

건조방법에 따른 초석잠(*Stachys sieboldii* Miq.)의 항산화 활성 및 신경세포 보호효과

오희경[†]

장안대학교 건강과학부 바이오동물보호과
(2018년 12월 7일 접수: 2018년 12월 22일 수정: 2018년 12월 25일 채택)

Antioxidant and Neuronal cell protective effects of *Stachys sieboldii* Miq. according to drying methods

Hee-Kyung Oh[†]

Department of Bio-animal care, Jangan University Samcheonbyeongma-ro 1182, Korea
(Received December 7, 2018; Revised December 22, 2018; Accepted December 25, 2018)

요약 : 건조방법을 달리한 초석잠(*Stachys sieboldii* Miq.)을 열수 및 70% 에탄올 용매로 추출하여 제조한 후 추출물 농도에 따른 총 flavonoid 및 총 polyphenol 함량, DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, 산화적 스트레스로부터의 신경세포 보호효과에 미치는 효과를 조사하기 위하여 실시하였다. 초석잠 추출물들의 총 flavonoid와 총 polyphenol 함량은 동결건조 열수 추출물에서 각각 가장 높았다($p<0.05$). DPPH 및 ABTS radical 소거활성은 농도의존적으로 증가하였으며, 1,000 ug/mL 농도에서는 동결건조 열수추출물에서 유의적으로 가장 높게 나타났으나, 대조군인 비타민 C에 비해 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 신경세포 보호효과는 열풍 및 동결건조 열수추출물에서 농도의존적으로 높게 나타났으며, 대조군인 비타민 C에 비해 낮았다($p<0.05$). 본 연구를 통하여 열풍건조에 비해 동결건조 초석잠의 열수추출물이 총 flavonoid와 총 polyphenol 함량이 더 높게 함유되어 있어 항산화 활성 및 산화적 스트레스로부터의 신경세포 보호효과가 우수하게 나타내는 것이 관찰되었다.

주제어 : 초석잠, 동결건조, 총 flavonoid, 항산화효과, 신경세포 보호효과

Abstract : This study investigated the antioxidant and neuronal cell protective effects of activity of water and 70% ethanol extracts from *Stachys sieboldii* Miq. according to different drying method(hot air drying and freeze-drying). The total flavonoid and total polyphenol content in water extracts was significantly higher after freeze-drying compared to hot air drying($p<0.05$). DPPH and ABTS radical scavenging were increased in a dose-dependent manner. The DPPH and ABTS radical scavenging activity of water extract were significantly higher after free-drying compared to hot air drying($p<0.05$). In a cell viability using MTT, the water extract according to

[†]Corresponding author
(E-mail: hkoh@jangan.ac.kr)

hot air drying and freeze-drying of *Stachys sieboldii* Miq. showed protective effect against H₂O₂-induced neurotoxicity. The results suggest that the water extracts of *Stachys sieboldii* Miq. after freeze-drying has antioxidant activities and may be useful for neurodegenerative disorders.

Keywords : *Stachys sieboldii* Miq., freeze-drying, Total flavonoid, antioxidant effect, neuronal cell protective effect

1. 서론

최근 증가되고 있는 만성 질환과 노화의 주요 원인으로 알려져 있는 자유라디칼(free radical)은 생체 내 산화적 스트레스를 유발하여 세포막의 지질 과산화, DNA 손상 등을 초래하여 심혈관계 질환, 알츠하이머, 뇌졸중, 암 등을 일으키는 것으로 알려져 있다[1]. 치매 환자의 절반 이상을 차지하고 있는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 진행성 퇴행성 뇌질환으로 밝혀지고 있으며, 뇌의 조직학적 변화와 전반적인 위축이 특징으로 보고된 바 있다[2,3]. 특히, 뇌 조직은 다른 조직 보다 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자 산화방지제가 상대적으로 낮아 자유 라디칼에 대해서 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다[4].

초석잠(*Stachys sieboldii* Miq.)은 꿀풀과의 여러해살이 식물로서, 중국에서는 전통적인 건강기능성재소로 알려져 있다[5]. 1년생 본초로서 여름에는 타원형 잎이 무성하고 겨울에는 뿌리가 지하에서 3-6cm 정도 자라며 골뎡이 모양으로 동충하초와 모양이 비슷하다고 알려져 있다[6]. 초석잠 추출물은 동물의 뇌 조직에서 치매증상 개선 및 뇌의 정상적인 기능을 유지하고 활성산소에 의한 뇌조직의 손상을 억제한다고 보고된 바 있다[7-9]. 또한, 초석잠 추출물은 과산화지질의 형성을 억제하고 아질산염을 소거하는 등의 산화화 활성이 보고되고 있다 최근 국내에서는 초석잠이 치매예방에 탁월한 효과가 있다고 알려지면서 초석잠 생산 증가를 위한 재배면적이 증가하고 있는 추세이다[10]. 그러나 현재까지 국내에 보고된 초석잠 관련 여러 방면의 연구들은 초석잠 분말을 첨가한 가공식품 개발이 주를 이루고 있고[11-15], 건조방법과 추출용매에 따른 초석잠의 산화화 효과 및 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과에 관한 연구는 아직까지 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 열풍 및 동결건

조를 실시한 후 초석잠을 열수 및 70% 에탄올 용매로 추출한 추출물의 산화화 활성 및 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 비교함으로써 건조방법과 추출용매에 따른 초석잠의 산화화 활성 및 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과에 미치는 영향을 검토하여 초석잠의 기능성 소재로 활용될 수 있는 기초자료를 제공하고 자 실시하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시약

실험에 사용된 초석잠(*Stachys sieboldii* Miq)은 2018년 2월 부안지역에 자생하는 것을 구입하여 사용한 것으로 초석잠 뿌리에 부착되어 있는 이물질들을 제거하고 수세한 다음 물기를 제거하였다. 열풍건조는 초석잠을 65°C의 온도에서 대류용 팬과 히터가 장착된 열풍건조기(GNO12, Hanil GNCO Co., Ltd., Jangseong, Korea)를 사용하여 48시간 건조하였다. 동결건조는 초석잠을 -70°C에서 deep freezer(MDF-U52V, Sanyo, Osaka, Japan)에서 냉동시킨 후 동결건조기(ED 8512, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 건조하였다. 본 실험에서 사용한 ethanol, tannic acid, rutin, sodim hydroxide, diethylene glycol, 비타민 C, DPPH, Dimethyl sulfoxide, ABTS 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. MTT assay kit는 Roche company에서 구입했으며, SH-SY5Y세포는 한국세포주은행으로부터 공급받아 사용하였다.

2.2. 시료추출

시료의 열수 추출물은 건조 초석잠 100 g에 증류수 1,000 mL로 90°C에서 6시간씩 가열 환류하면서 3회 추출하였다. 시료의 70% 에탄올 추출물은 건조 초석잠 100 g에 70% ethanol 1,000

ml을 가한 후 실온에서 6시간동안 정치하면서 3회 추출하였다. 열수 및 70% 에탄올 추출물은 각각 No. 2. 여과지(Advance Co., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 그 후 40°C 수욕 상에서 회전식감압농축기(N-1000S-W, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축시켰다. 농축 후 얻은 점조상의 추출물을 동결건조기(Bondiro Vacuum Freeze-Dryer, Ilshin Lab Co., Ltd, Seoul, Korea)에서 건조한 뒤 -70°C 냉동고에서 보관하였다.

2.3. 총 polyphenol 함량

초석잠 추출물 1mL와 Folin reagent 2 mL를 섞어 3분 동안 실온에서 정치한 후 10% Na2CO3 포화용액 2 ml을 가하고 30°C에서 암실에서 40분 동안 정치하였다. 그 후 UV-visible spectrophotometer(UV-1601PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다[16]. 표준물질로는 tannic acid을 이용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량곡선을 통하여 총 polyphenol 함량을 구했다.

2.4. 총 flavonoid 함량

초석잠 추출물 1mL와 diethylene glycol 2 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 1N NaOH 20 μl을 첨가하고 37°C water bath에서 1시간 동안 정치한다. 그 후 UV spectrophotometer(UV-1601PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다[17]. 표준물질로는 rutin을 이용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량곡선을 통하여 시료 중 총 flavonoid 함량을 계산했다.

2.5. DPPH radical 소거활성

초석잠 추출물 용액 1mL에 2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 1 mL을 가하여 균일하게 교반한 후 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성대조군으로 비타민 C을 이용하여 측정하였으며, DPPH radical 소거활성(%)은 시료무첨가구에 대한 시료첨가구의 흡광도비로 계산하여 나타났다.

2.6. ABTS 활성

초석잠 추출물 용액 0.5 mL와 희석한 7.4

mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 용액 0.5 mL를 첨가하여 암실에서 60분 동안 반응시킨 후 V-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 737nm에서 흡광도를 측정하였다(Roberta et al, 1999). ABTS radical 소거활성은 시료무첨가구에 대한 시료첨가구의 흡광도비로 계산하여 나타났다.

2.7. 신경세포 보호효과

Hydrogen peroxide(H2O2)으로부터 유도된 SH-SY5Y 세포 생존율에 대한 효과는 MTT reduction assay로 측정하였다(Heo et al. 2001). H2O2 처리하기 1시간 전에 SH-SY5Y 세포에 건조방법에 따른 초석잠의 용매별 추출물을 농도별로 처리하고, 100 μM H2O2를 각각 24시간 동안 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 SHSY5Y cell에 MTT stock solution을 가하여 37°C에서 3시간 incubation한 후, DMSO 100 μL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. microplate reader (UV-1601PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 200 μM 비타민 C를 사용하였고, cell viability는 대조구에 대한 % 농도로 산출하였다

2.8. 통계처리

모든 통계 분석결과는 실험군 당 평균치와 표준편차를 계산하였고, 통계처리 프로그램은 IBM SPSS statistic ver. 22를 사용하여 분석하였다. 각 시료에 대한 유의적인 차이는 one-way ANOVA로 분석 한 뒤 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 flavonoid와 총 polyphenol 함량

열풍건조 및 동결건조를 실시한 후 초석잠을 열수 및 70% 에탄올 용매로 추출한 후 추출물의 총 flavonoid 함량과 총 polyphenol 함량은 Table 1과 같다. 총 flavonoid 함량은 동결건조 초석잠의 열수 추출물에서 115.19 mg/g으로 가장 높았고, 열풍건조 초석잠의 열수 추출물, 동결건조 초석잠의 70% 에탄올 추출물, 열풍건조 초석잠의 70% 에탄올 추출물 순으로 유의적으로 감소된 결과를 보였다(p<0.05). 총 polyphenol 함

량은 동결건조 초석잠의 열수 추출물에서 29.34 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 열풍건조 초석잠의 열수 추출물, 동결건조 초석잠의 70% 에탄올 추출물, 열풍건조 초석잠의 70% 에탄올 추출물 순으로 유의적으로 감소하게 나타났다 ($p<0.05$). 초석잠의 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물 모두 열풍건조에 비하여 동결건조에서 유의적으로 높게 나타났다. 이는 Lee 등 [18] 은 초석잠 70% 에탄올 추출물의 총 polyphenol과 총 flavonoid 함량이 38.62 mg/g과 221.00 mg/g으로 함유한 결과와 유사한 경향이다.

3.2. DPPH radical 소거활성

열풍건조 및 동결건조를 실시한 초석잠을 열수 및 70% 에탄올 용매로 추출한 후 추출물의 농도별 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 건조방법(열풍건조, 동결건조)을 달리한 초석잠의 용매별 추출물의 DPPH radical

소거활성은 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 높게 나타났으며, 농도의존적인 경향을 나타냈다($p<0.05$). 동결건조 초석잠의 열수추출물 경우, 100~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 11.42~56.25%의 소거활성을 보여 대조군인 비타민 C와 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 84.83%의 소거활성을 보여 대조군으로 사용한 비타민 C에 비해 낮았다 ($p<0.05$).

3.3. ABTS radical 소거활성

열풍건조 및 동결건조를 실시한 초석잠을 열수 및 70% 에탄올 용매로 추출한 후 추출물의 농도별 ABTS radical 소거활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 건조방법(열풍건조, 동결건조)을 달리한 초석잠의 용매별 추출물의 ABTS radical 소거활성은 추출물 농도가 증가함에 따라 유의적으로 높게 나타났으며, 농도의존적인 경향을 나타

Table 1. Total flavonoid and polyphenol of different solvent extracts from *Stachys sieboldii* Miq. according to drying methods (mg/g)

	Hot air drying ¹⁾		Freeze-drying	
	Water extract	70% extract	Water extract	70% extract
Total flavonoid	111.44±0.78 ²⁾³⁾	110.21±0.04 ^d	115.19±0.14 ^a	111.17±0.06 ^c
Total polyphenol	22.41±0.04 ^b	20.50±0.16 ^d	29.34±0.08 ^a	21.34±0.21 ^c

¹⁾The concentrations of all samples was 1,000 ppm.

²⁾All values are expressed as mean±SE of triplicate determinations.

³⁾Means with different superscript within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$).

Table 2. DPPH radical scavenging of different solvent extracts from *Stachys sieboldii* Miq. according to drying methods (%)

Concentration (ug/mL)	Hot air drying		Freeze-drying		비타민 C
	Water extract	70% extract	Water extract	70% extract	
100	2.83±1.19 ^{1)dB2)}	4.32±0.19 ^{cB}	11.42±1.09 ^{dA}	3.43±0.13 ^{cB}	10.04±0.66 ^{dA}
250	18.92±1.92 ^{cB}	8.11±0.11 ^{cC}	26.08±1.75 ^{cA}	6.67±0.17 ^{cC}	27.23±1.81 ^{cA}
500	52.01±2.21 ^{bB}	18.83±1.71 ^{bD}	56.25±1.92 ^{bA}	24.07±1.15 ^{bC}	57.41±1.36 ^{bA}
1000	83.46±0.28 ^{aB}	62.63±2.73 ^{aC}	84.83±0.34 ^{aB}	62.28±1.81 ^{aC}	92.94±1.18 ^{aA}

¹⁾All values are expressed as mean±SE of triplicate determinations.

²⁾Means in the column(a-d) and row(A-D) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test($p<0.05$).

Table 3. ABTS radical scavenging of different solvent extracts from *Stachys sieboldii* Miq. according to drying methods. (%)

Concentration (ug/mL)	Hot air drying		Freeze-drying		비타민 C
	Water extract	70% extract	Water extract	70% extract	
100	12.75 ± 1.13 ^{1)dB2)}	13.54 ± 0.30 ^{dB}	13.92 ± 1.27 ^{dB}	9.80 ± 0.17 ^{dC}	29.69 ± 0.56 ^{cA}
250	26.87 ± 0.24 ^{cC}	25.06 ± 0.31 ^{cD}	28.48 ± 0.63 ^{cB}	19.27 ± 0.63 ^{cE}	60.68 ± 0.06 ^{bA}
500	49.88 ± 0.13 ^{bb}	43.83 ± 0.49 ^{bD}	49.93 ± 0.60 ^{bb}	36.17 ± 0.21 ^{bE}	89.81 ± 0.07 ^{aA}
1000	76.12 ± 0.10 ^{aC}	59.95 ± 0.19 ^{aE}	81.17 ± 0.16 ^{aB}	63.08 ± 1.25 ^{aD}	90.13 ± 0.04 ^{aA}

¹⁾All values are expressed as mean ± SE of triplicate determinations.

²⁾Means in the column(a-d) and row(A-D) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

났다($p < 0.05$). 농도 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 동결건조 초석잠의 열수추출물 경우, 열풍건조 초석잠의 열수추출물, 동결건조 초석잠의 70% 에탄올 추출물, 열풍건조 초석잠의 70% 에탄올 추출물에 비해 가장 높게 나타났으나, 대조군인 비타민 C에 비해서 낮았다($p < 0.05$).

3.4. 신경세포 보호효과

열풍건조 및 동결건조를 실시한 초석잠을 열수로 추출한 후 추출물 농도별로 H_2O_2 에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터의 SH-SY5Y 세포

생존율에 미치는 효과를 측정된 결과는 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. H_2O_2 를 처리한 처리구에서는 대조구(100%)에 비해 49.58%의 신경세포 생존율을 나타냈으며, 비타민 C 처리구에서는 78.75%의 신경세포 보호효과를 나타냈다. 열풍건조 초석잠의 열수 추출물 500 ppm 농도에서 신경세포 생존율은 63.14%로 비타민 C 처리구에 비해 낮았지만, 100 ppm에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 동결건조 초석잠의 열수 추출물 300ppm과 500 ppm 농도에서 신경세포 생존율은 각각 64.45%와 66.75%로 비타민 C 처리구

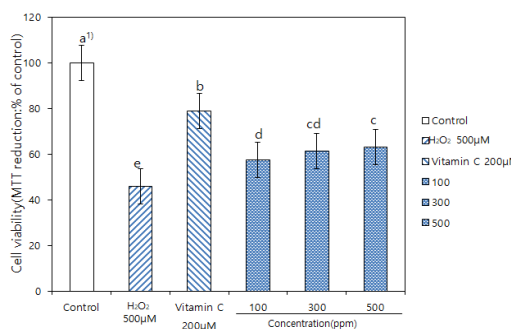


Fig. 1. Effects of water extracts from *Stachys sieboldii* Miq. according to hot air drying methods against H_2O_2 -induced cell death in SH-SY5Y cell system.

¹⁾Values with different superscripts indicate significant differences by Duncan's multiple range tests ($p < 0.05$).

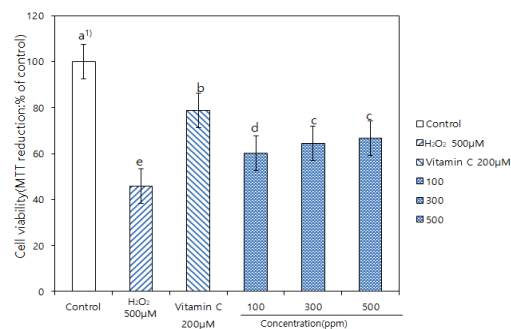


Fig. 2. Effects of water extracts from *Stachys sieboldii* Miq. according to freeze-drying methods against H_2O_2 -induced cell death in SH-SY5Y cell system.

¹⁾Values with different superscripts indicate significant differences by Duncan's multiple range tests ($p < 0.05$).

에 비해 낮게 나타났지만, 100 ppm에 비해 유의적으로 높았다($p<0.05$).

4. 결론

본 연구는 건조방법을 달리한 초석잠(*Stachys sieboldii* Miq.)을 열수 및 70% 에탄올 용매로 추출하여 제조한 후 추출물 농도별로 항산화 활성 및 신경세포 보호효과에 미치는 효과를 검토하고자 실시하였다. 초석잠 추출물들의 총 flavonoid와 총 polyphenol 함량은 동결건조 열수 추출물에서 각각 가장 높았다($p<0.05$). DPPHS 및 ABTS radical 소거활성은 농도의존적으로 증가하였으며, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 동결건조 열수추출물에서 유의적으로 가장 높게 나타났으나, 대조군인 비타민 C에 비해 낮았다($p<0.05$). 신경세포 보호효과는 열풍 및 동결건조 열수추출물에서 농도의존적으로 높게 나타났으며, 대조군인 비타민 C에 비해 낮았다($p<0.05$). 본 연구를 통하여 열풍건조에 비해 동결건조 초석잠의 열수추출물에서 총 flavonoid와 총 polyphenol 함량이 더 높게 함유되어 있어 항산화 활성 및 산화적 스트레스로부터의 신경세포 보호효과가 우수하게 나타나는 것을 확인 하였다.

감사의 글

본 연구는 2018년 장안대학교 연구비로 이루어진 연구로 이에 감사를 포함합니다.

References

1. J. P. Kehrer, L. O. Klotz, "Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health", *Crit. Rev. Toxicol.*, Vol.45, pp 765-798, (2015).
2. V. N. Talesa, "Acetylcholine esterase in Alzheimer's disease", *Mech Ageing Dev.* Vol.122, pp 1961-1969, (2001)
3. P. Kasa, Z. Rakonczay K. Gulya., "The cholinergic system in Alzheimer's disease", *Prog Neurobiol.*, Vol.52, pp 511-535. (1997).
4. M. J. Chung, S. Lee, Y. I. Park, J. Lee, K. H. Kwon, "Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from *Cirsium setidens* and *Aster scaber* in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells," *Life. Sci.* Vol.148, pp 173-182, (2016).
5. H. S. Baek, H. S. Na, Y. S. Kim, D. H. Lee, C. H. Ryu, B. H. Song, "Antioxidant activities of *Stachys sieboldii* MIQ roots." *J. Life Sci.*, Vol.14, pp 1-7, (2001).
6. D. J. Choe, H. Y. Ahn, Y. W. Kim, T. H. Kim, M. D. Kim, Y. S. Cho, "Improvement effect of *Stachys sieboldii* MIQ. according to mixing ratio of calcium on memory impairment in scopolamine-induced dementia rats", *J. Life Sci.* Vol.26, pp 812-818, (2016).
7. B. H. Ryu, S. O. Kim, "Effects of methanol extract of *Stachys sieboldii* MIQ on acetylcholine esterases and monoamine oxidase in rat brain" *Korean J. Food Nutr.* Vol. 17, pp 347-355, (2004).
8. H. S. Baek, Y. S. Na, D. H. Kim, C. H. Lee, B. H. Ryu, S. K. Song, "Antioxidant Activities of *Stachys sieboldii* MIQ Roots", *J. Life. sci.*, Vol.14, No.1 pp. 1-7, (2004).
9. H. S. Bae, Y. S. Na, B. H. Ryu, S. K. Song. "Antioxidant activities of *Stachys sieboldii* MIQ. stalks", *Korean J. Biotechnol Bioeng.* Vol.18, pp 266-271. (2003).
10. S. W. Lee, T. H. Jung, Y. W. Shin, "A comparative study of memory improving effects of *Stachys* rhizome and *Lycopi* rhizome on scopolamine-induced amnesia in mice", *Kor. J. Herbol.*, Vol.28, pp 69-77. (2013).
11. K. S. Jeon, S. I. Park, "Antioxidative Properties of Chinese Artichoke". *Korean J. Culinary Re.*, Vol.21, pp. 120-132, (2015).
12. Y. I. Park, S.M. Lee, N.M. Joo, 'Quality characteristics and optimization of rice muffin containing Chinese artichoke

- (*Stachys sieboldii* Miq) powder using response surface methodology'. *J. Korean Diet Assoc.*, Vol.20, pp.212-226, (2014).
13. M. J. Chung, S. M. Lee, N. M. Joo, "Optimization of rice cookies prepared with Chinese artichoke(*Stachys sieboldii* Miq) powder using response surface methodology and quality characteristics'. *Korean J Food & Nutr* Vol.27, pp.435-446. (2014).
 14. J. E. Lee, S. Y. Jin, Y. S. Han, "Antioxidant activities and quality characteristics of tofu supplemented with Chinese artichoke powder". *Korean J Food & Nutr* Vol.27, pp.10-21, (2014).
 15. M. R. Yang, The Analysis of Bioactive Materials in *Stachys sieboldii* Miq. and Its Application on Functional Ready-to-eat Food. PhD thesis, Gyeongnam National University, 9, Jinju, (2012).
 16. O. Denis, W. Denis, "On phosphotungastic-phosphomolybdic compounds as color regents". *J. Biol. Chem.* Vol. 12, pp 239-249, (1912).
 17. S. K. Chae, G. S. Kang, S. J. Ma, K. W. Bang, M. W. Oh, S. H. Oh, "Standard food analysis". Paju: Jigu-Moonwha Sa, pp 381-382, (2002).
 18. Y. J. Lee, D. G. Kang, J. S. Kim, H. S. Lee, "Lycopus lucidus inhibits high glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial", *Vascul. Pharmacol.* Vol.48, pp 38-46, (2008).