

Pyrrolizidine Alkaloids: Accurate mass Q-TOF LC/MS 및 All Ions MS/MS를 이용한 식물 및 건강 보조 식품의 특성 분석

응용 자료

식품, 건강 보조 식품, 식물

저자

Bharathi Avula, Satyanarayanaraju Sagi, Yan-Hong Wang, Mei Wang, and Ikhlas A. Khan

National Center for Natural Products Research, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Mississippi, University, Mississippi, USA

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, Delaware, USA

개요

Pyrrolizidine alkaloids(PA) 및 해당 *N*-oxide(PANO)는 사람과 동물 모두에게 심각한 간독성을 일으키기 때문에 이를 검출하고 특성 규명 및 정량할 확실한 분석 방법이 필요합니다. 표적 검출에는 triple quadrupole(QQQ) LC/MS 시스템이 이상적이지만, 표적 분석에 반드시 필요한 표준물질을 얻기가 항상 쉽지는 않습니다. 자연적으로 생성되는 PA 중 이미 알려진 극히 일부만 표준물질로 사용할 수 있습니다. 또한 QQQ 분석은 미지 화합물 스크리닝에 유용하지 않습니다. Accurate-mass 데이터를 제공하는 고분해능 질량분석기는 특정 표준물질 없이 미지 PA/PANO의 특성을 규명할 수 있습니다.

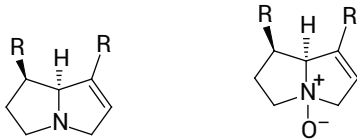
이 응용 자료는 식물 및 건강보조식품 내 PA 및 PANO에 대한 높은 선택성 및 감도의 특성 규명과 스크리닝, 잠정적 식별 그리고 정량을 위해 All Ions MS/MS 및 데이터베이스/질량 스펙트럼 라이브러리 검색을 이용한 accurate mass Q-TOF LC/MS 워크플로를 소개합니다. 고분해능 accurate mass MS/MS 스펙트럼을 사용하여 25종의 PA/PANO 표준물질에 대한 특성을 규명하였습니다. 이러한 데이터로 개별 복합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL)를 생성한 다음, 44종의 식물 및 건강 보조 식품 시료 내 PA/PANO의 스크리닝에 사용하였습니다. 정량 분석은 Q-TOF LC/MS 감응을 이용하여 수행하였습니다. 명확히 표적하지 않은 PA/PANO의 경우는 특징적인 조각 이온과 조각화 패턴을 사용하여 잠정적으로 식별하였습니다. 특성이 규명된 PA/PANO는 잠재적으로 추가적인 식물 및 건강 보조 식품 시료에서 더욱 고유한 PA의 발견을 이끌어낼 수 있었습니다.



Agilent Technologies

소개

Pyrrolizidine alkaloids(PA)는 식물이 초식성 곤충의 공격을 받았을 때 방어를 위해 자연적으로 생성하는 식물의 2차 대사체입니다. 이 물질은 지치과(*Boraginaceae*, 물망초 및 컴프리), 국화과(*Asteraceae*, 해바라기) 및 콩과(*Fabaceae*, 완두콩)에서 자주 발견됩니다. PA 및 해당 *N*-oxide(PANO)는 pyrrolizidine이라는 중심 화학 구조를 형성하는 헤테로고리 화합물을 기반으로 합니다(그림 1).



Pyrrolizidine(PA) Pyrrolizidine N-oxide(PANO)

그림 1. PA와 PANO의 주요 골격 구조

PA/PANO의 검출, 특성 규명 및 정량이 관심을 받는 이유는 사람과 동물 모두에게 간독성을 일으키기 때문입니다. 지금까지 식별된 PA는 350종 이상으로, 그 중 약 절반이 독성을 갖습니다[1]. 독성 영향은 대부분 정맥 폐쇄성 질환(VOD)에 기인한 것으로, 간의 작은 정맥이 막힌 상태를 의미합니다. 이러한 증상 중 대부분은 식단에서 PA를 제거하면 회복될 수 있지만 간경변이 발생한 경우 되돌릴 수 없습니다. 적은 양이라도 장기간 PA에 노출되면 암을 유발할 있습니다.

독일 Commission E에서는 생약 중 PA의 섭취를 1.0µg/일(최대 6주)로, 해당 PANO의 섭취를 0.1µg/일(기간 제한 없음)로 제한할 것을 권장하였습니다[2].

PA/PANO는 보통 식물의 씨앗과 꽃이 피는 부분에 집중되어 있으며[3] 우유, 내장, 알 및 식육 가공품을 통해 사람에게 전달될 수 있습니다. 동물들이 방목 시 뜯어 먹고 소화시킨 금방망이(Ragwort)는 PA의 원천 중 하나입니다. 지치과의 큰꽃말이속(Houndstongue) 식물은 일반적으로 가축들이 선호하는 먹이가 아니지만, 알갱이 형태의 사료 또는 저장 사료에 포함시켜 먹일 수 있습니다[4]. 식물을 소비하는 곤충에게도 PA가 축적될 수 있기 때문에[5], 꿀에도 PA가 포함되어 있을 수 있습니다[6, 7]. 기타 우려사항으로는 PA가 포함된 약초(예: 보리지 잎, 컴프리(허브차로 사용), 실 잎 모양의 개썩갓 및 머위)의 사용과 관련된 건강 위해성이 있습니다. 구체적인 사례는 [8, 9, 10]에 설명되어 있습니다.

독성과 노출 가능성을 고려할 때, PA/PANO는 상당한 위해성을 보이며 향산된 시험법의 필요성을 제기합니다. 자연적으로 생성되는 PA의 구조적 다양성으로 인해 극미량 분석

및 정량이 매우 까다롭지만 이를 위한 다양한 분석법이 설명되어 있습니다[11]. 전통적인 분석법으로는 비색 스크리닝 검사, 박막 크로마토그래피(TLC), 핵자기공명 장치(NMR), 가스 크로마토그래피(GC), 액체 크로마토그래피(LC) 및 액체크로마토그래피-질량분석법(LC/MS) 등이 있습니다. GC 분석법으로 PANO를 분석하기 위해서는 유도체화 과정이 필요합니다. 반면에 LC 분석법은 시료 전처리 단계가 거의 없기 때문에 PA와 PANO를 동시에 검출할 수 있습니다. 전기분무 이온화(ESI)를 활용한 LC/MS 분석법은 PA와 PANO의 극성 때문에 특히 선호되는 분석법입니다.

표적 검출에 사용되는 QQQ LC/MS 기기는 화합물의 식별 및 정량을 위한 정밀한 접근법입니다. 하지만 표적 분석은 보통 구하기 힘든 표준물질이 필요합니다. 자연적으로 생성되는 PA 중 이미 알려진 극히 일부만이 표준물질로 상용화되어 있습니다. 때문에 QQQ 기반 분석은 표적 정량에는 이상적이지만 미지 화합물 스크리닝에서는 사용하지 않습니다. Accurate mass 데이터를 제공하는 고분해능 질량분석기는 특정 표준물질을 구할 수 없을 때 미지의 PA 및 해당 유도체를 검출 하고 특성을 규명하기 위한 솔루션입니다. 전구 및 조각 이온의 accurate mass 정보는 식별 기능을 제공하며(확인 은 아님), 스펙트럼 라이브러리 데이터베이스에서 accurate mass 스펙트럼을 검색하여 다수의 화합물을 신속하게 스크리닝할 수 있습니다. 전체 스캔(full-scan) 질량 스펙트럼을 통해 데이터베이스에 없는 화합물을 식별할 수 있을 뿐만 아니라 데이터 소급 분석도 가능합니다.

이 응용 자료는 식물 및 건강 보조 식품 내 PA 및 PANO에 대한 높은 선택성 및 감도의 특성 규명과 스크리닝, 잠정적 식별 그리고 정량을 위해 All Ions MS/MS 데이터 수집 및 프로세싱, 스펙트럼 라이브러리 데이터베이스 검색을 이용한 accurate-mass Q-TOF LC/MS 워크플로를 소개합니다. 고분해능 accurate mass 스펙트럼을 사용하여 25종의 PA/PANO 표준물질의 특성을 규명하였습니다. 이 데이터로 개별 복합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL)를 생성한 다음, 44개의 실제 식물 및 건강 보조 식품 시료 내 PA/PANO의 스크리닝에 사용하였습니다. 정량 분석은 Q-TOF LC/MS 감응을 이용하여 수행하였습니다. 명확히 표적하지 않은 PA/PANO의 경우는 특징적인 조각 이온과 조각화 패턴을 사용하여 잠정적으로 식별하였습니다.

특성이 규명된 PA/PANO는 잠재적으로 추가적인 식물 및 건강 보조 식품 시료에서 더욱 고유한 PA의 발견을 이끌어 낼 수 있었습니다. 보완 연구 자료 “Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and *N*-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry”를 통해 분석법 및 결과에 대한 상세한 설명을 확인할 수 있습니다[12].

실험

화학물질 및 용매의 출처와 실험 절차에 대한 자세한 설명은 Food Chemistry에 게재된 보완 연구에서 확인할 수 있습니다[12].

표준물질, 시료 및 시료 전처리

표 4에 정리되어 있는 25종의 참조 표준물질은 Cerilliant Corporation(Round rock, Texas, USA)에서 구입하였으며 methanol에서 1.0mg/mL 농도로 조제하였습니다. 참조 표준물질의 화학 구조는 보완 연구 자료에서 확인할 수 있습니다[12]. 표 1에서 별표(*)로 표시되어 있는 riddelline 및 retrorsine은 10배 낮은 투여량에서 독성이 가장 강한 PA입니다.

표 1. PA/PANO 참조 표준물질

Monocrotaline	Retrorsine N-oxide
Intermedine	Heliotrine
Monocrotaline N-oxide	Seneciophylline
Indicine	Heliotrine N-oxide
Lycopsamine	Seneciophylline N-oxide
Europine	Integerrimine
Europine N-oxide	Senecionine
Indicine N-oxide	Senecionine N-oxide
Riddelline*	Senkirkine
Junceine	Schimidine
Riddelline N-oxide	Lasiocarpine
Trichodesmine	Lasiocarpine N-oxide
Retrorsine*	

44개의 식물 및 건강 보조 식품 시료를 분석하였으며 해당 시료의 출처는 보완 연구에서 확인할 수 있습니다[12]. 분석에 사용한 식물은: *Senecio* 종 시료 14개, *Eupatorium* 종 시료 5개, *Ageratum conyzoides*(L.) L. 시료 1개, *T. farfara* L. 시료 1개, *Petasites* 종 시료 2개, *H. indicum* L. 시료 1개, *Symphytum* 종 시료 11개, *Borago officinalis* 시료 1개 그리고 *Crotalaria juncea* L. 시료 1개가 있으며, *P. hybridus*가 포함된 것으로 표시된 7가지 건강 보조 식품도 함께 분석하였습니다.

시료 추출 절차는 PA 안정성, PA에 대한 PANO의 비율 및 수율에 영향을 미치기 때문에 다음의 5가지 시료 전처리법을 검토하였습니다.

1. Methanol 초음파 처리
2. 초음파 처리 및 methanol 재구성(reconstitution)
3. MeOH:H₂O 및 산 초음파 처리
4. 알칼로이드 추출
5. 마이크로웨이브 추출

말린 식물 시료 50mg을 methanol 2.5mL에서 30분간 초음파 처리한 후 959g에서 15분간 원심분리하는 methanol 초음파 처리가 가장 좋은 전처리법으로 확인되었습니다. 투명한 상등액을 수집하여 추출 절차를 4번 더 반복하였으며, 그렇게 얻은 상등액을 10mL 용적 플라스크로 옮겼습니다. Q-TOF LC/MS 시스템에 주입하기 전에 약 2mL의 추출물을 0.45µm PTFE 멤브레인 필터에서 여과하였습니다. 고농도 추출물은 10배 희석하였습니다.

Q-TOF LC/MS 분석

표준물질 및 시료 추출물의 LC/MS 분석은 Agilent Jet Stream 듀얼 전기분무 이온화원(ESI)을 장착한 Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS 시스템과 Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 연결하여 수행하였습니다. HPLC 시스템에는 binary 펌프, 용매 진공 탈기장치, 108개 바이알 수용 가능한 well-plate 트레이를 장착한 자동 시료 주입기 및 온도 조절 컬럼 장치가 포함됩니다. 표2와 3은 각각 HPLC 및 Q-TOF LC/MS의 파라미터입니다.

표 2. HPLC 파라미터

기기	Agilent 1290 Infinity LC 시스템
컬럼	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150mm, 2.7µm(p/n 693775-902)
이동상	A) Water with 0.1% formic acid B) Acetonitrile with 0.1% formic acid
그라디언트	0~23분, 3~4% B; 23~45분, 4~15% B; 45~55분, 15~25% B; 다음 2분~100% B
유속	0.27mL/분
사후 컬럼 평형화	3% B로 5분간 유지
컬럼 온도	40°C
주입량	2µL

표 3. Q-TOF LC/MS 파라미터

기기	Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 시스템
이온화 모드	Agilent Jet Stream 기술이 적용된 양이온 ESI
질량 범위	50~950m/z
건조 가스	N ₂ , 11L/분, 300°C
Sheath 가스	10L/분, 325°C
분무 가스	35psi
Fragmentor	125V
캐필러리	3,500V
스키머	65V
Octopole RF	750V

데이터를 생성하여 데이터베이스 및 MS/MS 스펙트럼 라이브러리를 구축하기 위해 표적 분석 MS/MS 모드에서 표 4에 표시된 파라미터를 사용하여 PA/PANO 참조 표준물질을 분석하였습니다. 25종의 화합물 모두로부터 예상되는 다양한 조각화 반응 때문에 여러 충돌 에너지가 필요하였습니다.

표 4. 표적 MS/MS 파라미터

Quadrupole 분리 폭	1.3amu
충돌 에너지	10, 20, 30 및 40eV

식품 및 건강 보조 식품 시료는 모든 이온이 분리 없이 사중극자를 통과하도록 설정된 All Ions MS/MS 모드로 분석하였습니다. 실험 1과 2는 각각 0과 30eV의 충돌 에너지를 사용하여 수행하였습니다.

All Ions MS/MS는 Agilent TOF 및 Q-TOF LC/MS 시스템의 수집 모드이자 데이터 프로세싱 도구로서, 전구 이온의 분리 없이 조각화를 가능하게 합니다. All Ions MS/MS 데이터 수집 모드는 고 에너지와 저 에너지 스캔이 번갈아 일어납니다(그림 2). 질량분석기로 들어간 모든 이온은 먼저 온전한 상태로 분석된(실험 1) 다음 조각화되어(실험 2) 후속 화합물 식별 및 확인에 사용될 수 있는 조각 이온을 생성합니다.

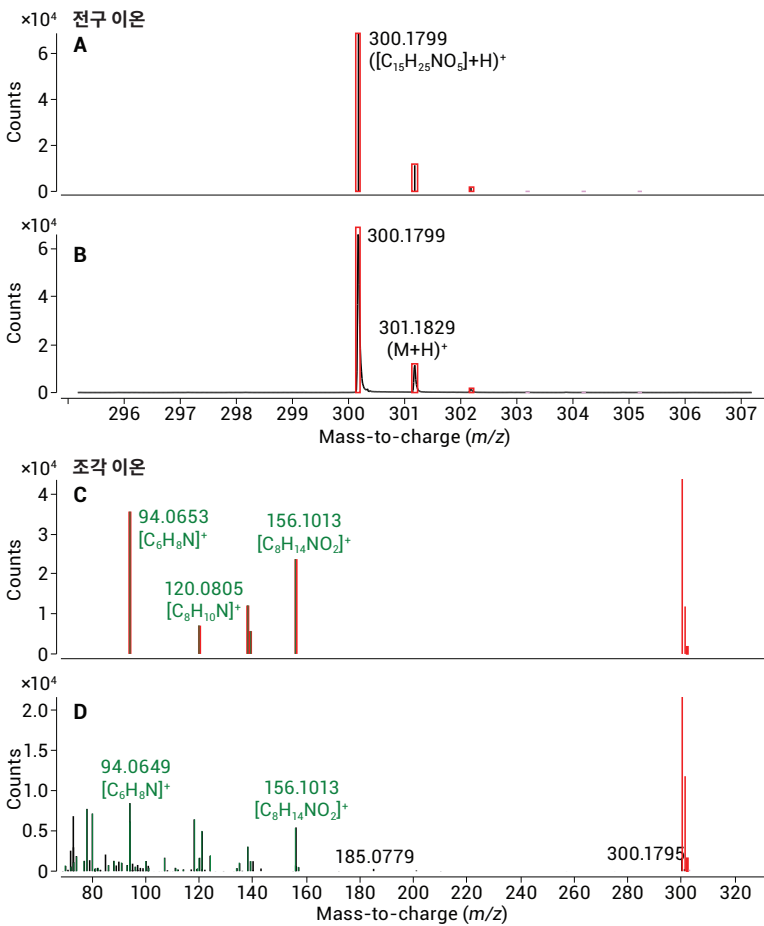


그림 2. A와 B는 0eV 충돌 에너지에서 얻었고, Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어의 Find by Formula 알고리즘으로 식별한 M+H⁺ 이온을 보여줍니다. A는 백그라운드 제거한 중심 질량 스펙트럼이고 B는 원본 프로파일 질량 스펙트럼입니다. 빨간색 상자는 동위원소의 이론상 위치와 존재비를 나타냅니다. C와 D는 30eV의 충돌 에너지에서 얻은 스펙트럼을 나타냅니다. C는 MS/MS 라이브러리 스펙트럼과 일치하는 중심 질량 스펙트럼입니다. D는 원본 프로파일 스펙트럼으로 다른 전구체에서 유래된 것일 수도 있는 이온을 포함하고 있습니다.

양이온 ESI 모드에서 참조 질량을 사용한 참조 이온 보정과 함께 accurate mass를 측정하였으며, 참조 질량은 m/z 121.0509(양성자화된 purine) 및 922.0098[양성자화된 hexakis(1H,1H,3Htetrafluoropropoxy) phosphazine 또는 HP-921]을 사용하였습니다. 참조 용액은 Agilent 1200 Series Isocratic 펌프를 이용하여 T 연결을 통해 ESI 이온 화원으로 전달하였습니다(유속: 20 μ L/분, 100:1 분할).

데이터 분석

데이터 수집 및 처리에는 Agilent MassHunter Workstation 소프트웨어를 사용하였습니다(Acquisition version A.05.01, Qualitative Data Analysis version B.06.00).

PA/PANO 데이터베이스 및 라이브러리 구축에는 MassHunter PCDL Manager(버전 B.04.00)를 사용하였습니다. 크로마토그래피 피크를 확인한 후 피크 평균화를 통해 스펙트럼을 생성한 다음, 이를 MassHunter PCDL Manager로 내보냈습니다.

MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어의 Find by Formula 알고리즘을 사용하여 Agilent PCDL의 accurate mass 데이터베이스 검색을 통해 All Ions MS/MS 데이터에서 전구 이온을 추출합니다. 그림 3은 indicine의 동시 용리 플롯입니다. All Ions MS/MS 소프트웨어는 추출된 크로마토그래피 피크를 accurate mass MS/MS 라이브러리에 저장된 조각 이온과 자동으로 연관시킵니다. 전구 이온과 그에 상응하는 조각 이온 피크를 그래프에 표시하여 동시 용리를 평가하고 동시 용리 점수(coelution score)를 지정합니다. 동시 용리 점수 및 동시 용리 플롯은 각 화합물의 전구 이온과 조각 이온 간의 연관성 정도를 나타냅니다.

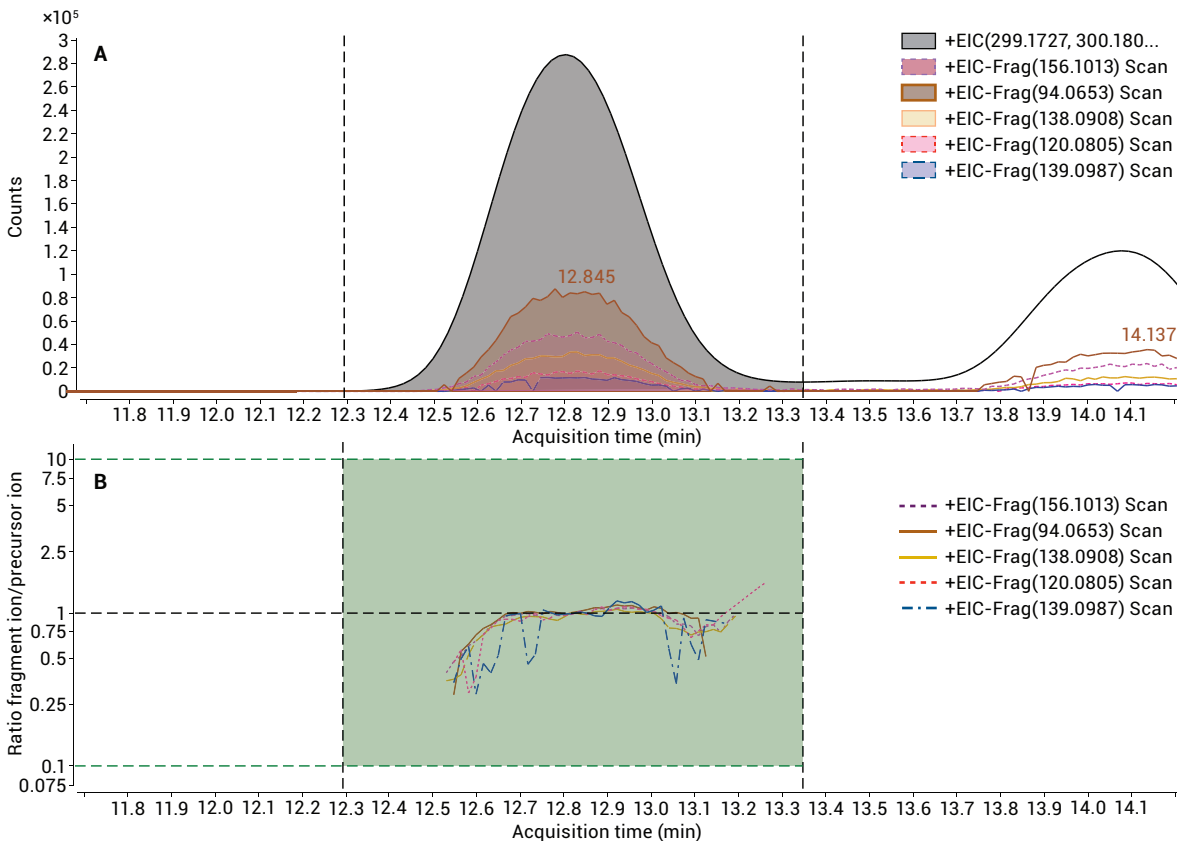


그림 3. *S. officinalis indicine*의 동시 용리 플롯(coelution plot). A) 전구 이온 및 생성 이온은 추출한 후 한 크로마토그램에 겹쳐 표시하였습니다. B) 계산된 동시 용리 점수가 표시됩니다.

결과 및 토의

크로마토그래피 결과

보완 연구 결과에 따르면, 표준물질 혼합물 및 각 속(genus) 식물을 분석한 MS1 level의 주피크 크로마토그램에서 indicine(m/z 299.2) 및 europine(m/z 329.2)을 제외하고 모든 표준물질이 분리되었습니다[12]. 그러나 이 두 화합물은 accurate mass MS 및 MS/MS 데이터를 사용하여 쉽게 구분할 수 있었으며, 질량 정확도는 2ppm 이하였습니다.

표준물질 조각화

MS/MS 조각화 실험은 특징적인 CID 조각 이온을 나타내는 참조 표준물질로 수행하여 시료 추출물 내 특정 PA/PANO의 식별을 지원하였습니다. 존재비가 큰 대부분의 조각 이온은 m/z 94, 120, 138, 168, 172 및 254에서 관측되었습니다. 예를 들어, m/z 94.06, 120.08, 138.09 및 254.14의 이온은 그림 4A와 4B에 나타난 스펙트럼에서 관측되었습니다. PA에서 나타난 다수의 특징적인 조각 이온은 해당 N-oxide 스펙트럼에서도 각기 관측되었습니다. Riddelline 및 riddelline N-oxide의 조각화 경로는 보완 연구에서 확인할 수 있습니다[12].

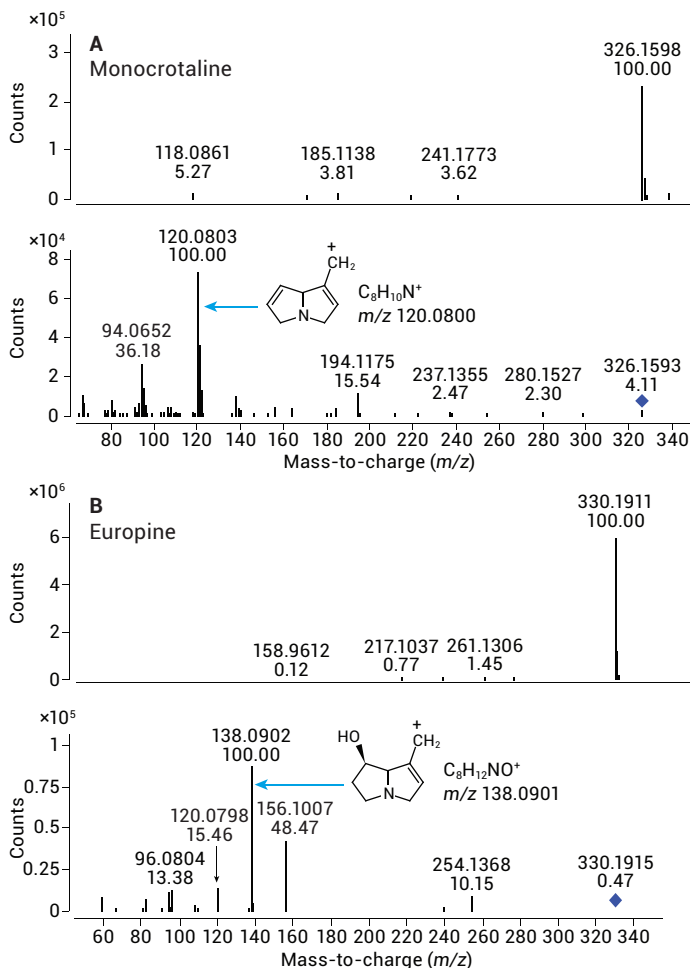


그림 4. 40eV 충돌 에너지에서 수집한 (A)monocrotaline과 (B)europine의 MS(분리 또는 충돌 에너지 없음) 및 MS/MS 라이브러리 스펙트럼은 m/z 96.08, 120.08, 138.09 및 254.14에서 특징적인 이온을 나타냈습니다.

화합물 데이터베이스 및 라이브러리

MS/MS 스펙트럼 라이브러리는 25종의 참조 표준물질 분석을 통해 얻은 데이터를 사용하여 구축하였습니다. +1가로 하전된 유사 분자 양이온([M+H]⁺)만 선택하여 MS/MS 스펙트럼을 생성하였습니다. 크로마토그래피 피크를 확인한 후 피크의 평균화를 통해 스펙트럼을 생성한 다음, 이를 MassHunter PCDL Manager로 내보냈습니다(그림 5).

라이브러리의 유용성은 식물 및 건강 보조 식품 시료 추출물 시험을 통해 검증하였습니다. 라이브러리 및 미지 화합물 스펙트럼에서 대응되는 피크를 검색하여 스펙트럼 매칭을 수행하였습니다. 지정된 accurate mass 허용오차 범위

내에서 완벽한 크로마토그래피적 동시 용리와 함께 라이브러리 스펙트럼에 있는 모든 조각이 시료에서 나타났을 때, 매칭 스코어는 100으로 지정됩니다.

복잡한 시료에서 참 양성(true positive) 결과를 제공하기 위해 일치하는 머무름 시간을 갖는 전구체와 하나의 조각 이온만 필요한 경우가 흔히 있습니다. 복잡한 시료 분석의 경우, All Ion MS/MS는 데이터 의존적 MS/MS 실험에서 PA의 전구 이온을 선택하지 않아 발생한 위음성(false negative)의 개수를 현저히 줄일 수 있습니다. 이것은 데이터 의존적 분석(Auto MS/MS) 중 화합물의 동시 용리가 너무 많을 때 발생할 수 있습니다.

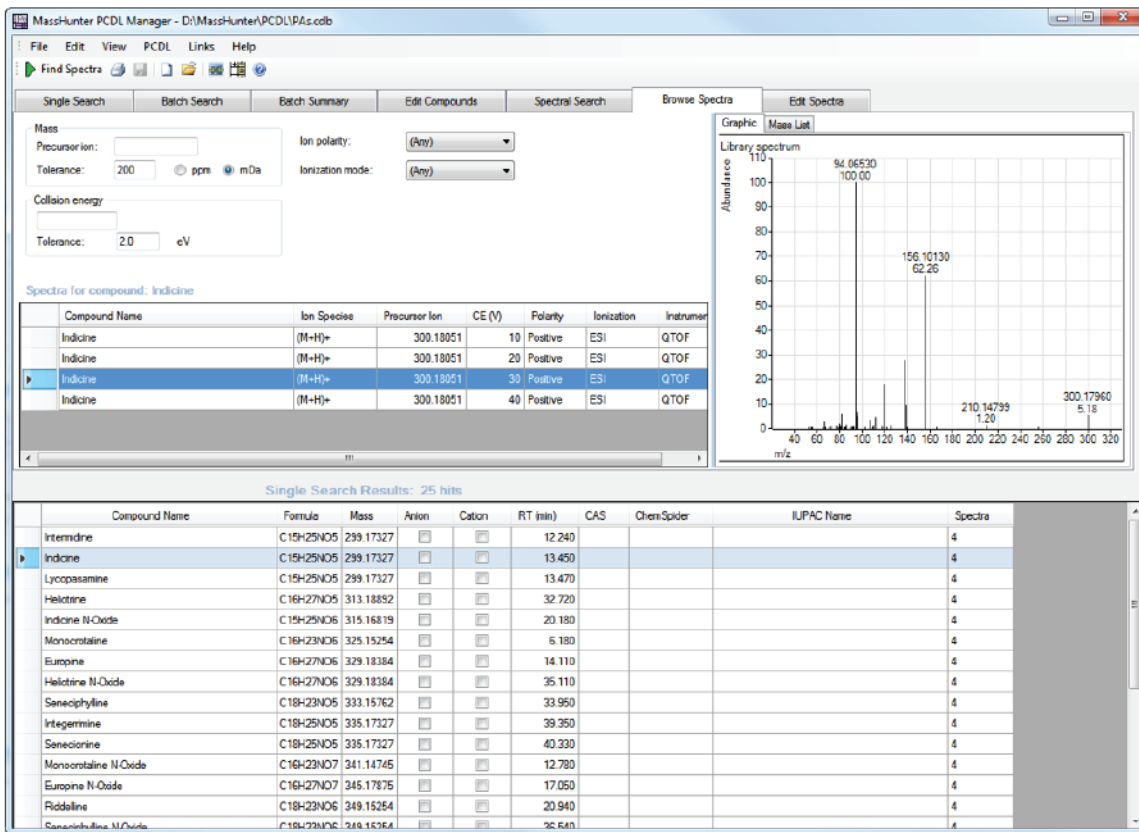


그림 5. PA/PANO 관련 MS/MS 스펙트럼 라이브러리는 25종의 참조 표준물질 분석을 통해 얻은 데이터와 MassHunter PCDL Manager를 사용하여 구축하였습니다.

식물 및 건강 보조 식품에서의 PA 검출

식물 및 건강 보조 식품 추출 시료의 LC 머무름 시간과 ESI 질량 스펙트럼을 PDCL에서 확보한 참조 표준물질과 비교한 결과, 수많은 PA/PANO를 검출할 수 있었습니다. 특정 화합물과 검출 농도를 포함하는 전체 결과 목록은 보완 연구를 통해 확인할 수 있습니다[12]. PA/PANO 식별은 양성자화된 분자와 특징적인 조각 이온의 exact mass를 기반으로 합니다. 특정 참조 표준물질이 없더라도 accurate mass 및 특징적 MS/MS 조각을 통해 추가 PA/PANO가 존재함을 알 수 있었습니다. 이런 이유로, 이 분석법을 사용하여 표준 물질 없이 PA와 유사한 표적 조각의 존재를 스크리닝할 수 있었습니다.

그림 6은 머위(*Petasites* 속으로 보통 Sweet Coltsfoot으로 알려짐)가 포함된 건강 보조 식품 시료 추출물의 All Ions MS/MS 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 나타냅니다. 이 크로마토그램은 m/z 138, 136 및 120의 특징적 이온을 이용하여 비표적 PA/PANO를 어떻게 발견했는지를 보여줍니다. 그림 7은 0 및 30 eV의 충돌 에너지(머무름 시간 23 분의 피크)로 수집한 All Ions MS/MS 스펙트럼을 나타냅니다. 유사 분자 이온은 0 eV의 충돌 에너지를 사용했을 때 생성된 반면, 30eV의 충돌 에너지에서는 풍부한 조각화 패턴이 생성되었습니다. 표시된 조각이 하나 이상의 유사 분자 이온에서 생성된 것일 수 있음에 유의해야 합니다. 결과는 PA를 나타내는 조각이 있음을 보여줍니다. 데이터베이스에 없는 피크에 존재하는 다른 조각을 해석하여 분자식을 결정함으로써 미지 PA/PANO 화합물을 식별할 수 있었습니다.

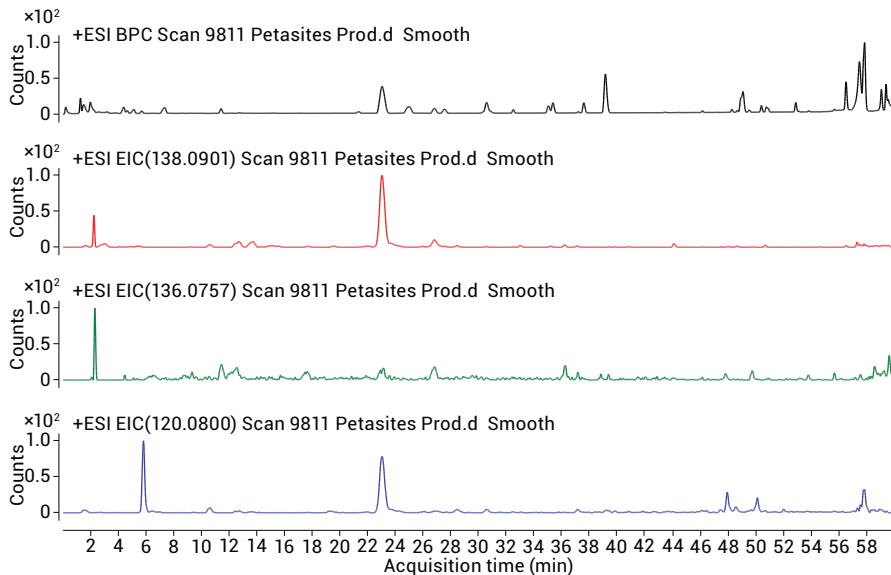


그림 6. 머위(*Petasites* 속으로 보통 Sweet Coltsfoot이라고 알려짐)가 포함된 건강 보조 식품 시료 추출물에 대한 All Ions MS/MS 추출 이온 크로마토그램(EIC). 비표적 PA는 m/z 138, 136 및 120의 특징 이온을 통해 발견하였습니다.

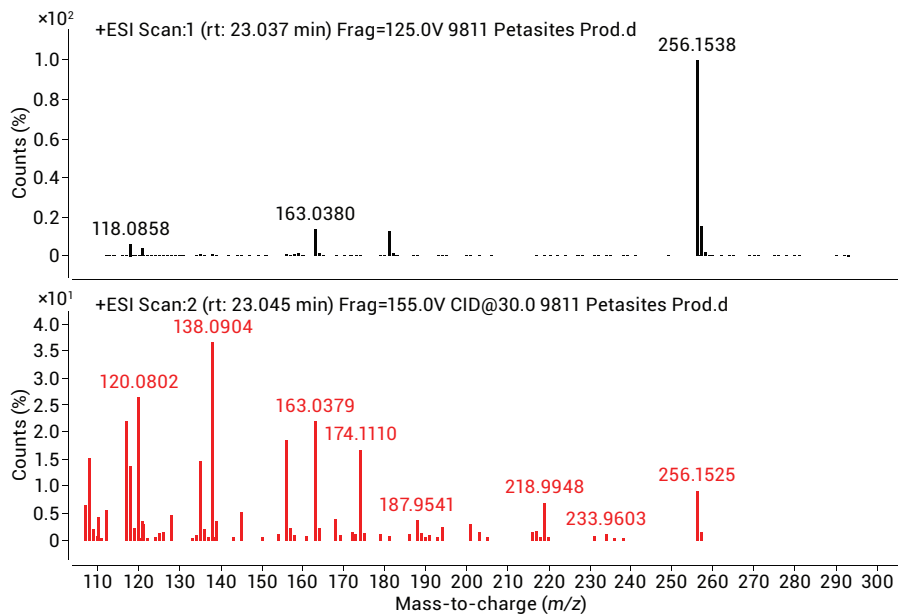


그림 7. All Ions MS/MS 스펙트럼은 그림 5에 표시된 건강 보조 식품 추출물 분석(머무름 시간 23분)을 통해 획득하였습니다. 유사 분자 이온은 0eV의 충돌 에너지를 적용하였을 때 m/z 256.1538에서 발견되었습니다. 충돌 에너지가 30eV인 경우, 특징적 PA 조각이 포함된 풍부한 조각화 패턴을 관측하였습니다.

PA 정량분석

참조 표준물질 분석으로부터 저농도 화합물의 경우 0.5~500ng/mL 범위에서 그리고 R² 가 0.99 이상인 기타 화합물의 경우 500~5,000ng/mL 범위에서 검량선을 작성하였습니다. 단, riddelline N-oxide, trichodesmine 및 retrorsine 제외하였으며, 이들의 범위는 각각 5~2,500ng/mL, 20~2,500ng/mL 및 1~2,500ng/mL였습니다. 검출 한계(LOD)는 위에 나열된 세 화합물을 제외하고 0.05~0.1ng/mL 범위에 있었으며 언급한 세 화합물의 LOD는 각각 1, 5, 및 0.4ng/mL이었습니다.

시료 추출물 정량분석은 Q-TOF LC/MS의 단일 MS 모드를 통해 수행하였습니다. 특정 PA/PANO의 경우 추출 이온 크로마토그램(EIC)은 유사 분자 이온([M+H]⁺)에 대해 생성하였고 면적값은 적분을 통해 결정하였습니다.

Q-TOF LC/MS 시스템의 accurate-mass 및 고분해능 성능은 선택성을 제공하였습니다. 선택한 식물 및 건강 보조 식품의 정량분석 결과는 보완 연구에서 확인할 수 있습니다 [12]. 일단 특정 식물에 있는 PA/PANO를 완전히 특성 규명하면, 표적 QQQ 기반 분석법으로 정량분석을 수행할 수 있습니다. 그러나, 식물의 정체를 모를 경우에는 Q-TOF

LC/MS가 선택되어야 할 분석법입니다. 건강 보조 식품에는 뜻하지 않은 오염 물질이 얼마든지 포함될 수 있으므로 Q-TOF LC/MS 분석법으로 위음성 결과를 줄이는 것이 바람직합니다.

결론

사람과 동물에게 간독성을 일으키는 것으로 알려진 PA와 PANO는 *Boraginaceae*, *Asteraceae* 및 *Fabaceae* 속을 포함한 많은 식물에서 흔하게 발견됩니다. 다른 우려 사항은 PA/PANO가 포함된 약초 및 보조 식품 사용과 관련된 건강상의 위해성입니다. 이런 이유로, PA/PANO의 검출, 특성 규명 및 정량분석은 매우 중요합니다.

표적 검출에는 QQQ LC/MS 시스템이 이상적이지만, 표적 분석에 반드시 필요한 표준물질을 얻기가 항상 쉽지는 않습니다. 또한 QQQ 분석은 미지 화합물 스크리닝에 유용하지 않습니다. All Ions MS/MS 기능이 있는 Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS 시스템은 특정 참조 표준 물질에 대한 필요 없이 PA/PANO를 나타내는 조각의 존재 여부를 스크리닝할 수 있는 솔루션을 제공하였습니다. 고분

해능 accurate mass MS/MS 스펙트럼을 사용하여 25종의 PA/PANO 참조 표준물질의 특성을 규명 하였습니다. 이 데이터는 식물 및 건강 보조 식품 시료에서 PA/PANO 유형의 화합물을 스크리닝하기 위해 PCDL을 생성하는 데 사용 하였습니다. 명확히 표적하지 않은 PA는 특징적인 조각 이온과 조각화 패턴을 사용하여 잠정적으로 식별하였습니다. 결과는 이 분석법이 식물 및 건강 보조 식품 내 알려진 혹은 미지의 PA/PANO의 특성을 단일 크로마토그래피 분석으로 규명할 수 있는 고감도의, 선택적이며, 효과적인 접근 방식임을 보여주었습니다. 특성이 규명된 PA는 잠재적으로 추가적인 시료에서 더욱 고유한 PA의 발견을 이끌어낼 수 있었습니다.

참고문헌

1. B. L. Stegelmeier, et al. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J. Nat. Toxins*, **8**, 1, 95-116 (1999).
2. M. Blumenthal, W. R. Busse. The complete German commission e monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. Austin, TX: *American Botanical Council*, pp. 116 (1998).
3. P. P. Fu, et al. Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides – Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Journal of environmental science and health Part C, Environ. Carcinogenesis & Ecotoxicology Rev.*, **19**, 353-385 (2001).
4. B. L. Stegelmeier, et al. Pyrrole detection and the pathologic progression of *Cynoglossum officinale* (houndstongue) poisoning in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 81-90 (1996).
5. R. Nishida, et al. Male sex pheromone of a giant danaine butterfly, *Idea leuconoe*. *J. Chem. Ecol.*, **22**(5), 949-972 (1996).
6. M. Kempf, et al. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**(1), 158-68 (2010).
7. J. A. Edgar, et al. Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health. *J. Agric. Food Chem.*, **50**(10), 2719-2730 (2002).
8. C. R. Kumana, et al. Herbal tea induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloid exposure in adults. *Gut*, **26**, 101-104 (1985).
9. R. J. Huxtable. The Myth of Beneficent Nature: The Risks of Herbal Preparations. *Ann. Intern. Med.*, **117**(2), 165-166 (1992).
10. W. V. McDermott, MD, et al. The Budd-Chiari Syndrome and Hepatic Venocclusive Disease: Recognition and Treatment. *Arch. Surg.*, **125**(4), 525-527 (1990).
11. C. Crews, et al. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **396**(1), 327-338 (2010).
12. B. Avula B, et al. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. *Food Chem.*, **178**, 136-48 (2015).

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품에 대한 더 자세한 정보를 알아보시려면 www.agilent.com/chem을 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
2015년 10월 12일
한국에서 인쇄
5991-6254KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies