

RP-HPLC-PAD를 이용한 葛根과 葛根 함유 처방의 Puerarin과 Daidzin 분석

초진영¹, 권하정¹, 정지선¹, 이제현^{2*}, 홍선표^{1*}

1: 경희대학교 한약학과 천연물 실험실, 2: 동국대학교 한의과대학 한의학과 본초학교실

Determination Method of Puerarin and Daidzin from Puerariae Radix by Reversed-Phase HPLC with Pulsed Amperometric Detection

Chen-Ying Chiao¹, Ha-Jeong Kwon¹, Ji-Seon Jeong¹,
Je-Hyun Lee^{2*}, Seon-Pyo Hong^{1*}

1: Dept. of Oriental Pharmaceutical Sciences, Kyung Hee University
1: Korean Medicine Research Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : This study presents a reversed-phase high-performance liquid chromatography- pulsed amperometric detection (RP-HPLC-PAD) method for the determination of puerarin and daidzin in Puerariae Radix extract and Chinese medicinal preparations.

Methods : Chromatographic separation was performed using a 10% acetonitrile with a reversed-phase column (Unison UK-C18, 100 mm×2.0 mm I.D.; 3 μm). The analyses were detected by pulsed amperometric detector (PAD) in alkaline conditions by combining with post-column NaOH solution. Geniposide was used as an internal standard.

Results : The limit of detection (S/N = 3) and the limit of quantification (S/N = 10) were 0.025 ng, 0.075 ng for puerarin, and 0.05 ng, 0.15 ng for daidzin, respectively. The intra- and inter-day precisions (RSDs) were less than 6.5% and average recoveries of puerarin were 99.7-101.3% and those of daidzin were 101.0-102.8%.

Conclusions : According to above results, we developed a determination method for puerarin and daidzin in Puerariae Radix with high sensitivity and selectivity.

Key words : Reversed-phase high-performance liquid chromatography; Pulsed amperometric detection, Puerariae Radix, Puerarin, Daidzin, Chinese medicinal preparations

* 교신저자 : 홍선표, 서울시 동대문구 회기동 경희대학교 약학대학 한약학과 천연물 실험실

· Tel : 02-961-0942 · E-mail : seonhongg@nate.com

† 공동교신저자 : 이제현, 경북 경주시 석장동 동국대학교 한의과대학 한의학과 본초학교실

· Tel : 054-770-2835 · E-mail : leejh1@dongguk.edu

· 접수 : 2008년 11월 30일 · 수정 : 2008년 12월 16일 · 채택 : 2008년 12월 22일

서론

갈근(葛根)은 콩과(Leguminosae)에 속한 다년생 덩굴성 초본인 칩(*Pueraria lobata*)의 뿌리로 해기퇴열(解肌退熱) 생진(生津) 투진(透疹) 승양지사(升陽止瀉)의 효능으로 한방임상에 널리 사용하는 한약재이다¹⁾.

갈근의 성분으로는 isoflavone에 속하는 puerarin, daidzin, daidzein, genistein, genistin, formonetin, coumesterol, 4'-7-dihydroxyisoflavone, 7-xyloside puerain, 3'-hydroxypuerain, 3'-methoxypuerain 등을 함유하고 있으며, 이외에 β -sitosrol, lupeol, lupenone, allantoin 등을 함유하고 있다.^{1,2)} 그 중에서 puerarin과 daidzin은 glucoside 배당체 phytoestrogen으로 주목을 받고 있으며³⁻⁵⁾, puerarin은 심근 보호 작용⁶⁾, 저밀도콜레스테롤 감소작용⁷⁾, 관상동맥의 개선 작용²⁾, 혈당강하작용⁸⁾이 보고되었으며, daidzin은 항비만⁹⁾, 항암¹⁰⁾, 조골세포 증식 촉진¹¹⁾ 등이 보고되었다. 특히 우리나라는 《대한약전》에 갈근의 한약재 규격으로 puerarin의 함량이 2.0%이상 함유한 것으로 규정하여 관리하고 있다¹²⁾.

일반적으로 갈근에 함유된 puerarin과 daidzin의 분석은 주로 자외선검출기를 이용한 HPLC-UV 방법을 사용하고 있다^{13,14)}. 그러나 UV 검출법은 발색단을 가진 물질들을 모두 검출하기 때문에 puerarin과 daidzin뿐만 아니라 배당체, 비배당체 등 발색단을 가진 물질들이 검출됨으로써 오히려 방해 peak으로 작용하여 분석에 지장을 초래하며, 또 분석법이 복잡하거나 장시간이 소요되는 단점이 있다¹³⁾. HPLC-MS의 분석방법은 가장 감도가 좋으나, 장비와 그 유지 비용의 단점이 있다^{15,16)}. 펄스식 전기화학검출기(Pulsed amperometric detector, PAD)는 전기화학적 검출기의 일종으로 금전극에서 탄수화물의 산화에 의해 발생하는 전류를 측정하는 것으로 pico-mol 농도 단위 까지 검출할 수 있다. 펄스식 전기화학검출기는 고성능 음이온교환칼럼(HPAEC)을 이용하여 당을 분석 측정하나 배당체의 경우 음이온교환칼럼에서 당과 배당체를 분리하기 어려운 단점이 있다^{17,18)}. 이에 본 연구팀은 역상 칼럼과 PAD를 조합하여 배당체를 효과적으로 분석할 수 있는 방법을 연구하였으며¹⁹⁾, 이 방법을 이용하여 갈근과 갈근이 포함된 처방에서 puerarin과 daidzin의 분석을 실험하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

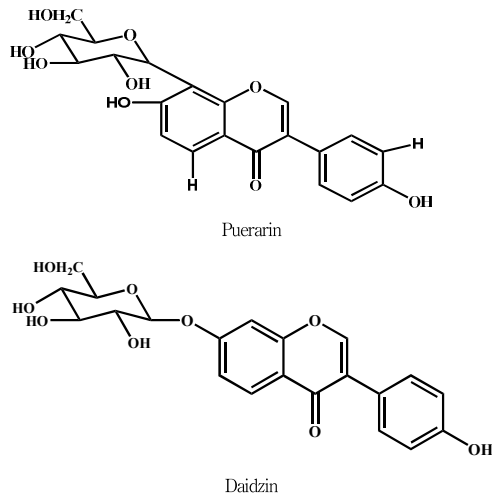


Fig. 1. Chemical structures of puerarin and daidzin

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

갈근은 강원도 정선에서 채취한 것을 사용하였다. 갈근을 함유하는 처방은 갈근탕(葛根湯)과 갈근황금황련탕(葛根黃芩黃連湯)의 처방조성에 따라 제조하였다²⁰⁾. 그 구성약재와 양은 Table 1과 같다. 갈근 함유 처방의 제조에 사용한 약재는 전라북도 임실에서 생산된 것을 사용하였으며, 황금은 전라남도 여수에서 생산된 것을 사용하였다. 황련, 감초, 마황은 중국에서 수입한 것을 사용하였으며, 계지는 베트남산 사용하였다. 사용한 약재는 《대한약전》과 《대한약전의한약규격집》의 성상을 기준으로 관능검사를 실시하여 적합한 것을 실험에 사용하였다.

Table 1. Compositions of Prescription Including Puerariae Radix

Gal-geun-tang		Galgeun-huanggeum-huanglian-tang	
Crude Drugs	Weights (g)	Crude Drugs	Weights (g)
Puerariae Radix	0.9	Puerariae Radix	1.6
Cinnamomi Ramulus	0.6	Coptidis Rhizoma	0.6
Ephedrae Herba	0.6	Scutellariae Radix	0.4
Paeoniae Radix	0.6	Glycyrrhizae Radix	0.4
Glycyrrhizae Radix	0.6		

2) 시약 및 기기

Puerarin과 daidzin의 표준품과 내부표준물질로 사

용한 geniposide는 Wako Co.(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 acetonitrile (Thermo Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA)은 HPLC grade를 사용하였으며, 기타 시약과 용매는 특급시약을 사용하였다.

HPLC 분석에 사용한 기기는 Reverse phase-HPLC-PAD 방법으로 한약재 분석에 일반적으로 사용하는 역상 칼럼의 HPLC 방식에 따라 배당체를 분리한 뒤, 당의 분리 분석에 사용하는 HPAEC-PAD 방법을 결합하는 방식으로 분석하였다(Fig 2). 사용한 기기는 SHISHEIDO NANOSPACE SI-2 HPLC system (Shisheido, Tokyo, Japan)으로, 칼럼은 UK-C18 GOLD (100 mm×2.0 mm I.D.; 3 µm, Imtakt Co., Japan), 검출기는 펄스식 전기화학검출기로 금전극과 Ag/AgCl 참조전극이 포함된 ICS-3000 series Dionex (Sunnyvale, CA)를 사용하였으며, Dionex (Sunnyvale, CA)의 Chromeleon client program을 사용하였다.

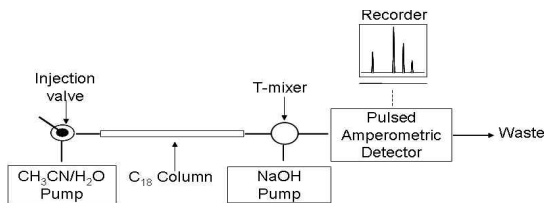


Fig. 2. Schematic diagram of reversed-phase HPLC-PAD system

2. 방법

1) 표준품

표준품으로 사용한 puerarin과 daidzin을 각각 정밀하게 1 mg으로 측정하여 증류수에 녹여 각각 1 mg/mL의 표준액을 제조하였다. 이 표준액을 2.5, 5, 10, 25, 50 µg/mL의 농도로 희석하여 농도별 표준액을 조제하였다. 각 농도별 표준액은 내부표준물질인 geniposide를 20 µg/mL 함유하도록 조제하여 HPLC로 분석하였다. 분석한 chromatogram은 각 peak면적과 internal standard와의 비율을 측정하여 검량선을 작성하였다.

2) HPLC 분석

HPLC의 분석은 Table 2의 방법에 따라 실험하였다. HPLC 분석조건은 puerarin과 daidzin, 내부표준물질인 geniposide가 동시에 분리되는 조건으로 정확도와 재현성 검증을 위하여 LOD (limits of detection),

LOQ (limits of quantitation), recovery test, 일간 및 일중 변화를 측정하였다.

Table 2. The HPLC Conditions for Analysis of Puerarin and Daidzin

System	Nanospace SI-2 series pump, oven (Shiseido, Japan)
Column	ICS-3000 series Dionex (Sunnyvale, CA) UK-C18 GOLD (100 mm×2.0 mm I.D.; 3 µm, Imtakt Co., Japan)
Mobile Phase	Pre-column eluent : 10% ACN Post-column eluent : 200 mM NaOH
Flow rate	Pre-column eluent : 0.2 mL/min Post-column eluent : 0.8 mL/min
Temperature	30°C
Injection volume	10 µL
Detection	Pulsed amperometric detector
Potential waveform	E1 = -0.2 V; E2 = 0 V; E3 = +0.22 V; E4 = 0 V; E5 = -2 V; E6 = +0.6 V.

3) 검액의 제조

갈근 20 g을 정확히 취한 후, 증류수 1000 mL를 가하여 2시간 환류 추출한 후 여과하였다. 여액은 감압 농축 후 동결건조하였다. 동결건조한 갈근 추출물 10 mg을 정밀하게 측정 후 증류수에 녹여 10 mg/mL로 만들고, 이 액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 이를 0.20 µm membrane filter (Advantec Inc., Tokyo, Japan)로 여과한 후 100 µL을 취하고 내부표준물질인 geniposide를 20 µg을 첨가한 후 증류수를 넣어 총 1 mL로 제조하여 HPLC로 분석하였다. 갈근을 함유하는 방제인 갈근탕과 갈근황금황련탕도 갈근과 같은 방법으로 검액을 제조하여 분석하였다. 갈근, 갈근탕 및 갈근황금황련탕의 수득률은 각각 30.6%, 17.7%, 22.9%로 나타났다.

4) 함량 계산

각 농도별 표준액의 면적과 내부표준물질인 geniposide의 면적을 나누어 x축을 표준액의 농도로, y축을 표준액과 geniposide의 피크 면적 비율로 검량선을 작성하였다. 추세선 및 수식을 설정 한 후 수식에 대입하여 검액의 함량으로 계산하였다.

결 과

1. HPLC 분석 조건

RP-HPLC-PAD 방법은 검출기에 들어가는 이동상 중의 유기용매 양이 늘어날수록 감도가 감소하는

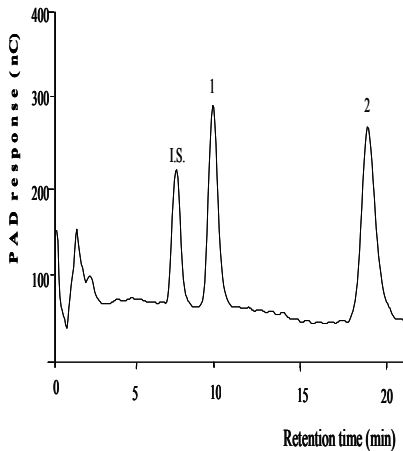


Fig. 3. RP-HPLC-PAD chromatogram of standard
Peak 1: puerarin, Peak 2: daidzin, I.S.: geniposide.

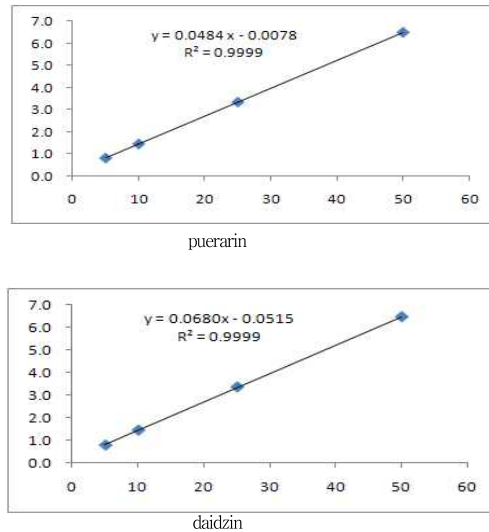


Fig. 4. Calibration curve of puerarin and daidzin

Table 3. Investigated Linear Range, Linear Equation, Corellation Coefficient, Limits of Detection (LOD) and Limits of Quantitation (LOQ) for Puerarin and Daidzin.

Analyte	Linear range	Linear equation	r^2	PAD		UV	
				LOD(ng)	LOQ(ng)	LOD(ng)	LOQ(ng)
Puerarin	0.025-50	$y=0.0484x-0.0078$	0.9999	0.025	0.075	0.0621	0.2070
Daidzin	0.050-50	$y=0.0680x-0.0515$	0.9999	0.050	0.150	0.0558	0.1860

양상을 나타내어 칼럼의 내경을 줄임으로써 유기 용매의 사용량을 줄이고 감도를 유지하였다¹⁹⁾. HPLC 분석조건에서 puerarin과 daidzin 및 내부표준물질인 geniposide는 20분 내에 분리되었다.(Fig. 3)

2. 검량선

위와 같이 최적의 HPLC 분석조건을 바탕으로 puerarin과 daidzin를 측정하여 정량곡선을 확인하고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 각 puerarin과 daidzin은 정량한계(limits of quantification, LOQ)에 해당하는 농도부터 2.5, 5, 10, 25, 50 mg/L에 해당하도록 조제한 후 각 농도별로 3회씩 반복 측정하여 얻은 평균값으로 정량 곡선과 상관계수를 얻었으며 정량 곡선은 Fig. 4에 나타내었다.

그 결과 모두 0.9999 범위에 해당하는 우수한 상관계수를 보여주고 있다. 검출한계(limits of detection, LOD)와 정량 한계는 각각 S/N 비율이 3인 지점과 10인 지점으로 지정하였다. Puerarin의 검출한계와 정량 한계는 각각 0.025 ng, 0.05 ng, daidzin의 검출한계와 정량한계는 각각 0.075 ng과 0.15 ng으로 나타났다.

3. 갈근 및 갈근을 함유한 제제의 HPLC 분석

RP-HPLC-PAD의 분석 방법을 갈근 및 갈근을 함유한 처방인 갈근탕 및 갈근황금황련탕에 적용하였다. 갈근과 갈근탕 및 갈근황금황련탕에 함유된 puerarin과 daidzin 및 내부표준물질인 geniposide는 HPLC 분석 방법에 대하여 분리도와 재현성이 유지되었으며(Fig. 5), daidzin과 puerarin의 일중(intra-day) 및 일간(inter-day) 변화는 Table 4에 나타내었다.

Puerarin의 일중 변화에 대한 상대표준편차(RSD)는 갈근 및 갈근탕, 갈근황금황련탕이 각각 3.0, 6.5, 4.9%로 나타났으며, daidzin은 각각 1.4%, 1.4%, 6.1%로 나타났다. Puerarin의 일간 변화상대표준편차(RSD)는 갈근 및 갈근탕, 갈근황금황련탕이 각각 1.5%, 3.8%, 2.9%로 나타났으며, daidzin은 각각 2.8%, 4.9%, 0.2%로 나타났다. 갈근 및 갈근 함유 처방에 대하여 puerarin의 평균 회수율은 99.7 - 101.3%, daidzin의 평균 회수율은 101.0 - 102.8%로 나타났다(Table 5).

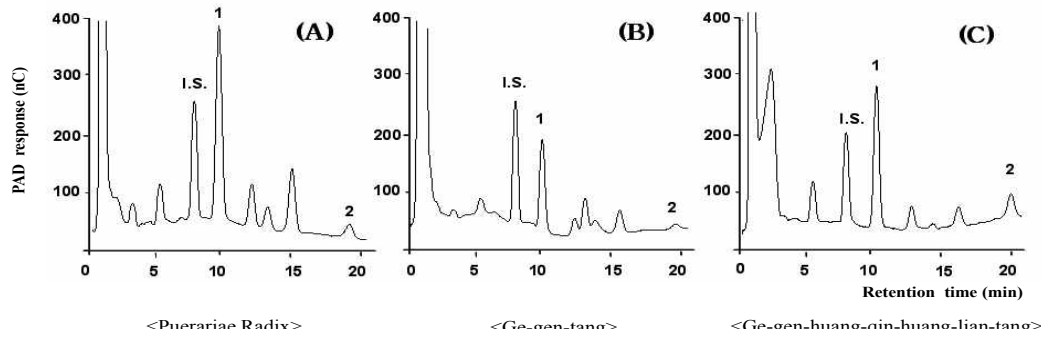


Fig. 5. RP-HPLC-PAD chromatogram of puerariae radix

(A), Gal-geun-tang (B), and Galgeun-huanggeum-huanglian-tang (C). Peak 1: puerarin, Peak 2: daidzin, I.S.: geniposide.

Table 4. Intra- and inter-day Validations for Determination of Puerarin and Daidzin in Puerariae Radix (PR), Gal-geun-tang (GGT), and Galgeun-huanggeum-huanglian-tang (GHHT) (n=3)

	Puerarin				Daidzin			
	Intra-day precision		Inter-day precision		Intra-day precision		Inter-day precision	
	Contents (mg/g)	RSD	Contents (mg/g)	RSD	Contents (mg/g)	RSD	Contents (mg/g)	RSD
PR	15.76±0.48	3.0	15.59±0.23	1.5	1.58±0.02	1.4	1.55±0.04	2.8
GGT	2.96±0.19	6.5	3.03±0.11	3.8	0.38±0.01	1.4	0.40±0.20	4.9
GHHT	7.38±0.36	4.9	7.48±0.22	2.9	0.94±0.05	6.1	0.94±0.01	0.2

Table 5. Recovery Test of Puerariae Radix (PR), Gal-geun-tang (GGT), and Galgeun-huanggeum-huanglian-tang (GHHT) (n=3)

	Added (ng)	Puerarin			Daidzin		
		Recovery (%)	Mean (%)	RSD (%)	Recovery (%)	Mean (%)	RSD (%)
PR	50	101.68±2.36	101.3	1.8	102.95±2.99	102.8	1.3
	100	102.97±4.09			101.46±0.64		
	250	99.38±0.87			104.02±0.85		
GGT	50	99.34±1.17	100.0	1.1	102.06±0.86	101.0	1.5
	100	101.33±1.25			99.93±1.06		
	250	99.41±0.56			99.55±0.59		
GHHT	50	99.42±2.07	99.7	0.3	99.58±1.10	101.9	2.0
	100	99.58±1.63			102.57±3.94		
	250	99.96±0.17			103.47±1.69		

고찰 및 결론

갈근은 콩과 Leguminosae에 속한 다년생 덩굴성 초본인 *Pueraria thunbergiana*의 뿌리로 한의학 임상에서 사용할 뿐 아니라 식용으로도 사용하는 한약재이다¹⁾. 갈근은 《신농본초경(神農本草經)》²¹⁾에 최초로 “주(主) 소갈(消渴) 신대열(身大熱) 구토(嘔吐) 제비(諸痺) 기음기(起陰氣) 해제독(解諸毒)”으로 수재된 이래로 해기퇴열(解肌退熱) 생진(生津) 투진(透疹) 승양지사(升陽止瀉)의 효능으로 임상에서 널리 사용하고 있다¹⁾. 갈근을 함유한 처방 중에서 갈근탕은 가장 대표적인 제제로 《상한론(傷寒論)》²²⁾에

“태양병(太陽病) 항배강수수(項背強几几) 무한오풍(無汗惡風)”을 사용하는 것으로 최초로 수재된 이래로 해기청열(解肌清熱)하는 효능으로 한방 임상과 한약 제제로 널리 사용하고 있다. 갈근황금황련탕도 《상한론》²²⁾에 “태양병(太陽病) 계지증(桂枝證) 의반하지(醫反下之) 이수부지(利遂不止) 맥촉자(脈促者) 표미해야(表未解也) 천이한출(喘而汗出)”에 사용하는 것으로 최초로 수재되어 있다.

갈근의 주요 성분인 puerarin과 daidzin은 isoflavonoid의 배당체로 최근 phytoestrogene으로 주목 받고 있으며³⁻⁵⁾, puerarin은 심근 보호 효과⁶⁾, 항콜레스테롤 효과⁷⁾, 혈당강하⁸⁾ 효과를 나타내며, daidzin은 항비만⁹⁾,

항암¹⁰⁾, 조골세포 증식 촉진¹¹⁾ 등이 보고되어 있다.

갈근의 puerarin과 daidzin의 분석은 주로 HPLC-UV 방법을 사용하였다^{13,14)}. 그러나 UV 검출법은 발색단을 가진 물질들을 모두 검출하기 때문에 puerarin과 daidzin뿐만 아니라 그 비당체 및 발색단을 가진 모든 물질들이 검출됨으로써 분석에 어려움이 있다¹³⁾. LC-MS의 분석방법은 가장 감도가 좋으나, 고비용의 문제로 적용의 어려움이 있다^{15,16)}. HPAEC-PAD 방법은 단당 및 다당 그리고 아미노산 등의 이온성 물질을 분리하고 분석하기 위해 고안된 장치이나 한약재에 주로 함유된 배당체의 적용에는 당과 배당체가 동시에 검출되기 때문에 한계가 있다^{17,18)}. 이에 갈근에 함유된 배당체인 puerarin과 daidzin의 분석에 적용하기 위해 배당체의 분리에 유용한 reversed-phase 컬럼과 당 분석에 유용한 펄스식 전기화학 검출기를 적용한 RP-HPLC-PAD법을 이용하여 실험하였다.

RP-HPLC-PAD의 분석조건에서 puerarin과 daidzin 및 내부표준물질인 geniposide는 20분 내에 분리되었으며, 갈근 및 한방 제제에서 검출에 선택적으로 분리되었다. Puerarin의 검출한계와 정량한계는 각각 0.025 ng, 0.05 ng, daidzin의 검출한계와 정량한계는 각각 0.075 ng과 0.15 ng로 나타났으며, 이는 HPLC-UV 방법을 이용한 보고와 비교하여 우수한 것으로 나타났다¹³⁾. 또한 갈근 및 갈근 함유 제제를 RP-HPLC-PAD의 분석 방법에 적용하였을 때 갈근 및 갈근탕, 갈근황금황련탕의 일중(intra-day) 변화의 상대표준편차(RSD)는 puerarin이 각각 3.0, 6.5, 4.9%로 나타났으며, daidzin은 각각 1.4%, 1.4%, 6.1%로 나타났다. 또한 일간(inter-day) 변화의 상대표준편차(RSD)는 puerarin이 각각 1.5%, 3.8%, 2.9%로 나타났으며, daidzin은 각각 2.8%, 4.9%, 0.2%로 나타났다. 갈근 및 갈근 함유 처방에 대하여 puerarin의 평균 회수율은 99.7 - 101.3%, daidzin의 평균 회수율은 101.0 - 102.8%로 나타났다. 이는 RP-HPLC-PAD를 이용한 갈근 및 한방제제에서 puerarin과 daidzin의 분석 방법이 기존에 보고된 결과와 비교하여 좋은 재현성과 정확성을 나타내었다. 이 방법은 갈근 및 갈근을 함유하는 제제의 품질 평가에 활용할 수 있을 것으로 사료되며, 나아가 한약재 및 이를 함유한 제제에 대하여 적용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학편찬위원회. 본초학. 서울 :

- 영림사. 2004 : 185-7.
- Duan S, Li YF, Luo XL. Effect of puerarin on heart function and serum oxidized-LDL in the patients with chronic cardiac failure. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2000 ; 25(2) : 176-8.
 - 김정숙, 하혜경, 김혜진, 이제현, 송계용. 췌의 부위별 췌다공증 효과. *한국식품과학회지.* 2002 ; 34(4) : 710-8.
 - Park EK, Shin J, Bae EA, Lee YC, Kim DH. Intestinal bacteria activate estrogenic effect of main constituents puerarin and daidzin of *Pueraria thunbergiana*. *Biol Pharm Bull.* 2006 ; 29(12) : 2432-5.
 - Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab.* 2003 ; 21(5) : 268-75.
 - Gao Q, Yang B, Ye ZG, Wang J, Bruce IC, Xia Q. Opening the calcium-activated potassium channel participates in the cardioprotective effect of puerarin. *Eur J Pharmacol.* 2007 ; 574 : 179-84.
 - Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Mantovani A, Moon TW, Lee SJ, Park KH. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice. *Eur J Pharmacol.* 2008 ; 578 : 159-70.
 - Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod.* 2003 ; 66 : 788-92.
 - Choi I, Kim Y, Park Y, Seog H, Choi H. Anti-obesity activities of fermented soy germ isoflavones by *Bifidobacterium breve*. *Biofactors.* 2007 ; 29 : 105-12.
 - Hasumuma R, Kawaguchi K, Kikuchi S, Sugiyama T, Kumazawa Y. Effects of isoflavones and soybeans fermented with *Bacillus subtilis* on lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor- α and fibrinolysis *in vivo*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2007 ; 29 : 323-33.
 - Li XH, Zhang JC, Sui SF, Yang MS. Effect of daidzin, genistin, and glycitin on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells and adipocytic transdifferentiation of osteoblasts.

- Acta Pharmacol Sin. 2005 ; 26 : 1081-6.
12. 식품의약품안전청. 대한약전(제9개정). 서울 : 식품의약품안전청. 2007: 902.
 13. Song J, Han Q, Qiao C, Yip Y, Xu H. Simultaneous determination of multiple marker constituents in concentrated Gegen Tang granule by high performance liquid chromatography. Chin Med. 2007 ; 20(2) : 7.
 14. Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S. Major isoflavonoid contents of the 1-year-cultivated phytoestrogen-rich herb, Pueraria mirifica. Biosci Biotechnol Biochem. 2007 ; 71 : 2527-33.
 15. Rong H, Stevens JF, Deinzer ML, Cooman LD, Keukeleire DD. Identification of isoflavones in the roots of Pueraria lobata. Planta Med. 1998 ; 64 : 620-7.
 16. Fang C, Wan X, Tan H, Jiang C. Identification of isoflavonoids in several kudzu samples by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Chromatogr Sci. 2006 ; 44 : 57-63.
 17. Jeong JS, Kwon HJ, Yoon HR, Lee YM, Choi TY, Hong SP. A pulsed amperometric detection method of galactose 1-phosphate for galactosemia diagnosis. Anal Biochem. 2008 ; 376 : 200-5.
 18. Jeong JS, Kwon HJ, Lee YM, Yoon HR, Hong SP. Determination of sugar phosphates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. J Chromatogr A. 2007 ; 1164(1-2) : 167-73.
 19. Kwon HJ, Jeong JS, Lee YM, Hong SP. A reversed-phase high-performance liquid chromatography method with pulsed amperometric detection for the determination of glycosides. Journal of Chromatography A. 2008 ; 1185 : 251-7.
 20. 약학대학 한약학 교재연구회. 한방방제학. 서울 : 정담. 1996 ; 212-214 : 336.
 21. 도홍경. 본초경집주. 북경 : 인민위생출판사. 1994 : 271.
 22. 채인식. 상한론역진. 서울 : 고문사. 1987 : 37, 40.