

흑삼에서 벤조피렌의 추출 조건 및 분석 방법에 관한 연구

조영호 · 송규용* · 백명기** · 이종화*** · 이계원#

건양대학교 제약공학과, *충남대학교 약학대학, **SK, ***한국화학연구원 안전성평가연구소
(Received March 1, 2012; Revised June 25, 2012; Accepted June 26, 2012)

Study on Extraction Condition and Analysis Methods of Benzopyrene in Black Ginseng

Young Ho Cho, Kyu Yong Song*, Myoung Ki Baek**, Jong Wha Lee*** and Gye Won Lee#

Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea

**College of Pharmacy, Chungnam University, Daejeon 320-711, Korea*

***Life Science R&D Park, SK Biopharmaceuticals Co., LTD, Daejeon 305-712, Korea*

****Toxicology Center, Korea Institute of Toxicology, Daejeon 305-343, Korea*

Abstract — To develop fundamental data of herbal materials with heat treatment, we studied analytical and extraction methods of benzopyrene in black ginseng and validated by HPLC analysis. Benzopyrene was successfully separated in mobile phase of acetonitrile:water (80 : 20) and detection of excitation 294 nm, emission 404 nm. The calibration curve of benzopyrene was linear over the concentration range of 1.17~37.50 ng/ml with correlation coefficient of above 0.999. The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of benzopyrene was 0.25 and 0.75 ng/ml, respectively. Hexane extraction method was used as a new extraction method for benzopyren and the efficient of extraction was over 95%. In conclusion, analytical method and extraction method were suitable for the determination of benzopyrene in the black ginseng and could be applied to fundamental study and guideline of herbal materials with heat treatment.

Keywords □ benzopyrene, heat treatment, black ginseng

Polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)는 2개 이상의 벤젠 고리를 가지고 있는 다환방향족 탄화수소로서 유기물의 불완전 연소 시 부산물로 발생하는 물질이다.^{1,2)} 200여종의 유도체 화합물이 알려져 있으며, 현재 내분비계 장애물질이면서 이들의 발암성이 밝혀진 바 있다.³⁾ 특히, PAHs 그룹에 속하는 벤조피렌 [benzo(a)pyrene, B(a)P;3,4-benzopyrene; 1,2-benzopyrene]은 황색의 결정성 고체로 300~600°C의 온도에서 불완전 연소 시 생성되어 유전독성과 발암성이 강한 것으로 알려져 최근 국제암 연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)는 그룹 1(발암물질)로 분류하였다.⁴⁾ 벤조피렌의 오염원은 매우 다양하다. 즉 벤조피렌은 환경오염 등으로 인해 조리·가공하지 않은 농산물 및 수산물 등의 식품에도 존재하고 식품을 조리·가공할 때 식품의 주성분인 탄수화물, 단백질, 지방 등이 열분해되어 생성되는 것으로 알려져 있다.²⁾

소비자들의 의식 수준이 높아짐에 따라 생약의 안전성, 건전성 확보에 대한 국민의 욕구가 날로 증가하고 있으며, 생약에 대한 소비자의 인식도 달라지고 있는 실정이다. 또한 이러한 상황에서 열처리 가공과정을 거치는 숙지황에서도 벤조피렌이 검출되어 가공과정을 거치는 식품 및 생약 등에서도 검출될 수 있다는 가능성이 제기되어 한약업계에 커다란 파장을 일으키면서 국민적 관심의 대상이 되고 있다.

PAHs는 대부분의 모니터링 자료가 환경 분야에 집중되어 식품 및 의약품에서의 자료는 찾아보기가 힘든 실정이었다. 하지만 최근 발암성에 근거하여 캐나다(8종) 및 미국 EPA(16종) 등에서는 PAHs 중 우선순위의 대상을 선정하여 식품 중에서 모니터링을 하고 있으며 EU 등에서는 기준을 설정하여 관리하고 있다.⁵⁾ 우리나라 식품의약품안전청에서도 2001년부터 식품 중의 PAHs 모니터링 및 위해평가를 수행하여 벤조피렌에 대한 기준이 설정되었다. 식용유지 중 벤조피렌은 2 µg/kg 이하(식품의약품안전청 고시 제2008-51호),⁶⁾ 훈제어육과 훈제건조어육 중 벤조피렌은 각각 5 µg/kg 이하, 10 µg/kg 이하(식품의약품안전청 고시 제2010-51호)⁷⁾로 기준을 설정하고 있다. 생약은 지황과 숙

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-730-5692 (팩스) 041-730-5692
(E-mail) pckmon@konyang.ac.kr

지황에 대해 벤조피렌은 5 µg/kg 이하(식품의약품안전청 고시 제2010-75호)⁸⁾로 기준이 설정되어 있으며 이와 비슷한 가공과정을 거치는 흑삼을 비롯한 생약들에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.⁹⁾

지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz)은 현삼과에 속하는 다년생초로서 뿌리를 채취하여 근엽과 잔뿌리를 제거하여 깨끗이 씻은 것을 생지황 또는 건지황(*R. Radix crude*)이라 하고 생지황을 양건한 것을 건지황(*R. Radix*), 황주, 백주 또는 사인주로 구증구포한 것을 숙지황(*R. Radix Preparata*)이라 하여 약효를 달리하여 사용하고 있다.¹⁰⁾

흑삼은 단단한 수삼을 구증구포 하여 말린 가공된 제품으로서 농약 등의 독성 성분이 제거 되고, 항암 효과와 인체에 필요한 유효 사포닌(Rg3, Rb2 등)이 증가되어 홍삼보다 최소 몇 배에서 30배까지 높게 들어 있는 것으로 밝혀져 있다.^{11,12)} 이는 당뇨에 필요한 아드레날린과 인슐린 생성에 영향을 주는 작용을 하므로 당뇨병, 간 기능 강화에 도움을 주고 각종 간질환을 회복시키며, 콜레스테롤의 대사를 조절하고 생성을 억제하는 작용을 한다.¹³⁾ 최근에는 뛰어난 가공성과 보관성으로 인해 수삼보다 흑삼을 더 많이 찾는 추세이다. 그러나 많은 약리학적 장점을 가지고 있음에도 불구하고 전통적 제조 방법인 구증구포의 방법을 적용하여 제조한 흑삼에서 벤조피렌이 검출되어 사회적인 이슈가 되고 있을 뿐만 아니라 제조시 증숙 시간 및 온도에 대한 구체적인 조건이 설정되어 있지 않아 발암성 물질인 벤조피렌이 검출될 가능성이 높은 문제점을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 사회적인 이슈가 되고 있는 흑삼이나 숙지황을 대상으로 식약청에 고시되어 있는 방법과 Hexan 단독으로 추출하는 방법을 비교 검토하고 최적의 추출 조건을 확립하여 열처리 방법에 따른 벤조피렌 함량 변화를 분석하여 적합한 열처리 조건을 제시하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

시약으로는 벤조피렌은 Sigma사(USA), N,N-Dimethylformamide(이하 DMF로 약함), 염화나트륨 및 무수황산나트륨은 Samchun사(Korea) 그리고 HPLC용 아세토니트릴은 JT Baker사(USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

기기로는 Mechanical Stirrer (MS-280, Korea), 감압 농축기 (Laborata 410, Heidolph, Germany), 원심분리기(Micro 12, Hanil Sci. Inc., Korea)를 사용하였다.

분석방법 및 밸리데이션

사용한 HPLC 장치는 Waters alliance 2690 system(USA), 검출파장은 여기 파장 294 nm, 발광 파장 404 nm, 컬럼은 AtlantisTMd

C₁₈(4.6*250 mm, 5 µm, Waters, USA), 컬럼 온도는 30°C, 데이터 처리장치로는 컴퓨터(Pentium II, Window XP)와 Waters alliance system millenium 32 data system을 사용하였다. 이 때 이동상으로는 아세토니트릴과 물을 80 : 20으로 혼합하여 사용하였고, 유속은 1.0 ml/min이었다.

HPLC를 이용한 분석법의 타당성¹⁴⁻¹⁶⁾은 특이성, 직선성, 검출한계와 정량한계 그리고 정확성 및 정밀성을 이용하여 검토하였다.

특이성

흑삼 추출액과 기지 농도의 표준품을 spiking한 흑삼 추출액을 비교하여 벤조피렌의 함량이 정량적으로 늘어나는지의 여부를 검토하였다.

따로 흑삼에서 벤조피렌을 추출하기 위하여 식약청 고시 방법을 사용할 때 최종적으로 얻어지는 상층과 하층의 Hexan층이 벤조피렌의 피크에 영향을 미치는지를 검토하기 위하여 HPLC로 주입하여 크로마토그램을 비교하였다.

즉, Hexan 100 ml를 분액여두에 넣고 물 : DMF 혼합액(1 : 9) 50 ml를 넣어 균일하게 흔들어 섞어준다. DMF와 Hexan을 분리한 후, Hexan층에 물 : DMF 혼합액(1 : 9) 25 ml를 넣고 흔들어 섞어 준 다음, Hexan과 DMF층을 분리하였다. 이 과정을 2회 반복 실시하였다. 분리된 Hexan층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40°C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 0.45 µm 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다(상층).

앞에서 분리된 100 ml의 DMF층에 1% 염화나트륨 용액 100 ml를 넣고 충분히 섞은 후 Hexan 50 ml를 넣고 추출하고, 다시 Hexan 35 ml를 넣고 2회 더 추출하였다.

Hexan 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40°C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 0.45 µm 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다(하층).

직선성

벤조피렌 표준품 50 mg을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 정확히 50 ml로 하여 표준 원액으로 한 다음 이를 희석하여 각 농도별 표준액에 대하여 분석조건에 의한 피크 면적 비를 구하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선으로부터 직선식의 상관계수(기준: R²=0.99 이상)를 구하여 직선성을 검토 하였고, 3회 반복 실험하여 평가 하였다. 이 때 검량선의 범위는 1.17~37.50 ng/ml이었다.

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검량선의 직선성 범위가 좋은 부분을 이용하여 다음과 같은 식을 이용하여 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 산출하였다.

검출한계 = $3.3 \times \sigma / S$ (S/N=3)
 정량한계 = $10 \times \sigma / S$ (S/N=10)

이 때 σ 는 절편의 평균 표준편차이며 s 는 기울기의 평균을 의미한다.

정확성과 정밀성

정확성은 분석물질의 참값(농도)에 대한 분석법에 의해 얻어진 평균 시험결과와 근접성을 의미하며, 기지량의 분석물질을 함유한 시료를 반복적으로 분석함으로써 구해진다. 정밀성은 하나의 균질화된 시료로부터 취한 열 개의 등분체(aliquots)로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 의미한다.

정확성과 정밀성은 미리 결정되어진 정량한계의 2배 농도, 검량선 작성시 최고 농도의 70~80% 농도 및 이들 두 가지 농도의 중간 농도를 제조하여 측정하였다. 즉, 벤조피렌을 1.50, 15.75 및 30.00 ng/ml의 농도범위에서 하루에 6회씩 3일간 실험을 행하여 정확성을 측정하였으며, 일간과 일내 정밀성은 동일한 농도 범위를 가지고 상대 표준편차(% CV)를 이용해 산출하였다.

추출 효율의 검토

속지황 적용 추출 방법, 유지류 추출 방법 및 hexan 단독 추출 방법의 효율을 각각 검토하였다.

식용유와 유지류 적용 방법은 벤조피렌 표준액 20.00 ng/ml를 hexan 100 ml에 넣어 충분히 섞어 주었다. hexan 층에 물 : DMF 혼합액(1 : 9)을 50 ml 넣어 균일하게 흔들어 섞어준 다음 DMF와 hexan 층을 분리시킨 후, 다시 hexan 층에 물 : DMF 혼합액 25 ml를 넣어 추출하였다. 이 조작을 2회 반복하여 혼합액 층이 총 100 ml가 되게 하였다.

분리된 물 : DMF 혼합액(1 : 9) 층에 1% 염화나트륨 100 ml를 넣고 충분히 섞은 후, hexan 50 ml를 넣고 추출하고 다시 hexan 35 ml를 넣고 2회 더 추출하였다.

hexan 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40°C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다.

속지황 적용 방법은 벤조피렌 표준액 20.00 ng/ml를 hexan 100 ml에 넣어 충분히 섞어 주었다. 물 100 ml를 넣고 균질화한 다음 hexan층을 분액 여두에 옮기고, 다시 hexan층에 물 50 ml로 2회 반복하여 추출 진탕하여 hexan층을 분액 여두에 합쳤다. 합한 hexan층을 물 50 ml로 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40°C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다.

hexan 단독 추출 방법은 벤조피렌 표준액 20.00 ng/ml를 hexan 100 ml에 넣고 교반한 후, 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후, 40°C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml

에 용해하고 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다.

따로 벤조피렌 표준액 20.00 ng/ml를 HPLC에 주입하여 분석하여 얻어진 면적값을 사용하여 다음과 같은 식으로 추출효율을 계산하였다.

$$\text{추출효율}(\%) = \frac{\text{추출후 면적}}{\text{벤조피렌표준액의 면적}} \times 100$$

추출 방법의 검토

식약청에 고시되어 있는 벤조피렌을 분석하기 위하여 여러 단계를 거쳐 추출하는 방법은 기준치가 정해져 있는 올리브유, 옥수수유 등의 식용 유지를 추출하기 위한 방법과 생약 중 속지황의 추출법이 있는데 두 가지 방법은 모두 물이나 DMF와의 혼합액을 이용하여 균질화한 다음, hexan으로 추출하는 방법으로 모두 시간이 오래 걸리고 산수유, 진피, 산사 및 황기와 같은 생약류에서는 에멀전 형성이나 층 분리에 오랜 시간이 소요되는 단점들이 있어 열처리하는 생약류들에 대한 기준을 강화하기 위해서는 추출과정을 단순화 할 필요성이 있으므로 이에 대한 타당성을 검토하였다.¹⁷⁾

시중에 유통되어지고 있는 구증구포로 처리된 흑삼과 속지황을 구입하여 식약청 고시 방법과 균질화 과정이 생략된 방법으로 각각 추출하여 벤조피렌의 함량을 비교 검토하였다.

즉, 식약청에 고시된 속지황 처리 방법에 따라 잘게 자른 흑삼 분말 10 g을 취하여 물 100 ml를 넣어 90분간 초음파 처리하여 균질화한 다음, hexan 100 ml를 넣어 추출하여 HPLC에 주입하여 분석하였다.

균질화 과정이 생략된 방법은 흑삼 분말 10 g을 칭량하여 hexan 100 ml를 넣어 교반기로 교반하여 여과하였다. hexan층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후, 40°C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 0.45 μm 막 여과기로 여과한 후, HPLC에 주입하여 분석하였다.

흑삼내 벤조피렌 함량 분석

밸리데이션된 분석 방법을 이용하여 실제 시중에서 유통되고 있는 검체와 실험실적으로 열처리 시간 및 구증구포 횟수에 따라 제조된 검체에서 벤조피렌의 함량 변화를 살펴보기 위하여 인삼의 뿌리, 꽃봉오리 및 잎을 0, 60, 90, 120, 180, 240 및 300 분 동안 각각 120°C에서 열처리 한 경우와 전통적인 구증구포의 방법에 따라 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12회 쪼준 경우의 흑삼 10 g을 각각 취하여 위에서 검토되어진 균질화 과정이 생략된 방법에 의해 hexan으로 추출하고, hexan 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40°C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 0.45 μm 막 여과기로 여과

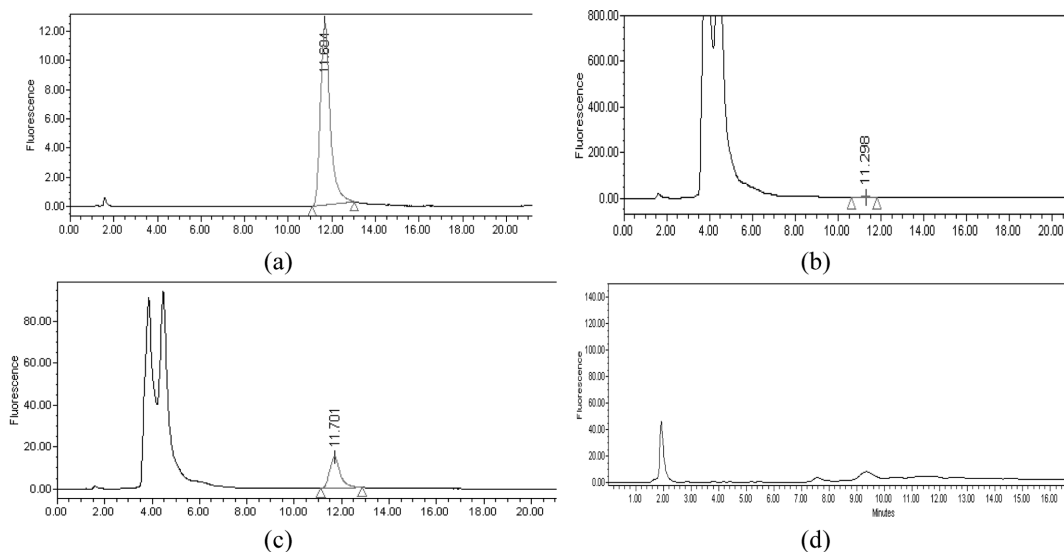


Fig. 1 – Chromatogram of benzopyrene (a), black ginseng (b), spiked black ginseng with benzopyrene (c) and blank (d, ginseng).

한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다.

통계적 분석

실험결과는 평균±표준편차(Mean±S.D.)로 계산하였고, 각 군 간의 유의성 검증은 students' t-test를 사용하였다. $p < 0.05$ 일 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

특이성

특이성은 시료 내 다른 물질의 공존 시 해당 분석 물질을 분리하고 정량하는 분석 능력을 나타낸다. 벤조피렌 표준액(40.00 ng/ml), 흑삼 추출액, 벤조피렌 표준액으로 spiking한 흑삼 추출액의 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 이 때 벤조피렌의 머무름 시간은 11.68분으로 흑삼 추출액의 다른 성분들과 명확하게 분리되었다. 흑삼 추출액에 기지 농도의 표준품을 spiking하여 얻어진 면적은 흑삼 추출액의 면적과 표준품의 면적을 더한 값과 같으므로 다른 물질과의 간섭 없이 분석할 수 있는 방법임을 확인할 수 있었다.

또한, 식용유에 적용하는 식약청 고시 방법에 의해 추출하는 방법에서 상층과 하층이 벤조피렌의 피크에 영향을 미치는지의 여부를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 즉, 상층에서 10.94분의 유지시간을 가지는 미지의 피크가 나타났는데 이는 정제 과정을 충분히 거치지 않아 잔류하는 DMF로 인한 피크로 사료되어진다. 그러나 하층에서는 벤조피렌의 피크에 영향을 주는 아무런 피크가 나타나지 않아 식약청 고시에 의해 기술된 추출 단계를 거쳐 추출되어지는 방법에 의해 얻어지는 추출액은 다른 피크와 분리되어 벤조피렌을 분석할 수 있음을 확인할 수 있

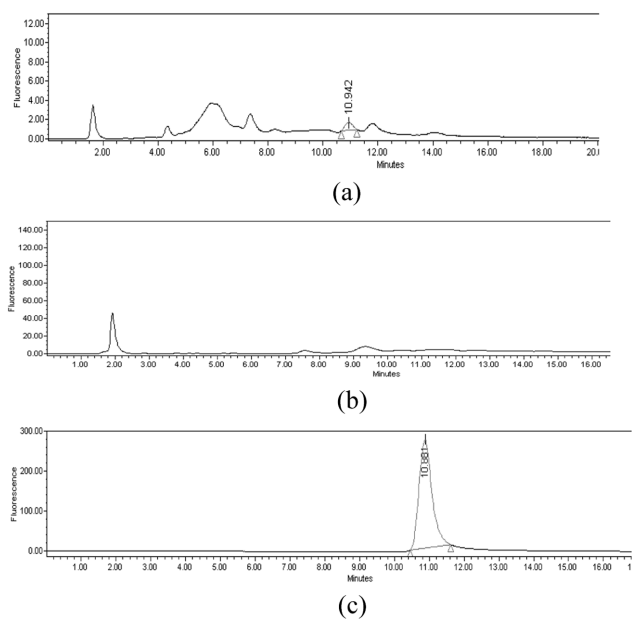


Fig. 2 – Chromatogram of upper (a) and lower layer (b) in extracts by method of KFDA and benzopyrene (c).

었다.

따라서 유지류의 방법을 이용하는 경우에는 추출용매에 DMF와 헥산 혼합액을 사용하는 경우에는 물로 충분히 세척하여 DMF가 잔류하지 않도록 하는 것이 중요할 것으로 사료된다.

직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

벤조피렌을 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.75 및 37.50 ng/ml의 농도로 제조하여 HPLC로 분석하였을 때 얻은 피크 면적을 Y축으로 표준액 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하여 나타내었다.

Table I – Precision and accuracy for the determination of benzo-pyrene

Conc. (ng/ml)	Accuracy (%)		Precision (% CV)	
	Intra assay	Inter assay	Intra assay	Inter assay
1.50	103.56	102.54	2.04	0.44
15.75	99.78	100.02	0.82	0.37
30.00	99.21	99.15	0.32	0.26

The values are mean±S.D. (n=6).

이 때 얻어진 검량선식으로부터 상관계수는 0.999 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다.

가장 직선성이 좋은 부분을 이용하여 검출한계와 정량한계를 구한 결과 각각 0.25와 0.75 ng/ml이었다.

정확성과 정밀성

결정되어진 정량한계의 2배농도, 검량선 작성시 최고 농도의 70~80% 농도 그리고 두 가지 농도의 중간농도를 이용하여 하루에 6번 시행하여 정밀성(repeatability, % CV로 표시)을 3일 동안 반복 시행하여 일간 정밀성(reproducibility, % CV)을 구하여 Table I에 나타내었다.

일반적으로 밸리데이션에서 요구되어지는 정확성은 평균값이 실측값의 ±15%(최저정량한계 ±20%)이고, 정밀성은 상대표준 편차가 실측값의 ±15%(최저정량한계 ±20%) 이내이어야 한다. 이 때 분석방법의 정밀성은 모든 표준품에서 일내와 일간 정밀성은 0.32~2.04와 0.26~0.44이었고, 정확성은 모두 95~115%의 이내로 나타났다. 이로부터 벤조피렌에 대한 HPLC 분석법은 흑삼이나 숙지황과 같은 열처리 생약에 이용될 수 있는 적합한 정밀성과 정확성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

추출 효율의 검토

벤조피렌 표준액 20.00 ng/ml의 면적과 추출 과정을 거친 벤조피렌의 면적값을 이용하여 추출효율을 검토한 결과 식용유 적용방법과 숙지황 적용방법은 96.70±0.21과 96.88±0.11%이었고, 헥산으로 단독 추출하는 방법이 98.75±0.25%로서 약간 더 높았다.

최 등¹⁸⁾은 한약재별 생약의 벤조피렌 시험법 검증 및 개선방안 연구를 통하여 분말이나 당을 많이 함유하는 생약에서는 헥산 단독으로 추출하는 방법보다는 물로 균질화하여 헥산으로 이행하는 방법이 추출 효율이 좋다고 제시한 바 있으나 열처리를 한 흑삼이나 숙지황을 대상으로 한 본 연구에서는 물로 균질화하는 방법보다는 헥산으로 단독 추출하는 경우 더 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 벤조피렌의 추출 방법은 생약의 종류나 특징에 따라 약간의 차이가 발생할 수 있을 것으로 사료되어지며 흑삼이나 숙지황과 같이 매트릭스가 복잡하지 않은 생약류에 대해서는 헥산으로 단독 추출하는 방법이 시간과 비용을 절

Table II – Changes of benzopyrene contents in the black ginseng according to extraction method

Sample	Benzopyrene Conc. (µg/kg)	
	A	B
1	1.61±0.00(1.66*)	1.62±0.01(1.64*)
2	1.97±0.03(2.03)	2.01±0.01(2.04)
3	2.06±0.00(2.12)	2.13±0.03(2.16)
4	2.19±0.10(2.26)	2.18±0.00(2.21)
5	2.41±0.02(2.48)	2.48±0.01(2.51)

A: KFDA method B: experimental method.

* is correction with extraction efficient.

The values are mean±S.D. (n=3).

약할 수 있어 더 바람직할 것으로 사료된다.

추출 방법의 검토

흑삼 중의 벤조피렌 함량을 헥산으로 단독 추출하여 측정된 결과를 Table II에 나타내었다. 즉, 벤조피렌 함량은 기존 추출 방법보다 약간씩 높게 추출된 것을 확인 할 수 있었고, 이는 기존 추출 방법에서 추출 효율을 고려한 보정치와 비교했을 때 유의성 있는 차이가 없으므로(p<0.05), 헥산으로만 추출한 방법의 타당성을 확인할 수 있었다.

따라서 특이성, 직선성 및 검출한계와 정량한계를 통하여 타당성이 검증된 벤조피렌 분석법과 추출방법의 개선은 향후 열처리를 하여 효능이 증대되어지는 흑삼과 같은 생약 함유 천연물에 대한 기준 규격을 설정할 수 있는 근거를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 이를 이용한 제품개발에 대한 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 기대되어진다.

흑삼내 벤조피렌 함량 분석

열처리 시간에 따른 벤조피렌 함량 변화 – 인삼 뿌리, 잎 및 꽃 봉오리에 열처리 시간을 달리하여 제조된 흑삼 중의 벤조피렌 함량을 측정하여 Table III에 나타내었다. 즉, 열처리하지 않은 시료인 일반 수삼은 벤조피렌이 검출되지 않았으나 흑삼의 경우 열처리 시간이 증가함에 따라 벤조피렌 함량이 높아졌으며 모두 기

Table III – Changes of benzopyrene contents in root, leaf and flower of the black ginseng during processing at 120°C under high pressure

Treatment time (min)	Benzopyrene conc. (µg/kg)		
	Root	Leaf	Flower
60	0.47±0.01	1.38±0.01	0.97±0.00
90	0.84±0.02	1.39±0.05	1.22±0.02
120	1.39±0.24	1.41±0.00	1.55±0.01
180	1.76±0.10	1.49±0.01	1.68±0.01
240	1.90±0.01	1.59±0.04	1.91±0.02
300	2.29±0.15	2.23±0.05	2.23±0.05

The values are mean±S.D. (n=3).

Table IV – Changes of benzopyrene contents in the black ginseng according to treatment number with heat

Treatment number	Benzopyrene conc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	0.92 \pm 0.01
2	1.04 \pm 0.01
3	1.20 \pm 0.01
4	1.23 \pm 0.03
5	1.49 \pm 0.01
6	1.61 \pm 0.00
7	1.97 \pm 0.03
9	2.06 \pm 0.00
10	2.19 \pm 0.01
12	2.41 \pm 0.02
*C	2.41 \pm 0.02
*C	2.19 \pm 0.10

*C is commercial sample.

The values are mean \pm S.D. (n=3).

준치 이내로 측정되었다. 이는 흑삼 제조방법과 동일하게 숙지황에 적용하였을 때 240분 이내에 2 ppb 이하의 벤조피렌을 함유하면서 2시간 이상에서 기준 성분인 5-HMF가 0.1% 이상으로 검출되었던 신 등¹⁹⁾의 연구결과와 동일하다 할 수 있다. 따라서 유해 성분인 벤조피렌이 적게 발생되고 유효 성분인 사포닌 성분이 증가된 흑삼을 제조하기 위해서는 240분 이내로 열처리하는 것이 적당한 것으로 사료되어진다.

구증구포 처리 횟수에 따른 벤조피렌 함량 – 구증구포 처리횟수에 따른 벤조피렌 함량을 측정된 결과 Table IV에서 보는 바와 같이 찌르는 횟수가 증가함에 따라 함량이 증가되었다. 구증구포라 함은 9번 찌서 말리는 것을 말하는 것으로 본 실험에서 9회 처리한 검체에 상응하는 것이라 할 수 있다. 구증구포 방법의 경우 120°C에서 적당한 시간별로 열처리 해주는 새로운 방법에 비해 흑삼을 제조하는 방법이 복잡할 뿐만 아니라 벤조피렌의 함량도 2 ppb 이상으로 함유되므로 문제가 있을 것으로 사료된다. 신 등¹⁹⁾의 연구결과에서 이와 비슷한 처리과정을 거치는 숙지황의 경우 본 연구진이 처리한 조건에서는 2~3 ppb로서 기준을 만족하였으나 실제 유통되고 있는 숙지황을 추출하여 분석하였을 때 20~40 ppb의 높은 수치를 나타내었고 국내산보다는 중국산에서 훨씬 더 높은 수치로 나타났다(data not shown). 이러한 결과는 백 등¹⁷⁾의 한약재 중 벤조피렌 함유량 모니터링 연구에서 생지황을 50°C와 70°C에서 건조하면 벤조피렌은 숙지황과 같은 수준으로 검출된다는 결과와 동일한 결과이다. 일반적으로 PAHs는 400~1000°C 온도에서 불완전 연소 시 생성되는 화합물로¹⁰⁾ 한약재에서 벤조피렌이 검출되는 것은 건조과정 중에 시간과 비용을 절감하기 위해 불을 직접 쬐거나 고온에서 급격하게 처리하면 생성되는 것으로 「대한약전」 통칙 또는 「대한약전의한약(생약)규격집」 총칙에 따라 적정한 온도에서 건조할 경우에는 벤조피렌이 생성되지 않는다. 그러므로 한약제조업체가 한약재를 60°C 이하의 적정한 온도로 건조 가공을 하여 벤

조피렌 저감화 노력을 지속적으로 해야 될 것으로 사료된다.

따라서 흑삼이나 숙지황 같이 단순한 매트릭스를 가지는 경우 벤조피렌의 추출은 헥산으로 단독 추출하는 방법을 적용하는 것이 타당한 것으로 사료된다. 또한, 본 연구 결과를 통해 인삼이나 생지황을 열처리하여 흑삼이나 건지황으로 제조할 때 식약청의 벤조피렌의 허용 기준을 만족하는 적정 온도 조건도 필요하지만 전통적으로 내려오는 구증구포의 방법을 이용할 때는 처리 조건을 명확히 규정하여 품질관리를 할 수 있도록 기준 설정이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 생약에 대한 소비자의 신용도와 가치를 높이기 위해서 벤조피렌과 같은 유해성분에 대한 설정기준이 필요한 열처리 생약의 벤조피렌 추출 조건, 분석법 및 열처리 방법을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 흑삼 중의 벤조피렌을 검출하기 위해 HPLC로 분석한 결과 머무름 시간은 11.68분으로 다른 성분들과 명확하게 분리되어 다른 물질과의 간섭 없이 분석할 수 있는 타당한 방법임이 확인되었다.

2) 벤조피렌은 1.17~37.50 ng/ml의 농도 범위에서 상관계수가 0.999 이상으로 양호한 직선성을 나타내었으며, LOD와 LOQ는 각각 0.25와 0.75 ng/ml이었다.

3) 벤조피렌의 면적값을 이용하여 추출효율을 검토한 결과 식용유 적용방법(96.70 \pm 0.21%)과 숙지황 적용방법(96.88 \pm 0.11%)에 비해 헥산으로 단독 추출하는 방법(98.75 \pm 0.25%)이 약간 더 높은 것으로 나타났다.

4) 일내, 일간 정밀성은 각각 0.32~2.04와 0.26~0.44이었고, 정확성은 95~115% 이내이었다.

개발된 벤조피렌의 추출방법과 분석법에 따라 인삼 뿌리, 잎 및 꽃봉오리를 120°C에서 열처리 시간이나 찌르는 횟수가 증가함에 따라 모두 벤조피렌 함량이 높아졌으며 특히 240분 이내에서는 2 ppb 이내이었다.

따라서 흑삼의 제조 시 여러 번 찌서 하는 구증구포의 방법 보다는 120°C에서 한 번 열처리하는 것이 공정을 더 단순화 할 수 있을 뿐 아니라 벤조피렌의 함량을 조절할 수 있는 적당한 방법으로 평가되었으며 생약 중 매트릭스의 종류에 따라 벤조피렌 추출방법을 달리 적용하여야 할 것으로 사료되어진다.

참고문헌

- 1) Columbia analytical services : U.S. EPA METHOD 610-Polynuclear Aromatic Hydrocarbons : Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial waste water (1999).

- 2) 식품의약품안전평가원 : 생약의 벤조피렌 시험법 해설서. p. 3 (2009)
- 3) Shubik, P. and Hartwell, J. L. : Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity. Federal Security Agency, US Public Health Service, Washington, D. C. publication no. 149 (1957).
- 4) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) : Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). U. S. Department of Health and Human Service, Public Health Service, p. 1 (1995).
- 5) Ahlbom, A., Asma, S., Bhisey, R. A., Djordjevic, M. V., Gupta, P. C., Hecht, S. S., Idris, A. M., Jinot, J. and Nair, J. : IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *World Health Organization International Agency for Research on Cancer* **89** (2004).
- 6) 식품의약품안전청 고시 제2008-51호 : 올리브유 중 벤조피렌 잔류 허용기준 및 시험법 (2008).
- 7) 식품의약품안전청 고시 제2010-51호 : 수산물에 대한 벤조피렌 기준 및 규격 (2010).
- 8) 식품의약품안전청 고시 제2010-75호 : 생약의 벤조피렌 기준 및 시험방법 (2010).
- 9) Kim, N. J., Jung, E. A., Kim, H. J., Sim, S. B. and Kim, J. W. : Quality evaluation of various dried roots of *Rehmannia glutinosa*. *Korean J. Pharmacogn.* **31**, 130 (2000).
- 10) Chug, H. J. : Studies on variation of constituents and enzyme activities of *Rehmannie Radix* by Processing. *Department of Pharmacy, Graduate School of Sookmyung Woman's University*, p. 1 (1989).
- 11) Lee, J. H., Shen, G. N., Kim, E. K., Shin, H. J., Myung, C. S., Oh, H. J., Kim, D. H., Roh, S. S., Cho, W., Seo, Y. B., Park, Y. J., Kang, C. W. and Song, G. Y. : Preparation of black ginseng and its antitumor activity. *Korean J. Oriental Physiol. & Pathol.* **20**, 951 (2006).
- 12) Song, G. Y., Roh, S. S., Seo, Y. B., Park, Y. J. and Myung, C. S. : Effect of Black Ginseng on Body Weight and Lipid Profiles. *Yakhak Hoeji* **50**, 381 (2006).
- 13) Han, S. T., Whang, W. K., Kim, I. H. and Yang, B. W. : Analysis of ginsenoside of black ginseng. *Yakhak Hoeji* **49**, 490 (2005).
- 14) Park, K. Y., Choi, S. B., Lee, G. C., Kim, N. S., Jeong, W. G., Koh, S. Y., Park, S. B., Choi, K. Y. and Cheong, E. H. : A study on the analytical method of monitoring compounds in drinking water(II)-chlorophenols, benzo(α)pyrene. *Rep. Inst. Health & Environ.* **12**, 133 (2001).
- 15) U. S. Pharmacopeia National Formulary, USP 26-NF 21, 3th Ed., Mack Printing Company, Easton, U. S. A., 2439 (2003).
- 16) Beuving, G. : Validation of analytical Methods. Validation Seminar, Istanbul, 31 May-01 June (2001).
- 17) 한국 의약품 수출입 협회 : 한약재 중 벤조피렌 함유량 모니터링 연구, 식품의약품안전청 (2009).
- 18) (주)글로벌 헬스 케어 생명과학연구소 : 한약재별 생약의 벤조피렌 시험법 검증 및 개선방안 연구, 식품의약품안전청 (2010).
- 19) Shin, Y. J., Cheong, K. J., Lee, G. W., Lee, S. Y., Seo, Y. B. and Song, G. Y. : Study on new manufacturing method of *Rehmanniae radix preparata* and evaluation of antioxidant activity. *Korean J. Aesthetics and Cosmetics Society* **9**, 199 (2011).