

이온성액체와 Deep Eutectic Solvent를 사용한 갈피에서 카페인산과 로즈마린산의 추출

이유리 · 이유진 · 노경호[†]

인하대학교 화학·화학공학융합학과
402-701 인천광역시 남구 용현동 253
(2014년 1월 20일 접수, 2014년 3월 12일 수정본 접수, 2014년 3월 18일 채택)

Extraction of Caffeic Acid and Rosmarinic Acid from *Zostera marina* Based on Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvent

Yu Ri Lee, Yu Jin Lee and Kyung Ho Row[†]

Department of Chemistry and Chemical Engineering Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-gu, Incheon 402-701, Korea
(Received 20 January 2014; Received in revised form 12 March 2014; accepted 18 March 2014)

요 약

갈피의 유용성분을 추출하기 위한 dipping, ultrasonic-assisted, heating 추출법의 적용성을 검토하였다. 이온성 액체와 공용용매(DES)를 갈피에 존재하는 카페인산과 로즈마린산의 추출 효율을 증가시키기 위해 첨가제로써 사용하였다. 실험에서 확인된 최적의 조건은 동결건조된 0.005 g의 갈피 뿌리 과우더와 5 mL의 methanol 그리고 0.5 g의 DES-3를 바 이알에 넣은 후 30분동안 dipping하여 추출하였다. 그 결과 0.19 mg/g 카페인산과 8.48 mg/g의 로즈마린산을 얻었다. 이 방법은 갈피에 있는 카페인산과 로즈마린산을 간단하고 성공적으로 적용할 수 있었고 전통적인 용매 추출법보다 청정용매인 DES를 첨가했을 때 갈피의 유용성분 추출에 더 적합함을 의미한다.

Abstract – The applicability of the dipping, ultrasonic-assisted, heating methods to the extraction of useful components from *Zostera marina* was investigated. For the increase of the extraction yield of caffeic acid and rosmarinic acid from *Zostera marina*, ionic liquids and DES were used as additives in the extraction solvent. The optimum extraction conditions were found: dipping extraction, methanol as extraction solvent, 0.005 g of freeze-dried material powder, 5 mL methanol, 30 min and 0.5 g of DES-3 (Et₄NCl and phenol) as additive. As a result, 0.19 mg/g of caffeic acid and 8.48 mg/g of rosmarinic acid were obtained. This method is simple and sensitive, and has been applied successfully to determine the component of caffeic acid and rosmarinic acid in *Zostera marina* and these results indicate that DES were used as additives is more suitable than traditional extraction for the extraction of useful components from *Zostera marina*.

Key words: Ionic Liquid, Deep Eutectic Solvent, *Zostera Marina*, Extraction, Caffeic Acid, Rosmarinic Acid

1. 서 론

오래 전부터 일반적으로 액상 추출에는 유기용매가 사용되었다. 유기용매는 값이 싸고 추출효율이 좋은 장점을 가지고 있으나 실험자의 건강이나 환경오염 문제를 야기시킬 수 있는 단점이 있다. 최근 이러한 유기용매의 단점을 극복하고자 여러 가지 청정용매에 대한 연구가 진행되고 있다[1].

이온성 액체(ionic liquids, ILs)는 거대 헤테로 고리 양이온과 다양한 무기 음이온의 결합으로 이루어진 염으로, 낮은 융점(<373 K)을 가져 상온에서 액체로 존재한다. 이온성 액체는 끓는점이 낮고, 낮은

증기압, 비휘발성, 낮은 융해점, 높은 이온 전도성 등 다양한 특성을 갖기 때문에 많은 분야에 적용되고 있다[2]. 특히 이온성 액체는 소수성, 유기용매에 대한 상용성, 목표화합물과 이온성 액체 사이의 π - π 상호작용 등으로 추출과 분리 분야에서 많이 적용되어왔다[3,4]. 그러나 한편으로는 이러한 이온성 액체가 인체에 유해한 독성을 갖고 있으며 생분해성이 낮고 미량의 불순물에 의해 이온성 액체의 물리적 특성에 영향을 미칠 수 있으며, 이온성 액체 합성 시 음이온의 완전한 교환을 위해 많은 염과 용매를 사용하기 때문에 환경친화적인 용매에 부적합하며 가격이 높다는 보고가 있다[5,6]. 이러한 단점을 극복하기 위해 Deep Eutectic solvent (DES)가 개발되었다. DES는 단순히 두 가지의 염을 혼합하여 두 염의 수소결합을 형성하여 생성된다. 이러한 DES는 가격이 싸며, 독성이 없어 인체에 무해하고 밀도, 점도, 이온 전도도 등 많은 물리화학적 특성이 이온성 액체와 유사하기 때문에 새로운 청정용매로 많은 연구가 진행되고 있다[7-9].

갈피(*Zostera marina*, *Z.marina*)는 거머리말과의 여러해살이 해초

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rowkho@inha.ac.kr

[‡]이 논문은 한양대학교 배성열 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다. 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.

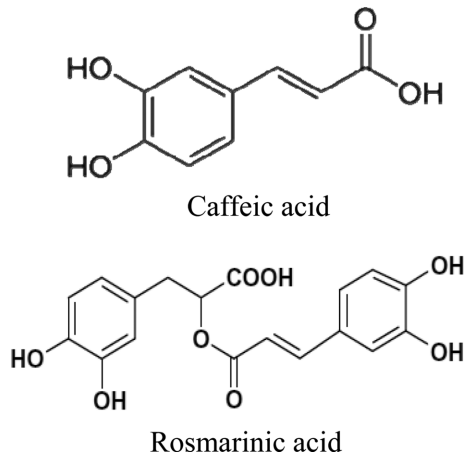


Fig. 1. Structure of target compounds.

로 전 세계적으로 5과 13속 60여 종이 한국, 중국, 일본, 유럽, 북아메리카에 분포하며 얇은 바다나 하구에 자생한다. 잘피는 해조류와는 달리 꽃이 피는 현화식물로서 뿌리와 잎은 구분이 확실하며 녹색의 꽃을 피우며, 광합성을 통해 950 L/m²의 산소를 생산하고 어린 물고기나 갑각류, 조개 등의 수중 생물의 서식지를 제공하고 수중에 존재하는 오염물질을 걸러 내어 물을 맑게 한다[10,11]. 잘피에는 카페인산(caffeic acid), 갈산(gallic acid), 페룰산(ferrulic acid), 로즈마린산(rosmarinic acid) 등과 같은 항산화 작용, 항염 작용으로 널리 알려진 페놀산 화합물이 다량 존재한다[12]. 카페인산은 항염, 피부암 감소, 구강암 세포 성장 억제 등의 효과는 많은 연구에 의해 증명되었으며 채소나 과일에서 쉽게 찾을 수 있다[13]. 로즈마린산은 강력한 항산화 효과, 항알러지, 면역억제, 아토피에 효과가 있다[14]. 카페인산과 로즈마린의 구조는 Fig. 1에 제시되어 있다.

본 연구는 잘피에 함유되어 있는 카페인산과 로즈마린산을 추출 효율을 높이기 위한 수단으로 이온성 액체와 DES를 합성해 첨가함으로써 카페인산과 로즈마린산의 최적의 추출 효율의 조건을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료 및 시약

본 연구에서 사용된 잘피는 인천 영흥도(Incheon, Korea)에 소재해 있는 수자원연구소에서 제공하였다. 표준시료인 카페인산과 로즈마린산은(Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였으며, 추출과 이동상에 사용된 methanol, ethanol, acetonitrile, ethyl acetate, n-hexane, dichloromethane, phosphoric acid는 DUKSAN pure Chemical CO., LTD (Ansan, Korea)의 HPLC grad를 사용하였다. 이온성 액체 합성 시 사용된 1-methylimidazole, bromobutane, chrolobutane, hexafluorophosphoric, sodium tetrafluoroborate 그리고 lithium는 Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA)에서 구입했다. DES 합성 시 사용된 methyl triphenyl phosphonium bromide (Me(Ph)₃PBr) (>98.0%), ammonium chloride (Et₄NCl) (>98.0%), choline chloride (ChCl) (>98.0%), Ethylene glycol (>99.5%), 1,2-butanediol (>98.0%), urea (>98.0%)는 Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, phenol (>99.0%)은 (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된

모든 시료들은 HPLC에 주입하기 전에 필터(MFS-25, 0.45 μm TF, Whatman, U.S.A)를 이용하여 여과하였다.

2-2. HPLC 조건

본 연구에 사용된 분석용 HPLC는 Waters 1525 Binary HPLC pump와 Waters 2489 UV/Visible detector (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A)를 사용하였다. 사용된 칼럼은 RS tech (Deajeon, Korea) 제품으로 C₁₈ (5 μm, 250×4.6 mm) 칼럼을 사용하였다. 이동상의 조성은 water-methanol-phosphoric acid (50/50/0.1, v/v)으로 유량 0.5 mL/min 흘려주었고 표준시료 및 검체시료 10 μL를 주입하여 330 nm 파장에서 분석하였다.

2-3. 표준용액의 준비와 추출

본 실험에 사용된 표준용액은 표준시료 카페인산과 로즈마린산을 methanol에 녹여 각각 0.005, 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도로 제조하였다. 이렇게 만들어진 표준 용액의 검량선을 만들고 이를 토대로 시험용액을 분석하였다. 그 결과 카페인산과 로즈마린산의 선형 회기 방정식을 얻을 수 있었으며 카페인산의 경우 $y=1.0 \times 10^8 x$ ($r^2=0.996$)의 방정식을 로즈마린산의 경우 $Y=3.0 \times 10^7 x$ ($r^2=0.997$)의 방정식을 얻었다. 위 방정식에서 x는 표준용액의 농도이고 y는 크로마토그래프의 피크의 면적을 나타낸다. 이 방정식은 농도를 알지 못하는 추출 시료의 정량 분석을 하기 위해 사용된다.

잘피는 뿌리와 잎을 각각 0.5 cm로 자른 뒤 동결건조 시킨 후 믹서기로 갈아서 파우더 형태로 만들었다. 파우더 형태의 잘피는 0.05 g을 5 mL의 여러 가지 추출 용매(methanol, ethanol, acetonitrile, ethyl acetate, n-hexane, dichloromethane)에 각각 혼합하여 30분 동안 ultrasonic을 이용해 추출하였다.

2-4. 이온성 액체와 DES의 합성

이온성 액체의 합성하기 위해서 둥근 바닥 플라스크에 1 mL의 1-Methylimidazole과 1.1 mL의 bromobutane과 chrolobutane을 넣어 혼합하여 353 K에서 6시간 동안 가열해 반응시킨 뒤에 ethyl acetate를 이용하여 세척하면 [BMIM][Br], [BMIM][Cl]이 각각 합성된다. [BMIM][BF₄]는 음이온의 브롬의 치환반응으로 합성된다. 합성된 [BMIM][Br]과 sodium tetrafluoroborate를 methylene chloride와 혼합하여 실온에 30분 정도 치환시킨다. 시간이 지난 후 용액은 두 개의 상으로 나누어진다. 이 때의 상층부분에 methylene chloride와 치환된 이온성 액체가 존재하므로 상층부분을 수집하여 methylene chloride를 증발시켜 주면 치환된 [OMIM][BF₄]을 얻을 수 있다. [BMIM][PF₆]와 [BMIM][Tf₂N]은 합성된 [OMIM][Br]에 물과 hexafluorophosphoric과 lithium를 각각 비이커에 혼합하여 실온에 30분동안 반응시킨다. 시간이 지난 후 용액은 두 개의 상으로 나누어진다. 상층부의 물을 제거시켜 주면 [BMIM][PF₆]과 [BMIM][Tf₂N]을 수집 할 수 있다. Table 1에는 본 실험에 사용된 이온성 액체의 목록이다.

DES는 이온성 액체의 합성 보다 간단한 방법으로 합성할 수 있다. 서로 다른 염과 hydrogen bond donors(수소결합 주개, HBD)를 다른 비율로 혼합한 뒤 373 K에서 단일 상이 될 때까지 스피너를 이용해 잘 섞어준다. Table 2는 본 실험에서 사용된 DES의 염, HBD, 염과 HBD의 비율을 보여준다.

Table 1. Structures of all the ionic liquids

No	Cations	Anions	Structure
1	[BMIM]	[Br]	
2	[BMIM]	[Cl]	
3	[BMIM]	[PF6]	
4	[BMIM]	[BF4]	

Table 2. Compositions of the synthesized DESs

Abbreviation	Salt	HBD	Salt/HBD ratio
DES-1	ChCl	Ethyl glycol	1:2
DES-2		1,2-Butanediol	
DES-3	Et ₄ NCl	Phenol	
DES-4		Urea	
DES-5	Me(Ph) ₃ PBr	Ethyl glycol	

Et₄NCl (Tetramethylammonium chloride)Me(Ph)₃PBr (methyltriphenylphosphoniumbromide)

3. 결과 및 고찰

3-1. 카페인산과 로즈마린산의 추출

먼저, 추출에 사용될 용매를 선정하기 위해서 water, methanol, ethanol, n-hexane, ethyl acetate, acetonitrile, dichloromethane을 각각 추출에 사용하였다. 추출은 0.05 g의 잘피 뿌리 파우더와 5 mL의 용매를 각각 바이알에 넣고 ultrasonic-assisted를 이용하여 30분 동안 추출하였다. Table 3은 각각의 용매에서 추출된 카페인산과 로즈마린산의 양을 나타내고 있다. 표에서 보는 것과 같이 water에서 추출했을 때 카페인산을 0.36 mg/g을 로즈마린산은 0.20 mg/g을 추출하고 methanol에서 추출했을 때 카페인산 0.08 mg/g 로즈마린산은 3.57 mg/g만큼 추출되었다. 카페인산과 로즈마린산이 추출 효율이 서로 다른 용매에서 각각 다르게 분석되었으나 본 연구에서는 로즈마린산의 추출 효율에 초점을 맞춰 methanol을 추출 용매로 사용하였다. 카페인산과 로즈마린산의 구조는 많은 하이드록시기(-OH)를 갖고 있어 water이나 alcohol에 잘 녹는 성질을 갖고 있기 때문에 많은 연구 논문에서 카페인산과 로즈마린산을 추출하기 위해서 water와 methanol을 혼합하여 사용하고 있다[15]. 그러나 본 실험에서는 추출

Table 3. Effect of extraction solvent

Extraction Solvent	Amount (mg/g)	
	Caffeic acid	Rosmarinic acid
Water	0.345177	0.196717
Ethanol	0.030289	0.499913
Methanol	0.08043	3.572787
Ethyl acetate	0.026464	Nd
Acetonitrile	Nd	Nd
N-hexane	0.005242	0.005407
Dichloromethane	0.024337	0.02863

※Nd: No detection (Extraction method: Ultra sonic, extract: *Zostera marina* root, solid/liquid ratio: 0.05 g/5 ml, time: 30 min)

Table 4. Effect of extraction methods

Methods	Amount (mg/g)	
	Caffeic acid	Rosmarinic acid
Ultra sonic	0.06043	2.572787
Dipping	0.036174	3.71438
Reflux (353 K)	0.025619	3.211753

(Extraction solvent: Methanol, time: 30 min, extract: *Zostera marina* root, solid/liquid ratio: 0.05 g/5 ml)

효율을 증가시키기 위한 첨가제로써 이온성 액체와 DES를 사용했다. Water의 경우 목표 화합물과 첨가제의 상호작용을 방해할 수 있으므로 water보다는 methanol을 선택하였다. 그 다음으로 진행된 실험은 추출 방법에 따른 카페인산과 로즈마린산의 추출 수율을 측정하는 실험으로 Dipping, ultrasonic-assisted, heating 방법으로 각각 30분 동안 실험하였다. 추출 방법에서 ultrasonic-assisted는 파워 70 W, 40 kHz에서 추출하였으며, heating 온도는 353 K에서 실험을 진행하였다. Table 4에서는 각각의 추출 방법에 대한 카페인산과 로즈마린산의 추출량이 나타나 있으며 Dipping이 카페인산 0.04 mg/g, 로즈마린산 3.71 mg/g으로 ultrasonic-assisted와 heating보다 로즈마린산의 추출 수율이 높았기 때문에 Dipping을 추출 방법으로 선택하였다.

3-2. 이온성 액체의 효과

이온성 액체는 점도, 낮은 증기압, 밀도, 소수성, 용해도 등 많은 물리화학적 특징들은 이온성 액체의 양이온과 음이온에 의해 결정이 된다. 이러한 양이온과 음이온을 사용자의 목적에 따라 적절한 물성을 갖도록 합성 할 수 있기 때문에 “디자이너 용매(designer solvent)”라고 불린다[16]. 이온성 액체의 양이온의 alkyl chain의 길이는 점도와 안정성에 영향을 미친다. 또한 음이온은 염기도(Basicity)와 용해도와 깊은 연관이 있으며 일반적으로 이온성 액체의 점도는 매우 높으나 BF₄⁻, PF₆⁻ 등과 같은 불화물 음이온(Fluorinated anion)이 포함된 이온성 액체는 비교적 낮은 점도를 갖는다[17]. 본 실험에서는 양이온은 1-butyl-3-methylimidazolium ([BMIM])에 Br⁻, Cl⁻, BF₄⁻, PF₆⁻으로 치환하여 실험을 진행하였다. Fig. 2는 이온성 액체를 첨가

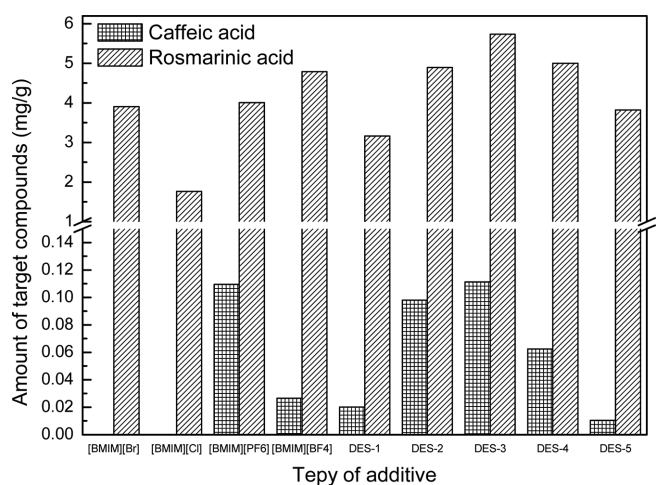


Fig. 2. Effect of Ionic liquids and DESs (Extraction method: Dipping, extraction solvent: methanol, time: 30 min, extract: *Zostera marina* root, solid/liquid ratio: 0.05 g/5 ml, ILs and DESs concentration: 0.01 g).

제로 사용했을 때의 카페인산과 로즈마린산의 추출 수율을 보여준다. 이온성 액체 중 [BMIM][BF₄]에서 가장 많은 추출 수율을 보여준다. 이것은 목표 화합물과 [BMIM][BF₄]의 사이에서 일어나는 수소결합, π-π 결합 등 다중 상호작용을 일으켰기 때문일 것이다[18].

3-3. DES의 효과

잘피에서 목표 화합물을 추출하기 위해서 DES 종류의 선택은 매우 중요하다. 확산, 용해도, 점도, 표면장력, 극성, 고상과 액상 사이에서 일어나는 물리화학적 상호작용은 추출 수율에 많은 영향을 주기 때문이다. DES 또한 일반적으로 많이 사용되는 유기용매에 비해 점도가 매우 높은 것이 특징이다[7]. Fig. 2에서는 DES의 종류에 따른 카페인산과 로즈마린산의 추출 수율을 볼 수 있다. 그림에서 볼 수 있듯이 DES-3가 카페인산은 0.11 mg/g이며 로즈마린산은 5.74 mg/g으로 가장 많은 양이 추출되었다. DES는 염과 HBD가 수소결합으로 공유되어 있는 상태이며 목표 화합물은 하이드록시기(-OH)기가 포함되어 있다. 본 실험 결과에서 보여준 염인 Et₄NCl과 HBD인 phenol이 공유되어 있는 상태에서 목표 화합물의 -OH기와 HBD인 phenol이 염인 Et₄NCl과 경쟁하게 되면서 목표 화합물이 염과 공유되어 추출된 것으로 보인다.

3-4. DES의 농도 효과

DES의 농도 선택 또한 매우 중요한 요소 중 하나이다. DES를 추출 용매로써 사용 하기도 하지만 점도가 높기 때문에 적량의 용매를 첨가하여 추출 효율을 높인다. Bi *et al.*의 기존 실험에서는 DES를 추출 용매로 사용하여 물을 첨가하여 플라보노이드를 추출하였다. 물의 양이 많아지면 강한 수소결합을 하기 때문에 목표 화합물과 DES 간의 상호 작용을 방해하기 때문에 추출 수율이 낮아진다 [19]. 이러한 이유로 본 실험에서는 물보다 극성이 비교적 낮은 methanol을 사용하여 실험을 진행하였다. 또한 본 실험에서는 DES가 주 추출용매가 아니라 추출 첨가제로써 사용했기 때문에 상온에서 고체상인 ILs과 DES의 특성을 감안하여 질량 (g)을 측정하여 첨가하였다. Fig. 3에서 보여 주는 것 같이 DES의 농도가 증가하면 추출 수율이 증가하는 것을 볼 수 있다. 그러나 일정이상의 DES가 첨가되면 오히려 추

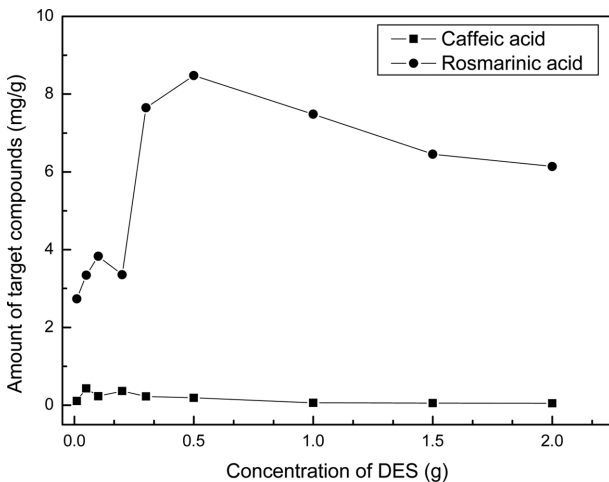


Fig. 3. Effect of concentration of DESs (Extraction method: Dipping, extraction solvent: methanol, time: 30 min, extract: *Zostera marina* root, solid/liquid ratio: 0.05 g/5 ml, addition agent: DES-3).

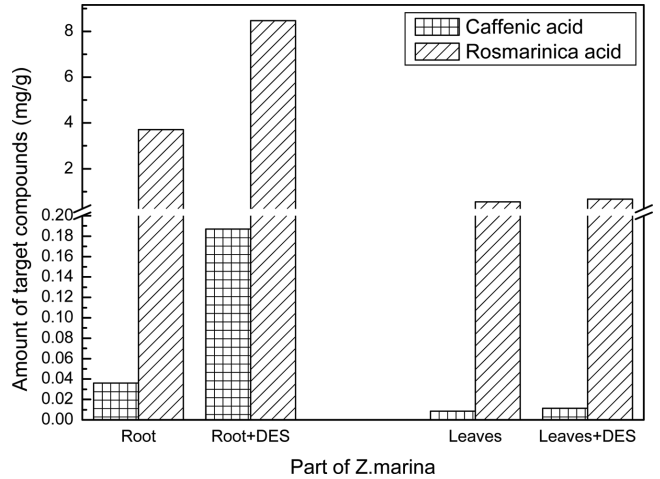


Fig. 4. Comparison of caffeic acid and rosmarinic acid cotents according to root and leaves in *Z. marina* (Extraction method: Dipping, extraction solvent: methanol, time: 30 min, extract: *Zostera marina* root and leaves, solid/liquid ratio: 0.05 g/5 ml, addition agent: DES-3, DESs concentration: 0.5 g).

출 수율이 감소된다. 본 실험에서는 0.5 g의 DES를 첨가하였을 때 카페인산은 0.19 mg/g 그리고 로즈마린산은 8.48 mg/g을 추출할 수 있었다. DES의 양이 일정 이상 증가할 경우 점도가 증가하기 때문에 목표 화합물과 DES의 상호작용을 방해할 수 있기 때문이라 보인다.

3-5. 잘피의 잎과 뿌리의 차이

잘피는 잎과 뿌리로 나누어 동결 건조하여 각각을 따로 추출하여 분석하였다. DES를 첨가하지 않고 methanol만을 사용하여 추출할 경우 잎과 뿌리에서 카페인산과 로즈마린산 모두 추출되었다. 하지만 뿌리가 잎보다 4~5배 많은 카페인산과 6~7배 많은 로즈마린산을 함유하고 있었다. DES를 첨가하여 추출할 경우 카페인산과 로즈마린산은 잎보다 뿌리에서 10배 이상의 차이를 보였다. Fig. 4에서 잘피의 잎과 뿌리에서의 함량 차이를 볼 수 있다. 그러므로 본 실험에서는 뿌리를 사용하여 실험을 진행하였다.

4. 결 론

이온성 액체와 DES를 사용하여 잘피에 존재하는 카페인산과 로즈마린산을 추출하는 것은 추출 수율을 높이는 데 있어서 유용하다. 본 실험에서는 이온성 액체와 DES를 추출 첨가물로 사용하여 추출하였고 서로 비교하였다. 뿐만 아니라 잘피의 뿌리부분과 잎 부분을 각각 추출하여 비교 분석하였다. 카페인산과 로즈마린산의 추출 조건은 dipping 방법으로 0.05 g의 잘피 파우더와 5 mL의 methanol을 혼합하여 사용하여 추출하였다. 잘피의 뿌리와 잎을 사용하여 추출하였을 때 뿌리가 잎보다 4~5배 많은 카페인산과 6~7배 많은 로즈마린산을 함유하고 있었다. DES를 첨가하지 않고 methanol에서 추출했을 때 카페인산은 0.08 mg/g 로즈마린산은 3.57 mg/g만큼 추출되었고 DES를 첨가하여 추출하였을 때 카페인산은 0.19 mg/g 그리고 로즈마린산은 8.48 mg/g 추출 수율을 보였다. 그러므로 잘피 뿌리부분을 이용해 methanol을 용매로 사용하여 DES를 일정량 첨가해 dipping 방법으로 30분간 추출하였을 때, 추출 수율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 2014년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 고순도 분리 연구실에서 수행되었습니다(경기씨그라프트 사업). 본 논문은 배성열 교수님 정년을 기념하여 투고되었습니다.

References

- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L. and Porter, N. L., "Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation," *Anal. Chem.*, **68**, 1033-1039(1996).
- Oh, S., Kang, J. W., Park, B. H. and Kim, K. S., "Physical and Thermodynamic Properties of Imidazolium Ionic Liquid," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **50**, 708-712(2012).
- Yinzhe, J. and Row, K. H., "Adsorption Isotherm of Ibuprofen on Molecular Imprinted Polymer," *Korean J. Chem. Eng.*, **22**, 264-267 (2005).
- Reiter, J., Jiří Vondřák, Jiří Michálek and Zdeněk Mička, "Ternary Polymer Electrolytes with 1-methylimidazole Based Ionic Liquids and Aprotic Solvents," *Electrochim. Acta.*, **52**, 1398-1408(2006).
- Deetlefs, M. and Seddon, K. R., "Assessing the Greenness of Some Typical Laboratory Ionic Liquid Preparations," *Green. Chem.*, **12**, 17-30(2010).
- Romero, A., Santos, A., Tojo, J. and Rodríguez, A., "Toxicity and Biodegradability of Imidazolium Ionic Liquids," *J. Hazard. Mater.*, **151**, 268-273(2008).
- Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S. and Jérôme, F., "Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications," *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 7108-7146(2012).
- Abbott, A. P., Ttaib, K. E., Ryder, K. S. and Smith, E. L., "Electrodeposition of Nickel Using Eutectic Based Ionic Liquids," *Trans. Inst. Metal Finish.*, **8**, 234-240 (2008).
- Bi, W., Tian, M. and Row, K. H., "Evaluation of Alcohol-based Deep Eutectic Solvent in Extraction and Determination of Flavonoids with Response Surface Methodology Optimization," *J. Chromatogr. A.*, **1285**, 22-30(2013).
- Achamlale, S., Rezzonico, B. and Grignon-Dubois, M., "Rosmarinic acid from Beach Waste: Isolation and HPLC Quantification in *Zostera Detritus* from Arcachon Lagoon," *Food Chem.*, **113**, 878-883(2009).
- Jung, M. E., Hong, J. W., Lee, J. I., Kong, C. S., Chang, J. S. and Seo, Y., "Inhibitory Effect of *Zostera japonica* on Growth of Human Cancer Cells," *Ocean and Polar Research.*, **34**, 385-394 (2012).
- Pilavtepe, M., Yucel, M., Helvaci, S. S., Demircioglu, M. and Yesil-Celiktas, O., "Optimization and Mathematical Modeling of Mass Transfer Between *Zostera marina* Residues and Supercritical CO₂ Modified with Ethanol," *J. Supercrit. Fluids.*, **68**, 87-93(2012).
- Ye, J. C., Hsiao, M. W., Hsieh, C. H., Wu, W. C., Hung, Y. C. and Chang, W. C., "Analysis of Caffeic Acid Extraction From *Ocimum gratissimum* Linn. by High Performance Liquid Chromatography and its Effects on a Cervical Cancer Cell Line," *Taiwanese J. Obstetrics and Gynecology.*, **49**, 266-271(2010).
- Kim, S., Yun, E. J., Bak, J. S., Lee, H. J., Lee, S. J., Kim, C. T., Lee, J. H. and Kim, K. H., "Response Surface Optimised Extraction and Chromatographic Purification of Rosmarinic Acid from *Melissa Officinalis* Leaves," *Food Chem.*, **121**, 521-526(2010).
- Peev, G., Penchev, P., Peshev, D. and Angelov, G., "Solvent Extraction of Rosmarinic Acid from Lemon Balm and Concentration of Extracts by Nanofiltration: Effect of Plant Pre-treatment by Supercritical Carbon Dioxide," *Chem. Eng. Res. Des.*, **89**, 2236-2243(2011).
- Fredlake, C. P., Crosthwaith, J. M., Hert, D. G., Aki, S. N. V. K. and Brennecke, J. F., "Thermophysical Properties of Imidazolium-Based Ionic Liquid," *J. Chem. Eng. Data.*, **49**, 954-964(2004).
- Marciniak, A., "Influence of Cation and Anion Structure of the Ionic Liquid on Extraction Processes Based on Activity Coefficients at Infinite Dilution. A Review," *Fluid Phase Equilib.*, **294**, 213-233(2010).
- Ma, W., Lu, Y., Hu, R., Chen, J., Zhang, Z. and Pan, Y., "Application of Ionic Liquids Based Microwave-assisted Extraction of Three Alkaloids N-nornuciferine, O-nornuciferine, and Nuciferine from Lotus Leaf," *Talanta.*, **80**, 1292-1297(2010).
- Bi, W., Tian, M. and Row, K. H., "Evaluation of Alcohol-based Deep Eutectic Solvent in Extraction and Determination of Flavonoids with Response Surface Methodology Optimization," *J. Chromatogr. A.*, **1285**, 22-30(2013).