

한약재의 수처에 관한 연구(Ⅶ)

- 천남성의 수처방법에 의한 uracil의 함량분석 -

김진숙

한국한의학연구원

Abstract

Studies on the Processing of Herbal Medicines(VII)

Kim Jinsook

Korea Institute of Oriental Medicine

Arisaematis Rhizoma was processed by many methods from old literatures. The content of uracil was significantly decreased after preparation.

Key words: Processing, Arisaematis Rhizoma, Uracil

한약재의 수처는 한의학의 이론에 근거하여 발전된 전통 제약기술이다. 즉 한약재를 단순히 정선, 수세, 절단의 과정에서 끝내지 아니하고 火, 水, 鹽, 蜜, 黄土 등을 이용하여 독성분을 약화, 제거하거나 또는 특정성분의 변화를 통하여 원하는 효능을 지닌 약재로 변화시키는 제제기술이다. 하지만 우리나라에서는 지금까지 어떠한 체계없이 한약시장 등지에서 비위생적, 비과학적으로 나름대로 행하여지고 있어 사회적으로 문제를

일으킬 수 있는 소지가 많으며, 무엇보다도 국민건강에 적지않은 영향을 끼칠 우려가 있다.

천남성(Arisaema amurense var. serratum, Arisaematis rhizoma)은 천남성과(Araceae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라 각지에 분포하며 또한 중국의 河南, 河北, 福建, 四川 등지에서도 자란다. 가을과 겨울에 채취하여 잔가지 및 외피를 제거한 괴경을 음건하여 약재로 사용한다. 천남성의性は 溫하고 有毒하며 味는 苦辛하

다. 肺, 肝, 脾에서 작용하여 燥濕化痰, 祛風止癢, 散結消腫, 治頭廉咳嗽, 破傷風, 驚風 등의 효능을 나타내고 있다.¹⁾

Jung 등은 *A. amurense* 추출물에서 새로운 cerebroside 계통의 화합물들을 분리하고, antihepatotoxic activity가 있음을 보고하였으며²⁾, 또한 분리한 glycerol 계통의 화합물들이 P388과 DLD-1 세포에 대하여 cytotoxicity가 있음을 보고하였다³⁾. 또한 Ducki S. 등은 *A. erubescens* 추출물에서 aurantiamide acetate⁴⁾와 paeonol⁵⁾를 분리하여 보고하기도 하였다. Song 등은 *A. fargesii* 추출물에서 hepatriacontane, benzoic acid, succinic acid 등 12종의 화합물들을 분리하여 보고하였다⁶⁾. 천남성이 한약재 품질 및 유통관리규정 제 23조 별표2에 의하면 중독우려 품목에 속하고 임상에서 빈번하게 상용되는 약재임에도 성분연구 뿐만 아니라 수지연구도 많이 되어 있지 않았기에, 이 약재를 선택하여 우선 수지추출 후 현저하게 차이가 있는 성분의 변화를 보았다.

재료 및 방법

실험재료 - 서울 경동시장의 정○물산에서 영주산 천남성을 구입한 후, 약초시험장(전라북도, 전주)의 천남성(*Arisaema amurense* var. *serratum*)과 유전자 비교 분석을 하여 천남성(*Arisaema amurense* var. *serratum*)임을 확인하였고⁷⁾. 한국한의학연구원에서 보관하고 있다. 생강은 시장에서 직접 구입하였으며, 백반은 경동시장에서 수입품(중국)을 구입하였다.

기기 및 시약 - 지표물질을 분리하기 위하여 silica gel column chromatography(s.c.c)(No. 9385, Merck, Germany)와 TLC plate (Kieselgel 60 F254, Merk)를 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-10AVP System Controller, LC-10ATVP Pump, SPD-10AVP UV-VIS

Detector, SIL-10ADVP Auto Injector(Japan)를 사용하였다. 이외 FAB-Mass Spectrometer(VG70-VSEQ; England), CI-Mass Spectrometer(Jeol. Co., JMS-AX-505WA, Japan), ¹H-NMR, ¹³C-NMR Spectrometer(Bruker AM-500, 500MHz, 125MHz; Germany)을 사용하였다. HPLC용 용매는 HPLC grade(Fisher)를 사용하였다. uracil은 BDH Co.(England) 시약을 사용하였다.

지표물질의 분리 - 수지추출 후 약재의 80% 메탄올 추출물을 TLC로 비교하여 수지에 의해서 함량이 현저하게 변화된 화합물을 지표물질로 정하였고, 이 화합물은 수지과정에서 생성된 여액으로부터 분리되었다.

즉 천남성의 수지과정 중에 나오는 여액건조물을 노르말 부탄올 500ml로 추출하여 약 0.2g을 얻어 s.c.c.하였다(EtOAc : MeOH : H₂O = 60 : 1 : 1 → EtOAc : MeOH : H₂O = 3 : 1 : 1). 이 중 8번째 분획을 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 70 : 30 : 4의 조건으로 다시 s.c.c.하여 무정형의 흰색분말인 화합물(uracil)을 약 10mg을 분리하였다.

수지 방법 - 수지방법은 고전방법들을 현대에 실시할 수 있도록 개선한 중약대사전⁸⁾과 중국의 전통포제기술을 과학적으로 조명한 『中國飲片炮製述要』을 모체로 편술한 “韓方臨床을 위한 韓藥炮製와 應用”에 제시된 방법⁹⁾과 대표적인 한의학 고전인 본초강목에 기록된 방법¹⁰⁾-특히 『時珍』과 『頌』이 제시한 방법-을 택하여 수지하였다. 그리고 무작위로 한 한의원(서울시 관악구 제○한의원)을 선정하여 임상에서 실제적으로 실시하는 방법도 병행하여, 총 6가지 방법으로 실시하였다. 모든 약재들은 실험을 시작하기 전에 90℃에서 3시간동안 건조하였고 크기가 고른 약재 일정량을 정확히 평량하였다. 수지가 끝나면 일정량을 정확히 평량하여 유발에서 분쇄한 후 증류수 50ml에 용해하여 2.5시간동안 3번 반복하여 환류추출, 감압건조한 후 HPLC 분석을 하였다.

가) 중약대사전법에 의한 수치방법⁸⁾

- ① 약재를 정확하게 평량한 후 증류수 50ml를 가하고 하루에 3회 증류수(50ml)를 교환하였다.
- ② 하루가 경과하자 흰 거품이 나기 시작하였고 이를 후에는 모든 약재에서 흰 거품이 나기 시작하였다. 거품이 나기 시작할 때 백반가루를 (약재:백반=100:2)를 가한 후 4℃에서 한 달간 보관하였다.
- ③ 한 달 후 약재를 꺼내어 약재, 신선한 생강조각, 백반가루를 층층이 깔고 증류수를 약재가 잠길 정도로 가하였다(약재 : 생강조각; 백반가루=100:25:12.5). 한 달 더 4℃에서 보관한 후, 약재의 백심이 없어질 때까지 100℃에서 끓인 후 생강조각을 제거하고 바람이 잘 통하는 그늘에서 약재를 60%정도 건조한 후 2mm로 썰어서 햇볕에서 건조하였다.

나) 『韓方臨床을 위한 韓藥炮製와 應用』의 1법에 의한 수치방법⁹⁾

- ① 가) ①항과 동일.
- ② 하루가 지나자 흰 거품이 나기 시작하여 백반가루(약재:백반=100:2)를 가하고 24시간 상온에서 방치하였다.
- ③ 24시간 방치 후 증류수를 3회 교환한 후, 아린 맛이 없어져서 약재를 꺼내어 신선한 생강조각, 백반가루 순으로 층층이 쌓은 후(약재:생강조각; 백반가루=100:25:12.5) 증류수를 가하여 한 달동안 4℃에서 보관하였다. 이 기간동안 하루에 한번 씩 증류수를 교환하였다.
- ④ 한 달 후 약재를 꺼내어 증류수를 가한 후 100℃

에서 백심이 없어질 때까지 끓인 후, 생강조각을 제거하고 그늘에서 건조하였다. 내외습도가 같을 때까지 밀폐하여 보관한 후 2mm 두께로 썰은 후 햇볕에서 건조하였다.

다) 『韓方臨床을 위한 韓藥炮製와 應用』의 2법에 의한 수치방법⁹⁾

- ① 가) ①항과 동일.
- ② 나) ②항과 동일.
- ③ 24시간 방치 후 증류수를 3회 교환한 후, 아린 맛이 없어져서 약재를 꺼내어 백반가루와 증류수를 가하여 100℃에서 백심이 없어질 때까지 끓였다.
- ④ 여기에 찬 증류수를 가한 후 꺼내어 그늘에서 건조한다. 내외습도가 같을 때까지 밀폐하여 보관한 후 2mm 두께로 썰은 후, 햇볕에서 건조하였다.

라) 『本草綱目』의 時珍에 의한 수치방법¹⁰⁾

- ① 약재를 정확히 평량하여 따뜻한 증류수에 씻은 후, 백반 끓인 증류수(1L: 37.5g) 50ml를 가하고 3일간 방치하였다. 이때 날마다 백반 끓인 증류수로 3번 교환하였다.(1냥=37.5g)
- ② 3일 후 강한 햇볕에서 건조하였다.

마) 『本草綱目』의 頌에 의한 수치방법⁹⁾

- ① 정확히 평량한 약재에 증류수 50ml를 각각 가하고 5일간 상온에서 방치하였다. 이때 날마다 증류수를 3회 교환하였다.
- ② 3일 후 강한 햇볕에서 건조하였다.

바) 임상에서 사용되는 수치방법

- ① 증류수에 백반(1L: 37.5g)을 녹인 후 약재를 1일 간 담가 두었다.(1냥=37.5g)
- ② 1일 후 약재를 햇볕에서 건조하였다.

HPLC 분석조건 - column: Shimazu VP-ops(250×4.6 mm, 5 μ m) , detector: UV 277nm, mobile phase: 30% acetonitril in H₂O flow rate: 1.0 ml/min..

표준검량선의 작성 - uracil(BDH Co. England) 10mg 을 정밀하게 달아 증류수 100 ml에 용해하여 100 μ g/ml 의 stock solution을 만들고, 이로부터 1, 5, 10 μ g/ml 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 μ 씩 취하여 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 면적을 구한 후 이들 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다(Fig. 1). 이때 회귀방정식은 $y=232.58x+3.2295$ ($r^2=0.9999$)이었다.

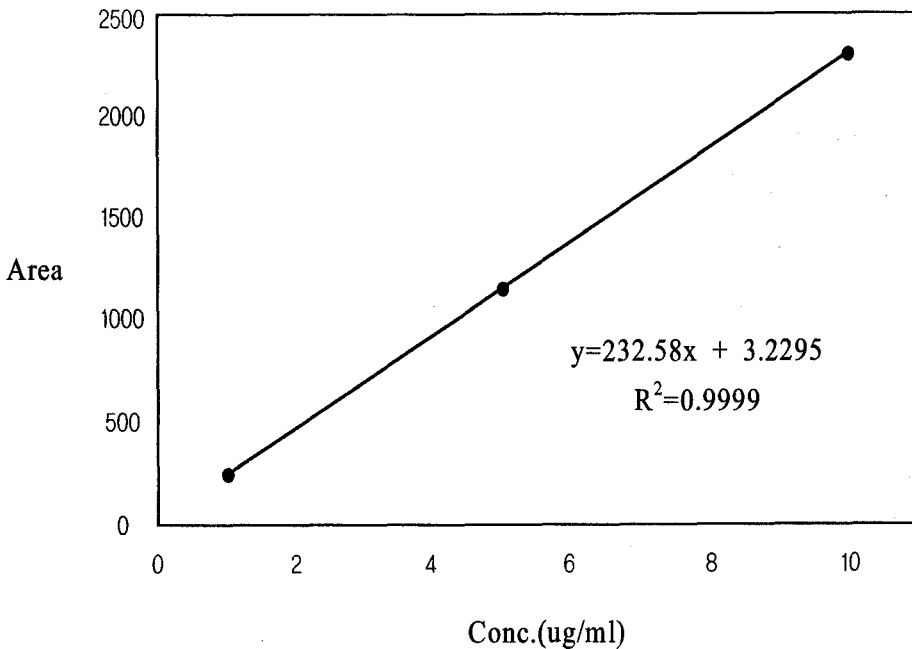


Figure 1. Calibration curve of Uracil.

검액의 조제 - 수치한약재 환류추출물의 일정량을 정확히 평량하여 증류수에 용해하고 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 분석하였다. 실험의 정확도를 위하여 각각 4~5개의 시료를 준비하였고, HPLC에 2번씩 주입하였다.

결과 및 고찰

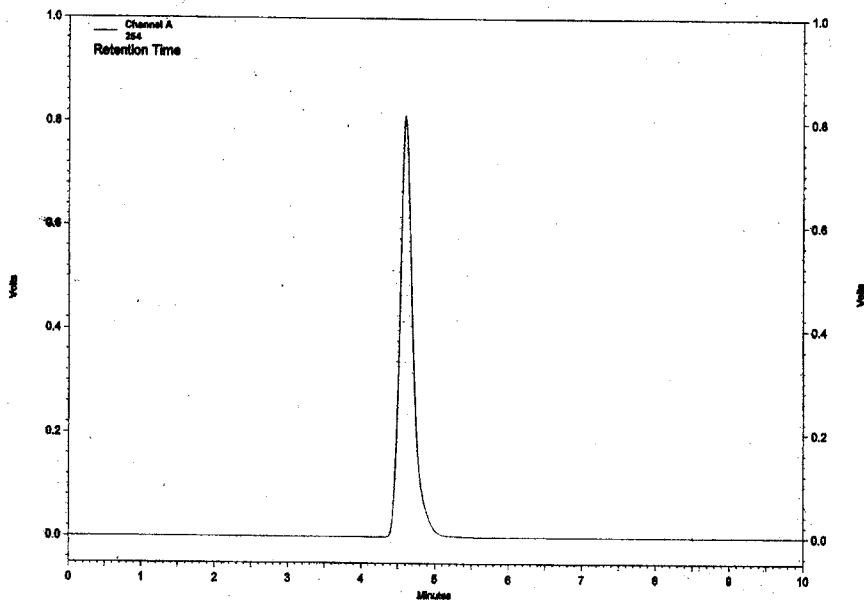
지표물질(uracil)의 구조확인 - 수치로 인하여 그 함량이 현저하게 변화되는 화합물을 분리하여 NMR, MS 등의 data를 종합분석한 결과 uracil의 data와 일치하였고¹¹⁾, TLC로도 확인되었다.

흰색의 무정형 분말(MeOH); ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆): 7.36(1H, d, J=7.6 Hz, CH), 4.35(1H, d, J=7.6 Hz, CH); ¹³C-NMR(125 MHz, DMSO-d₆), 164.4, 151.5, 142.2, 100.2; CI-MS: m/z 113 [M+1]⁺

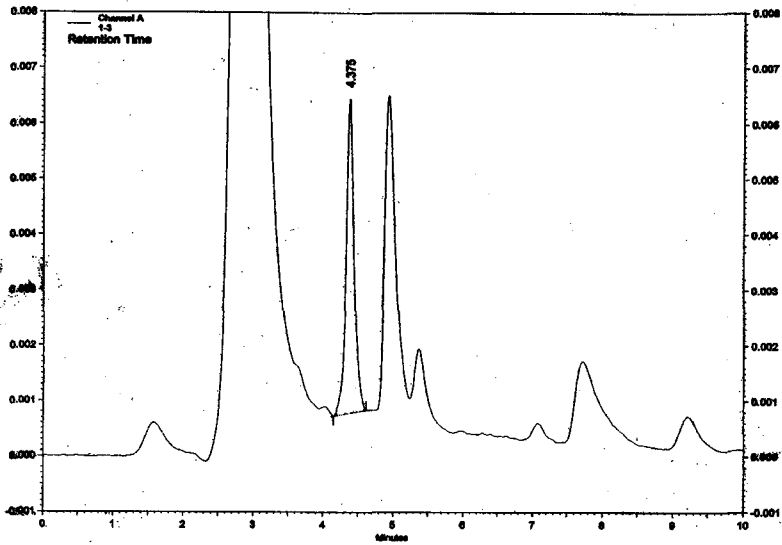
수치한약재들의 uracil 함량분석 - 위에서 서술한 조건에서 표준용액을 분석한 결과 비교적 양호한 직산상의 회귀방정식을 얻었으며($y=232.58x+3.2295$, $r^2=0.9999$), uracil은 4.4분에서 나타났고 수치 전 약재의 HPLC chromatogram은 Figure 2와 같다. 또한 spike test를 통하여 이 피크가 uracil임을 확인하였다. 수치 전후의 검체들을 HPLC 분석하여 얻은 chromatogram으로부터 uracil의 면적을 구한 후 상기 방정식으로부터 그 함량을 분석하였다. 수치하기 전의 천남성 중의 uracil의 함량은 3.64 ± 2.50 (mean±S.D.) ppm이고, 각각의 수

치 방법에 따라 수치한 천남성 중의 uracil의 함량은 각각 1.64 ± 0.36 , 0.26 ± 0.21 , 0.63 ± 0.26 , 0.26 ± 0.20 , 0.47 ± 0.20 , 0.81 ± 0.19 ppm으로 감소되었음을 알 수 있었다(Figure 3). 따라서 수치하기 전 천남성 중의 uracil의 함량을 100%로 하였을 때, 수치한 후의 각 천남성 중의 uracil의 상대적인 함량은 45.0%, 7.1%, 17.4%, 7.1%, 12.8%, 22.2%로 변화되었다.

약재들을 증류수에 침전시킬 때, 흰 거품이 발생하는 것은 발효현상에 의한 것이며⁹⁾ uracil의 함량은 한달동안 증류수를 교환한 방법(na)과 따뜻한 증류수에 씻은 후 백반 끓인 증류수를 가한 것(ra)들이 가장 소실이 많았다. 이는 uracil이 수용성인 것에 기인함을 알 수 있었다.

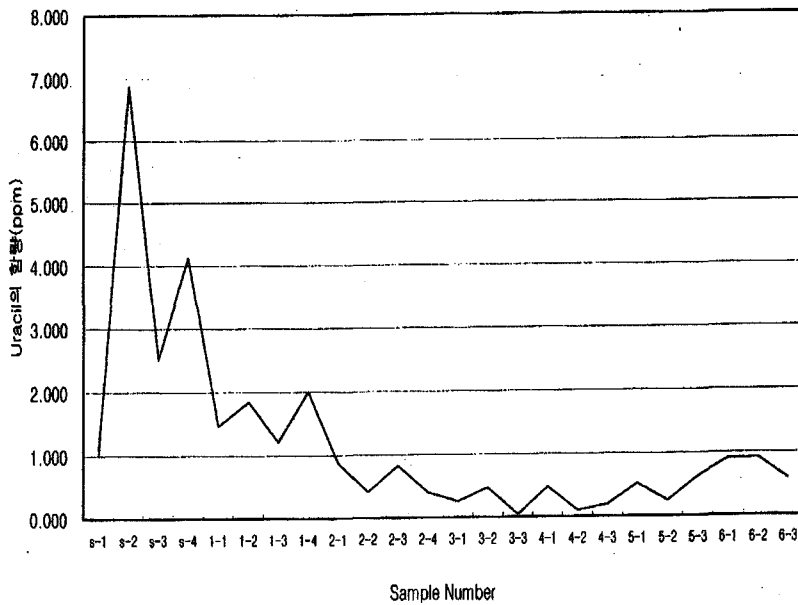


(1)



(2)

Figure 2. HPLC Chromatograms of uracil(1) and Arisaematis rhizoma extract(2)



S-1~4: unprocessed drugs; 1-1~4: drugs due to processing 1; 2-1~3: processing 2; 3-1~3: processing 3; 4-1~3: processing 4; 5-1~3: processing 5; 6-1~3: processing 6

Figure 3. Content(ppm) of uracil according to processing methods

사사

한국한의학연구원 기관고유사업에 의해서 수행되었
으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 이상인(1991), 『본초학』, 451-452, 의약사, 서울.
2. Jung JH, Lee CO, Kim YC, Kang SS(1996) 『New bioactive from *Arisaema amureuse*』, J. Nat. Prod, 59:3, 319-22, Mar.
3. Jung JH, Lee H, Kang SS(1996) 『Diacylglycerylgalactoside from *Arisaema amureuse*』, Phytochemistry, 42:2, 447~52, May.
4. Ducki, S., Hadfield, J.A., Lawrence, N.J., Zhang, X., and McGown, A.T.(1996) 『Isolation of Aurantiamide Acetate from *Arisaema erubescens*』, Planata medica, 62: 277~278.
5. Ducki, S., Hadfield, J.A., Lawrence, N.J., Zhang, X., and McGown, A.T.(1995) 『Isolation of Paenol from *Arisaema erubescens*』, Planata medica, 61: 586~587.
6. Song ZZ, Jia IJ.(1989) 『Studies on the chemical constituents of *Arisaema fargesii* Buchett』, China Journal of chinese Materia medica, 14:8, 482-2, 511, Aug.
7. 이미영(2000), 한약재(천남성, 초오, 반하) 『수치에 관한 연구』, 1-32, 한국한의학연구원 연구보고서, 서울.
8. 『신편 중약대사전(1971)』 5277~5282, 신문출판공사, 북경.
9. 이정원, 강병수(1990) 『韓方臨床을 위한 韓藥炮製와 應用』, 199~202, 영림사, 서울.
10. 이시진(1982) 『本草綱目』 草部 제 17권, 980, 인민위생출판사, 북경.
11. Charles J. Pouchert, Jacquelyn Behnke, 『The Aldrich Library of 13C and 1H FT NMR spectra』, vol. 3, 365a, Aldrich chemical company Inc., Heidelberg.

Table 1. The used materials of Magnolia species in this experiment

Species	Locality	Date of Collection
<i>Magnolia officinalis</i> Rehder et Wilson	China	2000. 7
<i>Magnolia obovata</i> Thunberg	Jeonju, Korea	1999.10
<i>Machilus thunburgii</i> S. et Z.	Jeonju, Korea	2000. 5

2) 내부형태 특성조사

시료 조직을 5mm × 5mm 크기로 부위별로 자른후, FAA 용액 (Formalin 5mL, Glacial acetic acid 5mL, 50% Ethyl alcohol 90mL)에 24시간 이상 고정시켰고, 고정액의 침투를 촉진하기 위해 진공펌프를 이용하여 조직내부의 기포가 조직액 상면에 나타나는 상태까지 탈기시켰다. 탈수는 Lang's butanol series의 2단계에서 부터 진행시켰으며 각 단계에서 탈수시간은 8시간으로 하였으며, 8단계가 끝난 후 다시 100% butanol로 2번 탈수하였다. Butanol과 soft paraffin(1 : 1)을 재료가 담겨있는 용기에 넣고 incubator에서 58~60℃를 유지하면서 butanol을 5일동안 완전히 기화시켰다. 여기에 동량의 hard paraffin을 넣어 incubator에서 60~70℃로 1~3일 동안 유지시켰다. 규정의 cake case에 넣어 포매(embedding)시킨 다음 1~2일 실온에 방치하였다. 칼날각도를 5도로 하고 두께를 5~10 μ m로 하여 절단한 후 albumin을 도포한 slide glass에 검체를 올려 놓고, slide warmer에서 1~2일동안 overnight하였다. Heidenhain's hematoxylin, safranin 및 light green을 사용하여 삼원염색을 하고, Canada balsam으로 봉입하고 건조기에서 24시간 동안 건조한 후, 광학현미경하에서 조직의 특성을 관찰 및 측정하고 사진을 촬영하였다.

DNA 분리 - 생체 앞에서 Doyle와 Doyle¹⁸⁾방법을

응용하여 DNA를 추출하였다. 소량의 시료를 막자사발에 넣고 미세분말상태로 마쇄한 후, 분말 시료를 700 μ l의 CTAB 완충용액 [50mM Tris-HCl (pH8.0), 0.7M NaCl, 50mM EDTA (pH8.0), 140mM β -mercaptoethanol]와 혼합한 다음 60℃ 항온기에서 1시간 처리한 후, phenol과 chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 첨가하여 실온에서 3,500 \times g로 원심분리하였다. 상층액과 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)를 첨가하여 완전히 섞이도록 흔들어준 다음 3,500 \times g로 원심분리하여 상층액을 취하여 냉동고에 보관중인 isopropanol을 넣고 -20℃에서 30분간 정치시켜 DNA를 침전시켰다. 침전시킨 DNA를 3,500 \times g에서 원심분리 하여 얻은 게놈 DNA를 70% EtOH로 세척하여 진공 혹은 자연 건조시켰다. 건조시킨 DNA를 100 μ l TE 완충용액 [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA]에 용해하여 1mg/ml의 RNase를 첨가하고 37℃ 항온기에서 30분간 처리한 ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Tech. USA)로 DNA 순도검정 및 정량을 실시하였다.

RAPD 분석 - PCR 반응용액은 멸균 증류수에 10 \times 완충용액 (750mM Tris-HCl, pH8.8, 200mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20), 200 μ M dNTP, 1.5mM MgCl₂, 300nM primer (UBC, Canada), 1 U DNA polymerase, 50ng DNA를 혼합 조성하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 2400 (PerkinElmer, USA)을 이용하여 9