

## HPLC-ESI/MS를 이용한 Eleutheroside B와 E의 정량

최영해 · 김진웅\*  
서울대학교 약학대학

### Quantitative Analysis of Eleutherosides B and E Using HPLC-ESI/MS

Young Hae Choi and Jinwoong Kim\*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract** – Liquid-chromatography coupled with electrospray-ion trap mass spectrometry was applied to the analysis of the eleutherosides B and E in the *Eleutherococcus senticosus* cortexes. The optimum ESI/MS results were obtained in the positive ion mode using extracted ion chromatogram targeting Na-adduct molecular ion of each compound. This method allowed rapid and simple gradient separation of underivatized eleutherosides B and E without pre-purification steps at very low concentration.

**Key words** – HPLC-ESI/MS; Eleutheroside B; Eleutheroside E; *Eleutherococcus senticosus*

시베리아 인삼으로도 불리는 가시오가피(*Eleutherococcus senticosus* Maxim.)는 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 낙엽관목으로 한방에서는 祛風濕, 壯筋骨, 活血, 補肝腎, 祛瘀의 효능이 있고, 風寒濕痺, 尿痛, 陰痿, 關節류머티즘을 치료하는 데 사용되어 왔다.<sup>1-4)</sup> 또한, 가시오가피의 물 추출물은 mouse 실험에 의해 스트레스성 성욕 및 체온 저하에 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되었고 알코올 추출물은 진정효과 증가에 의한 수면시간 증가가 있는 것으로 알려졌다.<sup>5,6)</sup>

현재까지 밝혀진 가시오가피의 성분은 coumarin류의 isofraxidin, eleutheroside B, steroid 및 triterpene 류의  $\beta$ -sitosterol, friedelin, lignan류의 sesamin, eleutheroside B, D, E, saponin류의 eleutheroside A, I, K, L, M, ciwujianoside A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E 등이 알려져 있다.<sup>4)</sup> 이러한 여러 가시오가피의 성분 중 eleutheroside B와 E (Fig. 1)는 가장 강력한 생리활성 효과를 갖는 것으로 알려져 있으며 가시오가피 배당체 성분의 약 80%를 차지하는 것으로 보고되었다.<sup>7,8)</sup> 따라서 기존의 여러 가시오가피 원시료나 함유제품의 품질 관리에 지표물질로 사용되고 있으며, fluorimetry,<sup>8)</sup> HPLC-UV,<sup>9-12)</sup> TLC,<sup>13)</sup> GC/MS<sup>14)</sup> 등과 같은 다양한 방법으로 분석되고 있다. 그러나, 기존의 방법 중 일부는 지표 성분에 대한 감도가 낮을 뿐 아니라, 함께 추

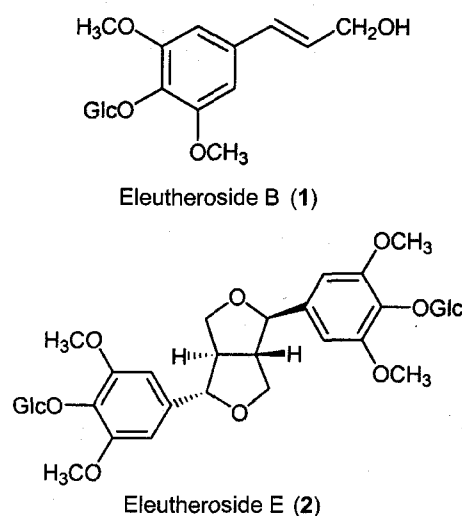


Fig. 1. Chemical structures of eleutheroside B and E.

출되는 성분에 의한 간섭을 많이 받는 등의 문제점이 있어 함유량이 낮은 시료에 적용하는데는 한계가 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하고자 감도가 뛰어나고 간섭물질에 거의 영향을 받지 않는 정확한 분석 등의 다양한 장점으로 최근 들어 천연물 분석에 널리 적용되는 HPLC-ESI/MS 법을 이용하여 eleutheroside B와 E의 정량법을 정립하고, 이 방법을 가시오가피 분석에 응용하고자 하였다.

\*교신저자(E-mail): jwkim@snu.ac.kr

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 연구에서 사용한 가시오가피는 경동 시장(서울)에서 시판되는 것을 구입하여 사용하였다. 모든 시료는 동결건조기를 이용하여 48시간 건조하였으며 분쇄한 후 사용하였다. Eleutheroside B와 E는 silica gel(Merck, Darmstadt, Germany), C<sub>18</sub> gel(YMC, Tokyo, Japan)등을 이용하여 분리, 정제 한 후, ESI-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등을 이용하여 그 구조를 동정하였다.

**추출** - 100 mg의 식물시료를 80% MeOH(덕산약품공업, 경기도 용인) 100 mL로 40°C에서 1시간동안 초음파 추출기를 이용하여 추출하였고 여과지로 여과한 후 감압상태에서 건조하였다. 건조된 추출물은 0.1% trifluoroacetic acid-methanol(1:1) 2 mL에 녹인 후 0.45 µm PVDF filter(Kenosha, WI, USA)로 여과하였다.

**표준액의 제조** - 가시오가피로부터 분리한 정량용 Eleutheroside B와 E를 각각 0.1% trifluoroacetic acid-methanol(1:1)에 녹인 후 0.1 µg/mL-25 µg/mL 범위 안에 5개의 표준액을 제조하였다.

**HPLC-ESI/MS 분석** - 본 연구에 사용된 HPLC-ESI/MS 기기는 autosampler, photodiode array detector, column oven, binary pump, degasser 등이 연결된 Agilent사의 Agilent 1100 series HPLC가 부착된 Electrospray Ion Trap 방식의 mass spectrometer이었다(Agilent, Waldbronn, Germany). Eleutheroside B와 E의 분석은 40°C에서 Eclipse XDB-C<sub>8</sub>(4.6 × 50 mm, particle size 5 µm, Agilent)를 이용하였으며, 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile의 혼합액을 gradient system으로 초기에 acetonitrile의 함량을 10%에서 30분까지 30%로 상승시키고 다시 60분까지 70%로 올린 후 60분에 85%로 하였다. 유속은 0.2 mL/min였으며, 각 시료는 autosampler를 통하여 5 µL씩 주입하였다. Electron spray ionization interface가 장착된 Nebulizing 가스로는 질소(99.99%)를 350°C, 20 psi, 5 L/min의 조건하에서 사용하였으며 capillary voltage는 1.1 kV였다. HPLC-ESI/MS 분석은 positive ion mode에서 m/z 100-1500의 분자량을 scanning하였다.

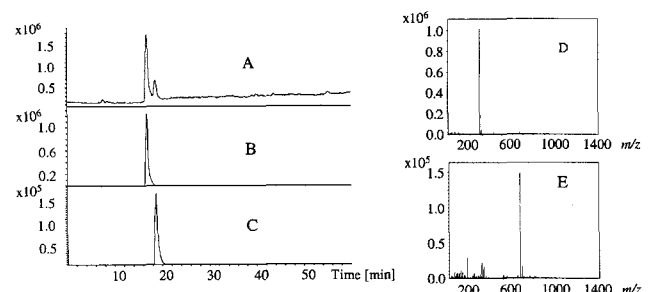
## 결과 및 고찰

질량분석기는 크로마토그래피의 검출기로서 이상적인 특성, 즉 광범위한 화합물 분석, 화학구조에 관한 정보 제공, 높은 감도 등을 가지고 있으며, 다양한 Interface가 개발됨에 따라 기존의 GC 이외에도 HPLC에 접목되고 있다.<sup>15-17)</sup> 이러한 Interface에는 Thermospray(TSP), Plasmaspray(PSP),

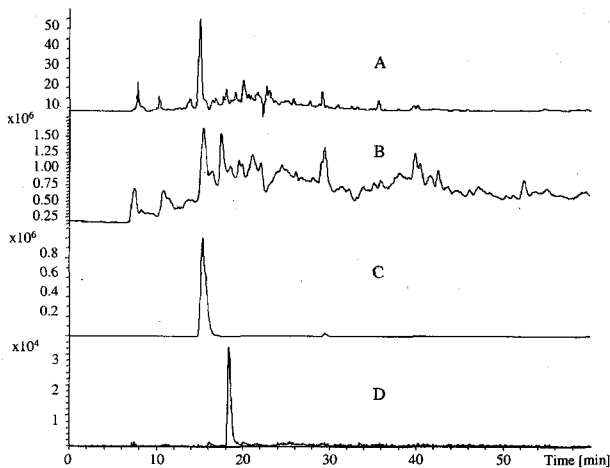
Particle Beam(PB), FAB(Fast Atom Bombardment), ESI(Electrospray Ionization), APCI(Atmospheric Pressure Chemical Ionization) 등이 있으며, 이 중에서 soft ionization에 의한 분자량 측정의 용이성, 넓은 분석범위(분자량 100-100,000), 적은 유속 등의 장점을 가지고 있는 ESI 또는 APCI 법이 천연물 분석에 주로 응용되고 있다.<sup>15,16)</sup>

본 연구에서 목표로 하는 가시오가피 성분 중 eleutheroside B와 E의 분석에 질량 분석기의 응용을 위해 ESI와 APCI에 의한 MS의 검출능을 비교 분석한 결과 ESI에 의한 검출능이 월등히 높음을 확인하였다. 또한, ESI 분석에 필수적인 목적 시료의 이온화를 위하여 각종 용매를 비교 분석해 본 결과 positive ion mode에서 0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile을 이동상으로 사용하였을 때 가장 최적의 크로마토그램과 mass spectrum을 얻을 수 있었다(Fig. 2). Mass spectrum 상에서 Eleutheroside B와 E의 base peak는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 [M+H]<sup>+</sup> 대신에 [M+Na]<sup>+</sup> adduct ion을 확인할 수 있었다. Eleutheroside B와 E의 정량 분석을 위하여 각각 물질의 [M+Na]<sup>+</sup>의 EIC(Extract Ion Current) chromatogram을 이용하였으며 대상 물질의 calibration curve를 위한 농도 범위는 0.1-25 µg/mL이었다. Eleutheroside B와 E의 농도 범위 내에서 직선성(γ<sup>2</sup>)은 각각 0.9997과 0.9903이었다.

본 연구에서 확립된 HPLC-ESI/MS법을 Eleutheroside B와 E의 [M+Na]<sup>+</sup>의 EIC chromatogram을 사용하여 시판되고 있는 3종류의 가시오가피에 적용하였다. Fig. 3에 보인 바와 같이 각각 시료의 80% 메탄올 추출물에서 가시오가피내 존재하는 목적 물질의 분리된 스펙트럼을 확인할 수 있었다. 이 크로마토그램을 기존의 UV 검출기와 비교 분석한 결과 높은 감도와 선택성을 나타내었다. 본 연구에서 응용 개발한 가시오가피 성분의 HPLC-ESI/MS법은 높은 감도와 선택성 등으로 인해 기존 분석법에 비해 적은 시료량(50 mg) 및 추출후 간섭물질 제거 작업 불필요 등의 장점을 갖는 것을 확인하였다.



**Fig. 2.** TIC (Total Ion current, A), EIC (Extract Ion Current) chromatograms and mass spectra of eleutherosides B (B,D) and E (C,E).



**Fig. 3.** UV (254 nm, A), TIC (Total Ion current, B), EIC (Extract Ion Current) of [M+Na]<sup>+</sup> of eleutheroside B (C), and eleutheroside E (D) chromatograms of sample 2.

**Table I.** Contents (μg/g ± S.D.)\* of eleutheroside B and E from *Eleutherococcus senticosus* cortexes obtained from commercial market

Sample Number	Eleutheroside B	Eleutheroside E
Sample 1	15.82 (± 1.45)	82.73 (± 1.70)
Sample 2	518.28 (± 10.02)	26.51 (± 0.87)
Sample 3	3.09 (± 0.78)	14.68 (± 1.99)

\*n=5

시판되는 가시오가피 3종류의 Eleutheroside B와 E의 함량 결과는 Table I에 나타내었다. 그 결과 3종류의 가시오가피의 Eleutheroside B와 E의 함량은 커다란 차이를 나타내었다. Eleutheroside B의 경우에는 3.09(±0.78)-518.28(±10.02), Eleutheroside E는 14.68(±1.99)-82.73(±1.70)이었다. 이러한 함량의 큰 차이는 우선 가시오가피로 시판되는 생약의 산지나 기원 등의 불확실성에서 기인하는 것으로 여겨진다. 또한 Eleutheroside B의 경우에는 12개월 이상 보관할 시에는 그 함량이 50% 이상 감소하고 3년이 지난 경우 완전히 시료에서 없어지는 것으로 보고된 바 보관기간에 따른 영향도 무시할 수 없다고 판단된다.<sup>18)</sup> 따라서, 본 연구에서 개발한 HPLC-ESI/MS법을 이용한 Eleutheroside B와 E의 분석을 이용하면 시판되는 가시오가피의 기원, 산지 및 보관기간 등의 판별에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

**인용문헌**

1. 김태욱(1996) 한국의 수목, p. 504. 교학사, 서울.  
 2. 배기환(2000) 한국의 약용식물, p. 360. 교학사, 서울

3. 정보섭, 신민교(1998) 향약대사전, p. 432. 영림사, 서울  
 4. Tang, W., Chinese Drugs of Plant Origin, 1992, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 1-12.  
 5. Takasugi, N., Moriguchi, T., Fuwa, T. S., Sanada, S., Ida, Y., Shoji, J. and Saito, H. (1985) Effect of *Eleutherococcus senticosus* and its components on rectal temperature, body and grip tones, motor coordination and exploratory and spontaneous movements in acute stressed mice. *Shoyakugaku Zasshi*, **39**: 232-237.  
 6. Nishiyama, N., Kamegaya, T., Iwai, A., Saito, H., Sanada, S., Ida, Y. and Shoji, J. (1985) Effect of *Eleutherococcus senticosus* and its components on sex-and learning-behaviors and tyrosine hydroxylase activities of adrenal gland and hypothalamic regions in chronic stressed mice. *Shoyakugaku Zasshi* **39**: 238-242.  
 7. Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V. (1969) Pharmacological investigation of glycosides from ginseng and *Eleutherococcus*. *Lloydia*, **32**: 46-51.  
 8. Lapchik, V. F., Frolova, G. M. and Ovodov, Y. S. (1969) Quantitative determination of *Eleutherococcus senticosus* glucosides. *Rast-Resur.* **5**: 455-457.  
 9. Slacanin, I., Marston, A., Hostettmann, K., Guedon, D. and Babe, P. (1991) The isolation of *Eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **2**: 137-142.  
 10. Yat, P. N., Arnason, J. T. and Awang, D. V. C. (1998) An improved extraction procedure for the rapid, quantitative high-performance liquid chromatographic estimation of the main eleutheroside (B and E) in *Eleutherococcus senticosus* (Eleuthero). *Phytochem. Anal.* **9**: 291-295.  
 11. Kang, J. S., Lihn, P. T., Cai, X. F., Kim H. S., Lee, J. J. and Kim Y. H. (2001) Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 407-411.  
 12. Hong, S. S., Hwang, J. S., Lee, S. A., Hwang B. Y., Ha, K. W., Ze, K. R., Seung, R. S., Ro, J. S. and Lee K. S. (2001) Isolation and quantitative analysis of acanthoside D from *Acanthopanax* Cortex. *J. Kor. Pharmacog.* **32**: 316-321.  
 13. Bladt, S., Wagner, H. and Woo, W. S. (1990) Taiga-Wuzel, DC-und HPLC-Analyse von *Eleutherococcus* bzw. *Acanthopanax*-Extracten und diese enthaltenden Phytopreparaten. *Deutsche Apotheker Ztg.* **130**: 1499-1508.  
 14. Awang, C. V. C., Ethier, J. -C., Kindack, D., Moir, D. B. and Zamacnik, J. (1991) Differentiation of *Eleutherococcus senticosus* (Siberian ginseng) from its commercial substitute, *Periploca sepium*, by HPLC and GC/MS techniques. *Int. Res. Congr. Nat. Prod., Amer. Soc. Pharmacog., Chicago, Illinois, July 21-26.*  
 15. Bruins, A. P. (1998) Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* **794**: 345-357.

16. Herderich, M., Richling, E., Roscher, R., Schneider, C., Schwab, W., Humpf, H. -U. and Schreier, P. (1997) Application of atmospheric pressure ionization HPLC-MS-MS for the analysis of natural products. *Chromatographia* **45**: 127-132.
17. Park, J. H. (1991) LC/MS interface. *Pharmacon* **21**: 30-38.
18. Xu, Z. B., Wang, M. Y. (1984) Content variation of some chemical constituents of Ci Wu Jia (*Acanthopanax senticosus*) during storage. *Chin. Trad. Herb Drugs* **15**: 15-17.

(2002년 4월 3일 접수)