

지실의 Poncirin, Naringin의 동시분석법 확립과 초음파 추출법 최적화

이아름 · 장설 · 이아영 · 최고야 · 김효선 · 김호경*

*한국한의약연구원 한약자원그룹

Simultaneous Determination and Optimization Ultrasound-Assisted Extraction of Poncirin and Naringin in *Poncirus trifoliata* Rafinesqu

Ah Reum Lee, Seol Jang, A Yeong Lee, Goya Choi, Hyo Seon Kim and Ho Kyoung Kim*

*Herbal Resources Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea.

ABSTRACT : The Poncirus fructus immaturus (*Poncirus trifoliata* Rafinesque) has been used in oriental medicine for uterine contraction, stomachache, abdominal distension and cardiovascular diseases. Two main compounds, poncirin and naringin were successfully analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and carried out method validation according to ICH guideline. A successful resolution and retention times were obtained with a C₁₈ reversed phase column, at an 1 ml min⁻¹ flow rate, with a gradient elution of a mixture of methanol, water and acetonitrile. Poncirin and naringin showed good linearity (R² > 0.999) in relatively wide concentration ranged. The recovery of each compound was 95.81 ~ 101.48% with R.S.D. values less than 1.0%. The application of ultrasound-assisted extraction was shown to be more efficient in extracting poncirin and naringin from Poncirus fructus immaturus. The predicted optimal poncirin and naringin yield were poncirin 2.15%, naringin 1.65% under an extraction temperature of 40°C, an extraction time of 10 min in a solvent of 70% methanol.

Key Words : Poncirus Fructus Immaturus, Poncirin, Naringin, HPLC, Ultrasound-Assisted Extraction, Optimization

서 언

지실 (Poncirus fructus immaturus)은 운향과 (Rutaceae)에 속한 탕자나무 (*Poncirus trifoliata* Rafinesque)의 익지 않은 열매로 봄·여름철에 1~2 cm의 어린 열매를 채취하여 쪼개서 말린 것을 사용한다 (Hwang, 1997). 한의학에서 지실의 효능은 가슴과 복부 팽만, 수종, 변비 등에 사용하였으며, 또한 위를 튼튼하게 하고 소화를 촉진시키기 위하여 널리 사용되고 있다 (Chung et al., 2005; Lee et al., 2009; Yoon et al., 2012). 최근에는 항염효능, 항과민증 효과와 지실 추출물이 암세포의 세포사멸을 유도하는 효과가 있다고 보고되었다 (Lee et al., 2008). 지실의 성분으로는 정유성분인 limonene, linalool, camphene과 flavonoid 성분인 poncirin, naringin, natriirutin, hesperidin, neohesperidin 그리고 coumarin 성분인 umbelliferone, auraptene, imperatorin이 보고되었다 (Lee et al., 2011; Wang et al., 2010). Flavonoid는 식물의 줄기, 뿌리,

껍질에 분포하는 색소성분이며 항산화 작용을 비롯하여 항암, 항혈전, 항염증 및 항균 작용 등 다양한 생리활성을 보여주고 있다 (Jeon et al., 2012; Kim et al., 2004). 지실의 flavonoid 성분인 poncirin은 항혈소판 작용 및 장내세균 억제 작용, 조골세포 분화효과와 항 헬리코박터파이로리 활성이 있다고 알려져 있다 (Kim et al., 1999; Teng et al., 1992; Zhu et al., 2013). Naringin은 콜레스테롤 억제효과와 백혈병 세포를 정상세포로 변화시키는 작용, 항 바이러스성, 간 보호 효과, 유방암 세포증식 저해작용이 있는 것으로 보고되었다 (Gordon et al., 1995; Jung et al., 2003; Ng et al., 1996).

Flavonoid 성분을 정성, 정량 분석하기 위해서 많은 분석방법들이 개발되었는데 그 중에서도 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)이 많이 사용되고 있다 (Ribeiro and Ribeiro, 2008). 지실에 함유된 flavonoid 성분 분석 (Hwang, 1997), 지실과 지각 중 flavonoid glycosides의 분리 및 정량에서 HPLC를 이용하였고, 최근에 naringin은 식물추출물, 생

[†]Corresponding author: (Phone) +82-42-868-9502 (E-mail) hkkim@kiom.re.kr

Received 2014 February 12 / 1st Revised 2014 February 25 / 2nd Revised 2014 March 18 / 3rd Revised 2014 March 21 / Accepted 2014 March 24

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.

채액과 제약 처방약품에서 분리 및 정량하는데 역상 HPLC가 많이 사용되어진다고 보고된다 (Kanaze *et al.*, 2003).

일반적으로 천연물로부터 유효 성분 추출을 위해서 환류 추출, 속실텯 추출을 사용하였는데 많은 용매와 에너지 사용, 긴 시간이 소요되는 단점 때문에 초임계 유체 추출과 마이크로웨이브 추출이 사용되고, 특히 flavonoid 성분은 초음파 추출법이 많이 사용되고 있다 (Sun *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). 초음파 추출법 (ultrasound-assisted extraction)은 비가열 방식의 추출법으로 가열에 의한 활성성분의 파괴를 최소화할 수 있으며, 초음파가 용매를 통과하며 생성되는 공동화현상 때문에 추출수율의 향상과 유용성분의 안전한 용출이 가능하며 추출시간을 감소시키는 효율적인 추출 기법이다 (Jang *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011).

지실의 성분분석과 관련하여 Hwang (1997)과 Kim 등 (1989)에서는 환류추출법을 사용하였고 Wang 등 (2010)에서는 naringin의 함량분석에서 환류추출법과 마이크로파추출법을 비교하였다. Lee 등 (2011)은 poncirin과 naringin의 함량 분석에서 초음파 추출법을 이용하였지만 초음파를 이용한 최적의 추출법과 관련된 연구는 미비한 실정이다. 식물체 내에 존재하는 많은 화합물들은 추출용매, 용매비율, 추출 시간과 온도 등 추출조건이 식물 화합물의 함량과 이화학적인 특성에 영향을 미치므로 (Kim *et al.*, 2010) 조건별 추출법을 최적화하고자 한다.

본 연구에서는 지실의 KP 10 (MFDS Notification No. 2013-103, 2013)에 지표물질로 설정되어있는 poncirin과 naringin의 효과적인 동시 분석법을 정립하고 추출용매, 시료·용매조성 비율, 추출시간 및 추출온도 등의 최적의 추출 조건을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

경북 춘양산에서 수집한 자연산 지실을 운곡한약품에서 2013년 6월에 구입하였고 최고야 박사로부터 기원의 진위와 품질상태를 검증받았다. 건조 지실은 Mixer (HMF-3000s, Hanil, Korea)로 분쇄한 후 70 mesh의 체로 쳐서 기밀용기에 보관하여 사용하였다. 지실의 지표성분인 poncirin (≥96.0%)은 Fluka사 (USA), naringin (≥96.8%)은 Chromadex사 (USA)에서 구입하였으며 (Fig. 1), 시료의 추출 및 분석에 사용된 용매인 acetonitrile, distilled water, ethyl alcohol, methanol은 Burdick & Jackson사 (USA)의 HPLC급 제품을 사용하였다.

2. 전처리 및 HPLC 분석 방법

1) 시료 전처리 및 표준용액 조제

지실 분말을 50 ml 용량 플라스크에 넣은 후, 용매 종류별,

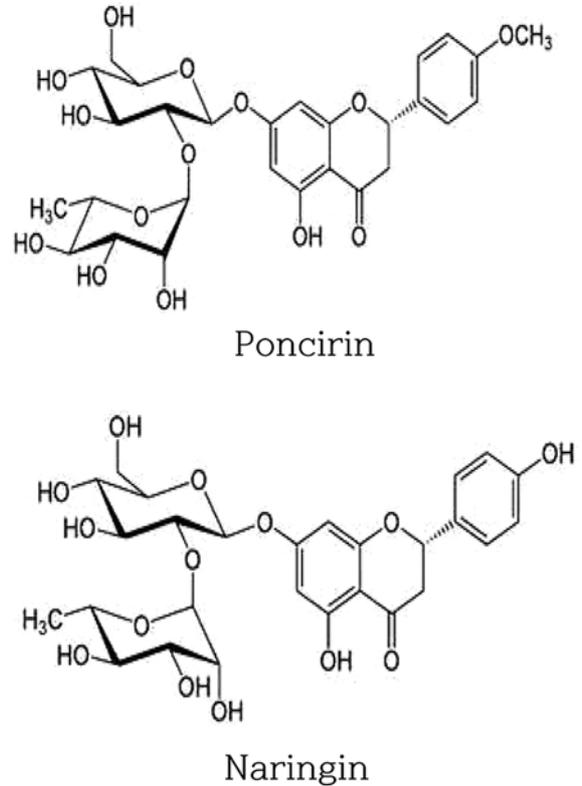


Fig. 1. Chemical structures of poncirin and naringin.

Table 1. HPLC conditions for the quantitative analysis of poncirin and naringin.

Items	Conditions
Instrument	LC-20A series (Shimadzu)
Detector	UV-Vis (wavelength at 313 nm)
Column	Xbridge C ₁₈ , 4.6 mm × 250 mm, 5 μm (Waters) (A) Water, (B) MeOH, (C) ACN
Mobile phase	70 : 15 : 15 (0 min) → 50:25:25 (20min) → 0 : 100 : 0 (40 min) → 70 : 15 : 15 (50 min)
Flow-rate	1.0 ml/min
Injection volume	10 μl

용매 농도별, 시료·용매 비율별, 추출 시간별, 추출 온도별로 초음파 추출기 (Branson 8510, 40 kHz, Emerson Industrial Automation, USA)를 이용하여 추출하였고 추출조건별 수율 및 성분 정량분석은 3회 반복 실시하였다. 분석 전 추출액은 0.45 μm syringe filter를 통과시킨 여액을 시료로 사용하였다. Poncirin, naringin 표준품 각 2 mg을 정밀히 재어 10 ml methanol에 용해시켜 200 μg/ml로 만들어 표준원액을 제조한 후, methanol로 단계적으로 희석하여 10, 25, 50 및 100 μg/ml 농도가 되도록 표준용액을 만들어 3반복 정량 분석 하였다.

2) HPLC 분석 조건

HPLC는 LC-20AD pump, SPD-10A UV-Vis detector 과 SIL-20A auto sampler등으로 구성된 LC-20A series (Shimadzu, Japan)이고 분석용 컬럼은 XBridge™ C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm, Waters, USA)를 이용하였다. 이동상으로는 Water : Methanol : Acetonitrile을 gradient mode로 흘려주었다. 주입량은 10 μl, 유속은 1.0 ml/min, 검출은 UV detector를 이용하여 313 nm에서 검출하였다 (Table 1).

3) 분석법 검증 (Validation)

분석법 validation은 ICH 가이드라인 (Gandhimathi and Ravi, 2008)에 준하여 지실의 poncirin, naringin의 검량선은 10 ~ 200 μg/ml 범위에서 작성하였다. 검출한계 (Limit of Detection)와 검량한계 (Limit of Quantification) 값은 HPLC/UV-vis에 주입 후 얻은 결과 값을 통해 측정에 대한 표준편차

(σ)를 계산하고, 선형검정곡선을 작성하여 기울기 (s)를 LOQ는 3.3 × σ/S와 LOQ는 10 × σ/S로 계산하였다 (Ma et al., 2013). 동일 시료에 대해 실험환경의 변동이 미치는 변화를 확인하기 위해 일내 (intra day, repeatability) 및 일간 (inter day, reproducibility) 정밀성 (precision)을 3가지 농도에서 평가하였고, 결과는 상대표준편차 (RSD)로 나타내었다. 정확성 평가를 위한 회수율 시험 (recovery)은 표준물 첨가법에 의하여 상대표준편차를 측정하여 확인하였다.

4) 통계처리

통계분석은 Minitab 16 (Minitab Inc., USA)을 이용하였고, 추출방법에 따른 추출수율은 ANOVA (Analysis of Variance)를 이용하여 분산 분석 후 Tukey법으로 사후검정을 실시하였고, Korean Pharmacopoeia Tenth Edition (KP 10, MFDS Notification No. 2013-103, 2013) 추출 방법과의

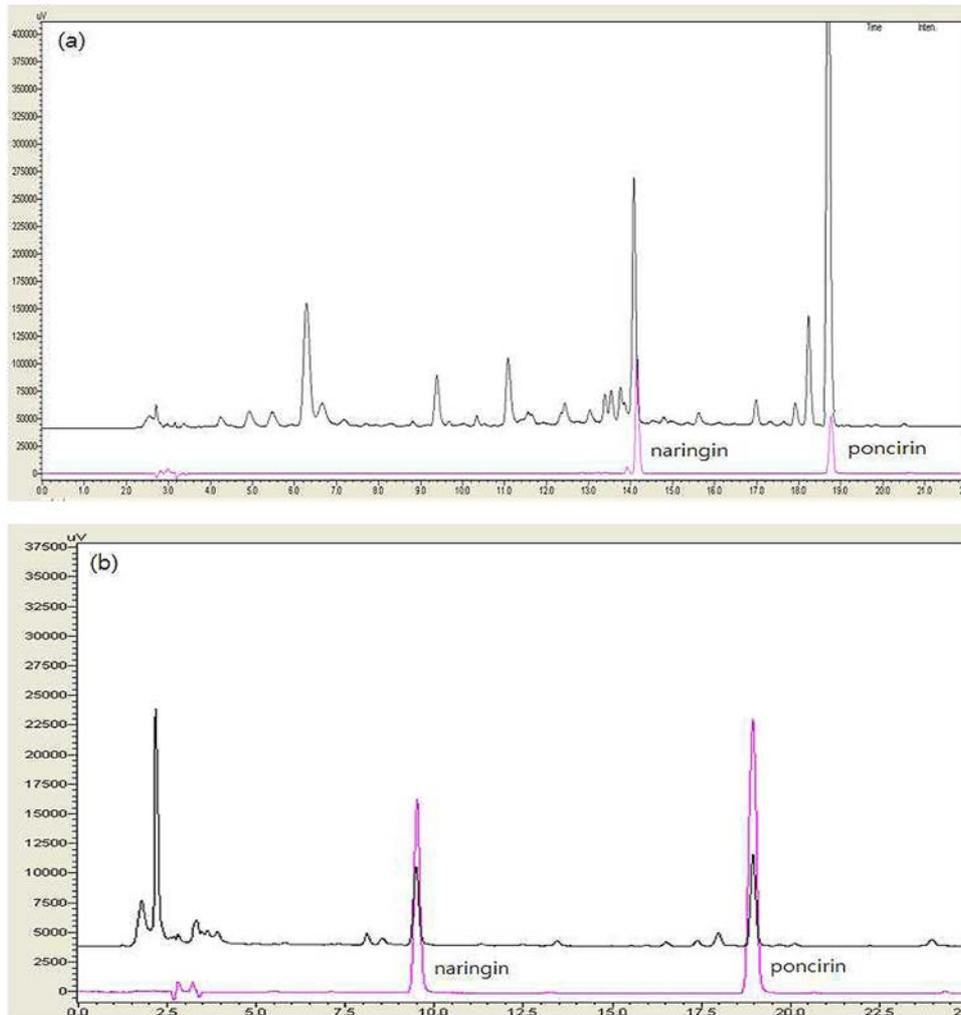


Fig. 2. Chromatograms of poncirin and naringin in standard and the sample at 313nm. (a); KP 10 analytical method, (b); developed analytical method.

Table 2. Linearity curve, LOD and LOQ data for poncirin, naringin.

Analytes	Regression equation*	Correlation coefficient (R ²)	Range (μg/ml)	LOD (μg/ml)**	LOQ (μg/ml)***
Poncirin	Y = 3085.2x - 2365.8	1.000	10.2 ~ 203.0	0.019	0.056
Naringin	Y = 3430.8x + 2712.2	0.999	10.3 ~ 205.0	0.016	0.049

*y; Peak Area, x; Concentration, **LOD = 3.3 × (SD / slope of calibration curve), ***LOQ = 10 × (SD / slope of calibration curve).

Table 3. Inter-day and intra-day variability for poncirin and naringin.

Analytes	Concentration (μg/ml)	Intra-day			Inter-day		
		Found* (μg/ml)	RSD** (%)	Accuracy*** (%)	Found (μg/ml)	RSD (%)	Accuracy (%)
Poncirin	25	25.40 ± 0.01	0.05	100.13	25.41 ± 0.03	0.13	100.16
	50	50.93 ± 0.07	0.14	100.35	50.89 ± 0.09	0.18	100.27
	100	101.61 ± 0.01	0.01	100.10	101.70 ± 0.10	0.10	100.20
Naringin	25	26.38 ± 0.02	0.08	102.98	26.38 ± 0.02	0.07	102.96
	50	51.79 ± 0.02	0.04	101.06	51.86 ± 0.06	0.11	101.19
	100	102.91 ± 0.07	0.07	100.40	102.96 ± 0.11	0.12	100.45

*Mean ± SD, **RSD (%) = 100 × SD/means, ***Accuracy (%) = {1-(mean concentration measured - concentration spiked) / concentration spiked} × 100.

Table 4. Recovery of poncirin and naringin by standard addition method.

Analytes	Amount added (μg/ml)	Amount found (μg/ml)	Recovery* (%)	RSD (%)
Poncirin	101.80	97.53	95.81	0.082
	101.80	101.23	99.44	
	101.80	102.88	101.06	
Naringin	101.96	101.94	99.98	0.023
	101.96	103.47	101.48	
	101.96	102.91	100.93	

*Recovery (%) = [detected amount / (original amount + added amount)] × 100.

비교는 독립표본 t-test로 분석하여 추출 수율의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 분석 조건의 확립

지실의 지표성분인 poncirin, naringin에 대한 동시 정량 분석법을 확립하고자 KP 10 (MFDS Notification No. 2013-103, 2013) 기준을 참고하여 다양한 용매와 용매조성에 대하여 분석조건을 변화시킨 결과 Water : Methanol : Acetonitrile (70 : 15 : 15 → 50 : 25 : 25) 기울기 용리조건을 확립하여 분석하였다. 기존의 방법으로 분석한 크로마토그램 (Fig. 2a)에서는 naringin은 추출물에서 피크의 겹침이 심해 분리능이 좋지 않았는데 새로 정립한 분석조건에서는 높은 분리능과 좋은 크로마토그램 (b)을 보였다 (Fig. 2b).

2. 검량성 및 검출한계 (LOD), 검량한계 (LOQ) 검증

지실의 지표성분인 poncirin (R² = 1), naringin (R² = 0.999)은 모두 양호한 직선성을 보였다. 농도범위와 LOD, LOQ 값은 poncirin은 10.2 ~ 203.0 μg/ml 농도범위에서 0.019 μg/ml, 0.056 μg/ml 이고, naringin은 10.3 ~ 205.0 μg/ml 농도범위에서, 0.016 μg/ml, 0.049 μg/ml으로 미량의 성분까지 검출 가능하였다 (Table 2).

3. 분석법의 정밀성 (Precision)과 정확성 (Recovery) 검증

분석법의 정밀성 평가를 위해 두 지표물질의 직선성이 확인된 농도 구간 중 3가지 농도를 기준으로 일간 (inter-day) 정밀도와 일내 (intra-day) 정밀도를 3회 반복 측정하였는데 일간 정밀도는 0.02 ~ 0.11%, 일내 정밀도는 0.01 ~ 0.07%의 상대표준편차 (RSD%) 값을 보여주었다 (Table 3).

분석법의 정확성 평가를 위하여 회수율 실험을 진행한 결과 poncirin은 98.77%, naringin은 100.80%의 회수율을 나타내었고 각각 0.082, 0.023% 상대표준편차를 보였다 (Table 4).

4. 용매종류 및 용매 조성에 따른 추출수율 변화

추출용매 조건의 변화에 따른 추출효율을 알아보기 위하여 지실 분말 0.5 g, 용매 50 ml, 60 min, 상온에서 flavonoid glycoside계 화합물은 alcohol, 물 또는 이들의 혼합용매로 추출하는 것이 일반적이라는 것을 참고하여 (Kim *et al.*, 1989) 에탄올, 물, 메탄올로 추출하였다. 평균 함량은 에탄올, 물, 메탄올에서 각각 poncirin 1.40%, 1.97%, 2.01%, naringin 0.86%, 1.55%, 1.28%로 poncirin은 메탄올에서 naringin은 물

지실의 Poncirin, Naringin의 동시분석법 확립과 초음파 추출법 최적화

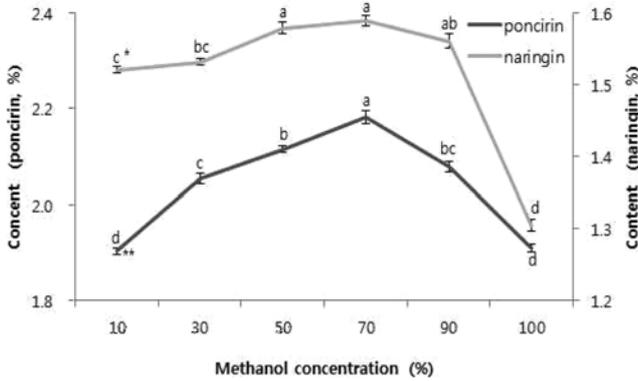


Fig. 3. Effect of methanol concentration on the contents of poncirin and naringin. *; One-way analysis of variance (ANOVA) using Post-hoc by Tukey ($p < 0.05$). **; Standard error is represented by error bar.

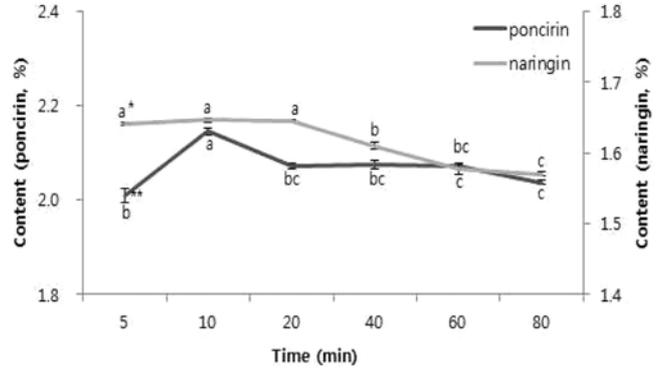


Fig. 5. Contents of poncirin and naringin extracted by different time. *; One-way analysis of variance (ANOVA) using Post-hoc by Tukey ($p < 0.05$). **; Standard error is represented by error bar.

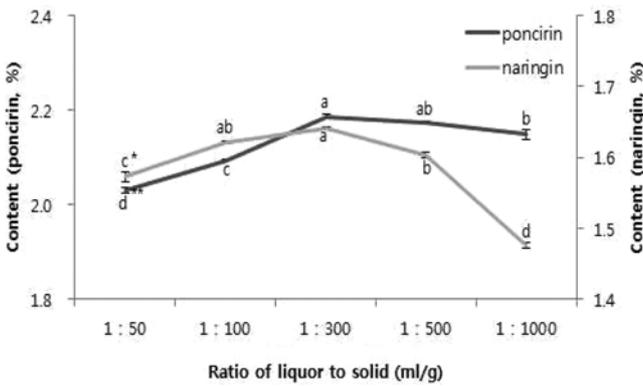


Fig. 4. Contents of poncirin and naringin extracted by various sample versus solvent ratio (g/ml). *; One-way analysis of variance (ANOVA) using Post-hoc by Tukey ($p < 0.05$). **; Standard error is represented by error bar.

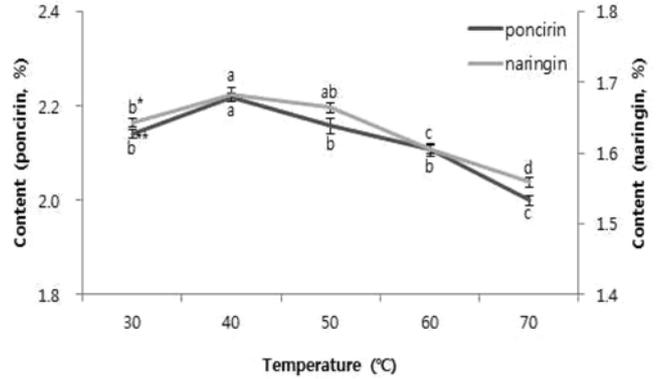


Fig. 6. Content of poncirin and naringin extracted by various temperature. *; One-way analysis of variance (ANOVA) using Post-hoc by Tukey ($p < 0.05$). **; Standard error is represented by error bar.

에서 높은 수율을 보였다. 메탄올은 극성용매와 비극성용매에서 용출되는 물질 모두가 잘 용출되고 용해도가 크고 가격이 저렴하고 추출 조치가 편리하여 식물추출 용매로 자주 사용되어진다 (Shin and Lee, 2011). 가장 추출 수율이 높은 메탄올과 물을 혼합하여 비교한 결과, 물과 메탄올 추출물보다 혼합용매에서 더 높은 수율을 보였고 혼합용매에서 추출효율이 더 높은 것은 일정비율의 물이 함유될 때 건조된 시료의 조직을 팽창시켜 용매가 시료공극내부로 부터 많이 침투되어 추출효과가 좋다는 보고가 있었다 (Kim *et al.*, 2010). 70% 메탄올 추출물에서 poncirin 함량은 2.18%로 통계적으로 유의성 있게 함량이 가장 높았고, naringin은 50, 70% 메탄올에서 유의적으로 높은 결과를 보였지만 평균수율이 50% 메탄올은 1.57%, 70% 메탄올은 1.59%로 산술적으로 높은 값을 보였다 (Fig. 3).

5. 시료와 용매 비율에 따른 추출수율 변화

용매 조성 추출수율이 가장 높은 70% 메탄올 50 ml 와

60 min, 상온에서 각 시료용매 비율별 지실 분말을 사용하여 추출수율 변화를 비교해 보았다. 시료와 용매의 비율을 1:50, 1:100, 1:300, 1:500, 1:1000으로 설정하여 추출한 결과, 각각 1:300에서 poncirin 2.19%, naringin 1.64%으로 높은 수율을 보였고, 통계 결과는 두 성분 모두 1:300에서 유의적으로 높은 결과를 보였다 (Fig. 4).

6. 추출 시간에 따른 추출수율 변화

추출수율이 가장 높은 70% 메탄올 50 ml, 지실 분말 0.167 g과 상온에서 다른 초음파 시간 (5, 10, 20, 40, 60, 80 min)을 설정하여 추출하였을 때, 각각 10 min에서 poncirin 2.15%, naringin 1.65%으로 높은 수율을 보였다. Tukey 사후 검정 결과 poncirin은 10분에서 유의적으로 높았고 naringin은 5, 10, 20분에서 유의적으로 높았지만 10분에서 산술적으로 높은 평균 수율을 보였으며 시간이 길수록 추출수율이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 5).

7. 추출 온도에 따른 수율변화

추출수율이 가장 높은 70% 메탄올 50 ml, 지실 분말 0.167 g, 초음파 시간 10 min과 온도에 따른 함량변화를 알아보기 위해 30, 40, 50, 60, 70°C의 조건에서 추출하였을 때, 각각 40°C에서 poncirin 2.22%, naringin 1.68%으로 높은 수율을 보였다. 통계 결과는 두 성분 모두 40°C에서 유의적으로 높은 결과를 보였고 40°C 이후로 온도가 올라갈수록 추출수율이 떨어지는 경향이 나타났다 (Fig. 6).

본 연구를 통하여 지실의 poncirin, naringin에 대한 동시분석 정량법과 초음파를 이용하여 최적의 추출법을 확립하고 검증하였다. 지실의 poncirin, naringin은 70% methanol로 1:300의 시료용매비율, 10 min 동안 40°C에서 추출효율이 가장 좋은 최적의 추출조건을 확립하였다. 조건별로 살펴본 결과 용매와 용매비율별로 비교하였을 때 추출수율이 poncirin 1.40~2.18%, naringin 0.86~1.59%로 가장 많은 차이를 보였는데 이는 초음파 추출에서 용매가 추출효율에 가장 효과적인 영향을 미친다는 기존의 연구결과 (Ma *et al.*, 2008)와 비슷한 결과를 보였다. 또한 초음파 추출법은 낮은 온도에서 추출하여 유용성분의 파괴를 줄일 수 있고 짧은 시간에도 높은 추출수율과 생리활성을 기대할 수 있다는 결과 (Woo *et al.*, 2009)와 같이 10분이라는 짧은 추출시간과 40°C의 온도에서 높은 추출수율을 보였다.

새롭게 개발된 분석방법을 검증하고자 직선성, 특이성, 정밀성, 정확성의 검증하여 신뢰성을 높이고자 하였고, 2가지 성분을 동시 분석할 수 있도록 그 조건을 확립함으로써 경제적, 시간적 및 인력에 대한 효율을 증대시킬 수 있었다. 기존의 KP 10 (MFDS Notification No. 2013-103, 2013)의 추출법과 정립된 추출법과 비교하였을 때 poncirin 함량은 2.12%와 2.15%로 최적화된 추출법에서 더 높은 함량을 보였다. Naringin은 약전 추출법에서 1.49%와 최적화된 추출법에서 1.60% 함량을 보였고, t-test결과 *p*-value가 0.05이하로 나타나 유의적인 차이를 보이는 것을 확인 할 수 있었다.

지실의 유효성분인 poncirin, naringin의 동시 분석법과 최적의 추출조건 확립을 위하여 실험을 진행하였고, 정립된 분석법과 초음파를 이용한 최적의 추출조건이 지실의 품질관리에 신속하고 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 전통의학 소재 자원 관리 시스템 구축사업(K14142) 및 ICT 융합 대체 한약자원 확보사업(K14410)의 고유생물자원 특성평가 및 대체 한약 자원 발굴 연구과제(K14411)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Chung HS, Hwang SH and Youn KS. (2005). Physicochemical characteristics of *Ponciri fructus* in relation to drying treatment. Korean Journal of Food Preservation. 12:449-454.
- Gandhimathi MI and Ravi TK. (2008). Use of Folin-Ciocalteu phenol reagent and 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine hydrochloride in the determination of oxcarbazepine in pharmaceuticals. Acta Pharmaceutica. 58:111-118.
- Gordon PB, Holen I and Seglen PO. (1995). Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. The Journal of Biological Chemistry. 270:5830-5838.
- Hwang GS. (1997). Analytical study on the flavonoid of *Poncirus trifoliata*. Korean Journal of Oriental Preventive Medical Society. 1:55-58.
- Jang GY, Kim HY, Lee SH, Kang YR, Hwang IG, Woo KS, Kang TS, Lee JS and Jeong HS. (2012). Effects of heat treatment and extraction method on antioxidant activity of several medicinal plants. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 41:914-920.
- Jeon SY, Baek JH, Jeong EJ and Cha YJ. (2012). Optimal extraction conditions of flavonoids from onion peels via response surface methodology. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 41:695-699.
- Jung UJ, Kim HJ, Lee JS, Lee MK, Kim HO, Park EJ, Kim HK, Jeong TS and Choi MS. (2003). Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. Clinical Nutrition. 22:561-568.
- Kanaze FI, Gabrieli C, Kokkalou E, Georarakis M and Niopas I. (2003). Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 33:243-249.
- Kim DH, Bae EA and Han MJ. (1999). Anti-helicobacter pylori activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 22:422-424.
- Kim JS, Choi YH, Seo JH, Lee JW, Kim SK, Choi SU, Kang JS, Kim YK, Kim SH, Kim YS and Ruy SY. (2004). Anti-proliferative activity of naturally occurring flavonoids on cultured human tumor cell lines. Korean Journal of Pharmacognosy. 35:164-170.
- Kim MK, Jeong CS, Shin YK, Park KH, Lee WJ, Lee EJ and Paek KY. (2010). Effects of extraction condition on extraction efficiency of rubiadin in adventitious roots of Noni(*Morinda citrifolia*). Korean Journal of Horticultural Science & Technology. 28:685-690.
- Kim MO, Kim JS, Sa YJ, Jeong HJ, Chun WJ, Kwon YS, Kim TY, Choi HS, Yu CY and Kim MJ. (2010). Screening of extraction solvent condition of fermented *Rhus verniciflua* stem bark by antioxidant activities. Korean Journal of Medicinal

- Crop Science. 18:217-223.
- Kim TJ, No JY, Ko JS and Rhee JS.** (1989). The separation and determination of flavonoid glycosides from *Poncirus trifoliata* rafia and *Citrus aurantium* L. Analytical Science & Technology. 2:301-307.
- Lee AY, Chun JM, Jang S, Choo BK, Lee HW and Kim HK.** (2008). Change of quality in *Poncirus trifoliata* rafinesque according to storage conditions. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:188-191.
- Lee JH, Lee SH, Kim YS and Jeong CS.** (2009). Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* on potential gastric disease. Phytotherapy Research. 23:1748-1753.
- Lee SL, Seo CS, Kim JH and Shin HK.** (2011). Contents of poncirin and naringin in fruit of *Poncirus trifoliata* according to different harvesting times and locations for two years. Korean Journal of Pharmacognosy. 42:138-143.
- Ling J, Ha JH, Choi YY, Seo YC, Kim JS, Kim YO, Cha SW, Kim JC and Lee HY.** (2011). Enhancement of cosmeceutical activities of *Berberis koreana* bark by high pressure and ultrasonification extraction processes. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:54-65.
- Ma KN, Cho HW and Myung SW.** (2013). Analysis of gibberellic acid from fruits using HPLC/UV-vis. Analytical Science & Technology. 26:19-26.
- Ma Y, Ye X, Hao Y, Xu G, Xu G and Liu D.** (2008). Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from penggan(*Citrus reticulata*) peel. Ultrasonics Sonochemistry. 15:227-232.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2013). The Korean pharmacopoeia(10th ed.). MFDS Notification No. 2013-103:1198-1199.
- Ng TB, Ling JM, Wang ZT, Cai JN and Xu GJ.** (1996). Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. General Pharmacology. 27:1237-1240.
- Ribeiro IA and Ribeiro MHL.** (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. Food Control. 19:432-438.
- Shin SL and Lee CH.** (2011). Screening of effective extraction conditions for increasing antioxidant activities from fronds of *Osmunda japonica*. Korean Journal of Plant Resources. 24:174-180.
- Sun Y, Bi J, Zhang L and Ye B.** (2012). Ultrasound-assisted extraction of three bufadienolides from chinese medicine Chansu. Ultrasonics Sonochemistry. 19:1150-1154.
- Teng CM, Li HL, Wu TS, Huang SC, Huang SC and Huang TF.** (1992). Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. Thrombosis Research. 66:549-557.
- Wang C, Pan Y, Fan G, Chai Y and Wu Y.** (2010). Application of an efficient strategy based on MAE, HPLC-DAD-MS/MS and HSCCC for the rapid extraction, identification, separation and purification of flavonoids from *Fructus aurantii immaturus*. Biomedical Chromatography. 24:235-244.
- Woo JH, Shin SL, Chang YD and Lee CB.** (2009). Comparison of antioxidant effects by different extraction methods in flowers of *Aster scaber*, *Aster maackii*, *Coreopsis lanceolata* and *Coreopsis tinctoria*. Korean Journal of Plant Resources. 22:381-388.
- Xia EQ, Ai XX, Zang SY, Guan TT, Xu XR and Li HB.** (2011). Ultrasound-assisted extraction of phillyrin from *Forsythia suspensa*. Ultrasonics Sonochemistry. 18:549-552.
- Yang YC, Wei MC, Huang TC, Lee SZ and Lin SS.** (2013). Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from *Radix Scutellariae*. Industrial Crops and Products. 45:182-190.
- Yoon HY, Cho YS, Jin Q, Kim HG, Woo ER and Chung YS.** (2012). Effects of ethyl acetate extract of *Poncirus trifoliata* fruit for glucocorticoid-induced osteoporosis. Biomolecules & Therapeutics. 20:89-95.
- Zhu X, Luo F, Zheng Y, Zhang J, Huang J, Sun C, Li X and Chen K.** (2013). Characterization, purification of poncirin from Edible citrus ougan(*Citrus reticulata* cv. *suavissima*) and its growth inhibitory effect on human gastric cancer cells SGC-7901. International Journal of Molecular Sciences. 14:8684-8697.