

## 한약박 및 유기셀레늄이 체내 중금속 축적도에 미치는 영향의 모발 분석과 혈액 및 장기 분석 간의 상관도 연구

손영희\* · 유지은<sup>1</sup> · 허지연<sup>1</sup> · 장성표<sup>1</sup> · 이병수<sup>1</sup> · 이보름<sup>1</sup> · 윤선기<sup>2</sup> · 이치호<sup>3</sup>

SGS Testing Korea, <sup>1</sup>국립충남대학교 화학과, <sup>2</sup>(주)윤선기퍼멘트, <sup>3</sup>건국대학교 축산식품생물공학과

### A Study of the Efficacy of Hair Analysis Relative to Serum and Organ Analysis for Assessing Heavy Metal Reduction in Living Animals Treated with an Herbal Medicine Remnant and Organic Selenium

Young-Hee Son\*, Ji-Eun Yoo<sup>1</sup>, Ji-Youn Heo<sup>1</sup>, Sung-Pyo Jang<sup>1</sup>, Byung-Soo Lee<sup>1</sup>,  
Bo-Reum Lee<sup>1</sup>, Seon-Gi Yun<sup>2</sup>, and Chi-Ho Lee<sup>3</sup>

SGS Testing Korea Co., Ltd., Anyang 431-080, Korea

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Yun Seon Gi Ferment Co., Ltd., Incheon 417-821, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

#### Abstract

This study was carried out to develop a method for decreasing the heavy metal composition of living stock. Sprague-Dawley (SD) male rats were pre-treated with heavy metals administered i.p. at the limits of regulation according to the feed CODEX in Korea. Herbal medicine remnant was administered p.o. (2, 4 ppm of average feeding amount) for the entire period of study with organic selenium (2 ppm of average feeding amount) before any other treatment. 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was also administered i.p. in a single dose of 60 mg/kg body weight before animals were sacrificed. The TBARS test with the FOX assay demonstrates a decrease of heavy metals due to these functional materials in vitro. Moreover, this decrease in heavy metals was also demonstrated by in vivo tests based on SD rats hair analysis and organ analysis after 6 weeks. A good linear correlation between hair analysis and organ analysis represented by liver and blood was shown. The present findings suggest that measurement method of heavy metal composition using hair analysis for healthy livestock can be used in place of detection methods carried out by organ and blood analysis, and herbal medicines with organic selenium may be very effective at decreasing heavy metals of feed materials in feed manufacture industry.

**Key words :** hair, organs, ICP, heavy metal analysis, herbal medicine remnant, organic selenium

#### 서 론

생물학적 시료에서의 중금속의 침착 정도에 대한 평가는 식품과 사료를 중심으로 한 안전성 평가에서부터 시작하여 진단 및 처방을 위한 임상시험에 이르기까지 다양한 시도가 이루어지고 있으며, 그 원인을 찾기 위한 기초 연구부터 진단 및 처방을 위한 최신 연구에 이르기까지 지속적인 연구 대상이 되어 왔다. 일반적으로 중금속의 침

착 정도를 시험하기 위한 기법을 통해 생체의 건강상태 및 특정 환경에서의 영향을 파악하기 위하여 혈액, 소변, 머리카락 등 신체의 일부를 취하여 시험 및 검사하는 방법이 통용되고 있으나, 혈액과 소변을 검체로 하기에는 채취 과정의 번거로움과 생육 환경의 다양성에 대한 변이성이 존재하는 단점 및 대상 개체가 갖는 다양한 형태의 병력에 대한 추적 등에 대한 시간적 공간적 제한요소들이 산재해 발병 초기부터 중독증상의 정도를 추적하는 데는 한계가 있다. 반면 모발의 경우에는 시료의 채취도 용이하지만 인간의 경우 자라는 속도가 대개 1cm/월 정도여서 지난 3-4개월 동안의 생육 환경에 대한 외인적, 내인

\*Corresponding author : Young-Hee Son, SGS Testing Korea Co., Ltd., Anyang 431-080, Korea. Tel: 82-31-460-8025, Fax: 82-31-460-8029, E-mail: younghee.son@sgs.com

적 영향을 파악할 수 있는 장점이 있고, 독성 물질에 대한 중독증상의 진단과 영양상태의 평가를 위한 모발 내 중금속 침착도 평가는 반복시험이 가능한 임상 선별검사를 통해 중금속 노출에 대한 진단 및 필수 극미량 원소의 상태 등을 조사하는 대체 진단법으로의 가능성이 열려있다(Ryu, 2005).

진단을 통한 중금속의 중독증상을 치유하고자 하는 시도 또한 서양의학과 동양의학을 막론하고 주요 관심사로 다뤄졌으며, 지금까지의 연구 결과 식물체 유래 화합물에서 기인한 다양한 폴리페놀이 중금속 억제에 기여하는 것으로 알려지고 있다. 현재까지 알려진 중금속 해독물질로는 셀룰로오스, 펙틴, 키토산, 알긴산, 리그닌 등의 난소화 점착성 고분자 당이 갖는 수착능력을 활용한 방법부터, 맥주, 효모, 미생물 대사물질, 유사호르몬 등의 이노축진제를 사용한 배출방법, 비타민, 항산화제 등을 이용한 세포면역능력 증가 등의 방법이 알려져 있고, 그 외 직접적인 해독능력을 갖는 물질에 대한 연구도 진행되고 있다. 예를 들어 대구한의대 한방생명자원연구센터에서는 감초의 ‘리퀴리티게닌’이라는 성분을 통한 카드뮴 및 비소의 해독 기작에 대한 보고를 한 바 있으며, 러시아 모스크바대학 화학연구소에서는 러시아 민간요법인 귀리의 해독능력에 착안한 귀리의 산, 당, 전분 화합물 12종의 중금속 이온과의 상호작용을 연구한 바 있다(Kim *et al.*, 2006).

따라서 본 연구는 종래의 체내 중금속 침착도 평가 기준으로서의 조직 및 혈액 검사와 새로운 진단 기술로서의 모발 검사 간의 상호 연관성을 밝혀 대체 진단법으로서의 분야 확립과 진단을 통한 새로운 기능성 사료 원료로서의 식물체 유래 화합물의 사용으로 대표적 생체시료인 흰쥐를 통한 중금속 침착도 해소 능력을 평가하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 기능성 원료

기능성 식물성 유래 화합물로서의 감초 내 ‘리퀴리티게닌’의 급여원으로서 경제적 가치를 고려해 본 연구에서는 한약 종류 찌꺼기인 한약박을 (주)윤선기퍼맨트로부터 공급받아 사용했으며, 동시에 항산화효과 등 추가적 기능성 부여를 위해 유기셀레늄은 (주)대한뉴팜에서 공급받아 사용하였다.

### 일반 급여 사료 및 축종에 따른 모발 분석에 의한 중금속 분포 시험

일반 시중 유통 사료의 중금속 분포 및 축종별 모발 내 중금속 분포는 전 연구의 사전조사 차원으로 진행하였다. 본 연구에서는 일반적인 사료의 성상 및 중금속과 미네랄의 조성을 파악하기 위하여, 시중에 유통되는 5개사의 견사료에 대한 시험을 수행하여 일반 사료 중 중금속 외 영향을 줄 수 있는 기타 유해 물질이 검출되지 않은 사료를 일반 시료화 하였다(The Standard method of Feed in Korea., 2003; The Standard and range of Harm feed, 2003). 또한 충남대학교 수의학과 동물병원의 협조 하에 일반인의 진료 의뢰 대상 견종의 모발을 일부 채취하였고, 측정된 모발은 견종, 병력, 연령 등에 의거하여 ICP (Inductivity Coupled Plasma)-AES(Ultima-2C)를 통해 분석한 결과는 Table 1에 나타낸 바와 같다.

### Liposome을 기질로 한 항산화 및 항염증 능력 시험

#### Liposome 조제

조제 EYPC 50 mg을 시험관에 넣고 유기용매를 질소가스로 제거하고, RP column(Lichroprep Lobar column, RP-8, 40-63 mm, 240×10 mm, Merck)을 이용하여 1 mL 단위로 분취 한 후(CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(1:10:0.5, v/v), 1.8 mL/min), HPTLC를 이용해 각 분취 단위를 전개하여 용출분획을 확인하였다(약 35-55 mL의 용출 범위, HPTLC plate (RP-8 F254s, Merck), CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(1:10:0.5, v/v), iodine vapor(발색-인)). 상기 용출분획을 합쳐서 용매를 제거하고 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(95:5, v/v)에 용해하여 5 mL을 시험관에 넣고 tube 외벽에 얇은 막이 되도록 도포하고 질소가스로 용매를 제거하고 진공 데시케이터에서 30분간 더 건조시켜 용매를 완전 제거하였다. Tris-HCl buffer 0.7 mL을 가하고 vortex로 1분간 교반하여 막층을 벗겨내고, sonicator상에서 30초간 분산시켜(200-5,000 nm), LipoFast에 polycarbonate membrane을 걸어 100 nm 크기의 LUV를 조제하였다(Barclay *et al.*, 1981; Lichtenberg *et al.*, 1988) (Table 2, Fig. 1).

FOX Assay (Ferrous Oxidation in Xylenol orange assay)

Xylenol orange 38 mg, 440 mg을 HPLC급 메탄올 450

**Table 1. The difference conditions of puppy species**

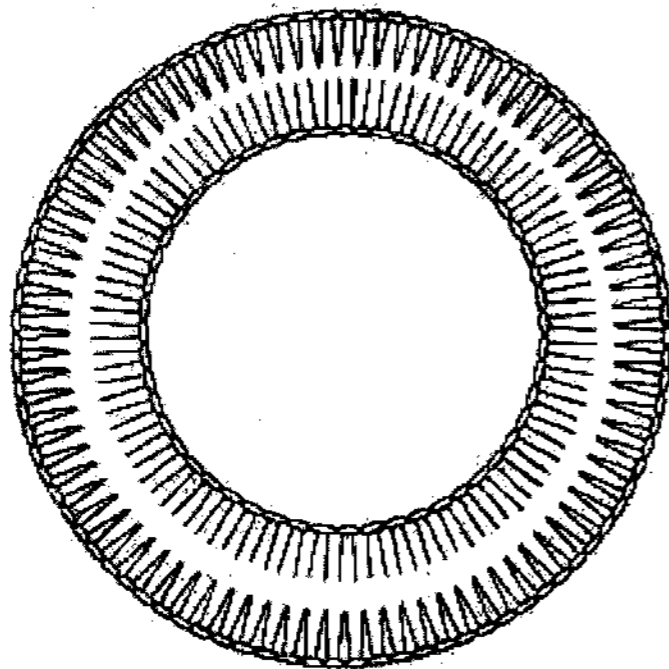
	M1	M2	P1	P2	F1	S1	P3	S2	C1	C2	C3
Age (year)	3.0	0.4	0.4	2.0	3.0	2.0	0.4		0.5	0.5	1.0
Medical history			RI*	SI**		Pr***					
Sex	Male	Female	Female	Female	Female	Female	Male	Male	Male	Female	Female

M Type: Martise species, P Type: Penichiz species, F Type: Poodle species, S Type: Schunachuzer species, C Type: Chizu species.

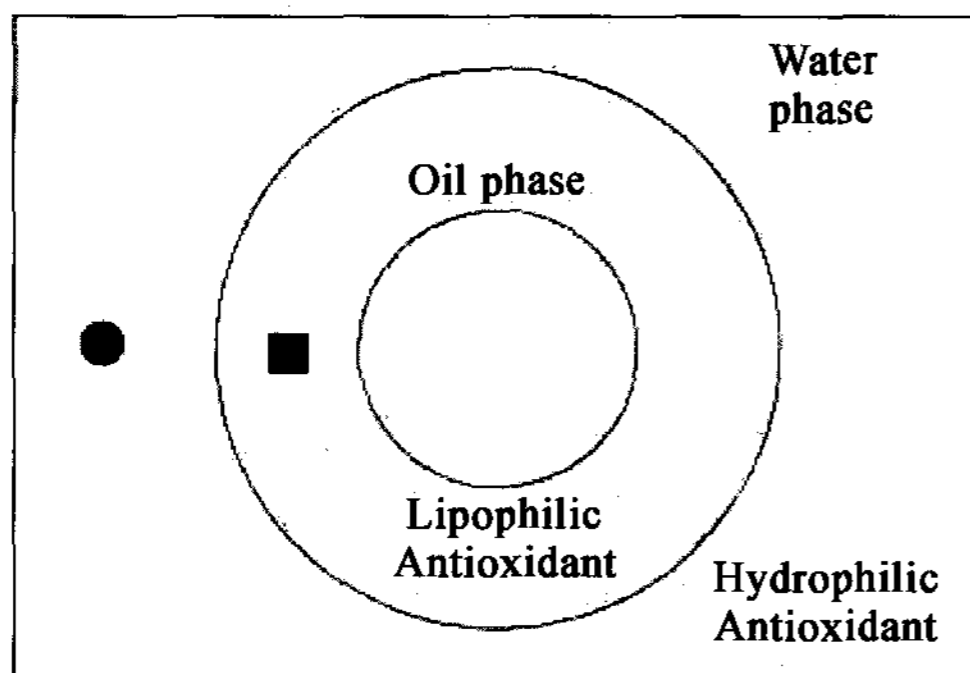
\*RI: Root hair Inflammation, \*\*SI: Skin Inflammation, \*\*\*Pr: Pregnant.

**Table 2. The condition of liposome bilayer for determining anti-oxidative effect *in vitro* analysis with AAPH induced treatment**

LiposoFast (AVESTIN Co., Ottawa, Canada)
Nitrogen gas
Polycarbonate membrane(pore size 100 nm)
HPTLC plate (RP-8 F254s, Merck)
TLC chamber
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (95:5, v/v)
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O (1:10:0.5, v/v)
10 mM tris-HCl buffer (pH 7.4)
EYPC (egg york)



(A) Large unilamellar vesicle



(B) ●, Water-soluble radical initiator  
■, Lipid-soluble radical initiator

**Fig. 1. The Basic formation of liposome.**

mL에 용해하고, ammonium ferrous sulfate 49 mg을 250 mM sulfuric acid 50 mL에 용해한 후 이를 위 용매에 가하였다. 최종 용매의 조건은 xylenol orange 100  $\mu\text{mol/L}$ , 4 mM BHT, 25 mM sulfuric acid, ammonium ferrous sulfate 250  $\mu\text{mol/L}$ 를 90% 메탄올에 용해한 형태로 조제하고, 용매의 교정은 매회 560 nm에서 일정 농도의 hydrogen peroxide와의 반응을 측정하여 수치 변화를 체크하였다( $3.72 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  이상 유지). 상기 용액을 표준물질과의 검량선을 작성하며 반응시간 37°C, 10분간 암소에서 liposome 300와 반응시켜 측정하였다. 이때 기능성 원료 사용군의 경우는 liposome 전체 기질농도에 준하여 각 5-100 ppm 수준이 되도록 가한 후 충분히 교반하여 시험에 적용하였다(Sodergren *et al.*, 1998).

TBARS value assay (Thiobarbituric acid reactive substance assay)

대표적인 항산화능력 평가항목으로서 지질 산화과정에 의해 계속적으로 증가하는 malonaldehyde의 양을 TBARS assay를 통해 시험하였다.

Liposome 300  $\mu\text{L}$ 과 기능성 원료를 liposome 기질농도에 준하여 각 5-100 ppm 수준으로 분주하고 이를 test tube에 넣은 후, SDS(200  $\mu\text{L}$ , 8.1% in water, v/v), acetic acid (1.5 mL, 20%, w/v, 15% NaOH(w/v)로 pH 4.0 조절), 2-thiobarbituric acid(1.5 mL, 0.8% in water, w/v), BHT(0.5 mL, 0.08% in MeOH, w/v)를 가하였다. 이를 수욕상에서 95°C에서 60분간 반응시키고 상온에서 방냉 후 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 표준물질로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다(Ohkawa *et al.*, 1979; Yagi, 1976).

#### Hyaluronidase inhibition assay

Hyaluronidase를 Acetate buffer에 용해하고(7,900 unit/mL), 위 용액에 수용화한 시료 20  $\mu\text{L}$ 를 가하였다. 이때 대조군으로는 MeOH를 사용하였다. 이에 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100°C를 가하고 수욕상에서 37°C/20 min 반응시켰다. 위 반응 물질에 hyaluronic acid를 가하고(12 mg/5 mL, acetate buffer), 이를 다시 37°C/40 min 반응 시키고 0.4 N NaOH, 0.4 M potassium tetraborate를 100  $\mu\text{L}$ 씩 가하였다. 다시 수욕상에서 100°C/3 min 반응시키고 상온까지 방냉 한 후, 3 mL의 dimethylaminobezaldehyde sol.을 가하고 다시 수욕상에서 37°C/20 min 반응시키고 585 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 공식에 근거하여 그 능력을 평가하였다(Bergmeyer *et al.*, 1974).

#### 실험동물 사육조건

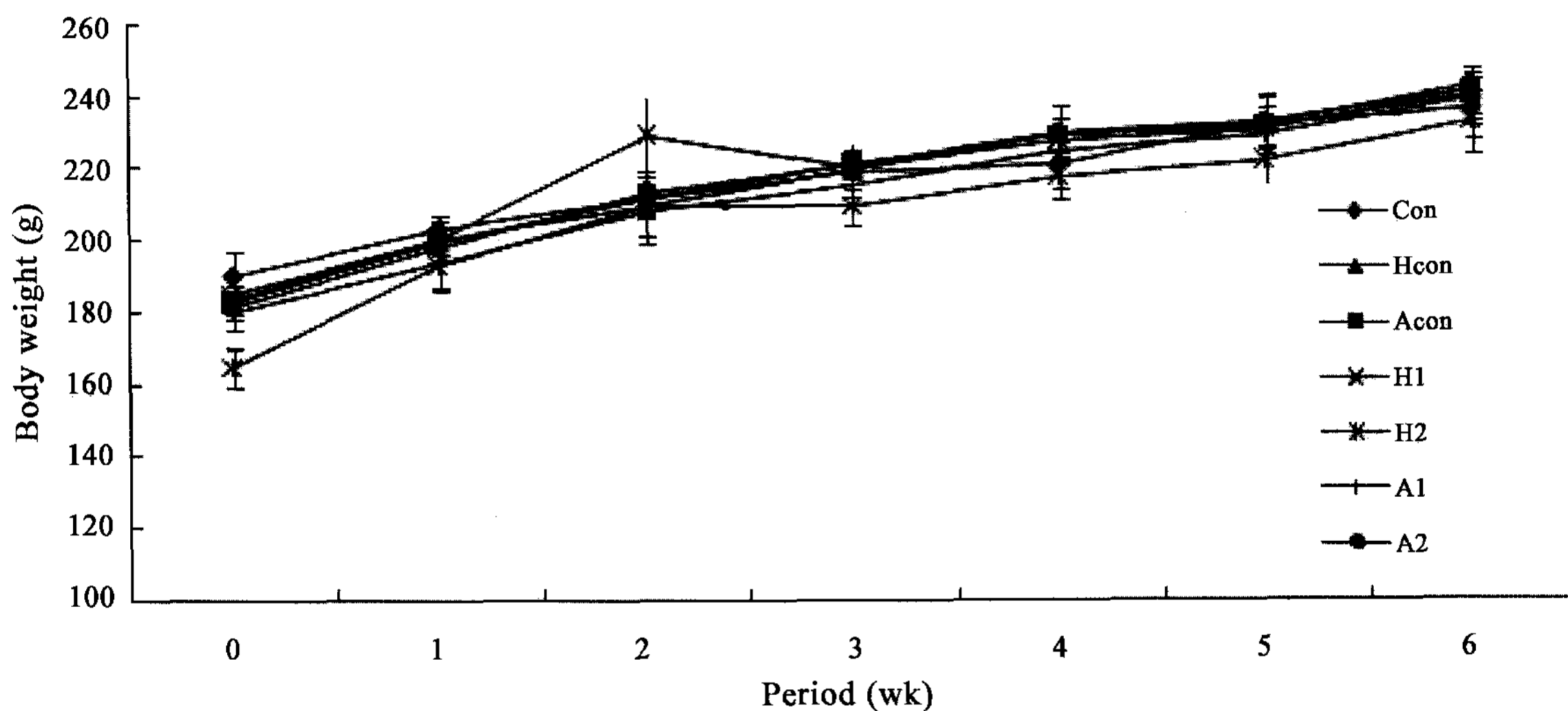
본 연구에 사용된 실험동물은 6주령의 흰쥐 수컷 SD (Sprague-Dawley)를 이용하여 실험하였으며, 각각의 실험군은 Table 3와 같다. 실험동물은 완전 임의 배치법에 의해 처리군 별로 체중이 균일하게 군당 6수씩 배치하여 stainless steel cage에 넣고 1주간 주위 환경에 적응 시킨 후 본 실험을 실시하였다(Fig. 2). 총 실험 기간은 6주였으며, 최초 실험 개시 시에 중금속 유발군에 대하여는 사료 관리법 상 허용 한계치까지 조제한 중금속 표준물질을 복강투여하였고, AAPH(2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) 유발군에 대하여는 도살 24시간 전에 AAPH 조제시료를 복강 투여하였다. 기능성 물질은 각 군당 매일 1회 경구 투여 하였으며, 식이는 일반 사료 및 용수를 제한 없이 급여하였다. 모발은 초기, 중기, 도축 시로 구분하여 매 회 동일 등 부위에서 3회 채취하였다.

6주 후 해독능력을 판정하기 위하여 전수 도살하였고, 간 및 혈액을 채취하여 각각의 시료에 대한 중금속 침착도 및 산화지수평가, sGOT, sGPT 시험 등을 실시하였다(Son, 2003).

**Table 3. Experimental groups for *in vivo* test**

Groups	Treatment
Con	Saline sol'n
Hcon	Heavy metal contamination inducing
Acon	AAPH contamination inducing
H1	Low concentration Se + Hm treated with heavy metal contamination
H2	High concentration Se + Hm treated with heavy metal contamination
A1	Low concentration Se + Hm treated with AAPH contamination
A2	High concentration Se + Hm treated with AAPH contamination

Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, Acon: 60 mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.



**Fig. 2. The Change of body weight among whole test period.** Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, Acon: 60 mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.

**중금속 침착도 시험**

매 회 수집된 모발은 채취 즉시 ICP-AES를 이용하여 사료 및 표준모발 분석과 동일하게 중금속 침착도를 시험하였다. 또한 장기 및 혈액도 채취 즉시 동일 방법으로 시험하였다(Table 4).

**Enzymatic assay**

sGOT 및 sGPT는 AAPH 등의 산화 스트레스에 대해 민감하게 변화하는 효소로 산화 스트레스가 유발될 경우 간에서 혈중으로 급격히 분비된다. 따라서 산화 스트레스에 의해 혈중 역가가 높게 나타나게 된다. 따라서 AAPH 및 중금속 유발로 인한 산화 스트레스를 대별하여 측정하는 대표지수로 활용하였다. 전 실험은 Eiken사에서 공급받은 분석 kit를 이용하여 분석하였다.

**Table 4. The condition of microwave digestion system for hair analysis by ICP-AES/MS**

	Specification
Magnetron power	1000 W
Frequency	2450-2455 MHz
Program step	up to 10 step
Vessel volume	100 mL
Max. pressure of vessel	110 bar
Max. temperature of vessel	260-300°C
Vessel material	TFM

**간의 산화지수 평가**

간 조직에서의 산화 스트레스 검증을 위해 TBARS 실험을 실시하였으며, 간 조직 역시 조직 내 중금속 변화 추이를 검증하였다.



**통계처리**

측정된 자료는 SAS 통계 package programme를 이용하여 분석하였으며, 결과 처리는 평균과 표준편차를 산정하였다. 각 군의 평균치 비교는 분산분석 후 Duncan's multiple range test를 통해 유의차 검정을 실시하였다( $p < 0.05$ ).

**결과 및 고찰**

**표준 사료 및 모발 내 중금속 침착도**

국내 사료 관리법에서 규정하고 있는 사료의 영양성분은 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, 조회분의 5개 항목을 일반항목으로 규정하고 있으며, 그 외 사료의 품질 평가를 위하여 금속성분의 분석을 겸하고 있다. 또한 유해물질의 규제를 위하여 유해중금속 및 곰팡이독소, 유해미생물, 잔류농약 등의 항목을 제한하고 있어, 일반적인 사료의 성분 및 중금속과 미네랄의 조성을 파악하기 위하여 시험을 실시하였다.

일반 사료의 중금속 분포는 Table 5에 나타난 바와 같

다. 제조사 별로 각각 20개씩의 표준 강아지 사료를 수거하여 ICP-AES 및 atomic absorption spectroscopy(AA-6800, Shimazu)로 분석한 결과 전체적인 결과는 현행 사료 관리법 상 적합한 제품으로 나타나, 생체 내 영향을 미칠 수 있는 정도의 역가는 아닌 것으로 사료된다. 또한 제조사간 중금속 분포는 차이를 보이지 않았다. 따라서 현재 유통되고 있는 사료의 경우 중금속 중독 증상에 대해서는 어느 정도 안전한 것으로 사료된다. 하지만, 중금속의 특징상 사료 및 용수를 제외한 여타 환경적 급이원으로부터의 위해도는 거의 없어, 빈번하지는 않지만 간혹 발생하는 중금속 중독 등의 발병을 예방하기 위한 차원에서 관리가 반드시 필요하다.

강아지를 대상 동물군으로 시험한 결과 전반적인 중금속의 침착 정도는 연령에 따라, 병력에 따라 차이가 있는 것으로 보여 진다(Fig. 3). 더욱이 모낭염 등의 염증 등에 따라 모발 내 중금속 축적 정도가 차이를 보임에 따라 각각의 중금속 원소별 중독증 외에도 여러 가지 병인으로서 중금속이 영향을 미치는 것으로 보여 진다.

**Table 5. The normal compositions of puppy feed purchased by markets**

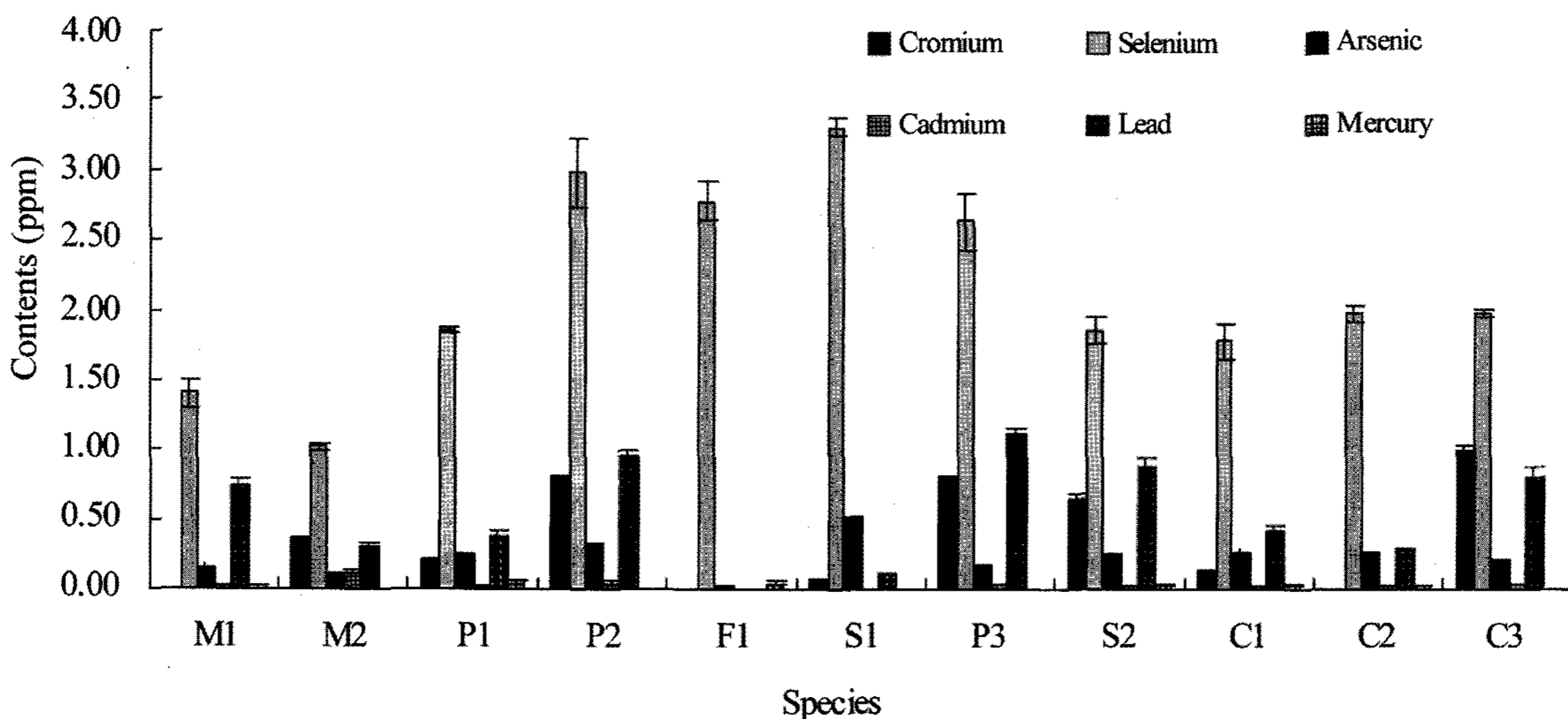
Heavy metals	M1	M2	M3	M4	M5
Selenium	0.26±0.00*	0.33±0.02	0.46±0.01	0.26±0.01	0.50±0.02
Mercury	ND**	0.07±0.00	0.05±0.00	0.02±0.00	0.09±0.01
Arsenic	0.18±0.00	0.02±0.00	ND	0.01±0.00	0.01±0.00
Lead	ND	ND	ND	ND	ND
Chromium	1.59±0.08	4.35±0.17	7.34±0.46	3.38±0.24	3.98±0.20
Cadmium	ND	ND	ND	0.51±0.04	0.72±0.05

\*Mean±S.D. (n=20).

\*\*Not detected.

M1-M5 means purchased manufacturer code.

No statistically significant with all groups ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3. The composition of major heavy metals in Puppy hair as species.** Values present the mean±S.D. (n=3). M type: Martise species, P type: Penichiz species, F type: Poodle species, S type: Schunachuzer species, C type: Chizu species.

**Liposome을 기질로 한 항산화 및 항염증 능력 시험**

각 기능성 원료의 능력 평가를 위해 상기 물질의 대표적 기능성으로 알려진 항산화 능력을 시험하였고, 축종에 따른 모발 분석 결과 병력상 염증이 발견된 군중에서의 중금속 침착도가 이상 발현한 것에 근거하여 항염증 시험을 실시하였다.

Liposome은 생체막 모델과 같은 기본적인 연구 및 drug delivery와 같은 응용연구에도 이용된다. 본 연구에서는 항산화 활성평가를 위해 생체막 모델로서 liposome을 이용하였다.

지질의 산화과정을 대별하여 설명하기 위해 hydrogen peroxide의 생성량과 malonaldehyde의 생성량을 정량하여 검증하였다. 항산화효과란 간단히 말해서 상기한 두 가지 물질의 생성을 억제하고 환원하는 기작을 말하는 것으로 hydroperoxide는 지질의 산화과정 중 발생하는 과산화물이며 생체에 산화 스트레스를 유발하는 원인 물질이다. 따라서 기능성 물질의 항산화 효과를 기대한다면 상기 물질에 대한 억제효과가 있어야 한다.

기능성 원료로서의 감초의 기능과, 항산화 능력 공여체로서의 유기셀레늄의 능력은 FOX assay 및 TBARS test를 통해서 수행하였다(Table 6-8). 시험에 사용한 농도는 셀레늄을 기준으로 각각 5-100 ppm까지 적용하였으며, 이때 비교를 위해 천연 항산화제인 ascorbate와 합성 항산화제인 BHT를 같은 방법으로 실험하였다. 중금

속으로 인한 인공적인 산화 스트레스를 유발하기 위해 AAPH를 LUV 조제 시 동시처리 하였으며, AAPH에 의해 증가한 과산화물의 양을 정량함으로써 각각의 능력을 평가하였다. 전 시험군에서 기능성 원료의 농도가 증가함에 따라 항산화 효과는 개선되었으며, 특히, 한약박과 유기 셀레늄을 동시 처리한 군에서는 상승효과를 기대할 수 있을 정도의 효과를 나타내었다. 또한 강력한 항산화제로서의 합성 항산화제인 BHT와 비교할 경우에도 거의 차이가 없는 결과를 가져온 것으로 미루어 보아 사료 원료로 사용하기에 적합하였다. 항염증시험은 강아지 모발과 병인과의 상관관계에 착안하여 시험을 수행하였다.

Hyaluronidase는 mucopolysaccharide를 가수분해하는 효소으로써 hyaluronic acid를 분해하는 작용 이외에 모세혈

**Table 6. Lipid peroxidation in liposomes without added any functional materials**

Initiator	FOX (Hydroperoxide, μM)	TBARS (Malonaldehyde, μM)
None (Control)	0.071±0.022*	0.108±0.023
AAPH	7.943±0.131**	8.110±0.387**

AAPH: 60 mg/kg LUV weight, 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) mix with LUV.

\*Mean±S.D.

\*\*Statistically significant increased ( $p<0.05$ ,  $n=5$ ) in comparison with incubation with initiator.

**Table 7. The protect effect of organic selenium and herbal medicine remnant on hydroperoxide of LUVs by FOX assay**

Conc.	Hydroperoxide concentration (μM)				
	Se	Hm	Aa	BHT	Se+Hm
5	6.248±0.213*	4.384±0.150	4.502±0.166	6.486±0.812	4.192±0.170
10	5.724±0.108	3.438±0.099	3.010±0.183**	6.003±0.224	3.211±0.099**
20	4.649±0.068	3.275±0.186	1.878±0.088	4.916±0.935	2.933±0.121
40	3.292±0.134	2.914±0.135	0.668±0.217	3.784±0.959	2.010±0.089
100	1.020±0.092	0.993±0.102	0.013±0.008	1.075±0.262	0.035±0.107

\*Mean±S.D.

\*\*Statistically significant increased ( $p<0.05$ ,  $n=5$ ) in comparison with incubation with initiator.

Se: organic selenium assembled groups (ppm), Hm: herbal medicine remnant assembled groups (ppm), Aa: ascorbic acid assembled groups (ppm), BHT: BHT assembled groups (ppm), Se+Hm: organic selenium with herbal medicine remnant assembled groups (1:1, ppm).

**Table 8. The protective effect of functional materials on TBARS assay**

Conc.	Malonaldehyde concentration (μM)				
	Se	Hm	Aa	BHT	Se+Hm
5	3.71±0.50*	3.36±0.34	3.81±0.33	3.06±0.34	3.28±0.28
10	3.11±0.63	2.81±0.22	3.34±0.35	2.29±0.15**	2.52±0.19**
20	2.81±0.64	1.26±0.37	2.59±0.33	1.66±0.26	1.08±0.29
40	1.06±0.64	0.79±0.13	1.74±0.25	1.04±0.13	0.64±0.12
100	0.77±0.21	0.28±0.09	0.95±0.30	0.88±0.21	0.27±0.08

\*Mean±SD.

\*\*Statistically significant increased ( $p<0.05$ ,  $n=5$ ) in comparison with incubation with initiator.

Se: organic selenium assembled groups (ppm), Hm: herbal medicine remnant assembled groups (ppm), Aa: ascorbic acid assembled groups (ppm), BHT: BHT assembled groups (ppm), Se+Hm: organic selenium with herbal medicine remnant assembled groups (1:1, ppm).

관 투과성에 관여하며 급성부종을 야기하는 기염제로 알려져 있다. 기능성 원료의 사용에 의하여 항염증 효과 대별 요인으로서의 hyaluronidase 억제효과를 살펴본 결과 한약박의 경우 상당한 정도의 hyaluronidase 억제효과를 가졌으며, 이에 반해 유기셀레늄 및 ascorbate는 큰 효과를 갖지 못한 것으로 나타났다. 그러나 유기셀레늄과 한약박을 동시 처리하였을 경우 한약박 단독으로 처리하였을 경우에 비해 억제효과가 조금 더 개선되는 것으로 보아 어느 정도의 상승효과는 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

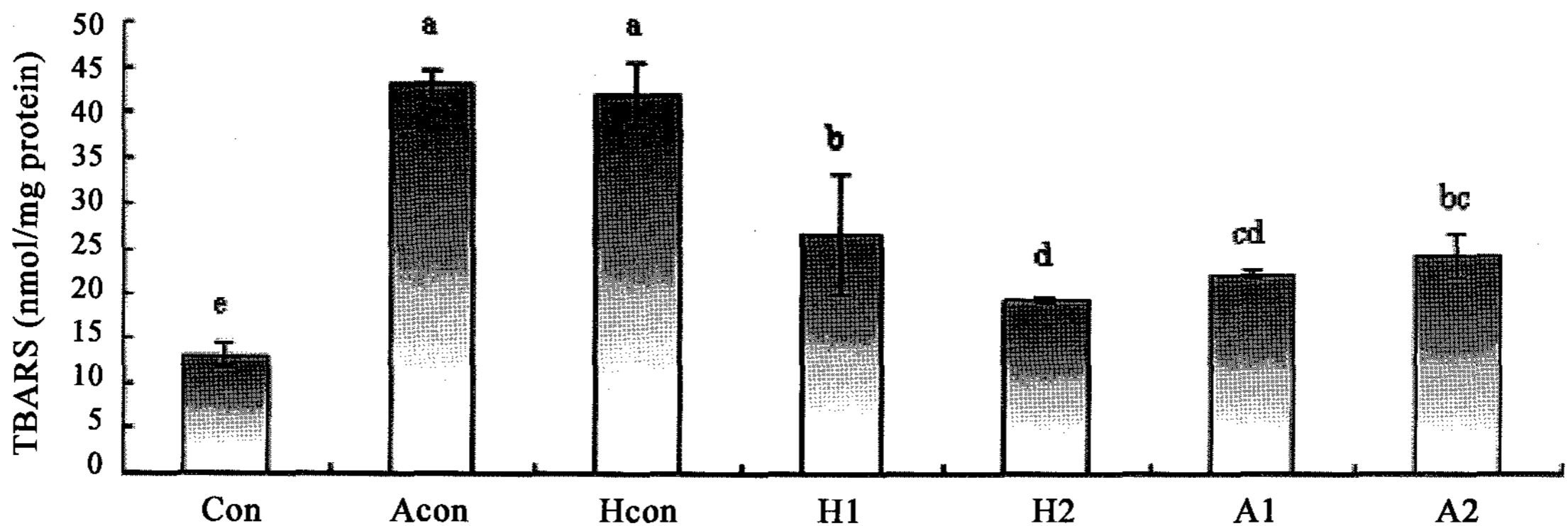
Hyaluronidase inhibitor (%)  

$$= [(OD_{control} - OD_{sample}) / OD_{control}] \times 100$$

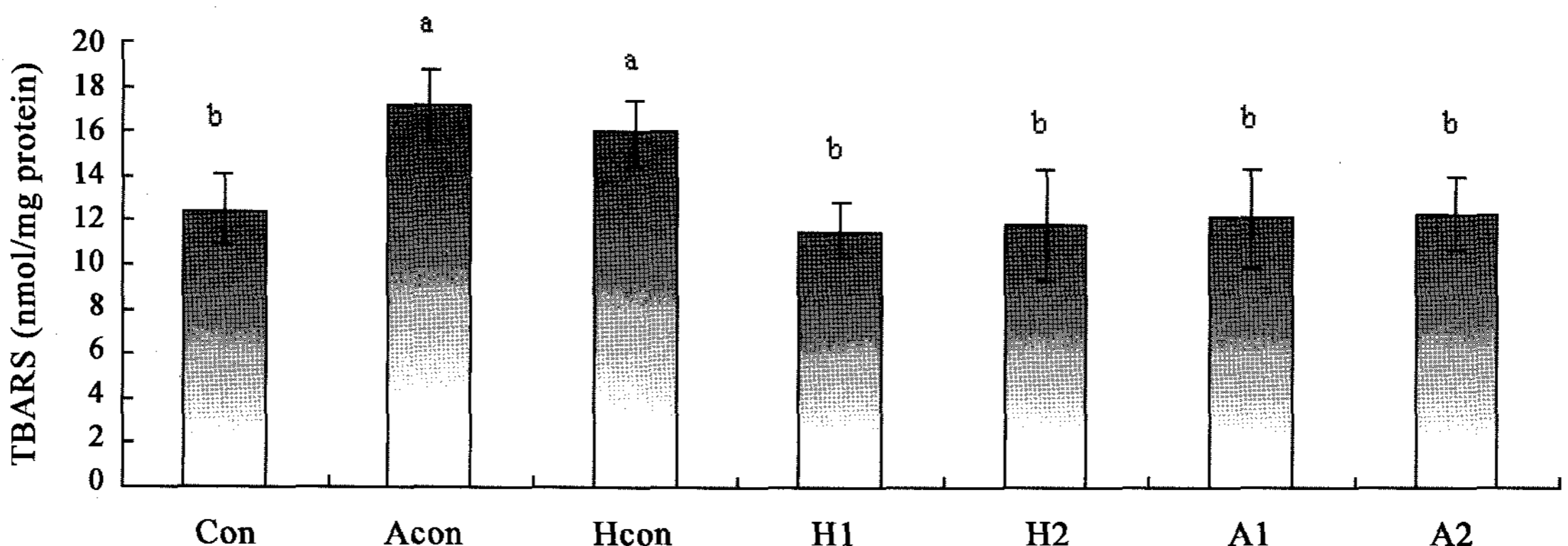
**동물실험**

혈청 및 간의 산화지수 평가 시험

Fig. 4, 5에 나타난 바와 같이 시험동물 도체에서 적출한 혈청 및 간 시료에 대한 산화지수 평가는 TBARS test를 통해 시험하였다. 각각의 결과에 미루어 혈청 및 간의 경향성은 차이가 없는 것으로 보여지며, 시험의 전제로 가정한 중금속 발현에 의해 생성되는 유기소의 생성을 확인할 수 있었다. 또한 한약박 및 유기셀레늄에 의한 항산화 효과를 입증할 수 있었다. 다만, 시험에 사용된 한약박 및 유기셀레늄의 농도 비율에 비해 산화 스트레스 억제에 관여하는 효과는 큰 차이가 없는 것으로 미루어 보아 사용된 기능성 원료의 능력이 어느 정도 포화되었음을 알 수 있다. 즉, 중금속 침착 억제능력이 어느 정도 보장되는 한



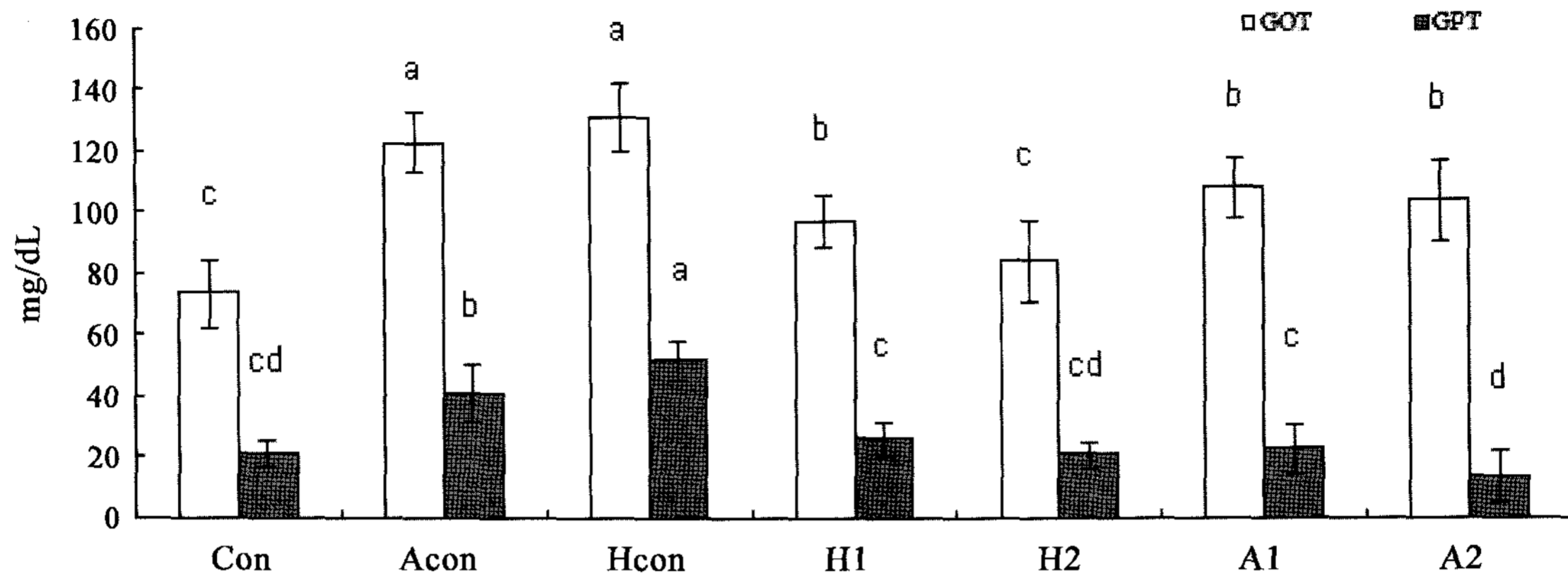
**Fig. 4. The difference of TBARS value (malonaldehyde composition) at liver between AAPH and heavy metal induced rats with functional materials.** Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Acon: 60 mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.



**Fig. 5. Difference of TBARS at serum between AAPH and heavy metal induced rats with functional materials.** Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Acon: 60 mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.

계치가 설정된다면 부가적인 항산화 효과 또한 충분히 가져 올 수 있을 것으로 사료된다.

혈중 sGOT 및 sGPT 역가 시험  
외부 스트레스에 의해 간에서 혈중으로 분비되는 sGOT 및 sGPT의 혈중 역가 또한 산화지수 평가 시험과 거의 동



**Fig. 6. The Difference of sGOT and sGPT level at serum between AAPH and heavy metal induced rats with functional materials.**  
Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Acon: 60 mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.

**Table 9. The Heavy metals decreasing efficiency at rat hair with functional materials during whole breeding period**

		(unit: ppm)					
Period	Groups	Cr	As	Se	Cd	Hg	Pb
1st	Con	902.0	459.8	726.8	ND*	56.4	317.3
	Hcon	1331.2	688.7	843.5	ND	244.8	532.8
	Acon	947.9	523.2	782.2	ND	224.7	421.4
	H1	1310.0	680.5	666.5	ND	266.5	525.9
	H2	1301.1	680.4	612.7	27.6	235.7	501.3
	A1	845.4	365.3	695.1	11.1	191.9	359.3
	A2	957.8	415.3	835.7	ND	138.0	348.1
2nd	Con	768.8	86.2	631.2	ND	35.0	24.4
	Hcon	1121.0	60.6	612.0	ND	179.7	172.4
	Acon	761.7	82.2	559.5	ND	134.0	55.7
	H1	649.1	115.9	593.9	ND	73.5	96.1
	H2	617.4	99.6	574.9	ND	52.6	43.7
	A1	587.6	70.9	618.1	ND	131.0	61.6
	A2	510.5	73.2	436.5	ND	89.0	74.4
3rd	Con	520.5	64.1	476.5	ND	32.9	23.1
	Hcon	921.4	63.3	481.7	ND	133.0	38.7
	Acon	574.1	69.7	522.9	ND	112.3	26.0
	H1	468.5	69.0	431.8	68.5	48.1	85.2
	H2	377.4	68.4	581.7	ND	42.7	19.7
	A1	395.4	41.5	569.6	ND	100.3	20.8
	A2	402.9	43.3	372.7	ND	44.8	61.1

\*Not detected.

1st, 2nd, 3rd means the time when rat hair was sampled (initial period, mid-term period, sacrifice period).

Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, Acon: 60 mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.



일한 경향성을 나타냈다. 즉, AAPH 및 중금속 유발군의 경우 급격하게 증가되는 sGOT 및 sGPT 역가를 살펴볼 수 있었으나, 기능성 원료 사용에 의해 다시 안정되는 추세를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 다만 산화지수 평가 시험과 마찬가지로 처리군 간의 유의차가 크게 발생하지 않는 것으로 미루어 보아 중금속 침착 억제능력의 한계치 설정에 부합되는 충분한 효과를 가져 올 것으로 판단된다.

모발, 간 및 혈중 중금속 침착 억제효과 평가 시험

본 시험의 최종 목표인 모발 분석과 간 및 혈중 중금속 분석을 통한 상관관계 도출을 위해 시험 전 기간 동안 격주로 3회 수집된 동물 모발과 시험 종료 시 적출한 간 및 혈액 시료 내 중금속 분포도를 측정하였다(Table 9-11). 모발 분석 결과 시험 기간이 진행되면서 점차 모발 내 침착되어 있는 중금속의 양은 자연적으로 감소하는 경향을 확

인하였다. 다만 임의로 중금속을 침착시킨 군에 비하여 기능성 원료를 사용한 군의 경우 그 감소 추이가 확연하게 빨리 진행됨을 확인할 수 있었다. 더욱이 유기셀레늄 2 ppm 및 한약박 4 ppm 수준의 조제시료에 대해서 가장 높은 개선효과를 살펴볼 수 있었으며, 이에 준하여 조제 사료를 급여할 경우 항산화효과 및 sGOT 및 sGPT 역가 개선에 의한 간 기능 보호효과 또한 기대할 수 있으리라 사료된다. 간 및 혈중 중금속 분포 또한 모발 분석과 유사한 경향성을 나타내어 모발 분석과 간 및 혈액으로 대별되는 조직 분석 간의 상관관계를 도출할 수 있었다. 다만, 조제시료의 배합 비율에 따른 차이를 간 및 혈중에서는 기대할 수 없었으며, 이는 간의 대표적인 기능으로서의 해독능력 및 완충능력에 기인한 것으로 사료되며, 상기 시험결과에 미루어 보면 조직 분석보다 모발 분석에 의한 결과가 더욱 민감하여 추후 기능성에 대한 평가 및 연구 개발에 더욱 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 10. The Heavy metals decreasing efficiency at rat liver with functional materials during whole breeding period

(unit: ppm)

Groups	Cr	As	Se	Cd	Hg	Pb
Con	123.17±22.82*	130.70±20.22	612.68±125.15	7.21±1.39	5.13±3.33	6.47± 4.55
Hcon	192.63± 5.15	185.48±25.85	553.82± 46.88	9.27±0.62	6.70±6.03	9.43±10.74
Acon	133.76±20.04	135.00±25.80	729.85±121.41	7.00±1.00	4.62±2.52	6.26± 4.43
H1	178.20±42.49	139.41±30.20	676.17±169.47	6.79±0.96	2.91±1.34	8.44± 3.12
H2	157.87±40.34	127.51±26.82	642.04±118.87	6.63±1.06	2.59±1.74	7.54± 4.75
A1	141.18±54.68	131.71±17.47	672.80±123.67	6.86±1.72	3.67±1.27	5.78± 1.61
A2	143.73±22.44	133.79±26.44	665.28± 93.05	7.21±1.22	3.39±1.98	5.67± 0.44

\*Mean±SD.

1st, 2nd, 3rd means the time when rat hair was sampled (initial period, mid-term period, sacrifice period).

Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, Acon: 60mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.

Table 11. The Heavy metals decreasing efficiency at rat serum with functional materials during whole breeding period

(unit: ppm)

Groups	Cr	As	Se	Cd	Hg	Pb
Con	137.82±12.03*	3,384.72±746.43	515.04±49.44	ND**	6.79±0.97	3.77±0.54
Hcon	160.73±11.98	3,581.80±529.14	517.50±51.64	ND	17.67±1.71	13.56±2.42
Acon	136.84± 9.87	3,486.02±654.81	540.42±27.45	ND	12.75±6.07	4.33±0.40
H1	109.31±29.22	3,394.37±309.69	516.17±68.68	ND	8.57±2.09	7.87±4.39
H2	116.63±41.22	3,390.94±314.96	494.51±41.00	ND	7.77±3.41	9.07±4.40
A1	107.80± 8.20	3,443.44±456.74	482.94±61.10	ND	10.03±4.19	7.24±0.98
A2	96.40±31.23	3,418.25±324.34	472.02±57.53	ND	9.02±4.45	4.50±0.87

\*Mean±SD.

\*\*Not detected.

1st, 2nd, 3rd means the time when rat hair was sampled (initial period, mid-term period, sacrifice period).

Con: 0.9% saline p.o. whole period before sacrifice, Hcon: heavy metal contamination induced at the beginning of the test with 10 ppm lead, 1 ppm cadmium, 0.4 ppm mercury, 100 ppm chromium, 100 ppm arsenic, Acon: 60 mg/kg b.w., 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH i.p. 24 hr before sacrifice, H1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, H2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Hcon group, A1: 2 ppm of organic selenium with 2 ppm of herbal medicine remnant on Acon group, A2: 2 ppm of organic selenium with 4 ppm of herbal medicine remnant on Acon group.

## 요 약

모발에 축적되는 중금속은 한약박 및 유기셀레늄 같은 기능성 원료에 의해 효과적으로 억제되며, 이는 간 및 혈액으로 대별되는 조직 분석과도 밀접한 상관관계가 보여진다. 또한, 기능성 원료의 여타 효과 즉, 항산화 효과, 항염증 효과 등 부가적인 기능성도 동시에 부여할 수 있는 가치가 있어 산업적인 효용성이 충분히 보장된다고 할 수 있다. 더불어 침체 되어있는 국내 사료산업에 고 부가가치 산업으로서의 기능성 원료를 공급하여 사료산업 활성화에 일조할 수 있으리라 전망한다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신 인력양성사업으로 수행된 연구결과입니다.

## 참고문헌

1. Barclay, L. R. C. and Ingold, K. U. (1981) Autoxidation of biological molecules. 2. Autoxidation of a model membrane. Comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 6478-6485.
2. Bergmeyer U., Bergmeyer J., and Grassl M. (1974) Methods of enzymatic analysis II. Harvard University, Cambridge, 1157-1158.
3. Kim, Y. W. (2006) Liquiritigenin, an aglycone of liquiritin in glycyrrhizae radix, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine. Master thesis, Daegu Haany Univ., Korea.
4. Lichtenberg, D. and Barenholz, Y. (1988) Liposomes: Preparation, characterization and preservation. *Methods of Biochemical Analysis*. Wiley, New York. **33**, 337-462.
5. Ohkawa H., Ohishi N., and Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbitric reactions. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
6. Ryu, E. J. (2005) Human scalp hair biology. Leewha Pub. pp. 203-208.
7. Sodergren, E., Nourooz-Zadeh, J., Berqlund, L. and Vessby, B. (1998) Re-evaluation of ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J. Biochem. Biophys. Methods* **37**, 137-146.
8. Son, Y. H. (2003) Inhibitory effects of onion juice on liver damage induced by free radical initiator in rats. Master thesis, Konkuk Univ., Korea.
9. The Standard and Range of Harm Feed. (2003) Ministry of Agriculture and Forestry, pp.222.
10. The Standard Method of Feed in Korea. (2003) Ministry of Agriculture and Forestry, pp.160.
11. Yagi, K. (1976) Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**, 212-216.

(2006. 11. 6 접수/2006. 12. 27 수정1/2007. 4. 15 수정2/  
2008. 5. 15 수정3/2008. 5. 19 채택)