

음양곽으로부터 Icariin의 분리 및 함량분석

김호경* · 이혜원 · 황성원 · 고병섭

한국한의학연구원 검사사업부

Isolation and Quantitative Analysis of Icariin from Epimedii Herba

Ho Kyoung Kim*, Hye Won Lee, Seong Won Hwang and Byoung Seob Ko

Quality Control of Herbal Medicine Department, Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

Abstract – Epimedii Herba has been used for tonic, cardiogenic, impotency, amnesic and diuretic. Icariin, a main component was isolated from the Epimedii Herba and identified by the spectroscopic methods. In order to evaluate the quality of Epimedii Herba purchased from various regions of Korea, quantitative determination of icariin in Epimedii Herba using HPLC method has been conducted. Quantitative analysis showed the average amount of icariin in commercial 42 samples was 0.34% on the dry weight basis.

Key words – Epimedii Herba, Icariin, Quantitative analysis, HPLC method.

음양곽(淫羊藿, Epimedii Herba)은 삼지구엽초 (*Epimedium koreanum* Nakai) 또는 기타 동속 근연 식물(매자나무과; Berberidaceae)의 지상부를 건조한 것으로 줄기와 잎으로 되어 있으며 줄기는 가늘고 원 추형이며 표면은 황녹색 혹은 담황색이고 광택이 있다. 줄기에 붙은 잎은 대생이고 2 회 3 출복엽이다. 작은 잎은 난원형으로 길이 3~13 cm, 너비 2~7 cm이며 잎 끝은 약간 뾰족하고 정생하는 작은 잎은 밑 부분이 심장형이고 양쪽의 작은 잎은 비교적 작으며 심장형에 가깝고 바깥 편은 비교적 크고 이(耳)형을 나타내며 가장자리는 황색으로 자모(刺毛)와 같은 잔 털이 되어 있다. 상면 표면은 황록색이고 하면 표면은 회록색이며 주맥은 7~9 줄이고 밑 부분에는 드문 드문 가늘고 긴 털이 있고 그물맥이 뚜렷하다. 작은 잎자루는 길고 질은 뻣뻣하며 냄새가 없고 맛은 조금 쓰다. 지리적으로는 만주에 분포하고 강원, 경기, 평남, 함남, 함북에 야생하며, 보정(補精), 강장(强壯), 음

위(陰痿), 건망(健忘), 강심(强心), 이뇨(利尿) 등에 쓰이는 생약재이다.^{1,3)}

성분으로는 icariin, quercetin, anhydroicaritin-3-O- α -rhamnoside⁴⁾, n-alkanes, phytosterols, phytosteryl glucosides⁵⁾, ikarisoside A, epimedoside C⁶⁾, epimedoside, icaraside A₁, maltol, salidroside⁷⁾, epimedin I⁸⁾, icaritin-3-O- α -rhamnoside⁹⁾, ikarisoside A-F¹⁰⁾ 등이 분리 보고되었으며 icariin 및 epimedoside A에 대한 계절적 변동에 따른 함량변화¹¹⁾, 채취시기 및 산지별 icariin 함량 분석¹²⁾, 열, 빛, 산소에 의한 icariin을 비롯한 flavonol glycoside의 함량 변화¹³⁾ 및 icariin 함량 분석¹⁴⁾에 관한 연구가 보고되었고 특히 주성분인 icariin은 간독성을 억제한다고 연구 보고된 바 있다¹⁵⁾.

그러나 음양곽의 품질을 평가할 수 있는 지표물질의 선정이나 이를 이용한 성분함량에 관한 연구는 보고된 바 없어 본 연구자는 생약의 품질규격화 연구의 일환으로 음양곽의 약효성분이면서 함량이 비교적 많고 HPLC로 정량이 가능한 성분을 지표성분으로 하여 음양곽의 성분분석법을 확립하고, 실제 음양곽 중의

*교신저자 : Fax : 02-3442-0220

지표성분의 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성회분을 정량하여 음양곽의 품질관리 기준을 설정하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 연구에 사용한 음양곽은 2000년 5월 국내(광주, 군산, 금산, 대구, 대전, 마산, 부산, 서울, 성남, 순천, 안동, 영주, 울산, 원주, 의성, 익산, 전주, 제주, 진주, 청주, 평택)에서 판매되는 42종을 구입하여 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

시약 및 기기 - Column용 gel은 Sephadex LH-20 (Pharmacia)와 ODS(Lichroprep RP-18, Merck)를 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck)와 RP-18 F_{254s}(Merck)를 사용하였다. 시약과 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였으며, HPLC용 용매는 HPLC grade(Merck)를 사용하였다. Negative-ion FAB-Mass(matrix : m-NBA)는 VG70-VSEQ(England)를, ¹H 및 ¹³C-NMR은 Bruker AM-500(Germany)를 사용하였으며 HPLC는 Shimadzu LC-10A_{vp} System Controller, LC-10AT_{vp} Pump, SPD-10A_{vp} UV-VIS Detector, SIL-10AD_{vp} Auto Injector(Japan)를 사용하였다. 회화로는 Barnstead Thermolyne(USA)사의 F4800 Furnace를 사용하였다.

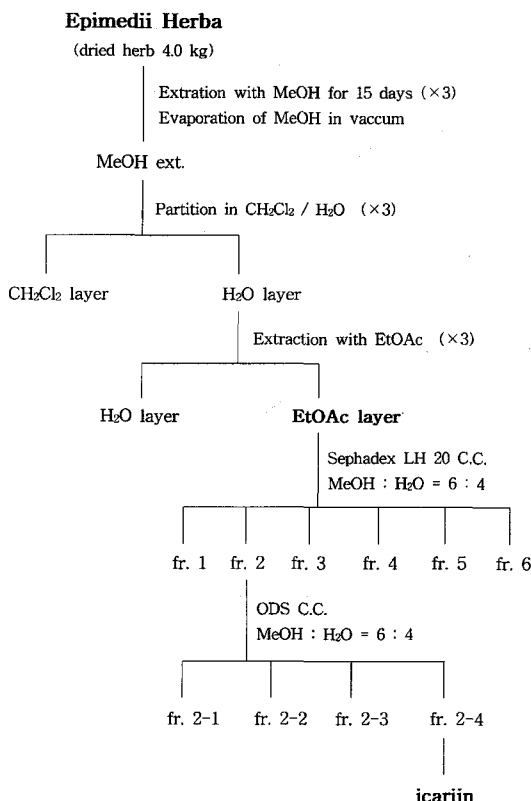
건조감량시험 - 무게를 단 칭량병에 시료 2~6 g을 넣어 무게를 정밀하게 측정하여 105°C에서 5시간 건조하고, 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 정밀하게 측정한다. 이것을 다시 105°C에서 1시간 건조하고 무게를 정밀하게 측정하여, 항량이 되었을 때까지 건조시킨다.

회분시험 - 사기도가니를 550°C에서 1시간 이상 강열하여 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 정밀히 단다. 시료 2~4 g을 사기도가니에 넣어 무게를 정밀하게 측정 후 회화로에 넣어 서서히 온도를 올리면서 550°C에서 4시간 이상 강열한다. 데시케이터에서 방냉한 후 정밀하게 무게를 측정 후 항량이 될 때까지 회화시킨다.

산불용성회분시험 - 사기도가니를 550°C에서 1시간 이상 강열하여 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 정밀히 단다. 회분에 묶은 염산 25 ml를 천천히 조심스럽게 넣고 5분간 조용히 끓여 불용물을 정량용 여과지를 써서 여과한 후 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한다. 무게를 정밀하게 측정 후 사기도가니에서 3시간 강열(550°C)하여 데시케이터에서

방냉한 후 그 무게를 정밀하게 측정한다. 항량이 될 때까지 강열한다.

지표성분의 분리 및 동정 - 음양곽(4.0 kg)을 MeOH로 15일간 실온에서 3회 반복 추출, 여과 및 감압 농축하여 MeOH 엑스(585.8 g)를 제조하였다. MeOH 추출물을 증류수로 현탁시킨 다음 동량의 methylene chloride(CH₂Cl₂)를 가하여 진탕하고 분획(3회)하여 CH₂Cl₂층으로 하였다. 물층은 다시 EtOAc로 앞의 방법과 같이 분획(3회)하여 EtOAc 및 H₂O 분획을 얻었다. EtOAc 분획물을 감압농축후(35.6 g) Sephadex LH-20 gel과 60% MeOH(4.0 l)을 사용한 column chromatography를 실시하여 6개의 fraction을 얻었다. 그 중 fr. 2를 ODS gel column에 loading 한 후 60% MeOH(3.0 l)로 elution하여 fr. 2-1~fr. 2-4를 얻은 후 fr. 2-4를 MeOH로 재결정하여 미황색의 침상결정인 compound 1을 단리하였다. 각종 spectral data와 비교 검토한 결과 compound 1은 icariin으로 확인되었다¹³⁻¹⁴⁾(Scheme 1).



Scheme 1. Extraction and isolation of icariin from *Epimedii Herba*

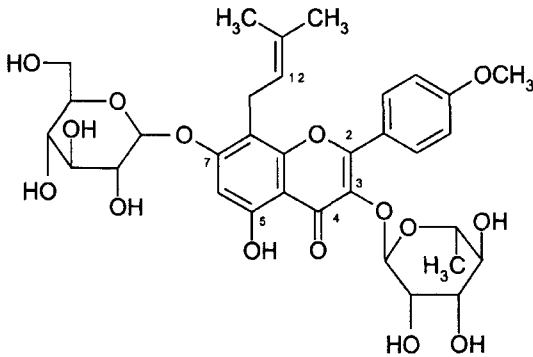


Fig. 1. Chemical structure of icariin.

Icariin - 미황색 침상결정, FAB(-)Mass(m/z): 675 [M-H], 513[M-H-glc], 367[M-H-(glc+rha)]; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ0.78 (3H, d, J=6.1 Hz, rha Me), 3.86 (3H, s, OMe), 4.00-5.40 (m, sugar protons), 1.65, 1.72 (each 3H, H-4", 5", Me), 5.15 (1H, brt, J=7.2 Hz, H-11), 6.63 (1H, s, H-6), 7.13 (2H, d, J=8.9 Hz, H-3', 5'), 7.90 (2H, d, J=8.9 Hz, H-2', 6'); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): 153.0 (C-2), 134.6 (C-3), 178.3 (C-4), 160.5 (C-5), 98.1 (C-6), 161.4 (C-7), 108.3 (C-8), 157.4 (C-9), 105.6 (C-10), 122.1 (C-1'), 130.6 (C-2'), 114.1 (C-3'), 161.4 (C-4'), 114.1 (C-5'), 130.6 (C-6'), 21.4 (C-1"), 122.3 (C-2"), 131.3 (C-3"), 25.5 (C-4"), 17.5 (C-5"), 102.0 (rha C-1), 70.3 (rha C-2), 70.7 (rha C-3), 69.7 (rha C-4), 70.1 (rha C-5), 17.9 (rha C-6), 100.5 (glc C-1), 73.4 (glc C-2), 76.6 (glc C-3), 71.1 (glc C-4), 77.2 (glc C-5), 60.6 (glc C-6), 55.5 (OMe).

HPLC 조건 - HPLC는 Shimadzu LC-10A_{VP} System 으로서 LC-10AT_{VP} Pump, SPD-10A_{VP} UV-VIS Detector, SIL-10AD_{VP} Auto Injector(Japan)를 사용하였다.

Column은 Luna C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm, Phenomenex)를 사용하였고 이동상으로는 MeOH:H₂O=50:50에서 20 min 동안 100:0(v/v)이 되도록 하였다. (gradient) 유속은 0.8 ml/min으로, UV Detector 파장은 350 nm에서 고정하여 실시하였다.

표준액의 조제 - Icariin 4.0 mg을 HPLC용 methanol 10 ml에 녹이고 이것을 stock solution으로 하여 20, 40, 60, 80, 100, 120, 200, 400 μg/ml로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였다. 각각의 표준용액 10 μl를 HPLC로 분석하여 chro-

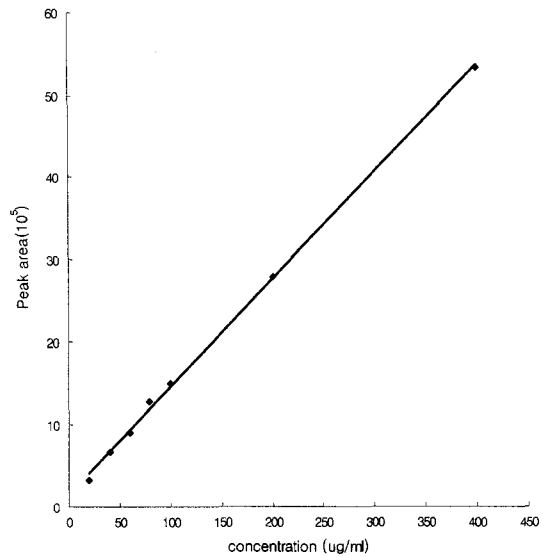


Fig. 2. Calibration curve of icariin.

matogram의 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하여 얻은 회귀직선 방정식은 $y=13063x+143738$ 이고 $R^2=0.9989$ 이었다 (Fig. 2).

검액의 조제 - 검체 2.0 g을 정확히 평량하여 methanol 40 ml를 가해 실온에서 3회 추출, 여과 및 감압농축하여 methanol 추출물을 얻었다. methanol 추출물을 H₂O 10 ml에 녹인 후 동량의 ether로 3회 탈지한 다음 H₂O층을 감압농축하였다. 이를 HPLC용 methanol 10 ml에 용해시킨 후 0.45 μm membrane filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. 각각의 검액을 10 μl씩 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각의 지표물질의 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

국내 시판되고 있는 음양곽에 대한 품질 표준화 연구의 일환으로 음양곽의 약효성분이면서 함량이 비교적 많고 HPLC로 정량이 가능한 성분을 지표성분으로 하여 음양곽의 성분분석법을 확립하고, 실제 음양곽 중의 지표성분의 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성회분을 정량하여 음양곽의 품질관리 기준을 설정하고자 하였다.

음양곽 MeOH 엑스를 제조하여 MeOH 추출물을 증류수로 현탁시킨 다음 동량의 methylene chloride

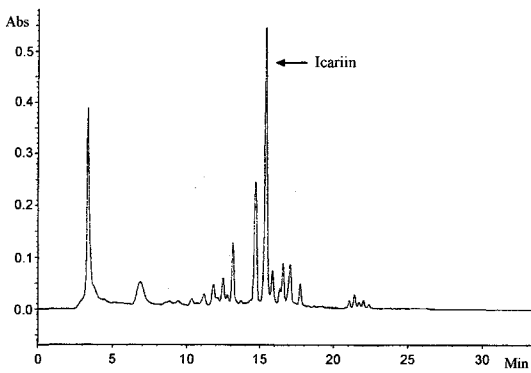


Fig. 3. HPLC chromatogram of extract from Epimedii Herba

(CH_2Cl_2)를 가하여 진탕, 분획하여 CH_2Cl_2 층으로 하였다. 물층은 다시 EtOAc로 분획하여 EtOAc 및 H_2O 분획을 얻었다. EtOAc 분획물을 감압농축후 Sephadex LH-20 gel과 ODS column chromatography를 실시하여 얻은 fraction을 MeOH로 재결정하여 compound 1을 단리하였다. 각종 spectral data와 문헌을 비교 검토한 결과 compound 1은 icariin으로 확인되어 음양곽의 HPLC로 정량이 가능한 지표성분을 icariin으로 선정하고 표준품을 확보하였다.

건조감량 시험에서는 평균 및 표준편차는 $7.175 \pm 1.003\%$ ($n=42$)이었고 시료에 따라 큰 차이는 보이지 않았다. 따라서 음양곽의 건조감량은 대한약전¹⁶⁾에 규정하고 있는 13% 이하로 규정하면 타당하리라 생각된다.

회분함량 시험에서는 평균 및 표준편차는 $7.574 \pm 0.688\%$ ($n=42$)로 대한약전에 규정하고 있는 8.0% 이하보다는 적으나, 시료 40개의 회분 함량이 8.5% 이하이므로 음양곽의 회분 함량은 8.5% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

또한 산불용성회분 시험에서 평균 및 표준편차는 $1.081 \pm 0.597\%$ ($n=42$)로 대한약전에 규정하고 있는 0.9% 이하보다 많았고, 시료 40개의 산불용성회분 함량이 2.0% 이하이므로 음양곽의 산불용성회분 함량은 2.0% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

음양곽의 지표물질인 icariin의 함량을 측정하기 위하여 HPLC법을 이용하여 정량하였다. Column으로는 ODS를 사용하였고 가장 분리능이 양호한 용매계로 MeOH: H_2O =50:50에서 20 min 동안 100:0(v/v)(gradient)이 되도록 하였다. 또한 유속은 0.8 ml/min으로 하였고 검출파장은 350 nm에서 고정하여 실시하였다.

지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 20~400 $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 농도에서 직선성이 인정되었으며 회귀직선 방정식은 $y=13063x+143738$ ($R^2=0.9989$)으로 나타났다. 이와 같은 조건에서 전국 각지에서 구입한 음양곽 42종의 icariin 함량을 시험하여 건조중량(g)중의 함량을 구하여 %를 산출하였다(Table 1). 음양곽 중의 icariin 함량의 평균 및 표준편차는 $0.342 \pm 0.123\%$ ($n=42$)이었고 함량이 매우 낮은 4개를 제외하면 모두 0.2% 이상의 icariin을 함유하고 있으므로 음양곽의 표준화를 위한 icariin의 함량은 0.2% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

결 론

1. 음양곽 4.0 kg을 MeOH로 15일간 실온에서 3회 반복 추출, 여과 및 감압 농축하여 얻은 MeOH 추출물을 증류수로 현탁시킨 다음 CH_2Cl_2 및 EtOAc로 3회 용매분획하였다. EtOAc 분획물을 감압농축 후 Sephadex LH-20과 ODS gel을 사용한 column chromatography를 실시하여 icariin을 분리·동정하였다.
2. 대한약전에는 건조감량을 13% 이하로 규정하고 있는데 42종의 시료에 대한 시험 결과 건조감량의 규정에 모두 적합하였다. 건조감량에 대한 평균 및 표준편차는 $7.175 \pm 1.003\%$ 이었고 시료에 따라 큰 차이는 보이지 않았다. 따라서 음양곽의 건조감량은 13% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.
3. 대한약전에는 회분을 8.0% 이하로 규정하고 있는데 42개의 시료에 대한 회분시험 결과, 평균 및 표준편차는 $7.574 \pm 0.688\%$ 로 대한약전에 규정하고 있는 8.0% 이하보다는 적으나, 시료 40개의 회분 함량이 8.5% 이하이므로 음양곽의 회분 함량은 8.5% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.
4. 대한약전에는 산불용성회분을 0.9% 이하로 규정하고 있는데 42개의 시료에 대한 산불용성회분시험 결과, 평균 및 표준편차는 $1.081 \pm 0.597\%$ 로 대한약전에 규정하고 있는 0.9% 이하보다 많았고, 시료 40개의 산불용성회분 함량이 2.0% 이하이므로 음양곽의 산불용성회분 함량은 2.0% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.
5. 음양곽의 주성분인 icariin을 지표물질로 하여 HPLC 방법을 확립하여 시료 42종의 icariin 함량을 시험한 결과, 평균 및 표준편차는 $0.342 \pm 0.123\%$ 이었고 함량이 매우 낮은 4개를 제외하면 모두 0.2% 이

Table I. The contents of icariin, loss on drying, residue on ignition and residue on acid insoluble ignition from various *Epimedium Herba*

Sample	Amount (%)	Lose on drying (%)	Residue on ignition (%)	Residue on acid insoluble ignition (%)
SJ 1	0.449	8.653	7.630	0.597
SJ 2	0.339	8.552	7.685	0.694
SJ 3	0.448	8.035	7.879	0.629
SJ 4	0.319	8.136	7.875	1.697
SJ 5	0.407	7.861	7.726	0.873
SJ 6	0.548	7.333	5.417	0.213
SJ 7	0.404	8.379	8.443	1.389
SJ 8	0.668	7.606	7.041	0.775
SJ 9	0.360	7.436	8.530	1.623
SJ 10	0.400	7.536	7.824	0.897
SJ 11	0.417	7.421	7.723	1.119
SJ 12	0.424	7.656	7.457	0.916
SJ 13	0.213	7.453	6.836	0.498
SJ 14	0.185	8.500	6.902	0.586
SJ 15	0.528	7.300	7.255	0.506
SJ 16	0.398	7.996	6.927	0.675
SJ 17	0.348	7.412	7.210	0.670
SJ 18	0.510	7.112	8.885	3.414
SJ 19	0.023	7.964	7.990	0.836
SJ 20	0.301	5.898	7.838	0.974
SJ 21	0.263	5.975	8.164	1.762
SJ 22	0.208	5.036	5.817	0.680
SJ 23	0.392	5.163	7.195	0.854
SJ 24	0.187	5.676	6.558	0.469
SJ 25	0.243	5.647	8.287	1.083
SJ 26	0.358	5.205	7.608	0.576
SJ 27	0.324	5.998	8.087	1.474
SJ 28	0.353	6.190	7.509	0.781
SJ 29	0.325	5.746	7.936	0.836
SJ 30	0.303	7.852	7.650	1.208
SJ 31	0.510	5.860	6.868	0.856
SJ 32	0.264	7.864	8.082	1.719
SJ 33	0.372	7.695	7.348	1.139
SJ 34	0.357	7.380	7.868	1.586
SJ 35	0.413	8.188	8.261	1.363
SJ 36	0.291	7.481	8.076	1.877
SJ 37	0.442	7.998	6.861	2.614
SJ 38	0.152	7.400	8.189	0.710
SJ 39	0.208	6.790	8.004	1.091
SJ 40	0.330	7.174	7.472	0.978
SJ 41	0.168	7.253	8.170	1.141
SJ 42	0.222	7.538	7.026	1.017
Mean±S.D.	0.342±0.123	7.175±1.003	7.574±0.688	1.081±0.597

상의 icariin을 함유하고 있으므로 음양곽의 표준화를 위한 icariin의 함량은 0.2% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

사 사

본 연구는 2000년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 陸昌洙(1993) 원색한국약용식물도감, 212: 아카데미서적, 서울.
- 張相文(1996) 한약자원식물학, 445: 학문출판, 서울.
- 문관심(1994) 약초의 성분과 이용, 250: 일월서각, 서울.
- 강삼식, 신국현, 정순간, 조의환(1988) 음양곽의 Flavonoid 성분에 관한 연구. 생약학회지 19(2): 93-96.
- 강삼식, 김주선, 강윤정, 한혜경(1990) 음양곽의 성분에 관한 연구(II). 생약학회지 21(1): 56-59.
- Li, W. K., Xiao, P. G. and Pan, J. Q. (1998) Complete assignment of ^1H and ^{13}C -NMR spectra of Ikariside A and Epimodoside C. *Magnetic Resonance in Chemistry* 36: 303-304.
- Sun, P., Ye, W., Zhao, J., Pei, Y., Wang, Z., Chen, Y., Ogihara, Y. and Takeda, T. (1995) Studies on the constituents of *Epimedium koreanum*. *Chem. Pharm. Bull.* 43(4): 703-704.
- Sun, P., Chen, Y., Shimizu, N. and Takeda, T. (1998) Studies on the Constituents of *Epimedium koreanum*. III. *Chem. Pharm. Bull.* 46(2): 355-358.
- Mizuno, M., Hanioka, S., Suzuki, N., Inuma, M., Tanaka, T., Liu, X. S. and Min, Z. D. (1987) Flavonol glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry* 26(3): 861-863.
- Fukai, T. and Nomura, T. (1988) Seven prenylated flavonol glycosides from two *Epimedium* species. *Phytochem.* 27(1): 259-266.
- 강삼식, 김주선(1991) 삼지구엽초 Flavonoid Glycoside의 계절적 변동. 생약학회지 22(2): 85-90.
- 신국현, 임순성, 안상득, 김승경, 박경열(1996) 삼지구엽초의 채취시기 및 산지별 성분 차이¹⁾. 한국약용작물학회지, 4(4): 321-328.
- Mizuno, M., Inuma, M., Tanaka, T., Sakakibara, N., Hanioka, S. and Liu, X. S. (1988) Flavonol glycosides in *epimedium* species. *Chem. Pharm. Bull.* 36(9): 3487-3490.
- 신국현, 강삼식, 정순간, 조의환(1989) 고속액체크로마토그래피에 의한 음양곽 중 Icarin의 정량. 생약학회지 20(1): 21-24.
- Lee, M. K., Choi, Y. J., Sung, S. H., Shin, D. I., Kim, J. W. and Kim, Y. C. (1995) Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum*. *Planta Med.* 61: 523-526.
- 대한민국보건복지부, 대한보건공정서협회(1998) 대한약전 제 7개정, 758. 한국메디칼인덱스사, 서울.

(2000년 12월 19일 접수)