

HPLC에 의한 熊膽의 UDCA성분 분석에 관한 研究

藥品化學科

鄭愛姬 · 吳世宗 · 尹源庸 · 朴聖培

Study on Separation of UDCA in Crude Bear gall by HPLC.

Pharmaceutical Chemistry Division

Ae-Hee Chung, Sea-Jong Oh, Won-Yong Yoon, Sung-Bae Park

==Abstract==

For the purpose of evaluating the quality of the bear gall, ursodeoxycholic acid which is known as the characteristic component of the bear bile acids was analyzed in 24 so-called bear galls and in the galls of other animals by HPLC installed with μ -Bondapak C₁₈ or Novapak C₁₈ and RI detector or UV detector (210nm). The HPLC peak of ursodeoxycholic acid was detected in six alkaline hydrolysates of the 24 samples.

緒 論

熊膽(Bear Bile, Fel Ursi)은 곰 *Ursus arctos* Linné 또는 그 밖의 근연동물(곰과 Ursidae)의 담즙을 말린 것으로 약효는 消炎, 解熱, 鎮痙鎮痛解每藥으로서 充血性炎症, 胃痛, 驚癇, 膽石疝痛, 黃疸, 下痢, 寄生蟲驅除, 外用으로는 點眼, 痔疾, 腫痛에 塗布하는데 응담을 단일투여하기도 하고 熊冰膏, 五膽膏, 神聖餅, 熊膽麝香丸, 奇應丸, 黑丸子, 妙功十一丸(反魂丹), 六神丸등 처방해서 사용하기도 한다.¹⁻³⁾

產地는 인도, 네팔, 중국, 소련(시베리아) 일본등지인데 우리나라에서는 몇몇 농장에서 사육하는 것을 제외하고는 거의 소량을 수입하는 실정이다.²⁾

成分으로는 약 20%의 담즙산이 ursodeoxycholic acid(UDCA), chenodeoxycholic acid(CDCA), cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA)로서 존재하며 이들 담즙산은 일반적으로 taurine 또는 glycine과 peptide 결합을 한 포합산을 형성하고 있으며 그의 cholesterol, 담즙색소(bilirubin, biliverdin), amino acid (taurine, glycine, aspartic acid, glutamic acid, lysine)등이 보고 되어 있다.³⁾ 이 중에서 담즙산을 분리하는 방법에는 여저크로마토그래프법,⁴⁾ 박층크로마토그래프법(TLC

법)⁴⁻⁷⁾ 가스크로마토 그래프법(GC법)^{5,8-11)} 고속액체 크로마토그래프법(HPLC법)^{7-8,12-16)} 등이 보고되어 있다. HPLC를 사용한 방법으로 유리담즙산과 포합담즙산등이 동시에 검출된다고 보고하였으나 Enzyme pak-HSD, Bile pak, Micro pack MCH-5등의 column과 형광광도계검출기를 사용하는 등 일반적인 검정 목적으로 사용하기에는 어려운 점이 있어, 저자등은 HPLC에서 보편적으로 사용되는 column과 용매를 사용하여 응담의 가수분해물중 지표물질로서 다른 동물의 담에서는 검출되지 않고 응담에 있어서만 특징적으로 함유되어 있다고 하는 UDCA성분의, HPLC에 의한 분석법을 개발하여 응담의 품질 확보에 응용코저 하였다.

實驗方法

1. 시 약

Cholic acid(CA), ursodeoxycholic acid (UDCA) lithocholic acid(LCA), hyodeoxycholic acid(HDCA) deoxycholic acid (DCA), chenodeoxycholic acid (CDCA)는 sigma 제품이고 그의 MeOH, petroleum ether NaOH, HCl, ethylacetate, Na₂SO₄ Anhydrous는 特級 또는 HPLC用을 사용하였다.

2. 장치 및 특정조건

High Performance Liquid Chromatograph

① Waters Associates Inc. Model 6,000A with Sic Chromatocorder 11

Detector : RI (differential refractometer)

column : μ -Bondapak C₁₈

Mobile phase : 70% MeOH

Flow rate : 0.7ml/min

Attenuator : 8×

Column temperature : 30°C

Sample size : 10 μ l

Chart Speed : 1.0cm/min

② Waters Associates Inc. Model 510 with waters 745 data module

Detector : Lambda-Max Model 481 detector at 210nm with 0.05 Aups.

Column : Nova pak C₁₈

Mobile phase : 65% MeOH

Flow rate : 1.0ml/min

Column temperature : Ambient

Sample size : 10 μ l

Chart speed : 0.25cm/min

3. 시 료

시중에 熊膽이라고 유통되는것 24종과 가락동 도살장에서 채취한 돼지쓸개(豚膽) 소쓸개(牛膽) 그의 시중에서 구입한 개쓸개(猪膽)등을 사용하였다.

4. 試驗方法

1) 표준용액의 조제 -UDCA, CA, DCA, CDCA, HDCA, LCA의 표준품 각각 100mg을 정밀히취하여 MeOH에 용해, 全량을 10ml로 한다.

2) 시료용액의 조제 -시중 용담과 돈담 우담 견담을 건조후 분말로 한 다음 200mg을 정밀히 취하여 이하 Tsuneo등의 방법에 따라⁷⁾ 수욕상에서 EtOH 15ml로 2시간씩 3회 환류추출하여 여과하고 여액을 80°C에서 감압농축하여 잔류물을 pet. ether 20ml로 1시간씩 3회 환류추출하여 여과, 여액을 제거하고 잔류물에 2.5N-NaOH 10ml를 넣어 온도 120°C, 압력 1kg/cm²의 autoclave에서 4시간 가수분해한 다음 실온에서 냉각 후 d-HCl으로 pH를 1로 조절한 다음 ethyl acetate 30ml, 25ml, 20ml로 3회 추출한 추출액을 물로 수회 세척하여 ethyl acetate층을 취하여 감압농축 한다. 잔류물을 MeOH 2ml로 용해하여 Millipore여과한 후 시료용액으로 한다.

結果 및 考察

1. Thin-Layer Chromatography

각표준액과 가수분해한 시료용액을 고정상 Kieselgel 60F₂₅₄(Merck), 이동상 isooctane isopropylalcohol : HAc(30 : 10 : 1), 발색제로서 10% H₂SO₄를 분무하여 정색한 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

각 표준액은 Rf치 0.2~0.5 사이에서 분리되었으며, CA와 DCA는 밝은 황색, CDCA와 UDCA는 약간의 쪽색을 띤 황색, HDCA는 진한 황색, LCA는 황갈색의 spot를 나타내었다. 상기 TLC조건을 이용하여 시중에서 응답이라고 유통되는 시료와 위화물로 사용되기 쉬운 우담, 돈담, 견담에 대해 TLC를 실시한 결과는 Table 1과 같다.

견담에서는 CA, CDCA와 HDCA가 검출되었으며, 우담에서는 CA, CDCA, DCA와 LCA가 검출되었다. 시중에서 유통되는 견체 24종중 UDCA가 검출된 것

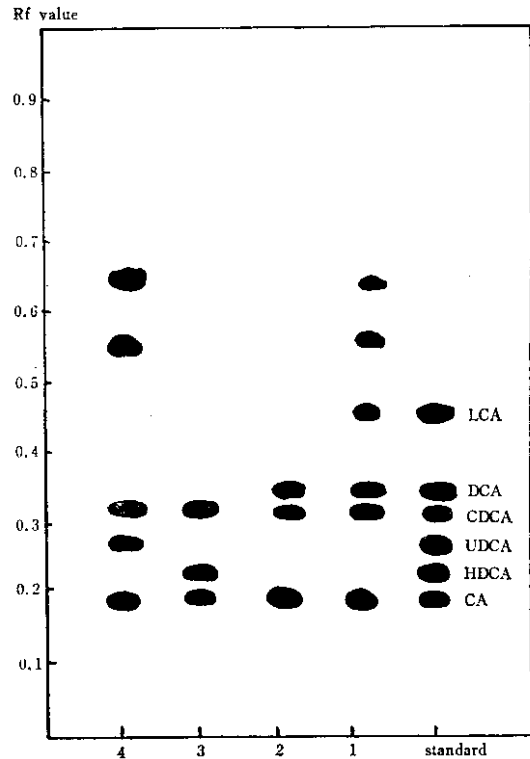


Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of standard mixture, Pig gall, ox gall and sample.

- | | |
|-------------|-------------|
| 1. ox gall | 2. dog gall |
| 3. pig gall | 4. sample |

Table 1. Composition of bile acid in animal galls and commercial crude bile drug.

Sample	HDCA	DCA	CDCA	LCA	CA	UDCA
Pig	+	-	+	-	+	-
Dog	-	+	+	-	+	-
Ox	-	+	+	+	##	-
1	-	-	##	-	+	##
2	+	-	##	-	##	-
3	-	##	-	-	##	-
4	-	-	##	-	+	##
5	##	-	##	-	-	-
6	##	-	##	-	-	-
7	-	+	-	-	##	-
8	##	-	##	-	-	-
9	##	-	##	-	-	-
10	-	+	-	-	+	-
11	##	-	##	-	-	-
12	##	-	##	-	-	-
13	-	+	+	-	-	+
14	-	+	-	-	-	##
15	-	+	-	-	-	+
16	-	-	##	-	##	+
17	-	+	-	-	+	-
18	-	+	-	-	##	-
19	##	-	##	-	+	-
20	-	##	-	-	##	-
21	##	-	##	+	-	-
22	-	-	+	-	+	+
23	-	-	+	-	-	##
24	-	-	##	-	##	+

Symbol; - : negative, + : weak positive, ## : positive, ### : strong positive.

은 6종이며, 9종에서는 HDCA가 확인되었다.

2. High-Performance Liquid Chromatography

HPLC의 RI detector를 사용하여 표준액과 시료용액을 Injection하여 얻은 chromatogram은 Fig. 2 및 3과 같다.

HPLC의 column은 Novapak C₁₈, 이동상으로는 65% MeOH을 사용하여 210nm의 파장에서 UV detector로 검출한 chromatogram은 Fig. 4 및 5와 같다.

HPLC를 사용한 두 방법에서 addition method에 따라 검액에 UDCA를 첨부한 결과 UDCA peak가 정량적으로 커짐을 확인하였다.

RI detector는 UV detector보다 감도가 떨어져서 시

료의 양이 많이 필요하므로 합성UDCA를 사용한 제제를 검정하는때는 별 무리가 없으리라고 생각되어지나 응답에 소량 들어있는 UDCA를 분리 정량하기 위해서는 감도가 더 예민한 방법이 요구되어진다.

210nm의 파장에서 UV detector를 사용하여 UDCA를 검출한 방법은 감도가 예민하며 양호하게 분리되었고 HPLC에서 일반적으로 쓰는 Novapak C₁₈ column과 65% MeOH을 사용하므로써 편리하다는 장점이 있는 것으로 생각된다. 또한 Kurozumi등에 따르면 곰도 산지별 계절별에 따라 응답에 함유되어 있는 UDCA의 양에 차이가 있으며 특히 冬眠중에 채취한 응답은 UDCA

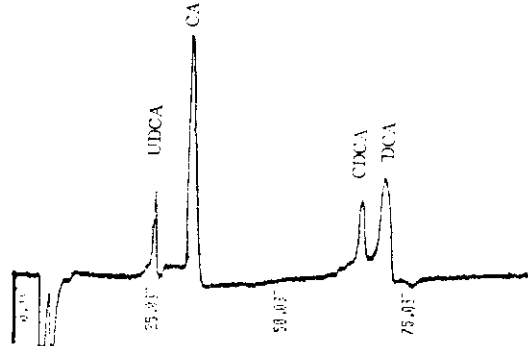


Fig. 2. HPLC chromatogram of the standard bile acid mixture.

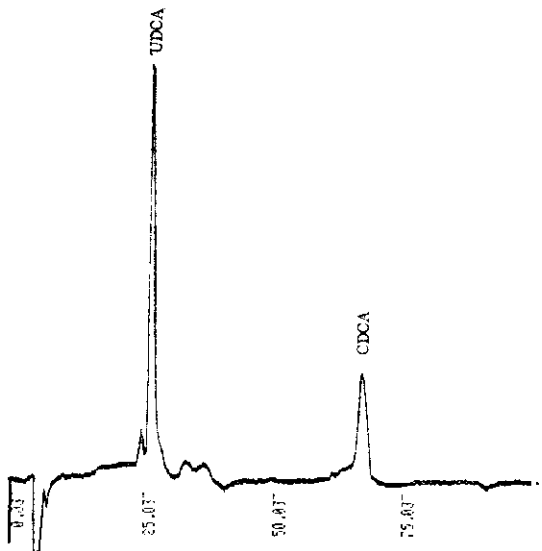


Fig. 3. HPLC chromatogram of commercial crude bile drug.

가 아주 미량이거나 존재하지 않는 것으로 보고하고 있다.¹⁷⁾ 그러므로 분석후 UDCA가 소량만 존재한다고 해서 응답의 眞品에 의심을 하기에는 어려운 점도 있을 것으로 본다. 따라서 곰의 쓸개를 산지별, 계절별로 적



Fig. 4. HPLC chromatogram of the standard bile acid mixture.

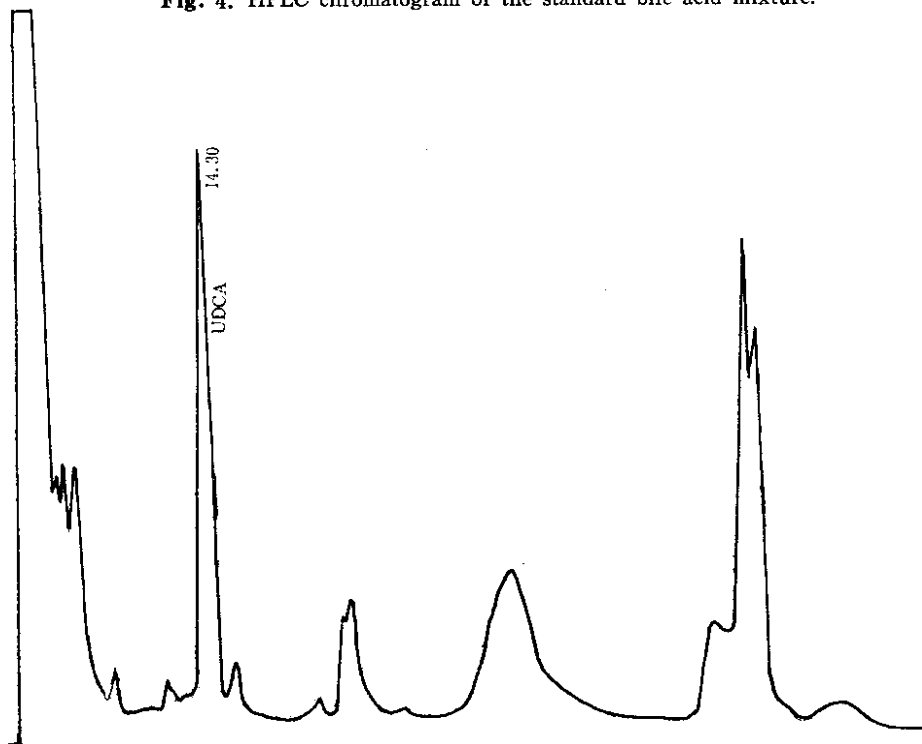


Fig. 5. HPLC chromatogram of commercial crude bile drug.

접 채취하여 웅담의 진품을 확보하고 이들의 UDCA 함량에 대한 기본자료가 마련되어야 할 것으로 사료된다. 우리나라의 현재 실정으로는 웅담의 진위여부를 판정하기 어려운 膽들이 고가로 유통되고 있으므로 이들의 품질관리를 위해 본 HPLC 분석법이 유용할 것으로 사료된다.

본 실험에서는 HPLC를 이용한 UDCA의 분리확인을 하였으나 본 방법으로 UDCA정량을 하기 위해서 추후 계속 연구하고자 한다.

結 論

시중에 웅담이라고 유통되는 검체 24종과 돈담, 우담

견담등을 TLC, HPLC로 분석하였다.

1. HPLC의 Novapak C₁₈ column, 이동상으로 65% MeOH, 210nm 파장에서 UDCA가 양호하게 분리되었다.

2. TLC로 분리 확인한 후 HPLC(210nm)에 의하여 분석한 결과, 시료용액 24종중 6종의 HPLC chromatogram에서 UDCA가 확인되었다.

參考文獻

- 1) 金最壽：標準本草學，進明出版社，서울 p.516 (1975).
- 2) 難波恒雄：原色和漢藥圖鑑(下)，Hoikusha publis-

- hing Co. Japan p.275 (1980).
- 3) 高木敬次郎：和漢藥物學，南山堂，東京 p.242 (1982).
 - 4) Masayasu Kimura.: Activity of Oriental Drugs. V. On the Relationship between Content and Spasmolytic Activity of Components of the Several Kinds of Bear Fel, *Yakugaku Zasshi* 87(7): 801 (1967).
 - 5) Akira Uji: Studies on Bear Gall. I. Determination of Bile Acids in Bear Gall by Gas Chromatography, *Yakugaku zasshi* 95(1):114 (1975).
 - 6) Akira Uji: Studies on Bear Gall II. Determination of Conjugated Bile Acids in Bear Gall by TLC-Autodetector, *Yakugaku zasshi* 95(2):214 (1975).
 - 7) Tsuneo Namba: Fundamental Studies on the Evaluation of Crude Drug. VII. On Animal Gall (I) *Yakugaku zasshi* 102(8):760 (1982).
 - 8) 東京生薬研究会：漢方薬の評価と開発技術，東京，p.316 (1983).
 - 9) Bonita C. Musial and C. Noel Williams: Quantitative assay of conjugated and free bile acids as heptafluorobutyrate derivatives by gas-liquid chromatography, *Journal of Lipid Research* 20: 78 (1979).
 - 10) Keiko Kurozumi, Teruo Harano, Kazumi Yamasaki and Yoshikazu Ayaki: Studies on Bile Acids in Bear Bile, *J. Biochem.* 74:489 (1973).
 - 11) Don Carl Jones, George W. Melchior, and Mary Jane Watkins Reeves: Quantitative analysis of individual bile acids by gas-liquid chromatography: an improved method, *Journal of Lipid Research* 17:273 (1976).
 - 12) 元道喜外：生薬 및 生薬製劑의 規格에 關한 研究 (2) 熊膽品質檢査에 關한 研究 Report of NIH Korea 21:349 (1984).
 - 13) C.N. Carducci, M.Matejka, H. Ergüven, N. Labonia and A. Mamianetti; High-performance liquid chromatographic analysis of bile acids in hamster bile, *Journal of Chromatography* 337:91 (1985).
 - 14) Sumihiko Okuyama, Nobuhiko Kokubun, Sakae Higashidate, Daisuke Uemura and Yoshimasa Hirata: A new analytical method of individual bile acids using high performance liquid chromatography and immobilized 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in column form, *The Chemical Society of Japan*, 1443, (1979).
 - 15) A.D. Reid and P.R. Baker: High-performance Liquid Chromatography of Bile acid with a Reversed-phase Radial Compression Column, *Journal of Chromatography* 247:149 (1982).
 - 16) Jong Dae Park and Seung Jo Yoo: Studies on the Separation of Major Bile Acids in Commercial Crude Bile Drugs, *Kor. J. Pharmacogn.* 12(3):139 (1981).
 - 17) Kurozumi: *J. Biochem.* 7:489 (1973).