

## 초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼분석법에 의한 8월풀잎에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 정량

윤정호, 안명일, 리현희

위대한 수령 김일성 동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《식료공업을 더욱 발전시키려면 사랑문제를 풀어야 합니다.

우리가 8월풀을 많이 심어 8월풀당을 생산하면 사랑을 다른 나라에서 많이 사오지 않아도 될것입니다.》(《김일성전집》 제71권 180페이지)

8월풀당은 열량이 낮고 당도가 높으며 인체에 영향이 없고 혈당조절작용을 하는것으로 하여 심장혈관질환치료에 리용되고있다. 8월풀당은 천연당원료로서 현재 식료품, 음료, 의약품 등에 널리 쓰이고있다. 8월풀당은 스테비오시드, 레바우디오시드 A, C, D, E와 돌코시드A, 스테비올비오시드 등으로 이루어져있다. 여기서 주성분은 스테비오시드와 레바우디오시드A인데 총배당체의 약 80%를 차지하고있다.[1] 스테비오시드(STV)는 단맛뒤에 쓴맛을 나타내는데 당조성에서 80%를 차지하며 레바우디오시드A(RA)는 사랑에 류사한 맛을 나타내지만 10%정도로서 량이 적다. 그러므로 효소 등을 리용하여 스테비오시드에 포도당분자를 덧붙여 보다 좋은 단맛을 내는 레바우디오시드A로 전환시키고있다.[2]

8월풀잎에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 정량은 얇은층크로마토그래프법[3], HPLC법[4], HPLC-MS법[5]으로 진행하고있다.

우리는 초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼분석(UPLC-MS)법으로 8월풀잎에서 스테비오시드와 레바우디오시드A를 정량하기 위한 연구를 하였다.

### 실험 방법

기구로는 초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼분석계(《ACQUITY UPLC SQD-2》), 전자천평(《AEG-120》), 초음파세척기(《KM-410L》), 50mL 마개달린 시험관을, 시약으로는 아세토니트릴(HPLC급), 에틸알콜(순), 초순수, 0.2% 개미산용액, 스테비오시드(순)와 레바우디오시드A(순)를 리용하였다.

스테비오시드와 레바우디오시드A의 초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼특성은 일정한 량의 스테비오시드와 레바우디오시드A표준용액을 UPLC-MS체계에 주입하여 연구하였다.

UPLC측정조건 탑으로는 ACQUITY UPLC BEH130(1.7 $\mu$ m, 2.1mm $\times$ 150mm)을, 이동상으로는 0.2% 개미산 : 아세토니트릴(60 : 40)을 리용하여 류속 0.1mL/min으로 균일용리를 진행하였으며 시료주입체적은 10 $\mu$ L, 측정시간은 15min이다.

MS측정조건 전기분무이온화(ESI)방식에서 모세관전압 3.5kV, 원추전압 0V, 탈용매화온도 250 $^{\circ}$ C, 탈용매화기체흐름속도 650L/h, 원천온도 125 $^{\circ}$ C이다.

8월풀잎에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출은 50mL의 시험관에 일정한 량의 시료와 40% 에틸알콜 20mL를 넣고 마개를 막은 다음 25min동안 초음파추출을

진행하였다. 그다음 원심분리하고 적당한 량의 상등액을 취하여 초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼측정을 진행하였다.

## 실험결과 및 고찰

스테비오시드와 레바우디오시드A의 질량크로마토그램 위의 조건에서 측정한 스테비오시드(분자량 804.97)와 레바우디오시드A(분자량 967.01)표준물질의 질량크로마토그램은 그림 1과 같다.

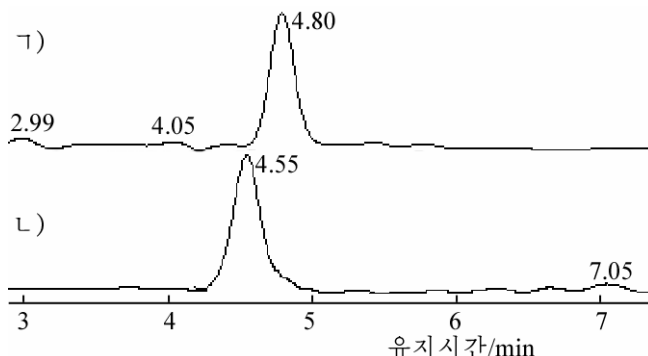


그림 1. 스테비오시드(T)와 레바우디오시드A(L)표준물질의 질량크로마토그램

그림 1에서 보는바와 같이 스테비오시드와 레바우디오시드A의 유지시간은 각각 4.80, 4.55min이다.

에틸알콜함량의 영향 시료에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출에 미치는 에틸알콜함량의 영향은 표 1과 같다.

표 1. 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출에 미치는 에틸알콜함량의 영향

에틸알콜의 함량/%	0	10	20	40	60	80	100
스테비오시드의 함량/%	4.2	5.8	6.5	6.8	6.7	5.8	4.4
레바우디오시드A의 함량/%	1.5	1.8	2.2	2.2	2.1	1.8	1.6

표 1의 결과로부터 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출은 40% 에틸알콜로 하였다.

초음파추출시간의 영향 시료에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출에 미치는 초음파추출시간의 영향은 표 2와 같다.

표 2. 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출에 미치는 초음파추출시간의 영향

초음파추출시간/min	10	15	20	25	50
스테비오시드의 함량/%	4.2	5.8	6.8	6.8	6.8
레바우디오시드A의 함량/%	1.7	1.9	2.2	2.2	2.2

표 2의 결과로부터 스테비오시드와 레바우디오시드A의 초음파추출시간을 25min으로 정하였다.

온도의 영향 25~60℃에서 에틸알콜로 스테비오시드와 레바우디오시드A를 추출할 때 온도에 따르는 함량변화가 나타나지 않으므로 추출은 방온도에서 진행하였다.

고액비의 영향 에틸알콜에 의한 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출에 미치는

고액비의 영향은 표 3과 같다.

표 3. 스테비오시드와 레바우디오시드A의 추출에 미치는 고액비의 영향

고액비	1 : 5	1 : 10	1 : 15	1 : 20	1 : 30
스테비오시드의 함량/%	4.5	5.0	6.8	6.8	6.8
레바우디오시드A의 함량/%	1.5	1.8	2.2	2.2	2.2

표 3의 결과로부터 고액비를 1 : 20으로 정하였다.

선형범위와 검출한계 질량크로마토그램에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 농도와 상대세기사이에는  $0.02 \sim 40 \mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 선형관계가 성립한다.(그림 2)

이때 상관결수( $R^2$ )는 스테비오시드에서 0.997, 레바우디오시드A에서 0.998이며 검출한계( $S/N=3$ )는 모두  $0.02 \mu\text{g/mL}$ 이다.

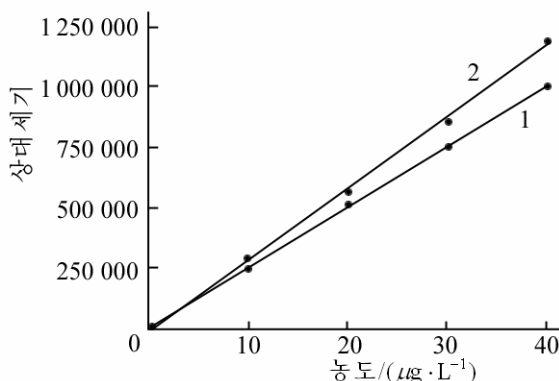


그림 2. 스테비오시드(1)와 레바우디오시드A(2)의 농도와 상대세기사이관계

대상물분석 시료에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 정량은 표준첨가법으로 진행하였다. 저울질한 일정한 량의 시료와 스테비오시드 및 레바우디오시드A표준용액, 40% 에틸알콜 20mL를 50mL 마개달린 시험관에 넣고 마개를 막은 다음 25min 초음파추출을 진행한다. 7 000r/min에서 원심분리하고 일정한 량의 상등액을 취해 UPLC-MS체계에 주입한다. 분석결과는 표 4와 같다.

표 4. 8월풀잎에서 스테비오시드와 레바우디오시드A의 분석결과( $n=5$ )

시료번호	스테비오시드			레바우디오시드A		
	함량/%	변동결수/%	회수률/%	함량/%	변동결수/%	회수률/%
1	6.8	3.8	99.6	2.2	3.5	99.5
2	7.1	4.1	99.8	2.1	4.3	99.7
3	6.3	3.3	100.1	1.6	3.5	99.9
4	6.1	3.1	99.5	1.9	3.8	99.6
5	7.9	2.9	99.9	2.4	3.1	99.6

8월풀잎에서 스테비오시드와 레바우디오시드A를 정량할 때 변동결수( $n=5$ )는 4.3%이하였으며 실제 시료에 첨가한 스테비오시드와 레바우디오시드A의 회수률은 99.5~100.1%였다.

## 맺 는 말

초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼분석법으로 8월풀잎속의 스테비오시드와 레바우디오시드A의 정량방법을 확립하였다.

스테비오시드와 레바우디오시드A에서 검량선의 선형범위는  $0.02 \sim 40 \mu\text{g/mL}$ , 검출한계 ( $S/N=3$ )는  $0.02 \mu\text{g/mL}$ , 변동계수는 4.3%이하, 회수율은 99.5~100.1%이다.

## 참 고 문 헌

- [1] 정영식 등; 조선약학, 4, 46, 1985.
- [2] 리천일 등; 식료공업, 4, 19, 주체103(2014).
- [3] F. García Sánchez et al.; Anal. Lett., 27, 2171, 1994.
- [4] Irma Aranda-González et al.; Biomed. Chromatogr., 29, 733, 2015.
- [5] Pawel Kubica et al.; Anal. Bioanal. Chem., 407, 1505, 2015.

주체110(2021)년 4월 5일 원고접수

## **Determination of Stevioside and Rebaudioside A in Stevia Leaf by Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry**

*Yun Jong Ho, An Myong Il and Ri Hyon Hui*

We established the method to determine stevioside and rebaudioside A in stevia leaf by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry.

The linear range of calibration curve is  $0.02 \sim 40 \mu\text{g/mL}$ , the detection limit( $S/N=3$ ) is  $0.02 \mu\text{g/mL}$ , the variation coefficient is below 4.3% and the recovery is 99.5~100.1%.

Keywords: UPLC–MS, stevioside, rebaudioside A