반응표면분석법을 이용한 병풀 Triterpene 성분의 초음파 추출조건 최적화

성은정¹ · 허희진¹ · 오세원² · 김대일² · 장금일¹ · 이준수¹

¹충북대학교 식품생명공학과

²충북대학교 원예과학과

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction for Triterpene Compounds from *Centella asiatica* Using Response Surface Methodology

Eunjeong Seong¹, Huijin Heo¹, Sewon Oh², Daeil Kim², Keum-Il Jang¹, and Junsoo Lee¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, and

²Department of Horticultural Science, Chungbuk National University

ABSTRACT *Centella asiatica* is a psychoactive medicinal plant belonging to the Apiaceae family. The major bioactive compounds of *Centella asiatica* are triterpene saponins, including madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, and asiatic acid. This study aimed to optimize the ultrasound-assisted extraction conditions to extract triterpenes from *Centella asiatica* using response surface methodology. A Box-Behnken design was employed to develop the following three extracting parameters, methanol concentration (X_1 : 60~100%), extraction time (X_2 : 10~50 min), and ultrasonic power (X_3 : 150~250 W). The optimal extraction conditions of madecassoside (83.14 mg/g dry weight) and asiaticoside (19.71 mg/g dry weight) were obtained at $X_1=80\%$, $X_2=30$ min, and $X_3=200$ W. The predicted values from the model matched well with the experimental results obtained using the optimal extraction conditions. The coefficients of variation for the inter-day and intra-day precisions were less than 5%. The limits of detection for madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, and asiatic acid were 0.32, 0.71, 0.09, and 0.15 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These results indicate that the validation parameters were generally reliable and satisfactory.

Key words: optimization, ultrasound-assisted extraction, *Centella asiatica*, response surface methodology, triterpene

서 론

병풀(*Centella asiatica*)은 미나릿과에 속한 다년생 포복성 초본으로 국내에서는 제주도 및 남부 지방의 섬이나 인도, 스리랑카, 남아프리카 등의 습지에서 서식하는 식물이다(Lee 등, 2019). 병풀은 아시아 지역에서 약용식물로 널리 사용되어 왔으며, 특히 항염증, 콜라겐 합성 촉진 및 피부 재생효과가 있어 의약품 및 화장품 분야에 널리 이용되고 있다(Kim 등, 2002). 병풀에는 quercetin, kaempferol, rutin과 같은 플라보노이드 유도체와 chlorogenic acid와 같은 phenolic acid 유도체, triterpene 성분이 존재한다고 보고되어 있다(Ali 등, 2015). 그중 병풀의 주요한 약리 성분은 triterpene이며, 병풀에 주로 함유된 triterpene은 pentacyclic triterpene glycoside 형태인 madecassoside 및 asiaticoside와 aglycone 형태인 madecassic acid 및 asi-

atic acid이다. 이러한 성분들은 병풀의 주요한 기능성 물질이며 지표 물질로 여겨진다(Zheng과 Qin, 2007). 병풀의 약용적 가치는 다양한 triterpene으로부터 유래한다고 알려져 있다(Srivasta 등, 1997). Asiaticoside와 madecassoside는 각각 type-I 콜라겐과 type-III 콜라겐의 합성을 촉진한다고 보고되었으며, 또한 체내에서 활성산소종의 활성을 감소시킴으로써 항산화 효과를 나타낸다고 알려져 있다(Hamid 등, 2002). 그뿐만 아니라 신경안정, 항우울, 치매에 관한 효과도 보고되어 있다(Buraphaka와 Putalun, 2020; Ali 등, 2015; Hafiz 등, 2020). 현재 보고되어 있는 병풀 속 triterpene 함량과 관련한 연구로는 병풀 잎에서 triterpene glycosides의 시기별 함량변화(Kim 등, 2002), 계절별 병풀의 triterpene 함량변화(Ali 등, 2015)가 보고되어 있다.

천연물로부터 활성 물질을 추출하는 방법에는 용매 추출, 환류 추출, 초음파 추출, 마이크로파 추출, 초임계 추출방법 등이 사용되고 있다(Go와 Park, 2020). 초음파 추출법(ultrasound-assisted extraction, UAE)은 다양한 식물성 소재에서 기능성 화합물의 추출효율을 향상시키는 데 사용되어 왔다(Vuong 등, 2015). UAE는 추출 속도를 높여 추출 공정을 단순화시키며, 효율적이고 용매를 절약할 수 있다는 이점을 가진다(Sharmila 등, 2016; Tao 등, 2014). 초음파

Received 11 Dec 2020; Revised 7 Jan 2021; Accepted 13 Jan 2021
Corresponding author: Junsoo Lee, Chungbuk National University, Chungdae-ro 1, Seowon-gu, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea, E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr

Author information: Eunjeong Seong (Graduate student), Huijin Heo (Graduate student), Sewon Oh (Researcher), Daeil Kim (Professor), Keum-Il Jang (Professor), Junsoo Lee (Professor)

는 cavitation bubble을 발생시키고 bubble이 붕괴되면서 식물세포벽을 파괴시켜 식물세포 내부 유기화합물의 방출을 증가시킨다고 알려져 있다(Rostagno 등, 2003). UAE는 다양한 식물체에 적용되어 왔으며 그 예로 진생베리(Go와 Park, 2020), 올리브 부산물(Goldsmith 등, 2018), 병아리콩(Hayta와 İşçimen, 2017) 및 양파껍질(Heo 등, 2019)에서 항산화 물질의 추출 최적화에 대한 연구가 보고되어 있다. 하지만 UAE가 병풀에 있어서 triterpene 화합물에 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구의 목적은 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 병풀로부터 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid의 4가지 triterpene 성분의 초음파 추출조건을 최적화하고자 하였다. 추출조건으로 메탄올 농도, 추출시간 및 초음파 세기를 독립변수로 선택하였고 최적화 조건의 유효성을 평가하기 위해 정밀도, 검출한계 및 정량한계를 포함한 분석 방법 검증 매개변수를 계산하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용한 병풀은 2020년 7월 충북 충주시의 병풀 재배 농가에서 제공받아 사용하였다. 병풀의 이물질을 증류수로 수세하여 동결건조 하였다. 분말형태로 분쇄한 뒤 -20 °C에서 보관하여 분석용 시료로 사용하였다. Madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 표준품은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

초음파 추출

동결건조한 병풀 분말 0.1 g을 취하여 40 mL의 메탄올을

첨가한 뒤 50°C에서 초음파기기(WUC-D10H, DAIHAN Scientific, Wonju, Korea)를 이용하여 추출하였다. 이후 Whatman No. 2(Whatman International Ltd., Kent, UK) 여과지로 병풀 추출물을 여과한 후 50 mL로 정용하였다.

실험설계

Box-Behnken design(BBD)에 따라 3가지 독립변수(X_1 : 메탄올 농도, X_2 : 추출시간, X_3 : 초음파 세기)를 설정하였다. 독립변수의 범위를 설정하고 -1, 0, 1 총 3단계로 부호화하였다. BBD에 따라 총 15구간을 설정하여 추출실험을 진행하였다(Table 1). 종속변수로는 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 함량을 측정하였다.

HPLC를 이용한 triterpene 성분 분석

Triterpene의 분석은 Ali 등(2015)의 방법을 변형하여 수행하였다. 50 mL로 정용한 병풀 추출물을 0.45 μ m PTFE membrane filter(Whatman, Clifton, NJ, USA)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 분석에 이용된 HPLC 컬럼은 Luna C18 column(250×4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 이용하였다. 이동상 A의 용매 조성은 water : phosphoric acid(99.95:0.05, v/v)이고 이동상 B의 용매 조성은 acetonitrile(100%)이다. 분석하는 0, 30, 40, 50분 동안 이동상 B를 20, 100, 20, 20%의 비율로 흘려주었다. 유속은 1.0 mL/min이고 UV 파장은 205 nm를 이용하였다.

분석 방법의 검증

HPLC를 이용한 triterpene 화합물의 분석 방법은 정밀성(반복성 및 재현성), 검출한계(limit of detection, LOD), 정

Table 1. Box-Behnken design matrices and responses for experimental values

Run	Variables			Responses			
	Methanol concentration (%) X_1	Extraction time (min) X_2	Ultrasonic power (W) X_3	Madecassoside (mg/g dw ¹⁾)	Asiaticoside (mg/g dw)	Madecassic acid (mg/g dw)	Asiatic acid (mg/g dw)
1	60 (-1)	10 (-1)	200 (0)	74.82	18.94	0.87	3.94
2	100 (1)	10 (-1)	200 (0)	56.45	18.02	0.94	4.01
3	60 (-1)	50 (1)	200 (0)	68.62	18.41	0.85	3.81
4	100 (1)	50 (1)	200 (0)	53.97	17.75	0.95	3.83
5	60 (-1)	30 (0)	150 (-1)	71.59	19.01	0.82	3.59
6	100 (1)	30 (0)	150 (-1)	40.75	15.27	0.78	3.39
7	60 (-1)	30 (0)	250 (1)	69.14	18.31	0.94	4.21
8	100 (1)	30 (0)	250 (1)	55.78	18.35	0.96	4.13
9	80 (0)	50 (1)	150 (-1)	71.66	18.70	0.90	3.79
10	80 (0)	50 (1)	150 (-1)	66.90	17.29	0.86	3.64
11	80 (0)	10 (-1)	250 (1)	73.72	18.59	0.96	4.18
12	80 (0)	50 (1)	250 (1)	77.98	19.86	1.00	4.35
13	80 (0)	30 (0)	200 (0)	85.58	20.30	0.73	3.19
14	80 (0)	30 (0)	200 (0)	81.12	19.13	0.65	2.90
15	80 (0)	30 (0)	200 (0)	82.72	19.71	0.99	4.26

¹⁾Dry weight.

량한계(limit of quantification, LOQ)를 이용하여 검증하였다(ICH, 2005). 정밀성(precision)은 병풀 추출물을 하루에 3 반복 실험하여 repeatability(intra-day)와 3일 동안 1회씩 실험하여 reproducibility(inter-day)의 coefficient variation(CV, %)을 계산하여 나타내었다. 검출한계와 정량한계는 크로마토그램의 signal-to-noise(S/N)의 평균값에 표준편차를 각각 3.3과 10으로 곱한 값을 더하여 구하였다.

통계처리

반응표면분석은 독립변수 X_i 와 X_j 에 대한 종속변수 Y (madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 함량)를 다음과 같은 2차 회귀식으로 나타내었으며, β_0 는 상수이고 β_i , β_{ii} , β_{ij} 는 회귀계수이다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

통계처리는 SAS ver. 9.4(SAS Institute, Cary, NC, USA) 소프트웨어를 사용하였다. 반응표면도는 Minitab ver. 14.12(Minitab Inc., State College, PA, USA)를 사용하였다. 모델의 적합성을 회귀계수(R^2)를 분석하여 평가하였다. 데이터 간의 유의적인 차이는 one-way ANOVA의 Duncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

모델의 적합성

병풀 속 주된 약리 성분은 triterpene으로 다양한 효능을 가지고 있다고 알려져 있으며, 그 예로 알츠하이머 질병 예방(Hafiz 등, 2020), 피부개선(Kim 등, 2020), 항염증(Somchit 등, 2004) 효과에 대한 연구가 보고되어 있다. 본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 병풀로부터 triterpene 성분의 초음파 추출조건을 최적화하고자 하였다. 반응표면분석법이란 많은 변수와 그들 간의 상호작용이 반응에 미치는 영향을 수학적, 통계적으로 분석하여 최적화된 조건을 얻는 실험계획법이다(Jeon과 Ryu, 2015). 본 연구에서는 병풀로부터 triterpene 함량의 최적 추출조건을 설정하기 위해 메탄올 농도(60~100%), 추출시간(10~50 min), 초음파 세기(150~250 W)를 독립변수로 설정하였다. BBD에 의해 설계된 15구간의 추출조건에서 얻어진 종속변수의 결과는 Table 1과 같다. 추출조건에 따른 최적값은 각각 madecassoside 85.58 mg/g, asiaticoside 20.30 mg/g, madecassic acid 1.00 mg/g, asiatic acid 4.35 mg/g으로 나타났다. 2차 회귀식에 대한 상수 및 회귀계수는 Table 2에 나타났다. 회귀분석 결과를 바탕으로 종속변수인 triterpene의 모델식의 적합도를 평가하였다(Table 3). 종속변수로서 madecassoside 및 asiaticoside 함량의 모델이 유의적이었고 R^2 는 0.9 이상으로 유의성을 보였다. 적합성

Table 2. Regression coefficients of the second-order polynomial equations

Coefficient ¹⁾	Madecassoside	Asiaticoside	Madecassic acid	Asiatic acid
β_0	-125.64	10.64	2.49	11.10
β_1	4.95***	0.36*	-0.008	-0.05
β_2	-0.55	-0.23	-0.02	-0.08
β_3	0.31	-0.009	-0.01	-0.05
β_{11}	-0.04***	-0.004***	-0.000009	0.0001
β_{22}	0.002	0.0002	0.00002	-0.00003
β_{33}	-0.005	0.0006	0.0003	0.001
β_{12}	0.009*	0.001**	0.00006	0.0002
β_{13}	0.003	0.0009	0.00003	0.0001
β_{23}	-0.003*	-0.0003*	0.00002	0.00009

¹⁾ β_0 represents intercept and β_1 , β_2 , and β_3 represent methanol concentration (%), extraction time (min), and ultrasonic power (W), respectively.

Significant at *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.1$.

Table 3. Analysis of variance for extraction variables as linear, quadratic term, and interactions on response variables

	Degree of freedom	Madecassoside		Asiaticoside		Madecassic acid		Asiatic acid	
		Sum of square	F value	Sum of square	F value	Sum of square	F value	Sum of square	F value
Model	9	1,998.85**	9.15	18.53**	6.12	0.08	0.67	1.37	0.57
Linear	3	1,035.39***	14.22	9.59**	9.51	0.04	0.97	0.77	0.32
Quadratic	3	824.70**	11.32	4.83*	4.79	0.03	0.89	0.54	0.22
Cross product	3	138.77	1.91	4.10*	4.06	0.006	0.16	0.06	0.02
Lack of fit	1	10.60	0.38	0.001	0	0.0002	0.0002	0.01	0.01
R^2		0.9427		0.9168		0.5473		0.5653	

R^2 = coefficient of determination.

Significant at *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.1$.

결여 검정(lack of fit)은 madecassoside 및 asiaticoside 함량에 대해 $P>0.1$ 로 유의성이 기각되었다. 따라서 반응표면모형은 madecassoside 및 asiaticoside 함량의 변화를 설명하는 데 적합하였으나, madecassic acid 및 asiatic acid 함량의 경우 적합성 결여 검증이 유의적($P<0.1$)인 결과를 보여 적합하지 않았다.

추출조건이 triterpene 성분에 미치는 영향

본 연구에서는 추출조건에 따라 병풀에 많이 함유되어 있는 triterpene의 함량에 대한 변화를 분석하였다(Table 4, Fig. 1). 메탄올 농도는 madecassoside 및 asiaticoside 함량에 있어서 각각 유의수준 $P<0.01$, $P<0.05$ 로 유의적인 영향을 주었다. 메탄올 농도가 높아짐에 따라 madecassoside

Table 4. Analysis of variance showing significance of the variables on responses

	Degree of freedom	Sum of square			
		Madecassoside	Asiaticoside	Madecassic acid	Asiatic acid
Methanol concentration (%)	4	1,687.02***	13.18**	0.01	0.10
Time (min)	4	56.55	1.39	0.04	0.38
Power (W)	4	441.09*	10.45**	0.04	0.90

Significant at *** $P<0.01$, ** $P<0.05$, * $P<0.1$.

Fig. 1. Response surface plots for the levels of madecassoside (A~C), asiaticoside (D~F), madecassic acid (G~I), and asiatic acid (J~L) depending on three variables, methanol concentration (MeOH), extraction time (Time), and ultrasound power (Power).

Table 5. Triterpenes of *Centella asiatica* extract by optimization condition of ultrasound-assisted extraction

Responses	Predicted value	Experimental value
Madecassoside (mg/g dw)	83.14 ^a	82.48 ^a
Asiaticoside (mg/g dw)	19.71 ^a	19.39 ^a
Madecassic acid (mg/g dw)	1.00 ^a	0.98 ^a
Asiatic acid (mg/g dw)	4.37 ^a	4.31 ^a

Predicted values were calculated from optimum condition of ridge analysis.

Experimental values were obtained using 80% methanol concentration, 30 min extraction time and 200 W of ultrasound power. Different letters within the same row indicate a significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

및 asiaticoside 함량이 감소하는 표면도가 그려짐을 알 수 있다(Fig. 1). 추출시간은 모든 종속변수에 대해 유의적인 영향을 미치지 않았다. 초음파 세기는 madecassoside와 asiaticoside의 함량에서 각각 유의수준 $P < 0.1$, $P < 0.05$ 로 유의적인 영향을 주었다. 추출시간보다는 초음파 세기가 triterpene의 추출효율에 더 큰 영향을 주는 것으로 사료된다. 병풀의 madecassic acid와 asiatic acid 추출에 대해 메탄올 농도, 추출시간 및 초음파 세기는 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

Lee 등(2007)은 마늘로부터 allin 추출에 있어서 추출시간에 대해 큰 영향을 받지 않았다고 보고하였으며, Yoo 등(2004)은 미역으로부터 항산화 물질 추출에 있어서 추출시간이 큰 상관관계를 보이지 않았다고 보고하였다. 또한 Park 등(2019)은 한인진의 항산화력에 있어서 초음파 세기가 유의적인 영향을 미쳤다고 보고하였다. 반면 Heo 등(2019)은 양과깍집의 항산화 활성과 총 폴리페놀 함량에 있어서 추출시간은 유의적인 영향을 미쳤지만, quercetin 추출에서는 추출시간 및 초음파 세기 모두 유의적인 영향을 미치지 않았

다고 보고하였으며, Ryu와 Koh(2018)는 포도 부산물로부터 총 페놀 함량에 있어 초음파 추출시간이 유의적인 영향을 미쳤다고 보고하였다.

최적 추출조건의 검증

병풀로부터 다양한 활성 성분을 보다 효율적으로 추출하기 위한 최적 추출조건은 메탄올 농도 80%, 추출시간 30분, 초음파 세기 200 W였다. Table 5는 최적 추출조건에서 얻어진 예측치와 그 조건에서 실제 실험에 의해 얻은 실측치를 비교하였다. 최적 추출조건에서 예측된 값은 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid가 각각 83.14 mg/g, 19.71 mg/g, 1.00 mg/g 및 4.37 mg/g이었다. 실측치는 madecassoside 82.48 mg/g, asiaticoside 19.39 mg/g, madecassic acid 0.98 mg/g 및 asiatic acid 4.31 mg/g으로 유의적인 차이는 없었으며 예측값의 신뢰성을 뒷받침하였다.

분석 방법의 유효성 검증

본 연구에서는 triterpene의 분석법 검증을 위하여 정밀성, 검출한계, 정량한계를 구하였다. 정밀성이란 같은 시료에 대하여 연속적인 분석을 통해 얻은 결과 간의 유사함을 의미하는 것으로 병풀 추출물의 정밀성 분석 결과는 Table 6과 같다. Intra-day 정밀성 CV값은 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid가 각각 2.72, 2.98, 2.66 및 2.99%로 나타났다. Inter-day 정밀도에서는 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid가 각각 0.58, 0.59, 4.03 및 3.23%로 나타나 intra-day, intra-day 모두 CV 5% 이하의 우수한 정밀성을 나타내었다. 검출한계 및 정량한계의 분석 결과, madecassoside의 검출한계는 0.32 µg/mL, 정량한계는 0.92 µg/

Table 6. Method validation of the ultrasound-assisted extraction method

Homolog	Parameter	Precision		Limit of detection (µg/mL)	Limit of quantification (µg/mL)
		Intra-day ¹⁾	Inter-day ²⁾		
Madecassoside	Mean ³⁾	83.14	82.26	0.32	0.92
	SD ⁴⁾	2.26	0.48		
	CV (%) ⁵⁾	2.72	0.58		
Asiaticoside	Mean	19.71	19.01	0.71	2.00
	SD	0.59	0.11		
	CV (%)	2.98	0.59		
Madecassic acid	Mean	0.91	0.95	0.09	0.27
	SD	0.02	0.04		
	CV (%)	2.66	4.03		
Asiatic acid	Mean	4.19	4.33	0.15	0.43
	SD	0.13	0.14		
	CV (%)	2.99	3.23		

¹⁾Intra-day precision was evaluated using three independent analyses of replicate sample performed on a given day.

²⁾Inter-day precision was evaluated using three independent analyses of replicate samples performed on different days.

³⁾n=3, mg/g sample on dry weight basis.

⁴⁾Standard deviation.

⁵⁾Coefficient of variation.

mL로 나타났으며, asiaticoside의 경우 검출한계 0.71 µg/mL, 정량한계 2.00 µg/mL로 나타났다. Madecassic acid의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.09 µg/mL, 0.27 µg/mL로 나타났으며, asiatic acid의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.15 µg/mL, 0.43 µg/mL로 나타났다.

요 약

본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 병풀로부터 triterpene 성분의 초음파 추출조건을 최적화하고자 하였다. Box-Behnken design에 따라 추출조건의 독립변수인 메탄올 농도(X_1 , %), 추출시간(X_2 , min) 및 초음파 세기(X_3 , W)에 따라 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 4가지 함량을 종속변수로 설정하여 이들의 값을 최대화 하는 공통의 조건을 예측하였다. Madecassoside 및 asiaticoside 함량에 대한 모델식의 R^2 은 0.9 이상으로 적합하였으며, madecassic acid 및 asiatic acid 함량에 대한 반응표면모형은 적합하지 않은 것으로 나타났다. 추출조건으로 메탄올 농도와 초음파 세기는 생리활성 성분 함량에 유의적인 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 최적 추출조건인 메탄올 농도 80%, 추출시간 30분 및 초음파 세기 200 W에서 제조한 추출물의 생리활성 성분 함량의 실측치는 예측치와 유사한 값을 나타내었다. 본 연구에 사용된 triterpene의 분석법에 대한 검증은 정밀성, 검출한계 및 정량한계를 평가하였다. Inter-day, Intra-day 모두 CV 5% 이하의 우수한 정밀성을 나타내었다. 또한 검출한계는 madecassoside 0.32 µg/mL, asiaticoside 0.71 µg/mL, madecassic acid 0.09 µg/mL, asiatic acid 0.15 µg/mL로 나타났다. 본 연구 결과 지표성분 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid의 분석 방법이 적합한 분석 방법임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구비 지원(과제번호 PJ01528501 2020)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ali A, Wannit TO, Kong ML, Valentina RN, Kelvin C, George Q. Seasonal variation of triterpenes and phenolic compounds in australian *Centella asiatica* (L.) Urb. *Phytochem Anal*. 2015. 26:436-443.
- Buraphaka H, Putalun W. Stimulation of health-promoting triterpenoids accumulation in *Centella asiatica* (L.) Urban leaves triggered by postharvest application of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors. *Ind Crops Prod*. 2020. 146:112171. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112171>
- Go HK, Park J. Study of optimized simultaneous extraction conditions for active component of ginseng berry using response surface methodology. *J Soc Cosmet Sci Korea*. 2020. 46:185-194.
- Goldsmith CD, Vuong QV, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. *LWT - Food Sci Technol*. 2018. 89:284-290.
- Hafiz ZZ, Amin MAM, James RMJ, Teh LK, Salleh MZ, Adenan MI. Inhibitory effects of raw-extract *Centella asiatica* (RECA) on acetylcholinesterase, inflammations, and oxidative stress activities via *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*. 2020. 25:892. <https://doi.org/10.3390/molecules25040892>
- Hamid AA, Shah Z, Muse R, Mohamed S. Characterisation of antioxidant activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food Chem*. 2002. 77:465-469.
- Hayta M, İççimen EM. Optimization of ultrasound-assisted antioxidant compounds extraction from germinated chickpea using response surface methodology. *LWT - Food Sci Technol*. 2017. 77:208-216.
- Heo H, Lee H, Kim Y, Jeong HS, Lee J. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from onion peels using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019. 48:441-446.
- ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland. 2005. p 11-12.
- Jeon S, Ryu G. Optimization of extrusion process conditions to increase the corn fiber gum and soluble arabinoxylan yield from corn fiber. *Korean J Food Sci Technol*. 2015. 47:149-157.
- Kim OT, Kim MY, Kim SJ, Kim YJ, Kim KS, Ahn JC, et al. Seasonal variations of triterpene glycosides contents in the leaf of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Korean J Med Crop Sci*. 2002. 10:375-378.
- Kim SJ, Ju YJ, Kim IY. Skin improvement effects and development of liposome capsule technology using *Centella asiatica* extract powder. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*. 2020. 37:1285-1297.
- Lee J, Myung CH, Lee JE, Jo MR, Kim HS, Lee NY, et al. Anti-inflammatory and moisturizing effect of *Centella* extracts fermented in Jeju lava water. *J Soc Cosmet Sci Korea*. 2019. 45:363-372.
- Lee JM, Cha TY, Kim SH, Kwon TK, Kwon JH, Lee SH. Optimization of hot-water extraction condition of garlic using a response surface methodology. *Korean J Food Preserv*. 2007. 14:385-393.
- Park D, Choi WS, Lee CH. Study of optimized extraction conditions for simultaneous anti-inflammatory and antioxidant activity of *Artemisia iwayomogi* using response surface methodology. *J Soc Cosmet Sci Korea*. 2019. 45:319-331.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J Chromatogr A*. 2003. 1012:119-128.
- Ryu D, Koh E. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and phenolic compounds from campbell early grape using response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol*. 2018. 50:474-479.
- Sharmila G, Nikitha VS, Ilaiyarasi S, Dhivya K, Rajasekar V, Kumar NM, et al. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Ind Crop Prod*. 2016. 84:13-21.
- Somchit MN, Sulaiman MR, Zuraini A, Samsuddin L, Somchit N, Israf DA, et al. Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Centella asiatica*. *Indian J Pharmacol*. 2004. 36:377-380.
- Srivasta R, Shukla YN, Kumar S. Chemistry and pharmacology of *Centella asiatica*: a review. *J Med Aromat Plant Sci*. 1997.

- 19:1049-1056.
- Tao Y, Wu D, Zhang QA, Sun DW. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrason Sonochem*. 2014. 21:706-715.
- Vuong QV, Nguyen VT, Thanh DT, Bhuyan DJ, Goldsmith CD, Sadeqzadeh E, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant, *Euphorbia tirucalli*, using response surface methodology. *Ind Crop Prod*. 2015. 63:197-202.
- Yoo MY, Kim KH, Lee JW, Kim SK, Yang JY. Optimization of extraction conditions of antioxidants from sporophyll of *Undaria pinnatifida* by response surface methodology. *Kor J Microbial Biotechnol*. 2004. 32:317-321.
- Zheng CJ, Qin LP. Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities. *J Chin Integr Med*. 2007. 5:348-351.