J Appl Biol Chem (2014) 57(1), 47–51
http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2014.008

Online ISSN 2234-7941
Print ISSN 1976-0442

Original Article: Bioactive Materials

Antioxidant and Cytotoxic Activity of Compounds from the Stem of *Juncus effusus*

Ye Jin Kim · Chan Ik Park · Jae Sung Park · Eun Mi Ahn*

등심초로부터 분리된 화합물의 항산화 활성 및 암세포 성장 억제 효과

김예진 · 박찬익 · 박재성 · 안은미*

Received: 1 July 2013 / Accepted: 11 September 2013 / Published Online: 31 March 2014
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

Abstract The stems of *Juncus effusus* were extracted with 70% aqueous ethanol and the concentrated extract was partitioned with ethyl acetate, *n*-butanol and H_2O, successively. Two compounds were isolated from the ethyl acetate fraction through the repeated silica gel and Sephadex LH-20 column chromatographies. According to the results of physico-chemical and spectroscopic data including NMR and IR, the chemical structures of the compounds were determined as dehydroeffusol (**1**) and effusol (**2**). Dehydroeffusol and effusol exhibited potent scavenging activity for DPPH and ABTS radicals with the IC_{50} values as 130±3.21 and 79±1.53 μM in DPPH assay, and as 39±3.51 and 24±2.73 μM in ABTS assay, respectively. The compounds also significantly inhibited the proliferation of human cancer cell lines, AGS and A549.

Keywords cytotoxicity · dehydroeffusol · effusol · *Juncus effusus*· radical scavenging activity

Y. J. Kim
Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk Dong, 702-701 Daegu, Republic of Korea

C. I. Park
Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan-si, 712-220, Republic of Korea

J. S. Park
KT&G, Material Standardization Team, Innovative Technology Research Laboratory R&D, Pyong chon-dong, Daedeog-gu, Dajeon, 302-828, Republic of Korea

E. M. Ahn
Department of Foodceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan-si, 712-220, Republic of Korea

*Corresponding author (E. M. Ahn: ahnem@dhu.ac.kr)

서 론

서구화된 식생활과 환경오염 및 과도한 스트레스로 인한 인체 내의 산화촉진으로 생성된 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS)은 세포막 파괴, 효소 불활성화, 지질산화, DNA 변성, 그리고 세포노화 등과 같은 잠재적인 세포 손상을 초래하여 암을 비롯한 동맥경화, 자가면역 질환 등의 심각한 병리적 장애를 일으키는 원인이 된다고 보고되고 있다(Ames, 1983; Halliwell과 Aruona, 1991). 인체 내에서 선천적으로 세포나 조직의 손상을 방어하는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 등의 항산화효소(antioxidant enzyme)가 존재하지만 이러한 효소는 성인의 시점에서 점차 감소하여 체외에서의 섭취가 반드시 필요하다. 또한 노화와 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 인정됨에 따라 이를 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발 연구도 활발히 진행되고 있다(Rehman 등, 2004; Lee 등, 2008).

최근 식품산업 분야에서는 노화를 지연시키거나 체내 활성산소의 생성을 효과적으로 억제하는 항산화제를 식품으로 섭취하는 것에 관심이 높아지고 있으며, 합성 항산화제, 항암제등의 부작용이 심각하게 대두되면서 부작용이 없으며, 높은 생리활성을 가지는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행 중이다(Jeong 등, 2012; Jiang 등, 2013).

등심초(*Juncus effusus* L.)는 골풀의 고갱이 부위(골풀의 단단한 껍질을 제거한 연한 속)로 오래 전부터 민간에서 뿌리와 고갱이 부위가 약초로 사용되었고 한국과 중국의 생약 규격집에 등록된 한약재이며, 소염, 해열, 이뇨, 지혈 등의 약리 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Moon 등, 1975; Liang 등, 1999). 또한 골풀의 지상부위는 돗자리, 방석, 다다미 등을 만들 때 사용하였으나, 현재 인건비 문제로 재배 농가는 자취를 감추었고 전국 강가, 습지, 논 주변에서 야생적으로 자라고 있다(Choi, 2010). 본 연구에서는 등심초로부터 생리활성 물질을 분리하고 이들 화합물들의 생리활성을 탐구하여 새로운 천연물 소재로써

의 이용가치를 높이고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. 본 연구에 사용된 등심초(*Juncus effusus* L.)는 경동시장에서 구매하여 사용하였으며 표본시료는 대구한의대학교 천연소재분석실험실에 보관되어 있다.

시약 및 기기. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70~230 mesh, Merck, Germany)을 사용하였고, Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Sweden)을 사용하였다. Thin Layer Chromatography (TLC)는 Kiselgel 60 F_{254}와 DC Kieselgel 60 RP-18 F_{254S} (Merck, Germany)를 사용하였고, 실험에 사용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400 (Varian, USA)으로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin model 599B (Perkin Elmer, USA)로 측정하였다. Electro ionization/mass spectrometer (EI/MS)는 JMSAX 700 (JEOL, Japan)을 사용하여 측정하였고, 융점은 Fisher-Johns 융점 측정기(Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였다. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. Penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA, PBS는 Lonza (USA)을 사용하였고, fetal bovine serum (FBS)은 HyClon (USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

추출 및 분획. 건조하고 분쇄한 등심초 10 kg에 70% ethanol (EtOH, 18 L)을 첨가하여 실온에서 24시간 추출하였다. 추출물을 여과하고 남은 잔여물에 추출용매(70% EtOH)를 첨가하여 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압농축하여 EtOH 추출물을 얻었다. 얻어진 EtOH 추출물에 H_2O를 2 L 가한 후 ethyl acetate (2 L×3)로 분배 추출하였고, 다시 H_2O층을 *n*-butanol (2 L×3)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 ethyl acetate 분획물 (EtOAc, 26 g), *n*-butanol (10 g) 및 H_2O 분획을 얻었다.

EtOAc 분획물로부터 화합물의 분리. EtOAc 분획(26 g)으로부터 silica gel column chromatography (c.c.) (φ 5×15 cm, $CHCl_3$-MeOH=10:1→7:1→5:1, $CHCl_3$-MeOH-H_2O=65:35:10→6:4:1)를 실시하여 16개의 분획물(JEE-1–JEE-16)을 얻었다. 이 중에서 강한 UV흡수 및 10% H_2SO_4에서 발색되는 JEE-8 (2.2 g) 분획물에 대하여 silica gel c.c. (φ 5×14 cm, $CHCl_3$-MeOH=45:1→40:1→30:1→20:1→5:1→3:1)를 실시하여 12개의 분획물(JEE-8-1–JEE-8-12)을 얻었고, JEE-8-4 (668.9 mg)에 대하여 다시 silica gel c.c. (φ 5×12 cm, *n*-hexane-EtOAc=6:1→4:1→2:1)를 실시하여 8개의 분획물(JEE-8-4-1–JEE-8-4-8)을 얻었다. JEE-8-4-2 (227.8 mg)을 Sephadex LH-20을 통하여 화합물 **1** (20 mg, SiO_2 TLC Rf 0.5, *n*-hexane:EtOAc=1:2)]과 화합물 **2** (6.3 mg, SiO_2 TLC Rf 0.5, *n*-hexane:EtOAc=1:1)]를 분리하였다.

화합물 **1** (dehydroeffusol): white amorphous powder; mp 228-229°C; IR ν_{max} 3270, 1660, 1540 cm^{-1}; EI/MS *m/z* 250; ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H): 8.48 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-4), 7.85 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-10), 7.57 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-9), 7.47 (1H, dd, *J*=10.4, 17.6 Hz, H-12), 7.15 (2H, br s, H-6, 8), 7.08 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-3), 5.74 (1H, d, *J*=1.2, 17.6 Hz, H-13'), 5.42 (1H, dd, *J*=1.2, 10.4 Hz, H-13), 2.55 (3H, s, H-11); ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C); 155.57 (C-7), 153.45 (C-2), 143.43 (C-12), 139.87 (C-5), 134.75 (C-8a), 133.99 (C-1a), 128.03 (C-9), 127.62 (C-4), 126.33 (C-4a), 124.62 (C-5a), 124.29 (C-10), 119.44 (C-6), 118.77 (C-1), 115.98 (C-3), 114.45 (C-13), 112.82 (C-8), 11.44 (C-11).

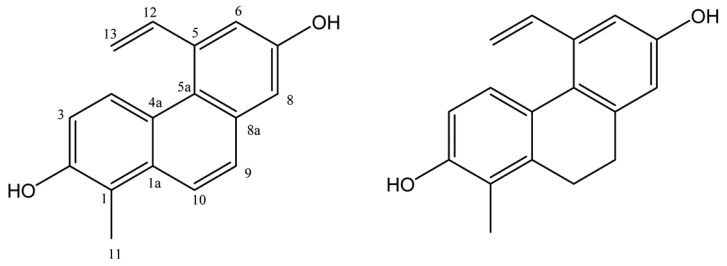
화합물 **2** (effusol): white amorphous powder; mp. 210-211°C; IR ν_{max} 3250, 1605 cm^{-1}; EI/MS *m/z* 252; ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H): 7.19 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-4), 6.94 (1H, dd, *J*=10.0, 17.6 Hz, H-12), 6.86 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-6), 6.66 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-3), 6.65 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-8), 5.65 (1H, dd, *J*=2.0, 17.6 Hz, H-13'), 5.21 (1H, dd, *J*=2.0, 10.0 Hz, H-13), 2.70 (2H, br s, H-9), 2.64 (2H, br. s, H-10), 2.22 (3H, s, H-11); ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C), 156.54 (C-7), 155.19 (C-2), 141.80 (C-5), 140.61 (C-8a), 140.30 (C-12), 137.43 (C-1a), 128.51 (C-4), 127.91 (C-4a), 127.18 (C-5a), 122.14 (C-1), 115.13 (C-6), 113.73 (C-13), 113.72 (C-3), 112.47 (C-8), 31.65 (C-9), 26.80 (C-10), 11.90 (C-11).

DPPH free radical 소거활성. Free radical 소거활성은 Blois 등(1958)의 방법을 변형하여 DPPH free radical 소거활성으로 측정하였다. 즉, 각 농도별 추출물 0.1 mL에 2×10^{-4} M DPPH 용액 0.1 mL를 가하고 10초간 혼합한 뒤 상온에서 60분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타냈다.

ABTS free radical 소거활성. 시료의 항산화능 측정은 Re 등(1999)의 방법에 따라 ABTS를 이용하여 측정하였다. ABTS를 7 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.4 mM의 potassium persulfate를 가하여 ABTS free radical을 생성시켜 실온의 암소에서 12–16시간 동안 방치 후 사용하였다. Radical이 생성된 ABTS 용액을 99% ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 100 μL와 시료 100 μL를 혼합하여 6분간 반응 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical 소거활성은 다음 식으로 계산하였다. Free radical scavenging activity (%)={1–(A test–A Blank/B control)}×100; A test: 시료 첨가구의 흡광도; A Blank: Blank의 흡광도; B control: 시료 무첨가구의 흡광도.

암세포주 배양. 본 실험에서 사용한 암세포주는 인체유래 위암세포주(AGS)와 폐암 세포주(A549)를 한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% FBS과 100 U/mL penicillin G, 50 μg/mL streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 (Gibco Co., USA)을 사용하여 5% CO_2, 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양을 실시하였다.

암세포주 성장억제 효과 측정. 시료의 암세포 성장억제 효과를 측정하기 위하여 Young등(2005)의 방법에 따라 MTT assay로 측정하였다. 즉 암세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 준비하여 96-well microplate 각 well당 균일하게 100 μL씩 분주한 후 세포배양용 incubator에 48시간 배양하였고, 각 화합물들은 최종 농도가 1% 이하가 되게 dimethyl sulfoxide로 용해시킨 후 RPMI 1640 배지로 희석하여 사용하였다. 불순물을 제거한 각 시료들을 1, 10, 40 μM 농도로 제작하여 100 μL씩 넣어주었으며, control은 시료용액 대신 RPMI 1640 배지를 100 μL씩 넣



dehydroeffusol (**1**) effusol (**2**)

Fig. 1 Chemical structure of phenanthrene compounds isolated from the stem of *Juncus effusus*.

어 다시 24시간 동안 배양시켰다. 그 후 MTT (1 mg/mL PBS)를 각 well당 10 μL씩 첨가하고 다시 incubation 시킨 뒤 4시간 후 ELISA reader 기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

EtOAc 분획물로부터 화합물의 분리. 등심초 10 kg을 70% EtOH로 추출하여 얻어진 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-butanol, H_2O로 순차적으로 분획하고 각 분획을 감압농축하여 3개의 분획을 얻었다. 그 중 EtOAc 분획으로부터 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 2종의 화합물을 분리하였다.

화합물 **1**은 EI/MS에서 *m/z* 250 $[M]^+$의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 250으로 결정하였다. IR spectrum으로부터 hydroxy group (3270 cm^{-1}), aromatic ring (1660, 1540 cm^{-1})의 작용기를 갖는 것으로 확인되었다. ^{1}H-NMR spectrum에서 6개의 aromatic proton이 관측되었고, 이들 signal들의 coupling constants 값을 통해 두 쌍의 proton이 *ortho*-coupling (δ_H 8.48, d, J=8.8 Hz, H-4; 7.08, d, J=8.8 Hz, H-3), (δ_H 7.85, d, J=9.0 Hz, H-10; 7.57, d, J=9.0 Hz, H-9), 한 쌍의 proton이 *meta*-coupling (δ_H, 7.15, br s, H-6, 8)하는 것을 확인하였다. 또한 δ_H 5.74 (1H, d, J=1.2, 17.6 Hz, H-13'), 5.42 (1H, dd, J=1.2, 10.4 Hz, H-13)에서 exo methylene signal이 관측되었다. ^{13}C-NMR spectrum에서 17개의 carbon이 관측되었고, δ_C 155.57 (C-7), 153.45 (C-2)에서 2개의 oxygen aromatic carbon signal이, 6개의 methine carbon이 관측되었으며, δ_C 114.44에서 methylene carbon이 관측되었다. 이러한 결과를 토대로 화합물 **1**은 phenanthrene 화합물인 dehydroeffusol로 결정하였다(Shima 등, 1991; Della Greca 등, 2002).

화합물 **2**는 화합물 **1**과 매우 비슷한 양상을 나타내었으며 δ_H 7.19 (1H, d, J=8.0 Hz, H-4)와 6.66 (1H, d, J=8.0 Hz, H-3)에서 *ortho* coupling과 δ_H 6.86 (1H, d, J=1.5 Hz, H-6), 6.65 (1H, d, J=1.5 Hz, H-8)에서 *meta* coupling 하는 proton을 확인하였다. 또한 δ_H 5.65 (1H, dd, J=2.0, 17.6 Hz, H-13'), 5.21 (1H, dd, J=2.0, 10.0 Hz, H-13)에서 exo-methylene signal이 관측되었고, δ_H 2.70 (2H, br s, H-9)과 2.64 (2H, br s, H-10)에서 각각 methylene signal이 관측되었다. ^{13}C-NMR spectrum에서는 모두 17개의 carbon이 관측되었으며 δ_C 31.65, 26.80에서 methylene carbon이 관측되어 본 화합물은 화합물 **1**의 C-9, 10에 수소가 첨가된 effusol로 동정하였다(Shima 등, 1991; Della Greca 등, 2002).

Table 1 Antioxidant activities of compounds isolated from *Juncus effusus*

Samples	DPPH IC_{50}[1)] value μM	ABTS IC_{50}[1)] value μM
Dehydroeffusol	130±3.21	39±3.51
Effusol	79±1.53	24±2.73
Ascorbic acid[2)]	2.3±0.24	3.1±1.20

[1)]IC_{50} value: The values indicate 50% decrease of free radical and are the means of triplicate data.
[2)]Ascorbic acid was used as a positive control.

Free radical 소거 활성. 항산화 효과는 DPPH 및 ABTS free radical에 대한 소거능을 근거로 평가하였다. 항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 free radical 소거 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다. 천연물이 가지는 free radical 소거활성을 측정하기 위해 널리 사용되는 대표적인 방법은 DPPH와 ABTS system이다(Peng 등, 2003; Chung 등, 2005).

등심초 분획물 (EtOAc, *n*-butanol, H_2O)의 항산화력을 측정하기 위해100, 250, 500 μg/mL로 희석하여 DPPH free radical 소거활성을 측정하였고, 등심초의 EtOAc 분획물에서 가장 높은 소거활성을 확인하였다. 항산화력이 가장 높게 측정되었던 EtOAc 분획물로부터 분리된 dehydroeffusol과 effusol의 free radical 소거활성을 측정하였고, 대조군(positive control)은 우수한 항산화 효과가 검증된 천연항산화제 ascorbic acid를 사용하였다(Table 1).

화합물들의 free radical 소거활성을 측정한 결과, effusol (DPPH; 79±1.53 μM, ABTS; 24±2.73 μM)이 dehydroeffusol (DPPH; 130±3.21 μM, ABTS; 39±3.51 μM)보다 높은 free radical 소거활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 1).

암세포 성장 억제효과. 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위해서는 각각의 화합물을 1, 10, 40 μM로 농도로 실험을 실시한 결과, 화합물들은 AGS와 A549의 성장을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

위암세포인 AGS의 경우 dehydroeffusol은 1 μM은 8.5%로 비교적 낮은 성장 억제 효과를 나타냈었으나 40 μM에서는 20.1%의 가장 높은 성장 억제 효과를 나타내었으나 농도에 따른 유의적은 차이는 없었다(Fig. 2A). Effusol은 1–40 μM의 농도에서 20–8%의 AGS 성장 억제 효과를 나타내었으나,

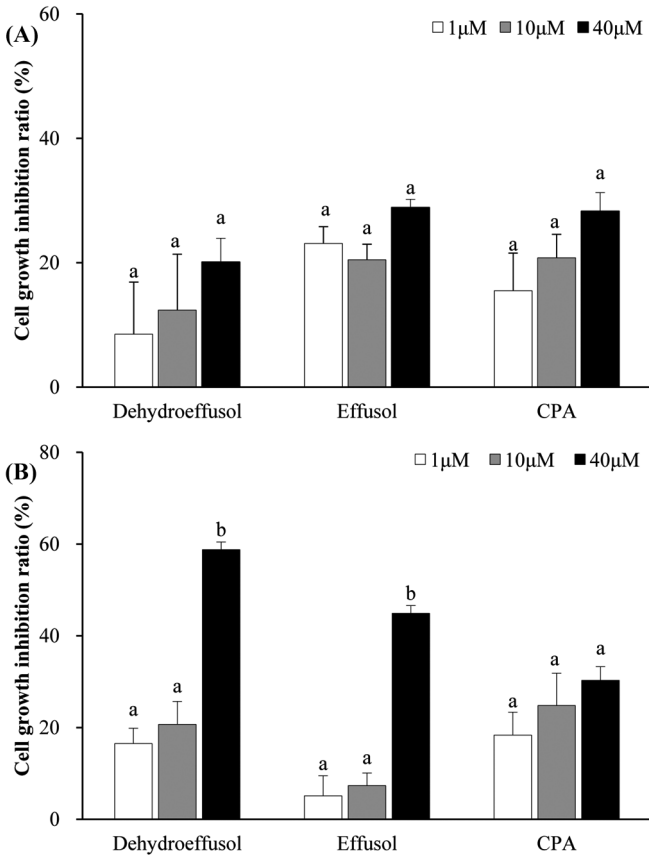


Fig. 2 Growth inhibitory abilities of phenanthrene compounds isolated from the stem of *Juncus effusus* in human cancer cell lines. Each value was compared with control at p <0.05 by ANOVA test. Mean values ± standard deviation from triplicate separated experiments are shown. (A; Human stomach cancer cell line (AGS), B; Human lung cancer cell line (A549)). CPA; anticancer drug cyclophosphamide (CPA) was used as positive control.

dehydroeffusol과 같이 농도에 따른 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 그러나 dehydroeffusol과 effusol은 항암제로 사용되는 cyclophosphamide (CPA, 15.5–28.3%) 약물과 비교해보면 유사한 성장 억제 효과를 나타내 우수한 항암 활성을 확인할 수 있었다.

폐암세포인 A549의 성장에 미치는 효과를 살펴본 결과, 1과 10 μM 농도에서 dehydroeffusol은 10.5와 20.7%의 성장 억제 효과를 나타내었고, effusol은 5.1와 7.3%로 AGS 성장 억제 결과와 유사한 효과를 나타냈으며, 화합물간의 유의적인 차이는 없었다(Fig. 2B). 그러나 40 μM의 농도에서는 각각의 화합물이 58.8%와 44.9%로 유의적으로 A549 성장을 억제 하였으며, 동일 농도에서 CPA (18.3~30.3%) 와 비교하면 dehydroeffusol과 effusol은 대조군(CPA)보다 더 높은 성장 저해 효과를 보였다.

한국인에게 대표적으로 발병되는 위암세포(AGS)와 폐암세포(A549)를 사용하여 dehydroeffusol과effusol의 세포 성장 억제 효과를 비교한 결과, AGS보다 A549에 대한 성장을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(p <0.05). 특히, dehydroeffusol의 경우에는 폐암세포(A549)를 타켓으로 하는 새로운 기능성 소재로서의 이용가치가 있을 것으로 사료되어진다.

초 록

등심초(*Juncus effusus*)를 70% ethanol로 추출하고 이 추출물을 ethyl acetate분획, *n*-butanol 및 H_2O 분획으로 나누었다. Ethyl acetate 분획에 대하여 silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 2종의 화합물을 분리하였다. 화합물 **1** (dehydroeffusol) 과 **2** (effusol)에 대하여 free radical 소거활성을 측정한 결과, dehydroeffusol (DPPH; 130±3.21 μM, ABTS; 39±3.51 μM)과 effusol (DPPH; 79±1.53 μM, ABTS; 24±2.73 μM)은 강한 항산화 활성을 나타내었다. 또한 이들 화합물들의 인체유래 위암세포(AGS), 폐암세포(A549)에 대한 성장억제 효과를 측정한 결과 모두 항암약물(CPA)과 유사하거나 더 높은 성장 저해 효과를 보였다.

Keywords 세포독성 · 항산화 활성 · dehydroeffusol · effusol · *Juncus effusus*

감사의 글 본 연구는 교육과학기술부 한국연구재단의 지원(2009-0067721)과 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원을 받아 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

References

Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative disease. *Science* **221**, 1256–64.

Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use or a stable free radical. *Nature* **181**, 1199–200.

Choi CH (2010) Anti-oxidative Activities of *Juncus effusus* L. extracts. MS Thesis, Seoul National University, Korea.

Chung YC, Chen SJ, Hsu CK, Chang CT, and Chou ST (2005) Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chemistry* **91**, 416–24.

Della Greca M, Fiorentino A, Isidori M, Lavorgna M, Monaco P, Previtera L et al. (2002) Phenanthrenoids from the wetland *Juncus acutus*. *Phytochemistry* **60**, 633–8.

Halliwell B and Aruona OJ (1991) DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett* **281**, 9–19.

Jeong CH, Bae YI, Park SJ, Lee SK, and Hur SJ (2012) Antioxidant activities of aqueous extract from three cultivars of guava leaf. *Food Sci. Biotechnology* **21**, 1557–63.

Jiang UY, Hu WC, Lee KC, and Wang MH (2013) Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Different Solvent Fractions from Ethanol Extract of *Synurus deltoides* (Aiton) Nakai Leaves. *Food Sci Biotechnology* **22**, 215–23.

Lee KN, Lee HB, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH et al. (2008) Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Korean J Herbiology* **23**, 1–8.

Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, and Lin JK (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophage. *Carcinogenesis* **20**, 1945–52.

Moon YH, Ko ST, Lee JH, Kim SW, and Ha CJ (1975) A study of on the Development of hypotensive agent (l) hypotensive action and mechanism of junci herba in the rabbit. *Kor J Pharmacogn* **6**, 211–7.

Peng ZF, Strack D, Baumert A, Subramaniam R, Goh NK, Chia TF et al. (2003) Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry* **62**, 219–28.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, and Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* **26**, 1231–7.

Rehman Z, Habbib F, and Shah WH (2004) Utilization of potato peels extract

as a natural antioxidant in soy bean oil. *Food Chemistry* **85**, 215–20.
Shima K, Toyota M, and Asakawa Y (1991) Phenanthrene derivatives from the medullae of *Juncus effusus. Phytochemistry* **30**, 3149–51.
Young FM, Phungtamdet W, and Sanderson BJS (2005) Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxocol In Vitro* **19**, 1051–9.