

## LC-MS/MS를 이용한 향소산 중 15종 성분의 정량분석

서창섭 · 신현규\*

한국한의약연구원 K-herb연구단

### Quantitative Analysis of the Fifteen Constituents in Hyangso-San by LC-MS/MS

Chang-Seob Seo and Hyeun-Kyoo Shin\*

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

**Abstract** – Hyangso-san is a traditional herbal medicine that consists of the seven herbal medicines, Cyperi Rhizoma, Perillae Folium, Atractylodis Rhizoma, Citri Unshius Pericarpium, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Zingiberis Rhizoma Crudus, and Allii Fistulosi Bulbus. Hyangso-san has long been clinically used to treat the influenza, including headache, fever, chills, and pantalgia. In this study, we were performed the simultaneous analysis of the 15 marker compounds (liquiritin apioside, liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, rosmarinic acid, liquiritigenin, kaempferol, glycyrrhizin, nobiletin, 6-gingerol, elemicin, atractylenolide III, nootkatone, and atractylenolide I) in Hyangso-san using liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Column for the separation of the 15 ingredients was used a Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> analytical column (2.1×100 mm, 1.7 μm) at 45°C by using a mobile phase of 0.1% (v/v) formic acid in water and acetonitrile with gradient condition. Identifications of all analytes were performed using a Waters ACQUITY TQD LC-MS/MS system. The flow rate and injection volume were 0.3 mL/min and 2.0 μL, respectively. Correlation coefficient of the calibration curve was ≥0.9958. The values of limits of detection and quantification of the 15 components were 0.002–4.29 and 0.01–12.88 ng/mL, respectively. The result of an analysis using the established LC-MS/MS method, kaempferol and atractylenolide I were not detected, while other 13 compounds were 0.08–56.87 mg/g in lyophilized Hyangso-san sample.

**Key words** – Hyangso-san, Quantitative Analysis, LC-MS/MS

향소산(香蘇散)은 許浚의 『東醫寶鑑』<sup>1)</sup>에 사계절의 감기(四時傷寒)로 인한 두통(頭痛), 진신통(身疼), 발열(發熱), 오한(惡寒), 상풍(傷風), 상습(傷濕), 상한(傷寒) 및 계절에 따른 급성 전염병(時氣瘟疫) 등을 치료하는데 사용되어 왔으며, 향부자(香附子, Cyperi Rhizoma), 자소엽(紫蘇葉, Perillae Folium), 창출(蒼朮, Atractylodis Rhizoma), 진피(陳皮, Citri Unshius Pericarpium), 감초(甘草, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma), 생강(生薑, Zingiberis Rhizoma Crudus) 및 총백(蔥白, Allii Fistulosi Bulbus) 등 7종의 생약이 4:4:3:2:1:2:2의 비율로 구성되어 있다. 본 한약 처방의 현대 과학적 생리활성 연구로는 항우울증,<sup>2,4)</sup> 항불안,<sup>5)</sup> 해열<sup>6)</sup> 및 방사선 보호<sup>7)</sup> 효과 등이 보고되었다. 그러나 이러한 한약 처방의 품질표준화를 위한 연구는 미비한 실정이다. 이에 저자들은

본 연구에서 사계절의 감기 질환에 주로 사용되는 처방 중 하나인 향소산을 선정하여 함량 분석을 기초로 한 품질표준화에 대한 기초자료를 제공하고자 질량분석기가 결합된 초고성능 액체크로마토그래피(ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometer; UPLC-ESI-MS)를 이용하여 처방에 함유된 주요 성분, 즉 향부자의 nootkatone,<sup>8)</sup> 자소엽의 rosmarinic acid와 elemicin,<sup>9)</sup> 창출의 atractylenolide I과 III,<sup>10)</sup> 진피의 hesperidin, naringin 및 nobiletin,<sup>11)</sup> 감초의 liquiritigenin, liquiritin apioside, liquiritin 및 glycyrrhizin,<sup>12)</sup> 생강의 6-gingerol<sup>13)</sup> 및 총백의 kaempferol과 ferulic acid<sup>14)</sup>의 함량 분석을 실시하였다.

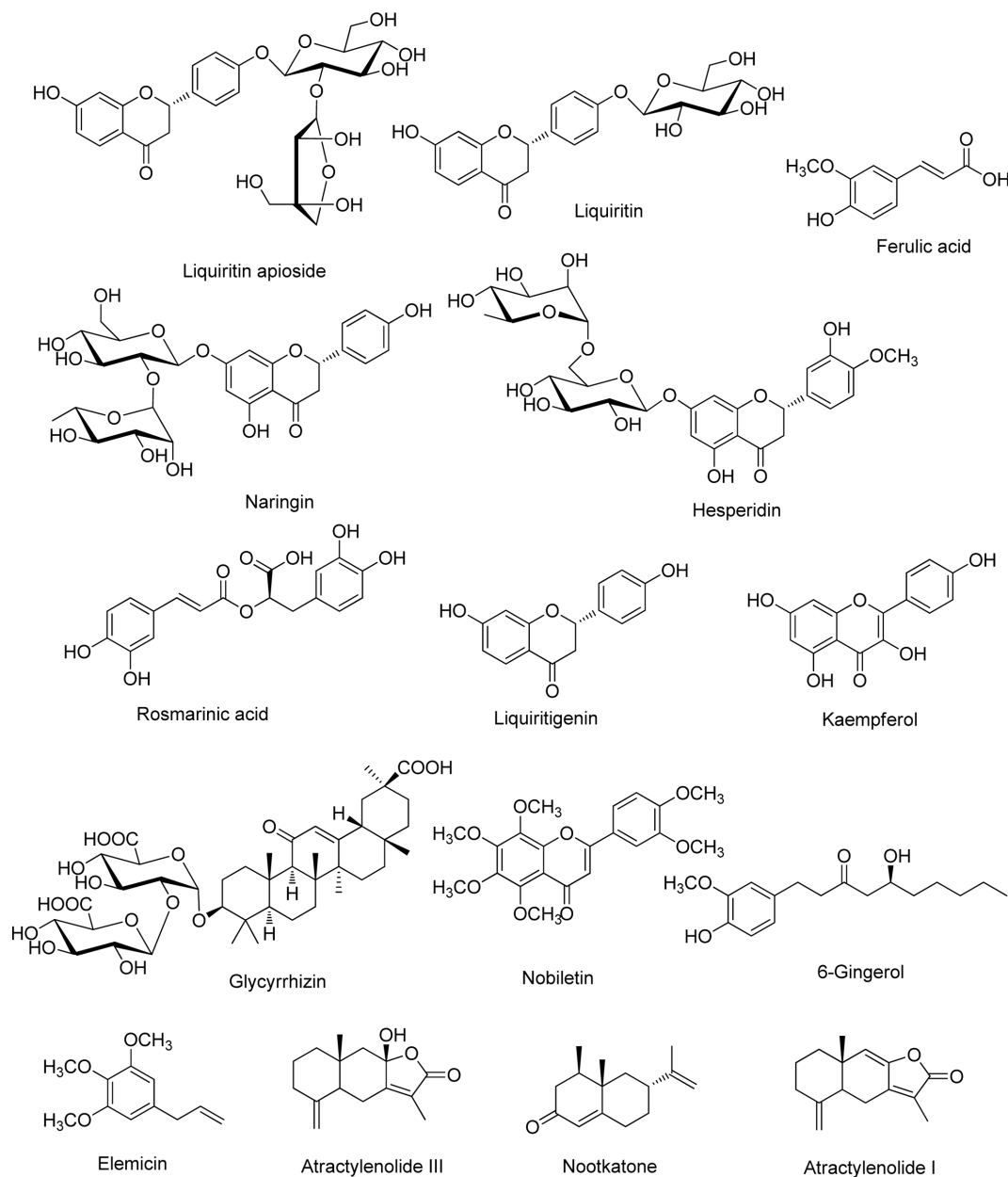
#### 재료 및 방법

**실험재료** – 향소산을 구성하는 향부자, 자소엽, 창출, 진피, 감초, 생강 및 총백 등 7종의 한약재는 모두 의약품용

\*교신저자(E-mail): hkshin@kiom.re.kr  
(Tel): +82-42-868-9464

**Table I.** Composition of Hyangso-San

Scientific name	Family	Latin name	Origin	Amount (g)
<i>Cyperus rotundus</i> Linne	Cyperaceae	Cyperi Rhizoma	Yeongcheon, Korea	7.500
<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>acuta</i> Kudo	Labiatae	Perillae Folium	Namwon, Korea	7.500
<i>Atractylodes lancea</i> De Candlle	Compositae	Atractylodis Rhizoma	China	5.625
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	Rutaceae	Citri Unshius Pericarpium	Jeju, Korea	3.750
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Leguminosae	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	China	1.875
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	Zingiberis Rhizoma Recnes	Ulsan, Korea	3.750
<i>Allium fistulosum</i> Linne	Liliaceae	Allii Fistulosi Bulbus	Hanam, Korea	3.750
Total amount				33.750

**Fig. 1.** Chemical structures of 15 marker components in Hyangso-san.

한약재 전문제조회사인 (주)내몸에당(Ulsan, Korea)에서 규격품을 구입하였다. 구입 후 이들 한약재는 본초학 전문가인 동국대학교 이재현 교수(Gyeongju, Korea)와 대전대학교 서영배 교수(Daejeon, Korea)로부터 관능검사 후 모든 실험에 사용하였다(Table I). 본 처방의 7가지 구성 생약의 표본(2012-KE44-1~2012-KE44-7)은 한국한의학연구원 K-herb 연구단에 보관하였다.

**시약 및 기기** - 향소산의 주요성분의 표준품인 rosmarinic acid(97.0%), naringin(95.0%) 및 ferulic acid(99.0%)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, hesperidin(98.6%), liquiritigenin(99.8%) 및 liquiritin(99.6%)은 Biopurify Phytochemicals(Chengdu, China)에서 구입하였다. Nootkatone(99.4%), glycyrrhizin(99.0%이상) 및 6-gingerol(98.0%이상)은 Wako Pure Chemical(Osaka, Japan)에서, atractylenolide I(99.0%이상)와 atractylenolide III(99.0%이상)는 KOC Biotec(Daejeon, Korea) 및 liquiritin apioside(98.0%이상)와 kaempferol(98.0%이상)은 Shanghai Sunny Biotech(Shanghai, China)에서 각각 구입하였다. Elemicin(95.0%이상)과 nobiletin(98.0%)은 Synchem OHG(Felsberg-Altenburg, Germany)와 ChemFaces Biochemical(Wuhan, China)에서 각각 구입하여 사용하였다. 이들 표준품들의 화학적 구조는 Fig. 1과 같다. LC-MS/MS 정성 및 정량분석을 위한 메탄올, 아세트나이트릴 및 물은 HPLC용으로 Burdick&Jackson(Muskegon, MI, USA)에서 구입하였으며, 개미산은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 경서기계산업의 초고속진공저온농축추출기(COSMOS660, Incheon, Korea)를 사용하여 향소산 물 추출물을 조제하였으며, 조제된 향소산 추출물의 함량 분석은 Waters의 ACQUITY UPLC system(Milford, MA, USA)을 사용하였다. ACQUITY UPLC system은 펌프, 컬럼 오븐 및 시료 자동주입기 등으로 구성되어 있으며, 질량분석기는 전자분무이온화(electrospray ionization, ESI) 소스가 장착된 탠덤 사중극자 질량분석기(ACQUITY TQD LC-MS/MS, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. UPLC와 MS에 의한 모든 데이터의 수집과 처리는 Waters MassLynx software(version 4.1, Milford, MA, USA)를 사용하였다.

**향소산 물 추출물 조제** - 향부자, 자소엽, 창출, 진피, 감초, 생강 및 총백 등 7종의 생약으로 구성된 향소산의 물 추출물을 조제하기 위해 Table I과 같은 무게 비율로 섞어 총 시료 양을 약 5.0 kg(1척 33.75 g×148.15배)으로 맞춘 후 물을 시료의 10배(50 L)로 첨가하였다. 혼합된 시료를 초고속진공저온추출기(Cosmos 660, Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)를 이용하여 98 kPa 압력으로 100°C에서 2 시간 전탕한 후 표준제(No. 270, 53 µm, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 이용하여 여과하였다. 여과액은 동결건조기(PVTFD100R, IShinBioBase, Dongduchun, Korea)

를 사용하여 동결건조하여 670.6 g의 물 추출물을 얻었다(수율: 13.4%).

**표준액 및 검액의 조제** - Liquiritin apioside를 비롯한 15종의 표준품을 각각 정밀하게 달아 메탄올을 이용하여 1.0 mg/10 mL의 농도로 조제한 후 냉장보관(4°C) 하였다. LC-MS/MS 정량분석을 위하여 동결 건조된 향소산 물 추출물 34.4 mg을 정확히 취한 후 70% 메탄올을 넣어 5 mL로 하였다. 그 후 상온에서 5분간 sonication한 후 다시 1분간 vortexing한 다음 추출액 100 µL를 정확히 취하여 10 mL 메스 플라스크에 넣은 후 70% 메탄올을 넣어 10 mL로 하였다(100배 희석). 희석된 용액을 0.22 µm syringe 여과 후 검액으로 하였다.

**UPLC 및 LC-MS/MS 분석 조건 설정** - LC-MS/MS를 이용한 다중반응탐색법(multiple reaction monitoring, MRM)으로 향소산에서 liquiritin apioside를 비롯한 15종의 주요 성분에 대한 함량 분석을 위해 Table II와 III과 같이 분석 조건을 설정하였다.

**검량선 작성** - 향소산의 주요 성분인 liquiritin apioside를

**Table II.** Conditions for LC-MS/MS analysis of Hyangso-San

HPLC condition			
Column	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> (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(%) <sup>1</sup>	B(%) <sup>2</sup>
	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		

<sup>1</sup>0.1% (v/v) aqueous formic acid

<sup>2</sup>Acetonitrile

**Table III.** Chromatographic retention time, MRM parameters, cone voltage, and collision energy for 15 components

Compound	Mode	Retention time (min)	Molecular weight (Da)	Precursor ion ( $m/z$ )	Product ion ( $m/z$ )	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Liquiritin apioside	[M-H] <sup>-</sup>	1.53	550.5	549.3	255.0	45	30
Liquiritin	[M-H] <sup>-</sup>	1.65	418.4	417.4	255.2	30	15
Ferulic acid	[M+H] <sup>+</sup>	1.89	194.2	195.0	177.0	15	10
Naringin	[M-H] <sup>-</sup>	1.97	580.5	579.3	271.0	45	30
Hesperidin	[M+H] <sup>+</sup>	2.13	610.6	611.5	303.2	20	15
Rosmarinic acid	[M-H] <sup>-</sup>	2.16	360.3	359.3	161.0	30	15
Liquiritigenin	[M+H] <sup>+</sup>	2.99	256.3	257.2	137.0	35	25
Kaempferol	[M+H] <sup>+</sup>	3.92	286.2	287.1	153.0	45	30
Glycyrrhizin	[M-H] <sup>-</sup>	5.20	822.9	821.9	351.2	45	40
Nobiletin	[M+H] <sup>+</sup>	5.93	402.4	403.2	373.0	40	25
6-Gingerol	[M+H] <sup>+</sup>	6.16	294.4	295.3	177.1	13	10
Elemicin	[M+H] <sup>+</sup>	6.47	208.2	209.1	194.0	20	10
Atractylenolide III	[M+H] <sup>+</sup>	6.73	248.3	249.3	231.2	25	10
Nootkatone	[M+H] <sup>+</sup>	8.64	218.3	219.2	163.1	30	15
Atractylenolide I	[M+H] <sup>+</sup>	9.34	230.3	231.2	185.1	35	20

비롯한 15종의 표준품에 대한 검량선은 미리 조제된 표준 용액을 이용하여 0, 10, 50, 100 및 500 ng/mL의 농도 범위에서 농도에 따른 피크 면적을 이용하여 작성하였으며, 작성된 검량선의 상관관계수(coefficient of correlation,  $r^2$ )를 이용하여 직선성을 판단하였다. 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 다음의 계산식에 의해 계산되었다.

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \sigma / S$$

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma / S$$

$\sigma$  = 공시험 검체의 표준편차

S = 검량선의 기울기

## 결과 및 고찰

**LC-MS/MS 분석조건 확립** - 향소산의 구성하는 7종의 생약 중 향부자에서 nootkatone, 자소엽에서 rosmarinic acid 와 elemicin, 창출에서 atractylenolide I과 atractylenolide III, 진피에서 hesperidin, naringin 및 nobiletin, 감초에서 liquiritigenin, liquiritin apioside, liquiritin 및 glycyrrhizin, 생강에서 6-gingerol 및 총백에서 kaempferol과 ferulic acid 등 총 15종에 대하여 LC-MS/MS MRM 방식으로 동시분석 조건을 설정하였다. 개미산이 함유된 물과 아세트나이트릴 두 용매를 이용한 기울기 용매 조건과 UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1×100 mm, 1.7 μm) 분석용 컬럼을 사용하여 15종 성분의 분리 및 정량 분석 조건을 설정하였다. 최적화된 이동상

조건을 적용하여 ESI 방법의 양이온과 음이온 모드에서 Table II와 III의 조건과 같이 분석을 실시하였으며, 컬럼 온도는 45°C, 유속은 분당 0.3 mL로 하여 모든 성분을 10분 이내로 분리하였다.

**검량선, 검출한계 및 정량한계 작성** - 향소산의 주요 성분인 liquiritin apioside를 비롯한 15종 성분에 대하여 검량선을 작성하였다. 그 결과 Table IV와 같이 15종 성분의 직선성을 나타내는 상관관계수 값이 0.9958-1.0000으로 아주 양호한 직선성을 보여주었으며, 검출한계와 정량한계는 0.002-4.29 ng/mL와 0.01-12.88 ng/mL로 각각 나타났다.

**향소산 물 추출물 중 주요 성분의 검출 및 함량 분석** - LC-MS/MS MRM 분석법으로 향소산을 구성하는 7종의 구성 생약 중 15종의 주요 성분에 대한 분자이온 피크를 확인하였다. 그 결과 5종의 성분, liquiritin apioside, liquiritin, naringin, rosmarinic acid 및 glycyrrhizin은  $m/z$  549.3, 417.4, 579.3, 359.3 및 821.9에서 [M-H]<sup>-</sup> 형태의 음이온 모드에서 분자이온 피크를 확인하였으며, 그 외 10종의 성분, ferulic acid, hesperidin, liquiritigenin, kaempferol, nobiletin, 6-gingerol, elemicin, atractylenolide III, nootkatone 및 atractylenolide I은  $m/z$  195.0, 611.5, 257.2, 287.1, 403.2, 295.3, 209.1, 249.3, 219.2 및 231.2에서 [M+H]<sup>+</sup> 형태의 양이온 모드에서 분자이온 피크를 각각 확인하였다(Table III). 또한 향소산 시료내 이들 성분들의 함량을 LC-MS/MS를 이용한 MRM 조건으로 분석하기 위하여 각각의 성분에 대하여 precursor ion(Q1)과 product ion(Q3)을 Table III과 같이 설정하였다. Liquiritin apioside는  $m/z$  550.5에서 Q1 피

**Table IV.** Linear range, regression equation, correlation coefficients, LOD, and LOQ for 15 marker components

Compound	Linear range (ng/mL)	Regression equation	Correlation coefficient	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Liquiritin apioside	0 – 500	$y = 8.12x - 0.84$	0.9999	0.55	1.65
Liquiritin	0 – 500	$y = 10.02x + 24.19$	0.9996	1.14	3.41
Ferulic acid	0 – 500	$y = 35.69x + 37.70$	1.0000	4.29	12.88
Naringin	0 – 500	$y = 6.43 + 2.88$	0.9999	0.23	0.70
Hesperidin	0 – 500	$y = 11.13x - 8.94$	0.9996	0.12	0.37
Rosmarinic acid	0 – 500	$y = 3.14x - 39.24$	0.9958	1.39	4.16
Liquiritigenin	0 – 500	$y = 30.62x + 79.01$	0.9993	0.11	0.34
Kaempferol	0 – 500	$y = 9.64x - 15.02$	0.9997	0.31	0.92
Glycyrrhizin	0 – 500	$y = 3.36x - 31.79$	0.9983	1.42	4.27
Nobiletin	0 – 500	$y = 492.68x + 3757.80$	0.9987	0.002	0.01
6-Gingerol	0 – 500	$y = 12.05x - 51.20$	0.9998	0.39	1.16
Elemicin	0 – 500	$y = 108.01x + 151.39$	0.9999	0.02	0.05
Atractylenolide III	0 – 500	$y = 61.20x + 55.99$	0.9999	0.12	0.37
Nootkatone	0 – 500	$y = 56.86x + 173.52$	0.9991	0.64	1.91
Atractylenolide I	0 – 500	$y = 57.90x + 99.36$	0.9998	0.15	0.44

**Table V.** Content of 15 marker components in Hyangso-san (n = 3)

Compound	Content (mg/g)			Source
	Mean	SD	RSD (%)	
Liquiritin apioside	8.83	0.27	3.07	<i>G. uralensis</i>
Liquiritin	8.97	0.12	1.31	<i>G. uralensis</i>
Ferulic acid	1.17	0.05	4.54	<i>A. fistulosum</i>
Naringin	56.87	2.08	3.65	<i>C. unshiu</i>
Hesperidin	46.38	0.96	2.07	<i>C. unshiu</i>
Rosmarinic acid	19.16	0.87	4.56	<i>P. frutescens</i>
Liquiritigenin	0.74	0.04	4.87	<i>G. uralensis</i>
Kaempferol	ND	–	–	<i>A. fistulosum</i>
Glycyrrhizin	27.69	1.36	4.91	<i>G. uralensis</i>
Nobiletin	0.66	0.01	2.13	<i>C. unshiu</i>
6-Gingerol	0.92	0.11	12.02	<i>Z. officinale</i>
Elemicin	4.45	0.04	0.96	<i>P. frutescens</i>
Atractylenolide III	0.08	0.00	6.10	<i>A. lancea</i>
Nootkatone	0.14	0.01	6.11	<i>C. rotundus</i>
Atractylenolide I	ND	–	–	<i>A. lancea</i>

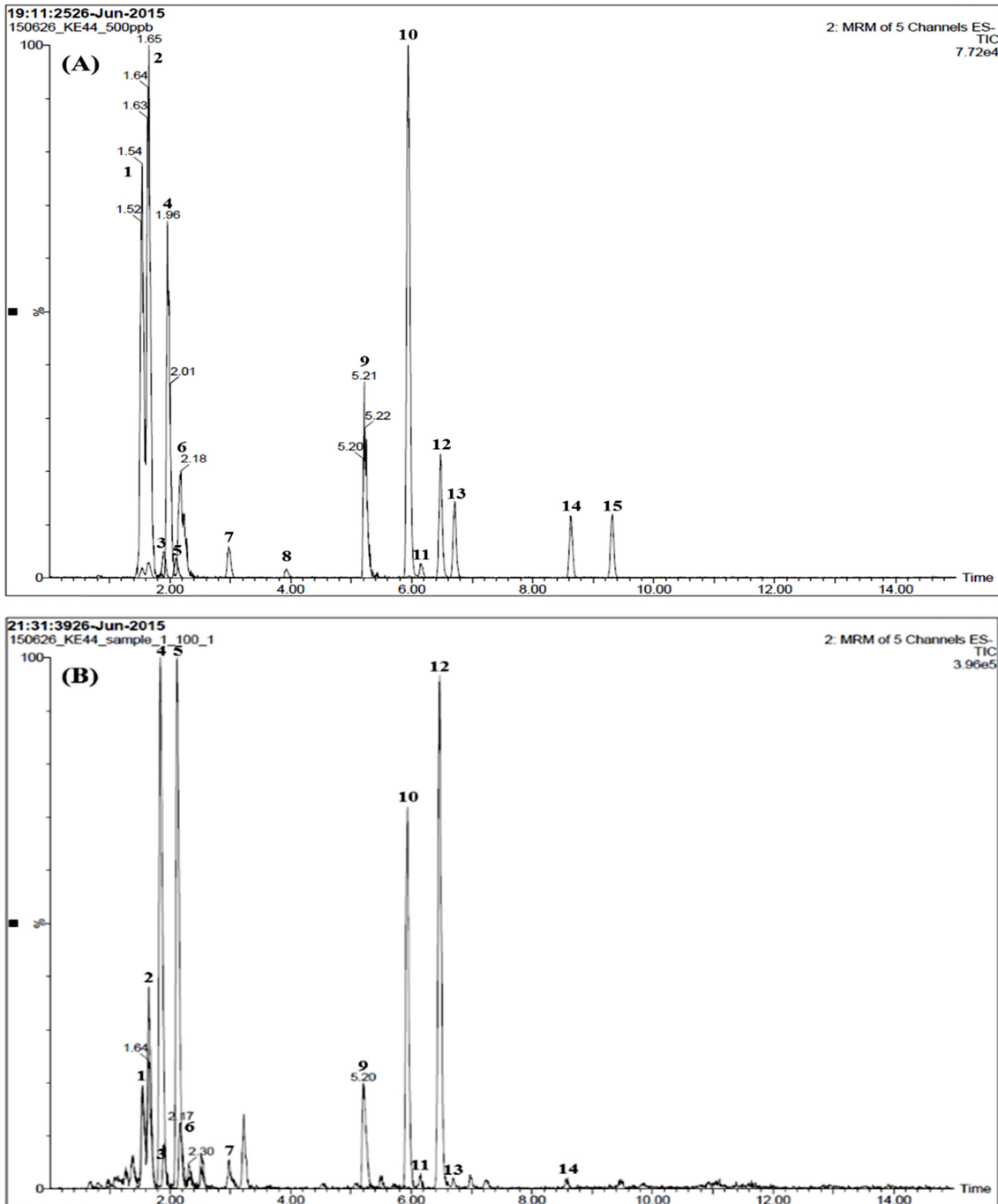
ND: not detected.

크가 관찰되었으며, Q1 피크에서 apiosyl-glucosyl 그룹이 떨어져 나간  $[M-H-apiosyl-glucosyl]^-$  형태로  $m/z$  255.0으로 Q3 피크를 설정하였으며,<sup>15)</sup> liquiritin은  $m/z$  417.4에서 Q1 피크를 확인하였으며, Q1 피크에서 glucose 1분자가 떨어진  $[M-H-Glu]^-$  형태로  $m/z$  255.0으로 Q3를 설정하였다.<sup>15)</sup> Ferulic acid는  $m/z$  195.0의 Q1에서 1개의 물 분자가 떨어진

$[M+H-H_2O]^+$  형태로  $m/z$  177.0으로 Q3를 설정하였으며,<sup>16)</sup> naringin과 hesperidin은  $m/z$  579.3과 611.5 각각의 Q1에서 두 성분 모두 rhamnosyl-glucosyl 그룹이 떨어진  $[M-H-rhamnosyl-glucosyl]^-$  과  $[M+H-rhamnosyl-glucosyl]^+$  형태로  $m/z$  271.0 및 303.2로 Q3를 설정하였다.<sup>17,18)</sup> Rosmarinic acid와 liquiritigenin은  $m/z$  359.3(Q1)와 257.2(Q1)에서  $C_9H_9O_5$

분자와  $C_8H_8O_8$  분자가 각각 이탈된  $[M-H-C_9H_9O_3]^-$ 와  $[M+H-C_8H_8O_8]^+$  형태로  $m/z$  161.0(Q3)과 137.0(Q3)로 각각 설정하였으며,<sup>19,20)</sup> kaempferol은  $m/z$  287.1의 Q1 피크에서 플라보놀 구조의 B링이 깨져 생성되는 전형적인  $^{1,3}A^+$  이온인  $[M+H-C_8H_6O_2]^+$  형태의  $m/z$  153.0에서 Q3를 설정하였

다.<sup>21,22)</sup> Glycyrrhizin은  $m/z$  821.9의 Q1 피크에서 glucose 2 분자가 이탈된  $[M-H-2Glu]^-$ 의 형태로  $m/z$  351.2로 Q3를 설정하였으며,<sup>23)</sup> nobiletin, 6-gingerol 및 elemicin은  $m/z$  403.2, 295.3 및 209.1에서 각각의 Q1 피크가 확인되었으며, Q1 피크에서  $CH_2O$ ,  $C_6H_{12}O_2$  및  $CH_3$  분자가 각각 떨어진



**Fig. 2.** Total ion chromatograms of the standard solutions (A) and Hyangso-san water extract (B) by LC-MS/MS MRM mode. Liquiritin apioside (1), liquiritin (2), ferulic acid (3), naringin (4), hesperidin (5), rosmarinic acid (6), liquiritigenin (7), kaempferol (8), glycyrrhizin (9), nobiletin (10), 6-gingerol (11), elemicin (12), atractylenolide III (13), nootkatone (14), and atractylenolide I (15).

$[M+H-CH_2O]^+$ ,  $[M+H-C_6H_{12}O_2]^+$  및  $[M+H-CH_3]^+$  형태로  $m/z$  373.0, 177.1 및 194.0으로 Q3를 각각 설정하였다.<sup>18,23,24</sup> Atractylenolide III와 atractylenolide I은  $m/z$  249.3과 231.2의 Q1 피크에서 1개의 물 분자가 떨어진  $[M-H_2O]^+$  형태의  $m/z$  231.2(Q3)와 1개의 물 분자와 CO가 떨어진  $[M-H_2O-CO+H]^+$  형태의  $m/z$  185.1(Q3)로 설정하였으며,<sup>16</sup> nootkatone은  $m/z$  219.2(Q1)에서  $C_{10}H_{16}$  분자가 떨어진  $[M+H-C_{10}H_{16}]^+$  형태로 Q3( $m/z$  163.1)를 설정한 후 정량을 실시하였다. 이와 같이 15종 성분에 대하여 LC-MS/MS MRM 분석을 위한 최적의 조건을 설정한 결과 liquiritin apioside, liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, rosmarinic acid, liquiritigenin, kaempferol, glycyrrhizin, nobiletin, 6-gingerol, elemicin, atractylenolide III, nootkatone 및 atractylenolide I은 1.53, 1.65, 1.89, 1.97, 2.13, 2.16, 2.99, 3.92, 5.20, 5.93, 6.16, 6.47, 6.73, 8.64 및 9.34분에 검출되었다(Table III 및 Fig. 2). 이와 같이 15종 성분은 10분 이내에 모두 분리가 되었으며, 향소산 물 추출물에 대한 이들 성분의 함량을 분석하기 위하여 설정된 LC-MS/MS MRM 분석법을 적용하여 함량을 분석하였다. 그 결과 Table V와 같이 kaempferol(*A. fistulosum*)과 atractylenolide I(*A. lancea*)를 제외한 13종의 성분은 0.74-56.87 mg/g으로 검출되었다. 이 중 진피로부터 유래된 naringin과 hesperidin이 56.87 mg/g과 46.38 mg/g으로 가장 많이 검출되었다.

## 결 론

향부자, 자소엽, 창출, 진피, 감초, 생강 및 총백 등 7종의 생약으로 구성되어 주로 감기 질환에 널리 처방되는 한약 처방 중 하나인 향소산의 함량 분석을 위하여 nootkatone(향부자), rosmarinic acid와 elemicin(이상 자소엽), atractylenolide I과 III(이상 창출), hesperidin, naringin 및 nobiletin(이상 진피), liquiritigenin, liquiritin apioside, liquiritin 및 glycyrrhizin(이상 감초), 6-gingerol(생강) 및 kaempferol과 ferulic acid(이상 총백) 등 15종의 성분에 대하여 LC-MS/MS MRM 모드로 함량 분석을 실시하였다. 분석 결과 본 한약 처방 추출물에서는 진피로부터 유래된 naringin과 hesperidin이 56.87 mg/g과 46.38 mg/g으로 가장 많이 검출되었으며, 감초의 glycyrrhizin과 자소엽의 rosmarinic acid 등이 27.69 mg/g과 19.16 mg/g으로 다른 성분에 비해 높은 함량을 나타내었다. 이러한 분석 결과는 향후 향소산 또는 이와 관련된 다른 한약 처방의 함량 분석을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘한약 처방의

과학적 근거 기반 구축사업(K15251)’에 의해 수행되었으며 이에 감사 드린다.

## 인용문헌

1. Heo, J. (2004) Donguibogam, 386. Namsandang, Seoul.
2. Ito, N., Nagai, T., Yabe, T., Nunome, S., Hanawa, T. and Yamada, H. (2006) Antidepressant-like activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine, Koso-san (Xiang-Su0San), and its mode of action via the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Phytomed.* **13**: 658-667.
3. Ito, N., Yabe, T., Nagai, T., Oikawa, T., Yamada, H. and Hanawa, T. (2009) A possible mechanism underlying an antidepressant-like effect of Kososan, a Kampo medicine, via the hypothalamic orexinergic system in the stress-induced depression-like model mice. *Biol. Pharm. Bull.* **32**: 1716-1722.
4. Ito, N., Hori, A., Yabe, T., Nagai, T., Oikawa, T., Yamada, H. and Hanawa, T. (2012) Involvement of neuropeptide Y signaling in the antidepressant-like effect and hippocampal cell proliferation induced by Kososan, a Kampo medicine, in the stress-induced depression-like model mice. *Biol. Pharm. Bull.* **35**: 1775-1783.
5. Gamo, Y., Ito, N., Oikawa, T. and Hanawa, T. (2009) An anxiolytic-like effect of kososan is different from the effect of hangekobokuto on two anxiety models in mice. *J. Trad. Med.* **26**: 11-17.
6. Itami, T., Ema, M., Sakamoto, J., Hosoda, K., Noguchi, M. and Kawasaki, H. (1992) Antipyretic effects of traditional Chinese medicines in bacterial endotoxin-induced febrile rabbits. *Yakugaku Zasshi* **112**: 129-134.
7. Wang, C. M., Shto, S. and Shinoda, M. (1990) Studies on chemical protectors against radiation. XXXII. Protective effects of methanol extracts of various Taiwan crude drugs on radiation injuries. *Yakugaku Zasshi* **110**: 885-889.
8. Seo, J., Kim, J., Kim, S., Liu, T. and Whang, W. K. (2012) Development of content analysis for *Cyperus rotundus* by HPLC-UV and a comparison between Chinese and domestic *Cyperus Rhizoma*. *Yakhak Hoeji* **56**: 280-287.
9. Zhao, B. T., Lee, K. R., Lee, J. H., Min, B. S., Son, J. K. and Woo, M. H. (2015) Quality evaluation of *Perillae Folium* by HPLC/PDA. *Arch. Pharm. Res.* **38**: 1521-1529.
10. Jeong, S. I., Kim, S. Y., Kim, S. J., Hwang, B. S., Kwon, T. H., Yu, K. Y., Hang, S. H., Suzuki, K. and Kim, K. J. (2010) Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Atractylodes japonica* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **15**: 7395-7402.
11. Ye, X., Cao, D., Zhao, X., Song, F., Huang, Q., Fan, G. and Wu, F. (2014) Chemical fingerprint and metabolic profile analysis of *Citrus reticulata* ‘Chachi’ decoction by HPLC-PDA-IT-MS<sup>n</sup> and HPLC-Quadrupole-Orbitrap-MS method. *J. Chromatogr. B* **970**: 108-120.

12. Zhou, S., Cao, J., Qiu, F., Kong, W., Yang, S. and Yang, M. (2013) Simultaneous determination of five bioactive components in Radix Glycyrrhizae by pressurized liquid extraction combined with UPLC-PDA and UPLC/ESI-QTOF-MS confirmation. *Phytochem. Anal.* **24**: 527-533.
13. Wang, W., Li, C. Y., Wen, X. D., Li, P. and Qi, L. W. (2009) Simultaneous determination of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: Application to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B* **877**: 671-699.
14. Parvu, M., Toiu, A., Vlase, L. and Parvu, E. A. (2010) Determination of some polyphenolic compounds from *Allium* species by HPLC-VU-MS. *Nat. Prod. Res.* **24**: 1318-1324.
15. 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.
16. 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.
17. Xiong, X., Jiang, J., Duan, J., Xie, Y., Wang, J. and Zhai, S. (2014) Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of naringin and its metabolite, naringenin in human plasma. *J. Chromatogr. Sci.* **52**: 654-660.
18. Liu, E. H., Zhao, P., Duan, L., Zheng, G. D., Guo, L., Yang, H. and Li, P. (2013) Simultaneous determination of six bioactive flavonoids in *Cirti Reticulatae Pericarpium* by rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **141**: 3977-3983.
19. Mitra, M., Nasrolah, G., Ebrahim, S., Alireza, G. and Mohammadreza, S. A. (2005) Main phenolic compound of petals of *Echium amoenum* Fisch. And C. A. Mey., a famous medicinal plant of Iran. *Daru* **13**: 65-69.
20. 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.
21. Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G. and Oreopoulou, V. (2007) Characterization of flavonoid subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* **12**: 593-606.
22. Li, P., Liu, M., Hu, J. and Su, W. (2014) Systematic chemical profiling of *Citrus grandis* 'Tomentosa' by ultra-fast liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **90**: 167-179.
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. Chromatogr.* **25**: 913-924.
24. Nitta, M., Kobayashi, H., Ohnishi-Kameyama, M., Nagamine, T. and Yoshida, M. (2006) Essential oil variation of cultivated and wild *Perilla* analyzed by GC/MS. *Biochem. Syst. Ecol.* **34**: 25-37.

(2016. 10. 10 접수; 2016. 12. 1 심사;  
2016. 12. 7 게재확정)