



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018年 8月
석사학위 논문

HPLC 및 LC-MS/MS를 이용한 산마늘과 박새의 판별법 개발

조선대학교 대학원

식품영양학과

이 청 미

HPLC 및 LC-MS/MS를 이용한 산마늘과 박새의 판별법 개발

Development of Analytical Method for *Allium victorialis*
and *Veratrum patulum* Using HPLC and LC-MS/MS

2018年 8月 23日

조선대학교 대학원

식품영양학과

이 청 미

HPLC 및 LC-MS/MS를 이용한 산마늘과 박새의 판별법 개발

지도교수 김 경 수

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2018年 4月

조선대학교 대학원

식품영양학과

이 청 미

이청미의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	김복희 (인)
위원	조선대학교	이재준 (인)
위원	조선대학교	김경수 (인)

2018년 5월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	VI
제 1 장 서 론	1
제 1 절 분석 대상 식물 선정	4
제 2 절 연구 목적	9
제 2 장 재료 및 방법	10
제 1 절 재료 및 분석기기	10
1. 시료	10
가. 원시료 및 가공식품의 구입	10
나. 시료의 전처리	11
2. 시약 및 재료	11
3. 분석 기기	11
제 2 절 박새의 지표성분 분석 방법	14
1. 비휘발성 유기성분의 HPLC 및 LC-MS/MS 분석	14
가. 시험용액 조제 방법	14
나. 분석 기기조건	14
1) 지표물질 탐색을 위한 HPLC-DAD 분석 조건	14
2) 지표성분 동정 및 확립을 위한 LC-MS/MS 분석 조건	18
2. 지표성분 분석을 통한 혼입여부 판별법 확립	20

가. 지표성분 분석을 위한 최적 추출법 선정	20
1) 추출용매 선정을 위한 시험용액 조제 방법	20
2) 추출방법에 따른 시험용액 조제 방법	20
나. 지표성분 분석을 위한 HPLC 분석 조건	21
다. HPLC 분석법의 유효성 검증	23
1) 유효성 검증(Method validation)	23
2) 맹검 실험(Blind test)	24
라. 지표성분의 정성 및 정량	24
3. 최적 분석법을 활용한 산마늘 가공식품 모니터링 방법	26
가. 시험용액 조제 방법	26
나. 가공식품 모니터링을 위한 HPLC 분석 조건	26
제 3 장 결과 및 고찰	27
제 1 절 박새의 지표성분 분석 결과	27
1. 지표물질 탐색을 위한 HPLC-DAD 분석 결과	27
가. 지표성분 탐색을 위한 추출용매 선정	27
나. HPLC screening 지표물질 탐색	31
2. 지표성분 동정 및 확립을 위한 LC-MS/MS 분석 결과	33
가. LC-MS/MS를 이용한 지표성분 및 구조 확인	33
나. Luteolin-7-O-glucuronide 표준물질 분석 결과 및 지표성분 확립	36
3. 유사 식용불가 식물인 박새의 지표성분 분석을 통한 혼입여부 판별법 확립	39
가. 유사 식용불가 식물의 지표성분 분석을 위한 HPLC 판별 분석법 확립	39
1) 추출 용매 선정 결과	39
2) 추출 조건 선정 결과	42
3) 분석 기기 조건 선정	42

나. HPLC 분석법의 유효성 검증	42
1) 유효성 검증(Method validation)	42
2) 맹검 실험(Blind test)	48
다. 지표성분의 정성 및 정량 분석 결과	51
제 2 절 산마늘 가공식품 중 유사원료 혼입여부 모니터링	54
제 4 장 요 약	56
참고문헌	58

표 목 차

Table 1. Number of food poisoning cases and patients	3
Table 2. Production status of wild plant	7
Table 3. Classification and photo of subject plants	8
Table 4. HPLC screening conditions of hexane extraction	16
Table 5. HPLC screening conditions of methanol and ethylacetate extraction	17
Table 6. LC-MS/MS conditions	19
Table 7. HPLC conditions for luteolin-7-O-glucuronide analysis	22
Table 8. Identification of peak of <i>V. patulum</i> methanol extraction	35
Table 9. LC-MS/MS analysis of luteolin-7-O-glucuronide standard	38
Table 10. Result of LC-MS/MS chromatogram of Luteolin-7-O-glucuronide	40
Table 11. Analysis results of luteolin-7-O-glucuronide by the extraction conditions	43
Table 12. Validation result of analysis method for discriminating <i>V. patulum</i>	47
Table 13. Results of blind test involving <i>V. patulum</i> in <i>A. victorialis</i>	50
Table 14. Quantitative value by mixing ratio of <i>A. victorialis</i> and <i>V. patulum</i>	53
Table 15. Luteolin-7-O-glucuronide content in <i>A. victorialis</i> processed food	55

그림 목차

Fig 1. Figure of <i>A. victorialis</i> processed food	10
Fig 2. Instrument of HPLC-DAD and LC-MS/MS	13
Fig 3. Result of screening analysis of hexane extraction	28
Fig 4. Result of Screening analysis of ethylacetate extraction	29
Fig 5. Result of Screening analysis of methanol extraction	30
Fig 6. Result of HPLC chromatogram (254 nm) and spectrum of the expected indicator in methanol and ethylacetate extraction	32
Fig 7. LC-MS/MS analysis result of <i>A. victorialis</i> and <i>V. patulum</i>	34
Fig 8. LC-MS/MS chromatogram of luteolin-7-O-glucuronide	37
Fig 9. Structure of luteolin-7-O-glucuronide	38
Fig 10. Chromatogram of methanol, ethanol extract(<i>V. patulum</i>) and luteolin-7-O-glucuronide standard	41
Fig 11. Comparison of Efficiency by Extraction Condition.	44
Fig 12. Standard curve of luteolin-7-O-glucuronide	47
Fig 13. Linearity of blind sample by development method	49
Fig 14. Chromatogram by mixing ratio of <i>A. victorialis</i> and <i>V. patulum</i>	52
Fig 15. Chromatogram and spectrum for confirming the presence of <i>V. patulum</i> in processed foods	55

ABSTRACT

Development of Analytical Method for *Allium victorialis* and *Veratrum patulum* Using HPLC and LC-MS/MS

Lee, Cheong Mi

Advisor : Prof. Kim, Kyong Su, Ph.D.

Department of Food and Nutrition

Graduate School of Chosun University

In the recent past, there is an increasing trend in society to use natural and pollution free food in view to maintain good health. Every year in the spring season, a variety of plants are collected from mountains and agriculture fields to consume as food for good taste and refresh lives. However, food poisoning is continuously reported in relation to intake of spring herbs and the majority of these cases are due to mistakes in selection of wild edible plants due to their similar appearance with toxic plants.

The wild edible plant *Allium victorialis* is often confused with plant *Veratrum patulum*, due to similarity in physical appearance. *V. patulum* causes poisoning symptoms such as hypotension, vomiting, dizziness, and abdominal pain. Thus to avoid any confusion of *V. patulum* with *A. victorialis*; an accurate method is very much required at the time of harvesting plants. This study is therefore designed to develop an analytical method for identification of *A. victorialis* and to prevent its possible adultration due to *V. patulum*.

First the elemental contents were analyzed and applied to identify *V. patulum* contained in *A. victorialis*. Then a discriminant method for analyzing selected

indicator was carried out, after method validation and blind tests confirmation. Finally, the developed method was applied to the processed foods in the markets to confirm the indicator compound for any adulteration. The HPLC-DAD and LC-MS/MS were used as analytical techniques in this study.

The HPLC-DAD screening test was performed with the samples solutions in which the polarity index was sequentially extracted using a soxhelt apparatus; to check the indicator component. Peak was confirmed as luteolin-7-O-glucuronide and analyzed using LC-MS/MS for the confirmed peak, and was established as the final indicator component of *V. patulum* after comparative analysis with the standard.

For efficient analysis, this study developed an efficient extraction method too for analytical analysis of luteolin-7-O-glucuronide contained in *V. patulum*. A methanol reflux extract under the condition of 2 hours was found as optimum extraction method. Proper method validation was carried out to obtain the reliability of the developed method and effectiveness of the obtained results. In order to confirm *V. patulum* contained in *A. victorialis*, the luteolin-7-O-glucuronide analysis method was applied to 19 processed foods commonly consumed in South Korea, and were found that there is no contamination of *V. patulum* and safe from causing aforementioned symptoms of poisoning.

From this research, the indicator compound of luteolin-7-O-glucuronide was developed and the analysis method so designed was applied successfully to determine whether there is any mixing of *V. patulum* with *A. victorialis* in processed foods from open markets of South Korea. As a result of this research, it will be possible to minimize damage by prompt response to the cause of food poisoning caused by *V. patulum* in *A. victorialis*. This will improve the reliability foods especially made of spring herb *A. victorialis*.

제 1 장 서 론

경제 규모가 커지고 국민 소득의 증가로 삶의 질이 향상되면서 배고픔에 대한 욕구 충족이 목적이던 과거와 달리 신체의 건강을 비롯한 먹는 즐거움을 위한 식생활로 변화하고 있다. 이와 더불어 안전한 먹을거리에 대한 관심 또한 높아지고 있으나 최근 달걀 살충제 파동, 중금속 오염, 집단 식중독 발생 등 식품안전사고의 증가로 소비자의 불안감은 증가하고 있다.

식품위생법 제2조 제14호에 따르면 “식중독”이란 ‘식품섭취로 인해 인체에 유해한 미생물 또는 유독물질에 의하여 발생하였거나 발생한 것으로 판단되는 감염성 질환 또는 독소형 질환’으로 정의한다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 ‘식품 또는 물의 섭취에 의해 발생되었거나 발생한 것으로 생각되는 감염성 또는 독소형 질환’으로 정의하였으며 전 세계적으로 식품의 안전을 위협하는 위해요인은 식중독을 포함한 오염된 식품에 기인한다고 보고하였다. 과거와 비교하여 향상된 위생관리 수준과 국민의 높은 식품안전수준으로 식품오염에 기인한 식중독의 발생 건수는 낮아질 것으로 예상되었으나 핵가족화로 인한 외식 중심 식사, 지역 및 국가 간 교류 증가 등 다양한 원인으로 빈번하게 발생하고 있다(Katsuhiko et al., 2002; Paul et al., 2001).

식중독은 원인 물질 또는 독성발현 기작을 중심으로 분류되며 원인물질에 따라 미생물 식중독, 화학적 식중독, 자연독 식중독으로 나뉜다. 이 중 자연독 식중독은 자연독 식중독은 자연산물에 의한 식중독으로 동식물에서 자연발생적으로 생성되거나 축적된 유해물질을 사람이 섭취함으로써 발생하는 식중독을 이른다. 식중독 통계 시스템(MFDS, 2018)에 의하면 2002년 이래로 현재에도 식중독 감염이 보고되고 있으며, 자연독과 관련된 식중독 발생 건수와 환자 수는 총 식중독 발생 수치에 비해 소수이지만 꾸준히 확인되고 있다(Table 1). 봄철 산나물에 의한 식중독은 자연독 식중독의 대표적인 예로 대부분 식품에 허용되지 않는 식물인 여로, 박새풀 및 자리공 등의 섭취로부터 기인한다. 이는 식용식물인 원추리, 산마늘 및 도라지뿌리와 유사한 외형으로 인하여 발생하고 있다. 특히 산마늘과 유사하게 생긴 박새는 식중독 발병 시 서맥, 저혈압, 무호흡의 증상이 나타나고 있으며 치료한 사례는 보고되지만 아직 정확한 치료법은 존재하

지 않는다(Aviado & Aviado, 2001; Clozel et al., 1990).

현재 산마늘과 박새의 구별은 채취 시 외형에 의존하고 있으며, 전문가가 아닌 일반인의 경우 판별이 어렵다. 특히 가공공정으로 인해 외형이 변형된 가공식품의 경우 구별이 불가능하기 때문에 이를 보완하기 위한 과학적인 판별법이 필요하다. 따라서, 본 연구는 식중독을 유발하는 박새의 혼입을 파악할 수 있는 신뢰성 있는 과학적인 분석법을 개발하고자 하였다.

Table 1. Number of food poisoning cases and patients

Year	Total food poisoning		Food poisoning by natural cause	
	Number of incidents	Number of patients	Number of incidents	Number of patients
2002	78	2,980	2	23
2003	134	7,906	2	11
2004	165	10,388	3	15
2005	109	5,711	1	3
2006	259	10,833	1	4
2007	510	9,686	3	22
2008	354	7,487	2	50
2009	228	5,999	6	126
2010	271	7,218	6	33
2011	249	7,105	4	27
2012	266	6,058	3	13
2013	235	4,958	1	16
2014	349	7,466	1	5
2015	330	5,981	0	0
2016	399	7,162	1	6

Source : Food and Drug Administration, Food poisoning statistics system, 2018.05.

제 1절 분석 대상 식물 선정

늘어가는 평균 수명 속 건강한 삶을 영위하기 위해 식생활에 대한 꾸준한 관심이 이어지고 있다. 유기농 및 자연산 식품에 대한 가치가 높아지면서 다양한 신선 채소류의 수요량 및 생산량이 증가하고 있으며, 산채류 또한 기능성 측면에서 각광받고 있다 (Table 2, Kang et al., 2013; Kim et al., 2011).

산채(山菜)류는 산야에 자생하며 식용이 가능한 식물로 국내 자생 식물 3,200 여 종 중 약 480 여 종에 해당된다. 이 중 기호성 및 식품학적 가치가 높아 실질적으로 섭취되는 산채류는 약 90여 종에 불과하며 36종만이 전국적으로 재배되고 있다(RDA, 1999). 예로부터 봄에는 겨울철 부족했던 비타민 보충과 따뜻한 봄 햇살에 나른해진 몸을 북돋기 위해 산이나 들에서 향긋한 봄나물을 채취 및 섭취하여 입맛을 돋게 하고 영양을 보충하여 생활에 활력을 주고자 하였다. 최근에는 산채류에 각종 생리활성 물질이 다량 함유되어 있다는 보고가 있으며 항산화능과 관련한 기능성 연구들이 진행되고 있다(Lee et al., 2005b; Lee et al., 2011; Yoon & Kim, 2007).

하지만 봄나물의 채취 및 섭취와 관련하여 식중독 사례가 지속적으로 보고되고 있으며, 이는 식용 산나물과 독성식물의 유사한 외형으로 오인하여 섭취하는 경우가 다수이다. 특히 4-5월에 채취되는 봄나물은 꽃이나 열매가 열리지 않은 어린순을 채취하므로 전문가가 아닌 경우 구별이 쉽지 않으며, 대표적인 예로 매년 봄마다 식중독 사고가 보고되는 원추리-여로(식용불가), 산마늘-박새(식용불가), 도라지-자리공(식용불가) 등이 있다. Lee 등(2005a)의 연구에 따르면, 일가족 5명이 박새를 산마늘로 오인하여 복용한 후 급성 병색으로 기면 상태를 보이는 등 구토, 복통 등의 증세와 더불어 저혈압 및 심정지와 같은 심각한 부작용을 나타내었다. Table 3의 그림과 같이 산마늘과 박새의 잎은 유사한 외형을 지니고 있다. 산마늘은 길이는 20-30 cm, 폭은 3-10 cm로 넓은 타원형의 잎으로 2-3매가 나며 박새는 세로로 주름이 진 넓은 타원형의 잎이 어긋나게 달려있다(Lee, 1982). 잎의 모양이 유사하여 전문가가 아닌 일반인의 경우 구별이 힘들며 오인으로 인하여 중독되는 사례가 종종 보고되고 있다.

산마늘(*Allium victorialis*)은 무기성분 및 비타민이 풍부하여 사람의 생명을 연장해

주는 식물이라 하여 ‘명이(茗蕒)나물’이라고 흔히 불려진다(Kim, 2013). 국내에서는 주로 울릉도를 비롯한 설악산, 지리산 등의 해발 800 m 이상의 서늘한 기후를 지닌 고산지대에 주로 자생하고 있으며(Kim et al., 2010b), 산마늘은 마늘, 양파, 파 부추 등과 동일한 *Allium*속으로 마늘 향이 강하다(Huh et al., 2006; Park et al., 1991). 산마늘은 3~5 월 어린 순과 줄기를 채취하여 섭취하며 독특한 향과 맛으로 인하여 기호성도 강하다(Choi et al., 1993; Jeong et al., 2005). 이에 수요량이 많아져 재배량도 늘고 있다. 산마늘의 재배량은 2015년 267T에서 2016년 349T으로 23.32%로 크게 증가하였으며, 이 값은 전체 산나물의 생산량의 증감률인 2.27%와 비교하였을 때 굉장히 큰 성장을 보임을 확인할 수 있다. 더불어 산마늘의 생산액 또한 2015년 4,817백만 원에서 2016년 6,217백만 원으로 22.52%의 높은 상승률을 보였다(Table 3). 산마늘의 수요량 증가의 배경으로 산마늘의 특유의 맛과 향을 비롯하여 다양한 효능이 있다. 산마늘은 비타민 결핍증, 소화기 계통 질병(위염, 복통, 변비 등), 고혈압, 신경쇠약, 건망증, 불면증 및 심장병 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있고 한의학에서는 산마늘은 한약재로서 각충(荻蔥) 또는 산충(山葱)으로 불리며 장기의 내부의 독성을 제거 또는 유정(遺精)의 치료에 사용된다(Moon, 1991; Ham et al., 2004; Kim et al., 1997; Kim et al., 2010a; Lim et al., 1996). 이와 같은 다양한 효능으로 최근 의약품 및 기능성 식품으로 주목받고 있다(Choi et al., 2005; Lee, 2007).

수분 (83.5%), 탄수화물 (10.2%), 조단백질 (4.3%), 조지방 (1.1%)으로 구성되어 있는 산마늘은 황함유 유기화합물이 다량 함유되어 있으며(Choi et al., 2005), allicin, astragalin, diallyldisulfide, kaempferol, methylallyldisulfide 및 quercetin 등의 활성물질이 보고되었다(Lee et al., 2007; Nishimura et al., 2000). Andersen과 Fossen (1995)은 acylation pattern을 보이는 두 개의 새로운 anthocyanin을 분리하였고 Lim 등(1996)은 flavonoid류 및 furostanol glycoside compound류의 구조를 보고하였다. Lee 등(2007)은 산마늘의 추출물을 분획하여 astragalin, kaempferol, quercetin 및 ferulic acid를 확인하였다. 더불어 산마늘은 항산화(Shirataki et al., 2001; Kwon et al., 2010), 항암 활성(Ham et al., 2004; Lee et al., 2001)을 비롯한 동맥경화, 고지혈증 및 콜레스테롤 억제 효능(Choi et al., 2005; Kim et al., 2000; Lee et al., 2004)에 관한 연구가 보고되었다.

산마늘과 유사한 외형을 지닌 박새(*Veratrum patulum*)는 한국, 중국, 일본, 러시아 등지에 분포하고 있으며 고산지대에서 군락을 이루어 자라나는 여러해살이 식물이다. 박새는 멜란티움과(Melanthiaceae) 여로속(*Veratrum*)으로 현행되고 있는 식품의약품안전처의 「식품의 기준 및 규격」에서 규정하고 있는 식품에 사용할 수 있는 원료목록에 등재되어 있지 않는 식용 불가능한 식물이다. 여로 속 식물들은 환경조건 및 지역에 따라 외부형태적인 변이가 심하여 박새 외에도 국내에서 백여로(*Veratrum album* var. *grandiflorum* Max.), 흑여로(*Veratrum nigrum*) 및 녹여로(*Veratrum viride* Aiton)가 자생하고 있다(Lee, 1982). 여로 속은 200 여 종의 스테로이드성 알칼로이드가 존재하며, 특히 박새의 경우 독성 물질으로 보고된 veratramine에 의한 중독 사례 등이 주로 연구되어졌다(Heretsch & Giannis, 2015; Gaillard & Pepin, 2001). 박새의 알칼로이드는 jerveratrum 알칼로이드와 ceveratrum 알칼로이드 2 종류로 구분되며, ceveratrum 알칼로이드는 여러 가지 산들과 구조적 결합이 가능하여 저혈압을 유발한다(James et al., 2004). 박새의 독성성분으로 알려진 veratrum 알칼로이드류는 골격근, 신경 및 심장세포에 작용하여 Bezold-Jarisch reflex라고 불리는 서맥, 저혈압, 무호흡의 증상을 유발한다고 알려져 있다(Aviado & Aviado, 2001; Clozel et al., 1990; Furbee & Wermuth, 1997; Hainsworth, 1991; Hintze, 1987; Zagle et al., 2005). 1940 ~ 1950 년대 서양의학에서는 혈압강하제로 연구되었으나 부작용으로 인하여 사용이 중지되기도 하였다(Beasley & Robinson, 1954; Currens et al., 1953).





따라서 본 연구에서는 식용 식물로서 *Allium*속 산마늘과 식용이 불가능한 유사 식물로서 *Veratrum*속 박새를 선정하여 식중독 발생 시 혼입여부를 판별할 수 있는 연구를 진행하고자 한다.

Table 2. Production status of wild plant

Plant	Amount(ton)			Sales(million won)		
	Year		Rate of	Year		Rate of
	2015	2016	change (%)	2015	2016	change (%)
Total	42,231	43,214	2.27	383,189	405,985	5.61
<i>Pteridium aquilinum</i>	9,244	9,553	3.23	52,440	58,421	10.24
<i>Platycodon grandiflorus</i>	6,071	6,665	8.90	120,374	119,190	-0.99
<i>Codonopsis lanceolata</i>	9,039	8,622	-4.83	134,277	134,686	0.30
<i>Aralia elata</i>	1,105	1,394	20.76	12,260	15,679	21.80
<i>Aster scaber</i>	7,198	7,306	1.49	25,537	34,321	25.59
<i>Osmunda japonica</i>	45	96	53.33	625	1,413	55.78
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	2,409	2,001	-20.39	4,983	5,342	6.72
<i>Hemerocallis fulva</i>	246	133	-85.88	981	429	-128.96
Allium victorialis	267	349	23.32	4,817	6,217	22.52
<i>Cirium setidens</i>	4,394	5,130	14.34	13,829	16,284	15.08
<i>Heracleum moellendorffii</i>	64	69	6.46	591	617	4.17
<i>Aruncus dioicus</i>	116	193	39.76	1,290	2,161	40.29
<i>Phyllostachys pubescens</i>	261	206	-26.26	978	668	-46.46
Other	1,771	1,496	-18.33	10,207	10,558	3.33

Source : Korea Forest Service, 2016 Forest Products Production Survey Report, p. 17

Table 3. Classification and photo of subject plants

		Edible plant <i>A. victorialis</i>	Not edible plant <i>V. patulum</i>
Picture	Law		
	Dry		
Order		Asparagales	Liliales
Family		Amaryllidaceae	Melanthiaceae
Genus		<i>Allium</i>	<i>Veratrum</i>
Species		<i>victorialis</i>	<i>patulum</i>

제 2절 연구 목적

본 연구에서는 박새의 혼용으로 인한 식중독으로부터 원인물질을 빠르게 파악하여 피해를 최소화하기 위해 가공에 영향을 받지 않는 지표성분을 이용하여 판별이 가능한 이화학적 분석법을 개발을 목표로 하였다. 이화학적 분석법 개발에 있어 판별의 명확성, 분석 데이터의 높은 정확도 및 재현성, 보편적인 분석기기의 사용, 효율적인 전처리 및 분석, 저렴한 분석비용 등을 주안점으로 고려하였다.

본 연구에서는 산마늘에 함유되어 있는 박새를 확인하기 위한 지표성분을 탐색 및 선정하여 지표성분을 분석하기 위한 판별법을 개발하고 최종적으로 가공식품에 함유 유무를 확인하고자 한다. 박새를 판별하기 위한 방법으로 박새의 독성 알칼로이드인 veratramine 및 protoveratrine을 분석하는 방법이 존재하지만 알칼로이드 분석은 전처리과정 및 분석과정이 복잡하여 재현성이 현저히 떨어지기 때문에 전처리 및 분석 과정이 편리하며 가공공정에 의해 영향을 받지 않는 이화학적 분석법의 개발이 필요하였다. 이에 본 연구에서는 식중독의 발생 시 원인 식물의 빠른 파악을 통한 신속한 대응이 가능하도록 산마늘에 혼입되어 있는 박새를 판별할 수 있는 이화학적 분석법 개발을 하고자 한다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1절 재료 및 분석기기

1. 시료

가. 원시료 및 가공식품의 구입

본 연구를 위하여 식용식물인 산마늘과 식용불가 식물인 박새는 2017년도 한국자생 식물협회로부터 생시료의 형태로 수급 받아 이용하였다.

산마늘 가공식품은 대부분 ‘명이 나물’으로 불리는 간장절임 형태로 판매되고 있었으며, 광주광역시 내 대형마트와 온라인을 이용하여 19건의 모니터링 시료를 구입하였다 (Fig 1).



Fig 1. Figure of *A. victorialis* processed food

나. 시료의 전처리

산마늘과 박새의 원시료는 흡과 이물질을 제거하기 위해 흐르는 증류수에 수세하였고, 간장절임의 산마늘 가공식품은 염분 제거를 위하여 증류수에 5분간 침지 후 수세하였다. 이 후 물기를 제거하여 60℃ 조건의 열풍건조기(GN-012, Hanil GNCO. Co. Ltd., Jangsung, Korea) 하에서 수분함량 15% 이내가 되도록 건조시켰다. 건조한 시료는 분쇄기로 균질화하여 분말상태로 PE 재질의 보관용기에 넣어 분석 전까지 -20℃ 조건의 냉동고 (MICOM CFD-0622, Samsung, Seoul, Korea)에 보관하였다.

2. 시약 및 재료

본 실험에서 시료의 추출 및 HPLC 분석을 위해 Milli-Q ultra pure water purification system(Millipore Co., Massachusetts, USA)에 의하여 18.2 MΩ 수준으로 정제한 증류수 또는 HPLC grade의 water(Fisher scientific, New Hampshire, USA)를 사용하였다. Methanol, ethanol, acetonitrile, ethylacetate 및 hexane은 Fisher Scientific (New Hampshire, USA)에서 HPLC grade 수준의 용액을, trifluoroacetic acid(TFA, Sigma-aldrich, Darmstadt, Germany) 및 luteolin-7-O-glucuronide (Sigma-aldrich, Darmstadt, Germany)와 같은 기타 시약은 분석용 특급시약을 구입하여 사용하였다.

3. 분석 기기

박새의 지표물질 탐색을 위하여 Shimadzu사(Kyoto, Japan)의 HPLC 시스템을 사용하였으며, pump(LC-20AD), autosampler(SIL-20A), column oven(CTO-20A), diode array detector(SPD-M20A), degassing unit(DGU-20_{3R}) 및 communication bus module(CBM-20A)으로 구성되었으며, 190 ~ 800 nm의 전 파장을 동시에 검출이 가능

한 diode array detector(DAD)를 장착한 HPLC (Prominence LC-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하였다. 지표성분 동정 및 확립을 위하여 화합물을 신속히 분리해주는 UPLC(Nexera X2, Shimadzu, Kyoto, Japan), 이온화를 위한 ESI(Electrospray ionisation) 및 time-of-flight(TOF) coupled Ion trap(IT)으로 구성되어 있는, 즉 UPLC-ESI-TOF/MS(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 각 지표성분의 구조를 파악하여 성분을 확인하였다(Fig 2).



Fig 2. Instrument of HPLC-DAD and LC-MS/MS.

제 2절 박새의 지표성분 분석 방법

1. 비휘발성 유기성분의 HPLC 및 LC-MS/MS 분석 방법

가. 시험용액 조제 방법

균질화한 산마늘과 박새 각각 5 g을 soxhlet 장치 하에서 극성도에 따라 순차적으로 hexane, ethylacetate 및 methanol 100 mL를 가하여 80°C 조건으로 8 시간씩 순차적으로 hexane, ethylacetate 및 methanol 추출물을 제조하였다. 수득된 추출물을 paper filter(no. 41, Whatman, Maidstone, USA)로 여과한 후 100 mL로 정용하였다. 정용된 용액을 0.45 μ m membrane syringe filter(Nylon, Whatman, Maidstone, USA)로 여과하여 HPLC screening 분석 및 LC-MS/MS 분석을 위한 시험용액으로 사용하였다.

나. 분석 기기조건

1) 지표물질 탐색을 위한 HPLC-DAD 분석 조건

박새의 지표물질 탐색을 위해 순차적으로 제조한 hexane, ethylacetate, methanol 추출물을 분석하기 위해 HPLC-DAD를 사용하였으며, detector의 검출파장은 190 ~ 800 nm로 full screening 하였다.

보통의 hexane 추출물은 극성 column을 이용하지만, 본 연구에서는 distilled water를 사용하지 않는 조건에서 비극성 컬럼인 Capcell pak C₁₈ (4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μ m, Shiseido, Japan)을 40°C 조건하에서 이용하였다. Hexane 추출물을 분석하기 위하여, 이동상으로 HPLC grade의 ethanol 및 acetonitrile(1:4, v/v)을 혼합한 용액을 등용리방법(isocratic mode)으로 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었으며 5.0 μ L의 시험용

액을 주입하여 50 분 동안 분석하였다(Table 4).

지표물질 탐색을 위해 methanol 및 ethylacetate 추출물의 screening 분석을 진행하였다. 분석법으로 column은 C₁₈-PAQ (4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Shiseido, Japan)을 장착한 HPLC를 사용하였으며, column oven의 온도는 40°C, 유속은 1.0 mL/min으로 흘려주었다. 시험용액은 10.0 μL를 주입하였으며 이동상은 기울기 용리 방법(gradient elution mode)을 이용하여 A 용매는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)가 혼입된 water, B 용매는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)가 혼입된 acetonitrile을 사용하였다. B 용매를 0.5 분부터 30.0 분까지 10%에서 85%로 상승시켰으며, 35.0 분까지 95%로 올려 5 분간 유지하였다. 이후 40.1 분까지 10%로 내린 후 10 분 동안 유지시켜 다음 분석을 위해 안정화 시켰다. 이외의 조건은 hexane 추출물의 screening 분석 방법과 동일하게 진행하였다(Table 5).

분석된 데이터는 Shimadzu LC solution version 1.25(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 활용하여 분석 및 해석되었다.

Table 4. HPLC screening conditions of hexane extraction

HPLC	Prominence LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan)
Wave length (nm)	190 ~ 800
Column	Capcell pak C ₁₈ (4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm,, Shiseido, Japan)
Injection volume (μL)	5.0
Flow rate (mL/min)	1.0
Column Temp. (°C)	40
Runing time (min)	50
Mobile phase	Ethanol, Acetonitrile (1:4, v/v)

Table 5. HPLC screening conditions of methanol and ethylacetate extraction

HPLC	Prominence LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Wave length (nm)	190 ~ 800	
Column	Capcell pak C ₁₈ (4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Shiseido, Japan)	
Injection volume (μL)	10.0	
Flow rate (mL/min)	1.0	
Column Temp. (°C)	40	
Mobile phase	(A) 0.1% TFA/DW, (B) 0.1%TFA/ACN	
	Time (min)	B (%)
Gradient	0.0	10
	0.5	10
	30.0	85
	35.0	95
	40.0	95
	40.1	10
	50	Stop

2) 지표성분 동정 및 확립을 위한 LC-MS/MS 분석 조건

HPLC 분석을 통하여 지표성분으로 추정되는 peak의 성분을 동정하기 위해 UPLC (Nexera X2, Shimadzu, Kyoto, Japan)가 결합된 ESI-TOF/MS(LCMS-IT-TOF, Shimadzu, Japan)을 사용하였다. 5.0 μ L의 시료를 주입하였으며, 분리를 위해 40°C 조건 하에서 비극성 컬럼인 capcell core C₁₈ (2.1 mm i.d. \times 150 mm L., 2.7 μ m, Shiseido, Japan)을 이용하였다. LC-MS/MS의 경우 화합물에 에너지를 가하여 이온화 상태로 만든 후, 이온의 질량 값을 측정하는 분석 기기로 성분의 분리 및 이온화에 도움을 주기 위해서 휘발성 산이 미량 가해진 이동상을 사용하였다. 0.1% trifluoroacetic acid가 포함된 water(A)와 0.1% trifluoroacetic acid가 포함된 acetonitrile(B)을 이동상으로 이용하였으며 기울기 용리조건(gradient elution mode)으로 0.2 mL/min 흘려주었다. 0.5 분까지 B 용매를 10%로 흘려주었으며 20.0 분까지 B 용매를 85%로 상승시켰다. 이후 column의 세척을 위하여 21.0 분까지 B 용매를 95%로 올려준 후 4 분간 유지하였으며, 다음 시료 분석 전 column의 안정화를 위해 25.1 분부터 B 용매를 10%로 급격히 줄여 5 분간 유지하였다. MS/MS 분석 조건으로 N₂ 기체를 1.5 L/min의 속도로 흘려주어 시료를 분무시킨 후, positive mode의 ESI(electro-spray ionization)를 사용하여 이온화 시켰으며, 모세관 전압은 4.5 kV를 주었고 CDL의 온도는 200°C로 유지하였다(Table 6).

Table 6. LC-MS/MS conditions

UPLC	Nexera X2(Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Wave length (nm)	190 ~ 800	
Column	Capcell core C ₁₈ (2.1 mm i.d. × 150 mm L., 2.7 μm, Shiseido, Japan)	
Column Temp. (°C)	40	
Flow rate (mL/min)	0.2	
Injection volume (μL)	5.0	
Mobile phase	(A) 0.1% TFA/DW , (B) 0.1% TFA/ACN	
	Time (min)	B (%)
	0.5	10
	20.0	85
Gradient	21.0	95
	25.0	95
	25.1	10
	30.0	STOP
Mass analyzer	Time-of-Flight (TOF) coupled Ion trap (IT), (LCMS-IT-TOF, Shimadzu, Japan)	
Ionization	ESI (4.5 kV, Positive mode)	
	100 ~ 1,000	
Mass range (m/z)	(Loop time 0.8 sec / event time ≥ 300 msec, repeat 3, ion accumulation 10 msec)	
Nebulizing gas flow	N ₂ , 1.5 L/min	
CDL Temp. (°C)	200	

2. 지표성분 분석을 위한 혼입여부 판별법 확립

가. 지표성분 분석을 위한 최적 추출법 선정

분석법 개발에 있어 분석하고자 하는 지표성분은 효율적으로 검출되어야 한다. 자연에는 다양한 화합물이 존재하며, 화합물은 추출 용매 및 방법에 따라 검출 효율이 큰 차이를 보인다. 식품 또한 다양한 성분이 혼합되어 있는 형태로 효율적인 분석을 위해서 최적 추출 조건 확립이 필요하며, 용매 조건 및 추출 방법을 달리하여 최적 추출 조건을 설립하였다.

1) 추출용매 선정을 위한 시험용액 조제 방법

추출 용매를 선정하기 위하여 균질화된 시료 5 g과 추출용매(methanol 및 ethanol) 100 mL를 80°C 조건으로 2시간 환류 추출(reflux extraction)하였다. 얻어진 추출물을 paper filter(no. 41, Whatman, Maidstone, USA)로 여과 후 100 mL로 정용하였으며, 0.45 µm membrane syringe filter(Nylon, Whatman, Maidstone, USA)로 여과하여 최적 용매를 선정하기 위한 시험용액으로서 이용하였다.

2) 추출방법에 따른 시험용액 조제 방법

최적의 추출 방법을 설립하기 위해 환류 추출 (reflux extraction), 열탕 추출 (hot-water extraction), 초음파 추출 (ultrasonic extraction)로 나누어 30분, 60분 및 120분 분석하였다. 모든 추출물은 시료 5 g과 100 mL의 methanol을 혼합하여 추출하였다. 환류추출물(reflux extraction) 80°C 조건 하에서 환류추출을 하였으며, 열탕추출 (hot-water extraction)은 80°C 조건의 waterbath에서 추출하였고, 초음파추출 (ultrasonic extraction)은 온도조건이 없는 sonicator에서 추출하였다. 추출된 추출액은

paper filter(no. 41, Whatman, Maidstone, USA)로 여과하여 정용하였으며, 이후 0.45 μm membrane syringe filter(Nylon, Whatman, Maidstone, USA)에 통과시킨 용액을 각각 환류추출물, 열탕추출물 및 초음파추출물의 시험용액으로 이용하였다.

나. 지표성분 분석을 위한 HPLC 분석 조건

식용불가 식물인 박새의 혼입 여부를 파악하기 위하여 채택한 지표물질인 luteolin-7-O-glucuronide의 HPLC 분석조건을 수립하였다. Luteolin-7-O-glucuronide의 최대 흡수파장인 254 및 348 nm에서 비교적 간섭이 적은 348 nm를 선정하였으며, 이동상으로 A 용매는 0.1% TFA(trifluoroacetic acid)가 함유된 water을, B 용매는 0.1% TFA가 함유된 acetonitrile을 기울기 용리조건을 활용하여 흘려주었다. 용매의 조성으로는 0.5 분에 B 용매 10%로 시작하여 20.0 분까지 50%으로 올려주었으며, 20.1 분에 95%로 급격히 상승시켜 5 분 동안 유지시켰다. 이후 다음 시료를 분석하기 위한 HPLC의 안정화를 목적으로 25.1 분부터 10 분 동안 B 용매를 10%로 유지시켰다 (Table 7).

Table 7. HPLC conditions for luteolin-7-O-glucuronide analysis

HPLC	Prominence LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Wave length (nm)	348	
Column	Capcell pak C ₁₈ (4.6 mm i.d. × 250 mm L., 5.0 μm, Shiseido, Japan)	
Column Temp. (°C)	40	
Flow rate (mL/min)	1.0	
Injection volume (μL)	10	
Mobile phase	(A) 0.1% TFA/DW , (B) 0.1% TFA/ACN	
	Time (min)	B (%)
	0.0	10
	0.5	10
Gradient	20.0	50
	20.1	95
	25.0	95
	25.1	10
	35.0	10

다. HPLC 분석법의 유효성 검증

1) 유효성 검증 (Method validation)

가) 특이성(Selectivity)

박새에 함유되어 있는 지표성분의 머무름 시간(retention time, RT)이 산나물의 타 성분과 머무름 시간과 중복되지 않게 분석이 가능하도록 분석조건을 수립하였으며, 추가적으로 해당 머무름 시간에 분석하고자 하는 표준물질과 동일한 spectrum이 나타나는지 확인하였다.

나) 직선성(Linearity)

직선성(linearity)을 만족하기 위하여 식용 불가 식물인 박새의 지표물질인 luteolin-7-O-glucuronide 표준물질의 검량선을 작성하였다. 표준용액 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 및 100 mg/kg을 조제하였으며, 각각 표준용액은 3회 반복 측정하였다. 분석된 표준물질의 peak area를 계산하여 검량선을 작성하였으며, 분석된 시험용액 값의 농도가 calibration curve의 측정범위 내에 포함되는지 확인하였다.

다) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

분석하고자 하는 물질이 시료에서 확인이 되는 최소 농도를 검출한계(Limit of detection, LOD)라고 하며 표준용액의 최저 농도를 10회 반복 분석하여 확인된 표준편차의 3.3배를 곱하여 계산하였다.

시료에서 분석하고자 하는 물질을 정량할 수 있는 최소 농도를 정량한계(Limit of quantitation, LOQ)라고 이르며 정량한계는 10배를 곱하고 검량선의 기울기로 나누어

확인하였다.

라) 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)

시료의 추출 이전에 시료에 포함되어 있는 표준물질의 함량과 비슷한 일정 농도의 표준용액을 첨가하여 최적 설립된 분석법으로 추출 및 분석하여 첨가한 외부표준물질의 농도로 회수율을 확인하는 외부 첨가법(spiking test)을 사용하여 정확성(Accuracy)을 측정하였다. 정밀성(Precision)은 7회 이상 반복 측정된 값을 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 나타내었다.

2) 맹검 실험(Blind test)

산마늘과 박새가 알 수 없는 비율로 혼입된 맹검시료에서 박새의 지표성분인 luteolin-7-O-glucuronide의 분석을 통해 개발한 관별법을 평가하고 분석법의 유효성을 검증하고자 하였다

맹검 실험을 위해 타 연구실로부터 혼입비율을 알 수 없는 박새가 혼입된 산마늘 분말 5 건을 제공받아 최종 확립된 추출법 및 분석법을 이용하였다. 지표물질인 luteolin-7-O-glucuronide의 함량에 따른 박새의 혼입비율(w/w%)을 파악하기 위하여 산마늘 시료에 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100%의 박새 시료가 혼입된 추출물을 제조하여 검량선을 작성하였다.

라. 지표성분의 정성 및 정량

본 연구에서 개발 및 검증한 HPLC 최적 분석조건으로 luteolin-7-O-glucuronide 표준용액을 diode array detector(DAD)를 이용하여 분석하였으며, 해당되는 peak의 retention time 및 UV spectrum의 일치 여부를 확인하여 정량하였다.

Luteolin-7-O-glucuronide 표준물질을 이용하여 1,000 mg/kg stock solution을 조제하였으며 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 및 100 mg/kg의 농도로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 표준용액을 HPLC로 분석하여 얻어진 peak area로 검량선을 작성한 후, 이를 이용하여 정량하였다.

3. 최적 분석법을 활용한 산마늘 가공식품 모니터링 방법

가. 시험용액 조제

분말화한 가공식품 시료 5 g과 methanol 100 mL를 플라스크에 넣어 80℃ 조건 하에서 2시간 환류추출(reflux extraction) 하여 얻어진 용액을 paper filter(no. 41, Whatman, Maidstone, USA)로 여과하였다. 여액은 낮은 농도로 함유되어 있는 박새의 여부를 파악하고자 rotary vacuum evaporator(B-480, Buchi, Switzerland)를 이용하여 감압농축하였으며 20 mL에 정용하였다. 0.45 µm membrane syringe filter(Nylon, Whatman, Maidstone, USA)로 여과 후 여액을 시험용액으로 이용하였다.

나. 가공식품 모니터링을 위한 HPLC 분석조건

Luteolin-7-O-glucuronide를 분석하기 위해 최종 확립된 제 2장. 제 2절. 2. 나.의 지표성분 분석을 위한 HPLC 분석 조건에 따라 동일하게 설정하여 가공식품 모니터링을 진행하였다.

제 3장 결과 및 고찰

제 1 절 박새의 지표성분 분석 결과

1. 지표물질 탐색을 위한 HPLC-DAD 분석 결과

가. 지표성분 탐색을 위한 추출용매 선정

지표성분 탐색에 적합한 추출용매를 확인하기 위하여 산마늘 및 식용 불가 식물인 박새를 극성도에 따라 hexane, ethylacetate 및 methanol로 분리된 순차적 추출물을 이용하여 HPLC-DAD 분석을 진행하였다. diode array detector(DAD)를 이용하여 190~800 nm 구간을 full-screening 하였으며, 주요 화합물이 포진되어 있는 203, 230, 254 및 280 nm의 파장에서 확인되는 chromatogram을 비교 분석하였다(Fig 3-5).

비극성 화합물을 확인할 수 있는 hexane 추출물의 203 nm에서는 여러 peak가 확인되었으며, 230, 254 및 280 nm의 경우 상대적으로 적은 개수의 peak이 검출되었고 hexane 추출물을 통틀어 박새에서만 확인되는 특이성 있는 peak는 존재하지 않았다. 중간 극성 및 극성화합물이 나타나는 ethylacetate 추출물 및 methanol 추출물은 hexane 추출물의 결과와 비교하여 높은 분리도를 보였으며, 다양한 peak가 확인되었다. 특히 methanol 추출물은 hexane 추출물 및 ethylacetate 추출물과 비교하여 peak area가 큰 peak이 다량 검출되었으며, 230, 254, 280 nm에서 박새에만 존재하는 특이적인 unknown peak를 확인하여 methanol 추출물을 중심으로 지표물질을 탐색하였다.

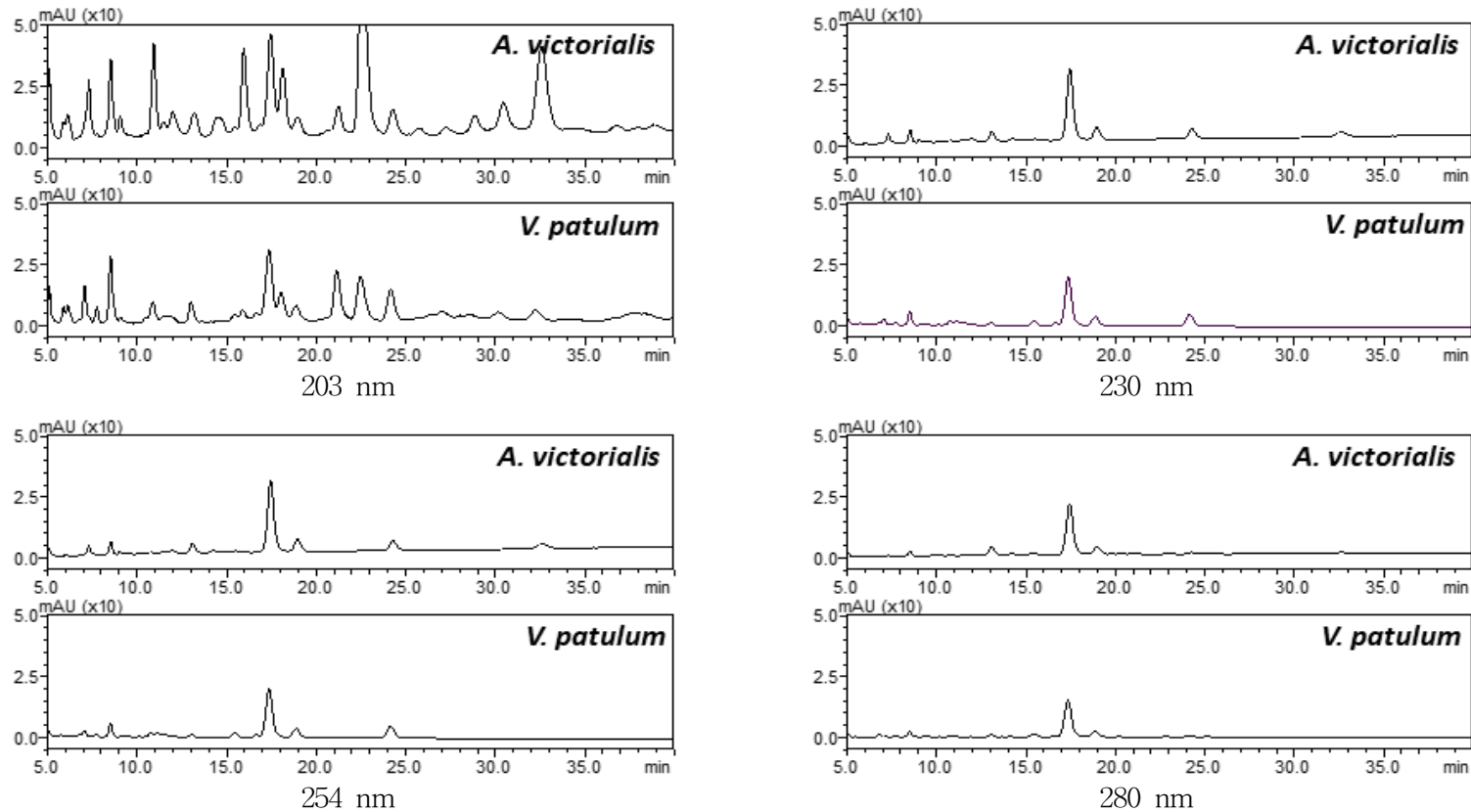


Fig 3. Result of screening analysis of hexane extraction
 (*A. victorialis* : *Allium victorialis*, *V. patulum* : *Veratrum patulum*)

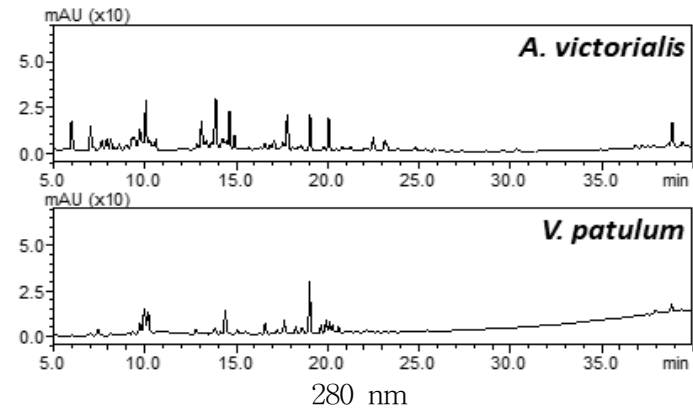
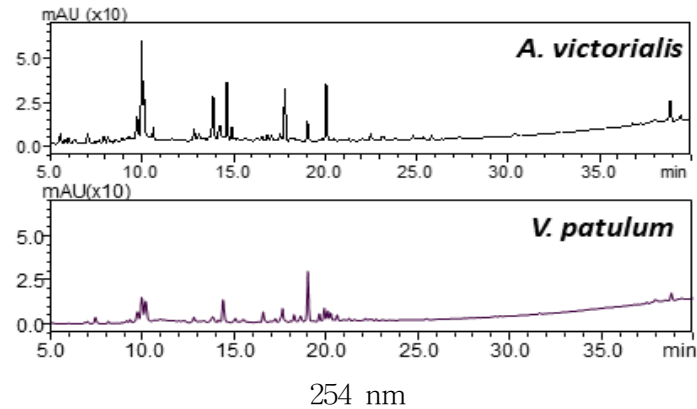
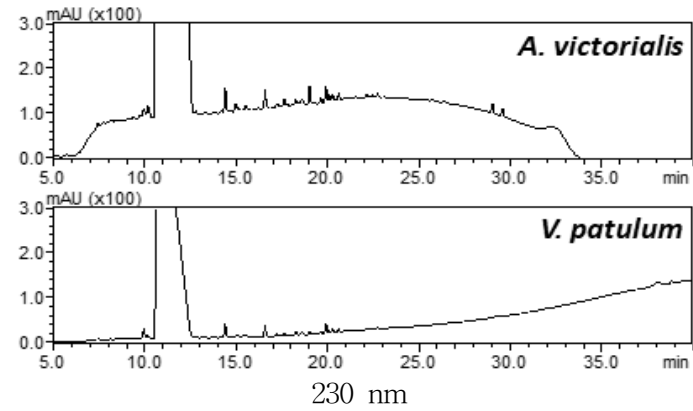
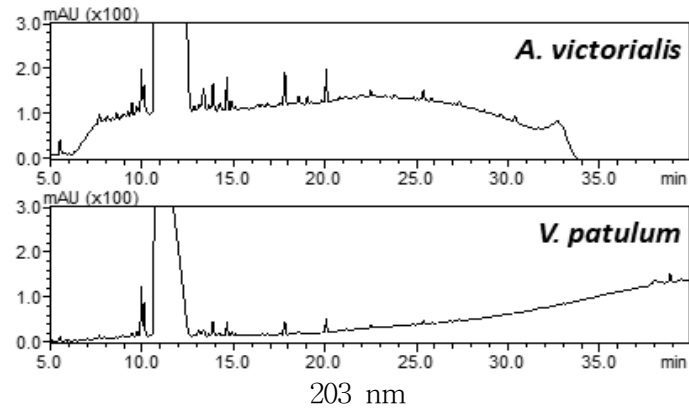


Fig 4. Result of Screening analysis of ethylacetate extraction
 (*A. victorialis* : *Allium victorialis*, *V. patulum* : *Veratrum patulum*)

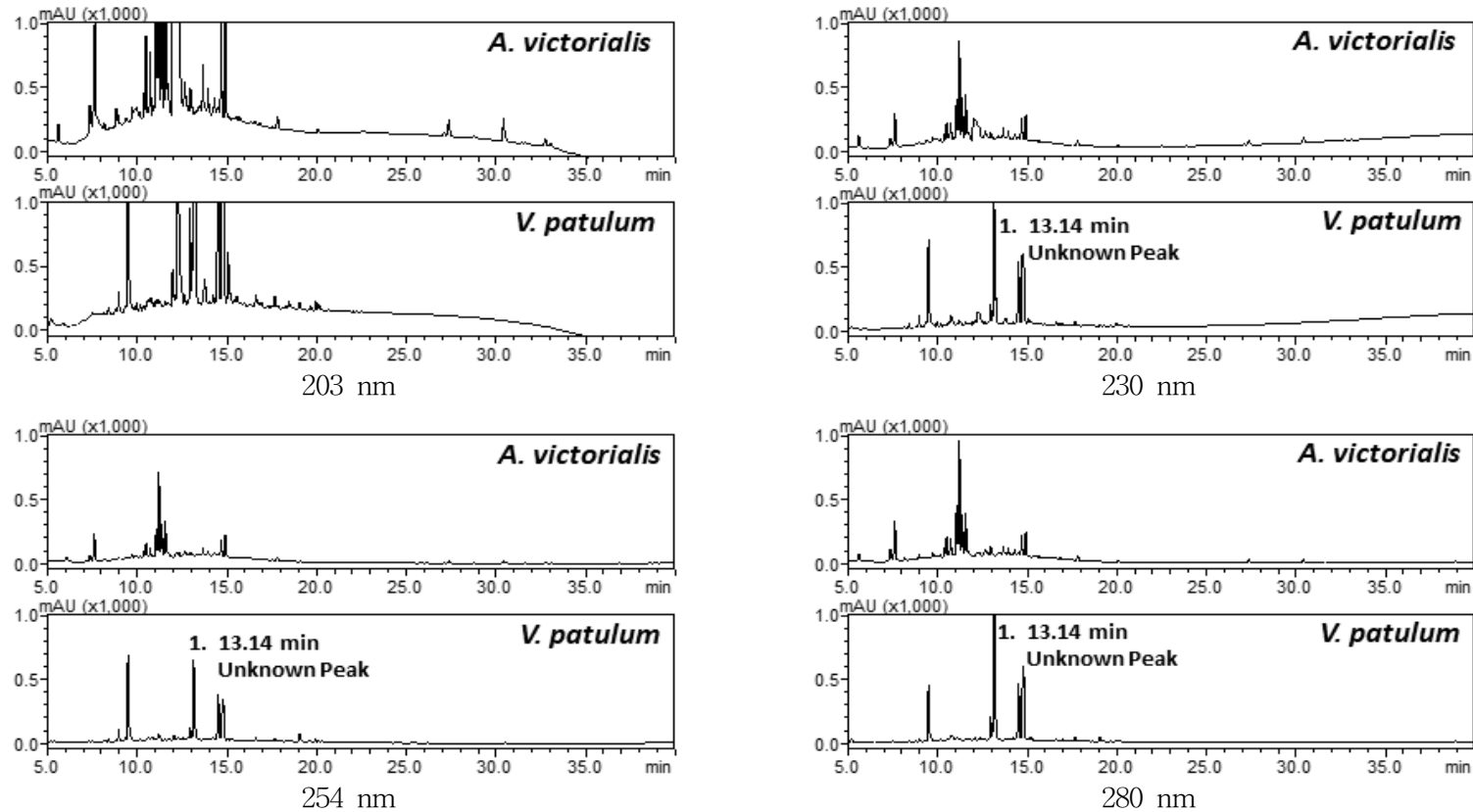


Fig 5. Result of Screening analysis of methanol extraction
(*A. victorialis* : *Allium victorialis*, *V. patulum* : *Veratrum patulum*)

나. HPLC screening 지표물질 탐색

극성 물질이 포함된 methanol 추출물을 대상으로 박새에 포함되어 있는 지표성분을 탐색하였다. 지표성분으로 선정되기 위한 조건인 산마늘에 포함되어 있지 않으면서 박새에 존재하는 물질을 채택하였다.

Methanol 순차적 추출물의 HPLC-DAD 분석결과 230, 254 및 280 nm 조건에서 박새에만 존재하여 지표물질로 가능할 것으로 사료되는 13.14 분의 unknown peak를 검출하였으며, 최대흡수파장은 254, 348 nm로 확인되었다. 추가적으로 ethylacetate 추출물에서 unknown peak의 RT를 확인해보았으나 확인되지 않았다. Methanol 순차적 추출물에서 확인된 13.14 분의 unknown peak를 산마늘과 박새를 판별할 수 있는 지표성분으로 추측하였으며, 이를 중심으로 LC-MS/MS 분석을 진행하였다(Fig 6).

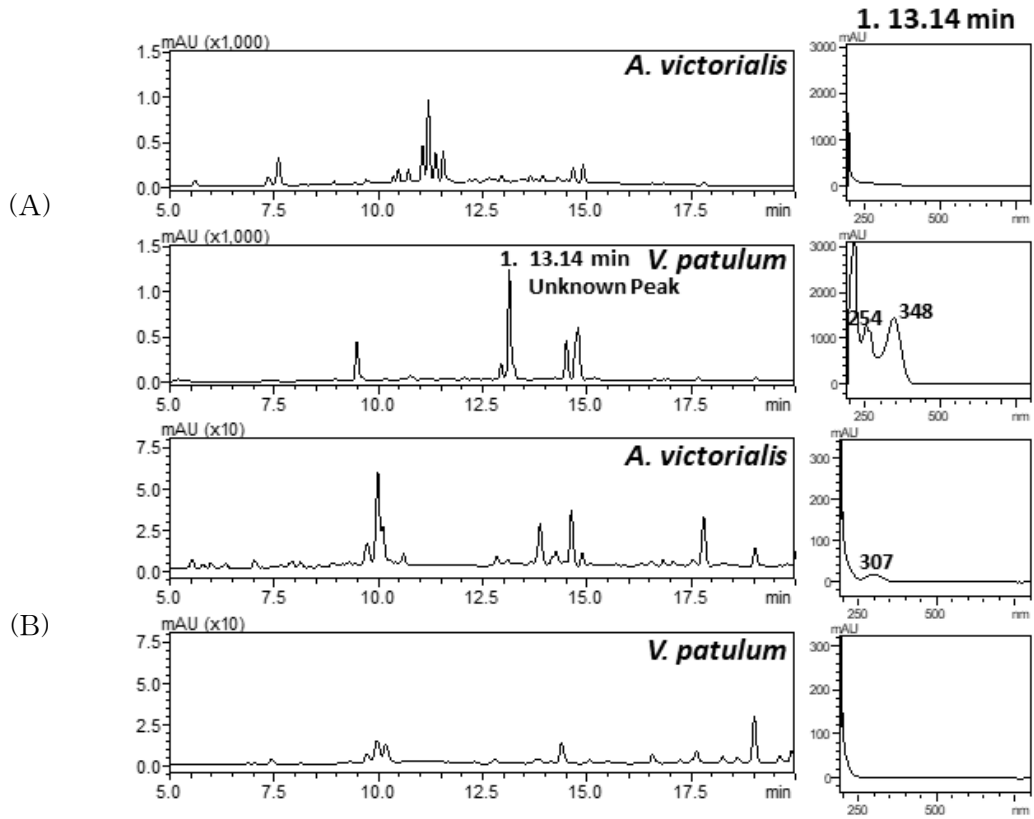


Fig 6. HPLC Result of HPLC chromatogram (254 nm) and spectrum of the expected indicator in methanol and ethylacetate extraction

(A) Methanol extract, (B) Ehtylacetate extract

(*A. victorialis* : *Allium victorialis*, *V. patulum* : *Veratrum patulum*)

2. 지표성분 동정 및 확립을 위한 LC-MS/MS 분석 결과

가. LC-MS/MS를 이용한 지표성분 및 구조 확인

산마늘과 유사한 외형을 지닌 박새의 관별하기 위하여 박새에 포함되어 있는 지표성분을 동정하고자 하였다. 순차적 추출물 중 극성화합물이 주로 나타나는 methanol 추출물의 HPLC-DAD 분석결과 13.14분에 확인된 unknown peak을 동정하기 위해 LC-MS/MS 분석을 진행하였다. HPLC와 비교하여 높은 압력으로 빠른 분석이 가능하며 분리능이 좋은 UPLC를 이용하였으며 13.14분에 확인되었던 unknown peak는 7.36분에 분석되었다. 지표성분으로 추측된 unknown peak는 254 및 348 nm에서 최대 흡광도를 보였다. LC-MS/MS 분석을 통해 unknown peak의 $[M+H]^+$ 이온 질량값(m/z)은 463.085로 $C_{21}H_{18}O_{12}$ 으로 확인되었으며(Fig 7), mass spectrum을 Formula Predictor(ver. 1.2) 및 Accurate Mass Calculator(Shimadzu, Kyoto, Japan) 프로그램으로 해석하였다. 그 결과, 질량값이 동일하여 unknown peak는 luteolin-7-O-glucuronide일 것으로 예상하였다(Table 8). 이후 박새의 지표물질로 예측되는 luteolin-7-O-glucuronide의 표준물질을 확보하여 분석을 실시하였다.

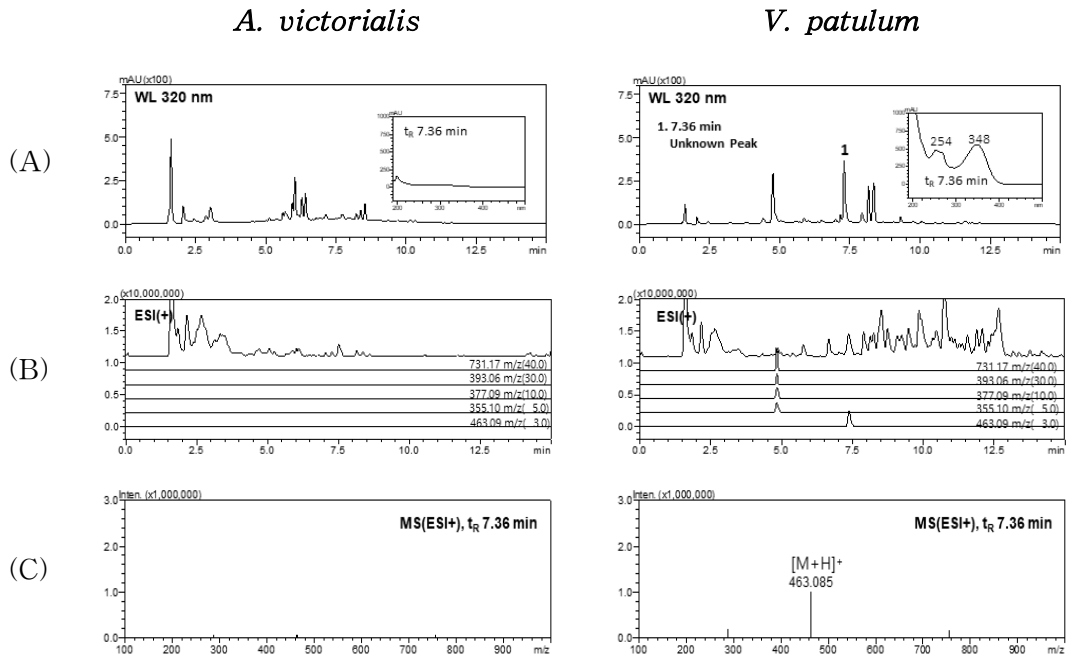


Fig 7. LC-MS/MS analysis result of *A. victorialis* and *V. patulum*

(A) UPLC-DAD chromatogram, (B) LC-MS/MS ion chromatogram in scan mode, (C) MS/MS spectrum

Table 8. Identification of peak of *V. patulum* methanol extraction

RT (min)	λ_{\max} (nm)	Meas. m/z	Ion	Predicted candidate		
				Mass(da)	Formula	Identification
7.36	254 348	463.085	[M+H] ⁺	462.078	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Luteolin-7-O-glucuronide

나. Luteolin-7-O-glucuronide 표준물질 분석 결과 및 지표성분 확립

Sigma사에서 구입한 박새의 지표물질의 후보로서 luteolin-7-O-glucuronide 표준물질을 100 ppm의 농도로 methanol에 녹여 제조한 후 membrane filter(0.45 μ m, Nylon, Whatman, Maidstone, USA)로 여과하여 산마늘 및 박새의 LC-MS/MS 분석방법과 동일한 방법으로 분석하였다.

Unknown peak의 예상물질인 luteolin-7-O-glucuronide의 표준물질 분석결과, 박새 추출물의 분석결과와 동일한 254 및 348 nm의 최대 흡광도를 확인하였다. 질량값(m/z)은 463.085 로 표준물질과 박새추출물의 질량값이 정확하게 일치하였다(Fig 8).

박새와 관련된 luteolin-7-O-glucuronide 연구는 진행되지 않았으나 같은 *Veratrum* 속 식물인 여로에 대한 연구는 진행되어 있었다. Hanawa et al.(1992) 및 Tang et al.(2007)의 연구에 따르면 여로속(*Veratrum*속)에 속해있는 백여로(*Veratrum gradiflorum*) 및 홍안여로(*Veratrum dahuricum*)에서 luteolin-7-O-glucuronide가 확인되었다. 동일한 속의 식물은 화합물의 조성이 유사하므로 박새에서 확인된 peak의 성분을 luteolin-7-O-glucuronide($C_{21}H_{16}O_{12}$)로 확립하였으며, 이를 박새의 지표물질로 선정하여 계속적으로 분석을 진행하였다(Table 8, Fig 9).

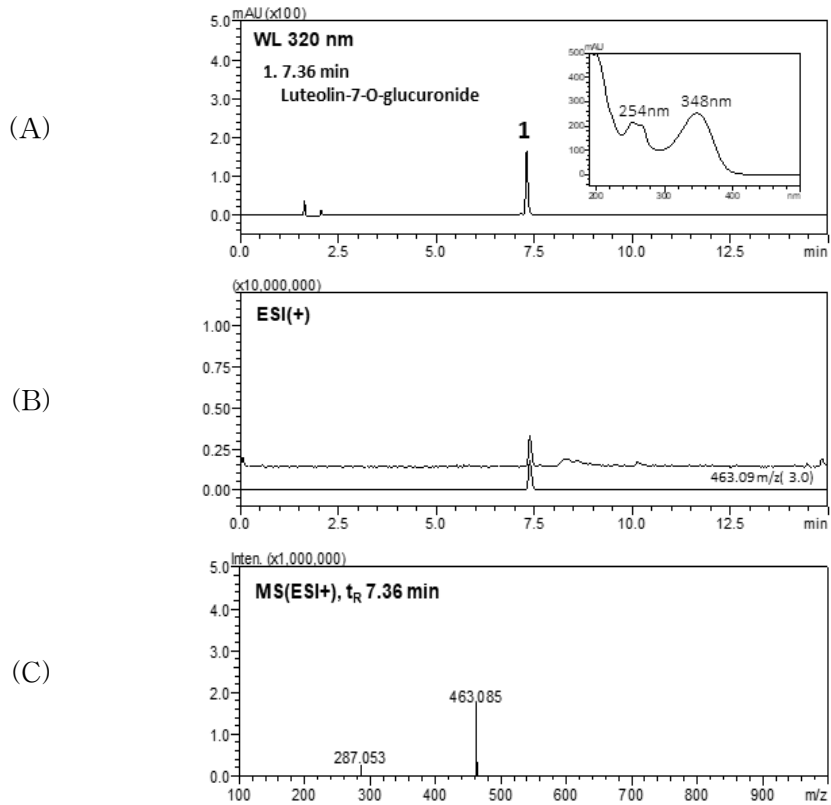


Fig 8. LC-MS/MS chromatogram of luteolin-7-O-glucuronide

(A) UPLC-DAD chromatogram, (B) LC-MS/MS ion chromatogram in scan mode, (C) MS/MS spectrum

Table 9. LC-MS/MS analysis of luteolin-7-O-glucuronide standard

Standard	RT (min)	λ_{\max} (nm)	Meas. m/z	Ion
Luteolin-7-O-glucuronide	7.36	254 348	463.085	[M+H] ⁺

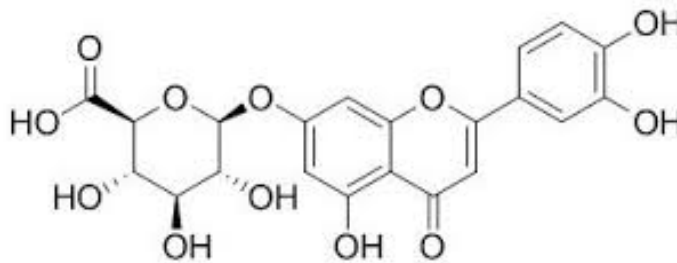


Fig 9. Structure of luteolin-7-O-glucuronide

3. 유사 식용불가 식물인 박새의 지표성분 분석을 통한 혼입여부 판별법 확립

가. 유사 식용불가 식물의 지표성분 분석을 위한 HPLC 판별 분석법 확립

본 연구는 산마늘에 식용 불가 식물인 박새의 혼입여부를 확인하기 위한 연구로 HPLC-DAD 및 LC-MS/MS를 사용하여 박새의 지표물질을 탐색 및 적용하였고 분석 결과를 바탕으로 HPLC를 이용한 최적 판별 분석법을 수립하였다. Screening 실험에 사용하였던 역상 컬럼인 Capcell pak C₁₈을 이용하여 분석을 진행하였으며 분석시간의 용이함을 위하여 기울기 용리 조건을 변경하였다. 지표물질로 선정된 luteolin-7-O-glucuronide의 최대 흡수 파장이자 타 화합물과 중복된 retention time을 갖지 않도록 검출 파장은 348 nm로 설정하였다.

1) 추출 용매 선정 결과

Luteolin-7-O-glucuronide의 최적 추출법을 확립하기 위하여 methanol 및 ethanol 환류추출을 대상으로 최적 추출용매를 선정하였다. 이전의 순차적 추출물 분석 결과 hexane 추출물과 ethylacetate 추출물에선 luteolin-7-O-glucuronide가 확인되지 않았으므로, methanol 추출물과 ethanol 추출물을 대상으로 최적 추출용매를 선정하고자 하였다. Luteolin-7-O-glucuronide 성분은 용매를 methanol로 사용한 경우 박새에서 84.22 mg/kg을 확인하였으며, 용매가 ethanol일 경우 30.04 mg/kg이 검출되었다. Ethanol 추출에 비교하여 methanol 추출물이 2배 이상의 높은 효율을 나타내었으며, luteolin-7-O-glucuronide를 분석하기 위한 최적 추출 용매를 methanol로 선정하였다 (Table 10, Fig 10).

Table 10. Result of LC-MS/MS chromatogram of Luteolin-7-O-glucuronide

(Unit : mg/kg)

Condition	<i>V. patulum</i>
Methanol extract	84.22±0.3341 ¹⁾
Ethanol extract	30.04±1.050

¹⁾ Values are mean ± standard deviations of three (n = 3) measurements

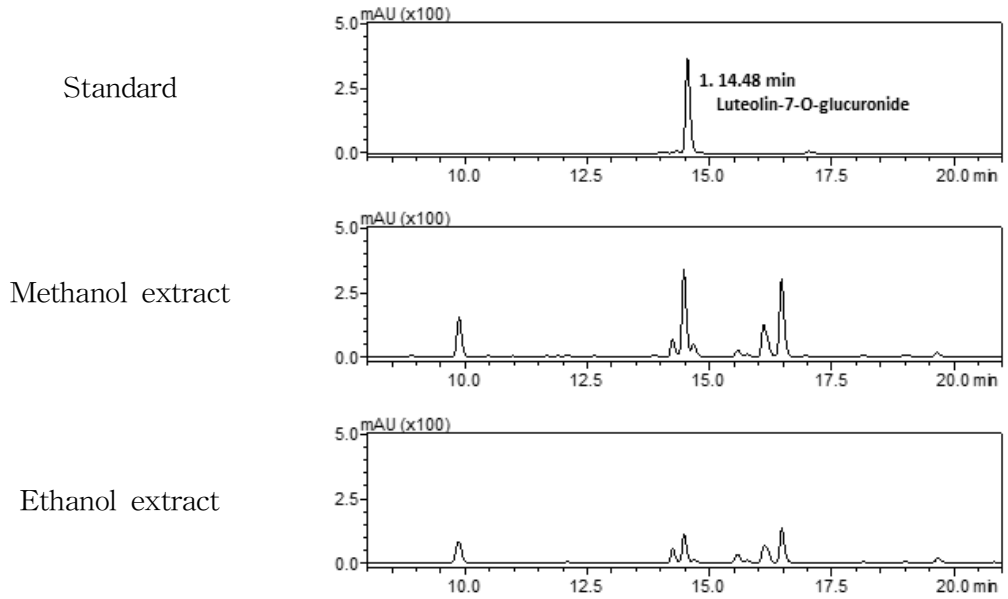


Fig 10. Chromatogram of methanol, ethanol extract(*V. patulum*) and luteolin-7-O-glucuronide standard

2) 추출 조건 선정 결과

추출 및 분석 효율을 높이기 위하여 추출 방법과 시간을 상이하게 제조하여 박새에 함유되어 있는 luteolin-7-O-glucuronide 분석을 진행하였으며 최적 추출조건을 선정하였다. 환류 추출(reflux extract)의 경우 luteolin-7-O-glucuronide의 함량은 30 분, 60 분 및 120 분 조건에서 각 100.229 mg/kg, 112.358 mg/kg 및 129.796 mg/kg으로 나타났으며, 박새 추출물의 추출 시간이 길어짐에 따라 추출 효율 또한 증가하는 추세를 보였다. 30 분, 60 분 및 120 분 열탕 추출(hot-water extraction) 조건하에서 101.081 mg/kg, 111.554 mg/kg 및 127.283 mg/kg 으로, 초음파 추출(ultrasonic extraction) 하에서 93.103 mg/kg, 101.670 mg/kg 및 113.081 mg/kg으로 나타났다. 환류 추출의 경향과 유사하게 열수 추출과 초음파 추출도 추출 시간이 길어질수록 luteolin-7-O-glucuronide의 함량도 높아지는 경향을 보였다.

환류 추출과 열탕 추출은 초음파 추출에 비하여 비교적 높은 추출 효율을 보였으며, 환류 추출이 열탕 추출은 유사한 추출효율을 보였으나 환류추출에서 소량 높게 확인되었다. 최적 추출조건으로 luteolin-7-O-glucuronide의 함량이 가장 높게 검출된 120 분 조건의 환류 추출을 채택하였다(Table 11, Fig 11).

Table 11. Analysis results of luteolin-7-O-glucuronide by the extraction conditions

(unit : mg/kg)

Condition	<i>V. patulum</i>	
Reflux extraction	30 min	100.2±0.6713 ¹⁾
	60 min	112.4±0.8429
	120 min	129.8±0.7962
Hot-water extraction	30 min	101.1±0.9190
	60 min	111.6±0.2466
	120 min	127.3±0.7178
Ultrasonic extraction	30 min	93.10±0.3974
	60 min	101.7±0.6710
	120 min	113.1±0.8199

¹⁾ Values are mean ± standard deviations of three (n = 3) measurements

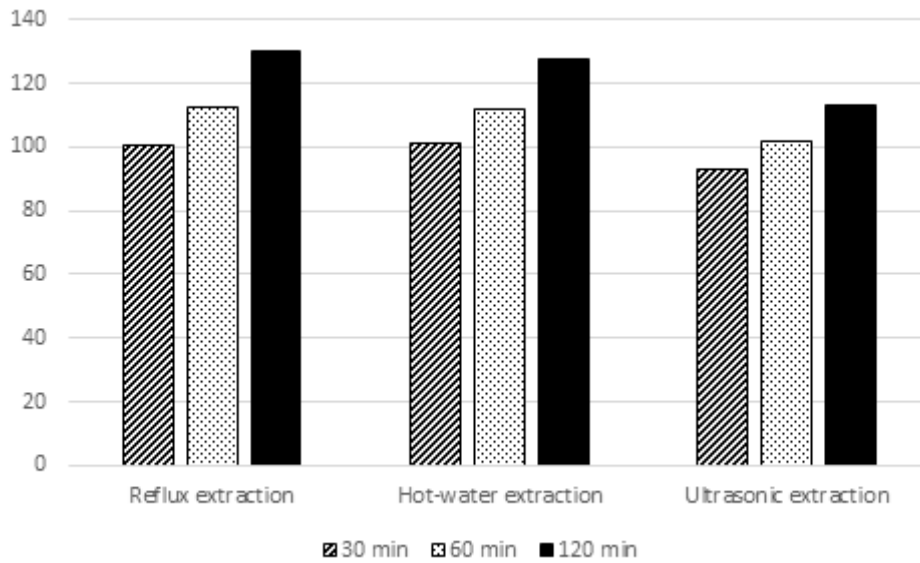


Fig 11. Comparison of efficiency by extraction condition.

3) 분석 기기 조건 선정

식용불가 식물인 박새의 혼입 여부를 파악하기 위하여 채택한 분석물질인 luteolin-7-O-glucuronide의 HPLC 분석 조건을 수립하였다. 비극성 역상컬럼인 Capcell pak C₁₈ (4.6 mm i.d. × 250 mm L., 5.0 μm, Shiseido, Japan)이 장착되어 있는 HPLC-DAD를 이용하였다. 분석과장은 지표 성분의 최대 흡수 파장인 348 nm로 설정하였으며, 산마늘 및 박새에 포함되어 있는 타 성분과 확인하고자 하는 화합물의 분리 여부를 확인하였다. 이외의 조건은 본 지표물질의 여부를 확인하기 위해 순차적 추출물을 기존의 screening 조건인 Table 4과 동일하게 진행하였으나 분석의 효율을 높이고자 기울기 용리 조건을 일부 변경하였다. 주요 peak가 확인되는 0.5 ~ 20.0 분에 B 용매를 10 ~ 50%으로 상승시켰으며, column의 세척을 위해 20.1 분에 B 용매를 95%로 상승시켜 5분간 유지하였다. 다음 분석을 위한 column의 안정화를 목적으로 25.1 분에 B 용매를 10%로 줄여 이를 10분 동안 유지하였다(Table 7).

나. HPLC 분석법의 유효성 검증

본 연구에서 개발한 분석법의 신뢰도를 확보하고자 유효성 검증을 실시하였다. 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성, 정확성 및 맹검 실험을 진행하므로써 산마늘에 혼입된 박새의 여부를 확인할 수 있는 효율적인 실험법임을 검증하였다(Table 12).

1) 유효성 검증(Method validation)

특이성(selectivity)은 여러 화합물이 혼합되어 있는 상태에서 확인하고자 하는 대상 물질을 선택하여 정확하게 측정할 수 있는 능력을 이르는 말로 다른 물질의 간섭없이 분리할 수 있어야 한다. 산마늘과 외형이 유사하나 식용이 불가능한 식물인 박새의 지표 물질로 선정된 luteolin-7-O-glucuronide의 머무름 시간은 14.48 분이였다. 박새 추출물의 분석 결과 동일한 머무름 시간에 luteolin-7-O-glucuronide가 검출되었으며, 다른

화합물의 peak에 의하여 간섭 받지 않고 분리됨을 확인하였다. 지표 성분의 표준물질과 박새 추출물에서 확인된 해당 peak의 최대 흡수파장은 $254(\lambda_{\max} 1)$, $348(\lambda_{\max} 2)$ nm로 UV spectrum이 동일하였다. 직선성(Linearity)을 확인하기 위해 luteolin-7-O-glucuronide의 1,000 mg/kg stock solution을 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 및 100 mg/kg으로 단계적으로 희석한 후 분석하여 peak area 값으로 검량선을 작성하였다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9991 로 우수한 직선성을 보였으며, 분석 성분의 정량값은 5 ~ 100 mg/kg 범위 내에 검출되었다(Fig 12). 348 nm에서 luteolin-7-O-glucuronide의 검출한계(Limit of detection, LOD) 및 정량한계(Limit of quantitation, LOQ)를 측정하였으며, 검출한계는 0.009 mg/kg으로, 정량한계는 0.030 mg/kg으로 확인되었다. 외부 첨가법(spiking test)을 이용하여 luteolin-7-O-glucuronide의 정확성(accuracy)을 측정한 결과, 95.1%로 측정되었다. 정밀성(precision)은 결과 값의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 확인하였으며, 2.85로 만족할 만한 결과 값을 얻었다.

적용된 분석법의 유효성 검증을 통하여 AOAC에서 제시한 기준에 만족하는 값을 얻었으며 본 연구에서 개발된 산마늘 중 박새 혼입 판별법은 재현이 가능하며 정확하여 판별법으로서 충분히 사용이 가능함을 입증하였다.

Table 12. Validation result of analysis method for discriminating *V. patulum*

	LOD ¹⁾ (mg/kg)	LOQ ²⁾ (mg/kg)	R ²	Accuracy	RSD ³⁾
Luteolin-7-O-glucuronide	0.009	0.030	0.9991	95.1	2.85

¹⁾ LOD : Limit of quantification

²⁾ LOQ : Limit of quantification

³⁾ RSD : Relative standard deviation

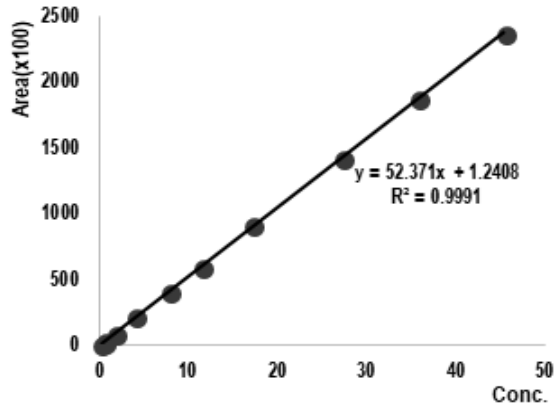


Fig 12. Standard curve of luteolin-7-O-glucuronide

2) 맹검 실험(Blind test)

타 실험실으로부터 분말형태의 맹검 시료 5건을 제공받아 맹검실험을 진행하였으며, 순서로 A, B, C, D, E로 칭하였다. 검량선은 산마늘 분말과 박새 분말을 일정 농도 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100%로 혼입하여 시험용액을 제조한 후 최적분석법을 이용하여 분석하였다. 모든 분석결과는 luteolin-7-O-glucuronide의 RT와 UV spectrum을 비교·확인하여 분석의 정확도를 높였다. 14.48 분에 확인되는 peak의 area를 계산하여 정량하였으며, 혼입비율별(%)로 검량선을 작성하였다(Fig 13).

분석 결과 모든 맹검 시료에는 박새가 혼입되어 있었으며, 오차의 정도는 true value \pm 2.09 로 확인되었다. 가장 낮은 농도로 확인되었던 맹검 시료 D, 측정값은 11.01%이었으나 실제 값은 10.00%으로 확인되어 -1.01%의 오차가 확인되었으며, 박새가 가장 높은 함량 확인된 시료 C의 경우 측정값은 75.55%로 나타났으나 실제값은 74.91%으로 -0.64%으로 확인되었다. 측정된 비율로 계산한 정확도는 96.3 ~ 110.1% 내에서 분석되었다(Table 13).

본 맹검실험을 통하여 박새가 10% 이상 첨가될 경우 본 분석법을 통하여 혼입여부를 파악이 가능할 것으로 확인되었으며, 개발한 판별법의 신뢰도를 높였다.

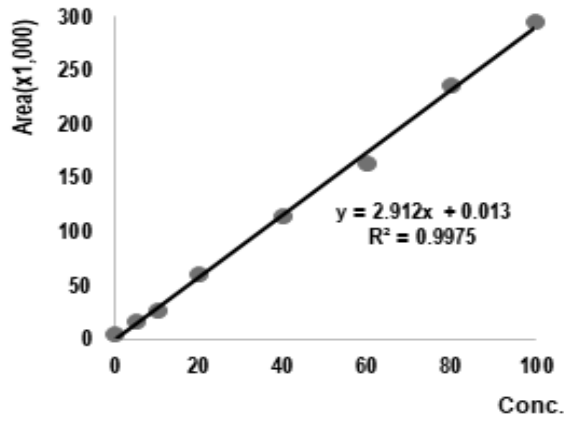


Fig 13. Linearity of blind sample by development method

Table 13. Results of blind test involving *V. patulum* in *A. victorialis*

(Unit : %)

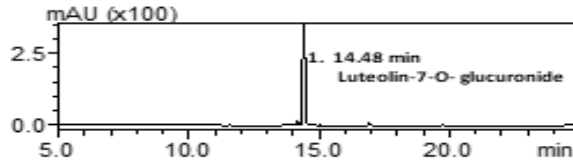
No.	True value	Measure value	Error
A	49.97	52.88	-2.09
B	34.97	33.89	1.08
C	74.91	75.55	-0.64
D	10.00	11.01	-1.01
E	42.01	40.44	1.57

다. 지표성분의 정성 및 정량 분석 결과

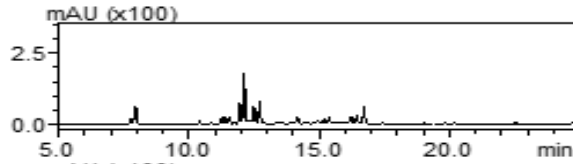
지표성분의 정성 및 정량분석을 위해 확립된 추출법과 분석법을 이용하였다. 정성을 위하여 분석한 결과와 박새의 지표물질인 luteolin-7-O-glucuronide 표준물질의 chromatogram을 비교하여 RT의 동일 여부를 확인하였으며, UV spectrum의 일치여부를 비교하였다. Luteolin-7-O-glucuronide의 RT는 14.48분으로 나타났으며, 최대 흡광도는 254 및 348 nm로 확인되었고 시료분석 시 같은 RT에 있는 peak이 동일한 최대 흡광도를 나타낼 시 같은 물질을 포함하고 있다고 판별하였다(Fig 14).

정량을 위해 luteolin-7-O-glucuronide의 stock solution을 희석시킨 용액으로 외부검량선을 작성하였으며, R^2 는 0.9991 이었다. 정량을 위해 혼입비율별 methanol 추출물을 3회 반복 분석하였다. 혼입 비율별 정량 값은 5% 이하는 검출되지 않았으며, 10%, 20%, 40%, 60% 및 80%에서 각각 136.4 ± 4.224 , 286.2 ± 3.752 , 509.5 ± 8.761 , 1030 ± 16.41 mg/kg으로 나타났다(Table 14).

Luteolin-7-O-glucuronide
 (Standard)

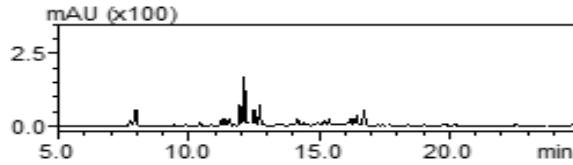


100 % *A. victorialis*



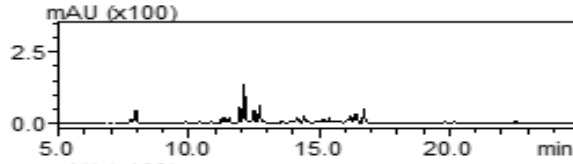
5% *V. patulum*

95% *A. victorialis*



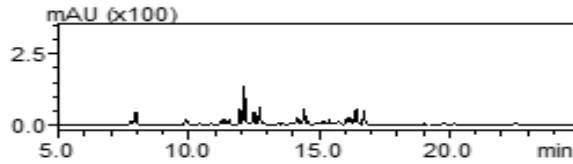
10% *V. patulum*

90% *A. victorialis*



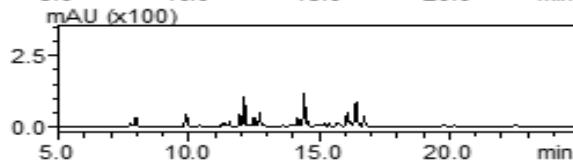
20% *V. patulum*

80% *A. victorialis*



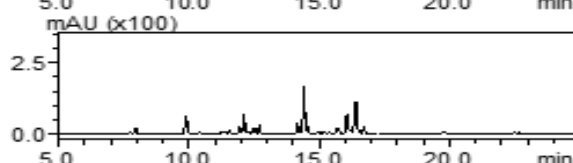
40% *V. patulum*

60% *A. victorialis*



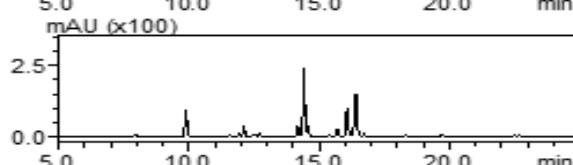
60% *V. patulum*

40% *A. victorialis*



80% *V. patulum*

20% *A. victorialis*



100% *V. patulum*

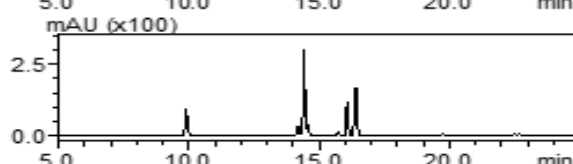


Fig 14. Chromatogram mixing ratio of *A. victorialis* and *V. patulum*

Table 14. Quantitative value by mixing ratio of *A. victorialis* and *V. patulum*

Mixing ratio	value(mg/kg)
10% <i>V. patulum</i> / 90% <i>A. victorialis</i>	136.4 ¹⁾ ±4.224
20% <i>V. patulum</i> / 80% <i>A. victorialis</i>	286.2±3.752
40% <i>V. patulum</i> / 60% <i>A. victorialis</i>	509.5±8.761
60% <i>V. patulum</i> / 40% <i>A. victorialis</i>	719.1±7.064
80% <i>V. patulum</i> / 20% <i>A. victorialis</i>	1030±16.41
100% <i>V. patulum</i>	1252±25.83

¹⁾ Values are mean ± standard deviations of three (n = 3) measurements

제 3 절 산마늘 가공식품 중 유사원료 혼입여부 모니터링

산마늘은 주로 수확시기에만 생물의 형태로 판매되며 그 이외에는 절임 나물의 형태로 판매되었다. 산마늘 절임은 울릉도에서 특산물로 ‘명이나물’이라고 부르며 간장절임의 형태로 판매되며, 특유의 향과 맛으로 선호가 높아 최근 수요량이 증가하고 있다. 따라서 판매되고 있는 산마늘을 주원료로 사용한 가공식품을 직접 또는 온라인을 통해 19 건을 수거하여 전처리 후 최적 분석법으로 분석하여 박새의 혼입여부를 확인하였다.

산마늘 가공식품은 이전의 추출법에서 낮은 농도로 혼입된 박새도 검출이 가능하도록 감압농축을 한 추출물을 시험용액으로 이용하였다. 산마늘 가공식품 총 19 건의 luteolin-7-O-glucuronide 분석 결과, 박새의 지표물질이 검출되는 RT인 14.48 분에 peak이 확인되지 않았으며, UV spectrum 또한 254 및 348 nm에서 최대흡수파장을 보이지 않았다. 산마늘 가공식품의 모니터링을 통해 19건의 시료에 대하여 박새의 혼입이 없었으며, 박새로 인한 식중독의 위험으로부터 안전함을 확인하였다(Table 15, Fig 15).

Table 15. Luteolin-7-O-glucuronide content in *A. victorialis* processed food

Products	No.	Luteolin-7-O-glucuronide Contents (mg/kg)
<i>A. victorialis</i> products	19	ND ¹⁾

¹⁾ ND : Not detected

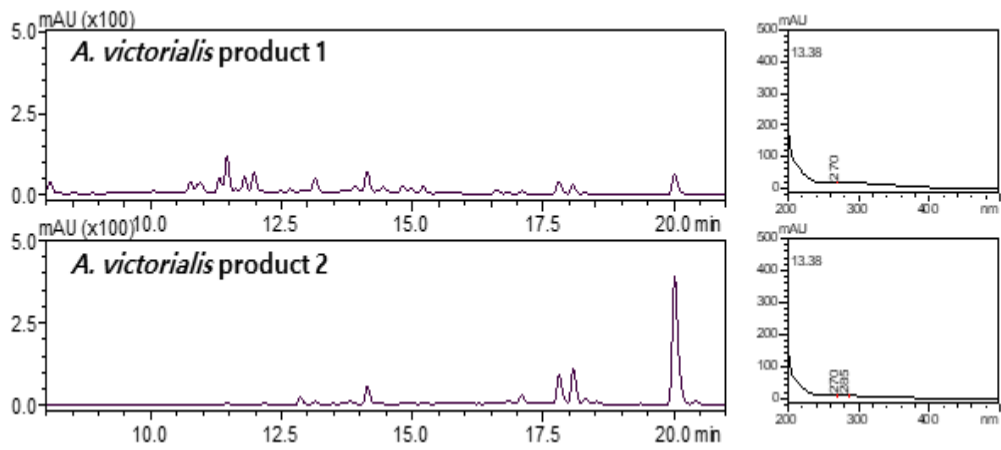


Fig 15. Chromatogram and spectrum for confirming the presence of *V. patulum* in processed foods

제 4장 요약

본 연구는 산마늘에 포함되어 있는 식용불가 식물인 박새의 혼입 여부를 판별하기 위한 실험법을 개발하기 위해 HPLC-DAD 및 LC-MS/MS를 이용하였다.

지표성분을 탐색하기 위해 sohlxet 장치를 이용하여 극성도별로 추출한 순차적 추출물을 제조하였으며 HPLC-DAD 분석을 통해 박새의 methanol 추출물에서 254 nm에 검출되는 13.14분의 unknown peak를 확인하였다. Unknown peak를 지표성분으로 추정하였으며 성분을 동정하기 위하여 LC-MS/MS 분석을 진행하였다. 해당 peak의 최대흡광도는 254 및 348 nm에 검출되었고 $[M+H]^+$ 이온의 질량값(m/z)은 463.085로 MS/MS library search 결과 luteolin-7-O-glucuronide로 동정되었다. Luteolin-7-O-glucuronide의 표준물질을 구입하여 추가 분석하였으며 박새의 지표물질로 추정되던 unknown peak의 RT 및 spectrum과 일치하여 지표물질로서 선정하였다.

박새의 지표물질로 확립된 luteolin-7-O-glucuronide의 최적분석법을 확립하기 위해 HPLC-DAD를 이용하였으며, 확립한 표준물질을 분석하기 위한 최적 분석법을 설정하였다. 최적 추출조건을 확립하기 위하여 methanol과 ethanol으로 용매를 달리하여 추출하였으며, 추출방법은 환류추출, 열탕추출, 초음파 추출로 각각 30분, 60분 및 120분 조건에서 추출하였다. 최종적으로 2시간 조건의 methanol 환류 추출물을 최적 추출법으로 선정하였다. 박새에 함유되어 있는 luteolin-7-O-glucuronide의 최적 분석법으로 HPLC의 분석 조건을 설립하였으며, 개발한 분석법의 신뢰도를 확보하기 위하여 유효성검증 (Method validation)을 진행하였다. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 0.009 및 0.030 mg/kg으로 확인되었으며, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성은 AOAC에서 제시한 기준에 적합한 결과를 얻었다. 맹검 실험 결과 $\pm 9.2\%$ 이내의 오차를 확인하였으며, 10% 박새의 혼입까지 확인이 가능하였다. 분석법을 이용하여 산마늘에 혼입되어 있는 박새의 여부를 판별할 수 있다고 판단하였다.

국내 유통·판매되고 있는 산마늘 가공식품 19건에 대하여 해당 가공식품에는 박새의 지표물질인 luteolin-7-O-glucuronide가 확인되지 않아 박새가 함유되어 있지 않다고 판단하였으며, 이로 인한 식중독으로부터 안전하였다.

본 연구의 결과로서 산마늘에 함유될 수 있는 박새의 혼입여부 판별을 위해 지표성분인 luteolin-7-O-glucuronide를 분석할 수 있는 HPLC 판별법을 개발하였다. 기존에 박새를 판별하기 위해 시각적으로 의존했던 구별법에서 신뢰성을 확보한 과학적인 방법을 이용하여 판별이 가능해졌으며, 보편적으로 사용되는 분석기기인 HPLC-DAD를 이용하여 활용도 또한 높였다. 박새에 의한 식중독 발생 시 본 분석법으로 판별이 가능하며, 타 원료판별 연구의 기초자료로서 활용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Andersen, Ø. M., & Fossen, T. (1995). Anthocyanins with an unusual acylation pattern from stem of *Allium victorialis*. *Phytochemistry*, 40(6), 1809-1812.
- Aviado, D. M., & Aviado, D. G. (2001). The Bezold Jarisch Reflex: a historical perspective of cardiopulmonary reflexes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 940(1), 48-58.
- Beasley, J., & Robinson, K. (1954). Intolerance to "Veriloid". *British Medical Journal*, 1(4857), 316.
- Choi, J.W., Lee, K.T., Kim, W.B., Park, K.K., Chung, W.Y., Lee, J.H., Lim, S.C., Jung, H.J. and Park, H.J. (2005) Effect of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* leaves on triton WR-1339-Induced and poloxamer- 407-induced hyperlipidemic rats and on diet-induced obesity rats. *Korean J. Pharmacogn.*, 36, 109-115.
- Choi J.Y. (2017) Determination of Adulteration in Ginseng(*Panax ginseng*) Products by Multi-target Profiling Method. Chosun university
- Choi, S.T., Lee, J.T. And Park, W.C. (1993) Growth environment and nutritional evaluation of native *Allium victorialis* var *platyphyllum* in Ulrung island. *Hanguk Nonghwahak Hoechi*, 36, 502-509.
- Clozel, J. P., Pisarri, T. E., Coleridge, H. M., & Coleridge, J. C. (1990). Reflex coronary vasodilation evoked by chemical stimulation of cardiac afferent vagal C fibres in dogs. *The Journal of physiology*, 428(1), 215-232.
- Currens, J. H., Myers, G. S., & White, P. D. (1953). The use of protoveratrine in the treatment of hypertensive vascular disease. *American heart journal*, 46(4), 576-592.
- Furbee, B., & Wermuth, M. (1997). Life-threatening plant poisoning. *Critical care clinics*, 13(4), 849-888.
- Hainsworth, R. O. G. E. R. (1991). Reflexes from the heart. *Physiological*

Reviews, 71(3), 617-658.

Ham, S.S., Cui, C.B., Choi, H.T. and Lee, D.S. (2004) Antimutagenic and cytotoxic effects of *Allium victorialis* extracts. Korean J. Food Preserv., 11, 221-226.

Hanawa, F., Tahara, S., & Mizutani, J. (1992). Antifungal stress compounds from *Veratrum grandiflorum* leaves treated with cupric chloride. Phytochemistry, 31(9), 3005-3007.

Heretsch, P., & Giannis, A. (2015). The *Veratrum* and *Solanum* alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 74, pp. 201-232). Academic Press.

Hintze, T. H. (1987). Reflex regulation of the circulation after stimulation of cardiac receptors by prostaglandins. In *Federation proceedings* (Vol. 46, No. 1, pp. 73-80).

Huh, M.K., Sung, J.S., Choi, J.S., Jeong, Y.K., Rhu, E.J. and Chung, K.T. (2006) Population structure and genetic diversity of garlic in Korea by ISSR marker. J. Life Sci., 16, 253-258.

Gaillard, Y., & Pepin, G. (2001). LC-EI-MS determination of veratridine and cevadine in two fatal cases of *Veratrum album* poisoning. Journal of analytical toxicology, 25(6), 481-485.

Jeong J.C., Ok, H.C., Hur, O.S., Kim, C.G., Kim, S.Y. and Kim, W.B. (2005) Food value and postharvest physiological characteristics of wild garlic (*Allium victorialis* var. *platyphyllum*) in Korea. Korean J. Hort. Sci. Technol., 23, 164-169.

James, L. F., Panter, K. E., Gaffield, W., & Molyneux, R. J. (2004). Biomedical applications of poisonous plant research. Journal of agricultural and food chemistry, 52(11), 3211-3230.

Kang, J. H., Chun, H. H., Song, N. B., Kim, M. S., Park, J., Oh, D. H., & Song, K. B. (2013). Effects of electron beam and ultraviolet-C irradiation on quality and microbial populations of leafy vegetables during storage. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 56(3), 301-307.

Katsuhiko Omoe, Machiko Ishikawa, Yu Shimoda, Dong-Liang Hu, Shigeko Ueda,

and Kunihiro Shinagawa. (2002). Detection of seg, seh, and sei genes in Staphylococcus aureus isolated and determination of the enterotoxin productivities of S. aureus isolates harboring seg, seh, or sei genes. J. Clin. Micro. 857-862

Kim, G.N., Cho, M.S. and Kwon, K.W. (2010a) Analysis growth performance and ascorbic acid contents of Allium victorialis var. platyphyllum, Ligularia fischeri, and L. stenocephala under changing light intensity. J. Korean For. Soc., 99, 68-74.

Kim, H. J., Song, H. J., & Song, K. B. (2011). Effect of combined treatment of aqueous chlorine dioxide with ultraviolet-C on the quality of red chicory and pak choi during storage. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 40(2), 245-252.

Kim H. K. (2013) Studies on the Components Change and Antioxidant Activities of Fermented Allium victorialis var. platyphyllum Extracts. Joongbu university

Kim, O. M., Jang, S. Y., Woo, S. M., Jo, Y. J., Choi, M. S., & Jeong, Y. J. (2010b). Changes in the physicochemical properties of tomato wine by alcohol fermentation. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 39(10), 1516-1521.

Kim, T.G., Kim, S.H., Kang, S.Y., Jung, K.K., Choi, D.H., Park, Y.B., Ryu, J.H. and Han, H.M. (2000) Antiatherogenic effect of the extract of Allium victorialis on the experimental atherosclerosis in the rabbit and transgenic mouse. Korean J. Pharmacogn., 31, 149-156.

Kim, W. B., Yoo, K. O., Ryu, S. Y., Seo, J. T., Om, Y. H., & Lim, H. T. (1997). Intraspecific variations of the Allium victorialis var. platyphyllum by polymerase chain reaction. Journal of the Korean Society for Horticultural Science (Korea Republic).

Korea Forest Service, Forest Products Production Survey. 2017.11.

Korea Forest Service, Survey of forest management status. Wild plantation. 2016. 2017.08

Kwon, J. E., Baek, U. H., Jung, I. C., & Sohn, H. Y. (2010). Biological Activity of

Fresh Juice of Wild-Garlic, *Allium victorialis* L. Korean Journal of Food Preservation, 17(4), 541-546.

Lee, H.J., Lee, S.K., Choi, Y.J., Jo, H.J., Kang, H.Y., Lee, S.S. and Choi, D.H. (2007) Extractives from the *Allium victorialis*. J. Korean For. Soc., 98, 106-114.

Lee, H. M., Park, J. S., & Cho, K. H. (2005a). Mass Poisoning with *Veratrum Grandiflorum*. Journal of The Korean Society of Clinical Toxicology, 3.

Lee, K.T., Choi, J.H., Kim, D.H., Son, K.H., Kim, W.B., Kwon, S.H. and Park, H.J. (2001) Constituents and the antitumor principle of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. Arch. Pharm. Res., 24, 44-50.

Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. G., & Lee, I. S. (2005b). Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. Korean Journal of Food Science and Technology, 37(2), 233-240.

Lee, S.S., Mun, S.H., Lee, H.J., Choe, D.H. and Jo, M.H. (2004) Cholesterol inhibitory activities of kaempferol and quercetin isolated from *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. Mokchae Konghak, 32, 17-27.

Lim, S.C., Park, H.J., Yun, S.Y., Lee, M.S. and Kim, W.T. (1996) Structure of flavonoids and furostanol glycosides isolated from the bulbs of *Allium victorialis* L. J. Korean Soc. Hort. Sci., 37, 675-679

Lee, Y. M., Bae, J. H., Jung, H. Y., Kim, J. H., & Park, D. S. (2011). Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 40(1), 29-36.

MFDS, Food poisoning statistics system. 2018.05.

Moon KS (1991) Ingredients and use of herbs. Seoul. Ilwolsa

National Biological Species Information System. 2018.05.02. ,
<http://www.nature.go.kr>

Nishimura, H.T., Takahashi, T., Wijaya, C.H., Satoh, A. and Ariga, T. (2000) Thermochemical transformation of sulfur compounds in Japanese domestic *Allium*,

Allium victorialis L. *Biofactors*, 13, 257-263.

Park, P. S., Lee, M. Y., & Lee, B. R. (1991). Effects of onion diet on carbon tetrachloride toxicity of rats. Korean Society of Food and Nutrition (Korea Republic).

Paul M. O., Donald Y. M. Leung, Heather L. D., Richard P. N., Patrick M. S. (2001). Biochemical and biological properties of the staphylococcal enterotoxin K. *Infection and Immunity*. Jan., 360-366

RDA (1999) Manual of wild edible greens cultivation. Manual of standard farming. No. 60.

Shirataki, Y., Motohashi, N., Tani, S., Sunaga, K., Sakagami, H., Satoh, K., Nakashima, H., Kanamoto, T., Wolfard, K. and Molnar, J. (2001) Antioxidative activity of *Allium victorialis* L. extracts. *Anticancer Res.*, 21, 3331-3339.

Tang, J., Li, H. L., Li, Y. L., & Zhang, W. D. (2007). Flavonoids from rhizomes of *Veratrum dahuricum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(6), 696-697.

Yoon JH, Kim KH. (2007) Biological functions of wild edible greens. *Annals of Plant Resources Research* 6: 219-243

Zagler, B., Zelger, A., Salvatore, C., Pechlaner, C., De Giorgi, F., & Wiedermann, C. J. (2005). Dietary poisoning with *Veratrum album* - a report of two cases. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 117(3), 106-108.