

HPLC를 이용한 이중탕 중 3종 활성성분의 동시분석법 확립

이보형^{1#} · 마진열^{2#} · 원진배¹ · 양혜진¹ · 윤보라¹ · 마충제^{1*}

¹강원대학교 생물소재공학전공, ²한국한의학연구원

Simultaneous Determination of Three Compounds in Ejung Tang by HPLC-DAD and LC-ESI-MS

BoHyoun Lee^{1#}, Jin Yeul Ma^{2#}, Jin Bae Weon¹, Hye Jin Yang¹, Bo-Ra Yun¹ and Choong Je Ma^{1*}

¹Department of Biomaterials Engineering, School of Bioscience and Biotechnology,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Exporo,
Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

Abstract – An accurate and sensitive analysis method was established for simultaneous determination of three bioactive compounds (glycyrrhizin, 6-gingerol and ginsenoside Rg3) in the Ejung Tang with high-performance liquid chromatography (HPLC)-photodiode array detection (DAD)-electrospray ionization (ESI)-Mass spectrometry (MS). The optimizing chromatographic separations were acquired by an C₁₈ column (5 μm, 4.6 I.D × 250 mm, SHISHEDO) using gradient elution with water comprising 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) and acetonitrile at a performing temperature of 35°C. Flow rate was 1.0 ml/min. A detection UV wavelength set at 205 nm and 250 nm. The three compounds were identified by electrospray ionization mass spectrometry. All calibration curves indicated great linear regression within test ranges (R²>0.9997). The established method provided acceptable precision and accuracy. The relative standard deviations (RSDs) of intra-day and inter-day were less than 2.00% and 3.00%, respectively. The recoveries were found to range from 94.49 to 101.10% for the three compounds analyzed. These results showed that this method was effective and reliable for quality control of Ejung-Tang.

Key words – Ejung Tang, Simultaneous determination, HPLC-DAD, LC-ESI-MS, Validation

한방처방은 복합적인 생약제제로 이루어져 있으면 다양한 생약의 구성 성분들이 복합적으로 효과를 나타낸다.¹⁻⁴⁾ 한방처방은 수 천년의 경험을 바탕으로 우리나라를 비롯한 동양권에서 질병 치료와 예방에 사용되고 있다. 최근 생활 환경이 향상되면서 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 상대적으로 부작용이 적은 생약 및 한방 처방의 사용이 증가하고 있고 연구와 개발이 지속적으로 활발하게 이루어지고 있다.⁵⁾ 한방 처방은 구성하는 생약의 채집 지별 활성 성분 함량의 차이와 다양한 제조 공정은 한방처방의 품질 관리와 신약 개발에 대한 연구를 어렵게 하는 요인으로 작용한다. 따라서 합리적으로 생약 및 한방처방을 이용하기 위한 정확한 정성적, 정량적인 분석 방법의 확립이 시급하다. 최근에는 분석 기술이 향상되면서 생약이나 한방처방에 포함

된 지표 성분을 분석하는 방법이 증가하고 있으며 주로 HPLC 이용하여 분석 한다.⁶⁾ 생약이나 한방처방에 대한 지표 성분 함량 분석은 여러 성분을 개별적으로 분석해야 함으로 시간적 경제적 손실이 가중 된다. 또한 지표 성분 함량의 편차가 크기 때문에 합리적인 분석법의 검증이 필요하다.

한대(漢代) 장중경(張仲景)의 상한론(傷論)에 ‘이중환(理中丸)’으로 기재되어 있는 처방인 이중탕(理中湯)은 인삼, 건강, 백출, 자감초로 구성되어 있으며 한냉성 위장질환에 사용된다. 속을 따뜻하게 하여 당설을 완화시키며 비위의 작용을 지지하여 그 기능을 강화시킨다. 주로 설사, 구토, 구역, 소화불량, 식욕부진 등의 증상을 치료하는데 사용된다. 최근 아토피 피부염에서의 효능이 보고 되었다.⁷⁾ 본 연구에서는 이중탕의 지표 성분인 감초의 glycyrrhizin, 건강의 6-gingerol, 인삼의 ginsenoside Rg3 3종의 화합물질을 표준물질로 선정하였다. 이중탕에 포함된 각각의 표준물질 함량을 최적의 조건으로 분석하는 동시분석법을 HPLC-DAD와 LC-

[#]Both authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): cjma@kangwon.ac.kr

(Tel): +82-33-250-6565

ESI-MS를 사용하여 확립하였다. 또한 확립된 분석법에 대하여 분석법 유효성 검증을 실시하여 검증하였고⁹⁾ 시중에 판매되는 이중당을 분석하여 검증된 분석법의 응용가능성에 대한 타당성을 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료 - 동시분석법을 확립하기 위하여 본 실험에서 사용한 시료인 이중당은 한국 한의학 연구원으로부터 제

공받았다. 기기 분석을 위한 용매는 J.T Baker사의 HPLC급 water와 acetonitrile을 사용하였다. 표준물질 glycyrrhizin, 6-gingerol은 식품의약품안정청, ginsenoside Rg3는 Chromadex에서 구입하였다. 각 표준물질의 순도는 98% 이상을 나타냈다.

표준용액 및 샘플의 제조 - 표준용액 제조를 위하여 각각의 지표 성분인 glycyrrhizin, 6-gingerol, ginsenoside Rg3의 무게를 정확하게 측정하여 60% methanol에 녹여 최종 농도 487.5 µg/ml, 400 µg/ml, 250 µg/ml로 제조하였고 이

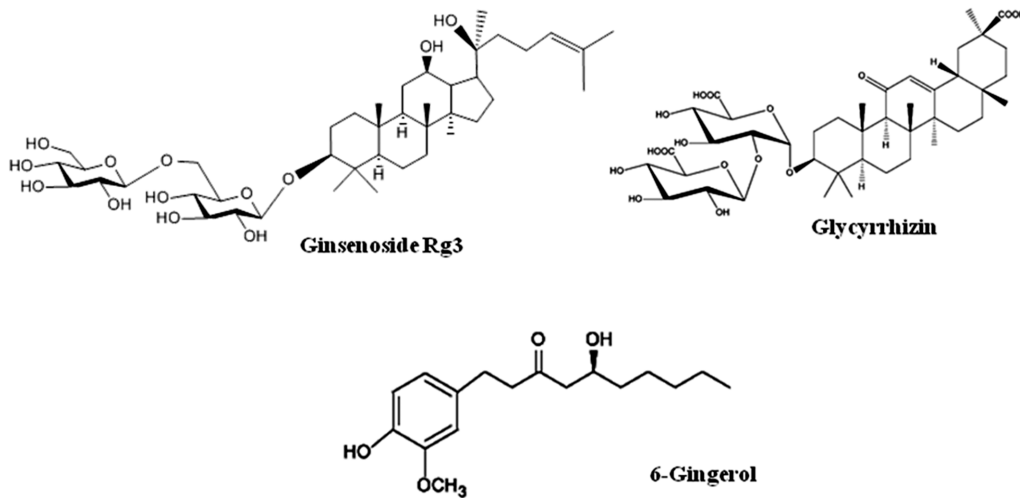


Fig. 1. Chemical structures of three constituents in Ejung tang.

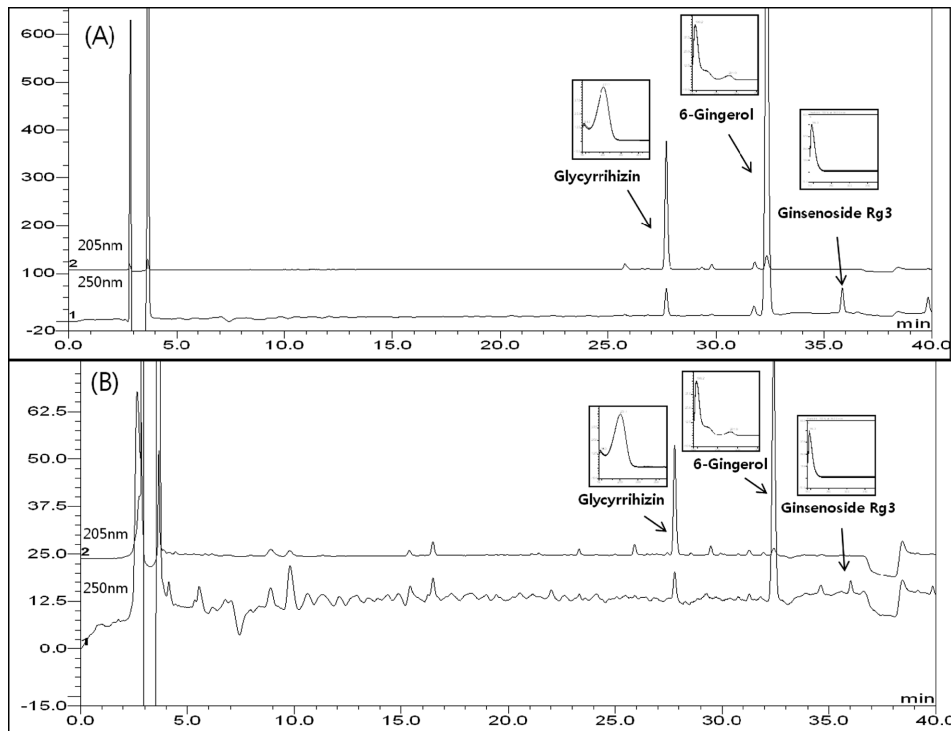


Fig. 2. The HPLC chromatogram of standard mixtures (A) and Ejung tang sample (B).

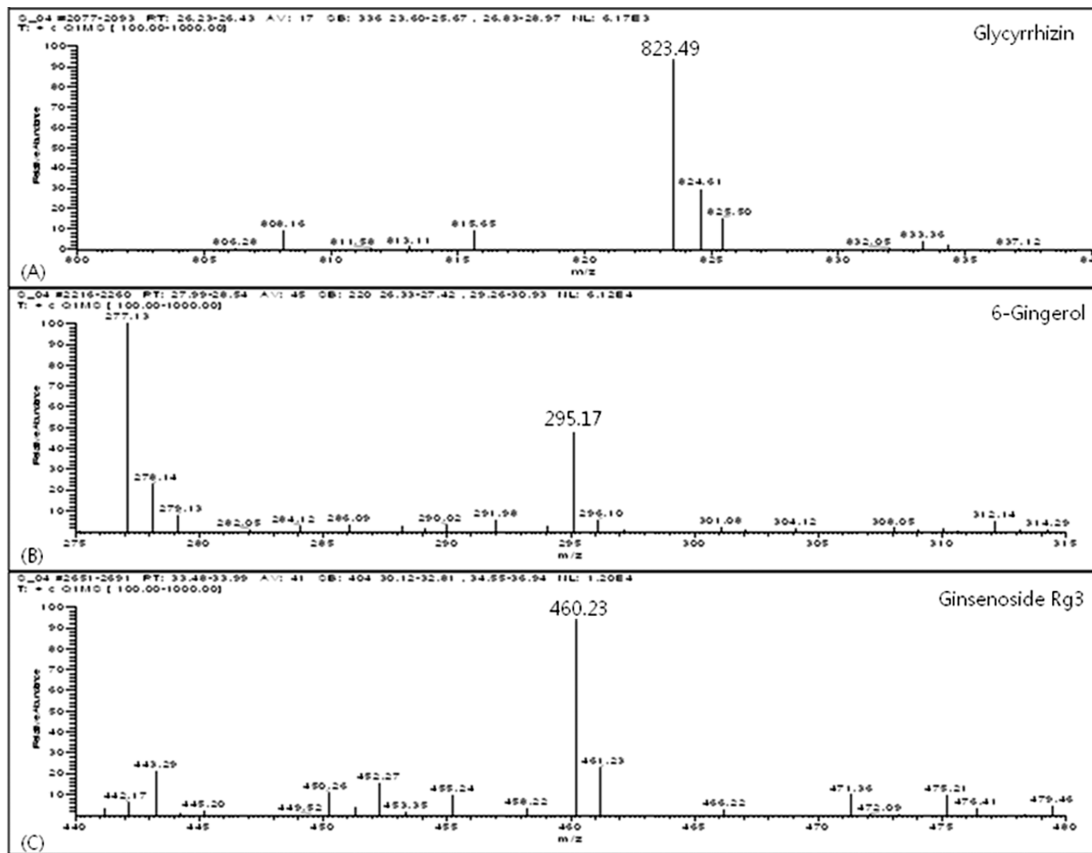


Fig. 3. The MS spectra of three compounds of standard mixtures.

중탕 시료는 무게를 정확히 측정하여 20.3 mg으로 10 ml의 60% methanol에 녹였다. 0.45 μ m membrane filter로 여과 후 주입하였다.

HPLC 분석조건 - HPLC는 LPG3X00 pump, Acc-3000 auto sampler, column oven, DAD-3000(RS) diode array UV/VIS detector로 구성된 Dionex사의 시스템을 사용하였다. 컬럼은 C₁₈ column (5 μ m, 4.6 I.D.×250 mm, SHISHEDO)이며, 온도는 35°C를 유지하였다. UV 검출기의 파장은 205 nm와 250 nm에서 확인하였다. 이동상은 HPLC급 용매로, 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid)를 포함한 water (A)와 Acetonitrile (B)를 사용하여 분리를 향상 시켰으며, 유속은 1.0 ml/min로 하였다. 이동상의 최적화를 위한 용매의 조성은 분석시간과 분리를 고려하여 지표 성분에 대한 분석법을 확립하였다(Table I).

HPLC-ESI/MS 분석조건 - 이중탕과 3가지 지표 성분의 혼합표준용액을 LC/MS/MS (TSQ Quantum Ultra, Thermo)로 분석하였다. 이온화 방식은 ESI (Electrospray ionization)를 사용하였다. 컬럼은 Atlantis사의 dC₁₈(150×2.0 mm I.D., 3 μ m)를 사용하였고, 이동상은 0.1% TFA가 포함된 water (A)와 acetonitrile (B)를 사용하였다. 총 분석시간은 50분으로 Injection volume은 20 μ l, 유속은 200 μ l/min로 분석 하

Table I. Solvent gradient elutions system condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	Solvent	
		A ^a (%)	B ^b (%)
0	1.00	80	20
5	1.00	80	20
30	1.00	50	50
35	1.00	40	60
40	1.00	30	70

^aA: 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) water

^bB: Acetonitrile

였다(Table II).

분석 방법의 검증(Validation) - HPLC 분석법의 정확도와 재현성을 검증하기 위해서 ICH (International Conference on Harmonization) guide line에 기초하여 직선성 평가, 검출한계 및 정량한계 측정, 반복 실험을 통한 정밀성, 그리고 회수율 시험을 통한 정확성 평가를 실시하였다.⁸⁻¹¹⁾

직선성 평가(Linearity) - 직선성 평가를 위한 검량선을 얻기 위해 각 표준물질을 60% methanol을 사용하여 6개의 농도($\times 1$, $\times 1/5$, $\times 1/10$, $\times 1/20$, $\times 1/40$, $\times 1/80$)로 단계별로 희석

을 한 후 HPLC분석을 3회 실시하였다. Linear regression equation ($y = ax + b$, a는 직선의 기울기, b는 y절편, x는 시료의 농도, y는 피크의 면적)을 계산하고 correlation coefficient (R^2)를 통해 직선성을 확인하였다. R^2 의 값이 0.99이상인 경우 시료 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

검출한계(LOD)·정량한계(LOQ) 측정 - 분석 물질의 검출 및 정량이 가능한 최저 농도를 확인하기 위하여 검출한계 (LOD)와 정량한계(LOQ)를 측정하였다. LOD와 LOQ는 calibration curve를 통하여 계산하였다. LOD와 LOQ는 signal to noise ratio가 3과 10으로서 LOD는 $3.3 \times (\text{표준편차} / \text{기울기})$, LOQ는 $10 \times (\text{표준편차} / \text{기울기})$ 로 계산하였다.

정밀성 평가(Precision) - 동일 시료에 대하여 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 확인하기 위함으로 intra-day variability는 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 하여 시료를 5회 반복 측정하여 상대표준편차로써 기준에 적합한지 평가하였다. Inter-day variability는 직선성이 확인된 농도구간중 3가지 농도를 기준으로 하여 시험일자를 변경하여 1일, 3일, 5일째 되는 날 5회 반복 실험하여 상대표준편차를 구하여 평가하였다. 적합한 상대표준편차 값은 3%이내이다.

Table II. HPLC-ESI/MS operating parameters

Parameters	Conditions																																
Company	TSQ Quantum Ultra, Thermo																																
Column	Atlantis dC18 (150×2.0mm I.D., 3 μm)																																
Mobile Phase	Solvent A : 0.1% TFA in Water Solvent B : Acetonitrile																																
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Solvent A (%)</th> <th>Solvent B (%)</th> <th>Flow (ml/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>80</td><td>20</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>5</td><td>80</td><td>20</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>30</td><td>50</td><td>50</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>35</td><td>40</td><td>60</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>40</td><td>30</td><td>70</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>42</td><td>80</td><td>20</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>50</td><td>80</td><td>20</td><td>0.2</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow (ml/min)	0	80	20	0.2	5	80	20	0.2	30	50	50	0.2	35	40	60	0.2	40	30	70	0.2	42	80	20	0.2	50	80	20	0.2
Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow (ml/min)																														
0	80	20	0.2																														
5	80	20	0.2																														
30	50	50	0.2																														
35	40	60	0.2																														
40	30	70	0.2																														
42	80	20	0.2																														
50	80	20	0.2																														
Injection volume	200 μl																																
Ion Source	ESI																																
Spray voltage	4000 V																																
Vaporizer temperature	100°C																																
Sheath gas pressure	50 psi																																
Aux gas pressure	30 psi																																
Capillary temperature	320°C																																

회수율 시험(Recovery) - 정확성을 평가하기 위해 함량이 확인된 시료와 3가지 시료 성분의 혼합표준용액의 농도를 달리하여 혼합한 후 3회 측정하여 판단하였다. 회수율의 범위는 90~110%가 이상적이다.

확립된 동시분석법을 이용한 이중탕 시료 분석 - 이중탕 시료를 분석하여 확립된 동시분석법의 효율성을 검증하였다. 이중탕 시료에 대하여 본 연구의 분석법을 이용하여 분석한 결과, 이중탕의 3가지 시료 성분 glycyrrhizin, 6-gingerol, ginsenoside Rg3의 피크가 서로 다른 성분들의 피크에 영향을 받지 않고 분석이 가능하였다. 확립된 분석법을 시중에 판매되는 4개의 이중탕 시료에 적용시켜 시료 성분의 함량을 평가하였다.

결과 및 고찰

분석조건의 확립 - 이중탕의 시료 성분인 glycyrrhizin, 6-gingerol, ginsenoside Rg3에 대한 동시 분석법을 확립하기 위해 다양한 용매 조성 및 파장에 대하여 분석 조건을 시행한 결과, 이동상인 water와 methanol을 시간대 별로 비율을 달리하고 water에 0.1% TFA를 첨가하여 분리능을 높였다.¹²⁾ 각 시료 성분의 UV spectra를 통해 시료 성분들의 최대 UV 흡수 파장을 확인하여 측정파장을 확립하였다. 최대 UV 흡수 파장은 glycyrrhizin은 250 nm, 6-gingerol과 ginsenoside Rg3는 205 nm로 설정하여 피크의 면적을 측정하였다.

LC/MS 성분분석 - 분자량과 retention time으로 분석물질을 확인하는 LC/MS를 사용하여 분자량을 측정하였다. 시료 성분인 glycyrrhizin, 6-gingerol, ginsenoside Rg3의 혼합 표준 용액의 분자량 피크 확인을 위해 양이온 모드에서 분석하였다. 각 시료 성분들은 glycyrrhizin은 822.93 m/z, 6-gingerol은 294.391 m/z, ginsenoside Rg3는 460.23 m/z로 분리되었다(Table III).

직선성 및 검출한계(LOD)·정량한계(LOQ) - 분석된 결과에 따라서 y축을 피크면적, x축을 표준 용액의 농도로 하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선을 통하여 시료 성분의 correlation coefficient(R^2)값을 확인한 결과 그 값이 0.9997이상으로 좋은 직선성을 보였다. 직선상의 검출한계 (LOD) 및 정량한계(LOQ)는 각각 0.08~1.03 μg/ml, 0.23~3.11 μg/ml 범위로 소량인 성분도 검출 및 정량이 가능함을 확인

Table III. Identification of the three compounds by HPLC-ESI/MS

Compound	MS data in positive ion mode(m/z)
Glycyrrhizin	822.93 [M+H] ⁺
6-Gingerol	294.39 [M+H] ⁺
Ginsenoside Rg3	460.23 [M-Glu] ⁺

Table IV. Characteristic Linear ranges, regression equation, correlation coefficient (R^2), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of calibration curve of compounds

Compound	Linear range ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation ^a $y = ax+b$		R^2 (n = 5)	LOD (μg)	LOQ (μg)
		Slope(a)	Intercept(b)			
Glycyrrhizin	2.03 – 162.50	+0.2296	-0.0050	1.0000	0.0750	0.2272
6-Gingerol	1.67 – 133.30	+1.2879	+1.3958	0.9999	0.0776	0.2350
Ginsenoside Rg3	2.08 – 83.30	+0.0931	-0.0553	0.9997	1.0262	3.1098

^aY: peak area, x: amount (μg)

Table V. Analytical results of intra- and inter-day variability

Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Intra-day (n = 5)			Inter-day (n = 5)		
		mean \pm SD ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	Accuracy (%)	mean \pm SD ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	Accuracy (%)
Glycyrrhizin	20.31	19.53 \pm 0.15	0.75	96.15	20.30 \pm 0.25	1.25	99.95
	40.63	38.10 \pm 1.06	0.41	95.98	40.70 \pm 0.88	2.17	100.20
	81.25	79.58 \pm 0.06	0.07	97.95	81.04 \pm 1.57	1.94	99.91
6-Gingerol	16.66	16.53 \pm 0.13	0.78	99.22	16.37 \pm 0.20	1.22	98.22
	33.33	32.82 \pm 0.49	1.45	98.47	33.86 \pm 0.18	0.54	101.61
	66.65	66.91 \pm 0.61	0.94	100.39	65.97 \pm 1.23	1.87	98.98
Ginsenoside Rg3	10.41	10.45 \pm 0.05	0.51	99.37	10.35 \pm 0.25	2.40	99.40
	20.83	22.45 \pm 0.37	1.65	107.79	20.35 \pm 0.28	1.39	97.73
	41.65	44.43 \pm 0.30	0.66	106.67	40.98 \pm 0.85	2.08	98.39

하였다(Table IV).

정밀성 평가 – 동시분석법의 정밀성을 평가하기 위하여 직선성이 확인된 농도 구간에서 3가지 농도를 기준으로 intra-day와 inter-day 시험을 반복해서 5회 측정하여 정밀성을 평가하였다. 정밀성 평가를 한 결과 intra-day 시험에서 glycyrrhizin은 0.41~0.75%, 6-gingerol은 0.78~1.45%, ginsenoside Rg3는 0.51~1.65%의 각각 RSD값을 나타내었고, inter-day 시험에서는 glycyrrhizin은 1.25~2.71%, 6-gingerol은 0.54~1.78%, ginsenoside Rg3는 1.39~2.40%의 RSD값을 보였다. Intra-day 시험과, inter-day 시험에서 모두 RSD값의 범위가 3%이 내로 우수한 정밀성을 나타내었다(Table V).

회수율 시험 – 본 연구에서 실시한 분석법의 정확성을 확인하기 위해 회수율 시험을 하여 검증하였다. 함량이 확인된 이종탕 샘플에 glycyrrhizin, 6-gingerol, ginsenoside Rg3 각각 세가지 지표 성분을 첨가한 뒤 함량을 확인하여 정확성을 검증하였다. 회수율 시험 결과 glycyrrhizin은 회수율이 최소 99.74에서 최대 101.10%, RSD값은 0.16~2.34%, 6-gingerol은 회수율이 최소 94.49에서 최대 100.10%, RSD값은 1.21~2.03%, ginsenoside Rg3는 회수율이 최소 95.10에서 최대 99.23%, RSD값은 0.41~1.98%의 범위로 나타났다. 이와 같은 회수율 시험의 결과로 이종탕 분석에 실시된

동시 분석법은 우수한 정밀성을 나타냈다(Table VI).

확립된 분석법을 이용한 이종탕의 분석 – 이와 같이 검증된 본 연구의 분석법을 이종탕 시료 분석에 이용하여 이종탕의 3가지 지표 성분인 glycyrrhizin, 6-gingerol, ginsenoside Rg3의 함량을 확인하였다. 검증된 이종탕 동시분석법의 검량선에 의거하여 3가지 지표 성분들의 함량 모두 확인이 가능하였다(Table VII).

Table VII. Substances of three marker compounds in commercial Ejung-tang samples

Sample	Content (mg/g)		
	Glycyrrhizin	6-Gingerol	Ginsenoside Rg3
ET ^a (a)	7.82 \pm 0.01	0.54 \pm 0.03	0.84 \pm 0.09
ET ^b (b)	7.79 \pm 0.03	0.33 \pm 0.01	0.77 \pm 0.02
ET ^b (c)	8.44 \pm 0.29	0.38 \pm 0.01	0.76 \pm 0.07
ET ^a b (d)	7.04 \pm 0.08	0.32 \pm 0.01	0.68 \pm 0.09
ET ^a b (e)	6.73 \pm 0.09	0.37 \pm 0.01	0.64 \pm 0.03

^aET: Ejung-tang samples from Korea institute of oriental medicine

^bET: Commercial Ejung-tang samples

Table VI. Accuracy for the test of compound

Compound	Spiked Amount (µg/ml)	Measured Amount (µg/ml)	Recovery ^a (%)	RSD (%)
Glycyrrhizin	10.27	18.27	101.10	0.16
	20.43	28.42	100.58	2.34
	40.52	48.52	99.74	0.88
6-Gingerol	7.87	8.48	94.49	2.03
	16.56	17.17	99.41	1.24
	33.36	33.96	100.10	1.21
Ginsenoside Rg3	5.17	5.91	99.23	0.41
	10.25	11.00	98.46	0.93
	19.81	20.55	95.10	1.98

^aRecovery (%) = (amount found - original amount) / amount spiked × 100%

결 론

본 연구는 위장질환 치료로 사용되는 이중탕의 3가지 지표 성분인 glycyrrhizin, 6-gingerol, ginsenoside Rg3에 대한 HPLC-DAD와 LC-ESI-MS를 사용하여 동시분석법을 확립하였다. 그리고 확립된 분석법은 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 정밀성, 회수율 실험을 통해 method validation을 시행하였다. 이 분석법은 이중탕에 함유된 3가지 지표 성분을 효과적으로 정량, 정성 분석하였다. 결론적으로 본 연구에서 검증한 이중탕의 3가지 지표 성분에 대한 동시분석법은 보다 효율적인 품질관리에 사용이 가능할 것이며 이중탕의 생리활성이나 기전에 대한 연구 및 제조 공정에 효율적으로 사용이 가능할 것이다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원(K11050)에 의하여 수행되었다.

인용문헌

- Xue, T. H. and Roy, R. (2003) Studying Traditional Chinese Medicine. *Science* **300**: 740-741.
- Lu, A. P., Jia, H. W., Xiao, C. and Lu, Q. P. (2004) Theory of traditional Chinese medicine and therapeutic method of diseases. *World J. Gastroenterol.* **10**: 1854-1586.
- Jiang, W. Y. (2005) Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**: 558-563.
- Wang, Z. G. and Ren, J. (2003) Current status and future direction of Chinese herbal medicine. *Trends. Pharmacol. Sci.* **23**: 347-348.
- Liang, Y. Z., Xie, P. and Chan, K. (2003) Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B.* **812**: 53-70.
- Drasar, R. and Moravcova, J. (2004) Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. *J. Chromatogr. B.* **812**: 3-21.
- Seo, H.-Y. Han, J.-Y. and Kim, Y.-H. (2011) Therapeutic Effects of Yijungtang on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions of NC/Nga Mouse Induced by Mite Antigen. *J. Kor. Orient. Pediatr.* **25(1)**: 1-27.
- Sarkar, M., Khandavilli, S. and Panchagnula, R. (2006) Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms. *J. Chromatogr. B.* **830**: 349-354.
- Liang, X., Zhang, L., Zhang, X., Dai, W., Li, H., Hu, L., Liu, H., Su, J. and Zhang, W. (2010) Qualitative and quantitative analysis of traditional Chinese medicine Niu Huang Jie Du Pill using ultra performance liquid chromatography coupled with tunable UV detector and rapid resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51(3)**: 565-571.
- Jiang, Z., Yu, Q.-H., Cheng, Y. and Guo, X.-J. (2011) Simultaneous quantification of eight major constituents in Herba Siegesbeckiae by liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55**: 452-457.
- Kim, M. K., Yang, D. -H., Jung, M., Jung, E. H., Eom, H. Y., Suh, J. H., Min, J. W., Kim, U., Min, H., Kim, J. and Han, S. B. (2011) Simultaneous determination of chromones and coumarins in Radix Saposhnikoviae by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. *J. Chromatogr. A.* **1218**: 6319-6330.
- Heyman, A. N. and Henry, R. A. (1999) Importance of controlling mobile phase pH in reversed phase HPLC. *Keystone Technical Bulletin.*

(2011. 12. 23 접수; 2012. 2. 24 심사; 2012. 2. 27 게재확정)