

삼지구엽초로부터 분리한 Icariin의 생리활성

김서진 · 박명수 · 딩티안 · 왕 준 · 오덕환[†]

강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학과

Biological Activities of Isolated Icariin from *Epimedium koreanum* Nakai

Seo Jin Kim, Myoung Su Park, Tian Ding, Jun Wang, and Deog Hwan Oh[†]

Dept. of Food Science and Biotechnology, School of Biotechnology and
Bioengineering and Institute of Bioscience & Biotechnology,
Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

Abstract

Epimedium koreanum Nakai is a wild medicinal plant commonly consumed in South Korea due to its health beneficial effects. In the present study, the antioxidative, antimutagenic and immunological activities of *E. koreanum* Nakai extracts were investigated for their use in food. The yields of icariin compounds from the ethanol extract as well as the ethyl acetate, butanol, hexane, water, and chloroform fractions of *E. koreanum* were 27.9, 2.5, 1.7, 1.4, and 1.3 $\mu\text{g/g}$, respectively. The icariin components (295.5 $\mu\text{g/g}$) were collected from the ethyl acetate fraction by thin layer chromatography (TLC) and analyzed via high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activities of each fraction were as follows: ethyl acetate (49.0 $\mu\text{g/mL}$), butanol (59.2 $\mu\text{g/mL}$), hexane (119.8 $\mu\text{g/mL}$), water (122.0 $\mu\text{g/mL}$), and chloroform (138.5 $\mu\text{g/mL}$), based on RC_{50} $\mu\text{g/mL}$. Icariin, isolated and identified as the main component, showed strong antioxidant activity with a RC_{50} value of 15.3 $\mu\text{g/mL}$, which was higher than those of ascorbic acid (19.5 $\mu\text{g/mL}$) and α -tocopherol (18.2 $\mu\text{g/mL}$). In an Ames test, none of the fractions produced mutagenic effects on *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100. In an immunomodulating activity test, the effects of *E. koreanum* Nakai on B cells (Rhamos) and T cells (Jurkat) were investigated. These results show that the growth and viability of B and T cells were increased by isolated icariin components for 1.27 and 1.28 fold, respectively. These results also provide preliminary data for the development of *E. koreanum* Nakai as an edible food material.

Key words: *Epimedium koreanum* Nakai, icariin, DPPH, Ames test, MTT assay

서 론

삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 매자나무과에 속하는 다년생초본식물로서 주로 경기, 강원 중북부지역을 중심으로 자생하고 있으며 초장은 30 cm 내외로 줄기의 가지가 세 개로 1가지에 3개의 잎이 달려 삼지(三枝)구엽(九葉)초라 한다(1). 잎은 잎자루가 길고 난형이고 끝이 뾰족하며 밑 부분이 심장형으로서 가장자리에 털 같은 잔톱니가 있다(2). 삼지구엽초 지상부를 건조한 것을 음양곽(淫羊)이라 하는데 한방에서는 강정, 항암, 항바이러스, 이노 등에 효능이 있는 것으로 알려지고 있다(3,4). 또한 지하부도 음양곽근으로 지상부와는 달리 천식의 발작이나 월경부조 또는 소야망증 등의 치료 목적으로 사용되고 있는 생약이다(5).

삼지구엽초의 주성분은 flavonoid인 icariin(6,7), quercetin, anhydroicaritin-3-O- α -rhamnoside, n-alkanes, phytosterols, phytosteryl glucosides, epimedeside C, epimedeside,

icariside A1, maltol, salidroside, epimedin I, icaritin-3-O- α -rhamnoside, ikarisoside A-F 등이 분리 보고(8-11)되었다. 이중 icariin은 삼지구엽초의 주요 약효성분으로 고혈압과 간독성을 억제한다는 보고(12)가 있으며, flavonoid glycoside인 epimedin A, B 및 C가 추가로 보고(13)되었다.

면역 반응 조절에 대해서는 감염에 대한 보호 작용, 자기 면역 질환, 그리고 암 등 여러 가지 질환에 있어서 면역 반응을 조절하려는 시도로 많은 면역 조절제 또는 생물학적 반응 조절제가 연구되고 있다. 생물학적 반응 조절제로서 천연 물질은 생체에 투여 시 부작용이 거의 없고 세포의 기능을 변화시키거나 조절하는데 큰 효과를 나타내는 새로운 물질원이 된다는 점에서 높이 평가되고 있다(14).

최근에는 국민소득의 향상과 환경의 악화 등 사회적 변화에 따라 건강에 대한 관심도가 고조되면서 각종 건강보조식품이 개발되고 그 수요 또한 증가하고 있는 실정이다(15). 그중에서도 삼지구엽초는 앞에서 언급한 바와 같이 이용성

[†]Corresponding author. E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6457, Fax: 82-33-241-0508

이 높은 식물임에도 불구하고 국내에는 삼지구엽초의 주성분인 icariin의 생리활성에 대하여 과학적으로 주로 연구된 바 없으며 다만 한방에서 약재 첨가물로서 일부 사용되고 있을 뿐이다. 따라서 본 연구는 삼지구엽초의 주된 약효성분으로 알려진 icariin의 항산화활성, 항돌연변이 및 면역증진 효과를 탐색하여 삼지구엽초의 기능성식품 소재로의 사용 가능성을 확보하기 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 재료는 경기도 농업기술원에서 재배·보존하고 있는 국내산 있는 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)를 제공받아 실험에 사용하였다(16).

Icariin 분리 정제

삼지구엽초의 뿌리, 줄기, 잎 중 뿌리와 줄기는 증류수로 2~3차례 수세한 다음 음건하였고, 잘게 세절하였다. 이들 시료를 일정량 취하여 삼각플라스크에 넣고 10배량의 70% 에탄올을 첨가하여 40°C에서 10시간씩 3회 진탕 추출한 다음 No. 2 여과지로 여과하였다. 여과액을 4°C에서 12시간 냉각한 다음 여과하고, 그 여과액을 감압 농축하여 추출용매를 제거한 후, 각각의 부위에서 얻어진 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 Fig. 1과 같이 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물 층으로 순차적으로 분획하고, 감압농축한 후 동결건조 하여 사용하였다. 각 용매 분획물 중 icariin 함량이 가장 많았던 에틸아세테이트 분획물을 methanol로 녹여 소량(약 1 g)의 silica gel 60 (70~230 mesh, Merck, Milwaukee, WI, USA)과 섞은 후 methanol을 완전히 휘발시켜 silica gel에 흡착시켰다. 유리칼럼(4.4×60 cm)

Table 1. The analytical conditions for HPLC of icariin from *Epimedium koreanum* Nakai

Items	Conditions
Instrument	Waters 600, USA
Column	μ -Bondapak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Detector	PDA detector
Wave length	270 nm
Mobile phase	Acetonitrile (A), water (B) mixture
Gradient	0~20 min A:B (20:80) 20~40 min A:B (30:70) 40~60 min A:B (40:60) 60~70 min A:B (20:80)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10.0 μ L

에 silica gel(약 240 g)을 전개용매(MeOH:H₂O=6:4)에 현탁시켜 칼럼에 충전시킨 후, 상층부에 미리 흡착시킨 시료를 loading하였다. 전개용매는 1 mL/min의 속도로 유지하였으며, 마지막에 methanol로써 전개시켜 Fig. 1과 같이 6개의 분획물을 얻었다. Icariin 표준물질과 분리물질을 TLC plate (Precoated Kieselgel 60 FII 254, Merck) 상에 점적시켜 전개용매(ethyl acetate:chloroform:formic acid:water=8:1:1:1)로 전개하여 UV 365 nm로 조사하여 생리활성 물질을 확인하였다. Icariin 표준물질과 유사한 위치의 화합물들을 농축한 후 다시 column chromatography를 통해 분획물을 얻은 후 TLC plate 상에서 단일 spot을 확인하였다. TLC 상에 분리된 물질을 HPLC(Waters 600, USA)를 이용하여 icariin의 함량을 분석(Table 1)하였으며, 분리된 icariin은 정제하여 동결건조 하여 본 실험에 사용하였다.

항산화 활성

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, Milwaukee, WI, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법(17)을 활용하였다. DPPH 약 2 mg을 ethanol 15 mL에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 이 용액 12 mL에 dimethyl sulfoxide(DMSO) 6.25 mL를 첨가한 후, 517 nm의 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 EtOH로 희석하여 10초간 진탕시켰다. 그리고 용매 1 mL에 분말로 icariin 1 mg을 섞은 후 충분히 녹이고, 준비된 DPPH 450 μ L에 시료 용액 50 μ L를 넣어 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 α -tocopherol과 ascorbic acid(Sigma)를 사용하였다. DPPH radical 소거활성은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(RC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

Ames test를 이용한 mutagenicity test

돌연변이원성 실험에 사용한 *Salmonella* Typhimurium의 histidine 영양요구성 변이주는 TA98, TA100의 두 종류를 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation muta-

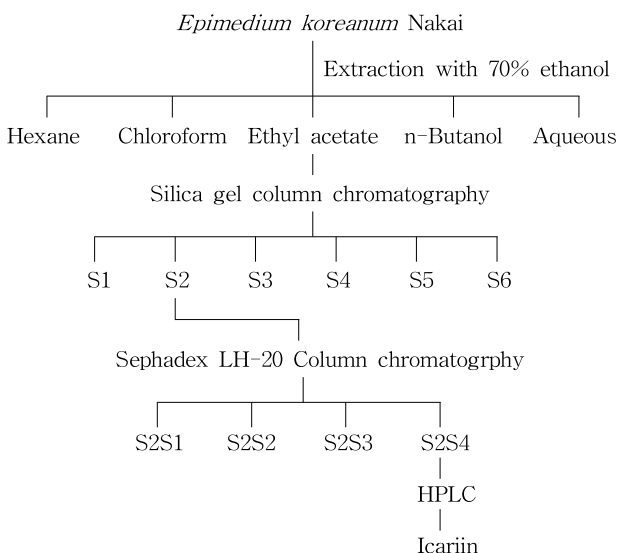


Fig. 1. Extraction and isolation of icariin from *Epimedium koreanum* Nakai.

genicity test(18)를 이용하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 icariin 50 µL를 가하고, TA culture 배지에서 하룻밤 배양된 균주 100 µL를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 µL가 되도록 하였다. Histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 mL씩 각 tube에 붓고 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(his^r revertant colony) 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 항 돌연변이 실험에 사용된 발암물질은 B(a)P 및 4NQO를 사용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 icariin 50 µL를 첨가한 다음 하룻밤 배양된 균주를 100 µL씩 주입한 후, 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 20분간 preincubation한 다음 histidine/biotin이 첨가된 45°C의 top agar를 2 mL씩 각 tube에 붓고 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 아래의 식에 의하여 계산하였으며, 대조구로는 icariin을 첨가하지 않은 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하여 균 생육 억제 유무를 판정하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(a-b)/(a-c)] \times 100$$

여기서 a는 돌연변이원에 의하여 유도된 복귀돌연변이의 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수이다.

면역 활성화 및 면역 증진 효과

본 실험에 사용한 면역 증진 효과 검증세포는 인간 면역 세포인 T-cell(Molt-4)과 B-cell(Rhams)을 이용하여 검증하였다. 삼지구엽초 주요성분인 icariin의 면역 증진 효과는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma) assay(19)와 24 well plate에 세포를 2.0×10^4 cells/mL의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양시키며 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포수를 측정하여 생육증강도를 측정하는 두 가지 방법을 사용하였다. MTT assay는 세포의 생육을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase에 의해 황색 수용성 물질인 MTT로부터 purple formazan이 생성되는 원리를 이용하였다. 이를 위해 각 세포주는 4×10^4 cells/mL의 농도로 조절하고 96 well plate에 cell을 100 µL씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 시료를 농도별로 20 µL씩 첨가하여 2~3일 동안 다시 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT시약을 well당 10 µL씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 후 MTT시약이 포함된 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 150 µL를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader(EL×808, Bio-tek[®] Inc., Highland

Park, VT, USA)를 이용, 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구로는 삼지구엽초의 70% 에탄올 추출액을 사용하였다.

$$\% \text{ of control} = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{control 흡광도}} \times 100$$

통계처리

모든 연구 결과의 자료는 통계 프로그램인 SAS(ver. 12.0, Statistical Analysis System, Milwaukee, WI, USA)를 이용하여 평균 및 표준편차를 계산하였으며, 군간의 비교에서 각각의 요인은 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 사용하였고, Duncan's multiple range test로 p=0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Icariin 분리 정제

본 실험결과에 사용한 삼지구엽초의 생리활성물질인 icariin의 함량은 에탄올 추출물에서 19.2 µg/g의 함량을 나타냈으며, 에탄올 추출물을 분획하여 icariin 함량을 측정된 결과 ethyl acetate(27.9 µg/g), butanol(2.5 µg/g), hexane(1.7 µg/g), water(1.4 µg/g), chloroform(1.3 µg/g) 순으로 icariin은 ethyl acetate 분획물에서 대부분 용출됨을 확인하였으며(Table 2), 삼지구엽초의 주성분은 icariin임이 확인되었고 대부분 ethyl acetate 분획물에서 용출된다는 보고(20)와 일치하였다. 가장 많은 icariin 함량을 나타낸 ethyl acetate 분획물을 silica gel column chromatography와 sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 재 분획·농축한 후, TLC(R_f 0.6)와 HPLC로 icariin 함량을 측정된 결과 295.5 µg/g의 함량을 나타내었다(Table 2). 본 실험에 사용한 삼지구엽초의 icariin 함량은 Shin 등(21)이 보고한 9월 중순 수확기 삼지구엽초의 icariin 함량(85.1 µg/g)보다 약 3.5배 높은 함량을 나타내었다.

항산화 활성

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 것은 여러 방법이 있으나 spectrophotometer를 이용한 DPPH

Table 2. Concentrations of icariin in ethanol extract and its various fractions from *Epimedium koreanum* Nakai

Extraction solvents	Icariin yields from fraction (µg/g)
Ethanol extract	19.2±0.17 ^{b1)}
Hexane	1.7±0.02 ^a
Chloroform	1.3±0.01 ^a
Fractions	
Ethyl acetate	27.9±0.13 ^b
Butanol	2.5±0.15 ^a
Water	1.4±0.02 ^a
Isolated icariin from ethyl acetate	295.5±0.35 ^c

¹⁾The data represent the mean±SD of three determinations (p<0.05).

Table 3. DPPH free radical scavenging activities of each fraction *Epimedium koreanum* Nakai

Extraction solvents		RC ₅₀ (µg/mL)
Fraction	Hexane	119.8±0.19 ⁽¹⁾
	Chloroform	138.5±0.16 ^c
	Ethyl acetate	49.0±0.07 ^b
	Butanol	59.2±0.11 ^b
	Water	122.0±0.15 ^c
Icariin	Isolates	15.3±2.35 ^a
	Standard	15.6±2.25 ^a
Reference	Ascorbic acid	19.5±0.09 ^a
	α-tocopherol	18.2±0.08 ^a

¹⁾The data represent the mean±SD of three determinations (p<0.05).

radical 소거 활성법이 간단하며 대량으로 측정이 가능하여 널리 이용되고 있다. 이 물질은 radical을 갖는 물질 중에서 비교적 안정한 화합물로 MeOH 용액에서는 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성물질이 DPPH radical을 포획하기 때문에 보라색이 소실된다. 따라서 미지의 식물추출물의 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있으며 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높은 장점이 있다. 삼지구엽초의 용매별 분획물과 에틸아세테이트에서 분리 정제한 icariin의 항산화 활성은 Table 3과 같다. 각 분획물의 항산화 활성은 ethyl acetate 분획층에서 49.0 µg/mL로 가장 높았으며, butanol(59.2 µg/mL), hexane(119.8 µg/mL), water(122.0 µg/mL), chloroform(138.5 µg/mL) 층의 순으로 나타났다. 삼지구엽초 용매별 분획물 중 ethyl acetate와 butanol 분획물의 항산화 활성 효능은 Lee 등(20)의 천년초 선인장 추출물의 항산화 효과연구에서 70% 에탄올 추출물에서의 항산화 활성(49.5 µg/mL)보다 다소 높은 결과로 나타났다. 용매별 분획물 중 가장 높은 항산화 활성을 나타낸 ethyl acetate 분획물에서 분리 정제한 icariin의 항산화 활성은 15.3 µg/mL로 icariin 표준품의 항산화 활성(15.6 µg/mL)과 거의 비슷한 활성을 나타냈으며, 대조구로 사용된 기존 천연 항산화제 ascorbic acid(19.5 µg/mL)와 α-tocopherol(18.2 µg/mL)보다 다소 높은 항산화 활성을 나타내었다. 삼지구엽초의 항산화 활성을 나타내는 물질로 Kim (22)은 에탄올 추출물에 DPPH와 반응하기 적합한 입체구조를 가지는 flavonoid 물질이 존재하기 때문으로 사료된다고 보고하였으며, Iinuma 등(23)은 삼지구엽초의 주성분인 icariin와 epimedin이 생쥐에서 간의 Kupffer cell에 의한 탐식작용을 활성화시킨다고 하였으며, Liu 등(24)은 삼지구엽초의 메탄올 추출물이 생명력이 결핍된 환자에 있어서 백혈구 수를 유의하게 증가시켜 면역능을 촉진시킨다고 보고하였다. 이러한 결과로 삼지구엽초 추출물을 더 정제할수록 항산화 활성은 증가된다는 보고(25)와 일치하며, 삼지구엽초의 경우 기능성식품을 개발할 때 추출물보다는 정제물을 이용하는 것이 여러 가지 측면에서 더 바람직할 것이며, 삼지구엽초를 이용한 천연 항산화제의 개발에도 많은 도움이 될 것이라

사료된다.

Ames test를 이용한 mutagenicity test

분리된 icariin과 표준품 icariin의 돌연변이 억제효과는 Fig. 2와 Fig. 3과 같다. S9 mix를 필요로 하는 간접변이원인 polycyclic aromatic hydrocarbon(B(a)P)을 사용한 TA98 균주에 대한 분리된 icariin과 표준품 icariin의 항돌연변이원성은 Fig. 2와 같이 1,000 µg/mL의 시료 농도에서 각각 97.3%, 93%의 높은 억제효과를 각각 나타내었고, TA100 균주에서 항돌연변이원성은 1,000 µg/mL의 시료 농도에서 각각 88.6%, 92.6%로 억제효과를 각각 나타내었다(Fig. 2). 삼지구엽초 icariin 성분이 TA98, TA100 돌연변이 균주에 대한 B(a)P의 변이원성은 icariin을 첨가하지 않은 대조구에 비해 93.0% 이상의 높은 억제효과를 보이고 있는데, 이는 Gruter 등(26)에 의한 mushroom의 B(a)P에 대한 최고 항변이 활성도(97.0%)와 비슷한 결과를 나타내었으며, 매우 높은 돌연변이 억제효과를 갖는다는 것을 시사하고 있다.

강력한 발암물질로써 직접변이원인 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)를 사용하여 TA98과 TA100 균주에 대한 시료의 항변이원성 실험 결과는 Fig. 3에 나타내었으며, 4NQO는 강력한 돌연변이 물질로 S9 mix에 의한 활성화를 필요로 하지 않는 물질이다. 분리된 icariin과 표준품 icariin의 TA98 균주에서의 4NQO에 대한 항변이원성은 시료 농도 750 µg/mL에서 각각 90% 이상의 억제효과를 보이고 1,000 µg/mL

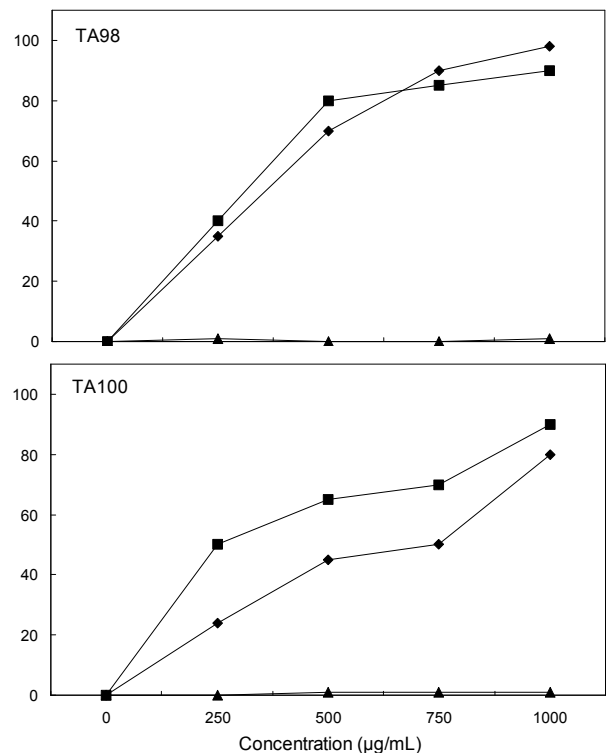


Fig. 2. The antimutagenic effects of isolated icariin and standard icariin against B(a)P induced *Salmonella Typhimurium* TA98 and TA100. ◆, isolated icariin; ■, standard icariin; ▲, control.

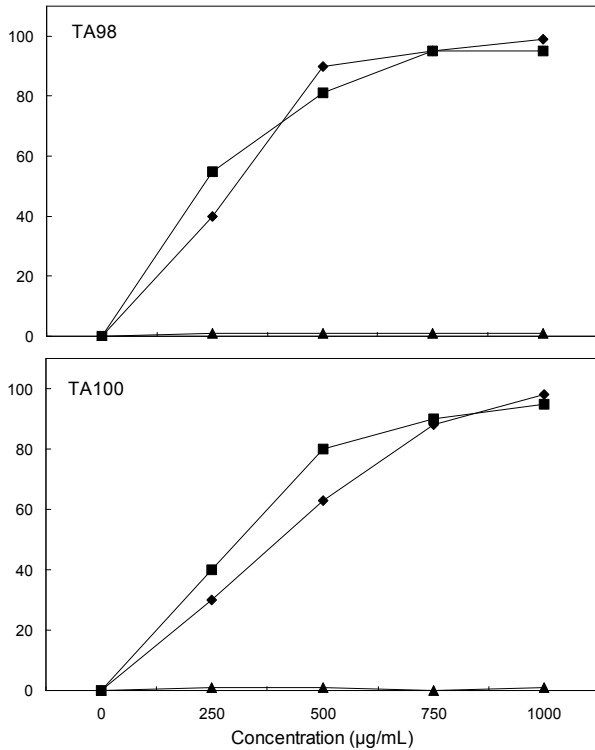


Fig. 3. The antimutagenic effects of isolated icariin and standard against 4NQO induced *Salmonella Typhimurium* TA98 and TA100. ◆, isolated icariin; ■, standard icariin; ▲, control.

농도에서는 각각 98.9%, 91%의 높은 억제효과를 나타내었다. TA100 균주에서도 1,000 µg/mL 농도에서 99.4%, 96.5%의 매우 높은 억제효과를 나타내었다.

삼지구엽초의 항돌연변이원성을 알아본 결과, B(a)P나 4NQO에서 전반적으로 TA98과 TA100 균주 모두에서 항돌연변이원성 활성이 높았다. 따라서 삼지구엽초에서 분리 정제된 icariin은 간접변이원의 활성화에 관여하는 최종 변이원 물질로 전환하는 역할을 하리라 추정되는 항변이원 물질 이외에도 직접변이원이 직접 DNA에 결합하여 유전적 변이원을 일으키는 것을 차단하는 작용을 하는 항변이원성 물질인 것으로 사료된다. Lee(27)는 냉이, 민들레, 수리취, 질경이 등 11종의 산채류 생즙에 대하여 돌연변이 억제율을 조사한 결과, 부추, 민들레, 냉이, 수리취, 썸바귀, 삼지구엽초 그리고 질경이가 B(a)P, 4NQO에 의해 유발된 변이원성에 대해 억제활성이 가장 컸다고 보고하였으며, Ito 등(28)은 양파, 가지, 호박 그리고 양배추의 생즙 및 가열즙이 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene(DMBA)에 의해 유발된 돌연변이원성을 억제하는 활성을 갖고 있으며 이것은 양파나 가지에 존재하는 SH 화합물이 glutathione transferase의 활성을 증가시키기 때문이라고 보고하였다(29).

면역 활성 및 면역 증진효과

분리된 icariin과 표준품 icariin의 면역 증진 효과 활성을 검색하기 위해 Human T cell(Jurkat)과 B cell(Rhamos)의

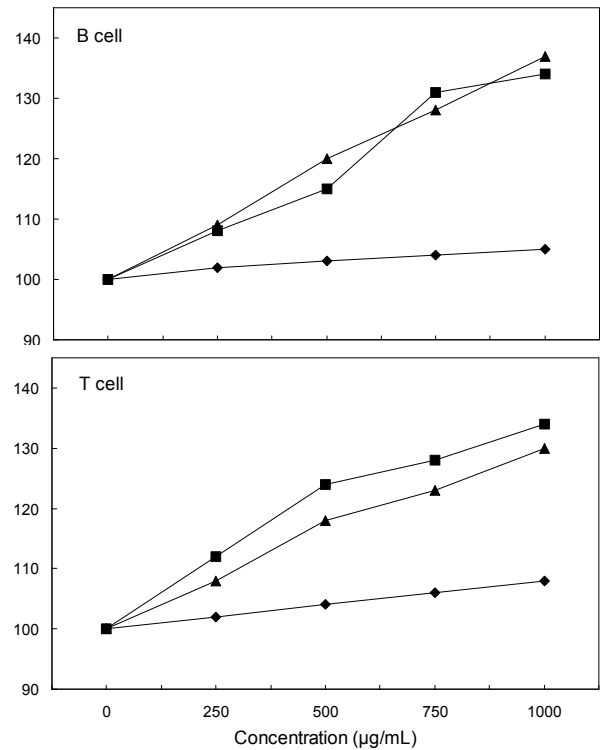


Fig. 4. The effect of isolated icariin and standard icariin on the growth of human B cell (Rhamos) and T cell (Jurkat). ◆, EtOH extract; ■, isolated icariin; ▲, standard icariin.

생육촉진 실험과 생육 활성도를 알아보았다(Fig. 4, Fig. 5). 분리된 icariin과 표준품 icariin의 Human T cell(Jurkat)과 B cell(Rhamos) 생육 촉진 실험 결과, B cell은 분리된 icariin과 표준품 icariin이 대조군인 70% 에탄올 추출물에 비해 각각 1.27배, 1.31배의 생육 촉진 활성을 나타내었고, T cell에서도 분리된 icariin과 표준품 icariin 모두 1.28배의 생육 촉진 효과를 보였다(Fig. 4). T cell과 B cell의 생육 활성도를 배양 시간별로 8일 동안 생 세포수를 측정할 결과는 Fig. 5와 같다. 분리된 icariin과 표준품 icariin 모두 B cell과 T cell에서 4일째 생육 활성도가 최대를 나타내었고 B cell보다 T cell에서 생육 활성도가 대조군인 70% 에탄올 추출보다 더 높게 나타났고 생육 촉진과 생육 활성에 대한 분리된 icariin과 표준품 icariin의 차이는 그리 크지 않았다. 이상의 결과에서 삼지구엽초 여러 용매 분획물 중 ethyl acetate에서 분리 정제한 icariin이 높은 면역증진효과를 보였으므로, 향후 식품산업에 있어서의 면역 증강 효능을 가진 삼지구엽초의 건강 기능성식품 개발에 매우 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 삼지구엽초의 기능성 식품학적 이용성 증진을 위한 기초적인 연구로써 우리나라 산야에서 존재하며 예로부터 약용으로 이용되고 있는 삼지구엽초의 주요성분인

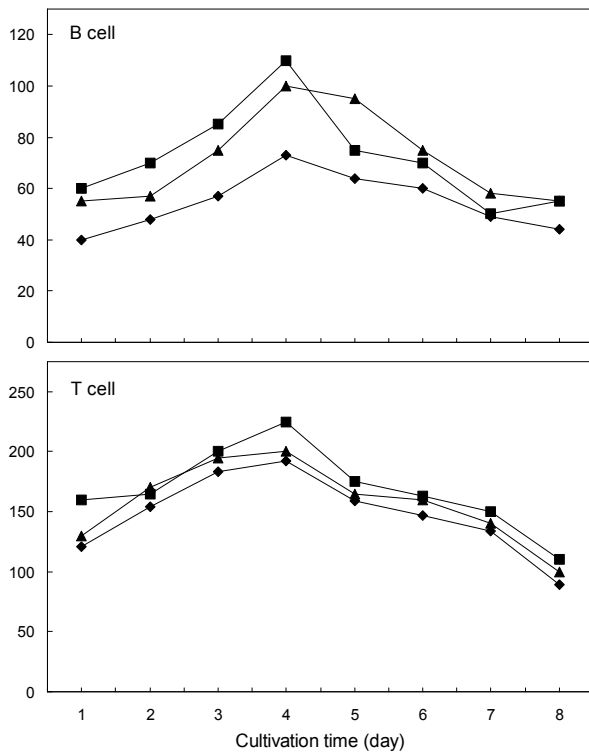


Fig. 5. The cell growth of human B (Ramos) cell and T (Jurkat) cell of isolated icariin and standard icariin (500 µg/mL). ◆, EtOH extract; ■, isolated icariin; ▲, standard icariin.

icariin을 분리하여 생리활성을 검토하였다. 에탄올로 추출한 삼지구엽초를 극성이 다른 용매인 에틸아세테이트, 부탄올, 헥산, 물, 클로로포름 층으로 분리하여, icariin의 함량을 측정된 결과 각각 27.9, 2.5, 1.7, 1.4, 1.3 µg/g이었고, icariin 수율이 가장 많은 에틸아세테이트 분획물로부터 정제된 icariin 수율은 295.5 µg/g이었으며 대부분 에틸아세테이트에서 용출되는 것을 확인하였다. 용매별 분획물의 항산화 효과는 에틸아세테이트 분획층에서 49.0 µg/mL로 가장 높았으며, 부탄올(59.2 µg/mL), 헥산(119.8 µg/mL), 물(122.0 µg/mL), 클로로포름(138.5 µg/mL) 층의 순으로 나타났으며, 정제된 icariin(15.3 µg/mL)은 대조구인 ascorbic acid (19.5 µg/mL), α-tocopherol(18.2 µg/mL)보다 다소 높은 활성을 나타내었다. *Salmonella* Typhimurium을 이용한 돌연변이 및 항돌연변이성에 미치는 영향을 조사한 결과, 삼지구엽초에서 분리한 icariin은 TA98과 TA100세포 모두에서 돌연변이성을 나타내지 않았다. 인간면역세포인 B세포와 T세포에서의 면역활성시험을 측정된 결과, icariin은 대조구보다 B세포에서 1.27배, T세포에서 1.28배의 비교적 높은 면역증강활성을 나타내었다. 이러한 결과는 삼지구엽초를 이용한 기능성식품 및 식품재료로서의 이용성 증진을 위한 기초 자료로 제공될 수 있을 것으로 판단된다.

문헌

- Lee YG, Sohn HO, Lee DW, Lim HB. 2002. The effect of water-extract of *Epimedium koreanum* Nakai on age-related change of the xenobiotic metabolizing enzyme system in the liver of rats. *Kor J Medicinal Crop Sci* 10: 29-36.
- Noh JH, Kim YJ, Choi KJ, Kim SW, Kim SK, Kim JH. 2003. Characteristics of seeding and rhizome propagation in *Epimedium koreanum* Nakai. *Kor J Medicinal Crop Sci* 11: 155-160.
- Shin KH, Lim SS, Ahn SD, Kim SK, Park KY. 1996. Difference in components of *Epimedium koreanum* in compliance with seasons and places of collection. *Kor J Medicinal Crop Sci* 4: 321-328.
- Han YH, Choi BR, Soh HS, Lee SJ, Choi YJ, Kim SY. 2000. *In vitro* plant regeneration for mass propagation of *Epimedium koreanum* Nakai. *Kor J Hort Sci Technol* 18: 834-838.
- Kang SS, Kim JS, Kang YJ, Han HK. 1990. Studies on the underground parts of *Epimedium koreanum*. *Kor J Pharmacogn* 21: 56-59.
- Kang SS, Shin KH, Chung SG, Cho EH. 1998. Flavonoids from *Epimedium koreanum*. *Kor J Pharmacogn* 19: 93-98.
- Xu SC, Xu BJ, Wang MT. 1987. Isolation and identification of icariin and icaraside I. *Chin Pharm Bull* 22: 129-132.
- Fukai T, Nomura T. 1988. Seven prenylated flavonol glycosides from two epimedium species. *Phytochemistry* 27: 259-266.
- Mizuno M, Hanioka S, Suzuki N, Iinuma M, Tanaka T, Liu XS, Min ZD. 1987. Flavonol glycosides from epimedium sagittatum. *Phytochemistry* 226: 861-863.
- Sun P, Zhao Ye W, Pei J, Wang Z, Chen Y, Ogihara Y, Takeda T. 1995. Studies on the constituents of *Epimedium koreanum*. *Chem Pharm Bull* 43: 703-704.
- Kang SS, Shin KH, Chung SG, Cho EH. 1988. Flavonoids from *Epimedium koreanum*. *Kor J Pharmacogn* 21: 93-96.
- Lee MK, Choi YJ, Sung SH, Shin DI, Kim JW, Kim YC. 1995. Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum*. *Planta Med* 61: 523-526.
- Xu SC, Wang ZX, Wu LJ, Wang NB, Chen YJ. 1982. Isolation and identification do icariin and epimidoside A. *Chin Tard Herb Drug* 13: 9-15.
- Hong H. 1986. *Oriental materia medica*. Oriental Healing Arts Institute, Taipei, Taiwan. p 563.
- Lee MK, Choi YJ, Sung SH, Shin DI, Kim JW, Kim YC. 1995. Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of *Epimedium koreanum*. *Plant Med* 61: 523-526.
- Kang CS, Choi BR, Park KY, Ahn SD. 1997. Establishment of growth environment and mass propagation system development for *Epimedium Koreanum*. *Kor J Pharmacogn* 30: 378-381.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
- Matsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sawamura M. 1980. Factors modulating mutagenicity in microbial test. In *Short-terms for detecting carcinogens*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, NY, USA. p 273-285.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601.
- Lee KS, Oh CS, Lee KY. 2005. Antioxidative effect of the

- fraction extracted from a cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Sci Technol* 37: 474-478.
21. Shin KH, Kang SS, Chung SG, Cho EH. 1989. Determination of icariin in *Epimedii herba* by high performance liquid chromatography. *Kor J Pharmacogn* 20: 21-24.
 22. Kim SY, Kim JH, Kim SK. 1992. Isolation and characterization of antioxidant components in *Epimedium koreanum* Nakai extract. *Korean J Food Sci Technol* 24: 535-540.
 23. Inuma M, Tanaka T, Sakakibara N, Mizuno M, Matsuda H, Shiomoto H, Kubo M. 1990. Phagocytic activity of leaves of system. *Yakugaku Zasshi* 110: 179-185.
 24. Liu FC, Liu JX, Ding GX, Zhang JY, Zhoy SH, Guo F, Wu TC, Hu TH. 1985. Correction between trace elements and immunological function in patients with vital energy deficiency. *J Trad Chin Med* 26: 856-857.
 25. Kim SJ, Oh DH. 2007. Free radical scavenging effect and extraction condition of ethanol extracts of *Epimedium koreanum* Nakai containing different icariin quantity. *J Food Hyg Safety* 22: 359-364.
 26. Gruter A, Friederich V, Wurgler FE. 1990. Antimutagenic effects of mushrooms. *Mutat Res* 231: 243-249.
 27. Lee JH. 1989. Studies on the demutagenic effect of the edible mountain herb juices. *MS Thesis*. Kangwon National University, Gangwon, Korea.
 28. Ito Y, Maeda S, Sugiyama T. 1986. Suppression of 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells by vegetable juices. *Mutat Res* 172: 55-60.
 29. Han KS, Ham SS, Jeong EH, Lee HK. 1992. Antimutagenic effects of the edible mountain herb juices against Trp-P-1 and 2-AF. *Kor J Food Hyg* 7: 161-168.

(2011년 8월 22일 접수; 2011년 9월 1일 채택)