



Original Article / 원저

LC-MS/MS를 이용한 理中湯의 정량분석 및 항산화 활성

서창섭·김은순·김예지·신현규*

한국한의학연구원 한의신약연구그룹

Quantification Analysis and Antioxidant Activity of Leejung-tang

Chang-Seob Seo · Ohn Soon Kim · Yeji Kim · Hyeun-Kyoo Shin*

Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental
Medicine, Yuseongdae-ro 1672, Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Korea.

ABSTRACT

Objectives : Leejung-tang (Lizhong-tang) has been used for treatment of gastrointestinal disorders in Korea. In this study, we performed quantification analysis of five marker components, liquiritin, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, glycyrrhizin, and 6-gingerol in Leejung-tang using a ultra performance liquid chromatography- electrospray ionization-mass spectrometer (UPLC-ESI-MS). In addition, we evaluated antioxidant activity of Leejung-tang.

Methods : The column for separation of five constituents used a UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm) maintained at 45°C. The mobile phase consisted of two solvent systems, 0.1% (v/v) formic acid in H₂O (A) and CH₃CN (B) by gradient flow. The flow rate was 0.3 mL/min with detection at mass spectrometer. The antioxidative activities conduct an experiment on 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of Leejung-tang.

Results : Calibration curves of five marker compounds were acquired with r² values > 0.99. The amount of the five compounds in Leejung-tang were 0.07 - 0.84 mg/g. The concentration required for 50% reduction (RC50) against ABTS radical was 119.02 ug/mL. In addition, the scavenging against DPPH radical of Leejung-tang was 11.4%, 14.5%, 19.8%, 29.6%, and 49.2% at 25 ug/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL, and 400 μg/mL, respectively.

© 2013 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This is an open access journal which permits unrestricted access via the internet (URL, <http://www.ompak.okdanche.com>.) non-commercial use, distribution, reproduction and providing the original work is properly cited.

Conclusions : The established LC-MS/MS method will be helpful to improve quality control of Leejung-tang. In addition, Leejung-tang is a potential antioxidant therapeutic agent.

Keyword : Quantification Analysis, Antioxidant, Leejung-tang, Lijzhong-tang, LC-MS/MS

I. 서 론

理中湯은 漢宋 張仲景의 「傷寒論」¹⁾에 처음 수록된 처방으로 人蔘 (Ginseng Radix Alba), 乾薑 (Zingiberis Rhizoma), 白朮 (Atractylodis Rhizoma Alba) 및 甘草 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma)의 4종으로 구성되어 있다.^{2,3)} 본 처방은 脾胃의 陽이 虛하고 陰이 성한 溫中祛寒과 氣가 虛한 것을 치료하고 脾가 虛한 것을 보하는 補氣健脾 하는데 사용되는 처방이다. 또한 脾胃中焦의 虛寒으로 인한 각종 설사, 구토, 소화불량 및 식욕부진 등의 소화기 질환 증상을 치료하는데 처방 빈도가 높다.^{2,3)} 이증탕의 실험적 연구로는 항알러지^{4,5)}, 진통⁶⁾, 면역증강⁷⁾, 항염증⁸⁾ 및 지사⁶⁾ 효과 등이 보고되었으며, 한약 처방의 안전성과 관련하여 증금속, 잔류농약 및 잔류이산화황에 대한 연구⁹⁾와 급성 독성¹⁰⁾에 대한 연구가 보고되었다. 최근에 알콜성위염 보호 효과¹¹⁾에 대한 연구 결과도 보고되었다. 그러나 현재까지 항산화에 대한 실험적 연구는 보고되지 않았다.

본 연구에서는 한약제제의 품질관리에 기초 자료를 제공하고자 한의학에서 구토, 만성위염 및 궤양 등의 위장관련 질환에 널리 사용되는 한약처방 중 하나인 理中湯을 선정하였다. 본 처방의 구성 약재 중 人蔘의 ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rg1, 甘草의 liquiritin과 glycyrrhizin 및 乾薑의 6-gingerol 등 5종의 성분을 대상으로 초고성능 액체크로마토그래피 질량분석기 (ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-

mass spectrometer; UPLC-ESI-MS)를 이용하여 정량분석을 실시하였다. 또한 理中湯의 ABTS와 DPPH 라디칼 제거를 통한 항산화 활성을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 理中湯의 구성 한약재인 人蔘(Ginseng Radix Alba), 乾薑(Zingiberis Rhizoma), 甘草 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma), 및 白朮 (Atractylodis Rhizoma Alba)은 (주)옴니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 규격품을 구입하였다. 理中湯을 구성하는 한약재의 기원은 이제현 교수 (Dongguk University, Gyeongju, Korea)와 서영배 교수 (Daejeon University, Daejeon, Korea)의 감별을 받은 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본 (2008-KE19-1 ~ 2008-KE19-4)은 한국한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

2. 시약 및 기기

표준물질인 ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, glycyrrhizin 및 6-gingerol은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였으며, liquiritin은 (주)천연물화학 (Da ejeon, Korea)에서 구입하였다. 이들 표준물질의 순도는 모두 98.0% 이상이었다. LC-MS/MS 분석을 위한 메탄올, 아세트나이트릴 및 물은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 개미산, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), phosphate buffer saline

*교신저자 : 신현규, 대전시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약기초연구그룹

· Tel : 042-868-9464

· Fax : 042-864-2120

· Email : hkshin@kiom.re.kr

•접수 2013/04/09 •수정 2013/04/19 •채택 2013/04/22



(PBS), 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 및 dimethyl sulfoxide (DMSO) 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

5종 성분의 분리를 위해 pump, digasser, column oven 및 autosampler로 구성된 Waters의 UPLC (Milford, MA, USA)를 사용하였다. 질량분석기는 electrospray ionization (ESI) source가 장착된 LC-MS/MS (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 데이터 처리는 Waters MassLynx software (version 4.1, Milford, MA, USA)를 사용하였다.

3. 표준액의 조제

Ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, liquiritin, glycyrrhizin 및 6-gingerol 5종의 표준품에 대한 표준용액은 무게를 정확하게 측정 후 메탄올로 녹여 모두 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다.

4. 理中湯 추출물 및 검액의 조제

理中湯의 구성한약재를 Table 1과 같이 무게 비율로 배합 (총 시료 양 약 10.0kg)하여 추출기 (Cosmos 660, Incheon, Korea)에 넣고, 물을 시료의 10배 (100L)로 첨가하여 100°C에서 2시간 전탕 한 후 농축 및 동결건조 하여 24.8%의 수율인 약 2.5kg

Table 1. Composition of Leejung-tang

Latin name	Amount (g)	Supplier	Location
Ginseng Radix Alba	7.50	Omnierb	Geumsan, Korea
Zingiberis Rhizoma	7.50	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Atractylodis Rhizoma Alba	7.50	Omnierb	China
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	3.75	HMAX	China
Total amount	26.25		

의 추출물을 얻었다. LC-MS/MS 정량분석을 위하여 추출물 10mg을 정확히 측정 후 물을 넣어 10mL로 맞춘 후 15분간 초음파 추출하였다. 그 후 0.22µm 멤브레인 여과하여 검액으로 하였다.

5. UPLC 및 LC-MS/MS 분석조건

理中湯 내 주요성분인 ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, liquiritin, glycyrrhizin 및 6-gingerol을 정량분석을 위해 Waters사의 UPLC와 질량분석기를 사용하여 Table 2와 같은 조건으로 분석을 하였다. 또한 성분의 LC-MS/MS 정량 분석을 위하여 각 성분의 precursor ion, product ion, cone voltage 및 collision energy 등에 대한 최적의 조

Table 2. Condition for LC-MS/MS Analysis of Leejung-tang

HPLC condition				MS condition	
Column	UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 µm)			Capillary voltage (kV)	3.3
Flow rate	0.3 mL/min			Extract voltage (V)	3
Injection volume	2.0 µL			Source temp. (°C)	120
Column temperature	45°C			RF lens (V)	0.3
Sample temperature	5°C			Desolvation temp. (°C)	300
Mobile phase	Time (min)	A (%) [*]	B (%) [†]	Desolvation gas (L/h)	600
	0	80	20	Cone gas (L/h)	50
	0.1	80	20		
	5	5	95	Collision gas (mL/min)	0.14
	6	0	100		
	6.1	80	20		
8	80	20			

*1.0% (v/v) acetic acid in H₂O ; †1.0% (v/v) acetic acid in CH₃CN

Table 3. Mass Detection Condition of Marker Compounds

Compound	Mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Liquiritin	Negative	417	255	30	15
Ginsenoside Rg1	Negative	799.2	637	50	20
Ginsenoside Rb1	Negative	1107.5	179	50	45
Glycyrrhizin	Negative	821.2	351	45	40
6-Gingerol	Positive	295	177	13	10

건은 Table 3과 같이 설정하여 multiple reaction monitoring (MRM) 모드를 적용하여 정량을 실시하였다.

6. 검량선 작성

Gginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, liquiritin, glycyrrhizin 및 6-gingerol 등 5종의 표준품에 대한 검량선은 50, 100, 500 및 1000 ng/mL의 농도로 희석하여 피크 면적과 농도에 대해서 작성하였다. 작성된 검량선은 상관계수 (r^2)를 구하여 직선성을 판단하였다.

7. 항산화 활성

(1) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay 방법¹²⁾을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성 시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 PBS (pH 7.4)로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS⁺용액과 시료를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA)를 사용하여 743 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 vitamin C를 사용하였다.

(2) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 96 well plate을 이용하여 실시하였다.¹³⁾ 96 well plate에 0.15 mM의 DPPH 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처방 추출물의 항산화능은 시료를 녹인 용매인 DMSO를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. 활성비교를 위하여 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

III. 결과 및 고찰

1. LC-MS/MS 분석조건 확립

理中湯의 구성 약재 중 인삼의 주요성분인 ginsenoside Rg1과 ginsenoside Rb1, 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 및 건강의 6-gingerol 등 5종의 성분을 LC-MS/MS를 이용하여 동시 정량을 실시하였다 (Fig. 1). 역상 UPLC 조건에 의한 ESI 방법의 양이온 모드와 음이온 모드에서 5종의 성분을 분리를 위해 0.1% (v/v) 개미산이 함유된 물과 아세트나이트릴의 이동상을 이용하여 Table 2와 3의 조건을 이용하여 검출하였다. MS 분석 결과 ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1, liquiritin 및 glycyrrhizin은 m/z 799.2, m/z 1107.5, m/z 418 및 m/z 821.2에서 각각의 [M-H]⁻ 형태의 분자이온 피크를 확인하였으며, 6-gingerol은 m/z

295 [M-H]⁺ 형태의 분자이온 피크를 확인 하였다 (Fig. 2). 확립된 理中湯의 LC-MS/MS MRM 모드 결과 5종의 성분인 liquiritin, ginsenoside Rg1,

ginsenoside Rb1, glycyrrhizin 및 6-gingerol 은 1.55분, 1.90분, 2.50분, 2.95분 및 3.57분에서 각각 검출되었다 (Fig. 3).

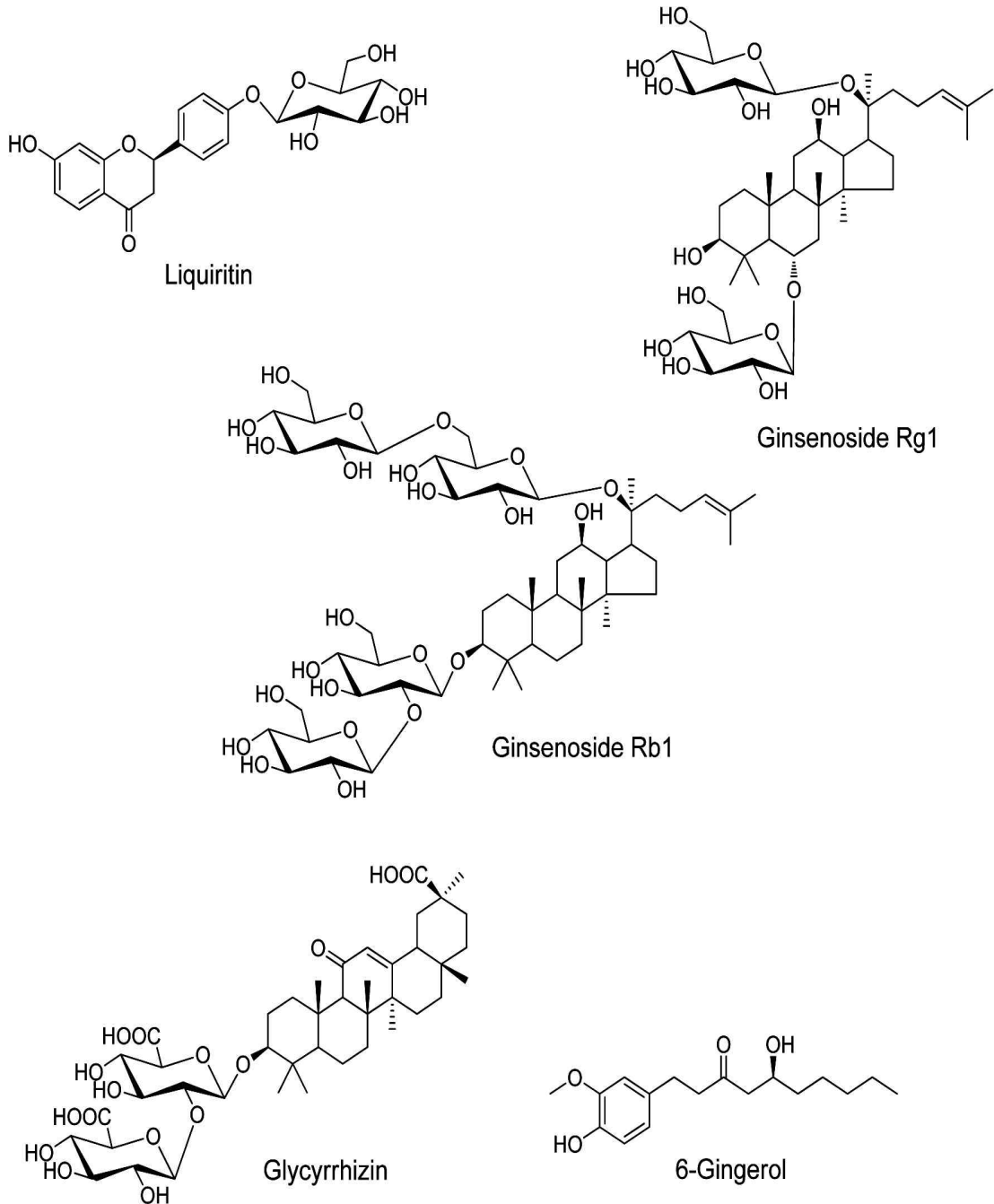


Fig. 1. Chemical structures of five marker constituents in Leejung-tang.

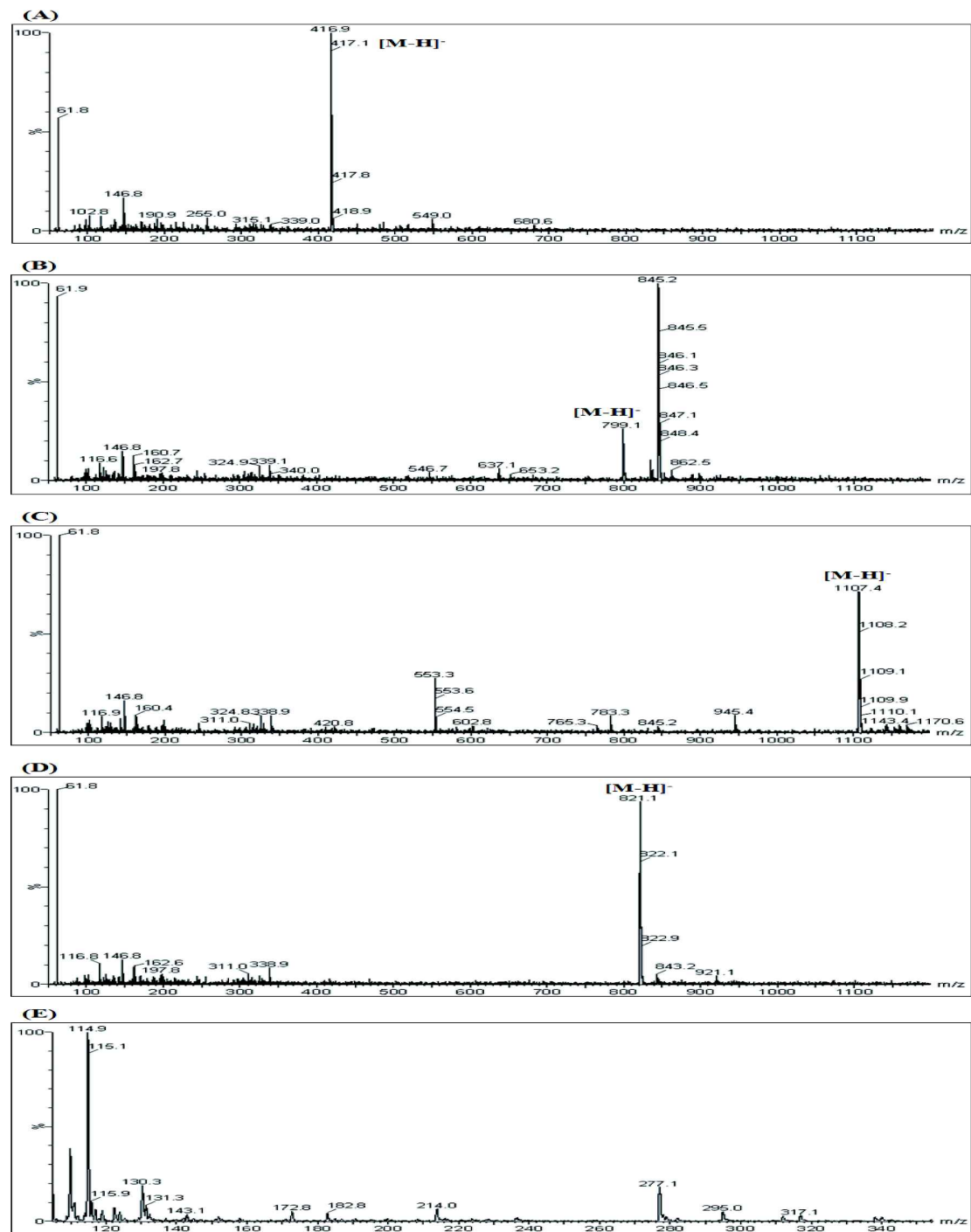


Fig. 2. Mass spectra of five standard compounds. Liquiritin (A), ginsenoside Rg1 (B), ginsenoside Rb1 (C), glycyrrhizin (D), and 6-gingerol (E).

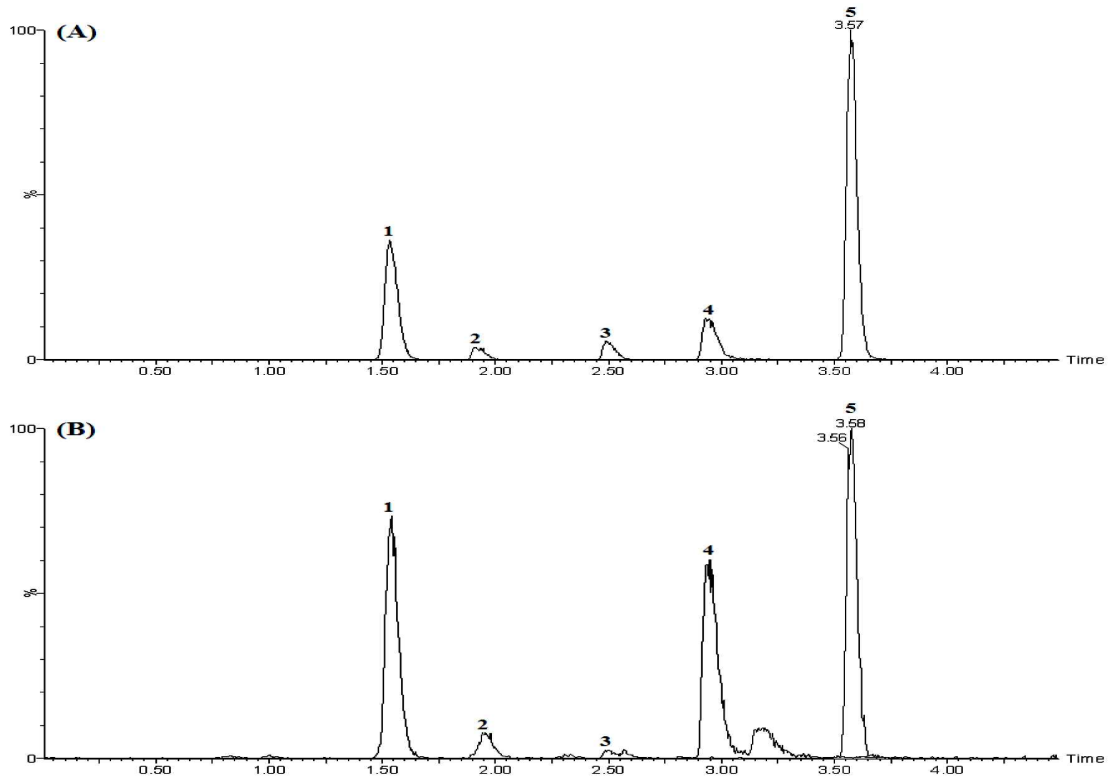


Fig. 3. Chromatogram of five marker compounds (A) and Leejung-tang sample (B) by LC-MS/MS MRM mode. Liquiritin (1), ginsenoside Rg1 (2), ginsenoside Rb1 (3), glycyrrhizin (4), and 6-gingerol (5).

2. 검량선

LC-MS/MS를 이용하여 농도에 따른 ESI 방법의 MRM 모드에서 liquiritin, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, glycyrrhizin 및 6-gingerol 등 5종의 성분에 대한 검량선 작성 결과 상관 계수 (r^2) 값이 0.9995, 0.9961, 0.9992, 0.9982 및 0.9997의 양호한 직선성을 각각 나타내었다 (Table 4).

3. 理中湯 중 주요성분의 함량분석

理中湯을 설정된 LC-MS/MS 분석법으로 5종 성분에 대한 함량을 분석하였다. LC-MS/MS에서 정량분석을 위한 ginsenoside Rg1의 MRM 조건은 m/z 799.2 (precursor ion) \rightarrow 637 (product ion), ginsenoside Rb1은 m/z 1107.5 (precursor ion) \rightarrow 179 (product ion), liquiritin은 m/z 417 (precursor ion) \rightarrow 255 (product ion), glycyrrhizin

Table 4. Linearities, Regression equation, and Correlation Coefficients for Marker Compounds

Compound	Linear range (ng/mL)	Regression equation	Correlation Coefficient
Liquiritin	50-10000	$y = 13.15x + 104.41$	0.9994
Ginsenoside Rg1	50-10000	$y = 1.38x + 7.86$	0.9968
Ginsenoside Rb1	50-10000	$y = 1.35x - 22.52$	0.9992
Glycyrrhizin	50-10000	$y = 4.63x - 30.22$	0.9982
6-Gingerol	50-10000	$y = 24.24x + 144.09$	0.9997

Table 5. Amount of the Five Marker Compounds in Leejung-tang

Compound	Mean (mg/g)	SD	RSD (%)
Liquiritin	0.35	0.00	0.60
Ginsenoside Rg1	0.07	0.01	7.72
Ginsenoside Rb1	0.11	0.01	7.47
Glycyrrhizin	0.84	0.01	0.63
6-Gingerol	0.17	0.01	4.27

은 m/z 821.2 (precursor ion) \rightarrow 351 (product-ion) 및 6-gingerol은 m/z 295 (precursor ion) \rightarrow 177 (product ion)로 설정한 후 정량을 실시하였다. 함량 분석 결과 理中湯 추출 물 중 인삼의 ginsenoside Rg1과 ginsenoside Rb1의 함량이 0.07 mg/g 및 0.11 mg/g으로 각각 나타났으며, 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin 이 0.35 mg/g과 0.84 mg/g으로 각각 나타났다. 또한 건강의 6-gingerol이 0.17 mg/g으로 검출 되었다 (Table 5).

4. 理中湯의 항산화 효과

理中湯의 항산화 활성을 평가하고자 추출물을 농도별로 조제한 후 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. ABTS 라디칼의 소거활성을 비교한 결과 Table 6과 같이 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보였으며, RC_{50} 값은 119.02 μ g/mL로 관찰되었다. 양성대조군인 vitamin C의 RC_{50} 값은 3.04 μ g/mL로 관찰되었다. DPPH 라디칼의 소거활성을 측정한 결과, Fig. 4와 같이 추출물의 농

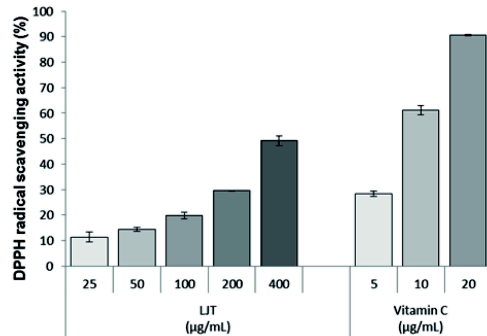


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of Leejung-tang. Data are represented as mean \pm SEM. LJT : Leejung-tang.

도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성과 유사하게 농도의존적인 경향이였다. 理中湯 추출물 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL 농도에서 각각 11.4, 14.5, 19.8, 29.6 and 49.2%의 라디칼 소거활성을 보였으며, 양성대조군으로 사용한 vitamin C는 5, 10, 20 μ g/mL 농도에서 각각 28.3, 61.1, 90.6%의 라디칼 소거활성을 보였다 (Fig. 4.).

IV. 결 론

理中湯을 구성하는 人蔘, 乾薑, 白朮 및 甘草의 4가지 구성 생약 중 人蔘의 ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rg1, 乾薑의 6-gingerol 및 甘草의 liquiritin과 glycyrrhizin 등 5종의 성분대하여 LC-MS/MS를 이용한 함량분석과 본 처방의 항산화 활성을 평가하였다.

LC-MS/MS 정량분석을 위한 MRM 조건은 ginsenoside Rg1 m/z 799.2/637, ginsenoside Rb1

Table 6. Scavenging Effects of Leejung-tang on ABTS⁺

Sample	Concentration (μ g/mL)	Scavenging effect (%) [*]	RC50 (μ g/mL) [†]
Leejung-tang	25	18.30 \pm 0.74	119.02 \pm 2.89
	50	29.78 \pm 1.12	
	100	49.74 \pm 3.14	
	200	73.97 \pm 1.66	
	400	93.79 \pm 0.55	
Vitamin C	2.5	43.80 \pm 1.36	3.04 \pm 0.06
	5	77.16 \pm 1.00	
	10	99.78 \pm 0.18	

^{*}Data are represented as mean \pm SEM ; [†]Concentration required for 50% reduction of ABTS⁺ at 5 min reaction



m/z 1107.5/179, liquiritin m/z 417/255, glycyrrhizin m/z 821.2/351 및 6-gingerol m/z 295/177으로 분석을 실시한 결과甘草의 주요 성분이 다른 성분에 비해 많이 함유되어 있음을 확인하였다. 또한 理中湯의 ABTS와 DPPH 라디칼 제거를 통한 항산화 활성은 용량이 높을수록 높은 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '한약 처방의 과학적 근거 기반 구축사업 (K13030)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ko MG, Jang MK. Hyundae-Sanghanron. Seoul: Haneuimunhwasa, 2000:647-9.
2. Hur J. Donguibogam. Seoul:Namsandang, 2007:382.
3. 韓醫科大學 方劑學教授 共編著. 方劑學. 서울:永林社, 2003:232-3.
4. Seo HY, Han JK, Kim YH. The effect of Li Zhong tang on the suppression of Th2 differentiation by IFN- γ response in IgE hyperproduction and atopic dermatitis-like skin lesions induced NC/Nga mouse. J Koreana Oriental Pediatrics. 2009;23:1-22.
5. Seo HY, Han JK, Kim YH. Therapeutic Effects of *Yijungtang* on atopic dermatitis-like skin lesions of NC/Nga mouse induced by mite antigen. J Koreana Oriental Pediatrics. 2011;25:1-27.
6. Koh KS, Kang SK, Choe YT. Studies on the effects of aqua-acupuncture with Yi-jung-tang extracts on the analgesia, anti-laxative and uropepsin value. J Korean Oriental Med. 1984;5:62-71.
7. Zhao N, Zhang W, Guo Y, Jia H, Zha Q, Liu Z, Xu S, Lu A. Effects on neuroendocrinoimmune network of Lizhong Pill in the reserpine induced rats with spleen deficiency in traditional Chinese medicine. J Ethnopharmacol. 2011;133:454-9.
8. Lee JA, Ha HK, Jung DY, Lee HY, Lee JK, Huang DS, Shin HG. Comparative study of 25 herbal formulas on anti-inflammatory effect. J Oriental Obstetrics & Gynecol. 2010;23:101-11.
9. Seo CS, Huang DS, Lee JK, Ha HK, Chun JM, Um YR, Jang S, Shin HG. Concentration of heavy metals, residual pesticides and sulfur dioxide of before/ after a decoction- In prescription of digestive system-. Kor J Herbology. 2009;24:111-9.
10. Jung YP, Hwang YH, Lee JH, Yim NH, Cho WK, Ma JY. A study on the acute toxicity of Leejung-tang (Lizhong-tang) and fermented Leejung-tang (Lizhong-tang) extract in ICR mice. Kor J Herbology. 2012;27:95-100.
11. Shin IS, Lee MY, Lim HS, Seo CS, Ha HK, Shin HK. Gastroprotective effects of Leejung-tang, an oriental traditional herbal formula, on ethanol-induced acute gastric injury in rats. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013;10:316-23.
12. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol Med. 1999;26:1231-7.
13. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, and Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol. 2000;71:109-14.