

LC-ESI-MS/MS를 이용한 용담사간탕의 주요 성분 분석

서창섭 · 하혜경*

한국한의약연구원 K-herb연구단

Quantitative Analysis of the Marker Constituents in Yongdamsagan-Tang using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry

Chang-Seob Seo and Hyekyung Ha*

K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Korea

Abstract – Yongdamsagan-tang has been used to treat the urinary disorders, acute- and chronic-urethritis, and cystitis in Korea. In this study, an ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) method was established for simultaneous analysis of the 20 bioactive marker compounds, geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, liquiritin apioside, acteoside, calceolarioside B, liquiritin, nodakenin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, glycyrrhizin, wogonin, glycyrrhizin, wogonin, saikosaponin A, decursin, decursinol angelate, alisol B, alisol B acetate, and pachymic acid in traditional herbal formula, Yongdamsagan-tang. Chromatographic separations of all marker compounds were conducted using a Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ analytical column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) at 45°C using a mobile phase of 0.1% (v/v) formic acid in water and acetonitrile with gradient elution. The MS analysis was performed using a Waters ACQUITY TQD LC-MS/MS coupled with an electrospray ionization source in the positive and negative modes. The flow rate was 0.3 mL/min and injection volume was 2.0 μL. The correlation coefficient of 20 marker compounds in the test ranges was 0.9943–1.0000. The limits of detection and quantification values of the all marker components were 0.11–6.66 and 0.34–19.99 ng/mL, respectively. As a result of the analysis using the optimized LC-ESI-MS/MS method, three compounds, geniposidic acid (from *Plantaginis Semen*), alisol B (from *Alismatis Rhizoma*), and pachymic acid (from *Poria Sclerotium*), were not detected in this sample. While the amounts of the 17 compounds except for the geniposidic acid, alisol B, and pachymic acid were 0.04–548.13 μg/g in Yongdamsagan-tang sample. Among these compounds, baicalin, bioactive marker compound of *Scutellariae Radix*, was detected at the highest amount as a 548.13 μg/g.

Keywords – Yongdamsagan-tang, Quantitative analysis, LC-MS/MS

용담사간탕(龍膽瀉肝湯)은 金·元代 李東垣의 『東垣十書-蘭室秘臧』¹⁾에 처음으로 기재된 처방으로 瀉肝膽實火 清下焦濕熱하는 효능이 알려져 있으며, 용담(龍膽, *Gentianae Scabrae Radix et Rhizoma*), 시호(柴胡, *Bupleuri Radix*), 택사(澤瀉, *Alismatis Rhizoma*), 목통(木通, *Akebiae Caulis*), 차전자(車前子, *Plantaginis Semen*), 적복령(赤茯苓, *Poria Sclerotium*), 생지황(生地黃, *Rehmanniae Radix*), 당귀(當歸, *Angelicae Gigantis Radix*), 치자(梔子, *Gardeniae Fructus*), 황금(黃芩, *Scutellariae Radix*) 및 감초(甘草, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) 등 11종의 생약으로 구성되어 있다. 이

후 우리나라에서도 許浚의 『東醫寶鑑』²⁾에 간장(肝藏)의 습열(濕熱)로 인하여 남자(男子)는 음정(陰挺)이 종창(腫脹)하고 부인(婦人)은 음정(陰挺)이 창양(瘡瘍)한 증상과 혹은 남자의 음경(陰莖)이 습양(濕瘍)하여 농수(膿水)가 나오는 증상을 치료하는데 사용된다고 기록되어 있다. 본 처방의 현대과학적 생리활성 연구로는 estradiol valerate로 유발된 흰 쥐의 다낭성 난소 발달과 수태에 미치는 영향,²⁾ 간암 세포주인 HepG2에서의 세포사멸 효과³⁾ 및 항염증, 항산화, 간 보호 및 항간염바이러스 효과⁴⁾ 등이 보고되었다. 또한 용담사간탕 투여로 호전된 대장포진 환자의 임상 증례 보고^{5,6)} 및 화농성 슬관절염 환자의 임상 증례 보고⁷⁾ 등이 보고되었다. 이에 저자들은 본 연구에서 비뇨기와 질환에 주로 처

*교신저자(E-mail): hkha@kiom.re.kr
(Tel): 042-868-9513

방되는 용담사간탕을 선정하여 처방에 함유된 주요 성분들의 함량을 분석하고자 하였다. 따라서 본 처방을 구성하는 구성생약의 성분에 관한 연구는 용담의 gentiopicroside 및 sweroside 등과 같은 secoiridoid glycosides,⁸⁾ 시호의 saikosapinin A, C 및 D 등과 같은 oleanane계 saponin,⁹⁾ 택사의 aliso B 및 alisol B acetate 등과 같은 triterpenoids,¹⁰⁾ 목통의 chlorogenic acid와 calceolarisoide B 등과 같은 pheylpropanoid,^{11,12)} 차전자의 acteoside와 geniposide 등과 같은 pheylpropanoid와 iridoid,^{13,14)} 복령의 pachymic acid와 dehydropachymic acid 등과 같은 triterpenoids,¹⁵⁾ 생지황의 aucubin과 catalpol 등과 같은 iridoid glycosides,¹⁶⁾ 당귀의 nodakenin, decursin 및 decursinol angelate 등과 같은 coumarins,¹⁷⁾ 치자의 geniposide와 gardenoside 등과 같은 iridoids,¹⁸⁾ 황금의 baicalin과 baicalein 등과 같은 flavonoids¹⁹⁾ 및 감초의 glycyrrhizin, liquiritin 및 liquiritin apioside 등과 같은 triterpene saponin과 flavonoids²⁰⁾ 등이 분리 보고 되었다. 이들 성분들 중 본 연구에서는 용담사간탕을 구성하는 생약들의 성분 중 본 연구에서는 시호의 saikosapinin A, 택사의 aliso B와 alisol B acetate, 목통의 chlorogenic acid와 calceolarisoide B, 차전자의 acteoside, geniposide 및 geniposidic acid, 복령의 pachymic acid, 당귀의 nodakenin, decursin 및 decursinol angelate, 치자의 geniposide, 황금의 baicalin, baicalein, wogonoside 및 wogonin 및 감초의 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritin apioside 및 liquiritigenin 등 20종에 대하여 질량분석기가 결합된 초고성능 액체크로마토그래피(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometer; UPLC-MS)를 이용하여 이들 성분의 함량 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 용담사간탕을 구성하는 11종의 한약재는 광명

당제약(Ulsan, Korea)에서 규격품을 구입하여 본초학 전공인 동국대학교 한의과대학 이제현 교수(Gyeongju, Korea)와 대전대학교 한의과대학 서영배 교수(Daejeon, Korea)로부터 한약재 관능검사 해설서²¹⁾에 따라 감정 후 사용하였다(Table I). 본 처방을 이루는 구성 한약재(2012-KE49-1~2012-KE49-11)와 용담사간탕 추출물(2012-KE49)의 표본은 한국 한의학연구원 K-herb연구단에 보관하였다.

시약 및 기기 - 용담사간탕 물 추출물로부터 주요 성분의 함량 분석을 위해 사용된 표준품으로 alisol B, alisol B acetate, geniposide, geniposidic acid, liquiritin, baicalin, glycyrrhizin, saikosapinin A, wogonin은 Wako Chemicals (Osaka, Japan), acteoside와 pachymic acid는 Biopurify Phytochemicals(Chengdu, China), calceolarisoide B와 liquiritigenin은 ChemFaces(Wuhan, China) 및 nodakenin, decursin 및 decursinol angelate는 NPC Bio Technology(Yeongi, Korea)에서 구입하였으며, chlorogenic acid, liquiritin apioside, baicalein 및 wogonoside는 Acros Organics(Pittsburgh, PA, USA), Shanghai Sunny Biotech(Shanghai, China), Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 및 Tauto Biotech(Shanghai, China)로부터 각각 구입하였다(Fig. 1). 이들 성분들의 순도는 모두 98.0%이상이었다. 성분 분석을 위해 사용된 메탄올, 아세트나이트릴 및 물은 HPLC용으로 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 개미산은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

용담사간탕 물 추출은 경서기계산업의 초고속진공저온농축추출기(COSMOS660, Incheon, Korea)를 사용하였으며, 주요 성분의 함량 분석은 Waters의 ACQUITY UPLC system (Milford, MA, USA)을 사용하였다. 질량분석기는 전자분무이온화(electrospray ionization; ESI) source가 장착된 탠덤 사중극자 질량분석기(ACQUITY TQD LC-MS/MS, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 모든 데이터의 수집과

Table I. Composition of Yongdamsagan-tang

Scientific name	Family	Parts of using	Origin	Amount (g)
<i>Gentiana scabra</i> Bunge	Gentianaceae	Root and Rhizome	China	3.750
<i>Bupleurum falcatum</i> Linne	Umbelliferae	Root	Gurye, Korea	3.750
<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk	Alismataceae	Rhizome	Yeongcheon, Korea	3.750
<i>Akebia quinata</i> Decaisne	Lardizabalaceae	Stem	Yeongcheon, Korea	1.875
<i>Plantago asiatica</i> Linne	Plantaginaceae	Seed	China	1.875
<i>Poria cocos</i> Wolf	Polyporaceae	Sclerotium	Pyeongchang, Korea	1.875
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertner) Liboschitz ex Steudel	Scrophulariaceae	Root	Gunwi, Korea	1.875
<i>Angelica gigas</i> Nakai	Umbelliferae	Root	Bonghwa, Korea	1.875
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	Rubiaceae	Fruit	Gurye, Korea	1.875
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Labiatae	Root	Gurye, Korea	1.875
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Leguminosae	Root and Rhizome	China	1.875
Total amount				26.250

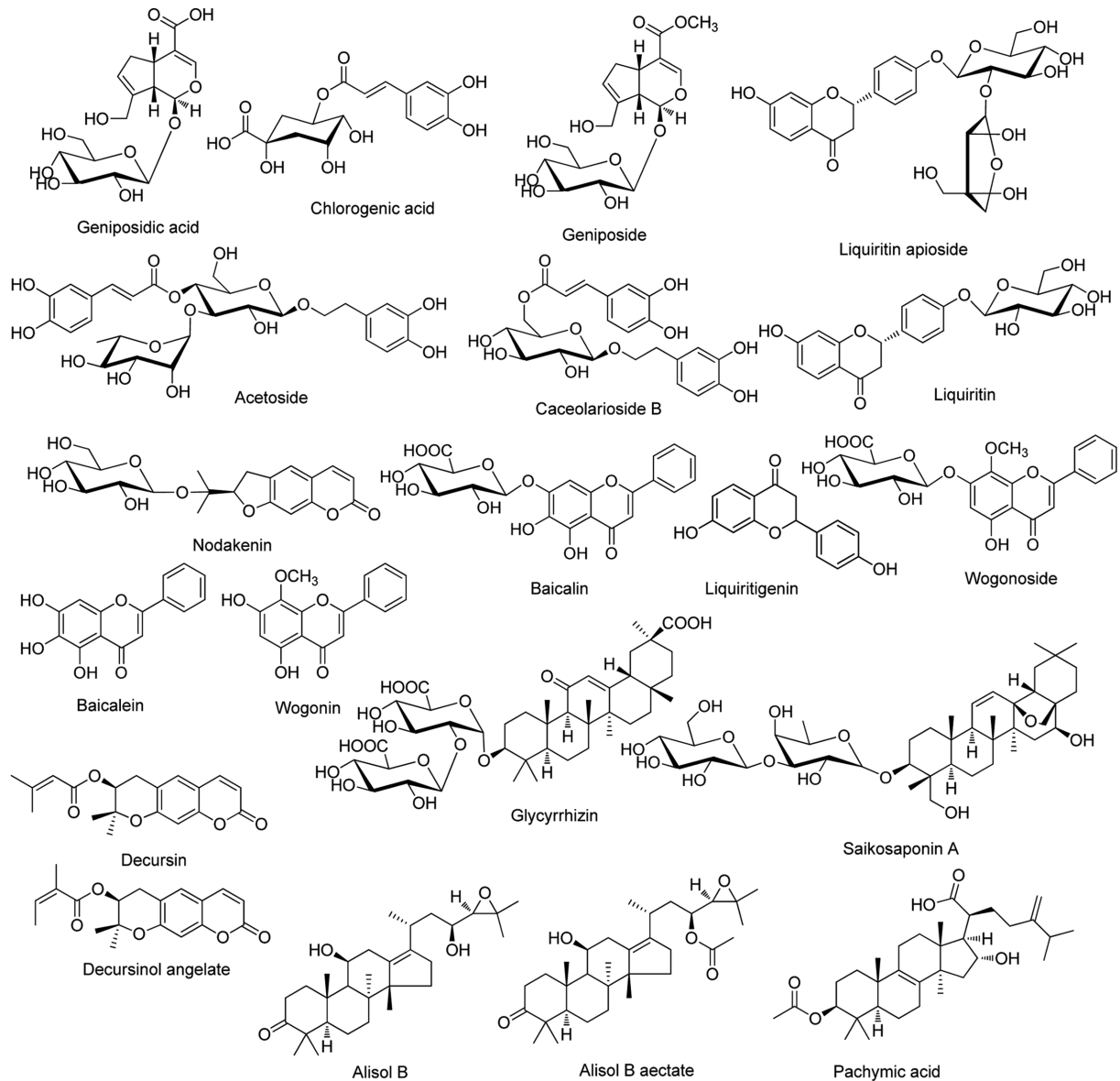


Fig. 1. Chemical structures of biomarker compounds of Yongdamsagan-tang.

처리는 Waters MassLynx software(version 4.1, Milford, MA, USA)를 사용하였다.

용담사간탕 물 추출물 조제 – 11종의 생약으로 구성된 용담사간탕의 물 추출물을 조제하기 위해 Table I과 같은 무게 비율로 배합하여 총 시료 5.0 kg(1첩 26.25 g × 190.5배)을 넣은 후 물을 10배수인 50 L를 첨가하였다. 혼합된 시료를 초고속진공저온추출기(Cosmos 660, Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)를 이용하여 98 kPa 압력으로 100°C에서 2시간 전탕한 후 표준체(No. 270, 53 μm, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 이용하여 여과하였다. 여과액은 동결건조기(PVTFD100, IShinBioBase, Yanju, Korea)를 사용하여 동결건조하여 926.4 g (18.5%)의 건조된 물 추출물을 얻었다.

표준액 및 검액의 조제 – Geniposidic acid를 비롯한 20종의 표준품을 각각 메탄올에 1,000 μg/mL의 농도로 녹인 후 냉장 보관한 후 분석 전에 희석하여 사용하였다. LC-MS/MS를 이용하여 용담사간탕의 주요 성분을 분석하기 위하여 조제된 용담사간탕 물 추출물 38.3 mg을 정확히 취한 후 70% 메탄올을 5 mL을 넣은 후 5분간 초음파 추출 후 1분간 vortexing 하였다. 그 후 0.1 mL을 정확히 취한 후 70% 메탄올을 넣어 10 mL로 100배 희석한 후 0.22 μm 멤브레인 필터하여 검액으로 하였다.

UPLC 및 LC-MS/MS 분석 조건 – 용담사간탕 물 추출물에서 geniposidic acid를 비롯한 20종의 함량 분석을 위해 Table II와 Table III의 조건으로 분석하였다. 20종 성분의 정

Table II. Conditions for LC-MS/MS analysis of Yongdamsagan-tang

HPLC condition			
Column	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.7 μm)		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	2.0 μL		
Column temperature	45°C		
Sample temperature	5°C		
Mobile phase	Time (min)	A (%) ¹	B (%) ²
	0	80	20
	0.1	80	20
	14.0	5	95
	15.0	0	100
	15.1	80	20
	18.1	80	20
MS condition			
Capillary voltage (kV)	3.3		
Extract voltage (V)	3.0		
Source temperature (°C)	120		
RF lens (V)	0.3		
Desolvation temperature (°C)	300		
Desolvation gas (L/h)	600		
Cone gas (L/h)	50		
Collision gas (mL/min)	0.14		

¹0.1%(v/v) formic acid in water²Acetonitrile**Table III.** Linearities, regression equation, correlation coefficients, LOD, and LOQ for marker compounds

Compound	Linear range (ng/mL)	Regression equation	Correlation coefficient	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Geniposidic acid	0 – 500	$y = 1.08x - 16.78$	0.9953	3.49	10.48
Chlorogenic acid	0 – 500	$y = 2.06x - 27.62$	0.9943	1.50	4.50
Geniposide	0 – 500	$y = 0.24x - 2.69$	0.9961	6.66	19.99
Liquiritin apioside	0 – 500	$y = 7.87x - 25.18$	0.9997	0.55	1.65
Acteoside	0 – 500	$y = 4.81x - 33.99$	0.9987	2.18	6.55
Calceolarioside B	0 – 500	$y = 3.95x - 12.72$	0.9994	1.43	4.28
Liquiritin	0 – 500	$y = 8.95x - 6.62$	0.9995	1.14	3.41
Nodakenin	0 – 500	$y = 21.41x - 137.19$	0.9993	0.21	0.64
Baicalin	0 – 500	$y = 13.71x - 192.14$	0.9956	2.00	6.00
Liquiritigenin	0 – 500	$y = 26.98x - 92.39$	0.9996	0.11	0.34
Wogonoside	0 – 500	$y = 75.43x - 36.21$	0.9999	1.50	4.50
Baicalein	0 – 500	$y = 1.78x + 42.37$	0.9796	1.00	3.00
Glycyrrhizin	0 – 500	$y = 3.46x - 31.98$	0.9982	1.42	4.27
Wogonin	0 – 500	$y = 105.76x + 21.44$	0.9999	1.50	4.50
Saikosaponin A	0 – 500	$y = 7.15x - 14.71$	0.9998	0.49	1.46
Decursin	0 – 500	$y = 222.99x + 206.64$	1.0000	0.38	1.13
Decursinol angelate	0 – 500	$y = 80.80x + 66.10$	0.9999	0.96	2.89
Alisol B	0 – 500	$y = 5.25x + 24.48$	0.9970	0.32	0.97
Alisol B acetate	0 – 500	$y = 7.67x - 27.60$	0.9989	0.37	1.10
Pachymic acid	0 – 500	$y = 1.52x - 6.98$	0.9972	1.05	3.16

량은 다중반응탐색법(multiple reaction monitoring, MRM)으로 실시하였다.

결과 및 고찰

LC-MS/MS 분석조건 확립 – 용담사간탕의 구성 생약 증시호의 saikosapinin A, 택사의 aliso B와 alisol B acetate, 목통의 chlorogenic acid와 calceolarisoid B, 차전자의 acteoside, geniposide 및 geniposidic acid, 복령의 pachymic acid, 당귀의 nodakenin, decursin 및 decursinol angelate, 치자의 geniposide, 황금의 baicalin, baicalein, wogonoside 및 wogonin 및 감초의 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritin apioside 및 liquiritigenin 등 20종에 대하여 LC-MS/MS MRM 분석법을 이용하여 동시 정량을 실시하였다. 모든 성분 UPLC BEH C₁₈(2.1 × 100 mm, 1.7 μm) 분석용 칼럼을 사용하여 분리하였다. 이동상으로는 물과 메탄올 및 아세트나이트릴과 산의 첨가 여부를 확인하여 최적의 분석 조건을 탐색하였으며, 그 결과 0.1%(v/v) 개미산이 각각 함유된 물-아세트나이트릴을 이용하여 기울기 용매조건으로 정량 분석을 실시하였다. 45°C의 칼럼온도와 0.3 mL/min의 유속으로 최적화된 이동상을 이용하여 ESI 방법의 양이온 모드와 음이온 모드에서 Table II와 III의 조건으로 MRM 분석을 실시한 결과 모든 성분이 15분 이내로 분리되었다.

검량선, 검출한계 및 정량한계 작성 – Geniposidic acid를

비롯한 20종의 성분에 대한 검량선은 0, 10, 50, 100 및 500 ng/mL의 농도 범위에서 농도에 따른 피크 면적을 이용하여 작성하였으며, 작성된 검량선의 상관계수(r^2)를 구하여 직선성을 판단하였다. 또한 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 신호 대 잡음 비로 3과 10으로 각각 계산하였다. 20종 성분에 대한 검량선 작성 결과 각 성분의 직선성을 나타내는 r^2 값이 0.9943–1.0000으로 우수한 직선성을 나타내었으며, LOD와 LOQ 값은 0.11–6.66 ng/mL와 0.34–19.99 ng/mL로 각각 나타났다 (Table III).

용담사간탕 물 추출물 중 주요성분의 동정 및 함량분석 – LC-MS/MS를 이용하여 11종의 생약으로 구성된 용담사간탕 중 주요 성분의 함량 분석을 위해 0.1% 개미산이 함유된 물-아세트나이트릴의 이동상 시스템으로 지표 성분으로 선정된 20종의 성분에 대한 분자 이온을 동정하였다. 그 결과 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, liquiritin apioside, acteoside, calceolarioside B, liquiritin, glycyrrhizin, saikosaponin A 및 pachymic acid 등 10종은 m/z 373.2, 353.2, 387.2, 549.3, 623.4, 477.3, 417.4, 821.9, 779.7 및 527.6에서 $[M-H]^-$ 형태의 분자 이온 피크를 확인하였으며, nodakenin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, wogonin, decursin, decursinol angelate, alisol B 및 alisol B acetate 등 10종의

성분은 m/z 409.4, 447.3, 257.2, 461.3, 271.1, 285.1, 329.2, 329.2, 473.6 및 515.6에서 $[M+H]^+$ 형태의 분자 이온 피크를 각각 확인하였다 (Table IV). 또한 LC-MS/MS를 이용하여 음이온 및 양이온 모드에서 동정된 지표 성분들에 대한 함량을 분석하기 위하여 Table IV와 같이 각각의 성분에 대한 precursor ion(Q1)과 product ion(Q3)을 설정하였으며, 각 성분의 MRM 분석 조건은 다음과 같다. Geniposidic acid는 m/z 373.2(Q1)에서 glucose 1분자와 H₂O 1분자가 떨어져 나간 $[M-H-Glu]^-$ 형태의 m/z 193.05에서 Retro-Diels-Alder 반응에 의해 생성된 m/z 123.0으로 Q3를 설정하였으며²²⁾, chlorogenic acid는 m/z 353.2(Q1)에서 caffeoyl기가 떨어져 나간 $[M-H-caffeoyl]^-$ 형태로 m/z 191.0으로 Q3를 설정하였다.²³⁾ Geniposide는 m/z 387.2의 Q1에서 C₁₀H₁₆O₈이 떨어진 $[M-H-C_{10}H_{16}O_8]^-$ 형태인 m/z 123.0을 Q3로 설정하였다.²⁴⁾ Liquiritin apioside는 m/z 549.3의 Q1 피크에서 apiosyl-glucosyl 그룹이 떨어져 나간 $[M-H-aposyl-glucosyl]^-$ 형태로 m/z 255.0으로 Q3 피크를 설정하였으며,²⁵⁾ acteoside와 calceolarioside B는 m/z 623.4와 477.3(Q1)에서 두 성분 모두 $[Caffeoyl-H_2O]^-$ 의 형태인 m/z 161.0을 Q3로 설정하였다.^{26,27)} Liquiritin, nodakenin 및 saikosaponin A는 m/z 417.4, 409.4 및 779.7에서 각각 확인된 Q1 피크에서 세 성분 모두 glucose 1분자가 떨어진 $[M-H-Glu]^-$, $[M+H-Glu]^+$ 및

Table IV. Chromatographic retention time, MRM parameters, cone voltage, and collision energy for marker compounds

Compound	Mode	Retention time (min)	Molecular weight (Da)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Geniposidic acid	$[M-H]^-$	0.79	374.3	373.2	123.0	25	20
Chlorogenic acid	$[M-H]^-$	0.80	354.3	353.2	191.0	20	20
Geniposide	$[M-H]^-$	1.22	388.4	387.2	123.0	25	15
Liquiritin apioside	$[M-H]^-$	1.53	550.5	549.3	255.0	45	30
Acteoside	$[M-H]^-$	1.55	624.6	623.4	161.0	45	35
Calceolarioside B	$[M-H]^-$	1.62	478.5	477.3	161.0	35	25
Liquiritin	$[M-H]^-$	1.65	418.4	417.4	255.2	30	15
Nodakenin	$[M+H]^+$	1.85	408.4	409.4	247.2	30	15
Baicalin	$[M+H]^+$	2.68	446.4	447.3	271.0	25	15
Liquiritigenin	$[M+H]^+$	2.99	256.3	257.2	137.0	35	25
Wogonoside	$[M+H]^+$	3.57	460.4	461.3	285.1	30	20
Baicalein	$[M+H]^+$	4.50	270.2	271.1	123.0	40	30
Glycyrrhizin	$[M-H]^-$	5.20	822.9	821.9	351.2	45	40
Wogonin	$[M+H]^+$	5.75	284.3	285.1	270.0	40	20
Saikosaponin A	$[M-H]^-$	6.06	781.0	779.7	617.3	45	35
Decursin	$[M+H]^+$	8.04	328.4	329.2	229.0	35	20
Decursinol angelate	$[M+H]^+$	8.15	328.4	329.2	229.0	35	20
Alisol B	$[M+H]^+$	10.57	472.7	473.6	365.4	30	15
Alisol B acetate	$[M+H]^+$	11.6	514.7	515.6	437.5	20	15
Pachymic acid	$[M-H]^-$	11.97	528.8	527.6	465.4	45	35

$[M-H-Glu]^-$ 형태로 m/z 255.2, 247.2 및 617.3으로 Q3를 설정하였으며,²⁷⁻²⁹⁾ baicalin과 wogonoside는 m/z 447.3과 461.3의 Q1 피크에서 두 성분 모두 1분자의 glucuronide가 이탈된 $[M+H-Glucuronide]^+$ 형태의 Q3 피크가 m/z 271.0과 285.1에서 각각 검출되었다.³⁰⁾ Liquiritigenin은 m/z 257.2(Q1)에서 $C_8H_8O_8$ 이 떨어진 $[M+H-C_8H_8O_8]^+$ 형태인 m/z 137.0을 Q3를 설정하였다.²⁷⁾ Baicalein은 m/z 271.1에서 Q1 피크를 확인하였으며, Q3 피크는 $C_9H_6O_2$ 가 이탈된 trihydroxyphenyl 골격의 $[M+H-C_9H_6O_2]^+$ 형태로 m/z 123.0으로 설정하였으며,³¹⁾ glycyrrhizin은 Q1 피크인 m/z 821.9로부터 glucose 2

분자가 떨어져 나간 aglycon 형태로 $[M-H-2Glu]^-$ 로 m/z 351.2를 Q3로 설정하였다.²⁷⁾ Wogonin은 m/z 285.1에서 Q1 피크를 확인하였으며, Q1 피크에서 1분자의 methyl group이 이탈된 $[M+H-CH_3]^+$ 로 m/z 270.0에서 Q3를 설정하였으며,³²⁾ decursin과 decursinol angelate는 m/z 329.2의 Q1으로부터 isoprenyl 골격과 hydroxy group이 떨어진 $[M+H-C_5H_8O_2]^+$ 형태인 m/z 229.0에서 Q3를 설정하였다.³³⁾ Aisol B, alisol B acetate 및 pachymic acid는 Q1 피크가 m/z 473.6, 515.6 및 527.6에서 각각 나타났으며, 이들로부터 Q3는 m/z 365.4, 437.5 및 465.4인 $[M+H-2H_2O-C_4H_8O]^+$, $[M+H-H_2O-$

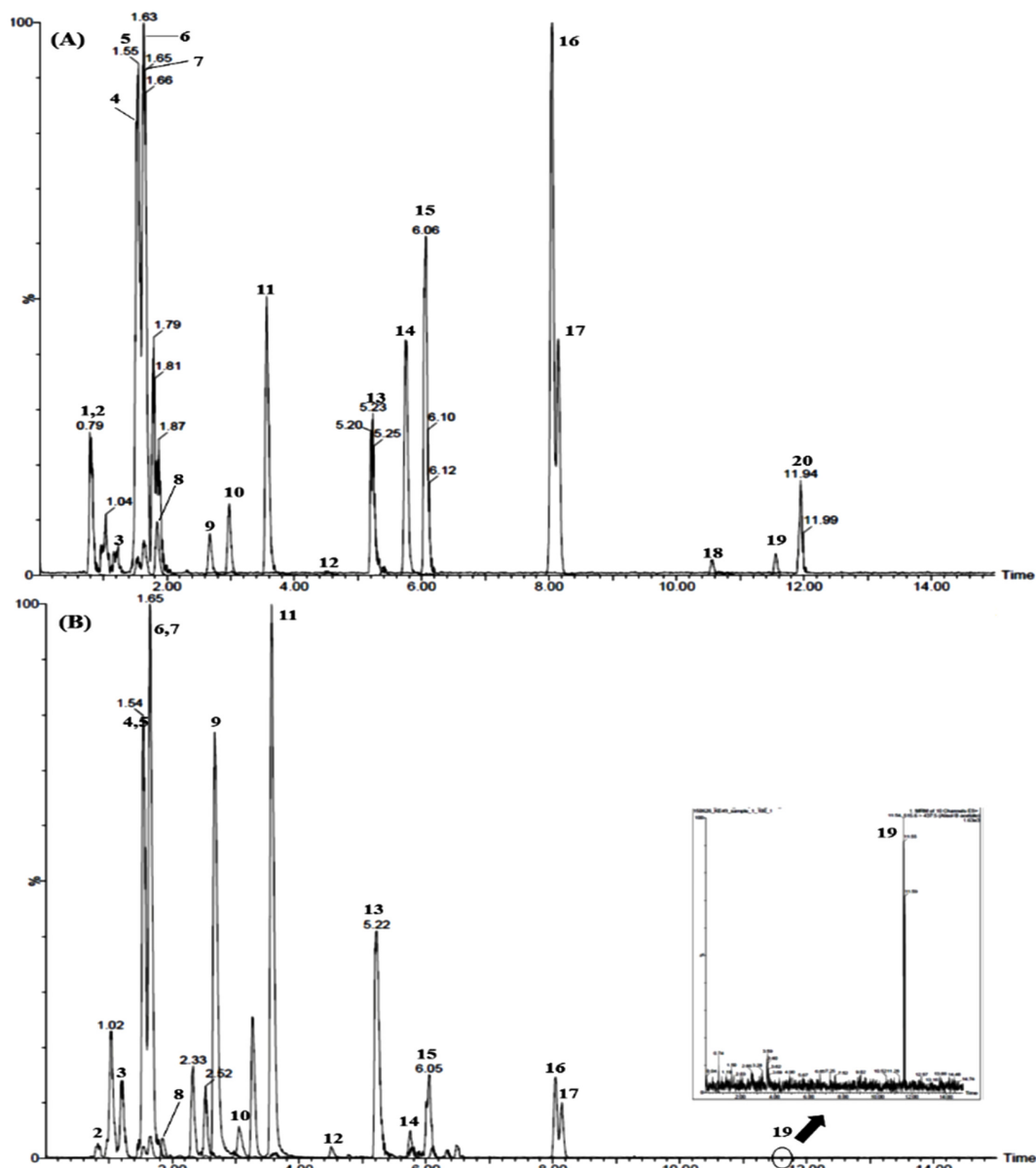


Fig. 2. Total ion chromatograms of the 20 standard mixtures (A) and Yongdamsagan-tang sample (B) by LC-MS/MS MRM mode. Geniposidic acid (1), chlorogenic acid (2), geniposide (3), liquiritin apioside (4), acteoside (5), calceolarioside B (6), liquiritin (7), nodakenin (8), baicalin (9), liquiritigenin (10), wogonoside (11), baicalein (12), glycyrrhizin (13), wogonin (14), saikosaponin A (15), decursin (16), decursinol angelate (17), alisol B (18), alisol B acetate (19), and pachymic acid (20).

Table V. Amount of marker compounds in Yongdamsagan-tang (n = 3)

Compound	Amount ($\mu\text{g/g}$)			Source
	Mean	SD	RSD (%)	
Geniposidic acid	ND ¹	–	–	<i>P. asiatica</i>
Chlorogenic acid	34.78	1.23	3.55	<i>A. quinata</i>
Geniposide	114.14	6.42	5.62	<i>P. asiatica</i> and <i>G. jasminoides</i>
Liquiritin apioside	21.27	0.53	2.49	<i>G. uralensis</i>
Acteoside	4.55	0.15	3.29	<i>P. asiatica</i>
Calceolarioside B	0.18	0.01	3.89	<i>A. quinata</i>
Liquiritin	23.56	0.25	1.06	<i>G. uralensis</i>
Nodakenin	16.54	0.34	2.05	<i>A. gigas</i>
Baicalin	548.13	7.76	1.42	<i>S. baicalensis</i>
Liquiritigenin	1.29	0.03	2.49	<i>G. uralensis</i>
Wogonoside	101.55	1.72	1.70	<i>S. baicalensis</i>
Baicalein	81.29	2.23	2.74	<i>S. baicalensis</i>
Glycyrrhizin	35.91	0.78	2.17	<i>G. uralensis</i>
Wogonin	5.00	0.05	1.00	<i>S. baicalensis</i>
Saikosaponin A	5.43	0.01	0.20	<i>B. falcatum</i>
Sum (Decursin and Decursinol angelate)	6.23	0.02	0.29	<i>A. gigas</i>
Alisol B	ND	–	–	<i>A. orientale</i>
Alisol B acetate	0.04	0.00	6.73	<i>A. orientale</i>
Pachymic acid	ND	–	–	<i>P. cocos</i>

¹ND: not detected.

AcOH]⁺ 및 [M-H-H₂O-CO₂]로 설정하였다.³⁴⁾ 이와 같이 본 분석 처방의 지표 성분으로 선정한 20종의 성분에 대하여 Q1 및 Q3를 설정한 후 이들 성분의 함량 분석을 실시하였다. 설정된 LC-MS/MS MRM 분석법을 이용하여 주요 성분을 분석한 결과 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, liquiritin apioside, acteoside, calceolarioside B, liquiritin, nodakenin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, glycyrrhizin, wogonin, glycyrrhizin, wogonin, saikosaponin A, decursin, decursinol angelate, alisol B, alisol B acetate 및 pachymic acid 등 20종의 성분은 0.79, 0.80, 1.22, 1.53, 1.55, 1.62, 1.65, 1.85, 2.68, 2.99, 3.57, 4.50, 5.20, 5.75, 6.06, 8.04, 8.15, 10.57, 11.60 및 11.97분으로 15분 이내에 모든 성분이 분리되었다(Table IV 및 Fig. 2). 설정된 분석법을 사용하여 용담사간탕 추출물을 분석한 결과 차전자로부터 유래된 geniposidic acid, 택사로부터 유래된 alisol B 및 복령으로부터 유래된 pachymic acid 등 2종은 검출이 되지 않았으며, 이를 제외한 17종의 성분은 0.04-548.13 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다(Table V).

결론

11종의 생약으로 구성되어 급·만성 요도염과 방광염 등의

비뇨기와 질화에 처방되어지는 한약 처방 중 하나인 용담사간탕에 대하여 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, liquiritin apioside, acteoside, calceolarioside B, liquiritin, nodakenin, baicalin, liquiritigenin, wogonoside, baicalein, glycyrrhizin, wogonin, glycyrrhizin, wogonin, saikosaponin A, decursin, decursinol angelate, alisol B, alisol B acetate 및 pachymic acid 등 20종의 성분에 대하여 LC-MS/MS MRM 방법으로 함량을 분석하였다. 그 결과 본 한약 처방 추출물인 용담사간탕에서 황금의 주요성분인 baicalin이 548.13 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많이 검출되었으며, geniposide(차전자와 치자)와 wogonoside와 baicalein(이상 황금)이 114.14, 101.55 및 81.29 $\mu\text{g/g}$ 으로 다른 성분에 비해 비교적 많이 함유되어 있었다. 이러한 분석 결과는 향후 용담사간탕 및 관련 한약 처방의 성분 분석을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사사

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘한약 처방의 과학적 근거 기반 구축사업(K17251)’에 의해 수행되었으며 이에 감사 드린다.

인용문헌

1. Lee, I. J., Lee, D. N., Seo, I. B. and Kim, H. J. (2011) Effects of Yongdamsagan-tang on the progression of the estradiol valerate-induced polycystic ovaries and on the conception in rats. *J. Orient. Obstet. Gynecol.* **24**: 48-72.
2. Heo, J. (2004) Donguibogam, 313. Namsandang, Seoul.
3. Yun, H. J., Kim, H. S., Heo, S. K., Hwang, S. G., Park, W. H. and Park, S. D. (2007) Effect of Yong-dan-sa-gan-tang on apoptosis in human hepatoma HepG2. *Korean J. Orient. Med. Prescr.* **15**: 127-137.
4. Qi, F., Wang, Z., Cai, P., Zhao, L., Gao, J., Kokudo, N., Li, A., Han, J. and Tang, W. (2013) Traditional Chinese medicine and related active compounds: A review of their role on hepatitis B virus infection. *Drug Discov. Ther.* **7**: 212-224.
5. Jung, M. Y., Kin, D. S., Kim, M. J., Song, J. S., Park, S. Y., Kim, J. H. and Choi, J. H. (2008) Three cases of herpes zoster improved by Yongdamsagantang. *J. Korean Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **21**: 176-183.
6. Koo, C. M., Park, Y. J., Park, J. H., Heo, G. J., Nam, C. G. and Sun, J. K. (2003) A case report of herpes zoster with acute pain by Yongdamsagan-tang (longdanxiegan-tang). *Korean J. Orient. Int. Med.* **24**: 151-156.
7. Kang, D. H., Kim, Y. D., Kim, C. N. and Min, J. Y. (2003) The effect of Youndamsagan-tang on a case of septic knee: A case report. *Korean J. Physiol. Pathol.* **17**: 1547-1551.
8. He, Y. M., Zhu, S., Ge, Y. W., Kazuma, K., Zou, K., Cai, S. Q. and Komatsu, K. (2015) The anti-inflammatory secoiridoid glycosides from *Gentiana Scabrae Radix*: the root and rhizome of *Gentiana scabra*. *J. Nat. Med.* **69**: 303-312.
9. Han, D. S. and Lee, D. K. (1985) Separation and determination of saikosaponins in *Bupleuri Radix* with HPLC. *Kor. J. Pharmacogn.* **16**: 175-179.
10. Lee, J. H., Kwon, O. S., Jin, H. G., Woo, E. R., Kim, Y. S. and Kim, H. P. (2012) The rhizomes of *Alisma orientale* and alisol derivatives inhibit allergic response and experimental atopic dermatitis. *Biol. Pharm. Bull.* **35**: 1581-1587.
11. Gao, H. M., Wang, Z. M., Qu, L., Fu, X. T. and Li, L. (2007) Determination of calceolarioside B in *Caulis Akebiae* by RP-HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **32**: 476-478.
12. Sung, Y. Y., Kim, D. S. and Kim, H. K. (2015) *Akebia quinata* extract exerts anti-obesity and hypolipidemic effects in high-fat diet-fed mice and 3T3-L1 adipocytes. *J. Ethnopharmacol.* **168**: 17-24.
13. Oh, J. S., Lee, J. G., Jung, H. W., Choi, J. Y., Choi, E. H., Kim, D. C., Kim, J. A., Son, J. K. and Lee, S. H. (2007) Isolation of melanin biosynthesis inhibitory compounds from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**: 376-381.
14. Kim, B. H., Park, K. S. and Chang, L. M. (2009) Elucidation of anti-inflammatory potencies of *Eucommia ulmoides* bark and *Plantago asiatica* seeds. *J. Med. Food* **12**: 764-769.
15. Li, G., Xu, M. L., Lee, C. S., Woo, M. H., Chang, H. W. and Son, J. K. (2004) Cytotoxicity and DNA topoisomerases inhibitory of constituents from the sclerotium of *Poria cocos*. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 829-833.
16. Kim, N. J., Jung, E. A., Kim, H. J., Sim, S. B. and Kim, J. W. (2000) Quality evaluation of various dried roots of *Rehmannia glutinosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 130-141.
17. Ahn, M. J., Lee, M. K., Kim, Y. C. and Sung, S. H. (2008) The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography-diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**: 258-266.
18. Lee, E. J., Hong, J. K. and Whang, W. K. (2014) Simultaneous determination of bioactive marker compounds from *Gardenia Fructus* by high performance liquid chromatography. *Arch. Pharm. Res.* **37**: 992-1000.
19. Tong, L., Wan, M., Zhang, L., Zhu, Y., Sun, H. and Bi, K. (2012) Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A and chrysin of *Radix Scutellariae* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70**: 6-12.
20. Zhang, Q. and Ye, M. (2009) Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *J. Chromatogr. A* **1216**: 1954-1969.
21. Lee, K. H. (2013) The dispensatory on the visual and organoleptic examination of herbal medicine, 24-723. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul.
22. Peng, M., Zhang, Y., Shi, S. and Peng, S. (2013) Simultaneous ligand fishing and identification of human serum albumin binders from *Eucommia ulmoides* bark using surface plasmon resonance-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **940**: 86-93.
23. Jaiswal, R., Muller, H., Muller, A., Karar, M. G. E. and Kuhnert, N. (2014) Identification and characterization of chlorogenic acid, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MSⁿ. *Phytochemistry* **108**: 252-263.
24. Zhou, T., Liu, H., Wen, J., Fan, G., Chai, Y. and Wu, Y. (2010) Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**: 2520-2528.
25. Li, L., Liang, S., Du, F. and Li, C. (2007) Simultaneous quantification of multiple licorice flavonoids in rat plasma. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**: 778-782.
26. Li, Y., Gan, L., Li, G. Q., Deng, L., Zhang, X. and Deng, Y. (2014) Pharmacokinetics of plantamajoside and acteoside from *Plantago asiatica* in rats by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **89**: 251-256.
27. Tan, G., Zhu, Z., Jing, J., Lv, L., Lou, Z., Zhang, G. and Chai, Y. (2011) Characterization of constituents in Sini decoction

- and rat plasma by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **25**: 913-924.
28. Kim, M. K., Yang, D. H., Jung, M., Jung, E. H., Eom, H. Y., Suh, J. H., Min, J. W., Kim, U., Min, H., Kim, J. and Han, S. B. (2011) Simultaneous determination of chromones and coumarins in Radix Saposhnikoviae by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. *J. Chromatogr. A.* **1218**: 6319-6330.
 29. Xu, L., Song, R., Tian, J. X., Tian, Y., Liu, G. Q. and Zhang, Z. J. (2012) Analysis of saikosaponins in rat plasma by anionic adducts-based liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Biomed. Chromatogr.* **26**: 808-815.
 30. Tong, L., Wan, M., Zhang, L., Zhu, Y., Sun, H. and Bi, K. (2012) Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A and chrysin of Radix Scutellariae extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70**: 6-12.
 31. Zhao, J., Su, C., Yang, C., Liu, M., Tang, L., Su, W. and Liu, Z. (2012) Determination of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3 in rat plasma by a rapid and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry method: Application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **64-65**: 94-97.
 32. Wang, Y., Yang, L., He, Y. Q., Wang, C. H., Welbeck, E. W., Bligh, S. W. and Wang, Z. T. (2008) Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**: 1767-1778.
 33. Ahn, M. J., Lee, M. K., Kim, Y. C. and Sung, S. H. (2008) The simultaneous determination of Coumarin in Angelica gigas root by high performance liquid chromatography-diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**: 258-266.
 34. Chen, L., Qi, J., Chang, Y., Zhu, D. and Yu, B. (2009) Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50**: 127-137.

(2017. 10. 27 접수; 2017. 11. 22 심사;
2017. 12. 1 게재확정)