J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 2, pp. 169~173 (2009)

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

한약재중의 아플라톡신 오염도 조사

박성규* · 장정임 · 하광태 · 김성단 · 김욱희 · 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, Younh-hee Choi, Hyun-jeung Seung, Si-jung Kim, Kyeong-ah Lee, Han-bin Jo, Byung-hyum 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, giycyrrhizae radix et rhizoma) collected in Yakyeang markets in Seoul. Aflatoxin levels were quantified by the immunoaffinity column clean-up method followed by performance liguid 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 나타내며[1-2] 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer IARC)에서 인체 발암성이 확실한 발암물질인 Group 1로 분류하고 있다[3].

아플라톡신은 완전히 건조되지 않은 농산물, 생약 등이 환기가 잘 되지 않아 습도 및 온도가 높은 장소에서 장기간 저장되거나 홍수・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 감초 와 같은 일부 생약에서 아플라톡신 오염 사례가 보고된 바 있으며[4-6], 독소를 생산하는 곰팡이가 발생한 경우 생산된 독소가 미량(10 ug/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 충해가 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 예상 되고 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 사료된다[7].

지금까지 자연발생적으로 알려진 아플라톡신은 B1>M1>G1>M2>B2>G2 의 순으로 독성이 강하며, 이들 6종의 아플라톡신이 위생학적 측면에서 매우 중요하며 세계적으로 규제하고 있는 국가가 많다[8]. 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 표준품을 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

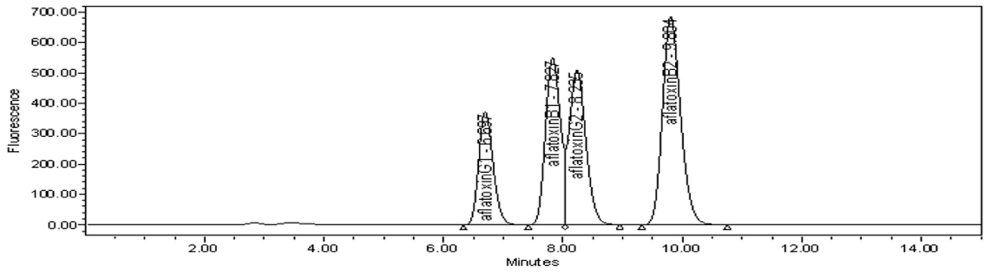
아플라톡신 B1, B2, G1, G2 표준품 각 각 1 ml를 정확하게 취하여 아세토니트릴(3) · 벤젠(97)을 넣어 정확히 100 ml로 하여 표준용액으로 하고, 아플라톡신 혼합표준용액을 methnol로 녹여 사용하였다.

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 노출되기 않도록 시험액 15 ml를 취하여 immuno affinity column에 통과한 후 Photochemicalcell으로 유도체화시킨 후 시험용액으로 사용 하였다.

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 μm, Thermo), 이동상은 Methaol 25% : Acetonitrile 15% : Water 60%로 유속은 1.0 ml/min, 시료용액 주입량은 50 μl로 하여 분석하였다.



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	aflatoxinG1	6.697	6210040	15.59	371994	100.000	ppb
2	aflatoxinB1	7.827	9438972	23.70	549727	100.000	ppb
3	aflatoxinG2	8.235	9810227	24.63	509351	25.000	ppb
4	aflatoxinB2	9.804	14364124	36.07	685053	25.000	ppb

Fig. 1. HPLC chromatogram of aflatoxin standard.

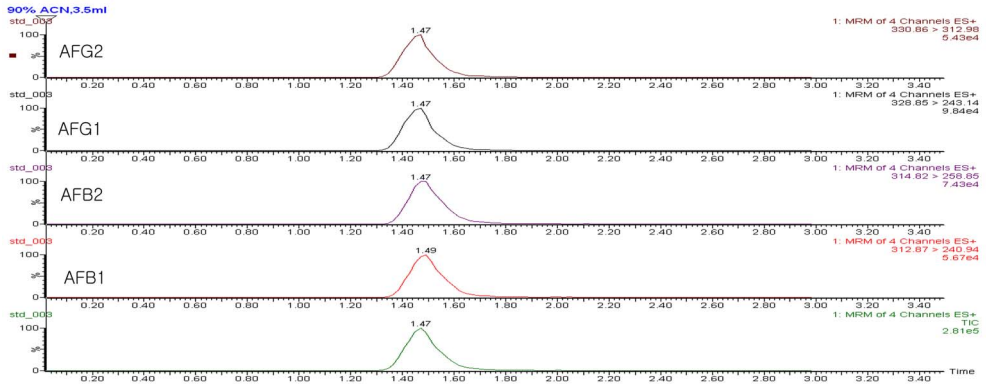


Fig. 2. LC/MS/MS chromatogram of aflatoxin standard mixture.

결과 및 고찰

아플라톡신 혼합표준용액의 HPLC-FLD 및 LC/MS/MS 크로마토그램은 Fig. 1, Fig. 2과 같았으며 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, G_2의 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 홍화, 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 실험결과 아플라톡신 B_1은 98.2±3.3, 89.7±1.5, 103±2.1, 89.0±1.5으로 비교적 양호한 회수율을 보였으며, 감초, 반하, 원지, 빈랑자 등에서는 상대적으로 약간 낮은 경향을 보였다. 본 실험 결과는 immunoaffinity column과 HPLC-FLD를 도입하여 보고한 chan 등[9] 또는 Jang 등[10]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 중10건(6.8%)에서 아플라톡신 오염이 확인 되었고, 오염수준은 아플라톡신 B_1으로서 0.45~79.15 μg/kg, B_2로서 0.04~15.02 μg/kg, G_1으로 0.71 μg/kg~5.32 μg/kg, G_2으로 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(B_1, B_2, G_1, G_2)이 모두 검출되어, Table 4. 의 조건으로 LC/MS/MS 확인 하였다. 빈랑자에서는 4.71~97.82 μg/kg으로 조사대상 생약보다 상대적으로 검출량이 높게 나타났으며, 국내생약기준(아플라톡신 B_1으로, 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 aflatoxions

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

국 가		규 제 대 상	규제기준(μg/kg)	
			아플라톡신B_1	총아플라톡신 (B1+B2+G1+G2)
한 국	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	20	-
		- 쌀/식용유	10	
	생 약*	- 약용식품의원료 - 추출물 및 그 제제	5	-
유럽연합		- 강황(울금)/건강(생강)/육두구/후추속	5	10
독 일		- 생약제재를 포함하는 의약품의 원료물질(원생약)	2	4
유럽약전		- 하르파고피툼근(천수근), 센나열매, 생강(건강)	2	4
아르헨티나		- 약초, 약재, 생약제제	5	20
		- 내복용, 국소용 최종 생약제제	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 있으며[11], 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 농산물의 운송, 유통, 저장의 단계에서 따뜻하고 습기가 많은 조건에 노출되었을 때 오염이 발생하게 된다[12]. 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 된다[13]. 또한 수확

후 소비까지 시간이 길수록 아플라톡신 오염이 증가 하게 된다는 것은 예측할 수 있을 것이다. 현재 생약에 대하여 검출된 이력이 있는 품목을 대상으로 아플라톡신 B_1으로 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 B_1으로 5 μg/kg 및 총 아플라톡신으로 20 μg/kg로 설정하여 관리하고 있으며 독일 경우 생약을 포함하는 의약품 및 식품에 대하여 아플라톡신 B_1은 2 μg/kg이하로 총 아플라톡신으로 4 μg/kg이하고 동일하게 규정하고 있다[14].

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 B_1로서 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

1. Campell. T.C., and L. Stoloff.: Implication of mycotoxins for health. *J.Agric Food Chem.*, **22**, 1006-1015 (1974).
2. Chu. F.s.: Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Adv. Appl. Microbiol.,* **40**, 352-357 (1977).
3. Roy, A. K., Sinha, K. K. and Chourasia, H. K. aflatoxin contamination of some common drug plants. *Appl. Environ. Microbiol*. **54**: 842-843 (1988).
4. Rief, K. and Metzger, W. Determination of aflatoxins in medicinal herbs and plants extracts. *J. Chromatgr. A.* **692**:131-136 (1995).
5. 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. Chromatgr: A* **1048**: 25-29 (2004).
6. D' Mello, J. P. F. and Macdonal, a. M. C. Mycotoxins. *Animal Feed Sci, Technol,* **69**: 155-166 (1997).
7. Cho, S. Y. Contamination and Detoxification of Aflatoxins. Kor. J. Pharmacogn. **38**:205-216 (2007).
8. 하덕모; 최신식품미생물학, 신광출판사 (1995).
9. Chan D., MacDonard 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).
10. 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).
11. 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).
12. Kang K. J., Park J. H. and Cho J. I.: Control of aflatoxins and characteristics of the quality in doenjang(soybeen paste)prepared with antifungal bacteria *Korea J. Food Sci. Technol.* **32**(6),1258-1265 (2000).
13. 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).
14. 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(doenjang) and soy sauce (kanjang) by traditional method. *J. Food prot*. **51**, 938-945 (1988).