

다중요인 분석에 의한 전탕용수에 따른 현호색 성분의 추출효과 비교

김태진¹ · 서은영¹ · 장유선² · 김상혁³ · 김대현³ · 주반멘³ · 김동희⁴ · 강종성^{3*}

¹충남대학교 신약전문대학원, ²충남대학교 의약품개발연구소,

³충남대학교 약학대학 약학과, ⁴대전대학교 한의학과

Influential Characteristics of Decoction Waters on Extraction of Components in Corydalis Tuber Analyzed by Multiple Factor Analysis

Tae Jin Kim¹, Eun Young Seo¹, Yu Seon Jang², Sang Hyuck Kim³, Dae Hyeon Kim³,
Van Men Chu³, Dong Hee Kim⁴ and Jong Seong Kang^{3*}

¹Graduate School of New Drug Discovery and Development, Chungnam National University, Daejeon, Korea

²Drug Development & Research Institute, Chungnam National University, Daejeon, Korea

³College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea

⁴College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

Abstract – The characteristics of decoction water are important for the extraction of herbal drugs. In this study, the relationship between the characteristics of water and extraction efficiency of bioactive compounds from *Corydalis* tuber was investigated. Six different types of decoction water, including three types of mineral water from Jeju Island and three types of bottled water sold in market, were used as decoction water for the extraction of bioactive compounds from *Corydalis* tuber. The contents of minerals in six types of water were analyzed by ICP-AES and ICP-MS; the contents of extracted bioactive compounds were analyzed by HPLC. Multivariate analysis of variance was used to analyze the differences in total extraction and bioactive compounds extracted with six types of water. Multiple factor analysis was used to analyze the relationship among the pH, content of mineral, anion, total extractions and content of bioactive components as factors. There was a significant difference among the six types of water in the total extracts and the bioactive compounds. The results proved that the content of extracted compounds from *Corydalis* tuber was influenced by the types of decoction water.

Key words – Multiple factor analysis, *Corydalis* Tuber, ANOVA, Decoction water, Alkaloid

현호색은 우리나라 전역에 자생하고 있는 들현호색 *Corydalis ternata* Nakai 또는 기타 동속근연식물(양귀비과 Papaveraceae)의 덩이줄기를 말하며 진통, 진정, 소화성 궤양작용 등에 사용되어왔다.^{1,2)} 현호색의 주요성분으로 glaucine, corydaline, corydamine, dehydrocorydaline, berberine, protopine, norglaurine, epi-coryximine, reticuline, demethylcorydalmine 등이 알려져 있다.^{3,6)} 현호색의 성분 중 corydaline, tetrahydropalmatine은 진통효과가 제일 강력한 것이어서 알칼로이드의 종류에 따라 그 진통 효과에 차이가 있지만 tetrahydropalmatine은 쥐의 뇌하수체의 ACTH 분비를 촉진시키며 아편이 갖는 진통효과의 약 100분의 1이다.^{7,8)} dehydrocorydaline은 소화성궤양의 발생을 억제하고 치유를 촉진하며, protopine은 acetylcholinesterase

의 활성을 억제하고, scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴를 개선한다.⁹⁾ 생약 또는 한약의 경우 다양한 화학적 특성으로 인해 유효성분 또는 구성성분이 추출되는 최적의 추출방법 및 용매종류는 약재마다 다르다. 똑같은 한약재라 하여도 포함된 성분 중 어떤 성분이 추출되느냐에 따라서 효능이 달라질 수 있다. 예를 들어 물로 추출하면 비극성 성분들도 일부 추출되기는 하지만 극성 성분들이 주로 추출되며, 전통적으로 탕제는 물로 추출하는 것이 일반적이다.¹⁰⁾ 약효물질은 세포안과 세포밖에 모두 위치하고 있으므로 세포안의 물질을 추출하기 위해서는 분말로 만들어 추출하는 것이 필요하고, 세포막을 파괴하기 위해서는 70%에탄올이 가장 유용하다. 한국한의약연구원에서 발표한 ‘한약자원 평가기술 구축 보고서’에서는 추출(전탕)방법 중 약탕기(가정용), 가압약탕기(업소용), 환류추출기(연구용)등 어떤 종류의

*교신저자(E-mail): kangjss@cnu.ac.kr
(Tel): +82-42-821-5928

약탕기를 사용하든지 함량에 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었고, 추출용매의 경우 물, 70% 에탄올, 메탄올, n-헥산으로 추출할 경우 함량은 확연하게 차이를 나타내었다.¹¹⁾ 허준의 「동의보감-탕액편」에는 ‘약으로 쓰는 물’이라 하여 물 이야기가 가장 먼저 기록되어 있고 정화수, 한천수 등 종류도 33종으로 나뉘어 물을 구하는 방법과 효능을 설명하여 물의 중요성을 나타내고 있다. 이것은 현대적인 시각에서 볼 때 물에 포함된 미네랄, 음이온 등이 물의 특성 결정에 중요한 역할을 한다는 것으로 볼 수 있다. 특히, 물 속에 존재하는 미네랄은 맛있고 건강한 물의 지표로도 사용되고 있다.¹²⁻¹⁴⁾

본 연구에서는 여러 가지 종류의 물을 전탕용수로 하여 현호색으로부터 생리적 활성을 갖는 물질을 추출하고 그 추출정도를 비교함으로써 물의 종류와 약효성분의 추출의 상관성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 - 현호색의 성분분석을 위해 사용된 고성능 액체크로마토그래피는 Shimadzu 20A (Japan) 시리즈로써 LC-20AD, SPD-20A, SIL-20A, CTO-20A, CBM-20A가 장착되어있고, 성분확인에는 Shimadzu사의 제품으로 SPD-10Avp detector, SIL-20A autosampler, LC-10AD pump로 구성된 LC-MS-2010-EV을 사용하였다. 사용된 컬럼은 Fortis C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)였다. 전탕용수중의 미네랄 및 음이온의 측정에는 ICP-AES (Perkin Elmer, MA, USA)와 Compact IC pro (Metrohm, Switzerland)를 사용하였다. 용매는 모두 HPLC용 시약으로 메탄올은 Burdick & Jackson (NJ, USA)을 사용하였고, TFA는 Acros Organics (NJ, USA)을 사용하였다. 3차 증류수는 Millipore사의 Milli-Q Apparatus (Bedford, MA, USA)를 사용하였다.

실험재료 - 현호색 시료는 대전광역시 중양동 한약재시장에서 구입하였으며 대전대학교 한의과대학 김동희 교수가 감정하였고, 증거시료는 대전대학교 한의과대학에 보관하였다. 실험에 사용된 물은 제주도, 경기도, 프랑스에서 생산되어 판매되고 있는 생수로 각각 S1, S2, S3, S4, S5, S6으로 표기하였다. 30 g 현호색을 500 mL의 물(S1, S2, S3, S4, S5, S6)로 환류하면서 1시간 동안 추출하여 추출한 용액을 상온으로 냉각시킨 후 여과하여 제조하여 원심분리기(Biospin, Hanil, Korea)를 이용하여 13000 rpm으로 10분 작동 후 상등액을 취하여 사용하였다. 추출액시료는 동일조건에서 현호색 시료를 10회 추출하여 S1-1~S1-10, S2-1~S2-10, S3-1~S3-10, S4-1~S4-10, S5-1~S5-10, S6-1~S6-10로 코드화하여 총 60개의 시료를 냉장보관하였다.

HPLC 및 LC-MS에 의한 성분분석 및 확인 - 현호색의 성분분석을 위해서 이동상으로 A는 0.1% TFA/H₂O, B는

메탄올을 사용하였다. gradient 프로그램은 0분 0% B; 40분 70% B와 같이 사용하였으며, 유속은 분당 1 mL, 주입량은 10 μL였으며, 검출과장은 280 nm였다. 성분 확인을 위하여 LC-MS를 이용하였고, 분무기체유속 1.5 L/min, CDL 온도 250°C, 가열블록온도 200°C, 검출기전압 1.50 kV, CDL 전압 15.0 V로 하여 HPLC-MS 분석을 시행하였다.

전탕용수 중의 미네랄 및 음이온 측정 - 미네랄은 ICP-AES로 측정하였고, RF power 1300W, cooling, 보조, 분무가스의 유속은 각각 1.5, 0.5, 0.8 L/min로 하였다. 음이온은 이온크로마토그래프(IC)로 측정하였다. 컬럼은 Metrosep A Supp (5.0 × 150 mm), 분리용매로 3.2 mM Na₂CO₃와 1.0 mM NaCO₃를 함유하는 물을 사용하였고, 유속은 0.7 mL/min, 분리온도는 30°C로 하여 분석하였다.

건조중량 및 pH 측정 - 현호색의 추출된 시료 1 mL을 에펜도르프 튜브에 넣고, 증발기에서 질소기류를 이용하여 수분을 증발시킨 후 잔류물의 무게를 측정하여 전탕용수 1 mL의 건조중량을 측정하였으며, 각각의 추출액의 pH를 측정하였다.

통계처리 - 현호색의 추출량이 전탕용수별 차이가 있는지 알아보기 위하여 프로그램 R (ver.2.12.2)을 이용하여 ANOVA 검정을 시행하였고, 다중요인분석(multiple factor analysis, MFA)은 Facto-MineR패키지의 MFA함수를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

현호색의 분석 및 성분확인 - 현호색의 추출물을 HPLC로 분석하였을 경우 대체로 6개의 주된 피크가 나타났으며 (Fig. 1), 성분은 모두 알칼로이드 계통으로 추정되었다 (Fig. 2). 각각의 피크에 대한 MS 스펙트럼과 현호색에서 관찰될 수 있는 성분의 MS 스펙트럼 및 분자량을 비교 하였을 때 positive ion mode에서 피크(1)은 분자이온에 H⁺가 부가된 m/z 342를 확인하여 norglaucine (MW: 341)으로, 피크(2)는 분자이온에 H⁺가 부가된 m/z 370을 확인하여 epi-coryximine (MW: 369)으로, 피크(3)은 분자이온에 H⁺가 부가된 m/z 354를 확인하여 protopine (MW: 353)으로, 피크(4)는 분자이온에 H⁺가 부가된 m/z 356을 확인하여 glaucine (MW: 355)으로, 피크(5)는 분자이온에 K⁺가 부가된 m/z 368을 확인하여 reticuline (MW: 329)으로, 피크(6)은 분자이온에 K⁺가 부가된 m/z 366을 확인하여 demethylcorydalmine (MW: 327)으로 추정하였다(Fig. 3).

미네랄 및 음이온 - 주요 미네랄 분석에서 분석에 이용된 용수 중 S4는 Ca과 Mg의 함량이 가장 컸으며, K의 함량은 가장 낮게 나타났다. 반면, S3는 Na, K, SiO₂의 함량이 용수 중에서 가장 높았으나 Mg의 함량은 가장 낮았다. 음이온 분석결과 S3는 F의 함량이, S5는 Cl과 NO₃의 함량이,

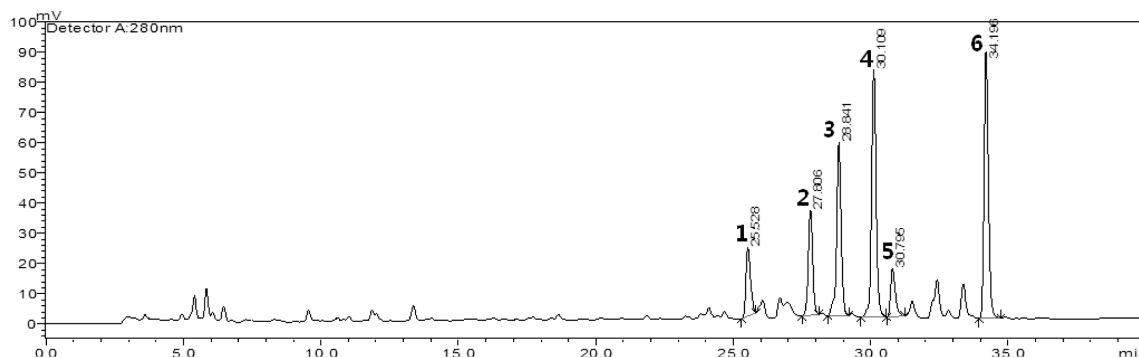


Fig. 1. HPLC chromatogram of *Corydalis* tuber extracts. Conditions: Column; Fortis C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm), eluent A. 0.1% TFA in water, B. methanol, gradient; 0min 0% B; 40min 70% B, flow rate; 1 mL/min, detection; UV 280 nm. Peak assumed as (1) norglaucine, (2) epi-coryximine, (3) protopine, (4) glaucine, (5) reticuline, (6) demethylcorydalmine.

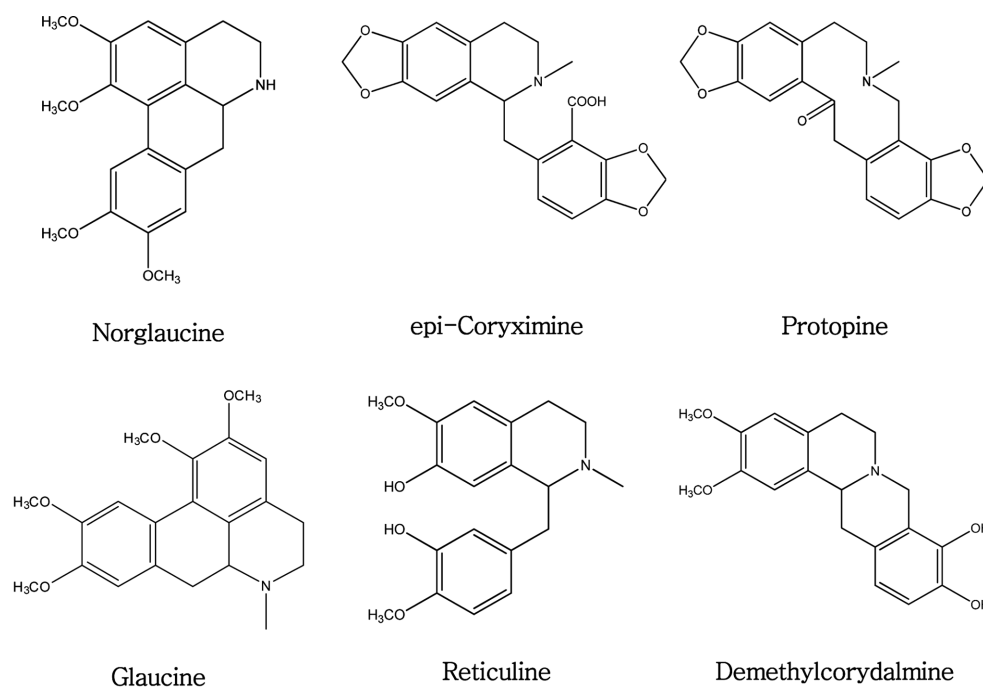


Fig. 2. Chemical structures of six components of *Corydalis* tuber.

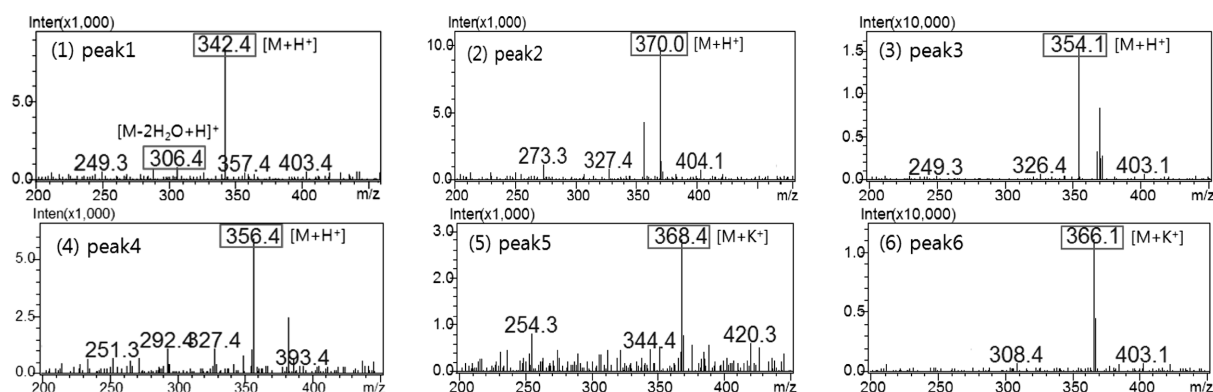


Fig. 3. Mass spectra of separated peaks. LC-MS Conditions: nebulizing gas flow; 1.5 L/min, CDL temperature; 250°C, heat block temperature; 200°C, detector voltage; 1.5 kV, CDL voltage; 15 V.

Table I. Contents of minerals and anions in six decoction waters in ppm

	Ca	K	Mg	Na	Si	S	F	Cl	NO ₃	SO ₄
S1	2.94	2.21	2.46	5.72	12.52	0.50	0.23	6.84	< 0.1	1.83
S2	2.77	4.18	3.42	10.94	12.37	0.56	0.23	5.74	1.58	1.98
S3	4.77	6.83	2.27	26.57	15.99	0.64	0.35	7.62	0.19	2.31
S4	76.70	1.03	26.19	6.28	6.66	4.72	0.16	8.46	4.15	15.06
S5	23.05	1.28	3.60	14.38	10.42	4.38	0.30	26.21	16.49	13.80
S6	12.35	2.29	2.49	6.27	4.09	3.02	0.16	13.81	11.00	9.62

Table II. Dry weight (mg/mL) and pH of extract of *Corydalis* tuber with six decoction waters

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	p-value
Dry weight	7.70±0.35	7.26±0.61	7.32±0.18	6.82±0.18	7.66±0.19	7.70±0.21	<0.01
pH	4.05±0.04	4.17±0.03	4.24±0.05	6.02±0.87	4.14±0.04	3.95±0.03	<0.01

Data expressed as mean±SD with n=5.

Table III. Area of major peaks in chromatogram of *Corydalis* tuber extracts

Peak no.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	p-value
1	178 ^c ±6	182 ^c ±8	170 ^c ±3	223 ^b ±3	262 ^a ±1	268 ^a ±2	<0.01
2	247 ^c ±8	255 ^c ±11	232 ^c ±3	315 ^b ±4	383 ^a ±2	387 ^a ±2	<0.01
3	421 ^c ±17	431 ^c ±23	384 ^c ±6	552 ^b ±9	660 ^a ±3	663 ^a ±3	<0.01
4	611 ^c ±22	632 ^c ±30	567 ^c ±8	836 ^b ±5	933 ^a ±3	941 ^a ±5	<0.01
5	18 ^c ±1	19 ^c ±1	18 ^c ±2	112 ^b ±18	215 ^a ±18	214 ^a ±19	<0.01
6	564 ^b ±22	596 ^{b,c} ±32	523 ^c ±8	929 ^a ±9	939 ^a ±5	945 ^a ±6	<0.01

^{a,b,c}: Post hoc results

Data expressed as mean±SE with n=10.

S4는 SO₄의 함량이 가장 높았다(Table I).

건조중량 및 pH - 현호색 분석시료 1 mL를 추출하여 회전감압농축기에서 증발하고 잔류물의 무게를 측정할 결과 S1과 S6가 가장 많은 건조중량을 나타내었고, S4가 가장 낮은 건조중량을 보였다. 추출 전 용수별 pH는 S1(7.56), S2(7.79), S3(7.96), S4(7.96), S5(7.44), S6(8.32)로 약염기였지만, 추출 후 용수별 pH 측정결과 모든 추출물은 약산성의 특성을 보였다(Table II).

주요피크 면적 및 ANOVA 검정 - 각각의 성분은 모두 알칼로이드 계통으로 구조가 대동소이하어 UV 흡수의 차이가 크지 않은 것으로 생각된다. 전탕용수에 따른 각성분의 추출정도는 크로마토그램에서의 피크의 크기를 상대적으로 비교하여 산출하였다. 현호색을 6종류의 전탕용수로 각각 추출한 시료를 동일한 분석방법을 이용하여 얻은 면적 값을 평균값으로 나타내었다(Table III). 전체적으로 모든 피크에서 S1, S2, S3 전탕용수보다 상대적으로 S4, S5, S6가 전탕용수에서 더 많은 면적 값을 갖는 것으로 확인되었다. 이후 통계적으로 피크별 성분의 함량에 차이가 있는지를 살펴보기 위하여 일원배치분산분석을 시행하였으며,

분석결과 P-값이 모두 유의수준 0.01 보다 작게 나타나 용수간 성분함량이 통계적으로 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다. 그리고 구체적인 성분차이를 알아보기 위하여 프로그램 R을 이용하여 ANOVA 검정을 실시한 결과 모든 성분함량은 S5와 S6가 가장 높게 나타났으며, S1~S3가 가장 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

다중요인분석 및 군집분석 - 미네랄, 음이온, 건조중량, pH 및 추출물의 분리성분함량과의 관계분석을 위하여 다중요인분석을 시도하였다. 각각의 성분들에 대하여 미네랄, 음이온, pH, 건조중량, 분리성분함량으로 5개의 군으로 하여 군 간의 관계를 살펴보았으며 두 개의 요인으로 한 2차원의 그래프를 통하여 표현하였다. 모든 추출성분은 음이온 중 Cl, NO₃, SO₄, S와 강한 상관관계를 갖고, 미네랄 중 Na, Si, K 그리고 음이온 F와 강한 음의 상관관계를 갖는 것으로 correlation circle로 표현되었다(Fig. 4a). 군집분석 결과 6종류의 전탕용수는 같은 지역에서 생산된 물인 S1, S2, S3가 A그룹으로, 나머지가 B그룹으로 분류될 수 있었고, B그룹은 다시 B1(S4)과 B2(S5, S6)의 소그룹으로 분류될 수 있는 것으로 나타났다(Fig. 4b).

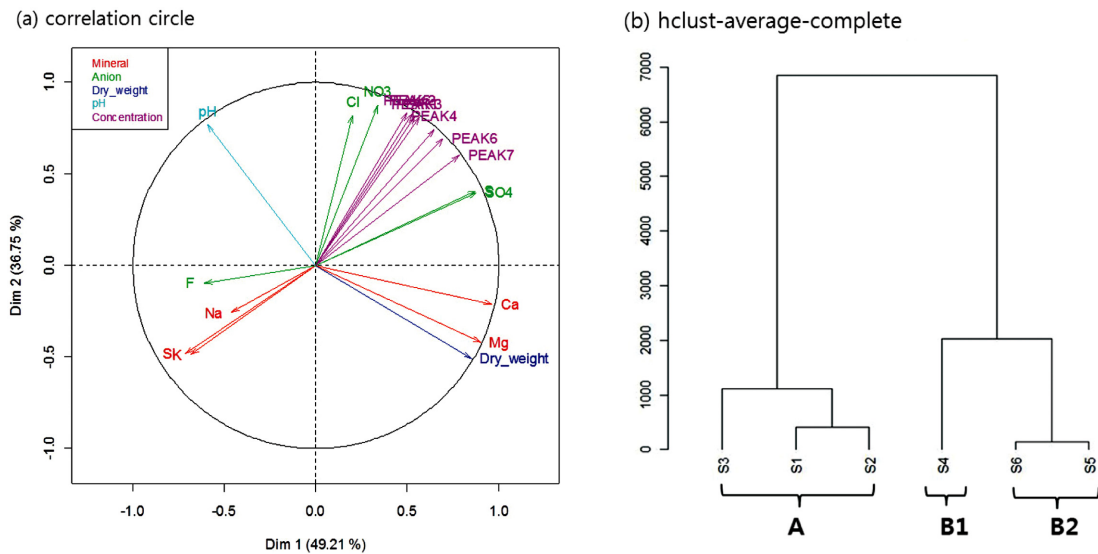


Fig. 4. (a) Correlation circle among minerals, anions, total extraction and marker compounds in multiple factor analysis and (b) dendrogram for classification of 6 types of water.

결론

이번 연구를 통해서 제주지역 암반수 및 다른 지역의 물 등 총 6종류의 물을 전탕용수로 하여 한약재 현호색을 추출한 결과 물의 특성과 추출에는 상관성이 있음을 확인할 수 있었다. ANOVA 검정 결과 현호색의 6개 성분 모두 P-값이 0.01보다 작음으로써 전탕용수별 차이를 확인할 수 있었고, 군집분석 결과 A(S1,S2,S3), B1(S4), B2(S5,S6)로 3그룹으로 나눌 수 있었다. 다중요인분석을 통하여 현호색의 6개의 성분은 모두 불소를 제외한 음이온과 강한 양의 상관관계를 가지고 있고, 미네랄 중 Na, Si, K와 강한 음의 상관관계를 갖는 것으로 나타났다. 6개의 성분은 모두 알칼로이드 계열로써 추정 확인하였고, 추출량은 pH, 건조중량과의 상관성이 낮았으며 미네랄과 음이온에 강한 상관관계를 갖는 것을 알 수 있었다. 현호색의 생리활성을 나타내는 알칼로이드 성분의 상대적인 추출정도는 B2(S5, S6)가 가장 높았고, B1(S4), A(S1, S2, S3)의 순으로 통계적인 차이를 확인할 수 있었다.

인용문헌

1. Kaneko, H. and Naruto, S. (1969) Studies on the constituents of *Corydalis* sp. alkaloids from Chinese corydalis and the identity of D-corydamine with D-corybulbine. *J. Org. Chem.* **34**: 2803-2805.
2. Fu, X. Y., Liang, W. Z. and Tu, G. T. (1986) Chemical studies on alkaloids in *Rhizoma corydalis* from Zhejiang Dongyang. *Acta Pharm. Sin.* **21**: 447-453.
3. Imaseki, I. and Taguchi, H. (1962) Alkaloids of the Chinese *Corydalis*. On the new bases corydalmine and dehydrocorydalmine. *Yakugaku Zasshi* **82**: 1214-1219.
4. Iwasa, J., Naruto S. and Ikeda N. (1966) Studies on the quaternary base of *Corydalis bulbosa* D.C. *Yakugaku Zasshi* **86**: 437-441.
5. Kaneko, H., Naruto, S. and Ikeda, N. (1967) Studies on the tertiary phenolic base of Korean. *Yakugaku Zasshi* **87**: 1382-1386.
6. Takemoto, T., Kondo, K. and Kondo, Y. (1964) Constituents of Korean *Corydalis*. *Yakugaku Zasshi* **84**: 721-724.
7. Kyoko, K., Tae, M., Akira, H., Ryo, T., Miwa, A., Teppei, S. and Fumihiko, Y. (2001) Augmentation of the pharmacological action of corydalis tuber by saussurea root in isolated mouse ileum. *Yakugaku Zasshi* **121**: 647-651.
8. Xiang, H., Wang, Z. T., Yu, G. D., Ruan, B. F. and Li, J. (2002) Alkaloids from *Rhizoma corydalis*. *J. Chin. Pharm. Univ.* **33**: 483-486.
9. Kim, S. R., Hwang, S. Y., Jang, Y. P., Park, M. J., Markelonis, G. J., Oh, T. H. and Kim, Y. C. (1999) Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities. *Planta Med.* **65**: 218-221.
10. 천연물화학 교재편찬위원회 (2003) 천연물화학, 72-73. 영림사, 서울.
11. 김호경, 추병길, 문병철, 채성욱, 윤태숙, 전명숙, 이혜원 (2007) 한약자원 평가기술 구축(III).
12. An, S. U., Kang, Y. J., Wi, H., Kim, J. M., Lee, Y. O., Park, O. H., Park, J. T. and Paik, K. J. (2009) Distribution of mineral contents in potable ground-water of Gwangju city. *J. Kor. Soc. Environ. Anal.* **12**: 185-191.
13. Kim, M. K., Sim, J. A., Eom, H. J., Kim, M. H. and Choi, M. K. (2010) Mineral contents in bottled natural water and estimation of their intake by Korean adults. *J. Kor. Diet Assoc.* **16**: 116-121.

14. You, E. H., Lee, J. K. and Kim, S. J. (1990) A study on the water quality of domestic mineral water, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **16**: 41-45.
 15. Jang, Y. S., Chu V.M., Lee, k. j., Seo, E. Y., Kim, D. H. and Kang, J. S. (2011) Effects of the decoction water on the extraction of the bioactive compounds from rhubarb, *Kor. J. Anal. Sci. Technol*, **24**: 38-44.
 16. Ko, I. S. and Kim, D. H. (1984) Investigation on trace elements distribution in hot and cold mineral spring waters in the South Korea, *Bull. K. H. Pharma. Sci.* **12**: 85-91.
 17. Nam, S. H. (1988) A study on a classification technique of natural mineral waters by its constitution and physico-chemical properties, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **14**: 33-38.
 18. Song, E. S., Kim, E. G. and Woo, N. R. Y (2006) Survey on the local residential utilization and the mineral content of mineral water in Chung Nam area. *Kor. J. Food Nutr.* **19**: 515-525.
 19. Kim, K. H., Lee, I. K., Piao, C. J., Choi, S. U., Lee, J. H., Kim, Y. S. and Lee, K. R. (2010) Benzylisoquinoline alkaloids from the tubers of *Corydalis ternata* and their cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Let.* **20**: 4487-4490.
 20. Wu, Y. R., Zhao, Y. X., Liu, Y. Q. and Zhou, J. (2007) Isoquinoline alkaloids from *Corydalis taliensis*. *J. Chem. Sci.* **62**: 1199-1202.
 21. Zhou, J., Tong, X., Lian, W. and Fang, Q. (1991) Chemical study on the alkaloids of *Corydalis hsuchowensis*. *Planta Med.* **57**: 156-158.
 22. Park, H. J., Baek, M. Y., Cho, J. G., Seo, K. H., Lee, G. Y., Moon, S. J., Ahn, E. M. and Baek, N. I. (2011) Insecticidal alkaloids on aphids from *Corydalis turtshaniinonii* tubers. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **54**: 345-352.
 23. Wu, T. S., Leu, Y. L., Kuoh, C. S. and Lee, K. H. (1997) Cytotoxic principles from *Saussurea lappa* and *Corydalis turtshaniinonii* f. *Yanhusuo*. *J. Chin. Chem. Soc.* **44**: 357-359.
- (2011. 12. 23 접수; 2012. 2. 17 심사; 2012. 2. 24 게재확정)