(+)-Dihydromyricetin 정제를 위한 분별침전공정 개선

임민경, 김진현*
공주대학교 화학공학부

Received: December 10, 2013 / Revised: December 31, 2013 / Accepted: January 2, 2014

Improvement of the Fractional Precipitation Process for the Purification of (+)-Dihydromyricetin

Min-Kyoung Lim and Jin-Hyun Kim*

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Cheonan 330-717, Republic of Korea

Fractional precipitation is a simple method for purifying (+)-dihydromyricetin extracted from biomass. However, the fractional precipitation process has been inherently problematic due to the lengthy precipitation time that is required. The fractional precipitation time was shortened and (+)-dihydromyricetin yield was improved by increasing the surface area per working volume (S/V) of the reacting solution through the addition of a cation exchange resin (Amberlite 200, Amberlite IR 120Na, Amberlite IR 120H, or Amberlite IRC 50). Most of the (+)-dihydromyricetin (>90%) could be obtained after about 16 h of fractional precipitation using Amberlite 200. Since high-purity (+)-dihydromyricetin can be obtained at a high yield and the precipitation time can be reduced by increasing the surface area available for precipitation, this improved method is expected to minimize solvent usage and the size and complexity of the high performance liquid chromatography operation required for (+)-dihydromyricetin purification.

Keywords: (+)-Dihydromyricetin, purification, fractional precipitation, surface area, improvement

서 론

*Hovenia dulcis*와 *Ampelopsis grossedentata* 유래 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin [(+)-ampelopsin] (Fig. 1)은 알코올 분해 및 간 질환 치료에 효능이 뛰어난 기능성 물질로 숙취해소 및 간 보호 관련 기능성 식품 및 의약품의 원료로 사용되는 물질이다[1, 6, 14, 16, 22]. Du 등[4]은 *Ampelopsis grossedentata* 유래 (+)-dihydromyricetin이 고혈압 억제에도 상당히 효과가 있음을 보고 하였으며 Yoshikawa 등[20]은 에탄올에 의한 근육이완 억제 효과 및 에탄올의 체내 대사촉진과 간 보호 효과 등이 있음을 보고하였다. 또한 항알러지 효능이 보고되기도 하였다[21].

생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin의 상업화(기능성 식품 또는 의약품)를 위해서는 유용 성분의 대량 분리 및 정제가 필수적이지만 이에 관한 연구는 아직까지 상당히 미흡한 실정이다. 특히 산업적 대량생산에 직접 활용될 수 있는 분

리 및 정제 방법에 대한 연구는 전무한 실정이다. 다만 유기용매를 이용한 추출 및 크로마토그래피를 이용한 낮은 순도(<10%)의 (+)-dihydromyricetin을 얻거나 테르페노이드, 지질, 엽록소, 페놀 등이 포함되어 있는 조추출물(crude extract)을 얻는 것에 제한적으로 연구가 진행되었다[18, 24]. 또한 고순도 정제를 위한 공정으로 고가의 크로마토그래피를 이용하고 있거나 전 처리없이 추출을 거친 조생성물(crude product)을 high performance liquid chromatography (HPLC)에 의해서 바로 최종 정제하여 경제적 측면에서 많은 문제가 있으며 또한 산업적 대량생산을 위한 스케일 업에 많은

Fig. 1. The structure of (+)-dihydromyricetin.

*Corresponding author

Tel: +82-41-521-9361, Fax: +82-41-554-2640

E-mail: jinhyun@kongju.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

어려움이 따른다[4].

2008년 분별침전(fractional precipitation)에 의해 높은 순도(>83.2%)의 (+)-dihydromyricetin을 얻을 수 있는 효율적인 정제공정이 개발되었다. 그러나 분별침전공정에서 침전에 많은 시간(~32 h)이 소요되어 대량생산 공정에 적용되는 데 여전히 어려움이 있다[13]. 따라서 본 연구에서는 분별침전을 위한 반응기 내부의 반응액 부피당 표면적을 증가시켜 분별침전에 소요되는 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 하였다. 이러한 연구결과는 기존의 분별 침전 방법에 의한 (+)-dihydromyricetin 정제공정의 문제점을 개선함으로써(+)-dihydromyricetin의 대량생산에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

재료 및 방법

(+)-Dihydromyricetin 시료

본 연구에 사용된 (+)-dihydromyricetin는 Guilin Natural Ingredient, Inc. (Guilin, China)에서 구입한 조추출물(순도: 50.0%)를 사용하였다.

(+)-Dihydromyricetin 분석

(+)-Dihydromyricetin 분석을 위해 HPLC 시스템(Waters, Milford, MA, USA)을 이용하였다. 분석은 C₁₈ 칼럼(4.6×150 mm, 5 μm, Beckman, USA)을 사용하였다. 이동상은 gradient 조건으로 0.1% 트리플루오로아세트산/아세트오니트릴 90/10 (v/v)로 5분 동안 흘려준 후 30/70 (v/v)로 전환하여 30분 동안 흘려주었다. 유속은 1.0 ml/min, 시료 주입량은 20 μl이며 254 nm에서 UV에 의해 검출하였다. HPLC 분석은 표준 정량곡선을 이용하였으며, 표준물질은 Guilin Natural Ingredient, Inc. (Guilin, China)에서 구입한 순도 98%의 제품을 사용하였다[13].

분별침전(fractional precipitation)

조추출물의 (+)-dihydromyricetin 시료(순도: 50.0%)를 아세톤에 녹인 후(0.1 g 조추출물/1 ml 아세톤), 증류수(5 ml)를 교반(350 rpm) 하에 한 방울씩 떨어뜨려 용해도 차이를 이용해 (+)-dihydromyricetin 침전을 유도하였다. 반응기 부피는 20 ml이며 반응액 부피는 6 ml이었다. 반응액 부피당 표면적(surface area/working volume, S/V)은 조업이 가능한 최대값(0.428 mm⁻¹)으로 고정하여 실험을 수행하였다. S/V는 다음과 같이 계산하였다.

$$S/V(\text{mm}^{-1}) = \frac{\text{[이온교환수지의 총 표면적}(\text{mm}^2)\text{]} }{\text{반응액 부피}(\text{mm}^3)} \quad (1)$$

반응액 부피당 표면적을 증가시키기 위하여 반응기 내부

Fig. 2. Schematic diagram of fractional precipitation by increasing surface area using ion exchange resin for the purification of (+)-dihydromyricetin.

에 음이온교환수지(Amberlite IRA 400OH, Amberlite IRA 400Cl, Amberlite IRA 910, Amberlite IRA 96, Amberlite IRA 67, Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)와 양이온교환수지(Amberlite IR 120H, Amberlite IR 120Na, Amberlite 200, Amberlite IRC 50, Sigma-Aldrich)를 각각 첨가하고 용액의 pH를 9.0로 조정 후 4°C에서 보관하여 (+)-dihydromyricetin 침전물을 얻었다. 실험에 사용된 이온교환수지의 입자크기는 16-50 mesh이며 표면적은 구의 표면적 계산 방법으로 구하였다. 이온교환수지는 35°C에서 하루 동안 건조한 후 실험에 사용하였다. (+)-Dihydromyricetin의 분별침전 개략도를 Fig. 2에 나타내었다. 침전 후 (+)-dihydromyricetin 침전물을 여과지(150 mm, Whatman, Buckinghamshire, UK)로 여과하여 침전물을 35°C에서 24시간 동안 진공오븐(UP-2000, EYELA, Japan)에서 건조하였다. 건조된 침전물의 순도와 수율은 HPLC로 분석하였다.

침전물 형태 확인

분별침전공정에서 (+)-dihydromyricetin 침전물 형태를 관찰하기 위해 전자현미경 SV-35 Video Microscope 시스템(Some Tech, Korea)을 사용하였다. 분별침전 동안 (+)-dihydromyricetin 침전물을 고배율(×100)에서 관찰하였다. 관찰된 (+)-dihydromyricetin 침전물은 IT-Plus 시스템(Some Tech, Korea)에서 동화상으로 확인하였으며 이를 통해 (+)-dihydromyricetin 침전물의 형태를 확인하였다[11].

결과 및 고찰

(+)-Dihydromyricetin 분별침전공정

분별침전은 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin을 효율적으로 정제할 수 있는 매우 간편한 방법으로, 용해도 차이를 이용하여 높은 순도의 (+)-dihydromyricetin을 고수율로

Fig. 3. Effect of precipitation time on the purity and yield of (+)-dihydromyricetin at a fixed acetone/distilled water ratio (1/5, v/v), precipitation temperature (4°C), pH (9.0), and initial concentration (0.1 g/ml) in fractional precipitation process.

얻을 수 있는 대표적인 정제공정이다[13]. 기존 문헌보고에 따르면 (+)-dihydromyricetin 분별침전을 위한 최적 조건으로 아세톤/증류수 비, 초기 (+)-dihydromyricetin 농도, 보관 온도, pH는 각각 1/5 (v/v), 0.1 g/ml, 4°C, 9.0이었다[13]. 주어진 최적의 분별침전 조건으로 실험을 수행하여 분별침전 동안 침전물을 여과, 건조 후 HPLC 분석을 수행한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 분별침전 24시간까지 수율(~70%)은 급격히 증가하다 24시간 이후 거의 변화가 없었다. 반면 분별침전 동안 순도(80-85%) 변화는 미미함을 알 수 있었다. 이러한 경향은 기존에 보고된 연구결과[13]와 유사하였으며, 분별침전에 많은 시간(24-32시간)이 소요됨을 확인할 수 있었다.

반응액 부피당 표면적(S/V) 증가의 영향

분별침전은 간단하고 효율적으로 정제할 수 있는 방법이지만 분별침전에 많은 시간(24-32시간)이 소요되어 (+)-dihydromyricetin의 대량생산에 어려움이 따른다. 이러한 분별침전에 소요되는 긴 침전시간 문제를 개선하기 위하여, 반응기 내부의 반응액 부피당 표면적이 증가된 분별침전공정을 도입하고자 하였다. 분별침전공정에서 (+)-dihydromyricetin이 침전되는 양상을 살펴 본 결과, 반응기 바닥과 벽에 얇게 침전되어 존재하는 것을 알 수 있었다. 실제 대부분의 결정화는 외부표면(외부 불순물 입자, 반응기 벽, 교반장치 표면 등)의 도움을 받아 핵이 생성된다[7-10]. 이러한 사실을 토대로 침전공정에서 반응기 내부의 반응액

Fig. 4. Effect of cation exchange resin used to increase surface area per working volume (S/V: 0.428 mm⁻¹) on the yield of (+)-dihydromyricetin during fractional precipitation.

부피당 표면적(S/V)을 증가시켜 (+)-dihydromyricetin이 침전할 수 있는 공간을 증가시켜 줌으로써 침전효율을 향상시키고자 하였다. 기존 문헌의 분별침전을 위한 최적 조건을 토대로 아세톤/증류수 비, 보관온도, 초기 (+)-dihydromyricetin 농도, pH는 각각 1/5 (v/v), 4°C, 0.1 g/ml, 9.0로 고정하고, 반응기 내부의 반응액 부피당 표면적(S/V: 0.428 mm⁻¹) 증가를 위해 양이온교환수지와 음이온교환수지를 각각 첨가하여 분별침전을 수행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 침전 시간이 경과함에 따라 (+)-dihydromyricetin 수율도 증가하였다. 반응기 내부 표면적을 증가시키지 않은 경우에 침전 24시간 경과 후 수율은 70.0% 정도인 반면 표면적 증가를 위해 양이온교환수지 중 강산성수지인 Amberlite IR 120H를 첨가한 경우 83.0%, Amberlite IR 120Na를 첨가한 경우 89.3%, Amberlite 200을 첨가한 경우 90.9%, 양이온교환수지 중 약산성수지인 Amberlite IRC 50을 첨가한 경우 75.0%로 각각 나타났다. 표면적 증가에 의해 침전 효율이 매우 향상됨을 알 수 있었다. 특히 Amberlite 200의 경우 침전 16시간에 높은 수율(>90%)을 나타내어 상대적으로 짧은 침전시간에 높은 수율로 (+)-dihydromyricetin을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 표면적증가물질과 (+)-dihydromyricetin 간의 친화력 차이 때문으로 판단된다[5, 12]. 반면 표면적 증가를 위한 음이온교환수지인 Amberlite IRA 400OH와 Amberlite IRA 400Cl의 경우에는 적은 양의 침전물이 형성되었으나 수율이 매우 낮았으며 Amberlite IRA 910, Amberlite IRA 96, Amberlite IRA 67의 경우에는 침전물이 전혀 형성되지 않았다. 순도는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 침전시간이 경과할수록 소폭 증가 하였으며, 침전 24시간에서의 순도는 반응기 내부 표면적을 증가시키지 않은 경우 80.0%, 표면적

Fig. 5. Effect of cation exchange resin used to increase surface area per working volume (S/V: 0.428 mm^{-1}) on the purity of (+)-dihydromyricetin during fractional precipitation.

Table 1. Distribution of (+)-dihydromyricetin in supernatant of precipitator after fractional precipitation (24 h) at different anion exchange resins used to increase surface area per working volume (S/V: 0.428 mm^{-1}).

Ion exchange resin	Distribution of (+)-dihydromyricetin in supernatant (%) [*]
Amberlite IRA 400OH	31.3 ± 2.0
Amberlite IRA 400Cl	33.2 ± 2.2
Amberlite IRA 910	17.2 ± 1.4
Amberlite IRA 96	17.5 ± 1.6
Amberlite IRA 67	19.7 ± 1.7

^{*}Data are shown as distribution (%) $\pm$ SD.

증가를 위해 양이온교환수지 중 강산성수지인 Amberlite IR 120H를 첨가한 경우 89.5%, Amberlite IR 120Na를 첨가한 경우 90.0%, Amberlite 200을 첨가한 경우 90.2%, 양이온교환수지 중 약산성수지인 Amberlite IRC 50을 첨가한 경우 89.6%로 각각 나타났다. 분별침전 24시간에서 표면적증가물질로 양이온교환수지인 Amberlite 200을 첨가한 경우 가장 높은 순도(90.2%)와 수율(90.9%)를 얻을 수 있었다.

음이온교환수지의 경우 표면적증가물질 첨가에 의한 반응액 부피당 표면적(S/V) 증가에도 불구하고 침전물이 형성되지 않는 이유를 조사하였다. 음이온교환수지에 (+)-dihydromyricetin이 흡착되었을 가능성을 확인하기 위하여, 분별침전 24시간 경과 후 상등액(supernatant)에서의 (+)-dihydromyricetin 함량을 분석하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 침전물이 미량 형성되었던 Amberlite IRA 400OH와 Amberlite IRA 400Cl의 경우 상등액에서의 (+)-dihydromyricetin

함량은 각각 31.3%와 33.2%이었다. 반면 전혀 침전물이 형성되지 않았던 Amberlite IRA 910, Amberlite IRA 96, Amberlite IRA 67의 경우 상등액에서의 (+)-dihydromyricetin 함량은 각각 17.2%, 17.5%, 19.7%이었으며 침전물이 미량 생성된 Amberlite IRA 400OH와 Amberlite IRA 400Cl보다 상등액에서의 (+)-dihydromyricetin 함량이 현저히 낮음을 확인할 수 있었다. 즉, 음이온교환수지 중 Amberlite IRA 910, Amberlite IRA 96, Amberlite IRA 67의 경우 Amberlite IRA 400OH와 Amberlite IRA 400Cl보다 더 많이 이온교환수지에 흡착됨을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 표면적증가물질로 음이온교환수지를 사용한 분별침전의 경우, 침전물이 원활하게 형성되지 않는 이유는 이온교환수지에 대부분의 (+)-dihydromyricetin이 흡착되기 때문으로 판단된다[17].

표면적 증가에 따른 (+)-dihydromyricetin 침전물 형태 변화

분별침전에서 반응액 부피당 표면적(S/V) 증가에 따른 침전물 형태 변화를 조사하기 위하여 전자현미경을 이용하여 (+)-dihydromyricetin 침전물을 확인하였다. 양이온교환수지와 음이온교환수지에서의 침전 양상을 Fig. 6과 Fig. 7에 각각 나타내었다. 표면적증가물질 종류와 침전 시간에 따라 침전 양상이 달라짐을 알 수 있었다. 동일한 침전 시간에서는 표면적증가물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 표면적증가물질인 양이온교환수지(Amberlite IR 120H, Amberlite IR 120Na, Amberlite 200, Amberlite IRC 50)와 음이온교환수지(Amberlite IRA 400OH, Amberlite IRA 400Cl)를 첨가한 경우 (+)-dihydromyricetin 침전물의 크기가 작아짐을 알 수 있었다. 표면적증가물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 표면적증가물질인 이온교환수지를 첨가한 경우 결정 성장을 저해 받았기 때문으로 판단된다[11]. 또한 표면적증가물질의 종류에 따라 입자 형태와 크기가 다른 이유는 표면적증가물질의 친화력(affinity) 차이 때문으로 판단된다[5, 12]. 즉, 표면적증가물질과 (+)-dihydromyricetin 입자의 친화력이 증가할수록 (+)-dihydromyricetin 입자 성장을 저해하는 더 효과적인 공간적 저해요소(steric barrier) 역할을 하기 때문에 침전물의 크기가 감소하게 된다. 이러한 현상은 원료의약품인 megestrol acetate [2], spironolactone [3], atorvastatin calcium [23]에서도 확인되었는데, 침전공정에서 고분자 물질을 첨가하여 성공적으로 이들 원료의약품의 입자 크기를 효과적으로 조절할 수 있었다. 일반적으로 원료의약품(active pharmaceutical ingredient, API)의 경우 입자 크기를 작게 하여 그 활용도를 높이려고 한다. 입자 크기가 작아질수록 제형 시 용해 속도(dissolution rate), 약물 분산의 균일성(uniformity of drug dispersion), 경구 생체 이용률(oral bioavailability) 등을 향상시킬 수 있는 장점을 가지고 있기 때문이다[2, 11, 19].

Fig. 6. Optical images of (+)-dihydromyricetin precipitate formed by fractional precipitation at 8 h, 16 h, 24 h: control (A); cation exchange resins Amberlite 200 (B); Amberlite IR 120H (C); Amberlite IR 120Na (D); Amberlite IRC 50 (E). Scale bar indicates 500 μm .

또한 입자 크기가 작을수록 정제 후 건조 단계에서 잔류수분 및 잔류용매 제거에도 상당히 도움이 되기 때문이다[15]. 이러한 이유로 본 연구 결과인 표면적증가물질인 이온교환수지를 첨가에 의한 (+)-dihydromyricetin 입자 크기 감소는 의약품의 활용 측면에서도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

요약

본 연구에서는 바이오매스 유래 생리활성물질인 (+)-

dihydromyricetin을 효율적으로 정제하기 위하여, 반응액 부피당 표면적(S/V)이 증가된 새로운 개념의 분별침전공정을 도입하였다. 분별침전 24시간에서 반응기 내부 표면적을 증가시키지 않은 경우 순도와 수율은 각각 80.0%와 70.0%인 반면 표면적 증가를 위해 양이온교환수지인 Amberlite 200을 첨가한 경우 순도와 수율은 각각 90.2%와 90.9%로 가장 효과적인 표면적증가물질임을 알 수 있었다. 특히 Amberlite 200의 경우 상대적으로 짧은 침전시간(16시간)에 높은 수율(>90%)로 (+)-dihydromyricetin을 얻을 수 있어 침전에 소요되는 시간을 효과적으로 단축시킬 수 있었다. 동일한 침전시

Fig. 7. Optical images of (+)-dihydromyricetin precipitate formed by fractional precipitation at 8 h, 16 h, 24 h: anion exchange resins Amberlite IRA 400OH (A); Amberlite IRA 400Cl (B); Amberlite IRA 910 (C); Amberlite IRA 96 (D); Amberlite IRA 67 (E). Scale bar indicates 500 μm .

간에서는 표면적증가물질을 첨가하지 않은 경우에 비해 표면적증가물질을 첨가한 경우 침전물의 입자 크기가 감소함을 알 수 있었다. 이러한 연구결과는 기존의 분별침전 방법에 의한 (+)-dihydromyricetin 정제공정의 문제점을 개선함으로써 (+)-dihydromyricetin의 대량생산에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. An SW, Kim YG, Kim MH, Lee BI, Lee SH, Kwon HI, Hwang B, Lee HY. 1999. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* Thunb and *Alnus japonica* Steud. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 7: 263-268.

2. Cho EB, Cho WK, Cha KH, Park JS. 2010. Enhanced dissolution of megestrol acetate microcrystals prepared by antisolvent precipitation process using hydrophilic additives. *Int. J. Pharm.* **396**: 91-98.
3. Dong Y, Ng WK, Shen S, Kim S, Tan RBH. 2009. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent precipitation. *Int. J. Pharm.* **375**: 84-88.
4. Du Q, Cai W, Xia M, Ito Y. 2002. Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns. *J. Chromatogr. A* **973**: 217-220.
5. Han MG, Jeon KY, Mun S, Kim JH. 2010. Development of a micelle-fractional precipitation hybrid process for the pre-purification of paclitaxel from plant cell cultures. *Process Biochem.* **45**: 1368-1374.
6. Hase K, Basnet P. 1997. Effect of *Hovenia dulcis* on lipopolysaccharide-induced liver injury in chronic alcohol-fed rats. *J. Trad. Med.* **14**: 28-33.
7. Jeon YL, Kim JH. 2013. Precipitation characteristics of paclitaxel in solvent systems with different ion exchange resins. *Korean J. Chem. Eng.* **30**: 1954-1959.
8. Kang I, Kim JH. 2012. Effect of reactor type on the purification efficiency of paclitaxel in the increased surface area fractional precipitation process. *Sep. Puri. Technol.* **99**: 14-19.
9. Kim WS. 2007. Principles and applications of crystallization technology. *KIC News* **10**: 9-24.
10. Kim WS, Lee EK. 2005. Technological trend of crystallization research for bioproduct separation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**: 164-176.
11. Lee JY, Kim JH. 2012. Decrease in the particle size of paclitaxel by increased surface area fractional precipitation. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 169-174.
12. Lee JY, Kim JH. 2012. Evaluation of the effect of crude extract purity and pure paclitaxel content on the increased surface area fractional precipitation process for the purification of paclitaxel. *Process Biochem.* **47**: 2388-2397.
13. Lee KH, Kim JH. 2008. Development and optimization of fractional precipitation for the pre-purification of (+)-dihydromyricetin. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **13**: 274-278.
14. Lee MK, Kim YG, An SW, Kim MH, Lee JH, Lee HY. 1999. Biological activities of *Hovenia dulcis* Thunb. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **7**: 185-192.
15. Pyo SH, Kim MS, Cho JS, Song BK, Han BH, Choi HJ. 2005. Efficient purification and morphology characterization of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**: 1162-1168.
16. Sakai K, Yamane T, Saitoh Y, Ikawa C, Nishihata T. 1987. Effect of water extracts of crude drugs in decreasing blood alcohol concentrations in rats. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 4597-4604.
17. Sim HA, Lee JY, Kim JH. 2012. Evaluation of a high surface area acetone/pentane precipitation process for the purification of paclitaxel from plant cell cultures. *Sep. Puri. Technol.* **89**: 112-116.
18. Song X, Ren Q. 2001. Preparation and application of dihydromyricetin. CN Patent 1,288,892.
19. Yeo SD, Kim MS, Lee JC. 2003. Recrystallization of sulfathiazole and chlorpropamide using the supercritical fluid antisolvent process. *J. Supercrit. Fluids* **25**: 143-154.
20. Yohsikawa M, Murakami T. 1996. Four methyl-migrated 16,17-seco-dammarane triterpene glycosides from chines natural Medicine, *Hovenia semen seu fructus*, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* **44**: 1736-1743.
21. Yohsikawa M, Murakami T, Ueda T, Yoshizumi S, Ninomiya K, Murakami N, et al. 1997. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II, and III, isolated from *hoveniae semen seu fructus*, the seed and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae): Inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi* **117**: 108-118.
22. Yoo SM, Mun S, Kim JH. 2006. Recovery and pre-purification of (+)-dihydromyricetin from *Hovenia dulcis*. *Process Biochem.* **41**: 567-570.
23. Zhang HX, Wang JX, Zhang ZB, Le Y, Shen ZG, Chen JF. 2009. Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. *Int. J. Pharm.* **374**: 106-113.
24. Zhang Y. 2003. Process for preparing dihydromyricetin from *Porcelain ampelopsis*. CN Patent 1,393,443.