

전탕용수의 미네랄 함량이 두충의 유효성분 추출에 미치는 영향 분석

박정근¹⁾ · 김태진²⁾ · 김경태¹⁾ · 이은실¹⁾ · 김동희³⁾ · 황귀서^{4)*} · 강종성^{1)*}

¹⁾ 충남대학교 약학대학, ²⁾ 한국유나이티드제약(주)

³⁾ 대전대학교 한의과대학, ⁴⁾ 가천대학교 한의과대학

Influences of mineral contents in decoction water on the extraction efficiency of bioactive compounds from *Eucommiae Cortex*

Jung Kean Park¹⁾, Tae Jin Kim²⁾, Kyung Tae Kim¹⁾, Eunsil Lee¹⁾

Dong Hee Kim³⁾, Gwi Seo Hwang^{4)*} & Jong Seong Kang^{1)*}

¹⁾ College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea

²⁾ Korea United Pharm Inc., Seoul, Korea

³⁾ College of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

⁴⁾ College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam, Korea

Abstract

Objective: *Eucommiae Cortex* is bark of *Eucommia ulmoides* Oliver, a deciduous tree native to China. Today, teas or herbal drugs made from *E. ulmoides* leaves are widely consumed as a healthy food especially in Eastern Asia including Japan, China and Korea. This study was aimed to verify the extraction efficiency of bioactive compounds from *Eucommiae Cortex* depending on characteristics of decoction water.

Method: Six types of decoction water with various origin were prepared and the contents of minerals in water were analyzed by ICP-AES and ICP-MS. The contents of extracted bioactive compounds were analyzed by HPLC and the relationship between mineral contents and extracted bioactive compounds in the decoction water were analysed by multiple factor analysis. The decoction waters could be classified in three groups by hierarchical cluster analysis.

· 접수: 2013년 9월 9일 · 수정접수: 2013년 12월 18일 · 채택: 2013년 12월 19일

* 교신저자: 강종성, 대전시 유성구 대학로 99 충남대학교 약학대학

전화: 042-821-5928, 팩스: 042-823-6566, 전자우편: kangjss@cnu.ac.kr

황귀서, 성남시 수정구 복정동 산 65 가천대학교 한의과대학

전화: 031-750-5421, 전자우편: seoul@gachon.ac.kr

Result : Extracted amounts of compounds in *Eucommiae Cortex* showed a positive relationship with Na, Si, K concentration in decoction water, while a negative relationship with Ca, Mg concentration.

Conclusion : The study proved that the minerals in water influenced the extraction efficiency of bioactive compounds from *Eucommiae Cortex*.

Key words : *Eucommiae Cortex*, mineral content, cluster analysis, multiple factor analysis, decoction water

I. 서론

두충(*Eucommiae Cortex*)은 두충나무(*Eucommia ulmoides* Oliver, *Eucommiaceae*)의 수피를 건조한 것으로, 중국의 사천, 협서, 호북, 하남, 귀주, 운남 등지가 주산지이나 약용가치가 높아 한국의 중남부에서도 많이 생산되고 있다.¹⁾ 대개 판상이고 바깥면은 현저한 주름과 피공이 있다. 안쪽면은 평활하고, 꺾으면 끈기있는 가는 흰 수지의 실이 생긴다.¹⁾ 두충의 성분으로 geniposide,²⁾ geniposidic acid,³⁾ liriodendrin,⁴⁾ chlorogenic acid,⁵⁾ pinosresinol diglucoside,⁶⁾ dehydrodiconiferyl alcohol D-glucopyranoside,⁷⁾ eucommiol⁸⁾ 등이 분리되었으며, 약리작용으로 혈관강화작용,⁹⁾ 진정, 진통작용,^{10,11)} 혈관확장,¹²⁾ 혈당상승 억제효과,^{13,14)} 혈중 HDL-콜레스테롤 증가와 총 콜레스테롤 감소 효과 등이 보고되었다.¹⁵⁾ 두충차 또는 두충주를 2-4개월간 복용한 고혈압환자의 혈압개선은 pinosresinol diglucoside의 작용임이 실험적으로 증명되었다.¹⁶⁾ 한약재에 포함된 유효성분은 전탕용수가 침윤과 침투 현상이 일어나 약재의 세포 속으로 들어가게 되어 세포내의 성분을 용해하여 삼투압, 농도 차로 전탕용수에 용출되는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 전통적으로 한약재는 전탕용수로 물을 사용하여 탕제로 복용하였다. 일반적으로 물은 다양한 미네랄을 함유하고 있는데, 함유된 미네랄의 종류 및 양은 물의 품질평가에 중요한 요소가 될

수 있다.^{18,19)} 물에 포함된 미네랄의 양은 물의 지표로서 중요한 역할을 하지만 물중의 미네랄의 차이가 한약재의 추출에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 현재까지 진행되지 않고 있다.

본 연구에서는 한약재인 두충을 6종의 전탕용수로 열수추출 하였고 HPLC와 LC-MS를 이용하여 추출물 중의 성분을 분석 하였으며 전탕용수의 음이온과 미네랄 함량을 IC, ICP-AES 및 ICP-MS을 이용하여 측정하였다. 추출물에서 분석된 성분의 종류 및 양이 미네랄의 함량 등 전탕용수의 물리적 특성과 관련성이 있을 것이라는 가정을 증명하기 위하여 통계분석을 실시하였다. 개체를 유사한 성격을 가지는 몇 개의 그룹으로 집단화하고 각 그룹의 특성을 파악하여 그룹들 사이의 관계를 분석하는 통계법인 계층적 군집분석(hierarchical cluster analysis)^{20,21)}을 크로마토그램에서의 피크면적 및 전탕용수별 추출량에 적용하여 분석하였으며, 다중요인분석(multiple factor analysis)²²⁾으로 미네랄, 음이온, pH, 건조중량, 추출량 등의 상관관계를 확인하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 기기 및 시약

두충의 성분분석을 위해 사용된 고성능액체

크로마토그래피는 Shimadzu 20A (Japan) 시리즈로써 LC-20AD, SPD-20A, SIL-20A, CTO-20A, CBM-20A가 장착되어있고, 성분확인에는 LC-MS-2010-EV (Shimadzu, Japan)을 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.

2) 실험재료의 처리

실험에 사용된 전탕용수는 모두 6가지로 각각 제주도(S1, S2, S3), 경기도(S4, S5), 프랑스(S6)에서 생산되어 시중에 판매되고 있는 생수로써 S1~S6으로 코드화하였다. 두충 시료는 국산으로 대전광역시 중앙동 한약재시장에서 구입하였다. 구입시료는 대전대학교 한의과대학 김동희 교수가 감정하여 국산 두충으로 확인하였고, 증거시료는 대전대학교 한의과대학에 보관하였다. 각각의 전탕용수 500 mL에 30 g 두충을 가하고 100 °C에서 1시간 동안 환류 추출하였다. 추출한 용액을 상온으로 냉각시킨 후 여과하여 원심분리기(Biospin, Hanil, Korea)를 이용하여 13000 rpm으로 10분 동안 원심분리 후 상등액을 취하여 사용하였다. 두충을 각각의 전탕용수로 동일 조건에서 10회씩 추출한 총 60개의 추출액시료를 코드화하여 냉장보관(5 °C)하였다.

2. 실험 방법

1) HPLC 및 LC-MS에 의한 성분분석

두충의 성분분석을 위해서 이동상으로 A는

0.1% 포름산-수용액, B는 0.1% 포름산-메탄올 용액을 사용하였다. 기울기용리 프로그램은 0분 15% B; 30분 70% B와 같이 사용하였으며, 유속은 분당 1 mL, 주입량은 10 μL였으며, 검출파장은 240 nm였다. 성분 확인을 위하여 LC-MS를 이용하였고, 조건은 분무기체유속 1.5 L/min, CDL 온도 250 °C, 가열블록온도 200 °C, 검출기 전압 1.50 kV, CDL 전압 15.0 V였다.

2) 전탕용수 중의 미네랄 및 음이온 측정

미네랄은 ICP-AES를 이용하여 RF power 1300 W, 냉각, 보조, 분무가스의 유속은 각각 1.5, 0.5, 0.8 L/min로 측정하였다. 음이온은 이온크로마토그래프(IC)를 이용하여 측정하였으며, 이 때 컬럼은 Metrosep A Supp (5.0 × 150 mm), 분리용매로 3.2 mM Na₂CO₃ - 1.0 mM NaHCO₃ 수용액, 유속은 0.7 mL/min, 분리온도는 30 °C로 하였다.

3) 건조중량 측정

두충 추출 시료 1 mL을 에펜도르프 튜브에 넣어 증발기에서 질소기류를 이용하여 수분을 증발시킨 후 잔류물의 무게를 측정하여 전탕용수별 1 mL의 건조중량을 측정하였다.

4) 통계처리

분석된 두충의 피크면적에 대한 전탕용수별 차이를 알아보기 위하여 프로그램 R (ver.2.14.1)을 이용하여 ANOVA검정을 시행하였고, 전탕용수간의 유사성분석을 위하여 군집분석패키지 중 hclust 함수를 사용하였다. 다중요인분석은 FactoMineR패키지의 MFA함수를 이용하여 분석하였다. 유의수준은 따로 명시하지 않은 경우 0.01로 하였다.

III. 결과

1. 두충의 분석 및 성분확인

두충의 추출물을 HPLC로 분석하였을 경우 대체로 6개의 주된 피크가 나타났다(Figure 1). 각각의 피크에 대한 Figure 2의 MS 스펙트럼과 두충에서 관찰될 수 있는 성분의 MS 스펙트럼 및 분자량을 비교 하였을 때 피크(1)은 geniposidic acid (MW: 374), 피크(2)는 chlorogenic acid (MW: 354), 피크(3)은 geniposide (MW: 388), 피크(4)는 pinoresinol diglucoside (MW: 682), 피크(5)는 dehydrodiconiferyl alcohol D-glucopyranoside (MW: 682), 피크(6)은 liriodendrin (MW: 742)으로 추정되었다.

2. 미네랄 및 음이온

전탕용수에 포함된 미네랄과 음이온 분석결과

생산지가 같은 지역이지만 취수원이 다른 S1, S2, S3은 Na를 제외한 다른 미네랄에서 비슷한 함량을 나타내었다. S3는 Na, K, Si, F의 함량이 용수 중에서 가장 많았으나 Mg의 함량은 가장 적었고, S4는 Ca, Mg, SO₄의 함량이 가장 많지만 K의 함량은 가장 적게 나타났다. S5는 Cl과 NO₃의 함량이 가장 많았다(Table 1).

3. 건조중량 및 pH

두충 분석시료 1 mL를 추출하여 회전감압농축기에서 증발하고 잔류물의 무게를 측정 한 결과 S2가 10.8 mg으로 가장 많은 건조중량을 나타내었고, S1이 10.2 mg으로 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 4.27~4.77로 약산성의 특성을 보였다(Table 2).

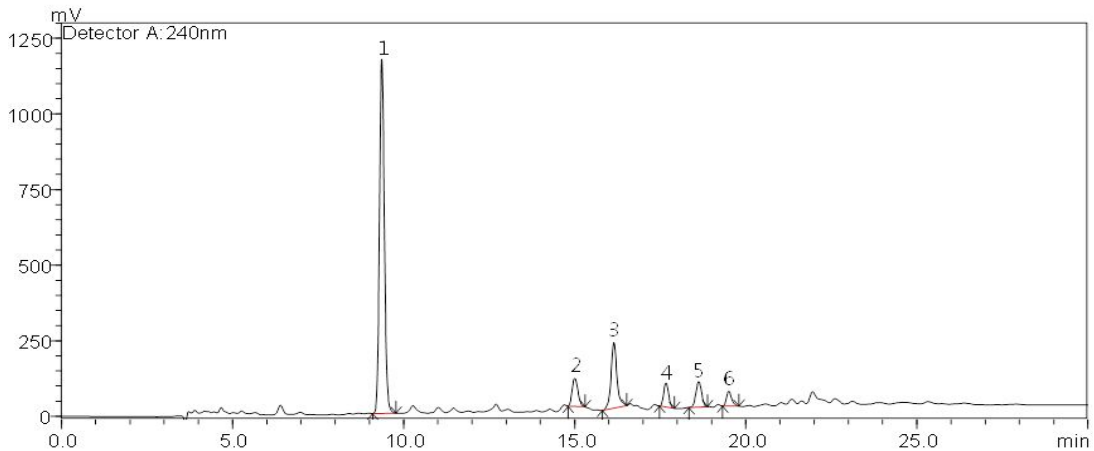


Figure 1. HPLC chromatogram of Eucommiae Cortex extracts. Conditions: Column; Fortis C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm), eluent A 0.1% formic acid in water, B 0.1% formic acid in methanol, gradient program; 0min 15% B; 30min 70% B, flow rate; 1 mL/min, detection; UV 240 nm. Peak assumed as (1) geniposidic acid, (2) chlorogenic acid, (3) geniposide, (4) pinoresinol diglucoside, (5) dehydrodiconiferyl alcohol D-glucopyranoside, (6) liriodendrin.

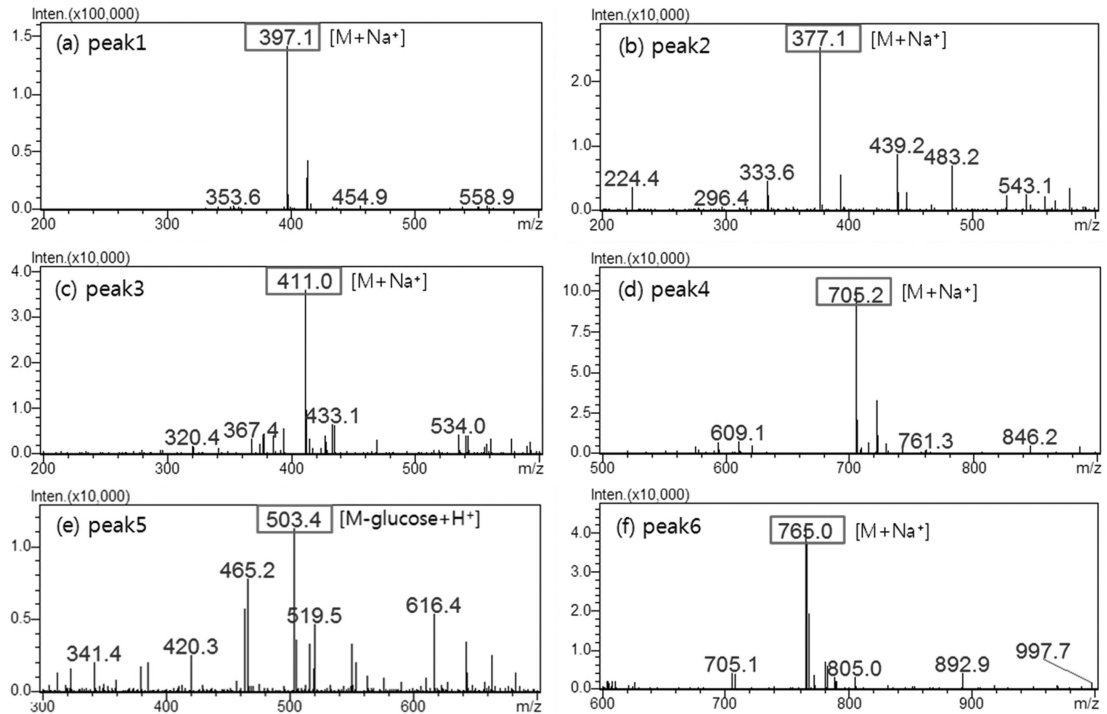


Figure 2. Mass spectra of separated peaks. LC-MS Conditions: nebulizing gas flow; 1.5 L/min, CDL temperature; 250 °C, heat block temperature; 200 °C, detector voltage; 1.50 kV, CDL voltage; 15.0 V.

Table 1. Contents of minerals and anions in decoction waters (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 2. Dry weight (mg/mL), pH in extract of *Eucommiae Cortex* (mean±SD, n=5)

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	p-value
Dry weight	10.2±0.3	10.8±0.2	10.4±0.2	10.5±0.2	10.4±0.2	10.6±0.2	<0.05
pH	4.48±0.02	4.57±0.03	4.56±0.02	4.77±0.02	4.31±0.03	4.27±0.02	<0.01

4. 주요피크 면적 및 ANOVA 검정

전탕용수에 따른 각성분의 추출정도는 크로마토그램에서의 피크의 면적을 상대적으로 비교하여 산출하였다. 두층을 6종의 전탕용수로 각각 추출한 시료를 동일한 분석방법을 이용하여 얻은 면적 값을 평균값으로 나타내었다(Table 3). 이후 통계적으로 피크별 성분의 함량에 차이가 있는지 여부를 살펴보기 위하여 일원배치분산분석법으로 분석결과 P-값이 모두 유의수준 0.01 보다 작게 나타나 용수간 성분함량이 통계적으로 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다. 성분에 따른 구체적인 전탕용수의 차이를 확인하기 위하여 사후검정을 실시한 결과 Table 3의 post hoc results에 나타난 것과 같이 일부의 전탕용수에 따라 성분의 추출량에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다.

5. 통계분석 및 다중요인분석

미네랄, 음이온, 건조중량, pH 및 추출물의 성분함량과의 상관관계를 알아보기 위하여 다중

요인분석을 실시한 결과, 누적 eigenvalue의 비율이 요인의 수가 2개일 때 66%로 나타났으므로 요인의 수를 2로 결정하여 2차원으로 분석하였다. 요인1의 변동률은 38.4%로 음이온 함량, 성분 함량 등에 주로 영향을 받으며, 이에 의해 S1, S2, S3과 S4, S5, S6의 두 그룹으로 나누어지는 것으로 나타났다. 요인2의 변동률은 27.9%로 건조중량, 미네랄, pH 등에 주로 영향을 받는 것으로 나타났다. 요인1과 요인2에 의한 전탕용수 간의 전체적인 연관관계는 S1, S2, S3는 상당히 긴밀하게, S4, S5, S6는 느슨한 관계가 있는 것으로 보였다(Figure 3a). 추출된 성분의 함량은 미네랄 중 Mg, Ca과 음의 상관관계를 보였으며, Na, Si, K과 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타났다. 성분 중 피크 2번과 6번은 다른 성분에 비해 미네랄과의 상관관계가 약한 것으로 판단되었다(Figure 3b). 추출된 성분함량간의 군집분석(Figure 3c) 결과 같은 지역 다른 취수원에서 생산된 전탕용수인 S1, S2, S3이 A그룹, S4와 S5가 B그룹, S6가 C그룹으로 분류되어 지역적인 유사성이 있는 것으로 나타났다.

Table 3. Area of major peaks in chromatogram of Eucommiae Cortex extracts

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6
S1	1212 ^b ±25	107 ^a ±3	265 ^a ±6	83 ^c ±2	101 ^{ab} ±2	56 ^{ab} ±3
S2	1225 ^b ±14	96 ^b ±4	269 ^a ±3	86 ^{ab} ±1	103 ^a ±2	57 ^a ±1
S3	1187 ^c ±23	99 ^b ±3	254 ^b ±8	85 ^{bc} ±1	101 ^b ±2	57 ^a ±2
S4	1092 ^d ±5	97 ^b ±2	220 ^c ±3	78 ^d ±0	86 ^d ±1	55 ^{ab,c} ±1
S5	1075 ^d ±14	100 ^b ±1	219 ^c ±3	77 ^d ±1	82 ^e ±1	53 ^c ±1
S6	1261 ^a ±15	99 ^b ±4	268 ^a ±4	87 ^a ±1	93 ^d ±2	54 ^{bc} ±1
p-value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

^{ab,c,d}: Post hoc results

Data expressed as mean±SD with n=10.

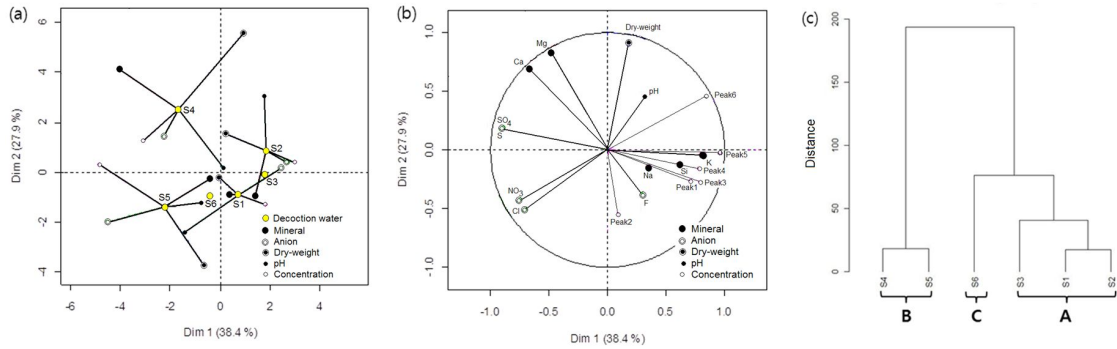


Figure 3. Statistical evaluation of the data with (a) individual factor map, (b) correlation circle in correlation among minerals, anions, dry weight, pH and marker compounds in multiple factor analysis, and (c) hierarchical cluster analysis of separated compounds from *Eucommiae Cortex* extracts with 6 types of decoction water.

IV. 고찰

두충(*Eucommia ulmoides* Oliver)은 오래 전부터 한약재로 사용되어 왔으며, 혈압강하 효과가 있어 고혈압을 예방한다고 알려져 있다. 두충을 함유한 음료수를 섭취한 그룹에서 혈압 강하작용이 나타난다는 임상시험 보고를 위시하여²³⁾ 두충의 약리작용에 관한 과학적인 연구가 상당수 보고되고 있다. 전통적인 한약의 전탕법에서는 물의 용량, 가열온도 및 전탕시간을 고려하여 효율적으로 한약재를 추출하기 위한 방법도 연구되어왔다. 하지만 물의 특성에 따른 추출률과의 상관관계 연구는 미진한 상황이다. 본 연구에서는 전탕용수별 특성이 두충 성분과의 추출 상관성을 확인하기 위하여 제주지역 및 다른 지역의 물 등 시중에 판매되고 있는 6종류의 물을 전탕용수로 사용하여 같은 방법으로 추출하여 비교하였다. 전탕용수 중의 미네랄, 음이온은 지역마다 다른 특성을 나타내었으며, pH의 경우 추출 후 모두 약산성의 특징이 나타났다. 이후 HPLC 이용하여 분석된 총 6개의 성분을 선정하여 피크의 면적으로 ANOVA 검정 결과 두충의 6개 성분 모두 P-값이 0.01보다 적음

으로써 통계적으로 전탕용수별 유의한 차이를 확인할 수 있었고, 군집분석 결과 A(S1, S2, S3), B(S4, S5), C(S6)로 3그룹으로 나뉘어졌다. 이 결과는 지역에 따라 생산되는 전탕용수의 성질이 서로 비슷하다는 것을 보여 주고 있다. 또한, 다중요인분석을 통하여 미네랄, 음이온, 건조중량, pH 및 추출물의 성분함량과의 상관관계를 알아보았으며, 두충의 성분 추출량은 대체적으로 미네랄 중 Na, Si, K은 양의 상관관계를 갖으며, Ca, Mg과는 음의 상관관계를 갖는 것으로 나타났다. 전체적으로 전탕용수 중 미네랄의 종류 및 함량은 성분의 추출과 상당한 연관성이 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 중점연구소과제(2009-0093815)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 생약학교재편찬위원회, 생약학, 동명사, 2010.
2. Son KH, Lee JM, Chang SY, Lee KS.

- Isolation and quantitative determination of geniposide from the Cortex of *Eucommia ulmoides* Oliver. Kor J Pharmacogn. 2001 : 32(2) : 89-92.
- Li Y, Sato T, Metori K, Koike K, Che QM, Takhashi S. The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis. Biol Pharm Bull. 1998 : 21(12) : 1306-1310.
 - Feng SM, Ni SF, Sun WJ. Preparative isolation and purification of the lignan pinosresinol diglucoside and liriodendrin from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. by high speed countercurrent chromatography. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2007 : 30(1) : 135 - 145.
 - Luo XB, Ma M, Chen B, Yao SH, Wan ZT, Yang DJ, Hang HW. Analysis of nine bioactive compounds in *Eucommia ulmoides* Oliv. and their preparation by HPLC photodiode array detection and mass spectrometry. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2004 : 27(1) : 63-81.
 - Bamba T, Fukusaki E, Nakazawa Y, Sato H, Ute K, Kitayama T, Kobayashi A. Analysis of long-chain polyprenols using supercritical fluid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Chromatogr A. 2003 : 995(1-2) : 203 - 207.
 - Joo OS, Nam SH. ACE Inhibitory Lignan Glycosides Isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver. Kor J Life Sci. 2009 : 19(6) : 698-704.
 - Li Y, Kamo S, Metori K, Koike K, Che QM, Takhashi S. The promoting effects of eucommiol from *Eucommia* cortex on collagen synthesis. Bio Pharm Bull. 2000 : 23(1) : 54-59.
 - Sih CJ, Ravikumar PR, Huang FC, Buckner C, Whitlock H JR. Letter: Isolation and synthesis of pinosresinol diglucoside, a major antihypertensive principle of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides*, Oliver). J Am Chem Soc. 1976 : 98(17) : 5412-5413.
 - Soka T. Encyclopedia of Chinese Drugs. Shanghai Science Technology Shogakukan Press. Tokyo. 1985 : 1964-1966.
 - Zhou Y, Liang M, Li W, Li K, Li P, Hu Y, Yang Z. Protective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. bark and leaf on amyloid β -induced cytotoxicity. Environ Toxicol Pharmacol. 2009 : 28(3) : 342 - 349.
 - Lang C, Liu Z, Taylor HW, Baker DG. Effect of *Eucommia ulmoides* on systolic blood pressure in the spontaneous hypertensive rat. Am J Chin Med. 2005 : 33(2) : 215 - 230.
 - Miura T, Nishiyama Y, Ichimaru M, Moriyasu M, Kato A. Hypoglycemic activity and structure-activity relationship of iridoidal glycosides. Biol Pharm Bull. 1996 : 19(1) : 160-161.
 - Lee MK, Kim MJ, Cho SY, Park SA, Park KK, Jung UJ, Park HM, Choi MS. Hypoglycemic effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Res Clin Prac. 2005 : 67(1) : 22-28.
 - Park SA, Choi MS, Kim MJ, Jung UJ, Kim HJ, Park KK, Noh HJ, Park HM, Park YB, Lee JS, Lee MK. Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/Ksj-db/db mice. J Ethnopharm 2006 : 107(3) : 412-417.
 - Sih CJ, Ravikumar PR, Huang FC, Buckner

- C, Whitlock HJ. Letter: Isolation and synthesis of pinoresinol diglucoside, a major antihypertensive principle of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides*, Oliver). *J Am Chem Soc.* 1976 : 98(17) : 5412 -5413.
17. Kim YK, Kim CS, Cui X. The decocting and taking methods of herbal medicines. *Kor J Ori Med.* 2004 : 10(2) : 63-72.
18. Kim MK, Sim JA, Eom HJ, Kim MH, Choi MK. Mineral contents in bottled natural water and estimation of their intake by Korean adults. *J Kor Diet Assoc.* 2010 : 16(2) : 116-121.
19. You EH, Lee JK, Kim SJ. A study on the water quality of domestic mineral water. *Kor J Env Health Soc.* 1990 : 16(2) : 41-45.
20. Kang JS, Park KJ, Wu E, Lee ES, Hwang GS, Lee HS, Kim YH, Comparative study of the Rhei Rhizoma by pattern analysis. *Kor J Pharmacogn.* 2008 : 39(3) : 179-185.
21. Liu XJ, Hu J, Li ZY, Qin XM, Zhang LZ, Guo XQ. Species classification and quality assessment of Chaihu (*Radix Bupleuri*) based on high-performance liquid chromatographic fingerprint and combined chemometrics methods. *Arch Pharm Res.* 2011 : 34(6) : 961-969.
22. Jang YS, Chu VM, Lee KJ, Seo EY, Kim DH, Kang JS. Effects of the decoction water on the extraction of the bioactive compounds from rhubarb. *Kor J Anal Sci Technol.* 2011 : 24(1) : 38-44.
23. Metori K, Furutsu M, Takahashi S. The prevention effect of ginseng with Du-zhong leaf extract on plasma and protein metabolism in aging. *Biol Pharm Bull.* 1997 : 20(3) : 237-242.