

*Salvia Miltiorrhiza Bunge*로부터 Tanshinone IIA의 용매추출

만효룡 · 정용인* · 노경호†

인하대학교 화학공학과 초정밀생물분리기술센터
402-751 인천시 남구 용현동 253
*한국기기유회사시험연구원 화학분석평가팀
135-892 서울시 강남구 신사동 587-10
(2008년 4월 1일 접수, 2008년 4월 21일 채택)

Solvent Extraction of Tanshinone IIA from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*

Xiaolong Wan, Yong An Jung* and Kyung Ho Row†

Center for Advanced Bioseparation Technology, Department of Chemical Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea

*Chemical Analysis & Research Team, Korea Machinery-Meter and Petrochemical Testing & Research Institute, 587-10, Sinsa-Dong, Gangnam-Gu, Seoul 135-892 Korea

(Received 1 April 2008; accepted 21 April 2008)

요 약

본 연구에서는 분석용 HPLC를 사용하여 단삼(*Salvia Miltiorrhiza Bunge*; SMB)의 추출물로부터 Tanshinone IIA (TIIA)를 분리하였다. 우선 유기용매를 사용하여 추출 및 전처리한 단삼 추출액으로부터 HPLC를 사용하여 TIIA를 분석하였으며, 고순도의 TIIA를 분리하기 위한 최적의 분석조건을 실험적으로 구하였다. 모든 단삼 시료들은 메탄올, 에틸아세테이트, 에탄올 등과 같은 유기용매로 추출하고 비교 분석하였다. 실험결과에 의하면 추출용매로 메탄올을 사용한 경우, 단삼으로부터 TIIA의 추출효율이 가장 우수 하였다. 또한 TIIA를 분석하기 위한 조건으로는 C₁₈ 컬럼을 사용하였고, 이동상은 물과 메탄올을 사용하여 주로 등용매 용리를 적용하였을 때, SMB 1 mg에 2.154 µg TIIA를 분말로 추출하였다.

Abstract – In this work, analytical HPLC was utilized to obtain Tanshinone IIA (TIIA) from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* (SMB). The optimum operating conditions were experimentally determined to analyze the TIIA in the pretreated extract. SMB was extracted with the various organic solvents of methanol, ethyl acetate, and ethanol, then the extract was analyzed to compare the amount of TIIA. From the results, the methanol showed the best extraction efficiency of TIIA. The analysis by C₁₈ column was performed. The mobile phase was composed of methanol and water, and the isocratic elution mode was mainly applied. 2.154 µg of TIIA/mg of SMB powder was extracted with methanol.

Key words: *Salvia Miltiorrhiza Bunge*, Tanshinone IIA, Extraction, Purification, RP-HPLC

1. 서 론

단삼(*Salvia Miltiorrhiza Bunge*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 약용식물로서 뿌리가 붉기 때문에 단삼이라 한다[1]. 단삼의 뿌리와 줄기는 오래 전부터 중국의 전통 의약으로 혈액순환, 심장 질환등에 사용되어 왔다[2]. 바이오산업에서 웰빙이 추구되는 현대 사회는 환경오염 및 식생활문화에 의하여 다양한 질병인 성인병 발생이 증가하고 예방에 따른 건강의 관심이 높아지고 있다. 대표적으로 비만, 고혈압, 심장질환등이 인체에 미치는 영향이 매우 크다.

따라서 천연물로부터 생리활성 물질의 소재 탐색 연구가 많은 연구자로부터 관심을 갖고 있으며, 항암물질에 의한 면역시스템의 활성화를 통해 질병에 대한 생체방어 능력을 보강해 준다[3]. 단삼(뿌리)은 치료수단인 동시에 국내에서 사용되는 한약재중의 하나이다[4]. 몇몇의 약리작용에 관한 연구에서는 크게 두 가지 형태의 화합물인 lipid-soluble diterpenoids와 water-soluble polyphenolic의 화합물로 나눌 수 있으며[5], 이것은 항산화 활성의 산화방지제에 대하여 혈관 및 피부 세포조직질환에 중요한 요인으로 많은 연구가 되고 있다[5, 6]. 단삼의 유용 성분을 살펴보면 대부분이 tanshinone I, IIA, IIB, dihydrotanshinone, cryptotanshinone, neotanshinone A, B, C, isotanshinone I, IIB, isocryptotanshinone등의 furo-1, 2 또는 furo-1, 4-naphthoquinone moiety를 가지는 abietane 형태의 diterpenoid

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rowkho@inha.ac.kr

‡ 이 논문은 인하대학교 정성택 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

색소이며, rosmarinic acid, lithospermate B, magnesium lithospermate B 같은 phenol성 화합물이 알려져 있다[4, 7]. 이중에서도 항암 및 고혈압조절제인 Cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA는 중요한 활성성분으로 구성되었다[3-8].

특히 TIIA는 주 활성성 성분으로 분자량이 $C_{19}H_{18}O_3$ (Molecular Weight: 294.33)며, 퇴행성 골 질환을 예방과 치료[9], 심장 질환, 혈관계에서 혈류량을 증가, 항균, 소염, 신부전증 개선, 심근경색, 신장질환 효과등이 보고되어 있다[9-11]. 이러한 효능 때문에 여러 측면을 연구한 결과 식품, 의약품 등의 외용제 및 건강식품, 과립차 및 음료로 이용되고 있고, 단삼의 성분 분석과 효능에 관한 것 뿐만 아니라 고순도 분리에 대한 연구는 계속해서 진행되고 있다[12]. TIIA를 얻기 위한 추출 방법으로는 일반적인 용매추출법으로 물, 메탄올, 에탄올, 아세트니트릴을 주로 사용하며[13], Soxhlet은 전통적인 증류방법으로 많이 알려져 있으며, 초음파 기술 추출공정은 고주파와 저주파의 사용에 따라 캐비테이션(기포가 생성되는 현상)에 따라 강도가 달라진다. 또한 시료물질에 미치는 영향은 과장의 침투력이 미세부분의 조직까지 쉽게 침투하여 추출효과를 향상하며[8, 14], 일반적인 추출방법보다, 빠르고, 자동적이며, 환경에 안전하여 유용물질을 선택적으로 얻을 수 있는 초임계 CO_2 를 이용한 추출방법이 연구되어지고 있다[2, 15]. 또한 생물공학 분야에서 필수적으로 사용되고 있는 HPLC는 탁월한 분석 및 분취 능력으로 인해서 최근에는 생물제품 생산용 장치로서도 부각되고 단삼에서의 분리 및 정제의 연구도 보고 되고 있다[16, 17].

본 연구에서는 단삼에 함유된 유용성분인 Tanshinone IIA (TIIA)에 대한 추출공정 및 분석용 HPLC를 사용하여 분리할 수 있는 최적 분리조건을 실험적으로 확립함으로써 TIIA에 대한 상용공정의 기초 자료를 제공하고자 한다.

2. 실험

2-1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 건조된 단삼뿌리는 경동시장(서울)에서 구입하였다. 시료는 균일하게 분쇄하여 38~56 μm 의 체에 여과한 후에 사용하였으며, 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기(Desiccator)에 보관하여 사용하였다. 표준 시료인 TIIA는 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products (북경, China)에서 구입하였다. 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 μm , Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. 이동상으로 사용된 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트는 덕산화학에서 구입하였으며, 아세트산은 동양화학에서 구입하였다. 물은 감압 펌프(Waters Co.)와 필터(HA-0.5 μm , Waters Co.)를 이용하여 여과한 3차 증류수를 사용하였다. 또한 표준용액은 표준시약 TIIA 1 mg을 에탄올 10 ml에 녹여 100 ppm으로 사용하였다. Fig. 1에서는 단삼에서 추출된 TIIA의 화학적 구조식을 보여주고 있다.

2-2. 실험 기기

본 실험에서 사용된 분석용 HPLC 장치는 Waters 515 multi-solvent delivery system 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector (50 μl sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.)를 사용했다. HPLC에서 얻은 chromatogram은 데이터 수

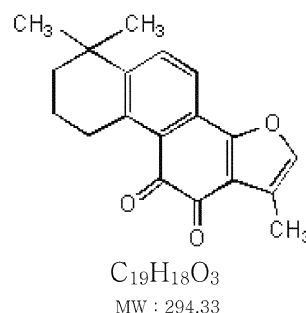


Fig. 1. The molecular structure of TIIA.

집 장치인 Chromate (Ver. 3.0, Interface Eng., Korea)를 통해서 얻었다. 추출액으로부터 TIIA의 분석은 입자 크기가 5 μm 인 물질이 충전된 분석용(RS-tech OP C_{18} , 0.46 \times 15 cm) 컬럼을 사용하였다. 단삼시료는 푸드믹서(Hanil Mixer FM-909T, 220 W, 1.3 A)를 사용하여 2분 동안 분쇄하였으며, 분쇄된 단삼분말로부터 교반기(Model : MS-300, Max : 1600 MTOPI)를 사용하여 용매추출을 하였다. 이때 RPM 측정은 Digital stroboscope (Tachometer Model : DT-2249)로 확인하였다. 전처리 단계에서 단삼추출액에 포함된 많은 양의 불순물을 제거하기 위해서 초원심 분리기(Beckman Coulter)를 사용하였다. 추출한 시료를 농축하기 위하여 회전식 증발기(BÜCHI Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였다. 이동상은 A : 물/아세트산(99.5/0.5, vol%)/ B : 메탄올(100, vol%)을 사용하여(30/70, vol%)까지 20분 동안 등용매 용리법과 A : 물/아세트산(99.5/0.5, vol%), B : 메탄올(100, vol%)을 0~10분까지 95:5로, 10~20분까지 5:95으로 기울기 용리법(gradient)으로 수행하였다.

2-4. 추출 방법

단삼뿌리(SMB)에서 TIIA를 추출하기 위해 단삼분말시료 15 mg에 메탄올, 에틸아세테이트, 에탄올을 각각 50 ml씩 넣고 상온(25 $^{\circ}C$)에서 15 h 동안 교반(500 rpm) 추출하였다. 불순물 및 잔류물(찌꺼기 등)을 제거하기 위해서 추출된 용액을 초원심 분리기(Beckman Coulter)에서 회전 속도 10,000 rpm, 4 $^{\circ}C$ 에서 1분 동안 원심분리를 하였으며, 분리된 액 중 상층액을 사용하였다. 단삼뿌리(SMB)가 포함된 하층 고형물은 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 이렇게 하여 얻어진 추출액은 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하여 분석을 위한 최종시료를 만들었으며, 분석용 컬럼으로 분석하였다.

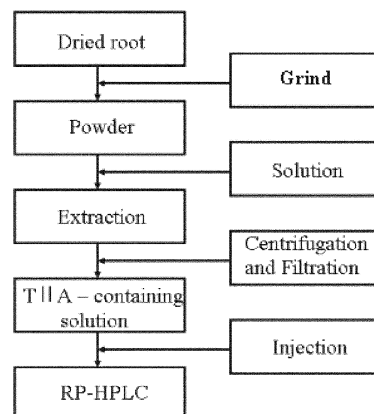


Fig. 2. Extraction and purification procedures of SMB.

분석을 위한 HPLC의 실험 조건은 유속 1 ml/min, 주입부피 15 µl, 검출과장은 254 nm로 고정하여 실험하였다. Fig. 2에서는 본 연구에서 적용된 추출 및 정제방법의 공정을 도식화하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 단삼뿌리(SMB)에 포함된 TIIA의 함량과 분리 및 분석조건을 실험적으로 고찰하여 확인하였다. TIIA는 항암물질 및 고혈압 억제제로 많이 알려진 중요한 물질이며, 단삼뿌리(SMB)에 함유되어 있는 유용성분들은 용매의 용해도를 이용하여 추출되어지며, TIIA 및 화합물은 유사한 물질의 구조식에 따라 제거 또는 최종목적물질까지 저순도, 중순도, 고순도로 얻게 된다[18]. 실험에서 언급한 바와 같이 다양한 추출용매를 사용하여 단삼뿌리로부터 TIIA를 추출하였으며, 사용된 각각의 추출용액에 대한 Polarity index는 메탄올(P^r=5.1), 에틸아세테트(P^r=4.4), 에탄올(P^r=5.2)이다[13,18].

Fig. 3에서는 실험을 통해서 얻은 여러 가지 농도의 TIIA 표준 용액으로부터 계산된 검량선을 나타내고 있다. 실험에서는 단삼 추출액으로부터 TIIA의 정량분석을 위해 표준용액의 농도를 20, 40, 60, 80, 100 ppm 등 5가지로 제조하였다. 제조된 각 표준용액을 HPLC에 주입하여 동일한 분석조건하에서 얻은 각각의 크로마토그램의 피크 면적(Y)과 농도(X)와의 관계로부터 검량선을 실험적으로 계산하였으며, 이때 TIIA 정량분석을 위한 계산식은 $Y = 4.982 \times 10^{-4}X - 8.4 \times 10^{-4}$ 이며 상관계수는 $r^2 = 0.9973$ 이었다. 이 계산식으로부터 각각의 유기용매에 추출된 TIIA의 양을 확인한 결과 사용한 유기용매 중 메탄올이 가장 우수한 추출수율을 나타내었다(Table 1참조). 또한 추출액 중의 TIIA에 대한 정성분석은 표준시료와의 체류시간을 비교하여 확인하였으며, TIIA의 체류시간은 9.1분이었다. Fig. 4에서는 메탄올 추출물에 대한 크로마토그램을 보여주고 있다.

Table 1. The extraction amounts of TIIA from SMB with three different extractants

Extractant	TIIA (µg/mg)
Methanol	2.154
Ethyl acetate	0.757
Ethanol	0.522

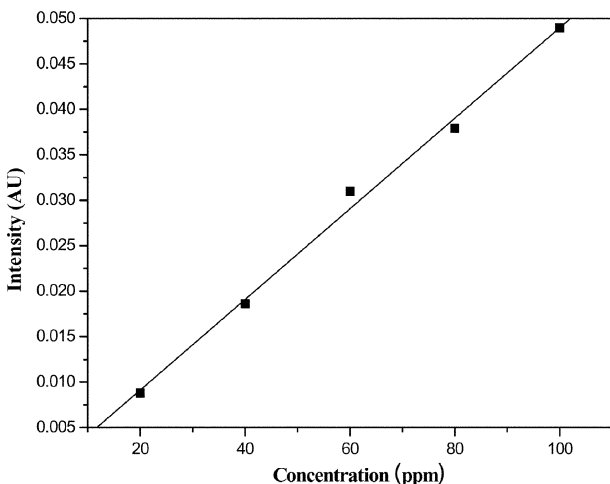


Fig. 3. The calibration curve of TIIA.

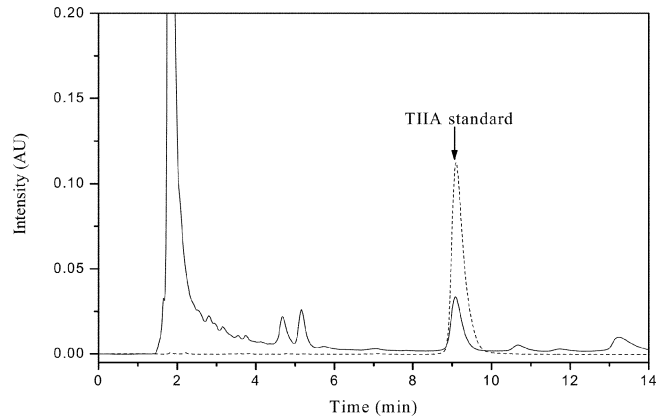


Fig. 4. Chromatograms of TIIA standard and methanol extract (Mobile phase: Methanol:Water (70:30, v/v, containing 0.15% AA), Flow rate: 1 ml/min, Injection volume = 15 µl).

일반적으로 물질 중에 함유된 유용성분을 추출하기 위한 추출공정에서 추출용매의 선정은 매우 중요하다. 추출하고자 하는 물질의 극성과 유사한 극성을 가지는 유기 용매에서 높은 용해도를 가지기 때문에 추출수율이 크게 된다[13, 16]. 단삼 시료로부터 TIIA를 추출하기 위한 추출용매로 메탄올을 사용하였을 때, 극성이 서로 비슷한 것끼리는 잘 혼합되고 섞이고 잘 붙는 성질에 따라 같은 성질끼리 서로 잘 녹으며 성질이 다른 것과는 섞이지도 녹이지도 못한다. 또한 극성(투사율 2-3)이 없는 것은 극성이 없는 것 끼리 분자사이로 용매가 끼어들어 녹여낼 수가 있으며 반대의 것들은 서로 침투가 어려워져서 녹이지 못한다. 단삼뿌리(SMB)에 함유된 TIIA를 추출하기 위해서 분쇄기로 잘 분쇄한 단삼뿌리분말을 100%의 메탄올에 넣고, 교반과 여과 단계를 거쳤다. 이 과정을 통하여 TIIA를 고효율적으로 추출하였으며, 이 경우 메탄올에 대한 Polarity index는 P^r=5.1로 많은 부분의 TIIA를 용해시킬 수 있었다. 전처리한 단삼 추출물은 분석용 컬럼을 사용하여 유속 1 ml/min, 주입부피 15 µl의 실험조건에서 분석하였다. 이동상으로는 물, 메탄올의 2성 분계의 이동상을 이용하여 여러 가지 이동상의 조성법에 의하여 분리능을 확인한 결과 메탄올-물(70:30, v/v, containing 0.15% AA)으로의 등용매 용리법이 가장 우수한 분리능을 나타내었다. 위와 같이 분리된 TIIA를 추출조건을 달리하여 피크의 면적을 확인한 결과 메탄올(MeOH)을 사용하였을 때 함량이 2.154 µg/mg로 에틸아세테이트(EtOAc) 0.757 µg/mg, 에탄올(EtOH) 0.522 µg/mg보다 4.3배가량 많은 양의 TIIA를 추출할 수 있었다. Table 1에서는 단삼뿌리(SMB)에 포함된 TIIA에 대해서 용매에 따른 추출 함량을 보여주고 있다. Fig. 5에서는 에틸아세테이트로 추출한 크로마토그램을 보여주고 있다. 추출용매는 메탄올보다 낮은 극성(P^r=4.4)을 갖고 있으며 주입부피 15 µl를 주입하여 동일한 실험조건에서 분석하였다. TIIA의 용해도는 Fig. 4와는 달리 다른 물질의 피크와 겹치지 않고 baseline이 안정된 낮은 피크의 Intensity를 볼 수 있었으나 메탄올 추출물에 비하여 Intensity가 낮았다. 이것은 TIIA이 에틸아세테이트(EtOAc)에 잘 녹지 않는 극성에 가까운 물질임을 알 수 있으며, 추출된 TIIA의 양은 0.757 µg/mg으로 메탄올 추출물에 비하여 2.8배 감소하였다. Fig. 6에서는 에탄올로 추출한 크로마토그램을 보여주고 있다. 추출용매로서 메탄올(P^r=5.1)과 에탄올(P^r=5.2)은 비슷한 Polarity index를 갖고 있지만 끓는점은 메탄올(65 °C), 에탄올(78 °C), 에틸아세테이트(77 °C)과 같이 용매에 따

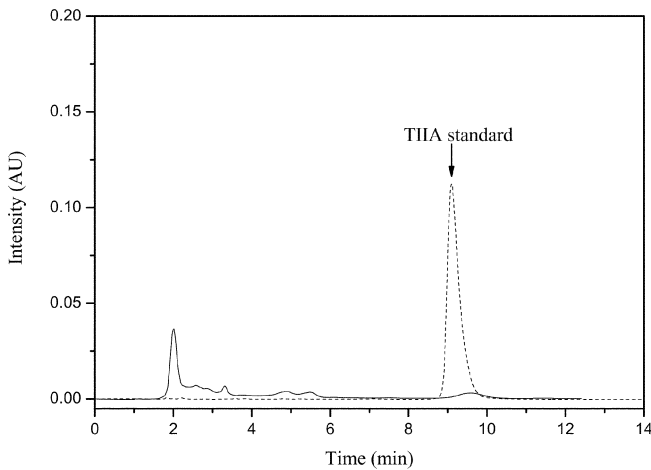


Fig. 5. Chromatograms of TIIA standard and ethyl acetate extract ((Mobile phase: Methanol:Water (70:30, v/v, containing 0.15% AA), Flow rate: 1 ml/min, Injection volume = 15 μ l).

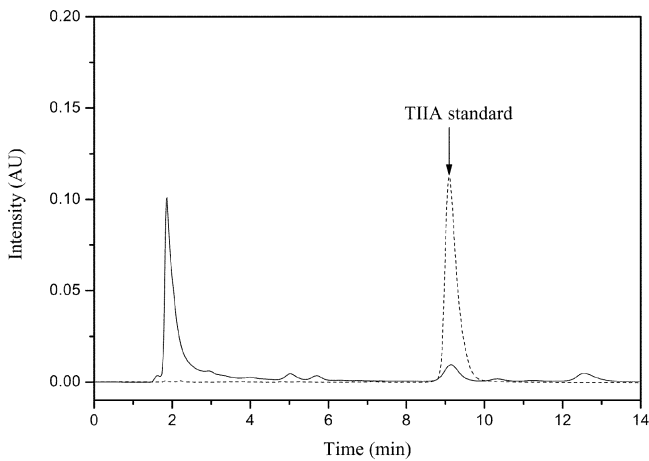


Fig. 6. Chromatograms of TIIA standard and ethanol extract (Mobile phase: Methanol:Water (70:30, v/v, containing 0.15% AA), Flow rate: 1 ml/min, Injection volume = 15 μ l).

라 차이가 있다. 극성이 강한 화합물은 뜨거운 비극성 용매에는 잘 용해되지 않으나, 극성 용매에는 차가워도 잘 용해되는 성질이 있다. 일반적으로 천연물 추출에서는 물질이 높은 온도에 의해서 유용성분들이 분해되지 않도록 상온에서 조업을 한다. 본 실험에서는 에탄올로 추출한 시료를 주입부피 15 μ l하고 HPLC에 주입하여 앞에서와 동일한 분석조건에서 실험하였다. 에탄올 추출에서 TIIA의 용해도는 Fig. 5와 비슷한 낮은 Intensity의 크로마토그램을 보이고 있다. TIIA의 추출된 양은 0.522 μ g/mg으로 메탄올 추출물에 비하여 4배정도 감소하였다. Fig. 7에서는 Fig. 4와 동일한 메탄올 추출용매를 이용하여 기울기 용리법(gradient)으로 분석한 크로마토그램을 보여주고 있으며, 같은 주입부피, 유량조건에서 실험하였다. 이동상 조성은 A : 물/아세트산, 99.5/0.5(vol%)/B : 메탄올/100(vol%)로 0~10분까지 95:5으로, 10~20분까지 5:95으로 기울기 용리법(gradient)으로 분석하였다. Fig. 4에서 얻은 결과와 비하여 TIIA의 체류시간이 13.5분으로 길어진 반면, 컬럼 효율과 분리도는 감소하였으며, 표준물질로부터 TIIA를 확인 할 수 있었다. 또한 분석법에 따른 함량변화의 차이는 ± 0.05 로 거의 없었다. 따라서 두 분석방법에 대한 TIIA의 정량분석 결과, 기울기 용리법(gradient)

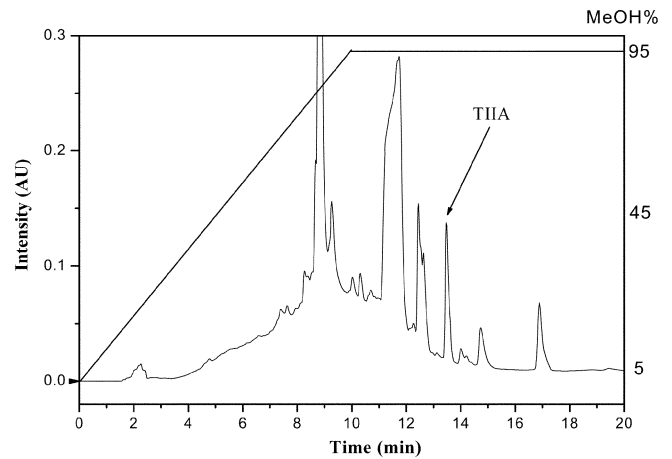


Fig. 7. Chromatogram of the methanol extract with gradient elution (Flow rate = 1 ml/min, Gradient elution: A: methanol, B: Water +0.5% AA, 0-10 min A/B=95:5, 10-20 min A/B=5:95, Injection volume = 15 μ l).

과 등용매 용리법은 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다.

4. 결 론

본 연구에서는 분석용 HPLC를 사용하여 단삼(SMB)의 추출물로부터 TIIA를 추출 및 분석하였다. TIIA를 추출하기 위한 추출용매로 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트를 사용하였으며, 추출액은 역상 C₁₈ 컬럼을 이용하여 동일한 분석조건하에서 추출물에 포함된 TIIA를 분석하였다. 실험결과에 의하면 추출용매로 메탄올(MeOH)을 사용하였을 때 TIIA의 함량이 2.154 μ g/mg로 에틸아세테이트(EtOAc) 0.757 μ g/mg, 에탄올(EtOH) 0.522 μ g/mg보다 더 우수한 추출수율을 나타내었다. 단삼에 함유된 TIIA를 분석하기 위한 최적 조건은 분석용 컬럼을 사용하여 유속 1 ml/min, 주입부피 10 μ l의 실험조건에서 이동상으로 물, 메탄올의 2성분계의 이동상을 이용하여, 등용매 용리법으로 분석하였을 때 메탄올-물(70:30, v/v, containing 0.15% AA)이 가장 우수한 분리능을 나타내었다. 또한 등용매 용리법과 기울기 용리법(gradient)을 적용하여 TIIA에 대한 추출량을 비교할 결과, 두 방법 모두 비슷한 경향을 보였다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Han, W. S., "Isolation of Antimicrobial Compounds from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*", *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **12**(3), 179-182(2004).
- Dean, J. R., Liu, B. and Price, R., "Extraction of Tanshinone IIA from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* Using Supercritical Fluid Extraction and a New Extraction Technique, Phytosol Solvent Extraction", *Journal of Chromatography A*, **799**(1-2), 343-48(1998).
- Yoon, Y. S., Kim, Y. O., Jeon, W. K., Park, H. J. and Sung, H. J., "Tanshinone IIA Isolated from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*

- Induced Apoptosis in HL60 Human Premyelocytic Leukemia Cell Line," *Journal of Ethnopharmacology*, **68**(1-3), 121-127 (1999).
4. Son, K. H., Park, M. J., Lee, S. H. and Park, J. H., "Isolation and Quantitative Determination of Tanshinone IIA from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*," *Korean J. Pharmacogn*, **30**(2), 158-162(1999).
 5. Chen, J., Wang, F., Lee, F. S. C., Wang, X. and Xie, M., "Separation and Identification of Water-Soluble Salvianolic Acids from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* by High-Speed Counter-Current Chromatography and ESI-MS Analysis," *Talanta*, **69**(1), 172-79(2006).
 6. Ding, M., Ye, T. X., Zhao, G. R., Yuan, Y. J. and Guo, Z. X., "Aqueous Extract of *Salvia Miltiorrhiza* Attenuates Increased Endothelial Permeability Induced by Tumor Necrosis Factor- α ," *International Immunopharmacology*, **5**(11), 641-651(2005).
 7. Ikeshiro, Y., Mase, I. and Tomita, Y., "Abietane Type Diterpenoids From *Salvia Miltiorrhiza*," *Phytochemistry*, **28**(11), 3139-3141(1989).
 8. Pan, X., Niu, G. and Liu, H., "Comparison of Microwave-Assisted extraction and Conventional Extraction Techniques for The Extraction of Tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*," *Biochemical Engineering Journal*, **12**(1), 71-77(2002).
 9. Kim, H. H., Kim, J. H., Kwak, H. B., H, H, Han, S. H., Ha, H., Lee, S. W., Woo, E. R. and Lee, Z. H., "Inhibition of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Tanshinone IIA Isolated from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*," *Biochemical Pharmacology*, **67**(9), 1647-656(2004).
 10. Gu, M., Zhang, G., Su, Z. and Ouyang, F., "Identification of Major Active Constituents in The Fingerprint of *Salvia Miltiorrhiza Bunge* Developed by High-Speed Counter-Current Chromatography," *Journal of Chromatography A*, **1041**(1-2), 239-243 (2004).
 11. Wan, J. M. F., Sit, W. H., Lee, C. L., Fu, K. H. M. and Chan, D. K. O., "Protection of Lethal Toxicity of Endotoxin by *Salvia Miltiorrhiza Bunge* is Via Reduction in Tumor Necrosis Factor Alpha Release and Liver Injury," *International Immunopharmacology*, **6**(5), 750-758(2006).
 12. Hong, S. P. and Row, K. H., "Separation of Acanthoside-D in *Acanthopanax Senticosus* by Preparative Recycle Chromatography," *HWAHAK KONGHAK*, **40**(4), 488-491(2002).
 13. Shi, Z., He, J. and Chang, W., "Micelle-Mediated Extraction of Tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* with Analysis by High-Performance Liquid Chromatography," *Talanta*, **64**(2), 401-407(2004).
 14. Yang, Q., Zhang, X. L., Li, X. Y., Tang, W. K., Zhang, J. X., Fang, C. X. and Zheng, C. Y., "Coupling Continuous Ultrasound-Assisted Extraction with Ultrasonic Probe, Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography for The Determination of Sodium Danshensu and Four Tanshinones in *Salvia Miltiorrhiza Bunge*," *Analytica Chimica Acta*, **589**(2), 231-238(2007).
 15. Chang, C. J., Chiu, K. L., Chen, Y. L. and Chang, C. Y., "Separation of Catechins from Green Tea Using Carbon Dioxide Extraction," *Food Chemistry*, **68**(1), 109-113(2000).
 16. Han, S. K., Lee, K. J., Kim, J. D., Lee, Y. W. and Row, K. H., "Extraction of Isoflavones from Korean Soybean by Sub/Super-critical Water," *Korean Chem. Eng. Res.*, **42**(6), 669-672(2004).
 17. Li, H. B. and Chen, F., "Preparative Isolation and Purification of Six Diterpenoids from The Chinese Medicinal Plant *Salvia Miltiorrhiza* by High-Speed Counter-Current Chromatography," *Journal of Chromatography A*, **925**(1-2), 109-114(2001).
 18. Row, K. H., "Principles and Applications of Liquid Chromatography," (1999).