

# Application News

No. 01-00405-K

High Performance Liquid Chromatograph Nexera™-e

## 2차원 LC 시스템 Nexera-e를 사용한 갈근탕 분석

Analysis of Kakkonto using Comprehensive Two-Dimensional LC Nexera-e

### 사용자 활용 포인트

- ◆ Nexera-e 시스템은 종합적인 2차원 분리에 사용할 수 있다.
- ◆ 개별 성분(글리시리직산)의 정확한 정량을 할 수 있다.

### ■ 서론

갈근탕(Kakkonto)은 한의학에서 땀을 촉진하고 소염과 진통 완화를 돕는 성질이 있어 감기, 두통, 어깨 결림 등에 효과가 있다고 알려져 있다. 갈근탕은 갈근(puerariae radix), 마황(ephedra), 감초(licorice), 작약(paeoniae radix) 등 다양한 천연물로 구성되어 있다. 또한, 에페드린(ephedrine), 글리시리직산(glycyrrhizic acid), 계피산(cinnamic acid)과 같은 많은 화합물을 함유하고 있다. 2차원 LC 시스템 Nexera-e는 이러한 복잡한 시료를 분리하는 데 유용하다.

그림 1은 Nexera-e 시스템의 외관(a)과 유로(b)를 보여준다. 종합적인 2D-LC 시스템 구성에서는 일반적으로 2개의 펌프와 2개의 컬럼이 사용되며, 1차원의 분획이 2차원의 컬럼으로 연속적으로 이동한다. 이 이동은 동기화된 밸브 전환을 통해 두 개의 동일한 루프를 교대로 채우는 방식으로 수행된다.

일반적으로 2차원 크로마토그래피에서 1차원(1D)과 2차원(2D)은 서로 다른 분리 모드를 사용한다. 이 조합은 일반적으로 1차원 분리에 비해 더 높은 분해능을 나타낸다. 갈근탕과 같은 한약은 상대적으로 극성인 화합물이 많이 포함되어 있으므로 pH도 고려해야 할 중요한 요소이다.

이 뉴스레터에서는 1D용 semi-micro 역상 컬럼 및 중성 pH 이동상과 2D용 초고속 역상 컬럼 및 산성 pH 이동상을 사용한 2차원 분리 방법을 소개한다. 글리시리직산의 표준용액을 이용하여 검량선을 작성하였고, 다른 제조사의 3가지 갈근탕 추출물 과립을 분석하여 글리시리직산을 정량 하였다.

### ■ 분석 조건

중성 및 산성 인산 완충액은 각각 1D 및 2D에 사용되었으며, 표 1에 분석 조건을 나타내었다.

일반적으로 역상 HPLC 모드에서 1D 및 2D를 모두 분석할 경우, 1D-LC에 의해 루프(loop)로 이동한 분획용액 내 유기용매의 농도가 증가할수록 용매효과로 인해 2D-LC 분석에서 분리 및 피크 모양이 더 나빠질 수 있다. LabSolutions™은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 '자동 농도구배 기능' (auto-gradient function)을 구비하고 있으며, 1차원의 농도구배 용리에 따라 2차원의 농도구배 용리 조건을 단계별로 변경하는 등 복잡한 농도구배 조건을 쉽게 만들 수 있다. 이 분석에서 자동 농도구배 기능을 사용하였으며, 1D와 2D의 시간 프로그램은 그림 2와 같다.

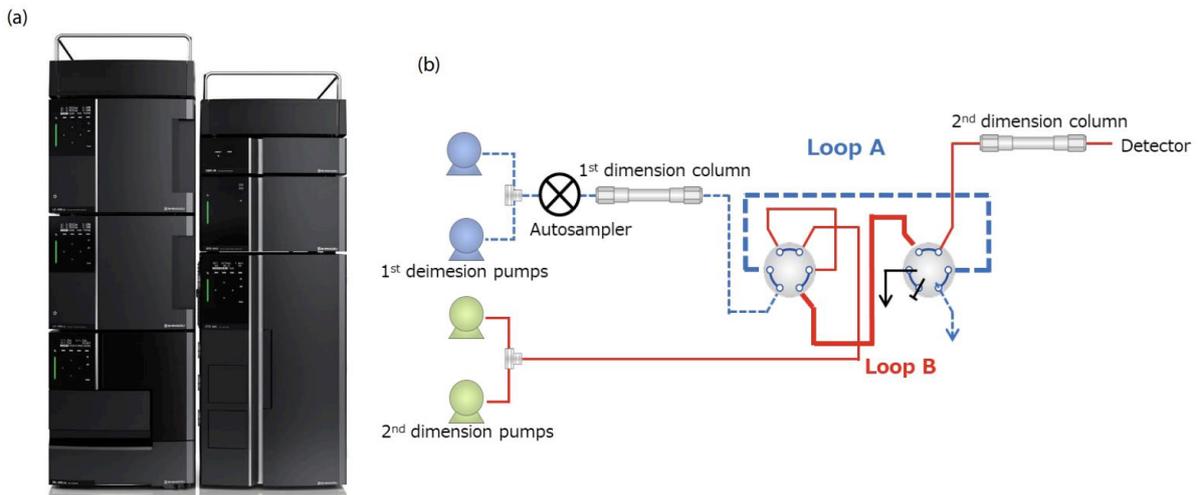


그림 1. Nexera™-e system  
(a) 시스템 외관 (b) 유로 모식도

표 1. 분석 조건

System	Nexera-e
<b>&lt;1D&gt;</b>	
Column	Shim-pack™ XR-ODSII (100 mm, X 1.5 mm I.D., 2.2 μm)*1
Mobile Phase A	10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.9)
Mobile Phase B	Acetonitrile
Flow Rate	0.05 mL/min
Time Program	B Conc. 5% (0 min) - 30% (70 min) - 90% (80-90 min) - 5% (90.01-110 min)
<b>&lt;2D&gt;</b>	
Column	Shim-pack Velox C18 (50 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm)*2
Mobile Phase A	10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.7)
Mobile Phase B	Acetonitrile
Flow Rate	1.5 mL/min
Time Program	Initial B Conc. 5% (0.01 min) - 45% (0.5 min) -5% (0.51-1.00 min) Final B Conc. 20% (0.01 min) - 65% (0.5 min) -20% (0.51-1.00 min)
Loop Vol.	50 μL
Modulation Time	1 min
Oven temp.	40 °C
Injection Vol.	2 μL
Vial	SHIMADZU LabTotal™ Vial for LC 1.5 mL, Glass*3
Detection	254 nm (SPD-M40)

\*1 P/N : 228-59907-94, \*2 P/N : 227-32009-02, \*3 P/N : 227-34001-01

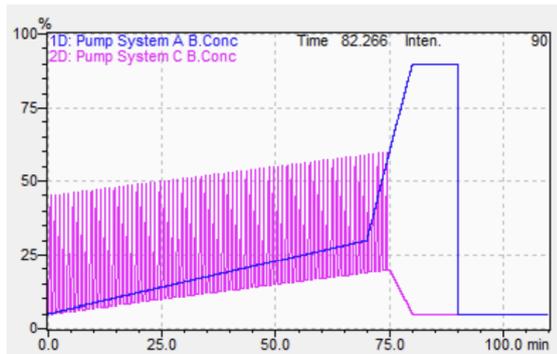


그림 2. 1D 펌프 (파란색)와 2D 펌프 (보홍색)의 시간 프로그램

■ 글리시리직산의 반복성 및 검량선 결과

그림 3은 글리시리직산 표준용액 50 mg/L의 2D 등고선 그래프 (Contour plot)이다. 2D 등고선 그래프는 전용 소프트웨어 ChromSquare로 확인할 수 있다. 가로축은 1D 머무름 시간을 나타내고, 세로축은 2D 머무름 시간을 나타낸다. 글리시리직산의 블룸 (blob, 색상차를 보이는 부분)은 검은색 직사각형으로 표시하였다. 표 2는 50 mg/L의 표준용액을 6번 반복 분석하여 1D 및 2D 분리 시, 머무름 시간의 반복성과 2D 등고선 그래프에서 블룸 면적의 반복성을 나타내었다. 블룸 면적에 대한 반복성은 3.59%, 1D의 머무름 시간에 대한 반복성은 0.01%, 2D는 0.01% 미만이었다. 그림 4는 글리시리직산의 농도 50 - 1000 mg/L 범위의 검량선이며, 상관계수  $r^2 = 0.9996$ 으로 우수한 직선성을 얻었다.

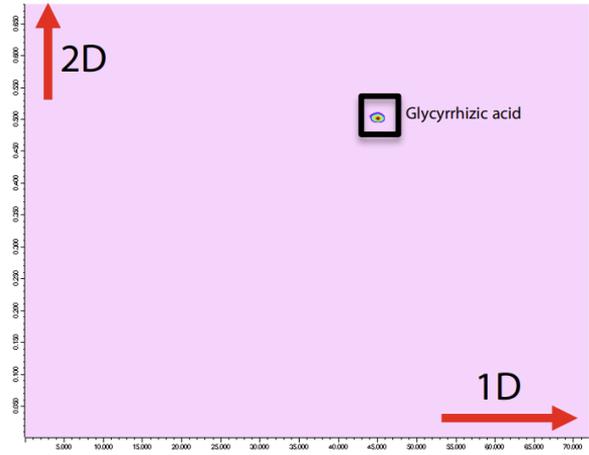


그림 3. 글리시리직산 표준용액의 종합적인 2D-등고선 그래프

표 2. 머무름 시간과 블룸 면적의 반복성 결과 (%RSD, n=6)

성분명	1D 머무름 시간 (%RSD)	2D 머무름 시간 (%RSD)	블룸 면적 (%RSD)
글리시리직산	0.01	<0.01	3.59

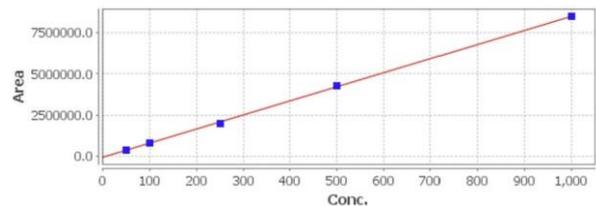


그림 4. 글리시리직산의 검량선

■ 갈근탕 추출 과립 중 글리시리직산의 정량분석

세 가지 다른 종류의 갈근탕 추출 과립을 사용하여 정량분석을 수행하였다.

그림 5에 나타난 시료 전처리 프로토콜과 같이 1.5 g 갈근탕 추출 과립을 50% 메탄올 수용액 15 mL로 추출하고, 추출물을 원심분리(3,500 rpm, 10 분)하였다. 상등액을 0.2 μm 멤브레인 필터를 통해 여과한 후, 시료 2 μL를 LC에 주입하였다.

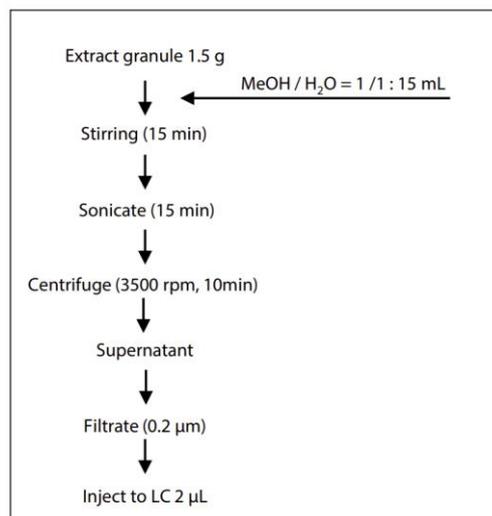


그림 5. 시료 전처리 프로토콜

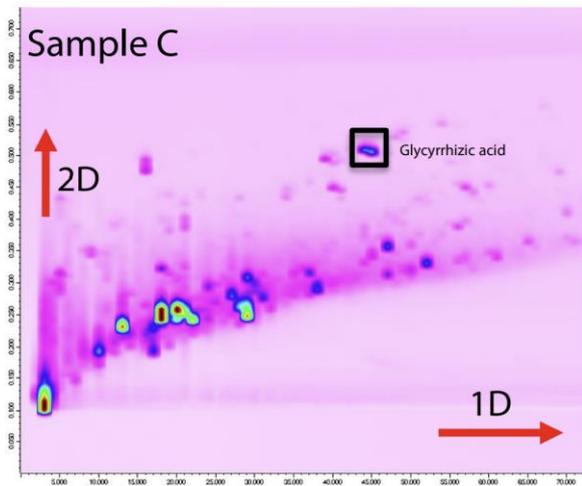
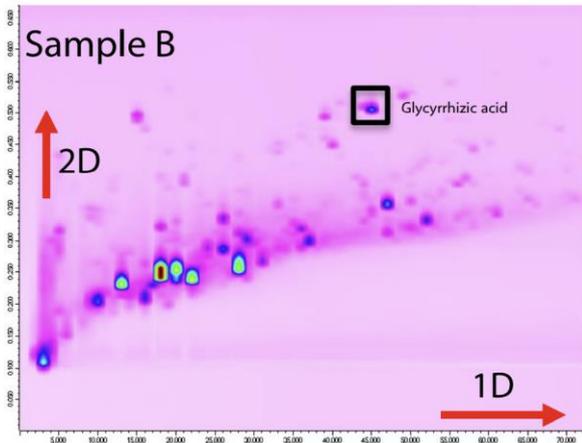
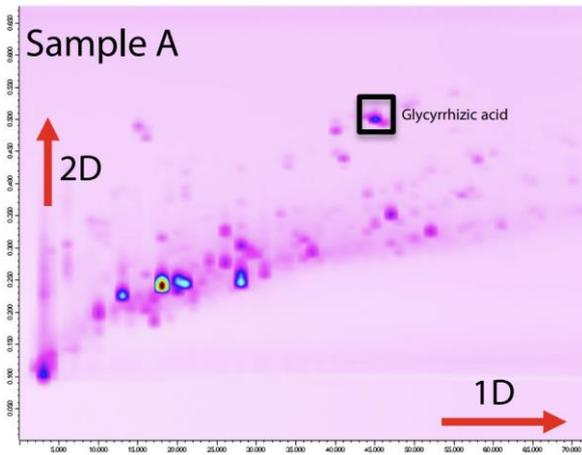


그림 6. 시료 A, B, C의 종합적인 2D-등고선 그래프

표 3. 시료 A의 글리시리직산의 반복성 결과 (%RSD, n=6)

성분명	1D 머무름 시간 (%RSD)	2D 머무름 시간 (%RSD)	블룸 면적 (%RSD)
글리시리직산	0.83	0.94	0.59

그림 6은 3개의 갈근탕 추출 과립 시료의 2D 등고선 그래프를 보여준다. 각 크로마토그램에서 다중 피크가 관찰되었으며, 2D 등고선 그래프에서 쉽게 확인할 수 있듯이 제품마다 패턴이 다르게 나타났다.

시료 A에 대해서 6회 반복분석을 하였다. 글리시리직산은 머무름 시간 정보를 사용하여 식별하였으며, 표 3은 글리시리직산의 머무름 시간 및 블룸 면적의 반복성 결과를 정리하였다. 실제 시료에서도 우수한 반복성 결과를 확인하였다.

그 다음, 갈근탕 추출 과립에 포함된 글리시리직산을 정량하였다. 3개의 갈근탕 제품에 포함된 글리시리직산의 정량 값은 표 4와 같으며, 이 값은 시료 전처리 후의 농도이다.

표 4. 갈근탕 추출 과립 중 글리시리직산의 정량 값

성분명	정량 농도 (mg/L)
시료 A <sup>*1</sup>	528.7
시료 B <sup>*2</sup>	557.6
시료 C <sup>*3</sup>	982.8

\*1 n=6, \*2 n=3, \*3 n=3

### ■ 결론

Nexera-e 시스템을 사용하여 글리시리직산의 종합적인 2차원 LC 분석을 하였다. 글리시리직산의 표준용액 50 mg/L로 반복성 평가를 수행하였고, 블룸 면적에 대한 반복성은 3.59%, 1D의 머무름 시간에 대한 반복성은 0.01%, 2D는 0.01% 미만이었다. 세 가지 다른 종류의 갈근탕 추출 과립을 분석하여 글리시리직산의 농도를 성공적으로 정량하였다.