

국내 자생 엉겅퀴 6품종의 실리마린 함량 및 간 보호 효과

남승희* · 이방희 · 김연지

전남대학교 농업생명과학대학 식품공학과 & 농업과학기술연구소

Silymarin Contents and Liver Protection Effects of Six Domestic Cultivated Thistles

Seung-Hee Nam*, Bang-Hee Lee and Yeon-Ji Kim

*Institute of Agricultural Science and Technology & Food Science,
College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea*

*Corresponding author: namsh1000@jnu.ac.kr

ABSTRACT

Six kinds of domestically cultivated thistles were collected and studied to compare their silymarin contents, antioxidant activity alcohol detoxification and liver protection effects using rat primary hepatocyte. There are *Cirsium pendulum*, *Cirsium setidens*, *Carduus crispus*, *Cirsium japonicum*, *Cirsium japonicum nakaisanum*, and *Cirsium japonicum spinosissimum*. Six types of thistles leaves were extracted using 80% ethanol and among samples, *Cirsium pendulum* thistle showed highest silymarin content (61.2 mg/g DW), alcohol detoxification (15.2 mU/mL) and antioxidant activity (ABTS and DPPH radical scavenging effects). Also, *Cirsium pendulum* extract showed a 85% liver protection function over ethanol or hydrogen peroxide treated rat primary hepatocytes, similar effect with silymarin (87%) as positive control. In conclusion, those results indicated that *Cirsium pendulum* extract is likely a superior functional food ingredient with liver protection and alcohol detoxification.

Additional key words: Thistles, Liver protection, Alcohol dextoxification, Silymarin

서 론

엉겅퀴속(*Cirsium* Miller)은 국화과(Asteraceae)의 국화아과(Asyeroideae) 엉겅퀴족(Cynareae) 엉겅퀴아족(Carduinae)에 속하는 식물군으로 전 세계적으로 분포한다(Kim and Won, 2009). 엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense* or DC)는 2년초로 연한 줄기는 껍질을 벗겨서 생으로 먹거나 나물로 먹으며, 항산화 효능 및 간 보호 효과가 탁월하다는 실리마린이라는

성분을 많이 함유하고 있다고 알려져 있다(Karkanis et al., 2011). 종류로는 큰잎엉겅퀴(*Cirsium pendulum*), 곤드레'라고도 하는 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens*), 지느러미엉겅퀴(*Carduus crispus*), 또한 실리마린 고함유로 알려진 흰무늬엉겅퀴(*Silybum marianum*)은 유럽 등지에서 강정제 및 천연 간보호제로 사용되고 있다.

엉겅퀴속 식물은 생리활성이 뛰어난 apigenin, luteolin, myricetin, kaempferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-O-neo-hes-

perioside를 포함한 약 78종의 flavonoid가 확인되었으며, apigenin은 암 예방 효과 및 신경보호 효과, 항염증, 항진경 및 항균작용 등의 생리 활성이 있다(Chung et al., 2007, Liu et al., 2006). 또한 엉겅퀴는 지질과산화물을 억제하고, glutathione reductase의 활성을 증가시켜 알코올 해독을 촉진시키므로 간 보호 작용이 있으며, 고지혈증 시 혈청 지질 함량을 감소시키고, 간장 내 총 콜레스테롤, 중성지질 등의 농도를 감소시켜 간 손상을 지연시킬 수 있다(Park et al., 2004). 흰무늬엉겅퀴(*Silybum marianum*)에 함유된 silymarin은 flavolignan으로 간장 보호 작용과 알코올 유도지질 산화의 예방 및 알코올성 간경화 등에 대한 보호 효과가 보고된바 있다(Wallace et al., 2005). 또한 큰엉겅퀴에서 cirsimarin을, 가시엉겅퀴(*Cirsium xanthocanthum*)의 뿌리에서는 linarin이 검출되었다(Kim and Won, 2009).

그러나 이러한 과학적인 근거에도 불구하고, 국내 자생 또는 재배된 엉겅퀴에 대한 연구는 아직까지 전무하며, 간에 좋은 효과가 있는 silymarin이 함유되어 있다고 밝혀진 우유엉겅퀴(milk thistle)는 유럽 남부와 아시아가 원산지로 남아메리카, 유럽, 아프리카에서 재배되고 있고, 우리나라에서는 한의원에서 수입을 통해 사용되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 예전부터 식용과 민간요법으로 사용된 엉겅퀴 6종 고려엉겅퀴(곤드레), 가시엉겅퀴, 좁은잎엉겅퀴, 지느러미엉겅퀴, 큰잎엉겅퀴, 재래엉겅퀴의 추출물에 대한 페놀, 플라보노이드 함량, 항산화 효과 및 실리마린 함량과 간 보호 효과에 대하여 연구하여 기능성 식품 개발의 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 국내 재배 엉겅퀴 시료 준비

엉겅퀴를 품종별, 부위별로 실리마린 함량 및 간 보호 효과 등을 조사하기 위해 5~6월에 6 품종의 재배된 엉겅퀴를 수확하였다. 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens*)와 큰잎엉겅퀴(*Cirsium pendulum*), 재래엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)는 전남농업기술원(전남 나주)에서 포장에서 재배, 가시엉겅퀴(*Cirsium japonicum spinosissimum*) 좁은잎엉겅퀴(*Cirsium japonicum nakaisanum*), 지느러미엉겅퀴(*Carduus crispus*)는 전남농업기술원 나주 재배포장 및 한방산업진흥원(전남 장흥)

하우스에서 재배된 것을 채취해 사용하였다. 80% 에탄올을 추출을 위해 잎을 3~5cm 크기로 절단, 동결건조 후 시료 1 g과 80% 메탄올을 20 mL 삼각플라스크에 넣고 혼합 후 60℃ Soxhlet 추출기에서 3시간 환류 추출한 다음 Whatmann #2 filter로 여과해 시험을 수행하였다. 추출된 시료는 여과 후 감압농축하여 완전 건조시킨 다음 건조물의 무게를 측정한 뒤 100 mg/mL의 농도가 되도록 DMSO(dimethylsulfoxide) 용매에 녹인 뒤 -20℃에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 엉겅퀴 추출물의 성분 및 효능 평가

가. 총페놀 및 플라보노이드 함량 조사

총페놀 함량은 Folin-Denis 시약을 사용, 시료에 sodium carbonate(7.5%) 첨가 후 100분간 암상태에서 반응시킨 시료를 760 nm에서 표준물질 sodium gallic acid를 이용하여 총페놀 함량을 정량하였다. 플라보노이드는 0.2 mL, diethyleneglycol 2 mL를 잘 섞어 1 N NaOH 0.02 mL 혼합해 37℃에서 1시간 반응 후 420 nm에서 표준물질 rutin을 사용하여 측정하였다(Park et al., 2004).

나. 실리마린 정량 (C_{18} reverse-phase HPLC)

6가지 silymarin standards(Chromadex, USA), silybin A & B, isosilybin A & B, silychristin, silydianin을 이용하여 C_{18} Reverse-phase HPLC Column으로 정량 분석하였고, Column은 Agilent Pre-18, scalar (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)를 사용하였고, 분석용매는 acetonitrile (A)과 0.1% formic acid(aq, B)를 사용하여 gradient 조건(0 min-20% A, 15 min-30% A, 20 min-40% A, 25 min-45% A, 25 min-45% A, 30 min-45% A, 35 min-20% A)으로 유속 0.8 mL/min으로 사용하였다. 시료 주입량은 10 μ L이며, 288 nm 흡광도에서 정량 분석하였다.

다. 항산화 효과 (DPPH, ABTS 소거능) 및 아질산염 소거능

항산화력 검정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하여 측정했는데, 일정무게 과일을 착즙하여 여과한 여액 1.0 mL에 60 μ M DPPH 2 mL와 대조구로 0.01% butylated hydroxytoluene, ascorbic acid,

α -tocopherol 각각 2 mL를 가해 5분간 섞고 37℃에서 30분간 방치 후 VERSA MAX microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용해 분광광도계 515 nm에서 측정하였다. ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로, 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정한 후 3.0 mL를 취하여 추출물 1.0 mL를 가한 다음, 실온에서 10분간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 10mM sodium nitroprusside 수용액 2 mL에 0.01M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 mL와 시료 용액 0.5 mL를 가하여 25℃에서 100분간 반응시킨 후 반응액 1 mL 취해 sulfanilic acid(0.33% in 20% acetic acid) 1 mL와 혼합한 후 5분간 방치한 다음 여기에 0.1 % (w/v) naphthylethylene-diamine dihydrochloride 용액(in 20% acetic acid)을 1 mL 가하여 30분간 방치 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 엉겅퀴 추출물의 알콜분해능 및 간 보호 효과

가. 알콜분해능

Kim et al (2012)가 수행한 것처럼, 50 mM sodium pyrophosphate buffer(pH 8.8)와 15 mM β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide(NAD)를 혼합한 후 95% (v/v) ethanol을 첨가하고, 여기에 엉겅퀴시료 추출물을 혼합 후 bovine serum albumin(pH 7.5)에 녹인 alcohol dehydrogenase(recombinant, expressed in *E. coli*), ADH (0.75 unit/mL)를 첨가한 후 VERSA MAX microplate reader(Molecular Device, USA) 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 실리마린을 알콜분해능 표준물질을 기준하여 엉겅퀴 추출물과 알콜분해능을 비교하였다.

나. 간 보호 효과

간 보호 효과는 Zaulet et al.(2017)과 Wallace et al. (2005)에 의해 수행된 것처럼, 8주령의 Sprague-Dawley(SD) rat을 중앙실험동물(Seoul, Korea)로부터 분양

받아 1주일 동안 안정화하였다. 실험 시작 전 자유식이 및 적정 사육조건 하(온도: 18±4℃, 습도: 70±10%, 명암: 일일 12시간 주기)에서 예비 사육을 통해 적응 기간을 두었다. 몸무게가 220~250 g 정도가 되었을 때 간 적출을 수행하였다. Ether를 이용해 마취 후, 개복하여 간의 문맥을 통해 HBSS (Hanks' Balanced Salt solution)을 순환하여 혈액을 완전히 제거하였다. 그리고 collagenase 용액을 처리한 후 완전한 단일세포(single cell)가 되도록 하고, phosphate-buffered saline (PBS) 버퍼로 여러 번 수세 후, 1% antibiotics와 10% FBS를 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)에서 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 먼저 엉겅퀴 추출물의 세포 독성(cytotoxicity)을 조사하기 위해 세포를 10, 50, 또는 100 μ g/mL의 농도로 시료군에서 세포 생존도를 조사하였다. Primary hepatocyte를 1% antibiotics와 10% PBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양하고, 48-well plate에 세포수가 10⁶ cell/mL가 되도록 seeding한 후 4시간 지난 후에 엉겅퀴 추출물 10 μ g/mL로 처리하였다. 시료 처리 후 2시간 뒤에 inducer로 150 mM ethanol 또는 10 μ M H₂O₂로 처리하여 독성을 유발하였으며, 24시간 후, XTT test를 통해 cell viability를 측정하여 엉겅퀴 추출물들의 간 보호 효과를 비교하였다(Wallace et al., 2005).

4. 통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 프로그램(Package relwase 8.01)을 이용하여 평균±표준편차로 표시하였고, 평균값의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검정법(multiple range test)에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 엉겅퀴 추출물의 총페놀 및 플라보노이드 함량 조사

국내 재배된 엉겅퀴 6종의 수확된 잎을 80% 에탄올로 추출하였다(Fig. 1). 엉겅퀴 추출액으로부터 총페놀과 플라보노이드 함량을 조사한 결과(Table 1), 큰잎엉겅퀴가 27.47 mg/g dried weight(DW)로 가장 높게, 지느러미엉겅퀴는 8.33 mg/g DW로 가장 낮게 함유되며, 플라보노이드 함량도 패턴은 유사하나홍미롭게도 재래엉겅퀴는 총페놀량은 낮으나, 플라보노이



Fig. 1. Six types of domestically cultivated thistles.

Table 1. Total phenolics, flavonoid content and antioxidant activities of domestic thistles

Variety	Total phenolics (mg/g DW)	Flavonoids (mg/g DW)	ABTS ¹⁾ scavenging (%)	DPPH ¹⁾ Scavenging		Nitric oxide scavenging activity (%)
				(%)	Vit C eq. (mg/g DW)	
<i>C. japonicum nakaisanum</i>	14.24 ^d	19.15 ^d	10.92 ^d	17.49 ^e	0.05	11.96 ^d
<i>C. japonicum spinosissimum</i>	17.81 ^c	32.38 ^{bc}	16.49 ^c	21.47 ^d	0.06	17.19 ^c
<i>C. crispus</i>	8.33 ^e	16.44 ^e	6.00 ^e	8.12 ^f	0.02	12.93 ^d
<i>C. japonicum</i>	22.66 ^b	38.48 ^a	18.48 ^b	30.77 ^b	0.09	19.58^b
<i>C. pendulum</i>	27.47 ^a	30.10 ^c	21.22 ^a	32.13 ^a	0.10	24.0^a
<i>C. setidens</i>	22.33 ^b	35.95 ^b	16.31 ^c	26.46 ^c	0.08	23.2^a

¹⁾ All domestic thistles was extracted 80% ethanol for 3h at 60℃ using Soxhlet method and thistles extracts was applied to detect its antioxidant activity using DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) or ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging effect using vitC Standard.

드 함량은 높았다.

2. 엉겅퀴 추출물의 항산화 효과 및 아질산염 소거능

엉겅퀴 추출물의 항산화 효과 및 아질산염 소거능

이 조사되었는데(Table 1), 항산화 효과로 ABTS와 DPPH 라디칼 소거효과를 측정한 결과, 큰잎엉겅퀴와 재래엉겅퀴가 가장 항산화 효과가 높았으며, 지느러미엉겅퀴가 항산화 효과 두 가지 측정법 모두에서 큰잎엉겅퀴 효과의 20~30% 정도 보유하는 것을 알

수 있었다. 6가지 엉겅퀴 추출물의 아질산염 소거효과 또한 조사 결과, 큰잎엉겅퀴와 고려엉겅퀴가 23~24%로 가장 높고, 지느러미엉겅퀴는 12%로 가장 낮게 나타났다(Table 1). 이와 같이 엉겅퀴 품종 중 큰잎엉겅퀴가 가장 높은 항산화 효과 및 아질산염 소거능을 보이는 결과는 기존의 다른 연구결과와 일치하는 것으로 나타났다(Kim and Won, 2009).

3. 엉겅퀴 추출물의 실리마린 정량 (C_{18} reverse-phase HPLC)

C_{18} 역상 칼럼을 이용한 HPLC로 실리마린, 6가지 표준물질인 silybin A & B, isosilybin A & B를 이용해 6가지 엉겅퀴품종별 함유량을 조사하였다(Fig. 2 and Table 2). 대부분 성분은 silybin A & B, isosilybin A & B가 차지하여 실리마린 함유량은 네 가지 주요 성분으로 정량, 비교 분석하였으며, 그 결과, 큰잎엉겅퀴는 다른 시료 대비 그램 시료 당 20~30배 높은 61.24 mg를, 고려엉겅퀴(곤드레) 또한 22.4 mg을 함유하였으며, 나머지 품종들은 5 mg 미만으로 함유량이 아주 낮았다. 성분 중에는 실리빈이 이소실리빈보다 높게 함유되어 이는 선행된 연구에서 보고된 것처럼 50~70%를 차지하였다(Karkanis et al., 2011).

4. 엉겅퀴 추출물의 알콜분해능

엉겅퀴 6품종 추출물의 알콜 분해능은 alcohol dehydrogenase activity assay kit(Sigma)를 이용해 측정하였으며 positive control로 실리마린을 이용해 비교 분석하였다(Table 2). 알콜분해능은 큰잎엉겅퀴가 가장 높았으며(15.2 mU), 아주 낮은 알콜분해능을 보이는 지느러미엉겅퀴(2.1 mU)를 제외한 나머지 품종들은 5~8 mU로 유사한 알콜분해능을 보였다.

5. 엉겅퀴 추출물의 간 보호 효과

엉겅퀴 6품종 추출물의 간 보호 효과를 조사하기 위해 먼저 추출물들의 세포독성을 쥐의 간을 적출, Primary hepatocyte를 배양, 활용해 추출물 농도별로, 10~100 μ g/mL로 처리해 조사한 결과(Fig. 3A), 50 μ g/mL 엉겅퀴추출물 처리 농도에서는 78.2~87.3 \pm 4.43%로 무처리인 control과 비교하여 유의적으로(* p <0.05) 세포 생존도가 감소한 것을 확인하였다. 하지만 10 μ g/mL 엉겅퀴추출물 농도에서는 모든 시료군에서 무처리 대조군과 비교하여 96~98%로 세포생존도에 변화가 없었으며(Fig. 3A), 10 μ g/mL 농도를 최대 안전범위로 설정한 후, 알콜성 간 보호 효과를 조사하기

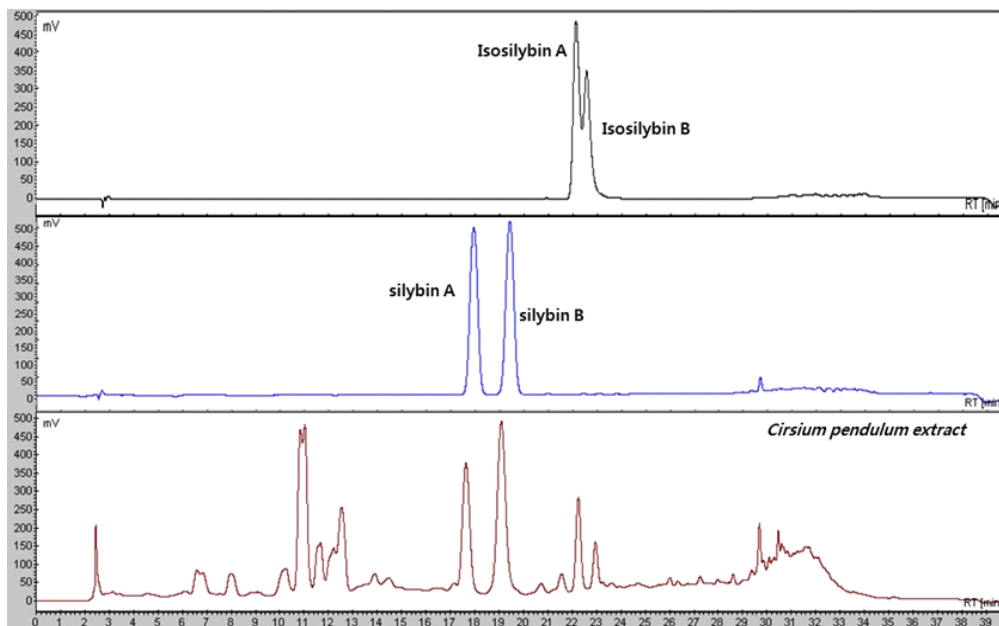


Fig. 2. HPLC chromatograms of silymarin standards (silybin & isosilybin) and *Cirsium pendulum* extract.

Table 2. Silymarin contents and alcohol hydrolyzing effects of domestic thistles

Variety	Alcohol detoxification (mU/mL)	Silymarin contents		
		Silybin (mg/g DW)	Isosilybin (mg/g DW)	Total (mg/g DW)
<i>C. japonicum nakaisanum</i>	6.40 ^c	2.87 ^c	0.51 ^d	3.38 ^d
<i>C. japonicum spinosissimum</i>	5.32 ^d	2.62 ^{cd}	1.75 ^e	4.37 ^e
<i>C. crispus</i>	2.13 ^e	2.17 ^d	1.58 ^e	3.75 ^d
<i>C. japonicum</i>	5.47 ^d	1.85 ^b	0.34 ^b	2.19 ^e
<i>C. pendulum</i>	15.25 ^a	34.54 ^a	26.71 ^a	61.24 ^a
<i>C. setidens</i>	8.57 ^b	5.82 ^b	16.66 ^b	22.48 ^b

¹⁾ All domestic thistles was extracted 80% ethanol for 3h at 60C using Soxhlet method and thistles extracts at 10 μ g/mL concentration was applied to detect its alcohol detoxification using alcohol dehydrogenase activity assay kit.

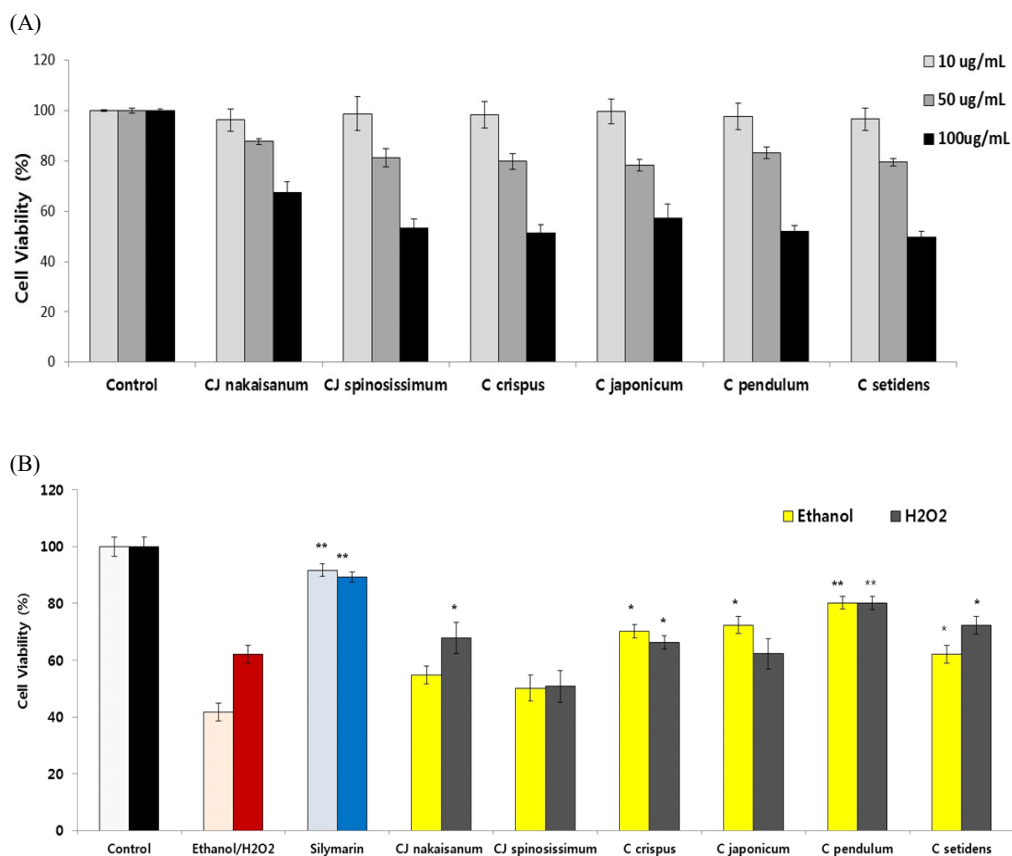


Fig. 3. Cytotoxicity (a) and liver protection effects (b) of domestic thistles extracts on cultured rat primary hepatocytes treated with H₂O₂ or ethanol. Data are means±standard deviation of six independent experiments. **p*<0.05 or ***p*<0.01 indicates significant difference from control.

위한 XTT assay를 수행하였다.

영경귀 추출물들의 간 보호 효과를 조사하기 위해 독성유발은 200 mM의 ethanol 또는 10 μ M의 hydrogen peroxide를 처리해 알콜 방어 및 항산화 효과를 알아보았다(Fig. 3B). Rat hepatocyte에 200 mM의 ethanol을 처리 시 세포 생존도는 41.75%로 크게 감소하는 것을 확인하였다. 하지만 실험 시료 6종을 각각 처리하였을 때 모든 실험군에서 유의적으로 ethanol만을 처리한 음성대조군과 비교하여 세포생존도가 증가하는 것을 확인하였다. 유의적(* p <0.05) 세포생존도 비교로, 시료군 중에서는 양성대조군인 silymarin군(91.71 \pm 2.20%)을 제외하고, 큰잎영경귀(80.21 \pm 2.27%)가 가장 높은 활성을 보였으며, 다음으로 재래영경귀(72.22 \pm 3.03%)와 지느러미영경귀(70.21 \pm 2.73%) 순으로 활성이 높았다. 10 μ M hydrogen peroxide를 처리하였을 때, 세포 생존도는 62.10%로 나타나 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 하지만 영경귀 추출물 6종을 각각 처리하였을 때 모든 실험군에서 유의적으로 hydrogen peroxide만을 처리한 음성대조군과 비교 시 세포생존도가 증가하는 것을 확인하였다. 유의적(* p <0.05) 세포생존도 비교로 시료군 중에서는 양성대조군인 silymarin군(89.23 \pm 3.12%)과 큰잎영경귀 100%군(82.10 \pm 2.25%), 고려영경귀(72.30 \pm 1.65%)이 가장 높은 활성을 보였으며, 결과적으로 영경귀 중 큰잎영경귀가 가장 간 보호 효과가 높다는 것을 확인하였다(Fig. 3B).

요 약

기능성 식품 개발을 위해 예전부터 간 해독 및 숙취 해소능이 높은 영경귀를 선별하기 위해 국내에서 재배, 사용되어온 영경귀 6품종, 고려영경귀(곤드레), 가시영경귀, 좁은잎영경귀, 지느러미영경귀, 큰잎영경귀, 재래영경귀의 잎을 채취, 에탄올로 추출하여 이들 추출물에 대한 총 페놀량, 플리보노이드 함량, 항산화 효과 및 실리마린 함량과 간 보호 효과에 대해 연구하였다. 품종 중 큰잎영경귀가 가장 항산화 효과, 플라보노이드, 실리마린 함량이 높고, 알콜 분해능 및 간 보호 효과가 가장 뛰어났다. 따라서 큰잎영경귀 잎 추출물은 숙취 해소 및 간 보호 효과를 갖는 기능성 식품 소재로 개발할 경우 의미가 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 원예특작과학원 연구사업(PJ013826)과 전라남도농업기술원 기본연구사업에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Kim, E. M. and Won, S. I. 2009. Functional composition and antioxidative activity from different organs of native *Cirsium* and *Carduus* Genera. Korean J. Food Cookery Sci. 25(4): 406-414.
2. Karkanis, A., Bilalis, D. and Efthimiadou, A. 2011. Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. Industrial Crops and Products 34: 825-830.
3. Chung, M. S., Um, H. J., Kim, C. K. and Kim, G. H. 2007. Development of functional tea product using *Cirsium japonicum*. Korean J. Food Culture 22(2): 261-265.
4. Liu, S., Luo, X., Li, D., Zhang, J., Qui, D. and Liu, W., Yang, Z. 2006. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. Int Immunopharmacol. 6(9): 1389-1393.
5. Park, J. C., Hur, J. M., Park, J. G., Kim, S. C., Park, J. R., Choi, S. H., Choi, J. W. 2004 Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. Phytother Res. 18(1): 19-24.
6. Wallace, S. N., Carrier, D. J. and Clausen, E. C. 2005. Batch solvent extraction of flavonolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner). Phytochem. Anal. 16(1): 7-16.
7. Kim, S. J., Kim, S. Y., Kim, J. A., Park, I. S., Yu, K. Y., Chung, C. H., Shim, J. S., Jang, S. J. and Jeong, S. I. 2012. Inhibitory effect of *Cirsium japonicum* root or flower extract on hepatic stellate cells activation. Kor. J. Pharmacogn. 43(1): 27-31.
8. Zaulet, M., Elvira, S., Kevorkian, M., Dinescu, S.,

Cotoraci, C., Suci, M., Herman, H., Buburuzan, L., Badulescu, L., Ardelean, A. and Hermenean, A. 2017. Protective effects of silymarin against

bisphenol A-induced hepatotoxicity in mouse liver. Exp. Ther. Med. 13(3): 821-828.