

철단백추출물 시험법에 관한 연구

毒性藥品科

白受鉉·宋英美·崔善姬
申守容·姜恩美·吳世宗

Studies on the Analysis method of Extractive Ferritin Powder

Division of Toxicopharmaceutics

Soo-Hyun Baek, Young-Me Song, Sun-Hee Choi
Su-Yong Shin, Eun-Mee Kang and Sea-Jong Oh

= Abstract =

This study was performed to improve the process of identification, purity test, and analysis of ferritinic iron in the established self-quality control methods of extractive ferritin power.

The results are as follows ;

- 1) The origin of the used animal as the standard in electrophoresis method of identification test should be specified (horse, bovine, pig, etc).
- 2) In the process of the identification test, the purity test and the analysis of ferritinic iron, the concentration of ammonium sulfate for precipitating should be raised from 25% up to about 40%.
- 3) In the quantitative analysis of ferritinic iron, atomic absorption spectrophotometry (AAS) is more desirable than the established self-quality control methods (Vis-spectrometry, Vis-spec.).

緒 論

철단백추출물은 철결핍성 빈혈의 예방과 치료의 목적으로 우리나라에서 정제, 캡슐제, 액제 등으로 제품화되어 시판되고 있으며 페리친을 주성분으로 한다. 페리친은 생체내에서는 철의 흡수와 저장에 관여하는 매우 중요한 물질로서 동물의 비장, 간장, 소장점막 등에 존재하며 분자량은 46만 정도로 다갈색을 띠며 철은 20~24%, 인단백질은 1.2~2%를 함유한다고 한다. 페리친은 수화 철산화물과 인산염으로 된 핵의 결정을 둘러 싸

고 있는 protein shell로 구성되어 있으며 철은 $(\text{FeO} \cdot \text{OH})_8 \cdot (\text{FeO} \cdot \text{OPO}_3\text{H}_2)$ 의 형태로 단백질과 결합된 것으로 추정된다. 핵은 4,500 Fe^{3+} ions 함유할 수 있다고 한다. Protein shell은 apoferritin (아포페리친)이라고 하며 분자량은 445,000에 이르며 부분적인 단백질의 구조 몇 가지가 보고되고 있다. 웨리친을 아이치온산 나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)으로 처리하면 무색의 철을 갖지 않는 아포페리친과 철과로 나뉘어지는 성질을 갖는다.¹⁻¹⁰⁾ 철단백추출물을 수입소분하는 회사는 이태리, 뉴질랜드, 아르헨티나 등으로 부터 수입하며 철단백추출물은 말의 비장으로부터 황산암모늄액을 가하여 침전시켜 만든 것으로

기준 및 시험방법도 거의 일치하여 모두 동일한 것에 근거를 두고있는 것으로 보이나 실험적용상의 진행이 잘 안되는 부분이 있다. 본 연구에서는 수입 원료 소분 업소로부터 제공된 철단백추출물을 가지고 품질관리상의 문제점을 중심으로 검토하였다.

- 1) 철단백추출물 원료의 규격시험법중 검토되어야 할 부분은 확인시험 중 침전시험조건이 시료 10% 수용액에 25% 황산암모늄용액을 가하면 침전을 형성한다로 되어 있어 침전조건이 명확치 않으며 침전형성이 잘 안됨으로 침전조건을 일정하게 정하고,
- 2) 제조방법상에만 말의 냉동된 비장을 원료로 하는 것이 나타나 있으며 기준 및 시험방법상에는 전혀 표기가 없으므로 전기영동시험중 표준액의 조제용 표준품의 규격이 명확치 않음으로 표준액은 말의 비장으로 만든 철단백추출물 또는 웨리친이라는 규격의 기재가 있어야 할 것으로 사료되며,
- 3) 순도시험 중 무기철염시험은 시료액은 시료 5g을 물 50 ml에 녹이고 완전히 침전이 생길 때까지 25% 황산암모늄용액을 넣은 다음 원심분리후 상등액에 치오시안산칼륨시액 10 ml를 넣은 다음 에텔로 추출한다. 표준액은 철로서 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수용액 50 ml로 시료액과 동일 조작하여 에텔층을 비색한다로 되어 있으나, 검액의 조제시 침전형성이 잘 안되는 경우가 있어서 시험 오차의 원인이 되어 침전형성 조건을 일정하게 다시 조정하여야 할 것이며, 시료와 표준액의 농도가 기준과 일치하지 않음으로 침전조건이, 기준에 맞추어 시료량과 표준액의 농도, 시액의 양, 에텔의 양 등은 일정하게 정하고,
- 4) 정량시험 중 검액의 조제는 시료 310 mg을 물 10 ml에 녹이고 20% 또는 25% 황산암모늄용액 6 ml를 넣으면 침전이 생긴다. 표준액의 조제는 황산철 암모늄 시약 10.1725 g을 물에 녹여 1,000 ml로 한 다음 10 ml를 100 ml로 한다로 되어 있어 침전이 잘 안되고 표준액 중의 철의 농도 (113.2 mg/ml)가 검액 중의 철의 농도 (20 mg/ml)와 크게 차이가 있어서, 오차의 우려가 있으므로 침전조건을 정하고 표준액의 농도를 검액 중의 철의 농도에 맞추어 조정하고자 한다.

實 驗

시료: 95년도 시중에 유통되는 철단백추출물 중 다

량 확보할 수 있었던 4개 회사의 8종에 대하여 해당 기준 및 시험방법을 적용하였다.

시험장비: 자외선 가시선흡광도계 (Beckman DU-70), 원자흡광도계 (Varian spectro AA 800), 원심분리기 (제일과학, C~C8), 정전류장치 (비전과학), 전기영동장치 및 관련 장치 (zip zone chamber, sample applicator, sample well plate, aligning base, disposable wicks, titan blotter pads 등, Helena 사)를 사용하였다.

시약: ammonium sulfate, ferric ammonium sulfate, sulfuric acid, sodium acetate, acetic acid, nitric acid, potassium thiocyanate, benzidine, methanol, potassium ferrocyanide, hydrochloric acid, ascorbic acid, ether, 2,2'-dipyridyl, polyethyleneglycol 400 등은 시약 일급, 특급 등 최순품을 사용하였으며, 전기영동용 cellulose acetate sheet (Helena lab.), tris-barbital-sod, barbital buffer (pH 8.8 Helena lab.)는 조제 상품을 사용하였으며, ferritin from horse spleen (Fluka)과 말과 소 비장 웨리친 (고려제약 제공)을 표준품으로 비교하였다. 이 실험에서 사용한 물은 실험실에서 정제하여 사용하였다.

1. 실험방법

1) 확인시험, 순도시험, 함량시험 중 침전조건 확정 시험

시료 10%용액 2 ml에 40%-황산암모늄용액 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml를 가하여 침전상태를 관찰하였다.

2) 순도시험 중 무기철염 발색 한계 시험

철표준액 (1 mg/ml)을 희석하여 각각 0.02, 0.04, 0.08, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 ppm 농도로 만든 후 각각 5 ml를 취하여 20%-치오시안칼륨시액 1 ml를 넣어 철과 반응시킨 후 에텔 1 ml를 가하여 추출하여 색깔을 관찰하였으며, 에텔의 양을 1 ml씩을 추가하여 다시 흔들어서 추출하여 색상을 비교하였다.¹¹⁾

3) 무기철염의 시험

시료액의 조제 : 시료 각 100 mg에 물 10 ml를 가하여 녹이고 40% 황산암모늄 15 ml를 가하여 침전을 완결시키고 원심분리하여 상등액을 취한다.

표준액의 조제 : 철 표준원액을 물로 희석하여 철로서 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 한다.

발색시험 : 표준액과 시료액 각 5 ml씩을 취하여 20%

치오황산칼륨시액 1 ml를 넣어 발색시킨 후, 에틸을 1 ml씩을 가하여 추출하여 표준색과 비색하였다.

4) 전기영동에 의한 확인시험

시료액의 조제 : ① 원료철단백추출물 300 mg에 황산암모늄 3 g을 가하고 물 10 ml로 희석한 다음 흔들여 주고, 5°C에서 30분간 냉장시키고, 생성된 침전을 3000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전을 물 10 ml에 녹인 것과 철단백추출물을 침전시키지 않고 곧바로 물에 녹여 30 mg/ml의 농도로 만들어 사용하였다.

표준액의 조제 : ① ferritin from horse spleen (Fluka, 50 mg/ml)의 농도를 30 mg/ml로 하여 사용하였다. ② 표준용 말 및 소의 비장추출물은 30 mg/ml의 농도로 만들어 ①과 비교 실험하였다.

5) 단백질의 확인

- ① Cellulose acetate plate를 완충액속에 plate중간에 기포가 생기지 않도록 한쪽 끝에서 부터 서서히 담근 후 20분간 방치한다.
- ② 전기영동조 양편수조에 완충액 100 ml씩 붓고 브릿지를 양쪽 칸막이에 한장씩 장착한다.
- ③ 검액 및 표준액을 마이크로실린저를 이용하여 Sample well plate에 각각 5 µl씩 채운다.
- ④ Applicator로 Sample well의 검체를 3~4회 문힌다.
- ⑤ 여지에 검체가 균일하게 도포되는지 1~2회 찍어 확인한다.
- ⑥ 완충액에서 Cellulose acetate plate을 꺼내고 흡착제를 이용하여 완충액을 제거한다.
- ⑦ Cellulose acetate plate 상단을 Aligning base의 Cathode Application선에 맞춘다.
- ⑧ 검체를 Applicator로 충분히 문히고 plate에 5초간 도포한다.
- ⑨ Plate를 전기영동조에 뒤집어 놓는다.
- ⑩ Side glass를 plate에 놓는다.
- ⑪ 전기영동 뚜껑을 닫은 후 전원을 연결하여 180 Volts로 하여 15분간 전기영동 시킨다.
- ⑫ 전기영동이 완료되면 40~50 ml의 착색용액에 6분간 담근다.
- ⑬ 탈색용액에 2분간 3회 탈색한다. Background가 백색이 될때까지 탈색한다.
- ⑭ 탈수용액에 2분간 2회 탈수한다. 꺼내어 공기 중에

서 5~10초간 메탄올이 흘러내리도록 세운다.

- ⑮ 투명화제에 5~10분간 담근후 꺼내어 수평면에 놓아 건조되도록 1분간 둔다음, 50~60°C 되는 건조기에 비스듬히 세워 15분간 건조시킨다.

표준액과 검액은 같은 표면, 크기, 이동성을 지닌 균일한 반점이 나타나야 한다.

6) 웨리친 철의 확인

단백질 확인시와 같이 전기영동시키되 단백질 착색용액 대신에 1 N 염산속에 몇분간 담근 후 철발색용액에 6분간 담그고 이하 단백질 확인방법과 동일조작한다.

표준품과 같은 위치의 표면적 및 이동성을 지닌 푸른 반점이 생겨야한다.

7) 원자흡광광도계법에 의한 웨리친 철의 정량

표준액의 조제-철 표준원액 (1,000 ppm)을 물에 녹여 1, 5, 10 ppm으로 하였다.

시료액의 조제-시료 약 100 mg씩을 정밀히 취하여 물 10 ml에 녹이고 40%-황산암모늄액 20 ml를 가하여 침전을 생성시킨 다음 원심분리하여 침전층을 취하고 25%-황산암모늄용액 10 ml를 가하여 세척한 후 다시 원심분리하여 침전층을 취하고 건조, 탄화후 질산에 습윤시켜 탄화 및 회화(500~650°C)한 다음 실온에서 질산(1:1) 5 ml를 가하여 용해시키고 100 ml로 한 다음 2 ml를 50 ml로 희석하였다.¹²⁾

정량-표준액과 시료액을 다음의 분석조건에 따라 원자흡광광도계법으로 정량하였다 (Table 1).

Table 1. Condition of AAS.

Element	Wavelength (nm)	Slit (nm)	Lamp (mA)	Fuel (l/min)
Fe	248.3	0.5	5.0	2.16

8) 비색법에 의한 웨리친 철의 정량

표준액의 조제-황산제이철암모늄시약 약 172.5 mg (철로서 약 20 mg)을 정밀히 달아 물에 녹여 묽은황산 10 ml, 묽은 질산 8 ml를 넣어 끓인 후 0.1 N 염산을 가해 100 ml로 한다.

시료액의 조제-시료 약 310 mg (철로서 약 40 mg)을 물 10 ml에 녹이고 40% 황산암모늄 용액 20 ml를 가하여 30분간 방치한 후 원심분리하고 상등액을 제거하고 25% 황산암모늄용액으로 침전을 세척하고 침전을 물에 녹여 20 ml로 한 후 10 ml를 취하여 표준액과 같이 조작

하여 검액으로 한다.

정량-검액과 표준액을 각각 5 ml씩 정확히 취하고 초산-초산나트륨완충액 (pH 4.5) 15 ml 및 2,2'-디피리딜용액 (0.1%) 3 ml를 넣고 물로 표선까지 채운 후 아스코르빈산을 20 mg씩 가하고 잘 흔들어 준 후 15분간 방치한다. 따로 검액 5 ml에 2,2'-디피리딜용액 (0.1%)을 넣지않고 동일하게 조작하여 공시험액으로 하고, 표준액과 시료액의 흡광도를 523 nm에서 측정한다.

結果 및 考察

1. 확인실험, 순도시험, 함량실험 중 침전조건 확정실험의 결과는 시료 모두 40% 황산암모늄 용액 2 ml를 가했을 때 부터 침전이 형성되기 시작하였으며 기준과 비교할 때 시료 10% (v/v) 용액 1 ml에 40% 황산암모늄 3 ml를 가하여 섞을 때 전체시험 용액중 황산암모늄의 농도가 25% 이상이 되므로 철단백추출물 시험기준의 용해도 실험 중 침전 형성여부를 관찰하여야 할 농도와 일치하였다.
2. 순도시험 중 무기철염 시험은 상기실험에서 반응액의 색을 눈으로 관찰가능한 철 표준액의 농도는 0.08 ppm으로서 기준의 0.1 ppm은 적정한 것으로 사료되었다. 적절한 에텔 추출액의 양은 치오시안칼륨시액의 2배량이었으며, 반응결과 생성된 발색물의 색은 추출했을 때 더 선명하게 관찰할 수 있었다. 시료용액 제조에 사용되는 원료의 양은 100 mg~1 g 정도면 충분하였다.
3. 정량시험에 있어서 기준의 기준 및 시험방법상의 문제점은 검액의 조제시 필요한 황산암모늄용액 (20% 또는 25%)양이 분명치 않으며 종말점이 명확치 않고, 웨리친의 침전 표준액의 철의 농도가 시료중의 철의 농도의 5~6배 정도로 높기 때문에 표준액의 철의 농도를 시료와 유사한 농도인 20 mg/ml 전후로 수정 조절한 결과 정량은 가능하였으나 비색법인 관계로 시료액의 용해양상에 따라 흡광도에 영향을 미칠 수 있기 때문에 철을 보다 정확히 분석할 수 있는 원자흡광광도계법에 의한 분석을 시도하였다. 10% 철단백추출물의 수용액을 40% 황산암모늄을 가하여 웨리친철을 분리한 후 원자흡광광도계법으로 검토했던 결과를 비색법에 의한 함량의 분석치와 비교한 결과 다소 차이가 있는 것은 검체의 물에 대한 용해도 및 부유상태의 차이와 25% 황산암모늄에 의한 세척시에 발생하는 것으로 사료

되며 외관이 붉은 색상이며 결정성인 것은 용해도가 높은 편이었으며 무정형의 것은 용해도가 일정치 않았으며 탁도가 높은 편이었다. 대체로 용해도가 낮으며 용액이 탁한 것은 제조공정상에서 발생하는 단백질의 변성에 의한 것으로 사료되며 철단백추출물의 품질과 밀접한 관계가 있을 것으로 추측되었다 (Fig. 1, Table 2).

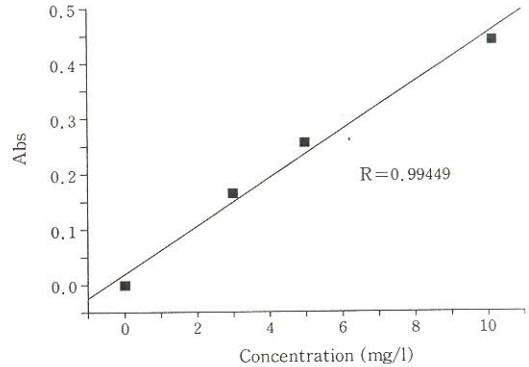


Fig. 1. Calibration Curve of the Fe Standard Solutions.

4. 전기영동시험에 의한 페리친 철의 확인과 순도시험상의 이중단백시험 등에 이용되는 완충용액 성분중 소디움에칠바르비추레이트가 항정신성의약품으로 규제대상인 관계로 완충용액의 임의 조제에는 문제가 있음으로 이미 단백질분석용으로 조제 시판되고 있는 전개용매나 셀룰로즈아세테이트 스트리핑을 사용하여 시험했으며 그 결과는 황산암모늄에 의한 침전을 사용한 것과 시료를 직접 물에 녹여 사용한 것 모두 표준품과 동일 위치에서 붉은 반점과 푸른반점을 나타내어 확인이 가능하였으나, 순도와 농도면에서 표준품으로 사용한 Fluka제의 말비장 웨리친이 가장 양호하였다 (Fig. 2, Fig. 3). 한편, 웨리친 철은 말의 비장으로부터 추출한 것만을 구입할 수 있었으며 기타 소나 말, 돼지 등의 비장으로부터 추출된 것이나 비장이 아닌 다른 장기로부터 추출된 것을 구별할 수 있는 표준품으로 사용할 수 있는 웨리친 철의 확보에 문제점이 있었다.
5. 1995년 9월 20일 보건복지부 고시에 의한 미생물 오염도 시험결과 부적합한 것이 2건 있었으며 시료 특성상 제조공정 및 유통과정 중의 미생물오염 가

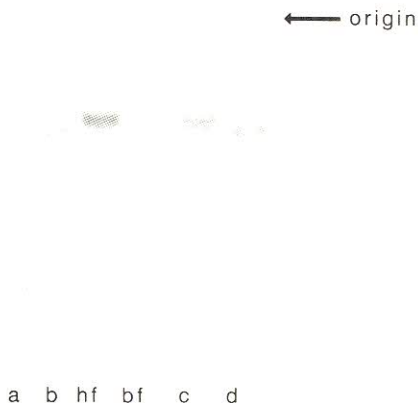


Fig. 2. Chromatogram ferritin by electrophoresis in the purity test.
 Test sample; a, b, c, and d
 Reference standard: hf=Horse spleen ferritin (fluka)
 bf=Bovine spleen ferritin

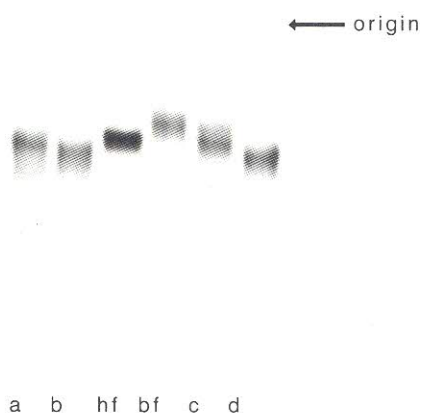


Fig. 3. Chromatogram of ferritinic iron by electrophoresis in the identification.
 Test sample; a, b, c, and d
 Reference standard: hf=Horse spleen ferritin (fluka);
 bf=Bovine spleen ferritin

Table 2. Analytical data of ferritinic iron by AAS and visible spectrometry.
 (Vis-Spec.) (mg/g, n=3)

Sample	AAS	Vis-Spec.	Apearance	Solubility
a	134.6	133.6	red brown, crystal	+++ , clear
b	140.5	133.5	red brown, crystal	+++ , clear
c	161.1	140.9	red brown, crystal	+++ , clear
d	146.4	161.0	red brown, crystal	+, opaque
e	127.8	134.0	red brown, amorphous	+, opaque
f	138.6	130.9	red brown, amorphous	+, opaque
g	86.7	142.1	brown, amorphous	+, muddy
h	135.4	153.2	brown, amorphous	+, muddy

능성이 크기 때문에 방부제사용을 검토하는 것이 타당할 것으로 사료된다.

結 論

철단백추출물원료의 자가 기준 및 시험방법상의 문제

점을 검토한 결과,

1. 확인시험 중 전기영동시험용 표준품의 규격(말의 비장 웨리친 등)을 명기하고,
2. 순도시험, 확인시험, 정량시험, 전기영동시험시 사용하는 웨리친 철의 침전시약인 황산암모늄시액은 기존의 농도(25%) 보다 높이고(40%),
3. 웨리친 철의 함량규격은 비색법으로 129 mg/g 이상이나 원자흡광도계에 의한 시험방법에 의하여 정밀 분석이 가능함으로 표기량에 따른 범위기준을 정하여 품질관리에 이용하는 것이 타당할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. Crichton, R.R. : Structure and function of ferritin, *Angew. chem. internat. edit.*, 12:57(1973).
2. Aisen, P. and Listowsky, I. : Iron transport and storage protein, *Ann. Rev. Biochem.*, 49:357(1980).
3. Niitsu, Y., Ishitani, K. and Listowsky, I. : Subunit heterogeneity in ferritin, *Biochemical and biophysical research communications*, 55:1134 (1973)
4. Crichton, R.R., Millar, J.A. Cumming, R.L.C. and Bryce, C.F.A. : The organ-specificity of fe-

- rritin in human and horse liver and spleen, Biochem. J., 131:51(1973)
5. Crichton, R.R. : The subunit structure of apoprotein and other eicosamers, Biochem. J., 126:761 (1972)
 6. Laufberger, M.V. : Sur la cristallisation de ferritine, Bull. Soc. Chem. Biol., 19:1565(1937)
 7. Halliday, J.W. and Powell, L.W. : Serum ferritin and isoferritins in clinical medicine, Prog. Hematol., 11:229(1966)
 8. Pauline M., Harrison : The structure of apoferritin : Molecular size, shape and symmetry from X-ray Data, J. Mol. Biol., 6:404(1963)
 9. 岩波理化学사전, 제4판, 岩波書店, 東京, p.1085 (1987)
 10. The Merck Index, 11th edit., Merck & Co., Inc, U.S.A p.3969(1989)
 11. 日本藥學會編: 衛生試驗法·註解, 東京, p.266(1990)
 12. AOAC official method of analysis, Iron in Drugs, Spectrophotometric Method, 18.4.18 p.11(1995)