

## HPLC-DAD를 이용한 백선피의 Dictamine, Obacunone, Fraxinellone의 동시분석법 확립

송지연 · 이민아 · 윤정선 · 김대현<sup>1</sup> · 김승현<sup>1</sup> · 김영중 · 성상현\*  
서울대학교 약학대학, <sup>1</sup>㈜엘컴사이언스 생명과학연구소

### Simultaneous Determination of Dictamine, Obacunone and Fraxinellone in *Dictamnus dasycarpus* cortex by HPLC-DAD

Ji-Yeon Song, Mina Lee, Jeong-Seon Yoon, Dea-Hyun Kim<sup>1</sup>, Seung-Hyun Kim<sup>1</sup>,  
Young-Chong Kim and Sang Hyun Sung\*

College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>1</sup>Institute for Life Science, Elcom Science Co. Ltd., Seoul 151-742, Korea

**Abstract** – A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the simultaneous determination of dictamine, obacunone and fraxinellone was established for the quality control of traditional herb *Dictamnus dasycarpus* cortex. Separation and quantification were successfully achieved with a Shiseido C18 column (5 µm, 4.6 mm I.D. × 250 mm) by gradient elution of a mixture of methanol and water at a flow rate of 1.0 ml/min. The diode-array UV/Vis detector (DAD) was used for the detection and the wavelength for quantification was set at 236 nm. The presence of dictamine, obacunone and fraxinellone in this extract was ascertained by retention time, spiking with each authentic standard and UV spectrum. All three compounds showed good linearity ( $r^2 > 0.999$ ) in relatively wide concentration ranges. The R.S.D. recovery of each compound was 101.0~103.7% with R.S.D. values less than 1.0%. This method was successfully applied to the determination of contents of dictamine, obacunone and fraxinellone in three commercial products of *D. dasycarpus* cortex. These results suggest that the developed HPLC method is simple, effective and could be readily utilized as a quality control method for commercial products.

**Key words** – *Dictamnus dasycarpus* cortex, HPLC, quantification, validation

백선(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)은 운향과(Rutaceae)에 속하는 다년생 초본으로 근피를 백선피(白鮮皮)라고 하며, 민간에서 거풍(祛風), 조습(燥濕), 해열(解熱), 해독(解毒), 음, 피부습진, 류머티즘으로 인한 통증, 황달 등의 치료에 사용되어 왔다.<sup>1,2)</sup> 몇몇 연구에서 limonoids, furanoquinoline alkaloids, sesterpenoids, flavonoids가 백선피의 주요 성분으로 밝혀진 바 있다.<sup>3,4)</sup> 본 연구에서는 HPLC-DAD 방법을 이용하여 백선피의 활성성분인 dictamine<sup>5,6)</sup>과 limonoids 유도체인 obacunone<sup>7)</sup> 및 fraxinellone<sup>8)</sup>에 대한 동시분석법을 확립하였으며, 확립된 방법의 타당성을 검토하였다. 또한 확립된 분석법을 이용하여 시중에 유통되는 국내산 백선피 내의 함량을 분석하여 본 분석방법의 응용가능성을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

**실험재료** – 백선피 10 g을 80% MeOH 50 ml로 3시간 동안 추출 후 농축하였고 100% MeOH에 녹여 10 mg/ml로 만들어 membrane filter 후 HPLC 검액으로 사용하였다.

**분석법의 확립** – 기기 HPLC는 Dionex사의 ChromelonTM Chromatography Data System을 사용하였으며 Dionex P680 pump, ASI-100 Automated Sample Inject 및 Dionex UVD 340U(DAD) 검출기를 사용하여 분석하였다.

**이동상의 최적화** – 이동상으로 Table I에서 보는 바와 같이 Methanol 및 water를 그 조성 및 비율을 달리하여 최적의 분리조건을 확립하였다. 또한 용매조성을 isocratic 및 gradient로 달리하여 분석시간 및 분리능을 고려한 최적의 분석조건을 위한 이동상을 확립하였다.

검출과장의 최적화 검출과장에 따른 분석능을 검토하여

\*교신저자(E-mail): shsung@snu.ac.kr  
(Tel): +82-2-880-7859

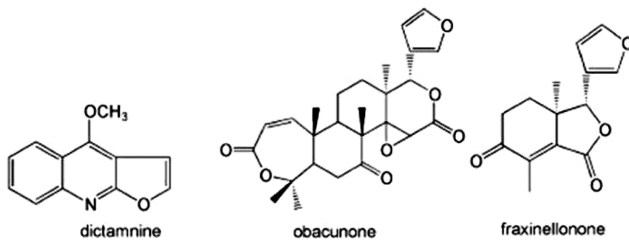


Fig. 1. Structures of marker constituents of *Dictamnus dasycarpus* cortex.

Table I. Solvent gradient conditions for HPLC-DAD

Final time (min)	Solvent A	Solvent B	Flow rate (ml/min)
0	55	45	1
15	70	30	1
22	55	45	1

Solvent A; Methanol, Solvent B; Water

지표성분에 대한 민감한 분석법을 확립하였다.

#### 확립된 분석법의 검증(Validation)

**지표성분의 검량선 작성 및 직선성 검토** – 백선피의 지표성분을 각각 정확히 칭량하여 100% MeOH에 녹인 후 표준용액으로 사용하였다. 유의성 있는 검량선을 얻기 위해 적어도 6가지 이상의 농도에서 실험을 실시하였으며 regression equation을  $y=ax+b$  ( $y$ 와  $x$ 는 각각 peak면적과 시료 함량)의 형태로 구하여 검량선을 작성하였다.

작성된 검량선은  $r^2$ 의 값을 통하여 직선성을 판단하였으며  $r^2$ 의 값이 0.99이상인 경우 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

**특이성(Specificity) 검토** – 확립된 분석법을 통하여 분리된 지표성분의 피크가 추출물 내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 PDA 검출기를 이용하여 피크의 순도를 검토하여 판단하였다. 즉, 각각의 피크에 대하여 여러 점에서 UV 흡수 스펙트럼을 판단하고 이것이 모두 일치하는 경우 피크

의 특이성을 인정하였다.

**정밀성(Precision) 평가** – Intra-day variability는 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시료를 3회 반복 측정하여 상대표준편차로써 기준에 적합한지 평가하였다. Inter-day variability는 직선성이 확인된 농도구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시험일자를 변경하여 1일, 2일, 3일째 되는 날 3회씩 실험하여 상대표준편차를 구하여 평가하였다.

**정확성(Accuracy) 평가** – 함량이 확인된 백선피와 농도를 알고 있는 확정 유효성분 용액을 비율을 달리하여 혼합한 후 직선성이 확인된 농도구간에서 3회씩 측정하여 판단하였다.

**확립된 동시분석법을 이용한 백선피의 함량 평가** – 본 연구를 통하여 확립된 분석법의 효율성을 검토하기 위하여 시판되는 백선피 3종에 대하여 지표성분의 함량평가를 수행하였다.

#### 결과 및 고찰

**분석조건의 확립** – 백선피의 지표성분인 dictamine, obacunone 및 fraxinellone에 대한 동시 정량 분석법을 확립하고자 다양한 용매 조성 및 파장에 대하여 분석조건을 검토한 결과 Shiseido CAPCELL PAK C18 column ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $4.6\ \text{mm ID} \times 250\ \text{mm}$ ) 컬럼을 이용하여 Table I의 용매조건으로 UV 236 nm의 검출파장을 확립하였다. 이 방법을 이용하여 백선피를 분석한 결과 dictamine, obacunone 및 fraxinellone의 분석이 가능하였다 (Fig. 2). 문헌을 토대로 water, 산을 첨가한 water, methanol 및 acetonitrile을 이용하여 분석조건을 검토하였으나, 고가의 acetonitrile이나 산을 첨가한 water의 사용 없이도 모든 피크가 완벽히 분리되는 methanol-water의 용매조건을 이동상으로 선택하였다. Y.Jiang 등 (2006)<sup>9)</sup> 등도 methanol-water의 용매조건을 이용하여 백선피 중의 7가지 지표성분을 정량 한바 있다. 본 논문에서는 Y. Jiang 보다 백선피의 세 가지 major compound인

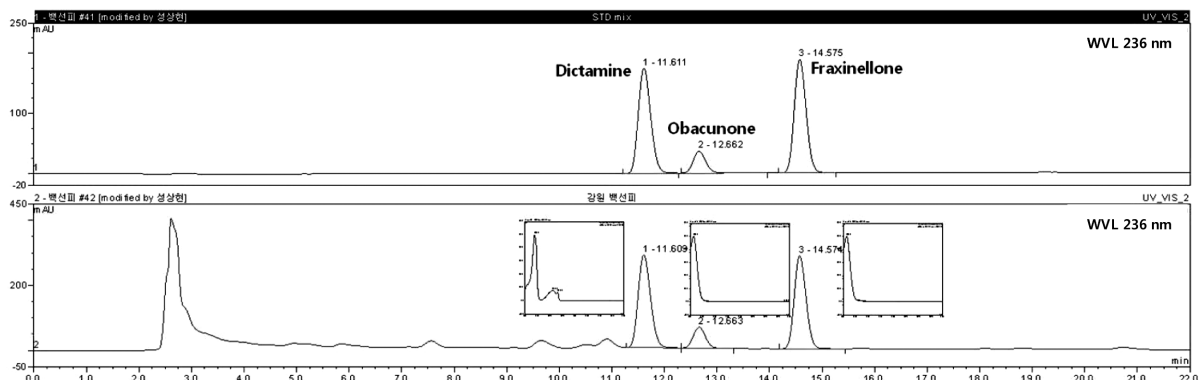


Fig. 2. Chromatogram of standard mixtures (A) and *Dictamnus dasycarpus* cortex.

**Table II.** linear ranges, limit of detection (LOD) and characteristic parameters of calibration curves of dictamine, obacunone and fraxinellone of *Dictamnus dasycarpus* cortex.

Compound	Linear range (µg/ml)	Linear regression equation a y=ax+b		Correlation coefficient (r <sup>2</sup> )	LOD (ng)
		Slope (a)	Intercept (b)		
Dictamine	0.004-0.05	292.7673	2.8803	0.9998	12.8
Obacunone	0.8-10	6.6572	0.8963	0.9999	164.9
Fraxinellone	0.64-8	43.3069	2.4527	0.9998	49

y=peak area, x=concentration (µg/ml)

**Table III.** Analytical results of intra-day and inter-day variability

Compound	Amount(g)	Intra-day		Inter-day	
		Detected (µg)	R.S.D (%)	Detected (µg)	R.S.D (%)
Dictamine	0.5	0.5130	0.1136	0.5042	1.8082
	0.2	0.2027	0.0416	0.2008	2.3766
	0.1	0.9083	0.0866	0.0976	3.1768
Obacunone	5	5.1886	0.4681	4.9806	5.3219
	2	2.1222	0.1635	2.0097	6.7080
	1	1.0465	0.0417	0.9917	7.0816
Fraxinellone	4	4.4650	0.0515	4.0268	9.9710
	1.6	1.7712	0.0511	1.6047	9.8589
	0.8	0.8763	0.6777	0.7918	10.3084

dictamine, obacunone 및 fraxinellone를 기준으로 하여 완벽히 분리되는 조건으로 세 지표성분의 유지시간을 앞당겼으며 설정된 세개의 지표성분에 대한 산지별 비교가 가능하도록 하였다.

#### 백선평의 동시분석법의 검증

**지표성분 피크의 순도(purity) 평가** - 백선평의 지표성분인 dictamine, obacunone 및 fraxinellone에 해당하는 피크의 순도는 DAD 검출기에 의해 확인하였으며, 순도는 각각 98, 91, 98% 이상이었다 (Fig. 2).

**분석법의 검량선 측정 및 검출한계(LOD)** - 설정 백선평의 지표성분인 dictamine, obacunone 및 fraxinellone는 모두 넓은 범위에서 좋은 직선성( $r^2 > 0.999$ )을 보였으며, 검출한계는 각각 12.8, 164.9 및 49 ng으로 미량의 성분까지 검출 가능하였다 (Table II).

**분석법의 정밀성(Precision) 검토** - 확립한 동시분석법의 정밀성을 검토하기 위하여 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시료를 3회씩 반복 측정하여 정밀성을 확인한 결과 3농도 모두에서 0.7% 이하의 상대표준편차를 나타내었다. 또한 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시험일자를 변경하여 1일, 2일, 3일째 되는 날 3회 반복 측정한 결과 10.3% 이하의 상대표준편차를 나타내었다 (Table III).

**분석법의 정확성(Accuracy/Recovery)검토** - 함량이 확인된 백선평 시료에 지표성분인 dictamine (0.05 mg/ml), obacunone (0.5 mg/ml), fraxinellone (0.4 mg/ml)을 가한 후 함량을 평가하여 정확성을 측정된 결과 101.0-103.7%의 정확성을 나타내었으며 또한 1.0% 이하의 상대표준편차를 나타내었다 (Table IV).

#### 분석법을 이용한 유통 백선평의 분석

이와 같이 확립된 분석법을 이용하여 유통 백선평에 대해

**Table IV.** Accuracy for the assay of marker constituents of *Dictamnus dasycarpus* cortex

Compound	Spiked amount (µg)	Measured amount (µg)	Accuracy (%)	R.S.D (%)
Dictamine	0.3740	0.3837	102.59	0.091
	0.3320	0.3422	103.05	0.174
	0.4160	0.4316	103.74	0.141
Obacunone	3.8216	3.9097	102.31	0.207
	3.4287	3.5365	103.14	0.088
	4.2144	4.1390	102.48	0.784
Fraxinellone	2.9116	2.9406	101.00	0.026
	2.5488	2.6020	102.09	0.754
	3.2744	3.3147	101.23	0.104

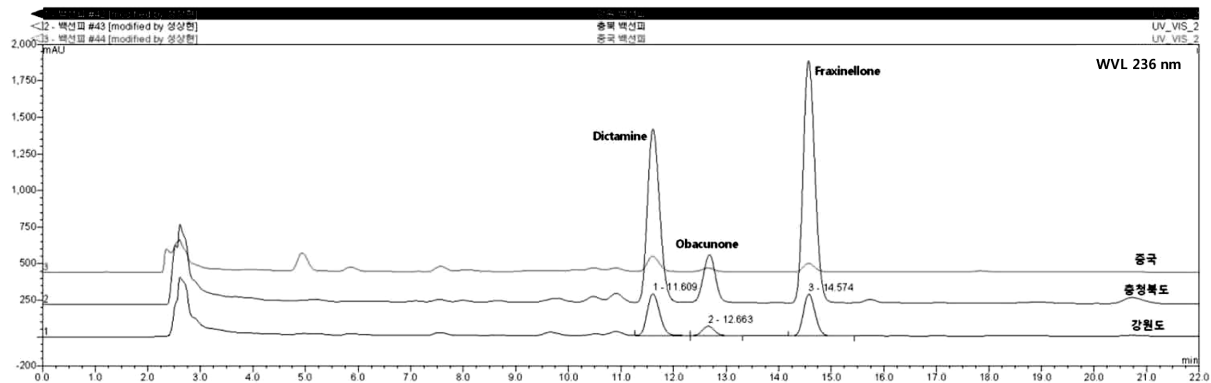


Fig. 3. HPLC chromatogram of three commercial *Dictamnus dasycarpus* cortex from different place of origins.

Table V. The contents of Dictamine, Obacunone, Fraxinellone from various *Dictamnus dasycarpus* cortex

Compound	No. of Sample	Measured amount (μg)	Content (%)	Content R.S.D (%)
Dictamine	1	0.2554	0.1277	0.0601
	2	1.0868	0.5434	0.0222
	3	0.0857	0.0429	2.7437
Obacunone	1	2.5698	1.2849	0.4729
	2	13.2961	6.6480	0.0532
	3	0.9478	0.4739	1.3347
Fraxinellone	1	1.8041	0.9021	0.0575
	2	10.7271	5.3635	0.0809
	3	0.3155	0.1577	2.6358

1: 강원, 2: 충북, 3: 중국산

여 dictamine, obacunone 및 fraxinellone의 분석을 수행하였다. 3개의 제조사로부터 생산된 백선피에 대하여 본 분석법을 이용하여 분석한 결과 3종의 백선피 모두 dictamine, obacunone 및 fraxinellone의 피크가 다른 성분에 의하여 간섭 받지 않고 분석이 가능하였다 (Fig. 3).

3종 백선피의 각 지표성분 함량 결과는 Table V와 같다. 중국산에 비해 국내산이 세 개 지표성분 함량이 더 높은 것으로 나타났으며, 계산된 함량결과는 각 지표성분 표준품의 linear range안에 포함되었다.

## 결 론

본 연구를 통하여 염증 및 급성 류마티스 관절염 치료 효과가 있는 백선피 내의 dictamine, obacunone 및 fraxinellone에 대한 동시 분석 정량법을 확립하고 이를 검증하였다. 본 분석법은 백선피에 함유되어 있는 dictamine, obacunone 및 fraxinellone 분석이 다른 성분에 간섭 받지 않도록 확립되었다. 또한 백선피에 들어있는 dictamine, obacunone 및

fraxinellone 3가지 성분을 동시 분석할 수 있도록 그 조건을 확립함으로써 경제적, 시간적 및 인력에 대한 효율을 증대시킬 수 있었다. 이와 같이 확립된 분석법을 이용하여 시중에 유통되는 백선피의 함량을 분석한 결과 특별한 전처리 없이 분석이 가능하였으며, 따라서 본 분석법이 백선피의 품질관리에 신속하고 효율적으로 사용될 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구는 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다 (한국연구재단-2009-0075964).

## 인용문헌

- Bae, K. H. (2000) The medical plants of Korea, 122, *Kyohaksa*, seoul.
- Jiachuan, L., Jianqing, Y., Huaidong, Y. and Zhixiong, L. (2008) Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. *Food. Chem.* **107**: 1205-1209.
- Weimin, Z., Jean-Luc, W., Kurt, H., Rensheng, X. and Guowei, Q. (1998) Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry* **47**: 7-11.
- Weimin, Z., Jean-Luc, W., Kurt, H., Hong-Yu, L., Helen, S. E., Rensheng, X. and Guowei, Q. (1998) Sesquiterpene glycosides from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry* **47**: 63-68.
- Kanamori, H. and Sakamoto, I. (1986) Further study on mutagenic furoquinoline alkaloids of dictamni radice cortex: Isolation of skimmianine and high-performance liquid chromatographic analysis. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 1826-1829.
- Storer, R. and Young, D. W. (1973) Constituents of the root of *Dictamnus albus* L. *Tetrahedron* **29**: 1217-1222.
- Nsima, T. K., Tetsuo, I., Hiroaki, O., Matsumi, D., Yoshiki, M. and Munehiro, N. (2008) Limonoids from the stem bark

- of *Cedrela odorata*. *Phytochemistry* **69**: 1782-1787.
8. Tian-Shung, W., Chia-Ying, L., Yann-Lii, L. and Chang-Qi, H. (1999) Limonoids and alkaloids of the root bark of *Dictamnus angustifolius*. *Phytochemistry* **50**: 509-512.
9. Jiang, Y., Li S. P., Chang, H. T., Wang, Y. T. and Tu, P. F. (2006) Pressurized liquid extraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of seven active compounds in Cortex Dictamni. *J. chromatogr. A* **1108**: 268-272.
- (2010. 11. 19 접수; 2010. 11. 30 심사; 2010. 12. 6 게재확정)