

참당귀 지상부 추출물의 지표성분 decursin의 분석법 개발 및 검증

김희연* · 이기연 · 김태희 · 박아름 · 노희선 · 김시창 · 안문섭

강원도농업기술원 농식품연구소

Development and Validation of Analytical Method for Decursin in Aerial Parts of *Angelica gigas* Nakai Extract

Hee-Yeon Kim*, Ki-Yeon Lee, Tae-Hee Kim, A-Reum Park, Hee-Sun Noh, Si-Chang Kim, and Mun-Seob Ahn
Agriproduct Processing Experiment Station, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Chuncheon, Korea
(Received November 29, 2018/Revised January 24, 2019/Accepted February 12, 2019)

ABSTRACT - Method development and validation of decursin for the standardization of *Angelica gigas* Nakai as a functional ingredient and health food were accomplished. The quantitative determination method of decursin as a marker compound of aerial parts of *Angelica gigas* Nakai extract (AAGE) was optimized by HPLC analysis using a C18 column (3×150 mm, 3 μm) with 0.1% TFA in water and acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min and detection wavelength of 330 nm. The HPLC/PDA method was applied successfully to quantification of the marker compound in AAGE after validation of the method with linearity, accuracy, and precision. The method showed high linearity in the calibration curve at a coefficient of correlation (R^2) of 0.9994 and the limit of detection and limit of quantitation were 0.011 μg/mL and 0.033 μg/mL, respectively. Relative standard deviation (RSD) values of data from intra- and inter-day precision were less than 1.10% and 1.13%, respectively. Recovery of decursin at 0.5, 1, 5 and 10 μg/mL were 92.38 ~ 104.11%. These results suggest that the developed HPLC method is very useful for the determination of marker compound in AAGE to develop a health functional material.

Key words : *Angelica gigas* Nakai, Decursin, Validation, HPLC

참당귀는 산형과(Umbellifera) *Angelica* 속에 속하는 다년생 초본으로 우리나라와 중국 동북부 지역에서 자생하며 건조된 뿌리가 생약재로 사용된다. 국내에서는 강원도 평창, 경북 봉화 등지에서 재배되며 개화기 전의 뿌리가 식용 및 약용으로 사용된다¹⁾. 참당귀는 약성이 따뜻하고 무독한 생약재로 부인과 질환 및 고혈압, 빈혈, 어혈 등에 효과가 있으며²⁾ 면역강화³⁾, 항암 및 항산화효과^{4,5)}, 간질환 및 혈류 개선효과^{6,7)}가 있는 것으로 알려져 있다. 참당귀에 관한 연구로 당뇨유발 모델에서의 참당귀 추출물의 당뇨개선효과⁸⁾, 참당귀 잎, 줄기, 뿌리 추출물의 생리활성효과⁹⁾, 발효 당귀의 생리활성 물질 및 효과¹⁰⁾ 등이 보고되었다.

참당귀의 약효성분으로 coumarin 계열의 decursin, decursinol, decursinol angelate, nodakenin 등이 함유되어 있으며 그 중 주성분은 pyranocoumarin 계열의 decursin과

decursinol angelate이다^{11,12)}. 참당귀의 주요 약효성분 중 decursin의 전립선암 치료제 개발에 관한 연구¹³⁾와 decursin 유도체의 아토피 피부염 및 ovalbumin에 의한 천식의 폐염증 유발 억제효과에 관한 연구¹⁴⁾가 보고되었다. 참당귀에서 분리된 decursin의 인지개선효과가 확인되었으며¹⁵⁾ 참당귀에서 분리된 decursin을 비롯한 coumarin계 화합물의 우수한 항염효과가 확인되었다¹⁶⁾. 또한, decursin과 decursinol angelate는 lipid droplet의 축적을 억제시켜 동맥경화증과 같은 혈액순환장애의 예방 및 치료 효과가 있으며²⁾ bovine 망막세포의 aldose reductase를 억제시켜 망막의 sorbitol 축적을 방지하여 당뇨로 인한 합병증을 예방할 수 있다고 보고되었다¹⁷⁾. 참당귀는 생약재로 쓰이는 뿌리의 생리활성 및 유효성분 분석에 관한 연구가 대부분이며 참당귀 지상부에 관한 연구로 당뇨모델에서 참당귀 잎 추출물의 항당뇨 효과¹⁸⁾와 참당귀 지상부 추출물의 생리활성¹⁹⁾에 관한 연구가 보고 되었으나 유효성분 및 기능성 소재활용 방안에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 참당귀의 유효성분인 decursin이 뿌리뿐만 아니라 지상부에도 함유되어 있는 것으로 확인되었으며⁹⁾ 이는 기능성 식품소재로서 참당귀 지

*Correspondence to: Hee Yeon Kim, Agriproduct Processing Experiment Station, Gangwon-do Agricultural Research and Experiment Services, Chuncheon, Gangwon-do 24203, Korea
Tel : 82-33-248-6526, Fax : 82-33-248-6555
E-mail : heeya80@korea.kr

상부의 활용 가치가 높다고 판단된다.

지표성분은 원재료에 존재하는 해당 성분의 농도와 효능 간의 상관관계가 불분명할 경우 원재료를 대표하는 성분으로 건강기능식품 개발에 있어서 원료의 표준화를 위한 지표성분 분석법의 설정 과정 및 설정된 분석법의 과학적인 검증과정이 요구된다²⁰⁾. 따라서, 본 연구에서는 건강기능성 식품 소재 개발을 목적으로 참당귀 지상부 추출물의 표준화를 위하여 decursin을 지표성분으로 선정하고 HPLC분석을 통하여 decursin의 분석법 확립 및 유효성 검정을 수행하였다.

Materials and Methods

참당귀 지상부 추출물 조제 및 HPLC 분석

본 실험에 사용된 참당귀 지상부는 2017년 강원도 평창에서 재배되었으며 수확 후 이물질을 제거하고 건조한 다음 분쇄하여 추출물 조제 시료로 사용하였다. 참당귀 지상부 건조시료를 60% 에탄올로 추출하여 동결건조 하였을 시 동결건조된 시료의 수분 흡수로 인하여 균일한 추출 분말이 생산되지 않아 분무건조를 진행하였다. 참당귀 지상부 전체 시료 5 kg에 60% 에탄올 50 L를 첨가하여 70°C에서 4시간 동안 순환 추출하고 10 µm 사이즈 필터에 여과시켰다. 여과된 추출액을 70°C에서 최종 추출액의 양이 5 L가 될 때까지 농축하였으며 농축액에 304 g의 텍스트린을 첨가한 다음 분무건조하여 추출분말을 얻었다. 참당귀 지상부 건조시료에 대한 분무건조 추출분말의 수율은 평균 약 14%이었다. 분무건조로 조제된 3 lot의 추출분말을 각각 0.1 g씩 정확하게 칭량하고 메탄올 100 mL을 가하여 최종농도가 1 mg/mL이 되게 재용해 한 다음 0.45 µm membrane filter에 통과시켜 HPLC 분석용 시료로 사용하였으며 모든 분석은 3반복 실시하였다.

표준용액의 조제

Decursin 표준품 1 mg에 10 mL 메탄올을 첨가하고 용해시켜 100 µg/mL의 농도로 표준원액을 조제하였다. 이 표준원액을 단계적으로 희석하여 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/mL 농도의 표준용액을 조제하여 HPLC 분석에 사용하였으며 분석된 peak 면적값에 0.97을 곱하여 표준품의 순도를 보정하였다.

분석시약

본 실험에 사용된 decursin (≥97%, HPLC)은 Sigma Co. (St Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고 추출 및 HPLC 분석에 사용된 용매는 Merck Co. (Kenilworth, NJ, USA)의 HPLC 등급을 사용하였다.

HPLC 분석

참당귀 지상부 추출액 및 decursin 표준용액의 분석은

Table 1. HPLC analysis condition of decursin

Classification	Condition
Instrument	Nano Space SI-2 (Shiseido, Japan)
Column	Cadenza CD-C ₁₈ (150 × 3 mm, 3 µm)
Column temp °C	50
Mobile phase	Eluent A: 0.1% TFA Eluent B: acetonitrile
Injection volume	5 µL
Detector	UV 330 nm
Run time	25 min

Gradient table			
Time (min)	Flow rate (µL)	%A	%B
Initial	500	25	75
3	500	25	75
4	500	50	50
18	500	50	50
19	500	25	75
25	500	25	75

Nano Space SI-2 HPLC (Shiseido, Japan)를 사용하였다. 컬럼은 Cadenza CD-C₁₈ (150 × 3 mm, 3 µm, Imtakt, Kyoto, Japan)을 사용하였고, 0.1% TFA와 100% acetonitrile을 이동상으로 사용하여 시료 주입량 5 µL, 컬럼 온도 50°C, 유속 500 µL/min으로 25분 동안 분석하였다(Table 1).

분석법의 검증(method validation)

참당귀 지상부 추출물의 기능성 식품 원료 개발을 위한 벨리데이션은 ‘의약품등 분석법의 벨리데이션 가이드(식품의약품안전처)’를 바탕으로 decursin의 농도별 표준용액을 HPLC로 분석하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision), 정확성(accuracy)을 측정하였다.

특이성은 시료 내에 존재할 수 있는 불순물, 분해물 등의 영향을 받지 않고 해당성분을 특이적으로 측정할 수 있는 정도를 나타내며 특이성 검정을 위하여 decursin의 농도별 표준용액과 참당귀 지상부 추출액을 HPLC로 분석하고 측정되는 머무름 시간과 크로마토그램을 비교하였다.

직선성은 decursin 표준용액의 농도에 비례하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 농도별 표준용액의 peak 면적과 농도 간 회귀분석에 의한 표준 검량선을 작성하고 산출된 검량선의 결정계수(coefficient of determination, R²)를 통하여 직선성을 확인하였다. Decursin 표준용액의 검량선에서 기울기와 y절편의 표준편차를 구하고 아래의 식에 근거하여 정량한계(LOQ)와 검출한계(LOD)를 산출하

였다. (LOQ = $10 \times \sigma/S$, LOD = $3.3 \times \sigma/S$, σ : y절편의 표준편차, S : 검량선의 기울기)

정확성은 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)을 통하여 측정하였다. 정확성은 농도별 표준용액의 일내분석과 일간분석을 통하여 측정된 값(measured value)이 참값(true value)에 근접한 정도를 백분율로 나타내었으며 일내분석은 농도별 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였고 일간분석은 일내분석 과정을 3일 동안 반복 분석하여 변이성을 확인하였다. 일내분석 및 일간분석 시 각 구간마다 3농도 3회 반복 측정하였다. 정밀성은 일내분석과 일간분석에서 얻어진 표준용액의 평균값과 표준편차를 근거로 상대표준편차를 측정하여 평가하였으며 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 나타내었다.

회수율은 농도별로 조제된 지표성분과 함량이 확인된 시료를 혼합 후 분석하여 회수되는 지표성분의 양으로 측정하였다. Decursin 표준정량곡선에서 직선성이 확인된 0.5, 1, 5, 10 µg/mL 농도의 표준용액에 참당귀 추출물을 혼합하여 HPLC로 3회 반복 분석하고 측정된 값으로부터 회수율과 상대표준편차를 산출하였다.

Results and Discussion

특이성

HPLC 분석 결과, 참당귀 지상부 추출물 내에 혼합되어 있을 가능성이 있는 다른 성분들로부터 decursin만 선택적으로 측정되었으며 다른 물질의 간섭 없이 성분이 분리되는 것을 확인하였다. HPLC분석을 통하여 얻어진 크로마

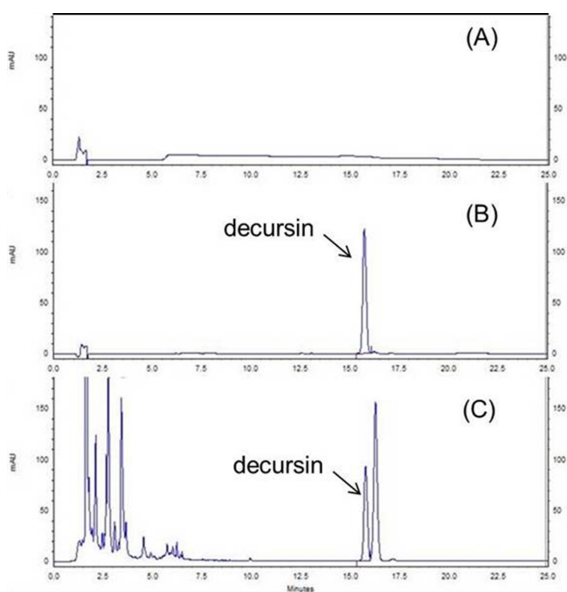


Fig. 1. HPLC Chromatograms of blank (A), decursin (B) and AAGE (C). AAGE : aerial parts of *Angelica gigas* Nakai extract.

토그램 상에서 표준용액 및 참당귀 지상부 추출물의 decursin peak 머무름 시간은 15.7분대로 동일하였으며 spectrum도 일치하는 것으로 본 분석법의 특이성을 검정하였다(Fig. 1).

직선성, 정량한계, 검출한계

Decursin 표준용액을 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/mL로 희석한 다음 HPLC로 분석하여 작성된 표준 검량선은 $y = 312,340x - 19,638$ 로 나타났으며 상관계수(R^2)는 0.9994로 매우 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 2). 정량한계(LOQ)와 검출한계(LOD)를 산출하기 위하여 decursin 표준용액을 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 µg/mL로 희석한 다음 HPLC로 분석하여 작성된 표준 검량선은 $y = 274,355x + 4,400.1$ 로 나타났으며 상관계수(R^2)는 0.9999이었다. 이 표준 검량선으로부터

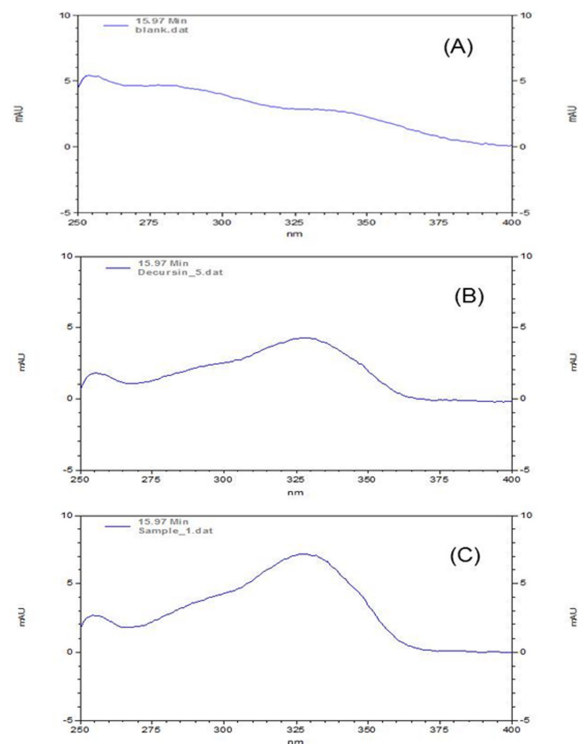


Fig. 2. PDA spectrums of blank (A), decursin (B) and AAGE (C). AAGE : aerial parts of *Angelica gigas* Nakai extract.

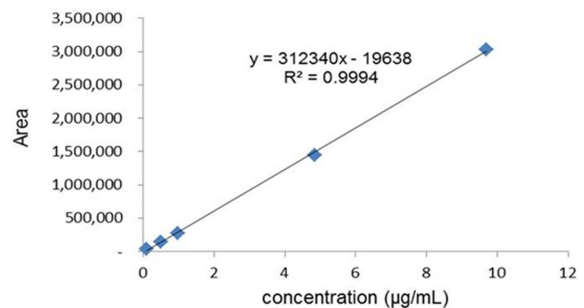


Fig. 3. Calibration curve of decursin standard solution.

Table 2. Correlation coefficients of the calibration curves, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of decursin

Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Slope	Intercept	Correlation coefficient(R^2)	LOD	LOQ
				($\mu\text{g/mL}$)	
0.1 ~ 10	312,340	-19,638	0.9994	0.011	0.034

Table 3. Intra- and inter-day precision and accuracy of decursin

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	RSD ¹⁾ (%)
Intra-day ²⁾	2.5	2.54 \pm 0.01 ⁴⁾	104.35	0.53
	5	4.68 \pm 0.05	96.49	1.10
	10	9.74 \pm 0.07	100.37	0.72
Inter-day ³⁾	2.5	2.36 \pm 0.01	97.23	0.26
	5	4.86 \pm 0.05	100.14	1.15
	10	9.57 \pm 0.05	98.66	0.58

¹⁾Relative standard deviation.

²⁾Intra-day : tree times per day.

³⁾Inter-day : one time analysis of decursin per day for 3 days.

⁴⁾Each data was obtained by triple analysis (n=3).

산출된 기울기와 y절편의 표준편차로 계산된 정량한계(LOQ)는 0.034 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 검출한계(LOD)는 0.011 $\mu\text{g/mL}$ 인 것으로 나타났다(Table 2). 정량한계는 검체 중 정확성과 정밀성을 가진 정량값으로 나타낼 수 있는 분석 대상물질의 최저농도를 의미하며 검출한계는 검체 내 존재하는 분석 대상물질의 검출 가능한 최저농도를 의미한다²⁾. 따라서 참당귀 지상부 추출물에 함유되어 있는 decursin의 함량은 0.034 $\mu\text{g/mL}$ 농도 수준까지 정량이 가능하며 0.011 $\mu\text{g/mL}$ 농도 수준까지 검출이 가능하다. Yang 등²²⁾의 연구에서 decursin의 정량한계는 0.08 $\mu\text{g/mL}$, 검출한계는 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 수준인 것과 비교하였을 때 본 연구의 decursin 분석법이 더 낮은 농도의 미량 성분까지 정량 및 검출이 가능하다고 판단된다.

정확성, 정밀성 평가

정확성은 농도별 표준용액의 일내분석과 일간분석을 통하여 측정된 값(measured value)이 참값(true value)에 근접한 정도를 백분율로 나타내었으며 측정된 값들로부터 상대표준편차(RSD)를 구하여 정밀성을 검정하였다. 일간 분석의 정확성 및 상대표준편차는 각각 96.49 ~ 104.35%, 0.53 ~ 1.10%이었으며 일내분석의 정확성 및 상대표준편차는 각각 97.23 ~ 100.14%, 0.26 ~ 1.15%이었다(Table 3). 각각의 분석에서의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로 나타나 decursin 분석법의 정확성 및 정밀성이 있음을 알 수 있었다.

회수율 측정

회수율은 참당귀 지상부 추출물이 혼합된 농도별 표준용액의 검출 농도와 추출물이 혼합되지 않은 농도별 표준

Table 4. Recovery and relative standard deviation of measured amount for decursin

Concentration ($\mu\text{g/mL}$) ¹⁾	Recovery (%)	RSD ²⁾ (%)
0.5	104.11 \pm 0.14 ³⁾	0.14
1	97.69 \pm 0.20	0.20
5	92.38 \pm 0.04	0.05
10	98.19 \pm 0.39	0.40

¹⁾Concentration of decursin standard.

²⁾Relative standard deviation.

³⁾Each data was obtained by triple analysis (n=3).

Table 5. Amount of decursin in aerial parts of *Angelica gigas* Nakai extract

Lot No.	Concentrations (% , mean \pm SD)
1	0.370 \pm 0.019 ¹⁾
2	0.349 \pm 0.012
3	0.358 \pm 0.010

¹⁾Each data was obtained by triple analysis (n=3).

용액의 검출 농도 차이를 구하고 이 값을 참당귀 지상부 추출물만 분석하여 검출된 농도 값으로 나누어 측정하였다. 표준품 농도별 지표성분의 회수율은 92.38 ~ 104.11%의 범위였으며 분석오차 10% 이내로 측정되었다. 지표성분 회수율에 대한 상대표준편차는 모두 0.5% 이내인 것으로 나타나 decursin 분석법의 정확성을 확인할 수 있었다(Table 4).

참당귀 지상부 추출물의 decursin 함량

본 연구의 분석법 검증을 통하여 decursin에 대한 HPLC 분석법이 참당귀 지상부 추출물에 함유되어 있는 지표성분

의 정량에 적용할 수 있는 특이성, 우수한 직선성, 정확성 및 정밀성 등이 있음을 확인하였다. 본 분석법으로 참당귀 지상부 분무건조 분말시료의 decursin 평균 함량은 0.359% 이었으며, 기준 규격을 80~120%로 설정하였을 때²³⁾ 기준 값은 0.287~0.431% 인 것을 확인할 수 있었다(Table 5).

Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역주력산업육성사업(P0002722)”로 수행된 연구결과입니다.

국문요약

본 연구에서는 건강기능성 식품 소재 개발을 목적으로 참당귀 지상부 추출물의 표준화를 위하여 decursin을 지표 성분으로 선정하고 HPLC분석을 통하여 decursin의 분석법을 확립하고 유효성 검정을 수행하였다. 유효성 검정 결과, decursin 표준용액과 참당귀 지상부 추출물의 retention time 및 spectrum이 일치하는 특이성을 확인하였다. 표준 검량선의 상관관계수(R²)는 0.9994로 매우 우수한 직선성을 나타내었으며 정량한계(LOQ)는 0.034 µg/mL이었고 검출한계(LOD)는 0.011 µg/mL이었다. Decursin의 intra-day 분석에서 정확성 및 상대표준편차는 각각 96.49 ~ 104.35%, 0.53 ~ 1.10%, inter-day 분석에서 정확성 및 상대표준편차는 각각 97.23 ~ 100.14%, 0.26 ~ 1.15%인 것으로 나타나 본 시험법의 정확성 및 정밀성을 확인할 수 있었다. 표준품 농도별 지표성분의 회수율은 92.38 ~ 104.11%의 범위였으며 분석오차 10% 이내로 측정되었다. 이는 본 연구에서 수행된 HPLC 분석법이 참당귀 지상부 추출물의 지표성분인 decursin을 분석하고 표준화하는데 적합한 시험법임을 의미한다.

Reference

1. Cho, M.G., Bang, J.K., Chae, Y.A.: Comparison of volatile compounds in plant parts of *Angelica gigas* Nakai and *A. acutiloba* Kitagawa. *Korean J. Med. Crop Sci.*, **11**, 352-357 (2003).
2. Son, C.Y., Beak, I.H., Song, G.Y., Kang, J.S., Kwon, K.I.: Pharmacological effect of decursin and decursinol angelate from *Angelica gigas* Nakai. *Yakhak Hoeji*, **53**, 303-313 (2009).
3. Kim, S.B., Kim, Y.H., Lee, C.W., Park, S.M., Ahn, K.S., Kim, I.H., Kim, H.M.: Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacol*, **40**, 39-48 (1998).
4. Kim, E.Y., Baik, I.H., Kim, J.H., Kim, S.R., Rhyu, M.R.: Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**, 333-338 (2004).
5. Park, K.W., Choi, S.R., Shon, M.E., Jeong, I.Y., Kang, K.S., Lee, S.T., Shim, K.H., Seo, K.I.: Cytotoxic effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in human cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **36**, 1385-1390 (2007).
6. Oh, S.H., Cha, Y.S., Choi, D.S.: Effects of *Angelica gigas* Nakai diet on lipid metabolism, alcohol metabolism and liver function of rats administered with chronic ethanol. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **42**, 29-33 (1999).
7. Kim, C.H., Kwon, M.C., Han, H.G., Na, C.S., Kwak, H.G., Choi, G.P., Park, U.Y., Lee, H.Y.: Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **16**, 255-260 (2008).
8. Park, M.J., Kang, S.J., Kim, A.J.: Hypoglycemic effect of *Angelica gigas* Nakai extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Food Nutr.*, **22**, 246-251 (2009).
9. Heo, J.S., Cha, J.Y., Kim, H.W., Ahn, H.Y., Eom, K.E., Heo, S.J., Cho, Y.S.: Bioactive materials and biological activity in the extracts of leaf, stem mixture and root from *Angelica gigas* Nakai. *J. Life Sci.*, **20**, 750-759 (2010).
10. Cha, J.Y., Kim, H.W., Heo, J.S., Ahn, H.Y., Eom, K.E., Heo, S.J., Cho, Y.S.: Ingredients analysis and biological activity of fermented *Angelica gigas* Nakai by Mold. *J. Life Sci.*, **20**, 1385-1393 (2010).
11. Kim, K.M., Jung, J.Y., Hwang, S.W., Kim, M.J., Kang, J.S.: Isolation and purification of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* Nakai. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**, 653-656 (2009).
12. Lee, S.H., Kang, S.S., Shin, K.H.: Coumarins and a pyrimidine from *Angelica gigas* roots. *Nat. Prod. Sci.*, **8**, 58-61 (2002).
13. Yim, D., Singh, R.P., Agarwal, C., Lee, S., Chi, H., Agarwal, R.: A novel anticancer agent, decursin, induces G₁ arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.*, **65**(3), 1035-1044 (2005).
14. Yang, E.J., Song, G.Y., Lee, J.S., Yun, C.Y., Kim, I.S.: A novel (S)-(+)-Decursin derivative, (S)-(+)-3-(3,4-dihydroxyphenyl dihydroxyphenyl)-acrylic acid 2,2-dimethyl-8-oxo-3,4-dihydro-2H, 8Hpyrano[3,2-g]-chromen-3-yl-ester, Inhibits ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of asthma. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 444-449 (2009).
15. Kang, S.Y., Lee, K.Y., Sung, S.H., Park, M.J., Kim, Y.C.: Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: Structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, **64**, 683-685 (2001).
16. Jung, Y.J., Choi, J.H., Jeong, W.S., Song, Y.S., Kang, J.S., Bi, K., Kim, M.J.: Anti-inflammatory activities of coumarins isolated from *Angelica gigas* Nakai on LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *J. Food Sci. Nutr.*, **14**, 179-187 (2009).
17. Jung, M.H., Lee, S.H., Ahn, E.M., Lee, Y.M.: Decursin and decursinol angelate inhibit VEGF-induced angiogenesis via suppression of the VEGFR-2-signaling pathway. *Carcinogenesis*, **30**, 655-661 (2009).
18. Jeong, H.J., Hong, S.Y., Lee, K.Y., Lee, J.H., Lim, S.H., Heo,

- N.K., Kim, H.Y.: Diabetic Effect Of *Angelica gigas* Nakai Leaf Extracts in Diabetes Mellitus Type 2 Model Mice by High Fat-fed and Streptozotocin-treated Rats. *J. Agricultural, Life and Environ. Sci.*, **27**, 6-14 (2015).
19. Lee, K.Y., Hong, S.Y., Jeong, H.J., Lee, J.H., Lim, S.H., Heo, N.K., Kim H.Y.: Biological activities of extract from aerial parts of *Angelica gigas* Nakai. *J. Agricultural, Life and Environ. Sci.*, **27**, 15-22 (2015).
20. Kim, Y.J., Han, S.H., Jeon, J.Y., Hwang, M.H., Im, Y.J., Chae, S.W., Kim, M.G.: Method development of ellagic acid as marker compound for standardization of gochang bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) as functional ingredient. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 1554-1558 (2012).
21. Kwon, J.G., Sed, C., Choi, Y.H., Choi, C.W., Kim, J.K., Jeong, W., Lee, J.E., O, K.H., Hong, S.S.: Validation of method determining coixol in *Coix lachrymal-jobi* var. *mayuen* roots extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **46**, 952-956 (2017).
22. Yang, H.J., Weon, J.B., Ma, J.Y., Ma, C.J.: Simultaneous determination of six bioactive components in Guibi-tang by HPLC-DAD. *Kor. J. Pharmacogn.*, **41**, 313-318 (2010).
23. KFDA.: Guideline of standard of functional ingredient for health functional food development. *Korea Food and Drug Administration*, Korea. pp. 53-59 (2008).