pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 3, pp. 217~221 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.217

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

고사리의 독성물질 Ptaquiloside 제거방법 연구

이향희 · 김애경 · 이민규 · 최수연 · 서진종 · 김은선 · 서계원 · 조배식*
광주광역시 보건환경연구원

Study on Processing Methods to Remove Toxic Ptaquiloside from Bracken Fern

Hyang-Hee Lee, Ae-Gyeong Kim, Min-Gyou Lee, Su-Yeon Choi, Jin-Jong Seo, Eun-Sun Kim, Kye-Won Seo, and Bae-Sik Cho*
Health and Environment Research Institute of Gwangju Metropolitan City, Gwangju, Korea
(Received March 2, 2017/Revised April 7, 2017/Accepted May 29, 2017)

ABSTRACT - The ptaquiloside is a carcinogenic compound from bracken fern (*Pteridium aquilinum L*). This study was to evaluate the content of ptaquiloside in bracken fern by various processing methods. The processing methods were heated and immersed time, water exchange number, and so on. Akali hydrolysis and solvent fractionation of ptaquiloside in bracken fern leads to the non-toxic and chemically stable pterosin B. The contents of pterosin B was analyzed by UPLC-MS/MS on mobile phase 3 mM ammonium acetate and methanol. The contents of total pterosin B in non-processing bracken fern in water extraction was 81.0 mg/kg and toxic ptaquiloside of them was 46.4 mg/kg. The heating time of 5 minutes removed 60% about the contents of pterosin B in the bracken fern, and two-thirds of them were already non-toxic pterosin B, namely were not transfered from ptaquiloside. Additional immersed time (12h), the pterosin B in bracken fern was 10 mg/kg, it was removed 87.6% and once every hour, water exchange times were removed 99.5% in comparison with them of untreated bracken fern and two-thirds of them were non-toxic pterosin B. To remove of ptaquiloside in bracken fern, heat, immersion, and water exchange times shall be carried out simultaneously.

Key words : Bracken fern, Ptaquiloside, Pterosin B, UPLC-MS/MS

고사리는 지구상에 가장 많은 식물 중 하나로, 남극대륙을 제외한 모든 대륙에서 광범위하게 분포되어 있는 고사리과의 여러해살이 양치식물이다. 단백질, 칼슘, 철분이 풍부하여 치아와 뼈를 튼튼하게 하고, 신진대사를 촉진시켜 체내의 노폐물을 배출시키며, 식이섬유가 많아 변비 예방과 부기를 빼는데 효과적이다. 우리나라에서는 식생활에 흔하게 볼 수 있는 산채나물로서 봄철에 나오는 어린 싹을 건조시킨 후, 저장해서 사계절동안 섭취하고 있다[1-4].

하지만, 고사리에 함유된 자체의 독성물질인 ptaquiloside는 적절한 조리과정 방법 없이 섭취하면 독성물질이 잔류될 수 있으며, 특히 잎의 끝이 말린 어린 고사리에 가장 많다고 한다. 국제 발암연구센터(IARC; International agency for research on cancer)는 고사리를 동물과 사람의 발암물질로 분류하고 있으며, ptaquiloside는 발암가능성 물질로 분류할 수 없다고 했다. 그러나 ptaquiloside는 고사리의 주된 발암물질로 확인되었다. 독성물질인 ptaquiloside의 사람 노출은 고사리 잎에 많이 함유된 독성물질이 빗물에 의하여 쉽게 토양과 물에 침출되어 지하수로 유입되어 일어난다고 알려졌다[5-9]. 특히, 고사리를 2-3년 동안 먹이로 먹은 소는 방광종양으로 인한 증상으로 혈뇨를 보였으며, 위, 장관 종양 등도 나타내었다. 지역적으로는 브라질, 볼리비아, 스코틀랜드 등에서 비슷한 현상을 보였다[6,10-12].

우리나라 사람들과 대부분의 동양인들은 고사리를 일반 야채식품으로 섭취하고 있으나 그에 따른 별다른 중독사례나 중독병변에 관한 임상보고를 찾을 수 없었다. 이러한 원인은 동양인들이 소량씩 간헐적으로 섭취하여 인체에 큰 영향을 미치지 않았기 때문일 것이다. 그러나 고사리를 장기간 또는 다량 섭취할 때 독성이 유발될 수 있다는 것은 다수의 논문에서 보고되었다[1,2,8].

그래서 고사리를 섭취하기 전 독성물질을 제거하기 위해 물에 침지나 삶기도 하지만 정확한 과학적 근거에 따른 조리방법에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구는 가열 시간, 침지 시간과 침지 횟수를 다양하게 변화

*Correspondence to: Bae-Sik Cho, Health and Environment Research Institute of Gwangju Metropolitan City, Gwangju 61986, Korea
Tel: 82-62-613-7560, Fax: 82-62-613-7567
E-mail: foodcbs@korea.kr

시켜 고사리에 함유된 잔류독성물질을 측정하였다.

Materials and Methods

시료 및 분석 표준물질

생체고사리는 전남 담양근교에서 채취하여 진공포장 후, 냉동 보관하였고, 건고사리는 생체고사리를 5분간 가열하여 햇빛에 건조한 다음, 밀봉 후 실온에 보관하면서 실험에 사용하였다. Ptaquiloside의 함량 분석은 화학적으로 불안정하여 재현성 있는 정량실험이 불가능하여 정량이 가능한 알칼리 가수분해물질인 pterosin B (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., China)을 구입하여 실험을 하였다.

Pterosin B 추출 및 기기분석조건

Ptaquiloside는 화학적으로 불안정하며 pH 8~11 사이에서 열처리에 의해 pterosin B로 전환된다(Fig. 1)[9,12]. 따라서 ptaquiloside를 알칼리에 의한 가수분해 한 다음, 알칼리용액에서 해리되어 있는 화합물에 HCl를 첨가하여 산성 조건에서 비해리화한 후, CH_2Cl_2으로 용매분획(Fig. 2)하여 pterosin B를 추출하였다. 분석기기는 UPLC-MS/MS, UVD를 사용하였으며[13-21], 분석조건과 MS/MS chromatogram은

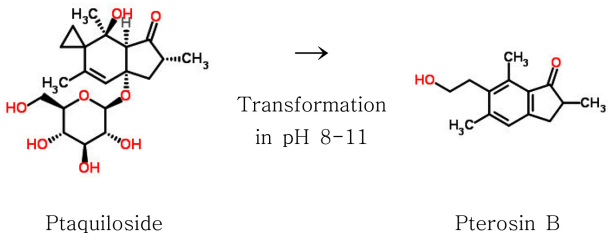

Fig. 1. Structure of ptaquiloside and pterosin B.

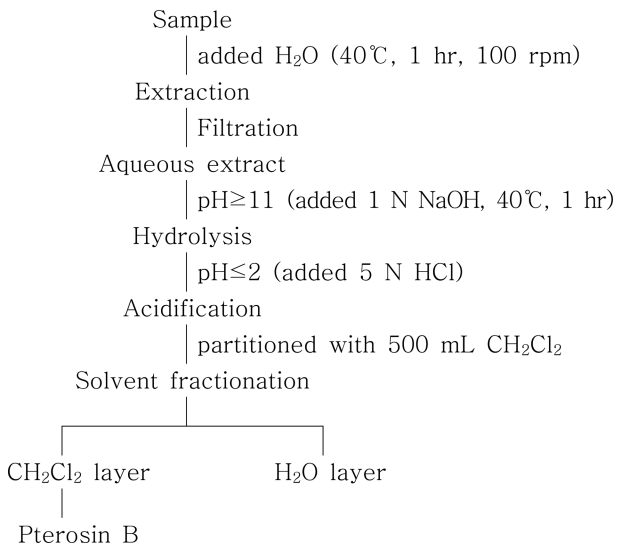

Fig. 2. Extraction of pterosin B from bracken fern.

Table 1과 Fig. 3에 나타내었다. 분석과정의 회수율은 고사리에 인위적으로 일정 농도의 pterosin B를 첨가하여 전처리방법에 따라 추출 후 분석하여 구하였다. 검출한계(LOD; Limit of detection)는 정량한계(LOQ; Limit of quantitation)로 예상 되는 최저 농도의 2배를 첨가, 7반복하여 측정한 후, 시료들의 면적에 대한 표준편차와 표준물질 검량선의 기울기를 이용하여 구하였으며, LOQ는 LOD에 3을 곱하여 구하였다[9,10].

고사리 자체의 ptaquiloside함량

고사리는 ptaquiloside와 pterosin B가 동시에 함유되어 있다. 고사리 자체에 함유된 pterosin B와 ptaquiloside에서 전환된 pterosin B 함량은 생체고사리를 40°C 물로 1시간 추출한 용액과 추가로 1 N NaOH을 가하고 40°C에서 1시

Table 1. The analytical conditions of instruments for pterosin B

Instrument	Parameter	Operation conditions
UPLC	Column	ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 1.7 um, 2.1 × 100 mm
	Mobile phase	A:B = 60:40 → 5:95 A: 3 mM Ammonium acetate, B: MeOH
	Flow rate	0.35 mL/min
	Injection volume	10 μL
	Run time	5 min
	Wavelength	260 nm
MS/MS	Ionization mode	ESI (Positive MRM mode)
	Collision and auxiliary gas	Ar, N_2
	Parent ion	219.1
	Daugther ion	201.1, 145.0
	Cone Energy (V)	40
	Collision Energy (V)	20, 24
	Source temp., desolvation temp. (°C)	120, 200
	Dwell time (s)	0.05

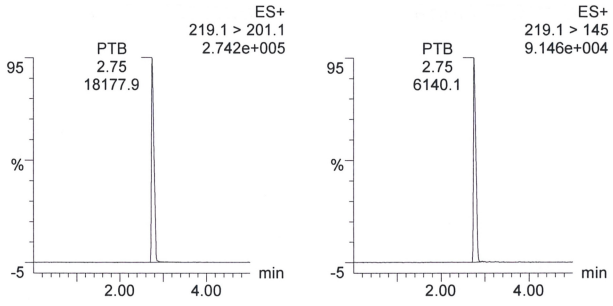

Fig. 3. UPLC-MS/MS chromatograms of ptetosin B. (patrent ion: 219.1, daugther ion: 201.1, 145.0)

간 추출한 용액으로 알칼리 가수분해 수행 전후를 분석하여 측정하여 구하였다. 그리고, 고사리를 5분 가열한 고사리를 가지고 H_2O로 추출한 다음, 알칼리 가수분해 전후의 pterosin B 함량을 측정하여 ptaquiloside 함량을 계산하였다.

시료의 여러 조건별 전처리

고사리를 1, 3, 5, 10 min별로 가열한 후, 잔류독성물질을 측정하였으며, 일정 시간(5 min) 가열 후, 침지시간(0, 1, 3, 6, 12 h)을 변수로 하여, 그리고 일정 시간(12 h) 침지하면서 침지 물 교환 횟수(0, 1, 2, 4, 12회)를 변수로 추가하여 실험하였다. 여러 조건별로 전처리하여 얻은 시료를 대상으로, 일정크기(1 cm)로 세절한 다음, Table 1의 전처리법에 의해 고사리에 남아 있는 ptreosin B 함량의 측정하였다. 결과값은 3반복 시험하여 측정한 값을 가지고 평균과 표준편차를 구하여 정리하였다.

Results and Discussion

고사리의 수분함량

생고사리의 수분함량은 91.0 ±0 .4%이었으며, 5분간 가열하여 햇빛에 건조한 다음, 밀봉 후 실온에 보관하면서 실험에 사용한 건고사리의 수분함량은 8.3 ± 0.2%이었다. 농식품종합정보시스템의 국가표준식품성분표[22]에 따르면, 생고사리의 수분함량은 93%, 건고사리는 12.2%로 알려져 있다.

전처리 및 기기분석방법에 대한 회수율, LOD, LOQ

고사리에 인위적으로 일정 농도의 pterosin B를 첨가하여 전처리방법으로 추출 후, 분석하여 구한 회수율은 95.0 ± 2.1%였고, 검출한계(LOD)는 0.018 mg/L 였으며, 정량한계(LOQ)는 0.055 mg/L로 나타났다. 다른 문헌에 따르면, pterosin B의 회수율은 95.5%로 본 실험과 유사하였으며, 검출한계(LOD)는 0.15 μg/L에서 1.95 mg/L 범위로 다양하게 나타났다[9,10,12]. 이는 pterosin B 추출방법과 분석기기에 따라 차이가 있을 것으로 판단되었다.

고사리의 ptaquiloside 함량

고사리에 들어있는 ptaquildoside 함량은 불안정하여 정확하게 분석하기 어려워 pterosin B로 전환시켜 분석하였다. 즉, 고사리의 ptaquiloside는 Fig. 1과 같이 ptaquiloside로부터 가수분해하여 pterosin B로 전환된 함량에서 고사리 자체에 들어 있는 pterosin 함량을 뺀 수치로 표현하였다. 생고사리는 먼저 H_2O로 추출한 다음, 알칼리 가수분해 전・후의 pterosin B 함량과 고사리를 5 min 가열한 후, H_2O로 추출한 다음, 알칼리 가수분해 전・후의 pterosin B 함량을 비교해 보았다(Table 2).

고사리를 H_2O로 추출(40°C, 1 h)한 후, 알칼리 가수분해

Table 2. Pterosin B and ptaquiloside contents (mg/kg) of bracken fern according to processing methods

Processing methods	Pterosin B (mg/kg)	Ptaquiloside (mg/kg)
H_2O extraction	35.6 ± 2.5	46.4
addition of akali hydrolysis	81.0 ± 2.6	
Heated (5 min) → H_2O extraction	21.6 ± 0.3	10.8
addition of akali hydrolysis	32.4 ± 2.0	

전・후의 pterosin B 함량은 알칼리 가수분해 전 H_2O 추출물에 35.6 mg/kg 함유되어 있었으며, 알칼리분해 후, 81.0 mg/kg이었다. 따라서, 고사리의 ptaquiloside 함량은 약 46.4 mg/kg이었다. 고사리의 독성물질 함량은 지역에 따라 굉장히 광범위하며, 70 mg/kg에서 12,900 mg/kg까지 지역에 따라 다양한 것으로 보고되었다[6,9,10].

그리고 5분 가열 후, 고사리에 H_2O로 추출한 다음, 알칼리 가수분해 전・후의 pterosin B 함량의 결과로 부터 ptaquiloside 함량은 10.8 mg/kg이었다. 즉, 5 min 가열은 독성물질인 ptaquiloside가 76.7% 제거됨을 알 수 있었다.

다양한 전처리에 따른 pterosin B 함량

실험조건을 다양하게 하여 가열시간별(0, 1, 3, 5, 10 min), 일정 시간(5 min) 가열 후 침지시간별(0, 1, 3, 6, 12 h), 일정 시간(12 h) 침지하는 동안 침지 물 교환 횟수(0, 1, 2, 4, 12회)를 추가로 하여 잔류되어 있는 pterosin B 함량을 측정해 보았다. 생고사리를 최대 10분 동안 데치면서 pterosin B 잔류량을 측정해본 결과(Fig. 4), 생고사리를 5분 가열로 인해 32.4 mg/kg으로 생고사리에 비해 60%정도가 제거되었고, 10분 동안 가열하면 27.2 mg/kg으로 약 66.4%가 제거되었다. 이처럼 가열 시간에 정비례하게 독성물질이 제거되지는 않고, 5분 이후에는 완만하게 감소하였다.

여기에 침지(12h)를 추가하면, 잔류되는 양이 10 mg/kg으로 생고사리에 비해 약 88%가 제거되었다(Fig. 5). 또한 매시간 물교환 작업 추가로 하면 0.4 mg/kg으로 생고사리에 비해 99.5%이상이 제거되었으며(Table 3), 이중 2/3에 해당하는 pterosin B는 Table 2에서 말해 주듯이 침지와 물교환 작업을 하기 전 5 min 가열로 인해 이미 ptaquiloside가 알칼리분해에 의해 전환되어 생긴 pterosin B가 아니라 알칼리분해 전부터 독성을 잃은 상태로 존재한 pterosin B 함량이라 할 수 있어 잔류된 독성물질로 환산한다면 0.1 mg/kg 정도라고 할 수 있다.

이처럼 고사리의 독성물질인 ptaquiloside는 열에 약하고 물에 잘 녹는 성질을 가지고 있다[6,9]. 따라서 독성물질 제거는 가열뿐만 아니라, 추가적으로 물에 담가주면서 물을 여러 번 갈아주면 훨씬 효과적임을 알 수 있었다. 이는 과거 우리 조상들이 고사리를 삶아 물에 오랫동안 불려서

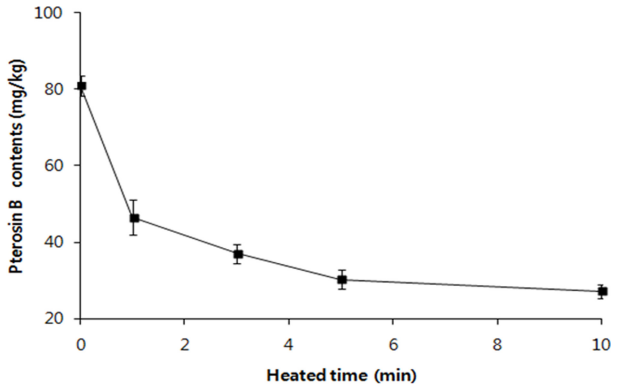

Fig. 4. Pterosin B contents of bracken fern by heated time.

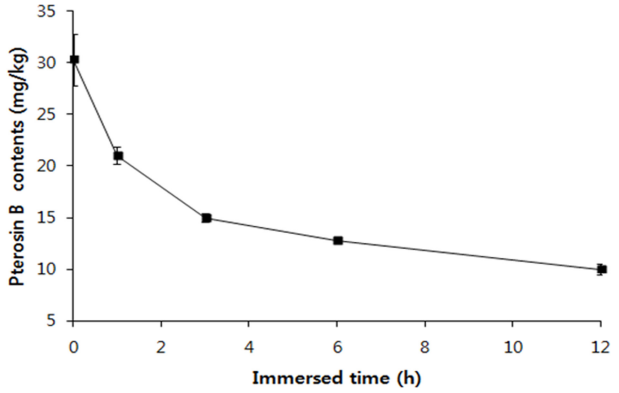

Fig. 5. Pterosin B contents by immersed time with heated 5 min.

Table 3. Pterosin B contents in bracken fern by water exchange number during immersed time (12h)

Number of water exchange	Time (h) of water exchange	Pterosin B (mg/kg)
-	-	34.6 ± 3.72
1	12	14.8 ± 2.28
2	6, 12	4.9 ± 0.59
4	3, 6, 9, 12	2.0 ± 0.32
12	1, 2, 3 ... 10, 11, 12	0.4 ± 0.02

독소 성분을 상당부분 제거한 후에 조리하여 먹은 이유를 설명해 주는 것으로 판단된다. 따라서 독성물질의 제거는 가열시간과 더불어 침지와 물 교환 횟수도 동시에 이루어져야 한다.

건고사리의 침지 시간에 의한 물 교환 횟수별 처리

생고사리를 5분간 가열하여 햇빛에 건조하여 가공된 건고사리를 가지고, 일정 시간(12 hr) 침지하는 하면서 침지 물 교환 횟수(0, 1, 2, 4, 12회)를 추가로 하여 잔류되어 있는 pterosin B 함량을 측정해 보았다.

실험 결과, 매시간 물교환 작업 추가로 하면 ptersoin B

Table 4. Content of pterosin B in dried bracken fern by water exchange number during immersed time (12h)

Water exchange number	Pterosin B (mg/kg)	
	Non calibrated in water content	Calibrated in water content
-	180.0 ± 34.4	17.7 ± 3.4
1	52.4 ± 12.2	5.1 ± 1.2
2	31.0 ± 2.5	3.0 ± 0.3
4	20.6 ± 5.0	2.0 ± 0.5
12	11.5 ± 2.5	1.1 ± 0.3

의 잔류량은 11.5 mg/kg이었으며(Table 4), 이는 건조무게로 계산했을 때이며, 생고사리와 비교하기 위해 수분함량을 보정하여 계산하면 약 1 mg/kg이 잔류되어 있고, 이것 역시 앞서 Table 2에서 말해 주듯이 잔류량의 2/3에 해당하는 pterosin B는 5 min 가열로 인해 이미 ptaquiloside가 알칼리분해에 의해 전환되어 생긴 pterosin B가 아니라 알칼리 분해 전부터 독성을 잃은 상태로 존재한 pterosin B 함량이므로, 실제 독성물질은 훨씬 더 적은 양으로 판단된다.

국문요약

Ptaquiloside는 고사리에 들어 있는 발암성 물질이다. 본 연구는 다양한 조리법에 따라 고사리에 함유된 ptaquiloside을 측정해 보고자 하였다. 조리법은 가열, 물에 침지, 물 교환 횟수 등이었다. 알칼리 가수분해와 용매분획은 ptaquiloside를 화학적으로 안정한 물질인 pterosin B로 전환시켜 주었다. Pterosin B 함량은 이동상용매로 3 mM ammonium과 메탄올 용매를 사용하여 UPLC-MS/MS로 분석하였다. 조리과정이 없는 생고사리의 H_2O추출물에 함유된 pterosin B함량은 81 mg/kg으로 검출되어 독성물질 ptaquiloside는 46.4 mg/kg이었다. 5분의 가열 시간 후 고사리의 pterosin B 함량은 약 60%정도 제거시켜주며, 이 중 2/3는 ptaquiloside에서 전환된 pterosin B가 아닌 고사리 고유의 ptersoin B 함량이었다. 12시간 침지를 추가한 고사리는 처리하지 않은 고사리에 비해 약 88%, 또한 매시간 물교환 작업을 추가시 99.5%까지 제거됨을 알 수 있었다. 따라서 독성물질 ptaquiloside의 제거는 가열시간과 더불어 침지와 물 교환 횟수도 동시에 이루어져야 함을 알 수 있었다.

References

1. Park, C.H., Kim, K.H., Yook, H.S.: Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of bracken (*Pteridium aquilinum* Kuhn) according to cooking methods. *Korean J. Food & Nutr.*, **27**, 348-357 (2014).

2. Lee, S.S., Jeong, J.G., Choi, C.H., Kim, J.H.: A Herbalogical study on the plants of pteridaceae in Korea. *Kor. J. Herbology*, **23**, 33-40 (2008).
3. Rasmussen, L.H., Donnelly, E., Strobel, B.W., Holm, P.E., Hansen, H.C.B.: Land management of bracken needs to account for bracken carcinogens-a case study from Britain. *Journal of environmental management*, **151**, 258-266 (2015).
4. Clauson-Kaas, F., Jensen, P.H., Jacobsen, O.S., Juhler, R.K., Hansen, H.C.B.: The naturally occurring carcinogen ptaquiloside is presents in groundwater below bracken vegetation. *Environmental toxicology and chemistry*, **33**, 1030-1034 (2014).
5. Yamada, K., Ojika, M., Kigoshi, H.: Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Natural product reports*, **24**, 798-813 (2007).
6. Gil da Costa, R.M., Bastos, M.M.S.M., Oliveira, P.A., Lopes, C.: Bracken- associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *Journal of hazardous materials*, **203**, 1-12 (2012).
7. Masaru, Y., Toshiyuki, S.: Acute toxicity of braxin C, a bracken toxin in guinea pigs. *The journal of toxicological sciences*, **19**, 17-23 (1994).
8. Sheo, H.J., Lee, M.Y.: A toxocological study of young fronds of bracken fern (Pteridium aquilinum var latiusculum) collected in Kwang Ju area. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **18**, 255-264 (1989).
9. Pia, H.J., Ole, S.J., Hans C.B.H., Rene, K.J.: Quantification of ptaquiloside and pterosin B in soil and groundwater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Agric. Food Chem*, **56**, 9848-9854 (2008).
10. Angela, C.T., Augusta, J.S., Luz, M.S.P., Betty, M.D., Evangelina, M.F.: Risk by human health for invasion of Pteridium arachnoideum, in Bolivar, Ecuador paquiloside's content in fronds and milk. *International Journal of Applied Science and Technology*, **4**, 84-94 (2014).
11. Somvanshi, R., Lauren, D.R., Smith, B.L. Dawra, R. K. Sharma, O.P., Sharma V.K., Singh, A.K., Gangwar, N.K.: Estimation of the fern toxin, ptaquiloside, in certain indian ferns other than bracken. *Current Science*, **91**, 1547-1552 (1996).
12. Paulo, C.R.A., Hans, C.B.H.: Determination of ptquiloside and pterosin B derived from bracken (Pteridium aquilinum) in cattle plasma, urin and milk. *Journal of Chromatography B*, **951**, 44-51 (2014).
13. Lars, H.R., Bjorn, S., Elizabeth, S.: Ptaquiloside in bracken spores from Britain. Chemosphere, **90**, 2539-2541 (2013).
14. Tjatur Rasa, F. S., Saito, T., Satoh, H.: The hemolytic activity of bracken extracts and guinea pigs. *J. Vet. Med. Sci*, **61**, 129-133 (1999).
15. Rasmussen, L.H., Hansen, H.C.B., Lauren, D.: Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. Chemosphere, **58**, 823-835 (2005).
16. Rasmussen, L.H., Jansen, L.S., Hansen, H.C.B.: Distribution of the carcinogenic terpen ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *J. Chem. Ecol*, **29**, 771-778 (2003).
17. Francesco, B., Giorgio, B., Rosario, N., Saverio, R.F., Francesco, D.G., Romano, M., Adriano, S., Cinzia, R., Antonio, T., Franco, R., Valeria, R., Sante, R.: A new, very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. *Food chemistry*, **124**, 660-665 (2011).
18. Clauson-Kaas, F., Hansen, H. C., Strobel, B. W.: UPLC-MS/MS determination of ptaquiloside and pterosin B in preserved natural water. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **408**, 7981-7990 (2016).
19. Agnew, M.P., Lauren, D.R.: Determination of ptaquiloside in bracken fern (Pteridium esculentum). *J. Chromatogr.*, **538**, 462-468 (1991).
20. Skourti-Stathaki, E., Clauson-Kaas, F., Brandt, K.K., Rasmussen, L.H., Hansen, H.C.B.: Dissipation of pterosin B in acid soils-tracking the fate of the bracken fern carcinogen ptaquiloside. *Chemosphere*, **165**, 453-459 (2016).
21. Clauson-Kaas, F., Ramwell, C., Hansen, H.C.B., Strobel, B.W.: Ptaquiloside from bracken in stream water at base flow and during storm events. *Water research*, **106**, 155-162 (2016).
22. http://koreanfood.rda.go.kr/kfi/fct/fctFoodSrch/list