



한약재중의 아플라톡신 오염도 조사

박성규* · 장정임 · 하광태 · 김성단 · 김육희 · 최영희 · 승현정 · 김시정 · 이경아 · 조한빈 · 최병현 · 김민영
서울시보건환경연구원

A Survey of the Presence of Aflatoxins in Herb Medicines

Sung-kyu Park*, Jung-Im Jang, Kwang-Tae Ha, Sung-dan Kim, Ouk-hee Kim, Youn-hee Choi,
Hyun-jeung Seung, Si-jung Kim, Kyeong-ah Lee, Han-bin Jo, Byung-hyun Choi, and Min-young Kim

Seoul Institute of Health & Environment

(Received May 4, 2009/Revised May 20, 2009/Accepted May 26, 2009)

ABSTRACT - A survey of total aflatoxin levels was conducted on 145 samples(carthamiflos, thujae semen, giy-cyrrhizae radix et rhizoma) collected in Yakeyng markets in Seoul. Aflatoxin levels were quantified by the immunoaffinity column clean-up method followed by performance liquid chromatography(HPLC)-fluorescence detector(FLD). Aflatoxins were found in 10(6.9%)samples including 5 Arecae semen, 4 Thujae semen, 1 Zizyphi semen with a range of 0.45~79.15 µg/kg. Generally These results show that the contamination level of aflatoxins in Herb Medicines consumed in Korea is high compared with the standard in Korea Herb Medicine Code(10 µg/kg as aflatoxin B1). It is considered that aflatoxin concentration was increased in herb medicines during a storage and drying in herb medicines examined

Key words : aflatoxin, immunoaffinity column, HPLC-FLD

곰팡이의 이차 대사산물로 생성하는 독소를 통틀어 곰팡이독소라 하며 곰팡이 독소 중 가장 독성이 큰 아플라톡신은 *Asp. flavus*나 *Asp. parasiticus*등의 대사산물로 동물에 대하여 발암성, 돌연변이성, 기형발현성 등을 나타내며¹⁻²⁾ 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer IARC)에서 인체 발암성이 확실한 발암물질인 Group 1로 분류하고 있다³⁾.

아플라톡신은 완전히 건조되지 않은 농산물, 생약 등이 환기가 잘 되지 않아 습도 및 온도가 높은 장소에서 장기간 저장되거나 흥수·우기에 수확 시 건조까지 저장기간이 길고 환기가 잘 되지 않을 때 더욱 잘 생성 된다. 최근 연구에 따르면 열대 및 아열대지방을 중심으로 생산되는 종자류 생약 및 감초와 같은 일부 생약에서 아플라톡신 오염 사례가 보고된 바 있으며⁴⁻⁶⁾, 독소를 생산하는 곰팡이가 발생한 경우 생산된 독소가 미량(10 µg/kg 이하)이라도 그 독성이 매우 강하고 물리화학적으로 안정한 저분자 물질이 대부분이기 때문에 세척 및 가열 등의 일반적인 가공조건으로는 제거되기 어렵다. 또한 생약은 건조와

저장이 불량하면 쟁해가 발생하기 쉽다. 생약은 일반적으로 환자 및 노약자가 다수 포함된 인구집단이 섭취하고 있어 특히 안전성이 고려되어야 하는데, 최근 외국으로부터 생약의 수입량이 증가하면서 아플라톡신의 오염은 더욱 증가할 것으로 예상되고 있고, 의약품 및 식품의 원료로 사용되고 있는 생약의 급속한 증가에 따라 생약의 국내 유입 및 그 원료로 제조, 가공한 식품 및 의약품에 대한 안전성 문제가 사회적 문제로 대두됨에 따라 그 관리가 시급한 실정이다. 세계적으로 아플라톡신에 대한 연구는 주로 식품 및 사료를 대상으로 하기 때문에 생약에 대한 자료가 부족한 실정이나 점차 그 대상이 확대되고 있으며 환자나 노약자를 대상으로 의료상의 목적으로 사용하거나 식·약 공용한약재처럼 기능성 건강식품 및 식품으로 사용되는 생약이 아플라톡신 등 곰팡이독소에 오염되었을 때 미칠 수 있는 영향은 건강상의 위해성뿐만 아니라, 경제, 사회적으로 매우 클 것으로 사료된다⁷⁾.

지금까지 자연발생적으로 알려진 아플라톡신은 B1>M1>G1>M2>B2>G2의 순으로 독성이 강하며, 이들 6종의 아플라톡신이 위생학적 측면에서 매우 중요하며 세계적으로 규제하고 있는 국가가 많다⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 생약 중 아플라톡신기준이 설정되어 있는 생약을 대상으로 HPLC-FLD분석법을 이용하여 아플라톡신에 대한 오염실태를 조사하였다

*Correspondence to: Sung-kyu Park, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health & Environment #202-3, Yangjae-dong, Seocho-Gu, Seoul, 137-130, Korea
Tel: 82-2-968-5096, Fax: 82-2-964-8174
E-mail: psk94@seoul.go.kr

재료 및 방법

재료

생약 중 아플라톡신 오염도 조사에 사용된 재료는 2008년도 서울약령시에서 포장 및 비포장 형태로 유통 판매되는 제품(145건)을 구입 하였으며 시료료 사용 하였다.

표준품 및 시약

실험에서 사용한 아플라톡신 B1, B2, G1, G2 표준품은 Sigma(Seattle, WA, USA)사에서 구입하여 사용 하였으며 추출과 분석에 사용된 acetonitrile methanol은 HPLC용으로(J.T. Baker, U.S.A)를 사용하였다.

정제용 칼럼 및 분석 장비

시료 정제용 칼럼은 immunoaffinity column(AflaTest, Vicam Co., U.S.A)을 사용하였고, 분석장비는 fluorescence detector가 부착된 HPLC(Waters Alliance 2695, Waters, U.S.A)

표준용액 조제

아플라톡신 B1, B2, G1, G2 표준품 각각 1 ml를 정확하

게 취하여 아세토니트릴(3)·벤젠(97)을 넣어 정확히 100 ml로 하여 표준용액으로 하고, 아플라톡신 혼합표준용액을 methnol로 녹여 사용하였다.

시료 전처리 방법

생약 중 아플라톡신 분석을 위하여 균질화한 시료 20 g에 1% NaCl이 포함된 70% methanol 용액 100 ml를 첨가하여 3분간 진탕한 후 여과하고 이 여액 10 ml에 증류수 20 ml를 희석하여 시험액으로 한다. 시험액이 혼탁할 시 glass fiber filter(Waterman GF/A)를 이용하여 여과하고 공기 중에 노출되지 않도록 시험액 15 ml를 취하여 immuno affinity column에 통과한 후 Photochemicalcell으로 유도체화시킨 후 시험용액으로 사용하였다.

HPLC에 의한 정량

아플라톡신 분석조건은 검출기는 Fluorescence detector (FLD, EX λ : 365 nm Em λ : 445 nm), column은 Hypersil gold(150 mm×4.6 m, 3 μ m, Thermo), 이동상은 Methanol 25% : Acetonitrile 15% : Water 60%로 유속은 1.0 ml/min, 시료용액 주입량은 50 μ l로 하여 분석하였다.

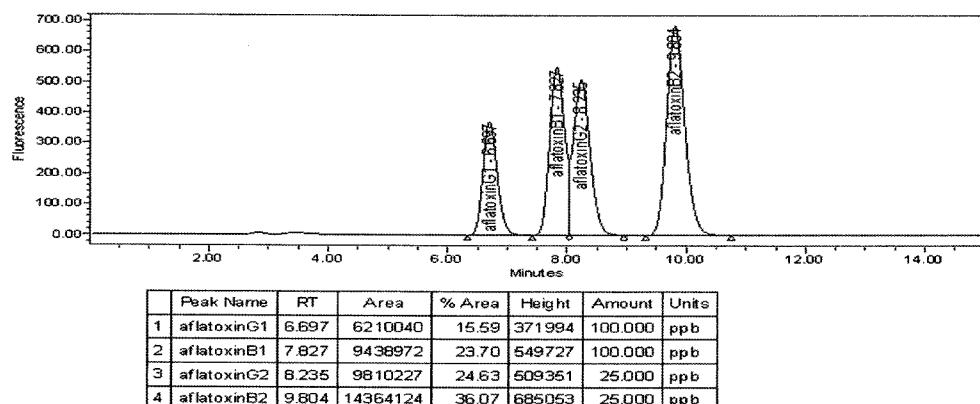


Fig. 1. HPLC chromatogram of aflatoxin standard.

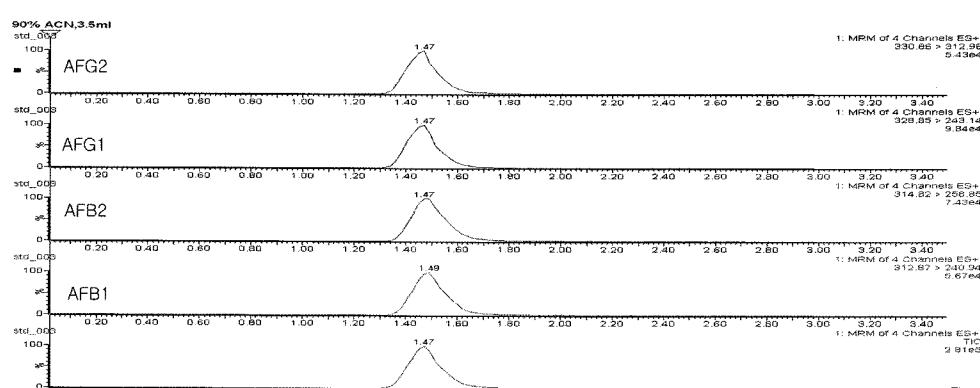


Fig. 2. LC/MS/MS chromatogram of aflatoxin standard mixture.

결과 및 고찰

아플라톡신 혼합표준용액의 HPLC-FLD 및 LC/MS/MS 크로마토그램은 Fig. 1, Fig. 2과 같았으며 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 검출한계(limit of detection, LOD)는 최소검출량을 구하는 방법으로 신호대 잡음비(S/N)>3으로 볼 때 0.01 µg/kg이었다. 아플라톡신의 회수율은 Table 1에서와 같이 아플라톡신이 검출되지 않은 시료 흥화, 산조인, 반하, 도인 등을 선정하여 총 아플라톡신 혼합표준용액을 최종 농도 5 µg/kg이 되도록 첨가한 후 시료 전처리 방법과 동일하게 전 처리하여 HPLC-FLD로 정량분석 하였다. 회수율 실험 결과 아플라톡신 B₁은 98.2±3.3, 89.7±1.5, 103±2.1, 89.0±1.5으로 비교적 양호한 회수율을 보였으며, 감초, 반하, 원자, 빈랑자 등에서는 상대적으로 약간 낮은 경향을 보였다. 본 실험 결과는 immunoaffinity column과 HPLC-FLD를 도입하여 보고한 chan 등⁹⁾ 또는 Jang 등¹⁰⁾의 견과류나 장류의 아플라톡신 회수율 73~101%, 64~101%과 비교해 볼 때 생약에서도 비슷한 경향을 보이고 있다.

유통생약 중 아플라톡신 오염도 조사

서울약령시에서 포장 및 비포장 형태로 판매되는 생약 145건을 대상으로 아플라톡신 오염실태를 조사한 결과, Table 2와 같이 총 145건 중 10건(6.8%)에서 아플라톡신 오염이 확인 되었고, 오염수준은 아플라톡신 B₁으로서 0.45~79.15 µg/kg, B₂로서 0.04~15.02 µg/kg, G₁으로 0.71 µg/kg~5.32 µg/kg, G₂으로 0.04 µg/kg~6.95 µg/kg으로 확인 되었으며 총 아플라톡신은 0.05~97.77 µg/kg 범위로 나타났다. 생약별로는 백자인의 경우 13건 중 4건(31%), 산조인의 경우 15건 중 1건(7%), 빈랑자의 경우 19건 중 5건(26%)에서 아플라톡신이 검출되었으며 백자인, 빈랑자의 경우 2건, 4건에서 아플라톡신 4종(B₁, B₂, G₁, G₂)이 모두 검출되어, Table 4의 조건으로 LC/MS/MS 확인 하였다. 빈랑자에서는 4.71~97.82 µg/kg으로 조사대상 생약보다 상대적으로 검출량이 높게 나타났으며, 국내생약기준(아플라톡신 B₁으로, 10 µg/kg이하)을 초과하는 것은 백자인 2건, 빈랑자 1건으로 나타났다.

생약의 경우에는 대부분이 60°C이하에서 건조된 것으로

Table 1. Average recoveries of added aflatoxins in various herb medicine

Type of medicines	Range of AFs levels(ug/kg)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Carthami Flos	98.2 ± 3.3	91.9 ± 2.3	98.8 ± 2.3	96.3 ± 1.4
Thujae Semen	133.6 ± 4.2	89.3 ± 1.7	89.5 ± 3.0	83.9 ± 2.3
Glycyrrhizae Radix etRhizoma	79.6 ± 2.4	71.1 ± 2.3	83.8 ± 1.6	77.1 ± 2.4
Zizyphi Semen	89.7 ± 1.5	104.3 ± 2.6	95.3 ± 2.4	95.4 ± 2.6
Pinelliae Tuber	103.9 ± 2.1	74.3 ± 1.8	88.9 ± 1.6	73.5 ± 1.4
Persicae Semen	89.0 ± 1.5	109.0 ± 2.2	81.1 ± 1.4	77.6 ± 1.5
Polygalae Radix	93.0 ± 2.5	75.4 ± 1.6	86.9 ± 1.5	76.2 ± 2.0
Cassiae Semen	75.5 ± 1.9	84.1 ± 1.7	73.5 ± 2.0	86.2 ± 1.7
Arecae Semen	118.8 ± 2.4	73.5 ± 2.2	80.4 ± 1.4	79.5 ± 1.6

Table 2. Incidence and detection range of total aflatoxins in herb Medicines

Type of medicines	Incidence		Range of AFs levels(ug/kg)			
	No.	%	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Carthami Flos	0/15	0				
Thujae Semen	4/13	31	1.50~68.10	0.06~13.130	0.88~1.35	0.04~6.95
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	0/14	0				
Zizyphi Semen	1/15	7	0.45	0.04		
Pinelliae Tuber	0/17	0				
Persicae Semen	0/15	0				
Polygalae Radix	0/16	0				
Cassiae Semen	0/21	0				
Arecae Semen	5/19	26	1.09~79.15	0.09~15.02	0.71~5.32	0.13~3.54
Total	10/145	7	0.45~79.15	0.04~15.02	0.71~5.32	0.04~6.95

Table 3. LC-MS/MS conditions for the confirmation of aflatoxins

Instrument	Paramenter	Conditions
LC parameter (Waters, 2695 HPLC)	Column	Gemini C18 column
	Mobile	Methanol25%: Acetonitrile15%: Water 60%
	Flow rate	0.3 mL/min
	Injection volumn	10 uL
MS parameter (Waters Micromass Quatttro Premier Xe)	Polarity	ESI +
	Capillary	3.2 kV
	Cone	33~45 V
	Source Temp	120°C
	Desolvation Temp	350°C
MRM (Multiple Reaction Monitoring)	Aflatoxin B1	3128.7>240.9
	Aflatoxin B2	314.8>258.8
	Aflatoxin G1	328.8>243.1
	Aflatoxin G2	330.8>312.9

Table 4. 각국의 아플라톡신 규제 현황

국가	규제 대상	규제 기준(μg/kg)	
		아플라톡신B ₁ 총아플라톡신(B1+B2+G1+G2)	
한국	식 품	- 곡류/두류/견과류 및 그단순가공품(분쇄, 절단 등) - 된장/고추장/고추가루	10
	생 약	- 감초 등9품목	10
일 본	식 품	- 식품(열매/종자/향신료 등)	10
	생 약	- 기준 없음	-
중 국	식 품	- 옥수수/옥수수제품/땅콩/땅콩제품 - 쌀/식용유	20 10
	생 약*	- 약용식품의원료 - 추출물 및 그제제	5
유럽연합	- 강황(울금)/건강(생강)/육두구/후추속	5	10
독 일	- 생약제재를 포함하는 의약품의 원료물질(원생약)	2	4
유럽약전	- 하르파고피톨근(천수근), 센나열매, 생강(건강)	2	4
아르헨티나	- 약초, 약재, 생약제제 - 내복용, 국소용 최종 생약제제	5	20
		불검출/g	불검출/g

*WHO는 생약의 곰팡이독소 기준은 제안하지 않고 시험법만 제안하고 있음

*중국 약용식물 및 제제 수출입 녹색업무표준시행(대외무역경제합작부 '01.4.23 공포))

건조 감량이 대부분 15%이하이기는 하나 다른 여러 가지 요인에 의해 영향을 받을 수 있고 건조가 완전히 되지 않거나 특히 장마철이나 무더운 여름에 저장 조건이 좋지 못한 시설에 보관될 때 발생할 수 있는 가능성이 매우 높을 것으로 예상 된다. 아플라톡신은 최저기온 20°C이하의 서늘한 지역에서는 최저기온 25°C 이상의 지역에 비하여 토양, 공기, 식물 표면의 곰팡이균수가 현저히 감소한 것이 보고된 바 있으며¹¹⁾, 아플라톡신이 오염될 수 있는 두 번째 시점은 식물의 수확 후 소비가 되기 전 단계의 모든 공정이다. 이미 오염된 시료의 아플라톡신 생성율이 증가하거나, 새로운 오염이 되는 시기로 수확과 생약 및 농산

물의 운송, 유통, 저장의 단계에서 따뜻하고 습기가 많은 조건에 노출되었을 때 오염이 발생하게 된다¹²⁾. 성숙된 작물이 이러한 조건에 노출되었을 때 다른 경쟁적 요소나 중단 없이 오염이 계속 진행되게 된다. 따라서 첫 번째 단계에서 생성된 곰팡이균의 군락이 두 번째 시점에 크게 영향을 미치게 된다. 그러므로 일찍 성숙된 작물을 뒤늦게 수확하게 되는 것은 경제적으로 손실뿐만 아니라, 아플라톡신에 오염될 여지를 제공하게 되는 것이다. 게다가 늦게 수확하게 될 때 수확 직전이나 수확 중에 비가 오면 치명적이어서 아플라톡신이 생성되어 생산품에 오염되는 것을 거의 피할 수 없는 자명한 사실이 된다¹³⁾. 또한 수확

후 소비까지 시간이 길수록 아플라톡신 오염이 증가하게 된다는 것은 예측할 수 있을 것이다. 현재 생약에 대하여 검출된 이력이 있는 품목을 대상으로 아플라톡신 B₁으로 10 µg/kg 이하로 규제되어지고 있으며 동양의학의 발달에 따라 그 수요가 급증하고 있는 반면 생약에 대한 곰팡이 독소 허용 한계를 정하여 관리하고 있는 국가는 몇 개국에 불과하다(Table 4). 아르헨티나의 경우 아플라톡신 B₁으로 5 µg/kg 및 총 아플라톡신으로 20 µg/kg로 설정하여 관리하고 있으며 독일 경우 생약을 포함하는 의약품 및 식품에 대하여 아플라톡신 B₁은 2 µg/kg이하로 총 아플라톡신으로 4 µg/kg이하고 동일하게 규정하고 있다¹⁴⁾.

요 약

서울약령시장과 시중마트에서 유통되고 있는 생약 145건을 immunoaffinity column 정제 방법을 이용하여 HPLC-FLD로 아플라톡신 오염 실태를 조사한 결과 총 145건 중 10건(6.9%)에서 아플라톡신 오염이 확인되었고, 오염수준은 아플라톡신 B₁로서 0.45~79.15 µg/kg, 총 아플라톡신으로 0.05~97.77 µg/kg의 범위로 빈랑자 19건 중 5건(26%), 백자인 13건 중 4건(31%), 산조인 15건 중 1건(7%)으로 검출 되었고, 백자인 2건, 빈랑자 1건에서 국내 기준치인 10 µg/kg을 초과 검출 되었다. 아플라톡신이 검출된 생약은 전통적인 방법으로 종이나 비닐팩에 보관하는 방법은 아플라톡신에 오염될 수 있는 가능성을 높임으로 진공 포장과 같이 미생물과의 접촉을 가능한 피할 수 있는 포장 등으로 변경되어야 한다. 또한 아플라톡신 생성균주가 잘 생장할 수 있는 환기가 잘 되지 않고, 고온 다습한 환경이 제공될 가능성이 높은 전통적인 저장 창고와 같은 시설을 항온 항습의 조절이 가능한 현대화 시설로 바꾸는 방안 또한 고려하여야 할 것이다.

곰팡이독소에 대하여 그 대상 품목 및 허용 한계가 다양하게 규제되고 있으나 규제를 하는 것은 아플라톡신이 오염된 식품이나 생약을 섭취 할 위험성을 줄이고자 하는 것이지 근본적인 해결책은 아니다. 서울약령시장 등 생약 시장은 매우 영세하고 문제점이 있을 수 있으며 의료 목적으로 환자를 대상으로 사용한다는 점을 감안한다면 더욱 신중하고 신속한 저감화 방안의 마련이 필요할 것이다.

참고문헌

- Campbell, T.C., and L. Stoloff.: Implication of mycotoxins for health. *J.Agric Food Chem.*, **22**, 1006-1015 (1974).
- Chu, F.s.: Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Adv. Appl. Microbiol.*, **40**, 352-357 (1977).

- Roy, A. K., Sinha, K. K. and Chourasia, H. K. aflatoxin contamination of some common drug plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 842-843 (1988).
- Rief, K. and Metzger, W. Determination of aflatoxins in medicinal herbs and plants extracts. *J. Chromatogr. A* **692**:131-136 (1995).
- Ventura, M., Gomez, A., Anaya, I., Diaz, J., Broto, F., Agut, M. and Comellas, L. Determination of aflatoxins B1,G1, B2,G2 in medicinal herbs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr: A* **1048**: 25-29 (2004).
- D' Mello, J. P. F. and Macdonal, a. M. C. Mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* **69**: 155-166 (1997).
- Cho, S. Y. Contamination and Detoxification of Aflatoxins. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**:205-216 (2007).
- 하덕모; 최신식품미생물학, 신팍출판사 (1995).
- Chan D., MacDonald S. J., Boughflower V, and Brereton P. : Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detector, *J. Chromatogr. A* **1059**, 13-16 (2004).
- Jang M. R., Lee C. H., Cho S. H., Park J. S., Kwon E. Y., Lww E. J., Kim S. H. and Kim D. B.: A survey of total aflatoxins in food using high performance liquid chromatogram-fluorscence detector(HPLC-FLD) and liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC-MS/MS). *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**(5),448-493 (2007).
- Saleemullah, Iqbal A., Khalil I. a. and Shah H.: aflatoxins contents of the stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food chemistry*. **98**(4), 699-703 (2006).
- Kang K. J., Park J. H. and Cho J. I.: Control of aflatoxins and characteristics of the quality in doenjang(soybean paste)prepared with antifungal bacteria *Korea J. Food Sci. Technol.* **32**(6),1258-1265 (2000).
- Kang K. J., Jeoung J. H. and Cho J. I.: Inhibition of aflatoxin-producing fungi with antifungal compound preduced by *Bacillus subtilis* *J.Food Hyg. Saf.* **15**(2), 122-127 (2000).
- Park K. Y., Lee K. B. and Bullerman L/ B.: Aflatoxin in production by *Aspergillus parasiticus* and its stability during the manufactor of Korea soy paste(doенjang) and soy sauce (kanjang) by traditional method. *J. Food prot.* **51**, 938-945 (1988).