

Effect of deep eutectic solvent (DES) on the extraction of asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica*

Jaeyong Choi^{1,†}, Yuim Jeon^{2,†}, and Sung Ho Ha^{2,★}

¹Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

²Department of Chemical Engineering, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

(Received February 27, 2023; Revised March 15, 2023; Accepted March 16, 2023)

병풀(*Centella asiatica*)로부터의 asiaticoside와 madecassoside의 추출효율에 미치는 DES의 영향

최재영^{1,†} · 전유임^{2,†} · 하성호^{2,★}

¹한남대학교 화학과, ²한남대학교 화학공학과

(2023. 2. 27. 접수, 2023. 3. 15. 수정, 2023. 3. 16. 승인)

Abstract: *Centella asiatica* (*C. asiatica*) extracts, including asiaticoside and madecassoside, are used in ointments to treat the wound and atopic dermatitis due to their antibacterial and skin-regenerating effects in Asia. Therefore, research on the cultivation and extraction efficiency of *C. asiatica* is being actively conducted to increase commercialization efficiency. In this study, various deep eutectic solvents (DESs) were prepared and used as the extraction solvents according to the mole ratio between the hydrogen bond acceptor (HBA) and hydrogen bond donor (HBD). And then, the extraction yields in distilled water (DW) and methanol (MeOH), commonly used extraction solvents for *C. asiatica*, were compared and analyzed by HPLC in the optimized operating condition. As a result, a mixture of DW and DES at a ratio of 3:7 showed about 1.4 times higher extraction efficiency than MeOH only. Conversely, the extraction efficiency in a mixture of MeOH and DES at a ratio of 3:7 was about 6% lower than that in MeOH only.

요 약: 병풀(*Centella asiatica*) 추출물인 asiaticoside와 madecassoside는 항균성 및 피부재생 등의 효과로 인해 아시아 지역에서 치료용 연고에 사용되고 있으며, 병풀의 재배 및 추출효율을 높이기 위한 연구가 상업화를 위해 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 환경 친화적인 추출 용매인 deep eutectic solvents (DESs)가 병풀에서 asiaticoside와 madecassoside의 추출 효율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 다양한 수소결합 받개(hydrogen bond acceptor, HBA)와 주개(hydrogen bond donor, HBD)의 혼합 몰비(HBA1:HBD2, HBA1:HBD3, HBA1:HBD4, 그리고 HBA1:HBD5)로 제조하여 추출용매로 사용하였으며, 용매 추출에서 일반적으로 사용되고 있는 추출용매인 증류수(DW)와 methanol (MeOH)의 추출 결과를 최적화된

†These authors contributed equally to this work.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-629-8896 Fax : +82-(0)42-629-8835

E-mail : shha@hnu.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

HPLC조건으로 분리하여 정량 분석하였다. 그 결과, DW와 DES를 3:7로 혼합하여 사용한 경우가 단일 MeOH를 사용한 경우보다 약 1.4배 높은 추출 효율을 보였다. 반대로 MeOH과 DES를 3:7로 혼합하여 사용하는 경우에는 단일 MeOH를 사용하는 경우보다 약 6% 낮은 추출 효율을 보였다.

Key words: *Centella asiatica*, Asiaticoside, Madecassoside, Quantitative analysis, Deep eutectic solvent (DES), Extraction, HPLC

1. 서 론

우리에게 호랑이풀(tiger grass)라고 더 널리 알려져 있는 병풀(*Centella asiatica*)은 선사시대부터 치료를 위해 사용되어진 약용 식물 중 하나이다. 병풀은 고온 다습한 환경에서 자생하는 특징을 가지고 있어 국내에서는 남해 일부지역과 제주도에서 자생하는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 최근에는 경남 합천과 충북 충주지역 등에서 상업화를 목적으로 국내산 병풀을 재배하고 있다.^{3,4} 병풀의 주요 지표성분은 asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside, 그리고 madecassoside이며, 그 중에서도 특히 asiaticoside와 madecassoside는 항균 및 항진균 특성과 면역활성 및 피부재생 등의 다양한 효과를 가지고 있어 이를 이용한 치료제 및 기능성 화장품 개발과 같은 연구가 활발하게 이루어지고 있다.^{4,6} 그 외에도 병풀에는 영양·식물학적 요소인 탄수화물 43.8%, 섬유질 17%, 단백질 8.4%, 그리고 지질 1.2% 등이 함유되어 있어 대체 식품으로써 활용 가능성이 높은 것으로 보고되었다.⁷

하지만, 병풀의 건조방법, 성장환경, 성장정도, 그리고 추출용매의 종류 등에 따라서 타겟 물질인 asiaticoside와 madecassoside의 추출효율이 다르다는 것이 최근 보고되었다.^{3,5} 용매추출법은 이와 같은 약용 식물 또는 천연물에서 원하는 성분을 분리하기 위해 사용되는 기본적인 분리 기법 중 하나이다. 용매추출법에 사용되는 용매로는 타겟 물질의 특성에 따라 유기용매, 알코올 및 이온성 액체 등을 선택적으로 사용하지만, 약용 식물과 같은 건강 및 생물학적 활성 물질을 추출하는 경우에는 친환경적이며 무해한 용매를 사용해야 한다는 한계가 있다.⁸ 국내에서 이루어지고 있는 병풀 추출물 연구에서 증류수(DW)와 ethanol (EtOH) 그리고 methanol (MeOH)이 추출용매로 사용되고 있다.^{3,5,9}

이러한 노력에도 불구하고 환경오염이 세계적인 문제점으로 대두되고 있는 최근에는 보다 더 친환경적인 용매로 deep eutectic solvent (DES)를 사용하는

비중이 크게 증가하고 있다.^{10,11} 2003년 A. P. Abbott *et al.*에 의해 제안된 DES는 수소결합 받개(hydrogen bond acceptor, HBA)와 수소결합 주개(hydrogen bond donor, HBD)에 해당되는 두 물질이 적절한 몰비(mole ratio)로 혼합되어 각각의 성분보다 더 낮은 녹는점과 낮은 독성을 가지면서 저렴한 비용으로 쉽게 제조할 수 있는 환경 친화적인 혼합용매의 통칭이다.¹¹⁻¹³ DES의 제조는 100 °C 이하에서 HBA와 HBD를 혼합하는 방법이 가장 널리 사용되고 있고, 이렇게 제조된 DES는 비교적 높은 점도를 가진다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위하여 다른 용매(예: DW 및 MeOH 등)에 DES를 희석하여 점도를 낮추기도 한다. 그 외의 물성(예: 밀도, 녹는점 및 극성도 등)에 의해서도 추출 효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있지만, DES 제조에 사용되는 HBA와 HBD의 종류 그리고 혼합 몰비의 변화를 통하여 비교적 쉽게 조절 가능한 것으로 알려져 있다.^{11,12,14}

본 연구에서는 DES 제조에 HBA로 choline chloride (ChCl), 그리고 HBD로 ethylene glycol (EG)을 선택하였다. 이렇게 제조된 DES가 병풀로부터의 asiaticoside와 madecassoside 추출효율에 미치는 영향을 관찰하고, 나아가 병풀 추출물의 정성 및 정량분석을 위한 최적화된 HPLC 분석조건을 확립하는 것을 목적으로 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

병풀은 제주도 자생 전초를 건조한 제품을 (주)허브마을(Cheongju, Korea)에서 구매하였으며, DES 제조를 위하여 ChCl (≥98%)와 EG (≥99.5%) 그리고 정량 분석을 위하여 표준물질 asiaticoside (M=959 g/mol, ≥98.5%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 madecassoside (M=975 g/mol, ≥95%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 사용되었다.

Asiaticoside와 madecassoside의 추출과 HPLC정량 및 정성분석을 위하여 Thermo Fisher Scientific (Waltham,

MA, USA)사의 HPLC grade인 methanol (MeOH), 그리고 acetonitrile (ACN)를 각각 사용하였다. 추출물의 정량 및 정성분석을 위해서 Agilent Technologies (Waldbronn, Germany)사의 1260 Infinity series HPLC 와 Symmetry C18 컬럼(Waters, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm)을 사용하였다. 기본적인 HPLC 분석조건은 0.5 mL/min의 유속, 10 μ L의 주입량, 205 nm의 검출 파장, 그리고 40 $^{\circ}$ C의 컬럼 온도에서 수행되었으며 HPLC분석은 결과의 재현성을 검증하기 위하여 모든 시료는 3회 반복 수행되었다.

2.2. DES 제조

DES 제조를 위한 시료준비는 N. F. Gajardo-Parra *et al.*의 연구와 동일하게 수행되었으며,¹⁵ 제조한 DES는 ChCl와 EG의 몰비(mole ratio)에 따라서 1:2, 1:3, 1:4 그리고 1:5로 제조하였으며, 각각 DES-1, DES-2, DES-3, 그리고 DES-4로 명명하였다. ChCl와 EG의 혼합은 교반기(Cimarec, Thermo Fisher Scientific, Marietta, OH, USA)를 이용하여 80 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 50 rpm의 속도로 교반하여 투명한 DES용매를 획득하였다.¹⁰ 이와 같이 제조된 각각의 DES는 증류수(DW) 또는 MeOH와 7:3 비율(DES:DW or MeOH)로 섞어준 용액을 병플로부터 asiaticoside와 madecassoside를 추출하기 위해 사용하였다.

2.3. Asiaticoside와 madecassoside의 추출

건조된 병풀의 대표성을 높이기 위하여 분쇄기(HMS-3250s, Hanil Electric, Bucheon, Korea)로 10분간 7,500 rpm으로 분쇄하였으며, 분쇄된 병풀은 10 mg/mL의 농도로 상온에서 20 rpm의 교반 속도로 특정 시간동안 용매 추출하였다. 그 후 과추출을 방지하기 위하여 추출액은 14,000 rpm에서 20분동안 원심 분리하였으며(Labogene-1730R, Bio-Medical Science Co., Ltd., Seoul, Korea), 상층액에 남아있을 불순물을 제거하기 위하여 0.22 μ m syringe filter(PTFE, 13 mm, MDI, Ambala Cantt, India)로 필터 하여 녹색의 맑은 추출시료를 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 추출시료는 내부 추출물질의 화학적 안정성을 위하여 HPLC 분석전까지 빛을 차단하고 냉장보관 되었다.

추출용매는 DW, MeOH, W-DES-1, W-DES-2, W-DES-3, W-DES-4, M-DES-1, M-DES-2, M-DES-3, 그리고 M-DES-4로 총 10개의 다른 조성으로 병풀에서 asiaticoside와 madecassoside를 추출하는데 사용하였다.

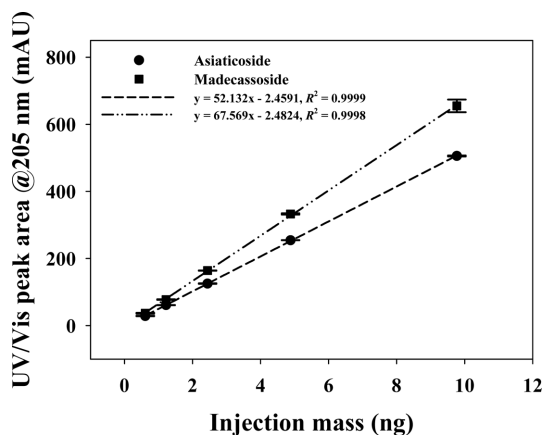


Fig. 1. Calibration curves for standard samples of asiaticoside and madecassoside by HPLC. Injection masses were 0.61, 1.22, 2.44, 4.88, and 9.77 ng, respectively.

2.4. 표준물질의 검정곡선

HPLC를 이용한 병풀에서 추출된 asiaticoside와 madecassoside의 정량분석을 위하여 각각의 표준물질을 1.95 μ g/mL로 제조하였으며, 각 표준물질은 주입 질량(injection mass)이 0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 그리고 9.77 ng이 되도록 주입량(μ L)을 조절하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보여주는 것과 같이 표준물질인 asiaticoside의 R^2 는 0.9999 그리고 madecassoside의 R^2 는 0.9998로 두 물질 모두 매우 높은 선형성을 보였으며, 각각의 검정곡선은 다양한 추출용매 조건으로 병플로부터 추출된 asiaticoside와 madecassoside의 정량분석에 사용되었다.

3. 결과 및 토의

3.1. HPLC 최적화

병풀에서 추출된 asiaticoside와 madecassoside의 HPLC 정량 및 정성분석을 위한 조건은 2018년 M. Rafi *et al.*가 보고한 DW와 ACN을 HPLC 이동상으로 사용하는 방법으로 최적화를 진행하였다.¹⁶ 본 논문에서 최적화 과정에 대한 결과는 보여주고 있지 않지만 이를 통해 결정된 최적화 조건은 ACN 22%에서 5분동안 유지된 후 45%로 10분동안 선형증가, 5분동안 80%까지 선형증가, 그리고 80%에서 5분동안 유지된 후 22%로 5분동안 선형 감소 후 다음 실험을 위한 평형상태가 10분동안 유지되는 총 분석시간 40분의 기울기 용리법을 선택하였다(Table 1). 그 결과 최적화 조건에서 MeOH로 추출한 asiaticoside와 madecassoside의 머무름 시간(t_r)은

Table 1. Optimized HPLC analysis conditions for asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica*

Parameter	Optimized conditions
Wavelength of detector	205 nm
Column oven temp.	40 °C
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	10 µL
Gradient condition	Time (min) DW (%) ACN (%)
	0 78 22
	5 78 22
	15 55 45
	20 20 80
	25 20 80
	30 78 22
	40 78 22

각각 18.2분과 16.9분에 용리되었으며, 식 (1)로 계산된 두 물질의 분리도는 4.24로 분리가 충분히 되었다는 것을 확인할 수 있었다.

$$\text{분리도} = 0.589\Delta t_r / \omega_{1/2m} \quad (1)$$

여기서 Δt_r 은 두 peak의 머무름 시간의 차이이며, $\omega_{1/2m}$ 는 두 peak의 반-높이 너비의 평균이다.

각각의 머무름 시간(16.9분과 18.2분)과 대상 물질의 물성으로부터 16.9분에 용리되는 peak는 madecassoside ($\log P = -1.34$)이며, 18.2분에 용리되는 peak는 asiaticoside ($\log P = 0.09$)라는 것을 예상할 수 있었다. 이를 검증하기 위하여 각각의 용리 peak를 분획하여 질량 분석법(mass spectroscopy, MS)으로 분자질량을 측정한

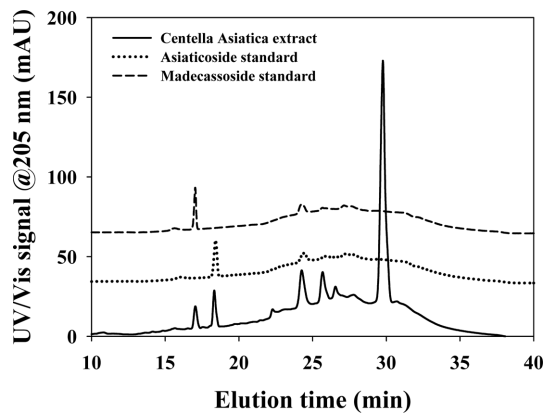


Fig. 2. Chromatograms of *Centella asiatica* extract, asiaticoside and madecassoside standards. The amount of standard sample injected into HPLC was 4.88 ng. The standard samples were dissolved in MeOH.

결과 959.51 g/mol (18.2분)와 974.51 g/mol (16.9분)로 asiaticoside와 madecassoside 표준물질의 nominal 분자량과 유사한 것을 확인하였으며, 추가적으로 표준 물질의 머무름 시간과 추출물질의 머무름 시간의 비교를 통하여 각각 peak가 asiaticoside (18.2분)와 madecassoside (16.9분)임을 Fig. 2와 같이 확인하였다. 이후 모든 HPLC 분석은 최적화된 조건에서 수행되었다.

3.2. 추출시간 최적화

추출시간이 추출효율에 미치는 영향 및 최적화된 시간을 선정하기 위하여 MeOH을 사용하여 동일한 추출 조건에서 30분, 1시간, 6시간, 24시간, 그리고 72 시간동안 병플에서 asiaticoside와 madecassoside를 추출하였으며 peak area의 비교를 통하여 그 효율을 확인하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 6시간까지 추출이 빠르게 일어나며(slope = 약 2.8), 6시간 이후(slope = 약 1.4) 추출 효율이 약 2배 낮아짐을 알 수 있었다. 본 연구에서는 DES의 조성, DW와 MeOH의 조성이 추출효율에 미치는 영향을 관찰하기 위한 것이므로 추출이 천천히 진행되기 시작하는 6시간(72시간을 기준으로 약 70% 추출)을 본 연구를 위한 최적의 추출 시간으로 선정하였다.

3.3. 추출용매 조성의 영향

앞서 언급한 총 10가지의 추출용매로 최적화된 추출시간을 적용하여 각각 추출하였으며, 준비된 병플 추출액은 최적화된 HPLC 분석조건 하에서 분리되었다.

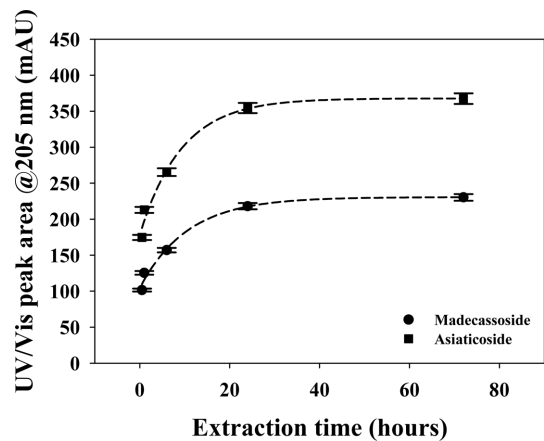


Fig. 3. UV/Vis peak area at 205 nm of extracted asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica* by HPLC (n=3). All extraction and HPLC analysis conditions were the same except extraction time. Extraction times were 0.5, 1.0, 6.0, 24, and 72 h, respectively.

Table 2. UV/Vis peak area and calculated mass of *Centella asiatica* extract by different extraction solvent compositions (n=3). The extracted mass was calculated by the calibration curves in Fig. 1

Extraction solvents	UV/Vis peak area at 205 nm (mAU)		Calculated mass (ng)	
	Asiaticoside	Madecassoside	Asiaticoside	Madecassoside
DW	20.3 ± 4.4	180.3 ± 7.8	0.44 ± 0.13	0.34 ± 0.10
MeOH	277.5 ± 10.6	20.6 ± 4.2	5.37 ± 0.25	2.71 ± 0.15
W-DES-1	367.2 ± 2.3	266.8 ± 1.8	7.09 ± 0.09	3.98 ± 0.06
W-DES-2	363.4 ± 7.1	258.6 ± 2.6	7.02 ± 0.18	3.86 ± 0.08
W-DES-3	341.4 ± 8.2	257.9 ± 1.0	6.60 ± 0.20	3.85 ± 0.05
W-DES-4	364.6 ± 13.9	270.8 ± 10.8	7.04 ± 0.31	4.04 ± 0.20
M-DES-1	222.8 ± 4.9	212.8 ± 25.6	4.32 ± 0.14	3.19 ± 0.42
M-DES-2	232.9 ± 3.5	162.5 ± 7.2	4.51 ± 0.11	2.44 ± 0.14
M-DES-3	205.2 ± 5.4	127.4 ± 4.4	3.98 ± 0.15	1.92 ± 0.10
M-DES-4	207.5 ± 8.4	130.9 ± 6.8	4.03 ± 0.21	1.97 ± 0.14

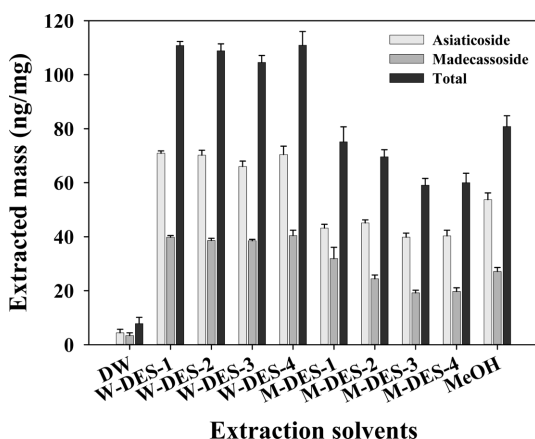


Fig. 4. Extracted mass of asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica* by different extraction solvents (n=3). The extracted mass was calculated by the calibration curves in Fig. 1 and then quantified as the mass for 1.0 mg of *C. asiatica*. The total mass was the sum of the extracted mass of asiaticoside and madecassoside.

그 결과 타겟 물질인 asiaticoside와 madecassoside의 UV/Vis peak area 그리고 Fig. 1의 검정곡선으로 계산된 각 물질의 질량을 Table 2에 정리하였으며, 이를 바탕으로 병풀 1.0 mg에서 추출된 asiaticoside와 madecassoside의 질량으로 보정하여 Fig. 4에 보여주고 있다. Table 2와 Fig. 4에서 알 수 있듯이 본 연구에서 사용된 제주산 병풀에서는 asiaticoside가 madecassoside보다 약 2배 더 많이 추출된 것을 확인할 수 있었다. 병풀은 성장환경과 성장정도의 차이로 인하여 각 성분의 함량이 다를 수 있으며, 추출방법에 따라라도 asiaticoside와 madecassoside의 함량차이가 나타나는

것을 확인할 수 있다.^{3,5,17,18}

추출효율은 순수한 DW만 이용하여 추출한 경우에는 보정 추출질량 7.8 ng/mg으로 (asiaticoside 4.4 ng/mg + madecassoside 3.4 ng/mg) 가장 낮았으며, 순수한 MeOH의 경우 약 80 ng/mg로 DW를 사용한 경우보다 약 10배 더 높은 추출 효율을 보였다. 이런 추출효율의 차이는 asiaticoside와 madecassoside의 용해도 차이와 추출용매의 물성으로 설명할 수 있다. X. F. Zheng *et al.*의 연구에 의하면 상온에서 madecassoside의 용해도는 MeOH에서 DW보다 약 17배 더 높은 것을 확인할 수 있으며, 추출용매의 점도가 낮아지면 추출 대상물질의 용해도가 높아지므로 추출효율이 증가하는 것이다.^{15,19,20} 따라서, 상대적으로 높은 용해도와 낮은 점도를 가진 MeOH에서 높은 추출효율을 보인 것이다.

하지만, MeOH 30%와 DES 70%가 혼합된 M-DES 추출용매들을 사용한 경우에는 60~75 ng/mg로 순수한 MeOH를 사용했을 때보다 낮은 효율을 보였으며, 반대로 DW 30%와 DES 70%가 혼합된 W-DES 추출용매들을 사용한 경우에는 104~111 ng/mg으로 가장 추출효율이 높은 것을 알 수 있었다. 즉, DES가 어떤 용매와 혼합되었는지에 따라서 추출효율이 변하는 것으로 보인다. 이런 현상은 앞서 설명한 asiaticoside와 madecassoside의 추출 메커니즘으로 설명할 수 있다. DES를 이용한 추출의 메커니즘도 대상물질과의 수소결합을 기반으로 하기 때문에 M-DES의 경우에는 MeOH과 DES 모두 대상물질의 하이드록시기(-OH)와 수소결합을 경쟁적으로 형성하며, HBA인 ChCl와 HBD인 EG와도 MeOH는 수소결합할 수 있기 때문에 추출효율이 순수한 MeOH을 사용한 것보다 낮아진 것으로 보인다.^{8,20,21} 그 밖의 경향성

으로는 DES에서 EG 함량이 증가할수록 추출효율이 낮아지는 것을 확인할 수 있으며, EG이 가장 많이 함유된 W-DES-4는 상대적으로 W-DES-1, W-DES-2, 그리고 W-DES-3보다 높은 표준편차를 보이는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 이와 같은 결과는 DES의 점도가 높아질수록 DES와 타겟 물질 사이의 수소결합의 세기가 약해지고, 상대적으로 높아지는 점도로 인하여 용해도가 낮아지기 때문이라고 예상된다.^{11,22}

4. 결 론

본 연구에서는 추출용매의 종류 및 조성의 차이에 따라 총 10가지의 다른 추출용매를 사용하여 병풀에서 asiaticoside와 madecassoside를 추출하였으며, HPLC를 이용하여 정성 및 정량분석을 수행하였다. 그 결과, DW와 MeOH을 이용한 추출에서는 병풀로부터 추출된 asiaticoside와 madecassoside의 총 양이 각각 7.8 ng/mg과 80 ng/mg으로, 기존에 보고되었던 것과 같이 MeOH에서 추출효율이 높은 것을 검증하였으며, MeOH 30%와 DES 70% (M-DES-3)의 경우 60 ng/mg으로 낮아졌으며, DW 30%와 DES 70% (W-DES-4)로 추출한 경우에서 가장 많은 111 ng/mg이 추출되었음을 확인하였다. 또한 DES 점도가 높아질수록(DES-1 → DES-4) 추출 효율이 DW와 혼합된 경우(W-DES)에서는 약 6%가 감소하였으며, MeOH과 혼합된 경우(M-DES)에서는 약 12%가 감소한 것으로 확인 되었다.

결과적으로 다양한 조성의 DES를 이용하여 병풀에서 asiaticoside와 madecassoside를 만족스럽게 추출하였고, 최적화된 HPLC 분석조건으로 정성 및 정량분석을 성공적으로 수행하였다. DES를 이용한 추출에서 점도는 낮추기 위해 사용되는 용매의 종류와 함량이 추출 효율에 큰 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었으며, 본 연구에서 사용된 DW 30% + DES 70%의 용매를 사용하는 경우 MeOH로 추출하는 경우보다 약 1.4배 더 좋은 효율을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2022학년도 한남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

1. B. Brinkhaus, M. Lindner, D. Schuppan, and E. G.

- Hahn, *Phytomed.*, **7**(5), 427-448 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80065-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80065-3)
2. I. E. Orhan, *eCAM.*, **2012**, Article ID 946259 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/946259>
3. H.-J. Eom, H.-Y. Shin, Y.-M. Ji, N. R. Kwon, H.-S. Yoon, I. J. Kim, Y. Song, and K.-W. Yu, *Korean J. Food Nutr.*, **34**(2), 165-173 (2021). <https://doi.org/10.9799/ksfan.2021.34.2.165>
4. Y. S. Kil, S. M. Sin, D. Y. Lee, J. W. Min, K. J. Yang, S.-W. Lee, Y.-H. Kim, and Y.-M. Goo, *J. Life Sci.*, **28**(8), 917-922 (2018). <https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.8.917>
5. H.-J. Eom, H. Y. Shin, H. J. Park, K. H. Kim, J.-H. Kim, and K.-W. Yu, *Korean J. Food Preserv.*, **29**(5), 749-761 (2022). <https://doi.org/10.11002/kjfp.2022.29.5.749>
6. W. Bylka, P. Znajdek-Awizeń, E. Studzińska-Sroka, A. Dańczak-Pazdrowska, and M. Brzezińska, *Phyther. Res.*, **28**, 1117-1124 (2014). <https://doi.org/10.1002/ptr.5110>
7. O.-N. Cu, I. Fu, A. J. P. Oj, and W. Ph, *Med. Aromat. Plants*, **9**(2), 1-7 (2020). <https://doi.org/10.35248/2167-0412.20.9.346>
8. A. Kalyniukova, J. Holuša, D. Musiolek, J. Sedlakova-Kadukova, J. Plotka-Wasyłka, and V. Andruch, *Ind. Crops Prod.*, **172**, 114047 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114047>
9. H.-Y. Shin, H. Kim, E.-J. Jeong, J.-E. Kim, K.-H. Lee, Y.-J. Bae, and K.-W. Yu, *Korean J. Food Nutr.*, **33**(6), 692-701 (2020). <https://doi.org/10.9799/KSFAN.2020.33.6.692>
10. B. Xia, D. Yan, Y. Bai, J. Xie, Y. Cao, D. Liao, and L. Lin, *Anal. Methods*, **7**(21), 9354-9364 (2015). <https://doi.org/10.1039/C5AY02035B>
11. J. K. U. Ling and K. Hadinoto, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3381 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23063381>
12. E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, *Chem. Rev.*, **114**(21), 11060-11082 (2014). <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
13. A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, and V. Tambyrajah, *Chem. Commun.*, **1**, 70-71 (2003). <https://doi.org/10.1039/B210714G>
14. Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, *Anal. Chem.*, **85**(13), 6272-6278 (2013). <https://doi.org/10.1021/ac400432p>
15. N. F. Gajardo-Parra, V. P. Cotroneo-Figueroa, P. Aravena, V. Vesovic, and R. I. Canales, *J. Chem. Eng. Data*, **65**(11), 5581-5592 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.jced>

- 0c00715
16. M. Rafi, F. Handayani, L. K. Darusman, E. Tohaeti, Y. Wahyu, Sulistiyani, K. Honda, and S. P. Putri, *Ind. Crops Prod.*, **122**, 93-97 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.062>
 17. H.-J. Kwon, J.-H. Park, G.-T. Kim, and Y.-D. Park, *Microchem. J.*, **98**(1), 115-120 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.12.008>
 18. Y. Hashim, H. Sidek, M. H. M. Helan, A. Sabery, U. D. Palanisamy, and M. Ilham, *Mol.*, **16**, 1310-1322 (2011). <https://doi.org/10.3390/molecules16021310>
 19. T. N. Pham, T. D. Lam, M. T. Nguyen, X. T. Le, D.-V. N. Vo, T. Q. Toan, and T. S. Vo, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, **544**, 012013 (2019). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/544/1/012013>
 20. X.-F. Zheng, J. Fu, and X.-Y. Lu, *J. Chem. Eng. Data*, **57**(11), 3258-3263 (2012). <https://doi.org/10.1021/je300883a>
 21. Y. Miyako, N. Khalef, K. Matsuzaki, and R. Pinal, *Int. J. Pharm.*, **393**(1-2), 48-54 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.059>
 22. H. Wang, S. Liu, Y. Zhao, J. Wang, and Z. Yu, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **7**(8), 7760-7767 (2019). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06676>

Author's Positions

Jaeyeong Choi : Research Professor
Yuim Jeon : Undergraduate Student
Sung-ho Ha : Professor