료를 실험적으로 구하여 제시하였다.

2. 실험 및 방법

2.1 실험재료 및 시약

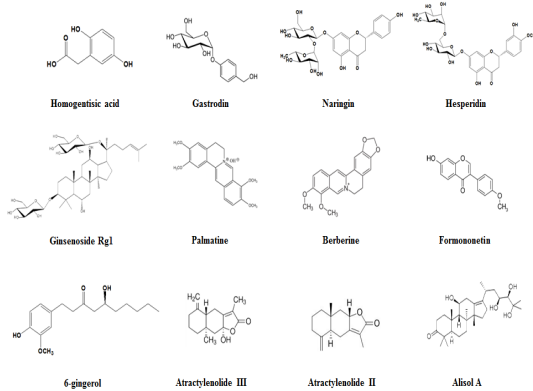
실험재료-본 연구에 사용된 반하백출천마탕의 구성 한약재인 반하 *Pinelliaternata*, 진피 *Citrus unshiu*, 맥아 *Hordeumvulgare*, 백출 *Atractylodes japonica*, 신곡 *Triticumaestivum*, 창출 *Atractylodes japonica*, 인삼 *Panax ginseng*, 황기 *Astragalusmembranaceus*, 천마 *Gastrodiaelata*, 백복령 *Poria cocos*, 택사 *Alismacanaliculatum*, 건강 *Zingiberofficinale*, 황백 *Phellodendronamurensense*, 생강 *Zingiberofficinale* 는 모두 영천현대약업사(2013년 3월 Gyeongbuk yeongcheon, Korea)에서 구입하였고, 대한약전에 기술된 각각의 약재 항목에 적합한 것을 엄선하여 4℃에서 냉장 보관하여 한의신약개발그룹에서 처리된 시료를 사용하였다.

시약-표준시료인 Ginsenoside Rg1은 식약처에서, Homogentisic acid, Naringin은 Sigma(USA.)에서, Atractylenolide II, Atractylenolide III, Liquiritigenin, Gastrodin, Berberine, Palmatine, Formononetin, 6-gingerol은 Faces Biochemical(China)에서 Alisol A은 Wako(Japan)에서 구입하였다. 각 표준물질의 순도는 97% 이상을 나타냈다. 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기(desiccator)에 보관하여 사용하였다. 용매는 HPLC 급(99.9%)으로 메탄올, 아세트나이트릴, 아세트산은 J.T. Baker(U.S.A.)에서 구입하였다. Buffer에 사용된 분석용 trifluoroacetic acid(TFA)는 Sigma(USA.)에서 구입하였다. 그리고 물은 3차 증류수를 사용하였다. Fig. 1에서는 12종 지표성분에 대하여 구조식을 정리하였다.

2.2 표준시료

분석에 사용된 지표 성분, homogentisic acid(200.0 μ g/mL), gastrodin(1000.0 μ g/mL), naringin(1400 μ g/mL), hesperidin(3200.0 μ g/mL), ginsenoside Rg1(500.0 μ g/mL), palmatine(200 μ g/mL), berberine(200 μ g/mL), formononetin(200 μ g/mL), 6-gingerol(200 μ g/mL), AtractylenolideII(200.0 μ g/mL), Atractylenolide III(200.0 μ g/mL), Alisol A(200.0 μ g/mL)을 정확히 칭량하

여 메탄올에 녹인 후 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.



[Fig. 1] Chemical structures of 12 kind maker components in Banhabaekchulchhonna-tang

2.3 HPLC 분석조건

HPLC는 Waters사의 시스템을 사용하였고 시스템은 pump(2695), autosampler, column oven, photodiode array UV/VIS detector(996)로 구성되었다. 분석된 chromatogram data는 Waters Empower 1.0 software system을 통해 확인하였다. Column은 Optimapak C₁₈ column(250 × 4.6 mm I.D., 5 μm, RS-tech(Daejeon, South Korea)이고 컬럼 온도는 40°C를 유지하였다.

이동상은 0.1%(TFA)를 포함하는 물(A)과 아세토나이트릴(B)의 구성으로 유속 1.0mL/min인 기울기용매 조성법을 이용하여 분리능을 향상시켰다. Table 1에서는 반하백출천마탕의 분석조건을 나타내었다.

[Table 1] Mobile phase condition of chromatographic analysis

Time(min)	Water A ^a (%)	Acetonitrile B ^b (%)
0	90	10
5	90	10
40	10	90
40	0	100
60	0	100

^aA: 0.1% Trifluoroacetic acid(TFA)+Water

^bB: Acetonitrile

모든 시료는 분석 전 0.2μm 멤브레인 필터로 여과한 후 20μL를 주입하여 분석하였다. DAD detector의 UV 파장은 190~400nm 범위에서 각 지표성분의 최대 UV 흡

수 파장을 선택하였다.

2.4 분석법 검증

반하백출천마탕의 동시분석법을 위해 설정된 분석법에 대하여 직선성, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, LOD, LOQ), 정밀성 평가(Precision test) 회수율 시험 (Recovery test)등을 판단하여 분석 방법을 검증하였다 [12-14].

직선성, 검출한계 및 정량한계-분석 방법이 분석할 지표물질의 농도에 대한 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 것을 확인하기 위해 직선성을 검토하였다. 각 표준용액을 60% 메탄올을 사용하여 5가지의 농도(×1/5, ×1/10, ×1/20, ×1/40, ×1/80)로 순차적으로 희석 한 후 혼합하여 HPLC 분석을 실시하였다. 분석한 결과에 따라 검량선을 작성하여 선형식(Y = ax+b, a는 직선의 기울기, b는 Y 절편, x는 시료의 농도, Y는 피크의 면적)을 계산하고 상관계수값(r^2)값을 통해 직선성을 확인하였다. 대상 분석물의 검출 및 정량이 가능한 최저 농도를 확인하기 위하여 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 측정하였다. LOD와 LOQ는 각 표준물질의 표준편차(SD)를 직선의 기울기(Slope)로 나눈 값으로 계산한다. LOD = 3.3×(SD of the response / slope of calibration curve), LOQ = 10×(SD of the response / slope of calibration curve).

정밀성 평가-확립한 분석법의 동일한 시료에 대하여 실험 환경의 변화에 따른 결과의 변이 정도를 상대표준 편차(RSD%)를 통해 정밀성을 판단하며 RSD% 값은 3% 이내가 적합하다. 정밀성 평가는 inter-day test와 intra-day test를 통하여 검증되었다. Inter-day test는 표준용액을 각각 3가지 농도로 희석해 혼합표준용액으로 제조하여 시험 날짜를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날, 5회 반복실험을 하여 상대표준편차를 구하여 평가하였다. intra-day test는 3가지 농도의 혼합표준용액을 하루 동안에 5회 반복실험을 하여 얻은 결과의 상대표준편차 (RSD%)를 구하여 평가하였다.

회수율 시험-회수율 시험은 함량이 확인된 시료에 농도를 알고 있는 지표 성분을 혼합한 후 분석을 통해 추가된 지표 성분의 양을 확인하는 방법으로, 정확성 평가를 위하여 실시하였다. 직선성이 확인된 구간의 3가지 농도

의 혼합표준용액을 60% 메탄올에 녹인 시료와 혼합한 후 3회 반복 측정하여 추가된 지표 성분의 회수율을 확인하였다. 이상적인 회수율은 90~110% 범위이며, 상대표준편차(RSD%)값을 측정하여 정밀성을 평가하였다.

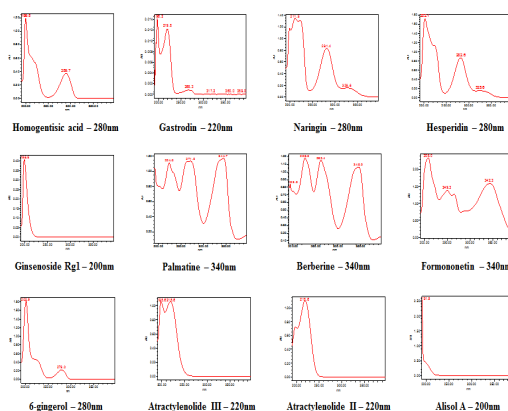
2.5 한방처방의 지표성분 분석

확립된 한방처방 동시분석법을 활용하여 추출물을 대상으로 fingerprint 패턴을 비교하였다.

시료조제-반하백출천마탕을 조제 후 동결건조 시켜 파우더 형태로 만들었다. 각각의 한방처방 시료를 정확히 칭량 후 60% 메탄올에 녹인 후 분석 전 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 사용하였다.

지표성분 및 함량분석-시료를 확립된 동시분석법에 적용하여 크로마토그램을 비교하였으며, 작성된 검량선을 통해 지표성분의 함량을 측정 후 추출물의 함량을 비교하였다.

UV 파장 조건은 200, 220, 280, 340nm를 적용하였으며, 각 지표 성분의 UV 스펙트럼을 통해 각 지표성분의 최대 UV 흡수파장을 확인하여 측정파장을 확립하였다 [Fig. 2].



[Fig. 2] The maximum UV absorption wavelength of 12 kind maker components

3. 결과 및 고찰

분석조건 확립

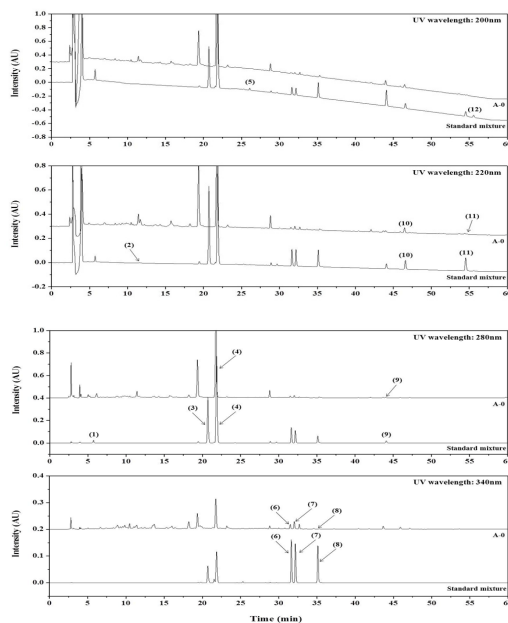
다양한 분리기술중에서 탁월한 크로마토그래피를 이용한 분리·분석방법을 적용하기 위해 상업용으로 잘 알려진 C₁₈ 컬럼을 선정하여 이동상조성을 변화하여 동시 분리·분석조건을 평가하였다[15].

한방처방의 지표성분 설정

수집된 자료 및 국내·외 논문을 바탕으로 한방처방의 각각의 지표성분과 한방처방에 대한 분석법을 확인한 후 지표성분을 설정하였다.

동시분석법 확립

반하백출천마탕의 주요 구성 생약 중 대한약전 9개정을 기준으로 12종 지표성분에 대하여 동시분석을 실시하였다. 최적의 HPLC 분석조건은 다양한 이동상의 기울기 용매조성법을 시험하여 분리능이 높은 이동상 조건을 얻었다. (0.1% (v/v) TFA (trifluoroacetic acid)+물(A)과 아세트나이트릴(B) 0-5min, 10→15%, 5-20min, 15→25%, 20-55min, 25→70%, 55-65min, 70% B) 분리능을 향상시키고 peak tailing을 방지하고 위해 0.1%(TFA)를 사용하였다. 컬럼 온도는 분리에 적합한 온도를 설정하였다.



[Fig. 3] The HPLC-DAD chromatogram of standard and Banhabaekchulchonma-tang (Homogentisic acid (1), Gastrodin (2), Naringin (3), Hesperidin (4), Ginsenoside Rg1 (5), Palmatine (6), Berberine (7), Formononetin (8), 6-gingerol (9), Atractylenolide III (10), Atractylenolide II (11), Alisol A (12))

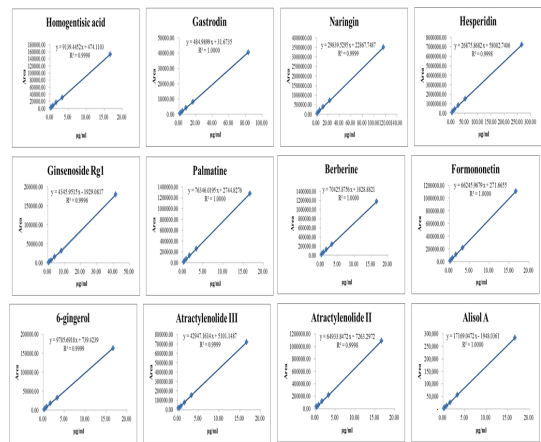
이때 Ginsenoside Rg1, Alisol A는 200 nm, Gastrodin, Atractylenolide II, Atractylenolide III는 220 nm, Homogentisic acid, Hesperidin, Naringin, 6-gingerol는 280 nm, Formononetin, Berberine, Palmatine는 340 nm의 파장에서 피크 면적을 측정하였다. 감도가 좋고 분리능이 우수하며 재현성이 뛰어난 RP-HPLC 조건을 적용하여 지표성분을 분석하여 크로마토그램을 확인한 후 반하백출천마탕의 시료를 분석하였다[Fig. 3].

직선성, 검출한계 및 정량한계

분석 결과에 따라 y축을 피크면적, x축을 표준 용액의 농도로 하여 검량선을 작성하여 12종 지표성분의 상관계수(r^2)을 확인한 결과, $r^2 > 0.9996$ 로 좋은 직선성을 나타내었고(Fig. 4), 직선상 안에서의 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of quantification)를 측정한 결과, 12종 지표성분은 0.012~0.878 $\mu\text{g/mL}$ 범위의 검출한계(LOD)를, 0.009~0.290 $\mu\text{g/mL}$ 범위의 정량한계(LOQ)를 나타내었다[Table 2].

정밀성 평가

확립된 동시분석법의 정밀성을 확인하기 위해 반복성 실험인 intra-day와 inter-day test 결과, intra-day는 0.07~1.21%, inter-day는 0.20~0.90%의 상대표준편차(RSD%)값을 나타내었다. Inter-day와 intra-day 모두



[Fig. 4] Calibration curve of 12 kind maker components

RSD%가 3% 이하로 높은 정밀성이 확인되었다. 정확도는 inter-day와 intra-day 모두 98.34% 이상을 나타내었다[Table 3].

회수율 시험

함량이 확인된 시료에 농도를 알고 있는 지표 성분을 혼합한 후 지표성분의 회수율을 평가한 결과, 12종 지표 성분은 97.17~108.40% 회수율을 나타내어 좋은 정확성을 나타내었으며 상대표준편차(RSD%)값은 2.15% 이하의 값을 나타내었다[Table 4].

[Table 2] The linearity, correlation coefficient(r^2), limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ)

Compounds	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression Equation ^a	r^2 (n=6)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Homogentisic acid	0.21~16.67	$y = 9139.45 x + 474.11$	0.9998	0.047	0.144
Gastrodin	1.04~83.33	$y = 484.99 x + 31.67$	1.0000	0.290	0.878
Naringin	1.46~116.67	$y = 29839.53 x + 22867.75$	0.9999	0.033	0.100
Hesperidin	3.33~266.67	$y = 26875.87 x + 58002.74$	0.9998	0.068	0.205
Ginsenoside Rg1	0.52~41.67	$y = 4345.95 x - 1929.08$	0.9996	0.039	0.118
Palmatine	0.21~16.67	$y = 76346.02 x + 2744.83$	1.0000	0.008	0.024
Berberine	0.21~16.67	$y = 70425.88 x + 3828.88$	1.0000	0.005	0.014
Formononetine	0.21~16.67	$y = 66245.97 x + 271.67$	1.0000	0.012	0.036
6-gingerol	0.21~16.67	$y = 9785.69 x + 739.42$	0.9999	0.021	0.063
Atractylenolide III	0.21~16.67	$y = 42947.16 x + 5101.15$	0.9999	0.004	0.012
Atractylenolide II	0.21~16.67	$y = 64933.85 x + 7263.30$	0.9998	0.009	0.027
Alisol A	0.21~16.67	$y = 17169.05 x - 1948.04$	1.0000	0.053	0.159

^aY : peakarea, x : concentration(mg/mL)

[Table 3] Analytical results of intra and inter-day test

Compounds	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day (n=5)			Inter-day (n=5)		
		Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Accuracy (%)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Accuracy (%)
Homogentisic acid	8.33	8.24 \pm 0.05	0.60	98.92	8.19 \pm 0.06	0.75	98.34
	4.17	4.15 \pm 0.01	0.07	99.53	4.16 \pm 0.03	0.62	99.73
	2.08	2.03 \pm 0.02	0.80	97.48	2.04 \pm 0.01	0.56	98.10
Gastrodin	41.67	40.94 \pm 0.18	0.43	98.25	41.16 \pm 0.12	0.30	98.79
	20.83	20.53 \pm 0.17	0.84	98.54	20.65 \pm 0.04	0.20	99.14
	10.42	10.10 \pm 0.12	1.21	96.94	10.41 \pm 0.05	0.70	99.96
Naringin	58.33	57.02 \pm 0.46	0.81	97.75	57.94 \pm 0.52	0.90	99.32
	29.17	28.91 \pm 0.24	0.83	99.13	28.89 \pm 0.06	0.20	99.06
	14.58	14.57 \pm 0.05	0.31	99.90	14.61 \pm 0.04	0.25	100.15
Hesperidin	133.33	131.35 \pm 0.33	0.25	98.52	133.55 \pm 0.88	0.66	100.16
	66.67	65.89 \pm 0.53	0.81	98.83	66.49 \pm 0.16	0.24	99.74
	33.33	33.45 \pm 0.11	0.34	100.36	33.45 \pm 0.09	0.27	100.34
Ginsenoside Rg1	20.83	20.23 \pm 0.16	0.80	97.12	20.62 \pm 0.04	0.20	99.06
	10.47	10.45 \pm 0.06	0.58	100.34	10.26 \pm 0.09	0.89	98.52
	5.21	5.19 \pm 0.04	0.81	99.70	5.21 \pm 0.03	0.54	99.95
Palmitate	8.33	8.09 \pm 0.08	1.00	97.06	8.28 \pm 0.07	0.88	99.34
	4.17	4.16 \pm 0.03	0.72	100.21	4.16 \pm 0.02	0.36	99.84
	2.08	2.08 \pm 0.01	0.24	99.90	2.08 \pm 0.01	0.24	99.87
Berberine	8.33	8.09 \pm 0.06	0.76	97.06	8.21 \pm 0.07	0.82	99.56
	4.17	4.16 \pm 0.02	0.58	99.75	4.16 \pm 0.02	0.53	99.88
	2.08	2.08 \pm 0.01	0.11	99.93	2.08 \pm 0.01	0.10	100.05
Formononetin	8.33	8.10 \pm 0.08	0.93	97.22	8.22 \pm 0.06	0.68	98.65
	4.17	4.13 \pm 0.04	0.95	99.06	4.16 \pm 0.02	0.38	99.91
	2.08	2.09 \pm 0.01	0.19	100.24	2.07 \pm 0.01	0.46	99.54
6-gingerol	8.33	8.37 \pm 0.03	0.34	100.46	8.35 \pm 0.03	0.41	100.15
	4.17	4.12 \pm 0.01	0.11	98.99	4.14 \pm 0.01	0.26	99.26
	2.08	2.10 \pm 0.01	0.32	100.80	2.09 \pm 0.01	0.23	100.30
Atractylenolide III	8.33	8.17 \pm 0.05	0.67	98.01	8.26 \pm 0.04	0.45	99.16
	4.17	4.12 \pm 0.03	0.73	98.94	4.16 \pm 0.01	0.17	99.86
	2.08	2.06 \pm 0.01	0.28	99.02	2.06 \pm 0.01	0.15	99.05
Atractylenolide II	8.33	8.20 \pm 0.02	0.22	98.37	8.23 \pm 0.01	0.03	98.77
	4.17	4.14 \pm 0.01	0.27	99.29	4.16 \pm 0.01	0.26	99.94
	2.08	2.07 \pm 0.01	0.41	99.23	2.07 \pm 0.01	0.40	99.50
Alisol A	8.33	8.38 \pm 0.04	0.49	100.57	8.35 \pm 0.01	0.15	100.19
	4.17	4.17 \pm 0.01	0.34	100.18	4.16 \pm 0.01	0.22	99.77
	2.08	2.10 \pm 0.01	0.28	100.81	2.08 \pm 0.01	0.50	99.99

[Table 4] Analytical results of accuracy test

Compounds	Spiked Amount (µg/mL)	Measured Amount (µg/mL)	RSD (%)	Recovery ^a (%)
Homogentisic acid	4.17	4.15 ± 0.02	0.55	99.54
	2.08	2.07 ± 0.01	0.37	99.40
	1.04	1.02 ± 0.01	0.17	98.23
Gastrodin	20.83	21.61 ± 0.55	2.54	103.74
	10.42	11.29 ± 0.20	1.74	108.40
	5.21	5.42 ± 0.12	2.15	104.03
Naringin	29.17	29.73 ± 0.03	0.09	101.94
	14.58	14.17 ± 0.04	0.30	97.17
	7.29	7.20 ± 0.04	0.50	98.76
Hesperidin	66.67	68.27 ± 0.35	0.51	102.41
	33.33	33.93 ± 0.13	0.38	101.79
	16.67	17.34 ± 0.13	0.77	104.05
Ginsenoside Rg1	10.42	10.22 ± 0.08	0.76	98.08
	5.21	5.23 ± 0.08	1.61	100.50
	2.60	2.57 ± 0.02	0.80	98.66
Palmitine	4.17	4.25 ± 0.02	0.37	101.90
	2.08	2.17 ± 0.02	0.70	103.99
	1.04	1.05 ± 0.01	0.45	101.24
Berberine	4.17	4.25 ± 0.02	0.44	102.05
	2.08	2.12 ± 0.01	0.21	101.63
	1.04	1.05 ± 0.01	0.68	101.08
Formononetine	4.17	4.23 ± 0.01	0.22	101.53
	2.08	2.16 ± 0.01	0.27	103.62
	1.04	1.03 ± 0.01	0.39	99.31
6-gingerol	4.17	4.11 ± 0.01	0.07	98.61
	2.08	2.06 ± 0.02	0.77	98.92
	1.04	1.07 ± 0.01	0.06	103.09
Atractylenolide III	4.17	4.18 ± 0.01	0.26	100.37
	2.08	2.11 ± 0.03	1.52	101.51
	1.04	1.07 ± 0.02	2.12	102.77
Atractylenolide II	4.17	4.14 ± 0.01	0.15	99.44
	2.08	2.07 ± 0.01	0.72	99.27
	1.04	1.02 ± 0.02	1.49	98.37
Alisol A	4.17	4.22 ± 0.01	0.26	101.26
	2.08	2.05 ± 0.01	0.51	98.17
	1.04	1.06 ± 0.01	0.37	101.97

추출물 함량분석

HPLC-DAD를 이용한 반하백출침마탕 중 12종 성분에 대하여 작성된 검량선을 통해 동시분석법으로 함량을 분석하였다.

전 처리한 추출물은 이동상 1.0mL/min, 주입부피

10µL, UV 파장 200, 220, 280, 340nm을 적용하여 확인하였다. 함량분석 결과 Hesperidin 11.564~14.488µg/mg, Atractylenolide II 0.053~0.075µg/mg, Atractylenolide III 0.400~0.498µg/mg, Formononetin 0.001~0.002µg/mg, Berberine 0.142~0.164µg/mg, Palmitine 0.067~

[Table 5] Comparison of amount of 12 kind maker components in Banhabaekchulchhonma-tang

(unit : ug/mg)

Sample	Homogentisic acid	Gastrodin	Naringin	Hesperidin	Ginsenoside Rg1	Palmatine
BB-0	n.d.	n.d.	n.d.	14.488	n.d.	0.088
BB-1	n.d.	n.d.	n.d.	11.564	n.d.	0.067
BB-2	n.d.	n.d.	n.d.	12.277	n.d.	0.070
BB-3	n.d.	n.d.	n.d.	12.249	n.d.	0.072
BB-4	n.d.	n.d.	n.d.	12.328	n.d.	0.072
BB-5	n.d.	n.d.	n.d.	12.504	n.d.	0.072
BB-6	n.d.	n.d.	n.d.	12.479	n.d.	0.071
BB-7	n.d.	n.d.	n.d.	12.340	n.d.	0.074
BB-8	n.d.	n.d.	n.d.	12.671	n.d.	0.076
BB-9	n.d.	n.d.	n.d.	12.893	n.d.	0.076
BB-10	n.d.	n.d.	n.d.	12.656	n.d.	0.074
BB-11	n.d.	n.d.	n.d.	12.372	n.d.	0.072

Sample	Berberine	Formononetine	6-gingerol	Atractylenolide III	Atractylenolide II	Alisol A
BB-0	0.159	0.001	0.240	0.498	0.061	n.d.
BB-1	0.142	0.002	0.162	0.400	0.053	n.d.
BB-2	0.151	0.002	0.160	0.455	0.068	n.d.
BB-3	0.154	0.002	0.157	0.454	0.066	n.d.
BB-4	0.156	0.002	0.157	0.465	0.070	n.d.
BB-5	0.156	0.002	0.162	0.468	0.070	n.d.
BB-6	0.152	0.002	0.156	0.465	0.071	n.d.
BB-7	0.158	0.002	0.154	0.464	0.070	n.d.
BB-8	0.162	0.002	0.164	0.477	0.073	n.d.
BB-9	0.164	0.002	0.003	0.485	0.075	n.d.
BB-10	0.159	0.002	nd	0.475	0.073	n.d.
BB-11	0.154	0.002	0.159	0.466	0.072	n.d.

Nd : Not detected

0.088 μ g/mg, 6-gingerol 0.003~0.240 μ g/mg로 나타났으며, Homogentisic acid, Naringin, Alisol A, Ginsenoside Rg1, Gastrodin에 대하여 확인되지 않았다(Table 5). 이처럼 유용성분을 분리·분석하기 위한 이동상 조성, 유속, 주입량의 변화를 고려한 기술기용매조성법(gradient mode)이 산업화 측면에서 품질관리 및 최적화에 고려될 수 있을 것이다[16].

4. 결론

반하백출천마탕을 구성하는 반하, 진피, 백출, 신곡, 창출, 인삼, 황기, 천마, 백복령, 택사, 건강, 황백, 생강의 구성약재 중 12종 지표성분에 대하여 동시분석을 실시하였다. 확립된 분석법에 대한 검증으로 직선성, 검출한계, 정량한계 회수율을 측정하여 분석법에 대한 유효성을 확인

하였다.

각각의 시료 함량을 분석한 결과 Hesperidin 11.564~14.488 μ g/mg Atractylenolide II 0.053~0.075 μ g/mg, Atractylenolide III 0.400~0.498 μ g/mg, Formononetin 0.001~0.002 μ g/mg, Berberine 0.142~0.164 μ g/mg, Palmatine 0.067~0.088 μ g/mg, 6-gingerol 0.003~0.240 μ g/mg로 나타났으며, Homogentisic acid, Naringin, Alisol A, Ginsenoside Rg1, Gastrodin에 대하여 확인되지 않았다. 이와 같이 수행된 연구결과는 실험적으로 입증된 동시분석법의 확립에 따라 한방제제에 대한 효율적이며 체계적인 유효성분 중심으로의 규격관리의 확립과 한약재의 품질 향상 및 품질관리의 기초 연구 자료로 활용될 수 있다. 또한 한약재 재배와 응용소재 개발을 위한 융합복합 연구의 체계적인 노력이 필요 할 것이다.

References

- [1] B. I. Seo, "A clinical study of Banhabaekchulchoenma tang on a patient with headache due to retention of phlegm", *Kor. J. Herbology*, Vol. 22, No. 2, pp. 79-82, 2007.
- [2] S. Y. Kim, H. Y. Won, C. W. Choi, K. S. Kim, K. O. Kim, and D. W. Lee, "The effect of Banhabaekchulchoenma-tang(BCT) on Dementia induced by focal brain ischemic injury in rats", *J. of Oriental Neuropsychiatry*, Vol. 17, No. 2, pp. 61-73, 2006.
- [3] S. H. Lee, J. S. Lee, H. S. Jung, W. C. Choi, and K. S. Kim, "A Case Report of Non-small Cell Lung Cancer with Brain Metastasis Patient Treated with Banhabaekchulchoenmatang Gagambang", *J of Kor. Traditional Oncology*, Vol. 14, No. 1, pp. 45-52, 2009.
- [4] N. K. Kim, Y. L. Oh, E. S. Seo, D. H. Lee "Cost-effectiveness Analysis of Bojungikgitang and Banhabaekchulchonmatang in Chronic Tinnitus Patients", *J of Kor. Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, Vol. 23, No. 1, pp. 260-269, 2010.
- [5] X. Y. Song, Y. D. Li, Y. P. Shi, L. Jin, and J. Chen, "Quality control of traditional Chinese medicines: a review", *Chinese J of Nat. Med.*, Vol. 11, No. 6, pp. 0596-0607, 2013.
- [6] B. Hazra, M. D. Sarma, and U. Sanyal, "Separation methods of quinoid constituents of plants used in Oriental traditional medicines", *J of Chromatography B*, Vol. 812, No. 1, pp. 259-275, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.007>
- [7] K. J. Lee, J. Y. Ma, and Y. S. Kim, "Identification of Curcuminoids from Turmeric(*Curcuma long*) Using Ultrasonic Wave and Dipping Method", *Korean Society for Biotech and Bioeng. Jour.*, Vol. 27, No. 1, pp. 33-39, 2012.
- [8] K. J. Lee, M. J. Gu, J. H. Roh, P. M. Jung, and J. Y. Ma, "Quantitative Analysis of Bioconversion Constituents of Insampeadock-san Using Various Fermented Bacteria", *Yakhak Hoeji*, Vol. 57, No. 3, pp 167-172, 2013.
- [9] B. H. Lee, J. B. Weon, B. R. Yun, J. W. Lee, M. R. Eom, and C. J. Ma, "Simultaneous Determination of 11 Major Components in Palmul-tang by HPLC -DAD and LC -MS-MS", *J of Chromatographic Science*, No. 6, pp 1-11, 2013. doi:10.1093/chromsci/bmt064.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmt064>
- [10] K. H. Row, "Separation of Two Components in the case of Large Difference in Concentration by Chromatography", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, Vol 6, No. 2, pp. 193-199, 1995.
- [11] C. S. Seo, J. H. Kim, and H. K. Shin, "Simultaneous Determination of Liquiritin, Nodakenin, Hesperidin and Glycyrrhizin in Bojungik-gi tang Using HPLC-PDA", *Yakhak Hoeji*, Vol. 57, No. 3, pp 187-193, 2013.
- [12] H. J. Yang, J. Y. Ma, J. B. Weon, B. H. Lee, and C. J. Ma, "Qualitative and Quantitative Simultaneous Determination of Six Marker Compounds in Soshitotang by HPLC-DAD-ESI-MS", *Arch Pharm Res*, Vol. 35, No. 10, pp. 1785-1791, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-012-1011-0>
- [13] C. S. Seo, J. H. Kim, and H. K. Shin, "Simultaneous Determination of Seven Constituents in Hermal Prescription Jaemunganghwatang Using HPLC-PDA", *Afr. J. Tradit. Complement Altern Med.*, Vol. 10, No. 1, pp. 113-123, 2013.
- [14] J. B. Weon, H. J. Yang, B. H. Lee, J. Y. Ma, and C. J. Ma, "Simultaneous Quantification of Eleven Chemical Components in Traditional Herbal Medicinal Formula Socheongryongtang by HPLC-DAD and LC-MS", *J. of Liquid Chrom. & Related Tech.*, Vol. 35, No. 16, pp. 2243-2254, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2011.629394>
- [15] C. H. Jin, J. W. Lee, and K. H. Row, "Optimum condition of Mobile Phase Composition for Purine Compounds by HCl Program", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, Vol 17, No. 3, pp. 317-320, 2006.
- [16] K. K. Chang, K. H. Row, and S. T. Chung, "Separation of Taxol from Taxanes by NP-HPLC", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, Vol 8, No. 2, pp. 286-291, 1997.

이 광 진(Kwang Jin Lee)

[정회원]



- 2001년 2월 : 인하대학교 대학원 화학공학과 (공학석사)
- 2006년 8월 : 인하대학교 대학원 화학공학과 (공학박사)
- 2008년 8월 : 한국과학기술연구원 (KIST) 천연물연구센터 Postdoctoral.
- 2012년 3월 : 미국 University of Hawaii at Hilo, College of Pharmacy Researcher fellow.
- 2012년 4월 ~ 현재 : 한국한의학연구원(KIOM) 한의신약 개발그룹 분리·분석 팀 Senior.

<관심분야>

생물화학, 생물분리기술, 천연물화학

양혜진(Yang Hye Jin)

[정회원]



- 2009년 2월 : 강원대학교 대학원 생물소재공학과 (공학석사)
- 2011년 8월 ~ 현재 : 한국한의학연구원(KIOM) 한의신약개발그룹 연구원

<관심분야>

천연물화학, 의약품분석학, 생명공학

마진열(Jin Yeul Ma)

[정회원]



- 2004년 2월 : 성균관대학교 대학원 제약학과 (약학박사)
- 1987년 5월 ~ 1994년 11월 : 한국화학연구소, 연구원
- 2010년 2월 ~ 2011년 12월 : 한국한의학연구원 한의융합연구본부, 본부장
- 2011년 12월 ~ 현재 : 한국한의학연구원 한의신약연구그룹, 그룹장
- 2010년 2월 ~ 2011년 2월 : 식품의약품안전청 중앙약사심의위원
- 2012년 9월 ~ 현재 : 한국의료분쟁조정중재원 의료사고감정단 자문위원

<관심분야>

약학, 한약학, 독성학