DAEHAN HWAHAK HWOEJEE
(*Journal of the Korean Chemical Society*)
Vol. 30, No. 4, 1986
Printed in the Republic of Korea

모세관 기체-액체 크로마토그래피에 의한 Costus Speciosus 중 Diosgenin의 정량에 관한 연구

金宅濟† · 車基錫 · 金榮相*
한국과학기술원 화학분석실
*고려대학교 문리대학 화학과
(1986. 1. 16 접수)

A Study on Capillary Gas-Liquid Chromatographic Determination of Diosgenin in Costus Speciosus

Taek-Jae Kim†, Kee-Surk Cha, and Young-Sang Kim*
Korea Advanced Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Dong Dae Mun, Seoul 131, Korea
**Department of Chemistry, Korea University, Jochiwon 320, Korea*
(Received January 16, 1986)

요 약. 모세관 기체—액체크로마토그래피(GLC)에 의해 인도네시아산 Costus speciosus 중의 diosgenin을 정량하기 위해 가수분해 및 추출, 아세틸화 반응 및 GLC의 측정 조건등을 검토하였다. 건조된 diosgenin 분말 0.20g을 3N HCl과 xylene의 혼합용액으로 95~100°C에서 4시간 환류시킨 다음 xylene층을 분리하였다. Xylene을 증발시켜 날려보내고 20 : 80의 acetic anhydride-pyridine을 가하고 30분간 환류시켜 아세틸화시킨 후 diethyl ether로 추출하였다. 무수 Na_2SO_4로 탈수시키고 ether를 날려 보낸 다음 찌끼를 *n*-hexane 5.00m*l*에 녹여 GLC로 분석하였다. SE-30 25m×0.33mm의 모세관을 사용하였고 컬럼온도는 180°C에서 270°C까지 10°C/min의 속도로 온도를 상승시켰다. 운반기체 N_2의 유속은 2m*l*/min이었고 FID로 검출하였다. Diosgenin의 분석결과는 0.281%이었고, 상대표준편차는 1.8%로서 재현성이 좋았다.

ABSTRACT. Diosgenin in an Indonesian Costus speciosus was determined by capillary gas-liquid chromatography (GLC). The experimental conditions for the hydrolysis, extraction and acetylation of the diosgenin, and the determination by GLC were investigated. 0.20g of dried sample powder was refluxed in the solution of 3N HCl and xylene at 95~100°C for 4 hours and the xylene layer was separated. The residue evaporated the xylene was refluxed in 20 : 80 acetic anhydride-pyridine for 30 minutes and the diosgenin acetate was extracted with diethyl ether. Dehydrated with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated the ether, the residue was dissolved in 5.00m*l* of *n*-hexane and injected into GLC. Capillary column of SE-30 25m×0.33mm was installed in GLC and the column temperature was increased from 180° to 270°C at rate of 10°C/min. The flow rate of carrier gas N_2 was 2m*l*/min and FID was used to detect. The analytical result of the diosgenin was 0.281% and relative standard deviation of 5 measures was 1.8%.

1. 서 론

Diosgenin(25R-Spirost-5-en-3β-OH)은 *Fig.* 1의 구조를 갖는 steroidal sapogenin의 일종으로서 cortisone 등과 같은 steroid 제제를 합성하는데 있어서 중요하게 사용되는 출발 물질이다. Steroidal sapogenin은 glycoside의 구조로 된 sapogenin으로서 여러가지 식물체에 함유되어 있으며, C-5와 C-25에서 이성질체를 갖고 있다.

이러한 sapogenin 이성질체간의 조성 및 함량은 식물의 종류 뿐만 아니라 같은 종류의 식물체라도 지역적 산지에 따라 크게 다르다. 따라서 diosgenin을 분석할 때는 식물체의 종류, 산지 또는 부위에 따라 그리고 공존하는 이성질체들이 무엇인가에 따라 방법을 달리해야 한다.

Diosgenin을 비롯한 sapogenin을 분석하는 방법으로는 무게분석법[1~6], 분광광도법[7~9], 얇은막크로마토그래피(TLC)[10,11], 컬럼 크로마토그래피-적외선 분광법[12~14], 적외선 액체 크로마토그래피(HPLC)[15~20], 기체-액체 크로마토그래피(GLC)[21,22] 등이 보고 되었다. 몇가지 방법들은 선택성의 부족, 정확성의 결여, 분석시간의 지연 등으로 바람직하지 못한데 비하여 HPLC와 GLC는 선택성이 좋음은 물론 비교적 신속하고 정확한 결과를 얻을 수 있어서 주로 이용되고 있다.

Cooke[21]는 GLC를 이용하여 Dioscorea deltoidea와 Dioscorea sylvatica 중 diosgenin을 분석하였는데 시료를 염산으로 가수분해시켜 light petroleum으로 추출하여 방해물질을 제거하는 과정을 택함으로서 시간이 많이 걸리며 diosgenin과 이성 질체간의 분리 정량에 무제가 있었다. Rozanski[22]도 Dioscorea tuber 중에서 diosgenin을 분석하였는데 Cooke과는 다르게 가수분해와 추출 과정을 동시에 행하여 분석시간을 단축시키는 장점을 갖고 있지만 공존하는 타성분들이 깨끗하게 제거되지 않아 분해능이 좋은 크로마토그래프가 필요하다.

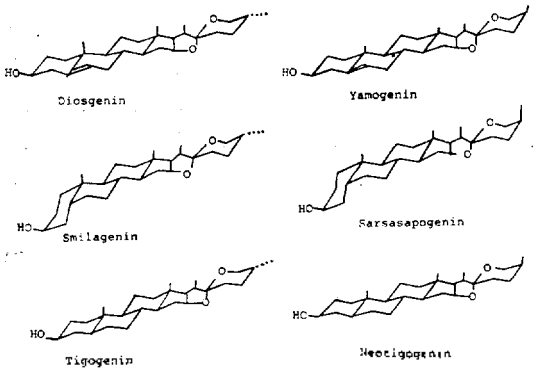

Fig. 1. Structures of six common diosgenin isomers.

한편 HPLC로 분석한 연구들이 보고되어 있는데 Higgins[15]는 역상방식으로 Agave 중 주요 sapogenins을 분석하였는데 sapogenins을 benzoyl chloride와 반응시켜 benzoate esters을 만들어 분리하였다. 한번 분석하는데 16시간이나 걸리는 단점이 있는가 하면 diosgenin 이외의 이성질체들을 분리, 확인하지 못하였다. Mahato 등[16]은 Costus speciosus 등 몇가지 식물체 중에서 diosgenin을 HPLC로 분석하였는데 시료를 가수분해하고 추출하여 μ-Porasil microparticulate (10μm) silica 컬럼(30cm×3.9mm *i.d.*)과 시차굴절계의 HPLC에 light petroleum-isopropanol 혼합용매로 용리시켰다. 시간이 오래 걸리고 조작이 복잡한 한편 분해능도 좋지 않아서 이성질체들의 분리, 확인이 되지 못하였다. Hunter 등[18]은 sapogenins을 acetate 유도체로 만들어 분리분석 하는 실험을 하였는데 HPLC의 μ-Porasil microparticulate의 정상 방식과 μ-Bondapak C_{18}의 역상방식을 사용하였고 UV 검출기(210nm)로 검출하였다. Lin 등[17,19]은 steroidal sapogenin을 정상과 역상방식으로 분석하였는데 30여 성분의 화학적 구조와 머무른시간과의 관계를 설명하였으나 C-25 epimers을 분리하지 못했다.

한편본 연구자들은 Hunter 등의 HPLC 분리방법을 이용하여 Costus speciosus을 가수분해 및 추출하여 얻은 sapogenins을 아세틸화 시켜서 HPLC로 정량 분석한 바 있다[20]. 그러나 HPLC의 정상 및 역상방식을 병행해서 두번하고 분석시간도 120분이나 소요되는 단점을 가지고 있다.

본 연구에서는 인도네시아산 Costus speciosus 중의 diosgenin을 가수분해 및 용매추출해 낸 다

음 아세틸화시켜모세관 GLC로 분리, 분석하고 그 결과들을 HPLC의 결과와 비교, 검토하고자 한다.

2. 실 험

기기 및 시약. 사용한 GLC는 Varian Vista Model 6000으로서 SE-30 25m×0.33mm(bonded phase)의 모세관으로 분리하였고 FID로 검출하였다. 컬럼의 온도는 180°C에서 270°C까지 10°C/min의 속도로 상승시켰으며 주입 장치의 온도는 270°C였고 검출기 온도는 280°C로 유지시켰다. 운반기체로는 N_2를 사용하였으며 유속은 2ml/min이었다. 다른 기체유속은 각각 H_2 25ml/min와 air 300ml/min이었다. 시료 주입은 split 방식으로서 split ratio는 1 : 10으로 조절하여 분석하였다.

실험에서 사용된 acetone, xylene, acetonitrile, diethyl ether, *n*-hexane 등의 유기용매는 HPLC용이었으며, HCl, acetic anhydride 등의 시약들은 분석급을 사용 하였다. 표준시약으로 사용한 diosgenin은 Sigma사 제품으로 99% 이상의 순도를 가지는 것이었다.

실험 과정. Costus speciosus을 직경이 20μm 이하 되게 곱게분쇄한 다음 100°C의 오븐에서 무게가 일정하게 될 때까지 건조시켜 분석시료로 사용하였다. 이 건조된 시료를 0.2g 정도 정확히 무게 달아 125ml 둥근바닥플라스크에 넣고 3N HCl 용액 15ml와 xylene 15ml를 가하여 자석젓게로 저어가면서 가열판에서 95~100°C로 4시간 동안 환류시켰다. 용액을 식혀서 분별깔대기에 옮겨 xylene층을 분리하였다.

Xylene층을 둥근 바닥 플라스크에 넣고 진공회전증발기로 용매를 날려 보낸 다음 diosgenin을 아세틸화하기 위하여 20 : 80의 acetic anhydride-pyridine 20ml를 가하고 30분 동안 환류시켰다. 반응된 용액을 125ml 분별깔대기로 옮기고 증류수 10ml를 가한 다음 diethyl ether로 20ml식 3회 추출하였다. Ether층을 모아 증류수 10ml로 2회 씻고 소량의 무수 Na_2SO_4로 탈수시켰다. 진공회전증발기에서 ether를 모두 날려보내고 찌끼에 *n*-hexane 5.00ml를 정확히 가하여 녹인 다음 GLC로 분석하였다.

표준용액은 순도가 99% 이상인 diosgenin을 정확히 무게를 달아 xylene 용매에 녹여 만든 모액(1.00μg/μl)으로 부터 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50μg/μl의 농도가 되도록 취하여 xylene을 날려 보낸 다음 시료의 처리와 똑같은 방법으로 diosgenin을 아세틸화, 추출 및 건조시켜 *n*-hexane 5.00ml에 녹여서 사용 하였다.

3. 결과 및 고찰

가수분해 및 추출. 식물체로부터 diosgenin을 분리해 내는 방법을 Cooke, Rozanski, Lubis 등이 연구 발표하였다. Cooke[21]는 건조된 시료에 2N HCl 용액을 가하고 102~104°C에서 환류시켜 가수분해시킨 다음 걸러서 말린 찌끼를 Soxhlet 장치에서 petroleum ether를 사용하여 12시간 동안 추출하였다. Lubis 등[9]은 시료를 80%의 뜨거운 ethyl alcohol로 추출하고 농축시켜 2N HCl 용액으로 가수분해한 다음 10% Na_2CO_3 용액으로 중화시켜 침전시켰다. 침전을 분리해 내어 Soxhlet 장치에서 petoleum ether로 24시간 동안 추출하여 sapogenins을 분리 하였다. 한편 Rozanski[22]는 본 실험에서와 같이 3N HCl 용액과 xylene을 가하여 가수분해와 동시에 추출하여 sapogenins을 분리, 분석하였다.

본 실험에서는 이들 방법에 의한 가수분해 및 추출효율을 보기 위하여 3가지 방법으로 시료로 부터 sapogenins을 분리해 낸 다음 GLC로 diosgenin을 정량하였다(*Table* 1). 얻은 결과들을 보면 Lubis법과 Cooke법은 시료로 부터 sapogenins을 완전히 분리해 내지 못하는 것으로 보이며 Rozanski법은 가수분해와 추출효율이 거의 완전히 분리되고 있음을 보여 준다. 이로서 추출과정이 정량적이 아니며, 복잡하고 시간이 많이 걸리는 Lubis나 Cook법 보다는 Rozanski법이 Costus speciosus으로부터 diosgenin을 추출해 내는데 유리함을 알 수 있다.

Rozanski법에서 시간에 따른 diosgenin의 추출효율을 보기 위하여 가수분해 및 추출 시간을 변화시키면서 GLC로 함량을 분석하였다. *Table* 2에서 보여 주는 바와 같이 4시간 이상 되면

Table 1. Comparison of analytical results of diosgenin by some hydrolysis and extraction methods

Hydrolysis and extraction	Analytical results (%)
Lubis' method	0.270
Cooke's method	0.274
Rozanski's method	0.281

가수분해 및 추출이 완전히 일어남을 알 수 있다.

그런데 Rozanski에 의하면 가수분해 시간이 길어지면 diosgenin의 일부가 HCl에 의해 탈수된 다고 하였는데 이를 확인하기 위하여 표준시약인 diosgenin을 같은 조건으로 4시간이상 가수분해하였으나 6시간 정도까지 diosgenin의 양이 변하지 않음을 관찰하였다. 이것으로 미루어 보아 본 실험에서 행한 4시간의 가수분해 동안에 탈수반응이 일어나지 않아 문제가 없음을 알았다.

이상의 방법에 의해 diosgenin이 정량적으로 추출되고 있는가를 확인하기 위하여 본래의 Costus speciosus시료 일정량에 diosgenin을 0.260, 0.520, 0.780mg을 각각 가한 다음 본 실험과정대로 가수분해 및 추출, 그리고 아세틸화 시켜서 GLC로 분석하였다. *Table* 3에서 보여 주는 바와 같이 첨가한 diosgenin의 회수율이 3회의 평균 값으로 99%이어서 diosgenin이 거의 완전히 추출되어 정량됨을 알 수 있다.

아세틸화 반응. 서론에서도 기술했던 바와 같이 충진컬럼(packed column)의 GLC나 HPLC로 추출된 sapogenins을 그대로 분리, 분석하는 것은 완전히 이루어 지지 않는다. 즉, 비슷한 구조를 가지는 이성질체가 diosgenin의 바로 옆에서 봉우리를 나타내고 있어서 diosgenin의 분석에 영향을 주고 있다. Hunter 등[18]이 여러가지의 sapogenins을 분리, 확인하기 위하여 이들을 아세틸화 했듯이 본 연구에서도 Costus speciosus로 부터 가수분해 및 추출한 sapogenins을 acetic anydride를 사용하여 아세틸화 시켰다.

Diosgenin을 아세틸화 하여 diosgenin acetate

Table 2. Extractive efficiencies of diosgenin in Costus speciosus on the change of hydrolysis time

Hydrolysis and extraction time, hours	Diosgenin found (%)
1	0.165
2	0.184
3	0.232
3.5	0.265
4	0.281
5	0.280
6	0.281

Table 3. Recoveries of diosgenin added in Costus speciosus by hydrolysis and extraction

Amount added, mg	Amount found, mg	Recovery (%)
0.260	0.258	99.2
0.520	0.516	99.3
0.780	0.773	99.1

형태로 GLC에 주입하여 크로마토그램을 얻어 보니 diosgenin피이크가 tailing없이 대칭적 이었고 감도도 증가함을 알았다. 일정량의 diosgenin을 취하여 *n*-hexane에 녹여 얻은 크로마토그램의 diosgenin 봉우리와 같은 양의 diosgenin을 본 실험에서와 같이 아세틸화 하여 *n*-hexane에 녹여서 얻은 diosgenin봉우리를 비교하여 보면 *Fig.* 2에서와 같이 아세틸화한 것이 Gausian 모양을 가질 뿐 만 아니라 봉우리 넓이로서 1.8배 크게 나타났다. 따라서 diosgenin을 분석하는데는 커다란 장점이 되고 있다.

반응 시간에 따른 아세틸화 반응의 완결 정도를 보기 위하여 이 반응의 수득률을 조사하였다. 즉, diosgenin 0.500mg을 정확히 취하여 실험에서와 같이 20 : 80의 acetic anhydride-pyridine 20m*l*와 함께 반응 시간을 10분에서 60분까지 변화시키면서 환류시킨 다음 diethyl ether로 추출, 무수 Na_2SO_4로 탈수, 증발 건조시켜서 *n*-hexane 5.00m*l*에 녹여서 아세틸화 된 정도를 GLC로 분석하였다. *Table* 4에서와 같이 acetic anhydride-pyridine 용액에서 30분 이상 환류시

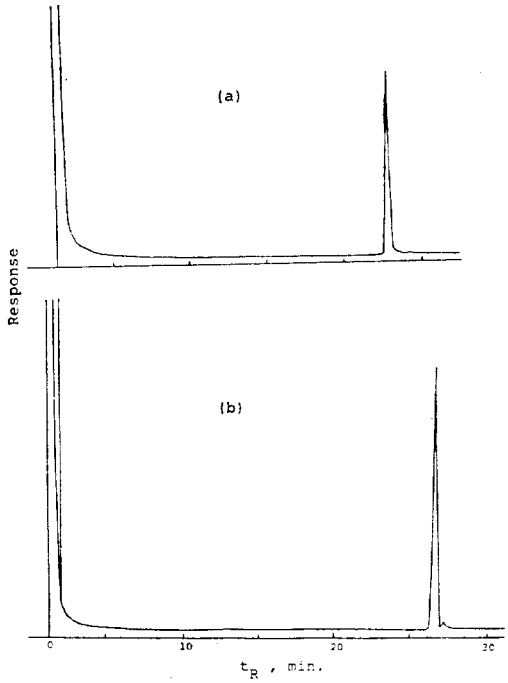

Fig. 2. GLC Chromatograms of diosgenin (a) and diosgenin acetate (b) of 250μg/ml obtained by using 25m×0.33mm *i.d.* SE-30 column.

키면 완전히 아세틸화 됨을 알 수 있다. 따라서 본 실험에서는 환류시간을 30분 간으로 정하였다.

GLC에 의한 diosgenin의 분리. GLC로 diosgenin을 분리, 분석하는 연구는 Cooke[21]과 Rozanski[22]가 하였는데 충진컬럼(3% SE-306′-1/4″)을 사용하였다. 이경우에 yamogenin 등의 다른 sapogenin 이성질체가 공존하면 diosgenin과 머므름 시간이 비슷하여 완전히 분리되지 않고 겹쳐서 나온다. 본 연구의 시료인 인도네시아산 Costus speciosus중에는 yamogenin 이성질체가 존재하고 있어서 diosgenin봉우리에 겹쳐서 봉우리 모양이 대칭적이 되지 못하고 shoulder가 생긴다(*Fig.*3). 이 봉우리의 면적을 구하여 표준 diosgenin으로 얻은 검정곡선에서 함량을 얻어보니 0.55%를 보여 주었다. 이 값은 HPLC나 본 실험에서 이용한 모세관 GLC의 분석값인 0.28보다는 2배정도 넘는 함량이다.

Table 4. Yield of diosgenin acetate on reaction time of acetylation

Reaction time, minutes	Diosgenin acetate found(%)
10	5
15	47
20	78
30	100
60	100

Diosgenin이 다른 이성질체로 부터 완전히 분리되지 못했음을 알 수 있다.

이에 본 연구에서는 충진컬럼보다 분리능이 우수한 모세관을 이용하는 것을 검토하였다. 흔히 사용되고 있으며 본 연구실에서 보유하고 있는 SE-30과 SE-54의 모세관을 이용하여 diosgenin을 분리하여 보았다. 같은 길이에서 SE-54보다는 SE-30컬럼이 더 잘 분리시키고 있어서 SE-30컬럼을 사용하기로 하였다.

컬럼온도를 비롯한 기기와 검출기조건은 이미 보고된 연구들을 조사하고 본 실험실에서 확인하여 실험에서 주어진 바와 같은 조건들을 선정하였다. 다만 SE-30모세컬럼의 길이에 따른 분리정도를 조사하였다. 컬럼의 길이가 길어지면 분리능이 증가하여 분리가 잘 되겠지만 무한히 길게는 할 수 없어서 9m, 25m, 50m의 길이를 갖는 직경 0.33mm의 모세관을 사용하였다. *Fig.* 4와 5에서 볼 수 있는 바와 같이 9m의 컬럼으로는 diosgenin이 완전히 분리되지 않고 yamogenin이성질체가 부분적으로 겹치고 있고 25m컬럼에서는 봉우리들이 겹치지 않고 거의 완전하게 분리되고 있다. 50m컬럼에서는 더 잘 분리되고 있다. 따라서 인도네시아산 Costus speciosus에 다른 이성질체로 부터 diosgenin을 분리하는데는 SE-30 25m×0.33mm 컬럼앞에서 주어진 기기 조건으로 만족한 결과를 얻을 수 있었다.

분석 결과. Costus speciosus중의 diosgenin 함량을 분석하기 위하여 실험에서 만든 표준용액들을 이용하여 표준검정곡선을 도시하였다(*Fig.* 6). 검정곡선은 원점을 지나고 직선성이 대단히

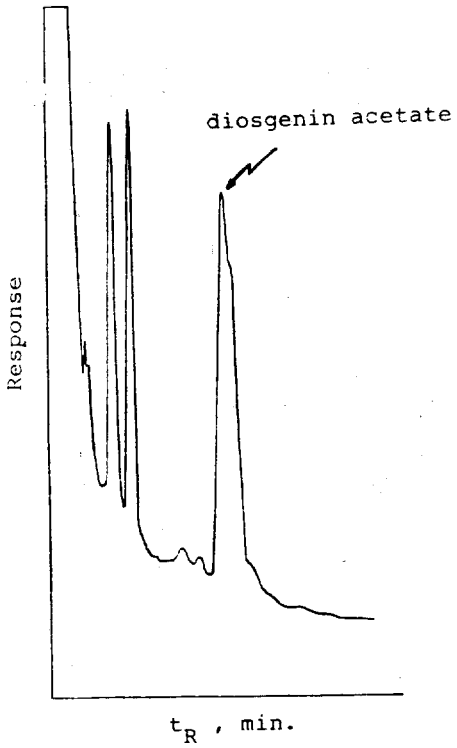

Fig. 3. GLC chromatogram of acetylated extracts from Costus speciosus obtained by using packed column [6′×1/4″ o.d. glass, 3% SE-30 on Gas Chrom Q (80/100mesh)].

좋았다. 5회 분석한 평균 함량은 0.281%이었고 상대표준편차가 1.8%로서 재현성이 좋음을 보여 주었다.

본 실험 방법으로 처리하고 모세관의 GLC로 얻은 분석 결과의 신뢰도를 알아 보기 위하여 다른 방법 [20]에 의한 분석값들과 비교하였다. 가수분해 및 추출과정은 본 연구의 Rozanski법과 다르게 Cooke방법으로 처리하였고 측정에서도 GLC와 아울러 HPLC를 사용하였다. 이들 결과들을 *Table* 5에 요약하였다. 가수분해와 추출과정을 별도로 행하여 공존불순물들을 더 잘 제거시킬 것으로 생각되는 Cooke법에 의한 결과들이 약간식 적게 나타났는데 이는 처리과정에서 약간의 diosgenin손실이 수반되는 때문으로 생각된다. 그런데 분해능이 썩 좋지 않는 충진컬럼 GLC로 diosgenin을 그대로 분리, 분석

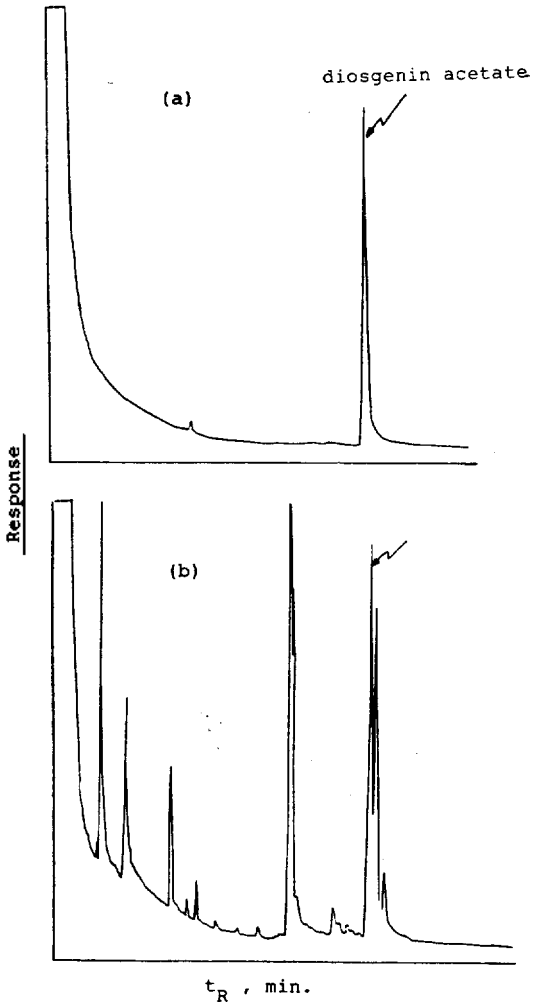

Fig. 4. GLC chromatograms of standard diosgenin acetate (a) and acetylated extracts from Costus speciosus (b) obtained by using 9m×0.33mm *i.d.* SE-30 column.

하는 경우에는 가능한 한 불순물들을 제거하는 것이 바람직하므로 Cooke법이 좋은데 반하여 본 실험에서 사용한 분해능이 좋은 모세관 GLC나 HPLC로 측정할 때는 처리가 간단하고 시간이 짧게 걸리는 Rozanski법이 유리한 것으로 생각된다. 또, sapogenins을 아세틸화 시켜 추출하면 불순물들은 더 제거시킬 수 있을 뿐만 아니라, 감도문제에서 좋은 결과를 얻을 수 있었

Table 5. Comparison of analytical results of diosgenin by hydrolysis & extraction methods

Chromatography		Number of determinations	Cooke's method		Rozanski's method	
Methods	Modes		Average (%)	Relative standard deviation (%)	Average (%)	Relative standard deviation (%)
HPLC	Normal phase	5	0.273	1.7	0.281	1.8
	Reversed phase	5	0.276	1.7	0.280	1.7
GLC		5	0.274	1.8	0.281	1.8

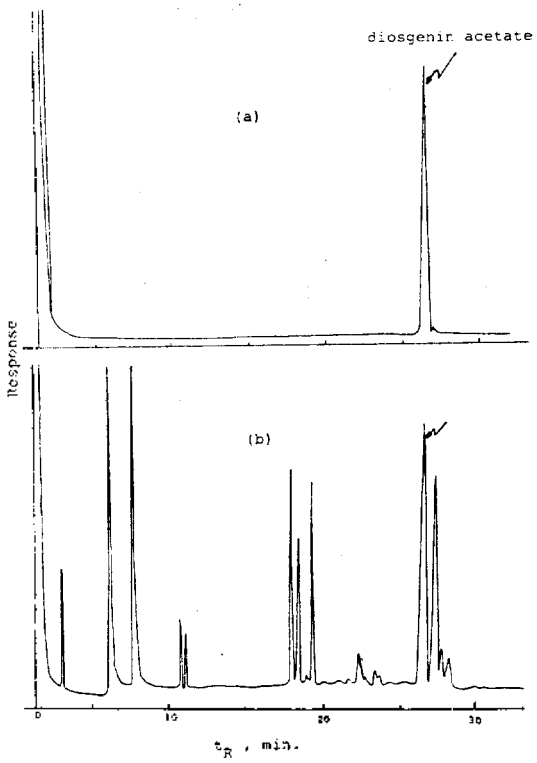

Fig. 5. GLC chromatograms of standard diosgenin acetate (a) and acetylated extracts from Costus speciosus (b) obtained by using 25m×0.33mm *i.d.* SE-30 column.

다.

Table 5에 주어진 HPLC결과들은 본 연구자들[20]이 전에 발표한 값으로 정상과 역상 방식으로 측정한 것인데 본 연구의 GLC결과들과 같은 가수분해와 추출방법의 시료에서 잘 일치하나 Cooke's 방법의 결과보다 Rozanski's 방법의 값이 약간 높았다. 자연물인 Costus speciosus 중에 함유된 diosgenin을 본 연구에서 제안한 방법과 조

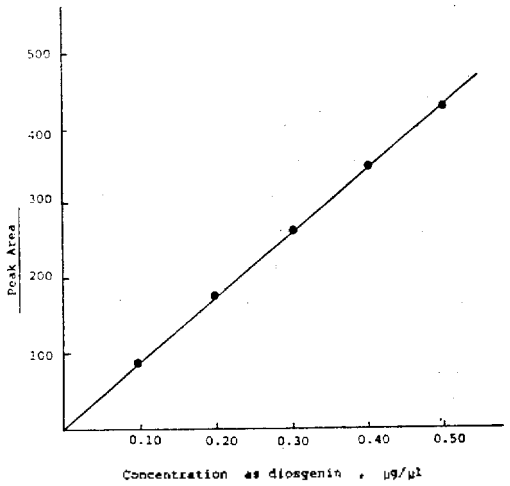

Fig. 6. Standard calibration curve of diosgenin acetate.

건으로 분석함으로서 좋은 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

4. 결 론

Costus speciosus 중의 diosgenin을 HCl과 xylene으로 동시에 가수분해 및 추출하고 acetic anhydride-pyridine으로 아세틸화시켜 모세관의 GLC로 정확히 분석할 수 있음을 확인하였고 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

(1) 자연물에서 diosgenin을 3N HCl 용액과 xylene의 혼합용액으로 95~100°C에서 4시간 환류시키는 동시 가수분해 및 추출법으로 완전히 분리해낼 수 있었다.

(2) 20 : 80의 acetic anhydride-pyridine 용액으로 30분간 환류시키면 모든 diosgenin을 아세틸화시킬 수 있었고 아세틸화 하므로서 감도 및 분해능을 증가시킬 수 있었다.

(3) SE-30의 모세관 GLC로 다른 성분들의 방해 없이 diosgenin acetate의 봉우리 면적을 구할 수 있었다.

(4) 본 실험 방법으로 분석한 인도네시아산 Costus speciosus중의 diosgenin의 함량은 0.281%이었고 상대표준편차는 1.8%로서 재현성이 좋았다.

아울러 HPLC에 의한 분석값과도 잘 일치하였다.

인 용 문 헌

1. J.W. Rothrock, P.A. Hammes and W.J. McAleer, *Ind. Chem.*, **49**, 186 (1957).
2. M.P. Morris, B.A. Roark and B. Cancel, *J. Agr. Food Chem.*, **6**, 856 (1958).
3. R.N. Chakravarti, D. Chakravarti and M.N. Mitra, *J. Proc, Inst. Chem. Calcutta*, **30**, 106 (1958).
4. W.H. Preston, J.R. Haun, J. W. Garvin and R.J. Daum, *Econ. Bot.*, **18**, 323 (1964).
5. R.N. Chakravarti, S.N. Dash and D. Chakravarti, *J. Proc. Inst. Chem. Calcutta*, **42**, 165 (1970).
6. Y. Selvaraj, *Indian J. Hort.*, **28**, 135 (1971).
7. E.A. Safowora and R. Hardman, *Plant Med.*, **26**, 385(1974).
8. A.K. Rishi, P. Kapoor and V.K. Vakhlu, *Curr. Sci.*, **45**, 327 (1976).
9. I. Lubis and S. Sastrapradja, *Amales Bogoriences*, VII, 71 (1980).
10. G. Blunden, R. Hardman and M.C. Morrison, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 948 (1976).
11. K.R. Brain and R. Hardman, *J. Chromatogr.*, **38**, 355 (1968).
12. K.R. Brain, F.R.Y. Fazil, R. Hardman and A.B. Wood, *Phytochemistry*, **7**, 1815 (1981).
13. R. Hardman and T.M. Jefferies, *Analyst*, **97**, 437 (1972).
14. T.M. Jefferies and R. Hardman, *Analyst*, **101**, 122 (1976).
15. J.W. Higgins, *J. Chromatogr.*, **121**, 329 (1976).
16. S.B. Mahato, N.P. Sahn and S.K. Roy, *J. Chromatogr.*, **206**, 169 (1981).
17. E. Heftman and J.T. Lin, *J. Liquid Chromatogr.*, **5**, 121 (1982).
18. I.R. Hunter, M.K. Walden, G.F. Bailey and E. Heftman, *J. Nat. Prod.*, **44**, 245 (1981).
19. J.T. Lin and C.J. Xu, *J. Chromatogr.*, **287**, 105 (1984).
20. 김태제, 박규창, 경희대학교논문집, 제14집 인쇄중.
21. B.K. Cooke, *Analyst* (London), **95**, 95 (1970).
22. A. Rozanski, *ibid*, **97**, 968 (1972).