

Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids by UPLC-MS/MS: Application to honey

Hoejin Ryu[★], Oukhee Kim, Eunsoon Lee, Misun Kim, Jeong-gon Kim, Eunsun Yun,
Hyunjeong Kim, and Musang Kim

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, 30, Janggunmaeul 3-gil,
Gwacheon-si, Gyeonggi-do 13818, Korea

(Received November 20, 2019; Revised December 6, 2019; Accepted December 9, 2019)

UPLC-MS/MS를 이용한 벌꿀제품의 피롤리지딘 알칼로이드 잔류실태 및 분석법 선진화

류회진[★] · 김옥희 · 이은순 · 김미선 · 김정곤 · 윤은선 · 김현정 · 김무상

서울특별시보건환경연구원, 식품의약품부

(2019. 11. 20. 접수, 2019. 12. 6. 수정, 2019. 12. 9. 승인)

Abstract: Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are a group of secondary metabolites that are produced by plants all over the world as a defense mechanism against herbivores. To date, over 660 PAs have been identified from more than 6,000 plant species that have been reported to be widely present in plants belonging to *Asteraceae*, *Boraginaceae*, and *Fabaceae*. This study describes an analytical method based on UPLC-MS/MS for the quantitation of 7 pyrrolizidine alkaloids (Lycopsamine, Echimidine, Retrorsine, Retrorsine N-oxide, Senecionine, Heliotrine, and Trichodesmine) in honey, and was applied to 84 honey samples for validation. Quantitation was performed based on a matrix-matched calibration to compensate for the matrix effect on the electrospray ionization. Good linear calibrations were obtained for all 7 PAs in the spiked honey samples (2.575-202.14 µg/kg; $R^2 \geq 0.998$). The extraction recoveries for most of the PAs in the honey samples were in the range of 81 %-108 %. The analysis showed that 6 of the 84 honey samples were contaminated by the PAs with the mean total sum of PAs being 47.19 µg/kg, and the concentrations of the PAs were observed to be in the range of 1.76-202.1 µg/kg. The retronecine type compounds (Echimidine, Lycopsamine) were the most frequently found PAs in honey. These data provide useful information for the assessment of human risk posed by the consumption of honey contaminated PAs.

요 약: 피롤리지딘 알칼로이드(Pyrrolizidine alkaloids, PAs)는 식물이 포식자로부터 자신을 방어하기 위해 생산하는 2차 대사산물이다. 현재까지 약 6,000 여종 이상의 식물에서 660 여개의 피롤리지딘 알칼로이드가 확인되었으며 주로 국화과, 지치과, 콩과 식물에 분포한다. 본 연구에서는 UPLC-MS/MS를 이용

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)2-570-3465 Fax : +82-(0)2-570-3248

E-mail : hjryu@seoul.go.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.

하여 벌꿀 속 자연독소의 일종인 피롤리딘 알칼로이드 7종에 대한 분석방법을 확립하고 유통중인 벌꿀제품 84건에 대하여 PAs 함유량을 모니터링하였다. 정량은 전자분무이온화 과정에서 벌꿀에 대한 matrix effect를 줄이기 위해 matrix-matched 검량선을 사용하였다. 직선성은 $R^2 \geq 0.998$, PAs 7종에 대한 회수율은 81-108% 수준이었다. 7종 동시분석법으로 국내 유통중인 벌꿀 84건을 검사한 결과, 7.1% (6/84건)의 검출률을 보였으며 검출량은 평균적으로 47.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 또한 검출된 PA 성분은 주로 Lycopsamine과 Echimidine으로 확인되었으며 1.76-202.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 검출범위를 나타내었다.

Key words: Pyrrolizidine alkaloids (PAs), honey, UPLC-MS/MS, Lycopsamine, Echimidine

1. 서 론

피롤리딘 알칼로이드(Pyrrolizidine alkaloids, PAs)는 보통 식물이 포식자로부터 자신을 보호하기 위한 방어기작으로 생산하는 2차 대사산물의 한 종류이다. 전 세계의 다양한 식물에 분포하고 있는 자연독소이며, 현재까지 약 6,000 여종 이상의 식물에서 660 여개의 피롤리딘 알칼로이드가 발견되고 있다.¹ 이 중 일부는 인간에게 발암가능성이 있는 것으로 판단하고 있다.² 지금까지 알려진 대부분의 PAs는 국화과(Asteraceae), 지치과(Boraginaceae), 콩과(Fabaceae) 등 3개 과(family)의 식물군에 주로 분포하고 있고 있으며, 이는 개화식물의 약 3%에 해당한다.¹⁻⁵ 하지만 같은 종 식물이라도 지리적 요인이나 계절에 따라 PAs의 구성 성분과 농도는 달라질 수 있으며, 일부 특정 꿀이나 허브차에서는 PAs 함량이 높게 나타날 수도 있다.⁶

PAs 화합물 자체는 화학구조적으로 안정되고 낮은 독성을 나타내지만 간에서 대사과정을 거치면서 독성이 발현된다. 특히 단기간에 과량을 섭취할 경우 급성 간독성을 유발하고 사망에까지 이를 수도 있다. 현재까지 발표된 문헌에 따르면 벌꿀, 화분, 허브차, 곡식, 샐러드 등에서 검출된 사례가 있다. 주로 농작물을 수확할 때 대상작물과 PAs를 생산하는 식물의 종자가 우연히 혼입되거나 꿀벌과 같은 매개체를 통해 오염되는 경우가 있다. 또는 PAs 생산식물이 널리 퍼져있는 목초지에 방목되거나 오염된 가공 사료를 먹인 초식 동물에서 유래한 우유나 달걀 등이 있다. 최근 독일에서는 샐러드용 채소에 개쑥갓(*Senecio vulgaris*)이라는 PAs 생산식물이 혼입되는 경우도 있었다.⁷

PAs 구조는 necine base (1-hydroxymethyl-pyrrolizidine)와 necic acid (aliphatic mono or dicarbon acids)로 구성되어있다. necine base 부분은 C4 위치에서 질소를 공유하는 bicyclic nitrogen heterocycle 구조를 가진다(Fig. 1). 보통 necine base는 C1과 C2 사이에 이중결

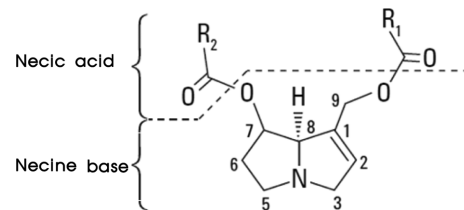


Fig. 1. Principal structure of pyrrolizidine alkaloids.

합이 있으며, C1에는 hydroxy methyl group을 가지고 있다. 이러한 구조적 특징으로 인하여 간을 통한 대사과정 중 Cytochrome P450이 관여하는 산화반응을 통해 독성 대사체인 pyrrolic ester를 생성하게 된다. 이후 DNA, 단백질, 지질 등과 반응하여 독성을 일으키게 된다.⁷⁻⁸ 이러한 위험성을 갖고 있는 PAs는 현재 식품 중에서의 기준·규격이 설정되어 있지 않은 상황이다. 다만 유럽식품안전청(EFSA) 등 여러 나라에서 경각심을 가지고 PAs에 대한 규제마련을 위해 노력하고 있는 추세이다. 네덜란드에서는 허브차 및 허브가 포함된 추출물에서의 총 PAs 양을 kg 당 1 μg 미만으로 관리하고 있다.^{2,9}

독일에서는 의약품에서 PAs의 일일 허용량으로 1 μg 을 초과하지 않아야 한다. 만약 6주 넘게 복용하기 위해서는 0.1 μg 까지 줄이도록 권고하고 있다.⁷

본 연구에서는 벌꿀에 대하여 UPLC-MS/MS를 이용한 PAs 7종(Fig. 2)의 동시분석법을 확립하고 국내 유통 중인 벌꿀제품에 대한 PAs 잔류실태를 조사하였다. 이를 통해 식품 속 잠재적인 신종 위해요소를 사전에 모니터링하여 예방조치가 가능한 기반을 마련하고자 하였다.

2. 재료와 방법

2.1. 시약 및 재료

PAs 표준품은 PhytoLab (PhytoLab GmbH & Co,

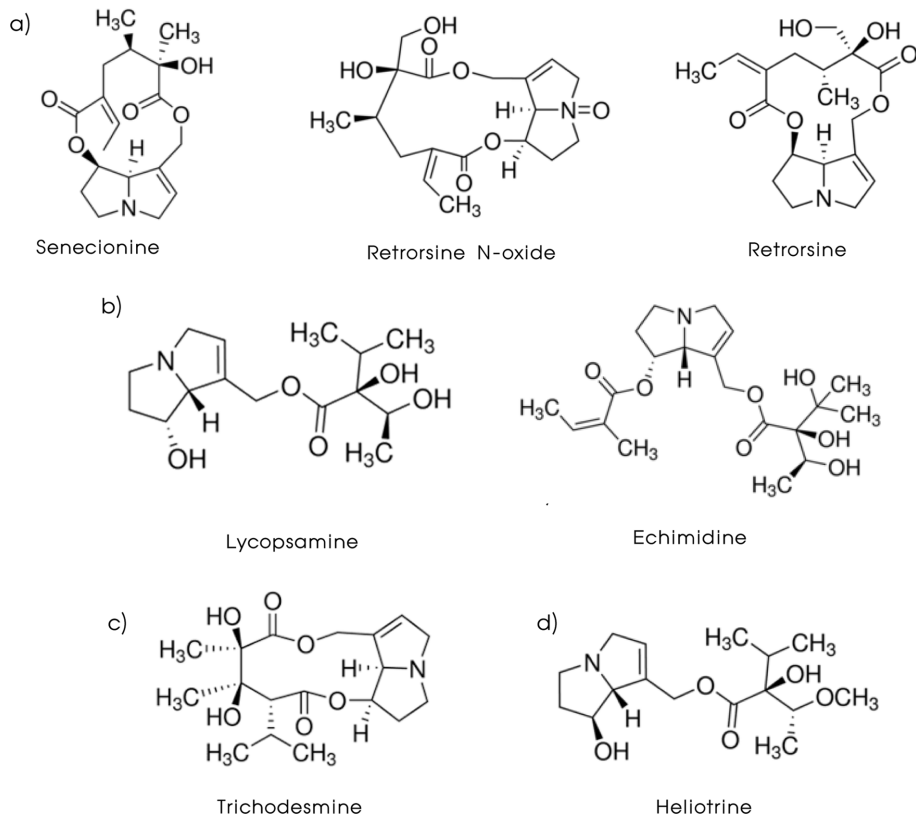


Fig. 2. Chemical structures of seven pyrrolizidine alkaloids. a) Senecionine-group, b) Lycopsamine-group, c) Monocrotaline-group, d) Heliotrine-group.

KG, Vestenbergsgreuth, Germany)에서 순도 99%, 용량은 10 mg으로 구입하였다. Methanol은 Merck (Darmstadt, Germany)의 HPLC급 고순도 용매를 사용하였고, 증류수는 ELGA Water purification system (ELGA, USA)을 이용하여 18 Ω 이상으로 사용하였다. Formic acid는 Fisher Chemical (Czech Republic), ammonium formate는 Sigma-Aldrich (MO, USA)로부터 1급 시약을 구입하여 사용하였고 그 외 기타 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 표준원액은 PAs (Lycopsamine 등 7종) 표준품을 각각 20 mL의 methanol에 용해하여 약 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도가 되도록 하였다. 또한 7종 동시분석을 위한 혼합표준용액은 표준원액을 이용하여 각각의 최종 농도가 0.515-13.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 methanol에 희석하여 mixture 형태로 조제하였다. Matrix-matched calibration을 위해 벌꿀 공시료 추출물 960 μL 에 혼합표준용액 40 μL 를 넣어 matrix-matched 표준용액을 조제한 뒤 공시료 추출액을 이용하여 단계적으로 희석하여 96% 이상의 벌꿀 matrix가 첨가된 matrix-



Fig. 3. Locations of honey collection denoted by blue circles.

matched 표준용액을 제조하였다. 제조된 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 -20 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

분석에 사용된 벌꿀제품 84건은 서울지역 대형 할인마트와 슈퍼마켓, 그 외 온라인 구매를 통하여 확보하였고, 대부분은 국내산 벌꿀이지만 일부 수입꿀도 포함하여 실험을 진행하였다. 또한 지리적 요인을 고려하여 강원도, 경상도, 전라도 등 여러 지역에서 생산된 벌꿀을 수집하였다(Fig. 3). 아카시아꿀과 잡화꿀은 각각 18건, 밤꿀은 14건, 야생화꿀과 사향벌꿀은 각각 12건, 그 외 마누카(manuka) 꿀 등 수입꿀 10건을 포함하여 총 84건을 대상으로 하였다.

2.2. 시료 추출 및 정제

검체를 잘 혼합하여 시료 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리용 용기에 넣고, 0.05M sulfuric acid을 포함한 50 % methanol 15 mL을 가하여 50 °C 수욕 상에서 10분간 초음파 처리하였다. 이후 진탕기로 30 분간 진탕한 후에 원심분리(2500 rpm, 10 min) 하였다. 이어 methanol 5 mL와 0.05M sulfuric acid이 함유된 50 % methanol 5 mL로 활성화시킨 양이온교환수지 고체상카트리지(Oasis MCX, 500 mg, 6 cc)에 추출한 상등액 15 mL를 주입하여 초당 1~2 방울의 속도로 통과시켰다. 이때 컬럼내에서 벌꿀이 재결정되는 것을 방지하기 위해 주변 온도를 약 40 °C 이상으로 유지하였다. 이후 2.5 % ammonium hydroxide가 함유된 methanol 5 mL로 용출하여 55 °C에서 질소로 건조하였다. 마지막으로 5 % methanol 1 mL를 가하여 녹인 후 0.2 µm 시린지 필터로 여과하여 시험용액

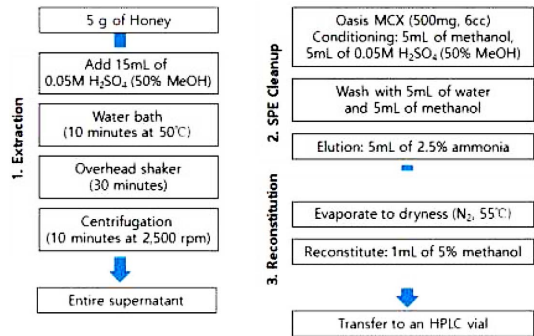


Fig. 4. Schematic overview of the sample preparation and extraction procedure for honey.

으로 사용하였다(Fig. 4).

2.3. 분석 기기 및 조건

본 연구에 사용한 액체크로마토그래프는 진공탈기 장치(vacuum degasser), 펌프(quaternary pump), 자동시료 주입기 및 컬럼오븐 등으로 구성된 UPLC (Vanquish; Thermo Scientific, USA)를 이용하였고, 컬럼은 Hypersil Gold C18 column (100 × 2.1 mm I.D., 1.9 µm, Thermo Scientific, USA)을 선택하였다. 기기 작동과 Data 처리는 Xcalibur 4.1 및 Trace Finder 4.1를 이용하였다. 이동상으로는 5 mM ammonium formate in 0.1 % formic acid와 0.1 % formic acid 가 포함된 5 mM ammonium formate in 95 % MeOH를 사용하여 기울기 용리방식을 적용하였다(Table 1). 이동상에 사용한 formic acid 는 peak의 분리능 및 protonation enhancer로써 PAs의 3차 amine기에서 protonation을 용이하게 하여 [M+H]⁺

Table 1. Operational parameters of UPLC for analysis of PAs in honey

Parameter	Conditions		
Column	Hypersil Gold C18 (100 × 2.1 mm I.D., 1.9 µm)		
Flow Rate	0.3 mL/min		
Injection Volumn	2 µL		
	A : 5 mM ammonium formate in 0.1 % formic acid (D:W)		
	B : 5 mM ammonium formate in 0.1 % formic acid (95 % MeOH)		
	Time (min)	A (%)	B (%)
Mobile Phase	0	95	5
	0.5	95	5
	7.0	70	30
	11.0	5	95
	13.0	5	95
	15.0	95	5

이온생성에 유리하게 작용하였다.¹⁰ 유속은 0.3 mL/min이며 2 μ L를 주입하였다. 또한 분석 초기 3 min 동안은 벌꿀 속에 들어있는 당류나 아미노산, 미네랄을 제거하기 위해 질량분석기를 통과시키지 않고 이 동상을 그대로 유출시켰다.

액체크로마토그래프에 연결된 질량분석기는 전자분무이온화(Electrospray ionization, ESI) 장치가 부착된 TSQ Altis triple-quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, USA)를 사용하였다. 전자분무이온화 장치는 positive ion mode를 사용하였고, Sheath Gas 45, Aux Gas 10, Sweep Gas 1로 적용하였다. Ion Transfer Tube의 온도는 325 °C, 이온화 전압은 3500V로 설정하였다. 분석의 선택성과 검출감도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였고, 선구이온(precursor ion)의 조각화(fragmentation)를 위한 Collision Gas로 아르곤 가스(1.5 mTorr)를 사용하였다. 또한 Collision cell에서 collision energy를 조절하여 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였고, 가장 좋은 감도를 보이는 product ion을 정량이온(Quantitation ion)으로, 다음으로 크게 검출되는 product ion을 정성이온(Qualification ion)으로 설정하여 최적화하였다(Table 2).

PAs 7종에 대한 동시분석법은 「식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인」과 AOAC_2013 기준으로 확립하였다. 분석방법의 정확성 확인을 위한 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 반응의 표준편차

와 검량선 기울기에 근거하는 방법에 따랐다. 각각의 PAs 검량선에서 2번째 농도에 해당되는 양을 PAs가 오염되지 않은 벌꿀시료에 첨가하여 분석한 후 표준편차와 기울기를 이용하여 검출한계($3\sigma/s$)를 구하고 검출한계에 3.3배를 곱하여 정량한계($10\sigma/s$)를 설정하였다. 또한 정확도는 회수율로 평가하여 검증하였다. 회수율은 대조군 시료에 표준물질을 첨가한 후 확립된 전처리 과정으로 추출한 검체시료와 표준물질을 비교하였다. 검체시료와 표준물질의 면적비로 나눈 값의 백분율(%)로서 구하였으며, 각 표준물질에 따라 0.5-50 μ g/kg의 농도범위에 대하여 3회 반복 시행하여 회수율을 구하였다. 정확도는 실제시료에 일정 농도의 분석대상 물질을 첨가하였을 때 그 양을 정확히 측정하는 능력으로 평가하였고, 정밀도는 시료를 반복하였을 때 얻어진 분석값의 상대표준편차(% RSD)로 반복성을 확인하였다. 마지막으로 PAs 7종을 동시분석하기 위해 벌꿀 매트릭스를 사용하여 각 정량한계의 1배에서 20배의 농도범위가 되도록 표준용액을 제조하여 검량선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분석법의 유효성 검증

UPLC-MS/MS를 이용한 PAs 7종에 대한 분석 검량선은 양호한 직선성($R^2 \geq 0.998$)을 보였으며, 회수율(%)은 81-108% 수준이었다. 상대표준편차(% RSD)

Table 2. Mass spectrometric conditions (positive ESI) used for the analysis of PAs in honey

Compound	Abbreviation	RT (min)	Precursor ion ([M+H] ⁺ , m/z)	Product ion (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
Lycopsamine	Ly	4.85	300	94	27.86	81.9
				138	20.92	
Heliotrine	He	6.77	314	138	21.45	76.71
				156	28.46	
Senecionine	Sn	7.93	336	120	30.09	88.01
				94	33.28	
Retrorsine	Re	6.26	352	120	31.72	91.53
				94	37.64	
Trichodesmine	Td	6.17	354	120	39.91	94.31
				222	29.71	
Retrorsine N-oxide	ReNO	6.44	368	94	44.95	91.9
				118	33.81	
Echimidine	Em	9.04	398	120	26.38	81.15
				220	17.47	

Table 3. Method performance parameters observed for PAs in honey matrix

Analytes	Regression equation	R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
Lycopsamine	y = 195300x-87820	0.9998	0.18	0.58	103	1.80
Trichodesmine	y = 1240000x-39100	0.9955	0.35	1.07	81-95	4.95
Retrorsine	y = 28070x-67880	0.9998	0.90	2.72	100-108	4.51
Retrorsine N-oxide	y = 19730x-41400	0.9996	1.12	3.39	81-97	4.70
Heliotrine	y = 426900x-170800	0.9999	0.42	1.29	104-107	1.97
Senecionine	y = 72278x-63746	0.9998	0.48	1.44	96-102	3.03
Echimidine	y = 324100x-85590	0.9994	0.12	0.37	95-98	3.25

는 약 5 % 이내의 정밀성을 나타내었다. 또한 실험방법의 검출한계(LOD)는 0.12-1.12 µg/kg 이고 정량한계(LOQ)는 0.37-3.39 µg/kg 이었다(Table 3).

3.2. Matrix effect

분석 시 매트릭스의 영향을 확인하기 위해 matrix-matched 표준용액을 만들어서 검량선을 작성하였다. 벌꿀 공시료(blank sample) 추출물에 총 5단계의 농도로 7종의 PAs 표준물질을 첨가하여 진행하였으며 매트릭스효과는 검량선 기울기를 이용한 아래 식에 의하여 계산하였다.¹¹ 벌꿀 매트릭스의 경우 매트릭스효과(ME)가 81.7-97.5 % 수준으로 모두 ionization suppression 현상을 보였다(Table 4).

$$\%ME = (\text{Slope of matrix-matched standard curve} / \text{Slope of solvent standard curve}) \times 100$$

특히 Senecionine의 경우 ME값이 81.7 %로 가장 크게 나타났으며, Heliotrine은 97.5 %로 matrix effect가 거의 없는 것으로 확인되었다.

또 다른 문헌에 따르면 ME가 50 % 이하 혹은 150 % 이상인 경우에는 강한 매트릭스 효과가 있고, 50~80 % 또는 120~150 %인 경우에는 중간정도의 매

트릭스 효과가 있으며, 80~120 %인 경우에는 매트릭스 효과가 없는 것으로 판단하기도 하였다.¹² 위의 기준을 적용하면 벌꿀의 경우에는 매트릭스 효과가 대부분 없는 것으로 판단되나 본 연구에서는 PAs 7종에 대한 동시분석을 진행하므로 매트릭스 효과를 최소화하기 위해 matrix-matched calibration curve를 산출하여 정량하였다(Fig. 5).

3.3. PAs 표준물질의 ESI-mass spectrometry

분석물질로 선정된 7개의 PAs 표준물질은 화학구조적 특징으로 볼 때 3개의 Senecionine-group (retrorsine, senecionine, retrorsine N-oxide)과 2개의 Lycopsamine-group (echimidine, lycopsamine), 1개의 Heliotrine-group (heliotrine)과 Monocrotaline-group (trichodesmine)으로 분류할 수 있다(Table 5, Fig. 2).¹ ESI-MS/MS positive ion 모드에서 PAs는 3차 아민그룹의 특성으로 인해 [M+H]⁺ 형태의 선구이온(precursor ion)을 생성하고, 이 이온들은 충돌가스(Ar) 의해 분해가 일어난다. 일부 화합물에 대한 MS/MS spectra를 Fig. 6에 나타내었다. 공통적으로 m/z 120, m/z 94 등의 fragment ion이 확인되었으며 일부 물질에서는 m/z 138, m/z 156, m/z 220 등도 검출이 되었다. Heliotrine의 경우 m/z 156, m/z 138, m/z 120, m/z 94, m/z 82 등이 fragment ion으로 확인되었다. 이는 C9와 C10 사이의 ester bond가 절단되면서 m/z 156의 피크가 형성되었고 이후 물분자(H₂O)가 차례로 떨어지면서 m/z 138, m/z 120가 생성된 것으로 추정된다.¹³⁻¹⁴ Echimidine은 open diester retrorsine type으로서 C1 및 C7 위치에 ester group이 치환되어있는 구조이다. MS/MS 스펙트럼에서는 m/z 238, m/z 220, m/z 174, m/z 138, m/z 120 등의 fragment ion이 검출되었으며, 이는 C9 위치의 ester group (C₇H₁₂O₄)이 절단되면서 m/z 238이 생성되고 이후 물분자(H₂O)가 제거되면서 m/z 220 피크

Table 4. Matrix matched effects (ME) in honey

Analytes	Matrix matched effects (ME, %)
Lycopsamine	91.9
Trichodesmine	83.2
Retrorsine	86.7
Retrorsine N-oxide	86.2
Heliotrine	97.5
Senecionine	81.7
Echimidine	91.0

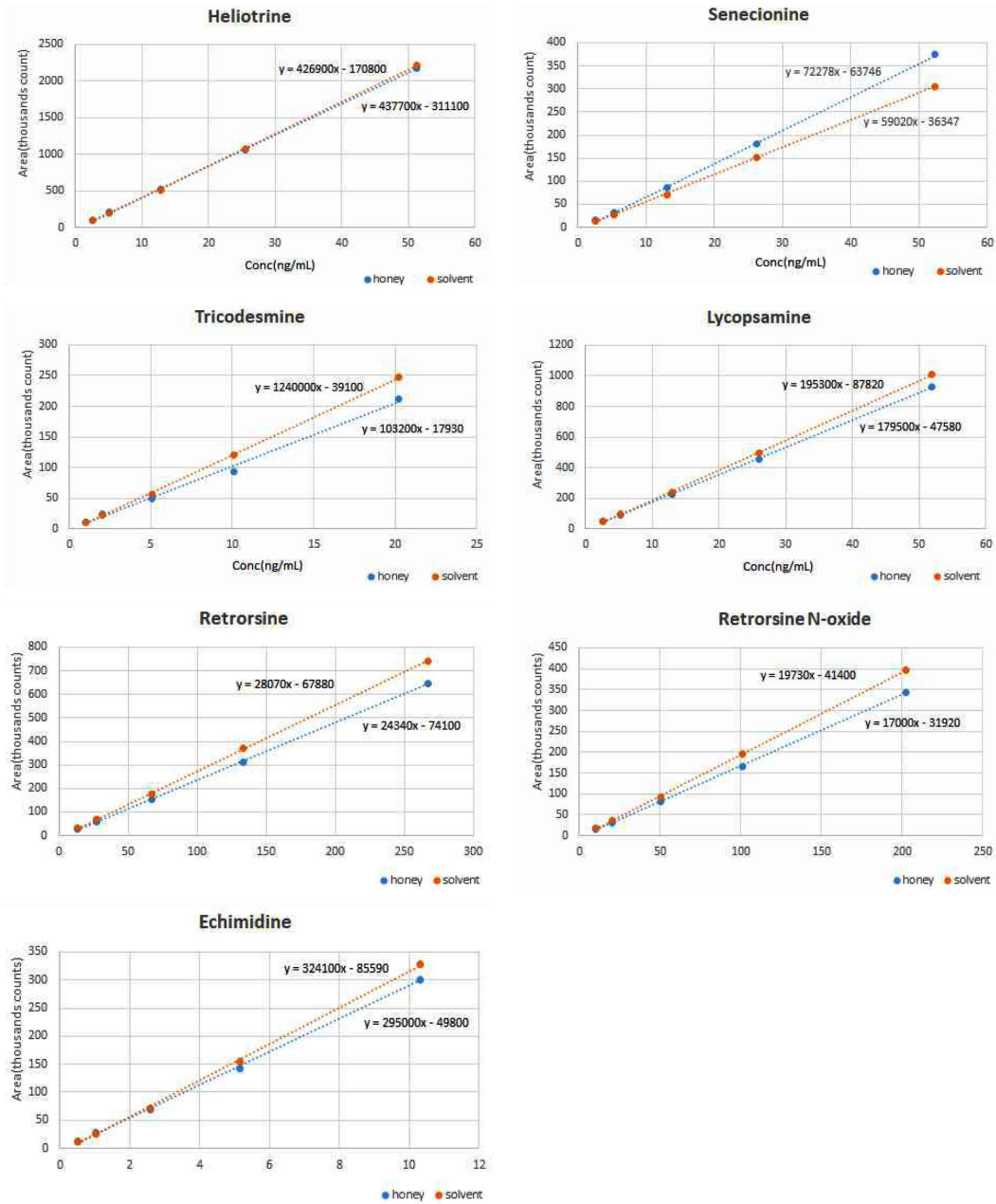


Fig. 5. Calibration curves for PA matrix-matched standard curve within the concentration of 0.515-267 ng/mL in honey extract.

가 생성된 것으로 보인다. 이 중 m/z 120를 정량이온으로, m/z 220은 정성이온으로 선택하였고 두 이온간 반응세기의 비율(%)은 17.56 ($\pm 20\%$)으로 설정하였다. 마지막으로 7개의 PAs의 mass fragment ion은 m/z 94, m/z 118, m/z 120, m/z 138, m/z 156, m/z 220, m/z 222 등으로 최종 결정하였다.

3.4. 벌꿀류에서의 PAs(7종) 확인 및 함유량조사
 확립된 동시분석법을 적용하여 총 84건의 유통 벌꿀류를 대상으로 PAs 7종에 대해 검사한 결과, 6개의 시료에서 PAs가 확인되었다. 총 PAs의 검출범위는 1.76-202.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었으며 평균 47.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 수준이었다. 또한 벌꿀류에서 검출된 PAs는 주로 Lycopsamine

Table 5. Classification of PAs based on botanical source origins

PA group	Botanical source	Representative PA
Lycopsamine-group	Boraginaceae family <i>Eupatorieae</i> spp. (Asteraceae family)	Echimidine, Lycopsamine
Senecionine-group	<i>Senecioneae</i> spp. (Asteraceae family) <i>Crotalaria</i> spp. (Fabaceae family)	Senecionine, Retrorsine, Seneciophylline, Retrorsine N-oxide
Heliotrine-group	<i>Heliotropium</i> spp. (Boraginaceae family)	Heliotrine, Lasiocarpine
Monocrotaline-group	<i>Crotalaria</i> spp. (Fabaceae family)	Trichodesmine, Monocrotaline

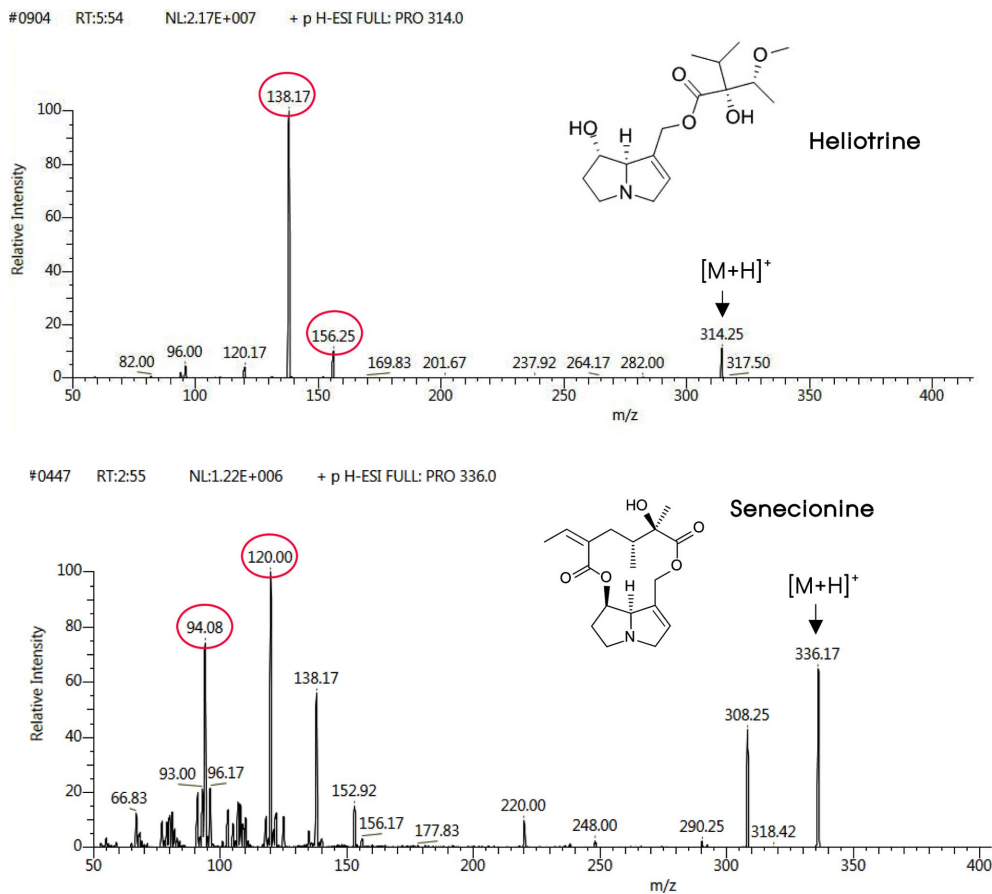


Fig. 6. MS/MS spectra and chemical structures of identified compounds; Heliotrine, Senecionine. Monitored product ions and precursors are marked.

과 Echimidine으로 확인되었으며 그 외 성분(Heliotrine, Trichodesmine, Senecionine, Retrorsine, Retrorsine N-oxide 등 5종)은 불검출이었다. 주요 검출성분은 이미 발표된 다른 문헌의 결과와 유사하였다.¹⁵⁻¹⁷ PAs가 검출된 벌꿀을 세부유형으로 나누어보면 마누카꿀이 2건, 유칼립투스꿀 1건, 잡화꿀 1건, 아카시아꿀 1건, 사양벌꿀 1건이었다. 마누카꿀과 유칼립투스꿀은 검

체수는 적었지만 상대적으로 검출량이 높게 나타났다 (Table 6). 반면 국내에서 많이 자생하는 밤, 아카시아, 야생화, 잡화 등을 밀원으로 하는 벌꿀에서는 대부분 검출되지 않았으며 일부 아카시아꿀과 사양벌꿀에서 각각 1건씩 미량 검출되었다.

현재까지 식품 중 국내의 PAs에 대한 기준은 없으나 독일연방위해평가원(BfR) 및 유럽식품안전청(EFSA)

Table 6. Concentration of individual targeted PAs detected in honey samples by LC-MS/MS

Floral sources	N ^{a)}	Number of incurred samples (range of contamination: µg/kg)						
		Ly ^{c)}	He ^{d)}	Sn ^{e)}	Re ^{f)}	Td ^{g)}	ReNO ^{h)}	Em ⁱ⁾
Acacia	18	1 (2.26)	ND ^{b)}	ND	ND	ND	ND	ND
Mixed blossom	18	1 (3.97)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (1.16)
Chestnut	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Wildflower	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lime tree	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Manuka	2	2 (16.42 and 30.00)	ND	ND	ND	ND	ND	2 (2.44 and 23.03)
Longan	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lychee	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Styra	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eucalyptus	1	1 (201.71)	ND	ND	ND	ND	ND	1 (0.39)
Sugar feed honey	12	1 (1.76)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	84							

^{a)}Total number of analysed samples

^{b)}Not detected

^{c)}Lycopsamine, ^{d)}Heliotrine, ^{e)}Senecionine, ^{f)}Retrorsine, ^{g)}Trichodesmine, ^{h)}Retrorsine N-oxide, ⁱ⁾Echimidine

에서는 하루 섭취량을 체중 1 kg 당 0.007 µg으로 권장하고 있으며 호주는 1 µg으로 제한하고 있다. PAs가 검출된 국내산 벌꿀(2건)의 경우 성인(60 kg 기준)이 하루에 벌꿀 10 g (1T 스푼)을 매일 섭취한다고 가정할 때 유럽 섭취허용치의 약 5% 정도에 불과한 것으로 나타났다.

4. 결 론

본 연구에서는 유통 벌꿀을 대상으로 PAs 7종에 대해 UPLC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 분석법은 직선성, 정확성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)로 유효성 검증을 하였다. 상관계수(R²)는 0.998 이상의 우수한 직선성을 보였고 회수율은 81-108% 이었으며, 상대표준편차(% RSD)는 5% 이내로 우수한 재현성을 나타냈다. 확립된 분석법에 의해 분석한 결과, 유통 벌꿀 84건 중 6건이 LOQ 이상으로 검출되었으며 평균 47.19 µg/kg 수준이었다. 검출된 PAs의 종류는 대부분 Lycopsamine과 Echimidine이었다. 벌꿀 중 가장 높은 검출량을 보인 품목은 유칼립투스(Eucalyptus) 꿀이었으며 국내에서 많이 생산되는 밤꿀, 아카시아꿀, 잡화꿀 등에서는 대부분 검출되지 않았다. 또한 국내

산 벌꿀의 경우, 지리적 위치에 따른 유의성은 확인되지 않았다.

References

1. European Food Safety Authority (EFSA), *The EFSA Journal*, **447**(1), 1-51 (2007).
2. European Food Safety Authority (EFSA), *The EFSA Journal*, **9**(11), 1-146 (2011).
3. P. P. Fu, Q. Xia, M. W. Chou, and G. Lin, *Journal of Food and Drug Analysis*, **15**(4), 400-415 (2007).
4. Y. Jiang, P. P. Fu, and G. Lin, *Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics*, **6**(3), 187-192 (2006).
5. M. Dreger, M. Stanisławska, A. Krajewska-Patan, S. Mielcarek, P.Ł. Mikołajczak, and W. Buchwald, *Journal Herba Polonica*, **55**(4), 127-147 (2009).
6. L. A. Hoogenboom, P. P. Mulder, M. J. Zeilmaker, H. J. van den Top, G. J. Remmelink, E. F. Brandon, M. Klijnstra, G. A. Meijer, R. Schothorst, and H. P. Van Eqmond, *Food Additive and Contaminants*, **28**(3), 359-372 (2011).

7. H. Wiedefeld, *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, **1**(2), 79-87 (2011).
8. Centre for Food Safety assessment, https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/files/Pyrrolizidine_Alkaloids_in_Food_e.pdf, Assessed 9 Aug 2019.
9. Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Advisory report on pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations, 2015.
10. J. Rossmann, S. Schubert, R. Gurke, R. Oertel, and W. Kirch, *Journal of Chromatography B*, **969**(1), 162-170 (2014).
11. A. Cappiello, G. Famiglini, P. Palma, and H. Trufelli, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **33**(1), 1067-1081 (2010).
12. B. Kmellár, P. Fodor, L. Pareja, C. Ferrer, M. A. Martínez-Uroz, A. Valverde, and A. R. Fernandez-Alba, *Journal of Chromatography A*, **1215**(1), 37-50 (2008).
13. B. Avula, S. Sagi, Y.-H. Wang, J. Zweigenbaum, M. Wang, and I. A. Khan, *Food Chemistry*, **178**, 136-148 (2015).
14. Y. Zhou, N. Li, F. F.-K. Choi, C.-F. Qiao, J.-Z. Song, S.-L. Li, X. Liu, Z.-W. Cai, P. P. Fu, G. Lin, and H.-X. Xu, *Analytica Chimica Acta*, **681**, 33-40 (2010).
15. L. Zhu, Z. Wang, L. Wong, Y. He, Z. Zhao, Y. Ye, P. P. Fu, and G. Lin, *Food Control*, **85**(1), 484-494 (2018).
16. C. T. Griffin, S. M. Mitrovic, M. Danaher, and A. Furey, *Food Additives & Contaminants: Part A*, **32**(2), 214-228 (2015).
17. P. P. J. Mulder, P. López, M. Castelari, D. Bodí, S. Ronczka, A. Preiss-Weigert, and A. These, *Food Additives & Contaminants: Part A*, **35**(1), 118-133 (2018).

Authors' Positions

Hoejin Ryu	: Official Researcher
Oukhee Kim	: Official Researcher
Eunsoon Lee	: Official Researcher
Misun Kim	: Official Researcher
Jeong-gon Kim	: Official Researcher
Eunsun Yun	: Senior Official Researcher
Hyunjeong Kim	: Senior Official Researcher
Musang Kim	: Senior Official Researcher