

토복령에 함유되는 (+)-Catechin과 Diosgenin의 함량분석

윤 준¹ · 윤기훈¹ · 황윤정¹ · 이지연¹ · 신화섭² · 이민원^{1*}

¹중앙대학교 약학대학, ²건국대학교 의료생명대학

Quantitative Analysis of (+)-Catechin and Diosgenin from *Smilax china* L. Rhizome

Jun Yin¹, Ki Hoon Yoon¹, Yoon Jeong Hwang¹, Ji Yeon Lee¹, Hwa Sup Shin² and Min Won Lee^{1*}

¹Laboratory of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

²Department of Biomedical Chemistry, Konkuk University, Chungju, Chungbuk 380-701, Korea

Abstract – Validation and contents determination of (+)-catechin and diosgenin from *Smilax china* L. rhizome (SC) were confirmed using Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC). (+)-Catechin was isolated from 60% prethanol SC extract and diosgenin was isolated by acid hydrolysis of saponin fraction from 60% prethanol extract of SC. Finally we have established the validation of the isolated compounds [(+)-catechin, diosgenin] and contents determinations of (+)-catechin and diosgenin by UPLC on 60% prethanol extract of SC [(+)-catechin: 0.06878%, diosgenin: 0.48169%], and on hot water extract of SC [(+)-catechin: 0.06584%, diosgenin: 0.42178%].

Key words – *Smilax china* L., (+)-Catechin, Diosgenin, UPLC, Acid hydrolysis, Validation, Content

청미래덩굴(*Smilax china* L.)은 한국, 일본, 중국, 필리핀 및 인도차이나 등의 지역에 분포하며, 우리나라 대부분의 산야에서 서식하는 백합과(Liliaceae)에 속하는 낙엽성 식물로서, 지역에 따라 산귀래, 명감나무, 매발톱가시, 참열매덩굴, 종가시덩굴 등 다양하게 불리고 있다.¹⁾ 청미래덩굴 뿌리는 토복령이라고 불리우며 이노, 관절염, 해독, 요통, 통풍, 종양 및 염증성질환등에 한방 및 민간적으로 응용되어 왔으며²⁾ 항산화, 항염, 항암, 항비만 및 중금속 배출 효과 등이 보고되어 있다.³⁻⁸⁾

토복령에는 diosgenin을 모핵으로 하는 saponin이 많이 함유되어 있으며^{1,9-11)} 이들 saponin을 산 가수분해를 통해 얻은 diosgenin은 항암, 항혈전, 항과콜레스테롤혈증, 항염, 항암 등의 활성이 있다.¹⁰⁻¹⁶⁾ 또한 토복령에는 (+)-catechin도 함유되어 있으며¹⁷⁾ (+)-catechin은 항산화, 항암의 활성뿐만 아니라 신경 보호효과가 보고되어 있기¹⁸⁻²⁰⁾ 때문에 지표성분을 선정 되었다.

손²¹⁾ 등은 토복령에서 diosgenin의 배당체인 dioscin이 0.01% 함유된다고 보고하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기 – Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) 기기는 Waters Acquity UPLC[®] H-Class system (Waters, America)를 사용하였다. 컬럼은 ACQUITY UPLC[®] BEH C18(1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm) Column을 사용하였다. 분석에 사용된 용매는 UPLC급 이고 Whatman[®] Membrane filters(0.2 μ m, diam. 47 mm)를 이용하여 필터링하고 용매를 사용하였다. 지표물질을 분리에 사용된 역상 컬럼은 고정상으로 Sephadex LH-20(10-25 μ m, GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden), MCI-gel CHP 20P(75-150 μ m, Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan) 및 ODS-B gel(40-60 μ m, Daiso, Osaka, Japan)이었다. TLC는 pre-coated silica gel 60 F254 plate(Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다.

식물재료 – 본 실험에 사용된 토복령은 2014년 3월에 경북생약농업협동 조합에서 규격품을 구입하였다. 중앙대학교 이민원교수가 감별하였음.

추출물 조제 – 토복령 분말을 1 mm정도 두께로 절편을 낸 300 g에 물을 가하여 100°C로 3시간 가열하여 3회 추출한 다음 감압 농축하여 열수 extract를 얻었으며, 같은 방법

*교신저자(E-mail): mwlee@cau.ac.kr
(Tel): +82-2-820-5602

으로 준비한 재료에 60% prethanol을 가하여 90°C에서 5시간 동안 환류추출로 3회 추출한 다음 감압 농축하여 60% prethanol extract(58.5 g)를 얻었다.

지표성분 분리 - (+)-Catechin: 토복령 60% prethanol extract(58 g)를 물에 현탁시켜 여과한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 H₂O/MeOH(gradient)로 용출시켜 세부분획으로 나누고 MCI-gel CHP20P(20% MeOH→100% MeOH, gradient) 및 MPLC(DaiSogel ODS-B: H₂O/MeOH, gradient)를 통하여 (+)-catechin(120 mg)을 분리하였다.

Diosgenin: Saponin 산가수분해를 통하여 diosgenin으로 변화시킨 후에 diosgenin의 함량을 측정하였다.²²⁾ 토복령 60% prethanol extract(4 g)에 60% MeOH, 2.5 mol/L 농도 H₂SO₄ 첨가하여 90°C에서 3시간 동안 환류시스템을 이용한 산가수분해를 하였다.^{23,24)} 산가수분해액을 식힌 후에 에테르로 용매추출을 하여 에테르층에서 diosgenin(96.3 mg)을 분리하였다.

표준용액의 조제 - 토복령으로부터 분리, 정제한 (+)-catechin과 diosgenin을 각각 1 mg 정확히 취해 MeOH를 2 ml가하여 stock solution(500 ppm)을 조제했다. 이 stock solution을 희석하여 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ppm 농도의 표준용액을 조제하였다.

검액의 조제 - 토복령 열수extract 및 60% prethanol extract 각각 1 mg을 용매에 녹여서 1000 ppm 농도 되도록 하여 UPLC검액으로 사용하였다.

UPLC 조건 - 표품인 (+)-catechin과 diosgenin의 분석조건을 Table I, II와 같이 설정한 다음, 이 분석조건에 따라 각각의 시료의 validation과 정량분석 실시하였다.

분석 방법의 검증(Validation) - UPLC 분석방법의 정확성 및 재현성을 검증하기 위하여 KFDA(식품의약품안전처)의 의약품등 시험방법 validation guide line에 따라서 특이성, 직선성, 정량한계, 정확성 및 정밀성 평가를 시행하였다.

특이성(Specificity) - 지표성분은 토복령 내의 다른 물질과 분리가 되는지 PDA검출기를 이용하여 피크의 순도를 검토하여 확인하였다.

검량선, 직선성(Linearity) - 직선성 평가를 위한 검량선을 얻기 위해 (+)-catechin과 diosgenin 표준용액을 MeOH 용액으로 희석하여 5개 농도의 각각 (+)-catechin 표준용액을 5개의 농도(250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 µg/mL), diosgenin 표준용액을 5개의 농도(500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/mL)가 되도록 용액을 만들어 실험 실시하였다. Linear regression equation($y=ax+b$ y: peak 면적, x: 시료 농도 a: 직선의 기울기, b: y절편)을 구하였으며 R²의 값을 통하여 직선성을 확인하였다. R²의 값이 0.99이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

정량한계(LOQ) - 분석물질의 정량이 가능한 최저 농도를

Table I. UPLC condition of (+)-catechin

(+)-catechin UPLC condition			
Column	Waters Acquity UPLC®		
Flow rate	0.61 ml/min		
UV length	210 nm		
Injection volume	10°C		
Mobile solvent	A: 0.1% Fomic acid; B: Acetonitrile		
Mobile Phase	Time(min)	A	B
	0	100	0
	13	100	0
	17	90	10
	22	0	100

Table II. UPLC condition of diosgenin

Diosgenin UPLC condition			
Column	Waters Acquity UPLC®		
Flow rate	0.61 ml/min		
UV length	210 nm		
Injection volume	10 °C		
Mobile solvent	A: 0.1% Fomic acid; B: Acetonitrile		
Mobile Phase	Time (min)	A	B
	0	35	65
	2	35	65
	16	0	100

확인하기 위하여 정량한계(LOQ)를 측정하였다. 정량한계(LOQ)는 $QL=10 \times \sigma/S$ (σ 는 반응의 표준편차, S는 검량선의 기울기)를 통하여 계산하였다. 기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구할 수 있다. 회귀직선에서 y 절편의 표준편차를 표준편차 σ 로서 이용할 수 있다.

정밀성(Accuracy) 및 정확성(Precision) - 동일 시료에 대하여 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 확인하기 위하여 정밀성 및 정확성 평가를 하였다. (+)-catechin 표준용액을 5개 농도(250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 µg/mL), diosgenin 표준용액을 5개 농도(500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/mL)의 범위에서, 각 시료 농도당 3일간 반복성 시험, 일내 3회 반복 반복성 시험을 하였다. 정밀성은 하나의 균질화 된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성으로 측정하여 정확성은 실제값과 측정값간의 일치되는 정도로 확인하였다.

함량분석(Content) - 분석법 validation 검증과정을 통하여 확립한 UPLC분석법으로 토복령 내의 지표성분의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정밀성, 정

확성 등을 갖고 있음을 확인하고, 검증된 분석법으로 토복령의 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

지표물질 분리 - 토복령의 열수와 60% prethanol extract 를 얻고 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 지표물질을 분리 하였으며 ¹H 300 MHz 및 ¹³C 150 MHz 핵자기 공명 분광기를 이용하여 (+)-catechin^{19,25}과 diosgenin^{26,27}의 구조를 동정하였다.

분석조건 확립 - 지표성분인 (+)-catechin과 diosgenin의 분석법을 확립하기 위한 최적의 각각 분석법이 확립되었다. 이동상 용매로 A: 0.1% formic acid, B: acetonitrile를 선정하여 각각 gradient elution을 적용함으로써 검체의 피크를 이상적으로 분리할 수 있었다. (+)-catechin은 13.12분, diosgenin은 3.82분에 검출되었다. 두 지표성분의 UV흡수 파장은 210 nm로 설정하여 피크의 면적을 측정하였다.

특이성(Specificity) - (+)-catechin의 경우는 UPLC를 이용하여 토복령 열수 및 60%주정 추출액의 chromatography를 비교하여 (+)-catechin의 피크가 분리되는 지를 확인한 결과, 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었다. 표준용액의 머무름 시간은 13.12분, 토복령 열수 추출액의 머무름 시간은 13.15분, 토복령 60% prethanol 추출액의 머무름 시간은 13.13분으로 표준용액의 피크 유지시간과 토복령 추출액의 피크 유지시간이 거의 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증하였다(Fig. 1).

Diosgenin의 경우는 UPLC에서 시료용액의 chromatography를 diosgenin 표준용액의 chromatogram과 비교하여 diosgenin의 피크가 분리되는 지를 확인한 결과 다른 물질과 간섭 없

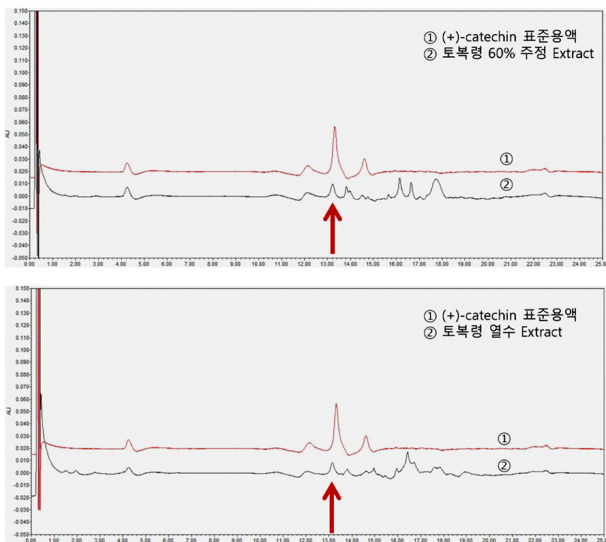


Fig. 1. Specificity of (+)-catechin.

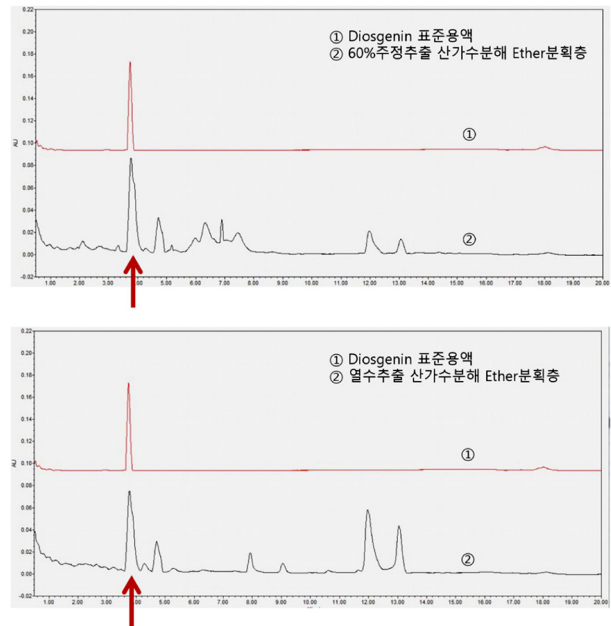


Fig. 2. Specificity of Diosgenin.

이 성분이 분리되었다. 표준용액의 머무름 시간은 3.82분이 고 시료용액의 머무름 시간은 3.82분으로 피크 유지시간이 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증하였다(Fig. 2).

검량선, 직선성(Linearity) - (+)-catechin: UPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은 $Y=20674X-23670$ 이며(Fig. 3), 검량선의 상관계수(R^2)는 1로 높은 직선성을 보인다.

Diosgenin: UPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은 $Y=2521.9X-1525.4$ 이며(Fig. 3), 검량선의 상관계수(R^2)는 1로 높은 직선성을 보인다.

정량한계(LOQ) - 정량한계(LOQ)공식을 이용하여 정량한계를 구하였다. (+)-catechin은 2.08 $\mu\text{g/mL}$ 으로 확인하였으며 diosgenin은 8.74 $\mu\text{g/mL}$ 으로 소량인 성분도 정량이 가능함을 확인하였다(Table III).

정밀성(Accuracy) 및 정확성(Precision) - (+)-catechin의 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로서 0.17~1.13%로 확인하였으며 정확성은 98.07~100.63% 이내로 양호한 값을 나타내었다(Table IV).

Diosgenin의 정밀성은 변동계수로서 0.09~1.48%로 확인하였으며 정확성은 98.20~103.40% 이내로 양호한 값을 나타내었다(Table IV).

함량분석(Content) - 확립된 분석법을 이용하여 지표물질의 함량을 측정 한 결과 토복령의 60%주정추출의 경우는 diosgenin의 함량은 0.48169%로 확인되었으며 (+)-catechin의 함량은 0.06878%로 확인되었다. 토복령의 열수추출의 경우는 diosgenin의 함량은 0.42178%로 확인되었으며 (+)-catechin의 함량은 0.06584%로 확인되었다(Table V). 이는

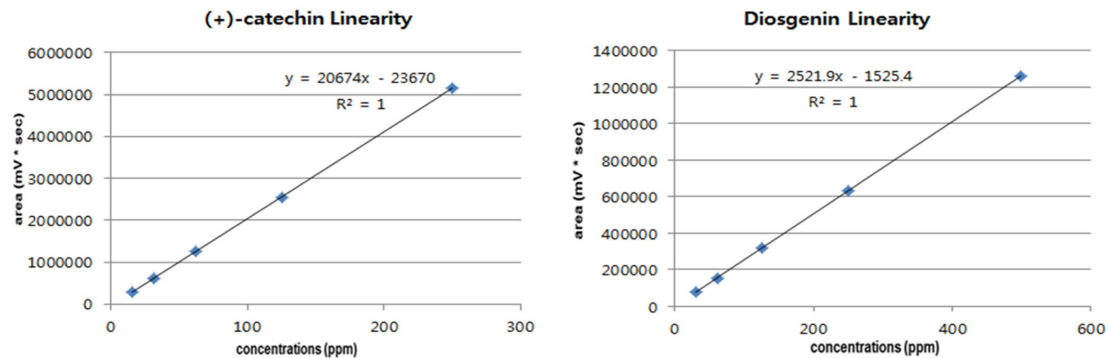


Fig. 3. Linearity of (+)-catechin and diosgenin (*y: peak area, x: concentration, R: Correlation coefficient).

Table III. Linear ranges and LOQ of standards

Compounds	Linear range (µg/mL)	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient(R ²)	LOQ (µg/mL)
(+)-catechin	15.625~250	20674	-23670	1	2.08
Diosgenin	31.25~500	2521.9	-1525.4	1	8.74

Table IV. Precision and accuracy of analytical results

Compounds	Conc. (µg/mL)	Accuracy(%)		Precision(c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
(+) -catechin	250	99.87	99.66	0.17	0.92
	125	100.63	100.36	0.12	0.53
	62.5	99.63	99.79	0.21	0.49
	31.25	99.98	99.78	0.50	0.34
	15.625	98.55	98.07	0.35	1.13
Diosgenin	500	98.20	100.07	0.37	1.48
	250	98.82	99.94	1.12	0.09
	125	98.81	99.23	0.21	1.32
	62.5	99.99	101.06	1.26	1.10
	31.25	103.40	102.79	0.80	0.39

*Intra-day: three times per day, Inter-day: one time analysis of standards per day for three days, c.v.: Coefficient of variation.

Table V. Contents of (+)-catechin and diosgenin

Solvent	Compounds		
	Diosgenin	(+) -catechin	
Contents	60% prethanol	0.48169%	0.06878%
	Hot water	0.42178%	0.06584%

초임계추출후 산가수분해하여 diosgenin 함량을 측정된 경우와 비슷한 결과였다.²⁸⁾

본 연구를 통하여 토복령에는 축합형 탄닌(condensed tannin)과 이플화합물의 전구체인 flavan-3-ol인 (+)-catechin 이 많이 함유되어 있어서¹⁷⁾ 이계열의 화합물이 토복령의 효능에도 크게 관여한 것으로 사료된다. 또한 그동안 토복령의 지표성분으로서 dioscin은 매우 미량 함유된 것으로 나

타났으며²¹⁾ aglycone인 diosgenin을 모체로 하는 배당체 (smilax saponin)는 다양하게 함유되어 있다.^{1,9-11)} 따라서 토복령의 표준화를 위한 함량평가에 있어서 (+)-catechin과 diosgenin을 지표성분으로 하는 것이 타당하다고 사료된다.

본 연구에서는 토복령에 함유된 dioscin을 포함한 saponin을 가수분해한 diosgenin과 (+)-catechin을 지표성분으로 설정하고 UPLC를 이용하여 분석법 validation과 함량평가를 수행하였다.

결론

토복령의 60% prethanol으로 추출하여 각종 컬럼 chromatography에 적용하여 (+)-catechin을 분리하였다. 결

과는 토복령의 60% prethanol 추출물을 산기수분해하여 ether 로 추출한 후 컬럼 chromatography를 이용하여 diosgenin을 분리하였다.

(+)-catechin과 diosgenin을 지표성분으로 설정하여 분석법을 확립하여 특이성, 직선성, 정량한계, 정확성 및 정밀성을 통하여 충분히 유의성이 있음을 확인하였으며 이상의 분석법을 이용하여 지표물질에 대한 함량분석을 시행하였다. 그 결과는 60%주정 추출의 경우에 (+)-catechin이 0.06878%로 검출되었으며 diosgenin은 0.48169%로 검출되었다. 열수 추출에서는 (+)-catechin이 0.06584%로 검출되었으며 diosgenin이 0.42178%로 검출되었다. 본 연구의 결과로 확립된 분석법은 토복령의 함량분석에 있어서 중요한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 농림수산식품부의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Kim, T. J. (2008) Wild Flowers and Resources Plants in Korea 5, 364. Seoul National University Publisher, Seoul, Korea.
- The Editorial Committee of Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine of People's Republic of China. (1999) Zhong-hua-ben-cao, 157-160. Shanghai Science and Technology Publisher, Shanghai, China.
- Xu, W., Liu, J., Li, C., Wu, H. and Liu, Y. (2008) Kaempferol-7-O- β -D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G 2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. *Cancer lett.* **264**: 229-240.
- Li, Y. L., Gan, G. P., Zhang, H. Z., Wu, H. Z., Li, C. L., Huang, Y. P., Liu, Y. W. and Liu, J. W. (2007) A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anti-cancer effects on human cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* **113**: 115-124.
- Khan, I., Nisar, M., Ebad, F., Nadeem, S., Saeed, M., Khan, H., Samiullah, Khuda, F., Karim, N. and Ahmad, Z. (2009) Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from *Smilax china* Linn.: experimental and computational studies. *J. Ethnopharmacol.* **121**: 175-177.
- Lee, S. E., Ju, E. M. and Kim, J. H. (2001) Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Exp. Mol. Med.* **33**: 263-268.
- Kang, H. S., You, H. C., Chio, Y. R., Kim, H. K., Jo, S. M. and Yoon, B. J. (2011) Effect of *Smilax china* L. rhizome extract on heavy metal contents in rats. *Korean J. Food & Nutr.* **24**: 233-238.
- Park, J. A., Jin, K.S., Kwon, H. J. and Kim, B. W. (2014) The Anti-Obesity Effect of *Smilax china* Extract. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 354-360.
- Nikaido, T., Ohmoto, T., Sashida, Y., Kubo, S. and Mimaki, Y. (1992) Steroidal saponins from *Smilax riparia* and *S. china*. *Phytochemistry* **31**: 2439-2443.
- Shao, B., Guo, H., Cui, Y., Ye, M., Han, J. and Guo, D. (2007) Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* **68**: 623-630.
- Challinor, V. L., Parsons, P. G., Chap, S., White, E. F., Blanchfield, J. T., Lehmann, R. P. and De Voss, J.J. (2012) Steroidal saponins from the roots of *Smilax* sp.: Structure and bioactivity. *Steroids* **77**: 504-511.
- Fu, W. W., Wu, Y. K. and Fan, J. Z. (2010) The design and synthesis of diosgenin anti-tumor derivatives (I)[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, **25**: 010.
- Choi, K. W., Park, H. J., Jung, D. H., Kim, T. W., Park, Y. M., Kim, B. O., Sohn, E. H., Moon, E. Y., Um, S. H., Rhee, D. K. and Pyo, S. (2010) Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF- κ B signaling pathways. *Vascular pharmacology* **53**: 273-280.
- Ma, H. Y., Zhao, Z. T., Wang, L. J., Wang, Y., Zhou, Q. L. and Wang, B. X. (2002) Comparative study on anti-hypercholesterolemia activity of diosgenin and total saponin of *Dioscorea panthaica*. *China Journal of Chinese materia medica* **27**: 528-531.
- Shishodia, S. and Aggarwal, B. (2006) Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I κ B kinase activation and NF- κ B-regulated gene expression. *Oncogene* **25**: 1463-1473.
- Gong, G., Qin, Y. and Huang, W. (2011) Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* **18**: 458-463.
- Huang, H. L., Lu, Z. Q., Chen, G. T., Zhang, J. Q., Wang, W., Yang, M. and Guo, D. A. (2007) Phenylpropanoid-substituted catechins and epicatechins from *Smilax china*. *Helvetica Chimica Acta* **90**: 1751-1757.
- Lu, N., Chen, P., Yang, Q. and Peng, Y. (2011) Anti-and pro-oxidant effects of (+)-catechin on hemoglobin-induced protein oxidative damage. *Toxicology in Vitro* **25**: 833-838.
- Ban, J. Y., Jeon, S., Bae, K., Song, K. and Seong, Y. H. (2006) Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. *Life Sciences* **79**: 2251-2259.
- Menon, L. G., Kuttan, R. and Kuttan, G. (1999) Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer lett.* **141**: 159-165.
- Son, K.H., Seo, J.H., Lee, J.M., Kwon, S.J., Chang, S.Y. and

- Lee, K.S. (2001) Isolation and Quantitative Determination of Dioscin from *Smilaxcis Chinae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 153-156.
22. Rothrock, J., Hammes, P. and McAleer, W. (1957) Isolation of diosgenin by acid hydrolysis of saponin. *Ind. Eng. Chem.* **49**: 186-188.
23. Yang, H., Yang, K. and Chen, J. (2005) The research on two-phase acid hydrolysis of extracting diosgenin [J]. *The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy* **4**: 270-272.
24. Shah, H. J. and Lele, S. (2012) Extraction of diosgenin, a bio-active compound from natural source *Dioscorea alata* var. *purpurea*. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **3**: 1-3.
25. Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P. and Lewis, J. (1996) ¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magn. Reson. Chem.* **34**: 887-890.
26. Elgendya, E. M. and Al-Ghamdyb, H. (2007) Thermal and photooxidation reactions of the steroids: β -sitosterol, stigmasterol and diosgenin. *Taiwan Pharmaceutical Journal* **59**: 113-132.
27. Pazhanichamy, K., Bhuvaneswari, K., Kunthavai, B., Eevera, T. and Rajendran, K. (2012) Isolation, characterization and quantification of diosgenin from *Costus igneus*. *JPC-J. of Planar. Chromat.* **25**: 566-570.
28. Shu, X., Gao, Z. and Yang, X. (2004) Supercritical fluid extraction of sapogenins from tubers of *Smilax china*. *Fitoterapia* **75**: 656-661.
- (2015. 7. 27 접수; 2015. 8. 14 심사; 2015. 8.31 게재확정)