

유통 한약재 초과(草果) 중 벤조피렌 오염실태 조사

황경화* · 염미숙 · 이희정 · 조아름 · 최은정 · 허명제 · 권문주

인천광역시 보건환경연구원 식약연구부 약품분석과

A Survey on Benzo(a)pyrene Contamination in *Amomum Tsao-ko* Fruit of Medicinal Herbs

Kyoung-Hwa Whang*, Mi-Sook Yeom, Hee-Jeong Lee, A-Reum Jo, Eun-Jeong Choi, Myong-Je Heo, and Mun-Ju Kwon

Pharmaceutical Analysis Division, Incheon Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment 471, Seohae-daero, Jung-gu, Incheon 22320, Korea

Abstract – *Amomum Tsao-ko* used as a traditional oriental herbal medicine, is indigenous to several Asia countries. This study was carried out to investigate the contamination by Benzo(a)pyrene in *Amomum Tsao-ko* Fruit of Medicinal Herbs. 20 samples of *Amomum Tsao-ko* Fruit were evaluated for the Benzo(a)pyrene contamination. They were analyzed for Benzo(a)pyrene using high-performance liquid chromatography(HPLC)-fluorescence detection and the positive samples were confirmed using gas chromatography tandem mass spectrometry. The levels of Benzo(a)pyrene were from 9.2 to 95.5 µg/kg and the average was 40.6 µg/kg. There are no Benzo(a)pyrene standards for *Amomum Tsao-ko* Fruit of Medicinal Herbs. These data will be used as a basic data for the future legislation on the regulation and control of benzo(a)pyrene of *Amomum Tsao-ko* Fruit of Medicinal Herbs.

Keywords – Benzo(a)pyrene, *Amomum Tsao-ko*, Medicinal Herbs

초과는 생강과(Zingiberaceae)에 속한 다년생 초본인 *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire의 성숙한 과실로 가을에 과실이 성숙할 때 채취하여 햇볕에 말리거나 혹은 저온에서 건조한다.¹⁾ 초과는 예로부터 중국전통의학, 약용식물, 조미료, 그리고 향신료 등으로 사용되어 왔으며,^{2,3)} 동양전통의학에서는 건조된 초과를 말라리아, 거담, 복통, 소화불량, 그리고 구토 등의 치료에 사용해 왔다.^{4,5)} 최근, 초과에서 추출된 다양한 생리활성 물질들은 항산화, 항진균 및 항염증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{6,7)} 초과 과실은 1.6%의 정유를 함유하며, 정유의 주요 성분으로 1,8-cineole, α,β-pinene, p-cymene, linalool, α-terpineol 등이 있다.¹⁾

한약(생약)은 의약품뿐만 아니라 건강기능식품, 화장품 보조제 및 방향성 제품 원료 등으로 확대되면서 그 사용 범위가 매우 넓다. 한약은 자연에 존재하는 다양한 식물, 동물, 광물질 등을 천연 그대로 사용하거나 건조 등의 일정한 가

공을 통해 원재료로 사용되고 있기 때문에⁸⁾ 자연환경을 기반으로 자라는 식물 한약재의 경우 주변 환경오염에 많은 영향을 받으므로 오염된 원료로 만드는 한약제제의 안전성 문제가 발생할 수 있다.⁹⁾ 또한, 환경오염으로 인한 중금속 오염 뿐만 아니라 최근 한약재의 수입 의존도가 높아짐에 따라 안전성이 검증되지 않은 값싼 중국산 한약재의 수입으로 잔류농약, 건조하거나 제조하는 과정에서 벤조피렌 등의 생성 등 한약재 안전에 대한 국민들의 우려가 커지고 있다.¹⁰⁾

벤조피렌(Benzo(a)pyrene, Bap)은 내분비계장애물질로 알려진 대표적인 다환 방향족 탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 화합물 중 하나로 2006년 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 1급 발암물질로 분류하였고, 발암성에 근거하여 캐나다 및 미국 등에서는 다환 방향족 탄화수소 중 우선순위 대상으로 선정되어 관리되고 있다.^{11,12)} 벤조피렌은 환경오염 물질로 대기, 수질, 토양 등에 널리 존재하며,¹³⁾ 식품의 조리·가공 시 주성분의 열분해로 생성되며¹⁴⁾ 조리·가공하지

*교신저자(E-mail): hkwha2005@korea.kr
(Tel): +82-32-440-5452

않은 식품에도 존재한다.^{15,16)}

우리나라 식품의약품안전처에서는 2001년부터 수행된 PAHs 모니터링 및 위해평가를 통해 생약의 벤조피렌의 기준 및 시험방법¹⁷⁾이 설정되었고, 광물성 생약을 제외한 모든 한약재에 벤조피렌 기준을 규정하는 고시¹⁸⁾를 행정예고 하였지만, 현재까지 한약재 중 지황과 숙지황만이 제한적으로 관리되고 있다¹⁹⁾.

우리나라에서 초과는 한약재로서 약사법과 대한민국약전을 근거로 품질안전관리가 이루어지고 있다. 대한민국약전에는 그 기원식물과 성상을 규정하여 진위를 판별할 수 있는 근거가 마련되어 있고 확인시험, 중금속, 잔류농약, 이산화황, 산불용성회분 등의 규격검사로 품질 안전성을 확보할 수 있도록 규정하고 있으나, 벤조피렌의 기준은 마련되어 있지 않다.²⁰⁾

따라서 본 연구는 한약재 초과(草果)의 벤조피렌 시험법의 유효성을 검증하고, 벤조피렌 잔류량을 조사하여 향후 한약재 초과(草果)의 벤조피렌 기준 설정 시 근거자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 초과는 식약처 관할 6개 지방청에서 2020년 2월 수거한 씨케이(주), (주)광덕제약, 한솔제약(주), (유)대효제약, 새롬제약(주), 대영제약(주), 대연제약, 주식회사 조화제약, 대명제약(주), (주)현진제약, (주)농림생약, (주)지오허브, 경희한약, 덕인제약(주), 풍산(주), (주)휴먼허브, 한약인(주), (주)푸어마인드, (주)남이제약, (주)광명당제약 20개 품목을 사용하였다. 표본은 인천광역시보건환경연구원 약품분석과 실험실에 보관중이다. 시료는 모두 수입산(중국산 15건, 베트남산 5건)이었고, 분쇄기(HMF-3150S, Hanil, KOREA)로 분쇄한 후 4°C 냉장상태로 보관

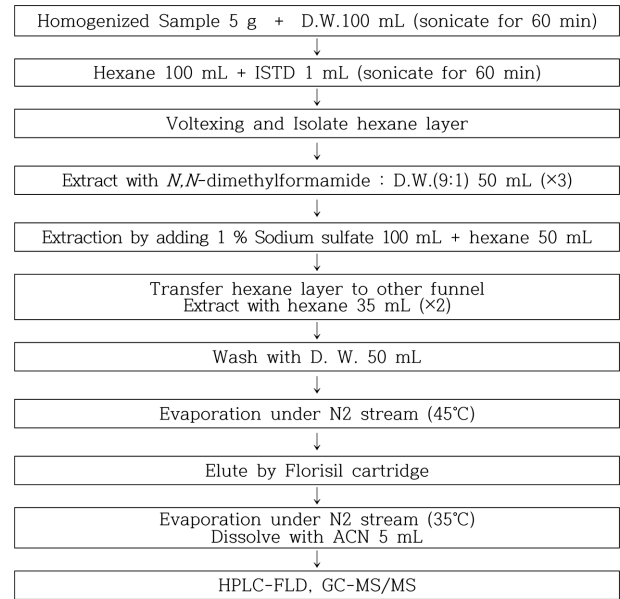


Fig. 1. Flow diagram of sample preparation for analysis of benzo(a)pyrene.

하면서 사용하였다.

시약 및 시액 - 벤조피렌 표준품과 내부표준물질 3-메틸콜란트렌(3-methylcholantrene)은 Sigma-Aldrich(USA)사의 제품을 사용하였고, 시료의 추출과 분석에 사용한 헥산(Hexane), 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM), 아세토니트릴(Acetonitrile, ACN)는 J.T.Baker(USA)사의 HPLC급을 사용하였다. 물은 초순수제조기(Milli-Q 16, Merk Millipore, Germany)에 의해 정제된 것을 사용하였다.

추출 및 정제 - 시료의 전처리 과정은 식품의약품안전평가원 생약연구과에서 제공한 초과 중 벤조피렌 시험법에 따라 다음과 같이 실험하였다. 한약재 약 500-600 g을 분쇄하여 균질화한 후 약 5.0 g을 정밀하게 달아 물 100 mL를 넣

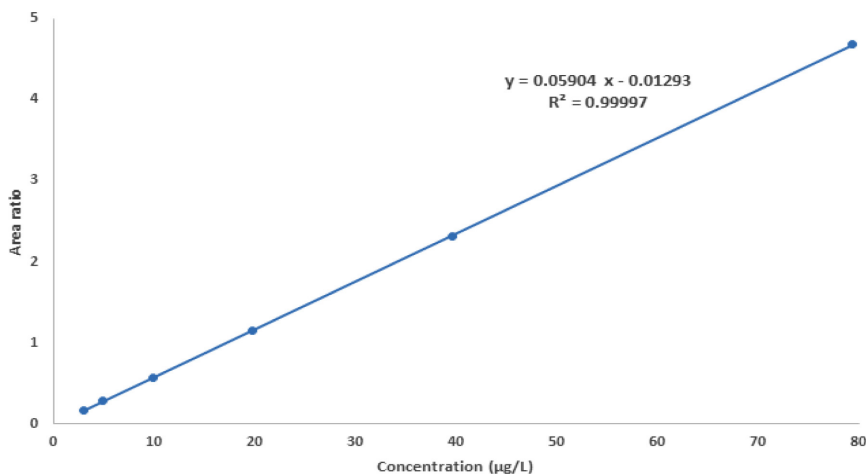


Fig. 2. Standard curve of benzo(a)pyrene for the analysis by HPLC.

Table I. The analytical conditions of HPLC for Benzo[a]pyrene

Parameters	Conditions
Instrument	Ultimate 3000, Thermo
Column	Supelcosil LC-PAH (4.6×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	80% Acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	Fluorescence Detector (Ex/Em) 294 nm/ 404 nm
Temperature	37°C
Injection volume	10 μL

Table II. The analytical conditions of GC-MS/MS for Benzo[a]pyrene

Device	Parameters	Conditions
GC	Instrument	Agilent-6890N gas chromatograph
	Column	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm Film)
	Carrier gas	He
	Flow rate	1 mL/min
	Injection volume	1 μL
	Injection mode	Splitless
	Inlet temp.	310°C
	Oven temperature	80°C(1 min) → 10°C/min → 180°C → 5°C/min → 245°C → 5°C/min → 300°C(5 min)
MS/MS	Instrument	Agilent 5975 Insert MSD
	Ionization method	EI (70 eV)
	Analyzer	Quadrupole
	Ion source temperature	250°C
	Detection mode	Selected Ion monitoring(SIM)
	Selective ions(m/z)	Benzo[a]pyrene 1) 252.0 2) 250.0, 253.0 3-Methylcholanthrene 1) 268.0 2) 252.0, 253.0

고 60 분간 초음파 추출하였다. 이 액에 hexan 100 mL 및 내부표준액 1 mL를 넣어 호모제나이저로 5분간 균질하게 섞은 다음 60분간 초음파 추출한 후 원심분리(3,200 g, 10분) 하여 hexan층을 분액깔때기(I)에 옮겼다.

분액깔때기(I)의 hexan층에 *N,N*-디메틸포름아미드-물혼합액(9 : 1) 50 mL를 넣고 진탕 추출 후 *N,N*-디메틸포름아미드-물혼합액(9 : 1)층을 분액깔때기(II)에 옮겼다(3회 반복). 분액깔때기(II)에 1% 황산나트륨 용액 100 mL를 넣고 진탕한 후 hexan 50 mL를 넣고 진탕한 후 정치하여 분리된 hexan층을 분액깔때기(III)으로 옮겼다. 분액깔때기(II)에 hexan 35 mL를 넣고 진탕 추출한 다음 hexan층을 분액깔때기(III)에 합한다(2회 반복). 분액깔때기(III)의 hexan층에 물 50 mL를 넣어 세척하고, hexan층을 무수황산나트륨 약 30 g으로 탈수 여과한 다음 45°C 수욕에서 감압하여 hexan이 약 2 mL가 될 때까지 농축하였다.

플로리실 카트리지(1 g, 6 mL)는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 hexan 20 mL를 순서대로 초당 2-3방울의 속도로 용출시

켜 활성화시킨 다음 사용하였다. 활성화된 카트리지에 추출 용액을 넣어 hexan-디클로로메탄혼합액(3 : 1) 20 mL를 초당 2-3 방울의 속도로 용출시켰다. 이 용출된 액을 35°C 질소 가스로 날려 보낸 다음 잔류물을 아세트니트릴 5 mL에 용해한 후 0.45 μm의 시린지 필터로 여과하여 시험액으로 사용하였다.

분석기기 및 조건 - 시료 내 벤조피렌을 정량분석하기 위해 FLD(fluorescence detector)가 장착된 HPLC(Ultimate 3000, Thermo, USA)를 사용하였다. 벤조피렌 분석에 필요한 용매 및 기기조건은 Table I과 같다.

시험법 유효성 검증 - 벤조피렌 분석에 사용한 HPLC 시험법의 유효성을 검증하기 위해 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(limit of detection) 및 정량한계(limit of quantification)를 측정하였다. 직선성 검증을 위해 3, 5, 10, 20, 40, 80 μg/L 6단계 농도로 검량선을 작성하였고, 벤조피렌 농도에 대한 적분면적을 회귀분석하고 상관계수(correlation coefficient, R^2)를 확인하여 평가하

었다. 정확성은 벤조피렌에 오염되지 않은 시료를 구입하기 힘들어 벤조피렌이 검출된 시료에 벤조피렌 최종농도가 10 µg/kg, 내부표준용액인 3-메틸콜란트렌은 50 µg/kg의 농도가 되도록 첨가한 후 시료의 벤조피렌 함량을 빼주어 회수율을 평가하였으며, 정밀성은 회수율 측정값의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 확인하였다. 검출한계와 정량한계는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법(21)을 사용하였고, 아래의 식으로 산출하였다.

$$\text{검출한계(LOD)} = 3.3 \times \sigma/S$$

$$\text{정량한계(LOQ)} = 10 \times \sigma/S$$

(σ: 회귀직선에서 y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

GC-MS/MS로 검출된 벤조피렌 재확인 - 벤조피렌이 검출된 시료는 GC-MS/MS(GC-Agilent 6890N, U.S.A., MS/MS-Agilent 5975 insert MSD, U.S.A.)를 통해 재확인하였으며, 분석에 필요한 용매 및 기기조건은 Table II와 같다.

결과 및 고찰

시험법 유효성 검증 - 본 실험의 유효성 검증에 대한 결과는 다음과 같다(Table III). 벤조피렌 표준용액을 내부표준법으로 검량선을 작성한 결과, 상관계수(R²)는 0.9999 이상의 직선성을 나타내었다. 검출한계(LOD)는 0.1 µg/kg, 정량한계는(LOQ)는 0.4 µg/kg이었다. 회수율은 85.3±4.8%이었으며 정밀성 파악을 위한 변동계수는 2% 미만이었다.

벤조피렌 함량 - 시중에서 유통되고 있는 한약재 초과 20건을 대상으로 벤조피렌 함량을 조사한 결과, 검사한 초과 모두 벤조피렌이 검출되었으며, 검출범위는 9.2~95.5 µg/kg, 평균 함량은 40.6 µg/kg이었다. 한약재 초과 벤조피렌 함

Table III. Results of correlation coefficient, LOD, LOQ and Recovery by HPLC-FLD

No. of samples	Detection of samples
Correlation coefficient (R ²)	0.999
LOD ^a (µg/kg)	0.1
LOQ ^b (µg/kg)	0.4
Recovery±SD ^c (%)	85.3±4.8
RSD ^d (%)	1.4

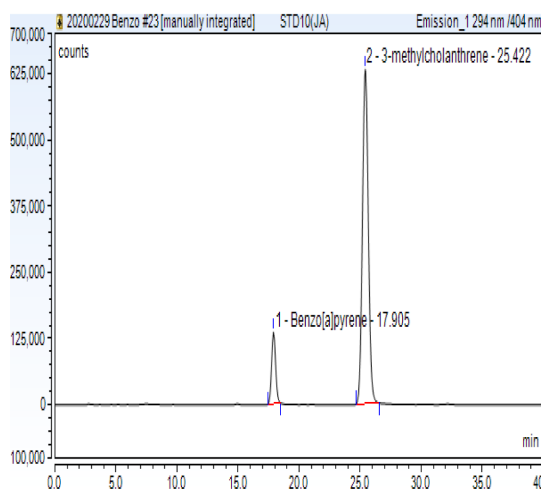
^aLOD: limits of detection ^bLOQ: limits of quantitation, ^cSD: Standard deviation, ^dRSD: Relative standard deviation

량에 대한 기존 연구를 살펴보면, 이 등²²⁾의 연구에서 초과 6개 제품 중 4개가 검출되었으며 검출 범위는 불검출 ~28.1 µg/kg이었고, Jo 등²³⁾의 연구에서는 평균 10.97 µg/kg 이 검출되었으며, 식품의약품안전처 2009년 모니터링 결과에서는 평균 38.59 µg/kg이 검출되었다.²⁴⁾ 2019년 인천보건 환경연구원 한약재 벤조피렌 모니터링 결과에서는 초과 3건을 검사하여 3건 모두 검출되었고, 검출범위는 16~53 µg/kg이었다.

한약재에서 검출된 벤조피렌의 투입경로에 대하여 Fishmes 등²⁵⁾은 뿌리에서의 흡착을 주요 경로로 간주하였다. 이는 환경오염이 심한 지역에서 자란 식물들은 뿌리를 통해 벤조피렌에 오염될 수 있음을 보여주었다.²³⁾ 또한, 한약재 건조·가공 과정에서 시간과 비용을 절감하기 위해 고온의 건조 과정이나 볶는 과정에서 생성되는 것으로 알려져 있다.²⁶⁾

따라서, 보다 안전한 한약재의 유통을 위하여 기존의 모니터링 및 이번 연구 결과를 바탕으로 건조과정을 거치면서 벤조피렌의 오염이 우려되는 한약재에 대한 관리 강화 및 세부적인 벤조피렌 허용기준 설정이 시급히 이루어져야 할 것이다.

(A) Benzopyrene Standard, ISTD



(B) Sample

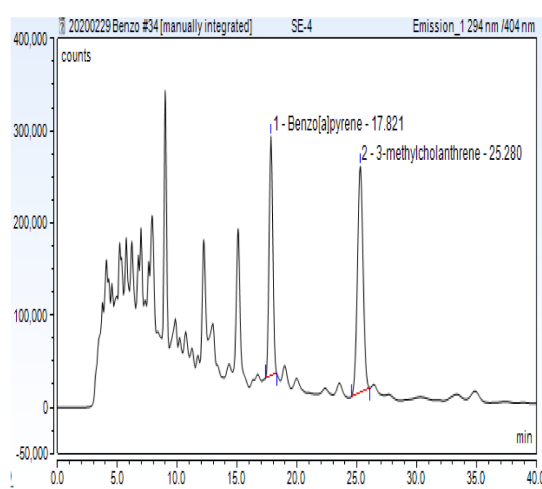


Fig. 3. Chromatogram of benzo(a)pyrene standard, istd(3-Methylcholanthren) and sample.

결 론

본 연구는 식품의약품안전처 ‘국민청원안전검사제’에서 청원된 벤조피렌 검사 대상(17종)에 포함되지 않은 한약재 중에서 2019년 인천보건환경연구원의 모니터링에서 벤조피렌이 다량 검출된 한약재 초과(草果)를 대상으로 시험법의 유효성을 검증하고, 벤조피렌 잔류량을 조사하였다. 확립된 시험법에 대해 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도에 대한 검증을 통하여 유효성을 확인하였다. 시중에 유통되고 있는 한약재 초과 20건을 검사한 결과, 20건 모두 벤조피렌이 검출되었다. 검출범위는 9.2~95.5 µg/kg 이었고 평균 농도는 40.6 µg/kg로 나타났다. 현재 한약재 벤조피렌 허용기준은 숙지황과 지황에만 5 µg/kg 이하로 설정되어 있어 그 외의 품목에 대한 기준 마련이 필요하다.

본 연구는 유통 중인 한약재 ‘초과’ 단일품목에 대하여 벤조피렌 오염량을 조사한 것으로 향후 위해평가를 거쳐 초과 벤조피렌 관리기준 설정 시 중요한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. 전국한의학대학교 공동교재편찬위원회 (2016) 본초학, 341. 영림사, 서울.
2. Moon, S. S., Lee, J. Y. and Cho, S. C. (2004) Isotsaokoin, an antifungal agent from *Amomum tsao-ko*. *J. Nat. Prob.* **67**: 889-891.
3. Yang, Y., Yan, R. W., Cai, X. Q., Zheng, Z. L. and Zou, G. L. (2008) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko*. *J. Sci. Food Agric.* **88**: 2111-2116.
4. Zhao, Z. Z. and Xiao, P. G. (2010) Encyclopedia of Medicinal Plants. World Publishing Corporation, Hong kong.
5. Lim, T. K. (2015) Edible medicinal and non-medicinal plants. 813-816. *Springer*, Switzerland.
6. Yang, Y., Yue, Y., Runwei, Y. and Guolin, Z. (2010) Cytotoxic, apoptotic and antioxidant activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko*. *Bioresource Technology* **101**: 4205-4211.
7. Kim, M. S., Ahn, E. K., Hong, S. S. and Oh, J. S. (2016) 2,8-Decadiene-1, 10-diol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through inactivation of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- γ B signaling pathway, *Inflammation* **39**: 583-591.
8. Park, H. M., Kim, S. Y. and Hwang, H. U. (2004) A study on the heavy metal contents in herbal medicines: cultivated herbal medicines at North Gyeongbuk area. *J. Environ. Sci.* **13**: 1117-1122.
9. Jo, H. Y., Jeon, J. S., Kim, B. H., Cho, S. H., Park, S. H., Kim, Y. S. and Yoon, M. H. (2011) Safety assessment of liquid-type herbal preparations. *J. Food Hyg. Saf.* **26**: 266-272.
10. Mumtaz, M. and George, J. (1995) Toxicological profile for poly cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Agency for toxic substances and Disease Registry, U.S. Department of health and human services.
11. Shin, H. S. (2010) Improvement of analytical method for benzo(a)pyrene in foods and study on monitoring and exposure. *Contaminated chemical division*, KFDA (Korea food and Drug Safety Administration).
12. Sung, T. K., Lee, J. S. (2012) Benzo(a)pyrene contents in commercial vegetable oils and changes during processing of vegetable oils. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 269-273.
13. Nielsen, T., Jorgensen, H. E., Larsen, J. C. and Poulsen, M. (1996) City air pollution polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *Science of the Total Environment* **189**: 41-49.
14. Guillen, M. D. (1994) Polycyclic aromatic compounds : extraction and determination in food. *Food Additives & Contaminants* **11**: 669-684.
15. Djinojic, J., Popovic, A. and Jira, W. (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Science* **80**: 449-456.
16. Dost, K. and Ideli, C. (2012) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection. *Food Chemistry* **133**: 193-199.
17. 식품의약품안전청 (2009) 생약의 벤조피렌 기준 및 시험방법 제정. 식품의약품안전청 고시 제2009-13호.
18. 식품의약품안전청 (2009) 생약의 벤조피렌 기준 및 시험방법 일부개정. 식품의약품안전청 공고 제2009-302호.
19. 식품의약품안전청 (2011) 생약 등의 잔류, 오염물질 기준 및 시험방법 일부개정. 식품의약품안전청 고시 제2011-27호.
20. 식품의약품안전처 (2019) 대한민국약전 제12차 개정. 식품의약품안전처 고시 제2019-102호.
21. 식품의약품안전청 (2012) 의약품등 시험방법 벨리데이션 가이드라인 적용을 위한 해설서(개정판).
22. Lee, S. R., Kim, A. K., Kim, S. D., Lee, H. K., Lee, H. J., Ryu, H. J., Lee, J. M., Yu, I. S. and Kweon, J. (2017) Monitoring and risk assessment of benzo(a)pyrene content in medicinal Herbs. *Kor. J. Pharmacogn.* **48**: 237-242.
23. Jo, S. A., Kim, S. J., Kim, N. H., Jung, S. J., Kim, H. S., Kimaaaaaaaaaaaaa, K. S., Han, K. Y. and Chae, Y. J. (2011) Analysis of benzo(a)pyrene content in medicinal herbs. *Report of S.I.H.E.* **47**: 94-102.
24. 한국의약품시험연구소 (2009) 한약재 중 벤조피렌 함유량 모니터링 연구. 식품의약품안전청 연구보고서.
25. Fishmes, J., Perrin-Ganier, C., Emperuer-Biosoonet, P. and Morel, J.L. (2002) Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J. Environ. Qual.* **31**: 1649-1656.
26. 식품의약품안전청 (2008) 한약재 표준제조공정지침. (2020. 4. 21 접수; 2020. 5. 18 심사; 2020. 5. 28 게재확정)