

HPLC-PDA를 이용한 반하, 호장남성, 수반하의 분류 및 함량분석

조지은[#], 이아영, 김효선, 문병철, 최고야, 지윤의, 김호경^{*}

한국한의학연구원 한약자원그룹

Content Comparative Analysis and Classification for *Piniellia ternate*, *P. pedatisecta* and *Typhonium flagelliforme* by HPLC-PDA analysis

Ji Eun Jo[#], A Yeong Lee, Hyo Seon Kim, Byeong Cheol Moon,
Choi Goya, Yunui Ji, Ho Kyoung Kim^{*}

Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Yuseong-daero 1672,
Yuseong-gu Daejeon, 305-811, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : A quantitative method using high performance liquid chromatography with a photodiode array detector(HPLC-PDA) was established for the quantitative analysis of the four main compound and pattern analysis to classification *Piniellia ternate*, *P. pedatisecta* and *Typhonium flagelliforme*.

Methods : The analytical procedure for the determination of *P. ternata*, together with the known main compounds uracil, uridine, guanosine and adenosine was established. Optimum HPLC-PDA separation of these *P. ternata* was possible on Luna C18(2) column material, using water and acetonitrile as mobile phase. The method was validated according to regulatory guidelines. In addition, this assay method were analyzed for the content of four main compound in *P. ternata*, *P. pedatisecta* and *T. flagelliforme* and by data obtained from the HPLC-PDA analysis was performed principal component analysis(PCA).

Results : Validation results indicated that the HPLC method is well suited for the determination of the roots of *P. ternata* with a good linearity ($r^2 > 0.999$), precision and recovery rates. Analysis of HPLC-PDA, the average content of uracil, uridine, guanosine and adenosine was significantly higher in *P. ternate* > *P. pedatisecta* > *T. flagelliforme* order. The application of PCA to main compound data by HPLC-PDA permitted the effective discrimination among the three species.

Conclusions : Analysis of both HPLC-PDA and PCA confirmed the fact that four main compound and pattern profiles of *P. ternata*, *P. pedatisecta* and *T. flagelliforme* were different from each other.

Key words : *Piniellia ternata*, *P. pedatisecta*, *Typhonium flagelliforme*, HPLC-PDA

서론

오랫동안 사람들은 자연에 있는 천연물자원을 이용하여 각 외상이나 질병을 치료해 왔다. 최근에는 21세기 인류가 추구하는 “건강과 삶의 질”이라는 명제를 서구의학만으로는 당장 해결할 수 없다는 문제가 대두되면서 세계적으로 보완-대체의학 치료법에 관심이 제고 되었고, 방대한 고전의약학

문헌과 서적이 체계적인 치료법을 뒷받침 하면서 이를 바탕으로 한 연구 열기가 확산되기 시작되었다¹⁾. 특히 우리나라는 수많은 우리 특유의 생약이 옛날 그대로 전래되어 현재까지 많이 이용되고 있다²⁾.

半夏는 오랫동안 동양에서 구토약, 진정약, 가래삭힘 약으로써 위하수, 임신구토, 기침, 어지러움증, 두통, 급성위염, 인후통 등의 치료에 전통적으로 사용되어온 약재이다³⁻⁷⁾. 약

*교신저자 : 김호경, 대전 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약자원그룹
· Tel : 042-868-9502 · Fax : 042-869-9434 · E-mail : hkkim@kiom.re.kr
#제1저자 : 조지은, 대전 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약자원그룹
· Tel : 042-868-9611 · E-mail : je8556@kiom.re.kr
· 접수 : 2013년 8월 15일 · 수정 : 2013년 9월 13일 · 채택 : 2013년 9월 22일

리학적으로는 자궁정부암⁸⁾, 항경련⁹⁾, 항궤양¹⁰⁾, 구토 및 진정 작용^{11,12)}에 관한 보고가 있으며, 성분은 정유와 소량의 지방, 전분, nicotine, 점액질, asparagine acid, glutamine, β -amino acid 등의 amino acid 과 uridine, β -sitosterol, choline, uracil, guanosine, adenosine 등이 함유하는 약재로¹³⁻¹⁵⁾ 半夏를 포함한 처방들에 관해서도 여러 연구가 보고되었다^{16,17)}.

半夏(Pinellia Tuber)는 대한민국약전, 대한민국약전외한약(생약)규격집에서 법으로 고시하고 있는 547종 한약재 중, 독성이나 부작용의 원인으로 식품으로 제한하고 있는 162품목 중 하나이다. 반하(*Pinellia ternata* Breitenbach)의 덩이줄기로서 주피를 완전히 제거한 것으로 그 기원을 규정하고 있고, 독성 및 부작용 완화를 위하여 수치 등의 가공법을 거쳐 임상에서 사용 되어 왔다. 그럼에도 고용량에서 사용시 부작용에 대한 우려가 있다^{8,19)}.

半夏는 현재 우리나라에서 다빈도로 사용되는 약재 중 하나로, 중국에서 대량 생산되어 수입·유통되고 있는 실정인데, 시장에서는 실제로 호장남성, 산주남성, 독각련, 수반하 등이 혼입되어 유통되기도 하는 것으로 알려져 있다. 특히,半夏의 주요 포제품인 法半夏는, 그 기원식물이 반하가 아닌 경우가 많아 위품으로 인한 피해 우려가 상존하고 있다^{20,21)}. 반하와 혼용되어 사용되는 위품들은 뿌리의 형태학적 유사함으로 인해 감별이 상당히 어려우며 채집, 유통 및 포제 과정 중 위품과 혼용될 가능성이 높다. 더욱이, 절편 또는 분말 상태일 경우 육안 감별이 곤란하기 때문에 반하의 혼·오용 방지를 위한 반하와 위품들간의 감별법이 절실히 요구되고 있으나半夏에 대한 보다 정확한 기원식물의 사용을 위해 다른 위품들과 구분할 수 있는 감별법에 대한 연구가 부족한 실정이다.

현재半夏의 감별은 유전자 감별법^{22,23)}과 외부형태학적 분류법 및 현미경을 이용한 내부 형태 감별법에 대한 연구가 보고되어 있다^{24,25)}. 그러나半夏의 이화학 분석을 통한 비교 논문은 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 HPLC-PDA를 이용하여 반하의 감별에 적합한 이화학 분석법을 확립하였고, 기원종인 반하와 혼·오용 되기 쉬운 약재로 호장남성(*P. pedatisecta* Schott)과 수반하(*Typhonium flagelliforme* (Loddiges) Blue)를 확립된 HPLC-PDA 분석법을 통하여 비교 분석하였다. 또한, 기원식물의 종별 요인에 의한 uracine, uridine, guanosine, adenosine의 성분함량을 알아보기 위해 수집한 3종에 대한 개체별 분석을 수행하였고, 수집된 개체별 데이터를 활용하여 통계분석을 통한 PCA 분석을 하였다. 본 실험을 통하여 반하가 다른 위품과 혼·오용될 수 있는 가능성으로부터 더 정확한 기원종을 구별할 수 있게 되었다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험약재

반하는 제주도에서 총 14점이 채집되었고, 전문가의 감별을 통해 KP의 기원 적합성을 확인하였다. 시료는 지상부와 수염뿌리를 제거한 후, 흐르는 물에 씻어 거피하였고, 통풍이

잘 되는 그늘진 곳에 자연 건조하여 성분 변성을 최소화 하였다. 호장남성과 수반하는 중국산 유통품을 구입하여 사용하였고, 총 시료수는 각각 15점으로 하였으며, 유통품 반하는 6점을 구입하여 사용하였다. 수집된 기원식물은 표본으로 제작하여 한국한의학연구원 한약 표준표본관에 보관 중이다 (Table 1).

Table 1. Sample list for raw herbal materials used in this study

Herbal medicine	Scientific name	Origin	Designation No.
반하 (半夏)	<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach	Korea(Jeju)	P.T01-P.T14
호장남성 (虎掌南星)	<i>P. pedatisecta</i> Schott	China	P.P01-P.P15
수반하 (水半夏)	<i>Typhonium flagelliforme</i> (Loddiges) Blue (= <i>Arum flagelliforme</i>)	China	T.T01-T.T15

2) 시약 및 기기

추출 및 UPLC에 사용한 methanol과 물은 HPLC grade (J.T.Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA)을 구입하여 0.2 μ m membrane filter(PALL Corporation, Ann Arbor, MI, USA)로 여과하여 사용하였고, 반하류의 지표성분인 uracil ($\geq 99.0\%$, USA), uridine($\geq 99.0\%$, USA), guanosine($\geq 99.0\%$, USA), adenosine($\geq 99.0\%$, USA)은 모두 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. 시료 추출을 위해 초음파 추출기 (8510E-DTH, Bransonic ultrasonic, Danbury, CT, USA)를 사용하였다.

2. 방법

1) 분석시료 제조 및 표준품 제조

건조된 시료는 곱게 분쇄하여 채에 사별한 것을 2.0 g씩 정확히 무게를 달아 삼각플라스크에 옮겨 담았다. 시료를 담은 삼각플라스크에 80% 메탄올 25 ml씩 넣어 잘 흔들어 준 후, 50℃의 수욕상에서 1시간 동안 초음파 추출을 하였다. 추출한 시료는 30분 방치하여 침전 시킨 뒤 맑은 추출용액을 걸러내고, 잔류물에 80% 메탄올 25 ml을 넣어 동일하게 반복한다. 여과물은 농축기로 증발·건조한 뒤, 다시 30% 메탄올 3 ml에 녹였다. 녹인 분석 시료는 주입하기 전에 2.0 ml를 취하여 0.22 μ m membrane filter에 여과하여 사용하였다.

HPLC 분석조건이 각 성분의 농도에 대하여 유의성이 있는지 확인하기 위해 uracil(1, 10, 50, 100, 500 μ g/ml), uridine(10, 50, 100, 500, 1000 μ g/ml), guanosin(5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml), adenosine(5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml) 표준품에 대해 5가지 농도를 단계적으로 희석하여 직선성과 범위를 검토하였다.

2) HPLC 분석 조건

분석에 사용한 HPLC system (Waters Corporation, Manchester, UK)은 2695 separation module, 2996 photodiode array detector로 구성된 장비를 사용하였다. 분석용 컬럼은 분리능이 가장 우수한 phenomenex Luna C₁₈(2)(250 \times 4.6mm, 5 μ m)를 선정하여 사용하였고, 컬럼 온도는 실온으로 하였다. 이동상으로 solvent A는 물, solvent B는 아세트나이트릴을 선정하였고, 시간에 따른 용

매의 조성은 다음과 같이 기울기 용리법으로 용출하였다. 0-2 min, 0% B; 2-35 min, 5% B; 35-55 min, 20% B; 55-65 min, 100% B로 설계하여 전개하였고, 모든 시료에 대한 분석시간은 총 65 분이었다. 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 10 μ l로 설정하였다. 분석파장은 190-400 nm으로 스캔한 후, 각 성분의 UV spectra를 참고하여 측정하였다. Uracil, uridine, guanosine, adenosine에 대한 최대 UV흡수 파장 값을 각각 257, 260, 251, 258 nm로 설정하여 피크의 면적을 측정하였고, 이들 화학구조는 Fig.1에 나타내었다. 이 분석조건을 이용하여 반하, 호장남성, 수반하의 패턴 분석과 각 개체 별 함량분석을 수행하였다.

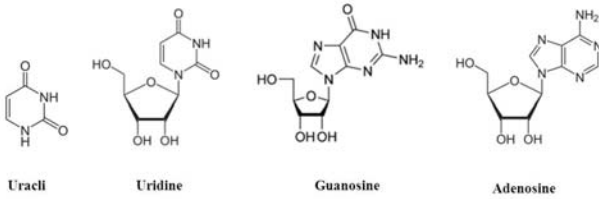


Fig. 1. Chemical structure of standard

3) 분석법 검증(validation)

반하류에 함유된 uracil, uridine, guanosine 및 adenosine 분석을 위한 최적 HPLC 분석조건 validation은 International Conference on Harmonisation (ICH)의 지침에 따라 수행하였다²⁶⁾. 각 성분의 농도에 대한 유의성이 있는지 확인하기 위해 각 성분의 5가지 농도를 단계적으로 희석하여 직선성(linearity)과 범위를 검토하였다. 또한 분석물의 각 성분에 대한 검출 및 정량이 가능한 최저 농도를 확인하기 위한 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)는 $3.3 \times \sigma/s$, $10 \times \sigma/s$ (σ : SD, s: 기울기)로 기준을 구하였다. 동일한 분석물에 대한 실험환경에 따른 변화의 결과를 확인하기 위해 측정된 정밀성(precision)과 정확성(accuracy)은 성분들을 methanol에 단계적으로 희석하여 각각 3가지 농도(10, 50, 100 μ g/ml)로 준비하였다. Intra-day test는 하루 동안 3회 반복 측정된 결과의 상대표준편차(RSD)를 구하여 평가하였고, inter-day test는 3일 동안 하루에 3회씩 반복 측정된 결과의 상대표준편차(RSD)를 측정하여 평가하였으며, 성분의 회수율 시험(recovery)은 표준물 첨가법에 의하여 수행하였다. 이는 반하 샘플(P.T12) 추출물에 methanol로 단계적인 희석을 통한 농도(uracil : 10, 50, 500 μ g/ml, uridine : 100, 500, 1000 μ g/ml, guanosine : 50, 250, 500 μ g/ml, adenosine : 10, 50, 100 μ g/ml)의 표준물질을 첨가하여 각 3회 반복 분석한 후 상대표준편차(RSD)를 측정하여 확인하였다.

4) 통계처리에 대한 다변량 분석

기원별, 종별 분류를 위한 통계분석은 Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA) software의 PCA(principle component analysis)를 사용하였다. 모든 통계분석은 HPLC-PDA를 사용하여 반하, 호장남성, 수반하 개체에 대한 uracil, uridine, guanosine 및 adenosine 피크 면적비를 측정하여 정량 분석한 데이터를 사용하였다.

결 과

1. HPLC의 분석법 검증(validation)

HPLC-PDA 분석에서 반하의 분석 조건을 최적화 하기 위해 여러 가지 이동상과 컬럼을 사용하였고, 최적의 조건을 설정하였다. 이동상은 아세트나이트릴과 물을 사용하여 gradient elution에서 65분 이내에 4개의 성분을 동시 측정하기 위해 선택되었다. 선정된 분석법의 검증을 위해 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성 및 회수율 시험을 하였다. Uracil, uridine, guanosine, adenosine의 직선성 농도 범위는 성분 모두 1-1000 μ g/ml 였고, 물질농도에 대한 r^2 를 확인한 결과 모두 0.999 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. 분석대상물질의 검출이 가능한 최저 농도인 검출한계(LOD)는 각 0.313, 0.125, 0.231, 0.101 μ g/mL이고, 분석대상물질의 정량이 가능한 최저 농도인 정량한계(LOQ)는 각 0.948, 0.388, 0.694, 0.309 μ g/ml로 확인되었다(Table 2).

Table 2. Regression equation, limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) of uracil, uridine, guanosine and adenosine (n=3)

Standard	Regression equation	Correlation coefficient (r^2)	LOD (μ g/mL)	LOQ (μ g/mL)
Uracil	$y = 36227.0149x + 5221.8238$	0.9999	0.31	0.94
Uridine	$y = 23724.5755x + 39107.1474$	0.9999	0.12	0.38
Guanosine	$y = 25663.9901x + 10181.1187$	0.9999	0.23	0.69
Adenosine	$y = 31953.7508x + 23993.3454$	0.9999	0.10	0.30

분석법의 정밀성 평가에서는 intra-day가 각 0.034-0.296, 0.227-0.381, 0.258-0.712, 0.102-0.370%의 상대표준편차(RSD)를 나타내었고, inter-day는 각 0.251-0.814, 0.293-0.972, 0.598-0.879, 0.531-0.736%의 상대표준편차(RSD)를 나타내었다 (Table 3).

Table 3. Intra-day and Inter-day variation of uracil, uridine, guanosine and adenosine

Standard	Concentration (μ g/mL)	Intra-day (n=3)		Inter-day (n=3)	
		RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)
Uracil	10	0.05	101.07	0.59	101.23
	50	0.03	100.25	0.25	101.30
	100	0.29	101.35	0.81	100.99
Uridine	10	0.22	99.45	0.97	99.78
	50	0.38	99.93	0.45	100.13
	100	0.38	100.34	0.29	100.39
Guanosine	10	0.25	100.45	0.59	100.30
	50	0.71	100.85	0.75	100.41
	100	0.26	100.87	0.87	100.57
Adenosine	10	0.10	99.06	0.53	100.69
	50	0.24	101.68	0.73	101.54
	100	0.37	100.83	0.53	101.44

회수율 시험은 각 3개 농도를 첨가한 검액과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검액을 분석하여 각 99.341-100.172, 100.076-100.223, 99-968-100.541, 99.724-100.458%의 회수율을 나타내었다 (Table 4).

Table 4. Recoveries of uracil, uridine, guanosine and adenosine for the validation of analytical methods (n=3)

Standard	Fortification level (µg/mL)	Recovery (%)	Relative standard deviation
Uracil	4.97	99.34	0.43
	25.60	100.17	0.56
	250.46	99.79	0.14
Uridine	49.35	100.07	0.62
	249.42	100.42	0.43
	500.49	100.22	0.12
Guanosine	24.84	99.96	0.57
	125.42	100.41	0.34
	249.67	100.54	0.20
Adenosine	4.92	99.89	0.10
	24.67	100.45	0.43
	49.40	99.72	0.56

2. HPLC-PDA를 이용한 패턴분석과 성분 확인

확립된 HPLC-PDA 분석법에 의하여 분석한 국내 자생종 반하(*P. ternata*), 유통품인 호장남성(*P. pedatisecta*)과 수반하(*T. flagelliforme*)의 chromatogram에서 uracil, uridine, guanosine, adenosine이 공통적으로 검출되었다. Retention time 6, 15, 27, 40분대에서 각각 확인 되었으며, 이는 UV spectra와 표준품의 비교에 의해 확인되었다. HPLC-PDA 패턴분석에서 3종을 비교하기 위한 그 외 다른 피크들은 UV spectra에 의해 확인되었다. 그 결과 반하와 호장남성은 비교적 유사한 패턴을 나타내었지만 12-16, 45-65분대에 다르게 나타났다. 수반하는 전체적으로 피크 면적이 낮고, 반하와 비교하였을 때 상대적으로 다른 패턴을 나타내었다 (Fig. 2).

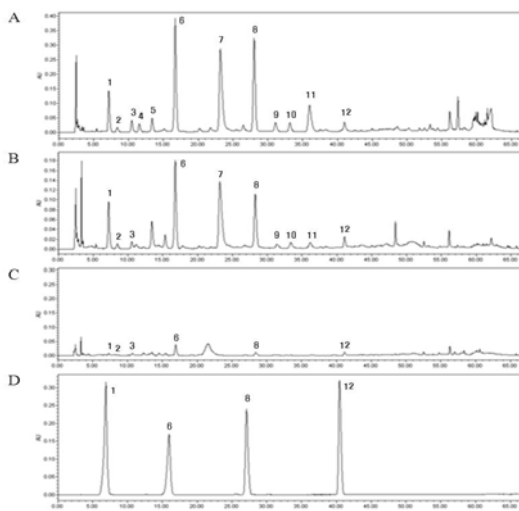


Fig. 2. HPLC-PDA chromatogram of *Pinellia ternata*(A), *P. pedatisecta*(B), *Typhonium flagelliforme*(C) and STD(D) : uracil(1), uridine(6), guanosine(8), adenosine(12)

3. HPLC를 이용한 함량 비교 분석

패턴분석을 통해 uracil, uridine, guanosine, adenosine 성분이 수집한 국내 자생종 반하와 중국 유통품인 호장남성과 수반하의 모든 시료에서 확인할 수 있었다. 이에 본 실험에서

동시에 확인된 4개 성분의 함량을 HPLC-PDA 분석조건에서 함량 분석을 하였다 (Table 5).

Table 5. Concentration (mg/g) of uracil, uridine, guanosine and adenosine in *Pinellia ternata*, *P. pedatisecta* and *Typhonium flagelliforme*

Sample NO.	Concentration (mg/g)			
	uracil	uridine	guanosine	adenosine
P,T1-01	0.042(±1.185)	0.380(±0.143)	0.313(±0.543)	0.122(±1.422)
P,T1-02	0.079(±1.735)	0.590(±0.608)	0.497(±1.070)	0.070(±1.630)
P,T1-03	0.050(±1.547)	0.525(±1.198)	0.485(±1.893)	0.100(±1.321)
P,T1-04	0.055(±0.775)	0.456(±0.837)	0.395(±0.708)	0.101(±1.508)
P,T1-05	0.082(±0.325)	0.828(±1.914)	0.431(±1.131)	0.066(±0.763)
P,T1-06	0.084(±0.850)	0.661(±1.160)	0.585(±0.922)	0.077(±0.632)
P,T1-07	0.081(±0.983)	0.672(±1.854)	0.430(±0.527)	0.050(±0.175)
P,T1-08	0.070(±0.187)	0.835(±0.887)	0.579(±0.355)	0.073(±1.638)
P,T1-09	0.074(±0.556)	0.588(±0.324)	0.419(±0.289)	0.065(±0.197)
P,T1-10	0.067(±0.187)	0.583(±0.683)	0.441(±1.728)	0.075(±1.692)
P,T1-11	0.058(±0.664)	0.381(±1.175)	0.301(±1.763)	0.069(±0.661)
P,T1-12	0.064(±1.709)	0.404(±0.088)	0.331(±1.428)	0.061(±1.996)
P,T1-13	0.094(±0.781)	0.530(±0.918)	0.426(±1.583)	0.023(±1.405)
P,T1-14	0.052(±0.369)	0.348(±0.905)	0.283(±0.694)	0.038(±1.845)
P,P01	0.073(±0.052)	0.232(±0.550)	0.146(±1.576)	0.021(±0.605)
P,P02	0.063(±1.649)	0.229(±0.369)	0.142(±0.373)	0.020(±1.017)
P,P03	0.062(±1.326)	0.232(±1.324)	0.139(±0.878)	0.017(±1.263)
P,P04	0.058(±1.940)	0.251(±1.838)	0.165(±1.958)	0.026(±0.829)
P,P05	0.067(±1.600)	0.240(±1.569)	0.147(±1.618)	0.018(±1.884)
P,P06	0.061(±1.579)	0.243(±0.996)	0.146(±1.192)	0.018(±1.799)
P,P07	0.063(±1.409)	0.247(±0.765)	0.140(±1.199)	0.018(±1.698)
P,P08	0.065(±1.486)	0.250(±0.857)	0.151(±1.667)	0.020(±1.531)
P,P09	0.067(±1.380)	0.245(±1.354)	0.164(±1.759)	0.020(±1.471)
P,P10	0.058(±1.250)	0.255(±1.684)	0.162(±0.308)	0.022(±1.896)
P,P11	0.060(±1.250)	0.269(±1.045)	0.166(±0.581)	0.022(±0.813)
P,P12	0.055(±1.246)	0.250(±1.663)	0.149(±0.806)	0.020(±1.499)
P,P13	0.053(±1.547)	0.268(±1.090)	0.169(±1.705)	0.020(±1.489)
P,P14	0.055(±1.637)	0.273(±1.502)	0.172(±0.728)	0.021(±1.438)
P,P15	0.062(±0.574)	0.282(±1.395)	0.165(±1.545)	0.022(±1.358)
T,F01	0.003(±1.909)	0.043(±1.625)	0.011(±1.146)	0.007(±1.071)
T,F02	0.003(±0.802)	0.042(±1.380)	0.011(±0.404)	0.007(±1.836)
T,F03	0.003(±1.909)	0.041(±1.364)	0.010(±1.123)	0.007(±1.063)
T,F04	0.003(±0.802)	0.043(±1.274)	0.010(±1.457)	0.007(±1.577)
T,F05	0.003(±1.804)	0.044(±1.306)	0.010(±1.457)	0.007(±0.988)
T,F06	0.003(±1.005)	0.042(±1.391)	0.010(±0.883)	0.006(±1.591)
T,F07	0.003(±1.721)	0.042(±1.612)	0.010(±1.657)	0.007(±1.635)
T,F08	0.003(±1.593)	0.042(±1.496)	0.010(±1.523)	0.007(±1.122)
T,F09	0.003(±1.349)	0.042(±1.413)	0.010(±0.390)	0.007(±1.218)
T,F10	0.003(±1.143)	0.041(±1.567)	0.010(±1.517)	0.007(±0.424)
T,F11	0.003(±1.576)	0.042(±1.174)	0.010(±0.529)	0.007(±1.828)
T,F12	0.003(±0.747)	0.042(±1.050)	0.010(±1.792)	0.007(±1.143)
T,F13	0.003(±1.494)	0.041(±1.502)	0.010(±0.720)	0.007(±1.861)
T,F14	0.003(±1.513)	0.043(±0.260)	0.010(±1.931)	0.007(±0.427)
T,F15	0.003(±1.345)	0.042(±1.242)	0.010(±1.393)	0.007(±1.656)

P,T01- P,T14 : *Pinellia ternata*, P,P01- P,P15 : *P. pedatisecta*, T,F01- T,F15 : *Typhonium flagelliforme*

국내 자생종인 반하는 uracil, uridine, guanosine, adenosine의 함량이 각각 0.042-0.094, 0.348-0.835, 0.283-0.585, 0.023-0.122 mg/g으로 반하의 각 성분

대한 함량이 개체별로 다양하게 확인되었다. 호장남성은 0.053–0.073, 0.229–0.282, 0.139–0.172, 0.017–0.026 mg/g과, 수반하는 0.003, 0.041–0.043, 0.010–0.011, 0.006–0.007 mg/g으로 두 종 모두 비교적 일정한 함량을 나타냈고, 3종 모두에서 2.0% 이내의 상대표준편차를 확인하였다. 4개의 지표성분에 대한 함량은 반하에 가장 많이 함유되고, 그에 비해 수반하는 매우 적게 함유되었으며, 전체적으로 반하>호장남성>수반하 순서로 함유되었다.

각 종별에 대한 개체별 함량의 통계분석 결과(Table 6), uracil의 평균 함량은 반하 0.068(±1.078)%, 호장남성 0.061(±1.326)%, 수반하 0.003(±1.347)%이고, uridine의 평균 함량은 반하 0.556(±1.049)%, 호장남성 0.251(±1.267)%, 수반하 0.042(±1.310)%, guanosine의 평균 함량은 반하 0.422(±1.045)%, 호장남성 0.155(±1.193)%, 수반하 0.010(±1.195)%, adenosine의 평균 함량은 반하 0.071(±1.349)%, 호장남성 0.020(±1.372)%, 수반하 0.007(±1.300)%로 모두 반하>호장남성>수반하 순서로 함유하여 명확한 차이를 확인하였다. 이를 ANOVA 분석 결과, 종별 성분 차이에 대한 통계적 유의성을 확인하였다(Tukey, post-hoc, $p < 0.005$).

Table 6. Average Concentration(mg/g) and p-value of the uracil, uridine, guanosine and adenosine

Herbal medicine	Uracil	uridine	guanosine	adenosine
<i>Pinellia ternata</i>	0.068(±1.078) ^a	0.556(±1.049) ^b	0.422(±1.045) ^b	0.071(±1.349) ^b
<i>P. pedatisecta</i>	0.061(±1.326) ^a	0.251(±1.267) ^a	0.155(±1.193) ^a	0.020(±1.372) ^a
<i>Typhonium flagelliforme</i>	0.003(±1.347) ^b	0.042(±1.310) ^c	0.010(±1.195) ^c	0.007(±1.300) ^c
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a,b,c : post-hoc by tukey

4. 통계분석을 이용한 다변량 분석

HPLC-PDA를 이용하여 분석된 반하 14점, 호장남성 15점, 수반하 15점에 대한 uracil, uridine, guanosine, adenosine의 함량 data를 활용하여 PCA 분석을 하였다. PCA 분석은 minitab 16 프로그램을 이용하여 통계처리하였고, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 이는 종별 PCA plot를 나타낸 것으로 국내 자생종인 반하와 유통품인 호장남성과 수반하는 3 그룹으로 명확한 구분이 가능하였다.

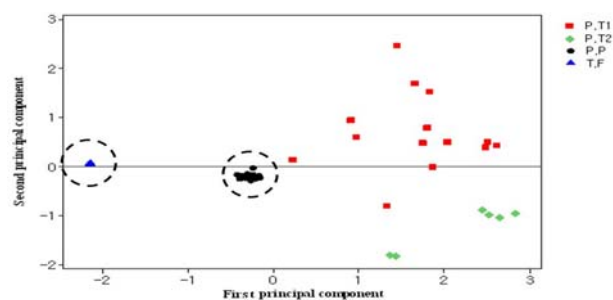


Fig. 3. PCA plot for *Pinellia ternate* in jeju (P.T1), *Pinellia ternate* in commercial medicinal herbs(P.T2), *P. pedatisecta* (P.P) and *Typhonium flagelliforme* (T.F)

고찰

기존의 한약재 감별 및 기원 확인은 일차적으로 형태학적 특성에 기반한 육안감별에 의존하였으나, 한약재는 건조되고 절편된 형태로 유입되기 때문에 모양이나 성상이 비슷한 한약재의 감별은 전문가가 아닌 이상 쉽지 않다. 하지만 한약재의 이화학적 성분 분석을 이용한 기원확인 및 감별하는 것은 육안 식별이나 형태학적인 감별보다 정확하기 때문에 한약재의 위품과 오용을 방지하여 한약재의 품질관리 및 안전성 확보에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

이에, 혼·오용되기 쉬운 반하의 구별을 위하여 KP에서 규정하고 있는 반하(*Pinellia ternata*)의 기준을 정하여, 위품인 호장남성(*Pinellia pedatisecta*)과 수반하(*Typhonium flagelliforme*)의 비교를 위한 지표로 HPLC-PDA를 이용한 이화학 분석을 수행하였다. 우선, HPLC-PDA를 이용한 반하 분석에 적합한 분석법을 확립하여 검증하였고, 혼용 가능성이 있는 호장남성과 수반하를 수집하여 비교 분석하였다. HPLC-PDA로 분석된 3종에 대한 크로마토그램으로 각각 패턴 비교분석 결과에서 의미 있는 결과를 얻을 수 있었다. 반하에서 uridine이 15분에서 가장 많은 성분 피크로 나타났으며, guanosine이 27분에서 두 번째로 많은 성분 피크였고, 그 다음 23분 피크에서 세 번째로 높은 것으로 관찰되었다. 호장남성의 피크에서는 uridine>unknown(7)>guanosine 순으로 많이 함유하였다. 반하와 호장남성의 두 크로마토그램에서 12–16, 45–65분대 이외의 피크들에 대해서 전체적으로 비슷하게 관찰되었는데, 이는 서로 유사한 종이기 때문이라 생각된다. 기원이 다른 수반하는 상대적으로 낮은 피크와 함께 반하와 다른 패턴으로 관찰되었다. 함량비교 분석은 3종 모두에 존재하는 uracil, uridine, guanosine, adenosine을 지표성분으로 하였다. 호장남성과 수반하의 지표성분 함량이 일정한 것에 비해 반하는 개체별로 다양한 함량의 차이를 확인할 수 있었는데, 이는 채집된 지역의 여러 환경적 요인의 영향으로 성분 조성 함량이 다를 수 있다고 판단된다²⁷⁾. Uracil의 평균 함유량은 반하 0.068%, 호장남성 0.061%로 약 0.007%의 작은 차이를 확인할 수 있었고, uridine, guanosine, adenosine의 평균 함유량이 반하가 0.556%, 0.422%, 0.071%이고, 호장남성이 0.251%, 0.155%, 0.020%로 약 0.341%, 0.267%, 0.061%의 차이를 확인하였다. 그에 비해, 수반하는 0.003%, 0.042%, 0.010% 0.007%의 낮은 함유량으로 반하와 뚜렷한 함량 차이를 확인하였다. 이렇듯 종별에 따라 uridine, guanosine, adenosine의 함량 차이가 나타나므로 정량분석을 통한 진·위품 감별에 응용이 가능할 것이라 기대된다. 3종에 대한 PCA 통계분석에서도 3개의 그룹으로 나뉘어 지는 것을 뚜렷하게 확인할 수 있었고, 함량분석에서 확인한 것과 같이 호장남성과 수반하 그룹은 각각 무리 지어 있는 것에 반해 반하 그룹에서는 넓게 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이렇듯 본 실험을 통하여 반하, 호장남성, 수반하의 성분 차이와 성분 함유량의 차이에 대해 확인할 수 있었다. 유통품 반하는 채집품 반하와 유사한 그룹으로 확인되었다.

한약의 약효는 여러 성분들의 상호작용에 의한 것이라 해석되는 실정인데, 활성성분들의 대부분이 기원식물에 따라 성분분열이 다르고, 산지와 생육조건 등의 환경에 의하여 성분

조성 함량이 다를 수 있기 때문에 잘못된 위품의 사용은 정확한 약효를 기대할 수 없으며, 한약의 안전성 문제를 초래할 수 있기 때문에 정확한 감별법으로 구별하여 정확한 기원종 한약재를 사용해야 할 것이다.

결론

본 실험에서는 KP에서 정품으로 규정하고 있는 반하와 위품으로 혼용되는 호장남성과 수반하 총 44점을 수집하여 그 기원을 확립하고자 하였다. 실험은 HPLC-PDA 분석법을 성공적으로 확립하였고, 분석법의 검증을 통한 적합성을 확인할 수 있었다. 또한 3종에 대한 패턴분석과 함량분석 및 PCA 분석을 성립된 분석법에 의해 수행하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 반하는 호장남성과 수반하 간의 크로마토그램 패턴에서 차이를 확인할 수 있었다.
2. 구성성분인 uracil, uridine, guanosine, adenosine에 대한 함량분석에서도 반하가 호장남성과 수반하에 비해 비교적 높은 함량을 나타내어 뚜렷한 차이를 확인하였고, 지표성분에 대한 전체적인 함유량은 반하>호장남성>수반하 순으로 함유하였다.
3. PCA 분석에서는 종별 통계처리 한 결과 3 그룹으로 나누어 지는 것을 확인할 수 있었다.

이상으로 본 연구 결과, HPLC-PDA를 사용하여 확립된 분석법은 향후 기원식물인 반하와 혼·오용 되기 쉬운 위품의 구별을 위하여 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 '한의본초활용기반구축사업(K13020)'의 지원으로 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

References

1. Chang IM, Current Trend of Natural Products Industry and Utilization of Herbal Materials. KOREAN. 2002 : 28-37.
2. Park JH, Studies on the Origin of Korean Folk Medicine. Kor J Pharmacogn. 1993 ; 24(4) : 322-7.
3. Wang XS, Wu YF, Ma JY, Shi QL, Study on chemical components and pharmacological activities of *Pinellia ternate*. Qilu Pharmaceutical Affairs. 2008 : 101-3.
4. Kim YJ, Shin YO, Ha YW, Lee S, Oh JK, Kim YS. Anti-obesity effect of *Pinelliaternate* extract. Biol Pharm Bull. 2006 ; 29(6) : 1278-81.
5. Lu H, Xue T, Zhang A, Sheng W, Zhu Y, Chang L, Song Y, Xue J. Construction of an SSH library of *Pinellia ternata* under heat stress, and expression analysis of four transcripts. Plant Mol Biol Rep. 2013 ; 31 : 185-94.
6. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. Herbology[Boncho-hak]. Seoul : Young-Lim Press. 2004 : 487-8.
7. Li CJ, Xu YM, Sun YL, Research on anti-cervical cancer component of *Pinellia pedatisecta* schott. J Shanghai Medical University. 1981 ; 8 : 421-3.
8. Wua XY, Zhaob JI, Zhanga M, Lib F, Zhaob T, Yang LQ. Sedative hypnotic and anticonvulsant activities of the ethanol fraction from Rhizoma *Pinelliae Praeparatum*. J Ethnopharmacol. 2011 ; 135 : 325-9.
9. Wu KZ, Tao ZJ. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the rhizome of *Pinelliaternata*. Acta Biochim Biophys. 1981 ; 13 : 267-74.
10. Park JH. Effects of *Pinellia ternata* tuber on the emetic and sedative action of xylazine hydrochloride in cata. Korean J Vet Res. 1992 ; 32 : 341-5.
11. Maki T, Takahashi K, Shibata S. An anti-emetic principle of *Pinellia ternata* Tuber. Plant Med. 1987 ; 53(5) : 410-4.
12. Seo BI. A clinical study of Banhabaekchulcheonmatang on a patient with headache due to retention of phlegm. Kor J Herbology. 2007 ; 22(2) : 79-82.
13. Lim SH, Jeong HY, Won HY, Kim HW, Choi CW, Jeong HS, Kim YG, Cho SI. Effects of Banhabubak-tang Extract on Psychological Stress. Kor J Herbology. 2012 ; 27(4) : 81-8.
14. Li XD, Hu SL, Yang LJ. Analysis of amino acid and inorganic elements from *Pinelliae* Herbs, China. J Chin Mater Med (Zhongguo Zhongyao Zazhi). 1990 : 377-81.
15. Chen P, Li C, Liang S, Song G, Sun Y, Shi Y, Xu S, Zhang J, Sheng S, Yang Y, Li M. Characterization and quantification of eight water-soluble constituents in tubes of *Pinellia ternate* and in tea granules from the Chinese multiherb remedy Xiaochaihu-tang. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006 ; 843(2) : 183-93.
16. Gao WP, Zeng X, Chen JS. Determination and comparison of effective components in polyploidy *Pinelliaternate* and wild *Pinelliaternate*. Chin Pharma J. 2011 ; 46 : 1625-9.
17. Yun YP. Coloured Illustrations for Discrimination of Herbal Medicine. Seoul : Homi Publishing

- Company, 2009 : 59-61.
18. Seo BI. A study on origins of herbal oriental medicines in several nations pharmacopoeias and standard collection for editing of korea herbs pharmacopoeia(II). J East West Med, 2001 ; 26(4) : 50-65.
 19. Yun YP. Coloured Illustrations for Discrimination of Herbal Medicine. Seoul : Homi Publishing Company, 2009 : 59-61.
 20. Zhanga Jy, Guoa QS Guoa, Zhengb DS. Genetic diversity analysis of *Pinelliaternata* based on SRAP and TRAP markers. Biochem Syst Ecol. 2013 ; 50 : 258-65.
 21. Xua T, Wanga B, Liua X, Fenga R, Donga M, Chen J. Microarray-based identification of conserved microRNAs from *Pinelliaternata*. Gene, 2012; 493(2):267-72.
 22. Choi YS, Kil KJ, Lee YJ. A Study on a Morphological Identification of *Pinelliae* Tuber, *Typhonii* Flagelliformis Rhizoma and *Arisaematis* Rhizoma. Kor J Herbology. 2007 ; 22(2) : 103-8.
 23. Kweon KT. A Research on Management System of Herbal Medicine in Common Use for Food and Medicine. Kor J Pharmacong. 2012 ; 27(2) : 25-9.
 24. Suzuki M. Irritating substance of *Pinelliaternata*. Arzneimittelforschung. 1969 ; 19 : 1307-9.
 25. Kim SH, Jeong H, Kim YK, Cho SH, Min KU, Kim YY. IgE-mediated occupational asthma induced by herbal medicine, Banha (*Pinellia ternata*). Kor J Herbology. 2007 ; 22 : 103-8.
 26. ICH Topic Q2B. validation of Analytical Procedures. Consensus Guideline, the European Agency for the Evaluation of Medicinal products. 1996.
 27. Li L, Xu L, Peng Y, He Z, Shi R, Xiao P. Simultaneous determination of five phenylethanoid glycosides in small-leaved Kudingcha from the *Ligustrum* genus by UPLC/PDA. Food Chem, 2012 ; 131 : 1583-8