

Original Article

캐롭 추출물을 활용한 경옥고의 항산화, 항염증 효과 증진

이성진^{1#}, 인창식^{2*}

1. 경희대학교 동서의학대학원 동서외과
2. 경희대학교 한의과대학 한의교육학교실

Improvement of Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Gyeongokgo Using Carop Extract

Sungjin Lee^{1,#}, Chang Shik Yin^{2*}

¹East-west Medicine Graduate School of East-west Medical Science Kyung Hee University

²Department of Medical Education, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives: Gyeongokgo is a traditional medicine typically used for individuals with wasting disorders and decreased immunity. Carop is well-known for its exceptional antioxidant effects. The objective of this study was to determine whether the antioxidant and anti-inflammatory properties of Gyeongokgo may be enhanced by the addition of carop.

Methods: Cytotoxicity was confirmed using an MTT assay. Free radical scavenging activity ability was evaluated using DPPH assay. The amount of produced nitrogen oxide, TNF- α , and IL-6 were measured using an ELISA reader.

Results: The Gyeongokgo with carop showed no cytotoxicity and a synergistic effect on antioxidant activity, when compared with the Gyeongokgo without carop. In addition, the inhibitory effect on nitric oxide production was higher for the Gyeongokgo with carop when compared with the Gyeongokgo without carop. The anti-inflammatory response of the Gyeongokgo with carop was possibly through the suppression of the production of TNF- α and IL-6.

Conclusion: The addition of carop to Gyeongokgo may be an effective measure to enhance the antioxidant and anti-inflammatory effects.

Key words : Gyeongokgo, Carop, Antioxidant, Antiinflammatory

*Corresponding author: Chang Shik Yin, Department of Medical Education, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Republic of Korea.

Tel : +82-2-961-0114, E-mail : acuyin@khu.ac.kr

First author: Sungjin Lee, East-west Medicine Graduate School of East-west Medical Science Kyung Hee University, Youngin, Republic of Korea.

Tel : +82-10-9369-6070 E-mail : kmdlsj@naver.com

서론

경옥고는 조선왕조실록과 승정원일기에 의하면 왕실에서 원기를 회복하는데 사용하였다. <동의보감>에서 타고난 수명만큼 살도록 건강하게 해주는 약이며, 인체의 부족함을 보충하여 각종 질병을 예방한다고 하였다.

경옥고는 인터페론 감마(interferon γ , IFN- γ)를 증진시켜 면역력을 증진시키는 효과가 있으며, 초미세먼지로 인해 발생하는 활성산소를 억제하고 호흡기의 염증과 손상을 억제하는 효과가 있다¹⁾. 현대인들은 과학문명의 발달 및 복잡한 일상생활로 인해 스트레스를 받고 있다. 스트레스는 코르티솔 분비 저하를 유발함으로써 면역력을 저하시킬 수 있다²⁾. 따라서 경옥고는 면역력이 저하된 현대인들에게 처방하였을 때 효과를 기대할 수 있다.

국제연합(UN)은 65세 이상을 노인으로 규정하고 전체 인구 중 노인 인구의 비율이 7% 이상이면 고령화 사회, 14% 이상이면 고령사회, 20% 이상이면 초고령 사회로 분류한다. 통계청에서 발표한 자료에 따르면 2024년 2월 기준 대한민국의 고령인구는 19.2%로 고령사회에 해당한다³⁾. 경옥고는 허혈성 뇌손상 개선효과, 파킨슨병 개선 효과 등이 알려져 있다. 따라서 뇌 건강을 증진시키기 위한 방안으로 경옥고 처방을 고려해볼 수 있다.

캐롭(Ceratonia siliqua)은 콩과 식물로 초콜릿보다 단맛이 적고 칼로리가 낮으며 초콜릿과 비슷한 맛을 내면서도 카페인이 없다. 열매를 캔디로 먹거나 초콜릿 대신 카페인이 없는 음식의 풍미를 내는데 사용한다. 캐롭은 비타민 E, D, C, B6, 나이아신, 엽산 성분이 많으며, 이로 인해 항산화 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다⁴⁾.

항산화는 노화⁵⁾, 면역력⁶⁾과 밀접한 연관이 있다. 따라서 경옥고의 항산화 효과를 높여줄 수 있다면 면역력 증진 및 노인 건강 증진에 도움을 줄 수 있다. 캐롭 추출물을 경옥고와 혼합하였을 때 초콜릿 향을 추가할 수 있을 것이라는 기대 외에도 경옥고의 항산화 효과 및 항염증 효과를 증대시킬 수 있다는 소견을 확인하여 이에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 재료

경옥고는 해밀 한의원 원외탕전실(부산 기장군, 한국)에서 제조한 경옥고를 사용하였다. 경옥고는 생지황 100 중량부를 기준으로, 인삼 9.375 중량부, 복령 18.75 중량부, 및 봉밀 62.5 중량부의 원료를 사용하여 제조하였다. 상기 경옥고에 10배 중량의 50% 에탄올을 가하여 72시간 동안 실온에서 교반 추출하여 경옥고 추출물을 제조하였다.

캐롭은 푸드아틀리에(서울, 한국)에서 구입하였다. 준비된 약재를 증류수에 세척한 뒤 건조하였다. 건조된 캐롭을 분쇄한 후, 10배 중량의 50% 에탄올을 가하여 72시간 동안 실온에서 교반 추출하여 캐롭 추출물을 제조하였다.

스테비아(Stevia rebaudiana)는 주)CK에서 인도산을 구입하여 사용. 준비된 약재를 증류수에 세척한 뒤 건조하였다. 건조된 캐롭을 분쇄한 후, 10배 중량의 50% 에탄올을 가하여 72시간 동안 실온에서 교반 추출하여 스테비아 추출물을 제조하였다.

	Gyeong o k g o (%)	Carop (%)	Stevia (%)	Total (%)
G	100	-	-	100
C	-	100	-	100
S	-	-	100	100
G1:C1	50	50	-	100
G1:C2	33.3	66.7	-	100
G2:C1	66.7	33.3	-	100
G1:C1+S	45	45	10	100
G1:C2+S	30	60	10	100
G2:C1+S	60	30	10	100

Table 1. Mixed ratio of Gyeongokgo, Carob and Stevia.

Table 1.과 같이 시료 G, C, S는 경옥고, 캐롭, 스테비아를 각각 단일 성분으로 하였다. 시료 G1:C1, G1:C2, G2:C1은 스테비아를 제외하고 경옥고와 캐롭을 각각 1:1, 1:2, 2:1로 혼합하였다. 시료 G1:C1+S, G1:C2+S, G2:C1+S는 스테비아를 10%, 경옥고와 캐롭을 각각 1:1, 1:2, 2:1로 혼합하여 총 비율이 100%가 되도록 준비하였다.

2. 방법

1) 항산화 활성 검사

경육고, 캐롭 및 스테비아의 단일추출물 또는 복합추출물의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성을 알아보기 위하여 A에서 I의 시료를 농도별(31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml)로 96 well plate에 분주하였다. 분주된 시료에 0.2mM DPPH 용액과 혼합하여 빛을 차단하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, Microplate reader(Molecular Devices FilterMax F5; San Francisco, CA, USA) 기기를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 세포독성 검사

세포 독성은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 비색정량분석법(colorimetric assay)을 사용하여 측정하였다. 인큐베이션 72시간 후, 배지의 부피는 1ml로 감소하였고, 1mg/ml MTT의 100 μ l는 각벽에 첨가되었다. 이후, 대식세포주(Raw 264.7)를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 5%의 CO₂ 및 95%의 O₂ 존재 하에 배양하였다. 대식세포주(Raw 264.7)는 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 대식세포주(Raw 264.7)에 lipopolysaccharide(LPS)를 200ng/ml 농도로 처리하였고, 농도별(1, 10, 100 μ g/ml)로 처리하였으며, 이후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 1mg/ml의 MTT를 처리하고 3시간 후, 세포에 MTT 처리로 인해 생성된 포마잔(formazan)을 DMSO 용매로 녹여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 산화질소 생성 억제

10% Fetal bovine serum(FBS)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% FBS, 100 μ g/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 첨가한 배지에 대식세포주(Raw 264.7)를 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 시료를 각각 1, 10, 및 100 μ g/ml 농도로 희석한 시료와 LPS(200ng/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후, 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess reagent[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphthylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 μ l를 혼합하여 96 well 플레이트에서 10분 동안 반응시켰다. 상기 Griess reagent 반응 후, Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA) 리더를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 산화질소의 양을 측정하였다. 생성된 아질산염

(nitrite)의 농도는 아질산나트륨(sodium nitrite)을 DMEM 용액에 용해한 표준 곡선을 이용하여 계산하였다. 비교실험을 위해 덱사메타손(Dexamethasone, 10 μ M)을 양성대조군으로 사용하였다.

4) 염증성 사이토카인 생성 억제 활성

염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 발현 변화를 ELISA 리더를 사용하여 측정하였다. 96-well plate에 각 사이토카인에 대한 단일 클론 항체를 PBS(pH 7.4)로 희석하여 96-well plate에 100 μ l씩 각각 코팅한 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 방치하였다. 상기 plate를 0.05% tween이 함유된 PBS로 세정 후 Reagent Diluent(1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃ in PBS) 300 μ L로 처리하여 1시간 동안 blocking 하였다. 여러 번 세정한 다음, A에서 I의 시료를 농도별(1, 10, 및 100 μ g/ml)로 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 방치하였다. 방치 시간이 경과된 후, 각 well을 다시 세정하였고, 바이오틴(biotin)이 결합된 2차 항체(Detection antibody) 100 μ l를 첨가하여 다시 2시간 동안 방치하였다. 웰(Well)을 씻어낸 다음 Streptavidin-HRP 100 μ l를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 방치하여 웰(well)을 다시 세정한 다음, 기질인 HRP 용액을 첨가하고, 발색반응은 흡광도 450nm에서 측정하였다.

5) 자료분석 및 통계처리

결과 통계처리는 GraphPad Prism8를 사용하였으며, 유의성 검정은 One way analysis of variance (ANOVA)로, 통계적 검정은 Student-Newman-Keuls test를 사용하였다. *p* 값이 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과

1. 항산화 활성 검사

Concentration (μg/ml)	K	C	S	G1: C1	G1: C2	G2: C1	G1: C1 +S	G1: C2 +S	G2: C1 +S
31.25	30.52	16.27	38.82	27.73	29.32	28.34	26.42	28.27	29.16
62.5	31.5	20.17	46.98	29.41	33.75	29.94	29.45	33.11	30.67
125	33.20	22.50	59.88	38.27	41.17	34.17	31.81	42.71	35.46
250	34.80	22.77	74.16	48.94	53.11	43.36	37.52	60.79	44.91
500	40.46	23.09	91.29	66.45	66.97	56.48	45.12	80.26	56.29
1,000	58.36	25.10	96.02	79.24	89.74	72.70	62.80	87.30	68.28

Table 2. DPPH assay. Samples of Preparation Examples A to I were dispensed into 96 well plates by concentration (31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 μg/ml) in order to determine the DPPH radical scavenging activity of a single extract or composite extract of Gyeongokgo, carob, and stevia. The dispensed sample was mixed with a 0.2 mM DPPH solution to block light and reacted at 37°C for 30 minutes, and then absorbance was measured at 520 nm using a microplate reader (Molecular Devices FilterMax F5; San Francisco, CA, USA) instrument.

경옥고(G) 또는 캐롭(C) 단일추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 다소 낮은 것으로 나타났으나, 이들을 1:1, 1:2, 2:1의 중량비로 조합한 G1:C1, G1:C2, G2:C1의 2중 복합추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 각각의 단일추출물 대비 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 상기와 같은 결과를 토대로, 경옥고 단일추출물 또는 캐롭 단일추출물의 항산화 활성은 그리 높지 않으나, 이들 2중 성분을 조합함에 따라 항산화 활성에 시너지 효과가 발생함을 확인할 수 있었다.

2. 세포 독성 검사

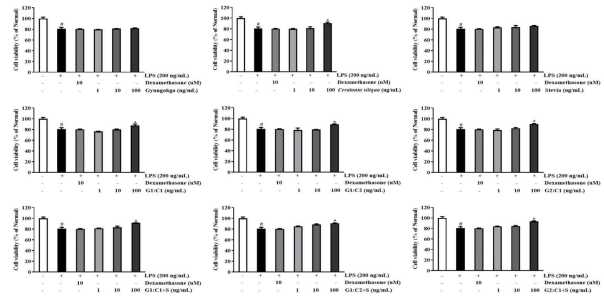


Fig. 1. MTT assay. A macrophage line (Raw 264.7) was treated with LPS at a concentration of 200 ng/ml. The cells were treated with each concentration (1, 10, 100 μg/ml), and the formazan produced by the MTT treatment was dissolved in DMSO solvent to measure absorbance at 570 nm.

LPS 처리한 대식세포주의 세포 생존율이 20% 정도 감소하는 것으로 관찰되었고, 단일추출물 중 가장 세포 생존율이 우수했던 캐롭 단일추출물을 처리한 시험군에서는 시료 무처리군 대비 세포 생존율이 각각 $80.18 \pm 0.71\%$ (1μg/ml), $81.03 \pm 2.82\%$ (10μg/ml) 및 $90.50 \pm 2.07\%$ (100μg/ml)로 측정되었으나, G의 3중 복합추출물을 처리한 시험군에서는 시료 무처리군 대비 세포 생존율이 각각 $81.45 \pm 0.54\%$ (1μg/ml), $83.12 \pm 2.89\%$ (10μg/ml) 및 $91.66 \pm 0.19\%$ (100μg/ml)로 측정되었고, H의 3중 복합추출물을 처리한 시험군에서는 시료 무처리군 대비 세포 생존율이 각각 $85.09 \pm 0.71\%$ (1μg/ml), $88.54 \pm 1.23\%$ (10μg/ml) 및 $90.83 \pm 0.81\%$ (100μg/ml)로 측정되었으며, I의 3중 복합추출물을 처리한 시험군에서는 시료 무처리군 대비 세포 생존율이 각각 $84.04 \pm 0.50\%$ (1μg/ml), $84.68 \pm 1.15\%$ (10μg/ml) 및 $93.44 \pm 1.71\%$ (100μg/ml)로 측정되었다.

상기 결과를 바탕으로 캐롭 및 경옥고의 2중 복합추출물, 또는 캐롭, 경옥고 및 스테비아의 3중 복합추출물은 세포독성이 없으며, 세포의 성장을 촉진하는 우수한 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

3. 산화질소 생성 억제

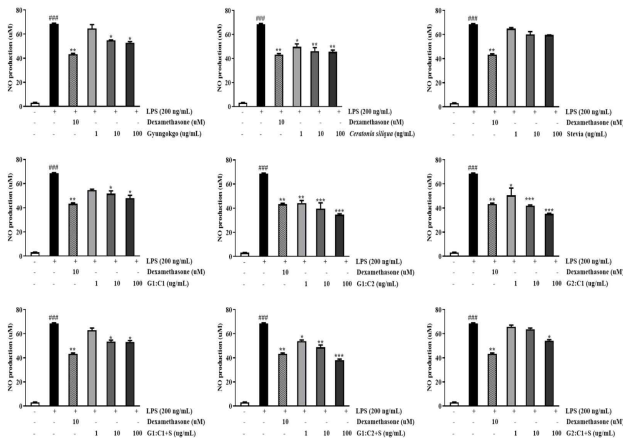


Fig. 2. Inhibition of nitric oxide production. The amount of produced nitrogen oxide was measured by measuring absorbance at 540 nm using an ELISA reader. The concentration of produced nitrite was calculated using a standard curve in which sodium nitrite was dissolved in a DMEM solution. For the comparative experiment, dexamethasone (10µM) was used as a positive control group.

경옥고 추출물과 캐롭 추출물이 1:2의 중량비로 혼합된 G1:C2의 복합추출물의 산화질소 생성 억제에 가장 좋은 효과를 나타내는 것으로 분석되었는데, E의 시료는 1, 10, 및 100µg/ml 농도에서 LPS(200ng/ml) 처리군 대비 각각 35%, 42% 및 49% 감소한 산화질소 생성량이 측정되어 2종 성분의 조합에 따른 현저히 증가한 산화질소 생성 억제 활성을 확인할 수 있었다. 또한, 경옥고 추출물과 캐롭 추출물이 1:1의 중량비로 혼합된 G1:C1의 복합추출물도 각각의 단일추출물 대비 현저히 개선된 산화질소 생성 억제 활성이 확인되었다.

4. 염증성 사이토카인 생성 억제 활성

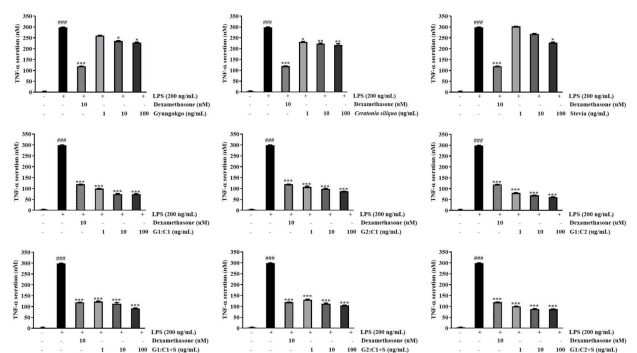


Fig. 3. Inhibition of TNF-α production. It was measured using an ELISA assay. After the sample was added by concentration (1, 10, and 100 µg/ml), 100 µl of detection antibody bound with biotin was added. After standing for 2 hours, 100 µl of Streptavidin-HRP was added. The HRP solution was added, and the color development reaction was measured at an absorbance of 450 nm.

경옥고, 캐롭, 스테비아 단일추출물은 최고 농도인 100µg/ml 농도에서 양성대조군인 텍사메타손의 효과 대비 24% 내지 27% 수준의 미미한 TNF-α 생성 억제 활성을 나타내었다. 이에 반해, 경옥고와 캐롭을 1:1, 1:2, 2:1의 중량비로 조합한 G1:C1, G1:C2, G2:C1의 2종 복합추출물은 양성대조군인 텍사메타손과 비교하여 더욱 우수한 억제 활성을 나타내었는데, G1:C1는 최고 농도인 100µg/ml 농도에서 양성 대조군 대비 38% 개선된 TNF-α 생성량이 측정되었고, G1:C2는 49% 개선된 TNF-α 생성량이 측정되었으며, G2:C1은 27% 개선된 TNF-α 생성량이 측정되었다.

또한, 경옥고, 캐롭, 및 스테비아의 3종 복합추출물을 처리한 시험군에서도 양성대조군 대비 월등하게 우수한 실험 결과가 관찰되었는데, 2종 복합추출물 대비 스테비아의 첨가로 인해 TNF-α 생성량 억제 활성이 소폭 개선되는 경향을 보였다.

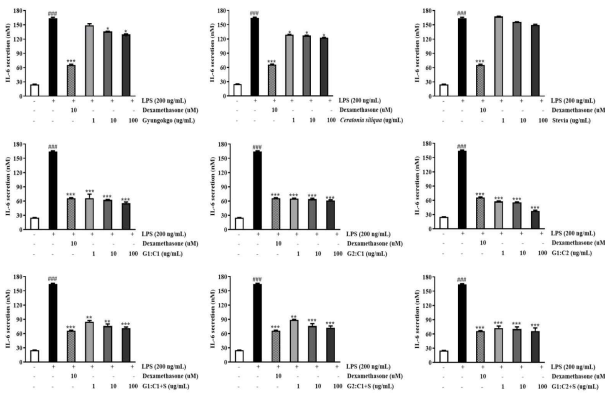


Fig. 4. Inhibition of IL-6 production. It was measured using an ELISA assay. After the sample was added by concentration (1, 10, and 100 μg/ml), 100 μl of detection antibody bound with biotin was added. After standing for 2 hours, 100 μl of Streptavidin-HRP was added. The HRP solution was added, and the color development reaction was measured at an absorbance of 450 nm.

경옥고, 캐롭, 스테비아 단일추출물은 최고 농도인 100μg/ml 농도에서 양성대조군인 텍사메타손 대비 미미한 수준의 IL-6 생성 억제 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 경옥고와 캐롭을 1:1, 1:2, 2:1의 중량비로 조합한 G1:C1, G1:C2, G2:C1의 2종 복합추출물은 양성대조군인 텍사메타손과 비교하여 더욱 우수한 IL-6 생성 억제 활성을 나타내었는데, G1:C1는 최고 농도인 100μg/ml 농도에서 양성대조군 대비 16% 개선된 IL-6 생성량이 측정되었고, G1:C2는 43% 개선된 IL-6 생성량이 측정되었으며, G2:C1은 7% 개선된 IL-6 생성량이 측정되었다. 또한, 경옥고, 캐롭, 및 스테비아의 3종 복합추출물을 처리한 시험군에서도 양성대조군과 유사한 실험 결과가 관찰되었는데, 2종 복합추출물 대비 스테비아의 첨가로 인해 IL-6 생성량 억제 활성은 소폭 감소하는 경향을 보였다.

상기 실험 결과를 바탕으로 본 발명의 경옥고 및 캐롭의 2종 복합추출물, 또는 경옥고, 캐롭, 및 스테비아의 3종 복합추출물은 TNF-α와 IL-6의 생성을 효과적으로 억제하여 염증반응 억제에 효과적임을 확인할 수 있었다.

고찰

본 연구에서는 경옥고에 캐롭을 추가하였을 때 항산화, 항염증 효과를 높여줄 수 있는지 평가하고자 하였다. 또한, 제품화 단계에서 스테비아를 추가하여 단맛을 높이는 것을 고려하여 실험을 설계하였다. 경옥고, 캐롭, 스테비아 복합추출물의 세포

독성, DPPH 라디칼 소거능, 일산화질소 생성 억제, 염증성 사이토카인 억제 여부를 연구하였다. 본 연구를 통해 경옥고, 캐롭, 스테비아 복합추출물은 세포 독성이 없으며, 세포의 성장을 촉진하는 우수한 효과가 있고, DPPH 라디칼을 소거하는 우수한 항산화 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 염증매개인자인 일산화질소의 생성을 효과적으로 억제하고, 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6의 발현을 억제하여 우수한 항염증 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 확인한 결과를 근거로 경옥고에 캐롭 추출물을 첨가했을 때 항산화, 항염증 효과를 높일 수 있을 것으로 판단된다.

캐롭은 이화학적 분석과 관능 평가면에서 기존 초콜릿과 유사한 모습을 보여주고 있다⁷⁾. 캐롭으로 머핀을 만들었을 때 코코아 가루를 추가한 것보다 덜 쓰고 더 달콤했다는 연구 결과도 있다⁸⁾. 이와 같이 캐롭을 이용해 초콜릿을 대체하려는 연구가 이루어지고 있다. 한약 맛을 개선하기 위해 초콜릿을 이용하는 방법도 있으나⁹⁾, 카페인을 과잉 섭취하는 경우 부작용에 대한 우려가 있다. 특히, 청소년의 카페인 섭취가 늘어나고 있는 것으로 알려져 있어 이에 대한 주의가 필요할 것으로 사료된다¹⁰⁾. 카페인은 없어 초콜릿 대용품으로 이용 가능한 캐롭 추출물¹¹⁾을 한약에 추가하여 제형을 변화시키는 것을 고려해볼 수 있다.

본 연구는 한의원 비용 처방 중 하나인 경옥고를 기본 처방으로 하고, 복용률을 높이기 위해 캐롭 추출물을 추가하여 연구를 진행하였다. 한방의료 진료환경에서 마주하게 되는 대표적인 애로사항은 복용률이 저하되는 상황이며, 어린 아이와 어른 모두 기호의 문제로 기존의 탕약을 복용하기 힘들어하는 경우가 있다. 초등학교 자녀를 둔 부모 331명을 대상으로 한 연구에서 응답자의 61.1%가 자녀들이 맛이나 냄새로 인해 한약 복용을 힘들어했다고 답했다¹²⁾. 일제강점기 서양 의학이 조선 사회에 들어오면서 탕약에서 벗어난 다양한 제형에 대한 개발이 이루어졌다¹³⁾. 최근 탕약, 알약 외에도 시럽, 젤리, 사탕 등 다양한 제형이 개발되고 있다.

본 연구에서 확인한 캐롭 첨가 시 항산화, 항염증 효능 개선 가능성은 향후 캐롭을 첨가하여 한약 제형을 개선하는 경우 단순한 향미 개선 외에 기능 개선의 효과를 함께 기대할 수 있다는 점에서 추후 추가적인 연구개발과 적용확대 가능성 면에서 긍정적이라 할 수 있다.

다만, 실제로 한약에 캐롭을 추가했을 때 관능적인 면에서 환자들의 거부감이 덜하고 복용률이 높

아지는지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

경옥고 및 캐롭의 2종 복합추출물과 경옥고, 캐롭 및 스테비아 3종 복합추출물은 아래의 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

1. 세포독성이 없으며, 세포의 성장을 촉진하는 효과가 있다.
2. DPPH 라디칼을 소거하는 항산화 활성을 나타내었다.
3. 염증매개인자인 일산화질소의 생성을 효과적으로 억제하고, 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 발현을 억제하여 항염증 활성을 나타내었다.

이해관계

The authors declare no conflict of interest.

참고문헌

1. Lee WH, Bae JS.. Inhibitory effects of Kyung-Ok-Ko, traditional herbal prescription, on particulate matter-induced vascular barrier disruptive responses. *International journal of environmental health research*, 2019 ; 29(3) : 301-11.
2. Lee SO, Suh MH. Exploring Subjective Stress, Sleep and Diurnal Variation of Salivary Cortisol in Korean Female Adults. *Journal of Korean biological nursing science*. 2016 ; 18(1) : 9-16.
3. Korean Statistical Information Service. Population dashboard of Republic of Korea.[serial online] 2024 Available from : URL : <https://kosis.kr/visual/populationKorea/PopulationDashboardMain.do>
4. Papaefstathiou E, Agapiou A, Giannopoulos S, Kokkinofa R. Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food sci nutr*. 2018 ; 6(8) : 2151-61.
5. Lim IS. The Approach of Antioxidant,Endocrine,&Immune System on Exercise&Aging. *Exrcise science*. 2002 ; 11(1) :

- 35-51.
6. Choi IP. Reactive Oxygen Species and Cancer. *Hanyang Medical Reviews*. 2013 ; 33(2) : 118-22.
7. Akdeniz E, Yakışık E, Rasouli Pirouzian H, Akkın S, Turan B, Tipigil E, Toker OS, Ozcan O. Carob powder as cocoa substitute in milk and dark compound chocolate formulation. *J Food Sci Technol*. 2021 ; 58(12) : 4558-66.
8. Pawłowska K, Kuligowski M, Jasińska-Kuligowska I, Kidoń M, Siger A, Rudzińska M, Nowak J. Effect of Replacing Cocoa Powder by Carob Powder in the Muffins on Sensory and Physicochemical Properties. *Plant Foods Hum Nutr*. 2018 ; 73(3) : 196-202.
9. Yoo KM, Lee KW, Moon BK, Hwang IK. Antioxidant Characteristics and Preparation of Chocolate Added with Sochungryong-Tang (Oriental Medicinal Plants Extract). *Korean J Food Cookery Sci*. 2005 ; 21(5) : 585-90.
10. Park EJ, Kim SY. Caffeinated Food Consumption Patterns and Level among High School Students in Yongin Region. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2017 ; 46(9) : 1128-36.
11. Tounsi, L., Mkaouar, S., Bredai, S., Kechaou N. Valorization of carob by-product for producing an added value powder: characterization and incorporation into Halva formulation. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2022 ; 16 : 3957-66.
12. Kim MK, Jung JH, Min Dlm Lee HJ, Park EJ. Study to Examine the Awareness of the Parents, whose Children are Attending an Elementary School in Gyeonggi-do, on Herbal Medication and Health Functional Food. *J Korean Oriental Pediatrics*. 2011 ; 25(1) : 111-8.
13. Hwang JH, Namil Kim. A study of how proprietary medicines during the Japanese colonial period led to transforms in Korean medicine and Korean medicine prescriptions. *The Journal of Korean medical history*. 2020 ; 33(1) : 99-112.