



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년06월19일  
 (11) 등록번호 10-1409848  
 (24) 등록일자 2014년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 G01N 33/50 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2014-0025220(분할)  
 (22) 출원일자 2014년03월03일  
 심사청구일자 2014년03월03일  
 (65) 공개번호 10-2014-0034891  
 (43) 공개일자 2014년03월20일  
 (62) 원출원 특허 10-2011-0064735  
 원출원일자 2011년06월30일  
 심사청구일자 2012년06월07일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR100905414 B1  
 KR100740582 B1  
 KR1020100087092 A  
 KR1020070027532 A

(73) 특허권자  
 한국생명공학연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (72) 발명자  
 오세량  
 대전 유성구 과학로 125, (어은동)  
 이형규  
 대전 유성구 과학로 125, (어은동)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

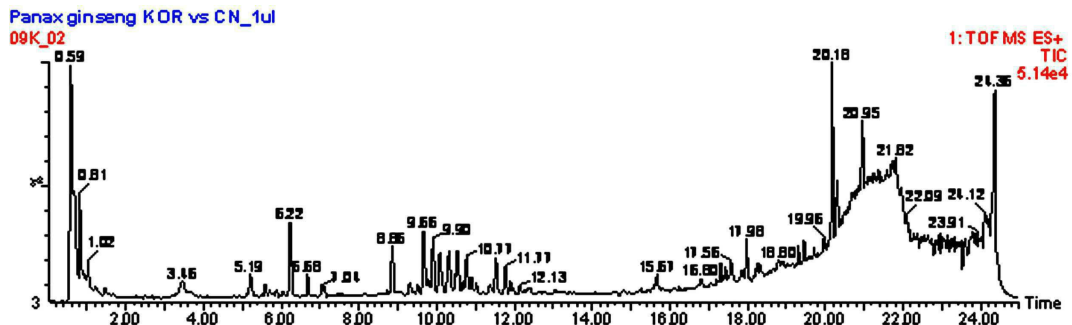
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **가공인삼의 원산지 또는 연령 판별용 표준 마커, 이의 확립방법 또는 이를 이용한 원산지 또는 연령 판별방법**

**(57) 요약**

본 발명은 가공인삼의 원산지 또는 연령 판별용 표준 마커, 이의 확립방법 또는 이를 이용한 원산지 또는 연령 판별방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 국내산 가공인삼 즉, 백삼과 홍삼에서 표준 마커를 확립하고, 상기 마커를 이용하여 산지 또는 연령의 식별이 쉽지 않은 농축액, 분말 등의 가공인삼의 산지 또는 연령을 신속하게 비교 분석이 가능하므로 수출입 시, 가공인삼의 산지 또는 연령 판별에 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**송혁환**

대전 유성구 과학로 125, (어은동)

**김두영**

대전 유성구 과학로 125, (어은동)

**김정환**

서울 서초구 서운로 207, 4동 204호 (서초동, 삼호  
아파트)

**김정희**

대전 유성구 과학로 125, (어은동)

**안경섭**

대전 유성구 과학로 125, (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM0491113

부처명 교육과학기술부

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 만성질환 치료용 전임상 후보물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

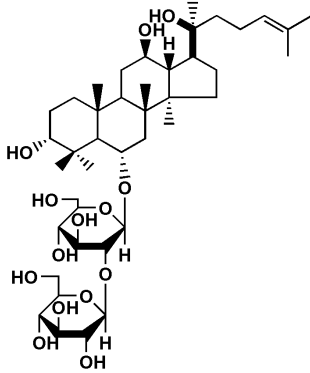
---

**특허청구의 범위**

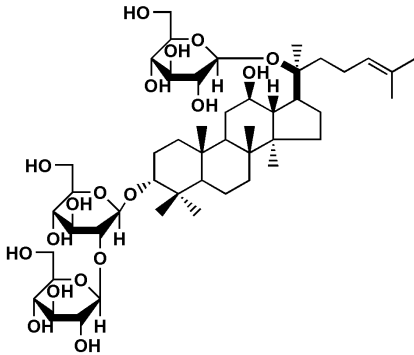
**청구항 1**

하기 화학식 3 또는 4로 표시되는 화합물을 포함하는, 국내산 홍삼과 중국산 홍삼의 산지 판별용 마커 조성물.

[화학식 3]



[화학식 4]



**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 국내산 홍삼의 산지 판별용 마커인 것을 특징으로 하는 국내산 홍삼과 중국산 홍삼의 산지 판별용 마커 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 화학식 4로 표시되는 화합물은 중국산 홍삼의 산지 판별용 마커인 것을 특징으로 하는 국내산 홍삼과 중국산 홍삼의 산지 판별용 마커 조성물.

**청구항 4**

국내산 홍삼과 중국산 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 LC-MS로 분석된 결과를 통계 처리 가능한 수치로 변환하고, 변환된 수치를 다변량 분석법으로 분석하여 얻은 데이터부터 그룹간의 차이를 보이는 성분을 검출하고, 가장 차이가 큰 성분을 선별하여 산지에 따른 표준 마커로서 확립하는 단계(단계 3)를 포함하는 제1항의 홍삼 산지 판별용 마커의 확립방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 단계 3의 다변량 분석법은 직교 최소자승 분석법인 것을 특징으로 하는 홍삼의 산지 판별용 마커의 확립방법.

**청구항 6**

제4항에 있어서, 상기 단계 3의 다변량 분석법으로 분석하여 얻은 데이터는 스코어 스캐터 플롯인 것을 특징으로 하는 홍삼의 산지 판별용 마커의 확립방법.

**청구항 7**

피검 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 분석 결과를 제1항의 화학식 3 또는 4의 산지 판별 마커와 비교하는 단계(단계 3)를 포함하는 홍삼의 산지 판별방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 가공인삼의 원산지 또는 연령 판별용 표준 마커, 이의 확립방법 또는 이를 이용한 원산지 또는 연령 판별방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 종래 농산물의 원산지판별을 위하여 최근에는 비파괴기술인 근적외선 분광법, 전자코, X-선 형광분석법 등이 많이 사용되고 있으며, 특히 근적외선 분광법을 이용한 비파괴 기술은 과채류의 당도, 곡류의 함수율, 아밀로오스의 함량, 우유와 유제품의 지방, 단백질 및 고형분함량 분석에 많이 응용되고 있으며, 농산물의 품종이나 원산지를 판별하기 위하여 전기영동, HPLC 분석법 등과 같은 기존의 단백질분석법을 활용할 수 있으나 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있어 현장에서의 적용에 어려움이 있었다. 그러나 최근, 기존의 분석법보다 분석시간이 짧고 분리능(resolution)이 높아 분석에 필요한 시간 및 시료량을 최소화할 수 있으며 양적 디지털 분석이 가능한 새로운 기법으로서 CE 크로마토그램이 적용되기 시작했으나 아직까지 곡류, 특히 밀의 품종 판별에 주로 활용되고 있다(비특허문헌 1).

[0003] 이에, 가공인삼, 비가공인삼 등을 포함한 다양한 농산물의 산지나 재배조건에 따라 발생하는 품질의 차이를 효율적으로 구분하고 WTO 체제에 의한 농산물의 산지표시 강화 및 제도화에 부응하기 위한 과학적 판별방법 개발이 시급히 요구되며 부정 유통되는 수입산 농산물이 날로 증가하고 있으므로 현장 단속 과정에서 수거된 이들 농산물의 원산지 검정을 위한 과학적인 식별방법 개발이 요구된다.

[0004] 인삼(panax ginseng C.A. Meyer)은 약용식물로서의 수천 년 전부터 사용되어 왔으며, 인삼은 오랫동안 자기 환경에 알맞게 진화해왔다. 조금씩 자기가 처한 환경에서 잘 살 수 있도록 적응해 왔으며 그 환경에 맞게 자신을 변화시켜 왔고, 인삼은 가공 방법에 따라 수삼, 백삼, 홍삼 등으로 구분하고, 채굴된 자연 상태의 인삼을 수삼이라고 하며, 수삼의 껍질을 벗긴 뒤 햇빛이나 열풍에 건조시킨 것을 백삼(white ginseng)이라고 한다. 또한, 백삼을 껍질을 벗기지 않은 상태로 증기로 찌서 건조한 것을 홍삼(red ginseng)이라 한다.

[0005] 인삼은 세계적으로 한국산 고려인삼이 가장 우수한 것으로 예부터 알려져 왔다. 그러나 최근 해외시장에서는 값싼 중국산과 미국과 캐나다산 인삼에 국제시장을 잠식당하고 있는 실정으로, 최근 중국산 인삼이 밀무역으로 국

내시장에 들어와 국내 재배 인삼의 입지를 어렵게 하고 있는 실정이고(비특허문헌 2), 또한, 해외 인삼의 경우 3-4년생 인삼을 채굴하기 때문에 연근판별에 큰 의미를 두지 않으나, 국내의 경우 고년근일수록 약효가 뛰어나다는 관습적 믿음에 따라 고년근일수록 가격이 비싼 특성 때문에 유통시장에서 저년근을 6년 근으로 위장하는 사례가 빈번하여 유통질서가 교란되고 소비자 신뢰도가 떨어지는 원인이 되고 있기에 인삼의 연근판별이 큰 문제점이 되고 있는 실정이다.

[0006] 현재 농림부령 연근판별 검사기준은 수확시 검사담당직원이 입회하여 연근을관정하며, 세부기준으로는 머리, 몸통 및 포피 형태, 다리 발달정도, 절단시 나이테 등을 육안 또는 발색시켜 판별(농림부, 인삼산업법, 법률 제8조, 2004)하도록 되어있는데, 재배 이력이 확인되는 현장에서 보조적인 판별법으로 사용되지만 관능평가 수준이라 논란의 여지가 많고, 더욱이 재배이력이 불분명한 유통시장에서는 적용하기 힘든 실정이라고 할 수 있다. 그동안 연구 보고된 연근판별법으로는 뇌두경혼(비특허문헌 3), 나이테(비특허문헌 4 및 비특허문헌 5), 지근발달(비특허문헌 6), 기계건조법(비특허문헌 4), 분비도관 조직염색(비특허문헌 7), 진세노사이드 함량(비특허문헌 8) 분석법 등이 보고된 바 있으나 분비도관 조직염색법이 정확한 판별법으로 평가되고, 그 외 방법들은 신뢰도가 낮아 보조적으로 활용되는 수준이다. 그러나 분비도관 조직염색법은 주근의 뿌리 단면으로 판별하기 때문에 재배인삼의 경우에 한정되고 인삼분말에는 적용 불가능하고, 가공된 홍삼의 경우에는 적용하기 힘든 방법이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하고자 국내산 가공인삼과 중국산 가공인삼의 산지 또는 연근 판별법을 연구하던 중, 국내산 가공인삼과 중국산 가공인삼에서 표준 마커를 분리 및 분석하여 선별하고, 이를 이용하여 산지를 판별하거나 연근을 판별할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

**선행기술문헌**

**비특허문헌**

- [0008] (비특허문헌 0001) 김남수, "국산 및 수입농산물(가공식품)의 판별기술과 안전성 평가기술 개발" 연구과제보고서, 2003;
- (비특허문헌 0002) 서동상, "한국산 장뇌산삼과 중국산 장뇌삼의 분류체계 확립 및 효능에 관한 연구" 연구과제보고서, 2007;
- (비특허문헌 0003) J. Ginseng Res. vol.31, 142-146, 2007;
- (비특허문헌 0004) J. Ginseng Res. vol 30, 153-157, 2006;
- (비특허문헌 0005) 인삼연구보고서-재배편, 한국인삼연초연구소 p331, 1987;
- (비특허문헌 0006) 인삼연구보고서-재배편, 한국인삼연초연구소 p175, 1988;
- (비특허문헌 0007) J. Ginseng Res. vol 25, 101-105, 2001;
- (비특허문헌 0008) Can. J. Plant Sci. vol 76, p 855 1996.

**발명의 내용**

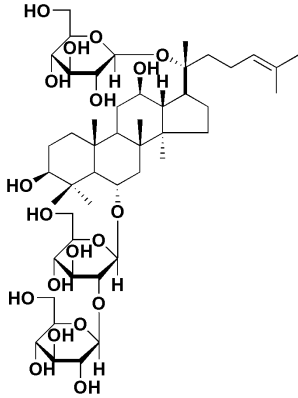
**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명의 목적은 백삼의 산지판별에 사용되는 백삼 산지 판별용 마커를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 백삼의 산지 판별방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 홍삼의 산지판별에 사용되는 홍삼 산지 판별용 마커를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 홍삼의 산지 판별방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 홍삼의 연령 판별에 사용되는 홍삼 연령 판별용 마커를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 홍삼의 연령 판별방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

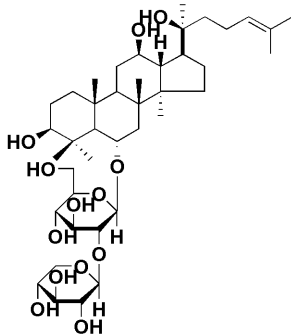
[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 국내산 백삼과 중국산 백삼의 산지관별에 사용되는 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 백삼의 산지 관별용 마커를 제공한다:

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] [화학식 2]



[0019]

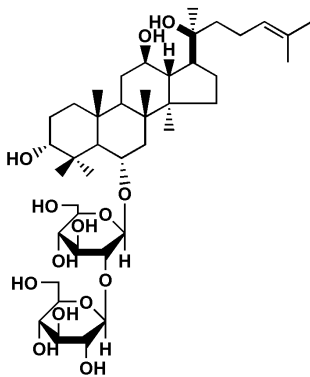
[0020] 또한, 본 발명은 피검 백삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

[0021] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

[0022] 상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 분석 결과를 상기 화학식 1 또는 2의 산지 관별용 마커와 비교하는 단계(단계 3)를 포함하는 백삼의 산지 관별방법을 제공한다.

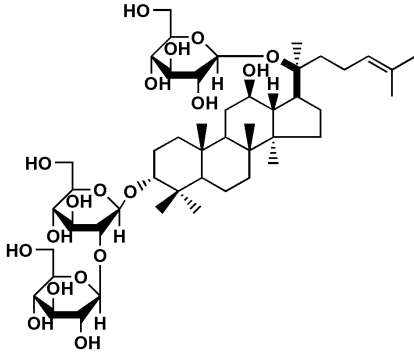
[0023] 나아가, 본 발명은 국내산 홍삼과 중국산 홍삼의 산지관별에 사용되는 하기 화학식 3 또는 4로 표시되는 홍삼의 산지 관별용 마커를 제공한다:

[0024] [화학식 3]



[0025]

[0026] [화학식 4]



[0027]

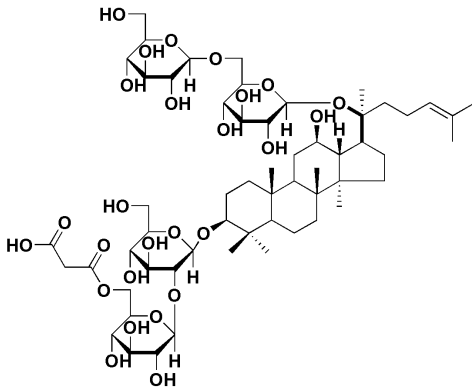
[0028] 또한, 본 발명은 피검 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

[0029] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

[0030] 상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 분석 결과를 상기 화학식 3 또는 4의 산지 판별 마커와 비교하는 단계(단계 3)를 포함하는 홍삼의 산지 판별방법을 제공한다.

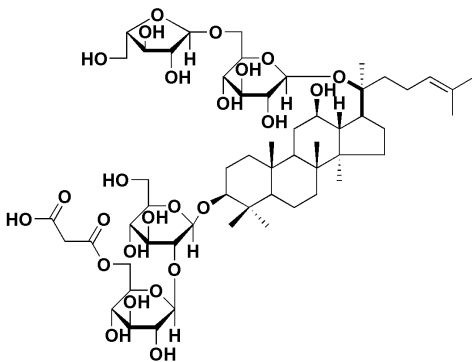
[0031] 나아가, 본 발명은 국내산 4년근 홍삼과 6년근 홍삼의 연근판별에 사용되는 하기 화학식 5 내지 11로 표시되는 홍삼의 연령 판별용 마커를 제공한다:

[0032] [화학식 5]



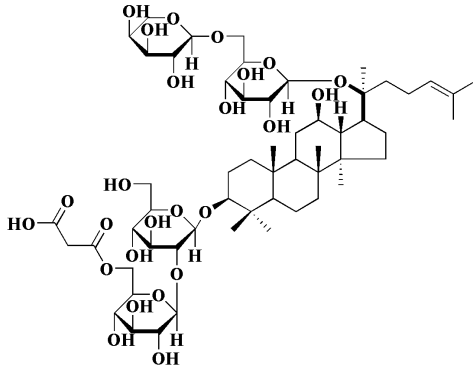
[0033]

[0034] [화학식 6]



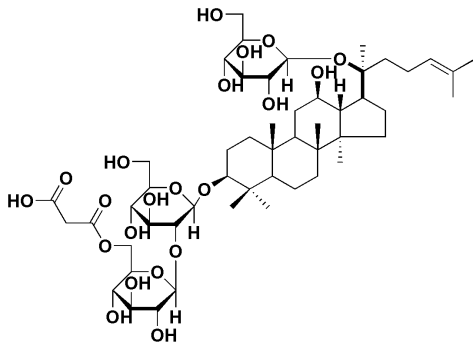
[0035]

[0036] [화학식 7]



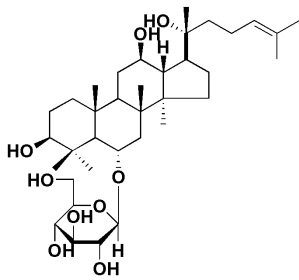
[0037]

[0038] [화학식 8]



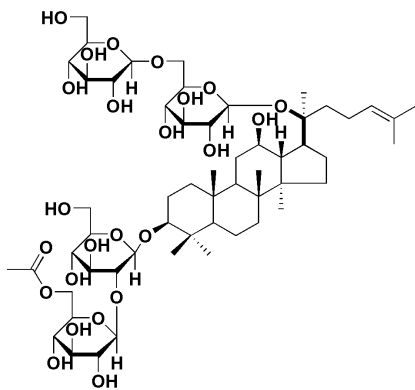
[0039]

[0040] [화학식 9]



[0041]

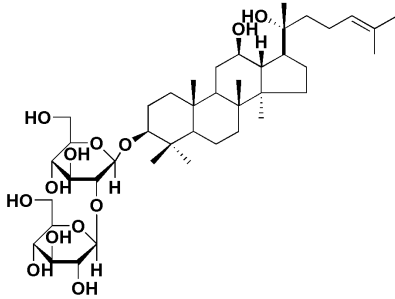
[0042] [화학식 10]



[0043]



[0044] [화학식 11]



[0045]

[0046] 또한, 본 발명은 피검 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

[0047] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

[0048] 상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 분석 결과를 상기 화학식 5 내지 11로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 연령 판별용 마커와 비교하는 단계(단계 3)를 포함하는 홍삼의 연령 판별방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0049] 본 발명에 의하면, 국내산 가공인삼 즉, 백삼과 홍삼에서 표준 마커를 확립하고, 상기 마커를 이용하여 산지 또는 연령의 식별이 쉽지 않은 농축액, 분말 등의 가공인삼의 산지 또는 연령을 신속하게 비교 분석이 가능하므로 수출입 시, 가공인삼의 산지 또는 연령 판별에 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0050]

도 1은 본 발명의 실시예의 국내산 백삼 추출물의 이온 크로마토그램을 나타내는 도면이다.

도 2는 본 발명의 실시예의 중국산 백삼 추출물의 이온 크로마토그램을 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명의 실시예의 국내산 백삼 추출물과 중국산 백삼 추출물의 스코어 스캐터 플롯을 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명의 실시예의 국내산 백삼 추출물과 중국산 백삼 추출물의 최소 직교자승분석의 S 플롯을 나타내는 도면이다.

도 5는 본 발명의 실시예의 (a)국내산 백삼 추출물과 (b)중국산 백삼 추출물의 박스 플롯을 나타내는 도면이다.

도 6은 실시예의 국내산 백삼 추출물의 질량 토막내기 방식을 나타내는 도면이다.

도 7은 실시예의 중국산 백삼 추출물의 질량 토막내기 방식을 나타내는 도면이다.

도 8은 본 발명의 실시예의 국내산 홍삼 추출물의 이온 크로마토그램을 나타내는 도면이다.

도 9는 본 발명의 실시예의 중국산 홍삼 추출물의 이온 크로마토그램을 나타내는 도면이다.

도 10은 본 발명의 실시예의 국내산 홍삼 추출물과 중국산 홍삼 추출물의 스코어 스캐터 플롯을 나타내는 도면이다.

도 11은 본 발명의 실시예의 국내산 홍삼 추출물과 중국산 홍삼 추출물의 최소 직교자승분석의 S 플롯을 나타내는 도면이다.

도 12는 본 발명의 실시예의 (a)국내산 홍삼 추출물과 (b)중국산 홍삼 추출물의 박스 플롯을 나타내는 도면이다.

도 13은 실시예의 국내산 홍삼 추출물의 질량 토막내기 방식을 나타내는 도면이다.

도 14는 실시예의 중국산 홍삼 추출물의 질량 토막내기 방식을 나타내는 도면이다.

도 15는 본 발명의 실시예의 국내산 4년근 홍삼 추출물의 이온 크로마토그램을 나타내는 도면이다.

도 16은 본 발명의 실시예의 국내산 6년근 홍삼 추출물의 이온 크로마토그램을 나타내는 도면이다.

도 17은 본 발명의 실시예의 국내산 4년근 홍삼 추출물과 6년근 홍삼 추출물의 스코어 스캐터 플롯을 나타내는 도면이다.

도 18은 본 발명의 실시예의 국내산 4년근 홍삼 추출물과 6년근 홍삼 추출물의 최소 직교자승분석의 S 플롯을 나타내는 도면이다.

도 19는 본 발명의 실시예의 국내산 4년근 홍삼 추출물의 박스 플롯을 나타내는 도면이다.

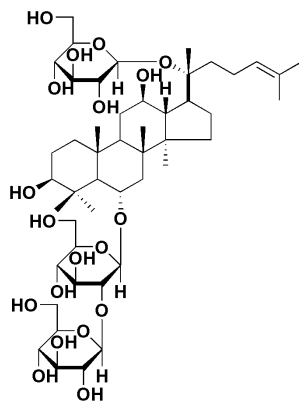
도 20은 본 발명의 실시예의 국내산 6년근 홍삼 추출물의 박스 플롯을 나타내는 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0051] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

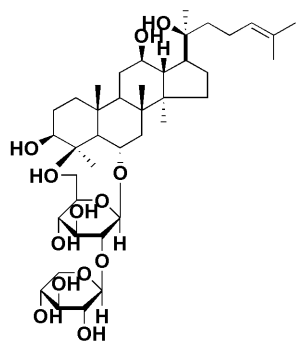
[0052] 본 발명은 국내산 백삼과 중국산 백삼의 산지관별에 사용되는 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 백삼의 산지 판별용 마커를 제공한다:

**화학식 1**



[0053]

**화학식 2**



[0054]

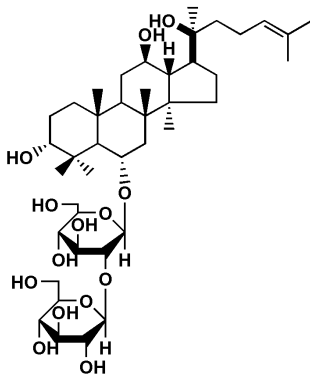
[0055] 이때, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 국내산 백삼의 산지 판별용 마커이고, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 중국산 백삼의 산지 판별용 마커이다.

[0056] 본 발명에 따른 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 백삼의 산지 판별용 마커는 국내산 백삼과 중국산 백삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

[0057] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

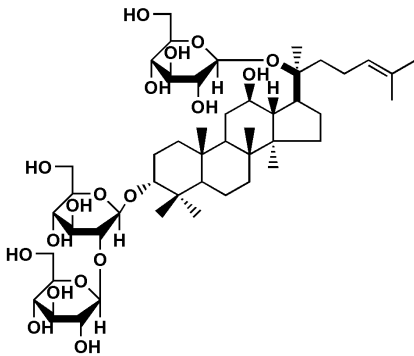
- [0058] 상기 단계 2에서 LC-MS로 분석된 결과를 통계 처리 가능한 수치로 변환하고, 변환된 수치를 다변량 분석법으로 분석하여 얻은 데이터부터 그룹간의 차이를 보이는 성분을 검출하고, 가장 차이가 큰 성분을 선별하여 산지에 따른 표준 마커로서 확립하는 단계(단계 3)를 포함하는 방법으로 확립될 수 있다.
- [0059] 구체적으로, 본 발명에 따른 단계 1은 국내산 백삼과 중국산 백삼으로부터 대사체를 추출하는 단계로써, 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub> 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하고, 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 더욱 바람직하며, 70% 메탄올을 이용하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있으며, 초음파추출 방법으로 1회 내지 5회 추출하는 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출온도는 20 내지 30 °C인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0060] 또한, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계로써, 컬럼크로마토그래피는 30-40 °C에서 사용하였으며, 이때 사용가능한 이동상 A는 물과 포름산(100:0.1, v/v)이고, 이동상 B는 아세토니트릴(acetonitril) 및 포름산(100:0.1, v/v)로 하여 사용하였다. 이동상의 유속량은 0.4ml/분 그리고 시료 주입량은 국내산 백삼 추출액과 중국산 백삼 추출액 시료를 각각 1 µl를 취하여 측정 에 사용할 수 있다. 또한, 질량분석기는 사중극자 직교 가속 비행시간 텐덤 질량 분석기를 사용할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0061] 나아가, 상기 단계 3은 LC-MS로 분석된 결과를 통계 처리 가능한 수치로 변환하고, 변환된 수치를 다변량 분석법으로 분석하여 데이터부터 그룹간의 차이를 보이는 성분을 검출한 다음 가장 차이가 큰 성분을 선별하여 산지에 따른 표준 마커로서 국내산 백삼 표준마커와 중국산 백삼의 표준 마커를 확립하는 단계로써, 이때 사용된 상기 다변량 분석법은 직교 최소자승 분석법이고, 이러한 다변량 분석법으로 분석하여 얻은 데이터는 스코어 스캐터 플롯으로 표준 마커를 확인할 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명은
- [0063] 피검 백삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);
- [0064] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및
- [0065] 상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 분석 결과를 상기 화학식 1 또는 2의 산지 판별용 마커와 비교하는 단계(단계 3)를 포함하는 백삼의 산지 판별방법을 제공한다.
- [0066] 상기 백삼의 산지 판별방법은 산지 식별이 어려운 농축액, 분말 등의 백삼 산지를 표준 마커를 이용하여 신속하게 비교가 가능하므로 수출입 시, 백삼의 산지 판별에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0067] 나아가, 본 발명은 국내산 홍삼과 중국산 홍삼의 산지판별에 사용되는 하기 화학식 3 또는 4로 표시되는 홍삼의 산지 판별용 마커를 제공한다:

화학식 3



[0068]

화학식 4



[0069]

[0070] 이때, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 국내산 홍삼의 산지 판별용 마커이고, 상기 화학식 4로 표시되는 화합물은 중국산 홍삼의 산지 판별용 마커이다.

[0071] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 3 또는 4로 표시되는 홍삼의 산지 판별용 마커는 국내산 홍삼과 중국산 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

[0072] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

[0073] 상기 단계 2에서 LC-MS로 분석된 결과를 통계 처리 가능한 수치로 변환하고, 변환된 수치를 다변량 분석법으로 분석하여 얻은 데이터로부터 그룹간의 차이를 보이는 성분을 검출하고, 가장 차이가 큰 성분을 선별하여 산지에 따른 표준 마커로서 확립하는 단계(단계 3)를 포함하는 방법으로 확립될 수 있다.

[0074] 구체적으로, 상기 단계 1 내지 3은 상기 백삼의 산지 판별방법과 동일한 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0075] 또한, 본 발명은

[0076] 피검 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);

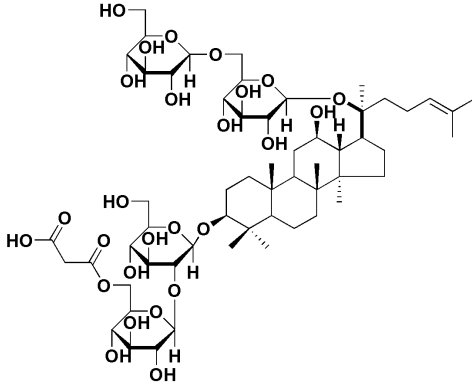
[0077] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및

[0078] 상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 분석 결과를 상기 화학식 3 또는 4의 산지 판별 마커와 비교하는 단계(단계 3)를 포함하는 홍삼의 산지 판별방법을 제공한다.

[0079] 상기 홍삼의 산지 판별방법은 산지 식별이 어려운 농축액, 분말 등의 홍삼 산지를 표준 마커를 이용하여 신속하게 비교가 가능하므로 수출입 시, 홍삼의 산지 판별에 유용하게 사용될 수 있다.

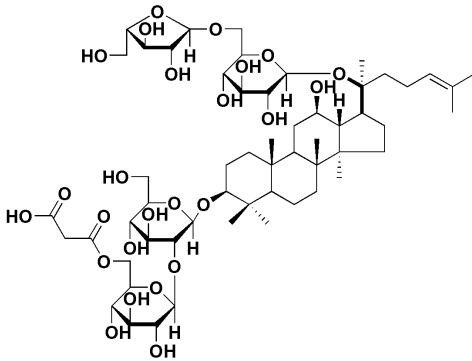
[0080] 나아가, 본 발명은 국내산 4년근 홍삼과 6년근 홍삼의 연근판별에 사용되는 하기 화학식 5 내지 11로 표시되는 홍삼의 연령 판별용 마커를 제공한다:

**화학식 5**



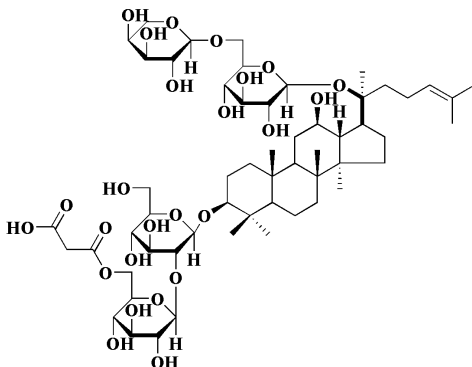
[0081]

**화학식 6**



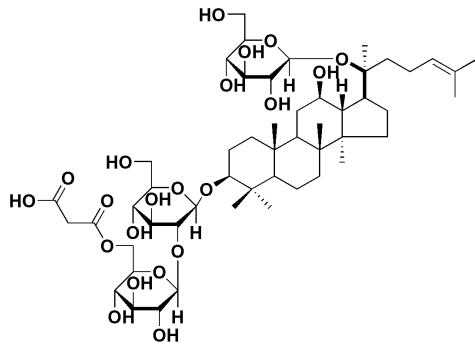
[0082]

**화학식 7**



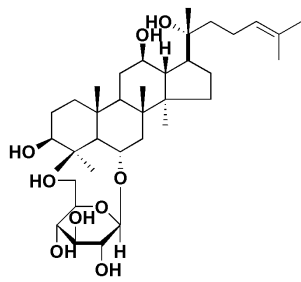
[0083]

화학식 8



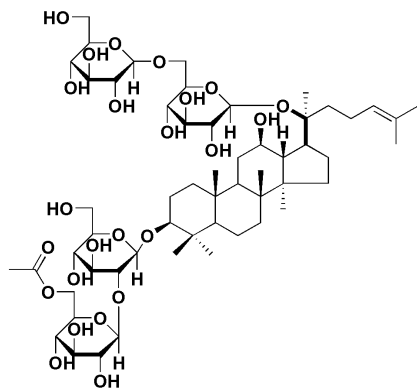
[0084]

화학식 9



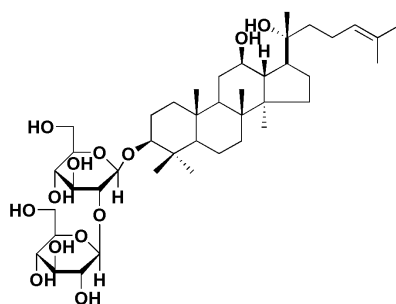
[0085]

화학식 10



[0086]

화학식 11



[0087]

- [0088] 이때, 상기 화학식 5 내지 8로 표시되는 화합물은 4년근 홍삼의 연령 판별용 마커이고, 상기 화학식 9 내지 11로 표시되는 화합물은 6년근 홍삼의 연령 판별용 마커이다.
- [0089] 본 발명에 따른 상기 화학식 5 내지 11로 표시되는 홍삼의 연령 판별용 마커는 국내산 4년근 홍삼과 6년근 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);
- [0090] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및
- [0091] 상기 단계 2에서 LC-MS로 분석된 결과를 통계 처리 가능한 수치로 변환하고, 변환된 수치를 다변량 분석법으로 분석하여 얻은 데이터부터 그룹간의 차이를 보이는 성분을 검출하고, 가장 차이가 큰 성분을 선별하여 홍삼의 연령에 따른 표준 마커로서 확립하는 단계(단계 3)를 포함하는 방법으로 확립될 수 있다.
- [0092] 구체적으로, 상기 단계 1 내지 3은 상기 백삼의 산지 판별방법과 동일한 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0093] 또한, 본 발명은
- [0094] 피검 홍삼으로부터 대사체를 추출하는 단계(단계 1);
- [0095] 상기 단계 1에서 추출된 대사체를 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)로 분석하는 단계(단계 2); 및
- [0096] 상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 분석 결과를 상기 화학식 5 내지 11로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 연령 판별용 마커와 비교하는 단계(단계 3)를 포함하는 홍삼의 연령 판별방법을 제공한다.
- [0097] 상기 홍삼의 연령 판별방법은 연령 식별이 어려운 농축액, 분말 등의 홍삼의 연령을 표준 마커를 이용하여 신속하게 비교가 가능하므로 수출입 시, 홍삼의 연령 판별에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0098] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0099] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0100] **<제조예 1> 가공 인삼의 준비**

[0101] 연근(연령)에 관계없이 한국과 중국 백삼의 산지 판별을 위하여 국내산 백삼 53점을 국내로부터 구입하고, 중국산 백삼 18점을 중국현지에서 국내에서 구입하고, 또한, 한국과 중국 홍삼의 산지 판별을 위하여 한국산 홍삼 50점을 국내에서 구입하고, 중국산 홍삼을 중국현지에서 국내에서 35점을 구입하여 실험에 사용하였다. 나아가, 홍삼의 4년근과 6년근의 연근 판별을 위하여 경기도 이천으로부터 4년 10뿌리와 6년 10뿌리의 인삼을 이용하여 홍삼으로 제조한 후, 연근판별에 사용하였다.

[0102] **<실시예 1> 백삼의 산지 판별용 표준 마커의 확립**

[0103] 국내산 백삼과 중국산 백삼의 산지 판별을 위한 마커를 확립하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0104] **단계 1: 백삼 대사체의 추출**

[0105] 상기 제조예 1에서 준비된 국내산 백삼과 중국산 백삼을 건조한 후, 각각을 분쇄하여 0.2 mg씩을 취한 후, 70% 메탄올 5 ml를 첨가하고, 350W의 초음파 분해 장치를 1시간 조사한 후, 추출액을 0.2 μm의 막여과기(membrane filter)(SUN-SRi, TN, USA)로 여과한 다음 추출액을 모았다.

[0106] **단계 2: 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용한 백삼 추출물의 분석**

[0107] 상기 단계 1에서 제조된 백삼 추출물의 대사체를 분석하기 위하여 UPLC는 워터스 에큐어티 UPLC 시스템을 이용하였으며, 컬럼은 에큐어티™ BEHC<sub>18</sub>(ACQUITY UPLC™ BEHC<sub>18</sub>)(10 mm×2.1 mm, i.d., 1.7 μm, waters, USA)을 35 °C에서 사용하였으며, 이동상 A는 물과 포름산(100:0.1, v/v)과 이동상 B는 아세토니트릴(acetonitril) 및 포름산(100:0.1,v/v)로 하여 초기에 이동상 B를 10%로부터 30%까지 7분까지 증가시킨 후, 44%로 14분까지, 100%로 21분까지 이동상 B를 증가시켜 분석 한 후, 이동상 B를 100%로 23.5분까지 유지시키고, 23.6분에 이동상 B를 10%로 낮춘 후 평형화 상태가 된 후 다음 분석에 사용하였다. 이동상의 유속량은 0.4ml/분 그리고 시료 주입량은 국내산 백삼 추출액과 중국산 백삼 추출액 시료를 각각 1 μl를 취하여 측정에 사용하였다.

[0108] Q-TOF 질량분석기는 워터스사의 사중극자 직교 가속 비행시간 텐덤 질량 분석기(quadrupole orthogonal acceleration time of-flight tandem mass spectrometer(Waters Q-TOF Premier™))를 사용하였다. 질량 분석기의 분석조건은 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

[0109]	이온 원(Ion source)	ESI+
	분무 기체(Nebulizer gas)	500 L/h
	분무 온도(Nebulizer Temperature)	350 °C
	콘 기체(Con gas)	50 L/h
	소스 온도(Source temperature)	100 °C
	모세관 전압(Capillary voltage)	2.7 kV
	콘 전압(Con Voltage)	27 V

[0110] 상기 국내산 백삼 추출물과 중국산 백삼 추출물의 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS)의 전체이온 크로마토그램(total ionchromatogram) 결과는 도 1 및 2에 나타내었다.

[0111] **단계 3: 통계 처리 가능한 수치로 변환 및 백삼 표준 마커의 확립**

[0112] 상기 단계 2에서 얻어진 LC-MS 데이터를 통계 처리 가능한 수치로 변환하기 위하여 워터스사의 마커링스 어플리케이션 매니저(MarkerLynx applications manager(ver. 4.1))를 이용하여 피크 발견(peak finding), 피크 정렬(peak alignment) 및 피크 여과(peak filtering)를 실행하였다. 상기 과정을 위하여 분석 데이터의 0.5분부터 19분까지를 이용하였고, 분석질량 범위는 200-1500 Da, 질량 오차허용범위는 0.02 Da, 매스 잡음(mass noise) 수준은 기초 피크 세기(base peak intensity)의 10%로 하였다. 이 과정을 통해 얻어진 모든 LC-MS 데이터에서 피크별로 머무름 시간(RT) 값과 매스값을 일치시키고 그에 따른 각 피크의 면적값을 얻은 후, 다변량분석(Multivariate statistical analysis)을 위하여 Simca-P+ ver. 12.0(Umetrics, Sweden) 소프트웨어를 이용하여 모든 데이터를 퍼-스케일(par-scaled(scaled to square root of SD))로 하여 국내산과 중국산 백삼을 그룹화하여 직교 최소자승분석(OPLS-DA)의 스코어 스캐터 플롯을 나타내었고, 직교 최소자승분석의 S 플롯(Simca-P+)을 얻어 두 산지간의 차이가 많은 성분들을 박스 플롯으로 나타내어 판별을 가능하게 하는 천연물 피크를 선별하고 이들의 질량 이온 크로마토그램[mass ion chromatogram, MassLynx(ver 4.1)]을 비교하여 유의성 있게 차이가 나는 성분을 질량 절단 방식(mass fragmentation pattern)으로 표준 마커를 선정하여 구조를 동정하였다. 그 결과를 도 3 내지 7에 나타내었다.

[0113] **결과**

[0114] (1) 상기 직교 최소자승분석의 스코어 스캐터 플롯 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 국내산 백삼과 중국산 백삼은 산지에 따라 두 그룹으로 분리되었다.

[0115] (2) 또한, 상기 직교 최소자승분석의 S 플롯 결과, 도 4 및 5에 나타낸 바와 같이, 5.21분의 963.5582의 질량을 가지는 성분과 9.30분의 771.4919의 질량을 가지는 성분이 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다(t-test; p>0.001).

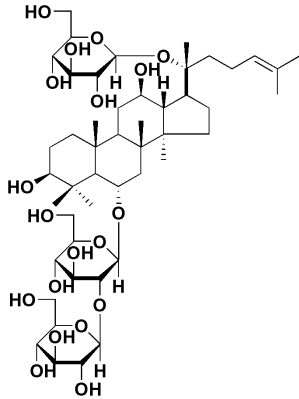
[0116] (3) 나아가, 질량 절단 방식(mass fragmentation pattern) 결과, 도 6 및 7에 나타낸 바와 같이, 국내산 백삼



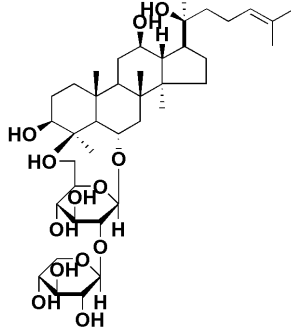
의 표준마커는 하기 화학식 1에 나타낸 바와 같이, 20-글루코진세노사이드 Rf(5.21분, M.W. 963.5582)로 확인되었으며, 중국산 백삼의 표준마커는 하기 화학식 2에 나타낸 바와 같이, 노토진세토사이드 R2(9.30분, M.W. 771.4919)로 확인되었다.

[0117]

[화학식 1]



[화학식 2]



[0118]

[0119] <실시예 2> 홍삼의 산지 판별용 표준 마커의 확립

[0120] 국내산 홍삼과 중국산 홍삼의 산지 판별을 위한 마커를 확립하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0121] 단계 1: 홍삼 대사체의 추출

[0122] 상기 제조예 1에서 준비된 국내산 홍삼과 중국산 홍삼을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0123] 단계 2: 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용한 홍삼 추출물의 분석

[0124] 상기 단계 1에서 제조된 홍삼 추출물의 대사체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0125] 상기 국내산 홍삼 추출물과 중국산 홍삼 추출물의 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS)의 전체이온 크로마토그램(total ionchromatogram) 결과는 도 8 및 9에 나타내었다.

[0126] 단계 3: 통계 처리 가능한 수치로 변환 및 홍삼 표준 마커의 확립

[0127] 상기 단계 2에서 얻은 결과를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0128] 결과

[0129] (1) 상기 직교 최소자승분석의 스코어 스캐터 플롯 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 국내산 홍삼과 중국산 홍삼은 산지에 따라 두 그룹으로 분리되었다.

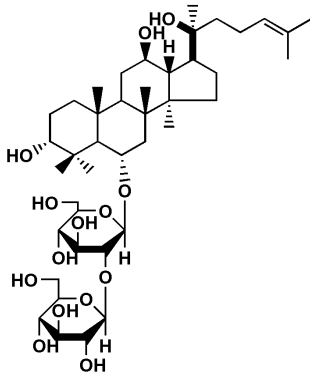
[0130] (2) 또한, 상기 직교 최소자승분석의 S 플롯 결과, 도 11 및 12에 나타낸 바와 같이, 9.04분의 801.4988의 질량을 가지는 성분과 11.70분의 767.4952의 질량을 가지는 성분이 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다(t-test; p>0.001).

[0131] (3) 나아가, 질량 절단 방식(mass fragmentation pattern) 결과, 도 13 및 14에 나타낸 바와 같이, 국내산 홍삼의 표준마커는 하기 화학식 3에 나타낸 바와 같이, 진세노사이드 Rf(9.04분, M.W. 801.4988)로 확인되었으며, 중국산 홍삼의 표준마커는 하기 화학식 4에 나타낸 바와 같이, 진세노사이드 Rd(11.70분, M.W. 767.4952)로 확

인되었다.

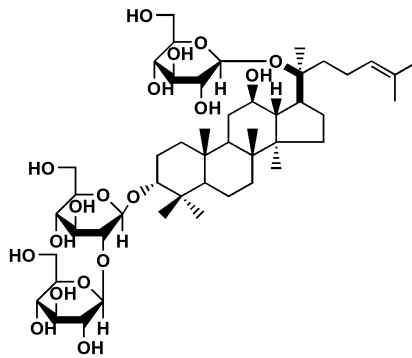
[0132]

[화학식 3]



[0133]

[화학식 4]



[0134]

**<실시에 6> 홍삼의 연령(4년근, 6년근) 판별용 표준 마커의 확립**

[0135]

국내산 4년근 홍삼과 6년근 홍삼의 산지 판별을 위한 마커를 확립하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0136]

**단계 1: 홍삼 대사체의 추출**

[0137]

상기 제조예 1에서 준비된 4년근 국내산 홍삼과 6년근 국내산 홍삼을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0138]

**단계 2: 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용한 홍삼 추출물의 분석**

[0139]

상기 단계 1에서 제조된 홍삼 추출물의 대사체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0140]

상기 국내산 4년근 홍삼 추출물과 6년근 홍삼 추출물의 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS)의 전체이온 크로마토그램(total ionchromatogram) 결과는 도 15 및 16에 나타내었다.

[0141]

**단계 3: 통계 처리 가능한 수치로 변환 및 홍삼 표준 마커의 확립**

[0142]

상기 단계 2에서 얻은 결과를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0143]

**결과**

[0144]

(1) 상기 직교 최소자승분석의 스코어 스캐터 플롯 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이, 국내산 4년근 홍삼과 6년근 홍삼은 연근에 따라 두 그룹으로 분리되었다.

[0145]

(2) 또한, 상기 직교 최소자승분석의 S 플롯 결과, 도 18 내지 20에 나타낸 바와 같이, 4년근 홍삼과 6년근 홍삼의 성분들이 질량에서 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다(t-test; p>0.001).

[0146]

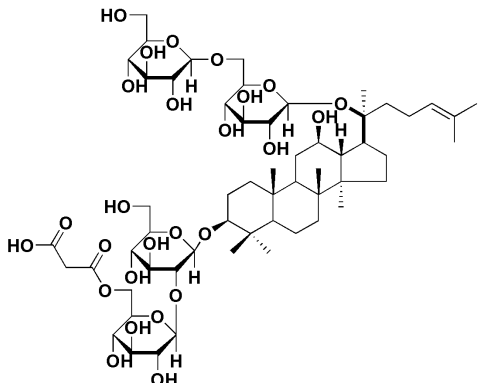
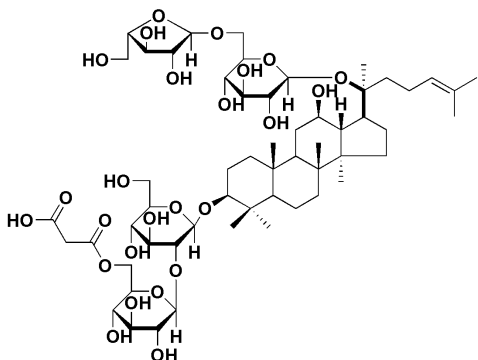
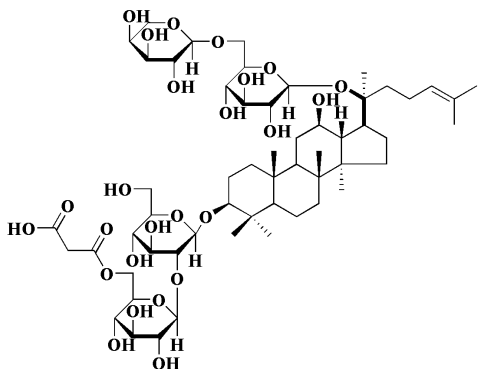
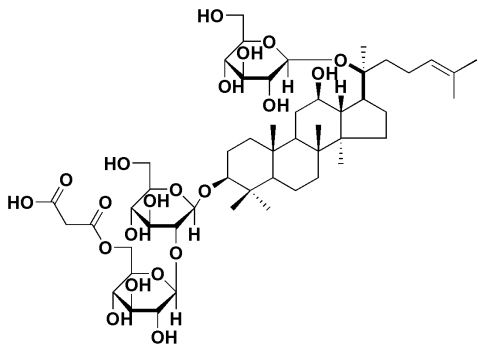
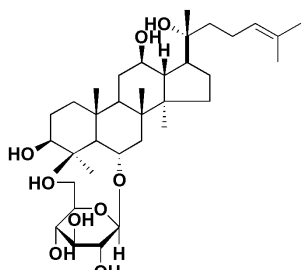
이중, 4년근 홍삼 성분은 말로닐 진세노사이드 Rb1(9.89 분의 1195.6145)(화학식 5), 말로닐 진세노사이드 Rc(10.30분, M.W. 1165.6030)(화학식 6), 말로닐 진세노사이드 Rb2(10.75분, M.W. 1165.6036)(화학식 7), 말로닐 진세노사이드 Rd(12.02분, M.W. 853.4980)(화학식 8)로 확인되었고, 또한 6년근 홍삼 성분은 (R)-진세노사이드 Rh1(10.48 분, M.W. 1277.8934)(화학식 9), 퀴네노사이드 R1(11.26분, M.W. 1151.6239)(화학식 10), (R)-진세노사이드 Rg3(15.80분, M.W. 749.4871)(화학식 11)로 확인되었다.

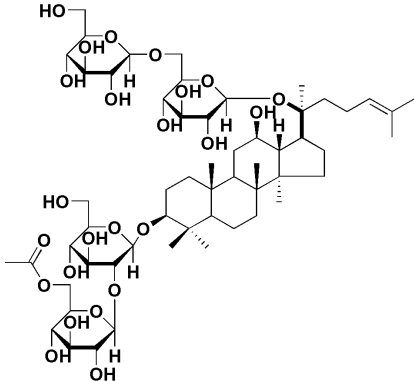
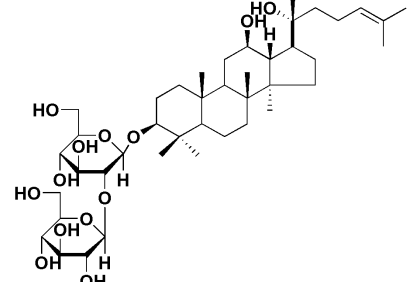
[0147]

상기 4년근 홍삼 성분과 6년근 홍삼 성분을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0148]

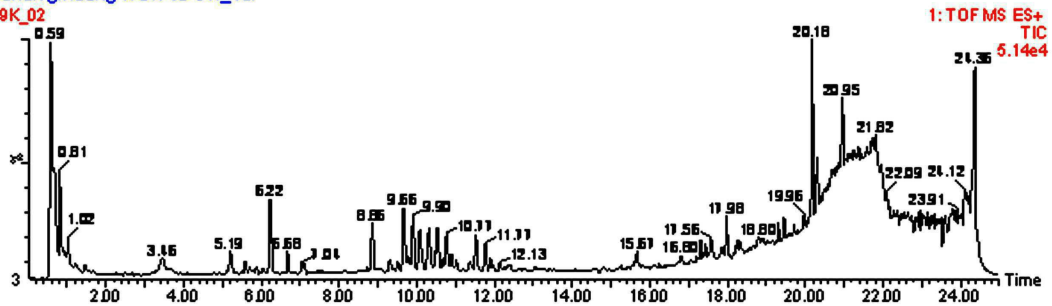
화학식	구조	화합물 명칭
5	 <p>The structure shows a central genistein skeleton with a malonyl group at C-7 and a p-coumaroyl group at C-8. It is substituted with a glucose molecule at C-1 and a galactose molecule at C-3.</p>	말로닐 진세노사이드 Rb1
6	 <p>The structure is identical to Rb1, showing a malonyl group at C-7, a p-coumaroyl group at C-8, and glucose/galactose substituents at C-1 and C-3.</p>	말로닐 진세노사이드 Rc
7	 <p>The structure is identical to Rb1, showing a malonyl group at C-7, a p-coumaroyl group at C-8, and glucose/galactose substituents at C-1 and C-3.</p>	말로닐 진세노사이드 Rb2
8	 <p>The structure is identical to Rb1, showing a malonyl group at C-7, a p-coumaroyl group at C-8, and glucose/galactose substituents at C-1 and C-3.</p>	말로닐 진세노사이드 Rd
9	 <p>The structure shows the (R)-enantiomer of genistein, featuring a hydroxyl group at C-7 and a p-coumaroyl group at C-8, with a glucose molecule at C-1.</p>	(R)-진세노사이드 Rh1

<p>10</p>		<p>퀸퀘노사이드 R1</p>
<p>11</p>		<p>(R)-진세노사이드 Rg3</p>

도면

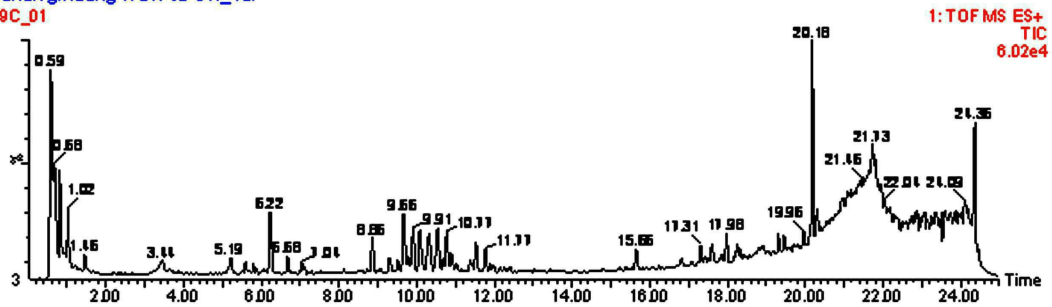
도면1

Panax ginseng KOR vs CN\_1ul  
09K\_02



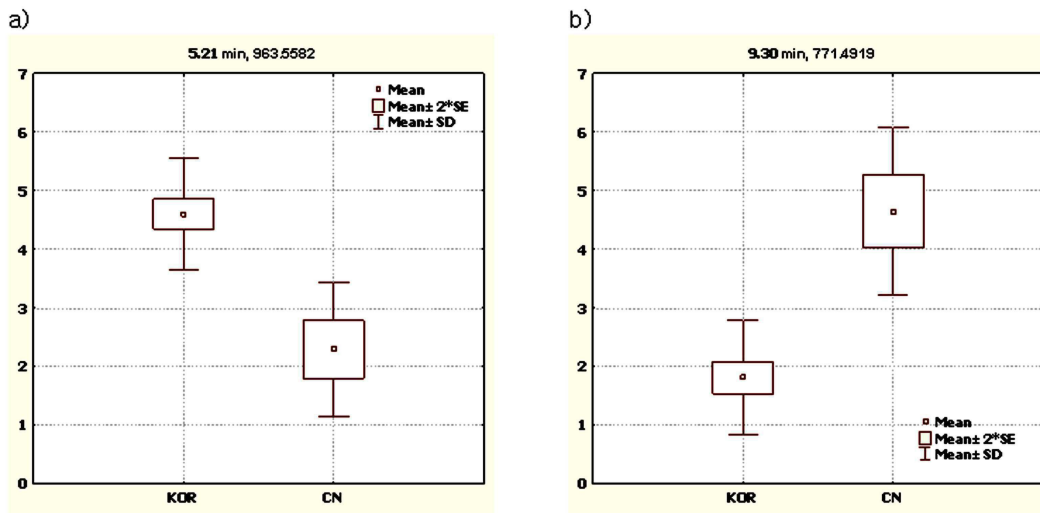
도면2

Panax ginseng KOR vs CN\_1ul  
09C\_01

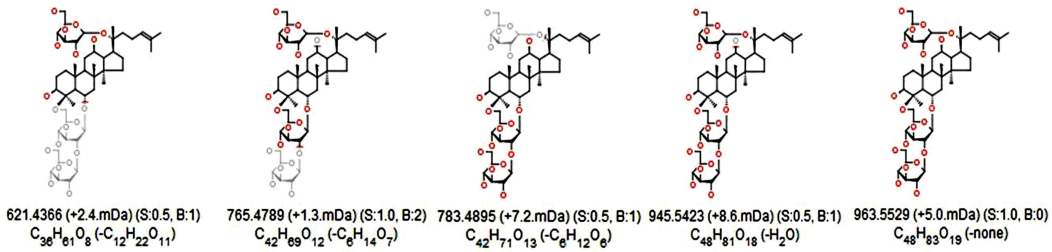




도면5

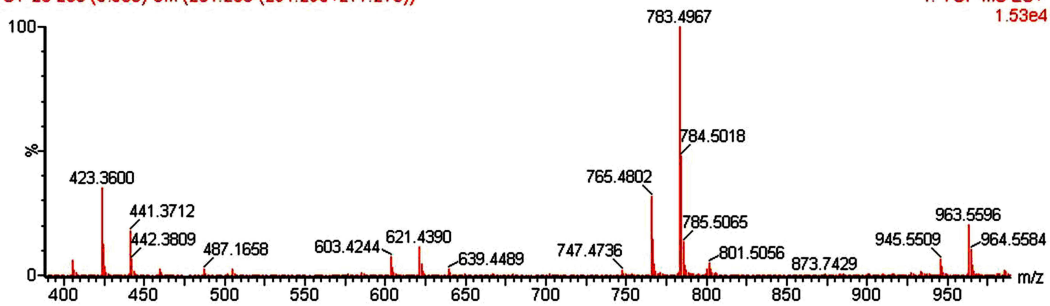


도면6

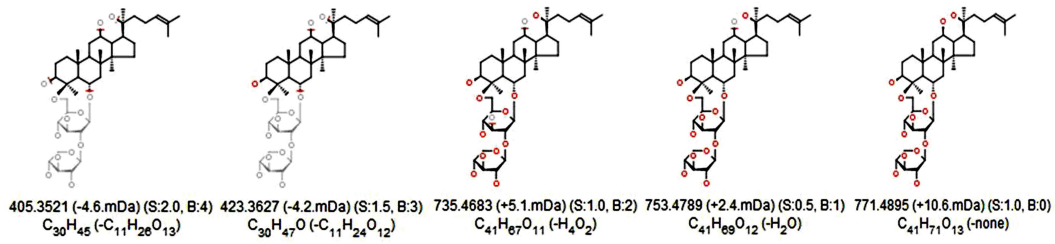


ST-20

ST-20 283 (5.568) Cm (281:286-(291:295+277:278))



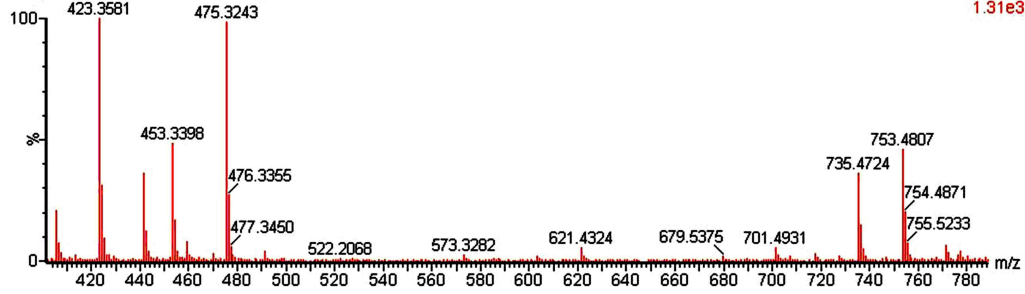
도면7



Panax ginseng KOR vs CN\_1ul

09C\_01 472 (9.293) Cm (471:474)

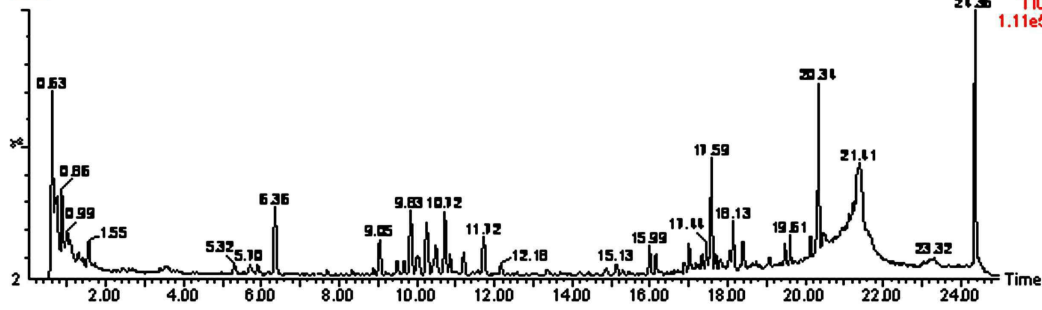
1: TOF MS ES+ 1.31e3



도면8

RG\_K\_1  
RG\_K\_01

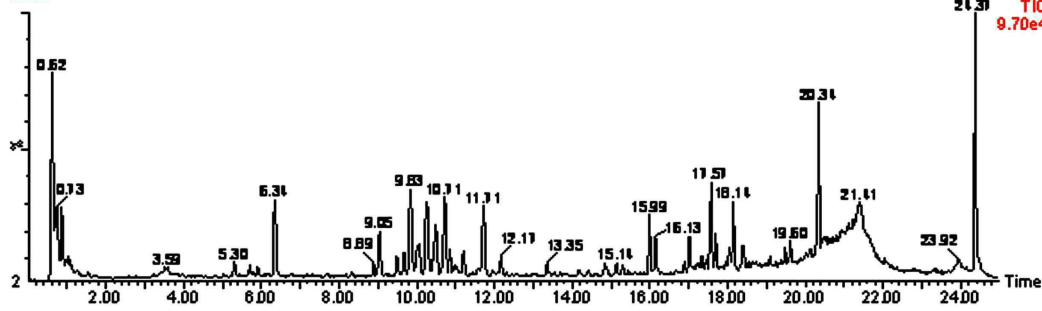
1: TOF MS ES+ TIC 1.11e5



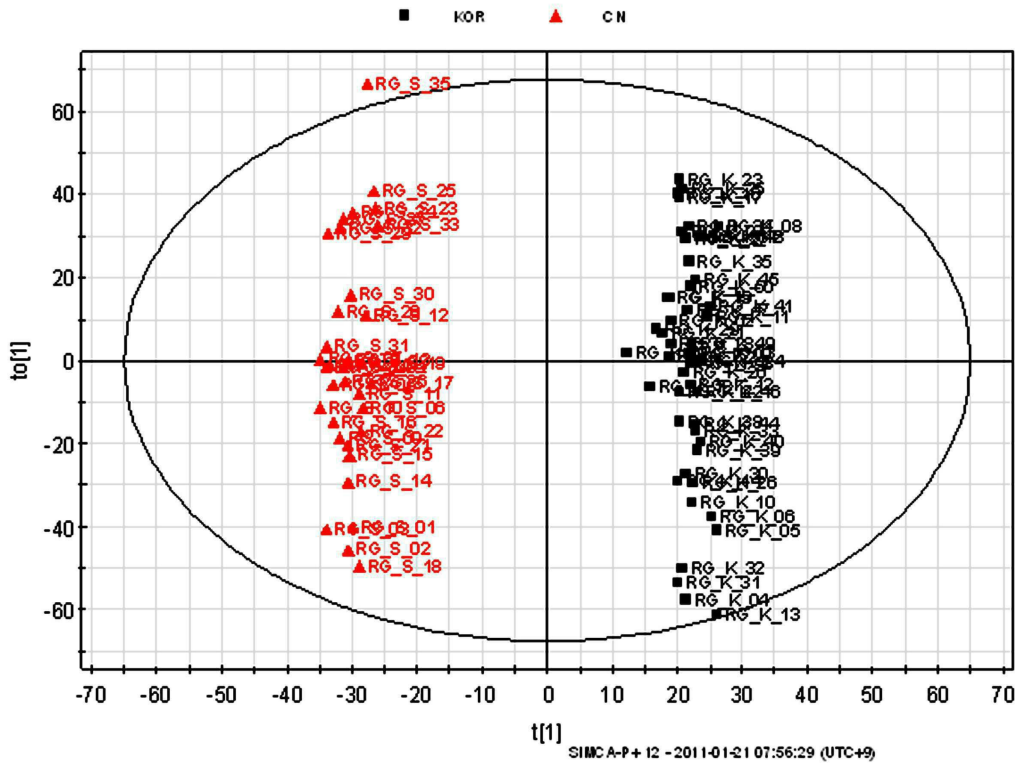
도면9

RG\_K\_1  
RG\_S\_01

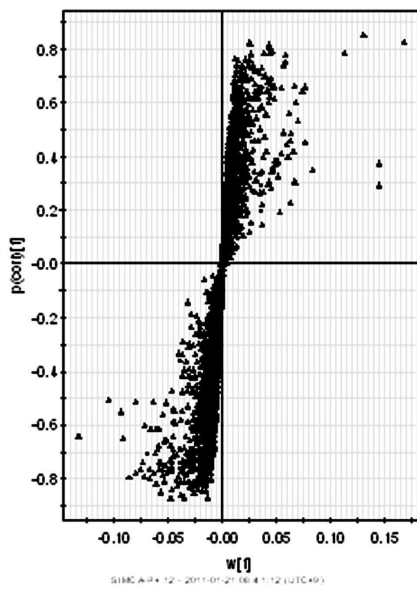
1: TOF MS ES+ TIC 9.70e4



도면10

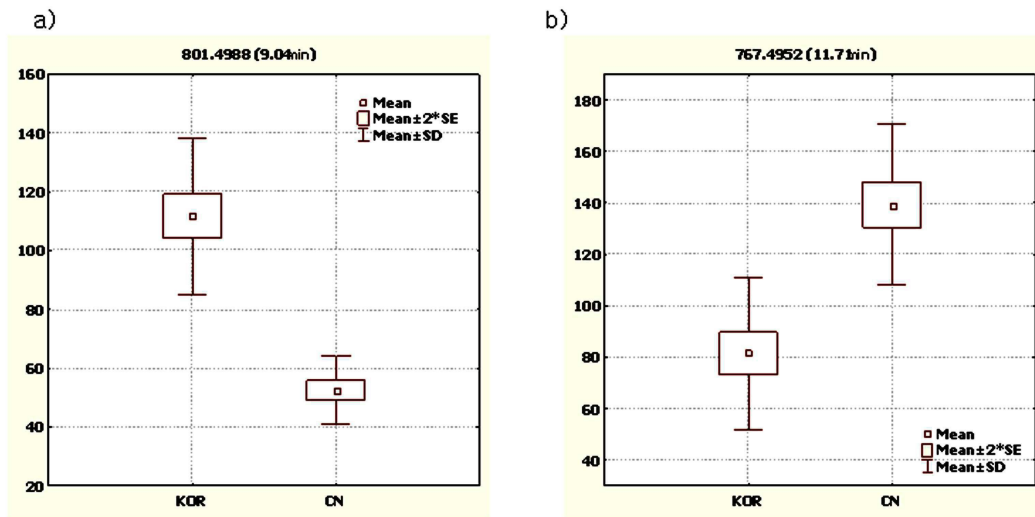


도면11

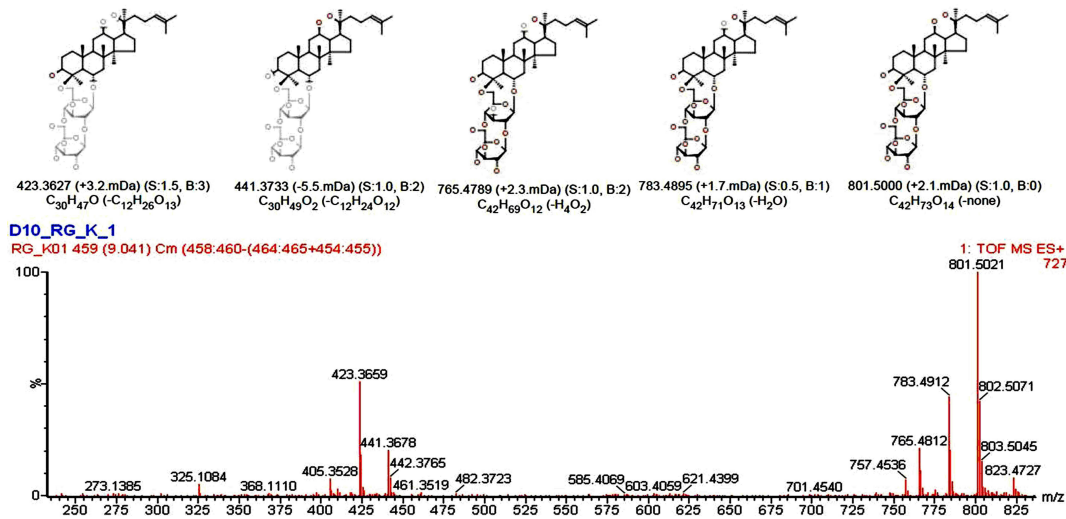




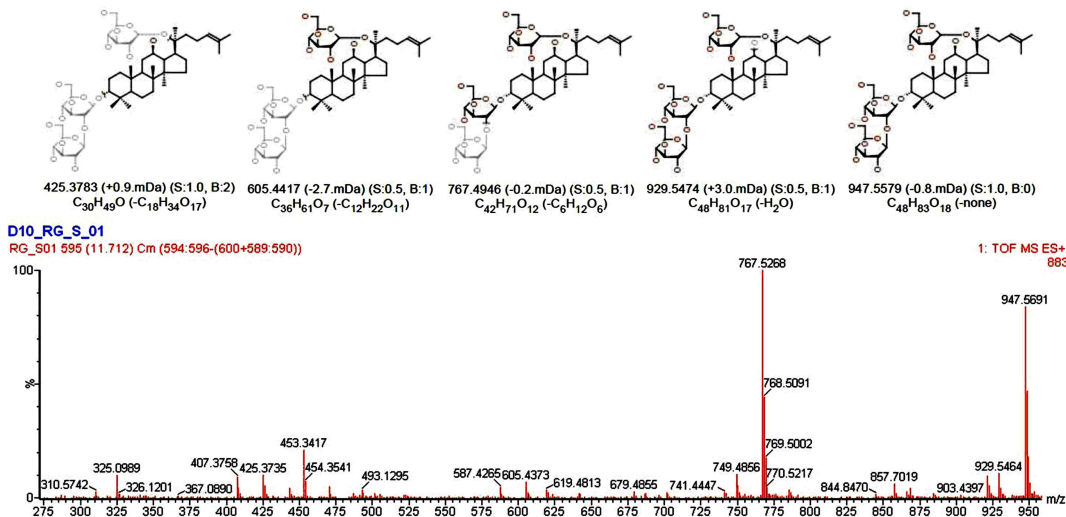
도면12



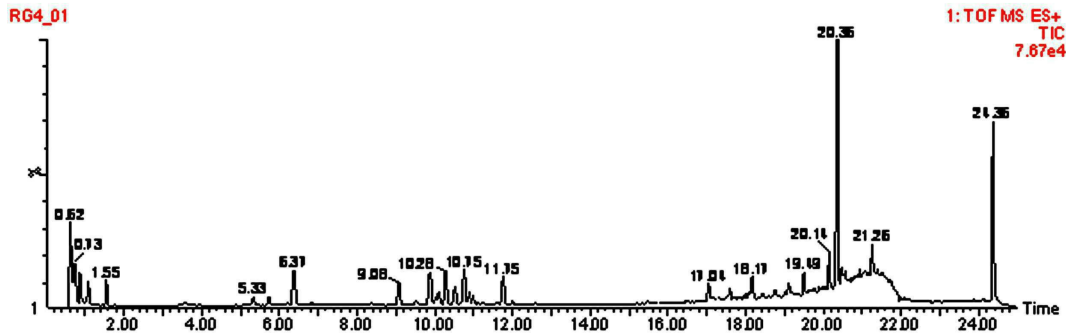
도면13



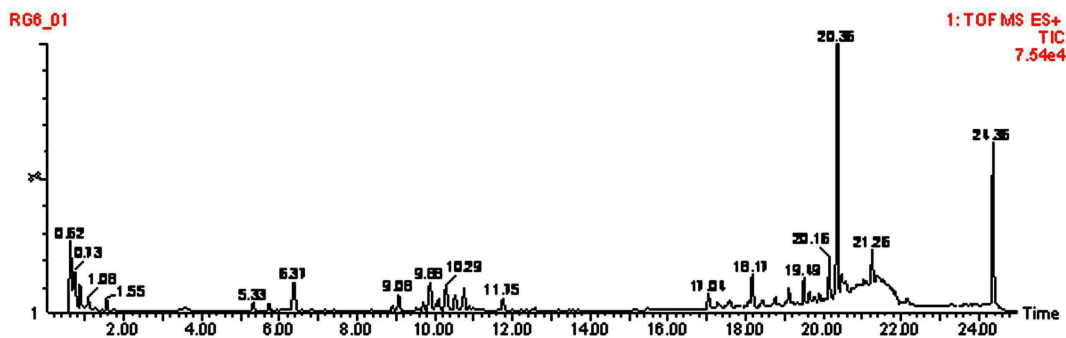
도면14



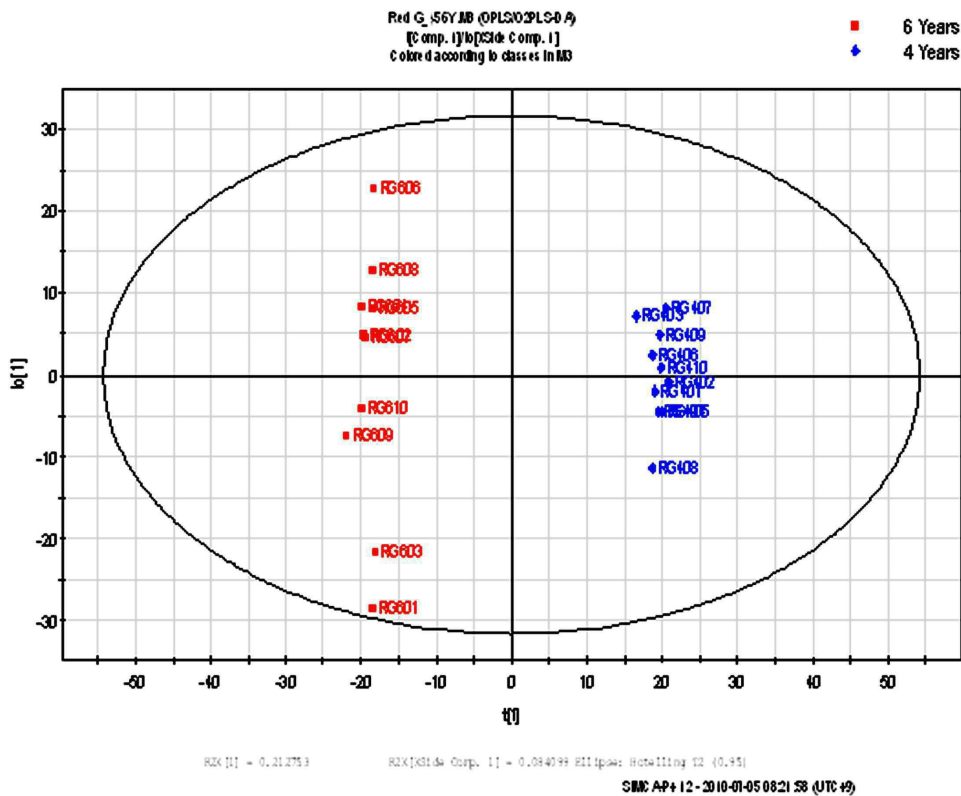
도면15



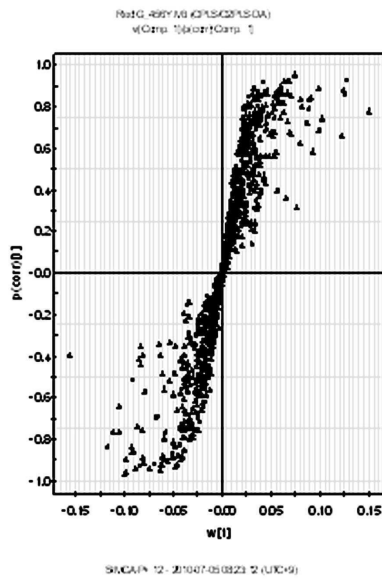
도면16



도면17

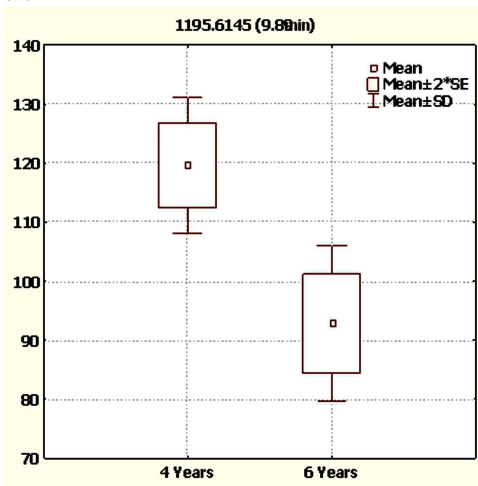


도면18

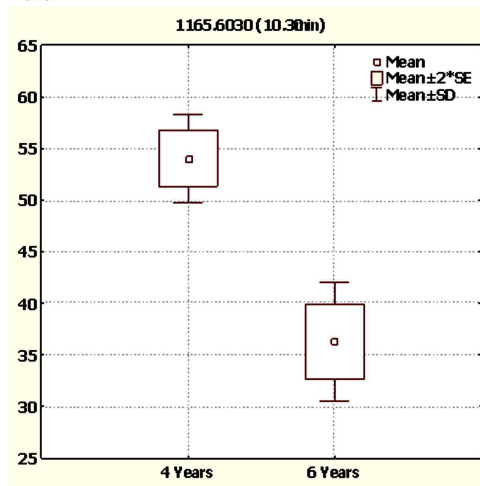


도면19

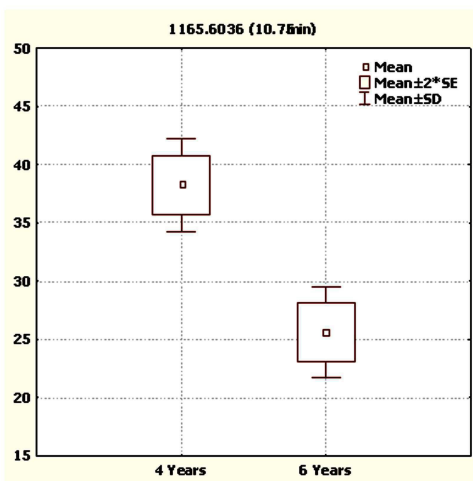
(a)



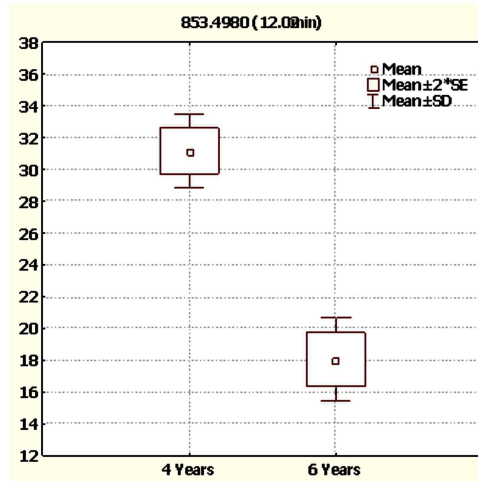
(b)



(c)

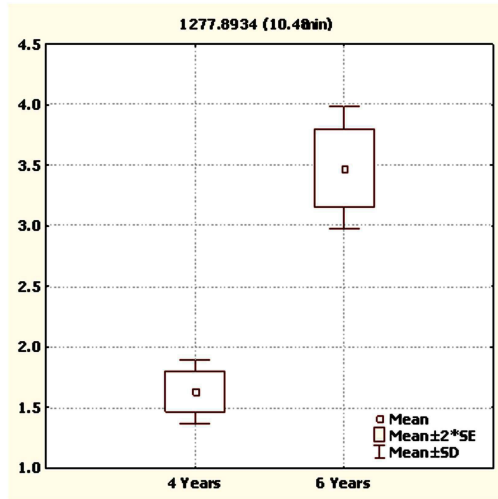


(d)

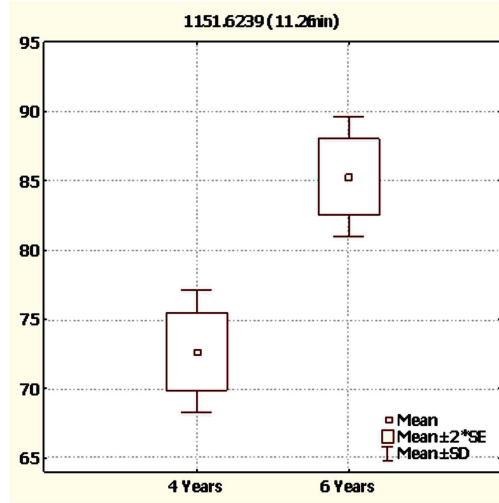


도면20

(a)



(b)



(c)

