

생약으로서 漆皮의 품질관리 기준에 관한 모니터링 연구

김지애¹, 김선영¹, 정승일¹, 이영종², 김상준^{1*}

1. (재)전주농생명소재연구원
2. 가천대학교 한의과대학

Monitoring of Rhois Vernicifluae Cortex for the Quality Control as Korean Herbal Medicine

Ji-Ae Kim¹, Seon-Young Kim¹, Seung-il Jeong¹, Young-Jong Lee², Sang-Jun Kim^{1*}

1. Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju-si, Jeolabuk-do, 54810 Republic of Korea
2. College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13120 Republic of Korea

Abstract

Rhois Vernicifluae Cortex (*Rhus verniciflua* Stokes Bark) as Anacardiaceae family plant doesn't have the standards on chemical characteristics in "Korean Herbal Pharmacopoeia". Rhois Vernicifluae Cortex were not recorded on Chinese Pharmacopoeia and Japanese Pharmacopoeia as the medicinal herbs. To suggest the new standard on the quality control, we monitored domestic Rhois Vernicifluae Cortex according to the standard operating procedures for herbal drugs. Rhois Vernicifluae Cortex were studied on purity(%), heavy metals, loss on drying(%), total ash, acid-insoluble ash(%) and extract contents(%) and compared to each other. Also, Rhois Vernicifluae Cortex were profiled and compared on chemical patterns using HPLC. These results would be references of the suggestion for the quality control of Rhois Vernicifluae Cortex in Korea.

Keywords: Rhois Vernicifluae Cortex, Korean Herbal Pharmacopoeia, standard on the quality control

서론

생약 자원으로서 칠피(漆皮)는 암치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있어 많은 관심을 받고 있는 소재이다. 하지만, 현재 국내 대한민국약전외한약(생약)규격집(KHP)²⁾에는 등재되어 있으나, 순도시험을 제외한 기준 규격이 미설정되어 있으며, 중국약전(ChP)³⁾ 및 일본약국방(JP)⁴⁾에는 건칠 이외의 칠피는 수록되어 있지않아 품질 관리를 위한 기준 규격이 제시되어 있지 않다. 본 연구에서는 국내에서

* Correspondence: 김상준(Sang-Jun Kim, Tel: +82-63-711-1054 Fax: +82-63-711-1004 E-mail: process95@jami.re.kr)

· Received 2017-11-08, revised 2017-11-13, accepted 2017-11-13, online-published 2017-11-14.

유통되고 있는 칠피를 수거하여 생약시험법¹⁾을 통하여 기준 규격을 검토하고 그 결과를 기준 규격 설정을 위한 기초자료로 제안하고자 하였다.

본론

1. 검체 시료

본 연구에서 사용한 칠피(漆皮)는 거피 후질각절단하여 양진한 것으로, 검체 시료는 2012~2014년도에 제조되어 유통되고 있는 국산한약재로서 한국한약유통협회 등의 도움을 받아 국내 한약 판매업체로부터 총 15개 시료를 수거하여 생약시험법에 따라 규격 시험을 수행하였다.



그림 1. 漆皮 검체 사진.

2. 성상 및 확인시험

漆皮의 기준 규격 시험 항목은 현행 공정서인 KHP에 수재되어 있지 않으며, 외국공정서(ChP⁵⁾, JP⁶⁾)에는 漆皮로서 등재되어 있지 않기 때문에, 시험항목 중 건조감량, 회분, 산불용성회분 및 엑스함량(물-에탄올엑스)에 대하여 국내외 공정서의 시험방법에 따라 규격 평가를 실시하였다. 국내 유통품으로서 수거한 漆皮 검체의 이물질 및 성상 평가 결과, 그림 1에서와 같이 검체 형태를 확인하였으며, 이물질은 검출되지 않았다. 검체의 확인시험법은 박층크로마토그래피법(TLC, thin-layer chromatography)을 적용하여 평가하였으며, 평가 방법은 다음과 같이 수행하여 결과를 확인하였다. 漆皮의 균질화된 분말 가루 4.0g을 측량하여 메탄올 20mL을 넣고 밀봉하여 때때로 흔들고 진탕혼합 후 1시간 동안 초음파추출을 시행하였다. 추출한 漆皮의 상등액은 여과지로 여과한 다음 여액을 5배 농축하였으며, 이 액을 가지고 박층크로마토그래피용 역상(reversed-phase) 실리카겔을 사용하여 제조한 박층판에 점적하였다. 점적한 검액의 분리(elution)를 위한 전개용매는 증류수·메탄올 혼합액(1 : 2)을

사용하였으며, 약 10cm 전개한 다음 박층판을 말리고, 자외선(254nm)을 쬐었을 때 혹은 여기에 분무용 황산시액을 고르게 뿌린 다음 105°C에서 5분간 말린 후 확인하였을 때, 표준성분과 R_f 값에 따라 반점을 비교 확인하였다. 확인 결과는 그림 2와 같다.

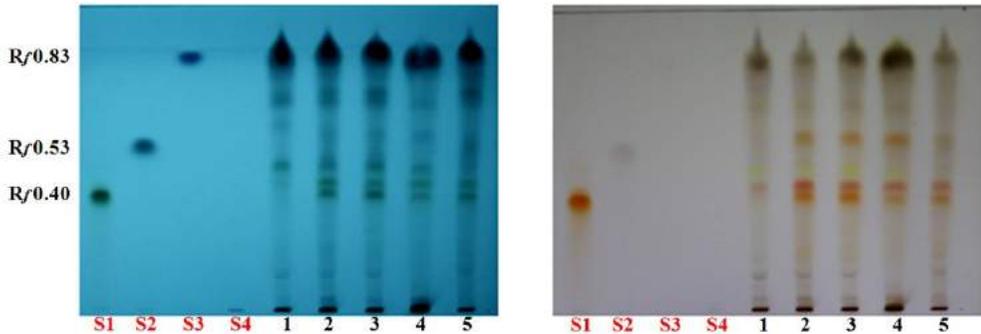


그림 2. 박층크로마토그래피법에 의한 漆皮의 확인시험 결과. S1: butein, S2: 2,4-dihydroxybenzylaldehyde, S3: 2,4-dihydroxybenzoic acid, S4: 3-pentaldecyphenol, 1~5: 漆皮 추출물

박층크로마토그래피법에 의한 확인시험 漆皮 검액의 평가를 위한 표준성분은 butein(S1), 2,4-dihydroxybenzylaldehyde(S2), 2,4-dihydroxybenzoic acid(S3), 3-pentaldecyphenol(S4)를 선정하여 수행하였다. 확인 결과, 표준성분 부테인(butein, S1) 반점의 R_f 값 0.40과 일치하는 반점을 확인하였다. 또한, R_f 값 0.83 부근에서 표준성분 디히드록시벤조익산(2,4-dihydroxybenzoic acid, S3)과 일치하는 반점이 검출됨을 확인하였다. 하지만, 표준성분 디히드록시벤조알데히드(2,4-dihydroxybenzylaldehyde, S2)와 펜타데실페놀(3-pentaldecyphenol, S4)의 경우에는 漆皮 검체의 검액에서 검출 농도가 낮아 추가 검토를 수행하고 있다. 따라서, 漆皮의 확인시험법에서는 표준성분을 부테인(butein)과 디히드록시벤조익산(2,4-dihydroxybenzoic acid)으로 선정하여 평가하는 것을 제안하고자 한다.

3. 순도시험(잔류중금속 평가)

국내 유통품으로서 수거한 漆皮 검체에 대한 순도시험은 잔류유해물질로서 중금속(카드뮴, 비소, 납, 수은)에 대한 잔류 농도를 측정하였다. 잔류중금속의 허용기준은 다음과 같다. 납(Pb)의 잔류허용기준은 5ppm 이하이고, 비소(As)는 3ppm 이하, 수은(Hg)은 0.2ppm 그리고 카드뮴(Cd)은 0.3ppm 이하로 규격화되어 있다. 漆皮 검체의 잔류중금속 측정은 유도결합플라즈마(ICP) 장치를 이용하였으며, 측정 결과는 표 1과 같다. 잔류중금속으로서 납은 0~0.16ppm의 잔류량을 확인하였으며, 비소는 모든 검체 시료에서 불검출되었음을 확인하였다. 또한, 잔류오염물질로서 수은은 잔류량이 0~0.01ppm으로 나타났으며, 카드뮴은 0~0.01ppm으로서 기준치 이하의 잔류농도를 확인하였다. 따라서, 漆皮 모든 검체에서 잔류중금속 함량 평가 결과는 불검출 또는 기준치 이하로 검출됨을 확인하였다.

표 1. 漆皮의 중금속검사결과

(단위, ppm)

| 시료번호 | 납(Pb) | 비소(As) | 수은(Hg) | 카드뮴(Cd) |
|-------|-------|--------|--------|---------|
| 칠피 1 | 0.0 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| 칠피 2 | 0.0 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| 칠피 3 | 0.0 | 0.0 | 0.01 | 0.01 |
| 칠피 4 | 0.0 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| 칠피 5 | 0.12 | 0.0 | 0.01 | 0.00 |
| 칠피 6 | 0.15 | 0.0 | 0.01 | 0.00 |
| 칠피 7 | 0.08 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| 칠피 8 | 0.01 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| 칠피 9 | 0.0 | 0.0 | 0.01 | 0.00 |
| 칠피 10 | 0.0 | 0.0 | 0.01 | 0.00 |
| 칠피 11 | 0.11 | 0.0 | 0.01 | 0.00 |
| 칠피 12 | 0.16 | 0.0 | 0.01 | 0.01 |
| 칠피 13 | 0.09 | 0.0 | 0.01 | 0.00 |
| 칠피 14 | 0.06 | 0.0 | 0.01 | 0.00 |
| 칠피 15 | 0.07 | 0.0 | 0.00 | 0.00 |

4. 건조감량(%), 회분(%), 산불용성회분(%) 및 엑스함량(%)의 평가

漆皮는 건조감량(%), 회분(%), 산불용성회분(%) 및 엑스함량(%)으로서 묽은에탄올엑스(%)를 생약시험법에 따라 실시하였으며, 그림 3과 표 2에서 평가 결과를 제시하였다. 평가 결과, 漆皮의 건조감량(%)은 $6.64 \pm 1.2\%$ 로 확인되었으며, 회분(%)은 $7.88 \pm 1.4\%$, 산불용성회분(%)은 $1.51 \pm 0.8\%$ 로 확인하였다(표 2). 묽은에탄올엑스(%)는 $13.89 \pm 4.4\%$ 로서 측정치를 나타냈다(표 2). 검체 漆皮의 개별 건조감량, 묽은에탄올엑스, 회분 및 산불용성회분에 대한 결과는 그림 3에서 나타났다. 각각의 시험 결과에 대한 RSD(%) 값은 18.1%, 32.0%, 17.9% 및 49.6%로서 나타났다. 산불용성회분의 경우 2% 이하의 결과값에 대한 편차가 커 49.6%의 RSD값을 확인하였다. 각각의 평가 결과, 기준 규격 제안을 위해서 RSD(%) 결과치는 모두 50% 이하로서 평가 방법이 선정되었으며, 결과에 대한 기준 제안(안)에 대한 통계 처리 방법을 적용하여 상한 및 하한치를 확인하였다.

표 2. 漆皮의 건조감량(%), 묽은에탄올엑스(%), 회분(%) 및 산불용성회분(%) 평가 결과

| 구분 | 건조감량(%) | 묽은에탄올엑스(%) | 회분(%) | 산불용성회분(%) |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| 평균값 \pm SD ¹⁾ (n=15) | 6.64 ± 1.2 | 13.89 ± 4.4 | 7.88 ± 1.4 | 1.51 ± 0.8 |
| ²⁾ RSD(%) | 18.1 | 32.0 | 17.9 | 49.6 |

1) SD : standard deviation(표준편차)

2) RSD : relative standard deviation(상대표준편차, %)



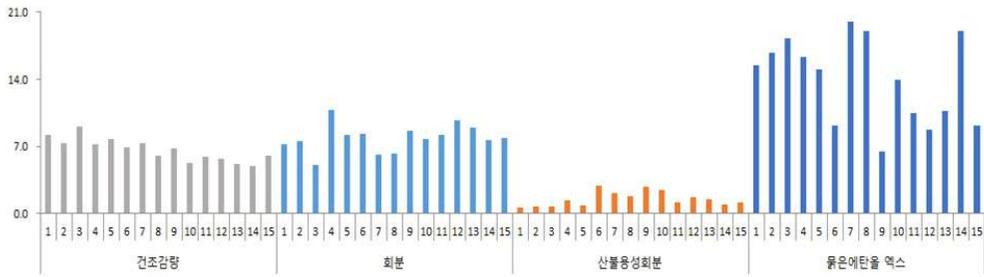


그림 3. 漆皮의 건조감량, 회분, 산불용성회분 및 묽은에탄올엑스 평가 결과

5. 액체크로마토그래피 프로파일링

건조된 분말로서 漆皮는 다음과 같이 추출하여 함유 성분에 대한 프로파일링⁶⁻⁹⁾을 실시하여 비교 검토하였다. 검체의 전처리 과정으로서, 漆皮 분말 가루 1.0g을 정확히 달아(7→10) 메탄올 수용액 20mL을 사용하여 60분간 환류 추출하였다. 추출 과정 후 상등액은 여과지로 1차 여과한 다음 0.45µm, syringe filter로 2차 여과하여 검액으로 사용하였다. 검액에 대한 표준크로마토그램 분석조건을 표 3과 같다. 분석장비는 Agilent사(미국)의 1200 모델로서 diode array detector(DAD)를 사용하였으며, 검출 파장은 190~400nm의 범위에서 검토하였다. 표준크로마토그램에서는 254nm로 선정하여 제시하였으며, 이동상으로는 포름산 수용액(1→1000)과 아세트니트릴 혼합액을 gradient 조건에서 분석을 진행하였다. 분석용 컬럼은 Phenomenex사(미국)의 컬럼으로서 C18 역상 컬럼을 선정하였다. 분석 시 컬럼 온도는 30°C 유지하였으며, 유속은 0.6mL/min에서 수행하였다. 표준크로마토그램 분석은 생약(한약) 제제의 성분 프로파일 설정 가이드라인⁵⁾에 근거하여 조건별 검토를 실시하였다.

표 3. 漆皮의 표준크로마토그램 분석조건

| | | | |
|-------------|---|----------|----------|
| - 분석장비(검출기) | Agilent 1200 HPLC (DAD 254nm) | | |
| - 분석컬럼 | Phenomenex Gemini NX C18 (4.6 × 150mm, 3µm) | | |
| - 이동상 조건 | A : 1→1000 포름산 수용액 (v/v) B : 아세트니트릴 | | |
| | 시간(min) | 이동상 A(%) | 이동상 B(%) |
| | 0 | 95 | 5 |
| | 30 | 55 | 45 |
| | 53 | 30 | 70 |
| | 56 | 30 | 70 |
| | 60 | 95 | 5 |
| - 컬럼온도 | 30°C | | |
| - 유속 | 0.6mL/min | | |

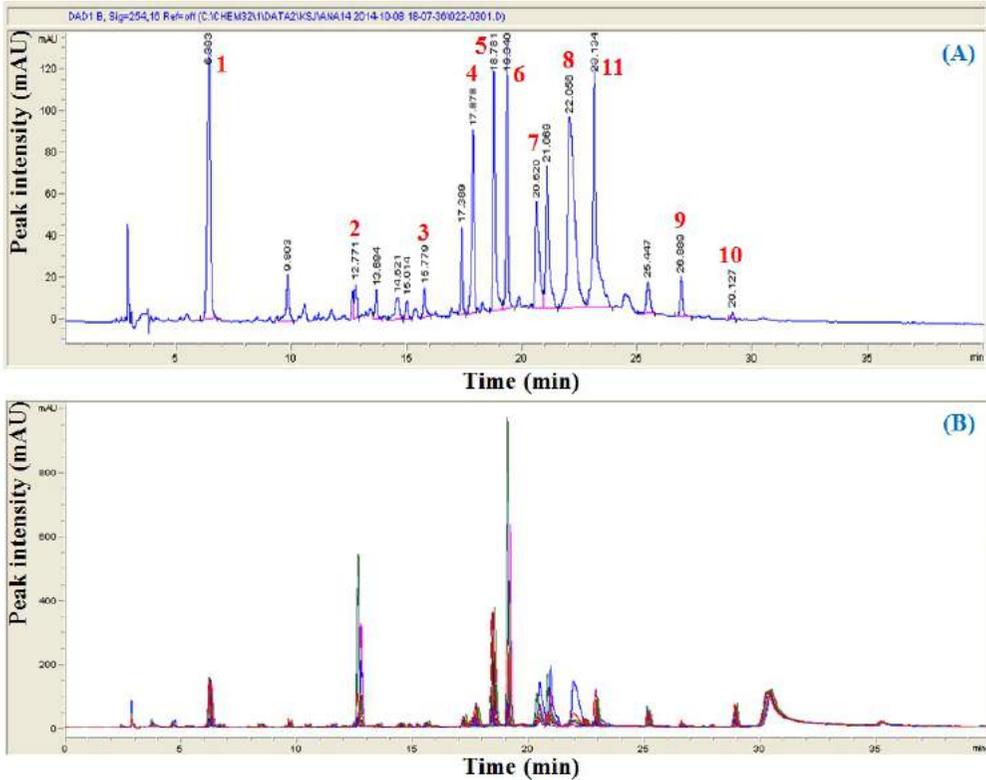


그림 4. 漆皮 추출물에 대한 액체크로마토그래피 크로마토그램(A)과 중첩크로마토그램(B). **Peak 2:** methyl gallate, **peak 3:** 2,4-dihydroxybenzaldehyde, **peak 5:** 2,4-dihydroxybenzoic acid, **peak 9:** luteolin, **peak 10:** butein, **peak 1, 4, 6, 7, 8, 11:** unknown.

그림 4에서와 같이 漆皮 시료 분석결과 5~10개의 주요한 피크를 확인하였고, 주요 성분은 참고문헌⁶⁻⁹⁾에 근거하여 선정하였다. 확인 결과, 표준성분과 일치하는 피크 중 피크 2는 메틸갈레이트(methyl gallate), 피크 3은 2,4-디히드록시벤알데하이드(2,4-dihydroxybenzaldehyde), 피크 5는 2,4-디히드록시벤조익산(2,4-dihydroxybenzoic acid), 피크 9는 루테올린(luteolin) 그리고, 피크 10은 부테인(butein)으로 확인하였다. 다만, 피크 1, 4, 6, 7, 8, 11은 확인되지 않아 추가 동정 과정 중에 있다. 시료 분석 결과는 생약(한약) 제제의 성분 프로파일 설정 가이드라인⁵⁾에 의하여 평가하였으며 피크 유지시간 및 피크 면적 등 RSD(%) 평가 결과 5% 이내로 확인하였다(data not shown).

결론

본 연구과정은 대한민국약전의 생약시험분에 따라 漆皮의 규격 평가를 실시하였으며, 기준 규격 제안에 대한 기초자료로서 활용하고자 하였다. 분석 결과에 대한 통계 처리는 적절한 통계적 방법으로서 수치를 산출하고 제안하기 위하여 분석값 중 이상치를 제외하였으며, RSD(relative standard deviation, %)의 크기로 산출하는 방식⁵⁾을 선택하여 통계 처리하였다. 결과값의 RSD에 따라 구분하였을 때, 이상치를 제외한 신뢰구간으로 선정 기준은 다음과 같다. 생약은 개체 간 편차가 크므로 분석값의

RSD에 따라 50%를 기준으로 기준치를 각각 달리 산출하였다. 결과값에 대한 RSD가 50%보다 작은 경우에는 전체 평균(M)과 표준편차(S)를 구하고, 분석값의 위아래 5%씩 제한 범위인 $M \pm 1.645S$ 안의 값만 취하고 (총 분석값들의 90%만 취하게 됨), 이 분석값의 평균(M') 및 표준편차(S')를 구하여 $M' \pm 1.96S'$ 로 기준을 적용하였다. 반면에, 결과값에 대한 RSD가 50%보다 큰 경우에는 전체 평균(M)과 표준편차(S)를 구하고, 분석값의 위아래 17%를 제거한 범위인 $M \pm S$ 안의 값만 취하고 (총 분석값들의 66%만 취하게 됨), 이 분석값의 평균(M') 및 표준편차(S')를 구하여 $M' \pm 1.645S'$ 로 기준을 적용하여 산출하였다. 이러한 신뢰구간을 바탕으로 하여 기준 제안에 대한 상한 또는 하한을 선정하였으며, 漆皮의 생약 기준 규격에 대한 제안으로서 다음 표 4와 같이 정리하였다. 漆皮의 확인시험을 위한 시험법은 역상 실리카겔을 사용하는 박층크로마토그래피법으로서 수행하였으며, 증류수와 메탄올 혼합액(1:2)을 전개용매로 하는 평가 방법을 제안하고 결과를 제시하였다. 건조감량(%)에 대한 평가 결과, 반복실험을 통한 결과값의 RSD값에 따른 상한치는 8.5%로 확인되었으며, 제안(안)으로서는 8.0% 이하의 기준을 제시하였다. 회분 평가 결과에 대한 RSD 통계 방법에 의한, 상한치는 10.1%로 확인되었으며, 회분 기준 제안(안)은 10.0% 이하로서 확인하였다. 또한, 묽은에탄올엑스 함량 평가 결과, 하한치는 6.4%로서 나타났으며, 제안(안)으로서는 묽은에탄올로서 엑스함량이 6.0%이어야 한다는 것으로 제안하고자 한다. 반면에, 산불용성회분의 경우에는 상한치가 2.7%로서 평가되었으나, 검체 漆皮의 산불용성회분(%) 결과값은 $1.51 \pm 0.8\%$ (RSD, 49.6%)로서 2% 미만의 값으로 나타났기 때문에 기준 규격 제안을 위해서 추가 검체 확보 등을 통한 재평가가 요구되는 것으로 사료된다. 다만, 액체크로마토그래피법(HPLC)을 이용한 표준크로마토그램 확인 과정에 의한 주요 성분을 확인하였으나, 정량 평가는 실시하지 않았다. 추가 기준 규격 평가 시험을 통하여 주요 성분에 대한 동등성 평가 및 정량 평가를 실시할 계획 추진 중에 있다.

표 4. 漆皮의 건조감량(%), 묽은에탄올엑스(%), 회분(%) 및 산불용성회분(%) 기준 제안(안).

| 구분 | 제안(안) | 평가 결과 |
|------------|-------------------|---|
| 확인시험(TLC) | 증류수 : 메탄올 = 1 : 2 | R _f 0.4 부근 반점 확인 |
| 건조감량(%) | ≤ 8.0% | 결과 : 6.64 ± 1.2 (n=15) 상한 : 8.5% |
| 묽은에탄올엑스(%) | ≤ 6.0% | 결과 : 13.89 ± 4.44 (n=15) 하한 : 6.4% |
| 회분(%) | ≤ 10.0% | 결과 : 7.88 ± 1.41 (n=15) 상한 : 10.1% |
| 산불용성회분(%) | ≤ 2.5% | 결과 : 1.51 ± 0.75 (n=15) 상한 : 2.7% |

漆皮는 대한민국약전의 KHP에서 기준 규격이 설정되어 있지 않으며 ChP 및 JP에는 漆皮가 수록되어 있지 않은바, 국내 유통되고 있는 漆皮의 품질 관리에 대한 중요성이 대두되고 있다. 따라서, 漆皮에 대한 검체 평가에 대한 중국 및 일본 등의 칠피 소재와의 비교 검토가 필요한 상황이며, 본 연구 결과를 바탕으로 하여 漆皮에 대한 감별 및 기준 규격 설정에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전평가원에서 주관한 국산한약재 재평가사업(14172MFDS990)의 지원에 의해 진행되었으며, 본 연구 수행에 필요한 표본을 제공해 주신 가천대학교 한의과대학에 감사드립니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전처. 대한민국약전 제 11개정. 식품의약품안전처. 2014.
2. 식품의약품안전처. 대한약전의한약(생약)규격집 제 4개정. 식품의약품안전처. 2014.
3. 國家藥典委員會 編. 中華人民共和國藥典. 北京:中國藥科技出版社. 2010.
4. 日本藥局方 16개정. 東京:廣川書店. 2011.
5. 식품의약품안전처. 생약(한약)체제의 성분 프로파일 설정 가이드라인. 식품의약품안전처. 2010.
6. Eun-Mi Ahn, Sang-Jae Park, Won-Cheo Choi, Suk-Hoon Choi, Nam-In Bae, Antioxidant activity of isolated compounds from the heartwoods of *Rhus verniciflua*, J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 2007;50(4):358-61.
7. Min-Young Kim, Ill-Min Chung, Deog-Cheon Choi, Hee-Juhn Park, Quantitative analysis of fustin and sulfuretin in the inner and outer heartwoods and stem bark of *Rhus verniciflua*, Natural Product Sciences, 2009;15(4):208-12.
8. So Young Kang, Ji-Young Kang, Myung-Joo Oh, Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes against fish pathogenic viruses *in vitro*, J. Microbiol., 2012; 502:293-300.
9. Sun-A Kim, Seung Hyun Kim, In Sook Kim, Dongho Lee, Mi-Sook Dong, Chun-Soo Na, Nguyen Xuan Nhiem, Hye Hyun Yoo, Simultaneous determination of bioactive phenolic compounds in the stem extract of *Rhus verniciflua* stokes by high performance liquid chromatography, Food Chemistry, 2013;141:3813-9.