두충의 건조법별 지표성분 및 항염증 활성 비교

도호정 · 이진호* · 하인혁* · 정화진* · 이재웅* · 김민정* · 김은지* · 이인희*
자생한방병원 한방재활의학과, 자생의료재단 척추관절연구소*

Comparison of Index Compound Content and Anti-inflammatory Activity of *Eucommiae Cortex* by Various Drying Methods

Ho-Jeong Do, K.M.D., Jin-Ho Lee, K.M.D.*, In-Hyuk Ha, K.M.D.*, Hwa-Jin Chung, Ph.D.*,
Jae-Woong Lee, M.S.*, Min-Jeong Kim, B.S.*, Eun-Jee Kim, M.S.*, In-Hee Lee, Ph.D.*

Department of Korean Medicine Rehabilitation, Jaseng Korean Medicine Hospital, Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation*

Objectives *Eucommiae cortex* is one of the frequently used herbs for musculoskeletal disorders, with well-known anti-inflammatory effect. Meanwhile, powdered form of herbal drugs is more advantageous than decoction form, in that storing and taking is more convenient. Thus, the authors aimed to investigate whether the drying method affects the index compound level and anti-inflammatory effect of *eucommiae cortex* water extract.

Methods *Eucommiae cortex* was extracted in distilled water at 100°C for 3 hours, filtered, and then evaporated under vacuum. One half of the sample was freeze-dried at -80°C. Another half of the sample was added with dextrin and then spray-dried at 180°C. To assess the possible change in index compound content, pinorelinol diglucoside was selected as the index marker. The content level of the index compound in various extract sample was quantified through high performance liquid chromatography. In addition, iNOS assay in LPS-induced RAW 264.7 cells was adopted to determine the anti-inflammatory effect of various extract samples. Furthermore, MTT assay was performed to confirm that the result of iNOS assay was not due to cytotoxicity.

Results There was no significance difference in index compound content between extract samples obtained through two different drying methods. Anti-inflammatory activity of extract samples were similar at the matching concentration, regardless of the drying methods. Extract samples did not show any significant cytotoxicity.

Conclusions Extract samples of *eucommiae cortex* were obtained through freeze-drying and spray-drying. Neither change in index compound content nor difference in anti-inflammatory activity was observed between drying methods. (J Korean Med Rehabil 2017;27(1):19-25)

Key words *Eucommiae cortex*, Pinorelinol diglucoside, Freeze-drying, Spray-drying, Anti-inflammatory

RECEIVED December 20, 2016
ACCEPTED January 3, 2017

CORRESPONDING TO
In-Hee Lee, Jaseng Spine and Joint
Research Institute, Jaseng Medical
Foundation, 858 Eonju-ro,
Gangnam-gu, Seoul 06017, Korea

TEL (02) 3218-2250
FAX (02) 3218-2244
E-mail ini3355@jaseng.co.kr

Copyright © 2017 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

서론»»»»

한약은 한방치료 수단 중 하나로 변증, 약제의 선택, 처방구성 등의 과정을 통해 처방된다. 통계청 자료에 따

르면 탕약 및 한약제제를 활용한 한약치료가 한방치료에 차지하는 비율은 32.5%로 나타나 한약이 한방치료에서 상당부분을 차지하고 있음을 알 수 있다¹⁾. 한편, 한약 중 탕제의 경우 제조과정의 표준화 및 균일화가 힘들다는

점, 약효의 재현성 확보가 어려운 점, 보관 및 저장으로 인한 치료의 질적 저하가 초래될 우려가 있다는 점 등의 이유로 문제가 되고 있다²⁾.

한약의 제형은 과학기술의 발전과 함께 새로운 제제 및 포장 재료의 도입, 품질 및 공정관리의 발달, 의료의 진보 및 사회의 변화를 통해 종류의 다양화, 효과의 극대화, 그리고 복용의 편리성을 높이는 방향으로 나아가고 있다³⁾. 또한 한방의료기관에 내원한 환자 217명을 대상으로 한 한방제형에 대한 설문조사에서 정제나 캡셀제 등 복용이나 휴대가 편리한 제형의 선호도가 45.1%로 나타나 복용이 편리한 한약 제형에 대한 소비자들의 요구가 높음을 알 수 있다⁴⁾.

복용이나 소지가 간편한 한방제형인 과립제나 정제, 캡셀제 등을 사용하기 위해서 기존 탕약 처방에 따라 배합한 약재를 기존 조제과정과 동일한 공정을 거쳐 여액(濾液)을 추출한 뒤 이를 건조시켜서 만든 엑스분말을 원료로 이용한다. 이렇게 한약재를 추출하여 건조하여 보관하는 방법은 오염을 방지하는 효과가 있어 한약을 장기간 보존하고자 할 때 쓰인다.

두충(*Eucommia Cortex*)은 식물분류학상 두충과(*Eucommiaceae*)에 속하는 낙엽교목인 *Eucommia ulmoides* Olive의 껍질을 건조시킨 것이다. 한의학적 관점으로 그 氣味는 辛溫無毒하고 神農本草經에서 不老長壽, 輕身益氣의 효과가 있다고 밝히고 있고 本草綱目에서는 腎과 肝에 작용하여 肝腎을 윤택하고 강하게 하며 허리, 무릎 통증을 치료하고 正氣를 보태고 筋骨을 튼튼하게 하고 잔노를 없애며 몸을 가볍게 하고 노화를 방지한다고 하였다^{5,6)}.

최근에는 다양한 연구를 통해 두충의 약리적인 효과에 대해서도 밝혀지고 있다. 두충은 혈압강하, 심장수축력 억제, 혈관확장, 축동 작용 뿐만 아니라 이뇨, 이담 작용, 혈당강하, 피로해소 작용, 진통소염 작용, 단백질 합성 및 지질대사 촉진 작용이 있고 류마티스 및 신경통 치료효과가 있는 것으로 나타났고⁷⁻¹¹⁾ 항돌연변이 효과도 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

이에 본 연구에서는 한방에서 널리 사용되는 두충을 활용하여 두충 물 추출물에 대하여 건조법을 달리하였을 때, 지표성분의 변화가 있는지 확인하고 항염증의 지표가 되는 iNOS assay를 통하여 생리활성의 차이를 비교하고자 하였다.

재료 및 방법»»»»

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 두충은 그린명품제약(남양주, 한국) 자체적으로 감별위원회를 거쳐 검증된 것을 제공받아 사용하였다.

2. 기기 및 시약

지표물질의 정량분석 실험에 사용된 HPLC는 Shimadzu Co. (Kyoto, Japan)의 LC-20AD, SIL-20AC, CBM-20A, SPD-20A, CTO-20AC를 사용하였으며, HPLC 용매인 Acetonitrile (ACN)과 증류수는 J.T.Baker Co. (Phillipsburg, USA)의 제품을 사용하였다. 두충의 지표물질인 Pinorensinol diglucoside의 순도는 98.00%였으며 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. iNOS assay 측정을 위한 micro plate reader는 Tecan Co. (Chapel Hill, USA)의 Sunrise 모델을 사용하였고, 세포배양에 사용된 DMEM, fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic은 Gibco Co. (Waltham, USA)의 제품을 사용하였다. 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약과 Lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, USA)의 제품을 사용하였다.

3. 통계

모든 실험은 3회 이상 반복하였고 실험값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0) program을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test로 분석하였다.

4. 두충의 추출

두충 200 g을 2 L의 증류수로 100°C에서 3시간 동안 추출한 후 pore size 1 μ m 필터로 여과하였다. 여과 후 감압농축하여 15 brix로 보정하고 남은 용액을 반씩 나누어 절반은 -80°C의 deep freezer (일신바이오베이스, 한

국)로 동결건조하였으며, 나머지 절반은 분무건조를 위한 dextrin을 50% 첨가한 후 180°C로 분무건조하였다 (EYELA, Japan). 각각의 방법으로 건조 후 분말의 무게를 측정하여 수율을 계산하였다.

5. 지표성분 함량분석

두충의 지표물질인 pinoresinol diglucoside는 대한약전의 두충정량법으로 분석하였다. C18 (4.6×250 mm, 5 μ m, Agilent)컬럼을 사용하였고, 컬럼온도는 35°C, 검출기는 UV 230 nm, 이동상으로는 0.1% formic acid의 물 (A)과 acetonitrile(B)을 사용하여 gradient profile로 최초 5% B로 시작하여 8~15 min까지 20% B, 30~35 min까지 5% B로 하였고 유속은 1 ml/min을 사용하였다.

6. 산화질소(NO)의 측정

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주은행(No.40071, 서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco, Waltham, USA) 과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, Waltham, USA) 이 함유된 DMEM (Gibco, Waltham, USA)을 사용하였다. 37°C와 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. RAW 264.7세포가 LPS에 의해 활성화되면 산화질소(NO)를 생성하고 생성된 산화질소는 세포배양 배지에서 NO₂의 형태로 존재한다. 그 양을 griess 시약과의 반응을 통해 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^6 cell/ml의 농도로 분주하고 37°C와 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 1 μ g/ml LPS로 자극시킨 후 각각의 건조된 두충 물추출 분말(800, 400, 200, 100, 50 μ g/ml)로 처리한 후 24시간동안 배양하였다. 상층액을 옮겨 담고 griess reagent (0.1%N-(1-naphthyl) ethylene diamide dihydrochloride, 과 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) 을 동량 첨가한 후 540 nm의 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. NO₂의 농도는 sodium nitrite의 표준곡선에 대입하여 계산하였다.

7. 세포생존율 측정

Griess 활성시험 후, 각 well에 MTT solution (final

500 g/ml) 을 첨가하고 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배지 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan을 용해시켰다. 570 nm에서 흡광도를 측정하였고 control group (LPS+)과 비교하여 세포생존율(%)을 측정하였다.

결과»»»»

1. 지표성분 함량분석

동결건조와 분무건조의 건조법별로 유효성분의 변화를 확인하기 위하여 두충의 지표성분인 pinoresinol diglucoside의 표준품을 농도별로 분석하여 표준곡선을 그린 후 각각의 샘플을 분석하여 대응하는 함량으로 정량하였다. 표준곡선의 R₂값은 1로 매우 정확한 직선을 형성하였다 (Fig. 1A, B). 이때의 기울기와 편차에 대입하여 계산한 결과, pinoresinol diglucoside의 함량은 동결건조 분말 1 g에 27.51 mg, 분무건조 분말 1 g에는 13.89 mg이었다 (Fig. 1C).

2. 산화질소의 측정

건조법에 따른 두충 물추출물의 생리활성을 비교하기 위하여 iNOS assay를 진행하였다. 분무건조의 경우 50%의 dextrin을 첨가하기 때문에 활성 비교시 두 배의 농도를 사용하였다. 동결건조는 400, 200, 100, 50 μ g/ml의 농도로 처리하였으며, 분무건조는 800, 400, 200, 100 μ g/ml의 농도를 처리하였다. NaNO₂를 이용하여 본 실험의 표준곡선을 그린 결과 R₂값은 0.9999로 유효한 직선을 형성하였다. 이때의 기울기 값과 표준편차에 대입하여 계산한 결과, 형성된 산화질소의 함량은 blank로 사용한 RAW 264.7 세포만 배양한 군은 0.177 ± 0.138 μ m, 대조군으로 blank에 LPS를 1 μ g/ml 처리한 군은 38.104 ± 0.918 μ m, 두충 물추출물 동결건조 분말을 400, 200, 100, 50 μ g/ml 처리한 군은 각각 15.155 ± 0.473 , 23.356 ± 0.200 , 32.333 ± 0.936 , 33.564 ± 1.531 μ m이었으며 분무건조 분말을 800, 400, 200, 100, 50 μ g/ml 처리한 군은 각각 15.061 ± 0.200 , 23.527 ± 0.798 , 32.826 ± 0.988 , 36.027 ± 1.270 μ m의 값을 형성하였다(Fig. 2A, B).

Fig. 1. HPLC analysis of pinoresinol diglucoside amount in *eucommiae cortex* samples from different drying methods. (A) Chromatogram of pinoresinol diglucoside standard at various concentrations (500, 100, 50, 10, 5, 1 μ g/ml). (B) Standard curve of pinoresinol diglucoside. (C) Chromatogram of *eucommiae cortex* samples from different drying methods; 10 μ l of spray-dried samples and 5 μ l of freeze-dried samples were injected to be analyzed.

Fig. 2. Quantification of anti-inflammatory effect of *eucommiae cortex* samples from different drying methods. (A) Standard curve of NaNO_2 . (B) iNOS assay of *eucommiae cortex* samples from different drying methods; in order to compare the effect of equivalent mass of *eucommiae cortex*, the concentration of final sample was adjusted accordingly. *p < 0.001, †p < 0.05, ‡p > 0.05 (=insignificant).

Fig. 3. Cytotoxicity assay of *eucommiae cortex* samples from different drying methods. Cell viability >85% was regarded as no significant cytotoxicity.

3. 세포생존율

산화질소를 측정된 실험에서 사용된 두층 물추출 건조 분말의 독성에 의한 것이 아닌 항염증 효능임을 입증하기

위하여 MTT assay를 진행하였다. 아무것도 처리하지 않은 blank를 100% 생존한 것으로 하였을 때 모든 실험결과치는 85% 이상으로 유의적인 독성이 없었음을 확인하였다(Fig. 3).

고찰»»»

최근 한약에 대한 수요가 지속적으로 증가하고 이에 따라 한약의 효능과 안전성, 안정성과 관련된 연구들이 요구되고 있는 상황이다¹³⁾.

다양한 물질들이 액상 형태로 추출된 탕약은 한약의 제형 중 가장 많이 사용되고 있으나 시간의 흐름에 따라 그 품질이 변하고 빛, 산소, 수분 등 여러 요인에 의해 영향을 받는다. 그 중 온도는 탕약의 품질변화에 가장 큰 요인으로 작용한다고 알려져 있다^{14,15)}.

하지만 모든 탕약에 이러한 내용을 일반화하기에는 과학적 근거가 부족한 상황이며 효능이나 안정성이 어떤 조건에서 얼마의 기간 동안 유지되는지에 대해서는 관련 연구가 부족한 실정이므로 한약제제의 종류에 따른 보관기간 및 유통기한 설정 등 다양한 연구와 그에 따른 평가방법을 모색하는 것이 필요하다^{16,17)}.

이에 본 연구에서는 탕약에 비해 저장과 복용이 편리하다고 알려진 엑스분말에 있어서 제조공법 중 분무건조법과 동결건조법을 적용하였을 때 지표성분 함량변화 및 생리활성 변화가 나타나는지를 살펴보고자 하였다.

추출물 등을 건조하는 방법은 열풍건조, 분무건조, 드럼건조, 동결건조 등 다양한 방법이 있다¹⁸⁾. 이 중 산업적으로는 분무건조와 동결건조가 가장 많이 사용되어 왔다. 분무건조는 산업적 건조법 중 가장 오래된 방법이며 경제적이란 장점을 가지고 있다¹⁹⁾. 물 추출된 용액이 분무시스템으로부터 미립화되어 면적이 증대되면서 약 180°C 정도의 열풍공기와 접촉으로 빠르게 증발되어 미세캡슐을 형성시키는 분무건조는 다른 건조방식에 비해 용해성, 유동성이 좋으며 미립화에서 분말제품에 이르기까지 하나의 공정으로 이루어지므로 식품, 의약품 등 다양한 응용이 가능하다^{20,21)}. 그러나 공정에 이용되는 180°C 정도의 고온과 급속건조로 인하여 성분이 변성될 수 있다는 단점을 가지고 있다²⁰⁾. 동결건조는 영하의 온도에서 승화를 통해 건조가 진행되기 때문에 성분의 변성 면에서 가

장 선호되는 방법이다²²⁾. 건조 전 특성을 잘 보존하며 건조물의 재수화율이 높은 반면²³⁾, 공정에서 에너지 소모가 높으며 시간이 오래 걸리는 단점을 가지고 있다^{24,25)}.

이와 같은 장단점이 있는 두 가지 건조법을 적용하여 두충을 추출하고 건조하였을 때, 건조법별 지표성분 및 활성의 차이를 보기 위하여 본 연구를 진행하였다. 결과적으로 두충은 온도가 올라가지 않는 동결건조와 고온의 건조과정이 포함되는 분무건조에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 두충에 함유되어 있는 유효성분으로는 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, pinorensin diglucoside, lirioidendrin, genipin 등이 있다²⁶⁾. 이중 대 한약전에 등재되어 있는 pinorensin diglucoside를 지표물질로 설정하였는데 pinorensin diglucoside는 온도와 시간이 증가하면 함량이 감소한다는 보고도 있었지만²⁷⁾, 반면 반대의 결과를 보인 보고도 있었다^{28,29)}. 본 연구에서도 고온의 처리과정을 보이는 분무건조방식을 사용하여도 함량에 유의한 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 항염증 활성을 통하여 비교한 생리활성면에서도 p-value를 0.05로 하였을 때 동결건조 50 µg/ml과 분무건조 100 µg/ml 사이에는 유의한 차이를 보였으나, 그 밖의 농도에서는 모두 유의한 차이를 보이지 않아 활성면에서도 유의한 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

두충의 효과는 실험적 연구를 통해서도 많이 밝혀진 바 있다. 두충이 뼈의 흡수 및 손실방지, 난소절제에 따른 배뇨량 증가의 방지 효과가 있고 골신생에 유의한 효과가 있을 뿐만 아니라^{30,31)}, 골모세포 증식의 촉진, 파골세포 증식의 억제의 효과가 있고³²⁾ 난소를 적출한 흰쥐를 대상으로 한 실험에서 두충의 투여가 골조직 형태에 유의한 변화를 초래한 것으로 나타났다³³⁾.

또한 콜라겐 합성의 촉진³⁴⁾, 면역기능 증가³⁵⁾, 혈청 지질함량 감소³⁶⁾, 뇌조직 및 혈장 내 catecholamine 함량 저하에 대해서 보고된바 있고²⁸⁾ 암세포의 증식을 저해하는 것으로 나타났다³⁷⁾. 이외에 두충은 신경절단에 의한 근육위축시 탈신경지배를 통한 근육 무게와 근섬유 굵기의 감소를 억제하는 것으로 알려져 있다³⁸⁾.

향후 연구에서는 pinorensin diglucoside 이외의 지표물질도 다양한 건조법에서 효능과 안정성이 유지되는지 확인할 필요가 있으며, 두충 이외의 다양한 한약재를 이용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론»»»»

두충 물추출물의 동결건조와 분무건조에서 지표성분인 pinoresinol diglucoside의 함량에 차이가 없었으며 항염증 작용을 통해 살펴본 생리활성에 있어서도 큰 차이를 보이지 않았다. 동결건조나 분무건조 등의 건조법을 이용한 한약 제형의 개발은 한방은 물론이거니와 식품 및 제약업 등 다양한 분야에서 활용할 수 있을 것이다.

References»»»»

- Choi H, Choi J, Lee CH. The chart of herbal medicine in Korean, 1st ed, Paju:Jipmoondang, 2010:191-2.
- Jeong YS, Moon BK, Nam HW, Park JS, Eum SY, Choe BM. The Survey on Using Alternative Medicine in General Population with Medical Problems : A Pilot Study. Korean J Psychosomatic Medicine. 1998;6(1):70-8.
- Research institute of east oriental medicine. Introduction to east oriental medicine. Seoul:Rao-gang, 1994:333.
- Choi HJ, Bang NY, Song BW, Kim NJ, Ryu BH. Survey on the preference for the dosage forms of oriental herbal medicine. J Kyung Hee Univ Med Cent. 2004;20(1):356-67.
- Ahn DG. Mysterious treatment of eucommia ulmoides, Paju:Openbooks, 1993.
- Research institute of east oriental medicine. Herbology. Seoul:Ryo-gang, 1994.
- Chien TH. Pharmacological action of Eucommia ulmoides. Japanese Journal of Pharmacology. 1957;6(2):122-37.
- Kin KC, Ting KS. Studies on drugs for treatment of hypertension: II. Toxicity and experimental therapy of Eucommia ulmoides Oliv. Acta Physiologica Sinica. 1956;20:247-54.
- Au C, Yang CP, Luang CJ, Leu HJ. The diuretic and cardiovascular effects of cortex eucommiae. Bull Taipei Med Coll. 1986.
- Sih CJ, Ravikumar PR, Huang FC, Buckner C, Whitlock H. Isolation and synthesis of pinoresinol diglucoside a major antihypertensive principle of Tu-Chung(Eucommia ulmoides). Journal of the American Chemical Society. 1976;98(17):5412-5.
- Xu SL, Zeng QZ, Huang WG, Yin Q. Effects of Duzhong on plasma cAMP and cGMP levels in mice. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 1986;17:204.
- Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S. Antimutagenicity of Tochu tea(an aqueous of Eucomia ulmoides leaves): 1. The clastogen- suppressing effects of Tochu tea in CHO cell and mice. Mutation Research. 1997;388(1):7-20.
- Man SC, Durairajan SSK, Kum WF, Lu JH, Huang JD, Cheng CF, Chung V, Xu M, Li M. Systematic review on the efficacy and safety of herbal medicines for Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease. 2008;14(2):209-23.
- Park IH, Kim YH, Choi SH, Yu SN, Kim SH, Ahn SC, Cho SI, Lee I. Effect of Preservation Conditions on the Stability of Samul-tang Decoctions. Journal of Life Science. 2015;25(10):1124-31.
- Yoon SJ, Lee SI. Study of Jagyakgamchotang's effect change by time. J of Herbology. 1991;6(1):29-34.
- Jin SE, Kim OS, Seo CS, Shin HK, Jeong SJ. Comparative study on stability and efficacy of Banhasasim-tang decoction depending on the preservation temperature and period. Journal of Korean Medicine. 2016;37(1):21-33.
- Jin SE, Kim OS, Shin HK, Jeong SJ. Comparative Study on Biological Activities of Gwakhyanjeonggi-san Decoction According to the Preservation Periods. Journal of Korean Medicine. 2014;35(3):60-9.
- Tsami E, Krokida MK, Drouzas AE. Effect of drying method on the sorption characteristics of medel fruit powder. Journal of food engineering. 1998;38(4):381-92.
- Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Curr Issues Intest Microbiol. 2002;3(2):39-48.
- Cho YH, Shin DS, Park JY. Microencapsulation technology in food industry. Food Science and Industry. 1997;30:98-111.
- Sano Y. Gas flow behaviour in spray dryer. Drying Technol. 1993;11(4):697-718.
- Frank F. Freezing-drying of bioproducts; putting principles into practice. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 1997;45:221-9.
- Jafar F, Farid M. Analysis of Heat and Mass transfer in freeze drying. Drying technology. 2003;21(2):249-63.
- Hammami C, Rene F. Determination of freezing-drying process variables for strawberries. Journal of Food engineering. 1997;32(2):133-54.
- Erbay Z, Icier F. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. Journal of food engineering. 2009;91(4):533-41.
- Seo CS, Kim JH, Shin HK, Kim BS. Quantitative Determination of the Six Marker Compounds in Eucommiae Cortex by Processing Method. Korean Journal of Pharmacognosy. 2015;46(2):123-32.
- Chen XY, Luo LL, Ren GC, Qu GY, Dong LS. Determination of pinoresinol diglucoside in processed Eucommia ulmoides and crude Eucommia ulmoides. West China Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;23(5):592-3.
- Park SD, Kim GW. Experimental studies of Eucommiae

- Cortex according to processing. The Journal of Dong Guk Oriental Medicine. 1992;1(1):81-107.
29. Kim HK. Studies for standardization of processed herbal medicines(I). Seoul:Ministry of Food and Drug Safety. 2003;31-56.
30. Oh HS, Kim HC, Lee SI, Ahn DK. Effects of Eucommiae Cortex and Folium on the Ovariectomized Rat as the Model of Postmenopausal Osteoporosis. Journal of Herbology. 1995;10(1):59-68.
31. Lee JA, Noh SH, Ahn DK, Choi HY. Effects of the Eucommiae Cortex and Chanenomis Fructus on the Aged Ovariectomized Rat of Postmenopausal Osteoporosis. Journal of Herbology. 2001;16(1):201-6.
32. Ha HY, Ho JY, Shin SM, Kim HJ, Koo SJ, Kim IH, Kim CS. Effects of Eucommiae Cortex on osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition. Archives of Pharmacal Research. 2003;26(11):929-36.
33. Jang JB, Kim KJ, Choi GY, Cho JH, Park YK, Lee KS. The Effects of Eucommiae Cortex on Bone Histomorphologic Change in the Ovariectomized Rats. The Journal of oriental obstetrics and gynecology. 2003;16(4):1-14.
34. Li Y, Kamo S, Metori K, Koike K, Che QM, Takahashi S. The promoting effect of eucommiol from Eucommiae cortex on collagen synthesis. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2000;23(1):54-9.
35. Kim UJ, Kim SH. Effect of Eucommia Cortex and Eucommia Cortex Leaf on Immune Function. Journal of Herbology. 1994;9(1):99-113.
36. Lee CG, Lee BK. Effect of Eucommia Cortex and Eucommia Cortex Leaf on the Development of Experimental Hypercholesterolemia in the Rats. The Journal of East-West Medicines. 1987;12(2):17-31.
37. Kim JB, Park JR, Jeon JR, Cha MH. Isolation and Identification of Anticancer Compounds from Eucommia ulmoides Leaves. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2001;30(4):732-8.
38. Cho JH, Kim KS, Cha JD, Lee HS, Choi H, Jung HS, Sohn NW, Sohn YJ. Effect of Eucommiae Cortex on Hind Limb Muscle Atrophy of Sciatic Nerve Transected Rats. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(6):1454-61.