

음양곽 주성분의 정량분석

한용남 · 황금희* · 이미순**

서울대 천연물과학연구소, *한국식품개발연구원, **덕성여대

Quantitative Analysis for Components of *Epimedium koreanum*

Yong Nam Han, Keum Hee Hwang* and Mie Soon Lee**

Natural Product Research Institute, Seoul National University

*Korea Food Research Institute, **Duksung Women's University

Abstract

Eum Yang Kwak, the aerial part of *Epimedium koreanum*, is widely used as a folk medicine for stimulant in man, tonic, and hypotensive purpose. The plant contains icariin (a specific flavonoid), magnoflorine (an alkaloid) and tannin, but their contents are not known until now. In this paper, a quantitative analysis method for them was developed. Determination of icariin and magnoflorine was successfully achieved by high performance liquid chromatography equipped with a UV detector in the ranges of 0.1~0.4 mg and 0.002~0.1 mg per ml sample, respectively. Extraction of the plant was carried out with water or 50% ethanol using different decocting temperatures and times. Icariin was well extracted either by water (100°C, 3 hr) or 50% ethanol (85°C, 1 hr), and its content in the plant was measured to be 0.94%. On the other hand, magnoflorine was fully extracted by 50% ethanol (85°C, 1 hr), and its content was determined to be 0.16%. Therefore, decoction of the medicinal plant with water at 100°C for 3 hr turned out to be recommendable for the best extraction.

Key words: *Epimedium koreanum*, icariin, magnoflorine, HPLC

서 론

음양곽은 다년생 초본인 삼지구엽초 *Epimedium koreanum* Nakai (매자나무과 Berberidaceae)의 지상부를 말린 생약으로⁽¹⁾ 한방 및 민간에서 강정, 전신불수, 건망증, 신경성 강장제의 목적으로 사용하고 있으며⁽²⁾ 병을 예방하고 몸을 보하는데 쓰인다고 한다⁽³⁾. 음양곽의 약리작용으로는 성기능흥분작용, 혈압강하작용, 혈당강하작용, 항virus 작용, 이뇨작용(소량), 항이뇨작용(다량)이 보고되고 있으며⁽⁴⁾ 소아마비, 신경쇠약, 만성 기관지염의 치료에 사용된다는 임상보고도 있다⁽⁵⁾. 음양곽을 비롯한 *Epimedium*속 식물의 성분에 관해서는 flavonoid⁽⁶⁻¹⁸⁾, alkaloid인 magnoflorine^(19,20), lignan⁽²¹⁾ 및 phenyletanoid glycoside, ionone 유도체, sesquiterpene glycoside 등^(22,23)이 보고되어 있다. *E. koreanum*으로부터는 flavonoid인 icariin^(24,25), epimedeside A⁽²⁴⁾, flavonoid glycoside인 epimedin A, B 및 C⁽²⁵⁾와 quercetin

및 anhydroicaritin-3-0-rhamnoside⁽²⁶⁾ 등이 보고되었으며 이중 icariin은 hypotensive effect를 나타내는 유효 성분으로 밝혀졌다^(27,28).

최근에 음양곽이 차나 드링크제 등의 제품으로 시판되면서 일반 대중들에게 관심이 높아지고 있다. 그 성분들에 대한 연구는 현재까지도 많이 진행되고 있으나 각 성분들의 함량이나 그 분석법에 대한 연구는 보고되어진 바 없다. 이점에 착안하여 본 연구에서는 음양곽의 주 성분으로 알려진 icariin과 알카로이드인 magnoflorine을 정량분석할 수 있는 분석방법을 개발하고 이를 활용하여 음양곽 중의 icariin과 magnoflorine의 함량을 구하였다. 한편, 음양곽을 온도, 시간, 용매조건을 달리하여 추출해서 차류 등 가공식품으로 개발시 최적 추출조건을 검토하여 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 음양곽(*Epimedium koreanum*) 6 kg은 경동시장 한약 견재상에서 구입하여 사용하였다.

Corresponding author: Keum Hee Hwang, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

Column chromatography용 silicagel은 Merk제 Kieselgel 60 (70-230 mesh, Art. 7734 및 230 mesh 이상 Art. 7729)를 사용하였으며, thin layer chromatography용 plate는 Merk제 precoated TLC plates silicagel 60F254를 사용하였고, TLC spot의 발색에는 UV lamp, Dragendorff 시약, Pauly 시약, 10% 황산용액 등을 사용하였다. 이온교환수지 Amberlite CG-50 (high capacity cation and anion exchange resins)과 ammonium reineckate는 Sigma사 제품을 이용하였다.

Icariin의 분리

음양곽의 추출 및 분획 : 한약 건재상에서 구입한 음양곽 6 kg을 조말(粗末)로 하여 메탄올 110 l를 가지고 대형 연속추출장치(200 l용량)에서 10시간씩 4회 연속 가열추출한 후 용매를 감압하에서 농축하여 제거하고 메탄올 추출물 18 l를 얻었다. 메탄올 추출물을 물에 분산시켜 동량의 헥산으로 4회 추출하고 물층을 약 1/3되게 농축하였다. 이 물층에 5% citric acid를 넣어 현탁시키고 동량의 CHCl₃으로 추출하였다. 이를 3회 반복하고 그 암모니아 알칼리성의 물층을 동량의 부탄올로 3회 반복 추출하여 부탄올 추출물 383 g을 얻었다. 한편, 암모니아 알칼리성 물층을 CHCl₃으로 추출할 때 생긴 침전물 2 kg을 따로 분획하여 icariin

rich fraction으로 분리하였다(Scheme 1).

Icariin의 단리

Scheme 1의 부탄올 추출물 383 g 중 127.5 g을 메탄올에 녹여 silicagel (Merk Art. 7734) 약 200 g에 흡착 건조시킨 후에 미리 준비해 둔 silicagel column (8×60 cm)에 가하고, CHCl₃/MeOH=10 : 1, 5 : 1, 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1의 순으로 용출하여 각각의 용출분액을 농축하였다. 이 중 CHCl₃/MeOH=4 : 1의 용출분액을 농축하여 MeOH/물 혼액에 두었더니 황색결정이 석출되었다. 이 물질은 UV에서 발색되고 Pauly 시약에 양성이었으며 TLC에서 Rf치가 0.6 정도인 icariin으로 알려진 flavonoid로 추정되었다. 여기서 단리한 icariin을 정량분석시의 표준품으로 사용하였다.

-Icariin-

mp 225-230°C

정색반응 FeCl₃ (+), Mg-HCl (+), Gibbs (-)

IR v_{max} (KBr, cm⁻¹) :

3400 (OH), 1650 (conjugated C=O), 1600 (conjugated double bond), 1500 (arom. C=C)

UV (EtOH) : 272 (4.25);

(EtOH/AlCl₃) : 280 (4.28), 308 (4.16), 345 (4.25);

(EtOH/NaAc) : 272 (4.46),

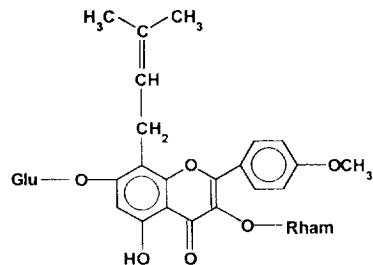
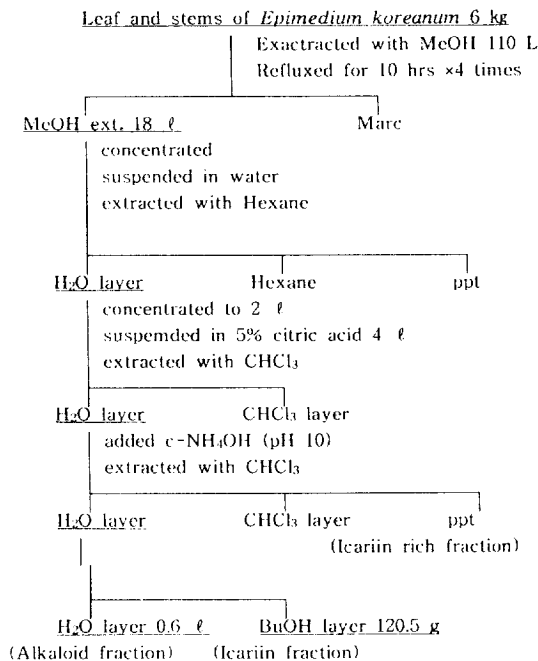
[α]_D²⁰ = -92° (C=0.25, pyridine)

EI-MS (70eV) [m/z] (rel.int., %) :

530 (M⁺-rhamnosyl),
368 (M⁺-rhamnosyl-glucose)

¹H-NMR (80 MHz, DMSO ppm) :

0.71 (3H, d, J=5Hz -CH-CH³ of rhamnose)
1.62, 1.70 (3H×2, each s, CH=C (CH₃)₂)
3.87 (3H, s, -OCH₃), 6.64 (1H, s, C₆-H)
7.13 (2H, d, J=9Hz, C-3', 5'-H)
7.91 (2H, d, J=9Hz, C-2', 6'-H)



Structure of Icariin

Scheme 1. Extraction and Fractionation of *Epimedium koreanum*

Magnoflorine의 분리

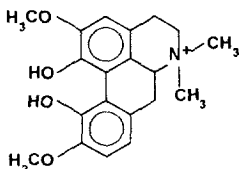
Icariin과 같은 방법으로 추출 분획하여 부탄올로 추출하고 남은 암모니아 알칼리성 물층을 감압하에서 농축하여 알칼로이드 분획 약 0.6 l를 얻었다. 암모니아 알칼리성 물층 약 0.6 l를 소량의 메탄올이 존재하는 아세톤 용액에 현탁하여 그 가용부를 취해 감압하에서 농축하여 알칼로이드 분획 103 l를 얻어 CHCl₃/MeOH/H₂O=(70 : 30 : 4, 15 : 10 : 2.5)의 혼합용매로 fresh column chromatography와 column chromatography를 여러차례 실시한 후 TLC상에서 전개용매 CHCl₃/MeOH/H₂O=15 : 10 : 2.5로 Rf치가 약 0.6 정도인 알칼로이드 분획을 정제하였다. 이 분획 중 일부를 물 20 ml에 녹여 미리 준비한 Amberlite CG-50 column (2×10 cm)에 가한 후 물로 여러차례 세척하고 4 N 초산으로 용출하여 40°C 수욕상에서 감압농축하여 물과 초산을 제거하고 310 mg의 알칼로이드 분획을 얻었다. 또 다른 일부는 4 N 초산 대신 메탄올로 용출한 후 감압농축하여 40 mg의 알칼로이드 분획을 얻어 이 둘을 합하였으며 이 합한 분획은 6 ml씩의 pyridine과 무수초산을 넣어 아세틸레이션하였다. 나머지 분획은 Amberlite CG-50 column을 통과시켜 메탄올로 용출한 후 농축하고 물에 녹여 과포화 상태로 ammonium reineckate를 넣어 알칼로이드를 석출시켜서 glass filter로 여과하고 물로 세척한 후 메탄올로 용출시켜 다시 Amberlite CG-50 column (2×10 cm)에서 CHCl₃/MeOH/H₂O=15 : 10 : 2.5의 용매로 용출시켜 감압 농축하여 100 mg의 단일물질을 얻었다. 이 물질은 UV에서 발색되고 Dragendorff 시약에 양성이었다. 여기서 단리한 magnoflorine을 정량분석시의 표준품으로 사용하였다.

-Magnoflorine-

mp : 184-190°C

¹H-NMR (80 MHz, DMSO, δ ppm) :

- 2.89 (3H, s, N-CH₃), 3.30 (3H, s, N-CH₃),
- 3.67, 3.69 (2×3H, each s, C₂,C₁₀-OCH₃),
- 4.35 (1H, dd, J=13.6 & 2.4 Hz, C₆a-H)
- 6.51 (1H, s, C₃-H), 6.46 (1H, d, J=8 Hz C^o-H)



Structure of Magnoflorine

6.62 (1H, d, J=8 Hz C₈-H)

EI-MS (70eV) [m/z] (rel.int., %) : 341 ([M⁺-1],

음양곽의 성분분석을 위한 검액원액의 조제

조절(調切) 음양곽 건중량 5g에 95 ml의 증류수를 가하고 교반하여 80°C에서 5분, 또는 수욕상에서 여러 시간별로 환류 냉각하면서 가열 추출하고 액이 더울 때 여지로 여과하였다. 여과된 침출액은 생약잔류물을 통과한 적당량의 증류수를 넣어 전체량을 100 ml로 하여 검액원액으로 하였다.

HPLC법에 의한 icariin의 정량

위에서 조제한 검액을 각 5 ml씩 정확히 취하고 에탄올 5 ml를 가한 후 50% (v/v)에탄올로 정확히 10 ml되게 한 후 HPLC 검액용 filter로 여과하여 그 여액을 검액으로 하여 다음의 조건에서 분석을 실시하였다. 칼럼은 LiChrosorb RP18 (10 μm) Pre-packed Column RT 250-4를 사용하였고 검출기는 Model 450 Variable Wavelength Detector (Waters)를 사용하여 측정파장 UV 272 nm에서 측정하였다. 분석에 사용된 용매는 MeOH/acetic acid/water (60 : 0.5 : 40)의 혼합용매였으며 25 μl를 주입하고 감도 0.4 AUFS에서 차트속도 0.5 cm/min, 용매유속 1.0 ml/min의 조건에서 분석을 실시하였다.

검량선을 작성하기 위하여 icariin 10 mg을 정확히 평량하여 50% (v/v) 에탄올에 녹여 10 ml 되게 하고 이를 희석하여 icariin 4 mg/10 ml, 3 mg/10 ml, 2 mg/10 ml, 1 mg/10 ml의 용액을 만들어 이를 표준액으로 25 μl씩 column에 주입하여 검량선을 작성하였다(Fig.

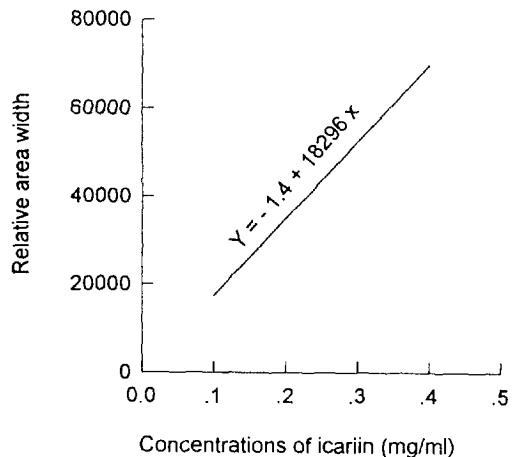


Fig. 1. Calibration curve for icariin

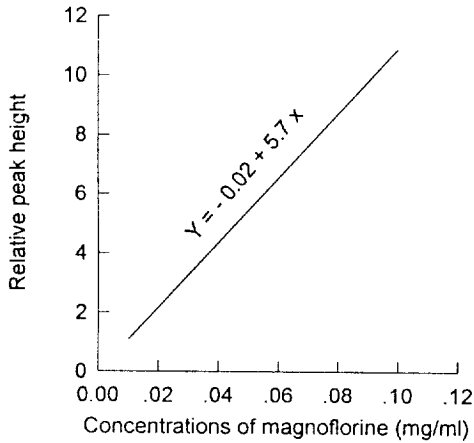


Fig. 2. Calibration curve for magnoflorine

1). 이 실험은 4회 반복하여 그 평균치를 구하였다. 검액을 각각 25 μ l씩 주사기로 취하여 column에 주입하고 위에서와 같은 조건으로 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram 중 표준품 icariin과 같은 retention time (t_R)에 나타나는 peak의 면적을 구하고 검량선으로부터 그 함량을 구하였다.

HPLC법에 의한 magnoflorine의 정량

검액원액을 10 ml 취하여 동량의 에틸아세테이트로 2회 추출하고 물층을 취하여 HPLC검액용 filter로 여과하여 그 여액을 검액으로 하였다. 한편, 50% (v/v) 에탄올로 추출한 검액원액을 10 ml 취하여 수욕상에서 감압 농축하여 에탄올을 제거하고 물로 10 ml 되게 하여 동량의 에틸아세테이트로 추출하였다. 이때의 HPLC의 조건은 다음과 같다. 측정파장 270 nm에서 MeOH/80 mM Na_2HPO_4 /water (35 : 35 : 30)의 혼합용매를 사용하여 감도 0.04 AUFS로 분석하였으며, 이외의 조건은 icariin 분석시와 동일하였다. 정량분석을 위한 검량선을 작성하기 위하여 magnoflorine 10 mg을 정확히 평량하여 50% (v/v) 에탄올에 녹여 10 ml 되게 하고 이를 희석하여 magnoflorine 0.2~1.0 mg/10 ml 용액을 만든 후 이를 표준액으로 각 25 μ l씩 column에 주입하여 검량선을 작성하였다(Fig. 2). 이 실험은 6회 반복하여 그 평균치를 구하였다. Magnoflorine 정량을 위해 위에서 조제한 검액을 각각 25 μ l씩 주사기로 취하여 column에 주사하고 위의 조건으로 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram 중 표준품 magnoflorine과 같은 retention time에 나타나는 peak의 높이를 구하고 검량선으로부터 그 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

icariin의 동정

음양곽의 n-부탄을 가용성 분획에서 단리한 icariin을 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3 : 1) 혼합용매로 TLC하면 Rf치 0.6에서 단일하였고 mp는 225-230°C (문헌치 225-227°C)이었다⁽¹³⁾. UV 흡수극대는 272 nm에서 나타났고, IR spectrum에서 3400 cm^{-1} 의 OH band, 1650 및 1600 cm^{-1} 에서 conjugated-carbonyl기 및 double bond의 band가 나타났다. 이와같은 성상이 문헌과 일치하는 것으로 보아 단리한 표품은 icariin으로 추정할 수 있었다.

이를 더 확실하게 하기 위해 Mass spectrometry법과 NMR spectrometry를 이용하여 이 물질의 화학구조를 분석하였다. Mass spectrum에서 m/z 530의 M⁺-rhamnosyl peak, m/z 368의 M⁺-rhamnosyl-glucosyl peak를 확인하였다. NMR spectrum은 δ 0.71 (3H, d, J=5 Hz)에서 rhamnose의 methyl기, δ 1.62와 δ 1.70에서 $(\text{CH}_2)_2$ C=C기, δ 3.87 (3H, d, J=5 Hz)에서 aromatic OCH_3 기, δ 6.64 (1H, s)에서 C₆-H, δ 7.13 (2H, d, J=9 Hz)에서 C₃'-H 및 C₅'-H, δ 7.91 (2H, d, J=9 Hz)에서 C₂'-H, C₆'-H 등을 보여주므로 단리한 물질은 icariin으로 확인하였다. Icariin은 1935년 赤井 등^(6,8)에 의하여 처음으로 단리되어 그 화학구조가 밝혀진 바 있으나 1975년에 Tokuoka 등에 의해 구조가 확정되었다⁽¹³⁾.

Magnoflorine의 동정

음양곽의 알카로이드 magnoflorine이 1957년에 단리되어 보고된 바 있으며^(19,20) 본 연구에서는 이를 추시하여 단리하였다. 이 과정에서 magnoflorine 이외의 알카로이드가 존재하는지 알아보기 위하여 알카로이드 분리를 시도하였으나 다른 알카로이드는 전혀 관찰할 수 없었다.

단리한 magnoflorine은 mp가 184-190°C였으며 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (15 : 10 : 2.5) 혼합용매에서 Rf치 0.6을 나타내는 단일 물질이었다. Mass spectrum에서 m/z 341에 M⁺-1의 peak가 나타났으며 NMR spectrum은 δ 2.89 (3H,s) 및 δ 3.3 (3H,s)에서 두개의 N-CH₃, δ 3.67 (3H,s), δ 3.69 (3H,s)에서 두개의 OCH₃, δ 4.35 (1H, dd, J=13.6 & 2.4 Hz)에서 C_{6a}-H, δ 6.51 (1H,s)에서 C₃-H의 δ peak가 나타났으며 δ 6.46 (1H, d, J=8 Hz)의 C₇-H와 δ 6.62 (1H, d, J=8 Hz)의 C₈-H가 서로 coupling하여 나타나는 것으로 보아 단리한 알카로이드는 magnoflorine임을 알 수 있었다.

Icariin의 정량분석법

천연물 중의 flavonoid 및 이들의 배당체의 함량을 정량분석하기 위해 μ Bondapak칼럼에서 MeOH/acetic acid/water (65 : 5 : 30) 혼합용매로 HPLC를 실시하는 방법은 잘 알려져 있다⁽²⁹⁾. 이 조건하에서 음양곽 추출액 중의 icariin 정량분석을 시도하였으나 retention time이 짧고 다른 성분과 겹쳐 분리가 좋지 않았다. 본 연구에서는 LiChrosorb RP18칼럼에서 MeOH/acetic acid/water (65 : 40 : 0.5) 혼합용매를 사용하여 icariin의 분리분석에 성공하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 icariin의 retention time이 7.37 min으로 다른 성분과도 잘 분리되었다. Icariin 0.1-0.4 mg/ml 50% (v/v) 에탄올 용액에 대해 검량선을 작성하여(n=8) 그 회귀선이 $y = -1.4 + 18296x$ 이고 correlation coefficient(r)=0.9999로 1.00에 매우 접근하는 직선을 얻었다.

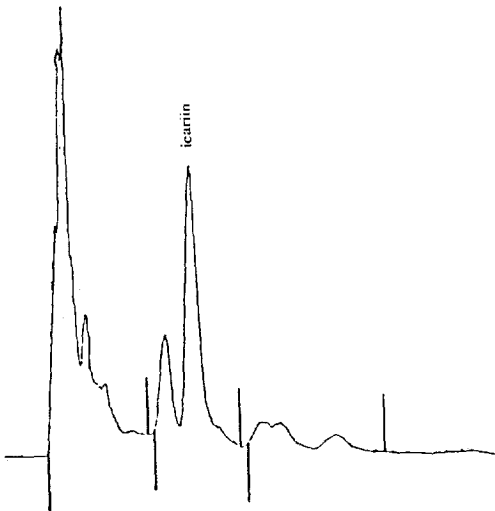


Fig. 3. HPLC chromatograms of water extract of *Epimedium koreanum* and icariin Analytical conditions : column, LiChrosorb[®] RP-18 (10 μ m); eluent, MeOH : acetic acid : water (60 : 0.5 : 40); flow rate, 1.0 ml/min; chart speed, 0.5 cm/min; detector, UV (272 nm)

음양곽 추출액 중의 icariin 정량분석

LiChrosorb RP 18 컬럼에서 MeOH/Acetic acid/Water (65 : 40 : 0.5) 혼합용매를 사용하여 HPLC를 실시한 정량분석법으로 분석한 음양곽의 물 또는 50% (v/v) 에탄올 추출액의 icariin 정량분석 결과는 다음과 같다. 물 또는 50% (v/v) 에탄올을 추출용매로 하여 대한약전 침제 또는 전제의 제법에 따라 추출한 침출액 (생약검체 5g의 100 ml 침출액)을 검액의 원액으로 하였다. 이를 2배 희석하여 50% (v/v) 에탄올용액으로 한 것을 전처리하지 않고 직접 검액으로 사용하였으며 이 검액 25 μ l를 주사하고 얻어진 chromatogram으로부터 icariin의 면적을 구하여 검량선으로부터 검액중의 icariin농도를 산출하였다. 그 결과를 사용한 음양곽 검체중의 함량으로 표시하여 Table 1에 나타내었다. 음양곽을 물로 100°C에서 가열하여 추출하였을 때 추출시간에 비례하여 icariin이 추출되었고 3 시간 이후에는 거의 일정량(0.9%~0.93%)에 도달하였다. 이 값은 음양곽을 50% (v/v) 에탄올로 1시간 가열 추출하였을 때의 값(0.94%)과 거의 일치하였다. 그러나 음양곽을 차(茶)로 달여서 먹는 조건(80°C에서 5분) 하에서는 약 1/4 양의 icariin이 추출되었다. 위의 결과로부터 음양곽중의 icariin함량은 약 0.94%로 추정되었다.

Magnoflorine의 정량분석법

알칼로이드는 질소의 화학적 성격에 따라 1-4급으로 분류할 수 있으며 1-3급 알칼로이드는 NH, 알칼리성에서 클로로포름, 에테르 등의 유기용매에 쉽게 이행되므로 식물 중의 중성 및 산성 성분으로부터 알칼로이드 분획을 분리 하고 이를 검액으로 사용하여 HPLC, gas chromatography (GC) 등의 방법으로 알칼로이드 함량을 구할 수 있다. 그러나 magnoflorine은 4급 암모늄염의 질소를 함유하고 있기 때문에 유기용매에 이행되지 않는다. 그러므로 본 연구에서는 음양곽 추출액을 에틸아세테이트로 추출하여 에틸아세테

Table 1. Icariin extraction from the aerial part of *Epimedium koreanum* using different decocting conditions

Decocting Conditions		Icariin contents (%)					Average \pm S.D
		Exp. 1	2	3	4	5	
50% EtOH	85°C 1 hr	-	-	-	-	0.94	0.94
Water	80°C 5 min	-	-	0.32	0.16	-	0.24
Water	100°C 30 min	-	-	0.48	0.42	-	0.45
Water	100°C 1 hr	0.44	0.76	0.61	0.64	0.44	0.58 \pm 0.14
Water	100°C 2 hrs	1.02	1.00	0.68	0.64	0.54	0.78 \pm 0.22
Water	100°C 3 hrs	1.08	1.14	0.92	0.88	0.64	0.93 \pm 0.20
Water	100°C 6 hrs	1.00	0.72	1.02	0.84	-	0.90 \pm 0.14

Table 2. Magnoflorine extraction from the aerial part of *Epimedium koreanum* using different decocting conditions

Decocting Conditions		Magnoflorine contents (%)				
		Exp.	1	2	3	Average ± S.D
50% EtOH	85°C 1 hr		0.172	0.154	0.158	0.161 ± 0.010
Water	100°C 0.5 hr		0.090	0.058	0.044	0.064 ± 0.030
Water	100°C 1 hr		0.062	0.066	0.044	0.057 ± 0.014
Water	100°C 2 hrs		0.090	0.090	0.070	0.083 ± 0.014
Water	100°C 3 hrs		0.148	0.118	0.102	0.123 ± 0.003
Water	100°C 6 hrs		0.066	0.072	-	0.069 ± 0.004

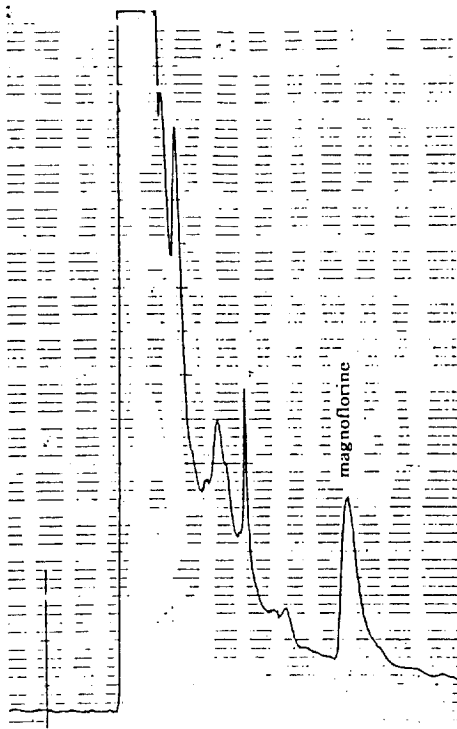


Fig. 4. HPLC chromatograms of water extract of *Epimedium koreanum* and magnoflorine Analytical conditions : column, LiChrosorb[®] RP-18(10 μm); eluent, MeOH : 80 mM Na₂HPO₄ : water (35 : 35 : 30); flow rate, 1.0 ml/min; chart speed, 0.5 cm/min; detector, UV (270 nm)

이트 가용성 분획을 제거한 후 수층을 검액으로 하여 HPLC 분석을 시도하였다. HPLC 컬럼은 LiChrosorb RP18을 사용하였고 용출액으로는 Fig. 4와 같이 MeOH/80 mM Na₂HPO₄/water (35 : 35 : 30) 혼합액이 최적이었다. Magnoflorine 0.02-0.10 mg/ml 50% 에탄올용액을 표준액으로 검량선을 작성하여 직선상의 검량선을 얻었으며(n=6) 그 회귀직선은 $y = -0.02 + 5.7x$ 이고 correlation coefficient (r)=1.0079로 1.00에 근접하였다.

Table 3. Yields of extraction from *Epimedium koreanum* under various decocting and extract conditions

Decocting Conditions			Yields (%)
50% EtOH	85°C	1 hr	16.5
Water	80°C	5 min	18.3
Water	100°C	0.5 hr	19.1
Water	100°C	6 hrs	20.3

음양곽 중의 magnoflorine 정량분석

물 또는 50% (v/v) 에탄올을 추출용매로 하여 대한 약전 침제 또는 전제의 제법에 따라 추출한 침출액(생약검체 5g의 100 ml 침출액)을 검액의 원액으로 하였고 이를 에틸아세테이트로 2회 추출한 후 수층을 직접 검액으로 하였다. 이 액 약 25 μl를 주사하고 얻어진 chromatogram으로부터 magnoflorine의 면적을 구하고 검량선으로부터 검액중의 magnoflorine 농도를 산출하였다. 그 결과는 음양곽 검체 중의 함량으로 표시하여 Table 2에 나타내었다. Magnoflorine은 50% (v/v) 에탄올에서 가장 잘 추출되었으며(0.61%) 물추출액 중에서는 100°C에서 3시간 추출시에 많이 추출되었으나(0.123%) 6시간 가열할 때 0.069%이었으므로 magnoflorine의 일부가 분해되는 것으로 추정된다. 음양곽 중의 magnoflorine의 함량은 약 0.16%이었다.

음양곽 extract의 함량

음양곽을 물 또는 50% (v/v) 에탄올을 추출용매로 하여 여러가지 추출온도, 추출시간에 따라 얻은 추출액 중의 icariin, magnoflorine, tannin의 함량을 분석한 결과, 추출조건에 따라 이들 성분의 용출정도가 달랐다. Icariin은 50% (v/v) 에탄올로 85°C에서 한시간 추출하였을 때나 물로 100°C에서 3시간 추출하였을 때 거의 같은 정도로 추출되었다(Table 1). Magnoflorine은 50% (v/v)에탄올로 추출하였을 때 더 많이 추출되었다(Table 2). 이러한 결과가 음양곽의 엑기스량에 기인하는 가를 알기 위해 엑기스함량을 측정하여 보았으나(Table 3) 엑기스의 함량은 오히려 50% (v/v) 에탄

올로 추출하였을 때가 가장 적었다. 따라서 음양곽의 여러 성분들의 추출정도는 성분들의 추출용매에 대한 용해도에 기인하는 것으로 추정된다.

요 약

음양곽 성분 중에서 icariin, magnoflorine을 분리하고 이를 표준품으로 음양곽 추출액의 이들 성분에 대하여 HPLC를 이용한 정량법을 수립하였으며 이 성분들의 추출효율을 여러 가지 추출조건하에서 검토하고 그 함량을 분석하였다.

Icariin은 0.1-0.4 mg/ml 농도에서, magnoflorine은 0.02-0.1 mg/ml 농도에서 아래와 같은 조건으로 정량 분석하였다. Icariin의 HPLC 조건 : 칼럼, LiChrosorb RP18; 용출용매, MeOH/water/acetic acid (60 : 40 : 0.5); 검출기, 자외부 흡광광도계; 측정파장, 270 nm; 주사량, 25 μ l. Icariin의 retention time은 7.37 min으로 다른 성분과도 잘 분리되었다. Icariin 0.1-0.4 mg/ml 50% (v/v)에탄올 용액에 대해 검량선을 작성하여(n=8) 직선을 얻었으며 그 회귀선은 $y = -1.4 + 18296x$ 이고 correlation coefficient (r)=0.9999로 1.00에 매우 접근하였다.

Magnoflorine의 HPLC 조건 : 칼럼, LiChrosorb RP 18; 용출용매, MeOH/80 mM Na₂HPO₄/water (35 : 35 : 30); 검출기, 자외부 흡광광도계; 측정파장, 270 nm ; 주사량, 25 μ l. Magnoflorine의 retention time은 11 min이고 2-10 mg/100 ml 50% 에탄올용액을 표준액으로 검량선을 작성하여 직선상의 검량선을 얻었으며(n=6) 그 회귀직선은 $y = -0.02 + 5.7X$ 이고 correlation coefficient (r)=1.0079로 1.00에 근접하였다.

음양곽의 추출용매로 물 또는 50% (v/v)에탄올을 사용하고 추출온도, 추출시간을 달리하였을 때 icariin, magnoflorine, 엑기스의 추출효율을 분석하였다. Icariin은 50% 에탄올(80°C, 1시간)로 추출하였을 때와 물(100°C, 3시간)로 가열 추출하였을 때 거의 같은 정도로 추출되었으나 magnoflorine은 50% 에탄올로 추출하였을 때 더 많이 추출되었다. 반면에 음양곽의 엑기스량은 50% 에탄올로 추출하였을 때 가장 적었고 물로 추출하였을 때는 추출시간이 길면 길수록 더 많았다. 음양곽을 직접 차(茶)로 음용할 때의 추출 조건에서는 icariin 및 magnoflorine의 추출 효율이 약 25%이므로 음양곽 엑기스로 가공한 차제제가 더 바람직하다고 생각된다.

음양곽 중에 icariin 및 magnoflorine의 함량은 각각 0.94, 0.16%임을 처음으로 분석하였다.

문 헌

1. 정태현 : 한국식물도감(草本部), 교육사 (1963)
2. 김종원 : 현대 생약학, 진명출판사 (1980)
3. 한약연구소 연구회 : 한약학, 대한약사회 (1986)
4. 지형준 : 대한약전의 한약(생약) 규격집, 한국메디칼인덱스사 (1988)
5. Dictionary of Chinese Materia Medica. (Zhong Yao Da-Ci-Dia or 中藥大辭典) Jiangsu New Medical College (Ed.), Shanghai Scientific Technological Publisher, Shanghai, p. 46 (1977)
6. Akai, S.: Untersuchungen ueber die Bestandteile von Epimedium Arten. I. Mitt. Ueber die Chemische Konstitution eines neuen Flavonglykosides von *Epimedium macranthum* Morr et Decne (I. Abteilung). *Yakugaku Zasshi*, **55**, 537 (1935)
7. Akai, S. and Matsukawa, Y.: Untersuchungen ber die Bestandteile von *Epimedium*-arten II Mitt. *Yakugaku Zasshi*, **55**, 705 (1935)
8. Akai, S. and Nakazawa, K.: Untersuchungen ber die Bestandteile von Epimedium Arten V Mitteil. *Yakugaku Zasshi*, **55**, 719 (1935)
9. Akai, S., Imaida, M. and Matsukawa, T.: Untersuchungen ber die Bestandteile von *Epimedium* Arten V Mitteil. *Yakugaku Zasshi*, **55**, 1139 (1935)
10. Takemoto, T., Daigo, K. and Tokuoka, Y.: Studies on the constituents of *Epimedium*. I. Flavonoids of *Epimedium grandiflorum* Morr.(1). *Yakugaku Zasshi*, **95**, 312 (1975)
11. Takemoto, T., Daigo, K. and Tokuoka, Y.: Studies on the constituents of *Epimedium* II. Flavonoids of *Epimedium grandiflorum* Morr.(2). *Yakugaku Zasshi*, **95**, 321 (1975)
12. Takemoto, T., Daigo, K. and Tokuoka, Y.: Studies on the constituents of *Epimedium* IV. Flavonoids of *Epimedium grandiflorum* Morr.(3). *Yakugaku Zasshi*, **95**, 698 (1975)
13. Takemoto, T., Daigo, K. and Tokuoka, Y.: Studies on the constituents of *Epimedium* V. Flavonoids of *Epimedium grandiflorum* Morr.(4). *Yakugaku Zasshi*, **95**, 825 (1975)
14. Mizuno, M., Hanioka, S., Suzuki, N., Iiuma, M., Tanaka, T., Liu, X.S. and Min, Z.D.: Flavonol glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry*, **26**, 861 (1987)
15. Yoshitama, K.: Anthocyanins and their distribution in the genus *Epimedium* Bot. Mag. Tokyo, **97**, 429 (1984)
16. Fujota, M., Itokawa, H. and Koyama, M.: *Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **21**, 50 (1971)
17. Yang, C-H., Liu, H-K., and Wu, C-L : *Chung Tsao Yao*, **11**, 444 (1980)
18. Xu, G., Xu, B. and Wang, M.: Isolation and identification of icariin and icarisid I. *Yaoxue Tongbao*, **22**(3), 129 (1987)
19. Tomita. M. and Ishii, H.: Studies on the alkaloids of Berberidaceae plants. XII. alkaloids of *Epimedium rugosum* NAKAI. *Yakugaku Zasshi*, **77**, 114(1957)
20. Tomita. M., and Ishii, H.: Studies on the alkaloids of Berberidaceae plants. XIII. Alkaloids of *Epimedium*

- grandiflorum* Morr. var. *thunbergianum* NAKAI. *Yakugaku Zasshi*, **77**, 212 (1957)
21. Tokuoka, Y., Daigo, K. and Takemoto, T. : Studies on the constituents of *Epimedium*. III. Lignoids of *Epimedium grandiflorum* Morr. *Yakugaku Zasshi*, **95**, 557 (1975)
 22. Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H. and Karasawa, H. : Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* Morr. var. *thunbergianum* (MIQ.) NAKAI. I. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1109 (1987)
 23. Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H. and Karasawa, H.: Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* Morr. var. *thunbergianum* (MIQ.) NAKAI. II. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3713 (1987)
 24. Xu, S, Wang, Z., Wu, L., Wang, N. and Chen, Y.: Isolation and identification of icariin and epimedeside A. *Zhongcaoyao*, **13**, 9 (1982)
 25. Liu, B-Q., Ma, H-S. and Mou, P.: Isolation and identification of icariin. *Chang T'sao Yao*, **11**, 201 (1980)
 26. Liu, C., Yu. Q. and Zhang, Li.: Effect of icariin on heart. *Zhongcaoyao*, **13**, 414(1982)
 27. Oshima, Y., Okamoto, M. and Hikino, H.: Validity of oriental medicines. Part 122. Epimedins A, B and C, flavonoid glycosides of *Epimedium koreanum* herbs. *Heterocycles*, **26**(4), 395 (1987)
 28. Kang, S.S., Shin, K.H., Chug, S.G. and Cho, E.H.: Flavonoids from *Epimedium koreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **19**, 93 (1988)
 29. L.N. Wulf and C.W. Nagel.: Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. *J. of Chromatography*, **116**, 271 (1976)
-
- (1995년 8월 22일 접수)