ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol.16, No.2, 125-133, 2003
Printed in the Republic of Korea

고체상 추출법과 LC/MS를 이용한 적포도주 중의 *trans*-Resveratrol 분석

박교범 · 문형실 · 이석근★
한국화학연구원 분석실
(2003. 2. 17. 접수, 2003. 3. 18 승인)

Quantitative Analysis of *trans*-Resveratrol in Red Wines by Solid Phase Extraction and LC/MS

Gyo-Beom Park, Hyoung-Sil Moon and Sueg-Geun Lee★
Chemical Analysis Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yusung, Taejeon 305-606, Korea
(Received Feb. 17, 2003, Accepted Mar. 18, 2003)

요 약 : 적포도주에 들어 있는 *trans*-resveratrol을 분석하기 위하여 본 연구에서는 Sep-Pak C_{18}-cartridges를 이용한 고체상 추출법의 전처리 및 LC/MS-ESI 방법과 LC/MS-APCI 방법을 사용하여 국내에서 시판되고 있는 포도주에서 *trans*-resveratrol의 함량을 비교 분석하였다. LC/MS-ESI 방법에 의한 *trans*-resveratrol 함량은 0.06-4.31 ㎍/mL로 검출되었고, 회수율은 88.4-97.9%, 상대 표준편차는 0.6-4.6%로 나타났으며, 검출한계는 0.001 ㎍/mL이었다. LC/MS-APCI방법의 경우 *trans*-resveratrol 함량은 0.09-4.02 ㎍/mL가 검출되었고, 검출한계는 0.005 ㎍/mL로 나타났다.

Abstract : In order to determine the contents of *trans*-resveratrol in red wine, which was mainly consumed in Korea, both LC/MS-ESI and LC/MS-APCI methods were used after solid-phase (Sep-Pak C_{18}-cartridges) extraction. The contents of *trans*-resveratrol obtained by LC/MS-ESI were detected in the range of 0.06-4.31 ㎍/mL. The recoveries were ranged from 88.4 to 97.9%. The values of relative standard deviation were ranged from 0.6 to 4.6% and the detection limit was 0.001 ㎍/L. The contents of *trans*-resveratrol obtained by LC/MS-APCI were detected in the range of 0.09-4.02 ㎍/mL and the detection limit was 0.005 ㎍/L.

Key words : *trans*-resveratrol, wine, LC/MS, LC/MS-APCI.

1. 서 론

식물에 들어있는 *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy stilbene)은 천연성분의 폴리페놀화합물로 식물이 화학적 스트레스를 받거나 UV조사 또는 병원균의 감염 등과 같이 외부의 자극으로부터 자신을 보호하기 위하여 자체적으로 합성[1]되는 것으로 소염제[2], 항산화제[3], 혈액응고 방지제[4], 항균제[5] 등의 다양한 생리활성의 효과가 있는 물질로 알려져 있다.

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)42-860-7710 Fax : +82+(0)42-860-7794
E-mail : leesg@pado.krict.re.kr

이 물질은 야채 및 과일류, 식물의 열매 등에 들어 있으며 특히 포도에 많이 함유되어 있다. 따라서 포도의 품종이나 재배조건 또는 포도주 제조시 발효 및 저장조건에 따라서도 trans-resveratrol의 함량이 차이가 나며 백포도주보다는 적포도주에 많이 함유되어 있다고 알려져 있다.[6]

포도주에서 *trans*-resveratrol을 분석하기 위한 방법으로 용매추출법[7]과 고체상추출법[8] 또는 직접주입법[9]등의 방법을 이용한 HPLC-UV 검출법이 주로 많이 사용되고 있다. Lamuela-Raventos[10] 등은 HPLC-UV 검출법을 사용하여 분석한 결과 미국산 적포도주에서 *trans*-resveratrol의 함량이 1 ㎍/mL 이하로 들어있다고 보고하였고, Ribeiro de Lima[11] 등은 포도주에서 0.5-3.0 ㎍/mL의 농도를 검출하였다고 보고하였다.

Revilla[12]는 HPLC-DAD (diode array detector)를 이용하여 여러 종류의 폴리페놀류를 한꺼번에 분리하여 검출하였으며, Zhu[13] 등은 HPLC-electrochemical 검출법으로 포도주나 포도쥬스에서 선택성과 감도를 증가 시켰다고 보고하였다.

이밖에 다른 분석방법으로 모세관 전기영동법 (CE)[14]과 초임계 유체크로마토그래피 (SFC)[15] 등이 있으며, 가스크로마토그래피 (GC)[16] 및 GC/MS[17] 등이 보고되었다. 그러나 GC의 경우 휘발성이 낮고 극성이 큰 물질이기 때문에 대부분 유도체화를 한 후 분석을 해야하는 번거로움이 있다. 이로 인하여 지금까지 가장 널리 사용되는 방법으로는 역상 HPLC에 의한 UV-absorbance[18], electro chemical[19], fluorescence[20] 검출기를 이용한 방법이다.

그러나 이런 방법들은 포도주의 많은 매질 때문에 분리능이 낮고, 미지성분을 확인하지 못하는 단점이 있으나 LC/MS를 이용하면 감도가 좋아 보다 낮은 농도까지도 검출할 수 있고 미지성분에 대한 확인을 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 Sep-Pak C_{18}-cartridges를 이용한 고체상추출법에 의한 LC/MS-전자분무 이온화 (ESI)[21]법과 LC/MS-대기압 화학이온화 (APCI)[22]법의 두 가지검출방식을 사용하여 국내에서 시판되고 있는 포도주를 대상으로 *trans*-resveratrol을 비교 분석하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 표준물질 *trans*-resveratrol (98%)은 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였고 고체상추출법의 전처리방법으로 사용한 Sep-Pak Plus C_{18}-cartridges는 Waters사 (Mildford, MA, USA) 제품이었고, 컨디셔닝하기 위하여 사용된 물은 Milli-Q 시스템 (Millipore, Bedford, USA)을 통과시킨 증류수를 사용하였다. 시료를 여과하기 위하여 0.45 ㎛ (Millipore) syringe filter를 사용하였으며 HPLC의 용매로 사용한 acetonitrile과 고체상추출법에 C_{18}-cartridges의 흡착물를 용출하기 위한 메탄올은 Berdick & Jackson사 (Muskegon, MI, USA), 에탄올 및 초산은 E. Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

사용한 기기는 HP-1100 Series liquid chromatograph /HP 1100 Series mass selective detector (Agilent Technologies, Palo, Alto, CA, USA)와 Photo-diodearray 검출기 (model 996, Agilent)를 사용하였으며 MS의 이온화 방식은 전자분무이온화 (electrospray ionization, ESI)법과 대기압 화학이온화(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)법을 이용한 역상 HPLC에 의하여 분석하였다.

HPLC 분석조건으로 컬럼은 Zorbax Eclipse XDB-C_{18} column (15 ㎝ × 4.6 ㎜ i.d., 3.5 ㎛)을 사용하였고 용매는 전자분무 이온화법의 양이온 모드와 대기압 화학이온화법에서 용매 A를 acetonitrile, 용매 B는 2.5% 초산을 사용하였고 전자분무이온화법의 음이온 모드는 용매 B에 50mM ammonium acetate를 사용하여 초기농도 20 (A) : 80 (B)%로 시작하여 25 min 후에는 50 (A) : 50 (B)%가 되도록 조절하였고 운반유량은 0.5 mL/min의 유속으로 하였다.

전자분무 이온화법의 분석조건은 drying gas로 질소 (99.999%)를 사용하여 10 L/min 의 유속으로 흘려주고, 이때 Drying gas 온도는 350 ℃이고 분사 압력은 40 psi 이었으며 capillary 및 fragmentor voltage는 4000 V 와 80 V로 하여 최적 조건을 정립하였다.

대기압 화학이온화법의 분석조건은 drying gas 유속을 4 L/min로 하고 drying gas 온도와 vaporizer 온도는 350 ℃, 그리고 분사 압력은 50 psi 이었다. Fragmentor voltage는 80 V, capillary voltage는 4000 V, corona current는 4 ㎂로 하여 특정이온을 선택하여 검출하는 selected ion monitroing (SIM)방법을 사용하였고 시료 주입방법은 autosampler를 이용하여 20 μL을 주입하여 분석하였다.

2.2. 표준용액의 제조

화합물의 표준용액의 제조는 위에서 구입한 순수한 표준품 즉 *trans*-resveratrol을 메탄올을 사용하여 1000 ㎍/㎖의 표준원액이 되도록 만들었다. 이 표준원액은 12% 에탄올용액을 사용하여 100 ㎍/mL의 표준용액으로 희석하여 사용하였으며 만든 표준용액은 -4℃ 이하의 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2.3. 시료

시료는 우리나라에서 많이 유통되고 있는 국내산 A, B, C와 외국산 D, E, F, G, H의 적포도주 8종을 시중에서 직접 구입하여 사용하였다.

2.4. 검정곡선의 작성

검정곡선을 작성하기 위한 표준 검정용액은 다음과 같이 만들어 사용하였다. 이미 만든 100 ㎍/mL의 표준용액을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 ㎍/mL의 농도 범위로 희석하여 만들고 2 mL vial에 각각 1 mL씩 넣어 뚜껑을 닫은 후 밀봉하였다.

검정곡선은 각 검정용액의 표준물에 대한 피크 면적과 농도와의 관계를 표시하는 표준검정곡선을 작성하였다. 즉, 각 화합물의 면적과 농도의 관계를 단순선형회귀 곡선으로 작성하였다.

2.5. 실험방법

본 연구에 사용된 포도주에는 매우 복잡한 매질과 여러 종류의 폴리페놀 화합물을 포함하고 있다. 따라서 LC/MS를 이용하여 분석하기 전 시료 속의 매질을 제거하거나 원하는 성분만을 추출하고자 고체상추출법을 사용하였다. Cartridges의 특성상 역상 Sep-Pak C_{18}-cartridges는 사용하기 전에 컨디셔닝을 하여서 사용하였다.

즉 먼저 Sep-Pak C_{18}-cartridges에 4 mL의 메탄올용액을 흘려주고 다시 4 mL의 물을 흘려 씻어준 후 여기에 5 mL의 포도주를 5 mL/min의 유속으로 흘려주어 흡착시켰다. 흡착된 Sep-Pak C_{18}-cartridges는 용출하기 전 물을 제거하기 위하여 아스피레이터를 이용하여 진공을 10분 정도 걸어주어 수분을 제거한 후 3 mL의 메탄올 용액을 흘려주어 분석성분을 용출 하였다. 용출한 용액은 HPLC에 주입하기 전 0.45 ㎛ syringe filter를 사용하여 여과한 후 20 μL를 주입하여 분석하였다.

2.6. 회수율 측정

회수율을 측정하기 위하여 먼저 포도주의 농도를 구한 다음 *trans*-resveratrol의 농도가 1.0 ㎍/mL가 되도록 5 mL의 포도주에 100 ㎍/mL 농도의 표준용액을 50 μL를 첨가한 후 앞의 시료와 같은 방법으로 활성화시킨 Sep-Pak C_{18}-cartridges에 시료용액을 통과시켜 흡착시킨 후 아스피레이터를 이용하여 남아있는 수분을 제거하였다.

다음에 3 mL의 methanol 용액으로 용출 한 후 LC/MS로 분석하여 크로마토그램의 피크를 측정한 후 면적을 구하여 앞에서 작성한 표준검정곡선으로부터 농도를 구하여 회수율을 계산하였다. 위의 과정을 5번을 반복하여 회수율과 표준편차를 계산하여 정확도와 정밀도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

농도 별로 만든 표준물질을 LC/MS의 전자분무 이온화법과 대기압 화학이온화법으로 *trans*-resveratrol을 분석하여 얻어진 상관 관계식과 상관계수는 *Table* 1에 나타내었다. *Table* 1에서와 같이 표준용액의 농도범위에서 R^2값이 전자분무 이온화법의 양이온 모드 (LC/MS-Positive-ESI)는 0.9973이고 음이온 모드 (LC/MS-Negative-ESI)는 0.9999이었으며 대기압 화학이온화 (LC/MS-APCI)법은

Table 1. Simple linear regression of standard calibration for the *trans*-resveratrol

Methods	Concentration range (㎍/mL)	Regression eqn.	Correlation coefficient (r)
LC/MS-Pos.-ESI	0.01 ~ 10	y = 281432 x - 4193.9	0.9973
LC/MS-Neg.-ESI	0.01 ~ 10	y = 212546 x - 994	0.9999
LC/MS-APCI	0.01 ~ 10	y = 95309 x + 9237.3	0.9978

Table 2. The analytical results of spiked samples by LC/MS-Positive-ESI

Samples	*trans*-resveratrol (㎍/mL)				
	Incurred	Spiked amount (㎍/mL)	Fortified	Recovery (%)	RSD (%)
A	1.56±0.06	1.0	2.35±0.04	91.8	1.7
B	0.96±0.03	1.0	1.77±0.07	90.3	3.9
C	0.07±0.01	1.0	0.97±0.02	90.7	2.1
D	0.30±0.00	1.0	1.15±0.01	88.5	0.9
E	1.24±0.05	1.0	2.08±0.07	92.9	3.4
F	2.36±0.01	1.0	3.12±0.06	92.9	1.9
G	4.16±0.03	1.0	4.98±0.04	96.5	0.8
H	1.63±0.03	1.0	2.53±0.21	96.2	8.3

[a] Mean value from 5 measurements

0.9978을 나타냄에 따라 직선성이 매우 좋고 분석방법이 적합함을 알 수 있었다.

3.2. 회수율 측정

회수율 측정은 표준물질 첨가방법에 의하여, 시료를 먼저 분석하여 시료의 농도를 얻은 다음 알고있는 농도의 표준물질을 첨가하여 시료와 같은 방법으로 추출하여 포도주의 정확한 *trans*-resveratrol의 함량을 측정한 후 전자분무이온화 방법의 양이온 모드에서 회수율을 얻었으며, 측정결과는 *Table* 2에 나타내었다.

상대 표준편차 (relative standard deviation, RSD)는 0.8-8.3%로 나타나 재현성이 좋았다.

검출한계는 전자분무 이온화법의 양이온 모드와 대기압 화학이온화법이 0.005 ㎍/mL로 같았으며 전자분무 이온화법의 음이온 모드가 0.001 ㎍/mL로 가장 낮았다.

3.3. 실제시료의 분석

고체상추출법을 이용한 포도주의 추출물은 전자분무 이온화법의 양이온 모드와 음이온 모드 및 대기압 화학 이온화법에 의한 검출방법으로 비교 분석하였다. 먼저 역상 HPLC조건에 의한 전자분무 이온화법의 양이온 모드에서 이온화 효율을 좋게 하기 위하여 이동상에 첨가하는 휘발성 ion-pairing 시약으로 1% trifluoroacetic acid를 사용하였을 때 $[M+H]^+$ 형태로 protonation되는 효율이 좋지 않아 피크의 감도가 낮았으며 용매를 2.5% acetic acid로 바꾸어 사용하였을 때 더 낮은 농도까지 검출할 수 있었다.

이때 이동상의 조성이 용매 A를 acetonitrile을 사용하고 용매 B는 2.5% acetic acid를 사용했으며 초기 용매비가 A : B = 70 : 30으로 물 보다 유기용매의 비가 많게 하였을 때는 *trans*-resveratrol의 머무름 시간이 6 min 이내로 빠르게 검출되었지만 포도주내의 모든 성분이 한꺼번에 용리 되어 분리능이 상대적으로 좋지 않았다. 따라서 초기 이동상의 비율을 유기용매 보다 물의 양을 많게 하기 위해서 A : B = 20 : 80의 비율로 시작하여 25분 후에는 A : B = 50 : 50으로 되도록 gradient로 분석하였을 때 분리능이 훨씬 더 좋았다.

전자분무 이온화법의 양이온 모드의 전형적인 특징은 protonation되어 $[M+H]^+$ 형태로 base peak가 나타나므로 분자량이 228인 *trans*-resveratrol의 구조에 붙어있는 수산화기(-OH)에서 protonation되어 m/z=229의 $[M+H]^+$가 검출되었다. 따라서 정량은 selected ion monitoring (SIM) 방법으로 m/z=229 $[M+H]^+$의 이온을 선택하여 분석하였으며 이때 사용된 표준물질의 이온크로마토그램은 *Fig*. 1이며 시료의 이온크로마토그램은 *Fig*. 2에 각각 보여주었다. 시료의 이온크로마토그램인 *Fig*. 2에서 보는 바와 같이 본 연구에서 정립한 분석조건에서 분리가 잘 되었으며 *trans*-resveratrol의 함량은 *Table* 2에 보여주었고 전자분무 이온화법의 양이온 모드 분석결과 시료 C의 경우 0.07 ㎍/mL로 매우 적은 양이 들어 있는 것과 시료 G의 4.16 ㎍/mL로 많은 양이 들어 있음을 알 수 있었다.

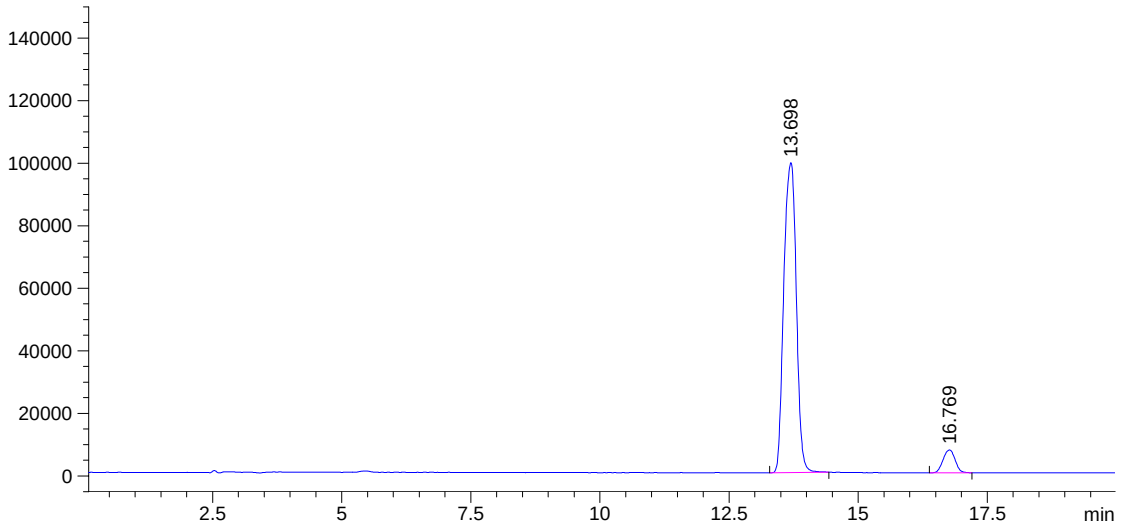

Fig. 1. Total ion chromatogram (TIC) of standard obtained by LC/MS-ESI positive ion mode.

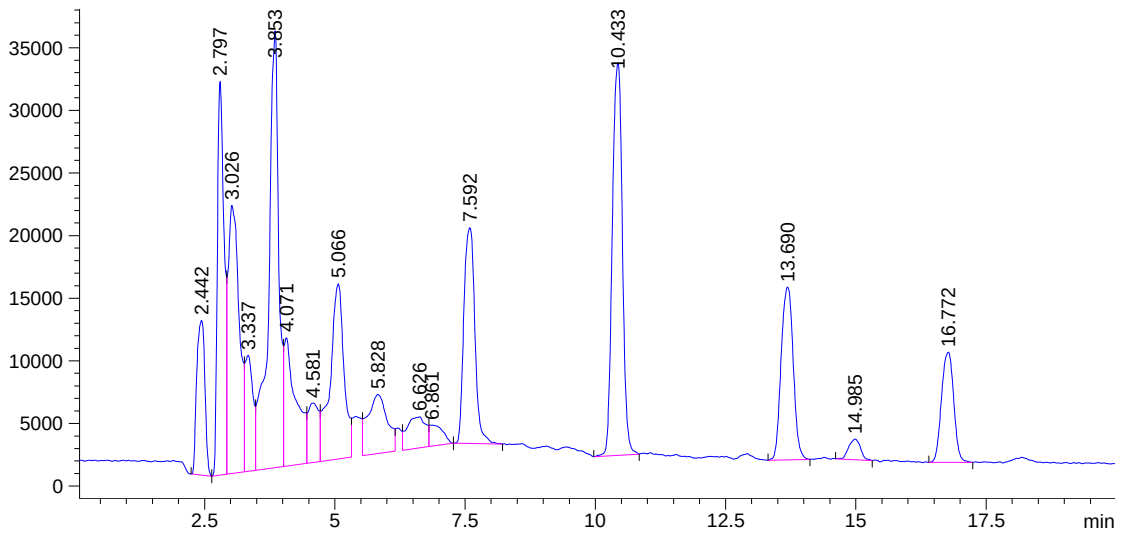

Fig. 2. Total ion chromatogram (TIC) of sample G obtained by LC/MS-ESI positive ion mode.

전자분무 이온화법의 음이온모드를 사용할 때는 일반적으로 $[M-H]^-$가 base peak로 나타난다. 따라서 *trans*-resveratrol의 구조에 붙어있는 수산화기 (-OH)에서 deprotonation되어 m/z=227 $[M-H]^-$의 이온이 검출되었다. 이때 이온화 효율을 좋게 하기 위하여 즉 deprotonation이 잘 되게 하기 위하여 이동상의 pH를 base로 선택하였다. 이때 0.5% ammonium hydroxide를 사용하였을 때 deprotonation의 효율이 높아 감도는 좋았지만 이동상의 pH가 높아져 머무름 시간이 5 min 이내로 빠르게 용리되어 나와 분리능이 좋지 않았다. 그러나 ammonium hydroxide대신 50 mM ammonium acetate를 넣어 이동상의 pH을 약간 낮게 하여 머무름 시간을 길게 하였을때 이온화 효율은 약간 떨어졌으나 분리능이 훨씬 더 좋았다.

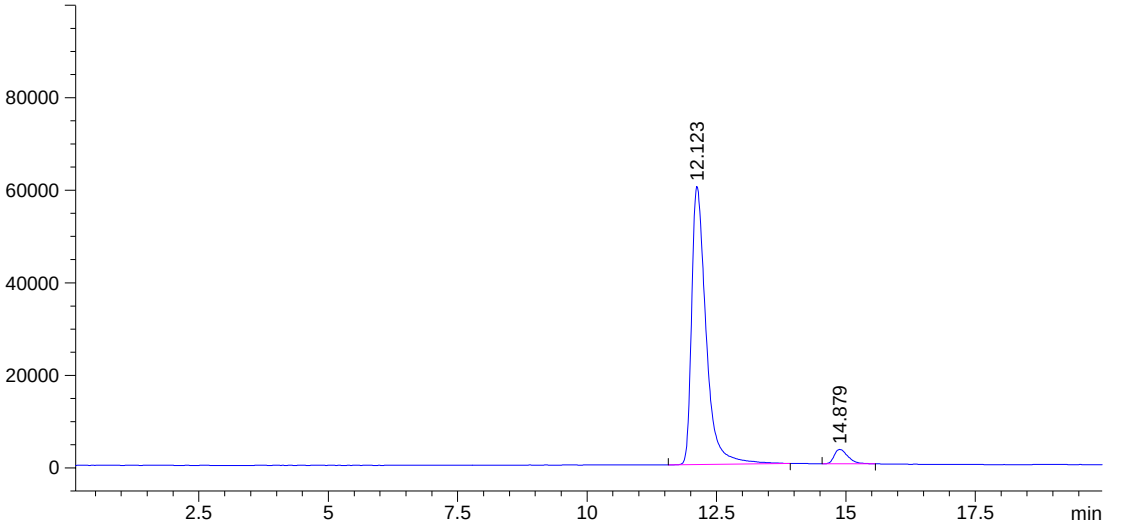

Fig. 3. Total ion chromatogram (TIC) of standard obtained by LC/MS-ESI negative ion mode.

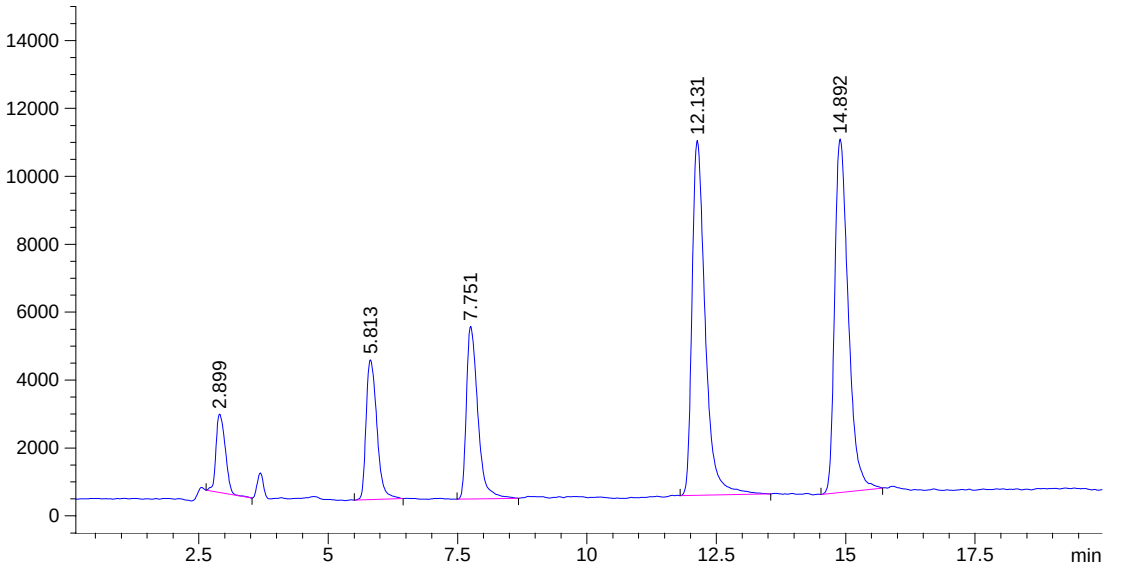

Fig. 4. Total ion chromatogram(TIC) of sample G obtained by LC/MS-ESI negative ion mode.

따라서 전자분무 이온화법의 음이온 모드에서 HPLC의 이동상 조건은 용매 A를 acetonitrile를 사용하고 용매 B는 50 mM ammonium acetate를 사용하여 초기용매의 비가 A : B = 20 : 80의 비율로 시작하여 30분 후 에는 A : B = 50 : 50으로 되도록 조절하였고 정량이온은 m/z=227 $[M-H]^-$을 선택하여 얻은 표준물질의 이온크로마토그램은 *Fig*. 3이며 시료의 이온크로마토그램은 *Fig*. 4 에 각각 보여주었다.

전자분무 이온화법의 음이온 모드에서 검출결과는 *Table* 3에 나타낸바와 같이 대부분의 함량은 전자분무 이온화법의 양이온 모드일 때와 거의 비슷한 결과를 얻었다. 다만 전자분무 이온화법의 양이온 모드의 검출한계가 0.005 ㎍/mL이었고 음이온 모드에서는 0.001 ㎍/mL로 나타나 음이온 모드가 더 감도가 좋았으며 검출

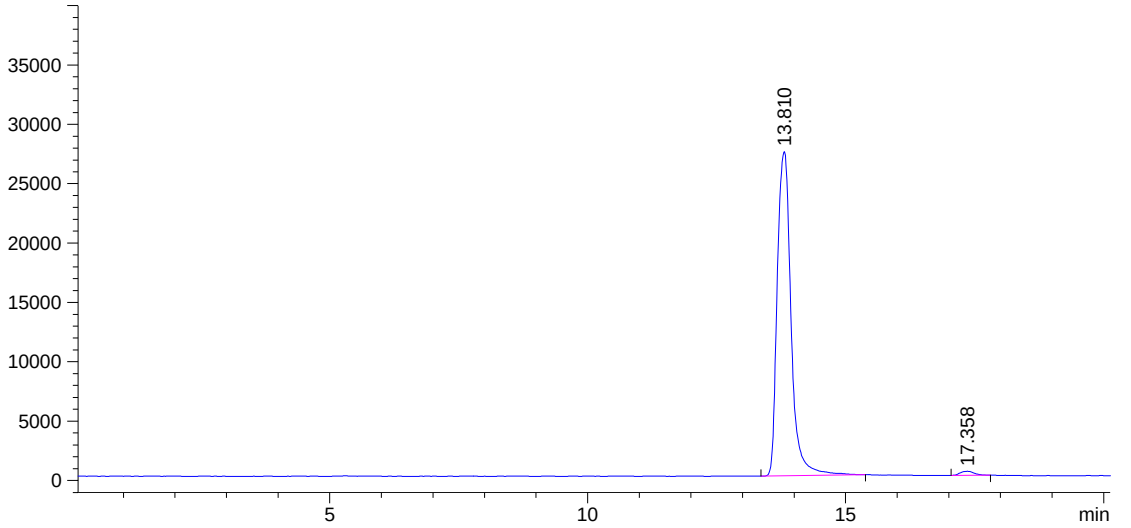

Fig. 5. Total ion chromatogram (TIC) of standard obtained by LC/MS-APCI.

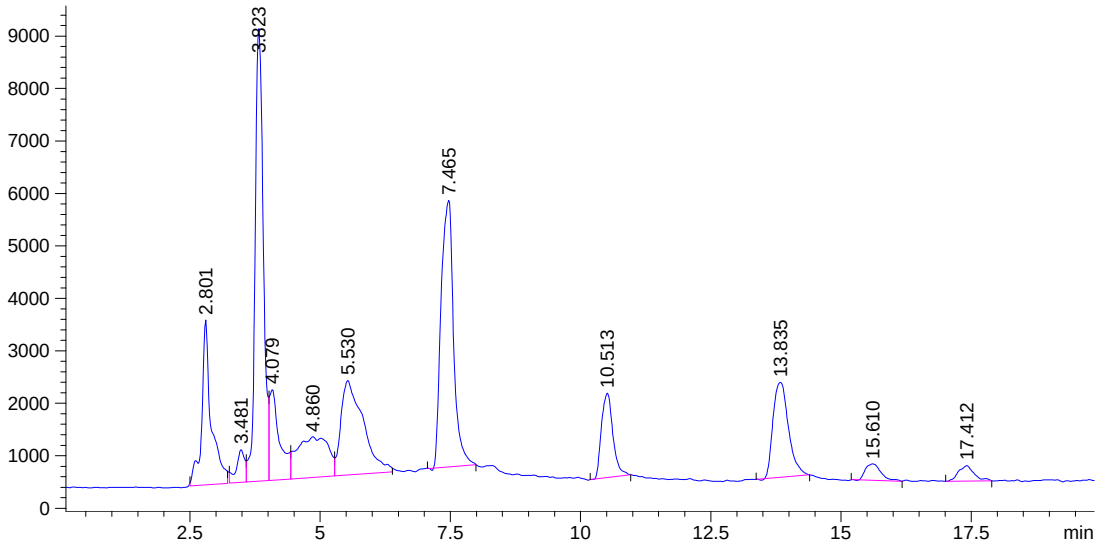

Fig. 6. Total ion chromatogram (TIC) of sample G obtained by LC/MS-APCI.

한계는 5배 이상 낮았다. 즉 *trans*-resveratrol이 가지고 있는 수산화기 (-OH)는 2.5% acetic acid의 이동상에 의해 이온화 될 때 protonation되어 m/z=229 $[M+H]^+$가 생성되는 것 보다 50 mM ammonium acetate용매를 사용하였을 때 deprotonation되어 m/z=227 $[M-H]^-$의 형태로 이온화가 잘 일어난다는 것을 알 수 있었다.

대기압 화학이온화법에서는 HPLC의 이동상의 조건은 전자분무 이온화법의 양이온 모드 조건과 같게 하였고 정량시 선택이온은 m/z=229 $[M+H]^+$을 선택하였으며, 이때 사용된 표준물질의 이온크로마토그램은 *Fig*. 5이며 시료의 이온크로마토그램은 *Fig*. 6이다. 분석결과는 *Table* 3이며 표에서 나타낸 바와 같이 앞서 분석한 전자분무 이온화법의 양이온 모드와 음이온 모드의 결과와 비교하였을 때 8개 시료의 값이 거의 비

Table 3. Concentration (μg/mL) of *trans*-resveratrol in red wines

Samples	Mean[a]±S.D.		
	LC/MS-Pos.-ESI	LC/MS-Neg.-ESI	LC/MS-APCI
A	1.56±0.06	1.69±0.12	1.71±0.15
B	0.96±0.03	0.89±0.05	1.15±0.08
C	0.07±0.01	0.06±0.01	0.09±0.01
D	0.30±0.00	0.31±0.01	0.43±0.01
E	1.24±0.05	1.09±0.02	1.15±0.03
F	2.36±0.01	2.43±0.08	2.18±0.06
G	4.16±0.03	4.31±0.08	4.02±0.07
H	1.63±0.03	1.76±0.08	1.60±0.03

[a] Mean value from 5 measurements

슷한 결과를 얻었고 검출한계는 0.005 μg/mL로 전자분무 이온화법의 양이온 모드와 같은 값을 얻었다.

4. 결 론

적포도주에서 *trans*-resveratrol을 분석하기 위한 LC/MS의 사용은 유도체화를 하지 않고 추출물을 직접 주입하여 분석할 수 있는 장점이 있으며 감도가 좋고 직선성이 뛰어나 매우 유용한 분석방법이었다.

시료의 전처리 방법으로 Sep-Pak C_{18}-cartridges를 사용한 고체상 추출법이 85.3 - 97.9%의 높은 회수율을 나타내었고 전자분무 이온화법과 대기압 화학이온화방법을 비교 분석한 결과 대부분의 이온화 방법에서 거의 비슷한 결과를 얻었으며 그중 검출한계가 가장 낮은 것은 전자분무 이온화의 음이온 모드를 사용할 때였다.

참고 문헌

1. P. Langcake and R. J. Pryce, *Phytochem.*, **16**, 1193 (1976).
2. E. Middleton and C. Kandaswami, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1167(1992).
3. C. T. Ho, Q. Chen, H. Shi, K. Q. Zang and R. T. Rosen, *Prev. Med.*, **21**, 520(1992).
4. S. Kallithraka, I. Arvanitoyannis, A. El-Zajouli and P. Kefalas, *Food Chem.*, **75**, 355(2001).
5. E. Celotti, R. Ferrarini, R. Zironi and S. L. Conte, *J. Chromatogr.*, **730**, 47(1996).
6. D. M. Golberg, A. Karumanchiri, E. Ng, J. Yan, E. P. Diamendis and G. J. Soleas, *J. Agric. Food Chem.,* **43**, 1245(1995).
7. F. Mattivi and Z. Lebensm, *Unters.-Forsch*, **196**, 522(1993).
8. C. Chilla, D. A. Guillen, C. G. Barroso and J. A. Perez-Bustamante, *J. Chromatogr.*, **750**, 209(1996).
9. D. M. Golberg, A. Karumanchiri, E. Ng, J. Yan, E. P. Diamendis and G. J. Soleas, *J. Chromatogr.*, **708**, 89(1995).
10. R. M. Lamuela-Raventos and A. L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.,* **41**, 521(1993).
11. M. T. Ribeiro de Lima, P. Waffo-Teguo, P. L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J. C. Cabanis and J. M. Merillon, *J. Anal. Chem.,* **47**, 2666 (1999).
12. E. Revilla and J. M. Ryan, *J. Chromatogr.*, **881**, 461(2000).

13. Y. X. Zhu, L. A. Coury, H. Long, C. B. Kissinger and P. T. Kissinger, *J. Liquid Chromatogra. and Related Technolo.,* **23**, 1555(2000).
14. X. Gu, Q. Chu, M. Dwyer and M. Zeece, *J. Chromatogr*., **881**, 471(2000).
15. M. T. Tena, A. Rios and M. Valcarcel, *Fresenius. J. Anal. Chem.,* **361**, 143(1998).
16. A. Antonelli, C. Fabbri and G. Lercker, *Chromato,* **42**, 469(1996).
17. D. M. Golberg, A. Karumanchiri, E. Ng, J. Yan, E. P. Diamendis and G. J. Soleas, *J. Anal. Chem.,* **66**, 3959(1994).
18. R. M. Lamuela-Raventos, A. I. Romero-Perez and A. L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.,* **43**, 281 (1995).
19. K. D. McMurtrey, J. Minn, K. Pobanz and T. P. Schultz, *J. Agric. Food Chem.,* **42**, 2077(1994).
20. R. Pezet, V. Pont and P. Cuenat, *J. Chromatogr*., **663**, 191(1994).
21. G. Stecher, C. W. Huck, G. K. Bonn and M. Popp, *Fresenius. J. Anal. Chem.,* **371**, 73(2001).
22. Y. Wang, F. Catana, Y. Yang, R. Roderick, and R. B. van Breemen, *J. Agric. Food Chem.,* **50**, 431 (2002).