

미나리 추출물의 기억력 손상 억제와 산화스트레스 억제 효과 및 Isorhamnetin 분석

원범영^{1*} · 신기영^{2*} · 하현지¹ · 위지향³ · 윤여상¹ · 김예리¹ · 박용진¹ · 정경옥³ · 성혜미³ · 이형근¹

¹(주)브레인트로피아 기업부설연구소

²단국대학교 자연과학대학 미생물학과

³(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터

Inhibitory Effects of Dropwort (*Oenanthe javanica*) Extracts on Memory Impairment and Oxidative Stress and the Qualitative Analysis of Isorhamnetin in the Extracts

Beom Young Won^{1*}, Ki Young Shin^{2*}, Hyun Jee Ha¹, Ji-Hyang Wee³, Yeo Sang Yun¹,
Ye Ri Kim¹, Yong Jin Park¹, Kyoung Ok Jung³, Hea Mi Sung³, and Hyung Gun Lee¹

¹Research & Development Center, Braintropia Co., Ltd.

²Department of Microbiology, College of Natural Science, Dankook University

³Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

ABSTRACT This study was conducted to investigate effect of the acetylcholinesterase inhibitor activity, the protective effect of the extract on SH-SY5Y cell death by H₂O₂, the memory improvement from scopolamine-induced rat. Moreover, the antioxidant activity of isorhamnetin from the dropwort (*Oenanthe javanica*) was investigated. Acetylcholinesterase inhibitor activity was highest (28.59%) in Hwasun *O. javanica* extract (H-OJE). H-OJE and Naju *O. javanica* extract (N-OJE) were not significantly different. SH-SY5Y cell death deceased to 37.23% and 36.68% for H-OJE and N-OJE, respectively, following treatment with the extracts. *O. javanica* extracts showed a protective effect against H₂O₂-induced neurotoxicity. Treatment with *O. javanica* extracts slightly improved scopolamine-induced (1 mg/kg, i.p.) memory impairment in rats. H-OJE contained the highest total phenolic and flavonoid contents of 117 mg/g and 30 mg gallic acid equivalents/g, respectively, and had a DPPH radical scavenging activity (SC₅₀) of 113.8 µg/mL and ABTS radical scavenging activity of 48.2 µg/mL, which was higher than the other extracts. The thiobarbituric acid reactive substances value was highest (50.2%) in H-OJE. Antioxidant activity differed significantly among dropwort extracts. Isorhamnetin was known as one of the flavonoid and for having neuroprotective effect. So we analyzed acid-hydrolyzed *O. javanica* extract HPLC. The results were that peak at 14 min and spectrum of the extracts was consistent with standard solution. The results of LC/MS/MS analysis were that the extract and standard solution were confirmed total ion chromatogram at identical time, precursor ion was 317 [M-H]⁺ m/z, product ion was 302 [M-H]⁺ m/z. Overall, the results showed that the dropwort extract led to memory improvement and had antioxidant activity. Based on these finding, further research to investigate the production of ethanol extract of dropwort as a processed food is warranted.

Key words: *Oenanthe javanica*, isorhamnetin, memory, antioxidant activity, functional food

서 론

현대의학의 발달에 따른 인간 수명의 연장은 노령인구의 증가를 초래하였고, 이와 함께 노인성 치매 환자는 65세 이상 노인인구의 약 10%로 높은 발병률을 보이고 있어 심각한 문제가 되고 있다. 노인성 치매는 주로 뇌혈관성 치매(cerebrovascular dementia)와 알츠하이머병(Alzheimer disease, AD)으로 구분되며, 이 중 AD는 50% 이상 차지한

다(1). AD는 발병 원인이 뚜렷치 않으나 일반적으로 콜린성 신경의 손상, 산화적 스트레스, 아밀로이드 침착, 염증성 인자, 스테로이드호르몬의 결핍, 흥분성 신경 독성 등이 나타나는 것으로 보고되고 있고(2), AD의 주 증상인 기억력 장애는 기억과 학습에 있어서 중요한 역할을 수행하는 cholinergic system의 심각한 손상에 의한 것으로 알려졌다(3). AD 질환의 인지력 감소는 acetylcholine을 생성하는 신경세포의 손상과 acetylcholine을 분해하는 효소인 acetylcholinesterase(AChE) 활성이 증가되어 기억장애가 더욱 악화된다(4). 또한 인지장애를 일으키는 손상 부위인 뇌 신경세포는 다른 조직에 비해 고도 불포화지방산 함량과 산소 소비가 높은 반면, 항산화 효소는 상대적으로 부족하여 산화적 스트레스에 의한 영향이 크다(5,6). 활성산소(O₂)나 산화

Received 2 September 2015; Accepted 16 November 2015

Corresponding author: Beom Young Won, Research & Development Center, Braintropia Co., Ltd., Anyang, Gyeonggi-do 14057, Korea

E-mail: bywon@braintropia.com, Phone: +82-31-425-3718

*These authors contributed equally to this work.

질소(NO)에 의해 일어난 뇌의 염증반응으로 알츠하이머성 인지기능 장애가 유발된다고 한다(7). AD 치료를 위해서 tacrine, donepezil, rivastigmine 및 galantamine의 네 가지 약물이 FDA(U.S. Food and Drug Administration)의 승인을 받았으나, 그중 하나인 tacrine의 경우 간독성 때문에 지금은 거의 사용되지 않고 있다(8). 이에 다양한 치료법이 제시되고 있지만 대부분이 부작용 및 손상 기전의 복잡성, 생체 내 낮은 이용률 및 간 독성 등으로 안전성이 입증된 천연물이나 약용식물에서 기존 약물들을 대체할 수 있는 새로운 치료 및 예방 효과를 나타낼 수 있는 개선제 개발이 진행되고 있다(9). 천연물로부터 얻은 물질의 신경보호 효과로 원지(*Polygala tenuifolia* Willdenow) 추출분말, 은행(*Ginkgo biloba*) 잎 추출물 및 녹차(green tea) 추출물/테아닌(L-theanine) 복합물, 로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.) 잎 추출물 등의 연구가 보고되었다(10-14).

미나리(*Oenanthe javanica*)는 미나리과에 속하는 다년초 초본으로 한국의 농가에서 특용 작물로 재배하고 있다(15). 독특한 향미 및 약리작용으로 인해 기능성식품 소재나 향신료로 활용도가 높은 약용식물이며(16), 특히 혈압 강하, 진정, 보혈, 정력 강장 등에 효과가 있다(17). 미나리의 주요 성분인 isorhamnetin은 quercetin의 3'-O-methylated metabolite로서 항산화, 항증식, 항염, 항암 효능을 나타낸다(18-20). 미나리의 항산화 활성에 관한 연구에는 미나리 에탄올 추출물(21), 돌미나리 추출물(22), 흑마늘(*Allium sativum* L.)과 미나리를 이용한 음료(23) 등이 진행되었다.

스코폴라민(scopolamine)은 시냅스의 무스카린 수용체(muscarinic receptor)의 길항제로서 시냅스에서 유리되는 신경전달물질인 아세틸콜린과 무스카린 수용체 간의 결합 저해로 정보 전달을 일시적으로 차단하여 학습과 기억력을 손상시키기 때문에 학습과 기억력 증진 효과를 검증하고자 하는 기억력감퇴 동물모델에 흔히 이용된다(24,25). 따라서 본 연구에서는 미나리 추출물의 기능성 검토와 이용 개발을 위하여 AChE 활성 억제, SH-SY5Y의 세포사멸 억제 효과, scopolamine으로 기억손상을 유발한 실험동물의 기억력 개선에 미치는 효과를 평가하고, 생리활성 효과를 검토하기 위하여 항산화 활성과 isorhamnetin을 분석함으로써 미나리 추출물을 이용한 기능성 식품을 개발하기 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

미나리 추출물 제조

본 연구에 사용한 미나리는 전라남도 화순, 나주, 의령 지역에서 재배된 것을 구입하였다. 미나리는 수세한 후 열풍 건조기(VB-200DM, Vision Biotech, Incheon, Korea)를 이용해 건조시킨 후, 분쇄기(Pin Crusher-140, Korea Pulverizing Machinery Co., Ltd., Incheon, Korea)를 이용하여 분쇄하였다. 이를 50% 에탄올에 75±5°C에서 4시

간 2회 추출하였고 Whatman No. 1(Whatman Ltd., Maidstone, Kent, UK) 여과지를 이용하여 여과한 후, 농축기(CEP-20S, OKAWARA Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 50°C에서 감압농축 하였다. 농축된 미나리 추출물은 분무 건조기(MSD200, GEA Niro Co., Soeborg, Denmark)를 이용하여 건조한 후 분말 상태로 준비하여 시료로 사용하였다.

시약

본 실험에 사용된 시약 중 ethyl alcohol은 Ethanol Supplies World Co.(Jeonjoo, Korea)의 제품을 사용하였고, 생리식염수(JW Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)를 구입하였다. Acetylthiocholine iodide, isorhamnetin, Folin-Ciocalteu phenol reagent, gallic acid, catechin, ascorbic acid, linoleic acid, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, butylated hydroxytoluene, trifluoroacetic acid(TFA)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 구입하여 사용하였고, DPPH, ABTS(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)는 라디칼 소거능 측정을 위해 구입하였다. 모든 분석 시 사용한 용매는 HPLC 등급으로 사용하였다.

실험동물

체중 150~180 g 되는 Sprague-Dawley계 수컷을 (주)코아텍(Peongtaek, Korea)에서 구입하여 표준사료로 일주일 동안 사육실의 환경에 적응시킨 후 체중에 따라 임의로 나누어 실험에 사용하였다. 실험군은 대조군, scopolamine 투여군, 미나리 추출물 투여군으로 나누었다. 식이와 물은 자유 섭취 방법으로 급여하였으며, 실험실의 사육조건은 온도 22±2°C, 습도 50±5%, 명암은 12시간(08:00~20:00)을 주기로 자동 조절되었다. 동물 실험 프로토콜은 서울대학교 병원 동물실험윤리위원회(Seoul National University Hospital Institutional Animal Care and Use Committee, SNUH-IACUC)의 승인을 받은 후 시행되었으며, 전 실험 과정 동안 모든 동물은 실험 동물관리원칙(the principles of laboratory animal care National Institutes of Health publication No. 85-32, revised 1985)을 준수하였다.

시험물질 투여

시험물질은 매일 1번, 8주 동안 투여하였으며, 시험 진행 기간에도 지속하였고 수동회피테스트 30분 전에 10 mg/kg의 용량으로 생리식염수에 녹여 경구 투여하였다. 투여 용량(10 mg/kg)의 설정은 Park 등(26) 원지추출분말(*Polygala tenuifolia* Willdenow)에 대한 SD-rats에서의 기억력 개선 효과에 준하여 결정하였다. 기억손상 유발을 위해 인지시험 1시간 전에 vehicle control 군과 미나리 추출물 투여군에 scopolamine(1 mg/kg, i.p.)을 주사용 생리식염수에 희석하여 복강 투여하였다.

HPLC 분석용 시험용액 조제

미나리 추출 분말은 90°C에서 30분 동안 H₂SO₄를 처리하여 산 가수분해를 시켰다. 산 가수분해 처리 후 미나리 추출 분말은 50% MeOH이 담긴 25 mL 정용플라스크에 넣고 정용한 후 0.45 µm PTFE syringe filter(Millipore, Milford, MA, USA)로 여과한 용액을 시험용액으로 사용했다. 표준용액은 50 mL(100 µL/mL)의 MeOH에 5 mg isorhamnetin을 용해한 후 4°C에서 보관하였다. 이를 HPLC 분석 시 sulfuric acid를 함유한 50% MeOH에 희석하여 사용하였다.

Acetylcholinesterase 억제 활성 측정

아세틸콜린분해효소 분석은 Ellman 등(27)의 acetylthiocholine iodide를 기질로 사용한 비색분석법으로 측정하였다. 아세틸콜린분해효소로 동물 뇌 무게의 10배수 용량 homogenization buffer(12.5 mM sodium phosphate pH 7.0, 400 mM NaCl)를 넣고 Potter-Elvehjem homogenizer(PRO250, ProScience, Oxford, CT, USA)를 이용해 균질화시킨 후 1,000×g로 10분간 원심분리(Hanil Science, Incheon, Korea) 하였다. 상층액을 취한 후 0.5% Triton X-100이 포함된 homogenization buffer를 첨가하고 30분 동안 반응시켜 1,000×g로 10분간 원심분리 하였다. 모든 과정은 4°C를 유지하며 진행시키고 상층액을 취하여 아세틸콜린분해효소로 본 실험에 사용되었다. 미나리 추출물은 5% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하고, 사용 바로 전에 buffer 1(100 mM sodium phosphate, pH 8.0)에 200 µg/mL의 농도로 희석하였다. 1.5 mL의 희석된 미나리 추출 실험용액은 100 µL의 acetylthiocholine iodide solution (75 mM)과 100 µL의 buffered Ellman's reagent[10 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)], 17.85 mM sodium bicarbonate 혼합물을 순서대로 혼합하고 10분 동안 25°C에서 반응시켰다. 1.2 mL reaction buffer와 100 µL 효소를 첨가한 후 410 nm에서 5분 동안 30초 간격으로 측정하였다. Reaction blank는 생리식염수를 사용하였다. 아세틸콜린분해효소 활성은 흡수계수 1.36 L/mmol/min을 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5회 반복 측정하였다.

세포사멸 분석

WST-1의 metabolizing activity는 제조사(Roche, Indianapolis, IN, USA)의 지시에 따라 수행하였다. SH-SY5Y 세포는 8×10³ cell/well의 농도로 96-well plate에 처리하고, 이전 보고된 연구(28-31)에 따라서 세포는 24시간 동안 배양하였다. SH-SY5Y 세포보호 효과 측정을 위해 750 µM H₂O₂를 처리하기 4시간 전에 미나리 추출물(10 µg/mL)을 처리한 후 37°C에서 5% CO₂와 95% air가 공급되는 환경에서 1시간 동안 배양하였다. ELISA reader(Bio-Rad, Munich, Germany)로 450 nm에서 측정하였다.

수동회피테스트

기억과 학습에 대한 미나리 추출물의 효과를 측정하기 위해 수동회피테스트 기구(PACS-30, San Diego Instrument, San Diego, CA, USA)를 사용하였다(32). Shuttle box는 2개의 같은 크기 방(23.5×15.5×15.5 cm)으로 나누어지고, guillotine door(6.5×4.5 cm)에 의해 분리된다. 불이 밝게 켜진 방은 조명이 설치되어 있고, 동물은 guillotine door를 통과해서 어두운 방으로 들어가게 된다. 동물은 처음에 불이 켜진 방에 놓여지고, 탐험적인 행동을 보이다가 어두운 방으로 들어간다. 어두운 방에 들어가자마자 guillotine door는 자동적으로 닫히게 된다. Training은 동물이 20초 이내에 어두운 방으로 들어갈 때까지의 훈련을 반복시킨다. Training 24시간 후에 scopolamine과 saline(1 mg/kg, i.p.)을 각각 실험 그룹과 control 그룹 동물 복강에 투여하였다. Scopolamine 투여 30분 후 단 한 번의 미나리(10 mg/kg)를 경구 투여하고, 이로부터 30분 후에 동물은 불이 켜지는 방에 놓여졌다. 동물이 어두운 방에 들어가면 guillotine door는 자동적으로 닫히게 되고, grid floor를 통해 3초 동안 shock(1 mA)가 가해진다. 그 동물이 어두운 방으로 들어가는 시간은 최장 300초를 기준으로 측정되었다. 만약 동물이 300초(cut-off time) 이내에 어두운 방으로 들어가지 않았다면 그것은 300초의 값으로 측정하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

미나리 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Hwang 등(33)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 각 추출물 100 µL에 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 가한 후 3분간 방치한 다음 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 가하였다. 2% Na₂CO₃ 용액을 가하고 30분 후 반응액의 흡광도 값을 spectrophotometer(Gene Spec III, JP/U-3010, Hitachi High-Tech-nologies Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalents(GAE)/100 g으로 나타났다. 모든 샘플은 3번 반복 분석하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

미나리 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Kim 등(34)의 방법에 따라 측정하였다. 미나리 추출물 250 µL에 3차 증류수 1 mL와 5% NaNO₂ 75 µL를 가하여 잘 혼합하고, 5분 후 10% AlCl₃·6H₂O 150 µL를 가하여 실온에서 6분 동안 반응시킨다. 그 후 1 N NaOH 500 µL를 가하여 11분 후, 510 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준물질은 (+)-catechin hydrate를 사용하였으며, 총 플라보노이드 함량은 시료 (+)-catechin hydrate equivalents(CE)/100 g으로 나타났다. 모든 샘플은 3번 반복 분석하였다.

DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 측정

DPPH 라디칼을 이용한 항산화능은 Blois(35)의 방법을 이용하여 측정하였다. 10 µL의 각 추출물과 positive control(ascorbic acid)에 EtOH 100 µM의 190 µL DPPH (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)를 혼합하여 첨가하였다. 25°C에서 30분 동안 반응 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 항산화능 측정은 아래와 같은 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{DPPH radical-scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 법을 이용한 항산화능 측정은 Re 등(36)의 방법을 변형하여 ABTS 양이온 라디칼을 분석하기 위한 성분의 탈색을 기본으로 하여 측정하였다. ABTS⁺는 100 mM의 potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 2.5 mM potassium persulfate와 7 mM ABTS stock을 같이 반응시키고 stock 용액은 80:1로 희석한다. 10 µL의 각 추출물과 positive control(ascorbic acid)을 96 well에 넣고, 300 µL의 ABTS⁺ 용액을 첨가한다. 감소하는 흡광도는 어두운 곳에서 3분 동안 734 nm에서 측정하였다. ABTS를 이용한 항산화능 측정은 아래와 같은 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

결과 값은 샘플 radical의 50% 농도로 정의된다. Parameter SC₅₀은 Turumtay 등(37)에 의해 나타났다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid(TBA) 법을 이용한 항산화능 측정은 손상되지 않은 세포와 세포 내의 미세포 추출액에 의해 linoleic acid 과산화 억제능으로 판단한다(38). 0.4 mL 각 추출물에 1 mL linoleic acid 유화액, 0.5 mL의 phosphate buffer solution(0.5 mL, 0.02 M, pH 7.4), 0.2 mL의 H₂O₂ (0.56 mM)를 혼합하여 37°C에 넣었다. Blank는 DMSO 또는 3차 증류수를 첨가한다. 37°C에 넣은 2 mL의 reaction solution을 12시간 후에 4%의 trichloroacetic acid(TCA) 0.2 mL와 0.8%의 TBA, 0.4%의 butylated hydroxytoluene(BHT)을 같이 혼합하였다. 이 혼합물을 100°C에 30분 동안 반응시키고 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. Linoleic acid 과산화 억제력 측정은 아래와 같이 산출하였다.

$$\text{Anti-lipid peroxidation activity} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

HPLC를 이용한 미나리 추출물의 isorhamnetin 분석

Isorhamnetin을 분석하기 위해 Agilent 1100 series HPLC(Agilent 1100, Agilent Technologies, Santa Clara,

CA, USA)와 UV detector(Waters 486, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. Column은 X bridge C₁₈ column (4.6×50 mm, 5 µm), 온도는 30°C로 유지하였다. Injection volume은 20 µL, flow rate는 1.0 mL/min으로 하였다. 이동상을 목적으로 용매 A(0.1% TFA 함유 10% MeOH), 용매 B(0.1% TFA 함유 100% acetonitrile)를 사용하였다. 모든 용매는 기포를 제거하였고, 0.45 µm filter(Millipore)를 통해 filter 하였다. Gradation은 처음에서 25분까지 용매 A : B(80:20, %:%)로 흘려주고 25분부터 분석 마지막까지 용매 A : B(55:45, %:%)로 흘려주었다.

LC/MS/MS를 이용한 미나리 추출물의 isorhamnetin 분석

Isorhamnetin을 분석하기 위해 Agilent 6550 LC-MS/MS(Agilent 6550, Agilent Technologies)와 UV detector(Waters 486, Waters)를 사용하였다. Column은 Shim-pack XR-ODS column(2.0×100 nm, 2.2 µm, SHIMADZU, Kyoto, Japan)을 사용하였다. 분석 용매는 용매 A(0.1% TFA in water), 용매 B(0.1% in ACN)를 사용하였으며, 모든 용매는 기포를 제거하였고 0.45 µm filter(Millipore)를 통해 filter 하였다. Flow rate는 0.25 mL/min, column 온도는 50°C, injection volume은 5 µL, 파장은 370 nm로 고정하였다. LC-MS/MS 전자분무 이온화법의 조건은 질소 1.5 L/min, 기화 온도는 200°C, capillary voltage는 4,500 V, mass range는 150~1,500 m/z였다. Gradation은 Table 1과 같다.

통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리 간의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variation)의 Duncan's multiple range test 사후분석을 이용하여 P<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

Acetylcholinesterase 억제 활성 측정

Acetylcholine의 합성과 분해에 관련된 효소로는 choline acetyltransferase(ChAT)와 acetylcholinesterase(AChE)가 있다. 따라서 체내의 신경 전달이 원활하게 이루어지려면

Table 1. LC-MS/MS gradient specifications for isorhamnetin of *Oenanthe javanica* extract (%)

Time (min)	A	B
0.00	80	20
30.00	60	40
30.01	10	90
35.00	10	90

A: 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) in water.

B: 0.1% TFA in acetonitrile.

AChE 수준에 영향을 미치는 ChAT와 AChE 효소 활성이 매우 중요하다(39). 미나리 추출물의 AChE 활성에 미치는 효과는 Fig. 1과 같다. 양성 조절 DHED(dehydroevodiamine)는 IC₅₀이 37.5 μM로 알려져 있으며(40), 대조군으로서 DHED는 44.36% 억제력이 나타났다. 화순미나리 추출물은 28.59%로 가장 높은 억제력을 나타냈고, 나주미나리 추출물은 25.11%, 의령미나리 추출물 11.66%로 나타났다. 의령미나리 추출물은 나주미나리 추출물과 비교하여 유의적으로 낮은 억제력을 나타내었으며($P < 0.05$), 화순미나리 추출물은 의령미나리 추출물과 비교하여 통계적으로 AChE의 활성을 유의적으로 저해하였다($P < 0.05$). 화순미나리 추출물은 나주미나리 추출물과 통계적으로 유의적 차이가 없었다($P > 0.05$). 미나리 추출물의 지역별마다 AChE 활성 억제 차이가 나타난 것은 품종, 토양 및 환경 조건의 변화에 따른 결과라고 사료된다. Kim 등(41)은 37종의 식물 추출물에서 AChE 저해 활성을 살펴본 결과, 당근 28.3%, 고추나물 21.5%, 딸기 19.4%로 약 20% 이상의 AChE 저해 활성을 보였고, 박하는 13.2%의 저해 활성을 나타내었으나 그 외 추출물에서는 10% 이하의 활성을 나타내거나 또는 활성을 전혀 나타내지 않았다고 한다. 미나리의 총 페놀 함량은 1.50%이며(42), 페놀성 복합물은 acetylcholinesterase 활성을 억제한다고 보고하였다(43). 따라서 미나리 추출물은 acetylcholinesterase inhibitor와 같이 신경접합부에 있는 acetylcholine을 분해하는 acetylcholinesterase 활성을 억제하여 acetylcholine의 활성을 촉진하게 되므로 기억과 학습 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다.

세포사멸 분석

H₂O₂는 생물학적으로 반응성이 매우 약하지만 주요 효소 활성 부위에 있는 thiol group을 산화시켜 불활성화를 초래하거나 10~100 μM 이상의 농도에서 세포에 직접적인 손상을 유발할 수도 있다(44). 신경계 질환은 산화적 스트레스에

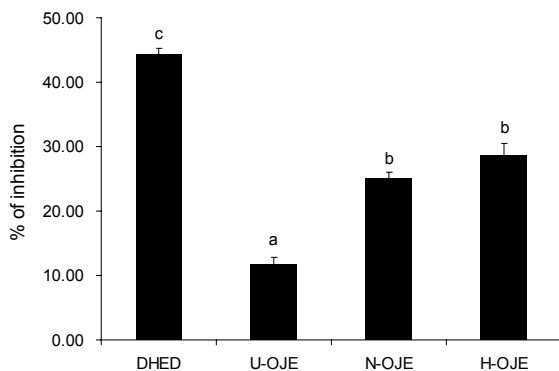


Fig. 1. *Oenanthe javanica* extracts inhibit acetylcholinesterase (AChE) activity. Inhibition is expressed relative to the control value (100%). AChE activity was inhibited by all *Oenanthe javanica* extracts (500 μg/mL). DHED (37.5 mM) was used as a positive control. Each value represents the mean±SEM. Different letters show a significant difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

의한 신경세포의 사멸에 의해 발생되며, 천연 항산화제인 flavonoids, polyphenols 등은 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호 효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다(45). H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 미나리 추출물 (10 μg/mL) 처리에 따른 SH-SY5Y 신경세포에서 나타나는 독성의 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

H₂O₂를 처리한 human neuroblastoma cell line인 SH-SY5Y 세포에서 H₂O₂ 비처리 대조군과 비교하여 세포사멸이 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). DMSO 41.69%와 비교하여 화순미나리 추출물 37.23%, 나주미나리 추출물 36.68%로 세포사멸이 통계적으로 유의하게 감소하였으며($P < 0.05$), 의령미나리 추출물 42.91%로 DMSO에 대하여 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$). Ma 등(46)은 미나리의 persicarin이 초기 배양 rat의 피질 세포 내에서 glutamate 유발 신경 독성에 대항하여 신경세포 보호와 항산화 작용을 나타내는 것으로 보고하였다. 미나리 추출물은 활성산소 활성에 효과적이라고 보고하였다(47). 또한 Zhang 등(48)은 미나리의 isorhamnetin이 유해한 산화에 대해 보호 작용을 나타낸다고 하였으며, 은행잎 추출물은 플라보노이드 배당체를 구성분으로 하며 신경보호 작용이 있다고 한다(49). 따라서 미나리 추출물에 함유된 플라보노이드의 영향으로 산화적 스트레스에 대한 신경보호 작용을 나타낸 것이라고 사료된다.

수동회피테스트

수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 해마에서 조건화된 기억과 변연계와 연관 있는 기억에 관한 영향을 측정하기 위해 주로 사용된다(50). 수동회피테스트 측정 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의해 기억이 손상된 vehicle control군은 57.7초로 scopolamine을 투여하지 않은 대조군 244.3초보다 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

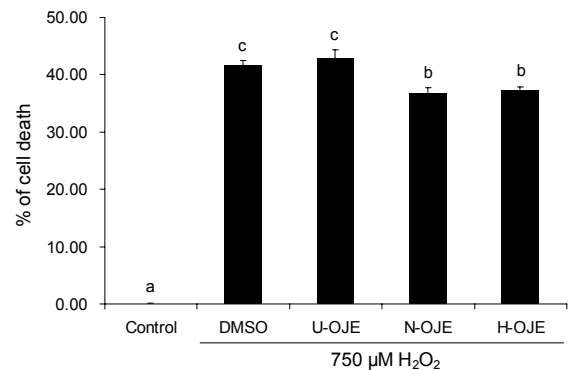


Fig. 2. *Oenanthe javanica* extracts decrease H₂O₂-induced cell death. SH-SY5Y neuroblastoma cells were pretreated with 10 μg/mL *Oenanthe javanica* extract for 4 h before H₂O₂ treatment (750 μM). After 24 h, WST-1 activity was determined according to the manufacturer's instructions (Roche). The values represent the mean±SEM. Different letters show a significant difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

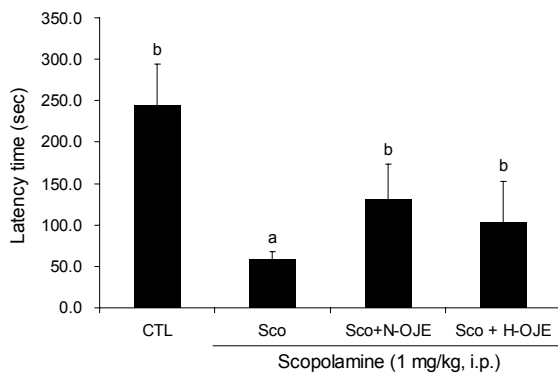


Fig. 3. Effect of *Oenanthe javanica* extracts on scopolamine-induced memory impairment. In a passive avoidance test, exposure of rats to scopolamine (1 mg/kg, i.p., $n=5$) induced significant memory deficits compared to the control group ($n=5$). H-OJE (Hwasun *Oenanthe javanica* extract) (10 mg/kg, p.o., $n=5$) and U-OJE (Uiryong *Oenanthe javanica* extract) (10 mg/kg, p.o., $n=5$) was administrated to rats before 1 h of the scopolamine treatment. CTL: non-treated. Sco: scopolamine (intraperitoneal injection, ip) treated+test-substance non-treated. Sco+N-OJE: scopolamine (intraperitoneal injection, ip) treated+Naju *Oenanthe javanica* extract. Sco+H-OJE: scopolamine (intraperitoneal injection, ip) treated+Hwasun *Oenanthe javanica* extract. Each value represents the mean \pm SEM. Different letters show a significant difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

대조군과 비교하여 scopolamine을 처리한 모든 그룹에서 latency time이 낮게 측정되었다. Scopolamine 처리 그룹에서 나주미나리 추출물 130.4초, 화순미나리 추출물 102.4초로 미나리 추출물을 투여한 그룹이 vehicle control군보다 높게 측정되었으며, 통계적으로 유의적 차이는 없었다($P>0.05$). 본 연구 결과 대조군과 비교하여 미나리 추출물 투여 (10 mg/kg)에 의하여 latency time이 증가되지 않은 것은 미나리 추출물 투여 용량이 다소 적은 용량이었기 때문이라 사료된다. 이는 Nam과 Lee(51)의 ICR mouse에 곤달비 뿌리 및 잎의 메탄올 추출물(250 mg/kg)과 Oh 등(52)의 도라지 열수 추출물(300 mg/kg)의 투여 용량과 비교하여 적은 용량으로 향후 미나리 추출물의 농도를 높여서 기억력 개선에 대한 추가 연구 진행으로 정확히 판단할 것이 필요하다고 판단된다. 은행(*Ginkgo biloba*)잎 추출물은 수동회피테스트에서 학습과 기억력 기능을 개선하였으며(53), 은행잎 추출물에는 몇 가지 활성 구성분 중 플라보노이드 배당체(quer-
cetin, kaempferol, isorhamnetin derivatives)가 가장 중요한 것이라고 하고 AD 동물모델에서 은행잎 추출물이 신경보호 작용을 가지고 있다고 보고하였다(46). 이상의 결과로 보아 본 실험에서 미나리 추출물을 투여하지 않은 그룹과 미나리 추출물 투여군은 유의적인 차이는 없었지만 플라보노이드는 미나리에 함유된 성분으로써 기억력 개선에 영향을 미친다고 사료된다.

총 폴리페놀과 플라보노이드 함량

미나리 추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량

을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 화순미나리 추출물이 117 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 나주미나리 추출물이 70 mg/g, 의령미나리 추출물이 53 mg/g으로 나타났다. 모든 미나리 추출물은 총 폴리페놀 함량이 통계적으로 유의적 차이가 나타났다($P<0.05$). Moon 등(54)의 보고에 따르면 약용식물의 폴리페놀 함량 중 상황버섯(*Phellinus linteus*)이 17.9 mg/g, 갈근(*Puerariae radix*)이 5.5 mg/g으로 나타났고, Kim 등(55)의 보고에서는 미나리과에 속하는 사상자(*Torilis fructus*) 에탄올 추출물이 15.7 mg/g, 당귀(*Angelica gigas* Nakai) 에탄올 추출물이 14.7 mg/g으로 측정되었다고 하며, 이와 비교하여 본 실험에서의 미나리 추출물은 폴리페놀 함량이 상당히 높은 것으로 사료된다. 또한 Jeong 등(23)의 흑마늘과 미나리를 이용한 음료 연구에서 미나리 첨가량에 따라 총 폴리페놀 함량이 증가하여 미나리에 함유된 폴리페놀의 영향이라고 보고하였으며, Lee(56)는 미나리의 첨가량이 증가할수록 혼합음료의 총 폴리페놀 함량이 증가한다고 하였다. 미나리 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 화순미나리 추출물이 30 mg GAE/g, 나주미나리 추출물이 12 mg GAE/g, 의령미나리 추출물이 10 mg GAE/g으로 나타났으며, 모든 미나리 추출물은 통계적으로 유의적 차이가 나타났다($P<0.05$). 돌미나리 70% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 각각 88.9 ± 0.46 mg GAE/g, 28.6 ± 0.64 mg QE(quer-
cetin equivalents)/g으로 나타났다(22). 한편 Huda-Faujan 등(57)의 연구에서 돌미나리 메탄올 추출물의 페놀 함량이 7.41 mg TAE(tannic acid equivalents)/100 g으로 나타났으며, Wan-Ibrahim 등(58)의 연구에서 돌미나리 물 추출물의 페놀 함량이 684 ± 14.7 mg GAE/g으로 나타난 것과 비교하면 미나리의 품종에 따른 차이의 영향이 있는 것으로 판단되며, 본 연구에서 미나리 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 높게 나타난 것으로 보인다. Kim 등(59)은 대부분의 식물에서 폴리페놀 함량이 플라보노이드 함량보다 높다고 하며, 폴리페놀 함량이 플라보노이드 함량보다 월등히 많은 시료의 경우 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 보아 플라보노이드 외에 phenolic acids, hydroxycinnamic acids 등에 속하는 다른 폴리페놀 화합물들이 전자공여능에 상당히 기여한다고 보고하였다.

Table 2. Total phenol and flavonoid contents of the extracts of *Oenanthe javanica* extract

Samples ¹⁾	Phenol (mg/g)	Flavonoid (mg GAE/g)
H-OJE	117 \pm 3 ²⁾	30 \pm 1 ^a
N-OJE	70 \pm 1 ^b	12 \pm 1 ^b
U-OJE	53 \pm 2 ^c	10 \pm 1 ^c

¹⁾H-OJE: Hwasun *Oenanthe javanica* extract, N-OJE: Naju *Oenanthe javanica* extract, U-OJE: Uiryong *Oenanthe javanica* extract.

²⁾Data are presented as the mean \pm SD of triplicate experiments. Different letters (a-c) show a significant difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 측정

미나리 추출물의 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능에 대한 SC₅₀을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능에 대한 SC₅₀은 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 값이 3.3 µg/mL였으며, 화순미나리 추출물이 113.8 µg/mL, 나주미나리 추출물이 229.7 µg/mL로 나타났고 의령미나리 추출물이 272.6 µg/mL로 나타났다. 이는 모든 미나리 추출물 사이에서 통계적으로 유의차가 있었으며(P<0.05), 화순미나리 추출물에서 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. Hwang 등(21)의 연구에서는 미나리 에탄올 추출물에서 1.07 mg/mL, 에틸아세테이트 미나리 추출물 층에서 0.08 mg/mL, 헥산 분획물에서 3.31 mg/mL, 클로로포름 분획물에서 2.43 mg/mL로 보고되었다. 또한 미나리 지상부 메탄올 추출물 에틸아세테이트 분획물에서 0.025 mg/mL로 보고되었다(60). 이와 같이 미나리 추출 용매 분획물에 따라 측정값은 다르게 나타났으며, 본 실험의 미나리 추출물 군은 Hwang 등(21)이 보고한 미나리 에탄올 추출물보다는 다소 높은 값을 나타냈다. ABTS 라디

칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 5에 나타냈으며, 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 값이 5.3 µg/mL로 측정되었다. 화순미나리 추출물이 48.2 µg/mL, 나주미나리 추출물이 78.1 µg/mL, 의령미나리 추출물이 98.7 µg/mL로 나타났으며, 모든 미나리 추출물은 통계적으로 유의차가 있었다(P<0.05). 이러한 결과는 DPPH 라디칼 소거능 및 폴리페놀, 플라보노이드의 결과와 유사하게 나타났다.

TBARS 측정

지질과산화와 관련된 산화 스트레스는 여러 신경병성 뇌 질환을 근원으로 하는 병리생리학적 메커니즘에서 원인이 되어 왔으며(61), 세포 손상에 잠재적 기여 인자이다(62). 미나리 추출물의 지질과산화 억제 효과는 Fig. 6에 나타내었다. 미나리 추출물은 55, 110, 220, 440 µg/mL의 농도로 처리하였다. 미나리 추출물 440 µg/mL에서 화순미나리 추출물이 50.7%의 억제력으로 가장 높았으며 다른 미나리 추출물보다 통계적으로 유의하게 높았다(P<0.05). 나주미나리 추출물 31.0%과 의령미나리 추출물이 15.9%로 통계적

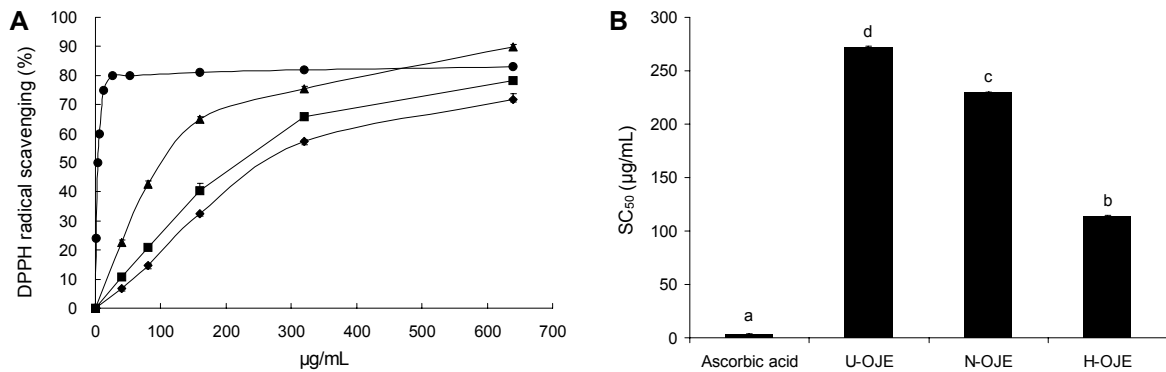


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of three *Oenanthe javanica* extract. (A) DPPH radical scavenging activity of three *Oenanthe javanica* extracts in a dose dependent manner. ●: ascorbic acid, ▲: Hwasun *Oenanthe javanica* extract (H-OJE), ■: Naju *Oenanthe javanica* extract (N-OJE), ◆: Uiryong *Oenanthe javanica* extract (U-OJE). (B) SC₅₀ value of each extract. Data are presented as the mean±SD of triplicate experiments. Different letters show a significant difference at P<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

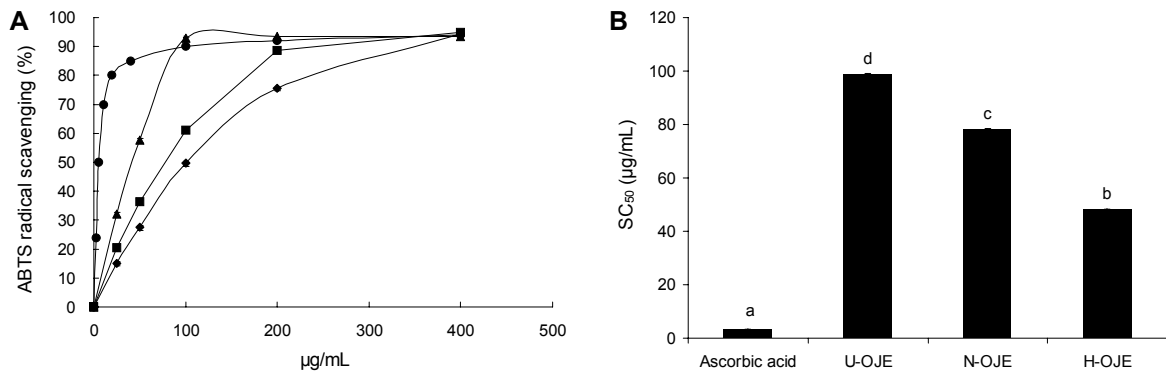


Fig. 5. ABTS radical cation decolorization of three *Oenanthe javanica* extract. (A) ABTS radical cation decolorization of three *Oenanthe javanica* extracts in a dose dependent manner. ●: ascorbic acid, ▲: Hwasun *Oenanthe javanica* extract (H-OJE), ■: Naju *Oenanthe javanica* extract (N-OJE), ◆: Uiryong *Oenanthe javanica* extract (U-OJE). (B) SC₅₀ value of each extract. Data are presented as the mean±SD of triplicate experiments. Different letters show a significant difference at P<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

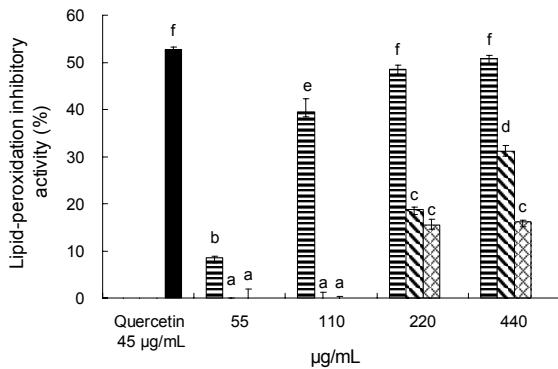


Fig. 6. Lipid-peroxidation inhibitory activities of *Oenanthe javanica* extract. Data are presented as the mean±SD of triplicate experiments. Different letters show a significant difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. ▨: Hwasun *Oenanthe javanica* extract, ▩: Naju *Oenanthe javanica* extract, ▪: Uiryeong *Oenanthe javanica* extract.

으로 유의적인 차이가 나타났다($P<0.05$). 이러한 결과는 총 폴리페놀, 플라보노이드, 라디칼 소거능의 결과에서 얻어졌던 결과와 일치한다. 따라서 미나리 추출물의 총 페놀 함량과 항산화 활성의 높은 연관관계를 보여준다. 화순미나리 추출물이 나주미나리, 의령미나리 추출물보다 지질산화 억제 효과가 높게 나타난 것은 추출물이 함유하는 폴리페놀 화합물 및 미나리 고유의 항산화 활성 성분에 기인된 것으로

판단되며, Shin 등(63)은 phenol류 화합물을 높게 함유하고 있는 추출물이 지방산화 억제 효과가 높다고 보고하였다. Oh와 Lee(64)는 에탄올 추출물 1,000 µg/assay 처리 시 들미나리가 61.5%의 저해율을 보였으며, 시금치(*Spinacia oleracea* L.) 43.8%, 부추(*Allium tuberosum* Rottler) 31.6%, 쪽갓(*Chrysanthemum coronarium* L.) 21.8%로 나타났다.

HPLC를 이용한 미나리 추출물의 isorhamnetin 분석

표준용액과 같이 시료 전처리 방법으로 처리한 미나리 추출물이 크로마토그램을 비교하여 isorhamnetin 피크가 분리되는지 확인한 결과 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었다(Fig. 7). 표준용액과 미나리 추출물의 머무름 시간은 14분대로 표준용액의 피크 유지시간과 미나리 추출물의 피크 유지시간이 일치하였다. 산 가수분해를 처리하지 않은 미나리 추출물은 동일시간대에 피크가 나타나지 않았다. 또한 표준용액과 미나리 추출물의 UV spectrum 측정 결과에서 동일한 spectrum을 나타내어 본 시험에서 정확한 isorhamnetin의 분리를 확인할 수 있었으며, 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9999 이상으로 높은 유의수준을 보여 분석에 적합함을 알 수 있었다. LC/MS/MS를 통해 미나리 추출물의 isorhamnetin 성분을 분석하였다(Fig. 8). 분석 결과 표준용액과 시험용액에서 동일한 시간대의 Total Ion Chromato-

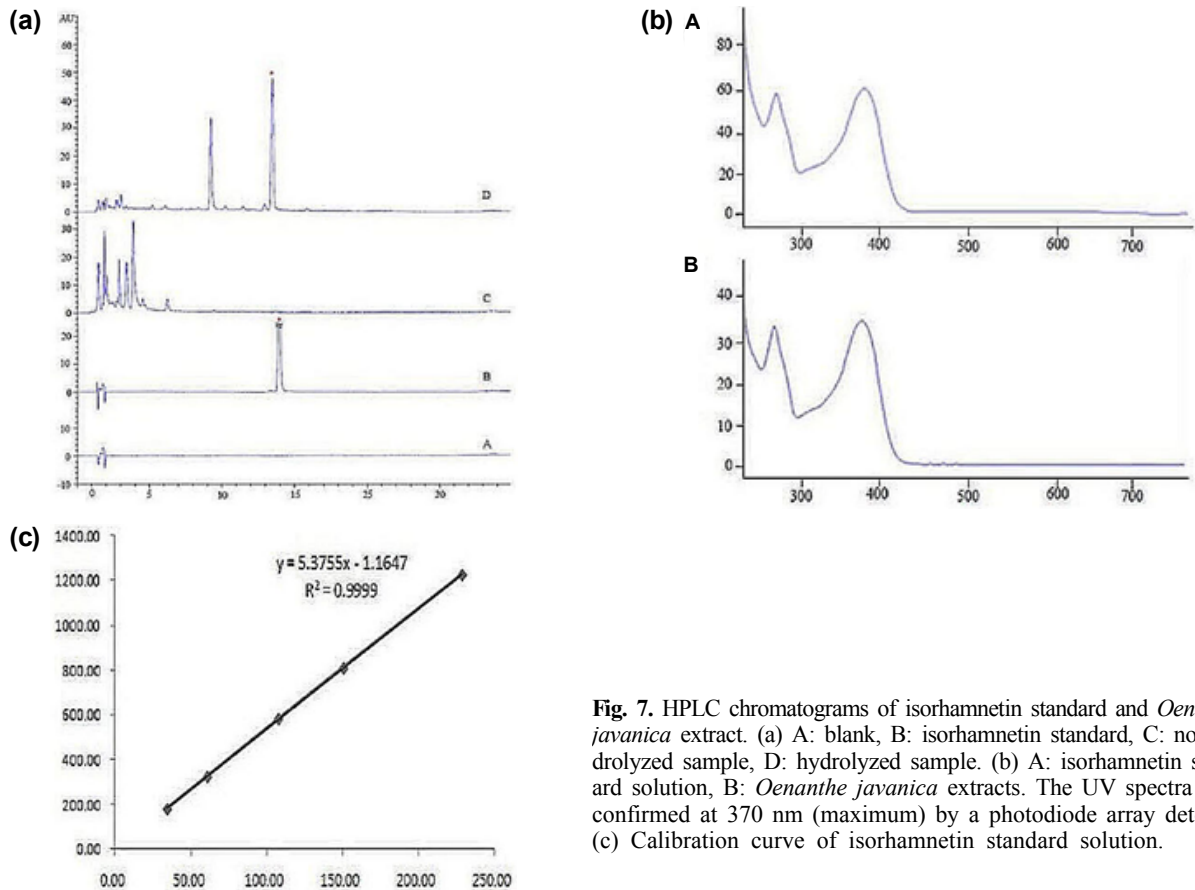


Fig. 7. HPLC chromatograms of isorhamnetin standard and *Oenanthe javanica* extract. (a) A: blank, B: isorhamnetin standard, C: non-hydrolyzed sample, D: hydrolyzed sample. (b) A: isorhamnetin standard solution, B: *Oenanthe javanica* extracts. The UV spectra were confirmed at 370 nm (maximum) by a photodiode array detector. (c) Calibration curve of isorhamnetin standard solution.

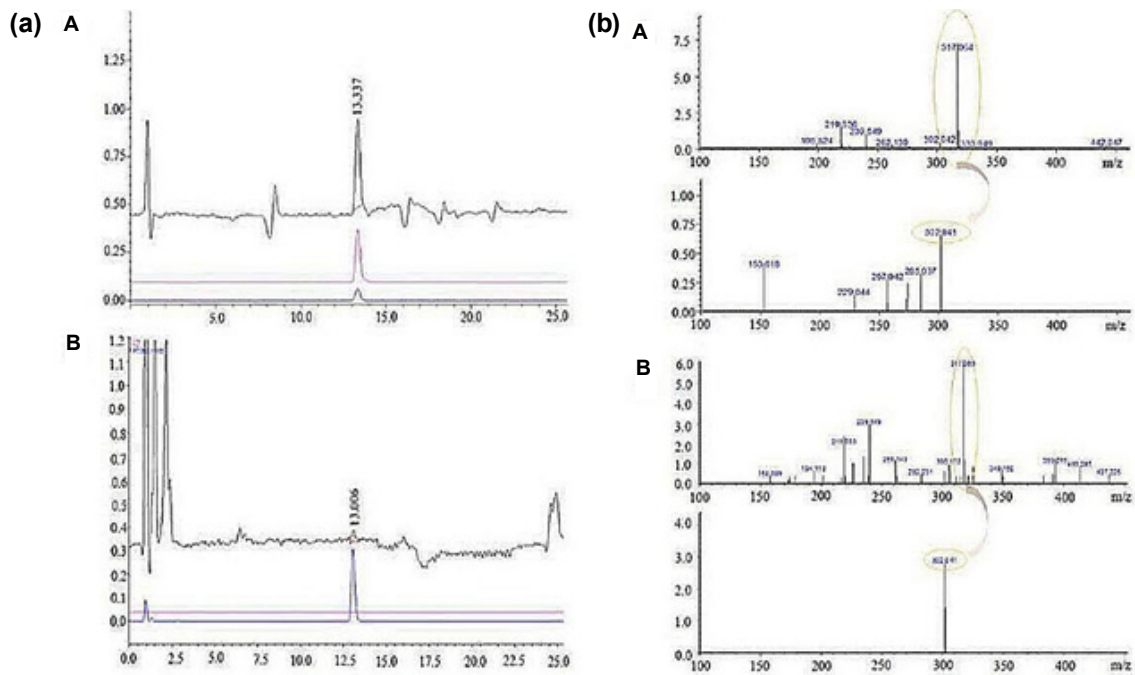


Fig. 8. LC-MS/MS chromatograms of isorhamnetin standard and *Oenanthe javanica* extract. Comparison of chromatogram and total ion chromatogram (TIC) analysis. (a) A: isorhamnetin standard solution, B: *Oenanthe javanica* extracts. Mass spectrum analysis for (b) A: isorhamnetin standard solution, B: *Oenanthe javanica* extracts.

gram(TIC)을 확인할 수 있었고, 질량 스펙트럼을 확인해 본 결과 precursor ion은 317 [M-H]⁺ m/z이고, product ion 302 [M-H]⁺ m/z로 확인할 수 있었다. 위의 제시된 분석 조건으로 HPLC/MS/MS를 이용하여 분석한 결과 표준용액과 시험용액의 TIC에서 동일한 시간대에 peak를 확인하였고, precursor ion(317 [M-H]⁺ m/z) 및 product ion (302 [M-H]⁺ m/z)이 유사한 값을 가지므로 표준용액과 미나리 추출물 중의 isorhamnetin이 동일 성분임을 확인할 수 있었으며, 미나리 추출물 중 isorhamnetin이 1.8 mg/g 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. Kim 등(65)의 기능성 원료 지표성분으로 Schizandrin의 분석법 개발 보고에서 특이성 측정에서도 표준용액과 시료의 피크 유지시간이 일치하였으며, 검량선의 상관계수(R²)가 0.9990으로 나타났다.

요 약

본 연구는 한국인이 일상생활에서 주로 상용하는 미나리에 대해 기억력 관련 효과와 항산화 효과, 미나리 추출물의 flavonoid 중 isorhamnetin을 분석하여 기능성식품 개발 및 이용에 기여하고자 실시하였다. Acetylcholinesterase의 활성 억제를 측정한 결과 화순미나리 추출물이 28.59%가 가장 높게 나타났으며, 나주미나리 추출물 25.11%와 유의적인 차이가 없었다. SH-SY5Y 세포사멸에 미치는 영향을 측정된 결과 DMSO와 비교하여 화순미나리 추출물 37.23%와 나주미나리 추출물 36.68%로 세포사멸이 유의적으로 감소하였다. 수동회피실험 결과 scopolamine 처리에 의해

기억력이 손상된 동물모델에서 미나리 추출물을 투여하였을 때 vehicle control보다 latency time이 높게 나타났다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과 화순, 나주, 의령 미나리 추출물 모두 미나리 처리 그룹군 간에도 유의적 차이가 있었고(P<0.05), 화순미나리 추출물이 총 폴리페놀 함량 117 mg/g, 총 플라보노이드 함량 30 mg GAE/g으로 가장 높게 측정되었다. TBARS 측정 결과 미나리 추출물 440 µg/mL의 농도에서 화순미나리 추출물이 50.7%의 억제력으로 가장 높았으며, 나주와 의령미나리 추출물보다 유의하게 높았다. 미나리 추출물의 플라보노이드 중 isorhamnetin을 분석한 결과 표준용액과 미나리 추출물의 머무름 시간이 14분대로 피크 유지시간이 일치하였으며, 동일한 spectrum을 나타내어 정확한 isorhamnetin의 분리를 확인하였다. 또한 LC/MS/MS를 통한 분석 결과 표준용액과 미나리 추출물에서 동일 시간대에 TIC를 확인하였고 precursor ion은 317 [M-H]⁺ m/z, product ion은 302 [M-H]⁺ m/z로 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과에 기초하여 미나리 추출물은 천연 항산화제와 기억력 개선제로써의 활용 가치를 시사한다고 사료된다. 또한 건강기능성 소재로서 식품산업 분야의 이용률 향상에 도움이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농림축산식품기술기획평가원 고부가가치식품 기술개발사업(과제번호: 111008-2)의 지원으로 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 137-147.
- Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficarò EP, Foster NL, Frey KA, Kilbourn MR. 1999. In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52: 691-699.
- Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH. 1996. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med* 62: 405-409.
- Kasa P, Papp H, Kasa P Jr, Torok I. 2000. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience* 101: 89-100.
- Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. 1993. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34: 609-616.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamates, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- Kong HJ, Park HS, Kim TH, Shin SR, Hong JY, Yang KM. 2013. Analysis of nutrition and antioxidants of Yak-Kong *Chungkukjang* powder added black foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1727-1735.
- Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH. 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 57: 513-533.
- Um MY, Ha TY, Seong KS, Kim YS. 2013. *In vitro* screening of the acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity, and neuronal cell protective effect of medicinal plant extracts. *Korean J Food Preserv* 20: 840-845.
- Shin KY, Lee JY, Won BY, Jung HY, Chang KA, Koppula S, Suh YH. 2009. BT-11 is effective for enhancing cognitive functions in the elderly humans. *Neurosci Lett* 465: 157-159.
- Mancuso C, Siciliano R, Barone E, Preziosi P. 2012. Natural substances and Alzheimer's disease: from preclinical studies to evidence based medicine. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1822: 616-624.
- Walesiuk A, Braszko JJ. 2010. Gingkoselect alleviates chronic corticosterone-induced spatial memory deficits in rats. *Fitoterapia* 81: 25-29.
- Park SK, Jung IC, Lee WK, Lee YS, Park HK, Go HJ, Kim K, Lim NK, Hong JT, Ly SY, Rho SS. 2011. A combination of green tea extract and L-theanine improves memory and attention in subjects with mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled study. *J Med Food* 14: 334-343.
- Ozarowski M, Mikolajczak PL, Bogacz A, Gryszyńska A, Kujawska M, Jodynis-Liebert J, Piasecka A, Napieczynska H, Szulc M, Kujawski R, Bartkowiak-Wieczorek J, Cichocka J, Bobkiewicz-Kozłowska T, Czerny B, Mrozkiewicz PM. 2013. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* 91: 261-271.
- Rhee HJ, Jung HS, Kim YD. 1994. Componential specification of the water dropwort (*Oenanthe javanica* DC). *J Sci Educ* 2: 17-32.
- Son MJ, Cha CG, Park JH, Kim CS, Lee SP. 2005. Manufacture of dropwort extract using brown sugar, fructose syrup and oligosaccharides. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1485-1489.
- Park JC, Yu YB, Lee JH. 1993. Isolation of steroids and flavonoids from the herb *Oenanthe javanica* Dc. *Kor J Pharmacogn* 24: 244-246.
- Jiang JS, Shih CM, Wang SH, Chen TT, Lin CN, Ko WC. 2006. Mechanisms of suppression of nitric oxide production by 3-O-methylquercetin in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 103: 281-287.
- Yang JH, Kim SC, Shin BY, Jin SH, Jo MJ, Jegal KH, Kim YW, Lee JR, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. 2013. O-Methylated flavonol isorhamnetin prevents acute inflammation through blocking of NF- κ B activation. *Food Chem Toxicol* 59: 362-372.
- Saud SM, Young MR, Jones-Hall YL, Ileva L, Evbuomwan MO, Wise J, Colburn NH, Kim YS, Bobe G. 2013. Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and β -catenin. *Cancer Res* 73: 5473-5484.
- Hwang CR, Hwang IG, Kim HY, Kang TS, Kim YB, Joo SS, Lee J, Jeong HS. 2011. Antioxidant component and activity of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 316-320.
- Hwang SJ, Park SJ, Kim JD. 2013. Component analysis and antioxidant activity of *Oenanthe javanica* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 45: 227-234.
- Jeong TS, Kim JH, An SA, Won YD, Lee SH. 2014. Quality characteristics and antioxidant activity of drink prepared with black garlic and *Oenanthe javanica* DC. *Korean J Food Preserv* 21: 193-198.
- Shudo K, Kagechika H, Yamazaki N, Igarashi M, Tateda C. 2004. A synthetic retinoid Am80 (tamibarotene) rescues the memory deficit caused by scopolamine in a passive avoidance paradigm. *Biol Pharm Bull* 27: 1887-1889.
- Tanabe F, Miyasaka N, Kubota T, Aso T. 2004. Estrogen and progesterone improve scopolamine-induced impairment of spatial memory. *J Med Dent Sci* 51: 89-98.
- Park CH, Choi SH, Koo JW, Seo JH, Kim HS, Jeong SJ, Suh YH. 2002. Novel cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. *J Neurosci Res* 70: 484-492.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 77: 817-827.
- Goodman Y, Mattson MP. 1994. Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* 128: 1-12.
- Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K, Mattson MP. 1997. Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* 17: 1046-1054.
- Suh YH, Checler F. 2002. Amyloid precursor protein, presenilins, and α -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* 54: 469-525.
- Shen Z, Wang G, Lin SZ. 1990. Two-way shuttlebox avoidance conditioning and brain NADH in rats. *Physiol Behav* 48: 515-517.
- Hwang IK, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong

- HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38: 342-347.
34. Kim HY, Woo KS, Hwang IK, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 40: 166-170.
35. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
36. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
37. Turumtay EA, Islamoglu F, Cavus D, Sahin H, Turumtay H, Vanholme B. 2014. Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Ind Crops Prod* 52: 687-694.
38. Nishikimi M. 1975. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun* 63: 463-468.
39. Woolf NJ. 1997. A possible role for cholinergic neurons of the basal forebrain and pontomesencephalon in consciousness. *Conscious Cogn* 6: 574-596.
40. Standridge JB. 2004. Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther* 26: 615-630.
41. Kim DI, Lee SH, Hur EY, Cho SM, Park HJ. 2005. Screening of natural plant resources with acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 427-432.
42. Han YQ, Huang ZM, Yang XB, Liu HZ, Wu GX. 2008. In vivo and in vitro anti-hepatitis B virus activity of total phenolics from *Oenanthe javanica*. *J Ethnopharmacol* 118: 148-153.
43. Neagu E, Paun G, Albu C, Radu GL. 2015. Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. *J Taiwan Inst Chem Eng* 52: 1-6.
44. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Hoke K, Taniguchi N. 2003. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem* 384: 567-574.
45. Zhao B. 2009. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem Res* 34: 630-638.
46. Ma CJ, Lee KY, Jeong EJ, Kim SH, Park J, Choi YH, Kim YC, Sung SH. 2010. Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Phytother Res* 24: 913-918.
47. Kwon D, Yoon S, Carter O, Bailey GS, Dashwood RH. 2006. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Angelica keiskei*, *Oenanthe javanica* and *Brassica oleracea* in the Salmonella mutagenicity assay and in HCT116 human colon cancer cells. *BioFactors* 26: 231-244.
48. Zhang N, Pei F, Wei H, Zhang T, Yang C, Ma G, Yang C. 2011. Isorhamnetin protects rat ventricular myocytes from ischemia and reperfusion injury. *Exp Toxicol Pathol* 63: 33-38.
49. Rossi R, Basilico F, Rossoni G, Riva A, Morazzoni P, Mauri PL. 2009. Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry of bilobalide in plasma and brain of rats after oral administration of its phospholipidic complex. *J Pharm Biomed Anal* 50: 224-227.
50. Van der Zee EA, Biemans BA, Gerkema MP, Daan S. 2004. Habituation to a test apparatus during associative learning is sufficient to enhance muscarinic acetylcholine receptor-immunoreactivity in rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 78: 508-519.
51. Nam YJ, Lee DU. 2013. Biological effects of the leaves and roots of *Ligularia stenocephala*. *J Life Sci* 23: 1381-1387.
52. Oh HG, Kim JH, Shin EH, Kang YR, Lee BG, Park SH, Moon DI, Kwon LS, Kim YP, Choi MH, Kim OJ, Park KH, Lee HY. 2013. Improving effects of Platycodon extracts jelly on β -amyloid-induced cytotoxicity and scopolamine-induced cognitive impairment animal models. *Korean J Plant Res* 26: 417-425.
53. Abd-Elhady RM, Elsheikh AM, Khalifa AE. 2013. Anti-amnesic properties of *Ginkgo biloba* extract on impaired memory function induced by aluminum in rats. *Int J Dev Neurosci* 31: 598-607.
54. Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, Kim EH, Park JW, Park IB, Kim SW, Kang SG, Park YK, Jung ST. 2004. Activities of antioxidation and alcohol dehydrogenase inhibition of methanol extracts from some medicinal herbs. *Korean J Food Preserv* 11: 201-206.
55. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
56. Lee HR. 2013. Studies on the preparation and quality characteristics of mixed beverage using dropwort and seaweed. *MS Thesis*. Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Korea.
57. Huda-Faujan N, Noriham A, Norrakiah AS, Babji AS. 2009. Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *Afr J Biotechnol* 8: 484-489.
58. Wan-Ibrahim WI, Sidik K, Kuppusamy UR. 2010. A high antioxidant level in edible plants is associated with genotoxic properties. *Food Chem* 122: 1139-1144.
59. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 80-85.
60. Jo HW, Lee SH, Nam DH, Kim JY, Lim SK, Lee JS, Park JC. 2008. Antioxidant activity and phytochemical study on the aerial parts of *Oenanthe javanica*. *Kor J Pharmacogn* 39: 142-145.
61. de la Monte SM, Neely TR, Cannon J, Wands JR. 2000. Oxidative stress and hypoxia-like injury cause Alzheimer-type molecular abnormalities in central nervous system neurons. *Cell Mol Life Sci* 57: 1471-1481.
62. Abdel-Wahab BA, Abd El-Aziz SM. 2012. *Ginkgo biloba* protects against intermittent hypoxia-induced memory deficits and hippocampal DNA damage in rats. *Phytomedicine* 19: 444-450.
63. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ. 2008. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 955-971.
64. Oh SI, Lee MS. 2003. Screening for antioxidative and anti-mutagenic capacities in 7 common vegetables taken by Korean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1344-1350.
65. Kim Y, Ha N, Han SH, Jeon JY, Hwang M, Im YJ, Lee SY, Chae SW, Kim MG. 2013. Confirmation of schizandrin as a marker compound in *Jangsu* Omija powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 244-248.