

## LC-MS/MS를 이용한 식품 중 천속단과 한속단 지표성분 동시분석

윤지숙<sup>†</sup> · 김진영<sup>†</sup> · 최장덕 · 권기성 · 조천호\*  
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 신중유해물질팀

### Simultaneous determination of *Phlomis umbrosa* and *Dipsacus asperoides* in foods using LC-MS/MS methods

Jisuk Yun<sup>†</sup>, Jinyoung Kim<sup>†</sup>, Jangduck Choi, Kisung Kwon, and Cheon-Ho Jo\*

New Hazardous Substance Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety

**Abstract** *Phlomis umbrosa* and *Dipsacus asperoides* are distinct species, even though they have a similar appearance. *Dipsacus asperoides* is used as a Chinese medicinal plant for and has bone strengthening and fracture healing but *Phlomis umbrosa* has no effect on bone growth. Recently, these plants were used in children's food to improve their bone growth, without distinction in food. Intakes of *Dipsacus asperoides* in food may be dangerous, because it has never been used in food and its safety has never been tested in humans. We developed liquid chromatography with tandem mass spectrometry method to distinguish these plants in food. The method was validated for linearity, limits of detection, limits of quantification, accuracy and precision. In 5 of 17 samples, we identified *Dipsacus asperoides*, containing loganin 0.19-14.45 µg/mL, sweroside 0.13-4.61 µg/mL and akebia saponin D 0.59-19.29 µg/mL. The developed method might be useful to identify *Dipsacus asperoides* in adulterated food.

**Keywords:** *Phlomis umbrosa*, *Dipsacus asperoides*, adulteration, LC-MS/MS

## 서 론

천속단과 한속단은 종과 속이 서로 다른 약재임에도 불구하고, 명칭이 유사하여 '속단'으로 통칭하여 판매되고 있어 혼란을 야기하고 있다. 중국 약전 및 우리나라 대한민국약전외한약(생약) 규격집에는 속단의 기원식물을 산토끼꽃과(Dipsacaceae)의 천속단(*Dipsacus asperoides*) 뿌리로 규정하고 있으며, 이와 명칭은 유사하나 별개의 생약인 한속단(*Phlomis umbrosa* Turczaninow)은 꿀풀과(Labiatae)의 뿌리로 수재되어 있다(1-3). 천속단은 우리나라에서는 생산되지 않고, 중국 서남부 산악지대에서 자생하고 있으나, 한속단은 우리나라의 북부 산악지대를 제외한 산기슭 어느 곳에서나 흔하게 자생한다(1,3). 천속단과 한속단 한약재는 외부 형태 특성 및 육안 관찰을 비롯한 관능검사로 구별할 수 있다. 천속단은 긴 원주형으로 약간 편평하거나 구부러져 있고, 찌그러진 세로 주름과 구멍이 있으며, 수염뿌리 흔적이 있으나, 한속단(*Phlomis umbrosa*)은 긴 원주형 혹은 방추형의 뿌리가 여러 개 달려 있으며, 바깥면에 세로 잔주름이 있다(4). 천속단은 골다공증, 골절, 조골세포의 증식 및 분화 촉진에 효과가 있으나, 국내

식용경험이 없고 안정성이 입증되지 않아 식품원료로 사용이 불가하다(5-8). 반면 한속단은 통증완화, 항염증, 알러지 질환에 효과가 있으며, 뿌리와 잎은 식품원료로 사용이 가능하다(5,9).

Lee 등(2)은 Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)을 이용한 유전자 분석법으로 천속단과 한속단의 한약재 감별법을 개발하였으나, 가공식품의 경우에는 식품의 제조가공과정에서 열에 의해 DNA가 손상될 수 있으므로 유전자 분석법으로 혼입여부를 판단하기는 어렵다. 지금까지 보고된 분석법은 천속단이나 한속단 한약재를 분석한 것으로(2,3,10-12), 식품에 적용하여 분석한 시험법은 없다. 그러므로 본 연구에서는 식품 중 천속단의 혼입여부를 판별하기 위하여 LC-MS/MS 동시분석법을 개발하여, 국내 유통 중인 캔디류, 액상차, 건강기능식품 등 총 17건의 식품에 대한 실태조사를 실시하였으며, 연구 결과는 식품 안전관리를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 분석 대상 시료

식품 중 불법 혼입된 천속단의 실태조사를 위하여 대형마트, 약국 및 인터넷을 통해 국내 유통중인 식품 중 어린이 키성장을 표방하는 제품을 구매하였다. 본 연구에서 분석한 시료는 캔디류 4건, 액상차 및 혼합음료 2건, 기타가공품 2건, 건강기능식품 9건을 포함하여 총 17건이었다. 모든 시료는 분석 전까지 판매 조건과 동일한 조건에서 보관하였다.

### 시약 및 초사

한속단 지표 성분인 shanzhiside methyl ester는 식품의약품안전

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Cheon-Ho Jo, New Hazardous Substance Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Chungbuk 28159, Korea.

Tel: 82-43-719-4453

Fax: 82-43-719-4450

E-mail: jch77@korea.kr

Received June 8, 2016; revised August 9, 2016;

accepted September 1, 2016

처에서 제조한 표준품을 사용하였고, 천속단 지표성분인 loganin, sweroside, akebia saponin D는 안동대학교 손건호교수에게 제공 받았다. 이등상 제조에 필요한 포름산(formic acid)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였고, 아세토니트릴(acetonitrile)과 메탄올(methanol)은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입 하였다. 기기 분석 시 필요한 물은 Thermo Scientific Barnstead Nanopure (Marietta, OH, USA)를 이용하여 얻은 3차 증류수를 사용하였다.

### 표준용액의 조제 및 전처리 방법

표준원액(stock standard solution)은 천속단 지표성분(loganin, sweroside, akebia saponin D)과 한속단 지표성분(shanzhiside methyl ester) 표준품을 각각 메탄올에 녹여 1 µg/mL가 되도록 제조하였다. 혼합 표준용액(mixed standard solution)은 표준원액을 50% methanol에 녹여 0.05-1.00 µg/mL의 범위가 되도록 희석하였다. 모든 시료는 분쇄 및 균질화 한 후 1g을 취하여 50% 메탄올 50 mL에 녹여 30분간 초음파 추출하고, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리(Gyrozen 1736R, Daejeon, Korea) 하였다. 상층액 1 mL을 취하여 0.2 µm 시린지 필터(Teknokroma, Barcelona, Spain)로 여과한 후 시험용액으로 사용하였으며, 시험용액의 농도가 검량곡선의 농도범위를 벗어날 경우 범위 내로 희석하여 사용하였다.

### 기기 및 분석조건

LC-MS/MS 분석은 Waters Xevo TQ-S (Milford, DE, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Waters AQUITY UPLC™ BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 µm)를 사용하였다. 이등상 A, B는 0.1% 포름산이 첨가된 물과 0.1% 포름산이 첨가된 아세토니트릴을 사용하였

**Table 1. Instrument conditions of LC-MS/MS**

Instrument	Waters Xevo TQ-S		
Column	BEH C18 (2.0×100 mm, 1.7 µm)		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water		
	B: 0.1% formic acid in acetonitrile		
Gradient conditions	Time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	95	5
	7.0	0	100
	8.5	0	100
	8.6	95	5
10.0	95	5	
Column flow rate	0.3 mL/min		
Ionization mode	ESI negative mode		
Capillary voltage	3.0 kV		
Source Temperature	150°C		
Desolvation Temperature	500°C		
Collision gas flow	800 L/hr		

**Table 2. MRM transitions and optimized mass spectrometer parameters**

Compound	Retention time (min)	Norminal mass	Precursor ion (m/z)	Quantitation ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collison energy (V)
Shanzhiside methyl ester	4.0	406	451	243	5	15
Loganin	4.6	390	435	227	5	10
Sweroside	4.7	358	403	195	5	15
Akebia saponin D	6.0	928	973	603	20	20

다. 2 µL의 시료를 주입하여 0.3 mL/min의 유속으로 10분 동안 분석하였다(Table 1). 각 지표성분의 머무름 시간(retention time, RT)과 multiple reaction monitoring (MRM) transition은 Table 2에 나타내었다.

### 시험법 유효성 검증

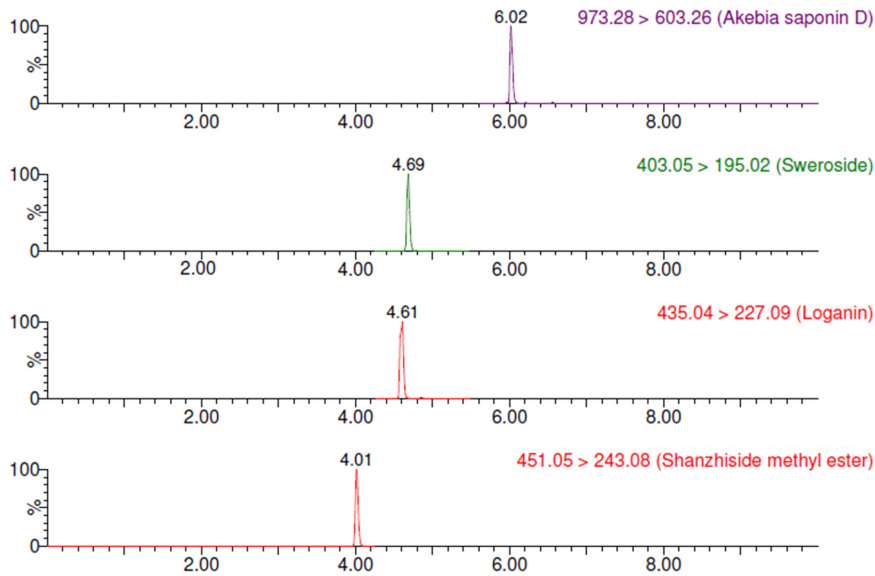
본 연구에서는 유효성 검증을 위해 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정확성(accuracy), 정밀성(precision)을 확인하였다. 천속단과 한속단의 지표성분이 검출되지 않은 대조시료에 표준용액을 첨가하여 선택성을 확인하였다. 직선성은 표준용액을 농도별(0.05, 0.10, 0.25, 0.05, 0.75, 1.00 µg/mL)로 희석하여 검량곡선을 작성하고, 회귀식과 결정계수(coefficient of determination,  $r^2$ )를 산출하였다. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 0.40 µg/mL 농도의 표준용액을 첨가한 시료를 3회 반복 측정하여 얻은 표준편차(standard deviation,  $\sigma$ )의 3배, 10배되는 값으로 계산하였다. 정밀성은 1일 3회 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 실시하였다. 정밀성은 대조시료에 0.40 µg/mL 농도의 표준용액을 첨가하여 얻은 상대표준편차(percentage of relative standard deviation, % RSD)로 확인하였다. 정확성은 회수를 시험법(recovery test)으로 측정하였으며, 대조시료에 0.40 µg/mL 농도의 표준용액을 첨가 한 후 회수율을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 시험법 유효성 검증

천속단의 성분은 loganin, sweroside, akebia saponin D, loganic acid, chlorogenic acid, dipsanoside A, dipsanoside F, 3-O-[β-D-glu-(1→4)] [α-L-rha-(1→3)]-β-D-glu(1→3)-β-L-rha-(1→2)-α-L-ara-hed 28-O-β-D-glu-(1→6)-β-D-glu ester, shanzhiside methyl ester가 보고되었고(3,10-12), 한속단의 성분은 sesamoside, shanzhiside methyl ester, 8-O-acetyl shanzhiside methyl ester가 보고 되었다(13). akebia saponin D는 중국 약전에서 천속단의 지표성분으로 규정하고 있을 뿐만 아니라 천속단의 중요한 생리활성성분으로, 조골세포의 증식 및 분화를 촉진시키는 것으로 보고된 바 있으므로(5-8,14), 키 성장과 관련된 제품 중 천속단 혼입여부 판별 시에는 반드시 포함되어야 할 지표성분이다. 또한 loganin은 산수유에도 함유되어 있는 성분이므로(15), Akebia saponin D가 검출되어야지만 천속단이 함유된 것으로 판단할 수 있다. 본 연구에서는 표준품 확보가 어렵거나 동시분석법으로 분석 시 선택성이 없는 지표성분은 제외하고, 천속단의 지표성분 3종(loganin, sweroside, akebia saponin D), 한속단의 지표성분 1종(shanzhiside methyl ester)을 최종 선정하였으며, 각 지표성분의 크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다.

본 연구에서 식품 중 천속단의 혼입여부를 판별하기 위하여 개



**Fig. 1. Chromatogram of 4 compounds.** Shanzhiside methyl ester (RT: 4.0 min), Loganin (RT: 4.6 min), Sweroside (RT: 4.7 min), Akebia saponin D (RT: 6.0 min)

발된 LC-MS/MS 동시분석법의 유효성 검증을 위하여 직선성, LOD, LOQ, 정밀성 및 정확성을 확인하였다(Table 3). 천속단과 한속단 지표성분의 선택성을 확인하기 위하여 대조시료와 표준용액을 첨가한 시료를 분석한 결과, 대조시료에서는 지표성분의 피크가 검출되지 않았으나, 표준용액을 첨가 시료에서는 표준용액과 동일한 머무름 시간(RT)에 피크를 확인하였다. 직선성 확인을 위하여 표준용액을 농도별로 분석하여 얻은 보정선으로부터 회귀식과 결정계수를 산출하였으며, 모든 지표성분은 결정계수 ( $R^2$ ) 0.99 이상 우수한 직선성을 나타내었다. Shanzhiside methyl ester, loganin, sweroside, akebia saponin D의 LOD는 0.03, 0.10, 0.04, 0.04  $\mu\text{g/mL}$ 이었고, LOQ는 0.10, 0.34, 0.14, 0.12  $\mu\text{g/mL}$  이었다. 분석오차를 의미하는 정밀성은 1일 3회 반복 측정하는 일내 분석(intra-day)과 연속 3일에 걸쳐 반복 측정하는 일간분석(inter-day)을 수행하였으며, 상대표준편차(% RSD)는 AOAC 가이드라인(16)인 15% 미만에 모두 적합하였다. 각 지표성분의 회수율은 93-103%를 나타내어, AOAC 가이드라인(16)인 70-125% 미만에 모두 적합하였다.

Cho 등(3)은 속단에는 당이 여러 개 결합된 사포닌(saponins) 성분들이 많이 포함되어 있으므로, 선택성 면에서 selective ion monitoring (SIM) mode가 MRM 보다 유리할 것으로 생각하여 LC-SIM-MS/MS로 천속단 한속단 함유제를 분석하였다. 본 연구에서 개발된 동시분석법은 MRM으로 분석하였으며, Cho 등(3)이 개발한 시험법보다 LOD, LOQ가 약 10배 정도 더 높았으나, 회수율은 차이가 없었다. 이는 Cho 등(3)이 시험법 유효성 검증을 위한

matrix로 지표성분을 임의 농도로 첨가하여 만든 QC 검체를 사용하였으나, 본 연구에서는 가공식품을 사용하였기 때문에 천속단이나 한속단 이외에 다른 식품원료가 들어 있어 matrix가 더 복잡하기 때문으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서 개발된 동시분석법은 건강기능식품뿐만 아니라 캔디류, 액상차, 혼합음료 등 가공식품에 혼입된 천속단을 간단하면서도 신속하게 판별하는데 유용한 시험법이 될 것이다.

**식품 중 속단 혼입여부 실태조사**

본 연구에서는 식품 중 천속단의 혼입여부를 판별하기 위하여 LC-MS/MS를 이용한 동시분석법을 개발하였으며, 식품의 적용여부를 확인하기 위하여 국내 유통되는 식품 중 어린이 키성장을 표방하는 제품 17건에 대한 실태조사를 하였다. 분석 결과 17건의 시료 중 5건(캔디류 1건, 건강기능식품 4건)에서 천속단이 검출되었으며, 검출 비율은 29%로 나타났다. 천속단 지표성분의 검

**Table 4. Levels of 4 compounds detected in this study**

	Analyte	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Phlomis umbrosa</i>	Shanzhiside methyl ester	0.21-339.81
<i>Dipsacus asperoides</i>	Loganin	0.19-14.45
	Sweroside	0.13-4.61
	Akebia saponin D	0.59-19.29

**Table 3. Linearity, LOD, LOQ, precision, and accuracy for 4 compounds**

Analyte	Regression equation	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precision (% RSD)		Accuracy (% Recovery)	
					Intra-day	Inter-day		
<i>Phlomis umbrosa</i>	Shanzhiside methyl ester	$y=0.9739x+7.7939$	0.9983	0.03	0.10	4.93	2.66	97.95±2.60
<i>Dipsacus asperoides</i>	Loganin	$y=0.9632x+12.522$	0.9986	0.10	0.34	11.12	10.72	103.56±11.10
	Sweroside	$y=0.9911x+2.7415$	0.9987	0.04	0.14	4.48	3.68	93.85±3.40
	Akebia saponin D	$y=1.0068x+5.1005$	0.9996	0.04	0.12	2.78	2.88	101.93±2.94



- extract of Hansogdan (*Phlomis umbrosa*) and Dalgaebi (*Commeline communis*) as a milk additive for enhancing the growth of physical height *in vivo*. Food Sci. Biotechnol. 21: 875-879 (2012)
18. Kim MY, Kim JY, Lim DW, Lee DH, Kim YJ, Chang GT, Choi HY, Kim HC. Skeletal growth and IGF levels in rats after HT042 treatment. Phytother. Res. 26: 1771-1778 (2012)
19. US Food and Drug Administration (FDA). FDA Poisonous Plant Database. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/plantox/detail.cfm?id=11513>. Accessed Jun. 3, 2016.
20. Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Lee KH, Kim JH, Seong RS, Kang TS, Lee JH, Jang YM. Development of primer sets for the detection of *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*. J. Fd. Hyg. Safety. 30: 1-6 (2015)