

LC-MS/MS를 이용한 인체 혈장에서 Ginsenoside Rb1의 분석법 검증

한송희^{1,2*} · 김윤정^{1,2*} · 전지영^{1,2} · 황민호^{1,2} · 임용진^{1,2} · 이선영^{1,3} · 채수완^{1,2,4} · 김민걸^{1,2*}

¹전북대학교병원 의생명연구원, ²전북대학교병원 임상시험센터
³전북대학교병원 방사선종양학과, ⁴전북대학교 의학전문대학원 약리학교실

Validation of the LC-MS/MS Method for Ginsenoside Rb1 Analysis in Human Plasma

Song-Hee Han^{1,2*}, Yunjeong Kim^{1,2*}, Ji-Young Jeon^{1,2}, Minhoo Hwang^{1,2}, Yong-Jin Im^{1,2},
Sun Young Lee^{1,3}, Soo-Wan Chae^{1,2,4}, and Min-Gul Kim^{1,2*}

¹Biomedical Research Institute, ²Clinical Trial Center, and

³Dept. of Radiatio Oncology, Chonbuk National University Hospital, Jeonbuk 561-712, Korea

⁴Dept. of Pharmacology, Chonbuk National University Medical School, Jeonbuk 561-712, Korea

Abstract

A new liquid chromatographic tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) assay for the quantification of ginsenoside Rb1 in human plasma was developed and validated. The separation was performed on a Agilent C18 column (4.6 mm×150 mm, particle size 5 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in methanol and a flow rate of 0.9 mL/min. The analyte was determined using electrospray positive ionization mass spectrometry in the multiple reaction monitoring (MRM) mode (m/z 1131.714→365.303). Human plasma samples were extracted with acetone : water (50:50) by the liquid-liquid extraction method. The method was linear over the dynamic range of 10~500 ng/mL with a correlation coefficient of $r=0.9995$. The intra- and inter-day precision over the concentration range of ginsenoside Rb1 was lower than 5.8% (correlation of variance, CV), and the accuracy was between 96.0~104.6%. This LC-MS/MS assay of ginsenoside Rb1 in human plasma is applicable for quantification in a pharmacokinetic study.

Key words: LC-MS/MS, ginsenoside Rb1, human plasma, validation

서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(*Araliaceae*)에 속하는 다년생초본류로써 한국, 히말라야, 중국, 일본, 북미에서 발견되는 약용식물이며 특히, 한국에서 자생하는 인삼을 고려인삼이라 한다(1). 고려인삼은 한방에서 중요한 약재로 사용되고 있고, 주요 성분의 효능에 대한 과학적 연구에 따라 면역효과, 중추신경계, 각종 스트레스, 항산화, 심혈관장애 개선작용 등에 관한 약리작용이 밝혀지고 있다(2-7). 인삼의 주요 활성성분은 사포닌이라고 부르는 ginsenoside로써 protopanaxadiol(PPD)계와 protophanaxatriol(PPT)계로 나누어진다. PPD계는 C-3 및 C-20의 OH기에 배당체결합(glycosidic bond)을 가진 구조로 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd 등이 있고, 대체적으로 중추신경계의 안정, 억제의 효능이 있다고 알려져 있다. 반면 PPT계에는 C-6 및 C-20의 OH기에 배당체결합을 가지고 있으며 ginsenoside Re, Rg1 등이 있고, 중추신경계의 흥분작용을 가지

는 등의 약리효능이 있는 것으로 알려져 있다(8). 지난 30여년간 인삼 성분 연구에서는 ginsenoside 분석이 가장 많은 비중을 차지하고 주로 고성능 액체 크로마토그래프법(high performance liquid chromatography, HPLC)을 정성 및 정량분석에 이용하고 있으며, 현재까지도 가장 많이 사용되고 있다(9). 대부분 인삼 자체의 추출물에서 많은 양을 가진 성분을 분석해 왔으며, ginsenoside Rg1과 같은 미량의 성분들도 개발 진행 중에 있다(10). PPD계 성분 중 하나인 ginsenoside Rb1은 ginsenoside Rg1과 함께 인삼의 주요성분으로서 한국, 유럽, 일본, 중국 등지에서 인삼제품 관리의 지표 성분(marker substance)으로 활용되고 있는 성분이다(11, 12). 기존에 인삼제품에서의 분석법은 많이 알려져 있으나 효능에 대한 최근 소비자들의 관심이 증가함에 따라 인삼 섭취 후 체내에서의 약동학적 특성에 대한 연구가 주목받게 되었다. 그동안 인체 혈장에서 미량으로 존재하는 ginsenoside Rb1은 HPLC로는 감도가 낮아 분석에 어려움이 있었고, 현대화, 표준화된 최신의 분석법이 필요하였다. 최근에

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: mgkim@jbtc.org
Phone: 82-63-250-2532, Fax: 82-63-250-2349

고감도 장비인 LC-MS/MS(liquid chromatography mass spectrometry, 액체 크로마토그래피 질량분석기)를 이용한 생체시료 분석법이 개발되면서 인삼성분에 대한 분석법도 적용할 수 있게 되었다. 본 분석법뿐만 아니라 앞으로 다른 ginsenoside들의 생체시료 내 분석법이 확립된다면 전반적인 인삼의 체내 약동학적 특성들에 대해서도 연구할 수 있는 계기가 될 것이다.

본 연구팀은 감도 및 정확성, 정밀성이 뛰어난 LC-MS/MS를 이용하여 인체 혈장에서 ginsenoside Rb1의 최저정량 한계 설정 및 빠른 분석 시간, 간단한 전처리 방법을 개발함으로써 이 분석법이 시험목적에 적합함을 과학적으로 입증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

이 연구에서 사용된 표준물질인 ginsenoside Rb1은 엠보 연구소(purity 98%, Seoul, Korea)에서 구입하였고 내부표준물질로 사용한 digoxin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다(Fig. 1). 또한 ginsenoside Rb1 분석 시 사용한 이동상의 물질인 formic acid는 Sigma에서 구입하였고 water와 methanol은 Fisher Scientific Korea(Seoul, Korea) 제품으로 HPLC등급을 사용하였으며 전처리 과정 중에 사용된 acetone은(purity 98%) Wako Pure Chemical(Osaka, Japan)에서 구입하였다.

표준용액 제조

Ginsenoside Rb1 표준품 10 mg을 정확히 측정하여 메탄올 10 mL에 용해시킨 후 최종 농도 10 µg/mL로 만들어 표준

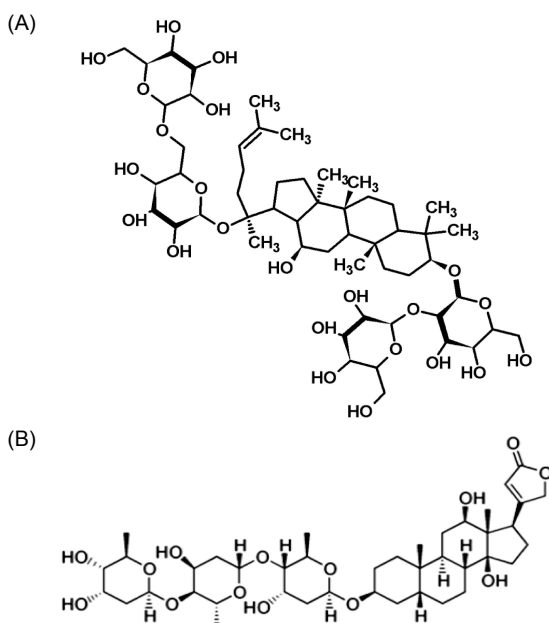


Fig. 1. Chemical structures of (A) ginsenoside Rb1 and (B) digoxin.

용액을 제조한 후 100, 200, 400, 800, 1,000, 2,000, 4,000, 5,000 ng/mL의 농도가 되도록 표준 검량선용 용액을 만들었다.

Ginsenoside Rb1의 추출과 검량선의 작성

인체 혈장 90 µL에 검량선용 용액 10 µL를 넣고, acetone : methanol(50:50)을 500 µL씩 더하여 넣고 4°C, 1,500×g에서 10분 동안 원심분리 한다. 원심분리 한 상층액 300 µL를 45°C의 진공원심농축기(2231, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)에서 45°C, 40분간 진공농축 한다. 진공농축 후 잔사액에 water : methanol(50:50) 용액 100 µL를 넣고 digoxin(1 µg/mL)을 100 µL씩 더하여 넣은 후 2분 동안 혼합한다. LC-MS/MS vial에 옮겨 분석하였으며 10, 20, 200, 400 ng/mL 농도의 QC(quality control) 시료 또한 혈장시료를 이용하여 상기의 검체 처리방법으로 처리하여 분석하였다. 표준 검량선용 용액의 LC-MS/MS 분석 결과에서 얻은 내부표준물질인 digoxin의 피크 면적에 대한 ginsenoside Rb1의 피크 면적비를 구하여 검량선을 작성하였다.

LC-MS/MS 분석

Ginsenoside Rb1의 분석을 위해 사용한 분석기기로는 Agilent HPLC 1200 series(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), API4000 LC-MS/MS(AB SCIEX, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. 인체 혈장 내에서 ginsenoside Rb1의 분석을 위하여 전기분무이온화법[electrospray ionization(ESI) mode]을 이용하였으며, 질량분석기의 세부 조건은 curtain gas 20, nebulizing gas 50, turbo gas 50, source 온도는 450°C, CAD gas는 10, entrance potential 10 V, MRM(multiple reaction monitoring) ion transfer(m/z) 및 collision energy(CE)는 각각 77 V, 15 V였다. 또한, ginsenoside Rb1, digoxin 각각의 precursor molecular ion의 m/z는 1131.714와 781.453이며, product ion의 m/z는 365.303과 651.500으로 모니터링 하였다. 이동상으로는 0.1% formic acid가 첨가되어 있는 water(A)와 methanol(B)을 사용하여 0분: 50%(A), 50%(B), 1분: 0%(A), 100%(B), 4.6분: 0%(A), 100%(B), 6.5분: 50%(A), 50%(B) 기울기 용리 조건으로 설정하여 분석하였고 사용한 분석 칼럼은 C18(Agilent® 4.6 mm×150 mm, particle size 5 µm)이었으며, 0.9 mL/min의 유속으로 시료 10 µL를 주입하여 분석하였다. LC-MS/MS의 분석조건은 Table 1과 같다. 정량은 상기 검량선 작성을 위한 시료 전처리를 통하여 얻어진 LC chromatogram으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 ginsenoside Rb1의 피크 면적비를 구하여 미리 작성된 검량선에 의해 혈장 시료 중 ginsenoside Rb1의 농도를 산출하였다.

분석법 검증

인체 혈장에 ginsenoside Rb1의 표준용액을 spiking하여 만든 ginsenoside Rb1의 직선성(linearity), 정밀성(intermediate precision), 정확성(accuracy), 특이성(specificity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantifi-

Table 1. Ion source and analyte-dependent MS parameters

Source parameter	Value
Curtain gas (psi)	20
Ionspray voltage (V)	5500
Temperature (°C)	450
GS 1 (psi)	60
GS 2 (psi)	60
EP (V)	10
CXP (V)	10
DP for ginsenoside Rb1	261
DP for digoxin	121
CE for ginsenoside Rb1	77
CE for digoxin	15

cation, LOQ), 회수율(recovery)을 측정하여 ginsenoside Rb1의 분석법을 검증하였다. Ginsenoside Rb1 특이성 검증으로는 표준용액과 같은 방법으로 인체혈장에서 전처리한 ginsenoside Rb1을 LC-MS/MS로 분석한 후 두 개의 크로마토그램을 비교하여 피크가 간섭물질의 방해 없이 같은 시간대에 분리되어 나오는지 확인하였고, 6개의 기원이 혈장공시료(여섯 사람에서 채취한 생체시료)를 이용하여 최저정량한계에서 간섭시험을 수행하였다. 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 500 ng/mL의 ginsenoside Rb1 검량선용 용액을 LC-MS/MS로 분석하여 피크의 면적에 대한 농도비 관계를 나타내는 검량선을 작성하여 직선성을 확인하였으며, 검출한계는 검출 중의 불순물 또는 분석물질을 정확한 값으로 정량화할 필요가 없는 최소의 양을 확인하여 신호 대 잡음(S/N, signal-to-noise) 비율 값이 3 이상으로 증명하였다. 또한 정량한계는 적절한 정확도와 정밀도로 검체 중의 불순물 또는 분석물질을 정량적으로 분석할 수 있는 최소의 양으로써 정확도, 정밀도, 특이성, 직선성 시험의 표준곡선으로 얻은

결과를 계산하여 추정하고 검출한계 부근의 3배 농도 이상에서 증명하였다. 또한 정밀성, 정확성 및 회수율의 검증방법으로 정밀성은 설정된 조건 하에서 균질화 된 동일 시료로부터 수차례 시료를 채취하여 얻은 분석 결과치 사이의 일치(분산) 정도로써 나타내었으며, 정확성은 설정된 조건 하에서 실측된 값이 이론값, 즉 이미 알고 있는 참값에 근접한 정도로써 표현하였다. 회수율은 분석과정의 추출효율로서 기지량의 분석물질에 대해 해당시험법의 시료추출과 처리과정을 모두 거친 후 얻은 분석치의 기지량에 대한 퍼센트(%)로써 나타내었다. 본 연구는 ginsenoside Rb1의 직선성, 정밀성, 정확성, 특이성, 검출한계, 정량한계, 재현성을 검증하기 위해 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 분석으로 나누어 실험을 실시하였으며 일내분석은 1일 5회의 실험을 진행하여 분석법 검증을 실시하였으며, 일간분석은 1일 1회의 실험을 5일 동안 진행하여 직선성, 정밀성, 정확성 등을 확인하였고, QC 시료 또한 일내분석은 1일 5회의 실험을 진행하였으며 일간분석은 1일 2회의 실험을 진행하여 ginsenoside Rb1의 분석법을 검증하였다.

결과 및 고찰

특이성

특이성은 존재할 지도 모르는 구성성분(대사체, 불순물, 분해산물 혹은 생체시료 구성성분)의 존재 하에 분석물질을 측정하고 구별해내는 생체시료 분석법으로 확인할 수 있다. 표준 용액과 인체혈장에서 시료를 전처리한 후 ginsenoside Rb1의 크로마토그램을 비교하여 ginsenoside Rb1 피크가 분리되는 지를 확인한 결과, Fig. 2와 같이 표준용액의 분석

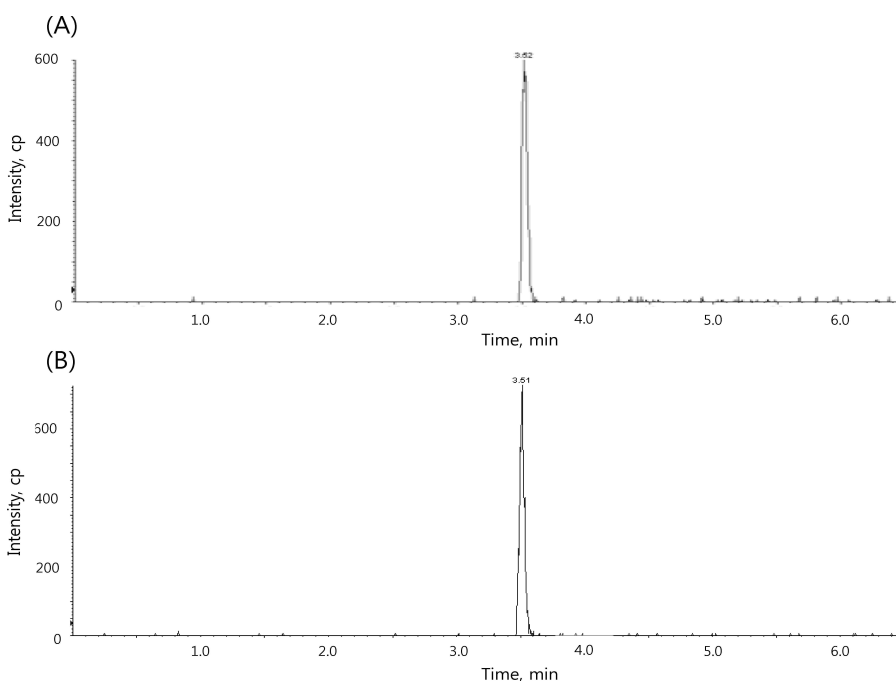


Fig. 2. Chromatograms of ginsenoside Rb1 (20 ng/mL) (A) standard and ginsenoside Rb1 in spiking human plasma (20 ng/mL) (B).

Table 2. Calculated concentrations of ginsenoside Rb1 in calibration standards

Statistical variable	Concentration (ng/mL)							
	10	20	40	80	100	200	400	500
Intra-day ¹⁾	$r=0.9994$							
Mean	9.7	20.9	40.2	79.6	99.6	196.2	398.2	505.6
CV (%) ³⁾	3.3	4.0	3.4	4.2	5.4	3.4	1.1	1.9
Accuracy (%)	97.1	104.6	100.4	99.5	99.6	98.3	99.3	101.1
RE (%) ⁴⁾	-3.0	4.5	-0.5	-0.4	-1.9	-0.4	1.1	
Inter-day ²⁾	$r=0.9988$							
Mean	10.3	19.9	39.2	78	103.7	193.8	387.8	516.4
CV (%)	5.8	4.6	3.4	5.1	3.2	3.2	4.3	2.9
Accuracy (%)	103.5	100.0	97.9	97.5	103.7	97.0	97.1	103.3
RE (%)	4.0	0.0	-2.0	-2.3	3.8	-3.1	-3.0	3.2

¹⁾Intra-day: five times per day. ²⁾Inter-day: one time analysis of ginsenoside Rb1 per day for five days.

³⁾Coefficient of variation. ⁴⁾Relative error.

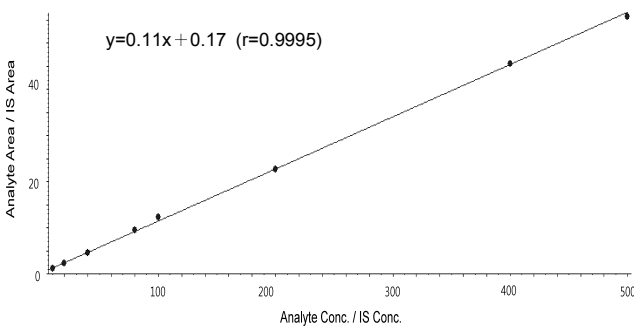


Fig. 3. Calibration curve of ginsenoside Rb1 in spiking human plasma.

시간은 3.52분, 인체혈장에서의 분석시간은 3.51분으로 ginsenoside Rb1 표준용액의 피크 머무름 시간과 인체혈장에서의 ginsenoside Rb1 피크 머무름 시간이 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 6개의 기원이 다른 혈장을 이용하여 각 공시료에 대한 간섭시험을 수행하였을 때 각각 다른 물질의 간섭 없이 분리됨을 확인하였다.

검량선 조사

검량선은 실험적 반응 수치와 분석물질의 농도 간의 상관관계를 나타내는 지표로써 ginsenoside Rb1의 표준용액을 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 500 ng/mL의 농도로 희석하여 LC-MS/MS로 분석하였을 때 검량선의 상관계수(R)는 0.9995의 값으로 Fig. 3과 같이 나타냈다.

정확성, 정밀성 검토 및 회수율 측정

정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였고, 정밀성은 설정된 조건 하에서 균질화 된 동일 시료로부터 수차례 시료를 채취하여 얻은 분석 결과치 사이의 일치정도를 의미하였을 때의 값을 구하였으며, 정량관계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N)를 10 이상으로 하였고, 판정기준은 변동계수(CV, coefficient variation)가 10% 이하를 만족하는지와 정확성(accuracy, %)이 85~115%일 때 만족하는 것으로 판단하였을 때 ginsenoside Rb1의 일내, 일간 실험의 결과는 Table 2, 3과 같이 일내의 정확성이 97.1~104.6%, 일간의

정확성이 97.0~103.7%로 나타났고 변동계수는 일내 1.1~5.4%, 일간 2.9~5.8%로 나타났다. 그리고 Table 2와 3과 같이 상관계수(R)는 일내 0.9994, 일간 0.9988 값의 유의수준으로 측정되었다. 또한 상대오차(RE, relative error)는 일내 -3~4.5%, 일간 -3.1~4.0%로 나타났으며, 회수율 또한 일내 97.0~104.5%, 일간 96.9~104.0%로 분석오차가 10% 이내인 것을 확인할 수 있었다. QC시료의 일내, 일간 분석결과는 Table 4, 5와 같으며 정확성은 일내 94.7~112.2%, 일간 93.8~108.8%, 변동계수는 일내 3.5~7.5%, 일간 5.3~8.6%로 나타났고, 상대오차는 일내 -3.5~12.2%, 일간 -6.2~

Table 3. Intra- and inter-day recovery of ginsenoside Rb1 in human plasma

Concentration (ng/mL)	Recovery (%), mean \pm SD	
	Intra-day	Inter-day
10	97.0 \pm 0.3 ¹⁾	104.0 \pm 0.6 ²⁾
20	104.5 \pm 0.8	100.0 \pm 0.9
40	100.5 \pm 1.3	98.0 \pm 1.3
80	99.5 \pm 3.4	97.6 \pm 3.9
100	99.6 \pm 5.3	103.8 \pm 3.4
200	98.1 \pm 6.7	96.9 \pm 6.2
400	99.5 \pm 4.4	96.9 \pm 16.7
500	101.1 \pm 9.8	103.2 \pm 15

¹⁾Each data was obtained by five times analyses (n=5).

²⁾Each data was obtained by ten times analyses (n=10).

Table 4. Intra- and inter-day precision and accuracy of ginsenoside Rb1 in human plasma QC samples (n=5)

Parameter	Calibration (ng/mL)			
	10	20	200	400
Intra-day ¹⁾				
Mean	11.2	19.3	189.6	399.2
CV (%) ³⁾	4.3	3.5	6.3	7.5
Accuracy (%)	112.2	96.4	94.7	99.7
RE (%) ⁴⁾	12.2	-3.5	-5.2	-0.2
Inter-day ²⁾				
Mean	10.8	19.4	187.6	391.1
CV (%)	8.6	6.9	5.3	7.9
Accuracy (%)	108.8	97.4	93.8	97.7
RE (%)	8.8	-2.7	-6.2	-2.2

¹⁾Intra-day: five times per day.

²⁾Inter-day: one time analysis of Schizandrin per day for 5 days.

³⁾Coefficient of variation.

⁴⁾Relative error.

Table 5. Recovery of ginsenoside Rb1 in human blank plasma QC samples at intra- and inter-day

Concentration (ng/mL)	Recovery (% , mean \pm SD)	
	Intra-day	Inter-day
10	112.2 \pm 0.4 ¹⁾	108.8 \pm 0.9 ²⁾
20	96.5 \pm 0.6	97.3 \pm 1.3
200	94.8 \pm 12.0	93.8 \pm 10.0
400	99.8 \pm 30	97.7 \pm 30.9

¹⁾Each data was obtained by five times analyses (n=5).

²⁾Each data was obtained by ten times analyses (n=10).

8.8%, 마지막으로 회수율은 일내 94.8~112.2%, 일간 93.8~108.8 범위의 적합한 결과를 나타내었으며, 혈중 ginsenoside Rb1에 대한 LC-MS/MS 분석법이 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성을 갖고 있음을 확인함으로써 인체에 미량으로 분석되는 ginsenoside Rb1의 안전성에 대해 과학적이고 신뢰할 수 있는 분석법을 설정하였다.

요 약

LC-MS/MS를 사용함으로써 인체 혈장에서 ginsenoside Rb1의 분석법을 개발하고 검증하였다. 유속 0.9 mL/min에 이동상 0.1% formic acid가 첨가된 water와 methanol을 사용하여 기울기 용리 조건으로 설정하였으며 사용한 분석 컬럼은 C 18(4.6 mm \times 150 mm, particle size 5 μ m)을 사용하여 분리하였다. MRM(multiple reaction monitoring) 방법의 전기 분무 이온화 이온 분석기로 모니터링 하여 분석하였다. 인체 혈장 샘플은 액체-액체 추출방법에 의해 acetone과 water가 섞인 용액으로 추출하였다. 이 분석의 검량선 범위는 10~500 ng/mL이며 상관계수는 0.9995를 나타냈다. 일내, 일간의 정밀성 농도범위는 상관계수 5.8% 그리고 정확성은 96.0~104.6%로 나타났다. 이 LC-MS/MS를 이용한 인체 혈장의 ginsenoside Rb1의 연구가 약동학 연구에 적용할 수 있을 거라 생각한다.

문 헌

1. Wen J, Zimmer EA. 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol* 6: 167-177.
2. Li XG. 1992. Studies on the transforming mechanism of amino acid components in ginseng in the course of ginseng process. *Korean J Ginseng Sci* 16: 64-67.
3. Singh VK, Agarwal SS, Gupta BM. 1984. Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract. *Planta Med* 50: 462-465.
4. Benishin CG. 1992. Actions of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem Int* 21: 1-5.
5. Kaneko H, Nakanishi K. 2004. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, Korean red ginseng: specifically, its anti-stress action for prevention of disease. *J Pharmacol Sci* 95: 158-162.
6. Kim WY, Kim JM, Han SB, Lee SK, Kim ND, Park MK, Kim CK, Park JH. 2000. Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J Nat Prod* 63: 1702-1704.
7. Kim H, Chen X, Gillis CN. 1992. Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical-induced injury. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 670-676.
8. Hyun MS, Hur JM, Shin YS, Song BJ, Mun YJ, Woo WH. 2009. Comparison study of white ginseng, red ginseng, and fermented red ginseng on the protective effect of LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *J Appl Biol Chem* 52: 21-27.
9. Park JY, Lee CY, Won JY. 2007. Analytical optimum of ginsenosides according to the gradient elution of mobile phase in high performance liquid chromatography. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 215-219.
10. Choi EH, Lee HJ, Kim CJ, Kim JT, Kwon IS, Kim Y. 2004. Anti-stress effects of ginseng in immobilization-stressed rats. *J Food Sci Nutr* 9: 253-258.
11. Choi GJ. 1991. Components of raw ginseng and quality control. *Korean J Ginseng Sci* 12: 247-256.
12. Han YJ, Kwon KR, Cha BC, Kwon OM. 2007. Component analysis of cultivated ginseng, cultivated wild ginseng, and natural wild ginseng by structural parts using HPLC method. *Korean Pharmacopuncture* 10: 37-53.

(2012년 8월 22일 접수; 2012년 11월 13일 채택)