

초음파를 이용한 오죽으로부터 Flavone C-glycosides의 추출 및 항산화활성분석 향상

¹최 선 도 · † ²이 광 진

¹국립강원대학교 삼척캠퍼스 화학공학과 ²한국과학기술연구원 (KIST) 강릉분원
(접수 : 2008. 5. 28., 게재승인 : 2008. 8. 6.)

Enhanced extraction and Antioxidant activity analysis of Flavone C-glycosides from Black bamboo using Ultrasonic wave

Sun Do Choi¹ and Kwang Jin Lee^{2†}

¹Department of Chemical Engineering, Kangwon National University 1 Joongang-ro Samcheok, Gangwon-do, 245-711, South Korea. ²Natural Product Research Center, Korea Institute of Science and Technology KIST Gangneung, 290 Daejeon-Dong, Gangneung, Gangwon-Do 210-340, South Korea

(Received : 2008. 5. 28., Accepted : 2008. 8. 6.)

In this work, the amounts of Flavone C-glycosides homoorientin, orientin extracted from Black bamboo by various ultrasonic waves frequency (35, 72, 170 KHz, 300 Watt \pm 1) time (15, 30, 60 min) and temperature (25°C) were compared using 50% aqueous ethanol solution. And describes analysis of the antioxidant potential of Black bamboo using an high-performance liquid chromatography (HPLC) on-line ABTS⁺ antioxidant screening method. In conjunction with the analysis of their 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺) radical scavenging ability, The optimum operating conditions were experimentally determined to analyze the Flavone C-glycosides homoorientin, orientin in the pretreatment ultrasonic extracts. From the results, the effect on extraction yield of variations in frequency, solvent composition and extraction time was investigated. The highest yield of Black bamboo was obtained by ultrasonic waves with a frequency of 72 KHz and an extraction time of 60 min, The extraction frequency 35 KHz (25°C), time 30 min was selected as an optimal antioxidant activity condition.

Key Words : Blakbamboo, Flavone C-glycosides, HPLC on-line ABTS⁺, Ultrasonic wave

서 론

대나무는 화본과 다년생 식물로써 우리나라를 비롯한 온대, 아열대 및 열대지방에 폭 넓게 분포되어 자생하고 있다[1, 2]. 대나무의 종류는 13종으로서 대표적인 품종으로 왕대, 솜대 및 맹죽이 있으며[3, 4], 특히 강원도 강릉시에는 오죽이 많이 알려져 있다. 대나무는 용도에 따라 가지, 잎, 순 등이 건축신소재, 수공예품, 기능성 식품의 원료 및 전통적인 의약품으로 사용되고 있다[2-4]. 약리적 특성으로는 플라보노이드 계열의 화합물이 많이 함유되어 있으며, 넓은 범위의 약용식물로 사용되고

있다[5]. 플라보노이드류에는 많이 알려진 homoorientin, orientin, vitexin, luteolin 6-C-(6"-O-trans-caffeoylglucoside), vitariflavone 및 tricinel을 들 수 있으며[6], 효능 및 효과에는 열내림, 출혈 방지, 이뇨, 소갈방지, 중풍, 고혈압등의 민간요법과, 항산화 활성, 항바이러스, 항염증 및 항암작용을 하는 것으로 보고되고 있다[7, 8].

이러한 대나무를 이용한 다양한 산업적 적용은 의약품소재, 기능성식품 및 화장품소재 연구는 활발히 진행되었지만, 오죽은 지역의 대표성에 비하여 산업적 생산성 연구가 거의 전무한 실정이다. 오죽으로부터 플라보노이드의 분리에 관한 연구보고는 많지 않으며, 추출방법으로 용매추출법으로 물, 메탄올, 에탄올, 아세트니트릴 및 수용성알코올 사용과, 열수추출법, Soxhlet법, 고온용매추출법, 기계적 압착법등의 전통적인 방법으로 알려져 있다[9, 10]. 일반적인 추출법은 온도에 영향을 많이 받아 추출물들의 열에 의한 성분파괴나 변성등의 단점이 있으며, 낮은 용해도로 인하여 추출효율이 높지 않았다. 따라서

† Corresponding Author : Natural Product Research Center, Korea Institute of Science and Technology KIST Gangneung, 290 Daejeon-Dong, Gangneung, Gangwon-Do 210-340, South Korea

Tel : +82-33-650-7270, Fax : +82-33-650-7299

E-mail : cfc0079@empas.com

추출효율을 증대시키기 위한 한 방법으로 아임계/초임계 CO₂, H₂O 추출법, 감마선조사법, 초고압처리법, 고전압펄스전기장, 초음파추출 기술이 많이 이용되고 있으며, 이중에서도 초음파추출은 산업적 적용에 효율적이다[11]. 초음파추출시스템은 Intensity (Watt)와 Frequency (KHz)의 변화에 따라 제거, 반응, 추출의 효율성을 조절 할 수 있다. 초음파 추출공정은 추출시간이 매우 중요하며[12], 고주파와 저주파의 사용에 따라 캐비테이션의 강도는 달라진다[13]. 또한 시료물질에 미치는 영향은 파장의 침투력이 미세부분의 조직까지 쉽게 침투하여 추출효과를 향상 시킬 수 있다[14, 15]. 또한 HPLC On-line ABTS⁺ screening를 이용한 천연물 연구기법을 활용한 바이오활성을 가지고 있는 다양한 생리활성물질의 신속한 탐색기법으로 적용하여 검토하는 것은 의미 있는 일이라 여겨진다[16, 17]. 특히 활성화합물의 항산화활성과 라디칼 소거능을 신속히 규명하여, 활성을 빠른 시간 내 탐색할 수 있는 장점은 생리활성물질 연구의 기반을 제공할 수 있을 것이다.

본 연구의 목적은 강릉시 주변에서 손쉽게 구할 수 있는 오죽잎에서 항산화활성이 높은 Flavone C-glycosides를 추출하기 위하여 초음파추출시스템에서 수용성에탄올 용매조성비 (%), 시간 (min)와 Frequency (KHz)를 변화하여 Flavone C-glycosides의 추출하고 HPLC On-line ABTS⁺ screening을 사용하여 항산화활성을 빠르게 분석하고 추출량을 실험적으로 구하여 비교하여 추출공정을 확립함으로써 이들 물질에 대한 상용공정의 기초 자료를 제공하고자 하는 것이다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 시료는 강원도 강릉시 한국과학기술연구원 KIST 강릉분원 인근 산에서 (2008년 3월)에 채취하여 음지, 상온 25℃에서 7일간 건조된 시료를 사용하였다. 표준 시료인 Homoorientin, orientin, vitexin와 isovitexin은 Sigma사에서 구입하였다. 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지 (PVDF 0.2 μm, Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. 용매는 HPLC급 (99.9%)으로 물, 아세트나이트릴, 에탄올은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)에서 그리고 아세트산은 동양화학 (Incheon Korea)에서 구입하여 사용하였다. 활성측정을 위해 Radical scavenging 활성 분석을 위하여 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺, C₁₈H₂₄N₆S₄)와 potassium persulfate를 Sigma-Aldrich에서 순도 99.0%를 구입하여 사용하였다. Fig. 1에서는 오죽에 함유된 flavone C-glycosides의 Homoorientin와 orientin의 구조식을 정리하여 놓았다.

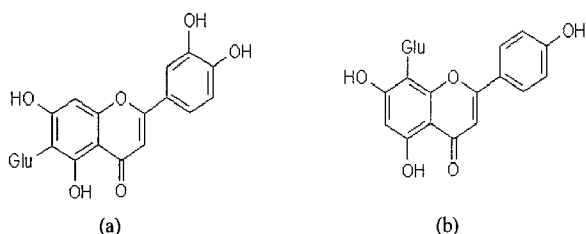


Figure 1. Chemical structures of flavone C-glycosides in antioxidant of black bamboo. (a) homoorientin, (b) orientin).

추출 및 전처리

추출은 일정한 온도 (상온)에서 수행 하였으며, 건조된 시료는 푸드믹서 (220W, 1.3 A person Hannil Mixer FM)에서 2분 동안 분쇄 후 입자를 체 거름 (30 μm)으로 분리하여 시료로 사용하였다. 이후, 오죽분말 3 g을 500 ml 비이커에 추출용매 에탄올과 물 100%, 수용성 에탄올 50%을 각각 100 ml씩 첨가하여 침적조건 및 초음파 추출시스템을 이용하여 추출하였다. 다양한 추출방법을 적용하기 위하여 초음파에너지 (35, 72, 170 KHz, 300 Watt ±1)를 각각 적용하였으며, 추출 온도는 반응기내 물을 chiller을 통해 순환시켜 (25℃ ±1)를 고정하였다. 초음파추출시간은 (15, 30, 60 min)에서 각각 적용하였다. 각각의 추출물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매 추출 후 여지필터 (pore size : 5 μm)에서 감압 여과하여 시료 잔유물과 분리시키고, 시료를 멤브레인 필터 (FH- 0.2 μm, Waters, Milford, MA, USA)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. Fig. 2에서는 오죽으로부터 flavone C-glycosides의 추출 및 정제공정을 나타내었다.

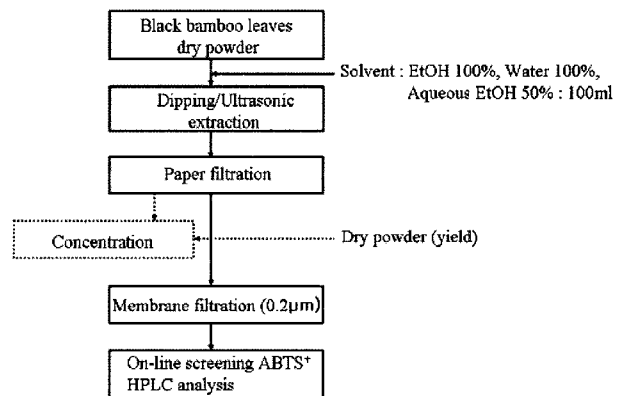


Figure 2. Process of extraction and purification.

초음파 시스템

연구에 사용된 초음파추출시스템은 bath형이며, 관통형 4주파 초음파 발생 장치로서 (220 V, Reactor : 1 L, Mirae Ultrasonic Tech. Co. Korea)이며, (Model No : Flexonic-500/100, 규격 W 382 xL 450 xH 150 mm)의 (Frequency 35, 72, 100, 170 KHz, Intensity max 300 Watt)로 상부와 하부에 온도 조절을 위한 밸브장치 및 chiller를 설치하여 온도를 일정하게 조절할 수 있다. Fig. 3에서는 오죽으로부터 flavone C-glycosides를 추출하기위한 초음파추출시스템을 나타내었다.

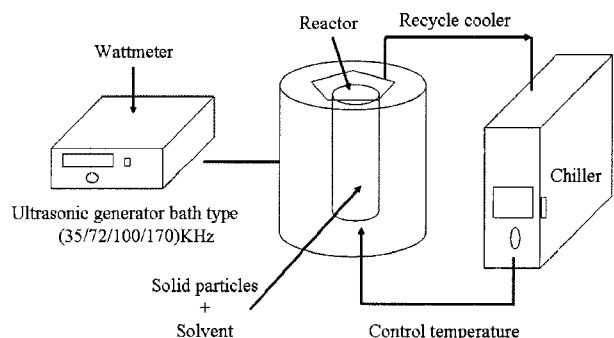


Figure 3. Experimental device for solid-liquid extraction with ultrasonic wave.

표준액 제조

표준 시료인 flavone C-glycosides의 Homoorientin와 orientin 은 2 mg/4 ml이 되게 에탄올에 녹여 500 ppm으로 만들어 사용하였다.

ABTS⁺ 표준액 제조

On-line 라디칼활성 측정을 위한 표준시료 조제는 125 ml 바이얼 병의 물 40 ml에 potassium persulfate 37.8 mg을 넣어 완전히 녹인 후 ABTS⁺ 44 mg을 첨가하여 충분히 교반 해준 후 호일을 둘러 쌓았다. 초기 제조된 용매 40 ml중 30 ml을 털어서 870 ml의 순수한 물을 넣은 1 L 갈색 병에 넣고 하루 정도 radical의 안정성을 위해 어두운 곳에서 보관한 뒤 사용하였다.

기기 및 Online screening ABTS⁺ HPLC 분석

HPLC급 물 (99.9%) 100%를 이용하여 추출된 시료는 농축을 하기 위해서 회전식증발기 (LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co., Japan)를 사용하였고, HPLC시스템으로는 Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbrom, Germany)으로 ChemStation (Agilent Technologies)이 부착된 HPLC-DAD를 사용하였다. 각각의 녹차추출물 5 µl를 Agilent 1200 HPLC system에 주입 하였다. ABTS⁺ 표준액은 Agilent 1200 pump에 의하여 ABTS⁺ 시약이 유속 0.5 ml/min로 1 ml loop를 통해 시약이 운반 되며, 혼합기에서 혼합된 시료를 통해 UV검출기 (Agilent Technologies, Germany) 734 nm에서 항산화활성을 측정하였다. 데이터처리는 Agilent사의 PC에 설치된 Millennium 3.2를 사용하였으며, 분석에 사용된 컬럼은 5 µm인 물질이 충전된 분석용 RP-HPLC의 컬럼 (RS-tech OP C₁₈, 4.6×250 mm)과 유속은 1 ml/min로 고정하였다. UV detector는 DAD의 파장범위는 200-400 nm를 적용하였으며, 크로마토그래피는 330 nm로 나타내었다. 이동상은 이성분계 A : Water/TFA (99.9/0.1, vol%), B : ACN (100, vol%)을 사용하여 (90 : 10-60 : 40, A : B vol.%)까지 45분 동안 선형기울기용매 용출법으로 실험하였다. Fig. 4에서는 HPLC on-line ABTS⁺ screening 시스템을 나타내었다.

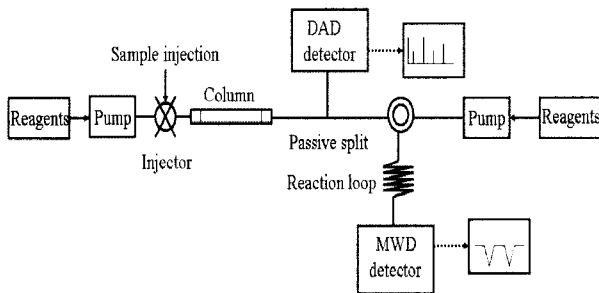


Figure 4. Schematic of on-line screening ABTS⁺ HPLC system.

결과 및 고찰

대나무의 항산화활성 성분으로 잘 알려진 Flavone C-glycosides의 homoorientin와 orientin을 들 수 있으며, 오죽은 인체내의 항균 및 항산화활성을 억제하는데 중요한 역할을 하며, 오죽 및 대나무는 상업적으로 매우 높은 관심을 받고 있다[1, 2]. 본

연구에서는 오죽에서의 Flavone C-glycosides의 homoorientin, orientin을 추출하기 위하여 침적추출온도 (25°C)와 초음파에너지 (35, 72, 170 KHz, 300 Watt ±1)를 각각 적용하였으며, 추출 온도는 반응기내 물을 chiller을 통해 순환시켜 (25°C±1)를 고정하였다. 추출시간은 (15, 30, 60 min)에서 각각 적용하였다. HPLC on-line ABTS⁺ screening를 사용하여 항산화활성을 빠르게 분석하고 homoorientin과 orientin을 정량하여 항산화활성의 영향을 실험적으로 확인하였다(Tables 1). 전처리한 오죽 추출물 (3 g)을 분석용 컬럼을 사용하여 이동상 1 ml/min, 주입부피 20 µl, 330 nm의 실험조건에서 분석하였으며, ABTS⁺ 시약은 유속 0.5 ml/min, 734 nm에서 분석하였다. 이동상은 이성분계 A : Water/TFA (99.9/0.1, vol%), B : ACN (100, vol%)을 사용하여 (90 : 10-60 : 40, A : B vol.%)까지 45분 동안 선형기울기용매 용출법으로 실험하였다. 실험에서 언급한 바와 같이 표준 시료농도는 500 ppm으로 만들었으며, homoorientin와 orientin의 정성분석은 표준시료의 체류시간을 비교하여 확인하였다. 이때, homoorientin와 orientin의 경우 체류시간이 각각 homoorientin는 14.8분, orientin는 15.7분이었다. Fig. 5에서는 오죽에 포함된 homoorientin와 orientin을 추출하기 위하여 다양한 추출용매 100% 물, 100% 에탄올 및 50% 수용성에탄올을 사용하여 침적시간에 따른 homoorientin와 orientin의 추출 효율을 비교하였다. 일반적으로 추출공정에서 추출용매의 선정은 매우 중요한 단계이다[15].

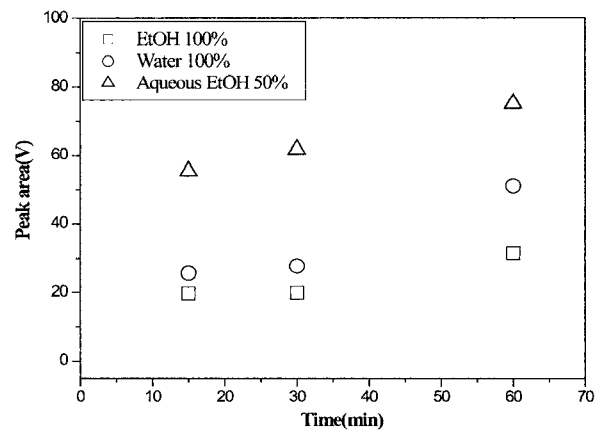
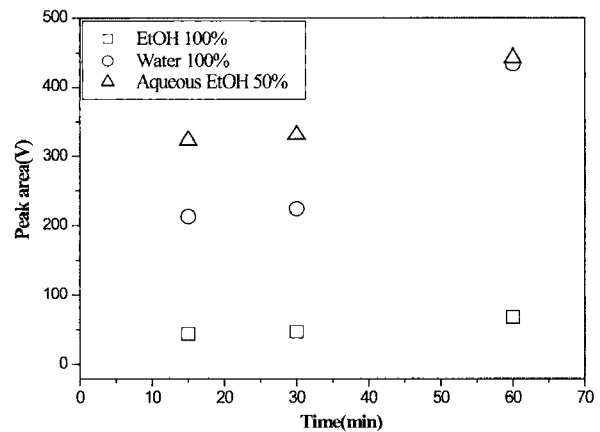


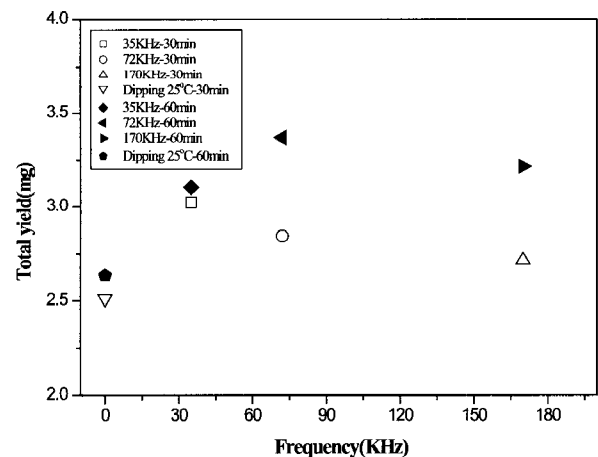
Figure 5. Extraction amount of some flavone C-glycosides with different extraction solvent composition and time. (dipping method, (a) homoorientin, (b) orientin).

Table 1. Effect of difference time and frequency on the antioxidant activity (Extraction temperature 25°C±1, 300W±3)

Ultrasound (Frequency / time (min))	Compounds	Retention time	Peake area (positive)	Area in 330 nm (%)	Peake area (Negativity)	Area in 734 nm (Bioactivity) (%)
35 KHz, 15 min	homoorientin	14.837	6838.6	38.781	501	64.7
	orientin	15.797	766.9	4.349	70.4	11.0
35 KHz, 30 min	homoorientin	14.833	9623.8	35.810	517	73.8
	orientin	15.797	1169.5	4.352	103.9	14.8
35 KHz, 60 min	homoorientin	14.835	8952.0	37.013	476	58.9
	orientin	15.790	1051.9	4.349	76.1	09.4
72 KHz, 15 min	homoorientin	14.833	7069.8	40.005	405	63.3
	orientin	15.793	769.5	4.355	73.3	11.3
72 KHz, 30 min	homoorientin	14.801	9707.1	38.025	509.6	65.7
	orientin	15.762	1092.9	4.281	76.3	09.3
72 KHz, 60 min	homoorientin	14.867	11494.1	38.815	569.9	68.1
	orientin	15.824	1285.1	4.340	78.1	10.1
170 KHz, 15 min	homoorientin	14.871	5961.2	44.636	383.3	66.7
	orientin	15.826	607.4	4.548	58.6	09.0
170 KHz, 30 min	homoorientin	14.870	7052.4	41.306	501	64.7
	orientin	15.827	744.2	4.359	68.6	11.8
170 KHz, 60 min	homoorientin	14.905	9449.3	40.720	507.2	65.0
	orientin	15.865	1025.0	4.417	74.4	09.4

따라서 초음파에너지의 영향력을 확인하기 위하여 침적방법 (상온 25°C)을 비교하여 하였다. 침적에 의한 homoorientin과 orientin추출물은 크로마토그램의 피크면적 (%)에 따라 에탄올은 homoorientin이 15분 44.4% > 30분 47.4% > 60분 68.8%이며, orientin은 15분 19.8% > 30분 20.1% > 60분 31.6%순으로, 물은 homoorientin이 15분 212.8% > 30분 224.4% > 60분 433.9%이며, orientin은 15분 25.8% > 30분 27.8% > 60분 51.1%순으로, 50% 수용성에탄올은 homoorientin이 15분 323.1% > 30분 331.1% > 60분 442.6%이며, orientin은 15분 55.5% > 30분 61.8% > 60분 75.2%순으로 에탄올 > 물 > 수용성에탄올 순으로 추출효율을 보였다. 이것은 추출하고자 하는 물질의 극성과 유사한 극성을 가지는 유기 용매에서 높은 용해도를 가지기 때문에 추출 수율이 크게 된다[18, 19]. 또한 용매가 시료에 들어갔을 때 서로 비슷한 것끼리는 잘 혼합되고 섞이고 잘 붙는 성질에 따라 같은 성질끼리 서로 잘 녹으며 성질이 다른 것과는 섞이지도 녹이지도 못한다. Fig. 6에서는 오죽에 포함된 homoorientin과 orientin를 50%수용성에탄올을 적용하여 25°C에서 초음파에너지 (35, 72, 170 KHz, 300 Watt ±1)의 변화와 추출시간은 30분과 60분을 적용하였다. 또한 수율은 여지여과후 농축단계를 거쳐 건조된 전체수율 (mg)을 얻을 수 있었다. 그 결과 추출시간 30분에서는 35 KHz : 3.023 mg > 72 KHz : 2.844 mg > 170 KHz : 2.714 mg > 침적 : 2.512 mg이었으며, 60분에서는 72 KHz : 3.368 mg > 170 KHz : 3.214 mg > 35 KHz : 3.104 mg > 침적 : 2.636 mg을 얻을 수 있었다. 이것은 초음파의 Frequency (KHz)와 Intensity (Watt)에 따라 초음파의 매질은 국부적으로 가열되고, 큰 장력으로 인해 물속에 작은 기포가 발생한다. 발생된 기포가 터질 때의 압력과 기포 안의 방전 때문에 초음파를 받은 물질은 기계적인 작용을 받거나 화학 변화를 일

킨다. 초음파 에너지가 더욱 증가하면 액의 분자간에 응집력이 파괴되고 미세한 캐비테이션 (기포가 생성되는 현상)인 공동 (cavity)이 발생되며, 이 공동이 폭발하면서 강력한 에너지를 방출에 의한 것으로 알 수 있다. 초음파 에너지가 더욱 증가하면 액의 분자간에 응집력이 파괴되고 미세한 캐비테이션 (기포가 생성되는 현상)인 공동 (cavity)이 발생되며, 이 공동이 폭발하면서 강력한 에너지를 방출에 의한 것으로 알 수 있다[11-15]. 또한 초음파 추출방법에 있어 초음파 에너지 세기와 시간에 따른 추출 영향 보여주었고, 시간이 길고 에너지가 강해지면 유용성분의 구조들이 분해됨을 알 수 있다. Fig 7에서는 오죽의 HPLC on-line ABTS⁺ screening 분석 크로마토그램을 보여주고 있다. 본 연구결과 HPLC on-line ABTS⁺ screening 기법은 활성화합물의 항산화활성과 라디칼 소거능을 신속히 규명하는데 유용하며, 활성을 빠른 시간내 탐색할 수 있는 장점을 가지고 있다고 판단되어 다양한 분야에 적용하여 기능성 물질의 신속 탐색법으로 검토하는 것은 의미 있는 일이라 여겨진다. 여기에서 homoorientin과 orientin의 항산화활성 경향은 다른 물질의 피크와 겹치지 않고 baseline이 안정된 낮은 피크의 Intensity를 볼 수 있었다. 또한 homoorientin과 orientin의 항산화활성은 Frequency 35 KHz, 30분에서 73.8%와 14.8%로 가장 높았으며, 그 외 추출물들은 편차 ±2 범위에서 유사한 경향을 볼 수 있었다. 그러나 전체 수율에서는 Frequency 72 KHz, 60분에서 추출 효율이 높았으며, Ferquency (KHz)와 Intensity (Watt)의 조절, 시간 (min)과 온도 (°C)의 영향에 따라 추출 효율 및 항산화활성의 영향은 다양한 변수에 의하여 편차가 클 것으로 사료된다.

**Figure 6.** Total yield in black bamboo leaves by dipping and ultrasonic extraction method. (Extraction time : 30 and 60 min, Extraction temp., 25°C).

요 약

오죽으로부터 HPLC On-line ABTS⁺ screening 기법을 사용하여 Flavone C-glycosides의 특성중의 하나인 항산화활성을 빠르게 분석하였으며, 오죽으로부터 homoorientin과 orientin의 추출을 다양한 초음파 주파수와 시간의 추출방법을 적용하였다. 전처리한 추출액에 포함된 오죽의 Flavone C-glycosides을 분석하고 최적의 추출조건을 실험적으로 모색하였다. 실험결과에

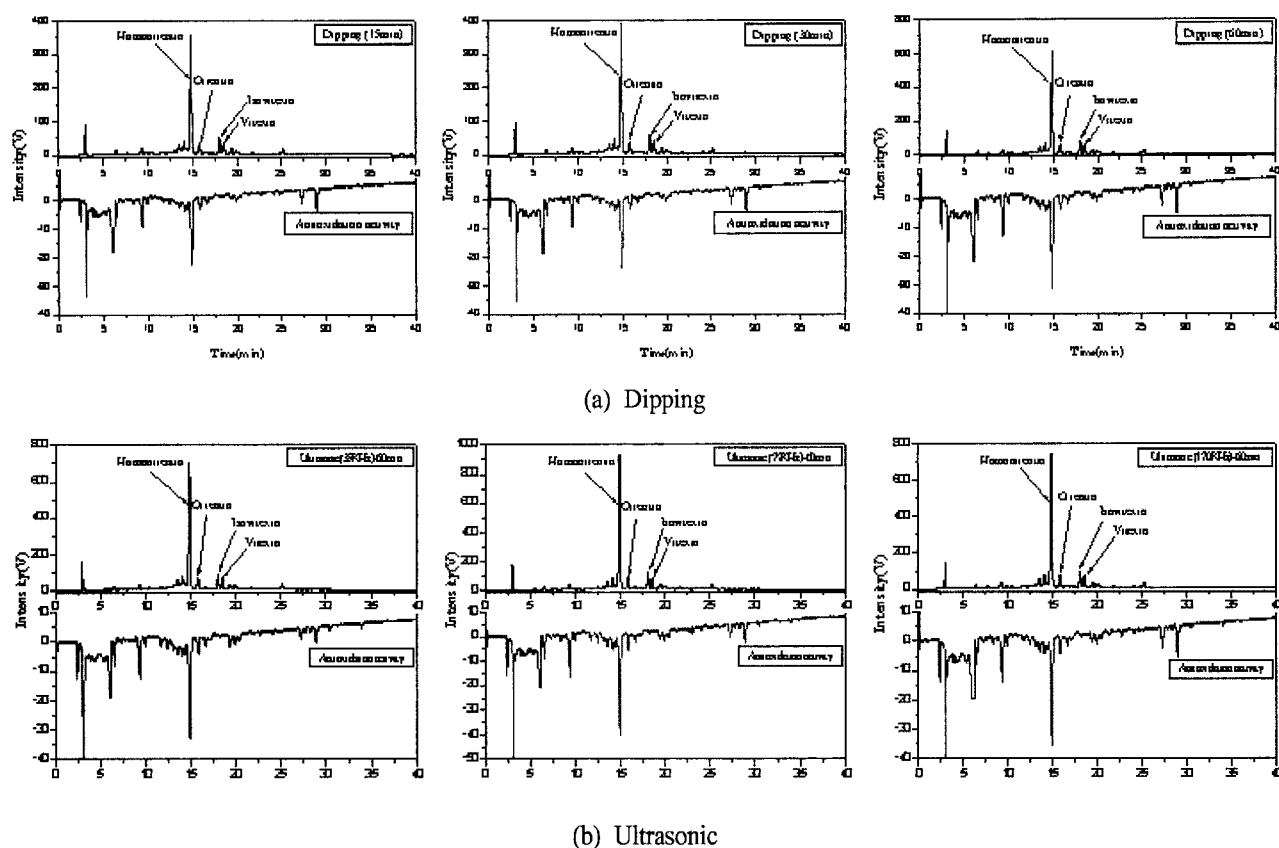


Figure 7. Chromatogram antioxidant activity of flavone C-glycosides from black bamboo leaves using on-line screening ABTS⁺ HPLC system. (mobile phase A: Water 99.0 vol% + TFA 0.1 vol%, B: ACN 100 vol%, gradient elution B : 10-40, run time : 45 min, flow rate : 1 ml/min, ABTS⁺ flow rate : 0.5 ml/min, injection volume : 20 μ L, wavelength : 730 nm)

의하면 전체 수율에서는 Frequency 72 KHz, 60분에서 3.37 mg으로 추출 효율이 높았고, homoorientin와 orientin의 항산화활성은 Frequency 35 KHz, 30분으로 추출한 시료가 73.8%와 14.8%로 가장 우수 하였다.

감 사

본 연구는 한국과학기술연구원 KIST강릉분원 천연물소재 연구센터에서 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Zhang, Y., J. Jiao, C. Liu, X. Wu, and Y. Zhang (2008), Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high performance liquid chromatography, *Food chemistry* **107**, 1326-1336.
- Lu, B., X. Wu, X. Tie, Y. Zhang, and Y. Zhang (2005), Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves, *Food and Chemical Toxicology* **43**, 783-792.
- Kim, M. J., M. W. Byun, and M. S. Jang (1996), Physiological and antibacterial activity of bamboo(*Sasa coreana Nakai*) Leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 135-142.
- Chung, H. J., and B. G. Ko (2005), Antibacterial activities of bamboo sap against *Salmonella Typhimurium* and inhibitory effects in a model food system. *Korean J. Food Culture.*, **20**, 709-714.
- Zhang, Y., B. Bao, B. Lu, Y. Ren, X. Tie, and Y. Zhang (2005), Determination of flavone C-glycosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection, *Journal of Chromatography A*, **1065**, 177-185.
- Wua, J. H., S. Y. Wu, T. Y. Hsieh, and S. T. Chang (2002), Effects of copper-phosphorous salt treatments on green colour protection and fastness of ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*), *Polymer Degradation and Stability* **78**, 379-384.
- Chung, D. K. and R. N. Yu (1995), Antimicrobial activity of bamboo leaves extract on microorganisms related to Kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 1035-1038.
- Hu, C., Y. Zhang, and D. D. J. Kitts (2000), Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *henonis* leaf extract in vitro. *Agric. Food Chem.* **48**, 3170-3176.
- Cushnie, T. T. P. and A. J. Lamb (2005), Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 343-356.
- Knorr, D., M. Zenker, V. Heinz, and D. U. Lee (2004), Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 261-266.
- Lee K. J. and K. H. Row (2006), Enhanced extraction of isoflavones from Korean soybean by ultrasonic wave, *Korean J. Chem. Eng.*, **23**, 779-783.
- Rezić I., A. J. M. Horvat, S. Babić, and M. Kaštelan-Macan (2005), Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography, *Ultrasonics Sonochemistry* **12**, 477-481.

13. Jerković I., J. Mastelić, Z. Marijanović, Ž. Klein, and M. Jelić (2007), Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. *Ultrasonics Sonochemistry* **14**, 750-756.
14. Vilkhū, K., R. Mawson, L. Simons, and D. Bates (2008), Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry A Review, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9**, 161-169.
15. Lee, K. J. and B. H. Um (2008), Extraction of Useful component from Natural plants using Ultrasound system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 101-108.
16. Nuengchamng, N., C. F. de Jong, B. Bruyneel, W. M. A. Niessen, H. Irth, and K. Ingkaninan (2005), HPLC Coupled On-line to ESI-MS and a DPPH-based Assay for the Rapid Identification of Anti-oxidants in *Butea superba*, *PHYTOCHEMICAL ANALYSIS Phytochem. Anal.* **16**, 422-428.
17. Ogawa, A., H. Arai, H. Tanizawa, T. Miyahara, and T. Toyo-oka (1999), On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Analytica Chimica Acta* **383**, 221-230.
18. Shi, Z., J. He, and W. Chang (2004), Micelle-Mediated Extraction of Tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* with Analysis by High-Performance Liquid Chromatography, *Talanta* **64**, 401-407.
19. Han, S. K., K. J. Lee, J. D. Kim, Y. W. Lee, and K. H. Row (2004), Extraction of Isoflavones from Korean Soybean by Sub/Supercritical Water, *Korean Chemical Engineering Research* **42**, 669-672.