

멸균법에 따른 황금의 미생물학적 품질보증과 바이칼린 함량에 미치는 영향

정 춘 식*
덕성여자대학교 약학대학

Effects of Sterilization for Quality Control and Content of baicalin in *Scutellariae Radix*

Choon Sik Jeong*

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

Abstract – The purposes of this study was to develop the best one among the methods using dry heat, gamma irradiation and alcohol gas, to sterilize *Scutellariae Radix* selected based on high frequency of circulation between merchants and high susceptibility to microbial contamination, through comparing these methods in terms of the followings; i) the efficacy of sterilization in comparison with cost, and ii) the alteration of chemical components of these herbal medicines. The results of this study will be taken advantage of establishment of the maximum limit of microorganism contaminated in herbal medicines. From the results of this study we conclude the followings: i) The sterilizing method using dry heat may be inappropriate, because it seriously changed their color and morphology which is an essential criterion to estimate a measure of quality between merchants and consumers, although it effectively got rid of contaminated microorganism and did not alter major components, baicalin; ii) The sterilizing method using gamma irradiation may be appropriate, because it showed a strong sterilizing effect, and no alteration of chemical components, color and morphology; iii) The sterilizing method using alcohol gas may also be appropriate, because it had a similar effects as in the case of gamma irradiation. Collectively, we suggest that appropriate sterilizing methods to guarantee the microbial quality of this herbal medicine may be those using gamma irradiation and alcohol gas.

Key words – *Scutellariae Radix*, sterilization, microbial quality control, baicalin

황금은 속씨은풀 *Scutellariae baicalensis* Georgi (꿀풀과 Labiatae)의 주피를 벗긴 뿌리로, 차고 무독하며 쓴 맛을 지녀 肺, 膽, 胃 및 大腸經에 작용하여 濕熱을 제거하고 止血 및 安胎의 목적으로 처방되어져 오던 약재이다.¹⁾ 최근 호흡기 및 소화관에 대한 항염증, 항암, 항바이러스, 항박테리아 활성이 밝혀져 이에 관한 연구가 진행되고 있다.²⁾ 그 주요 성분으로 baicalin, baicalein, wogonin, wogoninaside, neobaicalin 및 oroxylin A 등이 밝혀진 바 있으며,^{1,2)} 현재 대한약전 및 각국 공정서에 바이칼린(baicalin, C₂₁H₁₈O₁₁ : 446.37)을 지표성분으로 하여 생약의 건조물에 대하여 바이칼린 10.0% 이상을 함유하도록 함량시험을 설정하여 관리하고 있다.³⁾

그러나 황금과 같은 생약재는 생산, 재배, 유통, 저장, 판

매의 환경에서 많은 세균, 진균과 같은 미생물과 기타 이물에 오염되어 있기 쉬울 뿐 아니라, 여러 가지 불순물의 유입의 가능성이 많다. 이러한 미생물 및 기타 이물의 적절한 제거가 행해지지 않으면, 미생물 등에 의한 부패나 변질이 우려되고 품질의 저하를 가져올 수 있다. 이에 미생물 등의 제거를 위해 그동안 제안되었던 방법은 생약의 고유특성(맛, 향, 색, 질감 등)을 유지하고 안전성(화학적 잔류물 및 다른 신생물질의 생성 등)까지도 고려해야 하므로 많은 제한성을 가질 수 밖에 없었다.⁴⁾

최근 연구에 따르면, 건열이나 압력과 가스를 이용한 일반적인 멸균법보다 방사선 조사가 많은 잇점이 있다는 보고가 있었다. 생약재에 대한 방사선 조사 후 저분자량 성분의 양은 거의 변화가 없었으나, 황백과 같은 생약재에 들어 있는 고분자량 성분은 방사선 조사에 의해 그 점도가 감소한 것을 확인한 바 있다.⁵⁾ 그러나 국내에서 선행된 연구에

*교신저자(E-mail) : choonsik@duksung.ac.kr
(FAX) : 02-901-8386

따르면, 인삼엽록차에 대한 방사선 조사 및 에틸렌옥사이드 가스 멸균법에 의해 인삼의 주요성분인 진세노사이드 함량에 대한 영향은 거의 확인되지 않은 바 있었다.⁶⁾ 이에 본 연구에서는 에틸렌옥사이드보다 인체에 유해 정도가 덜한 알콜 가스를 사용하여 가스 멸균법을 시행하였다. 또한 황금의 미생물학적 품질관리를 위한 건열멸균 및 방사선 조사를 이용한 멸균이 관능적 품질변화 및 황금의 지표물질인 바이칼린의 양에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

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

시약 및 기구 - 시약으로 baicalin, phosphoric acid, acetonitril은 Sigma Co.에서 구입하였고 그 외 기타시약은 일급시약을 사용하였다. 기기는 Duksan Chemical Co.의 건열멸균기, Johnsam Co.의 clean bench 및 CO₂ incubator, Olympus Co.의 광학현미경, Waters Co.의 HPLC 및 Chromolith™ RP-18e(4.6 × 100) 컬럼을 사용하였다.

미생물 오염도 측정을 위한 시료원액 조제 및 희석 - 멸균하기 전 생약은 시료가 포장되어 있는 경우 미리 개봉부위 바깥쪽을 알콜로 솜으로 충분히 닦아 내고 화염멸균을 하는 등의 방법으로 무균처리를 하였다. 생약시료를 멸균된 가위, 핀셋 등을 사용하여 가능한 한 잘게 잘라 혼합한 다음 10 g을 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 접촉하고 8,000 rpm정도로 2분간 작동시켜 유체를 제조하였다. 시료원액은 필요에 따라 인산완충용액으로 단계 희석을 하되 세균수를 측정하는 경우에는 이상의 전 과정이 15분을 초과하지 않도록 희석 시료액을 제조하였다. 만들어진 희석 시료액은 곧바로 배지와 혼합하도록 하였다.

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

알콜 가스 멸균법 - 가스멸균법으로 에틸렌옥사이드 가스를 이용한 방법도 활용되나⁷⁾ 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 100 g 이 든 밀폐용기(2L)에 알콜 가스를 30분간 연속적으로 주

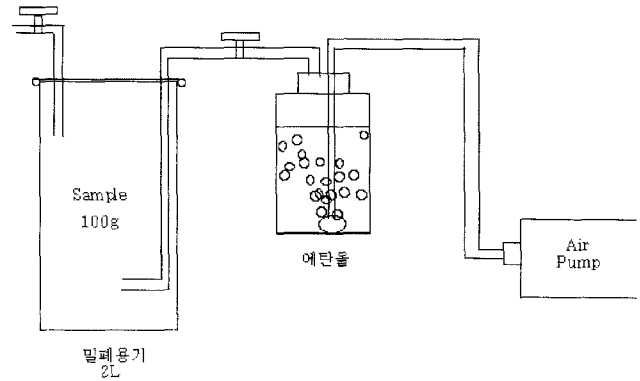


Fig. 1. Diagram of apparatus for the generation of alcohol gas.

입하여 용기내의 공기를 알콜 가스로 치환하였다. 그 후 밸브를 잠가 25°C에서 하루 동안 처리하였다.

방사선 조사 멸균법(gamma irradiation) - 생약 100 g을 비닐로 밀봉 포장하여 gamma irradiator(그린피어)에 넣고 방사선을 조사하였다. 이때 방사선 총 조사량은 2.5, 5, 10 kGy로 하였다.^{8,9)} 방사선 조사 전후 생약을 생리식염수로 희석하여 평판 도말법으로 세균수를 측정하였다.

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

총 진균수의 측정 - 시료 원액을 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 시료 원액을 희석하였다. 이 희석액 1 ml를 Sabouraud 포도당한천배지 평판에 넣은 후 멸균된 유리봉으로 잘 도말하였다. 그리고 20~25°C에서 5~7일간 배양한 후 이때 곰팡이 콜로니를 육안으로 계수하였다.

HPLC법에 의한 황금 중 바이칼린의 정량 - 황금 중 baicalin(C₂₁H₁₈O₁₁ : 446.37)의 정량은 대한약전 황금 항에 준하여 측정하였다.³⁾ 즉, 표준액은 단계별로 희석하여 0.006에서 0.1 mg/ml에 해당하는 농도로 검량선(Fig. 2, Y = 8E + 07X + 81832, R² = 1)을 작성하여 피크 면적을 상관관계식에 대입하여 바이칼린을 정량하였다. 고속액체크로마토그래피는 Waters 515 pump와 Waters 2487 Dual λ absorbance Detector 및 Chromolith™ RP-18e (4.6 × 100)컬럼을 사용하였다. 이동상으로 묽은 인산(1 → 146)과 아세트니트릴혼합액(18:7)를 사용하여 자외부 흡광광도계(측정파장 277 nm)에서 분석하였다.

통계처리 - 모든 실험은 각 생약시료에 대해 3회 반복하

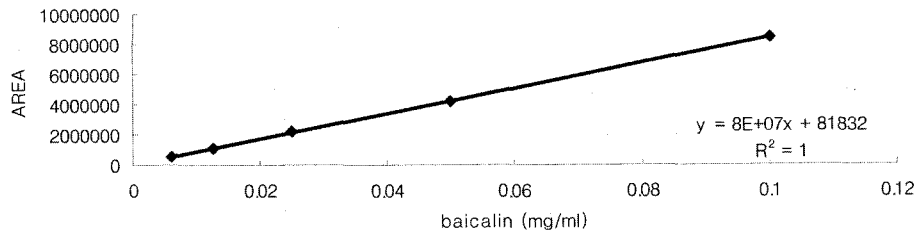


Fig. 2. Calibration for paenol over the range of 0.006 to 0.1 mg/mL.

여 시행하였다. 실험결과는 각각 (평균값±표준편차)로 나타내었으며, 통계 분석은 Student's t test로 행하였고 통계적 유의성은 p값이 0.05보다 작은 값으로 하였다.

결과 및 고찰

외부 형태의 변화 - Fig. 3에서 보는 바와 같이 건열 처리 시 70°C에서는 생약의 색 및 형태에 영향을 미치지 않

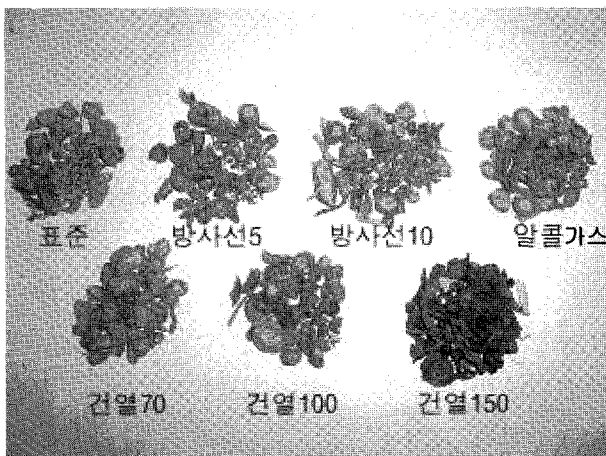


Fig. 3. Photographs of Scutellariae Radix before and after sterilization.

았으나, 100°C 및 150°C 건열처리에서 색이 진하게 변색되었고, 일부 형태도 일그러져 있었다. 따라서 100°C 이상의 건열처리는 색 및 형태 등 외관상 생약의 품질저하를 초래하므로 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 그러나 방사선 조사의 경우 세균 및 진균을 효과적으로 제거하면서 생약의 외부 형태에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

멸균법에 따른 균수의 변화 - 생약의 품질저하에 가장 밀접한 관계가 있는 진균은 모든 멸균법에서 효과적으로 제거되었다. 그러나 70°C 및 100°C의 건열법이나 알콜가스 멸균법에서는 세균을 완전히 사멸하기는 어려웠다. 150°C 이상의 건열법으로 처리했을 경우에는 세균 및 진균이 완전히 사멸되었고, 방사선조사 멸균법 역시 세균 및 진균이 완전히 사멸되었다(Table I). 선행된 연구에 따르면 방사선 조사는 미생물에 대하여 선택적으로 강력한 살균효과를 나타내며 생화학적 변화를 최소화하여 위생학적 위해성도 나타내지 않아 매우 안전하면서도 유용한 살균방법으로 인정되고 있다. 따라서 본 실험에서 사용한 조사량은 국제적으로 안전성이 인정된 선량(10 kGy)을 사용하였다.¹⁰⁾

멸균법에 따른 지표물질 양의 변화 - 황금의 검액 및 표준액 20 µ씩을 가지고 Chromolith™ RP-18e (4.6 × 100) 컬럼을 사용하여 고속액체크로마토그래피를 실시하여 피크 면적으로 검체 중 표준품의 양을 측정하고 그에 대한 평균의 표준편차를 구하였다. 멸균 처리하지 않은 황금 중의 바이

Table I. Summary of total microorganism and baicalin content before and after sterilization in Scutellariae Radix

Sterilization method	Total bacteria ^{a)}		Total fungi ^{b)}		Baicalin contents ^{c)}	
	before	after	before	after	mg/10 g sample	% control
Alcohol gas	6.5×10^5	8.3×10^4	-	-	1183.6 ± 9.10	99.5 ± 0.76
Dry heat	70°C	6.5×10^5	-	-	1191.6 ± 13.02	100.1 ± 1.09
	100°C	6.5×10^5	-	-	1197.9 ± 5.92	100.7 ± 0.50
	150°C	6.5×10^5	-	-	1172.9 ± 47.80	98.6 ± 4.02
Gamma irradiation	2.5 kGy	6.5×10^5	-	-	1177.5 ± 16.80	98.9 ± 1.41
	5 kGy	6.5×10^5	-	-	1205.8 ± 8.86	101.3 ± 0.74
	10 kGy	6.5×10^5	-	-	1206.3 ± 16.68	101.4 ± 1.40

^{a)}Number of bacteria per 1 g of Scutellariae Radix

^{b)}Number of fungi per 1 g of Scutellariae Radix

^{c)}Baicalin content was 1189.9 mg per 10 g of Scutellariae Radix in the control condition without sterilization

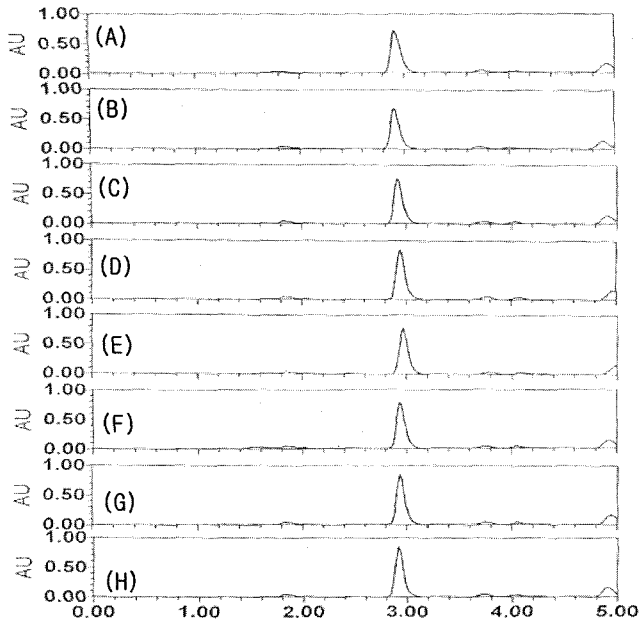


Fig. 4. Chromatogram of HPLC quantitative analysis of baicalin in *Scutellariae Radix* before and after sterilization. (A) represents the chromatogram of *Scutellariae Radix* without sterilization; (B) treated with alcohol gas; (C), (D) and (E) sterilized with dry heat at 70, 100 and 150°C, respectively;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

칼린 양은 1189.90 mg/10 g이었으며, 알콜가스 처리 멸균 후 1183.58 mg/10 g, 건열멸균 70, 100, 150°C에서 1191.47, 1197.94, 1172.87 mg/10 g, 방사선 2.5, 5, 10 KGy씩 조사 후 1177.50, 1205.83, 1206.30 mg/10 g으로 멸균 전과 멸균 후 지표성분의 변화는 1~2% 내외로 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4, Table I).

결 론

생약의 품질확보를 위해 외부적 관능(색, 형태 등)의 보존과 해충 및 미생물에 의한 품질저하를 방지하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 생약의 멸균법으로 건열, 방사선조사 및 알콜 가스를 이용한 멸균법을 시행한 결과, 100°C 이상의 건열 처리 시 황금의 색 및 형태에 변화를 초래하여 적당하지 않은 것으로 사료되었다. 그러나 방사선조사 및 알콜 가스 멸균법은 세균 및 진균을 효과적으로 제거하고, 황금의 지표물질인 바이칼린의 함량 및 외부 관능의 변화를 초래하지 않아 생약의 품질관리를 위한 멸균법으로서 제안 가능성이 있을 것으로 판단된다. 물론 추후 다른 생약에 대

한 추가적인 실험과 규모의 확대를 통해 실용화를 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2005년 덕성여자대학교와 2004년 식품의약품 안전청 용역사업의 지원에 의해 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드리며 실험에 도움을 주신 신운섭, 이용수 교수님께도 감사드립니다.

인용문헌

1. 全國韓醫科大學 本草學 教授(1991) 本草學, p. 178-179. 圖書出版 永林社, 서울.
2. Lia H.B., Jiangb Y., and Chena F. (2004) Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. *Journal of Chromatography B*, **812**: 277-290.
3. 한국약학대학협의회 약전분과회 편저(2003) 대한약전 제 8개정 해설서, p. 1323-1324. 도서출판 신일상사, 서울.
4. 변명우, 김동호, 육흥선, 안현주(2000) 식품미생물의 방사선 살균. *식품과학과산업* **33**: 58-70.
5. Kamakura H., Hirano T., Ito H., Sunaga H., Takizawa H., Takatani Y., Sekita S., and Satake M. (2002) Studies on the sterilization methods for the crude drugs. Possibility of EB machine for decontamination of crude drugs and influence on the components of crude drugs by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* **63**: 685-689.
6. Kwon J.H., Byun M.W., Choi K.J., Kwon D.W., and Cho H.O. (1992) Effects of decontamination treatments on chemical components of Panax Ginseng-Leaf Tea. *Korean Journal of Food Science Technology* **24**: 65-69.
7. Ah Y.C., Choi Y., Kim S.Y., Kim S.H., Lee K.S., and Byun Y. (2001) Effects of ethylene oxide gas sterilization on physical properties of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) microspheres. *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* **12**: 783-799.
8. Brantner A. and Lucke W. (1995) Influence of physical parameters on the germ-reducing effect of microwave irradiation on medicinal plants. *Pharmazie* **50**: 762-766.
9. Kimura S., Sasaki M., Kondo Y., Jo H., Kanbashi T., and Koida H. (1981) Study radiosterilization of crude drug pill involving bezoar bovis-radiolysis of bilirubin and choilic acids in hydrous starch pellet. *Radioisotopes* **30**: 669-673.
10. 변명우(1997) 식품산업에서 방사선 조사기술의 이용과 전망. *식품과학과산업* **30**: 89-101.

(2005년 7월 19일 접수)