On-line Screening HPLC-ABTS⁺ Assay을 이용한 산청목으로부터 Salidroside의 분리 및 생물활성 분석

이광진, 송나영, 마진열*

Isolation and Bioactivity Analysis of Salidroside from *Acer tegmentosum* using On-line Screening HPLC-ABTS⁺ Assay

Kwang Jin Lee, Na-Young Song, and Jin Yeul Ma*

접수: 2014년 3월 17일 / 게재승인: 2014년 4월 25일

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Acer tegmentosum* was a traditional Korean herbal medicine showing various pharmacological activities. In this work, *A. tegmentosum* were extracted with boiling water and then successively partitioned with dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH), and water. Salidroside, the target compound, was purified in *n*-BuOH phase using a chromatography method. For the analysis of salidroside, TLC and LC-MS were used as well as on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay with three different wavelength of 254, 280, and 320 nm. An amount of 1.34 g of salidroside were obtained in *n*-BuOH phase from *Acer tegmentosum* was a traditional Korean herbal medicine showing various pharmacological activities. In this work, *A. tegmentosum* were extracted with boiling water and then successively partitioned with dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH), and water. Salidroside, the target compound, was purified in *n*-BuOH phase using a chromatography method. For the analysis of salidroside, TLC and LC-MS were used as well as on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay with three different wavelength of 254, 280, and 320 nm. An amount of 1.34 g of salidroside were obtained in *n*-BuOH phase from 3 kg of dry biomass. The on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay is rapid and efficient tool to search bioactivity from *A. tegmentosum*. 3 kg

of dry biomass. The on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay is rapid and efficient tool to search bioactivity from *A. tegmentosum*.

Keywords: *Acer tegmentosum*, Analysis, Isolation, On-line HPLC, Salidroside

1. INTRODUCTION

현대인의 서구식의 식생활 변화, 생활환경속에 노출된 공해 물질, 복잡한 생활의 스트레스 때문에 암과 같은 여러 가지 만성질환이나, 난치성 질병이 증가하고 있다. 이에 윤택한 삶을 유지하고 체계적인 관리를 지속하기 위하여 친환경적인 웰빙 (well-bing) 및 힐링 (healing) 사업에 높은 관심을 갖고 있다. 특히 저항력에 민감한 노령인구의 급속한 증가로 인하여 천연물 및 한약재로부터 기능성 물질을 찾고자 많은 연구자들은 노력하고 있다 [1]. 예로부터 질병의 치료 및 예방의 목적으로 사용된 전통의약은 유용성분의 복합적인 상호작용에 의하여 다양한 약리효과를 보이며 상대적으로 인체 부작용이 적다는 장점이 있다 [2]. 최근 한의학계에서는 탕제의 체내 흡수율을 증대시키고 약리효능을 증가시킬 수 있는 방법으로 탕제를 발효시키는 발효 한약에 대한 관심과 기존의 처방을 좀더 과학적으로 최적화시켜 한방처방의 조성비를 조절하는 연구도 보고되고 있다 [3].

이중에서 산청목은 단풍나무과의 낙엽활엽 소교관목인 산겨릅나무로서, 한국을 비롯한 러시아, 중국 등에서 널리 분포되었으며 국내는 중부이북 태백산 등의 계곡가에 자생되

한국한의학연구원 한의신약개발그룹
Korean Institute of Oriental Medicine (KIOM), KM-Based Herbal
Drug Development Group, Daejeon 305-811, Korea
Tel: +82-42-868-9466, Fax: +82-42-868-9573
e-mail: jyama@kiom.re.kr

Fig. 1. Photo image: Korean medicine herbal *Acer tegmentosum*.

고 있다 [4]. 가지, 줄기, 뿌리 (Fig. 1)에 플라보노이드 계열의 화합물과 페놀계 화합물이 많이 함유되어 있으며 [5], 특히 salidroside, quercetin 및 catechin 등이 잘 알려져 있다 [6-8]. 약리적 효능 및 효과에는 항산화활성, 항지질과산화활성, 항미생물활성, 항보체활성등을 예방하며 특히 해독, 간암, 간경변증 등의 각종 간질환 및 통증, 항염, 항암 등의 활성을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다 [9,10]. 따라서 생리활성물질을 얻기 위한 가공 및 추출방법으로는 전형적인 용매추출법이 주로 사용되고 있으며, 추출효율을 증대시키기 위한 초임계 유체법, 초고압처리법, 초음파추출 기술이 많이 이용되고 있다 [11]. 추출물은 크로마토그래피 방법을 적용하여 주된 물질을 선택적으로 고순도 분리할 수 있으며 정량 및 정성방법으로 TLC, PTLC, LC-MS, NMR을 통해 순수물질을 분석 및 구조 동정을 할 수 있다 [12]. 또한 성분 분석과 동시에 유용 성분의 생물활성 분석을 위하여 HPLC 시스템에 ABTS⁺ assay를 타겟으로 하는 유용성분에 ABTS⁺ 라디칼 소거능력을 측정하여 활성을 확인하는 방법으로 천연물에서 생물활성을 가지고 있는 다양한 유용물질을 빠른 시간 내에 탐색이 가능하다 [13]. 이러한 응용 시스템은 고효율의 추출과 신속한 활성성분의 분석이 가능하며 효율적인 연구가 가능할 것으로 사료된다. 뿐만 아니라, 특정 시약의 선택이 아닌 ABTS⁺와 DPPH의 라디칼 소거능력의 비교 연구에 적용을 다양하게 시도될 것이다.

이처럼 용·복합을 구축하는 바이오산업에서의 의약품뿐만 아니라 기능성 소재를 얻기 위한 방법중 천연물 및 한약

재는 다양한 성분들의 복합체로서 기원이 동일한 생약의 경우에도 산지, 재배방법, 기후, 채집시기 및 조제 방법에 따라서 품질에 상당한 차이가 있다. 따라서 제제개발 및 응용 산업에 있어서 원료 및 제품 품질검사, 제품개발 (제제 개발 및 시범생산) 활성화, 천연물소재 정보제공 및 효능탐색 등의 표준화된 특성을 비교하여 대량생산을 위한 벨리테이션의 원천기술 확보가 반드시 필요하고 [14,15], 데이터베이스를 통해 체계화된 네트워크가 이루어져야 할 것이다 본 연구는 산청목의 식물화학적 기초자료를 확보하기 위하여 크로마토그래피를 행하여 major 물질인 salidroside을 고순도 분리하여 화학구조를 동정하였고 생리활성을 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay를 이용하여 빠르게 탐색하였으며 효율적인 활성소재 확보를 위한 상용공정의 기초데이터를 실험적으로 구하여 유용성을 확인하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 산청목 (*Acer tegmentosum*) 시료는 경북 영천시 임고면 양평리에서 재배된 (원산지: 한국) 약재를 대창약업사에서 구매하였고 한국한의학연구원 한의신약개발그룹에서 처리된 시료를 사용하였다. 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기 (desiccator)에 보관하여 사용하였고 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지 (PVDF 0.2 μ m, Waters)를 이용하여 여과를 하였다. Colum chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Merck)를 사용하였고 Octadecylsilane (ODS)은 LiChroprep RP-18 (Merck)을 사용하였으며 Sephadex LH-20 (Fluka)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kiesel gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S} (Merck)를 사용하였다. 용매는 HPLC급 (99.9%)으로 메탄올, 아세트나이트릴은 (J.T. Baker)와 trifluoroacetic acid (TFA)는 (Sigma)에서 구입하였다. 시료의 추출과 분획에 사용한 유기용매 Dichloromethane (DCM), Ethyl acetate (EA), Normal butyl alcohol (*n*-BuOH)는 대정화학(주)에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. 그리고 물은 초순수 제조장치 (Milipore)를 이용하여 제조한 3차 증류수를 0.2 μ m membrane filter (ADVANTEC)로 여과 처리하여 사용하였다. 활성분석에 사용된 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺, C₁₈H₂₄N₆S₄)와 potassium persulfate는 (Sigma)에서 구입하여 사용하였으며 순도는 99.9% 이상이다. Fig. 2에서는 산청목 추출물에서 분리한 salidroside의 구조식을 나타내었다.

2.2 추출 및 전처리

건조시료 3 kg으로 구성된 산청목은 샘플의 10배 부피로 물에 1 h 동안 침적한 다음 3 h 동안 100°C에서 열탕 추출 (Gyeongseo, Cosmos-660, Incheon, South Korea) 하였다. 추출된 추출물은 standard testing sieve (150 μ m, Retsch, Haan, Germany)로 여과 후 동결 건조 하였다. 제조된 시료는 4°C에

Fig. 2. Chemical structure of salidoside from *Acer tegmentosum*.

Fig. 3. Process of extraction and isolation of salidoside from *Acer tegmentosum*.

냉장 보관하여 실험에 사용하였다. 추출된 건조시료 20 g을 크로마토그래피 분리방법을 적용하여 물 : DCM (1:1)층, EA 층, *n*-BuOH층으로 각각 3회 반복 추출하여 분획 할 수 있었고 최종 *n*-BuOH 층 (4.18 g) 분획물에서 순수물질을 고순도로 얻을 수 있었다. 이후 소량의 시료를 0.2 μ m PVDF membrane filter로 여과하여 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 분석에 사용하였다. Fig. 3에서는 산청목에서 salidoside의 추출 및 정제방법을 나타내었다.

2.3 표준액제조

본 연구실에서 구조 동정에 의하여 확인된 salidoside (순도: 91% 이상) 2 mg을 고순도 메탄올 10 mL를 취하여 200 ppm의 표준원액을 제조하였다.

2.4 ABTS⁺ 표준액 제조

On-line 라디칼활성 측정을 위한 표준시료 조제는 증류수 40 mL에 potassium persulfate 시약 37.8 mg을 넣어 완전히 녹인

Table 1. LC-MS operating condition

Instrument	Condition
Column	HECTOR-M-RS-tech C ₁₈ (100×4.6 mm, 5 μ m)
Oven temp. (C)	40
Flow rate (mL/min)	0.5
Injection vol. (μ L)	10
Ionization source (positive mode)	API-ES
Fragmentor voltage (V)	70
Quadrupole temp. (C)	99
Capillary voltage (V)	3000
Nebulizer pressure (psi)	35
Drying gas temp. (C)	350
Mass rang (m/z) scan mode	200~500
Mobile phase (%)	A: 0.1% TFA in water, B: acetonitrile
Step gradient elution composition (%)	(B) : 10~25 (0~35 min), 25~10 (35~37 min), 10 (37~45 min)

후, ABTS⁺ 시약 44 mg을 첨가하여 충분히 교반 후 차광시켰다. 제조된 용액 40 mL 중 30 mL을 덜어서 고순도 물 870 mL에 희석시킨 후, 1리터 갈색 병에 넣고 하루 정도 라디칼의 안정성을 위해 어두운 곳에서 보관한 뒤 사용하였다.

2.5 기기 및 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 분석

HPLC급 시약과 추출된 시료를 농축하기 위해서 회전식 증발기 (Heidolph Instruments Laborata 4000 efficient, Germany)를 사용하였다. 본 연구에 사용된 HPLC 시스템은 Dionex Ultimate의 3000 pump와 injector에는 10 μ L sample loop (Dionex, ID $\times$ L 0.18 $\times$ 550 mm Viper 550 mm USA)으로 HPLC-diode-array detector (DAD)로 구성되었고 데이터 처리는 Dionex의 PC에 설치된 Chromeleon data acquisition system (Dionex version 7)과 HPLC-DAD를 사용하여 분석을 하였다. 또한 분리된 표준시료는 LC-MS는 Agilent LC-ESI-MSD 1100 + G1958 (Agilent, USA)를 사용하여 정량 및 정성분석을 하였다 (Table 1). NMR spectrum은 Varian Inova 400NB (Varian, USA)와 Varian Inova 600 (Varian, USA)으로 측정하였다. 분석에 사용된 컬럼은 5 μ m 물질이 충전된 분석용 역상 컬럼인 RS-tech column (4.6 $\times$ 250 mm, C₁₈, Korea)의 사용과 유속은 1.0 mL/min, 주입부피는 10 μ L, 컬럼오븐 온도는 40°C로 고정하였다. UV 검출기는 DAD의 파장범위를 200~400 nm로 하였고, 크로마토그램은 최대 UV 흡수 파장 값인 210, 254, 280 및 320 nm에서 나타내었다. 이동상은 이성분계 A: 물/TFA (99.9/0.1 vol.%), B: 아세토나이트릴 (100 vol.%)를 사용하여 (A : B, 60 : 40 vol.%)까지 60 min동안 일정용매조성법을 이용하여 분리능을 향상시켰다 (Table 2). ABTS⁺ 표준액은 유속 0.5 mL/min로 운반되며 혼합기에서 혼합된 시료의 생물활성은 UV 파장 734 nm에서 측정하였다. Fig. 4에서는 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 시스템을 나타내었다.

Table 2. Analysis of gradient elution conditions with RP-HPLC

Instrument	Condition	
Reverse Phase	RS-Tech Optimapak C ₁₈	
Column	(4.6×250 mm, 5 μm)	
Oven temp. (C)	40	
Flow rate (mL/min)	1.0	
Mobile phase (%)	A: 0.1% TFA in water, B: acetonitrile	
UV Absorbance (nm)	210, 254, 280, 320	
Time (min)	Solvent composition	
	0.1% TFA in water (A)	acetonitrile (B)
0	90	10
50	60	40
60	60	40
70	90	10

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

3. RESULTS AND DISCUSSION

산청목에서 주된 물질인 salidroside를 추출 및 고순도 분리하기 위하여 전통적인 용매추출법과 DCM, EA 및 *n*-BuOH 층으로 실시된 용매 분획, 크로마토그래피법을 적용한 순수 물질로부터 TLC, LC-MS 및 NMR을 이용하여 분석 및 구조 동정을 하였으며 빠른 생리활성을 탐색하였다.

3.1 추출 및 정제

추출은 일정한 상온 (25°C)에서 수행하였으며 건조된 시료 3 kg을 잘게 잘라서 시료로 사용하여 100°C에서 열탕추출을 3 h 동안 수행하였다. 이때 추출물 수율은 101.6 g을 얻었으며 그 중 20 g에 대하여 용매의 극성에 따라 CH₂Cl₂, EA, *n*-BuOH 및 H₂O로 분배 추출을 하였다. 일반적으로 천연물의 추출 수율은 천연물이 가지고 있는 조직 특성과 추출방법 및 추출시스템에 따라 수율의 변화가 매우 다르다 [2,11,15]. 따라서 산청목은 목질부분의 줄기로서 수율이 매우 낮은 것으로 판단된다. 또한 분획은 크로마토그래피 분리방법을 적용하여 물 : DCM (1:1), EA층 (1:1) 및 *n*-BuOH층 (1:1)으로 각각 3회 반복 추출하여 분획할 수 있었고 분획물에 따라 *n*-BuOH (4.18 g) > EA (1.24 g) > DCM (401.6 mg) 순으로 수율을 보였다 [16].

3.2 On-line HPLC-ABTS⁺ assay 및 TLC 분석

다양한 분리기술중에서 탁월한 크로마토그래피를 이용한 분

(a)

(b)

Fig. 5. Analysis of salidroside from *Acer tegmentosum* using on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay (A: injection volume : 10 μL, UV wavelength : positive 210 nm, negative 734 nm, B: normal phase TLC analysis).

리·분석방법을 적용하기 위해 상업용으로 잘 알려진 C₁₈ 컬럼을 선정하여 이동상조성을 변화하여 분리분석 및 빠른 생물활성을 평가하여 기능성소재로 사용이 가능한 기초 자료를 제시하였다 [17]. on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 분석조건은 다양한 이동상의 일정용매조성법을 시험하여 분리능이 높은 이동상 조건을 얻었다. 이동상은 이성분계 A: 물/TFA (99.9/0.1 vol.%), B: 아세토나이트릴 (100 vol.%)를 사용하여 (A : B, 60 : 40 vol.%)까지 60 min동안 적용하여 분리능을 향상시키고 peak tailing을 방지하고 위해 0.1% (TFA)를 사용하였다. ABTS⁺ 표준액은 유속 0.5 mL/min로 운반되며 혼합기에서 혼합된 시료의 생물활성은 UV 파장 734 nm에서 측정하였다. 이때 컬럼 온도는 분리에 적합한 온도 40°C를 설정과 크로마토그램은 UV 검출기는 DAD의 파장범위를 200~400 nm로 하여 나타내었다. Fig. 5(a)에서는 *n*-BuOH층 추출물 시료 50 mg/mL을 메탄올에 용해하고 0.2 μm PVDF membrane filter로 여과하여 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay에 의하여 빠르게 스크리닝 하였다. 또한 Normal phase TLC를 이용하여 서로 다른 이동상 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 4 : 3 : 1과 MeOH : H₂O = 1 : 3으로 분석하여 물질의 거동을 확인하였다 (Fig. 5(b)). 이 결과 역상 및 정상 분석에서 많은 양의 salidroside가 함유됨을 확인할 수 있다. 하지만 빠른 생물활성 스크리닝에서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다.

Table 3. Extract amount from *n*-BuOH fraction sample

Extraction solvent (Partition)	Open column fraction (No)	<i>n</i> -BuOH fraction (mg)
<i>n</i> -BuOH phase	1	111.6
	2	248.2
	3	1349.0 / (isolation amount 1300)
	4	97.0
	5	134.4
	6	221.2
	7	192.6
	8	382.1
	9	405.9
	10	250.6

3.3 고순도 분리 및 분석

최종 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel, ODS 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 진행하여 순수 물질을 얻을 수 있었다. 산청목 *n*-BuOH 분획 (4.18 g)에 대하여 silical gel c.c [4 × 11 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=10 : 3 : 1 (2.2 L) 7 : 3 : 1 (1.6 L) 4 : 3 : 1 (1.4 L) MeOH]를 진행하여 10개의 분획물을 얻었고 화합물 salidroside를 분리하였다. 이때 각 화합물에 대하여 ¹H, ¹³C-NMR을 측정하였고 문헌과 비교 분석하였다. 화합물 (salidroside) - colorless powder (MeOH); ESI-MS *m/z* 301.1 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) δ_H 7.08 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2, 6)과 δ_H 6.71 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3, 5)에서 전형적인 para-substituted benzene ring의 signal을 나타냈으며 4.31 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1''), 4.07 (1H, H-6''a), 3.88 (1H, dd, *J*=12.4, 2.0 Hz, H-6''b), 3.73 (H-3''), 3.67 (H-4''), 3.36 (H-2''), 3.28 (H-5''), 3.21 (2H, t, *J*=8.4 Hz, H-8), 2.86 (2H, t, *J*=8.4 Hz, H-7)등이 확인하였다. ¹³C-NMR(100MHz, CD₃OD, δ_C) 156.8 (C-4), 131.0 (C-2, 6), 130.8 (C-1), 116.1 (C-3, 5), 104.4 (C-1'), 78.1 (C-5'), 77.9 (C-3'), 75.1 (C-2'), 72.1 (C-8), 71.6 (C-4'), 62.8 (C-6'), 36.4 (C-7)에서는 세 개의 methylene 탄소를 포함하여 총 14개의 탄소와 1개의 glucose를 함유하였다. ¹H-NMR spectrum에서 δ_H 4.31 (1H)의 anomeric proton의 coupling constant가 8.0 Hz인 것으로 미루어 당은 β 형태의 configuration을 가진 것으로 판단된다. 이때 문헌치와 비교한 결과 salidroside를 동정할 수 있었다 [18]. Fig. 6(a, b)에서는 순수하게 분리된 salidroside의 UV 흡수 파장변화를 210, 254, 280 및 320 nm에서 확인하였다. 이때 210 > 280 > 254 > 310 nm에서 최대 흡수를 보였고 체류시간은 *Rt* : 8.053 min 이었다. 특히 선행연구를 기초로 한 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay의 빠른 생물활성 능력을 분리된 salidroside (농도: 200 ppm, 순도: 91% 이상, 생약재로부터 수율 : 0.04%)을 사용해 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 이때 positive 피크의 감도는 좋은 intensity와 분리능이 우수한 형태를 보였고 빠른 시료의 용출로 인해 분리도가 1.5 이하로 낮았으며 negative 피크면적도 완만히 비례하게 분석되었다 [11,12]. 일반적으로 생물활성이 있는 항산화 물질은 빛이나 열에 불안정하고 활성산소 (free radical oxygen radical)에 기인하여 추출 과정 중

Fig. 6. Analysis of UV wavelength from high purity isolation salidroside. **Fig. 7.** Bioactivity identification of isolation salidroside from *n*-BuOH fraction extract in *Acer tegmentosum*.

유효성분이 소멸되거나 재배기술 방법에 따라 유효성분의

Fig. 8. HPLC profile and LC-MS spectra of isolation salidroside from *Acer tegmentosum*.

함유되는 정도는 매우 큰 차이가 있을 것으로 생각된다 [19-21]. 따라서 산청목에서 salidroside 추출 및 활성 물질에 대하여 더욱 깊이 있는 연구가 필요하리라 사료된다. 또한 연속 분석 방법에서 LC-MS 분석은 질량 스펙트럼 및 체류시간에 기초하여 salidroside에 대하여 분자량 $C_{14}H_{20}O_7$, $[M+H]^+$, m/z 300.30 (301.1)을 명확히 보여주고 있다 (Fig. 8). 따라서 본 연구에서 수행된 연구 결과는 사실을 실험적으로 입증하는 기초자료로 이용될 수 있다 [22].

4. CONCLUSION

산청목은 전통약재로서 다양한 약리활동을 갖고 있다. 본 연구에서는 *n*-BuOH 층 추출액에 포함된 salidroside의 추출조건을 실험적으로 구하여 확인하였고 크로마토그래피법을 이용한 순수 물질을 분리하여 구조 동정하였다. 이 결과 on-line screening HPLC-ABTS+ assay를 이용하여 생물활성을 신속하게 탐색하였고 UV 흡광도는 210 nm에서 최대 흡수율을 보였으며 체류시간은 (*Rt*) 8.053 min이었다. 또한 고순도 salidroside을 1.34 g을 얻었으며 LC-MS 분석을 통해 $[M+H]^+$, m/z 300.30 (301.1)을 명확히 보여주었다. 위에서 얻은 기초 자료는 생리활성물질을 효율적으로 얻기 위한 방법으로 기능성 소재 개발의 산업적 측면에서 매우 중요하다. 뿐만아니라 on-line 분석방법을 적용한 물질 스크리닝 특성 연구는 거의 전무하며 매우 미흡한 실정이다. 따라서 상용공정의 활용 가능성의 모색을 통해 기능성 소재 개발 시 매우 유용한 기초 자료로 사용될 충분한 가치가 있다고 판단된다.

Acknowledgements

본 연구는 한국한의학연구원의 한의신약개발그룹 연구지원 (K14050) 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Shin, I. C., J. H. Sa, T. H. Shim, and J. H. Lee (2006) The physical and chemical properties and cytotoxic effects of acer tegmentosum maxim. extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 322-327.
- Lee, K. J., C. Liang, H. J. Yang, and J. Y. Ma (2012) Rapid identification of homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* leaves by HPLC on-line ABTS+ screening method. *Yakhak Hoeji* 56: 217-221.
- Lee, K. J., B. H. Lee, P. M. Jung, C. Liang, and J. Y. Ma (2013) Analysis of bioconversion components of fermentation Hwangryunhaedok-tang. *Yakhak Hoeji* 57: 293-298.
- Yu, T., J. H. Lee, Y. G. Lee, S. E. Byeon, M. H. Kim, E. H. Sohn, Y. J. Lee, S. G. Lee, and J. Y. Cho (2010) In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*. *J. Ethnophar.* 128: 139-147.
- Lee, S. A. and G. Moon (2010) Effects of mixture with *Hovenia dulcis* Thunb and *Acer tegmentosum* Maxim on liver failure induced by D-galactosamine in rats. *Korean J. Orient. Int. Med.* 31: 11-24.
- Seo, H. W., K. J. Park, G. H. Guahk, J. S. Im, D. K. Kim, J. Y. Leem, D. S. Cha, J. Kwon, C. H. Oh, and H. Jeon (2013) Antinociceptive activity of *Acer tegmentosum* MeOH extract. *Korean J. Pharmacogn.* 44: 188-192.
- Liu, Q., E. J. Shin, M. J. Ahn, B. Y. Hwang, and M. K. Lee (2011) Anti-adipogenic activity of *Acer tegmentosum* and its constituent, catechin in 3T3-L1 cells. *Natu. Product Sci.* 17: 212-215.
- Tung, N. H., Y. Ding, S. K. Kim, K. H. Bae, and Y. H. Kim (2008) Total peroxy radical-scavenging capacity of the chemical components from the stems of tegmentosum Maxim. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10510-10514.
- Yoo, Y. M., J. H. Nam, M. Y. Kim, J. W. Choi, K. T. Lee, and H. J. Park (2009) Analgesic and anti-gastropathic effects of Salidroside isolated from *Acer tegmentosum* heartwood. *The Open Bioac. Comp. J.* 2: 1-7.
- Lee, S. B. and H. J. Woo (2010) A study of the inhibitory effect of *Acer tegmentosum* Max. on fibrogenesis in hepatic stellate cell line T6. *Korean J. Orient. Int. Med.* 31: 346-355.
- Hazra, B., M. D. Sarma, and U. Sanyal (2004) Separation methods of quinonoid constituents of plants used in oriental traditional medicines. *J. Chromatogr. B.* 812: 259-275.
- Lee, K. J., J. Y. Ma, and Y. S. Kim (2012) Identification of curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa*) using ultrasonic wave and dipping method. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 27: 33-39.
- Lee, K. J., Y. K. Shin, and Y. S. Kim (2009) Enhanced effect extraction of Antioxidant substance Homoorientin from *Pseudosasa japonica* and *Phyllostachys bambusoides* leaves using Ultrasonic wave system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 24: 189-194.
- Hur, J. M., M. R. Jun, E. J. Yang, S. H. Choi, J. C. Park, and K. S. Song (2007) Isolation of isoprenoidal compounds from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 38: 67-70.
- Song, X. Y., Y. D. Li, Y. P. Shi, J. Ling, and J. Chen (2013) Quality control of traditional Chinese medicines: a review. *Chinese J. Nat. Medi.* 11: 0596-0607.

16. Park, K. M., M. C. Yang, K. H. Lee, K. R. Kim, S. U. Choi, and K. R. Lee (2006) Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum* Maxim. *Arch. Pharm. Res.* 29: 1086-1090.
17. Row K. H. (1995) Separation of two components in the case of large difference in concentration by chromatography. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 6: 193-199.
18. Hur, J. M., E. J. Yang, S. H. Choi, and K. S. Song (2006) Isolation of phenolic glucosides from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 149-152.
19. Kim, S. G., S. J. Hur, K. H. Kim, S. G. Kim, and W. K. Whang (2012) Antioxidant and anti-inflammatory compounds isolated from *Acer tegmentosum*. *J. Medicinal Plants Res.* 6: 3971-3976.
20. He, X. G., L. Z. Lin, L. Z. Lian, and M. Lindenmaier (1998) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*). *J. Chromatogr. A.* 818: 127-132.
21. Sandur, S. K., H. Ichikawa, M. K. Pandey, A. B. Kunnumakkara, B. Sung, G. Sethi, and B. B. Aggarwal (2007) Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *F. Radical Biology and Med.* 43: 568-580.
22. Priyadarsini, K. I., D. K. Maity, G. H. Naik, M. S. Kumar, M. K. Unnikrishnan, J. G. Satav, and H. Mohan (2003) Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin, *F. Radical Biology and Med.* 35: 475-484.