한약(생약) 제제 동시분석법 개발 계획



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

생약연구과

www.nifds.go.kr

목차

1. 생약연구과의 업무
2. 연구개발 배경
3. 연구결과 및 고찰
4. 향후 계획

생약연구과의 업무

1 식품의약품안전평가원 생약연구과

생약연구과의 업무

1. 한약등의 품질기준 및 품질검사기관 지정 및 실태조사 지원
2. 한약등의 위해관리 및 유해물질의 기술 지원
3. 한약등의 안전성・유효성 심사에 관한 조사・연구 등 기술 지원
4. 한약등의 시험 검정(관능검사를 포함한다)
5. 생약종합정보시스템의 운영
6. 「멸종위기에 처한 야생동식물종의 국제거래에 관한 협약」의 과학적 검토 업무 및 생약 관련 국제협력의 기술 지원에 관한 사항
7. 생약의 표준품 및 대조(對照)생약 제조・분양・관리
8. 생약자원센터의 관리 및 운영
9. 생약의 표본관리, 생약자원의 수집, 개발 및 보존에 관한 조사 및 연구
10. 한약등의 허가 및 심사에 관련한 조사 및 연구
11. 한약등의 제조 및 품질관리기준에 관한 조사・연구
12. 생약자원의 데이터베이스 구축 및 운영
13. 한약재 자원관의 운영
14. 한약등의 **시험법 개발**

연구개발 배경

2 연구개발 배경

현행 한약(생약)제제 품질관리 체계의 문제점

✓ 동일 생약에 대한 확인·정량 중복시험 수행

품목명	주성분(생약)		비고
	정량 및 확인시험 대상 ⇒각 생약별 HPLC 정량 및 TLC 확인 필요	확인시험 대상 ⇒각 생약별 TLC 확인 필요	
가미귀비탕	인삼, 치자, 감초 및 목단피	백출, 복령, 황기, 당귀, 원지, 시호, 목향, 대추, 건강 및 산조인	정량시험 4회, 확인시험 14회
갈근탕가천궁신이엑스과립	갈근, 마황, 작약, 감초 및 계지	대추, 신이, 천궁 및 건강	정량시험 5회, 확인시험 9회
당귀수산엑스과립	작약, 도인 및 감초	당귀, 오약, 향부자, 홍화 및 계심	정량시험 3회, 확인시험 8회
반하사심탕엑스과립	감초, 인삼, 황금 및 황련	반하, 건강 및 대추	정량시험 4회, 확인시험 7회
방풍통성산엑스과립	감초, 작약, 마황, 황금 및 치자	당귀, 천궁, 연교, 반하, 생강, 형개, 방풍, 대황, 망초, 백출 및 길경	정량시험 5회, 확인시험 16회
삼소음엑스과립	갈근, 인삼, 감초	자소엽, 지실, 길경, 진피, 전호, 반하, 복령, 대추, 생강, 목향	정량시험 3회, 확인시험 13회
소청룡탕엑스과립	작약, 감초 및 마황	건강, 계지, 세신, 오미자 및 반하	정량시험 3회, 확인시험 8회
시호계지탕	황금, 감초 및 작약	시호, 반하, 계지, 인삼, 대추 및 건강	정량시험 3회, 확인시험 9회
쌍화탕액	작약, 육계 및 감초	숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 생강 및 대추	정량시험 3회, 확인시험 9회
팔미지황환	산수유, 목단피 및 육계	숙지황, 산약, 택사, 복령 및 정제부자	정량시험 3회, 확인시험 8회

하나의 품목 당
HPLC 3~5회
TLC 7~16회

2 연구개발 배경

현행 한약(생약)제제 품질관리 체계의 문제점

✓ **지표물질 정량법 및 확인시험을 개별적으로 실시**

예)시호청간탕엑스과립	
정량법	1회량 (1포) 중 감초 중 글리시리진산 2.1 mg, 작약 중 패오니플로린 1.8 mg, 치자 중 게니포시드 4.5 mg, 황금 중 바이칼린 7.5 mg, 황련 및 황백 중 총 베르베린 [베르베린염화물로서] 3.2 mg 이상
확인시험	**시호, 당귀, 작약, 천궁, 지황, 황련, 황금, 황백, 치자, 연교, 길경, 우방자, 괄루근, 박하 및 감초** 이 약을 가루로 하고 이하 생약시험법 중 각 확인시험법에 따라 시험한다.

감초 등 생약 6품목에 대하여 TLC 확인시험과 HPLC 정량법 모두 설정

⇒ **품질관리 간소화 필요**

(TLC 확인시험을 HPLC 피크 확인으로 대체 등)

시호청간탕엑스과립 1품목의 품질관리에는 5회의 HPLC 정량분석 필요

⇒ **효율적인 품질관리를 위하여 다성분 동시정량법 개발 필수적**

2 연구개발 배경

현행 한약(생약)제제 품질관리 체계의 문제점

✓ 구성 생약 확인시험의 판정기준이 모호

지황·생지황·숙지황

이 약을 지황(또는 생지황, 숙지황)으로서 약 1.0 g에 해당하는 양을 달아 메탄올 100 mL를 넣어 환류냉각기를 달고 1 시간 환류추출한다. 식힌 다음 여과하고 여액을 감압농축하여 잔류물에 물을 넣어 녹인 다음 분액깔때기에 옮기고 아세트산에틸 30 mL를 넣어 추출한다. 아세트산에틸층을 취하여 감압농축하고 잔류물에 에탄올 2 mL를 넣어 녹여 검액으로 한다. 따로 「지황」(또는 「생지황」, 「숙지황」) 약 1.0 g을 달아 이하 검액과 같은 방법으로 조작하여 만든 액을 표준액으로 한다.

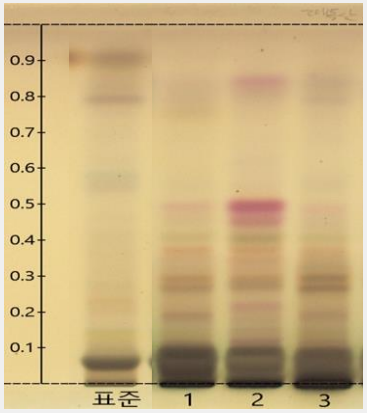
흡착제 : 실리카겔 GF_{254}

전개용매 : 클로로포름·메탄올혼합액(20 : 1)

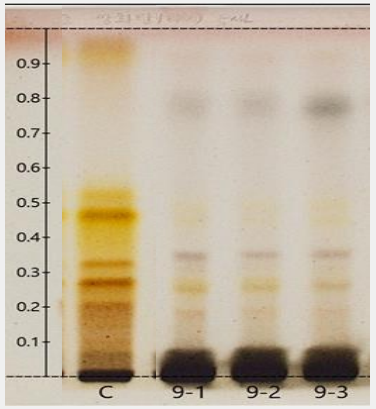
발색제 : 2,4-디니트로페닐히드라진시액 또는 자외선 (254 nm)

조 작 : 박층크로마토그래프법에 따라 시험한 다음 검액과 표준액의 R_f 값 및 색상을 비교하여 확인한다.

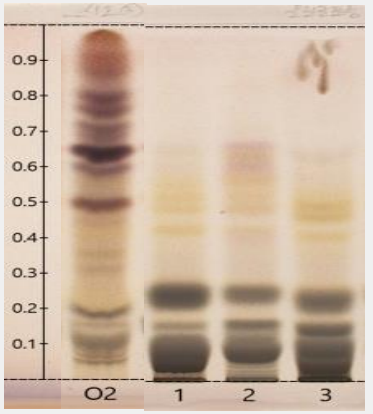
TLC 시험결과 예시



자소엽 및 제제1-3



감초 및 제제1-3



시호 및 제제1-3

전처리 과정이 복잡하며,
일부 품목의 경우 유해시약을 사용함
⇒ **전처리 간소화 필요 (환류추출→초음파추출 등)**
⇒ **유해시약 대체 시험법 개발 필요**
(클로로포름, 벤젠 → 디클로로메탄, 메탄올 등)

'표준생약'과 한약(생약)제제의 TLC 패턴을 비교하여 확인하여야 하나, 판정기준반점의 위치나 색이 정해져 있지 않아 판정에 어려움이 발생
⇒ **판정의 정확성 제고 필요**
('표준생약'과 대조하여 확인 → '지표물질' 반점확인)

2 연구개발 배경

현행 한약(생약)제제 품질관리 체계 전문가 자문결과 및 개선방향

전문가 자문회의 자문결과(21.12.2)

▶ 확인·정량 중복시험을 정량법 중 지표성분 피크 확인으로 대체 (조치완료, 개정고시 21.8.12)

▶ 지표물질 정량법 및 확인시험을 동시분석법으로 대체**(자체연구)**
- 한약(생약)제제 중 **정량법이 설정된 지표물질에 대한 동시정량법을 개발**
- 한약(생약)제제 **동시확인시험법 개발**

▶ 확인시험의 구성 생약에 대한 판정기준의 모호함 개선**(출연연구)**
- 물추출물에서 **확인가능한 지표성분 설정** 추진

"자체연구과제 및 출연연구과제를 통해 한약(생약)제제 동시정량·확인시험 개발"

연구내용 및 방법

3 연구내용 및 방법

1. 시험법 개발

▶ 배 경

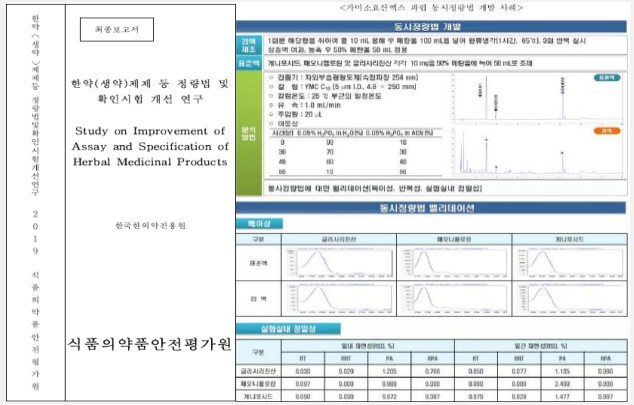
- 2019년 종료된 용역과제*를 통해 한약(생약)제제 동시분석법을 개발하여 개별 분석을 동시분석으로 변경하고 전처리를 간소화하는 등의 성과가 있었음

  (예) 시호청간탕엑스과립 : (현행) 정량법 – 5가지 지표성분에 대한 개별 정량법 수행

  → (개선) 5가지 지표성분에 대한 동시정량법 개발

  *** 한약(생약)제제 등 정량법 및 확인시험 개선 연구('16~'19, 한국한의약진흥원)**

- 허나, 용역연구과제의 동시분석법은 **개별 품목에 대한 동시분석법이라는 한계점** 존재



○ 동시분석법 개선

표준액 조제	글리시리진산, 신남산 및 패오니플로린 표준품을 각각 5 mg을 메탄올에 녹여 50 mL로 하여 표준액으로 한다.
검액 조제	1회분에 해당하는 양을 정밀하게 달아 50% 메탄올 40 mL을 넣어 30분간 초음파 추출한 다음 여과하고 50% 메탄올을 넣어 50 mL로 하여 검액으로 한다.
분석조건	- 검출기 : 자외부흡광광도계(측정파장 248 nm) - 칼럼 : YMC C18 칼럼(5 μm I.D., 4.6 × 250 mm) - 유속 : 1.0 mL/min - 주입량 : 10 μL - 이동상

시간(분)	0.05% H_3PO_4 in H_2O (%)	0.05% H_3PO_4 in Acetonitrile (%)
0	86	14
15	75	25
35	50	50
40	30	70
42	86	14
45	86	14

○ 동시정량 시험법 개발

표준액 조제	아시아티코시드 표준품 16 mg, 아시아틴산 표준품 12 mg 및 마데카신산 표준품 12 mg을 정확하게 달아 메탄올 25 mL에 녹여 표준액으로 한다.
검액 조제	이 약 0.5 g을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 여과한 다음 정확하게 50 mL로 하여 검액으로 한다.
분석조건	- 검출기 : 자외부흡광광도계(측정파장 210 nm) - 칼럼 : YMC C18 칼럼(5 μm I.D., 4.6 × 250 mm) - 칼럼온도 : 25℃ 부근의 일정온도 - 유속 : 1.0 mL/min - 주입량 : 10 μL - 이동상 :

시간(분)	0.05% H_3PO_4 in H_2O (%)	0.05% H_3PO_4 in Acetonitrile (%)
0	90	10
5	80	20
15	60	40
20	20	80
25	20	80
30	90	10
35	90	10

품목별 수행

3 연구내용 및 방법

1. 시험법 개발

▶ 한약(생약)제제 별 동시정량법 개발

- (현행) 한약(생약)제제 별 각 지표성분에 대해 개별 정량법 → **(개선) 한약제제 별 해당 지표성분에 대한 동시정량법 개발***
- 선행연구에서 제안한 한약제제 별 동시정량법은 **중복된 지표성분, 동일한 검액추출 조건, 유사한 이동상 조건**으로 이루어짐.

품목	계지복령환가대황엑스 과립	시호청간탕엑스 과립	인진호탕엑스 과립
정량 설정 현황	✓계지 중 신남산, ✓**목단피 및 작약 중 총 패오니플로린**, ✓도인 중 아미그달린	✓감초 중 글리시리진산, **작약 중 패오니플로린**, ✓**치자 중 게니포시드**, ✓황금 중 바이칼린, ✓황련 및 황백 중 총 베르베린(베르베린염화물)	✓인진호 중 디메틸에스쿠레틴, **치자 중 게니포시드**
검액추출	**1회 용량, 50 % 메탄올 50 mL 30 분, 초음파 추출**		
측정파장	240 nm	254 nm	254 nm

이동상 — (A) 0.05 % PA in water (B) 0.05 % PA in ACN

시간 (분)	A (%)	B (%)
0	86	14
15	75	25
30	50	50
35	30	70

시간 (분)	A (%)	B (%)
0	90	10
25	85	15
60	55	45
65	10	90
66	90	10
70	90	10

시간 (분)	A (%)	B (%)
0	86	14
15	75	25
30	50	50
35	30	70
40	86	14
45	86	14

⇒ **선행연구에서 제안된 한약(생약)제제 별 개발된 동시정량법을 착안하여 하나의 동시분석법을 통해 여러가지의 한약(생약)제제 분석이 가능하도록 13가지 동시분석법 개발**

2. 품목 선정 및 분석조건

▶ 품목 선정

- 공정서에 수록된 한약(생약)제제 중 가장 큰 비중을 차지하는 **과립제(완제)** 및 **연·건조엑스제(원료)**를 우선 선정(1차년도)

- 1차년도 분석법 확립 이후 환/산제 및 액제에 대한 동시분석법 및 확인시험법 개발(2차년도)

⇒ **과립제 및 연건조엑스제 대상 품목 : 제1법 - 166 품목, 제2법 - 92품목, 제3법 – 85품목**

▶ 분석 조건

- 추출물 제제에 사용되는 **13가지 성분을 분석**하는 **1법 (분석시간:80분)**
  가장 많은 제제에 사용되는 **지표성분 6종을 선정하여 간편하게 4종씩 분석** 가능한 **2법과 3법** 마련 **(분석시간 45~50분)**

동시정량법2 (바이칼린, 베르베린)	공통 품목 (글리시리진산, 패오니플로린)	동시정량법3 (신남산, 푸에라린)
생강사심탕엑스 과립	계지가작약탕엑스 과립	당귀건중탕엑스 과립
청상방풍탕엑스 과립	평위오령산엑스 과립	황기건중탕엑스 과립
반하사심탕엑스 과립	궁귀교애탕엑스 과립	계지탕엑스 과립
황금탕엑스 과립	귀기건중탕엑스 과립	당귀사역가오수유생강탕엑스 과립
대시호탕엑스 과립	당귀음자탕엑스 과립	귀기건중탕 액
지음강화탕엑스 과립	작약감초탕엑스 과립	소건중탕엑스 과립
용담사간탕엑스 과립	계지가용골모려탕엑스과립	계마각반탕 액
청상견통탕엑스 과립	승양보위탕엑스 과립	쌍화탕가갈근창출인삼 액
소시호탕엑스 과립	쌍화탕가갈근창출 액	안중산엑스 과립
청화보음탕엑스 과립	쌍화탕가갈근창출엑스과립	계지복령환가대황엑스과립
시호계지탕엑스 과립	쌍화탕 액	우황청심원액 (원방,사향대체물질함유)
삼황사심탕엑스 과립	쌍화탕엑스 과립	우황청심원액 (변방,사향대체물질함유)
동시분석법 2 (92 품목 적용 가능)	배농산급탕엑스 과립	우황청심원액(변방)
	십전대보탕 액	우황청심원액(원방)
	쌍금탕 액	갈근탕가천궁신이엑스과립
	온경탕엑스 과립	삼소음엑스 과립
	십전대보탕엑스 과립	대음금자 액
	탁리소독음엑스 과립	**동시분석법 3 (85 품목 적용 가능)**
	갈근탕 액	
	계마각반탕엑스 과립	
	십신탕 액	
	오적산엑스 과립	
	갈근탕엑스 과립	
	소청룡탕엑스 과립	
	소청룡탕 액	
	당귀수산엑스 과립	

	동시분석1법(13종성분)	동시분석2법(4종성분)	동시분석3법(4종성분)
분석대상	글리시리진산, 패오니플로린, 푸에라린, 신남산, 아미그달린, 패오놀, 로가닌, 쉬잔드린, 디메틸에스쿠레틴, 헤스페리딘, 게니포시드, 바이칼린, 베르베린	글리시리진산, 패오니플로린, 바이칼린, 베르베린	글리시리진산, 패오니플로린, 푸에라린, 신남산
검출기	자외부흡광광도계 **(측정파장 230nm)**	자외부흡광광도계 **(측정파장 220nm)**	자외부흡광광도계 **(측정파장 240nm)**
칼럼	안지름 약 4 ~ 6 mm, 길이 15 ~ 25 cm인 스테인레스강관에 5 ~ 10 μm의 액체크로마토그래프용옥타데실실릴실리카겔을 충전		
이동상	0.05 % PA in water 와 0.05 % PA in ACN를 농도기울기적으로 제어		
분석시간	**총 80분**	**총 45분**	**총 50분**

2. 시험법 벨리데이션 및 모니터링

▶ 시험법 벨리데이션 수행

- '의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인'에 따라 직선성 등 밸리데이션 전항목 수행

검증요소	기준범위	
검출한계(LOD)	Based on 3.3σ×/S of method blanks (S:기울기, σ: 표준편차)	
정량한계(LOQ)	Based on 10σ×/S of method blanks (S:기울기, σ: 표준편차)	
직선성(Linearity)	$R^2 \geq 0.99$	
반복성(RSD_r) %	4.8, 8.0, 16.0 mg/Kg	15
회수율(Recovery) %		70 ~ 110 %*
피크간 분리도	1.5 이상	

* AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Method for Dietary Supplements and Botabicals: 회수율 농도(10 ~100 ppm) → 허용범위(70 ~ 110 %)

▶ 모니터링 수행

- 시중 유통되는 한약(생약)제제에 대한 자체개발 동시분석법 및 현행 시험법 모니터링 수행

3. 업계 및 전문가 자문을 통한 개정(안) 마련

▶ 현장중심약전협의체를 통한 업계의견 수렴

- 자체연구과제에서 개발한 동시분석법에 대한 자사 품목 적용성 검토 등 공동 연구 수행

- 한약(생약)제제 제조업체의 의견을 수렴하여 과학적이고 효율적인 개정(안) 마련
  * 참여업체 : 광동제약 등 한약(생약)제제 제조업체 6개 업체

▶ 전문가 자문을 통한 개정(안) 마련

- 한약(생약) 및 분석 전문가 자문회의를 통하여 개발한 시험법에 대한 자문 수행

- 최종 개정(안)에 대하여 중앙약사심의위원회를 통해 최종 개정(안) 마련

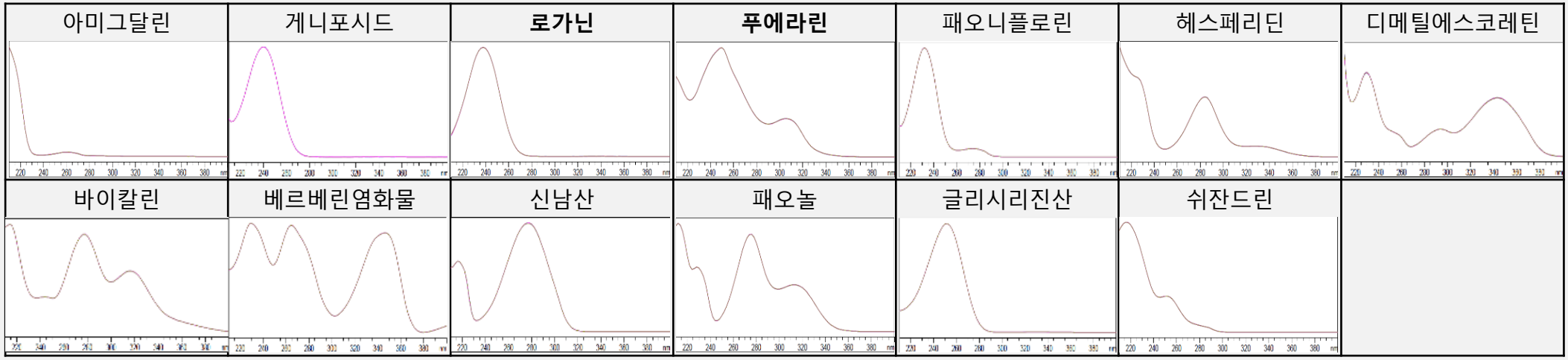
연구결과 및 고찰

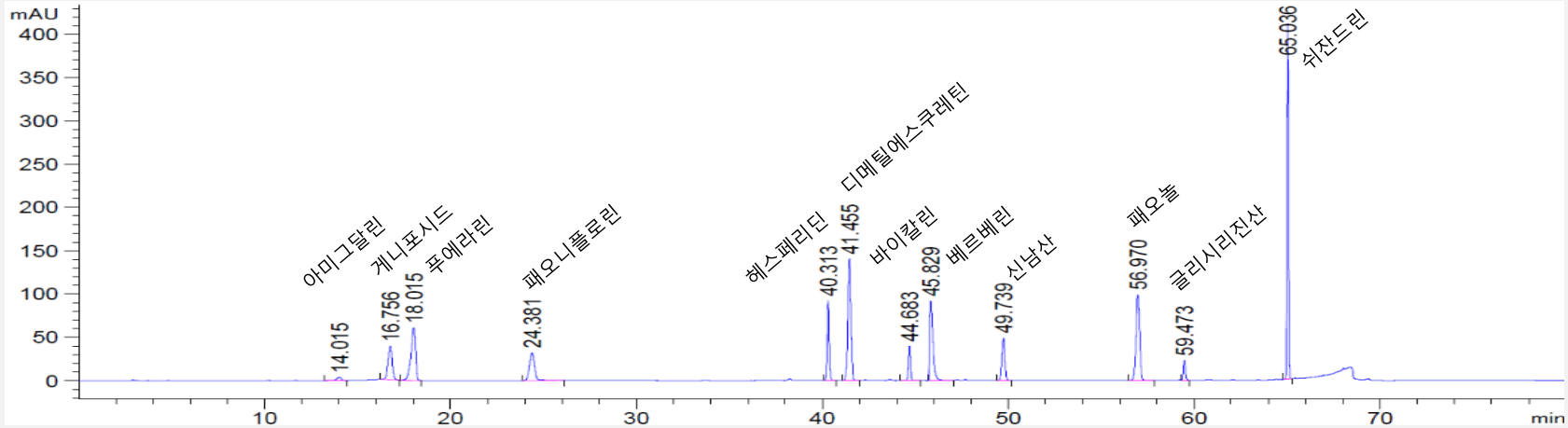
연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제1법)

다성분동시정량법(안)

분석대상물질

- 푸에라린 등 13종 지표물질이 동시에 검출되는 파장인 230 nm로 선정





연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제1법)

다성분동시정량법(안)

재료 및 실험방법

표준액

아미그달린(도인, 행인), 게니포시드(치자, 두충), 로가닌(산수유), 푸에라린(갈근), 패오니플로린(작약, 목단피), 베르베린염화물(황련, 황백), 디메틸에스쿠레틴(스코파론)(인진호), 바이칼린(황금), 신남산(계지, 육계), 헤스페리딘(진피), 패오놀(작약, 목단피), 글리시리진산(감초), 쉬잔드린(오미자)

전처리 방법 및 HPLC 기기 분석 조건

검액	표준액
이 약 약 1회 용량 取 + 50 % 메탄올 40 mL ↓ 30 분, 초음파 추출 여과 ↓ 50 % 메탄올를 넣어 100 mL로 맞춤 검액	아미그달린, 게니포시드푸에라린, 패오니플로린, 헤스페리딘, 디메틸에스쿠레틴, 바이칼린, 베르베린염화물, 신남산, 패오놀, 글리시리진산, 쉬잔드린표준품 각각 200 mg + 메탄올 10 mL ↓ 표준원액 (20,000 ug/mL) ↓ 아미그달린 표준원액 7.5 mL, 그 외 표준원액 각 2.5 mL 取 ↓ + 메탄올을 넣어 50 mL로 맞춤 표준액 (1,000 ug/mL)

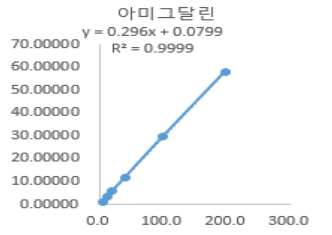
기기	HPLC : Agilent 1260 infinity		
검출기	자외부흡광광도계 (측정파장 230 nm)		
칼 럼	YMC Pack ODS-A 5㎛ 250×4.6mm 12nm		
칼럼온도	25 ℃		
이동상	(A) 0.05 % PA in water (B) 0.05 % PA in ACN		
	시간 (분)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	25	85	15
	60	55	45
	65	10	90
	66	90	10
	70	90	10
	80	90	10
유 량	1.0 mL/분		
주입량	10 uL		

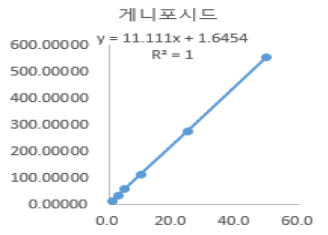
4 연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제1법)

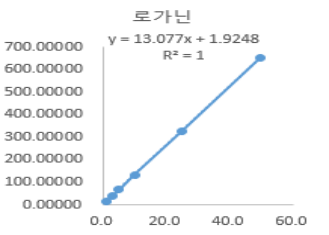
다성분동시정량법(안)

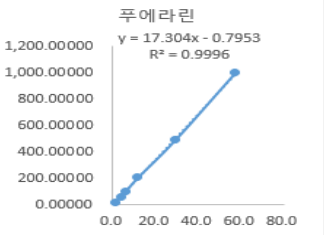
직선성, 검출한계, 정량한계

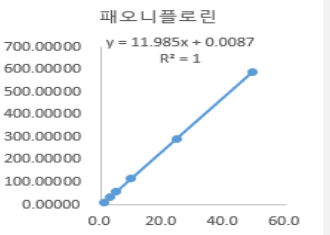
- 13가지 지표성분이 혼합된 표준액을 3반복 하여 직선성 및 검출한계, 정량한계를 확인함.
- 지표성분 모두 R^2 값 0.99 이상으로 직선성이 적합, 3반복하여 얻은 y절편의 표준편차으로 검출한계와 정량한계를 구함.

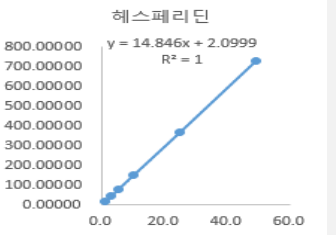


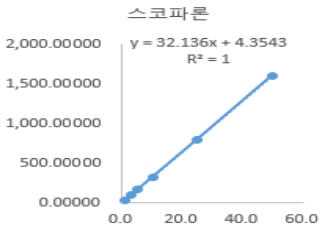


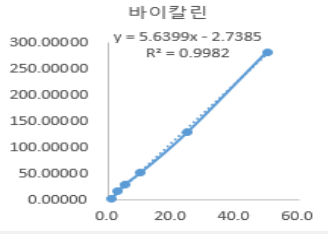


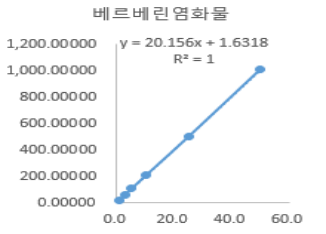


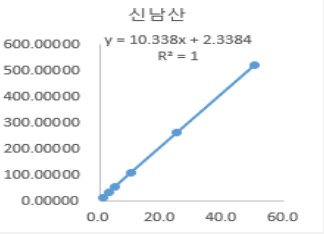


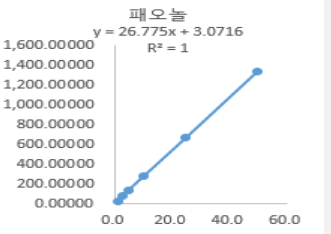


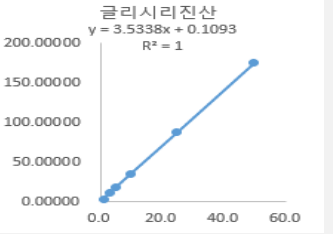


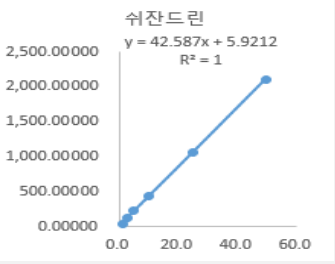












	아미달린	게니포시드	로가닌	푸에라린	패오니플로린	헤스페리딘	스코파론	바이칼린	베르베린	신남산	패오놀	글리시리진산	쉬잔드린
R^2 평균	0.9999	1.0000	1.0000	0.9996	1.0000	1.0000	1.0000	0.9982	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
y 절편 표준편차	0.0799	1.6454	1.9248	-0.7953	0.0087	2.0999	4.3543	-2.7385	1.6318	2.3384	3.0716	0.1093	5.9212
기울기 평균	0.2960	11.1105	13.0769	17.3037	11.9851	14.8457	32.1361	5.6399	20.1564	10.3379	26.7748	3.5338	42.5868
검출한계	2.1346	0.2689	0.2649	0.5778	0.2383	0.1913	0.1942	0.3229	0.2180	0.1799	0.1898	0.1600	0.1729
정량한계	6.4685	0.8148	0.8029	1.7510	0.7221	0.5797	0.5886	0.9785	0.6606	0.5452	0.5752	0.4847	0.5239

4 연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제1법)

다성분동시정량법(안)

분리도, 반복성

- 혼합표준액의 분리도는 1.5 이상이며, 혼합표준액을 9회 반복하였을 때 상대표준편차는 1.5 % 이하로 적합함.

지표성분	유지시간(T)	Width(1/2)	분리도
Amygalin	14.013	0.2518	
Geniposide	16.737	0.2449	6.471
Puerarin	**17.973**	**0.2456**	**2.973**
Paeoniflorin	24.342	0.3003	13.767
Hesperidin	40.264	0.1277	43.897
Scoparone	41.410	0.1815	4.373
Baicalin	44.625	0.1155	12.773
Berberine	45.776	0.1666	4.815
Cinnamic acid	49.692	0.1708	13.696
Paeonol	56.926	0.2167	22.029
Glycyrrhetic acid	59.425	0.1195	8.771
Shizandrin	65.013	0.0831	32.546

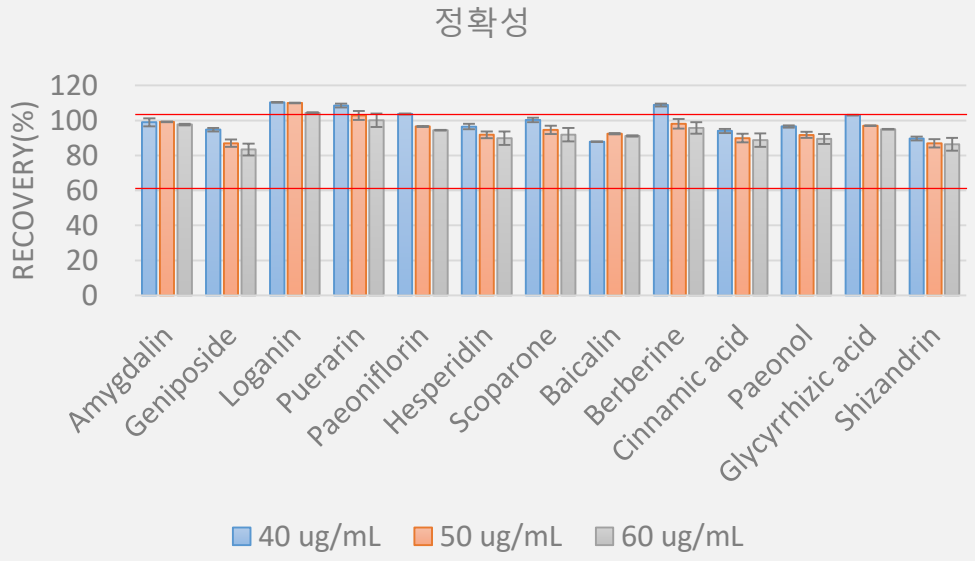
지표성분	1	2	3	4	5	6	7	8	9	평균	표준편차	상대표준편차
Amygalin	58.71220	59.75296	59.34158	59.28825	58.80157	58.76573	59.07201	58.88575	58.74865	59.04097	0.35534	**0.60185**
Geniposide	556.28503	558.28693	557.20642	556.23663	555.33466	554.82391	555.28052	555.90350	553.63263	555.88780	1.35401	**0.24358**
Loganin	654.19720	654.90918	654.52423	653.94678	652.97681	652.83069	653.27747	653.53772	651.40033	653.51116	1.05479	**0.16140**
Puerarin	945.79883	950.62384	946.41559	945.07477	935.83850	942.33582	946.45160	942.71118	945.33752	944.50974	4.04046	**0.42778**
Paeoniflorin	617.41284	611.22388	618.07037	623.40851	616.99988	605.33881	609.55316	608.46490	621.40894	614.65348	6.22413	**1.01262**
Hesperidin	737.50842	737.87775	737.27698	736.60724	734.97772	735.06299	735.14642	735.05377	733.26654	735.86420	1.52699	**0.20751**
Scoparone	1615.02502	1615.27649	1614.38733	1613.14075	1609.13257	1609.21326	1610.71545	1609.45898	1605.53564	1611.32061	3.32820	**0.20655**
Baicalin	286.85641	286.91608	286.60281	285.89767	285.21368	284.85773	284.75113	284.64987	283.72482	285.49669	1.12631	**0.39451**
Berberine	1005.94989	1006.18817	1005.46204	1005.30408	1002.40289	1004.67255	1014.49011	1014.17310	1011.56805	1007.80121	4.41869	**0.43845**
Cinnamic acid	523.29987	522.95612	522.86255	522.33069	521.54730	521.39288	521.13953	520.83588	519.84674	521.80128	1.14058	**0.21859**
Paeonol	1347.41443	1345.56042	1345.90637	1344.54187	1340.70227	1341.95874	1341.32361	1340.37988	1338.10986	1342.87749	3.09606	**0.23055**
Glycyrrhetic acid	175.54547	175.50835	175.61209	175.41133	174.90424	174.99837	174.85187	174.72224	174.41690	175.10787	0.42476	**0.24257**
Shizandrin	2130.39917	2121.45459	2130.29932	2119.20874	2123.14209	2123.21069	2123.74829	2123.44482	2117.69019	2123.62199	4.33481	**0.20412**

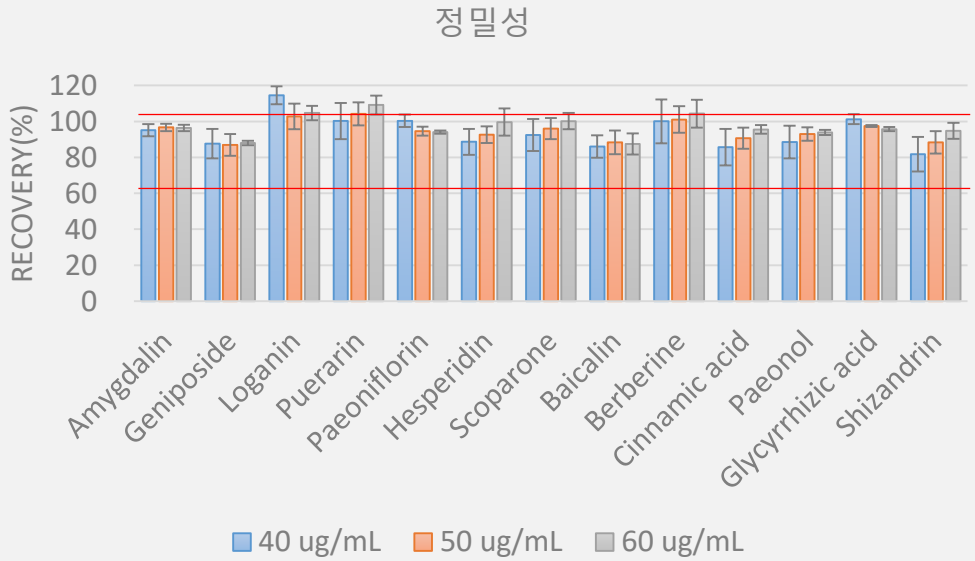
연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제1법)

다성분동시정량법(안)

정확성, 정밀성

- 3가지 농도(저, 중, 고)를 3반복하여 3일 동안 분석하여 정확성, 정밀성을 산출하였음.
- 정확성 : 회수율의 평균은 83.36 ~ 110.42 %, 상대표준편차(%RSD)는 0.10 ~ 7.34 %,
- 정밀성 : 회수율의 평균은 81.78 ~ 114.49 %, 상대표준편차(%RSD)는 0.58 ~ 12.23 %로 만족





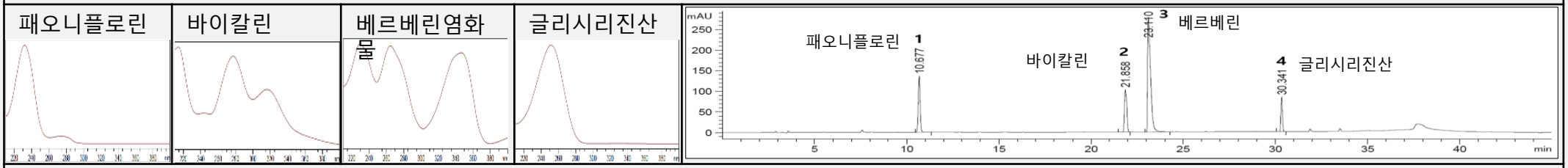
4 연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제2/3법)

시험 방법 검토

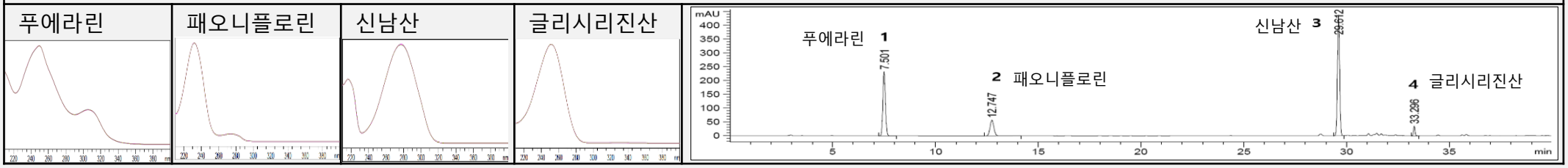
측정파장

- 제2법: 패오니플로린, 바이칼린, 베르베린염화물, 글리시리진산 지표물질이 동시에 검출되는 파장인 240nm로 선정
- 제3법: 푸에라린, 패오니플로린, 신남산, 글리시리진산 지표물질이 동시에 검출되는 파장인 220 nm로 선정

제2법



제3법



연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제2/3법)

다성분동시정량법(안) : 제2법

재료 및 실험방법

표준액

패오니플로린(작약, 목단피), 바이칼린(황금), 베르베린염화물(황련, 황백), 글리시리진산(감초) **(생약 6종 지표성분 4가지)**

전처리 방법 및 HPLC 기기 분석 조건

검액	표준액
이 약 약 1회 용량 取 + 50 % 메탄올 40 mL ↓ 30 분, 초음파 추출 여과 ↓ 50 % 메탄올를 넣어 100 mL로 맞춤 검액	패오니플로린, 바이칼린, 베르베린염화물, 글리시리진산 표준품 각각 20 mg + 메탄올 20 mL ↓ 표준원액 ↓ 표준원액 각 1 mL 取 ↓ + 메탄올을 넣어 20 mL로 맞춤 표준액

기기	HPLC : Agilent 1260 infinity		
검출기	자외부흡광광도계 (측정파장 240 nm)		
칼 럼	YMC Pack ODS-A 5㎛ 250×4.6mm 12nm		
칼럼온도	25 ℃		
이동상	(A) 0.05 % PA in water (B) 0.05 % PA in ACN		
	시간 (분)	A (%)	B (%)
	0	86	14
	15	75	25
	30	50	50
	35	30	70
	40	86	14
	45	86	14
유 량	1.0 mL/분		
주입량	10 uL		

연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제2/3법)

다성분동시정량법(안) : 제3법

재료 및 실험방법

표준액

푸에라린(갈근), 패오니플로린(작약, 목단피), 신남산(계지, 육계), 글리시리진산(감초) **(생약 6종 지표성분 4가지)**

전처리 방법 및 HPLC 기기 분석 조건

검액	표준액
이 약 약 1회 용량 取 + 50 % 메탄올 40 mL ↓ 30 분, 초음파 추출 여과 ↓ 50 % 메탄올를 넣어 100 mL로 맞춤 검액	푸에라린, 패오니플로린, 신남산, 글리시리진산 표준품
	각각 20 mg + 메탄올 20 mL ↓ 표준원액 ↓ 표준원액 각 1 mL 取 ↓ + 메탄올을 넣어 20 mL로 맞춤 표준액

기기	HPLC : Agilent 1260 infinity		
검출기	자외부흡광광도계 (측정파장 220 nm)		
칼 럼	YMC Pack ODS-A 5㎛ 250×4.6mm 12nm		
칼럼온도	25 ℃		
이동상	(A) 0.05 % PA in water (B) 0.05 % PA in ACN		
	시간 (분)	A (%)	B (%)
	0	85	15
	10	85	15
	25	65	35
	35	40	60
	40	40	60
	45	85	15
	50	85	15
유 량	1.0 mL/분		
주입량	10 uL		

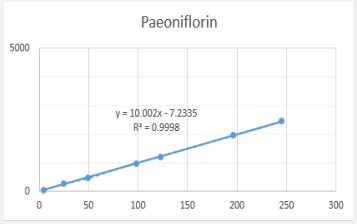
4 연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제2/3법)

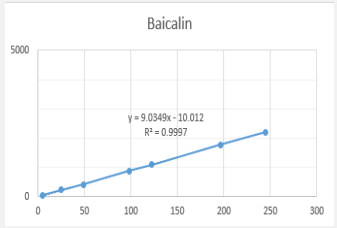
다성분동시정량법(안) : 제2/3법

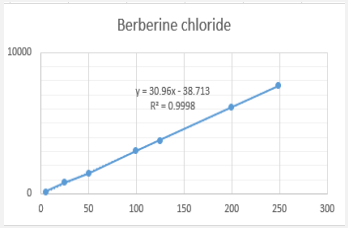
직선성, 검출한계, 정량한계

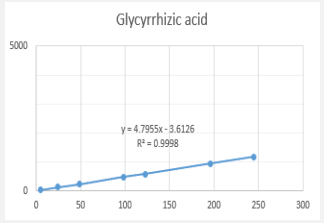
- 각 4가지 지표성분이 혼합된 표준액을 3반복 하여 직선성 및 검출한계, 정량한계를 확인함.
- 지표성분 모두 R^2 값 0.99 이상으로 직선성이 적합, 3반복하여 얻은 y절편의 표준편차로 검출한계와 정량한계를 구함.

제2법

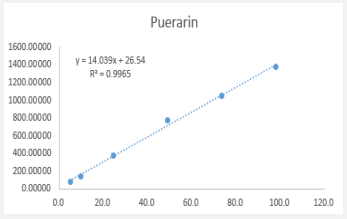


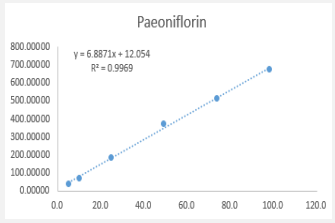


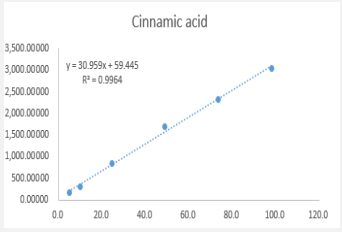


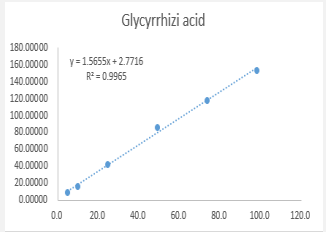


제3법









	제 2법				제 3법			
	패오니플로린	바이칼린	베르베린	글리시리진산	푸에라린	패오니플로린	신남산	글리시리진산
R^2 평균	0.9998	0.9997	0.9998	0.9998	0.9965	0.9969	0.9964	0.9965
y 절편	-7.2335	-10.0119	-38.7131	-3.6126	26.540	12.054	59.445	2.772
기울기 평균	10.002	9.035	30.960	4.796	14.039	6.887	30.959	1.565
검출한계	0.35	0.32	0.38	0.35	0.07	0.14	0.12	0.12
정량한계	1.07	0.96	1.15	1.05	0.21	0.42	0.35	0.35

연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제2/3법)

다성분동시정량법(안) : 제2/3법

분리도, 반복성

- 혼합표준액의 분리도는 1.5 이상이며, 혼합표준액을 9회 반복하였을 때 상대표준편차는 1.5 % 이하로 적합함.

제2법			
지표성분	유지시간(T)	Width(1/2)	분리도
Paeoniflorin	10.726	0.1329	
Baicalin	21.994	0.0905	59.518
Berberine	23.079	0.1509	5.304
Glycyrrhetic acid	30.399	0.0891	35.990
제3법			
지표성분	유지시간(T)	Width(1/2)	분리도
Puerarin	7.416	0.1658	
Paeoniflorin	12.593	0.2506	14.671
Cinnamic acid	29.614	0.1207	54.093
Glycyrrhetic acid	33.314	0.0762	22.174

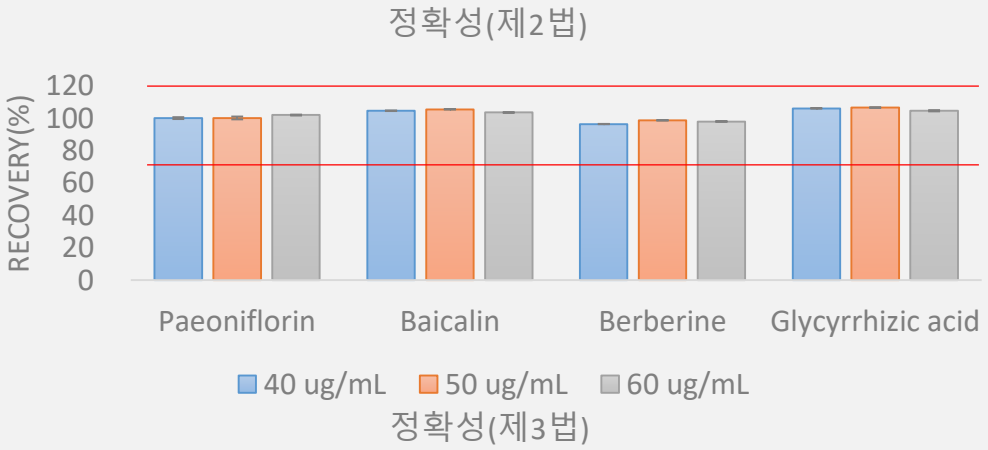
	제2법				제3법			
지표성분	Paeoniflorin	Baicalin	Berberine	Glycyrrhetic acid	Puerarin	Paeoniflorin	Cinnamic acid	Glycyrrhetic acid
1	977.24713	886.43689	3060.35425	470.28641	1985.10742	762.84283	3204.09131	167.79172
2	984.53619	894.48553	3068.20264	473.38287	1984.78540	757.76300	3203.06348	167.67848
3	994.39667	897.31738	3058.04688	475.73422	1988.41785	762.81396	3207.18872	167.92239
4	993.67273	897.07587	3061.82007	475.19748	1985.91992	761.35498	3203.17700	167.49890
5	988.45905	896.12860	3063.61670	473.82617	1984.88562	756.38184	3199.90698	167.50935
6	985.68066	892.21283	3057.66064	472.63416	1981.26563	760.79370	3197.24316	167.32869
7	984.52368	892.41534	3060.99121	472.62033	1984.28210	763.44836	3200.62109	167.29912
8	982.04767	890.35443	3055.92334	472.10956	1982.40125	751.42664	3197.59619	167.25449
9	984.86194	890.85699	3062.93774	473.44708	1982.55933	757.58813	3196.95679	167.31464
평균	986.15841	893.03154	3061.06150	473.24870	1,984.40272	759.37927	3,201.09386	167.51086
표준편차	5.39848	3.58584	3.69426	1.62833	2.13773	3.94183	3.53836	0.23946
상대표준편차	0.54743	0.40154	0.12069	0.34408	0.10773	0.51909	0.11054	0.14295

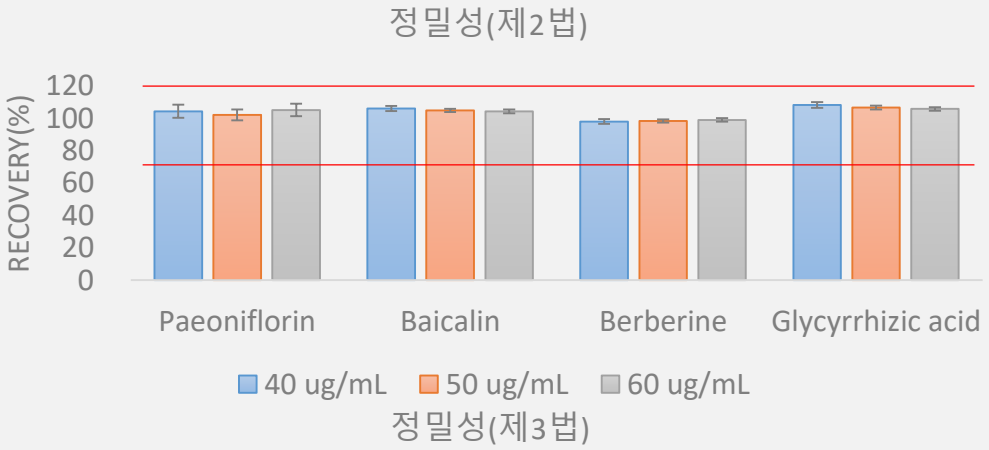
연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법(제2/3법)

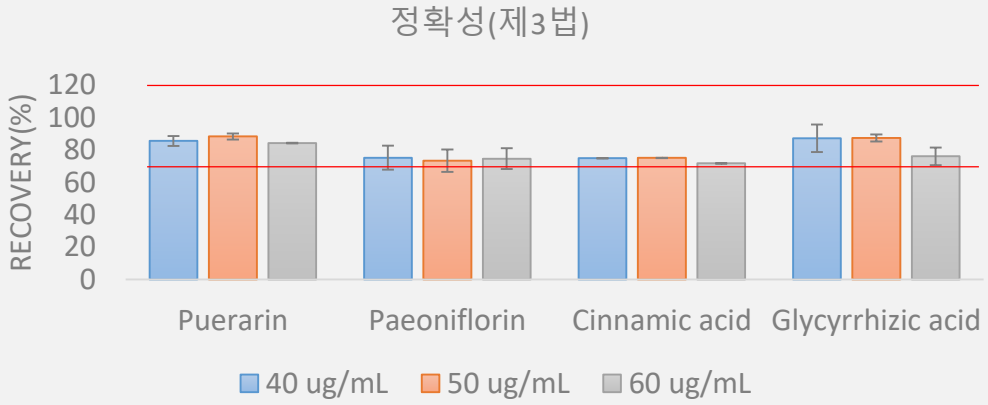
다성분동시정량법(안)

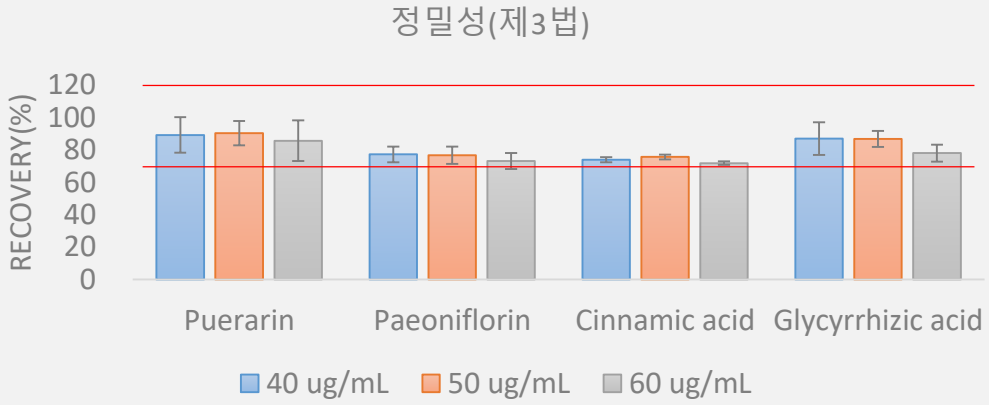
정확성, 정밀성

- 3가지 농도(저, 중, 고)를 3반복하여 3일 동안 분석하여 정확성, 정밀성을 산출하였음.
- (제2법) 정확성 : 회수율의 평균은 96.37 ~ 106.66 %, 정밀성 : 상대표준편차(%RSD)는 0.94 ~ 3.90 %,
- (제3법) 정확성 : 회수율의 평균은 71.59 ~ 88.20 %, 정밀성 : 상대표준편차(%RSD)는 1.45 ~ 14.62 %으로 만족.









연구결과 및 고찰 : 현장중심약전협의체

현장중심약전협의체

1차 현장중심약전협의체 개최(22.6.20.)

- 한약(생약)제제 확인 정량시험 개선을 위한 식약처 연구 현황 공유
- 한약(생약)제제 동시분석시험법에 대한 적용성 검토 협조
- 동시분석시험법에 대한 개선사항 및 공정서 수재 품목 개선사항 수렴

2차 현장중심약전협의체 개최(22.11.9.)

- 한약(생약)제제 동시분석시험법에 대한 적용성 검토 결과 논의

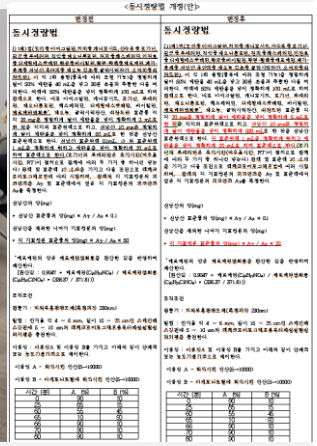
☞ **현행 시험법 대비 약 114% 검출 확인**, 업계 적용 가능함 확인

- 회의 현장 및 서면 의견 수렴을 통해 제조업계의 시험법 개선사항 조사

☞ 업계의 개선사항을 반영하여 동시분석시험법 개정(안) 마련



<회의 사진>



<시험법 개정(안)>

<업체 적용성 검토 결과>

업체명	A				B	C						D	E	자체연구			
적용품목	갈근탕	소청룡탕	반하사심탕	갈근탕가천궁신이	삼황사심탕	황련해독탕	온청음	시호계지탕	방풍통성산	자음강화탕	청화보음탕	소청룡탕	갈근탕	형개연교탕	시호청간탕	갈근탕가천궁신이	패독산
제형	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제	과립제
글리시리진산	79	133	108	61				101	84	164	81	232	92	94	80		
패오니플로린	262	170		282			95	122	87	143	132	60	299	120			
바이칼린			115		79	91	111	158	94					173	95		
베르베린			148		97	100				67	82						
푸에라린				119													
신남산				274												102	103
게니포사이드						47	47							96	95		

연구결과 및 고찰 : 전문가 자문회의

전문가 자문회의

▶ 전문가 자문회의 수행

○ 전문가 서면자문을 통해 한약(생약)제제 과립제 및 연건조제 동시분석시험법 타당성 검토 및 분석법 확립

* (자문위원) J교수(S대학교) 등 한약(생약) 및 분석 전문가 6명

<동시정량법(안)>

동시정량법

(1)제1법(도인·홍화·아미그달린,치자·황금·게니포시드,산조인·홍국·로가닌,갈근·홍화·푸에라린,작약·황금·패오니플로린,진피·홍화·헤스페리딘,인진호·홍화·캐럴에스쿠레틴,갈근·황금·바이칼린,갈근·작약·황금·제로제린,계지·목통·신남산,목단피·패오놀,감초·홍국·글리시리진산, 오미자·홍화·쉬잔드린) 의 약 1회 용량(품목에 따라 조절 가능)을 정밀하게 달아 50% 메탄올 40 mL을 넣고 30분 초음파 추출한 다음 여과한다. 여액에 50% 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 마로 아미그달린, 게니포시드, 로가닌, 푸에라린, 패오니플로린, 헤스페리딘, 디캐럴에스쿠레틴, 바이칼린, 제로제린염화물', 패오놀, 글리시리진산, 쉬잔드린 표준품 각각 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 5 mL로 한 것을 각각의 표준원액으로 하고, 신남산 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 500 mL로 한 것을 신남산 표준원액으로 한다. 각 표준원액 1 mL을 정확하게 취하고 메탄올을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 표준액으로 한다.(로가닌과 푸에라린은 유지시간(머무름시간, RT)이 겹치므로 검체에 따라 두 가지 중 하나만 넣는다) 검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여, 검액의 각 지표성분의 피크면적을 A_T 및 표준액에서 얻은 각 지표성분의 피크면적 A_S를 측정한다.

신남산의 양(mg)

= 신남산 표준품의 양(mg) × A_T / A_S × 0.1

신남산을 제외한 나머지 지표성분의 양(mg)

= 각 지표성분 표준품의 양(mg) × A_T / A_S × 20

'제로제린의 양은 제로제린염화물을 환산한 값을 반영하여 계산한다.
[환산값 : 0.9047 = 제로제린($C_{30}H_{34}NO_8$) / 제로제린염화물($C_{30}H_{34}ClNO_8$) = (336.37 / 371.81)]

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계(측정파장 230nm)

칼럼 : 안지름 약 4 — 6 mm, 길이 15 — 25 cm인 스테인레스강관에 5 — 10 μm의 옥타데실실릴화실리카겔을 충전한다.

이동상 : 이동상A 및 이동상B를 가지고 아래와 같이 농도구배조작으로 제어한다.

이동상 A - 희석시킨 인산(5→10000)

이동상 B - 아세토니트릴에 희석시킨 인산(5→10000)

시간 (분)	A (%)	B (%)
0	90	10
25	85	15
60	55	45
65	10	90
66	90	10
70	90	10
90	90	10

유량 : 1.0 mL/분

시스템적합성

시스템의 성능 : 표준액 10 μL를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 아미그달린, 게니포시드 로가닌(푸에라린), 패오니플로린, 헤스페리딘, 디캐럴에스쿠레틴, 바이칼린, 제로제린, 신남산, 패오놀, 글리시리진산, 쉬잔드린의 순서로 유출하고 각각의 피크가 완전하게 분리되도록 농도구배조건을 조정한다.

시스템의 재현성 : 표준액 10 μL씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6회 반복할 때 지표성분 각각의 피크면적의 상대표준편차는 1.5 % 이하이다.

(2) 제2법(작약·황금·패오니플로린,갈근·황금·바이칼린,갈근·작약·황금·제로제린,감초·홍국·글리시리진산) 의 약 1회 용량(품목에 따라 조절 가능)을 정밀하게 달아 50% 메탄올 40 mL을 넣고 30분 초음파 추출한 다음 여과한다. 여액에 50% 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 마로 패오니플로린, 바이칼린, 제로제린염화물', 글리시리진산 표준품 각각 20 mg을 정밀하게

다성분동시정량법 개정(안) 마련

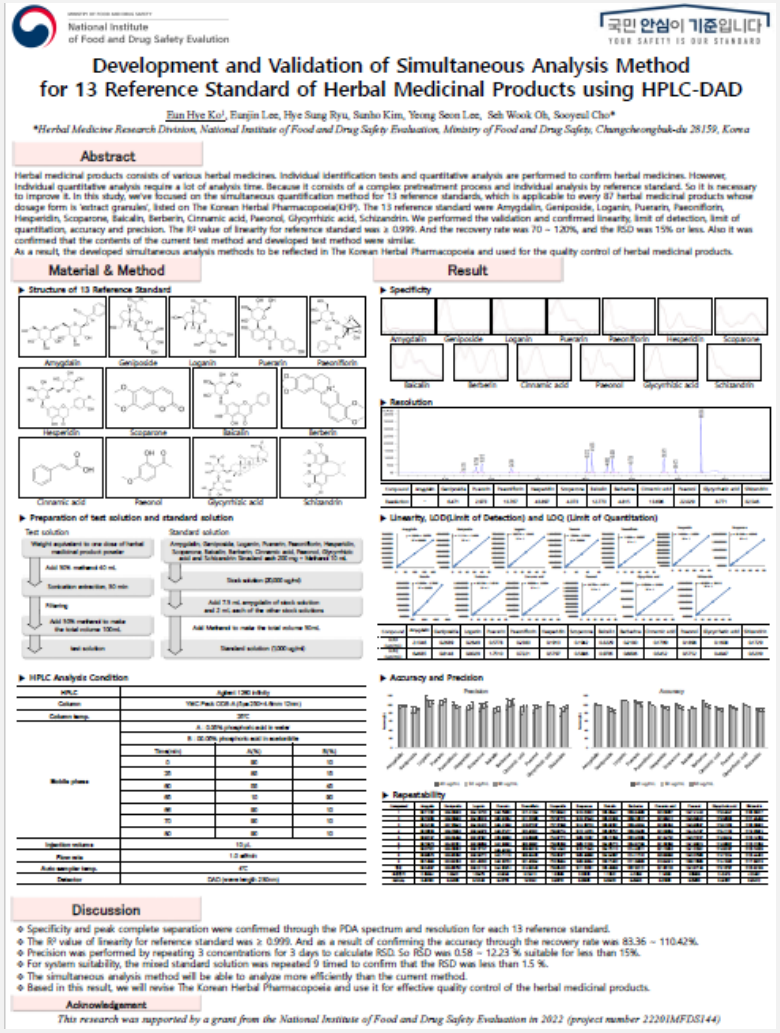
▶ 다성분동시정량법 개정(안) 마련

각조	일반시험법
시호청간탕엑스 과립 **Sihocheonggantang Extract Granules** **정 량 법** (제 1 법) 또는 (제 2 법)을 실시한다. (제 1 법) **1) 감초 중 글리시리진산** 이 약 20 포 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 고운 가루로 한 다음 감초로서 0.5 g에 해당하는 양을 정밀하게 달아 이하 생약시험법 중 감초 정량법에 따라 시험한다. **2) 작약 중 패오니플로린** 이 약 20 포 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 고운 가루로 한 다음 작약으로서 0.5 g에 해당하는 양을 정밀하게 달아 이하 생약시험법 중 작약 정량법에 따라 시험한다. **3) 치자 중 게니포시드** 이 약 20 포 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 고운 가루로 한 다음 치자로서 0.5 g에 해당하는 양을 정밀하게 달아 이하 생약시험법 중 치자 정량법에 따라 시험한다. **4) 황금 중 바이칼린** 이 약 20 포 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 고운 가루로 한 다음 황금으로서 0.5 g에 해당하는 양을 정밀하게 달아 이하 생약시험법 중 황금 정량법에 따라 시험한다. **5) 황련 및 황백 중 총 베르베린 (베르베린염화물로서)** 이 약 20 포 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 고운 가루로 한 다음 황련 및 황백으로서 각 0.5 g에 해당하는 양을 정밀하게 달아 이하 생약시험법 중 황련. 황백 정량법에 따라 시험한다. (제 2 법) 감초 중 글리시리진산, 작약 중 패오니플로린, 치자 중 게니포시드, 황금 중 바이칼린, 황련 및 황백 중 총 베르베린 (베르베린염화물로서) 생약시험법 중 동시분석시험법에 따라 시험한다.	**2) 함량시험법** **동시정량법** **(1) 제1법(도인 중 아미그달린,치자 중 게니포시드,산수유 중 로가닌,갈근 중 푸에라린, 작약 중 패오니플로린, 진피 중 헤스페리딘,인진호 중 디메틸에스쿠레틴,황금중 바이칼린,황련·황백중 베르베린,계지·육계중 신남산,목단피중 패오놀,감초중 글리시리진산, 오미자중쉬잔드린)** 이 약 1회 용량(품목에 따라 조절 가능)을 정밀하게 달아 50% 메탄올 40 mL을 넣고 30분 초음파 추출한 다음 여과한다. 여액에 50% 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 따로 아미그달린, 게니포시드, 로가닌, 푸에라린, 패오니플로린, 헤스페리딘, 디메틸에스쿠레틴, 바이칼린, 베르베린염화물*, 패오놀, 글리시리진산, 쉬잔드린 표준품 각각 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 5 mL로 한 것을 각각의 표준원액으로 하고, 신남산 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 500 mL로 한 것을 신남산 표준원액으로 한다. 각 표준원액 1 mL을 정확하게 취하고 메탄올을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 표준액으로 한다.(로가닌과 푸에라린은 유지시간(머무름시간, RT)이 겹치므로 검체에 따라 두 가지 중 하나만 넣는다) 검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여, 검액의 각 지표성분의 피크면적을 A_T 및 표준액에서 얻은 각 지표성분의 피크면적 A_S를 측정한다 **(2) 제2법 ...**

4 연구결과 및 고찰 : 다성분동시정량법

연구성과 : 제53회 한국생약학회 추계 학술대회 발표('22.11.03 ~ '22.11.04)

▶ 한약(생약) 동시분석법 개발(제1법, 제2·3법)에 대한 연구결과 발표



National Institute of Food and Drug Safety Evalution

국민 안심이 기준입니다 YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

Development and Validation of Simultaneous Analysis Method for 13 Reference Standard of Herbal Medicinal Products using HPLC-DAD

Eun Hye Ko†, Eunjin Lee, Hye Sung Ryu, Sunho Kim, Yeong Seon Lee, Seh Wook Oh, Sooyeul Cho*

*Herbal Medicine Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Chungcheongbuk-do 28159, Korea

Abstract

Herbal medicinal products consists of various herbal medicines. Individual identification tests and quantitative analysis are performed to confirm herbal medicines. However, Individual quantitative analysis require a lot of analysis time. Because it consists of a complex pretreatment process and individual analysis by reference standard. So it is necessary to improve it. In this study, we've focused on the simultaneous quantification method for 13 reference standards, which is applicable to every 87 herbal medicinal products whose dosage form is 'extract granules', listed on The Korean Herbal Pharmacopoeia(KHP). The 13 reference standard were Amygdalin, Geniposide, Loganin, Puerarin, Paeoniflorin, Hesperidin, Scoparone, Baicalin, Berberin, Cinnamic acid, Paeonol, Glycyrrhizic acid, Schizandrin. We performed the validation and confirmed linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy and precision. The R^2 value of linearity for reference standard was ≥ 0.999. And the recovery rate was 70 ~ 120%, and the RSD was 15% or less. Also it was confirmed that the contents of the current test method and developed test method were similar.

As a result, the developed simultaneous analysis methods to be reflected in The Korean Herbal Pharmacopoeia and used for the quality control of herbal medicinal products.

Material & Method

▶ Structure of 13 Reference Standard

Amygdalin, Geniposide, Loganin, Puerarin, Paeoniflorin, Hesperidin, Scoparone, Baicalin, Berberin, Cinnamic acid, Paeonol, Glycyrrhizic acid, Schizandrin

▶ Preparation of test solution and standard solution

Test solution: Weight equivalent to one dose of herbal medicinal product powder → Add 50% methanol 40 mL → Sonication extraction, 30 min → Filtering → Add 50% methanol to make the total volume 100mL → test solution

Standard solution: Amygdalin, Geniposide, Loganin, Puerarin, Paeoniflorin, Hesperidin, Scoparone, Baicalin, Berberin, Cinnamic acid, Paeonol, Glycyrrhizic acid and Schizandrin Standard with 200 mg → Methanol 10 mL → Stock solution (20,000 ug/mL) → Add 7.5 mL amygdalin of stock solution and 2 mL each of the other stock solutions → Add Methanol to make the total volume 10mL → Standard solution (1,500 ug/mL)

▶ HPLC Analysis Condition

HPLC	Agilent 1260 Infinity
Column	YMC Pack ODS-A (5μm 250×4.6mm 12nm)
Column temp.	25℃
Mobile phase	A : 0.05% phosphoric acid in water B : 80.05% phosphoric acid in acetonitrile

Time(min)	A(%)	B(%)
0	85	15
25	60	40
40	55	45
45	10	90
60	85	15
70	85	15
80	85	15

Injection volume	10μL
Flow rate	1.0 ml/min
Auto sampler temp.	4℃
Detection	DAD (wave length 230nm)

Result

▶ Specificity

Amygdalin, Geniposide, Loganin, Puerarin, Paeoniflorin, Hesperidin, Scoparone, Baicalin, Berberin, Cinnamic acid, Paeonol, Glycyrrhizic acid, Schizandrin

▶ Resolution

▶ Linearity, LOD(Limit of Detection) and LOQ (Limit of Quantitation)

▶ Accuracy and Precision

Precision, Accuracy

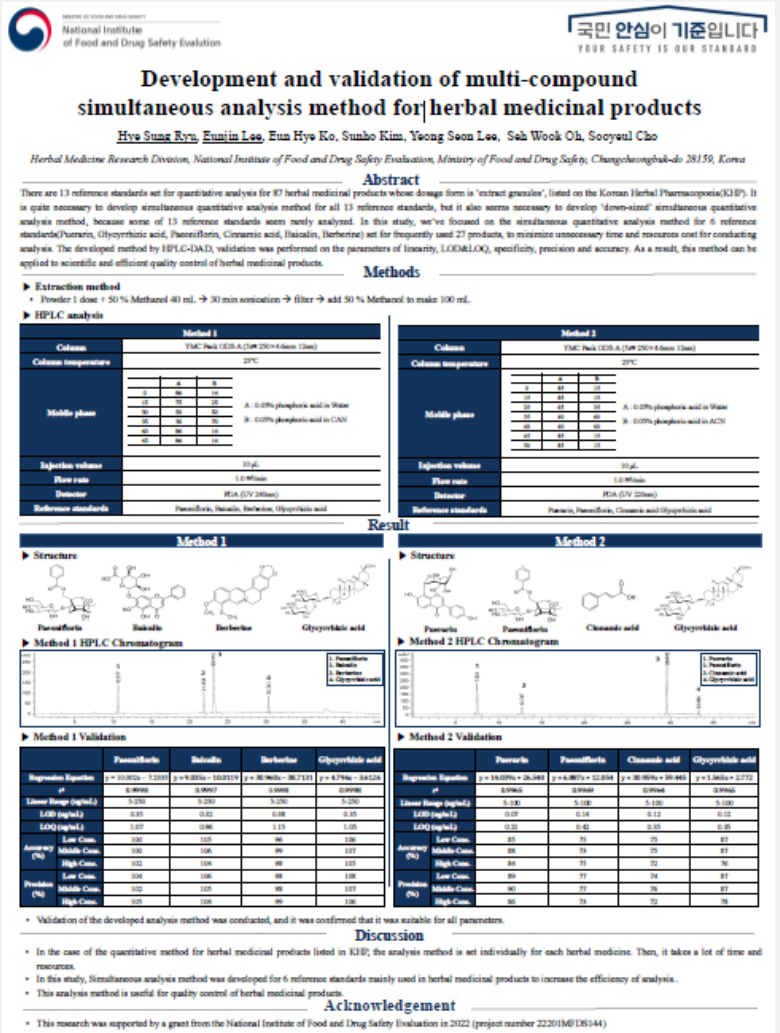
▶ Repeatability

Discussion

- Specificity and peak complete separation were confirmed through the PDA spectrum and resolution for each 13 reference standard.
- The R^2 value of linearity for reference standard was ≥ 0.999. And as a result of confirming the accuracy through the recovery rate was 83.36 ~ 110.42%.
- Precision was performed by repeating 3 concentrations for 3 days to calculate RSD. So RSD was 0.58 ~ 12.23 % suitable for less than 15%.
- For system suitability, the mixed standard solution was repeated 9 timed to confirm that the RSD was less than 1.5 %.
- The simultaneous analysis method will be able to analyze more efficiently than the current method.
- Based in this result, we will revise The Korean Herbal Pharmacopoeia and use it for effective quality control of the herbal medicinal products.

Acknowledgement

This research was supported by a grant from the National Institute of Food and Drug Safety Evaluation in 2022 (project number 22201MFDS144)



National Institute of Food and Drug Safety Evalution

국민 안심이 기준입니다 YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

Development and validation of multi-compound simultaneous analysis method for herbal medicinal products

Hye Sung Ryu, Eunjin Lee, Eun Hye Ko, Sunho Kim, Yeong Seon Lee, Seh Wook Oh, Sooyeul Cho

Herbal Medicine Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Chungcheongbuk-do 28159, Korea

Abstract

There are 13 reference standards set for quantitative analysis for 87 herbal medicinal products whose dosage form is 'extract granules', listed on the Korean Herbal Pharmacopoeia(KHP). It is quite necessary to develop simultaneous quantitative analysis method for all 13 reference standards, but it also seems necessary to develop 'down-sized' simultaneous quantitative analysis method, because some of 13 reference standards seem rarely analyzed. In this study, we've focused on the simultaneous quantitative analysis method for 6 reference standards(Puerarin, Glycyrrhizic acid, Paeoniflorin, Cinnamic acid, Baicalin, Berberine) set for frequently used 27 products, to minimize unnecessary time and resources cost for conducting analysis. The developed method by HPLC-DAD, validation was performed on the parameters of linearity, LOD&LOQ, specificity, precision and accuracy. As a result, this method can be applied to scientific and efficient quality control of herbal medicinal products.

Methods

▶ Extraction method

- Powder 1 dose + 50 % Methanol 40 mL → 30 min sonication → filter → add 50 % Methanol to make 100 mL

▶ HPLC analysis

Method 1	
Column	YMC Pack ODS-A (5μm 250×4.6mm 12nm)
Column temperature	25℃
Mobile phase	A : 0.05% phosphoric acid in Water B : 0.05% phosphoric acid in CAN
Injection volume	10 μL
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	PDA (UV 240nm)
Reference standards	Paeoniflorin, Baicalin, Berberine, Glycyrrhizic acid

Time(min)	A	B
0	85	15
15	70	30
30	50	50
35	30	70
40	85	15
45	85	15

Method 2	
Column	YMC Pack ODS-A (5μm 250×4.6mm 12nm)
Column temperature	25℃
Mobile phase	A : 0.05% phosphoric acid in Water B : 0.05% phosphoric acid in ACN
Injection volume	10 μL
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	PDA (UV 220nm)
Reference standards	Puerarin, Paeoniflorin, Cinnamic acid Glycyrrhizic acid

Time(min)	A	B
0	85	15
10	80	20
20	65	35
30	60	40
40	60	40
45	85	15
50	85	15

Result

Method 1

▶ Structure

Paeoniflorin, Baicalin, Berberine, Glycyrrhizic acid

▶ Method 1 HPLC Chromatogram

1. Paeoniflorin 2. Baicalin 3. Berberine 4. Glycyrrhizic acid

▶ Method 1 Validation

	Paeoniflorin	Baicalin	Berberine	Glycyrrhizic acid
Regression Equation	y = 10.802x − 7.2301	y = 9.838x − 10.8119	y = 30.960x − 26.7121	y = 4.794x − 3.6126
R^2	0.9998	0.9997	0.9998	0.9998
Linear Range (ug/mL)	5-250	5-250	5-250	5-250
LOD (ug/mL)	0.85	0.82	0.88	0.85
LOQ (ug/mL)	1.07	0.96	1.15	1.05
Accuracy (%) Low Conc.	100	105	96	106
Accuracy (%) Middle Conc.	100	106	99	107
Accuracy (%) High Conc.	102	104	98	103
Precision (%) Low Conc.	104	106	98	108
Precision (%) Middle Conc.	102	105	98	107
Precision (%) High Conc.	105	104	99	106

Method 2

▶ Structure

Puerarin, Paeoniflorin, Cinnamic acid, Glycyrrhizic acid

▶ Method 2 HPLC Chromatogram

1. Puerarin 2. Paeoniflorin 3. Cinnamic acid 4. Glycyrrhizic acid

▶ Method 2 Validation

	Puerarin	Paeoniflorin	Cinnamic acid	Glycyrrhizic acid
Regression Equation	y = 14.039x + 26.340	y = 6.807x + 12.854	y = 30.993x + 59.465	y = 1.365x + 2.772
R^2	0.9965	0.9969	0.9966	0.9965
Linear Range (ug/mL)	5-100	5-100	5-100	5-100
LOD (ug/mL)	0.07	0.14	0.12	0.12
LOQ (ug/mL)	0.21	0.42	0.35	0.35
Accuracy (%) Low Conc.	93	75	75	87
Accuracy (%) Middle Conc.	88	73	75	87
Accuracy (%) High Conc.	84	75	72	86
Precision (%) Low Conc.	89	77	74	87
Precision (%) Middle Conc.	90	77	76	87
Precision (%) High Conc.	86	73	72	78

- Validation of the developed analysis method was conducted, and it was confirmed that it was suitable for all parameters.

Discussion

- In the case of the quantitative method for herbal medicinal products listed in KHP, the analysis method is set individually for each herbal medicine. Then, it takes a lot of time and resources.
- In this study, Simultaneous analysis method was developed for 6 reference standards mainly used in herbal medicinal products to increase the efficiency of analysis..
- This analysis method is useful for quality control of herbal medicinal products.

Acknowledgement

- This research was supported by a grant from the National Institute of Food and Drug Safety Evaluation in 2022 (project number 22201MFDS144)

향후 계획

5 향후 계획

23년 생약연구과 계획

➢ **한약(생약)제제 정량법 개선 – 다성분동시정량법 개발**

- 한약(생약)제제 동시정량법(액제) 개발
  - 추출물제제(액제) 19품목 동시정량법 검토 및 개정(안) 마련
- 한약(생약)제제 동시정량법(환제) 개발
  - 비추출물제제(환제) 40품목 동시정량법 검토 및 개정(안) 마련

➢ **한약(생약)제제 확인시험법 개선 – 다성분동시확인시험법 개발**

- (현행) 대조생약에 대한 TLC 확인시험법 ☞ (개선) 지표성분에 대한 HPLC 동시확인시험법

“공정서 개정(안)을 통해 한약(생약)제제 품질관리에 활용”

감사합니다.

생약연구과 김선호 주무관
043-719-4816
thanx2u@korea.kr

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원