

# Application News

No. SSK-LCMS-2305

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-8060

## 허브차 중 피롤리지딘 알칼로이드 검출을 위한 LC-MS/MS 분석법

LC-MS/MS Method for Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids (PAs) in Herbal Teas

### ■ 서론

피롤리지딘 알칼로이드(pyrrolizidine alkaloids, PAs)는 식물 외부로부터 스스로를 보호하기 위해 생성하는 자연 독소 물질로서 사람의 간을 손상시키는 것으로 알려져 있다.

국제암연구소(IARC)에서는 피롤리지딘 알칼로이드 성분 중 일부를 Group 2B(인체 발암성 가능 물질)과 Group 3(인체 발암성 미분류 물질)로 분류하였다.<sup>[1]</sup> 피롤리지딘 알칼로이드의 기본 구조는 두개의 방향족 펜탄에 질소를 포함하는 형태로 일부 성분에 대한 구조를 그림 1에 나타내었다.

현재, 국내에서는 화학식품을 제외하고 피롤리지딘 알칼로이드의 안전 기준은 마련되어 있지 않다. 그러나 국내외의 허브차, 국화과 식물 및 벌꿀 등에서 피롤리지딘 알칼로이드 검출 사례가 보고 되었으며, 일부 한약재에도 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 이에 이 뉴스레터에서는 허브차 중 피롤리지딘 알칼로이드 검출을 위한 LC-MS/MS 분석법을 소개하고, 안전 기준 마련 및 관리에 도움이 되고자 한다.

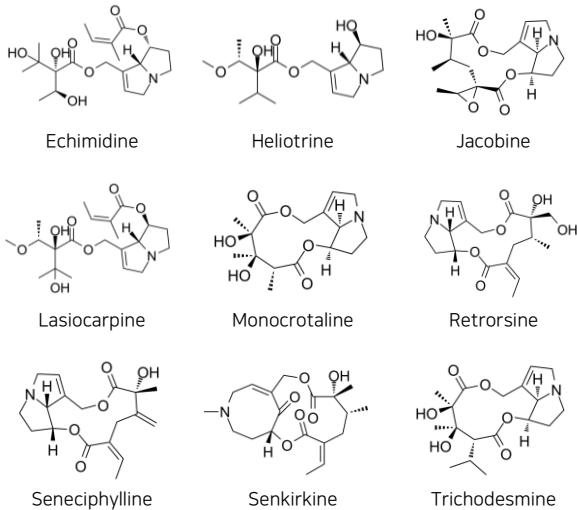


그림 1. 피롤리지딘 알칼로이드 구조 예시

### ■ 분석 방법

피롤리지딘 알칼로이드 28 성분 분석의 최적화를 위해 시마즈 액체크로마토그래피 질량분석기 LCMS-8060 과 Shim-pack GIST C18-HP (2.1 x 150 mm, 3 μm) 컬럼을 사용하였으며, 세부 분석 조건 및 MRM 조건을 표 1과 표 2에 각각 나타내었다. 이 분석 조건을 이용하여 분석한 피롤리지딘 알칼로이드 혼합 표준용액의 크로마토그램은 그림 2와 같다.

표 1. LC-MS/MS 분석 조건

Liquid chromatograph	Nexera™ X2
Column	: Shim-pack™ GIST C18-HP (2.1 mm I.D. x 100 mm L., 3 μm)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Mobile phase	: (A) 0.1% formic acid in 5 mM ammonium formate containing water : (B) 0.1% formic acid in 5 mM ammonium formate containing methanol
Oven temp.	: 30 °C
Injection volume	: 10 μL
Gradient	: 1 % B (0.0-1.5 min) - 15 % B (3.0 min) - 30 % B (18.0 min) - 95 % B (19.0-21.0 min) - 1 % B (21.0-25.0 min)
Mass spectrometer	LCMS-8060
Interface	: ESI, Positive mode
Data acquisition	: MRM mode
Heat block Temp.	: 400 °C
DL Temp.	: 300 °C
Interface temp.	: 400 °C
Nebulizing Gas Flow	: Nitrogen, 3.0 L/min
Drying Gas Flow	: Nitrogen, 5.0 L/min
Heating Gas Flow	: Zero Air, 15.0 L/min

표 2. MRM 조건

성분명	Precursor ion (m/z)	Product ion-1 (m/z)	Product ion-2 (m/z)
Echimidine	398	120	220
Echimidine-N-oxide	414	254	352
Erucifoline	350	120	138
Erucifoline-N-oxide	366	94	119
Europine	330	138	156
Europine-N-oxide	346	172	111
Heliotrine	314	138	156
Heliotrine-N-oxide	330	172	111
Intermedine	300	94	138
Intermedine-N-oxide	316	172	94
Jacobine	352	120	155
Jacobine-N-oxide	368	296	120
Lasiocarpine	412	120	336
Lasiocarpine-N-oxide	428	254	94
Lycopsamine	300	94	138
Lycopsamine-N-oxide	316	172	94
Monocrotaline	326	120	94
Monocrotaline-N-oxide	342	137	119
Retrorsine	352	120	138
Retrorsine-N-oxide	368	94	118
Senecionine	336	120	94
Senecionine-N-oxide	352	94	118
Seneciphylline	334	120	94
Seneciphylline-N-oxide	350	120	94
Senecivernine	336	120	308
Senecivernine-N-oxide	352	118	94
Senkirkine	366	168	122
Trichodesmine	354	222	120

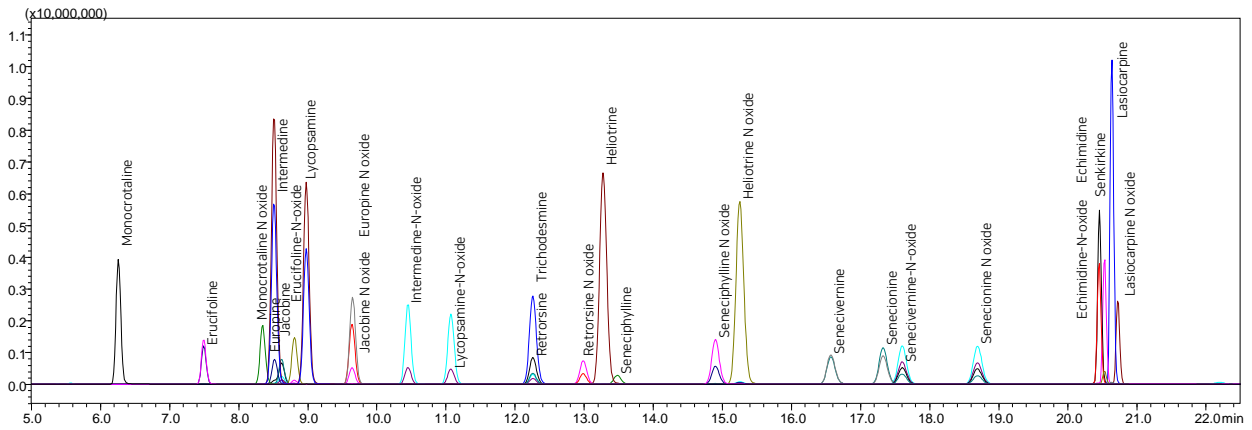


그림 2. 피롤리지딘 알칼로이드 28성분의 MS 크로마토그램 (농도: 10 ng/mL)

### ■ 전처리 방법

전처리 과정은 허브차 시료를 분쇄하여 균질화 한 후, 추출 및 정제, 농축 과정을 거쳤으며, 전처리 과정의 세부사항을 그림 3에 나타내었다.[2]

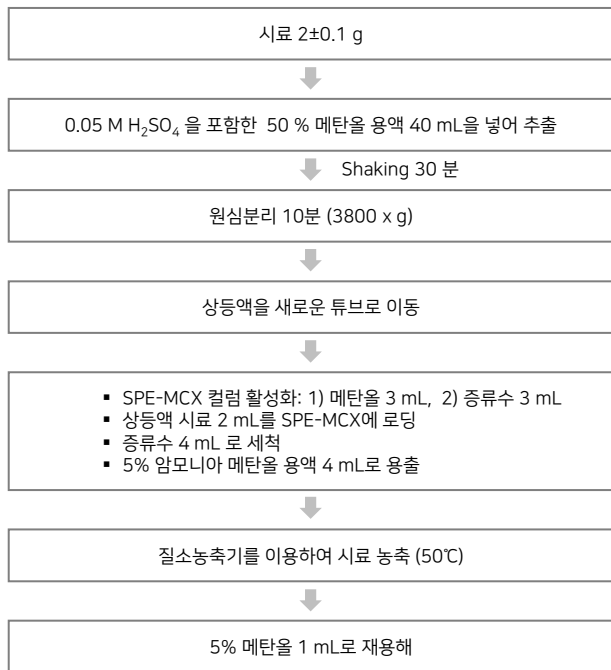


그림 3. 허브차 시료 전처리 방법

### ■ 결과 및 토의

#### 피롤리지딘 알칼로이드의 검량선

허브차 중 녹차잎 (green tea leaves)를 대상으로 분석법 밸리데이션을 진행하였으며, 검량선은 매질 보정 검량법(matrix matched calibration)을 적용하였다. 검량선의 범위는 각 성분의 정량한계를 고려하여 성분별로 다르게 설정하였으며, 모든 성분의 검량선 결정계수 ( $r^2$ )는 0.99 이상으로 우수하였다.

#### 허브차 시료를 이용한 회수율 시험 및 정량한계

허브차 시료에 피롤리지딘 알칼로이드 혼합표준용액을 검량선 범위 내의 저농도, 중농도, 고농도 수준으로 첨가하고, 농도별로 5개의 시료를 전처리하여 준비하였다. 평균 회수율은 (75-115) % 이내로 나타났으며, 상대표준편차(%RSD)는 (3-17) % 이내로 나타났다. 정량한계는 Labsolutions 소프트웨어에서 S/N=10으로 계산하였으며, 성분에 따라 (0.1-8.5) ng/g 수준으로 확인되었다(표 3).

표 3. 피롤리지딘 알칼로이드 분석법 밸리데이션 결과

성분명	회수율 (%) ± %RSD, n=5			LOQ ng/g (S/N=10)
	저농도 QC	중농도 QC	고농도 QC	
Echimidine	86±9	89±11	103±7	0.1
Echimidine-N-oxide	100±9	104±12	115±5	0.2
Erucifoline	75±8	79±10	76±5	1.1
Erucifoline-N-oxide	89±15	98±12	96±9	2.2
Europine	77±11	82±12	79±9	0.2
Europine-N-oxide	85±10	92±11	92±10	1.3
Heliotrine	91±6	92±14	87±11	0.3
Heliotrine-N-oxide	90±10	101±14	106±8	0.3
Intermedine	80±6	91±12	94±13	0.8
Intermedine-N-oxide	75±7	81±10	83±11	0.7
Jacobine	82±13	85±15	88±9	1.0
Jacobine-N-oxide	102±13	102±9	99±11	0.3
Lasiocarpine	87±15	89±11	98±10	0.2
Lasiocarpine-N-oxide	100±4	112±7	115±6	3.3
Lycopsamine	78±12	86±13	87±8	2.2
Lycopsamine-N-oxide	99±8	109±10	102±9	2.2
Monocrotaline	92±9	93±13	89±10	1.1
Monocrotaline-N-oxide	82±7	93±9	91±11	0.9
Retrorsine	79±17	82±15	83±8	1.2
Retrorsine-N-oxide	98±10	103±11	109±9	8.2
Senecionine	78±11	78±13	84±7	1.5
Senecionine-N-oxide	97±12	102±7	109±8	2.1
Seneciphylline	79±8	78±13	79±9	8.5
Seneciphylline-N-oxide	75±12	77±11	77±9	1.3
Senecivernine	78±12	77±9	78±13	1.4
Senecivernine-N-oxide	98±7	105±8	110±8	0.7
Senkirkine	115±13	110±6	104±4	2.4
Trichodesmine	76±3	88±13	98±9	1.0

## ■ 결론

시마즈 질량분석기 LCMS-8060을 이용하여 허브차 중 피롤리지딘 알칼로이드 28 성분 동시분석법을 확립하였다. 피롤리지딘 알칼로이드의 검량선은 매질 보정 검량법을 사용하였으며, 결정계수  $r^2 > 0.99$  으로 우수한 직선성을 얻었다. 또한, 회수율 결과는 (75-115) % 수준으로 확인되었으며, 정량한계는 성분에 따라 (0.1-8.5) ng/g 수준으로 나타났다.

## ■ 참고문헌

1. 화분제품에 피롤리지딘 알칼로이드 안전관리 강화 - 보도자료, 식품의약품안전처, 2019
2. Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material by SPE-LC-MS/MS, BfR-PA-Tea-2.0/2014