

고속액체크로마토그래피에 의한 음양곽 중 Icariin의 정량

申國鉉 · 姜三植 · 鄭淳侃* · 曹義煥*

서울대학교 생약연구소 · 三進製藥(株)*

Determination of Icariin in Epimedii Herba by High Performance Liquid Chromatography

Kuk Hyun Shin, Sam Sik Kang, Sun Gan Chung* and Eui Hwan Cho*

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460 and

*Sam Jin Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul 121-210, Korea

Abstract—A new method for quantitative determination of icariin in Epimedii Herba by high performance liquid chromatography was established. A reversed-phase system with a μ Bondapak C₁₈ column using methanol in water (15% to 70%, gradient elution) as a mobile phase was developed. Icariin and spinosin as an internal reference were detected at 350 nm and the analysis was successfully carried out within 30 min.

Keywords—Epimedii Herba · *Epimedium koreanum* · Berberidaceae · icariin · spinosin · HPLC

음양곽은 삼지구엽초 *Epimedium koreanum* N. (Berberidaceae)의 지상부를 건조한 생약으로서 한방에서는 강장 및 강정제로 사용된다. 1970년대 전반기의 통계에 의하면 이 기간중에 우리나라 한방병원에서 처방된 생약중 그 소비량이 89位로서 빈번히 처방투약 되고 있는 중요한 생약의 일종이다.¹⁾ 특히 최근에는 생활수준의 향상으로 이 생약의 强壯, 强精효과를 기대하여 건강식품으로서도 그 소비가 증가추세에 있으므로 이 생약의 품질관리를 위한 적합한 분석법 확립이 필요하다. 저자 등은 음양곽의 주성분은 flavonoid인 icariin²⁻⁵⁾임을 동정 보고한바 있으며 기타 quercetin,²⁾ anhydroicaritin-3-O- α -rhamnoside²⁾ 등이 minor flavonoid들을 확인 보고한 바 있다. 따라서 주성분인 icariin을 표적성분으로 하여 고속액체크로마토그래피법에 의하여 음양곽을 분석하는 새로운 방법을 확립하였다. 즉 icariin은 reversed-phase column인 μ Bondapak C₁₈를 사용하고 methanol과 H₂O의

혼합액으로 gradient elution하여 분리능과 精度가 매우 높은 chromatogram을 얻었으며 다른 생약이 혼합된 제제중의 음양곽 분석방법으로 이용가능함을 인지하였으므로 보고한다.

실험결과 및 고찰

음양곽의 표적성분을 찾아내기 위하여 음양곽을 용매분획하고 TLC 및 식물화학적 방법으로 성분분석을 실시한 결과 icariin이 주성분임을 확인하여 보고한바 있다.²⁾ 이 결과에 의하면 실험부에서 설명한 바와 같이 icariin은 ethylacetate fraction에만 대부분 용출됨을 확인하였다. 따라서 음양곽의 ethylacetate 분획 중 icariin 정량법을 검토하기 위하여 μ Bondapak C₁₈ 역상 column에 methanol-H₂O를 이동상으로 하여 HPLC를 실시하고 분리능을 검토한 결과 methanol : H₂O 혼합용매를 15~70%까지 gradient elution할 때 가장 분리능이 좋으며 다른 성분

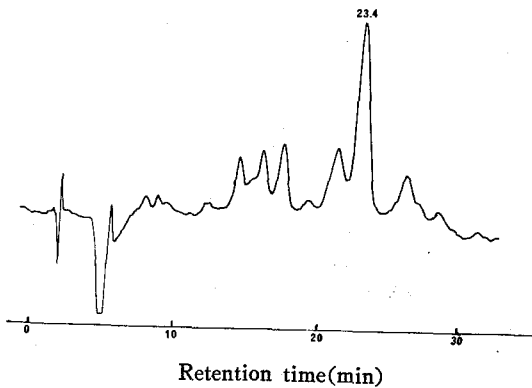


Fig. 1. HPLC chromatogram for icariin in ethylacetate extract from *Epimedii Herba*. Analytical conditions: column, μ Bondapak C_{18} , Radial-Pak cartridge (8 mm I.D. \times 10 cm); eluent, methanol: H_2O (gradient elution, 15% to 70%); flow rate, 1.5 ml/min; chart speed, 0.5 cm/min; detector, UV (350 nm).

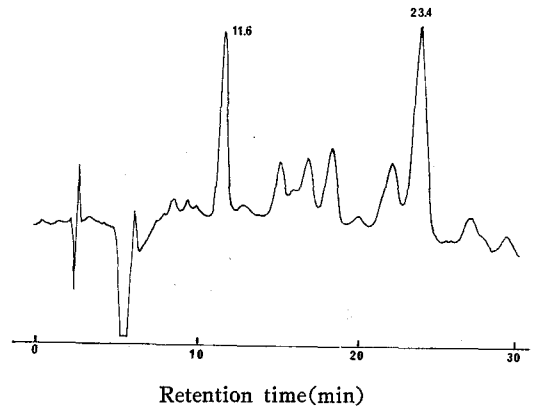


Fig. 3. HPLC chromatogram for the ethylacetate extract of *Epimedii Herba* in the presence of an internal reference. The analytical conditions were the same as in Fig. 1.

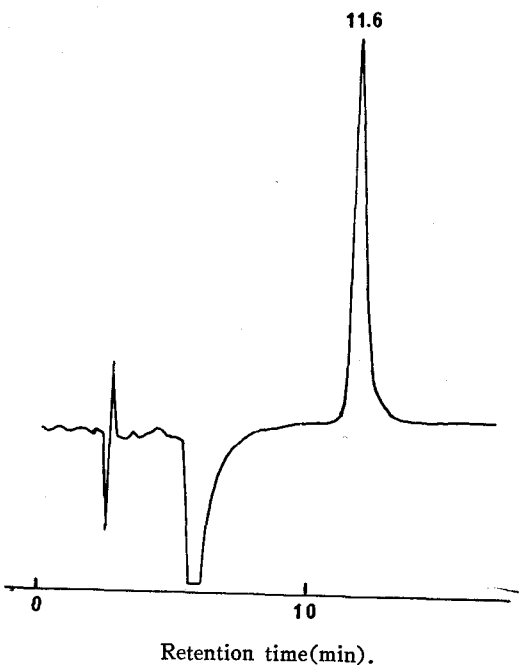


Fig. 2. HPLC chromatogram for spinosin as an internal reference. The analytical conditions were the same as in Fig. 1.

들의 방해를 받지 않는다는 사실을 알았으며 그 전형적인 chromatogram을 Fig. 1에 표시하였다. 이 chromatogram에서 보는 바와같이 t_R 23.4 min에 나타나는 강한 peak가 icariin에 해당하

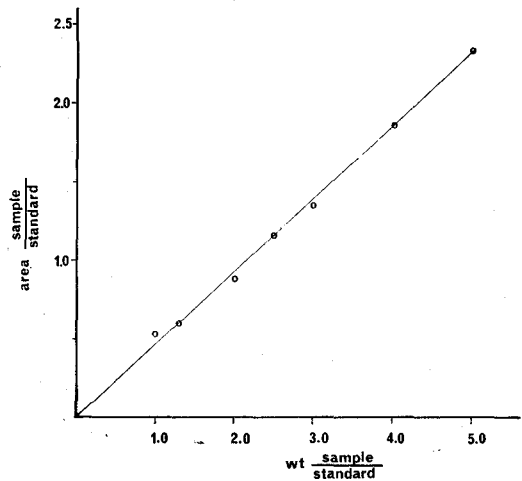


Fig. 4. Calibration curves for icariin. Standard; spinosin. Sample; icariin,

는 peak이며 icariin 표준품과 spike 실험을 실시하여 완전히 일치함을 알았다. 한편 HPLC의 정확도를 크게 하기 위하여 내부표준물질이 필요하므로 이를 선정하기 위하여 수종의 다른 flavonoid를 동일 HPLC 조건에서 chromatogram을 얻어 비교검토한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 t_R 11.6 min에서 peak를 나타내는 flavone-C-glycoside의 일종인 spinosin의 retention time이 icariin의 그것과 현저히 다르다는 사실을 알았다. Spinosin을 내부표준물질로 하고 음양과

ethylacetate 추출액에 혼합하여 얻은 chromatogram을 Fig. 3에 표시하였다. 내부표준물질 및 icariin 모두 분리능이 좋으며 음양과추출물의 다른 성분들과 거의 겹치지 않는다는 사실을 알았다.

표준 검량선

내부표준물질 spinosin의 양을 100 µg/ml로 고정시키고 icariin의 變量을 섞어서 HPLC를 실시하여 얻은 각 chromatogram들로부터 각 면적을 구하고 그 면적비를 구하여 plot하여 얻은 검량선을 Fig. 4에 표시하였다. 이 검량선의 회귀직선의 방정식은 $Y=0.467X-0.013$ 이며, 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 0.998로써 1.0에 접근하며 icariin과 spinosin의 증량비 (X)와 peak area ratio(icariin/spinosin, Y)간에 직선성이 인정되었다. 이때 내부표준물질 spinosin의 농도를 100 µg/ml로 고정시키면 검체중 icariin의 농도는 상기 회귀직선의 방정식으로 부터 $\frac{100}{0.467}(Y+0.013)\mu\text{g/ml}$ 가 된다.

음양과 및 그 제제중의 icariin 정량

실험부의 방법에 따라 건조된 음양과 일정량을 용매로 분획하고 HPLC를 실시한 후 icariin의 함량을 측정된 결과 그 함량이 0.14%(w/w)임을 알았다. 한편 음양과 함유 제제중 자양, 강장, 강정제로 널리 알려진 禿鷄散의 중요 구성성약인 오미자, 사상자, 육종용 등을 혼합하였을 때에 icariin의 chromatogram에 미치는 영향을 검토하기 위하여 사상자, 오미자, 육종용 각 5g씩을 각각 20% ethanol로 가열 추출하여 여과하고 여액을 각각 25 ml, 20 ml, 20 ml로 농축한 다음 음양과는 제외하고 육종용 추출액 14 ml, 오미자 추출액 14 ml, 사상자 추출액 34

ml를 혼합하고 이 혼합액 4.7 ml를 실험부의 분획법에 따라 분획하여 ethylacetate 분획에 대하여 HPLC를 실시한바 Fig. 5에서 보는 바와 같이 icariin 또는 내부표준물질에 대응하는 t_R 에서는 peak에 거의 영향을 주지 않으므로 제제중 이들 생약이 혼합되어 있을때에도 본 HPLC 조건을 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

실 험

식물재료

사판 음양과, 사상자, 오미자 및 육종용 등을 구입하여 감정후 사용하였다.

분석기기

HPLC분석기기는 Waters Associates의 분석용 Liquid Chromatograph로써 Model 660 Solvent Programmer, Model 450 Variable Wavelength Detector 및 M730 Data Module이 부착된 것을 사용하였으며 column은 Radial-Pak C₁₈ cartridge (8 mm i.d.×10 cm)를 사용하였다.

시 약

분석용시약은 특급시약을 사용하였고 분석전에 HPLC용 여과기로 여과시켰다. 추출용시약은 일급시약을 사용하였다. Icariin은 분자량 676, 용점 239°로써 음양과으로부터 순수분리하여²⁾ 정제한 것을 사용하였다. 내부표준물질로 사용된 spinosin⁶⁾은 용점 255~256°로 산조인으로부터 순수분리한 것을 정제하여 사용하였다.

HPLC의 조건

이동상으로써 methanol 및 증류수를 사용하였으며 30분간에 걸쳐 methanol의 함량비가 15%에서 70%가 될 때까지 gradient elution시켰다. HPLC 분석은 실온에서 시행하였고, 용매의 유속은 1.5 ml/min, gradient type은 convex No. 3, UV detector의 파장은 350 nm를 선택하였으며, 감도는 0.04 AUFS, chart speed는 0.5 cm/min로 하였다.

표준검량선의 작성

내부표준물질 spinosin 1 mg을 methanol 10 ml에 용해시켜 100 µg/ml로 하고, 표준물질인 icariin 50 mg을 methanol 100 ml에 용해시킨 액을 만들고 이를 다시 100 µg~500 µg/ml가 되도록

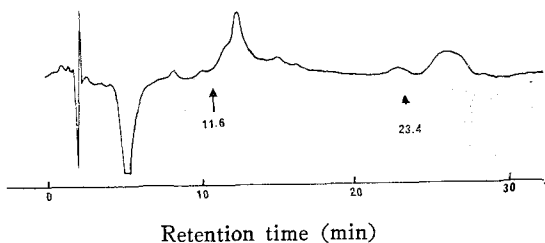


Fig. 5. HPLC chromatogram for the ethylacetate extract mixtures obtained from various crude drugs.

특 단계적으로 희석한 후 내부표준물질 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 희석된 각 표준용액을 1:1로 혼합하고 이액 15 μl 를 column에 주입하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻었다. 검량선은 표준물질 icariin의 양에 대하여 표준물질과 내부표준물질의 peak area ratio를 plot하여 얻은 점으로부터 작성하였다.

분석조작

음양과 5g에 20% ethanol용액 100 ml를 가하여 수욕상에서 2시간 가열추출한후 여과하고 감압농축하여 75 ml로 하였다. 이 추출액 7.5 ml를 분액여두에 취하고 증류수 150 ml를 가하여 희석후 CH_2Cl_2 300 ml씩으로 2회 추출하여 CH_2Cl_2 층을 제거하고 수층을 다시 ethylacetate 300 ml씩으로 2회 추출하였다. Ethylacetate 추출액을 합하여 무수망초 20 g으로 탈수하고 여과하였다. 여액을 증발건고시킨다음 methanol 2 ml를 가하여 용해시키고 불용물을 원심분리하여 제거후 HPLC시료로 하였다. 이 용액과 내부표준용액을 정확히 1:1로 혼합하고 이 용액 10~15 μl 를 column에 주입하여 chromatography를 실시하였다(Fig. 3). 사상자, 오미자 또는 육중용등의

존재하에서의 음양과 분석의 경우도 혼합제제(음양과 추출액 100 ml+육중용 추출액 14 ml+오미자 추출액 14 ml+사상자 추출액 34 ml)중 음양과 추출액 7.5 ml에 해당하는 량(12.2 ml)을 취하여 추출하고 최종 추출액을 methanol 2 ml에 용해시켜 HPLC를 실시한 후 검량선에 의하여 icariin을 정량하였다.

<1989년 1월 16일 접수: 2월 2일 수리>

문헌

1. 도해일, 류경수: 생약학회지 7, 73(1976).
2. 강삼식, 신국현, 정순간, 조의환: 생약학회지 19, 93(1988).
3. Xu, S., Wang, Z., Wu, L., Wang, N. and Chen, Y.: *Zhongcaoyao* 13, 9(1982).
4. Liu, B.-Q., Ma, H.-S. and Mou, P.: *Chung Ts'ao Yao* 11, 201(1980).
5. Ito, Y., Hirayama, F., Suto, K., Sagara, K. and Yoshida, T.: *Phytochem.* 27, 911(1988).
6. Woo, W.S., Kang, S.S., Shim, S.H., Wagner, H., Chari, V.M., Seligmann, O. and Obermeier, G.: *Phytochem.* 18, 353(1979).