



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0044806
(43) 공개일자 2017년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 30/02 (2006.01) G01N 1/40 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01) G01N 30/86 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 30/02 (2013.01)
G01N 1/40 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0144140

(22) 출원일자 2015년10월15일

심사청구일자 2015년10월15일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

(72) 발명자

권기성

충청북도 청주시 흥덕구 대농로 17, 106동 905호
(북대동, 지웰시티1차아파트)

최장덕

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 연제만수길 17
703동 1501호 (연제리, 오송대원칸타빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재량

전체 청구항 수 : 총 10 항

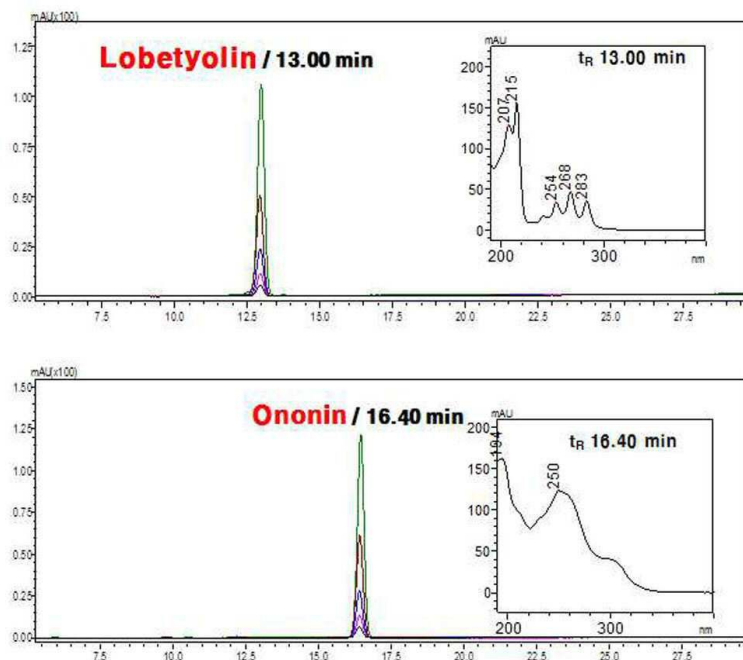
(54) 발명의 명칭 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 칩 혼입여부 판별방법

(57) 요약

본 발명은 인삼, 홍삼제품 더덕, 도라지, 칩 혼입여부 판별방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인삼과 생김새가 비슷하여 혼용할 경우 구별이 어려운 더덕, 도라지, 칩과 같은 타식품원료가 시중에서 판매되고 있는 분말, 음료, 농축액 형태의 인삼제품 또는 홍삼제품에 혼입되었는지 여부를 정성 및 정량적으로 정확하게 판별할 수 있

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법은 더덕, 도라지, 쑥 중에서 선택된 적어도 어느 하나의 타식품원료와 인삼을 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 상기 타식품원료의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와, 판별하고자 하는 인삼제품 또는 홍삼제품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와, 상기 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와, 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 상기 표지성분이 상기 인삼 또는 홍삼제품 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계를 포함한다.

(52) CPC특허분류

G01N 30/06 (2013.01)

G01N 30/8631 (2013.01)

G01N 33/025 (2013.01)

G01N 2001/4088 (2013.01)

(72) 발명자

조천호

세종특별자치시 도움1로 가재마을 5단지 520동
2101호

김경수

광주광역시 남구 서문대로654번길 24 진월삼익세라
믹아파트2차 201-1505호

홍준호

광주광역시 광산구 첨단중앙로181번길 42-25
108-1003

최지연

전라북도 부안군 변산면 지서로 86

노은영

광주광역시 북구 서하로 120 6동 1401호

김재성

경기도 성남시 중원구 회망로320번길 4-1 505호 (상대원동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1475008523

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 식품의약품안전처

연구사업명 식품등안전관리

연구과제명 불량식품 근절을 위한 분석법 개발 연구 - 이화학적 분석법을 활용한 불량식품 판별법 개발(건조방법에 따른 고춧가루의 지표물질 탐색 및 판별법 구축 연구)

기 여 율 1/1

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

더덕, 도라지, 쑥 중에서 선택된 적어도 어느 하나의 타식품원료와 인삼을 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 상기 타식품원료의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와;

판별하고자 하는 인삼제품 또는 홍삼제품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와;

상기 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와;

상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 상기 표지성분이 상기 인삼제품 또는 홍삼제품 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 판별단계는 상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과와 상기 표지성분의 머무름시간을 비교하여 상기 인삼제품 또는 홍삼제품 중의 상기 표지성분의 함유 여부를 판별하는 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 표지성분은 상기 더덕 및 상기 도라지에 함유된 로베티올린(lobetyolin)인 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 표지성분은 상기 쑥에 함유된 오노닌(ononin)인 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 인삼제품 또는 홍삼제품은 분말, 음료, 농축액 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 시험용액은 상기 분말형태의 인삼제품 또는 홍삼제품에 메탄올을 가해 환류추출한 후 여과한 여액을 감압농축시켜 얻은 농축물을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 수득한 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 시험용액은 상기 음료 형태의 인삼제품 또는 홍삼제품을 감압농축시켜 얻은 농축물을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 수득한 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 시험용액은 상기 농축액 형태의 인삼제품 또는 홍삼제품을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 수득한 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 판별단계는 상기 표지성분을 농도별로 액체 크로마토그래프로 분석하여 작성한 검량선을 근거로 상기 인삼제품 또는 홍삼제품 중에 혼입된 상기 타식품원료의 혼입을 정성 및 정량적으로 판별하는

것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 칩 혼입여부 판별방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 표지성분검출단계는 a)인삼의 액체크로마토그래피 분석결과와 타식품원료의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 상기 표지성분의 피크(peak)를 탐색하는 단계와, b)상기 인삼과 상기 타식품원료를 혼합한 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 상기 타식품원료의 혼합농도에 따른 상기 표지성분의 피크 변화를 관찰하는 단계와, c)상기 표지성분의 화합물을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 칩 혼입여부 판별방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 인삼, 홍삼제품 더덕, 도라지, 칩 혼입여부 판별방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인삼과 생김새가 비슷하여 혼용할 경우 구별이 어려운 더덕, 도라지, 칩과 같은 타식품원료가 시중에서 판매되고 있는 분말, 음료, 농축액 형태의 인삼제품 또는 홍삼제품에 혼입되었는지 여부를 정성 및 정량적으로 정확하게 판별할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 웰빙의 바람을 타고 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 건강 보조 기능 식품의 수요가 증가하고 있다. 특히, 홍삼을 비롯한 인삼가공제품의 시장이 비약적으로 성장하고 있다.
- [0003] 인삼을 이용한 가공제품은 경제적 이윤 추구를 목적으로 인삼 원료 대신 저가의 더덕, 도라지, 칩을 사용하여 유통 및 판매하는 사례가 급증하고 있다.
- [0004] 더덕, 도라지, 칩은 인삼과 생김새가 비슷하여 가공된 형태로 인삼과 혼용하여 사용할 경우 이를 육안으로 구별하기가 불가능하다. 따라서 인삼가공제품에 타식품원료가 혼입되었는지 여부를 확인할 수 있는 방법의 필요가 있다.
- [0005] 인삼의 표지성분으로써 진세노사이드(ginsenoside) 등이 알려져 있으며, 이는 약리활성이 뛰어나 기능성 관련 연구가 주를 이루어 진행되어 왔으나, 분석방법이 복잡하다는 단점이 있으며, 타원료 혼입을 구별할 수 있는 표지성분(indicator)으로서 이용이 불가하다.
- [0006] 이러한 문제점에도 불구하고 지금까지는 인삼의 품종을 판별하는 방법이나 인삼의 원산지 또는 연령을 판별하는 방법 등에 대한 연구가 주를 이루고 있을 뿐 인삼가공제품에서 더덕, 도라지, 칩 등과 같은 타식품원료의 혼입을 막기 위한 분석 및 판별 방법에 대한 연구는 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제 10-1409848호
(특허문헌 0002) 2. 대한민국 등록특허 제 10-1546504호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기의 문제점을 개선하고자 창출된 것으로서, 저가의 타식품원료를 사용하거나 표기사항을 허위로 표기하는 방법과 같은 사례로서 시중에 판매되고 있는 인삼제품 또는 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 칩이 표기 없이 혼입되어 있는지를 각각의 표지성분 분석을 통하여 혼입여부를 정확하게 판별할 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 칩 혼입여부 판별방법은 더덕, 도라지, 칩 중에서 선택된 적어도 어느 하나의 타식품원료와 인삼을 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 상기 타식품원료의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와; 판별하고자 하는 인삼제품 또는 홍삼제품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와; 상기 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와; 상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 상기 표지성분이 상기 인삼제품 또는 홍삼제품 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계;를 포함한다.
- [0010] 상기 판별단계는 상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과와 상기 표지성분의 머무름시간을 비교하여 상기 인삼제품 또는 홍삼제품 중의 상기 표지성분의 함유 여부를 판별한다.
- [0011] 상기 표지성분은 상기 더덕 및 상기 도라지에 함유된 로베티올린(lobetyolin)인 것을 특징으로 한다.
- [0012] 상기 표지성분은 상기 칩에 함유된 오노닌(ononin)인 것을 특징으로 한다.
- [0013] 상기 인삼제품 또는 홍삼제품은 분말, 음료, 농축액 중에서 선택된 어느 하나이다.
- [0014] 상기 시험용액은 상기 분말형태의 인삼제품 또는 홍삼제품에 메탄올을 가해 환류추출한 후 여과한 여액을 감압농축시켜 얻은 농축물을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 수득한다.
- [0015] 상기 시험용액은 상기 음료 형태의 인삼제품 또는 홍삼제품을 감압농축시켜 얻은 농축물을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 수득한다.
- [0016] 상기 시험용액은 상기 농축액 형태의 인삼제품 또는 홍삼제품을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 수득한다.
- [0017] 상기 판별단계는 상기 표지성분을 농도별로 액체 크로마토그래프로 분석하여 작성한 검량선을 근거로 상기 인삼제품 또는 홍삼제품 중에 혼입된 상기 타식품원료의 혼입을 정성 및 정량적으로 판별한다.
- [0018] 상기 표지성분검출단계는 a)인삼의 액체크로마토그래피 분석결과와 타식품원료의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 상기 표지성분의 피크(peak)를 탐색하는 단계와, b)상기 인삼과 상기 타식품원료를 혼합한 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 상기 타식품원료의 혼합농도에 따른 상기 표지성분의 피크 변화를 관찰하는 단계와, c)상기 표지성분의 화합물을 확인하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

- [0019] 상술한 바와 같이 본 발명은 분말, 음료, 농축액 형태의 인삼제품 또는 홍삼제품을 액체크로마토그래피로 분석하여 인삼제품 또는 홍삼제품 중에 함유되어 있는 더덕, 도라지, 칩의 표지성분을 정성 및 정량적으로 분석함으로써 인삼제품 또는 홍삼제품에 타 원료가 혼입되었는지 여부를 정확하게 판별할 수 있다.
- [0020] 이러한 판별방법에 의해 시중에서 유통 및 판매되고 있는 인삼제품 또는 홍삼제품에 더덕, 도라지, 칩 등과 같은 저가의 원료를 사용하거나 표기사항을 허위로 표기하는 것을 용이하게 단속할 수 있다.

도면의 간단한 설명

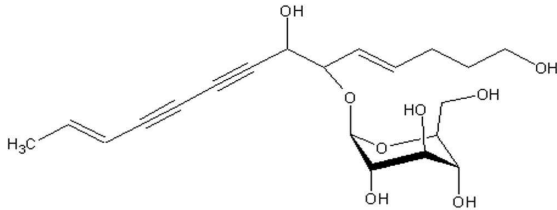
- [0021] 도 1은 더덕과 도라지의 표지성분인 로베티올린과 칩의 표지성분인 오노닌의 표준용액 크로마토그램과 UV spectrum을 나타낸 도면이고,
- 도 2는 인삼 시험용액, 더덕 시험용액, 인삼/더덕 혼합 시험용액의 크로마토그램과 UV spectrum을 나타낸 도면이고,
- 도 3은 인삼 시험용액, 칩 시험용액, 인삼/칩 혼합 시험용액의 크로마토그램과 UV spectrum을 나타낸 도면이고,
- 도 4는 더덕과 도라지의 표지성분인 로베티올린과 칩의 표지성분인 오노닌의 LC-MS-MS 스펙트럼 결과이고,
- 도 5는 더덕과 도라지의 표지성분인 로베티올린과 칩의 표지성분인 오노닌의 HPLC 및 LCMS의 분석결과이고,
- 도 6은 인삼에 더덕, 도라지 및 칩을 혼입하여 제조한 혼합 시험용액의 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명의 인삼, 홍삼제품 중 더덕, 도라지, 쑥 혼입여부 판별방법에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0023] 본 발명은 시중에서 유통되고 있는 인삼제품 또는 홍삼제품 중에 타식품원료의 혼입여부를 정확하게 판별할 수 있는 방법이다. 본 발명은 타식품원료의 표지성분이 인삼제품 또는 홍삼제품에 함유되었는지 여부를 통해 타식품원료의 혼입여부를 판별한다.
- [0024] 본 발명에서 인삼제품 또는 홍삼제품은 수삼, 건삼, 홍삼 등을 다양한 형태로 가공한 인삼가공제품을 의미한다. 가령, 인삼제품 또는 홍삼제품은 분말, 음료, 농축액 중에서 선택된 어느 하나의 형태로 가공한 제품을 의미할 수 있다. 그리고 타식품원료는 인삼가공제품에 혼입될 수 있는 식품원료로서, 인삼을 제외한 것을 의미한다. 타식품원료는 특히 더덕, 도라지, 쑥을 의미한다.
- [0025] 본 발명은 인삼제품 또는 홍삼제품을 액체크로마토그래피로 분석하여 인삼가공제품 중에 함유되어 있는 타식품원료의 표지성분을 정성 및 정량적으로 분석함으로써 인삼가공제품에 타 원료가 혼입되었는지 여부와 혼입농도를 판별할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 실시 예에 따른 인삼가공제품 중 타식품원료의 혼입여부 판별방법은 인삼과 타식품원료를 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 타식품원료의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와, 판별하고자 하는 인삼가공제품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와, 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와, 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 표지성분이 인삼가공제품 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계를 포함한다.
- [0027] 1. 표지성분검출단계
- [0028] 인삼과 타식품원료를 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 타식품원료의 표지성분을 검출한다.
- [0029] 인삼의 액체크로마토그래피 분석결과와 타식품원료의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 인삼에는 함유되어 있지 않으면서 타식품원료에 고유하게 함유된 표지성분(indicator)을 탐색하여 특정 표지성분을 검출하고, 검출된 표지성분의 화합물을 확인한다.
- [0030] 먼저, 표지성분의 검출을 위해 인삼의 액체크로마토그래피 분석결과와 타식품원료의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 표지성분의 피크(peak)를 탐색한다.
- [0031] 이를 위해 인삼과 타식품원료로부터 시험물질을 각각 조제한다.
- [0032] 홍삼(전 인삼)분말에 추출용매를 가해 환류추출한 후 여과한 다음 감압농축하여 인삼으로부터 시험물질을 조제할 수 있다.
- [0033] 그리고 타식품원료 역시 위와 같이 인삼과 동일한 방법으로 처리하여 타식품원료로부터 시험물질을 조제할 수 있다. 가령, 더덕, 도라지, 쑥 중의 어느 하나를 썰서 얻은 분말에 추출용매를 가해 환류추출한 후 여과한 다음 감압농축하여 타식품원료로부터 시험물질을 조제할 수 있다.
- [0034] 조제된 시험물질을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 수득한 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석한다. 액체크로마토그래피로 고성능액체크로마토그래피(HPLC: high-performance liquid chromatography)를 이용할 수 있다.
- [0035] 액체크로마토그래피 분석결과를 토대로 인삼에서 관찰할 수 없는 피크(peak)들 중 타식품원료에서만 관찰되는 피크들을 탐색하여 특정 머무름시간(RT:retention time)에 나타난 특정의 피크를 선정한다.
- [0036] 다음으로, 선정된 특정의 피크에 해당하는 물질이 표지성분으로 이용될 수 있을지 여부를 확인한다. 이를 위해 인삼과 타식품원료를 혼합한 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 타식품원료의 혼합농도에 따른 피크 변화를 관찰한다.
- [0037] 혼합물 중의 타식품원료의 혼합농도를 10~90중량%로 달리하여 피크의 변화를 관찰할 수 있다. 타식품원료의 혼합농도를 달리한 여러 종류의 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 혼합농도를 달리한 여러 종류의 혼합물에 나타나는 특정성분의 피크 변화를 관찰한다. 타식품원료의 농도 증대에 따라 피크강도가 증가하는 결과를 얻게 되면 이 피크에 해당하는 물질이 표지성분으로 이용될 수 있음을 의미한다.
- [0038] 다음으로, 표지성분의 화합물을 확인한다.
- [0039] 특정 머무름시간(RT)에 나타나는 피크에 해당하는 표지성분은 질량분석기 등을 통해 확인할 수 있다.

[0040] 더덕과 도라지는 같은 꽃초롱목(Campanulales) 꽃초롱과(Campanulaceae)의 더덕속과 도라지속으로 구분되므로 표지성분이 동일할 수 있다. 이러한 표지성분으로 하기의 화학식 1로 표현되는 로베티올린(lobetyolin)(C₂₀H₂₈O₈)일 수 있다.

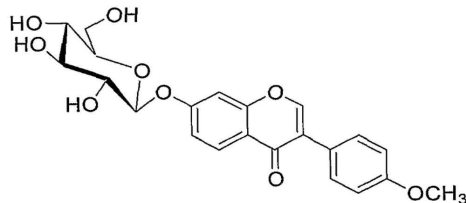
화학식 1



[0041]

[0042] 그리고 침은 표지성분으로서 하기 화학식 2로 표현되는 오노닌(ononin)(C₂₂H₂₂O₃)일 수 있다.

화학식 2



[0043]

2. 조제단계

[0045] 타식품원료의 표지성분을 선정한 후 타식품원료가 인삼가공제품에 혼입되었는지 여부를 확인하기 위해 시중에서 유통, 판매되고 있는 인삼가공제품으로부터 HPLC 분석을 위한 시험용액을 조제한다.

[0046] 시중에서 유통, 판매되고 있는 인삼가공제품은 주로 분말, 음료, 농축액의 형태로 가공되어 있다.

[0047] 분말 형태의 인삼가공제품의 경우 분말에 메탄올을 가해 환류추출한 후 여과한 여액을 감압농축시켜 얻은 농축물을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 시험용액을 조제할 수 있다. 가령, 분말 10g을 250mL 환류용 플라스크(flask)에 넣고 50% 메탄올(methanol) 30mL를 넣고 80℃ 수욕조에서 60분 동안 환류추출(reflux extract)하고 방냉한 후, 구멍지름 20 ~ 25μm인 여과지(whatman filter, No. 41)를 이용하여 여과한 후, 회수된 여액을 250mL 농축수기에 옮긴 후 회전식 감압농축기(rotary evaporator)를 이용하여 감압 농축한 다음 농축물에 메탄올 10mL를 넣고 용해시켜 멤브레인 필터(membrane filter, PTFE, 0.45μm)로 여과 후 시험용액을 제조할 수 있다.

[0048] 그리고 음료 형태의 인삼가공제품의 경우 음료를 감압농축시켜 얻은 농축물을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 시험용액을 조제할 수 있다. 가령 음료 10mL를 농축수기에 옮긴 후 회전식 감압농축기(rotary evaporator)를 이용하여 감압 농축한 다음 농축물에 메탄올 10mL를 넣고 용해시켜 멤브레인 필터(membrane filter, PTFE, 0.45μm)로 여과 후 시험용액을 제조할 수 있다.

[0049] 그리고 농축액 형태의 인삼가공제품의 경우 농축액을 메탄올에 용해시킨 다음 필터로 여과하여 시험용액을 조제할 수 있다. 가령, 농축액 1g에 메탄올 10mL를 넣고 용해시켜 멤브레인 필터(membrane filter, 0.45μm)로 여과 후 시험용액을 제조할 수 있다.

3. 분석단계

[0051] 인삼가공제품으로부터 만든 시험용액이 준비되면 액체크로마토그래피로 분석한다.

[0052] 액체크로마토그래피로 상술한 바와 같이 고성능액체크로마토그래피(HPLC: high-performance liquid

chromatography)를 이용할 수 있다.

- [0053] 4. 판별단계
- [0054] 인삼가공제품으로부터 만든 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 표지성분이 인삼가공제품 중에 함유되어 있는지를 판별한다.
- [0055] 인삼가공제품으로부터 만든 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과에서 표지성분의 머무름시간과 동일한 머무름시간에서 피크의 형성여부로 인삼가공제품 중에 표지성분이 함유되었는지 판별할 수 있다. 이를 통해 인삼가공제품에 타식품원료의 혼입여부를 확인할 수 있다.
- [0056] 또한, 인삼가공제품으로부터 만든 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과에서 표지성분의 머무름시간과 동일한 머무름시간에 형성된 피크의 강도와 면적을 계산하여 인삼가공제품에 혼입된 타식품원료의 혼입량을 정량적으로 확인할 수 있다. 이는 표지성분을 농도별로 달리하여 조제한 표준용액을 액체 크로마토그래프로 분석하여 작성한 검량선을 근거로 계산될 수 있다.
- [0057] 상술한 바와 같이 본 발명은 분말, 음료, 농축액 형태의 인삼가공제품 중에 함유되어 있는 타식품원료의 표지성분을 분석함으로써 인삼가공제품에 타 원료가 혼입되었는지 여부를 정성 및 정량적으로 정확하게 판별할 수 있다.
- [0058] 이하, 본 발명을 하기 실험예를 통하여 구체적으로 설명한다. 이는 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리 범위를 하기의 실험 예로 한정하는 것은 아니다.
- [0059] <실험예>
- [0060] 1. 실험재료 및 방법
- [0061] (1)실험재료
- [0062] 실험에서 사용한 인삼, 더덕, 도라지 및 칩은 모두 국내산으로, 재래시장에서 생물로 구매하여 준비하였다.
- [0063] 그리고 더덕과 도라지의 표지성분으로서 로베티올린(TRC, Toronto, Canada)을 사용하였고, 칩의 표지성분으로서 오노닌(TCI, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 그리고 메탄올(methanol), 아세토나이트릴(acetonitrile)과 물(water)은 HPLC grade(Fisher, USA)를 사용하였다.
- [0064] (2)표준용액의 조제
- [0065] 표지성분인 로베티올린(lobetyolin)과 오노닌(ononin)의 크로마토그램을 확인하고 검량선을 작성하기 위해 표지성분을 메탄올에 녹여 5, 10, 20, 40, 80ppm의 로베티올린 표준용액과 오노닌 표준용액을 각각 조제하였다.
- [0066] (3)시험물질의 제조
- [0067] 준비한 인삼, 더덕, 도라지 및 칩은 세척 후 비가식부를 제거하여 50℃ 온도로 농산물 건조기(GN-012,한일, (주)한일지엔코, 한국)를 이용하여 건조시켰다. 그리고 증탕기(OC-220PR, (주)오쿠, 한국)로 8시간 증탕하여 찌 다음 건조 후 분쇄한 분말을 에탄올을 추출용매로하여 70~80℃에서 6시간씩 2회 환류추출 후 여과지(whatman filter, No. 41)로 여과한 다음 감압농축하여 인삼 시험물질, 더덕 시험물질, 도라지 시험물질, 칩 시험물질을 각각 조제하였다.
- [0068] 이와 함께 인삼 시험물질에 더덕 시험물질을 10~90중량%로 혼합하여 인삼/더덕 혼합 시험물질을 조제하였다. 또한, 인삼 시험물질에 도라지 시험물질을 10~90중량%로 혼합하여 인삼/도라지 혼합 시험물질을 조제하였다. 또한, 인삼 시험물질에 칩 시험물질을 10~90중량%로 혼합하여 인삼/칩 혼합 시험물질을 조제하였다.
- [0069] (4)HPLC 분석용 시험용액의 조제
- [0070] 각 시험물질 1g을 methanol 10mL에 용해시킨 후 membrane filter (0.45μm)로 여과하여 시험용액을 제조하였다.
- [0071] 인삼 시험물질로 조제한 것을 인삼 시험용액, 더덕 시험물질로 조제한 것을 더덕 시험용액, 도라지 시험물질로 조제한 것을 도라지 시험용액, 칩 시험물질로 조제한 것을 칩 시험용액, 인삼/더덕 혼합 시험물질로 조제한 것을 인삼/더덕 혼합 시험용액, 인삼/도라지 혼합 시험물질로 조제한 것을 인삼/도라지 혼합 시험용액, 인삼/칩 혼합 시험물질로 조제한 것을 인삼/칩 혼합 시험용액이라고 한다.

[0072] 제조한 각 시험용액은 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석용으로 사용하였다.

[0073] (5)시험 조작

[0074] a. 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)의 시험조작

[0075] 고성능액체크로마토그래프의 측정조건은 건강기능식품공전의 인삼 및 홍삼의 진세노사이드 정량분석법을 응용하였다. 시험용액의 성분을 분석하기 위해 HPLC system(Shimadzu, Kyoto, JPN)과 diode array(PDA 또는 DAD) 검출기(Shimadzu, Kyoto, JPN)가 장착된 액체크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 분석용 컬럼은 5C18-PAQ(4.6 mm I.D. × 250 mm L., COSMOSIL, JPN), 컬럼 온도는 상온, 이동상으로는 물(water)과 아세토나이트릴(Acetonitrile)을 기울기용리(gradient elution)방법으로 하기 표1의 용매 이동상 혼합 비율 조건으로 분석하였으며, 유속은 1.6 mL/min, 주입량은 10μL로 하여 203nm에서 측정하였다.

표 1

컬럼	- C18 컬럼 (ODS와 동등 이상의 것) - 사용컬럼 : 5C18-PAQ, 4.6 mm I.D. × 250 mm L., COSMOSIL, JPN		
유량	1.6 mL/min		
검출기	UV (203 nm)		
시료주입량	10 μL		
용매 이동상	Gradient system		
	시간(분)	용매이동상 혼합비율	
		물 (%)	Acetonitrile (%)
	0	80	20
	10	80	20
	20	68	32
	30	50	50
	35	10	90
	40	80	20

[0076]

[0077] b. LC-MS-MS의 시험조작

[0078] -초고성능 액체크로마토그래피(UPLC)

[0079] UPLC가 결합된 ESI-HR-MS(LCMS-IT-TOF), SHIMADZU, JPN)을 이용하여 수행하였다. 컬럼은 Shim-pack XR-ODS II (3.0mm I.D. × 100mm L., SHIMADZU, JPN)을 사용하고 이동상으로는 물(water)(A)과 아세토니트릴(Acetonitrile)(B)을 사용하였다. 총 분석시간은 25분으로 B의 비율을 처음 2.7분간 20%로 유지하고, 10.9분까지 32%, 15분까지 95%까지 올려주었고 18분까지 유지하였으며 19분까지 초기 조건인 20% 흘러 초기 조건으로 안정화시켰다. 유속은 0.5 mL/min, 주입량은 1.0 μL, 컬럼온도는 40℃를 유지하였다.

[0080] - LC-MS-MS

[0081] 표지성분의 질량 분석은 하이브리드형 질량분석기인 비행유도형 결합 이온트랩 질량분석기(Ion trap coupled Time of flight, LCMS-IT-TOF, Shimadzu, JPN)를 사용해 포지티브 모드(positive mode)에서 각각 더덕, 도라지 및 칩의 표지성분 분석을 위한 최적의 조건을 확립하여 하기 표 2와 같이 나타내었다.

표 2

HPLC	LC-20A PROMINENCE, SHIMADZU	LCMS	Hybrid LCMS, LCMS-IT-TOF, SHIMADZU
Column	SHIM-PACK XR-ODS II, 3.0*100mm, SHIMADZU	Mass type	Ion trap coupled TOF(Time-of-flight)
Oven temp.	40 °C	Ionization	ESI(positive mode) / interface voltage 4.5 kv
Flow rate	0.5 mL/min	Nebulizing gas flow	N2, 1.5 L/min
Injection vol.	1.0 µL	CDL temp.	200 °C

[0082]

[0083] (6)검량선의 작성

[0084] 로베티올린 표준용액과 오노닌 표준용액을 일정량 취하여 액체 크로마토그래피에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크(peak) 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하였다(도1 참조). 표준용액으로 작성된 검량선을 근거로 피크높이법 또는 피크면적법에 따라서 정량하였다.

[0085] 2. 실험 결과

[0086] (1)HPLC 분석을 통한 표지성분의 검출

[0087] 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석한 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 도 2는 인삼 시험용액과 더덕 시험용액, 인삼/더덕 혼합 시험용액의 결과이고, 도 3은 인삼 시험용액과 칩 시험용액, 인삼/칩 혼합 시험용액의 결과이다.

[0088] 대부분의 사포닌(saponin) 분석시에는 203nm에서 관찰하지만 본 실험은 표지성분을 탐색하는 확인하는 것이 목적이므로 다양한 파장에서의 결과를 토대로 표지성분을 찾고자 진행하였다.

[0089] 도 2 및 도 3을 참조하면, 254nm와 203nm로 분석시 인삼에는 없는 피크(RT:13.75분경)가 더덕에서 검출되었으며, 칩 또한 인삼에는 없는 피크(RT:16.56분경)가 더덕과는 다른 시간대에 나타나는 것을 확인하였다. 동일시간대에 화합물이 검출됨과 동시에 UV spectrum을 확인하여 동일한 화합물인지를 확인한 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0090] 그리고 도시되지 않았지만 도라지 역시 인삼에는 없는 피크가 더덕과 동일한 머무름 시간대에 나타나는 것으로 확인되었다.

[0091] 그리고 더덕 또는 칩이 10, 20, 30, 40, 50중량%로 혼합된 인삼/더덕 혼합 시험용액, 인삼/칩 혼합 시험용액을 위의 실험과 동일한 분석방법으로 실험한 결과, 농도의 증대에 따라 동일 시간대의 피크 강도 또는 면적이 증가하는 결과를 얻었다.

[0092] 이를 통해 더덕과 도라지는 크로마토그램상에서 머무름 시간 13분대에 나타난 피크, 칩은 크로마토그램상에서 머무름 시간 16분대에 나타난 피크에 해당하는 물질이 표지성분임을 알 수 있었다.

[0093] (2)LC-MS-MS 분석을 통한 표지성분의 확인

[0094] 위에서 검출된 더덕 및 도라지의 표지성분, 칩의 표지성분의 분석결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0095] 더덕, 도라지는 같은 꽃초롱목(Campanulales) 꽃초롱과(Campanulaceae)의 더덕속과 도라지속으로 구분되어 같은 표지성분인 로베티올린(lobetyolin)인 것으로 확인되었다. 또한 로베티올린 표준용액의 액체크로마토그래피 분석결과 및 Chun-Feng Qiao의 논문(Chun-Feng Qiao, Zhen-Dan He, Quan-Bin Han, Hong-Xi Xu, Ren-Wang Jiang, Song-Lin Li, Yan-Bo Zhang, Paul Pui-Hay But, Pang-Chui Shaw, The use of lobetyolin and HPLC-UV fingerprints for quality assessment of Radix Codonopsis, 2007, J. Food & Drug analysis)과 비교하였을 때 UV spectrum 등이 모두 일치하여 로베티올린을 도라지, 더덕의 표지성분으로 확인하였다.

[0096] 쑤의 경우, 오노닌(ononin)의 표준용액의 UV spectrum 등과 비교하였으며 같은 콩과(Leguminosae) 식물인 황기 관련 문헌(Yan-Wen Lv, Wei Hu, Yu-Ling Wang, Lan-Fang Hung, Yun-Biao He, Sian-Zhen Xie, Identification and determination of flavonoids in Astragali Radix by high performance liquid chromatography coupled with DAD and ESI-MS detection, 2011, molecules, 16, 2293-2303)과 비교 하였을 때에서 결과의 일치를 보여 오노닌을 쑤의 표지성분으로 확인하였다.

[0097] (3)혼입비율에 따른 정량 분석

[0098] LC-MS-MS 분석을 통하여 확립한 더덕, 도라지의 표지성분인 lobetyolin과 쑤의 표지성분 ononin의 표준물질을 구입하여 표준물질이 분석되는 시간대, UV spectrum 및 문헌 등을 비교하여 각각의 표지성분임을 확신하였다.

[0099] 인삼가공제품에 혼합된 타식품원료의 양을 정량적으로 분석하기 위해 각 농도별(10, 20, 30, 40, 50중량%)로 조제된 인삼/더덕 혼합 시험용액, 인삼/도라지 혼합 시험용액, 인삼/쑤 혼합 시험용액을 분석한 HPLC 크로마토그램을 도 6에 나타내었다. 그리고 농도를 달리하여 10, 25, 50, 75중량%로 조제된 인삼/더덕 혼합 시험용액, 인삼/도라지 혼합 시험용액, 인삼/쑤 혼합 시험용액을 HPLC로 정량분석 하여 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

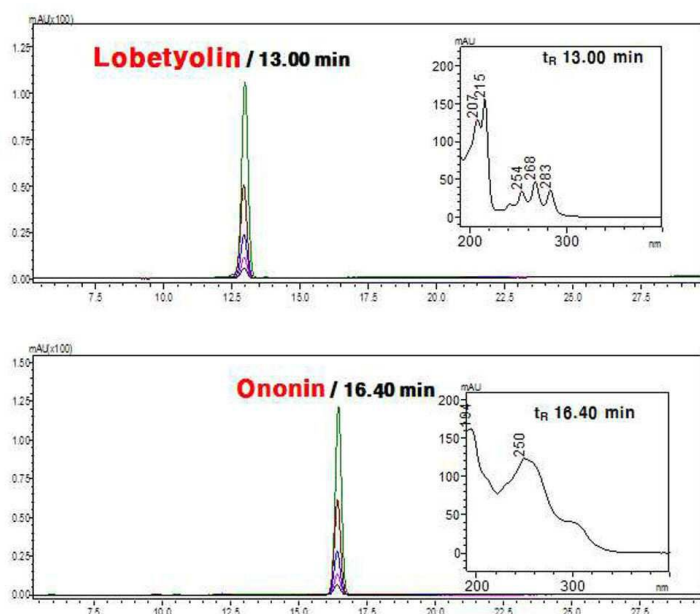
타식품원료의 농도(wt%)	인삼/더덕 혼합		인삼/도라지 혼합		인삼/쑤 혼합	
	Lobetyolin	ononin	Lobetyolin	ononin	Lobetyolin	ononin
0	-	-	-	-	-	-
10	76070	-	125587	-	-	263335
25	173555	-	284011	-	-	681758
50	339977	-	559894	-	-	1357647
75	497691	-	822979	-	-	2161294
100	667375	-	1212437	-	-	2874517

[0101] 실험 결과, 타식품원료의 혼합농도가 증가할수록 표지성분의 함량 증가의 직선성을 확인하였으며, 표지성분이 확실함을 증명하였다.

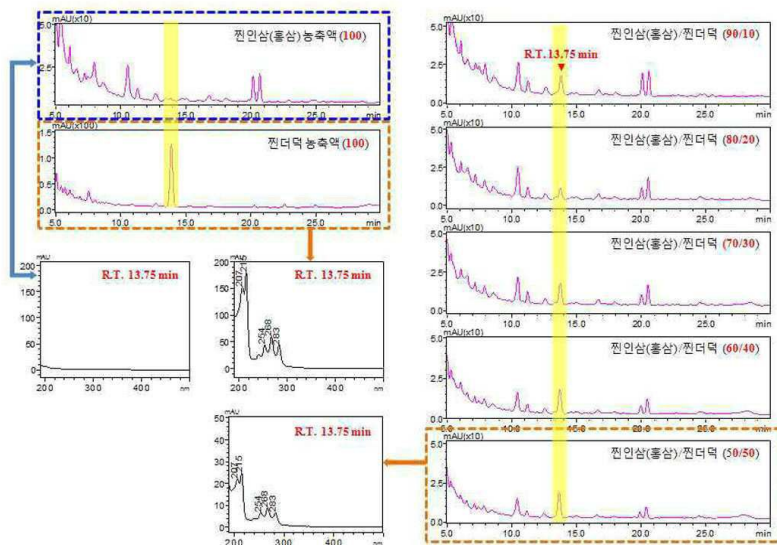
[0102] 이상, 본 발명은 일 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 실시 예가 가능하다는 점을 이해할 것이다.

도면

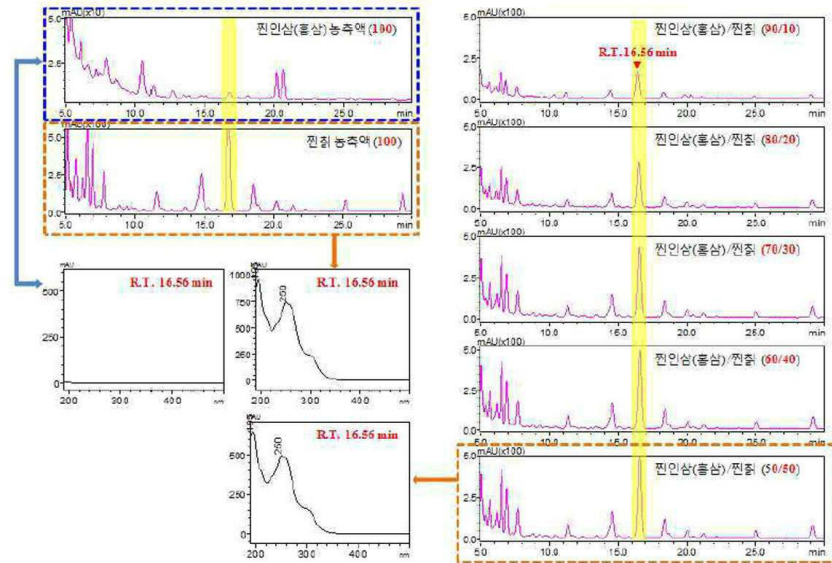
도면1



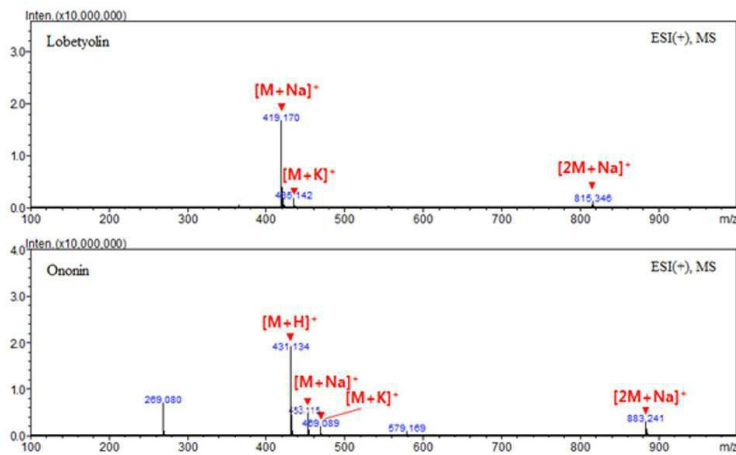
도면2



도면3

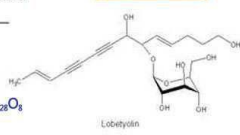
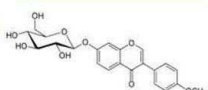


도면4



도면5

Table. HPLC & LCMS analytical result and identification of indicated compound

Sample	t_R (min)	λ_{max} (nm)	Meas. m/z	Ion	Meas. Molecular	Diff. (mDa)	Prediction Molecular	Formula
도라지(100), 더덕(100), 홍삼/도라지 (50/50), 홍삼/더덕 (50/50)	6.60	254, 267, 283	419.1674	$[M+Na]^+$	396.1782	-0.2	396.1784	Lobetyolin <chem>C20H28O8</chem> 
			435.1453	$[M+K]^+$	396.1821	3.7		
			815.3464	$[2M+Na]^+$	396.1786	0.2		
참(100), 홍삼/참 (50/50)	7.50	255, 301	431.1337	$[M+H]^+$	430.1269	0.5	430.1264	Ononin (Formononetin -7-glucoside) <chem>C22H22O9</chem> 
			453.1153	$[M+Na]^+$	430.1261	-0.3		
			469.0888	$[M+K]^+$	430.1256	-0.7		
			883.2406	$[2M+Na]^+$	430.1261	-0.3		

도면6

