서울綜合技試硏報 *Rep. Seoul Muni. Lab. Tech. Inspection*, 17 : 19～23 , 1981

고속액체크라마토그라프를 이용한 Legalon 제제의 분석에 관한 연구

梁 基 淑

藥品化學科

High pressure liquid chromatographic analysis of Legalon preparations

Ki Sook Yang

Pharmaceutical Chemistry Division

=Abstract =

A rapid and accurate determination method of legalon which is widely used in hepatitis at present was established by high pressure liquid chromatography.

Legalon is seperated by a μ-Bondapak C_{18} column with methanol : water (1 : 1) as the mobile phase and the seperation is completed within 30 min.

서 론

Legalon 즉 Silymarin 군은 *Carduus marianus L.* 또는 Silybin marianum Gaertn의 식물종자에서 추출한 성분[1]으로 3가지의 이성체[2] Silybin, Silydianine, Silychristine 으로 구성되어 있고 이중 Silybin 이 거의 주성분이며 약효물질로 알려져 있다. 이것은 flavonoid 와 corniferyl alcohol 의 radical coupling 에 의해 식물체내에서 형성되는 flavonolignan 으로 그의 단리와 화학[3,4] 이 보고되어 있으나 분석방법에 있어서는 발색법[5] 만이 알려져 있으므로 저자등은 HPLC 를 이용하여 Legalone 제제를 정량에 대해 검토한 바 양호한 결과를 얻었기 보고하는 바 이다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료는 시판의 단일제제와 복합제제를 택하였다.

단일제제 SA_1 : Silymarin 35 mg

복합제제 SA_2 : Carduus marianus L. (Silybin 15 mg／정)
Aesculus hippocastanum L. (Aescin 1.6 mg／정)
Hammamelis virginiana (Hammameli tannin 1.5 mg／정)

실험방법

1. 시약

methanol : HPLC 用

Distilled water : HPLC 用

Silymarin standard : NIH, 71.6%

Silybin standard : Madaus co. 100%

측정조건은 Table 1과 같다.

Table Ⅰ. Conditions of High Pressure liquid Chromatography

Model : Waters 244
Column : μ - Bondapak C_{18}
mobile phase : methanol - water (1 : 1)
detector : uv 280 nm (0.05 Aufs)
flow rate : 1.0 ml / min (1,000 psig)
Chart speed : 6 inch / hour

Table Ⅱ. Silymarin Contents in Samples

No of tests \ sameple	SA_1	SA_2
1	101.1	98.9
2	102.5	99.5
3	100.1	100.3
4	99.5	97.5
5	98.7	101.5
$\bar{x}$	100.38	99.54
SE	0.59	0.60

2. 방법

SA_2시료액의 조제 : Silymarin 15 mg 에 해당하는 양을 정평하여 물 100 ml 가한 후 30分 진탕하여 추출하고 ethyl acetate 100 ml 및 0.1N - Hcl 30 ml 을 가하여 수욕상에서 2시간 환류시킨다. 냉각 후 분액여두에 옮기고 NaCl 3g을 가해 염석시키고 수층을 제거 후 Ethyl acetate 층을 무수망초 3g 가해 탈수시키고 감압 농축하여 잔사를 50% methanol 200 ml 에 녹인 후 millipore 여과하여 사용하였다.

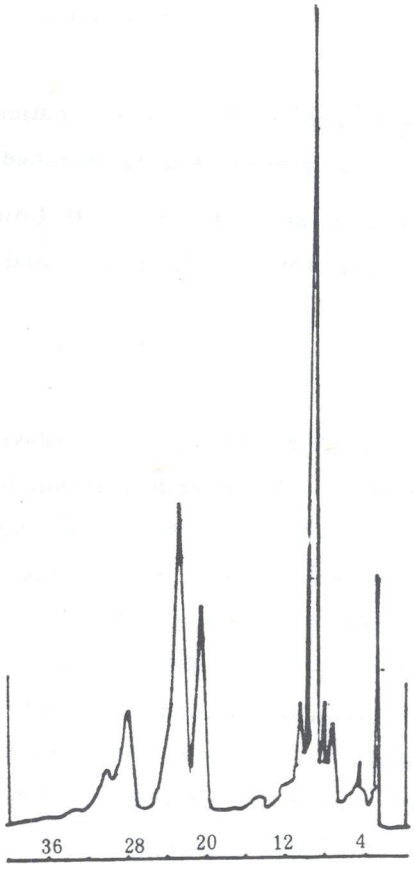

Fig. 1 Liquid chromatogram of SA_1

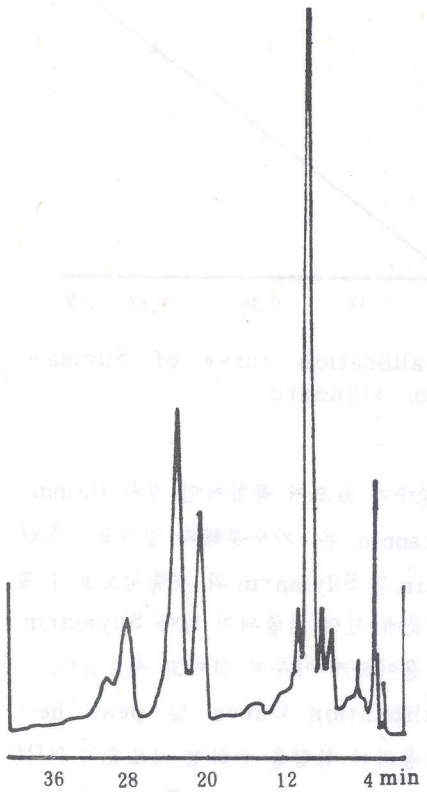

Fig. 2 Liquid chromatogram of Silymarin (in SA_1)

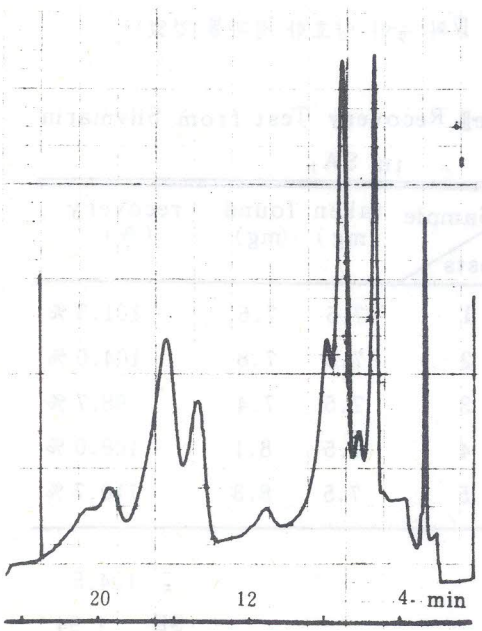

Fig. 3 Liquid chromatogram of SA_2

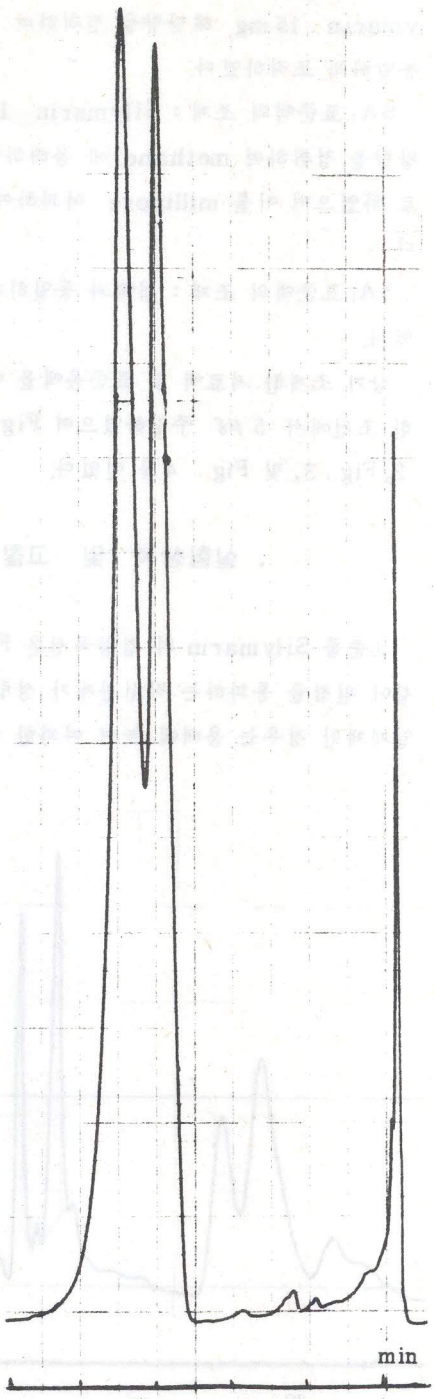

Fig. 4 Liquid chromatogram of Silbin standard

SA_2표준액의 조제 : 표준품 Silybin 및 Silymarin 15 mg 해당량을 정취하여 시료액과 동일하게 조작하였다.

SA_1표준액의 조제 : Silymarin 15 mg 해당량을 정취하여 methanol에 용해하여 200 ml로 하였으며 이를 millipore 여과하여 사용하였다.

SA_1표준액의 조제 : 검액과 동일하게 조작하였다.

상기 조제한 시료액 및 표준용액을 이미 기술한 조건에서 5 $\mu\ell$ 주입하였으며 Fig. 1, Fig 2, Fig. 3, 및 Fig. 4를 얻었다.

. 실험성적 및 고찰

표준품 Silymarin의 검량곡선은 Fig. 6 와 같이 원점을 통과하는 직선관계가 성립되며 단일제제인 경우는 용매에 녹여 여과한 후 그대로

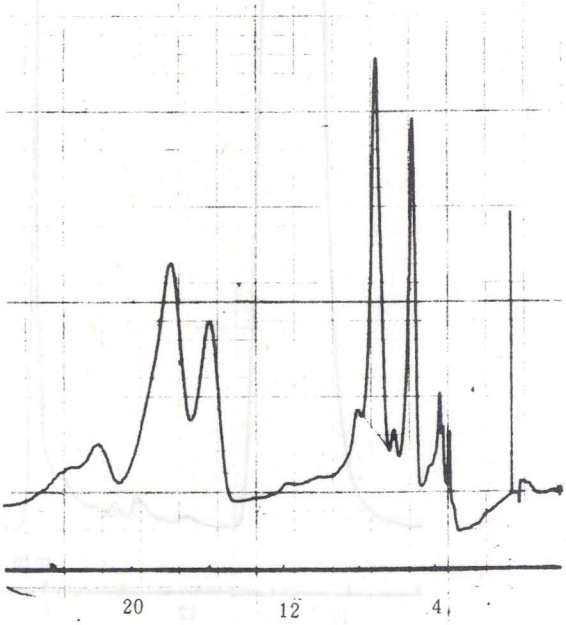

Fig. 5 Liquid chromatogram of Silymarin standard

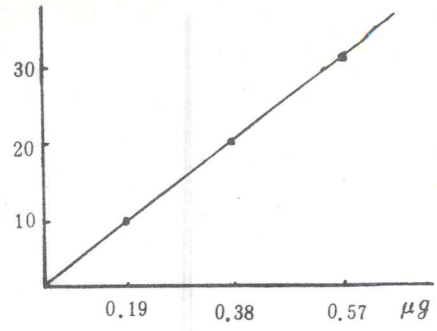

Fig. 6 Calibration curve of Silymarin standard

LC를 행할수가 있으며 복합제인 경우 Hammamelis tannin은 가수분해와 염석을 통해 또한 Aescin은 Silymarin의 검출감도보다 훨씬 낮기 때문에 전혀 검출되지 않아 Silymarin의 분리가 용이하게 이루어 진다고 사료된다.

상기의 Calibration Curve 및 peak height를 이용하여 함량을 구하면 시료중의 NIH 표준에 의한 Silymarin 함량은 Table Ⅱ과 같으며 그의 회수율을 측정한 결과 Table Ⅲ, Table Ⅳ와 같이 양호한 결과를 얻었다.

Table Ⅲ. Recovery Test from Silymarin in SA_1

No. of tests \ Sample	taken (mg)	found (mg)	recovery (%)
1	7.5	7.6	101.3 %
2	7.5	7.8	104.0 %
3	7.5	7.4	98.7 %
4	7.5	8.1	108.0 %
5	7.5	8.3	110.7 %

$\bar{x}$ 104.5

SE 1.94

Table Ⅳ. Recovery Test from Silymarin in SA_2

No. of tests \ Sample	taken (mg)	found (mg)	recovery (%)
1	7.5	7.3	97.3%
2	7.5	7.1	94.7%
3	7.5	8.4	112.0%
4	7.5	8.7	116.0%
5	7.5	7.6	101.3%

$\bar{x}$ 104.3

SE 3.72

그러나 Silybin 표준품의 peak 는 같은농도, 같은 조건에서 (Fig. 3, 4, 5) Silymarin Group 의 뒷부분의 peak 만이 크게 검출되어 Silymarin 시료와 Silymarin Standard 에서의 main peak 가 전혀 검출되지 않았다. 단일제의 가수분해 하지 않은 과정중에서도 역시 마찬가지의 결과를 나타내었다. 따라서 이 표준품에 대해서는 앞으로 더욱 검토해보고져 한다.

결 론

이상의 결과에서 Silymarin 은 0.2 μg/0.8 μg의 농도에서 양호한 수득률을 얻었으며 단일제는 30分 정도에서 모든 조작이 완료되고 복합제로 종래의 발색법에 비해 신속하고 정량적인 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. スタイソエツガ ; 生藥學 468 (1979)
2. Martha windholz ; The merck Index 9 th 8283 (1926)
3. Wagnel et al ; Arzneimttel – Forsch 18, 688 (1968)
4. Wagner et al ; ibid 24, 466 (1974)
5. 국립보건연구원발행 ; 의약품등의 기준 시험방법 (1979)