

초음파를 이용한 이대와 왕대 잎으로부터 항산화물질 *Homoorientin*의 추출효율 향상

이광진¹ · 신용국¹ · 김영식^{2*}

¹충북테크노파크 보건의료산업센터, ²국립강원대학교 삼척캠퍼스 화학공학과

Enhanced effect extraction of Antioxidant substance *Homoorientin* from *Pseudosasa japonica* and *Phyllostachys bambusoides* leaves using Ultrasonic wave system

Kwang Jin Lee¹, Yong Kook Shin¹, and Young Sik Kim^{2*}

¹Chungbuk Technopark, Chungbuk Health Industry Center, 686-4 Yangcheong-ri, Ochang-eub, Cheongwon-kun, Chungbuk-do 363-883, South Korea, ²Department of Chemical Engineering, Kangwon National University, Joongang-ro 1, Gyo-dong, Samcheok, Gangwon-do 245-711, South Korea

Abstract In this work, antioxidant substance homoorientin from *Pseudosasa japonica* and *Phyllostachys bambusoides* leaves were extracted using ultrasonic system, and analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on-line ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) antioxidant screening method. Also, the various experimental variables were the frequency and time of ultrasonic system. From the results, homoorientin was high extracted at the experimental condition of low frequency 35 kHz and time 60 min. And the content of homoorientin in *Phyllostachys bambusoides* was remarkably higher than that in the *Pseudosasa japonica* extract.

Keywords: Bamboo, Flavone C-glycosides, Homoorientin, Ultrasonic wave, HPLC

서 론

대나무는 화본과 다년생 식물로서 우리나라를 비롯한 온대, 아열대 및 열대지방에 폭 넓게 분포되어 자생하고 있다(1). 대표적인 품종으로 왕대, 솜대, 맹종죽, 조릿대 등이 있으며(2), 특히 강원도 강릉시에는 오죽 (*Black bamboo*) 이 많이 알려져 있다(3). 또한 그 주변에는 이대 (*Pseudosasa japonica*)와 왕대 (*Phyllostachys bambusoides*)가 많이 자생하고 있으며, 이대는 일본이 원산지로서 우리나라의 제주도 및 남부지역에 많이 자생하는 것으로 알려졌고, 왕대는 중국이 원산지로서 참대 또는 고죽이라고도 부른다(4, 5). 대나무는 용도에 따라 가지, 잎, 순 등이 건축신소재, 수공

예품으로 사용되고 식용으로는 죽순, 열매, 수액 등이 이용된다(2-4). 약리적 특성으로는 플라보노이드 계열의 화합물이 많이 함유되어 있으며, homoorientin, orientin, vitexin, luteolin 6-C-(6"-O-trans-caffeoylglucoside), vittariflavone 및 tricinel 들 수 있다(6). 효능 및 효과에는 광범위한 민간약으로 열내림, 출혈방지, 이뇨, 소갈방지, 중풍, 고혈압 등의 치료에 활용되었고 항산화활성, 항바이러스, 항염증 및 항암작용을 하는 것으로 보고되고 있다(7, 8).

몇몇 연구 동향을 살펴보면 대나무의 잎과 줄기에서 항산화활성, 아질산염제거능, 항균활성 연구(9), 줄기와 잎에서 에탄올 추출물의 식중독 유발균에 대한 항균활성에 관한 연구(10) 등이 소개되었다. 이러한 대나무를 이용한 다양한 산업적 적용은 의약품소재, 기능성식품 및 화장품소재 연구가 활발히 진행되었지만, 유용성분을 좀더 원활히 얻기 위한 선택적 추출조건에 대한 기초자료 연구는 미미한 실정이다. 일반적인 추출방법으로 열수추출법, Soxhlet법, 고온

*Corresponding author

Tel: +82-33-570-6542, Fax: +82-33-570-6535

e-mail: jameskim@kangwon.ac.kr, cfc0079@empas.com

용매추출법, 기계적압착법 등의 전통적인 방법과(11, 12), 추출효율을 증대시키기 위한 초음파유체법, 초고압처리법, 초음파추출 기술이 많이 이용되고 있다. 이 중에서도 초음파추출은 천연물 산업의 적용에 매우 효율적이다(13). 초음파추출공정은 추출시간이 매우 중요하며(14), 시료물질에 미치는 영향은 고주파와 저주파의 사용에 따라 캐비테이션의 강도, 즉 기포 (bubble)의 크기 및 에너지의 세기가 달라지고(15), 파장의 침투력이 미세부분의 조직까지 쉽게 침투하여 추출효과를 향상시킬 수 있다(16, 17). 또한 활성 분석을 위하여 HPLC 시스템에 활성분석에 많이 사용하는 시약 (ABTS, $C_{18}H_{24}N_6S_4$)을 적용하여 천연물에서 바이오 활성을 가지고 있는 다양한 생리활성물질을 신속한 기법으로 항산화활성을 빠른 시간내 탐색할 수 있는 장점을 적용하였다(3, 18, 19).

본 연구의 목적은 우리나라의 대표 죽종인 이대와 왕대 잎에서 항산화활성이 높은 flavone C-glycosides의 homoorientin을 추출하기 위하여 초음파추출시스템을 적용한 frequency (kHz)와 시간 (min)를 변화하여 유용성분을 추출하고 HPLC on-line ABTS screening을 사용하여 항산화활성을 빠르게 분석하고 추출량을 실험적으로 구하여 비교하였고, 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°C에서 7일간 건조된 시료를 사용하였다. 표준 시료인 homoorientin는 Sigma사에서 구입하였다. 모든 시료들은 HPLC에 주입하기 전에 막 여과지 (PVDF 0.2 μ m, 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. 활성 분석을 위하여 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, $C_{18}H_{24}N_6S_4$)와 potassium persulfate를 Sigma사에서 순도 (99.9%)를 구입하여 사용하였다. Fig. 1에서는 이대와 왕대 잎에 함유된 flavone C-glycosides의 homoorientin의 구조식을 정리하여 놓았다.

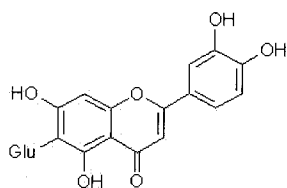


Fig. 1. Chemical structures of flavone C-glycosides homoorientin.

추출 및 전처리

추출은 일정한 온도 상온에서 수행 하였으며, 건조된 시료는 푸드믹서 (220 W, 1.3 A person Hannil Mixer FM)에서 2 min 동안 분쇄 후 입자크기 거름 (30 μ m)으로 분리하여 시료로 사용하였다. 이후, 이대와 왕대 잎 분말 3 g을 500 ml 비이커에 추출용매 수용성 에탄올 50%을 각각 100 ml씩 첨가하여 초음파추출을 하였다. 다양한 추출방법을 적용하기 위하여 초음파에너지 (35, 72, 170 kHz, 300 watt \pm 2)를 적용하였고, 추출 온도는 반응기내 물을 chiller를 통해 순환시켜 (25°C \pm 1) 고정시켰고 추출시간은 (15, 30, 60 min)을 적용하였다. 각각의 추출물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매 추출 후 여지필터 (pore size : 5 μ m)에서 감압 여과하여 시료 잔유물과 분리시키고, 시료를 멤브레인 필터 (FH-0.2 μ m, Waters, Milford, MA, USA)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. Fig. 2에서는 이대와 왕대 잎으로부터 homoorientin의 추출 및 정제공정을 나타내었다.

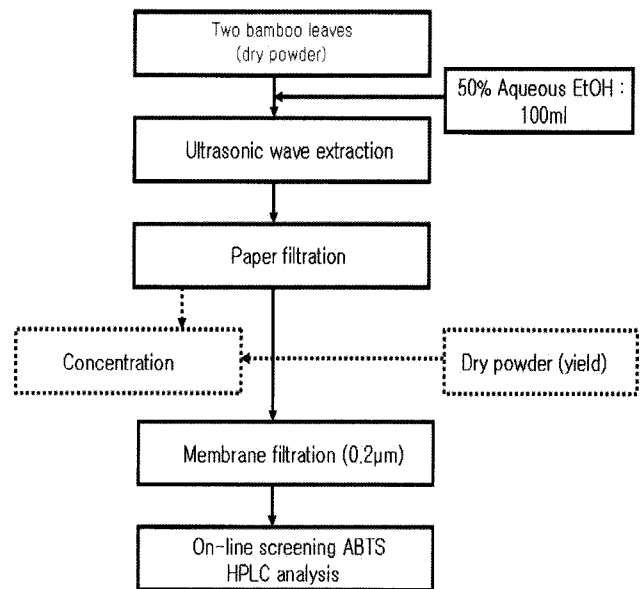


Fig. 2. Process of extraction and purification.

초음파 시스템

연구에 사용된 초음파추출시스템은 bath형이며, 관통형 4주파 초음파 발생 장치로서 (Mirae Ultrasonic Tech. Co. Korea)에서 제작하여 실험에 사용하였다. 초음파 추출시스템은 (Model No : Flexonic-500/100, W 382 x L 450 x H 150 mm, Reactor : 1 L)로써 초음파에너지 35, 72, 100, 170 kHz와 Intensity max 300 watt로 조절이 가능하고 chiller를 설치하여 온도를 일정 하게 (\pm 1) 조절할 수 있다. Fig. 3에서는 이대와 왕대 잎으로부터 homoorientin를 추출하기위한 초음파추출시스템을 나타내었다.

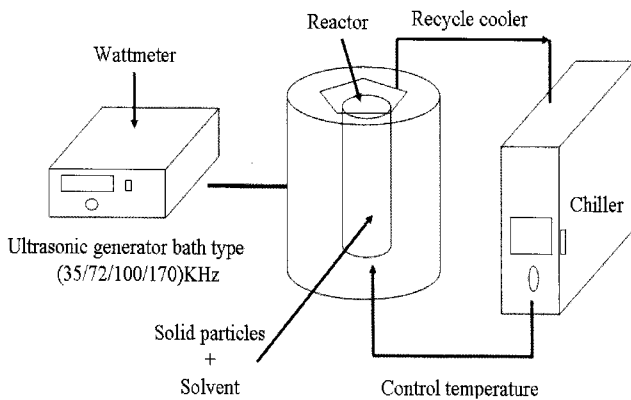


Fig. 3. Experimental device for solid-liquid extraction with ultrasonic wave.

표준액제조

표준 시료인 flavone C-glycosides의 homoorientin은 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 시약 37.8 mg을 넣어 완전히 녹인 후 ABTS 시약 44 mg을 첨가하여 충분히 교반 해준 후 호일을 둘러 쌓았다. 초기 제조된 용매 40 ml중 30 ml을 덜어서 870 ml의 순수한 물을 넣은 1 L 갈색 병에 넣고 하루 정도 라디칼의 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 회전식 증발기 (LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co., Japan)를 사용하였고, HPLC system으로는 Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)으로 ChemStation (Agilent Technologies)이 부착된 HPLC-diode-array detector (DAD)를 사용하였다. 각각의 대나무 추출물 20 µl를 Agilent 1200 HPLC system에 주입하였다. ABTS 표준액은 Agilent 1200 pump에 의하여 ABTS 시약이 유속 0.5 ml/min로 시약이 운반되며, 혼합기에서 혼합된 시료를 통해 UV detector (Agilent Technologies, Germany) 734 nm에서 항산화활성을 측정하였다. 데이터 처리는 Agilent사의 PC에 설치된 Millennium 3.2를 사용하였으며, 분석에 사용된 컬럼은 분석용 RP-HPLC의 컬럼 (RS-tech OP C₁₈, 5 µm, 4.6 × 250 mm)과 유속은 1 ml/min로 고정하였다. UV detector는 diode-array detector (DAD)의 파장범위는 200-400 nm를 적용하였으며, 크로마토그래피는 330 nm로 나타내었다. 이동상은 이성분계 A :

water/trifluoroacetic acid (99.9/0.1, vol. %), B : acetonitrile (100, vol. %)을 사용하여 (90 : 10-60 : 40, A : B vol. %)까지 45 min 동안 선형기울기용매 용출법으로 실험하였다. Fig. 4에서는 HPLC on-line ABTS screening 시스템을 나타내었다.

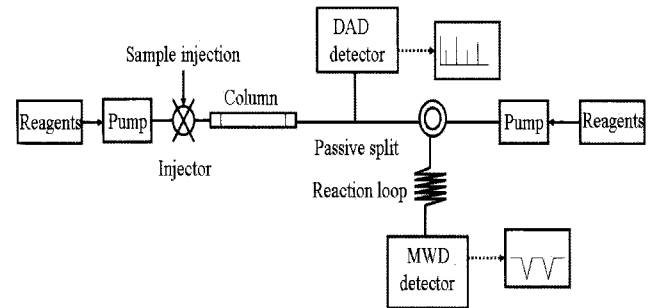


Fig. 4. Schematic of on-line screening ABTS HPLC system.

결과 및 고찰

대나무는 예전부터 상업적으로 매우 관심이 많았으며 항산화물질로 잘 알려진 flavone C-glycosides의 homoorientin은 인체내의 항산화활성을 촉진하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(7, 10, 20). 따라서 이대와 왕대 앞에서 기능성소재 개발에 필요한 가능성을 검토하고자 하였다. 실험에서 언급한 바와 같이 HPLC on-line ABTS screening를 사용하여 항산화활성을 빠르게 분석하고 homoorientin을 정량하여 추출에 따른 항산화활성의 영향을 실험적으로 확인하였다(Tables 1). 각각의 추출조건에서 얻어진 homoorientin의 정성분석은 표준시료의 체류시간을 비교하여 확인하였다. 이때, homoorientin의 체류시간은 16.7 min 이었다.

Fig. 5에서는 이대 앞에서 추출한 HPLC on-line ABTS screening 분석 크로마토그램을 나타냈다. 이대 앞에서 추출된 homoorientin의 체류시간이 잘 일치한 것을 확인하였고 homoorientin의 항산화활성 경향은 다른 물질의 피크와 겹치지 않고 baseline이 안정된 낮은 피크의 intensity를 볼 수 있었다. 이대 앞을 추출하기위하여 50% 수용성에탄올을 사용하여 초음파에너지와 시간에 따른 homoorientin의 추출 효율을 비교하였다. homoorientin의 추출물은 크로마토그램의 피크면적 (%)에 따라 35 kHz에서 15 min 12.75% > 30 min 12.34% > 60 min 10.57%과 72 kHz에서 15 min 11.57% > 30 min 11.06% > 60 min 10.52%과 170 kHz에서 15 min 12.19% > 30 min 11.48% > 60 min 10.79%의 효율을 보였고, 주파수 (frequency)의 영향은 15, 30, 60 min 모두 35 > 72 > 170 kHz 순으로 추출효율이 순차적으로 높았다. 이것은 초음파 에너지가 더욱 증가하면 액의 분자간 응집력이 파괴되고 미세한 캐비테이션 (기포가 생성되는 현상)인 공동 (cavity)이 발생되며, 이

Table 1. Effect of difference time and frequency on the antioxidant activity with two kinds of bamboo
(Extraction temperature 25 °C ± 1, 300 w ± 2)

Ultrasound / time (min)	Compounds	R _t	Peake area (positive)	Peake area in 330 nm (%)	Peake area (negativity)	Peak area in 734 nm (%) (Bioactivity)
35 kHz	15	16.82	154.272	12.75	714.7	1.02
	30	16.76	196.103	12.34	778.3	1.39
	60	16.76	225.116	10.57	1008.7	1.06
72 kHz	15	16.67	126.211	11.57	589.9	1.06
	30	16.68	181.887	11.06	801.9	1.36
	60	16.58	210.831	10.52	889.5	1.14
170 kHz	15	16.67	149.346	12.19	608.6	1.02
	30	16.71	156.842	11.48	711.2	1.09
	60	16.73	188.012	10.79	830.1	1.09
35 kHz	15	16.71	1040.83	23.36	5170.16	1.31
	30	16.76	1422.52	23.52	6377.42	1.39
	60	16.74	1574.71	23.67	6924.34	1.23
72 kHz	15	16.86	883.96	24.39	3926.68	1.35
	30	16.78	1115.07	23.86	4698.38	1.14
	60	16.81	1318.02	23.52	6149.75	1.22
170 kHz	15	16.87	709.59	24.71	3306.63	1.35
	30	16.92	853.17	24.69	4086.56	1.41
	60	16.93	1255.60	23.21	5977.63	1.32

공동이 폭발하면서 강력한 에너지를 방출에 의한 것으로 알 수 있다. 주파수의 변화에 따라 발생된 기포가 터질 때의 압력과 기포 안의 방전 때문에 초음파를 받은 물질은 기계적인 작용을 받거나 화학 변화를 일으켜 유용성분의 추출이 용이하다(14-16). 또한 초음파에너지가 저주파일때 캐비테이션의 진동이 매우 크고 주변 작업장 소리도 매우 크게 들리며 에너지 파장의 전달 폭이 매우 크다. 반대로 고주파일때는 캐비테이션의 진동이 매우 작고 주변 작업장 소리는 매우 작게 들리며 에너지 파장의 전달 폭이 직진형이다. 이러한 기계적 에너지의 변화에 따라 천연물에서의 저주파의 적용은 조직이 세밀하고 밀도가 큰 것이 적절하다고 판단되며, 고주파의 적용은 조직이 부드럽고 밀도가 작은 것에 용이하다고 판단되어진다(17). 시간에 대한 변수 (15, 30, 60 min)를 고려해보면 이대 잎의 추출물에서는 시간 (min)이 증가함에 따라 피크면적 (V)은 35 kHz에서 60 min : 225.116 > 30 min : 196.103 > 15 min 154.272으로 72 kHz에서 60 min : 210.831 > 30 min : 181.887 > 15 min 126.211으로 170 kHz에서 60 min : 188.012 > 30 min : 156.842 > 15 min : 149.346으로 추출 효율이 에너지와 시간의 증가에 따라 약 3-5%씩 증가함을 확인 할 수 있었다.

일반적으로 추출 시간이 길고 에너지의 세기가 강해지면 유용성분의 구조들이 쉽게 분해 (파괴)되어 목적의 유효성분이 일정부분 증가 또는 급격히 감소되는 경우가 많이 보고되고 있다(21, 22). 이처럼 대나무의 조직이 일반 천연물 조직에 비하여 섬유소의 밀도가 크고 조직이 강하게 연결되어 에너지 (파장)의 침투력이 미세부분의 조직까

지 쉽게 침투하지 못했기에 에너지와 시간의 증가에 따라 추출효율이 증가함을 보여줄 수 있었다.

Fig. 6에서는 왕대 잎에서 추출한 HPLC on-line ABTS screening 분석 크로마토그램을 나타냈다(Fig. 5와 동일 방법으로 실험). homoorientin의 추출물은 크로마토그램의 피크면적 (%)에 따라 35 kHz에서 60 min 23.67% > 30 min 23.52% > 15 min 23.36%과 72 kHz에서 15 min 24.39% > 30 min 23.86% > 60 min 23.52%과 170 kHz에서 15 min 24.71% > 30 min 24.69% > 60 min 23.21%의 효율을 보였다. 주파수 (frequency)에서는 각각의 시간 15, 30, 60 min에서 35 > 72 > 170 kHz 순으로 추출 효율을 보였고, 시간 (min)에 따라 피크면적 (V)은 35 kHz에서 60 min : 1574.71 > 30 min : 1422.52 > 15 min : 1040.83으로 72 kHz에서 60 min : 1318.02 > 30 min : 1115.07 > 15 min : 883.96으로 170 kHz에서 60 min : 1255.60 > 30 min : 853.17 > 15 min : 709.59으로 에너지와 시간증가에 따라 추출 효율이 약 3-6%씩 증가 함을 확인 할 수 있었다. 본 연구결과 Fig. 5와 Fig. 6을 비교해 보면 시료의 생김새나 종에 관계와 유용성분의 구조적 특성에 따라 분해와 추출의 정도가 다르다고 생각된다(17). 위 결과에 의하면 이대 보다 왕대 잎에서 homoorientin의 추출 함량이 6-7배 정도 높게 나타났다. 또한 homoorientin의 항산화활성은 이대 잎에서 frequency 170 kHz, 15 min에서 피크면적 (positive) 149.346, 12.19%와 피크면적 (negativity) 608.6, 1.02%로 가장 낮았고, 왕대 잎에서 frequency 35 kHz, 60 min에서 피크면적 (positive) 1574.71, 23.67%와 피크면적 (negativity) 6924.34, 1.23%로 가장 높았다. 따라서 실제적인 천연물

추출과정에서도 유용성분의 초음파 추출은 많은 실험을 통하여 확인해야 할 것이며, frequency (kHz)와 intensity (watt)의 조절, 시간 (min)과 온도 (°C), 추출용매 선정 및 조성의 영향 (%)에 따라 추출 효율은 다양한 변수에 따라 편차가 클 것으로 사료되고 HPLC on-line ABTS screening 기법을 이용한 활성화합물의 항산화활성의 신속한 규명은 다양한 분야에 적용하여 기능성 물질의 신속한 탐색법으로 검토하는 것은 의미 있는 일이라 여겨진다.

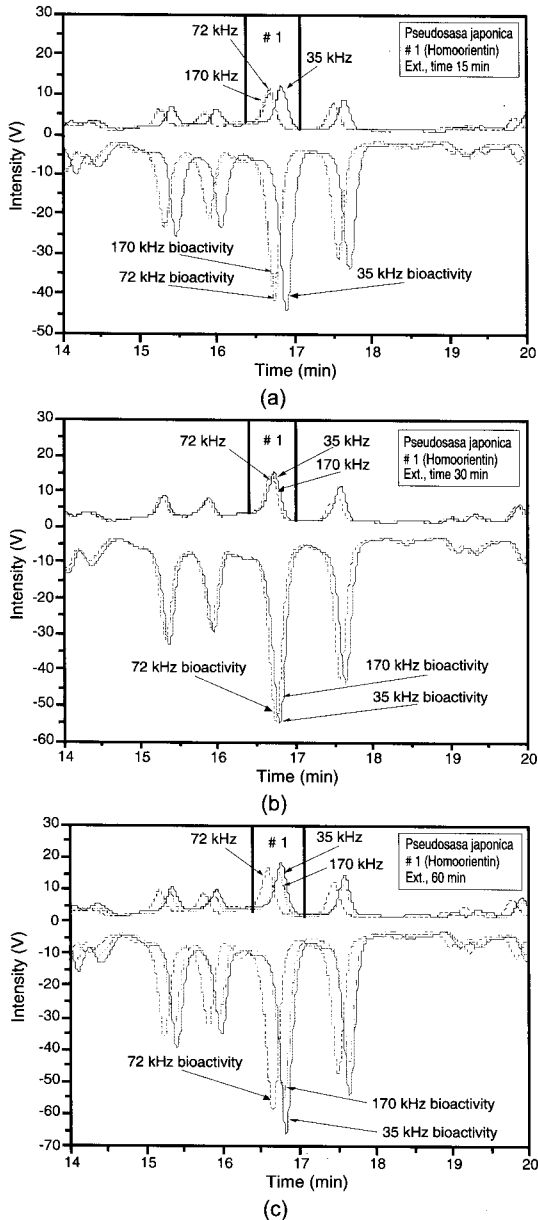


Fig. 5. Chromatogram antioxidant activity of flavone C-glycosides homoorientin from *Pseudosasa japonica* leaves using on-line screening ABTS HPLC system. (mobile phase A : water/trifluoroacetic acid (99.9/0.1, vol. %), B : acetonitrile (100, vol. %), gradient elution B : 10-40, run time : 45 min, flow rate : 1 mL/min, ABTS flow rate : 0.5 mL/min, injection volume : 20 µl)

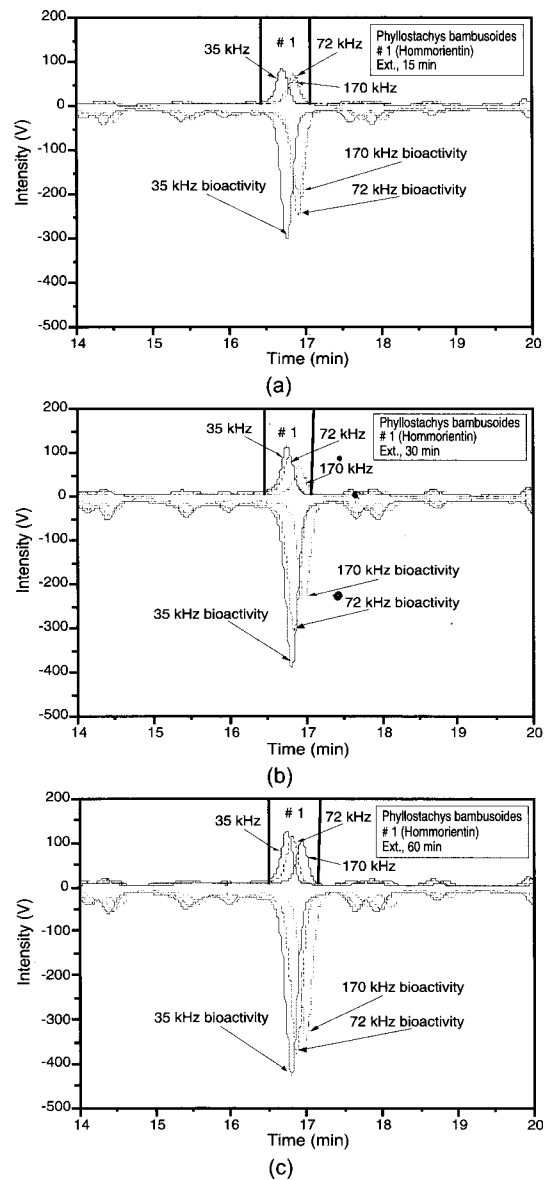


Fig. 6. Chromatogram antioxidant activity of flavone C-glycosides homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* leaves using on-line screening ABTS HPLC system. (mobile phase A : water/trifluoroacetic acid (99.9/0.1, vol. %), B : acetonitrile (100, vol. %), gradient elution B : 10-40, run time : 45 min, flow rate : 1 mL/min, ABTS flow rate : 0.5 mL/min, injection volume : 20 µl)

요약

대나무 (이대와 왕대) 잎으로부터 HPLC on-line ABTS screening 기법을 사용하여 flavone C-glycosides의 homoorientin의 항산화활성을 빠르게 분석하였으며, 이대와 왕대 잎으로부터 homoorientin의 추출을 다양한 초음파 에너지와 시간의 추출방법을 적용하였다. 전 처리한 추출액에 포함된 이대와 왕대 잎으로부터 homoorientin을 분석하고 최적의

추출조건을 실험적으로 모색하였다. 실험결과에 의하면 왕대는 이대 앞보다 homoorientin의 함량이 7배 정도 높았으며, 최적 추출은 35 kHz, 60 min에서 (positive) 피크면적 1574.71, 23.67%와 (negativity) 피크면적 6924.34, 1.23%로 왕대 앞에서의 추출 효율이 가장 우수 하였다.

접수 : 2009년 2월 17일, 게재승인 : 2009년 4월 23일

REFERENCES

- Zhang, Y., J. Jiao, C. Liu, X. Wuand, 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.
- Choi, S. D. and K. J. Lee (2008), Enhanced extraction and antioxidant activity analysis of flavone C-glycosides from black bamboo using ultrasonic wave, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 297-302.
- Ju, I. O., G. T. Jung, J. Ryu, J. S. Choi, and Y. G. Choi (2005), Chemical components and physiological activities of bamboo extracts prepared with different methods, *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 542-548.
- Chung, H. J. and B. G. Ko (2005), Antibacterial activities of bamboo sapagainst salmonella typhimurium and inhibitoryeffects in a model food system, *Korean J. Food Culture.* **20**, 709-714.
- 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 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.
- 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.
- Baek, J. W, S. H, Chung, and G. S. Moon (2002), Antimicrobial activities of ethanol extracts from koreanbamboo culms and leaves, *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 1073-1078.
- Cushmie, 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.
- 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 uniflora honeys of robinia pseudoacacia L. and castanea sativa L., *Ultrasonics Sonochemistry* **14**, 750-756.
- Vilkhu, 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.
- 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.
- Nuengchamngong, 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, *Phytochem. Anal.* **16**, 422-428.
- Ogawa, A., H. Arai, H. Tanizawa, T. Miyahara, and T. Toyoka (1999), On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Analytica Chimica Acta*, **383**, 221-230.
- Lim, J. A., Y. S. Na, and S. H. Baek (2004), Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from phyllostachys bambusoides, *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 306-310.
- Lee, K. J. (2008), Antioxidant activity analysis of catechin compounds in korean green tea using HPLC on-line ABTS antioxidant screening system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 96-100.
- 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.