

모세관 전기이동법에 의한 생약제제중 베르베린, 계피산 및 글리시리진의 동시 정량

姜成浩* · 鄭和珍[†] · 尹馨重[†] · 鄭斗洙

서울대학교 화학과

[†]한일약품 중앙연구소

(1996. 10. 29 접수)

Simultaneous Determination of Berberine, Cinnamic Acid and Glycyrrhizin in Pharmaceutical Formulations by Capillary Electrophoresis with Diode-Array Detection

Seong Ho Kang*, Wha Jin Chung[†], Hyung Jung Yoon[†], and Doo Soo Chung

Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

[†]Central Research Institute, Hanil Pharmaceutical Ind., Co., LTD, Seoul 133-112, Korea

(Received October 29, 1996)

요 약. 한국에서 전통적으로 사용되고 있는 생약제제 중 베르베린, 계피산 및 글리시리진의 정량을 위한 간단하고, 정확하고, 재현성 있는 모세관 전기이동법을 개발하였다. 이 성분들의 분리는 25 °C, 20 mM 인산완충액(pH 7.5)에서 실리카 캐필러리(57 cm × 75 μm i.d.)를 사용하여 수행하였다. 350 V/cm의 전기장으로 베르베린, 계피산 및 글리시리진의 동시 정량을 13분내에 할 수 있었다. 검정곡선은 베르베린에 대해서는 1~100 μg/mL, 계피산은 0.3~100 μg/mL, 글리시리진은 2.5~100 μg/mL의 농도 범위 안에서 좋은 직선성을 보여 주었다. 이 성분들에 대한 상대 표준편차(n=5)의 범위는 0.96~2.35%이었다. 베르베린, 계피산 및 글리시리진에 대한 검출한계(S/N=3)는 각각 0.5, 0.1 및 2.0 μg/mL이었다. 이론단수는 181,000(베르베린), 88,000(계피산) 및 169,000(글리시리진)이었다. HPLC에서는 3,100~4,800이었다.

ABSTRACT. A simple, accurate and reproducible capillary electrophoresis(CE) assay has been developed for the determination of berberine, cinnamic acid, and glycyrrhizin which are used in traditional Korean medicinal preparations. Separation of these compounds was performed in 20 mM phosphate buffer(pH 7.5) and acetonitrile (75:25, v/v) using a bare fused silica capillary(57 cm × 75 μm i.d.) at 25 °C. With the electric field of 350 V/cm, the time needed for the separation of berberine, cinnamic acid and glycyrrhizin was within 13 min. Calibration curves were linear for 1~100 μg/mL berberine, 0.3~100 μg/mL cinnamic acid and 2.5~100 μg/mL glycyrrhizin. The ranges of relative standard deviations(n=5) for those samples were between 0.96~2.35%. The limits of detection(S/N=3) for berberine, cinnamic acid and glycyrrhizin were 0.5, 0.1 and 2.0 μg/mL, respectively. The numbers of theoretical plates were 181,000(berberine), 88,000(cinnamic acid) and 169,000(glycyrrhizin), while they were 3,100~4,800 in HPLC.

서 론

최근 천연물에 대한 관심이 고조되면서, 제약 분야에서도 생약의 효과 및 안전성의 탁월성 등으로 인해 그 사용 빈도가 점차 증가되고 있는 추세이다. 황련, 계피 및 감초 등은 한국에서 빈번히 사용되는

대표적인 생약들 중의 일부이다.

황련은 黃連(*coptis japonica*) 또는 그 밖의 同屬植物(미나리아재비과)의 뿌리를 거의 제거한 근경으로 고미의 整腸健胃劑이고 한방에서는 정신불안에 쓰이며,¹ 승강부조로 인한 구토, 복통에 처방되는 황련

탕에 계피, 감초와 같이 쓰인다.² 계피는 녹나무과에 속하는 계피나무(*cinnamomum cassia*)의 수피 그대로 또는 주피를 제거한 것으로 방향성 전위, 교미, 계피 유 원료, 발한 해열, 구풍, 진통 효과를 갖고 있는 것으로 알려져 있으며,³ 감초는 유럽 감초(*glycyrrhiza glabra* var. *glandifera*) 또는 만주 감초(*glycyrrhiza uralensis*) 및 동속식물의 뿌리와 주근경을 그대로 또는 주피를 제거한 것으로 위궤양 치료 및 예방, 감미료, 진해거담, 교미 약의 용도로 사용된다.

이들을 포함한 대부분의 생약들은 여러 성분들로 구성되어 있으므로 이들의 주성분 중 하나를 선택하여 생약을 정량하는 방법을 택하고 있다. 베르베린, 계피산 및 글리시리진은 각각 황련, 계피 및 감초의 주성분으로서 Fig. 1과 같은 구조를 갖는다. 이 성분들에 대한 정량법으로는 현재까지는 HPLC(*high-performance liquid chromatography*)⁴⁻²⁴와 GC(*gas chromatography*)²⁵가 주로 사용되어 왔는데, 생약의 특성상 이들 성분을 동시에 정량하기는 매우 어려우며, 시료의 전처리, 칼럼의 효율, 분리시간의 지연 및 실험 결과의 재현성 등 많은 문제점을 갖고 있다. 따라서 이들 성분의 동시 정량을 하기 위해서는 보다 간편하고 효율적인 분석 방법이 요구되는데, 최근 몇 년간 눈부신 발전을 해온 모세관 전기이동법(*capillary electrophoresis*; CE)이 그 역할을 할 것으로 기대되어진다.²⁶⁻²⁸ GC는 분석 시료가 휘발성이여야 하는 제약이 있고, HPLC는 다른 계통의 시료를 동시에 분석하는데 분리시간이 많이 걸리며, 분리시간의 단축을 위해 기술기 용리를 사용할 때 실험 조건의 불안정 및 결과의 재현성 등에 문제점을 가지고 있다. 이에 비하여 CE는 HPLC에 비해 동시 정량이 가능할 뿐만 아니라 분석에 소요되는 시간이 작고, 월등한 분해능(이온 단수, $N \geq 10^5$)을 가지므로 여러 성분의 동시 정량이 가능하며, 훨씬 적은 양(1~10

nL)의 시료로 분석할 수 있는 장점이 있다.²⁹ 또한 모세관에서 시료를 직접 검출하며, 정량분석 및 자동화의 편이성 등으로 최근 급속도로 발전하고 있는 분리 기술이다.

개별적인 성분에 대해 CE를 이용한 정량은 1992년 Akada, Y. 등³⁰이 약학제제 중 베르베린을 정량한 이후 각각의 성분에 대한 연구가 현재까지 활발히 진행 중이다.³¹⁻³⁹ 하지만, 베르베린과 글리시리진은 alkaloids 계통이며 계피산은 유기산이므로 다른 계통의 성분을 동시 정량하는데 많은 어려움이 있다. 또한 이들을 CE를 사용하여 동시 정량한 예는 아직 국내·외에 발표되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 CE를 이용하여 황련, 계피 및 감초의 주성분인 베르베린, 계피산 및 글리시리진을 동시정량할 수 있는 간단하며, 빠르고, 재현성 있는 새로운 방법을 개발하였다. 아울러 HPLC 방법도 개발하여 CE와 비교를 하였다. 또한 실제 사용되고 있는 생약제제에 본 방법을 이용하여 정량을 시도하였다.

실 험

시 약. 황련, 계피 및 감초의 정량을 위해 사용된 *trans-cinnamic acid*($C_9H_8O_2$, FW: 148.16)는 Janssen Chimica(Belgium)사에서 구입하였으며, *glycyrrhizin*($C_{42}H_{62}O_{16}$, FW: 822.94)은 화광순약공업주식회사(일본)에서 *berberine*($C_{20}H_{18}NO_4Cl$, FW: 371.8)은 Sigma(USA)에서 구입하였다. CE의 전해질을 만들기 위해 사용된 인산이수소나트륨과 수산화나트륨은 분석시약급을 아세토니트릴은 HPLC등급을 정제 없이 그대로 사용하였다. 물은 NANOpure II 증류수 제조기(Barnsted, USA)를 이용하여 정제한 탈이온수를 사용하였다.

기기 및 장치. 시료의 분석에 사용한 CE는 Beckman사의 512-channel diode-array detector(DAD)를 장착한 P/ACE 5500 Capillary Electrophoresis System을 사용하였다. 모세관 전기이동시 사용한 컬럼은 $57\text{ cm} \times 75\ \mu\text{m i.d.}$ (유효 길이: 50 cm)의 fused silica capillary(Polymicro Technologies, USA)를 사용하였고, CE의 시스템 운영, 데이터 수집 및 분석을 위해 Beckman System Gold software(version 8.10)를 사용하였다. HP 8453 UV-Visible spectrophotometer(Hewlett Packard Co., USA)는 주성분의 스펙트럼을 얻기 위해 사용되었다. CE와 비교하기 위해 사용된

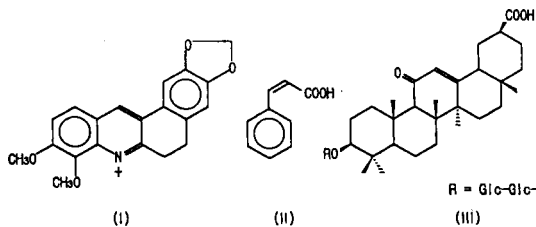


Fig. 1. Structural formulas of berberine (I), cinnamic acid (II) and glycyrrhizin (III).

HPLC는 Shimadzu LC-6A 펌프, Rheodyne 7125 20 μL loop injector, 자외선 검출기인 Shimadzu SPD-6A detector, 그리고 integrator인 C-R6A Chromatopac 등으로 구성된 system을 사용하였다. HPLC에서 사용된 컬럼은 LiChrospher RP-18(4 mm i.d. \times 12.5 cm, 5 μm , Merck, Germany)이었다.

표준용액과 시료용액의 조제. 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 표준품 베르베린, 계피산 및 글리시리진을 5% 아세트니트릴 수용액에 녹인 뒤 표준용액으로 하였다. 소아용 소화시럽으로 사용되는 C사의 유동액기스와 Y사의 생약액기스 0.3 g을 정취해 5% 아세트니트릴 수용액 100 mL에 녹인 뒤 0.45 μm 용매 여과지 (Puradisc 25 mm PP syringe filter, Whatman, UK)로 여과하여 CE의 시료용액으로 하였다. HPLC에서는 0.3~0.6 g의 시료를 정취해 5% 아세트니트릴 수용액 100 mL에 녹인 뒤, 0.45 μm 용매 여과지로 여과한 뒤 직접 시료용액으로 사용하거나, 물 100 mL에 녹인 뒤 동량의 에테르, 헥산, 클로로포름 및 디클로로메탄 등의 유기용매로 추출하여 여러 매트릭스를 제거한 뒤 필요한 액을 선별하여 농축하였다. 이 농축액에 일정량의 물을 가해 녹인 뒤 0.45 μm 용매 여과지로 여과하여 시료용액으로 사용하였다.

Capillary electrophoresis. CE의 최적 조건을 찾고자 전해질로는 20 mM 인산완충액(pH 7.5)과 아세트니트릴의 이성분계를 사용하여, 1 M NaOH로 pH를 조절하여 pH에 대한 영향을 조사하였고, 아세트니트릴의 비율을 15~30% 범위에서 변화시키면서 분리도 및 분리시간에 대한 영향을 조사하였다. 그 외 전압과 모세관의 길이 등에 대한 영향도 조사하였다. 분리는 25 $^{\circ}\text{C}$, UV 254 nm에서 시행하였고 DAD를 이용하여 먼저 각 피크의 UV 스펙트럼을 조사하여 표준시료에서 얻은 스펙트럼(Fig. 2)과 확인함으로써, 각 피크에 대한 각 성분을 재확인하였다. 또한 매 실험을 수행한 뒤 다음 분석을 위해 모세관의 조건을 최적화시키기 위해 물, 0.1 N NaOH 및 물 등의 순으로 6분 동안 캐필러리를 씻어 주었다.

Chromatography. 세 성분에 대한 동시 정량성을 CE와 비교하기 위해 HPLC를 수행하였다. LiChrospher RP-18 컬럼을 고정상으로 하고 물, 아세트니트릴 및 메탄올의 삼성분계를 이동상으로 하여 베르베린, 계피산 및 글리시리진을 동시정량할 수 있는 분석 조건을 조사하였다. 각 시료는 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서

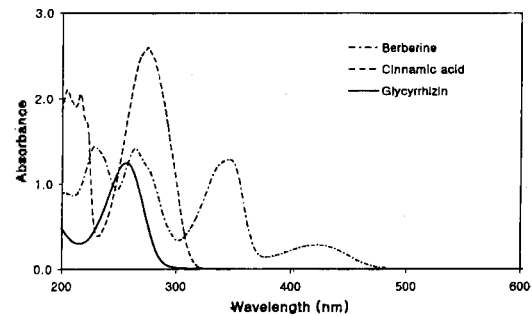


Fig. 2. UV/VIS spectra of berberine, cinnamic acid and glycyrrhizin dissolved in water and acetonitrile(95:5, v/v). Concentration; berberine and cinnamic acid(20 $\mu\text{g/mL}$), glycyrrhizin(100 $\mu\text{g/mL}$).

10 μL 을 주입하였으며, 흐름속도는 0.5~1.5 mL/min에서 조절하였다.

결과 및 고찰

CE의 최적화. 베르베린, 계피산 및 글리시리진을 동시 정량하기 위해 먼저 UV 스펙트럼을 조사하였다(Fig. 2). 스펙트럼에서 알 수 있듯이 280 nm 부근에서 베르베린과 계피산은 최대 흡수 파장을 나타내며, 글리시리진의 경우는 254 nm 부근에서 최대 흡수 파장을 나타내고 있다. 하지만 세 성분을 동시 정량하기 위해서는 280 nm보다 글리시리진의 흡수 세기가 상대적으로 큰 254 nm를 검출 파장으로 선택하였다. 모세관의 길이를 길게 하면 분리도는 증가되나 분리시간이 지연되며, 모세관의 양쪽에 걸어주는 전압을 증가시키면 분리시간은 단축되나 모세관 내의 전류의 증가로 결과의 재현성 및 안정성이 나빠진다. 따라서 분리도와 분리시간을 고려하여 최적 모세관의 길이와 전압을 57 cm, 20 kV로 결정하였다. 전해질에서 아세트니트릴의 비율이 증가함에 따라 분리도는 약간 증가되나 분리시간 또한 증가하기 때문에 분리도 및 분리시간을 고려하여 20 mM 인산완충액(pH 7.5)과 아세트니트릴의 비율을 75:25(v/v)로 선택하였다. Fig. 3은 본 CE 최적조건에서 33.3 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 세 성분의 표준용액에 대해 얻은 일렉트로그램을 수록한 것이다. 베르베린은 3.80분, 계피산은 11.66분 및 글리시리진은 12.19분의 이동시간을 나타내며, 세 성분 모두 13분내에 좋은 분리도를 가지며 분리할 수 있었다.

CE와 HPLC의 비교. CE와의 비교를 위해 베르

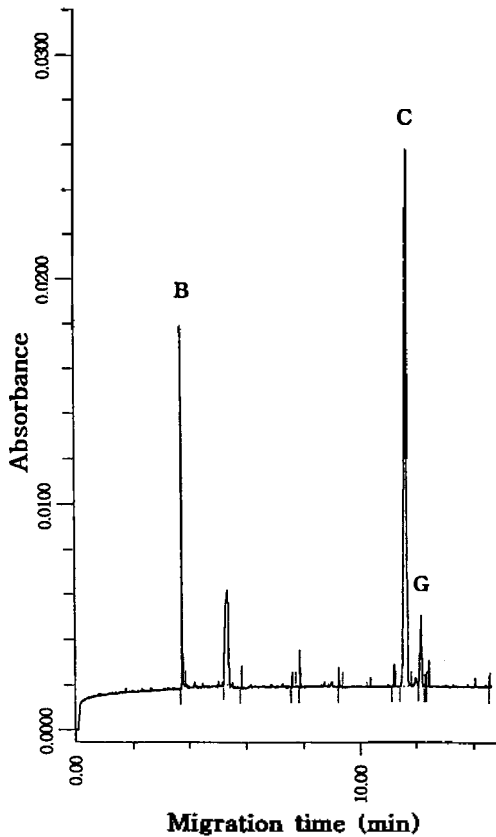


Fig. 3. Electropherogram obtained with standards containing berberine, cinnamic acid and glycyrrhizin. Concentration: 33.3 $\mu\text{g/mL}$. Condition: 57 cm \times 75 μm i.d. bared fused silica capillary, 20 kV, 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 sec hydrodynamic injection at 0.5 psi, detection at 254 nm. Peaks: B=berberine, C=cinnamic acid and G=glycyrrhizin.

베르베린, 계피산 및 감초 등 세성분을 동시 정량을 할 수 있는 HPLC 분리조건을 조사한 뒤, 본 HPLC의 분리조건에서 베르베린, 계피산 및 글리시리진의 표준용액과 시료용액에 대해 얻은 크로마토그램을 Fig. 4에 수록하였다. 표준용액과 시료용액에서 베르베린, 계피산 및 글리시리진의 머무름 시간이 각각 48.25분, 6.47분 및 28.50분을 나타냄을 알 수 있었다. 즉, 동시 정량의 경우 HPLC의 결과와 비교할 때, CE에서는 약 4배의 빠른 분리시간을 보여주었다. 또한 계피산의 경우 HPLC에서는 실제시료(Fig. 4B)에서 바탕선까지의 완전한 분리가 어려웠으며, 물의 비율을 증가시켜 이동상의 극성을 증가시킬 경우, 머무름 시간의 지연 및 피크의 넓어짐 현상으로

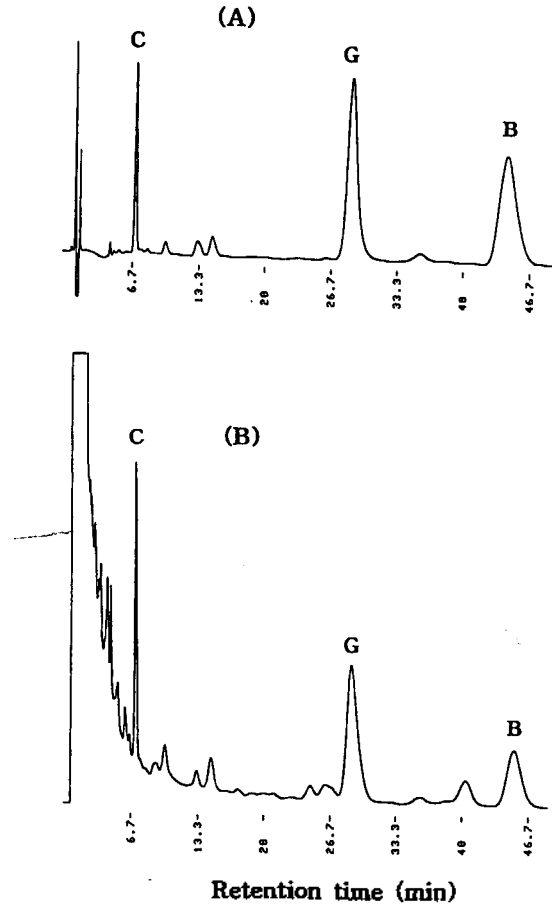


Fig. 4. Chromatogram obtained with standards containing standard berberine, cinnamic acid and glycyrrhizin (A) and chromatogram obtained with a pharmaceutical formulation (B). Amount injected: 10 μL . Column: Li-Chrospher RP18. Mobile phase: 20 mM sodium dihydrogenphosphate(pH 7.5 with 1 M NaOH) and acetonitrile (75:25, v/v). Detector: UV absorbance at 254 nm. Peaks: B=berberine, C=cinnamic acid and G=glycyrrhizin.

정량성 및 결과의 재현성에 많은 문제점이 있었다. 또한, HPLC와 CE의 분리조건에서 각 성분에 대한 이론단수(N)를 비교해 본 결과, HPLC의 경우, 베르베린, 계피산 및 글리시리진에 대해 각각 3,100, 4,800 및 3,400의 N값을 갖는 반면, CE의 경우에는, 이보다 18~58배 큰 값인 181,000, 88,000 및 169,000의 N값을 나타내며(Table 1), 완전한 분리가 가능하였다. 또한 어떠한 전처리 과정 없이도, 간단히 시료를 5% 아세토니트릴 수용액에 녹인 뒤, 직접 시료를 주입하여 분석할 수 있었다. 따라서 CE는 전

Table 1. Comparison of the numbers of theoretical plates (N) and separation time(MT^a, RT^b) in CE and HPLC

Compound	CE(N/MT ^a)	HPLC(N/RT ^b)
Berberine	(181,000/3.80)	(3,100/48.25)
Cinnamic acid	(88,000/11.60)	(4,800/6.47)
Glycyrrhizin	(169,000/12.19)	(3,400/28.5)

^aMT: Migration time(min), ^bRT: Retention time(min).

Table 2. Statistical results of calibration curves and limits of detection(S/N=3)

Compound	Limit of detection ^a ($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%) ^b	R ^c
Berberine	0.5	0.96	0.9999
Cinnamic acid	0.1	2.06	0.9996
Glycyrrhizin	2.0	2.35	0.9998

^aInjection: Pressure(0.5 psi) 5 sec, ^bRSD: Relative standard deviation(n=5), ^cR: Correction coefficient.

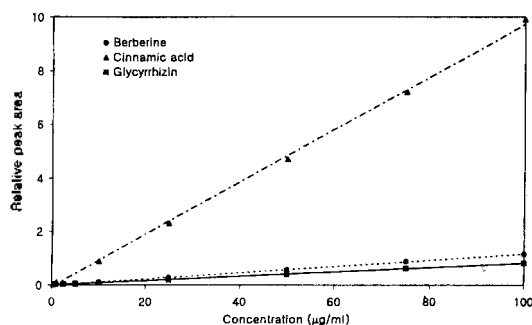


Fig. 5. Calibration curves of berberine($y=0.0115x-0.0038$, $r=0.9999$), cinnamic acid($y=0.0981x-0.0688$, $r=0.9996$) and glycyrrhizin($y=0.0081x+0.0025$, $r=0.9998$). y =linear regression equation, r =correlation coefficient.

처리 과정이 HPLC의 경우에 비해 매우 간단하였고, 세 성분의 동시 정량은 물론, 분리시간 또한 약 4배 이상 단축할 수 있었다.

재현성 및 직선성. 각 주성분의 피크 면적에 대한 재현성을 조사하고자, 앞에서 구한 CE 최적 분석 조건에서 세 성분의 표준용액(33.3 $\mu\text{g/mL}$)을 계속해서 5번 주입하였다. 베르베린, 계피산 및 글리시리진의 상대 표준편차(RSD)는 각각 0.96%, 2.06% 및 2.35%이었다. 또한 검량곡선에 대한 직선성을 구하기 위해 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 각 성분의 농도 대 피크면적 사이의 직선성 및 상관계수(r)를 구하였다(Table 2). 베르베린에 대해서는 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서, 계피산은 0.3~100 $\mu\text{g/mL}$, 그

Table 3. Contents of berberine, cinnamic acid and glycyrrhizin in pharmaceutical formulation by CE and HPLC (unit: $\mu\text{g/mL}$)

Compound	C Company	Y Company
Berberine	2.35(2.34 ^a)	2.35(2.35 ^a)
Cinnamic acid	0.67(0.65 ^a)	0.68(0.67 ^a)
Glycyrrhizin	2.11(2.10 ^a)	2.11(2.12 ^a)

^aResults in HPLC, n=3.

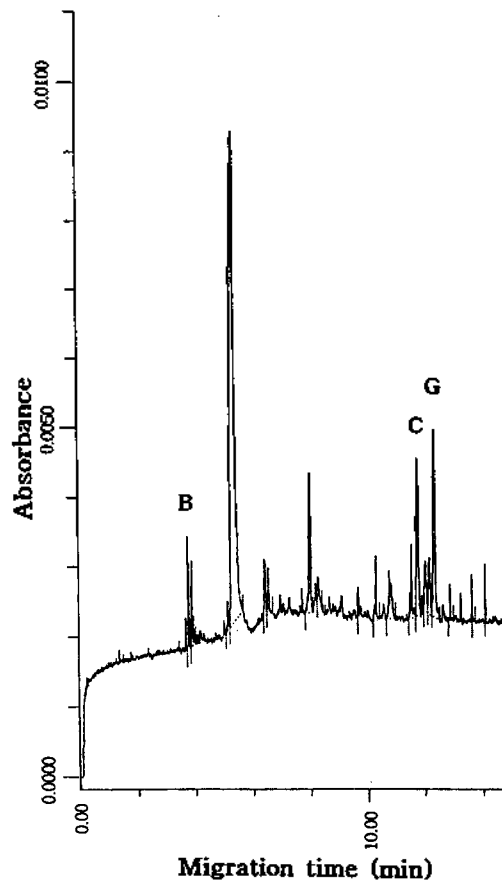


Fig. 6. Electropherogram of a pharmaceutical formulation. Condition: 57 cm \times 75 μm i.d. bare fused silica capillary, 20 kV, 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 sec hydrodynamic injection at 0.5 psi, detection at 254 nm. Peaks: B=berberine, C=cinnamic acid and G=glycyrrhizin.

리고 글리시리진은 2.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서 각각 $y=0.0115x-0.0038$, $y=0.0981x-0.0688$ 및 $y=0.0081x+0.0025$ 의 관계식을 나타내었다. 이때 각각에 대한 r 값은 모두 0.999 이상으로 아주 좋은 직선성을 나타내었다.

검출 한계. 베르베린, 계피산 및 글리시리진의 세 성분에 대한 검출한계를 조사하여 Table 2에 나타내었다. 표에서 보여주듯이 각 성분에 대한 검출한계(S/N=3)는 각각 0.5, 0.1 및 2.0 µg/mL이었다. 즉, 베르베린과 계피산에 대해서는 µg/mL(ppm) 이하의 농도까지도 검출할 수 있었다.

생약제제에의 응용. 본 연구에서 구한 CE 분석법을 이용하여 현재 소아용 소화시럽으로 시판되고 있는 C사와 Y사의 복합 생약제제 중 베르베린, 계피산 및 글리시리진을 정량하였다. 각 제제에 대해 분석한 결과, 각 성분의 함유량을 Table 3에 나타내었다. 각 성분의 함유량의 결과는 개개의 성분에 대해 HPLC로 정량한 결과와 잘 일치하였다. 또한 이때 얻은 일렉트로페로그램을 Fig. 6에 수록하였다. 그림에서 알 수 있듯이 주성분 외의 다른 성분들을 어떠한 전처리 과정을 통해 제거하지 않고도, 정량하고자 하는 베르베린, 계피산 및 글리시리진 등 세 성분 모두 13분내에 잘 분리됨을 알 수 있었다.

결 론

여러 성분들이 포함되어 있는 복합 생약제제 중 주성분에 대한 정량은 일반적으로 분석이 매우 어렵거나 시료의 전처리 과정 때문에 분석시간이 많이 소요된다. 본 연구에서는 모세관 전기이동법을 이용하여 생약제제 중 황련, 계피 및 감초의 주성분인 베르베린, 계피산 및 글리시리진을 10⁵ 이상의 이론 단수를 보이는 높은 효율로 세 성분을 동시에 어떠한 전처리 없이 13분내에 분리할 수 있었다. 이 방법의 정량성을 보기 위해 RSD(상대 표준 편차) 및 r(상관 계수)의 측정에서 2.35% 이하의 RSD와 r≥0.999의 좋은 직선성을 보여 주었다. 본 연구 결과는 날로 증가되고 있는 생약의 규격화 및 생약제제의 품질관리에 응용이 가능하리라 본다.

본 연구는 “1996년도 교육부 학술연구 조성비(BSRI-96-3418) 및 서울대학교 분자축매 연구센터”의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 자료 조사에 많은 도움을 주신 오동욱 연구원(한일약품)에게 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. 생약학연구회. 현대생약학; 개정판; 학창사; 한국,

1991; p 111.
 2. 김영훈; 신길구; 김재성; 배원식 동의보감; 남산당; 한국, 1986; p 360.
 3. 한약연구소위원회; 한약학; 대한약사회; 한국, 1986; p 147.
 4. Zhu, W. H.; Yu, R. Y. *Yaown Fenxi Zazhi*. 1994, 14, 47.
 5. Yan, D. H. *Yaown Fenxi Zazhi*. 1993, 13, 381.
 6. Andrisano, V.; Carvrini, V., Bonazzi, D. *Chromatographia*. 1993, 35, 167.
 7. Lu, G.; Liu, J. *Yaowu Fenxi Zazhi*. 1988, 8, 137.
 8. Sticher, O.; Soldati, F. *Pharm. Acta Helv (SWITZERLAND)*. 1978, 53, 46.
 9. Lin, S. J.; Tseng, H. H.; Wen, K. C.; Suen, T. T. *J. Chromatogr., A*. 1996, 730, 17.
 10. Cheng, X.; Chen, Y. Y.; Hu, Y. Z.; Yang, Q. H. *Sepu*. 1995, 13, 460.
 11. Yu, C.; Hong, Y. C.; Zhang, H.; Xu, X. R. *Sepu*. 1994, 12, 37.
 12. Wang, Y.; Zhao, L.; Lin, S.; Dong, S.; An, D. *Yaouxue Xuebao*. 1989, 24, 275.
 13. Lin, S.; Zhao, L.; Wang, Y.; Dong, S.; An, D. *Yaouxue Xuebao*. 1989, 24, 48.
 14. Zhao, L.; Cai, X.; Dong, S.; Lin, S.; An, D. *Zhongguo*. 1989, 20, 82.
 15. Zhao, Y.; Chen, Y.; Zhu, B.; Li, F.; Hao, L.; Li, X. *Yaouxue Xuebao*. 1988, 23, 938.
 16. Cremin, J. J.; Mcleod, K. R.; Harmon, D. L.; Goetsch, A. L.; Bourquin, L. D.; Fahey, G. J. *J. Anim. Sci. (UNITED STATES)*. 1995, 73, 1766.
 17. Amin, M. R.; Tomita, Y.; Onodera, R. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl. (NETHERLANDS)* 1995, 663, 201.
 18. Li, P.; Wang, X. Q.; Wang, H. Z.; Wu, Y. N. *Biomed. Environ. Sci. (UNITED STATES)* 1993, 6, 389.
 19. Meuwly, P.; Mettraux, J. P. *Anal. Biochem. (UNITED STATES)*. 1993, 214, 500.
 20. Bechet, I.; Ceccato, A.; Hubert, P.; Herme, P.; Crommen, J. *J. Pharm. Biomed. Anal. (ENGLAND)* 1992, 10, 995.
 21. Yuan, J.; Bucher, J. R.; Goehl, T. J.; Dieter, M. P.; James, C. W. *J. Anal. Toxicol. (UNITED STATES)* 1992, 16, 359.
 22. Scott, D. A.; Hammond, P. M.; Brearley, G. M.; Price, C. P. *J. Chromatogr. (NETHERLANDS)* 1992, 573, 309.
 23. Lurie, I. S.; Moore, J. M.; Cooper, D. A.; Kram, T. C. *J. Chromatogr. (NETHERLANDS)* 1987, 405,

- 273.
24. Nagels, L.; Van Dongen, W.; Parmentier, F. *Arch. Int. Physiol. Biochim. (BELGIUM)* **1979**, *87*, 585.
25. Marsh, M. V.; Caldwell, J.; Hutt, A. J.; Smith, R. L.; Horner, M. W.; Houghton, E.; Moss, M. S. *Biochem Pharmacol (ENGLAND)* **1982**, *31*, 3225.
26. Novotny, M.; Soini, H.; Stefansson, M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 646A.
27. Ward, T. J. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 633A.
28. Vespalec, R.; Bocek, P. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 755.
29. Kuhr, W. G.; Monnig, C. A. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 389R.
30. Akada, Y.; Ishi, N. *Bunseki Kagaku* **1992**, *41*, 349.
31. Chen, H. R.; Shen, S. J. *J. Chromatogr. A.* **1993**, *653*, 184.
32. Stuppner, H.; Ganzera, M. *J. Chromatogr. A.* **1995**, *717*, 271.
33. Li, K. L.; Sheu, S. J. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *313*, 113.
34. Sheu, S. L.; Lu, C. F. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1995**, *18*, 269.
35. Hsieh, F. Y. L.; Cai, J.; Henion, J. *J. Chromatogr. A.* **1994**, *679*, 206.
36. Henion, J. D.; Mordehai, A. V.; Cai, J. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2103.
37. Liu, Y. M.; Sheu, S. J. *J. Chromatogr.* **1993**, *634*, 329.
38. Liu, Y. M.; Sheu, S. J. *J. Chromatogr.* **1993**, *639*, 32.
39. Liu, Y. M.; Sheu, S. J. *J. Chromatogr.* **1992**, *623*, 196.