생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
49(1) : 76 ~ 83 (2018)

LC-ESI-MS/MS를 이용한 계지탕 중 주요 성분 분석

서창섭 · 하혜경*
한국한의학연구원 K-herb연구단

Quantitative Determination of the Bioactive Marker Components in Gyeji-tang Using LC-ESI-MS/MS

Chang-Seob Seo and Hyekyung Ha*
K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Korea

Abstract – A traditional herbal formula, Gyeji-tang has been used to treat the early colds, headache, chills, and fever in Asian countries. In this study, we were performed simultaneous determination of the 14 bioactive marker compounds, gallic acid, spinosin, paeoniflorin, albiflorin, liquiritin apioside, liquiritin, 6‴-feruloylspinosin, liquilitigenin, coumarin, cinnmamic acid, benzoylpaeoniflorin, cinnamaldehyde, glycyrrhizin, and 6-gingerol in Gyeji-tang using an ultra–performance liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS). Analytical column was used a Waters Acquity UPLC BEH C_{18} analytical column (2.1×100 mm, 1.7 μm) and maintained at 45°C with a flow rate of 0.3 mL/min. The mobile phase consists of 0.1% (v/v) formic acid in water and acetonitrile with gradient elution. The MS analysis was conducted using multiple reaction monitoring in the positive and negative modes by a Waters ACQUITY TQD LC-MS/MS system. The calibration curves of 14 bioactive marker compounds showed linearity with correlation coefficients ≥ 0.9798. The limits of detection and quantification values were in the range of 0.11-6.66 ng/mL and 0.34-19.99 ng/mL, respectively. As a result of the analysis using the established LC-MS/MS method, the amounts of tested 14 compounds in the lyophilized Gyeji-tang sample were detected up to 85.7 μg/g. These results may be useful for quality assessment of a traditional herbal formulas.

Keywords – Gyeji-tang, Quantitative determination, LC-ESI-MS/MS

계지탕(桂枝湯)은 후한대(後漢代) 장중경(張仲景)의 상한론 『傷寒論』[1]에 최초로 수록되어 두통(頭痛), 오풍(惡風), 발열(發熱), 한출(汗出) 등의 태양병(太陽病) 중풍(中風)에 처방되는 대표적인 처방으로 계지(桂枝, Cinnamomi Ramulus), 작약(芍藥, Paeoniae Radix), 감초(甘草, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma), 생강(生薑, Zingiberis Rhizoma Recens) 및 대조(大棗, Zizyphi Fructus) 등 5종의 생약으로 구성되어 있다. 이후 우리나라에서도 허준(許浚)의 동의보감『東醫寶鑑』[2]에 '治 太陽傷風 自汗 惡風寒'이라 하여 두통, 오한이 나고 땀이 나는 등의 열성병(熱性病)의 초기 증상을 치료하는데 사용된다고 기록되어 있다. 본 처방은 항염증,[3-5] 항산화,[6] 항당뇨,[7] 해열,[8,9] 및 췌장염[10]에 대한 효과를 보여주는 여러 결과들이 보고되었다. 이에 저자들은 감기 증상의 초기에 주로 처방되는 처방 중의 하나인 계지탕을 선정하여 품질관리의 일환으로 처방에 함유된 주요 성분들의 함량을 분석하고자 하였다. 따라서 본 처방을 구성하는 구성 생약들에 대한 주요 성분으로는 계지로부터 coumarin과 같은 coumarin류와 cinnamic acid와 cinnamaldehyde 등과 같은 phenylpropanoid류,[11,12] 작약으로부터 gallic acid 등과 같은 phenol류와 albiflorin, paeoniflorin 및 paeaoniflorin 유도체 등과 같은 monoterpenoid류,[13] 감초로부터 glycyrrhizin 등과 같은 triterpene saponin류와 liquiritin과 liquiritin apioside 등과 같은 flavonoid류,[14] 생강의 6-gingerol과 6-shogaol 등과 같은 phenol류[15] 및 대조로부터 spinosin과 6‴-feruloylspinosin 등과 같은 flavonoid류[16] 계열 등이 분리 보고 되었다. 분리 보고되어진 성분들 중 본 연구에서는 계지의 cinnamaldehyde, cinnamic acid 및 coumarin, 작약의 albiflorin, benzoylpaeoniflorin, gallic acid 및 paeoniflorin, 감초의 glycyrrhizin, liquiritigenin, liquiritin apioside 및 liquiritin, 생강의 6-gingerol 및 대조의 6‴-feruloylspinosin와 spinosin 등 14종에 대하여 질량분석기가 결합된 초고성능 액

*교신저자(E-mail) : hkha@kiom.re.kr
(Tel) : +82-42-868-9513

체크로마토그래피(ultra–performance liquid chromatography–mass spectrometer; UPLC–MS)로 이들 성분의 함량을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 계지탕을 구성하는 계지, 작약, 감초, 생강 및 대조 등 5종의 생약은 광명당제약(Ulsan, Korea)으로부터 규격품을 구입하여 대전대학교 한의과대학 서영배 교수(Daejeon, Korea)로부터 한약재 관능검사 해설서[17]에 따라 감정 후 사용하였다(Table I). 본 처방을 이루는 구성 생약(2012-KE46-1~2012-KE46-5)과 계지탕 추출물(2012-KE46)에 대한 각각의 표본은 한국한의학연구원 K-herb연구단에 보관하였다.

시약 및 기기 – 계지탕 물 추출물로부터 주요 성분의 함량 분석을 위해 사용된 표준품으로 albiflorin, paeoniflorin, cinnamaldehyde, cinnamic acid, 6-gingerol, glycyrrhizin 및 liquiritin은 Wako Chemicals(Osaka, Japan), benzoyl-paeoniflorin, 6‴-feruloylspinosin 및 spinosin은 Biopurify Phytochemicals(Chengdu, China), coumarin과 gallic acid는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA), liquiritigenin은 ChemFaces(Wuhan, China) 및 liquiritin apioside는 Shanghai Sunny Biotech(Shanghai, China)로부터 각각 구입하였으며, 이들 성분의 순도는 모두 98.0%이상이었다(Fig. 1). 또한 주요 성분의 분리 및 분석을 위해 사용된 용매인 메탄올, 아세토나이트릴 및 물은 HPLC용을 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA), 개미산은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 계지탕 물 추출의 제조는 COSMOS660 초고속진공저온농축추출기(Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)와 PVT100 동결건조기(IlShinBioBase, Yanju, Korea)를 사용하였다. 주요 성분의 함량 분석은 ACQUITY UPLC system(Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였으며, 질량분석기는 전자분무이온화(electrospray ionization; ESI) source가 장착된 탠덤 사중극자 질량분석기(ACQUITY TQD LC-MS/MS, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 모든 데이터는 MassLynx software(version 4.1, Milford, MA, USA)에 의해 수집 및 처리되었다.

계지탕 물 추출물 조제 – 계지, 작약, 감초, 생강 및 대조 등 5종의 생약으로 구성된 계지탕 물 추출물은 Table I과 같이 계지(1,875 g), 작약(1,250 g), 감초, 생강 및 대조(이상 각각 625 g)를 배합한 총 5.0 kg에 대해 물 50 L를 첨가한 후 초고속진공저온추출기를 이용하여 98 kPa 압력으로 100°C에서 2시간 동안 전탕하였다. 그 후 전탕액의 불순물 및 잔류물 제거를 위하여 표준체(No. 270, 53 μm, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 이용하여 추출액을 여과하였다. 여과된 추출액은 파우더로 얻기 위해 동결건조기를 사용하여 동결 건조하였으며, 그 결과 9.75% 수율인 487.5 g의 추출물을 얻었다.

표준액 및 검액의 조제 – Gallic acid를 비롯한 총 14종의 표준품을 메탄올을 이용하여 각각 1.0 mg/mL의 농도로 제조한 후 4°C 냉장 보관하면서 분석 전에 희석하여 사용하였다. LC-MS/MS를 이용하여 계지탕의 주요 성분의 정성 및 정량 분석을 위해 동결 건조된 계지탕 추출물 67.3 mg을 정확히 취한 후 70% 메탄올 5 mL을 넣은 후 5분간 초음파 추출 및 1 분간 vortexing 하였다. 그 후 100 μL를 정확히 취한 후 70% 메탄올을 넣어 10 mL로 100배 희석한 후 0.22 μm syringe 여과하여 검액으로 하였다.

UPLC 및 LC-MS/MS 분석 조건 – 동결 건조 된 계지탕 물 추출물로부터 gallic acid를 포함한 14종의 성분에 대한 함량 분석은 Table II와 Table III과 같은 조건을 사용하여 성분의 분리 및 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

LC-MS/MS 분석조건 확립 – 계지탕을 구성하는 5종의 구성 생약 중 계지의 cinnamaldehyde, cinnamic acid 및 coumarin, 작약의 albiflorin, benzoylpaeoniflorin, gallic acid 및 paeoniflorin, 감초의 glycyrrhizin, liquiritigenin, liquiritin apioside 및 liquiritin, 생강의 6-gingerol 및 대조의 6‴-feruloylspinosin와 spinosin 등 14종에 대하여 LC-MS/MS 다중반응탐색법(multiple reaction monitoring; MRM)을 이용하여 정량 분석을 실시하였다. 모든 성분은 UPLC BEH

Table I. Composition of Gyeji-tang

Scientific name	Latin name	Family	Origin	Amount (g)
Cinnamomum cassia Presl	Cinnamomi Ramulus	Lauraceae	Vietnam	1,875.0
Paeonia lactiflora Pallas	Paeoniae Radix	Paeoniaceae	Uiseong, Korea	1,250.0
Glycyrrhiza uralensis Fischer	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	Leguminosae	China	625.0
Zingiber officinale Roscoe	Zingiberis Rhizoma Recens	Zingiberaceae	Yeongcheon, Korea	625.0
Zizyphus jujube Miller var. *inermis* Rehder	Zizyphi Fructus	Rhamnaceae	Yeongcheon, Korea	625.0
Total amount				3,000.0

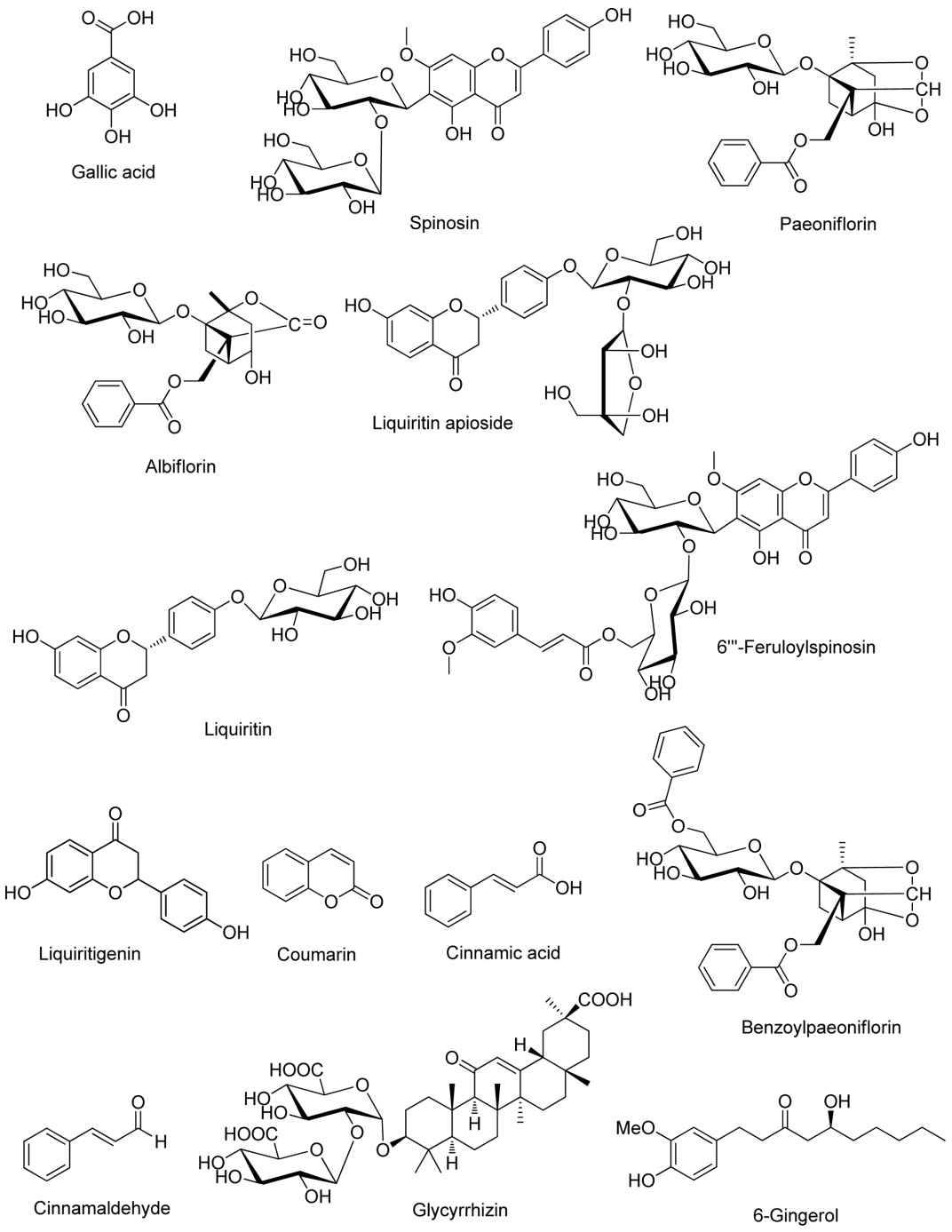

Fig. 1. Chemical structures of biomarker compounds of Gyeji-tang.

C_{18}(2.1×100 mm, 1.7 μm) 분석용 칼럼과 0.1%(v/v) 개미산이 함유된 물과 아세토나이트릴의 두 이동상을 이용하여 기울기 용매조건으로 정량 분석을 실시하였다. 또한 칼럼 온도와 유속은 각각 45°C와 분당 0.3 mL로 유지하면서 ESI 방법의 양이온 모드와 음이온 모드에서 Table II와 III의 조건으로 MRM 분석을 실시하였다. 그 결과 정량 가능한 14종의 성분이 10분 이내로 분리되었다.

검량선, 검출한계 및 정량한계 작성 – Table III과 같이 0–500 ng/mL의 농도 범위에서 농도에 따른 피크 면적을 이용하여 14종 성분의 검량선을 각각 작성하였으며, 작성된 검량선의 상관계수(r^2)를 통해 직선성을 판단하였다. 그 결과 직선성을 나타내는 r^2 값이 0.9798-1.0000으로 우수한 직선성을 보여 주었다. 또한 검출한계(limit of detection; LOD)와 정량한계(limit of quantification; LOQ)는 신호 대 잡음

Table II. Conditions for LC-MS/MS analysis of Gyeji-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		

[1]0.1%(v/v) formic acid in water
[2]Acetonitrile

비로 3과 10으로 각각 계산하였으며, 그 결과 주요 성분에 대한 LOD와 LOQ 값의 범위는 0.11-19.43 ng/mL와 0.34-58.29 ng/mL로 각각 나타났다(Table III).

계지탕 물 추출물 중 주요성분의 동정 및 함량분석 – LC-MS/MS를 이용하여 계지, 작약, 감초, 생강 및 대조 등 5종의 생약으로 구성된 계지탕 중 주요 성분의 함량 분석을 위해 0.1% 개미산이 함유된 물과 아세토나이트릴의 이동상을 이용하여 지표 성분으로 선정된 14종의 성분에 대한 분자 이온 피크를 동정하였다. 그 결과 gallic acid, paeoniflorin, liquiritin apioside, liquiritin, benzoylpaeoniflorin 및 glycyrrhizin 등 6종은 *m/z* 169.0, 479.2, 549.3, 417.4, 583.4 및 821.9에서 $[M–H]^-$ 형태의 분자 이온 피크를 확인하였으며, spinosin, albiflorin, 6‴-feruloylspinosin, liquiritigenin, coumarin, cinnamic acid, cinnamaldehyde 및 6-gingerol 등 8종의 성분은 *m/z* 609.5, 481.4, 785.5, 257.2, 147.1, 149.1, 133.1 및 295.3에서 $[M+H]^+$ 형태의 분자 이온 피크를 각각 확인하였다(Table IV). 또한 LC-MS/MS MRM 분석법을 이용하여 음이온 및 양이온 모드에서 주요 성분들의 함량 분석을 위해 각각의 성분에 대하여 precursor ion(Q1)과 product ion(Q3)을 Table IV와 같이 설정하였으며, 각 성분의 MRM 분석 조건은 다음과 같이 설정하였다. Gallic acid는 *m/z* 169.0의 Q1 피크에서 COOH 그룹이 떨어져 나간 $[M–H–COOH]^-$ 형태인 *m/z* 125.0을 Q3 피크로 설정하였으며,[18] spinosin은 *m/z* 609.6의 Q1 피크에서 glucose 1분자와 $C_4H_6O_4$ 그룹이 떨어져 나간 $[M+H–Glc–C_4H_6O_4]^+$ 형태의 *m/z* 327.1에서 Q3 피크를 설정하였다.[19] Paeoniflorin과 benzoylpaeoniflorin은 *m/z* 479.2와 583.4에서 Q1 피크를 확인하였으며 두 성분 모두 $[benzoic\ acid–H]^-$의 형태인 *m/z*

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)
Gallic acid (**1**)	0 – 500	$y = 2.08x - 76.48$	0.9798	19.43	58.29
Spinosin (**2**)	0 – 500	$y = 11.83x - 47.38$	0.9998	1.22	3.66
Paeoniflorin (**3**)	0 – 500	$y = 2.91x - 15.66$	0.9989	3.10	9.31
Albiflorin (**4**)	0 – 500	$y = 8.85x - 59.99$	0.9982	0.27	0.81
Liquiritin apioside (**5**)	0 – 500	$y = 8.49x - 31.19$	0.9997	0.55	1.65
Liquiritin (**6**)	0 – 500	$y = 10.51x - 5.61$	0.9999	1.14	3.41
6‴-Feruloylspinosin (**7**)	0 – 500	$y = 10.09x - 2.35$	0.9999	7.91	23.73
Liquiritigenin (**8**)	0 – 500	$y = 31.49x - 84.04$	0.9999	0.11	0.34
Coumarin (**9**)	0 – 500	$y = 42.82x - 4.33$	1.0000	0.91	2.74
Cinnamic acid (**10**)	0 – 500	$y = 22.26x - 75.02$	0.9997	0.87	2.60
Benzoylpaeoniflorin (**11**)	0 – 500	$y = 3.81x - 23.11$	0.9972	1.39	4.16
Cinnamaldehyde (**12**)	0 – 500	$y = 1.27x + 1.02$	0.9941	4.73	14.20
Glycyrrhizin (**13**)	0 – 500	$y = 3.28x - 26.71$	0.9977	1.42	4.27
6-Gingerol (**14**)	0 – 500	$y = 11.57x - 96.65$	0.9987	0.39	1.16

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)
Gallic acid (**1**)	$[M–H]^-$	0.81	170.1	169.0	125.0	25	15
Spinosin (**2**)	$[M+H]^+$	1.37	608.5	609.5	327.2	40	25
Paeoniflorin (**3**)	$[M–H]^-$	1.39	480.5	479.2	121.0	32	25
Albiflorin (**4**)	$[M+H]^+$	1.40	480.5	481.4	197.1	20	15
Liquiritin apioside (**5**)	$[M–H]^-$	1.53	550.5	549.3	255.0	45	30
Liquiritin (**6**)	$[M–H]^-$	1.65	418.4	417.4	255.2	30	15
6'''-Feruloylspinosin (**7**)	$[M+H]^+$	1.95	784.7	785.5	327.1	35	25
Liquiritigenin (**8**)	$[M+H]^+$	2.99	256.3	257.2	137.0	35	25
Coumarin (**9**)	$[M+H]^+$	3.06	146.1	147.1	91.0	30	20
Cinnamic acid (**10**)	$[M+H]^+$	3.74	148.2	149.1	131.0	20	10
Benzoylpaeoniflorin (**11**)	$[M–H]^-$	3.85	584.6	583.4	121.0	40	25
Cinnamaldehyde (**12**)	$[M+H]^+$	4.30	132.2	133.1	115.0	25	15
Glycyrrhizin (**13**)	$[M–H]^-$	5.20	822.9	821.9	351.2	45	40
6-Gingerol (**14**)	$[M+H]^+$	6.16	294.4	295.3	177.1	13	10

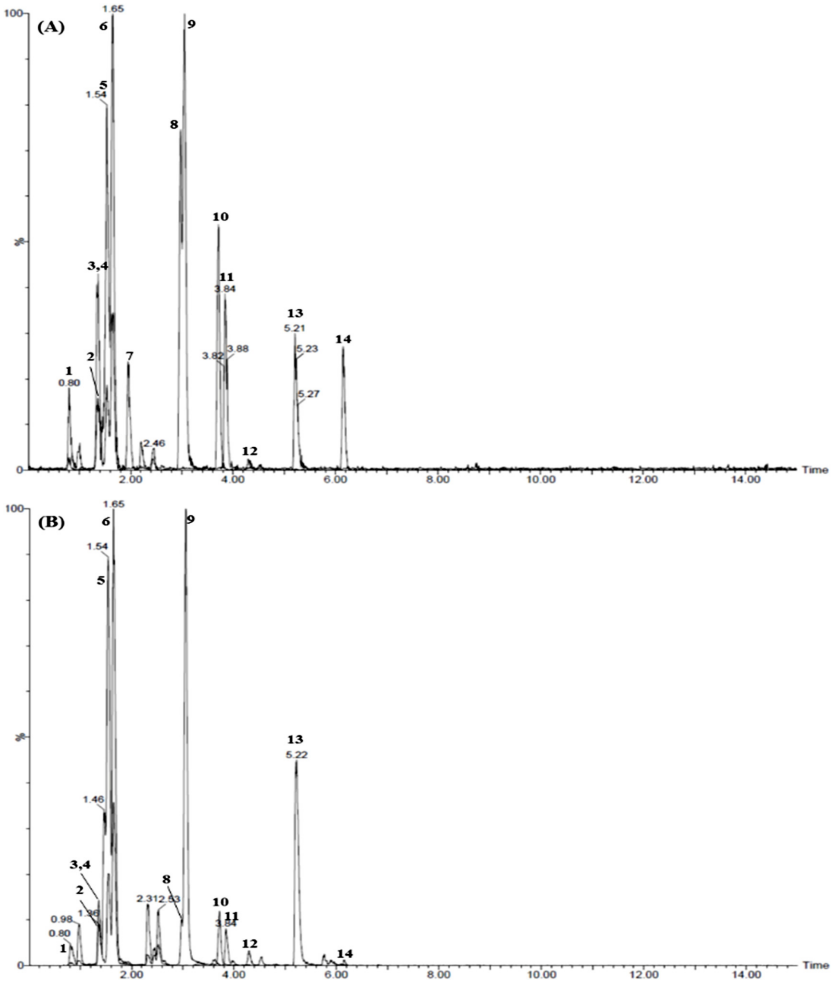

Fig. 2. Total ion chromatograms of the 14 standard mixtures (A) and Gyeji-tang sample (B) by LC-MS/MS MRM mode. Gallic acid (**1**), spinosin (**2**), paeoniflorin (**3**), albiflorin (**4**), liquiritin apioside (**5**), liquiritin (**6**), 6'''-feruloylspinosin (**7**), liquiritingenin (**8**), coumarin (**9**), cinnamic acid (**10**), benzoylpaeoniflorin (**11**), cinnamaldehyde (**12**), glycyrrhizin (**13**), and 6-gingerol (**14**).

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

Compound	Amount (μg/g)			Source
	Mean	SD	RSD (%)	
Gallic acid (**1**)	32.5	0.9	2.7	*P. lactiflora*
Spinosin (**2**)	≤ LOQ	–	–	*Z. jujube*
Paeoniflorin (**3**)	72.3	1.4	1.9	*P. lactiflora*
Albiflorin (**4**)	28.3	0.0	0.1	*P. lactiflora*
Liquiritin apioside (**5**)	45.8	0.8	1.8	*G. uralensis*
Liquiritin (**6**)	39.7	0.4	1.1	*G. uralensis*
6'''-Feruloylspinosin (**7**)	ND[1]	–	–	*Z. jujube*
Liquiritigenin (**8**)	5.5	0.2	3.1	*G. uralensis*
Coumarin (**9**)	40.5	0.9	2.3	*C. cassia*
Cinnamic acid (**10**)	8.6	0.0	0.5	*C. cassia*
Benzoylpaeoniflorin (**11**)	9.5	0.5	5.1	*P. lactiflora*
Cinnamaldehyde (**12**)	41.7	1.3	3.1	*C. cassia*
Glycyrrhizin (**13**)	85.7	1.3	1.5	*G. uralensis*
6-Gingerol (**14**)	1.5	0.1	6.1	*Z. officinale*

[1]ND: not detected.

121.0로 Q3 피크를 설정하였으며,[20,21] albiflorin은 *m/z* 481.4의 Q1 피크에서 glucose와 benzoic acid가 떨어져 나간 $[M+H-Glu-benzoic\ acid]^+$ 형태로 *m/z* 197.1로 Q3를 설정하였다.[21] Liquiritin apioside와 liquiritin은 *m/z* 549.3와 417.4의 Q1 피크에서 apiosyl-glucosyl 그룹과 glucose 그룹이 각각 떨어져 나간 $[M-H-apiosyl-glucosyl]^-$ 형태인 *m/z* 255.0과 $[M-H-Glu]^-$ 형태인 *m/z* 255.2로 Q3 피크를 각각 설정하였으며,[22,23] 6'''-Feruloylspinosin은 *m/z* 785.5의 Q1 피크에서 feruloyl 그룹, glucose 1분자 및 $C_4H_6O_4$그룹이 떨어져 나간 $[M+H-feruloyl\ group-Glc-C_4H_6O_4]^+$ 형태인 *m/z* 327.1을 Q3 피크로 설정하였다.[19] Liquiritigenin과 glycyrrhizin은 *m/z* 257.2와 821.9의 Q1 피크에서 $C_8H_8O_8$과 glucose 2분자가 각각 떨어진 $[M+H-C_8H_8O_8]^+$ 형태와 $[M-H-2Glu]^-$ 형태인 *m/z* 137.0과 351.2를 Q3 피크로 설정하였으며,[26] coumarin은 *m/z* 146.8에서 Q1 피크를 확인하였으며, Q1 피크에서 2분자의 CO가 떨어져 나간 $[M+H-2CO]^+$ 형태인 *m/z* 91.0을 Q3 피크로 설정하였다.[27] Cinnamic acid와 cinnamaldehyde는 *m/z* 148.9 및 133.1에서 각각의 Q1 피크를 확인하였으며, 각각의 Q1 피크에서 두 성분 모두 1개의 물 분자가 떨어져 나간 $[M+H-H_2O]^+$ 형태인 *m/z* 131.0과 115.0을 Q3 피크로 설정하였으며,[28,29] 6-gingerol은 *m/z* 295.3의 Q1 피크에서 $C_6H_{12}O_2$가 떨어져 나간 $[M+H-C_6H_{12}O_2]^+$ 형태의 *m/z* 177.1을 Q3 피크로 설정하였다.[23] 이와 같이 본 분석법에서 대상 처방의 지표 성분으로 선정한 14종의 성분에 대하여 Q1 피크와 Q3 피크를 각각 설정한 후 이들 성분에 대한 함량을 분석하였다. 설정된 LC-MS/MS MRM 분석법을 이용하여 주요 성분을 분석한 결과 gallic acid, spinosin, paeoniflorin, albiflorin, liquiritin apioside, liquiritin, 6'''-feruloylspinosin, liquilitigenin, coumarin, cinnmamic acid, benzoylpaeoniflorin, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 6-gingerol 등 14종의 성분은 0.81, 1.37, 1.39, 1.40, 1.53, 1.65, 1.95, 2.99, 3.06, 3.74, 3.85, 4.30, 5.20 및 6.16분으로 총 10분 이내에 모든 성분이 분리되었다(Table IV 및 Fig. 2). 또한 설정된 분석법을 통한 계지탕 추출물의 분석 결과 대조의 지표 물질로 선정한 6'''-feruloylspinosin은 검출이 되지 않았으며, spinosin 또한 정량한계 이하로 검출이 되었다. 그러나 이들 두 성분을 제외한 12종의 성분은 1.5-85.7 μg/g으로 나타났으며, 이러한 결과는 Table V에 나타내었다.

결 론

계지, 작약, 감초, 생강 및 대조 등 5종의 생약으로 구성되어 감기 증상의 치료를 위해 처방되어지는 대표적인 한약 처방 중 하나인 계지탕에 대하여 gallic acid, spinosin, paeoniflorin, albiflorin, liquiritin apioside, liquiritin, 6'''-feruloylspinosin, liquilitigenin, coumarin, cinnmamic acid, benzoylpaeoniflorin, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 및 6-gingerol 등 14종의 성분에 대하여 LC-MS/MS MRM 방법으로 함량을 분석하였다. 그 결과 본 한약 처방의 동결 건조 추출물에 대해 감초로부터 유래된 glycyrrhizin과 작약으로부터 유래된 paeoniflorin이 85.7 μg/g 및 72.3 μg/g으로 다

른 성분에 비해 많은 양이 검출되었다. 이러한 분석 결과는 향후 계지탕 및 계지탕을 바탕으로 한 가감방 등 관련 한약 처방의 품질 관리를 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

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

인용문헌

1. Lee, S. J. and Kim, Y. M. (2012) A study of 'Ji-Qi-Shang-Chong(其氣上衝)' and 'Gui-Zhi-Tang(桂枝湯)' in Shang-han-lun. *Formula Sci.* **20**: 165-176.
2. Heo, J. (2004) Donguibogam, 380. Namsandang, Seoul.
3. Yoo, S. R., Kim, Y., Lee, M. Y., Kim, O. S., Seo, C. S., Shin, H. K. and Jeong, S. J. (2016) Gyeji-tang water extract exerts anti-inflammatory activity through inhibition of ERK and NF-κB pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**: 390-399.
4. Jiao, H., Ma, J., Chen, Y., Ju, D., Xiang, L. and Wang, S. (2012) Effects of guizhi tang on inflammatory cytokines in myocardial ischemia and hyperlipidemia rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **37**: 1634-1637.
5. Kutsuwa, M., Nakahara, N., Kubo, M., Hayashi, K. and Ohizumi, Y. (1998) A comparative study of Kakkon-to and Keishi-to on prostaglandin E(2) release from rabbit astrocytes. *Phymedicine* **5**: 275-282.
6. Li, X. D., Gu, L. W., Ran, Q. S., Zhou, P., Zhan, X. L., Li, C. H. and Jiang T. L. (2016) Protective effects of three phenylallyl compounds from Guizhi decoction ox-LDL-induced oxidative stress injury of human brain microvascular endothelial cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **41**: 2315-2320.
7. Li, X., Jiang, Y. H., Jiang, P., Yang, J. L. Ma, D. F. and Yang, C. H. (2014) Effect of Guizhi decoction ([symbols; see text]) on heart rate variability and regulation of cardiac autonomic nervous imbalance in diabetes mellitus rats. *Chin. J. Integr. Med.* **20**: 524-533.
8. Zhou, J., Li, C. H., Huo, H. R., Kang, X. L., Li, L. F., Jiang, N. and Jiang, T. L. (2006) Effect of guizhi decoction on PKA and PKC activities of hypothalamus in fever rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **31**: 66-69.
9. Li, C. H., Zhou, J., Huo, H. R., Kang, X. L. and Jiang, T. L. (2003) Effect of guizhi tang and its active components on the fever induced by EP3 agonist. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **28**: 1056-1060.
10. Motoo, Y., Su, S. B., Xie, M. J., Mouri, H., Taga, H. and Sawabu, N. (2001) Effect of herbal medicine keishi-to (TJ-45) and its components on rat pancreatic acinar cell injuries *in vivo* and *in vitro*. *Pancreatology* **1**: 102-109.
11. Liang, K., Cui, S., Zhang, Q., Bi, K., Qian, Z. and Jia, Y. (2011) UPLC simultaneous determination of five active components in Cinnamomi Ramulus. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **36**: 3298-3301.
12. Wen, K. C., Huang, C. Y. and Liu, F. S. (1992) Determination of cinnamic acid and paeoniflorin in traditional Chinese medicinal preparations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **593**: 191-199.
13. Xu, S., Yang, L., Tian, R., Wang, Z., Liu, Z., Xie, P. and Feng, Q. (2009) Species differentiation and quality assessment of Radix Paeoniae Rubra (Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint. *J. Chromatogr. A.* **1216**: 2163-2168.
14. Zhang, Q. and Ye, M. (2009) Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *J. Chromatogr. A.* **1216**: 1954-1969.
15. Lee, H. R., Lee, J. H., Park, C. S., Ra, K. R., Ha, J. S., Cha, M. H., Kim, S. N., Choi, Y., Hwang, J. and Nam, J. S. (2014) Physicochemical properties and antioxidant capacities of different parts of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **43**: 1369-1379.
16. Niu, C. and Zhang, J. (2011) Quantitative analysis and chromatographic fingerprinting of the Semen Zizyphi Spinosae by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *J. Sep. Sci.* **34**: 2989-2996.
17. Lee, K. H. (2013) The dispensatory on the visual and organoleptic examination of herbal medicine, 24-529. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul.
18. Jiang, M., Zhou, M., Han, Y., Xing, L., Zhao, H., Dong, L., Bai, G. and Luo, G. (2013) Identification of NF-kB inhibitors in Xuebijing injection for sepsis treatment based on bioactivity-integrated UPLC-Q/TOF. *J. Ethnopharmacol.* **147**: 426-433.
19. Ren, Y., Wang, P., Wu, C., Zhang, J. and Niu, C. (2013) Identification of the metabolites after oral administration of extract of Ziziphi Spinosae Semen to rats or dogs by high-performance liquid chromatography/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **27**: 17-26.
20. He, Q., Hu, X. J. and Cheng, Y. Y. (2006) Analysis of 'SHUANGDAN' granules by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 485-492.
21. Cao, W., Wang, X., Li, H., Shi, X., Fan, W., Zhao, S., Liu, M. and Niu, L. (2015) Studies on metabolism of total glucosides of paeony from Paeoniae Radix Alba in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS. *Biomed. Chromagogr.* **29**: 1769-1779.
22. 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.

23. 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. Chromagogr.* **25**: 913-924.
27. Concannon, S., Ramachandran, V. N. and Smyth, W. F. (2007) A study of the electrospray ionization of selected Coumarin derivatives and their subsequent fragmentation using an ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**: 1157-1166.
28. Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P. and Simonetti, P. (2007) Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**: 390-399.
29. Flamini, R., Dalla Vedova, A., Cancian, D., Panighel, A. and De Rosso, M. (2007) GC/MS-positive ion chemical ionization and MS/MS study of volatile benzene compounds in five different woods used in barrel making. *J. Mass Spectrom.* **42**: 641-646.

(2017. 11. 27 접수; 2018. 1. 18 심사; 2018. 2. 12 게재확정)