

국내산 桑枝의 품질관리 연구

박유미^{1#}, 백미은¹, 이영종², 원재희^{1*}

1 : 한약진흥재단, 2 : 가천대학교

Studies on quality control of domestic *Morus alba* Linne

Yu Mi Park^{1#}, Mi Eun Beak¹, Young Jong Lee², Jae Hee Won^{1*}

1 : National Development Institute of Korean Medicine

2 : College of Korean Medicine, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : Mori Ramulus is a young branch of *Morus alba* Linne, which has been used as traditional medicines for antidiarrhea, antibacteria, and antihypertension in Korea. With the basis on these medicinal activities, it is registered at the Korean Herbal Pharmacopoeia. The standard for quality control in use, however, is not yet validated.

Methods : We experiment on heavy metals test, TLC, loss on drying, ash, acid-insoluble ash, contents of ethanol-soluble extracts and contents of oxyresveratrol by using the 15 samples of Mori Ramulus which are collected domestically. We tested items according to the General Test, processes and apparatus, Crude Drugs Test of KP(2011).

Results : Purity test(Heavy metals) showed contents for Pb, As, Hg, and Cd range of 0.1~1.1 ppm, 0.0~0.2 ppm, 0.00~0.01 ppm, and 0.00~0.02 ppm. Identification test(Thin layer chromatography) was on comparing with morucine standard solution in R_f value, all samples showed morucine spot (dark blue, R_f : 0.3) as same as R_f value of morucine-standard solution. Loss on drying was ranged from 5.1 to 8.9 %, ash and acid-insoluble ash were between the range 3.0~6.3% and 0.3~0.8%. Contents of ethanol-soluble extracts was ranged from 6.2 to 12.0%. Content of oxyresveratrol was ranged from 0.01 to 0.16 % based on the oxyresveratrol standard curve.

Conclusions : We sincerely hope that this study will be contributed to the standardization and quality control of Korean herbal medicines.

Key words : *Morus alba* Linne, Quality Control, Oxyresveratrol, TLC

I. 서 론

桑枝는 뽕나무과(Moraceae)에 속한 뽕나무 또는 기타 동속근연식물의 어린가지이며 뽕나무의 뿌리껍질로 주피를 제거한 것은 桑白皮, 완전히 익기전의 열매는 桑椹子, 그의 잎은 桑葉으로 사용한다.¹⁾ 현재까지 뽕나무과 생약의 약효와 성분 에 관한 연구자료는 보고되었지만 실제 시중에 유통되고 있는 桑枝의 품질관리 기준에 관한 연구는 아직 미비하다. 桑枝는 대한민국의약전외한약(생약)규격집에 수록되어있으나 중금속, 잔류농약, 잔류이산화황의 순도시험 기준만 규정되어 있고 이화

학 규격에 대한 기준이 전혀 설정되어 있지 않아 품질관리를 위해 그 실행과약이 시급하다. 桑枝의 한·중·일 3국 공정서 수재 현황을 살펴보면 일본 공정서에는 수록되지 않았으며 중국공정서에는 우리나라와 동일한 기원식물로 수록되어 있으나 품질관리를 위한 규격기준은 건조감량, 회분, 엑스함량(뮌은에탄올엑스함량)의 기준만 설정되어있다. 이에 桑枝의 중금속 함량, 건조감량, 회분, 산불용성회분, 뮌은에탄올엑스함량, TLC 패턴, HPLC 성분프로파일 등을 조사하여 桑枝의 규격을 조사하고 이를 적용하여 품질관리를 할 수 있는 기초자료로 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

*Corresponding author : Jae Hee Won, National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongsan, Republic of Korea
· Tel : +82-53-421-9704 · E-mail : won10042@nikom.or.kr

#First author : Yu Mi Park, National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongsan, Republic of Korea

· Tel : +82-53-421-9703 · E-mail : newmi77@nikom.or.kr

· Received : 28 April 2016 · Revised : 5 May 2016 · Accepted : 16 May 2016

II. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 桑枝(Mori Ramulus)는 우리나라에 유통되는 시료 15 개를 가천대학교 본초학 교실에서 수집하고 관능 위원이 기원을 감별한 것을 제공받아 사용하였다.

실험에 사용한 TLC용 plate는 silica gel Kieselgel 60 F254(Merck, Germany), HPLC용 표준물질 Mulberroside A, Chlorogenic acid 및 Oxyresveratrol은 Sigma-Aldrich Corporation(USA)에서 구매하였고 그 외 에탄올, 메탄올, 아세트니트릴은 HPLC급으로 사용하였으며, Formic acid는 특급으로 사용하였다. 또한, 증류수는 초순수제조장치 LEGA의 제품으로 제조하여 0.45 μm membran filter를 사용하여 여과한 후 사용하였다.

2. 방법 및 사용기기

1) 중금속 시험

중금속 시험은 대한민국의약품시험법 28. 생약시험법에 따라 시험하였다. 납, 비소, 카드뮴의 측정을 위해서는 유도 결합플라즈마분광계(ICP; Thermo, iCAP 6500, USA)을 사용하였으며, 수은의 측정은 수은분석기(NIC, Auto MA-2, Japan)를 사용하였다.

2) 확인시험 : 정색반응 및 TLC 패턴

- ① 정색반응은 桑枝 가루 1.0 g에 10 mL를 넣고 15 분간 환류추출한 다음 여과한 여액을 증발건조하여 잔류물에 클로로포름 10 mL를 넣어 녹이고 이 액 0.5 mL를 시험관에 취하여 아세트산탈수물 0.5 mL를 넣어 흔들어 섞은 다음 황산 0.5 mL를 천천히 넣을 때 접제면의 색을 관찰하였다.
- ② TLC 패턴확인을 위한 박층크로마토그래피 시험은 대한민국의약품시험법 14. 박층크로마토그래프법에 따라 시험하였다. 사용기기는 HPTLC(Camag, ATS4, Switzerland)이며, 검액의 제조는 桑枝 가루 1.0 g을 달아 메탄올 10 mL를 넣고 60분 동안 초음파 추출한 다음 여과하여 사용하였다. 따로 모루신표준품 1 mg을 메탄올 10 mL에 녹여 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 각각 5 μL 씩을 가지고 박층크로마토그래프법에 따라 시험하였으며 10% 에틸아세이트혼합액(1:1)을 전개용매로 하여 전개한 후 여기에 자외선(254 nm) 또는 바닐린황산시액으로 발색하여 관찰하였다.

3) 건조감량

건조감량시험은 대한민국의약품시험법 28. 생약시험법에 따라 시험하였다. 사용기기는 LDO-250F(Lab Tech, Korea)이다.

4) 회분 및 산불용성 회분

회분 및 산불용성회분 시험은 대한민국의약품시험법 28. 생약시험법에 따라 시험하였다. 사용 기기는 LEF-230P(Lab Tech, Korea)이다.

5) 엑스함량

엑스함량 시험은 대한민국의약품시험법 28. 생약시험법 묽은에탄올엑스함량시험법에 따라 시험하였다. 사용 기기는 LSB-015S(Lab Tech, Korea)와 LOD-150F(Lab Tech, Korea)이다.

6) HPLC 표준크로마토그램

HPLC 표준크로마토그램 작성을 위해 '생약제제의 성분프로파일 설정가이드라인'을 참조하였다. 사용기기는 HPLC(Waters, 1525 Binary HPLC pump, 2998 PDA 2707 Autosampler, USA)이며, 초음파추출장치 JAC4020P(KODO, Korea)를 사용하였다. HPLC 분석조건은 Table 1.과 같다.

Table 1. Condition of HPLC analysis

Instrument	Waters 1525 Binary HPLC Pump	
Column	Capcell-pack C18(4.6×250 mm, 5 μm)	
Mobile Phase	A: 0.1 % Formic Acid in Water	
	B: 0.1 % Formic Acid in Acetonitrile	
	Time(min)	Solution B (%)
	0	10
	30	55
Detector	310 nm	
Flow rate	1.0 mL/min	

검액의 제조는 桑枝 가루 약 1.0 g을 정밀하게 달아 메탄올 20 mL를 넣고 60분간 초음파추출한 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 검액으로 사용하였다. 최적의 컬럼선택을 위해 C18 컬럼 3 종류 중 분리도가 가장 좋은 shiseido사의 capcell pack컬럼을 선택하였고, 최적의 분리도를 위해 이동상의 조건은 0.1% 포름산을 함유한 물과 아세트니트릴의 비율을 90:10 으로부터 45:55 까지 30분간 농도구배 하여 분석하였다. 표준용액으로는 Mulberroside A, Chlorogenic acid 및 Oxyresveratrol을 각각 1 mg을 취하여 메탄올 10 mL에 녹여 표준용액으로 사용하였다.

III. 결 과

1. 중금속 시험 결과

국내 한약에 대한 중금속 허용기준의 경우 식물성 생약에 대해서는 납 5 ppm 이하, 비소 3 ppm 이하, 수은 0.2 ppm 이하, 카드뮴 0.3 ppm이하로 설정되어 있다. 桑枝 15개 시료

의 중금속 시험결과 납 0.1~1.1 ppm, 비소 0.0~0.2 ppm, 수은 0.00~0.01 ppm, 카드뮴 0.00~0.02 ppm 으로 매우 낮게 함유하는 것으로 조사되었으며 모든 시료가 기준에 적합하였다(Table 2).

Table 2. Result of Heavy metals Test

Samples	(단위, ppm)			
	Pb	As	Hg	Cd
1	0.7	0.2	0.00	0.02
2	0.7	0.1	0.00	0.01
3	0.3	0.1	0.00	0.00
4	1.1	0.1	0.00	0.02
5	0.3	0.1	0.00	0.00
6	0.2	0.0	0.00	0.00
7	0.1	0.0	0.00	0.01
8	0.1	0.1	0.01	0.01
9	0.1	0.1	0.00	0.01
10	0.1	0.1	0.00	0.02
11	0.1	0.1	0.01	0.01
12	0.4	0.1	0.01	0.01
13	0.5	0.1	0.01	0.02
14	0.7	0.1	0.01	0.02
15	0.4	0.1	0.01	0.01

2. 확인시험 : 정색반응 및 TLC 패턴

桑枝의 확인시험법은 우리나라 및 중국 공정서에 설정되어 있지 않다. 이화학적 정성시험으로 Liebermann-Burchard 반응에 의한 정색반응 시험을 수행한 결과 경계면에 적자색을 띠는 트리테르페노이드를 함유한 반응을 나타내었다(Fig. 1). 또한, 메탄올 추출액을 박층크로마토그래피법에 따라 헥산·에틸아세테이트혼합액(1:1)을 전개용매로 전개하여 자외선 254 nm에서 관찰한 결과 桑枝의 검액에서 얻은 여러 개의 반점 중 1개의 반점은 R_f 0.3의 모루신표준액 반점과 동일하였다(Fig. 2).



Figure 1. Result of Qualitative test(LB test)

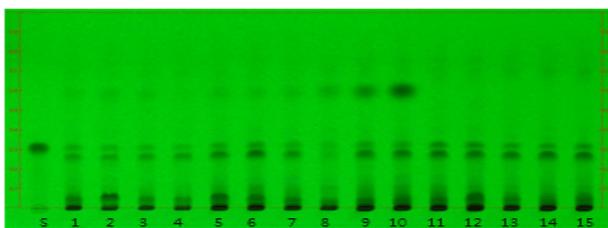


Figure 2. TLC pattern of standard and methanol extracts in Mori Ramulus.(under 254 nm)

또한, 바닐린황산시액으로 발색한 결과 자외선 254 nm에서 볼 수 없었던 다양한 패턴의 반점을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

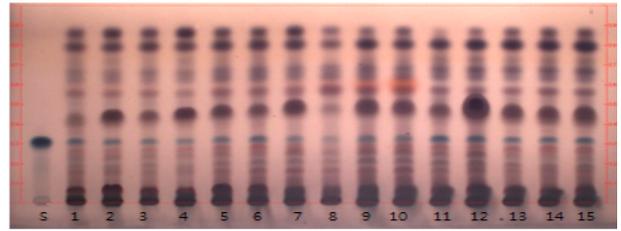


Figure 3. TLC pattern of standard and methanol extracts in Mori Ramulus.(by vanillin-sulfuric acid TS treatment)

3. 건조감량 측정

桑枝의 건조감량은 5.06~8.87% 범위로 측정되었으며 이는 모두 중국 공정서 11.0% 이하 기준에 적합한 것으로 조사되었다(Fig. 4).

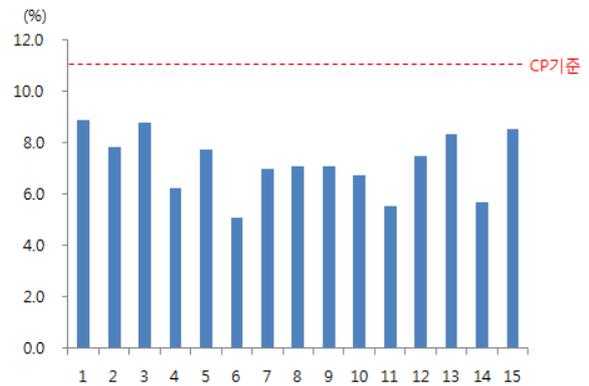


Figure 4. Evaluation of loss on drying in Mori Ramulus.

4. 회분 및 산불용성회분 측정

桑枝의 회분은 3.03~6.26%로 조사되었다. 중국 공정서 4.0% 이하 기준을 적용해 보면 7종 시료(1, 3, 9, 11, 13, 14, 15)는 중국약전 기준보다 높게 조사되었다(Fig. 5).

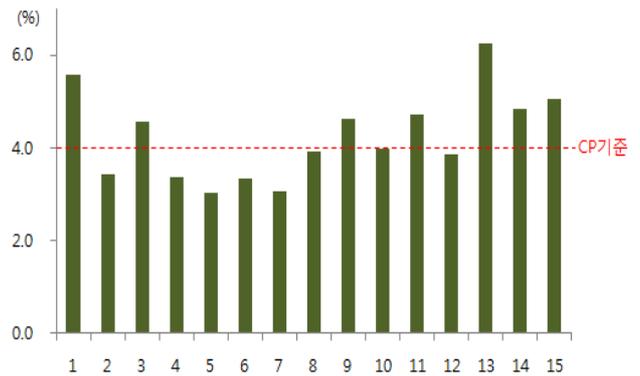


Figure 5. Evaluation of ash in Mori Ramulus.

桑枝의 산불용성회분은 0.34~0.79%로 조사되었다(Fig. 6).

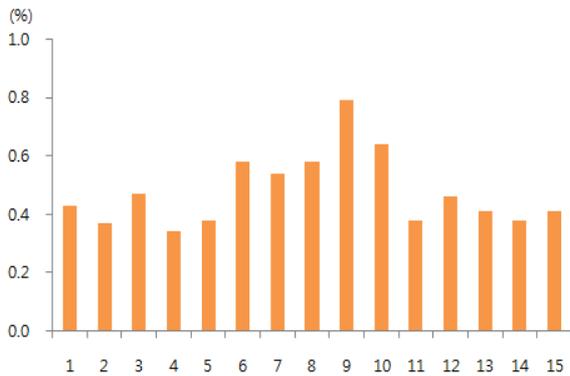


Figure 6. Evaluation of acid-insoluble ash in Mori Ramulus.

5. 엑스함량 측정

桑枝의 묽은에탄올엑스 함량은 6.17~11.98%로 모든 시료가 중국 공정서 기준 3.0% 이상에 적합한 것으로 조사되었다 (Fig. 7).

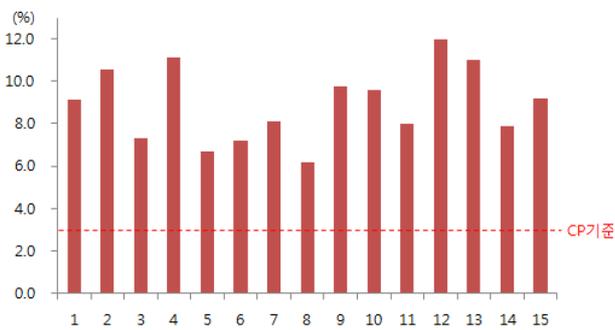


Figure 7. Evaluation of contents of ethanol-soluble extracts in Mori Ramulus.

6. HPLC 표준크로마토그램 작성

桑枝의 표준크로마토그램 작성을 위해 생리활성성분인 Mulberroside A, Chlorogenic acid 및 Oxyresveratrol을 표준물질로 하여 HPLC로 분석한 결과 그 머무름 시간은 각각 6.982, 7.864 및 14.785분으로 분리되었다(Fig. 8).²⁻⁹⁾ 또한 桑枝의 시료에서도 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다. 특히 Oxyresveratrol의 함량은 0.01~0.16% 범위로 조사되었다(Fig. 9).

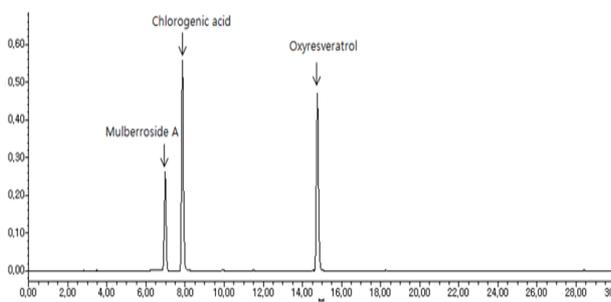


Figure 8. HPLC Chromatogram of standard solution (Mulberroside A, Chlorogenic acid and Oxyresveratrol)

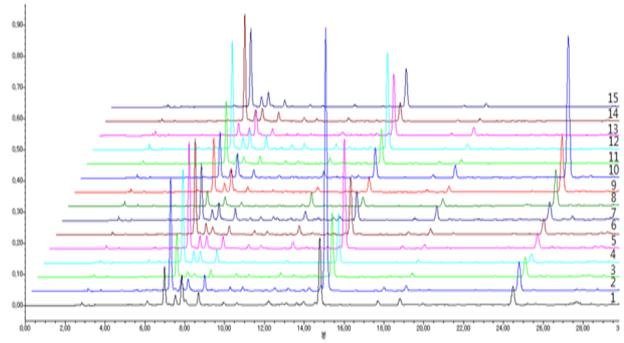


Figure 9. Overlapped HPLC Chromatogram of Mori Ramulus.

IV. 고찰

桑枝에 함유되어 있는 주성분 등을 그 특성에 따라 확인하는 데 필요한 확인시험 방법 및 기준이 설정되어 있지 않아 Liebermann-Burchard 반응에 의한 정색반응 시험을 수행한 결과 경계면에 적자색을 띠는 트리테르페노이드를 함유한 반응을 나타내었다. 또한, 메탄올 추출액을 박층크로마토그래피법에 따라 hexan · 에틸아세테이트혼합액(1:1)을 전개용매로 하여 전개하고 바닐린황산시액으로 발색하여 관찰한 결과 모든 시료에서 R_f 0.3 부근의 모루신 반점을 확인하였다.

桑枝의 건조감량은 5.06~8.87% 범위로 조사되었으며 이는 모두 중국 공정서 기준인 11.0% 이하에 적합하였다.

회분은 3.03~6.26%로 조사되었으며 산불용성회분은 0.34~0.79%로 조사되었다. 묽은에탄올엑스 함량은 6.17~11.98%로 모든 시료가 중국 공정서 3.0% 이상 기준에 적합한 것으로 조사되었다.

桑枝의 표준크로마토그램 작성을 위해 생리활성성분인 Mulberroside A, Chlorogenic acid 및 Oxyresveratrol을 분석할 수 있는 조건을 설정하고, 밸리데이션을 실시한 결과 시료에서 각 성분피크가 양호하게 분리됨을 확인하였다. 특히, 모든 시료에서 Oxyresveratrol을 포함한 4개의 피크를 확인할 수 있었으며 이들의 유지시간(RT)과 상대적유지시간(RRT)을 비교한 결과 모두 RSD 0.1% 이하로 나타났다. 또한, Oxyresveratrol의 함량은 0.01~0.16% 범위로 조사되었으며 이를 桑枝의 지표성분으로 설정하기 위해서는 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 결론

대한민국약전한약(생약)규격집에 기준이 미설정되어 있는 桑枝의 TLC, 건조감량, 회분, 산불용성회분 및 묽은에탄올엑스함량을 조사하여 桑枝의 품질관리를 위한 기초자료로 활용하고자 국내에서 수집한 桑枝 15개 시료 대해 시험해 본 결과는 다음과 같다.

1. 중금속은 납 0.1~1.1 ppm, 비소 0.0~0.2 ppm, 수은 0.00~0.01 ppm, 카드뮴 0.00~0.02 ppm 이다.

2. 확인시험은 모든 시료에서 LB 정색반응을 나타내었고, TLC 확인시험에서는 바닐린황산발색시액에서 다양한 패턴을 확인하였고 특히 R_f 값 0.3 부근에서 강한 남색의 모루신 반점을 확인하였다.
3. 건조감량은 5.1~8.9% 범위이다.
4. 회분은 3.0~6.3% 범위이며, 산불용성회분은 0.3~0.8% 범위이다.
5. 묽은에탄올엑스함량은 6.2~12.0%, 범위이다.
6. 桑枝의 HPLC 표준크로마토그램은 Mulberroside A, Chlorogenic acid 및 Oxyresveratrol 으로 작성하였으며 그 머무름 시간은 각각 6.982, 7.864 및 14.785 분으로 조사되었다.

본 연구의 결과는 현재 공정서에 미설정 되어있는 桑枝의 품질관리 기준 설정의 기초자료로 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전처 국산한약재규격재평가 연구사업 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. MFDS, The Korean Herbal Pharmacopoeia, Ministry of Food and Drug Safety, Korea, 2014
2. Wen-Yi Jin, The constituents isolated from the twig of *Morus alba* L. and their antioxidant effect, Chungnam National University, 2015
3. Gi-Hyeon Kim, Analysis of Antioxidant Activity and Oxyresveratrol Levels of Mulberry Branch, Korea Polytechnic University, 2015
4. Sang Yoon Choi, Kang Jin Lee, Sung Soo Kim and Sun Yeou Kim, Comparison of Resveratrol and Oxyresveratrol Contents Among Varieties of *Morus alba* L., Korean J. Medicinal Crop Sci., 2005 ; 13(4) : 146-149
5. Ji-Sun Kim, Tae-Youl Ha, Ji-Yun Ahn, Hyun-Ku Kim, Suna Kim, Composition and Quantitative Analysis of Stilbenoids in Mulberry(*Morus alba* L.) Leaves and Fruits with DAD/UV HPLC, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2008 ; 37(1) : 124-128
6. Sang Won Choi, Yeon Jeong Jang, Yu Jin Lee, Hyun Hee Leem, Eun Ok Kim, Analysis of Functional Constituents in Mulberry (*Morus alba* L.) Twigs by Different Cultivars, Producing Areas, and Heat Processings, Journal of Food Science and Nutrition, 2013 ; 18(4) : 256-262.
7. Doi K, Kojima T, Makino M, Kimura Y, Fujimoto Y, Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L., Chem Pharm Bull, 2001 ; 49(2) : 151-153.
8. Kyo Bin Kang, Dong Young Lee, Tae Bum Kim, Seung Hyun Kim, Hyo Jin Kim, Jinwoong Kim, Sang Hyun Sung, Prediction of tyrosinase inhibitory activities of *Morus alba* root bark extracts from HPLC fingerprints, Microchemical Journal, 2013 ; 110 : 731-738.
9. Jin Zhou, Shun-xiang Li, Wei Wang, Xiao-yi Guo, Xiang-yang Lu, Xin-pei Yan, Dan Huang, Bao-yang Wei and Liang Cao, Variations in the levels of Mulberroside A, Oxyresveratrol and Resveratrol in Mulberries in Different Seasons and during Growth, Hindawi publishing corporation, 2013(2013), 380692