

전탕용수의 종류에 따른 대황 성분의 추출효과

장유선¹ · 주반멘² · 이관준² · 서은영³ · 김동희⁴ · 강종성² ★

¹충남대학교 의약품개발연구소, ²약학대학 약학과,

³신약전문대학원, ⁴대전대학교 한의학과

(2010. 8. 30. 접수, 2010. 12. 21. 승인)

Effects of the decoction water on the extraction of the bioactive compounds from rhubarb

Yu Seon Jang¹, Van Men Chu², Kwan Jun Lee², Eun Young Seo³,
Dong Hee Kim⁴ and Jong Seong Kang² ★

¹Drug Development & Research Institute, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

²College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

³Graduate School of New Drug Discovery & Development,
Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

⁴College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, 300-716, Korea

(Received August 30, 2010; Accepted December 21, 2010)

요약: 본 연구는 제주지역에서 생산되는 세 종류의 물과 서울지역에서 사용되고 있는 수도물 등 네 종류의 물을 전탕용수로 하여 중요 한약재인 대황으로부터 활성성분을 추출하고 용수 중의 미네랄이 대황 활성성분 추출에 미치는 효과에 대하여 비교 분석하였다. 유도결합플라즈마방출분광기와 유도결합플라즈마질량분석기를 이용하여 30여종의 미네랄과 다수의 음이온을 분석하였다. 각 전탕용수로 대황을 추출하고 그 추출액의 일부를 증발시켜 총 추출량을 구하고, 또한 HPLC를 이용하여 추출액으로부터 대황의 생리활성 성분을 분석하였다. 용수 간 총 추출량과 대황 성분함량의 차이 검정을 위하여 Kruskal-Wallis 검정을 시행하였고, 미네랄, 음이온, 총 추출량 및 성분함량과의 관계분석을 위하여 다중요인분석을 시행하였다. 분석결과 용수 중의 미네랄 함량은 대황의 총 추출량 및 성분 추출량과 높은 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

Abstract: The quality of decoction water would be important for the preparation of herbal medicines. Four types of decoction water, S1, S2, S3 and S4, three types of mineral water from Jeju island and one type of tap water from Seoul region were evaluated. The contents of minerals in decoction water were analysed by ICP-AES and ICP-MS. There was significant difference in the mineral contents between the types of decoction water. The bioactive components from rhubarb were extracted with four types of water and the relationship between mineral contents in water and the extracted amounts of components was evaluated. The total extraction was calculated by evaporating water and weighing the residue. The bioactive components in rhubarb were determined by HPLC method. Kruskal-Wallis rank sum tests were used. Multiple factor analysis was used

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-821-5928 Fax : +82-(0)42-823-6566

E-mail : kangjss@cnu.ac.kr

www.kci.go.kr

to analyze the relation between the contents of mineral and total extraction or bioactive components in the decocted solutions. Not only the total extraction but also the amount of extracted bioactive components showed statistically significant relationship with the contents of minerals and anions in decoction water.

Key words: decoction water, rhubarb, total extraction, mineral content, multiple factor analysis.

1. 서 론

인구의 증가와 산업발전에 따른 오염물질 배출량 증가로 인한 자연환경 훼손 및 생태계의 변화로 지하수 오염은 심각해지고 있는 반면, 삶의 질에 대한 욕구는 증가하여 수질이 좋은 물에 대한 관심이 점점 고조되고 있다. 좋은 물에 대하여 쉽게 정의할 수 없으나 건강에 유익하고 맛있는 물이라고 할 수 있다.¹ 일생동안 섭취하는 물의 양은 대량으로, 장기간에 걸쳐 지속적으로 섭취하게 되면 물속에 함유되어 있는 성분이 체내의 각 기관에 미치는 영향을 무시할 수 없다. 특히, 물속에 존재하는 미네랄의 양에 크게 영향을 받으며, 미네랄의 비율에 따라서도 물맛의 차이가 큰 것으로 알려져 있다.² 수중의 미네랄 성분은 세포분열을 활성화하여 세포를 성장시켜 주며, 적정량이 함유되었을 때 물맛을 좋게 하고 건강에 도움을 줄 수 있다. 우리 인체에 필요한 필수 금속은 하루 약 1.5 g정도이며, 인체의 구성 원소 중 1일 100 mg이상 요구되는 미네랄은 칼슘, 마그네슘, 나트륨, 칼륨, 인 등이며, 그 이하로 요구되는 미량 원소는 철, 망간, 아연, 구리, 규소 등이 있다.² 한의학에서 각종 한약제로부터 유효성분을 추출하는 것은 매우 중요하며 추출 정도는 전탕용수, 추출방법 등에 영향을 받을 것으로 판단된다. 전탕법에 대한 현재까지의 연구는 주로 전탕시간 및 온도에 대한 것으로³⁻⁶ 전탕용수의 종류에 따른 추출효과는 연구된 바가 없다.

전탕용수의 종류에 따른 추출효과를 비교하기 위하여 제주지역에서 생산되는 세 종류의 물과 서울지역에서 사용되고 있는 수도물 등 네 종류의 물을 이용하여 한약재를 추출하고 성분함량을 HPLC로 분석하였다. 전탕용수 중의 미네랄은 그 자체로서 용수의 품질을 규정지를 뿐 아니라 타 활성성분의 추출 효과에도 영향을 미칠 수 있으므로 전탕용수 중의 미네랄 및 음이온 성분을 유도결합플라즈마방출분광기(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer; ICP-AES)와 유도결합플라즈마질량분석기(ICP Mass Spectrometer; ICP-MS) 및 이온크로마토그래프(Ion

Chromatograph; IC)을 이용하여 분석하였다. 추출대상 한약재로 대황을 선택하였는데 이 약은 마디풀과(Polygonaceae)에 속한 다년생 초본으로 사열통장(瀉熱通腸), 양혈해독(涼血解毒), 축어경통(逐瘀經痛) 등의 효능이 알려져 있는⁷ 한의학에서 매우 중요한 약재이다. 대황의 성분으로 안트라퀴논계 화합물인 chrysophanol, emodin, aloe-emodin, rhein, physcion, sennoside A, B, C, D, E 및 스틸벤계 화합물인 rhaponticin, piceid, deoxyrhaponticin 등이 알려져 있는데 현대과학에서 이들 성분에 의한 대황의 사하효과,⁸⁻¹⁰ 항미생물효과,^{11,12} 항암 및 항돌연변이효과,¹³⁻¹⁷ 지혈효과, 면역억제효과, 이노 및 항염증효과, 신경 보호효과,¹⁸ 장관 보호효과^{19,20} 등이 증명되고 있다. 본 연구에서는 대황의 총 추출량 및 성분 추출량이용수 중의 미네랄과 어떠한 연관성이 있는지를 다중요인 분석법으로 평가하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 시료

HPLC에 사용한 용매는 모두 HPLC용으로 SK Chemical (Ulsan, Korea)에서 구입하였고 시료 추출을 위한 용매는 모두 특급 및 일급시약을 사용하였다. 3차 증류수의 제조에는 Millipore사의 Milli-Q Apparatus (Bedford, MA, USA)를 사용하였다. 전탕용수로 사용된 물 시료는 제주지역에서 생산되는 세 종류의 물과 서울지역에서 사용되고 있는 수도물 등 네 종류로 제주개발공사로부터 제공받아 각각 S1, S2, S3, S4로 코드화하여 실온에 보관하였다. 대황시료는 대전광역시 중양동 한약재시장에서 구입하였으며 대전대학교 한의과대학 김동희교수가 감정하였고, 증거시료는 충남대학교 약학대학 약품분석교실에 보관하였다. 추출액 시료는 각 전탕용수로 동일조건에서 대황 시료를 5회 추출하여 S1-1~S1-5, S2-1~S2-5, S3-1~S3-5, S4-1~S4-5로 코드화하여 냉장 보관하였다.

2.2. 전탕용수 중의 미네랄 및 음이온 측정

전탕용수 중 ppm 수준으로 함유된 Ca, K, Mg, Na,

Si, S 등의 미네랄 분석을 위하여 ICP-AES를, ppb 수준으로 함유된 B, Al, Fe, Cu, V, Se, Sr, P, Mo 등의 분석으로 위하여 ICP-MS를 이용하였으며, 음이온 분석을 위하여 이온크로마토그래프(IC)를 이용하였다. ICP-AES는 Perkin Elmer사(Waltham, MA, USA)의 Optima 3300DV제품으로 RF power 1300W, cooling, 보조, 분무가스의 유속은 각각 1.5, 0.5, 0.8 L/min로 하였으며, ICP-MS는 Perkin Elmer사(Waltham, MA, USA)의 ELAN DRC II제품으로 RF power 1400W, cooling, 보조, 분무가스의 유속을 각각 15, 1.5, 0.1 L/min로 하였다. 이온크로마토그래프는 Metrohm 사(Switzerland)의 모델명 Compact IC pro를 사용하였으며, 칼럼은 Metrosep A Supp (5.0×150 mm), 분리용매로 3.2 mM Na₂CO₃와 1.0 mM NaHCO₃를 함유하는 물을 사용하였고, 유속은 0.7 mL/min, 분리온도는 30 °C로 하였다.

2.3. 대황의 추출

대황을 건조하여 조말로 하고 50 g을 취하여 전탕용수 S1, S2, S3, S4 각각을 500 mL씩 가하고 1시간 동안 환류 추출하였다. 추출액을 냉각 시킨 후 여과하여 검액으로 하였다.

2.4. 대황 성분 총 추출량의 측정

추출액 시료 1 mL를 미리 무게를 측정된 에펜도르크 튜브에 넣고 Techne사(England)의 모델명 FSC4000D 증발기에서 질소기류를 통하면서 수분을 증발시킨 후 잔류물의 무게를 측정하여 전탕용수 mL 당 총 추출량으로 하였다.

2.5. HPLC분석에 의한 추출 성분량 측정

대황추출액 중 활성성분을 Waters 510 펌프, Waters 717 자동주입기 및 Waters 486 UV 검출기(Milford, MA, USA)가 장착된 HPLC로 분석하였다. 사용된 칼럼은 RStech사(Korea)의 Optimapak C18 (4.6×250 mm, 5 μm)이었고 이동상은 0.05 M 인산완충액을 A, 아세트 니트릴을 B로 하여 0분 4% B; 10분 11% B; 25분 13% B; 50분 15% B; 70분 20% B; 100분 33% B; 115분 60% B; 150분 60% B와 같이 기울기 용리하였다. 이동상의 유속은 분당 1 mL, 주입량은 10 μL였으며 검출은 UV 280 nm였다. 분리된 성분의 확인을 위하여 ESI가 장착된 LC-MS-2010-EV (Shimadzu, Japan)를 이용하여, 분무기체유속 1.4 L/min, CDL 온도 250 °C, 가열 블록온도 200 °C, 검출기전압 1.50 kV, CDL 전압

15.0 V로 하여 HPLC-MS 분석을 시행하였다.

2.6. 통계처리

대황의 추출량이 전탕용수별 차이가 있는지의 여부를 살펴보기 위하여 Kruskal-Wallis검정을 시행하였으며, 용수중에 함유된 미네랄과 대황 추출액으로부터의 추출량 그리고 대황 성분 분리에 사용된 4종의 성분들의 함량과의 관계분석을 위하여 다중요인분석을 실시하였다. 다중요인분석은 여러 개의 블록으로 설명되어지는 객체들의 집합을 분석하는 다변량 통계분석 방법으로 블록들의 특성이 객체들의 집합에 미치는 영향을 분석하거나 블록간의 특성관계 파악에 유용하다.^{21,22} 본 연구에서는 통계분석용 소프트웨어 R(version 2.12.0, download <http://www.r-project.org>)을 활용하여 그룹 간 평균의 차이검정은 stats 패키지의 kruskal.test함수를 이용하였고 다중요인분석(multiple factor analysis, MFA)은 Facto-MineR패키지의 MFA함수를 각각 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

3.1. 전탕용수의 미네랄 성분분석

각각의 전탕용수로부터 미네랄 30여종과 음이온 5

Table 1. Contents of minerals and anions in decoction waters with various sources

	S1	S2	S3	S4	Unit
Ca	3.06	2.89	4.98	0.4	ppm
K	2.16	5.6	6.57	0.41	
Mg	2.38	4.57	2.19	0.13	
Na	5.43	17.74	25.22	1.38	
Si	12.32	12.28	16.01	0.24	
S	0.45	0.59	0.75	0.17	
B	7.4	14.67	21.79	9	ppb
Al	2.49	7.19	11	0.16	
Fe	4.08	5.56	7.55	0.15	
Cu	0.07	0.21	0.29	0.09	
V	9.3	29.64	36.26	< 0.05	
Se	0.27	0.42	0.18	0.1	
Sr	19.5	27.98	42.73	2.1	
P	97.12	119.94	115.1	1.33	
Mo	0.94	3.12	8.4	< 0.05	
F ⁻	< 0.1	< 0.1	0.1	< 0.1	
Cl ⁻	5.91	5.79	7.35	0.99	
NO ₃ ⁻	1.14	1.34	< 0.1	1.06	
SO ₄ ²⁻	1.43	1.62	1.99	< 0.1	

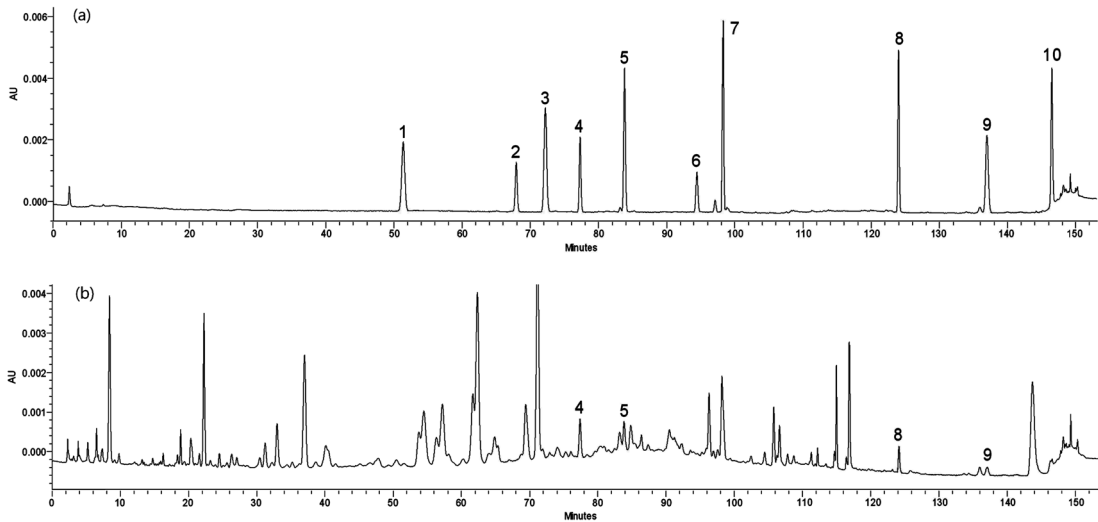


Fig. 1. Representative chromatograms of (a) standard mixture and (b) extract of rhubarb sample analyzed by HPLC. Conditions: Column; Optimapak C18 (4.6×250 mm), eluent A. 0.05 M phosphate buffer, B. acetonitrile, gradient; 0 min, 4% B; 10 min, 11% B; 25 min, 13% B; 50 min, 15% B; 70 min, 20% B; 100 min, 33% B; 115 min, 60% B; 150 min, 60% B, flow rate; 1 mL/min, detection; UV 280 nm. Peak identification; 1. piacetanol, 2. sennoside B, 3. rhaponticin, 4. sennoside A, 5. emodin-glucoside, 6. ampelopsin B, 7. deoxyrhaponticin, 8. emodin, 9. chrysophanol, and 10. physcion.

종을 분석하였으며 분석결과 Table 1에 나타내었다. 미네랄 및 음이온 중 Ca, Mg, Na, K, Si, SO_4^{2-} 등은 ppm 단위로 함유되어 있으며 맛있고 건강한 물의 미네랄 밸런스를 나타내는 하시모토(Hashimoto)지표⁵의 계산에도 이용된다. 이 지표에 의하면 네 가지의 전탕용수는 모두 맛있는 물로 분류되는 것으로 나타났다. 전탕용수별 미네랄 분석결과는 대체적으로 S1, S2, S3는 비슷한 결과를 보인 반면 S4는 다른 양상을 보였다. 30여종의 분석성분 중 S3의 경우 Ca를 비롯하여 18종의 미네랄에 대해 타 전탕용수보다 높은 함량을 보였으며, 그 중에서도 Na, B, V, Sr, Mo의 경우 특히 높은 함량을 보였다. 음이온의 경우 NO_3^- 와 PO_4^{3-} 등은 미량 함유되었고, Cl^- 이 가장 높은 함량을 나타냈다.

3.2 대황 성분의 총 추출량

대황 추출액 1 mL중 추출 성분의 총량은 S1, S2, S3, S4의 경우 각각 38.1, 38.7, 42.7, 32.9 mg이었다. 전탕용수에 대한 대황 성분의 총 추출량의 평균함량에 있어서 Kruskal-Wallis검정 결과 카이제곱은 11.37이고 p-값은 0.0099로 전탕용수별 추출량의 차이는 통계적으로 유의함을 알 수 있었다. 용수별 구체적 차이를 확인하기 위하여 사후검정한 결과 S4의 추출량이

가장 낮은 반면 S3의 추출량이 네 가지 용수 중 가장 높은 것으로 나타났으며 S1, S2에 대한 추출량의 차이는 뚜렷이 구별되지 않았다.

3.3 추출액으로부터 대황 성분의 분석

대황추출액 중의 성분을 확인하기 위하여 대황 및 유사 생약의 성분인 piacetanol, sennoside B, rhaponticin, sennoside A, emodin-glucoside, ampelopsin B, deoxyrhaponticin, emodin, chrysophanol, physcion 등 10종의 화합물을 지표성분으로 설정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 10개의 지표성분 중 대황추출액으로부터 sennoside A, emodin-glucoside, emodin, chrysophanol 등 4개의 성분이 확인되었다. LC-MS 분석 결과 양이온모드에서 emodin-glucoside (분자량 432)는 455 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 471 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 271 $[\text{M}-\text{Glc}+\text{H}]^+$, chrysophanol(분자량 254)은 255 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 음이온모드에서 sennoside A(분자량 862)는 861 $[\text{M}-\text{H}]^-$, emodin(분자량 270)은 269 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 에서 특징적인 피크를 나타내었다(Fig. 2). 표준품의 머무름 시간 및 LC-MS 측정의 결과와 비교하여 분리된 성분을 확인하였고, 그 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 전탕용수에 대한 분리된 성분들의 Kruskal-Wallis검정 결과 모든 성분들의 카이제곱은 12.38~15.68에 나타났으며, 이 때 p-값은

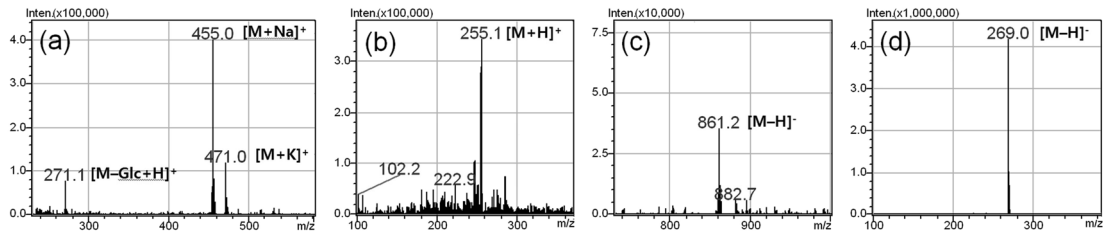


Fig. 2. LC-MS spectra of separated components (a) emodin-glucoside and (b) chrysophanol in positive mode, and (c) sennoside A and (d) emodin in negative mode. LC-MS conditions: nebulizing gas flow rate; 1.4 L/min, CDL temperature; 250 °C, heat block temperature; 200 °C, detector voltage; 1.50 kV, CDL voltage; 15.0 V.

Table 2. Contents of marker compounds in the rhubarb extract with various decoction waters (mean±SD, n=5, mg/mL)

Decoction water	SennosideA	Emodin-glucoside	Emodin	Chrysophanol
S1	0.200±0.016	0.025±0.002	0.025±0.003	0.017±0.003
S2	0.201±0.017	0.028±0.003	0.026±0.003	0.017±0.003
S3	0.243±0.015	0.033±0.002	0.046±0.002	0.037±0.003
S4	0.163±0.011	0.025±0.003	0.030±0.003	0.020±0.002

0.001~0.006의 범위 내에 존재하여 전탕용수별 성분들의 함량차이는 통계적으로 유의함을 알 수 있었다. 용수별 구체적 차이를 확인하기 위하여 사후검정한 결과 sennosideA는 S3가 가장 높았고 S4가 가장 낮았으며 S1과 S2는 구별이 되지 않은 반면 emodin-glucoside, emodin 및 chrysophanol은 S3가 다른 용수에 비해 성분 함량이 가장 높았고 S1, S2, S4는 구별이 되지 않았다.

3.4. 미네랄과 추출량 및 성분과의 관계

전탕용수중의 미네랄량 및 음이온과 성분추출량과의 관계를 각 전탕용수중의 미네랄함량, 음이온, 전탕용수로 추출한 추출액의 총 추출량, 분리된 성분함량을 다중요인분석으로 평가하였다. 미네랄에서 분석에 이용된 데이터는 극미량의 원소들을 제외한 6종의 값을 이용하였고, 음이온에서는 미량(<0.1 ppm)의 원소 값을 0으로 할당하여 처리하였다. 다중요인분석에서 블록1은 미네랄, 블록2는 음이온, 블록3은 총 추출량, 블록4는 대항 분리성분으로 하여 분석하였다. 설명 요인의 수를 결정하기 위한 eigenvalue를 검토하였을 경우 누적 eigenvalue의 비율이 comp2일 때 97%로 나타나므로 요인의 수를 2로 결정하여 2차원으로 분석하였다.

네 가지 블록에 의한 분석결과 Fig. 3과 같이 S4는 미네랄의 특성에 의하여 (S1, S2)의 군집과 구별되고, S3는 대항의 분리성분에 의하여 (S1, S2)와 구별되었다. 한편, 미네랄이 총 추출량에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 분리성분과 음이온을 차례로 제거한 후 분석을 시행하였으며 분석결과 미네랄, 음이온, 총추출량

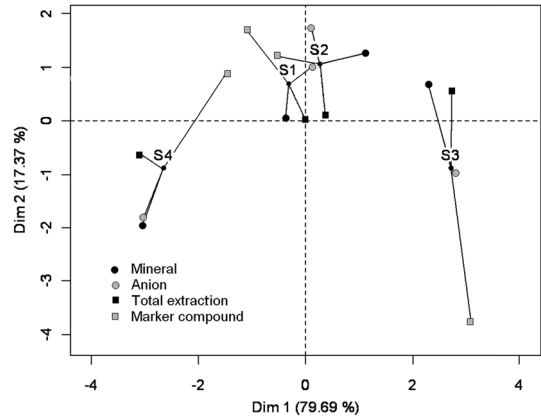


Fig. 3. Individual factor map among minerals, anions, total extraction and marker compounds.

의 관계에서 전탕용수들은 여전히 세 개의 군집 S3, (S1, S2), S4의 특성을 보였다. 이때 전체 변동분의 약 91%에서 미네랄과 총 추출량 모두 S3 ≥ S2 ≥ S1 ≥ S4 순으로 나타났으며, S1과 S2의 차에 비해 (S1, S2)와 S4 및 (S1, S2)와 S3는 상대적으로 크게 나타났다. 다중요인분석에서 모든 블록들의 요인들의 상관관계는 Fig. 4와 같고, 분석에 이용된 미네랄과 음이온 중 Mg와 NO₃⁻를 제외한 다른 모든 성분들은 총 추출량과 강한 양의 상관관계를 보였다. 네 가지 분리성분은 모두 총 추출량에 양의 상관관계를 보였고, 특히, sennoside A 및 emodin-glucoside는 강한 양의 상관관계를 보였다. 실험의 결과로 보아 전탕용수 중 미네랄의 종류

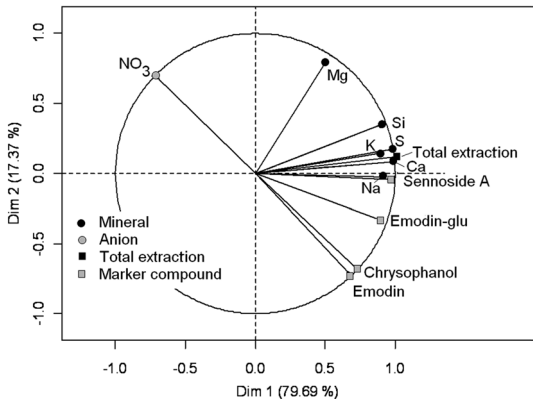


Fig. 4. Correlation circle among minerals, anions, total extraction and marker compounds in multiple factor analysis.

및 함량이 한약 성분의 추출에 어느 정도 영향을 미칠 수 있다고 추측되나 직접적인 요인이라고 단정하기는 어려울 것으로 판단된다.

결론

본 연구에서는 제주지역 암반수 3종과 서울지역 용수 1종 등 총 네 종류의 전탕용수에 대한 여러 종의 미네랄 및 음이온 성분을 분석하였고, 이것과 대황 성분 추출량과의 관계를 정립하고자 하였다. 분석결과 주요 미네랄 함량은 S1, S2, S3가 S4에 비해 월등히 많았다. 특히 S3의 경우 25개 원소 중 일부를 제외한 거의 모든 원소에서 가장 많은 함량을 보였다. 전탕용수에 따른 대황의 총 추출량을 Kruskal-Wallis 검정에 의하여 검정한 결과 $S3 \geq S2 \geq S1 \geq S4$ 순으로 세 집단 S3, (S1, S2), S4로 집단화 되었다. 미네랄과 총 추출량의 직접적인 관련성은 판단하기 쉽지 않으나 그 중 많은 종류의 미네랄이 추출량과 상관관계가 높은 것으로 분석되었다. 각 전탕용수로 추출된 대황의 성분, 즉, sennoside A, emodin-glucoside, emodin, chrysophanol의 추출정도는 용수에 따라 유의한 차이를 보였다. 추출 성분과 총 추출량이 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었으며, 성분 중에서도 sennoside A, emodin-glucoside는 추출량과 강한 양의 상관관계를 보였다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부, 한국산업기술진흥원, 제주광역경제권 선도산업지원단의 광역경제권 선도산업 육성사업 및 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업

(2009-0093815)으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이남례, 김영단, 최범석, 분석과학, **10**(6), 459-467(1997).
2. 이정자, 김오목, 이병옥, 정유진, 김경태, 최춘석, 대한상하수도학회 · 한국물환경학회, 공동 추계학술발표회 논문집, E143-E151(2006).
3. 김인락, 황금희, 주혜정, 대한본초학회지, **13**, 19-29(1998).
4. 김인락, 황금희, 주혜정, 마진열, 대한본초학회지, **14**, 15-22(1999).
5. 김호철, 안덕균, 이상인, 김용식, 본초분과학회지, **8**, 29-36(1993).
6. 김상찬, 김대희, 하수연, 동서의학, **25**, 1-39(2000).
7. 한국생약학교수협의회, 본초학, p255, 2007.
8. J. C. Tsai, S. Tsai and W. C. Chang, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 162-165(2004).
9. F. Raimondi, P. Santoro, L. Maiuri, M. Londei, S. Annunziata, F. Ciccimarra and A. Rubino, *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, **34**, 529-534(2002).
10. T. Yagi, K. Yamauchi and S. Kuwano, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 22-25(1997).
11. Z. Li, L. J. Li, Y. Sun and J. Li, *Chemotherapy*, **53**, 320-326(2007).
12. Z. C. Yang, B. C. Wang, X. S. Yang, Q. Wang and L. Ran, *Colloids Surf B Biointerfaces*, **25**, 79-81(2005).
13. X. R. Cui, Tsukada, M., Suzuki, N., Shimamura, T., Gao, L, Koyanagi, J., Komada, F. and Saito, S. *Eur. J. Med. Chem.*, **43**, 1206-1215(2008).
14. B. Xiao, J. Guo, D. Liu and S. Zhang, *Oral Oncol.*, **43**, 905-910(2007).
15. S. C. Kang, C. M. Lee, E. S. Choung, J. P. Bak, J. J. Bae, H. S. Yoo, J. H. Kwak and O. P. Zee, *Arch. Pharm. Res.*, **31**, 722-726(2008).
16. Y. T. Su, H. L. Chang, S. K. Shyue and S. L. Hsu, *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 229-241(2005).
17. M. Shoemaker, B. Hamilton, S. H. Dairkee, I. Cohen and M. J. Campbell, *Phytother. Res.*, **19**, 649-651(2005).
18. J. W. Gu, H. Hasuo, M. Takeya and T. Akasu, *Neuropharmacology*, **49**, 103-111(2005).
19. L. N. Liu, Q. B. Mei, L. Liu, F. Zhang, Z. G. Liu, Z. P. Wang and R. T. Wang, *World J. Gastroenterol.*, **11**,

- 503-507(2005).
20. L. Liu, Z. Guo, Z. Lv, Y. Sun, W. Cao, R. Zhang, Z. Liu, C. Li, S. Cao and Q. Mei, *Int. Immunopharm.*, **8**, 1481-1492(2008).
21. B. Escofier and J. Pagés, *Comp. Statistics & Data Anal.*, **18**, 121-140(1994).
22. J. Pagés, *Rev. Colomb. Estad.*, **27**(1), 1-26(2004).