

식방풍중의 Coumarin성분의 확인 및 정량

신국현 · 강삼식 · 지형준
서울대학교 천연물과학연구소

Analysis of the Coumarin Constituents in *Peucedanii Radix*

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 the analysis of coumarin constituents in the roots of *Peucedanum japonicum* by high performance liquid chromatography was established. Among two coumarin constituents identified, peucedanol was confirmed to be applicable to a standard compound. A reversed phase system with a μ Bondapak C₁₈ column using H₂O-MeOH=5:4 as a mobile phase was developed. Peucedanol and a minor constituent, umbelliferone were detected at 333 nm and the analysis was successfully carried out within 20 min.

Keywords—*Peucedanum japonicum* Thunberg · Umbelliferae · coumarin · peucedanol · umbelliferone · HPLC

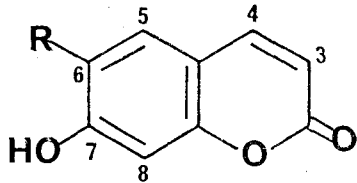
방풍(防風)은 한방에서 양음청폐(養陰淸肺), 거담지해(祛痰止咳)제로 쓰이는 주요한 약재다. 방풍으로 쓰이는 자원식물로서는 미나리과에 속하는 중국산의 원방풍(元防風 *Siler divaricatum* Benth. et Hook.)과 한국에 자생하거나 재배하는 갯방풍(*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt.), 갯기름나물(*Peucedanum japonicum* Thunb.)의 근경이나 뿌리를 약용으로 하고 있다.^{1,2)} 저자들은 국내에서 재배 생산하고 있는 갯기름나물의 뿌리(植防風)의 품질확보와 약효성분을 확립하기 위한 기초적인 시도로서 현재 시장점유율이 가장 큰 식방풍을 대상으로 하여 함유성분중에서 HPLC용 지표물질로 사용 가능한 성분을 추적하고 그 분석방법을 검토한 결과를 보고한다.

실험결과 및 고찰

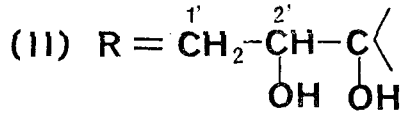
식방풍의 특이성분으로서 HPLC용 표준물질로 사용가능한 성분을 추적하기 위하여 함유성분의

분리를 시도하였다. 즉 식방풍을 ether로 추출하고 ether 추출물을 hexane-EtOAc(3:1)로 column chromatography를 실시하여 umbelliferone(I),^{3,4)} peucedanol(II)^{5,6)} 및 β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside(III)⁷⁾를 순수 분리 그 화학구조를 결정하였다. 이중 umbelliferone(I)은 미량성분이며 동속식물로 부터는 분리 보고된 바 있으나^{3,4)}, 이 식물로 부터는 처음 분리된 물질이며 문헌에 수재된 bergapten은 확인하지 못하였다. 이들 성분중 peucedanol(II)이 수득량이 가장 많았으며 이 성분은 *Peucedanum*속 식물에서는 지금까지 이 식물 외에는 보고된 바 없는 특이성분이므로⁸⁾ HPLC용 표준물질로서 적합함을 알았으며 이를 표준물질로하는 정량법을 검토하였다. Peucedanol을 μ Bondapak C₁₈ 역상 column에 의하여 전개 분리되는 최적용매계를 찾기 위하여 이동상으로서 MeOH 및 H₂O로 하고 여러 가지 혼합비율로 용출하여 그 분리능을 측정 검토한 결과 H₂O-MeOH(5:4), UV detector 333

nm에서 양호한 분리 pattern을 보여 Fig. 1에 표시한 바와 같이 $t_R=13.7$ min에서 peucedanol의 peak를 관찰할 수 있었으며 umbelliferone의 $t_R=12.0$ min와도 완전히 분리됨을 알 수 있었다.



(I) R = H



한편 이와같은 chromatogram이 식방풍의 용매추출물에 대하여도 적용 가능한가의 여부를 검토하기 위하여 식방풍을 MeOH로 추출한 후 EtOAc로 분획하여 peucedanol을 EtOAc 분획으로 이행시킨 후 여기에 MeOH을 가해 용해시키고 이 MeOH용액 일정량을 column에 주입하여 HPLC를 실시한 결과 Fig. 2에 표시한 바와같이 매우 양호한 chromatogram을 얻을 수 있었으며 peucedanol이 미량으로 함유된 umbelliferone이나 다른 미확인 peak들과도 잘 분리 됨을 확인하였다. Table I에서 보는 바와 같이 umbelliferone,

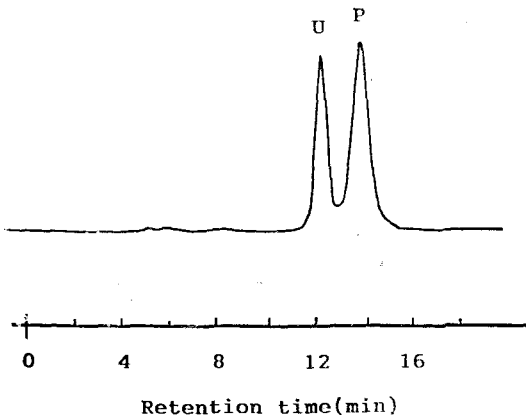


Fig. 1. HPLC chromatogram of a mixture of umbelliferone(U) and peucedanol(P). Mobile phase: water-MeOH (5 : 4, v/v)

peucedanol의 분리 pattern을 여러가지 parameter에 의하여 검토한 결과 column의 capacity factor k' 가 각각 1.7, 2.11로서 우수하고 기타 relative retention이나 resolution 등도 매우 양호하였다. 이상과 같은 실험조건 하에서 peucedanol의 MeOH용액 5 mg/ml를 단계적으로 희석하고 각 희석액 10 μ l씩을 Rheodyne injection valve를 통하여 정확히 주입하고 HPLC를 실시하여 각각의 peak area를 산출한 후 농도에 대하여 plot하여 표

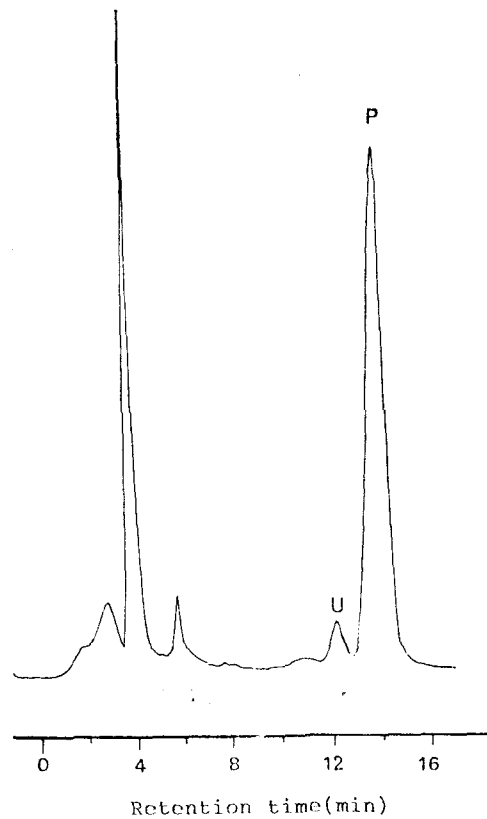


Fig. 2. Chromatogram of plant tissue extracts. Mobile phase: water-MeOH(5 : 4) Detection: 333 nm Flow rate: 0.25 ml/min Column: Spheri RP-18 U: umbelliferone, P: peucedanol

Table I. HPLC parameter for coumarins

Compounds	t_R	$t_{R'}$	k'	a	R
Umbelliferone	12.0	7.6	1.7	1.2	1.1
Peucedanol	13.7	9.3	2.1		

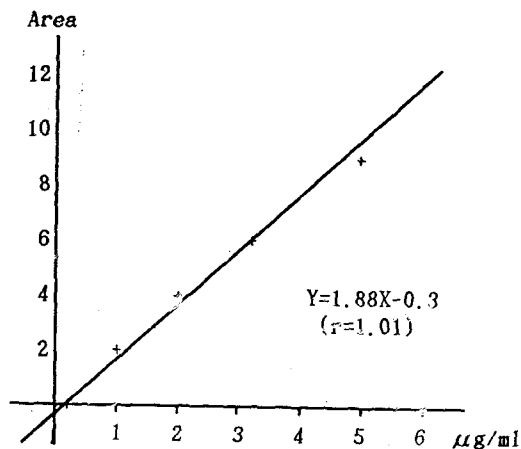


Fig. 3. Calibration curve for peucedanol

준검량선을 작성한 결과는 Fig. 3에 표시한 바와 같으며 그 회귀직선의 방정식은 $Y=1.88X-0.3$ ($r=1.01$)으로서 표준물질 1~6 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위에서 직선성이 인정되었다. 실험부의 함량분석 방법에 따라 식방풍 시료를 용매로 분획하고 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram과 표준검량선으로부터 식방풍 EtOAc ext. 및 건조근중의 peucedanol 함량을 산출한 결과 각각 0.83% (w/w) 및 0.019% (w/w)이었다.

실 험

실험재료—시판 식방풍을 구입하여 생약학적으로 확인 한 후 사용하였으며 그 표본은 본 연구소에 보관하였다.

분석기기 및 시약—HPLC용 기기는 Spectra Physics의 정량분석용 liquid chromatograph (model, SP 8800)로서 UV detector (Spectra 100, variable wavelength), integrator (SP 4270) 및 Rheodyne injection valve (10 μl)가 부착된 것을 사용하였으며, column은 $\mu\text{Bondapak C}_{18}$, reversed phase stainless column (Spheri-5, RP-18, 5 μm , 220 \times 4.6 mm)을 사용하였다. 분석용 시약은 특급 시약을 사용하였고 분석 실시전에 membrane filter로 여과하여 사용하였다.

성분의 분리—시판 식방풍 2.9 kg을 ether로 2회 설운에서 냉침하고 잔사에 MeOH을 가하여 3시간씩 4회 추출하여 MeOH ext.를 얻었다. 이

MeOH ext.에 ether 및 H_2O 를 가해 진탕 분획하여 ether 분획을 얻고 이를 냉침하여 얻은 ether ext.와 합한 후 감압농축하여 95 g의 ether ext.를 얻었다. 이 ext.을 flash column (SiO_2)에 걸고 hexane으로 용출시킨 다음 hexane-EtOAc (3:1)로 용출시켜서 15개의 subfraction을 얻었다. 이 subfraction들로부터 순차적으로 umbelliferone (I), peucedanol (II), 및 β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (III)를 순수분리하였다.

Umbelliferone (I)—백색의 침상결정 (MeOH), mp 218~219°; IR, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3150, 1720, 1688, 1619, 1574, 1460, 1238, 1130, 840; UV, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 216 (3.76), 243 (3.17), 253 (3.07), 325 (3.78); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH+KOH}}$ nm (log ϵ): 216 (4.06), 232 (sh, 3.61), 244 (sh, 3.48), 271 (2.98), 296 (sh, 2.98), 370 (3.90); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 - CD_3 OD) δ : 6.10 (1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-3), 6.69 (1H, d, $J=2.3\text{Hz}$, H-8), 6.70 (1H, dd, $J=2.3, 9.1\text{Hz}$, H-6), 7.25 (1H, d, $J=9.1\text{Hz}$, H-5), 7.58 (1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-4); MS, m/z (rel. int., %): 162 [M^+] (85.9), 134 [M-CO] (100), 106 [M-2CO] (8.1), 105 (26.6), 78 (32.8), 77 (18.7).

Peucedanol (II)—백색침상결정 (EtOAc), mp 175~176°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}=+58.5^\circ$ ($c=0.07$, MeOH) (Lit.⁶⁾ mp 174~175°, $[\alpha]_{\text{D}}=+31.2^\circ$; IR, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3495, 3320, 1715, 1690, 1635, 1512, 1485, 1455, 1392, 1150, 1060, 815; UV, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 220 (3.91), 246 (3.38), 256 (3.30), 333 (3.89); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH+KOH}}$: 216 (4.08), 234 (3.74), 273 (3.18), 299 (3.04), 378 (4.04); $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 1.97 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 3.41 (1H, dd, $J=10, 14\text{Hz}$, H-1'), 3.91 (1H, dd, $J=2, 14\text{Hz}$, H-1'), 4.60 (1H, dd, $J=2, 10\text{Hz}$, H-2'), 6.60 (1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-3), 7.33 (1H, s, H-8), 7.90 (1H, s, H-5), 7.98 (1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, H-4); MS, m/z (rel. int., %): 264 [M^+] (18.4), 246 [$\text{M-H}_2\text{O}$] (6.4), 231 [$\text{M-(H}_2\text{O+CH}_3$)] (1.3), 207 (1.6), 206 (13.1), 189 (10.9), 187 (12.0), 176 (99.7), 175 (100), 163 (40.5), 146 (25.4), 131 (8.3), 119 (7.2), 91 (16.0), 77 (14.9), 71 (24.5), 69 (28.9), 59 (65.9), 43

(35. 1).

 β -Sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside(III)

—무정형 분말(MeOH), mp 264~267°. 표품과 직접 대조하여 동정하였다.

식방풍중 peucedanol 함량분석—건조된 식방풍 15 g을 MeOH 50 ml씩으로 2시간 3회 수욕에서 환류추출 하고 MeOH 추출액을 합하여 감압농축 한 후 증류수로 헹타시켜서 EtOAc 50 ml로 3회 추출한다. EtOAc 추출액을 감압농축 건조한 다음(건조 extract : 344.1 mg) 그 33.3 mg을 100 ml의 MeOH에 용해시킨 액 10 μ l씩을 Rheodyne injector를 통하여 정확히 column에 주입하여 HPLC를 실시한다. 이때 이동상은 H₂O-MeOH (5 : 4), UV detector의 파장은 333 nm, 0.25 ml/min의 유속으로 실온에서 실시한다. 이와같이 하여 얻은 chromatogram으로부터 peucedanol에 해당하는 peak area를 구하고 peucedanol 표준검량선에 대입하여 peucedanol의 함량을 산출한다. EtOAc 추출액은 주입전에 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 불용물을 제거한다.

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

〈1992년 1월 18일 접수 : 2월 11일 수리〉

문 헌

1. 지형준, 이상인 : 한약규격집 주해서, 한국메디칼인텍스사, 서울, p.237 (1988).
2. 약품식물학 연구회 : 약품식물학 각론, 진명출판사, 서울, p.411 (1980).
3. Lee, Y.C. and Park, H.B. : *J. Pharm. Soc. Korea* 8, 30 (1964).
4. Yook, C.S., Kim, H.S. and Kim, C.T. : *Yakhak Hoeji* 30, 73 (1986).
5. Rondest, J., Das, B.C., Ricroch, M.-N., Christiane, K.-F., Potier, P. and Polonsky J. : *Phytochem.* 7, 1019(1968).
6. Hata, K., Kozawa, M., Ikeshiro, Y. and Yen, K.-Y. : *Yakugaku Zasshi* 88, 513(1968).
7. Kim, S.W., Chung, K.C., Son, K.H. and Kang, S. S. : *Kor. J. Pharmacogn.* 20, 76 (1989).
8. Murray, R.D.H., Mendez, J. and Brown, S.A. : *The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry*, John Wiley and Sons, pp.575-581 (1982).