大韓本草學會誌 제21권 제2호 (2006년 6월)
Kor. J. Herbology 2006 : 21(2) : 95-101

Perilla frutescens var. *acuta*의 화장품 약리활성에 관한 연구

최은영#, 이진태*, 안봉전, 이창언, 정수현, 장민정, 천순주, 성지연, 강보연, 조우아[1], 정연숙[2], 최향자[3], 백욱진[4]

대구한의대학교 화장품약리학과, 1: 남부대학교 향장미용학부,
2: Department of Genetic Resources Technology Kyushu University, 3: 소리소 화장품, 4: 동의 화장품

Studies on the Cosmeceutical Activities of *Perilla frutescens* var. *acuta*

Eun-Young Choi#, Jin-Tae Lee*, Bong-Jeun An, Chang-Eon Lee, Su-Hyun Jeung, Min-Jung Jang, Soon-Ju Cheon, Ji-Yeun Sung, Bo-Yun Kang, Woo-A Joe[1], Yeun-Suck Jeung[2], Hyang-Ja Choi[3], Uk-Jin, Baek[4]

Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University,
1: Department of Cosmetology Science, Nambu University, 2: Department of Genetic Resources Technology, Kyushu University, 3: Soriso Cosmetic, 4: Dong Eui Cosmetic

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to establich cosmeceutical activities of *Perilla frutescens* var. *acuta*.

Methods : *Folium Perillae*, which had been extracted, concentrated, and freeze drying with water and ethanol, have been used for the experiment. The effects on electronic donating ability, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition, whitening effect have been investigated in the cosmeceutical activity measurement of function experiment.

Results : Both water and ethanol extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* showed relatively high electron donating ability of more than 70 % at over 500 ppm. Also, SOD like activity increased in a dose dependent matter of more than 80 % at 5,000 ppm, while tyrosinase showed insufficient inhibitory rate. Xanthine oxidase showed a meaningful inhibitory effect of 72.4 % in water extract and 55.3 % at 1,000 ppm in ethanol extract. The addition of Fe^{2+}ion and Cu^{2}+ion showed relatively high oxidizing inhibitory effect of 57 % and 41 %, respectively, at 500 ppm in water extract and, when Fe^{2+}ion was added in ethanol extract, the effect of 64 % at 1,000 ppm was achieved. Also, higher oxidizing inhibitory effect was shown against Fe^{2+} rather than Cu^{2+} in both water and ethanol extracts. For human cancer cells, relatively high growth inhibition ability was shown against melanoma G361 in both water and ethanol extracts.

Conclusion : From the above results, it was confirmed that *Perilla frutescens* var. *acuta* could be used in functional cosmetics.

Key words : *Perilla frutescens* var. *acuta*, Cosmeceutical activity

제1저자 : 최은영, E-mail: choi-ey72@hanmaiil.net *교신저자 : 이진태, 경북 경산시 유곡동 대구한의대학교 화장품약리학과 Phone: 82-53-819-1430 Fax: 82-53-819-1430 E-mail: jtlee@dhu.ac.kr
· 접수 : 2006년 4월 27일 · 수정 : 2006년 5월 20일 · 채택 : 2006년 6월 24일

서 론

소엽(*Perilla frutescens* var. *acuta*)은 꿀풀과에 속하는 일년생 초본으로 잎은 소엽(蘇葉), 차조기 또는 차즈기라고 부르며, 한방약명은 자소(紫蘇)라 하고 이명(異名)은 계임(桂荏), 수소(水蘇), 향소(香蘇), 적소(赤蘇)등으로 쓰인다. 성미는 愼, 溫, 無毒하며, 초가을에 줄기와 잎이 무성하고 꽃이 함빡 피었을 때 채취한다. 중국이 원산지이며 약용식물로 들여와 우리나라 각처에서 재배되고 있는 귀화식물이다. 소엽은 홍분, 발한, 지해(止咳), 진정, 진통, 이뇨, 건위의 약리작용이 있으며, 건뇌(健腦), 출혈방지 등에 좋고, 담(痰)을 없애며, 개의 중독, 치질, 뇌의 질환, 혈액순환 촉진 및 천식 등의 치료에 응용 된다[1,2]. 소엽은 잎과 줄기 등에서 antocyanin 색소, interferon 유도체, phosphoglycoprotein, Cyanidin 3-(6-P-coumary 1-β-D-glycoside), 5-β-D-glycoside salt 등을 분리할 수 있다[3,4]. 또한 소엽은 全草에서 약 0.5%의 정유를 함유하고 있으며 잎의 정유에는 cyanogenic glycosides 등이 함유되어있는 것으로 알려져 있다[5]. 또한 *Streptococcus pyogenes* 에 대한 항균효과와 인체 구강 유상피 암세포 등에 대한 항암효과가 보고되고 있다[6,7]. 산화적 스트레스와 이로 인해 유발되는 건강문제를 해결할 수 있는 물질로서 항산화제에 대한 관심이 집중되고 있다. 이러한 추세에 따라 효능이 우수한 항산화제를 개발하려는 노력이 이루어지고 있으며 효력이 높으나 독성이 문제시 되는 BHT, BHA 등의 합성 항산화제[8]에 대한 기피로 천연자원에 대한 관심이 고조되고 있다.

지금까지 소엽은 항균, 항암 등의 약리학적 연구와 약효성분에 대한 연구는 많이 진행되어 있었으나 화장품산업의 소재로서 이용가치에 대한 연구는 거의 보고 되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 국내 여러 지방에서 자생되며, 밭에서 재배되기도 하는 소엽의 화장품 약리활성을 검증하여 화장품신소재로 응용할 수 있도록 그 가능성을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

(1) 시료 제조

대구 약령시장에서 한국산 소엽을 구입하여 물로 세척하여 음건 후 사용하였다. 시료의 열수추출은 시료 100 g에 증류수 10배의 양을 가하여 85 ℃에서 3시간 환류 냉각하여 상등액과 침전물을 분리하여 상등액은 별도로 모아두고 침전물을 위와 같은 방법으로 3회 반복 추출하였으며, 에탄올추출은 시료 100 g에 80% 에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 위와 같은 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각각 추출 분리된 상등액은 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉동실에 보관하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 전자공여능측정(electron donating ability, EDA)

전자 공여능은 Blois[9]의 방법을 변형하여 실험하였다. 각 시료용액 2.0 ㎖에 2×10^{-4} M의 1,1 - diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH) 1.0 ㎖을 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자 공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(2) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD유사활성은 Marklund[10]의 방법에 따라 실험하였다. 각 시료용액 0.2 ㎖에 Tris-HCl의 완충용액 (50 mM tris + 10 M EDTA, pH 8.5) 2.6 ㎖와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ㎖를 가하여 35℃에서 10분간 반응시킨 후 1.0 N HCl 0.1 ㎖를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(3) Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stirpe와 Corte의 방법[11]에 따라 실험하였다. 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 ㎖에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 0.2 ㎖에 시료용액 0.1 ㎖과 효소액 0.1 ㎖(40 mU/㎖)를 가하고 37 ℃에서 5분간 반응시킨 후 1N HCl 0.2 ㎖를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하여 다음의 식으로 저해율을 구하였다.

(4) TBARS 측정

TBARS(Thiobarbituric Acid Reactive Substances)는 Buege와 Aust의 방법[12]에 준하여 실험하였다. pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer 8 ㎖에 0.05 ㎖

의 Tween 20과 0.25 ㎖의 fish oil을 넣고 15분간 교반한 후 KOH 2~3조각을 넣고 150 ㎖까지 distilled water를 가한 후 교반하면서 2 M의 HCl로 pH 6.5가 되도록 oil emulsion 조제하여 사용하였다. oil emulsion 0.5 ㎖에 산화촉진제인 금속이온 0.1 ㎖과 시료용액 0.1 ㎖, distilled water 0.3 ㎖을 첨가하여 채운 시험관을 37℃ 수욕 상에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 잘 섞은 다음 2 ㎖의 TBA/TCA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 끓인 다음 원심분리 시켜 상등액을 흡광도 531nm에서 측정하였고, 공시료는 시료 대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다.

(5) Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi 등[13]의 방법에 준하여 실험하였다. 시료용액 0.5 ㎖에 기질인 10 mM L-DOPA 0.2 ㎖, 1/15 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 ㎖의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 unit/㎖) 0.1 ㎖ 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm에서 측정하여 저해율을 구하였다.

(6) 세포 배양 추출물의 세포증식 억제효과

실험에 사용된 암세포는 melanoma G361, lung cancer A549, breast cancer MDA, malignant melanoma SK-MEL31이며 한국세포주은행에서 분양받아 실험하였다. 암세포는 Fetal Bovine Serum(FBS)을 10% 첨가한 RPMI 1640 배지에 100 unit/㎖의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 적응시켜 배양하였다.

(7) MTT assay에 의한 암세포 생장억제 효과 측정

추출물의 암세포주에 대한 증식 억제 효과는 Carmichael 등의 방법[14]에 따라 MTT(methyl thiazol tetrazolium) assay 실험을 실시하였다. 즉 암세포주를 96 well plate에 각 well당 세포적정농도를 180 ㎕ 되게 분주하고 시료를 적정농도별로 조제하여 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에서 96시간 배양하였고 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 ㎎/㎖ 농도로 제조한 MTT 용액 20 ㎕를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO:EtOH(1:1) 150 ㎕를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 생장억제효과를 측정하였다.

(8) 통계처리

각 실험의 결과 통계처리는 SPSS package ver. 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA : analysis of variance)을 한 후 α=0.05 수준에서 Duncan의 다중검증법(DMRT : Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 전자 공여능 측정

각 추출물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 각 추출물의 농도가 증가할수록 전자 공여능의 효과도 높은 경향을 나타내었다. 소엽의 열수추출물의 경우 100, 500, 1,000 ppm에서 53.4%, 70.2%, 71.4%의 효과를 나타내다. 에탄올 추출물의 경우 100 ppm에서는 20.6%로 열수 추출물에 비해 낮은 소거능을 보였으나, 500 ppm과 1,000 ppm의 농도에서는 71.8%, 71.3%로 열수추출물과 유사한 전자 공여능을 나타내었다. 같은 조건하에서 1,000 ppm의 BHA는 93%의 전자 공여능을 나타내었으며, 합성 항산화제인 BHA에 비해 낮은 전자 공여능을 보였으나 다른 약용식물[15]에 비해서는 비교적 우수한 전자 공여능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 추후 소엽 추출물을 분리 및 정제하면 더욱 우수한 전자 공여능 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

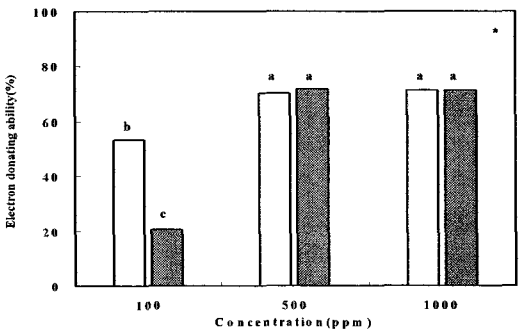

Fig. 1. Electron donating ability of *Perilla frutescens* var. *acuta* extracts.

□: water extract, ■: ethanol extract, *: BHA (1,000 ppm). Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

2. SOD 유사활성 확인

산화방지는 물론 노화 억제와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는 SOD 유사활성 측정을 위해 산화효소인 pyrogallol과 소엽추출물을 반응시켰으며, 소엽추출물이 pyrogallol의 자동산화를 얼마나 억제하는지 420nm의 흡광도에서 측정하였다. 소엽추출물의 SOD 유사활성은 열수추출물의 경우 500 ppm과 1,000 ppm에서 각각 14.7 %, 25.5 %였으나 3,000 ppm, 5,000 ppm에서는 60.2 %, 78.9 %로 비교적 높은 활성을 보였다. 에탄올추출물의 경우는 500 ppm과 1,000 ppm에서 각각 17.6%, 28.2 %의 효과를 보였으며 3,000 ppm과 5,000 ppm에서는 62.4 %, 86.7 %로 농도가 증가함에 따라 유의적인 증가를 보였다(Fig. 2). 같은 실험조건하에서 BHA 1,000 ppm에서는 80%의 SOD 유사활성을 나타내었으며 소엽 추출물의 분리 및 정제를 통한 화장품신소재로서의 가능성을 확인 할 수 있었다.

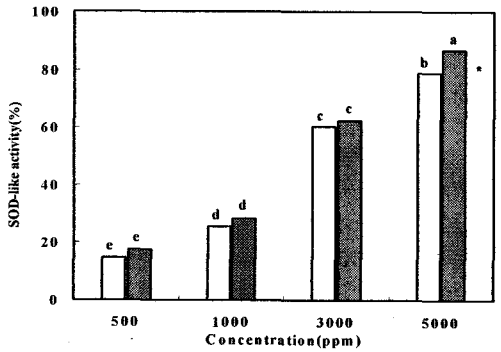

Fig. 2. SOD-like activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* extracts.
□: water extract, ■: ethanol extract, *: BHA (1,000 ppm). Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

3. Xanthine oxidase 저해활성 확인

본 실험에서 각 추출물의 농도별 xanthine oxidase의 저해활성을 관찰한 결과 Fig. 3와 같이 나타났다. 소엽의 열수 추출물의 경우 100 ppm과 500 ppm에서 8.6 %, 34.8 %로 비교적 낮은 저해율을 보이다가 1,000 ppm에서는 73.5 %의 높은 저해율을 나타내었다. 에탄올 추출물의 경우도 100 ppm과 500 ppm에서 17 %, 32 %, 1,000 ppm에서는 55.3 %를 나타내었으며 열수 추출물의 경우 에탄올 추출물의 저해활성보다 높은 수치를 보였다. 그리고 저해활성은 농도에 비례하여 증가하는 양상을 나타내었다. 같은 조건하에서 BHA 1,000 ppm에서는 27%의 비교적 낮은 xanthine oxdiase 억제효과를 나타내었다. 이를 통해 소엽이 현재 화장품산업에서 이용되고 있는 BHA보다 높은 xanthine oxidase 억제효과를 확인 할 수 있었다.

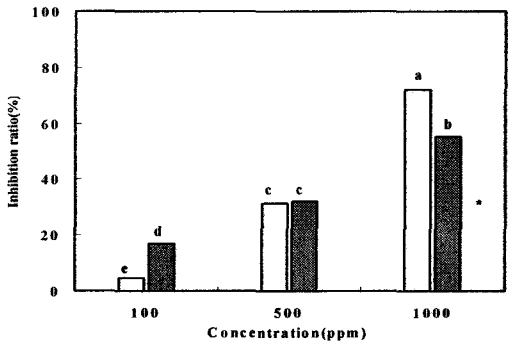

Fig. 3. Inhibition effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* extracts on xanthine oxidase.
□: water extract, ■: ethanol extract, *: BHA (1,000 ppm). Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

4. 금속이온 봉쇄 작용 확인

TBA법은 지방산, 생체막, 식품 등의 지질과산화를 측정하기 위하여 가장 빈번히 사용되는 방법이다. 미리 제조한 oil emulsion에 산화촉진제인 Fe^{2+}, Cu^{2+}이온과 소엽추출물을 가한 후 금속이온의 oil emulsion에 함유되어 있는 불포화지방산의 산패에 대한 천연물의 영향을 조사한 결과 Fig. 4, 5와 같이 나타났다. 전반적으로 Fe^{2+}이온이 Cu^{2+}이온보다 포집능력 이 뛰어났으며 열수추출물이 에탄올추출물보다 산패억제능력이 우수하였다. 열수추출물의 경우 Fe^{2+}이온은 500 ppm 이상에서 50 % 이상의 포집 능력을 보였으며, Cu^{2+}이온에 대해서도 40 % 이상의 산화 억제 효과를 나타내었다. 철이온 의존성 free radical 형성 반응계에는 Fe^{2+}이온에 의해 생성된 산소라디칼이 수소이온과 과산화수소를 생성하는데[16], 이 반응에서 유발된 라디칼 및 H_2O_2가 모두 지질의 산화에 작용할 수 있으며 특히 hydroxyl radical에 의해 주로 산화가 진행될 것으로 생각된다.

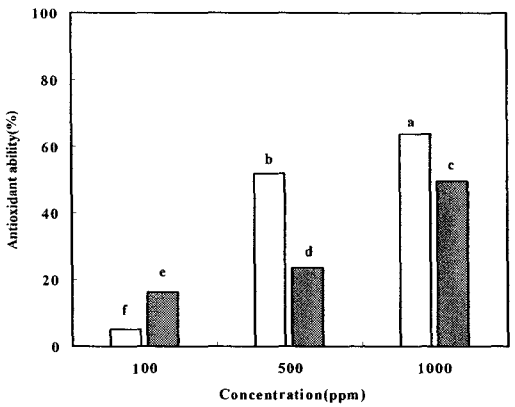

Fig. 4. Inhibition effect of lipid oxidation in *Perilla frutescens* var. *acuta* extracts reacted oil emulsion adding Fe^{2+}ion.
□: water extract, ■: ethanol extract. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

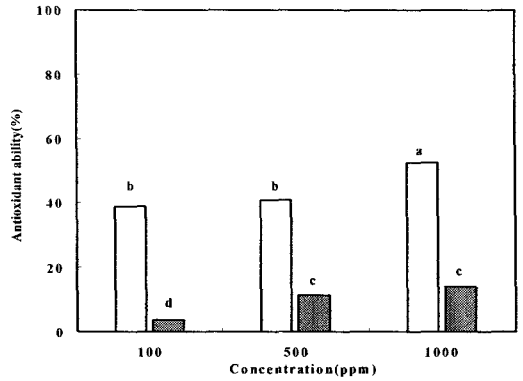

Fig. 5. Inhibition effect of lipid oxidation in *Perilla frutescens* var. *acuta* extracts reacted oil emulsion adding Cu^{2+}ion.
□: water extract, ■: ethanol extract. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

5. Tyrosinase 저해활성 확인

본 실험은 피부 내에서 melanin 생성에 key enzyme으로 알려져 있는 tyrosinase에 대한 활성을 억제하는 물질을 탐색할 목적으로 각 추출물의 농도별 tyrosinase 효소활성의 저해효과를 측정하였고 그 결과는 Fig. 6과 같이 나타났다. 소엽의 열수와 에탄올추출물은 1,000 ppm 이하의 농도에서 10% 이하로 비교적 낮은 저해효과를 나타내었다. 같은 조건하에서 1,000 ppm의 kojic acid가 99%의 활성효과를 나타내는 것에 비해 소엽 추출물은 유의한 tyrosinase 억제효과를 확인 할 수 없었다.

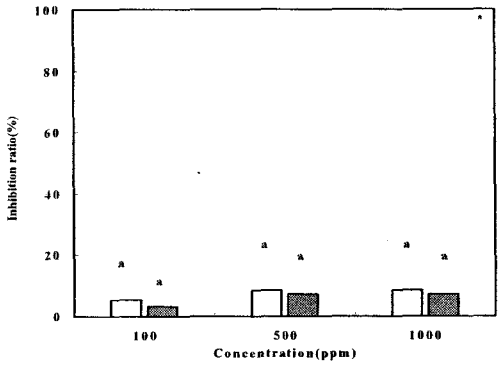

Fig. 6. Inhibition effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* extracts on tyrosinase.
□: water extract, ■: ethanol extract, *: Kojic acid (1,000 ppm). Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

6. MTT assay에 의한 암세포 생장저해 효과 확인

소엽추출물에 의한 G361, A549, MDA, SK-MEL31의 세포증식 억제율 결과는 Fig. 7, 8과 같이 나타났다. 암세포에 대한 소엽의 열수추출물에서의 생장저해 효과는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 500 ppm 이상에서 malignant melanoma인 SK-MEL31을 제외한 나머지 암세포에서 60~83% 정도의 비교적 높은 저해 효과가 나타났으며 1,000 ppm에서는 94%이상의 저해 효과를 보였다. 소엽의 에탄올추출물의 경우에도 농도 의존적으로 저해효과는 증가하였고, 1,000 ppm에서 SK-MEL31을 제외한 나머지 암세포에서 90% 정도의 저해효과를 나타내었다. 암세포에 대한 저해능은 에탄올추출물보다 열수추출물에서 보다 효과적이었고, melanoma G361에 대한 생장 저해능은 열수와 에탄올 모두 농도 의존적으로 증가하였으며 이는 melanin 세포 생성의 억제 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

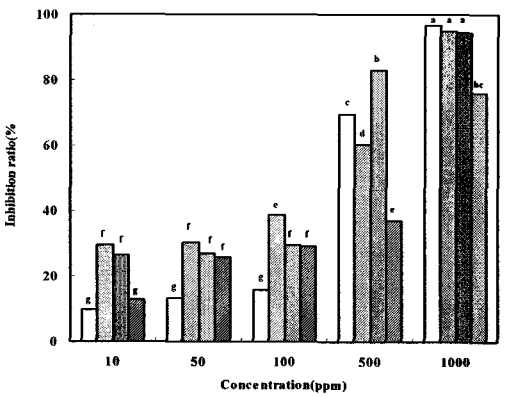

Fig. 7. Growth inhibition effect of water extract from *Perilla frutescens* var. *acuta* on the human cancer cells.
□: melanoma G361, ■: lung cancer A549, ■: breast cancer MDA, ▨: malignant melanoma SK-MEL 31. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

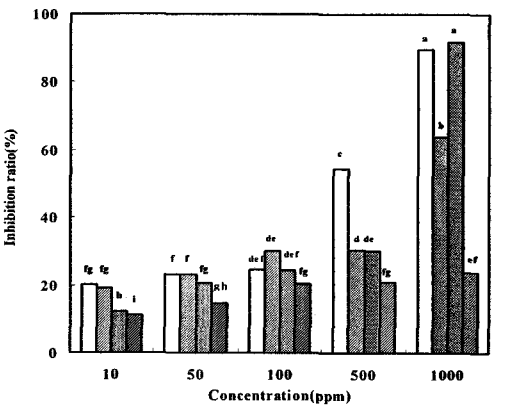

Fig. 8. Growth inhibition effect of ethanol extract from *Perilla frutescens* var. *acuta* on the human cancer cells.
□: melanoma G361, ■: lung cancer A549, ■: breast cancer MDA, ▨: malignant melanoma SK-MEL 31. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$

결 론

1. 소엽 열수 추출물과 에탄올 추출물의 전자 공여능은 500 ppm에서 70%이상의 효과를 나타내었다.
2. SOD 유사활성실험에서는 열수 추출물과 에탄올 추출물 5,000 ppm에서 80%이상의 효과를 나타내었으며 농도 의존적으로 효과가 증가되었다.
3. Tyrosinase 억제실험에서 열수, 에탄올 추출물에서 모두 유효한 결과를 나타내지 않았다.
4. Xanthine oxidase 억제실험에서 1,000 ppm의 열수 추출물은 73.5%의 효과를 나타내었으며, 에탄올 추출물은 55.3 %의 효과를 나타내었다.
5. 열수 추출물 500 ppm에서 Fe^{2+}이온의 포집능력을 보였으며 Cu^{2+}이온에 대해서도 40 %이상의 지방산화억제 효과를 나타내었다.
6. G361에 대한 성장 억제능 측정에서 열수 추출물과 에탄올 추출물에서 높은 억제효과를 나타내었다.

이상과 같은 결과를 통해 소엽의 기능성 화장품산업 응용가능성을 확인 할 수 있었다. 최근 천연물을 화장품 소재로 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 국내에서 재배한 허브 식물을 화장품 소재로서 활용하는 것에 대한 연구는 미흡한 편이다. 따라서 국내에서 자생되는 소엽(*Perilla frutescens* var. *acuta*)의 화장품약리활성을 검증하고 이를 바탕으로 화장품의 천연소재로서 활용가능성을 검토하고자 하였다. 이상의 실험 결과를 통해 소엽의 항산화 활성과 항암효과를 확인 할 수 있었으며 이의 화장품 천연소재로 활용 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청 주관 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업에 의한 결과입니다.

참고문헌

1. Lee CB. In Illustrated Flora of Korea. Hyangmoom Publishing Co., Seoul. 1989.
2. Kim TJ. In The Resources Plants of Korea. Seoul National University Publishing Co., Seoul. 1996.
3. Koezuka Y, Honda G and Tabata M. Genetic control of the chemical composition of volatile oils in Perilla frutescens. Phytochemistry. 1986;25:859-863.
4. Honda G, Koezuka Y, Kamisaka W and Tabato M. Isolation of sedative principles from Perilla frutescens. Chem. Pharm. Bull. 1986;34:1672-1677.
5. Aritomi M, Kumori T and Kawasaki T. Cyanogenic glycosides in leaves of from Perilla frutescens var. acuta. Phytochemistry. 1985;24:2438-2439.

6. Lee ES and Seo BI. Growth inhibition of Perilla frutescens var. acuta extract. Kor. J. Herbology 2005;20:83-89.
7. Chol KE, Kwak JS, Kim YO, Back, SH and Han DS. Development of anticancer agents from korean medicinal Plants (Part 5) Cytotoxic activity of the butanol soluble fraction of Perilla Frutescens against human skin melanoma cells. Kor. J. Toxicol. 1997;13:311-316.
8. Choe SY and Yan KH. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxy toluene(BHT) and butylated hydroxy anisole(BHA). Korean J. Food Sci. Technol. 1982;14:283-288.
9. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 1958;26:1199-1200.
10. Marklund, S and Marklund, G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismmutase. Eur. J. Bioche. 1974;47:469-474.
11. Stirpe F and Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 1969;244:3855-3863.
12. Buege JA and Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Method in Enzymol. 1978;52:302-310.
13. Yagi A, Kanbara T and Morinbu N. The effects of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 1986;3981:517-519.
14. Charmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Michell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay. assissment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 1987;47:936-940.
15. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NK, Lee SE and Baek NI. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 2004;47:135-140.
16. Halliwell B, and Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, Oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 1984;219:1-14.