



Original Article / 원저

忍冬의 忌鐵 및 伴鐵 抽出時 抽出物의 變化

정덕자¹, 정대화², 장미희², 박정아¹, 김상찬^{1*}

¹대구한의대학교 한의과대학, ²디앤비바이오

Extract changes of Caulis Lonicerae Japonicae according to with or without Iron

Deok Ja Jeong¹, Dae Hwa Jung², Mi Hee Jang², Chung A Park¹, Sang Chan Kim^{1*}

¹Daegu Haany University, ²D&B Bio

ABSTRACT

Objectives : In case of herbs decoction, the ceramic or earthenware pots was recommended, but not the metals, particularly iron or aluminum, which could cause unknown chemical reactions. In Korean Medical classics, it has been known that some herbs including Caulis Lonicerae Japonicae (CL) were not recommended to boil with iron pot. This study investigates the physical changes of extracts of CL with or without iron.

Methods : CL was decocted with reflux cooling extraction system to prevent evaporation and volatilization. Content of polyphenol was detected by Folin-Denis method and the levels of loganin and chlorogenic acid were evaluated by UPLC.

Results : The color of extract with glass beads (GB) is yellowish brown, and the iron beads (IB) is blackish brown. Polyphenol and chlorogenic acid levels were reduced in IB extracts.

Conclusions : The color of extract was change to blackish brown, and polyphenol and chlorogenic acid levels were reduced in CL extract with iron. Therefore, iron pots is not suitable for CL extraction.

Key words : Caulis Lonicerae Japonicae, Decoction, Iron, Chlorogenic acid.

I. 서론

方劑의 用法은 煎法과 服用法으로 크게 나누어지고, 煎法은 煎藥用具, 煎藥用水, 煎藥火候, 煎藥方法의 주요 항목으로 나누어진다. 이중 煎藥用具에 대하여, 先人들은 銀器가 가장 좋고, 磁器가 그 다음이다 (銀器爲上 磁者次之)라고 하였으며¹⁾ 銅, 錫, 鐵鍋를 사용하는 것은 적합하지 않다고 주장하였다. 그 이유는 약물을 달일 때 鐵器로 달이면 침전이 발생하여 용해도가 떨어지고 화학적 변화를 일으켜 부작용이 생길 수도 있고, 치료효과에도 영향을 미친다는 것이다.²⁾

전탕용기에 따라 탕제의 색, 맛, 금속이온, 산염기도 등을 지표로 연구한 결과, 鐵器에 달인 전탕액은 外觀이 深紫色, 黑綠色, 紫黑色을 나타내었고, 山楂, 苦蔘, 麻黃의 鐵器 전탕액은 녹슨 맛이 나는 것으로 보고되었다.^{3,4)}

方藥合編에서는 추출시 忌鐵해야 하는 약재는 桑白皮, 桑枝, 桑寄生, 石菖蒲, 益母草, 木瓜, 香附子, 茜根, 牡丹皮, 杜冲, 知母, 黃柏, 天門冬, 忍冬, 白馬莖, 草龍膽, 桃奴, 骨碎補, 地骨皮, 猪苓 등 20종을 제시하였으며, 忌銅약재로서 肉豆蔻를, 忌銅鐵약재로서 地黃, 何首烏, 玄蔘, 柴胡, 沒石子 등을 제시하였으며,⁵⁾ 동의보감 湯液序例에서도 忌銅鐵藥을 제시하였다.¹⁾

그러나, 한약에 관련된 많은 연구에서도 忌鐵약물에 대한 연구는 미흡한 편이다. 이에 저자는 忌鐵약물에 대한 초보적 연구로 忍冬의 忌鐵 및 伴鐵 추출시 폴리페놀의 함량과 대한민국약전⁶⁾ 및 선행연구결과⁷⁾의 기준에 해당하는 loganin 및 chlorogenic acid의 함량을 평가하여 보고하는 바이다.

II. 재료 및 연구방법

1. 시료 추출

본 연구에 사용된 약재 忍冬은 대원약업사(대구 수성구 소재)에서 구입하였다. 忍冬의 균질성을 위하여 약 300 g의 忍冬을 잘 혼합하고 분쇄기로 분쇄 후

40 mesh 망체를 통과시킨 후 골고루 섞어 균질화한 후 시료로 사용하였다.

균질하게 분쇄된 시료 5 g을 정밀하게 칭량하여 검액 추출용 시료로 사용하였으며, 이를 250 ml의 등근 플라스크에 넣은 후 75 ml의 증류수를 첨가하여 열수 추출하였다. 추출시 용매증발 및 성분의 휘발에 따른 추출물 농도의 오차를 줄이기 위하여 환류냉각 추출장치를 이용하여 Water Bath (changshin-lab, C-WBD4)에서 105°C 2시간 30분 증탕 추출 진행 후 실온까지 방냉하여 원심분리 튜브에 옮겨 3000 ×g로 원심분리(eppendorf, centrifuge5810R)한 후 상등액을 취하여 pH (Mettler toledo, SevenCompact pH/lon S220)를 측정하고 공경 0.2 μm이하의 멤브레인 필터로 여과하여 폴리페놀, pH, 정량실험을 진행하였다.

약물 추출시 忌鐵에 대한 실험을 위해 위 시료에 직경 1.587 cm의 철함유량이 96~97%인 베어링용 쇠구슬(인천, 대한민국)을 구입하여 세척 후 건조하여 각각 1~3개씩을 약재와 같이 넣어 위와 같은 방법으로 추출하였다(IB1~IB3, IB; Iron bead). 대조군에서는 같은 크기의 유리구슬을 3개 넣어 추출하였다(GB; glass bead). 추출시 사용한 쇠구슬의 무게는 개당 16.42 ± 0.12 g, 유리구슬의 무게는 개당 5.78 ± 0.41 g이었다.

2. 분석 기기 및 시약

고성능 액체크로마토그래피(UPLC)는 Waters ACQUITY™ ultra performance LC system (USA)을 사용하였으며, Waters ACQUITY™ photodiode array detector (PDA)와 HPLC 컬럼은 Waters ACQUITY™ BEH C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 × 100)을 사용하였고, software는 Empower를 사용하였다.

분석에 사용된 시약은 Methanol (HPLC용, Junsei), acetonitrile (HPLC용, JT BAKER), 물(3차 증류수)을 사용하였다. 실험에 사용된 표준품은 Sigma사 (USA) 및 ChemFaces사(China)의 제품을 구입하여 사용하였다.

*Corresponding author: Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : August 7, 2020 / Revised : August 19, 2020 / Accepted : August 25, 2020



3. 표준용액의 조제

忍冬 시료의 정량에 사용된 표준품은 loganin, chlorogenic acid이며 위 표준품들을 칭량하여, 각각 Methanol 1 ml당 1 μ g을 함유하는 표준원액을 만든 후, 위 표준원액 정량하여, Methanol로 ml당 1, 5, 10 ng의 농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 표준곡선의 결정계수(R_2) 값은 위 표준물질 모두에서 0.999 이상이었다.

4. 시료의 정량

PDA의 분석 파장은 loganin은 230 nm, chlorogenic acid는 330 nm에서 분석하였다. Column의 온도는 실온에서 분석하였다.

이동상으로는 0.1% Formic acid를 함유한 acetonitrile 과 물의 혼합액을 사용하였으며, 아래의 조건으로 분석하였다. 시료는 2 μ l를 주입하였으며, 유속은 0.4 ml/min이었다. 분석결과로, 머무름 시간에 의해 정성확인을 하였으며, 피크면적법으로 정량하였다.

Table 1. Mobile Phase Condition of UPLC

Time (minutes)	0.1% FA/Water (%)	0.1% FA/Acetonitrile (%)	Flow rate (mL/min)
0	98	2	0.40
1.0	98	2	0.40
2.0	90	10	0.40
4.0	70	30	0.40
7.0	50	50	0.40
9.0	30	70	0.40
10.0	10	90	0.40
12.0	0	100	0.40
14.0	98	2	0.40
16.0	98	2	0.40

UPLC; Ultra Performance Liquid Chromatography, FA; Formic acid

5. 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 응용한 Lee 등의 방법⁸⁾에 따라 측정하였다. 추출물 1 ml에 2 N Folin시약(Sigma, USA) 1 ml를 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na_2CO_3 1 ml를 서서히 가하였다. 이 혼합액을 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 UV spectrophotometer (TECAN, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물의 함량은 tannic acid를 이용하여 작성된 표준곡선으로부터 함량을 구하였고, 이때 tannic acid의 농도는 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml로 조제 후 측정하였다.

6. 통계

GB 추출군에 대한 IB 추출군의 통계적 유의성은 student t-test로 평가하였다. 통계적 유의성은 P

값이 0.05 또는 0.01 미만을 기준으로 검정하였다.

III. 결과

1. 추출물의 색상변화

鐵鍋에 달인 약액의 외관은 沈紫色, 黑綠色, 紫黑色을 나타낸다는 이전의 보고에³⁾ 근거하여, 본 연구에서는 먼저 忍冬의 鞣鐵 및 伴鐵시 추출액의 외관을 검토하였다. 본 연구에서도 GB추출물은 외관상 황갈색(Hex code #6c3b24)을 나타내었으나, IB3 추출물의 외관은 흑갈색(Hex code #372e2e)을 나타내었다(Fig 1A). 구슬의 외관에 있어서 GB의 경우는 추출전후에 뚜렷한 변화가 없었으나, IB의 경우 추출 후에는 쇠구슬의 외관이 맑지 않고 또한 표면이 회색으로 변화되었다(Fig. 1B).

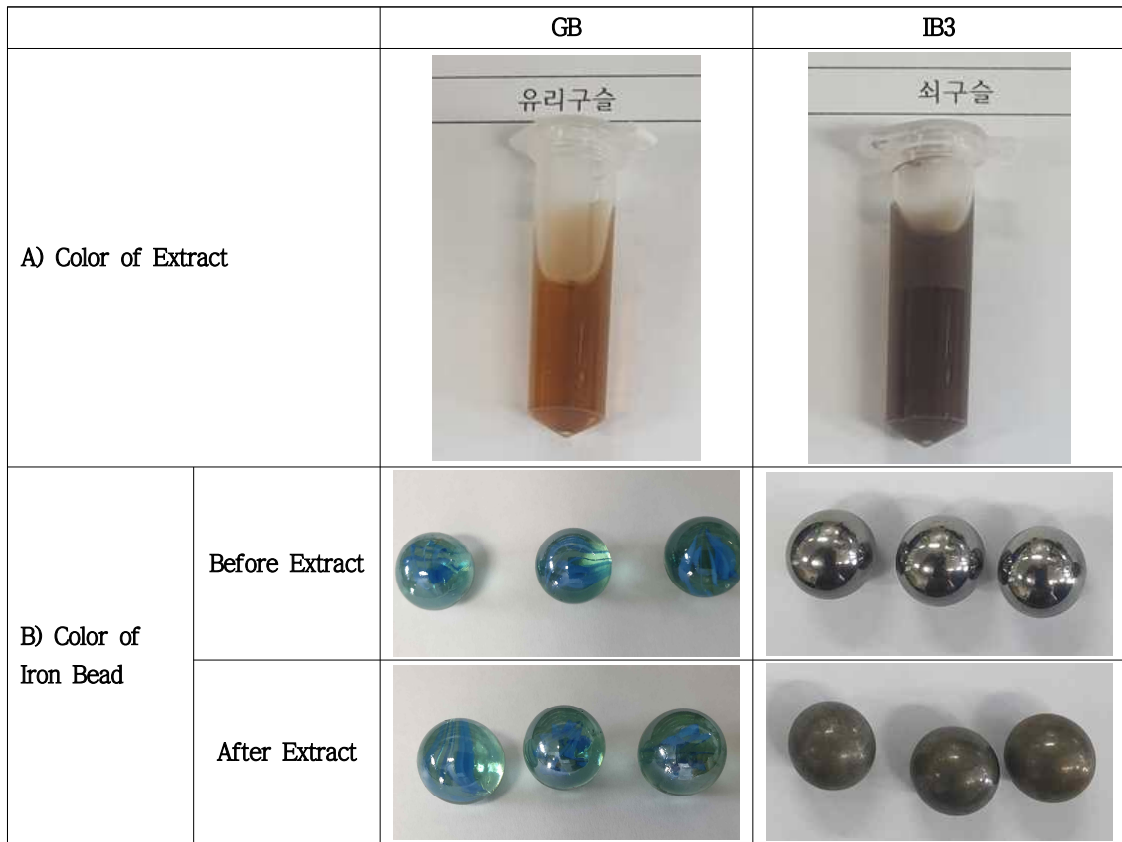


Fig. 1. Color of Extracts and Beads

(A) The color of extract with glass beads is yellowish brown (Hex code #6c3b24), and the color with iron beads is blackish brown (Hex code #372e2e). (B) The color of glass beads was not changed, but the color of iron beads was changed to gray.

2. pH 변화

대다수의 한약재는 유기산類, 플라보노이드, 알칼로이드, 아미노산, 탄닌 및 기타 페놀류 등을 함유하고 있다. 이러한 성분들은 Fe와 화학반응을 일으켜 약액의 변색, 혼탁, 침전을 유도하기도 한다. 특히 다량의 탄닌산은 철과의 반응을 통해 탄닌산제1철(鞣酸亞鐵)을 생성하기도 한다.⁴⁾ 이에 따라 본 연구에서는 각 추출물의 pH를 pH meter로 측정하였다. 측정 결과 GB 추출물은 4.580 ± 0.017 , IB1, IB2, IB3는 각각 4.657 ± 0.006 , 4.683 ± 0.021 , 4.737 ± 0.012 를 나타내어 추출물의 산성도 유의하게 완화되었다(Fig. 2).

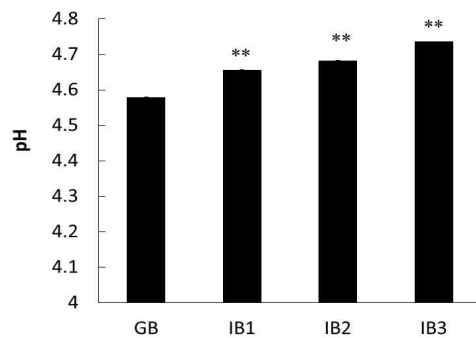


Fig. 2. The Change of pH on The Extracts
pH of the extracts was measured with pH meter. Values are expressed as the means \pm standard deviation (S.D.) of three independent experiments. *Significant as compared with GB, ** $p < 0.01$. GB; glass bead, IB; Iron bead

3. 폴리페놀함량의 변화

폴리페놀은 한 개 이상의 하이드록시기가 치환되어 있는 이차 대사산물로, 전자를 수용하는 메카니즘이 있어 다양한 생리활성을 가지고 있다. 대표적인 생리활성으로는 항산화효과, 항암효과, 항염증효과 등 다양한 효능이 알려져 있다.⁹⁾ 이러한 관계로 忍冬의 鞣鐵 및 伴鐵 열수 추출시 총 폴리페놀 함량을 조사하였다. GB 추출액의 폴리페놀 함량은 $69.71 \pm 4.18 \mu\text{g}/\text{mg}$ 이었으나, IB1, IB2, IB3는 각각 45.65 ± 2.87 , 23.24 ± 3.54 , $17.37 \pm 3.67 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 GB대비 65.49, 33.33, 24.92 %수준으로 감소하였으며, 철구슬 수의 증가에 따라 유의성있게 감소하였다 (Fig. 3).

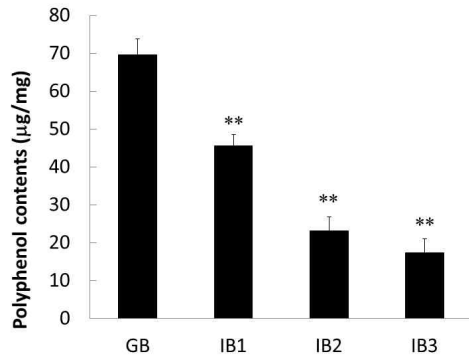


Fig. 3. Contents of Total Polyphenol in The Extracts

Contents of total polyphenol in the extracts based on tannic acid as a standard. Values are expressed as the means \pm standard deviation (S.D.) of three independent experiments. *Significant as compared with GB, ** $p < 0.01$. GB; glass bead, IB; Iron bead

4. 주요성분의 변화

Loganin은 忍冬의 지표성분으로서, 정량시 건조 忍冬덩굴은 loganin ($\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$; 390.38)을 0.1%이상 함유하여야 한다 <대한약전 의약품각조 제2부(제 2019-11호)>.⁶⁾ Loganin은 忍冬을 포함하여 金銀花, 山茱萸, 馬錢子, 敗醬根등에 포함되어 있으며,^{10,11)} loganin은 항염증효과¹²⁾, 항산화효과 및 세포보호효과를 나타내며¹³⁾, 또한 hippocampus와 frontal cortex에서 acetylcholinesterase의 활성을 억제하여 항건망효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 본 연구에서 loganin의 함량은 GB에서는 $210.91 \pm 2.51 \text{ ppm}$

이었으며, IB1, IB2, IB3는 각각 202.45 ± 6.62 , 205.09 ± 10.17 , $208.55 \pm 1.34 \text{ ppm}$ 으로 유의한 변화는 나타내지 않았다(Fig. 4A).

Chlorogenic acid는 杜沖, 山査, 金銀花, 예르바 마테(Yerba Mate) 등에 포함되어 있으며^{11,15,16)} chlorogenic acid는 항고지혈, 항당뇨, 항박테리아, 항산화, 항염증작용이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 본 연구에서 chlorogenic acid의 함량은 GB에서는 $100.18 \pm 2.08 \text{ ppm}$ 이었으며, IB1, IB2, IB3는 각각 89.10 ± 2.68 , 89.71 ± 2.28 , $87.53 \pm 1.48 \text{ ppm}$ 으로 유의한 감소를 나타내었다. Chlorogenic acid는 伴鐵의 경우 10~13%정도의 함량 감소를 나타내었다(Fig. 4B).

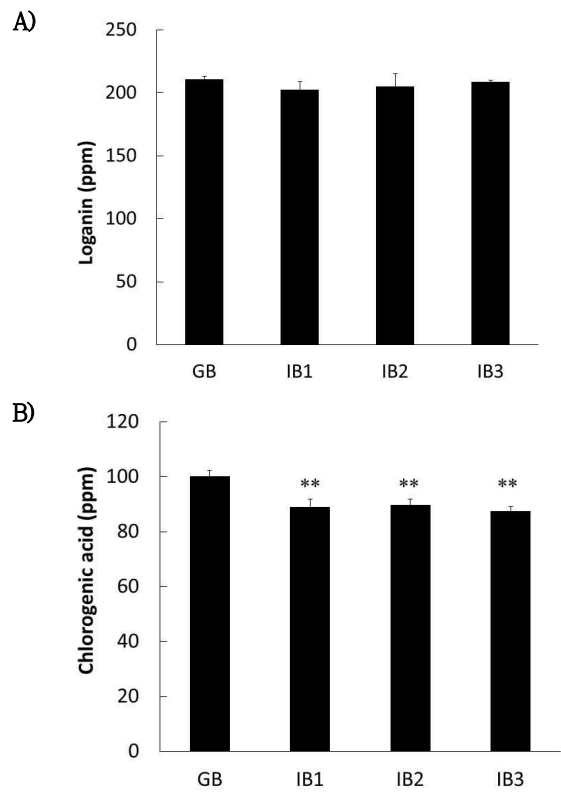


Fig. 4. Contents of Loganin and Chlorogenic Acid in Extracts

The Extracts were analyzed for its loganin (A) and chlorogenic acid (B) content using UPLC. Values are expressed as the means \pm standard deviation (S.D.) of three independent experiments. *Significant as compared with GB, ** $p < 0.01$. GB; glass bead, IB; Iron bead. UPLC; Ultra Performance Liquid Chromatography.

IV. 고찰 및 결론

본 연구는 동의보감 및 방약합편, 방제학의 근거에 따라 鐵器抽出이 권장되지 않는 忍冬에 대한 伴鐵추출물의 평가를 위하여 진행하였다. 일반적으로 忍鐵해야 하는 이유는 약물을 달일 때 鐵器로 달이면 침전이 발생하여 용해도가 떨어지고 추측하기 어려운 화학적 변화를 일으켜 부작용이 생길 수도 있고 또한 치료효과에도 영향을 미친다는 것이다.²⁾ 이전의 연구로 鐵器에 달인 전탕액은 外觀이 深紫色, 黑綠色, 紫黑色을 나타내었고, 山楂, 苦蔘, 麻黃의 鐵器 전탕액은 녹슨 맛이 나는 것으로 보고되었다.^{3,4)}

方藥合編에서는 추출시 忍鐵해야 하는 약재로 忍冬, 桑白皮, 桑枝, 桑寄生 등 20종을 제시하였으나, 본 연구에서는 忍冬에만 국한하여 진행하였다.

먼저 추출물의 외관은 glass beads (GB)를 넣어 추출한 추출물은 황갈색(Hex code #6c3b24)을 나타내었으나, iron beads 3개(IB3)를 넣고 추출한 추출물은 흑갈색(Hex code #372e2e)을 나타내었다. 이는 Ming과 Huang의 연구와 동일한 결과이다.³⁾ 추출물의 색상은 객관성을 확보하기 위하여 hex code를 병기하였다. 추출물을 2ml의 tube에 넣고 디지털 카메라로 촬영한 후 정중앙 부분의 색을 <https://www.color-hex.com/>에서 확인하여 hex code를 구하였다. 구슬의 외관에 있어서도 IB를 넣어 추출한 경우에는 쇠구슬의 표면이 회색으로 변화되었다. 이러한 결과는 한약재에는 대부분 유기산類, 플라보노이드, 알칼로이드, 아미노산, 탄닌 및 기타 페놀류 등을 함유하고 있으며, 이러한 성분들이 Fe와 화학반응을 철의 표면을 변화시킨 것으로 추측된다. 또한 pH에 있어서도 IB의 숫자가 증가함에 따라 추출물의 산성도도 유의하게 완화되었다. 이러한 결과는 약재속의 산성분과 철의 반응에서 기인한 것으로 추측되나 향후 추가적인 연구가 필요하다.

폴리페놀은 flavonoids, anthocyanins, lignans, catechins, tannins, isoflavones, resveratrols 등을 총칭하며, 식물계에 광범위하게 분포되어 있다.¹⁸⁾ 폴리페놀의 하이드록실기는 다양한 화합물과 쉽게 결합하는 특성으로 항산화 및 항암, 항염 효과를 나타낸다.⁹⁾ IB 추출액에서 폴리페놀의 함량은 IB의 숫자(1~3)가 증가함에 따라 GB대비 각각 65.49, 33.33,

24.92%수준으로 감소하였다. 이러한 결과는 폴리페놀이 항산화, 항암, 항염 등 다양한 생리활성을 가지고 있으므로, 忍冬 추출시 폴리페놀을 적절히 추출하기 위해서는 반드시 忍鐵(忍鐵)하여야 함을 보여주는 결과이다.

忍冬에는 lonicerin, luteolin, tannin, alkaloid 등을 함유한 것으로 알려져 있으나¹⁹⁾, 지표성분으로 <대한약전 의약품각조 제2부(제2019-11호)>⁶⁾에서는 loganin을 0.1% 이상 함유, <생약관련 공정서 규격 비교 연구(중국약전 제I부 약전 및 음편)>⁷⁾에서는 chlorogenic acid를 0.01% 이상 함유하는 것으로 정의하고 있어, 본 연구에서는 loganin 및 chlorogenic acid의 함량을 평가하였다.

Loganin은 항염증효과, 항산화효과, 세포보호효과 및 항건망효과를 나타내며,¹²⁻¹⁴⁾ chlorogenic acid는 항고지혈, 항당뇨, 항박테리아, 항산화, 항염증작용이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 본 연구에서 loganin의 함량은 GB를 넣어 추출한 추출물과 IB 1~3를 넣어 추출한 추출물에서 유의한 변화를 나타내지 않았다. 그러나, chlorogenic acid의 경우는 IB를 넣어 추출한 추출물에서 GB를 넣어 추출한 추출물에 비교하여 약 10~13%정도의 함량 감소를 나타내었다. 본 성분 분석 결과는 loganin 및 chlorogenic acid에 국한하여 진행하였으나, 인동추출물의 효과가 다성분의 복합적인 작용이므로 향후 성분변화의 추가적인 연구가 필요하다.

이상의 연구결과는 忍鐵/伴鐵 추출물에 대한 초보적인 연구로, 향후 추출물의 수율, 다양한 성분의 함량변화 및 이에 따른 약리효과, 약물배합시 해당성분의 추출비율 변화, 伴鐵時 독성 등 좀 더 심도 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2018R1A5A2025272)

References

1. Heo J. Dongeuibogam. Seoul:Namsandang. 1983. p.674, 678



2. Kim SC, Kim SH, Roh SH, Park SD, Byun SH, Seo BI, Seo YB, Lee SI, Lee TH, Joo YS, Choi HY. Herbal Formulations. Seoul: Younglimsa. 1999. p.54.
3. Meng GY, Huang ZX. The improvement of traditional Chinese medicine decoction. *Jilin Traditional Chinese Medicine*. 1990;5:36-7.
4. Herbal Formulations Text Compilation Committee. Herbal Formulations (general summary). Seoul:Koonja Press. 2020. p.126-7.
5. Hwang DY. *BangYakHabPyeon* (6th Ed). Seoul:Namsandang. 1985. p.286-7.
6. https://mfds.go.kr/brd/m_211/list.do?multi_itm_seq=0&board_id=data0005&seq=&itm_seq_1=&srchTp=0&srchWord=%EB%8C%80%ED%95%9C%EB%AF%BC%EA%B5%AD%EC%95%BD%EC%A0%84&data_stts_gubun=C9999
7. <http://www.ndsl.kr/ndsl/commons/util/ndslOriginalView.do?dbt=TRKO&cn=TRKO200600001900&rn=&url=&pageCode=PG18>
8. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2005;37(2):233-40
9. Jang HJ, Yu EA, Han KS, Shin SC, Kim HK, Lee SG. Changes in Total Polyphenol Contents and DPPH Radical Scavenging Activity of *Agrimonia pilosa* According to Harvest Time and Various Part. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 2008;16(6):397-401.
10. Wang JW, Pan YB, Cao YQ, Wang C, Jiang WD, Zhai WF, Lu JG. Loganin alleviates LPS-activated intestinal epithelial inflammation by regulating TLR4/NF- κ B and JAK/STAT3 signaling pathways. *Kaohsiung J Med Sci*. 2020;36(4):257-64.
11. Takaki K. *Kampo Pharmacology* (1st Ed). Tokyo: Nanzando. 1997. p.248, 350, 396
12. Wen H, Xing L, Sun K, Xiao C, Meng X, Yang J. Loganin attenuates intestinal injury in severely burned rats by regulating the toll-like receptor 4/NF- κ B signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2020;20(1):591-8.
13. Chen Y, Jiao N, Jiang M, Liu L, Zhu Y, Wu H, Chen J, Fu Y, Du Q, Xu H, Sun J. Loganin alleviates testicular damage and germ cell apoptosis induced by AGEs upon diabetes mellitus by suppressing the RAGE/p38MAPK/NF- κ B pathway. *J Cell Mol Med*. 2020;24(11):6083-95.
14. Kwon SH, Kim HC, Lee SY, Jang CG. Loganin improves learning and memory impairments induced by scopolamine in mice. *Eur J Pharmacol*. 2009;619(1-3):44-9.
15. Kim DG, Kim MB, Kim H, Park JH, Lim JP, Hong SH. *Herb Medicinal Pharmacognocny*. Seoul:Shinilbooks. 2005. p.116
16. Dabulici CM, Sârbu I, Vamanu E. The Bioactive Potential of Functional Products and Bioavailability of Phenolic Compounds. *Foods*. 2020;9(7):E953.
17. Yan Y, Zhou X, Guo K, Zhou F, Yang H. Use of Chlorogenic Acid against Diabetes Mellitus and Its Complications. *J Immunol Res*. 2020;9680508.
18. Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res*. 2000;33:55-64.
19. Seo BI, Choi HY. *Clinical Herbology* (1st Ed). Seoul:Younglimsa. 2004. p. 246