백수오
(白首烏)
Cynanchi Wilfordii Radix

이 약은 은조롱 *Cynanchum wilfordii* Hemsley (박주가리과 Asclepiadaceae)의 덩이뿌리이다.

성 상 이 약은 덩이뿌리로 원뿔모양이고 길이 5 ~ 10 cm, 지름 15 ~ 35 mm이다. 바깥면은 회황색 ~ 황갈색이며 세로주름이 많고 질은 단단하다. 꺾은 면은 흰색이다. 이 약을 현미경으로 보면 코르크층 아래 3 ~ 5층의 석세포환이 군데군데 끊어져 있고 사관, 도관 및 가도관은 계단상으로 배열되어 있다. 모든 유세포에는 전분립이 들어 있고 수산칼슘의 족정이 있는 것도 있다.

이 약은 냄새가 없고 맛은 쓰고 달며 떫다.

확인시험 이 약의 가루에 수산화칼륨시액을 넣으면 노란색을 나타낸다.

순도시험 **1) 중금속** 가) 납 5 ppm 이하.

나) 비소 3 ppm 이하.

다) 수은 0.2 ppm 이하.

라) 카드뮴 0.3 ppm 이하.

2) 잔류농약 가) 총 디디티(p,p′-DDD, p,p′-DDE, o,p′-DDT 및 p,p′-DDT의 합) 0.1 ppm 이하.

나) 디엘드린 0.01 ppm 이하.

다) 총 비에이치씨(α,β,γ 및 δ-BHC의 합) 0.2 ppm 이하.

라) 알드린 0.01 ppm 이하.

마) 엔드린 0.01 ppm 이하.

3) 이산화황 30 ppm 이하.

4) 이엽우피소 이 약 10 g을 멸균한 막자와 막자사발을 사용하여 액체질소로 순간적으로 조직을 얼린 상태에서 가루로 하여 사용한다. 이 약 100 mg을 정밀하게 달아 유전자 증폭반응 조작에 따라 DNA (이하 유전자라 한다)를 분리·정제하여 검액으로 한다. 따로 백수오표준생약 약 100 mg을

정밀하게 달아 검액과 같이 조작하여 대조액으로 한다.

유전자 분리 및 증폭반응 (PCR, Polymerase Chain Reaction)

가) 유전자 분리

이 약 100 mg에 500 μL의 lysis 용액 (20 mM Tris·HCl pH 8.0, 2 mM Sodium EDTA, 12 % Triton X-100, Lysome 20 mg/mL) 및 proteinase K 용액 (600 mAU/mL 이상) 10 μL를 넣고 37 ℃ 항온에서 1 시간 반응시킨다. 그 후 CTBA 용액 (0.1 M Tris·HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 2 % hexadecyltrimethylammonium bromide, 0.2 % β-mercaptoethanol) 400 μL를 넣고 65 ℃ 항온에서 30 분간 반응시킨다. 이 반응물에 페놀·클로로포름·이소아밀알콜혼합액 (25 : 24 : 1) 600 μL와 정제수 300 μL를 넣고 20 ℃를 유지하며 14,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상층액을 취하고 여기에 이소프로판올 600 μL를 넣고 20 ℃를 유지하며 14,000 rpm에서 10 분간 원심 분리한다. 침전된 유전자를 70 % 에탄올 500 μL로 2 ~ 3 회 세척하고 상온에서 건조시킨다. 건조된 유전자를 멸균된 정제수 30 μL로 녹여 4 ℃에서 1 시간 방치한 다음 RNase (100 mg/mL, 7,000 units/mL) 2 μL를 넣고 37 ℃에서 30 분간 반응시킨다. 분리된 유전자는 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정한 다음 농도 및 순도를 다음과 같이 계산한다.

유전자 농도 (μg/mL) = 50 μg/mL × A260 nm × 희석배수

(단, A260 nm = 1 일 때 유전자 농도는 50 μg/mL 인 것으로 하여 희석한다.)

유전자 순도 : A260 nm / A280 nm = 1.6 ~ 2.0

(또는 분리된 유전자는 1.0 % 아가로즈겔 전기영동법으로 농도 및 분리상태를 확인할 수 있다.)

※ 위 시험과정은 상용화된 유전자 분리·정제 키트를 사용할 수 있으며, 해당 제조사의 사용방법을 참고하여 유전자를 분리한다.

※ PCR법은 증폭하고자 하는 주형 유전자가 미량 존재하여도 증폭되므로 분리된 유전자 이외의 유전자가 혼입되지 않도록 실험에 사용되는 기구 및 시약 등의 실험실 환경 관리에 주의해야 한다.

- 실험자는 실험용 고무장갑을 착용하고, 실험대는 70 % 에탄올로 깨끗이

닦는다.

- 유전자를 취급할 때는 외부 공기와 접촉이 없는 무균상자 등의 독립된 공간을 이용하며, 열에 불안정한 시액을 제외한 micro tube/tip 및 증류수 등은 121 ℃에서 15 분 이상 멸균하여 사용한다.
- 본 실험에서 증류수는 특별한 사유가 없는 한 DNA, DNase 등의 오염이 없는 초순수를 말한다.

나) 유전자 증폭반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

샘플 유전자에 대한 PCR은 1회 확인시험으로 실시하되 trnH-psbA barcode primer로 PCR을 진행하고, 실험조건에 의한 오염을 확인하기 위해 "blank" (주형 유전자 대신 멸균증류수 첨가)을 실험에 포함시킨다.

유전자 증폭반응은 멸균된 0.5 mL 튜브에 PCR용 완충액 (10 × amplification buffer)에 forward primer (10 pmole) 0.5 μL, reverse primer (10 pmole) 0.5 μL와 분리한 주형 유전자 (농도 약 20 ng/μL) 1 μL를 넣고 멸균 정제수로 최종 반응액을 20 μL로 한다. PCR 반응조건은 아래 표와 같다.

※ 상기 PCR 조건은 기기 및 실험환경에 따라 변형할 수 있으며, PCR에 사용되는 시약도 상용화된 키트를 사용할 수 있으며 제조사의 권장조건을 따른다.

	온 도	시 간	cycle 수
최초 변성 (predenaturation)	94 ℃	3 분	1
변성 (denaturation) 결합 (annealing) 증폭 (extension)	94 ℃ 55 ℃ 72 ℃	30 초 30 초 30 초	34
최종 증폭 (elongation)	72 ℃	5 분	1
보 존	4 ℃	-	-

※ 결합(annealing) 온도는 primer의 Tm 값과 PCR 결과에 따라 조정 가능하다.

* Primer

Target region	Primer	염기서열
trnH-psbA	trnHf_05	5‘-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3′
	psbA3 F	5′-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3′

다) 전기영동

PCR 증폭 결과는 아가로즈 겔 또는 폴리아크릴아마이드 겔을 이용한 전기영동법으로 확인하며, 여기에서는 아가로즈 겔 방법을 제시한다.

아가로즈 겔의 첫 번째 홈에는 PCR 증폭산물의 크기를 식별할 수 있는 사이즈마커(100 bp PCR size marker)를 넣고 두 번째 홈부터 PCR 증폭산물을 넣는다. 이 때 검액은 10 μL를 넘지 않도록 한다. 전기영동의 전압과 시간은 겔의 농도와 크기에 따라 조절한다(아가로즈 겔 2 %, 전기영동 100 V, 30 분 ~ 1 시간). 전기영동이 끝난 겔은 에티디움브로마이드 (EtBr) 염색법으로 처리하여 증폭산물을 확인한다.

※ 에티디움브로마이드(EtBr)는 인체에 해로운 시액으로 피부와 직접접촉이 없도록 장갑과 마스크를 착용하고 취급에 주의한다. 폐액은 반드시 지정된 폐기물통을 이용하여야 한다.

라) 결과 확인 및 판정

염색이 끝난 아가로즈 겔을 영상분석장치(UV trans-illuminator)를 통해 증폭밴드를 확인할 수 있다. 검액에서 확인된 증폭밴드는 대조액과 다른 증폭밴드가 검출되어서는 안 된다. 본 실험에 대한 결과 판정은 유전자 분리부터 증폭반응까지 2회 반복 실험을 하여 그 결과가 동일하게 나타나야 한다.

건조감량 17.0 % 이하.

회 분 4.0 % 이하.

산불용성회분 1.0 % 이하.

엑스함량 묽은에탄올엑스 15.0 % 이상.

저 장 법 밀폐용기.