

LC-MS/MS Screening Method for Radical Scavenging Active Compounds in Extracts of *Ulmus pumila* Cortex

Do-Youn Im¹ and Kyoung-In Lee^{2*}

¹Division of Liberal Arts, Kwangju Women's University, Gwangju 62396, Korea

²Bio-center, Dongshin University, Naju 58205, Korea

Received July 7, 2020 / Revised August 9, 2020 / Accepted September 8, 2020

The radical scavenging activity measurement system linked with liquid chromatography (LC) is a useful tool for identifying the radical scavenging active compound in a sample composed of numerous compounds such as plant extracts. Using this system, DPPH and ABTS radical scavenging activity were measured on extracts of *Ulmus pumila* cortex, which is known as an herbal medicine with antioxidant activity. Mass spectrometry (MS) was performed on the identified radical scavenging active compounds to identify the four components estimated to be procyanidin B2, procyanidin B3, catechin-7-O-β-D-apiofuranoside, and catechin-5-O-β-D-apiofuranoside, respectively. In order to compare the relative contents between extract samples, multiple reaction monitoring (MRM) mode analysis conditions were set for the four compounds in order to examine the possibility of comparing the content of radical scavenging active compounds in *Ulmus pumila* cortex extract using LC-MS/MS. As a result of the relative content comparison, it was found that the higher the ethanol concentration of the extraction solvent, the higher the content of radical scavenging active compounds. As with the results of measuring the radical scavenging activity of each extract, it was confirmed that the content difference of three of the compounds (all except the compound estimated as procyanidin B3) was not significantly observed in the extracts with an ethanol concentration of 50% or more.

Key words : ABTS radical, DPPH radical, LC-MS, *Ulmus pumila*

서 론

다양한 산화성 물질은 생체 내외에서의 반응성이나 산화적 스트레스를 일으켜 과산화, DNA 변성, 단백질의 손상 등 다양한 이상반응을 나타내게 된다. 따라서 이러한 산화 반응들에 대한 항산화 활성을 가지는 물질에 대한 다양한 연구가 수행되고 있으며, 특히 항산화 활성이 항균활성이나 항염증 등 다양한 생리 활성과 연관성을 가지는 것으로 알려짐에 따라 관련 연구에서 빈번하게 다루지고 있다[6, 11, 12]. 기초적인 항산화 활성을 측정하는 방법 중 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정법과 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical 소거능 측정법은 BHT, BHA, vitamin C와 같은 대조군을 이용하여 결과의 비교가 용이한 장점을 가지고 있어서 생약과 같은 천연물 시료의 항산화 활성 측정에 가장 많이 활용되고 있다[3, 13, 15]. DPPH radical 소거능은 메탄올과 같은 용매에 용해된 안정한 DPPH

radical과 항산화 물질에서 공급되는 전자가 결합하여 비radical 형태로 변하게 되는 것을 흡광도를 측정하여 확인하게 되며, ABTS radical 소거능은 유리기들의 반응으로 만들어진 활성 양이온 ABTS⁺가 항산화 물질에 의해 얼마나 환원되는지를 흡광도를 이용하여 측정하게 된다[4, 18].

생약과 같은 천연물 분석 분야에서 활용되는 profile 분석은 일반적으로 자외선(ultra violet; UV)검출기와 연동된 액체크로마토그래피(liquid chromatography; LC) 장비에서 이루어진다. 이러한 profile 분석은 지표성분이나 유효성분을 특정하지 못한 시료의 분석이나 물질 분리 조건 설정 등을 위한 단계에서 유용하게 활용되고 있다. Profile 분석과 동일한 LC 조건에서 분리를 실시한 후 항산화 활성을 측정하기 위한 radical 용액과 반응시킬 수 있다면 분리된 물질의 개별적인 radical 소거 활성을 측정할 수 있게 된다. 이러한 원리가 적용된 LC 장비 기반의 실시간 물질 분리 및 항산화 활성 측정법 활용 연구가 다양한 시료를 대상으로 국내외에서 진행되고 있다[5, 7-9, 19]. 이러한 연구는 기본적인 측정 시스템의 구축이 용이하지 않고 시료 특성에 따라 활성의 검출 조건의 설정이 다양한 특성 등으로 인해 LC 분석이 필수적으로 요구되는 연구가 아닌 경우 아직까지 기존의 UV-spectrophotometer 장비를 활용하는 경우가 많은 실정이다. 한편, LC의 검출기 중 하나로 활용될 수 있는 질량분석기(mass spectroscopy; MS)는 초기 장비구축 비용 문제나 운용의 전문성 등에도 불구하고 각종

*Corresponding author

Tel : +82-61-336-3104, Fax : +82-61-336-3118

E-mail : lki@dsu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성분의 정성이나 정량분석에 점차 활용도가 높아지고 있다. 구성 성분에 대한 완벽한 분리가 쉽지 않고 모든 표준품을 갖추기 어려운 천연물 유래의 소재 연구에서 기초적이며, 예비적인 정성분석이나 시료 간의 상대적인 정량분석의 도구로서 유용한 경우가 많다. 특히, 이온화 후 해당 머무름 시간 영역에 있는 모든 ion을 검출하는 scan mode 분석이 아닌 특정 모분자에서만 생성되는 ion을 선택적으로 검출하는 multiple reaction monitoring (MRM) 또는 selected ion monitoring (SRM) mode 질량분석의 경우 다양한 성분이 혼재되어 있는 시료라고 하더라도 인접한 성분에 의한 간섭이나 방해를 최소화시킨 분석 결과를 얻을 수 있기 때문에 동시에 여러 가지 성분을 분석하는 경우에 적합하다. 이러한 MRM 또는 SRM mode의 분석법은 목적하는 성분의 표준품이 없는 경우에도 LC 시스템에서 시료 중의 존재하는 목적 성분이 용출되는 머무름시간 구간을 특정하여 얻은 MS data를 사용하여 설정하였으며, 시료 중에 존재가 확실한 성분이라면 여러 시료의 상대적 함량 비교까지 가능하게 된다.

따라서 생약 추출물의 profile 분석과 radical 소거 활성 측정을 동시에 수행하고 활성이 확인된 성분 peak에 대한 LC-MS 분석을 동일한 시스템 및 분리 조건에서 수행한다면 추출물 또는 분획물 수준에서 활성 성분을 특정할 수 있는 data를 얻을 수 있으므로 기존의 방법에 비해 시간과 노력, 시약의 소모량 등을 줄일 수 있으며, 활성 성분 정성분석과 시료들 간의 함량 비교에 활용할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 항산화 활성 성분을 가지고 있는 생약재로 알려진 유근피[1, 14, 17]의 추출물을 대상으로 하여 DPPH와 ABTS radical 소거 활성을 LC profile 분석과 동시에 측정 후 확인된 소거 활성 성분 peak의 MRM mode 분석 조건을 설정하여 LC-MS/MS를 활용한 유근피 추출물 중 radical 소거 활성 성분의 함량 비교 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 추출물의 조제

유근피(Cortex of *Ulmus pumila*)는 전남 화순에 위치한 전남생약농업협동조합에서 구입한 것을 blender (Warning, USA)로 분쇄 후 냉장 보관하면서 사용하였다. 분쇄된 유근피 시료 50 g에 정제수, 25% 에탄올, 50% 에탄올, 75% 에탄올, 95% 에탄올을 각각 1 l를 혼합하여 각 용매의 끓는점에서 3시간 동안 추출을 실시하였다. 추출액은 여과와 감압농축 및 동결건조를 실시한 후 실험에 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

시료의 항산화 활성을 확인하기 위해 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 라디칼 소거능을 측정하였다 [2]. 메탄올에 100 µM로 용해시킨 DPPH 용액 180 µl와 농도별

로 메탄올에 희석시킨 추출물 시료액 20 µl를 혼합한 후 암실에서 20분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액 대신 메탄올을 사용한 바탕시험을 기준으로 소거능을 산출하였다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 라디칼 소거능은 Re 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다 [16]. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합 후 상온, 암소에서 4시간 동안 방치하여 라디칼을 형성시키고, 사용 직전에 735 nm에서 흡광도가 0.700±0.05가 되도록 증류수로 희석하였다. 농도별로 메탄올에 희석시킨 추출물 시료액 20 µl와 ABTS용액 180 µl를 혼합하여 30분간 암소에서 방치한 후 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액 대신 메탄올을 사용한 바탕시험 흡광도를 기준으로 소거능을 산출하였다.

LC profile과 radical 소거 활성 동시 측정

유근피 추출물의 LC profile 확인과 radical 소거능 동시 측정을 위해 LC-30A (Shimadzu, Japan) 액체크로마토그래피와 column으로서 Kinetex C18 (2.1×150 mm, 2.6 µm, Phenomenex, USA)을 기본 장비 구성으로 하여 분석을 실시하였으며, 시료 주입량은 1 µl, column oven은 40°C를 유지하였다. 이동상으로 물 (A)과 메탄올 (B)을 사용하여 초기 2% B에서 시작하여 100% B까지 순차적으로 변화시킨 후 다시 0% B로 낮춰서 60분간 분석을 실시하였으며, 유속은 0.3 ml/min으로 유지하였다. 전체적인 시스템의 구성은 Fig. 1과 같이 구성하였으며, radical 용액을 공급하기 위해 추가로 LC-20AD pump (Shimadzu, Japan)를 설치하였다. Column에서 분리된 시료액과 radical 용액이 혼합된 이후 radical 소거 반응을 위해 내경 0.13 mm, 길이 1 m의 reaction tubing을 설치하였다. DPPH radical 소거 활성 측정에는 메탄올에 50 µM로 용해시킨 DPPH radical용액을 사용하였으며, 유속은 0.2 ml/min으로 유지하였다. ABTS radical 소거 활성 측정에는 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합 후 상온, 암소에서 4시간 동안 방치하여 형성된 radical을 사용 직전에 735 nm에서 흡광도가 0.700±0.05가 되도록 증류수로 희석한 radical용액을

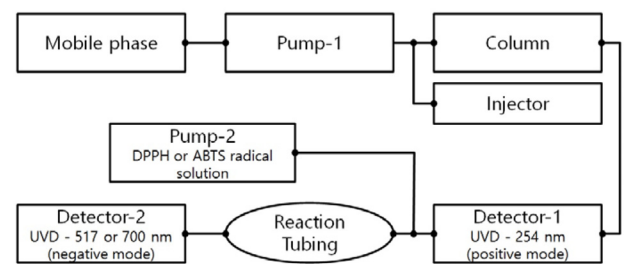


Fig. 1. Scheme of on-line LC profile and radical scavenging ability measurement system.

사용하였으며, 유속은 0.2 ml/min으로 유지하였다.

Radical 소거 활성 성분의 LC-MS 분석

Radical 소거 활성 성분에 대한 질량분석에는 LC-30A (Shimadzu, Japan) 액체크로마토그래피와 연동된 LCMS-8050 (Shimadzu, Japan) 삼중사중극자 질량분석기를 사용하였으며, LC profile과 radical 소거 활성 동시 측정 조건과 동일한 분리 조건을 적용하여 electro-spray ionization (ESI) 장치로 시료를 이온화시킨 후 Table 1과 같은 조건을 적용하여 분석을 실시하였다.

통계분석

추출 수율을 제외한 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차(mean ± SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 One-way analysis of variance (ANOVA)를 시행한 후 사후분석으로 Duncan’s multiple range test를 실시하여 p<0.05 수준에서 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

추출 용매별 유근피 추출물의 radical 소거 활성

유근피는 느릅나무의 뿌리껍질로서 향염증, 항균, 항산화와 같은 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 특히 항산화 활성이 뛰어난 식물 소재로 보고되고 있다[1, 14, 17]. 유근피를 열수와 농도별 에탄올을 용매로 하여 추출물을 제조하여 각 추출 조건별 수율을 측정된 결과를 Table 2에 제시하였다. 열수 추출물과 25% 에탄올 추출물의 수율이 각각

Table 1. Mass spectroscopy parameters for analysis of major active peaks

Parameters	Conditions
Interface	Electro-spray ionization
Nebulizing gas flow	3 l/min
Drying gas flow	9 l/min
Heating gas flow	9 l/min
Interface temperature	300°C
Desolvation line temperature	250°C
Heat block temperature	400°C

Table 2. Extraction yields of extracts of *Ulmus pumila* cortex

Sample	Yield (%)
Hot water extract	25.82
25% ethanol extract	25.17
50% ethanol extract	23.06
75% ethanol extract	21.44
95% ethanol extract	18.69

25.82%와 25.17%로 유사한 수준을 나타냈으며, 50% 이상의 에탄올 추출물에서는 에탄올 농도가 높아짐에 따라 추출물의 수율이 낮아지는 경향을 나타내었다.

Radical 소거 활성 측정에는 일반적으로 항산화 활성 관련 연구에서 빈번하게 이용되는 DPPH radical과 ABTS radical 소거능 측정 방법을 활용하였다. 두 가지의 radical 소거능 측정 방법은 각각의 radical 물질과 소거 활성 물질이 결합함으로써 색상이 변하는 정도를 분광학적으로 확인하게 된다. 안정한 radical 형태인 DPPH의 경우 활성 물질에서 전자를 받아 비radical 형태로 변하게 된다는 것과 유리기들이 반응하여 만들어진 양이온 형태의 ABTS가 활성 물질에 의해 환원된다는 것이 두 가지 측정의 차이로 알려져 있다. 또한 DPPH radical 소거능은 비교적 극성이 낮은 물질의 항산화 활성을 측정하는데 유리하며, ABTS radical 소거능은 극성이 높은 친수성 시료의 항산화 활성까지도 측정할 수 있으므로 시료의 특성이나 radical 소거 기작에 의한 차이가 발생되기도 한다[4, 18].

각 추출물의 농도별 radical 소거 활성 측정 결과를 바탕으로 50%의 radical을 소거하는데 필요한 추출물의 농도(SC₅₀)를 Table 3에 나타내었다. 두 가지 radical 소거 활성 모두에서 에탄올 농도 50% 이상의 추출물에서 상대적으로 우수한 radical 소거 활성을 가지는 것으로 확인되었으며, 특히 에탄올 농도가 가장 높은 95% 에탄올 추출물이 가장 높은 radical 소거 활성을 나타내었다.

유근피 추출물의 radical 소거 활성 성분 탐색

추출 조건별 radical 소거 활성 측정에서 가장 높은 활성을 나타낸 95% 에탄올 추출물에 존재하는 radical 소거 활성 성분을 확인하기 위해 Fig. 1과 같이 액체크로마토그래피(Liquid chromatography; LC) 기기와 결합된 radical 소거 활성 측정 시스템을 활용하였다. 이와 같은 시스템을 활용하면 LC의 column에서 분리된 성분의 개별적인 radical 소거 활성을 측정할 수 있게 되어 활성 성분의 추적이나 분리, 분석 등에 필요한 자료를 비교적 단시간에 얻을 수 있게 된다[5, 7-9, 19]. 다만, 이와 같이 분리용 column 이후에 radical 용액이 추가되고 반

Table 3. DPPH and ABTS radical scavenging activities of extracts of *Ulmus pumila* cortex

Sample	Radical scavenging activity (SC ₅₀ , mg/ml)	
	DPPH	ABTS
Hot water extract	0.875±0.048 ^d	0.611±0.021 ^d
25% ethanol extract	0.529±0.024 ^c	0.491±0.037 ^c
50% ethanol extract	0.488±0.014 ^{ab}	0.370±0.021 ^b
75% ethanol extract	0.481±0.028 ^a	0.372±0.018 ^b
95% ethanol extract	0.473±0.017 ^a	0.296±0.014 ^a

Values are mean ± SD (n=3).

Means in the same column with different subscript letters are significant differences at p<0.05 by One-way ANOVA.

응을 위한 tubing 길이의 영향으로 인해 분리된 성분이 확산되는 등 인접한 성분과의 간섭 현상들이 발생될 수 있다. 따라서 이와 같은 영향을 최소화하기 위해 사전에 radical 농도 및 tubing 조건의 최적화를 수행하여 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서 사용한 측정 시스템에서 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능 측정 결과에서 동일한 양상을 나타내었으며, UV 275 nm 측정 조건에서의 LC profile 분석으로 얻어진 chromatogram 패턴에서 확인된 주요 peak와도 유사한 경향을 보였다. 다만 UV 275 nm에서 1차 측정 후 radical 용액과 반응하는 reaction tubing의 길이로 인하여 0.2분 수준의 retention time 지연현상이 확인되었으나 비교 측정을 통해 radical 소거 활성 peak를 확인하는 것에 방해가 되는 수준은 아니었다. Fig. 2A와 같은 활성 peak의 retention time 비교를 통하여 Fig. 2B 및 2C와 같이 주요 radical 소거 활성 peak로서 1~4를 선택하였으며, 평균적인 retention time은 각각 10.4분, 10.9분, 11.4분, 13.2분임을 확인할 수 있었다. 각각의 활성 peak가 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능 측정 결과에서 동일한 retention time을 나타냄에 따라 각 peak가 동일한 성분에 의한 radical 소거 활성 peak임을 확인할 수 있었다.

Radical 소거 활성 성분의 LC-MS 분석

유근피와 유근피의 근원 식물인 느릅나무와 관련하여 다양한 활성 성분에 대한 분리와 동정이 있어 왔다. 대표적인 것으로서 왕느릅나무 수피로부터 taxifolin-gluco-pyranoside, eriodictyol-gluco-pyranoside, naringenin-gluco-pyranoside, catechin, epicatechin, catechin-gluco-pyranoside, procyanidin B1 등을 분리 보고한 것과 느릅나무로부터 catechin에 xylo-pyranose와 apiofuranose와 같은 5탄당이 결합된 배당체 화합물과 procyanidin B3를 분리하여 확인한 것 등이 있었다[1, 14].

본 연구에서 확인된 주요 radical 소거 활성 peak의 질량분석기(mass spectroscopy; MS) spectra를 Fig. 3 ~ Fig.6과 같이 제시하였으며, 상기의 기존 연구보고에서 밝히고 있는 성분들과 비교하여 다음과 같이 각 성분에 대한 검토 결과를 도출하였다. Peak 1의 MS spectra (Fig. 3A)를 보면 negative mode에서 [M-H]⁻ 형태로 볼 수 있는 577.1 m/z가 확인됨에 따라 모분자량이 578인 성분으로 추정할 수 있었다. 또한 MS² spectra (Fig. 3B)에서 577.1 m/z로부터 생성된 주요 fragment ion으로서 425.1, 407.1, 289.1 m/z가 나타남에 따라 분자량이 290인 catechin의 dimer 형태인 procyanidin B계열의 화합물임을 예상할 수 있었다. Fig. 4에 제시한 peak 2의 MS spectra (Fig. 4A)와

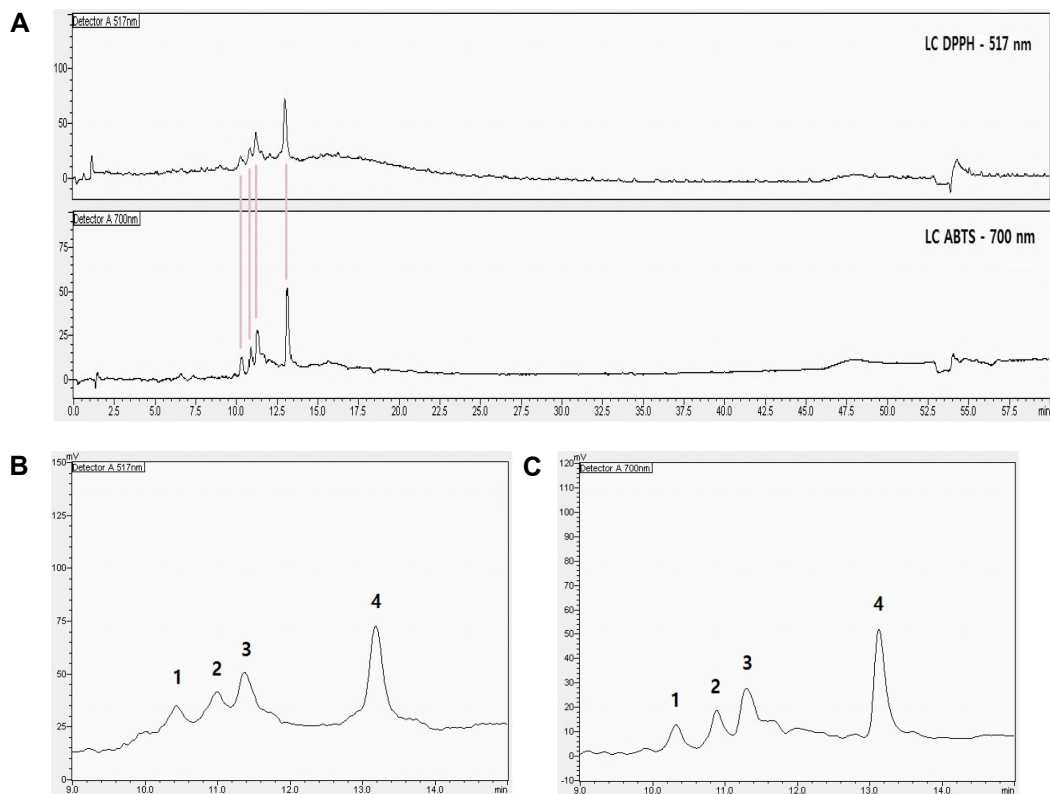


Fig. 2. On-line LC radical scavenging effects and major active peaks of the extract of *Ulmus pumila* cortex. (A) Full scale chromatogram of DPPH and ABTS radical scavenging effect, (B) enlarged chromatogram of DPPH radical scavenging effect (UV-517 nm, negative mode), (C) enlarged chromatogram of ABTS radical scavenging effect (UV-700 nm, negative mode). Different superscript numbers (1~4) are major active peaks.

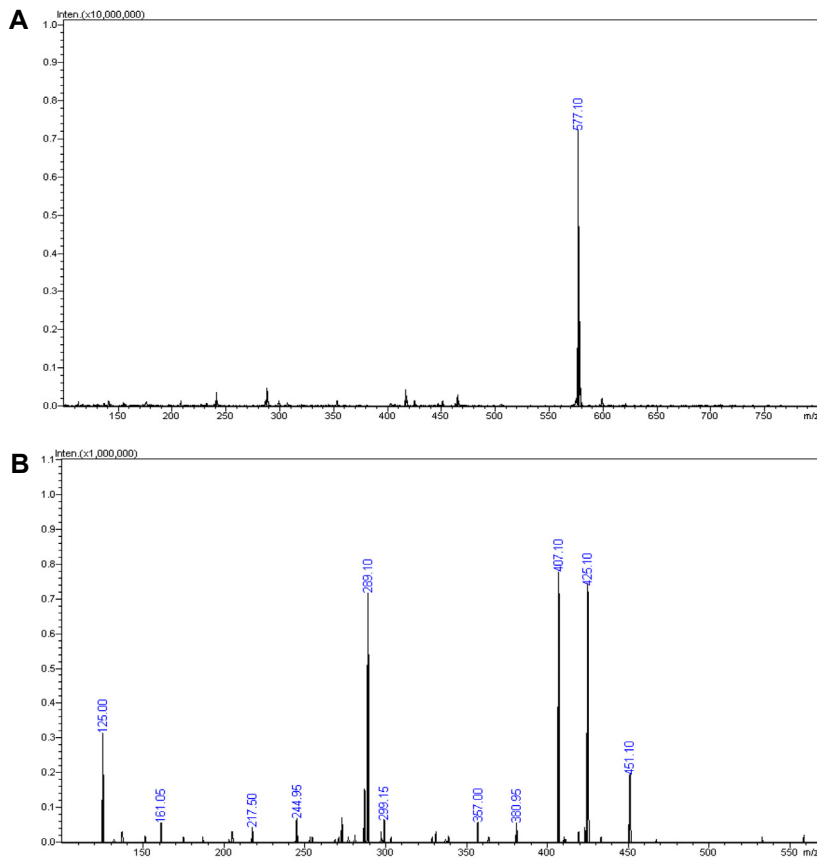


Fig. 3. LC-MS analysis results of the major active peak 1. (A) negative mode MS spectra of the major peak 1, (B) MS² spectra of m/z 577.1([M-H]).

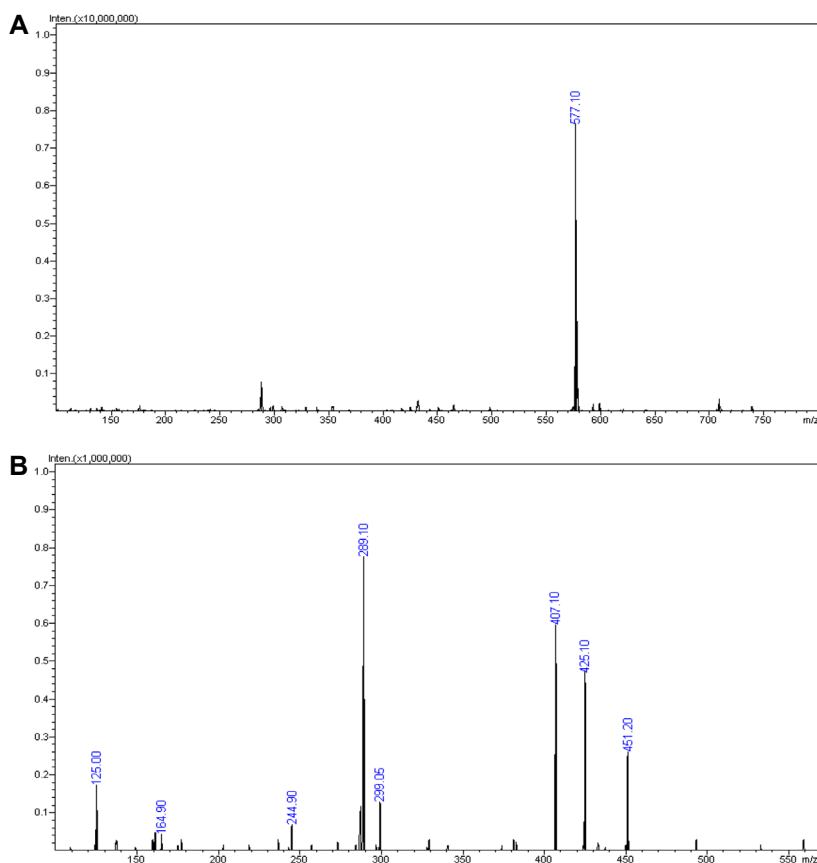


Fig. 4. LC-MS analysis results of the major active peak 2. (A) negative mode MS spectra of the major peak 2, (B) MS² spectra of m/z 577.1([M-H]).

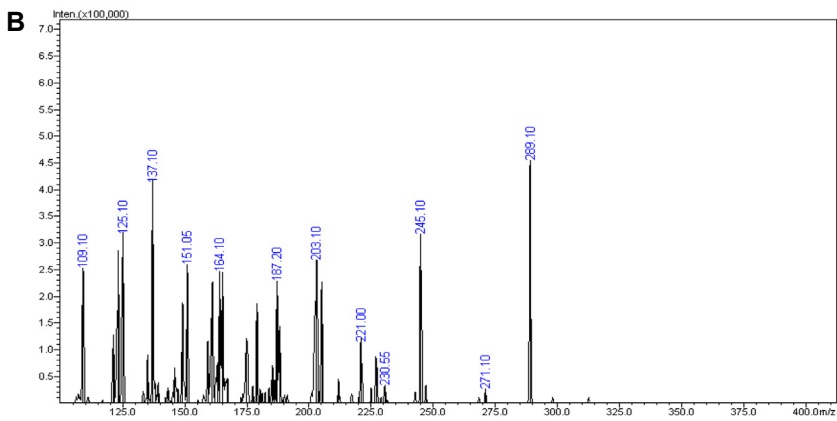
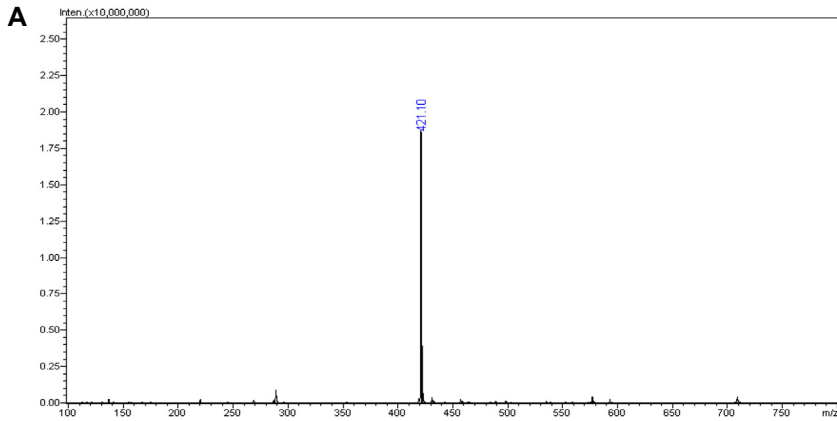


Fig. 5. LC-MS analysis results of the major active peak 3. (A) negative mode MS spectra of the major peak 3, (B) MS² spectra of *m/z* 421.1([M-H]).

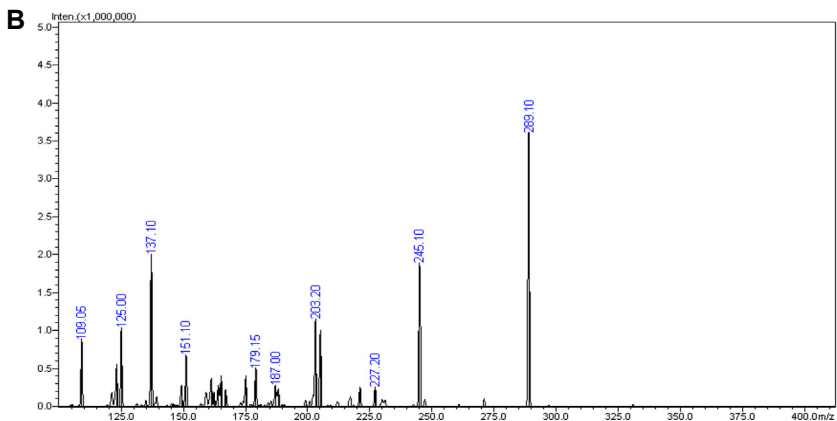
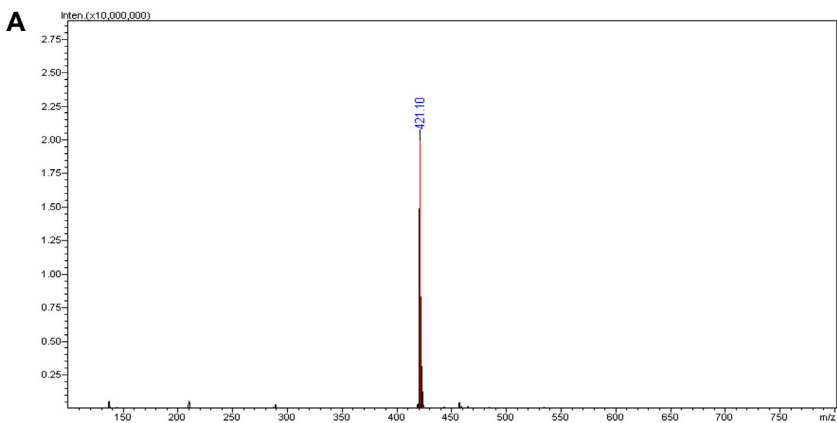


Fig. 6. LC-MS analysis results of the major active peak 4. (A) negative mode MS spectra of the major peak 4, (B) MS² spectra of *m/z* 421.1([M-H]).

MS² spectra (Fig. 4B) 경우, peak 1의 질량분석 결과와 동일한 패턴임을 확인할 수 있었으며, 이를 바탕으로 peak 1과 마찬가지로 procyanidin B 계열의 화합물임을 예상할 수 있었다.

Peak 3의 negative mode MS spectra (Fig. 5A)에서 [M-H]⁻ 형태인 421.1 m/z가 확인됨에 따라 모분자량이 422인 성분으로 추정할 수 있었으며, MS² spectra (Fig. 5B)에서 422.1 m/z로부터 생성된 주요 fragment ion으로서 289.1, 245.1, 203.1, 137.1 m/z 등이 확인됨에 따라 분자량이 290인 catechin에 fentose가 결합되어 있는 화합물임을 예상할 수 있었다. Fig. 6에 제시한 peak 4의 MS spectra (Fig. 6A)와 MS² spectra (Fig. 6B) 경우, peak 3의 질량분석 결과와 유사한 패턴임을 확인할 수 있었으며, 이를 바탕으로 peak 3과 마찬가지로 catechin에 fentose가 결합되어 있는 화합물임을 예상할 수 있었다. 이와 같은 질량분석 결과와 기존의 유근피 성분 연구 관련 문헌들을 검토하여 peak 1, 2, 3, 4를 각각 procyanidin B3, procyanidin B2, catechin-7-O-β-D-apiofuranoside, catechin-5-O-β-D-apiofuranoside로 추정할 수 있었다[10, 14].

Radical 소거 활성 성분의 비교를 위한 LC-MS/MS 분석 조건 설정

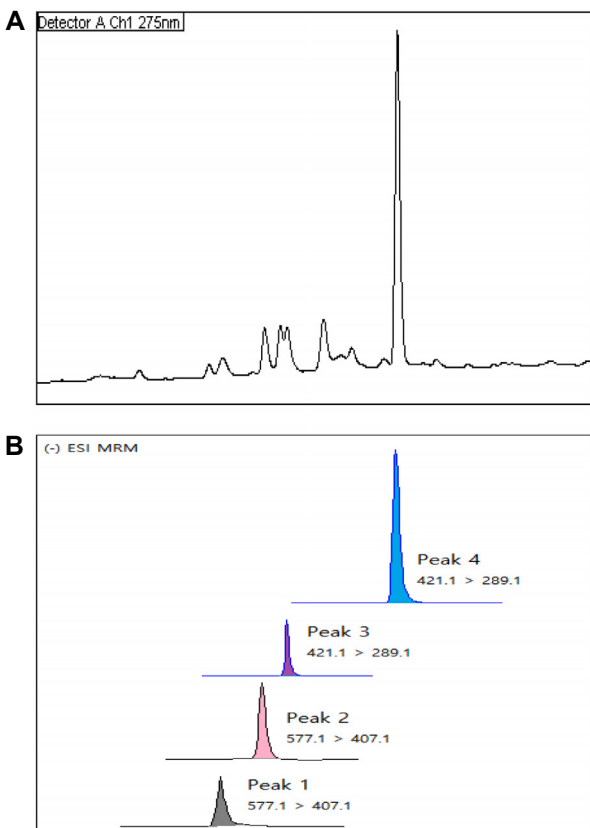


Fig. 7. LC-UVD and LC-MS/MS MRM chromatogram of the major active peaks. (A) UV-275 nm chromatogram, (B) LC-MS/MS MRM mode chromatogram.

Radical 소거 활성을 가지는 것으로 확인된 성분의 효과적인 분석을 위해 유근피95% 에탄올 추출물로부터 분리된 각 활성 peak의 성분을 사용하여 LC-MS/MS의 multiple reaction monitoring (MRM) mode 분석 조건을 설정하였다. LC-MS/MS의 MRM mode 분석은 설정된 precursor ion으로부터 생성된 product ion만을 검출하는 특성으로 인해 Fig. 7B에 나타난 바와 같이 일반적인 UV 검출기의 결과(Fig. 7A)보다 월등한 선택성을 나타내므로 인접한 다른 성분에 의한 간섭이나 오류 분석을 최소화할 수 있게 된다. 이러한 특성으로 인해 LC-MS/MS의 MRM mode 분석은 지표성분이 설정되어 있지 않은 생약과 같은 천연물의 분석에 활용되는 profile 분석이나 표준품을 확보하기 어려운 성분의 스크리닝 분석 등에 유용하게 활용될 수 있다.

MRM 설정에 필요한 precursor ion은 negative mode에서의 모분자 형태인 [M-H]⁻ ion을 선택하였으며, product ion은 MS² spectra에서 상대적으로 높은 감도를 나타낸 3개를 선택하였다. 선택된 ion 조합을 기준으로 collision energy 등의 세부 질량분석 조건 최적화 과정을 거친 후 최종 MRM mode 분석 조건을 Table 4와 같이 설정하였다.

설정된 MRM 조건을 적용하여 추출 용매별 유근피 추출물을 분석한 결과를 Table 5에 제시하였다. 각 추출물의 peak별 상대함량은 가장 radical 소거 활성이 높았던 95% 에탄올 추출물의 성분별 peak area를 기준으로 산출하였다. 전반적으로 에탄올 농도가 높아지면 radical 소거 활성 성분들의 함량이 높아지는 것으로 나타났으며, Table 3에 제시한 추출물의 radical 소거 활성 측정 결과와 유사하게 에탄올 농도 50% 이상의 추출물들에서 procyanidin B3로 추정된 peak 1을 제외한 성분들의 함량 차이가 크게 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에 Table 2의 추출 수율을 추가로 감안하여 50% 수준의 에탄올 농도가 유근피의 radical 소거 활성 성분 추출에 더 효과적임을 알 수 있었다. 이상의 연구 결과에서 LC 시스템과 연동된 radical 소거 활성 측정 시스템이 추출물과 같은 복잡한 성분 구성을 가지는 시료 중의 radical 소거 활성 성분을 확인하는 유용한 도구로 사용될 수 있으며, 확인된 성분의 정성분석과 상대적인 함량 비교를 위한 MRM mode의 LC-MS/MS 활용이 효과적임을 알 수 있었다. 이와 같은 방법은 선택적 ion 검출 방법인 MRM mode의 특성으로 인해 기존의 LC-UV 검출기 시스템을 사용한 단순 profile 분

Table 4. Negative ESI mode multiple reaction monitoring conditions of LC-MS/MS for major active peaks

Peak	Retention Time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)		
			1	2	3
1	10.4	577.1	407.1	425.1	289.1
2	10.9	577.1	407.1	425.1	289.1
3	11.4	421.1	289.1	245.1	137.1
4	13.2	421.1	289.1	245.1	137.1

Table 5. Relative ratio of major active peak area of extracts of *Ulmus pumila* cortex

Sample	Relative peak area ratio			
	1	2	3	4
Hot water extract	0.35±0.02 ^e	0.70±0.02 ^c	0.54±0.01 ^c	0.67±0.01 ^c
25% ethanol extract	0.56±0.00 ^d	0.81±0.00 ^b	0.78±0.00 ^b	0.86±0.01 ^b
50% ethanol extract	0.86±0.03 ^c	1.04±0.03 ^a	1.11±0.01 ^a	1.08±0.00 ^a
75% ethanol extract	0.93±0.04 ^b	1.03±0.01 ^a	1.05±0.00 ^{ab}	1.05±0.00 ^{ab}
95% ethanol extract	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^{ab}	1.00±0.00 ^{ab}

Values are mean ± SD (n=3).

Means in the same column with different subscript letters are significant differences at $p < 0.05$ by One-way ANOVA.

석에 비해 활성성분에 대한 검토에 유리하며, 다양한 연구보고들에서 밝히고 있는 MRM조건들을 활용하면 표준품이 없는 성분들에 대한 정성이나 시료들 간의 상대적인 함량 비교에 보다 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Bae, Y. S., Lee, S. Y., Oh, D. H., Choi, D. H. and Kim, Y. K. 2000. Bioactivities and isolation of functional compounds from decay-resistant hardwood species. *J. Kor. For. En.* **19**, 93-101.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Cha, B. C. 2015. Changes in the constituents and antioxidant activity in accordance with the processing conditions of *Citrus unshiu* Markovich. *Kor. J. Pharmacogn* **46**, 23-30.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. and Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 1043-1048.
- Hong, J. S., Kang, B. G., Jang, Y. S., Kim, S. H., Wang, Z., Park, Y. H., Park, J. H. and Lim, S. S. 2014. Studies on standardization of licorice based on its active components with on-line HPLC bioassay system. *Kor. J. Plant Res.* **27**, 401-414.
- Im, D. Y. and Lee, K. I. 2014. Antioxidative activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Arctium lappa* roots and analysis of phenolic compounds. *Kor. J. Pharmacogn* **45**, 141-146.
- Im, D. Y., Pyo, B. S., Kim, S. M. and Lee, K. I. 2017. Measurement of the Anti-oxidative properties of extract from medicinal plants using an on-line HPLC-DPPH assay. *J. Life Sci.* **27**, 44-49.
- Inoue, K., Baba, E., Hino, T. and Oka, H. 2012. A strategy for high-speed countercurrent chromatography purification of specific antioxidants from natural products based on on-line HPLC method with radical scavenging assay. *Food Chem.* **134**, 2276-2282.
- Jeon, Y. E., Lee, Y. S., Lim, S. S., Kim, S. J., Jung, S. H., Bae, Y. S., Yi, J. S. and Kang, I. J. 2009. Evaluation of the antioxidant activity of the fruiting body of *Phellinus linteus* using the on-line HPLC-DPPH method. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 472-479.
- Jung, M. J., Heo, S. I. and Wang, M. H. 2010. HPLC analysis and antioxidant activity of *Ulmus davidiana* and some flavonoids. *Food Chem.* **120**, 313-318.
- Kim, J. S. 2014. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antimicrobial activities of extracts from *Maesa japonica* (Thunb.). *Kor. J. Med. Crop Sci.* **22**, 289-294.
- Kim, J. Y., Kim, S. Y., Kwon, H. M., Kim, C. H., Lee, S. J., Park, S. C. and Kim, K. H. 2014. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity on chestnut, chestnut shell and leaves of *Castanea crenata* extracts. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **22**, 8-16.
- Kim, N. Y., Park, D. S. and Lee, H. Y. 2015. Effect of anti-skin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **23**, 37-42.
- Kwon, Y. M., Lee, J. H. and Lee, M. W. 2002. Phenolic compounds from barks of *Ulmus macrocarpa* and its antioxidative activities. *Kor. J. Pharmacogn* **33**, 404-410.
- Li, H. and Jeong, J. M. 2015. Antioxidant activities of various berries ethanol extract. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **23**, 49-56.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
- Yang, S. A., Kim, A. Y., Pyo, B. S. and Kim, S. M. 2019. Physiological activity of extracts of bark from *Ulmus davidiana* var. japonica and its fractions. *Kor. J. Pharmacogn* **50**, 112-117.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1619-1624.
- Zhang, H., Xi, W., Yang, Y., Zhou, X., Liu, X., Yin, S., Zhang, J. and Zhou, Z. 2015. An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of Citrus fruits. *Food Chem.* **172**, 622-629.

초록 : 유근피 추출물의 radical 소거 활성 성분에 대한 LC-MS/MS 스크리닝 분석법임도연¹ · 이경인^{2*}(¹광주여자대학교 교양과정부, ²동신대학교 바이오센터)

액체크로마토그래피 (liquid chromatography; LC) 시스템과 연동된 radical 소거 활성 측정 시스템은 식물 추출물과 같이 수많은 성분으로 구성된 시료 중의 radical 소거 활성 성분을 확인하는 유용한 도구이다. 이와 같은 시스템을 사용하여 항산화 활성 성분을 가지고 있는 생약재로 알려진 유근피의 추출물을 대상으로 DPPH와 ABTS radical 소거 활성을 측정 후 확인된 소거 활성 성분에 대한 질량분석을 실시하여 procyanidin B2, procyanidin B3, catechin-7-O-β-D-apiofuranoside, catechin-5-O-β-D-apiofuranoside로 각각 추정되는 4가지 성분을 확인하였다. 추출물 시료들 간의 상대적인 함량 비교를 위해 4가지 성분에 대한 MRM mode 분석 조건을 설정하여 LC-MS/MS를 활용한 유근피 추출물 중 radical 소거 활성 성분의 함량 비교 가능성을 검토하였다. 95% 에탄올 추출물을 기준으로 산출한 상대적인 함량 비교 결과에서 추출 용매의 에탄올 농도가 높아지면 radical 소거 활성 성분들의 함량이 높아지는 것으로 나타났으며, 각 추출물의 radical 소거 활성 측정 결과와 마찬가지로 에탄올 농도 50% 이상의 추출물들에서 procyanidin B3로 추정된 성분을 제외한 3가지 성분의 함량 차이가 크게 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에 각 추출물의 수율을 추가로 감안하여 50% 수준의 에탄올 농도가 유근피의 radical 소거 활성 성분 추출에 더 효과적임을 알 수 있었다. 이와 같은 활성 측정 및 분석 방법을 활용하게 되면 유근피 자체의 품질관리뿐만 아니라 추출물을 활용하는 다양한 제품 개발 단계에서 기존의 LC-UV 검출기 profile 비교보다 활용도가 높은 방법이 될 수 있을 것으로 판단된다.