

품질 보증을 위한 멸균법이 목단피의 패오놀 함량에 미치는 영향

이용수 · 신운섭* · 조소연** · 제금련*** · 이효민**** · 정춘식#

덕성여자대학교 약학대학, *관동대학교 의과대학, **식품의약품안전청 생약규격과,

식품의약품안전청 위해성평가과, *식품의약품안전청 식의약품위해성과

(Received February 10, 2005; Revised March 18, 2005)

Effects of Sterilization for Quality Control on the Content of Paeonol in Moutan Radicies Bark

Yong Soo Lee, Woon-Seob Shin*, So Yean Cho**, Keum-Ryon Ze***, Hyo Min Lee**** and Choon Sik Jeong#

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

*College of Medicine, Kwandong University, Kangnung 210-701, Korea

**Division of Herbal Medicines Standardization, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

***Division of Risk Assessment, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

****Division of Food and Drug Exposure Assessment, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Abstract — The purpose of this study was to develop the best methods to sterilize Moutan Root Bark which is frequently used as a herbal medicine, and known to have high susceptibility to microbial contamination. We used dry heat, gamma irradiation and alcohol gas treatment for sterilization, and evaluated these methods in terms of the followings; i) the efficacy of sterilization, and ii) the chemical alteration of a major component of the herbal medicines. Treatment with dry heat effectively got rid of contaminated microorganisms, and did not significantly alter the content of paeonol. However, it seriously changed the color and morphology which are an essential criterion to estimate a measure of quality of medicinal herbs. Treatment with gamma irradiation showed a strong sterilizing effect, and no alteration of the content of paeonol, color and morphology. Alcohol gas treatment resulted in similar effects as those in gamma irradiation. Collectively, these results suggest that appropriate sterilizing methods to guarantee the microbial quality of this herbal medicine may be those using gamma irradiation or alcohol gas.

Keywords □ Moutan Root Bark, sterilizing methods, dry heat, gamma irradiation, alcohol gas, paeonol

목단피는 목단 *Paenia suffruticosa*(작약과 Paeniaceae)의 뿌리껍질¹⁾로서, 가을에 수확하여 수염뿌리와 외피를 제거한 다음, 신선하고 습기가 있을 때에 목심을 벗겨 제거하고別に 말린 것을 그대로 쓰거나 초하여 사용한다.²⁾ 한방에서는 소염, 해열, 진통제 등으로 사용하고 있는 중요한 생약으로, 항돌연변이성, 항염증작용, 항산화작용 등에 관한 연구가 보고된 바가 있으며,^{3,4)} 현재 각국의 공정서 및 대한약전에서 목단피의 여러 성분 중 paeonol(C₉H₁₀O₃ : 166.17)을 지표물질로 설정하여 품질을 관리하고 있다.¹⁾

목단피를 포함하여 현재 우리나라에서 생산 및 유통되고 있는

생약은 토양뿐만 아니라 자연계에서 유래하는 세균·진균 등의 미생물이나 곤충 등 다양한 이물이 부착되어 있을 가능성이 많다. 이 중 육안으로 확인할 수 있는 토양이나 곤충 등의 불순물은 제거할 수 있지만, 미생물의 제거는 곤란하다. 따라서 생약에서 적절한 보관 관리가 행해지지 않으면, 미생물에 의한 부패나 변질이 우려되고 품질의 저하를 가져올 수 있다. 또한 유통 한약재의 대부분은 수입되고 있어서, 보관·유통 과정 중 미생물이 오염될 위험이 크다. 현재, 생약·생약제제를 둘러싼 환경은 국내외적으로 모두 크게 변하고 있으며, 최근 국내에서는 생약의 유해물질 관리의 필요성이 계속적으로 제기되고 있다. 특히 생약의 보존성을 높이기 위한 한 방법인 유향 훈증 등의 처리를 통해 잔류하는 이산화황의 유해성이 알려지면서 그 관리에 대한 필요성이 대두되었으며, 생약의 미생물 오염도를 낮추기 위한 유향 훈증의 대체방법에 대해서도 시급히 검토가 요구되고 있으나, 현

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8382 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) choonsik@duksung.ac.kr

재까지 국내에서 생약의 미생물 오염 관리에 대한 연구가 미미한 실정이다. 그리고 생약에 대한 미생물의 허용기준이나 보관 방법 등이 제시되어 있지 않으므로, 이를 원료로 사용하는 의약품제제나 화장품, 기능성 식품 등에 미생물이 오염될 가능성이 크다. 최근, 일본에서는 특히 생약분말 중의 미생물 살균에 대한 연구가 활발히 진행되었는데 방사선을 이용한 살균법과 동알콜 처리법에 대한 논문이 발표되었고 일본防菌防微學會에서 출판하는 防菌防微誌에서는 생약의 미생물한도 시험법, 생약의 살균법 및 생약에 부착되는 진균류에 관한 논문이 발표되었다.⁵⁻⁸⁾ 이를 계기로 국내에서도 생약의 유해물질 관리의 필요성은 계속 제기되고 있으나, 생약의 미생물 오염 관리에 대한 연구가 매우 미미한 실정이다.

본 연구는 시중에서 흔히 유통되고 미생물에 의한 변질이 빈번하다고 잘 알려진 생약 중 목단피를 선택하여 생약의 미생물학적 품질을 보증할 수 있는 멸균법을 확립하기 위해 건열, 방사선조사 및 알콜 가스를 이용한 멸균법을 비교하여 가장 효율적이고 멸균 후 각 생약의 지표성분에는 변화를 초래하지 않는 적정멸균법을 제시하고자 하였다.

실험 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용한 생약 검체는 한약사의 도움으로 서울 경동약령시장 한마음 약업사에서 구입하여 충남대학교 약학대학 배기환 교수님의 감별을 받아 진품으로 확인되는 시료에 대하여 연구를 수행하였다.

미생물 오염도 측정용을 위한 시료원액 조제 및 희석

멸균하기 전 생약은 시료가 포장되어 있는 경우 미리 개봉부위 바깥쪽을 알코올 솜으로 충분히 닦아 내고 화염멸균을 하는 등의 방법으로 무균처리를 하였다. 생약시료를 멸균된 가위, 핀셋 등을 사용하여 가능한 한 잘게 잘라 혼합한 다음 10g을 채취하였다. 잘게 자른 생약 시료를 멸균 블렌더 컵이나 스토마커 비닐봉지에 넣고 9배량의 인산완충용액(90 ml)을 가하여 균질화한 것을 시료원액으로 하였다. 시료를 균질화시킬 때 블렌더를 사용하는 경우에는 컵을 본체의 모터에 접속하고 저속(약 8,000 rpm)으로 2분간 작동시켜 유체를 제조하였다. 2분 이상 작동시키면 온도가 상승되므로 주의하여 당초에 2~3초간 고속으로 작동시켜 균질화시켰다. 스토마커를 사용하는 경우에는 비닐 백에 실험재료와 희석액을 넣고 내부 공기를 뱉 수 있는 한 많이 제거한 다음, 스토마커에 장착하고 30~60초간 작동시켰다. 시료원액은 필요에 따라 인산완충용액으로 10배 단계희석을 하여 희석시료액을 제조하였다. 실험시료에서부터 희석시료액을 만들 때까지 걸리는 시간은 가능한 한 짧게 하였으며, 만들어진 희석시

료액은 곧바로 배지와 혼합하도록 하였다. 특히, 세균수를 측정하는 경우에는 이상의 전 과정이 15분을 초과하지 않았다.

건열 멸균법

표본생약 각 100g을 비이커에 넣어 각 온도(70, 100, 150°C)에서 2시간 처리한 후 희석액으로 시료를 단계별로 희석하여 평판배지에 일정량을 도말하였다.

알콜 가스 멸균법

가스멸균법으로 에틸렌옥사이드 가스를 이용한 방법도 활용되나¹¹⁾ 멸균 후 잔존되어 있을 때 미치는 독성을 고려하여 인체에 무해한 알콜 가스를 이용한 방법을 채택하였다. Fig. 1과 같이 알콜 가스 발생장치를 제작하였으며, 알콜 가스 발생을 위하여 공기펌프에 스파저를 연결하여 에탄올에 공기를 40 ml/min의 속도로 주입함으로써 알콜 가스를 발생시켰다. 그리고 표본생약 각 100g이 든 밀폐용기(2l)에 알콜 가스를 30분간 연속적으로 주입하여 용기내의 공기를 알콜 가스로 치환하였다. 밸브를 잠그고 25°C에서 하루 동안 처리하였다.

방사선 조사 멸균법(gamma irradiator 멸균법)

생약 100g을 비닐로 밀봉 포장하여 gamma irradiator(그린피아)에 넣고 방사선을 조사하였다. 이때 방사선 총 조사량은 2.5, 5, 10 kGy로 하였다. 방사선 조사 전후 생약을 생리식염수로 희석하여 평판 도말법으로 세균수를 측정하였다.^{9,10)}

총 세균수의 측정

시료원액 1ml를 미리 멸균한 9ml의 인산완충용액 희석액에 넣은 후 볼텍스로 잘 섞은 후 다시 1ml를 취하여 같은 방법으로 10배씩 계단 희석하여 10~10,000,000배로 시료원액을 희석하였다. 이 희석액 1ml를 취하여 TSA(Trypticase Soy Agar) 평판배지에 넣은 후 멸균된 유리봉으로 잘 도말하였다. 그리고 35°C에서 24~48시간 배양한 후 이때 콜로니카운터로 계수하였다.

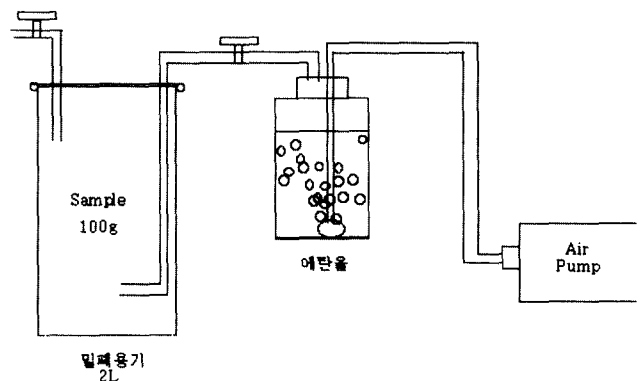


Fig. 1 - Diagram of apparatus for the generation of alcohol gas.

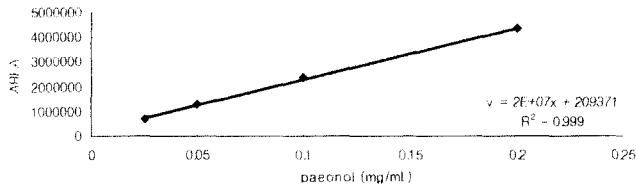


Fig. 2 – Calibration for paeonol over the range of 0.005 to 0.04 mg/ml.

총 진균수의 측정

시료원액을 미리 멸균한 미리 멸균한 9 ml의 인산완충용액 희석액에 넣은 후 볼텍스로 잘 섞은 후 다시 1 ml를 취하여 같은 방법으로 10배씩 계단 희석하여 10~1,000,000배로 시료원액을 희석하였다. 이 희석액 1 ml를 Sabouraud 포도당천배지 평판에 넣은 후 멸균된 유리봉으로 잘 도말하였다. 20~25°C에서 5~7일간 배양한 후 진균 콜로니를 육안으로 계수하였다.

HPLC법에 의한 목단피 중 paeonol의 정량

목단피의 가루 약 0.3 g을 메탄올 40 ml에 넣어 환류냉각기를 달고 수욕에서 30분간 가열하여 식힌 다음 여과한 후, 잔류물에 메탄올 40 ml를 넣어 같은 방법으로 조작하였다. 여액을 모두 합하여 메탄올을 넣어 100 ml로 하고 이 액 10 ml를 취해 메탄올을 넣어 25 ml로 하여 검액으로 사용하였다. 따로 패오놀 표준품(미리 염화칼슘테시케이터에서 1시간 이상 건조) 10 mg에 메탄올을 넣어 100 ml로 되게 하고 이 액 10 ml를 취해 메탄올을 넣어 50 ml로 하여 표준액으로 사용하였다. 표준액은 단계별로 희석하여 0.005에서 0.04 mg/ml에 해당하는 농도로 검량선(Fig. 2; $Y=2E+07X+209971$, $R^2=0.999$)을 작성하여 peak area를 상관관계식에 대입하여 패오놀을 정량하였다. HPLC는 Waters 515 pump와 Waters 2487 Dual λ absorbance Detector와 μ Bondapak™ C₁₈(3.9×300 mm, Waters)컬럼을 사용하였다. 이동상으로 물·아세트니트릴·빙초산 혼합액(65 : 35 : 2)을 사용하여 자외부 흡광광도계(측정파장 274 nm)에서 분석하였다.

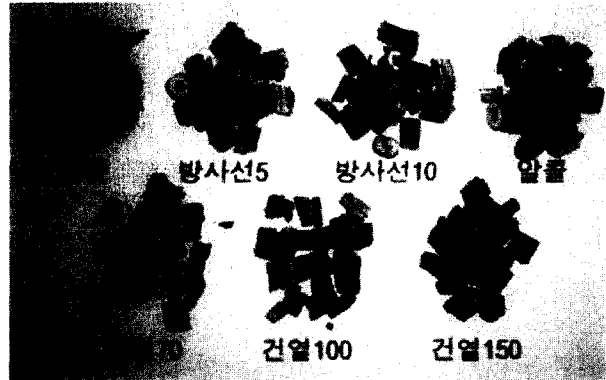


Fig. 3 – Photographs of Moutan Root Bark before and after sterilization.

실험자료의 통계분석

모든 실험은 각 생약시료에 대해 3회 반복하여 시행하였다. 실험결과는 각각(평균값±표준편차)로 나타내었으며, 통계 분석은 Student's t test로 행하였고 통계적 유의성은 p값이 0.05보다 작은 값으로 하였다.

실험결과 및 고찰

외부 형태의 변화

건열 처리 시 70°C와 100°C에서는 생약의 색과 형태의 변화에 영향을 미치지 않았으나, 150°C 건열처리에서 변색이 초래되었다(Fig. 3). 그러나 방사선 조사 및 알콜 가스 멸균에서는 생약의 변색 및 변형은 관찰할 수 없었다. 150°C로 건열 멸균한 경우에는 멸균의 효과가 좋다 할지라도, 생약 품질저하의 질적 판단의 주요 판단기준인 외부 관능(색, 형태)의 변화를 초래하기 때문에 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

멸균법에 따른 균수의 변화

총 세균수는 알콜 가스를 사용한 경우와 70°C에서 건열 멸균

Table I – Summary of total microorganisms and paeonol content before and after sterilization in Moutan Root Bark

Sterilization method	Total bacteria ^{a)}		Total fungi ^{b)}		Paeonol contents ^{c)}		
	before	after	before	after	mg/10 g sample	% Control	
Alcohol gas	2.0×10 ⁵	2.6×10 ⁵	2.2×10 ⁴	-	35.94±0.02	96.90±0.06	
Dry heat	70°C	2.0×10 ⁵	2.6×10 ⁵	2.2×10 ⁴	-	39.14±0.18	105.54±0.49
	100°C	2.0×10 ⁵	6.6×10 ⁴	2.2×10 ⁴	-	36.81±0.33	99.25±0.89
	150°C	2.0×10 ⁵	-	2.2×10 ⁴	-	35.38±0.27	95.40±0.74
Gamma irradiation	2.5 kGy	2.0×10 ⁵	2.4×10 ⁴	2.2×10 ⁴	-	36.87±0.05	99.43±0.20
	5 kGy	2.0×10 ⁵	2.0×10 ³	2.2×10 ⁴	-	34.93±0.10	94.19±0.27
	10 kGy	2.0×10 ⁵	-	2.2×10 ⁴	-	38.45±0.04	103.68±0.10

^{a)}Number of bacteria per 1 g of Moutan Root Bark

^{b)}Number of fungi per 1 g of Moutan Root Bark

^{c)}Paeonol content was 37.08 mg per 10 g of Moutan Root Bark in the control condition without sterilization.

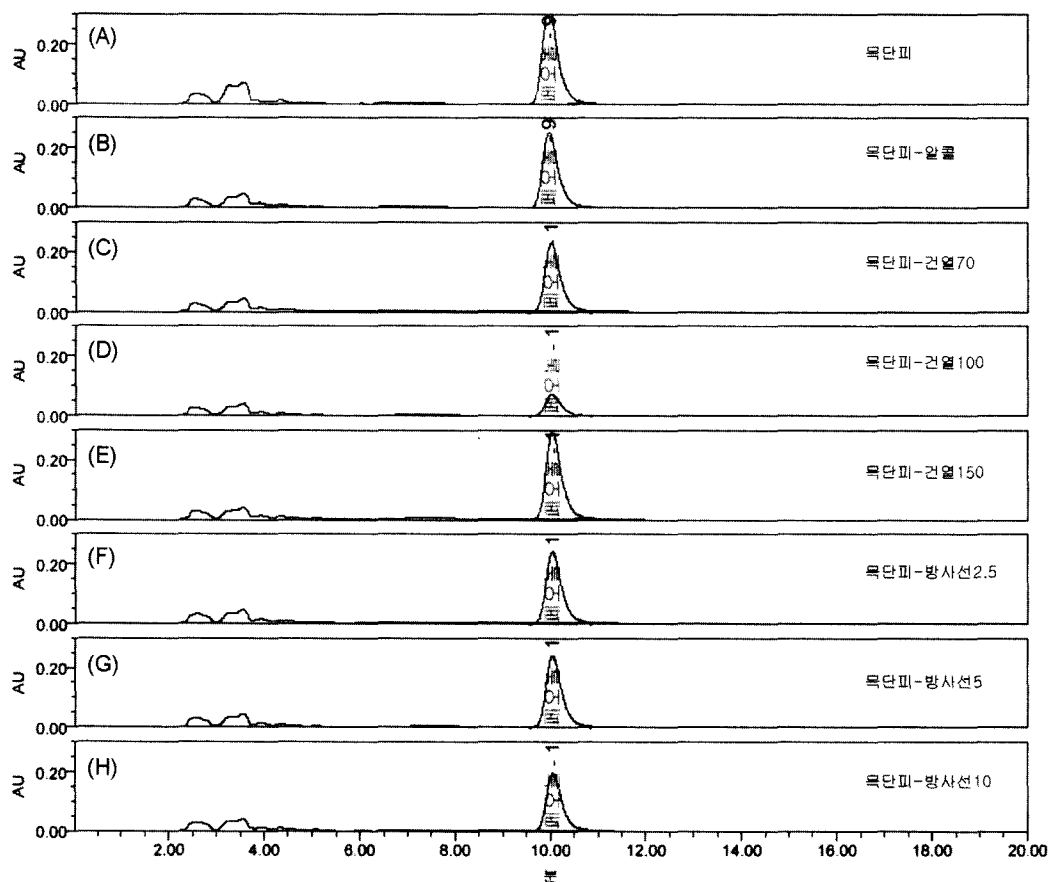


Fig. 4 - Chromatogram of HPLC quantitative analysis of paeonol in Moutan Root Bark before and after sterilization. (A) represents the chromatogram of Moutan Root Bark without sterilization; (B) treated with alcohol gas; (C), (D) and (E); sterilized with dry heat at 70, 100 and 150°C, respectively; (F), (G) and (H) treated with gamma irradiation at 2.5, 5 and 10 kGy, respectively.

한 경우에는 유의성 있는 변화가 없었으나, g 생약 당 균수로 표시한 경우 건열 멸균 시 100°C에서 총 세균수가 6.6×10^4 로 감소하였고 150°C에서는 모든 세균이 완전히 사멸하였다. 방사선 조사의 경우에는 조사량이 많아질수록 총 세균수가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 10 kGy로 조사한 경우 역시 모든 세균이 완전히 사멸하였다. 총 진균 수는 모든 멸균법에서 처리 후 모든 균이 사멸한 것을 확인할 수 있었다(Table I).

멸균법에 따른 지표물질 양의 변화

목단피의 검액 및 표준액 20 μ 씩을 가지고 μ Bondapak™ C₁₈ (3.9×300 mm) column을 사용하여 HPLC를 이용하여 피크 면적으로 검체 중 표준품의 양을 측정하고 그에 대한 평균의 표준 편차를 구하였다(Fig. 4). 멸균처리하지 않은 목단피 중의 페오놀 양은 37.08 mg/10 g이었으며, 알콜 가스 멸균 후 35.94 mg/10 g, 건열 멸균 70, 100, 150°C에서 39.14, 36.81, 35.38 mg/10 g, 방사선 2.5, 5, 10 kGy씩 조사 후 36.87, 34.93, 38.45 mg/10 g으로 멸균 전과 멸균 후 지표성분의 변화는 1~7% 내외이었고 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다(Table I).

결론

1. 생약의 미생물학적 품질을 보증하기 위한 멸균법으로 건열 멸균법은 생약의 품질을 저하하는 요인인 진균을 효과적으로 제거하고 지표성분의 변화는 초래하지 않지만 생약 유통업자와 소비자가 생약품질의 질적 판단의 주요 요인인 외부 관능(색, 형태)의 변화를 초래하기 때문에 생약의 멸균법으로 적당한 방법이 아니라고 판단된다.
2. 방사선조사 멸균법은 용량 의존적으로 진균을 효과적으로 제거하고 고용량에서는 모든 균을 완전히 사멸하였을 뿐 아니라, 지표성분 및 색과 형태의 변화도 초래하지 않아 생약의 멸균법으로 적당한 방법이라 판단된다.
3. 알콜 가스 멸균법은 진균을 효과적으로 제거하고 지표성분 및 색과 형태의 변화도 초래하지 않기 때문에 진균의 제거를 위한 생약의 멸균법으로 적당한 방법이라 할 수 있다. 가스 상태로 적용되거나 알콜 스프레이로 처리할 수 있기 때문에 잔류의 여지가 없고 설사 잔류한다 하더라도 인체에 무해하므로 문제가 되지 않을 것으로 사료된다.

4. 생약의 미생물학적 품질을 보증하는 방법으로 생약의 유통 과정에서 원료 매입 후 집합·수세·건조 직후, 또는 수송 후 저장·유통 바로 전 단계에서 방사선 조사 혹은 알콜 가스로 처리하거나 또는 이 두 가지 멸균법의 병용 적용이 생약의 미생물학적 품질을 보증하는 적당한 방법이 되리라고 판단한다.

5. 본 연구의 결과는 각 멸균법에 따른 목단피 중 페오놀의 함량변화에 대한 실험실적 연구이므로 추후 모든 생약의 미생물학적 품질 보증을 위한 실용화를 위해서는 다른 생약에 대해서 추가적인 실험과 규모 확대 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 추후 실용화 연구에서 방사선 조사법과 알콜 가스법으로 시행했을 때 소요되는 비용 및 효율을 정확히 산출하여 어느 방법이 보다 "저비용-고효율"의 생약 멸균법인지를 확립할 필요가 있을 것이라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년 식품의약품안전청 용역사업의 지원에 의해 수행되었기에 이에 깊이 감사드립니다.

문헌

- 1) 보건복지부 대한보건공정서협회 : 대한약전 제8개정, 1111 (2003).
- 2) 한국생약학교수협의회 편저, 대한약사회 : 本草學, 191 (1995).
- 3) Okubo, T., Nagai, F., Ushiyama, K., Seto, T., Satoh, K. and

Kano, I. : The inhibitory effects of moutan cortex and paeoniae radix on oxidative DNA damage by t-butylhydroquinone, phenolic antioxidant. *Mutation Res.* **379**, S178 (1997).

- 4) Umeda, M., Amagaya, S. and Ogihara, Y : Effects of certain herbal medicines on the biotransformation of arachidonic acid : a new pharmacological testing method using serum. *J. Ethnopharmacol.* **23**, 91 (1988).
- 5) 야마오키 루미 : 생약의 함유 방사능. 防菌防微誌 **31**, 373 (2003).
- 6) 아타라시 쿠니오 : 생약의 미생물 관리. 防菌防微誌 **31**, 739 (2003).
- 7) 야마세 유타카 : 생약의 전자선조사살균/멸균. 防菌防微誌 **31**, 745 (2003).
- 8) 키무라 쇼 지로, 마사시 오쓰미 유우코 : 습열살균에 의한 생약 말의 미생물수, 색조, 지표성분의 변화. 防菌防微誌 **31**, 751 (2003).
- 9) Brantner, A. and Lucke, W. : Influence of physical parameters on the germ-reducing effect of microwave irradiation on medicinal plants. *Pharmazie* **50**, 762 (1995).
- 10) Kimura, S., Taimatsu, M., Kodani, N., Ohnishi, T. and Okamoto, S. : Radiation sterilization of the crude drug "glycyrrhiza". *Biocontrol. Sci.* **2**, 87 (1997).
- 11) Ah, Y. C., Choi, Y., Kim, S. Y., Kim, S. H., Lee, K. S. and Byun, Y. : Effects of ethylene oxide gas sterilization on physical properties of poly(L-lactide)-poly (ethylene glycol)-poly(L-lactide) microspheres. *J. Biomater. Sci. Polym.* **12**, 783 (2001).