

당약의 swertiamarin 분석을 위한 추출조건 최적화

김태희[#], 장설, 이아름, 이아영, 최고야, 김호경^{*}

한국한의학연구원 한약자원그룹

Optimization of Extraction Conditions for Swertiamarin in *Swertia japonica* Makino

Tae Hee Kim[#], Seol Jang, Ah Reum Lee, A Young Lee, Goya Choi, Ho Kyoung Kim^{*}

Herbal Medicine Resources Group, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : Iridoid glycoside, swertiamarin is a well known bioactive component found in *Swertia japonica* Makino (SJ). In this study, we tried to optimize a suitable method which would extract swertiamarin effectively.

Methods : Extraction of SJ was carried out by various conditions of time (5 - 60 min), temperature (30 - 70°C), solvent (from non-polar to polar), and ratio of solvent / sample (10 : 1 - 40 : 1) using ultrasonic extractor. Swertiamarin in SJ extracts was quantified by high performance liquid chromatography - Photodiode array detector (HPLC-PDA) using C18 column and the analytical procedure was validated by evaluation of specificity, range, linearity, accuracy (recovery), precision (intra- and inter day variability), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ).

Results : An efficient extraction condition for swertiamarin in SJ was optimized using sonicator extraction (temperature 40°C, solvent 20% methanol, solvent / sample (20 : 1), and time 10 min. Analytical procedure was optimized by HPLC-PDA using isocratic solvent system of acetonitrile and water (9 : 91), and the method was validated in regard to linearity (correlation coefficient, $R^2 > 0.9999$), range (50 - 1000 µg/mL), intra- and inter-precision (RSD < 5.0 %), and recovery (99 -103 %). LOD and LOQ were 0.051 and 0.155 µg/mL, respectively.

Conclusion : An optimized method of extraction for swertiamarin in SJ was established through conditions of diverse extraction and the validation result indicated that the method is suited for the determination of swertiamarin in SJ.

Key words : *Swertia japonica* Makino, HPLC-PDA, validation

서론

당약 (當藥)은 쓴풀 *Swertia japonica* Makino (용담과 Gentianaceae)의 꽃이 필 때의 전초이고, 간염, 소화 장애, 급성과 만성적인 이질, 치통, 궤양 등의 질환을 치료하는 전통약물로서 한국, 중국 및 일본에서 널리 이용되어져 왔다^{1,2)}. 최근 연구결과에 의하면 당약 (當藥) 추출물은 간보호³⁾, 항산화⁴⁾, 항돌연변이⁵⁾, 항당뇨⁶⁾ 효과를 가지는 것으로 보고되어 있고, 당약 (當藥)의 구성성분으로는 iridoid glucoside, xanthone 및 flavonoid계열 화합물이 알려져 있으며,

secoiridoid glycoside 계열 성분인 swertiamarin은 당약 (當藥)의 주성분으로써, 중추 신경계 진정제이자 항콜린제 반응과 같은 생리활성을 나타내며, 광범위한 치료효과를 가지고 있는 유효성분이기도 하다⁷⁻¹⁰⁾. 이와 같은 당약 (當藥)에 관한 연구 결과들은 일본, 중국에서 주로 보고 되고 있으며, 우리나라에서는 연구가 거의 진행되고 있지 않은 상황이다. 특히 당약 (當藥)의 주성분을 특이적으로 수득할 수 있는 추출조건에 관한 연구는 미비한 상태이다. 최근, 천연물로부터 유효성분을 좀 더 효율적이고 간편한 방법으로 추출하기 위한 다양한 방법을 통한 연구가 수행되고 있지만 열수추출법, soxhlet

*교신저자 : 김호경, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약자원그룹
· Tel : 042-868-9502 · Fax : 042-862-9494 · E-mail : hkkim@kiom.re.kr
#제1저자 : 김태희, 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약자원그룹.
· Tel : 042-868-9502 · E-mail : bihope@hanmail.net
· 접수 : 2013년 12월 24일 · 수정 : 2014년 1월 21일 · 채택 : 2014년 1월 21일

법, 고온 용매 추출법 및 기계적 압착법 등의 방법은 수율이 낮고, 열에 의해 변성될 수 있으며, 추출용매의 소모량이 많아 비용이 높아진다는 단점이 있다¹¹⁻¹³. 이러한 단점을 극복하기 위하여 초음파추출의 사용이 증가되고 있으며, 초음파추출법은 초음파를 이용하였을 때 조직사이로 용매가 더 많이 침투하도록 하여 시료와 용매 사이의 접촉면적을 증가시키게 되어 시료의 용질이 용매로 더 빨리 확산되어 추출효과를 향상시키며¹⁴, 적은 용매를 사용하여 단시간에 원하는 물질을 추출할 수 있고, 기존의 추출 방법보다 추출효율이 높은 장점을 가지고 있다¹⁵. 그래서 초음파 추출법을 이용하여 천연물로부터 다양한 phytochemicals를 추출하는 연구가 진행되고 있고, 가시오갈피, 인진호 (茵陳蒿), 마황 (麻黃) 및 복분자 (復盆子)의 생리활성 평가에서 초음파로 추출하였을 시에 추출시간을 단축할 수 있을 뿐만 아니라 유효성분의 수율이 높아져 활성이 증가되는 것으로 확인되었다¹⁶⁻²⁰. 또한 iridoid계 화합물이 환류냉각 추출법보다는 초음파 추출에서 추출시간을 단축하면서 수득량을 증가시킨다는 것을 이전의 문헌을 통하여 알 수 있었다²¹.

따라서 본 연구에서는 초음파 장치를 이용한 추출방법을 당약 (當藥)으로부터 유효성분인 swertiamarin 추출에 적용하여 최적화 된 조건을 설정하고자 하였다. 추출용매, 시

료·용매조성 비율, 추출시간 및 추출온도 등의 조건을 변화시켜가며 당약 (當藥)에서 swertiamarin을 선택적으로 추출하고 효율적인 최적의 추출조건을 설정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용된 당약 (當藥)은 대전에 위치한 평화당 한약국에서 2013년 7월에 구입하여 사용하였다. 약재는 한국한의학연구원 한약자원그룹의 최고야 박사가 약재 감별을 실시하여 검증을 받아 사용하였다. 당약 (當藥)의 지표성분인 swertiamarin은 Chromadex (USA)사에서 구입하였으며, 시료의 추출 및 분석에 사용된 용매인 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, acetonitrile, methanol, water는 Burdick & Jackson (USA)사의 HPLC급 제품을 사용하였다. 그 외의 기타실험에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 전처리 및 표준품 제조

분쇄한 당약 (當藥)을 25 mL 용량 플라스크에 나누어 넣은 후, 용매종류별, 용매농도별, 시료·용매 비율별, 추출 시간별, 추출 온도별로 초음파 추출기 (40 kHz, Powersonic 420, Hwashin Co., Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출액은 HPLC 분석하기 전에 0.45 µm syringe filter를 통과시켜 여액을 시료로 사용하였으며, 모든 분석은 3회 반복 실험하였다. Swertiamarin은 2.0 mg을 정확하게 칭량한 후 메탄올에 녹여 표준원액을 만들었고, 이것을 단계적으로 희석하여 (1000, 500, 200, 100, 50 µg/mL) 정량분석을 위하여 사용하였다.

2) HPLC 분석 조건

HPLC 기기는 Waters (USA)사의 2695 separation module, 2998 photodiode array detector로 구성된 장비를 사용하였고, 분석용 컬럼은 XBridge™ C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 µm, Waters, USA)를 이용하였으며, 이동상으로는 물 : 아세트나이트릴 (91 : 9)의 혼합용매를 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min, 컬럼온도는 50°C, 검출파장은 238 nm이었다 (Table 1).

Table 1. Analytical Condition of HPLC-PDA

HPLC [†] -PDA [†]	
Column	XBridge™ C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 µm)
Mobile Phase	A - Water B - Acetonitrile A(%) : B(%) = 91 : 9
Wavelength (nm)	238
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	50°C
Injection volume	10 µL

[†]HPLC : High performance liquid chromatography

[†]PDA : Photodiode array detector

3) 분석법 검증 (validation)

당약 (當藥)의 지표성분인 swertiamarin을 정확히 칭량하여 메탄올에 녹인 후 표준 용액으로 사용하였다. 유의성 있는 검량선을 얻기 위해 5가지 농도에서 실험을 실시하였고, regression equation은 $y = ax + b$ (y 와 x 는 각각 peak면적과 지표성분의 농도)의 형태로 구하여 검량선을 작성하였다. 또한 검출한계 (LOD)를 통해 분석대상물의 검출이 가능한 최저 농도를 확인하였고, 정량한계 (LOQ)를 통해 분석대상물의 정량이 가능한 최저농도를 확인하였다. 검출한계는 $3.3 \times \sigma/S$, LOQ는 $10 \times \sigma/S$ (σ 는 반응의 표준편차, S 는 직선성의 기울기)로 값을 계산하였다. 동일 시료에 대해 실험환경의 변동이 미치는 변화를 확인하기 위해 일내 (intra day) 및 일간 (inter day) 정밀성 (precision)을 swertiamarin의 3가지 농도 (100, 200, 500 µg/mL)에서 평가하였고, 결과는 상대 표준편차 (RSD)로 나타내었다. 마지막으로, 정확성 평가를 위해 실시한 성분의 회수율 시험 (recovery)은 표준물 첨가법에 의하여 수행하였으며, 함량이 확인된 당약 (當藥) 시료와 농도를 알고 있는 표준액을 첨가하여 각 3회 반복 분석한 후 상대표준편차를 측정하여 확인하였다.

4) 통계처리

통계분석은 Minitab 16(Minitab Inc., Pennsylvania, USA)을 사용하였으며, 추출방법에 따른 추출효율은 ANOVA-test를 이용하여 분산 분석 후 사후검정으로 Tukey법을 실시하여 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 전처리 조건에 따른 함량 비교분석

1) 용매별 추출효과

당약 (當藥)의 지표성분인 swertiamarin의 추출용매 조건

의 변화에 따른 추출효율을 알아보기 위하여 시료 0.5 g을 정확히 측정하여 추출용매종류별로 12 mL씩 넣고 실온조건에서 초음파 추출기에서 15분간 추출 실험을 실시하였다. 비극성 용매인 *n*-hexane, ethyl acetate, chloroform으로 추출 시에는 swertiamarin이 용출되지 않았고, 물과 methanol에서 각각 0.805%, 0.535%의 함량을 확인 할 수 있었으며, 극성이 높은 용매일수록 swertiamarin의 함량이 증가되는 것을 알 수 있었다. 가장 효율이 높은 물과 알코올류인 methanol을 혼합하여 추출한 결과, 물로 추출했을 때는 0.805%, 20% methanol 추출조건에서 0.813%, 40% methanol에서는 0.761%, 60% methanol에서는 0.679%, 80% methanol에서는 0.628%로 지표성분의 함량을 확인하였으며, 이 함량결과를 Tukey검정법으로 분석한 결과, 총 네 개의 그룹으로 나뉘었으며 물과 20% methanol이 같은 그룹으로 묶이고 다른 조건들과 유의적 차이가 나타나지만 산술적으로 20% methanol의 함량값이 높아 최종적으로 선택하였다 (Figure 1).

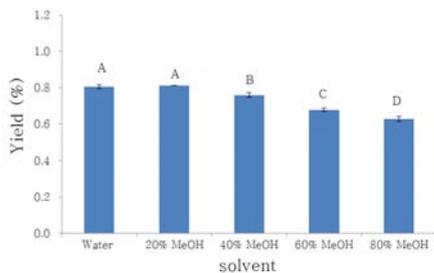


Figure 1. Content of swertiamarin extracted by different solvent ratio (MeOH/H₂O, v/v). Each values was the mean ± SD. Bars with different letters were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's multiple range test (p < 0.05).

2) 시료 · 용매 비율별 추출효과

시료와 추출 용매의 비율도 추출함량을 높이는 중요한 요인 중 하나이기에 swertiamarin의 추출함량이 가장 높은 용매 조건인 20% methanol을 사용하여 각 시료 · 용매 비율별로 시료와 용매를 넣고 실온조건에서 초음파 추출기에서 15분간 추출 실험을 실시하여 추출효과를 비교해 보았다. 시료와 용매의 비율을 1 : 10, 1 : 20, 1 : 24, 1 : 30, 1 : 40으로 설정하여 추출한 결과, 추출함량은 0.798 ~ 0.869%로 나타났고, 1 : 20의 비율에서 0.869%로 가장 효율이 좋은 것으로 확인되었다 (Figure 2).

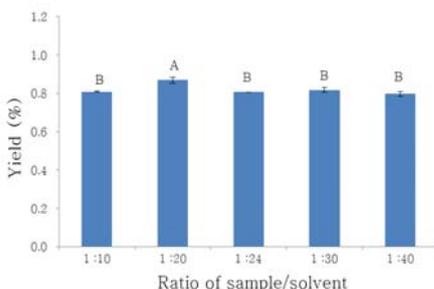


Figure 2. Content of swertiamarin extracted by various sample versus solvent ratio (g/mL). Each values was the mean ± SD. Bars with different letters were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's multiple range test (p < 0.05).

3) 추출 시간별 추출효과

추출시간이 추출효율에 대한 영향을 알아보기 위하여 당약 시료 0.6 g을 정확히 측정하여 20% methanol 12 mL에 실온에서 초음파로 각기 다른 시간 (5분, 10분, 20분, 40분, 60분)을 설정하여 추출하였다. 그 결과, 추출시간 10분에서 0.848%로 가장 높은 함량을 나타내었고 (Figure 3), 추출시간이 증가함에 따라 오히려 swertiamarin의 함량이 감소한 것을 확인하였다.

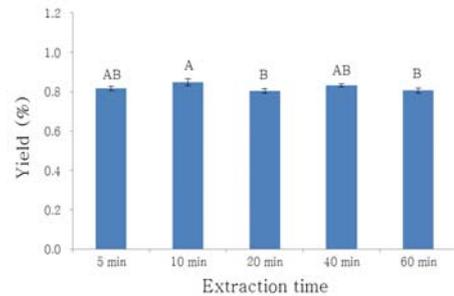


Figure 3. Content of swertiamarin extracted by different time. Each values was the mean ± SD. Bars with different letters were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's multiple range test (p < 0.05).

4) 추출 온도별 추출효과

생리활성 지표로 사용된 swertiamarin이 온도에 따른 함량변화를 알아보기 위해 설정된 최적의 추출조건인 당약 (當藥) 시료 0.6 g을 정확히 측정하여 20% methanol 12 mL에 넣고 10분 동안 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃의 조건에서 각각 추출하였다. 30℃에서는 0.855%, 40℃에서는 0.874%, 50℃에서는 0.824%, 60℃에서는 0.807%, 70℃에서는 0.805%의 함량을 나타내었고, 결과에 따라 가장 높은 추출효율을 보인 온도 조건은 40℃로 확인되었다 (Figure 4).

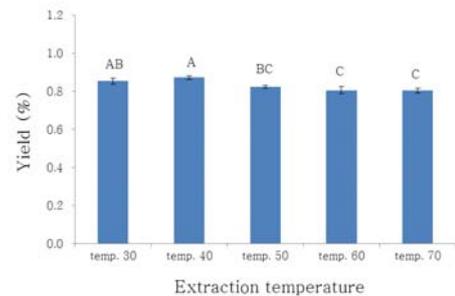


Figure 4. Content of swertiamarin extracted by various temperature. Each values was the mean ± SD. Bars with different letters were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's multiple range test (p < 0.05).

2. 분석법의 검증(validation)

당약 (當藥)의 지표성분인 swertiamarin의 분석조건은 물과 아세트나이트릴을 91 : 9의 비율로 혼합했을 때 분석시간 및 인접한 불순물과의 분리도를 크게 향상시켰고, 지표성분을 검출하기 위한 이상적인 파장은 238 nm이었으며, 이와 같은 조건에서 특이성을 가지는 것으로 확인되었다 (Figure 5). 검량선 (calibration curve)를 통해 계산된 상관관계수 (correlation coefficient : r²)는 0.9999로 좋은 직선성을 보였고, 지표성분의 농도 범위는 50 ~ 1000 ug/mL로 설정하였으며, 검출

한계와 정량한계는 각각 0.051 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 0.155 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다 (Table 2). 분석법의 일내, 일간 정밀성 평가에서는 상대표준편차 0.14 ~ 0.51%의 값을 나타내었고 일간시험에서는 상대표준편차 0.51 ~ 1.97%의 값을 나타내어 높은 정밀성을 확인할 수 있었다 (Table 3). 정확성 분석을 위하여 당약 (當藥) 시료에 표준품을 농도별로 첨가한 후 회수율을 확인한 결과, 99 ~ 103%의 범위 내에서 상대표준편차가 1.80 ~ 3.80% 이하의 값을 나타내는 것으로 확인되었다 (Table 4).

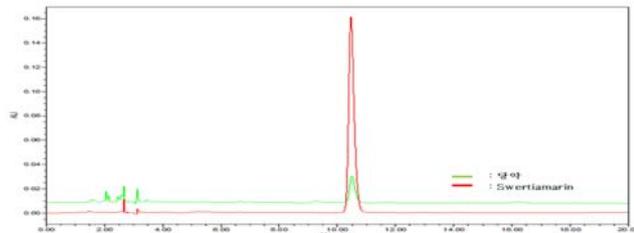


Figure 5. HPLC chromatograms of swertiamarin and *Swertia japonica* extract at 238 nm

Table 2. Analyzed Data of Linearity Regression, Limit of Detection (LODs), and Limit of Quantification (LOQ) for Swertiamarin

Standard	Regression equation	Correlation coefficient (r^2)	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
swertiamarin	$y^\dagger = 17189x^* + 31518$	0.9999	0.051	0.155

* x : concentration of standard, y^\dagger : peak area of standard

Table 3. Precision Data of Intra- and Inter-Day Variability

Standard	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Intra-day		Inter-day	
		Mean \pm SD*	RSD (%) [†]	Mean \pm SD	RSD (%)
swertiamarin	100	100.58 \pm 0.40	0.40	101.57 \pm 2.01	1.97
	200	197.73 \pm 0.28	0.14	196.80 \pm 1.01	0.51
	500	505.94 \pm 2.56	0.51	511.86 \pm 6.21	1.21

* Values are expressed as mean \pm SD on triplicate experiments

[†]RSD (%) : relative standard deviation

Table 4. Recovery Result by Standard Addition Method

Standard	Spiked amount ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Measured amount ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recovery (%) [*]	RSD (%)
swertiamarin	62.5	64.38 \pm 1.16	103.16	1.80
	125.0	123.96 \pm 3.17	99.22	2.55
	250.0	255.86 \pm 9.72	102.34	3.80

* Recovery (%) = (detected amount - original amount) / spiked amount \times 100

고찰

국민의 복지 증진에 따른 건강에 대한 관심이 높아지고, 고령화 사회로 전환이 가속화됨에 따라 의약산업도 점점 발전되어가고 있으며, 특히 천연물을 이용한 신약개발이 활발히 진행되고 있는 가운데 원재료의 주성분 또한 효능이 입증된 성분을 선택적으로 추출하고 효능이 입증된 성분을 개발하기 위하여 다양한 방법들이 시도되고 있지만 비극성 물질 혹은 극성물질들이 주성분이거나 생리활성 물질이 될 수 있기에 모든 생약에 적용할 수 없는 실정이다. 기존의 당약 (當藥) 연구에서는 HPLC-DAD-MS를 이용하여 분석한 연구와 swertiamarin을

생약 내 다른 성분과 동시분석 한 연구 결과는 있었으나, 당약 (當藥)에서 swertiamarin의 추출효율을 높이기 위한 추출법연구는 미비한 상황이다^{22,23}. 먼저 비극성에서 극성용매까지 용매 종류별로 swertiamarin의 추출함량을 높인 용매들을 확인하였으며, 비극성 용매들에선 swertiamarin의 용출량이 나타나지 않았다. 이는 Takei의²⁴ 연구결과에서처럼 당약 (當藥)을 물과 같은 극성용매에서 추출하였을 때 swertiamarin의 수율이 좋다는 결론과 비슷한 양상을 확인할 수 있었다. Yoo²⁵ 등은 길경 (桔梗)에서 용매 조건별로 추출물의 양을 비교하였을 때 단일용매로 추출한 경우보다 물과 유기용매를 혼합하여 추출하였을 때 추출효율이 증가됨을 알 수 있었고 Shin²⁶ 등은 물과 유기용매가 혼합된 용매에서 추출할 경우 시료 내 다양한 화합물들의 용매 친화력이 증가되었다는 것을 보고하였다. 또한 당약 (當藥)을 추출 시 ethanol보다는 methanol에서 주성분의 함량이 증가되었으며²², 물을 혼합하였을 때, iridoid 화합물의 용출효율이 증가되는 알 수 있었기에²¹ 이를 토대로 다양한 조건으로 실험하였고, 이것은 극성 용매인 물과 알코올류에 속하는 methanol을 혼합하였을 때 더 높은 용출량을 나타낸 결과와 일치하는 것으로 특히 methanol의 혼합비율 중에 20% methanol에서 0.813%로 가장 높게 용출되는 것을 확인할 수 있었다. 용매를 결정 한 후 시료·용매 비율별의 실험에서 1 : 20의 비율에서 가장 높은 함량 결과를 나타내었고, 추출 시간별로는 10분에서 가장 높은 효율을 나타내었다. 오히려 초음파 추출시간이 길어질수록 swertiamarin의 함량이 줄어드는 것으로 나타났으며, 이는 swertiamarin 성분이 분해되어 함량이 감소되어진 것으로 보여진다. 최적의 추출온도는 40°C이며, 실온온도인 30°C보다는 함량이 증가되었고 그 이상의 고온으로 올라갈수록 추출효율은 감소하였다. 이는 초음파 추출법이 기존의 환류냉각 추출법과 달리 저온에서 추출하여 짧은 시간에도 높은 추출효율을 기대할 수 있는 방법이라는 것에 일치하는 결과를 얻게 되었다²⁷. 최종적으로 당약 (當藥)의 swertiamarin은 20% methanol로 10분 동안 1 : 20의 시료·용매비율로 40°C의 온도 조건에서 진행하였을 때 추출효율이 가장 좋은 최적의 추출조건을 확립하였다. 또한 추출방법에 따른 분석법의 밸리데이션을 실시하여 농도의 범위를 설정하였고, 직선성, 정밀성, 정확성 평가에 의하여 당약 (當藥) 내 swertiamarin을 정량할 수 있는 방법으로 검증되었다. 이로써 확립한 추출조건은 swertiamarin의 함량을 극대화한 추출물 제조 연구에 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

결론

본 실험은 당약 (當藥)의 주요활성성분인 swertiamarin의 추출효율을 극대화하고 기존의 추출법과는 다른 효율적이고 경제적인 초음파 추출법을 적용하여 최적의 추출조건을 확립한 후 HPLC-PDA를 이용하여 swertiamarin의 함량을 분석 및 validation을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Swertiamarin의 가장 높은 함량을 나타낸 최적의 조건은 용매, 20% methanol 조건 (0.813%), 시료·용매 비율 1 : 20 조건 (0.869%), 40°C의 온도 조건

(0.874%), 초음파 추출시간을 10분 (0.848%)으로 조건을 확립하였다.

- Swertiamarin의 정량분석법은 HPLC-PDA를 이용하여 직선성, 농도의 범위, 정확성, 정밀성 평가를 통하여 검증되었다.

이상으로 효능이 입증된 당약 (當藥)의 주요성분인 swertiamarin의 최적의 추출조건을 위한 실험을 진행한 결과, 초음파 추출을 통해 안전성, 시간, 작업환경 등의 측면에서 효율적인 추출방법을 확립하였으며 당약 (當藥)의 주요성분의 함량극대화를 위한 추출물 제조 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구논문은 한국한의학연구원 전통의학 소재 자원 관리 시스템 구축사업 (K14142) 및 고유생물자원 특성평가 및 대체한약자원 발굴 연구과제 (K14411)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

- Yamahara J, Konoshima T, Sawada T, Fujimura H. Biologically active principles of crude drugs: pharmacological actions of *Swertia japonica* extracts, swertiamarin and gentianine. *Yakugaku Zasshi*, 1978 ; 98(11) : 1446-51.
- Basnet P, Kadota S, Shimizu M, Namba T. Bellidifolin: a potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from *Swertia japonica*. *Planta Med*, 1994 ; 60(6) : 507-11.
- Hase K, Li J, Basnet P, Xiong Q, Takamura S, Namba T, Kadota S. Hepatoprotective principles of *Swertia japonica* Makino on D-galactosamine /lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Chem Pharm Bull*, 1997 ; 45(11) : 1823-7.
- Xiufen W, Hiramatsu N, Matsubara M. The antioxidative activity of traditional Japanese herbs. *Biofactors*, 2004 ; 21(1-4) : 281-4.
- Hiramatsu N, Xiufen W, Takechi R, Itoh Y, Mamo J, Pal S. Antimutagenicity of Japanese traditional herbs, gennoshoko, yomogi, senburi and iwa-tobacco. *Biofactors*, 2004 ; 22(1-4) : 123-5.
- Basnet P, Kadota S, Shimizu M, Namba T. Bellidifolin: a potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from *Swertia japonica*. *Planta Med*, 1994 ; 60(6) : 507-11.
- Komatsu M, Tomimori T, Ito M. Studies on the constituents of *Swertia japonica*. I. On the structures of swertisin and isoswertisin. *Chem Pharm Bull*, 1967 ; 15(3) : 263-9.
- Komatsu M, Tomimori T, Makiguchi Y, Asano K. Studies on the constituents of *Swertia japonica*. 3. On the flavonoid constituents of the plants of *Swertia* spp. *Yakugaku Zasshi*, 1968 ; 88(7) : 832-7.
- Tomimori T, Komatsu M. Studies on the constituents of *Swertia japonica*. V. On the xanthone constituents of the plants of *Swertia* ssp. *Yakugaku Zasshi*, 1969 ; 89(3) : 410-7.
- Yamahara J, Kobayashi M, Matsuda H, Aoki S. Anticholinergic action of *Swertia japonica* and an active constituent. *J Ethnopharmacol*, 1991 ; 33(1-2) : 31-5.
- Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J Antimicrob Agents*, 2005 ; 26(5) : 343-56.
- Knorr D, Zenker M, Heinz V, Lee DU. Application and potential of ultrasonics in food processing. *Trends. Food Sci Technol*, 2004 ; 15(5) : 261-6.
- Yu SH, Chong MS, Kim HJ, Lee KN. Studies on the extraction method and polysaccharide of *Tricholoma matsutake* using the supersonic wave and microwave. *Korean J Orient Physiol Pathol*, 2007 ; 21(6) : 1431-6.
- Zou TB, Wang M, Gan RY, Ling WH. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from Mulberry, using response surface methodology. *Int J Mol Sci*, 2011 ; 12(5) : 3006-17.
- Wang XS, Wu YF, Dai SL, Chen R, Shao Y. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Ultrason Sonochem*, 2012 ; 19(6) : 1155-9.
- Jung GW, Kim WI, Hong IK, Park KA. Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Applied Chemistry*, 2000 ; 4(2) : 149-52.
- Toma M, Vimatoru M, Panjwnyk L, Mason TJ. Investigation of effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem*, 2001 ; 8(2) : 137-42.
- Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem*, 2001 ; 8(3) : 303-13.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. Improvement of anticancer activation of ultrasonicated extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2004 ; 12(4) : 273-8.
- Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee HY. Enhancement of immune activities of *Ephedrae Herba* and *Rubi Fructus* at

- low temperature extraction. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2005 ; 13(3) : 81-6.
21. Duan B, Hu J, Huang L, Yang X, Chen F. Chemical fingerprint analysis of *Gentianae Radix et Rhizoma* by high-performance liquid chromatography. *Acta Pharm Sin B.* 2012 ; 2(1) : 46-52.
 22. Wang Z, Ma C, Tang S, Xiao H, Kakiuchi N, Kida H, Hattori M. Qualitative and quantitative analysis of *Swertia* herbs by high performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). *Chem Pharm Bull.* 2008 ; 56(4) : 485-90.
 23. Chang J, Zhao XM, Liu CX, Zhang TJ. Simultaneous determination of swertiamarin and its metabolites (5Z)-5-ethylidene-8-hydroxy-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1H-pyrano[3,4-c]pyridin-1-one and erythrocentaurin in broth of *Aspergillus niger* by HPLC. *Biomed Chromatogr.* 2008 ; 22(2) : 191-5.
 24. Takei H, Nakauchi K, Yoshizaki F. Analysis of swertiamarin in *Swertia* herb and preparations containing this crude drug by capillary electrophoresis. *Analytical sciences.* 2001 ; 17(7) : 885-8.
 25. Yoo DS, Choi YH, Cha MR, Choi CW, Kim MR, Yon GH, Hong KS, Lee BH, Kim EJ, Cho SW, Kim YS, Ryu SY, Kang JS. Variation of saponin content in the decoctions of *Platycodi Radix* (II). *Kor J Pharmacogn.* 2010 ; 41(2) : 147-52.
 26. Shin SL, Lee CH. Screening of effective extraction condition for increasing antioxidant activities from fronds of *Osmunda Japonica*. *Korean J Plant Res.* 2011 ; 24(2) : 174-80.
 27. Woo JH, Shin SL, Chang YD, Lee CH. Comparison of antioxidant effects by different extraction methods in flowers of *Aster scaber*, *Aster maackii*, *Coreopsis lanceolata* and *Coreopsis tinctoria*. *Korean J Plant Res.* 2009 ; 22(5) : 381-8.