

한약재 중 제랄레논의 탱액으로 이행률 조사

심원보 · 송정언 · 김정숙¹ · 정영철² · 정덕화^{1,3*}

광주과학기술원 물리화학부, ¹경상대학교 농업생명과학연구원,
²한국국제대학교 식품의약학과, ³경상대학교 응용생명과학부

Investigation of the Transfer Rate of Zearalenone in Herbal Medicines to Their Decoction

Won-Bo Shim, Jeong-Eon Song, Jeong-Sook Kim¹, Young-Chul Chung², and Duck-Hwa Chung^{1,3*}

School of Physics and Chemistry, Gwangju Institute of Science and Technology

¹Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

²Department of Medicinal Food, International University of Korea

³Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University

Abstract The objective of this study was to establish an analytical method to detect zearalenone (ZEA) in herbal medicines and their decoctions and investigate the ZEA transfer rate from raw materials of herbal medicines to their decoctions. Herbal medicines (*Trichosanthis Semen*, *Eucommiae Cortex*, *Rubi Fructus*) spiked with a known concentration of ZEA were presoaked or unsoaked (as a pretreatment) and boiled for 3 h at 100°C or autoclaved for 1 h at 121°C. The decoction and the remnants were separated, cleaned up with an immunoaffinity column, and analyzed using HPLC. Recoveries for decoctions and remnants were 68.39-83.68% and 72.91-80.25%, respectively. ZEA was not detected in the decoction, whereas it was found in the remnants. Although ZEA in the raw material of herbal medicines was not transferred into the decoction during heating and autoclaving, the continuous monitoring for ZEA in raw herbal medicines should be carried out for the safe ingestion and utilization of herbal medicines.

Keywords: zearalenone, herbal medicine, decoction, transfer rate

서 론

최근 경제수준의 향상과 더불어 고령화 사회로 접어들면서 건강한 삶을 누리기 위한 노력이 증가함에 따라 질병의 치료뿐만 아니라 약해진 체력의 회복을 위해 현대 합성의약품 대신 천연 소재인 한약재에 대한 관심이 높아지고 있다(1,2). 한약재는 식물, 동물, 광물의 천연산물을 그대로 또는 세척·건조 등의 단순가공만을 거쳐 약용되고, 소비자의 수요를 충족시키기 위해 외국에서 많은 양을 수입하는 과정에서 장시간의 유통으로 추가적인 위해요소에도 노출되기 때문에 안전성 관리가 매우 중요하다. 일반적으로 한약재의 안전성 여부는 잔류농약과 중금속 오염 유무에 의해 판단되어 왔으나, 최근 유통과정 중 한약재에 오염된 *Aspergillus*, *Penicillium* 및 *Fusarium* 속 곰팡이가 생산하는 2차 대사산물인 곰팡이 독소가 검출됨에 따라 이들의 잔류여부가 한약재의 중요한 안전성 평가 지표로 거론되고 있다(3).

곰팡이 독소는 원료의 생산에서 수확, 유통, 소비에 이르기까

지 모든 단계에서 발생할 수 있으며, 이미 생산된 곰팡이 독소는 화학적으로 안정한 상태이기 때문에 세척 및 가열 등의 일반적인 가공조건으로는 제거되지 않아 이를 섭취한 사람에게는 독성을 유발하는 등의 유해한 영향을 미친다(4,5). 온대지역에 해당하는 우리나라에서는 성장과 독소 생성의 최적온도가 5-20°C에 해당하는 *Fusarium* 속 곰팡이의 발생가능성이 높으며, 이들이 생산하는 대표적인 곰팡이 독소는 제랄레논이다(6).

제랄레논은 [6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl) presorcylic acid lactone]의 구조를 지닌 물리화학적으로 안정한 저분자화합물(7) 주로 보리, 쌀, 옥수수, 귀리 등의 곡류에 많이 존재하며(8-11), 동물실험을 통해 비교적 적은 양(oral LD₅₀ value=20 g/kg of body weight)으로 심각한 독성을 나타내는 것으로 확인되었다(12,13). 또한 대부분 배출되기는 하나 배출되지 못한 일부는 자궁, 고환, 난소 등으로 전달되어 과에스트로겐증, 유산, 불임 등 주로 생식에 관련된 독성을 유발하는 것으로 보고되고 있다(14-17). 이러한 위험성에 따라 유럽연합을 포함한 여러 나라에서는 식품과 모든 사료에 대해 제랄레논의 허용기준을 0.02-1,000 µg/kg 범위로 정해놓고 있다(18). 우리나라의 경우 2008년 곡류를 주 원료로 한 가공식품 432건과 곡류 189건을 대상으로 모니터링을 실시한 결과 유럽연합 기준을 초과한 제품은 없었으나(19), 식품의 안전성 확보와 국제적 기준과의 조화를 위해 곡류 및 그 단 순가공품은 200 µg/kg 이하, 과자는 50 µg/kg 이하, 영유아식은 20 µg/kg 이하로 허용기준을 설정하고 있다(20).

특히 열에 안정한 제랄레논은 120°C에서는 분해되지 않고, 150

*Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Division of Applied Life Science, Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-772-1903
Fax: 82-55-757-5485
E-mail: dhchung@gnu.ac.kr
Received March 12, 2013; revised April 9, 2013;
accepted April 10, 2013

°C에서 29%, 200°C에서 60분간 가열 시 69%가 분해된다고 알려져 있지만(21,22), 100°C 전후의 온도에서 가열처리 하여 조제한 탱액을 섭취하는 한약재에 대한 탱액으로의 이행여부에 대한 조사는 부족한 실정이다. 현재 국내외적으로 곡류, 곡류 가공품 및 건조과일을 대상으로 한 제랄레논 모니터링 연구 및 분석법 개발은 활발히 이루어지고 있으나 아시아에서 제한적으로 이용되고 있는 한약재를 대상으로 하는 제랄레논 관련 연구는 거의 없고(23), 특히 한약재의 경우 실제 섭취하는 것은 한약재 자체가 아닌 한약재에 물을 첨가하여 가열 처리한 탱액으로, 한약재에 오염되어 있는 제랄레논 뿐만 아니라 탱액 조제 시 탱액으로 이행되는 정도에 대한 연구도 전무한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 탱액조제 시 한약재로부터의 제랄레논 이행률을 조사하기 위해 한약재 팔루인(*Trichosanthis Semen*), 두충(*Eucommiae Cortex*) 및 복분자(*Rubi Fructus*)에 제랄레논 표준물질을 임의의 농도로 오염시켜 탱액을 조제한 다음 탱액으로의 이행률에 관한 조사를 하였다.

재료 및 방법

실험재료

탕액제조 시 한약재로부터의 제랄레논 이행률을 확인하기 위해 건조 팔루인, 두충, 복분자 3종의 한약재를 선정하였다. 일반적으로 탱액제조 시에는 건조상태 그대로를 사용하므로 각 시료는 균질화 과정 없이 500 g 단위로 밀봉하여 4°C 냉장 보관하면서 사용하였다.

시약 및 정제용 칼럼

본 연구에 사용된 제랄레논 표준물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 시료의 추출과 정제에 사용된 acetonitrile과 methanol은 HPLC용으로 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. Tween 20은 Sigma (St. Louis, MO, USA), sodium chloride는 Duksan (Gyeonggi, Korea) 제품을 사용하였으며, 분석에 사용된 모든 시약 및 용매는 특급 및 크로마토그래피 수준으로 사용하였다. 제랄레논 정제용 immunoaffinity column은 zearalatest (Vicam, Watertown, MA, USA)를 이용하였다.

HPLC 분석조건

제랄레논 분석을 위해 515 pump, 717 autosampler 그리고 474 fluorescence detector (excitation 274 nm, emission 440 nm)가 장착된 Waters사의 HPLC system을 사용하였다. 분석용 칼럼은 Novapack C18 (3.9mm×150mm, 4µm), 이동상 용매는 acetonitrile: methanol:water (46:8:46, v/v/v)를 사용하여 유속은 1.0 mL/min, 시료의 일회 주입량은 20 µL로 하여 분석을 실시하였다.

탕액의 조제

팔루인, 두충, 복분자에 대한 각각의 탱액은 Arino 등(24)의 방법을 참고하여 해당 한약재를 수침 한약재 시료와 비수침 한약재 시료로 준비한 후 상압가열(100°C)과 고압가열(121°C)을 통해 조제하였다. 즉, 수침 한약재 탱액의 경우 시료 5g에 sodium chloride 1g을 넣고 3차 증류수 25mL를 첨가하여 1시간 동안 수침하여 가열하였고, 비수침 한약재의 경우 수침의 경우와 동일하게 시료를 준비한 후 수침과정 없이 바로 가열하였다. 이때 상압 가열은 hot plate에서 100°C의 온도로 3시간, 고압 가열은 고압증기멸균기를 이용하여 121°C의 온도로 1시간 동안 실시하였다.

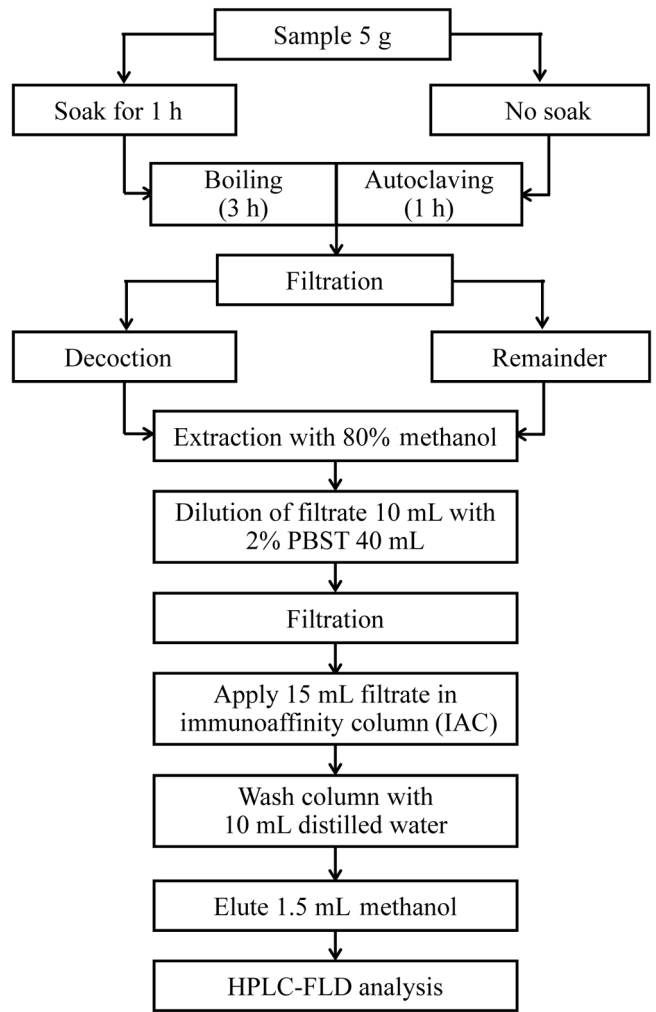


Fig. 1. Procedures for the preparation of decoction of herbal medicines to investigate transfer rate of zearalenone from raw herbal medicines to decoctions.

HPLC 분석법의 검증

한약재 중 제랄레논 분석에 사용되는 HPLC법을 검증하기 위해 식품의약품안전청에서 제시하는 가이드라인을 참고하여 직선성, 특이성 그리고 정확성 등에 대한 밸리데이션을 실시하였다. 시험분석법의 직선성은 제랄레논 표준물질을 acetonitrile에 녹여 1 µg/mL 농도로 조제한 다음 최종 농도가 5, 10, 20, 50, 100 및 200 ng/mL가 되도록 희석한 뒤 상관계수를 확인하였으며, 특이성은 음성으로 확인된 한약재에 표준물질을 200 ng/g의 농도로 임의로 오염시킨 후 확인하였다. 원료 한약재 내 존재하는 제랄레논의 분석가능 여부를 나타내는 정확성은 음성시료에 제랄레논을 100, 200 및 500 ng/g의 농도로 오염시켜 탱액 제조 전 원료 한약재에 대한 회수율과 탱액으로 조제한 후 탱액과 한약재 잔류물에 대한 회수율을 각각 확인하였다.

한약재 원료에서 탱액으로 이행률 확인

한약재에서 탱액으로 제랄레논의 이행률 확인을 위해 팔루인, 복분자, 두충 음성시료에 제랄레논 표준물질을 각각 100 및 200 ng/g의 농도로 오염시켜 어두운 곳에서 12시간 동안 방치한 후 앞서 설명한 탱액 조제방법으로 수침과 비수침 후 상압과 고압 가열로 탱액을 조제하였다. 조제된 탱액은 감압 플라스크에 멸균

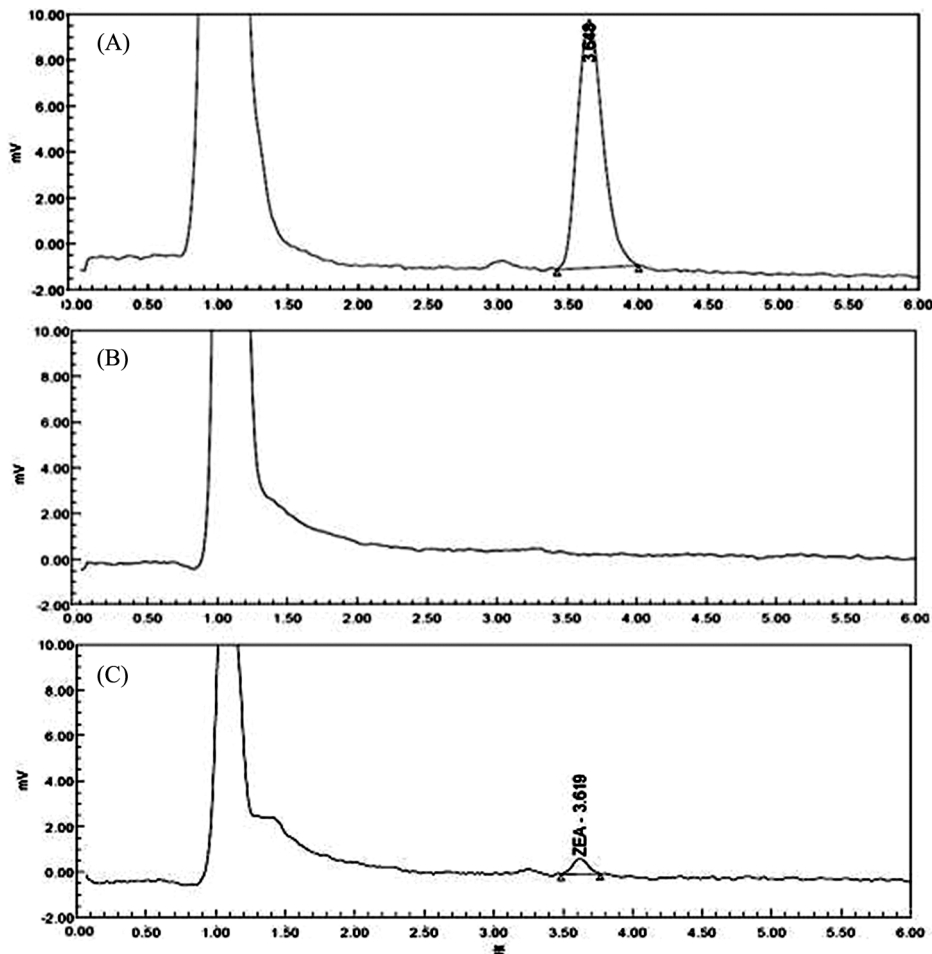


Fig. 2. Chromatograms of (A) zearalenone standard (200 ng/g), (B) control, and (C) spiked *Eucommiae Cortex* remnant (200 ng/g)

거즈를 올려 놓은 부흐너 깔때기를 장착한 후 감압펌프를 이용하여 탱액과 한약재 잔류물로 분리하였다.

분리된 탱액은 80% methanol을 25 mL 가하여 30분간 진탕 혼합하여 제랄레논을 추출하였다. 추출액은 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 여과지(Advantec No. 7, Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)로 1차 여과하고, 여과액 10 mL를 취해 2% Tween 20이 들어있는 인산염용액(phosphate buffered saline) 40 mL를 첨가하여 혼합 후 0.45 μ m syringe filter (Advantec, Toyo Roshi Kaisha)로 2차 여과하였다. 여과액 15 mL를 column에 주입하여 시료 내에 존재하는 제랄레논을 고정시키고, 3차 증류수 10 mL를 주입하여 불순물을 제거한 다음 메탄올 1.5 mL를 이용하여 고정되어 있는 제랄레논을 용출하여 정제하였다. 정제된 시료는 0.45 μ m syringe filter (Advantec, Toyo Roshi Kaisha)로 재 여과한 후 분석에 사용하였다. 탱액 분리 후 남은 한약재 잔류물의 경우도 동일한 방법으로 전처리 후 정제하여 분석을 실시하였다. 팔루인의 경우는 다른 한약재와 달리 단단한 껍질로 되어 있기 때문에 추출을 용이하게 하기 위해 잔류물을 파쇄한 후 전처리 하였다(Fig. 1).

결과 및 고찰

분석법의 검증

제랄레논 표준물질을 5, 10, 20, 50, 100 및 200 ng/mL 농도로

조제하여 검량선을 구한 결과 상관계수(R^2)는 0.9998로 양호한 직선성을 나타내었고, 검출한계(limit of detection, LOD)는 peak 대 noise 비가 3대 1일 때의 농도인 5 ng/g으로, 정량한계(limit of quantification)는 LOD×3일 때의 농도로 구한 결과 8 ng/g으로 확인되었다. 또한 분석법의 특이성 확인을 위해 제랄레논 표준물질, 음성시료 그리고 음성시료에 제랄레논 표준물질을 200 ng/g의 농도로 오염시킨 시료를 각각 분석한 결과 약 3분 40초경에 baseline과 명확하게 구분되는 제랄레논 peak가 나타났으며, 제랄레논 외에 다른 방해물질은 존재하지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

제랄레논 음성 한약재시료에 제랄레논을 100, 200 및 500 ng/g의 농도로 오염시켜 탱액 제조 전 원료 한약재에 대한 회수율을 측정된 결과 팔루인 83.7-95.5%, 두충 81.9-99.7%, 복분자 79.1-82.3% 수준의 회수율을 나타내었으며(Table 1), 이는 분석법 검증 시 허용 회수율 범위를 100-1,000 ng/g 농도에서 80-110%로 제시하고 있는 CODEX(25) 기준에 적합한 것으로 나타났다. 또한 3종의 한약재 중 회수율이 가장 좋은 두충을 선택하여 탱액을 조제한 후 탱액과 한약재 잔류물에 각각 100과 200 ng/mL or g 농도로 제랄레논을 오염시켜 회수율을 확인한 결과 탱액에서는 83.7와 68.4%, 한약재 잔류물에서는 80.3과 72.9%로 원료 한약재에서 보다는 회수율이 낮게 나타났다. 이는 열을 가함에 따라 한약재를 구성하고 있는 여러 성분들의 방해 작용이 증가한 것으로 생각되며, 원재료 보다는 낮은 회수율을 보였지만 이행률의 확인에는 문제가 없는 것으로 판단되었다.

제랄레논의 이행을 확인

한약재 음성시료에 최종농도가 100과 200 ng/g이 되도록 제랄레논 표준물질을 오염시켜 준비한 수침 한약재 시료와 비수침 한약재 시료를 각각 상압 및 고압가열 하여 탱액과 잔류물로 분리한 다음 추출·정제하여 분석을 실시하였다. 그 결과 한약재에 제랄레논이 존재하면 탱액으로 일정량 이행할 것이라는 예상과는 달리 상압 및 고압가열 한 모든 탱액에서 제랄레논이 검출되지 않았다. 반면 탱액을 제외한 수침 한약재 시료 잔류물에서는 상압가열의 경우 팔루인 18.71-19.48%, 두충 12.42-14.67%, 복분자 22.69-22.71%의 회수율을 나타내었고, 고압가열의 경우 팔루인 17.04-22.51%, 두충 13.80-17.75%, 그리고 복분자 21.50-22.99%의 비교적 낮은 회수율을 보였다. 비수침 한약재 시료 잔류물에서도 상압가열의 경우 팔루인 17.67-18.33%, 두충 12.29-16.13%, 복분자 10.17-13.76%의 회수율을, 고압가열의 경우 팔루인 15.96-17.29%, 두충 10.44-13.76% 그리고 복분자 11.49-13.30%의 낮은 회수율을 나타내었다(Table 2).

탕액의 조제 방법, 추출 온도 및 압력과는 상관없이 모든 탱액에서 제랄레논이 검출되지 않은 원인은 알칼리나 다양한 유기용매에는 녹으나 물에는 잘 녹지 않는 제랄레논의 물리화학적 성질 때문인 것으로 판단된다(26). Ryu 등(27)의 연구에 따르면 제랄레논을 온도 별로 한 시간 이상의 열처리를 통해 파괴 정도를 확인한 결과 125°C 이하의 온도에서는 23% 정도 감소되는 반면 150°C에서는 34-68% 정도가 감소되었고, 175°C 이상의 온도에서는 92% 이상, 225°C에서는 1시간 이상 가열하면 완전히 파괴되는 것으로 나타났다. 또한 125°C 이하의 온도에서는 pH가 낮을수록 파괴가 잘 되는 것으로 확인되었으나, 전반적으로는 pH 중성에서 가장 안정하고 pH가 높을수록 파괴 속도가 빠른 것으로

나타났다. 한약재 탱액의 pH는 한약재 원료에 따라 차이가 있지만 보통 pH 6.0 이하의 산성을 나타내어(28,29) 본 연구에서도 100과 121°C의 낮은 온도로 가열하였지만 탱액의 pH의 영향을 받아 제랄레논이 일정수준 파괴되었을 것으로 판단된다.

잔류물에서는 제랄레논이 검출 되기는 하였으나 탱액에서 검출되지 않은 제랄레논이 잔류물에 대부분 존재할 것이라는 생각과 달리 낮은 농도로 검출되었고, 수침이 적용된 한약재 잔류물의 회수율이 비수침에 비해 높게 나타났다. 이는 제랄레논이 물에 잘 녹지는 않지만 수침과정을 거침으로써 한약재로부터 제랄레논의 추출이 용이하게 된 것으로 생각된다. 또한 Matsuura 등(30)은 수분이 함유된 밀가루를 100°C에서 15분 가열 시 3.2%, 150°C에서 60분간 가열 시 28.5%의 제랄레논이 감소되었고, 제랄레논을 오염시킨 케익을 200°C에서 30분과 60분간 열을 가한 결과 37%과 69% 감소된 것으로 보고하고 있으며, Ryu 등(31)은 옥수수 가루를 이용한 압출성형공정에서 120-160°C의 열을 가하였을 경우 제랄레논이 66-83% 감소하였다고 보고하고 있다. 한약재를 100°C 이상의 온도에서 1시간 이상 지속적으로 가열하였으므로 제랄레논이 어느 정도 감소된 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 탱액에 존재하는 제랄레논의 분석을 위한 HPLC법을 확립하고 탱액조제 시 한약재로부터의 제랄레논 이행을 조사하였다. 한약재 (팔루인, 두충, 복분자)에 제랄레논을 임의의 농도로 오염시켜 수침 및 비수침 과정을 거친 후 상압가열 (100°C, 3 h)과 고압가열 (121°C, 1 h)하여 탱액을 조제한 다음 탱액과 한약재 잔류물로 분리하고 immunoaffinity column으로 정제하여 분

Table 1. Recoveries of zearalenone spiked in herbal medicines (n=3)

Spiked zearalenone level (ng/g)	<i>Trichosanthis Semenm</i>		<i>Eucommiae Cortex</i>		<i>Rubi Fructus</i>	
	Detected zearalenone (ng/g)	Recoveries (%)	Detected zearalenone (ng/g)	Recoveries (%)	Detected zearalenone (ng/g)	Recoveries (%)
100	95.5±4.2	95.5±4.2	99.7±1.9	99.7±1.9	82.3±2.2	82.3±2.2
200	167.7±1.8	83.9±1.8	180.2±4.7	90.1±4.7	158.1±2.4	79.1±2.4
500	418.7±2.6	83.7±2.6	409.4±1.6	81.9±1.6	398.1±3.6	79.6±3.6

Table 2. Percentage of zearalenone detected from decoctions and remnants after heating presoaked and unsoaked herbal medicine spiked with zearalenone

Conditions of herbal medicines and heating	Samples	Transfer rate of ZEA (%)				
		100 ng/g		200 ng/g		
		Decoction	Remnant	Decoction	Remnant	
Presoaked	Boiling (100°C, 3 h)	<i>Trichosanthis Semenm</i>	ND ¹⁾	19.5	ND	18.7
		<i>Eucommiae Cortex</i>	ND	14.7	ND	12.4
		<i>Rubi Fructus</i>	ND	22.7	ND	22.7
	Autoclaving (121°C, 1 h)	<i>Trichosanthis Semenm</i>	ND	22.5	ND	17.0
		<i>Eucommiae Cortex</i>	ND	17.8	ND	13.8
		<i>Rubi Fructus</i>	ND	21.5	ND	23.0
Unsoaked	Boiling (100°C, 3 h)	<i>Trichosanthis Semenm</i>	ND	18.3	ND	17.7
		<i>Eucommiae Cortex</i>	ND	16.1	ND	12.3
		<i>Rubi Fructus</i>	ND	10.2	ND	15.6
	Autoclaving (121°C, 1 h)	<i>Trichosanthis Semenm</i>	ND	16.0	ND	17.3
		<i>Eucommiae Cortex</i>	ND	10.4	ND	13.8
		<i>Rubi Fructus</i>	ND	11.5	ND	13.3

¹⁾ND: Not detected

석에 사용하였다. 가열처리를 하지 않은 탱액 제조 전 원료 한약재에 대한 회수율은 팔루인 83.7-95.5%, 두충 81.9-99.7%, 복분자 79.1-82.3%로 분석에 이용이 가능한 것으로 확인되었고, 3종의 한약재 중 회수율이 가장 좋은 두충을 선택하여 탱액을 조제한 후 탱액과 한약재 잔류물에 대한 회수율 측정된 결과 탱액에서는 68.4-83.7%, 한약재 잔류물에서는 72.9-80.3%로 원재료 보다는 낮은 수준으로 확인되었다. 한약재에서 탱액으로 제랄레논의 이행률은 한약재 원재료에 제랄레논을 임의의 농도로 오염시킨 후 탱액을 조제하여 분석하였으며, 그 결과 탱액에서는 제랄레논이 검출되지 않았고, 팔루인과 복분자 잔류물에서는 수침 시료의 경우 17.04-22.99%, 비수침 시료의 경우 10.17-18.33%의 제랄레논이 검출되었다. 그리고 두충 잔류물에서는 수침 시료의 경우 10.44-17.16%, 비수침 시료의 경우 12.42-17.75%가 검출되었다. 본 연구에서는 탱액에서 제랄레논이 검출되지 않아 이행률은 낮은 것으로 판단되나 보다 탱액 조제과정 중 첨가물에 의해 이행이 일어날 수 있는 가능성은 여전히 존재하기 때문에, 제랄레논을 포함한 곰팡이독소에 안전한 한약재의 확보를 위한 지속적인 노력이 필요하다. 또한, 유통 중인 한약재를 포함하여 조제포장되어 판매되는 탱액에 대해서도 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과와 일부이며, 이에 감사드립니다.

References

- Xue J, Liu D, Chen S, Liao Y, Zou Z. Overview on external contamination sources in traditional Chinese medicines. *Mode. Tradit. Chin. Med. Mater. Med.* 10: 91-96 (2008)
- Jung SJ, Kang ST, Han CH, Kim SJ, Ko SK, Kim YH, Kim YK, Kim BS, Chol BH. Survey of heavy metal contents and intake rates after decoction in herbal medicines classified by prats. *J. Fd. Hyg. Safety* 25: 402-409 (2010)
- Gyeongsang National University. Application of analytical method for detection of mycotoxins in herbal medicines. The Annual Report of KFDA. Cheongwon, Korea. pp. 11-12 (2009)
- Jang MR, Lee CH, Choi IS, Shin CS, Kim JH, Jang YM, Kim DS, Ahn DH. Analysis of zearalenone contamination in cereal-based products using high performance liquid chromatography-fluorescence detector and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 224-229 (2011)
- Song HH, Kim J, Lee C. A review of mycotoxins from *Fusarium* species. *Safe Food* 1: 19-28 (2006)
- Kamimura H. Problems with mycotoxin in food sanitation. Hyogo International Center, Japan International Cooperation Agency, Japan. pp. 10-26 (1993)
- Choi EJ, Kang ST, Jung SY, Shin JM, Jang MS, Lee SM, Kim JH, Chae YZ. Analysis and uncertainty estimation of zearalenone in cereal-based products by LC-MS/MS. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 658-665 (2012)
- Kim DH, Jang HS, Choi GI, Kim HJ, Kim HJ, Kim HL, Cho HJ, Lee C. Occurrence of mycotoxins in Korean grains and their simultaneous analysis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 111-119 (2013)
- Maragou NC, Rosengerg E, Thomaidis NS, Koupparis MA. Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnarigenin, zearalenone, α - and β -zearalenol in beer by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1202: 47-57 (2008)
- Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Mañes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45: 1-18 (2007)
- Wang YK, Yan YX, Mao ZW, Wang HA, Zou Q, Hao QW, Ji WH, Sun JH. Highly sensitive electrochemical immunoassay for zearalenone in grain and grain-based food. *Microchim. Acta* 180: 187-193 (2013)
- Shim WB, Kim KY, Chung DH. Development and validation of a gold nanoparticle immunochromatographic assay (ICG) for the detection of zearalenone. *J. Agr. Food Chem.* 57: 4035-4041 (2009)
- Ingle MB, Martin BW. Precocious puberty in Puerto Rico. *J. Pediatr.* 109: 390-391 (1986)
- D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare, and productivity. *Anim. Feed Sci. Tech.* 80: 183-205 (1999)
- Cole RJ, Cox RH. Handbook of TEM. Academic Press, New York, NY, USA. pp.152-263 (1981)
- Ito Y, Ohtsubo K. Effects of neonatal administration of zearalenone on the reproductive physiology of female mice. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 1155-1159 (1993)
- Marasas WFO, Rensburg SJ, Mirocha CJ. Incidence of fusarium species and the mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. *J. Agr. Food Chem.* 27: 1108 (1979)
- Gromadzka K, Waskiewicz A, Golinski P, Swietlik J. Occurrence of estrogenic mycotoxin-zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Res.* 43: 1051-1059 (2009)
- KFDA. Zearalenone, risk profile. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea. pp.16-18 (2010)
- KFDA. Korean Foods Code. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea. p. 2-1-12 (2011)
- Bennekoum EO, Brouwer L, Laurant EHM, Hooijerink H, Nielsen MWF. Confirmatory analysis method for zearalenone, its metabolites, and related mycotoxins in urine by liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 473: 151-160 (2002)
- WHO, IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. World Health Organization, Lyon, France. pp. 397-444 (1993)
- Zhang X, Liu W, Logrieco AF, Yang M, Ou-Yang Z, Wang X, Guo Q. Determination of zearalenone in traditional Chinese medicinal plants and related products by HPLC-FLD. *Food Addit. Contam. A* 28: 1-9 (2011)
- Arino A, Herrera M, Estopanan G, Juan T. High levels of ochratoxin A in licorice and derived products. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 366-369 (2007)
- Codex. Joint WHO/FAO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission Procedural Manual 19th ed. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy. pp. 52-53 (2010)
- Wang SH, Du XY, Lin L, Huang YM, Wang ZH. Zearalenone (ZEA) detection by a single chain fragment variable (scFv) antibody. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1681-1685 (2008)
- Ryu D, Hanna MA, Eskridge KM, Bullerman LB. Heat stability of Zearalenone in an aqueous buffered model system. *J. Agr. Food Chem.* 51: 1746-1748 (2003)
- Kim JH, Seo CS, Jeon WY, Shin HK. The comparative study on decoctions of *Yukmijihwang-tang* (*Liuweichuang-tang*) extracted by different extraction method and extraction time. *Korean J. Orient. Med. Prescr.* 19: 175-182 (2011)
- Kim JH, Seo CS, Jeon WY, Shin HK. The compositional differences of sipjeondaebotang (*Siquandabu-tang*) decoctions extracted by different extraction method and extraction time. *J. Orient. Obstet. Gynecol.* 25: 108-119 (2012)
- Matsuura Y, Yoshizawa T, Morooka N. Effect of food additives and heating on the decomposition of zearalenone in wheat flour. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 22: 293-298 (1981)
- Ryu D, Hanna MA, Bullerman LB. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *J. Food Prot.* 62: 1482-1484 (1999)