

## 초고성능액체크로마토그래프-질량분석법에 의한 긴세노시드들의 정량

김광호, 윤정호

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《생산과 건설에서 질을 높이기 위하여서는 생산과 건설의 모든 공정들에서 질적지표에 따르는 과학기술적요구를 엄격히 지켜야 합니다.》

인삼에서 기본활성물질인 트리테르펜사포닌 즉 긴세노시드들은 그 구조에 따라 생물학적활성이 차이난다.[2, 3] 실례로 프로토파낙사트리올의 구조를 가진  $Rg_1$ 과 프로토파낙사디올의 구조를 가진  $Rb_1$ 은 서로 반대의 약리학적활성을 나타낸다.[4] 따라서 인삼제품들에서 긴세노시드들을 정확히 분별정량하는것은 매우 중요한 문제로 제기된다.[5-7]

인삼제품들에서 긴세노시드들을 분별정량하기 위한 방법으로는 얇은층크로마토그래프법[8], 고성능액체크로마토그래프법[9-11], 초고성능액체크로마토그래프법[12], 고성능액체크로마토그래프-질량분석법[13-15]들이 있다.

우리는 초고성능액체크로마토그래프-질량분석법으로 홍삼추출액에서 12가지 긴세노시드( $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rf$ ,  $Rb_1$ ,  $Rb_2$ ,  $Rg_2$ ,  $20(R)Rg_2$ ,  $Rh_1$ ,  $Rd$ ,  $Rg_3$ ,  $Rh_2$ ,  $Ck$ )들을 분별정량하기 위한 연구를 하였다.

### 실 험 방 법

장치 및 기구로는 초고성능액체크로마토그래프(《ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC》), 빛2극소자배렬 검출기(《ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC PDA》), 질량분석계(《ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC SQD2》), 초음파세척기(《KM-410L》), 눈금플라스크(5, 10, 25, 50, 100mL), 시험관(10mL), 마이크로피펫(1~10mL, 200~1 000 $\mu$ L, 10~100 $\mu$ L), 마이크로려과막(0.22 $\mu$ m, 13mm)을, 시약으로는 초순수(18.2M $\Omega$ /cm), 아세토니트릴(HPLC급), 메틸알콜(HPLC급), 긴세노시드( $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rf$ ,  $Rb_1$ ,  $Rb_2$ ,  $Rg_2$ ,  $20(R)Rg_2$ ,  $Rh_1$ ,  $Rd$ ,  $Rg_3$ ,  $Rh_2$ ,  $Ck$ )표준(25mg)을 리용하였다.

혼합표준용액의 준비 긴세노시드  $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rf$ ,  $Rb_1$ ,  $Rb_2$ ,  $Rg_2$ ,  $20(R)Rg_2$ ,  $Rh_1$ ,  $Rd$ ,  $Rg_3$ ,  $Rh_2$ ,  $Ck$ 들의 혼합표준용액은 매 시료병에 70% 메틸알콜 1mL를 넣고 초음파세척기로 50℃에서 30min동안 충분히 용해시키고 200 $\mu$ L씩 분취하여 5mL 눈금플라스크에 넣고 70% 메틸알콜로 눈금을 맞추어 긴세노시드들의 함량이 각각 1 000 $\mu$ g/mL 되게 제조하였다. 검량선작성을 위하여 혼합표준용액을 70% 메틸알콜로 희석하는 방법으로 긴세노시드들의 함량이 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 25, 50 $\mu$ g/mL인 혼합표준용액계렬들(8개)을 준비하였다.

시료전처리 시료용액(홍삼추출액) 1mL를 70% 메틸알콜로 적당히 희석하여 초음파세척기(50℃)에서 5min동안 충분히 분산시킨 다음 마이크로려과막으로 려과한 려액 1mL를 분석에 리용하였다.

초고성능액체크로마토그래프측정조건 성분들의 분리는 ACQUITY UPLC® BEH 130 C<sub>18</sub> 탭(1.7 $\mu$ m, 2.1mm×150mm)에서 0.1% 개미산(A)과 아세토니트릴(B)을 이동상으로 리용하여 진행하였다. 이동상류속은 0.2mL/min이고 탭온도는 30℃, 시료주입량은 10 $\mu$ L이다. 빛2극 소자배렬검출기의 검출파장은 190~400nm이다. 구배용출조건은 다음과 같다.(표 1)

표 1. 구배용출조건

시간/min	흐름속도/(mL·min <sup>-1</sup> )	이동상 A함량/%	이동상 B함량/%
0	0.2	80	20
5	0.2	72	28
10	0.2	63	37
15	0.2	60	40
20	0.2	40	60
25	0.2	30	70
27	0.2	20	80
33	0.2	80	20
35	0.2	80	20

질량스펙트럼측정조건 음이온방식에서 모세관전압 -2kV, 분렬전압 10 또는 90V, 탈용매화온도 350℃, 탈용매화기체흐름속도 650L/h, 원천온도 125℃

## 실험결과 및 고찰

분렬전압의 영향 분렬전압은 이온화효율에 직접적인 영향을 미치는것으로 하여 성분들의 분석감도를 크게 변화시키므로 반드시 고려하여야 한다. 분렬전압 10V와 90V에서 R<sub>g1</sub>과 R<sub>f</sub>의 부가이온( $m/z$  832)의 선택이온크로마토그램은 그림 1과 같다.

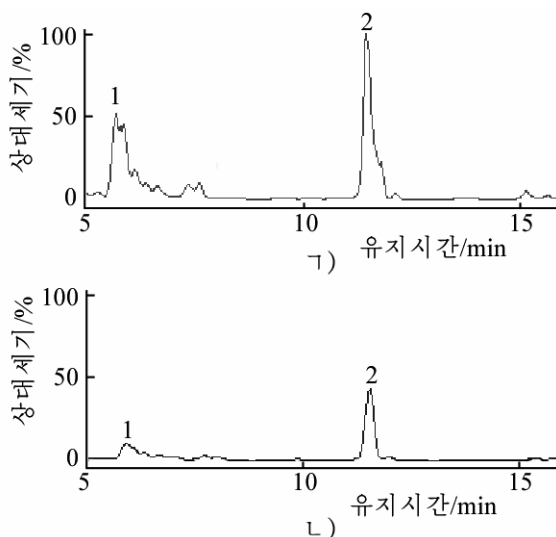


그림 1. 분렬전압 90V(ㄱ)와 10V(ㄴ)에서 R<sub>g1</sub>(1)과 R<sub>f</sub>(2)의 부가이온( $m/z$  832)의 선택이온크로마토그램

그림 1에서 보는바와 같이 분렬전압 90V에서의 봉우리면적이 10V일 때보다 3~5배

나 더 큰데 이런 경향성은 다른 모든 긴세노시드들에서도 나타났다. 따라서 프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올과 같은 복잡한 구조를 가진 긴세노시드들은 분렬전압 10V에서 상대적으로 이온화가 잘 진행되지 않는다는 것을 알 수 있다. 이것은 90V의 높은 분렬전압에서 분렬이온들이 하나도 발생되지 않은 것으로 확인할 수 있다. 정량적인 측면에서 볼 때 분렬전압 90V가 더 적합하므로 이것을 최적조건으로 선택하였다.

12개 긴세노시드들의 유지시간 및 부가이온확정 표 1의 구배용출조건에서 측정한 혼합표준용액(1 000 $\mu$ g/mL)의 크로마토그램은 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 프로토파낙사트리올의 구조를 가진 Re, Rg<sub>1</sub>, Rf가 프로토파낙사디올의 구조를 가진 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rd보다 상대적으로 빨리 용출되었는데 이것은 프로토파낙사트리올류의 극성이 프로토파낙사디올류의 극성보다 약하기 때문이다. 긴세노시드들의 용출순서는 초순수와 아세토니트릴을 이동상으로 리용한 선행연구[13]에서와 비교적 일치한다.

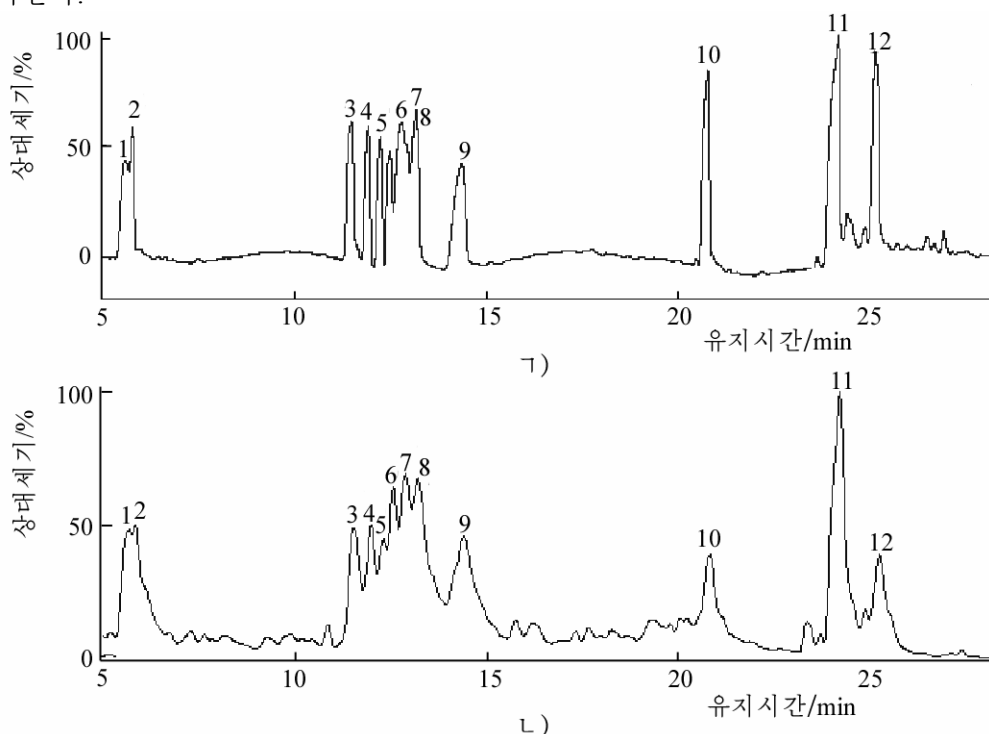


그림 2. 혼합표준용액의 크로마토그램

7) 빛2극소자배렬검출기 L) 질량분석계(90V)

1-Rg<sub>1</sub>, 2-Re, 3-Rf, 4-Rb<sub>1</sub>, 5-Rb<sub>2</sub>, 6-Rg<sub>2</sub>, 7-20(R)Rg<sub>2</sub>, 8-Rh<sub>1</sub>, 9-Rd, 10-Rg<sub>3</sub>, 11-Rh<sub>2</sub>, 12-Ck

긴세노시드들의 유지시간과 부가이온의  $m/z$ 값은 표 2와 같다.

일반적으로 음이온방식에서 성분들의 이온화는 이동상첨가제에 의하여 결정되는데 [16] 이것에 대해서는 이전의 연구결과[1]에서 확증하였다. 그러나 표 2에서 보는바와 같이 측정된 부가이온들의  $m/z$ 값들은 분자량보다 31Da만큼 큰데 이것은 이온화가 개미산 음이온의 부가에 의하여 진행되지 않았다는 것을 보여준다.

표 2에서 보는바와 같이 음이온방식에서 이동상첨가제와의 부가물림새에 의한 이온화과정과는 다른 연구결과[13, 14, 17, 18]들이 발표되었다.

표 2. 긴세노시들의 유지시간과 부가이온의  $m/z$ 값

번호	성분이름	분자량/Da	유지 시간/min	부가이온의 $m/z$ 값 ([M+CH <sub>3</sub> O] <sup>-</sup> )
1	Rg <sub>1</sub>	801	5.57±0.01	832
2	Re	947	5.76±0.01	978
3	Rf	801	11.47±0.01	832
4	Rb <sub>1</sub>	1 109	11.91±0.01	1 140
5	Rb <sub>2</sub>	1 079	12.23±0.01	1 110
6	Rg <sub>2</sub>	785	12.48±0.01	816
7	20(R)Rg <sub>2</sub>	785	12.78±0.01	816
8	Rh <sub>1</sub>	639	13.16±0.01	670
9	Rd	947	14.34±0.01	978
10	Rg <sub>3</sub>	785	20.77±0.01	816
11	Rh <sub>2</sub>	622	24.18±0.01	653
12	Ck	622	25.13±0.01	653

선행연구[14]에서는 음이온방식의 높은 분렬전압에서 44Da의 중성손실을 관측하였는데 그 원인을 CO<sub>2</sub>의 방출로 보았으며 50V의 분렬전압에서의 충돌유도해리과정에서는 산성긴세노시드들에서 말로닐기의 손실로 보았다. 또한 선행연구[13]에서는 예견한  $m/z$ 값과 차이나는 원인을 높은 분렬전압에서 H원자의 손실과 이온화원천안의 오염물질 즉 Cl<sup>-</sup>에 의한것으로 보았다. 우리의 측정조건에서는 이러한 원인들이 배제된다. 가장 설득력있는 원인은 시료전처리과정에 리용되는 메틸알콜과 선행연구[1]와는 달리 분렬전압을 90V로 선택하였기때문이라고 볼수 있다.[17, 18]

분렬전압이 10V와 90V일 때 대표적으로 감도가 제일 높은 Rh<sub>1</sub>의 질량스펙트르는 그림 3과 같다.

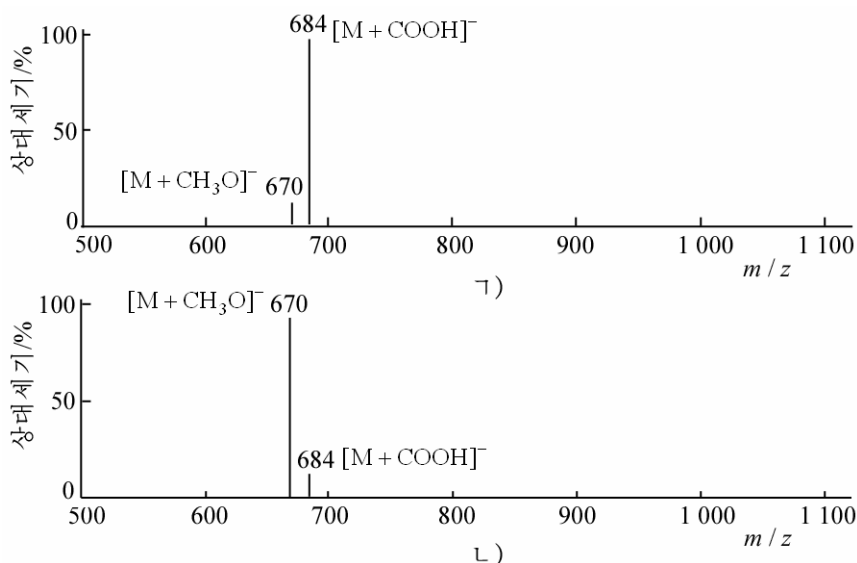


그림 3. 분렬전압 10V와 90V에서 긴세노시드 Rh<sub>1</sub>의 질량스펙트르

ㄱ) 10V, ㄴ) 90V

그림 3의 ㄱ)에서 보논바와 같이 10V의 분렬전압에서 측정된 질량스펙트럼에는  $[M+COOH]^-$  ( $m/z$  684) 외에 그보다 세기가 약 10배나 약한  $[M+CH_3O]^-$  ( $m/z$  670)이 함께 존재한다. 이와는 반대로 그림 3의 ㄴ)(90V)에서는  $[M+CH_3O]^-$ 의 세기가 상대적으로 10배정도 더 세게 나타난다. 이러한 현상은 다른 긴세노시드들에서도 공통적으로 나타났다.

일반적으로 음이온방식의 전기분무이온화원천안에는 친핵성분위기가 조성되는데 탑에서 용출되어 모세관끝에서 분무된 액체방울안에서 분석성분의 이온화에 영향을 미칠수 있는 화학종들은  $COOH^-$ 과  $CH_3OH$ 이다. 친핵성이 보다 센  $COOH^-$ 은  $CH_3OH$ 를  $CH_3O^-$ 으로 변화시킨다.[19]



따라서 이온화원천안에는 보다 많은  $CH_3O^-$ 이 존재하며 결국은  $[M+CH_3O]^-$ 이 우세하게 발생한다.

또한 높은 분렬전압(90V)에서는  $CH_3O^-$ 이 부가된  $[M+CH_3O]^-$ 이 보다 극성이 센 결합을 가진  $[M+COOH]^-$  ( $COOH^-$  부가)보다 더 안정하기때문이라고 볼수 있다. 이러한 분석결과로부터 음이온방식의 낮은 분렬전압에서는  $[M+COOH]^-$ 이 우세하고 높은 분렬전압에서는  $[M+CH_3O]^-$ 이 보다 우세하게 발생한다는것을 알수 있다. 따라서 분렬전압 90V에서 측정된  $[M+CH_3O]^-$ 을 성분들의 정량에 리용하였다.

검량선 12개 긴세노시드들의 정량을 위한 검량선들의 회귀방정식과 선형구간 및 검출한계는 표 3과 같다. 검출은 선택이온기록(Selected Ion Recording : SIR)법으로 진행하였다.

표 3. 검량선들의 회귀방정식과 선형구간, 검출한계

성분	회귀방정식	선형구간/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	회귀결수	검출한계/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
Rg <sub>1</sub>	$y=12\ 403x-35\ 660$	0.1~25	0.998 8	0.012
Re	$y=23\ 910x-202\ 740$	0.1~25	0.997 6	0.017
Rf	$y=14\ 558x+32\ 542$	0.1~25	0.997 4	0.033
Rb <sub>1</sub>	$y=13\ 557x+53\ 994$	0.1~50	0.999 0	0.021
Rb <sub>2</sub>	$y=12\ 432x-88\ 092$	0.1~25	0.998 1	0.022
Rg <sub>2</sub>	$y=17\ 619x-116\ 635$	0.1~25	0.998 9	0.028
20(R)Rg <sub>2</sub>	$y=19\ 087x-172\ 563$	0.1~50	0.998 0	0.023
Rh <sub>1</sub>	$y=16\ 973x-93\ 771$	0.1~50	0.998 8	0.008
Rd	$y=33\ 310x+109\ 045$	0.1~15	0.999 2	0.012
Rg <sub>3</sub>	$y=6\ 591.1x-2\ 831$	0.1~50	0.998 5	0.015
Rh <sub>2</sub>	$y=22\ 564x-80\ 643$	0.1~25	0.998 6	0.015
Ck	$y=13\ 398x+57\ 534$	0.1~25	0.998 8	0.026

표 3으로부터 모든 검량선들의 선형성이 좋다는것을 알수 있다. ( $R^2 > 0.997\ 0$ ) Rf의 검출한계는  $0.033\mu\text{g/mL}$ 로서 감도가 제일 낮으며 감도가 가장 높은것은 Rh<sub>1</sub>로서 검출한계가  $0.008\mu\text{g/mL}$ 이다.

대상물분석 정량은 표준첨가법으로 진행하였다. 홍삼추출액시료를 70% 메틸알콜로 5배 희석하고 첨가된 긴세노시드들의 함량이 각각  $0.5\mu\text{g/mL}$  되게 표준물질들을 첨가하였다. 검출은 선택이온기록(SIR)법으로 진행하였다. 홍삼추출액에서 12개의 긴세노시드들에 대한 정량결과는 표 4와 같다. 표 4에서 보논바와 같이 홍삼추출액에서 긴세노시드들의 회수률은 85.9~114.4%이며 상대표준편차는 3.7~13.9%이다.

표 4. 회수율과 상대표준편차( $n=5$ )

성분	함량/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	첨가량/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	찾은량/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	회수율/%	상대표준편차/%
Rg <sub>1</sub>	14.04	0.5	0.53	105.5	5.7
Re	21.32	0.5	0.51	101.1	9.9
Rf	11.95	0.5	0.56	111.6	5.3
Rb <sub>1</sub>	36.67	0.5	0.47	93.9	12.5
Rb <sub>2</sub>	22.75	0.5	0.46	92.1	7.4
Rg <sub>2</sub>	11.53	0.5	0.57	114.4	7.1
20(R)Rg <sub>2</sub>	4.01	0.5	0.55	109.1	13.9
Rh <sub>1</sub>	3.98	0.5	0.46	91.7	3.7
Rd	14.69	0.5	0.44	88.4	4.9
Rg <sub>3</sub>	38.04	0.5	0.43	85.9	9.5
Rh <sub>2</sub>	0.48	0.5	0.46	91.5	8.3
Ck	—	0.5	0.49	97.5	

—: 검출되지 않음.

## 맺는말

초고성능액체크로마토그래프—질량분석법으로 홍삼추출액에서 12가지 긴세노시드(Rg<sub>1</sub>, Re, Rf, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rg<sub>2</sub>, 20(R)Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rd, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>2</sub>, Ck)들을 정량하기 위한 분석방법을 확립하였다. 분리는 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH 130 C<sub>18</sub>탑(1.7 $\mu\text{m}$ , 2.1mm $\times$ 150mm)에서 이동상으로서 0.1% 개미산—아세트니트릴을 리용하여 0.2mL/min의 류속으로 진행하였다. 검출은 음이온방식의 전기분무이온화(ESI)원천을 통하여 선택이온기록(SIR)법으로 진행하였다. 상대표준편차는 14%이하이며 회수율은 85.9~114.4%이다.

## 참고문헌

- [1] 김일성종합대학학보 화학, 66, 1, 80, 주체109(2020).
- [2] S. Sengupta et al.; Circulation, 110, 1219, 2004.
- [3] H. Sun et al.; Int. Immunopharmacol., 6, 14, 2006.
- [4] P. Y. Yue et al.; Chin. Med., 2, 6, 2007.
- [5] W. Chen et al.; Chin. Med., 5, 12, 2010.
- [6] H. Yao et al.; Chin. Med., 6, 9, 2011.
- [7] L. Li et al.; J. Pharm. Biomed. Anal., 52, 66, 2010.
- [8] J. B. Wan et al.; Chin. J. Nat. Med., 2, 215, 2004.
- [9] J. B. Wan et al.; J. Pharm. Biomed. Anal., 41, 1596, 2006.
- [10] J. B. Wan et al.; J. Sep. Sci., 29, 2190, 2006.
- [11] J. B. Wan et al.; J. Sep. Sci., 30, 825, 2007.
- [12] J. Guan et al.; J. Pharm. Biomed. Anal., 44, 996, 2007.
- [13] Jian-Bo Wan et al.; Molecules, 17, 5386, 2012.
- [14] Jin-Yi Wan et al.; J. Pharm. Biomed. Anal., 107, 89, 2015.
- [15] Weiwei Tao et al.; J. Pharm. Biomed. Anal., 75, 248, 2013.

- [16] N. Fuzzati et al.; J. Chromatogr., A 854, 69, 1999.
- [17] Z. Haijiang et al.; J. Pharm. Biomed. Anal., 31, 175, 2003.
- [18] H. H. Zhang et al.; Chin. Pharm. J., 41, 391, 2006.
- [19] Richard B. Cole; Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, John Wiley & Sons, 66~67, 2010.

주제 109(2020)년 10월 5일 원고접수

## **Determination of Ginsenosides by Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry**

*Kim Kwang Ho, Yun Jong Ho*

We established the analytical method to determine twelve varieties of ginsenosides(Rg<sub>1</sub>, Re, Rf, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rg<sub>2</sub>, 20(R)Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rd, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>2</sub>, Ck) in the extract of red insam by using ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry. The separation was performed on ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH 130 C<sub>18</sub> column(1.7 $\mu$ m, 2.1mm $\times$ 150mm) at the flow rate of 0.2mL/min by using 0.1% formic acid–acetonitrile as mobile phase. The detection was performed by selected ion recording(SIR) method via electrospray ionization(ESI) source with negative ionization mode. The relative standard deviation is below 14% and the recovery is 85.9~114.4%.

Keywords: UPLC–MS, ginsenoside