

자란초에서 분리된 Luteolin 5-glucoside의 함량분석과 신경세포 보호 활성

우경완[#] · 심미옥[#] · 김아현 · 강병만 · 정호경 · 안병관 · 조정희 · 조현우*
한약진흥재단 한약자원본부

Quantitative Analysis of Luteolin 5-glucoside in *Ajuga spectabilis* and Their Neuroprotective Effects

Kyeong Wan Woo[#], Mi Ok Sim[#], A Hyun Kim, Byoung Man Kang, Ho Kyung Jung,
Byeongkwan An, Jung Hee Cho, and Hyun Woo Cho*

Division of Traditional Korean Medicine Resource, National Development Institute of Korea Medicine,
288, Woodlandgil, Anyangmyeon, Jangheunggun, Jeollanamdo 59338, Korea

Abstract – In the course of our continuing search for biologically active components from Korean medicinal plants, we isolated the main compound, luteolin 5-glucoside from aqueous fraction of *Ajuga spectabilis*. The structure was elucidated by the basis of ¹H and ¹³C NMR and TOF ESI-MS data. Quantitative analysis of luteolin 5-glucoside was carried out on a XBridge C18 column (S-5 μm, 4.6×250 mm) with gradient elution composed of acetonitrile:water. The results exhibit that the average content of main compound in *A. spectabilis* were 0.048%. Oxidative stress plays a major role Alzheimer's disease (AD) and other neurodegenerative disease. AD is major health problem and there is currently no clinically accepted treatment to cure or stop its progression. Pretreatment with luteolin 5-glucoside markedly attenuated H₂O₂-induced cell viability loss in a dose-dependent manner. Luteolin 5-glucoside also inhibited the formation of intracellular reactive oxygen species in SH-SY5Y. The results suggest that luteolin 5-glucoside from *A. spectabilis* has protective effects against oxidative stress-induced cytotoxicity, which might be a potential therapeutic compound for treating and/or preventing neurodegenerative disease implicated with oxidative stress.

Key words – Labiatae, *Ajuga spectabilis*, Luteolin 5-glucoside, Neuroprotective effect

알츠하이머는 기억 능력과 인지력이 상실되는 병으로, 퇴행성 뇌 신경질환의 대부분을 차지하고 있으며 특히, 뇌 신경세포 독성은 활성산소종이 세포내 증가함으로써 산화적 스트레스에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)는 세포가 에너지를 얻기 위해 생성되는 것으로 과생성시 지방 산화, DNA 손상 및 합성 억제 등을 유발시켜 세포의 큰 손상을 주게 된다.²⁾ 산화적 손상이 지속적으로 진행되며 퇴행성 뇌 질환을 일으키는 주요한 원인으로 밝혀짐에 따라 폴리페놀, 플라보노이드와 같이 항산화력이 강한 천연물질을 이용한 알츠하이머병과 같은 질병을 예방하기 위한 연구가 진행되고 있다.³⁾ 최

근 연구에서 quercetin이 알츠하이머 동물모델에서 GSH를 증가시키고 염증인자들은 감소시킴에 따라 알츠하이머의 치료제로서 가능성을 나타냈으며,⁴⁾ 고들빼기에서 분리된 flavonoid 유도체인 apigenin, luteolin, luteolin 7-glucoside, luteolin 7-glucuronide의 신경보호 효과를 규명하였다. 그 중 luteolin은 H₂O₂에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포에서의 생존률을 높이고 ROS 생성을 낮춤으로써 분리된 물질 중 가장 높은 신경세포보호 효과를 나타내었다.⁵⁾ 하지만, luteolin과 그 배당체에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다. 최근 정⁶⁾ 등은 luteolin 5-glucoside가 RAW 264.7세포에서 항산화 및 항염증 효능을 가진다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서는 자란초(*Ajuga spectabilis*)에서 분리된 지표성분 luteolin 5-glucoside의 신경세포의 산화적 손상에 대한 보호능을 평가하기 위하여 H₂O₂에 의해 유도된 SH-SY5Y 세포의 사멸에 대한 보호 효과를 측정하였다.

[#]These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): johw7@nikom.or.kr
(Tel): +82-61-860-2801

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 자란초는 2013년 11월에 충북 충주에서 채취하였으며, 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수에게 의뢰하여 동정하여 사용하였다. 표본은 한약진흥재단 한약재연구팀에 보관하였다.

기기 및 시약 - 추출 및 분획용 시약, TLC 및 column용 시약 등은 특급시약을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F_{254S}plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 사용하였으며, UV의 검색은 254와 365 nm에 측정하였다. Column chromatography의 충진제는 YMC gel ODS-A(50 μm)를 사용하였다. 단일 화합물의 구조를 규명하기 위해 이용한 NMR(Nuclear magnetic resonance) spectrum은 Varian 600 spectrometer(¹H: 600 MHz, ¹³C: 150 MHz)를 사용하여 측정하였고, NMR 용매는 Sigma, Inc (USA)의 DMSO-*d*₆를 사용하였다. 세포 배양액인 Minimum Essential medium(MEM)과 FBS, Streptomycin의 세포 배양 시약들은 Gibco(USA)에서 구입하여 사용하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS, CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)는 promega(USA)에서, H₂O₂, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출 및 분획 - 자란초 전초 1.7 kg에 methanol을 가하여 3시간 동안 3회 환류냉각 추출 후 감압 농축하여 메탄올 추출물 284 g을 얻었다. 이를 10% MeOH에 현탁시킨 후, *n*-hexane, H₂O 순으로 분획하고 각 분획물을 감압, 농축하여 *n*-hexane 분획물 40 g과 H₂O 분획물 220 g을 얻었다.

지표물질 분리 - H₂O 분획물을 ODS gel(50 μm, YMC, Japan) 500 g이 충진된 glass column(16 cm×80 cm)에 충전시킨 후 water(in 0.02% formic acid)-ACN 혼합용매(90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 0:100)를 전개용매로 하여 open column chromatography를 진행하였으며, 1 L씩 받아 TLC로 스크리닝하여 5개의 소분획물을 얻었다(ASW1-5). 이 중 ASW4(15 g)을 소량의 증류수를 넣어 현탁시키고 ODS gel(20 μm, YMC, Japan) 250 g을 glass column(5 cm×70 cm)에 충전시키고 water(in 0.02% formic acid)-ACN의 혼합용매(90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 0:100)로 15 mL/min의 속도로 서서히 유출시켜 500 ml씩 받아 TLC 패턴을 확인하여 9개의 소분획으로 나누었다(ASW4-1-9). 그 중 main compound가 함유된 ASW4-9(5 g)을 메탄올에 녹인 다음 Sephadex LH-20(Sigma, Sweden) 200 g이 충전된 glass column(2.5 cm×70 cm)에 로딩시키고 MeOH로 전개하여 50 ml씩 20개를 받은 후 TLC data를 바탕으로 3

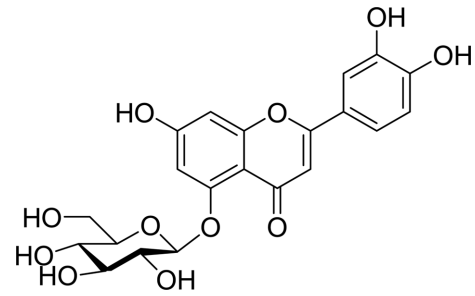


Fig. 1. Chemical structures of compound 1.

개의 소분획으로 나누었다(ASW4-9-3). 그리고 이 중 ASW4-9-2에서 메탄올 소량을 넣어 재결정화를 유도하여 30 mg을 순수하게 분리하였다(Fig. 1).

Luteolin 5-glucoside (1) Yellow powder; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.38 (1H, dd, *J*=8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.36 (1H, brs, H-2'), 6.88 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.69 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 6.55 (1H, s, H-3), 4.70 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-1"), 3.76 (1H, dd, *J*=12.0, 2.0 Hz, H-6"a), 3.55 (1H, dd, *J*=11.5, 5.5 Hz, H-6"b); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.9 (C-4), 162.7 (C-2), 161.3 (C-7), 158.6 (C-5), 158.3 (C-9), 149.2 (C-4'), 145.6 (C-3'), 121.4 (C-6'), 118.5 (C-1'), 115.9 (C-5'), 113.0 (C-2'), 108.1 (C-10), 105.6 (C-3), 104.5 (C-1"), 104.4 (C-6), 98.2 (C-8), 77.5 (C-3"), 75.5 (C-5"), 73.6 (C-2"), 69.6 (C-4"), 60.8 (C-6"); LC ESI IT-TOF MS: *m/z* 447 [M-H]⁻.

표준용액 조제 - 자란초로부터 정제한 지표물질 luteolin 5-glucoside를 2.07 mg를 정확히 취해 MeOH를 10 mL가하여 stock solution을 조제하였고, 단계별(207, 103.5, 51.75, 25.88, 12.94 ppm)로 희석하여 사용하였다.

검액 조제 - 자란초를 분쇄하여 약 1.0 g을 정확히 칭량하고, 용매별(MeOH, 50% MeOH, EtOH)로 각각 10 mL씩 첨가하여 30 분간 초음파 추출, 여과 후 사용하였다. 추출 조건(초음파 30분, 30분 2회, 60분과 환류 30분, 30분 2회, 60분 추출)에 따른 함량 분석은 동일한 방법으로 칭량 후 MeOH 10 mL를 첨가, 여과 후 검액으로 사용하였다.

HPLC 분석 조건 - 지표성분으로 분리된 luteolin 5-glucoside을 Table II와 같이 조건 설정 후 함량분석을 실시하였다.

검량선 및 직선성(Linearity) - 지표물질 luteolin 5-glucoside의 농도에 따른 직선적인 측정값을 확인하기 위해 직선성을 검토하였다. 표준용액을 MeOH로 단계적(207, 103.5, 51.75, 25.88, 12.94 μg/mL)으로 희석하여 HPLC로 실험하였다. 검량선은 $y=ax+b$ (*y*: peak 면적, *x*: 시료농도, *a*: 직선의 기울기, *b*: *y*절편)의 형태로 작성하였다.

세포 배양 - Human Neuroblastoma cell line인 SH-SY5Y

는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였으며, Minimum Essential medium(EMEM, ATCC, USA)에 10% Fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ Incubator에 배양하였다.

세포 독성 - 96 well plate에 5×10⁴ cells/well의 SH-SY5Y 세포를 분주하고 3시간 동안 배양한 후 시료를 첨가하고 24 시간 동안 배양한 다음 10 µL의 MTT solution을 첨가한 후 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 3시간 더 배양시킨 후, 즉시 490 nm서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

신경세포보호효과 - 세포를 96-well plates에 5×10⁴ cells/well 농도로 100 µL 씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 다음 시료를 처리하고 24시간 후 H₂O₂(최종농도 100 µM)를 첨가하고 30분간 더 배양한 후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

세포 내 ROS 측정 - 세포 내 ROS 측정은 2,7-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)가 세포 내로 투과된 후 아세틸기가 유리된 2,7-dichlorofluorescein(DCFH)의 형태에서 ROS와 반응하여 형광물질을 생성하는 성질을 이용하였다. SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 well당 약 8,000 cell이 되도록 접종하여 배양한 후 70-80% confluency가 되었을 때 luteolin 5-glucoside을 PBS에 녹여 30분간 처리하였다. 이를 걸여낸 후 10 µM DCFH-DA로 다시 40분간 처리한 후 flow cytometer(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)로 측정하였다.

결과 및 고찰

지표성분 구조 분석 - 지표물질은 노란색 가루로 재결정되었으며, TLC분석에서 Aninaldehyde 발색 시약 분무 후 가열시 노란반점을 나타내어 flavonoid로 추정하였다. ESI IT-TOF MS spectra에서 분자량 447 [M-H]⁻을 확인하였고, MSMS 분석에서 모핵인 luteolin 분자량 285 [M-H]⁻을 추가로 확인하였다.⁶⁾ ¹H-NMR spectrum에서 δ_H 7.38(1H, dd, J=8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.36(1H, brs, H-2'), 6.88(1H, d, J=8.0 Hz, H-5')에서 flavonoid B-ring의 1,3,4-치환된 3개의 proton peak를 확인하였고, δ_H 6.79(1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.69(1H, d, J=2.0 Hz, H-6)에서 A-ring의 meta coupling하는 2개의 doublet peak, δ_H 6.55(1H, s, H-3)에서 C-ring의 single peak를 확인하였다. 추가적으로 당의 anomeric proton δ_H 4.70(1H, d, J=7.0 Hz, H-1")을 관찰하였다. ¹³C-NMR

Table II. HPLC condition of luteolin 5-glucoside

Instrument	HPLC (Shimadzu 20 AD)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volumn	10 µL		
UV length	360 nm		
Mobile solvent	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in ACN		
Mobile phase	Time	A (%)	B (%)
	0	87	13
	30	77	23

Table III. The contents of luteolin 5-glucoside by extract solvents

Solvents	Content (%)		
	MeOH	50% MeOH	EtOH
	0.036	0.035	0.006

spectrum에서 15개의 flavonoid 모핵 peak와 당의 carbon peak[δ_C 104.5(C-1"), 77.5(C-3"), 75.5(C-5"), 73.6(C-2"), 69.6(C-4"), 60.8(C-6")]이 관찰되었다. 당의 anomeric proton의 coupling constant 값이 7.0으로 β형태로 확인하였다.⁸⁾ Luteolin 7번 위치에 glucose가 결합되었을 때 ¹H-NMR spectrum에서 δ_H 6.88(1H, d, J=1.8 Hz, H-8), 6.77(1H, d, J=1.8 Hz, H-6) 그리고 ¹³C-NMR spectrum에서 δ_C 99.5(C-6), 94.7(C-8)의 데이터를 비교하여 5번 위치에 결합된 것을 확인하였다.⁹⁾ 이상의 결과를 바탕으로 기존의 문헌과 비교하여 luteolin 5-glucoside로 구조 결정하였다.⁶⁾

함량분석 - 자란초에서 분리한 luteolin 5-glucoside을 지표성분으로 하여 HPLC 분석법을 확립하고자 하였다. Table II와 같은 조건으로 진행하여 머무름 시간은 11.4 min에서 확인할 수 있었다(Fig. 2). 위의 분석법을 바탕으로 추출용매에 따른 지표성분 함량 비교 시 MeOH 추출에서 가장 높은 효율을 보였고(Table III), MeOH을 이용한 추출조건별 결과 환류 추출 30분 2회 반복에서 가장 높은 효율을 확인하였다(Table IV). 지표물질의 표준용액을 1~200 µg/mL의 범위에서 검량선 상관계수(R²)은 1.000으로 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 이와 같은 방법으로 지표성분의 함량을 구하였고, 그 결과 자란초 MeOH 추출물에 0.048%의 luteolin 5-glucoside을 함유하였다(Table I).

세포생존률 - Luteolin 5-glucoside의 세포독성을 나타내는

Table I. Calibration data for analysis of luteolin 5-glucoside

Compound	Regression equation y=ax+b		Contents (mg/g)	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
	Slope(a)	Intercept(b)				
Luteolin-5-glucoside	15632.17	3317.25	0.48±0.00	1.0000	0.07	0.22

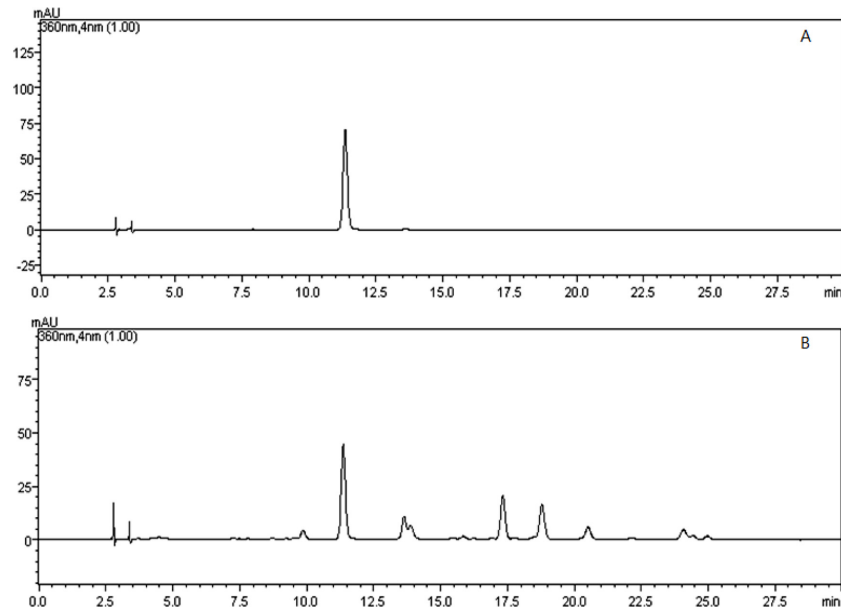


Fig. 2. HPLC chromatogram of luteolin 5-glucoside (A) and *Ajuga spectabilis* (B).

Table IV. The contents of luteolin 5-glucoside by extraction time and methods

Extraction method	Sonication			Reflux		
Time (min)	30	30*2	60	30	30*2	60
Content (%)	0.031	0.031	0.035	0.042	0.04s9	0.048
	0.031	0.034	0.030	0.038	0.047	0.042
	0.032	0.032	0.036	0.043	0.048	0.041
SD	0.032	0.032	0.034	0.041	0.048	0.044
Average	0.001	0.002	0.003	0.003	0.001	0.004

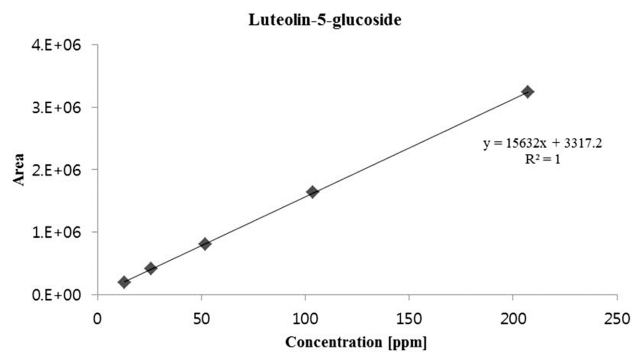


Fig. 3. Calibration curve of luteolin 5-glucoside.

농도를 알아보기 위해 MTS 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)는 살아 있는 세포에 있는 Mitochondrial NADH-dehydrogenase와 반응하여 tetrazolium salt를 환원시켜 색상을 갖은 formazan을 형성하여 살아있는 세포를 정량화 할 수 있다.

Luteolin 5-glucoside는 6.25, 12.5, 25 μ M의 농도로 처리하였을 때 모든 세포에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 4).

H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 Luteolin 5-Glucoside 신경세포보호효과 - 알츠하이머는 기억 능력과 인지능력이 상실되는 임상특성을 가지고 있는 퇴행성 뇌신경 질환으로써 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경세포의 사멸에 의해 발생되며, 천연 항산화 소재인 플라보노이드, 폴리페놀 등은 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호 효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다.⁹⁾

MTS법을 이용하여 luteolin 5-glucoside의 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 SH-SY5Y 세포주에 대한 신경세포 보호효과에 대한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 아무것도 처리하지 않은 control군에 비해 H₂O₂만을 처리한 군에서는 72%의 생존율을 나타내었고, luteolin 5-glucoside 처리시 농도의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것으로 나타났다. 이들 결과로부터 luteolin 5-glucoside 신경모세포종의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 갖고 있는 것으로 확인되었다.

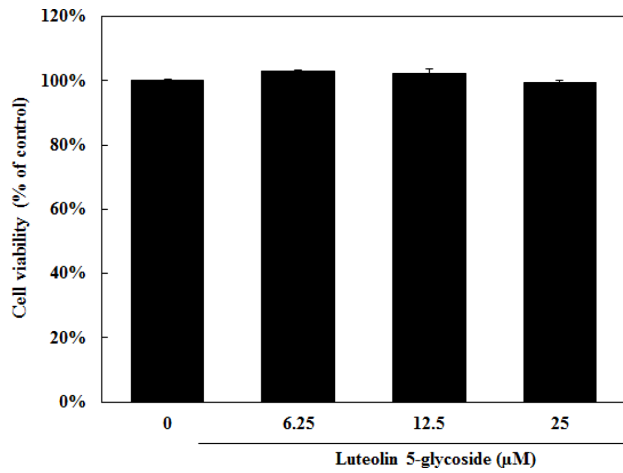


Fig. 4. Effect of luteolin 5-glucoside on cell viability in SH-SY5Y cells.

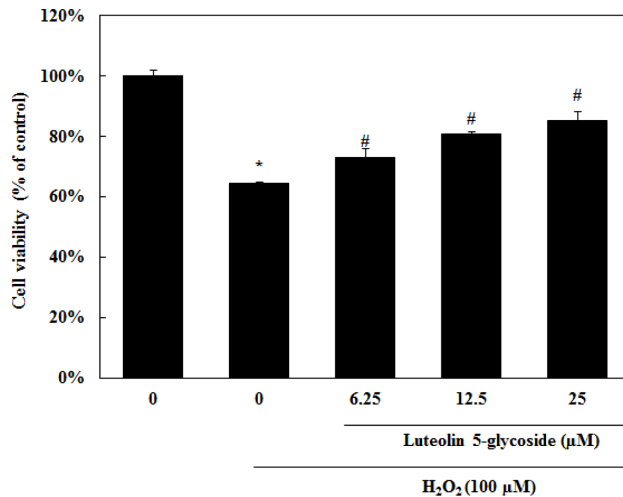


Fig. 5. Effect of luteolin 5-glucoside on hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in SH-SY5Y cells.

다음으로, DCFH-DA는 세포내로 비교적 자유롭게 투과되지만 세포내 esterase에 의해 DCFH로 전환되어진다. 전환된 DCFH는 세포 투과성이 낮아 세포 내에 축적되며 세포내 ROS로 존재할 경우 이와 반응하여 형광물질로 전환된다. Fig. 6은 luteolin 5-glucoside를 먼저 처리한 후 유세포 분석을 통하여 세포내 ROS 함량을 측정된 결과를 나타내었다. luteolin 5-glucoside를 처리한 모든 군에서 H₂O₂만 처리한 군에 비해 농도의존적으로 ROS함량이 유의적으로 감소하였다. 정⁶⁾ 등은 Raw 264.7세포에서 luteolin 5-glucoside가 ROS생성을 억제한다고 보고하였으며, 본 연구에서도 luteolin 5-glucoside가 ROS 생성을 농도의존적으로 감소시켰다.

권¹¹⁾ 등의 보고에 따르면 luteolin이 SH-SY5Y세포에서 H₂O₂로 유도한 세포독성을 억제하여 세포생존율을 높이고

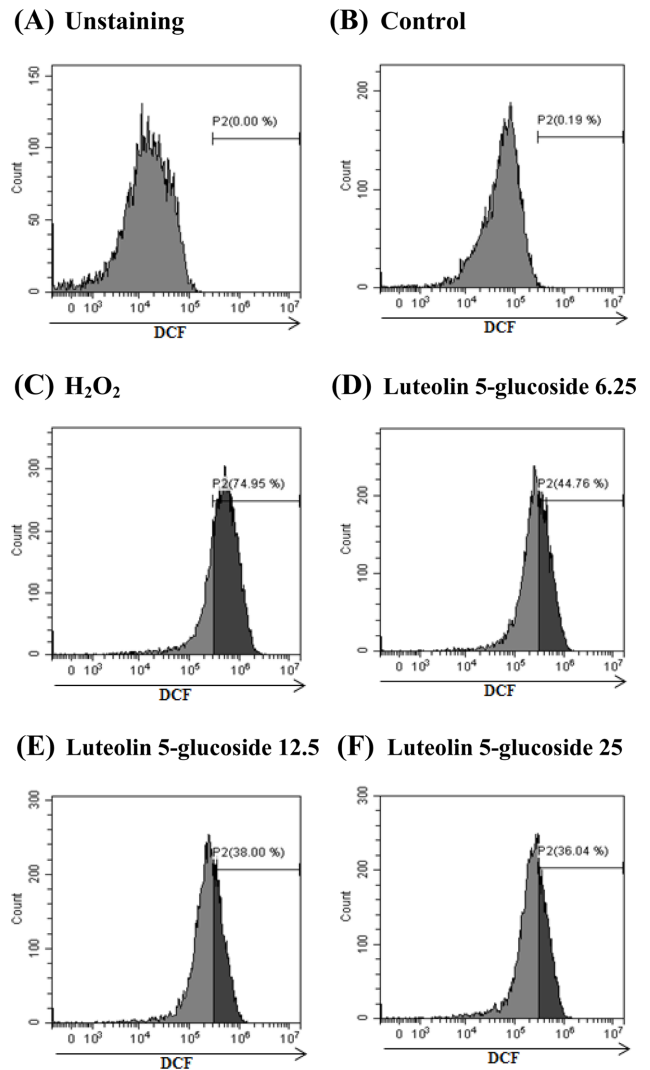


Fig. 6. Effect of luteolin 5-glucoside on hydrogen peroxide-mediated ROS induction in SH-SY5Y cells.

MAPKs의 활성을 억제함에 따라 신경세포보호작용이 있다고 발표하였다. 또한, luteolin은 Nrf2의 활성을 조절하여 ROS 생성을 억제하여 항산화활성을 증가시켜 세포보호 효과가 있다고 보고 된 바 있다.¹²⁾ 본 연구에서도 luteolin의 배당체인 luteolin 5-glucoside가 세포사멸을 억제하고 세포내 ROS 생성을 감소시킴에 따라 ROS에 의해 발생하는 뇌세포 사멸에 대해 보호작용의 역할을 할 것으로 사료되며, 향후 luteolin 5-glucoside의 구체적인 기전연구가 진행되어야 할 것이다.

결론

자란초의 전초로부터 지표성분인 luteolin 5-glucoside (1)를 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 분리하였고, ¹H, ¹³C

NMR과 TOF-ESI MS를 이용하여 구조동정 하였다. 분리된 지표성분을 이용하여 자란초의 분석법을 확립하여 MeOH 환류 30분 2회 반복 추출 시 0.048%으로 가장 많은 양을 함유하는 것으로 검출되었다. 지표성분의 luteolin 5-glucoside 가 H₂O₂에 의해 유도되는 산화적 스트레스 상태에서 ROS 생성을 억제시키고, 세포생존률을 증가시킴에 따라 신경세포 손상을 억제하거나 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 2014년도 보건복지부 한의약 산업 육성을 위한 기반구축(한국 토종자원의 한약재 기반구축사업) 결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

인용문헌

- Collins, J. A., Wood, S. T., Nelson, K. J., Rowe, M. A., Carlson, C. S., Chubinskaya, S., Poole, L. B., Furdul, C. M. and Loeser, R. F. (2016) Oxidative stress promotes peroxiredoxin hyperoxidation and attenuates pro-survival signaling in aging chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **291**: 6641-6654.
- Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. G. and Lee, I. S. (2005) Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 233-240.
- Huang, S. H., Lin, C. M. and Chiang, B. H. (2008) Protective effects of *Angelica sinensis* extract on amyloid beta-peptide-induced neurotoxicity. *Phytomedicine* **15**: 710-721.
- Sabogal-Guaqueta, A. M., Munoz-Manco, J. I., Ramirez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodriguez, M., Osorio, E. and Cardona-Gomez, G. P. (2015) The flavonoid quercetin ameliorates alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology* **93**: 134-145.
- Zhang, Y. C., Gan, F. F., Shelar, S. B., Ng, K. Y. and Chew, E. H. (2013) Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem. Toxicol.* **59**: 272-280.
- Jung, H. Y., Jin, S. E., Min, B. S., Kim, B. W. and Choi, J. S. (2012) Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside. *Food Chem. Toxicol.* **50**: 2171-2179.
- Kumar, S., Chandra, P., Bajpai, V., Singh, A., Srivastava, M., Mishra, D. K. and Kumar, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. *Ind. Crops. Prod.* **69**: 143-152.
- Woo, K. W., Han, J. Y., Suh, W. S., Lee, J. H. and Lee, K. R. (2014) Two new chemical constituents from leaves of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **35**: 2151-2154.
- Chung, H. S. (2003) Inhibition of monamine oxidase by a flavone and its glycoside from *Ixeris dentate* Nakai. *Nutraceuticals & Food.* **8**: 141-144.
- Zhao, B. (2009) Natural antioxidants protect neurons in alzheimer's disease and parkinson's disease. *Neurochem Res.* **34**: 630-638.
- Kwon, S. H., Hong, S. I., Kim, J. A., Jung, Y. H., Kim, S. Y., Kim, H. C., Lee, S. Y. and Jang, C. G. (2011) The neuroprotective effects of *Lonicera japonica* THUNB. against hydrogen peroxide-induced apoptosis via phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt in SH-SY5Y cells. *Food Chem. Toxicol.* **49**: 1101-1019.
- Zhang, Y. C., Gan, F. F., Shelar, S. B., Ng, K. Y. and Chew, E. H. (2013). Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia -induced cellular injury. *Food Chem. Toxicol.* **59**: 272-280.

(2016. 6. 9 접수; 2016. 7. 11 심사; 2016. 8. 16 게재확정)