pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 3, pp. 193~198 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.193

**Journal of Food Hygiene and Safety**
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

# LC-MS/MS를 이용한 건강기능식품 원료 중 바이칼린, 엘레우테로사이드 E, 리구스틸라이드 동시분석법 개발

**금은희 · 정소영 · 이진희 · 김미혜***
경인지방식품의약품안전청 수입식품분석과

# Development of Analytical Method for Determination of Baicalin, Eleutheroside E, and Ligustilide by LC-MS/MS in Raw Materials of Health Functional Foods

Eun Hee Keum, So Young Chung, Jin Hee Lee, and Meehye Kim*
*Imported Food Analysis Division, Gyeongin Regional Food and Drug Administration, Ministry of Food and Drug Safety, Incheon, Korea*
(Received April 11, 2017/Revised April 27, 2017/Accepted May 12, 2017)

**ABSTRACT** - *Scutellaria baicalensis*, *Eleutherococcus senticosus, and Angelica sinensis* have been used as raw materials for health functional foods. This study was conducted to develop a novel method to analyze levels of baicalin (*Scutellaria baicalensis*), eleutheroside E (*Eleutherococcus senticosus*), and ligustilide (*Angelica sinensis*) simultaneously in health functional foods. The methanol extracted samples were analyzed and quantified via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in the positive ion mode and the negative ion mode using multiple reaction monitoring. Standard calibration curves confirmed linearity with the correlation coefficient ($r^2$) of > 0.99 at 100-2000 μg/mL concentration range. The limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) were in the range of 13.0~35.2 μg/L and 39.3~106.7 μg/L, respectively. The recovery results ranged between 91.4~109.9% at 3 different concentration levels with relative standard deviations (RSDs) less than 5%. The proposed analytical method was characterized with high accuracy and acceptable precision. The new method would be an effective tool to analyze baicalin, eleutheroside E, and ligustilide simultaneously in raw materials of health functional foods.

**Key words :** Baicalin, Eleutheroside E, Ligustilide, LC-MS/MS, Method validation

2015년 국내 건강기능식품 시장규모는 2조 3,291억 원으로 전년대비 16.2% 증가하였으며, 2011년 이후 지속적으로 성장하고 있다[1]. 이 중 개별인정형 건강기능식품은 「건강기능식품 기준 및 규격」에 등재된 원료 이외에 해당 원료에 대한 기능성, 기준규격 등을 영업자가 개별적으로 식품의약품안전처로부터 인정받은 것으로, 당귀혼합추출물, 황금추출물등복합물, 가시오갈피등복합추출물 등이 있으며 2016년 12월말 기준 총 581건으로 해마다 증가추세에 있다[2].

황금, 가시오갈피, 당귀 등은 개별인정형 건강기능식품의 원료로 사용되고 있는 약용식물이다. 황금(*Scutellaria radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로 속썩은 풀(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 뿌리를 말하며 노란색을 띄기 때문에 황금(黃芩: golden root)이라 한다[3]. 황금에는 baicalin, baicalein, wogonin 등과 같은 많은 플라보노이드가 함유되어 있는데 그 중 baicalin이 가장 많이 존재한다[3,4]. Baicalin은 항알러지, 항염증, 항산화작용을 하며[5], 다양한 암세포에 독성을 나타내며 생체내에서 암세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다[6]. 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus* Max.)는 식물분류학상 두릅나무과에 속하는 낙엽성 다년생 활엽관목으로 그 생김새가 산삼을 닮아 러시아 및 유럽지역에서는 Siberian ginseng이라 불리 우는 야생식물이다[7]. 지금까지 가시오갈피의 여러 생리활성 물질이 밝혀졌는데 항피로, 항스트레스, 면역력 증진 및 항우울증 효과물질로 lignans와 iridoides가 보고되었고, 고콜레스테롤에 대한 효과와 항암물질로

*Correspondence to: Meehye Kim, Gyeongin Regional Food and Drug Administration, 137, Juan-ro, Nam-gu, Incheon 22133, Korea
Tel: 82-32-450-3360, Fax: 82-32-442-4622
E-mai: meehkim@korea.kr

sesamin, 담즙 촉진 물질로 isofraxidin, 그 외 다수의 항산화 페놀물질 등이 함유되어 있음이 보고되어 있다[8]. 특히 lignans 계 성분인 eleutherosides B와 E 성분은 가장 강력한 생리활성 효과를 갖는 것으로 알려져 있으며, 가시오갈피 배당체 성분의 약 80%를 차지하며 뿌리와 줄기에 함량이 높다[9]. 이 중 eleutheroside E는 흥분완화, 스트레스 억제 및 면역 활성에 매우 뛰어난 물질로 보고되고 있다[10]. 당귀 또한 대표적인 약용식물로 *Angelica sinensis*의 뿌리를 말린 것을 말하며, 오랫동안 전통약재로 사용되어져 왔다. Ligustilide는 이러한 당귀의 주요 성분으로, 최근 연구를 통해 항암, 기억력 개선, 신경보호작용 등을 포함하여 다양한 약리효과가 있는 것으로 보고되고 있으며[11] 또한 평활근(smooth muscle)의 완화, 항혈소판응집, 통증완화와 같은 생리활성을 지닌 것으로 알려졌다[12]. 이러한 다양한 생리활성을 지닌 황금, 가시오갈피, 당귀를 이용하여 제조된 개별인정형 건강기능식품 원료 중 가시오갈피등복합추출물, 황금추출물등복합물, 가시오갈피숙지황복합추출물은 관절・뼈건강에, 당귀등추출복합물과 인삼가시오갈피등혼합추출물은 기억력 개선에 도움을 줄 수 있다는 기능성을 식품의약품안전처로부터 인정받아 현재 제조・판매되고 있다[2].

Baicalin에 대한 분석법은 HPLC-UVD를 이용하여 정량하는 방법이 건강기능식품 기능성 원료 인정서에 등재되어 있으며, 이외에 생체시료에서 HPLC-UVD, HPLC-ECD, LC-MS/MS를 이용하여 baicalin, baicalein, wogonin을 동시분석하는 방법들이 보고되어 있다[13-15]. Eleutheroside E와 ligustilide에 대한 분석법 또한 HPLC-UVD를 이용하여 정량하는 방법이 인정서에 등재되어 있고 식물과 생체시료에서 HPLC-UVD와 LC-MS/MS를 이용한 분석법이 일부 보고되고 있다[16-18]. 이처럼 현재 황금, 가시오갈피, 당귀는 여러 개별인정형 건강기능식품 원료로 사용되고 있지만 이들 지표성분에 대한 분석법 연구는 매우 미흡한 실정이다.

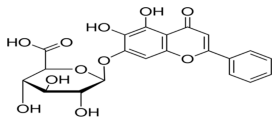
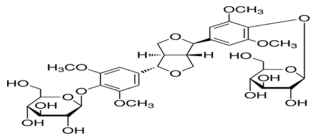
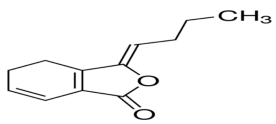
이에 본 연구에서는 황금, 당귀, 가시오갈피의 주요 지표성분인 baicalin, eleutheroside E, ligustilide를 LC-MS/MS를 이용하여 신속, 정확하게 3종의 성분을 동시에 분석할 수 있는 시험법을 개발하였다.

## Materials and Methods

### 실험재료

표본검체인 가시오갈피등복합추출물(주원료로 가시오갈피, 황금, 당귀 사용)의 경우 개별인정형 원료 제조업체인 (주)뉴메드로부터 제공받아 사용하였다.

**Table 1.** Molecular structure of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide

| | | |
|---|---|---|
| Baicalin | IUPAC name | (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(5,6-dihydroxy-4-oxo-2-phenyl-chromen-7-yl)oxy-3,4,5-trihydroxy-tetrahydropyran-2-carboxylic acid |
| | Chemical formula | $C_{21}H_{18}O_{11}$ |
| | Molecular weight | 446.36 g/mol |
| | Structure |  |
| Eleutheroside E | IUPAC name | (2R,3S,4R,5R,6S)-2-[4-[6-[(3,5-dimethoxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[3,4-c]furan-3-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol |
| | Chemical formula | $C_{34}H_{46}O_{18}$ |
| | Molecular weight | 742.72 g/mol |
| | Structure |  |
| Ligustilide | IUPAC name | (3Z)-3-butylidene-4,5-dihydro-2-benzofuran-1-one |
| | Chemical formula | $C_{12}H_{14}O_2$ |
| | Molecular weight | 190.24 g/mol |
| | Structure |  |

### 표준품 및 시약

Baicalin (95%), eleutheroside E (≥ 98.0%), ligustilide (≥ 98%) 표준품(CRM급)과 암모늄아세테이트(ammonium acetate), 개미산(formic acid), 디메틸설폭사이드(dimethylsufoxide, DMSO)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 메탄올, 아세토니트릴 등은 HPLC 등급으로 Merk (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

### 표준원액 및 표준용액의 조제

Baicalin, eleutheroside E, ligustilide 각각의 표준물질 10 mg을 정밀히 달아 DMSO 1 mL에 녹인 후 20% DMSO/메탄올로 10 mL 정용하여 표준원액으로 하였다. 표준원액은 갈색병에 담아 4°C에 보관하였으며, 이 용액을 85% 메탄올로 단계적으로 희석하여 100, 200, 500, 1000, 2000 μg/L의 표준용액을 조제하여 실험시 사용하였다.

### 시험용액의 조제

균질화한 시료 일정량을 정밀히 취한 후 50 mL 부피플라스크에 넣은 후 85% 메탄올로 정용하였다. 20분간 초음파 처리 후 0.45 μm 멤브레인 필터(Whatman, Dassel, Germany)로 여과하고 적절히 희석하여 시험용액으로 하였다.

### LC-MS/MS 분석조건

시료 분석을 위한 액체크로마토그래프-질량분석기(LC/MSMS)로는 MS/MS (Xevo TQ Detector)가 달린 Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 분석용 컬럼은 Acquity UPLC ® BEH $C_{18}$ (Waters, 100 mm × 2.1 mm(i,d), 1.7 μm particle size)이었다. 대상성분의 이온화법은 baicalin과 ligustilide의 경우 ESI (electro-spray ionization)법의 positive ion mode를, eleutheroside E는 negative ion mode를 사용하였다. 이동상으로는 5 mM 암모늄아세테이트 함유 용액과 0.1% 개미산 함유 아세토니트릴을 사용하여 0.3 mL/min 유속으로 하였다(Table 2).

**Table 2.** Analytical conditions for the determination of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide

| Items | Conditions | | |
|---|---|---|---|
| Mobile phase | A: 5 mM Ammonium acetate<br>B: 0.1% Formic acid in acetonitrile | | |
| | Time (min) | A (%) | B (%) |
| | 0 | 95 | 5 |
| | 0.5 | 95 | 5 |
| | 3.0 | 5 | 95 |
| | 3.5 | 5 | 95 |
| | 4.5 | 95 | 5 |
| Column | Acquity UPLC® BEH $C_{18}$<br>(100 mm × 2.1 mm(i.d), 1.7 μm) | | |
| Flow rate | 0.3 mL/min. | | |
| Ion mode | Baicalin, Ligustilide : ESI, Positive mode<br>Eleutheroside E : ESI, Negative mode | | |
| Inj. vol. | 2 uL | | |
| Analysis mode | MRM | | |
| Capillary voltage | Baicalin, Ligustilide : 3.5 kV<br>Eleutheroside E : 2.5 kV | | |
| Source temperature | 120°C | | |
| Desolvation temperature | 400°C | | |
| Desolvation gas flow | 700 L/h | | |

### 분석법 유효성 검증

확립된 baicalin, eleutheroside E, ligustilide 동시분석법의 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification), 정확도(Accuracy), 정밀도(Precision)에 대해 AOAC 시험법 검증 가이드라인[19]에서 제시하는 방법을 참고하여 유효성을 검증하였다. 직선성은 각기 다른 농도의 표준물질(100, 200, 500, 1000, 2000 μg/L)을 이용하였으며, 표준원액을 희석하여 제조하였다. 정량한계와 검출한계는 검량선의 기울기(S)와 y 절편의 표준편차(σ)를 이용하여 도출하였으며(정량한계 = 10 × σ/S, 검출한계 = 3.3 × σ/S), 정확도(회수율)는 공시료에 각기 다른 3개 함량의 표준 분석물을 첨가하여 확인하였다. 시료량의 변화에 대한 반복 정밀도를 확인하기 위하여 표본시료에 대하여 시료량별 5회 반복 측정하였고 실험실간 반복 정밀도는 표본시료에 대하여 2개의 실험실에서 5회 반복 측정하여 확인하였다.

## Results and Discussion

### 최적기기분석조건 확립

분석대상 물질 중 eleutheroside E는 분자구조상 $[M-H]^-$ 이온의 생성이 용이하고 baicalin과 ligustilide는 $[M+H]^+$이온의 생성이 용이하여 이동상 A에 5 mM 암모늄아세테이

**Table 3.** Selected-ion of LC-MS/MS for baicalin, eleutheroside E, and ligustilide

| Compound | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Cone voltage (V) | Collision Energy (eV) |
|---|---|---|---|---|
| Baicalin | 447.0 | 271.1 | 27 | 20 |
| Eleuthroside E | 741.1 | 579.2 | 35 | 11 |
| Ligustilide | 191.0 | 173.0 | 37 | 15 |

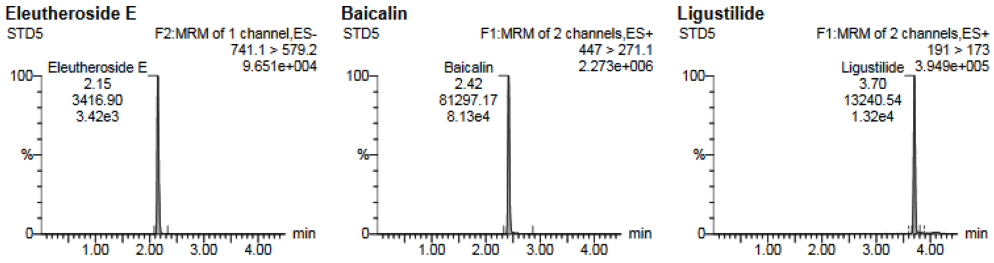



**Fig. 1.** Representative MRM chromatograms of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide standard.

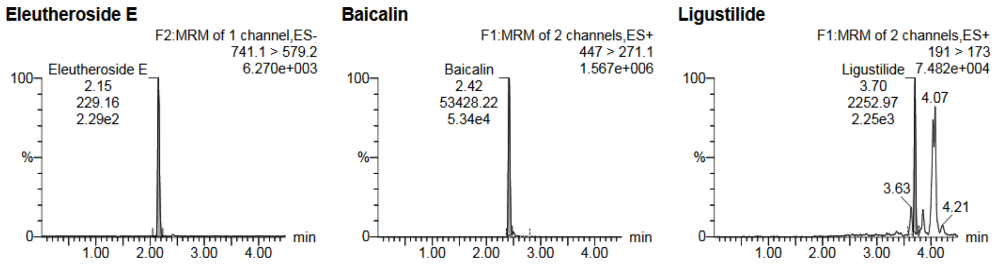



**Fig. 2.** Representative MRM chromatograms of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide in the sample.

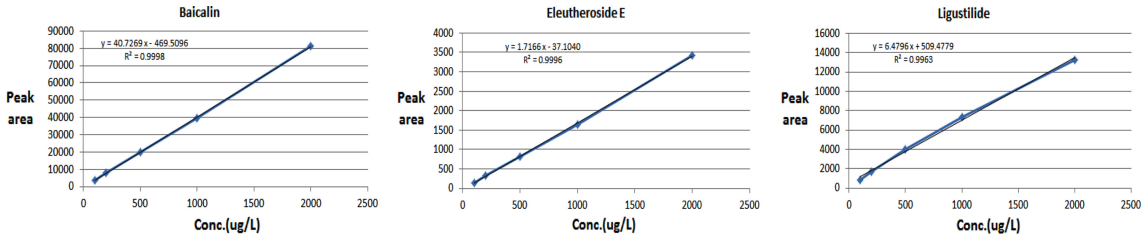



**Fig. 3.** Calibration curve of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide.

드가 함유된 증류수를, 이동상 B에는 0.1% 개미산이 함유된 아세토니트릴을 사용하여 기울기 용리방식으로 분석하였다. 최적 기기분석 조건은 Table 2에 나타내었고, 분석조건에서 선정된 특성이온은 Table 3에 나타내었다.

## 분석법 검증

### 특이성 및 직선성

특이성을 확인하기 위하여 표준품과 시료에서의 분리도 및 머무름 시간을 확인한 결과, 표준용액과 시험용액을 분석한 크로마토그램에서 동일한 위치에 단일 피크가 형성되었으며 머무름 시간은 eleutheroside E 2.15분, baicalin 2.42분, ligustilide 3.70분으로 나타났다(Fig. 1, 2). 또한 각 성분에 대한 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 표준용액 100, 200, 500, 1000, 2000 μg/L를 각각 2 uL씩 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 상관계수($r^2$)가 0.996 이상으로 나타나(Fig. 3) AOAC 가이드라인에서 제시하는 기준($r^2 > 0.99$)을 만족시켰다.

### 검출한계 및 정량한계

표본시료를 분석한 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하여 3.3배를 곱한 값을 기울기 값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. Baicalin, eleutheroside E, ligustilide의 정량한계는 각각 39.3 μg/L, 106.7 μg/L, 76.1 μg/L이었으며, 검출한계는 각각 13.0 μg/L, 35.2 μg/L, 25.1 μg/L으로 나타났다.

### 정확도 및 정밀도

공시료에 각각 200, 1000, 1800 μg/L의 표준 분석물을 첨가하여 3회 반복하여 회수율 실험을 수행하였다. 시험결과, 각 농도에서 평균 회수율은 baicalin, eleutheroside E, ligustilide에 대해 각각 108.0~109.9%, 99.8~101.3%, 91.4~97.2%로 나타났으며, 이 때 상대표준편차는 각각 0.3~2.3%, 2.8~4.0%, 0.8~3.4%로 나타났다(Table 4).

시료량의 변화에 대한 반복 정밀도를 확인하기 위하여 표본시료 중 시료채취량을 각기 달리하여 시료를 채취하고 5회 반복 측정한 결과, baicalin, eleutheroside E, ligustilide에 대한 상대표준편차(RSD)는 각각 0.8~2.5%, 2.5~4.7%,

**Table 4.** Validation results (accuracy) of analytical method for the determination of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide (n = 3)

| | Spiked Concentration (μg/L) | Recovery (%) | RSD (%) |
|---|---|---|---|
| Baicalin | 200 | 109.1 | 0.3 |
| | 1000 | 108.0 | 0.3 |
| | 1800 | 109.9 | 2.3 |
| Eleutheroside E | 200 | 99.8 | 2.8 |
| | 1000 | 100.3 | 4.0 |
| | 1800 | 101.3 | 3.8 |
| Ligustilide | 200 | 92.4 | 0.8 |
| | 1000 | 97.2 | 3.4 |
| | 1800 | 91.4 | 1.4 |

**Table 5.** Validation results (repeatability) of analytical method for the determination of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide (n = 5)

| | Sample amount (mg) | Measured mean (mg/g) | RSD (%) |
|---|---|---|---|
| Baicalin | 100 | 27.7 | 0.8 |
| | 200 | 27.2 | 2.3 |
| | 300 | 28.1 | 2.5 |
| Eleutheroside E | 100 | 2.5 | 2.5 |
| | 200 | 2.6 | 4.7 |
| | 300 | 2.5 | 3.8 |
| Ligustilide | 100 | 4.8 | 2.5 |
| | 200 | 4.8 | 4.3 |
| | 300 | 4.9 | 0.7 |

0.7~4.3%로 나타났다(Table 5).

각 분석물에 대한 정확도(회수율) 및 정밀도는 AOAC 가이드라인에서 제시하는 기준(분석물 농도 1 μg/g일 때 회수율 범위 75-120%, 상대표준편차 8%)에 모두 부합하는 결과로, 높은 정확도와 정밀도를 확인할 수 있었다.

### 실험실간 교차검증

분석법의 유효성 확인을 위하여 실험실간 교차검증을 실시하였다. Baicalin, eleutheroside E, ligustilide에 대한 상대표준편차는 각각 3.0%, 9.1%, 2.0%로 나타났으며, AOAC 가이드라인에서 제시하는 기준(분석물 농도 1 μg/g일 때 상대표준편차 16%)에 적합한 결과로서 분석법의 일관성을 확인할 수 있었다(Table 6).

## Acknowledgement

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비 지원(16161미래식055)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 국문요약

본 연구는 건강기능식품 중 baicalin, eleutheroside E, ligustilide를 효과적으로 분석할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 수행되었다. 이에 LC-MS/MS를 이용하여 신속하고 효율적으로 동시분석할 수 있는 시험법을 확립하였으며, 확립된 시험법에 대해 특이성, 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도에 대한 검증을 통하여 유효성을 확인하고자 하였다. 표준용액을 이용하여 검량선을 작성한 결과 $r^2 > 0.99$ 이상의 직선성을 확인하였고, baicalin, eleutheroside E, ligustilide에 대한 정량한계는 각각 39.3 μg/L, 106.7 μg/L, 76.1 μg/L이었으며, 검출한계는 각각 13.0 μg/L, 35.2 μg/L, 25.1 μg/L이었다. 또한 평균 회수율은 각 성분에 대해 108.0~109.9%, 99.8~101.3%, 91.4~97.2%로 나타났으며, 반복정밀도는 상대표준편차 5%이하, 실험실간 재현성은 9% 이하로 나타나 정확성, 재현성이 우수하였으며 이는 AOAC 가이드라인[19]에서 제시한 기준에 모두 적합한 수준이었다. 따라서 개발된 분석법은 향후 건강기능식품 중 baicalin, eleutheroside E, ligustilide를 동시분석하는데 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## References

1. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): 2016 Food & Drug Statistical Yearbook, eighteenth ed (2016).
2. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Status of recognization for the functional raw material of health functional food. (2016).
3. Shin J.M., Park C.K., Shin E.J., Jo T.H., and Hwang I.K.:

**Table 6.** Inter-laboratory validation results (reproducibility) of analytical method for the determination of baicalin, eleutheroside E, and ligustilide (n = 5)

| | LAB 1 | LAB 2 | Measured mean (mg/g) | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|
| | Measured mean (mg/g) ± RSD(%) | Measured mean (mg/g) ± RSD(%) | | |
| Baicalin | 27.7 ± 0.8 | 26.3 ± 1.3 | 27.0 | 3.0 |
| Eleutheroside E | 2.5 ± 2.5 | 2.1 ± 2.6 | 2.3 | 9.1 |
| Ligustilide | 4.8 ± 2.5 | 4.9 ± 0.6 | 4.8 | 2.0 |

Effects of Scutellariae baicalensis extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J. Food Sci. Technol*., **40**, 674-679 (2008).
4. Yun Luan, Sun Chao, Zhi-Ye Ju, Jue Wang, Xia Xue, Tong-Gang Qi, Guang-Hui Cheng, Feng Kong: Therapeutic effects of baicalin on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting inflammatory response. *Int. J. Immunopharmacol*., **26**, 188-193 (2015).
5. Juan J. Martinez Medina, Luciana G. Naso, Ana L. Perez, Alberto Rizzi, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams: Antioxidant and anticancer effects and bioavailability studies of the flavonoid baicalin and its oxidovanadium (IV) complex. *J. Inorg. Biochem*., **166**, 150-161 (2017).
6. Wei-yi Gong, Zheng-xiao Zhao, Bao-jun Liu, Lin-wei Lu, Jing-cheng Dong: Exploring the chemopreventive properties and perspectives of baicalin and its aglycone baicalein in solid tumors. *Eur. J. Med. Chem*., **126**, 844-852 (2017).
7. Lee W.T.: Distribution of *Acanthopanax* plants in Korea, *Korean. J. Pharmaco*., **10**, 103-107 (1979).
8. Kim M.J., Kwon Y.S., and Yu C.Y.: Antioxidative Compounds in Extracts of *Eleutherococcus senticousus* Max. Plantlets, *Korean J. Medicinal Crop Sci*., **13**, 194-198 (2005).
9. Kang J.S. Linh P.T., Cai X.F., Kin H.S., Lee J.J. and Kim Y.H.: Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 407-411 (2001).
10. Slacnin I., Marston A. and Hostettmann K.: The isolation of Eleutherococcus senticosus constituents by centrifugal partition chromatography and their qunatitative determination by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, **2**, 137-142 (1991).
11. Ming-Di Zhu, Lin-Xia Zhao, Xiao-Tian Wang, Yong-Jing Gao, Zhi-Jun Zhang: Ligustilide inhibits microglia-mediated proinflammatory cytokines production and inflammatory pain. *Brain Res. Bull*., **109**, 54-60 (2014).
12. Jie-Jia Li, Qing Zhu, Ya-Peng Lu, Peng Zhao, Zhan-Bo Feng, Zhong-Ming Qian, Li Zhu: Ligustilide prevents cognitive impairment and attenuates neurotoxicity in D-galactose induced aging mice brain. *Brain Res.*, **1595**, 19-28 (2015).
13. Li C., Zhang L., Lin G., Zuo Z.: Identification and quantification of baicalein, wogonin, oroxylin A and their major glucuronide conjugated metabolites in rat plasma after oral administration of Radix scutellariae product. *J. Pharm. Biomed. Anal*., **54**, 750-758 (2011).
14. Kotani A., Kojima S., Hakamata H., Kusu F.: HPLC with eletrochemical detection to examine the pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rat plasma after oral administration of a Kampo medicine. *Anal. Biochem*., **350**, 99-104 (2006).
15. Kim Y.H., Jeong D.W., Paek I.B., Ji H.Y., Kim Y.C., Sohn D.H., Lee H.S.: Liquid chromatography with tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of baicalein, baicalin, oroxylin A and wogonin in rat plasma. *J. Chromatogr. B*, **844**, 261-267 (2006).
16. Shi lan Feng, Fang di Hu, Jian xiong Zhao, Xi Liu, Y'un Li: Determination of eleutheroside E and eleutheroside B in rat plasma and tissue by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and photodiode array detection. *Eur. J. Pharm. Biopharm*., **62**, 315-320 (2006).
17. Jianming Guo, Jin-ao Duan, Er-xin Shang, Yuping Tang, Dawei Qian: Determination of ligustilide in rat brain after nasal administration of essential oil from Rhizoma Chuanxiong. *Fitoterapia* **80**, 168-172 (2009).
18. Guang-Hua Lu, Kelvin Chan, Chi-Leung Chan, Kelvin Leung, Zhi-Hong Jiang, Zhong-Zhen Zhao: Quantification of ligustilides in the roots of Angelica sinensis and related umbelliferous medicinal plants by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1046**, 101-107 (2004).
19. AOAC INTERNATIONAL: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC Official methods of analysis (2013).