

## 하고초의 생리활성 성분 Triterpenic Acids의 FAB-MS를 이용한 구조 규명

안영민<sup>1</sup> · 이강노<sup>2</sup> · 홍종기<sup>1</sup> · ★

<sup>1</sup>경희대학교 약학대학 나노의약생명과학과, <sup>2</sup>성균관대학교 약학대학 약학과  
(2008. 5. 20. 접수, 2008. 6. 18. 승인)

### Structural determination of triterpenic acids in *Prunellae Spica* by fast atom bombardment tandem mass spectrometry

Young Min Ahn<sup>1</sup>, Kang Ro Lee<sup>2</sup> and Jongki Hong<sup>1</sup> · ★

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea  
<sup>2</sup>College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
(Received May 20, 2008; Accepted Jun 18, 2008)

**요 약:** 본 연구에서는 하고초의 지표성분인 triterpenic acids 5종을 컬럼 크로마토그래피와 역상 HPLC를 이용하여 추출 및 분리했고, 이들 성분의 순도는 90% 이상임을 HPLC를 이용하여 확인했다. 고속원자충돌 이온화법-고분해능 질량분석기(FAB-HRMS)를 사용하여 지표성분의 분자량 및 원소조성을 결정했으며, 지표성분의 구조 분석은 FAB-MS/MS 의해 음이온 및 양이온 모드에서 수행하였다. Triterpenic acid류의 충돌유발분해(collision-induced dissociation, CID) 탄뎀 질량분석(MS/MS) 스펙트럼에서 protonated molecule인  $[M+H]^+$  및 deprotonated molecule인  $[M-H]^-$  이온의 CID는 주로 retro Diels-Alder (RDA), 탈수 (dehydration) 및 탈탄산(decarboxylation) 반응에 의한 다양한 생성이온들이 나타났다. 특히,  $[M-H]^-$  이온의 CID-MS/MS 스펙트럼에서는 charge-remote fragmentation (CRF) 현상에 의한 이온들도 특성이온으로 나타났다. 이들 CID-MS/MS 스펙트럼의 해석을 통하여 하고초의 지표성분인 triterpenic acids의 구조 규명을 수행하였다.

**Abstract:** Five triterpenic acids as marker compounds were extracted and isolated from *Prunellae Spica* by column chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), and their purity was determined by HPLC (purity  $\geq 90\%$ ). Molecular weight and elemental compositions of the five marker compounds were determined by fast atom bombardment high-resolution mass spectrometry (FAB-HRMS). The structural determination of the five marker compounds was carried out fast atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (FAB-CID-MS/MS). The collision-induced dissociation (CID) of protonated molecules  $[M+H]^+$  and deprotonated molecules  $[M-H]^-$  produced diverse product ions due mainly to retro Diels-Alder reaction (RDA), dehydration and decarboxylation. Moreover, the CID-MS/MS spectra of the  $[M-H]^-$  ions were observed charge-remote fragmentation (CRF) patterns. On the basis of interpretation of CID-MS/MS spectra, structural elucidation of triterpenic acids isolated from *Prunellae Spica* was clearly performed.

**Key words:** *Prunellae Spica*, triterpenic acid, structural analysis, FAB-CID-MS/MS, dissociation patterns

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-961-9255 Fax : +82-(0)2-961-0357

E-mail : jhong@khu.ac.kr

## 1. 서 론

한약재는 인간의 질병을 예방하여 건강을 유지하게 하거나 혹은 병에 걸렸을 때 치료의 목적으로 아주 오랫동안 폭넓게 사용되어져 왔다. 일반적으로 한약재는 매우 다양한 성분으로 구성되어 있으며, 주요 효능을 나타내는 생리활성 성분에 대해 정확히 규명하기 어려운 실정이다. 따라서 한약재 표준화를 위한 약재별 지표물질 선정에 대한 연구는 지속적으로 수행되고 있다. 생리활성 성분의 양은 같은 종이라 할지라도 서식 환경, 수확 시기, 저장 기간 및 사용 방법에 따라 큰 차이를 보인다.<sup>1,2</sup> 이와 같은 다양한 변화 요인들은 처방전에 의한 정확한 조제에도 불구하고 생리활성 성분에 대한 일정한 함량을 나타내기 어렵다. 한약재의 이러한 단점을 극복하고 활용도를 높이려면 양약의 경우처럼 언제 어디서나 동일한 효능을 나타낼 수 있도록 처방에 따르는 정확하고 일정한 성분과 함량이 지켜져야 한다. 그러므로 각 약재별 생리활성 성분에 대한 체계적인 연구와 그에 따른 지표물질 선정을 통하여 표준화 작업이 반드시 수행되어야 한다. 또한 한약재의 표준화를 위해서 지표성분의 정확한 구조분석은 기본적으로 선행되어야 할 과정이다.

하고초(夏枯草, *Prunellae Spica*)는 주변에서 쉽게 찾아볼 수 있는 다년생 약초인 꿀풀(*Prunella vulgaris* L., Fam. Labiatae)의 화수 부분을 건조하여 만든 약재로 주로 동아시아 지역에서 자생하며, 청간(淸肝), 이뇨(利尿), 소염(消炎), 해열(解熱) 및 혈압강하(血壓降下) 등에 사용되는 전통 생약재이다.<sup>3</sup> 이 한약재는 triterpenic acids, phenolic acids, flavonoids 및 saponins 등의 활성 성분을 포함하고 있다.<sup>4,5</sup> 그 중에서도 oleanolic acid, ursolic acid, hydroxyoleanolic acid 등과 같은 triterpenic acids는 하고초의 지표성분으로 항염증(anti-inflammatory), 항알러지(anti-allergic), 항종양(anti-tumor), 항당뇨(anti-diabetic), 보간(hepatoprotective) 및 anti-HIV 등의 효능을 가지고 있다.<sup>6-9</sup>

한약재의 지표성분들은 일반적으로 상업적으로 판매되는 수가 극히 적기 때문에 지표성분에 대한 분리 및 동정은 꼭 필요한 과정이다. 추출 및 분리는 극성이 다른 다양한 용매를 이용하여 각 성분을 분획한 후 크로마토그래피 방법을 통해 분리된다.<sup>10-12</sup> 구조 분석은 주로 핵자기 공명분광기(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR), 질량분석법(mass spectrometry, MS)을 이용하여 수행된다. 특히 질량분석법은 한약재

에서 추출한 미량의 화합물에 대한 구조 분석이 매우 유용하며, electron ionization (EI),<sup>13-15</sup> atmospheric pressure chemical ionization (APCI),<sup>16,17</sup> electrospray ionization (ESI)<sup>18-20</sup> 및 fast atom bombardment (FAB)<sup>21</sup> 등 다양한 MS 이온화 방법을 통해 추출 분리된 물질의 구조 분석을 수행하고 있다. 최근에 triterpenic acids의 구조 정보를 얻기 위해 저-에너지(low-energy) CID법을 이용한 LC-ESI-MS/MS와 LC-APCI-MS/MS가 사용되고 있으며, LC를 이용하기 때문에 여러 가지 화합물이 섞여있는 혼합물을 동시에 분석할 수 있으면서도 넓은 측정 범위와 좋은 감도를 나타내는 것이 장점이다. 하지만 낮은 에너지로 충돌을 일으키기 때문에 FAB-MS에 비해 제한적인 구조 정보만을 제공한다.<sup>16-20</sup>

최근 들어 한약재의 생리활성 성분 혹은 지표물질에 대한 동정은 고분해능 질량분석기(high-resolution mass spectrometry, HRMS)를 이용한 탄뎀질량분석 방법으로 수행되어지고 있다.<sup>22,23</sup> HRMS 분석은 미지 물질의 원소조성을 결정하는데 매우 유용한 자료를 제공한다. FAB-MS는 상대적으로 긴 시간동안 양이온 모드에서의  $[M+H]^+$  및 음이온 모드에서의  $[M-H]^-$  이온에 대하여 큰 세기의 안정한 스펙트럼을 보여주기에 때문에 화합물의 분자량을 결정하는데 매우 유용하였다. FAB-CID-MS/MS는 각각의 이온 모드에서 다양한 분해 패턴으로 구조분석에 중요한 정보를 제공하는 특징적인 분해이온들이 나타나기에 유사한 형태의 구조 해석에 매우 용이하였다. 또한 고-에너지(high-energy) CID-MS/MS를 사용하기 때문에 ESI와 APCI에서는 발견되지 않았던 많은 분해이온들을 추가적으로 생성시킬 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 하고초로부터 추출 분리한 5종의 triterpenic acids 성분인 oleanolic acid (OA), ursolic acid (UA), 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxyurs-12en-28oic acid (DUA), 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,24-trihydroxyolean-12en-28oic acid (TOA) 및 euscaphic acid (EA)를 고분해능 FAB-MS를 이용하여 정확한 분자량과 원소조성을 측정하고, FAB-CID-MS/MS를 이용하여 양이온과 음이온 모드에서 triterpenic acids의 CID-MS/MS 스펙트럼을 해석하여 이들 화합물의 구조 규명 연구를 수행하였다. 동시에 유사구조에 대한 스펙트럼의 MS/MS 분해 패턴화 작업을 수행하여 triterpenic acid류의 특성이온을 규명하였으며, 이들 이온은 미지의 triterpenic acid류의 구조 분석에 활용할 수 있다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

#### 2.2.1. 시약

본 연구에 사용된 triterpenic acids 5종(oleanolic acid, ursolic acid, 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxyurs-12en-28oic acid, 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,24-trihydroxyolean-12en-28oic acid 및 euscaphic acid)은 하고초로부터 추출 및 분리 하였으며, HPLC를 이용하여 각각의 순도를 확인한 결과 90% 이상의 순도를 확인할 수 있었다. 하고초의 지표성분인 triterpenic acids 5종의 구조는 Fig. 1에 나타내었다. 추출 및 분리에 사용된 유기용매는 methanol, n-butanol, ethyl acetate, n-hexane, methylene chloride, chloroform 및 acetonitrile이며, 분석용 등급으로 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구매하였다. 5종의 triterpenic acid중 oleanolic acid와 ursolic acid의 표준품은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 하고초로부터 분리된 성분과 비교 확인하는데 사용하였다.

#### 2.2.2. 추출 및 분리

하고초로부터 지표성분인 5종의 triterpenic acids를 추출 분리하기 위하여 이전 연구에서 사용되었던 방법을 수정하여 사용하였다.<sup>24,26</sup> 국산 하고초 2 kg을

80% 메탄올을 사용하여 상온에서 3회 추출한 결과 180 g의 추출물을 얻었다. 추출물을 물에 현탁시킨 후 용매 극성을 이용하여 n-hexane (8 g), ethyl acetate (20 g) 및 n-butanol (16 g)으로 용매를 분획하였다. Ethyl acetate (20 g) 분획을 컬럼 크로마토그래피와 HPLC를 이용하여 5종의 하고초 지표성분 OA, UA, DUA, TOA 및 EA를 분리 및 정제하였다. 이들 triterpenic acids 5종의 화학적 구조는 Fig. 1에 나타냈으며, 하고초로부터 추출, 분리 및 정제 과정은 Fig. 2에 도식화 하였다.

#### 2.2.3. Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS)

본 연구에서 사용한 FAB-MS는 B/E 배열을 가진 이중집중(double-focusing) 분석관 기기인 JMS-700 Mstation 질량분석기(JEOL, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 이온원은 분해능이 2000 (10% valley)인 양이온과 음이온 모드에서 10 kV 가속전압을 사용하였다. 이온들은 10 kV의 xenon atom gun을 사용한 고속원자충돌-이온화법(FAB)에 의해 생성되었다. 각 시료들은 메탄올에 녹인 후 시료 1  $\mu$ L를 매트릭스와 FAB probe tip 위에 놓고 쉰다. 여기에 사용된 매트릭스는 양이온 모드에서 3-nitrobenzyl alcohol (NBA, Sigma, USA)

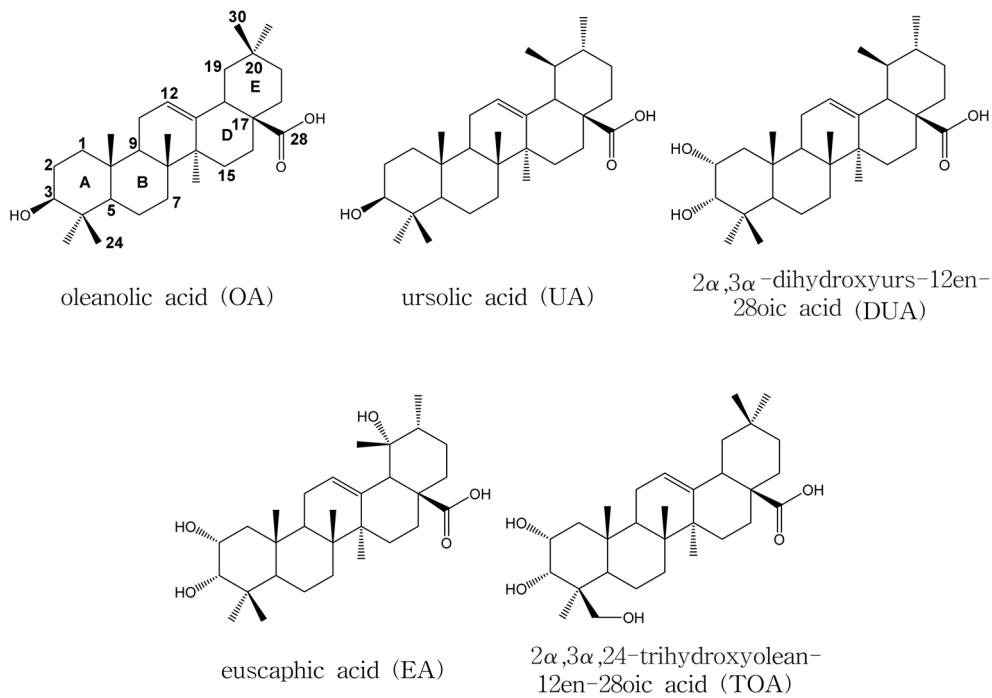


Fig. 1. Chemical structures of triterpenic acids isolated from *Prunellae Spica*.

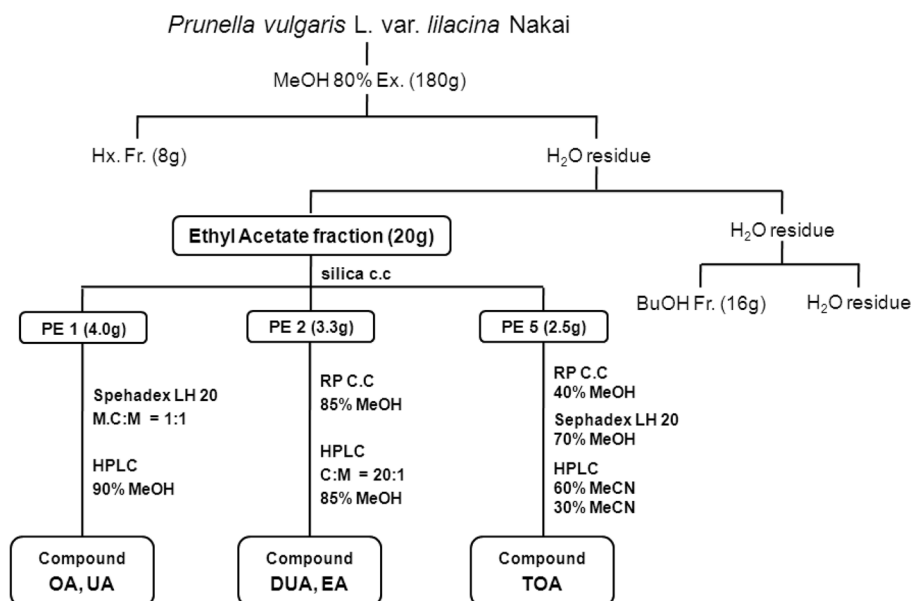


Fig. 2. Extraction and isolation of triterpenic acids from *Prunellae Spica*.

와 glycerol (JUNSEI, Japan)을 사용했고, 음이온 모드에서는 triethanolamine (TEA, Sigma, USA)와 glycerol (JUNSEI, Japan)을 사용하여 분석하였다. Calibration은 각 이온 모드에서 표준품인 Ultramark 1621 (PCR, Gainville, FL, USA)을 사용하여 수행하였다.

고분해능 FAB-MS는 분해능 5000 (10% valley)에서 측정하였다. 음이온 모드에서 시료 1  $\mu$ L를 매트릭스와 혼합한 후 표준품인 polyethylene glycol (PEG 600, Sigma, USA) 1  $\mu$ L를 사용하여 분석하였다.

B/E-linked scan 실험은 분해능 2000 (10% valley)에서 전구이온(precursor ion)을 10 kV로 가속 시킨 후, 일차무장영역(first field-free region, FFR)에서 충돌유발분해반응을 통해 생성이온(product ion)들을 얻었다. 충돌실에 충돌가스인 헬륨을 주입 후, 전구이온의 신호가 50%로 줄어들도록 압력을 유지하면서 여덟 번 스캔하여 얻은 신호를 평균하여 스펙트럼을 얻었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. FAB-MS를 이용한 분자량 확인

하고초에서 추출한 5종의 triterpenic acids는 이 약재의 지표물질로 선정하여 한약재 표준화 수행을 위하여 사용된 물질이다. 지표물질의 표준화에 앞서 추출된 지표성분의 구조분석은 우선적으로 수행되어야 한다. 하고초에서 추출한 5종의 triterpenic acids는 공

통적으로 30개의 탄소를 기본 구성으로 5개의 ring이 연결되어있는 pentacyclic 형태이며, C-12에 한 개의 이중결합과 C-17에 카르복시기 위치하고 있다. 이들 triterpenic acids 5종은 매우 유사한 형태를 가지고 있으며 각각은 작용기(functional group)의 개수 혹은 위치 차이로 구분되어 진다. 특히 UA와 OA는 메틸기가 각각 C-19와 C-20 위치에 치환되어 있을 뿐 나머지 부분은 완전히 동일한 형태이며, 구조적인 유사성으로 인해 매우 비슷한 화학적 물리적 성질을 나타내고 생리활성 또한 매우 흡사하다. DUA와 EA는 UA와 기본 구조가 동일하며, 단지 수산기(hydroxyl group)의 개수와 위치 차이만을 보인다. TOA는 OA와 동일한 구조를 기본 바탕으로 수산기의 개수와 위치 차이만을 보인다. DUA는 C-2 위치에, EA는 C-2와 C-19 위치에, TOA는 C-2와 C-24 위치에 수산기가 더 추가된 형태이다. DUA, TOA 및 EA는 UA와 OA의 식물체 내에서 산화되어 생성된 것으로 추정된다.

본 연구에서는 지표물질의 분자량을 측정하기 위하여 양이온 모드와 음이온 모드의 FAB-MS로 각각 분석하였다. Triterpenic acid는 카르복시산을 가지고 있으므로 음이온 모드로 분해능 2000 (10% valley)에서 측정된 결과 Fig. 3에서 보듯이 deprotonated molecule인  $[M-H]^-$  이온이 매우 큰 이온세기를 나타냈다. 이는 이들 화합물의 카르복시기와 매트릭스(TEA 또는 glycerol)가 FAB sputtering 하는 과정에서 카르복시기

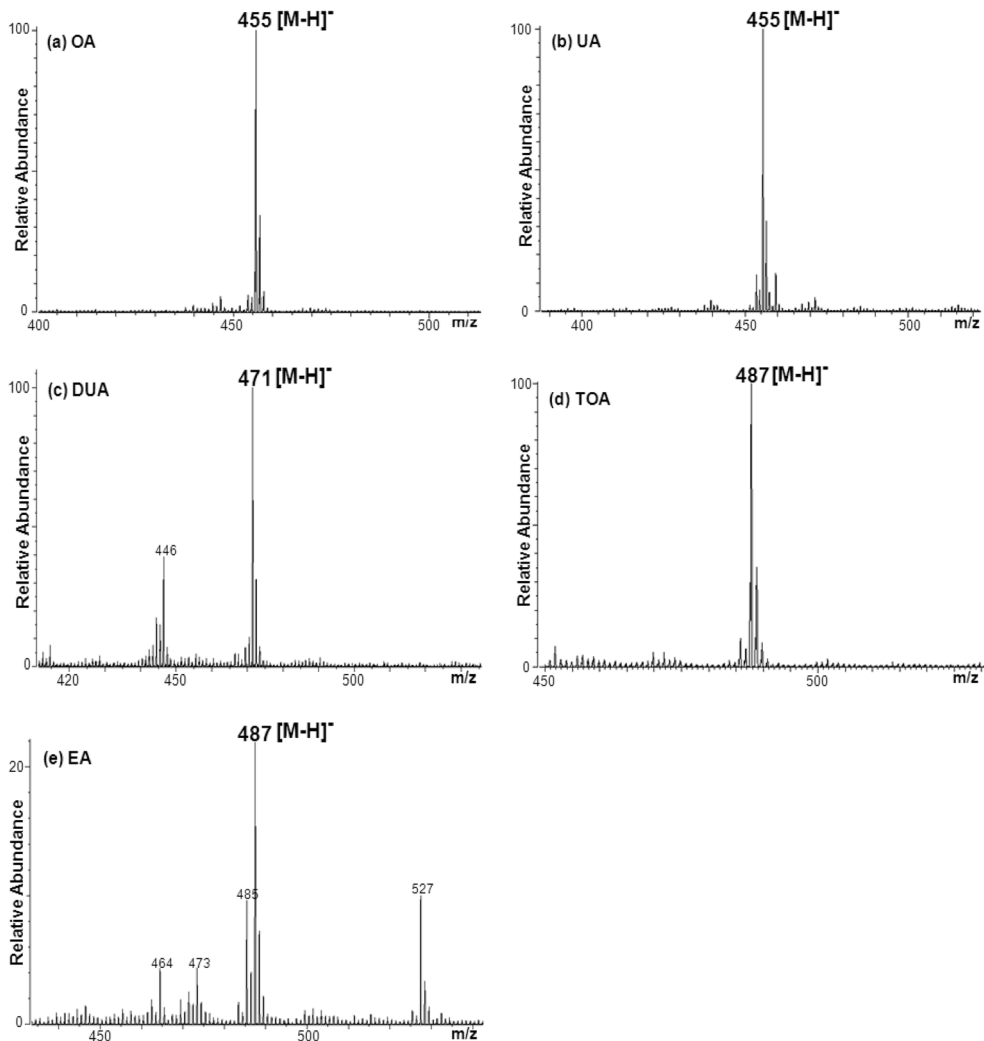


Fig. 3. Negative ion FAB-MS spectra of marker compounds (a; OA, b; UA, c; DUA, d; TOA and e; EA) isolated from *Prunellae Spica*.

가 탈수소화(deprotonation) 반응에 의해 쉽게 음전하를 형성하고, 카르복시기에 존재하는 두 개의 산소원자가 음전하를 공유하는 공명현상으로 존재하여 매우 안정화되기 때문에 높은 감도를 나타내는 것이라 예상된다. 이들 5종의 triterpenic acids 각각의 탈수소화(deprotonated molecule)인  $[M-H]^-$  이온은  $m/z$  455 (OA 및 UA),  $m/z$  471 (DUA) 및  $m/z$  487 (TOA 및 EA)에서 매우 높은 감도로 나타나 이들의 분자량을 쉽게 유추할 수 있다.

양이온 모드에서 측정된 triterpenic acids 5종의 FAB-MS 스펙트럼은 Fig. 4에 나타내었다. 전체적으로 triterpenic acids 5종의 탈수소화(protonated molecule)

인  $[M+H]^+$  이온은 음이온 모드의  $[M-H]^-$  이온보다 감도는 다소 낮은 것으로 나타났다. 또한 양이온 모드에서는  $[M+H]^+$  이온 이외에 탈탄산 및 탈수반응에 의해 생성된 이온들이 나타났다. 예를 들면 OA와 UA의 FAB-MS 스펙트럼인 Figs. 4(a), (b)에서 보듯이  $m/z$  457은  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  439는  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  411은  $[M+H-HCO_2H]^+$  및  $m/z$  393은  $[M+H-H_2O-HCO_2H]^+$ 에 해당하며, 수산기의 개수만큼 추가적으로 일어나는 탈수반응에 의한 조각이온들이 관측되었다. 이러한 현상은 Figs. 4(c)~(e)에서 보듯이 TOA, DUA 및 EA에서도 동일한 조각 패턴을 갖는 이온들이 관측되었다. FAB-MS가 약한 이온화과정임에도 불구하고 이러한

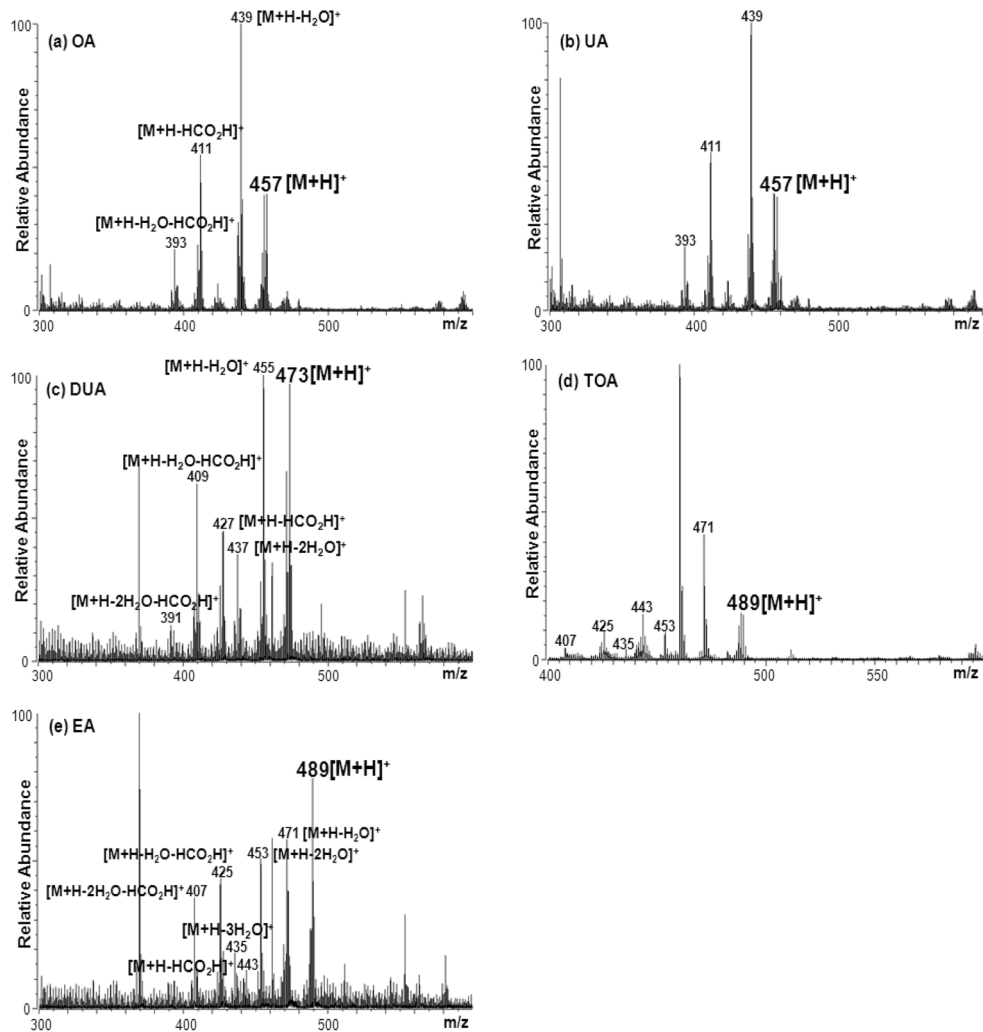


Fig. 4. Positive ion FAB-MS spectra of marker compounds (a; OA, b; UA, c; DUA, d; TOA and e; EA) isolated from *Prunellae Spica*.

이온들이 나타난 이유는 FAB sputtering 하는 과정에서 triterpenic acid의 수산기가 매트릭스로부터 양성자 하나를 받아들여 protonated molecule이 생성되고 난후 여분의 에너지는 물 분자를 떨어지게 하여 탈수 반응을 일으키고, 카르복시기는 C-18에서 수소원자를 받아 포름산(formic acid) 형태로 쉽게 떨어져 나가기 때문이다. 이와 같이 triterpenic acids의 FAB-MS 스펙트럼에서 나타난 이온들을 통해 이들의 분자량과 특성이온을 관측하며 일부 구조분석도 함께 수행할 수 있는 장점이 있다. 이 외에 Fig. 4에서  $m/z$  값을 따로 표기하지 않은 피크들은 사용된 FAB-matrix로부터 발생된 이온들이다.

### 3.2. High-resolution FAB-MS 측정

구조분석에 있어서 고분해능 질량분석법은 각 성분의 정확한 분자량 측정을 통해 지표성분의 원소조성을 밝혀낼 수 있는 좋은 장점을 가지고 있다. 앞서 FAB-MS 스펙트럼에서 보듯이 triterpenic acid는 음이온 모드에서 보다 좋은 감도를 나타내고 있어서 분해능 5000 (10% valley)의 음이온 모드에서 고분해능 질량분석법을 통해 각 분자량의 소수점 넷째자리까지의 정확한 분자량 값(exact mass)을 측정하였다. Table 1에 triterpenic acids 5종의 deprotonated molecule과 정확한 분자량 측정값을 요약하였다.  $[M-H]^-$  이온값의 이론치와 측정치의 오차 범위가  $-0.6$  mmu에서  $-2.5$

Table 1. Deprotonated molecules and exact mass measurements of [M-H]<sup>-</sup> ion (m/z) for marker compounds isolated from *Prunellae Spica*

Compound	Formula of [M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Exact mass measurement (m/z)		
			Theoretical	Observed	Difference (mmu)
OA	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	455	455.3525	455.3511	-1.4
UA	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	455	455.3525	455.3519	-0.6
DUA	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>4</sub>	471	471.3474	471.3454	-2.0
TOA	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>5</sub>	487	487.3423	487.3416	-0.8
EA	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>5</sub>	487	487.3423	487.3398	-2.5

mmu: milli wass unit

mmu로 측정되어 이들 화합물의 원소조성이 이론치와 거의 일치하는 것으로 나타났다.

### 3.3. FAB-CID-MS/MS에 의한 구조분석

하고초에서 추출한 triterpenic acids 5종의 정확한 구조분석을 위하여 분해능 2000 (10% valley)의 양이온 및 음이온 모드에서 FAB-CID-MS/MS를 이용하여 비교 실험하였다. 이 실험과정을 통해 양이온 모드에서 나타난 특성이온과 음이온 모드에서 나타난 특성이온을 종합적으로 해석해본 결과 구조분석에 유용하였다.

#### 3.3.1. 양이온 모드 FAB-CID-MS/MS에 의한 구조분석

Triterpenic acids 5종의 protonated molecule인 [M+H]<sup>+</sup> 이온의 고-에너지 CID-MS/MS 스펙트럼을 Fig. 5에 나타내었다. 각각의 스펙트럼은 triterpenic acids의 구조적 유사성으로 인해 CID에서도 유사한 분해 패턴을 보이고 있다. Triterpenic acids류의 [M+H]<sup>+</sup>에 대한 FAB-CID-MS/MS 스펙트럼의 특징은 크게 시클로헥산(cyclohexene) 구조를 가진 C-ring에서 RDA 분해 반응으로 인한 이온들과 탈탄산 및 탈수반응에 의해 생성된 이온들이 특성이온으로 나타났다.

Triterpenic acids의 [M+H]<sup>+</sup> 이온에 대한 FAB-CID-MS/MS 스펙트럼(Fig. 5)은 크게 두 부분의 특징적인 분해 패턴을 보인다. MS/MS 스펙트럼 상에서 m/z 380 이상의 높은 질량 이온 범위에서 탈탄산 및 탈수반응에 의한 분해 현상으로 나타나는 세기가 큰 이온들과 C-ring에서 RDA 반응에 의한 환 구조의 분해 현상은 각 성분의 구조적인 차이를 반영하면서도 전체적으로 유사한 패턴을 보여준다. 이러한 이온들은 다른 이온화 방식의 저-에너지 CID에 의해 발생된 이온분해 패턴과 매우 유사하다.<sup>16-20</sup> 그러나 FAB 이온화 방식처럼 고-에너지 CID에 의해 생성되는 분해이

온들의 패턴은 저-에너지 CID에 의한 이온분해로 생성된 이온 이외에도 연속적인 CH<sub>2</sub> group의 분해 반응과 같은 특징적인 이온들이 관측되어 구조분석에 보다 효과적으로 적용될 수 있다.

FAB-CID-MS/MS 스펙트럼의 분해 패턴을 triterpenic acids류의 특징을 가장 잘 포괄하고 있는 TOA의 [M+H]<sup>+</sup> 이온을 이용하여 Fig. 6에 도식화하였다. [M+H]<sup>+</sup> 이온의 FAB-MS에서 잘 확인되었던 탈탄산 및 탈수반응으로 인해 생성되었던 이온 형태들은 고-에너지 CID-MS/MS 스펙트럼(Fig. 5)에서 더 높은 세기로 나타났다. Fig. 5-(d)의 m/z 471, 453 및 435는 [M+H]<sup>+</sup>에 해당하는 전구이온으로부터 순차적으로 탈수반응이 일어나 생성된 분해이온이며, 이들의 구조는 Fig. 6에 나타내었다. 또한 m/z 443은 탈탄산 반응에 의해 [M+H]<sup>+</sup> 이온으로부터 포름산분자가 떨어져나가 생성된 [M+H-HCO<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> 이온에 해당하며, 그 후에 m/z 443으로부터 연속적으로 탈수반응이 일어난 m/z 425, 407 및 389 이온들도 나타났다. Fig. 5에서 보듯이, 이러한 분해 패턴은 다른 triterpenic acid류에서도 동일한 생성이온들이 관측되었다. Fig. 6의 m/z 393은 [M+H-H<sub>2</sub>O-HCO<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> 이온에 해당하는 m/z 425에서 C-24의 수산기가 탈수반응이 아닌 C-24와 함께 메탄올의 형태로 분해된 [425-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup> 이온에 해당한다. 탈탄산 반응이 일어날 때 카르복시기가 C-18의 수소 원자를 얻어 포름산의 형태로 분해되고, 나머지 부분인 [M+H-HCO<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> 이온은 C-18에 추가된 이중결합에 의해 컨주게이션(conjugation) 형태를 이루게 되어 구조적으로 더 안정화되기 때문에 스펙트럼에서 큰 세기를 보이게 된다. 위에서 언급했듯이 카르복시기 및 수산기를 가진 화합물은 특히 양이온 모드의 FAB-CID-MS/MS를 통해 작용기의 개수와 치환위치에 대한 중요한 구조적인 정보를 얻을 수 있다.

Triterpenic acid류의 [M+H]<sup>+</sup> 이온에 대한 CID-MS/

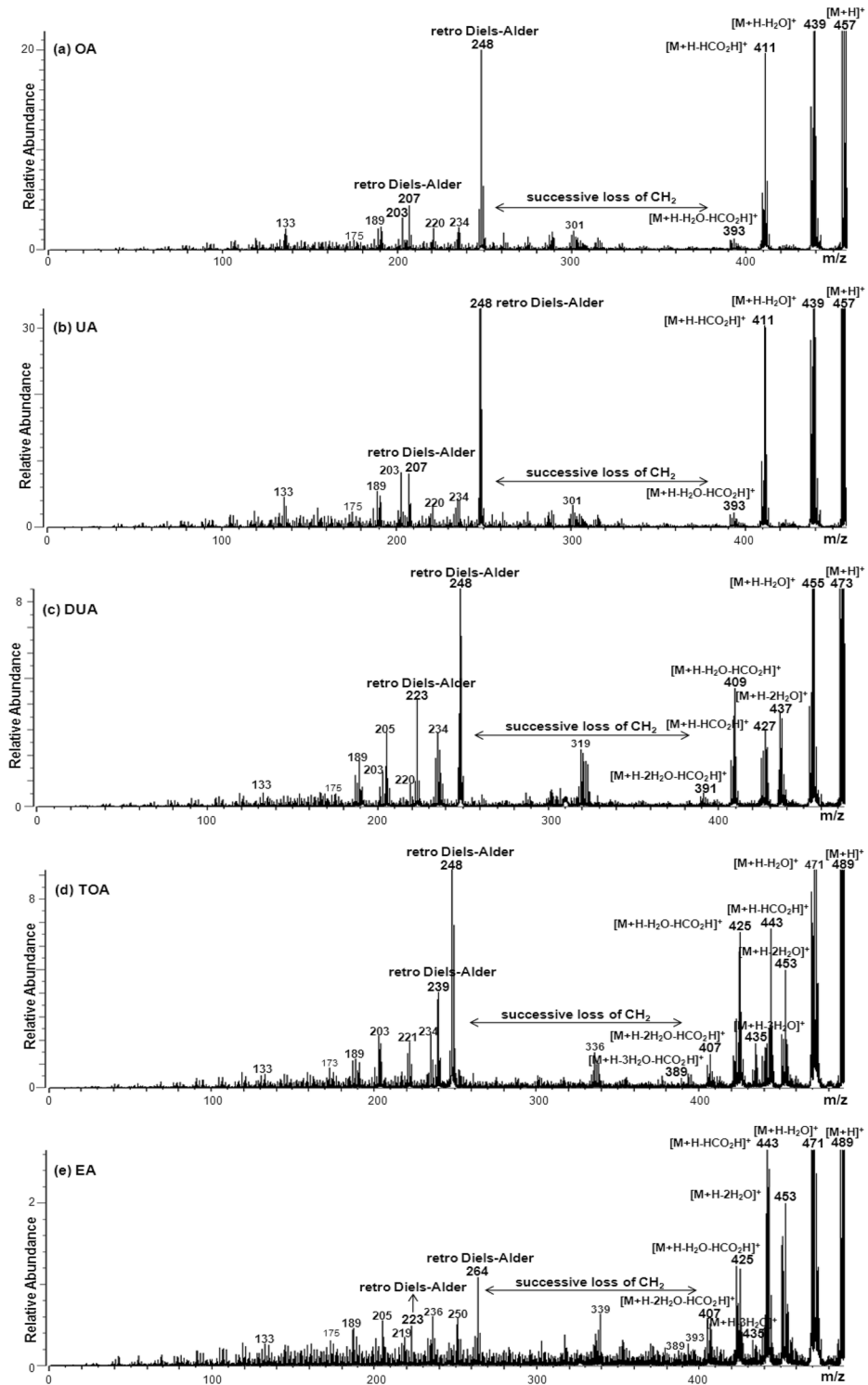


Fig. 5. FAB-CID-MS/MS spectra of marker compounds (a; OA, b; UA, c; DUA, d; TOA and e; EA) isolated from *Prunella Spica* by positive ion mode.



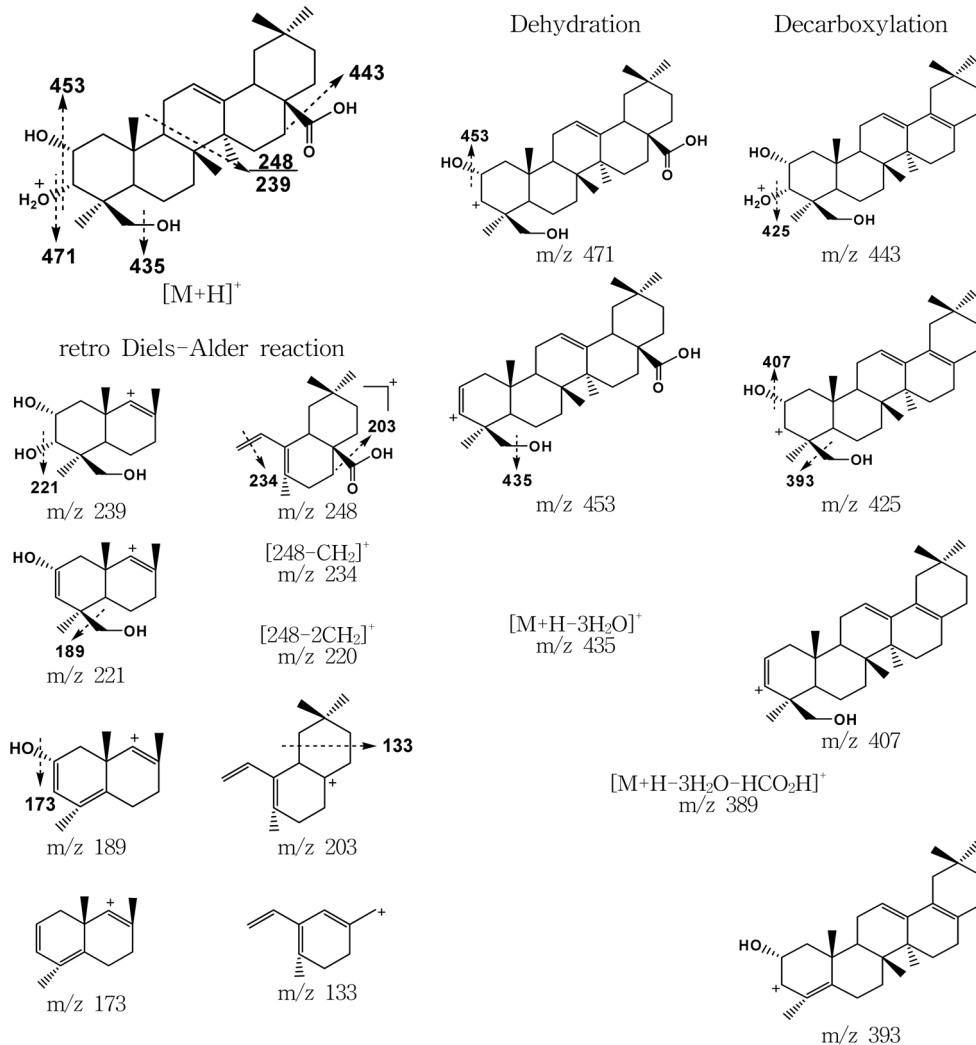


Fig. 6. FAB-CID-MS/MS dissociation patterns of  $[M+H]^+$  of TOA.

MS 스펙트럼에서의 또 다른 특성이온은 시클로헥산 구조를 가진 C-ring에서 RDA 반응에 의해 생성되는 분해이온들이다. Fig. 5에서 보듯이, 공통적인 분해는 C-ring의 C-9와 C-11사이 및 C-8과 C-14사이에서 일어나며, Fig. 5의  $m/z$  248 이온을 나타내는 ring D, E 부분과  $m/z$  207 이온을 나타내는 ring A, B의 두 부분으로 나타났다. 특히 Fig. 5(d)에서 보듯이 EA는 다른 성분들과 다르게 E-ring의 C-19에 수산기를 가지고 있기 때문에  $m/z$  248이 아닌  $m/z$  264로 나타났다. 이 이온은 D 또는 E-ring에 다른 작용기의 치환정보를 알려주는 중요한 진단이온으로 작용할 수 있다. 동일한 방법으로 Fig. 5(c)의  $m/z$  223, (d)의  $m/z$  239 및 (e)의  $m/z$  223 역시 A-ring의 C-2와 C-24 부분에 위치

하고 있는 수산기의 개수만큼 증가된 이온들이 나타났다. 그 외에 RDA 반응에 의해 형성된 ring A, B와 ring D, E의 구조에 위치하고 있는 작용기의 분해 현상도 나타났다. 그 예로 Fig. 6의  $m/z$  221, 205 및 189는  $m/z$  239로부터 탈수반응에 의해 생성된 분해이온이며,  $m/z$  248로부터 얻어진  $m/z$  234와 220은 탈메틸화(demethylation) 반응에 의해서 그리고  $m/z$  203은 탈탄산 반응에 의해서 얻어진 분해이온들이다. 또한  $m/z$  133은  $m/z$  203 이온의 E-ring에서 C-19와 C-21의 아래쪽이 분해되어 생성된 이온이다.

RDA 반응과 작용기들의 분해에 의해 생성되는 이온들 사이의  $m/z$  260~380 범위에서 나타나는 분해이온들은 환 구조의 분해 현상에 의해 연속적인  $CH_2$

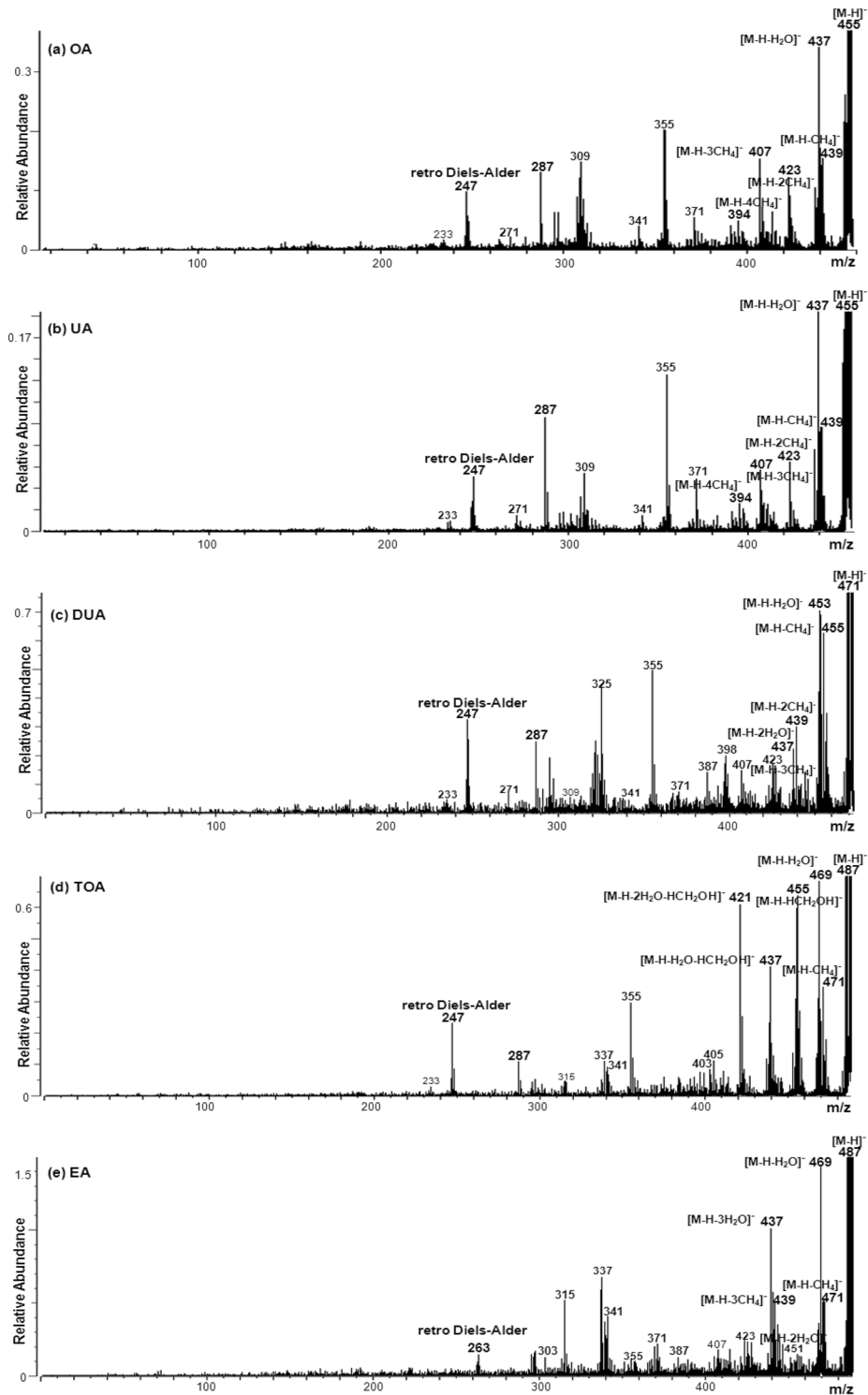


Fig. 7. FAB-CID-MS/MS spectra of marker compounds (a; OA, b; UA, c; DUA, d; TOA and e; EA) isolated from *Prunella Spica* by negative ion mode.

group의 분해로 인하여 생성되어진다. 이 이온들은 이들 사이의( $m/z$  260~380 범위) 탄소원자의 개수 정보를 제공해 준다. 반면에 양이온 모드에서는 주로 charge-driven 분해 반응이 일어나 CRF 현상에 의한 분해이온들과 경쟁적으로 스펙트럼에 나타났다. 양이온 모드에서 다양한 charge-driven 분해 반응이 우세하여 CRF 분해에 의해 생성된 이온들과 혼합되어 CRF 현상을 해석하기 어려웠다.<sup>27</sup> 또한 환 구조와 작용기들의 분해 반응에 대한 피이크들이 매우 큰 세기로 나타나기 때문에 상대적으로 CRF 현상에 의한 피이크들의 감도가 낮아져 해석에 더 큰 어려움이 있었다.

3.3.2 음이온 모드 FAB-CID-MS/MS에 의한 구조분석  
Triterpenic acids 5종의 deprotonated molecule인

[M-H]<sup>-</sup> 이온의 고-에너지 CID-MS/MS 스펙트럼은 Fig. 7에 나타내었다. 각각의 스펙트럼은 양이온 모드와 마찬가지로 triterpenic acids의 구조적 유사성으로 인해 CID 분해에서도 유사한 분해 패턴을 보이고 있다. Triterpenic acids류의 [M-H]<sup>-</sup>에 대한 FAB-CID-MS/MS 스펙트럼의 특징은 크게 RDA 분해 반응에 의한 이온들과 탈메틸화 및 탈수반응에 의해 생성된 이온 및 CRF 현상에 의한 이온들이 특성이온으로 나타났다.

Triterpenic acids의 [M-H]<sup>-</sup> 이온에 대한 FAB-CID-MS/MS 스펙트럼(Fig. 7)은  $m/z$  220 이상의 이온 범위에서만 특성이온들이 나타나고, 그 이하의 질량값을 갖는 이온은 거의 나타나지 않았다. 이는 카르복시기의 탈양성자로 인해 초기전하가 생성되지만 주변에

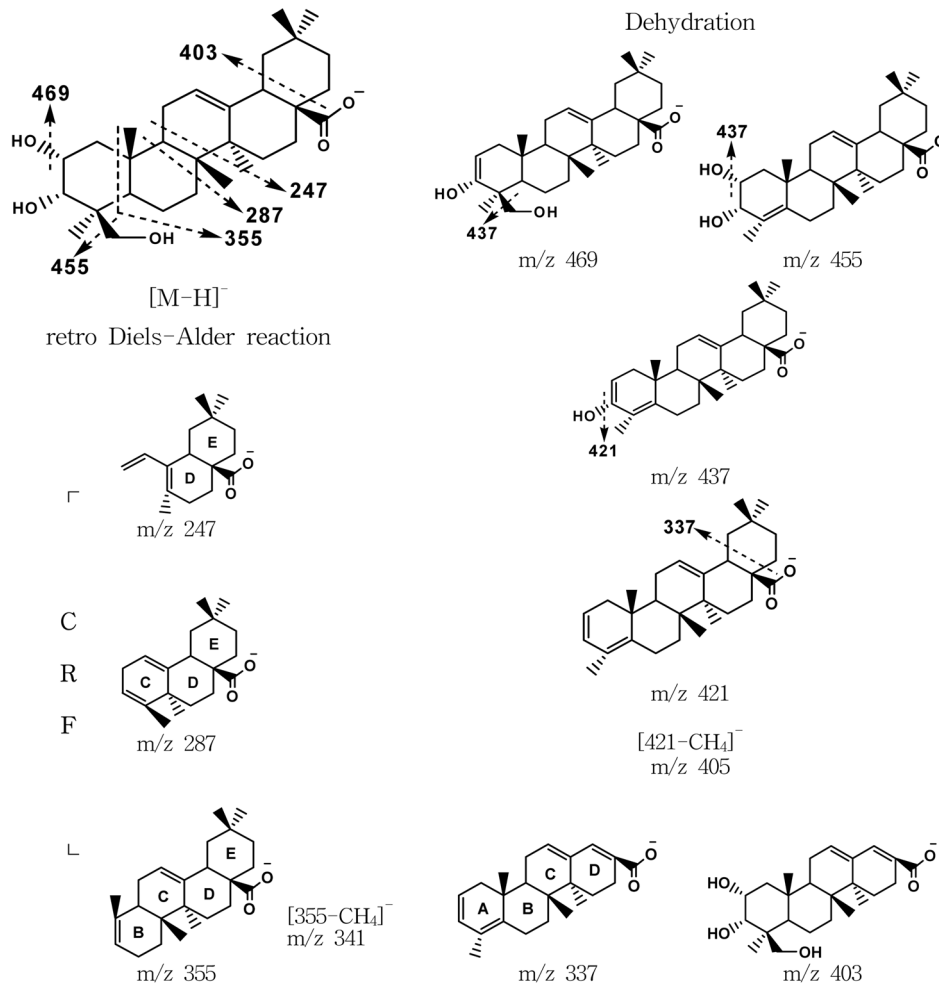


Fig. 8. FAB-CID-MS/MS dissociation patterns of [M-H]<sup>-</sup> of TOA.

다른 작용기가 존재하지 않아 낮은 질량의 이온이 발생되지 않는 것으로 기인된다. MS/MS 스펙트럼 상에서  $m/z$  390 이상의 높은 질량 이온 범위에서는 탈수반응 및 탈메틸화 분해 현상으로 나타나는 세기가 큰 이온들과 C-ring에서 RDA 반응에 의한 환 구조의 분해 현상은 각 성분의 구조적인 차이를 반영하면서도 전체적으로 유사한 패턴을 보여준다. 또한 기체 상태 이온이 전하가 위치한 부분으로부터 구조적으로 멀리 떨어져있는 곳에서부터 순차적으로 분해가 일어나는 현상을 CRF라하며,<sup>28,30</sup> triterpenic acids 5종의 [M-H]<sup>-</sup> 이온에 대한 고-에너지 CID-MS/MS 스펙트럼에서 공명형태의 음전하를 형성하고 있는 카르복시기를 기준으로 CRF 현상을 확인할 수 있었다. 이처럼 FAB 이온화 방식의 고-에너지 CID에 의해 생성되는 분해이온들의 패턴은 저-에너지 CID에 의해서는 생성되지 않는 많은 특성이온들을 나타내며, 양이온 모드에서의 고-에너지 CID-MS/MS 스펙트럼과 비교 분석되어 화합물의 구조분석에 보다 정확하고 효과적으로 적용될 수 있다.

FAB-CID-MS/MS 스펙트럼의 분해 패턴을 triterpenic acids류의 특징을 가장 잘 포괄하고 있는 TOA의 [M-H]<sup>-</sup> 이온을 이용하여 Fig. 8에 도식화하였다. [M-H]<sup>-</sup> 이온의 고-에너지 CID-MS/MS 스펙트럼(Fig. 7)에서 높은 질량 이온 범위에서는 탈메틸화 및 탈수반응에 의한 분해이온이 큰 세기로 나타났다. 이와 같은 분해 패턴은 양이온 모드에서 관찰된 현상과 비슷한 양상으로 나타났다. Fig. 8에서 보듯이  $m/z$  469, 455, 437 및 421 이온들은 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, [M-H-HCH<sub>2</sub>OH]<sup>-</sup>, [M-H-H<sub>2</sub>O-HCH<sub>2</sub>OH]<sup>-</sup> 및 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>OH]<sup>-</sup>에 해당하며, Fig. 7(d) 스펙트럼에서 다른 분해이온들에 비하여 매우 큰 세기로 나타났다. 반면 상대적으로 수산기의 수가 적은 Fig. 7(a)~(c)는  $m/z$  455, 439, 423, 407 및 394와 같은 탈메틸화 반응에 의해 생성된 분해이온들이 상대적으로 큰 세기로 나타났다.

Fig. 7의 각 스펙트럼에서 공통적으로 나타나는  $m/z$  247 이온은 RDA 반응에 의해 생성된 이온으로 공명형태의 음전하를 형성하고 있는 카르복시기를 포함한 ring D, E 부분이다. 양이온 모드의 경우와 다르게 ring A, B 부분이 나타나지 않는 이유는 아마도 RDA 반응을 통해 C-ring 위치에서 분해가 일어난 후에 수산기가 음전하를 띄며 안정화되기 어렵기 때문이라 추측된다. Fig. 7(e)의  $m/z$  263 이온은 나머지 구조들과 다르게 E-ring 부분의 C-19에 수산기가 위치하고 있기 때문에 RDA 반응에 의해 분해 현상이 일어날

때 16u 차이로 나타났다.

음이온 모드에서 [M-H]<sup>-</sup> 같은 closed-shell ion의 전하는 acidic site에 위치하여 고정되며, 그 전하를 기준으로 가장 먼 끝부분에서 선택적으로 일어나는 CRF 현상을 일으키는 경향이 있다. Fig. 8의  $m/z$  355, 287 및 247 이온은 음전하를 형성하고 있는 카르복시기로부터 가장 멀리 위치하고 있는 ring A부터 B와 C의 순서로 일어나는 순차적인 환 구조의 분해이온들을 나타내고 있다. 일반적으로 CRF 현상은 긴 알킬 사슬을 가지고 있는 지방산에서 가장 잘 나타나며,<sup>29,30</sup> 안정한 전하 부분이 일정한 위치에 고정되어 있을 때 더욱 잘 일어난다. Triterpenic acids 5종 [M-H]<sup>-</sup> 이온의 고-에너지 CID-MS/MS 스펙트럼을 통해 여러 개의 환 구조로 이루어진 화합물에서도 CRF 현상이 발생함을 확인할 수 있었다.

Fig. 7(d)의  $m/z$  403 이온은 E-ring에서 분해 반응이 일어나 생성된 분해이온(Fig. 8)으로, (a)와 (b)의  $m/z$  371 이온과 (c)와 (e)의  $m/z$  387 이온 또한 동일한 위치에서 분해가 일어나 각각의 수산기에 의한 차이를 반영하여 생성된 분해이온들이다. 또한  $m/z$  337은  $m/z$  403에서 탈수반응이 일어나 생성된 분해이온이다.

Triterpenic acids 5종 중 구조 이성질체인 UA와 OA 성분에 대한 양이온과 음이온 모드에서의 CID-MS/MS 스펙트럼을 바탕으로 특성이온을 통한 구조해석은 가능하였지만, 이들 두성분의 차이점인 메틸기의 위치에 대한 정보는 해석해내지 못하였다. 이는 메틸기가 C-19와 C-20의 유사한 위치에 치환되어 있어 이들 사이의 특성적으로 나타나는 분해 패턴이 나타나지 않아 MS/MS 스펙트럼 상에서 그 차이를 해석하기가 어려워 이들 이성체에 대한 구분이 명확히 이루어지지 않았다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 하고초로부터 생리활성 성분으로 잘 알려진 UA와 OA를 포함한 triterpenic acids 5종을 추출하여 그 구조를 규명함에 있어 고-에너지 FAB-CID-MS/MS의 유용성을 설명하였다. FAB-MS 스펙트럼에 나타난 이온들을 통해 triterpenic acids 5종의 분자량 측정과 일부 특성이온을 확인하였으며, 카르복시기의 존재로 인해 [M-H]<sup>-</sup> 이온이 좋은 감도로 확인되므로 음이온 모드에서 분자량 확인에 유용하다. [M+H]<sup>+</sup>와 [M-H]<sup>-</sup> 이온의 CID는 각 화합물의 구조에 대한 특징적인 생성이온들을 나타내어 구조 규명에

매우 유용한 정보를 준다. 고-에너지 CID-MS/MS의 각 이온 모드에서 모두 나타난 RDA 반응에 의한 C-ring의 분해현상과 작용기들의 위치 혹은 개수에 대한 각 성분의 구조적인 차이를 확인하는데 유용하다. 특히 음이온 모드의 스펙트럼을 통해 여러 개의 환 구조로 이루어진 화합물에서도 CRF 현상의 발생이 확인되었다.

FAB-CID-MS/MS는 미량의 시료만으로도 매우 짧은 시간 안에 화합물을 분석할 수 있을 뿐만 아니라 높은 에너지를 사용하기 때문에 더 상세한 분해패턴까지 확인가능하다는 장점이 있어 구조 확인에 보다 유용한 정보를 얻을 수 있다. 양이온 및 음이온 모드 FAB-MS/MS 스펙트럼의 분해 패턴 해석을 통해 보다 정확한 구조분석이 이루어질 수 있었다. 향후 FAB-CID-MS/MS를 이용한 구조 규명 방법을 통해 현재까지 보고된 바 없는 새로운 triterpenic acids류의 구조를 쉽게 규명할 수 있는 기반 자료로 활용될 수 있을 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 연구과제인 “한약재 평가기술 과학화 연구”의 연구비에 의해 수행되었다.

### 참고문헌

1. N. K. Dubey, R. Kumar and P. Tripathi, *Current Science*, **86**(1), 37-41(2004).
2. M. M. W. B. Hendriks, L. C. Juarez, D. D. Bont and R. D. Hall, *Anal. Chim. Acta*, **545**, 53-64(2005).
3. J. S. Kim, S. S. Kang, K. S. Lee, S.-Y. Chang and D. H. Won, *Kor. J. Pharmacogn.*, **31**(4), 416-420(2000).
4. K. S. Nam and Y. H. Shon, *Kor. J. Pharmacogn.*, **35**(2), 147-151(2004).
5. Y. H. Shon, K. T. Lee, S. H. Park, K. H. Cho, J. K. Lim and K. S. Nam, *Kor. J. Pharmacogn.*, **32**(4), 269-273(2001).
6. E. Nadinic, S. Gorzalczany, A. Rojo and C. V. Baren, *Fototerapia*, **70**, 166-171(1999).
7. M. E. Alvarez, A. E. Rotelli, L. E. Pelzer, J. R. Saad and O. Giordano, *II. Farmaco.*, **55**, 502-505(2000).
8. C. Farina, M. Pinza and G. Pifferi, *II, Farmaco.*, **53**, 22-32(1998).
9. N. Banno, T. Akihisa, H. Tokuda, K. Yasukawa, H.

- Higashihara, M. Ukiya, K. Watanabe, Y. Kimura, J. Hasegawa and H. Nishino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(1), 85-90(2004).
10. L. Guo, S. Y. Cho, S. S. Kang, S. H. Lee, H. Y. Beak and Y. S. Kim, *J. Ethnopharm.*, **113**, 306-311(2007).
11. Y. C. Wang and Y. S. Yang, *J. Chromatogr. B.*, **850**, 392-399(2007).
12. J. Li, H. Qi, L.-W. Qi, L. Yi and P. Li, *Anal. Chim. Acta*, **596**, 264-272(2007).
13. F. Modugno, E. Ribechini and M. P. Colombini, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 1787-1800(2006).
14. H. Heinzen, J. X. deVries, P. Moyna, G. Remberg, R. Martinez and L. F. Tietze, *Phytochemical Analysis*, **7**, 237-244(1996).
15. J.-Q. Gu, Y. Wang, S. G. Franzblau, G. Montenegro and B. N. Timmermann, *Phytochem. Anal.*, **17**, 102-106(2006).
16. G. A. van der Doelen, K. J. van den Berg, J. J. Boon, N. Shibayama, E. R. de la Rie and W. J. L. Genuit, *J. Chromatogr. A*, **809**, 21-37(1998).
17. L. Huang, T. Chen, Z. Ye and G. Chen, *J. Mass Spectrom.*, **42**, 910-917(2007).
18. G. M. Cabrera, A. P. Vellasco, L. M. Levy and M. N. Eberlin, *Phytochem. Anal.*, **18**, 489-495(2007).
19. L. Lacikava, M. E. Abdel-Hamid, L. Novotny, I. Masterova and D. Grancai, *Chromatographia*, **63**, 117-122(2006).
20. L. Novotny, M. E. Abdel-Hamid, H. Hamza, I. Masterova and D. Grancai, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 961-968(2003).
21. M.-R. Lee, C.-M. Chen, B.-H. Hwang and L.-M. Hsu, *J. Mass Spectrom.*, **34**, 804-812(1999).
22. R. K. Boyd, P. A. Bott, B. R. Beer, D. J. Harvan and J. R. Haas, *Anal. Chem.*, **59**, 189-193(1987).
23. A. P. Bruins, K. R. Jennings and S. Evans, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **26**, 395-404(1978).
24. H. Kojima, H. Tominaga, S. Sato and H. Ogura, *Phytochemistry*, **26**(4), 1107-1111(1987).
25. M. S. Ali, S. A. Ibrahim, S. Jalil and M. I. Choudhary, *Phytother. Res.*, **21**, 558-561(2007).
26. T. Nakanishi, Y. Inatomi, H. Murata, S. Ishida, Y. Fujino, K. Miura, Y. Yasuno, A. Inada, F. A. Lang and J. Murata, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**(2), 334-336(2007).
27. C. Cheng and M. L. Gross, *Mass Spectrometry*

- Reviews*, **19**, 398-420(2000).
28. N. J. Jensen, K. B. Tomer and M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1863-1868(1985).
29. J. Hong, K. Cho, Y. H. Kim, C. Cheong, K.-S. Lee and J. H. Jung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1120-1126(2001).
30. J. H. Gil, J. Seo, K.-J. Kim, J. H. Jung, O.-S. Jung, M.-S. Kim and J. Hong, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 1253-1256(2006).