

국내 유통 중인 환약의 미생물 검출수준

고광표¹⁾ · 신헌태^{2)*}

¹⁾서울대학교 보건대학원 미생물학연구소실

²⁾동신대학교 한의과대학 예방의학교실

Microbial detection on pill types of herbal medicine in South Korea

Gwang-pyo Ko¹⁾ & Heon-tae Shin^{2)*}

¹⁾Environmental Microbiology Dept., Graduate school of public health, Seoul National Univ.

²⁾Preventive medicine Dept., Oriental Medicine College, Dongshin Univ.

Abstract

Objectives: This study has aimed to monitor microbial detection on pill types of herbal medicine which are circulating in markets including Oriental Medical Clinics(O.M.C.s) and Pharmacy in Korea.

Methods: 10 different samples of O.M.C.s and 10 different samples of Pharmacy were investigated by culture method and non-culture method based on the 9th edition of microbial examination released by Korea Food & Drug Administration.

Results: The total microbial count among each 10 samples were detected within the limit suggested by WHO. 2 samples of O.M.C.s and 1 samples of Pharmacy exceeded WHO's limit in fungi count. No samples exceeded WHO's limit in bacteria count. Most bacteria founded in samples were the phylum of *Firmicutes* and *Proteobacteria* which are common in soil by non-culture method.

Conclusion: Further study should be followed to set up proper microbial limit of herbal materials including pill types.

Key words : Microbial detection, Herbal medicine, Pill, Herbal medicine safety

· 접수: 2011년 11월 9일 · 수정접수: 2011년 12월 15일 · 채택: 2011년 12월 16일

* 교신저자: 신헌태, 전남 나주시 건재로 253, 동신대학교 한의과대학 예방의학교실

전화: 061-330-3528, 팩스: 061-330-3519, 전자우편: goodomd@naver.com

I. 서론

환약은 한방의료기관 및 약국에서 주로 사용하는 전통적인 약제형태로써, 복용과 보관이 편리하여, 다용되고 있다. 환약은 일부 가열공정을 거쳐 제조되는 경우도 있으나, 가열공정을 거치지 않는 경우가 많으므로, 미생물존재는 불가피하다고 볼 수 있다.^{1,2)}

2004년 안용준 등³⁾은 전국에서 유통되고 있는 한약제에 대한 미생물수준을 조사하여, 마황, 개자, 구기자, 인진, 우슬 등에서 기준치 이상의 미생물이 발견되었다고 보고하였다. 한편, 의약품, 식품에 대한 위생관념이 사회적으로 커지면서, 한약제 안전성에 대한 사회적 관심도 같이 증가하고 있다. 일반적으로 지금까지 한약의 안전성은 관능검사, 이산화황 존재 유무, 잔류농약 및 중금속오염 여부에 의해 판단되어 왔으나, 최근에는 생약에서 검출된 곰팡이가 생성하는 곰팡이 독소 잔류여부가 생약의 중요한 안전성 지표로 거론되면서⁴⁾ 식약청에서도 이에 대한 관리를 강화하고 있다. 즉, 2004년에 ‘생약의 곰팡이독소 허용기준 및 시험방법 제정’⁵⁾하여, 9개 한약에 대한 곰팡이독소(아플라톡신 B1) 기준이 신설되었고, 이후 과루인 등 10개 품목이 검사항목으로 추가되었다.⁶⁾

따라서, 현재 식품의약품안전청의 고시에서는 한약 및 한약제제에 대해, 총세균수, 총진균수, 대장균, 살모넬라, 녹농균, 황색포도상구균 그리고 19종 한약제에 대한 곰팡이독소허용기준이 있으며, 점점 확대되고 있는 추세이다. 체계적인 연구를 통해 한약제미생물허용한도를 설정하려는 노력은 몇몇 연구진에 의해 시도되었다. 이주현 등⁷⁾과 정덕화 등⁸⁾이 한약제와 관련한 미생물검출수준과 아플라톡신독소를 중심으로 연구하였으나, 아직 관련 연구가 부족한 실정이다.

특히, 환약은 한약제의 최종 섭취형태이므로, 관련 연구가 시급한 실정이라고 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 한방의료기관에서 다용하는 환약 10종과 약국에서 판매되고 있는 한방환약 10종에 대한 미생물검출수준과 환약에 분포하는 Bacteria의 동정에 관한 연구를 시도하였다.

II. 연구방법

1. 한약제 선정

본 연구에 사용한 환약은 서울소재한의원에서 6종(영등포구2곳, 종로구1곳, 성북구1곳, 은평구2곳), 경기도소재한의원에서 4종(고양시2곳, 안산시1곳, 안양시1곳), 그리고, 약국에서 판매하는 한방환약 10종을 구입하여 사용하였다. 한의원에서 수집한 10종 환약 중 9종은 한방소화제로 상용되는 환약으로 최근에 제조하여, 판매 중인 것으로 사용하였고, 나머지 1종은 변비개선용으로 사용되는 환약이었다. 약국에서 판매되는 10종의 한방환약은 각종 질환에 빈번하게 판매되는 약을 기준으로 선택하였다. 10종의 약국 한방환약 중 소화제 1종, 진해거담제 2종, 피로회복강장제 2종이 포함되었고, 지사제, 변비완화제, 심신안정제, 진통제, 신경통완화제, 가려움증완화제는 각 1종씩 포함되었다. 약국 한방환약은 7개 제약사에서 제조되어 최근 납품된 것으로 선정하였다(Table 1).

2. 시료 전처리

위생 포장된 환약 시료를 개봉부위 바깥쪽을 70% 알콜로 충분히 닦아내고, 화염멸균하는 방법으로 무균처리를 하였다. 멸균된 가위, 핀셋을 사용하여 적당한 크기로 절단한 후, 10g을 채취하여 멸균된 flask bottle에 넣고 시료의 9배

Table 1. Pills used for this study

Pills from O.M.C.s			Pills from Pharmacy		
Label	Division	Location of the O.M.C.s	Label	Name of the pills	Division
H1	Digestant	Seoul	P1	Woowhang chongshimwon	Tranquilizer
H2	Digestant	Seoul	P2	Jungnowhan	Antidiarrhea
H3	Digestant	Seoul	P3	Kongjindan	Restorative
H4	Digestant	Seoul	P4	Dangguijakyaksan	Painkiller
H5	Laxative	Seoul	P5	Manryeongdan	Antineuralgic
H6	Digestant	Gyeonggi-do	P6	Youngwidan	Digestant
H7	Digestant	Gyeonggi-do	P7	Yongsawhan	Antiitchiness
H8	Digestant	Gyeonggi-do	P8	Yukmiwon	Restorative
H9	Digestant	Gyeonggi-do	P9	Taepyoungwhan	Cough lozenge
H10	Digestant	Gyeonggi-do	P10	Haedamwhan	Cough lozenge

* H1~H10 : Pills from O.M.C.s * P1~P10 : Pills from Pharmacy

* O.M.C. : Oriental Medical Clinic

량의 인산완충용액(90mL)을 가하여 균질화한 것을 시료원액으로 하였다. 시료의 균질화 처리는 환약의 경도에 따라 용출 정도가 달라지지만 일괄적으로 200rpm에서 약 1~2분 처리하였고, 인산완충용액으로 dilution factor 0.1이 되도록 검액을 제조하여 이를 시료원액으로 하였다. 총세균수 측정은 10^{-7} , 총곰팡이는 10^{-6} 까지 희석하여 검액을 만들었다.

3. 미생물 한도검사

1) 총 세균수 측정

전처리 과정을 거친 시료원액 또는 희석한 검액 1ml를 펠트리 접시에 분주하고 미리 45°C로 보온하여 둔 액체 상태의 멸균한 Tryptic soy agar(TSA)배지 15mL를 넣어 혼합하고 37°C에서 24시간 배양한 후 계수하였다. 환약재에 혼재하는 진균의 증식을 억제하기 위해 항진균제

2.0ml/L 암포테리신 B시액을 배지에 넣어 사용하였다. 각 희석단계마다 2개의 배지에 반복 실험을 진행하였으며 한 평판당 10~100개 이하의 집락을 가지는 평판에서 계측 결과를 가지고 총 세균수를 산출하였다. 실험법은 대한약전의 미생물 한도 시험법⁶⁾을 기준으로 진행하였다. 모든 작업은 무균작업대에서 실시하였다.

2) 총 진균수

총 진균수의 계수를 위해 대한약전을 참조하여 항생물질을 첨가한 Potato dextrose agar배지를 사용하였으며 항생제로는 Chloramphenicol 50mg/L을 사용하였다. 10^{-6} 까지 희석한 검액 1ml를 펠트리접시에 분주하고 미리 45°C로 보온하여 액체 상태의 멸균한 Potato dextrose agar 배지 15mL를 넣어 혼합하였다. 각 희석단계마다 2개의 배지에 반복 실험을 진행하였으며 곰팡이는 25°C에서 5일간 배양한 후 계수하였다.

4. 환약에 분포하는 Bacteria 동정

1) DNA추출

총 세균수실험에서 한의원샘플과 약국샘플 모두 WHO 기준(10^7 CFU/g)에 적합하였으나, 평균이상 검출된 H5, P2환약에 분포하는 Bacteria를 동정하기 위해, 시료원액을 각 1mL를 Ultra clean™ soil DNA isolation kit를 이용하여 제조자의 지시를 따라 DNA를 추출하였다.

2) 16S rDNA 유전자 증폭 반응

추출된 DNA 샘플은 Table 2의 primer를 이용하여 유전자 증폭 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. PCR 반응액 조성은 한 반응 당 template DNA 2.5 μ L, 10mM dNTP mix 1 μ L, 10 X PCR buffer 2.5 μ L와 각각의 primer (50 pmol) 0.3 μ L씩, 5U의 Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea) 0.25 μ L을 첨가하여 전체 25 μ L 분량으로 멸균된 증류수를 맞추었다. 각각의 PCR 반응액은 중합효소연쇄반응기(Applied Biosystems 2720, USA)로 세균 특이적인 16s rRNA primer(27f-685r)를 이용하여 PCR반응을 실시하였다. 반응조건으로는 94 $^{\circ}$ C에서 변성(denaturation)을 2분간 실시한 후, PCR comprised 35cycle은 94 $^{\circ}$ C에서 변성 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 수소결합(Annealing) 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 신장반응(Extension) 1분, 최종 신장반응(final extension)은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하였다. 생성된 PCR product는 1% ethidium bromide stained agarose gel에서 100V로 20~30분간 전기 영동하여 DNA

image analyzer로 확인하였다.^{14, 15)}

3) TA vector cloning 및 염기서열분석

16S rDNA 염기서열분석을 위한 TA cloning은 생성된 PCR 산물을 pGEM T easy vector system(Promega, USA)를 사용하여 실시하였다. PCR 산물을 1% agarose gel에서 50V로 전기영동한 후 gel extraction kit(QIAquick Gel Extration Kit, Qiagen, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출한 PCR product 1.5 μ L, pGem-T easy vector 0.5 μ L, T4 TNA ligase 0.5 μ L, 2x rapid ligation buffer T4 DNA ligase 2.5 μ L를 멸균한 test tube에 넣어 room temperature에서 60분간 ligation을 수행하였다. Ligation한 후 DH5 α E.coli competent cell에 transformation한다. 그 후 LB ampicillin plate에 0.1M IPTG와 50mg/mL X-gal을 같이 섞어서 도말하여 white/blue selection을 시도하였다. 37 $^{\circ}$ C incubator에서 12시간 배양하였고 생성된 colony 중 white colony를 3unit을 각각 3mL LB ampicillin broth에서 배양하였다. 배양된 샘플은 각각 plasmid miniprep kit(Labopass, Cosmo4, Korea)으로 TA 클로닝된 재조합 플라스미드를 추출한 후 Cosmo4에 16S rDNA 염기서열분석을 의뢰하였다.¹⁹⁾

4) 계통학적 분석

27f-685r primer로 얻은 각각의 16S rDNA 유전염기서열을 미국국가생물공학센터(NCBI) BLAST, EZTAXON¹⁶⁾을 이용하고, 다른 염기

Table 2. Primers used for PCR

Primer	Sequence	Reference
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	(Johnson 1994) ¹⁵⁾
685r	5'-TCTACGCATTTCACCGCTA-3'	(Johnson 1994) ¹⁵⁾

서열정보와 비교하여 1차적으로 확인을 하였다. 이를 토대로 ARB¹⁸⁾ database를 이용하여 재 확인한 후, ARB neighbor-joining tree 방법으로 ARB database tree에 삽입한 후 계통수 (phylogenetic tree) 결과를 얻었다.^{16, 17, 18)}

III. 결 과

1. 환약에서의 미생물 검출수준

반복시험한 Sample들의 미생물검출 평균을 Table 3에 나타내었다.

총세균수에서는 한의원샘플과 약국샘플 모두 WHO 기준(10^7 CFU/g)에 적합하였다. 한의원 샘플의 전체평균은 9.7×10^4 CFU/ml, 약국샘플의 전체평균은 4.5×10^4 CFU/ml 였다.

총진균수에서는 한의원샘플 10개중 2개샘플에서, 약국샘플 10개 중 1개샘플에서 WHO기준

(10^4 CFU/g)을 초과하였다. 그러나, 한의원샘플과 약국샘플모두 전체평균은 9.9×10^3 CFU/ml, 8.2×10^3 CFU/ml로써, WHO 기준에 적합하였다.

2. 환약에 분포하는 Bacteria 동정

총세균수시험에서 한의원샘플과 약국샘플 모두 WHO 기준(10^7 CFU/g)에 적합하였으나, 평균이상 검출된 H5, P2시료에 대해 비배양적인 방법을 통해 환약에 분포하는 Bacteria를 동정한 결과, 분포 균은 크게 *Firmicutes*문, *Proteobacteria*문의 두 종류에 속하였다.

*Firmicutes*문 중 *Bacilli*강에 속하는 균으로 *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc lactis*, *clostridiummagnum* 이 있었다.

*Proteobacteria*문에는 *Alpha proteobacteria*강과 *Gamma proteobacteria*강에 속하는 균들이

Table 3. Comparison of microbial detection of pills from O.M.C.s and Pharmacy

Pills from O.M.C.s			Pills from Pharmacy		
Label	BACTERIA (CFU/ml)	FUNGI (CFU/ml)	Label	BACTERIA (CFU/ml)	FUNGI (CFU/ml)
H1	5.2×10^2	6.8×10^2	P1	2.7×10	1.1×10^3
H2	2.2×10^4	7.4×10^2	P2	2.6×10^5	5.6×10^3
H3	1.1×10^4	1.2×10^3	P3	1.2×10^4	1.8×10^3
H4	1.5×10^5	7.0×10^2	P4	2.2×10^4	6.1×10^2
H5	4.8×10^5	$2.4 \times 10^{4*}$	P5	1.3×10^4	1.1×10^3
H6	1.1×10^3	$1.3 \times 10^{4*}$	P6	2.2×10^4	6.2×10^3
H7	1.3×10^5	8.5×10^2	P7	9.4×10^4	6.7×10^3
H8	1.7×10^2	1.1×10^3	P8	1.9×10^4	$1.2 \times 10^{4*}$
H9	6.9×10^4	3.4×10^3	P9	2.4×10^2	1.2×10^2
H10	1.1×10^5	1.3×10^3	P10	3.1×10^3	1.1×10^3
Average	9.7×10^4	9.9×10^3	Average	4.5×10^4	8.2×10^3
Numbers of contamination	0/10	2/10	Numbers of contamination	0/10	1/10

* Microbial contamination Limit : Bacteria 10^7 CFU/g, Fungi 10^4 CFU/g(WHO's Microbial Contamination Limit Category-1 standard)

Table 4. Microbial distribution of pill types of herbal medicines

Genus of Pills from O.M.C.	Genus of Pills from Pharmacy
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Enterobacter sp.</i>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Serratia fonticola</i>	
<i>Pseudomonas sp.</i>	

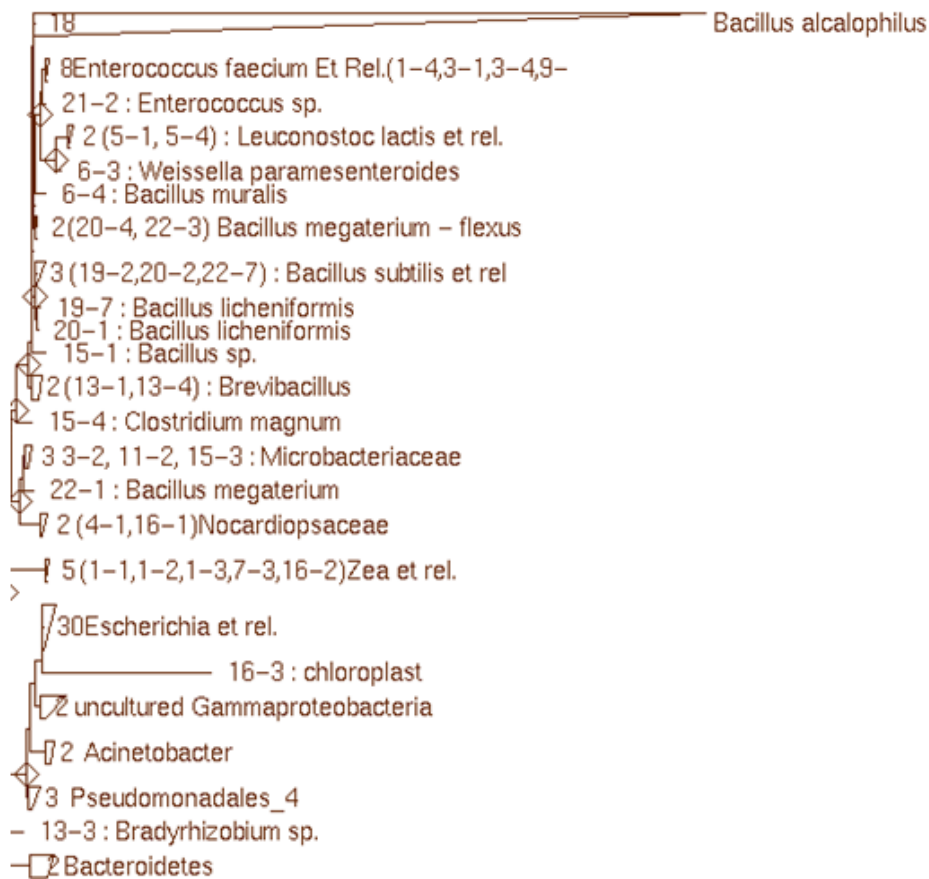


Fig 1. Phylogenetic tree of bacteria from pill types of herbal medicine by using ARB

있는데, *Alpha proteobacteria*로 질소고정균인 *Bradyrhizobium sp*가 분포하고 있었고, *Gamma proteobacteria*강에는 토양 미생물인 *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonascedrina*가 분포하고 있었고, 장내균인 *Enterococcus faecium*, *Enterobacter sp. Serratia fonticola* 등이 분포하고 있었다(Table 4, Figure 1).

IV. 고 찰

1. 한약제에서 미생물검출수준

한약제에 대한 미생물허용한도의 각 나라별 규격기준을 살펴보면, 최근 유럽에서는 호기성균의 미생물검출한도(microbial contamination limit)를 $10^7 \sim 10^8$ CFU/g 이하로 설정하고 있다. 미국에서도 유럽과 같은 기준을 설정하고 있다. 일본은 열탕처리여부를 기준으로 2가지 다른 기준을 가지고 있는데, 열탕을 처리하여 이용하는 생약 및 제제와 엑기스제를 포함하는 카테고리1의 기준은 호기성 세균은 g당 10^7 CFU 이하, 곰팡이와 효모를 포함하는 진균의 경우는 g당 10^4 CFU 이하, 대장균(*E. coli*)은 g당 10^2 CFU 이하, 살모넬라균(*Salmonella*)은 비검출을 기준으로 하고 있다. 카테고리1에 해당하는 것을 제외한 기타 생약 및 제제, 분말생약, 환제, 산제를 포함하는 카테고리2의 경우는 호기성 세균은 g당 10^5 CFU 이하, 진균은 g당 10^3 CFU 이하, 장내세균과 기타 그람음성균은 g당 10^3 CFU 이하, 대장균(*E. coli*)과 살모넬라균(*Salmonella*)은 비검출을 기준으로 정하고 있다.

국내에서는 식품의약품안전청 고시 제2003-20호에, “생약추출물을 함유하는 내용고형제제는 세균의 검출한도를 1×10^5 CFU/g 이하로, 진균의 검출한도를 1×10^2 CFU/g 이하로 설정하고 있으나, “원생약분말 1성분 이상 함유하는 내용고형제제는 세균 및 진균시험을, 생균제제는 세

균시험을 제외한다”고 명시되어 있어, 생약추출물에 대해서만 총세균수, 총진균수에 대한 기준이 마련되어 있는 상황이다.

곰팡이검출기준에 대해서는, 식품의약품안전청 공고 제2009-136호 생약 등의 잔류·오염물질에 관한 고시에 의하면, ‘감초 결명자 과루인 귀관 도인 모과 반하 백자인 백편두 빈랑자 산조인 연자육 울금 원지 육두구 지구자 파두행인 홍화’ 이상 19종에 대해 아플라톡신B1의 검사기준이 마련되어 있으나, 아플라톡신B1 외의 진균에 대한 기준은 마련되어 있지 않다.

또한, 식품의약품안전청 고시 제2011-22호 「한약(생약)제제 등의 품목허가·신고에 관한 규정」 제정 고시에 의하면, 과립제 산제 캡슐제 환제는 미생물한도시험의 필수대상이 아닌 것으로 분류하고 있다. 즉 한약제제학적 시험항목에서 “개개 품목의 제제특성에 따라 판단하여 시험항목을 설정하는 것”으로 명시하였다. 이렇듯, 원료한약제, 한약제제, 환약, 과립제, 산제, 캡슐제 등 다양한 제형에 따른 미생물허용한도 상세 기준은 마련되어 있지 않다. 이러한 상황에서 이주현 등⁷⁾은 한약제의 미생물허용한도 설정을 위한 연구를 실시하여, 산지가 다른 개별 한약제 54품목들의 미생물검출실태에 대한 조사를 실시하여, Bacteria는 7.41%(4/54), Fungi는 25.93%(14/54)의 검출수준을 제시하였다.

본 연구에서는 약국환약과 한의원환약의 각각 10%(1종류/10종류), 20%(2곳/10곳)에서 fungi가 기준치를 상회하여 검출되어, 상기의 연구결과(25.9%)보다는 낮은 검출수준을 보였다. 한편, Bacteria는 기준치를 상회한 품목이 상기연구와 달리 검출되지 않아 안전한 것으로 인정되었다. 그러나, GMP시설을 갖춘 한방제약회사에서 생산, 유통되는 약국용 한방환약에서도, Fungi에서 10%정도의 초과검출수준을 보인 것은, 천연물인 한약제의 특성상 생산단계에서 미생물이 혼입되었을 가능성이 있으며, 또한, 가열공정이 없이 조제된 환약의 공정상의 특성으

로 나타날 수도 있음을 의미한다. 한편, 상기연구⁷⁾에서 상지, 지황, 진피, 마황, 오수유 등의 개별약재에 대한 검출을 지적하였듯이, 본 연구에 사용된 한방소화제의 원료한약재로 쓰이는 여러 개별 한약재에서의 검출도 의심된다. 한의원에서 상용하는 한방소화제는 개별 환약에 따라 구성 한약재가 다르나, 진피, 지실 등의 육진약(六陳藥), 발효공정을 활용하는 신곡 등의 한약재가 포함되는 경우가 많아, 미생물 발생가능성이 상재한다고 볼 수 있다.

이러한 한약재의 미생물발생가능성은 개별 한약재의 특성에서 기인한 것일 수도 있으나, 약재의 보관기간, 보관상태, 포장상태 등에 영향을 받을 수 있는 만큼,^{3,11)} 이에 대한 좀 더 체계적 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 환약에서 발견되는 미생물의 종류에 대한 연구도 같이 진행될 필요가 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 환약에 분포하는 Bacteria의 동정에 관한 연구만이 진행되어, 차후 Fungi에 관한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

2. 환약에 분포하는 미생물(Bacteria) 동정

안용준 등³⁾의 연구에 의하면, ‘국내 유통되는 18종 한약재에서 기준치 이상의 포도상구균(*Streptococcus*)과 녹농균(*Pseudomonas*)은 검출되지 않았으나, 비검출되어야 할 살모넬라균(*Salmonella*)는 18종의 한약재 중에서 계피(桂皮, *CINNAMOMI CORTEX*), 산수유(山茱萸, *CORNI FRUCTUS*), 오미자(五味子, *SCHIZANDRAE FRUCTUS*)를 제외한 모든 한약재에서 기준치 이상이 검출되었으며, 대장균(*E. coli*)은 18종 한약재 모두에서 기준치 이상이 검출되었다’고 하였다. 상기연구³⁾에 이용된 18종의 한약재는 마황, 개자, 구기자, 인진, 우슬, 금은화, 목단피, 음양곽, 작약, 지각, 계피, 산수유, 오미자, 정향, 황금, 황백 등으로, 본 연구

에서 이용된 한방환약의 원재료로도 사용되는 약재들이 다수였다. 그러나, 본 연구에서 배양비의존적 방법을 이용한 한방환약에 분포하는 박테리아 동정 결과, 대부분의 박테리아는 토양에 존재하는 균이었다. 이들은 한약재의 원재료가 주로 식물의 뿌리나 줄기인 점을 미루어 보았을 때 이들 원재료로부터 유래한 균으로 생각된다. 분포 균은 크게 *Firmicutes*문, *Proteobacteria*문의 두 종류에 속하였다.

*Firmicutes*문 중 *Bacilli*강에 속하는 균으로 *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc lactis*, *Clostridiummagnum*이 있었다.

*Proteobacteria*문에는 *Alpha proteobacteria*강과 *Gamma proteobacteria*강에 속하는 균들이 있는데, *Alpha proteobacteria*로 질소고정균인 *Bradyrhizobium sp.*가 분포하고 있었고, *Gamma proteobacteria*강에는 토양 미생물인 *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonascedrina*가 분포하고 있었고, 장내균인 *Enterococcus faecium*, *Enterobacter sp.*, *Serratia fonticola* 등이 분포하고 있었다. 분포하고 있는 Bacteria 중 대부분은 무해하며, 일부균은 유익균으로 발효균주로 이용되기도 한다. 그러나, *Proteobacteria*문에 속하는 *Pseudomonascedrina*, *Enterococcus faecium* 등은 일상환경에 존재하는 균주나 환경에 따라 병원체로 작용하여, 각종 감염증, meningitis, VRE 등의 질환을 일으킬 수 있는 만큼 관리에 신중을 기할 필요가 있다.²⁰⁾ 다만, 이 균들이 환약의 제조과정 중 어느 단계에서 혼입되었는지, 어느 정도의 양이 존재하는지는 추후 연구가 필요하다고 생각된다. 본 연구는 현재까지 부족했던, 환약에 분포하는 미생물을 분자생물학적인 방법을 통해 살펴보았다는데 그 의미가 있다고 하겠다. 앞으로, 특정 세균에 대한 특이적인 primer를 사용한 실험을 통해 환약의 안전수준을 높여 나가야 할 것으로 생각된다.

또한, 본 연구에서는 시판되고 있는 일부 환약을 대상으로 한 연구이므로, 앞으로 대상 환약재를 확대한 연구를 통해, 원료환약재와 조제품인 환약, 탕약 등 한의약제품들의 미생물허용한도를 설정해 나가는 것이 필요할 것으로 사료된다.

V. 요약

1. 서울, 경기소재 한의원에서 환약 10종과 경기소재 약국1곳에서 판매되는 한방환약 10종, 총 20종의 환약에 대해 미생물검출연구를 하였다.

2. 총세균수는 한의원환약, 약국환약에서 모두 WHO기준(1.0×10^7) 이내로 검출되었다.

3. 총진균수는 한의원환약, 약국환약의 각각 2종류, 1개제품에서 WHO기준(1.0×10^4)을 초과하였다.

4. 배양 비의존적 방법을 이용하여 환약에 분포하는 Bacteria를 동정한 결과, 대부분의 박테리아는 토양에 존재하는 Firmicutes문, Proteobacteria문의 두 종류에 속하였다.

5. 환약의 안전성을 제고하기 위해, 생산, 가공, 유통, 보관 등 각 단계에서의 추가적인 미생물검출연구가 필요하다.

감사

이 논문은 동신대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다. 감사드립니다.

참고문헌

1. Bokin Bobai. 31(11): 739-743, 2003.
2. Bokin Bobai. 31(7): 399-409, 2003.
3. 안용준. 생약의 미생물학적 품질보증 연구-

- 생약의 저장조건에 따른 충해 및 미생물오염조사. 2004.
4. 정덕화. 생약의 유해물질 기준 제·개정을 위한 연구(II) -생약의 곰팡이 독소 기준 설정 연구-. 2006.
5. 식품의약품안전청. 생약의 곰팡이독소 허용 기준 및 시험방법 제정. 식품의약품안전청고시 제2004-91호.
6. 식품의약품안전청. 일반시험법, 대한약전 제9개정. 식품의약품안전청고시 제2007-89호.
7. 이주현, 전원경, 고병섭, 천진미, 이아영, 김호경. 한약재의 미생물허용한도 설정을 위한 모니터링(I). 한국한의학연구원논문집. 12(1): 49-57. 2006.
8. 정덕화. 생약의 곰팡이독소 기준 설정 연구. 2006.
9. 김남재, 심상범, et al. 한약중 중금속 함량 및 용출에 관한 연구. 경희의학12(2): 158-166. 1996.
10. 양기화. 생약재의 안전성 검토. 대한의사협회지 48(4): 339-348. 2005.
11. 김호경. 한약자원 평가기술 구축(II) -한약의 보관기준 연구. 한국한의학연구원연구보고서한약자원평가기술구축(II), p.1-p.101. 2006.
12. Garvey, G., G. Hahn, et al.. Heavy metal hazards of Asian traditional remedies. International Journal of Environmental Health Research. 11(1): 63-71. 2001.
13. Nakajima, K., K. Nonaka, et al.. Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. Lettersin Applied Microbiology. 40(2): 128-132. 2005.
14. Ho, I., F. Leung. Isolation and characterization of repetitive DNA sequences from Panax ginseng. Molecular Genetics and Genomics. 266(6): 951-961. 2002.

15. Johnson, J.. Similarity analysis of rRNAs
In: Methods for General and Molecular
Bacteriology(Gerhardt P, RGE Murray,
WA Wood and NR Krieg, eds). American
Society for Microbiology, WashingtonDC :
683-700. 1994.
16. Chun, J., J. Lee, et al.. EzTaxon : a web-
based tool for the identification of pro-
karyotes based on 16S ribosomal RNA
gene sequences. International Journal of
Systematic and Evolutionary Microbiology.
57(10) : 2259. 2007.
17. Amann, R., W. Ludwig, et al.. Phyloge-
netic identification and in situ detection of
individual microbial cells without cultiva-
tion. Microbiology and Molecular Biology
Reviews 59(1) : 143-169. 1995.
18. Ludwig, W., O. Strunk, et al.. ARB : a
software environment for sequence data.
Nucleic Acids Research. 32(4) : 1363. 2004.
19. Schwarz, Z. and H. Koessel. The pri-
mary structure of 16 S rDNA from Zea
mays chloroplast is homologous to E.
coli 16 S rRNA. Nature. 283(5749) : 739-
742. 1980.
20. Reiter, B., U. Pfeifer, et al.. Response of
Endophytic Bacterial Communities in Potato
Plants to Infection with *Erwinia carotovora*
subsp. *atroseptica*. Applied and Environ-
mental Microbiology. 68(5) : 2261-2268. 2002.