

민들레의 항동맥경화 메카니즘 구명 및 제품 개발에 관한 연구

Research on the Mechanism of Anti-atherosclerosis
from Dandelion and Development of Function Food

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “민들레의 항동맥경화 메카니즘 구명 및 제품 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 7월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
총괄연구책임자 : 김 영 찬
세부연구책임자 : 홍 희 도
연 구 원 : 이 영 철
연 구 원 : 김 성 수
연 구 원 : 노 정 해
연 구 원 : 최 상 윤
연 구 원 : 임 주 혁
연 구 원 : 김 미 연
연 구 원 : 김 선 애

요 약 문

I. 제 목

민들레의 항동맥경화 메커니즘 구명 및 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

민들레는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 일반명 Dandelion, 학명은 *Taraxacum*, 한방명칭은 포公英(浦公英, *Taraxacum. Herba*)으로 불리우며 우리나라를 비롯하여 전세계에 2,000여 종이 분포하고 있으며, 한방에서 해열, 발한, 건위, 강장, 타장, 최유, 해독, 임파선염, 급성기관지염, 위염, 간염, 담낭염 등에 사용되고 있다. 민들레는 유럽, 호주, 뉴질랜드 등에서 재배되는 작물로 유럽에서는 만병통치약으로 사용될 정도로 각종 질병 예방에 필수적인 허브로 인식되고 있으며, 국내에서도 경남 의령, 전북 임실 등에서 재배되고 있으며 지역 특화작물로 지정되어 그 재배면적이 확대되고 있다.

민들레에 대한 국내외 연구로는 추출물의 면역활성, 항균력, 항당뇨, 항산화 활성 등에 대한 단편적인 연구 보고들이 있으며, 항동맥경화 활성과 관련된 메커니즘 구명, 활성 물질의 분리, 동정에 대한 연구는 미미한 상태이며, 제품개발에 관한 연구로는 민들레를 이용한 김치 개발, 전통주 개발 기술, SFE를 이용한 추출물 제조 기술 정도의 연구가 진행되었으나, 실용화 및 상품화는 현재 활발하지 못한 상태이다. 최근 들어 지방질의 과다 섭취에 의해 심장 및 혈관계 질환이 급격히 증가하여 성인병 사망률 1위를 차지하고 있으며, 90% 이상이 동맥 경화증으로 야기되며, 동맥경화의 주요 원인으로서는 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨병, 비만, 운동부족, 스트레스 등에 의하여 유발된 유리산소 라디칼($\cdot\text{OH}$, $\text{O}^{\cdot 2}$, H_2O_2 , 지질과산화물 라디칼 등)이며 이들에 의한 저밀도단백질(Low Density Lipoprotein, LDL)의 산화가 중요한 원인이 된다. 따라서 동맥경화의 초기 병변인 LDL의 산화를 억제하는 것이 죽상동맥경화로의 진전을 막는 최우선적인 Key point가 되며 천연 저분자 항산화제의 체내 역할이 매우 중요하다.

본 연구는 국내에서 재배되고 있는 민들레의 항동맥경화 활성을 시험하고자 in

vito, in vivo 모델을 통하여 항산화 활성, LDL 산화억제 활성, 항동맥경화 활성을 시험하였다. 또한 민들레를 이용한 다양한 제품을 개발하고자 적정 전처리조건 설정과 함께, 꽃차, 뿌리차, 숙성액 등의 제품을 개발하고 이들의 특성을 조사하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 민들레로부터 항산화 물질의 분리 및 동정

- 용매분획, column chromatography를 이용한 분리
- NMR, MS 등 기기분석을 통한 구조 동정

2. 민들레의 항산화 활성 시험

- ROS scavenging activity(DPPH, ABTS, $\cdot\text{OH}$, O^2 , H_2O_2)
- Chinese hamster V79-4 cell을 이용한 항산화 시험

3. 민들레의 항동맥경화 활성 시험

- HepG2 cell을 이용한 항동맥경화 활성 시험
- Human low density lipoprotein(LDL) 산화 억제 시험
- Newzealand whit rabbit을 이용한 동맥경화 예방 시험

4. 민들레를 이용한 가공제품 개발

- 민들레 꽃을 이용한 차제품 개발
- 민들레 뿌리를 이용한 SD 분말차 개발
- 민들레 잎을 이용한 숙성액 제품개발
- 민들레 잎을 이용한 발효차 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 민들레로부터 항산화 물질의 분리 및 동정

민들레 잎과 뿌리의 80% 에탄올 조추출물로부터 용매분획, column chromatography를 통하여 각각 3개의 단일 화합물을 분리하였으며, 이들의 구조를 MS, NMR 등 기기분석을 통하여 동정하였다. 민들레 뿌리로부터 quercetin-3--glucoside, quercetin-3-rhamnose, luteolin-7-glucoside를 동정하였으며, 뿌리로부터 isorhamnetin, chlorogenic acid, ferulic acid를 동정하였다.

2. 민들레의 항산화 활성 시험

민들레 잎과 뿌리의 80% 에탄올 조추출물, 용매분획, 분리한 단일 화합물의 항산화 활성을 검정한 결과 용매분획 중 ethyl acetate 분획에서 가장 높은 활성을 보였으며, 단일물질 중에는 flavonol glucoside인 quercetin-3-glucoside와 luteolin-7-glucoside가 높은 항산화 활성을 보였다. V79-4 cell을 이용한 시험에서도 민들레가 세포내 산화적 스트레스를 효과적으로 방어하는 것으로 나타났다.

3. 민들레의 항동맥경화 활성 시험

HepG2 cell을 이용한 항동맥경화 활성을 시험한 결과 민들레 잎과 뿌리의 80% 에탄올 조추출물과 용매분획, 분리한 단일 물질들은 세포내 LDL receptor binding activity를 증가시키고, mRNA의 단백질 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 HMG-CoA reductase mRNA의 발현을 억제한 동시에 ACAT-1의 발현도 억제하는 것으로 나타났다. Human LDL에 대한 산화억제 활성 시험에서는 LDL 산화에 의한 2차 산물인 MDA와 conjugated diene의 생성도 효과적으로 억제하는 것으로 나타나 동맥경화 발병의 초기 원인인 LDL의 산화적 손상을 효과적으로 방어하는 것으로 나타났다.

토기모델을 이용한 동물실험에서는 민들레의 잎과 뿌리 급여에 의하여 고콜레스테롤로 야기된 동맥경화 관련 바이오마커의 개선과 함께 심장대동맥의 지질침착을 억제하는 것으로 나타났다.

4. 민들레를 이용한 가공제품 개발

민들레 꽃을 이용한 차제품 개발을 위하여 동결건조, 저온건조, CO₂ 처리 후

저온건조 하여 이화학적 특성 및 관능평가를 한 결과 CO₂ 처리 후 저온건조 하여 제조한 차제품의 L값 19.38, a값 -0.20, b값은 0.83이었으며, 투과도와 탁도는 각각 94%와 0.032였으며, 관능평가 결과 가장 높은 점수를 얻었다.

민들레 뿌리를 이용한 SD 분말차를 제조하기 위한 액기스의 전처리 조건으로 190℃, 3분 볶음처리를 하였으며, 추출용매는 물 추출물의 수율이 32%로 가장 높았다. 분무건조를 위한 최적 배합비 설정시험에서 배합비 II(민들레 추출액(44 °Bx) 70 g, 사이클로덱스트린 10 g, 말토덱스트린 20 g, 플락토놀리고당 5 g, 아라비아 검 6 g, 증류수 89 g)로 혼합한 후 주입온도 140℃, 배출온도 95℃에서 분무속도 20 mL/min 으로 분무하였을 때 가장 품질이 좋은 것으로 나타났다.

민들레 숙성액 제조를 위해 자당, 올리고당, 고과당을 민들레 잎 중량 대비 1:2와 1:1로 첨가하여 4℃와 37℃에서 각각 숙성시켰을 때 총페놀과 플라보노이드 함량은 5주를 기점으로 감소하였으며, 최종 pH는 5.85~6.07을 유지하였다. 관능평가 결과 자당을 민들레 잎 중량 대비 1:1로 첨가한 후 37℃에서 7주간 숙성시켰을 때 가장 좋은 결과를 얻었다.

민들레 발효차 제조는 100℃에서 10분간 증숙, 상온에서 1차건조, 37℃, 95% RH에서 12시간 발효, 40℃ 열풍건조(수분함량 10% 이하) 하는 것이 최적 제조공정으로 조사되었다.

SUMMARY

1. Isolation and identification of anti-oxidants from dendlion

Three single compounds were isolated from 80% ethanol crude extracts of dandelion leaves and roots through solvent fractionation and column chromatography, and then identified their structures using MS and NMR. Quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnose, luteolin-7-glucoside were identified from dandelion leaves and isorhamnetin, chlorogenic acid, ferulic acid were identified from dandelion roots.

2. Anti-oxidant activity tests of dendlion

As the result of investigation on the antioxidative effect of 80% ethanol crude extracts, solvent fractions and isolated single compounds from dandelion leaf and root, ethyl acetate fraction showed the highest activity among solvent fractions and quercetin-3-glucoside, luteolin-7-glucoside showed high activity among single compounds. Dendlion also effectively protected cellular oxidative stress of V79-4 cell

3. Anti-arteriosclerosis activity tests of dendlion

As the result of investigation on anti-arteriosclerosis effect using HepG2 cell, 80% ethanol crude extracts, solvent fraction and isolated single compounds from dendlion leaf and root increased intra-cellular LDL receptor binding activity and expression of mRNA and protein. However, they decreased HMG-CoA reductase mRNA and ACAT-1 expression. Anti-oxidative activity test on human LDL showed that dandelion effectively protected LDL oxidation via inhibition of secondary product formation of LDL oxidation such as MDA and conjugated diene.

In vivo experiments using rabbit showed that feeding of dandelion leaf and root ameliorated biomarkers of arteriosclerosis induced by high cholesterol and inhibited lipid adhesion of heart aorta.

4. Development of processing product using dandelion

For the development of tea product using dandelion flower, the physicochemical properties and sensory evaluation were performed with freeze-dried, low temperature-dried and CO₂ treatment after low temperature-dried products. As the result of sensory evaluation, CO₂ treatment after low temperature-dried tea product received high score. The color value of low temperature-dried after CO₂ treatment tea product was 19.38 (L-value), -0.20 (a-value) and 0.83 (b-value) each. The transmissivity was 94% and turbidity was 0.032, respectively.

For the development of spray dryer powdered tea using dandelion root extract, dandelion root was roasted at 190°C for 3 min. The yield of hot-water extract from dandelion was 32%. In order to decide optimal conditions for spray dryer powder, 4 kinds of recipe were examined their physicochemical properties such as drying aptitude, fluidity, color and sensory characteristics. Among them, recipe II (44 °Bx dandelion extract, 35% cyclodextrin, 10% maltodextrin, 2.5% fructooligo saccharide, 2.5% gum arabic, 45% water) showed the highest quality characteristics.

In order to make the dandelion ripe liquid, sucrose, fructose and oligosaccharide were mixed with dandelion leaves, and stored for 7 weeks at 4°C and 37°C. Total phenolics and flavonoids contents decreased after 5 weeks ranged 30~70 mg/mL and 5~25 mg/mL, respectively. pH value maintained ranged from 5.85 to 6.07 during storage which showed no significant difference according to variety of sugar and storage temperature.

Several manufacturing process in order of washing, steaming, 1st drying, ferment, 2nd drying and chopping for fermented dandelion tea required. Optimal conditions for fermented dandelion tea were as followed; steaming at 100°C for 10 min, first drying at room temperature below 20~30% of moisture content, ferment at 37°C for 12 hour under 95% relative humidity.

CONTENTS

Chap. 1. Outline of research project	11
1. Objective	11
2. Significance	11
Chap. 2. Present state	13
Chap. 3. Results and discussion	14
1. Isolation and identification of active compounds from dandelion	14
1) materials and methods	14
a. Materials	14
b. Isolation and identification of active compounds	14
c. Quantification of active compounds	14
2) Results and discussion	17
a. Isolation and identification of active compounds from dandelion	17
a) Selection of solvent and pretreatment conditions	17
b) Isolation and identification of active compounds from leaves	19
c) Isolation and identification of active compounds from roots	31
d) Quantification of active compounds	43
2. Antioxidant activities of dandelion	44
1) Methods	44
a. Determination of antioxidant activities using Spectrophotometry	44
b. Determination of antioxidant activities using Chinese hamster V-79 cell	46
2) results and discussion	48
a. Antioxidant activities of dandelion	48
a) Antioxidant activities of solvent fractions	48
b) Determination of antioxidant activities using Chinese hamster V-79 cell	54

b. Antioxidant activities of active compounds	61
a) ROS scavenging activity	61
3. Determination of anti-atherosclerosis activities of dandelion	62
1) Determination of anti-atherosclerosis activities using HepG2	62
2) Determination of anti-atherosclerosis activities using LDL	65
3) Determination of anti-atherosclerosis activities using rabbit model	66
4) Results and discussion	69
a. Anti-atherosclerosis activities using HepG2	69
b. Anti-atherosclerosis activities using LDL	74
c. Anti-atherosclerosis activities using rabbit model	81
4. Development of functional food from dandelion	91
1) materials and methods	91
a. Manufacturing of dandelion flower teas	91
b. Manufacturing of dandelion root powder teas	91
c. Manufacturing of dandelion ripe liquid	94
d. Manufacturing of fermented teas	96
2) Results and discussion	97
a. Manufacturing of dandelion flower teas	97
b. Manufacturing of dandelion root powder teas	100
c. Manufacturing of dandelion ripe liquid	106
d. Manufacturing of fermented teas	118
Chap. 4. Attainment and Contribution	122
Chap. 5. Proposal for application	124
Chap. 6. Reference	125

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1절 연구개발의 목표	11
제 2절 연구개발의 필요성	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	14
1절 민들레로부터 항산화 물질의 분리	14
1. 재료 및 방법	14
가. 실험재료	14
나. 항산화 물질의 분리 및 동정	14
다. 항산화 성분의 함량 분석	14
2. 결과 및 고찰	17
가. 민들레로부터 항산화 물질의 분리 및 동정	17
1) 민들레의 추출용매 및 전처리 공정 확립	17
2) 민들레 잎으로부터 활성물질의 분리 및 동정	19
3) 민들레 뿌리로부터 활성물질의 분리	31
4) 분리한 화합물의 함량 측정	43
제 2절 민들레의 항산화 활성 시험	44
1. 실험방법	44
가. Spectrophotometry에 의한 항산화 활성 측정	44
나. Chinese hamster V-79 cell을 이용한 항산화 시험	46
2. 결과 및 고찰	48
가. 민들레의 항산화 활성	48
1) 용매분획별 항산화 활성	48
2) V79-4를 이용한 항산화 시험	54

나. 민들레로부터 분리한 물질의 항산화 활성	61
1) 분리한 물질의 활성산소 소거활성	61
제 3절 민들레의 항동맥경화 활성 시험	62
1. Hep G2를 이용한 항동맥경화 활성 시험	62
2. Low density lipoprotein (LDL) 산화 억제 시험	65
3. 토끼모델을 이용한 동맥경화 예방 효과	66
4. 결과 및 고찰	69
가. Hep G2를 이용한 항동맥경화 활성 시험	69
나. Human LDL을 이용한 항동맥경화 활성	74
다. 토끼모델을 이용한 항동맥경화 활성	81
제 4절 민들레를 이용한 가공제품 개발	91
1. 재료 및 방법	91
가. 민들레 꽃차 제조	91
나. 커피대용 뿌리차 제조	91
다. 민들레 숙성액 제조	94
라. 민들레 발효차 제조	96
2. 결과 및 고찰	97
가. 민들레 꽃차 제조	97
나. 커피대용 뿌리차 제조	100
다. 민들레 숙성액 제조	106
라. 민들레 발효차 제조	118
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	122
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	124
제 6 장 참고문헌	125

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목표

본 연구의 목표는 국내산 민들레의 항동맥경화 활성을 시험하고자 *in vitro* 와 *in vivo* 모델에서 항산화 활성, LDL 산화억제 활성, 항동맥경화 활성을 시험하였다. 또한 민들레를 이용한 다양한 제품을 개발하고자 적정 전처리조건 설정과 꽃차, 뿌리차, 숙성액 등의 제품을 개발하고 이들의 특성을 조사하여 민들레의 재배면적 확대 및 실용화를 통한 농가소득 증대에 기여하는데 최종목표를 두고 있다.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

민들레는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 일반명 Dandelion, 학명은 *Taraxacum*, 한방명칭은 포공영(浦公英, *Taraxacum. Herba*)으로 불리우며 우리나라를 비롯하여 전세계에 2,000여 종이 분포하고 있으며, 한방에서 해열, 발한, 건위, 강장, 타장, 최유, 해독, 임파선염, 급성기관지염, 위염, 간염, 담낭염 등에 사용되고 있다. 유럽, 호주, 뉴질랜드 등에서 재배되는 민들레는 만병통치약으로 사용될 정도로 각종 질병 예방에 필수적인 허브로 인식되고 있으며, 국내에서도 경남 의령, 전북 임실 등에서 재배되고 있으며 지역 특화작물로 지정되어 그 재배면적이 확대되고 있다.

민들레에 대한 국내외 연구로는 추출물의 면역활성, 항균력, 항당뇨, 항산화 활성 등에 대한 단편적인 연구 보고들이 있으며, 항동맥경화 활성과 관련된 메커니즘 구명, 활성 물질의 분리, 동정에 대한 연구는 미미한 상태이다. 제품개발에 관한 연구로는 민들레를 이용한 김치 개발, 전통주 개발 기술, SFE를 이용한 추출물 제조 기술 정도의 연구가 진행되었으나, 실용화 및 상품화는 현재 활발하지 못한 상태이다.

최근 들어 지방질의 과다 섭취에 의해 심장 및 혈관계 질환이 급격히 증가하여 성인병 사망률 1위를 차지하고 있으며, 90% 이상이 동맥경화증으로 야기된다. 동맥경화의 주요 원인으로는 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨병, 비만, 운동부족, 스트레스 등에 의하여 유발된 유리산소 라디칼($\cdot\text{OH}$, O^2 , H_2O_2 , 지질과산화물 라

디칼 등)이며 이들에 의한 저밀도단백질(Low Density Lipoprotein, LDL) 산화이다. 동맥경화로 인한 사망률은 10만명 당 25명(2002)으로 치료제의 시장 규모는 1,947억원으로 가장 높은 시장 성장률을 보이고 있다 (당뇨치료제 1,550억원, 신경치료제 1,432억원). 따라서 동맥경화의 초기 병변인 LDL의 산화를 억제하는 것이 죽상동맥경화로의 진전을 막는 최우선적인 Key point가 되며 천연 저분자 항산화제의 체내 역할이 매우 중요하다.

국내에서 시판되고 있는 민들레 소재 제품을 대부분이 잎, 뿌리를 건조하여 tea bag 또는 분말로 유통되고 있는 실정이며, 일부 엑기스 제품형태의 단순 추출물 형태이거나 엑기스를 첨가한 과립 차, 환, 타블렛 등이 유통되고 있다. 따라서 다양한 형태의 제품 개발의 필요성이 대두되고 있다.

2. 경제·산업적 측면

동맥경화로 인한 사망률은 10만명 당 25명(2002)으로 치료제의 시장 규모는 1,947억원으로 가장 높은 시장 성장률을 보이며(당뇨치료제 1,550억원, 신경치료제 1,432억원) 현재 1조 5천억원대에 이르는 기능성 식품 시장은 해마다 꾸준한 증가세를 보이고 있으며, 국외 유명 기능성 식품 제조 회사의 국내 진출이 현저히 증가하고 있다.

기존의 단순 가공형태의 민들레 제품을 탈피하여, 기능성이 구명된 다양한 제품의 개발로 민들레 재배 농가 및 관련 가공업체의 고부가치 창출이 시급한 실정이다.

3. 사회·문화적 측면

최근 고지방, 고단백 식생활로 인하여 암과 성인병의 발병율이 높고, 사망원인으로서 동맥경화, 고혈압, 당뇨 등으로 인한 뇌, 심장 등 혈관 순환계 질병에 의한 사망율이 암 다음의 순위이며, 동맥경화는 식생활과 관련된 생활 습관의 개선과 건강 기능식품의 지속적인 섭취에 의해 예방하는 것이 보다 중요하다.

동맥경화로 유발되는 각종 성인병은 식생활과 운동, 보건 기능성 식품의 지속적인 섭취에 의하여 예방이 가능한 것으로 연구되고 있으며, 민들레의 기능성 성분 및 관련 질병 예방의 과학적 구명 연구는 국민의 보건 향상 뿐만아니라 생활의 질 향상, 의료비 절감 등의 효과를 가져올 수 있을 것으로 생각된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

민들레는 유럽, 호주, 뉴질랜드 등에서 대량 재배되는 작물로 유럽에서는 만병통치약으로 사용될 정도로 각종 질병 예방에 필수적인 허브로 인식되고 있다. 국내에서도 경남 의령, 전북 임실 등에서 재배되고 있으며 지역 특화작물로 지정되어 그 재배면적이 확대되고 있다.

민들레에 대한 국내외 연구 현황으로는 다음과 같다.

국내

- 민들레 다당체 추출물의 항암 및 면역 활성화에 관한 연구(Jeong, 1991)
- 민들레로부터 항알러지 물질의 분리 및 동정(Cheong, 1998)
- 추출용매에 따른 병원성 미생물에 대한 항균력에 관한 연구(Kim, 1998)
- 민들레 김치 제조에 관한 연구(Kim, 2000)
- 민들레를 이용한 전통주 개발(Kim, 2000)
- *in vitro*에서 LDL 산화 억제 작용에 관한 연구(Cheun, 1996)

국외

- 민들레 물 추출물의 *in vitro*에서의 항산화 활성(Hagymasi, 2000)
- SFE를 이용한 민들레 잎 추출물 제조(Simandi, 2002)
- Streptozocin 유로 당뇨쥐에 대한 민들레 물 추출의 효과(Cho, 2002)
- 민들레의 페놀 화합물 함량과 항산화 활성(Yasukawa, 1998)
- 민들레 함유 식물추출물의 NOD mice에서의 간보호 효과(Petlevski, 2003)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 민들레로부터 항산화 물질의 분리

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

본 실험에 사용한 민들레는 민들레식품(경남 의령)에서 공급받아 잎과 뿌리로 선별하여 수세한 후 각각의 전처리 공정을 거쳐 추출용 시료로 사용하였다. 각각의 전처리 공정은 아래와 같다.

Table 1. Pretreatment conditions of dandelion leaf and root

전처리 조건	
동결건조	민들레 잎, 뿌리 선별 → 수세 → 동결 → 건조
천일건조	민들레 잎, 뿌리 선별 → 수세 → 양건(2~3 days)
열풍건조	민들레 잎, 뿌리 선별 → 수세 → 열풍건조(45°C, 48 hr)
브랜칭+ 열풍건조	민들레 잎, 뿌리 선별 → 수세 → 브랜칭(잎-80°C 열수, 1 min, 뿌리-95°C 열수, 5 min)
열풍건조+ 볶음처리	민들레 잎, 뿌리 선별 → 수세 → 열풍건조(45°C, 48 hr) → 볶음처리(잎-150°C, 3 min, 뿌리-190°C, 3min)

나. 항산화 물질의 분리 및 동정

1) 조추출물 조제 및 용매분획

건조된 민들레 잎과 뿌리 부분을 각각 분쇄기(FM-681 food mixer, Han Il, Korea)를 이용하여 분쇄한 후 시료 500 g에 80% 에탄올과 물 1.5 L를 가하여 3 시간 동안 2회 반복 환류 추출하여 조추출물을 조제하였다. 조추출물은 rotary vaccum evaporator(Rotavapor, Büchi, Germany)로 감압 농축하여 10% 메탄올 수용액에 현탁한 후 극성에 따라 헥산, 디에틸에테르, 에틸아세테이트, n-부탄올 순으로 용매 분획하였으며 수율은 105°C 상압가열건조법으로 구하였다.

2) Silica gel column chromatography

민들레 잎과 뿌리의 활성분획에 대하여 분획에 대하여 silica gel G 60 column chromatography를 행하였다. Silica gel G 60을 클로로포름/메탄올/물 (70/30/10, v/v/v, 하층)로 평형화를 시킨 후 open column (Φ 3.0×60 cm)에 충전하였다. 용출은 메탄올의 양을 증가시키면서 클로로포름/메탄올/물의 비율을 75/25/10 (v/v/v)에서 60/40/10 (v/v/v)로 순차적으로 분당 1.5 mL의 속도로 용출시키면서 50 mL씩 분취하였다. 용출된 각 획분은 spectrophotometer (UV 1601, Shimadzu Co., Japan)로 280 nm에서 흡광도를 측정하고, DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 흡광도와 라디칼 소거능을 기준으로 분획하였다.

3) Sephadex LH-20 column chromatography

Silica gel column chromatography에 의해 확인된 활성 분획에 대하여 Sephadex LH-20 column (Φ 2.5×30 cm)을 장착한 MPLC (moderate pressure liquid chromatograph, TrisTM model 160, ISCO Co., USA)을 이용하여 이동상으로 60% 메탄올을 사용하여 분당 1 mL의 속도로 10 mL씩 분취하였다. 용출된 각 획분은 280 nm에서의 흡광도와 DPPH 라디칼 소거능을 기준으로 분획하였다.

4) Preparative HPLC

DPPH 라디칼 소거능과 280 nm에서의 흡광도를 기준으로 나눈 획분에 대하여 활성이 가장 우수한 획분을 분취용 column (Develosil ODS HG-5, Φ 20×250 mm)을 사용하여 HPLC (high performance liquid chromatograph, LC-10A, Shimadzu Co., Japan)로 분리·정제하였다. 분리된 성분은 분석용 HPLC column (Develosil ODS-5, Φ 4.6×250 mm) 및 TLC (thin layer chromatography)로 단일성분임을 확인하고 구조 동정을 하였다.

5) FAB-Mass spectroscopy

분리된 물질의 분자량은 FAB-MS spectrometer (JAMS 700, JEOL Co., Japan)를 사용하여 glycerol을 matrix로 하여 측정하였다.

6) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

분리된 물질 10 mg을 DMSO- d_6 또는 methanol- d_4 에 용해한 후 TMS (tetramethylsilane)를 내부표준물질로 하여 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz)의 spectrum을 AMX-300 Spectrometer (Varian Unity PLUS, Varian, USA)를 사용하여 상온에서 분석하였다. 구조분석은 화학적 이동값 (ppm)을 통해 확인하였다.

다. 항산화 성분의 함량 분석

1) 총페놀 함량

총페놀 함량은 Prussian blue법으로 측정하였다. 건조 잎 분말 1 g에 60% 메탄올 100 mL를 가하여 2회 추출하여 감압농축하여 100 mL로 정용하였다. 시료 100 μL 에 증류수 3 mL, 0.016 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mL, 0.01 M $\text{FeCl}_3/0.1$ N HCl 1 mL를 혼합하여 강하게 진탕한 후 실온에서 15분간 방치하고, stabilizer (H_2O : 1% gum arabic: 85% phosphoric acid=3:1:1, v/v/v) 5 mL를 첨가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

2) 총플라보노이드 함량

총플라보노이드 함량은 건조 시료 1 g에 50% 메탄올 100 mL를 가하여 2회 환류 추출하여 얻은 추출액을 분석 시료로 사용하였다. 시료 1 mL에 diethylene glycol 10 mL, 1 N NaOH 1 mL,를 넣고 강하게 진탕한 후 37°C 항온기에서 1시간 정치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총플라보노이드 화합물의 함량은 naringin을 사용하여 검량곡선을 작성하고 naringin에 대한 당량으로 환산하였다.

3) 분리한 항산화 화합물의 정량

민들레의 잎과 뿌리의 항산화 물질의 함량은 HPLC로 다음과 같이 측정하였다. 시료 5 g에 80% 메탄올 100 mL를 가하여 2회 반복 추출하여 여과한 후 감압농축하였다. 건조 시료를 10% 메탄올로 현탁시키고 여기에 에틸아세테이트 50 mL를 가하여 2회 추출하여 에틸아세테이트 층을 감압 농축한 후 일정량을 메탄올에 용해하여 HPLC로 분석하였다. 이때 사용한 칼럼은 Develosil ODS-5 (Φ

4.6×250 mm), 이동상은 0.1% 초산을 함유한 물(A)과 아세토니트릴(B)을 사용하여 10분간 100% A, 50분간 60% A, 10분간 80% A로 흘렸으며, 검출은 UV 280 nm였다.

2. 결과 및 고찰

가. 민들레로부터 항산화 물질의 분리 및 동정

1) 민들레의 추출용매 및 전처리 공정 확립

가) 추출용매의 선정

민들레 잎과 뿌리 엑기스 제조를 위한 추출용매를 선정을 위하여 물과 80% 에탄올을 사용하여 각각 환류 추출한 후 총페놀 함량과 플라보노이드 함량을 측정하고, DPPH 라디칼 소거활성을 통한 항산화 활성을 시험한 결과는 Table 2에 나타내었다. 총페놀 함량과 플라보노이드 함량은 민들레 잎이 뿌리보다 높았으며, 특히 잎의 경우 80% 에탄올 추출군이 다른 추출군에 비하여 월등히 높게 나타났다. 뿌리의 경우 추출용매에 따른 총페놀과 플라보노이드 함량은 큰 차이를 보이지 않았으며, 1 mg/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거활성 또한 큰 차이를 보이지 않았다. 반면, 민들레 잎 80% 에탄올 추출물에서 85.44%의 라디칼 소거활성을 보여 80% 에탄올이 민들레의 추출용매로서 적당한 것으로 판단되었다.

Table 2. Total phenol and flavonoids content and DPPH radical scavenging activity of dandelion according to different solvent

		Total phenol	Total flavonoids	DPPH radical scavenging activity(1mg/mL)
Leaf	Water	2.59±0.43	141.9±20.3	68.76±3.6
	80% EtOH	7.60±0.97	470.2±184.5	85.44±2.5
Root	Water	1.15±0.45	56.3±11.4	55.67±2.6
	80% EtOH	1.70±0.21	65.5±10.9	52.47±4.5

나) 전처리 조건에 따른 항산화 활성

민들레의 가공적성 및 전처리 공정 개선을 위하여 현장에서 적용이 가능한 전처리 조건을 모색하고자 민들레 잎과 뿌리를 동결건조, 천일건조, 열풍건조, 브랜칭 후 건조, 볶음처리(roasting)하여 이들 추출물의 활성산소 소거능을 비교하였다.

이들 처리군의 항산화 활성을 비교하기 위하여 80% 에탄올 조추출물에 대한 hydroxyl 라디칼과 hydrogen peroxide 소거활성을 시험한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Hydroxyl and DPPH radical scavenging activities of dandelion according to various drying conditions

		Hydroxyl radical		Hydrogen peroxide	
		1 ppm	10 ppm	1 ppm	10 ppm
Trolox		75.69	94.34	55.34	64.29
	Freezing drying	68.11	79.28	15.63	16.54
	Sun drying	67.53	62.21	15.53	23.90
Leaf	Hot air drying	70.13	89.65	14.40	22.45
	Blanching	59.67	63.80	11.41	21.00
	Roasting	41.16	32.10	9.92	13.93
	Freezing drying	69.17	62.46	10.03	22.60
	Sun drying	74.12	65.93	15.79	18.34
Root	Hot air drying	74.76	60.31	10.90	22.05
	Blanching	67.77	51.50	4.37	15.03
	Roasting	66.15	45.27	9.05	14.83

Hydroxyl 라디칼의 경우 잎 추출물은 10 ppm 농도에서 32.10~89.65%, 1 ppm 농도에서 41.16~70.13%의 소거활성을 보였으며, 뿌리는 10 ppm 농도에서 45.27~65.93%, 1 ppm 농도에서 66.15~74.76%의 소거활성을 보였다. 이는 대조군으로 사용한 trolox보다는 다소 낮은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 전처리 조건에 따른 hydroxyl 라디칼 소거활

성은 잎의 경우 열풍건조, 동결건조 처리시 높게 나타났으며, 뿌리의 경우에는 처리군간에 활성의 차이가 뚜렷하지 않은 것으로 나타났다. Hydrogen peroxide의 경우 잎은 10 ppm 농도에서 13.93~23.90%, 1 ppm 농도에서 11.41~15.63%의 소거활성을 보였으며, 뿌리는 10 ppm 농도에서 14.83~22.60%, 1 ppm 농도에서 4.37~15.79%의 소거활성을 보여 hydroxyl 라디칼 소거활성보다는 다소 낮게 나타났다. 또한 전처리에 따른 민들레 추출물의 hydrogen peroxide 소거활성간에는 뚜렷한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합할 때 민들레의 건조방법으로는 수확 직후 저온(45°C)에서 열풍건조는 것으로 적당할 것으로 판단된다.

2) 민들레 잎으로부터 활성물질의 분리 및 동정

가) 용매분획

민들레 잎 500 g에 80% 에탄올 1.5 L를 가하여 3시간씩 2회 반복 환류 추출하여 조추출물을 조제하였다. 조추출물을 감압 농축하여 10% 메탄올 수용액에 현탁한 후 극성에 따라 헥산, 디에틸에테르, 에틸아세테이트, n-부탄올 순으로 용매 분획하였다. 이들의 각각 수율은 Table 4와 같다. 80% 에탄올 조추출물의 수율은 23.88%였으며, 헥산 2.91%, 디에틸에테르 1.11%, 에틸아세테이트 1.26%, 부탄올 5.53%, 그리고 물층이 10.36%였다.

Table 4. Yields of solvent fractions from dandelion leaf (unit: g%)

Fraction	Yield
Crude extract(80% ethanol)	23.88±2.18 ¹⁾
Hexane	2.91±0.21
Diethyl ether	1.11±0.07
Ethyl acetate	1.26±0.32
n-Butanol	5.53±0.64
Water	10.36±0.71

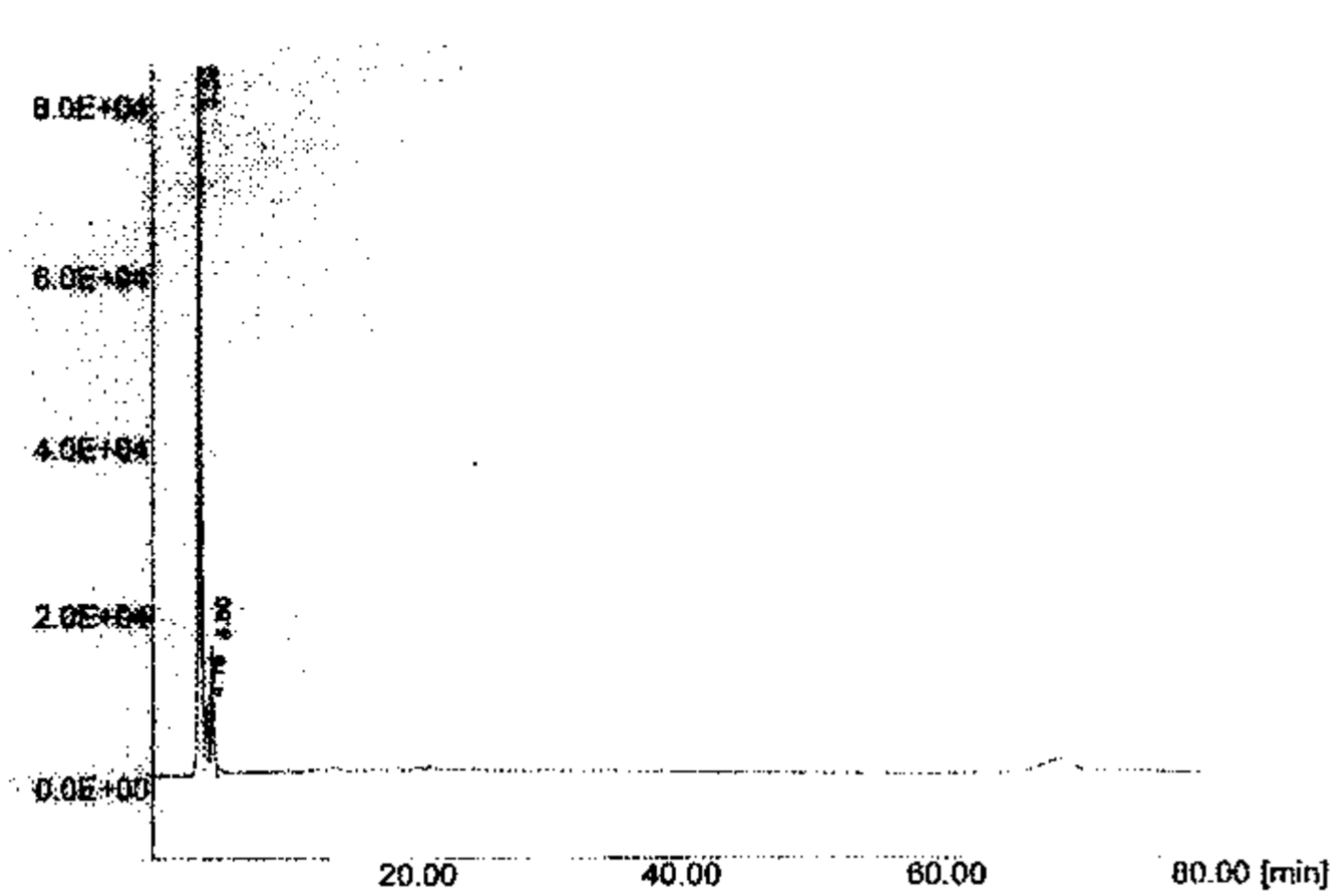
¹⁾Values present mean±S.D. (n=3).

나) Column chromatography에 의한 분리

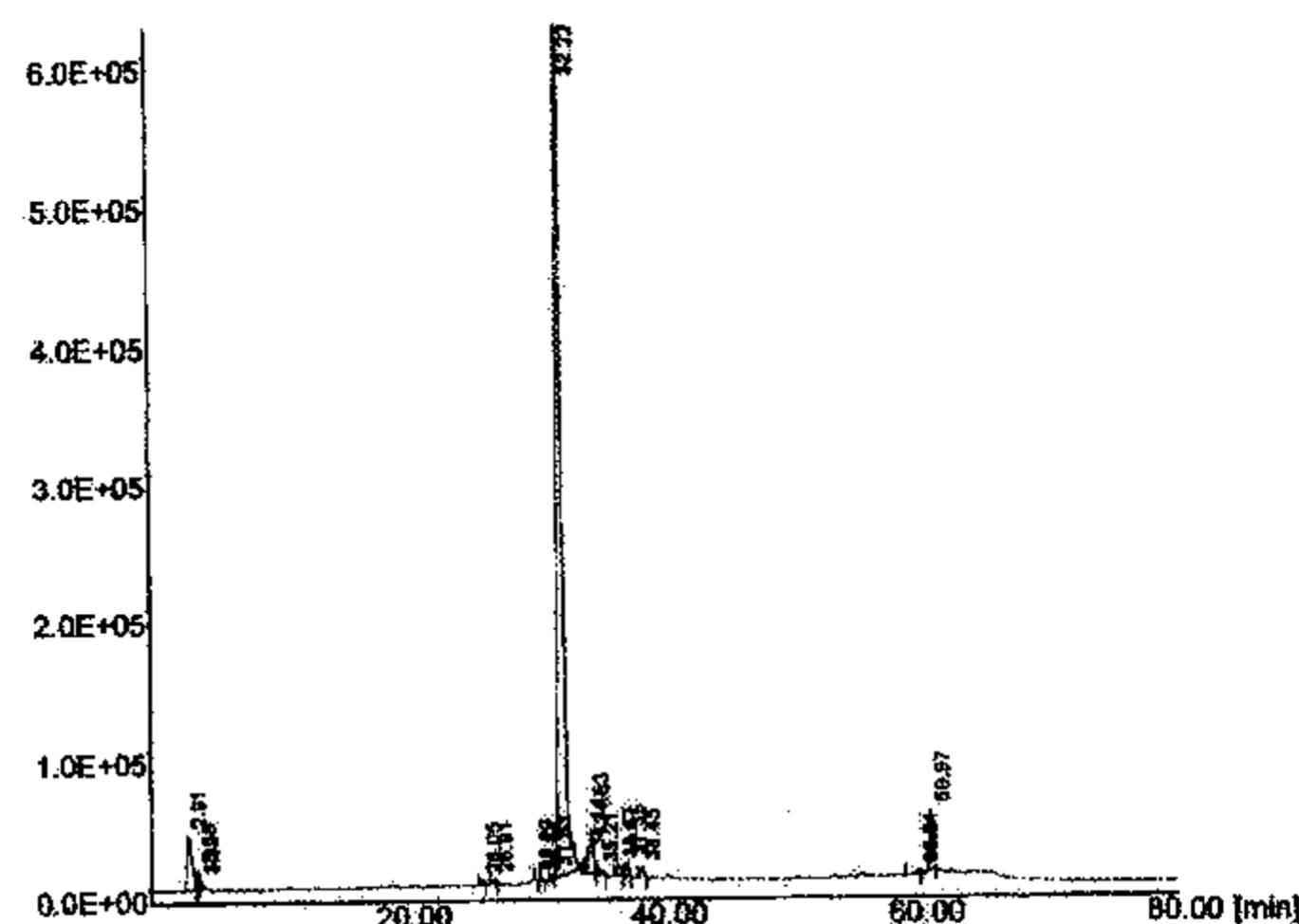
민들레 잎 80% 에탄올 조추출물로부터 용매 분획한 획분을 *in vitro*에서 항산화 활성을 조사한 결과 에틸아세테이트 획분에서 강한 항산화성과 LDL 산화억제 활성을 보였으며, silica gel column chromatography를 통하여 활성 물질을 분리하였다. 에틸아세테이트 획분 3.165 g을 silica gel에 loading 한 후, 용출은 클로로포름과 메탄올을 이용하여 메탄올의 농도를 높이면서 순차적으로 분당 2.5 mL의 속도로 50 mL씩 분취하였다. 분취된 각 획분은 TLC 패턴을 분석하여 8개의 fraction으로 나누었다. 이들 8개의 fraction의 수율과 DPPH 라디칼 소거활성을 시험한 결과는 Table 5와 같다. 수율은 fr. 2에서 가장 높았으나 DPPH 라디칼 소거활성은 높지 않았으며, Fr. 5의 경우 수율은 11.9%였으며 라디칼 소거활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 Fr. 5와 6을 정제하기 위하여 이후 Sephadex LH 20 column chromatography를 행하였다. 60% 메탄올로 용출하여 Fr. 5에 대하여 Fr. 5-1(186 mg), Fr. 5-2(34 mg), Fr. 5-3(8 mg)으로 3개의 fraction으로, Fr. 6은 Fr. 6-1(159 mg), Fr. 6-2(28 mg), Fr. 6-3(24 mg), Fr. 6-4(4 mg)의 4개의 fraction을 각각 분취하였다. 이중 Fr. 5-1, Fr. 5-2, Fr. 6-2, Fr. 6-3을 HPLC로 분석한 결과 어느정도 정제가 된 것으로 확인 하였으며, Fr. 5-2와 Fr. 6-3은 동일한 물질로 추정할 수 있었다. 이들 fraction에서 Prep HPLC를 통하여 3개의 단일 물질을 정제하였다.

Table 5. Yields and DPPH radical scavenging activity of ethyl acetate fractions separated by silica gel column chromatography

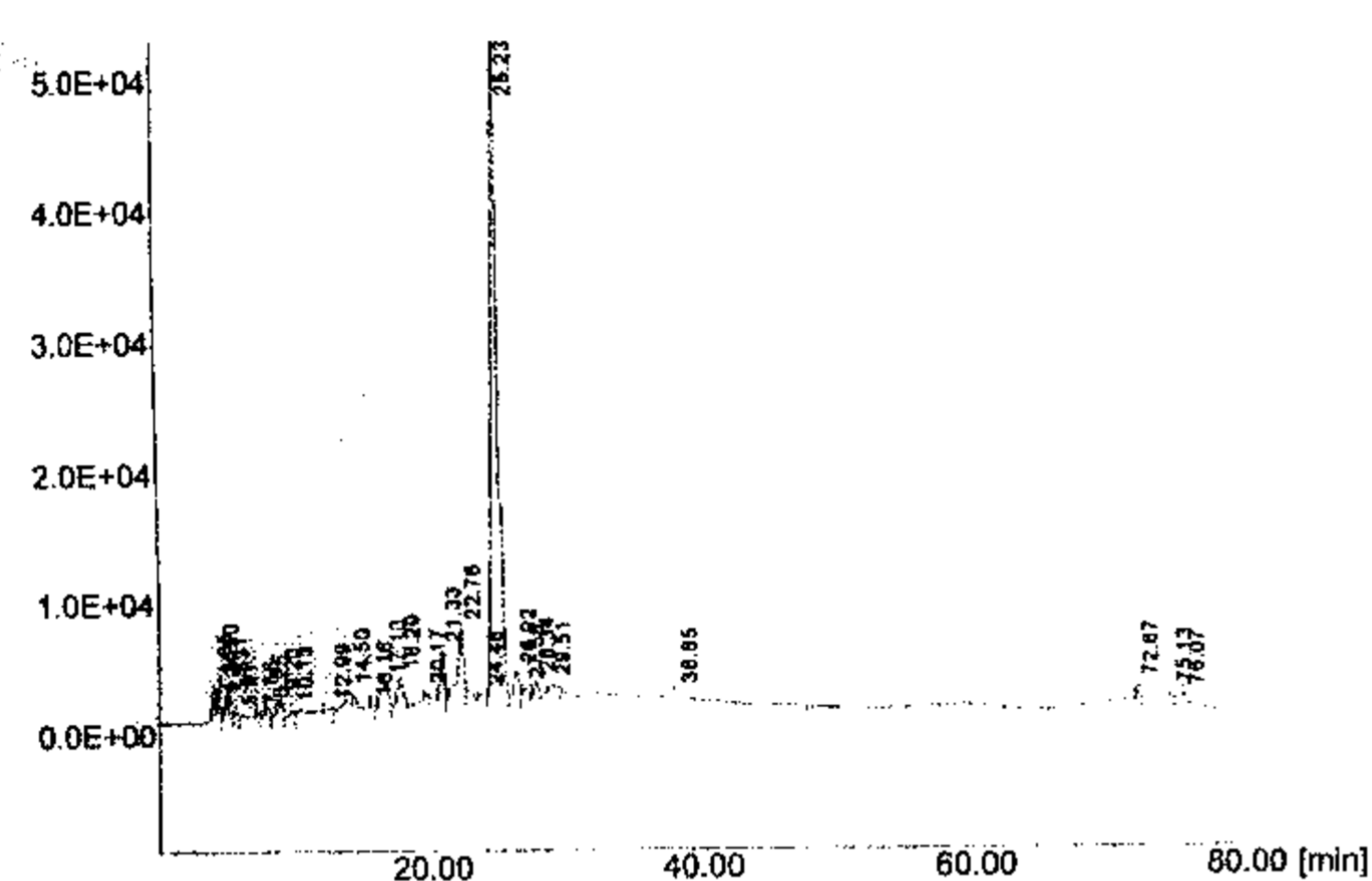
Fraction(No)	Yields (g)	DPPH radical scavenging activity(%)	Fraction(No)	Yields (g)	DPPH radical scavenging activity(%)
Fr. 1(1~3)	0.209	22.54	Fr. 5(11~20)	0.378	76.36
Fr. 2(4)	0.478	17.67	Fr. 6(21~29)	0.303	50.93
Fr. 3(5~7)	0.431	42.92	Fr. 7(30~40)	0.165	16.85
Fr. 4(8~10)	0.219	44.23	Fr. 8(41~60)	0.107	5.66



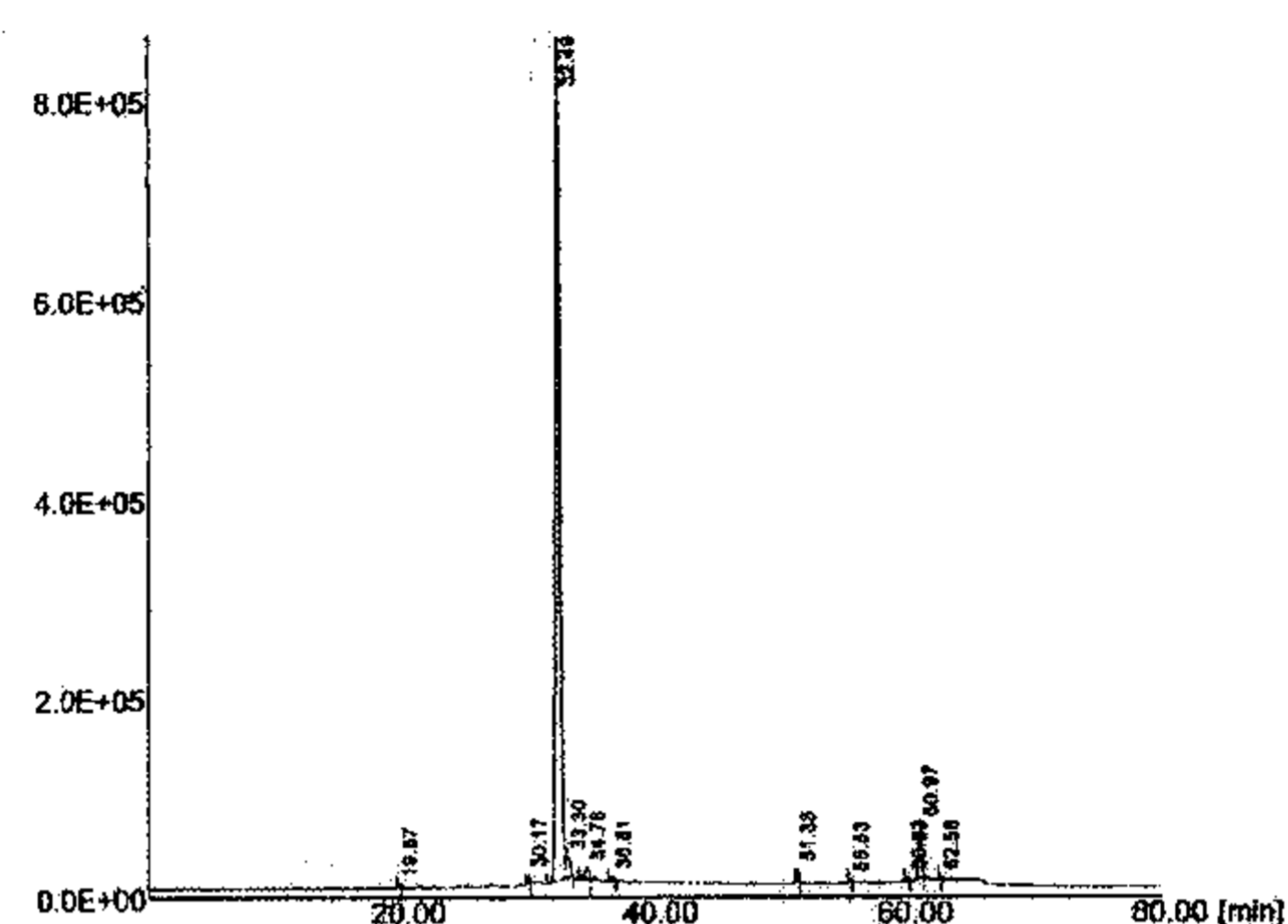
Fr. 5-1



Fr. 5-2



Fr. 6-2



Fr. 6-3

Fig. 1. HPLC chromatogram of each fractions separated by column chromatography.

다) 활성물질의 구조동정

(1) Compound 1

민들레의 잎으로부터 분리한 compound 1을 NMR 분석을 한 결과, ^1H NMR spectrum에서 6~8 ppm에서 벤젠 고리 유래의 proton과, 3~4 ppm 부근의 signal은 당 유래의 proton으로 flavonoid 배당체로 추정되었다(Fig. 2, 3). $\delta 6.18$ 과 $\delta 6.37$ 의 signal을 각각 H-6과 H-8로 assign하였다. $\delta 7.71$ (1H, s)의 signal은 B환의 H-2'의 signal로 추정되었으며, $\delta 7.57$ (1H, d, $J=8.1$ Hz)와 $\delta 6.86$ (1H, d, $J=8.1$ Hz)은 coupling constant 값이 8.1 Hz로 *ortho* coupling하고 있는 H-6'와 H-5'로 추정되었다. 5~6 ppm 사이에서 당의 anomeric proton으로 추정되는

signal이 85.24 (1H, d, $J=6.9$ Hz)에서 나타났다.

^{13}C NMR 90~180 ppm flavonoid 핵의 탄소의 signal이 나타나고, 60~80 ppm 사이에서 나타난 당 유래의 peak 수가 5개이며, 104.33 ppm에서 anomeric carbon의 signal이 나타나 ^1H NMR의 결과에서와 같이 flavonoid glycoside로 추정된다. 또한 anomeric proton의 coupling constant 값이 6.9 Hz로 anomeric proton의 configuration은 β -form으로 추정된다. Flavonoid 핵에서 가장 저자장을 나타내는 carbonyl기의 signal이 177.69 ppm이므로 flavonol 배당체로 추정되었다. C3의 signal 저자장측으로 이동되어 C3 위치의 hydroxyl기에 당이 결합된 것을 문헌치와 비교하여 확인하였다.

구성당을 확인하기 위하여 compound 1에 2 N HCl/50% MeOH를 가하여 산 가수분해 시킨 후 에틸아세테이트로 분획하고 남은 물층을 분리하였다. 분리된 물층의 TLC는 silica gel plate를 이용하여 에틸아세테이트/아세트산/메탄올/물 (65:20:15:15, v/v/v/v)로 전개시켰다. 분리된 0.5% thymol/EtOH- H_2SO_4 (95:5)용액을 분무한 후 100 $^\circ\text{C}$ 오븐에서 당을 발색시켜 표품과 Rf치를 비교하여 glucose를 확인하였다.

Fig. 4는 compound 1의 FAB-MS spectrum으로 m/z 465에서 $[\text{M}^++1]$ 을 확인하였다. 이상의 기기분석 결과를 종합하여 민들레 잎으로부터 분리한 compound 1을 quercetin-3- O - β -D-glucopyranoside로 구조 동정하였다.

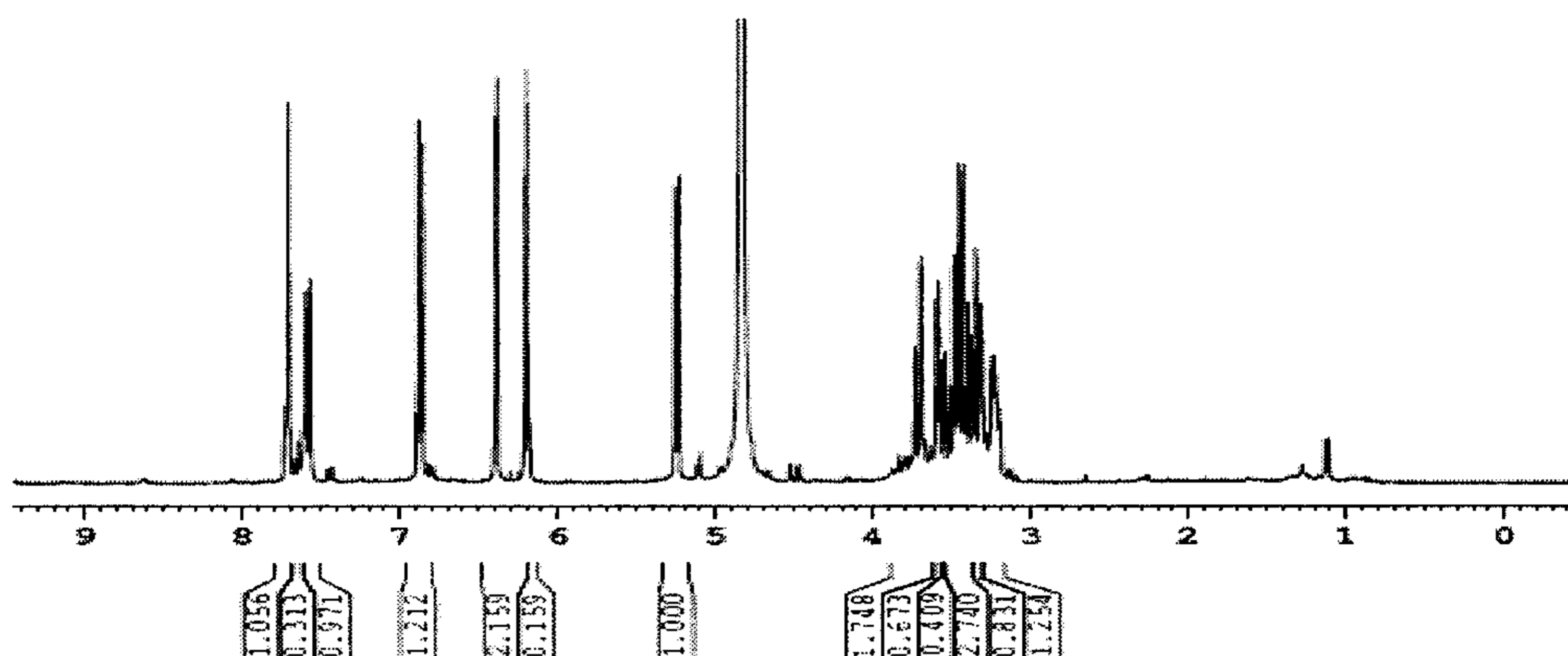


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 1 isolated from dandelion leaf.

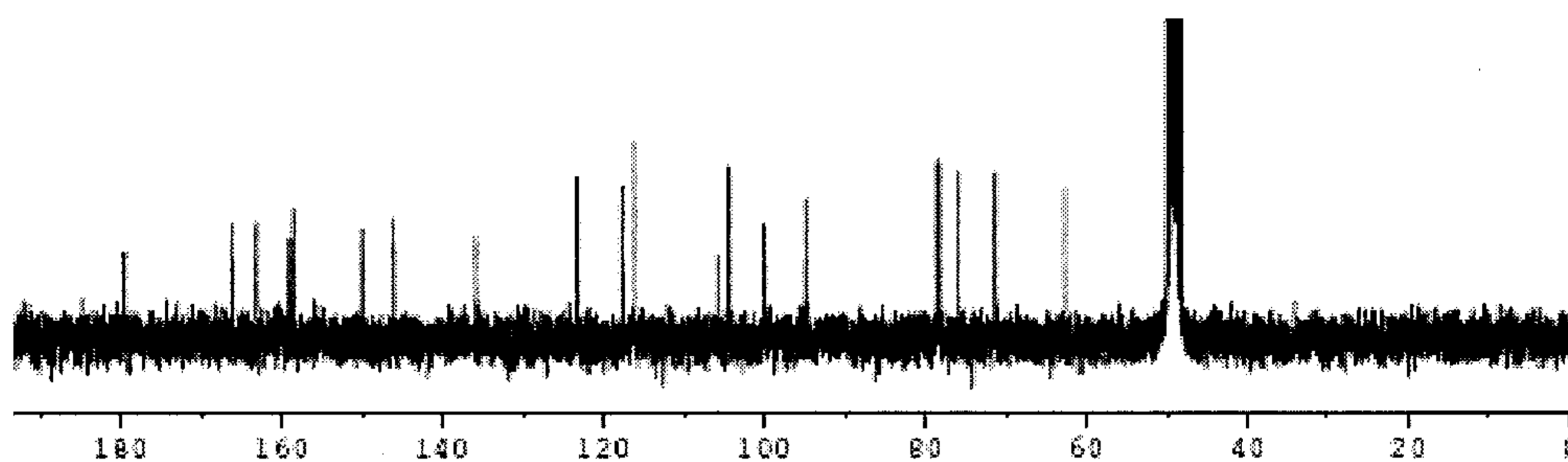


Fig. 3. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 1 isolated from dandelion leaf.

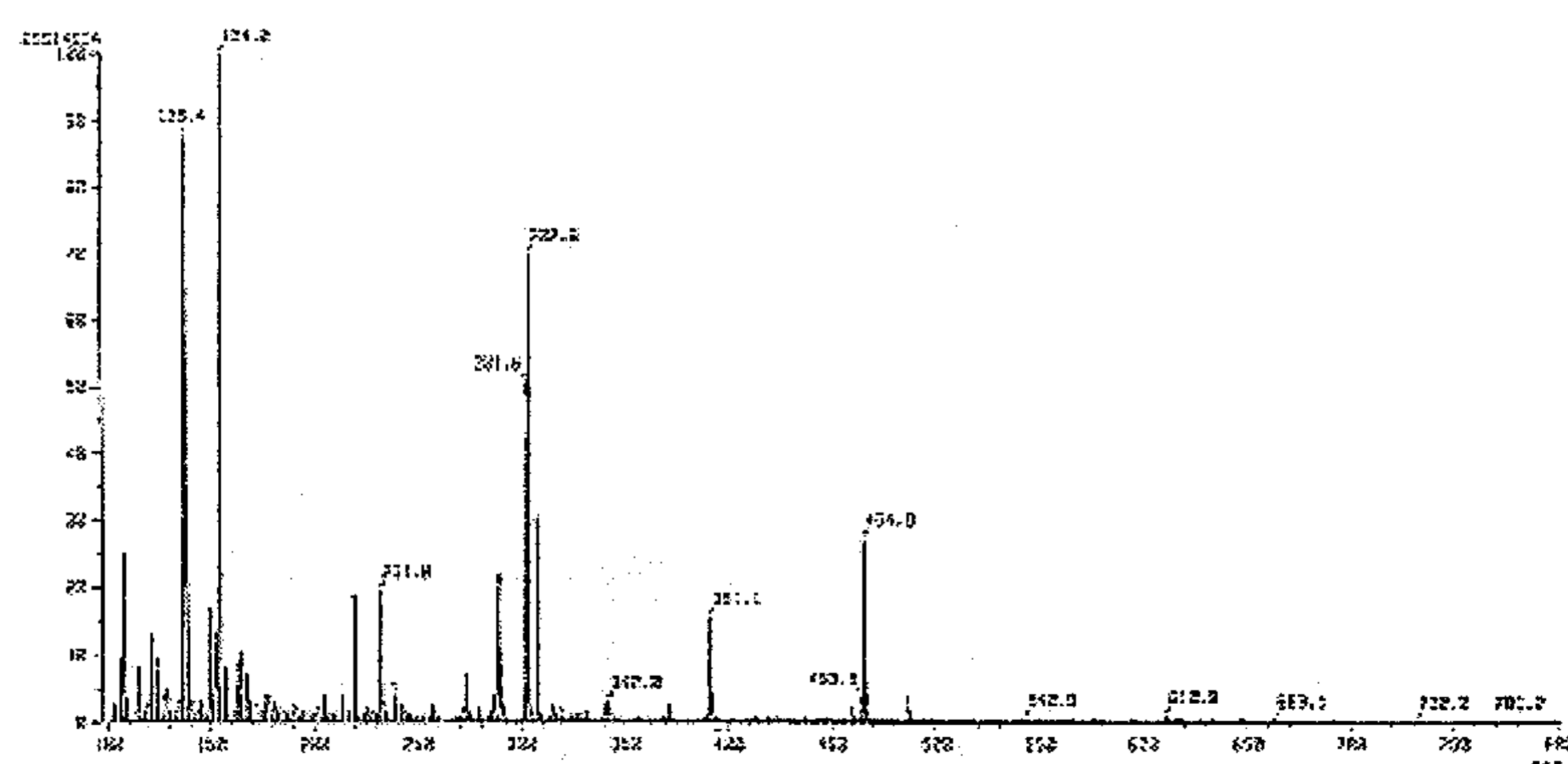


Fig. 4. FAB-MS spectrum of compound 1 isolated from dandelion leaf.

Table 6. Spectral data of compound 1 isolated from dandelion leaf

NMR δ ^1H (CD_3OD) ppm	7.71 (1H, s, H-2'), 7.57 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5'), 6.37 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, s, H-6)
glycosyl	5.24 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-1''), 3.74 (1H, dd, H-6''a), 3.70 (1H, dd, H-6''b), 3.58 (1H, dd, H-2''), 3.47 (1H, t, H-3''), 3.32 (1H, t, H-4''), 3.30 (1H, t, H-5'')
NMR δ ^{13}C (CD_3OD) ppm	179.42 (C4), 165.92 (C7), 162.95 (C5), 158.98 (C2), 158.38 (C9), 149.80 (C4'), 145.83 (C3'), 135.60 (C3) 122.28 (C1,'6'), 117.56 (C2,5''), 115.97 (C3',5'), 105.64 (C10), 104.357 (C1''), 99.87 (C6), 94.71 (C8), 78.32 (C5''), 78.08 (C3''), 75.70 (C2''), 71.16 (C4''), 62.52 (C6'')
FAB-MS (glycerol) m/z	464 [M^++1]

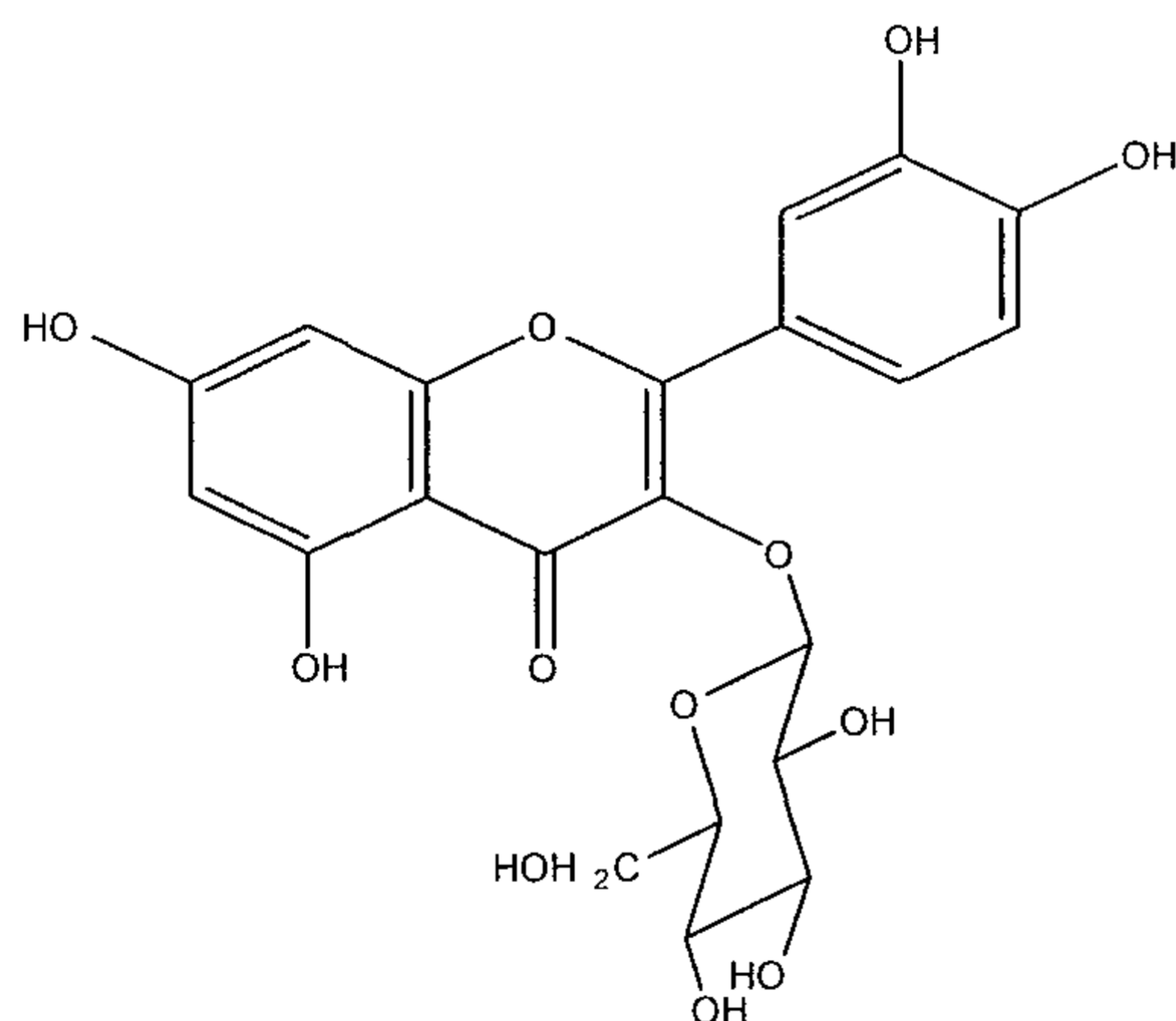


Fig. 5. Chemical structure of compound 1 isolated from dandelion leaf.

(2) compound 2

민들레 잎으로부터 분리한 compound 2의 구조동정을 위하여 ^1H , ^{13}C NMR을 수행한 결과는 Fig. 6과 7에 나타내었다. ^1H NMR spectrum에서 6~8 ppm에서 벤젠 고리 유래의 proton과, 1~4 ppm 부근의 signal은 당 유래의 proton으로 flavonoid 배당체로 추정되었다. δ 6.20과 δ 6.37의 signal을 각각 H-6과 H-8로 assign하였다. δ 7.34 (1H, s)의 signal은 B환의 H-2'의 signal로 추정되었으며, δ 7.31 (1H, d, $J=8.4$ Hz)와 δ 6.90 (1H, d $J=8.4$ Hz)은 coupling constant 값이 8.1 Hz로 *ortho* coupling하고 있는 H-6'와 H-5'로 추정되었다. 1~6 ppm 사이에서 당의 anomeric proton으로 추정되는 signal이 δ 5.35 (1H, d, $J=1.8$ Hz)에서 나타났다. 또한 메틸기 유래의 δ 0.94 (3H, d, $J=6.0$ Hz)는 결합 당부분에 메틸기가 있는 것으로 추정되었다.

^{13}C NMR에서는 compound 1과 유사한 signal로 90~180 ppm flavonoid 핵의 탄소의 signal이 나타나고, 60~80 ppm 사이에서 나타난 당 유래의 peak 수가 5개이며, 103.70 ppm에서 anomeric carbon의 signal이 나타나 ^1H NMR의 결과와 같이 flavonoid glycoside로 추정된다. Flavonoid 핵에서 가장 저자장을 나타내는 carbonyl기의 signal이 179.81 ppm이므로 flavonol 배당체로 추정되었다. C3의 signal 저자장측으로 이동되어 C3 위치의 hydroxyl기에 당이 결합된 것을 문헌치와 비교하여 확인하였다.

구성당을 확인하기 위하여 compound 2에 2 N HCl/50% MeOH를 가하여 산 가수분해 시킨 후 에틸아세테이트로 분획하고 남은 물층을 분리하였다. 분리된 물층의 TLC는 silica gel plate를 이용하여 에틸아세테이트/아세트산/메탄올/물 (65:20:15:15, v/v/v/v)로 전개시켰다. 분리된 0.5% thymol/EtOH-H₂SO₄ (95:5)용액을 분무한 후 100°C 오븐에서 당을 발색시켜 표품과 R_f치를 비교하여 rhamnose를 확인하였다.

Fig. 8는 compound 2의 FAB-MS spectrum으로 m/z 449에서 $[\text{M}^++1]$ 을 확인하였다. 이상의 기기분석 결과를 종합하여 민들레 잎으로부터 분리한 compound 2를 quercetin-3-*O*- β -D-rhamnopyranoside로 구조 동정하였다.

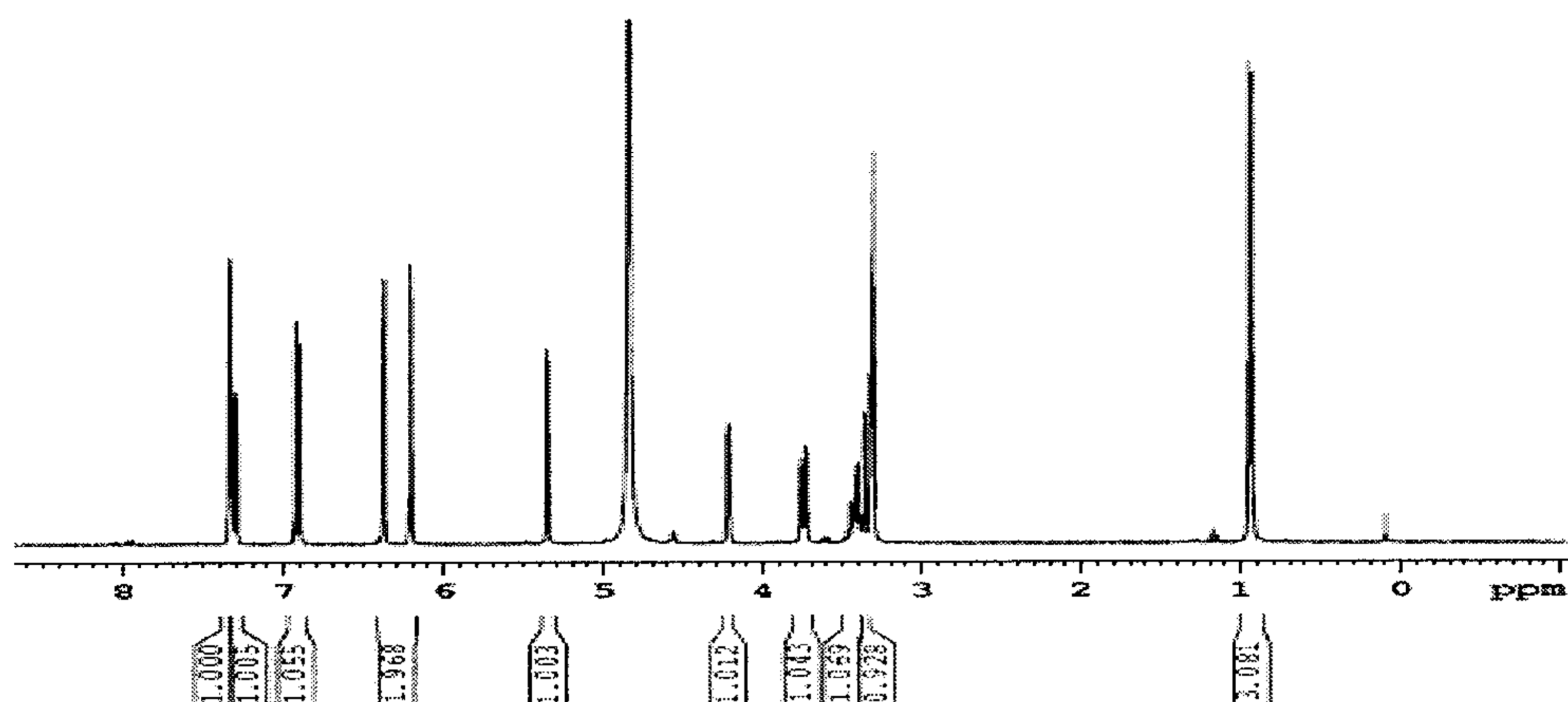


Fig. 6 ^1H -NMR spectrum of compound 2 isolated from dandelion leaf.

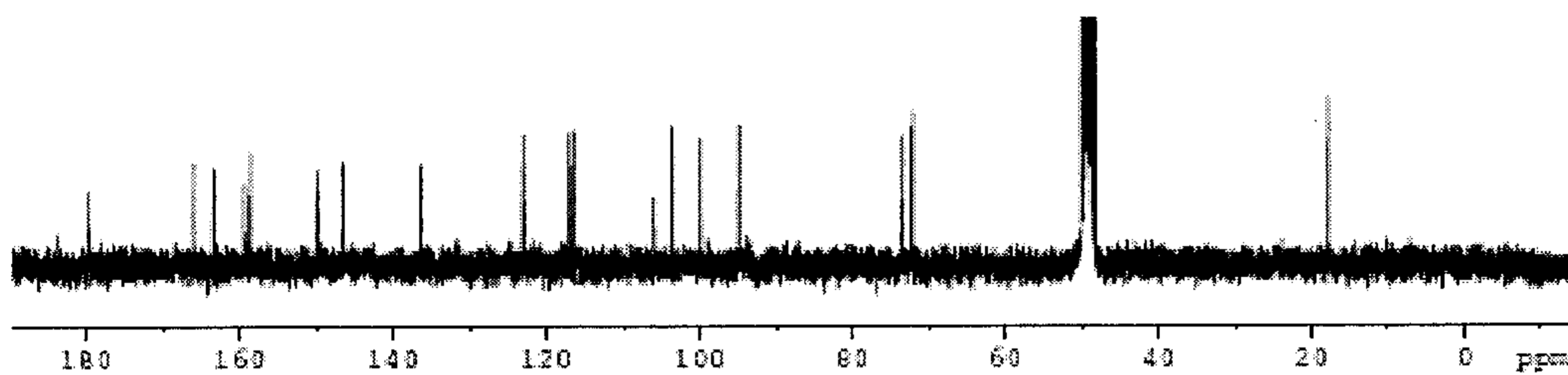


Fig. 7. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 isolated from dandelion leaf.

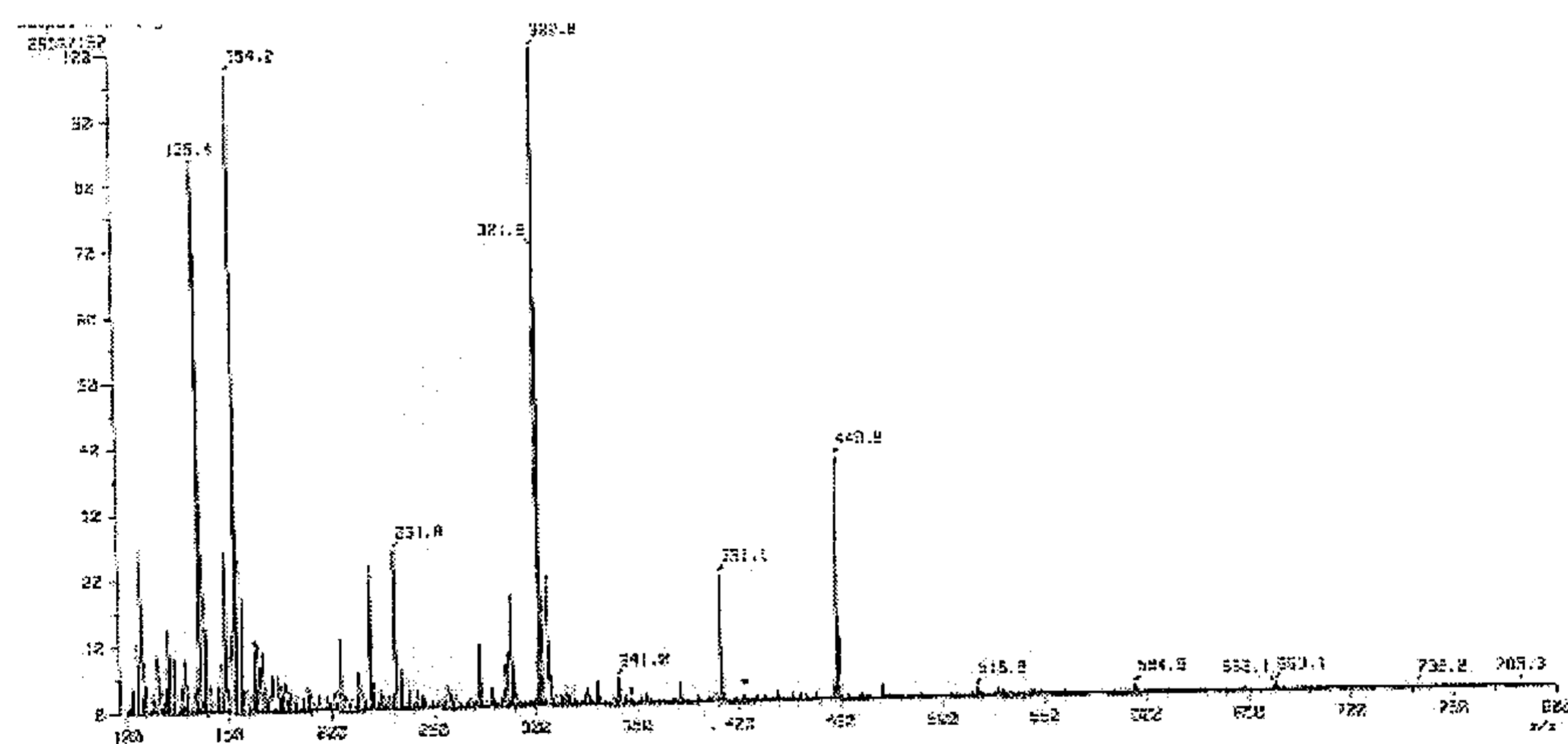


Fig. 8. FAB-MS spectrum of compound 2 isolated from dandelion leaf.

Table 7. Spectral data of compound 2 isolated from dandelion leaf

NMR δ ^1H (CD_3OD) ppm	7.34 (1H, s, H-2'), 7.31 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.37 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, s, H-6)
rhamnosyl	5.35 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-1''), 4.20 (1H, dd, H-2''), 3.73 (1H, dd, H-3''), 3.42 (1H, t, H-4''), 3.72 (1H, m, H-5''), 0.94(3H, d, $J=6.0$, H-6'')
NMR δ ^{13}C (CD_3OD) ppm	179.81 (C4), 166.02 (C7), 163.38 (C5), 159.47 (C2), 158.61 (C9), 149.95 (C4'), 146.58 (C3'), 136.39 (C3), 123.13 (C1'), 123.00(6'), 117.08 (C2), 116.52 (C5''), 106.05 (C10), 103.70 (C1''), 99.95 (C6), 94.85 (C8), 73.41 (C5''), 72.27 (C3''), 72.18 (C2''), 72.06 (C4''), 17.80 (C6'')
FAB-MS (glycerol) m/z	448 [$\text{M}^+ + 1$]

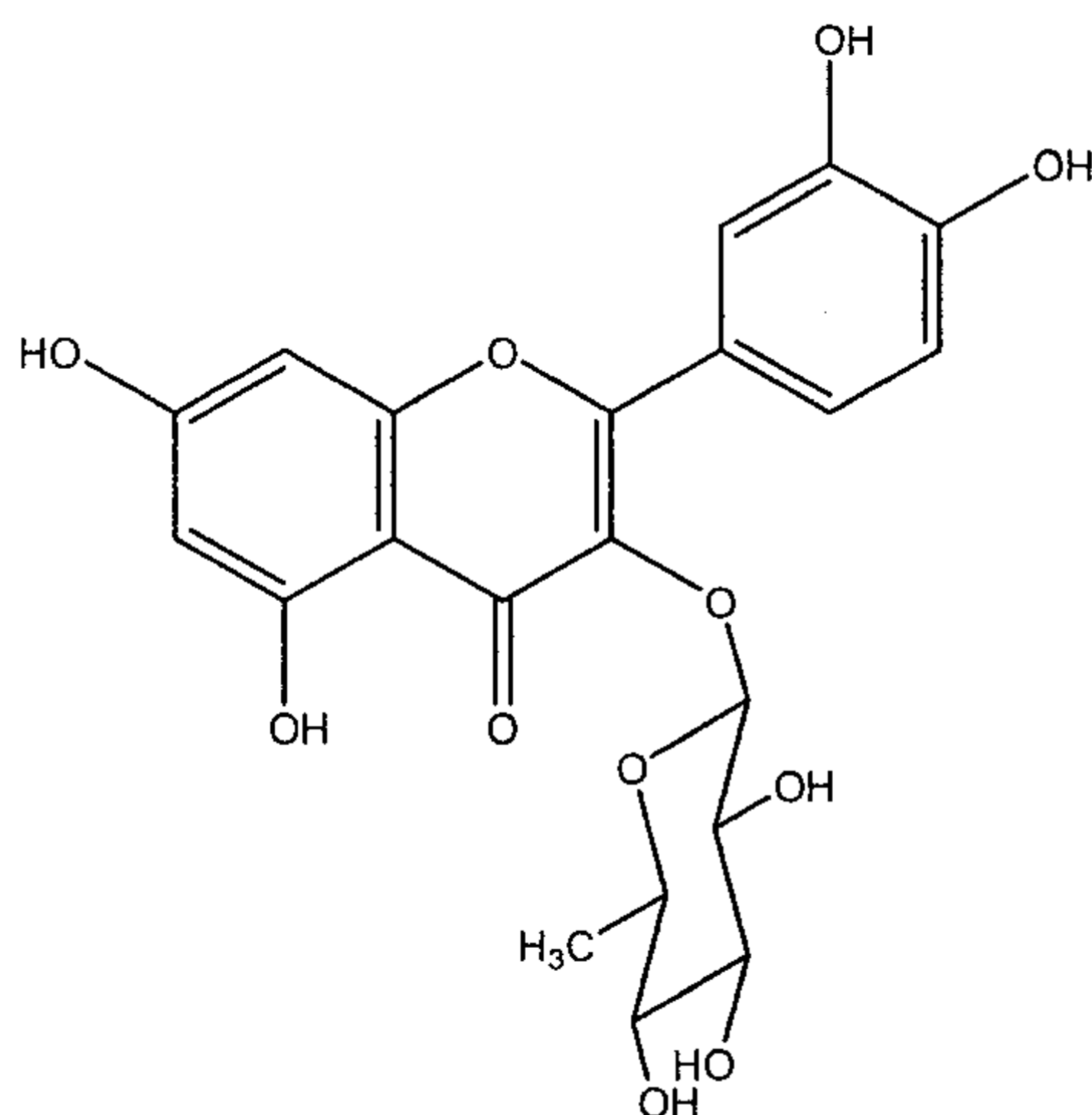


Fig. 9. Chemical structure of compound 2 isolated from dandelion.

(3) Compound 3

민들레 잎으로부터 분리한 compound 3의 구조동정을 위하여 ^1H , ^{13}C NMR을 수행한 결과는 Fig. 10과 11에 나타내었다. ^1H - NMR spectrum에서 6개의 signal이 6~8 ppm에서 나타났고, 이중 $\delta 7.41$ 과 $\delta 6.46$ 에서 m-coupled doublets이 나타났고, $\delta 7.42$ 에서의 singlet peak는 H-3의 peak로 flavonoid B ring의 C-3에서 치환기가 존재하지 않는 flavone의 구조임을 추정할 수 있었다. 또한 A환의 signal보다 저자장에서 3개의 peak가 나타나 B환은 2개의 치환기가 있는 것으로 추정할 수 있었다. 당 유래의 peak는 3~4 ppm에서 나타났으며, anomeric proton으로 추정되는 signal이 $\delta 5.08$ (1H, d, $J=7.2$ Hz)에서 나타났었다.

^{13}C NMR에서 signal로 90~185 ppm flavonoid 핵의 탄소의 signal이 나타나고, 60~80 ppm 사이에서 나타난 당 유래의 peak 수가 5개이며, 103.20 ppm에서 anomeric carbon의 signal이 나타나 ^1H NMR의 결과에서와 같이 flavonoid glycoside로 추정된다. Carbonyl(4-keto)기의 signal은 181.96 ppm에서 나타났고, C-7의 signal이 164.53 ppm으로, 치환기가 없는 경우에서 나타나는 166 ppm 부근보다 약 2 ppm 정도 고자장으로 이동되어 C-7번 위치에 O-glycosylation 되었음을 알 수 있다. O-glycosylation된 C-1의 signal이 103.20 ppm으로 나타났었다.

구성당을 확인하기 위하여 compound 3에 2 N HCl/50% MeOH를 가하여 산 가수분해 시킨 후 에틸아세테이트로 분획하고 남은 물층을 분리하였다. 분리된 물층의 TLC는 silica gel plate를 이용하여 에틸아세테이트/아세트산/메탄올/물 (65:20:15:15, v/v/v/v)로 전개시켰다. 분리된 0.5% thymol/EtOH- H_2SO_4 (95:5)용액을 분무한 후 100°C 오븐에서 당을 발색시켜 표품과 Rf치를 비교하여 glucose를 확인하였다.

Fig. 12는 compound 3의 FAB-MS spectrum으로 m/z 447에서 $[\text{M}^+ + 1]$ 을 확인하였다. 이상의 기기분석 결과를 종합하여 민들레 잎으로부터 분리한 compound 3을 luteolin-7-O- β -D-rhamnopyranoside로 구조 동정하였다.

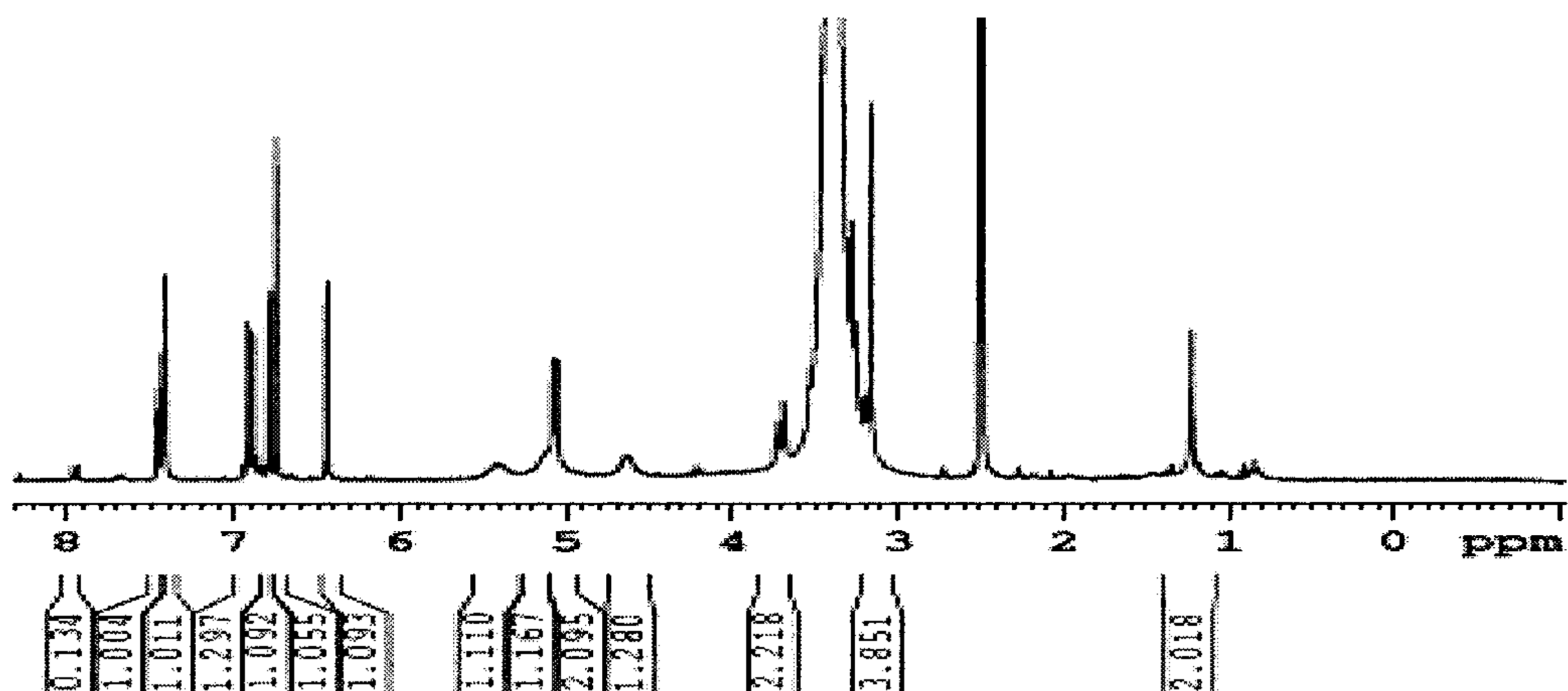


Fig. 10. ^1H -NMR spectrum of compound 3 isolated from dandelion leaf.

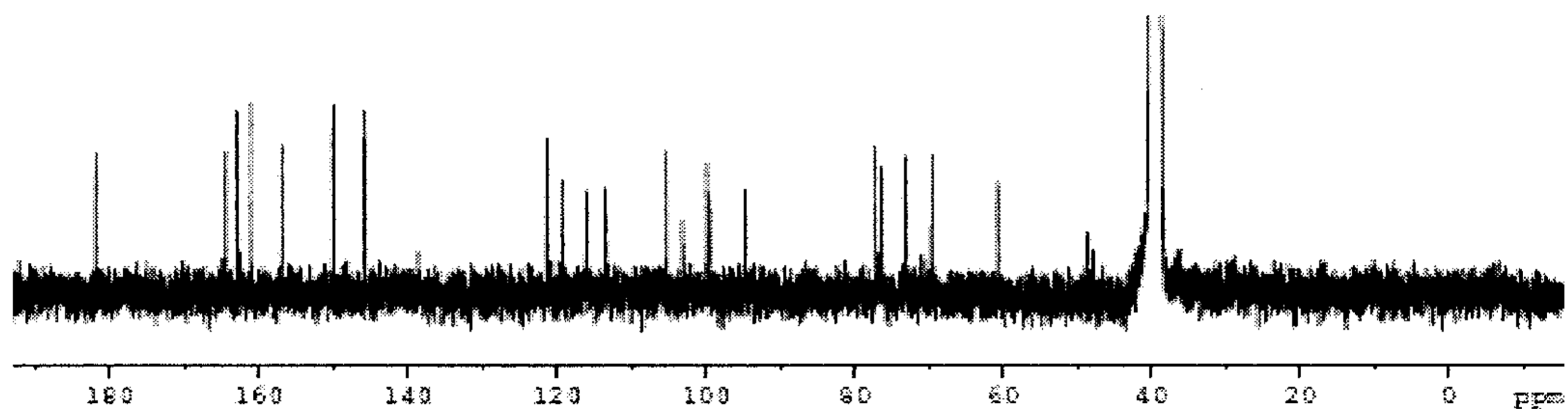


Fig. 11.. ^{13}C -NMR spectrum of compound 3 isolated from dandelion leaf.

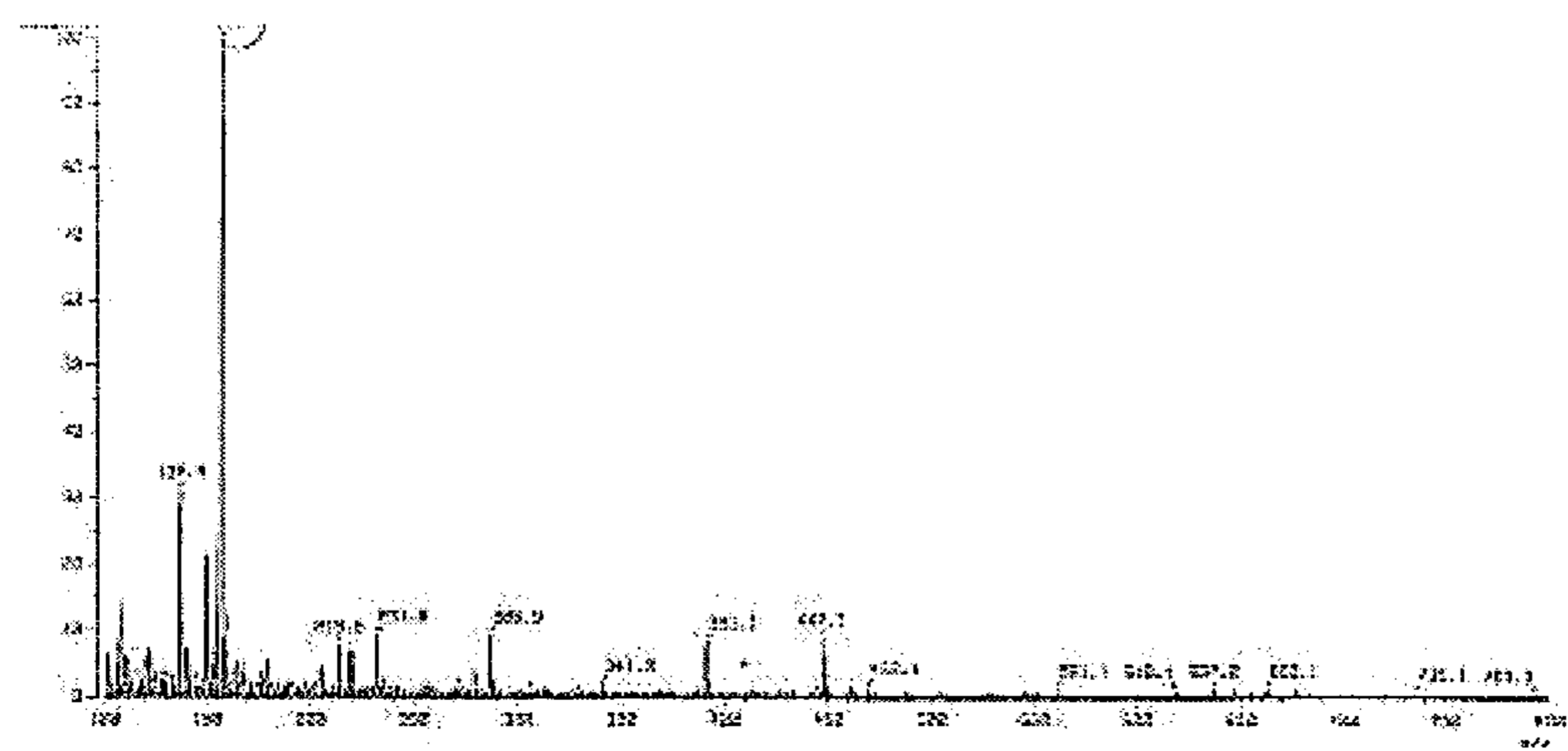


Fig. 12. FAB-MS spectrum of compound 3 isolated from dandelion leaf.

Table 8. Spectral data of compound 3 isolated from dandelion leaf

NMR δ ^1H (CD_3OD) ppm	7.42 (1H, s, H-2'), 7.41 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.44 (1H, s, H-8), 6.43 (1H, s, H-6)
glycosyl	5.08 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.69 (1H, dd, H-6''), 3.69 (1H, dd, H-2''), 3.28 (1H, t, H-3''), 3.28 (1H, t, H-4''), 3.16 (1H, t, H-5'')
NMR δ ^{13}C (CD_3OD) ppm	181.96 (C4), 164.53 (C7), 162.99 (C5), 162.54 (C2), 161.17 (C9), 156.99 (C4'), 149.99 (C3'), 145.83 (C3) 121.41 (C1') 119.23 (C6'), 116.04 (C2), 113.58(C5''), 105.38 (C10), 103.20 (C1''), 99.94 (C6), 94.80 (C8), 77.19 (C5''), 76.42 (C3''), 73.16 (C2''), 69.60 (C4''), 60.63 (C6'')
FAB-MS (glycerol) m/z	446 [$\text{M}^+ + 1$]

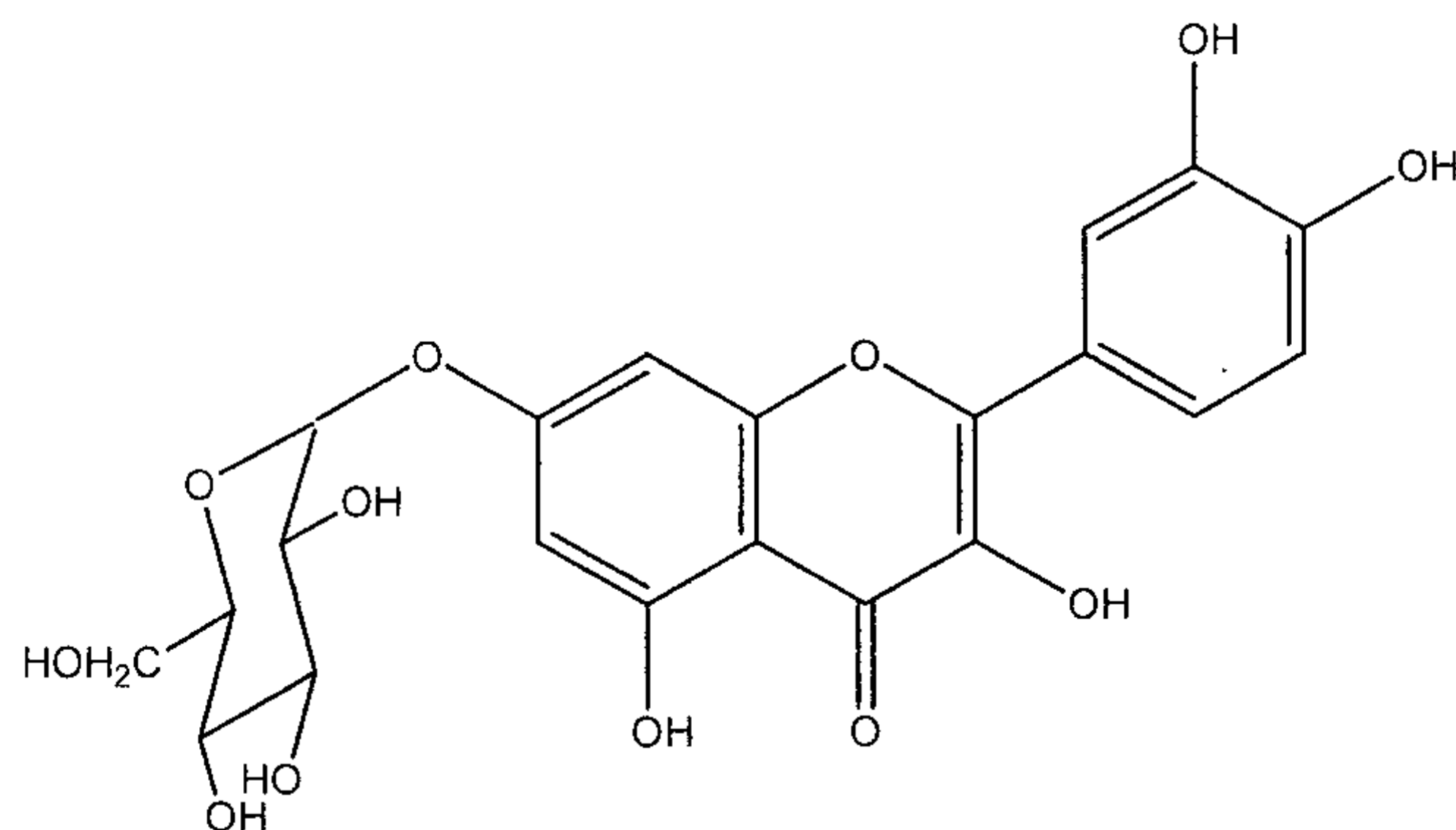


Fig. 13. FAB-MS spectrum of compound 3 isolated from dandelion leaf.

3) 민들레 뿌리로부터 활성물질의 분리

가) 용매분획

민들레 뿌리 500 g에 80% 에탄올 1.5 L를 가하여 3시간씩 2회 반복 환류 추출하여 조추출물을 조제하였다. 조추출물을 감압 농축하여 10% 메탄올 수용액에 현탁한 후 극성에 따라 헥산, 디에틸에테르, 에틸아세테이트, n-부탄올 순으로 용매 분획하였다. 이들의 각각 수율은 Table 9와 같다. 80% 에탄올 조추출물의 수율은 21.77%였으며, 헥산 1.15%, 디에틸에테르 0.23%, 에틸아세테이트 0.44%, 부탄올 1.32%, 그리고 물층이 16.56%였다.

Table 9. Yields of solvent fractions from dandelion root (unit: g%)

Fraction	Yield
Crude extract(80% ethanol)	21.77±1.9 ¹⁾
Hexane	1.15±0.32
Diethyl ether	0.23±0.16
Ethyl acetate	0.44±0.11
n-Butanol	1.32±0.55
Water	16.56±2.1

¹⁾Values present mean±S.D. (n=3).

나) Column chromatography에 의한 분리

민들레 뿌리로부터 활성물질을 분리하기 위하여 활성산소 소거활성과 추출수율을 고려하여 부탄올 분획으로부터 활성물질을 분리하였다. 먼저 부탄올 분획 5 g을 Amberlite XAD-4 column에 충전한 후 이동상을 물과 메탄올을 이용하여 메탄올의 농도를 증가시키면서 순차적으로 용출시켰다. 분취한 분획을 동일하게 희석한 후 280 nm에서의 흡광도와 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과는 Fig. 14와 같다. 280 nm에서의 흡광도는 7~11번 획분, 18~23번 획분에서 흡광

도의 증가가 관찰되었으며, 25~36번 획분에서 가장 높은 흡광도를 나타내었다. DPPH radical 소거활성에서는 19~24번 획분, 27~47번 획분에서 높은 활성을 보였다.

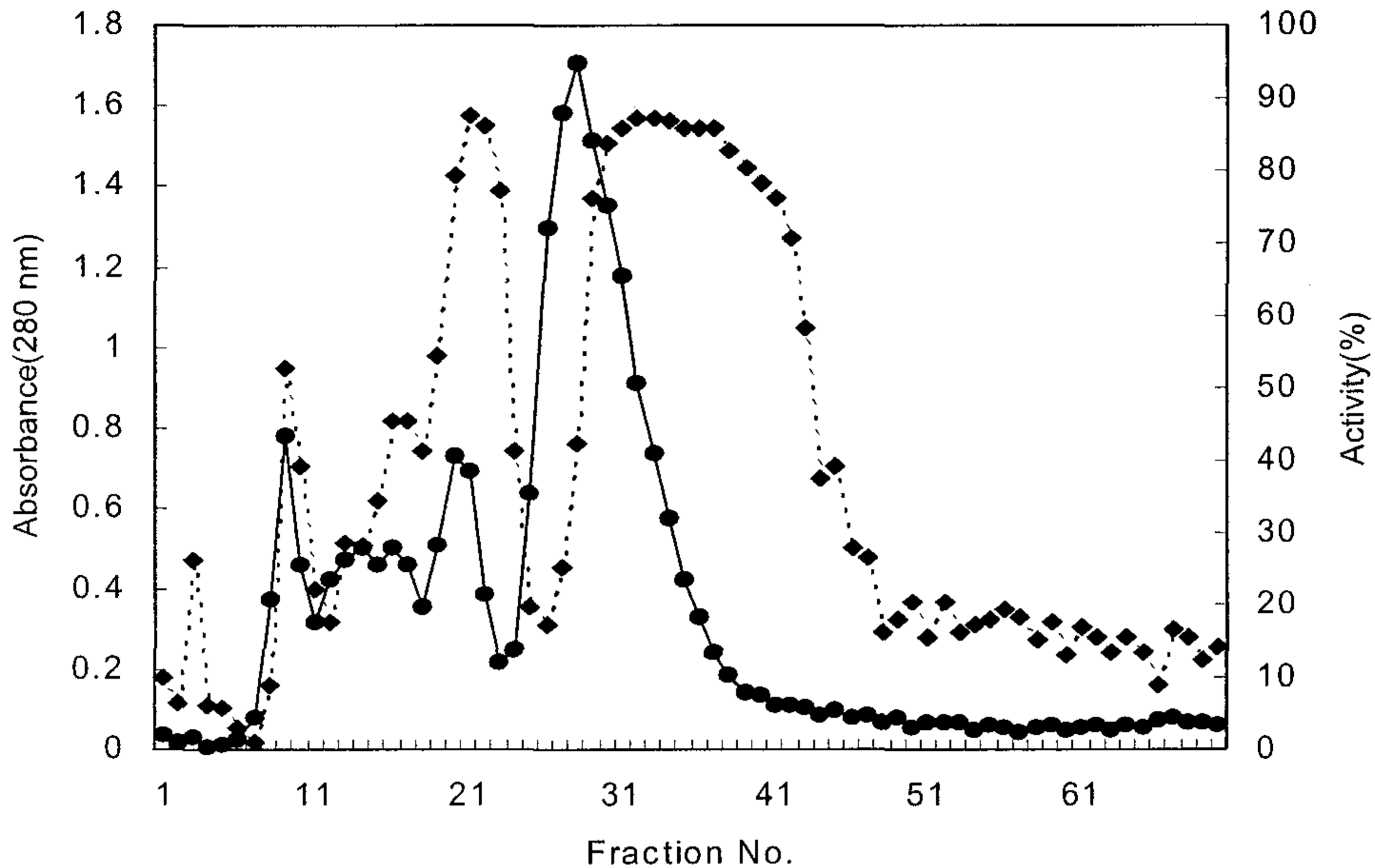


Fig. 14. Chromatogram of the buthanol fraction by XAD-4 column chromatography.

----; DPPH radical scavenging activity, —; optical density.

280 nm의 흡광도와 DPPH radical 소거활성 획분별로 거의 일치하는 경향을 나타내어 이들간에 높은 상관관계가 있는 것으로 생각되어지며 이를 기준으로 1~10번을 Fr. 1, 11~19번을 Fr. 2, 20~26번을 Fr. 3, 27~42번을 Fr. 4, 43~60번을 Fr. 5로 각각 나누었다. 흡광도와 DPPH radical 소거활성을 기준으로 5개의 획분으로 구분하여 이들 획분을 건고 시킨 후 수율과 DPPH radical을 측정 한 결과는 Table 10과 같다. 획분별 DPPH radical 소거활성은 10 ppm 농도에서 Fr. 3에서 67.82%, Fr. 4에서 59.36%, Fr 5에서 56.90%의 소거능을 보였다. 그 외에 다른 획분에서는 30% 정도의 낮은 활성을 보였다.

Table 10. Yields and DPPH radical scavenging activity of *n*-butanol fractions separated by silica gel column chromatography

Fraction(No)	Yields(g)	DPPH radical scavenging activityiity(%)	
		1 ppm	10 ppm
Fr. 1(1~10)	1.168	7.13	30.312
Fr. 2(11~19)	1.173	7.29	27.37
Fr. 3(20~26)	0.817	22.42	67.82
Fr. 4(27~42)	0.439	19.20	59.36
Fr. 5(43~60)	0.779	21.22	56.90

다) Sep-pak C₁₈ cartridge에 의한 분리

Fr. 1과 2는 수율은 다른 획분에 비하여 높았으나, DPPH 라디칼 소거활성은 미미한 것으로 나타나 이후 Fr. 3~5에 대하여 Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 분리하였다. 각 fraction의 시료 일정량(100 mg)을 Sep-pak C₁₈ cartridge에 충전한 후 증류수, 30% 메탄올, 70% 메탄올로 순차적으로 용출하였다. 용출된 획분은 건조시킨 후 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과는 Fig. 15와 같다. 각 fraction에서 모두 30% 메탄올로 용출하였을 경우 높은 활성을 보였으며, 다음으로 증류수, 70% 메탄올 순이었다. Fraction 중에서 앞서 실시한 DPPH 라디칼 소거능 시험과 동일한 결과로 Fr. 3에서 가장 높은 활성을 보였다.

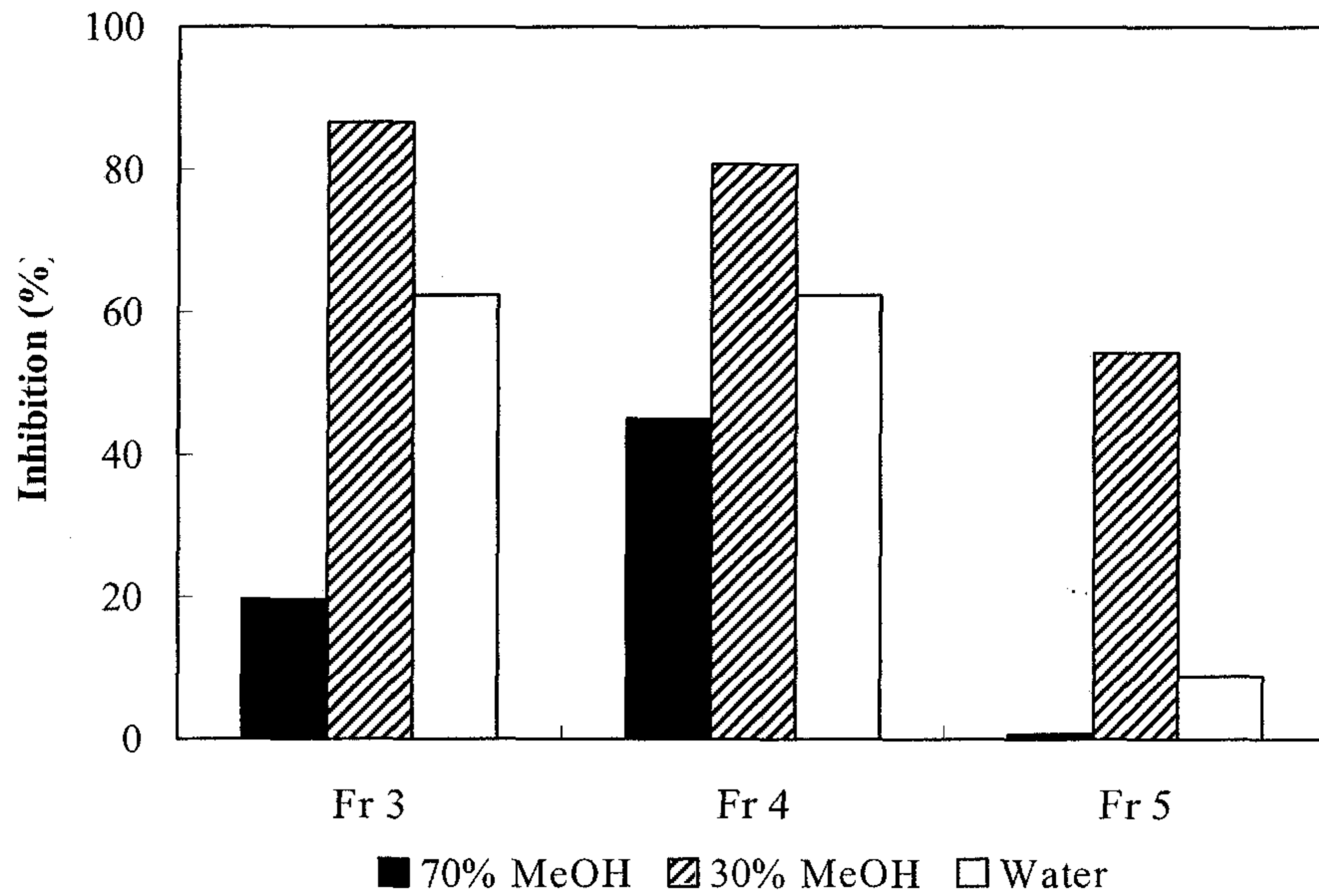


Fig. 15. DPPH radical scavenging activity of each fraction separated by Sep-pak C₁₈ cartridge.

또한 이들 분획 중 라디칼 소거활성이 높은 30% 메탄올 용출 분획에 대해서 HPLC를 이용하여 분리한 결과는 Fig. 16과 같다. Fr. 3-30과 Fr. 4-30에서 5개의 주요 피크를 확인하였고, Fr. 5-30에서 3개의 주요 피크를 확인하였다. Fr. 3-30과 Fr. 4-30은 상대적 함량은 상이하였지만 주요피크의 머무름 시간이 일치하는 것으로 판단되어 5개의 피크를 Prep HPLC를 이용하여 단일 물질로 정제 중에 있다. Fr. 5-30에서는 머무름 시간 15.90분과 19.02분의 피크는 앞의 분획과 겹치는 것으로 확인되었으며, 이들을 Prep HPLC로 분리 정제하였다.

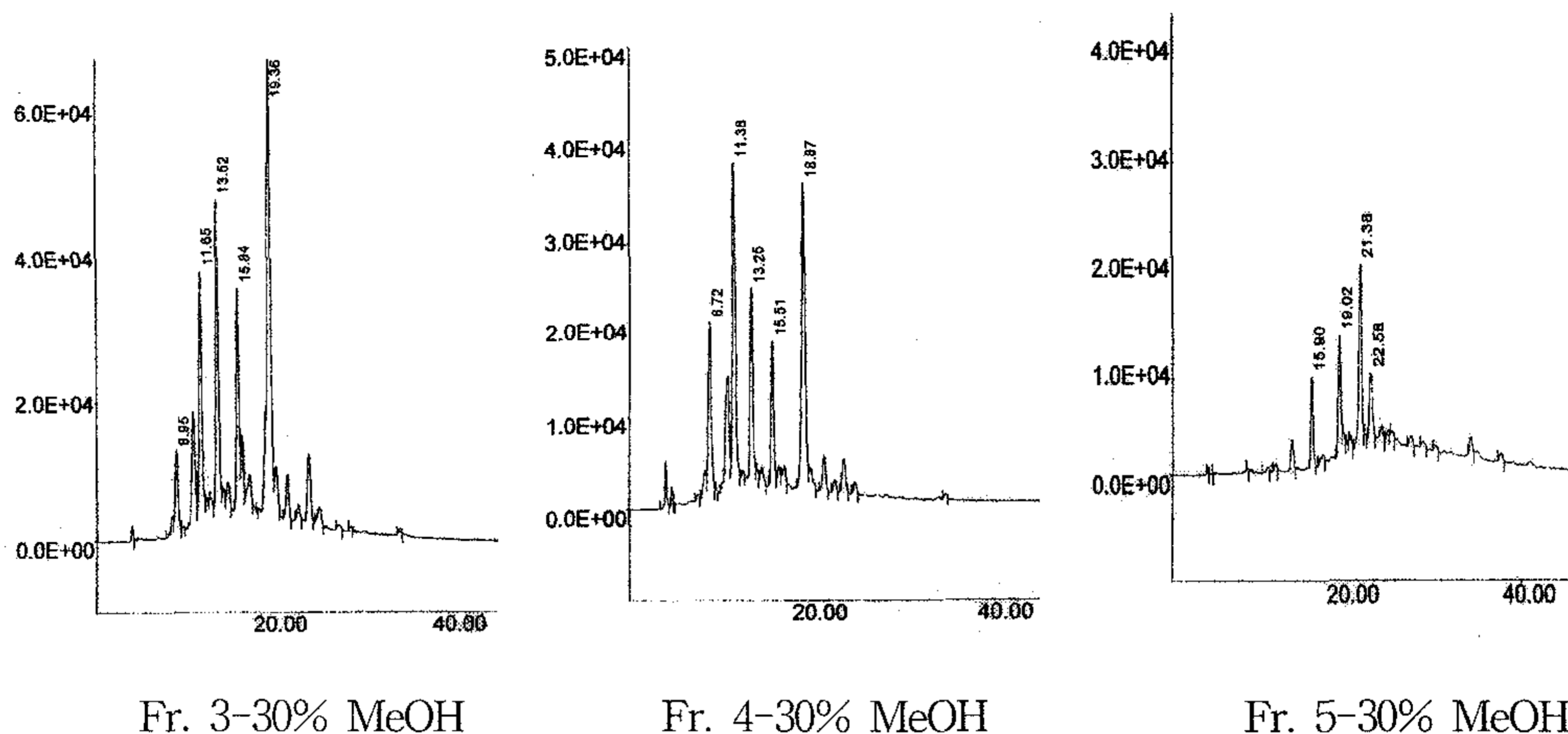


Fig. 16. HPLC chromatogram of each fraction separated by Sep-pak C18 cartridge from butanol fraction of dandelion root.

라) 활성물질의 구조동정

(1) compound 4

민들레 뿌리로부터 활성물질을 분리하기 위하여 3개의 단일 peak를 얻었으며, 이중 compound 4를 구조동정하기 위하여 기기분석을 행하였다. Compound 4의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR의 spectrum은 Fig. 17, 18과 같다. ^1H -NMR spectrum에서 *meta* coupling을 하고 있는 두 aromatic proton의 signal $\delta 6.19$ (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), $\delta 6.47$ (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8)과 benzene B환의 4개의 aromatic proton 유래의 signal $\delta 6.47$ (2H, d, $J=13.5$ Hz, H-3',5'), $\delta 7.75$ (2H, d, $J=13.5$ Hz, H-2',6')으로부터 flavonoid 핵의 존재를 확인할 수 있었으며 $\delta 3.84$ 의 메톡시기 유래의 peak를 확인할 수 있었다.

^{13}C NMR 스펙트럼에서는 90~180 ppm에서 flavonoid 유래의 signal을 확인하였고, 메톡시기 유래의 55.75 ppm의 peak를 확인할 수 있었다. 가장 저자장의 175.86 ppm의 signal은 4-keto기의 signal로, flavonol의 경우 flavone의 4-keto기보다 8~10 ppm 정도 고자장에서 나타나므로 3번 위치에 치환기가 존재하지 않는 flavonol 화합물로 추정할 수 있었다. Fig. 19는 compound 4의 FAB-MS spectrum으로 m/z 317에서 $[\text{M}^++1]$ 의 peak를 확인하였다.

이상의 기기분석 결과를 종합하여 민들레의 뿌리로부터 분리한 compound 4를 isorhamnetin으로 구조 동정하였다.

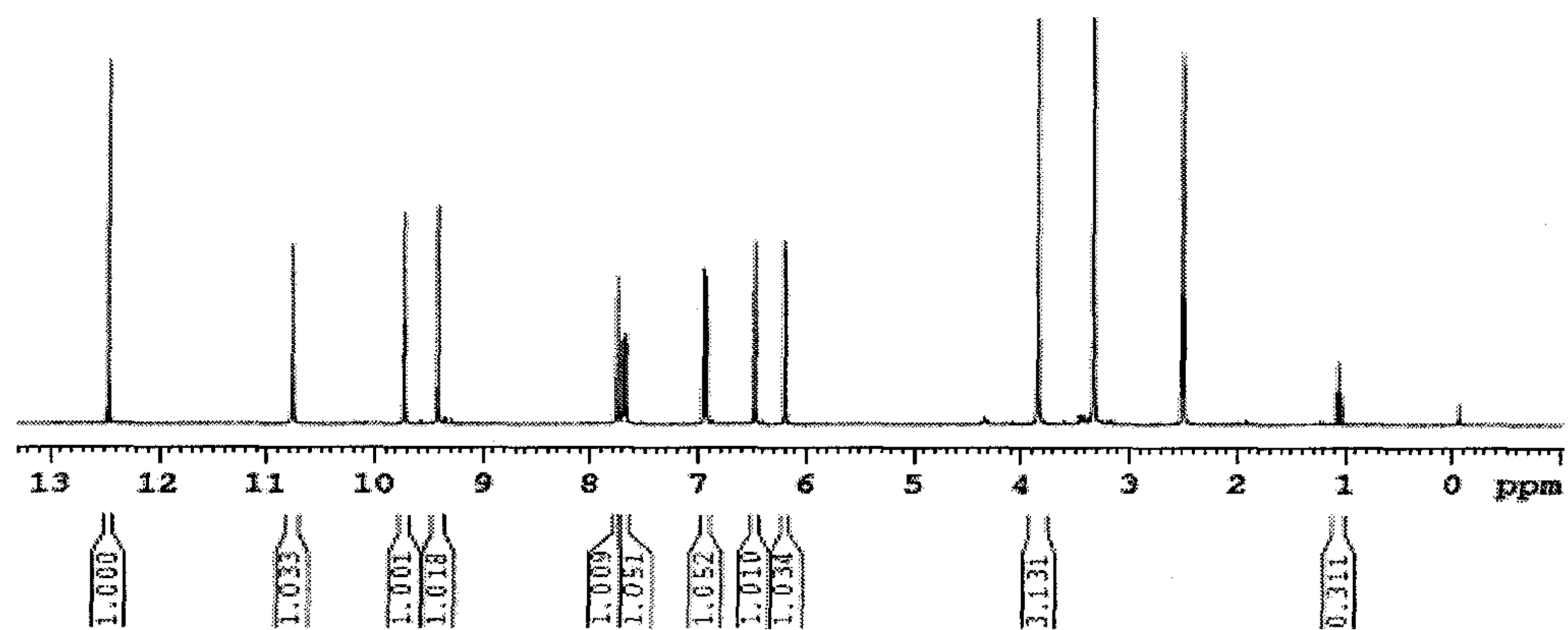


Fig. 17.. ^1H -NMR spectrum of compound 4 isolated from dandelion root.

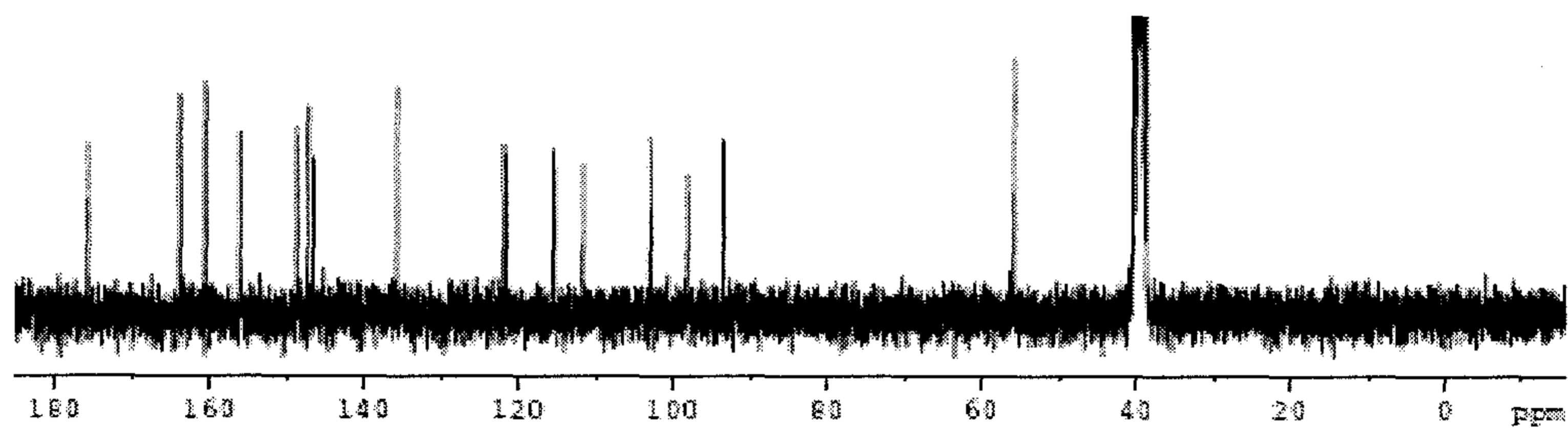


Fig. 18.. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 isolated from dandelion root.

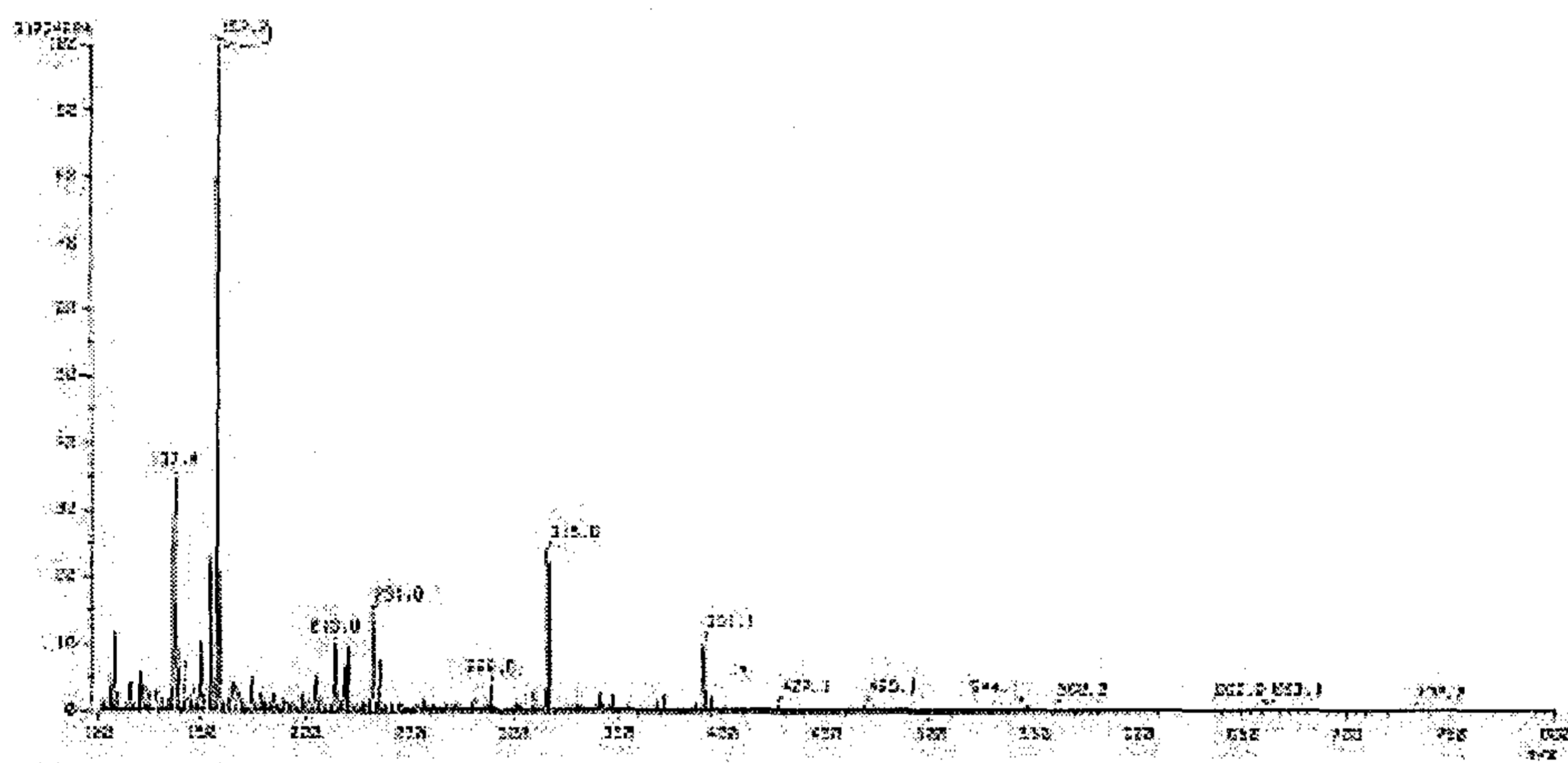


Fig. 19. FAB-MS spectrum of compound 4 isolated from dandelion root.

Table 11. Spectral data of compound 4 isolated from dandelion root

NMR δ ^1H (DMSO- <i>d</i> 6) ppm	7.75 (2H, d, $J=13.5$ Hz, H-2',6'), 6.95 (2H, d, $J=13.5$ Hz, H-3',5'), 6.47 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 3.84 (OCH ₃)
NMR δ ^{13}C (DMSO- <i>d</i> 6) ppm	175.86 (C4), 163.88 (C7), 160.66 (C5), 156.13 (C2), 148.89 (C9), 147.34 (C4'), 146.60 (C3), 135.27 (C1'), 121.95 (C6'), 121.07 (C2), 115.52 (C5'), 111.70 (C10), 103.01 (C1'), 98.18 (C6), 93.57 (C8), 55.75 (C3'),
FAB-MS (glycerol) m/z	316 [M ⁺ +1]

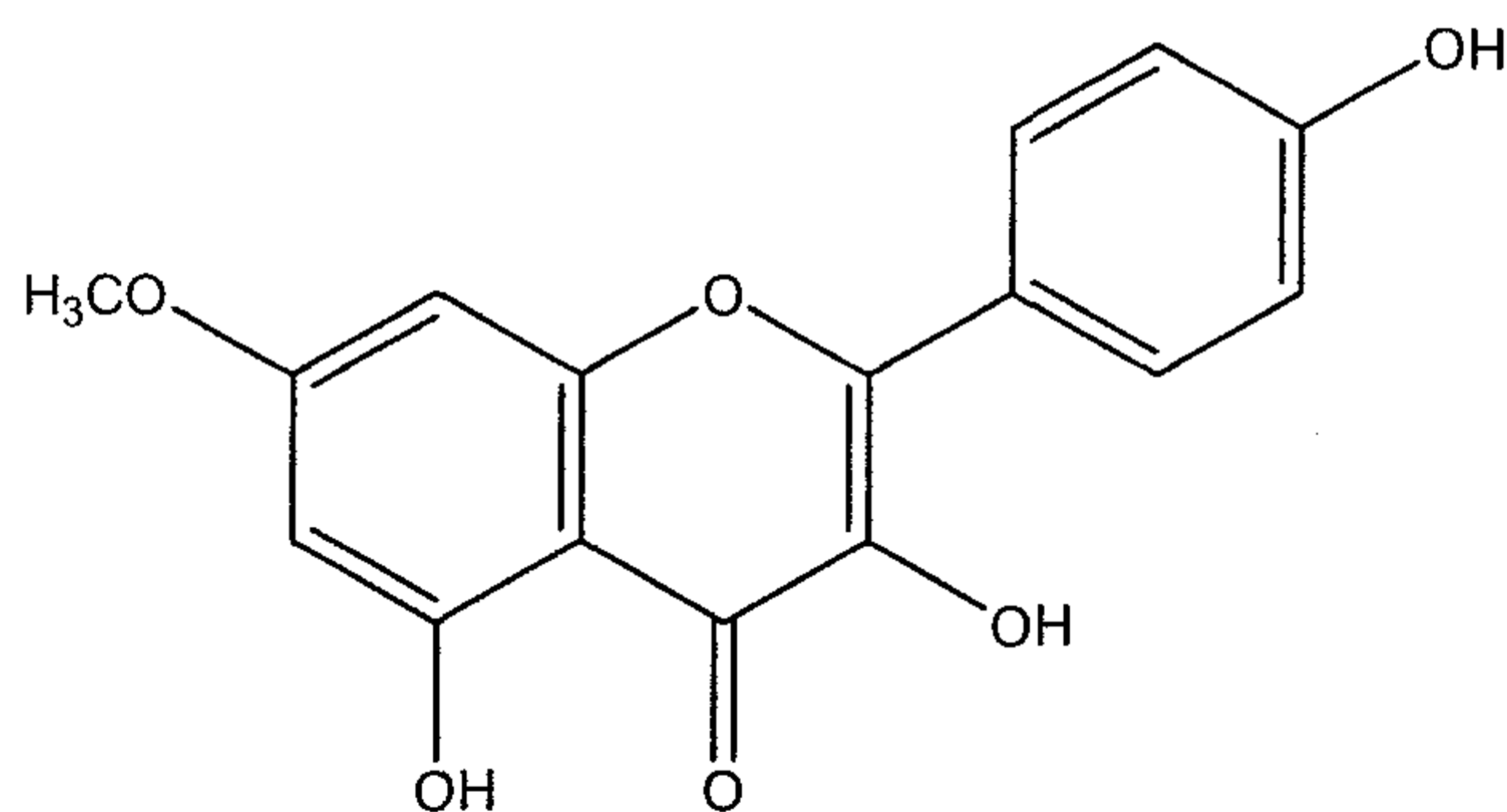


Fig. 20. Chemical structure of compound 4 isolated from dandelion root (Isorhamnetin).

(2) Compound 5

민들레의 뿌리로부터 분리한 compound 5의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR의 spectrum은 Fig. 21, 22와 같다. ^1H -NMR spectrum에서 δ 6.96, δ 6.94, δ 6.75의 3개의 peak는 벤젠환 유래의 proton으로 추정되며, coupling constant $J=15.6$ 인 δ 7.58과 δ 6.28은 *trans*-olefinic proton으로 추정된다. δ 5.32(1H, m, H-5), δ 4.17(1H, m, H-3), δ 3.73(1H, m, H-4), δ 2.25(1H, m, H-2ax), 2.15(2H, m, H-2eq, H-6eq), 2.04(1H, m, H-6ax)에서 4개의 proton peak에 해당하는 2개의 methylene에 의한 signal과 3개의 hydroxyl기에 연결된 methine을 추정할 수 있다. ^{13}C NMR에서 16개의 탄소 peak가 관찰되었으며, 벤젠환 유래의 signal이 115~146 ppm에서 나타났다. 가장 저자장의 177.15 ppm의 signal은 carbonyl기의 존재를 추정할 수 있다. 76.27 ppm~71.42 ppm의 4개의 탄소 peak는 OH가 존재하는 methine의 탄소를, 가장 고자장의 38.91 ppm과 38.36 ppm의 signal은 2개의 methylene의 peak로 quinic acid의 구조로 추정할 수 있다. Fig. 23은 compound 5의 FAB-MS spectrum으로 m/z 355에서 $[\text{M}'+1]$ 의 peak를 확인하였다.

이상의 기기분석 결과를 종합하여 민들레의 뿌리로부터 분리한 compound 5를 5-caffeoyl quinic acid 즉, chlorogenic acid로 구조 동정하였다.

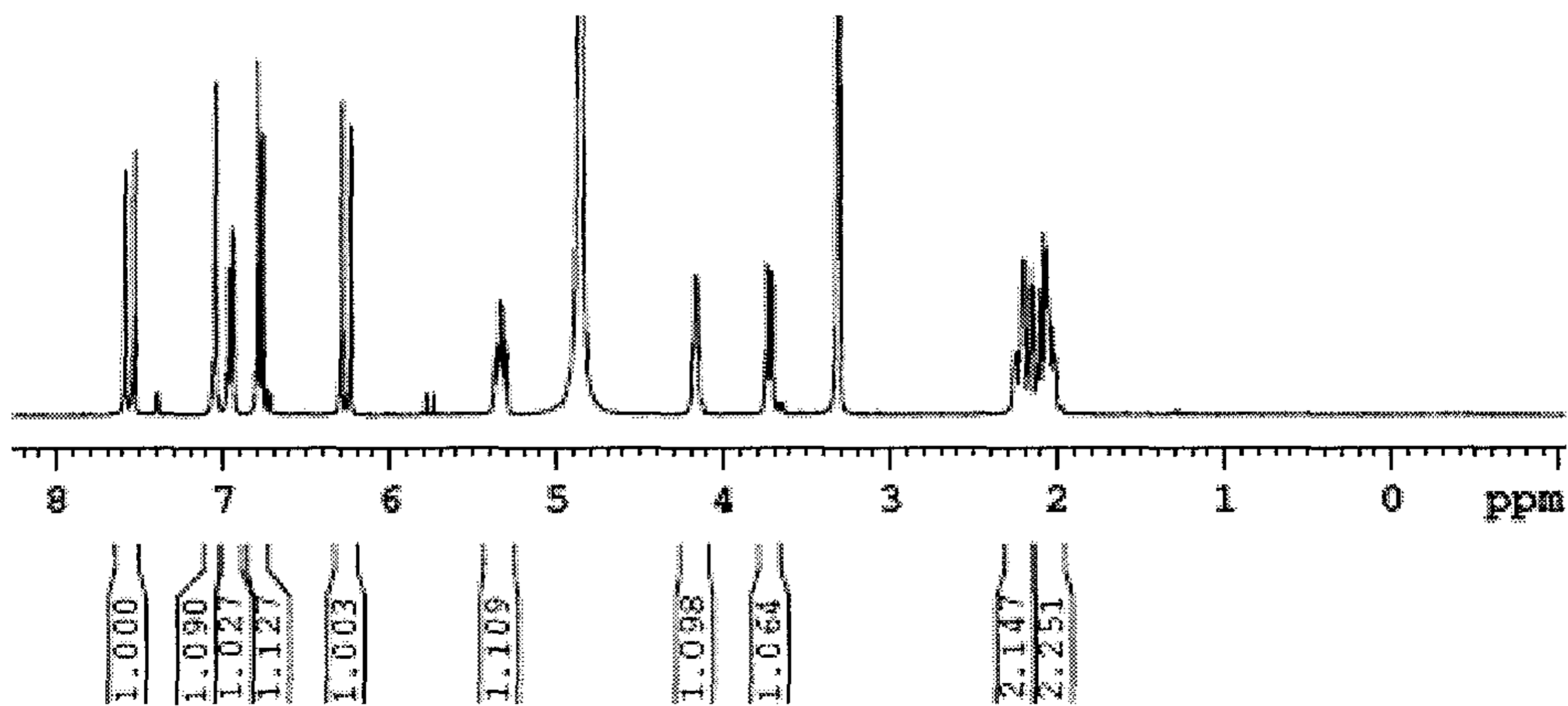


Fig. 21. ^1H -NMR spectrum of compound 5 isolated from dandelion root

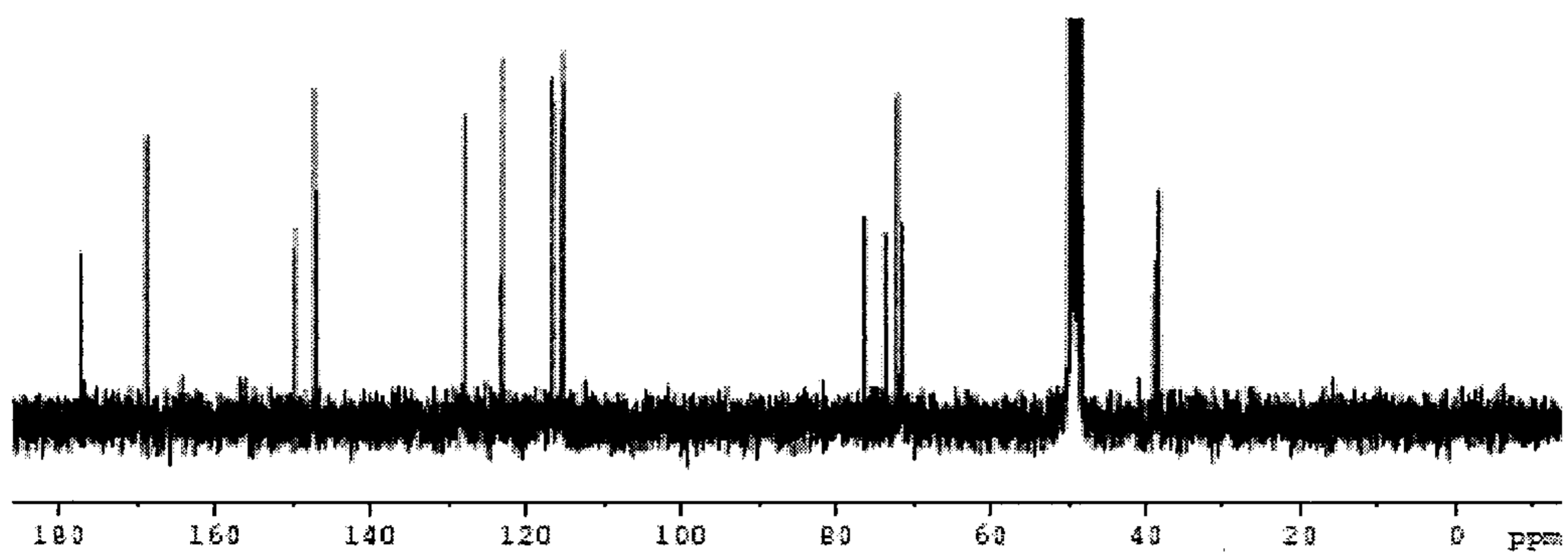


Fig. 22. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 isolated from dandelion root

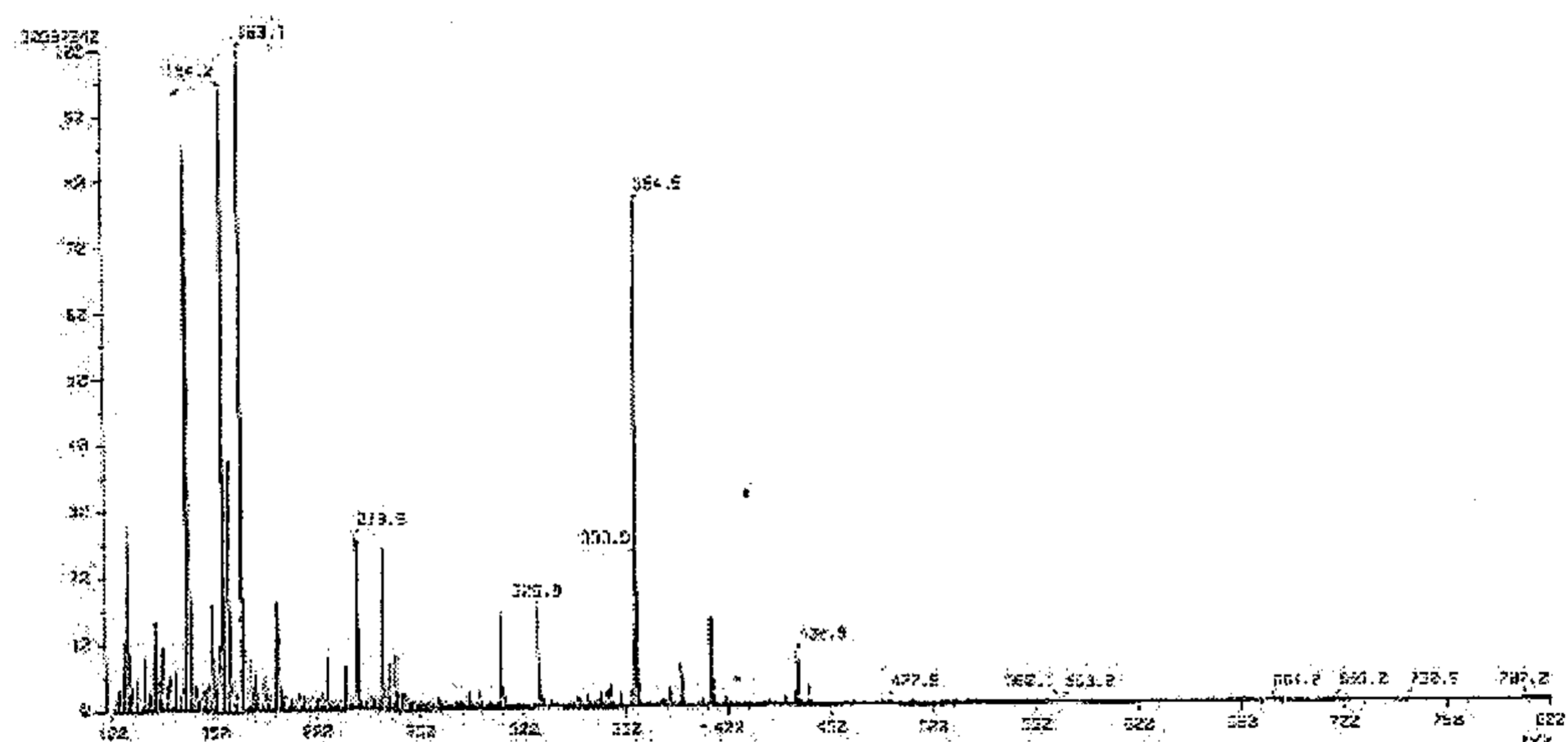


Fig. 23. FAB-MS spectrum of compound 5 isolated from dandelion root.

Table 12. Spectral data of compound 5 isolated from dandelion root

NMR δ ^1H (CD_3OD) ppm	7.58 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7'), 6.96 (1H, dd, $J=8.2, 2.2$ Hz Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, $J=15.6$, H-8), 5.32(1H, m, H-5), 4.17(1H, m, H-3), 3.73(1H, m, H-4), 2.25(1H, m, H-2ax), 2.15(2H, m, H-2eq, H-6eq), 2.04(1H, m, H-6ax)
NMR δ ^{13}C (CD_3OD) ppm	177.15 (C7), 168.79 (C9'), 149.72 (C4'), 147.22 (C7'), 146.95 (C3'), 127.94 (C1'), 123.10 (C6'), 116.61 (C8') 115.40 (C5'), 115.33 (C2'), 76.27 (C1), 73.61 (C2), 72.12 (C3), 71.42 (C5), 38.91 (C6), 38.36 (C4)
FAB-MS (glycerol) m/z	355 [$\text{M}^+ + 1$]

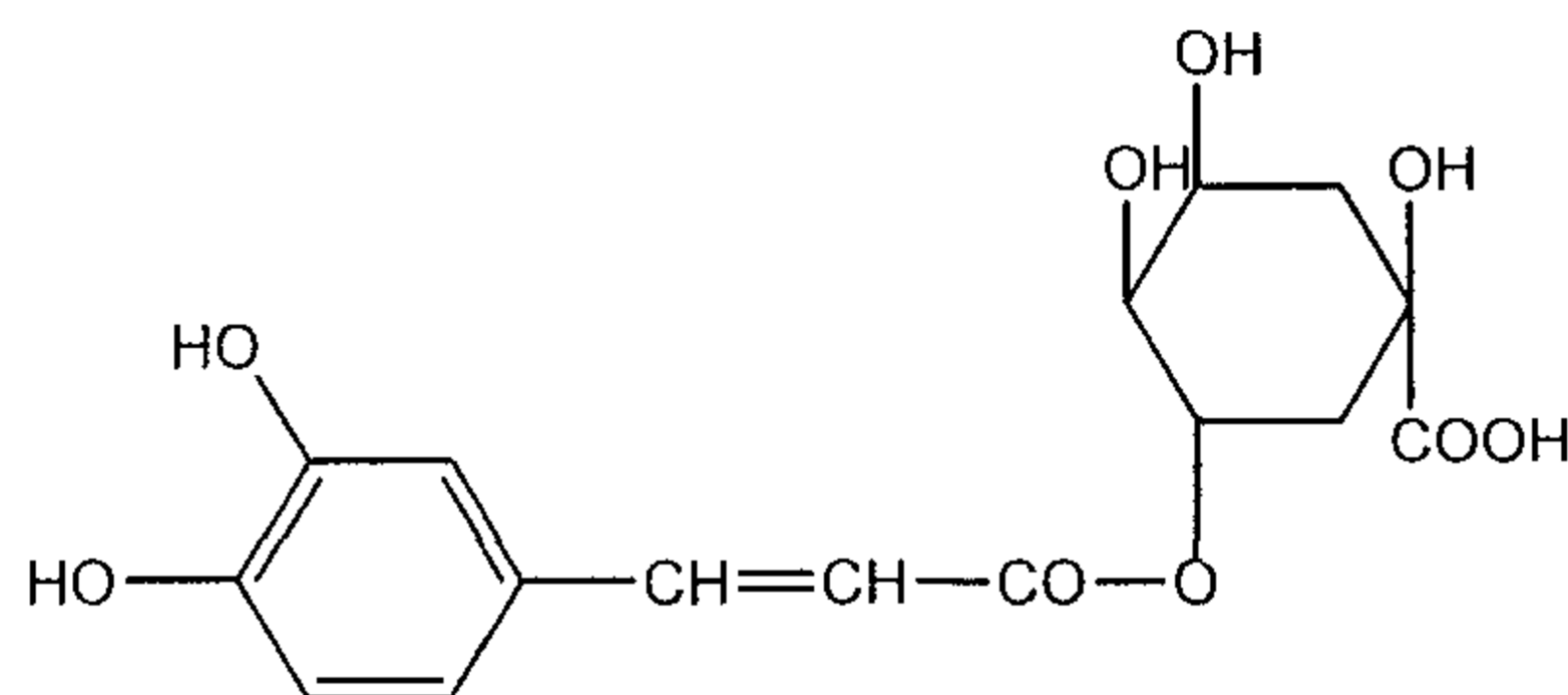


Fig. 24. Chemical structure of compound 5 isolated from dandelion root (chlorogenic acid).

(3) Compound 6

민들레의 뿌리로부터 분리한 compound 6에 대한 ^1H , ^{13}C -NMR 분석 결과는 Fig. 25와 26에 나타내었다. Compound 6의 경우 ^1H -NMR 스펙트럼 상에서 6~8 ppm 사이에서 전형적인 phenol 화합물의 피크를 관찰할 수 있었으며, δ 3.31의 signal은 벤젠환에 치환된 메톡시(OCH_3)기의 signal로 추정된다. 또한 trans 형의 이중결합(alkyl)의 signal로 δ 6.33(1H, d, H-8), δ 6.28(1H, d, H-9)을 assign하

였다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 6개의 벤젠환 유래의 peak가 111.82~150.64 ppm 에서 관찰되었고, 56.57 ppm에서 methoxy group(OCH_3)의 피크를 확인할 수 있었다. 또한 149.50 ppm과 116.04 ppm의 peak는 olefinic carbon의 peak로 171.10 ppm의 peak는 carboxy기의 peak로 추정된다. 이들 스펙트럼을 문헌을 통하여 assign한 결과 ferulic acid로 구조 동정하였다.

Fig. 27은 compound 6의 FAB-MS spectrum으로 m/z 195에서 $[\text{M}^+ + 1]$ 의 peak를 확인하였다.

이상의 기기분석 결과를 종합하여 민들레의 뿌리로부터 분리한 compound 4를 ferulic acid로 구조 동정하였다.

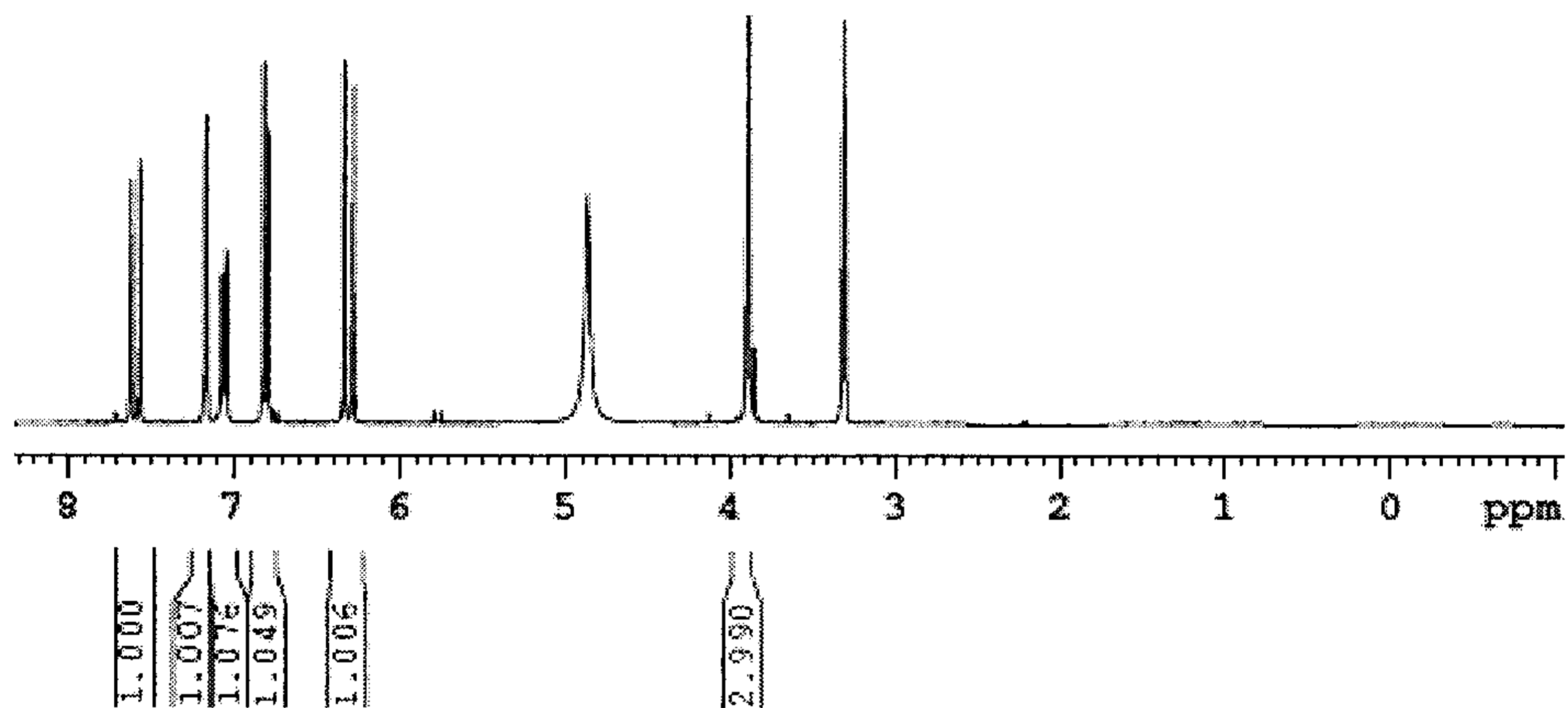


Fig. 25. ^1H -NMR spectrum of compound 6 isolated from dandelion root.

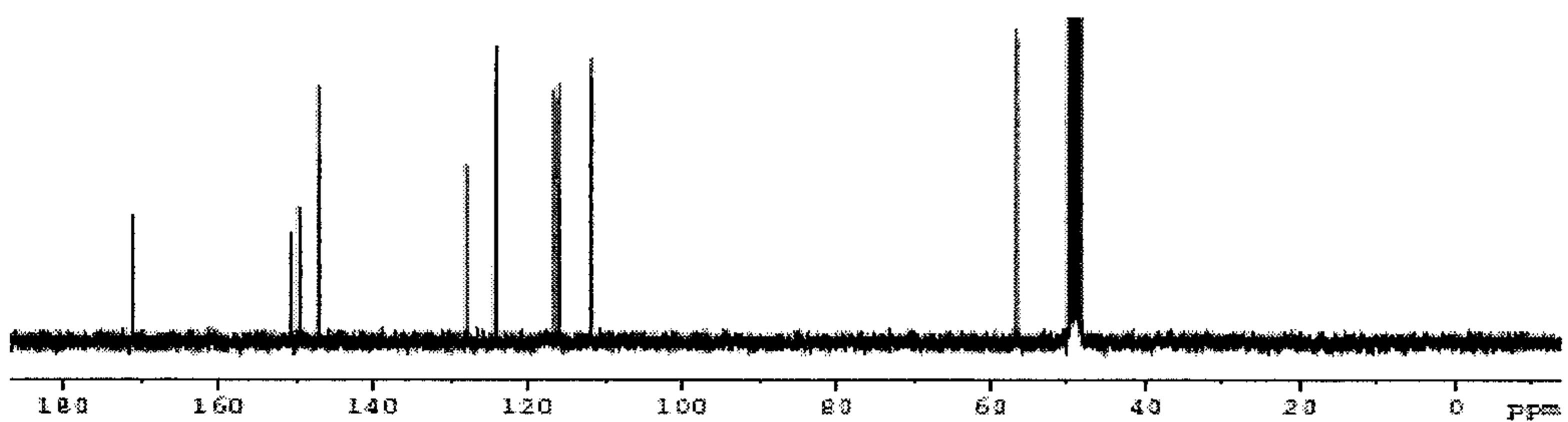


Fig. 26. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 isolated from dandelion root.

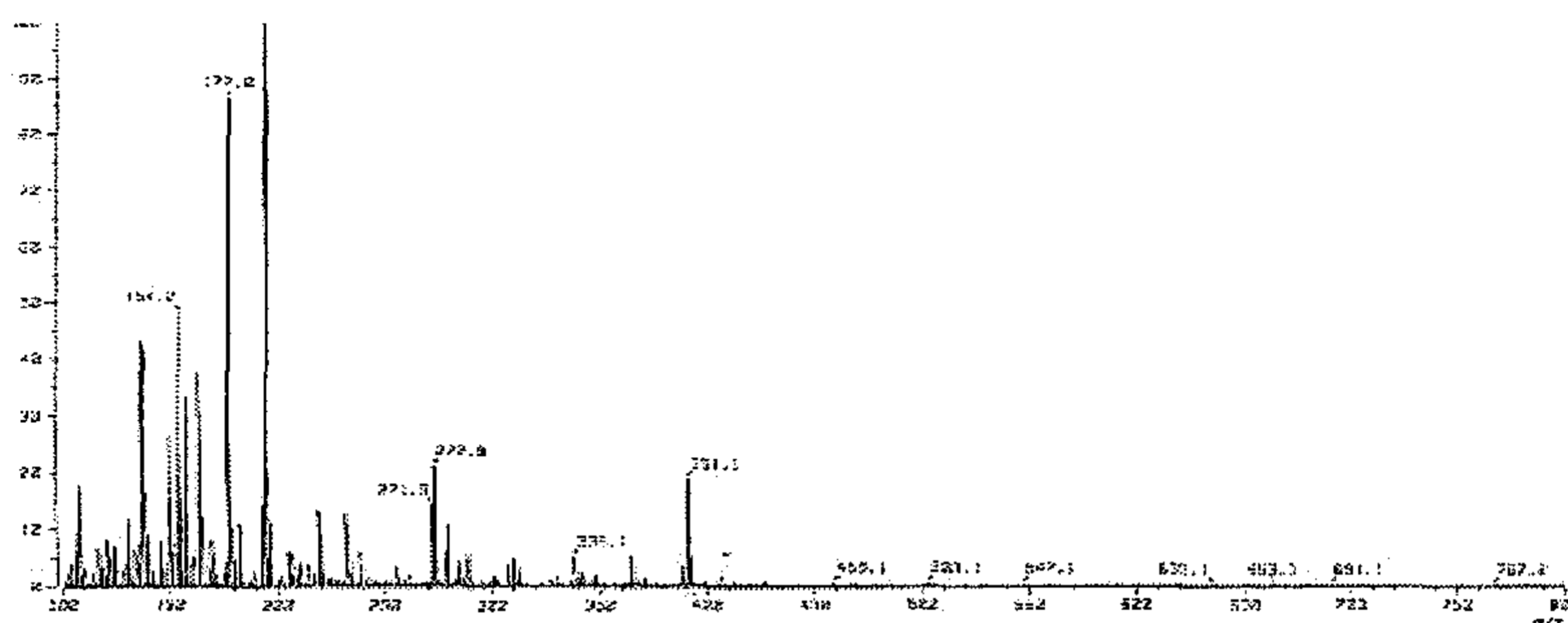


Fig. 27. FAB-MS spectrum of compound 6 isolated from dandelion root.

Table 13. Spectral data of compound 6 isolated from dandelion root

NMR δ ^1H (CD_3OD) ppm	benzene cycle: 7.62 (1H, d, H-5), 7.56 (1H, s, H-2), 7.17 (1H, d, H-6), 6.82 (1H, s, H-4), 3.31 (OCH_3 , H-7)
glycosyl	alkyl chain: 6.33 (1H, d, H-8), 6.28 (1H, d, H-9)
NMR δ ^{13}C (CD_3OD) ppm	benzene cycle: 150.64 (C3), 147.06 (C4), 127.93 (C1), 124.12 (C6), 116.60 (C5), 111.82 (C2), 56.57 (OCH_3) alkyl chain: 171.10 (C10), 149.50 (C8), 116.04 (C9)
FAB-MS (glycerol) m/z 195 [$\text{M}^+ + 1$]	

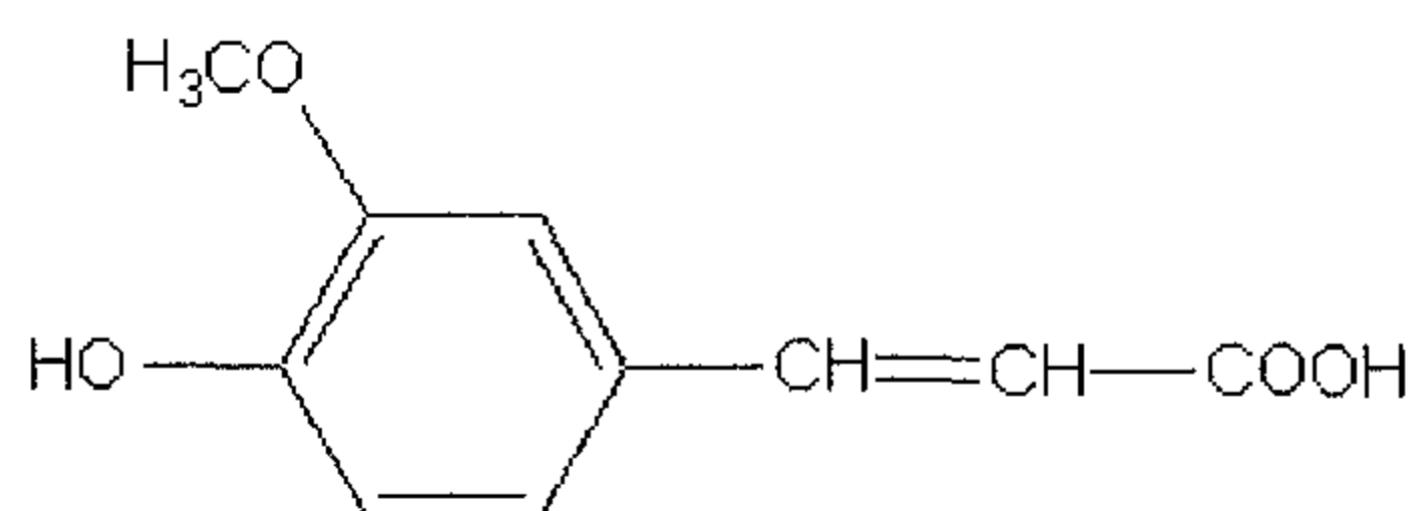


Fig. 28. Chemical structure of compound 6 isolated from dandelion root.

4) 분리한 화합물의 함량 측정

민들레의 잎과 뿌리로부터 분리한 화합물의 함량을 HPLC로 정량한 결과는 Table 19와 같다. 민들레 잎에서는 quercetin-3-glucoside가 265.72 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그다음으로 quercetin-3-rhamnoside(108.26 mg%), luteolin-3-glucoside (83.77 mg%) tnsddljT다. 뿌리에서는 chlorogenic acid가 173.35 mg%로 가장 높았으며, ferulic acid가 92.92 mg%, isorhamnetin이 69.27mg%였다.

Table 19. Polyphenolic compounds contents of dandelion leaf and root
(unit: mg/ 100 g)

Compounds		Content
Leaf	Quercetin-3-glucoside	265.72
	Quercetin-3-rhamnoside	108.26
	Luteolin-7-glucoside	83.77
Root	Isorhamnetin	69.27
	Chlorogenic acid	173.35
	Ferulic acid	92.92

제 2절 민들레의 항산화 활성 시험

1. 실험방법

가. Spectrophotometry에 의한 항산화 활성 측정

1) DPPH radical 소거활성

DPPH 라디칼에 대한 소거활성은 Blois의 방법으로 측정하였다. 에탄올 적정량에 시료 0.2 mL와 4×10^{-4} M DPPH 용액 0.8 mL을 가하여 10초간 혼합하고 10분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였고 소거활성은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = \left(1 - \frac{Abs}{Abc}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of DPPH solution without sample at 525 nm

Abs : Absorbance of DPPH solution with sample at 525 nm

2) Superoxide anion 소거활성

Superoxide 라디칼 ($\cdot O_2$) 소거활성은 Iio 등의 방법에 따라 xanthine-xnathine oxidase cytochrome c 환원법으로 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL, 50 mM PBS 완충용액 (pH 7.8) 1.2 mL, 1 mM xanthine 0.2 mL와 0.05 mM cytochrome C 0.2 mL를 혼합하였다. 여기에 550 nm에서 분당 흡광도의 변화가 0.02가 되도록 희석한 xnathine oxidase 0.2 mL를 가하여 3분간의 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 superoxide anion의 소거능은 아래의 식으로부터 구하였다.

$$\text{Superoxide anion scavenging activity} = \left(1 - \frac{Abs}{Abc}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of control at 550 nm

Abs : Absorbance after sample treatment at 550 nm

3) Hydrogen peroxide 소거활성

시료 일정량을 에탄올에 녹인 후 20 μ L를 취하여 0.1 M PBS 완충용액 (pH

5.0) 100 μ L, 1.0 mM hydrogen peroxide 20 μ L와 혼합하여 96 micro well plate 상에서 37°C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 1.25 mM ABTS[2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoleine)-6-sulfonic acid] 30 μ L, peroxidase (1 unit/mL) 30 μ L 를 가한 후 37°C에서 10분간 반응을 시켰다. 반응이 끝난 microplate를 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) reader (ELISA Processor II, Behring Co., Germany)를 사용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Hydrogen peroxide의 소거활성은 아래의 식으로부터 구하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide scavenging activity} = \left(1 - \frac{Abs}{Abc}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of control at 405 nm

Abs : Absorbance after sample treatment at 405 nm

4) Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxy radical 소거활성은 2-deoxyribose oxidation 방법으로 측정하였다. 0.1 mM FeSO₄/0.1 mM EDTA · 2Na 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 10 mM H₂O₂ 0.2 mL를 혼합하고 최종 볼륨이 2 mL가 되도록 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)를 가하였다. 0-time의 경우 0°C에서, 대조구 및 시료 처리구는 37°C에서 4시간 반응시켰다. 4시간 반응 후 2.8% TCA (trichloroacetic acid) 1 mL를 가하여 반응을 종료시키고 1% TBA (thiobabituric acid)/50 mM NaOH 1 mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열하고 급냉시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl 라디칼의 소거활성은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity} = \left(1 - \frac{Abs - Abo}{Abc - Abo}\right) \times 100$$

Abo : Absorbance of 0-time at 532 nm

Abc : Absorbance of control at 532 nm

Abs : Absorbance of after sample treatment at 532 nm

5) ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) 소거활성 측정
2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt

(Biochemika, Germany)를 물에 녹여 7 mM로 만든 후 2.45 mM potassium persulfate와 함께 암소에서 12-16 시간동안 실온에서 반응시키면 ABTS radical cation($ABTS \cdot^+$)이 생성된다. 734 nm에서 흡광도가 0.700 ± 0.02 가 되도록 에탄올로 희석한 후 이 희석액 1 ml와 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 시료 50 μl 를 혼합하고 30 분간 반응시킨 후 734 nm에서 분광광도계(DU 530 spectrometer, Beckman, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였으며 대조군은 시료 대신 에탄올만 처리하였다. 라디칼 소거 활성은 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$ABTS \text{ radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

나) Chinese hamster V-79 cell을 이용한 항산화 시험

1) 세포배양

Chinese hamster lung fibroblasts, V79-4(ATCC CCL-93)은 미국 ATCC에서 분양 받아 사용하였고, 5% CO_2 , 95% O_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 조건에서 72시간 배양한 후 5% fetal bovine serum FBS, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 사용하였으며 이때 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 100 unit/mL penicillin과 2 mM의 L-glutamine을 넣어 사용하였다. 세포배양에 필요한 fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, sodium bicarbonate, trypsin-EDTA는 Gibco에서 구입하였다. 그 외 RNA 추출에 사용된 시약은 모두 Sigma에서 구입하였다.

2) Cell extract

배양 24시간, 72시간 후 dish의 배지를 제거하고 DPBS로 2회 세척 후 0.25% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 모은 뒤 원심 분리(1,500 rpm, 3 min 30 sec)하여 cell pellet을 얻었다. 여기에 DPBS 1 mL을 가하고 얼음 상에서 한 sample 당 5초씩 3번 세포를 파쇄시켜 세포 분쇄액을 얻었다. 항산화 효소 활성은 바로 측정하였으며 지지과산화물함량, 단백질 정량 등은 -80°C 에서 냉동 보관하며 실험을 이용하였다.

3) ROS조건의 cell viability

세포의 viability는 MTT assay을 이용하여 실험하였다. 96 well plate에 V79-4세포를 1.2×10^5 cell/mL로 나누어 배양하였고 배양 후 16시간이 지난 후 여러 가지 농도의 추출물(10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)을 처리하였고 한 시간 뒤에 1 mM의 H_2O_2 을 첨가하였다. 37 °C조건에서 24시간 배양한 후 100 μL 의 MTT stock solution(5 mg/mL)을 첨가하였으며 다시 4시간 뒤에 10 μL isopropanol을 첨가하여 570 nm에서 ELISA reader(Bio-Rad, USA)을 이용하여 측정하였다. 대조군의 formazandml density는 100%로 표시하였으며, 나머지 추출물의 cell viability에 미치는 영향도 대조군에 대한 viable cell의 percentages로 표시하였다.

4) Lipid peroxidation inhibitory activity

Lipid peroxidation 측정은 malonaldehyde(MDA)을 측정하여 평가하였다. 여러 가지 농도의 추출물(10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)을 처리한 세포는 60분 동안 배양한 후 1 mM의 H_2O_2 을 첨가하여 다시 60분간 배양한다. 차가운 PBS로 두 번 씻어준 후 1.15% KCl로 균질화 시키고 100 μL 의 세포 lysates을 취한다. 8.1% SDS 2.1 mL과 20% acetic acid(pH 3.5) 1.5 mL, 0.8% TBA 1.5 mL을 넣은 후 최종 4.0 mL의 부피가 되도록 증류수를 넣어 채운다. 95°C에서 120분간 가열한다. 실온으로 온도를 내린 후 5.0 mL의 n-butanol-pyridine(15:1, v/v)을 첨가하여 섞어준다. 1500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위의 상층액을 얻고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) DCHF-DA(dichlorodihydrofluorescein diacetate) 측정법

비형광물질인 dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCHF-DA)가 세포 내에 들어가 esterase 효소에 의해서 dichlorodihydrofluorescein(DCHF)로 변환되고 다시 세포내 hydrogen peroxide와 반응하면 dichlorofluorescein(DCF)로 산화되어 발색되는 형광정도를 측정함으로써 세포내에 hydrogen peroxide의 양을 측정하여 활성 산소종 저해율을 알 수 있다. V79-4 세포들을 3×10^5 cell/mL 농도로 96 well에 접종한 후에 24시간 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거한 후, 배지에 녹인 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 시료를 처리하여 5시간 더 배양하였다. 배양 후 산화적

스트레스를 유발시키기 위하여 2 mM H₂O₂를 10 µl/well 을 첨가해주고 30분 동안 배양하고 나서 50 µM DCHF-DA(Sigma Chemical Co., USA)를 20 µl/well 을 가한 후 multiple plate reader(Model Victor3, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 측정하였다. 시료를 넣지 않고 배지와 2 mM H₂O₂만을 가한 것을 대조군으로 하여 시료 처치군과 비교하여 활성 산소종 저해율을 구하였다.

6) Glutathione peroxidase(GPx) 활성

GSH를 기질로 사용하는 방법으로 측정하였는데, glutathione이 GPx에 의하여 산화형 glutathione(GSSG)로 산화되고 다시 NADPH에 의해 환원형 glutathione(GSH)으로 환원될 때 NADPH가 산화된다. 이 때 NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 340 nm에서 NADPH의 분자흡광계수 6.22 nM⁻¹/cm을 이용하여 측정하였다. 5 nM의 potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 8.4 mM NADPH, 1 unit의 GR, 1.125M NaN₃, 150 mM GSH를 넣은후 시료를 첨가하고 2.2mM H₂O₂를 첨사하여 반응을 시작시켜 340 nm에서 3분간 흡광도 변화를 spectrophotometer로 측정하였다. GPx의 활성도는 1분 동안 NADPH 1 mol이 산화되는 양을 1 unit으로 하여 mg protein당 unit 으로 표시하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 민들레의 항산화 활성

1) 용매분획별 항산화 활성

가) 용매분획별 총페놀함량

80% 에탄올 조추출물로부터 극성에 따라 순차적으로 용매분획한 획분에 대하여 활성산소 소거활성을 시험하였다. 민들레 뿌리, 잎의 80% 에탄올 추출물과 각각의 분획물에 대한 페놀성 화합물의 함량을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 80% 에탄올을 이용한 경우 뿌리 보다는 잎에서 보다 많은 페놀성 화합물이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 분획물 중에서는 뿌리와 잎 양쪽 모두에서 ether와 ethyl acetate fraction에서 높은 페놀성 화합물이 존재하였다.

Table 1. Total phenol contents of extract and fractions prepared from root and leaf of dandelion (unit: g%)

Extract and fractions	Parts	
	Root	Leaf
Crude extract	7.9±0.4 ^c	9.4±0.3 ^c
Hexane fraction	3.0±0.1 ^d	2.6±0.1 ^d
Ether fraction	22.1±0.6 ^a	11.7±1.1 ^b
Ethyl acetate fraction	22.0±0.7 ^a	21.1±0.3 ^a
n-Butanol fraction	11.6±0.5 ^b	9.0±0.4 ^c
H ₂ O fraction	4.0±0.2 ^d	9.1±0.2 ^c

*All value are mean±SD(n=3)

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

나) DPPH, ABTS 라디칼 소거활성

DPPH radical에 대한 민들레 잎과 뿌리의 소거활성은 Table 2에 나타내었다. 민들레 뿌리와 잎 양쪽 모두 총페놀함량이 높은 ether fraction 과 ethyl acetate fraction에서 활성이 높게 나타났다. 시료내 총페놀함량과 DPPH radical 소거활성 간에는 비례관계가 성립되는 것으로 나타났다.

ABTS는 일종의 염료로써 외부의 radical 공격을 받게 되면 열분해 과정을 거쳐 radical로 바뀌는 성질을 가지고 있다. 일반적으로 항산화 활성 검증을 위한 기초 시료로써 DPPH와 더불어 많이 이용되고 있다. 민들레 뿌리 fraction의 ABTS 라디칼 소거능은 Table 3과 같다. 10 mg/ml 농도에서는 hexane을 제외한 나머지 시료들이 100%에 가까운 소거능을 갖는 것으로 나타났고, 1 mg/ml 농도에서는 ethyl acetate와 butanol fraction에서 90% 가 넘는 소거능을 나타냈다. 민들레 잎의 10 mg/ml 농도에서도 hexane fraction을 제외한 대부분의 fraction이 높은 라디칼 소거능을 나타냈고, 1 mg/ml 농도에서는 ethyl acetate fraction이 대조물질로 사용된 trolox 보다도 높은 활성을 나타냈다.

Table 2. Electron donating abilities of extract and fractions prepared from root and leaf of dandelion (Inhibition, %)

Extract and fractions	Parts	Root		Leaf	
		10 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml
Trolox		97.8±0.0 ^a	97.4±0.0 ^a	97.8±0.0 ^a	97.4±0.0 ^a
Crude extract		85.1±4.6 ^c	32.7±0.6 ^e	85.7±0.2 ^c	44.6±2.8 ^c
Hexane fraction		26.0±2.3 ^c	5.9±1.0 ^g	19.5±3.0 ^e	4.0±2.8 ^f
Ether fraction		93.6±0.0 ^b	57.6±0.4 ^c	89.4±0.4 ^{bc}	43.3±3.3 ^{cd}
Ethyl acetate fraction		93.3±0.1 ^b	67.1±0.7 ^b	91.5±0.2 ^b	70.2±1.8 ^b
n-Butanol fraction		94.4±0.3 ^{ab}	44.2±1.7 ^d	91.9±0.4 ^b	22.5±3.0 ^e
H ₂ O fraction		81.1±0.6 ^d	11.6±2.8 ^f	62.0±5.1 ^d	37.9±5.4 ^d

*All value are mean±SD(n=3)

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

Table 3. ABTS radical scavenging activities of extract and fractions prepared from root and leaf of dandelion (Inhibition, %)

Extract and fractions	Parts	Root		Leaf	
		10 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml
Trolox		100.0±0.0 ^a	96.7±2.1 ^a	100.0±0.0 ^a	96.7±2.1 ^a
Crude extract		100.0±0.0 ^a	33.8±2.7 ^c	99.3±0.4 ^c	53.7±5.8 ^c
Hexane fraction		15.4±2.2 ^c	3.2±0.3 ^e	11.4±2.2 ^e	2.4±1.6 ^f
Ether fraction		99.6±0.1 ^a	76.0±1.8 ^b	97.1±0.2 ^{bc}	50.5±1.1 ^{cd}
Ethyl acetate fraction		99.4±0.1 ^a	92.6±3.9 ^a	100.0±0.0 ^b	98.9±0.3 ^b
n-Butanol fraction		99.3±0.2 ^a	92.6±3.9 ^a	99.8±0.0 ^b	33.3±0.5 ^e
H ₂ O fraction		87.4±3.5 ^b	15.6±2.2 ^d	99.9±0.1 ^d	49.1±2.1 ^d

*All value are mean±SD(n=3)

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

다) SOD 유사활성

SOD 유사활성은 pyrogallol이 수용액에서 빠르게 자동산화(autooxidation)되고, 이러한 자동산화에 superoxide가 관여한다는 원리를 이용한 것이다. 즉, superoxide dismutase나 유사활성물질이 존재하는 경우 이의 자동산화가 억제될 수 있고, 억제되는 정도를 비교하여 실험대상 물질의 효능을 비교하는 것이다. 민들레 뿌리 추출물 및 분획물의 활성비교에서는 ethyl acetate fraction이 가장 높은 활성을 나타냈다. 민들레의 잎과 뿌리 모두 총페놀함량이 높았던 ether fraction과 ethyl acetate fraction에서 SOD 유사활성도 높은 것을 나타냈다.

Table 4. SOD-like activities of extract and fractions prepared from root and leaf of dandelion (Inhibition, %)

Parts	Root		Leaf	
	20 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	10 mg/ml
Extract and fractions				
Trolox	29.7±1.4 ^a	12.0±4.4 ^{ab}	29.7±1.4 ^b	12.0±4.4 ^c
Crude extract	8.5±1.6 ^{cd}	5.2±1.0 ^b	28.8±8.9 ^{bc}	18.6±1.8 ^{abc}
Hexane fraction	10.7±6.3 ^{cd}	3.3±2.1 ^b	31.3±0.7 ^b	14.4±4.2 ^{bc}
Ether fraction	7.4±2.1 ^{cd}	2.4±0.3 ^b	26.6±3.7 ^{bc}	19.4±6.5 ^{abc}
Ethyl acetate fraction	23.5±2.1 ^{ab}	8.9±8.3 ^b	43.6±0.5 ^a	27.9±3.4 ^a
n-Butanol fraction	7.2±4.4 ^d	21.9±5.9 ^a	19.7±0.3 ^c	14.4±1.6 ^c
H ₂ O fraction	17.5±6.5 ^{bc}	9.4±6.0 ^b	20.1±0.3 ^c	24.2±2.3 ^{ab}

*All value are mean±SD(n=3)

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

라) Hydroxyl and hydrogen peroxide 소거활성

Hydroxyl radical에 의해 2-deoxyribose로부터 생성된 thiobarbituric acid

reactive substance (TBARS)를 측정된 결과 1 mg/ml의 농도에서는 민들레의 잎과 뿌리 모두 H₂O fraction의 활성이 높게 측정되었고, fraction 중에서는 ether fraction과 ethyl acetate fraction은 농도가 낮을수록 활성이 높게 나타났다.

Hydrogen peroxide(H₂O₂) 는 free radical은 아니지만 가장 유해한 hydroxyl radical을 만드는 중간물질로써 매우 중요한 의미를 갖는 물질이다. 본 실험에서는 대조물질로 사용된 trolox의 활성은 약 5% 정도였고, 이에 반해 민들레의 뿌리 및 잎의 추출물 fraction은 trolox 보다 높은 소거활성을 나타냈다.

Table 4. Hydroxyl radical scavenging activities of extract and fractions prepared from root and leaf of dandelion (Inhibition, %)

Parts	Root		Leaf	
	1 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml	0.1 mg/ml
Extract and fractions				
Trolox	93.2±0.5 ^a	76.7±1.8 ^{ab}	93.2±0.5 ^a	76.7±1.8 ^{ab}
Crude extract	86.9±1.3 ^{ab}	81.0±1.2 ^a	83.9±12.6 ^a	80.9±1.5 ^{ab}
Hexane fraction	52.2±5.5 ^d	43.5±12.1 ^c	59.7±9.7 ^b	39.2±5.2 ^c
Ether fraction	57.2±3.5 ^d	80.2±0.2 ^a	74.2±19.5 ^{ab}	74.6±6.5 ^b
Ethyl acetate fraction	66.7±3.0 ^c	82.1±0.9 ^a	72.5±11.6 ^{ab}	82.7±0.0 ^a
n-Butanol fraction	80.6±6.7 ^b	82.1±0.9 ^a	90.8±9.5 ^a	78.0±0.9 ^{ab}
H ₂ O fraction	88.6±7.0 ^b	71.0±2.6 ^b	91.1±11.1 ^a	80.5±0.3 ^{ab}

*All value are mean±SD(n=3)

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

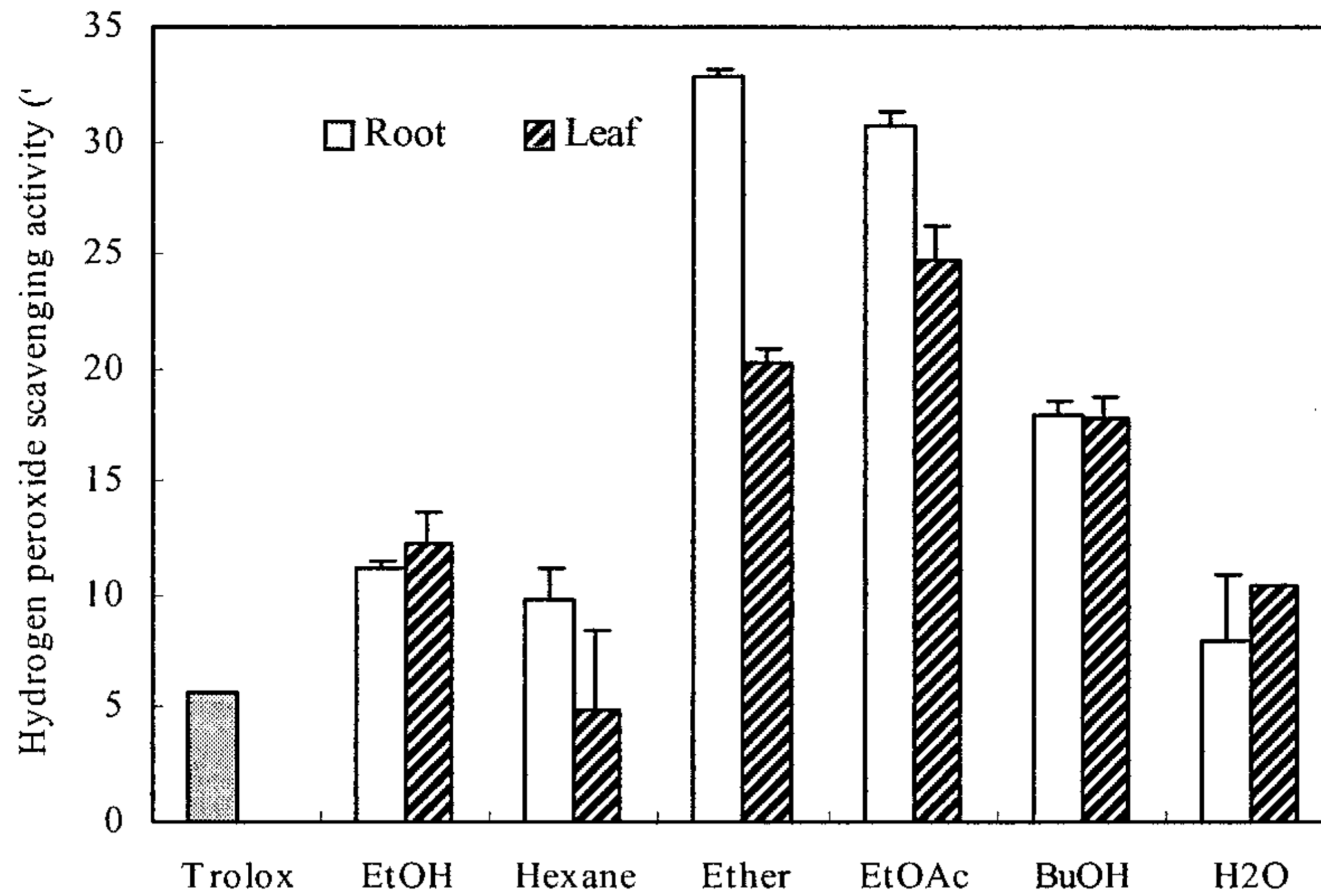


Fig. 1. Hydrogen peroxide scavenging activity of extract and fractions prepared from dandelion. Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment.

EtOH : crude extract, Hexane : Hexane fraction, Ether : Ether fraction, EtOAc : Ethyl acetate fraction, BuOH : Butanol fraction, H2O : Water fraction

마) 지질과산화 억제 활성

Phosphatidylcholine을 기질로 이용한 지질과산화 억제활성에서는 잎의 methanol 추출물이 뿌리 보다 2배 정도의 높은 활성을 나타냈다. 민들레 뿌리의 fraction 중에서는 butanol fraction과 water fraction이 지질과산화를 억제하는데 효과적이었고, 농도에 의존적으로 활성이 증가되는 것으로 나타났다. 민들레 잎의 0.5 mg/ml에서는 ether fraction과 ethyl acetate fraction의 활성이 높은 편이었으나, 농도가 증가되면서 오히려 활성이 감소되는 것으로 나타났다.

Table 6. Lipid peroxidation inhibition activities of extract and fractions prepared from root and leaf of dandelion (Inhibition, %)

Extract and fractions	Parts	Root		Leaf	
		1 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml	0.5 mg/ml
Trolox		59.4±2.4 ^b	58.2±5.7 ^a	59.4±2.4 ^c	58.2±5.7 ^a
Crude extract		38.6±2.9 ^c	17.8±5.3 ^c	62.9±12.6 ^b	40.2±5.3 ^{cd}
Hexane fraction		59.2±8.1 ^b	14.0±0.0 ^c	64.9±9.7 ^a	49.1±2.0 ^{bc}
Ether fraction		43.9±3.4 ^c	40.7±4.6 ^b	50.7±19.5 ^d	53.7±2.0 ^{ab}
Ethyl acetate fraction		44.6±6.1 ^c	40.2±7.9 ^b	49.3±11.6 ^d	56.5±7.3 ^{ab}
n-Butanol fraction		72.0±3.1 ^a	43.9±1.3 ^b	42.5±9.5 ^c	42.1±6.6 ^d
H ₂ O fraction		76.6±5.4 ^a	49.1±4.6 ^b	59.2±11.1 ^c	50.0±11.2 ^{bcd}

*All value are mean±SD(n=3)

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

2) V79-4를 이용한 항산화 시험

(가) 민들레 용매분획이 cell proliferation에 미치는 영향

민들레 잎과 뿌리의 조추출물 및 용매분획에 대하여 Chinese hamster lung cell V79-4를 이용하여 cell proliferation에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. MTT 결과 잎의 경우 100 µg/mL 농도에서는 모든 분획에서 90% 이상의 세포 생존율을 보였다. 조추출물, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획의 경우 시험 농도를 400 µg/mL로 증가시켜도 80% 이상의 생존율을 보인 반면, 헥산과 에틸에테르 획분과 같은 지용성 획분에서는 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하여 고농도 처리시 세포독성을 가지는 것으로 조사되었다. 뿌리의 경우 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획에서는 120~140% 이상의 높은 세포 생존율을 보였으며, 400 µg/mL의 농도로 처리할 경우에도 세포 생존율은 큰 변화가 없는 것으로 나타나 세포보호효과가 높은 것으로 판단된다. 반면 에틸에테르 획분의 경우 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하여 고농도에서는 세포독성이 있는 것으로

나타났으며, 이는 앞의 경우와 유사하게 지용성 획분에서 세포독성을 나타내었다.

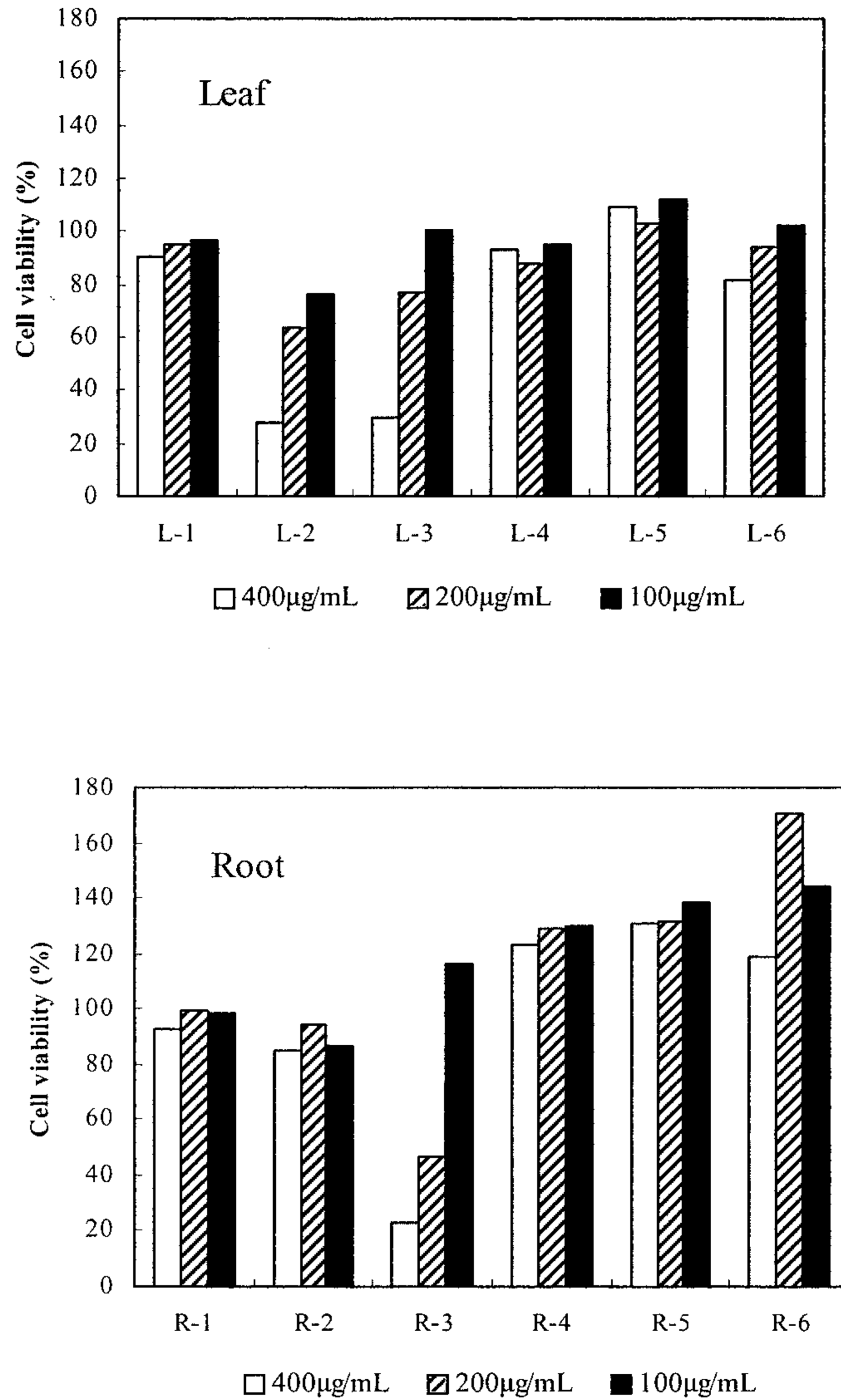


Fig. 2. Effect on the cell proliferation of dandelion extracts in V79-4 on the H₂O₂-induced oxidative damage.(L1-leaf crude Ex., L2-leaf hexan Fr., L3-leaf Et₂O Fr., L4-leaf EtOAc Fr., L5-leaf BuOH Fr., L6-leaf H₂O Fr.; R1-root crude Ex., R2-root hexan Fr., R3-root Et₂O Fr., R4-root EtOAc Fr., r5-root BuOH Fr., R6-root H₂O Fr)

(나) DCHF-DA(dichlorodihydrofluorescein diacetate) 측정

Esterase 효소에 의해서 DCHF-DA에서 DCHF로 변환되고 세포내 생성된 활성 산소종은 형광물질인 DCF로 전환시키는데 이렇게 전환된 형광물질의 양을 세포내 형성된 활성 산소종으로 간주하였으며 결과는 Table 7에 나타내었다. 이러한 활성 산소종은 외부자극에 의하여 세포막에 존재하는 수용체를 통하여 일시적으로 생성되며 세포내 활성산소의 증가는 세포 사멸과 관계가 있다. 앞과 뿌리 부분 모두 헥산 분획물을 제외하고는 모든 분획물 200 µg/mL 농도에서 70-80%의 높은 활성 산소종 저해율을 나타내었으며 앞과 뿌리 부분 모두 같은 농도에서 분획물별로 높은 유의적 차이를 나타내었으며 앞 부분의 헥산 분획물을 제외하고는 모든 분획물에서 농도별로 높은 유의적 차이를 보였다. 또한 앞과 뿌리 부분 모두 80% 에탄올, 디에틸에테르, 에틸아세테이트, 물 분획물에서 부위별로 유의적 차이를 나타내었다.

Table 7. Effect of various dandelion fractions on intracellular ROS scavenging activity

location	fraction	Intracellular ROS scavenging activity (%)	
		concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
		100	200
leaf	80% ethanol	81.33 \pm 1.03 ^{1)c}	85.39 \pm 1.32 ^{b,c2)}
	hexane	7.68 \pm 7.20 ^c	13.31 \pm 8.25 ^d
	diethylether	85.13 \pm 0.73 ^b	87.98 \pm 0.62 ^{a,b}
	ethylacetate	87.42 \pm 0.74 ^a	89.71 \pm 0.56 ^a
	n-butanol	78.13 \pm 0.86 ^d	83.97 \pm 0.78 ^c
	water	81.86 \pm 0.93 ^c	86.25 \pm 0.84 ^{a,b,c}
	F-value vs fraction	2737.02 ^{***}	585.79 ^{***}
root	80% ethanol	74.82 \pm 1.01 ^c	82.07 \pm 1.17 ^b
	hexane	12.54 \pm 1.43 ^c	40.05 \pm 7.27 ^d
	diethylether	82.90 \pm 1.08 ^a	86.80 \pm 1.24 ^a
	ethylacetate	83.37 \pm 1.17 ^a	85.40 \pm 0.73 ^{a,b}
	n-butanol	80.20 \pm 1.18 ^b	83.76 \pm 0.68 ^{a,b}
	water	54.29 \pm 3.30 ^d	71.87 \pm 1.70 ^c
	F-value vs fraction	2070.16 ^{***}	258.14 ^{***}

(다) 세포내 lipid peroxidation 저해 활성

V79-4 세포주를 이용하여 산화적 스트레스에 의하여 생성되는 세포내 지질과산화물의 생성 억제활성을 시험한 결과는 Fig. 3과 같다. 민들레 잎 추출물의 경우 80% 에탄올 조 추출과 획산 분획을 제외한 다른 모든 분획에서 90% 이상의 높은 과산화물 생성 억제를 보였으며, 뿌리의 경우에는 에틸에테르, 에틸아세테이트, 부탄올 획분에서 90% 이상의 높은 호라성을 보였다. 반면, 80% 에탄올 조추출물은 30% 정도의 비교적 낮은 억제활성을 보였으며, 물 분획의 경우 저농도(100 $\mu\text{g/mL}$)에서는 거의 활성을 보이지 않았다.

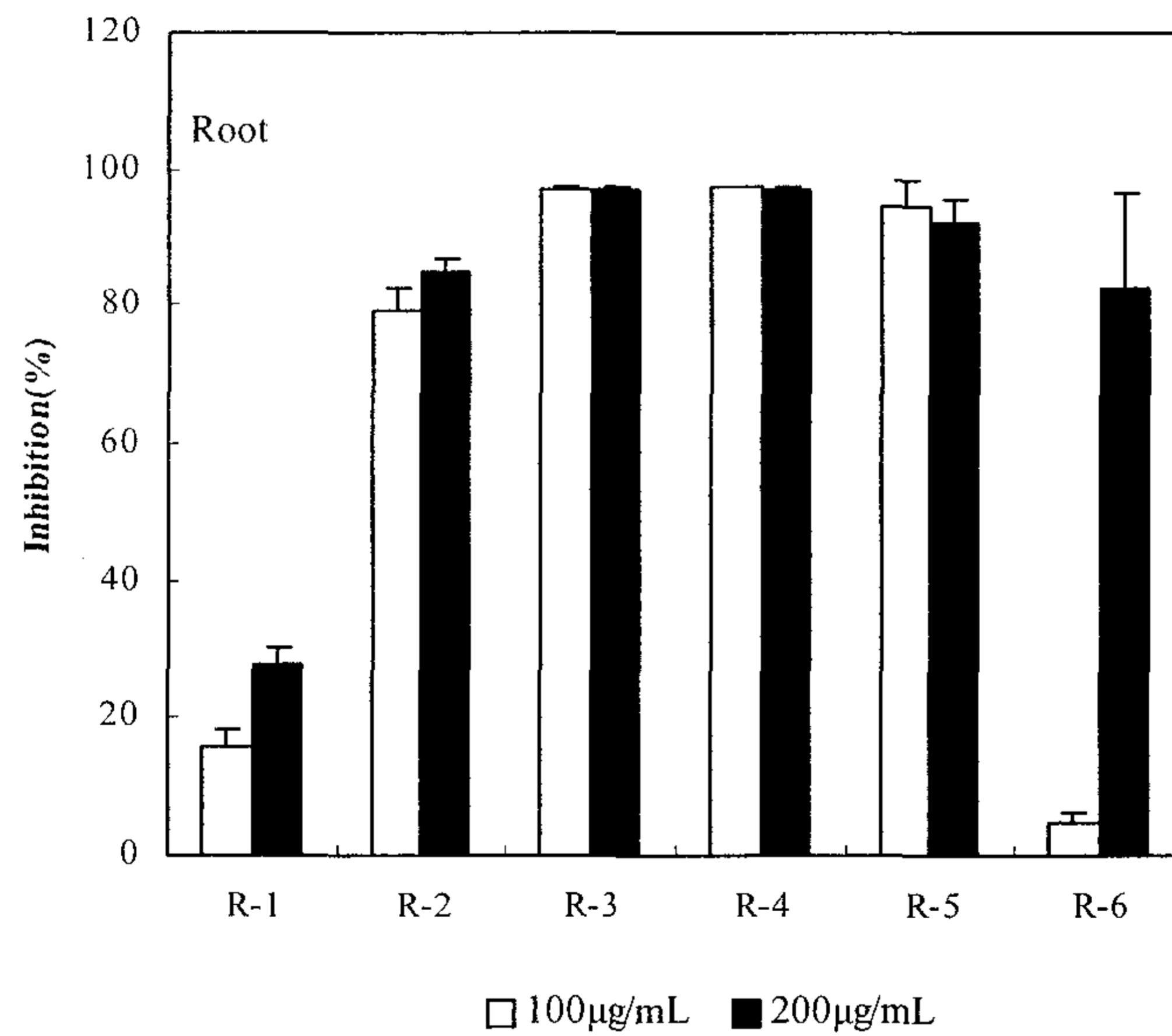
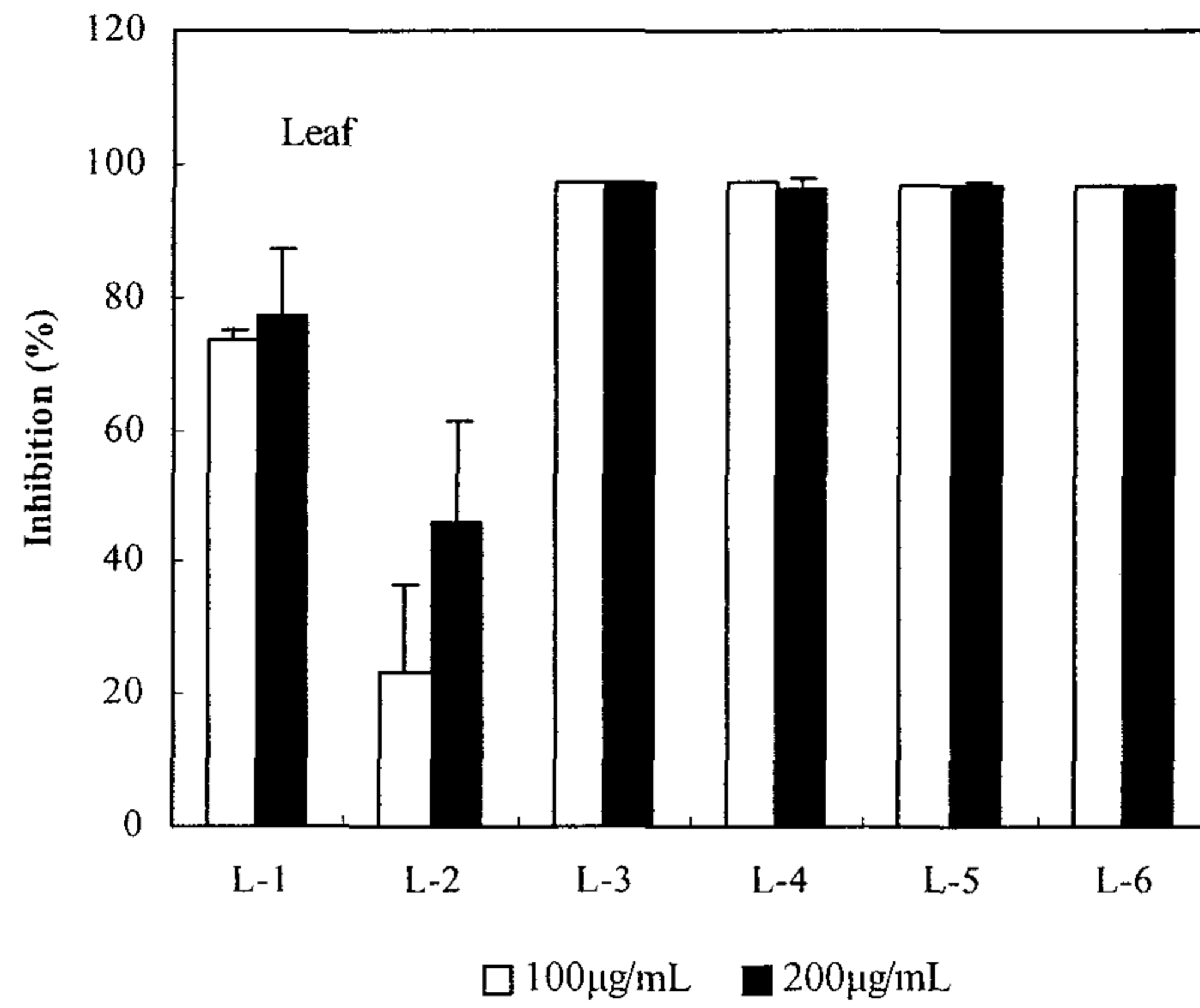


Fig. 3. Lipid peroxidation inhibitory effect of dandelion extracts in V79-4 on the H_2O_2 -induced oxidative damage. The abbreviation is the same as Fig. 2.

(라) 항산화 관련 효소 활성

민들레 잎과 뿌리의 분획물들을 처리한 V79-4 세포의 항산화 효소 활성 측정 결과는 Table 8에 나타내었다. SOD 활성은 대조군과 비교하였을 때 효소 활성의 차이가 크게 나타나지 않았다. 잎의 경우 분획물별로 유의적 차이가 없으나 뿌리에서는 유의적 차이를 나타내었다. GSSG의 경우 잎과 뿌리 부분 모두 디에틸에테르 분획물에서 각각 10, 13.7 $\mu\text{M}/10^6$ cells 로 높은 GSSG 농도를 나타내었으며 catalase는 잎의 경우 헥산, 에틸아세테이트 분획물에서 각각 26.69, 33.53 unit/ 10^6 cells 로 높은 효소 활성을 나타내었으며 뿌리의 경우에는 헥산, 디에틸에테르 분획물에서 각각 13.3, 16.9 unit/ 10^6 cells 로 높은 효소 활성을 나타내었다. 잎 부분의 SOD 측정을 제외하고 모두 분획물별로 유의적인 차이를 나타내었으며 GSSG 측정에서만 잎과 뿌리의 부위별 차이도 유의적으로 나타났다.

Table 8. Effect of various dandelion fractions on antioxidant enzyme activity in V79-4

location	fraction	antioxidant enzyme activity		
		SOD(U)	GSSG(μ M)	CAT(U)
	control	0.42 \pm 0.01	2.99 \pm 0.35	0.53 \pm 0.09
leaf	80% ethanol	0.40 \pm 0.01 ^{1)a,b}	3.26 \pm 0.41 ²⁾	4.97 \pm 0.39 ^b
	hexane	0.42 \pm 0.04 ^b	8.78 \pm 0.01 ^b	26.69 \pm 2.76 ^a
	diethylether	0.44 \pm 0.04 ^{a,b}	10.12 \pm 0.21 ^a	9.39 \pm 3.19 ^b
	ethylacetate	0.46 \pm 0.05 ^{a,b}	6.97 \pm 0.04 ^c	33.53 \pm 11.89 ^a
	n-butanol	0.44 \pm 0.04 ^{a,b}	4.84 \pm 0.13 ^d	0.66 \pm 0.18 ^b
	water	0.42 \pm 0.01 ^a	3.64 \pm 0.03 ^c	4.84 \pm 0.49 ^b
	F-value vs fraction	N.S. ³⁾	612.07 ^{***}	21.80 ^{***}
root	80% ethanol	0.55 \pm 0.03 ^a	7.49 \pm 0.04 ^c	5.13 \pm 1.60 ^{b,c}
	hexane	0.47 \pm 0.05 ^b	7.10 \pm 0.05 ^d	13.39 \pm 1.39 ^{b,a}
	diethylether	0.55 \pm 0.02 ^a	13.74 \pm 0.15 ^a	16.90 \pm 10.66 ^a
	ethylacetate	0.39 \pm 0.02 ^c	8.95 \pm 0.06 ^b	12.03 \pm 2.28 ^{b,a}
	n-butanol	0.42 \pm 0.03 ^{b,c}	5.50 \pm 0.04 ^c	0.46 \pm 0.15 ^c
	water	0.41 \pm 0.04 ^{b,c}	5.60 \pm 0.04 ^c	2.32 \pm 0.54 ^c
	F-value vs fraction	13.06 ^{***}	4732.16 ^{***}	6.43 ^{**}

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

나. 민들레로부터 분리한 물질의 항산화 활성

1) 분리한 물질의 활성산소 소거활성

민들레 잎으로부터 quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, luteolin-7-glucoside를 분리 동정하였으며, 뿌리로부터 isorhamnetin, chlorogenic acid, ferulic acid를 분리 동정하였다. 이들의 활성산소 소거활성을 시험한 결과는 Table 9와 같다. DPPH 소거활성의 경우 35.7~78.9%로 trolox에 비해서는 다소 낮은 활성을 보였다. 분리한 물질 중에는 잎에서 분리한 flavonol 화합물이 뿌리로부터 분리한 물질보다 다소 높은 활성을 보였다. flavonol 화합물간에는 차이가 없는 것으로 나타나, 치환된 당의 종류와 위치에 따라서는 활성에 차이가 없는 것으로 나타났다. 반면 aglycon 형태인 isorhamnetin의 경우 위의 화합물보다 활성이 낮게 나타났으며, ferulic acid가 가장 활성이 낮았다. 반면, hydroxyl 라디칼의 경우 isorhamnetin을 제외하고는 5개의 물질 모두 90% 이상의 높은 활성을 나타내어 trolox와 거의 유사한 활성을 나타내었다. Superoxide anion과 H₂O₂의 경우에도 잎에서 분리한 화합물의 뿌리보다 다소 높은 활성을 보였으며, 다른 라디칼 소거활성과 유사하게 분리한 물질간의 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 9. ROS scavenging activities of active compounds isolated from dandelion (Inhibition, %)

	DPPH	·OH	·O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Q-3-G	78.9±2.5	96.8±3.2	57.3±2.1	66.4±3.1
Q-3-R	73.2±3.1	94.3±1.9	58.4±3.2	63.5±2.7
L-7-G	76.2±2.9	94.3±1.1	58.4±1.2	57.8±1.3
Isorhamnetin	54.4±4.7	66.4±2.1	23.4±3.9	35.6±2.2
Chlorogenic acid	50.9±3.3	92.0±3.7	34.5±2.0	33.4±2.2
Ferulic acid	35.7±2.5	90.1±2.4	36.6±1.6	29.7±4.3
Trolox	95.4±2.1	93.5±2.1	17.3±3.4	19.3±3.4

Each values were mean±standard deviation of triplicate test

The concentration of the tested solution were 0.1 mg/mL

제 3절 민들레의 항동맥경화 활성 시험

1. Hep G2를 이용한 항동맥경화 활성 시험

가. 재료 및 방법

1) 실험재료

사람의 간암세포의 HepG2 세포는 한국세포주은행으로부터 분주 받았으며 배양배지는 RPMI 1640(Gibco BRL)을 사용하였다. 배지에 첨가한 콜레스테롤은 수용성 콜레스테롤(Sigma)을 사용하였고, 사용한 인삼은 위의 분획 방법으로 얻은 19가지 분획물을 이용하여 실험하였다. 세포배양에 필요한 fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, sodium bicarbonate, trypsin-EDTA는 Gibco에서 구입하였다. 그 외 RNA 추출에 사용된 시약은 모두 sigma에서 구입하였다.

2) 세포 배양

세포는 RPMI 1640 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin을 첨가하여 5% CO₂, 95% O₂, 37 °C 조건에서 72시간 배양한 후 2% FBS RPMI 1640 배지에서 48시간 배양하였다. 그 후 phosphate buffered saline (PBS)로 세포를 한번 세척한 후 다음의 실험군에 따른 배지로 8시간 동안 배양하였다. 정상군(normal)은 무혈청 (serum-free) RPMI 1640배지에서 배양하였고 대조군(control)은 무혈청 (serum-free) RPMI 1640배지에 cholesterol(10 µg/mL)를 첨가하여 배양하였다. 그리고 실험군은 무혈청 RPMI 1640 배지에 cholesterol(10 µg/mL)를 전처리한 후 각각의 배지에 추출물을 첨가하여 세포를 8시간 배양하였다. 각 군들의 세포는 PBS로 3번 세척 한 후, 1000 X g에서 15분간 원심분리 하여 세포를 수거하여 총 RNA를 추출하였다. 배지에 첨가된 추출물은 DMSO에 녹여 사용하였으며 세포배양배지에 첨가시 DMSO의 최종농도가 0.1%가 넘지 않도록 조절하였다.

3) 총 RNA의 추출

총 RNA의 추출 방법은 다음과 같다. 원심분리하여 수거한 세포에 GITC용액 (4M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, water-saturated phenol)을 5배 부피 이상 첨가하여 23 gauge needle을 사용해 균질화 시킨 후, 2 M sodium acetate(pH 4.5), water-saturated phenol, 그리고 chloroform/isoamylalcohol(49:1,

v/v)를 첨가한 후 20분간 원심 분리(4°C, 10,000 Xg)한 후 상층액을 취해 phenol/chloroform 추출 1회와 chloroform/isoamylalcohol 추출을 2회 실시하였다. 그 후 상층액에 0.1배 부피의 3 M sodium acetate(pH 5.2)와 2.5배 부피의 ethanol을 첨가해 -70°C에서 30분간 둔 후 20분간 원심 분리(4°C, 10,000 Xg)한 후 생성된 pellet을 70% ethanol로 세척해 공기중에 말린 후 이를 RNase-free water에 다시 녹여 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 총 RNA를 정량하여 Northern blot에 사용하였다.

4) Northern blot

LDL receptor mRNA의 probe는 pLDLR3(ATCC 57004)의 1.9kb Bam-II 절편을 사용하였고 human β -actin cDNA(HHC 189, ATCC 65128)의 1.1kb EcoRI 절편을 총 RNA 보정용으로 사용하였다. Probe는 각 절편을 digoxigenin (DIG)-high prime labeling kit II(Roche)을 이용하여 random labeling 하였다. 각 mRNA band의 양을 Flour-STM multiimager(Bio-Rad)로 측정하였고 같은 세포의 β -actin mRNA 값에 의해 보정하였다.

5) HepG2 세포내 LDL receptor binding activity

수거한 세포를 PBS로 2번 씻은 후 단백질량을 정량하였다. 단백질 정량은 BCA 정량법(sigma)을 사용하여 측정하였다. LDL receptor binding activity는 다음의 방법으로 측정하였다. 인삼추출물과 polyphenol로 처리한 세포 50 μ g의 단백질을 취하여 1시간동안 실온에서 LDL gold conjugates(20 μ g of protein/mL)을 실시하여 total 과 non-specific binding을 측정하였다. 1시간 후에 세포 pellet을 원심분리하여 4%(w/v) gum arabic과 silver enhancement Intense BL Kit solution(Amersham, Sydney, Australia)에 첨가하였다. silver enhancement solution의 흡광도를 Ciba Bio autoanalyzer (Roche Diagnostica, Nutley, NJ)을 이용하여 500 nm에서 측정하였다. 세포에 결합된 LDL 단백질의 양은 mg당 단백질의 ng LDL로 표시 하였다.

6) LDL receptor protein

LDL receptor protein의 양은 polyclonal anti LDL receptor antibody를 사용

하여 western blotting로 측정하였다. 각각의 농도로 처리된 HepG2 세포 pellet 50 μ L과 300 μ L의 buffer(250 mM Tris-maleate(pH 6.0), 1 mM phenylmetanesulfonyl fluoride, 1 mM N-ethylmaleimide)를 1.5 mL plastic centrifuge tubes에 넣고 400 g에서 10분간 원심분리 하였다. 90 μ L의 5%(w/v) Triton X-100을 넣고 vortex하고 세포 mixture은 다시 400 \times g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 된 cell supernatant을 측정하였다. samples(100 μ g of protein)은 3-15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gradient gel이용하여 측정하였다. polyclonal antibody against LDL receptor을 membrane에 overlaid 시키고 anti-rabbit IgG antibody(Sigma, St. Louis, MO)을 반응시켰다. LDL receptor band는 hyper film-ECL X-ray film(Amersham, Sydney, Australia)을 이용하여 확장시켰으며 ECL enzyme substrate kit(Amersham, Sydney, Australia)을 이용하여 측정하였다. 결과는 densitometer scan으로부터 측정된 arbitrary absorbance unit으로 나타내었다.

7) LDL receptor mRNA and HMG-CoA reductase mRNA

LDL receptor mRNA을 측정하기 위하여 먼저 total cellular RNA을 분리하여 측정하였다. LDL receptor mRNA은 reverse transcription과 polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용하여 측정하였다. LDL receptor sequences는 PCR로 각각 upstream과 down stream으로 증폭시켰다. Modified nucleotide가 증폭되는 동안 dUTP을 LDL receptor sequence에 conjugated 시켰다. 증폭된 서열은 3% agarose gel에 90분 동안 90 V로 흘려주면서 0.8 mM Tris acetate(pH 8.5), 40 μ M EDTA을 running buffer로 하여 진행시켰다. film은 LKB Ultrascan XL laser densitometer(Pharmacia LKB Biotechnology)으로 스캔하였다. HMG-CoA reductase mRNA은 reverse transcription과 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용하여 위의 전처리 방법과 같게 처리하였다.

8) ACAT-1 protein expression

HepG2 세포에 2시간 및 24시간 샘플 처리 후 세포를 ice-cold PBS (pH7.4)로 세척한 다음 200 μ L의 whole cell lysis buffer (pH 7.4)를 이용하여 수확하였다. Cell lysate를 강하게 교반하고 초음파세척기로 균질화하여 얼음에 30분간 방치하

고 4°C에서 15분간 13,000rpm으로 원심분리하 뒤 상층액을 취하여 단백질 샘플로 사용하였다. BCA법으로 측정된 동일한 양의 단백질 샘플을 4배의 loading buffer와 혼합한 후 10% criterion Tris-HCl precast gel에 loading하여 전기영동하고 semi-dry transfer system을 이용하여 PVDF membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% 탈지우유를 함유한 PBST buffer로 상온에서 1시간 blocking한 후 anti-ACAT-1 antibody (3% 탈지우유)로 4°C에서 overnight 반응시키고 2차 antibody 반응시킨 뒤 ECL kit를 이용하여 분석하였다.

2. Low density lipoprotein (LDL) 산화 억제 시험

가. LDL의 분리

Human LDL은 건강한 20대 여성으로부터 채혈한 후 혈액 50 mL를 4°C에서 3시간 방치한 후 3,000 rpm에서 원심분리한 후 분리된 상층 1 mL에 EDTA/NaN₃/phosphate buffer (pH 7.4) 0.5 mL와 NaCl/phosphate buffer ($d=1.006$) 2 mL를 첨가하여 14°C에서 초원심분리기 (ultracentrifuger optima TLX, Beckman Co., USA)로 44,000 rpm에서 16시간 원심분리하여 VLDL을 분리하였다. VLDL을 제거하고 남은 하층 2 mL에 NaBr/phosphate buffer ($d=1.182$) 1 mL를 가하여 14°C에서 44,000 rpm으로 20시간 원심분리하여 LDL을 분리하였다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA 용액 (pH 7.4)으로 4°C에서 48시간 투석하고, 다시 0.15 M NaCl, 10 mM PBS (phosphated buffered saline, pH 7.0)으로 48시간 투석하여 EDTA를 제거하였다. 분리된 LDL은 0.22 μ m membrane fliter로 여과한 후 4°C에서 일주일간 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. LDL의 산화

PBS로 희석한 LDL (0.1 mg protein/mL) 200 μ L에 10 μ M CuSO₄ DMSO에 녹인 시료 10 μ L를 혼합하여 37°C에서 배양하여 산화를 유도하였으며, 1 mM EDTA 1mL, 1 mM BHT 1mL를 가하여 반응을 중지하였다.

다. TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance) 함량 측정

LDL의 산화에 의해 생성된 산화지질의 양은 TBARS로 측정하였다. 산화

LDL 용액에 25% TCA 1 mL를 가하여 10,000 rpm으로 원심분리하여 단백질을 침전시키고, 상등액 1 mL에 1% TBA 1 mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에 대한 시료 첨가구의 산화 억제 활성은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibitory effect on LDL oxidation} = \left(1 - \frac{Abs}{Abc}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of control at 532 nm

Abs : Absorbance of after sample treatment at 532 nm

라. Conjugated diene 함량 측정

LDL의 산화에 의해 생성된 conjugated diene의 측정은 Esterbau 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 37°C에서 반응시킨 LDL에 클로로포름 2 mL와 메탄올 1 mL를 가하여 10,000 rpm에서 원심분리하여 상층은 버리고 하층 2 mL를 취하였다. 하층을 질소로 용매를 제거한 후 cyclohexane 1.5 mL에 용해 시킨 후 234 nm에서 8시간 동안 경시적으로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

3. 토끼모델을 이용한 동맥경화 예방 효과

가. 실험동물 및 식이

민들레 잎과 뿌리의 지질대사 및 항동맥경화 효과를 살펴보기 위해 동맥경화를 쉽게 유발하는 흰 토끼 (New zealand white rabbit)를 (주)중앙실험동물에서 분양 받아 각 군당 7마리씩 총 3군으로 하여 실험을 실행하였다.

식은 고형사료 (Purina rabbit chow pellet)을 분말로 만든 뒤, 동맥경화를 유발하기 위해 1% 콜레스테롤 (w/w)을 혼합하여 사용하였다. 사료는 100g/kg b.w. 로 공급하고, 실험기간 동안 사육실의 온도는 20°C, 상대습도는 55%를 유지하며 명암주기는 12시간 간격으로 조절하였다.

실험식이 시작일을 기준으로 1주마다 동물체중으로 체중을 달아 체중의 변화상태를 측정하였고, 실험식이 시작일로부터 1주 간격으로 토끼의 안구 정맥에서 채혈하여, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, TBARS 함량 변화 등을 관찰하였다.

간장은 적출하여 0.1 M PBS 로 세척한 후 이물질을 제거하고 사용직전까지 -70℃ deep freezer에 보관하였다. 간장 이외의 장기들을 제거하고 심장에서 나오는 대동맥궁과 복부대동맥까지를 적출 해 냈다. 적출된 대동맥은 냉장 PBS (0.1 M, pH 7.4)로 세척하면서, 이물질을 제거하고, 10% formalin에 고정시켰다.

Table 1. Composition of experimental diet

Group	Diet
Normal	Basal diet
Control	Basal diet + 1% cholesterol
Dandelion	Basal diet + 1% cholesterol + 1% Dandelion leaf or root

나. 혈장을 이용한 이화학적 실험

1) 혈장 분리

혈액을 4℃에서 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 혈장만을 취하여, -20℃에서 냉동보관하면서 분석용으로 사용하였다.

2) 혈장의 지질성분 분석

혈청 내 지질패턴을 분석하기 위해 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도는 혈액자동분석기(Automatic Analyzer, HITACHI, Japan)를 사용하여 측정하였다. 또한, atherogenic index (AI)는 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤 농도를 이용하여 계산하였다.

$$AI = (\text{Total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol})/\text{HDL-cholesterol}$$

3) 혈장 TBARS 함량

혈장 내 지질과산화물 형성량은 TBA법을 사용하여, malondialdehyde (MDA)로 정량하였다. 표준 시약으로 malondialdehyde (Fluka, 63287)을 사용하여 1 mg protein의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 나타냈다. 혈장 내 단백질 함량은 Lowry법에 의해 측정하여 사용하였다.

다. 간조직의 항산화 효소활성 및 TBARS 함량 측정

간장 조직에 0.1 M PBS (pH 7.4)를 가하여 homogenizer로 균질화 하고, 균질액은 TBARS 함량 측정에 나머지는 10,000 rpm에서 1시간 원심 분리 후 상등액을 취하여, 항산화효소 활성 측정에 필요한 효소원으로 사용하였다.

간균질액의 상등액 (cytosol)을 가지고 Simons와 Johnson의 방법에 따라 glutathione (GSH)함량을 측정하고, Habig법에 의해 GST (glutathione-S-transferase)활성을 측정하였다. GPx (glutathione peroxidase)활성은 tert-butylhydroperoxide를 기질로 하여 Paglia와 Valentine의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. Catalase 활성은 hydrogen peroxide와 sodium potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 기질로 하여 240 nm에서 일정시간 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD (Superoxide dismutase) 활성은 Marklund 방법에 따라 pyrogallol의 autooxidation 억제도로 나타냈다.

간조직 내 지질과산화물 형성량은 TBA법을 사용하여, malondialdehyde (MDA)로 정량하였다. 표준 시약으로 malondialdehyde (Fluka, 63287)을 사용하여 1 mg protein의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 나타냈다. 단백질 함량은 Lowry법에 의해 측정하여 사용하였다.

라. 대동맥의 조직변화

대동맥은 10% formalin으로 고정하고 paraffin에 포매한 후 4-6 μm 의 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin 복염색을 실시하였다.

마. 통계처리

모든 실험의 결과는 평균과 표준편차로 산출하였으며, 각 실험치 간의 검증은 SAS를 이용한 ANOVA와 Duncan's multiple range test로 각 군간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

4. 결과 및 고찰

가. Hep G2를 이용한 항동맥경화 활성 시험

1) LDL receptor 발현 및 binding activity

민들레로부터 분리한 화합물의 LDL receptor 수의 증가와 mRNA 전사 여부의 관계를 세포수준에서 알아보기 위한 실험 결과는 Fig. 1~3에 나타내었다. 10 µg/mL의 콜레스테롤을 Hep G2 세포에 첨가한 후 LDL receptor의 발현을 살펴본 결과 대조군에 비하여 시료 첨가군은 LDL receptor의 발현이 증가하는 경향을 나타내었다. 분리한 화합물 중 LDL receptor 발현 증가에 미치는 영향으로 특히 L-3-G와 isorhamnetin에서 높은 발현 증가를 보였다. Fig. 4와같이 LDL receptor binding activity가 증가하는 것은 세포속의 LDL receptor의 숫자가 증가하여 HepG2 세포의 겉표면의 LDL과 결합하기 때문이다. 그러므로 민들레로부터 분리한 화합물들은 HepG2 세포의 LDL receptor의 up-regulate 한다는 것을 보여준다. 즉, LDL receptor binding activity가 증가하는 것은 세포속 LDL receptor protein과 mRNA의 양을 증가시키게 된다.

Table 2와 같이 증가된 LDL receptor binding activity은 HepG2 세포의 LDL receptor protein의 증가에 의한 것이고(약 4배) 이것은 LDL receptor mRNA의 발현을 증가(약 30배) 시켰다. 이것은 인삼 에틸아세테이트 추출물이 gene transcription 수준의 LDL receptor을 증가시킨 것으로 보인다.

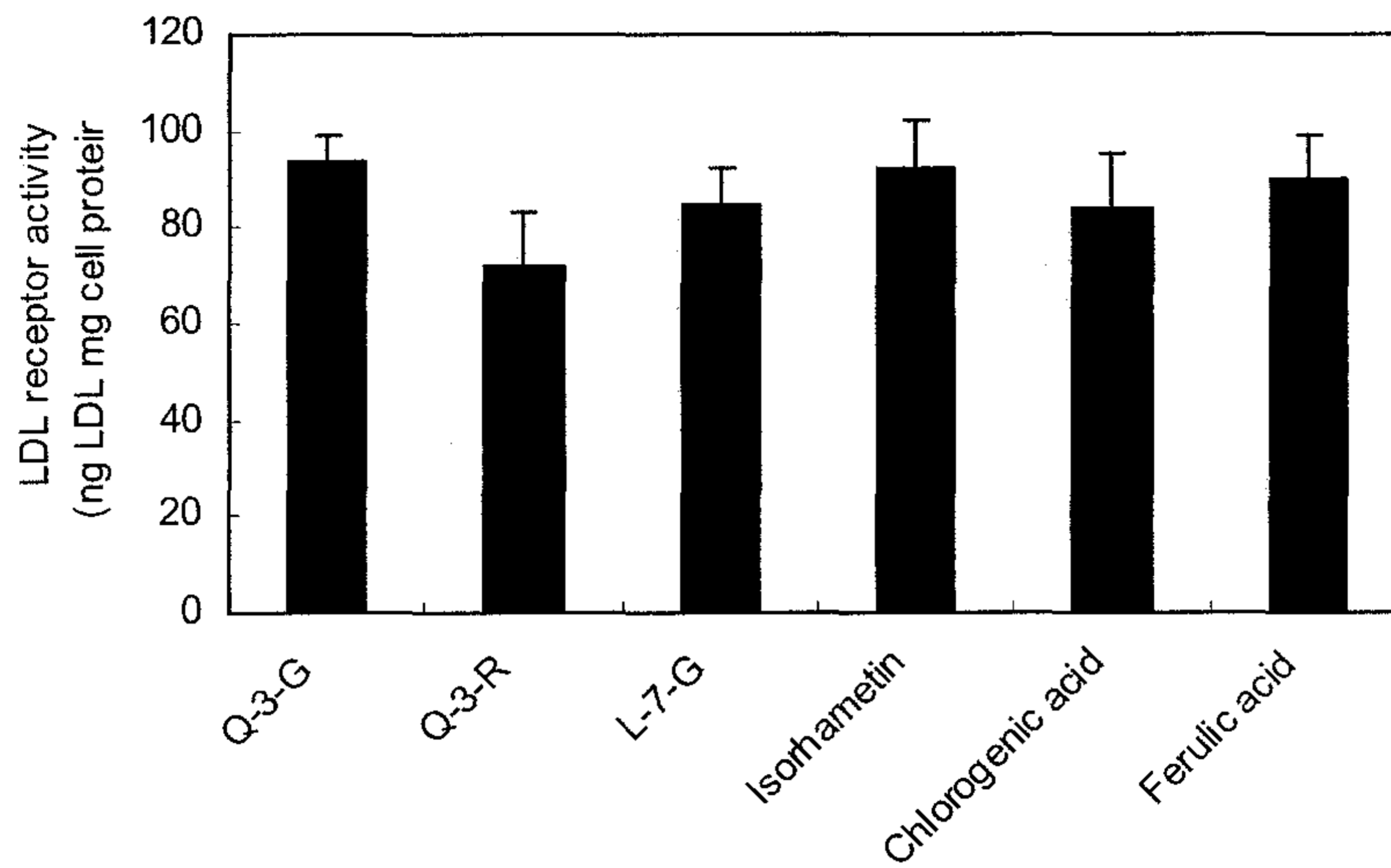


Fig. 1. Effects of active compounds from dandelion on the LDL receptor activity.(Q-3-G; quercetin-3-glucoside, Q-3-R; quercetin-3- rhamnoside, L-7-G; luteolin-7-glucoside)

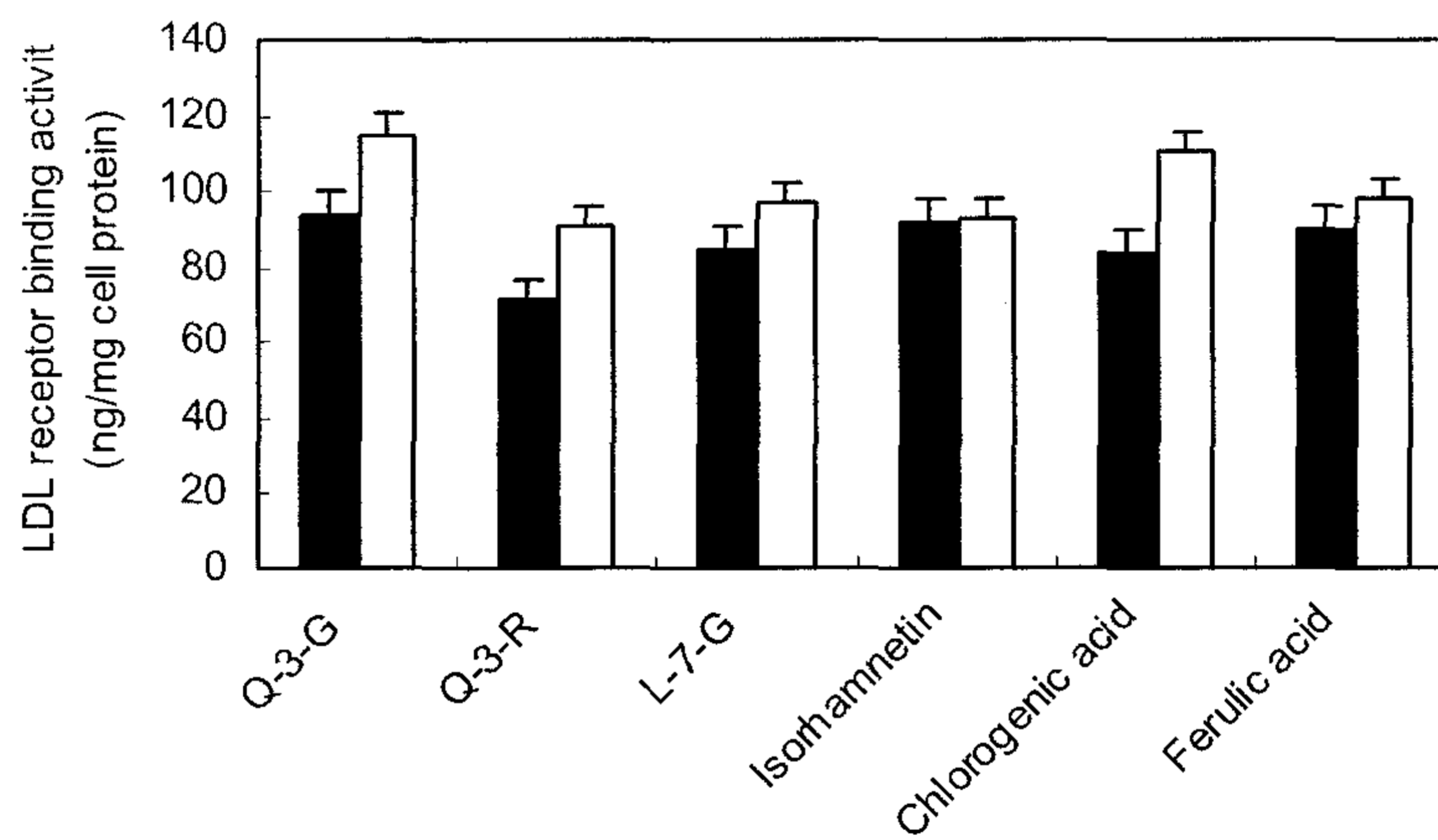


Fig. 2. Effects of various ginseng extracts on the LDL receptor binding activity(black bars mean 50 µg of various ginseng extracts and white bars mean 100 µg of various ginseng extract in HepG2 cell).

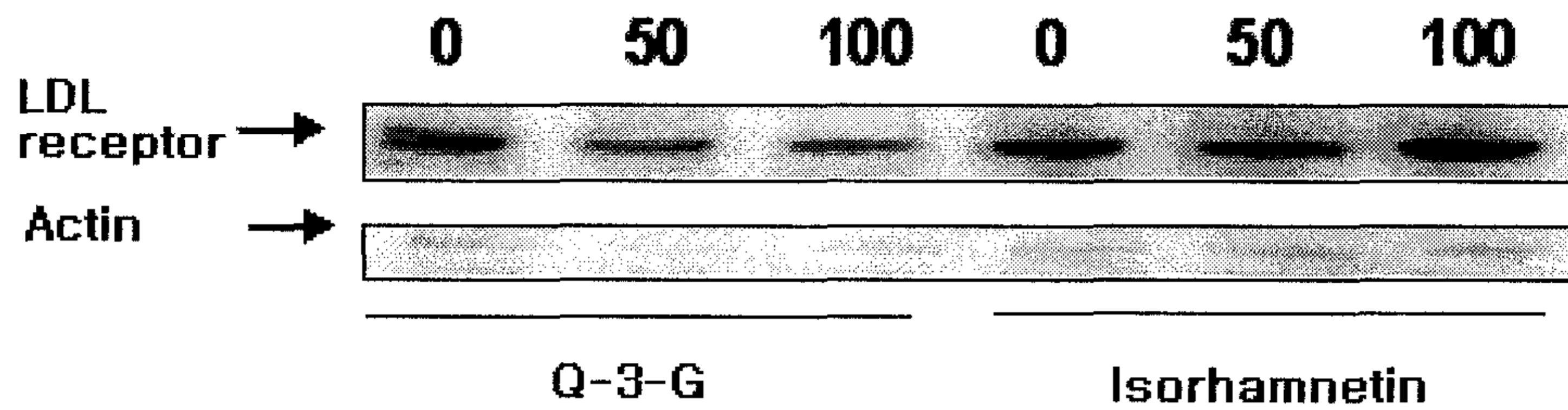


Fig. 3. Effect of Q-3-G and isorhamnetin on LDL receptor mRNA in HepG2 cells.

2) HMG-CoA reductase 감소 효과

LDL receptor mRNA의 발현 증가는 HMG-CoA reductase를 억제함으로써 세포 내 뿐 아니라 혈중 콜레스테롤을 많이 낮추는 역할을 한다고 보고하고 있다. Table 3에서와 같이 민들레로부터 분리한 화합물들의 농도가 0-100 µg으로 증가함에 따라 HMG-CoA reductase 농도가 감소함을 알 수 있다. 분리한 화합물 중 Q-3-G와 isorhamnetin은 농도 의존적으로 HMG-CoA의 발현을 억제 하였으며, 그 외 다른 화합물들은 16-19 copies × 10⁵/µg of cell RNA를 보여 무처군에 비하여 약 50% 정도의 발현 억제율을 보였다.

Table 3. Effect of active compounds from Ginseng on the HMG-CoA reductase mRNA in HepG2 cells

	HMG-CoA reductase mRNA (copies × 10 ⁵ /µg of cell RNA)		
	0	50 µg	100 µg
Q-3-G	41.7±1.3	26.6±1.8	11.5±2.7
Q-3-R	39.6±2.1	28.9±1.2	19.4±1.8
L-7-G	34.5±2.3	26.5±2.1	17.4±2.1
Isorhamnetin	34.4±4.1	15.4±2.6	4.6±0.3
Chlorogenic acid	37.3±3.3	29.4±3.3	19.2±0.9
Ferulic acid	26.5±2.7	25.4±3.1	16.3±1.3

Q-3-G; quercetin-3-glucoside, Q-3-R; quercetin-3-rhamnoside, L-7-G; luteolin-7-glucoside

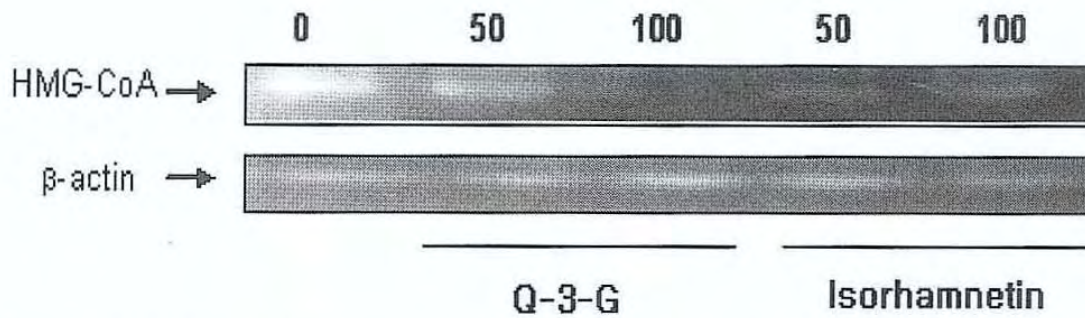


Fig. 4. Q-3-G and isorhamnetin on HMG-CoA mRNA in HepG2 cells

나. 세포내 cholesterol 감소 효과

LDL receptor을 up-regulated 시키는지 알아보기 위해서 HepG2 세포내의 cholesterol 농도를 측정하여 확인할 필요성이 있다. 세포내의 cholesterol의 함량이 적을수록 LDL receptor up-regulate가 잘 이루어진다는 것은 이미 많이 보고되었다. Fig. 5와 같이 민들레로부터 분리한 화합물의 첨가 농도가 0에서 100 μg 으로 증가될수록 cell cholesterol 함량이 모두 감소하는 것으로 나타났다. 초기 세포내 cholesterol 농도는 0.27~3.0 mg/mg cell protein이었으나 시료 첨가에 의해 0.1~0.14 mg/mg cell protein으로 감소하였다. 특히, Q-3-G와 isorhamnetin의 첨가에 의해 cell cholesterol 함량 가장 낮게 나타났는데, 이는 앞서 실험한 LDLreceptor binding activity와 HMG-Co A reductase mRNA의 발현 억제와 연관된 결과로 여겨진다. 즉, 민들레로부터 분리한 화합물들은 혈관에 많이 존재하는 LDL의 제거를 위하여 세포내로 LDL receptor의 발현을 증가시키고 이것은 HMG-CoA reductase mRNA의 발현을 감소 시켜 세포내의 cholesterol 함량 정도를 감소시키는 것으로 보인다.

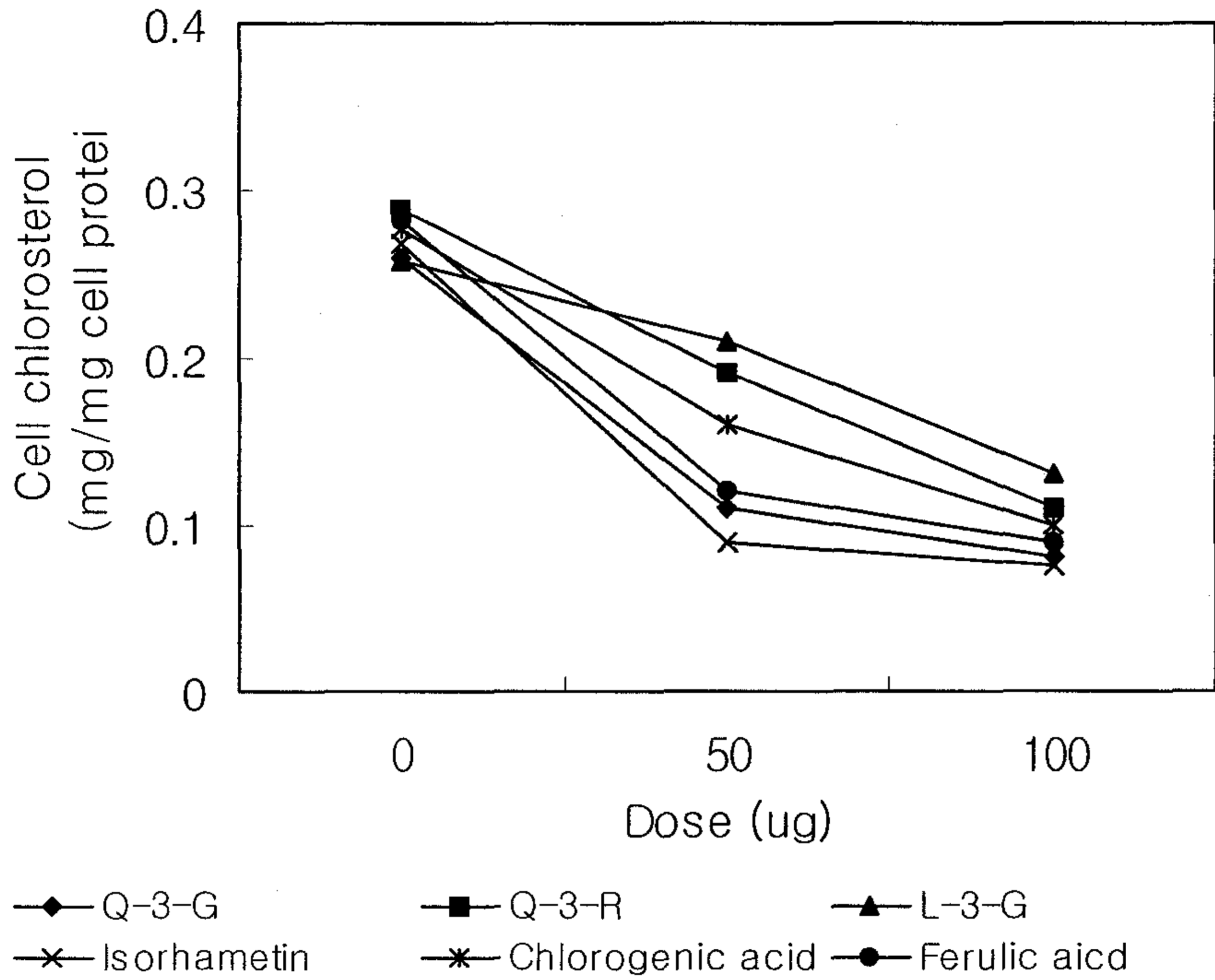


Fig. 5. Dose-dependent effect on intracellular total and free cholesterol concentration.

다. ACAT 저해활성

민들레 잎 및 뿌리 80% EtOH 조추출물 및 용매분획물이 HepG2 human hepatoma cell의 ACAT-1 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 2시간 및 24시간 처리에서 민들레 잎 80% EtOH 조추출물 및 EtOAc 분획에서 ACAT-1 단백질 발현이 강하게 저해되었다. 민들레 뿌리의 경우에는 80% EtOH 조추출물만이 ACAT-1 발현을 다소 억제하는 것으로 나타났다.

민들레 잎과 뿌리에서 분리한 화합물의 경우 luteolin-7-glucoside, Isorhamnetin, ferulic acid에서 ACAT-1 발현억제 활성을 나타내었으며 특히 compound 3은 100µM 2시간처리에서 가장 강한 억제활성을 나타내었다.

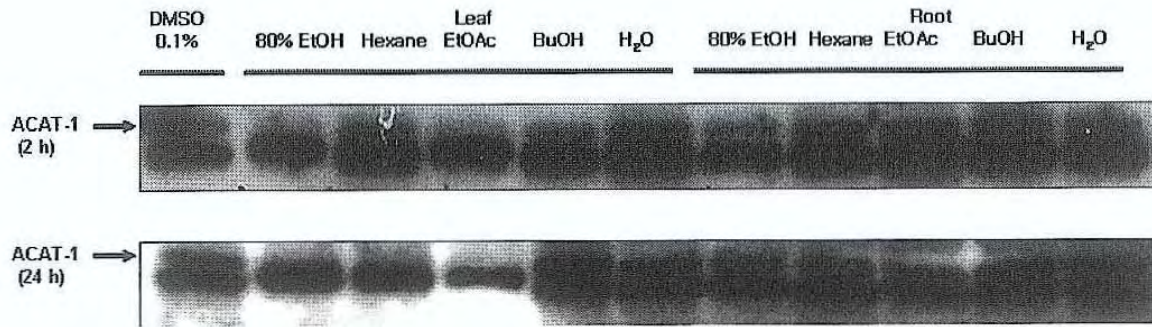


Fig. 6. ACAT-1 protein expression after treatments with solvent fraction from dandelion in HepG2 human hepatoma cells.

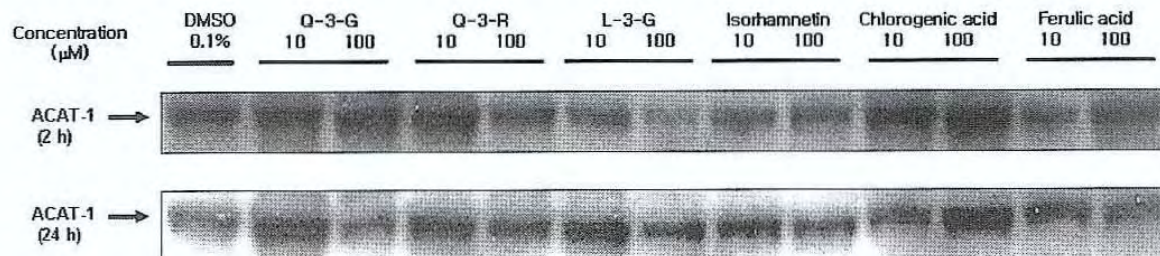


Fig. 7. ACAT-1 protein expression after treatments with compounds isolated from dandelion in HepG2 human hepatoma cells.

나. Human LDL을 이용한 항동맥경화 활성

1) TBARS 측정에 의한 LDL 산화 억제 활성

지질과산화물의 분해산물로 malondialdehyde(MDA)와 4-hydroxynonenal (4-HNE)와 같은 aldehyde가 생성된다. MDA는 amine을 가지는 phosphatidylserine이나 phosphatidylethanol amine과 같은 인지질과 결합하거나, protein의 lysine 잔기와 결합하여 세포막의 변형을 일으킨다. MDA의 측정방법으로 2-thiobarbituric acid를 이용한 TBARS assay가 가장 일반적인 사용된다. 산화된 LDL의 과도한 침착으로 유도된 포말세포는 죽상동맥경화의 초기병변이라고 생각되는 지방반 (fatty streak)이나 섬유판 (fibrous plaque)의 형성을 야기시킬 수 있다. 또한 산화된 LDL은 높은 세포내 화학적 독성을 지님으로서 국소적인 혈관 내피세포와 평활근 세포의 손상을 일으켜 죽상동맥경화의 병변으로 작용할 수 있다. 따라서 초기 단계에서 산화적 손상에 의한 LDL의 산화는 동맥경화의 주된

요인이 되며, 이를 억제하는 것은 동맥경화 예방의 중요한 key-point를 가진다.

LDL을 10 μ M CuSO₄로 산화를 유도하여 생성된 TBARS의 양을 532 nm에서 흡광도를 측정 대조구와 비교하였다. Fig. 8에서 나타난 것과 같이 잎의 경우 10 mg/mL의 농도에서 LDL의 산화억제 활성은 조추출물, 부탄올, 에틸아세테이트, 에테르, 물 분획 순이었다. 이들 분획은 동일 농도의 Trolox보다는 다소 낮은 활성을 보였다. 또한 헥산의 경우 오히려 대조군에 비하여 더 높은 TBARS 값을 나타내어 LDL 저해 활성이 전혀 없는 것으로 나타났는데, 이는 헥산 획분중의 지용성 물질들이 기질로 작용하여 MDA 생성을 유발한 것으로 판단된다. 뿌리의 경우에는 에틸에테르, 에틸아세테이트, 부탄올 분획 순이었으며, 물분획에서는 저해 활성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 뿌리와 잎을 비교하였을 때 LDL산화에 의한 MDA 생성억제는 동일 농도에서 뿌리가 약간 높은 활성을 가지는 것으로 나타났으며, 고농도 처리시에는 시료 자체의 색으로 인한 흡광도의 증가로 측정 오차가 발생하는 것으로 나타났다.

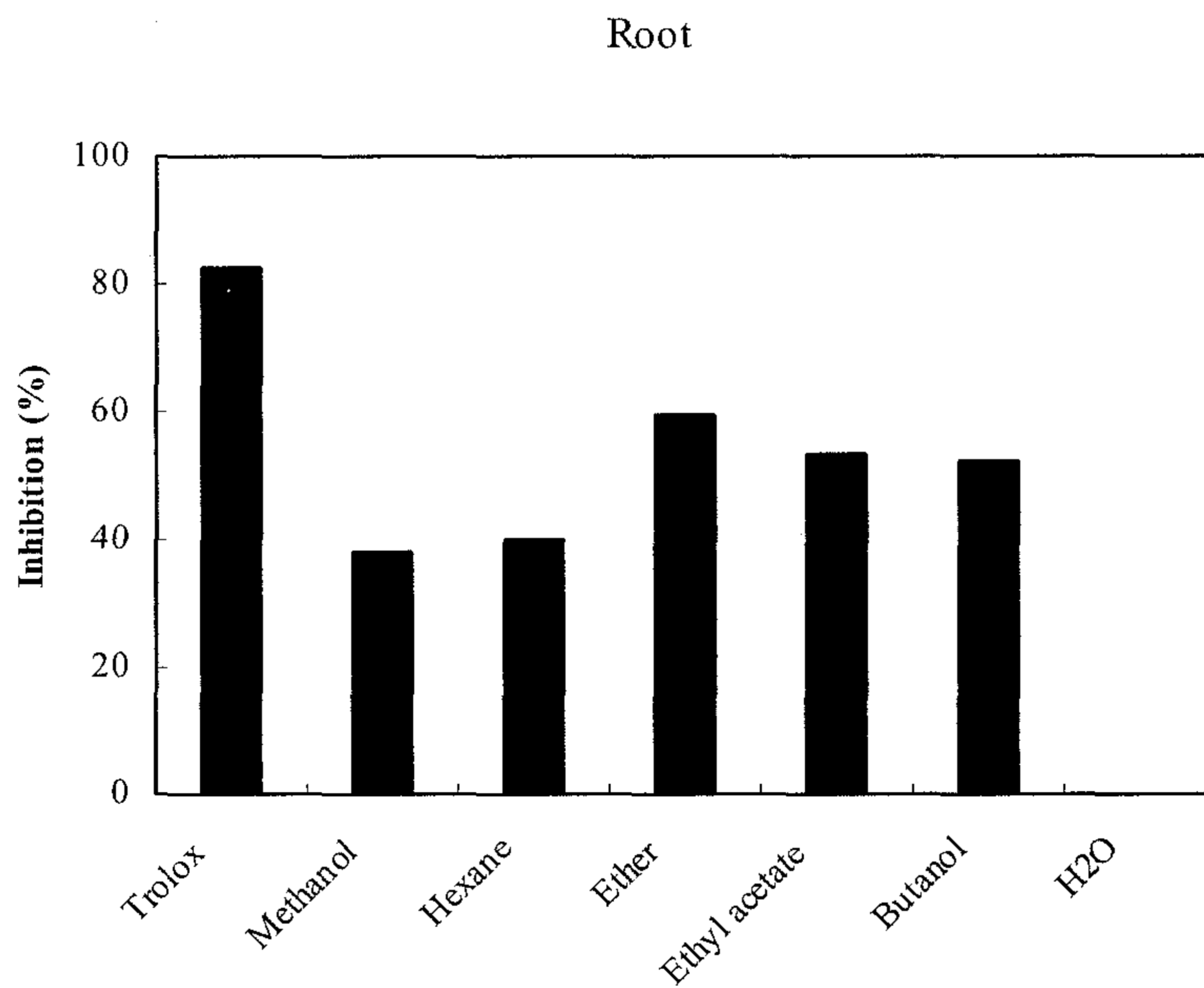
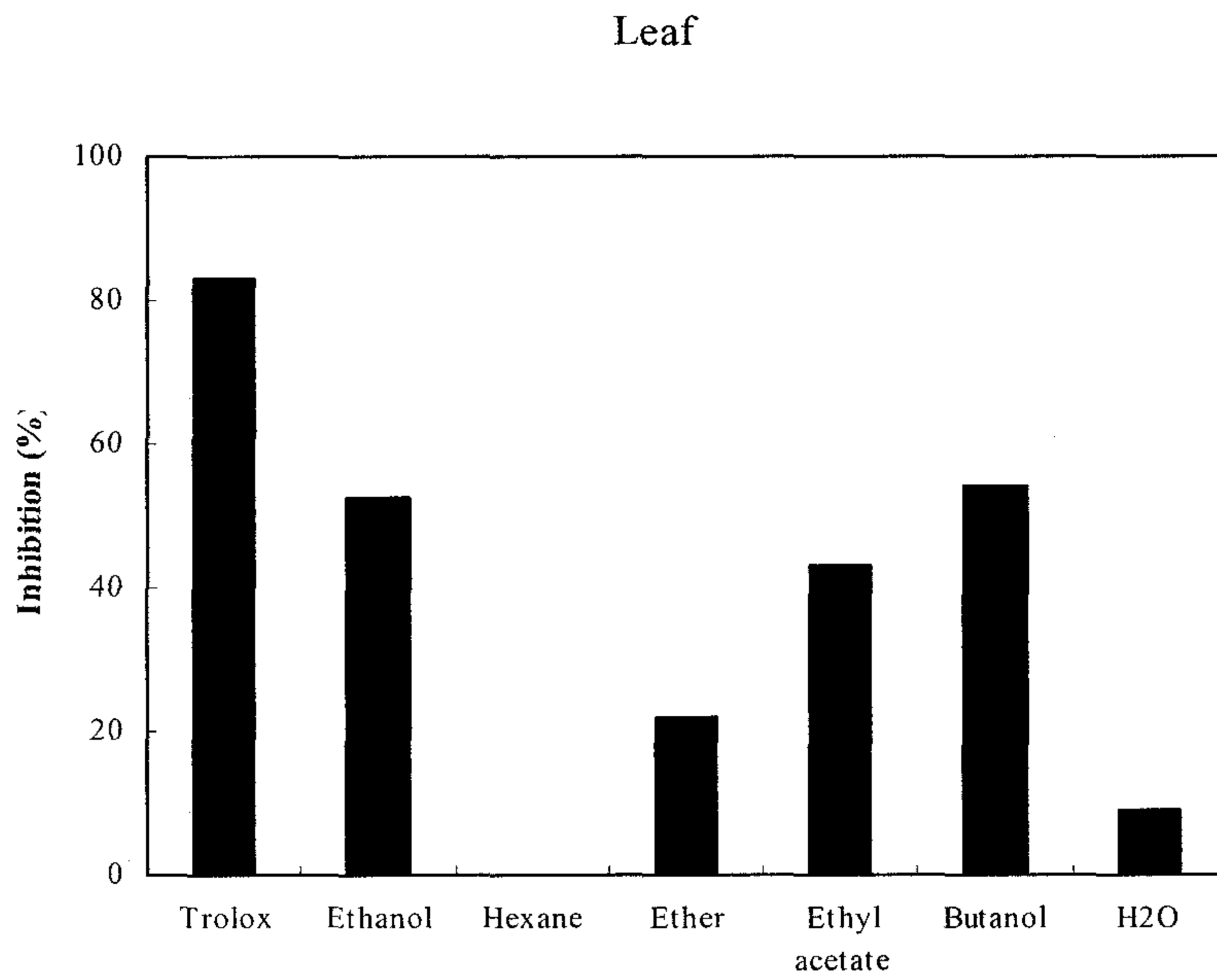


Fig. 8. Inhibitory effect of flavonoid glycosides on the formation of TBARS during CuSO_4 induced peroxidation of LDL.

Table 4. Inhibitory effect of active compounds isolated from dandelion on the formation of TBARS during CuSO₄ induced peroxidation of LDL

	Inhibition of TBARS formation (%)		
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Q-3-G	30.42±1.2	89.98±3.3	91.73±3.1
Q-3-R	24.17±2.0	85.33±2.9	84.23±1.6
L-7-G	33.45±1.1	75.05±2.4	80.32±1.7
Isorhamnetin	7.57±3.4	34.43±1.9	51.23±2.2
Chlorogenic acid	9.43±2.7	29.62±4.5	37.89±3.4
Ferulic acid	9.19±2.5	40.34±3.8	55.07±1.6
Trolox	15.69±1.8	77.65±2.7	96.87±3.2

Q-3-G; quercetin-3-glucoside, Q-3-R; quercetin-3-rhamnoside, L-7-G; luteolin-7-glucoside

2) Conjugated diene 측정에 의한 LDL 산화 억제 활성

LDL의 산화 과정 중 초기 단계는 불포화지방산을 함유한 인지질과 콜레스테롤 에스테르의 과산화이다. 먼저 불포화지방산의 수소가 이탈되고, 재배열되어 conjugated diene을 형성한다. 생성된 conjugated diene은 산소에 의해 peroxy radical을 거쳐 lipid peroxide를 생성한다.

CuSO₄로 LDL의 산화를 유도하면서 경시적으로 conjugated diene의 생성을 234 nm에서 흡광도의 증가를 관찰한 결과는 Fig. 9와 같다. 대조구의 경우 배양 초기부터 1시간 동안 급격한 흡광도의 증가를 보였다. 반면 민들레 추출물 첨가에 의하여 초기 산화 시간을 연장할 수 있는 lag phase의 기간이 길어지고 최종적으로 conjugated diene의 생성도 억제하는 것으로 나타났다.

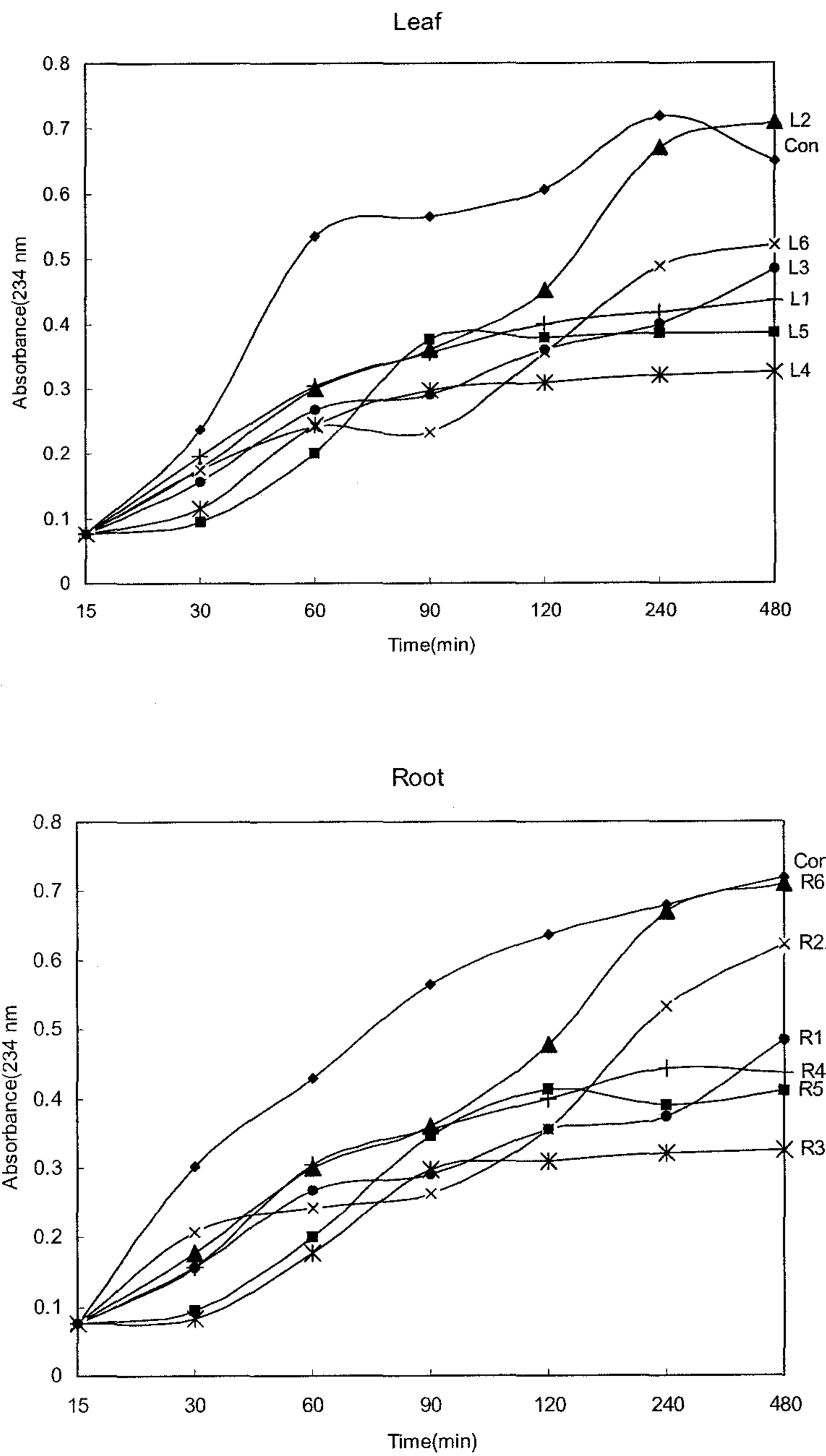


Fig. 9. Inhibitory effects of conjugated diene formation on the CuSO_4 induced LDL peroxidation.

민들레 잎과 뿌리로부터 분리한 6종의 페놀화합물에 대한 LDL 산화시 conjugated diene 생성 억제 활성을 조사한 결과는 Fig. 10과 같다. 대조군의 흡광도가 0.6에 비하여 가장 높은 저해활성을 보인 quercetin-3-glucoside는 0.3 부근으로 약 50%의 저해활성을 보였다. 분리한 화합물의 conjugated diene 생성 억제활성은 quercetin-3-glucoside, luteolin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, ferulic acid, isorhamnetin, chlorogenic acid 순이었다.

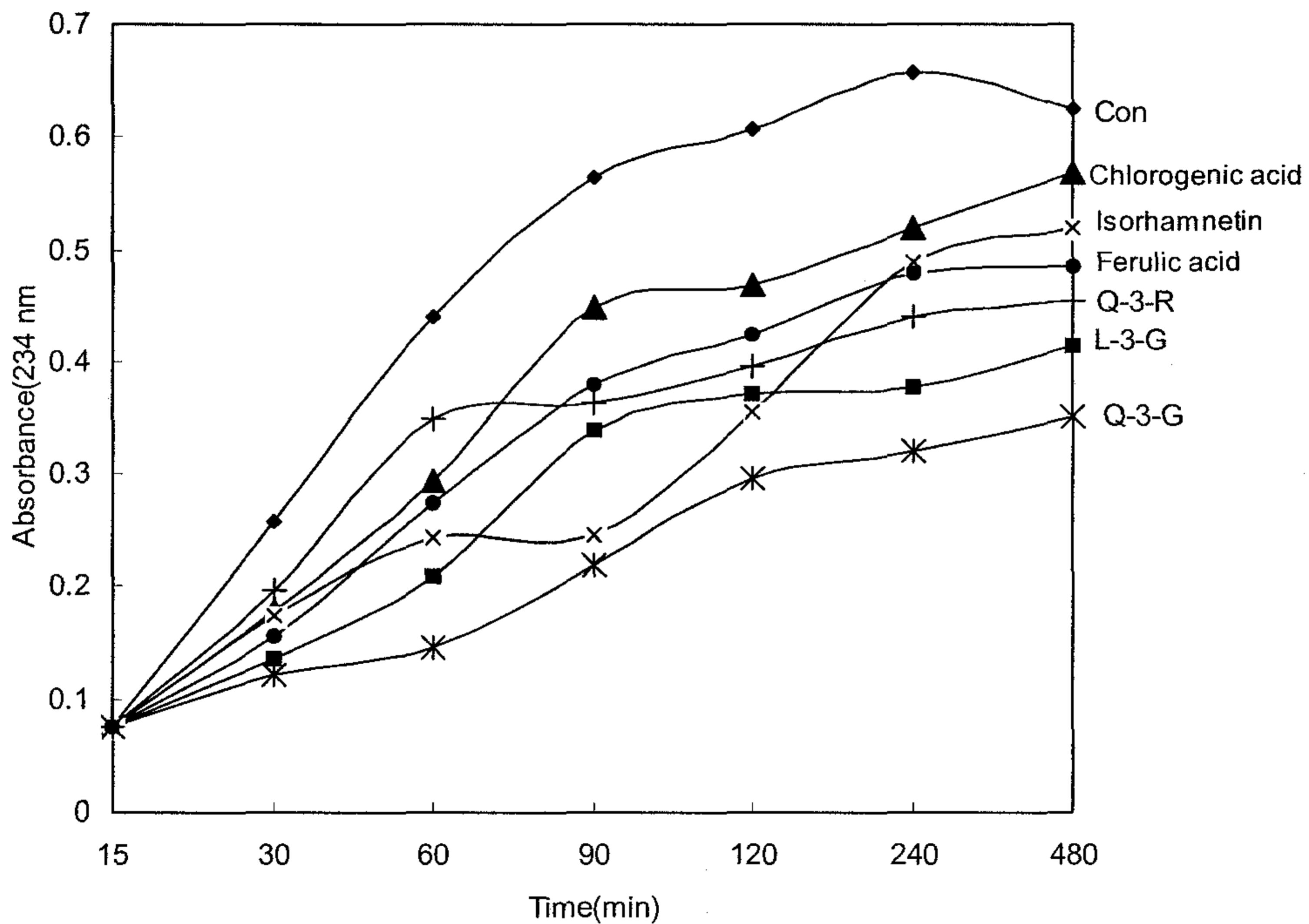


Fig. 10. Inhibitory effects of active compounds isolated from dandelion on the conjugated diene formation CuSO_4 induced LDL peroxidation.

Q-3-G; quercetin-3-glucoside, Q-3-R; quercetin-3-rhamnoside, L-7-G; luteolin-7-glucoside.

4) SDS-PAGE

LDL의 산화에 따른 단백질의 분해 정도를 관찰하기 위하여 LDL을 CuSO_4 로 산화를 유도한 후 10% SDS-PAGE에 전개 시킨 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. Lipoprotein을 구성하고 있는 apolipoprotein은 여러 종류가 있는데 이 중 apolipoprotein A-I, A-II, C, E 등은 수용성 저분자의 단백질로 아미노산의 sequence와 지질 결합부위가 이미 알려져 있다. 그러나 apolipoprotein B (apo B)는 불용성의 거대분자로 아직 정확한 1차 구조가 밝혀지지 않았다. Apo B는 chylomicron의 22%, LDL의 98%, VLDL의 37%로 LDL의 apolipoprotein은 대부분이 apo B로 이루어져 있다.

Fig. 11은 민들레로부터 분리한 페놀화합물과 LDL을 37°C 에서 4시간 반응 후 SDS-PAGE에 전개시킨 후 단백질의 분해를 관찰한 결과이다. 그림에서 N은 native LDL의 밴드로 apo B 단백질의 분해가 거의 일어나지 않았고, control의 경우 LDL이 거의 분해가 이루어져 tailing 만이 관찰되었다. 시료첨가에 의하여 native LDL에 비해서는 단백질의 분해가 다소 관찰되지만 대조구에 비해서는 다소 짧은 tailing을 보여 시료 첨가에 의해 LDL의 apo B 100 단백질의 분해를 어느 정도 억제한 것을 알 수 있다. 분리한 화합물 중 민들레 잎으로부터 분리한 quercetin-3-glucoside와 luteolin-7-glucoside가 가장 뚜렷한 밴드를 보여 LDL 산화에 의한 단백질 분해를 가장 잘 억제한 것으로 나타났으며, 뿌리에서 분리한 isorhamnetin, chlorogenic acid, ferulic acid의 경우 대조군에 비해서는 밴드의 형성이 잘 유지하였으나, native LDL에 비해서는 밴드의 뚜렷한 감소가 관찰되어 강한 억제 활성을 보이지는 않는 것으로 나타났다. 산화 LDL은 negative charge가 증가되므로 agarose gel 상에서 이동도가 LDL 산화의 지표가 되며, SDS-PAGE 상에서 apo B 100 분해에 의한 small-size의 LDL은 동맥경화 유발과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

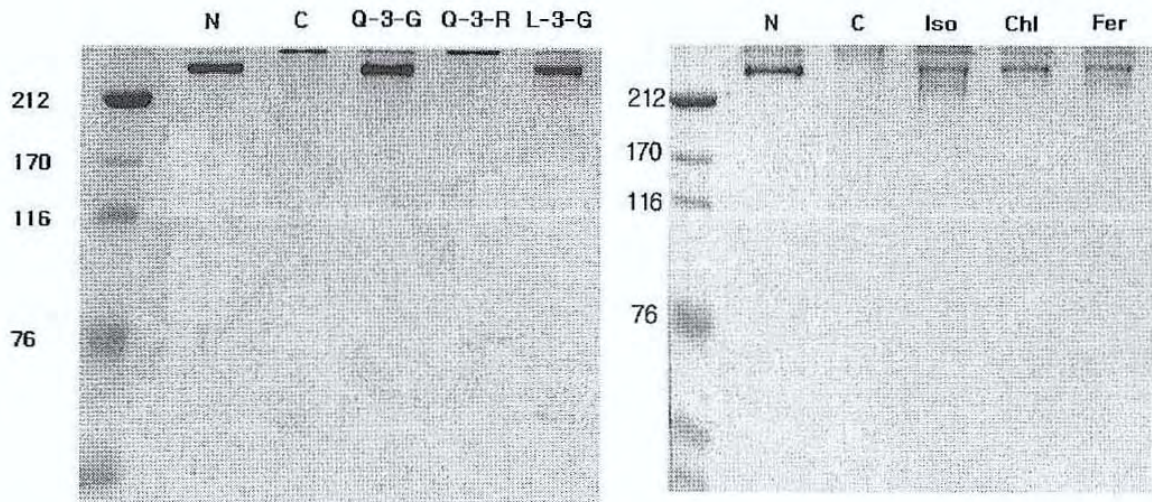


Fig. 11. Inhibition of CuSO_4 induced apo B fragmentation by active compounds isolated from dandelion N; native LDL(without any addition), lane C; control, lane Q-3-G; quercetin-3-glucoside, lane Q-3-R; quercetin-3-rhamnoside, lane L-7-G; luteolin-7-glucoside, lane Iso; Isorhamnetin, lane Chl; chlorogenic acid, lane Fer; ferulic acid
Electrophoresis was carried out on a 10% SDS-polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

다. 토기모델을 이용한 항동맥경화 활성화

1) 실험동물의 체중변화와 간무게 측정

Table 5와과 Fig. 12는 4주간의 사육기간 동안 실험동물의 체중변화량과 부검 후 간의 무게 변화를 측정된 결과이다. 체중변화량 측정 결과 2.36~2.46 kg으로 각 군별로 유의성은 나타내지 않았다. 부검 후 간의 무게 측정결과 일반식이군 (Normal)의 경우 65 g 정도인데 비하여 실험군(콜레스테롤 급여군, 콜레스테롤 + 민들레 잎 급여군, 콜레스테롤 + 민들레 뿌리 급여군)의 경우 100~110 g으로 간 무게가 유의적으로 증가하였다. 그러나 콜레스테롤 투여군과 민들레 투여군 간의 유의적인 차이는 없었다.

Table 5. Effect of dandelion on rabbit weight gain

Group	Body weight gain (kg/4 week)
Normal	2.451 ± 0.061
Control	2.467 ± 0.067
Dandelion leaf	2.430 ± 0.198
Dandelion root	2.368 ± 0.081

1) Normal: Normal diet, Control: High cholesterol diet, Dandelion Leaf: High Cholesterol + Dandelion Leaf, Dandelion Root: High cholesterol + Dandelion Root

2) Mean ± S.D.

3) Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

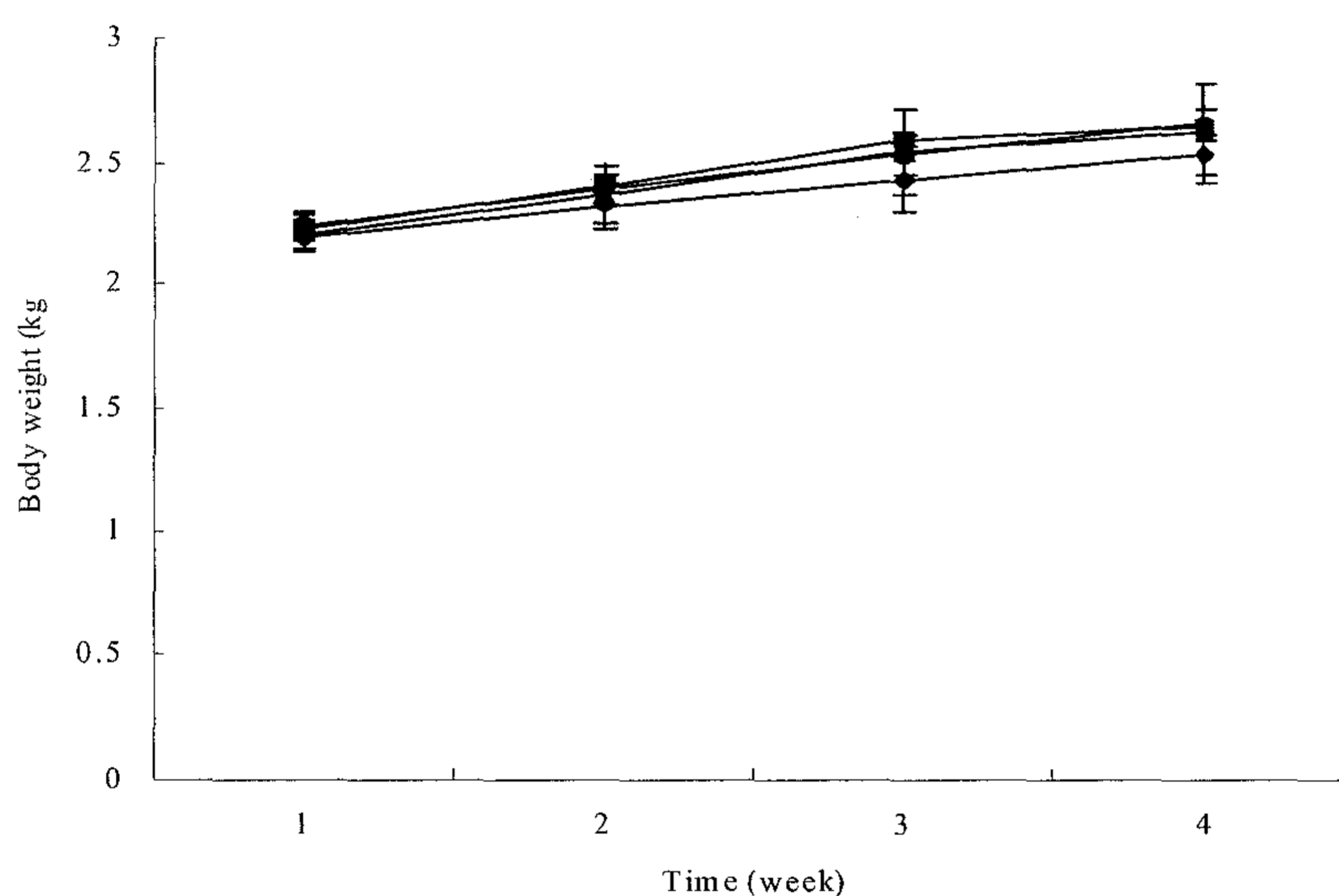


Fig. 12. The change of rabbit's weight for experimental period

(-●-: Normal diet, -■-: High cholesterol diet, -▲-: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, -◆-: High cholesterol + Dandelion Root diet)

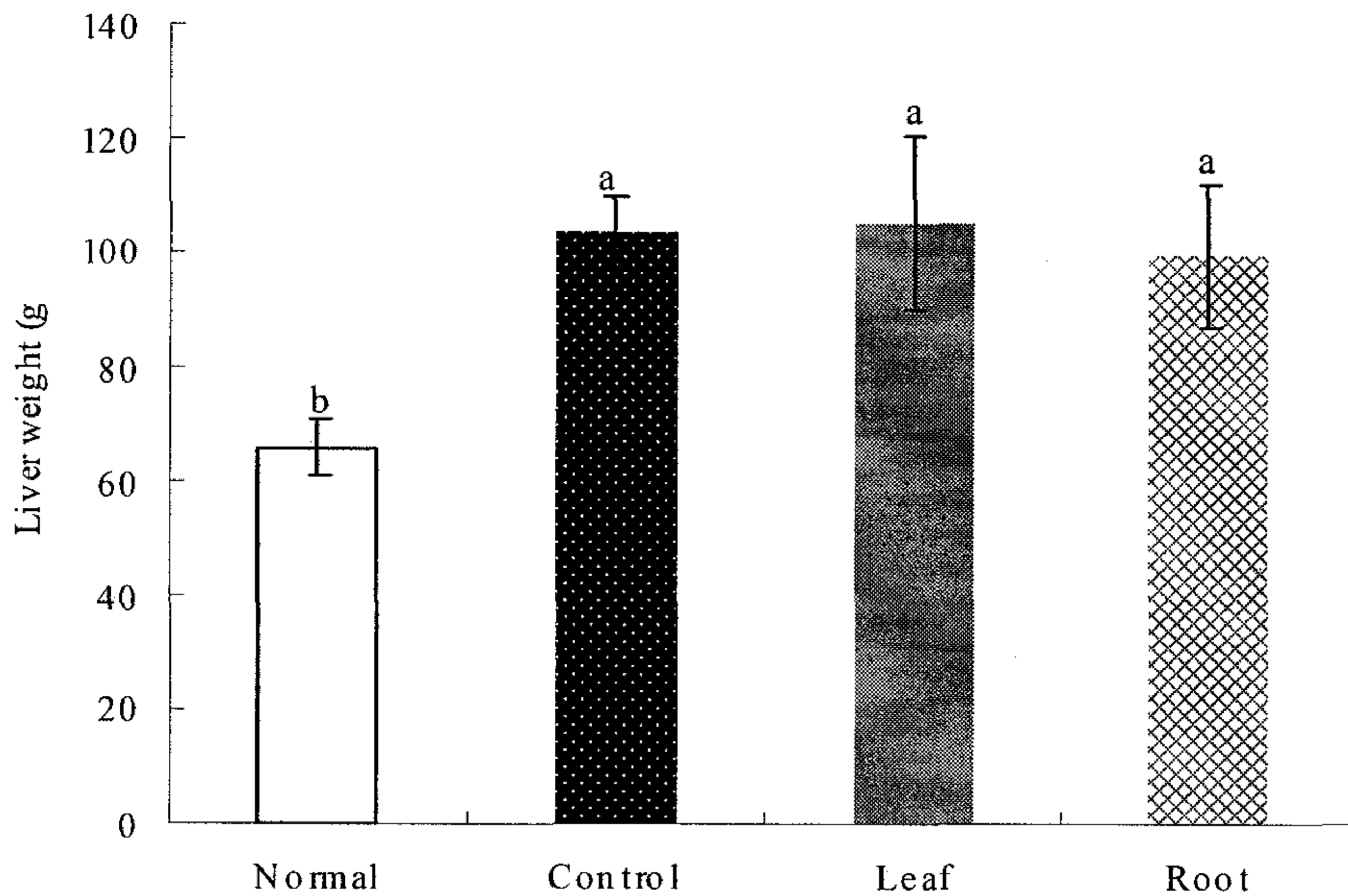


Fig. 13. Effect of dandelion on liver weight of rabbit (n=6 per/group).

(Normal: Normal diet, Control: High cholesterol diet, Leaf: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, Root: High cholesterol + Dandelion Root diet)

Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $p > 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) 혈중 지질농도

민들레 잎과 뿌리가 고 콜레스테롤 혈증 토끼의 혈중 지질 패턴에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 6, 7과 Fig. 14와 같다. AST (Alanine Aminotranferase), ALT (Aasparate Aminotransferase)의 경우 유의적인 차이가 없었고 ($p > 0.05$), CK (Creatine Kinase)의 측정 결과 대조군 (Control)에서 실험군 (Dandelion Leaf, Root)에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. ($p > 0.05$)

혈중 Cholesterol 및 Triglyceride, HDL cholesterol, LDL cholesterol, phospholip의 측정 결과 대조군 (Control)에서 실험군 (Dandelion Leaf, Root)에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. ($p > 0.05$). 전반적으로 일반식이군 (Normal)의 AST, ALT, CK, 혈중 Cholesterol 및 Triglyceride, HDL cholesterol, LDL cholesterol,

phospholip 함량이 가장 낮았고, 실험군 (Dandelion Leaf, Root)은 대조군 (Control)과 유의적으로 차이를 나타내지 않았다 ($p>0.05$).

Table 6. Serum concentration of AST, ALT, CK of different experimental groups

parameter	Group/diet			
	Normal	Control	Leaf	Root
AST (U/L)	27.75 ± 3.304	30.75 ± 4.573	32.75 ± 3.096	38.0 ± 3.266
ALT (U/L)	39.25 ± 4.113	51 ± 4.690	53.75 ± 2.754	49.25 ± 8.016
CK (U/L)	534.75 ± 179.32	802 ± 158.45	1823.5 ± 813.66	1775.3 ± 512.66

1) Normal: Normal diet, Control: High cholesterol diet, Leaf: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, Root: High cholesterol + Dandelion Root diet

2) Mean ± S.D.

Table 7. Serum concentration of TC, HDL-C, LDL-C, TG, Phospholipid of different experimental groups

parameter	Group/diet			
	Normal	Control	Leaf	Root
TC (ml/dl)	60.75 ± 4.27	11134.5 ± 180.1	1328.75 ± 56.15	1337.75 ± 36.92
HDL-C (ml/dl)	25.25 ± 0.96	20.5 ± 2.65	20.75 ± 4.99	15.25 ± 2.99
LDL-C (ml/dl)	19 ± 2.94	370 ± 96.17	485.25 ± 47.83	637 ± 19.17
TG (ml/dl)	37 ± 7.07	88.25 ± 33.70	88 ± 19.20	97.75 ± 9.47
Phospholipid (ml/dl)	85.75 ± 2.06	419.5 ± 48.39	498.75 ± 22.13	573 ± 45.07

1) Normal: Normal diet, Control: High cholesterol diet, Leaf: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, Root: High cholesterol + Dandelion Root diet

2) Mean ± S.D.

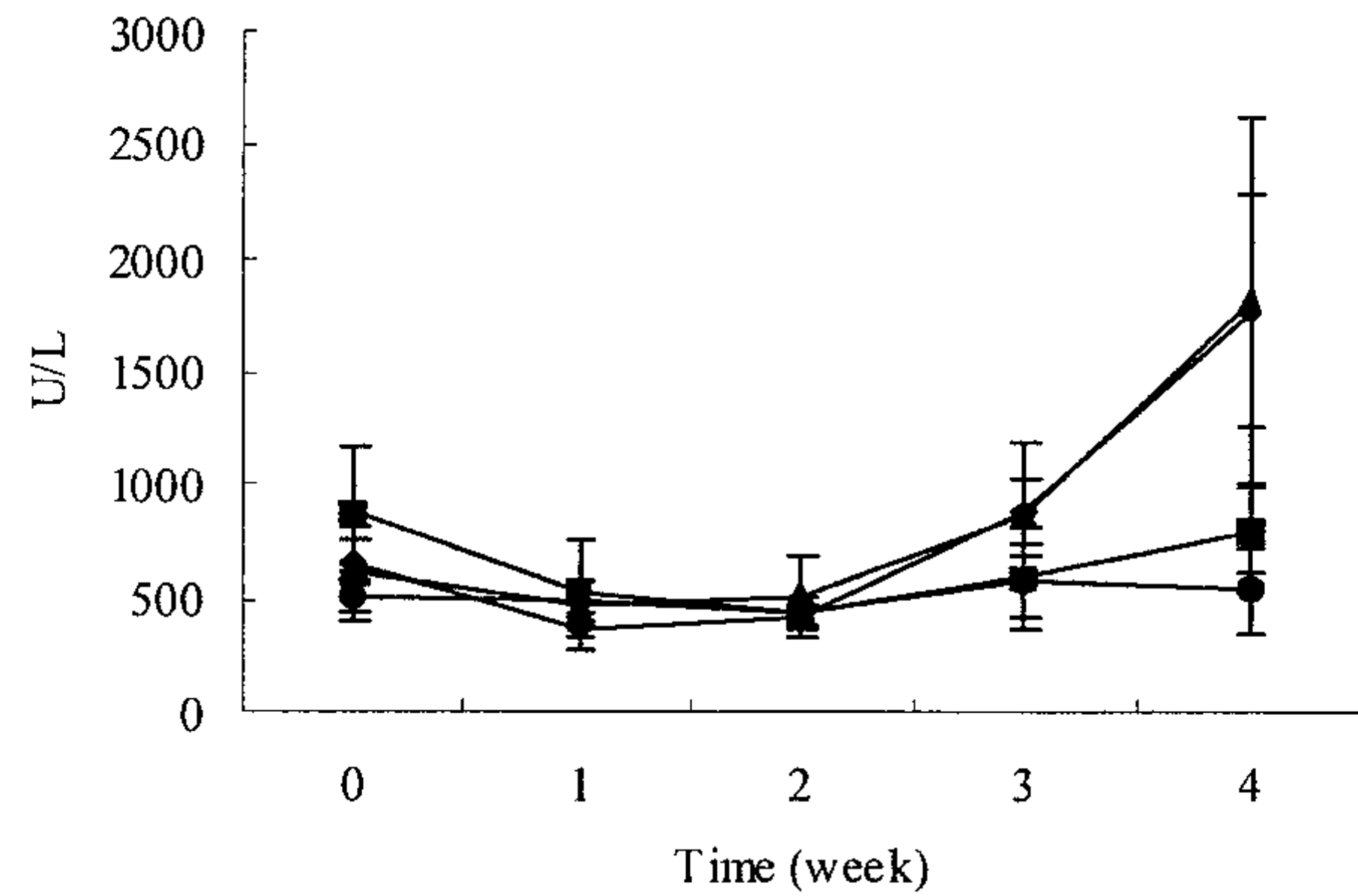
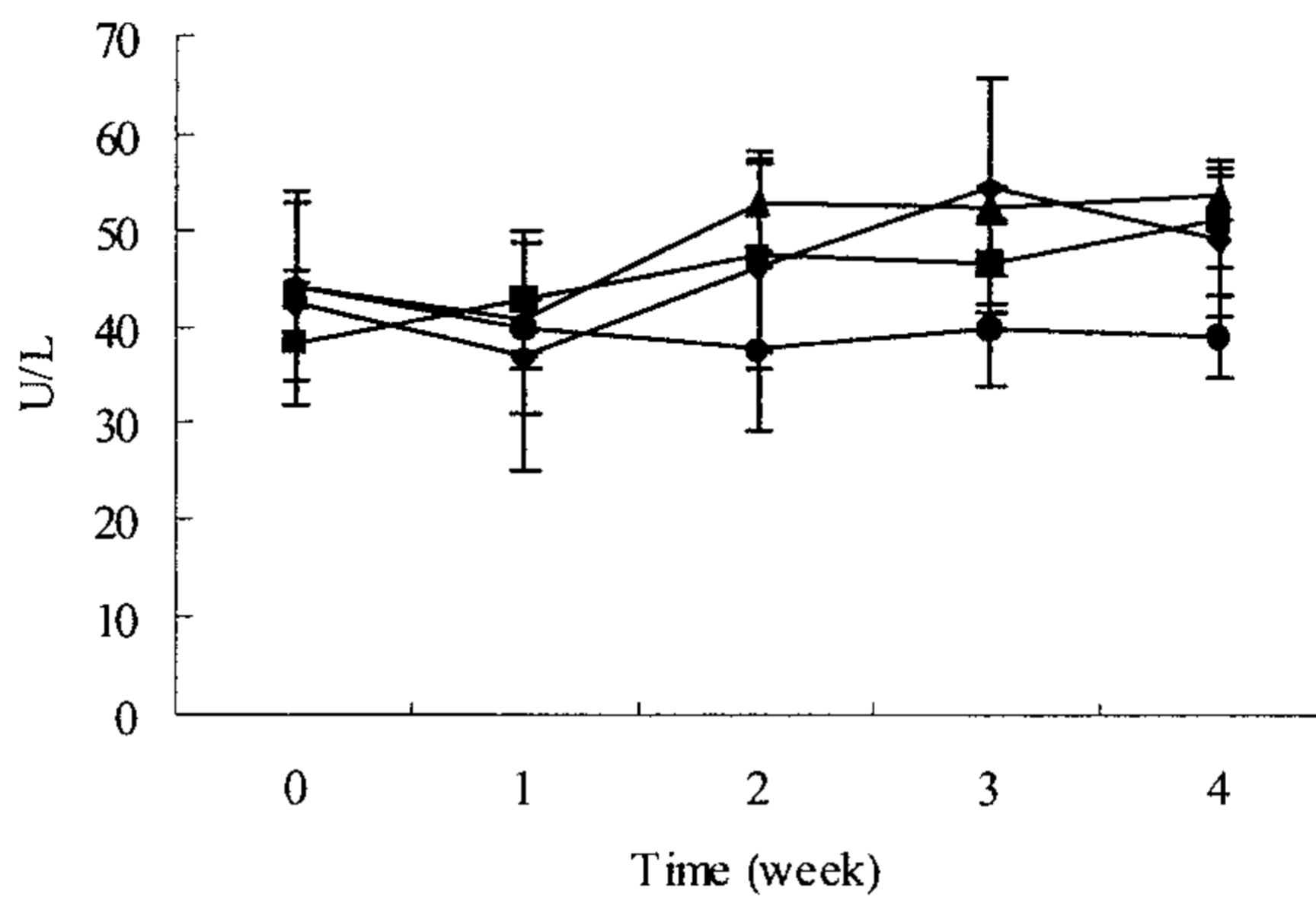
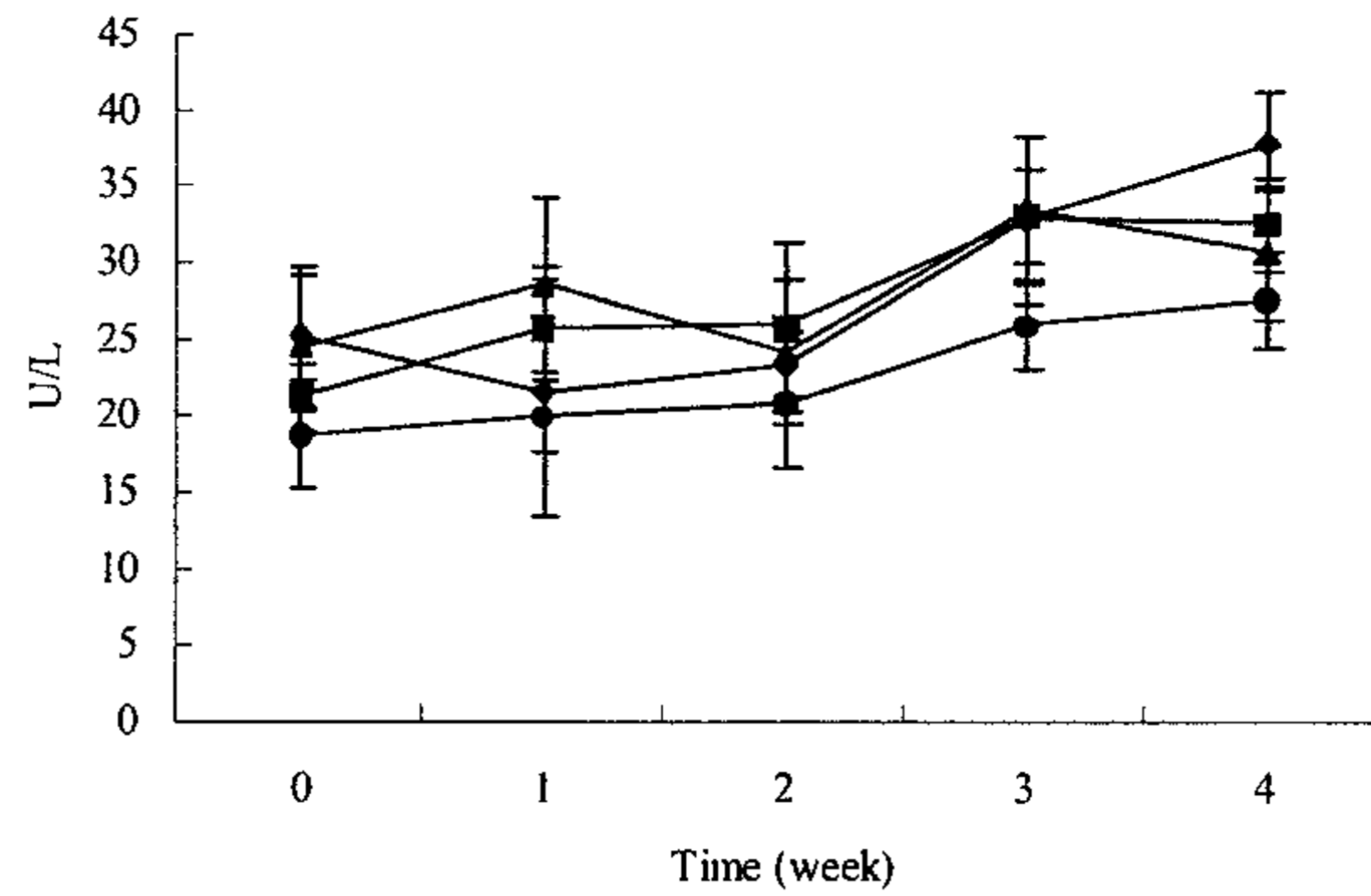


Fig. 14. Serum concentration of AST, ALT, CK of different experimental groups.

(-●-: Normal diet, -■-: High cholesterol diet, -▲-: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, -◆-: High cholesterol + Dandelion Root diet)

3) 간조직의 항산화 관련 효소 활성

Table 8과 Fig. 15, 16에는 간조직의 항산화 효소 활성을 나타내었다. 체내 항산화 기능 물질인 glutathione 함량 (GSH)은 대조군 (Control)에 비해 실험군 (Dandelion Leaf, Root)의 경우 유의적으로 높은 함량을 나타내었으며, 일반식이군 (Normal)과는 유의적으로 차이가 없었다 ($p>0.05$).

Superoxide Dismutase (SOD) 활성도 역시 glutathione 함량과 유사한 경향을 나타내었는데, 실험군이 대조군에 비해 각각 0.568, 0.62 Unit/mg protein으로 그 활성이 높은 것으로 나타나 초기에 생성되는 superoxide anion radical을 효과적으로 제거한 결과로 보여졌다. Glutathione Peroxidase (GPx)와 Catalase (CAT)의 경우 둘이 유사한 활성을 나타내었는데, 대조군에 비해 실험군의 경우 유의적으로 높은 활성을 나타내었다 ($p>0.05$). 특히 민들레 뿌리의 경우 민들레 잎을 투여한 군보다 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타내었다.

실험군에서 대조군에 비해 Thiobarbituric acid substance (TBARS)의 함량이 유의적으로 낮은 것 ($p>0.05$)으로 나타나 free radical 소거활성과의 관련성을 설명해 줄 수 있다.

TBARS 함량 역시 민들레 뿌리를 투여한 군에서 일반식이군과 차이가 없을 정도의 측정결과가 나와 앞으로의 민들레 뿌리 내의 항산화 물질에 대한 높은 기대를 보여주었다.

Table 8. Effect of dandelion on the activities of antioxidant enzymes enzymes in liver tissue of rabbits fed a each experimental diet

parameter	Group/diet			
	Normal	Control	Leaf	Root
GST (Unit/ml protein)	0.66 ^a ± 0.093	0.35 ^c ± 0.145	0.483 ^b ± 0.129	0.5 ^{ab} ± 0.025
GPx (Unit/ml protein)	97.88 ^a ± 8.456	54.54 ^d ± 3.884	74.75 ^c ± 5.026	86.51 ^b ± 5.639
CAT (Unit/ml protein)	9.238 ^a ± 0.074	1.178 ^d ± 0.329	3.863 ^c ± 0.240	5.854 ^b ± 0.179
SOD (Unit/ml protein)	0.65 ^a ± 0.015	0.395 ^b ± 0.084	0.568 ^a ± 0.033	0.62 ^a ± 0.014
GSH (mg/g liver)	5.145 ^a ± 0.269	3.527 ^b ± 0.085	4.766 ^a ± 0.223	4.842 ^a ± 0.458
TBARS (µm/mg protein)	0.602 ^b ± 0.018	0.699 ^a ± 0.032	0.679 ^a ± 0.011	0.608 ^b ± 0.018

1) Normal: Normal diet, Control: High cholesterol diet, Leaf: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, Root: High cholesterol + Dandelion Root diet

2) Mean ± S.D.

3) Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

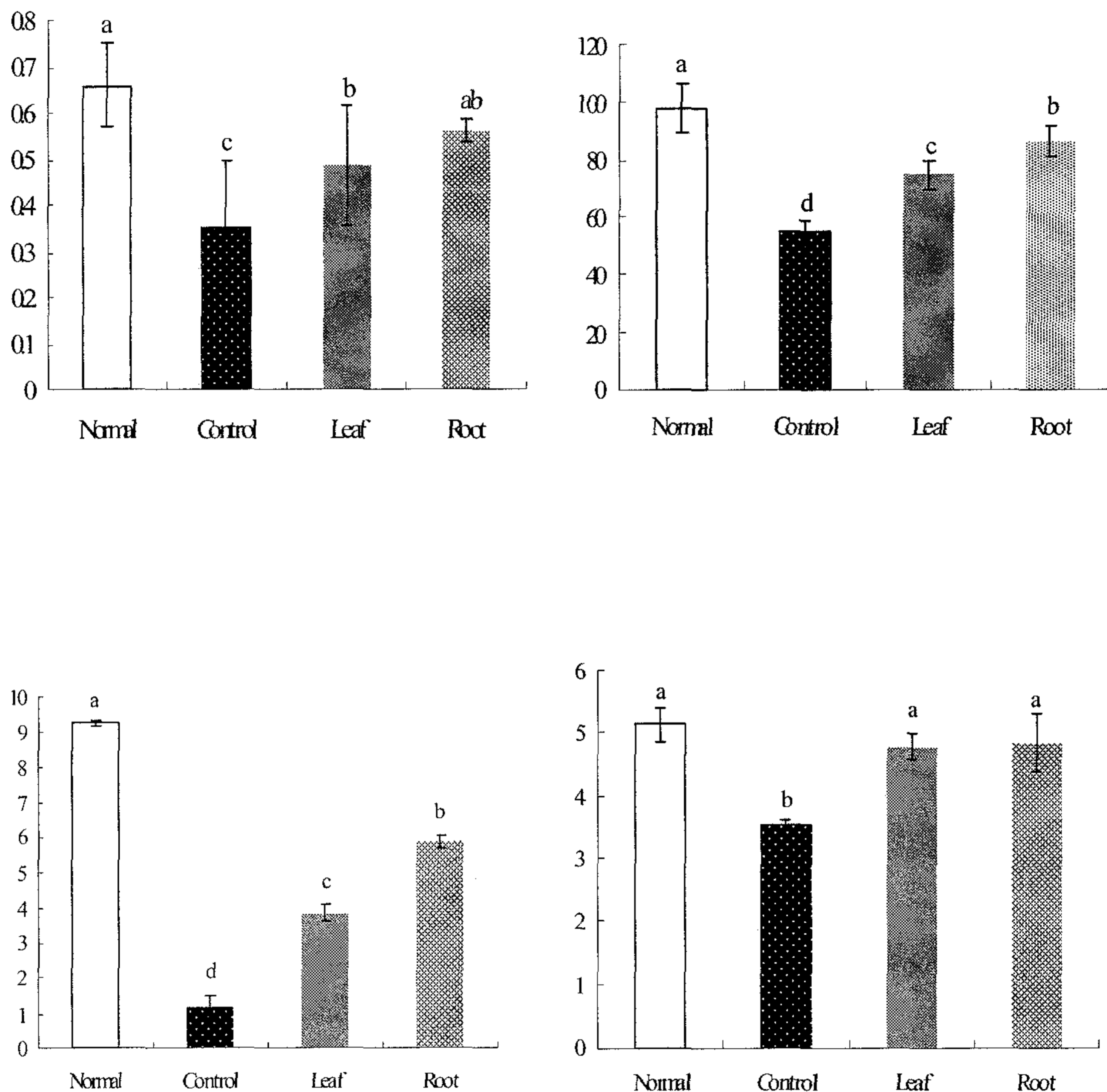


Fig. 15. GST, GPx, CAT, SOD, GSH content in liver tissue of rabbits fed a each experimental diet (n=6 per/group).

(Normal: Normal diet, Control: High cholesterol diet, Leaf: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, Root: High cholesterol + Dandelion Root diet)

Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $p > 0.05$ by Duncan's multiple range test.

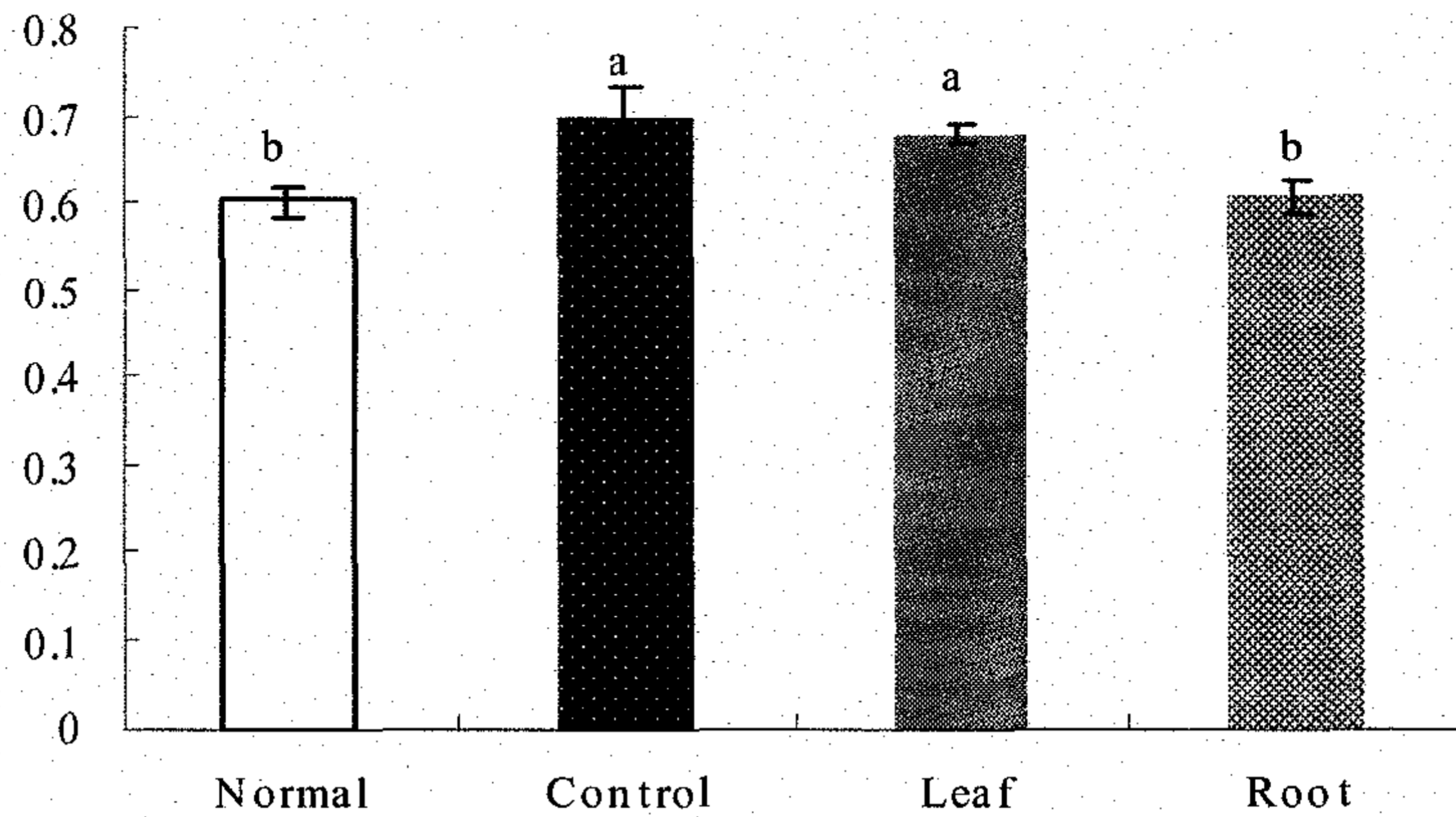


Fig. 16. TBARS level in liver tissue of rabbits fed a each experimental diet (n=6 per/group).

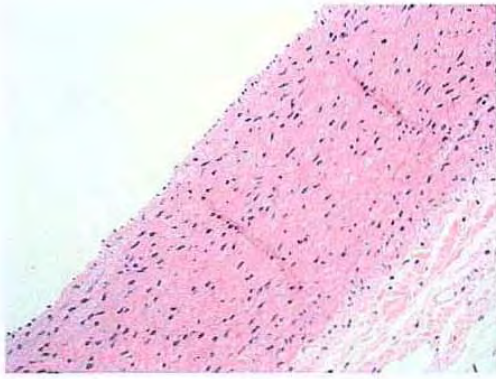
(Normal: Normal diet, Control: High cholesterol diet, Leaf: High cholesterol + Dandelion Leaf diet, Root: High cholesterol + Dandelion Root diet)

Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $p > 0.05$ by Duncan's multiple range test.

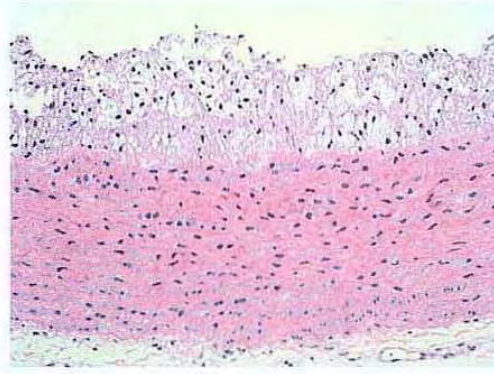
4) 심장대동맥의 현미경학적 관찰

식이성 콜레스테롤에 민감한 동물은 토끼와 다양한 조류이며 상대적으로 저항력이 있는 동물은 개와 고양이, 그리고 랫드 라고 알려져 있다. 많은 연구결과에서 밝혀진 바에 의하면 동맥경화증의 발병기전은 죽상판 (atheromatous plaque) 형성에 의한 것으로 lipoprotein과 같은 거대분자의 투과성 증대, 평활근세포의 유주와 분열증식, 증식된 평활근세포에서 과량의 collagen, elastin, glycosaminoglycan 분비, 내피세포에 의한 지질탐식 작용 및 칼슘침착 등에 의해 일어난다.

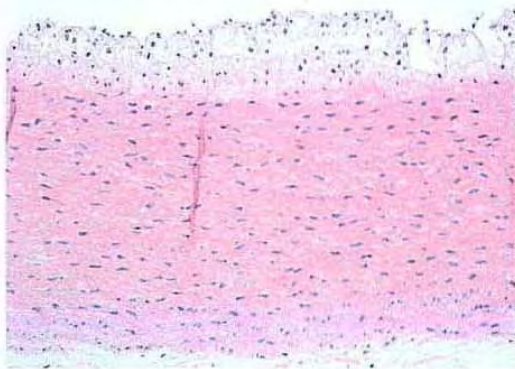
Fig. 17에서와 같이 시험물질에 의한 대동맥의 병리조직학적 검사 및 평가결과, 대동맥에서 대조군 (Control)에 비해 민들레의 잎과 뿌리를 투여한 실험군에서 죽상판 형성과 중막 두께에 있어서 현저한 감소를 보여 민들레 잎과 뿌리 급여에 의한 실험동물인 토끼의 동맥경화 억제효과를 관찰할 수 있었다.



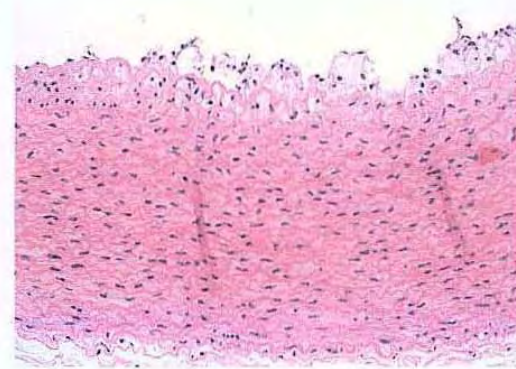
N



C



L



R

Figure 17. Histopathological finding of an aorta from the rabbit (Magnification x 200, stained with hematoxylin-eosin)

N: normal group, C: cholesterol fed group, L: dandelion leaf fed group, R: dandelion root fed group.

제 4절 민들레를 이용한 가공제품 개발

1. 재료 및 방법

가. 민들레 꽃차 제조

1) 실험재료

민들레 꽃잎차 제조용 꽃은 4월 초순 민들레의 개화 시점을 기준으로 개화 후 1주일 이내의 꽃잎을 채취하여 세척하여 이물을 제거한 후 실험재료로 사용하였다.

2) 민들레 꽃차 제조

채취한 민들레의 형태를 유지하기 위하여 저온건조(15℃), 동결건조, CO₂ 처리 후 저온건조(15℃)하여 제품의 형태를 비교하였으며, 품질 특성으로 열수추출물의 색도, 투과도 및 관능평가를 행하였다. CO₂ 처리는 PE 포장을 이용하여 30분간 처리하였다.

3) 색도, 탁도 및 투과도

색도는 색차계(Color difference meter, Color Quest II HunterLab, USA)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 측정하고 색의 변화를 조사하였다. 투과도는 분광흡광도계(DU0650, Beckman)를 이용하여 650 nm에서, 탁도는 600 nm에서 측정하였다.

4) 관능평가

패널 20명을 대상으로 민들레 꽃차의 맛, 향, 색과 종합적 기호도 4가지 항목에 대하여 9점 척도의 관능검사를 실시하였다. 이 때 아주 좋다를 9점으로, 보통이다 5점, 아주 나쁘다를 1점으로 하였다.

나. 커피대용 뿌리차 제조

1) 민들레 뿌리의 볶음조건 설정

민들레 뿌리의 적정 볶음 온도와 시간을 결정하기 위하여 Table 1과 같이 150, 190, 230℃에서 볶음 시간은 각각 1, 3, 5분으로 하였다.

Table 1. Roasting conditions of dandelion leaf and root

Sample	Roasting conditions	
	Roasting temperature(°C)	Roasting time (min)
1	150	1
2	150	3
3	150	5
4	190	1
5	190	3
6	190	5
7	230	1
8	230	3
9	230	5

2) 색 도

민들레 뿌리의 용매별 추출물들의 색도는 색차계(Color difference meter, Color Quest II HunterLab, USA)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 측정하고 색의 변화를 조사하였다. 이때 사용된 표준백색판의 명도, 적색도, 황색도는 각각 92.68, 0.81, 0.86이었다.

3) 투과도(%T)와 pH

민들레 뿌리의 용매별 추출물들을 잎은 1 °brix, 뿌리는 2 °brix로 동일농도로 조정된 후 10,000 g에서 10분간 원심분리 시켰다. pH는 pH meter(Orion SA520, USA)로 측정하였고, 투과도는 분광흡광도계(DU0650, Beckman)를 이용하여 650 nm에서 측정하였다.

4) 유리당 분석

민들레 뿌리의 용매별 추출물들을 잎은 1 °brix, 뿌리는 2 °brix의 동일농도로 조정된 뒤 0.25 μm 필터로 여과시켜 HPLC를 사용하여 유리당 함량 및 조성을 분석하였다. 컬럼은 carbohydrate analysis column(300 × 3.9 mm i.d, Waters,

USA), 용매는 80% acetonitrile, 용매의 이동속도는 1.5 mL/min, 검출기는 RI, 온도는 20°C, 유리당 표준 시료는 프럭토스(fructose), 슈크로스(sucrose), 글루코스(glucose)를 사용하였다.

5) 민들레 뿌리 추출물의 SD 분말 조건 설정

민들레 뿌리추출물을 50°C에서 감압농축하여 가용성고형분 함량을 65 °brix로 조절한 다음 분무건조 시료로 사용하였다. 사용된 부형제로는 프락토올리고당(FO: 50%이상, sun-oligo P3)는 (주)삼양제넥스, 사이클로덱스트린(CD: 18%이상, cydex-S)과 말토덱스트린(MD: D.E. 1420이상)은 (주)대상, 아라비아검(AG: IRX 50924, Rouen cedex-France)은 (주)유창케미칼의 제품을 사용하였다.

민들레 뿌리 엑기스의 분말화에 사용된 분무건조기는 디스크형의 분무건조기(L-8, Okawara Kokohki, Japan)를 사용하였고(그림 1) 분무조건은 주입 온도는 140°C, 이때의 배출 온도는 95°C였으며 분무속도는 20 mL/min로 하여 분말 건조 하였다.

민들레 뿌리 엑기스와 부형제들간의 배합비, 분무건조조건은 Table 2와 같고 각각의 배합비에 따른 엑기스와 부형제간의 배합순서는 먼저 민들레 엑기스와 증류수를 섞은 후 사이클로덱스트린을 넣고 2시간 동안 교반시킨다. 2시간 교반되는 동안 민들레의 향은 사이클로덱스트린의 내부에 포집되어 분무건조시 민들레의 향이 손실되는 것을 방지한다. 그 후 말토덱스트린, 프락토올리고당 및 아라비아검을 순서대로 서서히 넣은 후 균질화하여 분무건조 시료로 사용하였다.

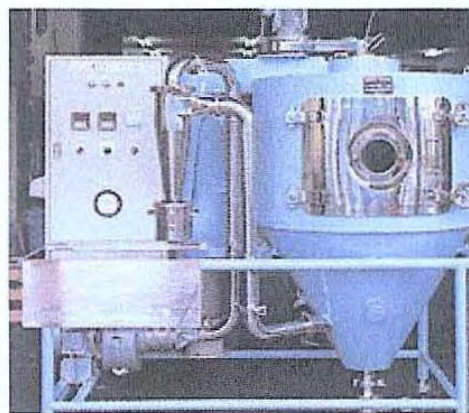


Fig. 1. Photograph of spray dryer.

Table 2. Recipe for SD powder prepared with dandelion root extract

	Recipe			
	I	II	III	IV
D.E. ¹⁾ (g)	30	70	110	110
C.D. ²⁾ (g)	10	10	0	13
M.D. ³⁾ (g)	29	20	13	0
F.O. ⁴⁾ (g)	20	5	0	0
A.G. ⁵⁾ (g)	10	6	0	0
D.W. ⁶⁾ (g)	101	89	77	77
°Bx	44	44	44	44
T.W. ⁷⁾ (g)	200	200	200	200
Inlet temp. (°C)	140	140	140	140
Outlet temp. (°C)	95	95	95	95
Velocity (mL/min)	20	20	20	20

¹⁾D.E. : dandelion extract, ²⁾C.D. : cyclodextrin,

³⁾M.D. : maltodextrin, ⁴⁾F.O. : fructooligosacchride,

⁵⁾A.G. : gum arabic, ⁶⁾D.W.: deionized water

⁷⁾T.W. : total weight

6) 관능평가

패널 20명을 대상으로 민들레 뿌리 SD 분말을 1.5 g을 취하여 70°C 물 80 mL에 용해시킨 후 맛, 향, 색과 종합적 기호도 4가지 항목에 대하여 9점 척도의 관능검사를 실시하였다. 이 때 아주 좋다를 9점으로, 보통이다 5점, 아주 나쁘다를 1점으로 하였다.

다. 민들레 속성액 제조

1) 실험 재료

민들레 생잎 100 g을 민들레 뿌리 80 g과 물 8 L를 1시간 동안 끓인 민들레 뿌리 추출물에 넣어 숙성액을 제조하였다. 이 때 각각 자당, 올리고당, 고과당을 농도별로 넣어준다. 그 후 저온과 37°C에서 보관하면서 품질변화를 조사하였다. 농도별 제조법을 Table 3과 같다.

Table 3. Composition of experimental liquid

Group	저온	37°C
자당 (1:1)	잎+뿌리 Ext+자당=1:1:1	잎+뿌리 Ext+자당=1:1:1
자당 (1:0.5)	잎+뿌리 Ext+자당=1:1:0.5	잎+뿌리 Ext+자당=1:1:0.5
올리고당 (1:1)	잎+뿌리 Ext+올리고당=1:1:1	잎+뿌리 Ext+올리고당=1:1:1
올리고당 (1:0.5)	잎+뿌리 Ext+올리고당=1:1:0.5	잎+뿌리 Ext+올리고당=1:1:0.5
고과당 (1:1)	잎+뿌리 Ext+고과당=1:1:1	잎+뿌리 Ext+고과당=1:1:1
고과당 (1:0.5)	잎+뿌리 Ext+고과당=1:1:0.5	잎+뿌리 Ext+고과당=1:1:0.5

2) 총폴리페놀 함량

민들레 숙성액의 phenolic 화합물의 양을 측정하기 위해 Folin-Denis 방법으로 비색정량을 하였다. 숙성액 1 mL과 folin 시약 1 mL를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤 10% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가하여 혼합하여 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀산 획분의 phenolic 화합물의 양은 gallic acid를 표준물질로 하여 표기 하였다.

3) 총플라보노이드 함량

민들레 숙성액 1 mL에 10 mL diethylen glycol을 가하여 잘 혼합하였다. 다시 여기에 1N NaOH 0.1 mL를 잘 혼합시켜 37°C의 수욕상에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 함량은 naringin을 표준물질로 하여 표기하였다.

4) 당도

민들레 숙성액의 당도를 전자 당도계 (ATAGO, PAL-1)을 사용하여 측정하였다.

5) 색도

민들레 숙성액의 색도를 COLOR QUEST II (D65-1.0, Hunter Lab.)로 측정하였다. Hunter System에 의해 명도 (L, lightness), 적색도 (a, redness), 황색도 (b, yellowness) 값으로 나타냈다.

6) 탁도

민들레 숙성액의 탁한 정도를 600 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

7) pH

민들레 숙성액의 pH를 pH meter (model 410A, ORION)으로 측정하였다.

8) 관능검사

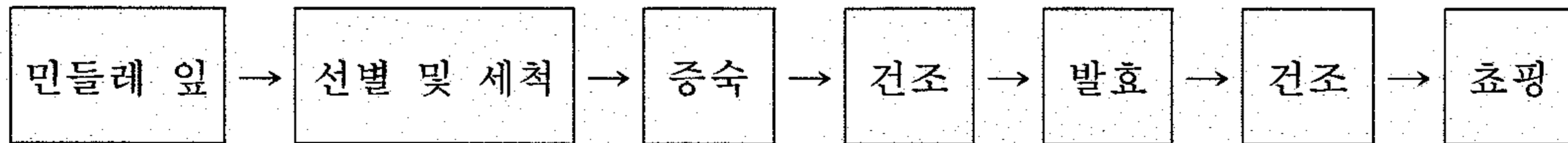
패널 20명을 대상으로 민들레 숙성액의 맛, 향, 색과 종합적 기호도 4가지 항목에 대하여 9점 척도의 관능검사를 실시하였다. 이 때 아주 좋다를 9점으로, 보통이다 5점, 아주 나쁘다를 1점으로 하였다.

라. 민들레 발효차 제조

1) 제조공정

민들레 발효차 제조를 위한 시료는 4월 초순경 어린잎을 채취하여 수세 후 아래와 같이 증숙, 건조, 발효, 건조, 초핑의 공정을 거쳐 제조하였다.

증숙은 steam을 이용하여 5~10분간 행하였으며, 증숙이 끝난 민들레 잎은 상온에서 수분함량이 30%까지 건조한 후, 37℃에서 24시간 발효시켰다. 발효가 끝난 민들레 잎은 40℃ 열풍건조기에서 수분함량 10% 이하까지 건조한 후 초핑하여 tea-bag용 차를 제조하였다.



2) 색도, 탁도 및 투과도

색도는 색차계(Color difference meter, Color Quest II HunterLab, USA)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 측정하고 색의 변화를 조사하였다. 투과도는 분광흡광도계(DU0650, Beckman)를 이용하여 650 nm에서, 탁도는 600 nm에서 측정하였다.

3) 관능평가

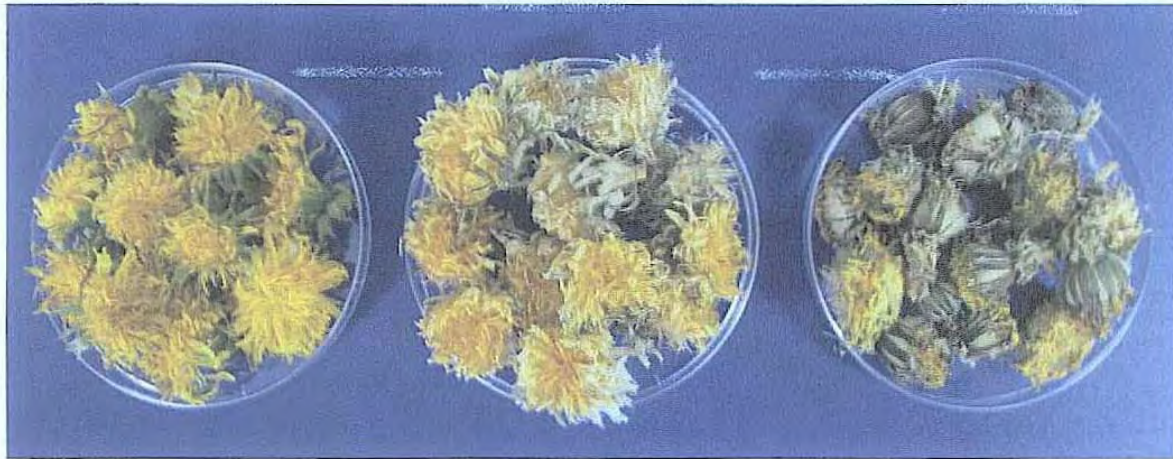
패널 20명을 대상으로 민들레 꽃차의 맛, 향, 색과 종합적 기호도 4가지 항목에 대하여 9점 척도의 관능검사를 실시하였다. 이 때 아주 좋다를 9점으로, 보통이다 5점, 아주 나쁘다를 1점으로 하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 민들레 꽃차 제조

1) 민들레 꽃차의 건조 조건 설정

민들레 꽃차 제조시 가장 고려할 사항으로 꽃잎의 형태 유지를 위하여 동결건조, 저온건조, CO₂ 처리 후 각각 건조하였다. 민들레 꽃은 개화 후 1~2 주 후면 꽃잎이 떨어지고 흩날림을 생성하므로, 본 실험에서는 개화 후 1주 전후의 꽃잎을 대상으로 건조 실험을 행하였다. 각 처리구로 건조된 민들레 꽃잎은 Fig. 2와 같다. 동결건조 처리구에서 민들레 잎의 형태와 색이 가장 잘 보존 되었으며, CO₂ 처리 후 건조 처리군에서는 색이 다소 탈색되어 옅은 색을 띄었다. 저온건조 처리구의 경우에는 꽃잎의 위조 현상이 일어나 꽃의 형태를 유지하지 못하는 것으로 나타났다. 꽃의 형태와 색상유지에는 동결건조가 가장 적당하지만 건조비용이나, 현장의 이용 가능성을 고려할 때 CO₂ 처리후 건조하는 것도 어느정도 품질을 유지할 수 있을 것으로 생각된다.



동결건조

CO₂ + 저온건조

저온건조

Fig. 2. Photograph of dried dandelion flowers.

2) 색도, 탁도 및 투과도

각 처리군별로 건조된 민들레 꽃을 0.5 g씩 70℃ 물 80 mL에 2분간 용출시킨 후 용출액의 색도, 탁도 및 투과도를 조사한 결과는 Table 4에 나타내었다. L 값은 동결건조 처리군이 33.88로 가장 높았으며, 저온건조 처리구가 가장 낮게 나타났으며, 적색도를 나타내는 a 값은 반대로 저온건조 처리구에서 가장 높게 나타 저온건조시 꽃잎의 갈변에 의한 색의 퇴색이 진행된 것으로 생각된다. 또한 황색도를 나타내는 b 값의 경우 CO₂ + 저온건조 처리구에서 가장 높게 나타나 민들레 꽃잎이 가진 고유의 노란색이 가장 잘 침출되는 것으로 나타났다. 이는 동결건조 처리구에 비하여 CO₂ + 저온건조 처리구가 소비자 기호에 더 근접하다고 생각할 수 있으며, 상품성도 어느 정도 있다고 판단된다. 투과도의 경우에는 CO₂ + 저온건조 처리구가 94%의 투과도를 보여 가장 높았으며, 동결건조(89.4%), 저온건조(71.1%)의 순이었다. 탁도는 동결건조 처리구와 CO₂ + 저온건조 처리구는 각각 0.033과 0.032로 유사하였으나, 저온건조 처리구의 경우 0.172로 5배 이상 높은 탁도를 보였다.

Table 4. Color, transmittance and turbidity of dandelion flower teas.

	L	a	b	Transmittance	Turbidity
동결건조	33.88	-0.72	-7.46	89.4	0.033
CO ₂ + 저온건조	19.38	-0.20	0.83	94.0	0.032
저온건조	16.38	-0.15	-0.15	71.1	0.172



동결건조

CO₂ + 저온건조

저온건조

Fig. 3. Photograph of dandelion flower teas.

3) 관능평가

민들레 꽃차의 색, 향, 맛 그리고 종합적 기호도에 대한 관능평가를 실시한 결과는 Table 5와 같다. 색의 경우 CO₂ + 저온건조 처리구가 7.2점으로 가장 높았으며, 그 다음으로 저온건조(5.6점), 동결건조(3.9점) 순이었다. 이는 앞서 실험한 색도의 결과와 비교하였 때 민들레 꽃 고유의 노란색이 민들레 꽃차의 경우 중요한 평가 요인으로 작용하는 것임을 알 수 있다. 동결건조 처리구와 같이 L 값은 높으나 b 값이 낮은 경우 오히려 낮은 관능평가 점수를 얻는 것으로 나타났다. 향의 경우에는 동결건조 처리구와 CO₂ + 저온건조 처리구 간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났으며, 저온건조 처리구의 경우 약간의 풀냄새로 인하여 가장 낮은 점수를 얻었다. 민들레 꽃차의 맛에서는 동결건조 처리구가 가장 높은 점수를 얻었으며, CO₂ + 저온건조 처리구의 경우 다른 처리군간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 종합적인 기호도에 있어서는 CO₂ + 저온건조 처리

구가 가장 높은 관능평가 점수를 보였으나, 동결건조 처리구와 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 민들레 꽃차의 제조는 고비용의 동결건조 처리보다는 관능적으로 유의적인 차이가 없고, 민들레 고유의 색상이 더 잘 침출되어 나오는 CO₂ + 저온건조 처리가 현장에서 실용화 될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 5. Sensory score of dandelion flower teas.

	Sensory characteristics			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptance
동결건조	3.9±0.0 ^c	4.2±0.0 ^a	6.0±0.8 ^a	5.6±1.0 ^a
CO ₂ + 저온건조	7.2±2.2 ^a	4.9±1.8 ^a	4.7±0.9 ^{ab}	6.2±0.8 ^a
저온건조	5.6±1.5 ^b	3.2±1.1 ^b	3.6±1.7 ^b	3.6±1.1 ^b

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

나. 커피대용 뿌리차 제조

1) 엑기스 제조를 위한 볶음조건 설정

가) 색도

민들레 뿌리의 특유의 쓴맛을 완화하고 추출 수율을 높이기 위하여 앞서 전처리 공정에서 항산화 활성이 가장 높은 45℃ 열풍건조 시료에 대하여 볶음처리를 하였다. 볶음온도는 150, 190, 230℃ 세 구간으로 선정하고, 볶음 시간은 1, 3, 5 분간 회전형 볶음기를 사용하여 처리하였다. 볶음처리 처리 후 각 실험군의 열수 추출물의 색도를 색차계로 측정된 결과는 Table 6과 같다. 볶음에 의한 열처리로 민들레 뿌리에 갈변현상이 일어나 열수추출물에서 명도(L)는 볶음 온도와 시간이 증가할수록 감소하였고, 적색도(a)는 비례적으로 증가하였으며, 황색도(b)는 일정한 경향을 나타내지 않았다. 또한 ΔE 값은 150℃, 5min 처리구에서 58.03, 190℃, 5min 처리구에서 74.14, 230℃, 5min 처리구에서 63.61로 각 실험 온도구간에서 5 분 이상의 볶음처리는 심한 갈변을 일으킬 수 있다. 각 처리군에서 갈변이 가장

심한 처리구는 190℃에서 5분간 볶음처리한 실험구로 나타났다. 본 실험에서의 결과로만 판단한다면 150℃에서 5 min, 190℃에서 3 min, 230℃에서 1 min 정도의 볶음처리는 민들레의 뿌리 열수추출물 제조시 색도에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 물론 볶음공정을 거친 뿌리의 맛이나 향도 중요하지만 시각적인 면에서 추출물의 색도는 엑기스 소재 제조시 매우 중요하다. 지나치게 높은 볶음 온도나 긴 시간은 추출물의 색을 갈색화 시킬 뿐만 아니라 탄맛을 생성시켜 엑기스 소재 제조에 적합하지 못한 색도와 맛을 가지게 된다. 따라서 민들레 뿌리의 최적 볶음 조건은 색도와 관능검사 등을 복합적으로 고려하여, 비교 평가하여 결정하는 것이 좋다고 생각된다.

Table 6. Color of hot-water extract from dandelion root according to roasting conditions.

	Color			
	L	a	b	ΔE
Raw	75.44	2.20	28.36	
1 ¹⁾	69.76	5.05	30.26	6.66
2	67.06	6.41	31.48	9.83
3	24.79	27.67	15.91	58.03
4	68.44	5.82	30.34	8.12
5	67.44	6.44	31.81	9.68
6	6.31	12.39	3.45	74.14
7	54.88	14.00	31.29	23.90
8	45.21	23.17	28.50	36.63
9	14.79	21.58	9.28	63.61

¹⁾ Roasting conditions are same as Table 1.

나) 관능평가

볶음처리에 따른 민들레 뿌리 열수 추출물의 관능평가를 실시한 결과는 Table 7과 같다. 엑기스의 향의 경우 5.1~6.2점으로 볶음 처리하지 않은 추출물(4.2)보

다 높은 점수를 얻었으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 단맛의 경우 150℃와 190℃에서는 볶음시간이 증가할수록 단맛도 증가하였으나, 230℃의 고온으로 볶음 처리하였을 경우 오히려 단맛이 감소하는 것으로 나타났다. 쓴맛은 150℃, 5분, 190℃, 3분 처리할 경우 각각 5.9점과 5.8점을 얻어 가장 높았으나, 230℃, 5분 가열시 오히려 쓴맛이 증가하여, 과도한 볶음처리는 민들레 뿌리의 탄화 현상으로 인하여 쓴맛이 증가하는 것으로 나타났다.

Table 7. Sensory score of hot-water extracts from dandelion according to roasting conditions.

	Sensory properties			
	Flavor	Sweet taste	Bitter and tannic taste	Overall acceptance
Raw	4.2±0.2 ^a	5.0±0.0 ^{ab}	4.0±0.0 ^c	4.0±0.0 ^a
1 ¹⁾	5.1±2.2 ^a	3.9±1.8 ^{ab}	3.3±0.9 ^a	3.1±1.8 ^b
2	5.6±1.5 ^a	5.2±1.1 ^a	4.6±1.8 ^c	4.6±1.0 ^a
3	5.6±1.5 ^a	4.7±1.0 ^{ab}	5.9±1.4 ^{bc}	4.8±1.4 ^a
4	6.2±1.2 ^a	3.9±1.2 ^{ab}	5.2±1.7 ^c	4.2±1.4 ^{ab}
5	5.4±1.6 ^a	4.1±1.2 ^{ab}	5.8±1.2 ^b	5.4±1.7 ^a
6	5.1±2.2 ^a	5.7±1.8 ^b	4.9±0.9 ^a	4.2±1.8 ^{ab}
7	5.5±1.5 ^a	5.1±1.1 ^a	4.6±1.8 ^c	4.6±1.0 ^a
8	5.4±1.5 ^a	4.5±1.0 ^{ab}	5.3±1.4 ^{bc}	4.8±1.4 ^a
9	6.0±1.2 ^a	4.0±1.2 ^{ab}	4.0±1.7 ^c	4.0±1.4 ^{ab}

*Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's test

다) 뿌리추출물의 이화학적 특성

민들레 뿌리의 볶음처리 조건을 190℃, 3min 처리구로 설정하고 적정 추출용매를 선정하기 위하여 물, 30% 에탄올, 70% 에탄올로 각각 추출하여 이들의 이

화학적 특성을 조사하였다. 수율은 물 추출물에서 32.0%로 가장 높았으며, 30% 에탄올과 70% 에탄올 추출물은 각각 20.93과 21.07%로 큰 차이가 없었다. pH의 경우 4.98~5.64를 30% 에탄올 추출물에서 가장 높았다. 투과도의 경우 에탄올 함량이 높을수록 낮아졌는데 이는 에탄올 함량이 높을수록 비극성의 색소 성분들이 더 많이 용출되어진 것으로 생각된다.

민들레 뿌리 추출물에서 유리당은 fructose, sucrose, glucose가 검출되었으며, 그 함량은 1.2~1.6%, 3.9~4.1%, 7.7~8.0%로 sucrose의 함량이 가장 높았다. 추출용매에 따라서는 유리당의 함량 차이는 뚜렷하지 않은 것으로 나타났다.

Table 8. Physicochemical properties of solvent extracts from dandelion root

	Yield(%)	pH	Transmittance(%)	Free sugar(%)		
				Fructose	Sucrose	Glucose
H ₂ O	32.00	5.27	35.77	1.65	3.95	8.01
30% EtOH	21.07	5.64	35.62	1.20	4.16	7.99
70% EtOH	20.93	4.98	24.50	1.38	3.99	7.74

2) SD 조건 설정

가) 민들레 엑기스 분말의 품질 특성 및 최적조건

민들레엑기스를 부형제와 혼합하여 분무건조한 분말의 흐름특성은 Table 9와 같다. 모든 배합비에서 민들레 엑기스는 분무건조 되었다. 부형제 첨가에 의해 민들레의 관능적 특성인 맛, 향, 색이 차이를 보였으며 전체적인 분말의 품질특성은 배합비 IV에서 가장 좋은 것으로 나타났다. 사이클로덱스트린의 적당한 사용은 민들레의 향을 더욱 강하게 느끼게 해주는 역할을 하였으며, 프락토올리고당은 기능적인 면에서는 뛰어났지만 당의 영향으로 전체적인 분말의 흡습성을 증가시켰다. 이상의 결과로 볼 때 민들레 분말 제조시 제품특성에 따라 부형제를 첨가하지 않은 배합비와 사이클로덱스트린, 말토덱스트린, 프락토올리고당 및 아라비아검을 적절히 사용하면 최적의 엑기스 분말을 얻을 수 있다.

Table 9. Characteristics of SD powder from dandelion root extract

	Recipe			
	I	II	III	IV
Aptitude ¹⁾	+++++	+++++	+++	+++
Fluidity ²⁾	++	+++	+++	+++
Color ³⁾	+	++	+++	+++

1) + : 보통, +++ : 좋음, +++++ : 매우 좋음

2) + : 매우 약함, +++ : 보통, +++++ : 매우강함

3) + : 밝은 갈색, +++ : 갈색, +++++ : 진한갈색

3) 관능평가

민들레 뿌리 엑기스 SD 분말을 70℃ 물 80 mL에 용해한 후 색, 향, 맛에 대한 관능평가를 한 결과는 Table 10과 같다. 색의 경우 민들레 엑기스가 70~110 g 첨가된 II와 III번 배하비에서 7.2와 7.6으로 높은 점수를 얻었으며, 림팩의 경우 민들레 엑기스의 첨가량이 많을수록 낮은 점수를 얻었다. 또한 맛의 경우에도 민들레 엑기스의 첨가량이 많아질수록 낮은 점수를 얻어, 민들레 뿌리 엑기스 SD 분말은 배하비 기준으로 70 g (총 중량 대비 35%)가 적당한 것으로 생각된다. 종합적인 기호도에 있어서도 배하비 II가 가장 높은 점수를 얻어 민들레 뿌리 엑기스의 SD 분말화 최적 배합비는 민들레 엑기스 35%, 사이클로덱스트린 5%, 말토덱스트린 10%, 플라кто올리고당 2.5%, 아라비아검 2.5%, 수분 45%인 것으로 조사되었다.

Table 10. Sensory score of SD powder from dandelion root extract

Recipe	Sensory characteristics			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptance
I	4.9±0.0 ^{b1)}	5.7±0.0 ^a	6.0±0.8 ^a	5.6±1.0 ^b
II	7.2±2.2 ^{a2)}	4.7±1.8 ^{ab}	4.7±0.9 ^{ab}	6.2±0.8 ^a
III	7.6±1.5 ^a	4.6±1.1 ^{a^b}	3.6±1.7 ^{bc}	3.6±1.1 ^c
IV	5.1±1.1 ^b	4.2±1.3 ^b	3.2±1.2 ^c	3.4±0.9 ^c

1) Mean ±S.D.

2) Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)



Fig. 4. Photograph of dandelion root SD powder.

다. 민들레 숙성액 제조

1) 총폴리페놀 함량

저장 조건에 따른 (저온, 37°C) 민들레 숙성액의 총페놀함량을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 저온 저장 상태에서 올리고당 (1:0.5)를 제외한 숙성액은 5주 까지 페놀함량이 증가 하다가 7주가 되면서 그 함량이 급격히 감소하였다. 올리고당 (1:0.5)의 경우에는 다른 sample에 비해 그 함량이 매우 낮았다. 페놀 함량은 올리고당 (1:1)이 가장 높았는데 5주가 되면서 급격히 증가하는 경향을 나타냈다.

37°C 저장 조건하에서는 올리고당 (1:1)과 고과당 (1:1)의 경우에는 그 양이 점차 감소 하다가 7주째에 그 양이 급격히 증가하였다. 전반적으로 다른 sample 의 경우에는 점차 함량이 감소하였고, 올리고당 (1:0.5)는 저온에서와 마찬가지로 그 함량이 가장 적었다. 37°C 저장 조건 역시 저온 저장과 마찬가지로 올리고당 (1:1)의 폴리페놀 함량이 가장 높았다.

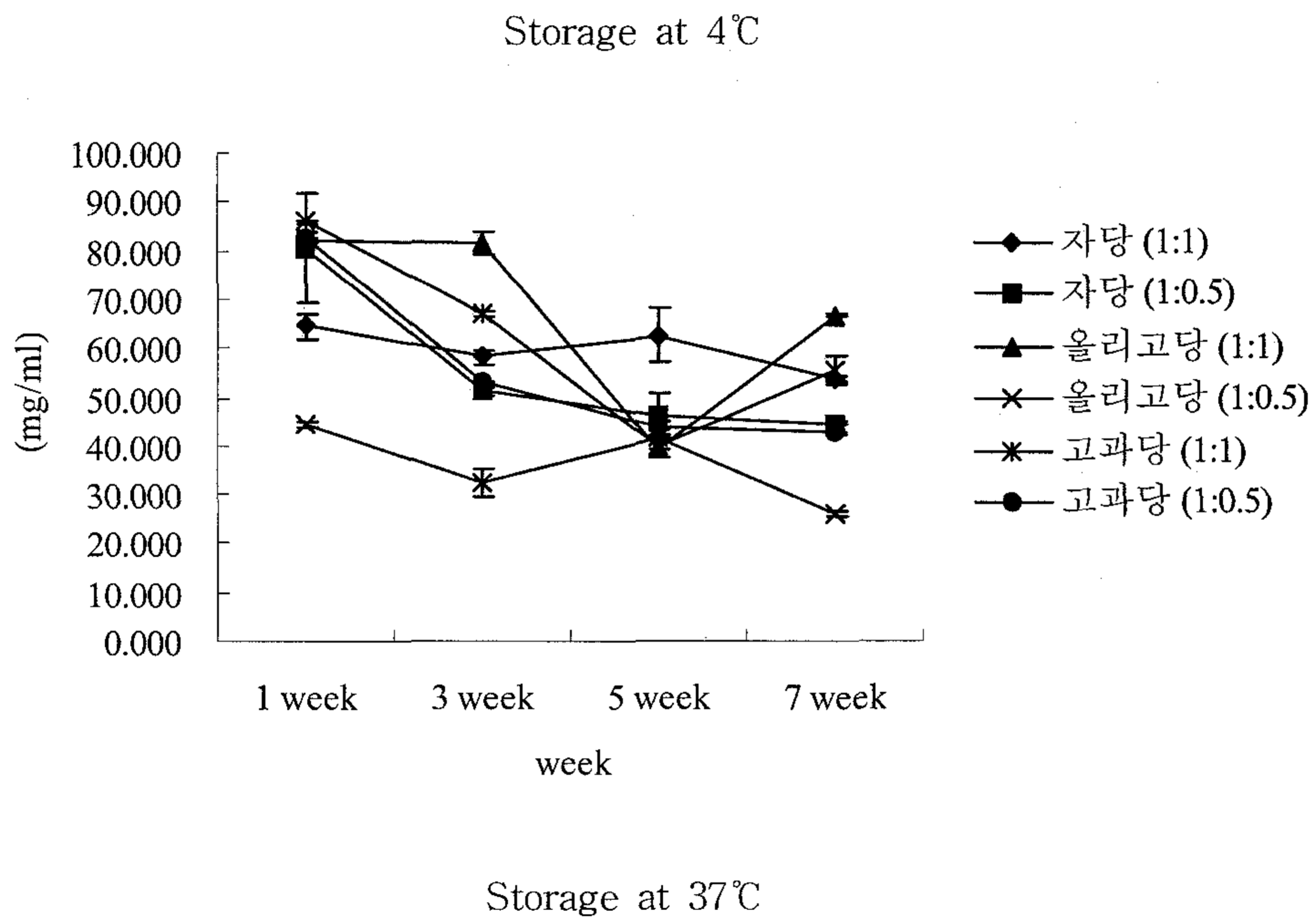
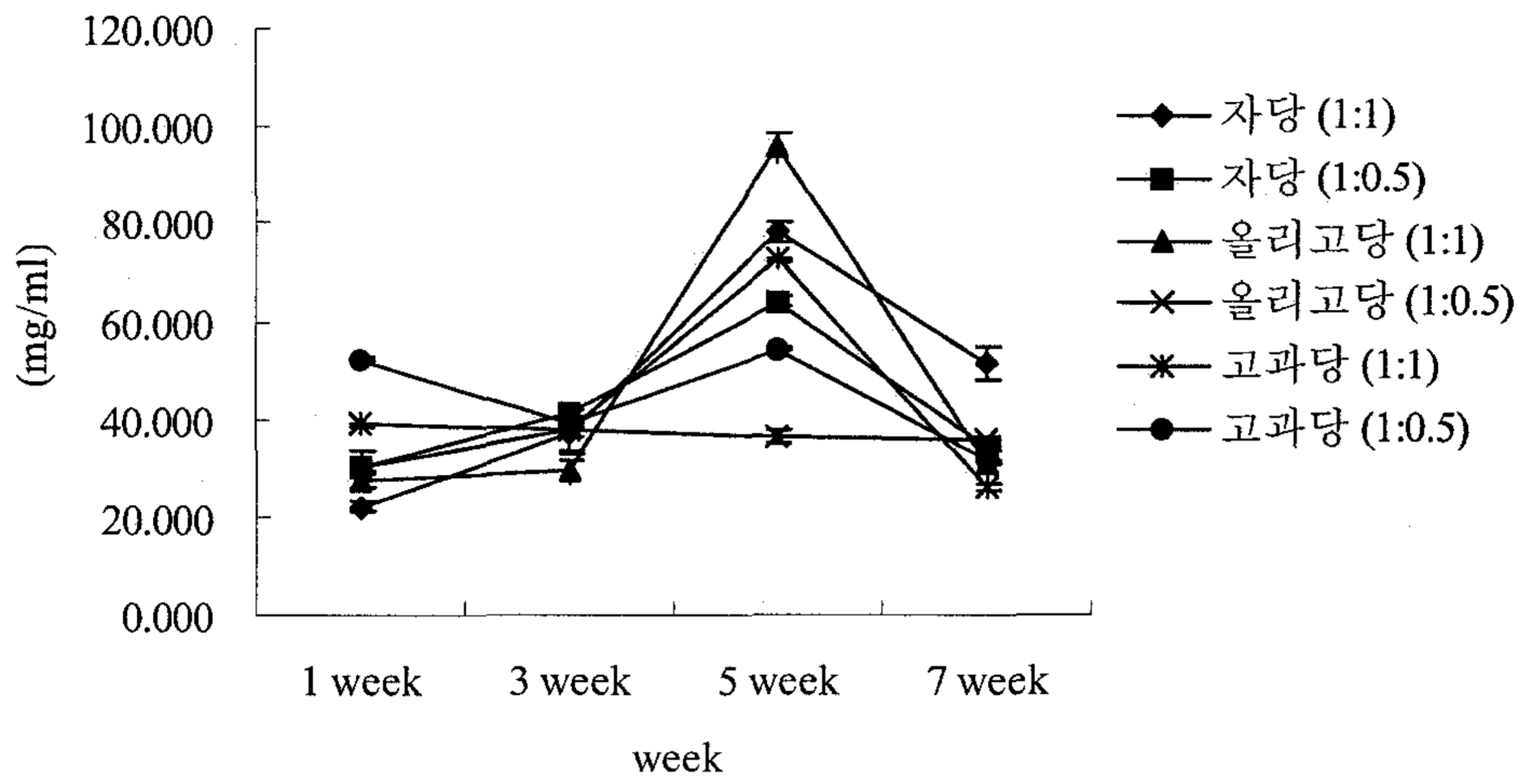
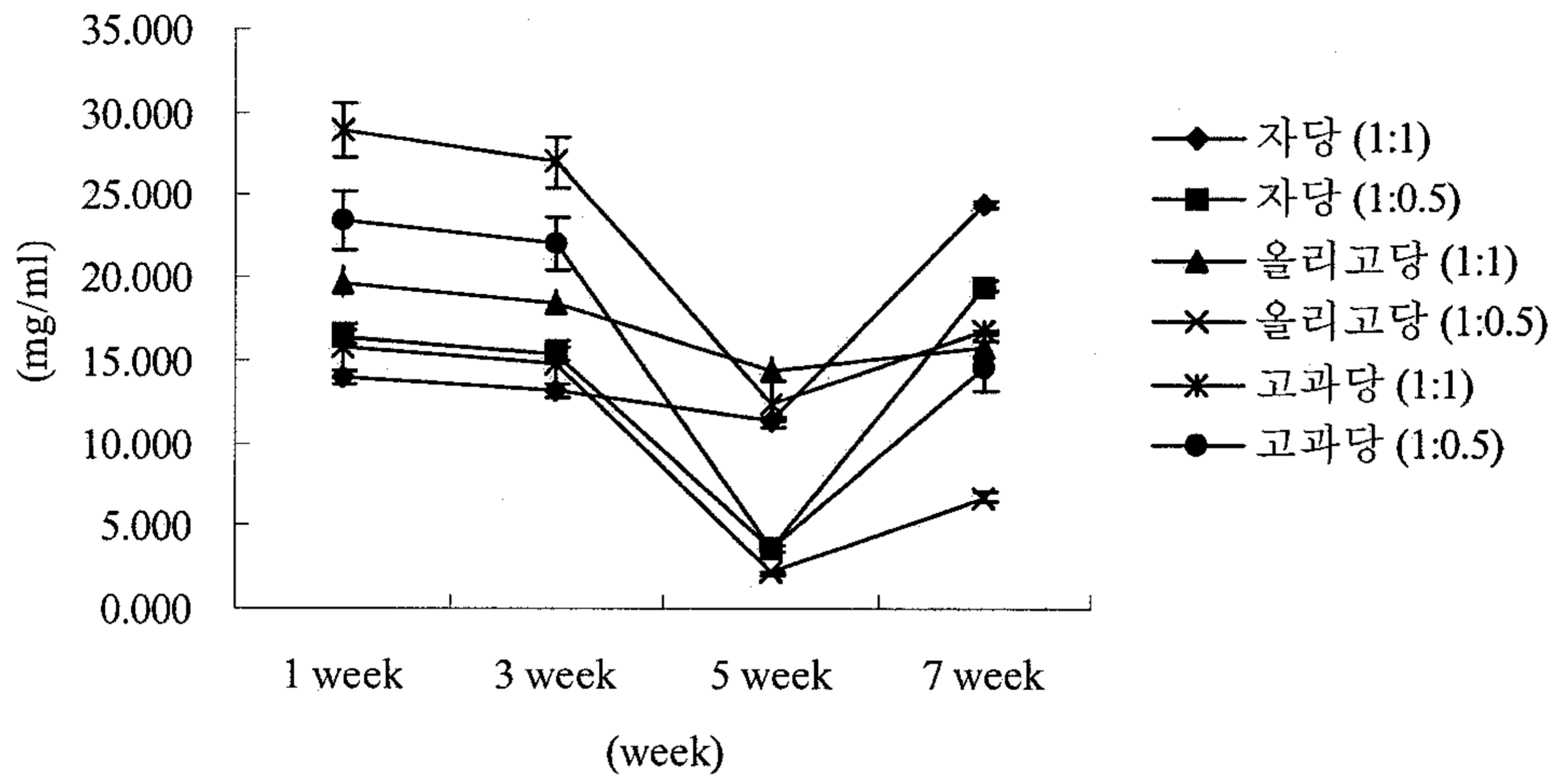


Fig. 5. Total phenol content of ripe liquid of dandelion (4°C, 37°C)

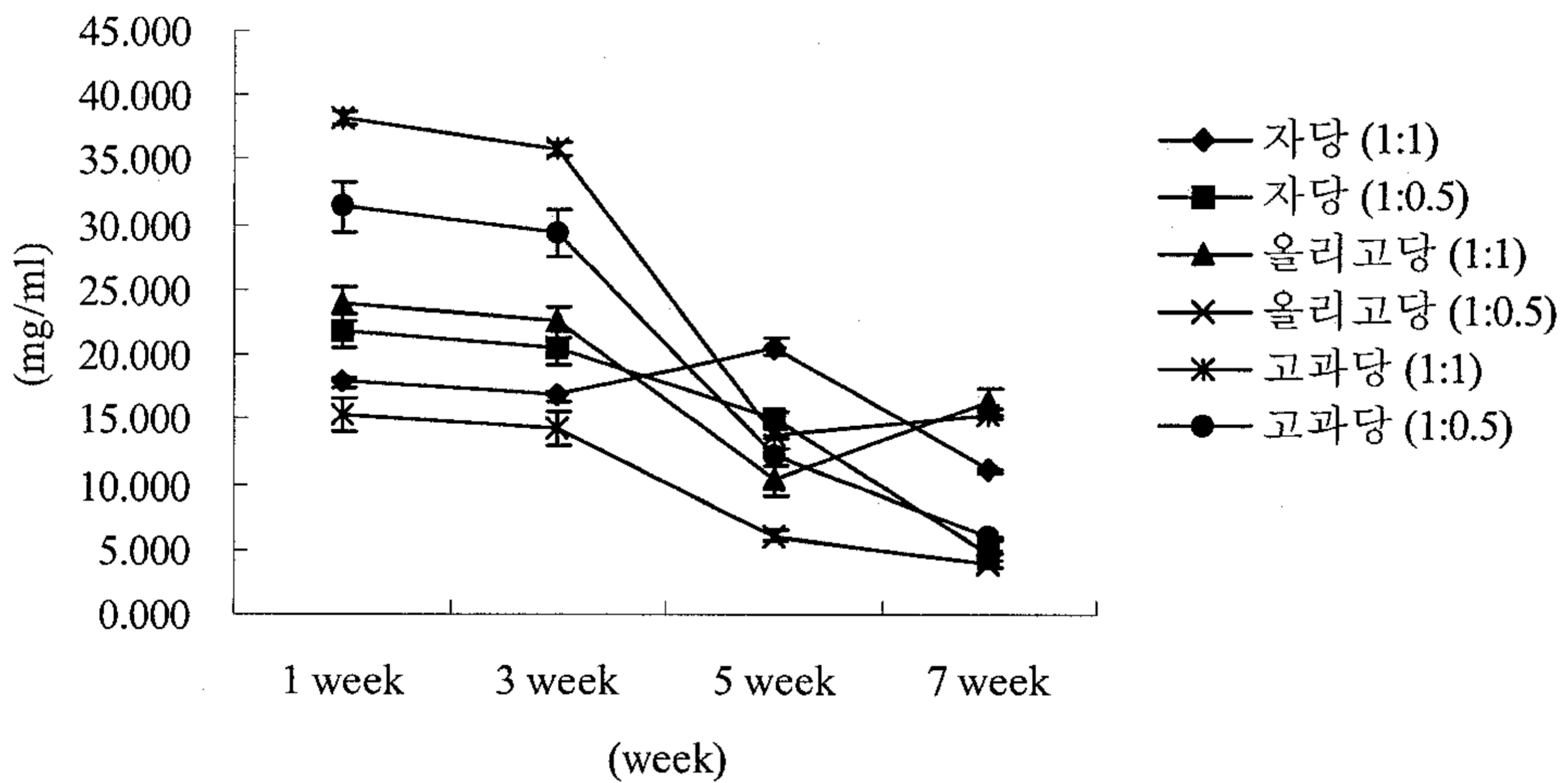
2) 총플라보노이드 함량

저장 조건에 따른 (저온, 37°C) 민들레 숙성액의 총폴리페놀함량을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 저온 저장 상태에서 플라보노이드의 함량은 5주가 되면서 급격히 감소하다가 7주에는 다시 증가하는 경향을 보였다. 다른 sample에 비해 자당 (1:1)의 총플라보노이드 함량이 가장 높았다.

37°C의 저장 조건에서 올리고당 (1:1)과 고과당 (1:1)의 경우 점차 감소하던 플라보노이드 함량이 7주가 되자 증가하였다. 그러나 다른 sample의 경우에는 그 양이 감소하였다. 특히, 자당 (1:1)은 7주가 되면서 급격히 감소하였으며, 올리고당 (1:0.5)는 총폴리페놀 함량과 마찬가지로 총플라보노이드 함량이 매우 낮았다.



Storage at 4°C



Storage at 37°C

Fig 6. Total flavonoide content of ripe liquid of dandelion (저온, 37°C)

3) 당도

민들레 뿌리 추출물과 뿌리 추출물에 농도별로 자당, 올리고당, 고과당을 첨

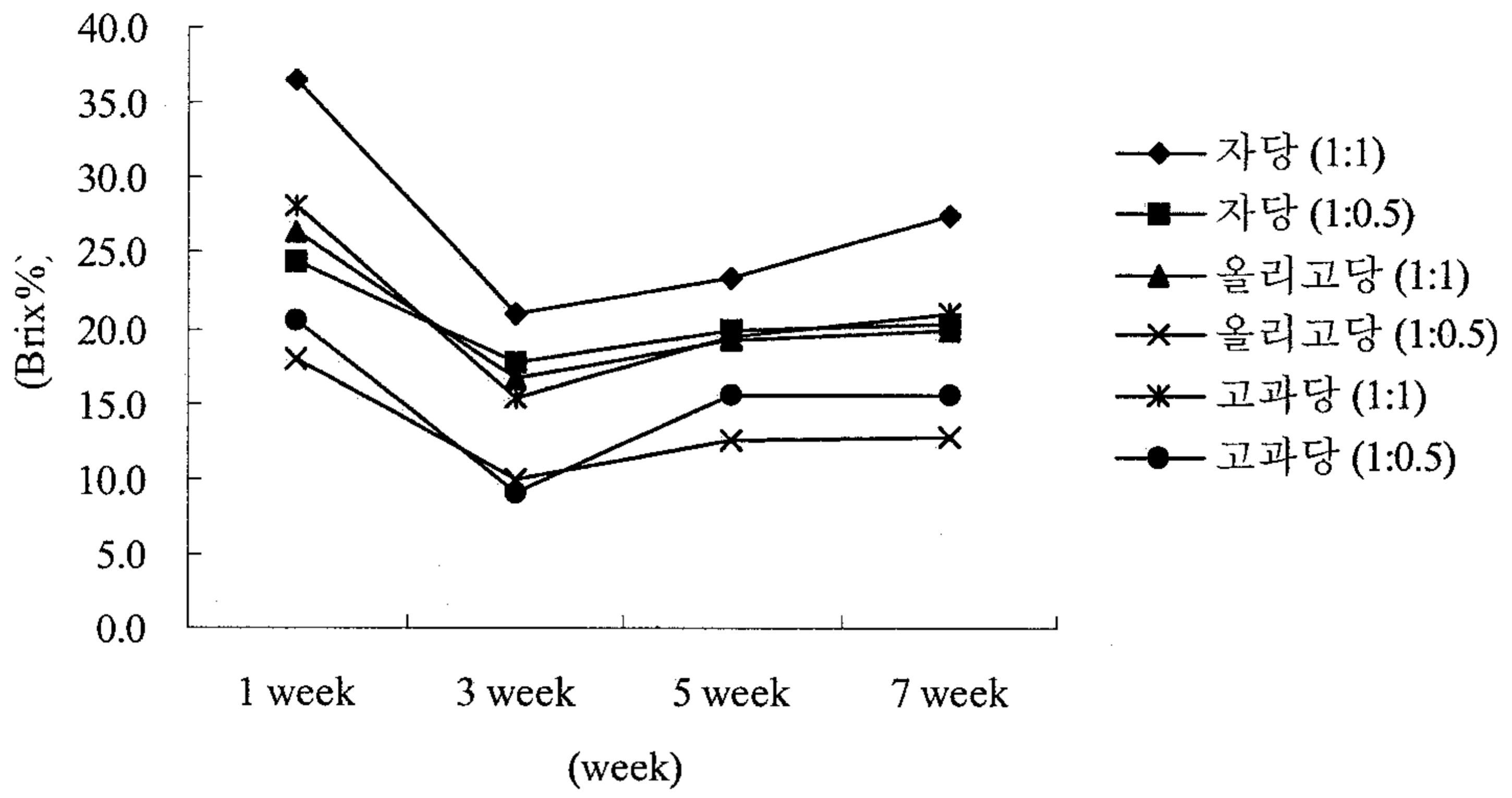
가하였을 때의 당도, pH, 탁도, 색도의 측정치는 Table 11과 같다.

Table 11. Sugar content, pH, turbidity, color difference of experimental liquid

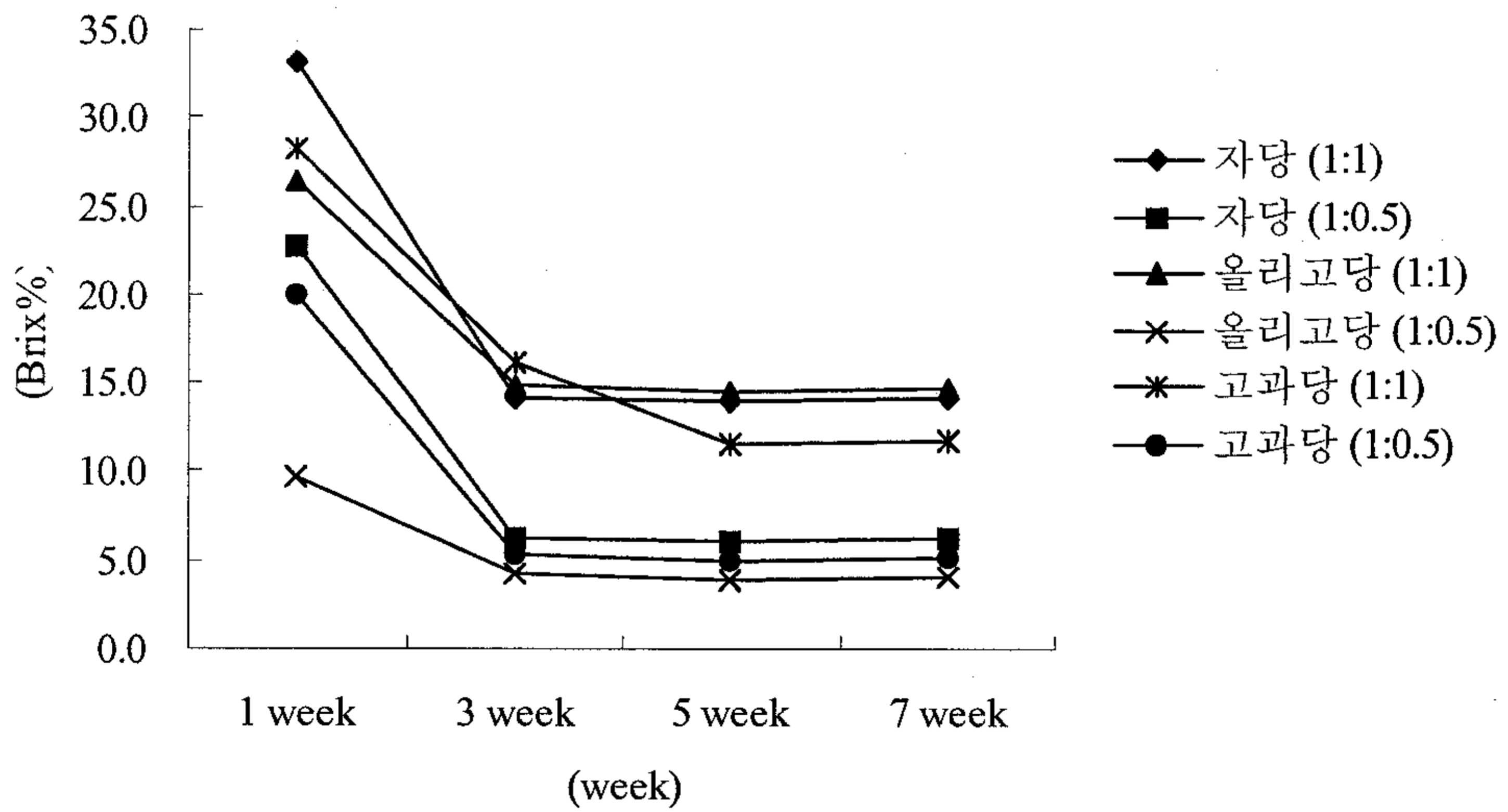
Group	Brix	pH	Turbidity (O.D.)	Color		
				L	a	b
뿌리 추출물	0.7	6.47	0.078	25.60	-0.87	-0.57
자당(1:1)	40.7	6.07	0.048	28.21	-0.45	-0.45
자당 (1:0.5)	34.7	6.19	0.054	28.54	-0.53	-0.56
올리고당 (1:1)	39.8	5.38	0.037	31.31	-0.38	-0.78
올리고당 (1:0.5)	26.6	5.73	0.052	30.62	-0.55	-0.27
고과당 (1:1)	39.0	5.57	0.037	25.35	-0.41	-1.31
고과당 (1:0.5)	26.4	5.85	0.050	28.74	-0.26	0.73

1) Samples are dilute with distilled water (1:3)

각 조건에 따른 민들레 숙성액의 당도 측정 결과는 Fig. 7과 같다. 저온 저장의 경우 3주 까지 감소하던 당도가 5주가 되면서 점차 증가하였다. 특히, 자당 (1:1)의 경우에는 다른 sample에 비해 당도가 높았다. 37°C 저장조건 하에서는 3주부터 당도가 급격히 감소하다가 평형 상태를 유지하였다. 자당 (1:1), 올리고당 (1:1)이 당도가 가장 높았다.



Storage at 4°C



Storage at 37°C

Fig. 7. Sugar content of ripe liquid of dandelion (저온, 37°C)

4) 색도측정

민들레 숙성액의 색차는 Table 12, 13과 같이 L, a, b로 나타냈으며, 민들레를 첨가하지 않은 sample을 기준으로 비교한 각각의 값을 ΔE 로 나타냈다. 명도를 나타내는 L값은 그 범위가 23.04~110.52로 저온 1 week의 고과당 (1:1)이 23.04로 가장 낮은 값을, 37°C의 7week의 올리고당 (1:0.5)가 110.52로 가장 높은 값으로 민들레 숙성액의 밝기가 가장 밝았다. 민들레 잎을 첨가하지 않고 당만 첨가한 당액의 L값은 25.35~31.31로 민들레 잎을 첨가함으로써 오히려 명도가 증가, 밝기가 밝아진 것으로 나타났다. 또한 숙성 단계를 거치면서 명도가 증가하였으며, 저온 보다는 37°C의 상태에서 L값이 컸다. 적색도를 나타내는 a는 -3.52~13.35이다. a값은 숙성 단계를 거치면서 감소하는 것으로 보아 적색을 띠는 경향이 줄어들었다. 황색도를 나타내는 b는 숙성단계에 따라 저온에서는 감소하였으나, 37°C 증가하는 것으로 보아 황색이 증가함을 알 수 있다. 결론적으로 숙성단계를 거침에 따라 명도는 증가하고, 적색은 감소하였다. 그러나 황색도는 저장온도에 따라 다르게 나타나 저온에서는 감소, 37°C에서는 증가하였다.

Table 12. Color difference of ripe of liquid dandelion (4°C)

week \ Group	L	a	b	ΔE	
1 week	자당 (1:1)	23.67	7.04	13.18	15.81
	자당 (1:0.5)	30.46	1.98	12.61	13.54
	올리고당 (1:1)	30.96	6.22	15.56	17.63
	올리고당 (1:0.5)	30.12	4.27	14.70	15.73
	고과당 (1:1)	23.04	5.96	12.67	15.54
	고과당 (1:0.5)	29.18	5.71	14.85	15.34
3 week	자당 (1:1)	36.58	1.35	33.45	34.93
	자당 (1:0.5)	61.57	8.10	45.59	57.40
	올리고당 (1:1)	55.06	12.02	51.99	59.18
	올리고당 (1:0.5)	36.58	2.87	22.62	23.90
	고과당 (1:1)	44.04	12.74	46.81	53.27
	고과당 (1:0.5)	57.55	0.58	27.73	39.49
5 week	자당 (1:1)	67.54	6.07	40.46	57.03
	자당 (1:0.5)	68.89	4.42	40.26	57.61
	올리고당 (1:1)	76.50	3.20	33.91	57.08
	올리고당 (1:0.5)	78.51	1.54	27.94	55.62
	고과당 (1:1)	65.27	6.74	44.52	61.20
	고과당 (1:0.5)	68.19	6.23	39.18	55.47
7 week	자당 (1:1)	92.01	-1.49	13.00	65.23
	자당 (1:0.5)	86.25	2.7	38.99	70.04
	올리고당 (1:1)	92.76	-2.00	36.23	71.75
	올리고당 (1:0.5)	73.05	-3.52	13.87	44.82
	고과당 (1:1)	78.65	-1.19	36.39	65.29
	고과당 (1:0.5)	102.05	-2.34	20.72	76.02

Table 13. Color difference of ripe of liquid dandelion (37°C)

week \ Group		L	a	b	ΔE
1 week	자당 (1:1)	52.17	9.93	27.71	38.17
	자당 (1:0.5)	51.99	9.23	27.30	37.70
	올리고당 (1:1)	49.55	8.42	25.26	32.99
	올리고당 (1:0.5)	54.65	6.86	26.87	37.00
	고과당 (1:1)	33.66	11.09	19.86	25.48
	고과당 (1:0.5)	52.08	7.73	26.36	35.57
3 week	자당 (1:1)	80.34	0.44	23.71	57.46
	자당 (1:0.5)	62.46	4.78	34.18	48.84
	올리고당 (1:1)	60.44	7.82	43.26	53.44
	올리고당 (1:0.5)	71.98	0.99	25.82	48.93
	고과당 (1:1)	57.09	13.35	54.32	65.51
	고과당 (1:0.5)	73.05	2.54	30.16	53.27
5 week	자당 (1:1)	66.39	3.57	33.23	51.01
	자당 (1:0.5)	59.65	-0.47	16.20	35.34
	올리고당 (1:1)	64.71	3.23	33.08	47.70
	올리고당 (1:0.5)	51.52	-0.96	14.67	25.69
	고과당 (1:1)	57.24	2.68	32.49	46.57
	고과당 (1:0.5)	62.89	-0.87	13.74	36.55
7 week	자당 (1:1)	97.54	-1.68	35.05	77.92
	자당 (1:0.5)	98.27	-2.15	33.43	77.59
	올리고당 (1:1)	99.77	-2.26	26.74	73.81
	올리고당 (1:0.5)	110.52	-2.8	17.94	81.98
	고과당 (1:1)	96.18	-2.47	33.36	78.89
	고과당 (1:0.5)	85.11	-4.32	19.21	59.46

5) pH

민들레 숙성액의 pH 측정결과는 Fig. 8과 같다. 원액의 pH는 5.5~6.5로 점차 pH가 감소하여 3.0정도의 pH를 나타내어 관능검사 결과 신맛이 강하게 나타났다. 저장함에 따라 산도가 증가한 것을 알 수 있다.

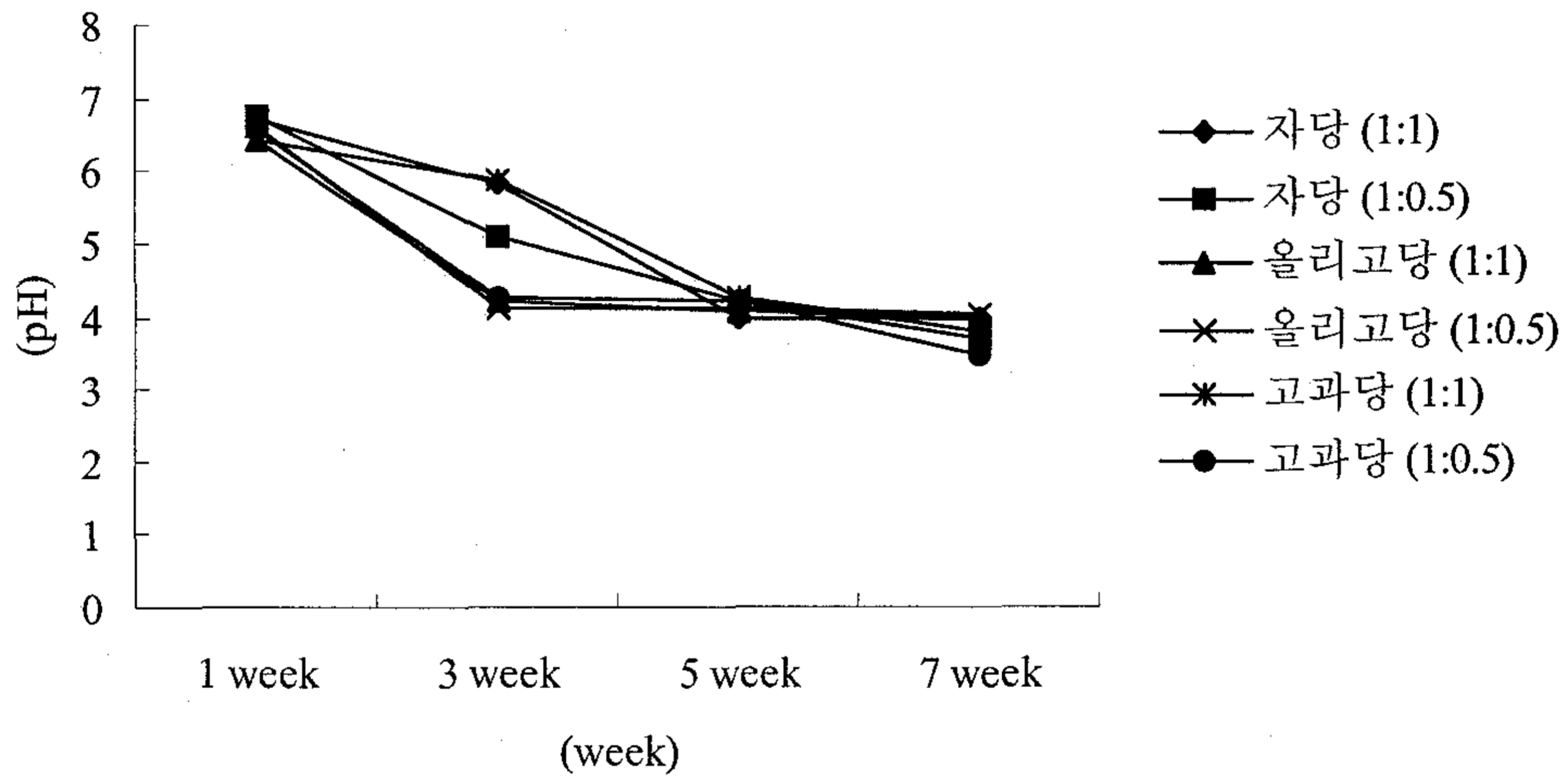
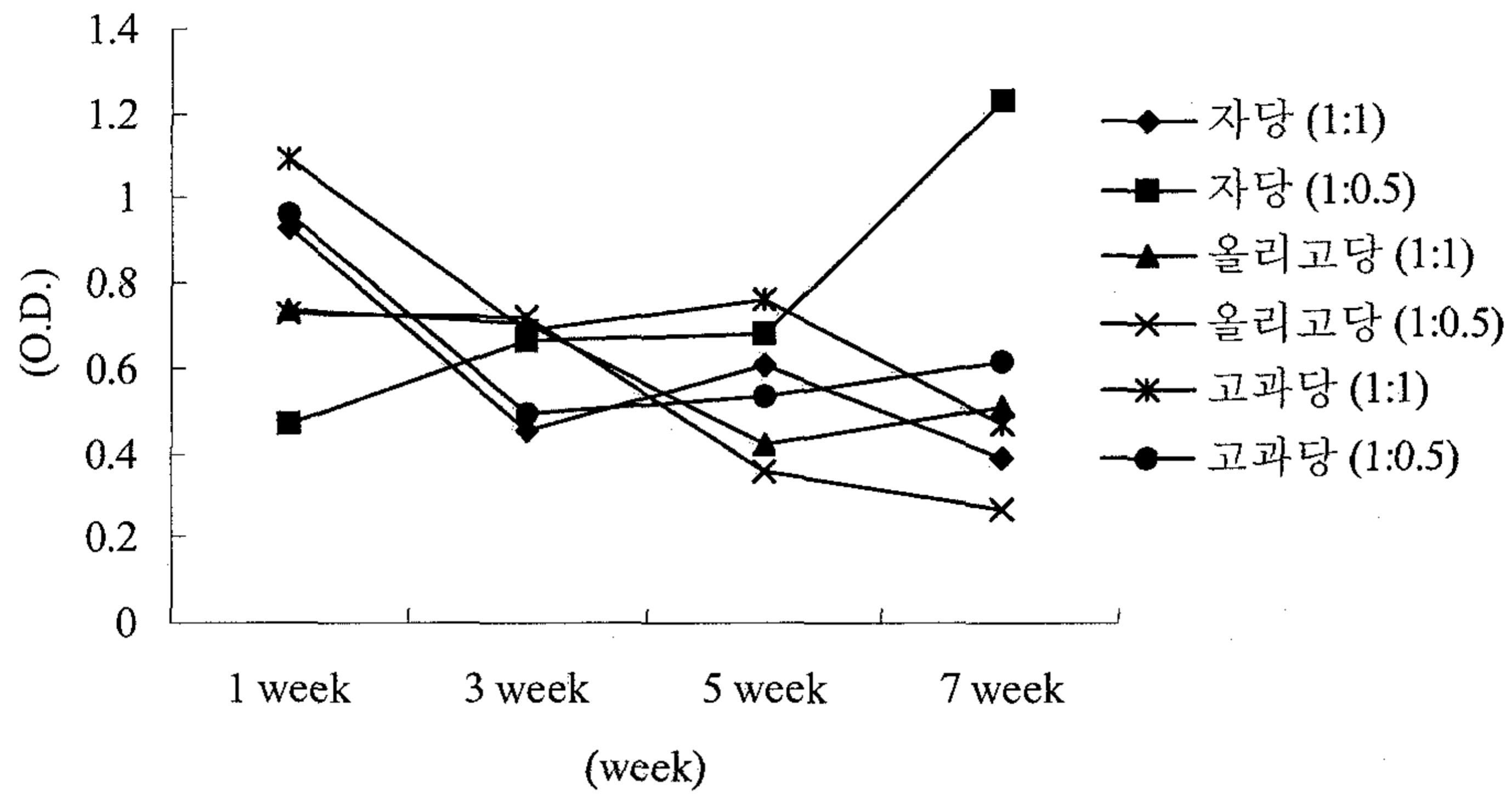


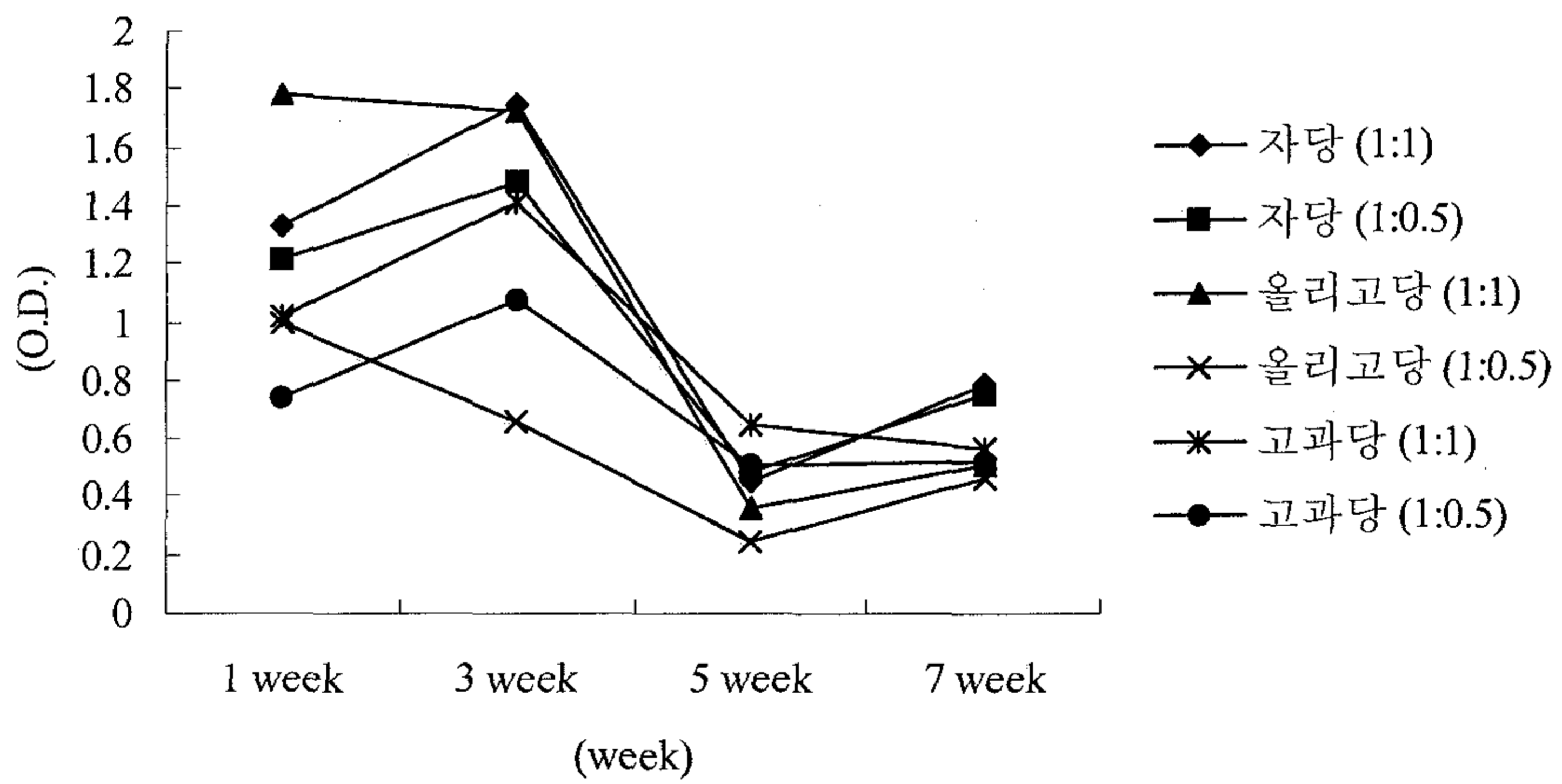
Fig. 8. pH of ripe liquid of dandelion(37°C).

6) 탁도

민들레 숙성액의 탁도 측정결과는 Fig. 9와 같다. 저온 상태에서 자당 (1:0.5)는 7주가 되면서 탁도가 급격히 증가한 반면에 자당 (1:1)과 고과당 (1:1) 탁도가 감소하였다. 37°C에서는 5주까지 감소하던 탁도가 7주가 되자 증가하는 양상을 보였다.



Storage at 4°C



Storage at 37°C

Fig. 9. Turbidity of ripe liquid of dandelion (4°C, 37°C).

7) 관능검사

민들레 숙성액의 관능검사는 Table 14와 같다. 저온저장 하에서는 고과당

(1:1)이 종합적인 결과 6.3으로 가장 좋은 점수를 받았으며 다른 sample과 유의적인 차이를 보였다 ($p>0.05$). 향의 선호도에서는 낮은 점수를 받아 차후 제품으로 출시할 경우 향의 개선이 필요할 것으로 사료된다.

37°C 조건 하에서는 자당 (1:1)이 5.9점으로 다른 sample 보다 높은 점수를 받아 유의적인 차이를 보였으나 ($p>0.05$), 맛과 색에서 보통의 점수를 받아 저온 저장의 sample 보다는 그 선호도가 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 14. Sensory evaluation of ripe liquid of dandelion (4°C, 37°C)

Group	Taste	Flavor	Color	Overall acceptance
자당 (1:1)	4.9 ± 1.792	4.5 ± 1.716	4.5 ± 1.841	5 ± 1.491 ^{bc}
자당 (1:0.5)	3.1 ± 1.449	4.7 ± 1.767	4.1 ± 1.370	3.6 ± 1.265 ^d
올리고당 (1:1)	5.7 ± 0.949	5.7 ± 1.252	6.3 ± 1.418	5.9 ± 1.101 ^{ab}
올리고당 (1:0.5)	3 ± 0.816	4.6 ± 1.174	6.4 ± 1.075	4.2 ± 0.422 ^{cd}
고과당 (1:1)	6.2 ± 2.201	4.7 ± 1.567	6 ± 2.357	6.3 ± 2.003 ^a
고과당 (1:0.5)	1.5 ± 0.707	3.4 ± 2.171	4.1 ± 1.969	2.3 ± 1.252 ^e

Group	Taste	Flavor	Color	Overall acceptance
자당 (1:1)	5.5 ± 1.581	6 ± 1.886	5.3 ± 1.567	5.9 ± 1.595 ^a
자당 (1:0.5)	2.7 ± 1.160	5 ± 1.886	6 ± 1.633	3.2 ± 1.033 ^c
올리고당 (1:1)	3 ± 1.491	4.1 ± 2.025	5.6 ± 1.955	3.4 ± 1.174 ^{bc}
올리고당 (1:0.5)	2.5 ± 1.080	4.1 ± 1.729	4 ± 2.108	2.7 ± 1.252 ^c
고과당 (1:1)	3.7 ± 1.767	5.6 ± 1.506	5.3 ± 2.111	4.7 ± 1.494 ^{ab}
고과당 (1:0.5)	2.5 ± 1.354	4.6 ± 1.647	4.2 ± 2.201	3.5 ± 1.509 ^{bc}

1) Mean ±S.D.

2) Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

라. 민들레 발효차 제조

1) 민들레 발효차 제조

4월 초순경 채취한 어린 민들레 잎을 증숙, 건조, 발효, 초핑 과정을 거쳐 민들레 발효차를 제조하였다. 세척 후 선별한 어린잎을 steam을 이용하여 5분과 10분간 증숙한 후 수분 함량 20-30% 정도까지 1차 건조를 시켰다. 건조가 완료된 잎은 37℃, 상대습도 95%에서 12시간과 24시간 동안 발효과정을 거쳐 최종 수분 함량이 10% 이하가 될 때까지 45℃ 열풍 건조기로 건조하였다. 건조가 끝난 차잎은 초핑기를 이용하여 tea-bag용 사이즈로 분쇄하였다. 증숙 시간별, 발효 시간별 제조한 발효차는 Fig. 10과 같다. 현재 시판되고 있는 tea-bag 제품((주)민들레식품, 참여기업)보다 진한 갈색을 띄었으며, 증숙 시간이 증가할수록 잎의 색이 더 진한 경향을 나타내었고 발효 시간에 따른 차이는 뚜렷하지 않은 것으로 판단된다.

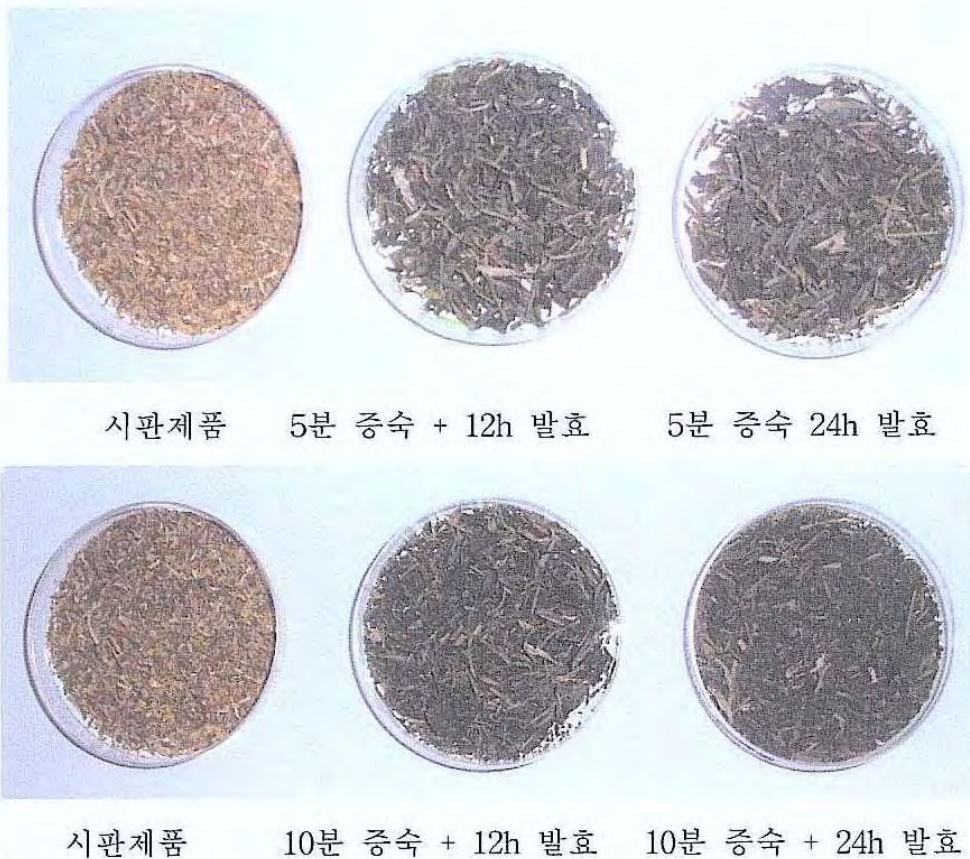


Fig. 10. Photograph of fermented dandelion teas.

2) 색도, 투과도 및 탁도

민들레 발효차 1.5 g에 70℃ 물 80 mL을 가하여 2분간 침출한 후 침출액의 색도, 투과도 및 탁도를 측정한 결과는 Table 15와 같다. L 값은 시판제품(A)이 37.43으로 가장 높았고, 10분 증숙 + 24h 발효군(E)가 15.97로 가장 낮았다. 증숙 시간에 따라서는 5분 증숙 처리구(B, C)가 28~29, 10분 증숙 처리구(D, E)가 15~16으로 증숙 시간이 길어질수록 L 값이 감소하는 경향이나 같은 증숙시간인 경우 발효 시간에 따라서는 L 값의 차이가 없는 것으로 나타났다. a 값의 경우에는 A가 가장 낮은 -3.68을 나타내었고, E가 가장 높은 값을 보여 a 값은 증숙시간이 길어지고 발효시간이 길어질수록 점차 증가하는 경향을 보였다. 반면 b 값은 이와는 달리 C에서 가장 낮은 -4.25를 나타내었고, E에서 가장 높은 3.09를 나타내어 일정한 경향을 나타내지는 않았다. 투과도의 경우에는 A와 B가 각각 97.2와 96.5로 유사한 값을 보였으며, D가 가장 낮은 투과도(71.1)를 보였다. 탁도 역시 투과도와 유사한 경향으로 D에서 가장 높게 나타났다. 이는 증숙과 발효과정에 따라 용출되는 고형물의 종류와 함량이 다른 것으로 생각되지만, 초핑과정에 일어날수 있는 불균일한 입자 형태와 크기에도 영향을 받는 것으로 생각된다.

Table 15. Color, transmittance and turbidity of fermented dandelion teas

	L	a	b	Transmittance	Turbidity
시판제품(A)	37.43	-3.68	0.05	97.2	0.021
5분 증숙 + 12h 발효(B)	29.69	-2.21	-0.60	96.5	0.026
5분 증숙 + 24h 발효(C)	28.38	-1.87	-4.25	86.6	0.077
10분 증숙 + 12h 발효(D)	16.42	-0.01	-0.77	71.1	0.101
10분 증숙 + 24h 발효(E)	15.97	0.06	3.09	81.2	0.058

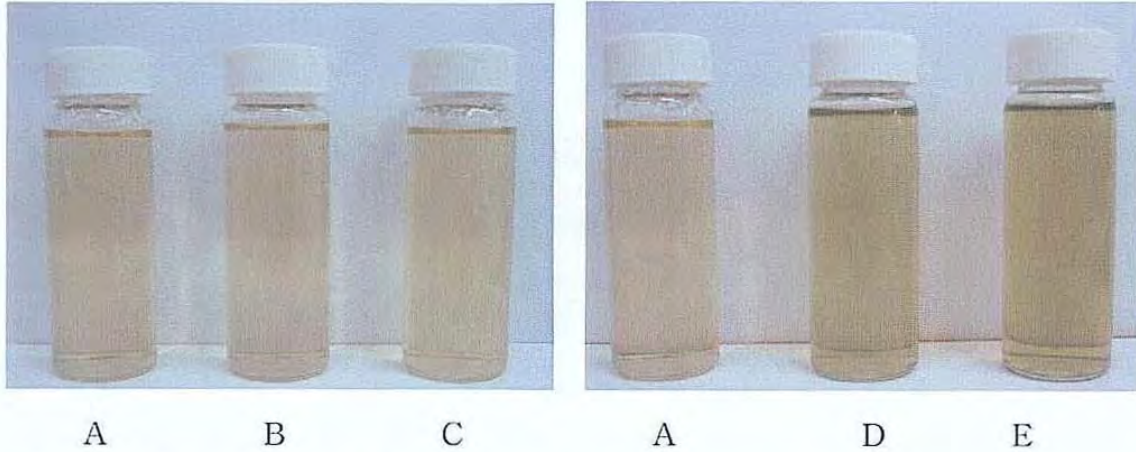


Fig. 11. Photograph of fermented dandelion teas.

3) 관능평가

민들레 발효차의 색, 향, 맛 그리고 종합적 기호도에 대한 관능평가를 실시한 결과는 Table 16과 같다. 색의 경우 D가 6.4로 가장 높았으며, 시판제품인 A가 4.9로 D는 유의차를 보였으나, B, C, E와는 유의차를 보이지 않았다. 침출차의 경우 어느 정도 색이 침출되는 것이 관능적으로 높은 점수를 보이는 것으로 나타났다. 그러나 E의 경우 과도한 색의 침출은 오히려 관능적으로 침출차로서 거부감을 가지는 것으로 조사되었다. 향의 경우에는 전반적으로 발효차 제품들이 기존의 시판제품에 비교하여 상대적으로 낮은 2.8-3.7점을 보였는데 이는 발효에 의한 바료취 또는 풀냄새에 기인한 것으로 생각되며, 향후 이를 보완할 수 있는 전처리 등의 추가 공정개선이 필요할 것으로 생각된다. 민들레 발효차의 맛에서는 A와 D가 각각 5.0와 5.1점으로 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 24시간 발효한 C와 E가 가장 낮은 점수를 보였다. 종합적인 기호도에 있어서는 A와 D가 각각 5.4와 5.2로 유의적인 차이는 없었고, C와 E가 가장 낮게 나타났다. 12시간 발효에서는 증숙시간에 따라 5분 증숙 처리한 구보다 10분간 증숙 처리한 구간에 유의적인 차이를 보였고, 24시간 발효에서는 증숙시간별로 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 본 실험에서 제조한 발효차(D)는 기존의 시판제품과 비교하여 향에서 다소 관능적 평가가 떨어지지만, 전반적으로 거의 대등한 기호도를 보여 향후 민들레를 이용한 제품 다양화 측면에서 산업화가 가능하리라 생각된다.

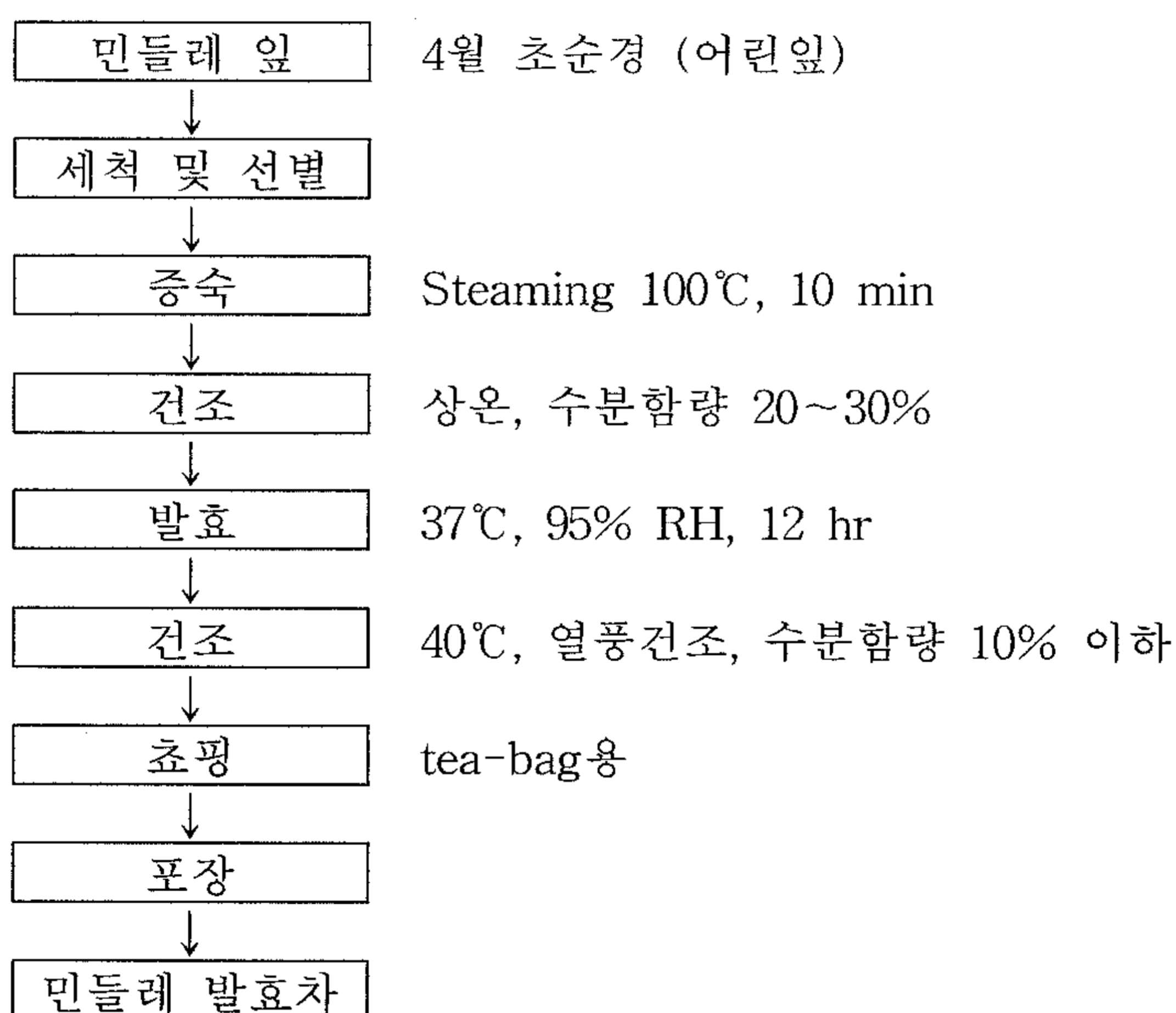
Table 16. Sensory score of fermented dandelion teas

	Sensory characteristics			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptance
시판제품(A)	4.9±0.0 ^{bc}	6.2±0.0 ^a	5.0±0.7 ^a	5.4±1.3 ^a
5분 증숙 + 12h 발효(B)	5.0±2.2 ^b	2.8±1.3 ^b	4.7±0.9 ^{ab}	4.2±0.8 ^{bc}
5분 증숙 + 24h 발효(C)	5.2±1.5 ^b	3.0±1.1 ^b	3.9±1.5 ^b	3.6±1.2 ^c
10분 증숙 + 12h 발효(D)	6.4±0.7 ^a	3.7±1.2 ^b	5.1±0.8 ^a	5.2±0.4 ^a
10분 증숙 + 24h 발효(E)	4.3±1.1 ^c	3.0±0.4 ^b	3.3±1.1 ^b	3.5±0.9 ^c

*Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's test

4) 민들레 발효차 공정도

이상의 결과를 종합하여 설정한 민들레 발효차의 최적 공정도는 Fig. 12와 같다.



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 민들레의 항산화 활성 검정 및 항산화 물질의 분리·동정

민들레의 항산화 활성을 검정하기 위하여 다양한 활성산소종에 대하여 소거 활성을 조사하였다. 민들레의 잎과 뿌리로 구분하여 용매분획, column chromatography 등을 이용하여 활성물질을 단일성분으로 분리하였고, FAB-MS, NMR 등의 기기분석을 이용하여 민들레 잎으로부터 quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, luteolin-7-glucoside를 동정하였으며, 뿌리로부터는 isorhamnetin, chlorogeni acid, ferulic acid를 구조 동정하였다. 또한 이들의 다양한 항산화 활성과 함량을 측정하였다.

2. 민들레의 항동맥경화 활성 시험

HepG2 cell을 이용한 항동맥경화 활성을 시험한 결과 민들레 잎과 뿌리의 80% 에탄올 조추출물과 용매분획, 분리한 단일 물질들은 세포내 LDL receptor binding activity를 증가시키고, mRNA의 단백질 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 HMG-CoA reductase mRNA의 발현을 억제한 동시에 ACAT-1의 발현도 억제하는 것으로 나타났다. Human LDL에 대한 산화억제 활성 시험에서는 LDL 산화에 의한 2차 산물인 MDA와 conjugated diene의 생성도 효과적으로 억제하는 것으로 나타나 동맥경화 발병의 초기 원인인 LDL의 산화적 손상을 효과적으로 방어하는 것으로 나타났다.

토기모델을 이용한 동물실험에서는 민들레의 잎과 뿌리 급여에 의하여 고콜레스테롤로 야기된 동맥경화 관련 바이오마커의 개선과 함께 심장대동맥의 지질 침착을 억제하는 것으로 나타났다.

3. 민들레를 이용한 가공제품 개발

민들레 꽃을 이용한 차제품 개발을 위하여 동결건조, 저온건조, CO₂ 처리 후 저온건조 하여 이화학적 특성 및 관능평가를 한 결과 CO₂ 처리 후 저온건조 하여 제조한 차제품의 L값 19.38, a값 -0.20, b값은 0.83이었으며, 투과도와 탁도는 각각 94%와 0.032였으며, 관능평가 결과 가장 높은 점수를 얻었다.

민들레 뿌리를 이용한 SD 분말차를 제조하기 위한 엑기스의 전처리 조건으로 190℃, 3분 볶음처리를 하였으며, 추출용매는 물 추출물의 수율이 32%로 가장 높

왔다. 분무건조를 위한 최적 배합비 설정시험에서 배합비 II(민들레 추출액(44 °Bx) 70 g, 사이클로덱스트린 10 g, 말토덱스트린 20 g, 플락토놀리고당 5 g, 아라비아 검 6 g, 증류수 89 g)로 혼합한 후 주입온도 140°C, 배출온도 95°C에서 분무속도 20 mL/min 으로 분무하였을 때 가장 품질이 좋은 것으로 나타났다.

민들레 숙성액 제조를 위해 자당, 올리고당, 고과당을 민들레 잎 중량 대비 1:2와 1:1로 첨가하여 4°C와 37°C에서 각각 숙성시켰을 때 총페놀과 플라보노이드 함량은 5주를 기점으로 감소하였으며, 최종 pH는 5.85~6.07을 유지하였다. 관능평가 결과 자당을 민들레 잎 중량 대비 1:1로 첨가한 후 37°C에서 7주간 숙성시켰을 때 가장 좋은 결과를 얻었다.

민들레 발효차 제조는 100°C에서 10분간 증숙, 상온에서 1차건조, 37°C, 95% RH에서 12시간 발효, 40°C 열풍건조(수분함량 10% 이하) 하는 것이 최적 제조공정으로 조사되었다.

이사의 결과를 바탕으로 현재 엑기스와 단순 tea-bag 제품이 주를 이루는 민들레 제품 시장에서 제품 다양화를 통한 소비자의 구매요구 충족과 민들레의 건강기능성에 대한 과학적 근거 자료로 제시가 가능하리라 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과는 2차례의 학술발표(민들레의 부위별 항산화 효과, 한국식품과학회 학술발표회(2006), 민들레 뿌리추출물의 V79-4 세포에 대한 항산화성 및 세포 성장률에 미치는 영향, 한국식품과학회 학술발표회(2006))와 전문학술지에 투고(민들레 잎과 뿌리 추출물의 항산화 효과, 한국조리과학회)투고하여 연구결과를 발표하였다. 현재 민들레의 항동맥경화 활성화에 대한 연구결과는 지속적인 논문발표를 통해 효능 우수성을 홍보할 계획이다.

또한, 본 연구에서 개발한 기술은 참여기업을 대상으로 적극적인 기술이전 및 제품 출시를 통하여 상용화할 것이며, 지속적인 기술지원을 통하여 품지개선 및 관리를 병행할 계획이다.

제 6 장 참고문헌

강경아, 조수현, 고영상, 김진숙, 현진원 (2005) 산화적 스트레스로 유도된 V79-4 햄스터 폐 섬유아세포에 대한 천연물 분리 황 산화물질 탐색. *생양학회지* 36(1): 34-37

강미정, 김광수 (2001) 민들레의 생리활성과 연구동향. *식품산업과 영양* 6(3): 60-67

손상혁, 조철훈, 오만진, 손천배, 변명우 (2006) 감마선 조사에 의한 민들레 추출물의 생리활성 및 물리화학적 변화. *산업식품공학지* 10(1): 40-47

Han, S.K., J.K. Hwang, S.N. Park, K.H. Lee, K.I. Ko, K.S. Kim. (2005) Potential effect of solvent fractions of *Taraxacum mongolicum* H. on protection of Gastric Mucosa. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(1): 84-89

Roberta RE, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radic Biol. Med.* 26: 1231-1237

Proctor, P.H.: Free radicals and human disease. In Miquel. J.A.T. Quintannilha. H. Weber(ed.) *Handbook of free radicals and antioxidants in medicine.* Vol. I, CRC Press Boca Raton. Florida. p. 17 (1992)

Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, N.M. and Verneulen, N.P.E.: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *free radical Biology & medicine*, 26, 202-226 (1999)

Nakayama, T., Niimi, T., Osawa, T. and Kawakishi, S.: The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.*, 281, 77-80 (1992)

Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z. and Ferencik, M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life science*, 65, 1864–1874 (1999)

McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein(hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049–6055 (1969)

Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P.: Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1205–1210 (2001)

Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. and Aruoma, O.I.: Free radicals and antioxidants in food and vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 7–20 (1995)

Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S. and Hayek, M.: Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 14625–14765 (1995)

Hamilton, R.J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F.B. and Pierce, H. : Chemistry of free radicals in lipids. *Food chemistry*, 60, 193–199 (1997)

Steinberg, D.: Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*, 84, 1420–1425 (1991)

Ames, B.M., Shigena, M.K., Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 7915–7922 (1993)

Gackowski, D., Kruszewski, M., Jawien, A., Ciecierski, M. and Olinski, R.: Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free radical Biology & medicine*, 31,

542-547 (2001)

Fuhrman, B., Volkova, N., Rosenblat, M. and Aviram, M.: Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxidants & Redox signaling*, 2, 491-506 (2000)

Stein, J.H., Keevil, J.G., Donald, D.A., Aeschlimann, S. and Folts, J.D.: Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 100, 1050-1055 (1999)

Kim, T.W.: Functional properties of low density lipoprotein(LDL) and oxidized-LDL. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 530-539 (1994)

Wang, W.: Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation ex vivo model : interaction of protein binding activity. *Nutrition Research*, 19, 191-202 (1999)

Luc, G and Fruchart, J.C.: Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 206-210 (1991)

Hanfang, Z., Yuzhou, Y. and Urs, P.S.: Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. *J. Biol. Chem.*, 268, 5535-5542 (1993)

Thomas, M.J., Chen, B., Zabalawi, M., Anderson, R., Wilson, M., Weinberg, R., Thomas, M.G. and Rudel, L.L.: Is the oxidation of high density lipoprotein lipids different than the oxidation of low-density lipoprotein lipids?. *Biochemistry*, 40, 1719-1724 (2001)

Chang, S., Tan, C., Frankel, E.N. and Barrett, D.M.: Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 147-151 (2000)

Chalas, J., Claise, C., Edeas, M., Messaoudi, C., Vergnes, L., Abella, A. and Lindenbaum, A.: Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed Pharmacother.*, 55, 54-60 (2001)

O'reilly, J.D., Tom, A.B., Sanders, H. and Wiseman, H.: Flavonoids protect against oxidative damage to LDL *in vitro*: Use in selection of a flavonoid rich diet and relevance to LDL oxidation resistance *ex vivo*?. *Free Rad. Res.*, 33, 419-426 (2000)

Gracia, M.T.S., Heinonen, M. and Frankel, E.N.: Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithine-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3362-3367 (1997)

Teissedre, P.S. and Waterhouse, A.L.: Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3801-3805 (2000)

Pearson, D.A., Frankel, E.N., Aeschbach, R. and German, J.B.: Inhibition of endothelial cell mediated low-density lipoprotein oxidation by green tea extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1445-1449 (1998)

Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1201 (1958)

Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takai, N. and Fukumoto, M.: Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2173-2182 (1985)

Muller, H.E.: Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, 259, 151-158 (1985)

Chung, S.K., Osawa, T., and Kawakishi, S.: Hydroxyl Radical-scavenging effect of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 118-124 (1997)

Luo, G.M., Qi, D.H., Zheng, Y.g., Mu, Y., Yan, G.L., Yang, T.Y. and Shen, J.C.: ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Letters*, 492, 29-32 (2001)

Calliste, C.A., Trouilla, P., Allais, D.P., Simon, A. and Duroux, J.L.: Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3321-3327 (2001)

Kang, M.Y.: Protective role of sesame lignans against oxidative stress. PhD. Thesis, Nagoya Univ., Japan (1999)

Hermann, E., Martina, D.R., Georg, W.S. and Gunther, J.: Biochemical, structural functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chemical Research in Toxicology*, 3, 236-254 (1990)

Esterbau, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rothender, M.: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Commun.*, 6, 67-75 (1989)

Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H.: Determination of aldehydic lipid

peroxidation product : malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Method in Enzymology, 186, 407-421 (1990)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970)

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anan. Biochem., 72, 248-254 (1964)

Benson, A.M., Hunkeler, M.J. and Talalay, P.: Increase of NADP(H) quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5216-5220 (1980)

SAS: SAS/STAT User's guide. Release 6.03 edition, SAS Institute, INC., Cary, NC, USA (1988)