

## 삼지구엽초의 採取時期 및 產地別 成分 差異<sup>1)</sup>

신국현\*·임순성\*·안상득\*\*·김승경\*\*·박경열\*\*\*

### Difference in Components of *Epimedium koreanum* in Compliance with Seasons and Places of Collection

Kuk-Hyun Shin\*, Soon-Sung Lim\*, Sang-Deuk Ahn\*\*

Sung-Kyeong Kim\*\*, and Kyeong-Yeol Park\*\*\*

**ABSTRACT** : As a first step for improvement of breeding and productivity of Epimedium Herba, the patterns of components and the difference in icariin, a main component of this plant, in compliance with seasons and places of collection were evaluated by HPLC.

As a result, the patterns of components in samples collected in July-September were shown to be markedly increased compared to those collected in May. Corresponding to the alternations of the pattern, the amount of icariin, which was estimated to be 0.017% in May was found to be increased markedly up to 0.82% in September. The samples collected at Chul-won district showed the highest icariin contents (0.94%), however, those collected in China was only 50% level (0.4%) of domestic ones. These results strongly suggest that the quality of Epimedium Herba might be quite different with respect to the seasons and places of the collection.

### 緒 言

삼지구엽초는 그 지상부를 건조한 것을 淫羊藿이라하여 한방에서 강장 및 강정제로 빈번히 처방 투약되고 있는 중요 약재의 하나이며 특히 최근에는 생활수준의 향상으로 건강식품으로서도 그 소비가 증가 추세에 있음은 주지의 사실이다.

삼지구엽초는 주로 강원도 일대와 경기도 북부의 中山間地에 분포하고 있는데 생태계 변화와 무

분별한 남획으로 인하여 점차 소멸되고 있는 추세이다. 본 연구진들은 삼지구엽초의 繁殖과 栽培法 研究를 통하여 생산성 및 품질향상을 위한 체계적 연구의 일차적인 시도로서 본 식물의 採取時期와 地域에 따른 成分狀과 주성분의 함량차이를 비교 검토하였다.

본 연구에서는 우선 삼지구엽초의 主成分으로서 藥效成分으로 알려진 icariin을 標的成分으로하여 HPLC법<sup>1)</sup>에 의하여 성분함량 分析을 실시 하였으며, 아울러 HPLC chromatogram에 의하여 그

1) 본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

\* 서울대학교 천연물과학연구소 (Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul, 110 - 460, Korea)  
\*\* 강원대학교 농업생명과학대학 (Coll. of Agri. & Life Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200 - 701, Korea)  
\*\*\* 경기도 농촌진흥원 (Kyonggi Provincial Rural Development Administration, Hwasong 445 - 970, Korea)

pattern 分析을 실시하고 採取時期 및 產地別 icariin함량을 분석하였다.

## 材料 및 方法

### 1) 植物 材料

自然産 삼지구엽초는 5월 및 9월 중순에 (강원도 일대)에서 채집하였으며 栽培한 삼지구엽초는 7월 및 9월 중순에 채취 하였다. 한편 수입된 삼지구엽초의 약효성분 함량을 조사하기 위하여 9월중순 철원지역에서 채취한 것과 중국에서 채취한 것(수입품, 경동시장 구입) 등을 사용 하였다.

### 2) 試藥 및 機器

分析用 시약은 특급시약을 사용하였고 분석전에 HPLC용 여과기로 여과하여 사용하였다. 抽出用 시약은 一級 시약을 사용하였다. Icariin은 분자량 676, 용점 239℃로써 삼지구엽초로부터 순수분리하여<sup>2,3)</sup> 정제한 것을 사용하였다. 内部 標準物質로 사용된 spinosin은 용점 255~256℃로 산조인으로 부터 순수분리한<sup>4)</sup> 것을 정제하여 사용하였다.

분석기기는 Spectra-Physics의 분석용 Liquid Chromatograph로써 Sp8800 ternary HPLC pump와 Model Spectra 100의 Variable wavelength detector와 Sp4270 integrator가 부착된 것을 사용하였고 column은 역상인 Bondapak- C<sub>18</sub>(Serial No. 128078)을 사용하였다.

### 3) 標準檢量線의 作成

내부표준물질 spinosin 1mg을 methanol 10ml에 용해시켜 100 µg/ml로 하고, 표준물질인 icariin 50mg을 methanol 100ml에 용해시킨 액을 만들고 이를 다시 100~500 µg/ml가 되도록 단계적으로 희석한 후, 内部標準物質 100 µg/ml와 희석된 각 표준물질을 1:1로 혼합하고 이 액 15 µl를 column에 주입하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻었다.

檢量線은 표준물질인 icariin과 내부표준물질인 spinosin의 weight ratio에 대하여 peak area ratio를 plot하여 얻은 點으로부터 작성하여 Fig. 1에 표시하였다. 이 검량선의 회귀직선 방정식은  $Y=0.467X-0.013$

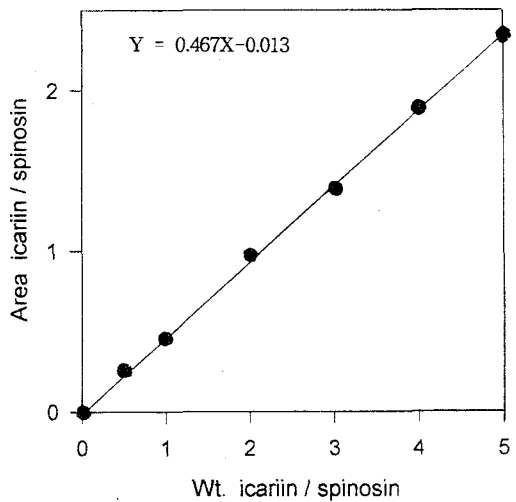


Fig. 1. Calibration curve for icariin.

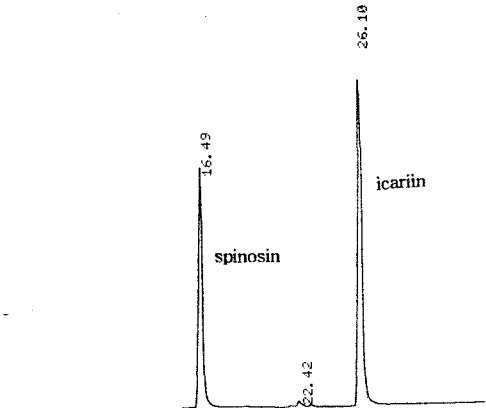


Fig. 2. HPLC chromatogram of icariin and spinosin (internal reference).

$467X-0.013$ 이며, 그 直線性을 검정한 결과 그 상관계수가 0.998로써 1.0에 접근하며 icariin과 spinosin의 중량비(X)와 peak area ratio(Y)간의 직선성이 인정되었다.

이때 内部標準物質의 濃度를 100 µg/ml로 고정시키면 試料中の icariin농도는 上記 回歸直線의 방정식으로부터  $100/0.467(Y+0.013)$  µg/ml가 된다.

### 4) 分析操作

각 시료를 5g씩 취하여 20% ethanol용액 100ml를 가하여 水浴上에서 2시간 가열 추출한후 여과하

고 減壓濃縮하여 75ml로 하였다. 이 추출액 7.5ml를 분획여두에 취하고 증류수 150ml를 가하여 회석 후  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  300ml씩으로 2회 추출하여  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 층을 제거하고 수층을 다시 ethylacetate 300ml씩으로 2회 추출하였다. Ethylacetate 추출액을 합하여 무수망초 20g으로 탈수하고 여과하였다.

여액을 증발건조시킨 다음 methanol 2ml를 가하여 용해시키고 不溶物を 원심분리하여 제거한 후 HPLC시료로 하였다. 이 용액과 내부표준용액을 정확히 1 : 1로 혼합하여 15  $\mu\text{l}$ 를 column에 주입하여 chromatography를 실시하였다.

## 결과 및 考察

### 1) 삼지구엽초로부터 icariin의 純粹分離

삼지구엽초의 주성분인 icariin을 표준물질로 하여 그 分析法과 含量分布를 검토하기 위하여 삼지구엽초로부터 icariin의 순수분리를 시도하였다.

즉 삼지구엽초 지상부 (1.4 kg)를 細切하여 20% methanol로 3시간씩 5회 수욕상에서 환류추출하고 추출액을 여과하여 합한 것을 감압증류로 농축 (202.4g)하였다.

이를 다시 chloroform 및 ethylacetate로 분획하여 ethylacetate fraction (15.5g)을 silica gel column에 걸쳐 EtOAc : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  (100 : 16.5 : 13.5)로 용출시켜서 crude한 결정을 얻고 methanol로 재결정하여 미황색의 침상결정 3.5g을 얻었으며, spectral data에 의하여 icariin임을 동정하였다.

Mp 239 $^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -82.3^{\circ}$  (c, 0.175, pyridine) (Lit. <sup>20</sup> mp 231.5 $^{\circ}$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$ KBr  $\text{cm}^{-1}$  3370, 1650, 1605, 1595, 1508, 1256, 1180, 1100-1020, 830, 810; UV  $\lambda_{\text{max}}$ MeOH nm (log  $\epsilon$ ) 272 (4.63), 317 (4.38), 352 (4.30);  $\lambda_{\text{max}}$ NaOAc 272 (4.63), 317 (4.38), 352 (4.30);  $\lambda_{\text{max}}$ MeONa 280 (4.64), 375 (4.07);  $\lambda_{\text{max}}$ NaOAc+ $\text{H}_3\text{BO}_3$  272 (4.63), 353 (4.32);  $\lambda_{\text{max}}$ AlCl<sub>3</sub> 281 (4.59), 308 (4.32), 348 (4.44), 416 (4.20);  $\lambda_{\text{max}}$ HCl+AlCl<sub>3</sub> 281 (4.58), 307 (4.36), 343 (4.43), 415 (4.17);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.82 (3H, d,  $J=4\text{Hz}$ , rha- $\text{CH}_3$ ), 1.63, 1.71 (3H each, s, =C( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>),

5.04 (1H, brs, anomeric H), 6.67 (1H, s, H-6), 7.16 (2H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ , H-3',5'), 7.93 (2H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ , H-3',5'), 7.93 (2H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ , H-2',6'), 12.59 (1H, brs, 5-OH).

### 2) 分析條件의 檢討 및 內部標準物質 選定

Methanol- $\text{H}_2\text{O}$  이동상으로 하여 분리능을 검토한 결과 methanol :  $\text{H}_2\text{O}$  混合溶媒를 15~70%까지 gradient elution할 때 가장 分離能이 좋았으며 다른 성분들의 방해를 받지않는다는 사실을 알았다 (조건: 온도-상온, 용매유속-1.5ml/min, UV detector 파장-350nm, 감도-0.05AUFS, chart speed-0.5cm/min).

한편 HPLC의 정확도를 크게 하기 위하여 내부표준물질이 필요함으로 이를 선정하기 위하여 수종의 다른 flavonoid를 동일 HPLC조건에서 chromatogram을 얻어 비교 검토한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이  $t_R=16.49\text{min}$ 에서 peak를 나타내는 flavone-C-glycoside의 일종인 spinosin의 retention time이  $t_R=26.10\text{min}$ 인 icariin의 peak와 현저히 다르다는 사실을 알았다.

### 3) 採取時期 및 產地別 HPLC pattern

실험부의 분석방법에 준하여 각종 삼지구엽초 시료를 용매분획하고 주성분이 함유된 ethylacetate 분획에 대하여 HPLC를 실시한 결과 얻은 각각의 전형적인 chromatogram을 Fig. 3~8에 표시하였다.

9월 중순에 채취한 재배품이나 자연산 또한 철원에서 채취한 시료들은 매우 유사한 pattern을 보여서 약 14종의 peak중 각각 주성분인 icariin에 대응하는  $t_R=26\text{min}$ . 과  $t_R=25\text{min}$ . 에 매우 큰 peak를 나타내었다. 7월 재배품의 경우는 이와 유사한 pattern이나  $t_R=33\sim 35\text{min}$ . 부위에 다른 것들에 비해 매우 특징적인 3개의 큰 peak를 나타내었다. 이는 7월 중에 많이 생성되는 중간 대사산물들로 추정된다.

5월 自然産의 경우는 전반적인 peak들이 동일조건에서 낮은 값을 나타내어 특히 icariin의 함량이 낮음을 알 수 있었는데 이 시기에는 아직 2차 대사산물인 flavonoid성분들이 많이 생성되지 않았음을 나타내는 것으로 생각되었다. 中國産의 경우는

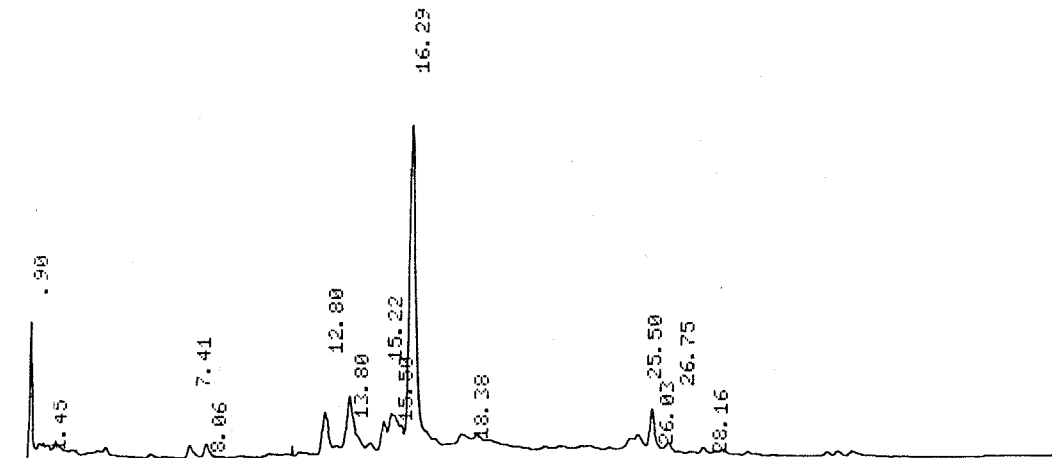


Fig. 3. Typical HPLC chromatogram of the leaves of natural *Epimedii herba* collected in May.

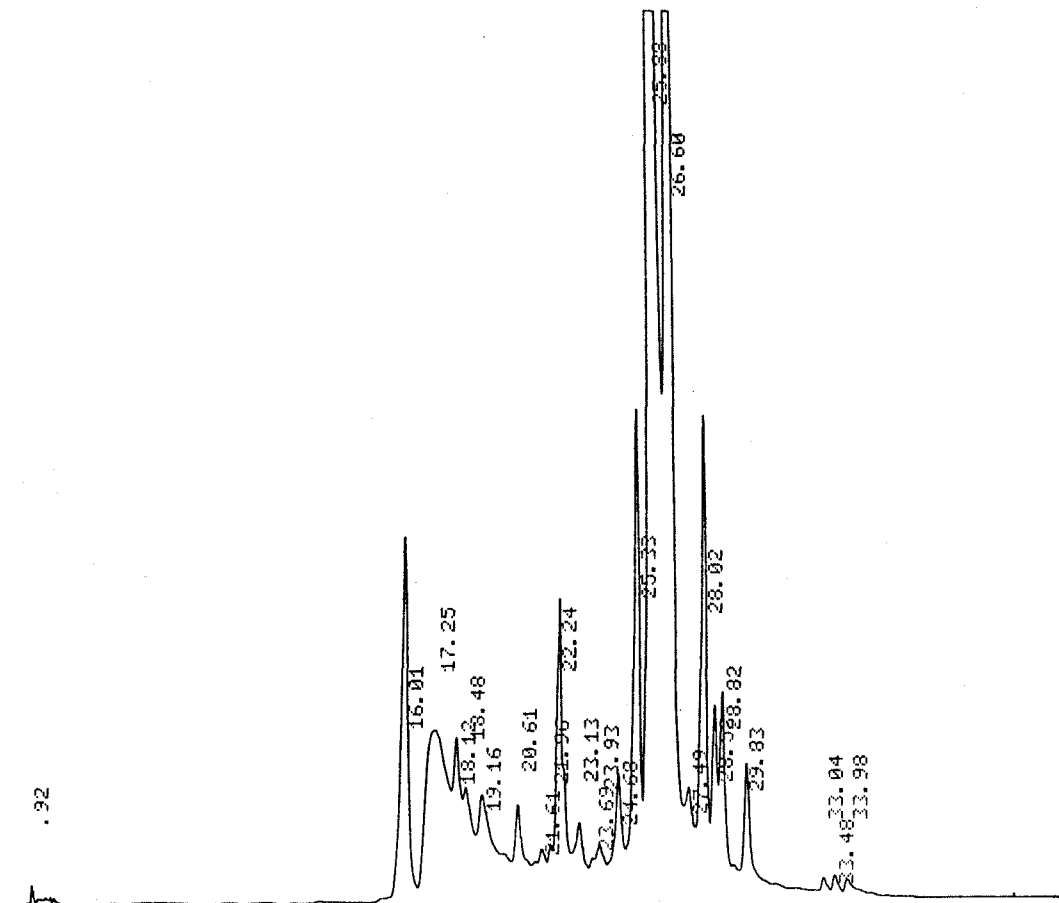


Fig. 4. Typical HPLC chromatogram of the leaves of natural *Epimedii herba* collected in September

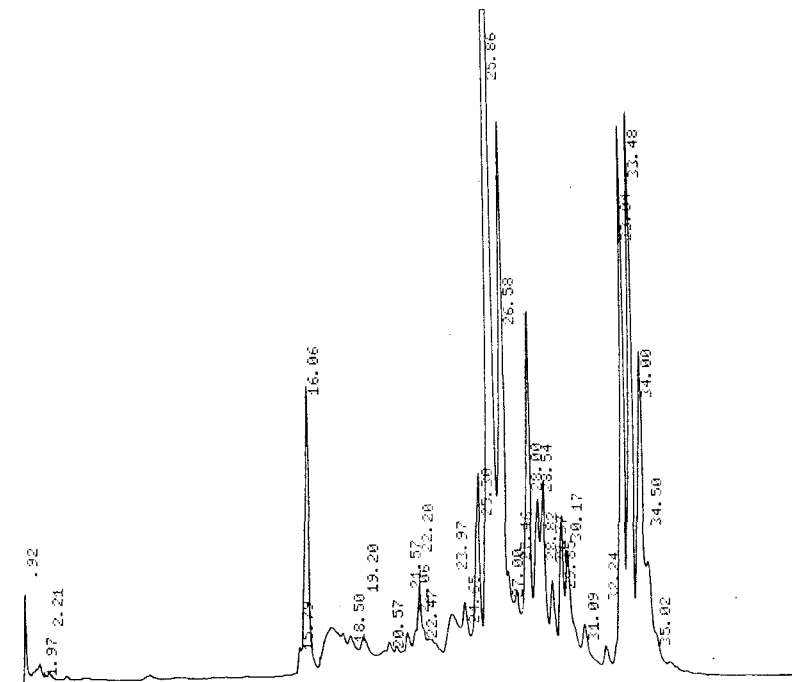


Fig. 5. Typical HPLC chromatogram of the leaves of cultivated *Epimedii herba* collected in July.

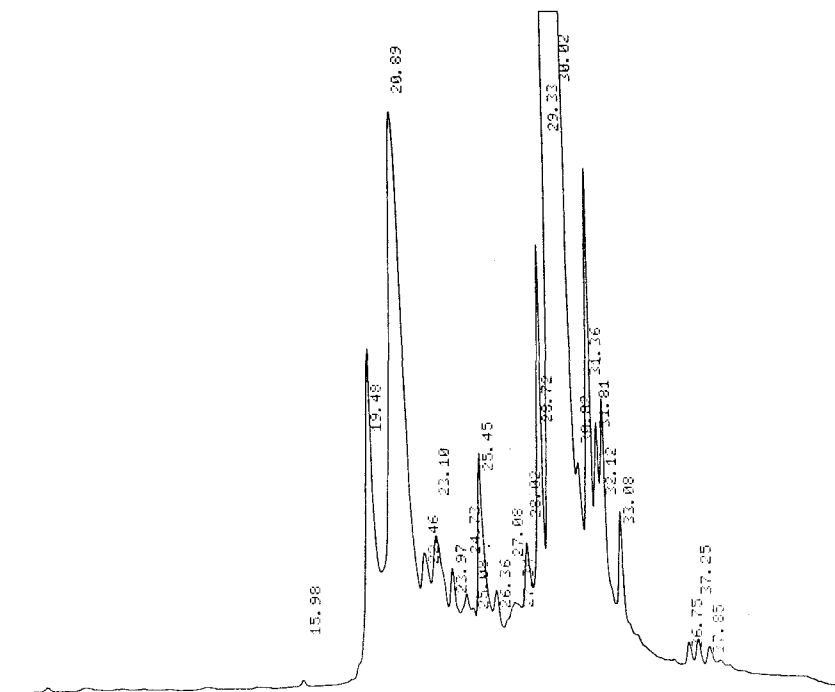


Fig. 6. Typical HPLC chromatogram of the leaves of cultivated *Epimedii herba* collected in September

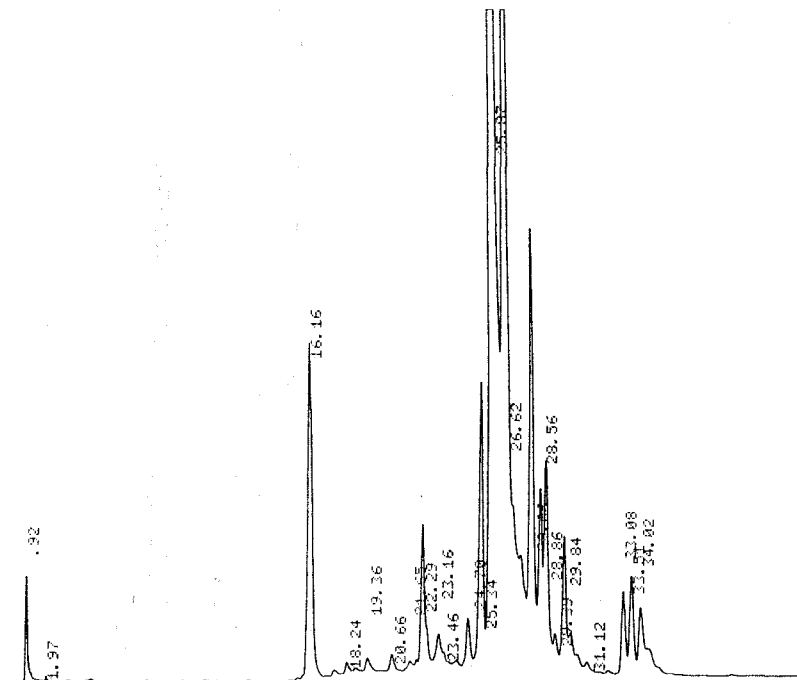


Fig. 7. Typical HPLC chromatogram of the leaves of *Epimedii herba* collected at Chulwon

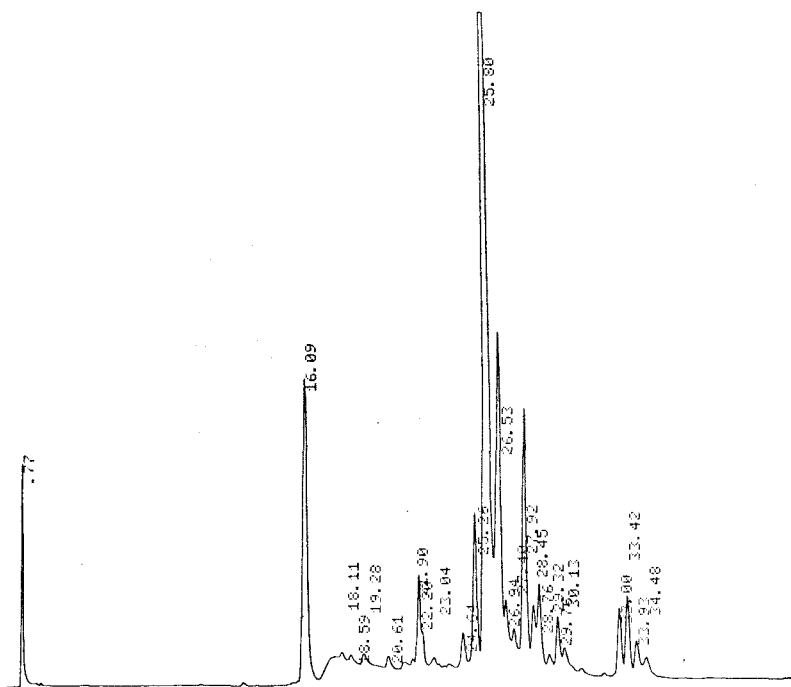


Fig. 8. Typical HPLC chromatogram of the leaves of *Epimedii herba* collected in China.

icariin의 함량이  $t_R=25\text{min.}$ 의 peak에 비해 현저히 낮은값을 나타내었다.

#### 4) 採取時期 및 產地別 icariin 含量

각종 삼지구엽초 시료에 대한 HPLC를 3회 실시하고 얻은 chromatogram중의 icariin peak를 標準

檢量線에 대입하여 icariin 함량을 산출한 결과를 Table 1에 종합하여 표시하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 각종 chromatogram들의 pattern과 부합되게 icariin함량을 나타냄을 알 수 있다. 즉 5월 중순의 자연산은 icariin함량이 0.017%에 불과하여 매우 적게 검출되었으나 9월 중

Table 1. Analysis of icariin in the leaves of *Epimedium herba* collected at different seasons and places by HPLC

Months collected				Place collected	
Natural		Cultivated		Chulwon	Chinese
May	September	July	September		
0.13	8.78	5.34	8.60	9.46	4.14
0.094	8.41	5.41	7.75	9.72	4.10
0.27	8.35	4.70	8.26	8.99	3.78
$0.17 \pm 0.09^a$ (0.017) <sup>b</sup>	$8.51 \pm 0.23$ (0.85)	$5.15 \pm 0.39$ (0.52)	$8.20 \pm 0.43$ (0.82)	$9.39 \pm 0.37$ (0.94)	$4.01 \pm 0.20$ (0.40)

<sup>a</sup> mg of icariin/g of dry plant

<sup>b</sup> (w/w %)

순의 자연산의 경우는 0.85%로서 약 50배 높은 함량을 나타내었다. 재배품의 경우도 7월 중순은 0.52%였던 것이 9월 중순에는 0.82%로 증가하여 9월 중순 자연산과 유사한 함량을 나타내었으나 약간 낮은 값을 보였다.

이는 재배품보다는 자연산이 더 나은 편이지만 재배품도 손색이 없어 삼지구엽초의 재배필요성을 인정하는 결과로 사료되며 채취시기는 2차 대사산물인 flavonoid의 축적이 최고 수준에 도달하는 9월 중순이 適期로 사료되었다. 한편 철원 지역에서 채집한 삼지구엽초의 경우는 0.94%의 icariin함량을 나타내어 가장 우수한 함량 분포를 나타냄을 알 수 있으며 이에 비해 중국산의 경우는 한국산의 약 50% 수준에 머무름을 알 수 있다.

이상의 실험 결과에 의하면 삼지구엽초의 採取時期 및 採取場所에 따라 그 품질의 차이가 현저한 것으로 사료된다.

## 摘 要

삼지구엽초의 번식과 재배법을 개발하여 자생지

에서의 남획과 자연 소멸을 막는 동시에 양질의 삼지구엽초 생약을 확보하기 위한 일련의 실험을 채취시기 및 생산지에 따른 주요성분의 함량차를 비교 검토하였던바 채취시기에 따라서는 여름보다는 가을(9월 중순)에 채취한 것이 icariin성분이 월등히 높았고, 재배산과 자연산간에는 자연산이 약간 높은 경향이였다.

한편 철원지역에서 채취한 삼지구엽초(0.94%)에 비해 중국산(0.4%)의 icariin함량은 절반수준에 불과하여 삼지구엽초는 채취시기 및 장소에 따라 품질의 차이가 큰 것으로 사료된다.

## 引用文獻

1. Shin, K. H., Kang, S. S., Chung, S. G. and Cho, E. H. 1989. Determination of icariin by high performance liquid chromatography. *Kor. J. Pharmacogn.* 20 : 21-24.
2. 강삼식, 신국현, 정순간, 조의환. 1988. 음양곽의 Flavonoid 성분에 관한 연구. *생약학회지* 19 : 93-96.

3. \_\_\_\_\_, 김주선, 강윤정, 한혜경. 1990. 음양곽의 성분에 관한 연구(Ⅱ). 삼지구엽초 지하부의 성분. 생약학회지 21(1) : 56-59
4. Woo, W. S., Kang, S. S., Shim, S. H.,

Wagner, H., Chari, V. M., Seligmann, O. and Obermeier, G. 1979. The structure of spinosin from *Zizyphus vulgaris* var. *spinosa*. *Phytochem.* 18 : 353-355.