

마황 3종 판별을 위한 KASP 마커 개발과 활용

박보름# · 이선희# · 한경문 · 황진우 · 김형일 · 백선영*

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 첨단분석센터

Development and Utilization of KASP Markers for the Identification of Three Types of *Ephedra* Herbs

Boreum Park[#], Sun Hee Lee[#], Kyung-Moon Han, Jin Woo Hwang, Hyung il Kim, and Sun Young Baek^{*}

Advanced Analysis center, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si 28159, Korea

Abstract – *Ephedra* herbs are defined as stem of *Ephedra sinica*, *Ephedra intermedia* and *Ephedra equisetina* in the Korean Pharmacopoeia. It is important to use pure herbs to derive the safety and efficacy of herbal medicine. However, the identification of these herbs by conventional taxonomic methods is difficult. Recently, many studies have applied these DNA barcoding for the identification of herbal medicinal species using standard DNA markers. In this study, we report a case study in which the identification of *Ephedra* species was done by DNA barcoding. For identification of *Ephedra* species, 17 samples were collected, and a reference DNA barcode library was developed using 6 markers (*rbcL*, *matK*, *ITS2*, *ycf1*, *ycf3*, and *rpoC2*). To develop KASP-SNP markers, we selected 4 markers (*ycf1*, *ycf3*, *rpl2*, and *rbcL*), which were able to distinguish three *Ephedra* species. In the result, the specific markers for each of the three *Ephedra* were clustered into FAM-positive section, whereas non-targeted plants were clustered either HEX-positive or negative section. Therefore, we have developed KASP assay that allow rapid and easy *Ephedra* species identification using three KASP markers.

Keywords – *Ephedra* herb, DNA barcode, Herbal medicinal materials, Molecular identification, KASP assay

대한민국 약전에서 마황은 마황과에 속하는 초마황 (*Ephedra sinica* Stapf), 중마황(*Ephedra intermedia* Schrenk et C.A.Mey.), 목적마황(*Ephedra equisetina* Bunge)의 초질 경으로 정의한다.¹⁾ 마황은 2019년에는 952톤이 중국, 파키스탄, 베트남, 몽골 등에서 국내로 수입되었으며 2020년에는 한약재 수입액 4위를 차지할 정도로 국내에서 사용량이 많은 한약재 중 하나이다.²⁾ 마황속 식물은 아시아, 아메리카, 유럽, 북아프리카에 약 67종이 분포하며 중국에는 14종, 파키스탄에는 9종, 몽골에는 9종이 자생한다.^{4,6)} 따라서 수입 과정에서 마황이 아닌 마황속 식물이 마황으로 국내로 유입되어 안전의 사각지대가 발생할 수 있다. 마황에는 에페드린 알칼로이드(Ephedrine-type alkaloids)를 포함하고 있어 약리 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 하지만 에페드린 알칼로이드는 초마황, 중마황, 목적마황 이외에 다양

한 마황속 식물에도 포함되어있으며 종에 따라서 알칼로이드의 종류와 함량, 비율이 다르다.⁷⁾ 따라서 정확하고 안전한 마황 사용을 위해서는 마황 종을 확인할 수 있는 분석법 확립이 필요하다.

한약재의 기원을 판별하는 방법은 관능검사,⁷⁾ 이화학적 검사,⁸⁾ 분자생물학적 검사⁹⁾ 등이 있다. 한약재의 경우 국가별로 기원이 되는 식물을 혼재하여 사용하는 경우가 많으며 모양이나 형태가 유사하지만 다른 식물들도 많다. 또한 건조나 분쇄 등 가공과정을 거쳐 판매되는 경우도 많아 가공 이후에도 위품 판별이 가능한 분자생물학적 검사방법이 한약재 판별법으로 개발되고 있다. 분자생물학적 검사방법으로 마황의 핵유전자구간 18S ribosomal RNA(rRNA)-ITS1-ITS2^{10,11,12,13,14,15)}와 엽록체 유전자구간 *trnK*,¹⁰⁾ *matK*,⁶⁾ *trnL-trnLF*,^{12,13)} *psbA-trnH*,^{15,16)} *chlB*¹⁷⁾ 등 다양한 마커를 이용한 중분석 방법에 대해 보고되었다. Xinlian C. 등¹⁸⁾에 따르면 초마황, 중마황, 목적마황에 대해 전장 엽록체 유전체 (Whole chloroplast genome)를 분석하고 mVISTA를 이용해 3종의 유전자 차이가 큰 11개의 구역을 통해 분류할 수 있

[#]These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): stepany9838@korea.kr

(Tel): +82-43-719-5322

다고 보고하였다. 본 연구에서는 Kompetitive Allele Specific PCR(KASP) 마커를 이용해 마황속 식물에서 초마황, 중마황, 목적마황을 구별하고자 한다. KASP는 LGC Biosearch Technologies(Teddington, UK)사의 기술로 서로 다른 형광이 붙은 Forward primer를 이용해 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 나 삽입-결실(insert-indel)의 유전형 분석(genotyping) 방법으로 유전자 바코드 내의 종에 따른 단일 염기의 다양성에 의해서 종 분석 방법으로 쓸 수 있다.¹⁹⁾ 가공된 한약재나 의약품, 식품의 경우 여러 원료가 혼합되어 있을 수 있다. KASP는 대상원료의 유전자형에 대해 형광을 띄기 때문에 여러 개의 유전자가 혼합된 검체에서도 분석이 가능한 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 마황속 식물에서 초마황, 중마황, 목적마황에 특이적인 SNP를 찾고 이를 표적하는 KASP 마커를 개발하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 - 마황 3종은 식품의약품안전평가원과 동의보감소재은행에서 분양 받아 사용하였다. 그 외에 마황속 식물이거나 에페드린과 관련된 식물을 허브마을(청주), American Herbal Pharma(Soquel, CA, USA), 한국생명공학연구원 해외생물소재센터에서 구매하여 사용하였다. 식물 재료는 5.8S ribosomal RNA - internal transcribed spacer 2, maturase K(*matK*), ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit(*rbcL*), RNA polymerase beta subunit(*rpoC2*), *YCF1*, *YCF3* 유전자 분석을 통해 종 분석 이후 사용하였다(Table I).

DNA추출 - 모든 시료는 tube mill control(IKA, staufen, Germany)를 이용하여 균질화 한 뒤, DNA 추출은 DNeasy Power Plant pro Kit(Qiagen, Hilden, Germany)의 기본 프로토콜에 따라서 진행하였다. 원물의 경우 25 mg, 샘플의 경우 50 mg을 취한 후 450 μ L의 solution CD1 및 50 μ L의 Solution PS을 가한다. Tissuelyser(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 30Hz에서 2분 동안 균질화 후 2분간 14,000 rpm에서 원심 분리한 뒤 상층액을 취해 새 2 mL microcentrifuge tube(ependorf, Hanburg, German)에 옮긴다. 여기에 200 μ L의 Solution CD2 가한 후 vortex mixer를 사용하여 균질화 후 2분간 14,000 rpm에서 원심 분리하여 상층액을 취해 새 2 mL microcentrifuge tube에 옮긴다. 여기에 65°C의 500 μ L의 buffer APP 가한 후 vortex mixer를 사용하여 균질화하고 650 μ L를 취하여 MB spin column에 넣고 1분간 14,000 rpm에서 원심 분리한다. 통과한 액은 버리고 반복한다. MB spin column에 650 μ L의 Buffer AW1를 가한 후 1분간 14,000 rpm에서 원심 분리 후 통과한 액을 버린다. MB spin column에 650 μ L의 buffer AW2를 가한 후 1분간 14,000 rpm에서 원심 분리 후 통과한 액을 버린다. 추가로 2분간

16,000 rpm에서 원심 분리 후 MB spin column을 새로운 2 mL microcentrifuge tube에 옮겨 꼽는다. MB spin column에 50 μ L buffer EB을 가한 후 실온에서 1분 대기 후 1분간 14,000 rpm에서 원심 분리하고 통과된 DNA는 -4°C에 보관하여 사용한다.

염기서열 분석 - 염기서열분석에 필요한 primer 제작을 위해 Genbank 내 식물의 유전자 데이터를 참고하였다. 실험에 사용된 primer sequence는 Table II와 같다. PCR 반응액은 AccPower[®] PCR master mix(BIONEER, Daejeon, Korea) 10 μ L, 주형 DNA 8 μ L, 10 pmol Forward primer 1 μ L, 10 pmol Reverse primer 1 μ L를 혼합하여 0.2 mL PCR Tubes(Eppendorf, German)에 분주하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분동안 초기 변성을 수행한 뒤, 95°C에서 20초간 변성과 62°C에서 20초간 결합과 72°C에서 30초동안 신장하는 과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 신장 반응을 시킨 후 QIAxcel Advaned(QIAGEN, Hilden, Germany), QIAxcel DNA High Resolution Kit, QX Alignment marker 15bp-3Kb, QX DNA Sixe Marker Fx 174/HaeIII를 사용하여 PCR 결과물을 확인하였다. 단일 밴드가 확인된 PCR 결과물은 Macrogen(Seoul, Korea)에 염기서열분석을 진행하였으며 실험결과는 NCBI에 등록하여 accession number를 부여받았다(Table I).

KASP 분석 - 마황 3종에 대해 특이적인 SNP에 대해 LGC genomics(Teddington, UK) 사에 의해 KASP by Design (KBD)로 KASP assay mix를 제작하였다. KASP 분석을 위한 반응액은 주형 DNA 5 μ L, KASP V4.0 2X Master Mix/High ROX(LGC genomics, Teddington, UK) 5 μ L, KASP Assay mix 0.14 μ L 를 섞어 MicroAmp[™] Optical 96 Well Reaction Plate에 분주하였다. KASP 마커마다 DNA를 대신해 증류수를 넣어 음성대조군으로 사용하였으며 각 KASP 마커마다 대상 식물의 서열 일부를 합성하여 FAM 양성 올리고 뉴클레오타이드로 사용하였으며, 근연종 식물의 서열 일부를 합성하여 HEX 양성 올리고 뉴클레오타이드로 함께 실험하였다. 올리고 뉴클레오타이드는 가운데 1개의 염기서열이 다르고 나머지 앞, 뒤 50bp는 같도록 제작하였으며 제작한 올리고 뉴클레오타이드의 서열은 Table III와 같다. 제작된 올리고 뉴클레오타이드는 3차 증류수를 이용하여 1 fmol의 농도로 희석하여 주형 DNA처럼 5 μ L씩 사용하였다. 유전자 증폭 및 분석은 7900 HT real-time PCR system(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)에서 진행하였으며 소프트웨어는 SDS software(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 실험은 LGC genomics(Teddington, UK)에서 제공하는 “Guide to running KASP genotyping on the ABI 7900 instrument”와 동일하게 진행하였으며 증폭 조건은 61°C-55°C touchdown protocol 진행하였다. 실험결과에 따라서 recycling step도 추가로 진행하였다.

Table I. Voucher specimens of plant raw materials and accession number

Voucher	Sample number	Species	gene	Accession number
Ministry of Food and Drug Safety	plant1	Ephedra sinica	<i>ycf3</i>	MW821979
			<i>ycf1</i>	MW821972
			<i>rpoC2</i>	MW821952
	plant2	Ephedra equisetina	<i>ycf3</i>	MW821980
			<i>ycf1</i>	MW821973
			<i>rpoC2</i>	MW821952
	plant3	Ephedra sinica	<i>ycf3</i>	MW821981
			<i>ycf1</i>	MW821974
			<i>rpoC2</i>	MW821953
	plant4	Ephedra sinica	<i>ycf3</i>	MW821982
<i>ycf1</i>			MW821975	
<i>rpoC2</i>			MW821954	
plant5	Ephedra sinica + Ephedra equisetina	Mixed sample	Mixed sample	
plant6	Pinellia ternata	<i>rbcL</i>	MZ773172	
		<i>matK</i>	MZ773153	
		<i>ITS2</i>	MZ773160	
Herb Research Bank of Traditional Korean Medicine	plant7	Ephedra intermedia	<i>ycf3</i>	MW821983
			<i>ycf1</i>	MW821976
			<i>rpoC2</i>	MW821955
	plant8	Ephedra sinica	<i>ycf3</i>	MW821984
			<i>ycf1</i>	MW821977
			<i>rpoC2</i>	MW821956
plant9	Ephedra intermedia	<i>ycf3</i>	MW821985	
		<i>ycf1</i>	MW821978	
		<i>rpoC2</i>	MW821957	
Herb maul	plant10	Taraxacum officinale	<i>rbcL</i>	MZ773174
			<i>matK</i>	MZ773154
			<i>ITS2</i>	MZ773162
	plant11	Prunus Armeniaca	<i>rbcL</i>	MZ773175
			<i>matK</i>	MZ773155
			<i>ITS2</i>	MZ773163
plant12	Taxus Cuspidata	<i>rbcL</i>	MZ773176	
		<i>ITS2</i>	MZ773164	
plant13	Ginkgo Biloba	<i>rbcL</i>	MZ773177	
		<i>ITS2</i>	MZ773165	
plant14	feniculum Vulgare	<i>rbcL</i>	MZ773178	
		<i>ITS2</i>	MZ773166	
online market	plant15	Ephedra viridis	<i>ycf3</i>	MZ773150
			<i>ycf1</i>	MZ773147
			<i>rpoC2</i>	MZ773157
			<i>rbcL</i>	MZ773179
			<i>ITS2</i>	MZ773167
American Herbal Pharma	plant16	Ephedra viridis	<i>ycf3</i>	MZ773151
			<i>ycf1</i>	MZ773148
			<i>rpoC2</i>	MZ773158
			<i>rbcL</i>	MZ773181
			<i>ITS2</i>	MZ773169
			plant17	Ephedra torreyana
<i>ycf1</i>	MZ773149			
<i>rpoC2</i>	MZ773159			
<i>rbcL</i>	OL512810			
			<i>ITS2</i>	MZ773170

Table II. PCR primer used for sequencing

Gene	Primer sequence(5'-3')
<i>ITS2</i>	F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT R:GACGCTTCTCCAGACTACAAT
<i>matK</i>	F:CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG R:ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC
<i>ycf3</i>	F : ACCAAACCTCTGCTGCTTCA R : AGGGGAAAAAGCACCATAAAGA
<i>ycf1</i>	F :CCATAGCTGATGGATTCAATCTTTG R :CAAAGAGATGAACTTGTCTACCCC
<i>rpoC2</i>	F :CGTCTAACAAATTTTCTTGCTTGA R : ACATGTATAAGCCCTAGGTTCCC
<i>rbcL</i>	F :ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC R :GTAAATCAAGTCCACCRCG

제품에 대한 분석법 적용 - 시중에 유통되고 있는 제품에서의 분석법 적용을 확인하기 위해서 마황이 들어있을 것으로 예상되는 다이어트 제품을 5개와 인터넷 직구를 통해 차 1종을 구매하였다. 시료의 균질화를 위해 막자사발로 갈아 시료를 취하고 분말이나 액상 제품은 일정량을 바로 취하고 캡슐 제품은 캡슐 안의 내용물만 취하여 실험을 하였다. KASP 분석에서는 균질화 된 시료 50 mg을 취하여 DNeasy Power Plant pro Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 -20°C 이하 냉동실에 보관한 뒤, KASP 분석을 수행하였다.

Table IV. SNP location and genotype

Sample number	Species	Gene/location of nucleotide			
		<i>ycf3</i> /324	<i>ycf1</i> /2586	<i>rpoC2</i> /2074	<i>rbcL</i> /103
Plant1	<i>E. sinica</i>	C	T	C	A
Plant3	<i>E. sinica</i>	C	T	C	A
Plant4	<i>E. sinica</i>	C	T	C	A
Plant8	<i>E. sinica</i>	C	T	C	A
Plant16	<i>E. sinica</i>	C	T	C	A
Plant7	<i>E. intermedia</i>	A	C	C	A
Plant9	<i>E. intermedia</i>	A	C	C	A
Plant2	<i>E. equisetina</i>	A	T	T	A
Plant15	<i>E. viridis</i>	A	T	C	A
Plant17	<i>E. viridis</i>	A	T	C	A
Plant18	<i>E. torreyana</i>	A	T	C	A

결과 및 고찰

마황 특이 SNP분석 및 KASP 마커 제작 - 마황에 특이적인 SNP를 찾기 위해 초마황 4개, 중마황 2개, 목적마황 1개, 마황이 아닌 Ephedra 3개(*E. viridis* 2개, *E. torreyana* 1개)에 대해 11개의 유전자 구간의 염기서열 분석을 진행하였다. 염기서열 분석결과와 GenBanK에 등록된 염기서열 정보를 바탕으로 *ycf3*의 324번째 뉴클레오타이드에서 초마황 특이 SNP를, *ycf1*의 2586번째 뉴클레오타이드에서 중마황 특이 SNP를, *rpoC2*의 2074번째 뉴클레오타이드에서 목

Table III. Oligonucleotide sequence

KASP marker	Positive fluorescence	sequence
NEFM21ES	FAM	TGCCGTCTTTAGGACCTAATACTACACCACTGCGCAATACTTATGAAAGACAAAG AATAAACTTTATTACATAAGTAAATCCCTTTATGAGCAGATCTAAT
	HEX	TGCCGTCTTTAGGACCTAATACTACACCACTGCGCAATACTTATGAAAGAAAAAG AATAAACTTTATTACATAAGTAAATCCCTTTATGAGCAGATCTAAT
NEFM21EI	FAM	TAAACATGTATAAACGATTATTACACGAAGCATGTTTAGCTCTGACAAACAATTC TGTATCATCGCCATATTCGTCTTCATAATATCCTACGTTTTTTAA
	HEX	TAAACATGTATAAACGATTATTACACGAAGCATGTTTAGCTCTGACAAATAATTC TGTATCATCGCCATATTCGTCTTCATAATATCCTACGTTTTTTAA
NEFM21EE	FAM	CTTTACACATATTTAGACGCAAAACAAAAAATATTTTTAAAGAATTGCAATTAGAA AGGAACTATTTTCAAAAAAAGGGCTTACAAGAAAAAATCATT
	HEX	CTTTACACATATTTAGACGCAAAACAAAAAATATTTTTAAAGAATTGCAACTAGA AAGGAACTATTTTCAAAAAAAGGGCTTACAAGAAAAAATCATT
NEFM21EPHEDRA	FAM	GATATCGAACCTGTTCCGGGAGAAGACAATCAATTTATTGCTTATGTAGCATATCC TTTGGACCTTTTTGAAGAAGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
	HEX	GATATCGAACCTGTTCCGGGAGAAGACAATCAATTTATTGCTTATGTAGCTTATCC TTTGGACCTTTTTGAAGAAGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC

Table V. Ephedra-specific KASP marker sequence

Marker name	Target plant	Forward primer-FAM	Forward primer-HEX	Common Reverse primer
NEFM21ES	<i>E. sinica</i>	CCACTGCGCAATACTTATG AAAGAC	ACCACTGCGCAATACTTAT GAAAGAA	GATCTGCTCATAAAGGGAT TTACTTATGTA
NEFM21EI	<i>E. intermedia</i>	CGAAGCATGTTTAGCTCTG ACAAAC	ACGAAGCATGTTTAGCTCT GACAAAT	GAAGACGAATATGGCGAT GATACAGAATT
NEFM21EE	<i>E. equisetina</i>	GCCCTTTTTTTTTGAAAATA GTTCCTTTCTAA	CCCTTTTTTTTTGAAAATA GTTCCTTTCTAG	CTTTACACATATTTAGACG CAAACAAAAAA
NEFM21EPHEDRA	<i>Ephedra spp.</i>	GAAGACAATCAATTTATTG CTTATGTAGCA	GAAGACAATCAATTTATTG CTTATGTAGCT	GAACCTTCTTCAAAAAGG TCCAAAGGATA

적마황 특이 SNP를, *rbcL*의 103번째 뉴클레오타이드에서 마황속 특이적인 SNP를 찾았다(Table IV). 그리고 4개의 SNP를 표적으로 하는 LGC genomics (Teddington, UK)에 KASP 마커 제작을 의뢰하였다. 모든 KASP 마커는 표적하는 마황과 결합했을 때 FAM 형광 양성을 보이도록 제작되었으며 각각의 프라이머 서열은 Table V과 같다.

KASP 마커의 SNP 판별력 확인 – 제작한 KASP 마커가 SNP자리의 1개의 염기서열의 차이에 따라 다른 형광값을 나타내는지 확인하기 위해서 Macrogen(Seoul, Korea)에서 단일 가닥의 올리고 뉴클레오타이드를 제작하였다. 실험 결과, FAM 양성 올리고 뉴클레오타이드(red triangle)와 KASP 마커가 결합하여 FAM 양성을 띠고 X축에 위치하였으며, HEX 양성 올리고 뉴클레오타이드(blue triangle)와 결합하

여 HEX 양성을 띠고 Y축에 위치하였다(Fig. 1). 따라서 제작한 KASP 마커는 SNP 위치에서 서로 다른 형광이 붙여진 2개의 Forward primer가 경쟁 반응을 하며 유전자형에 따라 FAM 또는 HEX 형광을 방출하는 것을 확인하였다. 이에 따라 제작한 올리고 뉴클레오타이드는 대상 식물의 DNA를 대신해서 형광값에 대한 양성대조군으로 사용 가능함을 확인하였다.

식물 재료에서 마황 판별 – SNP에 대한 분별력을 확인한 KASP 마커를 이용해 마황 3종을 포함한 11개의 마황속 식물에 대해서 KASP 분석을 진행하였다(Table VI). Fig. 1에서는 초마황, 중마황, 목적마황에 대한 KASP 형광값 결과를 나타냈다. 초마황 판별 마커 NEFM21ES는 4개의 초마황과 초마황을 대상으로 하여 합성한 FAM양성 올리고(red triangle)

Table VI. KASP analysis results of raw materials

Sample number	Species	NEFM21ES	NEFM21EI	NEFM21EE	NEFM21EPHEDRA
Plant1	<i>E. sinica</i>	FAM	HEX	HEX	FAM
Plant3	<i>E. sinica</i>	FAM	HEX	HEX	FAM
Plant4	<i>E. sinica</i>	FAM	HEX	HEX	FAM
Plant8	<i>E. sinica</i>	FAM	HEX	HEX	FAM
Plant16	<i>E. sinica</i>	FAM	HEX	HEX	FAM
Plant5	<i>E. sinica</i> + <i>E. equisetina</i>	FAM	HEX	FAM	FAM
Plant7	<i>E. intermedia</i>	HEX	FAM	HEX	FAM
Plant9	<i>E. intermedia</i>	HEX	FAM	HEX	FAM
Plant2	<i>E. equisetina</i>	HEX	HEX	FAM	FAM
Plant15	<i>Ep. viridis</i>	HEX	HEX	N.D.	FAM
Plant17	<i>E. viridis</i>	HEX	HEX	N.D.	FAM
Plant18	<i>E. torreyana</i>	HEX	HEX	HEX	FAM
Plant6	<i>P. ternata</i>	N.D.	HEX	N.D.	N.D.
Plant10	<i>T. officinale</i>	N.D.	HEX	N.D.	N.D.
Plant11	<i>P. armeniaca</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Plant12	<i>T. cuspidata</i>	N.D.	HEX	N.D.	N.D.
Plant13	<i>G. biloba</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Plant14	<i>F. vulgare</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Table VII. KASP analysis results of diet herbal medicines and food

	Voucher	NEFM21ES	NEFM21EI	NEFM21EE	NEFM21EPHEDRA	Judgment
DHM 1	H Clinic	FAM	HEX	HEX	FAM	<i>E.sinica</i> include
DHM 2	J Clinic	HEX	FAM	HEX	FAM	<i>E. intermedia</i> include
DHM 3	S Clinic	FAM	FAM	HEX	FAM	<i>E.sinica</i> + <i>E. intermedia</i> include
DHM 4		FAM	HEX	HEX	FAM	<i>E.sinica</i> include
DHM 5	L Clinic	FAM	HEX	HEX	FAM	<i>E.sinica</i> include
tea 1	internet	FAM	HEX	HEX	FAM	<i>E.sinica</i> include

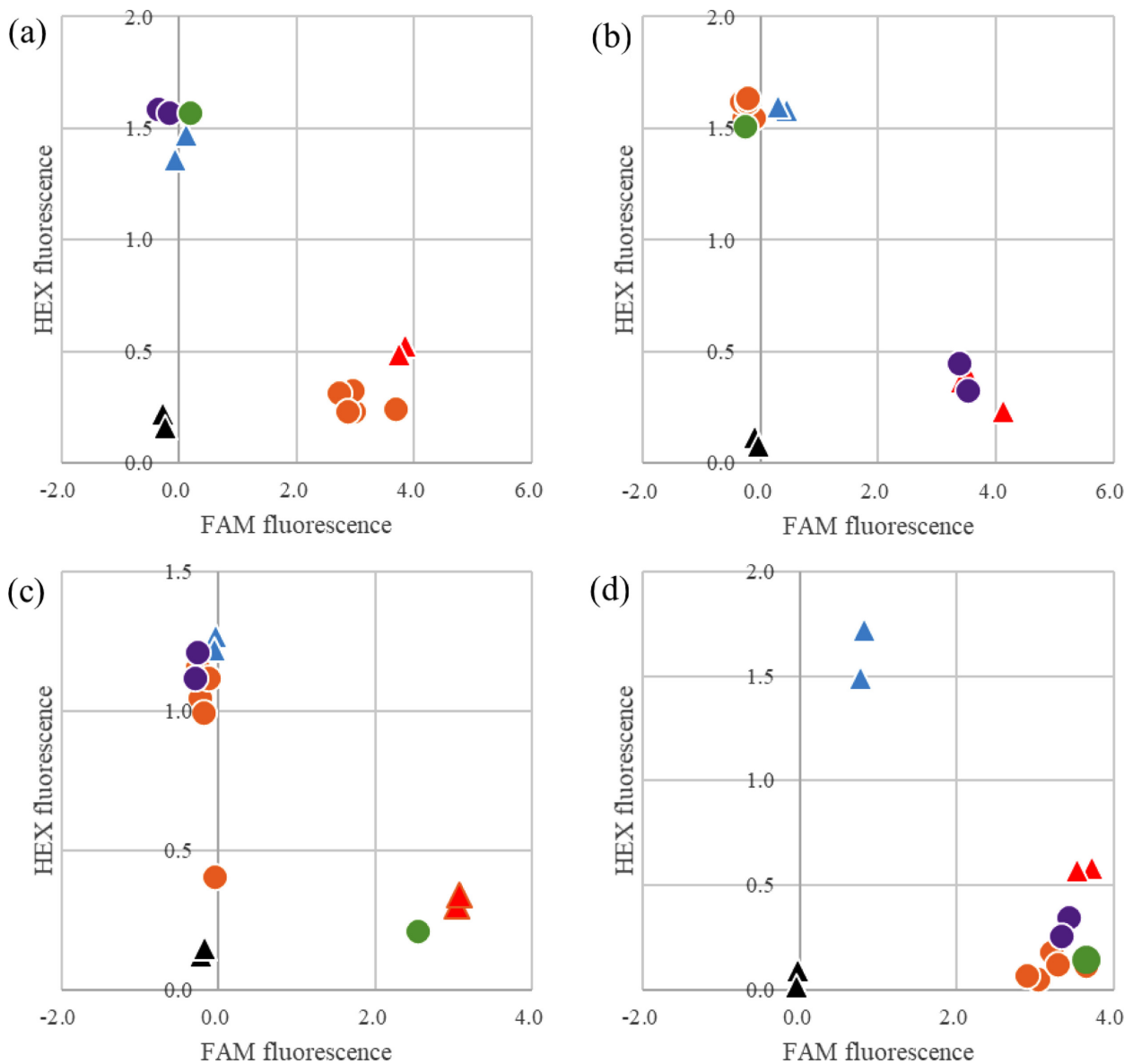


Fig. 1. KASP assay result on plant raw materials. Four KASP markers analysis 11 *Ephedra* plants. *E. sinica* (orange cycle, ●) emit FAM on NEFM21ES(a) and NEFM21Ephedra(d). *E. intermedia* (purple cycle, ●) emit FAM on NEFM21EI(b) and NEFM21Ephedra(d). *E. equisetina* (green cycle, ●) emit FAM on NEFM21EE(c) and NEFM21Ephedra(d). DW(black triangle, ▲), FAM positive oligo (red triangle, ▲) and HEX positive oligo(blue triangle, ▲) are used as negative and positive controls for fluorescence values and which do not have a direct meaning.

에서만 FAM 양성을 보이며 그 외에 중마황, 목적마황, *E. viridis*, *E. torreyana*에서 HEX 형광 양성으로 나타났다(Fig. 1(a)). 중마황 판별마커 NEFM21EI는 2개의 중마황과 중마황을 대상으로하여 합성한 FAM양성 올리고(red triangle)에서만 FAM 양성을 보이며 그 외에 초마황, 목적마황, *E. viridis*, *E. torreyana*에서 HEX 양성을 나타냈다(Fig. 1(b)). 목적마황 판별마커 NEFM21EE는 1개의 목적마황과 목적마황을 대상으로하여 합성한 FAM양성 올리고(red triangle)에서만 FAM 양성을 보이며 그 외에 초마황, 중마황, *E. viridis*, *E. torreyana*에서는 HEX 양성으로 나타났다(Fig. 1(c)). 마황속 판별마커 NEFM21EPHEDRA는 초마황, 중마황, 목적마황, *E. viridis*, *E. torreyana*과 마황속을 대상으로하여 합성한 FAM양성 올리고(red triangle) 모두에서 FAM 양성을 나타냈다(Fig. 1(d)). KASP 마커의 분석결과 값과 염기서열 분석결과가 일치함으로써 마황속 판별마커가 FAM 양성을 나타내며 초마황, 중마황, 목적마황 판별마커 중 하나 이상의 FAM 양성이 확인되면 마황이라고 판단 할 수 있다. 마황속 식물이지만 마황이 아닌 *E. viridis*, *E. torreyana*는 NEFM21EPHEDRA에서는 FAM 양성을 나타냈지만 초마황, 중마황, 목적마황 마커에서는 HEX나 음성을 보였다. 따라서 마황속 표적 마커에서 FAM 양성이 나왔으나 마황 3종 표적 마커에서 FAM 음성이 나온다면 *Ephedra* 속 식물 중 마황이 아닌 식물로 판단할 수 있다. 추가적으로 에페드린이 함유되어 있다고 보고된 식물(반하, 주목, 서양민들레, 살구씨, 회향나무)에 대해 KASP 분석을 했을 때 모두 FAM 음성을 나타냈다. 이에 따라 이 연구에서 제작한 4개의 KASP 마커를 이용하여 특이적으로 마황 중 초마황, 중마황, 목적마황 외에 다른 마황속도 감별이 가능하여 마황을 한약재로 쓸 때 마황 종의 감별에 이용이 가능할 것으로 사료 된다. Cui JF 등¹⁰⁾에 따르면 초마황, 중마황, 목적마황의 에페드린 알칼로이드의 총 함량이 종에 따라서 최대 2배의 차이를 보이기 때문에 마황 중에서도 어떠한 마황을 쓰느냐에 따라서 에페드린 알칼로이드의 양이 차이 나며 이에 따라서 약리학적 효능 차이가 나타날 것으로 보이며, Lee 등⁷⁾에서도 안전한 마황의 사용과 약효의 재현성을 위해 마황 기원 종의 감별이 중요성을 이야기하였으며 3개의 마황에 대한 외부 형태 감별 기준을 제시하였다. Plant 5는 초마황과 목적마황의 혼합물로 초마황 판별마커와 목적마황 판별마커가 모두 FAM 양성이 나오에 따라 두 개가 혼합이 되었음을 확인할 수 있었다. 이 경우 일반적인 관능 검사로는 혼입 여부를 확인하기 어렵지만, 이 연구에서 개발한 방법으로 종의 혼입을 판별할 수 있었다. 이에 이 연구에서는 분쇄나 혼합물에서도 마황 종의 판별이 가능한 분자생물학적 기술을 개발하였다 따라서 4개의 KASP 마커를 활용하여 마황의 정확한 종을 확인을 함으로써 안전하게 마황을 사용할 수 있을 것으로 사료 된다.

KASP 마커의 제품 적용성 검토 - 제품에서 KASP 마커의 활용을 위해 다이어트 약 5종과 차 1종을 구매하였다. 다이어트 약은 모두 환제제이며 한의원 4곳에서 구매하였다. 차는 인터넷 에서 마황차(*Ephedra tea*)로 검색하여 인터넷 직구로 구매하였다. DHM1,4,5은 초마황 표적마커와 마황속 표적마커에서 FAM 양성을 나타내어 제품 내 초마황이 사용되었다고 판단하였다(Table VII). DHM2는 중마황 표적마커와 마황속 표적마커에서 FAM 양성을 보여 제품 내 중마황이 사용되었다고 판단하였다. DHM3은 초마황 마커와 중마황 마커, 마황속 마커에서 FAM 양성을 보여 초마황과 중마황이 섞인 것으로 판단하였다. DHM 3과 DHM 4는 동일한 한의원에서 구매했지만 처방 단계에 따라서 마황 종류를 다르게 사용하는 것도 확인하였다. 마황은 1990년대부터 체중감량과 신체기능활성화를 위한 건강기능식품과 의약품에 많이 사용되었다.²⁰⁾ 이 연구에서 구매한 5개의 체중 감량 목적의 다이어트 한약 모두에서 초마황과 중마황이 함유된 것으로 확인되어 체중감량의 목적으로 국내에서 초마황과 중마황이 사용이 되고 있음을 확인하였다.

인터넷 직구를 통해서 구매한 tea 1는 초마황 표적마커와 마황속 표적마커에서 FAM 양성을 나타내어 제품 내 초마황이 확인되었다. 대한민국 식품위생법 상 마황은 건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료로 지정되어있지만²¹⁾ 해외 직구를 통해 마황을 식품으로 쉽게 접할 수 있음을 확인하였다. 관세청 조사에 따르면 2021년 해외 직구 수입 품목 중 1위는 건강식품이며²²⁾ 2021년 5월부터 6월까지 해외 특송 및 우편화물로 반입된 식품에 대해 안전성 집중 검사를 실시한 결과, 식품에 사용할 수 없는 의약품 성분 등 부정물질이 함유된 해외직구식품이 약 11만정을 적발되었다.²³⁾ 따라서 해외직구를 통해 마황이 함유된 식품이 국내에 유입됨으로서 안전의 사각지대가 생길 수 있기 때문에 제품에서 마황의 함유를 확인 할 수 있는 시험법이 필요하다.

본 연구를 통해서 개발된 KASP 마커 4종은 마황속 식물 중에서 초마황, 중마황, 목적마황을 판별할 수 있으며 혼합이나 가공된 제품 형태에서도 마황의 함유 여부를 확인할 수 있어 한약재 감별뿐만 아니라 인터넷 직구를 통한 부정 불법 식품을 확인할 수 있는 유용한 시험법으로 활용 가능하다고 생각된다.

사 사

본 연구는 식품의약품안전평가원 연구과제(세부과제번호: 21201분석연307)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

1. Ministry of Food and Drug Safety (2019) The Korean Phar-

- macopoeia, Cheongju, Korea.
2. Ministry of Food and Drug Safety (2021) 2021 Food & Drug Statistical Yearbook, Cheongju, Korea.
 3. González-Juárez, D. E., Escobedo-Moratilla, A., Flores, J., Hidalgo-Figueroa, S., Martínez-Tagüeña, N., Morales-Jiménez, J., Muñoz-Ramírez, A., Pastor-Palacios, G., Pérez-Miranda, S., Ramírez-Hernández, A., Trujillo, J. and Bautista, E. (2020) A review of the ephedra genus: distribution, ecology, ethnobotany, phytochemistry and pharmacological properties. *Molecules* **25**: 3283.
 4. Flora of China Editorial Committee (2018) Flora of China. *Flora of China*.
 5. Nasir, E. (1981) Flora of Pakistan. In Agriculture Research Conference, *Islamabad (Pakistan)*.
 6. Kitani, Y., Zhu, S., Omote, T., Tanaka, K., Batkhuu, J., Sanchir, C., Fushimi, H., Mikage, M. and Komatsu, K. (2009) Molecular analysis and chemical evaluation of ephedra plants in Mongolia. *Biol. Pharm. Bull.* **32**: 1235-1243.
 7. Lee, S. H., Yoon, J. H., Lee, G. S. and Ju, Y. S. (2016) The morphological identification for three authentic species of ephedrae herba. *Korean Herb. Med. Inf.* **4**: 43-49.
 8. Su, X. L., Lin, R. C., Wong, S. K., Tsui, S. K. and Kwan, S. Y. (2003) Identification and characterisation of the chinese herb langdu by LC-MS/MS analysis. *Phytochemical Analysis* **14**: 40-47.
 9. Han, E. H., Kim, Y. H. and Lee, S. W. (2015) Development of molecular biological techniques for the differentiation of medicinal plant species. *J. Plant. Biotechnol.* **42**: 6-12.
 10. Cui, J. F., Zhou, T. H., Zhang, J. S. and Lou, Z. C. (1991) Analysis of alkaloids in chinese ephedra species by gas chromatographic methods. *Phytochemical Analysis* **2**: 116-119.
 11. Zhao, Y. S., Xie, L. X., Mao, F. Y., Cao, Z., Wang, W. P., Zhao, Q. P. and Zhang, X. H. (2016) Identification of ephedra species by phylogenetic analyses using matK and ITS1 sequences. *Acta Soc. Bot. Pol.* **85**: 3492.
 12. Long, C., Kakiuchi, N., Takahashi, A., Komatsu, K., Cai, S. and Mikage, M. (2004) Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of ephedra plants in China. *Planta med.* **70**: 1080-1084.
 13. Kakiuchi, N., Nakajima, I., Kurita, Y., Long, C., Cai, S. and Mikage, M. (2006) Studies on cultivated ephedra plants in inner mongolia autonomous region and ningxia hui autonomous region. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 746-749.
 14. Wang, G., Bai, X., Chen, X., Ren, Y. and Han, J. (2022) Development of a genus-universal nucleotide signature for the identification and supervision of ephedra-containing products. *Molecules* **27**: 2342.
 15. Zheng, Y., Gao, H., Song, M., Lin, Y., Fan, J., Zhang, Y. and Liu, X. (2021) Identification of plant materials containing ephedrine alkaloids based on DNA barcoding and TaqMan real-time PCR assay. *Acta Physiol. Plant* **43**: 1-10.
 16. Techen, N., Khan, I. A., Pan, Z. and Scheffler, B. E. (2006) The use of polymerase chain reaction (PCR) for the identification of ephedra DNA in dietary supplements. *Planta Med.* **72**: 241-247.
 17. Guo, Y., Tsuruga, A., Yamaguchi, S., Oba, K., Iwai, K., Sekita, S. and Mizukami, H. (2006) Sequence analysis of chloroplast chlB gene of medicinal ephedra species and its application to authentication of ephedra herb. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 1207-1211.
 18. Chen, X., Cui, Y., Nie, L., Hu, H., Xu, Z., Sun, W., Gao, T., Song, J. and Yao, H. (2019) Identification and phylogenetic analysis of the complete chloroplast genomes of three ephedra herbs containing ephedrine. *Biomed. Res. Int.* **2019**: 5921725.
 19. Park, B. R., Lee, S. H., Eom, K. Y., Noh, E. Y., Han, K. M., Hwang, J. W., Kim, H. I. and Baek, S. Y. (2022) Development of method using LC-ESI-MS/MS and KASP for identification of *Gymnema sylvestre* in food. *J. Food Hyg. Saf.* **37**: 46-54.
 20. Abourashed, E. A., El-Alfy, A. T., Khan, I. A. and Walker, L. (2003) Ephedra in perspective—a current review. *Phytother. Res.* **17**: 703-712.
 21. Ministry of Food and Drug Safety (2022) Food Sanitation Act, Cheongju, Korea.
 22. Korea Customs Service (2021) Key feature of 2021 e-commerce import. Available from: <https://eiec.kdi.re.kr/policy/materialView.do?num=222185>. Accessed 23 October 2022.
 23. Korea Customs Service (2021) Korea customs service - ministry of food and drug safety joint inspection at the customs clearance stage for pre-block harmful foods on direct overseas purchase. Available from: <https://www.korea.kr/news/pressReleaseView.do?newsId=156462141>. Accessed 23 October 2022.
- (2022. 11. 18 접수; 2022. 12. 13 심사;
2022. 12. 16 게재확정)