

HPLC-MS/MS에 의한 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin의 분석

유영범 · 김미정 · 황대선 · 하혜경 · 마진열 · 신현규*

한국한의학연구원 한약제제연구부

(2007. 5. 16. 접수. 2007. 8. 3. 승인)

Quantitative analysis of liquiritin and glycyrrhizin in glycyrrhizae radix by HPLC-MS/MS

Young-Beob Yu, Mi-Jung Kim, Dae-Sun Huang, Hye-Kyeong Ha,
Jin-Yeul Ma and Hyeun-Kyoo Shin*

*Dept. of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine,
Jeonmin-dong 461-24, Yuseong-gu, Daejeon, Korea*

(Received May 16, 2007; Accepted August 3, 2007)

요 약: 한약과 기능성식품으로 널리 활용되는 감초의 지표물질인 glycyrrhizin과 liquiritin을 HPLC-MS/MS 로 정성, 정량분석을 실시하였다. 두 가지 지표성분 모두 positive ion mode에서 검출이 가능하였고, precursor ion과 product ion을 조합한 multiple-reaction monitoring (MRM) mode에서 liquiritin은 m/z 436.2 → 257.0로 관찰되었고, glycyrrhizin은 m/z 823.4 → 453.4 로 각각 검지되었다. 감초 물 추출물을 분무건조기로 건조한 분말에서 glycyrrhizin의 경우 5.8%, liquiritin의 경우 2.3% 각각 함유되어 있었다. 회수율은 103-113%였고, 일간, 일내 정밀도 실험에서 상대표준편차는 0.95-1.8% 였다. 본 실험 조건에서 liquiritin 과 glycyrrhizin의 검출한계는 각각 0.4 ng/mL과 0.01 ng/mL 이었다.

Abstract: Licorice, Glycyrrhizae Radix is widely used as a herbal medicines and a dietary supplements in East Asia. We employed high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry to determine liquiritin and glycyrrhizin in the Glycyrrhizae Radix. Liquiritin and glycyrrhizin in Glycyrrhizae Radix were ionized by positive ion pneumatically assisted electrospray and detected by HPLC-MS/MS in the multiple-reaction monitoring (MRM) mode using precursor → product ion combinations at m/z 436.2 → 257.0 and 823.4 → 453.4, respectively. The assay had a calibration range from 10 to 3,000 ng/mL. The limits of detection (LOD) of the liquiritin and glycyrrhizin were 0.4 ng/mL and 0.01 ng/mL, respectively. The reproducibility and repeatability (relative standard deviation) at different analyte concentrations varied from 103 to 113 % and 0.95 to 1.8 %, respectively. According to the above results, HPLC-MS/MS method permits assignment of tentative structures such as liquiritin and glycyrrhizin in the Glycyrrhizae Radix.

Key words : Glycyrrhizae Radix, HPLC-MS/MS, liquiritin, glycyrrhizin

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-868-9464 Fax : +82-(0)42-868-9471

E-mail: hkshin@kiom.re.kr

1. 서 론

한약을 연구개발의 소재로 사용하기 위해서는 한약의 재배에 있어서 GAP (good agricultural practices)와 한약제제의 생산에 있어서 GMP (good manufacturing practices) 그리고 임상연구에서의 GCP (good clinical practices)를 이루는 일이 선행 과제이다. 한약제에 대한 표준화는 대한약전,¹ 대한약전의 한약(생약)규격집(제8개정),² 조선민주주의인민공화국 약전(제5판),³ 일본약국방해설서(제14개정),⁴ 중화인민공화국약전(2000년판1부)⁵ 등 각국 약전과 WHO monograph⁶에서 그 상세한 기준을 제시하고 있다. 그러나 새로운 분석기기의 개발과 분석방법의 발달로 천연물 복합물질의 표준화에 대한 새로운 기준제시가 절실하다. 더욱이 국내외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품의 개발이 관심의 대상이 되고 있으며 전통 한약제외의 허브류나 천연물 기능성식품의 수입이 증가하는 추세에 있으나 제품에 대한 품질평가 기술은 많이 개발되어 있지 못하고 있다.

한약의 표준화나 약리활성물질 분석의 유용한 도구가 되고 있는 HPLC (high performance liquid chromatography)는 UV/visible, RI (refractive index), fluorescence, electrochemical 등을 이용한 검지기의 발달로 천연물, 의약품, 단백질, DNA 등의 분리와 분석에 널리 사용되고 있다.⁷ HPLC를 이용한 분석법은 표준품과의 머무름시간(retention time) 비교라는 제한적 특성과 DAD (diode array detector)에서의 spectra 만이 유일한 화학적 정보이고, 분석물질의 표준품을 반드시 확보하고 있어야 하는 단점이 있다. 이러한 HPLC의 단점을 보완하기 위하여 최근 HPLC-MS의 사용이 증가되고 있다. 분석물질을 MS에 도입하기 위하여 전자이온화법(EI: electron impact ionization), 화학이온화법(CI: chemical ionization) 등이 사용되지만, 이는 강한 이온화 전위(ionization potential)로 당, 단백질 같은 천연물 분석에는 적합하지 않으며, 비휘발성 시료나 열에 불안정한 시료를 안정한 조건인 기체상으로 전환하여 MS에 도입하기 위하여 연성이온화법이 개발되었다.⁸ 연성이온화법 중 대기압이온화식(atmospheric pressure ionization) 인터페이스로 최근 널리 사용되고 있는 전기분무 이온화방법(ESI: electrospray ionization)은 2002년 노벨화학상 수상자인 Fenn에 의해 고안되었으며,⁹ HPLC에서 나오는 용출액을 액체방울 상태에서 다수의 전하를 갖는 이온을 생성시키므로써, 분자량 100이하의 극성화합물에서 100 kDa 이상의 단

백질 분자량 측정이 가능하고 펩토몰 ($<10^{-15}$)범위까지 검출이 가능하여 천연물, 의약품, 생체고분자의 분석, 약물동력학 등에서 사용이 증가되고 있다.¹⁰⁻¹² 최근 HPLC-DAD나 HPLC-MS를 활용한 천연물의 미량 다성분 동시 분석이 활발히 연구되고 있다.¹³⁻¹⁵

특히 본 연구에서는 기존의 생약의 지표물질 정량화와는 달리 한의원이나 한방병원의 탕액들의 표준화 연구에 중심을 두고 분석을 실시하였으며, 한약제 중 처방빈도 수가 높은 감초를 한의원에서 추출하는 것과 유사하게 물 추출물을 만들고 이를 건조 분말하여 liquiritin과 glycyrrhizin를 각각 지표물질로 선정하고 이를 HPLC-MS/MS로 동시 정성정량분석을 실시하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

실험에 사용한 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 신흥 제약(여수시, 한국)에서 구입하여 한국한의학연구원 한약제제연구부에서 동정한 후 실험에 사용하였다. 시료는 감초 100 g을 20배량의 정제수에 넣고 2시간 동안 100°C에서 무압력으로 추출(Cosmos 660, 경서기계 산업, 인천, 한국) 하였다. 이액을 여과하여 건조분무기(Eyela SD 1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 분말화하고 이를 냉장상태로 보관하면서 실험에 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

실험에 사용한 용매는 acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany), methanol (MeOH, Merck, Darmstadt, Germany), acetic acid (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)을 각각 사용하였으며, 그 외의 시약은 HPLC용 혹은 특급시약을 구입하여 사용하였다. 분석에 사용한 HPLC는 Degasser (G1379A degasser), Binary pump (G1312A BinPump), Auto Sampler (G1367A WPALS) 및 temperature controller (G1330B ALSTherm)로 각각 구성되어 있는 Agilent 1100Series (Agilent Technologies, CA, USA)를 사용하였다. 그리고 칼럼은 COSMOSIL 5C18-AR-II, 150×2.0 mm I.D. (Nacali Tesque Inc., Kyoto, Japan)을 사용하였다. 질량분석기로는 API 3000 MS/MS system (Applied Biosystem, CA, USA)을 사용하였다.

2.3. 표준용액의 제조

실험에 사용한 지표물질인 liquiritin 과 glycyrrhizin

은 Wako Chemical (Osaka, Japan)에서 구입하여 실험에 사용하였으며, 이를 70% methanol에 1 mg/mL로 녹인 후 10, 30, 100, 300, 1,000, 3,000 ng/mL의 농도로 희석하여 표준 검량선을 작성하였다.

2.4. HPLC-MS/MS 용 시료의 준비

실험 2.1의 방법에 따라 제조된 건조분말시료 5 mg에 70% methanol 50 mL을 첨가하여 섞은 후 30분간 초음파 추출하였다. 그리고 이를 0.45 µm syringe 여과기로 여과한 후 20 µL 씩 자동주입기로 주입하면서 실험에 사용하였다.

2.5. HPLC-MS/MS 분석조건 수립

HPLC는 Table 1의 방법에 따라 분석을 실시하였다. 역상 칼럼을 활용한 HPLC 분석조건은 1% acetic acid와 5% acetonitrile이 포함된 물을 A 용매로 하고, 0.1% acetic acid와 5% H₂O이 포함된 acetonitrile을 B 용매로 하였다. 분석시간 0분에서 3분까지 B 용매 20%로 용리하고, 3분에서 25분까지 linear gradient로 B 용매가 90%가 되도록 한 다음 30분까지 90%로 B 용매를 유지하면서 300 µL/min의 유속으로 분석을 실시하였다(Table 1). 전자분무 이온화법의 분석조건은 drying gas는 질소기체(99.999%)를 사용하였으며 이온화를 위한 turbospray 온도는 450°C이고, positive ion spray 전하는 5000 voltage, 충돌유발분해를 유도하는 충돌기체(collison gas, N₂ gas, 99.999%)의 압력은 7 psi, ion optics의 오염을 방지하기 위하여 사용하는 curtain gas는 12 psi의 압력으로, nebulizer gas는

15 psi로 각각 설정하였다. 전구이온(precursor ion)과 분해이온(product ion)을 조합한 MRM (multiple reaction monitoring) 분석을 위하여 direct syringe pump (Havard apparatus 11 plus, MA, USA)를 활용하여 10 µL/min 유속으로 표준품 용액을 주입하면서 declustering potential (DP), focusing potential (FP), collision energy (CE)과 collision cell exit potential (CXP)의 조건을 수립하였다(Table 2).

2.6. 정량법의 validation

Liquiritin과 glycyrrhizin 표준물질의 검량선으로 부터 직선성을 검토하였고, 각 표준물질을 100 ng/mL로 하여 3회 반복 주입하여 피크의 면적을 기초로 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀도를 검토하였다. 회수율을 측정하기 위하여 먼저 감초내의 지표물질 농도를 확인한 후 100, 300, 1000 ng/mL의 표준품 지표물질을 각각 시료에 첨가하여 2.5에서 수립된 분석 조건으로 분석을 실시하였다. 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량 한계(limit of quantitation, LOQ)를 다음과 같이 계산하였다. $LOD = (3.3 \times \sigma) / S$, $LOQ = (10 \times \sigma) / S$, S는 검량선의 기울기, σ 는 공시료를 분석한 표준편차를 나타낸다.

2.7. 함량 계산

각 농도별 표준액의 면적을 측정하여, X 축을 표준액의 농도로 Y 축을 피크의 면적으로 설정하여 검량선을 작성하였다. 추세선 및 수식을 설정한 후 검액의 면적을 수식에 대입하여 검액에 함유되어 있는 표

Table 1. Analytical conditions of marker substances

Flow rate	300 µL/min
Injection vol.	20.0 µL
Column Temp.	Room temperature
detector	Quadrupole MS/MS analyzer
Mobile Phase	0.1% acetic acid and 5% acetonitrile in water (A), 0.1% acetic acid and 5% H ₂ O in acetonitrile (B)
Analytical conditions	0 min (80:20, A:B), 3-25 min (10:90), 30 min (10:90), 30.01-35 min(80:20)

Table 2. Mass detection conditions of marker substances

Marker substances	Q1 mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Time (msec)	DP (V)	FP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
Glycyrrhizin	823.322	453.4	150	101	370	33	30
Liquiritin	436.079	257	150	46	210	19	14

A voltages (V) of declustering potential (DP), focusing potential (FP), collision energy (CE), and collision cell exit potential (CXP)

준품의 양을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 감초 지표성분의 HPLC-MS/MS 스펙트럼

감초를 물로 추출하고 건조분무기로 분말화한 것을 다양한 용매조건으로 HPLC 분석을 실시하여 Table 1 과 같이 최적의 분석조건을 수립하였다. 그리고 HPLC-MS/MS 분석을 실시하였으며 분자이온의 확인을 위하여 positive ion mode에서 Q1 scan을 실시하였다. Liquiritin의 경우 m/z 436.2 가 관찰되어 $[M+NH_4]^+$ 에 기인한 피크로 추정되었으며 이의 확인을 위하여 Na^+ 이온을 추가한 후 selected ion scan mode로 측정된 결과 $[M+Na]^+$ 피크가 증가되고, $[M+NH_4]^+$ 피크가 감소하는 경향을 나타내어 m/z 436.2는 liquiritin의 암모니움 adduct 이온으로 동정하였다.^{16,17} glycyrrhizin의 경우 m/z 823.4 $[M+H]^+$ 에서 분자이온 피크가 관측되었다. Liquiritin의 분해이온은 419.2 $[M+H]^+$ 에서 관찰되었고, liquiritin에서 당이 제거된 비당부인 liquiritigenin 에 기인한 피크가 m/z 257.0

$[M+H-glucose]^+$ 에서 각각 관측되었다. 또한 retro-Diels-Alder (RDA)반응으로 인한 flavonoid C ring의 C-C bond의 분절에 의해 발생하는 피크들이 m/z 119, m/z 136에서 각각 관측되었다. Glycyrrhizin의 fragment ion 피크 중 m/z 647.4 $[M+H-glucuronide]^+$ 는 1개 분자의 glucuronic acid가 탈리된 피크로 추정되며, m/z 471.2 $[M+H-2glucuronide]^+$ 에서 2개 분자 glucuronic acid가 탈리된 glycyrrhetic acid(비당부의 피크)가 관측되었고, m/z 453.4 $[M+H-2glucuronide-H_2O]^+$ 에서 aglycone에서 물분자가 탈리된 피크가 각각 관측되었다(Fig. 2, Fig. 3). 이와 같은 분석결과는 감초(Glycyrrhizae Radix)의 주성분인 glycyrrhizin과 liquiritin 등의 metabolite 분석을 위한 HPLC-MS/MS 연구결과를 참조하여 확인하였다.¹⁸ 이와 더불어 분자이온과 분해이온에 대한 최적의 multiple reaction monitoring (MRM) 조건을 수립하기 위하여 지표물질 을 10 μ L/min 연속주입기로 주입하면서 declustering potential (DP), focusing potential (FP), collision energy (CE)과 collision cell exit potential (CXP)의 조건을 수립하였다(Table 2).

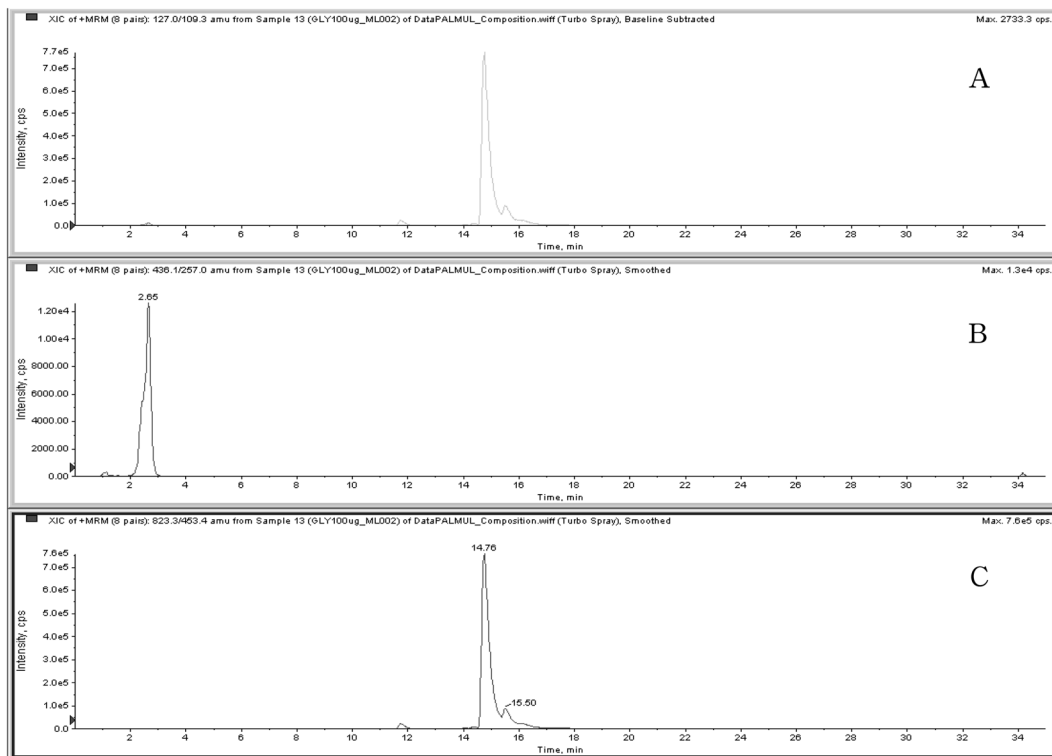


Fig. 1. Extract ion chromatograms of liquiritin (B) and glycyrrhizin (C) in Glycyrrhizae Radix (A) using MRM mode.

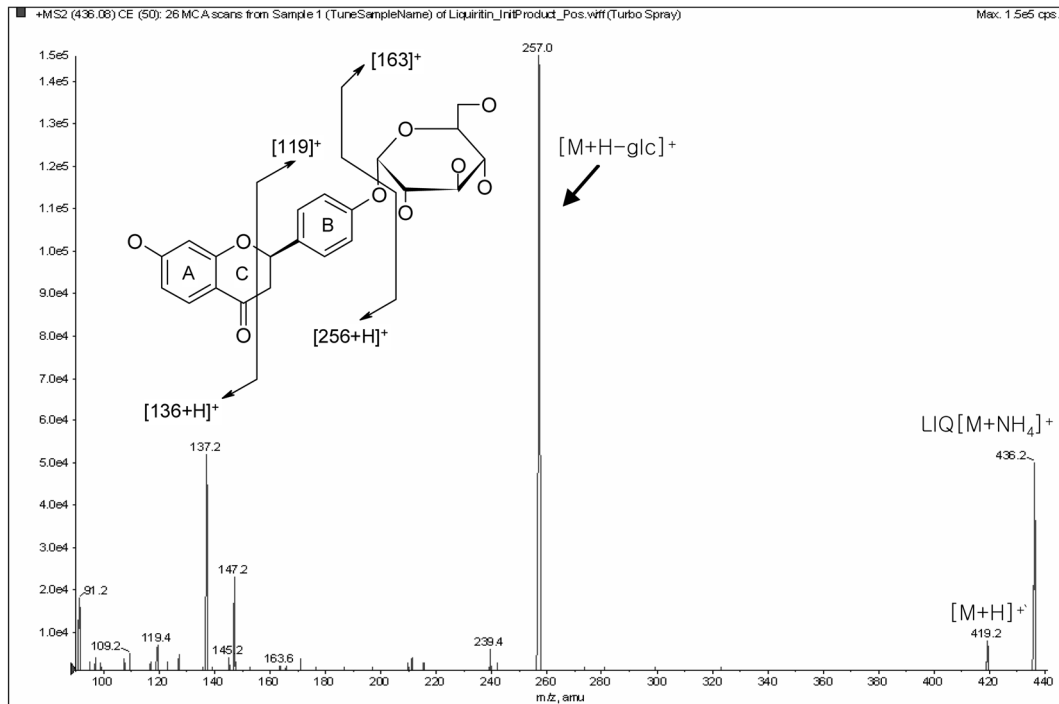


Fig. 2. MS-MS spectrum of liquiritin detected in Glycyrrhizae Radix.

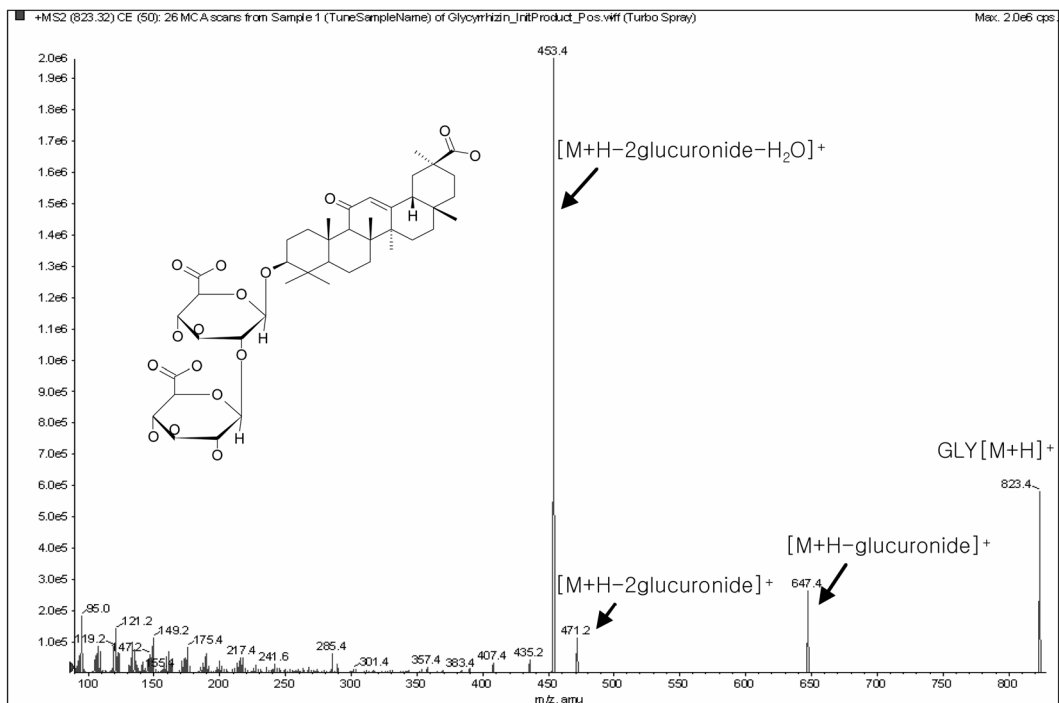


Fig. 3. MS-MS spectrum of glycyrrhizin detected in Glycyrrhizae Radix.

Table 3. Relative standard deviations of inter-day and intra-day for the marker substances

(n=3)

Marker substance	Concentration (ng/mL)	Peak area of marker substance		R.S.D(%)	
		Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day
Liquiritin	100	5040.00	4980.00	1.8	1.6
Glycyrrhizin	100	592000.00	586000.00	0.99	0.95

3.2. HPLC-MS/MS에 의한 감초의 지표성분 정량

분석의 신뢰를 확인하기 위하여 validation을 실시하였으며 liquiritin의 경우 0.4 ng/mL의 검출한계 값을 나타내었고, glycyrrhizin의 경우 0.01 ng/mL 검출한계 값을 나타내었다. 100 ng/mL의 농도로 한 각 표준액을 3회 측정하여 피크의 면적을 구하고 이로부터 구한 일내 정밀도의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)가 0.95에서 1.6%로 양호하였으며, 일내 정밀도를 측정 한 동일한 농도로 표준액을 1일 1회 3일간 반복측정하여 농도에 따른 피크의 면적을 구한 일간 정밀도의 상대표준편차가 0.99에서 1.8%로 양호하였다. 표준물질 첨가방법에 의한 회수를 측정에서도 상대표준편차가 0.7~3.0%로 좋은 재현성을 나타내었다. 지표성분들의 정성분석은 MRM에 의한 분자이온을 Q1 스캔에서 검지하고 그 product 이온을 Q3에서 스캔하였고, 이와 함께 표준물질의 머무름 시간과 비

교하여 확인하였다. 지표물질의 분석을 실시하여 좋은 분리능을 가진 크로마토그램을 얻었으며(Fig. 1), 표준품들의 검량선은 10~3,000 ng/mL 농도에서 좋은 직선성을 나타내었으며(Fig. 4, 5), 0.9925(glycyrrhizin)와 0.9978(liquiritin)의 상관계수를 나타내었다(Table 4). 그리고 감초의 지표물질인 liquiritin의 함량이 2.3%로 나타났으며, glycyrrhizin의 경우 5.8% 함유되어 있음을 알 수 있었다(Table 4).

한약이 의약품으로서의 기능을 수행하기 위한 최소 조건으로 유효성분, 혹은 지표성분의 함량에 대한 기준설정이 절실한 과제로 남아 있다. 이에 본 연구에서는 한약처방의 과학화의 일환으로 다빈도 처방 약 중 감초의 HPLC-MS/MS 분석을 실시하였다. 특히 본 연구에서는 한의원이나 한방병원에서 사용하는 탕전법에 따라 열수추출을 실시하고 분무건조기를 이용하여 분말화 한 후 분석을 실시하였다. 감초는 한의학 임상에서 사용하는 다빈도 약물로서, 식품의 원료로도 사

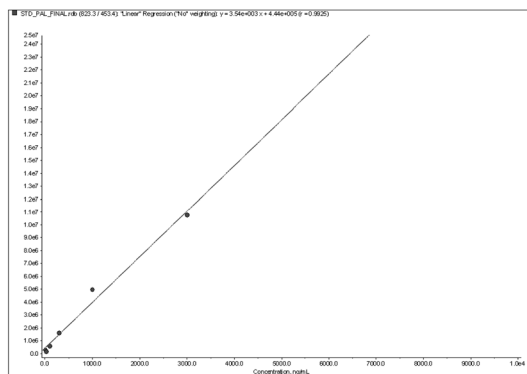


Fig. 4. Calibration curve of glycyrrhizin.

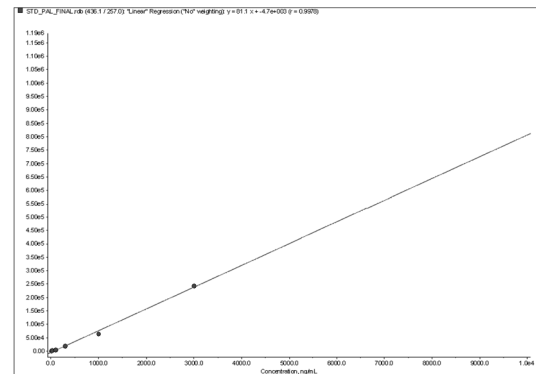


Fig. 5. Calibration curve of liquiritin.

Table 4. Intercept, slope and correlation coefficients of calibration graphs

(n=3)

Marker substances	Retention time (min)	Calibration Range (ng/mL)	Intercept	Slope	Correlation coefficient (R)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Content (%)
Liquiritin	2.65	10-3000	-4700	81.1	0.9978	0.4	1.23	2.3
Glycyrrhizin	14.76	10-3000	444000	3540	0.9925	0.01	0.03	5.8

Table 5. The analytical results of spiked samples by HPLC-MS/MS

Marker substances	Spiked amount (ng/mL)	Detected amount (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Glycyrrhizin	100	104.6±0.7	104.6±0.7	0.7
	300	322.3±5.0	107.4±1.6	1.6
	1000	1106.0±33.3	110.0±3.3	3.0
liquiritin	100	105.0±2.0	105.0±2.0	1.9
	300	309.6±5.0	103.2±1.7	1.6
	1000	1130.0±20.0	113.0±2.0	1.8

Mean values from 3 measurements.

용이 가능하여 그 활용이 광범위하다. 감초의 화학적 연구로는 triterpene glycosides¹⁹인 glycyrrhizin, glycyrrhetic acid와 flavonoids²⁰ 성분인 liquiritin, formononetin 등의 성분이 잘 알려져 있다. 약리활성에 관한 연구로는 glycyrrhizin의 부신피질호르몬 양작용²¹, isoliquiritigenin의 진경작용²² 등이 알려져 있다. HPLC를 활용한 지표성분분석에 관한 많은 연구가 수행되었고, 대한약전에서 HPLC 분석법을 고시하고 있으며 의약품으로 사용되는 감초에 대하여 glycyrrhizin의 함량이 2.0%이상 함유되어 있어야 한다고 규정하고 있다.¹ 천연물 분석에서 기존의 HPLC 분석법은 검출한계, 화학적 정보가 미약하여 새로운 분석법이 고려되고 있으며 본 연구에서도 HPLC-MS/MS를 활용하여 감초의 지표물질 분석을 실시하였고, 미량의 분석물질을 ng 수준에서 검지할 수 있었으며 분석조건도 양호하여, 향후 한의원이거나 한방병원의 탕액 표준화와 한약탕액을 활용한 동물실험 및 임상시험 시 한약탕액의 품질관리방법으로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

4. 결 론

감초 물 추출물 중 지표성분인 liquiritin과 glycyrrhizin을 HPLC-MS/MS에 의해 정성, 정량분석을 실시하였다.

1. HPLC-MS/MS에서 liquiritin의 fragment 이온들이 m/z 436.2 $[M+NH_4]^+$, 419.2 $[M+H]^+$, 257.0 $[M+H-glucose]^+$ 에서 각각 관찰되었으며, glycyrrhizin은 m/z 823.4 $[M+H]^+$, 647.4 $[M+H-glucuronide]^+$, 471.2 $[M+H-2glucuronide]^+$, 453.4 $[M+H-2glucuronide-H_2O]^+$ 에서 각각 관찰되었다. 그리고 precursor ion과 product ion을 측정하여 multiple reaction monitoring (MRM) 분석조건을 수립하였다.

2. 감초 물 추출물 지표물질의 함량분석을 실시하였으며, glycyrrhizin의 경우 5.8%로 높게 나타났으며, liquiritin의 함량이 2.3% 함유되어 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 한국한의학연구원 기관고유사업(K1S0070411)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청, '대한약전', 제8개정, 식품의약품안전청고시 제2002-15호, 서울, 대한민국, 2002.
2. 식품의약품안전청, '대한약전의한약(생약)규격집', 서울, 식품의약품안전청고시 제2004-17호, 대한민국, 2004.
3. 조선민주주의인민공화국 보건부 약전위원회, '조선민주주의인민공화국 약전', 제5판, 평양 의과학출판사, 평양, 조선인민민주주의공화국, 1996.
4. 일본약국방해설서 편집위원회, '일본약국방해설서', 제14개정, 광천서림, 동경, 일본, 2001.
5. 국가약전위원회, '중화인민공화국약전', 2000년판 1부, 화학공업출판사, 북경, 중화인민공화국, 2000.
6. WHO, 'WHO monographs on selected medicinal plants', 1-20, Geneva, Swiss, 1998.
7. B. A. Olsen, B. C. Castle, D. P. Myers, *Trend Anal. Chem.*, **25**, 796-805 (2006).
8. M. L. Gross and R. M. Caprioli, 'The encyclopedia of Mass Spectrometry', 1st ed., Vol. 6, 401, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2007.
9. J. F. Mora, G. J. Van Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J. B. and Fenn., *J. Mass. Spectrom.*

- 35(8), 939-952 (2000).
10. A. P. Bruins, *J. chromatogr. A*, **794**, 345-357 (1998).
 11. J. H., Park, *Pharmacon*, **21**, 30-38 (1991).
 12. M. Herderich, E. Richling, R. Roscher, C. Schneider, W. Schwab W, H. U. Humpf and P. Schreier, *Chromatographia*, **45**, 127-132 (1997).
 13. Y. B. Yu, Y. S. Yoon and G. H. Cho, *J. Korean Oriental Med.*, **25**, 45-54 (2004).
 14. Y. B. Yu, S. H. Kim and Y. S. Yoon, *J. Toxicol. Pub. Health*, **21**, 255-261 (2005).
 15. B. C. Liao, S. S. Hsiao, M. R. Lee, T. T. Jong and S. T. Chiang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1174-1178 (2007).
 16. B. FU, H. Li, X. Wang, F.S.C. Lee and S. Cui, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7408-7414 (2005).
 17. L. Li, S. Liang, F. Du and C. Li, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 778-782 (2007).
 18. Z. J. Lin, S. X. Qiu, A. Wufer and L. Shum, *J. Chromatogr. B*, **814**, 201-207 (2005).
 19. S. Shibata, K. Takahashi, S. Yano, M. Harada, H. Saito, Y. Tamura, A. Kumagai, K. Hirabayashi, M. Yamamoto and N. Nagata, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1910-1918 (1987).
 20. T. Nakanishi, A. Inada, K. Kambayashi and K. Yoneda, *Phytochemistry*, **24**, 339-341 (1985).
 21. R. Takeda, I. Miyamori, R. Soma, T. Matsubara and M. Ikeda, *J. Steroid Biochem.*, **27**, 845-849 (1987).
 22. Y. Sato, JX. He, H. Nagai, T. Tani and T. Akao, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 145-149, (2007).