Kor. J. Pharmacogn. 51(4): 270 ~ 277 (2020) https://doi.org/10.22889/KJP.2020.51.4.270

LC-MS/MS를 이용한 종자류 생약의 곰팡이독소 동시분석 및 위해도 평가

최은정* · 박영애 · 최수정 · 정삼주 · 박윤선 · 황인숙 · 유인실 · 신기영 서울시보건환경연구원

Simultaneous Analysis of Mycotoxins and Risk Assessment in Seeds using LC-MS/MS

Eun Jung Choi*, Young Ae Park, Su Jeong Choi, Sam Ju Jung, Youn Sun Park, In Sook Hwang, In Sil Yu, and Gi Young Shin

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gyeonggido 13818, Korea

Abstract – This study analyzed mycotoxins, aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , fumonisin B_1 , B_2 , ochratoxin A and zearalenone, using LC-MS/MS and conducted risk assessment on 54 samples of seeds distributed in SeoulYangnyeongsi and the management status of extramural herbal dispensary facility. The matched calibration showed a good linearity as observed in 6 concentration levels(r^2 >0.999) as a result of method validation applied with Arecae semen. Limits of detection(LOD) and quantification(LOQ) were in the range of 0.02-0.11 µg/kg and 0.08-0.34 µg/kg, respectively. Recoveries also estimated, ranging from 65.1-99.7% with relative standard deviation(RSD) 0.5-6.3%. As a result of the method on 54 samples, mycotoxins were detected in 16 samples. Among them, two Thujae semen showed a degree of concentration that exceeded the aflatoxin specification. In the risk assessment, the human exposure safety standard values were calculated as ADI(Acceptable Daily Intake) for aflatoxin B_1 , fumonisin and zearalenone. Ochratoxin A was calculated as PTWI(Provisional Tolerable Weekly Intake). The MOE(Margine of Exposure) of aflatoxin B_1 was in the range of 40.36-3536.88. And no items exceeded 100% in %TDI(Tolerable Daily Intake) and %TWI(Tolerable Weekly Intake) of fumonisin, zearalenone and ochratoxin A.

Keywords - Mycotoxin, LC-MS/MS, Seeds

곰팡이독소(mycotoxin)는 Aspergillus속, Fusarium속 및 Penicillium속 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사 산물로 사람과 동물에 간암, 식도암, 신장장애 등의 건강상 장해를 일으킨다. 1) 이러한 곰팡이독소는 400여종이 알려져 있으며, 식품첨가물, 잔류농약보다 높은 위험성을 갖고 있어 국제사회에서 중요하게 다루어지고 있고, 현재까지 신종 독소 및 그위험성에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다. 2-4)

국내 한약은 동물, 식물 또는 광물에서 채취된 것으로 주로 원형대로 건조, 절단 또는 정제된 생약⁵⁾으로 정의하고 있으며, 생산단계에서 일반 농산물과 같은 개념으로 재배되고 유통되어, 생육기간, 저장, 유통 중에 오염된 곰팡이에의해 곰팡이독소를 생성하게 된다.⁶⁾ 우리나라의 한약재는

2008년 생약의 곰팡이독소 허용기준 및 시험 방법에 따라 감초 등 9품목에 대하여 곰팡이독소 중 아플라톡신 B_1 을 $10~\mu g/kg$ 이하로 기준을 신설하였고, 7 최근 개정된 식품의약 품안전처고시에 따라 현호색을 포함하여 21품목을 대상으로 총 아플라톡신(B_1 , B_2 , G_1 , G_2 의 합) $15~\mu g/kg$ 이하, 아플라톡신 B_1 으로서 $10~\mu g/kg$ 이하로 관리되고 있다. 8

곰팡이독소에 관한 연구는 국내의 경우 HPLC-FLD로 분석한 아플라톡신에 관한 연구가 대부분이며, ^{9,10)} 국외에서는 LC-MS/MS를 이용한 곰팡이독소의 개별 및 동시 분석법과 오염도의 모니터링에 대한 연구가 보고되고 있다. ^{11,12)} HPLC-FLD를 이용한 아플라톡신 분석법은 유도체화 과정이 필요하므로 분석시간이 길고, 아플라톡신 검출 시 LC-MS/MS로 재확인이 필요하며, 여러 종류의 곰팡이독소와 동시분석이 어려운 단점이 있다. ^{13,14)} 그러나 LC-MS/MS는 미량의 물질도 정량이 가능한 고감도 분석 장비로 정확성과 선택성

*교신저자(E-mail):planet25@seoul.go.kr (Tel):+82-2-940-9815 이 높으며, 한 번의 전처리로 곰팡이독소의 동시분석이 가능한 장점이 있다. 곰팡이독소는 한 가지만 선택적으로 오염되는 것이 아니라 여러 독소가 동시 오염이 가능하고, 이러한 현상은 독성의 상승작용을 일으킬 수 있으므로 $^{15,16)}$ 동시분석에 따른 오염도 수준 파악이 필요하다. 따라서 최근식품공전 유해물질시험법에 LC-MS/MS를 이용한 이플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , 오크라톡신 A, 제랄레논, 푸모니신 B_1 , B_2 동시분석법을 신설하여 식물성 원료 및 가공식품으로 확대하였다. 17,18

본 연구에서는 이,¹⁹⁾ 김²⁰⁾과 Han²¹⁾등의 모니터링 결과를 토대로 대한민국약전 및 대한약전외한약(생약)규격집에서 아플라톡신의 기준이 설정되어 있는 한약재 품목 중 종자류를 대상으로 아플라톡신(AFB₁, B₂, G₁, G₂), 푸모니신(FUMB₁, B₂), 오크라톡신 A(OTA), 제랄레논(ZEA)을 LC-MS/MS를 이용해 동시분석 하였다. 또한 유효성을 검증함으로써 8가지 곰팡이독소의 오염수준을 파악하고, 곰팡이독소의 인체노출량을 산출하여 위해수준을 평가함으로써 곰팡이독소의 효율적인 분석법을 모색하고 위해평가에 관한 기초자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 대한민국약전 및 대한약전외한약(생약)규격집의 충아플라톡신 기준이 설정되어 있는 한약재 21품목 중총 아플라톡신의 검출율이 높은 ^[9-21] 종자류 6품목 54건을 대상으로 2019년 서울약령시와 서울시내 원외탕전실에서한약재를 구매하여 실험재료로 사용하였다(Table I). 시료는 가천대학교 한의과대학 이영종 교수가 대한민국약전 및 대한약전외한약(생약)규격집을 근거하여 기원식물 사용부위 등을 감별한 후 분쇄기로 분쇄하고 밀봉하여 냉동보관(-20°C)하여 분석에 사용하였다.

표준품 및 시약 – 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 표준품은 CFUM Oskar Tropitzsch GmbH (Germany)사, 푸모니신 B₁,

 B_2 는 Romer(USA)사, 오크라톡신 A 및 제랄레논은 Sigma-Aldrich(USA)사를 사용하였다. Methanol 및 acetonitril(J.T Baker, USA)은 HPLC등급 제품의 용매를 사용하였고, ammonium formate(Sigma-Aldrich, USA)와 formic acid (Fisher Chemical, USA)는 MS등급을 구입하여 사용하였다. 시료의 여과는 유리섬유여과지(Wathman GF/A)(Wathman TM, UK)를 사용하였고, 정제에 사용된 고체상 추출 컬럼 (Solid Phase Extract, SPE)은 Isolute(Biotage, 3 mL, UK)를 사용하였다.

분석기기 및 장치 - 시료의 분쇄는 DA338(Daesung Artlon, Korea)을 사용해 균질화 하였고, sonicator는 CPX8800H(Branson, USA)를 이용하여 추출하였다. 원심분리기는 TOMY MX-301(TOMY SEIKO CO., LTD, Japan)을 사용하였다.

HPLC와 LC-MS/MS는 Vanquish(ThermoFisher Scientific, USA)와 TSQ- Altis(ThermoFisher Scientific, USA)를 연결하여 분석하였다.

분석조건은 8종의 곰팡이독소를 분리하기 위해서 구배 (Gradient)조건을 이용하였으며, Table II, Table III과 같다.

시료 전처리 - 분쇄한 시료 2.5g에 0.1% formic acid을 함유한 50% acetonitril용액 20mL을 가하고, 30분간 추출한후 3,700 G에서 10분간 원심분리 하였다. 이 액을 유리섬유여과지로 여과한 후 여액 3 mL에 물을 가해 15 mL가 되게 하여 추출액으로 하였다.

정제는 고체상 추출 컬럼인 Isolute에 acetonitril과 물을 각각 2 mL를 주입하여 활성화 시킨 후 추출액 5 mL를 통과시켰다. 이어서 물과 10% acetonitril 용액 2 mL를 통과 시킨후 Isolute 내에 남아 있는 용액을 제거하였다. 그후 0.1% formic acid을 함유한 acetonitril 용액 2 mL와 methanol 4 mL로 용출 시킨 후 50° C에서 질소 건고 하였다. 건고물에 0.1% formic acid을 함유한 50% methanol 용액 1 mL를 가해 용해 시킨 후 필터(PTFE, $0.2 \text{ }\mu\text{m}$)로 여과한 액을 LC-MS/MS로 분석하였다. 17

Table I. List of seeds for monitoring of 8 mycotoxins

Sample name	Korean medicinal herbs name	Country (No. of samples)	No. of samples
Persicae semen	도인	South Aflica(5), Iran(4). Turkey(4), China(1)	14
Nelumbinis semen	연자육	Vietnam(11)	11
Arecae semen	빈랑자	Indonesia(10)	10
Armeniacae semen	행인	China(7), South Aflica(2) Turkey(1)	10
Trichosanthis semen	괄루인	China(6)	6
Thujae semen	백자인	China(3)	3
Total			54

272 Kor. J. Pharmacogn.

Table II. Analy	vtical conditions	of LC-MS/MS	for mycotoxins

Devices	Parameters	Conditions								
	Column	Hypersil GOLD TM (Hypersil GOLD TM $C_{18}(100 \times 2.1 \text{ mm}, 1.9 \mu\text{m})$							
	Mobile phase	(A) 0.1 mM Ammor	nium forma	ite 0.1% fo	ormic acid	in Distilled	water			
	Moone phase	(B) 0.1 mM Ammonium formate 0.1% formic acid in Methanol								
HPLC	Gradient	Time(min)	0	1	6	7	7.5	11		
		Solvent A(%)	70	70	20	20	70	70		
	Flow rate	0.3 ml/min								
	Injection volume	5 μl								
		ESI (electro-spray ionization) positive, negative								
MS/MS		Pos Ion Spray Volta	Pos Ion Spray Voltage(V): 3500							
W15/W15		Neg Ion Spray Volt	Neg Ion Spray Voltage(V): 2500							
		Vaporizer Temp. (°C	C): 450							

Table III. LC/MS-MS parameters for mycotoxins determination

			Product ion						
Compound name	Retention time(min)	Precursor ion (m/z)	Quantifier (m/z)	Collision Energy (V)	Qualifier (m/z)	Collision Energy (V)			
AFB ₁	5.31	312.950	285.021	23.65	240.975	39.08			
AFB_2	5.01	315.000	287.000	25.73	258.917	30.55			
AFG_1	4.73	328.962	243.000	27.93	200.030	36.00			
AFG_2	4.33	330.962	312.929	25.20	245.000	30.62			
$FUMB_1$	6.52	722.250	334.167	40.00	352.167	37.00			
$FUMB_2$	7.27	706.417	336.167	38.00	318.167	40.00			
OTA	7.38	403.962	238.946	24.86	220.946	38.36			
ZEA	7.37	317.038	174.929	24.29	130.929	29.71			

분석법 유효성 검증 - 유효성 검증은 식품의약품안전평 가원의 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인(2015)²²⁾ 과 DG SANTE(2017)²³⁾를 근거로 수행하였다. 매질효과 (matrix effect), 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification), 정확성 (accuracy), 정밀성(precision)을 평가하였다. 매질효과는 6단계 농도의 solvent standard와 matrix matched standard를 사용하여 확인하였고, 매질효과는 다음과 같이 계산하였다.

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

검출한계와 정량한계는 8종의 곰팡이 독소가 검출되지 않은 빈랑자에 6단계 농도가 되도록 표준용액을 첨가하고 5회 반복 실험하여 LOD=3.38/S, LOQ=108/S식으로 계산하였다(δ: 회귀선 y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기).

정확성과 정밀성 또한 8종의 곰팡이독소가 검출되지 않은 빈랑자에 최종 농도가 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 는 $0.25~\mu g/kg$, $1.0~\mu g/kg$, $3.0~\mu g/kg$, $7.0~\mu g/kg$, $7.0~\mu$

Recovery(%) =

Measured concentration by Matrix matched standard×100 Spiked concentration

위해도 평가 – 식품의약품안전평가원의 인체적용제품 위해성평가 공통지침서(2019)에 따라 아플라톡신 B_1 , 푸모니신(B_1 , B_2 의 합), 오크라톡신 A 및 제랄레논의 위해도평가를 실시하였다. 위해도 평가는 위험성확인, 위험성결정, 노출량평가, 위해도결정 4단계로 수행 된다. 24 그 중 노출량평가는 곰팡이독소 오염도, 한약재의 일일 복용량, 체중 등을 활용하여 산출하였다. 한약재의 일일 복용량은 한약(생약)의 기

Table IV. Evaluation results of health based guidance value

Year	Compound name	Health based guidance value
2012	OTA	TWI 0.11 μg/kg b.w/day
2013	FUM	TDI 1.65 µg/kg b.w/day
2013	ZEA	TDI 0.4 µg/kg b.w/day
2014	AF	Recommended risk assessment by MOE

준 미설정 잔류농약 적부판정 해설서²⁵⁾를 참고하였고, 평균체중은 통계청의 시도별 성별 연령별 평균 체중 분포 현황²⁶⁾에 따라 65.82 kg을 적용하였다. 또한 오염도 자료 중곰팡이독소가 1건이라도 검출된 한약재는 검체 건수와 무관하게 전량 노출평가에 포함시켰으며, 곰팡이독소가 검출되지 않은 한약재는 평가에서 제외하였다. 노출 허용 수준의 기준값이 되는 인체노출안전기준은 Table IV와 같다.^{27,28)}

비의도적 오염물질인 곰팡이독소 중 발암물질인 아플라 톡신 B₁은 노출안전역(MOE, Margine of Exposure)으로 위해도 수준을 평가하였으며, BMDL₁₀(Benchmark Dose Lower Confidence Limit)값 중 가장 낮은 0.170 μg/kg b.w/ day를 선정하여 식(2)로 산출하였다. ^{24,27,29)} 푸모니신, 오크라 톡신 A와 제랄레논은 만성독성 비발암평가로 위해도 수준을 평가하였다. 푸모니신과 제랄레논은 식품의약품안전처에서 제시한 인체노출안전기준인 일일섭취한계량(TDI, Tolerable Daily Intake) 1.65 μg/kg b.w/day, 0.4 μg/kg b.w/day로 각각 비교하여 %TDI를 구한 후 위해도 수준을 평가하였다. ^{27,29)} 오크라톡신 A는 식품의약품안전처에서 제시한 주간섭취한계량(TWI, Tolerable Weekly Intake) 0.11 μg/kg b.w/day를 적용하였고, ²⁷⁾ 인체노출안전기준인 잠정주간섭취한계량(PTWI, Provisional Tolerable Weekly Intake) 대비노출량 비율로 위해도 수준을 계산하였다. ²⁴⁾

ADI(ng/kg b.w/day) =

한약재의 곰팡이독소 오염도(μg/kg)×일일 생약복용량(g/day) 평균 체중(kg)

1 1 0 (Kg)

(1)

MOE =
$$\frac{\text{BMDL}_{10}(\mu g/\text{kg b.w/day})}{1일 인체노출량(mg/\text{kg b.w/day})}$$
(2)

PTWI (ng/kg b.w/week) =

한약재의 곰팡이독소 오염도(μg/kg)×일일 생약 복용량(g/day)×7 평균 체중(kg) (4)

%TWI =
$$\frac{\text{PTWI (ng/kg b.w/week)} \times 100}{\text{인체노출안전기준(\mug/kg b.w/day)}}$$
(5)

결과 및 고찰

분석법 유효성 검증 -8종의 곰팡이독소를 LC-MS/MS로 분석 시 매질의 영향을 최소화 하기 위해 매질보정검량선 (matrix matched calibration)을 작성하였다. 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 는 0.1-5.0 μ g/L, 푸모니신 B_1 , B_2 , 오크라톡신 A와 제랄레논은 0.4-10.0 μ g/L 범위에서 확인한 결과 결정계수(Determination coefficient, r^2)는 모두 0.999이상으로 양호한 직선성을 나타내었다.

매질 효과는 Table V와 같이 빈랑자에서 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 는 51.1-57.2%로 이온억제 효과가 크게 나타났다. 따라서 빈랑자의 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 을 분석할 때 매질 효과를 고려해야 할 것으로 생각되며, 그 외 곰팡이독소는 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 매질 효과의 결과는 SANTE가이드라인 23 에서 제시한 $ME(\%)<\pm20$ 조건을 참고하였다.

검출한계는 0.02-0.11 μ g/kg, 정량한계는 0.08-0.34 μ g/kg 범위로 각각 나타내어 Liu^{30} 가 보고한 범위보다 낮은 수준 이었다(Table VI).

정확도와 정밀도는 회수율과 상대표준편차를 통해 검증하였다. 회수율은 전체적으로 65.1-99.7%의 범위로 나타냈으며, 푸모니신 B₂가 농도 12.0 µg/kg에서 65.1%로 가장 낮은 회수율을 나타내었다(Table VII). 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 0.25 µg/kg에서 90.9-99.7%, 1.0 µg/kg에서 74.0-79.3%, 3.0 µg/kg에서 80.6-88.0%범위였다. 푸모니신 B₁과B₂, 오크라톡신 A 그리고 제랄레논은 1.0 µg/kg에서 73.7-98.2%, 4.0 µg/kg에서 66.8-90.5%, 12.0 µg/kg에서 65.1-97.1%로 나타났다. 상대표준편차는 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂의 0.25 µg/kg에서 0.7-6.3%, 1.0 µg/kg에서 0.8-4.0%, 3.0 µg/kg에서 0.5-2.7% 범위였다. 푸모니신, 오크라톡신 A, 제랄레논은 1.0 µg/kg에서 0.5-5.0%, 4.0 µg/kg에서 1.7-4.1% 그리고 12.0 µg/kg에서 0.8-5.3%로 나타났다. 이러한 결과는 EC 가이드라인³¹⁾에서 제시한 조건과 비교 시 양호한 것으로 판단되었다.

Table V. Matrix-Effect(ME) and determination coefficient(r²) of 8 mycotoxins in Arecae semen

Compound name	ME(%)	Determination coefficient(r ²)
AFB_1	-51.1	0.9999
AFB_2	-55.4	0.9995
AFG_1	-55.5	0.9997
AFG_2	-57.2	0.9999
$FUMB_1$	15.5	0.9999
$FUMB_2$	14.3	0.9994
OTA	1.1	0.9998
ZEA	-12.4	1.0000

274 Kor. J. Pharmacogn.

Table VI. Matrix matched linear range, LOD and LOQ of 8 mycotoxins in Arecae semen

Compound	Linear range (μg/L)	LOD ¹⁾ (µg/kg)	LOQ ²⁾ (µg/kg)
AFB ₁	0.1-5.0	0.02	0.08
AFB_2	0.1-5.0	0.03	0.09
AFG_1	0.1-5.0	0.03	0.10
AFG_2	0.1-5.0	0.03	0.10
$FUMB_1$	0.4-20.0	0.11	0.34
$FUMB_2$	0.4-20.0	0.11	0.34
OTA	0.4-20.0	0.03	0.11
ZEA	0.4-20.0	0.03	0.11

 $[\]overline{^{1)}}$ LOD(Limit of Detection) = 3.3 δ /S

공팡이독소 오염 - 대한민국약전 및 대한약전외한약(생약)규격집의 총 아플라톡신 기준이 설정되어 있는 한약재 21품목에서 총 아플라톡신의 검출율이 높은 종자류 54건 중16건(29.6%)에서 곰팡이독소가 검출되었다(Table VIII).

8종의 곰팡이독소 중 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 가 13건으로 가장 많이 검출되었으며, 백자인 3건 중 2건에서 17.1(B_1 13.6)-47.1(B_1 40.8) μ g/kg으로 국내 기준을 초과하는 오염도를 나타내었고, 한 건에서는 기준 이하로 검출되었다. 도인 3건과 빈랑자, 연자육 각각 2건에서도 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 가 기준 이하로 검출되었다. 이 중 백자인과 빈랑자의 검출은 이 19 와 정 32 의 한약재 아플라톡신 검출 결과와 유사한 결과를 보였다.

푸모니신 B_1 , B_2 는 8건 검출되었고, 검출 범위는 3.3-15.0 μ g/kg으로 식품공전의 옥수수 및 수수의 기준(B_1 , B_2 의 합으로서)인 4 μ g/kg보다 낮은 수준을 보였다.

오크라톡신 A는 1건(13.6 µg/kg), 제랄레논은 2건(4.9-6.6

Table VII. Recovery of 8 mycotoxins in Arecae semen

Compound	Spiked conc.	Recovery (%)	EC				
name	$(\mu g /kg)$	•	Conc. (µg /kg)	Recovery (%)	RSD (%)		
	0.25	$96.0\pm4.7^{1)}$					
AFB_1	1.0	77.1±2.2					
	3.0	88.0 ± 2.7					
	0.25	90.9±0.7					
AFB_2	1.0	79.3 ± 0.8					
	3.0	84.8 ± 0.5	<1	50-120	≤22		
	0.25	99.7±4.3	1-10	70-110	≤16		
AFG_1	1.0	77.7 ± 4.0					
	3.0	86.9 ± 0.9					
	0.25	97.4±6.3	-				
AFG_2	1.0	74.0±3.5					
	3.0	80.6 ± 0.8					
	1.0	73.7±5.0					
$FUMB_1$	4.0	69.1±3.1					
	12.0	67.5±4.2	< 500	60.120	< 20		
	1.0	74.5±1.4	≤500	60-120	≤30		
FUMB_2	4.0	66.8±4.1					
	12.0	65.1±1.2					
	1.0	84.1±5.0					
OTA	4.0	79.3±3.6	1-10	70-110	≤20		
	12.0	81.6±5.3					
	1.0	98.2±0.5					
ZEA	4.0	90.5±1.7	≤50	60-120	≤ 4 0		
	12.0	97.1±0.8					

¹⁾Mean±RSD(Relative Standard Deviation), n=3

 $^{^{2)}}$ LOQ(Limit of Quantification) = $10\delta/S$

δ: Standard deviation of response

S: Slop of the calibration curves

Vol. 51, No. 4, 2020 275

Table VIII. Level of 8 mycotoxins in seeds

			No. of	detection			
Compound			Concentration	range (μg /kg)			Total
name	Persicae semen	Thujae semen	Areca semen	Nelumbinis semen	Trichosanthis semen	Armeniacae semen	Total
No. of sample	14	3	10	11	6	10	54
AED	3	3	2	2	N.D. ¹⁾	N.D.	10
AFB_1	(1.1-6.3)	(1.1-40.8)	(0.9-1.4)	(1.0-1.4)	N.D.	N.D.	(0.9-40.8)
AED	N.D.	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3
AFB_2	N.D.	(1.1-6.3)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(1.1-6.3)
AFG_1	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1
ArO_1	(1.2)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(1.2)
AFG_2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
$FUMB_1$	2	N.D.	2	ND	N.D.	N.D.	4
FUNID ₁	(3.6-3.9)	N.D.	(4.1-7.5)	N.D. N.	N.D.	N.D.	(3.6-7.5)
ELIMD	2	2	1	ND	ND	N.D.	5
$FUMB_2$	(4.8-10.4).	(4.4-15.0)	(3.3)	N.D.	N.D.	N.D.	(3.3-15.0)
OTA	ND	ND	1	ND	ND	ND	1
OIA	N.D.	N.D.	(13.6)	N.D.	N.D.	N.D.	(13.6)
7E A	ND	N.D. N.D.	ND	ND	2	ND	2
ZEA	N.D.		N.D.	N.D.	(4.9-6.6)	N.D.	(4.9-6.6)

¹⁾N.D.= Not Detected

μg/kg)에서 검출되었다. 식품공전의 오크라톡신 A의 식품최 대기준인 육두구(15.0 μg/kg), 제랄레논은 곡류(200 μg/kg) 와 비교 시 상대적으로 낮은 검출량을 보였다.

54건의 종자류 중 곰팡이 독소의 동시 오염은 6건이었다. 아플라톡신과 푸모니신의 동시 오염이 4건이었으며, 빈랑자 1건에서 아플라톡신, 푸모니신 그리고 오크라톡신 A가 동 시 오염을 나타내었다.

종자류는 작물 재배 중에 다양한 병원체에 감염 될 수 있어 곰팡이독소의 독성 상승작용이 가능하며, 아플라톡신은 열대 기후에서 발생하여 우리나라 기후가 아플라톡신 생성에 적합하다고는 할 수 없지만, 최근 기후변화로 인한 온난화와 외국으로부터 한약재의 수입량이 증가 하고 있어 노출 가능성 역시 증가 할 수 있다. 33 푸모니신 또한 넓은 온도와 높은 습도에서 생장이 가능하여 수확 직전과 보관 초기에 푸모니신이 생성 될 수 있어³⁴⁾ 빈랑자와 같이 고온 다습한 열대나 아열대 지역에서 채취, 건조되어³⁵⁾ 곰팡이 독소가 생성될 가능성이 높은 한약재의 지속적인 모니터링이필요하다고 생각된다.

위해도 평가 - 한약재의 곰팡이독소 8종(아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , 푸모나신 B_1 , B_2 , 오크라톡신 A, 제랄레논)의 오염 수준을 확인하고, 그 중 아플라톡신 B_1 , 푸모나신(B_1 , B_2 의 합), 오크라톡신 A, 제랄레논의 인체노출량을 산출하여

한약재 중 곰팡이독소의 위해 수준을 평가하였다(Table IX). 이플라톡신 B_i의 ADI는 0.05-4.21 ng/kg b.w/day 수준이

었고, 위해지수인 노출안전역은 40.36-3536.88 수준이었다. 발암성과 유전독성 물질인 아플라톡신 B₁은 독성에 대한 역 치가 없다고 판단하여 노출안전역으로 현 노출수준을 확인 하고 있으며 새로운 위험 정보가 확보되면 위해도를 재평 가 하여야 한다. $^{24)}$ 현재 아플라톡신 B_1 은 합리적으로 달성 가능한 수준에서 노출을 줄이기 위해 ALARA(As Low As Reasonably Achievable) 원칙에 따라 관리 되어지고 있으 며, 36) 이에 따라 저감화를 위한 노력이 필요하다. 푸모니신 의 ADI는 0.27-1.48 ng/kg b.w/day 수준이었고, 위해 수준 은 위해지수인 %TDI가 0.02-0.09%으로 안전한 수준으로 나타났다. 오크라톡신 A는 PTWI 2.16 ng/kg b.w/week 수 준이었고, 위해지수인 %TWI는 1.97%로 안전한 수준으로 나타났다. 제랄레논의 ADI는 0.44 ng/kg b.w/day 수준이었 으며, %TDI는 0.11%로 위해우려가 낮은 수준이었다. 인체 적용제품 위해성평가 공통지침서에 따르면 위해수준인 위 해 지수는 1이상일 경우 위해하다고 판단되며, 백분율로 표 기할 수 있어 100% 이하이면 안전하다고 판단한다. 24)

한약재 곰팡이독소의 위해도 평가는 안전한 수준으로 평가되었으나, 한약재는 탕제로 주로 섭취되기 때문에 탕제 제조 시 곰팡이독소 이행에 따른 불확실성이 존재할 수 있

276 Kor. J. Pharmacogn.

Table	IX.	Risk	assessment	of	8	my	vcotoxins	in	seeds

	Compound name		Thujae semen	Areca semen	Nelumbinis semen	Trichosanthis semen	Total
	Daily dose(g/day)		15	15	15	15	
	Mean (μg/kg)	0.74	18.48	0.23	0.21		19.66
AFB_1	ADI (ng/kg b.w/day)	0.12	4.21	0.05	0.05		4.44
	MOE	1381.29	40.36	3215.34	3536.88		8173.87
FI D 4	Mean (μg /kg)	1.62	6.48	1.49			9.60
FUM (B1+B2)	ADI (ng/kg b.w/day)	0.27	1.48	0.34			2.09
$(\mathbf{D}_1 \cdot \mathbf{D}_2)$	%TDI	0.02	0.09	0.02			0.13
	Mean (μg /kg)			1.36			1.36
OTA	PTWI (ng/kg b.w/week)			2.16			2.16
	%TWI			1.97			1.97
	Mean (μg /kg)					1.92	1.92
ZEA	ADI (ng/kg b.w/day)					0.44	0.44
	%TDI					0.11	0.11

다. 또한 곰팡이독소 오염도의 분포로부터 통계적 신뢰성을 갖는 검체수를 확보하여 지속적인 조사가 실시되어야 하고, 노출량 평가 역시 재평가되어야 한다고 생각된다.

결 론

서울약령시와 원외탕전실에서 유통되고 있는 한약재 중 종자류 6품목 54건을 대상으로 LC-MS/MS를 이용하여 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , 푸모니신 B_1 , B_2 , 오크라톡신 A 및 제랄레논을 분석하고 위해도를 평가하였다.

Matrix effect는 아플라톡신 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 가 빈랑자에서 51.1-57.2%로 이온억압효과를 보였고, 그 외 곰팡이독소는 SANTE가이드라인의 ME(%)<±20 이내였다. 매질을 보정한 검량선의 결정계수는 모두 0.999이상이었다. LOD와 LOO 는 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂에서 0.02-0.03 µg/kg, 0.08-0.10 μg/kg, 푸모니신 B₁, B₂에서 0.11 μg/kg, 0.34 μg/kg 그 리고 오크라톡신 A와 제랄레논은 0.03 µg/kg, 0.11 µg/kg을 나타내었다. 회수율의 범위는 아플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂ 74.0-99.7%, 푸모니신 B₁, B₂ 65.1-74.5%, 오크라톡신 A 79.3-84.1%, 제랄레논 90.5-98.2%이었다. 상대표준편차는 아 플라톡신 B₁, B₂, G₁, G₂에서 0.5-6.3%, 푸모니신 B₁, B₂에 서 1.2-5.0%, 오크라톡신 A에서 3.6-5.3%, 제랄레논에서 0.5-1.7%이었다. 곰팡이독소는 종자류 16건 에서 검출되었으며 그 중 백자인 2건에서 대한민국약전의 기준을 초과하는 오 염도를 나타내었고, 나머지는 모두 기준 이내였다. 위해도 평가 시 인체노출안전기준치는 아플라톡신 B₁, 푸모니신, 제 랄레논은 ADI, 오크라톡신 A는 PTWI로 산출하였다. 아플 라톡신 B₁의 위해지수인 노출안전역은 40.36-3536.88 수준

이었으며, 푸모니신, 제랄레논의 %TDI와 오크라톡신 A의 %TWI는 100%를 초과한 품목은 없었다.

인용문헌

- 1. FAO. (2001) Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Rome. Italy.
- 2. Bhat, R., Rai, R. V. and Karim, A. A. (2010) Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Sci. and Food Saf.* **9**: 57-81.
- 3. Beltran, E., Ibanez, M., Sancho, J. V., Cortes, M. A., Yusa, V. and Hernandez, F. (2011) UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chem.* **126**: 737-744.
- 4. 서정희 (2000) 곰팡이독소의 특성과 식품에서의 문제점. 한국소비자보호원 소비자 안전국 안전보고서.
- 5. Ministry of Government Legislation. (2020) https://www.moleg.go.kr
- 6. 한국보건산업진흥원 (2001) 다빈도 한약재 소비형태 및 가격구조 실태조사 연구. 보건복지부 연구 보고서.
- Kim, S. D., Kim, A. K., Lee, H. K., Lee, S. R., Lee, H. J., Ryu, H. J., Lee, J. M., Yu, I. S. and Jung, K. (2017) A monitoring of aflatoxins in commercial herbs for food and medicine. *J. Food Hyg. Saf.* 4: 267-274.
- 8. Ministry of Food and Drug Safety. (2020) The Korean Pharmacopoeia https://nedrug.mfds.go.kr
- Park, S. K., Jang, J. I., Ha, K. T., Kim, S. D., Kim, O. H., Choi, Y. H., Seung, H. J., Lee, K. A., Jo, H. B., Choi, B. H. and Kim, M. Y. (2009) A survey of the presence of aflatoxins in herb medicines. *J. Food Hyg. Saf.* 2: 169-173.

Vol. 51, No. 4, 2020

- Park, S. Y., Moon, H. J., Cho, S. Y., Lee, J. G., Lee, H. M., Song, J. Y., Cho, O. S. and Cho, D. H. (2011) Monitoring of aflatoxins on commercial herbal medicines. *Kor. J. Food Hyg. Saf.* 26: 315-321.
- Liu, Q., Xiao, C., Liu, H., Hu, Y., Guo, W. and Kong, W. (2019) Sensitive assessment of multi-class mycotoxins residue in Atractylodis rhizoma. *Industrial Crops&Products* 127: 1-10.
- Wei, R., Qiu, F., Kong, W., Wei, J., Yang, M., Luo, Z., Qin, J. and Ma, X. (2013) Co-occurrence of aflatoxin B1, B2, G1, G2 and ochrotoxin A in *Glycyrrhiza uralensis* analyzed by HPLC-MS/MS. *Food contr.* 32: 216-221.
- Fedorowski, J. and LaCourse, W. R. (2010) A review of postcolumn photochemical reaction systems coupled to electrochemical detection in HPLC. *Analytical Chimica Acta* 657: 1-8.
- Zhang, L., Dou, X. W., Zhang, C., Logrieco, A. F. and Yang, M. H. (2018) A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines. *Toxins.* 10: 1-39.
- Santos, L., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. (2009) Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in spain. *J. Sci. Food. Agric.* 89: 1802-1807.
- Qin, L., Jiang, J. Y., Zhang, L., Dou, X. W., Ouyang, Z., Wan, L. and Yang, M. H. (2020) Occurrence and analysis of mycotoxins in domestic chinese herbal medicines. *Mycology*. 11: 126-146.
- Ministry of Food and Drug Safety. (2018) Food standard and specifications (Notice 2018-54)
- 18. Ministry of Food and Drug Safety. (2018) Food standard and specifications (Notice 2018-74)
- Lee, H. K., Kim, A. K., Kim, O. H., Kim, S. D., Lee, Y. J., Lee, S. R., Kim, I. Y., Lee, J. M., Yu, I. S. and Jung, K. (2017) Preliminary monitoring of mycotoxins for safety management of medicinal herbs. *Kor. J. Food Hyg. Saf.* 32: 187-192
- Kim, Y. H., Kang, H. S., Oh, S. W., Lee, H. J., Kim, M. G., Chung, S. Y., Choi, S. H., Bang, S. J., Han, K. J., Lee, J. W., Kim, Y. S. and Kim, H. Y. (2010) Monitoring of aflatoxins in medicinal herbs. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 42: 27-32.
- Han, Z., Ren, Y., Zhu, J., Cai, Z., Chen, Y., Luan, L. and Wu, Y. (2012) Multianalysis of 35 mycotoxins in traditional chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography-tandemmass spectrometry coupled with accelerated solvent extraction. *J. Agric. Food Chem.* 60: 8233-8247.

22. 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 (2015) 의약품등 시험방법 밸리데이션 가이드라인.

- 23. Directorate General for Health and Food Safety. (DG SANTE) (2017) Guidance documentent on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/2017/11813. Fell-bach. Germany.
- 24. 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 (2019) 인체적용 제품 위해성평가 공통지침서.
- 25. 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 (2018) 한약(생약)의 기준 미설정 잔류농약 적부판정 해설서.
- KOSIS. (2020) Korean Statistical Information Service. http://kostat.go.kr/portal/korea/index.action
- 27. 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 (2020) 국내 인체 노출안전기준 평가 결과. http://www.nifds.go.kr/wpge/ m 280/cont 03/cont 03 08 05 03 02.do
- 28. 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 (2015) 유해물질 의 인체노출 안전기준 설정연구.
- 29. 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원. (2016) 곰팡이독 소 위해평가.
- Liu, H., Luo, J., Kong, W., Liu, Q., Hu, Y. and Yang, M. (2016) UFLC-ESI-MS/MS analysis of multiple mycotoxins in medicinal and edible Areca catechu. *Chemosphere*. 150: 176-183
- 31. EC. (2006) Laying down the method of sampling and analysis for the official control of the level of mycotoxins in foodstuffs. *Official J. European Union* 12-34.
- 32. 정덕화 (2006) 생약의 유해물질 기준 재개정을 위한 연구 (II)-생약의 곰팡이독소 기준 설정 연구.
- 33. 식품의약품안전처 (2010) 유해물질총서 아플라톡신 전문.
- 34. EFSA. (2005) Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *J. EFSA.* **235**: 1-32.
- 35. Nugraha, A., Khotimah, K. and Rietjens, I. M. C. M. (2018) Risk assessment of aflatoxin B1 exposure from maize and peanut consumption in indonesia using the margin of exposure and liver cancer risk estimation approaches. *Food & Chem. Toxicol.* 113: 134-144.
- Mannani, N., Tabarani, A., Abdennebi, E. H. and Zinedine,
 A. (2020) Assessment of aflatoxin levels in herbal green tea
 available on the moroccan market. Food Contr. 108: 106882.

(2020. 9. 17 접수; 2020. 11. 5 심사; 2020. 11. 18 게재확정)