



홍삼음료 중 벤조피렌 분석

허수정* · 진선희 · 최동미

식품의약품안전청 신중유해물질과

Analysis of Benzo(a)pyrene in Red Ginseng Beverage

Soojung Hu*, Sunhee Jin, and Dongmi Choi

New Hazard Chemicals Division, Korea Food & Drug Administration,
#194 Tongil-Ro, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea

(Received January 24, 2008/Accepted February 26, 2008)

ABSTRACT – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) contamination arises from several source including processing of food(smoking, direct drying, cooking) and environmental contamination of air, water or soil. A red ginseng is produced by steaming the root followed by drying. The methodology involved extraction with n-hexane and washing with water, clean-up on Sep-Pak Florisil Cartridges and determination by HPLC/FLD. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water in 8:2 by the isocratic elution and the excitation wavelength of fluorescence detector was 294 nm and its emission wavelength was 404 nm. The average recovery was about 105% and the relative standard deviation was 0.5. The levels of benzopyrene in the selected red ginseng beverage samples were not detected.

Key words: benzopyrene, internal standard, red ginseng beverage, HPLC/FLD

서 론

다환방향족탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 이하 PAHs)는 현재 내분비계장애물질이면서 또한, 발암가능물질로 Codex 및 JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)의 위해평가를 위한 우선순위 목록에 포함되고 있다. U.S.EPA에서 PAHs중 우선대상물질로 16종의 PAHs를 선정하였으며 IARC(International Agency for Research on Cancer)와 IRIS(Integrated Risk Information System)의 발암등급 분류를 Table 1에 나타내었고 분자구조는 Fig. 1과 같다. 위해성 확인 평가를 위해 특정유해물질의 발암등급을 분류하고 있으며 분류 기관(WHO/IARC, U.S. EPA/IRIS 등)에 따라 다소 차이는 있으나 일반적으로 4등급으로 분류하고 있으며 구체적인 내용은 Table 2에 나타내었다. 발암성에 근거하여 캐나다(8종) 및 미국 EPA(16종) 등에서는 PAHs 중 우선순위대상을 선정하여 식품 및 환경 중 PAHs를 모니터링하고 있으며 EU 등에서는 기준을 설정하여 관리하고 있다. 특히 내

분비계장애물질로 알려진 대표적 PAHs 화합물 중 하나인 벤조피렌(Benzo(a)pyrene)은 최근 IARC에서 그룹 1(인체 발암물질)로 분류하고 있으며¹⁾, 식품 중 벤조피렌은 주로 음식을 조리, 가공할 때 식품의 주성분인 탄수화물, 단백질, 지방 등이 열분해 되어 생성되는 것으로 알려져 있다²⁾.

우리나라 대표적 특산물 중 하나인 인삼(*Panax ginseng*

Table 1. Classification of EPA 16 PAHs

No.	PAHs	IARC	IRIS
1	Naphthalene	2B	D
2	Acenaphthylene	2B	D
3	Acenaphthene	3	D
4	Fluorene	3	D
5	Phenanthrene	3	D
6	Anthracene	3	D
7	Fluoranthene	3	D
8	Pyrene	3	D
9	Benzo(a)anthracene	2B	B2
10	Chrysene	2B	B2
11	Benzo(b)fluoranthene	2B	B2
12	Benzo(k)fluoranthene	2B	B2
13	Benzo(a)pyrene	1	B2
14	Dibenzo(a,h)anthracene	2A	B2
15	Benzo(g,h,i)perylene	3	D
16	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	2B	B2

*Correspondence to: Soojung Hu, New Hazard Chemicals Team, Korea Food & Drug Administration, #194 Tongil-Ro, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea
Tel: +82-(0)2-380-1665, Fax: +82-(0)2-382-4892
E-mail: sjhu@kfda.go.kr

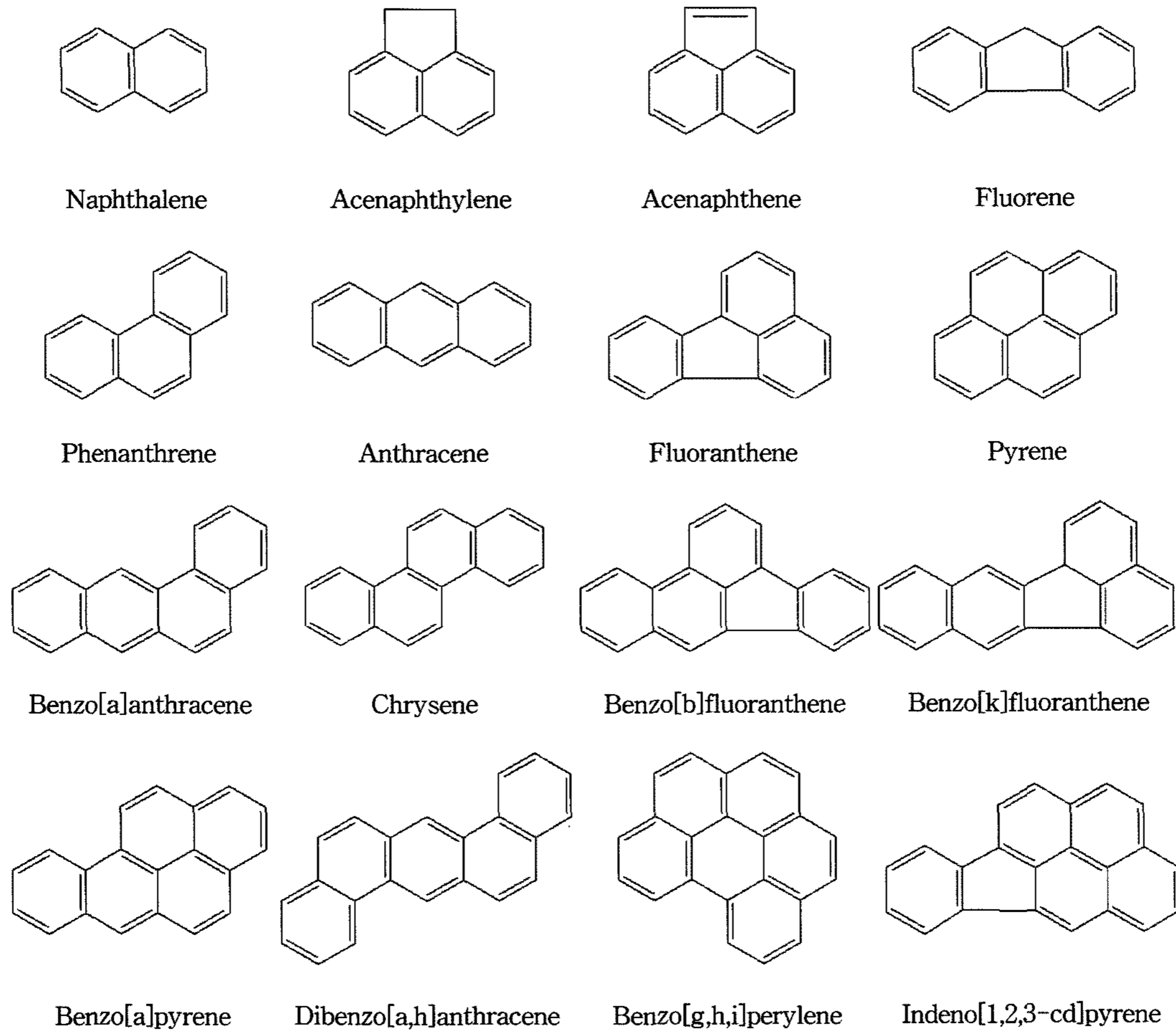


Fig. 1. Structure of EPA 16 PAHs.

Table 2. Carcinogenic Classification

WHO/IARC	
Group 1	carcinogenic to human
Group 2A	probably carcinogenic to human
Group 2B	possibly carcinogenic to human
Group 3	not classifiable as to its human
EPA/IRIS	
Group A	human carcinogen
Group B	probable human carcinogen
Group C	possible human carcinogen
Group D	not classifiable as to human carcinogen
Group E	evidence of non-carcinogen for human

C.A. Meyer)은 수 천년 전부터 불로장생의 영약으로 알려져 각종 스트레스에 대한 방어작용 등이 알려져 있으며 인삼의 생리 활성과 관련되어 함유 성분의 화학적 및 생물 활성에 관한 연구가 진행되고 있다³⁾. 인삼에 대한 과학적 연구는 1960년대 후반 본격적으로 시작되어 Brekhman 등⁴⁾과 Sanada 등⁵⁾이 사포닌 성분을 인삼의 주성분으로 강조한 이후 사포닌을 중심으로 많은 연구가 이루어지고 있다.

인삼은 가공방법에 따라 크게 백삼과 홍삼으로 분류된다. 홍삼은 생인삼(수삼)을 수증기 또는 기타 방법으로 찌서 익혀 건조한 것을 말한다. 즉, 가공과정 면에서 홍삼은 수삼을 그대로 건조한 백삼과는 다르게 일정 온도조건하에서 수증기로 찌서 건조한 인삼으로 두 종류의 인삼간에는 열처리 공정에 차이점이 있다. 홍삼은 관행적으로 98°C 내외에서 2시간 정도 쪄 후 건조하여 제조하는 것으로 알려져 있다. 홍삼은 증숙할 때 열처리가 가해지므로 인삼의 전분이 호화되고 아미노-카보닐 반응(aminio-carbonyl reaction)인 Maillard 반응에 의해 내용조직이 담황갈색-적갈색을 띠는 아미노산 유도체가 생긴다는 것이 밝혀졌다⁶⁾. 즉, 수삼 중 알기닌(arginine)과 맥아당(maltose)이 결합하여 아미노산 유도체인 Maltulosyl arginine이 생성되며 이 성분 중 하나는 Arginine-Fructose-Glucose(Arg-Fru-Glc)로서 이 성분의 함량은 백삼보다 홍삼에서 현저히 높다는 것이 밝혀졌다(홍삼 5% > 백삼 0.2% 이하). Agr-Fru-Glc가 생성되는 Maillard 반응 조건은 수분함량이 적고 산도가 낮은 산성조건 하에서 잘 일어나므로 같은 열처리를 하더라도 수삼을 물로 끓일 때보다 수증기로 쪄 후 건조 과정을 거치는 홍삼제조 시에 Maillard 반응이 잘 일어나

는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 식품공전에 의하면 홍삼이 주원료인 홍삼음료를 홍삼 또는 가용성 홍삼성분에 식품 또는 식품첨가물 등을 가하여 제조한 것으로 직접 음용하는 것을 말한다고 정의하고 있다⁸⁾.

이에 본 연구에서는 홍삼음료 중 벤조피렌 분석을 위한 전처리방법 등을 최적화하고 시중에 유통중인 홍삼음료에 대한 벤조피렌 모니터링을 수행하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 및 시약

시중에 유통되는 홍삼음료 7건을 대형마켓 등에서 채취하여 대상시료로 하였다. 분석에 사용한 시약은 헥산, 디클로로메탄, 메탄올 등은 Merck Inc. (USA) 등에서 HPLC 급이나 잔류농약용을 구매하였다. 표준물질인 벤조피렌은 Chem Service Inc. (USA), 내부표준물질인 3-메틸콜란트렌은 Supelco Inc. (USA)에서 구매하였다. 후로리실 카트리지는 Waters Inc. (Ireland)에서 구매하였다.

분석 대상 물질 및 내부표준물질

벤조피렌 (CAS No.: 50-32-8) 및 내부표준물질로 사용한 3-메틸콜란트렌(CAS No.: 56-49-5)의 구조식, 물리·화학적 성질은 Table 3와 같다.

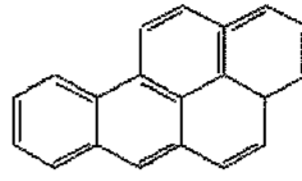
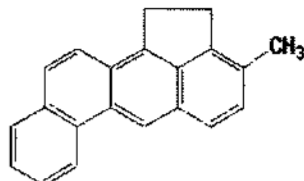
표준검량곡선 작성

HPLC/FLD의 검량선 작성을 위해 벤조피렌 표준원액 100 µg/mL을 아세토니트릴로 희석하여 표준용액 100 ng/mL로 조제하고 내부표준원액 100 µg/mL을 아세토니트릴로 희석하여 내부표준용액 10 ng/mL로 조제한다. 검량곡선표준용액은 벤조피렌 표준용액과 내부표준용액에 아세토니트릴을 가해 내부표준물질 농도는 10 ng/mL, 표준물질은 5개 농도(1, 2, 5, 10, 20 ng/mL)로 되도록 조제하고 농도별로 분석하여 검량선을 작성하였다.

시료 전처리 방법

검체 약 100 g을 정밀히 달아 내부표준용액 1 mL를 첨가하고 분액깔대기(I)에 옮기고 헥산 50 mL를 넣어 격렬하게 흔들어 섞은 후 정치하여 물층을 분리하여 다른 분액깔대기(II)에 옮겼다. 물층에 헥산 50 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 헥산층을 분액깔대기(I)에 합쳤다. 물 50 mL씩을 넣고 흔들어 섞은 후 정치하여 물층은 버리는 조작을 2회 되풀이하였다. 헥산층에 에멀전이 생성된 경우에는 5~10 mL의 메탄올을 첨가한 후 방치하여 에멀전을 제거하고 수층은 버렸다. 헥산층은 무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수여과한 후 40 이하의 수욕 상에서 감압하여 약 2 mL로 농축하였다. 후로리실카트리는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 헥산 20

Table 3. Chemical structure and properties of benzo(a)pyrene & 3-methylcholanthrene

Structure	Benzo(a)pyrene	3-Methylcholanthrene
Structure		
Molecular formula	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₁ H ₁₆
Molecular weight	252.31	268.35
Melting point(°C)	179~179.3	179~180
Boiling point(°C)	bp ₁₀ 310~312	bp ₈₀ 280

mL를 초당 2~3 방울의 속도로 유출시킨 후 사용하였다. 이 카트리지에 위의 농축액을 1 mL/분의 속도로 가하였다. 이어서 헥산 5 mL와 헥산/디클로로메탄 (3:1) 15 mL로 각각 용출시킨 후 이 용출액을 40°C 이하의 수욕상에서 질소가스 하에 날려 보낸 후 잔류물을 아세토니트릴에 녹여 전량을 1 mL로 하고 이를 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

기기 분석

HPLC 컬럼은 LC-PAH column(25 × 4.6 mm, I.D. particle size 5 µm)를 사용하였으며 형광검출기의 여기파장은 294 nm 이고 형광파장 404 nm 이었다. 이동상으로는 아세토니트릴과 물의 혼합액(8:2)을 사용하였으며 isocratic 조건으로 분석하였다. 시료는 10 µL를 주입하였으며 유속은 1.0 mL/min이었다. 분석결과 머무름 시간에 의해 정성 확인을 하였으며 내부표준법에 따른 피이크 면적법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

벤조피렌에 대한 표준물질 및 내부표준물질인 3-메틸콜란트렌 표준용액의 크로마토그램, 공시료에 혼합표준액을 첨가하여 전처리 후 고속액체크로마토그래피에 주입하여 얻은 크로마토그램 및 벤조피렌이 검출되지 않은 시료의 크로마토그램은 Fig. 2와 같다.

Tfouni 등의 논문⁹⁾을 참고하여 홍삼음료 중 벤조피렌을 선택적으로 추출할 수 있는 헥산을 추출용매로 선택하였다. 수층과의 추출에서 분액이 용이한 디클로로메탄을 사용하여 추출한 결과, 시료 중 분석하고자 하는 물질만 추출하지 않고 디클로로메탄이 거의 모든 물질을 추출함으로써 그 다음단계에서 후로리실 SPE 카트리가 정제용량 초과로 정제컬럼으로서의 역할을 하지 못했다. 또한 추출 및 세척 과정에서 홍삼음료의 사포닌 함유로 인해 시료 중 사포닌 함량에 따라 다량의 에멀전이 생성되는 시료가 있었으며, 허 등의 논문¹⁰⁾에서도 언급하였듯이 에멀전의 제거가 분석의 회수율에 많은 영향을 미치므로 에멀전 제거를 위해 온도변화 및 NaCl 포화수용액 등을 첨가

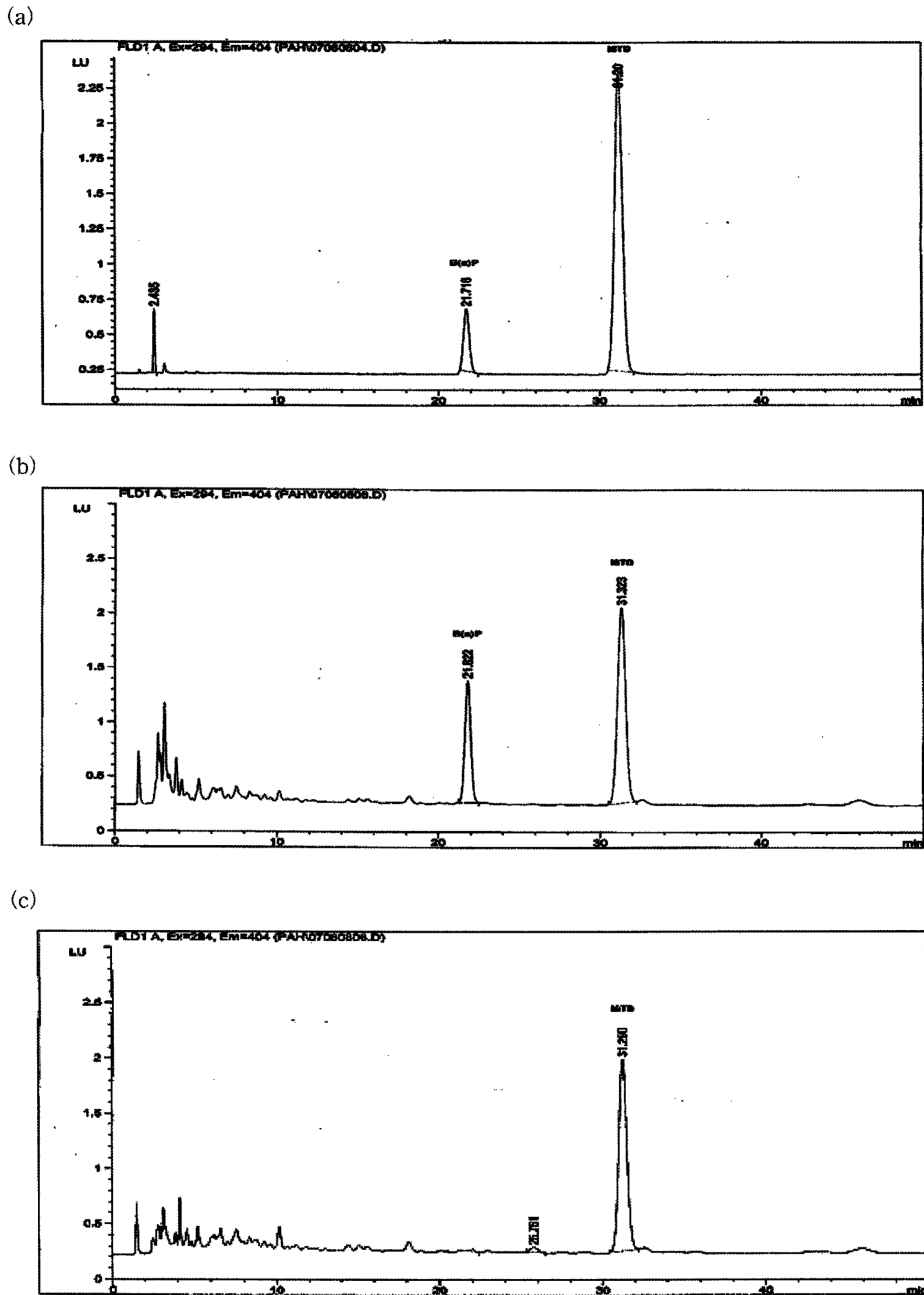


Fig. 2. Typical chromatogram of benzo(a)pyrene for standard (a) spiked sample (b) and sample (c).

하였다. 냉장보관 등과 같은 온도변화에 의한 에멀전 제거는 8시간 이상의 장시간 방치에도 좋은 효과를 얻기 어려웠고, NaCl 포화수용액의 첨가는 시료에 따라 차이가 있었지만 100 mL 이상 다량의 용액이 첨가되었으며 에멀전 제거에도 4시간이 소요되었다. 이에 비해 메탄올을 에멀전 제거용액으로 사용한 결과 5~10 mL 정도의 양으로도 1시간 이내에 에멀전을 제거할 수 있었다.

5개 벤조피렌 표준용액 검량선의 상관계수 $r^2=0.9997$ 이었으며 검출한계는 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이었고 정량한계는 $0.9 \mu\text{g}/\text{kg}$

이었다. 공시료에 표준물질 $10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 을 첨가하여 5회 반복실험을 수행하여 회수율을 측정한 결과 Table 4와 같이 평균 회수율은 105%, 상대표준편차(RSD)는 0.5%로 Table 5의 EU 규격 50~120%¹¹⁾와 EPA 규격 60~120%¹²⁾를 만족하는 결과를 얻었다. 또한 회수율 측정과 같은 방법으로 공시료에 표준물질 $10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 을 첨가하여 3회 반복실험으로 실험자간 밸리데이션(Inter-laboratory test)을 수행한 결과 평균 회수율 108~114%, 상대표준편차 0.2~0.8의 좋은 결과를 얻었다(Table 6).

Table 4. Recovery of benzo(a)pyrene spiked in red ginseng beverage (n=5)

Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Found ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	RSD
10.0	10.5	105	0.5

Table 5. Acceptable recovery range

EU	U.S.EPA
50 ~ 120 %	60 ~ 120 %

Table 6. Inter-laboratory test (n=3)

	Recovery (%)	RSD
A	108	0.3
B	114	0.8
C	111	0.2

시중에 유통 중인 홍삼음료 중 벤조피렌 모니터링을 위해 홍삼음료 7건을 분석하였다. 분석의 정확성과 신뢰성을 높이기 위해 Quality Control(QC) 시료를 포함하여 분석하였으며 모든 홍삼음료에서 벤조피렌이 검출되지 않았다. 일반적으로 PAHs는 400~1000°C 온도에서 불완전 연소 시 생성되는 화합물로¹³⁾ 홍삼의 제조 공정 온도인 98°C를 준수함으로써 벤조피렌이 생성되지 않는 것을 알 수 있다.

요 약

다환방향족탄화수소는 환경오염이나 식품의 제조공정 과정에서 생성될 수 있으며, 홍삼은 수증기로 찌고 건조하여 만들어진다. 시료를 헥산으로 추출한 후 물로 세척하고 후로리실 SPE 카트리지로 정제한 후 고속액체크로마토그래피/형광검출기로 분석하였다. 이동상으로는 아세트니트릴과 물의 혼합용액(8:2)을 사용하였으며 형광검출기의 여기파장은 294 nm이었고 형광파장은 404 nm이었다. 평균 회수율은 105%이었으며, 상대표준편차는 0.5이었다.

대상 식품인 홍삼음료 중 벤조피렌은 검출되지 않았다.

참고문헌

1. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, **92** (2006).
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs), U. S. Department of health and human services, public health service (1995).
3. 정승일, 김천석, 이용구, 이호섭, 김일광, 인삼 사포닌에서 Ginsenoside-Rg2와 -Rg3의 이성질체인 20(R&S) Pro-sapogenin들의 역상고속액체크로마토그래피에 의한 분리, 분석과학, **11**(5), 404-408 (1998).
4. Brekhman I. I., Dardymav I. V., New substances of plant origin which increase nonspecific resistance, *Annu. Rev. Pharmacol.*, **9**, 419-426 (1969).
5. Sanada S., Shoji, Structures of ginsenoside-Rb3 and 20-glucoginsenoside-Rf, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1694-1697 (1973).
6. 남기열, 홍삼과 백삼의 비교 고찰, 고려인삼학회, **29**(1), 1-18 (2005).
7. M. Katano, Tumor growth inhibitory substance isolated from Panax ginseng C. A. Meyer, *Proc. 5th Intl Ginseng Symp.*, 33-38 (1988).
8. 식품공전, 식품의약품안전청 5-67 (2007).
9. Silvia A. V. Tfouni, Rita M. D. Machado, Monica C. R. Camargo, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaca by HPLC with fluorescence detection, *Food Chem.*, **101**, 334-338 (2007).
10. 허수정, 우건조, 최동미, 올리브유 중 벤조피렌 분석, 분석과학, **20**(2), 170-175 (2007).
11. Commission. Directive 2005/10/EC of 4 February (2005).
12. U.S. EPA, U.S. EPA Method TO-13A Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (1999).
13. P. Šimko, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and flavouring food additives, *J of Chromatogr. B*, **770**, 3-18 (2002).