

Effect of Preservation Conditions on the Stability of Samul-tang Decoctions

In Hwa Park^{1†}, Yeon Hak Kim^{1†}, Seong Hwan Choi¹, Sun Nyoung Yu^{2,3}, Sang Hun Kim^{2,3},
Soon Cheol Ahn^{2,3}, Su In Cho⁴ and In Lee^{5*}

¹Department of Korean Medicine, Pusan National University School of Korean Medicine, Yangsan 626-870, Korea

²Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

³Immunoregulatory Therapeutics Group in Brain Busan 21 Project, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

⁴Division of Pharmacology, Pusan National University School of Korean Medicine, Yangsan 626-870, Korea

⁵Department of Korean Internal Medicine, Korean Medicine Hospital of Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

Received July 14, 2015 / Revised August 9, 2015 / Accepted August 25, 2015

Consumer interest in the stability of medicinal herb extracts during storage has increased. Although the advent of new technologies has improved preservation conditions, increasing the storage time, there are few studies on the preservation of herb extracts. The purpose of this study was to perform microscopic observations of Samul-tang decoctions under various preservation conditions. The storage temperature (a high temperature, room temperature, with or without light, refrigeration, or cryopreservation) and storage time (0, 15, 30, 90, and 180 days) were given to each condition. Macroscopic morphology, pH, UV absorption, HPLC, and bacteriological studies were performed to determine microscopic changes in Samul-tang decoctions. The biological activity (tyrosinase inhibition) of the Samul-tang decoctions was also examined. There were no major changes in the indicated observation items when the extracts were stored in each condition. However, at higher storage temperatures and longer storage times, microscopic changes increased, although no bacteria were detected. Furthermore, the higher the storage temperature was and the longer the storage time was, the bigger the change was, despite of minor microscopic changes. Therefore, to maintain the stability of herbal extracts during storage, it is recommended to keep the Samul-tang decoction in the preservation condition of refrigeration and cryopreservation or without light rather than high temperature and room temperature as possible.

Key words : Preservation condition, Samul-tang decoction, storage time, storage temperature, stability

서 론

최근 식품의약품안전처에서는 수입 한약재 안전성 검사 강화 및 온라인 불법 판매 행위에 대한 처벌 수위를 높인다는 발표를 한 바 있다. 이후, 한국 소비자원의 보도 자료에 따르면 최근 시중에 유통 중인 건강 기능 식품 중 하나인 백수오 관련 제품의 상당수가 가짜임이 밝혀졌으며, 이에 따라 한국소비자원은 식품의약품안전처에 백수오의 원재료 관리 및 감독 강화를 요청할 계획이라고 공지하였다. 한약재를 이용한 의약품에 대한 국내 수요가 최근 증가하고 있으며, 그에 따라 안전성에 대한 강화 요구도 비례하여 증가하고 있음을 알 수 있다.

많은 국민이 경험한 한방치료에 사용된 주된 치료 방법은

침과 한약으로서, 통계청 자료에 따르면 한방 치료 4,599 회 중 침 치료는 59.2%, 탕약은 27.6%, 한약제제는 4.9%로 전체 치료의 92.7%가 침 치료와 한약 치료로 이루어지고 있다[13]. 침 치료의 경우, 내원한 병원 내에서 전문가를 통해 이루어지지만 한약치료의 경우 전문가를 통해 처방된 약을 환자가 개인적으로 보관하고 복용한다는 점에서 침과 달리 정확한 보관 방법에 대한 지시가 필요하다. 하지만 최근까지 이에 대한 정확한 연구가 부족하여, 안전하고 효과적인 복용지도를 할 수 없었다. 이에 따라 전탕액의 보관 방법 및 보관 형태 등에 대한 연구의 요구가 증가하고 있는 추세이다.

한약은 변증, 처방, 약물, 방제의 과정을 거쳐 처방되는데 [15] 처방 중에서도 많이 사용되는 약물들을 중심으로 전탕액의 탕전 및 보관에 대한 연구가 진행되었다. 평위산의 보관 기간 및 온도에 따른 항염증 효과를 비교한 결과, 냉동 및 냉장 조건에서 6개월까지 항염증 효능이 유지되었으나, 상온 보관에서는 그렇지 않은 것으로 확인되었으며[7], 진피의 지표성분인 hesperidin을 8개월 보관 후 변화 분석을 통해 상온보관보다는 냉장 보관이 안정한 방법임이 입증되었다[6]. 광항정기산은 3개월간 상온 보관하여, 항염증 및 항산화 활성의 변화를 평가했을 때, 2개월 이내 복용해야 약효의 소실이 없음이 증명

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-55-360-5660, Fax : +82-55-360-5509

E-mail : leein21@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되었다[10]. 사군자탕과 사물탕 전탕액을 5°C와 20°C에서 10, 20, 30일간 보관 한 후, 세균 수 측정 및 한약 전탕액의 변질상태를 확인한 결과[4], 30일간 보관한 사물탕 전탕액에서 세균학적 검사상 문제가 없었으며, 휘발성 염기질소, 트리메칠아민, 과산화물가 및 thiobarbituric acid value 등의 변화도 없었다.

저자는 국내의 10대 한약재 중 최근에도 여전히 주문량이 많은 한약재인 당귀, 천궁을 기본으로 하는 한약 전탕액인 사물탕을 선정하였다. 사물탕은 보혈을 위한 처방으로서 어지러움, 창백함 등이 대표 증상인 혈허증을 치료하는데 주로 사용된다[1, 15]. 일반 가정환경은 실험실 환경의 보관조건 보다 다양하게 한약 전탕액을 보관하고 있다. 따라서 한약 전탕액의 장기 보관 시, 안정성에 대한 변화를 조사하기 위해 보관방법을 냉동 조건, 냉장 조건, 상온 압 조건, 상온 빛 조건, 고온 조건으로 총 5가지로 선정하여, 부유물, 침전물 확인, pH, 세균학적 검사를 시행하였고, 또한 한약 전탕액의 유효 활성의 변화와 High performance liquid chromatography (HPLC)를 통한 유효 성분의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 사물탕 전탕액의 구성 원료 한약재인 당귀(*Angelicae gigas* Nakai, Radix), 천궁(*Cnidium officinale* Makino, Rhizoma), 백작약(*Paeonia lactiflora* Pall, Radix), 숙지

황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino, Radix)은 화림 제약(Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 표준물질인 nodakenin은 Nagara Science Co. (Kawagoe, Japan)로부터 구입하였으며, ferulic acid, paeoniflorin, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다(Fig. 1). 각 표준물질의 순도는 98% 이상이었다. HPLC용 용매는 water, acetonitrile (ACN)은 JT Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA)를 통해 구입하였고, mushroom tyrosinase, kojic acid 등은 Sigma에서 구입하였다.

약재의 추출

사물탕 전탕액 1 첩은 동의보감에 기재된 양을 기준(Table 1)으로 하였으며, 이를 근거로 환산한 결과, 사물탕 1 파우치당 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황 각 3.12 g이다. 사물탕 전탕액 파우치 제조를 위하여 사물탕 2.5 첩(50 첩) 분량(936 g)의 약재와 약재 무게의 약 10 배 부피에 해당하는 9.5 l의 증류수를 가한 후 초음파 병합 약탕기(Sonimedi, Wonju, Korea)를 사용하여 전탕하였다. 장비 조작은 한방의료기관에서 통상적으로 사용하는 방식과 유사하게 초음파 병합 약탕기 온도를 95°C로 설정하였다[9]. 전탕액은 자유조절 톨포장기(MH 205 Tower, Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)를 사용하여 파우치 팩으로 포장하였다.

전탕액의 보관

사물탕 전탕액은 파우치에 포장한 상태로 냉동 조건(freezing

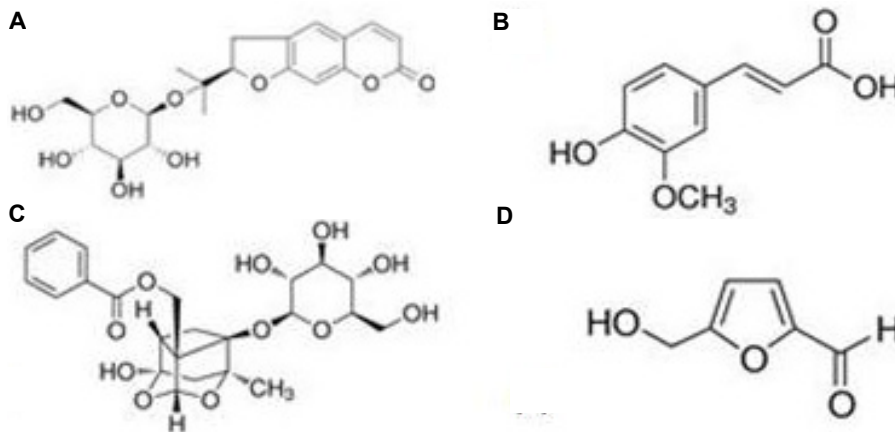


Fig. 1. Chemical structures of standard constituents in Samul-tang decoction. (A) Nodakenin, (B) ferulic acid, (C) paeoniflorin, (D) 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF).

Table 1. The composition of Samul-tang

Korean name	Botanical name	Scientific name	Amount (g)
Danggwi	<i>Angelicae gigantis</i> radix	<i>Angelicae gigas</i> Nakai	4.68
Cheongung	<i>Cnidii</i> rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> Makino	4.68
Baekjakyak	<i>Paeoniae</i> radix Alba	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	4.68
Sukjihwang	<i>Rehmanniae</i> radix Preparata	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i> Makino	4.68

preservation, -18°C, FP), 냉장 조건(cold preservation, 4°C, CP), 상온 암 조건(room temperature preservation under dark, RTPD), 상온 빛 조건(room temperature preservation under light, RTPL), 가혹조건인 고온 조건(high temperature preservation, 40°C, HTP)에 각각 보관하였다(Table 2). 각 조건에서 0, 15, 30, 90, 180 일이 지난 후, 보관한 전탕액 중 무작위로 파우치 3개를 선택하여 개봉하고, 감압 건조하였다. 건조된 분말은 methanol로 용해하고, 이를 10 mg/ml 농도로 정량하여 해당 실험에 사용하였다.

부유물, 침전물의 관찰

사물탕 전탕액의 투명 파우치를 개봉하지 않은 상태에서 부유물, 침전물의 양상을 관찰하였고 부유물, 침전물의 양상은 임의로 6가지 단계로 분류하였다. 냉동 조건에 있었던 사물탕 전탕액은 상온에서 해동시킨 후 동일한 방법으로 관찰하였다. 부유물, 침전물이 관찰 되지 않음(nothing, -), 침전물이 작은 가루형태로 관찰됨(light, +), 침전물이 미세한(지름 0.1~1 cm 정도) 형태로 관찰됨(semi light, ++), ‘++’와 입자크기는 유사하지만, 그 수가 배로 증가된 것이 관찰됨(medium, +++),

Table 2. Storage temperature and storage time of Samul-tang decoction

Preservation condition	Storage temperature (°C)	Storage time (days)	Light	No. of packs
Control	25	0	-	3
		15		3
		30		3
		90		3
FP	-18	180		3
		15		3
		30		3
		90		3
CP	4	180		3
		15		3
		30		3
		90		3
RTPD	Room temperature	180		3
		15		3
		30		3
		90		3
RTPL	Room temperature	180		3
		15		3
		30	+	3
		90		3
HTP	40	180		3
		15		3
		30		3
		90		3

FP: freezing preservation under dark, -18°C, CP: cold preservation under dark, 4°C, RTPD: room temperature preservation under dark, RTPL: room temperature preservation under light, HTP: high temperature preservation under dark, 40°C.

바닥에 가라앉은 침전물의 너비 2 cm 정도(heavy, ++++), 바닥에 가라앉은 침전물의 너비 3 cm 정도(strong heavy, +++++)로 정의하였다.

흡광도와 산도(pH)의 측정

사물탕 전탕액을 현탁하여 채취하고, 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 UV/VIS 분광광도계(JP/U-2800, Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 254 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 또한 전탕액 상층액을 pH meter (672 pH/Ion meter, Metrohm, Herisau, Switzerland)를 이용하여 산도를 측정하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

사물탕 구성약재의 지표물질을 분석하기 위해 photodiode array가 장착된 HPLC/DAD (LC-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하였다. Column은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 µm, Agilent, Santa Clara, USA)을 사용하였고, 시료 주입량은 10 µl로 설정하였다. 이동상은 water (1.0% acetic acid 포함, solvent A), acetonitrile (ACN) (1.0% acetic acid 포함, solvent B)로 구성하였고, 이동상의 조건은 0-40 min 구간에서 5-40% solvent B, 40-70 min 구간에서 40% solvent B로 농도 구배를 주어 유속을 0.8 ml/min로 하여 분석하였다. 검출파장은 각 지표물질의 최대 흡수 파장을 적용하여 254 nm로 설정하였다.

Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 활성은 Lee의 방법[5]에 따라 L-tyrosine이 tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) quinone으로 전환되는 것을 측정하였다[16]. 1 mM L-tyrosine 과 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)와 증류수를 6:6:4(v/v/v)의 비율로 넣은 tyrosinase buffer 160 µl, 시료 10 µl, mushroom tyrosinase (200 U/ml) 30 µl를 96 well plate에 넣어 37°C 배양기에서 1 시간 동안 반응한 후, VERSA_{MAX} microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mushroom tyrosinase 저해 활성은 시료용액의 첨가 군과 무첨가 군의 흡광도 감소율로 나타내었다. Positive control로는 kojic acid를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase 저해활성율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}}\right) \times 100$$

세균학적 검사

호기성 세균 수의 측정을 위해 tryptic soy agar (TSA), 진균 수의 측정을 위해 Sabouraud dextrose agar (SDA), *Escherichia coli*의 분리를 위해 MacConkey agar (MC agar), *Salmonella* 선택배지인 triple sugar iron agar (TSI agar), *Staphylococcus aureus* 선택배지인 mannitol salt agar를 사용

Table 3. Appearance evaluation of Samul-tang decoction under the preservation conditions

Time (days) Condition	0	15	30	90	180
FP	-	+	+	++	+++
CP	-	+	++	+++	+++++
RTPD	-	+	++	++++	+++++
RTPL	-	+	+++	++++	+++++
HTP	-	++	++++	+++++	+++++

FP: freezing preservation under dark, -18°C, CP: cold preservation under dark, 4°C, RTPD: room temperature preservation under dark, RTPL: room temperature preservation under light, HTP: high temperature preservation under dark, 40°C. The scores were assigned the number of + 0 to 5 with 'strong heavy' equaling 5, 'heavy' equaling 4, 'medium' equaling 3, 'semi light' equaling 2, 'light' equaling 1, 'nothing' equaling 0.

하였고, 그 외 *Pseudomonas cetrinide* agar (PCA), Luria Bertani (LB) 배지를 사용하였다. 각 평판배지에 각 보관 조건의 전탕액을 100 µl씩 도말 한 후 37°C 배양기에서 24-30시간 동안 배양하여 세균의 성장여부를 관찰하여 오염도를 판정하였다.

통계처리

모든 실험의 결과는 3번 반복 수행하여 얻어진 것으로, 통계 분석은 ANOVA에 의해 분석하여 mean±S.D로 표시하였고, 통계적 유의성은 $p \leq 0.05$ 이하 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

사물탕 전탕액의 육안적 관찰

사물탕 전탕액의 변질 여부를 판단하기 위하여 육안으로 물리적인 변화를 관찰하였다. 사물탕 전탕액을 개봉하지 않고

투명 파우치 상태에서 관찰한 결과, 사물탕 전탕액의 보관기간과 온도에 따른 변화는 Table 3과 같았다. 보관 기간이 길어질수록 부유물, 침전물의 양이 증가하였고, 보관기간이 동일한 경우 고온, 상온 빛 조건에서 보관한 사물탕의 부유물, 침전물이 더 많았다. 하지만, 전탕액을 180일 동안 냉동 보관했을 경우, 부유물, 침전물이 적게 관찰되었다. 보관조건이 악화될수록 부유물, 침전물의 양이 증가한 이유는 추출 초기와는 달리 보관하면서 사물탕에 포함된 구성 성분의 용해도가 감소하기 때문으로 생각된다. 육안적 검사는 적은 비용, 시간, 노력으로 물리적 변화를 알 수 있지만 객관성이 결여될 수 있으므로 화학적 변화, 세균학적 검사 등의 추가 실험결과를 포함하여 변질 여부를 판단해야 할 것으로 사료된다.

사물탕 전탕액의 산도(pH) 변화 분석

변질은 식품이 미생물, 햇빛, 산소, 화학물질 등의 작용에 의해서 기존성분이 분해되고 맛, 냄새, 색깔 및 외관 등이 변화되어 식품으로서의 가치를 잃게 되는 현상으로, 주로 세균학적 검사 및 화학적 검사를 통하여 변질 여부를 판정이 이루어진다[4]. 따라서 사물탕 전탕액의 보관 기간 및 온도에 따른 화학적 검사 중의 하나로 전탕액의 산도 변화를 관찰하였다. 각 보관조건의 사물탕 전탕액 파우치를 일정기간 간격으로 꺼내어 전탕액의 산도를 측정 한 결과, Fig. 2와 같았다. 최초 전탕액의 산도는 pH 5.28이었으나 보관 기간에 따라 산도가 점차 감소하여 180일 후, 모든 보관 조건에서의 산도는 pH 4.85-5.21로 나타났다. 180일 고온 조건 보관 시에는 보관기간이 지남에 따라 산도가 다소 감소하는 경향을 보였으나 큰 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보관 방법 및 기간이 사물탕 전탕액의 pH에는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 하지만, 180일 이상 장기간 보관 시에는 사물탕 전탕액 내의 유효성분의 변화 또는 변질을 방지하기 위해서는 냉동 조건, 냉장 조건이나 상온 암 조건에서 보관하는 것이 바람직

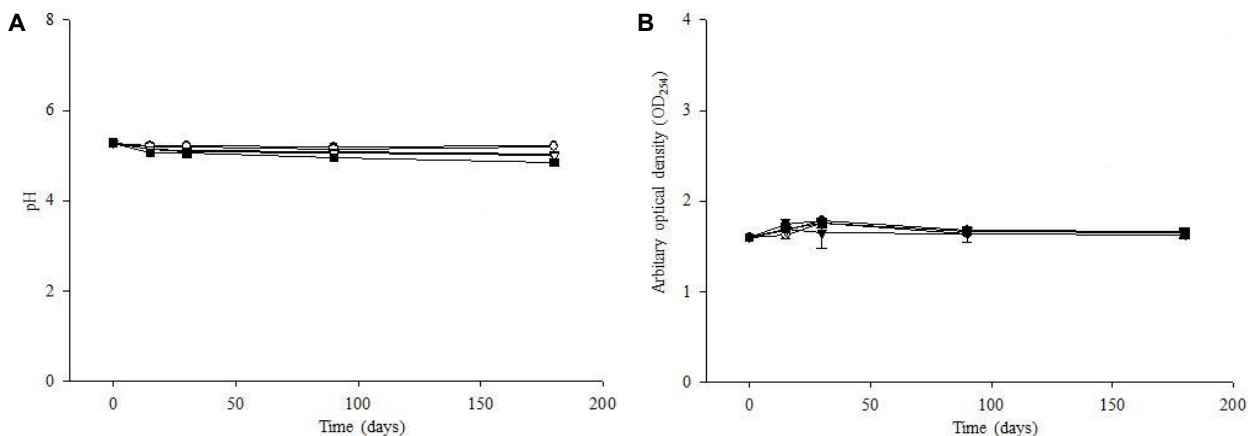


Fig. 2. Change of pH (A) and optical density (B) of Samul-tang decoction under the storage temperatures and times. The storage temperature was -18°C (●), 4°C (○), room temperature under dark (▼), room temperature under light (▽), and 40°C (■), respectively.

할 것으로 생각된다.

사물탕 전탕액 흡광도의 변화 분석

한약재의 중요한 생리활성 성분들은 대부분 254 nm의 자외선에서 최대흡수 파장을 나타내므로 전탕액의 보관기간과 온도에 따른 유효성분의 경시적 변화를 관찰하기 위해 254 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 2B). 각 보관온도에서 0, 15, 30, 90, 180일간 보관한 시료를 3배 희석하여 흡광도를 측정된 결과, 육안적 관찰 결과와 유사하게 보관기간이 길어질수록 흡광도가 서서히 증가하는 양상은 보였으나, 0과 180일에서의 흡광도를 비교해 볼 때 유의적인 변화는 없었다.

사물탕 전탕액의 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석

보관 전 전탕액과 고온 조건에서 180일 동안 보관한 사물탕

전탕액을 HPLC로 분석한 결과, Fig. 3과 같았으며 나머지 보관조건에서의 HPLC 분석 결과도 Fig. 3B와 유사하였다(data not shown). 사물탕 구성약재의 지표물질들이 retention time (RT) 10.4분에 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (숙지황), RT 20.8 분에 paeoniflorin (백작약), RT 23.4분 에 nodakenin (당귀), RT 24.4 분에 ferulic acid (천궁)이 검출되었다[1]. 사물탕 전탕액의 지표물질로 사용된 4가지를 중심으로 성분의 변화를 관찰한 결과, 전탕액의 제조과정에서의 유효 성분 변화는 크게 나타나지 않았다. 전탕액 보관 0 일의 경우(Fig. 3A)와 180일 간 고온 조건에서 보관한 경우(Fig. 3B)를 비교한 결과, ferulic acid 함량의 변화가 관찰되었으나 전체적으로 지표물질이나 기타 성분의 변화는 없었다. 그러나 지표물질 nodakenin과 ferulic acid의 함량 비율을 비교한 결과, 냉동, 냉장 조건에서 보관하는 경우를 제외하고 보관기간이 길어질수록 nodakenin과 ferulic acid의 비율이 감소하였다(Fig. 3C). 따라서

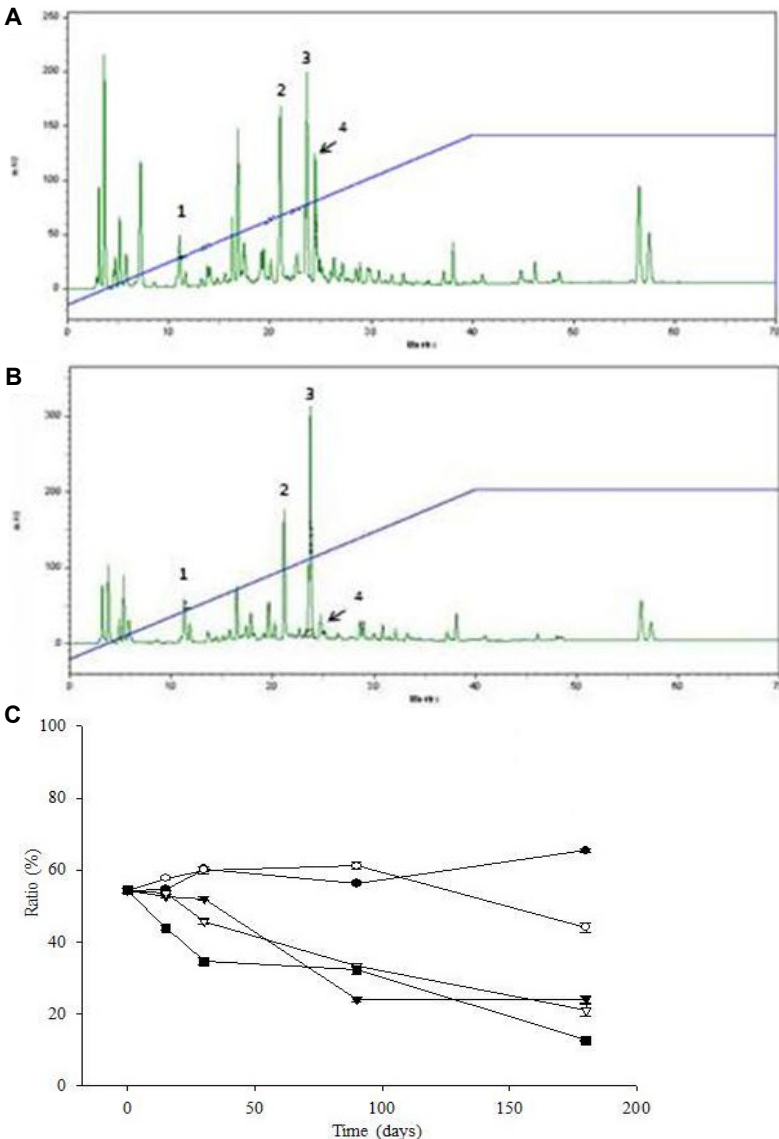


Fig. 3. HPLC of Samul-tang decoction under the storage temperatures and times. (A) Control of Samul-tang decoction, (B) Samul-tang decoction stored at 40°C for 180 days, (C) Change of the ratio of ferulic acid to nodakenin. Optimized HPLC conditions were as followed. Column: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm, Agilent), mobile phase: 1.0%(v/v) acetic acid in water (A) and 1.0%(v/v) acetic acid in acetonitrile (B); gradient: 0-40 min : 5-40% solvent B, 40-70 min : 40% solvent B ; flow rate: 0.8 ml/min; inject volume: 10 μl; temperature: 40°C; detection: 254 nm. Standards: 1, 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde (retention time (RT) 10.4 min); 2, paeoniflorin (RT 20.8 min); 3, nodakenin (RT 23.4 min); 4, ferulic acid (RT 24.4 min). The storage temperature was -18°C (●), 4°C (○), room temperature under dark (▼), room temperature under light (▽), and 40°C (■), respectively.

유효성분의 변화를 최소한으로 방지하기 위해서는 장기간 보관 시, 저온인 냉동, 냉장 조건에서 보관하는 것이 좋을 것이라 사료된다.

Mushroom tyrosinase 저해 활성의 변화 분석

기존의 연구결과를 분석하면, 사물탕을 구성하는 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황의 ethanol 추출물은 약재에 따라 mushroom tyrosinase 저해 활성이 55-85.49%로 높았다[2, 3, 6, 14]. 기존의 결과를 근거로, 사물탕 전탕액도 mushroom tyrosinase 저해 활성이 있을 것으로 판단되어 보관 0일의 사물탕 전탕액 중 무작위로 3개를 추출하여 tyrosinase 저해 활성을 측정한다. 결과, 3개의 시료 모두 유사한 저해 활성을 보여(Fig. 4A) 사물탕 전탕액의 유효한 생리활성을 확인하였다. 따라서 사물탕 전탕액의 보관조건에 따라 무작위로 한 개의 시료를 선택하여, tyrosinase 저해 활성이 50-60%를 나타내는 500 µg/ml 농도로 희석하여 tyrosinase 저해활성의 변화를 관찰하였다(Fig. 4B). 그 결과, 사물탕 전탕액의 보관 0일째 tyrosinase 저해 활성이 58%이고, 보관기간과 온도에 따라 저해 활성이 34-48%까지 감소하였으나 유효활성인 tyrosinase 저해활성의 변화는 크지 않았다. 냉동 조건에서 보관된 사물탕 전탕액의 경우, 보관 기간이 길어져도 90일까지는 유효 생리활성인 tyrosinase의 저해 활성이 일정하게 유지되었고, 냉장에서 보관하는 경우, 30일까지 저해 활성이 일정하게 유지되었다. 반면에 사물탕 전탕액을 고온 조건, 상온 빛 조건, 상온 암 조건에서 보관한 경우, tyrosinase 저해 활성의 변화가 관찰되었다. 따라서 사물탕 전탕액의 보관기간 및 온도에 따른 유의적 변화는 크게 나타나지 않았지만, 사물탕의 장기간 보관 시, 예상되는 유효 생리활성, 침전물 등의 변화를 고려할 때 고온 조건, 상온 빛 조건, 상온 암 조건에서보다 냉동 혹은 냉장 조건에서 보관하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

Table 4. Microbiological evaluation of Samul-tang decoction under the preservation conditions

Condition Medium	Time (days)		180				
	0	180	FP	CP	RTPD	RTPL	HTP
LB	-	-	-	-	-	-	-
TSA	-	-	-	-	-	-	-
SDA	-	-	-	-	-	-	-
MC	-	-	-	-	-	-	-
TSI	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
PCA	-	-	-	-	-	-	-

FP: freezing preservation under dark, -18°C, CP: cold preservation under dark, 4°C, RTPD: room temperature preservation under dark, RTPL: room temperature preservation under light, HTP: high temperature preservation under dark, 40°C. LB: Luria Bertani, TSA: tryptic soy agar, SDA: Sabouraud dextrose agar, MC a: MacConkey agar, TSI agar: triple sugar iron agar, mannitol: mannitol salt agar, PCA: *Pseudomonas* cetrimide agar.

사물탕 전탕액의 세균학적 검사

냉동 조건, 냉장 조건, 상온 암 조건, 상온 빛 조건 그리고 고온 조건에서 보관 중인 사물탕 전탕액 파우치를 일정시간 간격(0, 15, 30, 90, 180 일)으로 꺼내어 세균학적 검사를 하였다. tryptic soy agar (TSA), Sabouraud dextrose agar (SDA), MacConkey agar (MC agar), triple sugar iron agar (TSI agar), mannitol salt agar, *Pseudomonas* cetrimide agar (PCA), Luria Bertani (LB) 배지 등 총 7가지의 배지에서 배양한 결과, 세균은 전혀 검출되지 않았다. 따라서, 사물탕 전탕액을 파우치 상태 여러 조건에서 장시간 보관한 경우, 세균의 오염에 관한 문제는 발생하지 않았다.

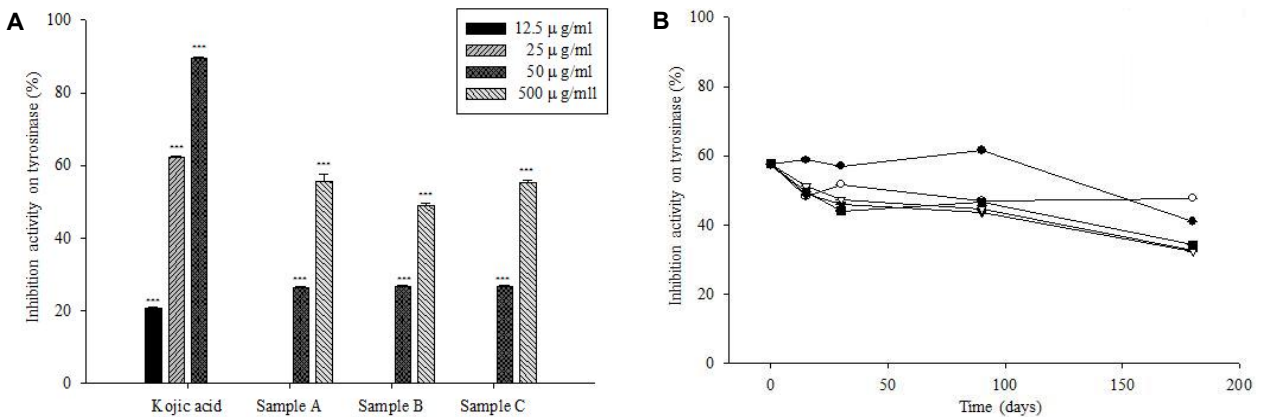


Fig. 4. Mushroom tyrosinase inhibition of Samul-tang decoction (A) and their changes under the storage temperatures and times (B). Kojic acid was used as positive control. The storage temperature was -18°C (●), 4°C (○), room temperature under dark (▼), room temperature under light (▽), and 40°C (■), respectively. Data represent the mean ± SD (n=3 in each group) from three separate experiments. *** p<0.001 compared with control.

고찰

최근 여러 분야에서 한의학적 치료의 우수성을 현대 과학적으로 입증하고자 하는 노력이 꾸준히 증가하고 있는 추세이다 [1]. 한약의 유효성 및 안전성에 대한 보고가 증가하고 있는 반면, 안정성에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다 [10]. 일반적인 물리적, 화학적 혹은 생물학적 환경에서도 약물이 약리적 효능을 잃지 않고 유지하는 경우를 안정하다고 말하며 이를 약물의 안정성이라고 한다 [11]. 이는 약물의 개발과 생산 및 투약의 모든 과정에서 매우 중요한 요소이다 [10]. 적절한 복약 지도를 위해서는 제조된 한약 전탕액이 얼마나 안정적으로 유지되는지에 대한 연구가 필요하다. 이에 본 연구는 한방 의료기관 다빈도 처방 중 하나인 사물탕 전탕액의 보관기간 및 온도에 따른 안정성을 평가하고자 하였다. 사물탕은 당귀, 천궁, 작약, 숙지황으로 구성되어 있고, 기존에 발표된 국내·외 연구 논문에 따르면 심혈관 기능 및 혈액 순환 기능 개선효과, 빈혈 개선 효과, 뇌 조직 및 신경 보호 효과, 면역 조절 효과, 항암 효과, 항 스트레스 효과, 방사선 방호 효과, 운동 피로 회복 효과, 염증 및 알러지 억제 효과, 항산화 효과 등이 있는 것으로 보고되었다 [1].

의약품이나 식품의 보관기간 설정에 영향을 주는 인자로는 크게 빛, 산소, 수분, 온도 등이 있다 [12]. 이 인자들의 작용에 의해서 기존성분이 분해되고 색깔 및 외관, 맛, 냄새 등이 변화되어 의약품 혹은 식품으로서의 가치를 잃게 되는데 이를 변질이라고 한다 [4]. 이 때 온도는 품질변화에 영향을 미치는 가장 중요한 요인으로 작용하게 된다 [12]. 따라서 전탕액의 보관기간 및 온도에 따른 안정성을 파악하는 것이 중요하다. 한약재 및 전탕액은 식품과 유사하게 대부분 당질, 지질, 단백질 등 복합성분으로 구성되었으므로 장기간 보관으로 인한 변질이 예상된다 [4]. 특히, 전분이 많은 식품은 장기간 보관 시, 전분 분자들이 자연적으로 침전하여 불용성의 덩어리를 형성하는 노화현상이 일어나게 되고, 전분의 종류, 농도, 수분함량, 온도, pH 등이 노화 요인이 된다 [4]. 또, 60°C 이상의 고온에서 제조하는 한약 전탕액에 고온 내성 세균인 *Bacillus meaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *Paenibacillus rhizosphaerae* 등과 같은 *Bacillus* 속의 미생물들이 존재한다는 보고가 되어 있다 [7]. 제조된 한약 내의 세균의 생장은 보관 기간 및 온도에 큰 영향을 받을 것이라 판단하며, 제조된 한약 내에 세균번식으로 인해 전탕액의 변질의 심각한 문제를 유발할 수도 있다. 이를 근거로 사물탕 전탕액의 부적절한 보관 시 변질을 우려하여, 사물탕 전탕액의 보관기간 및 온도에 따른 안정성을 평가하기 위하여 육안적 관찰, 산도, 흡광도, high performance liquid chromatography (HPLC) 분석, Mushroom tyrosinase 저해 활성, 세균학적 검사 등을 조사하였다. 사물탕 전탕액의 변질여부, 전탕액 속 전분 노화정도를 파악하기 위해 육안적 관찰, 산도, 흡광도를 관찰하였고, HPLC 분석, Mushroom ty-

rosinase 저해 활성변화를 통해 유효성분의 변화와 생리활성의 변화를 알아보려고 하였으며, 세균학적 검사를 통해 세균 오염에 대한 안정성을 검사하고자 하였다. 그 결과, 보관조건이 가혹 조건에 가까워질수록 변화가 나타나지만, 그 정도는 미약하다. 결론적으로 사물탕 전탕액을 복용하기 전에는 냉동 조건, 냉장 조건, 상온 압 조건에서 보관하는 것이 가장 바람직한 것으로 판단되었다. 또한 가혹 조건인 고온 조건을 제외한 다른 모든 조건에서 보관한 사물탕은 30일까지는 변화가 없었으므로, 장기간 보관 시는 냉동, 냉장 보관을 권장하고, 30일 이내는 가혹조건에서의 보관만 피한다면 사물탕의 약리활성이나 유효 성분에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다. 또한 사물탕의 파우치 형태는 180일까지 세균이 검출되지 않아 안정한 복용형태라 사료되었다. 향후 사물탕 이외의 여러 한약처방 탕액 파우치에 대해 보관 기간 및 온도 조건을 달리한 실험을 통하여 전탕액 파우치에 대한 적절한 보관기간 및 온도를 정하여야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 부산대학교병원 임상연구비 지원으로 이루어졌음.

References

- Kim, J. H., Lee, J. K., Ha, H. K., Seo, C. S., Lee, H. Y., Jung, D. Y., Lee, N. H., Lee, J. A., Huang, D. S. and Shin, H. K. 2009. Analysis of studies on Samul-tang for fundamental establishment of evidence based medicine. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* **23**, 779-788.
- Hur, S. S. and Kim, I. C. 2014. Antioxidative properties and whitening effects of the *Cuscutae* semen, *Rubi* fructus and *Paeoniae* radix. *J. Kor. Oil Chem. Soc.* **31**, 136-142.
- Kim, S. H. and Kim, I. C. 2008. Antioxidative properties and whitening effects of the *Eucommiae* cortex, *Salvia miltiorrhizae* radix, *Aurantii nobilis* pericarpium and *Cnidii* rhizoma. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **18**, 618-623.
- Lee, C. G. 2008. A study on the spoilage of Sagunja tang and Samul tang extracts according to the conditions of preservation. Ph.D. dissertation, Semyung University, Jecheon, Korea.
- Lee, S. Y., Choi, H. D., Yu, S. N., Kim, S. H., Park, S. K. and Ahn, S. C. 2015. Biological activities of *Mesembryanthemum crystallinum* extract. *J. Life Sci.* **25**, 638-645.
- Ha, H. K., Shin, I. S., Lim, H. S., Jeon, W. Y., Kim, J. H., Seo, C. S. and Shin, H. K. 2012. Changes in anti-inflammatory effect of Pyungwi-san decoction according to the preservation temperature and period. *Herbal Formula Science* **20**, 29-35.
- Seo, C. S., Shin, H. K., Kim, J. H. and Shin, K. S. 2011. Changes of principal components and microbial population in Pyungwi-san decoction according to the preservation

- temperature and period. *J. Kor. Med.* **32**, 41-49.
8. Cho, Y. J. 2012. Characterization of biological activities of *Rehmannia glutinosa* extracts. *J. Life Sci.* **22**, 943-949.
 9. Seok, G. H., Moon, J. M. and Cho, S. I. 2012. Comparative study of Pyungwi-san extracted by different decoction extractor and extraction time. *Kor. J. Herbology* **27**, 63-69.
 10. Jin, S. E., Kim, O. S., Shin, H. K. and Jeong, S. J. 2014. Comparative study on biological activities of Gwakhyang-jeonggi-san decoction according to the preservation periods. *J. Kor. Med.* **35**, 60-69.
 11. Adessi, C. and Soto, C. 2002. Converting a peptide into adrug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **9**, 963-978.
 12. Seo, C. S., Kim, J. H., Lim, S. H. and Shin, H. K. 2011. Estimation of shelf-life by long-term storage test of Pyungwi-san. *Herbal Formula Science* **19**, 183-194.
 13. Lim, D. O., Jung, M. J., Park, J. S., Seo, K. S., Hwang, J. W., Kim, E. Y., Kim, J. E., Han, K. J., Kim, S. M. and Kim, Y. S. 2014. Report on utilization of Korean medicine and usage of Korean medical herb extracts. *Kor. Health Industry Development Institute* 11-1352000-000547-12.
 14. Kim, C. H., Kwon, M. C., Han, J. G., Na, C. S., Kwak, H. G., Choi, G. P., Park, U. Y. and Lee, H. Y. 2008. Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **16**, 255-260.
 15. Choi, H., Choi, J. and Lee, C. H. 2010. The chart of herbal medicine in Korean, pp. 3 and pp. 191-192, 1st ed., Jipmoon-dang: Paju-si, Gyeonggi-do, Korea.
 16. Kim, Y. J. and Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources : structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1707-1723.

초록 : 사물탕 전탕액의 보관 조건에 따른 안정성 분석

박인화^{1†} · 김연학^{1†} · 최성환¹ · 유선녕^{2,3} · 김상현^{2,3} · 안순철^{2,3} · 조수인⁴ · 이인^{5*}

(¹부산대학교 한의학전문대학원 한의학과, ²부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학 교실, ³부산대학교 Brain busan 21 면역조절 치료소재 연구인력양성사업단, ⁴부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부, ⁵부산대학교 한방병원 한방내과)

본 연구를 통해 보관 조건에 따른 사물탕 전탕액의 유효활성 물질 및 안정성과 관련된 특성들의 경시적 변화를 관찰하였다. 사물탕 전탕액의 보관온도(냉동 조건, 냉장 조건, 상온 암 조건, 상온 빛 조건, 고온 조건)를 달리하여, 각각을 0, 15, 30, 90, 180일간 보관하였다. 사물탕 전탕액의 경시적 변화로는 육안적 관찰, 산도, 흡광도, high performance liquid chromatography (HPLC) 분석, 생리활성(tyrosinase 저해 활성), 세균학적 검사 등을 관찰하였다. 그 결과, 사물탕 전탕액의 다양한 보관 기간과 온도에서, 육안적 검사, 산도, 흡광도, HPLC분석, 생리활성에서 경시적으로 큰 변화가 없었으며, 세균학적 검사를 통해서도 세균이 검출되지 않았다. 그러나 그 변화의 차이는 크지 않았지만, 사물탕 전탕액의 보관조건이 악화될수록, 보관기간이 증가할수록 미세한 변화가 관찰되었다. 따라서 6개월 이상 장기간 보관 할 경우, 사물탕 전탕액을 상온 암 조건, 상온 빛 조건, 고온 조건에서보다 냉동 혹은 냉장 조건이나 가능하면 어두운 곳에서 보관하는 것이 유효성분 및 활성의 변화나 전탕액의 변질을 방지하기 위한 보관법으로 판단되었다.