한국식생활문화학회지 32(6): 583-588, 2017
J. Korean Soc. Food Cult. 32(6): 583-588, 2017
본 논문의 저작권은 한국식생활문화학회에 있음.
Copyright © The Korean Society of Food Culture

ISSN 1225-7060(Print)
ISSN 2288-7148(Online)
https://doi.org/10.7318/KJFC/2017.32.6.583

용매별 정향 추출물의 항산화 및 신경세포 보호 효과

오 희 경*
장안대학교 건강과학부 식품영양과

Antioxidant and Neuronal Cell Protective Effects of *Eugenia caryophyllata* Thunb. by Extraction Solvent

Hee-Kyung Oh*
Department of Food and Nutrition, Jangan University

Abstract

This study examined the antioxidant and neuronal cell protective effects of the water and methanol extracts of *Eugenia caryophyllata* Thunb. The total polyphenol content was significantly higher in the methanol extract than in the water extract. The DPPH radical scavenging activity in the water extract was similar to Vit. C at a concentration of 100~200 μg/mL. The ABTS radical scavenging activity in the water and methanol extract was similar to Vit. C at a concentration of 800~1,000 μg/mL. The superoxide dismutase (SOD)-like activity in the methanol extract was similar to Vit. C at a concentration of 800~1,000 μg/mL. The DPPH, ABTS radical scavenging and (SOD)-like activity increased with increasing extract concentration. In a cell viability using MTT, the water extract (50 and 100 ppm) and methanol extract (100 ppm) had a protective effect against H_2O_2-induced neurotoxicity.The result ssuggest that the extract of *E. caryophyllata* Thunb. has antioxidant activities and may be useful for treating neurodegenerative disorders.

Key Words: *Eugenia caryophyllata* Thunb., polyphenol, antioxidant effect, neuronal cell protective effect

I. 서 론

최근 서구화된 식습관 및 식문화 환경 변화로 운동부족과 영영과다, 흡연, 음주 등 건강을 위험 하는 요인들에 의해 생성되는 만성질환이 계속해서 증가함에 따라 건강 증진 및 질병 예방을 충족시킬 수 있는 건강기능성 식품 소재에 대한 관심이 증가되고 있다(Park et al. 2004).

생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환을 유도하는 자유라디칼은 산화적 스트레스를 유발하게 되며, 이러한 산화적 스트레스는 세포막을 손상시키고 단백질, 지질, 탄수화물 및 DNA와 반응하여 여러 조직의 세포를 손상시켜 뇌졸중, 암, 신경장애 등 다양한 질병이 발생하는 것으로 알려져 있다(Ames 1993). 특히 산화적 스트레스에 의한 지질 과산화가 퇴행성 신경질환의 대부분을 차지하는 Alzheimer's disease (AD)을 유발시킨다는 연구들이 보고되고 있다(Ames et al. 1993). 최근에 개발된 퇴행성 신경질환의 치료법인 외과적 수술, 세포이식 및 항산화제 처리 등 다양한 치료법은 부작용 및 뇌조직의 손상 등을 초래함으로써 여러 가지 위험부담을 안고 있으므로 항산화성을 기반으로 한 신경세포 보호효과가 뛰어나고 안정성이 입증된 천연소재의 개발이 요구되고 있다(Yoon et al., 2007).

정향은(*Eugenia caryophyllata* Thunb.)은 상록 소교목의 꽃봉오리를 건조한 것으로 도금양과(Myrtaceae)에 속한다. 정향은 오래전부터 서양요리에서 각종 육류와 야채요리를 만들 때 이용되어져 왔으며, 국내에서는 방충제, 곰팡이 방제 목적과 향미강화 및 나쁜 향미 억제 등 목적으로 이용되는 것으로 보고되고 있다(Singh et al. 2009). 현재까지 정향 추출물에 관한 연구로 항산화효과, 항염증효과(Oztuurk et al. 2005), 항균효과(Wang et al. 2010) 등의 많은 연구들이 보고되고 있다. 한편 정향의 추출방법과 추출조건 등에 따라 정향의 항산화 효과에 대한 연구결과들이 다소 다르게 보고되고 있다(Lee & Yoon. 1993; Ahnet al. 2000; Dong et al. 2004; Oh 2016). 따라서 추출조건에 따른 정향의 항산화 효과와 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과에 대한 과학적 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 정향 농도별 열수 및 메탄올 추출물의 diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), azino-bis diammonium salt (ABTS) 및 superoxide dismutase (SOD) 유사활성과 같은

*Corresponding author: Hee-Kyung Oh, Dept. of Food and Nutrition, Jangan University, Gyeonggi-do 445-756, Korea
Tel: 82-31-299-3063 Fax: 82-31-299-5633 E-mail: hkoh01@hanmail.net

항산화 효과를 비교하고 MTT assays를 활용한 신경세포 보호효과를 측정하여 Alzheimer's disease (AD)와 같은 신경퇴행성 질환에 대한 정향의 활용가능성을 제시하고자 하였다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 실험 재료 및 추출물의 제조

본 실험에 사용한 시료는 서울 경동시장에서 판매하는 인도네시아산 정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb.)을 2016년에 구입하여 냉동고에 보관하면서 추출용 시료로 분석하는데 사용하였다. 시료의 열수 추출물은 정향 100 g에 증류수 1,000 mL을 첨가하고, 90°C로 12시간 동안 가열 환류하면서 3회 추출하였다. 시료의 메탄올 추출물은 정향 100 g에 메탄올 1,000 mL을 첨가하여 실온에서 6시간씩 3회 추출하였다. 열수 및 메탄올 추출물은 No. 2. 여과지(Advance Co., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 그 후 40°C 수욕 상에서 진공회전농축기(N-1000S-W, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압・농축한 다음 동결건조(Bondiro Vacuum Freeze-Dryer, Ilshin Lab Co., Ltd, Seoul, Korea)하여, –70°C에 냉동고에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

2. 총 polyphenol 함량

정향 농도별 열수 및 메탄올 추출물 1 mL와 Folin reagent 2 mL을 가한 후 실온에서 3분 동안 반응시키고 10% Na_2CO_3 2 mL을 혼합 한 후 30°C에서 40분간 정치하였다. 흡광도는 760 nm에서 UV-visible spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다(Folin-Denis, 1912). 표준곡선은 tannic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)로 작성한 검량선으로부터 총 polyphenol 화합물의 함량을 구하였다.

3. DPPH radical 소거활성

정향 농도별 열수 및 메탄올 추출물 1 mL에 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 1 mL을 가한 후 균일하게 교반한 다음 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, 517 nm에서 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Blois, 1958). DPPH radical 소거활성은 (1–시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100에 의하여 산출하였다.

4. ABTS radical 소거활성

시료의 각 농도별 용액 0.5 mL와 희석한 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 용액 0.5 mL를 혼합하여 30분간 반응시킨 후 735 nm에서 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Roberta et al. 1999). ABTS radical 소거활성은 (1–시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100에 의하여 계산하여 나타냈다.

5. SOD 유사활성(Superoxide dismutase-like activity)

정향 농도별 열수 및 메탄올 추출물 용액 40 μL에 Tris-HCl buffer (50 mM tris amino-methane, 10 mM EDTA, pH 8.0) 120 μL와 7.2 mM pyrogallol 20 μL을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨다. 1 N HCl 20 μL를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Marklund & Marklund, 1974). SOD 유사활성은 (1–시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)×100에 의하여 계산하여 나타냈다.

6. 신경세포 보호효과 측정

Hydrogen peroxide (H_2O_2)으로부터 유도된 SH-SY5Y 세포 생존율에 대한 효과는 MTT reduction assay로 측정하였다(Heo et al. 2001). 정향 열수와 메탄올 추출물을 농도별로 SH-SY5Y 세포에 H_2O_2 처리하기 1시간 전에 처리하고, 100 μM H_2O_2를 각각 24시간동안 처리하였다. 이 상태의 SH-SY5Y cell에 MTT stock solution을 처리하여 37°C에서 3시간 incubation한 다음, DMSO 100 μL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 570 nm에서 microplate reader (UV-1601PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 대조구는 200 μM 비타민 C를 사용하였고, cell viability는 대조군에 대한 % 농도로 나타냈다.

8. 통계처리

모든 통계자료는 3회 반복 실시하여 얻은 결과로, 실험결과의 통계 분석은 SPSS Win. 20.0을 사용하였다. 각 시료에 대한 값은 mean±SD로 나타내었으며 실험군 간의 차이 유의성을 일원배치 분산분석(One way ANOVA)를 실시하였고, 시료 간의 유의적인 차이는 Duncan's multiple range test와 t-test를 이용하여 사후 검증을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 총 polyphenol 함량

정향 열수 및 메탄올 추출물의 총 polyphenol 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 정향 열수 및 메탄올 추출물의 총 polyphenol 함량은 각각 286.39 mg/g와 531.62 mg/g으로, 메탄올 추출물은 열수 추출물에 비해 총 polyphenol 함량이 유의적으로 더 높게 나타났다($p<0.05$). Oh (2016)의 연구에서 정향 열수 추출물에서 총 phenol성 화합물 함량이 239.26 mg/g으로 나타났다고 보고되어, 본 연구와 비교 하였을 때 유사한 것으로 나타났다. 또한, Dong et al.(2004) 연구결과에서 정향 물과 메탄올 추출물에서 총 phenol성 물질 함량은 23.1%와 42.8%을 함유하고 있는 것으로 보고되어, 본 연구

<Table 1> Total polyphenol content of *Eugenia caryophyllata* Thunb. extract by water and methanol

Extract solvent	Total polyphenol(mg/g DW)
Water	286.39±2.95[1)#2)]
Methanol	531.62±2.72

[1)]Mean±SD
[2)]Means in the column with different superscripts are significantly different by Student's t-test at p<0.05.

결과의 정향 메탄올 추출물에서 총 polyphenol 함량이 더 높게 나온 결과와 유사하게 나타났다.

2. DPPH radical 소거활성

정향 농도별 열수 및 메탄올 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 모든 처리구에서 추출물 농도가 증가함에 따라 소거활성이 증가하는 경향을 보였다(p<0.05). 6~50 μg/mL의 농도에서 정향 메탄올 추출물의 경우 열수 추출물 보다 DPPH radical 소거능은 유의적으로 높게 나타났으나(p<0.05), 100 μg/mL와 200 μg/mL의 농도에서는 열수 추출물의 항산화 활성은 대조군으로 사용한 비타민 C와 유의적인 차이를 보이지 않았다. Dong et al.(2004)은 정향을 물, 메탄올 및 에테르로 추출하여 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과, 각각 36.1, 30.9, 29.7%로 물 추출물에서 자유라다칼 소거능이 가장 높았다고 보고하였으며, 이는 본 연구 결과에서의 정향 열수 추출물이 메탄올 추출물에 비해 DPPH radical 소거능이 증가한 결과와 유사한 경향을 보였다.

3. ABTS radical 소거활성 및 SOD 유사활성

정향 농도별 열수 및 메탄올 추출물의 ABTS radical 소거활성과 SOD 유사활성을 측정한 결과는Table 3과 Table 4와 같다. 정향 열수 및 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS radical 소거능이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다(p<0.05). 100~400 μg/mL의 농도에서 정향 메탄올 추출물의 경우 대조군으로 사용한 비타민 C에 비해 유의적으로 높게 나타났으나(p<0.05), 800~1000 μg/mL의 농도에서는 정향 열수 및 메탄올 추출물은 비타민 C와 유사한 항산화 활성을 나타내었다.

SOD 유사활성은 정향 열수 및 메탄올 추출물 농도가 증가함에 따라 유의적으로 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(p<0.05). 농도 100~400 μg/mL에서 메탄올 추출물은 열수 추출물에 비해 SOD 유사활성은 유의적으로 높았으나, 대조군인 비타민 C에 비해서는 낮은 활성을 보였다(p<0.05). 농도 800~1000 μg/mL에서 메탄올 추출물은 80.33%와 83.26%의 높은 소거능을 나타내었으며(p<0.05), 대조군인 비타민 C와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

인체 내 생성된 자유라디칼을 환원시키거나 소거하는 능력은 체내의 항산화 활성을 예측할 수 있고, 이러한 자유라디칼 소거작용은 인체의 노화와 질병을 예방하는데 도움이 된다. 항산화 활성을 측정하는 방법의 일종인 ABTS radical 소거활성은 극성과 비극성 시료의 소거활성을 모두 측정할 수 있으므로 DPPH radical 소거활성과는 달리 광범위하게 사용하는 것으로 보고되고 있다(Van et al. 1999). Jeong et al.(2010)의 보고에 의하면, 어성초 60% 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS radical 소거활성이 높아지는 경향을 보였으며, 이는 어성초 메탄올 추출물이 phenol성 화합물과 같은 비교적 극성이 높은 화합물을 다량 함유하고 있어 자유라디칼을 우수하게 소거하는 것으로 알려져 있다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성은 활성산소 종을 hydrogen peroxide (H_2O_2)로 전환하는 반응을 촉매작용을 하는 pyrogallol 생성량을 측정하여 활성산소에 대한 산화 억제 효과를 측정할 수 있는 방법이다(Benzie et al. 1996). SOD 유사활성 물질은 SOD와 결합된 phenol계 물질로 superoxide에 대한 산화 억제 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다(Nice et al. 1995). Choi et al.(2012)은 와송을 메탄올과 물로 추출하여 SOD 유사활성을 측정한 결과 1 mg/mL 농도에서 각각 38.9%와 32.5%으로 메탄올 추출물이 물 추출물에 비해 자유라다칼을 우수하게 소거하는 것으로 보고하여 본 연구결과와 유사한 것으로 나타났다. 본 실험 결과에서 정향 열수 추출물에 비해 비극성 용매인 메탄올 추출물에서의 총 polyphenol 함량 증가는 항산화 활성이 증가하는 것으로 사료된다.

<Table 2> DPPH radical scavenging of *E. caryophyllata* Thunb. extract by water and methanol (%)

Extract solvent	Concentration (μg/mL)				
	6	25	50	100	200
Water	23.77±0.35[1)a C2)3)]	33.69±0.58[bC]	54.78±1.34[cC]	89.92±0.09[dA]	92.17±0.09[eA]
Methanol	25.07±0.22[aB]	42.23±0.36[bB]	62.24±0.18[cB]	88.69±0.17[dB]	91.00±0.09[eB]
Vit. C	31.46±0.11[aA]	59.42±1.67[bA]	89.07±1.53[cA]	90.07±0.58[cA]	92.43±0.06[cA]

[1)]Mean±SD
[2)]Values represent an average of three determinations.
[3)]Means in the column (A-C) and row (a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

<Table 3> ABTS radical scavenging of *E. caryophyllata* Thunb. extract by water and methanol (%)

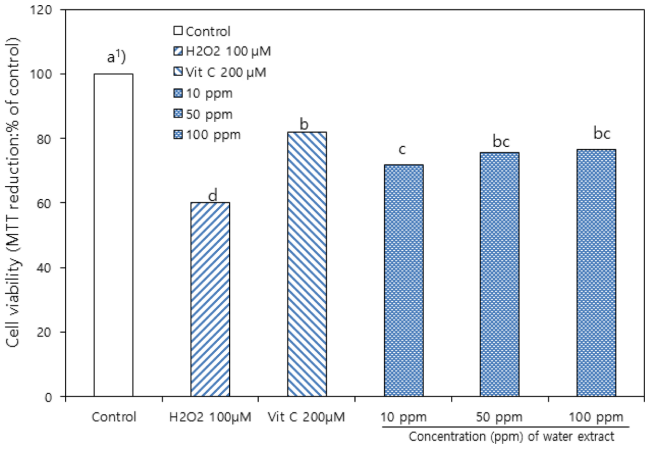
Extract solvent	Concentration (μg/mL)				
	100	200	400	800	1000
Water	31.13±0.35[1)eA2)3)]	55.6±0.51[dB]	83.21±1.14[cA]	94.36±0.09[bNS]	96.34±0.09[aNS]
Methanol	32.37±0.16[eA]	72.12±0.56[dA]	83.03±0.12[cA]	95.02±0.07[b]	96.83±0.05[a]
Vit. C	25.32±0.13[eB]	51.83±1.77[dC]	66.51±0.53[cB]	94.57±0.38[b]	95.57±0.01[a]

[1)]Mean±SD
[2)]Values represent an average of three determinations.
[3)]Means in the column(A-C) and row(a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

<Table 4> SOD-like activity of *E. caryophyllata* Thunb. extract by water and methanol (%)

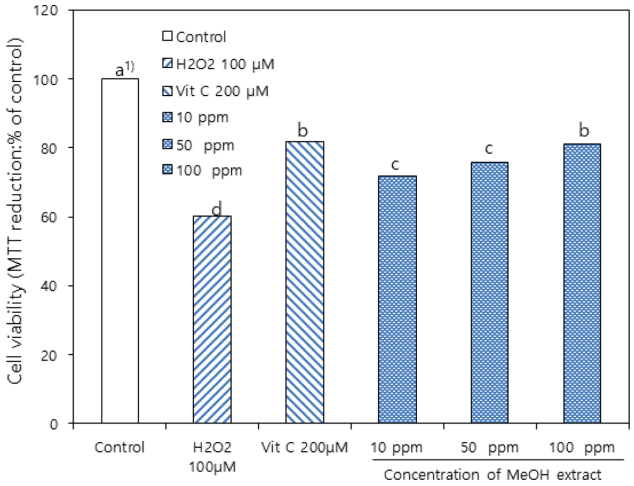
Extract solvent	Concentration (μg/mL)				
	100	200	400	800	1000
Water	12.55±0.35[1)eC2)3)]	32.22±0.28[dC]	63.04±1.33[cC]	81.52±0.09[bB]	80.54±0.05[aB]
Methanol	15.90±0.16[eB]	38.08±0.36[dB]	58.37±0.18[cB]	80.33±0.17[bA]	83.26±0.01[aA]
Vit. C	18.68±0.19[eA]	43.39±1.87[bA]	63.04±0.13[cA]	81.52±0.28[bA]	85.02±0.09[aA]

[1)]Mean±SD
[2)]Values represent an average of three determinations.
[3)]Means in the column (A-C) and row (a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.



<Figure 1> Protective effect of water extracts from *E. caryophyllata* Thunb against H_2O_2-induced cell death in SH-SY5Y cell system

[1)]Values with different superscripts indicate significant differences at p<0.05.



<Figure 2> Protective effect of methanol extracts from *E. caryophyllata* Thunb against H_2O_2-induced cell death in SH-SY5Y cell system

[1)]Values with different superscripts indicate significant differences at p<0.05.

4. 신경세포 보호효과

정향 농도별 열수 및 메탄올 추출물이 H_2O_2에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 SH-SY5Y 세포 생존율을 측정한 결과는 <Figure 1>과 <Figure 2>와 같다. Neuronal cell viability는 H_2O_2를 처리한 처리구에서 대조구(100%) 대비 60.4%의 생존율을 나타냈고, H_2O_2와 비타민 C를 동시에 처리한 처리구에서는 81.78%의 생존율로 H_2O_2 대비 21.38% 정도의 신경세포 보호효과를 나타내었다. 정향 열수 추출물을 처리한 시료에서는 50 ppm과 100 ppm 농도에서 비타민 C 200 μM와 유의적으로 유사한 신경세포 보호효과를 보였으며, 농도 10 ppm에 비해 유의적으로 높게 나타났다 (p<0.05). 정향 메탄올 추출물을 처리한 시료에서는 100 ppm 농도에서 비타민 C 200 μM와 유의적으로 유사한 신경세포 보호효과를 보였으며, 10 ppm과 50 ppm 농도에 비해 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). Jeong et al.(2010) 연구에 의하면, 어성초 60% 메탄올 추출물에 함유되어 있는 다양한 phenol성 화합물으로 인해 H_2O_2에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과가 나타난 것으로 보고하였다. 이는 본 연구 결과에서 정향 열수 및 메탄올 추출물에 함유되어 있는 phenol성 화합물에 의해 과산화수소로부터 유도된 손상으로부터 신경세포를 보호하여 세포생존율을 증가한 것으로 사료된다.

뇌 신경세포막은 불포화지방산을 매우 많이 함유하고 있으며, 뇌 신경세포막에서의 지방 산화는 다른 조직에 비해 산화적 손상이 비정상적으로 매우 민감하므로 세포사멸을 일으키는 원인으로 알려져 있다. Zhao et al.(2009)의 연구결과에 의하면 Alzheimer disease (AD)와 같은 신경계 질환은 산화적 스트레스로부터 신경세포의 손상에 의해 발생되며, flavonoids, polyphenols 등의 항산화 활성을 갖는 성분들은 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하여 세포 생존율을 높여주는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 정향 열수와 메탄올을 통해 추출된 phenol성 화합물이 과산화수소로부터 유도되는 손상으로부터 뇌 신경세포를 보호하여 세포생존율을 높여 주는 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 정향 열수 및 메탄올 추출물의 농도별 항산화 활성 및 신경세포 보호효과를 비교함으로써 추출용매에 따른 정향의 항산화 활성 및 신경세포 보호효과에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다. 메탄올 추출물의 총 polyphenol 함량은 열수 추출물에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 정향 열수 및 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능은 농도 의존적인 경향을 보였으며, 특히 100 μg/mL와 200 μg/mL의 농도에서 정향 열수 추출물은 비타민 C와 유사한 소거능력을 보였다. ABTS radical 소거활성과 SOD 유사활성도 결과 농도 의존적인 경향이 나타났다. 800~1000 μg/mL의 농도에서 정향 열수 및 메탄올 추출물은 비타민 C와 유사한 ABTS radical 소거활성 활성을 나타내었다. 정향 메탄올 추출물은 800~1000 μg/mL의 농도에서 SOD 유사활성이 비타민 C와 유사한 경향을 나타내었다. 정향 열수 추출물 50 ppm과 100 ppm 농도에서 대조군인 비타민 C와 유의적으로 유사한 신경세포 보호효과를 나타내었다. 정향 메탄올 추출물 100 ppm 농도에서 대조군인 비타민 C와 유의적으로 유사한 신경세포 보호효과를 나타내었다. 본 연구 결과를 통하여 phenol성 화합물을 함유한 정향 열수 추출물과 메탄올 추출물은 항산화 및 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과를 나타내어 퇴행성 신경질환 예방에 유용한 건강기능성 식품 소재가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2017년 장안대학교 연구비로 이루어진 연구로 이에 감사를 표합니다.

References

Ahn CK, Lee YC, Yeom CA. 2000. Antioxidant and mixture effects of curry spices extracts obtained by solvent extraction. Korean J Food Sci Technol., 32(4): 491-499

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidant, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7915-7922

Ames BN. 1983. Dietary carcinoges and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative disease. Science, 23(221): 1256-1264

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem., 239(1):70-76

Blois, MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181: 1199-1203

Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of some commercial test. J Korean Soc Food Sci Nutr., 32(5):723-727

Choi SY, Chung MJ, Sung NJ. 2008. Studies on the antioxidative ability of methanol and water extracts from *Orostachys japonicus* A. berger according to harvest times. Korean J Food Nutr 21(2): 157-164.

Dong S, Moon JS, Rhee SK, Son JY. 2004. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. J Korean Soc Food Sci Nutr., 33(4):609-613

Dong S, Moon JS, Rhee SK, Son JY. 2004. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. J Korean Soc Food Sci Nutr., 33(4):609-613

Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungastic phosphomolyblic compounds as color regents. J Biol Chem, 12(1):239-249

Jeong HR, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong CH, Heo HJ. 2010. Antioxidant and Neuronal cell Protective effects of an extract of *Houttuynia cordata* Thunb(a culinary herb). Korean J Food Preserv., 17(5):720-725

Kaur G, Athar M, Alam M. 2010. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. Mol Carcinog., 49(3):290-301

Lee YC, Yoon JH. 1993. Antioxidantive effects of volatile oil and oleoresin extracted from rosemary, sage, clove and nutmeg. Korean J Food Sci Technol., 25(4):351-354

Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem., 47(3):469-474

Nice DJ, Robinson DS, Jolden MA. 1995. Characterization of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. Food Chem 52(4):393-397

Oh HK. 2016. Antioxdant and Anti-inflammatory activities of extracts from Eugenia caryophllata Thunl. J korean Soc Food Cult. 31(5):481-488

Oztuurk A, Ozbek H. 2005. The anti-inflammatory activity of

eugenia caryophyllata essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. Eur J Gen Med., 2(1): 159-163

Park SH, Hwang HS, Han JH. 2004. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function. Korean J. Nutr., 37(5):364-372

Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Anath P, Min Y, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio Med., 26(9):1231-1237

Singh AK, Dhamanigi SS, Asad M. 2009. Anti-stress activity of hydroalcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). Indian J Pharmacol., 41(1):28-31

Van DBR, Haenen GRMM, Van DBH, Bast A. 1999. Applic ability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem., 66(4): 511-517

Wang C, Zhang J, Chen J, Fan Y, Shi Z. 2010. Antifungal activity of eugenol against Botrytis cinerea. Trop Plant Pathol., 35(3):137-143

Yoon MY, Lee BB, Kim JY, Kim YS, Park EJ, Lee SC, park HR. (2007) Antioxidant activity and neuroprotective effect of Psoralea corylifolia linne extract. Korean J. Pharmacogn., 38(1), 84-89

Zhao B. 2009. Natural antioxidants protect neurons in alzheimer's disease and parkinson's disease. Neurochem. Res., 34, 630-638

Received December 12, 2017; revised December 22, 2017; accepted December 26, 2017