pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 2, pp. 46~54 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.2.46

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

식품에서 당살초 판별을 위한 LC-ESI-MS/MS 분석법과 KASP 마커 개발

박보름[1] · 이선희[1] · 엄권용[2] · 노은영[3] · 한경문[1] · 황진우[1] · 김형일[1] · 백선영[1]*

[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 첨단분석센터
[2]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 첨가물포장과
[3]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의료제품연구부 의약품연구과

Development of Method using LC-ESI-MS/MS and KASP for Identification of *Gymnema sylvestre* in Food

Boreum Park[1], Sun Hee Lee[1], Kwonyong Eom[2], Eunyoung Noh[3], Kyoung Moon Han[1], Jinwoo Hwang[1], Hyungil Kim[1], Sun Young Baek[1]*

[1]*Advanced Analysis center, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, Korea*
[2]*Food Additives and Packaging Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, Korea*
[3]*Drug Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, Korea*

(Received April 4, 2022/Revised April 15, 2022/Accepted April 19, 2022)

ABSTRACT - Known for its effectiveness in weight loss and diabetes prevention, *Gymnema sylvestre* products can be found in the US, Japanese, and Indian markets. However, the recommended dosage or safety of these products has not yet been proven. Therefore, development of an analytical method for detecting the content of *Gymnema sylvestre* in food products is required. Accordingly, this study proposes an analysis method that can examine *Gymnema sylvestre* in food using LC-ESI-MS/MS and KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR) markers. In LC-ESI-MS/MS, a simultaneous analysis method for gymnemic acid and deacylgymnemic acid was optimized using negative ionization mode, and its validation test was completed for solid and liquid samples. In addition, KASP markers were prepared by finding the specific SNP of *G. sylvestre* in ITS2 and matK through DNA barcodes. The two KASP markers returned positive FAM fluorescence result when combined with *G. sylvestre*, and this aspect was confirmed in raw *G. sylvestre* as well. The applicability of the method was tested on 21 different food and healthy functional products containing *G. sylvestre* purchased on the internet. As a result, although there was a difference in the ratios of gymnemic acid and deacylgymnemic acid in LC-ESI-MS/MS, the index component was detected in all 21 products samples. In the KASP analysis, 9 products returned positive FAM result, and the rest of the products were found to be containing *G. sylvestre* extract. This study is the first study to use the dual system of LC-ESI-MS/MS and KASP for the analysis of *G. sylvestre*. The study has confirmed that these two methods are applicable to the examine *G. sylvestre* content in food products.

Key words: *Gymnema sylvestre*, LC-ESI-MS/MS, KASP, Food analysis

*Correspondence to: Sun Young Baek, Advanced Analysis center, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, 28159, Korea
Tel: +82-43-719-5322
E-mail: braat2019@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

당살초(*Gymnema sylvestre*)는 협죽도과 김네마속 식물로 인도, 아프리카, 호주, 베트남, 중국 남부 등 건기와 우기가 뚜렷한 지역의 해발 3,000 m 이상의 고산지대에서 자생하는 식물이다. 당살초라는 이름은 '단맛을 없애는 풀'이라는 뜻으로 잎을 씹으면 1-2분 만에 설탕의 단맛을 느낄 수 없게 된다는 데서 유래 되었다. 당살초라는 이름 이외에 madhynashini (Sanskrit), Gurmar (Hindi), merasingi (Marathi), Gimunema (Japan) 등 나라마다 다양한 이름으로 불리며 전 세계에서 사용되고 있다[1]. 2000년 전부터 인도에서는 당뇨병 치료 약으로 사용였으며, 중국에서는 유선열, 해열, 종기, 외상 등에 치료제로 사용하고 있다[2]. 최근 들어 일본에서는 당살초가 다이어트에 효능을 보인다는 광고와 함께 차나 껌으로 만들어 판매되고 있으며, 당살초 잎 분말을 식사와 함께 섭취하면 소장에서 포도당의 흡수를 억제하여 인슐린의 분비량이 줄어들어, 당뇨병의 치료를 촉진하는 효능을 기대할 수 있다고 알려져 있다[1].

2018년 EFSA Journal에 실린 'Risk assessment of substances used in food supplements: the example of the botanical *Gymnema sylvestre*' 논문에서는 당살초는 권장용량이 불분명하고, 순도가 검증되지 않아 안정한 원료라고 보기 어렵다고 당살초의 안전성에 문제를 제기하였다[3]. 같은 맥락으로 식품의약품안전처에서도 당살초의 안전성이 확보되지 않아 식품의 원료로 사용을 허가하지 않고 있다[4]. 인터넷의 발달로 편리한 국내외 온라인 쇼핑이 가능해지면서 현지에서 판매되는 원료나 해외 인터넷 쇼핑을 통한 물품구매가 얼마든지 가능해짐에 따라 국내에서 허용되지 않은 원료를 이용한 건강식품을 현지에서 구입하거나 인터넷 쇼핑몰(구매대행 및 해외직구)을 이용한 해외 식품의 반입도 꾸준히 증가하고 있다. 이에 따라서 국내에서 사용이 허용되지 않은 식품 원재료를 유통할 경우 제품의 안전성의 문제로 국민건강에 심각한 위험을 초래할 수 있다. 이들 식품 원료와 제품은 정식 수입하여 통관할 경우 서류검사, 관능검사, 무작위 검사 및 정밀검사 등을 받게 되지만, 인터넷 쇼핑몰(해외구매대행, 해외직구)이나 해외여행을 통해서 반입되는 경우 통관검사 등의 절차가 생략될 수 있으므로 식품 안전의 사각지대가 발생하게 된다. 국내도 식품에 사용할 수 없는 원료를 가공식품으로 유통, 판매하는 경우가 지속 적발되고 있고 식용불가 원료와 그 가공식품에 관한 적발사례와 위해정보가 빈번히 보고되고 있으며, 향후 안전관리를 위하여 식용불가 원료의 사용을 확인할 수 있는 분석법 확립이 필요하다.

식품 속 원료 함유 여부를 확인하는 다양한 분석 방법 중에서 이 논문에서는 이화학적 방법과 유전학적 방법 모두를 이용한 듀얼 시스템을 구축하고자 하였다. Yoshikawa 등[5,6] 에서는 열수 추출한 gymnemic acid I, II, III, IV, V, VI, and VII를 NMR을 통해 구조를 확인하였고 Yoshikawa 등[7] 에서는 추가로 에탄올 추출물에서 gymnemic acids VIII, IX, X, XI, and XII를 분리하고 구조를 확인하였다. 식품 속 이화학분석에 관한 최근 연구는 단순한 전처리만으로도 신속하고 정밀하게 시료를 동시 분석할 수 있는 LC-MS/MS가 많이 사용되고 있다[8]. 따라서 이 연구에서는 LC-MS/MS에서 당살초 분석법을 구축하고자 하였다.

또한 유전학적 분석방법으로 종 판별을 하는 가장 대표적인 방법은 DNA barcode 분석이 있다[9]. 지금까지 보고된 당살초에 대한 유전학 판별법에는 RAPD analysis[10,12,13], AFLP markers[11], ISSR markers[12,14], Squalene synthase[15] 등이 있다. 이 연구에서 식품에서 유전학적으로 당살초를 판별하기 위해서 DNA barcode을 대상으로 하는 KASP (Kompetitive allele-specific PCR)방법을 선택하였다. KASP는 LGC Biosearch Technologies (Teddington, UK)사에서 개발 및 판매하는 genotyping assay system으로 동식물의 판별[16,17]이나 DNA 돌연변이 확인[18,19]에 많이 사용되고 있다. SNP 기반으로 단 하나의 염기서열 1개의 차이로도 증폭 여부가 달라지며 형광값을 통해 증폭 여부를 알 수 있다. 일반적으로 알려진 TaqMan probe보다 저렴하며 염기서열 분석보다 분석 시간이 짧다는 장점이 있다. 또한 식품의 경우, 다양한 원료로 이루어져 있으므로 DNA 추출 시 여러 종이 섞여 있어 염기서열분석이 어려움을 겪을 수 있는데 KASP 분석법으로 이를 극복할 수 있다.

따라서 이 연구에서는 식품에서 식용불가 원료인 당살초를 판별할 수 있는 LC-ESI-MS/MS 분석법과 KASP 분석법을 개발하여 이중 시스템으로 원료 판별법을 구축하여 당살초의 식품에 불법 혼입 또는 불법유통을 방지하는데 기여하고자 한다.

Materials and Methods

시약 및 재료

LC-MS/MS 분석에 사용된 물과 아세토니트릴, 메탄올, 에탄올, 포름산은 MS 및 HPLC grade (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)로 구입하여 사용하였다. 지표물질인 gymnemic acid I는 AOBIOUS (Gloucester, MA, USA) deacylgymnemic acid는 Tokiwa phytochemical (Sakura, Japan)에서 구매하였다. 당살초 지표물질 표준원액(stock standard solution)은 용량 플라스크에 gymnemic acid I 10.0 mg/10 mL, deacylgymnemic acid 20.0 mg/20 mL를 정밀히 취하여 100% 메탄올 모두 녹인 후 정용한 것을 표준원액으로 하였다. 모든 표준원액은 냉장 보관하며 100% 메탄올로 희석하여 1 μg/mL의 표준용액(working standard solution)으로 사용하였다.

DNA 추출은 DNeasy Power Plant pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였다. 염기서열 분석에서는 AccPower PCR master mix (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하였으며 KASP 분석에서 사용된 KASP assay mix와

KASP V4.0 2X Master Mix/High ROX 는 LGC (Teddington, UK)에서 구매하였다. 염기서열을 위한 증폭은 0.2 mL PCR Tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) 에 분주하고 KASP 분석을 위한 조성물은 MicroAmp™ Optical 96 Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)에 분주하여 증폭을 진행하였다. 양성 대조군(positive control)으로 사용된 당살초는 Extrasynthese (Genay, France)와 American Herbal Pharmacopoeia (Scotts Valley, CA, USA)에서 구입하였다.

확립된 분석법 적용성을 검토하기 위해서 당살초가 함유되어 시중에 유통되고 있는 다이어트나 당뇨와 관련된 분말차나 다류, 건강보조식품 21종을 구매하여 사용하였다.

LC-MS/MS 분석조건 확립

분석기기로 UPLC/MS/MS는 acquity UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) 및 acquity triple quadrupole tandem mass spectrometer (Waters Corporation)를 사용하였다. 컬럼은 acquity UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm)을 사용하며, 온도는 40°C를 유지하였다. 이동상은 0.1% formic acid가 함유된 물(Solvent A)와 0.1% formic acid가 함유된 메탄올(Solvent B)을 사용하였으며, Solvent A가 감소하는 기울기용리 조건을 이용하였다. 초기조건은 Solvent A가 90%에서 시작되며 3분이 되는 시점에 50%, 4분이 되는 시점에서 10%로 감소하며 0.4 mL/min의 유속으로 분석하였다. 표준용액 및 검액은 100% 메탄올로 희석하였으며, 각 2 μL를 주입하였다. negative (-) 이온화 모드에서 capillary voltage는 2.5 kV, desolvation 온도는 400°C, desolvation gas flow는 600 L/h (N_2), cone gas flow 50 L/h 설정하여 가장 최적의 MS/MS 분석조건을 확립하였다. 확립한 분석법은 FDA, ICH, USP 지침을 참고하여[20-22] 특이성(specificity), 직선성(linearity), 반복성(repeatability), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출 한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 안정성(stability), 회수율(Recovery)을 선정하여 유효성을 검증하였다.

DNA 추출 및 PCR

원물의 경우 25 mg, 샘플의 경우 50 mg을 취한 후 DNA 추출은 DNeasy Power Plant pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany)의 기본 프로토콜에 따라서 진행하였다. DNA 농도는 분광광도계를 사용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하고 그 값이 1일 때 DNA 농도가 50 ng/μL인 것으로 계산한다. 추출된 DNA 순도를 확인하기 위하여 230, 260, 280 nm에서 흡광도를 각각 측정한다. A_{260}/A_{280} 과 A_{260}/A_{230} 측정값이 1.7-2.0 일 경우 PCR에 적합한 농도로 판단한다. 다만, 가공식품의 경우 이러한 순도 적용이 어려운 때도 있으므로 반드시 적용되는 것은 아니다. 추출된 DNA는 -20°C에 보관하여 사용하였다.

당살초 동정은 internal transcribed spacer (ITS)와 maturase K (matK)에 대해 진행하였으며 프라이머와 PCR 조건은 Cold Spring Harbor Laboratory DNA Learning Center의 'Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things'[23]를 참고하였다. 5.8S ribosomal RNA - ITS2 유전자 구간과 matK 유전자 구간에 대해 PCR 증폭을 진행하였고 단일밴드가 확인된 PCR 산물을 Macrogen (Seoul, Korea)에 양방향 염기서열분석을 의뢰한다. 염기서열 결과는 Forward primer와 Reverse primer 결과 중 일치하는 구간만 추출하여 NCBI DB에서 *Gymnema sylvestre* 임을 확인하였다. 해당 염기서열은 NCBI에 등록했으며 Accession Number는 MW319025, MW319026, MW319027, MW319028, MW3190009, MW319010이다.

당살초 특이 KASP 마커 제작

NCBI DB에서 "*Gymnema sylvestre*"를 검색하여 유전정보

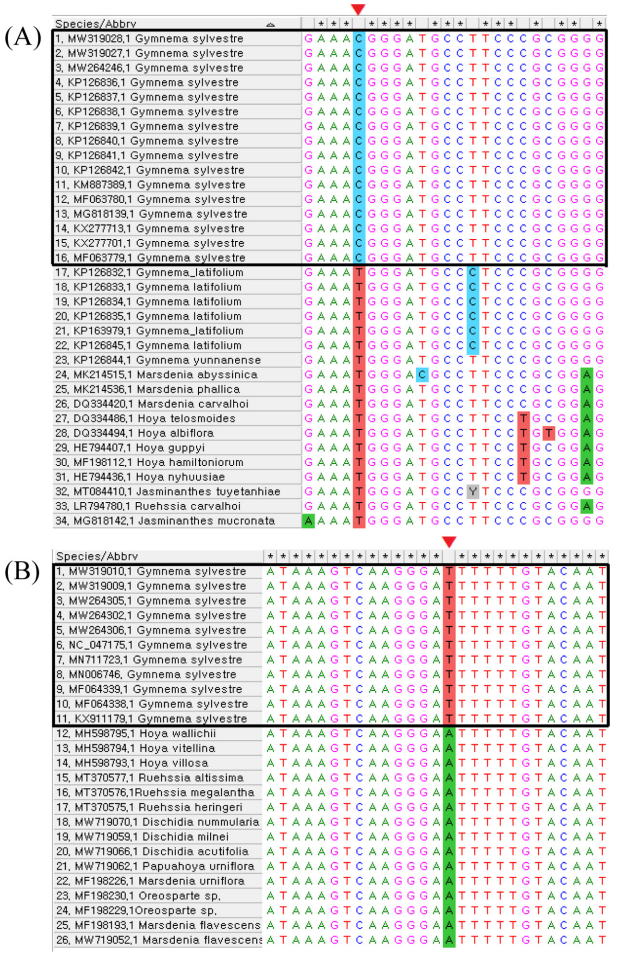

Fig. 1. Sequence aligment of the Marsdenieae plants.
All plants in figure are Marsdenieae plants such as *G.sylvestre*. Base on the results of sequencing and NCBI Data Base, Two single nucleotide polymorphisms (SNP) were found on ITS2 (A) and matK (B) gene. each SNP is indicated by a red triangle(▼). In this study, the sequence obtained for the *G.sylvestre* were MW319027 and MW319028 (ITS2), MW3190009 and MW319010 (matK).

를 얻었고 Mega X (version 11.0.10, Penn State University, PA, USA)로 근연식물과 당살초를 구분할 수 있는 특이 Single nucleotide polymorphisms(SNP)을 탐색하였다(Fig. 1). 핵 유전자 ITS2의 119번째 염기서열과 엽록체 유전자 matK의 1002번째 염기서열을 당살초 특이 SNP로 선정하였고 KASP 마커를 제작하였다(Table 4). NEFM19GS01는 핵 유전자인 ITS2에서 119번째 염기서열이 C인 당살초에 대해 FAM 형광이 표지된 Forward primer과 결합하여 FAM 형광을 나타내며 X축에 위치하도록 제작되었다. NEFM19GS02는 엽록체 유전자인 matK에서 1002번째 염기서열이 T인 당살초에 대해 FAM 형광이 표지된 Forward primer과 결합하여 FAM 형광을 나타내며 X축에 위치하도록 제작되었다.

KASP 분석조건 확립

KASP assay mix는 LGC genomics 사에 의해 KASP by Design (KBD)로 제작하였다. 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. 5 μL의 주형 DNA, 5 μL of KASP V4.0 2X Master Mix/ High ROX 와 0.14 μL of KASP Assay mix를 섞어 PCR 반응액을 만들어 MicroAmp™ Optical 96 Well Reaction Plate에 10.14 μL 씩 분주 후 증폭 및 분석을 진행하였다. 실험은 LGC에서 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. 증류수를 주형 DNA를 대신해 음성대조군으로 사용하였으며 실험마다 2개의 음성대조군, 2개의 FAM 양성대조군(FAM positive oligo), 2개의 HEX 양성대조군(HEX positive oligo)을 넣어서 실험하였다.

식품 중 분석법 적용성 검토

시료를 균질화하기 위해 막자사발로 갈아 시료를 취하고 분말이나 액상 제품은 일정량을 바로 취하고 캡슐 제품은 캡슐 안의 내용물만을 취하여 실험을 하였다. LC-MS/MS 분석에서는 고체 시료와 액체 시료 각 1 g을 취하여 고체 시료는 50 mL 용량 플라스크에 액체 시료는 10 mL 용량 플라스크에 넣고 일정량의 100% 에탄올을 첨가한 후 30분 동안 초음파추출, 방랭한 뒤 100% 에탄올로 정용하였다. C18 카트리지(500 mg, 6 mL)를 이용한 SPE법으로 제품 내 방해 물질을 제거한 후 최종 용출된 12 mL의 용출액을 20 mL 용량 플라스크에 넣고 100% 에탄올로 정용한 뒤 LC-MS/MS로 분석하였다. KASP 분석에서는 고체 시료와 액체 시료 각 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.

Results and Discussion

당살초 지표 성분 2종에 대한 LC-MS/MS 조건 확립

당살초의 잎에는 triterpene saponins (gymnemic acids), oleanane saponins (gymnemasaponins), dammarene saponins (gymnemosides), gurmarin, triterpenoid saponins (gymnemasins), gymnemanol, gymnestrogenin, flavonol glycoside, sterols, d-quercitol, lupeol, parabin, conduritiol A 등 다양한 사포닌 성분이 함유되어 있다고 알려져 있다[24,25]. 이 중 표준품 수급이 가능한 gymnemic acid I와 deacylgymnemic acid에 대해서 LC-MS/MS 동시분석을 진행하였다. MS 분석을 위하여 ESI (Electrospray Ionization)법을 선택하였고, 각 성분의 1000 ppb 표준용액을 질량분석기에 직접 주입(direct infusion)하여 각 표준성분에 적합한 이온화 모드, 모분자(precursor ion)를 찾았다. Negative (-) 이온화 모드에서 capillary voltage는 2.5 kV, desolvation temperature는 400°C, desolvation gas flow는 600L/h(N2), cone gas flow 50 L/h로 설정하여 가장 최적의 MS/MS 분석조건을 확립하였다. 최적화된 모분자에 충돌에너지를 단계별로 가하였고, 딸이온(product ion)의 intensity를 비교하여 정량이온과 정성 이온을 선택하였다. 최적의 딸이온이 생성하는 충돌에너지 및 기타 파라미터를 저장하여 확립된 MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)조건은 Table 1과 같다. 동시 분석을 위한 이동상은 참고문헌을 통해 비교분석을 하여 0.1% formic acid를 포함한 water, 메탄올 이동상 조건에서 HSS T3 컬럼을 사용하는 것으로 LC 분석조건을 확립하였다.

당살초에 대한 LC-MS/MS 분석법 검증

확립된 LC-ESI-MS/MS 분석법은 FDA, ICH, USP guideline을 참고하여[20-22] 특이성(specificity), 직선성(linearity), 반복성(repeatability), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of

Table 1. Precursor and product ions by LC/MS/MS multiple reaction monitoring in negative ion mode

Chemical	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	CE (eV)	CV (kV)
Gymnemic acid I	805.30	84.7	50	35
		98.8	45	
		112.80	45	
		597.25	50	
Dyacylgymnemic acid	681.42	84.9	45	35
		112.9	40	
		505.25	40	

quantitation, LOQ), 안정성(stability), 회수율(recovery)을 선정하여 유효성 검증하였다(Table 2).

EIC (extracted ion chromatogram)을 통해 얻은 크로마토그램을 당살초 성분 2종이 들어 있지 않은 공시료 검체의 크로마토그램과 비교하였을 때 확립한 LC-MS/MS 분석조건에서 당살초 각 성분이 시료의 다른 매트릭스 성분들로부터 간섭을 받지 않고 분리됨으로써 특이성(specificity)을 띄는 것을 확인하였다.

당살초의 각 지표성분의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ) 값을 고려한 농도 범위의 검량선(calibration curve)을 작성하였고, 각 지표 성분에 대해 5-100 ng/mL 농도 범위에서 signal-to-noise ratio of 3 (S/N=3) 로 정의하였다. 지표성분의 검출한계와 정량한계는 각각 1.0-3.0 ng/mL (Gymnemic acid I), 2.5-7.5 ng/mL (Dyacylgymnemic acid)로 확인하였다. 검량선의 상관계수(R^2)가 1.000 이상의 직선성(linearity)을 나타내었다.

정밀성(precision)과 정확성(accuracy)을 확인하기 위해서 같은 시료에 대하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3회 반복 실험하였다(intra-day). 또한, 각 농도에 대하여 3일에 걸쳐 3회 반복 실험하였다(inter-day). 정밀성은 피크 면적의 표준편차를 피크 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(상대표준 편차, RSD, CV%)로 구하였으며, 정확성은 검량선에 의해, 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로 산정하였다. 농도는 gymnemic acid I의 경우 5, 10, 100 ng/mL, dyacylgymnemic acid의 경우 10, 100, 1000 ng/mL로 설정하였다. 실험결과, 정밀성은 0.22-4.20% (intra-day), 0.00-6.67% (inter-day), 정확성은 90.40-106.20% (intra-day), 93.83-106.11% (inter-day)이었다. 같은 분석조건에서 물질별로 정밀성 및 정확성이 차이가 있음을 판단할 수 있었다.

안정성(stability)을 확인하기 위해 gymnemic acid I의 경우 5, 10, 100 ng/mL, dyacylgymnemic acid의 경우 10, 100, 1000 ng/mL의 농도가 되도록 제조하고 실온에 6시간 방치 후 측정(0시간) 한 뒤 24, 48시간 동안 얻은 피크 면적을 이용하여 통계처리 하였다. 그 결과, 각 성분의 피크 면적의 상대표준 편차(RSD)가 11.28% 이내로 즉, 시험용액상태는

Table 2. Validation results on LC-EIS-MS/MS

Performance characteristic	Solid sample	Liquid sample
LOD	1.0~2.5 ng/mL	1.0~2.5 ng/mL
LOQ	3.0~7.5 ng/ml	3.0~7.5 ng/mL
Percision	0.57~4.20% (intra-day)	0.22~2.94% (intra-day)
	0.08~4.45% (inter-day)	0.00~6.67% (inter-day)
Accuracy	95.07~106.20% (intra-day)	90.40~106.13%(intra-day)
	96.31~106.11% (inter-day)	93.83~104.57% (inter-day)
Stability	0.23~3.01% RSD	
Recovery	84.10~107.44%	88.43~103.19%

Table 3. Information of KASP marker

Marker name		Sequence(5'→3')
NEFM 19GS01	Forward primer-FAM	CCGCGGGAAGGCATCCCG
	Forward primer-HEX	CCGCGGGAAGGCATCCCA
	Reverse primer	GCGGGAAGCGCCAAGGACTT
	FAM positive oligo	CGCCGGGCAACCGAAACAAAAACCGGCGCGGGAAGCGCCAAGGACTTGNGAAAC GGGATGCCTTCCCGCGGGGAGTGCCGTTCGCGGANTCCTCGCCGCGGGG
	HEX positive oligo	CGCCGGGCAACCGAAACAAAAACCGGCGCGGGAAGCGCCAAGGACTTGNGAAAT GGGATGCCTTCCCGCGGGGAGTGCCGTTCGCGGANTCCTCGCCGCGGGG
NEFM 19GS02	Forward primer-FAM	TGAAAGATAACCCATAAAGTCAAGGGAT
	Forward primer-HEX	ATTGAAAGATAACCCATAAAGTCAAGGGAA
	Reverse primer	GAAGGGCCCATATAAAGCAATTGTACAAA
	FAM positive oligo	TGAAGGGTTTAGTCGCACAATTGAAAGATAACCCATAAAGTCAAGGGATTTTTTGT ACAATTGCTTTATATGGGCCCTTCGCGAGTGAAACCACAGGT
	HEX positive oligo	TGAAGGGTTTAGTCGCACAATTGAAAGATAACCCATAAAGTCAAGGGAATTTTTGT ACAATTGCTTTATATGGGCCCTTCGCGAGTGAAACCACAGGT

최소 48시간 동안 안정한 그것으로 판단되었다.

회수율(Recovery)을 검토하기 위하여 표준품 첨가법(standard spiking method)을 사용하였다. 앞서 확립된 전처리법을 토대로 고체 시료의 경우 50 mL 용량 플라스크에 균질하게 분말화한 시료를 1 g씩 정밀히 취하였고, 액체 시료의 경우 10 mL 량 플라스크에 균질하게 섞인 시료 1 g씩 정밀히 취하였다. 여기에 저, 중, 고농도의 당살초 분석지표 성분 표준액을 각 농도에 적합하도록 가한 후 일정량의 100% 메탄올을 추가하고, 실온에서 30분 동안 초음파 추출하고 방랭한 뒤 100% 메탄올로 정용하였다. C18을 이용한 SPE법을 실시하고 최종 용출된 12 mL의 용출액을 20 mL 용량 플라스크에 정용한 뒤 LC-MS/MS에 2 μL를 주입하여 각 3회 분석 후 표준품과의 농도비를 비교하여 회수율을 구하였다. 회수율은 검량선에에 의하여 정량한 농도를 표준품의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로 구하였으며, 그 값의 평균은 84.10-107.44%이다.

KASP 마커 확인 및 당살초 원물 적용

제작한 KASP 마커가 SNP를 잘 구분하는지 확인하기 위해서 우리는 약 100 bp의 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 제작하였다. NEFM19GS01의 FAM positive oligo는 51번째 염기서열이 C이고 NEFM19GS01의 HEX positive oligo는 51번째 염기서열이 T이며 나머지는 같은 염기서열을 가진다. NEFM19GS02의 FAM positive oligo는 49번째 염기서열이 T이고 NEFM19GS02의 HEX positive oligo는 49번째 염기서열이 A이며 나머지는 같은 염기서열을 가진다. 분석을 위해 3차 증류수로 희석하여 1fmol의 FAM/HEX positive oligo라고 표기하였다. 제작된 올리고뉴클레오타이드는 각 형광의 양성대조군으로, 주형 DNA처럼 사용한다. 제작한 올리고 뉴클레오타이드에 대해 KASP 마커 분석 결과, 2개의 KASP 마커 모두 각각의 FAM positive oligo에서는 FAM 양성을 띠며 X축에 위치하고, HEX positive oligo에서는 HEX 양성을 띠며 Y축에 위치하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 당살초 특이적이라고 지정한 1개의 염기서열 차이도 KASP 분석을 통해 형광값의 차이로 구분할 수 있음을 확인하였다. 또한, Extrasynthese와 AHP에서 구매한 2개의 당살초 원물에 대해서 2개의 KASP 마커에서 모두 FAM 양성을 띠며 x축에 위치하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

식품에 대한 분석법 적용

인터넷을 통하여 구입한 21개의 제품에 대해 LC-ESI-MS/MS 분석결과, 당살초 지표성분인 gymnemic acid I는 21개 제품 모두에서 검출되었으며, dyacylgymnemic acid는 19개의 제품에서 검출되었다(Table 4). 검출 농도는 gymnemic acid I는 893-15352 μg/mL, dyacylgymnemic acid는 49-383502 μg/mL로 검출되었다. 당살초 지표 성분 2종의 비율을 살펴보면 21개의 제품 중 HFF-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 17에 해당하는 제품에서 gymnemic acid I이 dyacylgymnemic acid보다 2배 이상의 농도가 검출되었다. 하지만 HFF-12, 13, 14, 16, 18의 경우 두 성분의 농도가 비슷하게 검출되었으며, HFF-11, 19, 20, 21에서는 dyacylgymnemic acid가 gymnemic acid I보다 더 큰 농도로 검출되는 경우도 확인할 수 있었다. 식물은 같은 종일지라도 성장지역, 수확 부위 및 수확 시기에 따라서

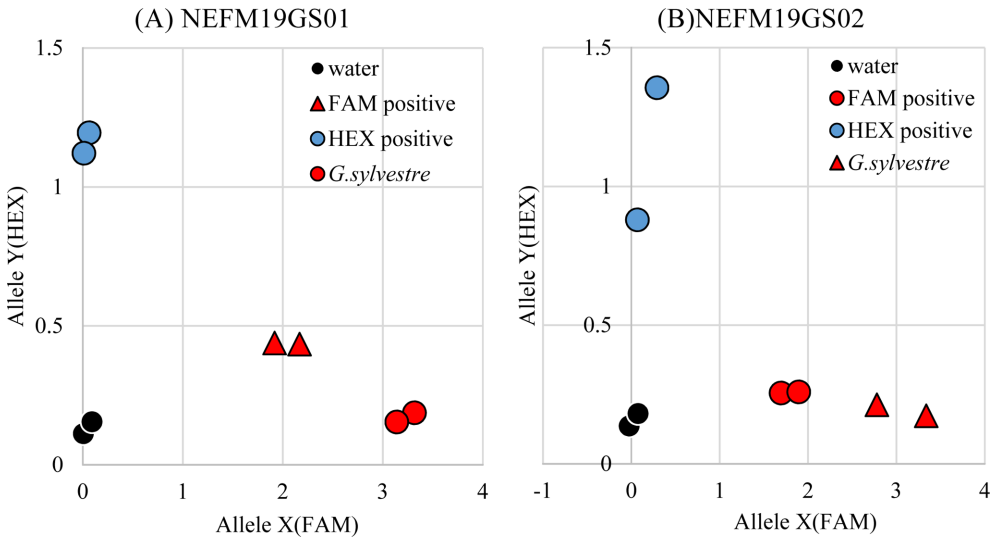

Fig. 2. KASP assay result of a. NEFM19GS01 and b. NEFM19GS02.
Two KASP markers emit FAM fluorescence on two *G.sylvestre*(red triangle, ▲). *G.sylvestre* dots on the lower right corner of the allelic discrimination plot. FAM positive oligo (red cycle, ●) and HEX positive oligo(blue cycle, ●) are used as positive controls for fluorescence values and which do not have a direct meaning.

Table 4. The result of product analysis including *G. sylvestre* using LC-EIS-MS/MS and KASP

Sample number	Indicate the ingredients *G. sylvestre*	Sample type	LC-ESI-MS/MS		KASP	
			Gymnemic acid I (μg/mL)	Dyacylgymnemic acid (μg/mL)	NEFM 19GS01	NEFM 19GS02
HFF-1	leaf	powder	4536	187	FAM	FAM
HFF-2	leaf	powder	3112	706	FAM	FAM
HFF-3	leaf	powder	4623	401	FAM	FAM
HFF-4	leaf	tea	3532	49	FAM	FAM
HFF-5	extract + leaf	capsule	7673	486	FAM	FAM
HFF-6	leaf	capsule	7351	232	FAM	FAM
HFF-7	leaf	capsule	3411	N.D.	FAM	FAM
HFF-8	leaf	capsule	1329	120	FAM	FAM
HFF-9	extract	capsule	9746	21674	FAM	N.D.
HFF-10	extract	capsule	4083	1186	N.D.	N.D.
HFF-11	extract	powder	9834	11568	N.D.	N.D.
HFF-12	extract	capsule	10059	7973	N.D.	N.D.
HFF-13	extract	tablet	9475	8411	N.D.	N.D.
HFF-14	extract	capsule	4196	3885	N.D.	N.D.
HFF-15	extract	capsule	9107	2689	N.D.	N.D.
HFF-16	extract	capsule	15352	14019	N.D.	N.D.
HFF-17	extract	tablet	5815	N.D.	N.D.	N.D.
HFF-18	extract	capsule	893	738	N.D.	N.D.
HFF-19	extract	capsule	11357	29151	N.D.	N.D.
HFF-20	extract	capsule	10085	12531	N.D.	N.D.
HFF-21	extract	capsule	5375	38350	N.D.	N.D.

* N.D.= Not Detected

화학물질이 다르다고 알려져 있다[17]. 당살초는 전 세계적으로 재배되며 수확 시기도 9월부터 2월까지라고 알려져 있다[26]. Pandey 등[27]에 의하면 당살초의 지리적 위치나 성장 환경에 따라 화학성분이 달라진다 보고하고 있다. 따라서 다양한 지역에서 재배되며 수확되는 당살초에 대해 두 개의 지표 성분 비율까지는 확정할 수 없으나 당살초 제품에서 두 개의 지표 성분이 모두 포함된 것을 확인하였다.

반면 KASP 마커를 이용해 분석한 결과에서는 21개의 제품 중에서 9개의 제품에서 FAM 양성으로 당살초가 검출되었다. HFF-1-8은 당살초 잎(gymnema sylvestre leaf)을 원료로 한 제품이며 HFF-9-21은 당살초가 함유되어 있다고 표기가 되어 있지만, 그 형태가 추출물이라고 명시되어있는 제품들이었다. 많은 문헌에서 추출물(extracts) 형태나 침출물(tinctures)의 허브 제품의 경우 고온과 고압 환경 등에 의해 DNA가 손상되어 유전자 분석의 한계라고 말하고 있다[28,29]. 따라서 HFF-9-21 제품은 LC-MS/MS 분석을 통해서 제품 내 당살초를 확인했지만, 제품 공정과정에 DNA가 파괴되 유전자 분석은 불가능한 검사대상물들이라고 판정하였다. KASP를 이용한 식품 중 당살초 검출을 위한 분석법의 적용성에서는 DNA 상태가 절대적인 영향을 미쳤다. 재배환경, 수확 시기 등에 상관없이 당살초에 대한 판별력이 뛰어나지만, 일부 제품에서는 공정과정 속 DNA 손상 때문에 판별력이 낮아지는 단점을 보였다.

아직 당살초에 관해서 많은 연구가 수행되지 않았으며, 식물에 따라서는 같은 종이여도 김네마속에는 40가지의 식물들이 있고 이 중 일부는 당살초와 같은 약리효과를 가진다고 보고되고 있다[30,31]. 따라서 본 연구에서 개발한 분석법을 이용하여 김네마속 식물들에 대하여 적용하여야 될 것으로 판단된다. 본 분석법으로 당살초 제품류에 적용하였을 때 이화학 지표성분과 유전자 검출이 가능한 제품군류가 다수였기 때문에, 당살초의 식품의 내의 불법 혼입 또는 불법 유통을 방지하는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처의 연구개발비

(18181부분연422)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

당살초(*Gymnema sylvestre*)는 다이어트와 당뇨에 효과가 있다고 알려지면서 미국, 일본, 인도에서 다양한 제품들이 판매, 유통되고 있다. 하지만 권장용량이 불분명하고 안전성이 입증되지 않았다. 따라서 식품에서 당살초를 확인할 수 있는 분석법 개발이 필요하다. 이 연구에서는 LC-ESI-MS/MS와 KASP 마커를 이용해 식품 속에서 당살초를 확인할 수 있는 분석법을 마련하였다. LC-ESI-MS/MS에서는 negative 이온화 모드에서 gymnemic acid 와 deacylgymnemic acid를 동시 분석법을 최적화 하였으며 고체시료와 액체시료에 대한 유효성 검증 마쳤다. 또한 염기서열 분석을 통해서 ITS2와 matK에서 당살초 특이적인 SNP를 찾아 KASP 마커를 제작하였다. 제작한 2개의 KASP 마커는 당살초와 결합해 FAM 형광 양성을 나타내며 당살초 원물에서 이러한 양상을 확인하였다. 인터넷을 통해 구매한 21개의 당살초 함유 식품 및 건강기능식품에 대해 적용성 검토를 진행하였다. LC-ESI-MS/MS에서 gymnemic acid 와 deacylgymnemic acid의 비율 차이는 있지만 21개의 제품 모두에서 지표성분이 검출되었다. KASP 분석에서는 9개의 제품에서 FAM 양성이 나타났으며 분석이 되지 않은 제품들은 추출물인 것으로 밝혀졌다. 이 연구는 LC-ESI-MS/MS와 KASP를 이중 시스템으로 당살초를 분석한 첫 번째 연구이며, 2개의 분석법이 식품에서 당살초 판별에 적용되는 것을 확인하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Boreum Park https://orcid.org/0000-0003-4082-8956
Sun Hee Lee https://orcid.org/0000-0002-8431-0289
Kwonyong Eom https://orcid.org/0000-0003-3538-8407
Eunyoung Noh https://orcid.org/0000-0003-0731-4419
Kyoung Moon Han https://orcid.org/0000-0002-7202-0591
Jin Woo Hwang https://orcid.org/0000-0003-0623-5305
Hyungil Kim https://orcid.org/0000-0002-8119-8674
Sun Young Baek https://orcid.org/0000-0002-7018-8323

References

1. Kanetkar, P., Singhal, R., Kamat, M., *Gymnema sylvestre*: a memoir. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **41**, 77-81 (2007).
2. Gupta, P., Sujata, G.S., Pratibha, S.P., A miracle fruit plant–*Gymnema sylvestre R. Br. (Retz)* Pharmacieglobale. *Int. J. Comprehens. Pharm.*, **3**, 1-12 (2012).
3. Marakis, G., Ziegenhagen, R., Lampen, A., Hirsch-Ernst, K.I., Risk assessment of substances used in food supplements:the example of the botanical *Gymnema sylvestre*. *EFSA J.*, **16,** e16083 (2018).
4. Ministry of Food and Drug Safety, (2022, February 21). Food Code; Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp? idx=9.
5. Yoshikawa, K., Amimoto, K., Arihara, S., Matsuura, K., Structure studies of new antisweet constituents from *Gymnema sylvestre*. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1103-1106 (1989).
6. Yoshikawa, K., Amimoto, K., Arihara, S., Matsuura, K., Gymnemic acid V, VI and VII from gur-ma, the leaves of *Gymnema sylvestre* R.Br.. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 852-854 (1989).
7. Yoshikawa, K., Nakagawa, M., Yamamoto, R., Arihara, S., Matsuura, K., Antisweet natural products. V. Structures of gymnemic acids VIII-XII from *Gymnema sylvestre R.Br.*. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1779-1782, (1992).
8. Lee, Y.C., Park, J.S., Kim, S.D., Yang, H.R., Kim, E.H., Yi, Y.J., Cho, S.J., Jo, H.B., Kim, H.J., Chae, Y.Z., Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids added to foods as adulterants using LC-ESI-tandem mass spectrometry. *J. Fd. Hyg. Safety*, **28**, 247-251 (2013).
9. Kress, W. J., Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *J. Syst. Evol.,* **55**, 291-307 (2017).
10. Nair, S., Keshavachandran, R., Molecular diversity in chakkarakolli (*Gymnema sylvestre R. Br.*) assessed through isozyme and RAPD analysis. *Trop. Agric.* **44,** 31-36 (2006).
11. Osman, M.A., Dhawan, S.S., Bahl, J.R., Darokar, M.P., Khanuja, S.P.S, AFLP marking and polymorphism among progenies of *Gymnema sylvestre:* an important medicinal Plant of India. *Nat. Prod. Commun.*, **6**, 1679-1682 (2011).
12. Shahnawaz, M., Zanan, R.L., Wakte, K.V., Mathure, S.V., Kad, T.D., Deokule, S.S., Nadaf, A.B., Genetic diversity assessment of *Gymnema sylvestre (Retz.)R. Br. ex Sm.* populations from Western Ghats of Maharashtra, India. *Genet. Resour. Crop. Evol.* , **59,** 125-134 (2012).
13. Krishna, R.B., Reddy, reddy S.R., Vijayalaxmi, M., Anugna, K., Divyavani, N., Reddy, K.J., Molecular characterization of 17 accessions of *Gymnema sylvestre R. Br.* using rapd markers. *Int. J. of Pharma Bio Sci.*, **3**, B126-135 (2012).
14. Saeed T, Shahzad A, Ahmad N, Parveen S, High frequency conversion of non-embryogenic synseeds and assessment of genetic stability through ISSR markers in *Gymnema sylvestre*. *Plant Cell Tiss. Org.*, **134**, 163-168 (2018).
15. Kalariya K.A., Meena R.P., Poojara L, Shahi D, Patel S, Characterization of squalene synthase gene from *Gymnema sylvestre R. Br.*. *Beni Suef Univ. J. basic Appl. Sci*, **10,** 6 (2021).
16. Winfield, M., Burridge, A., Ordidge, M., Harper, H., Wilkinson, P., Thorogood, D., Copas, L., Edwards, K., Barker, G., Development of a minimal KASP marker panel for distin-

guishing genotypes in apple collections, *PLoS ONE*, **15,** e0242940 (2020).
17. Steele, K., Tulloch, M.Q., Burns, M., Nader, W., Developing KASP markers for identification of basmati rice varieties. *Food Anal. Method*, **14**, 663-673 (2021).
18. Zhao, S., Li, A., Li, C., Xia, H., Zhao, C., Zhang, Y., Hou, L., Wang, X.J., Development and application of KASP marker for high throughput detection of AhFAD2 mutation in peanut. *Electron J. Biotechn.*, **25**, 9-12 (2017).
19. Grimm, K.D.S., Porter, L.D., Development and Validation of KASP markers for the identification of pea seedborne mosaic virus pathotype P1 resistance in *Pisum sativum*. *Plant Dis.,* **1004**, 1824-1830 (2020).
20. Food and Drug Administration. "Guidelines for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics, and veterinary products." Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 1-39 (2019).
21. Guideline, ICH Harmonised Tripartite. "Validation of analytical procedures: text and methodology." Q2 (R1) (2005).
22. Validation of Compendial Procedures <1225>, The United States Pharmacopeia, 32th Rev., and The National Formulary, 27th Rev., Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention Inc., (2009).
23. Center, Cold Spring Harbor DNA Learning. "Using DNA barcodes to identify and classify living things." DNA Learning Center (2014).
24. Dateo, G.P. and Long, L., Gymnemic acid, the antisaccharine principle of *Gymnema sylvestre*. Studies on isolation and heterogenesity of gymnemic acid A1. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 899-903 (1973).
25. Khramov, V.A., Spasov, A.A., Samokhina, M.P., Chemical composition of dry extracts of *Gymnema sylvestre* leaves. *Pharm. Chem. J.*, **42**, 30-32 (2008).
26. Tiwari, P., Mishra, B.N., Neelam, S., Sangwan, N.S., Phytochemical and pharmacological properties of *Gymnema sylvestre*: An important medicinal plant, Hindawi Publishing Corporation. *BioMed. Res. Int.*, **2014**, 18 (2014).
27. Pandey, A.K., Yadav, S., Variation in gymnemic acid content and non-destructive harvesting of *Gymnema sylvestre* (Gudmar). *Pharmacogn. Res.,* **2,** 309-312 (2010).
28. Baker, D.A., Dennis, Wm. Stevenson, Little DP, DNA barcode identification of black cohosh herbal dietary supplements. *J. AOAC Int.*, **95**, 1023-1034 (2012).
29. Masada-Atsumi, S., Onuma, M., Suenaga, E., Maruyama, T., Hishida, A., Kiuchi, F., Kobayashi, S., Goda, Y., Jakamatsuka, T., Genome-based authentication of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*; Ranunculaceae) supplements available in the Japanese markets. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **20**, 178-189 (2013).
30. K. Shimizu, M. Ozeki, A. Iino, S. Nakajyo, N. Urakawa, and M.Atsuchi, "Structure-activity relationships of triterpenoid derivativesextracted from *Gymnema inodorum* leaves on glucoseabsorption." *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 223-229 (2001).
31. Xie, J.T., Wang, A., Mehendale S., Wu J., Aung, H.H., Dey, L., Qiu, S., Yuan, C.S., Anti-diabetic effects of *Gymnema yunnanense* extract." *Pharmacol. Res.*, **47**, 323-329 (2003).