

고속원자충격질량분석에 의한 녹차성분 검색

문동철* · 이정희 · 이용문

충북대학교 약학대학

(Received April 29, 1992)

Diagnostic FAB-MS Spectra of Green Tea Components

Dong Cheul Moon*, Jeong Hee Lee and Yong Moon Lee
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Abstract—A simple diagnostic method using Fast Atom Bombardment mass spectrometry was applied to the characterization of green tea flavonols from the eluates of Sephadex LH-20 column chromatography. From the ethyl acetate extracts, crude mixture of flavonol fraction(Fr.1~4) were separated by the stepwise gradient elution with 30, 45, and 60% aqueous acetone. Procyanidine B analogues were found to be typical constituents of Fr. 1. Main components of Fr. 2 were catechins and gallo-catechins. Fr. 3 contained mainly ester type compounds, catechin-gallates, gallo-catechin-gallates with their analogues. Fr. 4 was contaminated with some phthalate esters.

Keywords □ Fast atom bombardment mass spectrometry, Sepadex LH-20, tea flavonols.

녹차(*Camellia sinensis* L.)는 혈압강하작용,¹⁾ 유지에 대한 항산화작용,²⁾ 혈 중 cholesterol 증가 억제 작용³⁾ 등 여러가지 약리효과가 있다고 알려져 있으며 최근에는 혈소판응집 저해활성도 보고된 바 있다.⁴⁾ 이들 효과는 주로 caffeine이나 tea catechins(tannins)에 의한다고 추정된다. 차열중의 catechin류는 물에 가용성분들 중 그 함유량이 비교적 많은 polyphenol 성분으로 유리형의 (-)epicatechin(EC), (-)epigallo-catechin(EGC)과 ester형인 (-)epicatechingallate(ECG), (-)epigallo-catechingallate(EGCG) 4종류로 구성되어 있고, 이들 flavonol 성분들이 혈소판응집 저해활성과 관련이 있다. 그러나 식물성분에는 여러가지 유사화합물이 존재하기 때문에 이들 성분에 대한 미량수준에서의 분석은 신약개발차원에서도 매우 유익한 정보를 제공하리라 사료된다.

M. Barber 등에 의해 개발된 고속원자충격질량분석(Fast atom bombardment mass spectrometry: FAB

MS)⁵⁾은 극성이 크고 열에 불안정한 여러종류의 생리활성 물질들에 대한 분자량 확인 및 그 구조에 대한 정보를 효과적으로 제공하여 왔다. positive- 및 negative ion FAB MS spectrum의 특징은 일반적으로 quasi-molecular ion들인 $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ ion과 probe 내 target 시료와 matrix의 상대적인 양 및 ion desorption 수율과, 어디서나 검출될 수 있는 극미량 수준의 알칼리이온(특히 Na 이온)의 contamination 정도에 따라서 $[MG_n+H]^+$, $[MG_n+Na]^+$, $[MG_n-H]^-$, $[MG_n+Na-2H]^-$ 등 여러가지 clusters ion들의 sputtering도 spectral quality 및 재현성에 영향을 주는 요인이 된다. 그러나 flavonol glycosides와 같은 화합물에서 FAB MS법은 분자이온 외에 aglycon (AH_2^+) 및 sugar ion들에 의한 특징적 조각이온들을 보이므로 그 구조를 쉽게 파악할 수 있다.⁶⁾ FAB MS 실험의 최적화조건, matrix, sensitivity, data처리법 등 실제 취급 기술면에 대한 연구가 많이 이루어 졌지만,⁷⁻¹⁰⁾ matrix에 의한 spectral interferences나 $[M+H-H_2O]^+$ 등 해리 ion들로 인하여 low mass

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

영역에 나타나는 peak의 해석은 어려운 점이 많다. 따라서 최근에는 continuous flow(CF) FAB MS(on-line LC-FAB MS)에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다.

본 연구에서는 취급 시료량이 소량이지만 복잡한 조성의 혼합성분들을 column 분리할 경우 각 분획 성분들을 검색하기 위한 목적으로 static FAB MS(off-line LC-FAB MS) 법을 이용하였다. 녹차 중 혈소판응집 저해활성을 보이는 EtOAc 분획¹¹⁾ 성분들을 Sephadex LH-20 column으로 분리하고, 분획성분들의 확인 및 characterization을 시도하였다. 검색대상으로 차류의 polyphenol성분들인 flava-3-ols, proanthocyanidins, hydrolyzable tannins, theasinensins 및 theaflavins계 기지화합물 약 40여종을 검토하였다.

실험방법

질량분석— 질량분석기로는 VG-TRIO IIA quadrupole mass spectrometer(VG Biotech, Ltd., Altrincham, U. K.)를 이용하였다. FAB gun으로 saddle field형의 neutral atom gun (Ion Tech Ltd., Teddington, England)을 이용하였다. xenon fast atom beam 생성 조건으로 8-9 kV FAB power에서, atom emission current로 1 mA를 유지하였다. 측정은 주로 m/z 200~700 범위를 3 sec/scan 이내로 하였다. mass calibration에는 CsI(in glycerol)의 ionization을 이용하였다. 시료측정에서 냉동건조한 시료의 경우 약 1 µg-100 ng을 probe target에 loading하고 (+)mode에서는 주로 0.1% TFA(in MeOH)를 혼합한 glycerol을 matrix로 이용하였다. column 용출물 시료는 1~2 µl를 취하여 target probe에 그대로 spot하였다.

시약 및 물질— 몇가지 flavonol 표준품들(catechin, epicatechin, rutin, kaemperol 등)은 국립보건연구원으로부터 제공받았다. 고순도 xenon은 research급(99.95%; East Rutherford, New Jersey)이며 matrix인 glycerol는 Aldrich 특급시약(99.9%)을 사용하였고 그 외 모든 시약은 분석급 및 HPLC급 시약을 그대로 사용하였다.

용매분획— 시편녹차 350g을 약 80°C의 열수 1l로 20분간 추출한 다음 고형성분은 압착 제거하고, 추출액을 합하여 2,100 rpm에서 5분간 원심분리하여 고형성분을 완전히 제거한 후 상층액을 합하여 60°C

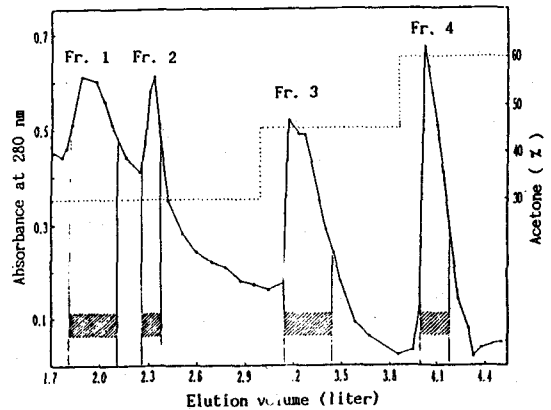


Fig. 1—A stepwise elution chromatogram of the EtOAc extracts of green tea on sephadex LH-20 with aqueous acetone.

(Fr. 1) The 1st eluate with 30% sol'n.; (Fr. 2) The 2nd eluate with 30% sol'n.; (Fr. 3) Eluate with 45% sol'n.; (Fr. 4) Eluate with 60% sol'n.

이하에서 약 150 ml까지 증발 농축하였다. 농축액 50 ml에 대하여, EtOAc 150 ml로 추출(×3회)하고 추출액을 합하여, 다시 약 30 ml로 농축하여 column분리용 농축시료로 하였다. caffeine은 column 흡착능이 적어서 물로 용리시켜 제거되므로 $CHCl_3$ 추출과정을 생략하였다.

Column 분리 및 농축—Sephadex LH-20(30~100 µm, Pharmacia) 60g을 탈이온수 600 ml를 사용, 4시간 정도 팽윤시킨 후, 내벽을 미리 silicanization한 column(30 mm i.d.×360 mm)에 충전한 다음 물 500 ml를 흘려 안정화시켰다. 다음, 농축시료액 약 15 ml를 loading하고, 먼저 물 1100 ml로 caffeine, 유리 아미노산 및 당류 등이 포함된 녹색분획을 씻어 내리고 이어서 15% acetone 용액 600 ml를 흘려 terpenoids류 및 착색물질들을 완전히 제거하였다. 다음에 30%-(1300 ml), 45%-(900 ml) 및 60% acetone (600 ml)으로 단계적으로 용리시켰다. Figure 1의 용리곡선에서 30% acetone에 의해 용리되는 두분획과 45% 및 60%- 용액에 의한 분획 중 사선으로 표시한 부분만을 분취하여 각각 Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3 및 Fr. 4로 하고 이 용액 중 1~2 µl를 취하여 mass spectrum을 측정하고 50°C 이하에서 약 20 ml로 감압농축하였다. 각 농축액을 -80°C에서 냉동건조하여 분말을 얻었다.

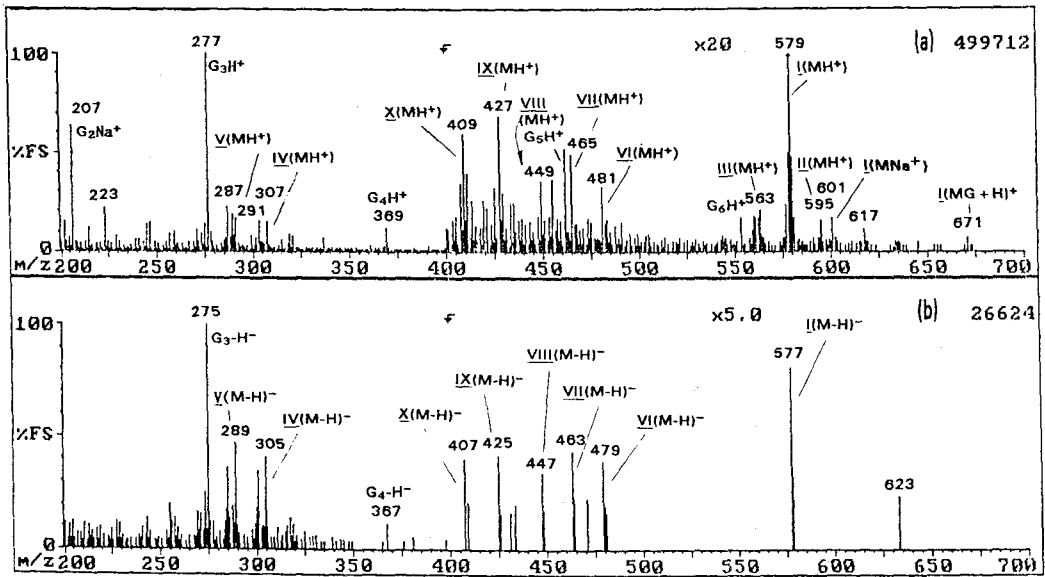


Fig. 2—FAB mass spectrum of the 1st half eluate of EtOAc extract of green tea with 30% aqueous acetone on a sephadex LH-20 column. (a) in positive mode (b) in the negative mode.

20% MeOH 용액을 eluant로 한 HPLC(Hitachi L-2500; Cosmosil 5C₁₈; 4.6 mm i.d. × 150 mm; 270 nm; column temp., 30°C)에서 여러 성분들이 분리되며 epicatechin (EC; 순도 약 80%) 및 caffeine은 표준품으로 확인하였지만 이외의 성분들은 확인하지 않았다.¹¹⁾

결과 및 고찰

Flavonoids 화합물은 acidic proton이 없으므로 FAB MS에서 [M+H]⁺ 및 [M-H]⁻에 의한 sample ion current가 비교적 약하지만 유도체화가 필요없이 혼합물 중 몇가지 성분들의 확인에 있어서는 매우 확실한 정보를 얻을 수 있다. flavonoid glycosides는 [M+H]⁺ 외에 aglycon(AH₂⁺), sugar, [M+H-H₂O]⁺ 및 MH₂⁺-H₂O에 기인한 조각이온들도 예상된다. (±)FAB MS spectral quality는 target에서의 sample solubility 및 균일한 surface monolayer 형성과 관계가 있다. matrix interference로 인해 sample ion 해석에 어려움도 있지만 [MG_n+H]⁺ 등 다양한 ion cluster들의 상대적 abundance로부터 성분확인에 확실한 지견을 얻을 수 있었다.

30% acetone 용출분획(Fr. 1) 성분들—Fr. 1의 (±)

FAB MS spectra는 Figure 2-(a)(b)와 같다. 뚜렷하게 검출되는 성분으로는 분자량 578(m/z 579: [M+H]⁺; m/z 577; [M-H]⁻)의 anthocyanidin계 isomer들 (procyanidine B-2, /or B-3, /or B-4; C₃₀H₂₆O₁₂; compd. I)로 확인되었다. 그 외 compd. I과 phenolic OH 수가 1개씩 차이가 나는 isomer들(mass difference, 16amu: compd. II and III in Table I)도 약 10%정도 포함되어 있으며 미량(1%정도)이지만 phenolic OH 수가 2개씩 차이가 있는 성분들도 확인되었다. 질량범위 400~500 amu에 보이는 미확인 ion들(m/z 481, 465, 449 및 m/z 427, 409; compd. VI-X in Table I)도 phenolic OH 수에 차이가 나는 계열 화합물로 추정된다. m/z 300 부근의 ion들은 여러가지 glycosides들의 복잡한 fragments 들에 의해 나타날 수 있다. 분자량 306(m/z 307: [M+H]⁺; m/z 305([M-H]⁻) 및 290(m/z 291: [M+H]⁺; m/z 389: [M-H]⁻)의 ions들은 각각 gallo-catechins 및 catechin isomers로 보이지만 HPLC결과를 참고할 때 그 함량이 적다. 일반적으로 low mass 범위에서 background 영향을 무시할 수 없고 low mass ion 들의 ion sputtering 정도가 크기 때문에 ion abundance가 그 함량에 반드시 비례한다고는 볼 수 없다.

30% acetone 용출분획(Fr. 2) 성분들—Fr. 2의 (±)

Table I—Positive- and negative ion FAB mass spectral data of the 1st half eluate of the EtOAc extract of green tea with 30% aqueous acetone on a sephadex column

Compound	Positive Ions(Rel. abundance, normalized to m/z 579)			Assignments
	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[MG+H]^+$	
I	579(100)	601(12)	671(5)	procyanidin B analogues
II	595(11)	617(8)	687(-)	Compd. I+OH
III	563(15)	585(3)	655(2)	Compd. I-OH
IV	307(206)	329(31)	399(32)	gallocatechins
V	291(238)	313(30)	383(44)	catechins
VI	481(23)	503(3)	573(3)	
VII	465(35)	487(9)	557(5)	Compd. VI-OH
VIII	449(25)	471(8)	541(4)	Compd. VI-2OH
IX	427(49)	449(25)	519(3)	afzelechin gallates
X	409(42)	431(8)	501(4)	Compd. IX-H ₂ O
	Negative Ions(Rel. abundance, normalized to m/z 577)			
	$[M-H]^-$	$[MNa-2H]^-$	$[MG-H]^-$	
I	577(100)	599(-)	669(-)	procyanidin B analogues
IV	305(251)	327(31)	397(26)	gallocatechins
V	289(285)	311(57)	381(32)	catechins
VI	479(47)	501(-)	571(-)	
VII	463(53)	485(-)	555(-)	Comd. IV-OH
VIII	447(42)	469(-)	539(-)	Compd. IV-2OH
IX	425(51)	447(42)	517(-)	afzelechin gallates
X	407(49)	429(-)	499(-)	Compd. IX-H ₂ O

The mass spectral data are restricted to the most characteristic ions.

Relative abundances are normalized to most characteristic ions m/z 579 and 577 in positive- and negative ion FAB mass spectra, respectively.

G: Glycerol

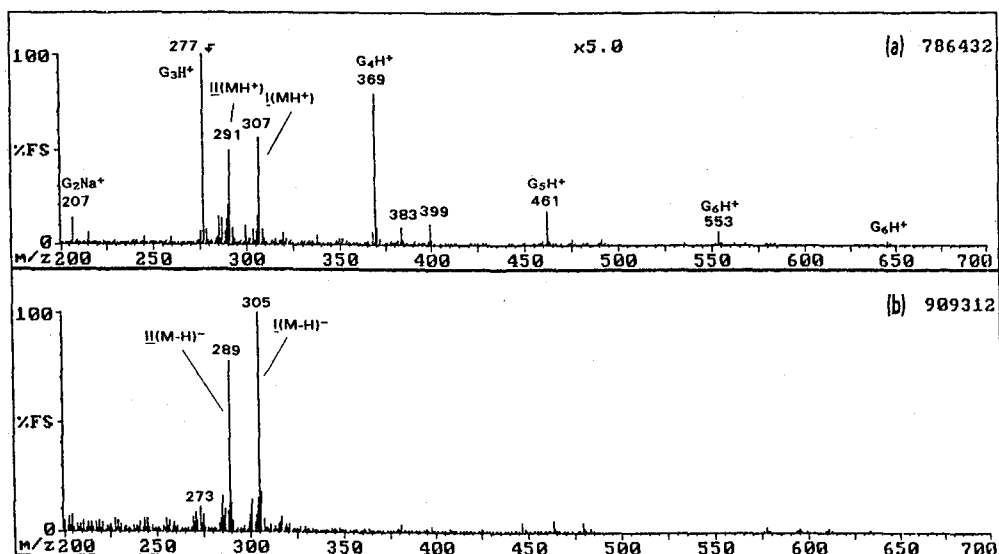


Fig. 3—FAB mass spectrum of the 2nd half eluate of EtOAc extract of green tea with 30% aqueous acetone on a sephadex LH-20 column. (a) in positive mode (b) in the negative mode.

Table II—Positive- and Negative- ion FAB mass spectral data of the 2nd eluate (Fr. 2) of 30% aqueous acetone solution on a sephadex LH-20 column

Compound	Positive Ions(Rel. abundance, normalized to m/z 307)				Assignments
	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[MG+H] ⁺	[MG ₂ +H] ⁺	
I	307(100)	329(3)	399(18)	491(6)	gallo catechins
II	291(87)	321(6)	383(16)	475(5)	catechins
III	579(2)				procyanidin B analogues
Negative Ions(Rel. Abundance, normalized to m/z 305)					
	[M-H] ⁻	[MNa-2H] ⁻	[MG-H] ⁻		
I	305(100)	327(3)	397(2)		gallo catechins
II	289(78)	311(3)	381(4)		catechins
III	577(2)	599(-)	669(-)		procyanidin B analogues
IV	479(5)	501(-)	-		
V	463(5)	485(-)	-		compd. IV-OH
VI	447(5)	469(-)	-		compd. IV-2OH
VII	431(1)	453(-)	-		compd. IV-3OH
VIII	321(4)	343(1)	413(-)		compd. I+OH

The mass spectral data are restricted to the most characteristic ions.

Relative abundances are normalized to most characteristic ions m/z 307 and 305 in positive- and negative ion FAB mass spectra, respectively.

G: Glycerol

FAB MS spectra는 Figure 3-(a), (b)와 같은 분자량이 각각 306 (m/z 307: [M+H]⁺; m/z 305: [M-H]⁻) 및 290 (m/z 291: [M+H]⁺; m/z 289: [M-H]⁻)인 gallo catechins 및 catechins류가 주성분임을 확인할 수 있었다(HPLC에서의 R.T., 각각 5.72 min. 및 13.6 min.). catechins 및 gallo catechins에 phenolic OH가 한개 떨어지거나 더 붙은 화합물들도 미량 함유되어 있음이 확인되었다. 소량의 procyanidine B계열 화합물 및 기타 미확인 계열화합물들(compds. IV, V, VI, VII in Table II)도 검출되었다.

45% acetone 용출분획(Fr. 3) 성분들—Fr. 3에 대한 (±)FAB spectra는 Fig. 4-(a) 및 (b), tabulated data는 Table III과 같다. 뚜렷하게 확인되는 주성분은 분자량이 각각 458(m/z 459: [M+H]⁺; m/z 457: [M-H]⁻), 442(m/z 443: [M+H]⁺; m/z 441: [M-H]⁻) 및 426(m/z 427: [M+H]⁺; m/z 425: [M-H]⁻)들이인 에스테르화합물, gallo catechin-gallates, catechin-gallates 및 afzelechin-gallates(compd. I, II, III in Table III)임을 확인할 수 있었다. compd. III는 녹차에서는 보고된 바 없는 화합물로서 HPLC 상에서 (R.T. 44

min)도 확인할 수 있었다. compd. I, II, III의 FAB MS 피크강도는 100 : 40 : 10 정도로 HPLC에서의 면적비와 유사하였다.

60% acetone 용출분획(Fr. 4) 성분들—소량의 gallo catechin-gallates 및 catechin-gallates들도 검출되지만 m/z 391, 279, 149에서 검출되는 주 성분들이 column chromatography system에서 오염될 수 있는 phthalic anhydride, dibutyl- 및 dioctyl phthalate로 판명되므로써 column의 반복사용이 곤란하다고 결론 내렸다.

결 론

1. 녹차의 열탕 추출물 중 혈소판 응집저해활성을 가장 강하게 보이는 EtOAc 용매추출 분획 중의 각 성분 분리를 위하여 Sephadex LH-20 column에서 30%, 45% 및 60% aqueous acetone을 용리액으로 하여 단계적으로 용리했을때 네 분획(Fr. 1, 2, 3 및 4)을 얻었다. FAB mass spectrometry법을 이용하여 각 분획성분을 검색한 결과 Fr. 1에서 극성이 큰

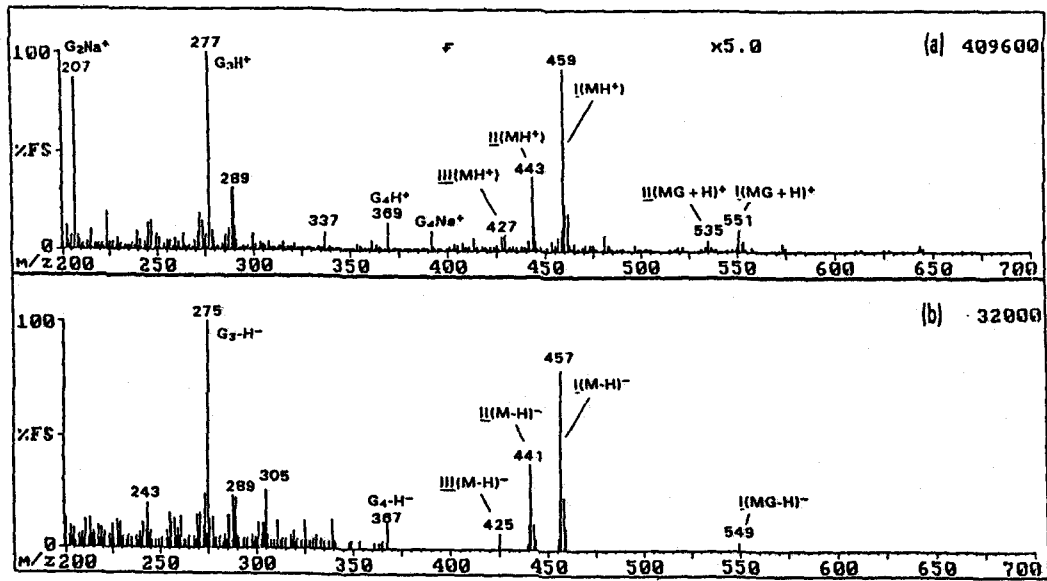


Fig. 4—FAB mass spectrum of the eluate of EtOAc extract of green tea with 45% aqueous acetone on a sehadex LH-20 column. (a) in positive mode (b) in the negative mode.

Table III—Positive- and Negative- ion FAB mass spectral data of the eluate (Fr. 3) of 45% aqueous acetone solution on a sephadex LH-20 column

Compound	Positive Ions(Rel. abundance, normalized to m/z 459)						Assignments
	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[MG+H]^+$	$[MG+Na]^+$	$[MG_2+H]^+$	$[MG_2+Na]^+$	
I	459(100)	481(9)	551(12)	573(5)	643(3)	665(1)	gallocatechin-gallates
II	443(40)	465(4)	535(5)	557(-)	627(1)	-	catechin-gallates
III	427(8)	449(11)	519(2)	531(-)	611(1)	-	afzelechin-gallates
	Negative Ions(Rel. Abundance, noramalized to m/z 457)						
	$[M-H]^-$	$[MNa-2H]^-$	$[MG-H]^-$				
I	457(100)	479(-)	549(4)				gallocatechin-gallates
II	441(48)	463(-)	533(-)				catechin-gallates
III	425(8)	447(-)	517(-)				afzelechin-gallates

The mass spectral data are restricted to the most characteristic ions.

Relative abundances are normalized to most characteristic ions m/z 459 and 457 in positive- and negative ion FAB mass spectra, respectively.

G: Glycerol

proanthocyanidine계 polyphenols, Fr. 2로부터 catechins 및 gallocatechins, Fr.3에서 gallocatechin-gallates, catechin-gallates의 검색이 가능하였다. 이들 주 성분들 외에 phenolic OH 수가 다른 계열화합물들이 각 분획성분들에 함께 포함되어 있음이 확인가능하였고 이들의 상대적 함량비 추정도 가능하였다.

2. FAB mass spectrometry를 이용한 혼합성분들의 검색법에 관한 본 연구는 표준품 찾기가 매우 어렵고

정제방법이 대단히 까다로운 flavonols류의 column 분리법 설계에 유용하게 적용되리라 사료된다. 기지 성분들의 경우 확인 및 동정이 간단하며 동일계열의 혼합물은 분리정량도 가능하리라고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1991년도 한국과학재단 기초연구비지원

(KOSEF 911-0304-043-1)에 의한 결과의 일부로, 이에 해당기관에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T.: Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **61**, 803 (1987).
- 2) Matsuzaki, T. and Hara Y.: Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **59**, 129-134 (1985).
- 3) Muramatu K. *et.al.*: Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 613-622 (1986).
- 4) Yamanaka M.: Antiplatelet aggregation effects of tea extracts and catrechins. *Proceedings of Annual Conference of Nippon Nogeikagaku* **62**, 627 (1988).
- 5) Barber, M., Bordoli, R.S., Sedgwick, R.D. and Tyler, A.N.: Fast atom bombardment mass spectrometry of solids as an ion source in mass spectrometry. *Nature* **293**, 270 (1981).
- 6) Crow, F.W., Tomer, K.B., Looker, J.H. and Gross, M.L.: Fast atom bombardment and tandem mass spectrometry for structure determination of steroid and flavonoid glycosides. *Anal. Biochem.*, **155**, 286-307 (1986).
- 7) Clay, K.L., Wahlin, L. and Murphy, R.C.: Interlaboratory reproducibility of relative abundances of ion currents in fast atom bombardment mass spectral data. *Biomed. Mass Spectro.*, **10**, 489 (1983).
- 8) Martin, S.A., Costello, C.E. and Biemann, K.: Optimization of Experimental Procedures for fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **54**, 2362 (1982).
- 9) Gower, J.L.: Matrix compounds for fast atom bombardment mass spectrometry. *Biomed. Mass.*, **12**, 191 (1985).
- 10) Malorni, A., Marine, G. and Milone, A.: Effect of matrix modification by strong mineral acids on the positive fast atom bombardment mass spectra of peptides. *Biomed. Environ. Mass. Spectro.*, **13**, 477 (1986).
- 11) Moon, D.C. and Lee, Y.M.: Manuscript in preparation (1992).