

## 고속액체크로마토그래피에 의한 백지근 중 Byakangelicin의 정량

신국현 · 강삼식 · 지형준  
서울대학교 생약연구소

### Determination of Byakangelicin in *Angelicae dahuricae Radix* by High Performance Liquid Chromatography

Kuk Hyun Shin, Sam Sik Kang and Hyung Joon Chi

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea.

**Abstract**—A new method for quantitative determination of byakangelicin in *Angelicae dahuricae Radix* by high performance liquid chromatography was established. A reversed-phase system with a  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column using THF : dioxane : MeOH : HAc : 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O = 72.5 : 62.5 : 25 : 10 : 1 : 329 as a mobile phase was developed. Byakangelicin together with ter-O-byakangelicin and oxypeucedanin methanolate, and isooxypeucedanin as an internal reference were detected at 350 nm and the analysis was successfully carried out within 30 min.

**Keywords**—*Angelicae dahuricae Radix* · *Angelica dahurica* Benth. et Hook. · Umbelliferae · byakangelicin · ter-O-byakangelicin · oxypeucedanin methanolate · isooxypeucedanin · HPLC

白芷根은 산형과에 속하는 *Angelica* 속 식물의 하나인 白芷(*Angelica dahurica* Benth. et Hooker)의 뿌리를 건조한 것으로서 한방에서 진정, 진통 및 정혈약으로 가장 빈번히 처방투약되는 대표적인 생약의 하나이므로 이 생약의 품질관리를 위한 적합한 분석방법의 확립이 요구된다. 백지의 주성분군은 furanocoumarin들로서 수십종의 coumarin성분들이 분리 보고되었으며<sup>1,2)</sup> 그 특이성분은 byakangelicin<sup>2)</sup> 및 ter-O-byakangelicin 임이 확인된바있다.<sup>3,4)</sup> 따라서 주성분이면서 특이성분의 하나인 byakangelicin을 표적성분으로하여 HPLC에 의하여 백지를 분석하는 방법을 검토한 결과 분리능과 정도가 매우 높은 분석방법을 확립하였으며 한방제제중의 백지의 확인 및 정량에 이용할 수 있는 간편하

고 신속한 방법임을 인지하였으므로 보고한다.

### 실험결과 및 고찰

백지의 주성분이며 정량분석의 지표물질로서 byakangelicin 또는 ter-O-byakangelicin등을 순수 분리하여 정제 한 것과 백지에 함유된 다른 furanocoumarin성분인 phellopterin, isoimperatorin, imperatorin, oxypeucedanin methanolate 등을 분리 정제한것들을 임의로 혼합하여 methanol에 용해시킨후  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column에 주입하고 가장 분리능이 양호한 용매계를 추적한 결과 특이성분인 byakangelicin 및 ter-O-byakangelicin이 다른 성분들에 의하여 방해됨이 없이 독립된 peak로 나타남을 확인 하였으며 그 t<sub>R</sub>은 각각

**Table I.** HPLC parameters for furanocoumarins

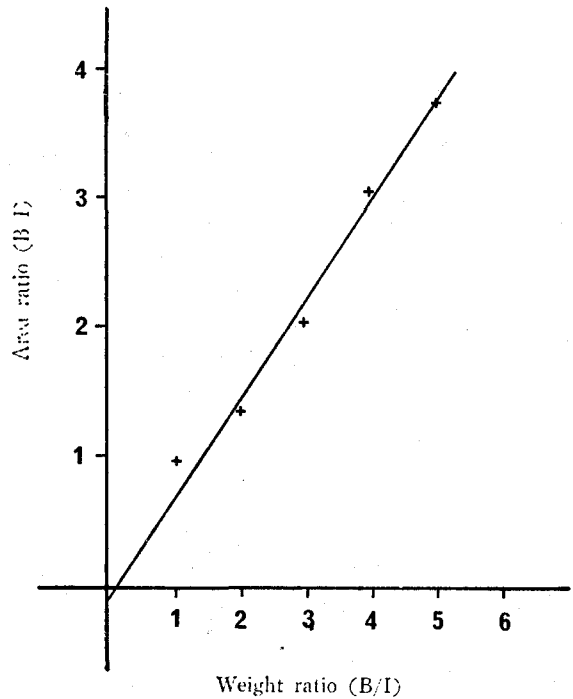
Compounds	$t_R$	$t_R'$	$k'$	$a$	R
Byakangelicin	6.6	4.0	1.54		
Ter-O-byakangelicin	8.2	5.6	2.15	1.40	1.45
Oxypeucedanin methanolate	15.6	13.0	5.00	2.32	4.93
Unidentified	17.8	15.2	5.84	1.17	1.22
Isooxypeucedanin	20.2	17.6	6.77	1.16	1.20

$t_R$ : retention time (min);  $t_R'$ : net retention time  
 $k'$ : capacity factor of column;  $a$ : relative retention;  
 R: resolution;  $t_0=2.6$  min.

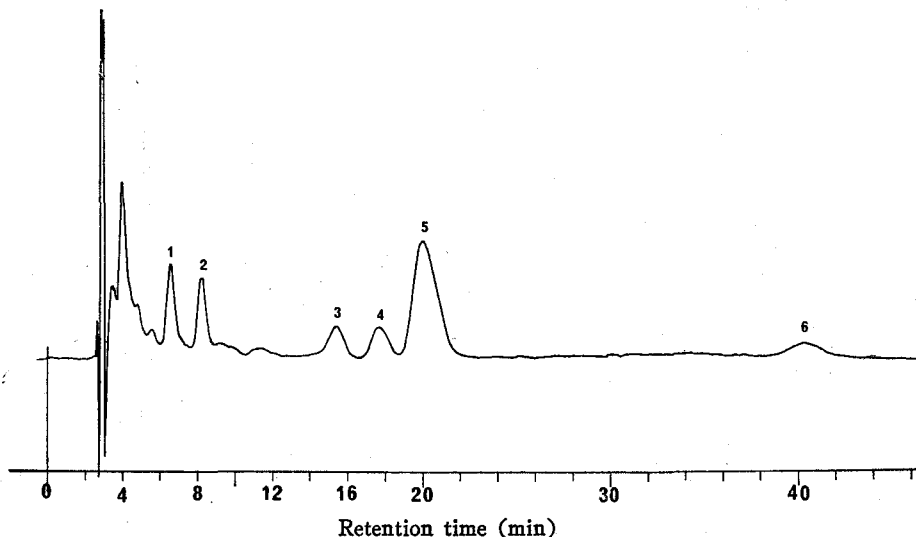
Solvent mixture: tetrahydrofuran : dioxane :  
 MeOH : acetic acid : 5% $H_3PO_4$  :  
 $H_2O$  (72.5:62.5:25:10:1:329)

Flow rate : 1.0 ml/min.

6.6 min 및 8.6 min 임을 확인 하였다(Table I). 이때 imperatorin, phellopterin 등은 그  $t_R$  이 너무 길어서( $t_R=40.6$  min) chromatogram 상에서 전혀 방해물 받지 않는다는 사실을 알았으며 상기 2종의 특이성분에 대한 동시 정량도 가능함을 알았다. 시료 주입시의 오차를 최소화하기 위하여 필요한 내부표준 물질을 선정하기 위하여 수종의 furanocoumarin들을 동일 HPLC 조건에서 column에 주입하고 그  $t_R$ 에 의하여 비

**Fig. 1.** Calibration curve for byakangelicin B : byakangelicin; I : isooxypeucedanin (Int. ref.)

교검토 한 결과  $t_R$  20.2 min에서 독립된 peak를 나타내는 isooxypeucedanin 이 가장 적합한 물질임을 알았다. Column의 capacity factor, relative

**Fig. 2.** HPLC chromatogram of methanol extract from *Angelicae dahuricae* Radix.

1: byakangelicin; 2, ter-O-byakangelicin; 3, oxypeucedanin methanolate; 4, unidentified peak; 5, isooxypeucedanin (Int. ref.); 6, phellopterin+imperatorin.

The analytical conditions are as described in the Experimental section.

retention, resolution 및 retention time 등을 산출한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 모든 물질들에서 capacity factor  $k'$ 는 1.5 이상이고, relative retention  $a$ 는 1.0 이상이고 또한 resolution 이 isooxypeucedanin (내부표준물질)과 unknown peak 간에 1.20으로서 최소치이나 2%이하의 오차범위에서 분리능을 나타냄을 확인하였다.

상기 실험조건 하에서 내부표준물질 isooxypeucedanin을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 methanol 용액으로 고정시키고 byakangelicin 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  액을 기준으로 5단계로 희석한 액과 각각 1:1로 혼합한 다음 이액 25  $\mu\text{l}$ 를 column에 주입하여 HPLC를 실시하고 각각의 peak area를 산출한후 peak area의 비와 농도비를 plot하여 표준검량선을 작성한 결과는 Fig. 1에 표시한 바와 같으며 그 회귀직선의 방정식은  $Y=0.719X+0.085$  ( $r=0.980$ )로서 표준물질 0.5~5.5  $\mu\text{g}$  범위에서 직선성이 인정되었다.

실험부의 HPLC 조건과 분석조작에 따라 백지근 methanol extract 일정량을 methanol에 용해시킨후 따로 조제한 내부표준물질을 1:1로 혼합하고 HPLC를 실시한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 전형적인 pattern을 갖는 chromatogram을 얻을수 있었으며 표준검량선에 대입하여 백지근 methanol ext. 및 건조근 중의 byakangelicin 함량을 산출한 결과 각각 0.46%(w/w) 및 0.18%(w/w) 임을 알았다.

## 실 험

**식물재료**—시판 백지근을 구입하여 식물학적으로 확인한 후 사용하였다.

**분석기기**—HPLC용 기기는 Waters Associates의 분석용 Liquid Chromatograph (Model 244)로서 Model 450 variable wavelength detector 및 M730 data module이 부착된 것을 사용하였고 column은  $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ , reversed-phase stainless column (10  $\mu$ , 3.9 mm $\times$ 18 cm)를 사용하였다.

**HPLC의 조건**—이동상으로서 tetrahydrofuran (THF) (72.5 ml), dioxane(62.5 ml), methanol (25 ml), HAc (10 ml) 및 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1 ml)를 혼합한 후 이를 증류수로 500 ml로 한것을 사용

하였다. HPLC는 실온에서 실시 하였고 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector의 파장 350 nm에 고정하여 실시 하였다.

**시약**—분석용 시약은 특급시약을 사용하였고 분석 실시 전에 membrane filter로 여과하여 사용하였다. 각종 furanocoumarin 표준물질로서 byakangelicin (MW 334, mp 93 $^\circ$ ), ter-O-methylbyakangelicin (MW 348, mp 88 $^\circ$ ) 및 imperatorin, isoimperatorin, phellopterin, oxypeucedanin methanolate등은 백지근으로부터<sup>4)</sup>, 내부표준물질인 isooxypeucedanin (MW 286, mp 108 $^\circ$ )는 강활근 으로부터 순수분리 한것<sup>5)</sup>을 정제하여 사용하였다.

**분석조작**—건조된 백지근 10 g을 methanol로 5회 수욕상에서 가열 환류추출하고 추출액을 합하여 감압농축 건조하여 methanol ext. 3.86 g을 얻었다. Methanol ext. 0.2 g을 취하여 methanol 10 ml에 용해시키고 따로 내부표준물질 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  methanol 용액을 조제한 후 각 용액을 1:1로 혼합한 액 25  $\mu\text{l}$ 를 column에 주입하여 HPLC를 실시 하였다. 이와같이 하여 얻은 chromatogram 으로부터 byakangelicin과 내부표준물질의 peak area ratio를 구하고 표준검량선에 plot하여 byakangelicin 함량을 산출하였다.

**감사의 말씀**—본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업 연구비 (1989~1991)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사한다.

<1990년 8월 1일 접수: 8월 31일 수리>

## 문 헌

- Hata, K., Kozawa, M., Yen, K.Y. and Kimura, Y.: *Yakugaku Zasshi* 83, 611 (1963).
- Saiki, Y., Morinaga, K., Okegawa, O., Sakai, S., Amaya, A., Ueno, A. and Fukushima, S.: *Yakugaku Zasshi* 91, 1313 (1971).
- Kozawa, M., Baba, K., Okuda, K., Fukumoto, T. and Hata, K.: *Shoyakugaku Zasshi* 35, 90 (1981).
- Shin, K.H., Kim, O.N. and Woo, W.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 19, 19 (1988).
- Woo, W.S., Lee, C.K. and Shin, K.H.: *Planta Medica* 45, 234 (1982).