

초고성능액체크로마토그래프-질량분석법에 의한 백삼과 인삼엑스에서 긴세노시드Re의 정량

김광호, 윤정호

긴세노시드 혹은 트리테르펜배당체들은 인삼에서 기본활성물질로 인정되고있다. 현재 인삼에서 70개이상의 긴세노시드들이 발견되었으며 이것들은 중추신경계통, 심장혈관계통, 면역계통의 질병들과 당뇨병, 암치료에 특효가 있다.[1] 치료에 리용되는 긴세노시드들은 알약, 교갑, 엑스형태로 또는 탄산음료나 사이다와 같은 경구수액형태로 인체내에 투여된다.[2] 최근에 인삼추출물로부터 각이한 긴세노시드들을 분리 및 검출, 정량하며 인체대사과정을 밝히기 위한 연구들이 진행되고있는데 그 방법들을 보면 HPLC-UV[3], HPLC-ELSD[3-5], HPLC-ESI-MS/MS[6], UPLC-UV[7]들이다.

우리는 초고성능액체크로마토그래프-질량분석법(UPLC-MS)을 리용하여 몇가지 인삼제품들 즉 백삼과 인삼엑스에서 긴세노시드Re($C_{48}H_{82}O_{18}$, $M=946$)를 추출 및 정량하기 위한 분석방법을 확립하고 대상물분석에 적용하였다.

기구 및 시약

기구로는 초고성능액체크로마토그래프-질량분석기(《ACQUITY™ UPLC-SQD2》), 분리탑(《ACQUITY UPLC® HSS T3》, $1.7\mu m$, $2.1mm \times 100mm$), 원심분리기(《allegra X-12》), 전자천평(《LIBROR EB-330D》), 마개달린 삼각플라스크(100mL)를, 시약으로는 초순수(HPLC 급), 메타놀(HPLC급), 개미산(MS급), 트리플루오로초산(MS급), 긴세노시드Re표준용액($1000\mu g/mL$)을 리용하였다. 초고성능액체크로마토그래프측정조건은 이동상 0.1% 개미산수용액(A) : 메타놀(B), 흐름속도 $0.15mL/min$, 탑온도 $30^{\circ}C$, 시료주입량 $10\mu L$ 이다. 구배용리조건은 표 1과 같다.

표 1. 구배용리조건

시간 /min	흐름속도 /($mL \cdot min^{-1}$)	이동상 A /%	이동상 B /%
0	0.15	80	20
12	0.15	40	60
15	0.15	20	80
17	0.15	80	20
20	0.15	80	20

질량스펙트르측정조건은 모세관전압 $3.5kV$, 원추전압 $10V$, 탈용매화온도 $350^{\circ}C$, 탈용매기체흐름속도 $650L/h$, 원천온도 $150^{\circ}C$ 이다. 인삼에서 긴세노시드들의 추출은 선행연구[1]에서와 같은 방법으로 진행하였다.

실험결과 및 고찰

이온화방식의 확정 일반적으로 전기분무이온화방식에는 양이온방식과 음이온방식이 있다. 이온화방식에 따라 분석질의 이온화과정이 촉진될수도 있으며 반대로 억제되거나 진행되지 않을수도 있다. 선행연구[6]에서는 인삼의 추출물에서 긴세노시드Re를 음이온방식으로, 선행연구[2]에서는 수삼, 백삼, 홍삼의 추출물들에서 양이온방식으로 측정하였다.

이온화방식을 선택하기 위하여 매우 미세하게 분쇄한 백삼 1g이 들어있는 마개달린

삼각플라스크에 80% 메타놀 50mL를 첨가한 다음 얼음욕에서 초음파추출을 30min동안 진행하였다. 다음 이 추출액을 5 000r/min에서 5min동안 원심분리를 진행하고 상등액 1mL를 취하여 실험에 리용하였다. 먼저 양이온방식에서 측정을 진행하였는데 긴세노시드Re의 분자이온봉우리($[M+H]^+$, m/z 947)가 측정되지 않았다. 다시 음이온방식으로 측정을 진행한 결과 m/z 991인 이온이 측정되었다.

이 이온은 용매클러스터이온 즉 긴세노시드Re분자와 이동상첨가제인 개미산과의 부가이온($[M+HCOO]^-$, $m/z = 946+45=991$)으로 해석할수 있다. 이러한 부가물립재를 재확인하기 위하여 개미산대신에 트리플루오로초산을 초순수에 첨가하여 이동상 A(0.1% 트리플루오로초산수용액)로 측정을 진행하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 측정된 m/z 1 059인 이온은 긴세노시드Re분자에 트리플루오로초산음이온(CF_3COO^- , m/z 113)이 부가된것이다.

우의 실험결과로부터 긴세노시드Re는 양이온방식에서는 측정되지 않고 음이온방식에서 측정되며 이때 개미산음이온이 부가되어 이온화가 진행된다는것을 알수 있다. 따라서 이후의 분석들에서는 모두 음이온방식으로 측정을 진행하였으며 긴세노시드Re분자의 검출은 개미산을 리용할 때 생기는 m/z 991인 이온으로 진행하였다.

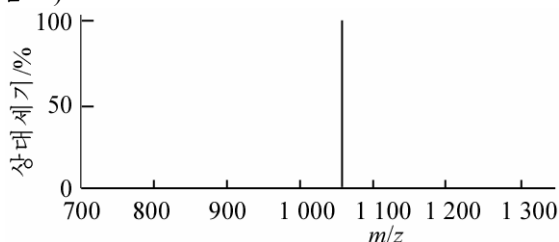


그림 1. 음이온방식에서 $[M+CF_3COO]^-$ (m/z 1 059)의 MS
이동상 A(0.1% 트리플루오로초산수용액)

분리방법의 선택성검증 우와 같이 긴세노시드Re의 부가이온물립재를 확정하는데 이어 인삼추출물에서 몇가지 긴세노시드들을 초고성능액체크로마토그래프-질량분석법으로 검출하였다. 이때 구배용리조건은 표 1에서와 같다. 총이온크로마토그램에서 9가지 긴세노시드들의 m/z 값에 따르는 선택이온크로마토그램은 그림 2와 같다.

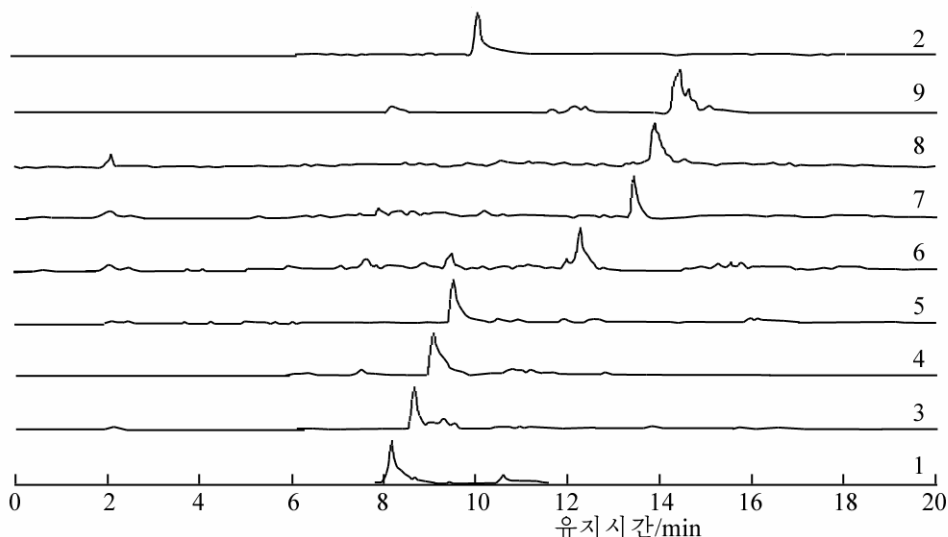


그림 2. 9가지 긴세노시드들의 선택이온크로마토그램
1-9는 각각 긴세노시드 Rh₁, Re, Rb₁, Rg₁, Rb₂, G, Ra₃, Rg₂, Ra₁인 경우

그림 2에서 보는바와 같이 모든 성분들의 봉우리들이 서로 간섭하지 않았다. 이것은

이 성분들이 질량이온화원천안에서 이온화될 때 호상간 이온억제와 이온강화를 일으키지 않으며 결과 바탕효과가 매우 작아졌다는것을 알수 있으며[1] 따라서 이 분리방법의 선택성이 매우 높다는것을 보여준다.

음이온방식에서 검출된 긴세노시드들의 부가이온들과 유지시간은 표 2와 같다.

표 2. 음이온방식에서 검출된 긴세노시드들의 부가이온들과 유지시간($n=3$)

No.	긴세노시드	분자량(Da)	유지시간/min	$m/z([M+HCOO]^-)$
1	Rh ₁	638	8.54	683
2	Re	946	10.14	991
3	Rb ₁	1 108	8.67	1 153
4	Rg ₁	800	8.87	845
5	Rb ₂	1 078	9.33	1 123
6	G	960	12.33	1 005
7	Ra ₃	1 240	13.86	1 285
8	Rg ₂	784	14.18	829
9	Ra ₁	1 210	14.46	1 255

표 2에서 보는바와 같이 검출된 이온들은 모두 개미산음이온이 분자에 부가되어 이온화된 형태로 측정되었으며 유지시간은 분자량이 증가함에 따라 커지는 경향성을 나타낸다.

검량선의 선형성과 검출한계 긴세노시드Re표준용액으로 검량선을 작성한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 검량선의 회귀방정식은 $y = 2.149 0x + 0.369 4$ ($r^2 = 0.999 2$), 선형범위는 $0.05 \sim 20 \mu\text{g/mL}$, 검출한계($S/N=3$)는 $0.03 \mu\text{g/mL}$ 이며 정량한계($S/N=5$)는 $0.05 \mu\text{g/mL}$ 였다.

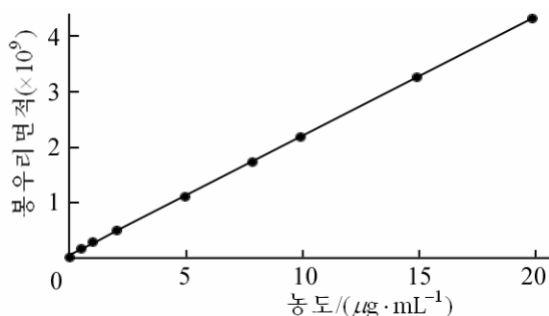


그림 3. 긴세노시드Re의 검량선

추출물과 바탕효과 인삼과 인삼엑스로부터 긴세노시드들의 추출에는 주로 가압액추출[6, 8, 9]과 초음파추출[1]이 있다.

선행연구[6, 8]에서는 가압액추출을 진행하였는데 이 방법은 시간이 짧고 한번 순환시켜 추출하지만 반드시 감압조건과 방온도에서 용매를 제거하여야 하며 추출조작을 고온과 고압에서 진행하는것만큼 추출조건이 매우 가혹하고 이것들이 추출물에 미치는 영향이 매우 컸다. 선행연구[9]에서도 역

시 가압액추출을 진행하였는데 추출방법의 선택성이 높지 못한 결과 추출물을 다시 초순수에 풀고 고상추출을 진행하여 당과 폐놀산들을 제거하는 조작이 첨가되었다.

그러나 초음파추출[1]에서는 가압액추출에서처럼 고온, 고압 그리고 고상추출과 같은 복잡한 조작이 필요없으며 추출액을 분석체계에 직접 주입할수 있는 우점을 가지고있다.

액체크로마토그래프—질량분석법에 리용되는 추출방법을 확립하는데서 중요한것은 바탕효과를 보다 작게 하여 분석결과의 정확도와 정밀도를 높이는것이다. 초음파추출을 진행하는데서 추출제 즉 메타놀의 함량은 추출물과 바탕효과에 가장 큰 영향을 미친다. 따라서 메타놀의 함량을 $50 \sim 80\%$ 까지 변화시키면서 긴세노시드Re의 추출물과 바탕효과를 고찰하였다. 추출물과 바탕효과는 선행연구[10]에서와 같은 방법으로 계산하였다.(표 3)

표 3. 메타놀함량에 따른 긴세노시드Re의 바탕효과와 추출률($n=3$)

메타놀 함량/%	농도 $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	바탕효과/%		추출률/%	
		평균값	상대표준편차	평균값	상대표준편차
50	0.20	81.7	7.1	89.4	11.2
	2.00	91.3	3.6	92.4	10.4
	20.0	92.9	2.5	88.8	7.5
60	0.20	86.7	8.8	96.7	14.1
	2.00	94.5	4.3	92.9	6.6
	20.0	94.4	2.7	94.3	10.9
70	0.20	93.3	3.0	98.2	3.1
	2.00	96.3	2.5	98.8	3.1
	20.0	101.9	3.2	103.4	6.9
80	0.20	90.0	5.5	92.6	12.2
	2.00	92.3	8.6	99.5	11.6
	20.0	91.4	3.3	105.1	6.9

표 3에서 보는바와 같이 메타놀함량이 70%일 때 추출률은 98.2~103.4%로서 가장 높았으며 상대표준편차도 3.1~6.9%범위로서 가장 작았다. 따라서 이후의 모든 추출조작들에서 추출제로 70% 메타놀을 리용하였다.

대상물분석 백삼과 인삼엑스에서의 긴세노시드Re의 정량은 10V의 원추전압에서 m/z 991인 이온을 선택하여 선택이온기록법으로 정량하였다.(표 4)

표 4. 분석결과($n=3$)

농도 $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	백삼		인삼엑스	
	회수률/%	상대표준편차/%	회수률/%	상대표준편차/%
0.20	94.41	3.1	96.57	2.9
2.00	97.62	3.7	104.2	4.8
20.0	101.1	2.7	99.83	2.3

표 4에서 보는바와 같이 백삼과 인삼엑스시료에 첨가한 긴세노시드Re의 회수률은 94.41~104.2%이며 변동결수는 4.8%이하이다.

맺 는 말

백삼과 인삼엑스에서 긴세노시드Re를 초고성능액체크로마토그래프-질량분석법으로 정량하기 위한 연구를 진행하였다.

긴세노시드Re는 주로 음이온형태로 이온화되며 측정된 검출이온은 m/z 991이다. 9가지의 긴세노시드들 즉 Rh₁, Re, Rb₁, Rg₁, Rb₂, G, Ra₃, Rg₂, Ra₁을 대상시료속에서 검출하였다. 추출제로 바탕효과가 가장 작고 추출률이 높은 70% 메타놀을 선택하였다.

검량선의 선형범위는 0.05~20 $\mu\text{g/mL}$ 이고 검출한계($S/N=3$)는 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 이며 정량한계($S/N=5$)는 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 이다.

회수률은 94.41~104.2%, 변동결수는 4.8%이하이다.

참 고 문 헌

- [1] Yong Fan et al.; J. Pharm. Biom. Anal., 107, 89, 2015.
- [2] Weiwei Tao et al.; J. Pharm. Biom. Anal., 75, 248, 2013.
- [3] Wan J. B. et al.; J. Pharm. Biom. Anal., 41, 1596, 2006.
- [4] Wan J. B. et al.; J. Sep. Sci., 29, 2190, 2006.
- [5] Wan J. B. et al.; J. Sep. Sci., 30, 825, 2007.
- [6] Jian-Bo Wan et al.; Molecules, 17, 5836, 2012.
- [7] Guan J. et al.; J. Pharm. Biom. Anal., 44, 996, 2007.
- [8] Agnieszka Mroczek et al.; J. Chromatogr., A 967, 147, 2008.
- [9] Wieslaw Oleszek et al.; J. Agri. Food Chem., 55, 8095, 2007.
- [10] Magda Caban et al.; Anal. Chim. Acta, 782, 75, 2013.

주체108(2019)년 10월 5일 원고접수

Determination of Ginsenoside Re in White Insam and Extract of Insam by Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

Kim Kwang Ho, Yun Jong Ho

We studied on the determination of the ginsenoside Re in white insam and extract of insam by the ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry method. Ginsenoside Re is mainly ionized in the negative ion mode and the detect ion is $m/z=991$. Nine ginsenosides(Rh₁, Re, Rb₁, Rg₁, Rb₂, G, Ra₃, Rg₂, Ra₁) are identified in real samples. 70% methanol, in which the matrix effect is the lowest and the extract efficiency is the highest, is selected as the extractant.

The linear range of calibration curve is from 0.05 to 20 μ g/mL and the limit of detection($S/N=3$) is 0.03 μ g/mL, the recovery is 94.41~104.2% and the correlation coefficient is below 4.8%.

Keywords: UPLC–MS, ginsenoside Re