

최 종  
연구보고서

Flavonoids 함유 엉겅퀴속 및 향유속 자생식물을  
이용한 월경전 증후군 및 항우울증 효과  
식품소재 개발에 관한 연구

Development of food functional materials for  
premenstrual syndrome and anti-depression from  
flavonoids of *Crisium* spp. and *Elsholtzia* spp.

덕성여자대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Flavonoids 함유 영경귀속 및 향유속 자생식물을 이용한 월경전 증후군 및 항우울증 효과 식품소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2007년 5월

주관연구기관명 : 덕성여자대학교

총괄연구책임자 : 김 건 희

세부연구책임자 : 김 건 희

세부연구책임자 : 정 미 숙

세부연구책임자 : 이 용 수

참 여 기 업 : (주)후드윈

# 요 약 문

## I. 제 목

Flavonoids 함유 엉겅퀴속 및 향유속 자생식물을 이용한 월경전 증후군 및 항우울증 효과 식품소재 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

엉겅퀴속(*Cirsium* spp.) 및 향유속(*Elsholtzia* spp)은 우리나라의 전국 산야에 자생하며 본초서에는 엉겅퀴(大薊)가 어혈, 토혈, 비혈, 응종, 대하증을 다스리고 항균작용 및 항염작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 향유속 식물은 발한, 이뇨, 해열, 지혈 등의 효과가 보고되어 있다. 엉겅퀴속 식물에서 78종의 flavonoids가 확인되었으며, anti-inflammatory, antibacterial 등의 생리활성이 있는 apigenin이 확인되었다. Flavones에 속하는 apigenin은 anti-inflammatory, anti-spasmodic 및 antibacterial 등의 생리활성이 있다고 보고되어 연구의 관심이 되고 있다. 본 연구의 목적은 엉겅퀴속(*Cirsium*) 및 향유속(*Elsholtzia*) 식물의 생리활성 물질인 flavonoids의 가공 중 유효성분의 최적 조건을 확립하고, 이를 이용한 고수요 고부가 여성 건강 기능성 식품소재를 개발함으로써 국민건강증진 및 고품질의 건강 기능성 식품 생산에 기여할 뿐만 아니라 이를 통한 재배 확대로 농가소득 증가를 이루고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

국내 산야에 자생하는 엉겅퀴속 및 향유속 flavonoids를 이용하여 월경전 증후군에 효과가 있는 여성 건강 기능성 식품소재를 개발하기 위하여, flavonoids 분석 및 가공 최적조건 확립, 기능성 소재를 이용한 제품화 기술개발 연구, 건강기능성

소재의 생리활성 연구로 나누어 다음과 같이 3년간 수행하였다.

1. 엉겅퀴속 및 향유속 식물 flavonoids 분석조건 확립
2. 엉겅퀴속 및 향유속 식물의 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구
3. 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 검색
4. 활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호작용 및 신경전달 억제 효과 검색
5. 가공조건에 따른 엉겅퀴속 및 향유속 식물의 flavonoids 물질 분석 조건 확립
6. 엉겅퀴 및 꽃향유를 이용한 Nutraceuticals의 제품화 연구
7. 월경전 증후군에 대한 임상효과 확인

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 엉겅퀴속 및 향유속 식물의 flavonoids 분석조건 확립

엉겅퀴의 잎과 꽃에서 total flavonoids, apigenin 함량이 비교적 높은 수치로 확인되었다. 엉겅퀴 추출물을 건강 기능 식품으로 제품화하기 위하여 일반독성(단여투여) 및 유전독성(복귀돌연변이, 염색체이상)의 안전성 분석 결과, 사용된 농도범위에서는 시험군주들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다. 향유(*Elsholtzia ciliat*), 꽃향유(*Elsholtzia splendens*)의 잎과 꽃에 총플라보노이드 함량이 높았으며, 꽃에서 apigenin 함량이 유의적으로 높았다.

2. 엉겅퀴속 및 향유속 식물의 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구

동결건조 엉겅퀴 분말이 함유된 4가지 블록스프를 첨가한 면이 무첨가군과 동일한 선호도를 나타내었다. 엉겅퀴 분말을 첨가한 스넥 및 빵의 선호도가 무첨가군보다 높았다. 엉겅퀴 뿌리 차에서 선호도가 높게 나타났으며, 엉겅퀴 잎 추출물을 첨가하여 엉겅퀴 추출물 음료를 개발하였다. 꽃향유 정유를 GC-MSD로 분석한 결과 총 27종의 휘발성 성분이 확인되었다. 꽃향유를 첨가한 두부스넥과 식빵, 마늘빵 및 차의 구매의향이 높게 나타났다. Apigenin 함량이 가장 높게 나타난 꽃향유 꽃과 잎 추출물을 첨가하여 음료를 개발하였다.

3. 엉겅퀴의 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 검색

엉겅퀴 성분인 apigenin은 신경세포에서 세포 기능에 중요한 역할을 한다고 알려진 활성산소종의 발생, 세포내 칼슘농도를 증가시켰고, 세포내 칼륨농도, 염소농

도를 감소시켰으며 간암세포에 대한 세포독성을 나타내었다.

4. 활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호 작용 및 신경전달 억제 효과 검색  
향유추출물은 통증발현기전에 깊이 관여하고 있다고 알려진 세포내 칼슘신호의 저하를 나타내었다. 또한 세포내 칼륨농도의 저하 및 염소이온 농도의 증가를 유발하였다. 향유추출물에 의한 막전압의 과분극은 GABA<sub>A</sub> 수용체의 활성화에 의한 세포내 염소이온 농도의 증가와 ATP-의존성 칼륨통로의 활성화에 의한 세포내 칼륨이온 농도의 감소에 기인한다는 사실을 알 수 있었다. 막전압의 과분극은 통증전달을 매개하는 구심성 감각신경에서 활동전위의 전달을 억제하는 효과를 가지고 있다. 따라서 향유추출물은 월경전증후군에서 흔히 나타나는 통증의 예방에 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

5. 가공조건에 따른 엉겅퀴속 및 향유속 식물의 flavonoids 물질 분석 조건 확립  
건조방법에 따른 엉겅퀴 추출물의 apigenin 함량은 동결건조에서 가장 높았고, 50℃ 오븐건조, 음건 순으로 높았다. Apigenin 함량은 엉겅퀴 잎 부위에서, 40% 에탄올에서 가장 잘 추출되었다. 엉겅퀴 apigenin 함량은 추출시간이 증가할수록 함량이 감소하는 경향을 보이나 4시간 이상 추출 시 apigenin 함량이 감소하지 않는 것을 확인하였다. 동결건조 꽃향유 추출물의 apigenin이 가장 높았으며, 꽃향유 40-80% 에탄올 용매의 추출물에서 apigenin 함량이 높음을 확인하였다.

유효성분이 다량 함유된 추출물을 건강 기능 식품으로 제품화하기 위하여 일반독성(단여투여) 및 유전독성(복귀돌연변이, 염색체이상)의 안전성 분석을 수행하였을 때, 본 시험 조건에서 꽃향유 추출물의 암수 마우스에 1회 경구투여는 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견에 있어서 어떠한 독성소견도 유발하지 않았으며, 본 시험물질의 반수 치사량은 2000 mg/kg/day을 상회하는 것으로 사료되었다. 꽃향유 추출물은 본 시험 조건하에 사용한 농도범위에서는 *Salmonella typhimurium* 4개 균주와 *E. coli* 1개 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다. *In Vitro* 염색체이상시험(*In vitro* Chromosome Aberration Assay)에서도 염색체이상을 유발하지 않았다.

6. 엉겅퀴속 및 향유속 식물을 이용한 Nutraceuticals(타블렛, 캡슐 등)의 제품화 및 산업화 연구

엉겅퀴 및 꽃향유 nutraceutical은 전문가 검사를 통하여 캡슐로 제조하였으며, 캡

술에 함유된 분말상태의 식물이 육안으로 확인되지 않도록 하기 위하여 경질 적갈색 불투명 캡슐로 하였다. 제조된 캡슐은 target group을 대상으로 관능검사를 하였으며, 이를 월경전 증후군에 대한 임상효과 확인에 이용하였다.

#### 7. 월경전 증후군에 대한 임상효과 확인

Scheffe 방식으로 각 집단 별 우울, 불안 사전-사후 점수 비교 결과, 꽃향유를 처치한 집단이 다른 두 집단에 비해 우울과 불안 점수가 현저하게 감소하였다. 각 집단 별로 월경전 증후군 검사에서 통계적으로 유의한 결과는 아니지만 사전-사후 평균 점수에서 가장 많은 변화를 보인 집단은 꽃향유를 처치한 집단으로 나타났다. 꽃향유 집단이 우울 및 불안(STAI) 점수에서 가장 많은 변화를 보였다. 꽃향유 집단이 월경전 증후군 전체 점수에서 통계적으로 유의하지는 않았으나 가장 많은 점수의 변화를 보였고, 월경전 증후군의 하위 유형인 불안정 척도에서도 통계적으로 유의한 변화를 나타내었다.

#### 8. 동물실험

영경귀 추출액은 일반 운동 활성을 증가시키는 경향을 나타냈다. 특히 300 mg/kg 영경귀 추출액은 중앙영역에서 일반 운동 활성을 유의성 있게 증가시켰으며, Forced Swimming test에서 immobile duration을 유의성 있게 감소시켰으며, mobile 및 strong mobile duration을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 효과는 심질환계 항우울 약인 imipramine과 SSRI인 fluoxetine의 효능에 상응하였다. 영경귀 추출액은 300 mg/kg에서 기존의 항우울제에 상응하는 항우울 효능이 있는 것으로 사료된다.

#### 9. 활용에 대한 건의

꽃향유가 20대 여성을 대상으로 한 실험에서 월경전 증후군 증상 가운데, 불안 및 우울을 유의적으로 감소시켰으며, 영경귀는 동물실험에서 immobile duration을 유의성 있게 감소시켰으며, mobile 및 strong mobile duration을 유의적으로 증가시켰다. 또한 영경귀 및 꽃향유의 꽃과 잎에서 생리활성을 지닌 총 플라보노이드 및 apigenin 함량이 높았고, 다양한 식품에 첨가되었을 때, 긍정적인 결과를 나타내어 기능성 식품의 좋은 소재로 확인되었다. 따라서 영경귀 및 꽃향유의 소비를 확대할 수 있는 방안 마련 및 생산 확대에 노력을 기울여야 할 것으로 판단된다.

## SUMMARY

*Cirsium* species and *Elsholtzia* species grow widely in Asian and Western countries and are used as medicinal plants all over the world. *Cirsium* species and *Elsholtzia* species are known as a traditional folk remedy source in Asian countries including Korea. Recently 78 flavonoids reported from *Cirsium* species, especially anti-inflammatory and antibacterial activities of apigenin were reported. The objectives of this study were to investigate the contents of total flavonoids and apigenin of *Cirsium* and *Elsholtzia* species, the optimum processing condition, to establish the applications as nutraceutical materials and to study the biological activities of *Cirsium* and *Elsholtzia* species.

The contents of total flavonoids and apigenin of *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* were analyzed and sensory evaluation were applied on tea, bread, and snack added with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens*. Among the different plant parts of *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens*, flowers and leaves had the highest level of total flavonoids and apigenin contents. Drying method affected total flavonoids and apigenin content of *Cirsium japonicum*, and *Elsholtzia splendens*, but fixed pattern was not revealed. In sensory evaluation, overall acceptance of *Cirsium japonicum* flower-leaf mix tea was higher than those of leaf tea and also the purchase intention of *Cirsium japonicum* flower-leaf mix tea was higher than those of leaf tea. Also purchase intention of tofu snack, bread, and flower tea added with *Elsholtzia splendens* were higher than control groups.

The antidepressant effects of *Cirsium japonicum* were investigated using open

field test and forced swimming test. Supplementation of *Cirsium japonicum* increased dose-dependently movement, rearing frequency and total turn angle in the center area of open field in mice. Treatment of *Cirsium japonicum*'s extract(300mg/kg body weight) decreased immobile duration and increased mobile and strong mobile duration significantly, and it is comparable to that of imipramine and fluoxetine. These results indicate that *Cirsium japonicum* has antidepressant effect. Treatment of *Cirsium japonicum* did not induced any impairment in motor coordination and myorelaxation. These results indicate that the constituents or its complex of *Cirsium japonicum* could be a candidate as a new antidepressant.

In premenstrual syndrome, the effects of *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* were investigated using 30 women participants at age of twenties for 3 months. In the *Elsholtzia splendens* capsule treated group, scores of depression and anxiety were significantly decreased than the placebo group and the *Cirsium japonicum* capsule treated group by Scheffe test. Also mean scores of the pre-post treatment were significantly changed. Moreover, liability, a symptom of premenstrual syndrome, was significantly decreased in *Elsholtzia splendens* capsule treated group.

Our results indicate that *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* could be effective plant materials in premenstrual syndrome and excellent plant materials for the food industry.

# CONTENTS

SUMMARY .....	1
Chapter 1 Outline of Research Project .....	9
Chapter 2 State of the Art Report .....	18
Chapter 3 Research Performed and Results .....	20
Chapter 4 Research Attainments and Contributions to Related Fields .....	156
Chapter 5 Application Plans for Research Results .....	159
Chapter 6 New Science and Technology Information .....	161
Chapter 7 References .....	163

# 목 차

요 약 문 .....	1
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	9
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	9
제 2 절 연구개발의 목표 및 범위 .....	10
제 2 장 국내외 기술개발현황 .....	18
제 1 절 국내외 관련기술의 현황 및 문제점 .....	18
제 2 절 앞으로의 전망 .....	19
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	20
제 1 절 연구수행방법 .....	20
제 2 절 연구내용 및 결과 .....	39
제 4 장 연구목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	156
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	159
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	161
제 7 장 참고문헌 .....	163

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

영경귀속(*Cirsium* spp.) 및 향유속(*Elsholtzia* spp)은 우리나라의 전국 산야에 자생하며 본초서에는 영경귀(大薊)가 어혈, 토혈, 비혈, 응종, 대하증을 다스리고 항균작용 및 항염작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 향유속 식물은 발한, 이뇨, 해열, 지혈 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 외국에서도 영경귀가 민간요법에 널리 쓰이고 있지만 생리활성에 대한 과학적 근거를 바탕으로 이제 시작 단계로 pertolirarin, acacetin, rhamnoglycoside 및 heptadecene 등과 같은 약리 성분이 연구된 바 있다. 향유속에 대한 연구도 향기성분에 대한 연구만 수행되었을 뿐 생리활성성분에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 최근 들어 외국에서 영경귀속 식물에서 78종의 flavonoids가 확인되었으며, anti-inflammatory, antibacterial 등의 생리활성이 있는 apigenin이 확인되었다. Flavones에 속하는 apigenin은 anti-inflammatory, anti-spasmodic 및 antibacterial 등의 생리활성이 있다고 보고되어 연구의 관심이 되고 있다(2003, Biochemical systematics and ecology). Apigenin이 나타내는 항염증작용은 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis, RA) 치료에 매우 중요하다. 노인 특히 여성노인에게 류마티스성 관절염이 자주 나타나는데, 미국의 경우 210만 명 가운데 약 72%에 달하는 150만 명이 여성 환자이며, 치료를 위한 비용이 한해 30억 달러에 달하고 있는 것으로 보고되고 있으며 우리나라의 경우에는 매년 유의적으로 증가추세에 있다. 따라서 본 연구에서는 영경귀속 및 향유속 flavonoids를 구명하고, 가공 최적화 조건 확립하여 여성들에게 많이 발생하는 관절염 신경증 및 월경전 증후군에 효과가 있는 고품질의 여성 건강기능 식품소재를 개발하고자 한다.

### 2. 경제·산업적 측면

건강기능성식품의 세계시장규모는 2000년도에 1,280억불로 성장하였고 국내시장 규모는 세계시장의 약 1.2%를 차지하였으며, 미국과 유럽의 과학기술 예측 조사에 의하면 21세기 건강기능성식품 시장은 자동차산업과 대등한 규모로 성장할 것

이라고 보고한 바 있다. 국민들의 건강과 식품에 대한 지식이 축적되어 천연 성분으로 이루어진 기능성 식품 시장이 지속적으로 성장하고 있다. 보건복지부에서 건강보조식품에 대한 적용범위 및 성분규격을 결정한 1990년 이후 현재까지 키토산, 스쿠알렌을 포함한 25종의 건강기능식품이 인정되어 있으며, 약 1조원의 시장 규모를 가진 223개 업체에서 생산 판매하고 있다. 그러나 이들 업체가 연구기반이 없는 제품을 생산하고 있어 생리활성 물질의 유효성 여부가 의심되고 있다. 현재 건강기능식품의 80% 이상이 외국에서 수입되고 있는 현실을 감안 할 때 국내산 자생식물을 대상으로 보다 과학적 연구를 토대로 개발된 기능성 식품 소재 개발은 국민의 건강 증진의 차원에서 매우 깊은 의미를 지니며, 고부가가치를 갖는 영경취속 및 향유속 식물재배를 농가에 권장하여 고소득을 가능하게 할 수 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

국내에서 국민건강과 관련된 health food의 개념을 가진 건강기능식품이 상업화된 것은 1970년대로 추정되고 있다. 경제성장과 더불어 식생활의 서구화, 생활양식의 변화 및 인구의 노령화 등으로 퇴행성 성인병이 증가되면서 2002년 보건복지통계연보에 의하면 2001년 인구 10만 명당 123.5명이 암으로 사망하고 뇌혈관질환으로 73.8명, 심장질환으로 34.2명이 사망하였다. 이와 같은 성인병의 발생이 식이와 직접적인 관련이 있다는 과학적인 연구결과가 보고되면서 소비자들의 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 우리나라 국민의 수명연장으로 65세 이상의 노년층 인구가 전체의 8.3%를 차지하여 선진국처럼 고령화 사회로 진입하고 있으며 특히 현재, 여성의 평균 수명이 80세로 여성의 만성질환에 유효한 기능성 식품에 대한 기대가 고조되고 있다. 본 연구의 결과로 자생 식물자원을 여성 건강 기능성 식품으로 개발하여 국민건강증진에 기여하며, 나아가 노령화 사회에 적극적인 대비를 할 수 있다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 범위

### 1. 연구개발 목표와 내용

본 연구과제의 최종 연구 목표는 영경취속(*Cirsium*) 및 향유속(*Elsholtzia*) 식물

의 생리활성 물질인 flavonoids의 가공 중 유효성분 최적 조건 확립과, 이를 이용한 고수요 고부가 여성 건강 기능성 식품소재를 개발함으로써 국민건강증진 및 고품질의 건강 기능성 식품 생산에 기여할 뿐만 아니라 이를 통한 재배 확대로 농가소득 증가를 이루고자 한다. 이러한 목표달성을 위하여 국내산 자생식물인 엉겅퀴속과 향유속을 선정하여 flavonoids 분석 및 가공 중 유효성분 최적 조건 확립, 유효기능성 성분을 이용한 제품화 기술 및 산업화 기술 확립 및 류마티스성 관절염, 신경통 및 월경전 증후군에 유효한 여성건강 기능성 식품소재 개발에 대한 연구를 수행할 예정이다.

엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)는 우리나라의 전국 들판에 자생하며 일본, 중국 뿐 아니라 지중해연안, 북미 남서부, 호주 등 난대에서 한대에 이르기까지 널리 자생하는 식물로 세계적으로 잘 알려진 식물이다(Fig. 1). 국화과(*Compositae*)에 속하는 엉겅퀴의 영어 명은 Thistle, 한자로는 大薊, 小薊, 刺薊, 牛薊口로 불리며 우리나라에서는 가시나물, 향가새라고도 하며 고려엉겅퀴는 곤드레, 엉겅퀴 뿌리는 大薊根으로 부른다. 국내산 엉겅퀴의 종류는 약 11종(Table 1)이다. 본초서에는 엉겅퀴(大薊)가 어혈, 토혈, 비혈, 응종, 대하증을 다스리며, 精을 기르고 血을 보호한다고 기록되어 있다. 약리작용으로는 대혈압작용, 사람의 유독 결핵의 성장을 억제하는 항균작용 및 항염작용이 있는 것으로 알려져 있다. 엉겅퀴의 항염효과 및 항균효과를 나타내는 유효성분은 flavone으로 추정되고 있다. 외국에서도 엉겅퀴가 민간요법에 널리 쓰이고 있지만 생리활성에 대한 과학적 근거를 바탕으로 한 연구는 거의 보고된 바가 없다. 단지 pertolirarin, acacetin, rhamnoglucoside 및 heptadecene 등과 같은 약리 성분이 연구된 바 있다. 엉겅퀴속 식물에서 78종의 flavonoids가 확인되었으며, anti-inflammatory, antibacterial 등의 생리활성이 있는 apigenin이 확인되었다. 향유속은 꿀풀과 식물로 국내에는 향유(*Elsholtzia ciliata*), 꽃향유(*Elsholtzia splendens*), 좁향유 및 애기향유가 자생하고 있으며 꽃, 잎 및 줄기의 전초에서 독특한 향기가 나는 한국산 방향성 식용식물로 어린잎은 나물 등으로 식용한다(Fig. 1). 향유속 식물에는 flavonoids가 함유되어 있으며 전초는 발한, 이뇨, 해열, 지혈 등에 생약으로도 사용되고 있다.



영경귀(*Cirsium japonicum*)



Kkothyangyu (*Elsholtzia splendens*)

꽃향유(*Elsholtzia splendens*)

Figure 1. 영경귀(*Cirsium japonicum*) 및 꽃향유(*Elsholtzia splendens*).

Flavonoids는 식물의 대표적인 이차 대사산물로 담황색 내지는 노란색을 띠며 유리상태 또는 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당류와 결합하여 배당체(glycoside)로 존재한다. 일반적으로 잎, 꽃, 과실부위는 배당체로, 목질조직(woody tissue)은 aglycons, 그리고 종자에는 배당체와 aglycons의 두 가지 형태로 함유되어 있다. 자연계에 4,000종 이상의 flavonoids가 존재하며, 그 구조는 2개의 benzene ring에 산소를 함유한 pyrone ring을 매개로 결합되어 있는 2-phenyl-benzo-a-pyrone ring으로 이루어져 있다. 식품에 존재하는 flavonoids는 대부분 flavonols(querletin, kaempferol, myricetin)과 flavones(luteolin, apigenin)이다.

각 식품에 존재하는 flavonoids의 양과 종류는 유전적 요인(genetic factors), 환경적 요인(environmental factors), 가공기술(processing technique)에 의해 영향을 받게 된다. 유전적 요인으로는 품종(cultivars), 성숙도(maturity), 발달단계(development stages)를 들 수 있다. Flavones에 속하는 apigenin은 anti-inflammatory, anti-spasmodic 및 antibacterial 등의 생리활성이 있다고 보고되어 연구의 관심이 되고 있다(2003, Biochemical systematics and ecology). 기본적인 flavones의 화학구조는 다음과 같다(Fig. 2).

Table 1. 국내에서 자생하는 엉겅퀴의 종류

종 류	특 성
지느러미 엉겅퀴 ( <i>Carduus crispus</i> L.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 2년초</li> <li>· 연한줄기는 껍질을 벗겨 생으로 먹거나 나물로 먹는다.</li> <li>· 전초(全草)는 강장, 뇨수 및 지혈제로 사용</li> </ul>
큰 엉겅퀴 ( <i>Cirsium Pendulum</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 낮은 지대에서 서식한다.</li> <li>· 어린순은 나물로 먹는다.</li> </ul>
엉겅퀴 ( <i>Cirsium japonicum</i> Var. <i>ussuriense</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속한다.</li> <li>· 좁은 잎 엉겅퀴: 잎이 좁고 녹색이며 가시가 다소 많다.</li> <li>· 가시 엉겅퀴: 잎이 다닥다닥 붙어 있고 보다 가시가 많은 것을 말한다.</li> <li>· 흰 가시 엉겅퀴: 백색의 꽃이 핀 엉겅퀴</li> </ul>
도깨비 엉겅퀴 ( <i>Cirsium schantarense</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 깊은 산 속에 땅에서 자란다.</li> <li>· 어린순은 나물로 먹는다.</li> </ul>
동래 엉겅퀴 ( <i>Cirsium toraiense</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 부산 및 동래 근처에서 서식</li> </ul>
바늘 엉겅퀴 ( <i>Cirsium rhinoceros</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 흰 바늘 엉겅퀴: 백색의 꽃이 피는 것을 말한다.</li> </ul>
벼들 잎 엉겅퀴 ( <i>Cirsium lineare</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 수원 근처 산림에서 자란다.</li> </ul>
흰 잎 엉겅퀴 ( <i>Cirsium valssovianum</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 중부 이북의 풀밭에서 자란다.</li> </ul>
고려 엉겅퀴 ( <i>Cirsium setidens</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 산과 들판의 약간 그늘진 곳에서 자란다.</li> <li>· 4~5월경 어린순은 나물로 한다.</li> <li>· 흰잎 고려 엉겅퀴: 잎 뒷면이 모시풀 같이 백색인 것</li> </ul>
정영 엉겅퀴 ( <i>Cirsium chanroenicum</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 지리산, 가야산, 조령 및 구례에서 자란다.</li> </ul>
물 엉겅퀴 ( <i>Cirsium nipponicum</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국화과에 속하는 다년초</li> <li>· 울릉도 성인봉의 중부 길가에서 자란다.</li> </ul>

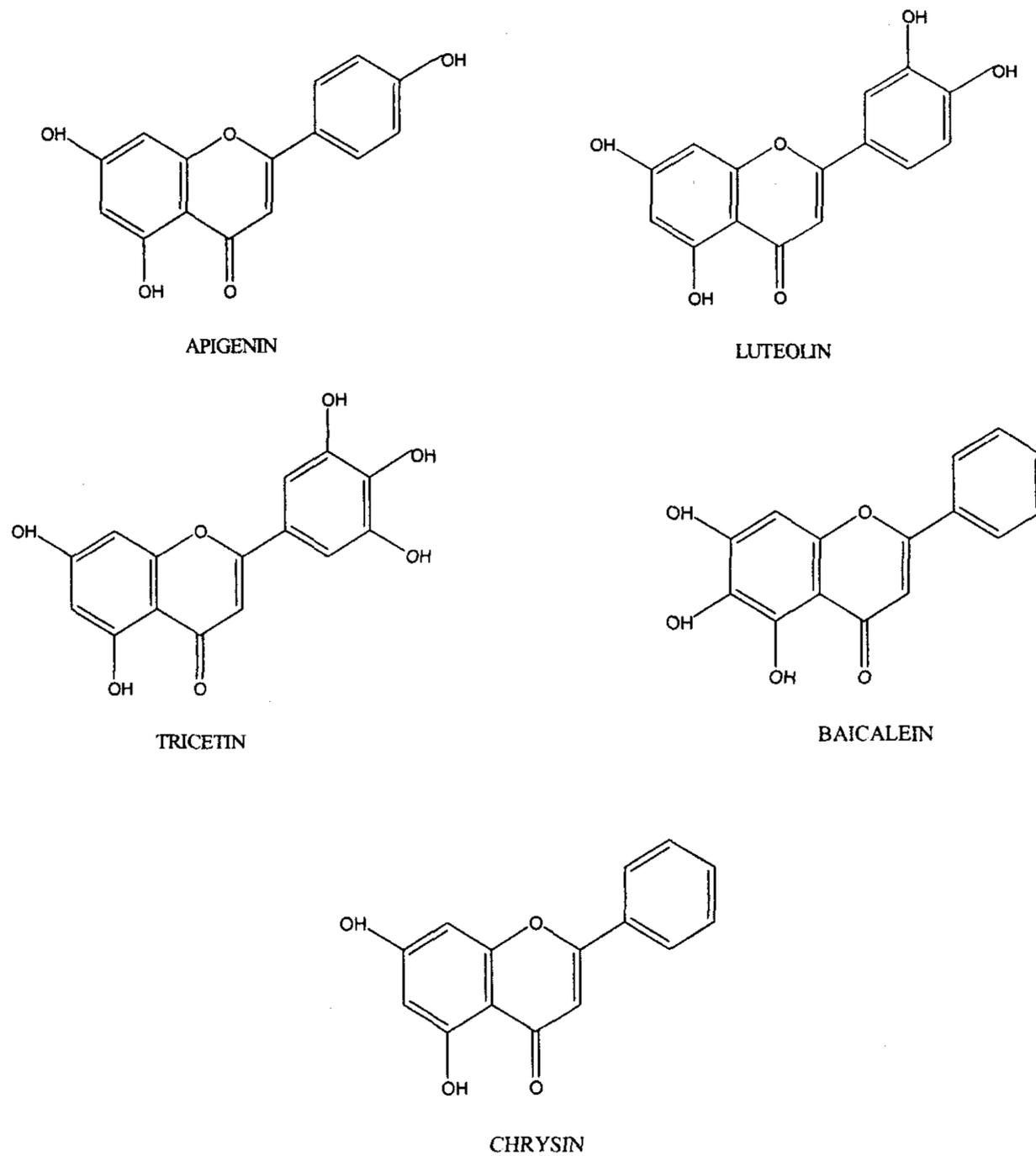


Figure 2. 기본적인 Flavones의 화학구조.

Apigenin이 나타내는 항염증작용은 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis, RA) 치료에 매우 중요하다. 노인 특히 여성노인에게 류마티스성 관절염이 자주 나타나는데, 미국의 경우 210만 명 가운데 약 72%에 달하는 150만 명이 여성 환자이다. 우리나라에도 매년 류마티스성 관절염 환자가 급증하고 있어 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 이 질병의 특징은 관절에 만성적인 염증이 생기며 연골과 뼈를 파괴시키고 나아가 관절이 변형되는 것이다. 류마티스성 관절염 환자의 관절에 과량의 유리산소 라디칼이 생성되는데 이러한 유리산소 라디칼에 의한 손상으로부터 항산화제 및 항염증제가 이를 보호한다. 따라서 본 연구에서는 국내 산야에 자생하는 엉겅퀴속 및 향유속 flavonoids를 이용한 여성 건강 기능성 식품소

재를 개발하기 위하여 flavonoids 분석 및 가공 최적조건 확립, 기능성 소재를 이용한 제품화 기술개발 연구, 건강기능성식품의 산업화 연구 및 건강기능성 소재의 생리활성 연구로 분야를 나누어 수행하였다.

## 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

### 가. 1차년도(2004)

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발결과
○ 엉겅퀴속 식물의 flavonoids 분석조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flavonoids 정성 및 정량분석을 위하여 HPLC, LC/MS 및 NMR을 이용하여 분석 조건 확립</li> <li>- 엉겅퀴속 식물의 종류에 따른 flavonoids subclass 구명</li> <li>- 식물의 부위별 flavonoids subclass 정성, 정량분석</li> <li>- 엉겅퀴 추출물의 안전성 검사</li> </ul>	재현성 있는 flavonoids 분석방법 및 성분구명
○ 엉겅퀴속의 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 엉겅퀴속 식물 및 추출액을 이용한 음료, 차류 및 스낵 제조를 위한 배합비율(recipe) 분석</li> <li>- 전문가에 의한 관능검사</li> <li>- Target group에 의한 관능검사</li> <li>- 포장재질 및 포장조건 선정</li> <li>- 유통기한 설정</li> </ul>	엉겅퀴속 식물 및 추출물 제품의 식품학적 연구 및 산업화
○ 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포수준에서 일반적인 항산화 효과 검색</li> <li>- 세포막 안정화에 우수한 소재 검색</li> </ul>	항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 확인

나. 2차년도(2005)

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발결과
○ 향유속 식물의 flavonoids 분석조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 향유속 식물 중 flavonoids 물질을 가장 많이 함유한 식물 선정</li> <li>- 식물의 부위별 flavonoids subclass 정성 및 정량 분석</li> <li>- 향유 추출물의 안전성 검사</li> </ul>	생리활성 성분 분석의 기초자료 마련
○ 향유속 식물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 향유속 식물의 꽃을 이용한 차, 음료 개발을 위한 최적 추출조건 분석</li> <li>- 향유속 식물의 잎을 이용한 차, 음료 개발을 위한 최적 추출조건 분석</li> <li>- 향유속 식물의 꽃과 잎을 이용한 차, 음료 개발을 위한 최적 추출조건 분석</li> <li>- 전문가에 의한 관능검사</li> <li>- Target group에 의한 관능검사</li> <li>- 유통기한 설정을 위한 저장실험</li> </ul>	향유속 식물 및 추출물 제품의 식품학적 연구 및 산업화
○ 활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호작용 및 신경전달 억제 효과 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 우수한 생리활성을 나타낸 소재에 대한 <i>in vitro</i> 활성 검색</li> <li>- 활성산소종에 의한 세포손상 모델 구축 및 기능성 소재의 억제 효과</li> <li>- 신경세포에서 흥분 유발시 유도되는 신경전달물질의 유리 억제 효과 탐색</li> </ul>	활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호작용 및 신경전달 억제 효과

다. 3차년도 (2006)

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발결과
<p>○ 가공조건에 따른 영경귀속 및 향유속 식물의 flavonoids 물질 분석 조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 가공 조건에 따른 영경귀속 식물의 flavonoids 물질 변화 분석</li> <li>- 가공 조건에 따른 향유속 식물의 flavonoids 물질 변화 분석</li> </ul>	<p>최적 가공조건 확립</p>
<p>○ 영경귀 및 꽃향유를 이용한 Nutraceuticals (타블렛, 캡슐)의 제품화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 영경귀 nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 배합비율(recipe) 분석 및 제조</li> <li>- 꽃향유 nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 배합비율(recipe) 분석 및 제조</li> <li>- 전문가에 의한 관능검사</li> <li>- Target group에 의한 관능검사</li> </ul>	<p>영경귀 및 향유속 식물 제품의 식품학적 연구 및 산업화</p>
<p>○ 월경전 증후군에 대한 임상효과 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2차년도에 우수한 활성을 나타낸 소재를 월경전 증후군 증상이 심한 여성에게 투여하여 개선 효과 확인</li> <li>- 월경전 증후군 개선 효과가 확인된 소재의 제품 가능성 탐색</li> </ul>	<p>월경전 증후군 개선 효과 확인</p>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

현재 전 세계적으로 천연식물자원에 존재하는 식물화학성분의 기능적 측면이 중요하게 부각되면서, 이러한 미량 생리활성 성분으로 특정 질병의 진행을 억제하거나 예방하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 외국의 경우, 식품에 함유된 식물화학성분의 생리활성에 관한 연구가 1960년대부터 꾸준히 계속되어 왔으나, 우리나라는 1990년대에 들어서야 비로소 본격적인 연구가 시작되었으며, 과학적이고 체계적인 기초연구가 없이 진행되어 온 것은 주지의 사실이다. 최근에는 자생식물자원에 대한 활성물질 검색이 활발히 이루어지고 있으나 대부분 단일 화학성분이 아닌 추출물 범위에서 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 그러므로 자생식물자원에 함유된 생리활성물질을 단일성분으로 분리한 후 이에 대한 지속적인 연구도 아울러 이루어져야 한다. 국내의 경우, 2000년에 들어 각 연구자들의 자원식물류의 생리활성에 대한 관심이 확대되면서 관련학회들의 세미나와 심포지엄이 많이 이루어지고는 있으나 대부분 효능검색에 대한 내용으로 편중되어 있으며, 현재 대부분의 식품관련 연구자들 또한 주로 의, 약 및 한방 관계자들의 유효성분의 효능에 대한 연구를 바탕으로 일반성분, 비타민, 무기질 및 특정 성분의 분석 및 제품개발에 대한 연구에만 국한되어 있는 실정이다. 자생식물에 우수한 생리활성 성분이 존재하더라도, 제품화되는 과정에서의 성분의 손실은 기능성식품으로서의 가치를 상실하게 만들 것이다. 또한 기능성 식품 및 식품의약품제조 공정에 따른 유효성분 최적화 조건은 매우 필요한 연구 분야임에도 불구하고 아직까지 국내에서는 이 분야의 기본이 되는 제조공정에 따른 유효성분 분석기술 확립에 대해서는 연구가 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 현재까지 엉겅퀴의 flavone에 대한 연구는 TLC, GC나 UV, HNMR 또는 CNMR을 사용한 연구가 대부분이며, 아직까지 HPLC와 LC/MS를 사용한 연구 진행은 거의 없는 실정이다. 엉겅퀴의 약리작용은 국내 및 국외에서도 오랫동안 민방에서 널리 알려져 왔다. 그러나 국내에서는 고려엉겅퀴의 일반성분 분석 및 엉겅퀴 뿌리의 일반성분 분석 및 무기질 함량조사가 보고되어 있을 뿐이다. 국외에서는 엉겅퀴의 약리성분 (pertolirarin, acacetin, rhamnoglycoside, ciryneol A,A,C,D,E, heptadecene 성분 등 함유)에 대한 보고와 다양한 flavonoids에 대한 연구가 보고되고 있으나 주로 엉겅퀴 뿌리에 국한하여 연구를 진행하고 있는 중이다. 일본에서는 건조 엉겅퀴

뿌리를 사용하여 신경통 및 류마티즘에 유효한 crude drug인 "Wazokudan"이 개발 되어있다. 따라서, 본 연구에서는 엉겅퀴속 및 향유속 식물을 대상으로 기능성 식품 소재로 개발 가능한 주요 성분인 flavonoids 성분 구명 및 제품화 과정에서의 유효성분의 최적화 조건을 확립하여, 여성질환에 유효한 건강 기능성 식품 소재를 개발하여 국민건강 증진 및 농가 소득증가를 목적으로 연구를 수행하고자 한다.

## 제 2 절 앞으로의 전망

본 연구의 결과로 엉겅퀴속 및 향유속 식물이 여성 건강 기능성 식품 소재로 활용될 것이다. 엉겅퀴속 및 향유속 식물을 소재로 한 기능성 식품의 섭취로 만성 퇴행성질환의 발병률을 감소시키고, 고령화 사회를 건강하게 이끌어 갈 수 있다. 또한, 이 분야의 연구를 통해 국내 자생식물의 생리활성 연구를 체계적으로 정립하여, 국내 자생 식물에 대한 지속적인 연구를 수행 할 수 있는 기본이 될 것으로 사료된다. 현재 우리나라에 자생하는 엉겅퀴속 식물과 향유속 식물의 flavonoids에 대한 연구는 본 연구팀이 이미 선행연구를 수행하였으며 전반적인 연구흐름에 대한 파악이 되어 있는 상태이므로 기술도입의 필요성은 없다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구수행방법

#### 1. 영경귀속 식물의 flavonoids 분석조건 확립

광릉, 수원, 충주, 춘천 지역의 영경귀를 채취, 수집하여 실험시료로 사용하였다. Total flavonoid 함량은 영경귀 시료의 재배지역별, 건조방법별, 시료부위별로 나누어 분석하였으며, flavonoids 분석은 용매 종류 및 조건에 따른 추출조건을 확립한 후 영경귀내의 flavonoids 성분을 UV로 검출하고 reverse phase HPLC를 이용하여 성분을 분석하였다. 재현성 있는 flavonoids 분석방법 확립을 위하여 다양한 조건으로 최적의 재현성 있는 결과를 얻을 수 있는 HPLC 분석 조건을 확립하였다.

#### 가. 기능성 식품신소재의 제품화를 위한 추출물의 안전성 조사

유효성분이 다량 함유된 추출물을 건강 기능 식품으로 제품화하기 위하여 일반독성(단여투여) 및 유전독성(복귀돌연변이, 염색체이상)의 안전성 분석을 수행하였다.

##### 1) 단여투여 독성 시험

체중 20~25 g의 수컷 마우스 20마리를 1군으로 하여 4시간 절식 후 영경귀 추출물 5 g/kg을 경구투여한 후 행동의 이상 유무를 관찰하고 72시간까지의 사망수를 측정하여 일반증상, 체중, 부검소견 등 체내의 급성적인 변화를 검사하였다.

- 시험기간 : 11~12주(예비시험 포함)
- 투여경로 : 경구
- 사용동물 : ICR mouse(SPF) / SD rat
- 사용동물수 : 40마리(5마리 × 4그룹 × 2성별): 예비시험 미포함
- 순화기간 : 6~7 일
- 투여기간 : 1일 단회 투여(2주간 관찰)
- 검사항목 : ① 일반증상(치사율) ② 체중변화 ③ 부검

## 2) 유전독성 시험

### (1) 복귀돌연변이 시험(Ames test)

유전독성시험 중 가장 빠르고 간편하면서도 발암성시험결과와 매우 밀접한 상관관계를 보이는 시험법으로서 특정 아미노산 합성이 저해된 미생물을 이용하여 시험물질에 의해서 아미노산 합성 균주로 전화되는 지를 확인하는 시험으로서 일반적으로 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537과 *Escherichia coli* WP2 uvrA 등의 5균주를 사용한다.

- 시험기간 : 1 개월
- 사용균주 : *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537  
*Escherichia coli* WP2 uvrA
- 시험균의 구성 : 본시험에서는 공비 2 혹은 3으로 5 단계 이상의 농도군과 음성 및 양성대조군으로 시험균을 구성하며 농도군당 3 매의 플레이트를 사용한다.
- 용량설정시험 : 1주
- 본 시험 : 1주(본 시험에서 모호한 양성 판정이 나왔을 경우 확인 시험을 위해서 1주소요)
- 검사항목 : 복귀돌연변이 집락 수 계수

### (2) *In Vitro* 염색체이상시험(*In vitro* Chromosome Aberration Assay)

시험물질의 cytogenetic effect를 보기 위한 시험법으로서 일반적으로 Chinese Hamster Lung(CHL) 포유동물세포를 이용하여 시험을 수행한다.

- 시험기간 : 최소 2 개월
- 사용 cell line : Chinese Hamster Lung(CHL) cell line
- 시험균의 구성 : 예비시험 결과에 따라 산출한 최고농도를 포함하여 공비 2 또는 3으로서 3 단계 이상의 농도군 및 음성/양성대조군으로 시험균을 구성한다.
- 저장된 세포주의 배양 : 1주
- 용량설정시험 : 2주
- 본 시험 : 3주 (용량설정시험에서 재시험 시 2주추가 소요. 본 시험에서 모호한 양성 판정이 나왔을 경우 확인 시험을 위해서 3주추가 소요)
- 검사항목 : 세포독성 및 염색체이상 계수

## 2. 엉겅퀴속의 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구

엉겅퀴를 2004년 7~8월 사이에 산지별(전남 장성, 경기 수원, 강원 춘천)로 채집하여 잎, 뿌리 등의 부위별로 분리하여 오염물을 제거하고 충분히 씻은 후, 동결 건조하여 냉장보관하면서 추출에 사용하였다. 추출의 조건은 다음과 같다. 엉겅퀴 추출 농도는 1%, 3%, 5%, 10%로 하였으며, 추출 온도는 60℃, 80℃, 98℃, 추출 시간은 1시간 및 2시간씩 각 산지별과 부위별로 모두 실시하였다. 추출 후 추출액의 무게, pH, UV 흡광도, 고형물 함량 등을 측정하여 기능성 식품에 첨가하기 위한 추출물의 추출조건을 분석하였다.

가. 동결건조 엉겅퀴 분말을 첨가한 블록스프의 제조

### 1) 제조 방법

엉겅퀴의 동결건조 분말을 첨가한 김치찌개 스프, 곰탕 스프, 계란탕 스프, 육개장 건조스프를 제조한 후 호화 건면과 함께 먹을 수 있는 “즉석 컵 제품”을 제조하였다. 전문가(식품영양학과 전문 관능검사자 10인)에 의한 예비관능검사를 수행하여 시료 첨가 농도를 결정하였다. 4종의 블록스프에 냉동 건조한 엉겅퀴 분말을 0.5%, 1% 및 2% 첨가(블록스프와 건면의 건조 총중량에 대한 함량임)하여 스프를 제조하였다. 건조스프와 건면에 뜨거운 물을 첨가, 복원시킨 후 색, 향기, 뒷맛 및 선호도를 분석하였다. 엉겅퀴 분말이 0.5 및 1% 첨가된 경우, 색의 진한 정도, 향기의 좋은 정도, 뒷맛의 강도 및 전반적인 선호도 값이 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 2%의 시료가 첨가되면 국물의 색이 바람직하지 않은 색으로 변색되고, 쓴 뒷맛이 오래 지속되어 전반적인 선호도가 감소하는 결과를 얻었다. 따라서 4종의 블록스프 제조 시 엉겅퀴분말을 블록스프와 건면의 건조 총중량에 대한 1%를 첨가하였다. 블록스프는 건면과 함께 복원시켜 관능검사를 실시하였으며 그 제조방법은 다음과 같다.

가) 블록스프

- A. 소재 전처리 - 블록에 들어가는 원료별로 자숙 및 냉침한다.
- B. 첨가물계량 - 블록에 들어가는 첨가물을 계량한다
- C. 혼합가열- 전처리한 소재 및 첨가물을 넣고 가열 교반한다.
- D. 몰딩 및 팬입 - 폴리에틸렌 몰드에 혼합물을 충전한 다음 팬입한다.
- E. 예비동결 - -30℃ 이하로 동결실 온도를 유지하고 동결실내에 장시간 방치에 따른 표면건조 배제(2일 이내 건조관 입관)

- F. 동결건조 - 풍온을 60℃ 이하로 관리하며, 건조된 원물의 외관검사 실시  
(수분 5%이하 및 변색 여부)
- G. 배출 및 검사 - 20~26시간 후에 건조기에서 원료를 꺼낸 다음, 미생물검사와 수분함유량이 5% 이하인지 검사한다.
- H. 탈팬 및 개별포장 - 검사에 통과한 제품에 한하여 탈팬 및 폴리에틸렌(또는 폴리프로필렌) 필름에 개별 포장한다.

나) 호화건면(소면)

- A. 소면전처리 - 1팬 분량씩 소면을 자숙한 다음 냉침을 한다.
- B. 몰딩 및 팬입 - 폴리에틸렌 몰드에 혼합물을 충전한 다음 팬입한다.
- C. 예비동결 및 동결건조 - 예비 동결을 실시한 다음 동결건조 한다.
- D. 배출 및 검사 - 20~30시간 후에 건조기에서 원료를 꺼낸 다음, 미생물검사와 수분함유량이 5% 이하인지 검사한다.
- E. 탈팬 및 가포장 - 검사에 통과한 제품에 한하여 탈팬 가포장을 실시한다.

다) 완제품 포장

- A. 개별소재 투입 - 용기에 동결건조 소면, 개별포장한 블록을 하나씩 투입한다.
- B. 뚜껑 결합 - 뚜껑을 덮은 다음 유통기한을 적은 라벨지를 뚜껑위에 올린다.

2) Target group에 의한 관능검사

20대 여대생(200명) 및 30대 이상 여성(30~50대) 50인을 대상으로 하여 엉경귀 동결건조 분말을 넣지 않은 제품과의 선호도를 조사하는 관능검사를 실시하였다.

나. 엉경귀 분말을 첨가한 스넥 및 빵의 제조

1) 엉경귀 분말을 첨가한 두부스넥 및 잡곡빵 제조

전문가(식품영양학과 전문 관능검사자 10인)에 의한 예비관능검사를 수행하여 시료 첨가 농도를 결정하였다. 두부스넥 및 잡곡빵 재료에 0.5%, 1% 및 2%의 냉동건조 엉경귀 분말을 첨가하여 제품을 제조한 후 관능검사를 하였을 때 1%첨가 제품에서 가장 바람직한 결과가 얻어졌다. 따라서 냉동건조 엉경귀분말 1%를 두부스넥과 잡곡빵에 첨가, 제조하여 target group 관능검사를 실시하였다. 두부스넥과 잡곡빵의 제조법은 아래와 같다.

가) 두부스넥

- A. 두부 500 g의 물기를 제거한 후 계란 5개를 풀어서 중탕한다.
- B. 설탕 400 g, 소금 24 g, 버터 100 g을 중탕하여 A와 섞는다.
- C. 밀가루 1,300 g과 검정깨, 생강즙, 그리고 장성산 영경귀 잎 분말 (총 중량의 1%)을 넣어 잘 치댄 후 모양을 만들어 튀겨낸다.

나) 잡곡빵

- A. 박력분 1 kg에 호밀 등 혼합 잡곡과 영경귀 잎 분말(총 중량의 1%), 설탕 60 g, 버터 40 g, S<sub>500</sub>(빵 개량제 일종), 분유 20 g, 이스트 40 g, 계란 4개, 물과 우유를 1:1 비율로 첨가하여 반죽을 한다.
- B. 2시간 정도 발효를 시킨 후 다시 반죽을 하고 모양을 만들어 오븐에 굽는다.

2) Target group에 의한 관능검사

20대 여대생(200명) 및 30대 이상 여성(30~50대) 50인을 대상으로 하여 영경귀를 넣지 않은 제품과 함께 관능검사를 실시하였다.

다. 영경귀 티백차의 제조

1) 영경귀 차 제조

영경귀 뿌리차와 영경귀 잎차를 각각 1과 2의 농도로 제조하였으며, 또한 영경귀 뿌리와 잎을 각각 1:1, 1:2, 2:1의 비율로 차를 제조하고 이들 역시 각각 농도를 2배로 높여서 제조하였다. 영경귀 차의 제조 방법은 다음과 같다.

- A. 영경귀의 뿌리와 잎을 동결 건조 후 roast pan을 이용하여 120℃, 20분간 튀는 과정을 거친다.
- B. 깨끗한 종이 위에 10분 정도 방치하여 열을 식인 후 powder로 만들어 놓는다.
- C. 튀어 놓은 영경귀의 뿌리와 잎을 비율대로 계산하여 tea bag에 1.2 g씩 넣어 면실로 잘 묶은 후 100 ml의 물에 우려낸 것을 1의 농도로 하여 관능검사의 시료로 제시하였다. 2배의 농도는 2.4 g의 영경귀를 100 ml에 우려내는 것으로 하였다.

2) Target group에 의한 관능검사

20대에서 40대로 구성된 관능검사 전문가 18명을 대상으로 하여 차의 선호도, 색, 맛, 향미, 뒷맛, 떫은 맛 등 관능검사를 실시하였다.

라. 영경귀 잎 추출물을 이용한 음료 개발

### 1) 엉겅퀴 잎 추출물 병음료 개발

예비관능검사를 통하여 엉겅퀴 잎 추출물 농도가 약 80~90% 일 때 선호도가 높게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 엉겅퀴 잎 추출물 농도를 78%, 83% 및 88%의 3가지로 음료를 제조한 후, 관능검사를 실시한 결과 시료 88% 첨가 시 쓴 맛이 뒷맛으로 감지되면서 선호도가 감소하였다. 따라서 엉겅퀴 잎 추출물 농도 83.05%를 기준으로 음료를 제조하였다.

2) 병음료의 유통기한 설정을 위하여 온도에 따른 색도 및 관능특성을 시간별로 실험하였다.

3) 병음료의 20대 및 30대 이상의 그룹에서 관능검사를 실시하였다.

## 3. 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 검색(엉겅퀴)

### 가. 세포배양

본 연구에 사용한 사람 신경세포종(IMR-32 neuroblastoma) 및 사람 간암세포(HepG2 human hepatoma)는 American Type Culture Collection에서 구입하였고 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 Eagle's minimum essential medium(MEM)으로 세포수가  $5 \times 10^5$  cells/ml가 되도록 하여 배양하였다. 배양용기는 75 mm<sup>2</sup> flask를 사용하였으며 15 ml의 배지로 37°C, 포화습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 단층배양하였다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, confluence에 도달한 세포는 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization 한 후 계대 배양하여 유지하였다.

### 나. 세포내 활성산소종의 측정

세포내 활성산소종의 변화는 이에 민감한 형광탐침인 DCFH-DA를 이용하여 측정하였다. DCFH-DA는 세포막을 투과하여 세포 안으로 들어간 후, esterase에 의해 가수분해되어 형광을 띄지 않는 DCFH를 유리하며 이 물질은 생성된 활성산소종에 의해 산화되어 형광 발하는 DCF로 변화하였다. 따라서, DCF 형광세기는 생성된 활성산소종의 양과 비례하였다. 5 μM의 DCFH-DA를 세포현탁액에 가해 37°C에서 2시간 동안 진탕 배양하여 세포내로 loading 시킨 후 다시 세포현탁액을 cuvette에 옮겨 483 nm 파장에서 excitation 시켜, 530 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기로 측정하였다.

#### 다. 세포내 칼슘농도의 측정

세포내 칼슘농도는 형광탐침인 Fura-2/AM을 이용하여 측정하였다. 2  $\mu$ M의 Fura-2/AM을 세포 현탁액에 가해 37°C에서 30분 동안 진탕 배양하여 세포내로 loading 시킨 후, loading 되지 않은 Fura-2/AM을 원심분리하여 제거시켰다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액(125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 6 mM glucose, pH 7.4)에 현탁 시킨 후 cuvette에 옮겨 340 nm 및 380 nm 파장에서 excitation 시켜, 510 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다. 세포내 칼슘농도는 두 파장에서 나온 형광세기의 비를 Grynkiewicz 등의 방법을 이용하여 환산하였다.

#### 라. 세포내 칼륨농도의 측정

세포내 칼륨농도는 형광탐침인 PBFI/AM을 이용하여 측정하였다. 비이온성 계면활성제인 0.02% pluronic F-127을 포함한 Hank's solution의 세포현탁액에 5  $\mu$ M PBFI/AM을 가해 37°C에서 2 시간 동안 진탕 배양하여 세포내로 loading 시킨 후, loading 되지 않은 형광탐침을 원심분리하여 제거시켰다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액(125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 6 mM glucose, pH 7.4)에 현탁 시킨 후 cuvette에 옮겨 340 nm 및 380 nm 파장에서 excitation 시켜, 500 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다. 세포내 칼륨농도는 두 파장에서 나온 형광세기의 비로써 나타내었다.

#### 마. 세포내 염소농도의 측정

세포 내 염소이온 농도는 이에 민감한 MQAE 형광법을 사용하여 측정하였다. 50 mM의 MQAE를 간암세포 현탁액에 가해 실온에서 밤새 동안 진탕 배양하여 세포 안으로 봉입 시킨 후, 봉입 되지 않은 것은 0.1% bovine serum albumin 을 포함한 세포 배양액에 현탁시켜 원심 분리하여 제거하였다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액에 현탁시킨 후 cuvette에 옮겨 365 nm 파장에서 excitation 시켜, 450 nm 파장에서 나오는 형광을 형광 분석기로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다.

#### 바. 암세포 독성 측정

살아있는 세포는 미토콘드리아에 존재하는 탈수소 효소에 의해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)가 MTT-formazan으로 전환되므로 이것의 양을 재면 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있다. 암세포를 1 ml 배지에 약물 또는 약물을 녹인 용매만을 처리하여 24-well multiwell plate에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 MTT 용액(2.5 mg/ml H<sub>2</sub>O) 100 µl를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 생성된 MTT-formazan 결정체를 분리하기 위하여 처리된 세포 현탁액을 eppendorf tube에 옮겨 원심분리(1500 rpm, 4분) 하였다. 상등액을 조심스럽게 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 µl를 첨가하여 결정체를 용해시킨 후 540 nm 에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

### 4. 향유속 식물의 flavonoids 분석조건 확립

#### 가. 향유속 식물 중 flavonoids 물질을 가장 많이 함유한 식물 선정하여 Total flavonoid 함량 분석

분말시료 1 g에 50% methanol 용액을 60 ml 가하여 80°C에서 1시간 환류 추출 하였다. 추출액은 냉각 후 50% methanol로 100 ml 정용하여 Whatman No. 1로 여과하였다. 여과액 중 1 ml을 취하여 diethylene glycol 10 ml를 혼합하고 여기에 1N-NaOH용액 1 ml 가하여 잘 혼합한 것을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석은 각 시료 당 3반복 실시하였고 이때 표준곡선은 rutin(Sigma Co., USA)의 농도를 0~0.5 mg 범위가 되도록 제조한 표준용액을 이용하여 작성하였으며 검량선으로부터 시료의 플라보노이드 함량을 결정하였다.

#### 나. 식물의 부위별 flavonoids subclass 정성 및 정량 분석

(HPLC를 이용한 flavonoids 중 apigenin 함량 분석)

사용기기는 Waters사 515 펌프와 2487 UV detector를 이용하였으며. 컬럼은 Luna 5u Phenyl-Hexyl(4.6 mm × 150 mm)를, 파장은 UV 345 nm를 사용하였다. 이동상으로는 0.1% formic acid in water 와 0.1% formic acid in acetonitrile를 15분간 20% B -50% B의 농도기울기를 주며 1 ml/min유속으로 흘려주었고, 시료주입량은 10 µl 였다. Apigenin(Sigma Co., USA) 0.01 g을 DMSO로 100 ml

정용 하여 필요시 희석하여 표준물질로 사용하였고 검량선으로부터 시료의 apigenin 함량을 결정하였다.

다. 기능성 식품신소재의 제품화를 위한 향유 추출물의 안전성 조사

1) 단여투여 독성 시험 : 체중 20~25 g의 수컷 마우스 20마리를 1군으로 하여 4시간 절식 후 국화과 자생식물 추출물 5 g/kg을 경구투여한 후 행동의 이상 유무를 관찰하고 72시간까지의 사망수를 측정하여 일반증상, 체중, 부검소견 등 체내의 급성적인 변화를 검사하였다.

2) 유전독성 시험(복귀돌연변이) : 유전독성시험 중 가장 빠르고 간편하면서도 발암성시험결과와 매우 밀접한 상관관계를 보이는 시험법으로서 특정 아미노산 합성이 저해된 미생물을 이용하여 시험물질에 의해서 아미노산 합성 균주로 전화되는 지를 확인하는 시험으로서 일반적으로 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537과 *Escherichia coli* WP2 uvrA 등의 5균주를 사용하였다.

## 5. 향유속 식물 및 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구

가. 꽃향유, 향유의 추출물을 음료 등의 기능성 식품에 첨가하기 위한 유효성분의 최적 추출조건 분석

1) 시료 : 꽃, 잎의 부위별로 분리하여 세척 후, 동결건조

2) 추출의 조건 : 시료의 추출 농도는 5 및 10%, 추출 온도는 60℃, 80℃, 98℃, 추출시간은 1 및 2시간

3) 분석 : 추출액의 고형물함량, pH, UV 흡광도, 무게

나. 꽃향유 정유의 추출 및 성분확인

1) 정유추출 : Clavenger-type apparatus로 2시간 증류

2) 확인 : GC-MSD(Agilent 5973N, Palo Alto, CA, USA), retention indices (RI)

다. 꽃향유 첨가 두부스넥, 식빵 및 마늘빵 제조 한 후, target group을 대상으로 관능검사

1) 두부스넥, 식빵 및 마늘빵 제조시 꽃향유 첨가량 : 꽃향유 꽃의 첨가량은 0.5% (w/w)

2) 관능검사 : Target group인 20대 여성 192명을 대상으로 선호도 조사 및 구매 의향 조사를 실시

라. 동결건조 꽃향유의 차를 잎 및 꽃으로 각각 제조 후, 관능검사

1) 차 제조 : 동결건조 꽃향유 꽃차, 잎차 제조시 농도는 강한 향기로 인하여 일반차 농도의 1/2에 해당하는 sample 0.6 g/ 120 mL water

2) 관능검사 : Target group인 20대 여성 153명을 대상으로 선호도 조사 및 구매 의향 조사를 실시

3) 색도 및 경도 측정 : 색도-Hunter Colorimeter(Minolta)

4) 경도-Sun Rheometer Compac-100(Sun Scientific Co., Ltd, Japan) 이용

마. 꽃향유 꽃 및 잎 부위 추출물을 이용하여 병 음료 개발

1) 꽃향유 꽃 및 잎 분말 5%, 물 95%를 80°C에서 1시간 추출하여 병음료 개발

## 6. 활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호 작용 및 신경전달 억제 효과 검색

가. 세포배양

본 연구에 사용한 사람 신경세포종(IMR-32 neuroblastoma) 및 사람 간암세포(HepG2 human hepatoma)는 American Type Culture Collection에서 구입하였고 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 Eagle's minimum essential medium(MEM)으로 세포수가  $5 \times 10^5$  cells/ml가 되도록 하여 배양하였다. 배양용기는 75 mm<sup>2</sup> flask를 사용하였으며 15 ml의 배지로 37°C, 포화습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 단층배양하였다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, confluence에 도달한 세포는 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization 한 후 계대 배양하여 유지하였다.

나. 세포내 칼슘농도의 측정

세포내 칼슘농도는 형광탐침인 Fura-2/AM을 이용하여 측정하였다. 2 μM의 Fura-2/AM을 세포 현탁액에 가해 37°C에서 30분 동안 진탕 배양하여 세포내로 loading 시킨 후, loading 되지 않은 Fura-2/AM을 원심분리하여 제거시켰다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액(125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 6 mM glucose, pH 7.4)에

현탁 시킨 후 cuvette에 옮겨 340 nm 및 380 nm 파장에서 excitation 시켜, 510 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다. 세포내 칼슘농도는 두 파장에서 나온 형광세기의 비를 Grynkiewicz 등의 방법을 이용하여 환산하였다.

#### 다. 세포내 칼륨농도의 측정

세포내 칼륨농도는 형광탐침인 PBFI/AM을 이용하여 측정하였다. 비이온성 계면활성제인 0.02% pluronic F-127을 포함한 Hank's solution의 세포현탁액에 5  $\mu$ M PBFI/AM을 가해 37°C에서 2 시간 동안 진탕 배양하여 세포내로 loading 시킨 후, loading 되지 않은 형광탐침을 원심분리하여 제거시켰다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액(125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM HEPES, 6 mM glucose, pH 7.4)에 현탁시킨 후 cuvette에 옮겨 340 nm 및 380 nm 파장에서 excitation 시켜, 500 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다. 세포내 칼륨농도는 두 파장에서 나온 형광세기의 비로써 나타내었다.

#### 라. 세포내 염소농도의 측정

세포 내 염소이온 농도는 이에 민감한 MQAE 형광법을 사용하여 측정하였다. 50 mM의 MQAE를 간암세포 현탁액에 가해 실온에서 밤새 동안 진탕 배양하여 세포 안으로 봉입 시킨 후, 봉입 되지 않은 것은 0.1% bovine serum albumin 을 포함한 세포 배양액에 현탁시켜 원심 분리하여 제거하였다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액에 현탁시킨 후 cuvette에 옮겨 365 nm 파장에서 excitation 시켜, 450 nm 파장에서 나오는 형광을 형광 분석기로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다.

#### 마. 막전압의 측정

막전압은 di-O-C<sub>5</sub>(3) 형광탐침을 사용하여 측정하였다. Di-O-C<sub>5</sub>(3)는 세포막에 분포하여 형광을 내는데 그 세기는 막전압이 탈분극 될 때 감소하는 성질을 나타낸다. 이 실험은 Seligmann 등의 방법에 기초하여 시행하였는데 간단히 설명하면, 세포를 37°C에서 30분간 Hanks 용액에서 담구어 둔 후 mL당  $4 \times 10^5$  세포가 되게 Hanks 용액에 재현탁 시키고 형광탐침(0.25 M)을 넣은 후 cuvette에

옮겨 37°C에서 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하면서 460 nm 파장에서 excitation 시켜, 510 nm 파장에서 나오는 형광을 형광 분석기로 측정하였다.

## 7. 가공조건에 따른 영경귀속 및 향유속 식물의 flavonoids 물질 분석 조건 확립

### 가. 가공조건에 따른 시료제조

본 실험에 사용한 영경귀와 꽃향유는 강원도 화천에서 2006년 10월에 수확된 것으로 영경귀는 잎과 뿌리, 꽃향유는 꽃, 잎, 줄기 부위별로 나누어 오븐건조와 음건, 동결건조 3가지로 건조하였다. 오븐건조(Model WFO-601SD, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)는 50°C에서 1주일간 건조하였으며, 음건은 통풍이 잘되는 그늘에서 2주간 건조하였다. 동결건조시료는 -70°C에서 급속동결하여 동결건조기(FD5505 Ilshin Lab Co., Ltd., Korea)에서 건조하여 mixer(Hanil Electrical Co., FM-681)를 이용해 세절, 마쇄한 다음 냉동보관하면서 실험에 사용하였으며 각 시험 항목에 대한 시료의 분석은 3회 반복하였다. 부위별 분말시료 각 0.5 g에 20% 에탄올, 40% 에탄올, 60% 에탄올, 80% 에탄올 및 물 50 ml를 가하여 실온에서 magnetic stirrer(Thermolyne, SP135930-33)를 이용하여 1h, 2h, 4h, 8h, 16h 추출한 다음 여과한 것을 시료로 사용하였다.

### 나. 총 플라보노이드 함량 분석

분말시료 1 g에 50% methanol 용액을 60 ml 가하여 80°C에서 1시간 환류 추출하였다. 추출액은 냉각 후 50% methanol로 100 ml 정용하여 Whatman No. 1로 여과하였다. 여과액 중 1 ml을 취하여 diethylene glycol 10 ml를 혼합하고 여기에 1N-NaOH용액 1 ml 가하여 잘 혼합한 것을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석은 각 시료 당 3반복 실시하였고 이때 표준곡선은 rutin(Sigma Co., USA)의 농도를 0~0.5 mg 범위가 되도록 제조한 표준용액을 이용하여 작성하였으며 검량선 으로부터 시료의 플라보노이드 함량을 결정하였다.

### 다. HPLC를 이용한 flavonoids 중 apigenin 함량 분석

사용기기는 Waters사 515 펌프와 2487 UV detector를 이용하였으며. 컬럼은 Luna 5u Phenyl-Hexyl(4.6 mm × 150 mm)를, 파장은 UV 345 nm를 사용하였

다. 이동상으로는 0.1% formic acid in water와 0.1% formic acid in acetonitrile를 15분간 20% B -50% B의 농도기울기를 주며 1 ml/min 유속으로 흘려주었고, 시료주입량은 10 ul 였다. Apigenin(Sigma Co., USA) 0.01 g을 DMSO로 100 ml 정용 하여 필요시 희석하여 표준물질로 사용하였고 검량선으로부터 시료의 apigenin 함량을 결정하였다.

## 8. 영경귀속 및 향유속 식물을 이용한 Nutraceuticals(타블렛, 캡슐 등)의 제품화 및 산업화 연구

### 가. 영경귀 nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 배합비율(recipe) 분석 및 제조

영경귀 nutraceuticals을 타블렛 또는 캡슐로 제조하기 위하여 전문가를 대상으로 예비 제조한 시료의 관능검사를 한 후, 그 결과를 바탕으로 영경귀캡슐을 제조하였다. 캡슐 제조를 위하여 멀티탱크에 정제수를 먼저 투입한 후, 젤라틴, 자당지방산에스테르, 빙초산을 투입한 후, 교반하여 원료를 용해시킨다. 교반 후 최소 2시간 이상 최대 24시간 동안 숙성시킨다. 55±10℃로 유지되는 리시빙 탱크로 젤라틴 용액을 이송시킨다. 서비스탱크로 젤라틴용액을 소분한 후, 이산화티타늄, 식용색소적색 제40호, 식용색소황색 제5호, 식용색소청색 제1호를 넣고 색상을 조절하고 용액의 점도를 조절한다. 캡슐제조 기계에서 침액, 건조 등을 거쳐 캡슐을 제조하여 선별한 후, 자가 품질검사를 실시하여 합격된 제품을 밀봉 포장한다. 영경귀캡슐은 동결건조하여 분말화한 영경귀 120 mg, 유당 73.6 mg, 젤라틴 3.52 mg, CMC-Na 0.88 mg 및 스테아린산마그네슘 2 mg을 첨가하여 제조하였다. 영경귀캡슐 1개당 중량은 200 mg이었다. 영경귀캡슐에 대한 플라시보캡슐은 영경귀분말 대신 옥수수전분을 동량 첨가하고 나머지 원료 및 배합비율은 동일하게 첨가하여 플라시보캡슐을 제조하였다.

### 나. 꽃향유 nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 배합비율(recipe) 분석 및 제조

꽃향유 nutraceuticals을 타블렛 또는 캡슐로 제조하기 위하여 전문가를 대상으로 예비 제조한 시료의 관능검사를 한 후, 그 결과를 바탕으로 꽃향유캡슐을 제조하였다. 캡슐은 위에서 제시한 방법대로 경질 적갈색 불투명 캡슐로 제조하였다. 꽃향유캡슐은 동결건조하여 분말화한 꽃향유 120 mg, 유당 73 mg, 젤라틴 4 mg, CMC-Na 1 mg 및 스테아린산마그네슘 2 mg을 첨가하여 제조하였다. 꽃향유캡슐 1개당 중량은 200 mg이었다. 꽃향유캡슐에 대한 플라시보캡슐은 꽃향유분말 대신 옥수수전분을 동량 첨가하고 나머지 원료 및 배합비율은 동일하게 첨가하여

꽃향유 플라시보캡슐을 제조하였다.

#### 다. 전문가에 의한 관능검사

엉경퀴 및 꽃향유의 타블렛과 캡슐을 예비 제조하여 관능검사하였다. 엉경퀴 및 꽃향유 nutraceutical을 타블렛 또는 캡슐로 제조하기 위하여, 타블렛과 캡슐(경질 적갈색 캡슐)을 preliminary 제조하여 전문가를 대상으로 관능검사를 하였다. 관능검사에 참여한 전문가는 식품영양학 전공 대학원생 및 연구원으로 평균 연령은 30세(24~36세)이었으며 여성으로 구성된 12명이었다. 관능검사 항목은 외관, 색 및 전체적인 선호도의 3가지이었다.

#### 라. Target group에 의한 관능검사

엉경퀴캡슐과 꽃향유캡슐을 제조한 후, 생리전 증후군 실험 대상자의 연령인 20대 여대생 57명을 대상으로 target group 관능검사를 실시하였다. 관능검사 대상자 가운데 식품 및 약품에 대한 알레르기 반응이 있는 사람은 제외하였으며, 관능검사에 대한 충분한 설명 후, 본인이 참여하겠다고 허락한 대상자에 한하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사 대상자들에게 무작위로 추출한 3자리 숫자가 적힌 5가지 시료를 흰색 쟁반(35 cm × 20 cm) 위에 무작위로 나열하여 제시하였으며, 왼쪽 시료부터 차례로 외관 및 색을 평가하고 물과 함께 삼킨 후(삼킴성), 전체적인 선호도를 평가하도록 하였다. 정수된 물은 흰색 종이컵(150 mL)에 담아서 제공하였다. 대조군은 엉경퀴 및 꽃향유 캡슐의 색과 크기가 유사한 적갈색 경질 캡슐인 “엘시스틴500(안국약품(주))”를 사용하였고, 엉경퀴플라시보캡슐, 엉경퀴캡슐, 꽃향유플라시보캡슐 및 꽃향유캡슐의 5종에 대하여 외관, 색, 삼킴성 및 전체적인 선호도를 평가하였다.

### 9. 월경전 증후군에 대한 임상효과 확인

#### 가. 연구 방법

본 연구의 대상자를 모집하기 위해 2006년 11월 말에서 12월 초까지 서울 소재 D대학의 여학생들에게 “월경 전 증후군 관리 프로그램”이라는 제목으로 모집 공고를 하였다. 모집 공고를 보고 프로그램에 신청한 학생들을 대상으로 Screening 용 심리검사 도구를 사용하여 접수 면접(약 20분 정도 소요)을 실시하였고, 이 중

지난 3주기 이상 월경을 거르거나, 피임도구를 사용하거나, 피임약을 복용한 경우, 그리고 SCL-90-R(간이 정신 진단 검사)에서 심각한 정신병을 가지고 있어서 집단 상담에 맞지 않다고 평가된 여성들을 제외하고 총 30명의 참가자를 선별하였다. 선별한 학생들을 대상으로 약 지급전에 실험과 관련된 간단한 Orientation 을 실시하였다. 30명의 참가자를 나이, 월경전기 증상 점수, 우울 및 상태 불안 등의 점수를 기준으로 매칭 시켜 꽃향유 집단(1 Group), 영경귀 집단(2 Group), Placebo 집단(3 Group)에 각각 10명씩 할당하였다. 연구에 참가하게 된 모든 대상자들에게 약이 지급된 후부터 마지막 약 복용 날 까지 피임약이나 진통제의 복용을 중단할 것을 부탁하였다. 또한 약 복용 시간은 매일 아침 10시로 규칙적인 시간에 먹기로 약속하였고, 매일의 증상을 평가하기 위하여 증상 기록 일기를 쓰도록 권유하였다. 약은 안전한 위생백에 2주 분량의 약을 담아 지급하였고, 2주마다 방문하여 증상 기록 일기를 확인하고 증상의 변화에 대한 이야기를 나누도록 하였다. 또한 대상자들의 프로그램 참가에 대한 동기화를 위해 2주마다 소정의 참가비를 지급하였다. 전체 약 복용 날짜는 2007년 1월 18일부터 3월 19일까지 약 3달이었으며 뒤늦게 연구에 참가한 대상자는 4월까지 복용하도록 하였다. 약 복용이 모두 끝난 후, 일지를 제출하고 사전에 실시했던 설문지를 재 실시하여 결과를 보도록 하였다. 본 연구는 30명의 대상자 모두 약 지급이 끝난 마지막 주 까지 탈락자 없이 무사히 진행되었으며 중간에 유학을 가게 된 대상자가 한 명 있었는데, 한 번에 약을 지급하였고 설문지는 메일로 수령하도록 하였다. 따라서 연구 대상자의 성별은 모두 여성(100%)로, 이들의 평균 연령은 22.9세였으며, 월경 전기 평가서(PAF)의 평균 점수는 257.57점 이었다. 각 집단의 인원수는 1, 2, 3 집단 각각 10명이었다(Table 2).

Table 2. 전체 참가자의 인구 통계학적 특성

변 인	구분	꽃향유집단	영경귀집단	Placebo집단	전체
성별N(%)	여자	10명(100%)	10명(100%)	10명(100%)	30명(100%)
나이(세)M(SD)		23.00(.94)	23.10(1.79)	22.60(1.65)	22.90(1.47)
초경연령(세)M(SD)		13.70(1.83)	13.10(1.66)	13.40(.70)	13.40(1.45)
월경주기(일)M(SD)		29.90(2.23)	30.50(2.88)	32.20(4.21)	30.87(3.26)
월경기간(일)M(SD)		5.80(1.03)	6.00(1.05)	6.90(1.37)	6.23(1.22)

## 나. 평가 도구

### 1) 우울 척도(Beck Depression Inventory; BDI)

Beck과 그의 동료들(1961)에 의해 고안된 성인용 우울 검사(BDI)를 사용하여 대상자들의 우울을 측정하였다. 이 검사는 우울증 유형과 정도를 측정하는 총 21 문항으로 구성되어 있고 각 문항들은 일상생활에서 경험할 수 있는 우울과 관련된 정서적, 인지적, 동기적 변화를 포함하고 있다. 본 검사는 4점 Likert식 척도로 점수가 높을수록 우울이 높은 것으로 해석된다. Beck등(1961)의 연구에서 신뢰도 및 양분 상관 계수는 .65에서 .67까지 있으며 본 연구에서의 신뢰도 계수(Cronbach's  $\alpha$ )는 .70이었다.

### 2) 불안 척도(State-Trait Anxiety Inventory; STAI)

Spielberger와 동료들(1970)에 의해 개발된 상태-특성 불안(STAI) 검사를 한덕웅, 이장호, 탁진국(1993)이 한국어 판 척도로 표준화한 것을 사용하였다. 총 40문항 중 현재 상태의 불안 수준을 측정하는 20문항만을 사용하여 측정하였다. 이 검사는 정신 장애가 없는 정상적인 성인의 불안 상태를 측정하는 도구이나 임상적으로 불안한 집단 및 정신과 환자의 불안을 판별해주는 유용한 검사도구이기도 하다. 4점 Likert 식 척도로 구성되어 있으며, '전혀 그렇지 않다'는 1점, '조금 그렇다'는 2점, '보통 그렇다'는 3점, '아주 그렇다'는 4점으로 채점하여, 얻을 수 있는 점수의 범위는 20~80점이며, 점수가 높을수록 불안 수준이 높은 것으로 해석된다. 본 연구에서의 신뢰도 계수(Cronbach's  $\alpha$ )는 .61이었다.

### 3) PAF(premenstrual Assessment Form)와 PAF-PCV(premenstrual Assessment Form-Past Cycle Version)

Halbreich와 Edicott(1982)가 월경 전기 동안의 기분이나, 행동, 신체 조건에서의 변화를 측정하기 위해 개발한 PAF와 PAF-PCV의 Unipolar Summary Scales은 총 95문항으로 구성되어 있다. PAF는 지난 3 차례의 월경 주기 동안에 경험한 PMS 증상에 대해서 회고적으로 평가하는 도구이며, PAF-PCV는 처치 후 한 차례 월경 주기 동안 경험한 PMS의 증상에 대해서 회고적으로 평가하는 도구이다. 본 척도는 '해당하지 않음(1점)'에서부터 '극심한 변화가 있음(6점)'까지 총 6점 척도로 되어있으며 자기 보고형 질문지로 최소 95점에서 최대 570점까지 받을 수 있으며, 점수가 높을수록 증상 정도가 심한 것으로 평가된다. 월경 전기 평가서는 평상시로부터 월경 주기 중 황체기인 '월경 전 14~17일부터 월경 시작 날까지'에 생기는 변화를 강조하고 있으며, 연구 목적에 따라 월경 전 증후군에 대한 형태

학적 하위 유형을 파악할 수 있도록 되어 있다. 본 연구에서는 강현정(1998)이 번안하고 고선규(2004)가 사용한 월경 전기 평가서를 사용하였는데, 연구에서 사용된 PAF는 총 18개의 하위 증상군으로 구성되어 있으며(Table 2), 고선규의 연구에서 사용된 월경 전기 평가서의 내적 일치도(Cronbach's  $\alpha$ )는 .98이었으며 본 연구에서 사용된 월경 전기 평가서의 신뢰도 계수는 .94였다. PAF의 하위 유형은 아래와 같이 구성되어 있다(Table 3).

Table 3. 월경 전기 평가서(PAF)의 18개 하위 유형

하위유형	하위유형
1. 기분 저조 / 즐거움 상실 (Low mood / Loss of pleasures)	10. 충동성 (Impulsivity)
2. 내인성 우울특질 (Endogenous depressive features)	11. 기질적인 정신증적 특질 (Organic mental discomfort)
3. 불안정 (Liability)	12. 일반적인 신체적 불쾌 (General physical discomfort)
4. 비전형적인 우울증적 특질 (Atypical depressive features)	13. 수분정체의 신호 (Sign of water retention)
5. 신경질적인 특질 (Hysteroid features)	14. 자율신경과 관련된 신체적 변화 (Autonomic physical changes)
6. 적대감 및 분노 (Hostility / Anger)	15. 피로 (Fatigue)
7. 사회적 위축 (Social Withdrawal)	16. 사회적 기능 손상 (Impaired social functioning)
8. 불안 (Anxiety)	17. 기타 기분 및 행동의 변화 (Miscellaneous mood / Behavior)
9. 행복감 증가 (Increased Well-Being)	18. 기타 신체적 변화 (Miscellaneous Physical changes)

## 10. 동물실험

### 가. 시험 물질 한약재

영경귀(*Cirsium japonicum*) 및 꽃향유(*Elsholtzia splendens*)의 80% 메탄올 추출액을 동결건조하여 사용했다.

### 나. 실험동물 및 물질의 투여

실험동물은 4주령 웅성 ICR 마우스를 한림 실험동물 주식회사(화성, 한국)에서 구입하였다. 1주일간의 안정화 기간과 실험 기간 중에는 항온( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), 항습( $55\pm 5\%$ )이 유지되고, 적절한 조명(200~300 LUX)과 하루 12시간 단위로 명암 주기가 조절되고, 40 dB 이상의 소음이 없는 환경에서 사육하였고, 사육기간 동안 음식과 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 실험 당일에는 영경귀 추출액과 꽃향유 추출액을 경구 투여하고 30분 후에 각 실험을 시행하였다.

### 다. 항 우울 효능 검색 법

#### 1) Locomotor activity test

가) 의의 : 뇌기능의 항진과 저하, 진정, 흥분, 불안, 우울, 회피 정도를 검색하는데 활용한다.

나) 실험동물 : 성숙한 웅성 ICR 생쥐( $20\pm 2$  g)

다) 실험과정 : 위의 실험동물을 1주일간 안정화 시키고, 실험 전날 Etho-Vision system에서 5분 동안 적응 시킨다. 실험 당일 시험 물질 투여 25분 후 실험 박스에 흰쥐를 놓고서 5분간 적응 시킨 후, 박스 중앙으로 실험동물을 이동시키고 10분간 행동 양상을 관찰 및 분석한다.

라) 효능 평가를 위한 분석 항목 : 총 이동 거리, 총 이동 시간, 총 이동 각, 총 rearing 횟수 중앙 영역에서의 총 이동 거리, 총 이동 시간, 총 이동 각, 총 rearing 횟수

#### 2) Rotarod test

가) 의의 : 균형 유지능, 운동 유지능, 근 이완 작용 및 진정 효능 등의 검색에 활용한다.

나) 실험동물 : 성숙한 웅성 ICR 생쥐( $20\pm 2$  g)

다) 실험과정 : 위의 실험동물을 1주일간 안정화 시키고, 실험 전날 일정한 RPM (생쥐-36RPM)으로 설정된 실험 장치에서 약 1~5분간 적응 훈련시킨다. 실험 당

일 시험 물질 투여 30분 후, 기구에 동물을 올려놓은 후 떨어지기까지 걸리는 시간과 20분간 떨어진 횟수를 측정한다.

라) 효능 평가를 위한 분석 항목 : 실험 기구에 올려놓은 후 처음 떨어질 때까지 걸리는 시간과 20분간 떨어진 횟수

### 3) Horizontal wire test

가) 의의 : 균형 유지능, 운동 유지능, 근 이완 작용 및 진정 효능 등의 검색에 활용한다.

나) 실험동물 : 성숙한 웅성 ICR 생쥐( $20 \pm 2$  g)

다) 실험과정 : 위의 실험동물을 1주일간 안정화 시키고, 실험 전날 실험 장치에서 1~5분간 적응시킨다. 실험 당일 시험 물질 투여 30분 후, 기구에 실험동물을 올려놓은 후 떨어지기까지 걸리는 시간과 20분간 떨어진 횟수를 측정한다.

라) 효능 평가를 위한 분석 항목 : Wire에 올려놓은 후 처음 떨어질 때까지 걸리는 시간과 20분간 떨어진 횟수

### 4) Forced swimming test

가) 의의 : 항 우울 효능의 검색에 활용한다.

나) 실험동물 : 성숙한 웅성 ICR 생쥐( $20 \pm 2$  g)

다) 실험기구 및 조건 : 생쥐용 수욕 장치(내경: 15 cm; 높이: 20 cm; 물의 높이: 10 cm)

라) 실험과정 : 위의 실험동물을 1주일간 안정화 시키고, 실험 전날 생쥐의 경우 5분간 적응시킨다. 다음 날 오후 1시~오후 5시에 본 실험을 실행한다. 시험 물질 투여 30분 후, 생쥐의 경우 수욕 장치에서 총 6분간 포기 반응을 시행시킨다. 처음 2분간은 적응 시간으로 방치해두며, 이후 4분 동안 immobile time, mobile time, strong mobile time을 측정한다.

마) 효능 평가를 위한 분석 항목 : Immobile time, Mobile time과 Strong mobile time

## 제 2 절 연구내용 및 결과

### 1. 영경귀속 식물의 flavonoids 분석조건 확립

가. Total flavonoid 함량 분석 : Total flavonoid 함량을 영경귀 시료의 재배지역별, 건조방법별, 시료부위별로 38종의 시료를 현재 분석한 결과 건조방법별 total flavonoid 함량의 큰 차이는 보이지 않았다. 꽃과 잎, 뿌리, 줄기의 부위별 total flavonoid 함량을 비교 분석한 결과 다른 부위보다 잎과 꽃에서 total flavonoid 함량이 비교적 높은 수치로 확인되었다.

나. HPLC를 이용한 영경귀 flavonoids 함량 분석 : 예비실험결과 영경귀의 Flavonoids 중 apigenin 성분이 많이 함유되었음을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 apigenin 성분을 대조군으로 하여 영경귀 추출물을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 Table 4와 같다.

다. 재배지역별 flavonoid 함량 분석 : Table 4의 분석조건으로 영경귀 식물의 재배지역별 apigenin 함량을 비교분석하였다. 그 결과 충주지역에서 수집된 시료에서 다른 지역보다 높은 양의 apigenin이 검출되었다(Table 5).

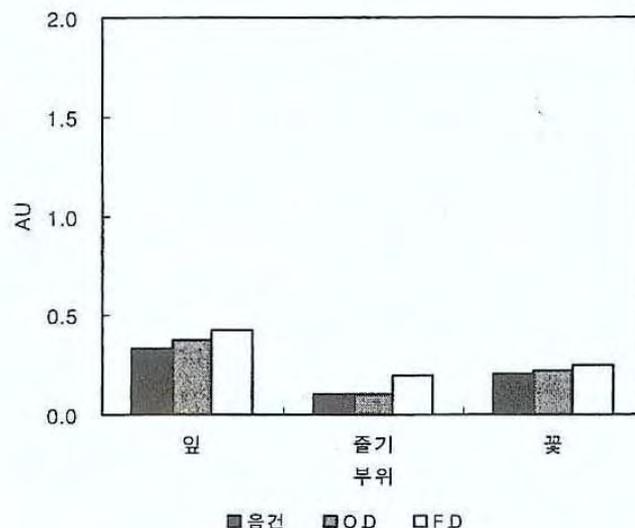


Figure 3. Total flavonoid analysis of *Cirsium japonicum* collected from Kwangreung. OD: oven drying, FD: freeze drying.

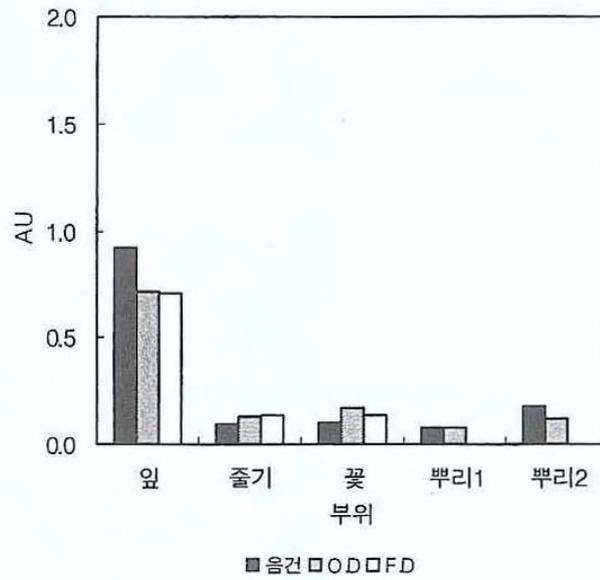


Figure 4. Total flavonoid analysis of *Cirsium japonicum* collected from Chungju. OD: oven drying, FD: freeze drying.

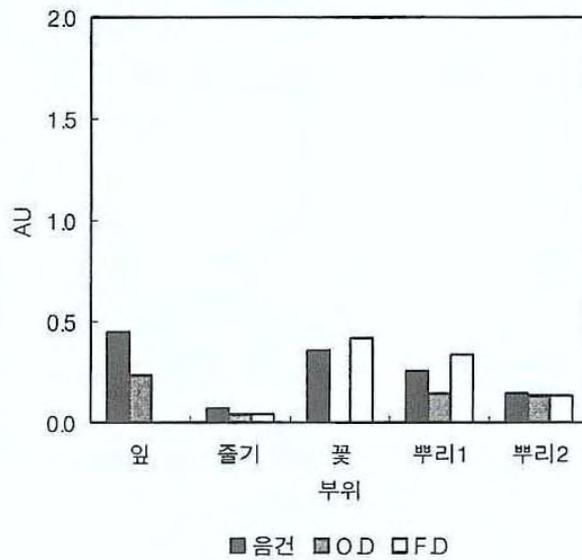


Figure 5. Total flavonoid analysis of *Cirsium japonicum* collected from Chuncheon. F: flower, L:leaf, R:root, S:stem, OD: oven drying, FD: freeze drying.

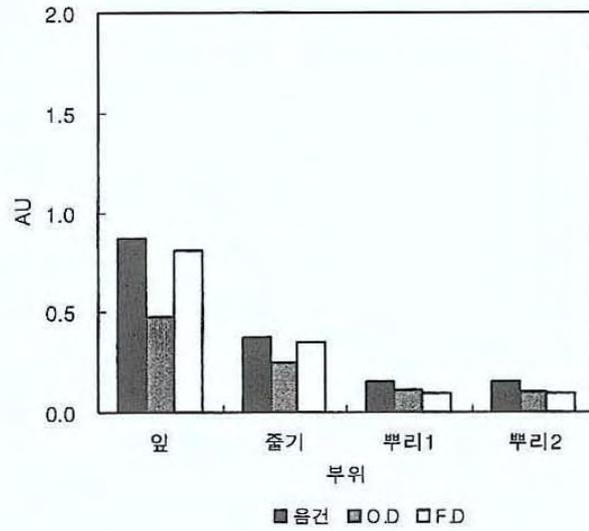


Figure 6. Total flavonoid analysis of *Cirsium japonicum* collected from Suwon.  
 F: flower, L:leaf, R:root, S:stem, OD: oven drying, FD: freeze drying

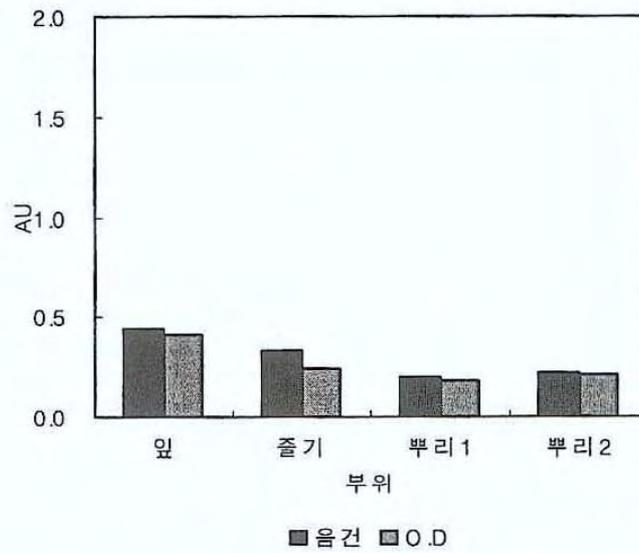


Figure 7. Total flavonoid analysis of *Cirsium japonicum* collected from Jangsung. F: flower, L:leaf, R:root, S:stem, OD: oven drying, FD: freeze drying

Table 4. Analysis condition of HPLC for *Cirsium japonicum*

기 기	규 격
HPLC (Waters)	SPD-10A series
Mobile phase	(A)1% of 0.1M formic acid in acetonitrile (B)1% of 0.1M formic acid in water
Gradient	17-40 % for 10 min. 40-40 % for 5 min. 40-90 % for 3 min. 90-17% for 22 min. Running time 40 min.

Column : Xterra RPC18, 15 cm 4.6 mm, 5 micron

UV-spectra : 270 nm, 345 nm

라. 부위별 apigenin 함량 분석 : Table 4의 분석조건으로 엉겅퀴 식물의 부위별 apigenin 함량을 비교분석하였다. 그 결과 엉겅퀴 식물의 꽃과 잎에서 추출된 시료가 다른 부위보다 높은 양의 apigenin이 검출되었다(Table 5). 이 결과는 total flavonoid 함량을 분석한 결과와 유사하다.

마. 건조방법별 apigenin 분석 : 음건, 동결건조, 오븐건조를 이용하여 건조방법별 apigenin의 함량을 비교 분석한 결과 본 연구에서 시행한 건조방법에 따른 apigenin 함량의 큰 차이는 없었다(Table 5).

바. 기능성 식품신소재의 제품화를 위한 추출물의 안전성 조사 : 유효성분이 다량 함유된 추출물을 건강 기능 식품으로 제품화하기 위하여 일반독성(단여투여) 및 유전독성(복귀돌연변이, 염색체이상)의 안전성 분석을 수행하였다.

#### 1) 단여투여 독성 시험

Total flavonoid 함량과 flavonoid 중 apigenin의 함량이 다른 시료와 비교시 비교적 높은 충주지역의 엉겅퀴 시료를 80% 에탄올로 추출하고, 약 150배 정도 감압 농축하여 단회투여 독성시험을 실시하였다.

#### 2) 유전독성 시험

가) 복귀돌연변이 시험(Ames test) : 엉겅퀴 추출물의 세균에서의 유전독성 검색을 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘요구성 균주 TA10, TA1535, TA

1537과 대장균 *E.coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 시험물질은 DMSO에 용해하여 처리하였으며 본시험의 처리 농도는 용량설정시험에서 결정하였다. 용량설정시험결과 모든 균주에서 최고농도군에 이르기까지 집락수의 감소와 같은 항균성은 관찰되지 않았다. 따라서 본시험에서는 5000 ug/plate를 최고농도로 하여 대사활성효소계 미적용 및 적용하에 공비2로서 6단계 농도군(156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 ug/plate) 및 각각 부형제/양성대조군으로 실험하였다. 시험결과 모든 균주에서는 본시험의 최고농도에 이르기까지 유의성 있는 복귀돌연변이 집락수의 증가는 나타나지 않았다. 또한, 모든 균주에서 집락수의 감소와 같은 항균성도 전혀 관찰되지 않았다. 모든 양성 대조군에서는 집락수가 부형대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다(Table 6). 따라서 엉겅퀴 추출물은 본시험 조건하에 사용된 농도범위에서는 시험균주들에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

나) *In Vitro* 염색체이상시험(*In vitro* Chromosome Aberration Assay) : 총주지역 엉겅퀴 샘플을 80% 에탄올로 추출하고, 약 150배 정도 감압농축하여 염색체 이상 시험을 실시하였다.

Table 5. HPLC analysis of *Cirsium japonicum* extracted with 80% ethanol  
(단위 : ppm)

	광릉	수원	충주	춘천	장성
F-OD	1.988	-	2.048	-	-
F-음건	2.162	-	4.120	-	-
F-FD	2.018	-	3.904	-	-
L-OD	N.D.	1.512	8.001	1.320	0.082
L-음건	1.680	1.817	6.535	-	N.D.
L-FD	N.D.	-	8.248	-	-
R1-OD	-	1.634	2.078	2.064	0.127
R2-OD	-	1.812	1.665	1.984	N.D.
S-OD	1.648	1.660	1.630	1.761	N.D.
S-음건	1.477	-	2.397	-	N.D.
S-FD	1.304	-	1.662	-	-
R-FD	-	N.D.		N.D.	-
R-음	-	N.D.	N.D	N.D.	N.D.

F: flower, L:leaf, R:root, S:stem, OD: oven drying,  
FD: freeze drying, ND: not detected

Table 6. Result of bacterial reverse mutation assay with ethanol extracts from thistle

		G05031						
Tester strain	Chemical Treated	Dose (ug/plate)	Colonies/plate(Mean)(Factor)a)					
			Without S-9 mix			With a-9 mix		
TA100	Test Item	0	119 ±			128 ±	10	
		156	110 ±		[0.9]	134 ±	9	[1.0]
		313	119 ±	6	[1.0]	134 ±	3	[1.0]
		625	111 ±		[0.9]	131 ±	17	[1.0]
		1250	127 ±	4	[1.1]	140 ±	13	[1.1]
		2500	133 ±	5	[1.1]	141 ±	16	[1.1]
		5000	135 ±		[1.1]	116 ±	4	[0.9]
TA1535	Test Item	0	14 ±			10 ±	1	
		156	13 ±		[0.9]	13 ±	3	[1.3]
		313	19 ±		[1.4]	13 ±	3	[1.3]
		625	14 ±		[1.0]	8 ±	1	[0.8]
		1250	13 ±		[0.9]	11 ±	2	[1.1]
		2500	15 ±		[1.1]	11 ±	3	[1.1]
		5000	14 ±		[1.0]	11 ±	2	[1.1]
TA98	Test Item	0	29 ±			30 ±	2	
		156	25 ±		[0.9]	33 ±	1	[1.1]
		313	25 ±		[0.9]	32 ±	3	[1.1]
		625	30 ±		[1.0]	31 ±	2	[1.0]
		1250	28 ±		[1.0]	27 ±	2	[0.9]
		2500	24 ±		[0.8]	34 ±	2	[1.1]
		5000	27 ±		[0.9]	29 ±	2	[1.0]
TA1537	Test Item	0	16 ±			21 ±	1	
		156	14 ±		[0.9]	18 ±	5	[0.9]
		313	19 ±		[1.2]	21 ±	2	[1.0]
		625	15 ±		[0.9]	17 ±	3	[0.8]
		1250	17 ±		[1.1]	18 ±	3	[0.9]
		2500	21 ±		[1.3]	24 ±	3	[1.1]
		5000	20 ±		[1.3]	21 ±	1	[1.0]
<i>E.coli</i> WP2 uvrA	Test Item	0	13 ±			18 ±	1	
		156	10 ±		[0.8]	13 ±	3	[0.7]
		313	13 ±		[1.0]	12 ±	2	[0.7]
		625	9 ±		[0.7]	16 ±	3	[0.9]
		1250	11 ±		[0.8]	15 ±	3	[0.8]
		2500	14 ±		[1.1]	17 ±	3	[0.9]
		5000	10 ±		[0.8]	18 ±	1	[1.0]
Positive controls								
TA100	SA		442 ±	9	[3.7]			
TA1535	SA		414 ±	6	[29.6]			
TA98	2-NF		280 ±	8	[9.7]			
TA1537	9-AA		197 ±		[12.3]			
WP2 uvrA	4NQO		130 ±	26	[10.0]			
TA100	BP					756 ±	48	[5.9]
TA1535	2-AA		13 ±		[0.9]	273 ±	11	[27.3]
TA98	BP		25 ±		[0.9]	433 ±	21	[14.4]
TA1537	BP					212 ±	24	[10.1]
WP2 uvrA	2-AA					196 ±	5	[10.9]

a) No. of colonies of treated plate/No. of colonies of vehicle control plate

SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine

4NQO : 4-Nitroquinoline-1-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

## 2. 엉겅퀴속의 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구

### 가. 엉겅퀴의 부위별 유효 성분을 추출하는 최적 조건 확립

엉겅퀴는 동결건조한 후, 유효성분을 얻기 위하여 추출하였으며, 추출하기 전의 동결건조된 상태의 엉겅퀴 잎, 뿌리, 줄기의 특성을 관능검사한 결과는 Table 7과 같다. 엉겅퀴의 채집 지역(산지)에 관계없이 잎, 줄기 및 뿌리는 동일한 특성을 나타내었다. 또한 동결건조한 엉겅퀴의 채집지역 및 부위에 관계없이 쓴맛과 쓴 향기를 가지고 있었다. 춘천, 장성, 수원에서 구입한 엉겅퀴를 잎과 뿌리로 나누어 추출한 결과는 다음과 같다(Fig. 8). 춘천의 엉겅퀴는 잎, 줄기, 뿌리 모두 추출 농도가 증가하고 추출시간이 증가하며, 온도가 높아질수록 높은 고형물 함량을 나타냈으며, 이중 뿌리를 10%로 추출했을 시 다른 부위에 비해 높은 고형물 함량을 나타내었다. 장성의 엉겅퀴는 잎과 뿌리 모두 추출 농도가 증가하고 추출시간이 증가하며, 온도가 높아질수록 높은 고형물 함량을 나타냈으며, 이중 뿌리를 10%로 추출했을 시 다른 부위에 비해 높은 고형물 함량을 나타내었다. 그러나 뿌리의 10% 추출에서 추출온도가 60℃와 80℃에서는 큰 차이가 없었고 98℃에서는 증가가 되었으나 잎 10% 추출에서는 온도가 높아질수록 오히려 고형물 함량이 낮아짐을 알 수 있었다. 수원의 엉겅퀴는 잎과 뿌리 모두 추출 농도가 증가하고 추출시간이 증가하며, 온도가 높아질수록 높은 고형물 함량을 나타냈으며, 이중 뿌리를 10%로 추출했을 시 다른 부위에 비해 높은 고형물 함량을 나타내었다. 특히 농도가 진해지고 추출온도가 높아지며 추출시간이 지날수록 잎과 뿌리 모두에서 완만한 고형물 함량 증가를 나타내었다. 산지에 따른 잎 부위를 살펴보았을 때(Fig. 9), 잎 부위의 고형물 함량은 장성 엉겅퀴 10%로 추출한 것이 가장 높았으며, 농도가 높아짐에 따라 고형물 함량은 점점 증가함을 보였다. 추출 시간은 1시간과 2시간 사이에서 고형물 함량의 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한, 추출 온도에서는 대체적으로 온도가 증가함에 따라 고형물 함량도 증가되었음이 나타났다. 그러나 80℃와 98℃에서 고형물 함량 차이는 엉겅퀴 산지에 따라 달랐다. 산지에 따라 뿌리 부위를 살펴보았을 때, 고형물 함량은 장성 엉겅퀴 10%로 추출한 것이 가장 높았으며, 농도가 높아짐에 따라 고형물 함량은 점점 증가함을 보였다. 추출 시간은 1시간과 2시간 사이에서 고형물 함량의 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나, 수원 엉겅퀴 및 춘천 엉겅퀴는 2시간 추출 시에 오히려 고형물 함량이 떨어지는 것도 나타났다. 또한, 추출 온도에서는 대체적으로 온도가 증가함에 따라 고형물 함량도 증가되었음이 나타났다. 그러나 엉겅퀴 산지에 따라 98℃ 추출 시에 비해 80℃ 추출 시 고형물 함량이 떨어지는 것도 나타났다. 추출

액의 pH 및 UV 흡광도는 농도 및 추출 시간에 따라 일정한 수치를 보였으므로 논의에서 제외하였다. 따라서 기능성 식품에 첨가할 엉겅퀴 추출의 최적 조건에서 추출 시간이 높아짐에 따라, 추출시간이 길어짐에 따라, 고형물 함량이 점점 상승함으로 농도는 1%, 1시간으로 결정하였으며, 추출 온도는 80℃와 98℃ 사이에서 큰 차이가 없었고, 지나친 온도 상승으로 인한 유효 물질의 소실을 우려하여 추출온도는 80℃로 정하였다. 각 산지 및 부위에 따른 고형물 함량 분석 결과, 80℃에서 1시간 추출 조건에서 장성의 엉겅퀴 뿌리의 추출효율이 가장 높았다.

Table 7. 엉겅퀴의 특성 관능검사

		엉겅퀴의 관능특성 표현
동결건조 분말	잎	향기 - 마른 풀 향기, 약한 썩향기 맛 - 부드러운 맛, 약간 단맛
	뿌리	향기 - 흙냄새, 약한 비릿하면서 초콜렛 향기 맛 - 초기에는 단맛이 감지, 뒤에는 쓴맛
	줄기	향기 - 마른 풀 향기, 마른 나무 향기 맛 - 부드러운 맛, 약간 단맛
추출물	잎, 뿌리, 줄기	향기 - 쓴 냄새 맛 - 쓴 맛

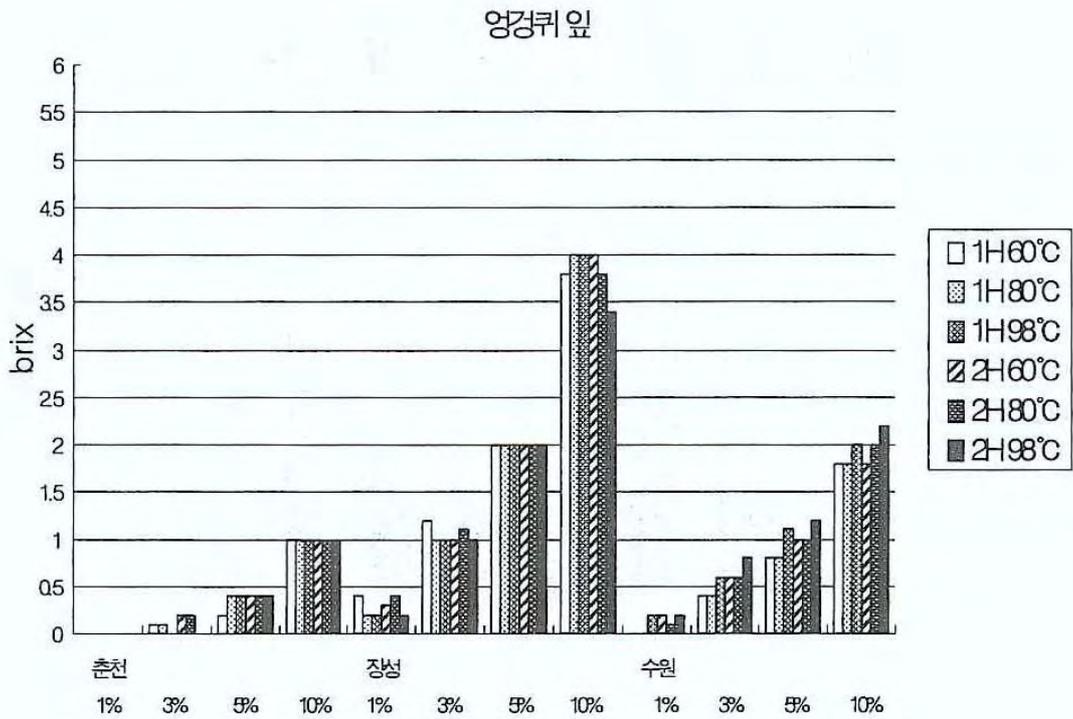
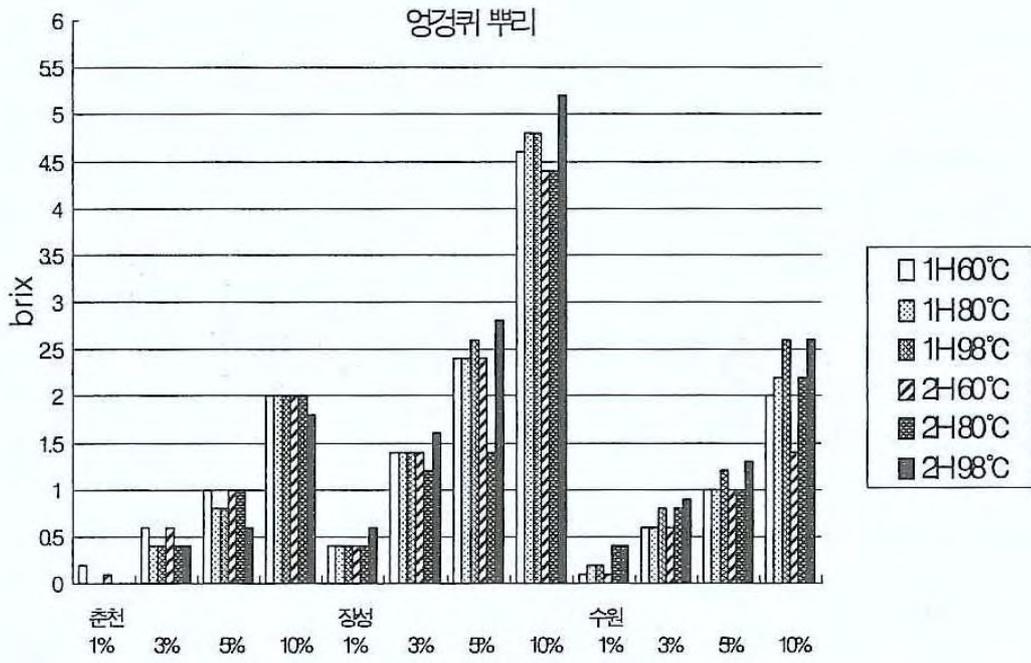


Figure 8. 영경귀 농도에 따른 잎 및 뿌리의 추출물 함량.

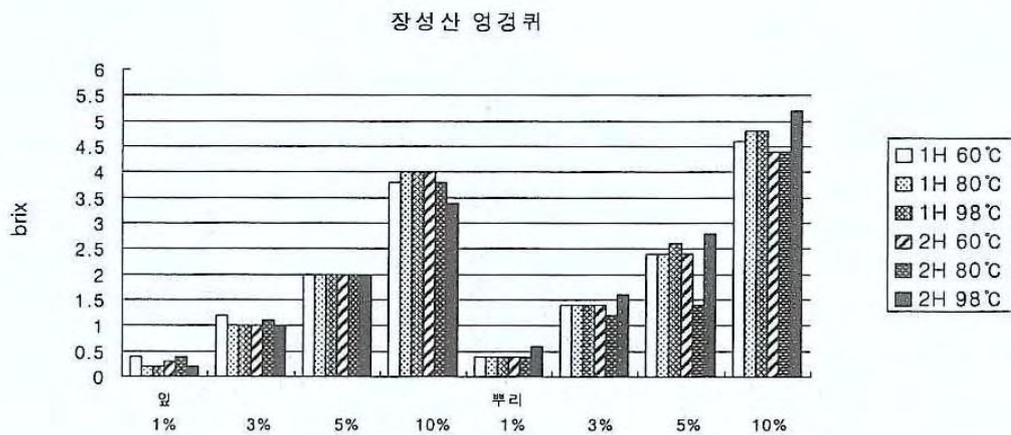
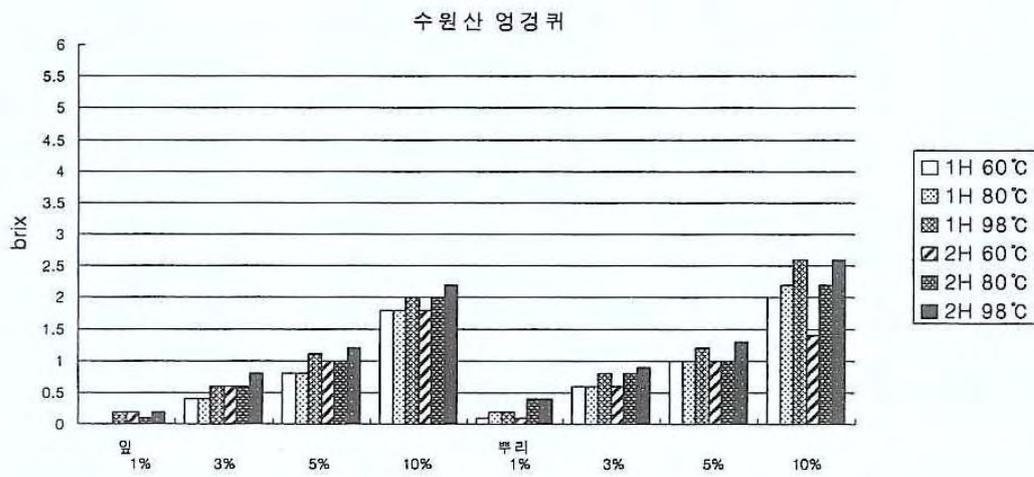
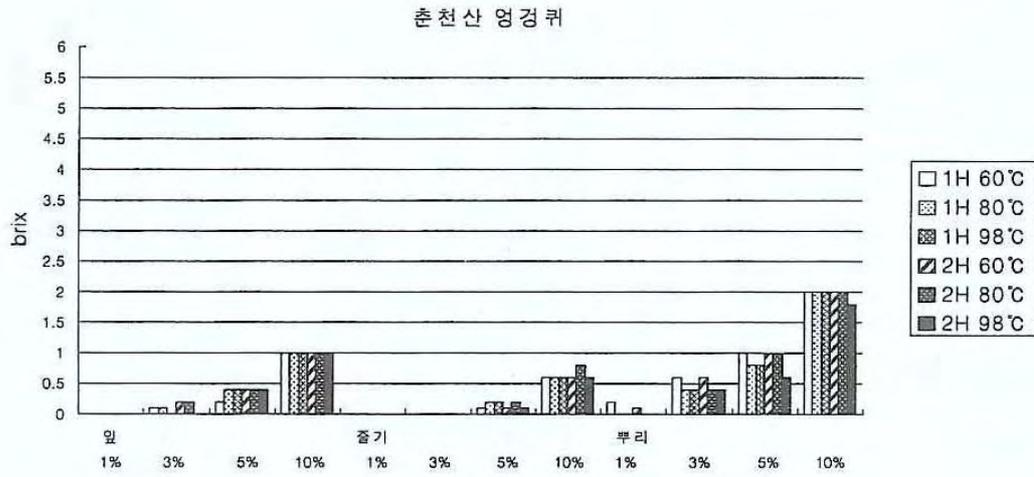


Figure 9. 산지별 영경귀 추출물 함량.

나. 동결건조 영경귀 분말을 첨가한 블록스프의 제조 및 관능검사 결과  
동결건조한 영경귀 분말을 1%첨가한 제품과 영경귀를 첨가하지 않은 제품을 비교하였으며, 20대 여대생(200명) 및 30대 이상 여성(30~50대) 50인을 대상으로 하여 즉석에서 시식하면서 선호도 조사를 실시하였다. 7점의 hedonic scale로 실시하였으며, 1점을 '매우 나쁘다', 7점은 '매우 좋다'로 하였다(Table 8, Fig. 10~14).

1) 김치찌개 : 20대 및 30대 이상의 두 그룹에서 김치찌개 스프의 제조 시 영경귀를 첨가하였을 경우(Fig. 11)는 첨가하지 않은 시료에 비해 낮은 선호도를 보였다. 이것은 김치찌개 고유의 맛과 영경귀 분말이 서로 조화되지 않은 맛을 나타낸 것으로 볼 수 있다.

2) 육개장 : 20대 및 30대 이상의 두 그룹에서 영경귀를 첨가하였을 때(Fig. 12) 높은 선호도를 보였다. 육개장 고유의 맛과 영경귀 분말이 서로 조화되어 구수한 맛을 나타낸 것으로 볼 수 있다.

3) 계란탕 : 20대 및 30대 이상의 관능그룹에서, 영경귀를 첨가하였을 경우(Fig. 13) 더 높은 선호도를 보였다. 계란탕스프는 김치찌개 및 육개장 등 매콤한 다른 양념들과의 영향을 덜 받으며 상대적으로 맛이 부드럽고 순한 맛을 낸다. 이러한 계란탕 맛의 특성과 영경귀가 조화를 잘 나타낸 것으로 사료된다.

4) 곰탕 : 20대 및 30대 이상의 관능검사자의 평가 결과에 의하면, 영경귀를 첨가하였을 경우(Fig. 14) 더 높은 선호도를 보였다. 곰탕 스프 역시 계란탕과 마찬가지로 김치찌개 및 육개장에 비해 상대적으로 맛이 부드럽고 순한 맛을 내므로, 이러한 맛의 특성과 영경귀가 조화를 잘 나타낸 것으로 사료된다.

영경귀 분말을 첨가하여 4가지 블록스프를 제조한 후 면에 첨가하여 관능검사를 실시한 결과, 20대 및 30대 이상의 관능검사자 모두에서, 영경귀의 독특한 맛은 국물이 순하고 부드러운 맛을 내는 계란탕 및 곰탕에서 더 높은 선호도를 나타내었으며, 고춧가루 등이 첨가되어 얼큰한 맛을 내는 김치찌개 및 육개장 등에서는 영경귀를 첨가하지 않은 시료와 큰 차이는 보이지 않았다. 또한 김치찌개에서는 영경귀를 첨가하지 않은 시료가 오히려 더 높은 선호도를 보였다. 이것은 김치찌개가 영경귀와 어울리지 않는 것으로 판단되기도 하나, 한국인의 전형적인 입맛

으로 대표되는 김치찌개의 입맛을 쉽게 바꾸기는 힘들다는 결과를 보여주기도 한다.

Table 8. 스프를 첨가한 면류의 선호도 조사

		김치찌개	육개장	계란탕	곰탕
20대	영경귀첨가	3.89±1.26 <sup>c</sup>	4.00±1.58 <sup>b</sup>	4.52±1.46 <sup>a</sup>	4.14±1.42 <sup>b</sup>
	영경귀무첨가	4.33±1.38 <sup>a</sup>	3.66±1.54 <sup>b</sup>	3.03±1.22 <sup>bc</sup>	2.96±1.52 <sup>c</sup>
30대	영경귀첨가	4.01±1.31	4.11±1.22	4.58±1.12	4.23±1.67
이상	영경귀무첨가	4.35±1.02	3.87±1.34	3.56±1.22	3.45±1.07

20대 : n=200, p<0.05, 30대이상 : n=50

1점: 매우 나쁘다, 7점: 매우 좋다

각종 스프의 선호도 조사 결과

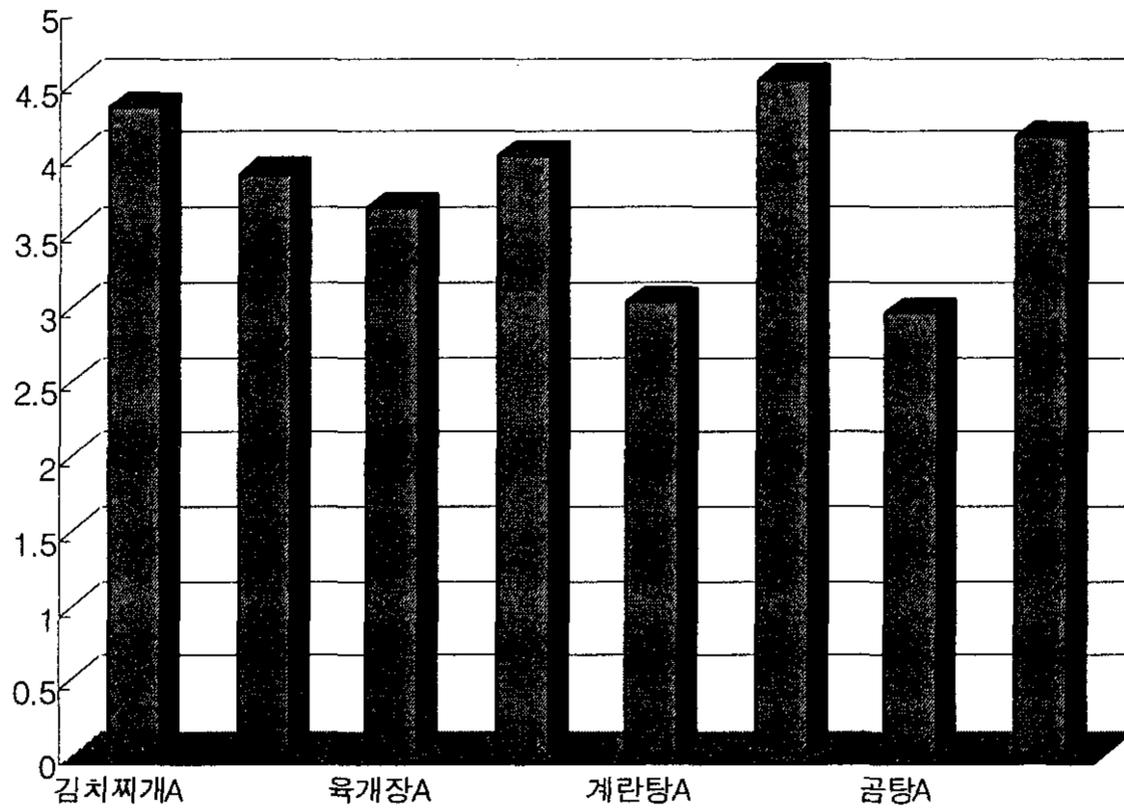


Figure 10. 20대 관능검사자에 의한 스프를 첨가한 면의 선호도.

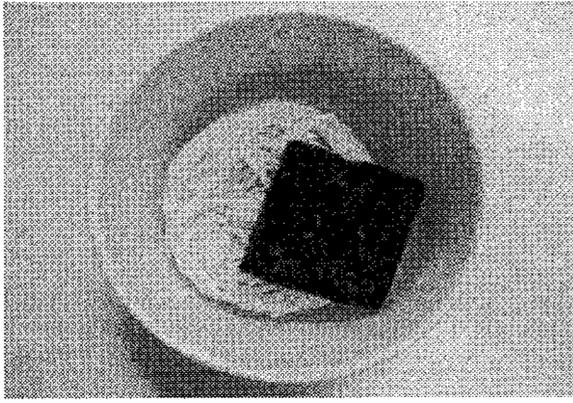


Figure 11. 영정귀를 첨가한 김치찌개.

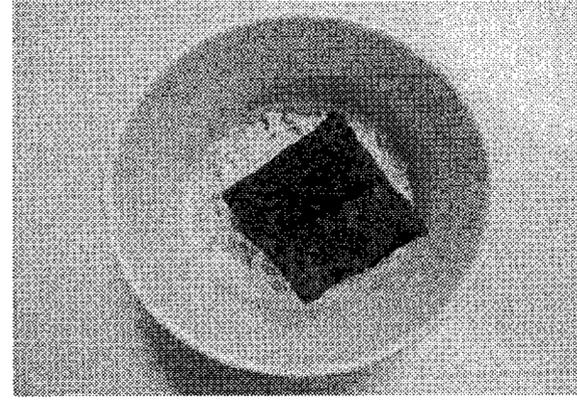


Figure 12. 영정귀를 첨가한 육개장.

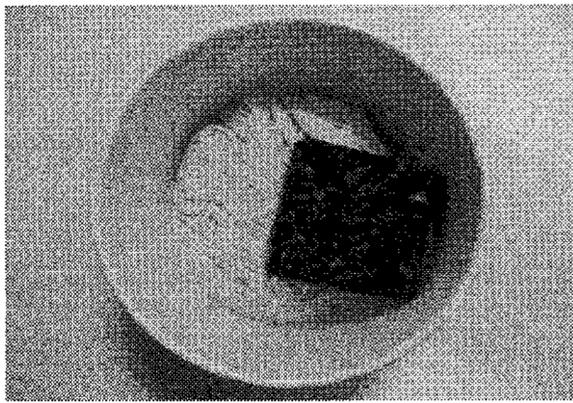


Figure 13. 영정귀를 첨가한 계란탕.

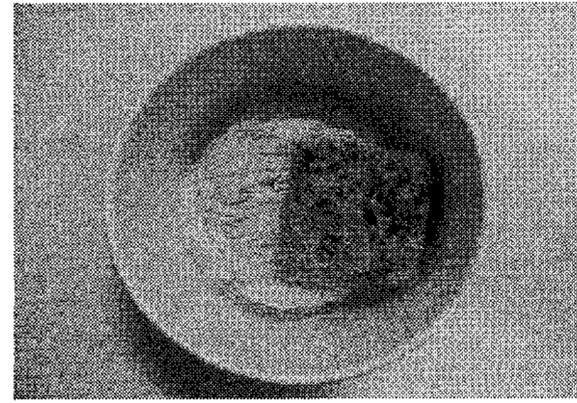


Figure 14. 영정귀를 첨가한 곰탕.

#### 다. 영정귀 분말을 첨가한 스넥 및 빵의 제조 및 관능검사 결과

##### 1) 두부스넥

20대 및 30대 이상의 두 관능그룹 모두에서 영정귀를 첨가하였을 경우 더 높은 선호도를 보였다(Table 9, Fig. 15,16). Hunter colorimeter로 측정된 L, a, b값 및 Rheometer로 측정된 hardness는 Table 10과 같으며, 영정귀가 첨가된 두부스넥의 hardness가 다소 높게 나타났다. 두부는 최근 건강을 지향하는 트렌드와 맞물려 웰빙 건강식품으로서 인기가 높을 뿐 아니라 영양학적인 가치도 우수하여 이것을 첨가하여 제조한 스넥은 맛과 기능적인 측면에서 관심을 높일 것으로 사료된다. 또한 영정귀를 첨가함으로써 맛과 기능성을 한층 높일 수 있는 식품으로 기대가 된다.

##### 2) 잠곡빵

20대 및 30대 이상의 두 관능그룹 모두에서 영경귀를 첨가하였을 경우 더 높은 선호도를 보였다(Table 9, Fig. 15,17). Hunter colorimeter로 측정된 L\*, a\*, b\*값 및 Rheometer로 측정된 hardness는 Table 3-9와 같으며, 영경귀가 첨가된 빵의 hardness가 다소 높게 나타났다. 잡곡빵은 상대적으로 타 종류의 제빵류에 비하여 설탕 및 버터의 함량이 낮으며, 호밀, 보리 등 각종 잡곡류가 첨가되어 있어 당뇨 및 기타 성인병을 우려하는 집단에서 자주 선택을 한다. 여기에 기능성을 지닌 영경귀 분말을 첨가시켜 빵을 제조하였으므로 맛 뿐 아니라 건강을 생각하는 기능성 빵으로서의 가치를 증대시키는 제품이 될 것으로 사료된다.

Table 9. 두부스넥 및 보리빵의 선호도 결과

		두부스넥	잡곡빵
20대	영경귀첨가	4.70±1.10	4.73±1.24
	영경귀무첨가	4.22±1.32	4.07±1.24
30대 이상	영경귀첨가	4.67±1.08	4.53±1.34
	영경귀무첨가	4.33±1.21	4.12±1.83

1점: 매우 나쁘다, 7점: 매우 좋다  
 20대 : n=200, 30대이상 : n=50

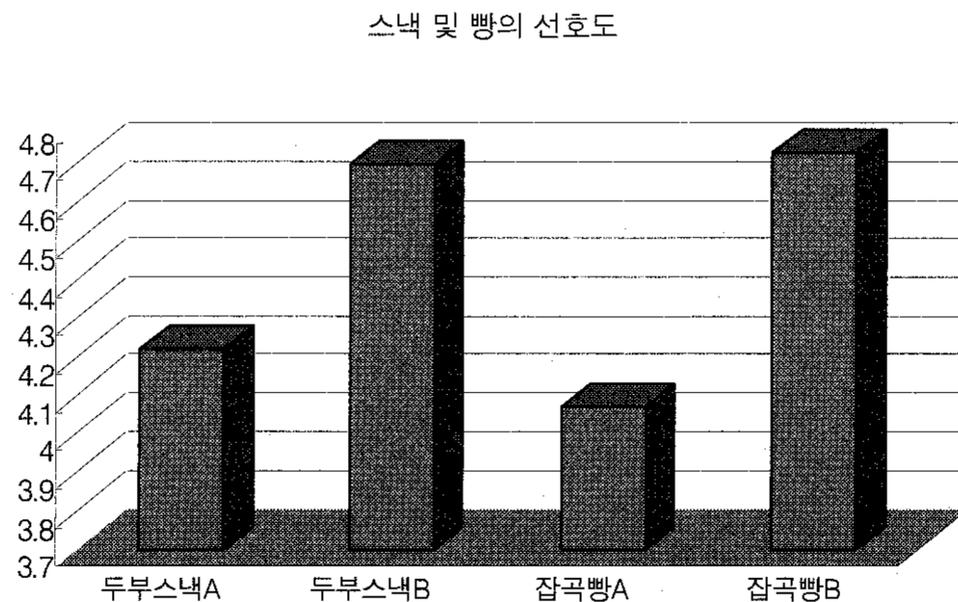


Figure 15. 20대 관능검사자에 의한 스넥 및 빵의 선호도.

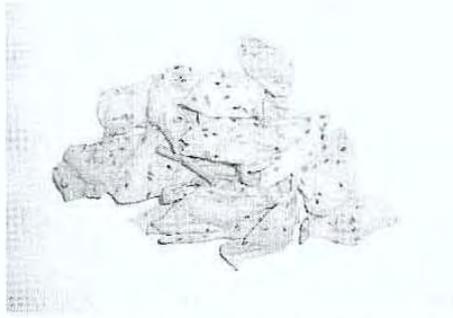


Figure 16. 영경귀를 첨가한 두부스넥.

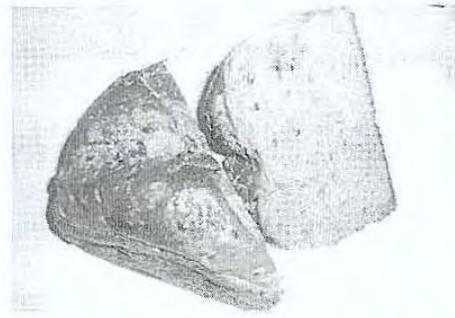


Figure 17. 영경귀를 첨가한 잡곡빵.

Table 10. 두부스넥 및 잡곡빵의 색도 및 hardness 측정

		색도(Hunter) <sup>1)</sup>			Hardness <sup>2)</sup>
		L*	a*	b*	
두부스넥	영경귀첨가	56.10	4.04	29.43	28093990.0
	영경귀무첨가	59.98	7.21	32.53	22716154.0
잡곡빵	영경귀첨가	45.80	13.13	25.60	128362.9
	영경귀무첨가	54.01	13.42	31.20	124190.9

n=5

<sup>1)</sup>Hunter Colorimeter(Minolta) L; lightness, +a; red, -a; green, +b yellow, -b; blue.

<sup>2)</sup>Sun Rheometer Compac-100(Sun Scientific Co., Ltd, Japan)

#### 라. 영경귀 티백차의 제조 및 관능검사 결과

1) 영경귀 뿌리차, 영경귀 잎차를 제조하여 차 관능검사 경험이 많은 18인의 숙련된 패널이 관능검사를 하였다(Table 11). 영경귀의 뿌리차를 농도별로 제조하여 관능 평가를 실시한 결과, 색깔이나 뒷맛, 떫은맛에서 농도가 진할수록 강하게 나타났으며 향미는 농도와 관련해서 큰 차이는 없었고 기호도는 뿌리차 농도가 약한 것이 더 좋게 평가되었다. 영경귀의 잎차를 농도별로 제조하여 관능 평가를 실시한 결과, 색깔이나 뒷맛, 떫은맛에서 농도가 진할수록 강하게 나타났으며 향미는 농도와 관련해서 큰 차이는 없었고 기호도는 뿌리차와 달리 농도가 높은 차에서 더 좋게 평가되었으나 뿌리차와 잎차 모두 유의적인 차이는 없었다.

2) 영경귀 뿌리와 잎을 1:1로 제조한 차와 뿌리와 잎을 1:2로 제조한 차, 그리고 뿌리와 잎을 2:1로 제조한 차에 대하여 색깔, 향미, 떫은 맛, 뒷맛 및 전반적인 기

호도에 대하여 경험이 많고 숙련된 18인의 패널이 관능평가를 하였다. 또한 위에 제시한 농도에 각각 2배씩 진하게 우려낸 엉경귀 차에 대해서도 관능평가를 실시하였다(Table 12). 엉경귀 뿌리와 잎을 1:1로 혼합하여 제조한 차와 같은 비율로 농도를 2배로 제조한 엉경귀 혼합차를 관능 평가한 결과, 색깔, 뚝은 맛, 뒷맛에서 유의적인 차이가 있었으나 향미 및 기호도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 엉경귀 뿌리와 잎을 1:2로 혼합하여 제조한 차와 같은 비율로 2배의 농도로 제조한 엉경귀 혼합차를 관능 평가한 결과, 색깔에서만 유의적인 차이가 있을 뿐 뚝은 맛, 뒷맛, 향미 및 기호도에서 유의적인 차이는 없었다. 엉경귀 뿌리와 잎을 2:1로 혼합하여 제조한 차와 같은 비율로 농도를 2배로 제조한 엉경귀 혼합차를 관능 평가한 결과, 색깔과 뒷맛에서 유의적인 차이가 있었으며 뚝은 맛, 향미 및 기호도에서는 유의적인 차이가 없었다. 즉, 농도에 따라 차의 색깔에 있어서는 유의적인 차이가 있었다. 특히 뿌리의 농도가 진할 때는 유의적인 차이는 없었으나 잎의 농도가 높아질수록 차의 색깔에서는 유의적인 차이가 나타났다. 차를 마실 때 중요한 요소 중의 하나인 향미는 농도가 진할수록 강해졌으나 유의적인 차이는 없었으며, 뚝은 맛 역시 농도가 진해지면 강하게 나타나는 것으로 나타났다. 뒷맛 역시 농도가 진해질수록 강해졌으나 유의적인 차이는 없었으며 뿌리차 1:1에서는 농도가 연한 것이 더 진한 것으로 나타났다. 엉경귀의 차의 제조에 있어서 전반적인 기호도는 농도의 차이와 관계없이, 또한 제조 비율과 관계없이 모두 유의적인 차이는 없었으며, 뿌리만을 1의 농도로 제조한 차와 뿌리와 잎을 1:1로 제조한 차의 기호도가 제일 높은 것으로 나타나 엉경귀 차는 뿌리 부위를 활용하는 것이 기호도 측면에서는 좋은 영향을 주는 것으로 사료되었다.

Table 11. 엉경귀 뿌리차 및 잎차의 관능검사 결과

	뿌리1배 <sup>1)</sup>	뿌리 2배 <sup>2)</sup>	잎 1배	잎 2배
색	2.92 <sup>c</sup>	4.15 <sup>a</sup>	3.15 <sup>b</sup>	4.69 <sup>a</sup>
향미	3.23 <sup>a</sup>	3.31 <sup>a</sup>	3.54 <sup>a</sup>	3.31 <sup>a</sup>
뚝은 맛	2.54 <sup>a</sup>	3.31 <sup>b</sup>	3.38 <sup>b</sup>	3.77 <sup>b</sup>
뒷맛	2.62 <sup>a</sup>	3.69 <sup>b</sup>	3.15 <sup>b</sup>	3.69 <sup>b</sup>
기호도	5.31 <sup>a</sup>	4.62 <sup>a</sup>	4.85 <sup>a</sup>	5.23 <sup>a</sup>

n=18, p<0.05

1점: 매우 열다 혹은 매우 약하다, 매우 나쁘다, 9점: 매우 진하다 혹은 매우 강하다, 매우 좋다.

<sup>1)</sup>차 재료 1.2 g을 100 ml의 물에 우려낸 것, <sup>2)</sup>차 재료 2.4 g을 물 100 ml에 우려낸 것

Table 12. 엉겅퀴의 뿌리와 잎을 혼합한 차의 관능검사 결과

	뿌리와 잎의 제조 비율(뿌리:잎)					
	1:1 <sup>1)</sup>	2:2(2배) <sup>2)</sup>	1:2	2:4(2배)	2:1	4:2(2배)
색	1.11 <sup>a</sup>	1.94 <sup>bc</sup>	3.33 <sup>d</sup>	3.78 <sup>e</sup>	1.67 <sup>ab</sup>	2.56 <sup>c</sup>
향미	4.33 <sup>a</sup>	3.22 <sup>a</sup>	3.61 <sup>a</sup>	3.33 <sup>a</sup>	3.00 <sup>a</sup>	3.22 <sup>a</sup>
뽀은 맛	4.06 <sup>a</sup>	3.06 <sup>b</sup>	3.22 <sup>b</sup>	3.67 <sup>ab</sup>	3.06 <sup>b</sup>	3.50 <sup>ab</sup>
뒷맛	4.50 <sup>a</sup>	3.44 <sup>b</sup>	3.11 <sup>bc</sup>	3.67 <sup>b</sup>	2.72 <sup>c</sup>	3.89 <sup>b</sup>
기호도	5.31 <sup>a</sup>	4.39 <sup>a</sup>	4.44 <sup>a</sup>	4.56 <sup>a</sup>	4.17 <sup>a</sup>	4.33 <sup>a</sup>

n=18, p<0.05

1점: 매우 열다 혹은 매우 약하다, 매우 나쁘다, 9점: 매우 진하다 혹은 매우 강하다, 매우 좋다.

<sup>1)</sup>차 재료 1.2 g을 100 ml의 물에 우려낸 것, <sup>2)</sup>차 재료 2.4 g을 물 100 ml에 우려낸 것

#### 마. 엉겅퀴 추출물을 이용한 음료 개발

1) 엉겅퀴추출물을 사용하여 병음료를 개발하였다.

엉겅퀴의 채집지역 및 부위에 따른 추출물의 분석에서 일반적으로 80℃에서 1시간의 추출 조건이 가장 효율적으로 분석되었으며, 제 1세부과제에서 엉겅퀴의 부위별 총flavonoids 및 apigenin 함량이 잎에서 가장 높게 나타났다. 따라서 음료의 제조 시 위의 조건에서 엉겅퀴 잎을 추출하여 사용하였다.

Table 13. 엉겅퀴추출물 음료의 배합비율

성분	함량(중량%)
엉겅퀴 잎 추출물*	83.05
액상고과당	12.5
구연산	0.2
구연산나트륨	0.1
사과과즙	4.0
비타민C	0.05
향	0.1
합계	100

\* 엉겅퀴 잎 추출물 제조법 : 엉겅퀴 잎 분말 5%, 물 95%를 80도에서 1시간 추출

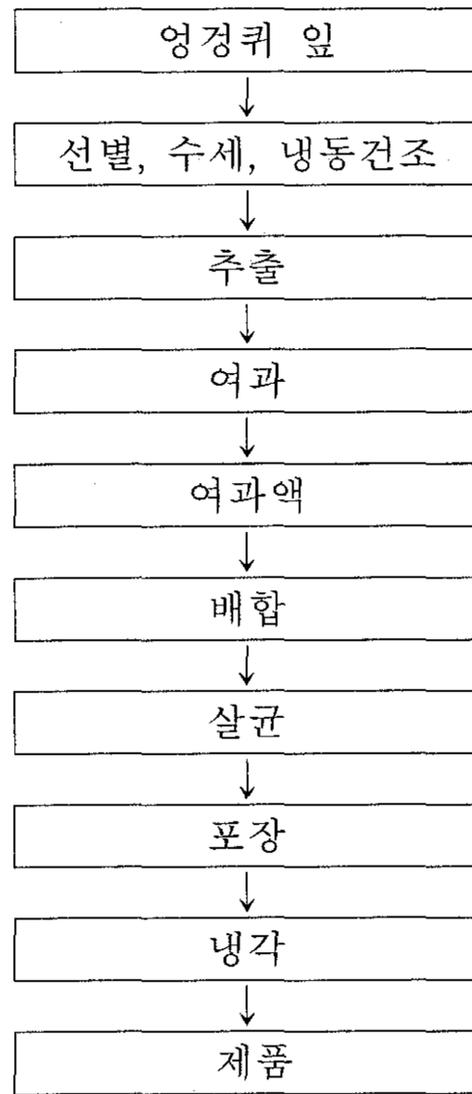


Figure 18. 영정귀추출물 음료 제조 공정.



Figure 19. 영정귀 잎 추출물 음료.

2) 병음료의 유통기한 설정을 위하여 온도에 따른 색도 및 관능특성을 저장기간 별로 실험하였으며, 관능검사를 실시하였다.

엉겅퀴 추출물을 배합조건에 따라 배합한 음료를 저장온도 및 시간에 따라 품질 변화를 모니터링 하였다. 저장온도(37°C, 50°C, 60°C) 및 온도별 저장기간에 따른 당도, pH, 산도, 색도, 대장균군 및 관능검사를 통한 품질 변화를 측정하였다.

#### 가) 당도측정

당도는 hand refractometer를 사용하여 측정하였다. 단 샘플링한 시료는 25°C로 유지된 상태에서 3회 반복하여 측정한다. 시료의 저장기간 동안 당도의 변화는 Fig. 20과 같으며, 저장기간 동안 거의 변화를 나타내지 않았다.

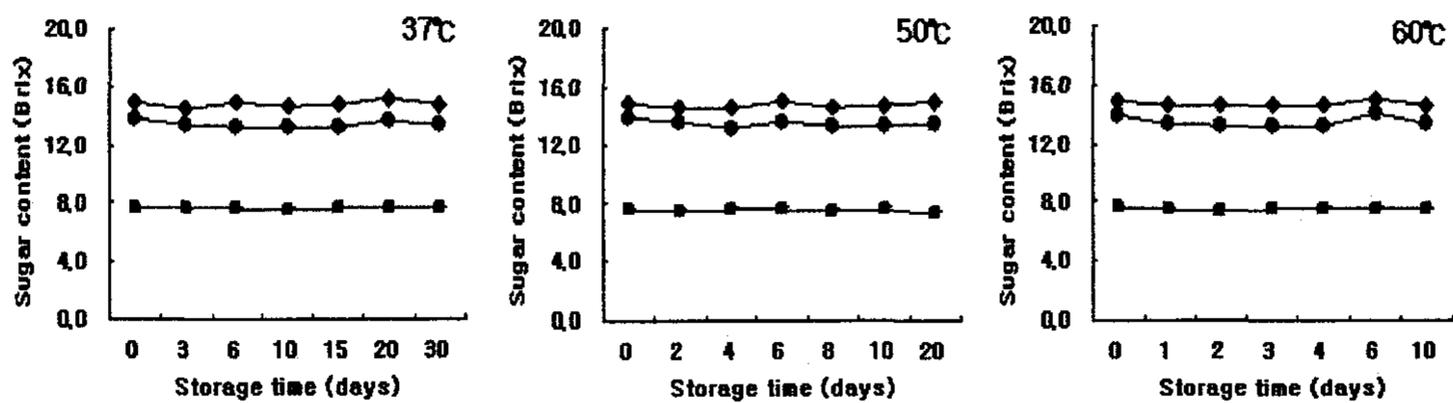


Figure 20. Changes in sugar concentration of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C. (-■- : Control, -◆-: beverages with *Cirsium japonicum* extracts, -●-: beverages with *Elsholtzia splendens* extracts)

#### 나) pH 및 산도 측정

시료의 pH는 pH meter(Metrohm Co. Swiss)를 사용하여 25°C의 조건에서 측정하였다. 적정산도는 시료 10 ml을 취하여 용량플라스크에 넣고 증류수를 가하여 전량을 100 ml 한다. 이중에서 20 ml을 삼각플라스크에 취하여 0.1N NaOH로 중화 적정하여, 이때 소비된 NaOH용액의 mL수를 구연산계수(0.0064)로 환산하였다. 시료의 온도별 저장기간 중 pH와 산도의 변화는 Fig. 21과 Fig. 22에 나타내었다. 저장기간 동안 비교적 일정한 pH를 유지하였다. 이와 같은 결과는 저장온

도가 시료의 pH의 변화에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 산도의 변화에 있어서는 저장 중 저장 온도별로 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

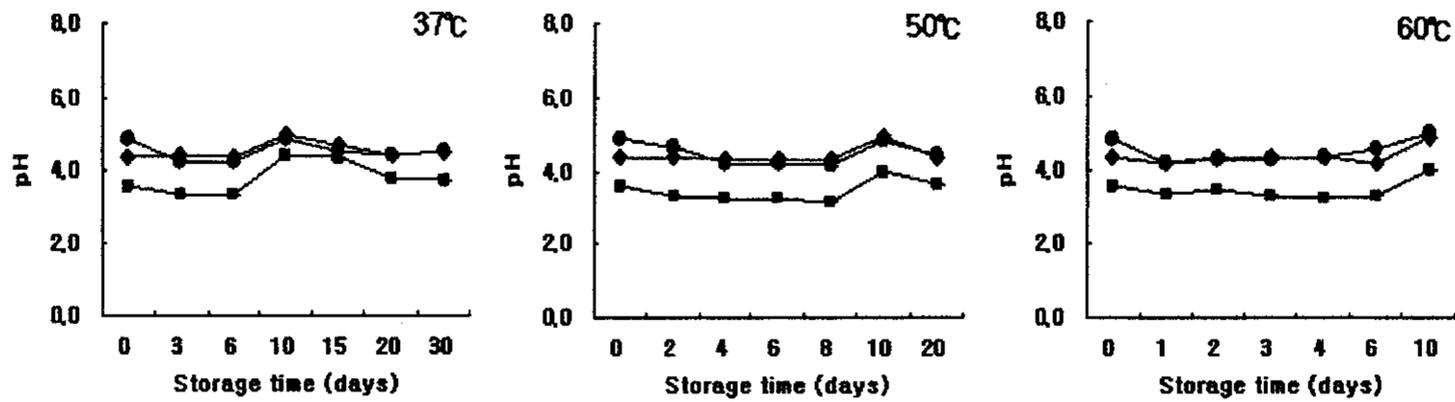


Figure 21. Changes in pH of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C. (-■- : Control, -◆-: beverages with *Cirsium japonicum* extracts, -●-: beverages with *Elsholtzia splendens* extracts)

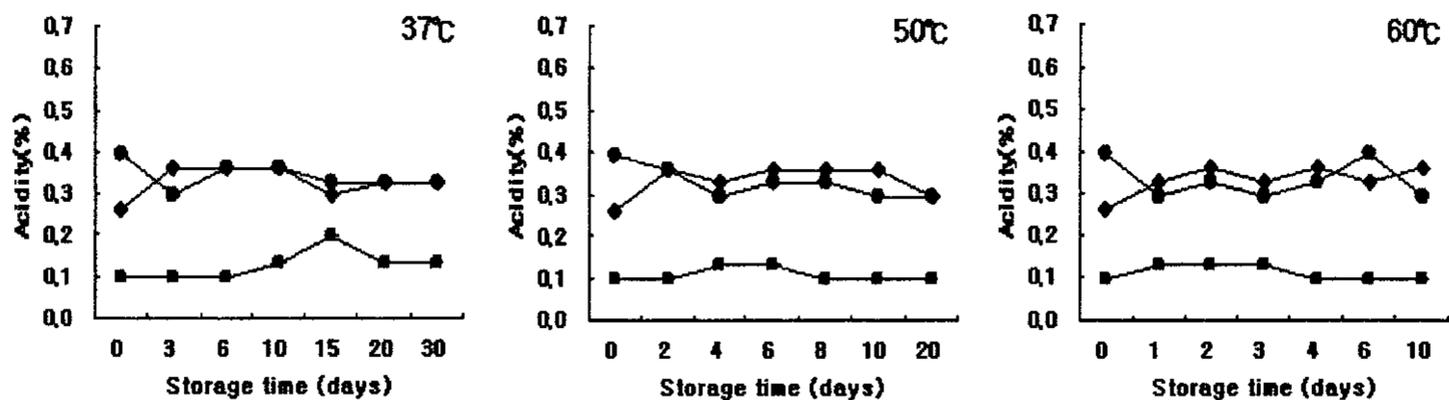


Figure 22. Changes in acidity of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C. (-■- : Control, -◆-: beverages with *Cirsium japonicum* extracts, -●-: beverages with *Elsholtzia splendens* extracts)

#### 다) 색도 측정

시료의 색도는 Chroma meter CT-310(Minolta camera Co., Japan)을 사용하여 측정하여 Hunter scale에 의해 L(lightness), a(redness), b(yellowness), ΔE(total color difference) 값으로 나타내었으며, ΔE는 저장 초기 시료의 L, a, b 값을 기준으로 나타내었다. 저장기간 중 색도의 변화를 Table 14에 나타내었으며, 저장기간 중의 변화는 크지 않은 것으로 나타났다.

Table 14. Sensory evaluation of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C

Storage time (days)	at 37°C	0	3	6	10	15	20	30
Control	L	70.40	72.55	71.74	72.97	73.71	73.85	73.95
	A	1.50	1.34	1.73	1.63	0.19	0.19	0.20
	B	3.09	2.45	2.37	2.84	2.08	2.36	2.43
	E	69.57	72.61	72.02	71.91	73.71	73.85	73.90
<i>Cirsium japonicum</i> extract	L	70.56	72.26	72.09	72.20	73.06	72.86	72.72
	A	0.53	0.78	0.62	0.65	0.43	0.52	0.67
	B	2.69	2.84	2.33	3.31	2.09	1.79	1.86
	E	69.79	72.33	72.13	72.28	73.06	72.86	73.90
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	L	70.66	71.77	70.64	70.56	71.56	71.29	72.01
	A	0.17	0.19	0.26	0.22	0.26	0.20	0.22
	B	2.61	2.27	2.25	1.96	2.19	2.27	2.21
	E	70.76	71.80	71.35	72.08	71.57	71.33	71.39

Storage time (days)	at 50°C	0	2	4	6	8	10	20
Control	L	70.40	71.65	72.01	71.69	72.70	72.73	73.59
	A	1.50	1.48	1.23	1.68	1.59	1.65	1.47
	B	3.09	3.28	2.56	2.87	2.71	2.79	2.89
	E	69.57	71.78	72.04	71.75	72.74	71.94	73.59
<i>Cirsium japonicum</i> extract	L	70.56	70.58	71.37	72.57	70.90	71.78	72.45
	A	0.53	0.67	0.36	0.43	0.82	1.46	0.05
	B	2.69	3.13	2.67	3.13	2.71	3.89	3.01
	E	69.79	70.71	71.34	73.33	70.91	71.90	72.46
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	L	70.66	71.90	72.56	71.39	71.63	71.64	71.45
	A	0.17	0.29	0.19	0.18	0.16	0.22	0.23
	B	2.61	2.22	2.46	2.41	2.24	2.81	2.52
	E	70.76	71.94	72.61	70.99	70.88	70.56	71.50

Storage time (days)	at 60°C	0	1	2	3	4	6	10
Control	L	70.40	73.47	70.97	71.74	72.74	72.77	71.78
	A	1.50	1.87	1.70	1.77	1.54	1.21	1.35
	B	3.09	2.15	3.62	2.79	2.36	2.53	2.64
	E	69.57	73.52	70.75	71.63	72.71	72.80	72.42
<i>Cirsium japonicum</i> extract	L	70.56	72.20	71.94	72.61	72.31	72.56	72.80
	A	0.53	0.70	0.77	0.49	0.74	0.52	0.62
	B	2.69	2.04	2.60	2.80	2.19	2.02	2.50
	E	69.79	72.23	72.04	72.64	72.38	72.63	72.80
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	L	70.66	70.85	71.38	71.61	70.98	72.07	71.74
	A	0.17	0.27	0.31	0.25	0.22	0.27	0.26
	B	2.61	2.23	3.10	2.87	2.91	2.26	2.80
	E	70.76	70.89	71.45	71.90	71.00	72.16	71.08

라) 대장균균 측정

시료의 총대장균군(total Coliform)을 측정하기 위하여 대장균용 페트리 필름(Petrifilm Coliform Count Plates, 3M<sup>TM</sup>, Korea)을 사용하였다. 음료시료 1 ml을 필름에 수직으로 접종하고 상부필름을 기포가 생기지 않도록 덮은 후 누름판으로 누른다. 30~60초 후에 겔화가 완료되면 37°C에서 24~48시간 배양해 필름위에 형성된 붉은색 집락에 기포가 함께 붙어 있는 집락만을 측정한다. 저장기간 중 대장균군의 변화는 Table 15와 같다. 저장기간 중 대장균군은 전혀 검출되지 않았으며, 저장실험이 완료될 때 까지 음성이었음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 시료의 살균이 적절하였으며, 모든 제조과정이 무균적으로 수행되었음을 의미한다.

Table 15. Changes in total Coliform of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C

Storage time (days) at 37°C	0	3	6	10	15	20	30
Control	ND <sup>1)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Cirsium japonicum</i> extract	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

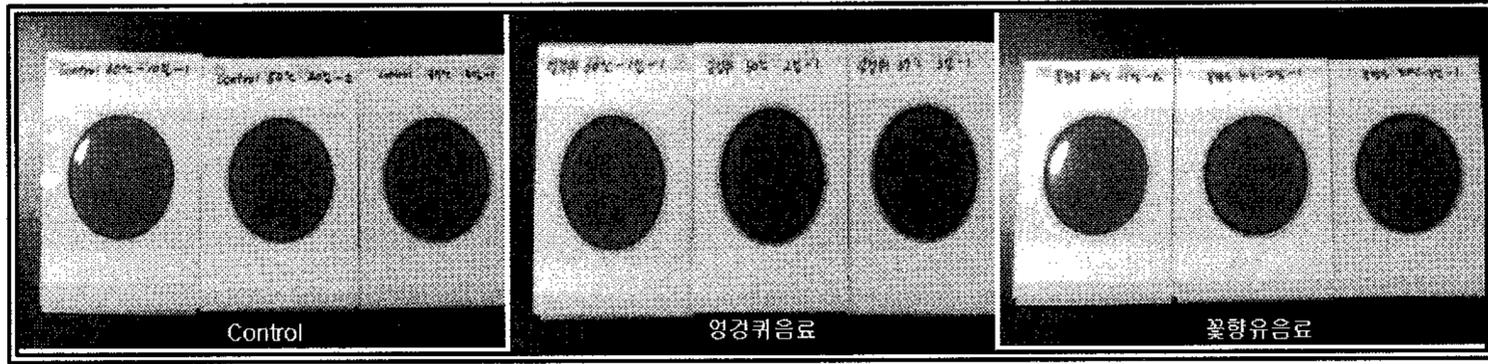
  

Storage time (days) at 50°C	0	2	4	6	8	10	20
Control	ND						
<i>Cirsium japonicum</i> extract	ND						
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	ND						

Storage time (days) at 60°C	0	1	2	3	4	6	10
Control	ND						
<i>Cirsium japonicum</i> extract	ND						
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	ND						

<sup>1)</sup> ND means 'not detected'.



#### 마) 관능검사

관능검사는 관능검사 요원 선별검사를 실시하여 선정된 10명을 대상으로 실시하였다. 표준시료를 대조구로 하여 다른 온도에서 보관한 시료와 색상, 향미, 맛, 전반적인 기호도 등을 9점 기호척도법으로 평가하였다. 영정귀 추출물을 배합조건에 따라 배합한 음료를 온도별 저장기간 중의 관능평가 결과를 종합적으로 분석한 Table 16에 나타난 결과와 같으며, control과 비교하였을 때 향미, 맛, 전반적인 선호도가 조금 높은 것으로 나타나, 음료로 개발하였을 때 가치가 있을 것으로 사료되어진다.

Table 16. Sensory evaluation of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts

	Control	<i>Cirsium japonicum</i> extract	<i>Elsholtzia splendens</i> extract
Color	7.25±0.83	7.13±0.68	7.12±0.73
Flavor	6.10±0.71	6.78±0.68	6.70±0.66
Taste	6.67±0.57	7.25±0.68	7.05±0.62
Overall acceptability	6.58±0.63	7.22±0.62	7.08±0.73

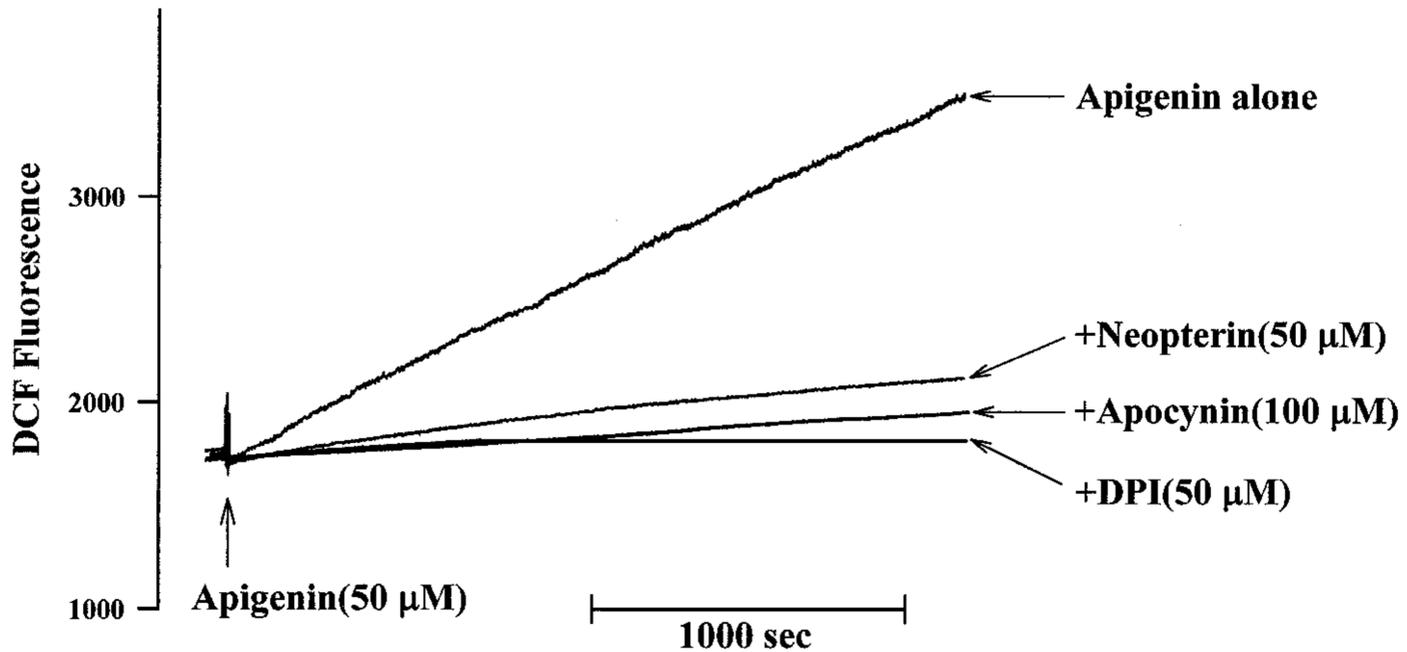
영정귀 병음료를 온도별로 저장하면서 당도, pH, 산도, 색도, 대장균군 및 관능검사를 통한 품질 변화를 측정된 결과, 37℃에서 30일간, 50℃에서 20일간, 60℃에서 10일간 병음료의 품질이 유지됨을 확인하였다.

### 3. 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 검색(영정귀)

가. 영정귀의 주요성분인 apigenin에 의한 세포내 활성산소종의 변화 및 그 기전

1) 실험목적: 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 apigenin에 의한 세포내 활성산소종의 변화를 관찰하고 그 발생기전을 탐구하였다.

2) 실험결과:



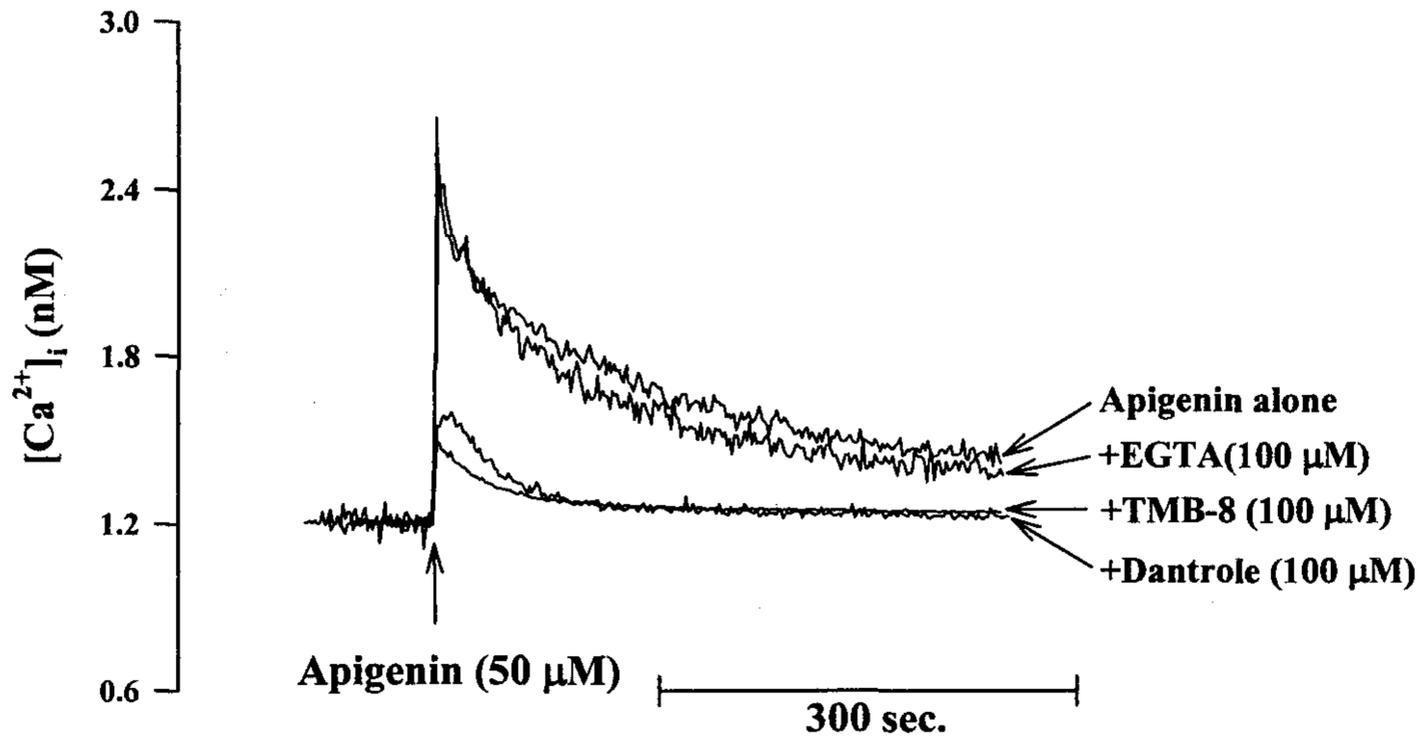
가) IMR-32 세포에서 엉겅퀴의 flavonoid 성분인 apigenin은 예상과는 달리 세포내 활성산소종의 증가를 초래하였다.

나) Apigenin에 의한 세포내 활성산소종의 증가는 세포막 NADPH oxidase 억제제인 DPI, apocynin 및 neopterin에 의해 현저히 억제되었다.

3) 실험의의 : 본 실험 결과로써 엉겅퀴 성분인 apigenin은 신경세포에서 세포 기능에 중요한 역할을 한다고 알려진 활성산소종의 발생을 증가시킴을 알 수 있었으며 이것은 세포막 NADPH oxidase의 활성화에 의해 유도되는 것으로 사료된다. 향후 이러한 작용이 신경세포의 생리적 기능(예를 들면 전기신호의 발생 및 전달)에 미치는 영향을 관찰함으로써 인체 기능의 조절에 미치는 엉겅퀴의 작용을 밝히고자 하였다.

나. Apigenin에 의한 세포내 칼슘농도의 증가 및 그 기전

1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 apigenin에 의한 세포내 칼슘농도의 변화를 관찰하고 그 기전을 탐구하였다.



2) 실험결과

가) IMR-32 세포에서 엉겅퀴의 flavonoid 성분인 apigenin은 세포내 칼슘농도의 증가를 초래하였다.

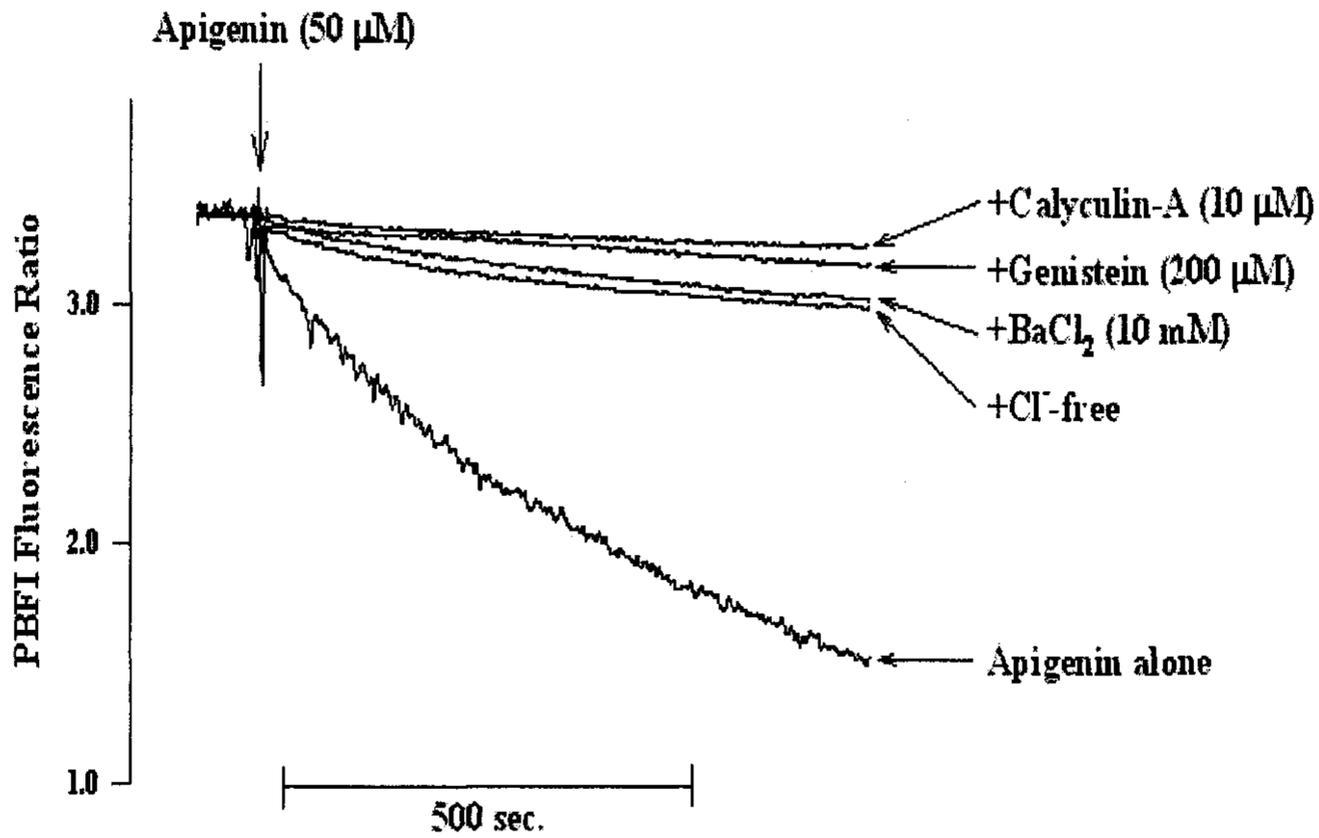
나) Apigenin에 의한 세포내 칼슘농도의 증가는 세포내로의 칼슘유입 억제효과를 나타내는 EGTA에 의해서는 변화가 없었으나 세포내 ER로부터 칼슘유리를 억제하는 dantrolene이나 TMB-8에 의해서는 유의성 있는 감소를 나타내었다.

3) 실험의의 : 본 실험 결과로써 엉겅퀴 성분인 apigenin은 신경세포에서 세포 기능에 중요한 역할을 한다고 알려진 세포내 칼슘농도를 증가시킨다는 사실을 알 수 있었으며 이것은 세포내 칼슘 저장소인 ER로부터 유리된 것으로 밝혀졌다. 향후 이러한 apigenin의 작용이 신경세포의 생리적 기능에 미치는 영향을 관찰함으로써 인체 기능의 조절에 미치는 엉겅퀴의 작용을 밝히고자 하였다.

다. Apigenin에 의한 세포내 칼슘농도의 변화 및 그 기전

1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 apigenin에 의한 세포내 칼륨농도의 변화를 관찰하고 그 기전을 탐구하였다.

2) 실험결과



가) IMR-32 세포에서 엉겅퀴의 flavonoid 성분인 apigenin은 세포내 칼륨농도의 감소를 초래하였다.

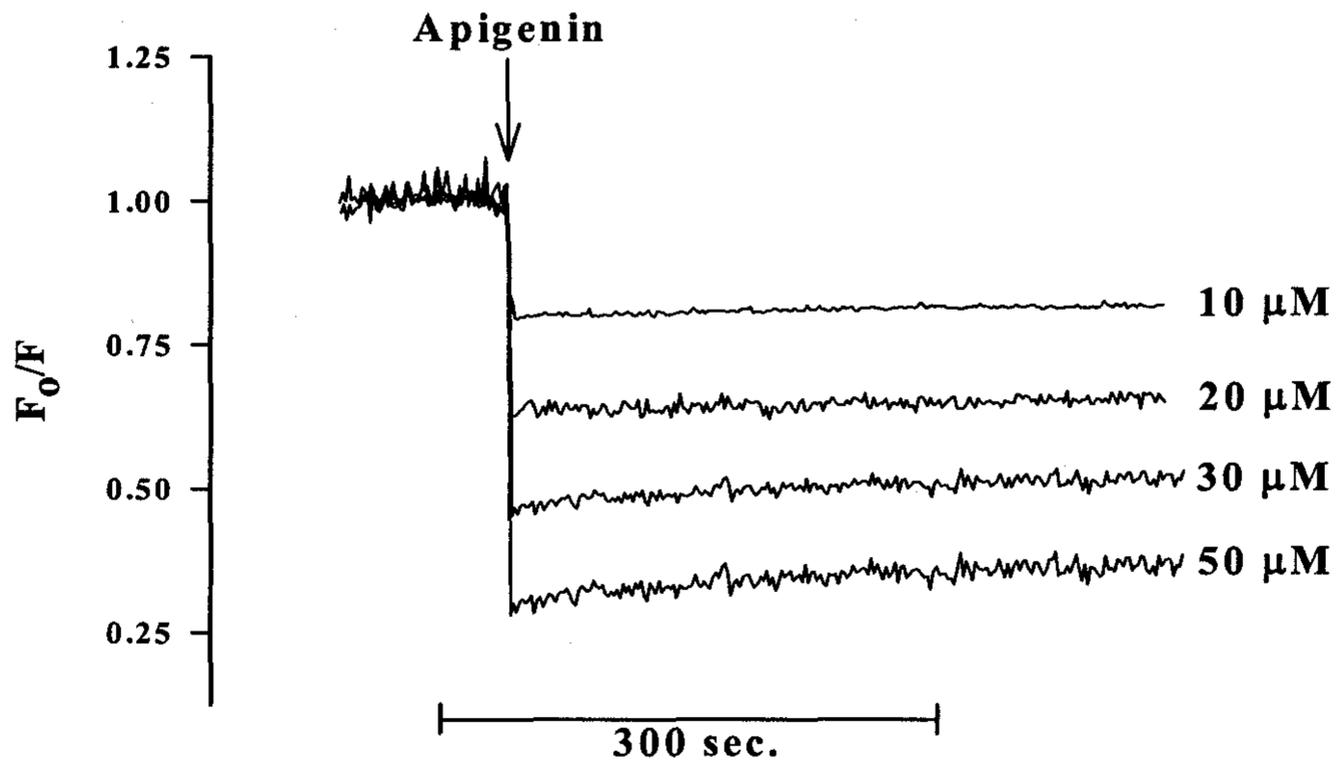
나)  $K^+$ - $Cl^-$ -cotransport(KCC) 억제제인 calyculin-A, genistein 및  $BaCl_2$ 는 apigenin에 의한 세포내 칼륨농도의 감소를 유의성 있게 저해하였다.

3) 실험의의 : 본 실험 결과는 엉겅퀴 성분인 apigenin은 신경세포에서 세포 기능에 중요한 역할을 한다고 알려진 세포내 칼륨농도를 감소시켰으며 이것은 세포막 KCC를 활성화시켜 유발하는 것으로 사료된다. 향후 이러한 apigenin의 작용이 신경세포의 생리적 기능에 미치는 영향을 관찰함으로써 인체 기능의 조절에 미치는 엉겅퀴의 작용을 밝히고자 하였다.

라. Apigenin에 의한 세포내 염소농도의 감소

1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 apigenin에 의한 세포내 염소농도의 변화를 관찰하고 그 기전을 탐구하였다.

2) 실험결과



가) IMR-32 세포에서 엉겅퀴의 flavonoid 성분인 apigenin은 세포내 염소농도의 감소를 초래하였다.

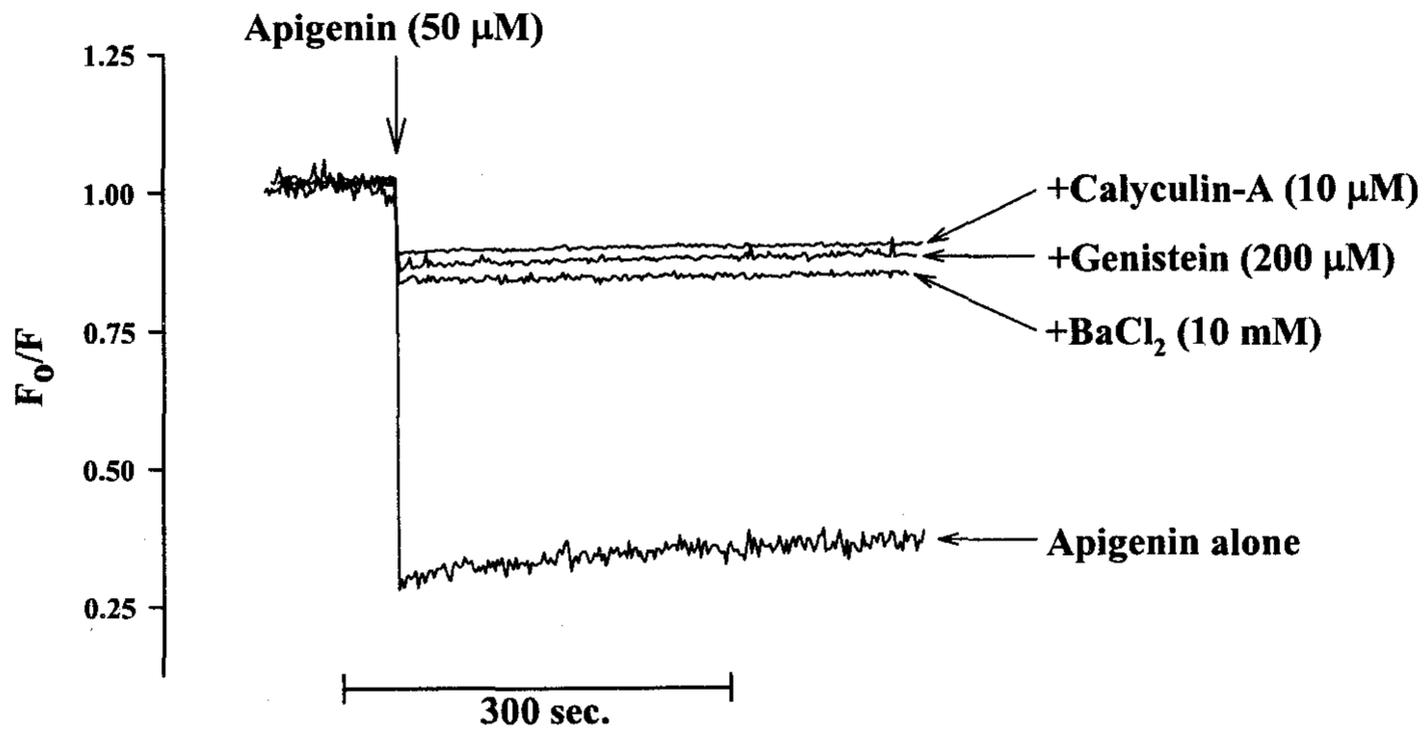
나) Apigenin에 의한 세포내 염소농도 감소 효과는 apigenin의 농도의존적으로 일어났다.

3) 실험의의 : 본 실험 결과는 엉겅퀴 성분인 apigenin은 신경세포에서 세포내 염소농도를 농도의존적으로 감소시킨다는 사실을 나타내며 이 작용의 기전을 알아보기 위해 다음 실험을 진행하였다.

마. Apigenin에 의한 세포내 염소농도의 감소기전

1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 apigenin에 의한 세포내 염소농도의 감소기전을 탐구하였다.

## 2) 실험결과



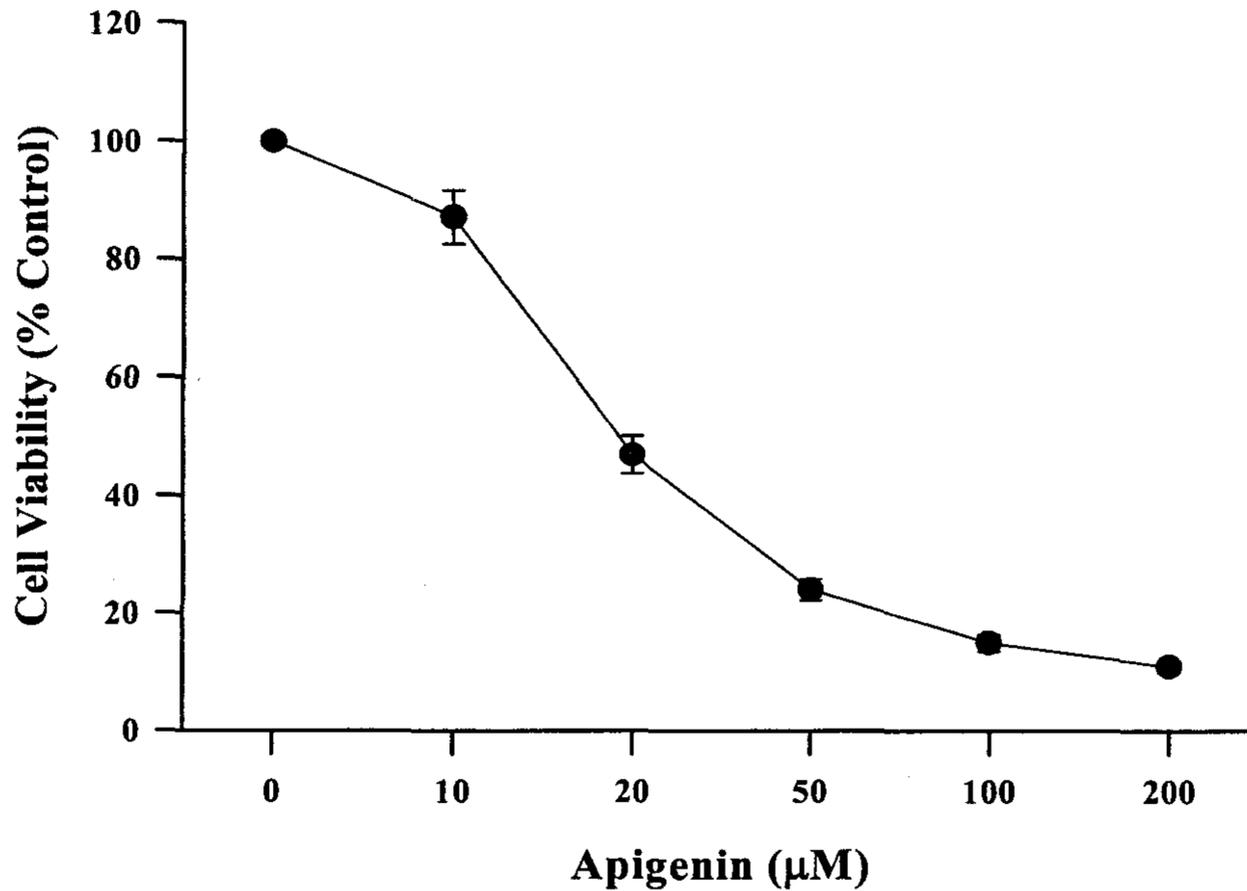
가) IMR-32 세포에서 apigenin에 의한 세포내 염소농도의 감소는  $K^+Cl^-$ -cotransport(KCC) 억제제인 calyculin-A, genistein 및  $BaCl_2$ 에 의해 현저히 반전되었다.

3) 실험의의 : 본 실험 결과로써 엉겅퀴 성분인 apigenin은 신경세포에서 세포내 염소농도를 농도 의존적으로 감소시켰으며 이 작용은 세포막 KCC를 활성화시킴으로써 유발하는 것으로 사료된다. 향후 이러한 apigenin의 작용이 신경세포의 생리적 기능에 미치는 영향을 관찰함으로써 인체 기능의 조절에 미치는 엉겅퀴의 작용을 밝히고자 하였다.

바. Apigenin에 의한 암세포 독성작용

1) 실험목적 : 사람 간암세포(HepG2 human hepatoma)에서 apigenin에 의한 세포 독성을 관찰하였다.

## 2) 실험결과



가) HepG2 사람 간암세포에서 apigenin은 농도의존적으로 세포독성을 나타냄.

3) 실험의의 : 본 실험 결과로써 엉겅퀴 성분인 apigenin은 간암세포에 대하여 세포독성을 나타낸다는 사실을 입증하였고 이 작용은 엉겅퀴가 항암작용을 가지고 있다는 사실을 나타내는 것으로 이를 확실히 하기 위해선 향후 보다 구체적이고 체계적인 추가 실험이 필요하다고 판단된다.

## 4. 향유속 식물의 flavonoids 분석조건 확립

가. 총플라보노이드 함량 분석

### 1) 향유(*Elsholtzia ciliat*)

가) 재배지역별 : 광주, 화천, 춘천 순 이였으나 유의차는 없었다( $p < 0.05$ ).

나) 건조방법별 : 음건, 동결건조, 오븐건조를 이용하여 건조방법별 총플라보노이드 함량을 비교 분석한 결과 본 연구에서 시행한 건조방법별 총플라보노이드 함량의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 없었다.

다) 부위별 : 향유의 부위별 총플라보노이드 함량은 지역별로 조금 차이는 있으나 대체로 잎, 꽃, 줄기, 뿌리 순이었으며 잎과 꽃은 줄기와 뿌리에 비해 유의적으로 많은 함량을 보이고 있다( $p < 0.05$ ).

## 2) 꽃향유(*Elsholtzia splendens*)

가) 재배지역별 : 광주, 화천, 춘천 순이었으나 유의차는 없었다( $p < 0.05$ ).

나) 건조방법별 : 음건, 동결건조, 오븐건조를 이용하여 건조방법별 total flavonoid 함량을 비교 분석한 결과 본 연구에서 시행한 건조방법별 total flavonoid 함량의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 없었다.

다) 부위별 : 꽃향유의 부위별 total flavonoid 함량은 꽃, 잎, 줄기, 뿌리순이었으며 잎과 꽃은 줄기와 뿌리에 비해 유의적으로 많은 함량을 보이고 있다( $p < 0.05$ ).

### (1) Total flavonoid 함량 분석

Total flavonoid 함량을 향유와 꽃향유 시료의 재배지역별, 건조방법별, 시료부위별로 70종의 시료를 분석한 결과 건조방법별 total flavonoid 함량의 큰 차이는 보이지 않았고, 꽃과 잎, 뿌리, 줄기의 부위별 total flavonoid 함량을 비교 분석한 결과 향유와 꽃향유 모두 다른 부위보다 잎과 꽃에서 total flavonoid 함량이 비교적 높은 수치로 확인되었다.

### (2) 재배지역별 flavonoid 함량 분석

향유(Table 17) / 꽃향유(Table 18)의 재배지역별 total flavonoid 함량을 비교분석하였다. 그 결과 광주, 화천, 춘천 순이었으나 유의차는 보이지 않았다( $p < 0.05$ ).

### (3) 부위별 flavonoid 함량 분석

향유(Table 17) / 꽃향유(Table 18)의 부위별 total flavonoid 함량을 비교분석하였다. 그 결과 꽃과 잎에서 추출된 시료가 다른 부위보다 높은 양의 total flavonoid 함량을 보이고 있다.

### (4) 건조방법별 flavonoids 분석

음건, 동결건조, 오븐건조를 이용하여 건조방법별 total flavonoid의 함량을 비교 분석한 결과 본 연구에서 시행한 건조방법별 total flavonoid 함량의 큰 차이는 없었다(Table 17,18).

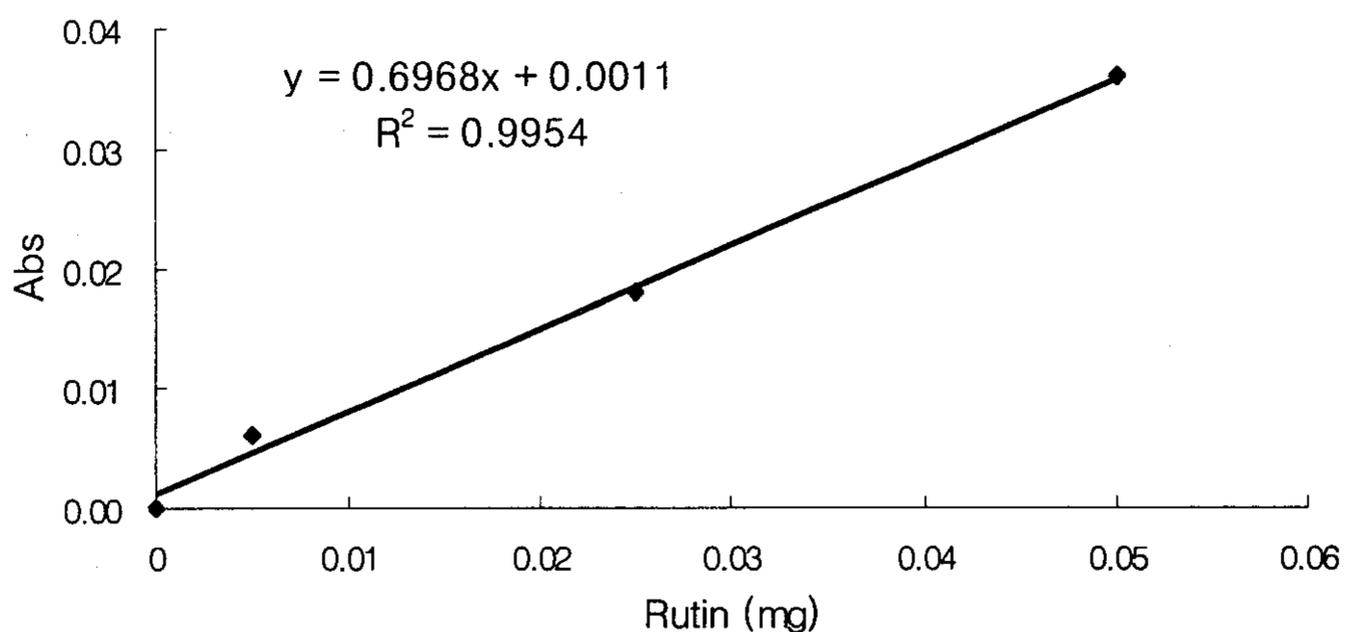


Figure 23. Calibration curve of rutin.

Table 17. Total flavonoid content in different sections of *Elsholtzia ciliat*

		Total flavonoid content (mg/g)		
		Hwacheon	Kwangju	Chuncheon
Flower	Air dry	1.18	1.92	1.14
	Oven dry	1.06	1.93	1.14
	Freezing dry	0.89	1.83	1.23
Leaf	Air dry	0.72	2.45	1.14
	Oven dry	0.61	2.38	1.15
	Freezing dry	0.83	2.24	1.55
Stem	Air dry	0.22	0.44	0.25
	Oven dry	0.27	0.40	0.27
	Freezing dry	0.28	0.34	0.27
Root	Air dry	0.20	0.37	0.22
	Oven dry	0.21	0.34	0.21
	Freezing dry	0.25	0.19	0.20

Table 18. Total flavonoid content in different sections of *Elsholtzia splendens*

		Total flavonoid content (mg/g)		
		Hwacheon	Kwangju	Chuncheon
Flower	Air dry	1.42	2.35	0.71
	Oven dry	1.36	2.39	0.91
	Freezing dry	1.01	2.52	1.02
Leaf	Air dry	0.87	2.14	0.72
	Oven dry	1.13	1.79	0.79
	Freezing dry	0.96	1.99	0.85
Stem	Air dry	0.28	0.56	0.20
	Oven dry	0.30	0.47	0.25
	Freezing dry	0.32	0.46	0.28
Root	Air dry	0.23	-	0.20
	Oven dry	0.28	-	0.21
	Freezing dry	0.23	0.32	0.20

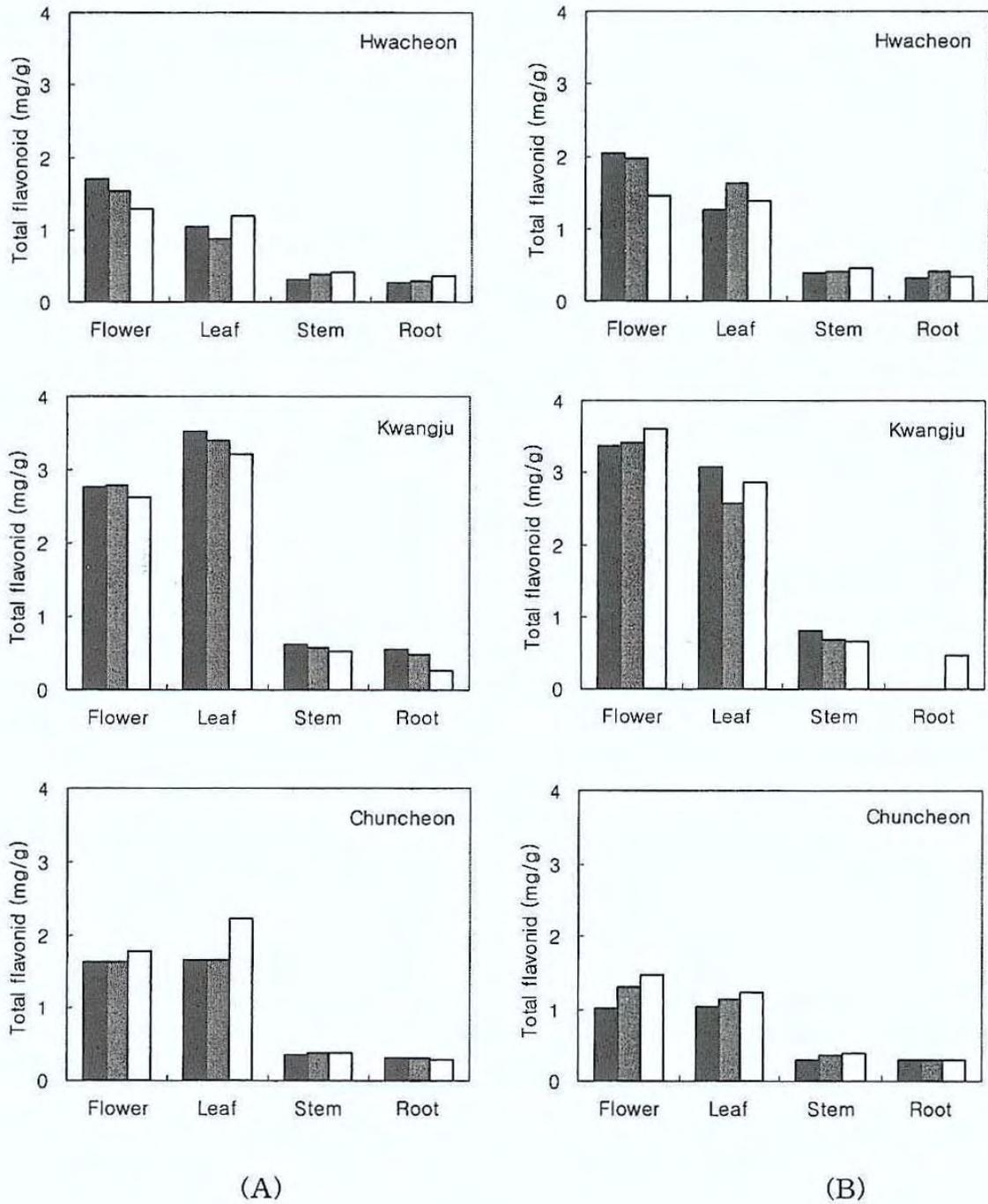


Figure 24. Total flavonoid content in different sections of (A) *Elsholtzia ciliat* / (B) *Elsholtzia splendens*. ■, Air dry; ▒, Oven dry; □, Freezing dry.

나. HPLC를 이용한 flavonoids 중 apigenin 함량 분석

LC/MS 분석 결과(Fig. 25) 꽃향유에서 rutin, quercetin, apigenin 등의 flavonoids가 있는 것을 확인하였다. 그 중 apigenin의 함량을 알아보기 위해 HPLC를 이용하여 Table 19의 조건으로 분석 하였다.

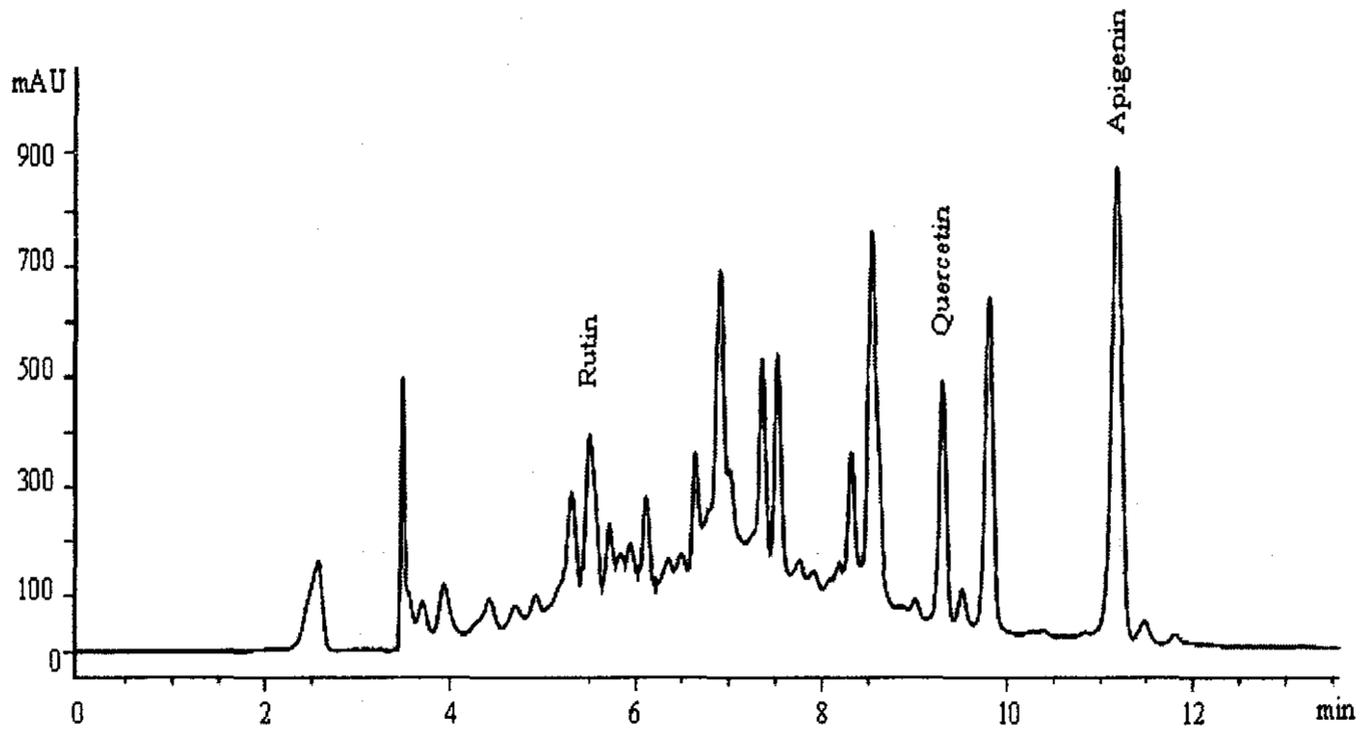


Figure 25. Chromatogram of *Elsholtzia splendens*.

Table 19. Analytical conditions of HPLC for apigenin

Instrument	Condition
HPLC	Waters Associates Model 51
Column	Luna 5u Phenyl-Hexyl 150 x 4.6 mm
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in Water B: 0.1% Formic acid in Acetonitrile
Gradient	20% B - 50% B in 15 minute
Detector	UV 345 nm
Flow rate	1 ml/min
Injection volume	10 $\mu$ l

1) 향유(*Elsholtzia ciliat*)

가) 재배지역별 : 광주의 향유는 화천, 춘천에 비해 높은 apigenin 함량을 보이고 있다( $p < 0.05$ ).

나) 건조방법별 : 음건, 동결건조, 오븐건조를 이용하여 건조방법별 apigenin 함량을 비교 분석한 결과 본 연구에서 시행한 건조방법별 apigenin 함량의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 없었다.

다) 부위별 : 향유의 부위별 apigenin 함량은 지역별로 차이가 있었다. 화천과 춘천지역은 잎, 꽃, 줄기, 뿌리 순이었으나 광주지역의 향유는 꽃에서 월등히 높은 apigenin 함량을 나타내고 있고 잎, 줄기, 뿌리는 비슷한 함량을 보이고 있다 ( $p < 0.05$ ).

2) 꽃향유(*Elsholtzia splendens*)

가) 재배지역별 : 춘천, 광주, 화천 순이었으나 유의차는 없었다( $p < 0.05$ ).

나) 건조방법별 : 음건, 동결건조, 오븐건조를 이용하여 건조방법별 apigenin 함량을 비교분석한 결과 본 연구에서 시행한 건조방법별 apigenin 함량의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 없었다.

다) 부위별 : 꽃향유의 부위별 apigenin 함량은 꽃, 잎, 줄기, 뿌리 순이었으며 꽃이 다른 부위에 비해 유의적으로 높은 함량을 보이고 있다( $p < 0.05$ ).

(1) HPLC를 이용한 엉겅퀴내 Flavonoids 함량 분석

예비실험결과 향유 속의 Flavonoid 성분 중 apigenin 성분이 많이 함유되었음을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 apigenin 성분을 대조군으로 하여 향유 및 꽃향유 추출물을 HPLC를 이용하여 분석하였다. Apigenin 함량을 향유와 꽃향유 시료의 재배지역별, 건조방법별, 시료부위별로 70종의 시료를 분석한 결과 건조방법별 apigenin 함량의 큰 차이는 보이지 않았고, 꽃과 잎, 뿌리, 줄기의 부위별 apigenin 함량을 비교 분석한 결과 광주지역의 향유와 화천, 광주, 춘천 지역의 꽃향유의 꽃에서 apigenin 함량이 비교적 높은 수치로 확인되었다.

(2) 재배지역별 flavonoid 함량 분석

Table 19의 분석조건으로 향유(Table 20)/꽃향유(Table 21)의 재배지역별 apigenin 함량을 비교분석하였다. 그 결과 광주지역에서 수집된 시료에서 다른 지역보다 높은 양의 apigenin이 검출되었다.

(3) 부위별 flavonoid 함량 분석

Table 19의 분석조건으로 향유(Table 20)/꽃향유(Table 21)의 부위별 apigenin 함량을 비교분석하였다. 그 결과 향유의 화천과 춘천 시료는 앞에서 apigenin 함량이 높았으며 꽃향유의 화천, 광주, 춘천, 향유의 광주 시료는 꽃에서 추출된 시료가 다른 부위보다 높은 양의 apigenin이 검출되었다.

(4) 건조방법별 flavonoids 분석

음건, 동결건조, 오븐건조를 이용하여 향유(Table 20)/꽃향유(Table 21)의 건조방법별 apigenin의 함량을 비교 분석한 결과 본 연구에서 시행한 건조방법별 apigenin 함량의 큰 차이는 없었다.

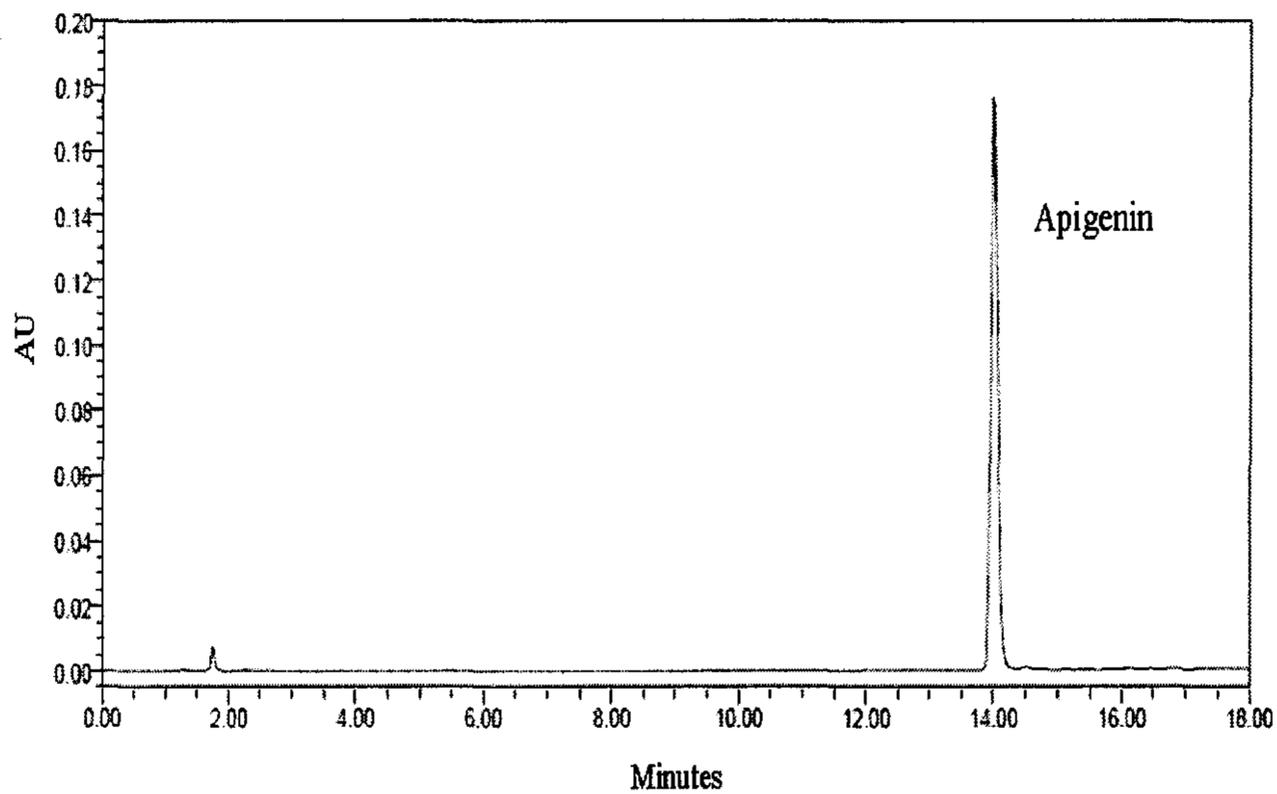


Figure 26. Chromatogram of apigenin.

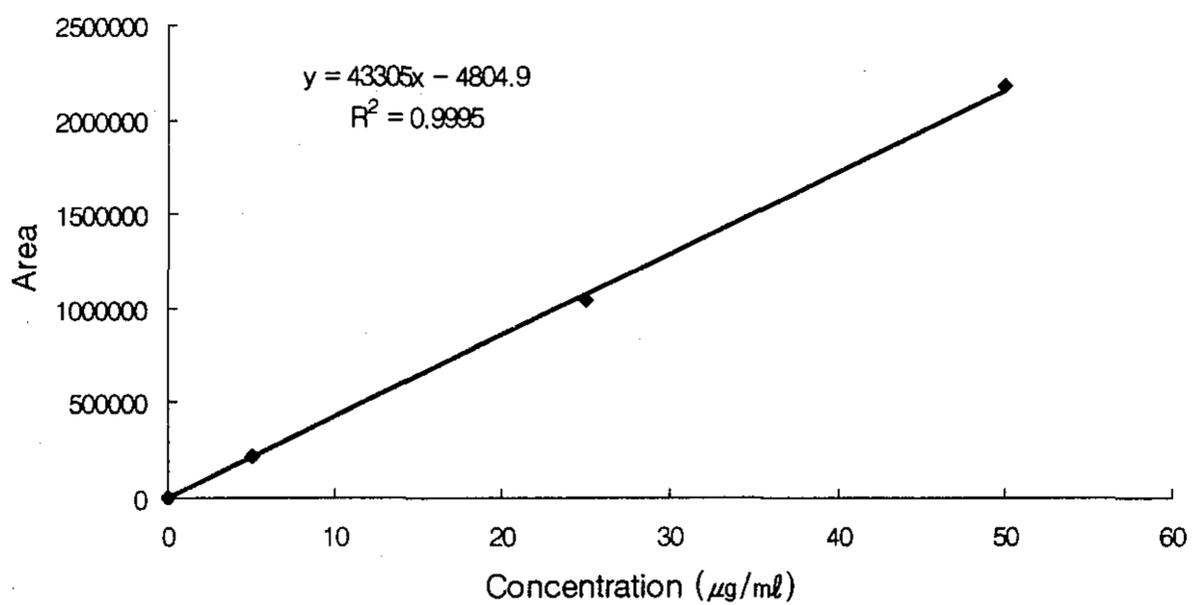


Figure 27. Calibration curve of apigenin.

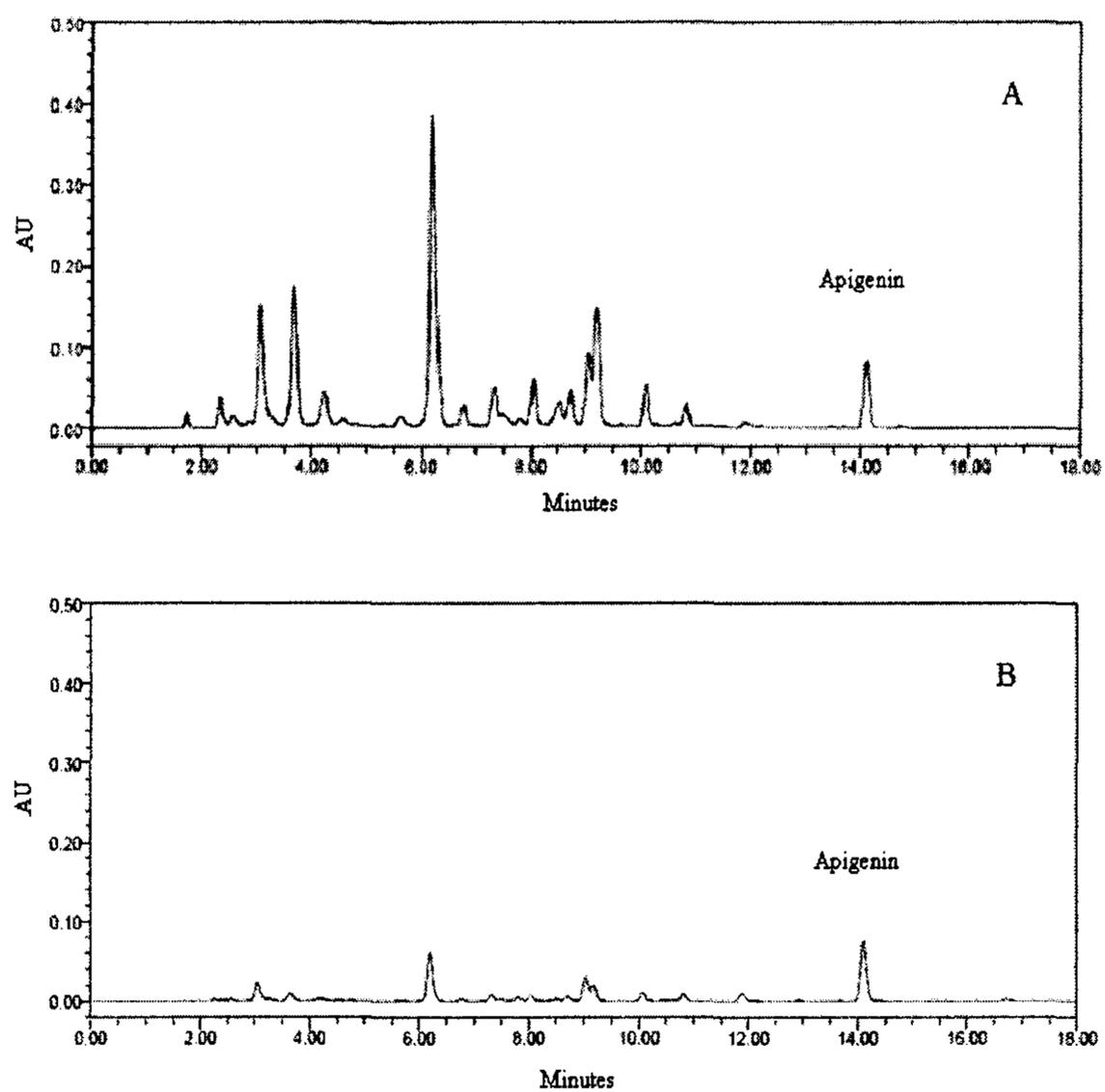


Figure 28. Chromatogram of spiked apigenin in (A) *Elsholtzia ciliat* / (B) *Elsholtzia splendens*(Kwangju FD-F).

Table 20. HPLC analysis of *Elsholtzia ciliat* extracted with 80% methanol

		Apigenin content ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Hwacheon	Kwangju	Chuncheon
Flower	Air dry	0.35±0.04 <sup>1)</sup>	18.67±0.45	0.27±0.04
	Oven dry	0.49±0.03	13.61±0.34	0.22±0.02
	Freezing dry	0.31±0.03	11.17±3.03	0.22±0.04
Leaf	Air dry	1.19±0.52	0.52±0.01	1.35±0.39
	Oven dry	1.89±0.45	0.41±0.16	1.40±0.26
	Freezing dry	2.27±0.15	0.33±0.17	1.38±0.15
Stem	Air dry	0.21±0.04	0.25±0.15	ND <sup>2)</sup>
	Oven dry	0.24±0.03	0.28±0.05	0.15±0.01
	Freezing dry	0.17±0.01	ND	0.22±0.07
Root	Air dry	0.32±0.04	0.23±0.01	ND
	Oven dry	0.29±0.02	0.21±0.01	ND
	Freezing dry	0.34±0.10	ND	0.30±0.08

<sup>1)</sup>Mean±standard deviation (n=3).

<sup>2)</sup>ND : not detected.

Table 21. HPLC analysis of *Elsholtzia splendens* extracted with 80% methanol

		Apigenin ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		Hwacheon	Kwangju	Chuncheon
Flower	Air dry	11.19±1.50 <sup>1)</sup>	12.11±0.19	11.97±1.56
	Oven dry	9.05±1.28	5.15±1.91	16.34±1.93
	Freezing dry	5.51±0.75	18.02±6.94	7.460±0.70
Leaf	Air dry	1.44±0.09	0.48±0.03	2.15±0.16
	Oven dry	0.39±0.05	0.55±0.01	2.34±0.35
	Freezing dry	1.62±0.02	1.35±0.12	5.02±0.51
Stem	Air dry	0.22±0.15	0.37±0.01	0.45±0.03
	Oven dry	0.26±0.05	0.23±0.01	0.43±0.17
	Freezing dry	0.19±0.02	0.44±0.03	0.26±0.01
Root	Air dry	0.28±0.05	-	0.21±0.02
	Oven dry	0.28±0.04	-	0.18±0.01
	Freezing dry	0.64±0.15	0.21±0.01	0.27±0.02

<sup>1)</sup>Mean±standard deviation (n=3).

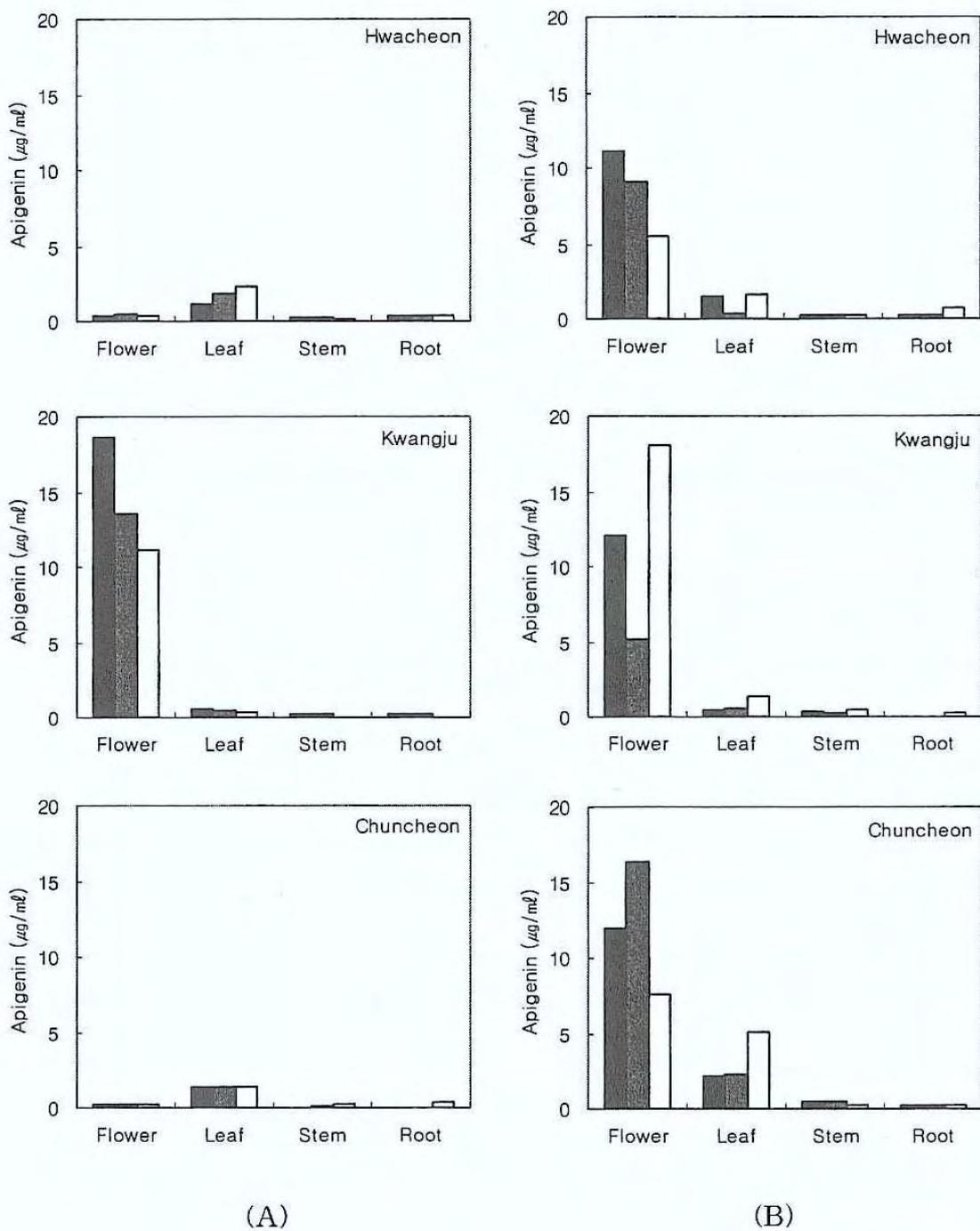


Figure 29. HPLC analysis of (A) *Elsholtzia ciliat* / (B) *Elsholtzia splendens* extracted with 80% methanol. ■, Air dry; ▒, Oven dry; □, Freezing dry.

## 5. 향유속 식물 및 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구

### 가. 향유속 식물의 꽃, 잎, 꽃 및 잎을 이용한 차, 음료개발을 위한 최적 추출조건 분석

향유속 식물은 동결건조한 후, 유효성분을 얻기 위하여 추출하였으며, 추출물의 특성을 전문관능 검사자가 묘사한 결과는 Table 22와 같다. 꽃향유와 향유 추출물의 맛과 향기는 두 가지 식물에서 동일하게 쓴맛 및 쓴향기, 나무향기로 평가되었다. 강원도 화천에서 채집한 꽃향유와 춘천에서 수집한 향유를 꽃 및 잎으로 분류하여 추출한 결과는 다음과 같다(Fig. 30~32). 향유의 꽃 5%를 80℃에서 추출하였을 때, 추출물의 brix가 가장 높았다. 꽃향유의 경우는 60℃ 및 98℃에서는 농도와 시간에 따른 추출물의 brix 차이는 나타나지 않았다. 꽃향유의 꽃과 잎의 5%는 추출시간에 따른 추출물 중량에 차이가 없었으며, 향유의 꽃 5%에서도 추출온도에 따른 추출물의 중량 차이는 없었다. 추출물의 pH는 꽃향유 5% 및 향유 5%에서 추출시간 및 추출온도에 따른 변이가 없었다. 또한 추출물의 UV 흡광도는 농도 및 추출 시간에 따라 일정한 수치를 보였으므로 논의에서 제외하였다. 따라서 기능성 식품에 첨가할 꽃향유 및 향유의 추출 최적 조건에서 추출 시간에 따른 변이가 크게 나타나지 않았으므로 추출시간은 1시간으로 정할 수 있다. 추출물의 중량, pH 결과에 따르면 5% 농도에서는 온도에 따른 변이가 크게 영향하지 않았다. 따라서 지나친 온도 상승으로 인한 유효 물질의 소실을 우려하여 추출온도는 80℃로 정하였다. 꽃향유 및 향유는 5% 농도에서 80℃ 온도로 1시간 동안 추출하는 것이 가장 적절한 추출조건이라 할 수 있다.

Table 22. 전문관능검사자에 의한 향유속 식물 추출물의 특성 분석

		꽃향유의 관능 특성 표현		향유의 관능 특성 표현	
꽃, 잎 및 줄기의 추출물	향기	쓴 향기, 나무 향기		쓴 향기, 나무 향기	
	맛	쓴 맛		쓴맛	

Table 23. 전문관능검사자에 의한 꽃향유 정유의 향기 특성

		향기 특성 표현	
꽃향유 정유		꽃향유 향기, 꽃 향기, 소엽(배초향 향기), 달콤한 향, 약한 들깻잎 향	

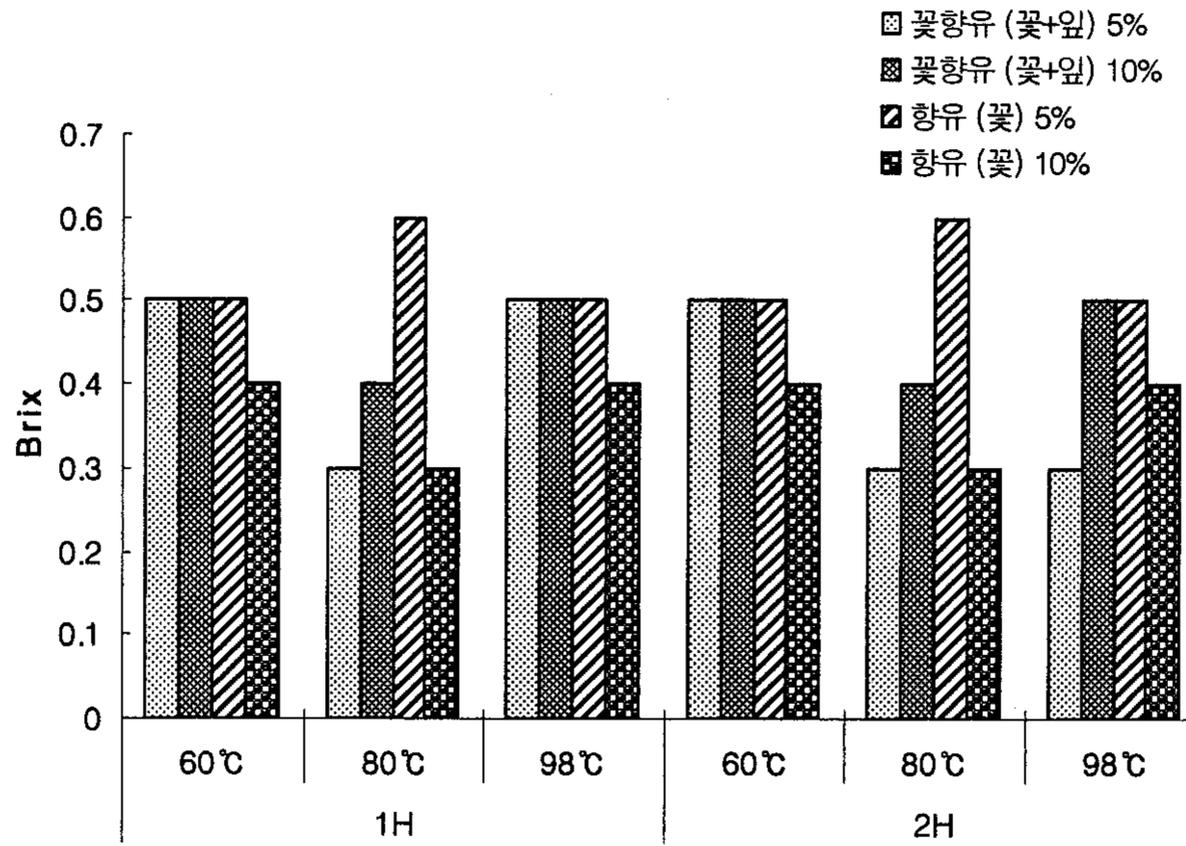


Figure 30. 향유속 식물 추출물의 추출조건에 따른 Brix 변화.

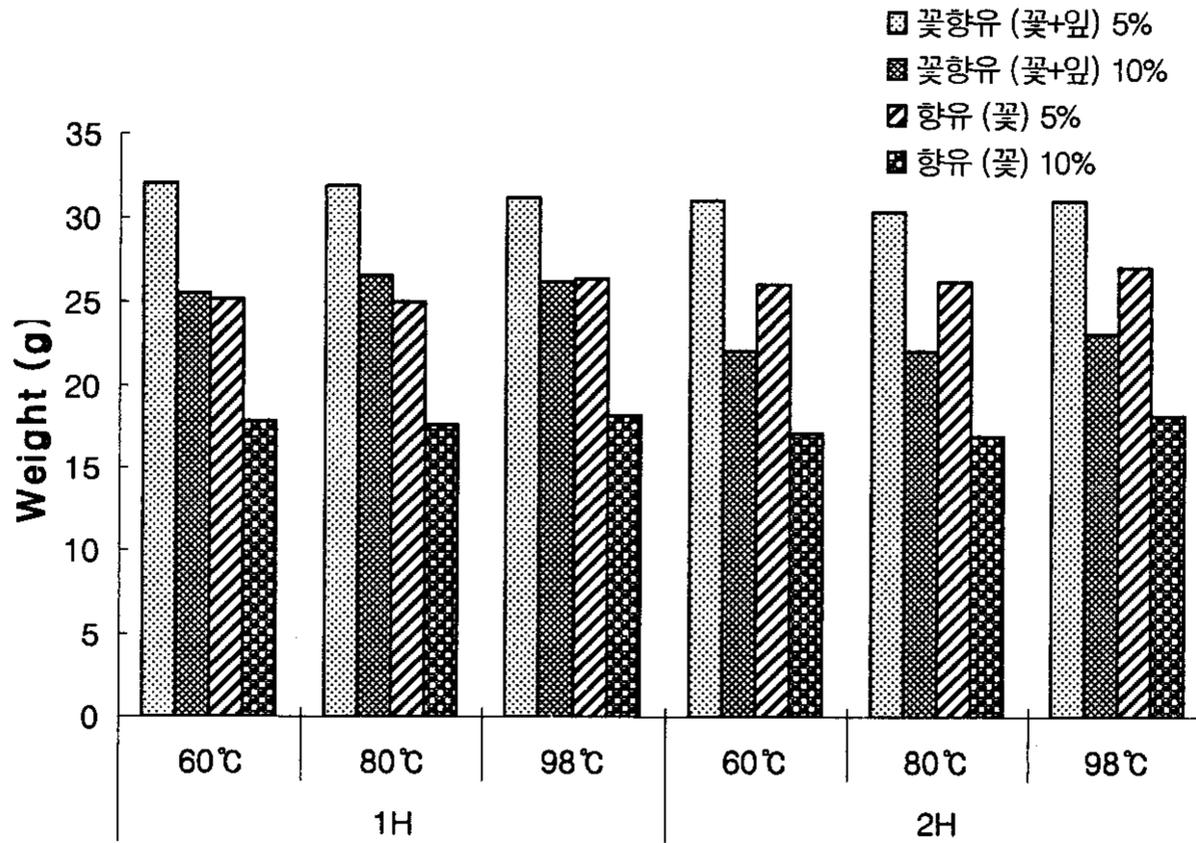


Figure 31. 향유속 식물 추출물의 추출조건에 따른 중량 변화.

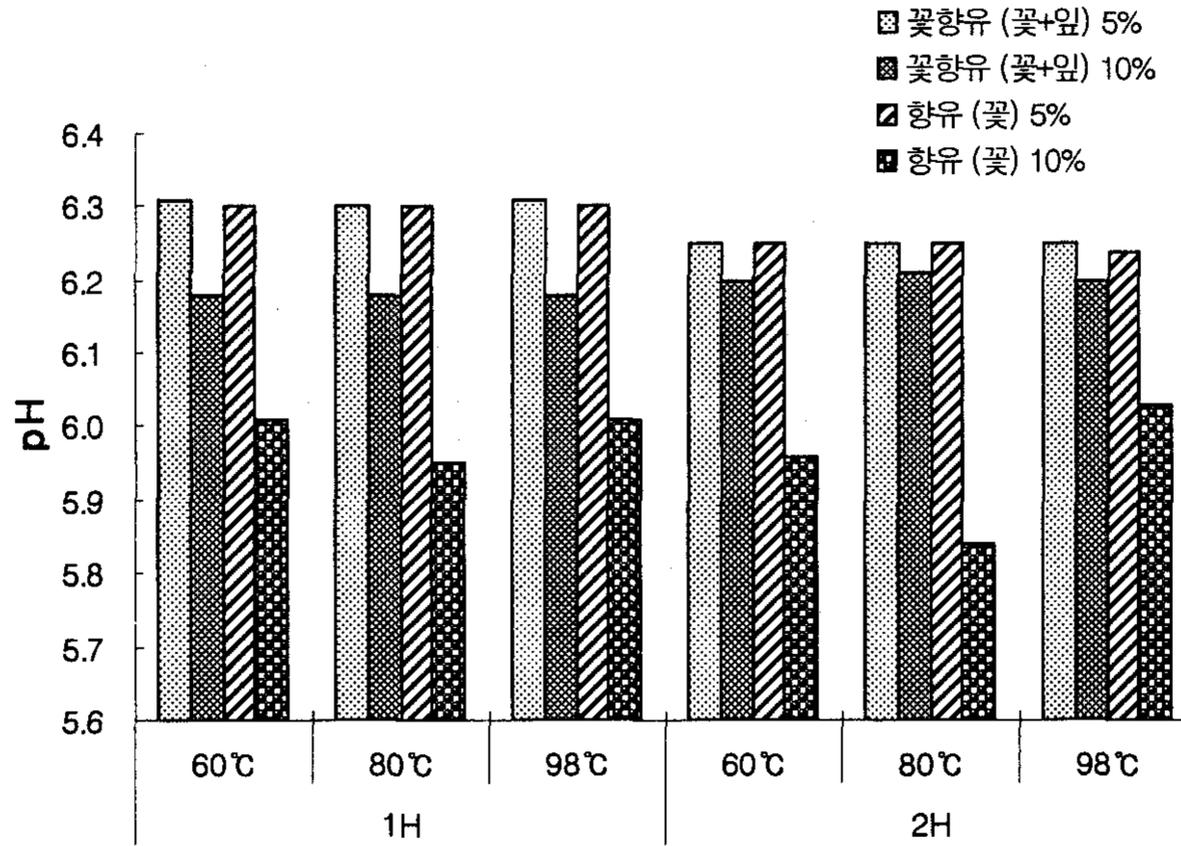


Figure 32. 향유속 식물 추출물의 추출조건에 따른 pH 변화.

#### 나. 꽃향유 정유추출 및 성분확인

본 연구의 다른 과제에서 향유속 식물의 flavonoids 함량 분석에서 향유보다 꽃향유에 apigenin 함량이 더 높았다. 향유속 식물은 향기가 우수하므로 그 향기성분의 확인은 매우 중요하다. 따라서 꽃향유에 관심을 가지고 향기 분석을 실시하였다. 동결건조한 꽃향유 꽃 200 g을 Clavenger-type apparatus에 넣고 2시간 동안 수증기증류한 후, 정유 0.1 mL를 얻었으며, 정유 추출효율은 0.05%로 우리나라 식물 가운데서 비교적 높은 수율이라고 할 수 있다. 꽃향유의 정유를 sniffing 하였을 때 감지되는 향의 특성은 꽃향유향기, 꽃향기, 배초향 등으로 묘사되었다 (Table 23). 정유를 GC-MSD(Agilent 5973N, Palo Alto, CA, USA)에 의하여 분석한 결과는 Table 24와 같다. 꽃향유 정유를 GC-MSD로 분석한 결과 총 27종의 휘발성 성분이 확인되었다. Hydrocarbon 11종(47.85 ppm), 1 종의 ester(1.41 ppm), 8 종의 alcohol(40.89 ppm), 4 종의 ketone(71.03 ppm), 1 종의 aldehyde (0.02 ppm) 및 기타 2종(1.0 ppm)이 나타났다. 이 가운데 estragol(36.77 ppm), limonene(30.20 ppm), nagingetone(63.7 ppm)이 주요성분으로 확인되었다.

Table 24. 동결건조 꽃향유 정유의 향기성분

RI <sup>D</sup>	Chemical class	Compounds	mg/kg of <i>Elsholtzia splendens</i>	
1065	Aldehydes	n-hexanal	0.01	
1202		trans-2-hexanal	3.21	
1462	Alcohols	2,4 heptadienal	0.23	
MS		1-octen-3-ol	1.59	
1331		1-hexanol	0.11	
1519		<i>l</i> -linalool	-	
MS		estragol	49.52	
1695		<i>l</i> -borneol	-	
MS		chavicol	3.08	
1920		1-dodecanol	I.S	
1960		methyl eugenol	1.72	
2009		nerolidol	-	
MS		globulol	-	
MS		viridiflorol	-	
2035		sphathulenol	0.69	
2178		trans-muurolol	-	
2125		trans-cadinol	-	
1007		Hydrocarbons	$\alpha$ -pinene	0.55
1050			camphene	1.14
1073			$\beta$ -pinene	-
1110			sabinene	0.26
1148			$\beta$ -myrcene	0.59
1165	$\beta$ -phellandene		0.77	
1188	limonene		38.25	
MS	$\alpha$ -copaene		-	
1444	$\gamma$ -elemene		2.86	
1517	$\beta$ -bourbonene		0.64	
MS	calamene		1.58	
1527	$\alpha$ -gurjunene		0.17	
MS	trans-caryophyllene		-	
1573	$\beta$ -elemene		2.86	
1585	$\beta$ -caryophyllene		1.23	
1627	aromadendrene		0.15	
1659	$\alpha$ -humulene		2.21	
1686	germacrene D		2.67	
1724	$\delta$ -cadiene		1.37	
1747	$\alpha$ -farnesene		1.45	
1135	Ketones	1-penten-3-one	-	
MS		champor	-	
1268		3-octanone	1.22	
MS		isopulegone	1.38	
MS		elsholtziaketone	6.23	
MS		naginataketone	64.24	
1871		jasmone	0.72	
1905	$\beta$ -ionone	2.49		
1203	Esters	1-octen-3-yl-acetate	1.92	
MS		geranyl acetate	0.32	

나. 꽃향유 분말을 첨가한 스넥 및 빵의 제조 및 관능검사 결과

향유속 식물인 꽃향유와 향유의 동결건조 꽃, 잎 및 줄기에 대한 특성을 평가하였다. 관능검사는 전문 관능검사자 8명이 특성을 묘사하였다(Table 25). 동결건조한 향유와 꽃향유의 꽃, 잎 및 줄기부위의 향기와 맛은 거의 유사하였으나, 꽃향유의 꽃에서 강한 꽃향기가 확인되었다. 또한 본 연구의 다른 과제에서 향유속 식물의 flavonoids 함량 분석에서 향유보다 꽃향유에 apigenin 함량이 더 높았다. 본 연구는 향유속 식물을 생리전증후군의 증상 완화 등을 위한 목적으로 실시되고 있으므로, 젊은 여성들이 더 선호할 수 있는 꽃향기가 강하고 apigenin 함량이 높은 꽃향유를 스넥, 빵 및 차로 개발하기로 결정하였다.

Table 25. 동결건조 향유속 식물의 특성 관능검사

		꽃향유의 관능 특성 표현	향유의 관능 특성 표현	
동결 건조 분말	잎	향기	강한 꽃 향기, 약한 소엽향기	약한 꽃 향기, 약한 소엽향기
		맛	부드러운 맛, 약간 단맛	부드러운 맛, 약간 단맛
	줄기	향기	마른 풀 향기, 마른 나무 향기	마른 풀 향기, 마른 나무 향기
		맛	부드러운 맛	부드러운 맛

1) 두부스넥

꽃향유 분말을 첨가한 제품의 target group인 20대 192명을 대상으로 9점 scales 을 이용하여 관능검사를 한 결과, 꽃향유를 넣은 두부 스넥은 5.65±1.37이었고, 꽃향유를 넣지 않은 두부스넥은 5.51±1.36으로 나타나 꽃향유를 첨가하였을 경우 약간 높은 선호도를 보였다. 꽃향유를 넣은 두부스넥이 시판된다면 구매하겠다는 의향 정도는 5.15±1.58로 나타났다. 실제 꽃향유를 첨가한 제품과 첨가하지 않은 제품의 맛과 향기 그리고 색깔에 있어서 관능성의 차이는 없었으나, 만약 기능성을 가진 꽃향유가 첨가되어 있다면 그 제품을 구매하겠다는 의향이 높았다. 두부는 최근 건강을 지향하는 트렌드와 맞물려 웰빙 건강식품으로서 인기가 높을 뿐 아니라 영양학적인 가치도 우수하여 이것을 첨가하여 제조한 스넥은 맛과 기능적인 측면에서 관심을 높일 것으로 사료된다. 또한 꽃향유를 첨가함으로써 맛과 기

능성을 한층 높일 수 있는 식품으로 기대가 된다.



Figure 33. 꽃향유 무첨가 두부스넥.



Figure 34. 꽃향유 첨가 두부스넥.

## 2) 식빵

꽃향유 분말을 첨가한 제품의 target group인 20대 192명을 대상으로, 9점 scales 을 이용하여 관능검사를 한 결과, 꽃향유를 넣은 식빵은  $5.94 \pm 1.24$ 였으며, 꽃향유를 넣지 않은 식빵은  $5.86 \pm 1.22$ 로 나타나 꽃향유를 첨가하였을 경우 약간 높은 선호도를 보였다. 꽃향유를 넣은 식빵이 시판된다면 구매하겠다는 의향 정도는  $5.83 \pm 1.37$ 로 나타나 두부 스넥에서 보다는 높은 결과를 나타내었다. 실제 꽃향유를 첨가한 제품과 첨가하지 않은 제품의 맛과 향기 그리고 색깔에 있어서 관능성의 차이는 없었으나, 만약 기능성을 가진 꽃향유가 첨가되어 있다면 그 제품을 구매하겠다는 의향이 역시 높았다.

식빵은 상대적으로 다른 빵류에 비하여 설탕 및 버터의 함량이 낮으며, 호밀, 보리 등 각종 잡곡류를 첨가할 수도 있어 당뇨 및 기타 성인병을 우려하는 집단에서 자주 선택을 한다. 여기에 기능성을 지닌 꽃향유 분말을 첨가시켜 빵을 제조하였으므로 맛 뿐 아니라 건강을 생각하는 기능성 빵으로서의 가치를 증대시키는 제품이 될 것으로 사료된다.

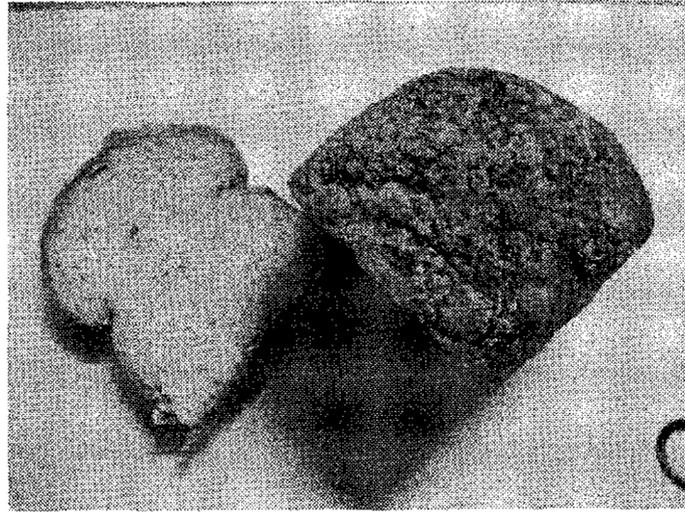


Figure 35. 꽃향유 무첨가 식빵.

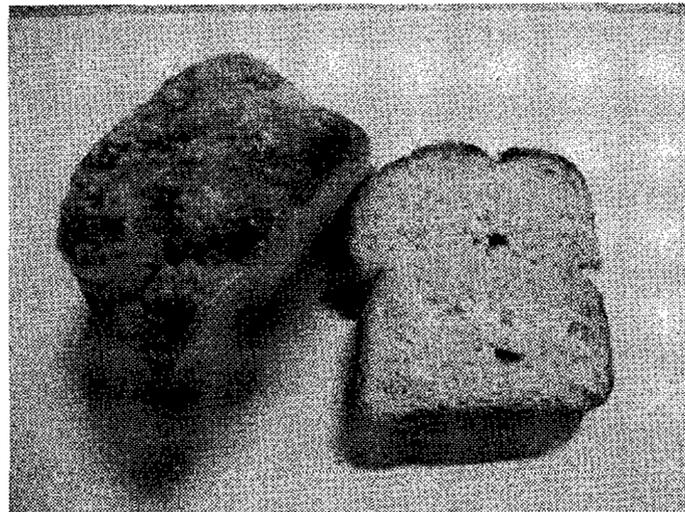


Figure 36. 꽃향유 첨가 식빵.

### 3) 마늘빵

꽃향유 분말을 첨가한 제품의 target group인 20대 192명을 대상으로, 9점 scales 을 이용하여 관능검사를 한 결과, 꽃향유를 넣은 마늘빵은  $6.48 \pm 1.27$ 이었으며, 꽃향유를 넣지 않은 마늘빵은  $6.40 \pm 1.36$ 으로 나타나 꽃향유를 첨가하였을 경우 약간 높은 선호도를 보였다. 꽃향유를 넣은 마늘빵이 시판된다면 구매하겠다는 의향 정도는  $6.51 \pm 1.45$ 로 나타나 관능검사를 한 제품 중 가장 높은 결과를 나타내었다.

실제 꽃향유를 첨가한 제품과 첨가하지 않은 제품의 맛과 향기 그리고 색깔에 있어서 관능성의 차이는 없었고 뒷맛에서 약간의 쓴맛을 나타냈으나, 기능성을 가진 꽃향유가 첨가되어 있다면 그 제품을 구매하겠다는 의향이 역시 높았다.

꽃향유가 첨가된 마늘빵 제조 시 바케트 빵 위에 바르는 소스에 꽃향유를 첨가시켰기 때문에 빵 자체의 맛에 있어서는 꽃향유가 첨가되지 않은 제품과 차이가 없었으나 소스 특유의 향과 맛이 새로운 입맛을 찾는 소비자들에게 선호도를 나타내었을 것으로 생각되며, 기능성을 지닌 꽃향유 분말을 첨가시켜 빵을 제조하였으므로 맛 뿐 아니라 건강을 생각하는 기능성 빵으로서의 가치를 증대시키는 제품이 될 것으로 사료된다.

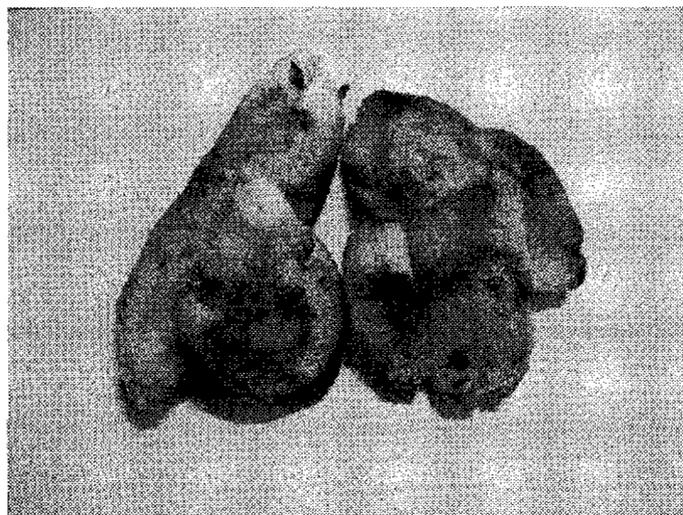


Figure 37. 꽃향유 무첨가 마늘빵.



Figure 38. 꽃향유 첨가 마늘빵.

Table 26. 꽃향유 첨가 스넥 및 빵의 선호도

	두부스넥	식빵	마늘빵
꽃향유를 넣지 않은 것(A)	5.51±1.36	5.86±1.22	6.40±1.36
꽃향유를 넣은 것(B)	5.65±1.37	5.94±1.24	6.48±1.27

n=192

1점: 극도로 싫다, 9점: 극도로 좋다

Table 27. 꽃향유 첨가 스넥 및 빵의 구매의향

	두부스넥B	식빵B	마늘빵B
구매의향	5.15±1.58	5.83±1.37	6.51±1.45

n=192

1점: 구매할 의향이 전혀 없다, 9점: 구매할 의향이 매우 크다.

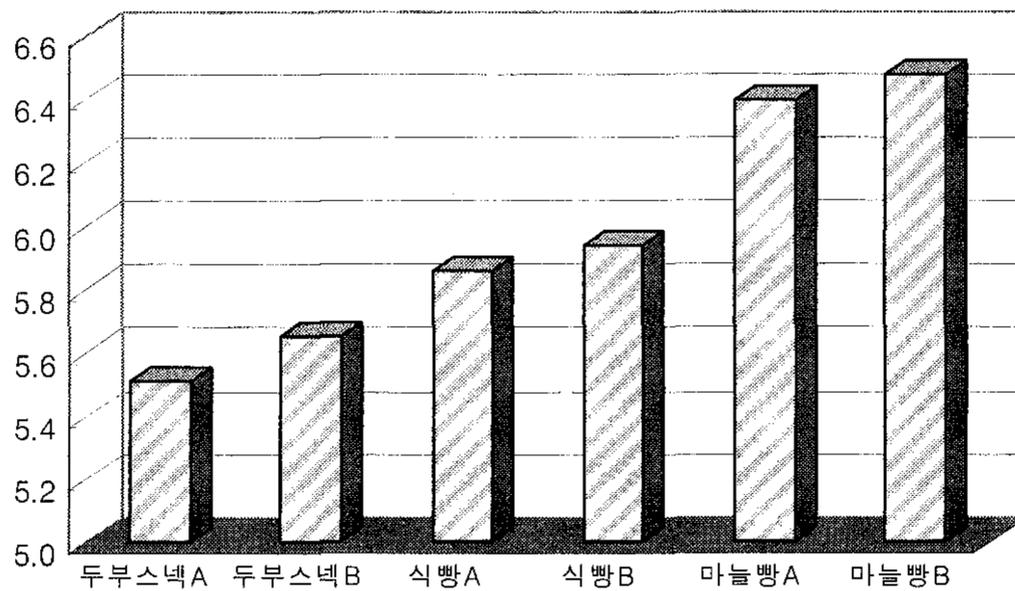


Figure 39. 두부 스넥 및 빵의 선호도 결과.

(A: 꽃향유 무첨가 제품, B: 꽃향유 첨가 제품)

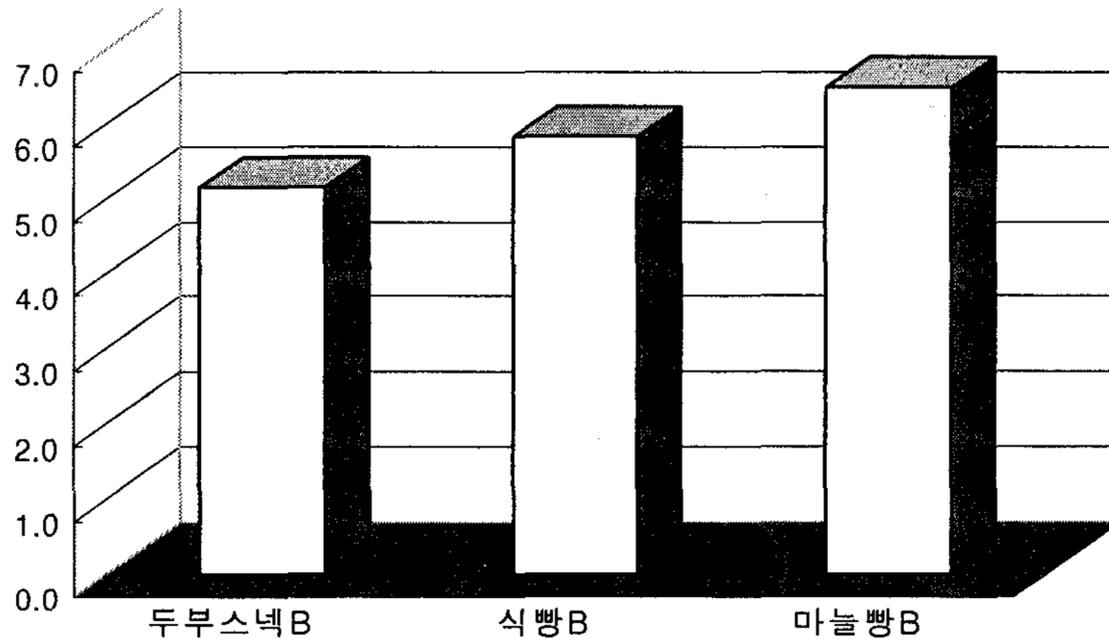


Figure 40. 꽃향유 첨가 제품(B)의 구매 의향 정도.

Table 28. 꽃향유 첨가 두부스넥 및 마늘빵의 색도 및 hardness 측정

		색도(Hunter) <sup>1)</sup>			Hardness <sup>2)</sup>
		L*	a*	b*	
두부스넥	꽃향유첨가	56.23	4.13	30.43	553000000
	꽃향유무첨가	58.91	7.38	31.53	427000000
마늘빵	꽃향유첨가	48.80	10.24	26.11	53306311
	꽃향유무첨가	53.23	11.42	30.36	37461087

n=3

<sup>1)</sup>Hunter Colorimeter(Minolta) L; lightness, +a; red, -a; green, +b yellow, -b; blue

<sup>2)</sup>Sun Rheometer Compac-100(Sun Scientific Co., Ltd, Japan), Dyne/cm<sup>2</sup>

#### 다. 꽃향유 차의 관능검사 결과

꽃향유 차의 target group인 20대 153명을 대상으로 9점 scales로 관능검사를 한 결과, 꽃향유 잎차의 선호도는  $4.99 \pm 1.65$ 였으며, 꽃향유 꽃차의 선호도는  $5.18 \pm 1.49$ 로 나타나 꽃향유 꽃차가 높은 선호도를 보였다. 꽃향유 차가 시판된다면 잎차를 사겠다는 의향 정도는  $5.01 \pm 1.94$ 이었고, 꽃차를 사겠다는 의향은  $5.16 \pm 1.77$ 로 나타

나 꽃향유 잎차보다 높았다. 최근 허브 차는 건강을 지향하는 트렌드와 맞물려 웰빙 건강식품으로서 인기가 높을 뿐 아니라 현대인의 스트레스 및 정신 수양을 위해 그 수요가 꾸준히 증가되고 있는 추세이다. 그러나 허브 향기의 특성상 그 관능성에 있어서 좋아하고 싫어함이 개인에 따라 차이가 명백하다. 본 연구에서도 잎차와 꽃차의 선호도가 4.99 및 5.18로 나타났지만 이는 실험 응답에 대한 평균치를 나타낸 것임을 주지하여야 하며, 실제 데이터에서는 좋고 싫음이 극명하게 나타남을 알 수 있었다. 기능성을 가진 꽃향유 차가 시판된다면 그 제품을 구매하겠다는 의향 역시 이와 같은 이유를 바탕으로 하여 결과가 나타난 것으로 사료된다.

Table 29. 꽃향유 잎차와 꽃차의 선호도 및 구매의향 정도

	꽃향유 잎차	꽃향유 꽃차
선호도	4.99±1.65	5.18±1.49
구매의향 정도	5.01±1.94	5.16±1.77

n=153

1점: 극도로 싫다, 구매할 의향이 전혀 없다

9점: 극도로 좋다, 구매할 의향이 매우 크다.

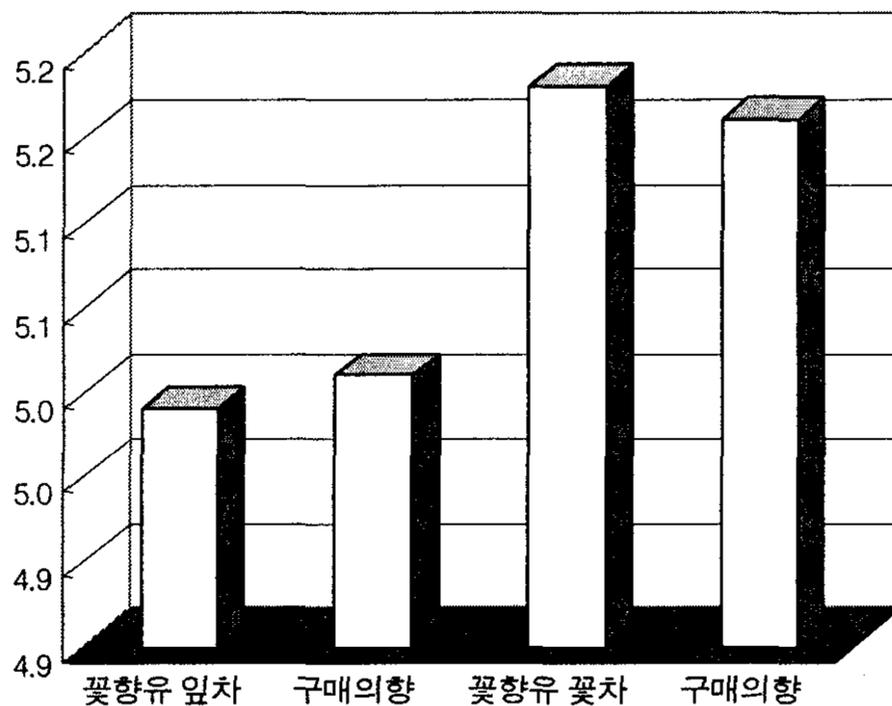


Figure 41. 꽃향유 잎차와 꽃차의 선호도 및 구매 의향 정도.

라. 향유속식물 추출물을 이용한 음료 개발

1) 꽃향유 추출물을 이용하여 병음료를 개발하였다. 꽃향유 추출물의 분석에서 5%농도로 80℃에서 1시간의 추출 조건이 가장 효율적으로 분석되었으며, 제 1세 부과제에서 실시한 향유속식물의 flavonoids 함량 분석에서, 향유보다 꽃향유에 apigenin 함량이 더 높았으며, 꽃과 잎에서 그 함량이 더 많았다. 따라서 병음료의 제조 시 꽃향유의 꽃과 잎에서 추출물을 추출하여 사용하였다.

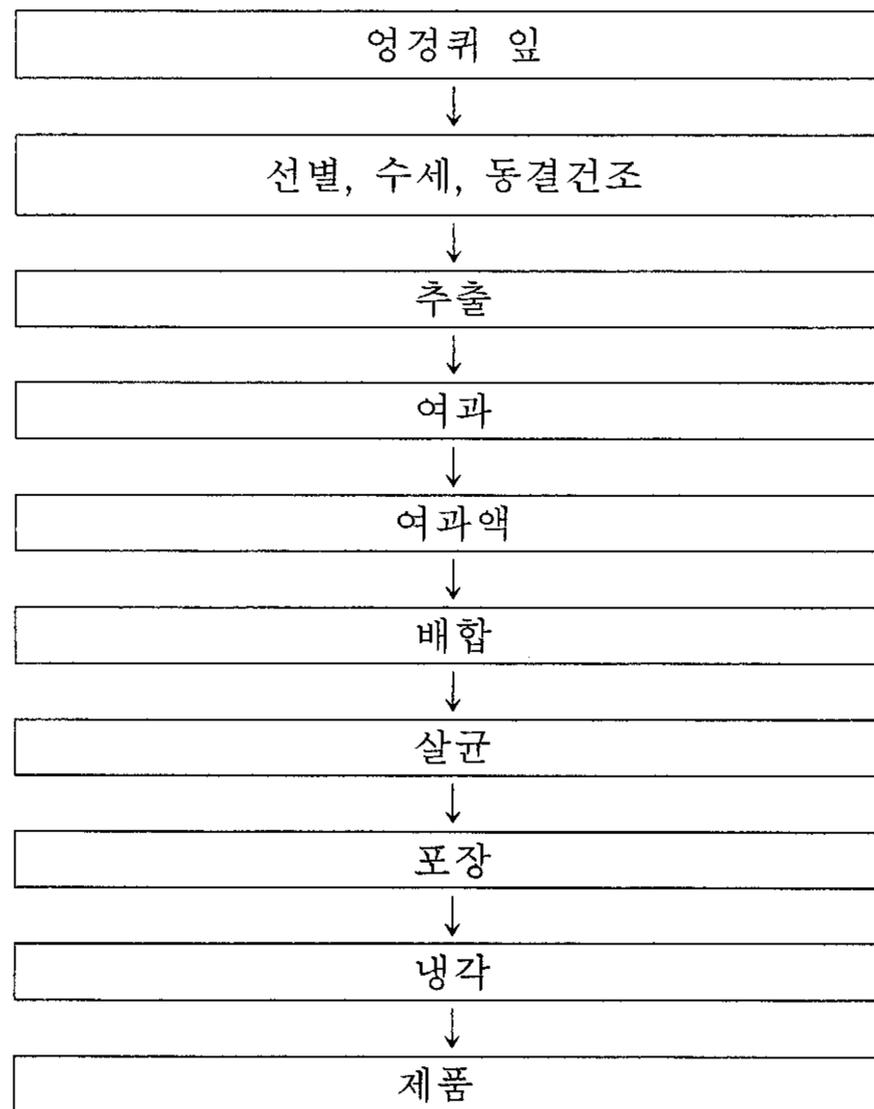


Figure 42. 꽃향유 추출물 음료 제조 공정.

Table 30. 꽃향유 추출물 음료의 배합비율

성분	함량(중량%)
꽃향유 추출물	84.05
액상고과당	11.5
구연산	0.2
구연산나트륨	0.1
사과과즙	4.0
비타민C	0.05
향	0.1
합계	100

\* 꽃향유 꽃 및 잎의 추출물 제조법 : 시료분말 5%, 물 95%를 80℃에서 1시간 추출



Figure 43. 꽃향유 추출물 병 음료.

2) 꽃향유 병음료의 유통기한 설정을 위하여 온도에 따른 색도 및 관능특성을 저장기간별로 실험하였다.

꽃향유 추출물을 배합조건에 따라 배합한 음료를 저장온도 및 시간에 따라 품질 변화를 모니터링 하였다. 저장온도(37°C, 50°C, 60°C) 및 온도별 저장기간에 따른 당도, pH, 산도, 색도, 대장균군 및 관능검사를 통한 품질 변화를 측정하였다.

#### 가) 당도 측정

당도는 hand refractometer를 사용하여 측정하였다. 단 샘플링한 시료는 25°C로 유지된 상태에서 3회 반복하여 측정한다. 시료의 저장기간 동안 당도의 변화는 Fig. 44와 같으며, 저장기간 동안 거의 변화를 나타내지 않았다.

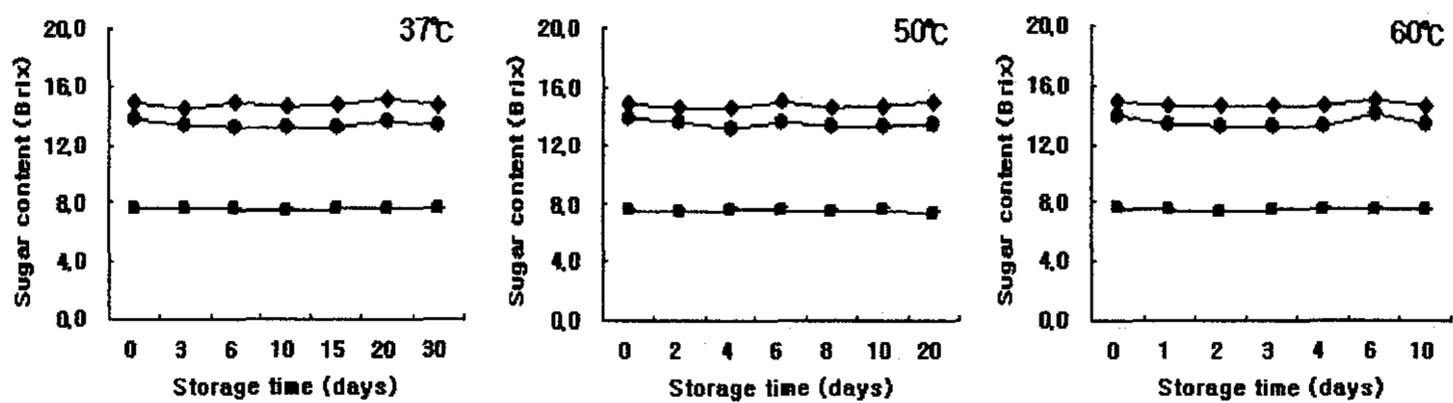


Figure 44. Changes in sugar concentration of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C. (-■- : Control, -◆-: beverages with *Cirsium japonicum* extracts, -●-: beverages with *Elsholtzia splendens* extracts)

#### 나) pH 및 산도 측정

시료의 pH는 pH meter(Metrohm Co. Swiss)를 사용하여 25°C의 조건에서 측정하였다. 적정산도는 시료 10 ml을 취하여 용량플라스크에 넣고 증류수를 가하여 전량을 100 ml 한다. 이중에서 20 ml을 삼각플라스크에 취하여 0.1N NaOH로 중화 적정하여, 이때 소비된 NaOH용액의 mL수를 구연산계수(0.0064)로 환산하였다. 시료의 온도별 저장기간 중 pH와 산도의 변화는 Fig. 45,46에 나타내었다. 저장기간 동안 비교적 일정한 pH를 유지하였다. 이와 같은 결과는 저장온도가 시료

의 pH의 변화에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 산도의 변화에 있어서는 저장 중 저장 온도별로 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

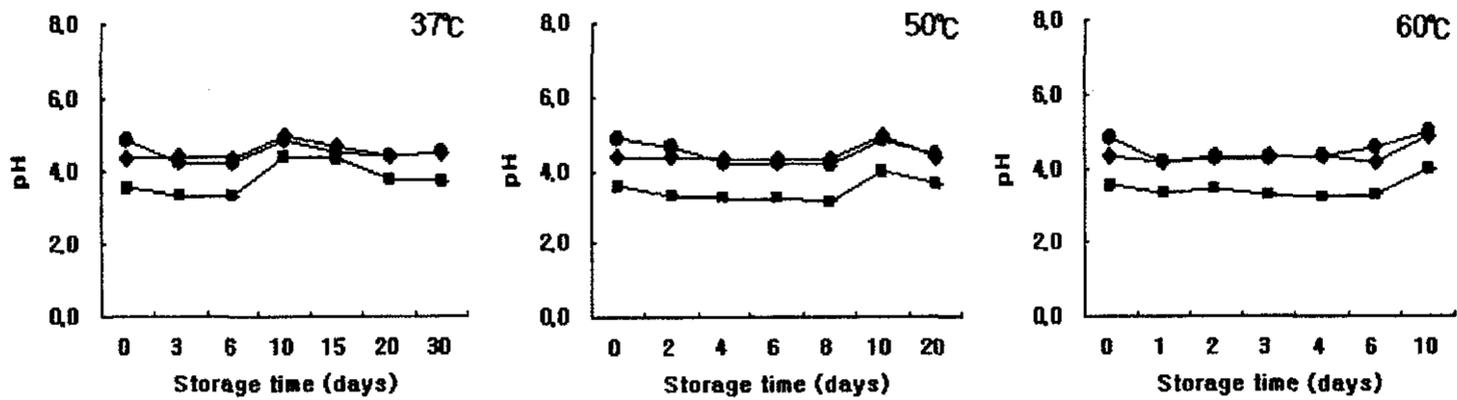


Figure 45. Changes in pH of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C.

(-■- : Control, -◆-: beverages with *Cirsium japonicum* extracts, -●-: beverages with *Elsholtzia splendens* extracts)

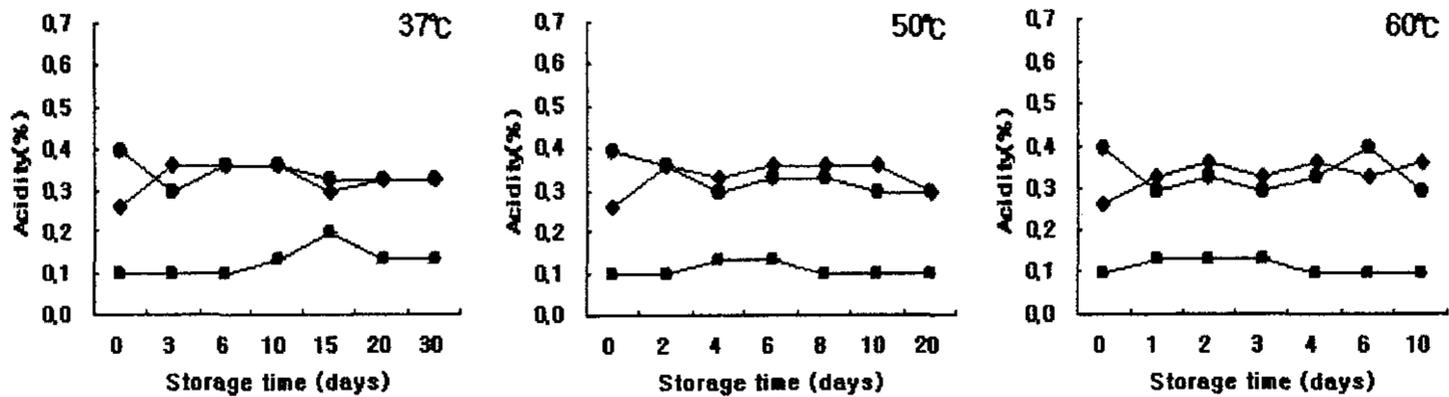


Figure 46. Changes in acidity of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C.

(-■- : Control, -◆-: beverages with *Cirsium japonicum* extracts, -●-: beverages with *Elsholtzia splendens* extracts)

#### 다) 색도 측정

시료의 색도는 Chroma meter CT-310(Minolta camera Co., Japan)을 사용하여 측정하여 Hunter scale에 의해 L(lightness), a(redness), b(yellowness),  $\Delta E$ (total color difference) 값으로 나타내었으며,  $\Delta E$ 는 저장 초기 시료의 L, a, b 값을 기준으로 나타내었다. 저장기간 중 색도의 변화를 Table 31에 나타내었으며, 저장기간 중의 변화는 크지 않은 것으로 나타났다.

Table 31. Sensory evaluation of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37°C, 50°C and 60°C

Storage time (days)	at 37°C	0	3	6	10	15	20	30
Control	L	70.40	72.55	71.74	72.97	73.71	73.85	73.95
	A	1.50	1.34	1.73	1.63	0.19	0.19	0.20
	B	3.09	2.45	2.37	2.84	2.08	2.36	2.43
	E	69.57	72.61	72.02	71.91	73.71	73.85	73.90
<i>Cirsium japonicum</i> extract	L	70.56	72.26	72.09	72.20	73.06	72.86	72.72
	A	0.53	0.78	0.62	0.65	0.43	0.52	0.67
	B	2.69	2.84	2.33	3.31	2.09	1.79	1.86
	E	69.79	72.33	72.13	72.28	73.06	72.86	73.90
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	L	70.66	71.77	70.64	70.56	71.56	71.29	72.01
	A	0.17	0.19	0.26	0.22	0.26	0.20	0.22
	B	2.61	2.27	2.25	1.96	2.19	2.27	2.21
	E	70.76	71.80	71.35	72.08	71.57	71.33	71.39

Storage time (days)	at 50°C	0	2	4	6	8	10	20
Control	L	70.40	71.65	72.01	71.69	72.70	72.73	73.59
	A	1.50	1.48	1.23	1.68	1.59	1.65	1.47
	B	3.09	3.28	2.56	2.87	2.71	2.79	2.89
	E	69.57	71.78	72.04	71.75	72.74	71.94	73.59
<i>Cirsium japonicum</i> extract	L	70.56	70.58	71.37	72.57	70.90	71.78	72.45
	A	0.53	0.67	0.36	0.43	0.82	1.46	0.05
	B	2.69	3.13	2.67	3.13	2.71	3.89	3.01
	E	69.79	70.71	71.34	73.33	70.91	71.90	72.46
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	L	70.66	71.90	72.56	71.39	71.63	71.64	71.45
	A	0.17	0.29	0.19	0.18	0.16	0.22	0.23
	B	2.61	2.22	2.46	2.41	2.24	2.81	2.52
	E	70.76	71.94	72.61	70.99	70.88	70.56	71.50

Storage time (days)	at 60°C	0	1	2	3	4	6	10
Control	L	70.40	73.47	70.97	71.74	72.74	72.77	71.78
	A	1.50	1.87	1.70	1.77	1.54	1.21	1.35
	B	3.09	2.15	3.62	2.79	2.36	2.53	2.64
	E	69.57	73.52	70.75	71.63	72.71	72.80	72.42
<i>Cirsium japonicum</i> extract	L	70.56	72.20	71.94	72.61	72.31	72.56	72.80
	A	0.53	0.70	0.77	0.49	0.74	0.52	0.62
	B	2.69	2.04	2.60	2.80	2.19	2.02	2.50
	E	69.79	72.23	72.04	72.64	72.38	72.63	72.80
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	L	70.66	70.85	71.38	71.61	70.98	72.07	71.74
	A	0.17	0.27	0.31	0.25	0.22	0.27	0.26
	B	2.61	2.23	3.10	2.87	2.91	2.26	2.80
	E	70.76	70.89	71.45	71.90	71.00	72.16	71.08

라) 대장균군 측정

시료의 총대장균군(total Coliform)을 측정하기 위하여 대장균용 페트리 필름(Petrifilm Coliform Count Plates, 3M™, Korea)을 사용하였다. 음료시료 1 ml을 필름에 수직으로 접종하고 상부필름을 기포가 생기지 않도록 덮은 후 누름판으로 누른다. 30~60초 후에 겔화가 완료되면 37℃에서 24~48시간 배양해 필름위에 형성된 붉은색 집락에 기포가 함께 붙어 있는 집락만을 측정한다. 저장기간 중 대장균군의 변화는 Table 32와 같다. 저장기간 중 대장균군은 전혀 검출되지 않았으며, 저장실험이 완료될 때 까지 음성이었음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 시료의 살균이 적절하였으며, 모든 제조과정이 무균적으로 수행되었음을 의미한다.

Table 32. Changes in total Coliform of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts during storage at 37℃, 50℃ and 60℃

Storage time (days) at 37℃	0	3	6	10	15	20	30
Control	ND <sup>1)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Cirsium japonicum</i> extract	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

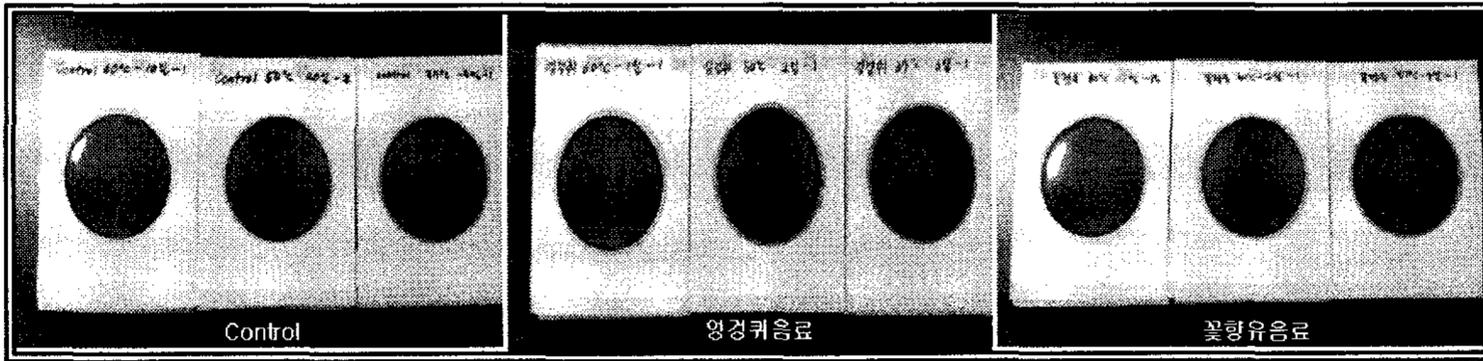
  

Storage time (days) at 50℃	0	2	4	6	8	10	20
Control	ND						
<i>Cirsium japonicum</i> extract	ND						
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	ND						

Storage time (days) at 60℃	0	1	2	3	4	6	10
Control	ND						
<i>Cirsium japonicum</i> extract	ND						
<i>Elsholtzia splendens</i> extract	ND						

<sup>1)</sup> ND means 'not detected'.



#### 마) 관능검사

관능검사는 관능검사 요원 선별검사를 실시하여 선정된 10명을 대상으로 실시하였다. 표준시료를 대조구로 하여 다른 온도에서 보관한 시료와 색상, 향미, 맛, 전반적인 기호도 등을 9점 기호척도법으로 평가하였다. 꽃향유 추출물을 배합조건에 따라 배합한 음료를 온도별 저장기간 중의 관능평가 결과를 종합적으로 분석한 Table 33에 나타난 결과와 같으며, control과 비교하였을 때 향미, 맛, 전반적인 선호도가 조금 높은 것으로 나타나, 음료로 개발하였을 때 가치가 있을 것으로 사료되어진다.

Table 33. Sensory evaluation of beverages with *Cirsium japonicum* and *Elsholtzia splendens* extracts

	Control	<i>Cirsium japonicum</i> extract	<i>Elsholtzia</i> <i>splendens</i> extract
Color	7.25±0.83	7.13±0.68	7.12±0.73
Flavor	6.10±0.71	6.78±0.68	6.70±0.66
Taste	6.67±0.57	7.25±0.68	7.05±0.62
Overall acceptability	6.58±0.63	7.22±0.62	7.08±0.73

꽃향유 병음료를 온도별로 저장하면서 당도, pH, 산도, 색도, 대장균 및 관능검사를 통한 품질 변화를 측정된 결과, 37°C에서 30일간, 50°C에서 20일간, 60°C에서 10일간 병음료의 품질이 유지됨을 확인하였다.

## 6. 활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호 작용 및 신경전달 억제 효과 검색

가. 향유추출물의 세포내 칼슘신호에 미치는 영향

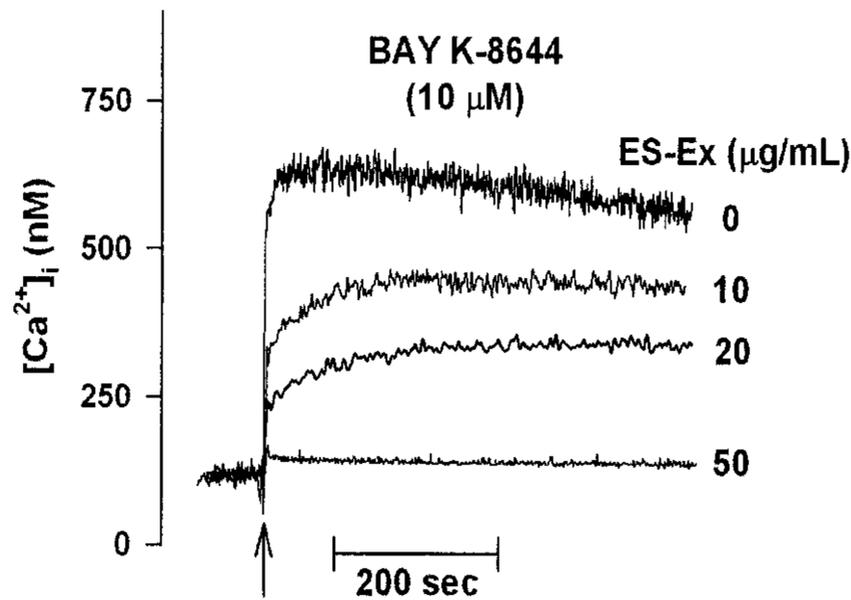
1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 향유추출물(ES-Ex)에 의한 세포내 칼슘신호에 미치는 영향을 조사하였다.

2) 실험결과

가) IMR-32 세포에서 전압의존성 L형 칼슘통로 활성화제인 BAY K-8644(10  $\mu$ M)는 세포내 칼슘농도의 증가를 초래하였다.

나) 향유추출물(ES-Ex)은 BAY K-8644에 의한 세포내 칼슘농도의 증가를 농도 의존적으로 감소시켰다.

3) 실험의의 : 본 실험 결과로써 향유추출물은 통증발현기전에 깊이 관여하고 있다고 알려진 세포내 칼슘신호의 저하를 가져온다는 사실을 알 수 있었다. 이 결과는 향유추출물이 월경전증후군에서 흔히 나타나는 통증의 예방에 효과를 나타낼 것으로 사료된다.



나. 향유추출물의 세포내 칼슘농도에 미치는 영향

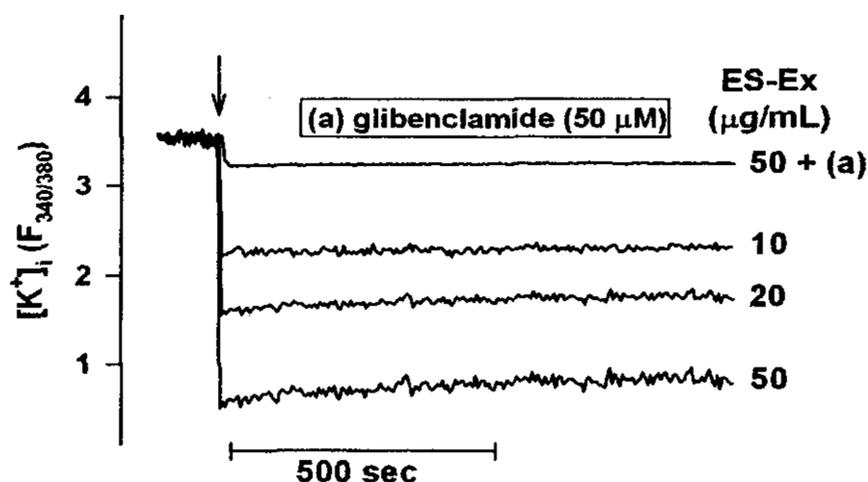
1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 향유추출물(ES-Ex)에 의한 세포내 칼슘농도에 미치는 영향을 조사하였다.

## 2) 실험결과

가) IMR-32 세포에서 향유추출물(ES-Ex)은 농도의존적으로 세포내 칼륨농도를 감소시켰다.

나) 향유추출물(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 의한 세포내 칼륨농도의 감소효과는 ATP-의존성 칼륨통로를 선택적으로 억제하는 약물인 glibenclamide(50  $\mu\text{M}$ )에 의해 현저히 저하되었다. 하지만 이 효과는 다른 칼륨통로인 전압의존성 칼륨통로 선택적 억제 약물인 4-aminopyridine(4-AP; 500  $\mu\text{M}$ )과 tetraethylammonium(TEA; 50 mM) 및 칼슘-민감성 칼륨통로 선택적 억제 약물인 apamine(0.2  $\mu\text{M}$ )과 charybdotoxin(ChTx; 0.1  $\mu\text{M}$ )에 의해서는 유의성 있는 차이가 없었다.

3) 실험의의: 본 실험 결과로써 향유추출물은 세포내 칼륨농도의 저하를 유발하며 이 작용은 ATP-의존성 칼륨통로의 활성화에 기인한다는 사실을 알 수 있었다. 칼륨통로의 활성화는 막전압의 과분극을 초래함으로써 신경전달과정을 억제하는 효과를 가지고 있으므로 통증발현과정을 억제하는 효과에 영향을 미칠 것으로 사료된다.



## 다. 향유추출물의 세포내 염소농도에 미치는 영향

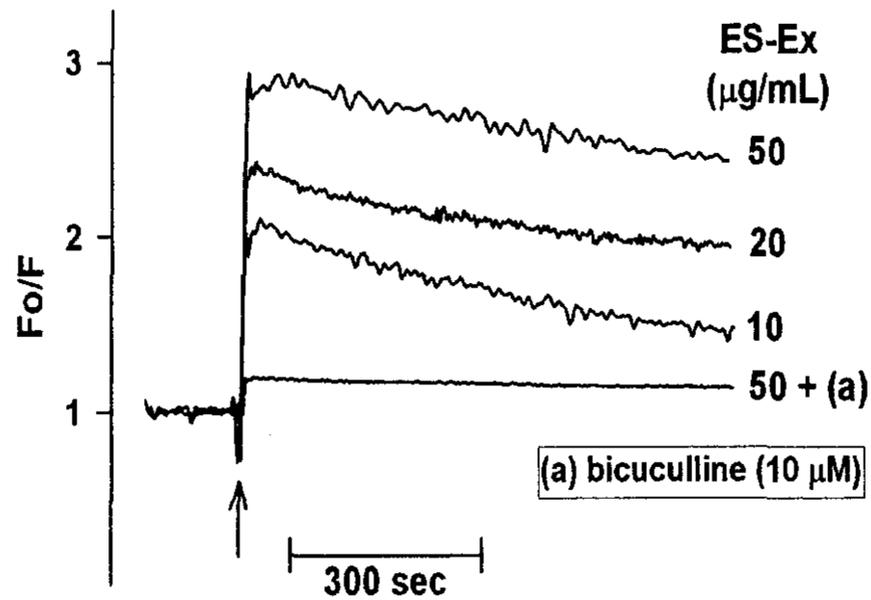
1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 향유추출물(ES-Ex)에 의한 세포내 염소농도에 미치는 영향을 조사하였다.

## 2) 실험결과

가) IMR-32 세포에서 향유추출물(ES-Ex)은 농도의존적으로 세포내 염소농도를 증가시킨다.

나) 향유추출물(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 의한 세포내 염소농도의 증가효과는 염소통로로 작용하는  $\text{GABA}_A$  수용체를 선택적으로 억제하는 약물인 bicuculline(10  $\mu\text{M}$ )에 의해 현저히 저하되었다.

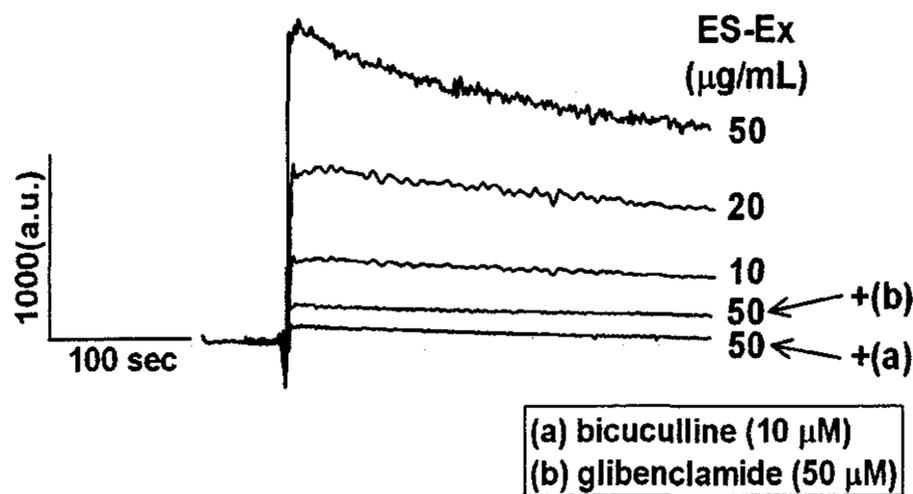
3) 실험의의 : 본 실험 결과로써 향유추출물은 세포내 염소이온 농도의 증가를 유발하며 이 작용은  $\text{GABA}_A$  수용체의 활성화에 기인한다는 사실을 알 수 있었다. 염소통로의 활성화는 막전압의 과분극을 초래함으로써 신경전달과정을 억제하는 효과를 가지고 있으므로 향유추출물에 의한 통증발현과정의 억제 효과에 영향을 미칠 것으로 사료된다.



라. 향유추출물의 세포막전압에 미치는 영향

1) 실험목적 : 사람 신경세포종(IMR-32 human neuroblastoma)에서 향유추출물(ES-Ex)에 의한 세포막전압에 미치는 영향을 조사하였다.

2) 실험결과



가) IMR-32 세포에서 향유추출물(ES-Ex)은 농도의존적으로 세포막전압을 과분극시켰다.

나) 향유추출물(50 µg/mL)에 의한 과분극효과는 각각 ATP-의존성 칼륨통로와 GABA<sub>A</sub> 수용체 염소통로를 선택적으로 억제하는 glibenclamide(50 µM) 및 bicuculline(10 µM)에 의해 현저히 저하되었다.

다) 실험의의 : 본 실험 결과로써 향유추출물에 의한 막전압의 과분극은 GABA<sub>A</sub> 수용체의 활성화에 의한 세포내 염소이온 농도의 증가와 ATP-의존성 칼륨통로의 활성화에 의한 세포내 칼륨이온 농도의 감소에 기인한다는 사실을 알 수 있었다. 막전압의 과분극은 통증전달을 매개하는 구심성 감각신경에서 활동전위의 전달을 억제하는 효과를 가지고 있으므로 향유추출물은 월경전증후군에서 흔히 나타나는 통증의 예방에 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

## 7. 가공조건에 따른 엉겅퀴속 및 향유속 식물의 flavonoids 물질 분석 조건 확립

### 가. 엉겅퀴

#### 1) 건조방법 및 부위에 따른 엉겅퀴 추출물의 apigenin 함량 변화

건조방법에 따른 apigenin의 함량 변화를 알아보기 위해 음건, 50℃ 오븐건조, 동결건조한 시료 0.5 g에 60% 에탄올 50 ml을 가하여 4시간 추출한 다음 여과하여 apigenin 함량을 조사하였다. 건조방법에 따른 엉겅퀴 추출물의 apigenin 함량은 Table 34와 같이 동결건조에서 가장 높았고, 50℃ 오븐건조, 음건 순으로 높았다.

Table 34. Content of apigenin in *Crisium japonicum* extracts as influenced by drying methods

	Apigenin content ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Leaf	
Freezing dry	0.74 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	
Oven dry	0.23 $\pm$ 0.04	
Air dry	0.19 $\pm$ 0.02	

<sup>1)</sup>Mean $\pm$ standard deviation (n=3).

#### 2) 추출용매에 따른 엉겅퀴 추출물의 apigenin 함량 변화

최적 추출용매 조건을 설정하기 위해 시료(Freezing dry) 0.5 g에 20% 에탄올, 40% 에탄올, 60% 에탄올, 80% 에탄올 및 물 50 ml을 가하여 실온에서 1시간 추출한 다음 각 추출용매에 따른 엉겅퀴 추출물을 제조하였다. Apigenin 함량은 잎 부위에서 40% 에탄올이 2.42  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았고 물에서는 검출되지 않았다.

Table 35. Content of apigenin in *Crisium japonicum* extracts prepared with different extraction solvent

	Apigenin content ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Leaf	
Water extract	N.D. <sup>2)</sup>	
20% EtOH extract	2.13 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	
40% EtOH extract	2.42 $\pm$ 0.19	
60% EtOH extract	0.65 $\pm$ 0.03	
80% EtOH extract	0.83 $\pm$ 0.03	

<sup>1)</sup>Mean $\pm$ standard deviation (n=3).

<sup>2)</sup>Not Detector.

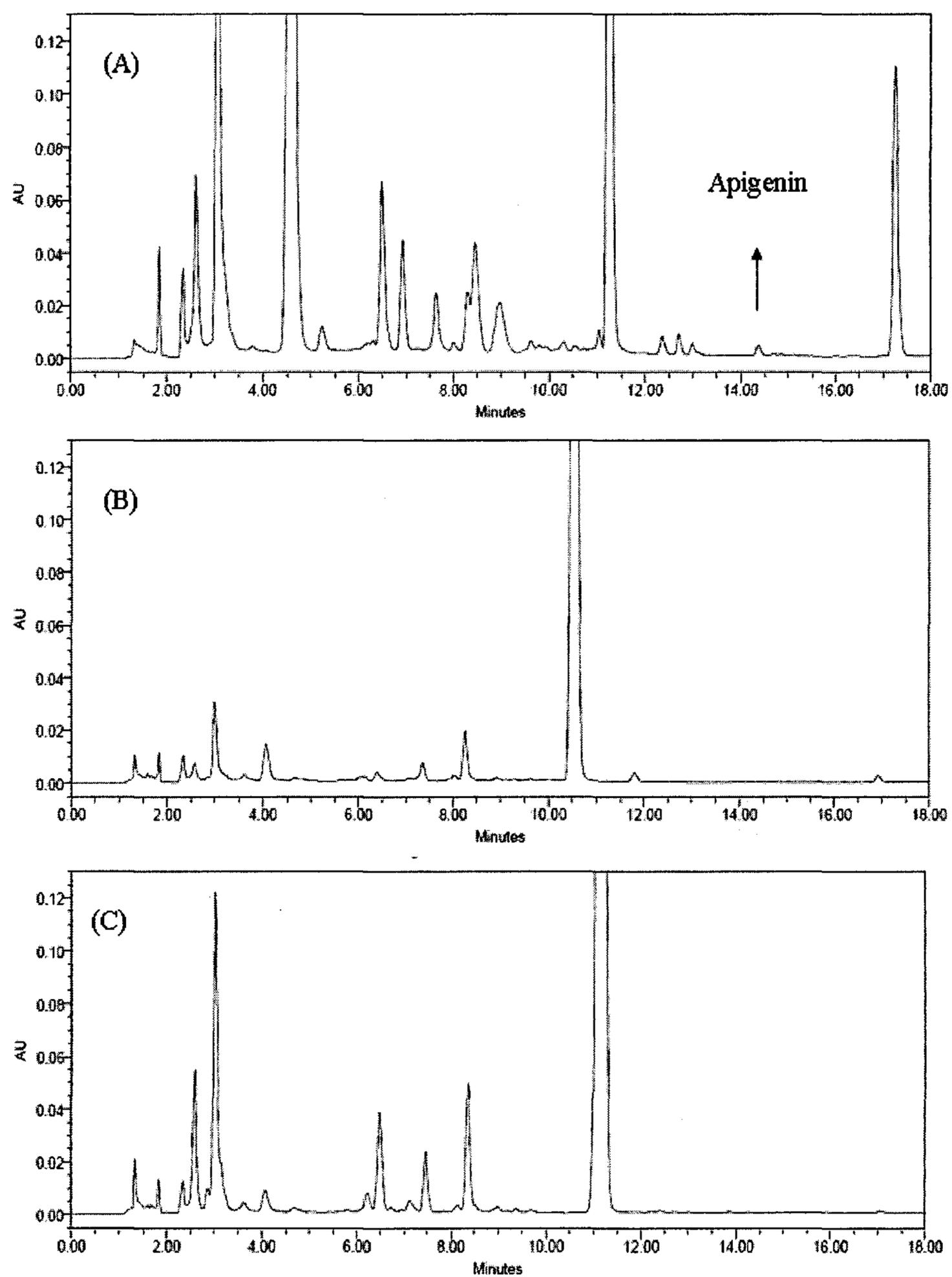


Figure 47. Chromatogram of flavonoids in leaf of *Crisium japonicum* by HPLC. (A) Freezing dry, (B) Oven dry, (C) Air dry.

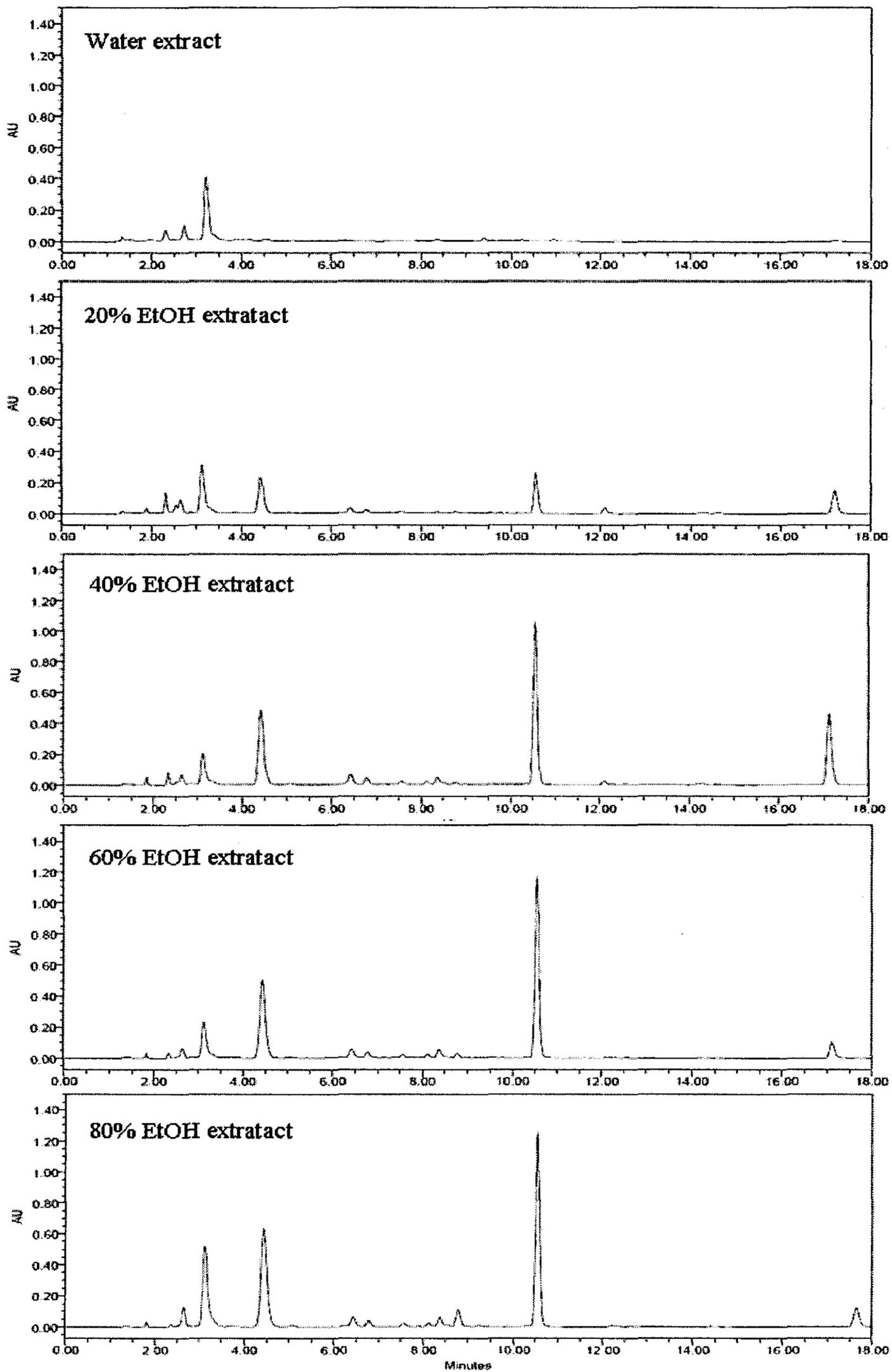


Figure 48. Content of apigenin in leaf of *Crisium japonicum* extracts prepared with different extraction solvent.

3) 추출시간에 따른 엉겅퀴 추출물의 apigenin 함량 변화

최적 추출시간 설정을 위해 시료(Freezing dry) 0.5 g에 60% 에탄올 50 ml을 가하여 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간 추출한 다음 여과하여 apigenin 함량을 조사하였다. Apigenin 함량은 추출시간이 증가할수록 함량이 감소하는 경향을 보이나 4시간 이상 추출 시 apigenin 함량이 감소하지 않는 것을 확인하였다.

Table 36. Content of apigenin in *Crisium japonicum* extracts prepared with different extract time

	Apigenin content ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Leaf	
1 hr	0.74 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	
2 hr	1.68 $\pm$ 0.08	
4 hr	1.53 $\pm$ 0.09	
8 hr	0.70 $\pm$ 0.06	
16 hr	0.67 $\pm$ 0.05	

<sup>1)</sup>Mean $\pm$ standard deviation (n=3).

4) 엉겅퀴 추출물의 총플라보노이드 함량

각 부위별로 동결건조된 시료 5 g에 60% 에탄올 50 ml을 가하여 1시간 추출한 다음 여과하여 총 플라보노이드 함량을 조사하였다. 부위별 총 플라보노이드 함량은 apigenin 함량에서와 같이 잎 > 뿌리 순으로 조사되었다. 엉겅퀴의 잎, 뿌리 추출물은 동결건조 시료에서 각각 1.60, 0.24 mg/g으로 가장 높았고. 오븐건조 시료는 0.66 mg/g, 0.20 mg/g, 음건 시료에서는 0.55 mg/g, 0.17 mg/g으로 조사되었다. 따라서 동결건조 한 잎 부위에 플라보노이드가 많이 존재함을 알 수 있다.

Table 37. Total flavonoid content in different sections of *Elsholtzia splendens*

	Total flavonoid content (mg/g)	
	Leaf	
Freezing dry	1.60 $\pm$ 0.09	
Oven dry	0.66 $\pm$ 0.04	
Air dry	0.55 $\pm$ 0.07	

<sup>1)</sup>Mean $\pm$ standard deviation (n=3).

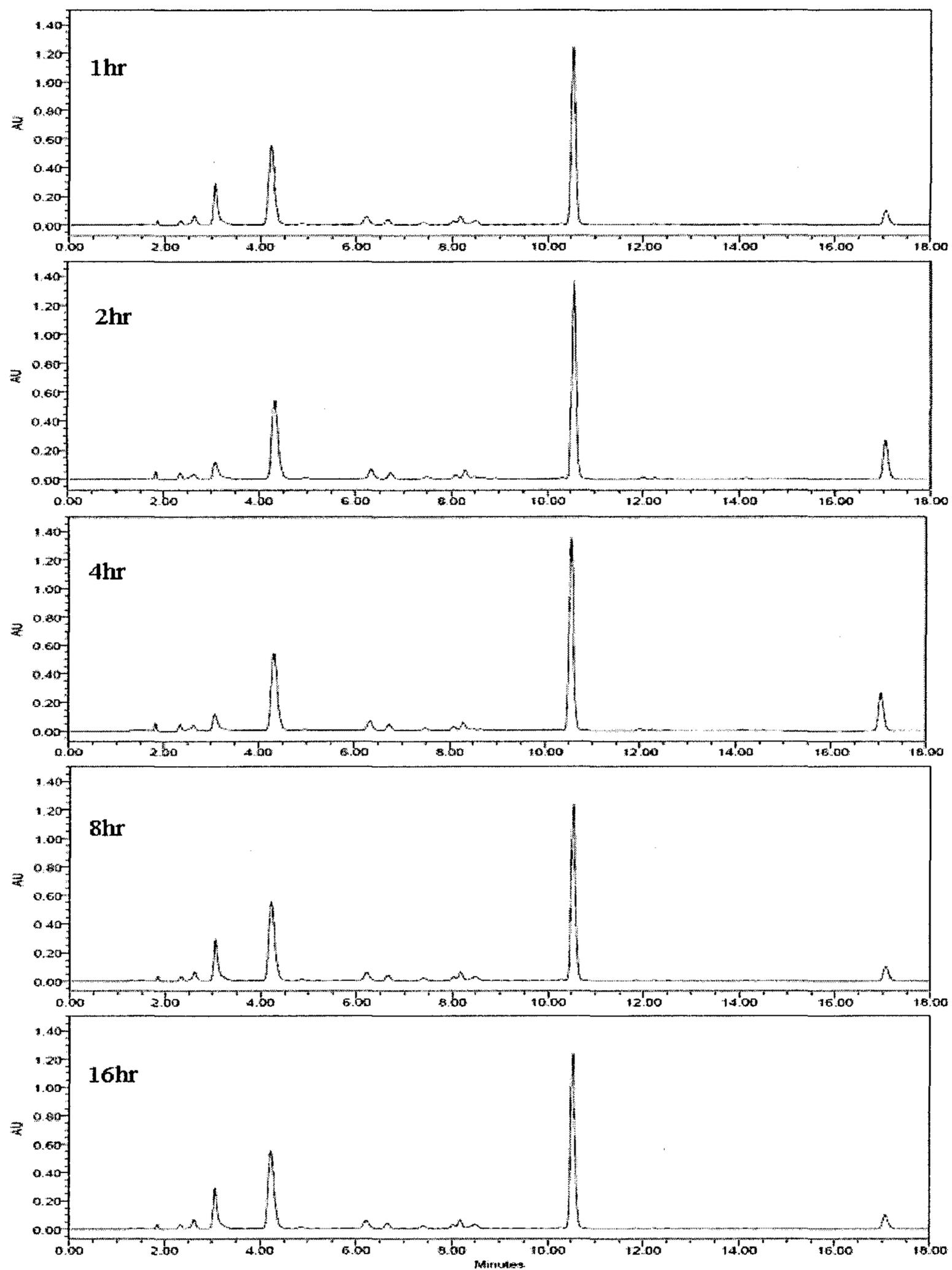


Figure 49. Content of apigenin in leaf of *Crisium japonicum* extracts prepared with different extract time.

나. 꽃향유

1) 건조방법 및 부위에 따른 꽃향유 추출물의 apigenin 함량 변화

건조방법에 따른 apigenin의 함량 변화를 알아보기 위해 음건, 50℃ 오븐건조, 동결건조한 시료 0.5 g에 60% 에탄올 50 ml을 가하여 1시간 추출한 다음 여과하여 apigenin 함량을 조사하였다. 건조방법에 따른 꽃향유 추출물의 apigenin 함량은 Table 35와 같다. 동결건조에서 3.50  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았고, 50℃ 오븐건조는 3.15  $\mu\text{g/g}$ 으로 조사되었다. 음건은 1.50  $\mu\text{g/g}$ 으로 동결건조와 오븐건조에 비해 매우 낮은 함량을 보이고 있다.

Table 38. Content of apigenin in *Elsholtzia splendens* extracts as influenced by drying methods

	Apigenin content ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Flower	
Freezing dry	4.98±0.45	
Oven dry	3.15±0.34	
Air dry	1.50±0.23	

<sup>1)</sup>Mean±standard deviation (n=3).

2) 추출용매에 따른 꽃향유 추출물의 apigenin 함량 변화

최적 추출용매 조건을 설정하기 위해 시료(Oven dry) 0.5 g에 20% 에탄올, 40% 에탄올, 60% 에탄올, 80% 에탄올 및 물 50 ml을 가하여 실온에서 1시간 추출한 다음 각 추출용매에 따른 꽃향유 추출물을 제조하였다. Apigenin 함량에 있어서는 40% 에탄올이 3.54  $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었으며, 60% 에탄올과 80% 에탄올이 3.42  $\mu\text{g/g}$ 와 3.10  $\mu\text{g/g}$ 을 나타냈다. 40-80% 에탄올 용매의 추출물에서 apigenin 함량이 높음을 확인했다.

Table 39. Content of apigenin in *Elsholtzia splendens* extracts prepared with different extraction solvent

	Apigenin content ( $\mu\text{g/g}$ )
	Flower
Water extract	N.D. <sup>2)</sup>
20% EtOH extract	1.13 $\pm$ 0.20
40% EtOH extract	3.54 $\pm$ 0.08
60% EtOH extract	3.42 $\pm$ 0.08
80% EtOH extract	3.10 $\pm$ 0.03

<sup>1)</sup>Mean $\pm$ standard deviation (n=3).

3) 추출시간에 따른 꽃향유 추출물의 apigenin 함량 변화

최적 추출시간 설정을 위해 시료(Oven dry) 0.5 g에 60% 에탄올 50 ml을 가하여 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간 추출한 다음 여과하여 apigenin 함량을 조사하였다. Apigenin 함량은 2시간에서 추출한 것이 3.56  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았고 시간이 증가 할수록 다소 감소하다가 8시간 이후에는 급격히 감소하는 경향을 보인다.

Table 40. Content of apigenin in *Elsholtzia splendens* extracts prepared with different extract time

	Apigenin content ( $\mu\text{g/g}$ )
	Flower
1 hr	3.34 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>
2 hr	3.56 $\pm$ 3.05
4 hr	3.47 $\pm$ 0.41
8 hr	2.32 $\pm$ 0.21
16 hr	2.07 $\pm$ 0.05

<sup>1)</sup>Mean $\pm$ standard deviation (n=3).

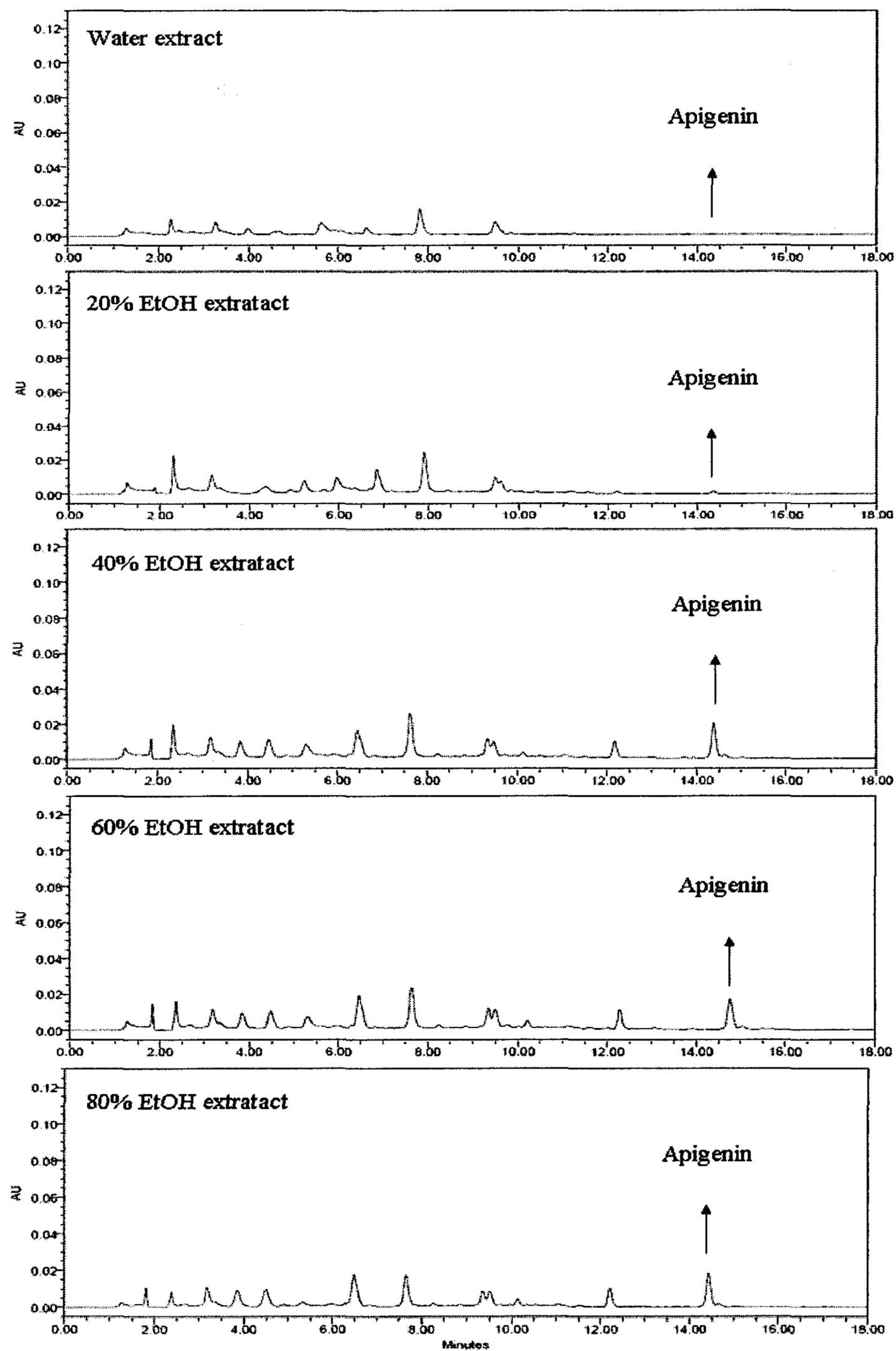


Figure 50. Content of apigenin in flower of *Elsholtzia splendens* extracts prepared with different extraction solvent.

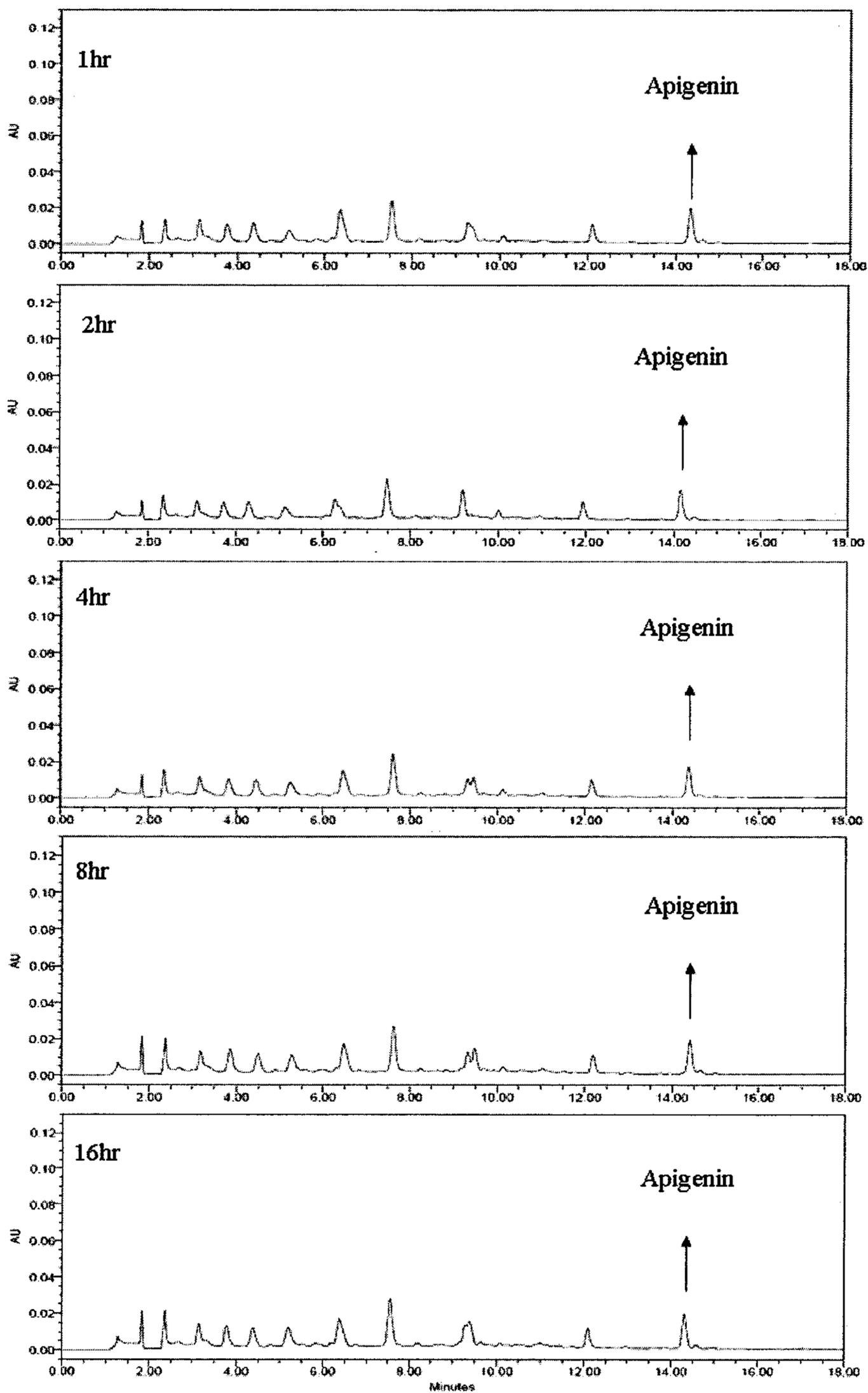


Figure 51. Content of apigenin in flower of *Elsholtzia splendens* extracts prepared with different extract time.

#### 4) 꽃향유 추출물의 총 플라보노이드 함량

각 부위별로 시료 5 g에 60% 에탄올 50 ml을 가하여 1시간 추출한 다음 여과하여 총 플라보노이드 함량을 조사하였다. 건조방법별로는 동결건조 0.77 mg/g, 오븐건조 0.55 mg/g, 음건 0.52 mg/g 순으로 조사되었으나 유의적인 차이는 없었다.

Table 41. Total flavonoid content in different sections of *Elsholtzia splendens*

	Total flavonoid content (mg/g)		
	Flower	Leaf	Stem
Freezing dry	0.77±0.04 <sup>1)</sup>	1.09±0.05	0.35±0.02
Oven dry	0.55±0.01	0.76±0.02	0.32±0.01
Air dry	0.52±0.03	0.76±0.03	0.30±0.01

<sup>1)</sup>Mean±standard deviation (n=3).

#### 다. 꽃향유 추출물의 안전성 평가 시험

기능성 식품신소재의 제품화를 위한 추출물의 안전성 조사 : 유효성분이 다량 함유된 추출물을 건강 기능 식품으로 제품화하기 위하여 일반독성(단여투여) 및 유전독성(복귀돌연변이, 염색체이상)의 안전성 분석을 수행하였다.

##### 1) 급성경구독성시험

시험물질 꽃향유 추출물의 경구투여에 의한 급성독성을 조사하기 위하여 ICR 계통의 마우스 암수 각각 5마리씩을 이용하여 0, 500, 1000, 2000 mg/kg/day의 용량으로 1회 경구투여한 후 15일간의 사망률, 일반증상 및 체중 변화와 투여 후 15일째에 부검소견을 관찰하였다. ICR 계통의 마우스 암수는 체중이 18.6~25.2 g 인 것을 사용하였으며, 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%로 설정된 실험실에서 실시하였다. 분말시료 0.5 g에 80% ethanol 50 ml를 가하여 60분 동안 magnetic stirrer를 사용하여 추출하여 200배 농축한 후, 단계별로 희석하여 투여액을 조제하였다. 투여액량은 Path/Tox system(version 4.2.2)에서 체중 kg당 10 ml로 계산한 양을 사용하였다. 일반증상은 투여 후 15일 까지 매일 1회 이상 실시하였으며 체중측정은 투여직전, 투여 후 2,4,8, 및 15일에 측정하였다. 시험 종료시 전 생존동물은 CO2 가스로 마취시킨 후 개복하여 육안적으로 모든 내부 장기의 이상 유무를 관찰하였다. 본 시험에서 최고용량군으로 투여한 2000 mg/kg/day의

용량은 급성경구독성시험에서 한계용량으로 권장되는 용량으로서 시험 결과, 암컷 2000 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 연변과 암수 1000 mg/kg/day 및 2000 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 체중의 미세한 감소는 발생빈도가 낮게 관찰되었으며, 그 후 정상적으로 회복된 것으로 보아 일시적인 현상으로 시험물질의 직접적인 영향으로 사료되지 않았다(Table 42). 또한 시험물질의 투여에 기인한 사망 동물 및 육안적 부검소견은 관찰되지 않았다(Table 43). 따라서, 본 시험 조건에서 꽃향유 추출물의 암수 마우스에 1회 경구투여는 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견에 있어서 어떠한 독성소견도 유발하지 않았으며, 본 시험물질의 반수 치사량은 2000 mg/kg/day을 상회하는 것으로 사료되었다.

Table 42. Body weights of mice (Group Summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS					
		SEX : MALE			
PERIOD	Group DOSE:(mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000	T3 2000
DAY1	MEAN	29.6	28.8	30.3	29.7
Dosing	S.D.	1.04	0.82	1.02	1.12
	N	5	5	5	5
DAY2	MEAN	31.7	30.7	31.7	30.8
Dosing	S.D.	1.37	1.03	0.86	0.81
	N	5	5	5	5
DAY4	MEAN	32.4	31.4	32.5	32.1
Dosing	S.D.	1.30	0.91	0.80	0.96
	N	5	5	5	5
DAY8	MEAN	34.2	33.2	34.0	34.4
Dosing	S.D.	1.79	1.11	1.27	1.13
	N	5	5	5	5
DAY15	MEAN	36.2	34.7	36.6	37.4
Dosing	S.D.	1.63	1.21	1.52	1.44
	N	5	5	5	5

SUMMARY OF BODY WEIGHTS

		SEX : FEMALE			
	Group	V. CONTROL	T1	T2	T3
PERIOD	DOSE:(mg/kg)	0	500	1000	2000
DAY1	MEAN	21.0	21.7	21.5	21.7
Dosing	S.D.	1.84	1.25	1.32	0.73
	N	5	5	5	5
DAY2	MEAN	22.8	22.4	23.0	22.6
Dosing	S.D.	1.77	1.27	1.33	0.66
	N	5	5	5	5
DAY4	MEAN	23.5	23.4	23.7	23.5
Dosing	S.D.	1.59	1.09	1.16	1.01
	N	5	5	5	5
DAY8	MEAN	24.6	23.8	24.6	24.3
Dosing	S.D.	1.60	1.09	1.22	0.88
	N	5	5	5	5
DAY15	MEAN	26.0	25.1	26.2	26.1
Dosing	S.D.	1.87	1.63	1.90	0.94
	N	5	5	5	5

Table 43. Mortality of mice(Group Summary)

		GROUP SUMMARY OF MORTALITY														
		SEX : MALE														
DOSE (mg/kg)		DAYS ON TEST														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		GROUP SUMMARY OF MORTALITY														
		SEX : FEMALE														
DOSE (mg/kg)		DAYS ON TEST														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a = Number animals alive at the start of each study day

b = Number of mortalities during each study day

## 2) 복귀돌연변이 시험(Ames test)

꽃향유 추출물의 세균에서의 유전독성을 검색하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘요구성 4개 균주와 *E. coli*의 트립토판 요구성 1개 균주를 이용하여 시험을 실시하였다. 시험에 사용한 균주의 생균수는 흡광도에 의한 측정 결과 모든 *Salmonella typhimurium* 균주의 경우에는  $1.0\sim 1.2\times 10^9$  cells/ml 이었고, *E. coli* 균주의 경우에는  $3.2\times 10^9$  cells/ml 이었다. 시험물질 처리군과 비교하기 위한 부형제로 DMSO를 선택하였다. 시험물질 최고농도액 및 S-9 mix의 무균성 확인을 위한 플레이트에서 미생물의 오염에 의한 집락은 나타나지 않았다. 대사활성효소계의 활성을 측정하기 위해서는 양성대조물질 2-AA와 BP를 각각 TA1535와 TA98 균주에 사용하였는데, 두 균주에서 대사활성효소계 미첨가시에 비해 첨가시에 현저한 변이원성을 나타낸 것으로 확인되었다(Table 44). 부형제대조균의 복귀돌연변이 집락수는 historical data의 범위내에서 관찰되었다. 양성대조균의 경우, 부형제대조균에 비해 3배 이상의 집락수 증가를 보이면서 현저한 복귀돌연변이 집락수의 증가를 보였다. 이는 본 시험이 적합하게 수행되었다는 것을 나타내고, 결과의 정당성을 뒷받침한다고 할 수 있다.

시험 결과, 모든균주에서 대사활성효소계 적용여부와 관계없이 꽃향유 추출물을 처리한 어떤 농도군에서도 복귀돌연변이 집락수는 증가하지 않았다.

꽃향유 추출물은 본 시험 조건하에 사용한 농도범위에서는 *Salmonella typhimurium* 4개 균주와 *E. coli* 1개 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

Table 44. Result of bacterial reverse mutation assay with ethanol extracts from *Elsholtzia splendens*

		G05031								
Tester strain	Chemical Treated	Dose (ug/plate)	Colonies/plate(Mean)(Factor)a)							
			Without S-9 mix			With a-9 mix				
TA100	Test Item	0	104	±	8		133	±	10	
		156	105	±	8	[1.0]	113	±	10	[0.8]
		313	118	±	4	[1.1]	129	±	11	[1.0]
		625	112	±	3	[1.1]	121	±	19	[0.9]
		1250	103	±	2	[1.0]	127	±	19	[1.0]
		2500	124	±	14	[1.2]	121	±	16	[0.9]
		5000	122	±	5	[1.2]	139	±	4	[1.0]
TA1535	Test Item	0	15	±	1		12	±	1	
		156	18	±	6	[1.2]	10	±	5	[0.8]
		313	14	±	5	[0.9]	9	±	4	[0.8]
		625	16	±	2	[1.1]	14	±	2	[1.2]
		1250	16	±	2	[1.1]	11	±	1	[0.9]
		2500	17	±	3	[1.1]	12	±	1	[1.0]
		5000	18	±	2	[1.2]	11	±	3	[0.9]
TA98	Test Item	0	18	±	2		30	±	6	
		156	25	±	4	[1.4]	35	±	4	[1.2]
		313	19	±	2	[1.1]	36	±	11	[1.2]
		625	21	±	6	[1.2]	37	±	7	[1.2]
		1250	20	±	4	[1.1]	35	±	10	[1.2]
		2500	16	±	5	[0.9]	39	±	6	[1.3]
		5000	21	±	6	[1.2]	24	±	2	[1.1]
TA1537	Test Item	0	10	±	3		21	±	3	
		156	9	±	2	[0.9]	22	±	5	[1.0]
		313	8	±	2	[0.8]	19	±	5	[0.9]
		625	9	±	2	[0.9]	19	±	3	[0.9]
		1250	8	±	3	[0.8]	23	±	3	[1.1]
		2500	7	±	1	[0.7]	23	±	2	[1.1]
		5000	9	±	2	[0.9]	29	±	5	[1.4]
<i>E.coli</i> WP2 uvrA	Test Item	0	16	±	4		25	±	6	
		156	21	±	4	[1.3]	20	±	2	[0.8]
		313	17	±	3	[1.1]	20	±	5	[0.8]
		625	13	±	1	[0.8]	23	±	2	[0.9]
		1250	14	±	5	[0.9]	26	±	6	[1.0]
		2500	15	±	3	[0.9]	26	±	6	[1.0]
		5000	15	±	4	[0.9]	28	±	6	[1.1]
Positive controls										
TA100	SA	0.5	620	±	10	[6.0]				
TA1535	SA	0.5	469	±	39	[31.3]				
TA98	2-NF	2	574	±	90	[31.9]				
TA1537	9-AA	50	355	±	88	[35.5]				
WP2 uvrA	4NQO	0.5	103	±	5	[6.4]				
TA100	BP	2					926	±	39	[7.0]
TA1535	2-AA	2	15	±	4	[1.0]	463	±	2	[38.6]
TA98	BP	2	19	±	4	[1.1]	390	±	57	[13.0]
TA1537	BP	2					155	±	19	[7.4]
WP2 uvrA	2-AA	4					185	±	9	[7.4]

a) No. of revertant colonies of treated plate/No. of colonies of vehicle control plate  
 SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine  
 4NQO, 4-Nitroquinoline-1-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene  
 Test item: *Elsholtzia splendens* extracts, Vehicle: Dimethylsulfoxide (DMSO)

### 3) *In Vitro* 염색체이상시험(*In vitro* Chromosome Aberration Assay)

꽃향유 샘플을 80% 에탄올로 추출하고, 약 200배 정도 감압농축하여 염색체 이상 시험을 실시하였다.

가) 시험제목 : 꽃향유 추출물의 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험

나) 시험목적 : 꽃향유 추출물의 배양 포유동물 세포에 있어서 염색체이상 유발성 여부를 검색하기 위하여 실시하였다.

다) 시험방법 : 농촌진흥청고시 제2006-7호(2006년 4월 17일) '농약의 등록시험기준과 방법(별표 6: 인축독성시험의 기준과 방법)' 및 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 473 'In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test'에 준하여 실시하였다.

### 라. 결과

#### 1) 대사활성효소계 적용군의 시험성적(Table 2, Appendix 1 및 Appendix5)

본 시험 결과, 이상증기상의 빈도는 부형제대조군, 1250, 2500 및 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 순으로 1.0, 1.5, 2.0 및 4.5로 모든 시험물질 처리군에서 이상증기상의 증가가 관찰되지 않았다. 또한, 숫적 이상을 가진 증기상의 수는 시험물질 처리군에서 부형대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 양성대조군에서는 이상증기상의 빈도가 38.5로서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다 ( $p<0.01$ ).

#### 2) 대사활성효소계 미적용군의 시험성적(Table 1, Appendix 2-4)

6시간 처리군의 이상증기상의 빈도는 부형대조군, 1250, 2500 및 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 순으로 2.0, 2.0, 3.0 및 3.0로 모든 시험물질 처리군에서 이상증기상의 증가가 관찰되지 않았다. 부형대조군의 [polyploid+핵내배화]의 빈도는 [0.0+0.0]이었고 모든 시험물질 처리군에서 부형제대조군에 비해 유의한 증가를 나타내지 않았다.

22시간 처리군의 이상증기상의 빈도는 부형대조군, 1250, 2500 및 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군의 순으로 0.5, 2.5, 3.0 및 8.0으로 용량상관성 있는 이상증기상의 증가가 관찰되었고, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다( $p<0.01$ ). 부형대조군의 [polyploid+핵내배화]의 빈도는 [0.0+0.0]이었고 모든 시험물질 처리군에서 부형제대조군에 비해 유의한 증가를 나타내지 않았다.

한편 6시간 처리군과 22시간 처리군의 양성대조군에서는 이상증기상의 빈도가 각각 26.5 및 44.4로서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다( $p < 0.01$ ).

#### 마. 고찰

꽃향유 추출물의 유전독성을 평가하기 위해 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용하여 대사활성효소계(S-9 mix) 적용(+S) 및 미적용(-S)하에 염색체 이상시험을 수행하였다. 시험물질은 DMSO에 용해하여 처리하였으며 본시험의 최고농도는 용량설정시험(P062039)을 실시하여 결정하였다. 6시간 처리군의 경우, 대사활성효소계 적용여부와 상관없이 부형제대조군에 비해 50% 이상의 세포증식 억제는 관찰되지 않았고, 대사활성효소계 미적용하에 22시간 처리한 군의 경우, 최고농도인 5 mg/ml에서 50% 이상의 세포증식 억제가 관찰되었다(Annex 1). 용량설정시험의 결과를 바탕으로 4 농도군에서 본 시험을 수행하였다(Appendix 4). 그러나 대사활성효소계 적용 6시간 처리군에서 시험에 사용한 S-9의 세포독성 유발로 S-9의 종류를 변경하여 재시험을 수행하였다(Appendix 5). 염색체이상 계수는 세포독성과 계수가능한 증기세포수를 고려하여 3 농도군에서 수행하였다.

염색체이상을 계수한 결과, 대사활성효소계 적용에 관계없이 6시간 처리군에서 부형대조군에 비해 통계학적으로 유의하고 용량상관성 있는 이상증기상의 증가는 관찰되지 않았다. 반면 대사활성효소계 미적용시 22시간 처리했을 때, 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의하고 용량상관성 있는 이상증기상의 증가가 관찰되었다. 또한 양성대조군의 경우에는 대사활성효소계 적용시 CPA 6시간 처리군과 대사활성효소계 미적용시 EMS 6 시간 및 22시간 처리군에서 부형대조군에 비해 염색체이상의 유의성있는 증가가 관찰되었다. 부형대조군과 양성대조군에서의 염색체이상은 historical data의 범위내에서 관찰되었고, 이는 본 시험이 적합하게 수행되었음을 나타낸다(Annex 2).

**Table 1. Chromosome aberration test and Relative cell count <sup>a)</sup> (1st Exp.)**

Study No. N06032						
Nominal conc. of Test item (µg/ml)	S9 mix	Times <sup>b)</sup> (hours)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberrations	Mean of PP + ER	Relative Cell Counts (%)
6 h treatment (-S9)						
0	-	6-18	2.5/2.0 <sup>a)</sup>	2.5/2.0	0.0 + 0.0	100
625	-			Not Counted		116
1250	-	6-18	2.0/2.0	3.0/3.0	0.0 + 0.0	123
2500	-	6-18	3.5/3.0	5.0/4.5	0.0 + 0.0	101
5000	-	6-18	3.5/3.0	4.5/4.0	0.0 + 0.0	86
EMS 800	-	6-18	27.0/26.5 <sup>**d)</sup>	37.50/37.0	0.0 + 0.0	119
22 h treatment (-S9)						
0	-	22-2	1.0/0.5 <sup>a)</sup>	1.0/0.5	0.0 + 0.0	100
625	-	22-2		Not Counted		130
1250	-	22-2	3.0/2.5	3.5/3.0	0.5 + 0.0	139
2500	-	22-2	3.5/3.0	3.5/3.0	0.5 + 0.0	118
5000	-	22-2	8.5/8.0 <sup>**d)</sup>	11.5/10.5	0.0 + 0.0	102
EMS 600	-	22-2	45.5/44.5 <sup>**e)</sup>	67.5/65.0	0.0 + 0.0	99

# Visible turbidity was observed when treated and at the end of the treatment.

\*\* Significantly different from the control at  $P < 0.01$ .

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> See Appendix 2, 3 & 4 for individual data

<sup>b)</sup> Treatment time-recovery time

<sup>c)</sup> Gaps included/excluded, means of duplicate cultures; 100 metaphases were examined per culture.

<sup>d)</sup> The vehicle and test-item treated group: Chisquare test and Fisher's exact test

<sup>e)</sup> The vehicle and positive control groups: Fisher's exact test

Abbreviation:

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication; EMS, Ethylmethanesulfonate

**Table 2. Chromosome aberration test and Relative cell count <sup>a)</sup> (2nd Exp.)**

Study No. N06032						
Nominal conc. of Test item (µg/ml)	S9 mix	Times <sup>b)</sup> (hours)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberrations	Mean of PP + ER	Relative Cell Counts (%)
6 h treatment (+S9)						
0	+	6-18	2.0/1.0 <sup>c)</sup>	3.5/2.5	0.0 + 0.0	100
625	+	6-18		Not Counted		96
1250	+	6-18	2.0/1.5	2.0/1.5	0.5 + 0.0	97
2500	+	6-18	2.0/2.0	3.0/3.0	0.0 + 0.0	91
5000	+	6-18	5.0/4.5	5.5/4.5	1.0 + 0.0	82
CPA 6	+	6-18	39.0/38.5 <sup>** d)</sup>	58.5/57.5	0.5 + 0.0	58

\*\* Significantly different from the control at  $P < 0.01$ .

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> See Appendix 1 & 5 for individual data

<sup>b)</sup> Treatment time-recovery time

<sup>c)</sup> Gaps included/excluded, means of duplicate cultures; 100 metaphases were examined per culture.

<sup>d)</sup> The vehicle and positive control groups: Fisher's exact test

Abbreviation:

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication; CPA, Cyclophosphamide monohydrate

## Appendix 1. Chromosome aberration test in the presence of S-9 mix

Study No. N06032											
Nominal conc. of Test item (µg/ml)	Times <sup>a)</sup> (hrs)	Number of Aberrant Metaphases	Number of Total Aberrations	Number of findings/100 metaphases							
				Gap	Chromosome type		Chromatid type		Other	PP + ER	
					BRK	EXC	BRK	EXC			
6 h treatment											
0 (A) <sup>b)</sup>	6-18	3/1 <sup>c)</sup>	4/2	2	2	0	0	0	0	0	0+0
0 (B)	6-18	1/1	3/3	0	3	0	0	0	0	0	0+0
625 (A)	6-18				Not Counted						
625 (B)	6-18				Not Counted						
1250 (A)	6-18	3/2	3/2	1	0	0	0	1	1	0	0+0
1250 (B)	6-18	1/1	1/1	0	0	0	1	0	0	0	1+0
2500 (A)	6-18	3/3	4/4	0	3	0	1	0	0	0	0+0
2500 (B)	6-18	1/1	2/2	0	2	0	0	0	0	0	0+0
5000 (A)	6-18	4/3	4/3	1	1	0	1	1	0	0	1+0
5000 (B)	6-18	6/6	7/6	1	3	0	2	1	0	0	1+0
CPA 6 (A)	6-18	39/38	56/54	2	3	0	18	31	2	0	0+0
CPA 6 (B)	6-18	39/39	61/61	0	4	1	19	35	2	0	1+0

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> Treatment time-recovery time

<sup>b)</sup> (A) and (B) indicate duplicate cultures.

<sup>c)</sup> Gaps included/excluded, 100 metaphases per culture.

CPA : Cyclophosphamide monohydrate

BRK, Break; EXC, Exchange; PP, Polyploid; ER, Endoreduplication

**Appendix 2. Chromosome aberration test in the absence of S-9 mix  
(6 h treatment)**

Study No. N06032											
Nominal conc. of Test item ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Times <sup>a)</sup> (hrs)	Number of Aberrant Metaphases	Number of Total Aberrations	Number of findings/100 metaphases							
				Gap	Chromosome type		Chromatid type		Other	PP + ER	
					BRK	EXC	BRK	EXC			
6 h treatment											
0 (A) <sup>b)</sup>	6-18	3/3 <sup>c)</sup>	3/3	0	1	0	2	0	0	0+0	
0 (B)	6-18	2/1	2/1	1	0	0	0	0	1	0+0	
625 (A)	6-18				Not Counted						
625 (B)	6-18				Not Counted						
1250 (A)	6-18	2/2	3/3	0	2	0	0	0	1	0+0	
1250 (B)	6-18	2/2	3/3	0	2	0	0	1	0	0+0	
2500 (A)	6-18	4/3	6/5	1	3	0	2	0	0	0+0	
2500 (B)	6-18	3/3	4/4	0	3	0	0	0	1	0+0	
5000 (A)	6-18	3/3	3/3	0	2	0	1	0	0	0+0	
5000 (B)	6-18	4/3	6/5	1	2	0	2	1	0	0+0	
EMS 800 (A)	6-18	29/29	42/41	1	6	0	14	21	0	0+0	
EMS 800 (B)	6-18	25/24	34/33	1	3	1	6	22	1	0+0	

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> Treatment time-recovery time

<sup>b)</sup> (A) and (B) indicate duplicate cultures.

<sup>c)</sup> Gaps included/excluded, 100 metaphases per culture.

EMS : Ethylmethanesulfonate

BRK, Break; EXC, Exchange; PP, Polyploid; ER, Endoreduplication

**Appendix 3. Chromosome aberration test in the absence of S-9 mix  
(22 h treatment)**

Study No. N06032											
Nominal conc. of Test item (µg/ml)	Times <sup>a)</sup> (hrs)	Number of Aberrant Metaphases	Number of Total Aberrations	Number of findings/100 metaphases							
				Gap	Chromosome type		Chromatid type		Other	PP + ER	
					BRK	EXC	BRK	EXC			
22 h treatment											
0 (A) <sup>b)</sup>	22-2	2/1 <sup>c)</sup>	2/1	1	1	0	0	0	0	0	0+0
0 (B)	22-2	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
625 (A)	22-2				Not Counted						
625 (B)	22-2				Not Counted						
1250 (A)	22-2	2/1	2/1	1	0	0	1	0	0	0	1+0
1250 (B)	22-2	4/4	5/5	0	4	0	1	0	0	0	0+0
2500 (A)	22-2	2/2	2/2	0	1	0	1	0	0	0	1+0
2500 (B)	22-2	5/4	5/4	1	1	0	2	1	0	0	0+0
5000 (A)	22-2	7/7	9/9	0	4	0	3	2	0	0	0+0
5000 (B)	22-2	10/9	14/12	2	2	0	8	2	0	0	0+0
EMS 600 (A)	22-2	48/47	74/71	3	2	0	19	48	2	0	0+0
EMS 600 (B)	22-2	43/42	61/59	2	5	0	9	43	2	0	0+0

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> Treatment time-recovery time

<sup>b)</sup> (A) and (B) indicate duplicate cultures.

<sup>c)</sup> Gaps included/excluded, 100 metaphases per culture.

EMS : Ethylmethanesulfonate

BRK, Break; EXC, Exchange; PP, Polyploid; ER, Endoreduplication

**Appendix 4. Relative cell counts of main study <sup>a)</sup> (1st Exp.)**

Study No. N06032								
Nominal Conc. of Test item (µg/ml)	S-9 mix	Times <sup>b)</sup> (hours)	Cell counts		Mean	Relative Cell Counts <sup>d)</sup> , %		
			Flask A <sup>c)</sup>	Flask B				
0	+	6-18	1480	1445	1467	1466	1465	100
625	+	6-18	1761	1677	1704	1652	1699	116
1250	+	6-18	1761	1716	1842	1904	1806	123
2500	+	6-18	1402	1394	1598	1510	1476	101
5000	+	6-18	1237	1221	1242	1312	1253	86
CPA 6	+	6-18	1577	1539	1993	1876	1746	119
0	-	6-18	6206	6230	5603	5648	5922	100
625	-	6-18	5676	5672	5166	5224	5435	92
1250	-	6-18	6744	6810	6061	6051	6417	108
2500	-	6-18	5703	5668	5586	5569	5632	95
5000	-	6-18	5815	5819	5692	5791	5779	98
EMS 800	-	6-18	4885	4814	4986	4988	4918	83
0	-	22-2	3686	3716	3393	3444	3560	100
625	-	22-2	4687	4647	4590	4619	4636	130
1250	-	22-2	5228	5152	4707	4694	4945	139
2500	-	22-2	3857	3854	4551	4478	4185	118
5000	-	22-2	3583	3320	3846	3813	3641	102
EMS 600	-	22-2	3421	3390	3604	3612	3507	99

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> Each culture was trypsinized and suspended with 1 ml of 0.05% trypsin and 9 ml of culture medium. The cell suspensions of 0.8 ml/culture were diluted 25 times with 19.2 ml of Isoton® sol. The cells in 0.5 ml Isoton sol. were counted twice/culture using Coulter Counter® model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

<sup>b)</sup> Treatment time - recovery time

<sup>c)</sup> A and B indicate duplicate cultures.

<sup>d)</sup> Relative Cell Counts =  $\frac{\text{Cell counts of treated flask}}{\text{Cell counts of control flask}} \times 100 (\%)$

CPA, Cyclophosphamide monohydrate; EMS, Ethylmethanesulfonate

**Appendix 5. Relative cell counts of main study <sup>a)</sup> (2nd Exp.)**

Study No. N06032								
Nominal Conc. of Test item (µg/ml)	S-9 mix	Times <sup>b)</sup> (hours)	Cell counts				Mean	Relative Cell Counts <sup>d)</sup> , %
			Flask A <sup>c)</sup>		Flask B			
0	+	6-18	6701	6759	6493	6572	6631	100
625	+	6-18	6231	6286	6614	6420	6388	96
1250	+	6-18	6823	6727	6105	6095	6438	97
2500	+	6-18	5545	5661	6576	6471	6063	91
5000	+	6-18	4973	4926	5927	5869	5424	82
CPA 6	+	6-18	4498	4419	3310	3142	3842	58

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> Each culture was trypsinized and suspended with 1 ml of 0.05% trypsin and 9 ml of culture medium. The cell suspensions of 0.8 ml/culture were diluted 25 times with 19.2 ml of Isoton® sol. The cells in 0.5 ml Isoton sol. were counted twice/culture using Coulter Counter® model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

<sup>b)</sup> Treatment time - recovery time

<sup>c)</sup> A and B indicate duplicate cultures.

<sup>d)</sup> Relative Cell Counts =  $\frac{\text{Cell counts of treated flask}}{\text{Cell counts of control flask}} \times 100 (\%)$

CPA, Cyclophosphamide monohydrate

**Annex 1. Result of preliminary dose-range finding test <sup>a)</sup>**

Study No. P06039						
Nominal Conc. of Test item (µg/ml)	S-9 mix	Times <sup>b)</sup> (hours)	Cell counts		Mean	Relative Cell Counts <sup>c)</sup> , %
			One Flask/dose			
0	+	6-18	7759	7641	7700	100
19.5	+	6-18	7780	7640	7710	100
39.1	+	6-18	7627	7706	7667	100
78.1	+	6-18	7948	7877	7913	103
156.3	+	6-18	7699	7751	7725	100
312.5	+	6-18	7914	7970	7942	103
625	+	6-18	8049	7912	7981	104
1250	+	6-18	8269	8221	8245	107
2500	+	6-18	8262	8300	8281	108
5000	+	6-18	7191	7136	7164	93
0	-	6-18	9007	9108	9058	100
19.5	-	6-18	9357	9330	9344	103
39.1	-	6-18	9133	9124	9129	101
78.1	-	6-18	9162	9235	9199	102
156.3	-	6-18	9239	9284	9262	102
312.5	-	6-18	9189	8989	9089	100
625	-	6-18	9289	9373	9331	103
1250	-	6-18	9313	9220	9267	102
2500	-	6-18	9170	9102	9136	101
5000	-	6-18	5858	5746	5802	64
0	-	22-2	9170	9072	9121	100
19.5	-	22-2	8777	8665	8721	96
39.1	-	22-2	8904	8749	8827	97
78.1	-	22-2	8954	8932	8943	98
156.3	-	22-2	9091	8934	9013	99
312.5	-	22-2	9178	9141	9160	100
625	-	22-2	8727	8866	8797	96
1250	-	22-2	8139	9239	8689	95
2500	-	22-2	7082	7146	7114	78
5000	-	22-2	4181	4043	4112	45

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> Each culture was trypsinized and suspended with 1 ml of 0.05% trypsin and 9 ml of culture medium. The cell suspensions of 0.8 ml/culture were diluted 25 times with 19.2 ml of Isoton® sol. The cells in 0.5 ml Isoton sol. were counted twice/culture using Coulter Counter® model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

<sup>b)</sup> Treatment time - recovery time

$$\text{Relative Cell Counts} = \frac{\text{Cell counts of treated flask}}{\text{Cell counts of control flask}} \times 100 (\%)$$

**Annex 1. Result of preliminary dose-range finding test <sup>a)</sup>**

Study No. P06039						
Nominal Conc. of Test item (µg/ml)	S-9 mix	Times <sup>b)</sup> (hours)	Cell counts		Mean	Relative Cell Counts <sup>c)</sup> , %
			One Flask/dose			
0	+	6-18	7759	7641	7700	100
19.5	+	6-18	7780	7640	7710	100
39.1	+	6-18	7627	7706	7667	100
78.1	+	6-18	7948	7877	7913	103
156.3	+	6-18	7699	7751	7725	100
312.5	+	6-18	7914	7970	7942	103
625	+	6-18	8049	7912	7981	104
1250	+	6-18	8269	8221	8245	107
2500	+	6-18	8262	8300	8281	108
5000	+	6-18	7191	7136	7164	93
0	-	6-18	9007	9108	9058	100
19.5	-	6-18	9357	9330	9344	103
39.1	-	6-18	9133	9124	9129	101
78.1	-	6-18	9162	9235	9199	102
156.3	-	6-18	9239	9284	9262	102
312.5	-	6-18	9189	8989	9089	100
625	-	6-18	9289	9373	9331	103
1250	-	6-18	9313	9220	9267	102
2500	-	6-18	9170	9102	9136	101
5000	-	6-18	5858	5746	5802	64
0	-	22-2	9170	9072	9121	100
19.5	-	22-2	8777	8665	8721	96
39.1	-	22-2	8904	8749	8827	97
78.1	-	22-2	8954	8932	8943	98
156.3	-	22-2	9091	8934	9013	99
312.5	-	22-2	9178	9141	9160	100
625	-	22-2	8727	8866	8797	96
1250	-	22-2	8139	9239	8689	95
2500	-	22-2	7082	7146	7114	78
5000	-	22-2	4181	4043	4112	45

Test item : 꽃향유 추출물

<sup>a)</sup> Each culture was trypsinized and suspended with 1 ml of 0.05% trypsin and 9 ml of culture medium. The cell suspensions of 0.8 ml/culture were diluted 25 times with 19.2 ml of Isoton® sol. The cells in 0.5 ml Isoton sol. were counted twice/culture using Coulter Counter® model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

<sup>b)</sup> Treatment time - recovery time

$$\text{Relative Cell Counts} = \frac{\text{Cell counts of treated flask}}{\text{Cell counts of control flask}} \times 100 (\%)$$

**Annex 2. Historical control data for CHL cultures <sup>a)</sup>**

2002-2006

	6+S		6-S		24-S or 22-S	
	Vehicle control	CPA 6 µg/ml	Vehicle control	EMS 800 µg/ml	Vehicle control	EMS 600 µg/ml
Mean aberrant metaphases <sup>b)</sup>	0.58	21.79	0.41	20.64	0.47	29.82
SD	0.71	7.71	0.60	5.08	0.67	6.78
Minimum	0.00	8.00	0.00	9.00	0.00	12.00
Maximum	3.00	44.00	2.00	40.00	3.00	52.00

*(updated on March 30, 2006)*

<sup>a)</sup> Calculated on the basis of data from 196, 190 and 188 vehicle control cultures (6+S, 6-S and 24-S or 22-S respectively)  
 Calculated on the basis of data from 134, 136 and 132 positive control cultures (6+S, 6-S and 24-S or 22-S respectively)

<sup>b)</sup> Gaps excluded, 100 metaphases were examined per culture.

Vehicle control (Sterile distilled water, DMSO, acetone or vehicle supplied by sponsor)

CPA : Cyclophosphamide monohydrate

EMS : Ethylmethanesulfonate

## 8. 엉겅퀴속 및 향유속 식물을 이용한 Nutraceuticals(타블렛, 캡슐 등)의 제품화 및 산업화 연구

가. 엉겅퀴 nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 배합비율(recipe) 분석 및 제조  
 기능성 소재를 이용한 제품 개발 및 산업화 연구를 위하여, 제1세부과제에서 총 플라보노이드와 apigenin 함량 분석 결과, 엉겅퀴의 1회 섭취량을 120 mg으로 설정하였다. 엉겅퀴 nutraceutical을 타블렛 또는 캡슐로 제조하기 위하여, 타블렛과 캡슐(경질 적갈색 캡슐)을 preliminary 제조하여 전문가를 대상으로 관능검사를 하였다(Table 45). 관능검사에 참여한 전문가는 식품영양학 전공 대학원생 및 연구원으로 평균 연령은 30세(24~36세)이었으며 여성으로 구성된 12명이었다. 관능검사 결과 엉겅퀴타블렛 보다 엉겅퀴캡슐이 외관, 색 및 전체적인 선호도에서 각각 5.65, 5.79 및 6.65의 높은 점수를 나타내어 엉겅퀴 nutraceutical은 캡슐로 제조하기로 결정하였다. 캡슐에 함유된 분말상태의 식물이 육안으로 확인되지 않도록 하기 위하여 경질 적갈색 불투명 캡슐로 하였으며, 캡슐의 배합비율은 Table 46과 같다. 엉겅퀴캡슐은 동결건조하여 분말화한 엉겅퀴, 유당 및 젤라틴 등을 첨가하여 제조하였으며, 그 배합비율과 완성된 제품의 모양은 Table 45와 Fig. 52와 같다. 엉겅퀴캡슐 1개당 중량은 200 mg이었다. 엉겅퀴캡슐에 대한 플라시보캡슐은 엉겅퀴분말 대신 옥수수전분을 동량 첨가하고 나머지 원료 및 배합비율은 동일하게 첨가하여 플라시보캡슐을 제조하였다.

Table 45. 엉겅퀴 및 꽃향유 첨가한 타블렛<sup>1)</sup>과 캡슐<sup>2)</sup>의 전문가 관능검사

	대조군	엉겅퀴 타블렛	꽃향유 타블렛	캡슐 대조군 <sup>3)</sup>	엉겅퀴 캡슐	꽃향유 캡슐
외관	4.90±1.01	4.51±1.06	4.43±0.92	5.42±0.91	5.65±0.85	5.49±1.01
색	5.02±0.17	4.98±1.02	4.78±1.20	5.43±0.62	5.79±1.01	5.61±0.32
전체적인 선호도	5.01±0.49	5.05±0.37	4.96±0.65	6.36±0.21	6.65±1.30	6.39±0.73

n=12

1점: 극도로 싫다, 5점: 보통이다, 9점: 극도로 좋다

<sup>1)</sup> 유당, 결정 셀룰로즈 등을 첨가하여 성형함,

<sup>2)</sup> 경질 적갈색 불투명 캡슐

<sup>3)</sup> 적갈색 경질 캡슐인 엘-시스틴500, 안국약품(주) 사용

Table 46. 경질 캡셀 적갈색 불투명(43U/43U)의 배합비율

성분	배합비율(%)
젤라틴	93.7903
자당지방산에스테르	0.0469
빙초산	0.1688
이산화티타늄	0.7503
식용색소적색제40호	1.2380
식용색소황생제5호	0.3095
식용색소청색제1호	0.0131
정제수	3.6831
	100.0000

Table 47. 영경귀 캡슐의 원료명 및 배합비율

원료명	배합비율(%)	캡슐 당 함유량(mg)	원료 정보
영경귀동결건조분말	60.00	120.00	
유당	36.50	73.60	HILMA (미국)
젤라틴(165Bloom, 식품용)	1.76	3.52	(주)젤텍 (국산)
카르복시메틸셀룰로오스나 트륨(CMC-Na)	0.44	0.88	(주)보락 (국산)
스테아린산마그네슘	1.00	2.00	신일제약 (국산)
	100.00	200.00	



Figure 52. 꽃향유(왼쪽), 영경귀캡슐(가운데), placebo용 캡슐(오른쪽) 사진

나. 꽃향유 nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 배합비율(recipe) 분석 및 제조  
 꽃향유의 총플라보노이드와 apigenin 함량 분석 결과, 꽃향유의 1회 섭취량을 120 mg으로 설정하였다.

꽃향유 nutraceutical을 타블렛 또는 캡슐로 제조하기 위하여, 타블렛(유당, 결정 셀룰로즈 등을 첨가하여 성형)과 캡슐(경질 적갈색 캡슐)을 preliminary 제조하여 12명으로 구성된 여성 전문가를 대상으로 관능검사를 하였다(Table 45). 전문가 그룹은 식품영양학 전공 대학원생 및 연구원으로 평균 연령은 30세(24~36세)이었다. Table 45에 제시된 바와 같이 꽃향유 타블렛 보다 꽃향유캡슐이 외관, 색 및 전체적인 선호도에서 높은 점수(외관; 5.49, 색; 5.61, 전체적인 선호도; 6.39)를 보였으므로 꽃향유 nutraceutical은 캡슐형태로 제조하기로 결정하였다. 캡슐에 함유된 분말상태의 식물이 육안으로 확인되지 않도록 하기 위하여 영경귀캡슐에서와 마찬가지로 경질 적갈색 불투명 캡슐로 하였다(Table 46).

꽃향유캡슐은 동결건조하여 분말화한 꽃향유, 유당 및 젤라틴 등을 첨가하여 제조하였으며, 그 배합비율과 완성된 제품의 모양은 Table 48 및 Fig. 52와 같다. 꽃향유캡슐 1개당 중량은 200 mg이었다. 꽃향유캡슐에 대한 플라시보캡슐은 영경귀분말 대신 옥수수전분을 동량 첨가하고 나머지 원료 및 배합비율은 동일하게 첨가하여 꽃향유 플라시보캡슐을 제조하였다.

Table 48. 꽃향유캡슐의 원료명 및 배합비율

원료명	배합비율(%)	캡슐 당 함유량(mg)	원료 정보
꽃향유동결건조분말	60.00	120.00	
유당	36.50	73.00	HILMA (미국)
젤라틴(165Bloom, 식품용)	2.00	4.00	(주)젤텍 (국산)
카르복시메틸셀룰로오스나 트륨(CMC-Na)	0.50	1.00	(주)보락 (국산)
스테아린산마그네슘	1.00	2.00	신일제약 (국산)
	100.00	200.00	

#### 다. 전문가에 의한 관능검사

영경귀 및 꽃향유를 이용한 Nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 제품화 연구를 위하여, 영경귀 및 꽃향유를 첨가한 타블렛과 캡슐을 제조하여 어떤 형태의 nutraceutical이 더 바람직한지를 확인하기 위하여 전문가에 의한 관능검사를 실시하였다. 전문가는 관능검사에 많은 경험이 있는 본교 식품영양학 전공 대학원생 및 연구원으로 성별은 모두 여성이었으며, 평균 연령은 30세(24~36세)이었다. 이들 전문가들이 예비 제조된 영경귀 및 꽃향유의 타블렛과 캡슐을 및 각 대조군을 대상으로 관능검사를 실시하였다. Table 45에 제시된 바와 같이, 타블렛보다는 캡슐의 형태가 전문가들에게 더 선호되었으며, 따라서 본 연구에서 제조하고자 하는 영경귀 및 꽃향유 nutraceuticals은 캡슐 형태로 제조하기로 결정하였다. 또한 관능검사에 참여한 전문가의 의견 및 관능검사 결과에 따라 캡슐은 경질 적갈색 불투명으로 제조하기로 하였다.

#### 라. Target group에 의한 관능검사

영경귀캡슐과 꽃향유캡슐을 제조한 후, 생리전증후군 실험 대상자의 연령인 20대 여대생 57명을 대상으로 target group 관능검사를 실시하였다. 검사 항목은 외관, 색, 삼킴성(캡슐을 물과 함께 삼켰을 때의 느낌) 및 전체적인 선호도의 총 4가지

이었다. 관능검사 대상자 가운데 식품 및 약품에 대한 알레르기반응이 있는 사람은 제외하였으며, 관능검사에 대한 충분한 설명 후, 본인이 참여하겠다고 허락한 대상자에 한하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사 대상자들에게 무작위로 추출한 3자리 숫자가 적힌 5가지 시료를 흰색 쟁반(35 cm × 20 cm) 위에 무작위로 나열하여 제시하였으며, 왼쪽 시료부터 차례로 외관 및 색을 평가하고 물과 함께 삼킨 후, 전체적인 선호도를 평가하도록 하였다. 정수된 물은 흰색 종이컵(150 mL)에 담아서 제공하였다. 대조군은 엉경퀴 및 꽃향유 캡슐의 색과 크기가 유사한 적갈색 경질 캡슐인 “엘시스틴500(안국약품(주))”를 사용하였고, 엉경퀴플라시보캡슐, 엉경퀴캡슐, 꽃향유플라시보캡슐 및 꽃향유캡슐의 5종에 대하여 외관 색, 삼킴성 및 전체적인 선호도를 평가하였다. Table 49에 따르면, 5종 시료의 외관의 점수는 5.32~5.43사이로 나타났으며, 색은 5.49~5.62, 삼킴성은 4.98~5.13 및 전체적인 선호도는 5.59~5.81로 나타났다. 즉, target group의 관능검사자가 5종의 시료 모두를 보통으로 표현하여 각 시료 사이의 차이는 없었다.

Table 49. 엉경퀴 및 꽃향유를 첨가한 경질 캡슐의 target group 선호도

	대조군 <sup>1)</sup>	엉경퀴 플라시보	엉경퀴캡슐	꽃향유 플라시보	꽃향유캡슐
외관	5.34±0.35	5.41±0.47	5.43±0.07	5.32±0.53	5.39±0.98
색	5.55±1.02	5.62±1.21	5.49±0.95	5.53±0.47	5.51±0.32
삼킴성 <sup>2)</sup>	5.01±0.21	5.11±1.01	4.98±0.25	5.04±0.41	5.13±0.93
전체적인 선호도	5.65±1.01	5.71±1.30	5.59±0.81	5.68±1.00	5.81±0.97

n=57

1점: 극도로 싫다, 5점: 보통이다, 9점: 극도로 좋다

<sup>1)</sup> 적갈색 경질 캡슐인 엘-시스틴500, 안국약품(주) 사용

<sup>2)</sup> 캡슐을 물과 함께 삼켰을 때의 느낌

## 9. 월경전 증후군에 대한 임상효과 확인

가. 각 집단 별 우울, 불안 사전-사후 점수 비교

통계적 검증을 하기에 앞서, 각 집단에 대한 동질성 검사를 한 결과 각 집단의 분산이 동일한 것으로 나타났다. 그 다음 각 집단 별로 우울(BDI), 불안(STAI)

검사에서 약물 처치 전후에 집단 간 유의한 차이가 나타났는지를 확인하기 위해 일원분산분석(ANOVA)을 실시하였다. 그 결과, 우울과 불안 모두에서 집단 간에 유의한 차이가 존재함을 알 수 있다. Scheffe 방식으로 사후 검증한 결과, 꽃향유를 처치한 집단이 다른 두 집단에 비해 우울과 불안 점수가 현저하게 감소하였다 (Table 50).

Table 50. 우울(BDI)과 불안(STAI) 검사의 집단 비교

변인	시점	꽃향유 집단 (n=10)	영정귀 집단 (n=10)	Placebo 집단 (n=10)	
우울(BDI)	사전	33.50(5.82)	33.60(8.81)	33.70(6.11)	8.776**
	사후	23.60(4.79)	30.40(5.40)	33.00(5.33)	
불안(STAI)	사전	59.40(7.30)	50.90(9.50)	55.60(9.85)	4.130*
	사후	48.10(5.20)	52.00(6.18)	57.10(9.10)	

( )은 표준편차 \*  $p < .05$ , \*\*  $p < .01$

#### 나. PAF의 전체 및 하위 18개 증상군의 사전-사후 점수 비교

각 집단 별로 PAF(월경 전기 증상 점수) 검사에서 처치 전후에 집단 간 유의한 차이가 나타났는지를 확인하기 위해 일원분산분석(ANOVA)을 실시하였다. 분석 결과, PAF 검사 전체 점수에서는 집단 간에 통계적 유의차가 나타나지 않았으나 하위 유형 중 scale 3(불안정)에서만 집단 간 유의한 차이가 나타났는데 사후 분석 결과, 꽃향유를 처치한 집단에서 불안정 점수가 다른 집단에 비해 현저하게 낮아졌음을 알 수 있다. 또한 통계적으로 유의하지는 않았으나 사전-사후의 평균 점수에 변화가 존재함을 알 수 있었다. 전체 PAF 검사에서 꽃향유를 처치한 집단은 사후 평균 점수가 사전 평균 점수에 비해 94점, 영정귀를 처치한 집단은 72점, placebo를 제공한 집단은 38점의 차이를 보였다. 즉, 통계적으로 유의한 결과는 아니지만 사전-사후 평균 점수에서 가장 많은 변화를 보인 집단은 꽃향유를 처치한 집단으로 나타났다(Table 51).

Table 51. PAF 검사 및 하위 증상군의 집단 비교

변인	시점	꽃향유집단 (n=10)	영경취집단 (n=10)	Placebo집단 (n=10)	F
PAF 전체	사전	270.20(82.61)	257.30(74.81)	245.20(73.48)	.650
	사후	176.70(61.33)	185.60(53.65)	207.00(67.47)	
scale 1 기분저조/즐거움 상실	사전	29.60(12.09)	28.30(9.32)	29.00(12.61)	1.191
	사후	20.20(10.34)	18.50(6.02)	24.40(9.44)	
scale 2 내인성 우울 특질	사전	15.60(4.17)	13.70(5.01)	14.30(4.81)	.450
	사후	8.90(4.12)	9.90(3.35)	10.50(3.92)	
scale 3 불안정	사전	11.50(3.81)	11.80(2.82)	10.20(4.02)	4.441*
	사후	6.40(1.65)	8.30(3.06)	10.80(4.57)	
scale 4 비정형적인 우울증적 특질	사전	21.30(6.75)	21.70(6.65)	20.40(5.84)	.481
	사후	14.50(6.01)	15.60(6.00)	17.20(6.55)	
scale 5 신경질적인 특질	사전	16.00(6.06)	15.90(4.63)	14.20(6.46)	2.495
	사후	10.30(3.20)	10.10(4.18)	13.80(4.94)	
scale 6 적대감 및 분노	사전	19.00(8.03)	15.70(5.40)	14.80(6.30)	2.315
	사후	9.40(3.03)	9.90(3.64)	13.80(7.27)	
scale 7 사회적 위축	사전	14.90(4.73)	14.10(4.63)	12.40(5.95)	.831
	사후	7.50(3.69)	8.20(3.91)	9.90(5.11)	
scale 8 불안	사전	14.00(5.62)	12.10(3.84)	12.40(4.03)	.195
	사후	8.70(4.00)	9.00(2.87)	9.70(4.03)	
scale 9 행복감 증가	사전	5.40(2.80)	5.80(2.00)	5.60(2.12)	.656
	사후	5.50(1.84)	5.90(2.13)	4.90(1.91)	
scale 10 충동성	사전	11.60(5.80)	9.50(3.90)	9.70(3.95)	1.714
	사후	6.30(2.41)	7.80(3.12)	9.20(4.61)	
scale 11 기질적인 정신증적 특질	사전	17.30(8.74)	15.40(4.58)	16.30(6.77)	.039
	사후	12.70(7.33)	12.50(3.57)	13.20(5.73)	
scale 12 일반적인 신체적 불쾌	사전	17.00(5.01)	17.50(5.68)	16.30(6.00)	1.668
	사후	11.50(3.06)	13.10(5.55)	15.70(6.38)	

( )은 표준편차 \*  $p < .05$ , \*\*  $p < .01$

변인	시점	꽃향유집단 (n=10)	영경귀집단 (n=10)	Placebo집단 (n=10)	F
scale 13 수분정체의 신호	사전	9.20(3.12)	9.00(4.14)	10.40(4.65)	1.178
	사후	6.30(3.20)	6.40(2.55)	8.20(3.52)	
scale 14 자율신경과 관련된 신체적 변화	사전	17.30(7.12)	18.20(7.69)	17.10(7.20)	.729
	사후	11.70(4.17)	15.10(7.48)	13.30(6.77)	
scale 15 피로	사전	14.30(4.24)	14.30(3.90)	14.70(5.12)	.278
	사후	9.50(4.04)	9.30(3.27)	10.50(4.20)	
scale 16 사회적 기능 손상	사전	31.40(8.98)	28.10(8.41)	28.80(11.94)	.195
	사후	19.50(7.43)	21.40(8.97)	21.50(7.72)	
scale 17 기타 기분 및 행동의 변화	사전	30.40(8.72)	29.00(8.74)	27.60(9.14)	.989
	사후	20.30(6.09)	19.50(8.02)	23.90(8.08)	
scale 18 기타 신체적 변화	사전	12.80(4.32)	16.40(6.59)	14.80(5.96)	1.253
	사후	9.30(4.03)	10.80(3.62)	10.90(4.71)	

( )은 표준편차 \*  $p < .05$ , \*\*  $p < .01$

#### 다. 각 집단의 검사별 점수 변화 패턴 비교

집단 간 차이가 통계적으로 유의한 결과를 보인 검사들의 변화 패턴을 보기 위해 그림을 제시하였다. 우울(BDI)의 사전-사후 검사 점수는 꽃향유 집단이 33.50점에서 23.60점으로, 영경귀 집단이 33.60점에서 30.40점으로, 플라시보 집단이 33.70점에서 33.00점으로 감소되었다. 결과적으로 꽃향유 집단이 우울에서 가장 많은 점수의 변화를 보였음을 알 수 있다(Fig. 53).

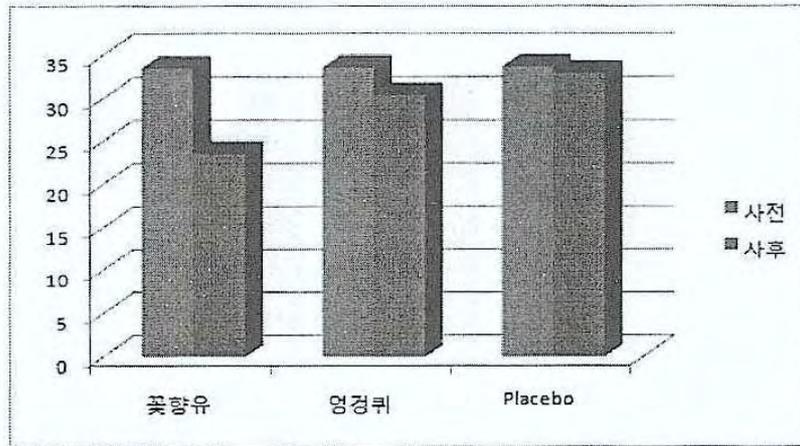


Figure 53. 우울(BDI)의 점수 변화.

불안(STAI)의 사전-사후 검사 점수는 꽃향유 집단이 59.40점에서 48.10점으로, 영경귀 집단이 50.90점에서 52.00점으로, 플라시보 집단이 55.60점에서 57.10점으로 감소되었다. 결과적으로 꽃향유 집단이 불안 점수에서도 가장 많은 변화를 보였음을 알 수 있다(Fig. 54).

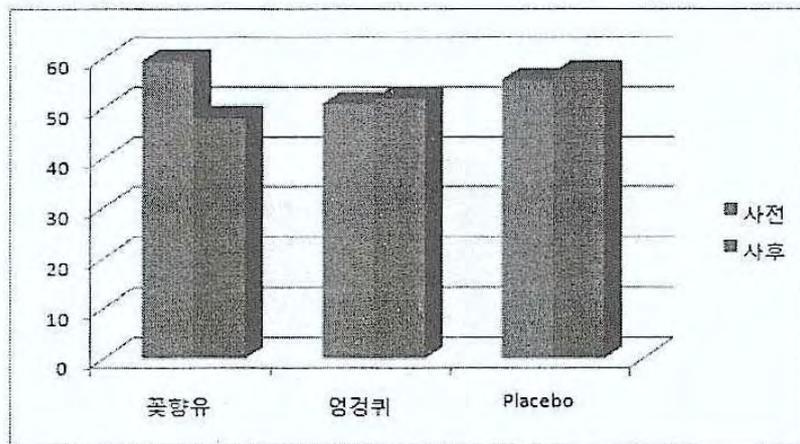


Figure 54. 불안(STAI)의 점수 변화.

PAF(월경 전기 증상) 점수의 경우 유의한 결과를 보이지는 않았으나 사전-사후 검사 점수에서 변화가 있었으므로 다음의 그림을 제시한다. PAF 검사 전체 점수는 꽃향유 집단이 270.20점에서 176.70점으로, 영경귀 집단이 257.30점에서 185.60점으로, 플라시보 집단이 245.20점에서 207.00점으로 감소되었다. 결과적으로 꽃향유 집단이 PAF 전체 점수에서 통계적으로 유의하지는 않았으나 가장 많은 점수의 변화를 보였다고 할 수 있겠다(Fig. 55).

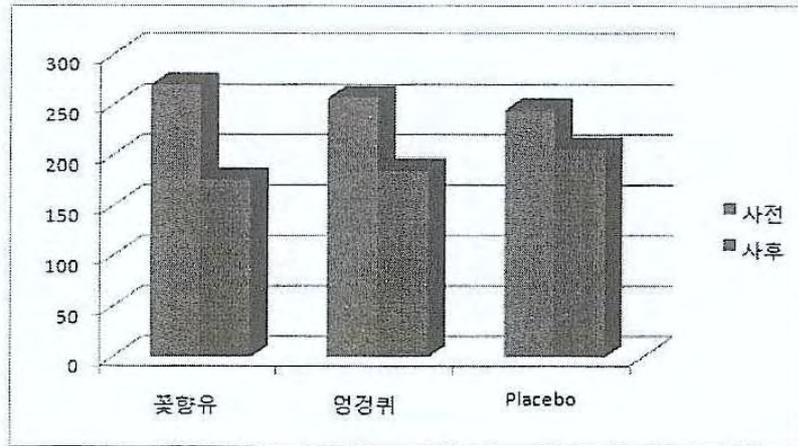


Figure 55. PAF(월경 전기 증상)의 점수 변화.

PAF(월경 전기 증상)의 하위 유형 중 유의한 결과를 보인 scale 3(불안정)에 대한 점수 변화는 다음과 같다. 꽃향유 집단이 11.50점에서 6.40점으로, 영경귀 집단이 11.80점에서 8.30점으로 감소되었고 플라시보 집단은 10.20점에서 10.80점으로 오히려 증가하였다. 결과적으로 꽃향유 집단이 다른 집단에 비해 PAF 하위 유형인 불안정 척도에서도 통계적으로 유의한 변화를 보였다고 할 수 있다(Fig. 56).

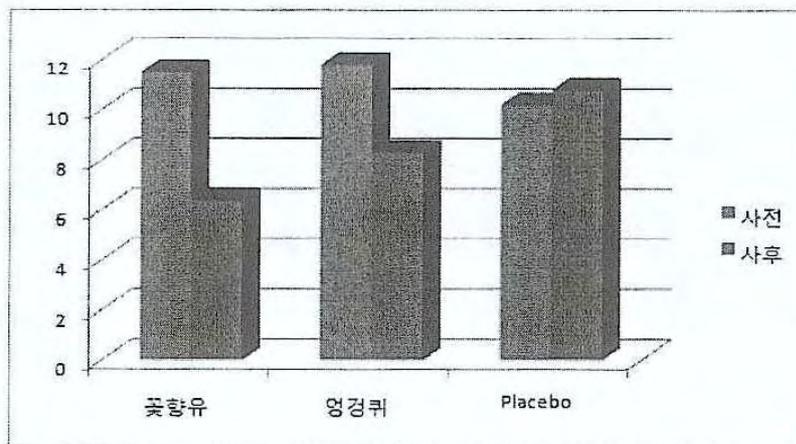


Figure 56. PAF 하위 유형 중 scale 3(불안정)의 점수 변화.



9. 그 밖에 어떤 이유 때문에 지나간 세 차례의 주기 동안 월경을 거른 적이 있습니까?  
 1 - 예    2 - 아니요

10. 자신이 경험하는 월경전 증상에 대해서 이야기 해주세요.

---



---



---

11. 월경전 증상에 대처하기 위해서 했던 행동이 있으면 이야기 해주세요.

---

12. 자신이 PMS 증상이 심하다고 느끼기 시작한 것은 언제부터입니까?

---

13. 프로그램 참여 시간을 위해서 수업시간을 표시해주세요!

	월	화	수	목	금
a 9-10					
a 10-11					
a 11-12					
p 1-2					
p 2-3					
p 3-4					
p 4-5					
p 5-6					
p 6시 이후					

- 다음 장으로 가주세요 -

※ 각 문항을 자세히 읽어보시고 그 중 요즈음의(지난 일주일 동안의) 자신을 가장 잘 나타낸다고 생각되는 하나의 문장을 선택하여 그 번호를 ( )에 기입하여 주십시오. 한 문항도 빠뜨리지 말고 한 문장만을 선택하되, 너무 오래 생각하지 마시고 솔직하게 답해 주십시오.

1. ( )

- 1)나는 슬프지 않다.
- 2)나는 슬프다.
- 3)나는 항상 슬프고 기운을 낼 수 없다.
- 4)나는 너무나 슬프고 불쌍해서 도저히 견딜 수 없다.

2. ( )

- 1)나는 앞날에 대해서 별로 낙심하지 않는다.
- 2)나는 앞날에 대해서 용기가 나지 않는다.
- 3)나는 앞날에 대해서 기대할 것이 아무 것도 없다고 느낀다.
- 4)나의 앞날은 아주 절망적이고 나아질 가망이 없다고 느낀다.

3. ( )

- 1)나는 실패자라고 느끼지 않는다.
- 2)나는 보통 사람들보다 더 많이 실패한 것 같다.
- 3)내가 살아온 과거를 되돌아보면 실패 투성이인 것 같다.
- 4)나는 인간으로서 완전히 실패자라고 느낀다.

4. ( )

- 1)나는 전과 같이 일상생활에 만족하고 있다.
- 2)나의 일상생활은 예전처럼 즐겁지 않다.
- 3)나는 요즈음에는 어떤 것에서도 별로 만족을 얻지 못한다.
- 4)나는 모든 것이 다 불만스럽고 싫증난다.

5. ( )

- 1)나는 특별히 죄책감을 느끼지 않는다.
- 2)나는 죄책감을 느낄 때가 많다.
- 3)나는 죄책감을 느낄 때가 아주 많다.
- 4)나는 항상 죄책감에 시달리고 있다.

6. ( )

- 1)나는 벌을 받고 있다고 느끼지 않는다.
- 2)나는 어쩌면 벌을 받을지도 모른다는 느낌이 든다.
- 3)나는 벌을 받을 것 같다.
- 4)나는 지금 벌을 받고 있다고 느낀다.

7. ( )

- 1)나는 나 자신에게 실망하지 않는다.
- 2)나는 나 자신에게 실망하고 있다.
- 3)나는 나 자신에게 화가 난다.

4)나는 나 자신을 증오한다.

8. ( )

- 1)내가 다른 사람보다 못한 것 같지는 않다.
- 2)나는 나의 약점이나 실수에 대해서 나 자신을 탓하는 편이다.
- 3)내가 한 일이 잘못되었을 때는 언제나 나를 탓한다.
- 4)일어나는 모든 나쁜 일들은 다 내 탓이다.

9. ( )

- 1)나는 자살 같은 것은 생각하지 않는다.
- 2)나는 자살할 생각을 가끔 하지만, 실제로 하지는 않을 것이다.
- 3)자살하고 싶은 생각이 자주 든다.
- 4)나는 기회만 있으면 자살하겠다.

10. ( )

- 1)나는 평소보다 더 울지는 않는다.
- 2)나는 전보다 더 많이 운다.
- 3)나는 요즘 항상 운다.
- 4)나는 전에는 울고 싶을 때 울 수도 있지만, 요즘은 울래야 울 기력조차 없다

11. ( )

- 1)나는 요즘 평소보다 더 짜증을 내는 편은 아니다.
- 2)나는 전보다 더 쉽게 짜증이 나고 귀찮아진다.
- 3)나는 요즘 항상 짜증을 내고 있다.
- 4)전에는 짜증스럽던 일이 요즘은 너무 지쳐서 짜증조차 내지 않는다.

12. ( )

- 1)나는 다른 사람들에 대해 관심을 잃지 않고 있다.
- 2)나는 전보다 다른 사람들에 대한 관심이 줄어들었다.
- 3)나는 다른 사람들에 대한 관심이 거의 없어졌다.
- 4)나는 다른 사람들에 대한 관심이 완전히 없어졌다.

13. ( )

- 1)나는 평소처럼 결정을 잘 내린다.
- 2)나는 결정을 미루는 때가 전보다 더 많다.
- 3)나는 전에 비해 결정을 내리는데 더 큰 어려움을 느낀다.
- 4)나는 더 이상 아무 결정도 내릴 수가 없었다.

14. ( )

- 1)나는 전보다 내 모습이 더 나빠졌다고 느끼지 않는다.
- 2)나는 나이 들어 보이거나 매력 없게 보일까봐 걱정한다.
- 3)나는 내 모습이 매력없게 변해버린 것 같은 느낌이 든다.
- 4)나는 내가 추하게 보인다고 믿는다.

15. ( )

- 1)나는 전처럼 일을 할 수 있다.
- 2)어떤 일을 시작하는데 전보다 더 많은 노력이 든다.
- 3)무슨 일이든 하려면 나 자신을 매우 심하게 채찍질해야만 한다.
- 4)나는 전혀 아무 일도 할 수가 없다.

16. ( )

- 1)나는 전과 다름없이 잠을 잘 잘 수 있다.
- 2)나는 전만큼 잠을 자지는 못한다.
- 3)나는 전보다 한두 시간 일찍 깨고 다시 잠들기 어렵다.
- 4)나는 평소보다 몇 시간이나 일찍 깨고, 한 번 깨면 다시 잠들기 어렵다

17. ( )

- 1)나는 평소보다 더 피곤하지는 않다.
- 2)나는 전보다 더 쉽게 피곤해진다.
- 3)나는 무엇을 해도 피곤하다.
- 4)나는 너무나 피곤해서 아무 일도 할 수 없다.

18. ( )

- 1)내 식욕은 평소와 다름없다.
- 2)나는 요즈음 전보다 식욕이 좋지 않다.
- 3)나는 요즈음 식욕이 많이 떨어졌다.
- 4)요즈음에는 전혀 식욕이 없다.

19. ( )

- 1)요즈음 체중이 별로 줄지 않았다.
- 2)전보다 몸무게가 2Kg 가량 줄었다.
- 3)전보다 몸무게가 5Kg 가량 줄었다.
- 4)전보다 몸무게가 7Kg 가량 줄었다.

20. ( )

- 1)나는 건강에 대해 전보다 더 염려하고 있지는 않다.
- 2)나는 통증, 소화불량, 변비 등과 같은 신체적 문제로 걱정하고 있다.
- 3)나는 건강이 염려되어 다른 일은 생각하기 어렵다.
- 4)나는 건강이 너무 염려되어 다른 일은 아무 것도 생각할 수 없다.

21. ( )

- 1)나는 요즈음 성에 대한 관심에 별다른 변화가 있는 것 같지 않다.
- 2)나는 전보다 성에 대한 관심이 줄어들었다.
- 3)나는 전보다 성에 대한 관심이 많이 줄어들었다.
- 4)나는 성에 대한 관심을 완전히 잃었다.

※ 아래 문항들은 우리가 때때로 나타내는 문제들을 항목으로 모아 놓은 것입니다.  
우선 하나 하나 자세히 읽어 보시고, 당신이 지난 7일 동안 (오늘을 포함해서) 이런 문제 때문에 얼마나 괴로워했는지를 평가해 보십시오. 그런 후에 오른쪽에 있는 다섯 가지 대답 가운데 당신의 상태를 가장 잘 나타낸 대답을 하나 골라서 전혀 없으면 1, 아주 심하면 5에 “X”를 하십시오.

문제를 하나도 빠지 말고 반드시 한 가지로만 대답하십시오.

보기	1 (전혀 없다)	2 (약간 있다)	3 (보통 정도)	4 (꽤 심하다)	5 (아주 심하다)
1. 허리가 아프다			X		

당신이 허리가 보통정도로 아프다면 보기에서처럼 3에 “X” 표를 하면 됩니다.

문항	1	2	3	4	5
1. 머리가 아프다.					
2. 신경이 예민하고 마음의 안정이 안 된다.					
3. 쓸데없는 생각이 머리에서 떠나지 않는다.					
4. 어지럽거나 현기증이 난다.					
5. 성욕이 감퇴되었다.					
6. 다른 사람들이 못마땅하게 보인다.					
7. 누가 내 생각을 조정하는 것 같다.					
8. 다른 사람들이 나를 비난 하는 것 같다.					
9. 기억력이 좋지 않다.					
10. 조심성이 없어서 걱정이다.					
11. 사소한 일에도 짜증이 난다.					
12. 가슴이나 심장이 아프다.					
13. 넓은 장소나 거리에 나가면 두렵다.					
14. 기운이 없고 침체된 기분이다.					
15. 죽고 싶은 생각이 든다.					
16. 다른 사람은 듣지 못하는 헛소리가 들린다.					
17. 몸이나 마음이 떨린다.					
18. 사람들이란 믿을 것이 못된다는 생각이 든다.					
19. 입맛이 없다.					
20. 울기를 잘 한다.					
21. 이성을 대하면 어색하거나 부끄럽다.					
22. 어떤 함정에 빠져 헤어날 수 없는 기분이 든다.					
23. 별 이유 없이 깜짝 놀란다.					
24. 자신도 건잡을 수 없이 울화가 치민다.					
25. 혼자서 집을 나서기가 두렵다.					
26. 자책을 잘한다.					
27. 허리가 아프다.					

28. 하고자 하는 일이 뜻대로 안 되고 막히는 기분이다.					
29. 외롭다.					
30. 기분이 울적하다.					
31. 매사에 걱정이 많다.					
32. 매사에 관심과 흥미가 없다.					
33. 두려운 느낌이 든다.					
34. 쉽게 기분이 상한다.					
35. 나의 사사로운 생각을 남이 아는 것 같다.					
36. 다른 사람들이 나를 이해 못 하는 것 같다.					
37. 다른 사람들이 나를 싫어하거나 나에게 불친절하다고 느낀다.					
38. 매사에 정확을 기하느라고 일을 제때에 해내지 못한다.					
39. 심장(가슴)이 마구 뛰다.					
40. 구역질이 나거나 게운다.					
41. 내가 남보다 못한 것 같다(열등감을 느낀다).					
42. 근육통 또는 신경통이 있다.					
43. 다른 사람들이 나를 감시하거나 나에 관해서 속덕거리는 것 같다.					
44. 잠들기가 어렵다.					
45. 매사를 확인하고 또 확인하고 해야만 마음이 놓인다.					
46. 결단력이 부족하다.					
47. 자동차나 기차를 타기가 두렵다.					
48. 숨쉬기가 거북하다.					
49. 목이 화끈거리거나 찰 때(냉할 때)가 있다.					
50. 어떤 물건이나 장소 혹은 행위가 겁이 나서 피해야 한다.					
51. 마음속이 텅 빈 것 같다.					
52. 몸의 일부가 저리거나 찌릿찌릿하다.					
53. 목에 부스뎅어리가 걸린 것 같다.					
54. 장래가 희망 없는 것 같다.					
55. 주의집중이 잘 안되는 것 같다.					
56. 몸의 어느 부위가 힘이 없다.					
57. 긴장이 된다.					
58. 팔 다리가 묵직하다.					
59. 죽음에 대한 생각을 한다.					
60. 과식한다.					
61. 남들이 나를 쳐다보거나 나에 관해서 이야기를 할 때는 거북해진다.					
62. 내가 생각하는 것이 내 생각 같지 않다.					
63. 누구를 때리거나 해치고 싶은 충동이 생긴다.					
64. 새벽에 일찍 잠을 깬다.					
65. 만지고 셈하고 씻고 하는 것과 같은 행동을 반복하게 된다.					
66. 잠을 설친다.					

67. 무엇을 때려 부수고 싶은 충동이 생긴다.					
68. 다른 사람들에게는 없는 생각이나 신념을 갖고 있다.					
69. 다른 사람과 함께 있을 때는 나의 언행에 신경을 쓰게 된다.					
70. 시장이나 극장처럼 사람이 많이 모인 곳에 가면 거부하다.					
71. 매사가 힘들다.					
72. 공포에 휩싸이는 때가 있다.					
73. 여러 사람이 있는 곳에서 먹고 마시기가 거부하다.					
74. 잘 다룬다.					
75. 혼자 있으면 마음이 안 놓이거나 무섭다.					
76. 다른 사람들이 내 공로를 인정하지 않는다.					
77. 사람들과 함께 있을 때에도 고독을 느낀다.					
78. 안절부절 못해서 가만히 앉아 있을 수가 없다.					
79. 허무한 느낌이 든다.					
80. 낮익은 것들도 생소하거나 비현실적인 것처럼 느낀다.					
81. 고함을 지르거나 물건을 내던진다.					
82. 사람들 앞에서 쓰러질까봐 걱정한다.					
83. 그냥 놓아두면 사람들에게 내가 이용당할 것 같다.					
84. 성 문제로 고민한다.					
85. 내 죄 때문에 벌을 받아야 한다.					
86. 무슨 일이든 조급해서 안절부절못한다.					
87. 내 몸 어딘가가 병들었다고 생각한다.					
88. 늘 남과 동떨어져 있는 느낌이다.					
89. 죄를 지었거나 잘못을 저질렀다고 느낀다.					
90. 내 마음 어딘가 이상하다고 느낀다.					

- 다음 장으로 가주세요-

※ 다음 문장들은 사람들이 자신을 표현하는데 사용하는 것들입니다. 문항을 자세히 읽어보시고 당신이 지금 이 순간에 바로 느끼고 있는 상태를 각 문항의 오른쪽에 있는 네 개의 항목 중 하나에 표시를 해주십시오. 옳고 그른 답은 없습니다. 한 문장에 오래 머무르지 마시고, 솔직하게 답해주십시오.

문 항	전혀 그렇지 않다	조금 그렇다	보통으로 그렇다	대단히 그렇다
1. 나는 마음이 차분하다.				
2. 나는 마음이 든든하다.				
3. 나는 긴장되어 있다.				
4. 나는 신경이 날카로워 있다.				
5. 나는 마음이 편하다.				
6. 나는 당황해서 혼란스럽다.				
7. 나는 앞으로 불행이 있을까봐 걱정하고 있다.				
8. 나는 마음이 놓인다.				
9. 나는 불안하다.				
10. 나는 편안하게 느낀다.				
11. 나는 자신감이 있다.				
12. 나는 짜증스럽다.				
13. 나는 마음이 조마조마하다.				
14. 나는 극도로 긴장되어 있다.				
15. 내 마음은 긴장이 풀려 푸근하다.				
16. 나는 만족스럽다.				
17. 나는 걱정하고 있다.				
18. 나는 흥분되어 어쩔 줄 모르겠다.				
19. 나는 안정되어 있다.				
20. 나는 기분이 좋다.				

## 10. 동물실험

### 가. 항 우울 효능 검색 결과

#### 1) Locomotor 활성-이동 거리와 이동 시간

Fig. 57, 58에서 보는 바와 같이 엉겅퀴 추출액은 이동 거리와 이동 시간을 기준으로 한 일반 운동 활성을 증가시키는 경향을 나타내었으나 꽃향유 추출액은 일반 운동 활성에 영향을 미치지 않았다

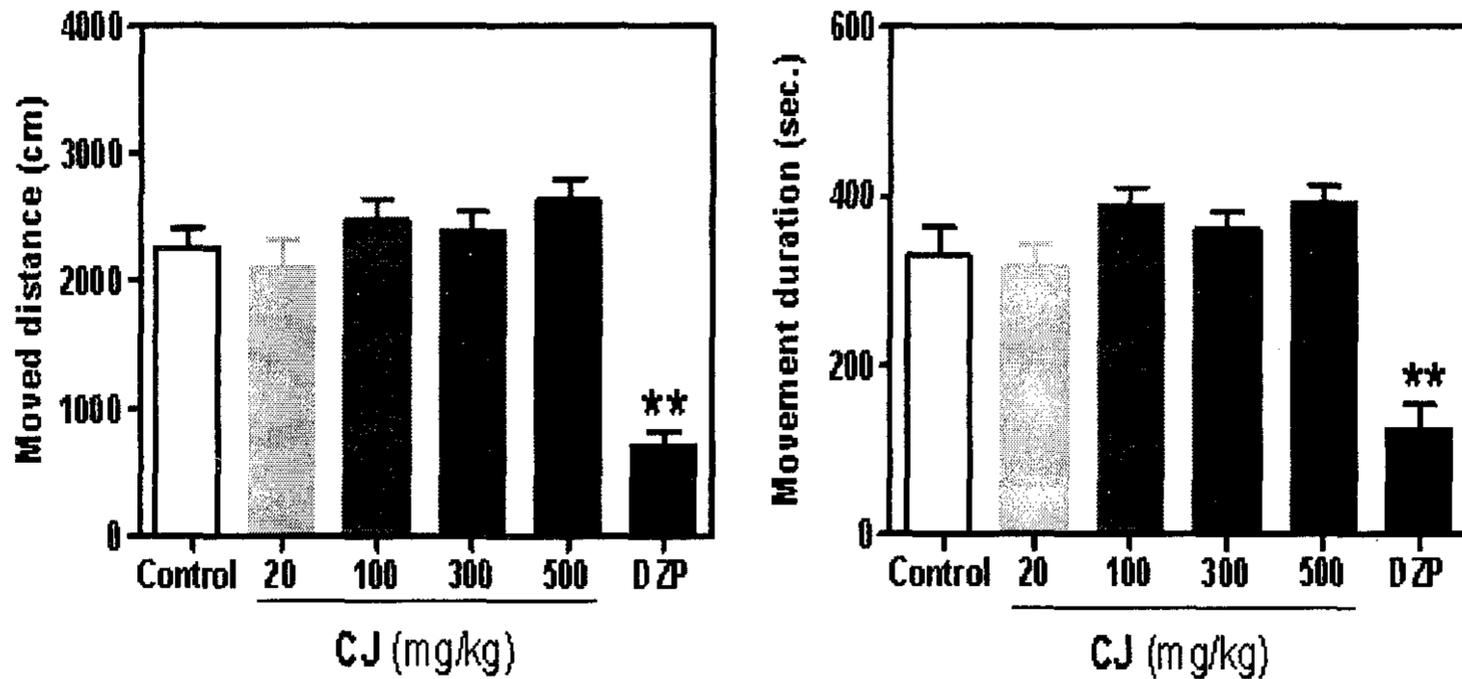


Figure 57. Effects of *Cirsium japonicum* on locomotor activity in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the moved distance or movement duration for 10 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

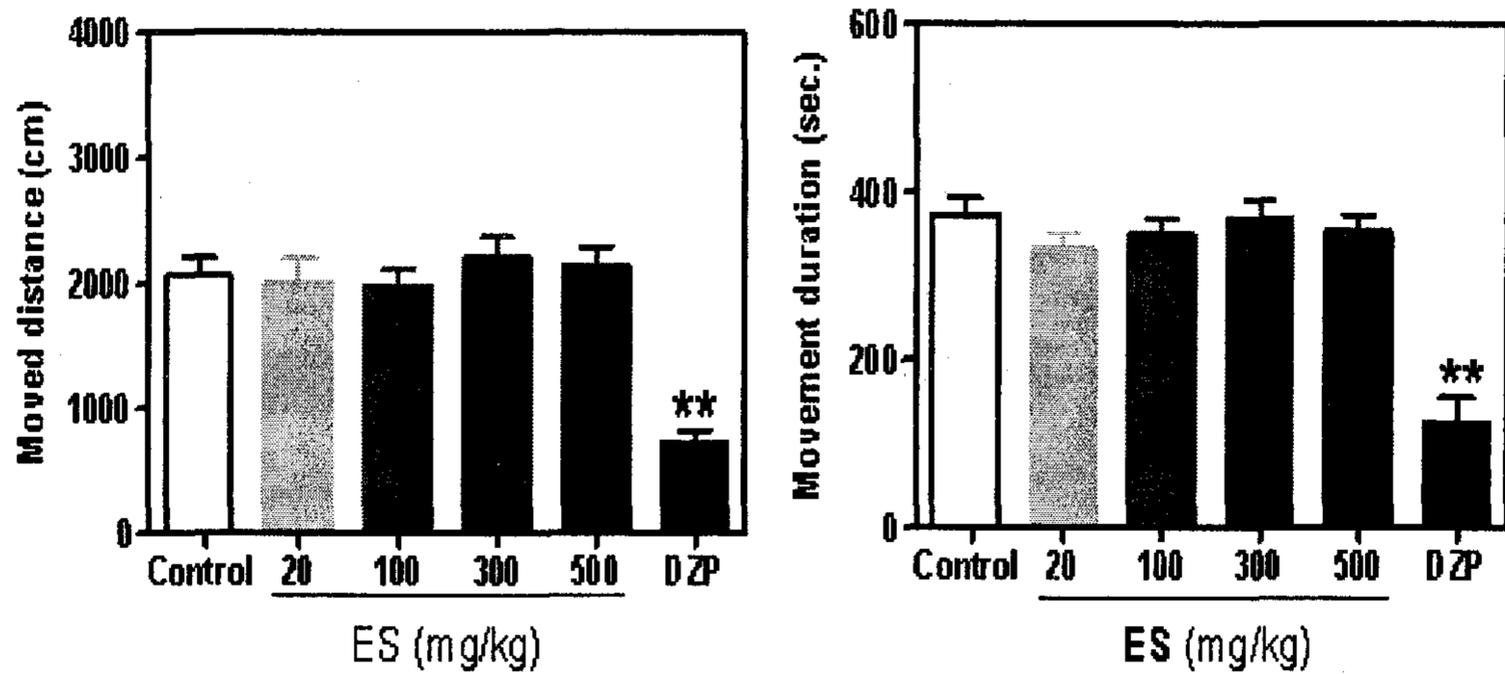


Figure 58. Effects of *Elsholtzia splendens* on locomotor activity in mice (n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the moved distance or movement duration for 10 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group) DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

## 2) Locomotor 활성 - Rearing frequency와 Turn angle

Rearing frequency는 실험동물이 몸을 세우고 주변을 살피는 횟수를 측정한 것이며, Turn angle은 실험동물의 총 이동 각을 계산한 것으로 우울하거나 불안증이 있을 때에는 두 항목 모두 감소하는 경향이 나타나므로 우울증과 불안증 해소의 지표로 사용된다. Fig. 59, 60에서 보는 바와 같이 엉겅퀴 추출액은 대조군에 비하여 Rearing frequency 및 Turn angle을 증가시키는 경향을 나타내었으며 꽃향유 추출액은 오히려 대조군에 비하여 Rearing frequency를 감소시키는 경향을 나타내었다.

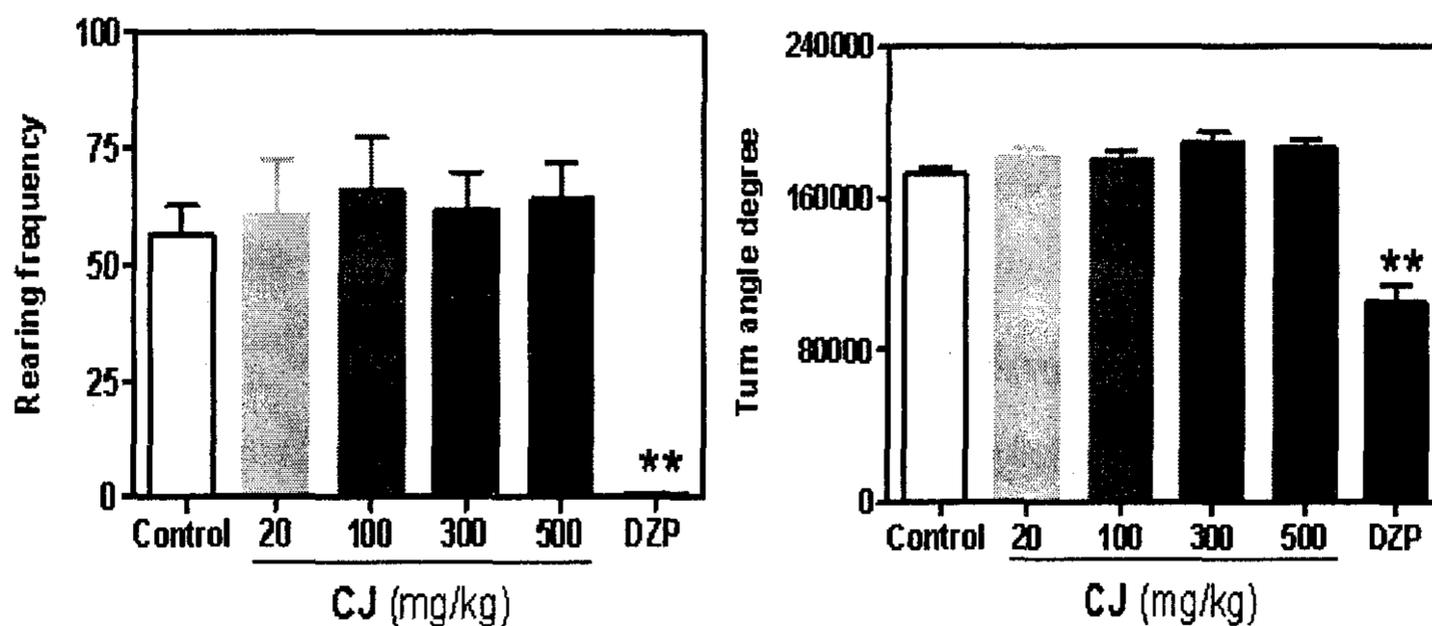


Figure 59. Effects of *Cirsium japonicum* on rearing and turn angle in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the rearing frequency or total turn angle degree for 10 minutes. (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  versus vehicle control group) DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

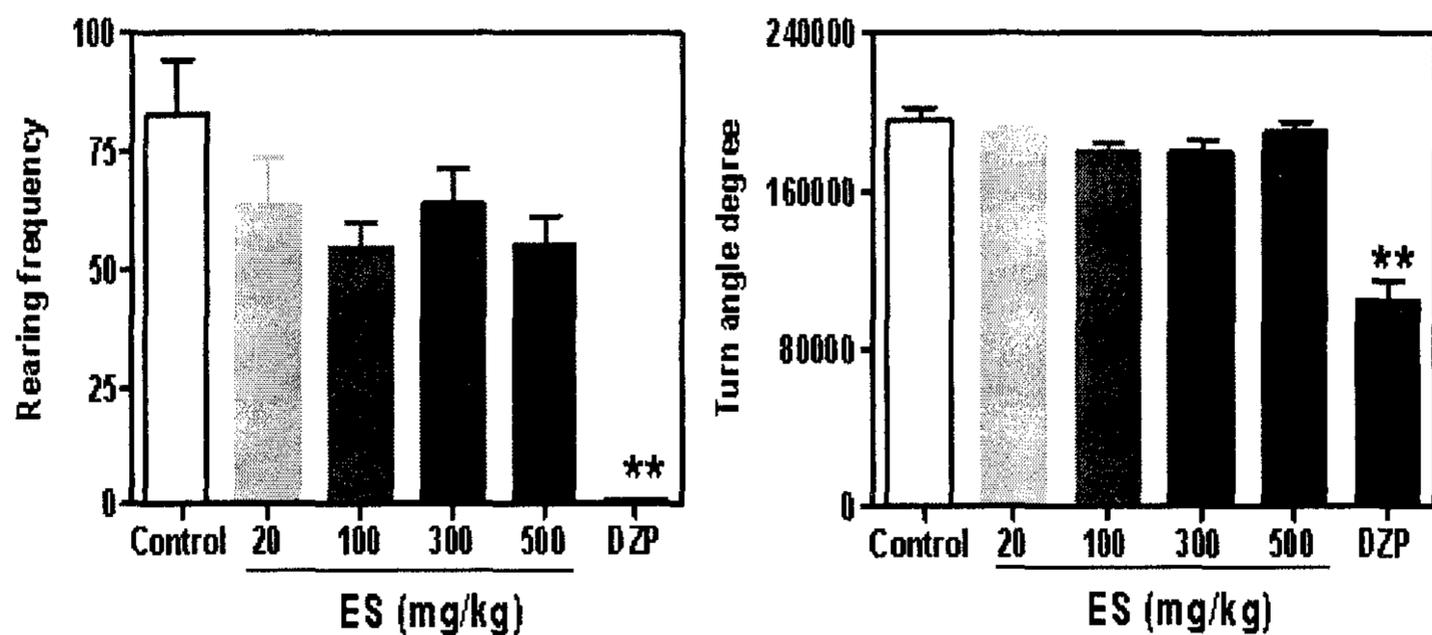


Figure 60. Effects of *Elsholtzia splendens* on rearing and turn angle in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the rearing frequency or total turn angle degree for 10 minutes. (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

### 3) 중앙 영역에서 Locomotor 활성

정서적으로 불안한 상태에서는 중앙 부위보다 가장자리에 머무르는 성질을 활용하여 우울한 정도를 검색하였다. Fig. 61에서 보는 바와 같이 엉겅퀴 추출액은 이동 거리와 이동 시간을 기준으로 한 일반운동 활성을 용량 의존적인 형태로 증가시키는 경향을 나타냈으며 300 mg/kg 투여 군에서 유의성 있는 차이를 나타냈다. 꽃향유 추출액은 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다.

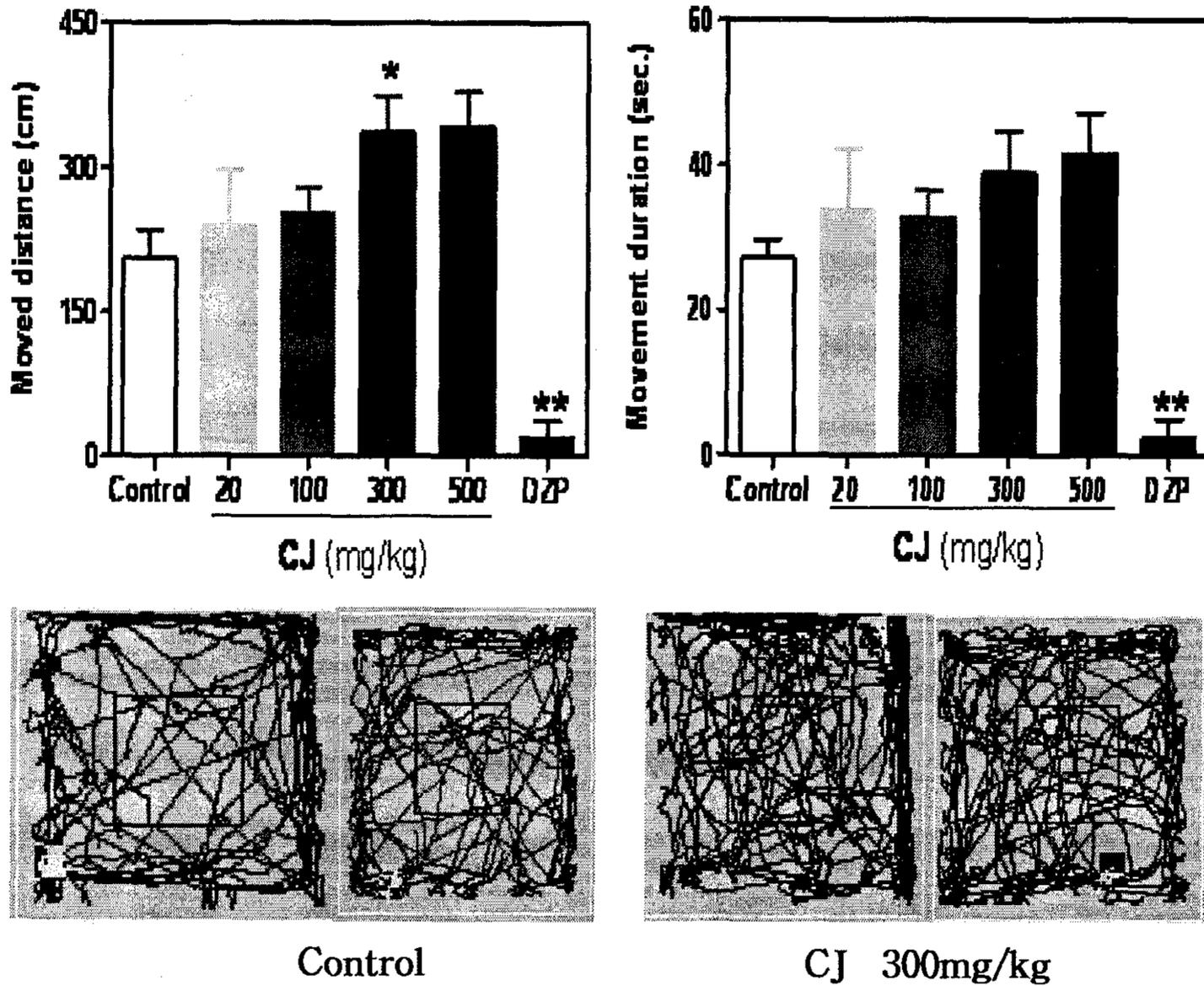


Figure 61. Effects of *Cirsium japonicum* on locomotor activity in center area in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the moved distance or movement duration for 10 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

### 4) 중앙 영역에서 Rearing frequency와 Turn angle

Fig. 62에서 보는 바와 같이 엉겅퀴 추출액이 Rearing frequency와 Turn angle을 용량 의존적으로 증가시키는 경향을 나타내었으며 300 mg/kg 투여 군에서 유의

성 있는 차이를 나타냈다. 꽃향유 추출액은 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다

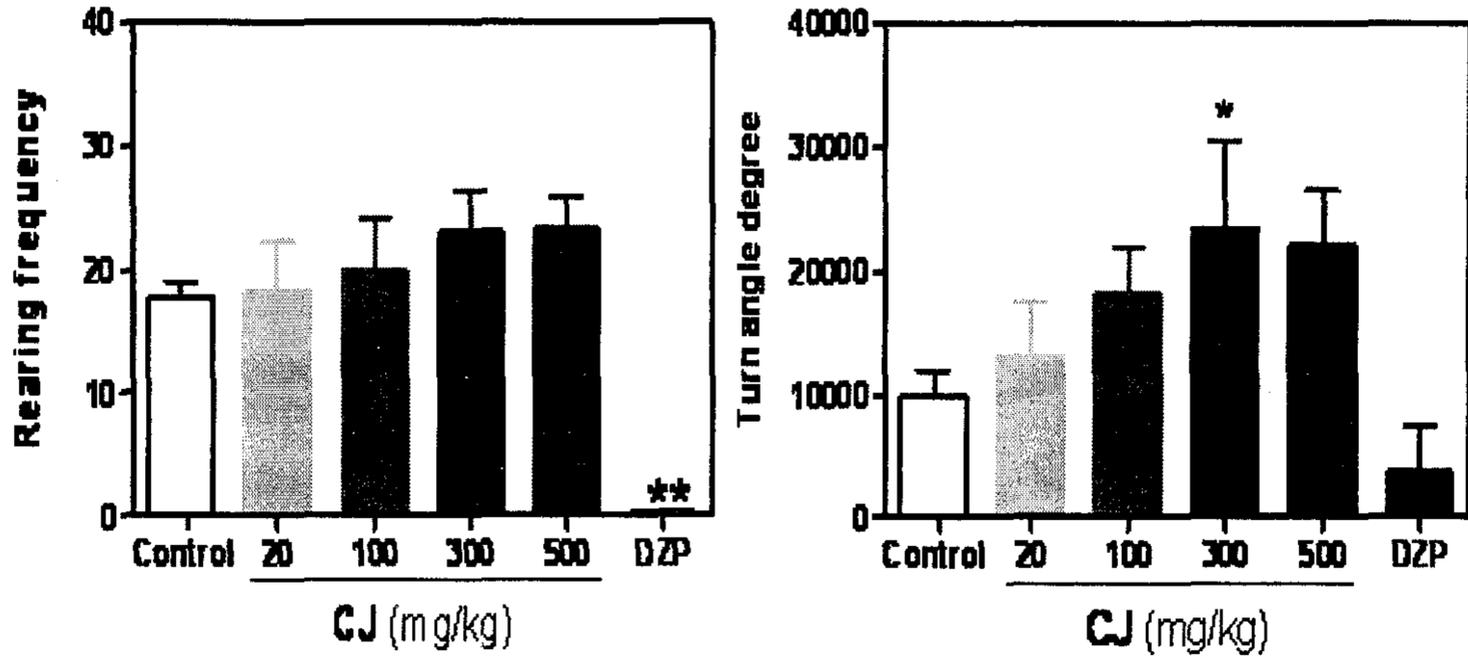


Figure 62. Effects of *Cirsium japonicum* on rearing and turn angle in center area in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the rearing frequency or total turn angle degree for 10 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

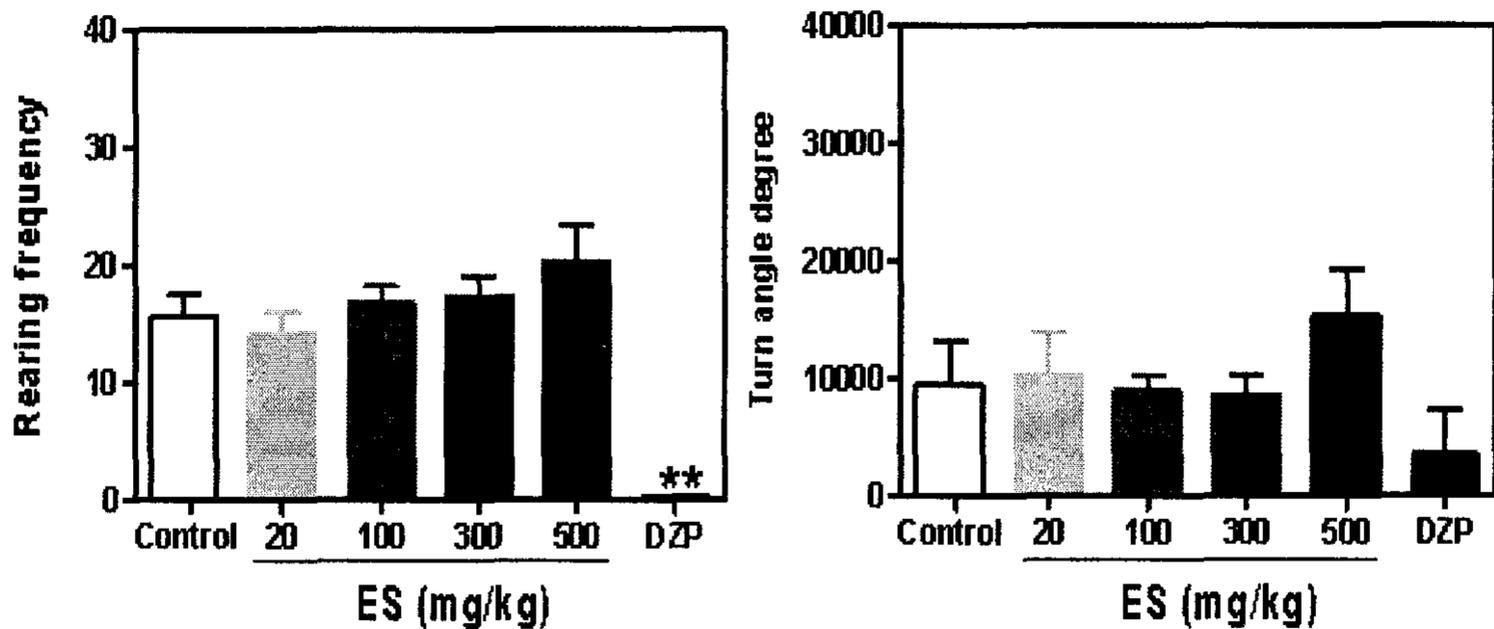


Figure 63. Effects of *Elsholtzia splendens* on rearing and turn angle in center area in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the rearing frequency or total turn angle degree for 10 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

5) Rotarod test

본 실험은 균형 유지 능력과 운동 유지 능력, 그리고 진정 및 근 이완 효능을 확인할 수 있는 실험 방법이다. Fig. 64, 65에서 보는 바와 같이 엉겅퀴 추출액 300 mg/kg 투여 군에서 운동 유지 능력이 감소하는 경향이 나타났으며 꽃향유 추출액에서도 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다.

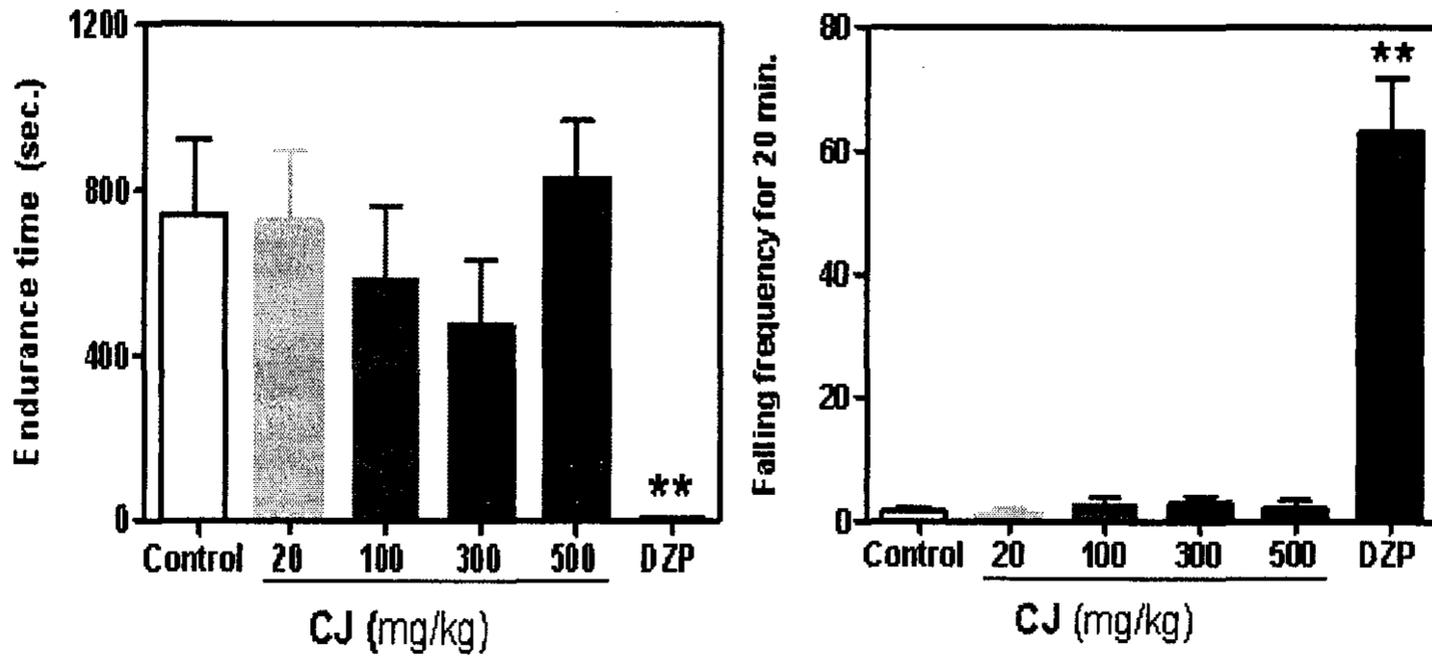


Figure 64. Effects of *Cirsium japonicum* on activity on the rotarod in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the endurance time or falling frequency for 20 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

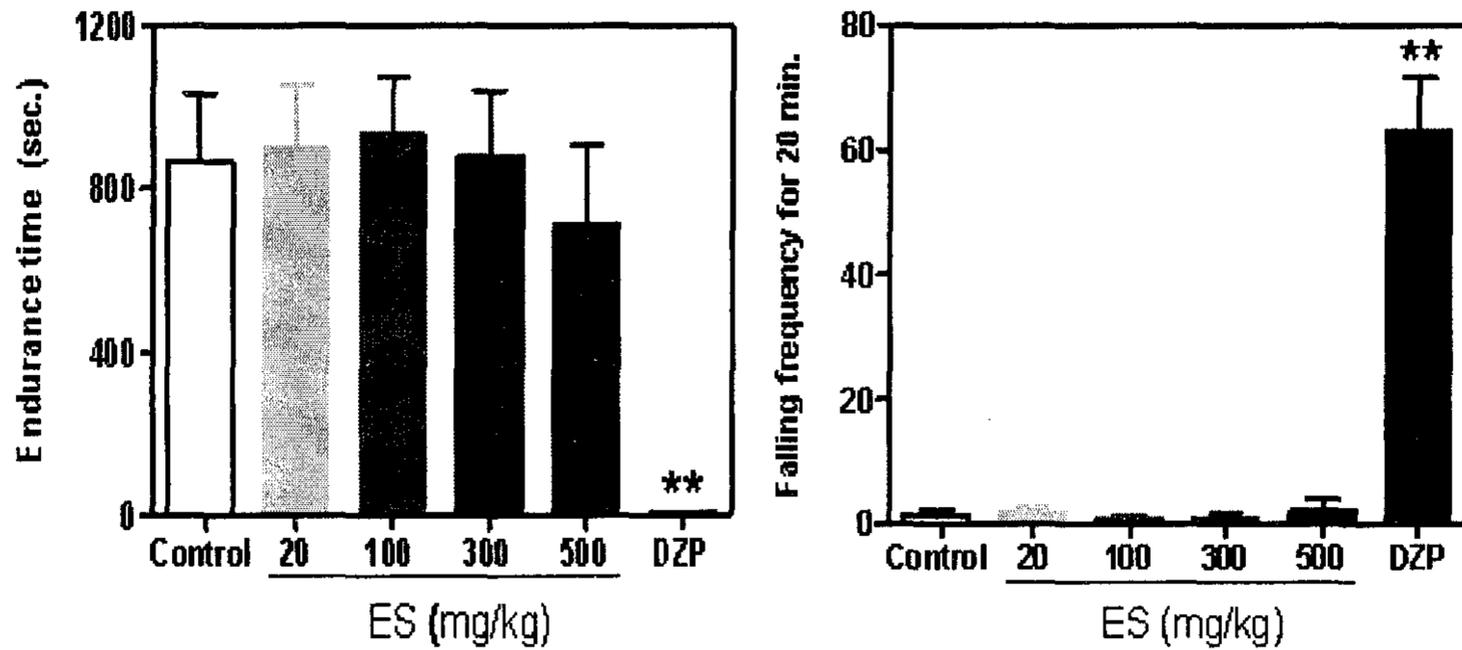


Figure 65. Effects of *Elsholtzia splendens* on activity on the rotarod in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the endurance time or falling frequency for 20 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

#### 6) Horizontal Wire test

본 실험은 rotarod test와 함께 균형 및 운동 유지 능력 또는 근 이완 작용을 확인하는 지표로 이용된다. Fig. 66, 67에서 보는 바와 같이 엉겅퀴 추출액을 투여한 군에서는 균형 및 운동 유지 능력이 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다. 꽃향유 추출액도 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

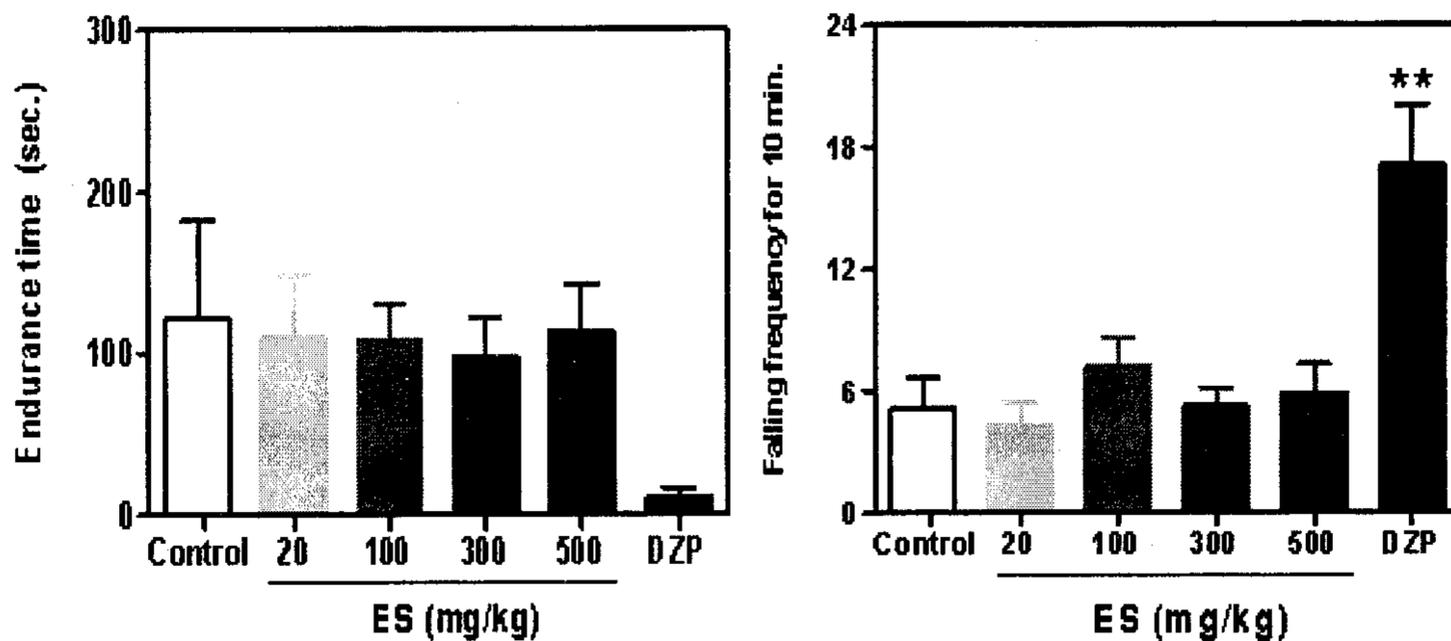


Figure 66. Effects of *Elsholtzia splendens* on activity on the wire in mice (n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the endurance time or falling frequency for 10 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

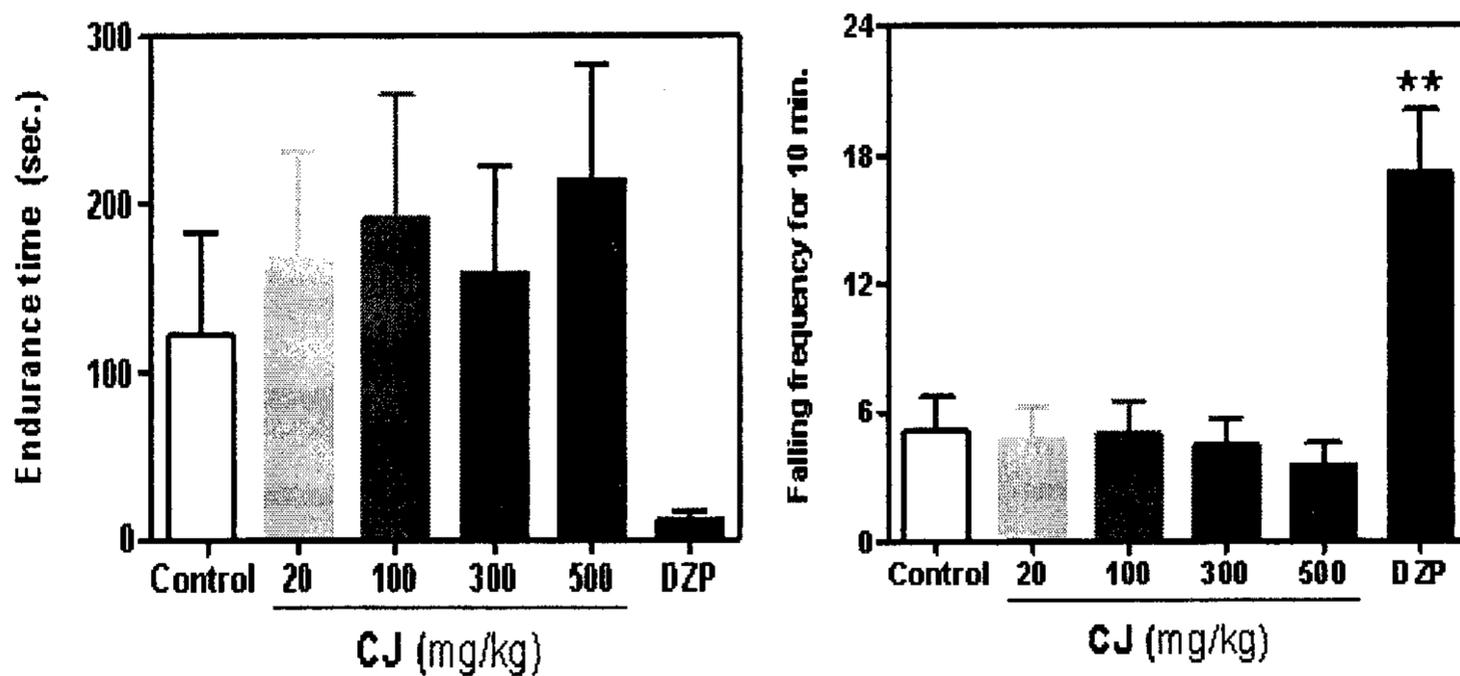


Figure 67. Effects of *Cirsium japonicum* on activity on the wire in mice (n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the endurance time or falling frequency for 10 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). DZP: diazepam 5 mg/kg s.c.

### 7) Forced Swimming test

물이 채워진 좁은 실린더 안에 동물을 빠뜨렸을 때, 처음에는 동물이 탈출하려는 행동을 보이다가 시간이 흐르면 움직임을 멈추는 부동성(immobility)을 보이며, 24시간 후 재검사를 해보면(즉 다시 실린더의 물에 빠뜨리면) 전날에 비해 더 많은 부동성을 보인다. 이러한 부동성의 증가와 활동성의 감소를 지표로 삼아 항우울 효과를 검색한 결과 Fig. 68, 69와 같이 엉겅퀴 추출액 300 mg/kg 투여 군에서 immobile duration이 유의성 있게 감소하였으며, mobile duration과 strong mobile duration은 유의성 있게 증가하였다. 이러한 엉겅퀴 추출액의 효과는 TCA인 imipramine과 SSRI인 fluoxetine의 효과와 상응하거나 그 이상인 것으로 나타났다. 반면에 꽃향유 추출액은 300 mg/kg 투여 군에서 mobile duration만을 유의성 있게 증가시켰을 뿐 다른 항우울 효과를 나타내지는 못하였다.

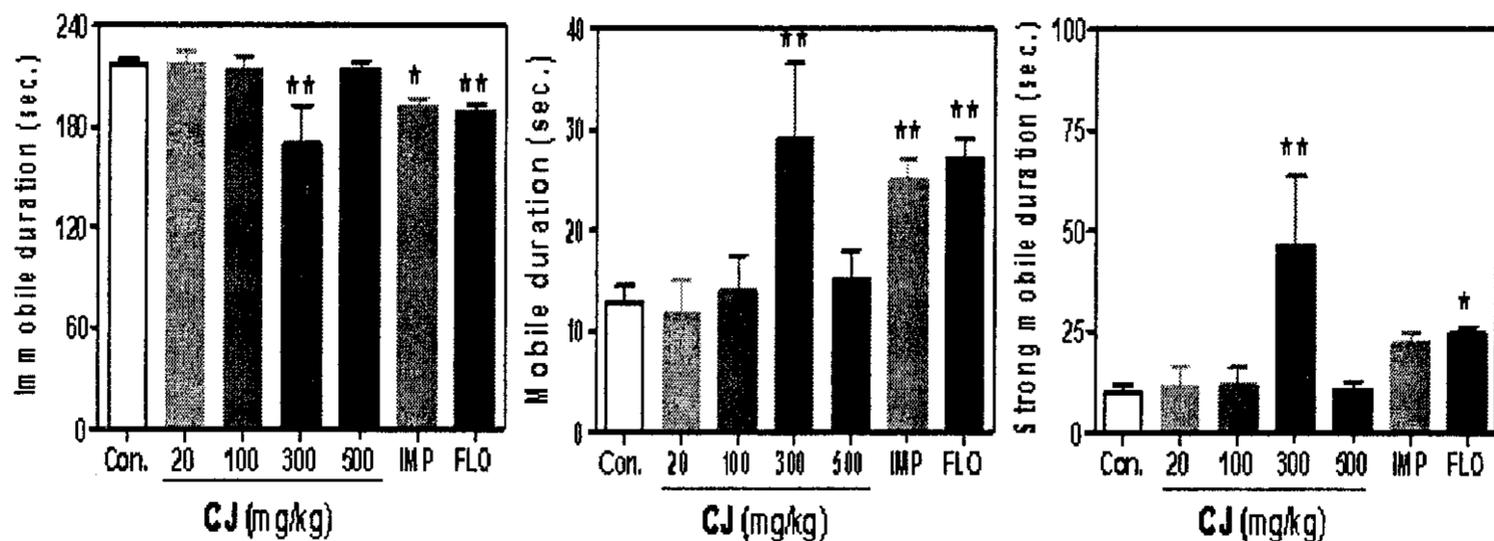


Figure 68. Effects of *Cirsium japonicum* on forced swimming test in mice(n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the immobile or mobile or strong mobile duration for 4 minutes.(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). IMP: imipramine 5 mg/kg s.c.; FLO: fluoxetine 10 mg/kg.

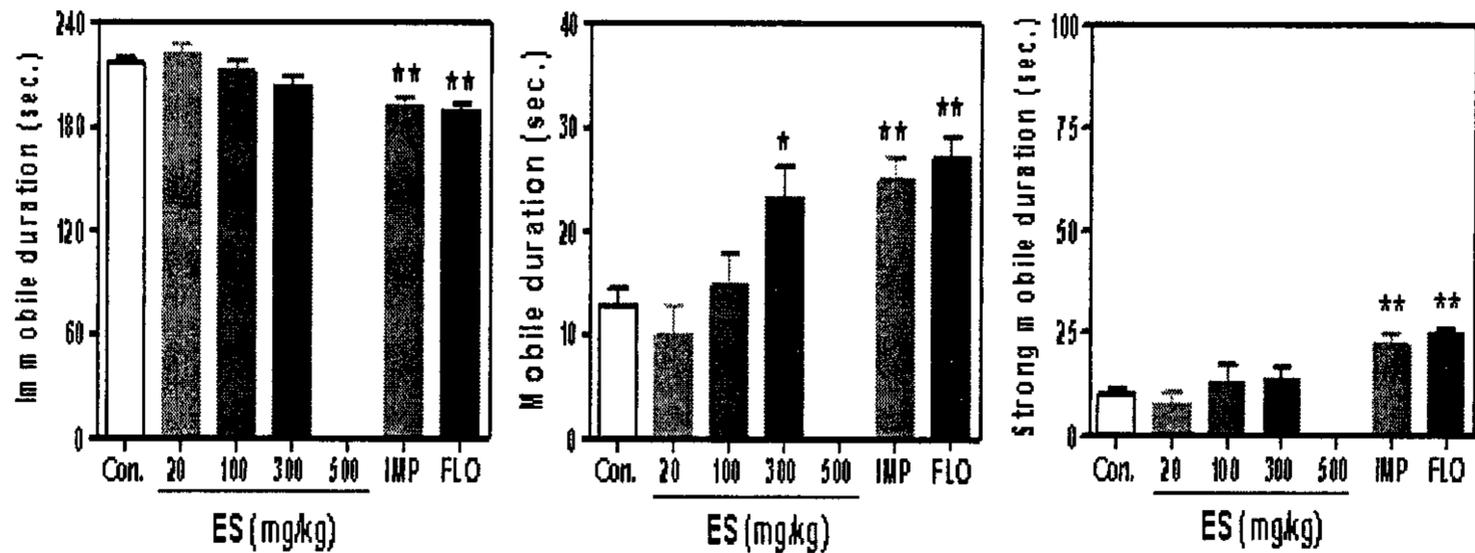


Figure 69. Effects of *Elsholtzia splendens* on forced swimming test in mice (n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the immobile or mobile or strong mobile duration for 4 minutes.

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus vehicle control group). IMP: imipramine 5 mg/kg s.c.; FLO: fluoxetine 10 mg/kg.

#### 라. 결론

영경귀 추출액은 일반 운동 활성을 증가시키는 경향을 나타냈다. 특히 300 mg/kg 영경귀 추출액은 중앙영역에서 일반 운동 활성을 유의성 있게 증가시켰으며, Forced Swimming test에서 immobile duration을 유의성 있게 감소시켰으며, mobile, strong mobile duration을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 효과는 삼환계항우울약인 imipramine과 SSRI인 fluoxetine의 효능에 상응하였다. 반면에 꽃향유 추출액은 일련의 실험에서 유의성 있는 결과를 보이지 않았다. 모든 결과를 고려해 볼 때, 꽃향유 추출액은 항우울 효능이 없는 것으로 판단되며, 영경귀 추출액은 300 mg/kg에서 기존의 항우울제에 상응하는 항우울 효능이 있는 것으로 사료된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술

연구목표	목표달성도 및 기여도
<p>○ 영경귀 속 식물의 flavonoids 분석조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flavonoids 정성 및 정량분석을 위하여 HPLC을 이용하여 분석조건 확립함.</li> <li>- 영경귀속 식물의 flavonoids subclass 중 apigenin을 분석하였음.</li> <li>- 식물의 재배지역별, 부위별, 건조방법별 flavonoids subclass를 분석하였음.</li> <li>- 영경귀 추출물의 안전성 실험을 실시하였음.</li> </ul>
<p>○ 영경귀속의 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 영경귀속 식물 및 추출액을 이용한 음료, 차류 및 스낵 제조를 위한 배합 비율 (recipe) 분석을 달성하였음.</li> <li>- 전문가 및 Target group에 의한 관능검사를 실시하였음.</li> </ul>
<p>○ 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 검색</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IMR-32 사람 신경세포종에서 영경귀의 flavonoid 성분인 apigenin이 세포내 산화적 스트레스에 미치는 영향 및 그 기전을 규명하였음. 예상과는 달리 apigenin은 신경세포에서 활성산소종의 발생을 증가시켰으며 그 기전으로는 세포막 NADPH oxidase가 관여함을 확인하였음.</li> <li>- IMR-32 세포에서 apigenin이 세포 생리기능에 중요한 영향을 미친다고 알려진 칼슘, 칼륨 및 염소이온의 세포내 농도의 변화를 초래하며 이 효과의 기전을 규명하였음. 세포내 칼슘증가는 세포내 저장소로부터 유리됨으로써 유발되고 칼륨과 염소이온의 유출은 세포막에 존재하는 <math>K^+</math>-<math>Cl^-</math>-cotransport의 활성화에 의해 일어난다는 사실을 확인하였음.</li> <li>- HepG2 사람 간암세포에서 apigenin이 농도의존적으로 세포독성을 나타낸다는 사실을 확인하였음.</li> </ul>

연구목표	목표달성도 및 기여도
○ 엉겅퀴속 식물의 flavonoids 분석조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flavonoids 정성 및 정량분석을 위하여 HPLC, LC/MS 및 NMR을 이용하여 분석 조건을 확립하였음.</li> <li>- 엉겅퀴속 식물의 종류에 따른 flavonoids subclass 구명하였음.</li> <li>- 식물의 부위별 flavonoids subclass 정성, 정량 분석하였음.</li> <li>- 엉겅퀴 추출물의 안전성 검사를 실시하였음.</li> </ul> <p>⇒ 재현성 있는 flavonoids 분석방법 및 성분구명</p>
○ 엉겅퀴속의 분획 추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 엉겅퀴속 식물 및 추출액을 이용한 음료, 차류 및 스낵 제조를 위한 배합비율 (recipe) 분석 달성하였음.</li> <li>- 전문가 및 Target group에 의한 관능검사를 실시하였음.</li> <li>- 포장재질, 포장조건 선정 및 유통기한 설정하였음.</li> </ul> <p>⇒ 엉겅퀴속 식물 및 추출물 제품의 식품학적 연구 및 산업화</p>
○ 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포수준에서 일반적인 항산화 효과 검색하였음.</li> <li>- 세포막 안정화에 우수한 소재 검색하였음.</li> </ul> <p>⇒ 항산화 활성 및 세포막 안정화 효과 확인</p>
○ 향유속 식물의 flavonoids 분석조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 향유속 식물 중 flavonoids 물질을 가장 많이 함유한 식물을 선정하였음.</li> <li>- 식물의 부위별 flavonoids subclass 정성 및 정량 분석하였음.</li> <li>- 향유 추출물의 안전성 검사를 실시하였음.</li> </ul> <p>⇒ 생리활성 성분 분석의 기초자료 마련</p>
○ 향유속 식물을 이용한 제품 개발 및 산업화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 향유속 식물의 꽃과 잎을 이용한 차, 음료 개발을 위한 최적 추출조건 분석.</li> <li>- 전문가 및 Target group에 의한 관능검사를 실시함.</li> <li>- 유통기한 설정을 위한 저장실험을 실시함.</li> </ul> <p>⇒ 향유속 식물 및 추출물 제품의 식품학적 연구 및 산업화</p>
○ 활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호작용 및 신경전달 억제 효과 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 우수한 생리활성을 나타낸 소재에 대한 <i>in vitro</i> 활성 검색함.</li> <li>- 활성산소종에 의한 세포손상 모델 구축 및 기능성 소재의 억제 효과 탐색.</li> <li>- 신경세포에서 흥분 유발시 유도되는 신경전달물질의 유리 억제 효과 탐색.</li> </ul> <p>⇒ 활성산소종에 의한 세포손상에 대한 보호작용 및 신경전달 억제 효과</p>

연구목표	목표달성도 및 기여도
<p>○ 가공조건에 따른 영정귀속 및 향유속 식물의 flavonoids 물질 분석 조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 가공 조건에 따른 영정귀속 식물의 flavonoids 물질 변화 분석하였음.</li> <li>- 가공 조건에 따른 향유속 식물의 flavonoids 물질 변화 분석하였음.</li> </ul> <p>⇒ 최적 가공조건 확립</p>
<p>○ 영정귀 및 꽃향유를 이용한 Nutraceuticals (타블렛, 캡슐)의 제품화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 영정귀, 꽃향유의 nutraceuticals(타블렛, 캡슐)의 배합비율(recipe)을 분석하였으며, 제조하였음.</li> <li>- 전문가 및 Target group에 의한 관능검사를 실시하였음.</li> </ul> <p>⇒ 영정귀 및 향유속 식물 제품의 식품학적 연구 및 산업화</p>
<p>○ 월경전 증후군에 대한 임상효과 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2차년도에 우수한 활성을 나타낸 소재를 월경전 증후군 증상이 심한 여성에게 투여하여 개선 효과 확인하였음.</li> <li>- 월경전 증후군 개선 효과가 확인된 소재의 제품 가능성 탐색하였음.</li> </ul> <p>⇒ 월경전 증후군 개선 효과 확인</p>

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

\* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

### 1. 기대효과

#### 가. 기술적 측면

- 1) 국내외적으로 유효성분에 대한 관심이 고조되고 있는 엉겅퀴속 및 향유속 식물을 이용한 여성 건강 기능 식품 제조 및 실용화 기술 개발
- 2) 국내의 건간 기능 식품의 유효성분에 대한 과학적인 근거 제시
- 3) 신기능성 유효성분인 flavonoids의 신뢰성 있는 과학적 분석 기술 확립
- 4) 식물자원에서 flavonoids 함량을 최대화 할 수 있는 가공기술 확립 및 이에 따른 고급화된 양질의 신기능성 식품 및 식품의약 개발 기술의 기반 확립
- 5) 외래 도입 국내산 자원 식물자원을 이용한 고기능성 식품제조 및 실용화 기술 개발

#### 나. 경제·산업적 측면

- 1) 국내산 자원식용식물의 고부가가치화로 자원식용식물의 활성화에 기여
- 2) 고도 기술을 이용한 건강 기능 식품 신소재의 개발을 통하여 의약과 식품의 중간 형태로서 소비될 수 있는 새로운 산업 분야를 창출
- 3) 국내에서 생산되는 엉겅퀴속 및 향유속 식물에 대한 고기능성 성분인 flavonoids 함량 측정
- 4) Flavonoids 최고 함량의 가공적성 및 고 함량 부위에 대한 과학적 기초 자료 제시로 세계적 상품화가 가능
- 5) 국내 자원 식용식물을 이용한 고부가가치 수출 상품 개발
- 6) 농가소득증대를 위한 특약작물로 자원 확보
- 7) 식용 식물자원을 이용한 건강 기능 식품 가공공장 설립 및 운영에 따른 지역 경제의 활성화 촉진
- 8) 류마티스성 관절염, 신경통 및 월경전 증후군 예방을 위한 여성건강 기능 식품 소재 개발로 국민의 건강 증진

## 2. 활용방안

- 가. 엉겅퀴속 및 향유속 식물을 이용한 건강 기능 제품 개발 및 판매시 그 기능성에 대한 기초자료 제공
- 나. 건강 기능 제품 개발시 생리활성 성분 함량에 대한 정확한 기초자료제공
- 다. 건강 기능 제품 개발시 농가와 연계한 수요확보로 농가소득 안정화 유도

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

향유와 꽃향유의 정유 주성분은 elsholtzidiol 이고 기타 sterol, phenol성 물질과 flavonoid 배당체를 함유하고 있다. *Elsholtzia* 속으로부터 isoatragalin, lutedin-7-glucoside, lutedin-3-glucoside, lutedin-7-galactoside 등 플라보노이드와 관계가 깊은 5,2-dimethoxy-6,7-methylene dioxy flavanone; 5-hydroxy-7-methoxy-6-O-[-1-rhamno pyranosyl(1→2)-β-d-fucopyranosyl] flavoneglycoside; 5,5-dihydroxy-7-acetoxyl-6,8,3,3-tetramethylpyran(3,4) flavone; 5,5-dihydroxy-7-methyl)butyroxyl-6,8,3,3-tetramethyl pyran(3,4)flavone; 5,5-dihydroxly-6-7-methylenedioxy-8,3,3 trimethylpyran(3,4) flavone 등이 분리 확인되었다. 플라보노이드는 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀 화합물로서 채소류, 과일류, 종실류 등에 존재하며, 채소류와 유관속 식물의 잎, 꽃, 과실, 줄기, 뿌리 등 거의 모든 부위에 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 플라보노이드는 flavan핵 구조를 가진 저분자량의 폴리페놀 화합물로 페놀이 3개의 A, B 및 C환의 기본구조로 구성되어 있는 diphenyl-pro-pane(C6-C3-C6)의 골격을 지니고 있다. 지금까지 알려진 플라보노이드는 약 4,000여 종류가 있으며 주요한 플라보노이드로서 flavonols, flavones, flavonones, flavanols, andthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols 및 chalcones 등 많은 종류가 있다. 플라보노이드는 식물성 성분으로 다양한 구조적 특성을 가지고 있으며 벤젠환의 탄소기에 -OH기와 탄소의 2와3 위치에 2중결합, 탄소 4번 위치에 카보닐기와 A와 B환에 결합되어 있는 OH기에 의하여 항산화활성을 갖는다. 식품을 통해 플라보노이드를 섭취하고 있으나 흡수와 대사에 대하여 잘 알려져 있지 않다. 그러나 오랫동안 식품으로 섭취하였으므로 독성이 없으며 소화관에서 흡수된 후 대사 되어 우리의 건강에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 플라보노이드는 항암, 항산화 작용이 있다고 보고되었는데 항암성과 항돌연변이성을 갖는 플라보노이드는 flavonol계의 quercetine, kaempferol, myricetin이 있으며, flavonone계의 apigenin, luteolin 그리고 limonin, nomilin 등이 알려져 있다. 그리고 플라보노이드 중에서 quercetin 등은 *in vitro*에서 low-density lipoprotein(LDL)의 산화와 cytotoxicity를 억제할 수 있다고 보고한 바 있으며, apigenin(4',5,7-trihydroxyflavone)은 *in vitro*와 *in vivo*에서 암세포 성장 억제작용 뿐 아니라, 항염, 항산화 작용을 보인다. 식물에서 분리된 플라보노이드의 생리활성으로는 신선초에서 분리된 luteolin-7-O-β-D-galactopyranoside의 콜레스테롤 합성 저해효과, 미나리 persicarin의 알콜대

사촉진작용, 비파의 플라보노이드 화합물의 DPPH radical 소거능과 지질과산화 억제활성 등이 알려져 있다. 현재 전 세계적으로 천연식물자원에 존재하는 식물 화학성분의 기능적 측면이 중요하게 부각되면서, 이러한 미량 생리활성 성분으로 특정 질병의 진행을 억제하거나 예방하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 외국의 경우, 식품에 함유된 식물화학성분의 생리활성에 관한 연구가 1960년대부터 꾸준히 계속되어 왔으나, 우리나라는 1990년대에 들어서야 비로소 본격적인 연구가 시작되었으며, 과학적이고 체계적인 기초연구가 없이 진행되어 온 것은 주지의 사실이다. 최근에는 자생식물자원에 대한 활성물질 검색이 활발히 이루어지고 있으나 대부분 단일 화학성분이 아닌 추출물 범위에서 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 그러므로 자생식물자원에 함유된 생리활성물질을 단일성분으로 분리한 후 이에 대한 지속적인 연구도 아울러 이루어져야 한다. 국내의 경우, 2000년에 들어 각 연구자들의 자원식물류의 생리활성에 대한 관심이 확대되면서 관련학회들의 세미나와 심포지엄이 많이 이루어지고는 있으나 대부분 효능검색에 대한 내용으로 편중되어 있으며, 현재 대부분의 식품관련 연구자들 또한 주로 의, 약 및 한방 관계자들의 유효성분의 효능에 대한 연구를 바탕으로 일반성분, 비타민, 무기질 및 특정 성분의 분석 및 제품개발에 대한 연구에만 국한되어 있는 실정이다. 자생식물에 우수한 생리활성 성분이 존재하더라도, 제품화되는 과정에서의 성분의 손실은 기능성식품으로서의 가치를 상실하게 만들 것이다. 또한 기능성 식품 및 식품의약품제조 공정에 따른 유효성분 최적화 조건은 매우 필요한 연구 분야임에도 불구하고 아직까지 국내에서는 이 분야의 기본이 되는 제조공정에 따른 유효성분 분석기술 확립에 대해서는 연구가 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 현재까지 엉겅퀴의 flavone에 대한 연구는 TLC, GC나 UV, HNMR 또는 CNMR을 사용한 연구가 대부분이며, 아직까지 HPLC와 LC/MS를 사용한 연구 진행은 거의 없는 실정이다. 엉겅퀴의 약리작용은 국내 및 국외에서도 오랫동안 민방에서 널리 알려져 왔다. 그러나 국내에서는 고려엉겅퀴의 일반성분 분석 및 엉겅퀴 뿌리의 일반성분 분석 및 무기질 함량조사가 보고되어 있을 뿐이다. 국외에서는 엉겅퀴의 약리성분(pertolirarin, acacetin, rhamnoglucoside, ciryneol A,A,C,D,E, heptadecene 성분 등 함유)에 대한 보고와 다양한 flavonoids에 대한 연구가 보고되고 있으나 주로 엉겅퀴 뿌리에 국한하여 연구를 진행하고 있는 중이다. 일본에서는 건조 엉겅퀴뿌리를 사용하여 신경통 및 류마티즘에 유효한 crude drug인 "Wazokudan"이 개발 되어있다.

## 제 7 장    참고문헌

- Afanas ev, I.B. and Dorozhko, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763 (1989)
- Chen, J.W., Zhu, Z.Q., Hu, T.X., Zhu, D.Y. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical scavenging effects. *Acta Pharmacol. Sin.* 23: 667-672 (2002)
- Cody, V. Crystal and molecular structure of flavonoids. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties*, p. 29-44, Alan R. Liss, New York, NY, USA (1988)
- Das, N. P., ed. *Flavonoids in biology and medicine III-Curent issues in flavonoids research*. Singapore : Singapore University press (1990)
- De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R.S., Jessup, W. and Leake, D.S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1743 (1990)
- Fang J., Xia C., Cao Z., Zheng J.Z., Reed E. and Jiang B.H.: Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB. J.* 19: 342-353 (2005)
- Ferenci P., Dragosics B., Dittrich H., Frand H., Benda L., Lochs H., Meryn S., Base W. and Schneider B.: Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J. Hepatol.* 9: 105 (1989)
- Fiala, E.S., Reddy, B.S., Weisburger, J.H. Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs, *Ann. Rev. Nutr.* 5: 295-321 (1985)
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R. and Schweigerer, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* 57: 2916-1921 (1997)
- Hackett, A. M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, Pharmacological and Structural Activity Relationships*. P. 177-194, Alan R. Liss. New York, NY. USA (1986)
- Han, W.S. Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from

- Chrysanthemum boreale Makino. Korean J. Medical Crop Sci. 11(1): 1-4 (2003)
- Harborne, J. B., T. J. Mabry, H. Mabry. The flavonoids. London : Chapman and Hall (1975)
- Heo, J. Donguibogam. Nasadang, Seoul, Korea. p. 1173 (2000)
- Herrmann, K. The flavonoids and flavones in plants. A review. J. Food Technol. 11: 433-448 (1976)
- Hetog, M.G.L., Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. and Lromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. Lancet. 342: 1007 (1993)
- Hetog, M.G.L., Hollman, P.C.H. and Venema, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anti-carcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. J. Agric. Food Chem. 40: 1591 (1992)
- Ingelman-sundberg M., Johansson I., Penttil K., Glaumann H. and, Lindros K.O.: Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P450 (IIE1) in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 55 (1988)
- Ishida, H., Umino, T., Tsuji, K. and Kosuge, T.: Studies on antihemorrhagic substance in Herbs classified as hemostatics in Chinese medicime. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum DC.* *Chem. Pharm. Bull.* 35: 861 (1987)
- Kim, D.W., Son, K.H. and Chang, H.W. Anti-Inflammatory Activity of *Elsholtzia splendens*. 13: 127-131 (2003)
- Kim, H.P., Mani, I., Iversen, L., Ziboh, V.A. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prosta- glandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 58: 17-24 (1998)
- Kim, N.M., Ko, S.R., Choi, K.J. and Kim, W.J. Effect of some factors on extraction of effectual components in cinamon extrsct. J. Korean Agric. Chem. Soc. 36: 17-22 (1993)
- Kim, S.J. and Kim, G.H. Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. J Food Science and Nutrition 8: 330-335 (2003)
- Kuhnau, J. The flavonoids. A class of semi-; 117-191.essential food components. Their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, 24

(1976)

- Lee W.B., Kwon H.C., Cho O.R., Lee K.C., Choi S.U., Baek N.I. and Lee K.R.: Phytochemical constituents of *Cirsium setidens Nakai* and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Arch. Pharm. Res.* 25: 628-635 (2002)
- Lee, C. : Korean dictionary of plant, Hyangmunsa, Seoul, Korea, 660 (1999)
- Lee, J.M., Son, E.S., Oh, S.S. and Han, D.S. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. *Korean J. Dietary Culture.* 16(5): 504-514 (2001)
- Lee, S.J.: Korean Folk Medicine. *Seoul National University Press. Seoul.* pp. 145-146 (1966)
- Lee, S.Y., Chung, M.S., Kim, M.K., Baek, H.H. and Lee, M.S. Volatile Compounds of *Elsholtzia splendens*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37(3): 339-344 (2005)
- Lee, T.B. Illustrated flora of Korea. Hyangmoonsa. Korea. p. 660 (1989)
- Liu S., Luo X., Li D., Zhang J., Qiu D., Liu W., She L. and Yang Z.: Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum DC.* *Int. Immunopharmacol.* Sep; 6(9), 1387-1393 (2006)
- Loizzo M.R., Statti G.A., Tundis R., Conforti F., Ando S. and Menichini F.: Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum.* *Fitoterapia* 75, 577-580 (2004)
- Losi G., Puia G., Garzon G., de Vuono M.C. and Baraldi M.: Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 502, 41-46 (2004)
- Lu, J., Shen, T., Guo, Z. The chemical constituents of *Elsholtzia blanda*. *Acta Botanica Sinica* 43, 545-550 (2001)
- Martinex-Vazquez M., Ramirez Apan T.O., Lastra A.L. and Bye R.: A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata.* *Plata. Med.* 64, 134-137 (1998)
- Middleton, E., Jr. and C. Kandawami. The impact of plant flavonoids on mammalian biology. Implications for immunity, inflammation and cancer. In the *Flavonoids. Advances in Research Since 1986*(J.B. Harborne, ed.),

- p.619-652, Chapman and Hall, London, UK (1993)
- Mourelle M., Murrel P., Favari L. and Franco T.: Prevention of CCl<sub>4</sub> induced cirrhosis by silymarin. *Fund. Clin. Pharmacol.* 3, 183 (1989)
- Nazaruk J. and Gudej J.: Flavonoid compounds from the flowers of *Cirsium rivulare(jacq.)* All. *Acta. Pol. Pharm.* 60: 87-89 (2003)
- Park J.C., Hur J.M., Park J.G., Kim S.C., Park J.R., Choi S.H. and Choi J.W.: Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum var. ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* 18, 19-24 (2004)
- Park, J.C., Yu, Lee, J.H., Hattori M., Lee, C.K., and Choi, J.W. Protective effect of *Oenanthe javanica* on the hepatic lipid peroxidation in bromobenzene-treated rats and its bio-active Component. *Planta Medica* 62: 488-490 (1996)
- Perez Gutierrez R.M., Ramirez E. and Vargas R.: Effect of *Cirsium pascuarensense* on blood glucose levels of normoglycaemic and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res.* 15, 552-554 (2001)
- Pierpoint, W. S. Flavonoids in the human diet. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. P. 125-140, Alan R. Liss, New York, NY USA (1986)
- Plaumann, B., Fritsche, M., Rimpler, H., Brandner, G. and Hess, R.D. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 13: 1605-1614 (1996)
- Raty, A. K. and N. P. Das. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation. Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 39: 69-79 (1998)
- Riccardo Solimani, Filippo Bayon, Ida Domini and pier GiorgioPifferi. Flavonoid-DNA interaction studied with flow linear dichroism technique. *J. Agric. Feed Chem.* 43: 876 (1995)
- Saller, R., Meier, R. and Brignoli, R.: The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 61, 2035-2063 (2001)
- Shin H., Kweon Y. and Park S.: Antidepressant effect of Sayuksan and its influence on monoamines of depression model rats. *Kor. J. Herbology.* 19(2), 71-82 (2004)

- Sohn, K., Song, J., Chae, Y. and Kim, K.: The growth and essential oil of *Elsholtzia ciliata*(Thunb.) Hylander. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39(6), 809 (1999)
- Sohn, K.H., Song, J.S., Chae, Y.A. and Kim, K.S. The Growth and Analysis of Essential Oil of *Elsholtzia splendens* Nakai. *J. Kor. Hort. Sci.* 40(2): 271-275 (1999)
- Son, G.H., Song, J.S., Seon, U.S. and Kim, G.S. Effects of Uniconazole on Aromatic Compounds of *Elsholtzia ciliata* and *E. splendens*. *J. Kor. Hort. Sci.* 44(6): 961-966 (2003)
- Song, S.E. and Chae, Y.A. Characteristics of Volatile Oil Components in *Elsholtzia splendens* Nakai Collected in Korea. *Korean J. Medical Crop Sci.* 12(6): 459-462 (2004)
- Song, S.Y., Chae, Y.A., Ohk, H.C., Kim, D.Y. and Park, B.S. Analysis of volatile compounds of *Elsholtzia splendens* in Korea. *Korean J. Breeding.* 36(1): 255-256 (2003)
- Wallace, S.N., Carrier, D.J. and Clausen, E.C.: Batch solvent extraction of flavanolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner). *Phytochem. Anal.* Jan-Feb; 16(1), 7-16 (2005)
- Yamazaki M., Hirakura K., Miyaichi Y., Imakura K., Kita M., Chiba K. and Mohri T.: Effect of polyacetylenes on the neurite outgrowth of neuronal culture cells and scopolamine-induced memory impairment in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1434-1436 (2001)
- Yim S.H., Kim H.J. and Lee I.S.: A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharm. Res.* 26, 128-131 (2003)
- Yoon, J.S. The comparative studies on the effects of *Elsholtzia ciliata* and *Elsholtzia splendens*. *Kor. J. Herbology* 7: 33-45 (1992)
- Zhang, W., Du, J. Separation and evaluation of flavonoid glycosides from *Elsholtzia blanda* Benth. *China Journal of Chinese Materia Medica* 24, 96-98 (1999)
- 김현택, 최준식, 박은혜, 이강희, 김은주, 이연경: 신경과학자를 위한 뇌질환 동물 행동검사. (주)시그마프레스, 56 (2006)
- 윤병국, 장준근, 전길신: 산야초 여행. 석오출판사, 32 (1988)
- 최영전: 산나물의 재배와 이용법. 오성출판사, 337 (1987)