

추출 방법에 따른 자소엽 추출물의 항산화 효과 비교

서인영 · 김희수 · 장경수 · 여민호 · 김혜란 · 정보경 · 장경수[†]

부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과
(2018년 1월 15일 접수: 2018년 2월 9일 수정: 2018년 2월 25일 채택)

Comparison of Anti-Oxidative Activities of *Perilla frutescens* Extracts by Extraction Methods

In-Yeong Seo · Hee-Su Kim · Kyeong-Su Jang · Min-Ho Yeo · Hye-Ran Kim
Bo-Kyoung Jung · Kyung-Soo Chang[†]

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Catholic University of Pusan, Busan 46252, Republic of Korea.
(Received January 15, 2018; Revised February 9, 2018; Accepted February 25, 2018)

요약 : 자소엽(*perilla frutescens*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하며 널리 알려져 있는 약용 식물이다. 본 연구에서는 자소엽을 물, 열수, 초음파 추출 방법으로 추출하여 항산화 효과를 비교하고 가장 효과적인 추출 방법을 제시하고자 한다. 물, 열수, 초음파 처리를 통해 각각의 자소엽 추출물을 제조 하였고, DPPH 라디칼 소거능 및 총 페놀 함량을 통해 항산화 효과를 검증하고, 인간 간세포인 HepG2에 대한 세포 독성효과와 hydrogen peroxide (H₂O₂)로 유도된 산화적 스트레스로부터 간세포 보호효과를 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 확인하였다. 자소엽 초음파 추출물은 5000 µg/mL농도에서 69.07%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내며 물, 열수 추출물과 비교하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 또한 총 페놀 함량 측정 결과 51.60±1.06 mg GAE/g extract 로서 물, 열수 추출물 보다 높은 총 페놀 함량을 확인하였다. 그러나 산화적 스트레스에 의한 세포 보호효과는 미비하였다. 본 연구를 통해 추출 방법에 따른 항산화 효과의 차이를 확인하였으며, 우수한 항산화 효과를 나타낸 자소엽 초음파 추출물을 이용하여 추가적인 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

주제어 : 자소엽, 추출물, 추출방법, 항산화, 초음파

Abstract : *Perilla frutescens* (*P. frutescens*) is one of evergreen shrubs belonging to the Labiatae and is grown wildly in Korea. This study was carried out to evaluate the anti-oxidative effects of *Perilla frutescens* Extracts by Extraction Methods (water, heating and sonication). Anti-oxidative effects were measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and total phenol content. Cell viability and hepatoprotective effects were identified by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Among various extracts, *P.*

[†]Corresponding author
(E-mail: kschang@cup.ac.kr)

frutescens extracts by sonication showed the highest DPPH radical scavenging activity at 5000 $\mu\text{g/mL}$. Total phenolic content in *P. frutescens* extracts by sonication was 51.60 ± 1.06 mg GAE/g extract. However, *P. frutescens* extracts did not show hepatoprotective effects. This study identified anti-oxidative effects of *P. frutescens* extracts by sonication, and it would be necessary to perform further studies of *P. frutescens* extracts by sonication.

Keywords : *Perilla frutescens*, Extracts, Extraction methods, Anti-oxidative, Sonication

1. 서론

활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)과 같은 자유 라디칼은 세포에서 정상적인 대사 활동을 통해 지속적으로 생성된다[1]. 예를 들어 superoxide anion, hydroxy radical, hydrogen peroxide와 같은 활성 산소종이 존재하는데, 최근 환경오염 물질, 유기 용매 및 담배 연기 등과 같은 외부 요인 또는 다양한 내부 요인으로 인해 활성 산소종이 과도하게 생성된다[2]. 이들은 지질 과산화물 생성을 유도하여 세포막을 손상시키며 세포의 항산화 레벨을 감소시켜 세포에서 항산화 작용과 산화적 생산의 불균형을 초래하여 인체에 해로운 영향을 미친다[3,4].

체내에는 활성 산소종으로부터 우리 인체를 보호하기 위해 항산화 효소(superoxide dismutase, catalase)와 그 외에 비타민 C, E 등이 방어하는 역할을 하고 있다[5]. 그러나 과도하게 생성된 자유 라디칼과 낮은 항산화 방어 시스템은 산화적 스트레스를 유발하여 생체 분자의 구조와 기능 변형을 일으키는 화학적 변화를 일으킨다[6]. 산화적 스트레스는 만성 퇴행성 질환, 염증성 질환, 암, 당뇨병 등을 포함하는 다양한 질병의 주요 위험 인자이다[7]. 이러한 질병을 예방하기 위한 항산화제는 항산화 불균형을 예방할 수 있지만, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propylgallate와 같은 항산화제는 여러 실험을 통해 다양한 부작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다[8].

여러 가지 약용 식물은 고대부터 질병을 예방하고 치료하기 위해 사용되어 왔으며, 현재 약용 식물에서 발견 되는 생리 활성을 가지는 천연 화합물은 임상에서 적용하여 약물의 원천이 되고 있다[9]. 과일, 야채, 허브 등에서 발견되는 생리 활성 물질은 항산화, 항염증, 동맥 경화 및 혈관 신생 억제 활동 등에 다양한 효과를 나타내며 수

천 가지의 천연 화학 성분들이 발견되었다 [10,11]. 이처럼 생리 활성을 가지는 천연 물질을 활용하기 위해서는 활성 탐색 및 추출물의 제조 공정이 중요하고 천연물의 추출 효율 증대를 위해 에탄올, 열수, 초음파, 가압추출 등 여러 방법이 시도되고 있다[12].

자소엽(*Perilla frutescens*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 음식 염료의 하나로 중국, 일본, 한국에서 가장 인기 있는 약용 식물로 자소엽의 잎은 해독제, 진해제, 항생제, 해열제로 사용되며 특히 중국의 전통 장 질환 및 알레르기 치료의 민간요법으로 사용된다[13]. 자소엽의 항균 효과[14], 항산화 효과[15], 항염증효과[16] 등 생리 활성에 대한 연구가 보고 되어있다. 또한 자소엽 오일은 건강한 노화와 학습 성과에 유의한 것으로 알려져 있다[17]. 그러나 생리 활성이 있는 것으로 보고되어진 자소엽 추출물은 추출 방법에 따른 항산화 효과에 관한 연구는 현재까지 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 자소엽 추출물을 물, 열수, 초음파 추출 방법에 의해 추출하여 DPPH 라디칼 소거능 시험을 통한 물질 자체의 항산화 효능 및 총 페놀 함량을 측정하고, 인간 간세포 HepG2에 추출물을 처리한 후 세포 독성효과 및 산화적 스트레스로부터 세포 보호효과를 농도별로 관찰하여 자소엽 추출물의 가장 효과적인 추출 방법을 제시하고 천연 항산화제 개발을 위한 자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 추출물 제조

자소엽 물 추출물을 얻기 위하여 자소엽 분말을 정제수로 가해 24시간 이후 추출하였고, 자소

엽 열수 추출물을 얻기 위하여 자소엽 분말을 정제수로 가해 100°C에서 끓인 후 24시간 이후 추출하였으며, 자소엽 초음파 추출물을 얻기 위하여 자소엽 분말을 정제수를 가한 후 1시간 음파 처리(Hwashin, Korea)를 하고 24시간 이후 추출하였다. 세 가지 방법을 이용한 추출액을 모아 여과지(Chemlab, Spain)로 여과시켜 얻은 여액을 감압 농축(Heidolph, Germany)하여 각각의 용매를 제거 시킨 후 동결건조(Christ, Germany) 한 후 분석용 시료로 사용하였다.

2.2. DPPH 라디칼 소거능

자소엽 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Lee 등의 방법에 따라 실행하였다[18]. 용매에 200, 1000, 5000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석한 자소엽 추출물을 준비하여 96 well plate에 10 μL 씩 분주하고 용매에 200 μM 농도로 제조한 DPPH (Sigma-Aldrich, USA)를 190 μL 를 혼합하여, 37°C에서 30분 동안 반응시킨다. 이후에 550 nm에서 흡광도 측정을 하였다(Biotrak II Plate reader, Amersham Life Science, UK). 측정값은 3번의 반복 실험을 통해 평균값과 표준편차로 나타내었다.

2.3. 총 페놀 함량

총 페놀 함량 측정 방법은 Folin-Denis 방법으로 확인하였다. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 자소엽 추출물과 증류수(1650 μL)와 100 μL Folin-Denis 시약을 혼합하여 5 분 뒤 1 N Sodium Carbonate 200 mL를 추가하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨다. 이후에 750 nm에서 흡광도를 확인하였다(Spectronic Genesys 5, Milton Roy Company, USA). 총 페놀 함량 측정을 위해 표준 물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다. 측정값은 3 번의 반복 실험을 통해 평균값과 표준편차로 나타내었다.

2.4. 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주는 인간 간세포인 HepG2로 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배지로는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Hyclone, USA)를 사용하였고, 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA), 0.1mM non-essential amino acids (GIBCO, USA), penicillin-streptomycin

(GIBCO, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

2.5. 세포 독성효과

자소엽 추출물의 간세포에 대한 세포 독성효과를 확인하기 위해 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 통해 확인하였다. 세포를 1 X 10⁵개/mL 농도로 96 well에 100 μL 분주하고 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하고 각각의 물질을 해당 세포에 농도별로(25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL 분주하고 37°C, 5% CO₂에서 72시간 배양하였다. 5 mg/mL 농도인 MTT 시약 (Ambresco, USA)을 20 μL 분주하여, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양하였다. 배지를 제거하고 Dimethyl sulfoxide (Ambresco, USA)를 200 μL 분주하고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Biotrak II Plate reader, Amersham Life Science, UK). 측정값은 3번의 반복 실험을 통해 평균값과 표준편차로 나타내었다.

2.6. 산화적 스트레스에 대한 세포 보호효과

자소엽 추출물의 산화적 스트레스에 따른 간세포에 대한 세포 보호효과를 확인하기 위해 MTT assay를 변형하여 확인하였다. 세포를 1 X 10⁵개/mL 농도로 96 well에 100 μL 분주하고 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하고 각각의 물질을 해당 세포에 농도별로(25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL 분주하고 37°C, 5% CO₂에서 48 시간 배양하였다. 이후에 100 mM H₂O₂를 20 μL 분주 후 24시간 배양하였다. 5 mg/mL 농도인 MTT 시약(Ambresco, USA)을 20 μL 분주하고, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DMSO를 200 μL 분주하고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다(Biotrak II Plate reader, Amersham Life Science, UK). 측정값은 3번의 반복 실험을 통해 평균값과 표준편차로 나타내었다.

2.7. 통계 분석

본 연구의 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Chicago, USA) 통계 프로그램으로 one-way ANOVA test를 실시하여 각 군의 유의성을 p<0.05 수준에서 검정하였다.

3. 결 과

3.1. 추출 방법에 따른 자소엽 추출물의 추출 수율

자소엽 추출물의 추출 수율은 물, 열수, 초음파 방법에 따라 차이를 나타내었다. 물 추출물은 0.29%, 열수 추출물은 0.78%, 초음파 추출물은 0.69%의 추출 수율을 확인하였고, 열수>초음파>물 순서로 높은 추출 수율을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Extraction yield of *Perilla frutescens* extracts

Solvent	Method	Yield (dry basis, %)
	-	0.29
Purified Water	Heating	0.78
	Sonication	0.69

3.2. 자소엽 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

추출 방법에 따른 자소엽 추출물의 항산화 효과를 DPPH 라디칼 소거능 시험을 통해 확인하였다. 자소엽 추출물에서 항산화 효과를 농도별로 확인해 본 결과 농도 의존적으로 항산화 효과를 확인하였다. 자소엽 물 추출물은 200, 1000, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 13.43, 33.18, 46.23%의 항산화 효과를 나타내었고, 자소엽 열수 추출물은 200, 1000, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 9.07, 21.95, 58.26%의 항산화 효과를 나타내었고, 자소엽 초음파 추출물은 200, 1000, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 19.92, 34.66, 69.07%의 항산화 효과를 확인하였다. 대조군으로 사용한 quercetin은

200, 1000, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 모두 60% 이상의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내며 높은 항산화 효과를 확인하였다. 추출 방법에 따른 항산화 효과의 차이는 초음파>열수>냉수 추출물 순서로 높은 항산화 효과를 관찰 할 수 있었다(Table 2).

3.3. 자소엽 추출물의 총 페놀 함량

자소엽 물 추출물(PE I), 열수 추출물(PE II), 초음파 추출물(PE III)을 이용하여 총 페놀 함량을 확인하였다. 세 번의 반복 실험을 통해 함량을 분석해 본 결과 물 추출물(PE I)은 42.80 ± 1.06 mg GAE/g extract, 열수 추출물(PE II)은 46.53 ± 0.23 mg GAE/g extract, 초음파 추출물(PE III)은 51.60 ± 1.06 mg GAE/g extract를 확인 할 수 있었다. 추출 방법에 따른 총 페놀 함량의 차이는 초음파>열수>냉수 추출물 순서로 높은 총 페놀 함량을 확인 할 수 있었다(Table 3).

Table 3. Total phenolic content of *Perilla frutescens* extracts

Extracts ¹⁾	Total phenolic content (mg GAE/g extract)
PE I	42.80 ± 1.06
PE II	46.53 ± 0.23
PE III	51.60 ± 1.06

¹⁾ PE I is *Perilla frutescens* extracts by water., PE II is *Perilla frutescens* extracts by hot water., PE III is *Perilla frutescens* extracts by sonication.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of *Perilla frutescens* extracts and nature materials

Materials ¹⁾	DPPH radical scavenging activity (%)		
	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
PE I	$13.43 \pm 0.34^*$	$33.18 \pm 0.97^*$	$46.23 \pm 1.11^*$
PE II	$9.07 \pm 2.56^*$	$21.95 \pm 3.51^*$	$58.26 \pm 2.36^*$
PE III	$19.92 \pm 3.38^*$	$34.66 \pm 2.75^*$	$69.07 \pm 5.82^*$
Quercetin	$62.14 \pm 2.66^*$	$85.33 \pm 0.91^*$	$86.72 \pm 2.34^*$

¹⁾ PE I is *Perilla frutescens* extracts by water., PE II is *Perilla frutescens* extracts by hot water., PE III is *Perilla frutescens* extracts by sonication. *The means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

3.4. 자소엽 추출물의 세포 독성효과

자소엽 추출물의 간세포에 대한 세포 독성효과를 측정하기 위해 인간 간세포 HepG2를 이용하여 자소엽 추출물을 농도 별로 처리한 후 72시간 동안 세포 독성을 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 군의 생존율은 100%로 보았을 때, 간세포에서 자소엽 물 추출물은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, 자소엽 열수 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, 자소엽 초음파 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 자소엽 추출물의 추출 방법에 따른 차이는 열수 및 초음파 추출물과 비교하여 물 추출물에서 낮은 독성을 확인하였다. 대조군으로 사용한 quercetin은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Table 4).

3.5. 산화적 스트레스에 따른 자소엽 추출물의 세포 보호효과

간세포에서의 자소엽 추출물의 산화적 스트레스에 따른 세포 보호효과를 확인하기 위해 HepG2 세포에 H_2O_2 를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 후, 자소엽 추출물의 세포 보호효과를 측정하였다. 자소엽 물, 열수, 초음파 추출물의 모든 농도에서 세포 보호효과는 확인 할 수 없었다. 이러한 결과는 항산화 효과를 나타내는 물질과 세포 보호효과를 나타내는 물질이 일치하지 않음을 확인 하였다. 대조군으로 사용한 quercetin은 농도 의존적으로 세포 보호효과를 확인하였고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 약 30%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 약 58%의 세포 생존율을 확인하였다(Table 5).

Table 4. Cell viability of *Perilla frutescens* by MTT assay

Materials ¹⁾	Cell viability (%)		
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$
PE I	106.00 \pm 5.22*	101.00 \pm 5.89	90.51 \pm 5.09*
PE II	100.00 \pm 0.44	89.85 \pm 4.20*	75.31 \pm 8.17*
PE III	101.00 \pm 3.23	81.33 \pm 4.21*	72.06 \pm 7.61*
Quercetin	109.70 \pm 4.21*	110.20 \pm 3.10*	89.45 \pm 7.61*

¹⁾ PE I is *Perilla frutescens* extracts by water., PE II is *Perilla frutescens* extracts by hot water., PE III is *Perilla frutescens* extracts by sonication. *The means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 5. Cell protection ability of *Perilla frutescens* extracts against oxidative stress by MTT assay

Materials ¹⁾	Cell viability (%)			
	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
PE I	8.00 \pm 0.26	10.46 \pm 0.38	10.05 \pm 1.08	9.92 \pm 0.40
PE II	8.00 \pm 0.26	7.99 \pm 0.29	8.03 \pm 0.75	7.74 \pm 0.14
PE III	8.00 \pm 0.26	8.32 \pm 0.75	8.65 \pm 0.37	9.26 \pm 0.00
Quercetin	8.00 \pm 0.26	17.52 \pm 0.90*	30.00 \pm 1.34*	58.00 \pm 1.87*

¹⁾ PE I is *Perilla frutescens* extracts by water., PE II is *Perilla frutescens* extracts by hot water., PE III is *Perilla frutescens* extracts by sonication. *The means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

4. 고 찰

최근 천연 물질을 이용한 항산화 효과에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있으며, 천연 물질에 포함된 생리 활성을 가지는 화합물을 이용한 항산화 제제 개발이 증가하고 있는 추세이다. 천연 항산화 물질은 기존의 합성 항산화제가 가지고 있는 부작용을 극복하고, 자유 라디칼을 통한 세포에 미치는 손상을 방지하여 염증성 질환을 억제한다[19].

본 연구에서는 한국에 널리 분포하고 있는 자소엽을 물, 열수, 초음파 추출 방법을 통해 추출하여 추출 방법에 따른 항산화 효과를 비교하고 간세포에 대한 세포 보호효과에 대해 알아보았다. 다른 추출 방법에 따라 자소엽의 추출 수율의 차이를 확인하였고 열수>초음파>물 순서로 높은 추출 수율을 확인하였다. 열수 및 초음파 추출물은 물 추출물과 비교하여 2배 이상의 높은 추출 수율을 나타내었다. DPPH는 안정한 자유 라디칼로서 항산화 물질 확인을 위해 많이 이용되는 물질로서 자소엽 물, 열수, 초음파 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 비교 한 결과, 세 가지 추출물 모두 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능을 확인하며 효과적인 항산화능을 가지는 성분이 존재하는 것을 확인하였고, 항산화 효과는 초음파>온수>냉수 추출물 순서로 높은 항산화 효과를 확인하였다. 초음파 추출방법은 식물의 세포벽을 파괴하여 식물의 활성 성분이 용매로 전달 효율이 향상되는 것으로 다른 추출방법과 비교하여 높은 활성을 나타내는 것으로 보고 되어있으며, 본 연구 결과와 일치하였다[20].

약용 식물에는 생리 활성을 가지는 많은 화합물을 포함하고 있으며 폴리페놀은 높은 항산화 효과를 가지며 심혈관 및 염증성 질환의 예방에 효과적으로 알려져 있고 암세포 진행 억제 역할을 한다고 알려져 있다[21]. 자소엽의 물, 열수, 초음파 추출물에서 각각 42.8 46.5 51.6 mg GAE/g extract의 총 페놀 함량을 확인하였으며, 본 결과는 DPPH 라디칼 소거능과 연관성 있는 결과를 나타내며 초음파>온수>냉수 추출물 순서로 높은 총 페놀 함량을 확인하였다. 많은 천연 물질에서 총 페놀 함량이 알려져 있는 가운데 고 지혈증 효능이 있는 *Opuntia joconostle* 물질 씨앗의 47.85±1.29 mg GAE/g extract의 총 페놀 함량과 유사한 결과를 확인하였다[22].

본 연구에서는 자소엽 추출물의 항산화 효과를

바탕으로 하여 간세포에 산화적 스트레스를 유발하여 세포 보호효과를 확인하였다. 인간 간암세포주인 HepG2는 항산화 효소를 생산하여 항산화 효과 및 세포 보호효과를 관찰하는데 유용하게 사용되는 세포주이다. 자소엽의 물, 열수, 초음파 추출물에서 간세포에 대한 세포 보호효과는 미비하였으며 추출물 자체의 항산화 효과는 확인 하였지만, 간세포에서 항산화가 크게 작용하지 않은 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 동일한 시료라도 추출 방법에 따라 추출 수율 및 항산화 효과가 차이가 있음을 확인하였다. 따라서 이를 기초로 하여 높은 활성을 나타낸 초음파 추출 방법을 이용하여 추출 공정에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되며 자소엽 추출물의 항산화 효과뿐만 아니라 항바이러스 및 항알러지 등의 방면에서도 효과를 확인하여 또 다른 효과를 기대할 수 있을 것이다.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Brain Busan 21 program.

References

1. N. A. Shah, M. R. Khan, K. Naz, M. A. Khan, "Antioxidant potential, DNA protection, and HPLC-DAD analysis of neglected medicinal *Jurinea dolomiaea* roots", Biomed Res Int., Vol.2014, No.726241. pp. 1-10, (2014).
2. Y. J. Lee, D. B. Kim, J. S. Lee, J. H. Cho, B. K. Kim, H. S. Choi, B. Y. Lee, O. H. Lee, "Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea", Molecules, Vol.18, No.10 pp. 12937-12950, (2013).
3. S. Tobwala, W. Fan, C. J. Hines, W. R. Folk, N. Ercal, "Antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens* and its protective effects against oxidative stress in various cell cultures", BMC Complement Altern Med., Vol.14, No.271 pp. 1-10, (2012).

4. P. B. Rakhunde, S. Saher, S. A. Ali, "Neuroprotective effect of *Feronia limonia* on ischemia reperfusion induced brain injury in rats", *Indian J Pharmacol.*, Vol.46, No.6 pp. 617-621, (2014).
5. S. Bayati, R. Yazdanparast, "Antioxidant and free radical scavenging potential of yakuchinone B derivatives in reduction of lipofuscin formation using H₂O₂-treated neuroblastoma cells", *Iran Biomed J.*, Vol.15, No.4 pp. 134-142, (2011).
6. C. T. Kumarappan, E. Thilagam, S. C. Mandal, "Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*", *Saudi J Biol Sci.*, Vol.19, No.3 pp. 349-355, (2012).
7. B. Shen, J. Truong, R. Helliwell, S. Govindaraghavan, N. J. Sucher, "An in vitro study of neuroprotective properties of traditional Chinese herbal medicines thought to promote healthy ageing and longevity", *BMC Complement Altern Med.*, Vol.13, No.373 pp. 1-8, (2013).
8. T. Chipiti, M. A. Ibrahim, N. A. Koorbanally, M. S. Islam, "In vitro antioxidant activities of leaf and root extracts of *Albizia antunesiana* harms", *Acta Pol Pharm.*, Vol.70, No.6 pp. 1035-1043, (2013).
9. J. W. Lampe, "Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies", *Am J Clin Nutr.*, Vol.70, No.3 pp. 475S-490S, (1999).
10. N. Sharma, K. W. Samarakoon, R. Gyawali, Y. H. Park, S. J. Lee, S. J. Oh, T. H. Lee, D. K. Jeong, "Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of *Euphorbia hirta* ethanolic extract", *Molecules*. Vol.19, No.9 pp. 14567-14581, (2014).
11. H. Ghaffari, B. J. Ghassam, S. Chandra Nayaka, K. Ramachandra Kini, H. S. Prakash, "Antioxidant and neuroprotective activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. against oxidative stress-induced neurotoxicity", *Cell Mol Neurobiol.*, Vol.34, No.3 pp. 323-331, (2014).
12. H. M. Park, J. H. Hong, "Effect of Extraction Methods on Antioxidant Activities of *Mori ramulus*", *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, Vol.43, No.11 pp. 1709-1715, (2014).
13. D. H. Kim, Y. C. Kim, U. K. Choi, "Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Staphylococcus aureus* using evolutionary operation factorial design technique", *Int J Mol Sci.*, Vol.12, No.4 pp. 2395-2407, (2011).
14. M. H. Kim, N. H. Lee, M. H. Lee, D. J. Kwon, U. K. Choi, "Antimicrobial Activity of Aqueous Ethanol Extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* Leaf", *KOREAN J. FOOD CULTURE.*, Vol.22, No.2 pp. 266-273, (2007).
15. M. H. Kim, W. W. Kang, N. H. Lee, D. J. Kwoen, U. K. Choi, "Antioxidant Activities fo Extract with Water and Ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta* kudo Leaf", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, Vol.50, No.4 pp. 327-333, (2007).
16. H. U. Son, J. C. Heo, M. S. Seo, S. H. Lee, "Effects of *Perilla frutescens* L. on anti-oxidant and anti-inflammation activity", *Korean J. Food Preserv.*, Vol.17, No.5 pp. 757-761, (2010).
17. Y. Takenaka, Y. Arii, H. Masui, "Subunit structure and functional properties of the predominant globulin of perilla (*Perilla frutescens* var. *frutescens*) seeds", *Biosci Biotechnol Biochem.*, Vol.74, No.12 pp. 2475-2479, (2010).
18. S. M. Lee, M. K. Na, R. B. An, B. S. Min, H. K. Lee, "Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma*", *Biol Pharm Bull.*, Vol.26, No.9 pp. 1354-1356, (2003).
19. S. F. Albaayit, Y. Abba, R. Abdullah, N. Abdullah, "Evaluation of Antioxidant Activity and Acute Toxicity of *Clausena*

- excavata* Leaves Extract”, Evid Based Complement Alternat Med., Vol.2015, No.975450 pp. 1-10, (2014).
20. S. L. Shin, C. H. Lee, “Antioxidant Activities of Ostrich Fern by Different Extraction Methods and Solvents”, Journal of Life Science, Vol.21, No.1 pp. 56-61, (2011).
21. L. Mhadhebi, A. Mhadhebi, J. Robert, A. Bouraoui, “Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Aqueous Extracts of Three Mediterranean Brown Seaweeds of the Genus *Cystoseira*”, Iran J Pharm Res., Vol.13, No.1 pp. 207-220, (2014).
22. O. Osorio-Esquivel, A. Ortiz-Moreno, L. Garduño-Siciliano, V. B. Alvarez, M. D. Hernández-Navarro, “Antihyperlipidemic effect of methanolic extract from *Opuntia joconostle* seeds in mice fed a hypercholesterolemic diet”, Plant Foods Hum Nutr., Vol.67, No.4 pp. 365-370, (2012).