

HPLC-PDA를 이용한 정향(*Eugenia caryophyllata*) 중의 eugenol 분석법 확립 및 검증

윤형준 · 윤소미 · 이명현* · 손성완

국립수의과학검역원

(게재승인: 2008년 1월 30일)

Determination of eugenol in *Eugenia caryophyllata* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and method validation

Hyeong-Jun Yun, So-Mi Yun, Myoung-Heon Lee*, Seong-Wan Son

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

(Accepted: January 30, 2008)

Abstract : A method for the quantification of eugenol in the medicinal herb Clove was developed and validated. For preparation of sample solutions clove was dried at 60°C for 2h and ground by mixer and extracted with 95% ethanol for shaking extraction. The elutes were analyzed by HPLC system included a reversed phase column, a isocratic mobile phase of 60% methanol and PDA detector set at 280 nm. Calibration graphs were linear with very good correlation coefficients ($r^2 > 0.9999$) from 0.0125 ~ 1 µg/ml. The limit of detection per sample injection (20 µl) was 0.81 ng/µl and limit of quantification was 2.47 ng/µl. The method showed good intra-day precision (%RSD 0.08 ~ 0.27%) and inter-day precision (%RSD 0.32 ~ 1.19%).

Keywords : clove, eugenol, HPLC, validation

서 론

정향(*Syzygium aromaticum*, *Eugenia caryophyllata*)은 정향나무의 꽃봉오리로 열대 각지에서 재배되는 상록교목으로 짧은 막대기 모양이고 전체의 길이는 1 cm ~ 2 cm이다. 윗부분은 꽃으로 둘러 싸여 구형을 이루고 아래 부분은 약간 납작한 둥근 기둥모양의 꽃받침 층으로 이루어져 있다. 정향은 가장 널리 알려지고 사용되어지는 향신료 중에 하나로 서양에서는 일반적으로 향신료와 방부제로 사용한 반면에 동양에서는 정향 또는 정향의 추출물이 약으로도 사용되어져 왔다 [14, 26]. 최근 논문에서 정향은 항당뇨병 [21], 항염증(항산화 활성에 기인한) [20, 24], 혈관확장 효과 [4], 마취효과 [3, 9], 향

균성 [17, 25], 항진균 [6], 진드기 구제제 [11] 등의 다양한 약리활성을 가지고 있다고 밝혀졌다. 민간에서는 소화불량, 급만성 위장염, 구토, 설사 등의 복부질환, 암, 콜레라, 기침, 혼수, 심장병, 말꼭질, 치통 등에 사용한다.

강한 향을 가진 정향 기름은 정향의 꽃봉오리 또는 잎으로 만든 가루에서 증기증류법으로 얻을 수 있다. 정향기름의 주요 구성성분은 eugenol(2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol), eugenol acetate, β -caryophyllene 으로 효과를 나타내는 정확한 성분이 무엇인지는 밝혀지지 않았다. 그러나 최근 eugenol에 의한 다양한 약리활성 작용이 연구되어지고 있다 [18]. 또 다른 주요구성성분 중 하나인 β -caryophyllene은 최근연구에서 국소마취 활

*Corresponding author: Myoung-Heon Lee
National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1848, Fax: +82-31-467-1795, E-mail: leemh@nvrqs.go.kr]

성을 가지고 있다고 알려졌다 [14, 15].

Eugenol 은 정향기름의 화학적 구성성분이며 진통제 특성을 가지고 있어서 치과의술에서 사용되어져 왔다 [19]. 또한 항균효과 [12]와 항염효과 [22]가 있다는 것이 알려졌다. 무엇보다도 eugenol은 트롬복산의 생합성을 저해 [12]하는 것으로 밝혀졌고 neuroprotective [27], 항암, 항빈혈 [1], 항히스타민 [18], 항아나팔렉시스 [10] 등의 약리특성을 나타낸다. 또한 어류 [7, 23]와 개구리 [13]에서 마취효과와 무통각증 효과가 있다는 것이 증명되었다. 이 효과에 대한 eugenol의 정확한 기작에 대해서는 여전히 연구 중에 있다 [2].

이러한 천연물을 사용한 연구에서 식물은 지질학적 위치와 기후상태, 토양의 특성에 따라 추출물의 구성성분에 큰 차이가 있다. 특히 eugenol과 같은 oil 성분을 식물에서 추출하여 분석하는 경우 지리학적 요인, 기후 조건 등에 따라 원료성분 자체에서의 차이가 매우 크게 나타난다. 그러므로 신뢰할 수 있는 제품 생산을 위해서는 원료 단계에서부터의 품질관리가 매우 중요한데 이를 위해서는 신뢰성 있는 분석 방법이 매우 절실한 실정이다. 정향 품질평가와 관련하여 eugenol에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 주로 박층크로마토그래피, 가스크로마토그래피 등을 이용한 방법으로 식물에서 eugenol 성분을 추출하기 위해 sodium dodecyl sulfate를 이용한 전처리를 거치는 등 추출방법이 복잡하여 분석까지 장시간이 소요되었으며, micella electrokinetic capillary chromatography 등의 일반화되지 않은 장비를 이용한 연구들로 매 batch마다 분석을 시행해야 하는 동물용의약품 품질관리 기술로의 적용에는 제한적이었다. 이에 본 연구에서는 정향의 지표성분인 eugenol의 최적 추출방법 확립과 HPLC 이용한 정향의 빠르고 간단한 분석방법 설정 및 확립된 분석방법의 유효성검증을 시행하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 정향은 서울, 대구, 영천의 시장에서 판매되고 있는 것을 사용하였다. 모든 약제는 실험실에서 적정상태(어두운곳, 25°C)에서 보관하였다. 각 약제의 1kg을 상업용 분쇄기로 분쇄한 다음 850 µm 체로 거른 후 사용하였다.

시약 및 기기

측정에 사용한 HPLC는 Agilent HPLC system model HP-1100(Agilent, USA)을 사용하였으며 정향의 추출에 사용한 교반기는 shaking incubator(TITEK, Japan)을 사

용하였다. 표준품 eugenol(Sigma, USA)에서 구입하였으며, HPLC 분석 및 정향성분 추출에 사용된 용매는 HPLC 급 시약으로 methanol, acetone과 dichloromethane (J.T.Baker, USA), ethanol(Sigam, USA)에서 구입하여 사용하였다. 칼럼은 Lichrospher RP18(4.6 × 150 mm; 5 µm; Merck, USA), Zorbax SB8(4.6 × 150 mm; 5 µm; Agilent, USA), Purospher STAR RP18(4.6 × 150 mm; 5 µm; Merck, USA), Hypersil GOLD(4.6 × 50 mm; 3 µm; Thermo, USA), XTerra RP18(4.6 × 250 mm; 5 µm; Waters, USA)을 사용하였다. 증류수는 ELGA PURELAB Classic water system (ELGA, UK)을 사용하여 전기전도도 18.2 MΩ 이상을 사용하였다.

표준액의 조제

eugenol 표준품 100 µl를 정확히 취하고 100 ml volumetric flask에 넣고 HPLC급 methanol을 눈금까지 맞춰 1.0 µg/ml stock solution을 만들어 냉장 보관하였다. 준비된 stock solution을 methanol로 희석하여 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 µg/ml로 단계적으로 희석하여 검량용 표준 용액을 조제 하였다. 각각의 표준용액 20 µl를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하였다.

최적추출조건선정 및 시료준비

최적 추출 조건 선정을 위하여 여러 가지 실험적 요소에 변화를 주었다. 추출용매는 증류수, acetonitrile, methanol, ethanol, acetone 그리고 dichloromethane을 사용하였다. 최대 추출효율 시간을 정하기 위해 시간을 1, 2, 3, 4 그리고 5시간으로 변화를 주었다. 분쇄한 시료 (3g)를 각각의 용매 10ml에 넣고 각각의 시간동안 50°C에서 교반하여 추출하였다. 추출하는 동안 온도는 shaking incubator(TITEK, Japan)에 의해 일정하게 유지되었다. 교반하여 얻은 추출물은 0.45 µm syringe filter(28 mm; Gelman, USA)로 필터한 후 10 ml volumetric flask에 넣은 후 각각의 용매로 10 ml이 되도록 채웠다. 그 후 추출한 각각의 시료 500 µl를 취하여 10 ml volumetric flask에 넣은 후 HPLC급 메탄올로 눈금까지 채웠다. 이렇게 만든 시료를 0.2 µm syringe filter(13 mm; Gelman, USA)로 여과하여 각각의 시료를 20 µl씩 HPLC에 주입하여 분석하였다.

HPLC 분석 조건

최적 분석 조건 확립을 위해 XTerra RP18(4.6 × 250 mm; 5 µm; Waters, USA)등 총 5종의 칼럼을 테스트하여 분리도 및 해상도가 가장 우수한 XTerra RP18(4.6 ×

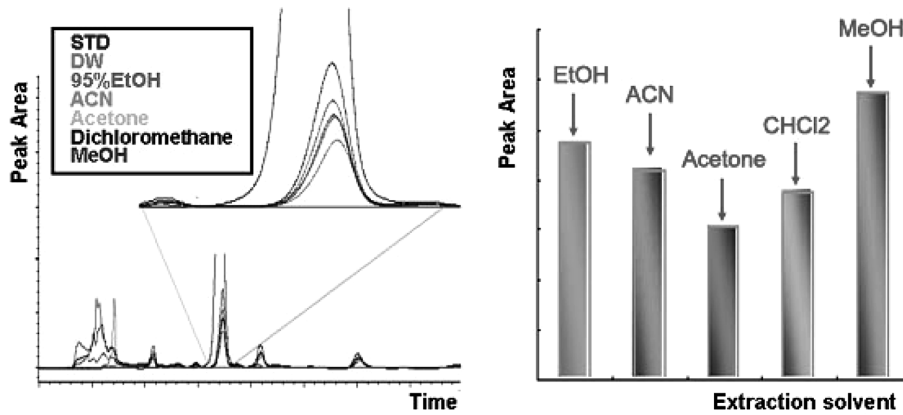


Fig. 1. Comparison of various solvents for eugenol extraction from clove.

250 mm; 5 μ m; Waters, USA) 칼럼을 선정하였고 이동상으로는 물/methanol(40/60,v/v)을 사용하였으며 검출기는 최대흡수파장인 UV 280 nm, 이동상의 속도는 0.8 ml/min, 분석시간은 15분이었다.

시스템 적합성

Eugenol 0.5 μ g/ml 농도를 사용하여 시스템 적합성 parameter(plate count, N, symmetry factor, S, tailing factor, Tf, selectivity, R)는 daily system 수행으로 평가하였다.

확립된 기기분석의 유효성 검증

분석방법의 특이성, 정밀도, 직선성, 정확도를 검증하였다. 직선성을 평가하기 위해 1 μ g/ml의 농도로 만들어 놓은 표준품 stock solution을 methanol에 희석하여 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μ g/ml 6단계로 희석하여 3반복 하여 직선성을 확인하였다. Eugenol의 정밀도를 결정하기 위해 0.25, 0.5, 1 μ g/ml 농도로 inter-day와 intra-day assay를 실행하였다. 정확도(%bias)는 계산값(C_{nom})과 측정값(C_{obs})를 통하여 다음과 같이 계산하였다. : $bias(\%) = [(C_{obs} - C_{nom}) / (C_{nom})] \times 100$. 상대표준편차(%RSD)는 C_{obs} 로부터 다음과 같이 계산하였다. : $\%RSD = [표준편차(SD) / C_{obs}] \times 100$. HPLC를 사용한 eugenol의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 ICH guideline [8] 의해 결정하였다.

결 과

최적추출용매 설정

최적추출용매를 선정하기 위해 물, acetonitrile, 95% ethanol, acetone, methanol, dichloromethane 등 다양한 용매를 사용하였다. 시료 3 g에 각각의 용매 10 ml을 넣어

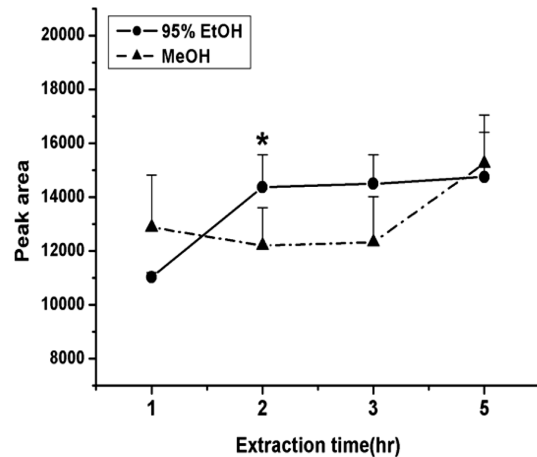


Fig. 2. Effect of time on the amount of eugenol extracted from clove.

서 50°C, 2시간 동안 교반하였다. 추출한 샘플은 0.45 μ m syringe filter(28 mm; Gelman, USA)로 여과하여 methanol을 사용하여 적절한 농도로 희석 후 HPLC 시스템에 주입하였다. 그 결과 methanol과 95% ethanol에서 높은 추출 효율을 보였다(Fig. 1). 이에 95% ethanol과 methanol을 사용하여 추출시간을 결정하였다.

최적추출시간 선정

methanol과 95% ethanol에서 최적 추출시간을 선정하기 위해 두 가지 용매를 사용하여 1~5시간 동안 추출을 하였다. 그 결과 95% 에탄올은 2시간 추출 시 최대추출 효율을 보였고 메탄올의 경우 4시간정도 추출해야 유사한 정도의 효율을 얻을 수 있었다(Fig. 2). 추출시간을 고려한 추출효율을 반영한 결과 95% 에탄올이 가장 적합하였다(Fig. 3).

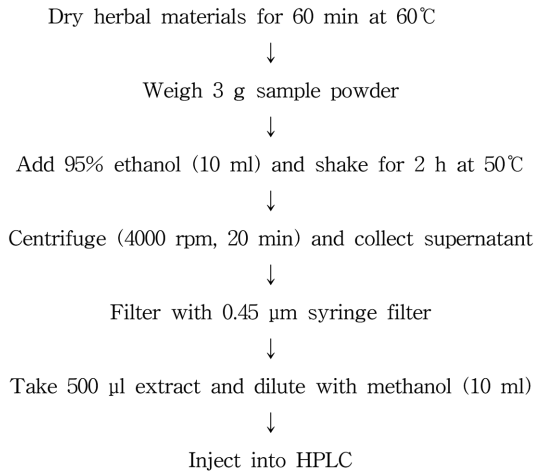


Fig. 3. Sample preparation scheme (modification of San Myint *et al.*(1995)'s procedure; [16]).

최적분석조건 확립

5종의 칼럼을 비교 테스트한 결과 가장 좋은 분리도 및 해상도를 나타낸 XTerra RP18(4.6×250 mm; 5 μm; Waters, USA)을 분석 칼럼으로 선정하였다(Fig. 4). 시료를 분석한 결과 8.5분대에서 표준품과 동일한 시간대에 peak이 확인되었고(Fig. 5) Spectrum을 비교한 결과 동일한 물질임을 확인할 수 있었다. 이동상 조건은 60% methanol, 최대 흡광도를 나타낸 UV 280 nm를 검사파장으로 하여 이동상 속도 0.8 ml/min으로 분석조건을 확립하였다.

시스템 적합성

확립된 기기분석법에 대해 시스템적합성 parameter (plate count, N, symmetry factor, S, tailing factor, Tf, selectivity, R)를 검증한 결과 모두 국제기준에 적합한 것으로 나타났다(Table 1).

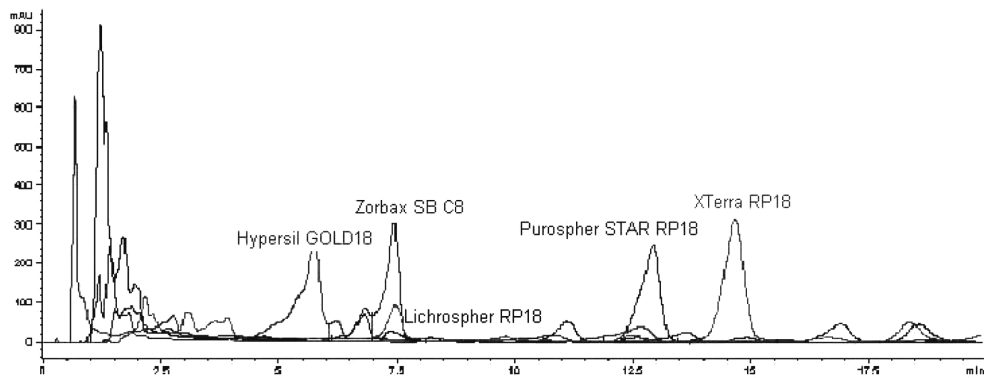


Fig. 4. HPLC profile of clove extract according to the various stationary phase.

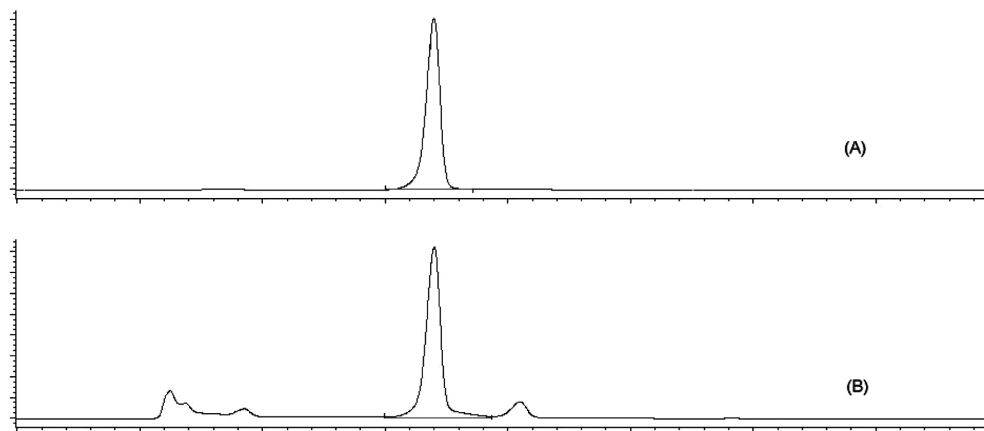


Fig. 5. HPLC chromatogram of the eugenol standard at 1 μg/ml (A) and the clove extract (B).

확립된 기기분석법의 유효성 검증

확립된 분석조건에서 표준품의 농도 0.0125~1 µg/ml 농도로 6개구간에서 표준곡선을 확인한 결과 우수한 직선성($r^2 > 0.9999$)을 나타내었다(Fig. 6). 샘플의 검출한계와 정량한계는 각각 0.81 ng/µl와 2.47 ng/µl로 매우 낮은 농도까지 분석이 가능 하였다(Table 2). intra-day와 inter-day assay를 통하여 분석방법의 정밀도를 확인한 결과 1.19% 이하 였다(Table 3). 시료에 표준품을 Low (0.075 µg/ml), Middle(0.15 µg/ml), High(0.3 µg/ml) 3개 농도로 spike 하여 회수율을 확인한 결과 평균 103.7%의 우수한 회수율을 나타내었으며 평균 %RSD값도 0.52%로 매우 우수하였다(Table 4).

고 찰

이 연구의 목적은 정향에서 eugenol의 최적추출방법과 분석법을 확립하고 검증하는데 있다. 그동안 GC를 이용한 정향의 추출법과 분석법만이 확립되어 있어서 정향의 품질관리에 있어 제한적이었던 바, 본 연구에서

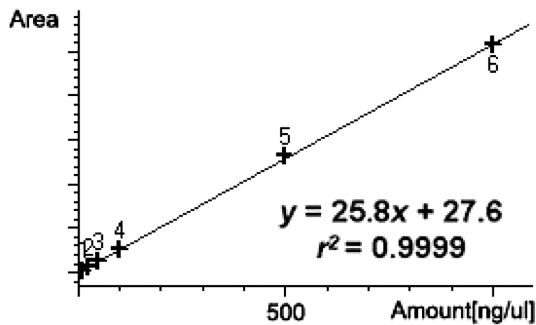


Fig. 6. Calibration curve for eugenol standards ($r^2 > 0.9999$).

는 HPLC를 이용한 정향중의 eugenol의 최적추출조건과 최적기기분석조건을 확립하고 확립된 분석방법에 대한 유효성을 검증 하였다.

1. 정향중의 eugenol의 최적 추출용매는 95% 에탄올 이었고 2시간 정도 추출 시 가장 우수한 추출 효율을 나타내었다.

2. HPLC를 이용한 정향중의 eugenol의 최적기기분석 조건은 XTerra RP18(4.6 × 250 mm; 5 µm; Waters, USA) 칼럼을 이용, 이동상은 60% 메탄올, 검출과장은 UV 280 nm에서 가장 우수한 분리능 및 해상도를 나타내었다.

3. 확립된 기기분석법에 대해 시스템 적합성 parameter를 조사한 결과 Plate count 5,164, Symmetry factor 1.1, Tailing factor 0.63, Resolution 4.43으로 국제기준인

Table 1. System suitability parameters and recommended reference

System Factor	Results	Reference (CDER* guideline)
Column	XTerra RP18	-
Plate count (N)	5,164	> 2,000
Symmetry factor (S)	1.1	< 2
Tailing factor (Tf)	0.63	< 2
Resolution (R)	4.43	> 2

*CDER : Center for Drug Evaluation & Research (FDA)

Table 2. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of eugenol in Clove[†]

Compound	LOD (ng/µl)*	LOQ (ng/µl)*
Eugenol	0.81	2.47

*LOD : $3.3 \times (\text{SD of the response} / \text{slope of the calibration curve})$.

LOQ : $10 \times (\text{SD of the response} / \text{slope of the calibration curve})$.

[†]Cited from ICH guideline [8].

Table 3. Precision of developed HPLC method

QC sample (ng/µl)	Intra-day studies (n = 6)		Inter-day studies (n = 30)	
	Measured amount (ng/µl)	RSD (%)	Measured amount (ng/µl)	RSD (%)
250	249 ± 0.20	0.08	251 ± 1.85	0.73
500	503 ± 1.36	0.27	495 ± 5.93	1.19
1000	998 ± 1.23	0.12	1001 ± 3.21	0.32

Table 4. Recovery of eugenol at the three calibration ranges

Compound	Low level	Mid level	High level	Recovery (%) mean SD ^b	RSD ^b , %
	SD ^a (RSD), %	SD ^a (RSD), %	SD ^a (RSD), %		
Eugenol	104.5 ± 1.13 (1.08)	103.8 ± 0.59 (0.57)	102.8 ± 1.66 (1.62)	103.7 ± 0.54	0.52

^an = 6, ^bn = 18.

CDER guideline에 적합하였다.

4. 확립된 기기분석법의 유효성을 검증한 결과 $r^2 > 0.9999$ 의 우수한 직선성을 나타내었고, 검출한계와 정량한계는 각각 0.81 ng/μl와 2.47 ng/μl로 아주 낮은 농도까지 분석이 가능하였으며, inter-day, intra-day precision 테스트 결과 1.19% 이하의 정밀도를 나타내었고, 세 개의 농도그룹(Low, Mid, High)에서 평균 103.7%의 우수한 회수율을 나타내었다. 이때 평균 %RSD 값은 0.52%로 매우 우수하였다.

위의 연구결과를 통해 정향의 최적추출법과 HPLC를 이용한 최적기기분석조건을 제시함에 따라 정향을 원료물질로 이용한 동물용 생약제제의 품질평가 시 정확하고 신뢰성 있는 품질평가 기법을 제공할 것으로 사료된다.

결 론

정향의 주요 구성성분인 eugenol에 대한 간단하고 빠른 HPLC 분석법을 확립하고 이를 국제기준(ICH guidelines [8])에 맞춰 검증함으로써 신뢰성 있는 분석법을 확립하였다.

참고문헌

1. **Atsusan T.** Clove oil or dehydroeugenol for controlling oxygen in the human body. Japan Kokai Tokyo Koho 1991, **227**, 6.
2. **Beaudry F, Guénette SA, Vachon P.** Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. Biomed Chromatogr 2006, **20**, 1216-1222.
3. **Cooke SJ, Suski CD, Ostrand KG, Tufts BL, Wahl DH.** Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture 2004, **239**, 509-529.
4. **Damiani CEN, Rossoni LV, Vassallo DV.** Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. Vascul Pharmacol 2003, **40**, 59-66.
5. **Ghelardini C, Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Bartolini A.** Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. Farmaco 2001, **56**, 387-389.
6. **Gowda NKS, Malathi V, Suganthi RU.** Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. Anim Feed Sci Technol 2004, **116**, 281-291.
7. **Hikasa Y, Takase K, Ogasawara T, Ogasawara S.** Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. Nippon Juigaku Zasshi 1986, **48**, 341-351.
8. **International Conference on Harmonisation (ICH).** Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). In: ICH Guidelines. ICH, Geneva, 2005.
9. **Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA.** The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S (TM) and Benzoak (R) as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. Aquaculture 2003, **221**, 549-566.
10. **Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR, Pital SS.** Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. Drug Dev Ind Pharm 2004, **30**, 195-203.
11. **Kim SI, Yi JH, Tak JH, Ahn YJ.** Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). Vet Parasitol 2004, **120**, 297-304.
12. **Laekeman GM, van Hoof L, Haemers A, Vanden Berghe AD, Herman AG, Vlietinck AJ.** Eugenol a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. Phytother Res 1990, **4**, 90-96.
13. **Lafortune M, Mitchell MA, Smith JA.** Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. J Herpe Med Surg 2001, **11**, 13-18.
14. **Leuschner RGK, Zamparini J.** Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. Food Control 2002, **13**, 399-404.
15. **Mandrioli R, Musenga A, Ferranti A, Lasaponara SS, Fanali S, Raggi MA.** Separation and analysis of the major constituents of cloves by micellar electrokinetic chromatography. J Sep Sci 2005, **28**, 966-972.
16. **Myint S, Daud WR, Mohamad AB, Kadhun AAH.** Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. J Chromatogr B Biomed Appl 1996, **679**, 193-195.
17. **Mytle N, Anderson GL, Doyle MP, Smith MA.** Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*)

- oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control* 2006, **17**, 102-107.
18. **Nishijima H, Uchida R, Kawakami N, Shimamura K, Kitamura K.** Role of endothelium and adventitia on eugenol-induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. *J Smooth Muscle Res* 1998, **34**, 123-137.
 19. **Ohkubo T, Shibata M.** The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res* 1997, **76**, 848-851.
 20. **Prasad NS, Raghavendra, R, Lokesh BR, Naidu KAKA.** Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004, **70**, 521-528.
 21. **Prasad RC, Herzog B, Boone B, Sims L, Waltner-Law M.** An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *J Ethnopharmacol* 2005, **96**, 295-301.
 22. **Reddy AC, Lokesh BR.** Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann Nutr Metab* 1994, **38**, 349-358.
 23. **Sladky KK, Swanson CR, Stoskopf MK, Loomis MR, Lewbart GA.** Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am J Vet Res* 2001, **62**, 337-342.
 24. **Srinivasan K.** Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Res Intern* 2005, **38**, 77-86.
 25. **Velluti A, Marin S, Gonzalez P, Ramos AJ, Sanchis V.** Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiol* 2004, **21**, 649-656.
 26. **Vrinda Menon K, Garg SR.** Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiol* 2001, **18**, 647-650.
 27. **Wie MB, Won MH, Lee KH, Shin JH, Lee JC, Suh HW, Song DK, Kim YH.** Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci Lett* 1997, **225**, 93-96.