형태특징 및 RAPD분석에 의한 후박 (厚朴) 약재의 진위감별

이미영 · 김홍준 · 주영승* · 고병섭
한국한의학연구원, *우석대학교

Abstract

Discrimination of Genuines and Misuses of Hu-Bak medicines by Morphological Characters and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis

Lee Miyoung, Kim Hongjun, Ju Youngseung*, Ko Byoungseob
Korea Institute of Oriental Medicine
*Wou-Suk University

For identification of genuine and misuse samples of Hu-Bak medicines, an morphological characters, and RAPD (random amplified polymorphic DNA) were performed. In this study, three samples were collected, of which two were genuine and one was misuse sample. Genuine samples of "Hu-Bak" were Magnolia obovata Thunberg and Magnolia officinalis Rehder et Wilson. Misuse samples was Machilus thunbergii S. et Z. In the morphological characters, M. obovata Thunberg and M. officinalis Rehder et Wilson were similar, but M. thunbergii S. et Z. was different with cortex, cambium, and fibrous layer. The result of RAPD analysis, seven primers can distinguish between genuines and counterfeit samples of Hu-Bak medicines.

Key words : Identification, Magnolia obovata Thunberg, Magnolia officinalis Rehder et Wilson, RAPD analysis, morphological characters

서 론

후박은 목련과(Magnoliacea)로 성미가 溫 無毒 苦辛하여 行氣燥濕, 降逆平喘, 治濕滯傷中, 食積氣滯의 효능이 있으며 (전국한의과대학본초학교수, 2000), 건위소화약, 사하약, 진해거담약으로 쓰이는 처방에 배합되며 방향성 건위, 복통등에 이용되는 약재이다 (한대석, 1989). 그러나 현재 국내에 유통되고 있는 厚朴은 우리나라 남해지방과 울릉도에 자생하고 있는 녹나무과에 속하는 후박나무 Machilus thunbergii S. et Z.의 수피로서 토후박(土厚朴) 이라 일컬으며, 후박과 동일한 용도로 쓰이고 있지만 氣味와 성분상 근거가 없으므로 한약재의 厚朴으로 사용할 수 없는 오용되고 있는 대표적인 약재로 알려져있다.

대한약전 (2002)에 후박은 일본목련 *Magnolia obovata* Thunberg과 후박 *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson 또는 凹葉厚朴 *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson var. *biloba* Rehder et Wilson을 수록하고 있다. 중국은 후박 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wil. 과 凹葉厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils.을 기재하고 있고 (中華人民共和國藥典, 1996) 일본은 목련과 (Magnoliacea)의 和厚朴 *Mangolia obovata* Thunberg을 공정서의 품목으로 수록 (일본약국방, 1996)하고 있는데 和厚朴의 열매는 민간적으로 감기, 구토등에 사용하고 있다. 현재 유통에 있어서는 울릉도와 섬지역에서 자라고 있는 후박나무 *Machilus thunburgii* S. et Z.의 수피를 土厚朴으로 시판하고 있지만, 일본은 중국후박을 당후박으로 수입하고 있으나 한국산 토후박은 수입하지 않고 있다. 본 연구에서는 육안으로 형태학적인 비교를 통해 차이점을 알아보고, 보다 객관적인 방법으로 유전자 분석법인 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 분석 을 이용하였는데, 이는 DNA 염기서열에 대한 어떠한 정보 없이도 개체의 전체 게놈을 대상으로 유전변이 분석이 가능하며 임의 단일 (arbitrary single) primer를 이용한 PCR방법에 의해 개체간에 변이를 보여주는 방법 (Williams et al., 1990)으로 비교적 쉽게 많은 수의 절편을 만들어 낼 수 있어 RFLP와 비교하여 많은 이점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Tinker et al., 1993).

따라서 유통과정에서 수입된 厚朴의 國籍과 기원이 불분명하고, 국산 厚朴으로 유통되고 있는 토후박과의 감별을 위하여 국내의 울릉도, 제주도, 남부 섬지역 등에서 자라고 있는 후박나무(土厚朴)의 수피와 일본목련의 수피(日厚朴), 후박을 대상으로 형태적인 감별특징과 내부형태, 유전자분석을 통해 차이점을 살펴보고 이를 감별에 적용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 후박 *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson, 일본목련 *Magnolia obovat*a Thunberg, 후박나무 *Machilus thunburgii* S. et Z.를 수집하여 감정한 후 사용하였으며 (Table 1), 한국한의학연구원 표본실에 일련번호를 부여하여 보관중이다.

2. 방법

1) 형태특징조사

구입한 건조 표본 한약재의 외부형태특징 수준을 보강하기 위하여 stereoscope (Meiji techo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

4℃에서 5분간 시행한 후, 94℃에서 30초, 37℃에서 30초간, 72℃에서 1분간을 35회 수행하고, 72℃에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 100bp DNA ladder (GibcoBRL, Germany)와 함께 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 Bioimaging system (Syngene, England)으로 관찰하여 결과를 분석하였다.

Data 분석 - 각 유전형에 대한 유사성은 NTSYS (Numerical Taxonomy and Multi Analysis System) 프로그램[19]에 의한 개체들의 그룹별 산술평균 UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Average)에 기초한 방법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

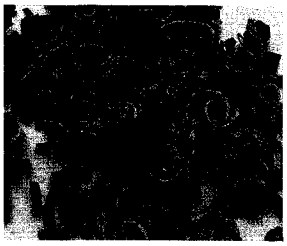
후박은 국내에서 토후박, 당후박, 일후박등이 유통되고 있는데, 당후박과 일후박은 목련과이며 토후박은 녹나무과. 토후박은 후박나무 *Machilus thunburgii* S. et Z.의 수피로 한의서에 기록이 없고 효능도 검증이 안된 것으로 위품이어서 논란이 되고 있다. 토후박은 식물명이 후박나무이어서 동명이품인데 후박으로 유통된 경위는 방약합편(方藥合編)에 제주도에서 생산한다는 기록이 있어 이 영향을 받지 않았나 하고 추론해 볼 뿐이다. 토후박은 남부 해안가에서 재배되고 있고 제주도 및 울릉도등 섬지방에서 자생하고 있고, 가구용 혹은 가로수로 많이 식재하고 있는데, 한약재로 유통되고 있어 이에 대한 홍보와 규제가 필요하다고 생각되므로 본 연구에서는 형태감별학적인 특징과 RAPD분석법으로 후박의 식별방법에 관해 알아보았다.

1. 형태감별 특징

1) 후박(厚朴) *Magnolia officinalis* REHD et WILS.

후박은 당후박이라고도 하며, 줄기껍질이 두루마리 또는 쌍두루마리 모양으로 되어있어 '통박'이라고 하며 바깥표면은 회갈색 또는 베이지색이고 표면은 껄껄하며 코르크층은 때로 비닐조각모양으로 쉽게 탈락하고 표면에는 타원형의 피목과 세로주름이 선명하게 나 있다. 안쪽 표면은 좀 매끈하고 자주빛이 도는 갈색 또는 짙은 자갈색을 띠며 가는 세로무늬가 촘촘하게 나 있고 질은 단단하고 기름기가 돌며 쉽게 꺾어지지 않는 특징이 있다. 냄새는 향기롭고 맛은 쓰면서 시고 매운감이 있다. 뿌리껍질은 원통모양 또는 불규칙한 덩이조각으로서 표면은 회갈색이고 질은 굳고 쉽게 꺾어진다. 입에 넣고 씹으면 찌꺼기가 많이 씹히는 특징이 있다.

2) 일본목련(日厚朴) *Magnolia obovata* Thunberg



일본목련은 '일후박'이라고도 하며, 형태특징이 후박(唐厚朴)과 유사하며, 수피는 회백색으로 평활하다. 속껍질이 진한 고동색이며, 두께가 두껍고, 안쪽으로 약간 굽은 모양이다. 그리고 자른 면이 매끈하며, 독특한 향기가 강하다.

3) 후박나무(土厚朴) *Machilus thunburgii* S. et Z.

후박나무는 우리나라에서 주로 사용하며, '토후박'이라고도 하며, 속껍질이 갈색 ~ 밝은 황갈색으로 두께가 얇다. 대부분 고리 모양을 이루고 있고 자른 면이 거칠며, 독특한 향기가 있다. 따라서 후박과 일후박, 토후박의 구분을 위해 형태성상과 약재의 특징을 <표 1>과 같이 정리하였다.

표 1) 후박, 일후박 그리고 토후박의 성상 및 약재특징

종류	줄기색	꽃색	잎모양	약재성상
후박 (唐厚朴)	자갈색	백색이며 향기가 남	호생, 타원모양의 도란형, 어린 잎의 밑면에 회색의 털이 촘촘히 나 있고, 측맥에는 긴 털이 촘촘히 나 있음	껍질이 두껍고 부드러우며 기름기가 많고 안쪽 표면은 자주빛이 도는 갈색을 띠며, 매우 작은 결정이 있으며 향기가 짙은 것이 上品
일본목련 (日厚朴)	자갈색	누른빛의 백색, 향기 좋음	잎은 도란상 긴 타원형, 목련류 중 잎이 제일 커서 거친 질감효과	향기가 강하고 매운맛이 주로 난다
후박나무 (土厚朴)	나무껍질이 회백색이고 반질반질하지만 점차 회갈색으로 변함	圓錐花序하여 황록색	약간 두터우며, 도란상 타원형, 도란상 긴 타원형	속껍질이 갈색 ~ 밝은 황갈색으로 두께가 얇고 대부분 고리 모양

2. 내부형태

후박 *Magnolia officinalis* Rehd et Wils.은 코르크층이 10~13세포층으로 넓게 구성되어 있으며 외표피는 粗皮化되어 있다. 형성층은 세로로 발달하여 안에 황색의 과립상물질로 차여져 있다. 코르크 안쪽층에 공간을 갖고 있으며 석세포층이 넓게 분포되어 있다. 석세포층에 이어있는 피층은 넓게 분포하며 부분적으로 무리를 이룬 석세포군이 있고 유관속이 분포한다. 사부에는 부분적으로 油細胞가 발달되어 있으며 射線과 사부섬유층이 있다. 박벽세포는 다량의 전분립을 함유한다.

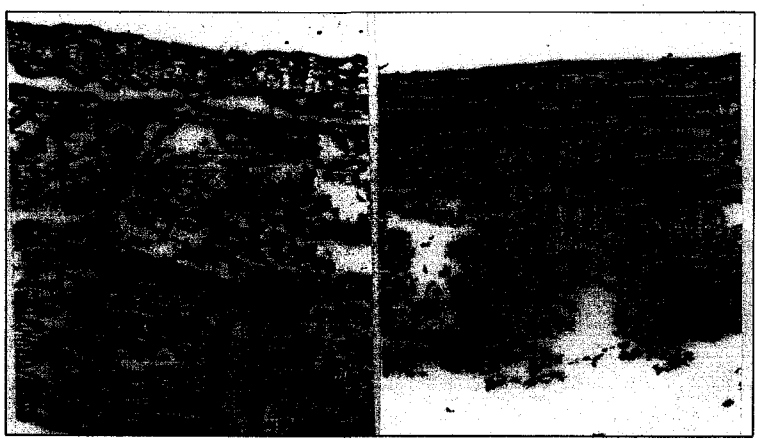


Fig. 1. Internal morphological features of *Magnolia officinalis* REHD et WILS. Phellem and sclereid 100X(left), vascular bundle 100X(right)

일본목련 Magnolia obovata Thunberg은 코르크층이 4~7세포층으로 구성되어 있으며 외표피는 직사각형으로 발달되어 있고 세포간극은 크며 木化가 부분적으로 진행되어있다. 코르크내층은 많은 공간을 두고 석세포군이 분포한다. 사부는 매우 넓으며 유관속이 매우 발달되어 있다. 사선이 부분적으로 발달되어 있으며 서부섬유충이 있고 벽은 매우 두껍다. 유세포는 부분적으로 나타나며 한개 혹은 여러개가 서로 연결되어있다. 박벽세포는 다량의 전분립을 함유한다.

후박나무 *Machilus thunburgii* S. et Z.는 목본식물로서 3~4층의 형성층대가 환상으로 발달하며, 이에서 비롯된 다량의 2기목부가 재를 형성하고 있다. 뚜렷한 연륜이 발달하고 있으며 춘재가 90%, 추재가 10%정도를 차지한다. 횡단면상에서 도관은 각상으로 2~5개씩 주로 방사방향으로 다공을 형성한다. 이러한 도관절의 직경은 60.4±7.3㎛ (접선직경 : 58.9±5.2㎛, 방사직경 : 61.9±5.0㎛), 길이는 353.0±32.3㎛정도이다. 또한 도관절의 양끝과 측벽상에는 각각 단천공판과 호생벽공을 갖는다. 주축유조직은 나타나지 않으며, 방사조직은 높이가 1~66세포, 폭은 1~3세포로 크기가 매우 다양하다. 이런 방사조직은 횡주세포와 직립세포로 구성된 이형방사조직이다. 한편 후박나무의 2기목부에는 다량의 목부섬유가 발달한다. 목부섬유의 길이와 폭은 각각 636.9±78.3㎛과 18.2±2.2㎛이다.

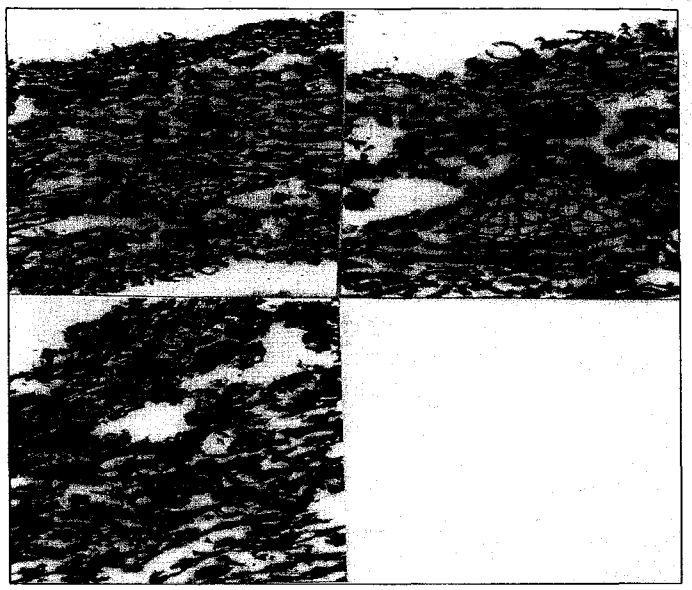


Fig. 2. Internal morphological features of *Magnolia obovata* THUNBERG. Phellem and vascular bundle 100X(the upper left), vascular tissue 100X (the upper right), sclereid 100X(the lower left)

형성층의 외측에 분화된 2기사부는 목부와 달리 연륜은 뚜렷하지 않으며, 양도 목부에 비해 훨씬 더 적다. 이와 같은 2기사부는 사요소와 방사조직 및 사부섬유로 구성된다. 그런데 사부섬유의 길이와 폭은 각각 721.5±67.4㎛과 13.4±1.5㎛으로 목부섬유에 비해 길이는 더 길지만 폭은 오히려 더 좁다. 또한 2기사부와 피층의 경계부를 따라 속상으로 분화된 후벽조직이 서로 연결되어 원통형을 이룬다. 피층은 유조직으로 구성되며, 일부에는 약간의 세포간극이 발달되었고 목본식물이므로 뚜렷한 2기생장을 함에도 불구하고 주피는 분화되지 않으며, 표피의 외측벽상에는 20㎛정도의 두꺼운 각피층이 발달하고 있다.

후박과 일본목련 그리고 후박나무에 대한 내부형태를 <표 2>와 같이 정리하여 비교하였다. 후박과 일후박은 내부구조가 유사하여 건조약재에서 내부형태에 의한 식별은 외표피와 서부섬유층의 특징에 의해 구별이 가능하고, 후박나무는 후박과 일후박과는 완연히 달라 건조하여도 내부형태적 식별이 쉽게 가능하다.

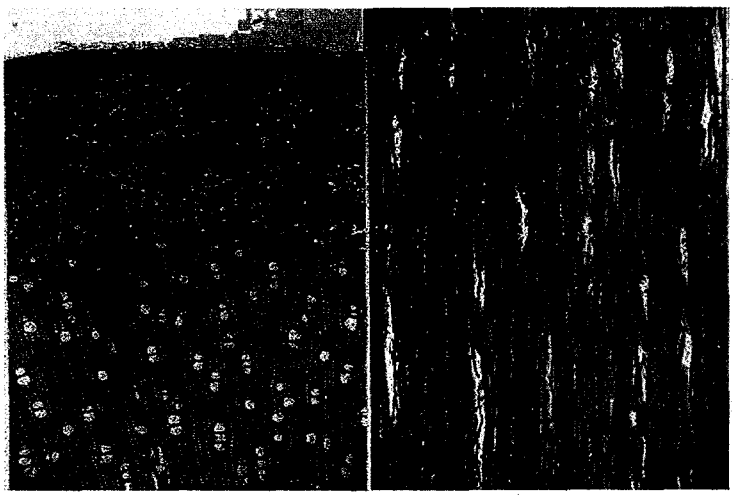


Fig. 3. Internal morphological features of *Machilus thunburgii* S. et Z.
Cross section 60X(left), longitudinal section 60X(right)

표 2) 후박과 일후박 그리고 후박나무에 대한 내부형태의 비교

종류	특징
후박	외표피는 粗皮化, 형성층은 세로로 발달하여 안에 황색의 과립상 물질이 있음
일후박	외표피는 직사각형, 서부섬유층이 있고 벽은 매우 두꺼움
후박나무	형성층대가 환상으로 발달, 후박나무의 2기목부에는 다량의 목부섬유가 발달, 표피의 외측벽상에는 두꺼운 각피층이 발달

3. RAPD 분석

세 종류의 후박류를 대상으로 20개의 primer를 이용하여 직접 채취한 잎에서의 RAPD 다형성을 살펴보았을때, 대부분의 primer에서 서로 다른 다형성을 나타냈으며, 특히 후박나무가 다른 약재보다 가장 많은 다형성 패턴이 관찰되었다. 각 종류에 특이적으로 나타내는 밴드는 <Table 2>에 요약하였다.

후박 3품종에 대한 다형성 양상 결과, 당후박과 일후박에서 공통으로 보이는 밴드들이 많이 나타났으며 이

는 11개 primer로 310(620bp), 312(300bp, 900bp), 314 (400, 850bp), 316(600bp), 317(450bp), 318(1100bp), 320(300bp), 322((350bp), 350(400bp), 354(750bp), 357(430bp, 1000bp)에서 공통으로 나타났다 (Fig. 4, 5). 그리고 후박류 세가지 약재를 동시에 구별하기 좋은 primer는 312, 323, 320, 351, 352, 359, 360이었으며, 이를 감별에 이용하면 효율적으로 사용될 수 있으리라 사료된다.

Table 2. A summary of the RAPD markers(bp) from three species of Magnoliae Cortex

Primer No.	Specific fragment (bp)		
	Magnolia officinalis	*Magnolia obovata*	*Machilus thunburgii*
310		1400	900, 2500
312	450	1000, 1100	1450
314		1100	1200
315	900		1000, 1150
316		600	750, 900, 950
317	780	820	600, 1100
318	400, 550, 650		680, 800, 900, 1600
320	900, 2000	400	450
322	700		450, 580, 800, 1400, 1800
323	900	880, 1200	550, 1000
350			950, 1100, 1400
351	900,1800	700, 800	300, 850
352	320	420, 1050, 1200	750, 900
353	620		380, 720, 1500
354	800		450, 1000
355			850
357			400
358		450	620, 950
359	400, 900	800, 1000	380, 650, 1100
360	420, 750	450, 680, 780	650, 1500

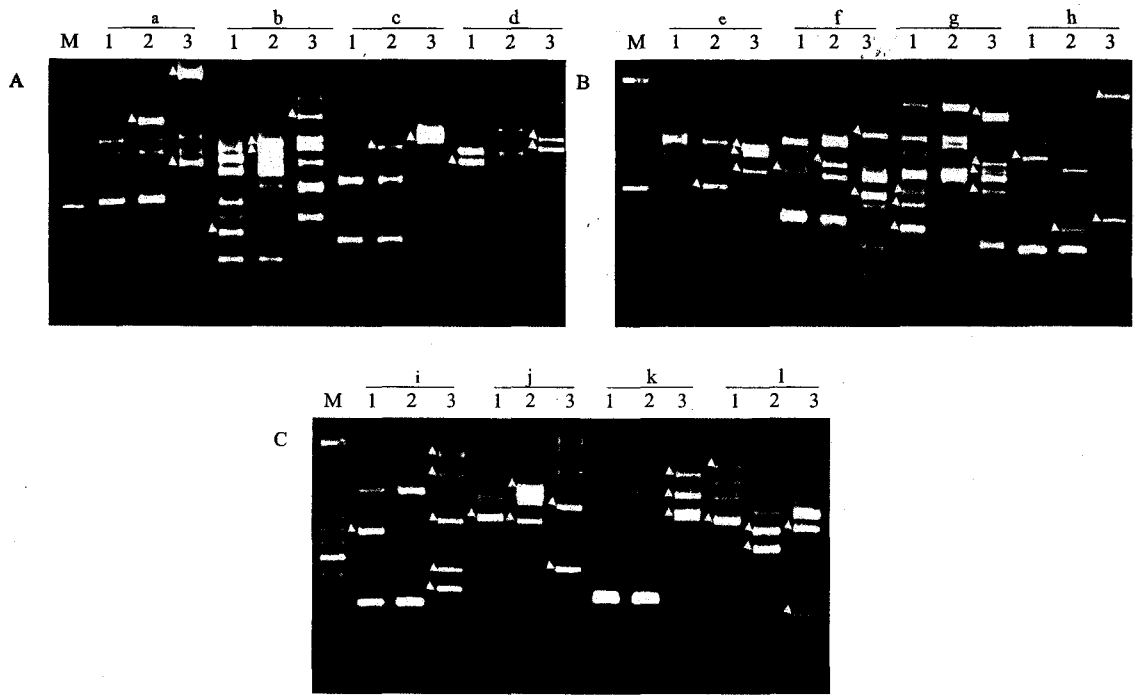


Fig. 4. RAPD polymorphism of Magnoliae Cortex. The primer used was 310(a), 312(b), 314(c), 315(d), 316(e), 317(f), 318(g), 320(h), 322(i), 323(j), 350(k), and 351(l). Lane 1, *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson; 2, *M. obovata* Thunberg; 3, *Machilus thunburgii* S. et Z. M, 100bp DNA ladder. Arrow indicates polymorphic bands

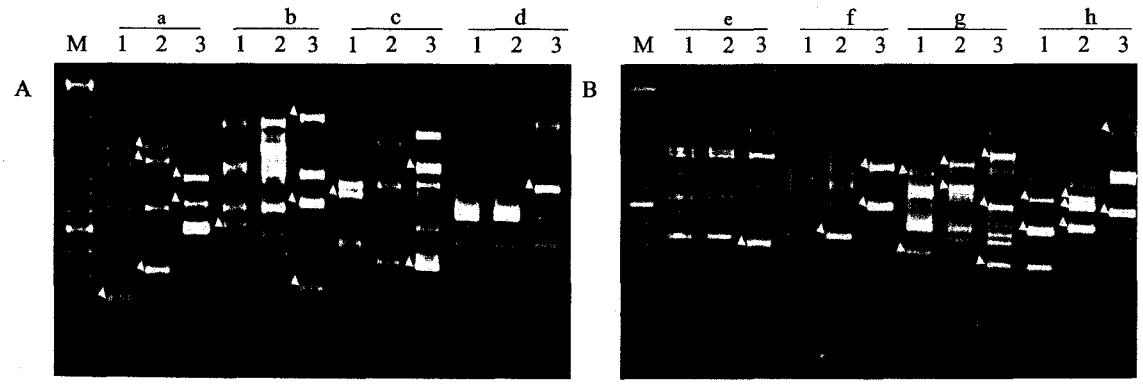


Fig. 5. RAPD polymorphism of Magnoliae Cortex. The primer used was 352(a), 353(b), 354(c), 355(d), 357(e), 358(f), 359(g) and 360(h). Lane 1, *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson; 2, *M. obovata* Thunberg; 3, *Machilus thunburgii* S. et Z. M, 100bp DNA ladder. Arrow indicates polymorphic bands

4. 유전적 연관성 분석

당후박 Magnolia officinalis REHDER 일본목련 M. obovata THUNBERG, 후박나무 Machilus thunbrugii S. et Z 에서 밴드의 유무를 확인한 후 유연관계를 확인하고자 이를 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average)에 기초한 방법으로 분석한 결과, 당후박과 일본목련은 0.595의 유연관계를 나타냈으며, 후박나무는 0.246으로 다른 후박과 상당한 차이가 나는 거리를 나타냈다 (Fig. 6). 따라서 당후박과 일본목련은 근연관계임을 알 수 있으며, 후박나무는 원연관계임을 알 수 있었다. 일본에서 후박의 성분연구에 대한 보고에서 "당후박과 일후박은 같은 성분을 가지고 있고 그 식물의 기원이 같은 종에서 출발하고 있다"는 주장을 입증하고 있는 것으로 사료된다.

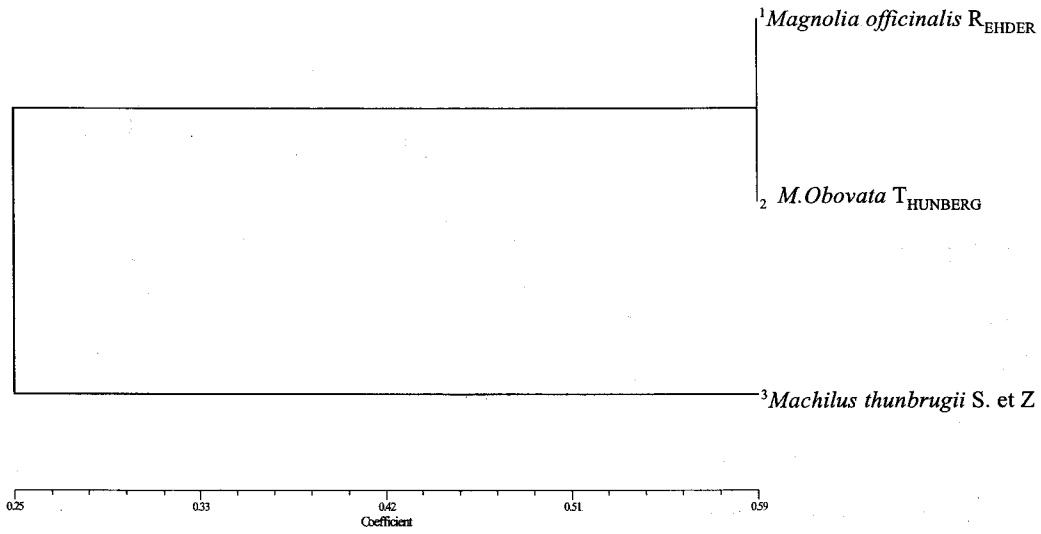


Fig. 6. Dendrogram showing the relationship between Magnoliae Cortex based on UPGMA analysis of genetic distance measures

결론

후박과 일후박, 토후박의 구분을 위해 형태감별 특징과 내부형태, PCR 분석결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 형태감별

후박은 안쪽 표면이 매끈하고 자주빛이 도는 갈색으로 질은 단단하고 기름기가 돌며 쉽게 꺾어지지 않는 특징이 있으며, 일본목련의 수피는 회백색으로 속껍질

이 진한 고동색이며, 두께가 두껍고, 안쪽으로 약간 굽은 모양이다. 토후박은 속껍질이 갈색 ~ 밝은 황갈색으로 두께가 얇고 대부분 고리모양을 이루고 있다.

2. 내부형태

후박과 일본목련은 내부구조가 유사하여 건조약재에서 내부형태에 의한 식별은 외표피와 세로로 발달된 형성층과 서부섬유층의 특징에 의해 구별이 가능하고, 후박나무는 후박과 일본목련와는 완연히 달라 건조하여도 내부형태적 식별이 쉽게 가능하다.

3. 유전자분석

본 연구에 사용된 20개의 RAPD primer중 당후박과 일본목련에서 공통적으로 보이는 band들은 11개 primer로 55%.가량 동일하게 나타났으며, 세종류의 후박을 구별하기 좋은 primer는 7개 primer로 이를 이용하여 감별에 이용할 수 있을 것으로 사료되며, 유연관계분석에서 당후박 Magnolia officinalis Rehd: Wilson과 일후박 Magnolia ovobata Thunb은 근연관계였으며, 후박나무는 원연관계에 있었다.

참 고 문 헌

1. Tinker N.A., M.G. Fortin, and D.E. Mather. 1993. 「Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley」, Theor. Appl. Genet. 85: 976~984.
2. Williams J.G.K., A.R. Kubelik, A.J. Licak, J.A. Ratalski, and S.V. Tingey. 1990. 「DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers」, Nucl. Acids. Res. 18: 6531~6535.
3. 『대한약전 (제 8개정)』, 2002. 식품의약품안전청.
4. 『일본약국방 (제 13개정)』, 1996. 厚生省藥局方 監修, 第一法規出版株式會社.
5. 전국한의과대학본초학교수. 2000. 『본초학』, 영림사.
6. 『中華人民共和國藥典(中葯彩色圖集)』, 1996. 中華人民共和國 衛生部 藥典委員會 編. 광동과기출판사.
7. 한대석. 1989. 『생약학』, 동명사.