



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](#)

2020년 8월
석사학위 논문

HPLC 및 LC-MS/MS에 의한 곰취 가공식품 중 혼입된 동의나물 판별

조선대학교 대학원

식품영양학과

송 옥 연

HPLC 및 LC-MS/MS에 의한 곰취 가공식품 중 혼입된 동의나물 판별

Determination of *Ligularia fischeri* in mixture of *Caltha
palustris* processed foods by HPLC and LC-MS/MS

2020년 8월 28일

조선대학교 대학원

식품영양학과

송 옥 연

HPLC 및 LC-MS/MS에 의한 곰취 가공식품 중 혼입된 동의나물 판별

지도교수 김 경 수

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2020년 5월

조선대학교 대학원

식품영양학과

송 옥 연

송옥연의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 복 희 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 재 준 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 경 수 (인)

2020 년 6 월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	V
제 1 장 서 론	1
제 2 장 재료 및 방법	7
1. 시료 및 실험재료	7
가. 원시료 및 곰취 가공식품의 구입	7
나. 실험재료 및 분석기기	8
2. HPLC를 이용한 지표성분 탐색	9
가. 시험용액 조제	9
나. 지표성분 탐색을 위한 HPLC 분석 조건	9
3. HPLC를 이용한 지표성분 최적 분석법 선정	13
가. 지표성분 분석을 위한 최적 추출법 선정	13
나. 지표성분 분석을 위한 HPLC 최적 분석 조건	14
4. LC-MS/MS를 이용한 지표성분 동정	15
5. HPLC 분석법의 유효성 검증 및 맹검 실험	17
가. 유효성 검증(Method validation)	17
나. 맹검 실험(Blind test)	19
6. 지표물질의 정성 및 정량 방법	20
7. 곰취 가공식품 모니터링	20

제 3 장 결과 및 고찰	21
1. HPLC를 이용한 지표성분 탐색	21
가. 지표성분 탐색을 위한 추출용매 선정	21
나. HPLC를 이용한 지표물질 탐색	25
2. HPLC를 이용한 지표성분 최적 분석법 선정	27
가. HPLC를 이용한 동의나물의 관별법 확립	27
3. 지표성분 동정 및 확립을 위한 LC-MS/MS 분석 결과	31
가. LC-MS/MS를 이용한 지표성분 및 구조 확인	31
나. 표준물질 분석 결과 및 지표성분 확립	35
4. HPLC 분석법의 유효성 검증 및 맹검 실험 결과	39
가. 유효성 검증(Method validation) 결과	39
나. 맹검 실험(Blind test) 결과	42
5. 지표성분의 정성 및 정량 분석 결과	44
6. 곰취 가공식품 중 유사원료 혼입여부 모니터링	47
제 4 장 요약	49
참고문헌	51

표 목 차

Table 1. Production of short-term income forest products and wild vegetables for the past five years	2
Table 2. Classification of <i>L. fischeri</i> and <i>C. palustris</i>	6
Table 3. HPLC instrument conditions of methanol and ethyl acetate extraction ..	11
Table 4. HPLC instrument conditions of hexane extraction	12
Table 5. LC-MS/MS instrument conditions	16
Table 6. HPLC instrument conditions for analysis of indicators in samples	29
Table 7. Analysis results of unknown peaks by the solvent conditions	30
Table 8. Analysis results of unknown peaks by the extraction conditions	30
Table 9. Identification of peak of <i>C. palustris</i> methanol extraction	34
Table 10. LC-MS/MS analysis of magnoflorine and taspine standard	38
Table 11. Validation result of analysis method for discriminating <i>C. palustris</i>	41
Table 12. Results of blind test involving <i>C. palustris</i> in <i>L. fischeri</i>	43
Table 13. Quantitative result of sample ratio by mixing	46
Table 14. Magnoflorine and taspine content in <i>L. fischeri</i> processed food	48

그림 목 차

Fig 1. Chromatogram comparison result according to wave length of <i>n</i> -hexane extraction	22
Fig 2. Chromatogram comparison result according to wave length of ethyl acetate extraction	23
Fig 3. Chromatogram comparison result according to wave length of methanol extraction	24
Fig 4. HPLC result of chromatogram and spectrum of the expected indicator in methanol extraction	26
Fig 5. <i>L. fischeri</i> and <i>C. palustris</i> chromatogram with UPLC detector	32
Fig 6. LC-MS/MS analysis result of <i>C. palustris</i>	33
Fig 7. UPLC chromatogram of sample and standards	36
Fig 8. LC-MS/MS chromatogram of magnoflorine and taspine	37
Fig 9. Structure of magnoflorine and taspine	38
Fig 10. Standard curve of magnoflorine and taspine	41
Fig 11. Linearity of blind sample by development method	43
Fig 12. Chromatogram mixing ratio of <i>L. fischeri</i> and <i>C. palustris</i>	45
Fig 13. Chromatogram and spectrum for confirming the presence of <i>L. fischeri</i> in processed foods	48

ABSTRACT

Determination of *Ligularia fischeri* in mixture of *Caltha palustris* processed foods by HPLC and LC-MS/MS

Song, Ok Yeon

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

Department of Food and Nutrition

Graduate School of Chosun University

Recently, as the quality of life improves due to the increase of national income. So, natural foods consumption are increasing for example organic foods. In particular, plants are harvested from the mountains or agricultural lands have been recognized as representatives of healthy food, and the number of plants directly harvesting is increasing. As a result, there are increasing in food poisoning cases due to the inadequate consumption of inedible plants against of edible plants.

The samples are suspected of being mixed due to its similar appearance of edible plant. *Caltha palustris* is a toxic plant that can cause blisters, stomach pain, and sediment when it is eaten directly or any mixture of processed food. So, these two sample discrimination method establishment is very needed to prevent food poisoning.

In this study, a screening test was first conducted to search for indicator compounds between *C. palustris*(edible plant) and *L. fischeri*(inedible plant), and it was extracted using soxhlet method, whereas the solvent is used as priority basis. As a result, the methanol was selected as the final solvent. For HPLC analysis, two peaks were identified only in *C. palustris*. These two unknown peaks were

selected as indicator components and their retention times were 13.52 min and 18.16 min, respectively.

Also, in order to establish an efficient analysis method, reflux extraction, hot water extraction and ultrasonic extraction were tried with different times, such as 30 minutes, 60 minutes and 120 minutes, and finally, reflux extraction 120 minutes was selected as the optimal extraction condition.

The unknown peaks found in HPLC were analyzed by LC-MS/MS and it is confirmed the compound of magnoflorine and tsapine. So, it was compared with the standard of both compounds and selected as the indicator compound.

Finally, magnoflorine and tsapine have been identified an indicator compound of *C. palustris*. It will be possible to discriminate indicator compounds through optimal analysis methods when it are mixed in agricultural products distribution or processed food. In addition, it will be possible to minimize the damage caused by ingestion of plants, and *L. fischeri* will be improved as a reliable food in the modern food table.

제 1 장 서 론

제 1절 개 요

안전한 식품을 섭취하는 것은 소비자의 8대 권리 중 기본적인 권리이다. 산나물은 옛날부터 한국인들에게 있어 자연환경 및 사회경제 등의 영향에 의해, 식량자원이 부족하여 다른 나라들보다 이용이 발달하였기 때문에 우리 민족의 역사가 깃든 먹거리로 이용되었다(Hwang, 1991). 최근에는 급격한 국민 소득 및 교육수준 증가에 따라 유기농 및 무농약과 같은 청정임산물과 건강보조식품 등에 대한 관심이 높아지면서 건강을 위한 산학협력들이 이루어져, 다양한 기능성을 가진 산나물의 관심 또한 증가하게 되었다(Nam et al., 2017).

자연 그대로 산야에서 자라는 식물 중 식용 가능한 것을 산채(山菜)라고 정의하고, 우리나라 산야에서 식용으로 이용될 수 있는 식물은 현재 약 480종이며, 식품학적으로 가치와 기호성이 높은 산채는 약 90여 종이다(Yeon et al., 2012; An, 2009).

산채의 산업적 가치는 상대적으로 낮게 평가되었으나, 최근에는 건강식품으로 인식이 바뀌면서 소득 작목으로 부상하고 있으며(Yi & Goh, 2011), 산림청(2019)에 의하면 단기소득임산물의 생산액이 꾸준히 증가함에 따라, 산채류 즉, 산나물의 생산액도 증가하는 추세를 보이고 있다. 2018년 총 단기소득임산물의 생산액은 29,448억 원으로 2014년 총 생산액인 27,800억 원에 비하여 5.9%의 성장률을 보였으며, 단기소득임산물에 속하는 산나물의 경우 2018년 생산액은 4,732억 원으로 2014년의 총 생산액인 3,685억 원에 비하여 28.4%의 높은 성장률을 보였다(Table 1).

산나물의 소득이 높아짐에 따라, 산나물과 외형이 유사한 독초를 오인하여 섭취 후 부작용을 일으키는 식중독 피해가 빈번하게 일어나는데, 특히 꽃이 피기 전 싹이 돌아나는 시기에는 전문가들조차 구별이 힘들다고 한다(KFMA, 2008).

Table 1. Production of short-term income forest products and wild vegetables for the past five years

Unit : 100 million won, (%)

	2014	2015	2016	2017	2018
Short-term income forestry products	27,800	28,704	27,664	29,136	29,448
Wild vegetables	3,685	3,832	4,060	4,119	4,732

Reference : Korea Forest Service(2018 Production of Forest Products)

“식중독”이란 식품섭취에 있어서 유독물질 또는 인체에 유해한 미생물에 의해 발생되었거나 발생한 것으로 판단되는 독소형 및 감염성 질환을 일컫는데(Ko, 2008), 현재 국민들의 식품에 대한 요구가 증가함에 따라 식중독 발생에 대한 위험 또한 증가하고 있어 식품 안전성은 중요한 과제로 떠오르고 있다. 식중독은 원인에 따라 식품에 증식, 부착 된 미생물과, 미생물이 생산한 미생물 식중독, 외부에서부터 혼입된 화학적 식중독 및 식품의 본래 성분으로 존재하는 자연독 식중독으로 나뉜다. 이때 자연독 식중독은 동식물에서 자연적으로 발생하여 생성되거나 축적된 유해물질을 섭취하면서 발생하는 식중독으로, 주로 봄철 산나물에 의한 사례가 대표적이며(KFMA, 2008), 산나물로 오인할 수 있는 독초는 동의나물, 샷갓나물, 여로, 박주가리 및 털머위 등이 있다(KFMA, 2008). 이 중 아직 판별 가능한 분석법이 존재하지 않는, 식용이 가능한 곰취와 식용이 불가능한 동의나물에 대해 판별 가능한 분석법을 개발하고자 한다.

취나물 중 하나인 곰취(*Ligularia fischeri*)는 국화과에 속하는 산나물로 특유의 맛과 향이 뛰어나 오래전부터 즐겨왔다. 주로 중국, 일본, 유럽 및 러시아 등지에 분포하고 있으며, 주로 산의 습지나 비옥한 초생지에서 서식하는 다년생 초본식물이다. 특징으로 높이는 1-2 m 정도이고, 근경은 굵으며 줄기 위쪽에 잔털이 있다(KNA, 2014). 근생잎은 가장자리에 뾰족하고 규칙적인 톱니모양을, 경생엽의 아랫부분은 근생엽에 유사하나 엽병이 짧고 밑부분이 넓어서 엽초처럼 생겼다(Yeon et al., 2012).

우리나라에서는 봄에 주로 어린잎을 채취하여 나물로 이용하였는데, 약리학적으로는 기침, 가래, 두통, 백일해, 천식 및 요통에 효험을 나타내었으며, 혈액순환을 활발하게 하고 황달, 고혈압 및 간장병에 약용하여 전염성 피부병과 고름집에 잎을 빵아 붙였다고 보고된다(Chang et al., 2008).

곰취는 영양학적으로 무기질과 vitamin A, B, C, β -carotene 및 niacin을 고루 함유하고 있다. 그 중 potassium 778 mg/100g, calcium 241 mg/100g, iron 30.926 mg/100g, 섬유소 0.56 mg/100g, β -carotene 4,681 μ g/100g, vitamin A 780 RE/100g 및 수렴성 배당체인 tannin 3.3 ppm/g으로 기능성 식품재료로서 활용가치가 높다(Cho & Kim, 2005; Chang, Kim & Oh, 2008). 아미노산의 총 함량은 3,562 mg/100g으로

alanine, glutamin acid, glycine 및 aspartic acid와 같은 풍미 관련 아미노산들이 높은 비율을 차지하였고, isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, threonine 및 valine은 필수아미노산 중 상당 부분을 구성하고 있다(Ahn et al., 2011; Woo, Shin & Hong, 2017). 또한 곰취의 항산화 효과, 항암, 활성 산소 억제 및 염증억제 등의 효능이 있어 기능성 식품과 의약품 개발에 유용한 자원으로 여겨지며(Bae et al., 2009; Choi, 2019), 식물체 추출물에 대한 생리활성, 품질 특성 등 기능성 성분 분석이 주를 이루고 있다.

동의나물(*Caltha palustris*)은 미나리아재비과에 속하는 곰취와 외형이 유사한 식물로 산간 습지 또는 수변에서 서식하는 다년생 초본식물이다. 특징으로 잎은 뭉쳐서 나고 가장자리 톱니가 둔하며, 표면에 광택이 있고, 줄무늬와 잎자루는 없다. 꽃은 4~5월에 피고 황색으로 해발 700 m의 부근 정도까지 자생이 가능하며 경사가 완만한 곳에서 잘 자란다(Park et al., 2004). 뿌리는 비교적 짧고 굵으며, 꽃자루의 길이는 15 ~ 20 cm 정도이다. 일부 민간에서 식용으로 이용되나, 독성을 갖고 있어서 구토, 부종, 수포, 복통 및 허탈 등의 증상을 유발할 수 있기 때문에 현재 우리나라에서는 식품에 사용할 수 있는 식품 원재료에 등재되어 있지 않은 식용이 불가능한 식물이지만, 약용으로는 줄기와 잎으로 즙을 내어 구토제로 이용하기도 한다(Yoon, 1973).

동의나물의 성분연구로는 알칼로이드(alkaoid), 아르기닌(arginin), 아네모닌(anemonin), 콜린(cholin) 및 사포닌(saponin) 등을 함유하고 있다고 알려져 있다(Park et al., 2004). Yoon 등(1973)의 연구에 따르면 동의나물의 유독성 물질로 saponin이 포함되어 있다고 발표하였고, Park 등(2004)의 연구에 따르면 동의나물을 취나물로 오인하여 복용한 후 복부 통증, 구토 및 오심 증상을 보이는 등 서맥과 저혈압 같은 부작용을 나타냈으며, 이에 해당하는 원인으로 동의나물에 포함되어 있는 saponin에 의한 것이라고 하였다.

따라서 본 연구에서는 동의나물의 섭취 시 발생하는 문제를 미연에 방지하기 위해, 외부의 물리적 환경에 의해 영향을 받지 않는 지표성분을 찾아내서 동의나물이 곰취의 가공식품에 혼입되었을 경우 판별이 가능한 분석법을 개발하는 것을 목표로 하였다. 분석법 개발을 위하여 최적의 전처리 방법, 분석의 정확도, 재현성 및 효율성 등을

고려하였으며, 최종적으로 유통되고 있는 곰취 생물을 비롯하여 가공식품에 함유되어 있는지의 혼입유무를 확인하고자 하였다. 따라서 곰취 가공식품에 의한 식중독 발생 시 동의나물이 원인 식물일 경우, 신속히 파악하고 대응이 가능할 수 있게 하도록 분석법을 개발하고자 한다.

Table 2. Classification of *L. fischeri* and *C. palustris*

		Edible plant	Not edible plant
		<i>L. fischeri</i>	<i>C. palustris</i>
Picture	Raw	 <p>금취 (<i>Ligularia fischeri</i>)</p>	 <p>동리나물 (<i>Caltha palustris</i>)</p>
	Dry	 <p>금취 (<i>Ligularia fischeri</i>)</p>	 <p>동리나물 (<i>Caltha palustris</i>)</p>
Order		Asterales	Ranunculales
Family		Asteraceae	Ranunculaceae
Genus		<i>Ligularia</i>	<i>Caltha</i>
Species		<i>fischeri</i>	<i>palustris</i>

제 2 장 재료 및 방법

1. 시료 및 실험재료

가. 원시료 및 곰취 가공식품의 구입

본 실험을 위해 사용된 시료인 곰취와 동의나물은 한국자생식물생산자 영농조합법인을 통하여 생시료의 형태로 수급 받아 사용하였다. 동의나물과 곰취의 원시료는 이물질과 흙을 제거한 후 증류수로 수세한 후 물기를 제거하고 건조기(GN-012, Hanil GNCO, Jangsung, Korea)를 이용하여 40℃ 조건에서 수분 함량 15% 이하로 건조한 다음, 분쇄기로 균질화하여 모든 실험의 시료로 이용하였다.

시중에 유통되고 있는 곰취 가공식품의 모니터링을 진행하고자 광주광역시 에 있는 재래시장, 대형마트, 온라인 등을 통하여 곰취를 이용하여 제조한 장아찌, 냉면, 분말 및 찌빵 등을 구입하였다. 곰취 가공식품 중 찌빵의 경우 소를 제외하고 곰취가 함유되어 있는 빵 부분만을 사용하였고, 분석시 염에 의한 방해를 줄이기 위해 장아찌류는 국물을 제외하고 증류수 1 L에 30분씩 3회 담구어 탈염하였다. 전처리를 마친 찌빵, 장아찌류를 포함한 그 외 가공식품은 모두 원시료와 동일한 조건 하에서 건조 후 균질화하여 사용하였다.

모든 시료는 polyethylene 재질의 보관용기에 담아 냉장고(MICOM CFD-0622, Samsung, Suwon, Korea)에서 분석 전까지 -20℃ 조건 하에 보관하였다

나. 실험재료 및 분석기기

본 연구에 사용한 증류수는 18.2 MΩ 수준으로 순수재증류장치(Millipore Co., Massachusetts, USA)에 의해 정제된 증류수와 HPLC grade의 water(Fisher scientific, Pittsburgh, USA)를 구입하여 사용하였다. 분석을 위해서 사용한 acetonitrile, ethyl acetate, hexane 및 methanol 등의 용매는 Fisher Scientific 사에서 HPLC grade 수준으로 구입하여 사용하였으며, 기타 시약들은 분석용 특급시약을 구입하여 사용하였다. HPLC 분석을 위한 표준물질로, magnoflorine 및 taspine(Sigma-aldrich, Darmstadt, Germany)을 구입하여 사용하였다.

시료를 건조시키기 위해 농산물 건조기(GN-012, HanilGNCO, Jangsung, Korea)를 이용하였다. 지표물질의 정제 및 분리는 DAD(Diode array detector, SPD-M20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 장착한 HPLC(20-A HPLC system, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하였고, 지표성분 동정 및 확립은 UPLC(Nexera X2, Shimadzu, Kyoto, Japan), ESI(Electrospray ionisation) 및 time-of-flight(TOF) coupled Ion trap(IT)으로 구성되어 있는 UPLC-ESI-TOF/MS(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다.

2. HPLC를 이용한 지표성분 탐색

가. 시험용액 조제

곰취 및 동의나물의 HPLC 분석을 위하여 균질화된 시료 5 g을 각각 thimble filter에 담고, soxhlet 장치를 이용하여 *n*-hexane, ethyl acetate 및 methanol 순으로 극성도에 따라 추출용매 100 mL로 순차적 추출을 하였다. 추출된 용액은 paper filter(No. 41, Whatman, Kent, UK)로 여과하였고, 100 mL mass flask에 정용하였으며, 0.45 μ m membrane filter(Nylon, Whatman, Kent, UK)를 이용해 여과 후 최적의 추출용매를 선정하기 위한 시험용액으로 사용하였다.

나. 지표성분 탐색을 위한 HPLC 분석 조건

지표물질 탐색을 위해 극성도에 따라 순차적으로 제조한 hexane, ethyl acetate 및 methanol 추출액을 사용하여 HPLC 분석을 진행하였다.

기기는 Shimadzu 사(Kyoto, Japan)의 communication bus module(CBM-20A), degassing unit(DGU-20A_{3R}), 2대의 pump(LC-20AD), autosampler(SIL-20A), column oven(CTO-20A) 및 diode array detector(SPD-M20A)가 연결된 HPLC 시스템을 사용하였으며, screening 분석시 column 온도는 40 $^{\circ}$ C로, 유속은 1.0 mL/min, 검출파장은 190 ~ 800 nm, 주입량은 10 μ L으로 실험하였다.

Methanol 및 ethyl acetate 추출물은 column oven에 5C₁₈-PAQ column(4.6 mm I.D. \times 250 mm L., 5 μ m, Cosmosil, Kyoto, Japan)을 장착하여 이용하였다. 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) in water(A용매), 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) in acetonitrile(B용매)을 사용하였으며, B용매를 기준으로 0.0 ~ 0.5분간 10%로 유지하고, 0.5 ~ 20.0분간 50%, 20.0 ~ 20.1분까지 95%로 상승시켰다. 95% 비율로 5분간 유지시키고 25.0 ~ 25.1분까지 10% 비율로 설정한 다음 10분간 유지시켜 다음 분석을 위하여

기기를 안정화시켰다(Table 3).

보통의 hexane 추출물은 분석 시 극성 column을 이용하지만, 본 연구에서는 비극성 컬럼인 5C₁₈-PAQ column(4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Cosmosil, Kyoto, Japan)으로 distilled water를 사용하지 않는 조건에서 이용하였다. Hexane 추출물을 분석하기 위해, 이동상으로 HPLC grade의 ethanol과 acetonitrile(1:4, v/v) 용액을 등용리방법(isocratic mode)으로 분석하였다(Table 4).

모든 분석된 데이터는 Shimadzu LC solution version 1.25 SP4(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 활용하여 분석 결과를 수집 및 해석하였다.

Table 3. HPLC instrument conditions of methanol and ethyl acetate extraction

HPLC	Prominence LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Column	5C ₁₈ -PAQ column (4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Cosmosil, Kyoto, Japan)	
Column Temp.	40 °C	
Flow rate	1.0 mL/min	
Wave length	190 ~ 800 nm	
Injection volume	10 μL	
Mobile phase	(A) 0.1% TFA in Water, (B) 0.1% TFA in Acetonitrile	
Gradient profile	Time (min)	B (%)
	0.0 ~ 0.5	10
	0.5 ~ 20.0	50
	20.0 ~ 20.1	95
	20.1 ~ 25.0	95
	25.0 ~ 25.1	10
	25.1 ~ 35.0	STOP

Table 4. HPLC instrument conditions of hexane extraction

HPLC	Prominence LC-20A (Shimadzu, Kyoto,Japan)
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto,Japan)
Column	5C ₁₈ -PAQ column (4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Cosmosil, Kyoto, Japan)
Column Temp.	40 °C
Flow rate	1.0 mL/min
Wave length	190 ~ 800 nm
Injection volume	10.0 μL
Mobile phase	Ethanol, Acetonitrile (1:4, v/v)
Runing time	35 min

3. HPLC를 이용한 지표성분 최적 분석법 선정

가. 지표성분 분석을 위한 최적 추출법 선정

최적의 추출용매를 선정하기 위하여 시료 2.5 g과 methanol 및 ethanol을 50 mL씩 2시간 동안 80°C 조건으로 환류 추출(reflux extraction)을 하였다. 추출액은 paper filter(No. 41, Whatman, Kent, UK)로 여과하여 100 mL mass flask에 정용하였으며, 0.45 µm membrane filter(Nylon, Whatman, Kent, UK)로 다시 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

최적의 추출 방법을 설립하기 위해 열탕 추출(hot-water extraction), 초음파 추출(ultrasonic extraction) 및 환류 추출(reflux extraction)로 나누었으며 30분, 60분 및 120분씩 분석하였다. 열탕추출과 초음파 추출은 시료 1 g과 20 mL의 용매로 추출하였으며, 환류 추출은 시료 2.5 g과 50 mL의 용매로 추출하였다. 열탕 추출은 80°C 조건의 water bath에서 추출하였고, 초음파추출은 ultrasonicator에서 온도조건을 따로 정하지 않고 추출하였다. 마지막으로 환류추출은 열탕 추출과 동일한 조건인 80°C에서 추출을 진행하였다. 추출된 모든 추출액은 각각 paper filter(No. 41, Whatman, Kent, UK)로 여과하였으며, 분석 전에 0.45 µm membrane filter(Nylon, Whatman, Kent, UK)로 여과하여 최종 시험용액으로 사용하였다.

나. 지표성분 분석을 위한 HPLC 최적 분석 조건

최적 추출 방법으로 얻어진 시험용액으로 지표성분 분석을 위하여 최적의 HPLC 분석 조건을 수립하였다. HPLC(LC-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)와 DAD가 장착된 기기에 5C₁₈-PAQ column(4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Cosmosil, Kyoto, Japan)을 연결하여 실험하였다. Gradient 방법을 이용하여 water(A용매)와 acetonitrile(B용매)을 이동상으로 사용하였고, B용매를 기준으로 0 ~ 10분간 20% 유지 후, 10 ~ 20분까지 32%의 비율로 증가시켰고, 20 ~ 30분까지 50%, 30 ~ 35분까지 90%로 흘려주었다. 35 ~ 40분까지는 다음 분석을 위한 안정화를 목적으로 20%로 유지시켰다. Column 온도는 40℃, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 10 μL 및 검출파장은 190 ~ 800 nm의 조건으로 분석을 수행하였다.

4. LC-MS/MS를 이용한 지표성분 동정

LC-MS/MS 분석은 autosampler, degasser, automatic column 및 oven module으로 구성된 UPLC(Nexera X2, Shimadzu, Kyoto, Japan)와 ESI-TOF/MS(LCMS-IT-TOF, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하였으며, HPLC 분석을 통해 지표성분으로 추정되는 peak를 동정하였다. 본 기기에서는 화합물을 이온화 상태로 만든 후, 질량값을 측정하기 때문에 화합물의 이온화 및 분리에 도움을 주기 위해 휘발성 산이 가해진 이동상으로 0.1% trifluoroacetic acid in water(A용매)와 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile(B용매)을 사용하였다. 또한 column으로는 capcell core C₁₈ (2.1 mm i.d. × 150 mm L., 2.7 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 시료 5 μL을 주입하고 column oven 온도는 40℃, 이동상 유속은 0.2 mL/min인 조건 하에서 분석을 하였다. 기울기 용리조건(gradient elution mode)은 B용매를 기준으로 설정하였고, 0.0 ~ 0.5분까지 10%로 B용매를 흘려주었으며 0.5 ~ 20.0분까지 85%로 상승시켰다. 20.0 ~ 21.0분까지 B용매를 95%로 올려준 후 4분간 column의 세척을 위해 유지하였으며, 다음 시료를 위해 column의 안정화로 25.1분부터 B용매를 10%로 급격히 줄여서 5분간 유지하였다. MS/MS 분석 조건으로 1.5 L/min의 속도로 N₂ 기체를 흘려주어 시료를 분무시킨 다음, ESI(electro-spray ionization, positive mode)로 이온화 시켰으며, CDL의 온도는 200℃, 모세관 전압은 4.5 kV를 주었다(Table 5).

Table 5 . LC-MS/MS instrument conditions

UPLC	Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Column	Capcell core C ₁₈ (2.1 mm i.d. × 150 mm L., 2.7 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)	
Column Temp.	40 °C	
Flow rate	0.2 mL/min	
Wave length	190 ~ 800 nm	
Injection volume	5 μL	
Mobile phase	(A) 0.1% TFA in Water, (B) 0.1% TFA in Acetonitrile	
Gradient profile	Time (min)	B (%)
	0.0 ~ 0.5	10
	0.5 ~ 20.0	85
	20.0 ~ 21.0	95
	21.0 ~ 25.0	95
	25.0 ~ 25.1	10
	25.1 ~ 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)	
Mass range	100 ~ 1,000 m/z (Loop time 0.8 sec / event time ≥ 300 msec, repeat 3, ion accumulation 10 msec)	
CDL Temp.	200 °C	
Nebulizing gas flow	N ₂ , 1.5 L/min	

5. HPLC 분석법의 유효성 검증 및 맹검 실험

가. 유효성 검증(Method validation)

1) 선택성(Selectivity)

동의나물에 존재하는 지표성분의 머무름 시간(retention time, RT)이 곰취에서 확인되는 다른 성분과의 간섭을 받지 않는 분석 조건을 수립하였으며, 추가적으로 표준물질과의 비교를 통해 해당 머무름 시간에 동일한 UV spectrum이 나타나는지 확인하였다.

2) 직선성(Linearity)

동의나물의 지표물질인 검량선을 작성하기 표준용액을 구입하여 분석을 진행하였다. 두 화합물의 동시 분석을 위해 표준용액을 섞어서 mix standard를 제조하였으며, 분석은 3회씩 반복 측정을 하였다. 분석된 표준물질의 peak area를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 검량선식을 구하였다.

3) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

분석 시료에 존재하는 물질의 유무를 확인할 수 있는 최소 농도를 검출한계(Limit of detection, LOD)라고 말하며, 시료에 존재하는 물질의 정량 가능한 최소 농도를 정량한계(Limit of quantitation, LOQ)라고 한다. 본 실험에서는 표준용액의 최저 농도를 10회 반복 분석하고 표준편차를 계산하여 3.3배를 하여 검출한계를 구하였고, 표준편차에 10배를 곱하고 검량선의 기울기로 나누어 정량한계 값으로 사용하였다.

4) 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)

일정 농도의 한 시료를 7회 이상 측정하여 정밀성(Precision)을 상대표준편차(relative standard deviation, RSD%)로 표현하였으며, 시료 전처리 시, 시료에 함유되어 있는 지표물질의 함량과 비슷한 농도의 표준물질을 첨가하여 추출 및 분석하여 정확성(Accuracy)을 구하였다. 최종 결과값에서 첨가한 표준물질의 농도 회수율을 확인하는 방법인 외부 첨가법(spiking test)을 사용하였다.

나. 맹검 실험(Blind test)

본 연구에서 분석법의 유효성을 검증하고 판별법의 판별력을 평가하기 위해 동의나물과 곰취를 혼합한 형태의 시료를 받아 맹검 실험을 진행하였다.

맹검 실험을 위하여 타 연구실로부터 곰취에 동의나물을 임의의 비율로 혼합한 형태의 분말시료 10 건(각 총 중량 약 2.5 g)을 제공받았다. 맹검 시료 2.5 g을 25 mL methanol로 2시간 동안 80℃ 조건하에서 환류추출(reflux extract)한 후 냉각하여 paper filter(No. 41, Whatman, Kent, UK)로 여과한 다음 25 mL 부피플라스크에 정용하고 0.45 µm membrane filter(Nylon, Whatman, Kent, UK)로 재여과한 여과액을 최종 시료로 사용하였다.

HPLC 분석은 최적 분석 조건으로 분석하였으며, RT와 UV spectrum의 일치 여부를 통해 검량선을 이용하여 혼입비율을 계산하여 결과를 비교하였다.

6. 지표물질의 정성 및 정량 방법

곰취 가공식품 중 동의나물의 혼입 여부 확인을 위한 지표물질의 정성 방법을 위해, HPLC 최적 조건으로 동의나물 지표성분과 표준용액 분석을 통해 chromatogram peak의 RT 및 UV spectrum의 일치함을 확인하였다.

또한 동의나물 지표성분 표준용액을 분석에 용이한 농도로 조제한 다음, HPLC 분석을 통해 얻어진 chromatogram상의 peak 높이 또는 area를 이용하여 검량선 작성에 사용하였으며, 분석된 시험용액 결과의 농도가 calibration curve의 측정 범위 내로 검출되는지 확인하였다. 검량선 범위를 벗어나는 경우, 희석하여 범위 내에서 정량할 수 있도록 하였다.

7. 곰취 가공식품 모니터링

곰취 가공식품 모니터링을 위해 분말화한 시료 1 g을 methanol 10 mL와 함께 환류용 플라스크에 넣고, 2시간 동안 80℃ 조건 하에서 환류추출(reflux extraction)한 후, paper filter(No. 41, Whatman, Kent, UK)로 여과하였다. 여액은 낮은 농도의 동의나물의 여부를 정확하게 파악하고자 감압농축을 진행하였으며, 기기는 감압농축기(B-480, Buchi, Flawil, Switzerland)를 이용하였다. 이후 10 mL 부피 플라스크에 정용하고, 0.45 µm membrane filter(Nylon, Whatman, Kent, UK)로 재여과하여 최종 시험용액으로 이용하였다. 곰취 가공식품 모니터링을 위해 최종적으로 확립된 분석 조건과 동일하게 진행하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. HPLC를 이용한 지표성분 탐색

가. 지표성분 탐색을 위한 추출용매 선정

식용 가능 식물인 곰취와 식용 불가 식물인 동의나물을 극성도에 따라 *n*-hexane, ethyl acetate 및 methanol로 순차적 추출을 한 후 HPLC 분석을 통해 지표성분 탐색에 가장 적합한 용매를 선정하였다. 조건으로는 HPLC를 이용해 190 ~ 800 nm 범위로 설정하여 full-screening을 진행하였고, 결과 중 203, 230, 245 및 280 nm의 파장을 선택하여 chromatogram과 spectrum을 비교 분석하였다.

순차적 용매별 HPLC 실험 결과, *n*-hexane 및 ethyl acetate 추출물에서는 203 nm에서 가장 많은 peak가 확인되었지만, 곰취와 비교하여 동의나물에서 특이성이 있는 peak는 확인되지 않았다. Methanol 추출물의 경우, *n*-hexane과 ethyl acetate 추출물들에 비해 다수의 peak가 확인되었으며, 이후 methanol 추출물을 중심으로 지표성분을 탐색하였고, 동의나물에서만 확인되는 unknown peak를 발견하였다(Fig 1-3).

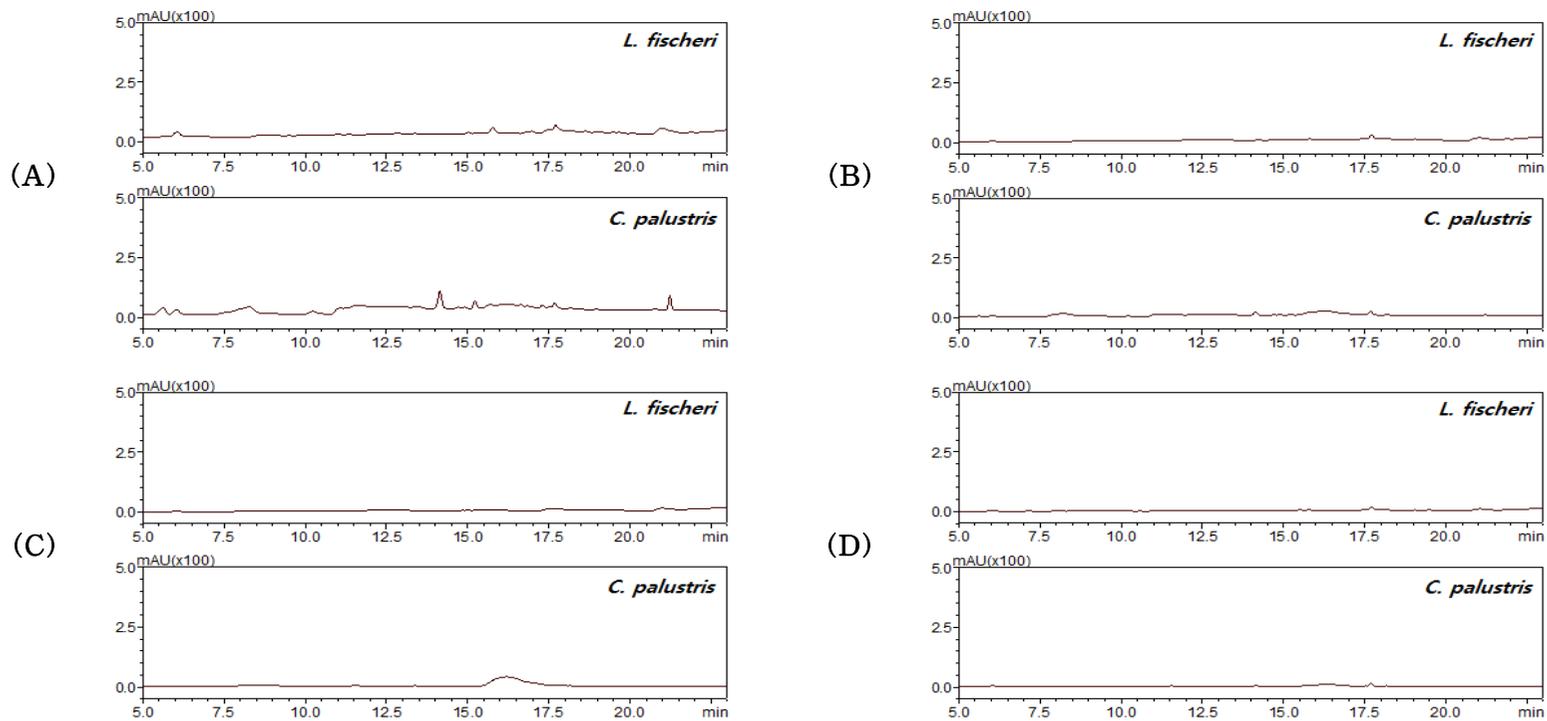


Fig 1. Chromatogram comparison result according to wave length of *n*-hexane extraction

(A) : 203 nm, (B) : 230 nm, (C) : 245 nm, (D) : 280 nm

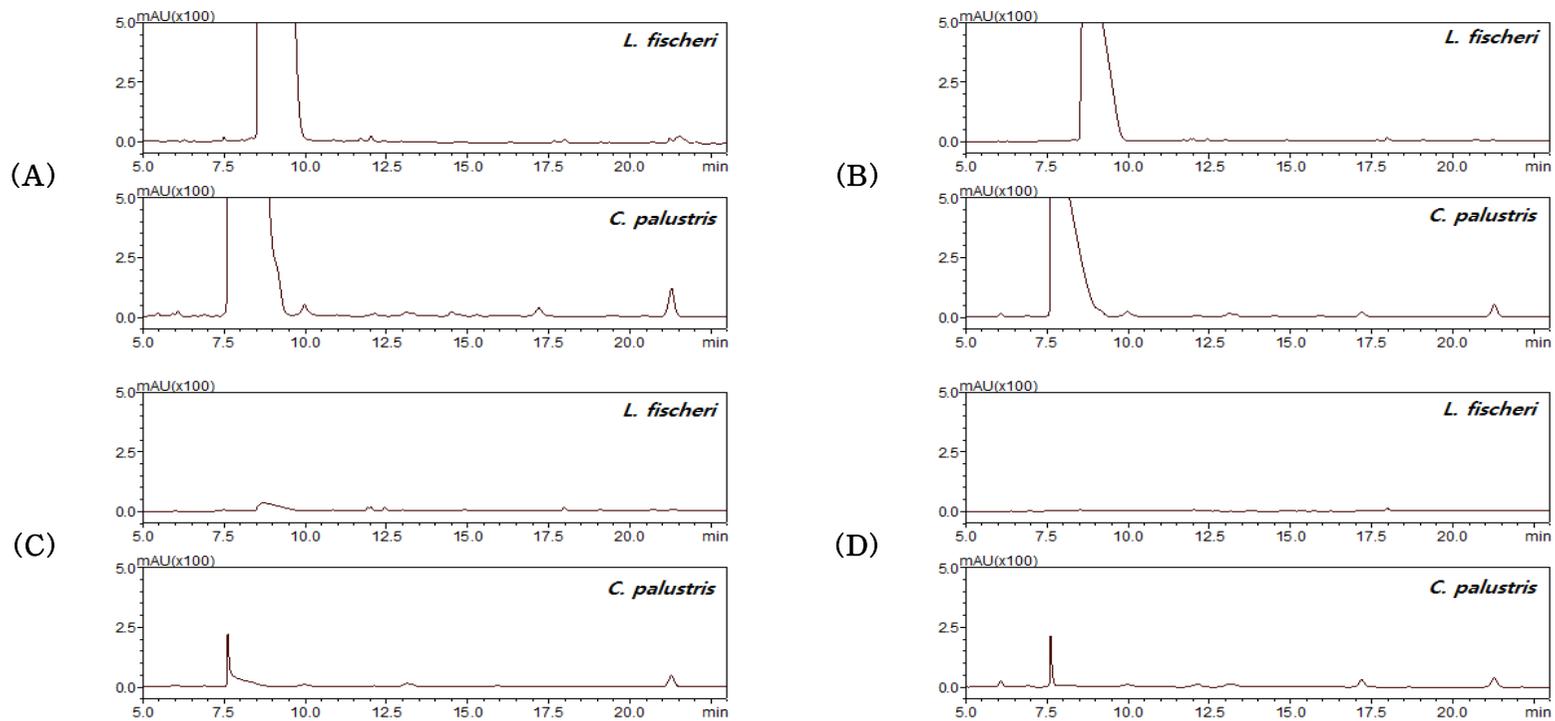


Fig 2. Chromatogram comparison result according to wave length of ethyl acetate extraction

(A) : 203 nm, (B) : 230 nm, (C) : 245 nm, (D) : 280 nm

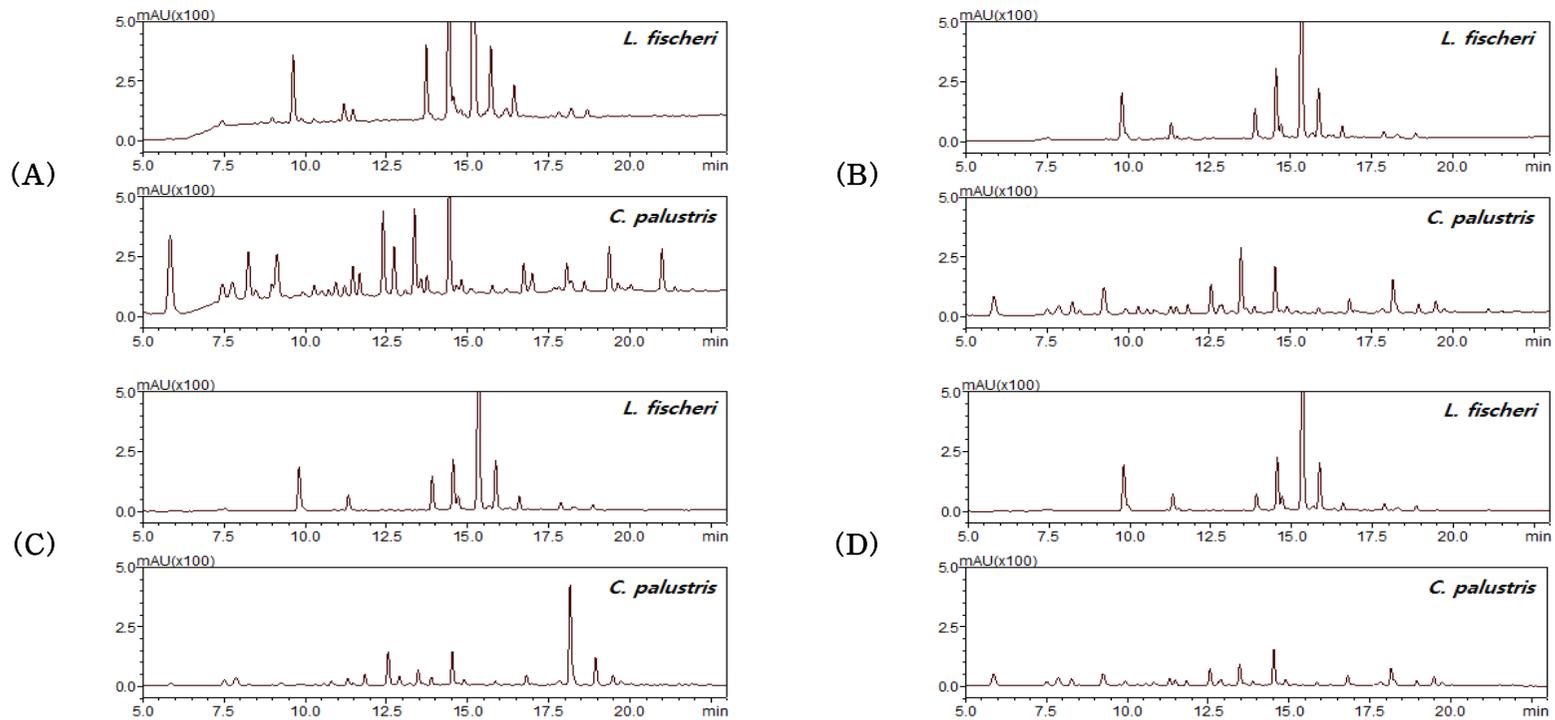


Fig 3. Chromatogram comparison result according to wave length of mathanol extraction

(A) : 203 nm, (B) : 230 nm, (C) : 245 nm, (D) : 280 nm

나. HPLC를 이용한 지표물질 탐색

Unknown peak가 확인된 methanol 추출물을 대상으로 동의나물에 포함되어 있는 지표성분을 탐색하였다. 다양한 파장 범위를 선택하여 분석을 진행하였으며, 지표성분으로 선정되기 위해 동의나물에는 존재하지만 곰취에는 존재하지 않는 물질을 선택하였다.

Methanol 추출물 분석 결과 동의나물만 발견된 RT 13.52분 및 RT 18.16분의 unknown peak를 확인하였으며, 최대 흡수파장은 각각 270 nm 및 245 nm로 확인되었다. 이를 판별이 가능한 지표성분으로 추측하였고, 최적 추출법 확립을 위한 실험을 진행하였다(Fig 4).

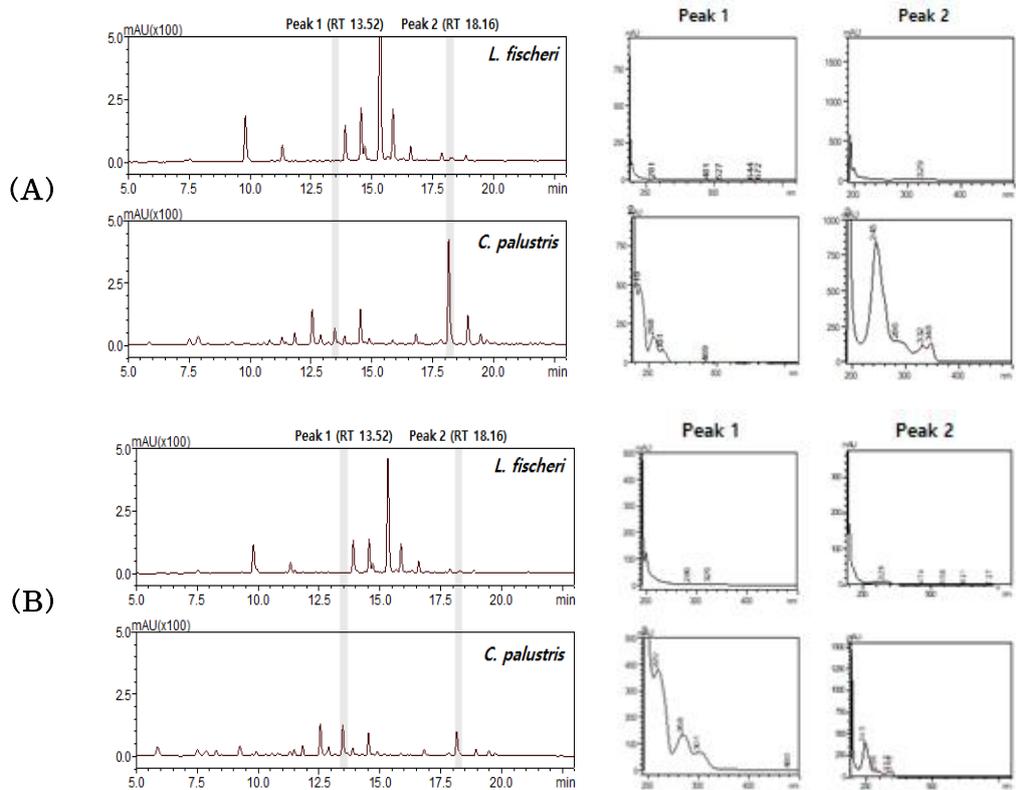


Fig 4. HPLC result of chromatogram and spectrum of the expected indicator in methanol extraction

(A) : 245 nm, (B) : 270 nm

2. HPLC를 이용한 지표성분 최적 분석법 선정

가. HPLC를 이용한 동의나물의 판별법 확립

본 연구는 곰취에 식용 불가 식물인 동의나물이 혼입되었는지를 확인하는 것이 목표로, HPLC screening test를 이용한 분석 결과를 바탕으로 HPLC 최적의 분석조건을 수립하였다. Column은 역상 컬럼인 5C₁₈-PAQ column(4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Cosmosil, Kyoto, Japan)를 사용하여 분석을 하였으며, 기울기 용리 조건을 검토해보았을 때, 현 분석방법이 가장 최적화된 분석법라고 판단하여 그대로 진행하였다. 동의나물의 지표물질로 선정된 RT 13.52분 및 18.16분의 최대 흡수 파장은 각각 270 nm 및 245 nm였으나, 두 peak의 효율성과 안정성을 보았을 때, 흡수파장을 270 nm으로 설정하였다(Table 6).

Screening 결과를 통해 추출용매를 methanol로 선정하였으며, 최적의 추출법을 확립하기 위해 극성용매인 methanol 및 ethanol의 추출물을 대상으로 실험을 통해 최적의 추출용매를 선정하였다. 분석 결과, 동의나물 methanol 추출물의 peak 1 area 값은 345,645, peak 2의 area 값은 5,730,434으로 확인되었으며, ethanol 추출물의 peak 1 area 값은 149,576, peak 2의 area 값은 3,280,928의 결과를 나타내었다. 결과를 비교하였을 때, ethanol보다 methanol이 상대적으로 높은 추출 효율을 나타내었기 때문에 동의나물에만 존재하는 unknown peak들을 분석하기 위한 최적의 추출 용매로 methanol을 선정하였다(Table 7).

추출 및 분석의 효율을 높이기 위해 추출 시간과 방법을 다르게 설정하여 동의나물에 함유되어 있는 unknown peak들의 추출효율을 비교하여 최적의 추출조건을 선정하였다. 먼저 추출 시간은 30분, 60분 및 120분으로 조건을 설정하였고, 추출 방법으로는 열탕 추출(hot-water extraction), 초음파 추출(ultrasonic extraction) 및 환류 추출(reflux extraction)로 나누어 추출하였다.

먼저 열탕 추출(hot-water extraction)의 경우, magnoflorine 및 taspine 함량은 30분,

60분 및 120분 조건에서 각각 peak 1의 area 값은 228,101, 277,517 및 730,994으로 나타났으며, peak 2의 area 값은 각각 597,918, 731,967 및 697,994으로 나타났다. 초음파 추출(ultrasonic extraction)의 경우, 추출 시간별 조건에서 각각 peak 1은 121,466, 151,294 및 207,938으로 나타났으며, peak 2는 256,468, 713,967 및 199,777으로 확인되었다. 마지막으로 환류 추출(reflux extraction)의 추출 시간별 peak 1의 area 값은 223,390, 247,424 및 677,057, peak 2의 area 값은 933,057, 726,603 및 4,396,028으로 나타났다. 열탕추출은 60분까지 area 값이 증가하나 peak 2의 2시간 추출과 비교하였을 때, 줄어드는 경향을 보였다. 반면 초음파추출 및 환류추출은 추출 시간이 길어질수록 화합물들의 area 값도 높아지는 경향을 보였다.

추출 방법을 기준으로 열탕 추출과 환류 추출은 초음파 추출에 비해 높고, 유사한 추출 효율을 보였다. 이를 추출 시간으로 비교하였을 때, 환류 추출이 열탕 추출에 비해 추출 효율이 높게 확인되었으며, 최종적으로 120분 조건의 환류 추출을 최적의 추출조건으로 선정하였다(Table 8).

Table 6. HPLC instrument conditions for analysis of indicators in samples

HPLC	Prominence LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Detector	Diode array detector (DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Column	5C ₁₈ -PAQ column (4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm, Cosmosil, Kyoto, Japan)	
Column Temp.	40 °C	
Flow rate	1.0 mL/min	
Wave length	270 nm	
Injection vol.	10 μL	
Mobile phase	(A) Water (B) Acetonitrile	
Gradient profile	Time (min)	B (%)
	0.0 ~ 0.5	10
	0.5 ~ 20.0	50
	20.0 ~ 20.1	95
	20.1 ~ 25.0	95
	25.0 ~ 25.1	10
	25.1 ~ 35.0	STOP

Table 7. Analysis results of unknown peaks by the solvent conditions

Unit : area

Condition	Peak 1 (13.52 min)	Peak 2 (18.16 min)
Methanol extract	345,645	5,730,434
Ethanol extract	149,576	3,280,928

Table 8. Analysis results of unknown peaks by the extraction conditions

Unit : area

Condition		Peak 1 (13.52 min)	Peak 2 (18.16 min)
Reflux extraction	30 min	223,390	933,057
	60 min	247,424	726,603
	120 min	677,057	4,396,028
Hot-water extraction	30 min	228,101	597,918
	60 min	277,517	731,967
	120 min	730,994	697,994
Ultrasonic extraction	30 min	121,466	256,468
	60 min	151,294	713,967
	120 min	207,938	199,777

3. 지표성분 동정 및 확립을 위한 LC-MS/MS 분석 결과

가. LC-MS/MS를 이용한 지표성분 및 구조 확인

본 연구에서는 HPLC와 ion trap(IT) mass analyzer 및 time of flight(TOF) mass analyzer가 장착된 LC-ESI-IT-TOF/MS를 사용해서 앞에서 추측한 RT 13.52분 및 RT 18.16분의 unknown peak을 동정하였다.

Unknown peak를 동정하기 위해 LC-MS/MS 분석을 진행하였으며, 최적의 분석 조건을 기준으로 진행하였다. 기기조건으로 column 길이와 유량의 조건이 조금 달랐으며 따라서 HPLC 검출기를 이용한 결과와 RT의 차이가 있었다. UV spectrum의 유사여부에 따라, RT 13.52분의 unknown peak은 RT 7.02분에, RT 18.16분의 unknown peak은 9.95분에서 확인되었다(Fig 5).

지표성분으로 추출된 unknown peak 중 먼저 RT 7.02분의 화합물에 대한 $[M]^+$ 이온 질량값(m/z)은 342.169, $C_{20}H_{20}NH_4^+$ 으로 확인되었고, RT 9.95분의 화합물에 대한 $[M+H]^+$ 값(m/Z)은 370.129, $C_{20}H_{19}NO_6$ 으로 확인되었다. 본 결과에 대해 Accurate Mass Calculator(Shimadzu, Kyoto, Japan) 및 Formula Predictor(ver. 1.2) 프로그램을 통해 mass spectrum을 해석하였고, RT 7.02분의 unknown peak는 magnoflorine, RT 9.95분의 unknown peak는 taspine일 것으로 예상하였다(Fig 6, Table 9).

이후 동의나물의 지표성분으로 예측되는 magnoflorine 및 taspine의 표준물질을 구입하여 분석을 실시하였다.

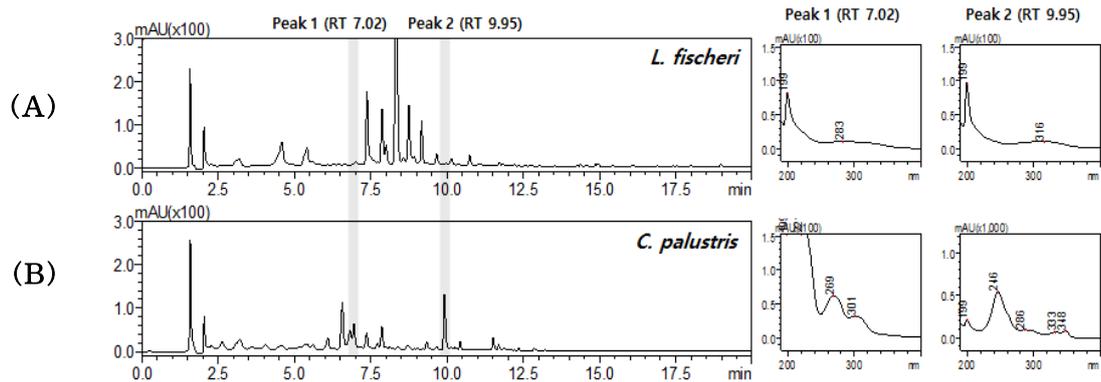


Fig 5. *L. fischeri* and *C. palustris* chromatogram with UPLC detector

(A) *L. fischeri* chromatogram and spectrum

(B) *C. palustris* chromatogram and spectrum

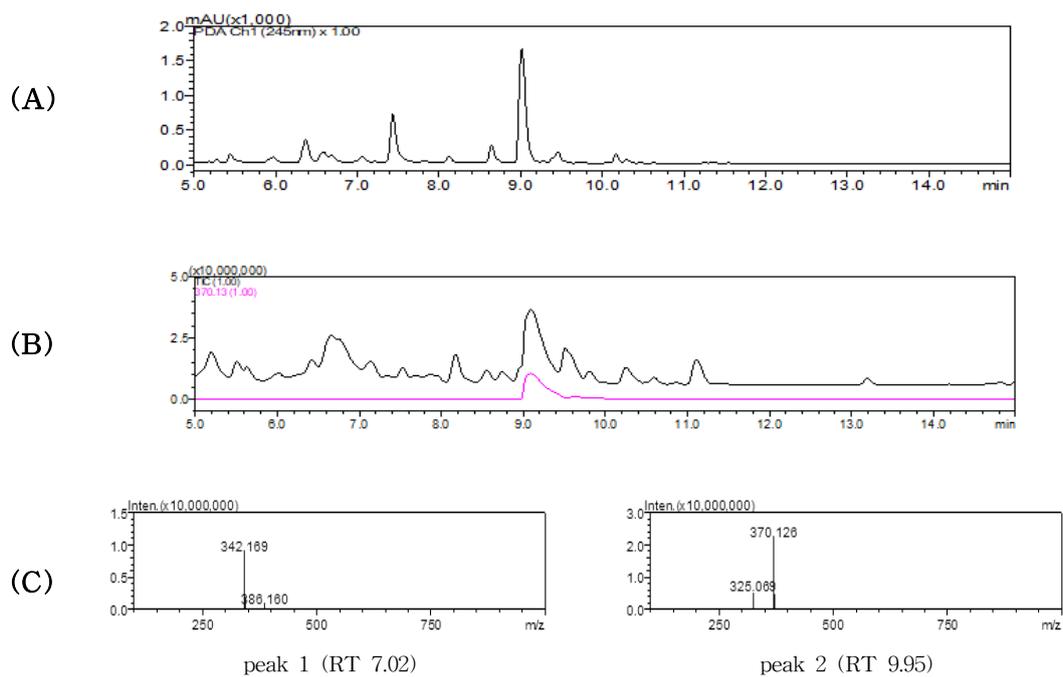


Fig 6. LC-MS/MS analysis result of *C. palustris*

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

Table 9. Identification of peak of *C. palustris* methanol extraction

Sample	R.T. (min)		UV Detection	ESI(+)-TOF-MS		Predicted candidate		
	HPLC	LCMS	$\lambda_{\max 1}$	m/z	Adduct Ion	Mass(da)	Formula	Compound
<i>C. palustris</i>	13.52	7.02	270	342.169	[M] ⁺	342.41	C ₂₀ H ₂ NH ₄ ⁺	Magnoflorine
MeOH extract	18.16	9.95	245	370.126	[M+H] ⁺	369.12	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	Taspine

나. 표준물질 분석 결과 및 지표성분 확립

HPLC 및 LC-MS/MS의 분석을 통하여 검출된 unknown peak의 지표성분이 magnoflorine 및 taspine에 해당함을 증명하기 위해, 표준물질을 구입하여 LC-MS/MS 결과의 UV spectrum, RT 및 문헌 등을 비교하여 지표성분임을 확인하였다.

각각의 표준물질은 시료의 전처리와 동일하게 진행하였으며, 동시 분석을 위해 두 표준물질을 섞어 mix standard로 만들어 분석하였다.

분석 결과, 동의나물 추출물의 결과와 동일한 RT 7.02분, RT 9.95분대에 나오는 것을 확인하였으며, 각각의 표준물질에 대한 이온 질량값(m/z)은 342.169 및 370.128로 확인되었고, UV spectrum 또한 일치하여 동일한 물질임을 확인하였다(Fig 7-8, Table 10).

따라서, 해당 물질을 magnoflorine 및 taspine으로 확립하였으며, 동시분석을 위해 최대 흡수파장을 270 nm으로 설정하였다.

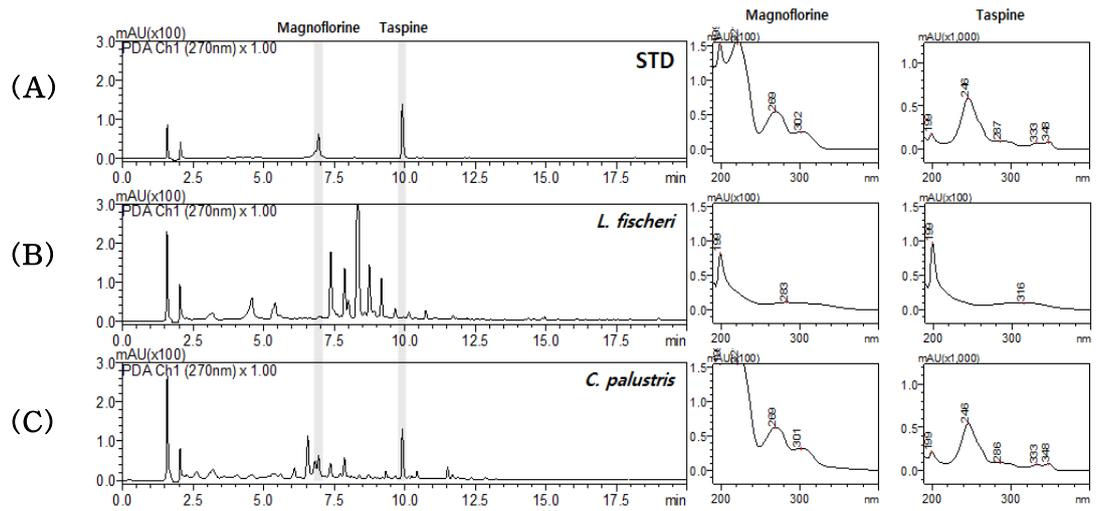


Fig 7. UPLC chromatogram of sample and standards(magnoflorine, taspine)

- (A) Standard chromatogram and spectrum
- (B) *L. fischeri* chromatogram and spectrum
- (C) *C. palustris* chromatogram and spectrum

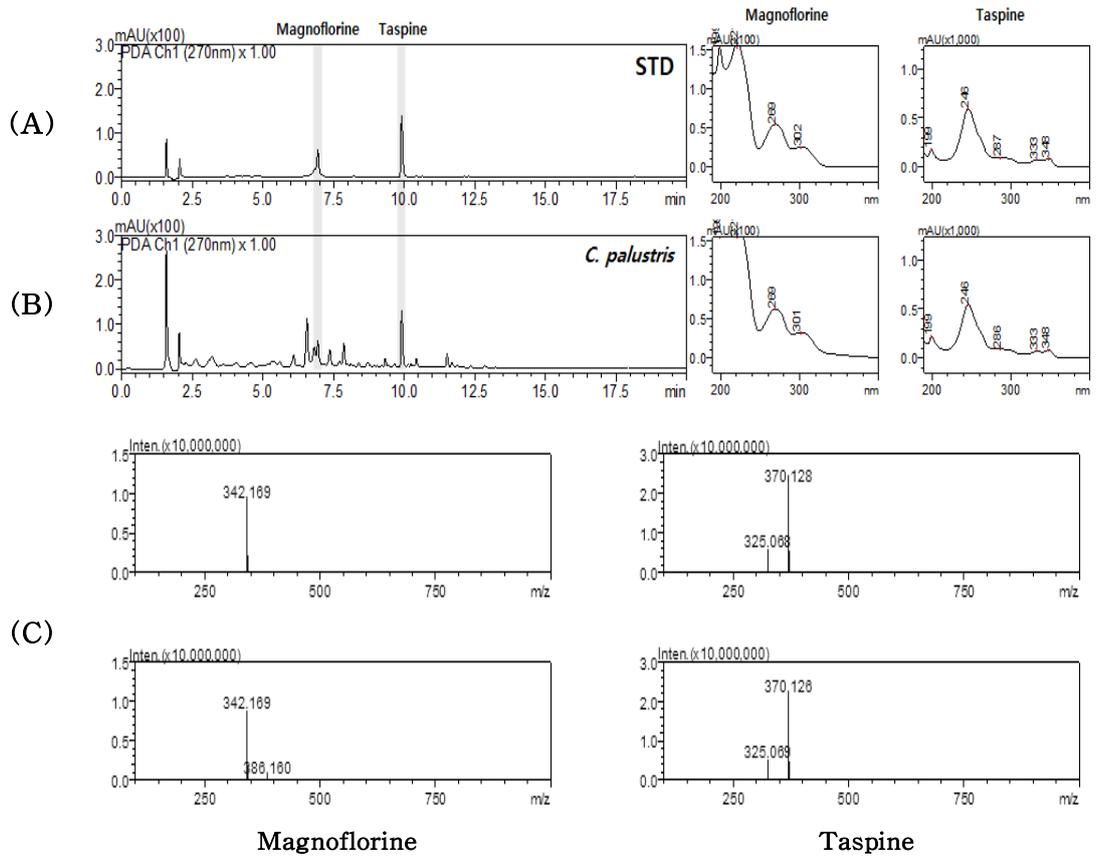
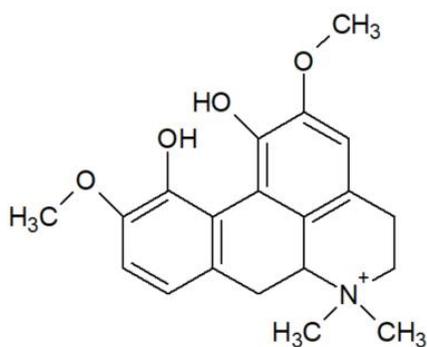


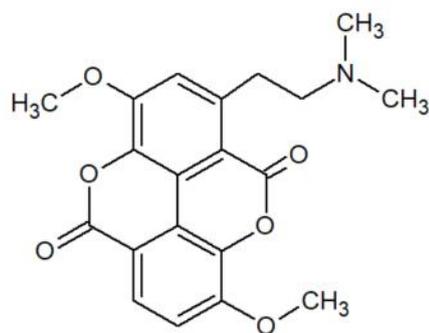
Fig 8. LC-MS/MS chromatogram of magnoflorine and taspine
 (A) Standard chromatogram (B) Sample chromatogram (C) MS/MS spectrum

Table 10. LC-MS/MS analysis of magnoflorine and taspine standard

Standard	R.T. (min)	$\lambda_{\max 1}$	m/z	Adduct Ion
Magnoflorine	7.02	270	342.169	$[M]^+$
Taspine	9.95	245	370.126	$[M+H]^+$



Magnoflorine



Taspine

Fig 9. Structure of magnoflorine and taspine

4. HPLC 분석법의 유효성 검증 및 맹검 실험 결과

가. 유효성 검증(Method validation) 결과

선택성(selectivity)의 결과로 동의나물의 지표성분으로 선정된 magnoflorine 및 taspine의 머무름 시간은 13.52 및 18.16분으로 타 화합물에 간섭을 받지 않고 분리되었으며, 지표성분의 UV spectrum가 일치함을 확인하였다. Magnoflorine의 최대 흡수파장은 270 nm, taspine의 최대 흡수파장은 245 nm으로 나타났으며, 두 화합물의 동시분석을 위해서 최대 흡수파장을 270 nm로 선정하였다.

직선성(linearity)을 확인하기 위해 magnoflorine 및 taspine의 표준물질 섞어서 mix standard를 제조하고 각각의 10, 25, 50, 100, 250 및 500 mg/kg, 1, 2.5, 5, 10, 25 및 50 mg/kg의 농도가 되도록 희석한 후 표준 검량선을 작성하였다. 두 성분 모두 선형 회귀분석을 통해 검량선의 상관계수(R^2)를 얻었으며, magnoflorine은 0.9952, taspine은 0.9954 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다(Fig 10).

Magnoflorine 및 taspine의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 최대 흡수파장인 270 nm에서 측정하였으며, magnoflorine의 LOD는 1.07 mg/kg, LOQ는 3.55 mg/kg이었고, taspine의 LOD는 0.07 mg/kg, LOQ는 0.22 mg/kg으로 확인되었다.

정밀성(precision)은 본 연구의 최적 분석 조건으로 3회 반복 측정하여 동일한 값이 나오는지 확인하였고, 상대표준편차(RSD%)로 확인하였다. 그 결과 magnoflorine은 0.83%, taspine은 0.55%로 확인되었다. 정확성(accuracy)은 표준물질이 검출되지 않은 시험용액에 두 표준물질을 첨가하여 분석하는 외부 표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 측정하였고, 그 결과 magnoflorine은 98.1%, taspine은 95.7%로 만족할 만한 값을 얻었다. 본 연구의 적용된 분석방법에 대한 유효성 검증을 위하여 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision) 및 정확성(accuracy)을 분석하였으며, 모든 결과는 AOAC의 기준에 만족하는 값을 얻었으며, 본 연구에서 개발한 곰취와 동의나물의 혼입여부 판

별법이 효율적이면서 재현 가능성이 높은 판별법임을 입증하였다.

Table 11. Validation result of analysis method for discriminating *C. palustris*.

	LOD ¹⁾ (mg/kg)	LOQ ²⁾ (mg/kg)	R ²	Accuracy (%)	RSD ³⁾ (%)
Magnoflorine	1.07	3.55	0.9952	98.1	0.83
Taspine	0.07	0.22	0.9954	95.7	0.55

¹⁾ LOD : Limit of quantification

²⁾ LOQ : Limit of quantification

³⁾ RSD : Relative standard deviation

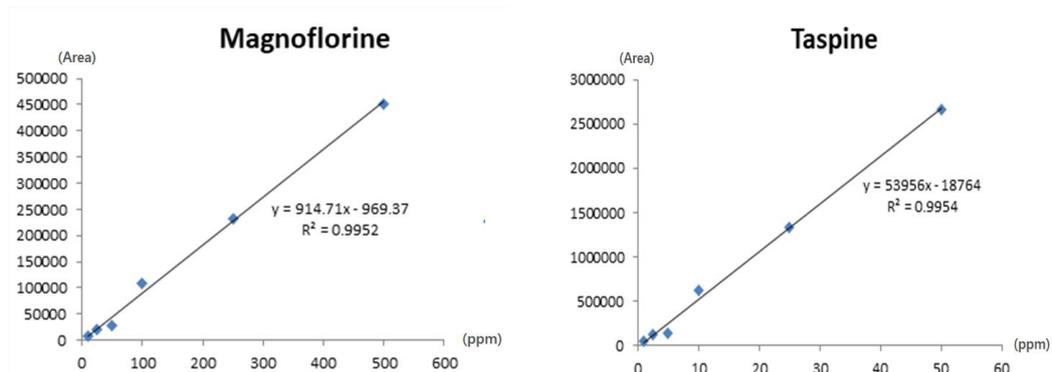


Fig 10. Standard curve of magnoflorine and taspine

나. 맹검 실험(Blind test) 결과

맹검 실험을 위해 타 실험실에서 미지의 비율로 혼합된 분말형태의 시료 10건을 제공받아 실험을 진행하였으며, 시료는 편의상 A ~ J로 칭하였다. 동의나물의 혼입 비율을 확인하기 위하여 검량선은 곱취 및 동의나물 분말을 특정 비율 2, 5, 10, 15, 20, 50, 70 및 100%로 혼입하였으며, 시험용액을 제조한 후 최적 분석법을 이용하여 분석하였으며, 확실한 분석결과를 얻기 위해 magnoflorine의 최대 흡수 파장인 270 nm에서, taspine은 245 nm에서 area 값을 확인하였다. 모든 분석 결과는 magnoflorine 및 taspine의 chromatogram의 RT와 UV spectrum을 비교 및 확인을 통해 분석의 정확도를 높였으며, RT 13.52분 및 18.16분에 확인되는 peak area 값으로 혼입비율별(%) 검량선을 계산하여 정량하였다(Fig 11).

분석 결과, 맹검 시료 총 10건의 오차 정도는 magnoflorine은 true value \pm 1.62, taspine은 true value \pm 2.39로 확인되었다. 10건 중 C, H 및 J 시료는 0%로 미혼입이었으며, A 시료의 측정값은 magnoflorine은 10.6%, taspine은 ND로 나타났으며, 실제값은 6%였으므로 각각 3.7% 및 6%의 오차가 확인되었다. B 시료의 측정값은 magnoflorine은 11.8%, taspine은 13.3%으로 나타났으나 실제값은 10%로 각각 1.8%, 3.3%의 오차가 확인되었다. D번 시료의 magnoflorine은 19.2%, taspine은 21.3%의 결과가 나타났고, 실제값은 20%로 각각 0.8%, 1.3%의 오차가 확인되었으며, E 시료의 magnoflorine은 31.1%, taspine은 28.3%의 결과가 나왔으며, 실제값은 30%로 1.1%, 1.7%의 오차가 확인되었다. F 시료의 측정값으로 magnoflorine은 8.2%, taspine은 ND의 결과가 나왔으며, 실제 결과값은 5%로 3.2%, 5%의 오차가 나타났다. G번 시료의 측정값으로 magnoflorine은 13.0%, taspine은 13.6%로 실제값인 12%에 비해 1.0%, 1.6%의 오차가 나타났으며, 마지막으로 I 시료의 측정값으로 magnoflorine은 8.7%, taspine은 ND로 실제값은 5%로 3.7% 및 5%로 확인되었다(Table 12).

맹검실험을 통하여 동의나물의 혼입여부 파악은 본 분석법으로 10% 이상 첨가될 경우 가능할 것으로 확인되었으며, 이를 통해 개발한 판별법의 신뢰도를 높였다.

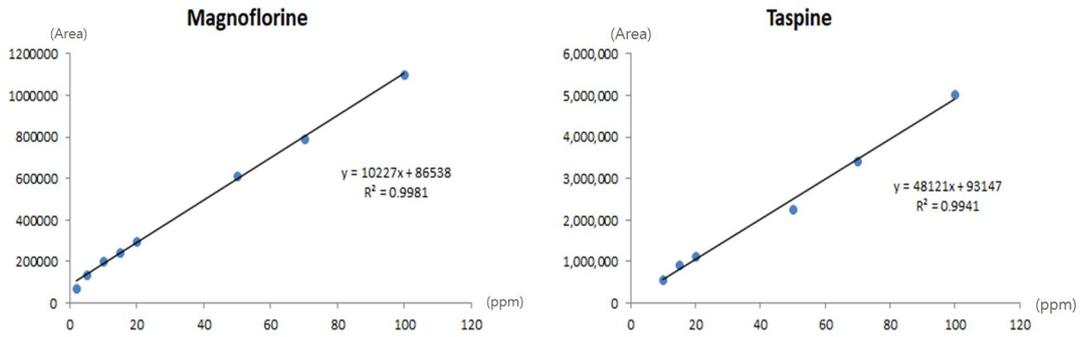


Fig 11. Linearity of blind sample by development method

Table 12. Results of blind test involving *C. palustris* in *L. fischeri*

	True value (%)	Magnoflorine value (%)	Error	Taspine value (%)	Error
A	6	11.4	-4.6	ND ¹⁾	-6
B	10	12.7	-1.8	13.3	3.3
C	0	ND	0	ND	0
D	20	19.9	0.8	21.3	1.3
E	30	31.6	-1.1	28.3	-1.7
F	5	9.1	-3.2	0	-5
G	12	13.8	-1	13.6	1.6
H	0	ND	0	ND	0
I	5	9.5	-3.7	ND	-5
J	0	ND	0	ND	0

¹⁾ ND : Not detected

5. 지표성분의 정성 및 정량 분석 결과

동의나물의 지표물질인 magnoflorine 및 taspine의 정성 및 정량분석을 위해 확립된 추출법과 분석법을 이용하였다. 정성을 위하여 magnoflorine 및 taspine의 표준물질의 chromatogram RT와 일치 여부를 확인하였으며, UV spectrum를 통해 비교하였다. Magnoflorine의 RT는 13.52분으로 나타났으며, taspine의 RT는 18.16분으로 나타났다 (Fig 12).

정량을 위해 magnoflorine 및 taspine의 standard를 각각 10, 25, 50, 100, 250 및 500 mg/kg, 1, 2.5, 5, 10, 25 및 50 mg/kg의 농도로 조제한 다음, HPLC 분석을 통해 얻어진 chromatogram상의 peak 높이 또는 area를 이용하여 검량선 작성에 사용하였다. 희석시킨 용액으로 외부 표준물질 검량선을 작성하였으며, 각각의 methanol 추출물을 3회 반복 분석하였다. 혼입 비율별 정량 값은 magnoflorine의 경우, 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 50%, 70% 및 100%에서 각각 0.00 ± 0.00 , 207.39 ± 1.35 , 254.18 ± 4.81 , 271.47 ± 1.78 , 325.42 ± 1.23 , 671.84 ± 3.53 , 868.51 ± 2.53 및 1202.77 ± 4.70 mg/kg으로 나타났다. Taspine의 경우, 5% 이하는 검출되지 않았으며, 10%, 15%, 20%, 50%, 70% 및 100%에서 각각 15.59 ± 0.30 , 17.51 ± 0.48 , 20.86 ± 1.85 , 40.64 ± 3.29 , 62.99 ± 2.81 및 93.92 ± 1.17 mg/kg으로 확인되었다. magnoflorine과 taspine 최종 검량선의 R^2 는 각각 0.9952 및 0.9954 이었다.(Table 13).

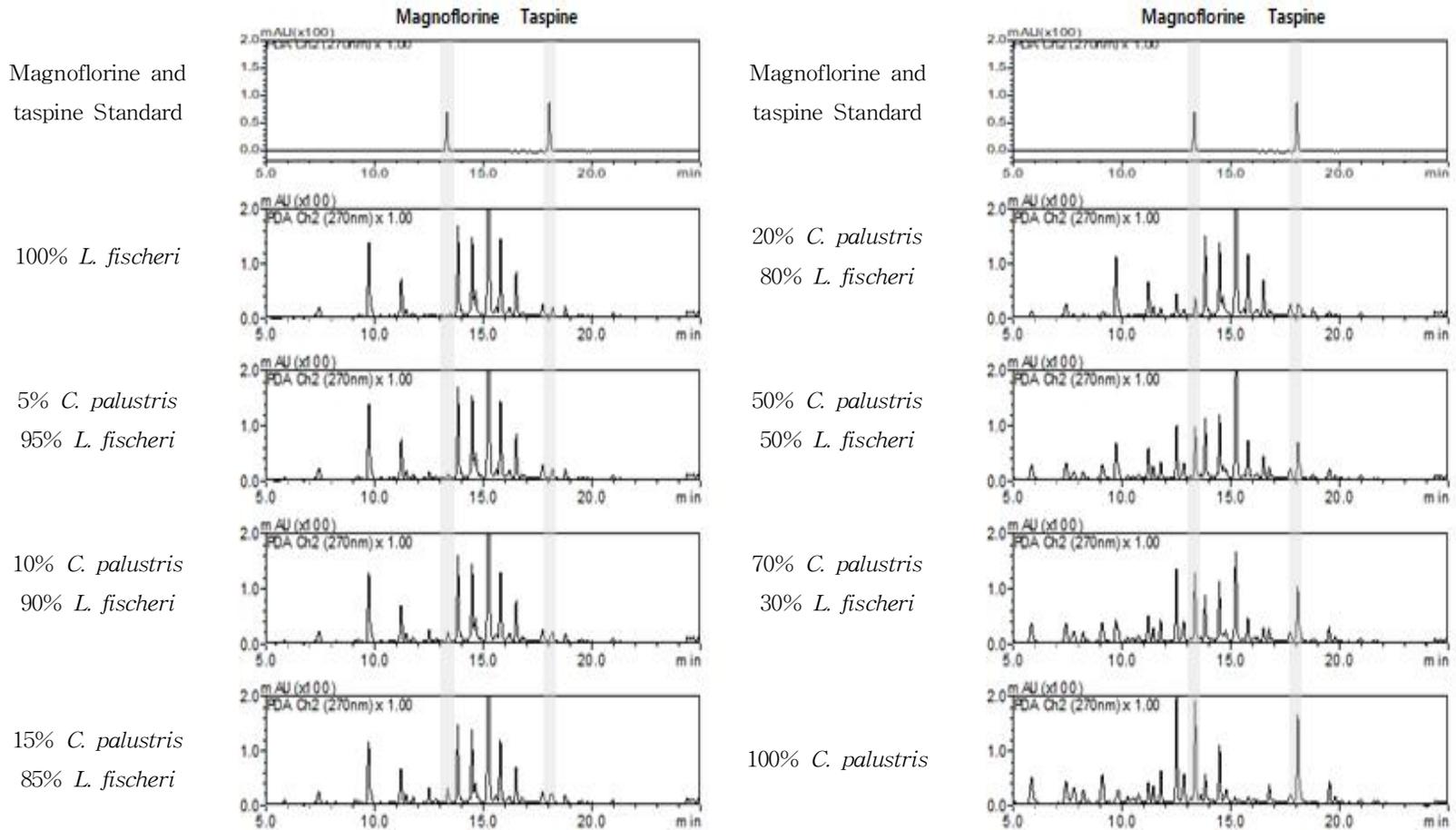


Fig 12. Chromatogram mixing ratio of *L. fischeri* and *C. palustris*

Table 13. Quantitative result of sample ratio by mixing

Unit : mg/kg

Mixing ratio	Magnoflorine	Taspine
100% <i>L. fischeri</i>	ND ¹⁾	ND
5% <i>C. palustris</i> / 95% <i>L. fischeri</i>	207.39 ± 1.35 ²⁾	ND
10% <i>C. palustris</i> / 90% <i>L. fischeri</i>	254.18 ± 4.81	15.59 ± 0.30
15% <i>C. palustris</i> / 85% <i>L. fischeri</i>	271.47 ± 1.78	17.51 ± 0.48
20% <i>C. palustris</i> / 80% <i>L. fischeri</i>	325.42 ± 1.23	20.86 ± 1.85
50% <i>C. palustris</i> / 50% <i>L. fischeri</i>	671.84 ± 3.53	40.64 ± 3.29
70% <i>C. palustris</i> / 30% <i>L. fischeri</i>	868.51 ± 2.53	62.99 ± 2.81
100% <i>C. palustris</i>	1202.77 ± 4.70	93.92 ± 1.17

¹⁾ ND : Not Detected ²⁾ Value are mean ± standard deviation(n=3)

6. 곰취 가공식품 중 유사원료 혼입여부 모니터링

곰취는 주로 수확시기에만 생물의 형태로 판매되며, 곰취를 이용한 다양한 가공식품이 판매되고 있다. 곰취를 주원료로 사용한 식품에는 절임, 냉면 및 찜빵 등이 있다. 시중에 판매되고 있는 곰취 절임은 주로 간장절임의 형태로 곰취 특유의 맛과 향으로 인해 높은 선호도를 가진다. 곰취 냉면 및 찜빵은 제품의 전면이 아닌 냉면의 면과 찜빵의 빵 부분에 곰취를 첨가한 형태로 판매되고 있다. 따라서, 곰취를 첨가한 가공식품들을 대형 마트 또는 시장에서 직접 또는 온라인으로 30건을 구매하였고, 최적 전처리법 및 최적 분석법을 이용하여 동의나물의 혼입여부를 확인하였다.

곰취 가공식품에서 낮은 농도로 혼입된 동의나물도 검출이 가능하도록 감압농축을 진행한 추출물을 시험용액으로 이용하였으며, 곰취 가공식품 30건의 magnoflorine 및 taspine 분석 결과, 동의나물의 지표물질이 검출되는 RT 13.52 및 18.16분에 peak은 검출되지 않았으며, 270 nm에서 UV spectrum 또한 최대 흡수과장을 보이지 않았다. 따라서 현재 판매되고 있는 곰취 가공식품의 모니터링을 통해 30건의 시료에 대하여 동의나물의 혼입이 없었으며, 동의나물로 인한 식중독으로부터 안전함을 확인하였다 (Table 14, Fig 13).

Table 14. Magnoflorine and taspine content in *L. fischeri* processed food

Unit : mg/kg

Products	No.	Magnoflorine contents	Taspine contents
<i>L. fischeri</i> products	30	ND ¹⁾	ND

¹⁾ ND : Not detected

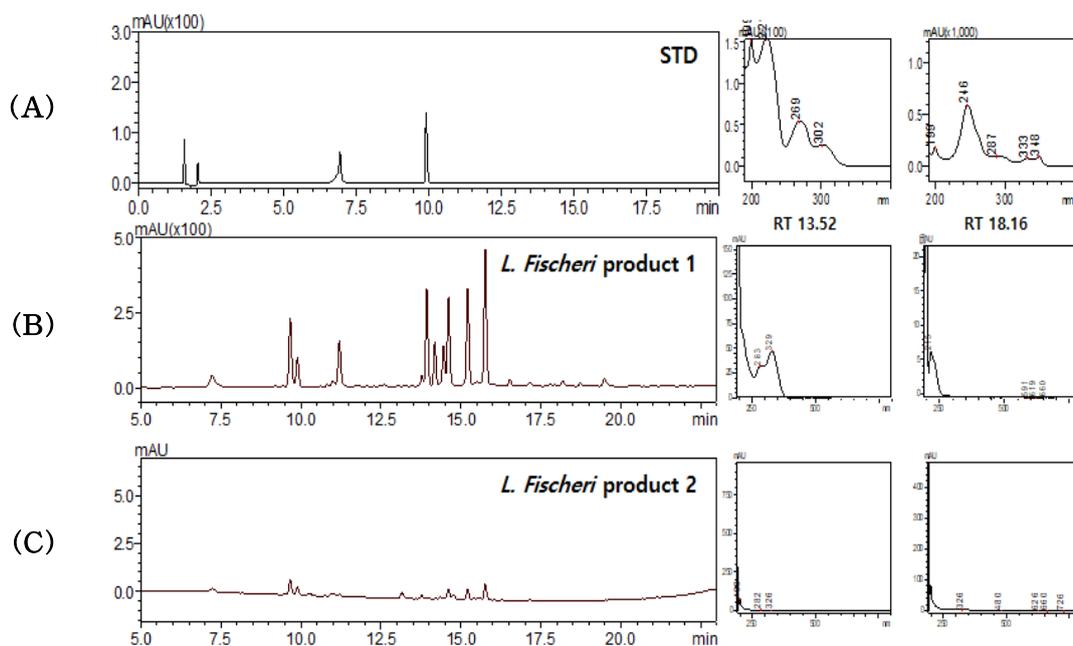


Fig 13. Chromatogram and spectrum for confirming the presence of *L. fischeri* in processed foods

(A) Standard chromatogram and spectrum

(B),(C) *L. fischeri* processed foods chromatogram and spectrum

제 4 장 요약

본 연구는 곰취와 외형이 유사한 식용불가 식물인 동의나물 섭취 시 발생하는 식중독에 대한 대응이 가능하도록 분석법을 개발하고자 하였으며, 혼입 여부를 위한 판별 분석법을 위해 HPLC 및 LC-MS/MS를 이용하였다.

먼저 동의나물의 지표성분 탐색을 위해 sohlxet 장치를 이용하여 추출물을 수득하였으며, 추출은 극성도별로 hexane, ethyl acetate 및 methanol 순서로 추출물을 제조하였다. HPLC 분석을 통해 동의나물의 methanol 추출물에서 270 nm에서 높게 검출되는 RT 13.52분대의 unknown peak를 확인하였고, 245 nm에서 높게 검출되는 RT 18.16분의 다른 unknown peak를 확인하였으며, 동시분석을 위해 최대 흡수 파장으로 270 nm를 선정하였다. 이후 총 2개의 unknown peak를 지표성분으로 추측하였고, 최적 분석법을 확립하기 위해서 추출용매, 방법 및 시간을 달리하여 분석을 진행하였다. 그 결과, 최종적으로 최적 추출용매는 methanol, 최적 추출방법은 환류 추출(reflux extraction), 최적 추출시간은 2시간으로 선정되었다.

이후 최적 추출조건과 기기조건으로 LC-MS/MS 분석을 통해 성분 동정을 진행하였다. LC-MS/MS에서는 분석조건 및 다른 column의 이용으로 약간의 RT의 차이를 보였으며, UV spectrum의 동일여부에 따라, RT 13.52의 unknown peak는 RT 7.02분에 나타났으며, $[M]^+$ 이온 질량값(m/z)은 342.169, RT 18.16분의 unknown peak는 9.95분에서 보였으며, $[M+H]^+$ 이온 질량값(m/z)은 370.129으로 확인되었다. MS/MS library search 결과, RT 7.02분대에 확인된 unknown peak는 magnoflorine, RT 9.95분에 존재하는 peak는 taspine으로 동정되었다. 동정된 화합물의 일치여부 확인을 위해, 지표성분으로 추정되는 magnoflorine 및 taspine의 표준물질을 구입하여 시료와 동일한 조건으로 분석을 하였으며, RT 및 UV spectrum이 모두 일치하여 지표물질로 선정하였다.

다음으로 곰취와 동의나물의 혼입여부 판별방법에 대한 신뢰도를 확보하기 위해서 유효성 검증을 진행하였으며, magnoflorine 및 taspine에 대한 직선성의 결과로 0.9952 및 0.9954, 검출한계(LOD)의 결과로 1.07 mg/kg 및 0.07 mg/kg, 정량한계(LOQ)의 결

과로는 3.55 mg/kg 및 0.22 mg/kg, 정밀성은 0.83% 및 0.55%이며, 마지막으로 정확성은 98.1% 및 95.7%으로 확인하였다. 해당 분석에 대한 결과는 모두 AOAC에서 제시한 기준에 적합하였으며, 추가적으로 맹검 테스트(blind test)를 진행하였다. 시료는 타 실험실에서 시료를 제공받았으며, 실험 결과 magnoflorine은 true value \pm 1.62, taspine은 true value \pm 2.39으로 확인되었다.

국내 유통되고 있는 곰취 가공식품 30건에 대하여 동의나물의 지표물질로 선정된 magnoflorine 및 taspine에 대한 혼입여부를 확인하였고, 분석 결과 모든 곰취 가공식품에서 두 지표물질을 확인할 수 없었으며, 식중독의 위험으로부터 안전함을 확인하였다.

최종적으로 본 연구 결과, 식용가능 식물인 곰취에 식용불가 식물인 동의나물의 혼입여부 판별을 위해서 동의나물의 지표성분인 magnoflorine 및 taspine을 보편적 분석기기인 HPLC를 통해 분석할 수 있는 판별법을 개발하였다. 이를 통해 다양한 분석기관에서도 활용성 높게 판별이 가능할 것이며, 다른 유사원료 판별에 대한 기초연구로 활용될 수 있을 것이라고 사료된다.

참 고 문 헌

Ahn. S. M., Kim. M. S., Jung. I. C., & Sohn. H. Y. (2011). Antibacterial, antioxidative and anti-proliferative activity against human colorectal cell of *Pimpinella brachycarpa*. Korean journal of food preservation, 18(4), 590-596.

An. S. Y. (2009). Medicare for functional foods/medicines. Wild edible plants as natural resources for the development of medicare industry at Yanggu-gun. Seminar of Yanggugun. Yanggu, Korea. 79-132.

Bae. J. H., Yu. S. O., Kim. Y. M., Chon. S. U., Kim. B. W., & Heo. B. G. (2009). Physiological Activity of Methanol Extracts from *Ligularia fischeri* and Their Hyperplasia Inhibition Activity of Cancer Cell, Journal of bio-environment control, 18(1), 67-73.

Chang. S. K., Kim. J. H., & Oh. H. S. (2008). The Development of Functional Cold Buckwheat Noodles Using Biological Activities of Hot Water Extracts of *Ligularia fischeri* and *Angelica gigas* Nakai. Journal of The Korean Society of Food Culture, 23(4), 479-488.

Cho. S. D., & Kim. G. H.. (2005). Food Product Development and Quality Characteristics of *Ligularia fischeri* for Food Resources. Korean journal of food preservation, 12(1), 43-47.

Choi. H. S., (2019). Chemical Composition of the Essential Oils from *Ligularia fischeri* and *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*, 31(4), 284-293.

Hwang. E. H., (1991). A survey on availability of wild vegetables. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 20(5), 440-446.

Ko. J. H., (2008) A Study of Guideline on the Right Practice of Sanitary control in Food Service Institutions from Trends of Recent Food Poisoning Outbreaks. Master's thesis. University of Ulsan.

Korea Forest Management Association (2008). 약초와 독초 구분해서 식용해야.

Korea Forest Management Association, 188, 34-35.

Korea National Arboretum. (2014). Korean National Organism Knowledge Information System. www.nature.go.kr (in Korean)

Nam. H. S., Jung. J. W., Kim. D. W., & Ha. H. C. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extracts of *Ligularia fischeri*. Korean journal of food preservation, 24(6), 834-841.

Park. C. W., Ok. T. G., Cho. J. H., Choi. D. W., Her. A. Y., Lee. H. Y., Kim. Y. H., Cho. B. R., Kim. S. E., Choi. K. H., Bae. J. H., Seo. J. Y., Chung. J. B., Ahn. H. C., & Ahn. M. E. (2004). The Shock with Bradycardia after Ingestion of *Caltha palustris*. Journal of The Korean Society of Clinical Toxicology, 2(1), 41-44.

Woo. Y. J., Shin. S. R., Hong. J. Y. (2017). Study on antioxidant and physiological activities of extract from *Ligularia fischeri* by extraction methods. Korean journal of food preservation, 24(8), 1113-1121.

Yeon. B. R., Cho. H. M., Yun. M. S., Jhoo. J. W., Jung. J. W., Park. Y. H., & Kim. S. M. (2012). Comparison of Fragrance and Chemical Composition of Essential Oils in Gom-chewi (*Ligularia fischeri*) and Handaeri Gom-chewi (*Ligularia fischeri* var. *spicifoprmsis*). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 41(12), 1758-1763.

Yi. H. M., & Goh. J. T. (2011). A study on the consumers' satisfaction of Yanggu *Ligularia fischeri*. Korean journal of food marketing economics, 28(4), 77-92.

Yoon. K. R., (1973). Screening for Saponins of the Root of *Caltha minor* Nakai. Korean Journal of Pharmacognosy, 4(2), 101-102.