



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권으로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

황정 추출물이 랫트의 피부조직에
미치는 항산화 효과



2007년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

박 정 민

이 학 석 사 학 위 논 문

황정 추출물이 랫트의 피부조직에
미치는 항산화 효과

지도교수 최 진 호

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함



2007년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

박 정 민

박정민의 이학석사 학위논문을 인준함

2007년 2월 23일



주 심 이학박사 김 형 락 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

위 원 이학박사 최 진 호 (인)

목 차

<i>Abstract</i>	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 실험재료	7
1-1. 시약 및 재료	7
1-2. 시료 및 추출	7
2. <i>In vitro</i> 실험	9
2-1. 프리라디칼 소거능 측정	9
2-2. 폴리페놀 함량 측정	9
2-3. 티로시나아제 활성 저해능 측정	9
2-4. 엘라스타아제 활성 저해능 측정	10
3. 투여 실험	11
3-1. 실험동물 및 사육조건	11
3-2. 실험용 조제 사료의 제조	11
3-3. 체중, 사료 섭취량의 측정	12
3-4. 사료 및 에너지 효율의 측정	12
3-5. 피부조직 균질액 제조	12
3-6. 단백질 함량의 측정	14
4. 활성산소종의 생성량 측정	14
4-1. 수퍼옥시드 라디칼의 생성량 측정	14
4-2. 히드록시 라디칼의 생성량 측정	15

5. 산화적 스트레스의 분석	15
5-1. 과산화지질의 함량 측정	15
5-2. 산화단백질의 함량 측정	16
6. 활성산소종 제거효소의 활성 측정	16
6-1. 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 측정	16
6-2. 카탈라아제의 활성 측정	17
7. 분석결과와 통계처리	17
 III. 결과 및 고찰	18
1. <i>In vitro</i> 실험	18
1-1. 프리라디칼 소거능 평가	18
1-2. 폴리페놀 함량 평가	19
1-3. 티로시나아제 활성 저해능 평가	21
1-4. 엘라스타아제 활성 저해능 평가	23
2. 체중변화, 사료 및 에너지 효율의 평가	25
3. 황정 클로로포름 분획물 섭취시 혈액의 항산화능 평가	28
3-1. 단백질 함량의 변화	28
3-2. 수퍼옥시드 라디칼의 생성량 평가	29
3-3. 히드록시 라디칼의 생성량 평가	30
3-4. 산화단백질의 함량 평가	32
3-5. 과산화지질의 함량 평가	33
3-6. 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 평가	35
3-7. 카탈라아제의 활성 평가	36
4. 황정 클로로포름 분획물 섭취시 피부조직의 항산화능 평가	38
4-1. 단백질 함량의 변화	38
4-2. 수퍼옥시드 라디칼의 생성량 평가	39

4-3. 히드록시 라디칼의 생성량 평가	41
4-4. 산화단백질의 함량 평가	43
4-5. 과산화지질의 함량 평가	43
4-6. 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 평가	46
4-7. 카탈라아제의 활성 평가	46
 IV. 요약	 48
 V. 참고문헌	 52



Antioxidative Effects of *Polygonatum odoratum*
Extracts on Rat Skin

Jung-Min Park

*Department of Food and Life Science, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

This study was designed to investigate the antioxidative effects of *Polygonatum odoratum* extract diets on rat serum and skin homogenate. *Polygonatum odoratum* was extracted with 80% methanol and was fractionated with chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH) and distilled water(H₂O). In these fractions, chloroform fraction has the greatest it used in antioxidative experiment.

First, In vitro experiment (tyrosinase inhibition activity and elastase inhibition activity) was acted with CHCl₃ fraction which has high antioxidative effects of *Polygonatum odoratum* to confirm whiteninig and antiwrinkle effects on rat skin. Tyrosinase inhibition activity was 17% in 0.5 g/ml of *Polygonatum odoratum* CHCl₃ fraction so it has a little whiteninig effects. Elastase inhibition activity was 58% in 100 µg/ml of *Polygonatum odoratum* CHCl₃ fraction. It was an amazing antiwrinkle effects on rat skin.

Next, CD rats were grouped. Twenty-eight male CD rats (SPF/VAF Crj/Bgi male, 180±10 g) were divided into four groups. One group is a basic diet group(control), the others are experimental groups on four different contents of the chloroform fraction, *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF); POCF-25, POCF-50, POCF-75 and POCF-100 mg/kg BW/day and fed for 4 weeks.

For evaluation of antioxidative effects in serum and skin homogenate, the oxygen free radical such as superoxide radical (O₂^{•-}), and hydroxyl radical (•OH), the oxidative stress such as lipid peroxide (LPO) and oxidized protein (OP), and the scavenger enzyme such as superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) were measured.

At the end of the experimental period, body weights and food intakes almost did not change among these five groups. Superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) contents were effectively inhibited (10.1%~12.0%) in POCF-75 and POCF-100 groups in rat serum compared with control group, and hydroxyl radical ($\cdot OH$) contents were significantly inhibited (12.0%~14.1%) in POCF-75 and POCF-100 groups in rat serum compared with control group. LPO level in serum was decreased (10.3%) in POCF-100 group compared with control group. OP levels in serum were significantly decreased (15.3%) in POCF-100 groups compared with control group. SOD activities in serum were effectively increased (13.6%~15.6%) in POCF-75 and POCF-100 groups compared with control group. CAT activities in serum were increased (33.4%) in POCF-100 group compared with control group.

Superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) contents were inhibited (16.9%~16.4%) in POCF-75 and POCF-100 groups in rat skin homogenate compared with control group, and Hydroxyl radical ($\cdot OH$) contents were significantly inhibited (6.8%~14.6%) in POCF-50, POCF-75 and POCF-100 groups in rat skin homogenate compared with control group. LPO level in skin homogenate was decreased (7.9%~12.9%) in POCF-50, POCF-75 and POCF-100 group compared with control group. OP levels in skin homogenate were significantly decreased (11.4%~15.1%) in POCF-75 and POCF-100 groups compared with control group. SOD activities in skin homogenate were effectively increased (10.4%) in POCF-100 groups compared with control group. CAT activities in skin homogenate were increased (23.3%~26.7%) in POCF-75 and POCF-100 group compared with control group.

These results suggest that *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) may be protect the skin aging and may be effectively inhibit the senile aging procedures. Therefore POCF has a potential utilization as the source of health assistant foods for antiaging of skin. But *Polygonatum odoratum* chloroform fraction might be needed further study to certify the exact mechanisms.

서론

우리나라의 경우 세계보건기구 (WHO)가 2006년 작성한 세계보건보고서에 따르면 한국 남성의 평균 수명은 73세, 여성은 80세로 조사됐으며, 지난해 말 통계청 조사 결과에서는 100세 이상 인구수가 961명으로 집계되어 한국인의 평균수명이 크게 늘어나고 있음을 보여주고 있다. 고령화시대를 맞아 평균수명이 늘어나면서 노인건강 문제가 새로운 관심으로 떠오르면서 노화에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다.

한편 일본은 세계가 인정하는 장수 국가로 일본 내에서도 특히 오키나와 현은 100세 이상 장수노인들이 많이 사는 곳으로 유명하다. 지난 2004년 세계보건기구 조사 결과 일본인의 평균 수명은 82세로 세계 1위의 장수국으로 선정됐으며 1971년 이후 해마다 기록을 경신하고 있는 100살 이상 고령자 수는 1998년 만 명, 2003년에 2만 명을 돌파했고 몇 년 안에 3만 명마저 넘을 전망이라고 한다. 특히 일본 전문가들은 장수 원인 중 하나로 식습관을 들고 있으며 현재 식품과 항산화 활성에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다.

인간의 노화현상으로는 우선 머리카락이 빠지고 하얗게 되며, 피부는 탄력성을 잃고 주름살이 늘어간다. 또한 시력이 떨어지고 뼈가 약해지며 혈관벽이 굳어져 동맥경화가 발생하기도 한다. 면역력도 현저하게 떨어지며 뇌의 신경세포수가 감소하고 알츠하이머병과 같은 증상도 나타난다. 이와 같은 노화현상은 불가역적인 것이지만 오늘날에는 노화를 지연시키려는 많은 노력과 연구들이 진행되고 있다.

노화의 원인에 관한 학설 중에는 노화나 죽음은 미리 생물에 프로그램되어 있다고 보는 ‘프로그램설’과 노화현상은 환경적인 영향인 환경호르몬, 다이옥신, 중금속 등에 의한 것이라고 보는 ‘비프로그램설’로 살펴볼 수 있는데, 비프로그램설 중 ‘유해산소설’이 가장 주목을 받고 있는 학설이다(Harman, 1956; 1984). 생체 내에서는 에너지 대사를 위해 끊임없이 산화 작용이 일어나며 이 과정 중 상당량의 유리기 (수퍼옥사이드 라디칼 ($O_2^{\cdot-}$), 히드록시 라

디칼 ($\cdot\text{OH}$), 과산화수소 (H_2O_2))가 생성된다. 이들 유리기가 지질 과산화반응을 촉진하여 과산화물이 생성되고 이들의 산화분해 및 중합반응에 의해 다양한 2차 산물이 만들어진다. 이러한 물질은 단백질, DNA, 효소 및 T-cell과 같은 면역계를 손상, 각종 질환을 야기시키며, 특히 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 생체는 이들 활성산소종으로부터 스스로를 보호하기 위해 항산화 효소인 수퍼옥시드 디스무타아제 (SOD), 카탈라아제, 글루타치온 퍼옥시다아제 (GSH-Px)와 비효소적 항산화제로 비타민 C, 토코페롤, 셀레늄, 요산 등을 가지고 있다. 그러나 생체 내 활성 산소종과 항산화 시스템 간의 균형이 깨져 각종 질병이 발생하게 된다(Freeman, 1982, Halliwell, 1999, Andrew, 2001). 따라서 이러한 유리기의 생성을 억제하거나 생성된 활성산소종을 소거하기 위한 물질연구가 진행되고 있는데 그 중 각종 천연물 추출물에 대한 관심이 특히 많다. 현재 도토리 추출물, 흑미 색소, 복분자 열매 물질 등 다양한 천연물로부터 항산화 활성이 검색되어 그 효과가 검증되고 있다(Sung et al., 1997, Lee et al., 2000, Chung et al., 2003).

그래서 본 연구에서는 한국산 야생식용식물 중 식용으로 오랫동안 사용되어 오고 있으며 예로부터 강장, 영양불량, 기미제거, 안질환, 피부미용에 효능이 좋다고 알려진 황정을 택하여 황정 추출물을 섭취하였을 때 피부조직에 미치는 항산화 활성을 검색해 보고자 하였다.

황정은 주로 한국·일본·중국 등 동아시아에 서식하는 백합과 (Liliaceae)에 속하는 다년생초로 학명은 *Polygonatum odoratum* Druce. Var로서 땅 밑을 기며 자라는 마디가 있는 굵은 뿌리줄기에서 땅위줄기가 나와 한쪽으로 굽어 50~80cm까지 비스듬히 자란다. 긴 타원형의 잎은 어긋나 2줄로 나란히 달리는데, 뒷면은 흰색이며 잎가장자리는 밋밋하다. 대롱처럼 길게 생긴 연한 초록색의 꽃은 5월 무렵 잎겨드랑이에 3~5송이씩 무리져 피며, 열매는 가을에 아래로 처져 둥그런 장과(漿果)로 검은빛이 도는 자주색으로 익는다(Lee., 2006) (Fig. 1).

황정의 맛은 달콤하며 오장에 두루 좋은 영양을 주는데 주로 비경 (脾經)

과 폐경 (肺經)에서 작용을 해 비장을 보하고 폐를 윤택하게 한다. 몸이 허약한 사람이나 병후에 기력이 부족한 사람에게 좋으며 특히 근육과 뼈의 무력증에 뛰어난 효과를 보여 풍습 등에 약재로 쓰인다.

동의보감에 "황정은 태양의 정 (精)을 받은 생약이라서 허로와 쇠약한 신체를 보하고 근육과 뼈를 튼튼하게 하며 정신을 맑게 해주고 간과 신을 보하고 정력을 도와 심기 (心氣)를 편하게 해주는 약으로서 먹으면 몸이 가벼워지고 기운이 나며 장수한다" 고 말하고 있다.

또한 현대 약리학 연구에 의하면 황정에는 falcatan 및 polygonaquinone 등의 다당류와 triterpenoid, convallarin, convallamarin 등의 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 보고되어져 있으며 β -sitosterol, Vit A 등 인체의 영양상태를 개선하고 면역력과 혈관의 유연성을 높이는데 중요한 역할을 하는 물질들이 함유되어 있다고 알려져 있다. 또한 황정은 고혈압이나 관상동맥, 심장병, 류머티즘, 당뇨 등의 질환에 효과가 있는 것으로 밝혀져 그 예방과 치료에 응용되고 있다.

이처럼 황정에 관한 다양한 효능이 알려져 있으나 이에 대한 체계적인 연구는 미비한 실정이다. 따라서 황정의 생리활성연구로서 본 연구에서는 황정을 80% 메탄올추출물을 용매분획하여 얻어진 CHCl_3 , EtOAc, BuOH, H_2O 분획물을 사용하여 생리활성 기능을 검토하였으며, 이들 분획물 중에서 활성이 가장 높게 나타난 CHCl_3 분획물을 사용하여 *in vitro* 실험 (tyrosinase inhibition activity, elastase inhibition activity)을 통해 미백 효과와 주름개선 효과를 확인해 보았다. 또한 동물실험을 통해 황정 식이가 랫트의 혈청과 피부조직에 미치는 항산화 효과를 평가하였다. 혈청은 우리 몸의 모든 피부 아래를 순환하면서 각종 영양소와 노폐물을 운반함으로써 피부에 매우 직접적인 영향을 끼친다. 따라서 랫트의 혈청과 피부조직에서 활성산소의 함량 및 활성산소종 제거효소의 활성을 측정하였고, 산화적 스트레스를 평가하기 위하여 과산화지질의 생성량과 산화단백질의 생성량을 측정하였다. 이러한 실험을 통해, 본 연구에서는 황정 추출물의 천연 항산화제로서의 개발 가능성에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.



Scientific name: *Polygonatum Odoratum* Druce. Var

Common name: Naruko-yuri

Family: Liaceae

Distribution: China, Japan, Korea

Components: Falcatan, Polygonaquinone, Mineral

Efficiency: Tonic, Febrifuge

Fig. 1. Pharmacological effects and components
of *Polygonatum odoratum* Druce. Var

II. 재 료 및 방 법

1. 실험재료

1-1. 시약 및 재료

본 실험에 사용된 황정 (*Polygonatum odoratum* Druce. Var)은 거창건재 한약품(범천동)에서 구입하였으며, 실험사료의 조제에 필요한 starch (Daesang, Korea), casein은 ICN사 (USA), lard (Sinhan, Korea), corn oil (Cheiljedang, Korea), cellulose는 Sigma (USA), vitamin 및 mineral mix (AIN-76)는 ICN Co. (USA), *DL*-methionine, choline chloride는 Sigma (USA) 제품을 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였고 황정의 추출 용매는 시약용 1급을 사용하였다.

1-2. 시료 및 추출

건조된 황정을 분쇄기를 사용하여 잘 마쇄하여 80% 메탄올로 3회 냉침한 후 여과하고 그 여액을 rotary vacuum evaporator에서 농축하여 MeOH 추출물 366.75 g을 얻었다. 계통적 분석법에 따라 순차적으로 분획하여, 각 분획물 CHCl_3 fraction (20.79 g)과 EtOAc fraction (20.43 g), *n*-BuOH fraction (140.07 g), H_2O fraction (185.46 g)을 얻었으며, 그 과정은 Fig. 2에 나타내었다. 각 분획물 중 CHCl_3 fraction을 동결건조하여 분말로 만든 후 실험을 위한 시료로 사용하였다.

Dried of *Polygonatum odoratum* (3.0kg)

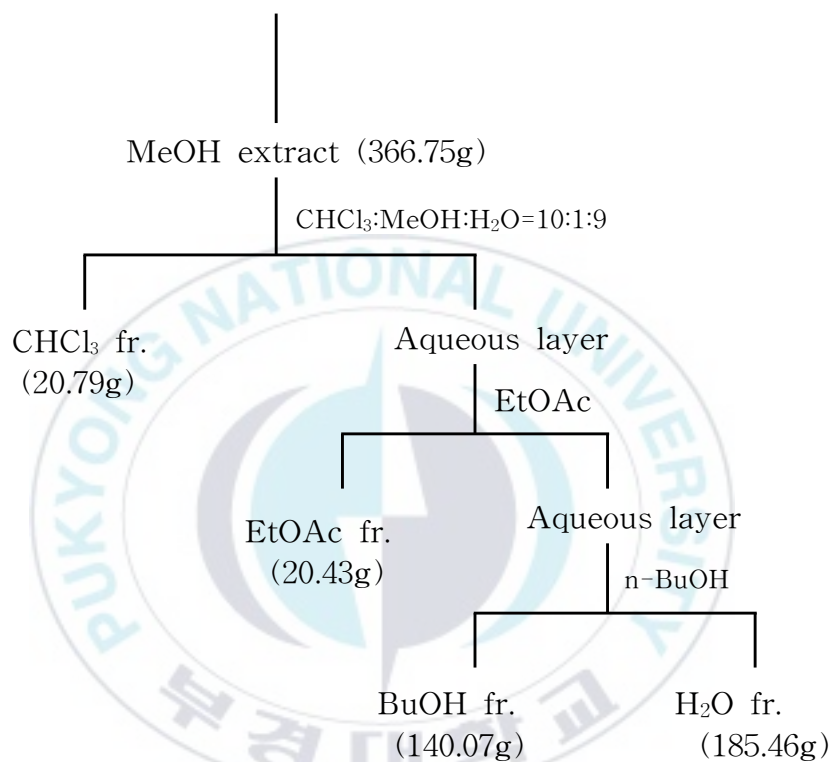


Fig. 2. Extraction and fractionation procedures of *Polygonatum odoratum*

2. *In vitro* 실험

2-1. 프리 라디칼의 소거능 측정

시료의 항산화 검색법으로서 유리라디칼의 소거작용 실험은 Yoshida 등 (1989)이 사용한 방법에 따라 각 시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 소거 효과를 측정하였다. 농도별 시료 (10~480 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 메탄올에 녹인 뒤 4 ml씩 취하여 1.5×10^{-4} M 농도로 메탄올에 용해시킨 DPPH 용액 1 ml과 잘 혼합한다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 프리 라디칼의 소거활성을 50% 저해 농도 (IC_{50})로 계산하였다.

2-2. 폴리페놀 함량 측정

시료의 폴리페놀 함량은 AOAC 분석법에 따라 측정하였다. 농도별 시료 (10~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 증류수에 녹인 뒤 1.5 ml씩 취하여 1 N 농도로 조제한 Folin-Ciocalteu phenol 0.5 ml과 잘 혼합한다. 이 혼합액에 다시 1 M의 Sodium Carbonate, Anhydrous 0.5 ml을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후, 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 총폴레페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. Tannic acid를 이용한 표준곡선은 Tannic acid 1 mg을 증류수 1 ml에 녹이고 최종농도가 0, 50, 100, 150, 200 및 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용액이 되도록 취하여 위와 같은 방법으로 640 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다(Gutfinger, T. 1981).

2-3. 티로시나아제 활성 저해능 측정

식약청에서 고시한 기능성 화장품 효력을 측정하기 위한 가이드라인에서 제시한 미백효과를 확인할 수 있는 방법으로 티로시나아제의 활성 저해능을 측정하였다. 시료를 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg /10 ml solution 농도

로 증류수에 희석하여 조제하였다. 시험관에 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 6.5) 220 μl 와 시료액 20 μl , tyrosinase (2 unit/ μl) 20 μl 를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM tyrosine 40 μl 넣고 잘 혼합한 후 37°C에서 15 분간 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 공시료액으로 시료액 대신 0.1 M 인산염완충액 (pH 6.5)을 넣는다. 활성 저해율이 50%일 때의 시료 농도를 산출하였으며 티로시나아제의 활성 저해율은 다음 식에 의하여 계산되었다.

$$\text{tyrosinase 활성 저해율(\%)} = 100 - \frac{b - b'}{a - a'} * 100$$

a ; 공시료액의 반응 후 흡광도

b ; 시료액의 반응 후 흡광도

a',b' ; tyrosinase를 완충액으로 대체 시 측정한 흡광도

2-4. 엘라스타아제 활성 저해능 측정

Tschesche and colleagues (1996) 방법에 따라 0.2 M Tris-HCl buffer (containing 1% albumin) 0.1 ml와 10 mM MAAPVN(N-(methoxysuccinyl)-ala-ala-pro-val 4-nitroanilide) 0.025 ml을 혼합한 후 시료를 넣는다. 이 혼합물에 elastase (3 unit/ml)를 가한 후 25°C에서 20분간 배양하고 냉침으로 반응을 정지시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정한다. 공시료액으로 시료액 대신 0.2 M Tris-HCl buffer를 넣는다. 엘라스타아제의 활성 저해율은 다음 식에 의하여 계산되었다.

$$\text{elastase 활성 저해율(\%)} = \{1 - (C - D) / (A - B)\} * 100$$

A ; 공시료액의 반응 후 흡광도

B ; 공시료액의 반응 전 흡광도

C ; 시료액의 반응 후 흡광도

D ; 시료액의 반응 전 흡광도

3. 투여 실험

3-1. 실험동물 및 사육조건

한국바이오제노믹스에서 개발한 SPF/VAF Crj/Bgi CD계 랫트 (male, 180±10 g)를 구입하여 동물사육실에서 2주 동안 예비 사육한 다음, 실험설계로서 황정의 생리활성 실험을 하기 위하여 7마리씩 5군으로 하여 황정 CHCl₃ 분획물의 동결건조 분말을 25 mg/kg BW 첨가한 실험군을 POCF-25 mg/kg BW, POCF-50 mg/kg BW, POCF-75 mg/kg BW 그리고 POCF-100 mg/kg BW 첨가한 실험군을 각각 POCF-25, POCF-50, POCF-75 및 POCF-100으로 하여 4주 동안 사육하였다. 동물사육실은 항온항습 (22±2℃, 65±2% RH)하에서 12시간 싸이클 (06:00~18:00)로 명암이 자동 조절되었다.

3-2. 실험용 조제 사료의 제조

실험군의 사료조성은 탄수화물 58.3% (α-corn starch 45.0% + sucrose 13.3%)를 기준으로 하여 황정 CHCl₃ 분말을 첨가하고 대조군에는 실험군에 첨가한 황정 CHCl₃ 분말을 제외하였고, 단백질 18.0% (sodium-free casein), 지질 15.0% (lard/ corn oil : 2/1, w/w), 비타민과 무기질 (AIN-76 mixture)

각각 1.0%, 3.5%, 그리고 섬유질 3.0%, DL-methionine 0.3%, choline chloride 0.2%를 첨가하였고, 여기에 cholesterol 0.5% 및 sodium chloride 0.2%를 첨가하였다. 조제사료의 조성표는 Table 1과 같다.

3-3. 체중, 사료 섭취량의 측정

체중은 실험기간 4주 동안 2일 간격으로 체중을 측정하였고, 사료 섭취량은 매일 18:00에 사료를 평량한 다음, 다음날 사료 잔량을 평량하여 매일의 사료 섭취량을 측정하였다.

3-4. 사료 및 에너지 효율의 측정

사료효율 (feed efficiency), 에너지 효율 (gross efficiency)은 Flood 등 (1993)의 방법에 따라 다음 식 (A) 및 식 (B)로 계산하였다.

$$\text{Feed efficiency} = [\text{Body weight gain(g)}/\text{Food intake(g)}] \times 10^2 \dots \dots \dots (A)$$

$$\text{Gross efficiency} = [\text{Body weight gain(g)}/\text{Energy consumed(kcal)}] \times 10^3 \dots \dots (B)$$

3-5. 피부조직 균질액 제조

피부조직의 분획은 Choi 등 (1989)이 사용한 방법으로 실시하였다. 저온실에서 완충용액 (1.15% KCl/ 10 mM phosphate buffer + 5 mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 피부조직 무게당 10배 (w/v)의 완충용액으로 조직 균질기를 이용하여 3000 rpm에서 균질화한 다음 700 × g에서 10분간 원심분리하여 얻은 균질물을 실험에 사용하였다. 피부조직 균질물은 실험 전까지 -70℃에 보관하면서 분석하였다.

Table 1. Diet compositions of experimental animal for evaluation of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction.

Components	Control	POCF-25	POCF-50	POCF-75	POCF-100
POCF (g/kg BW/day)	–	0.025	0.050	0.075	0.100
Carbohydrate (starch+sugar)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)	58.3 (45.0+13.3)
Protein (casein)	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0
Lipids (lard : corn oil=2 : 1)	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Cellulose	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium cholate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

3-6. 단백질 함량의 측정

혈청 및 피부조직 균질물의 총단백질의 함량은 Lowry 등 (1951)의 방법인 BSA법으로 측정하였다. 혈청 및 균질물을 20 μl 씩 취하고 여기에 1.0% SDS 용액을 각각 24 μl 및 16 μl 를 혼합하고, 증류수로써 240 μl 및 160 μl 가 되도록 희석 (12배 및 8배)한다. 희석된 용액 15 μl , 20 μl 를 취해 증류수를 80 μl , 85 μl 씩 넣고 희석시킨다. 여기에 반응시약 (0.5% copper sulfate solution : 1.0% sodium tartrate solution : 2.0% sodium carbonate solution = 0.5 : 0.5 : 49, v/v)을 1.0 ml씩 첨가하여 약 10초간 혼합한다. 그리고 20분간 실온에서 방치한다. 이후 발색시약으로써 1.0 N Folin시약을 0.1 ml씩 첨가하여 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 다음, 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의하여 단백질의 함량 (mg protein/ml fraction)을 정량한다.

4. 활성산소종(ROS)의 생성량 측정

4-1. 수퍼옥시드 라디칼의 생성량 측정

수퍼옥시드 라디칼 (superoxide radical)의 생성은 McCord 등 (1969)과 Chan 등 (1974)의 방법에 따라 superoxide dismutase를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다. 즉 0.1 mM EDTA를 함유한 인산완충용액 (pH 7.8) 420 μl 에 cyanide의 농도가 50 μM 이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 37°C에서 10분간 가온하였다. 이 용액에 혈청 및 피부조직 균질물을 300 μl 와 0.1 mM cytochrome C 50 μl 를 넣어 분광광도계를 사용 550 nm에서 흡광도를 시간에 따라 측정하였다. 이 때 cytochrome C의 양은 분자흡광계수 $19,500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 계산하였다.

4-2. 히드록시 라디칼의 생성량 측정

Deoxyribose의 파괴 정도를 알기 위해 hydroxyl radical 생성 정도를 측정하는 방법으로서 반응성 산소대사물에 의해 deoxyribose가 파괴되어 aldehyde가 생성되며 이 aldehyde는 산성용액에서 thiobabituric acid와 반응하여 발색되는 것을 이용한 Halliwell 등 (1981)의 방법에 따라 측정하였다. 혈청 및 피부조직 균질물의 히드록시 라디칼 (hydroxyl radical)측정은 먼저 0.1 M의 인산완충용액 (pH 7.4), 10 mM의 NaN_3 , 7 mM의 deoxyribose, 5 mM의 ferrous ammonium sulfate, 0.54 M NaCl 시약을 각각 33.3 μl 씩 첨가하고 검체균은 시료 15 μl 과 증류수 185 μl 을 합하여 200 μl 되게 하여 이 혼합된 용액을 37°C 항온수조에서 15분간 가온한다. 그러나 대조균은 가온 과정을 생략하고 대조균의 시료 30 μl 을 시험관에 넣는다. 그리고 모든 시험관에 증류수 185 μl 을 넣고 잘 혼합한다. 이 반응액에 8.1% SDS용액 75 μl 와 20%의 acetic acid 500 μl , 증류수 25 μl 를 추가하여 넣고 1.2% TBA 용액 333 μl 를 넣어 잘 섞는다. 그 후 30분간 끓인 다음 실온에서 식힌 후, 800 × g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량곡선에 의하여 검체균과 대조균의 흡광도 차이를 이용하여 히드록시 라디칼 (nmole/mg protein)의 생성량을 계산하였다.

5. 산화적 스트레스의 분석

5-1. 과산화지질의 함량 측정

혈청 및 피부조직 균질물 중의 과산화지질 함량은 Choi and Yu (1990)가 사용한 방법에 따라 TBA법으로 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하였다. 혈청 및 피부조직 균질물 20 μl 에 증류수 180 μl 을 혼합한 것을 각 시험관에 취하고 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate)용액 200 μl 를 가하여

약 5초간 혼합한 후 20% 초산 1.5 ml를 넣어 다시 5초간 혼합하고, 1.2% TBA (thiobarbituric acid)시약 1.0 ml을 첨가하여 깨끗한 구슬로 마개한 뒤 30분간 수조에서 가열한다. 이 반응액을 $800 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분광광도계를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 따라 과산화지질의 함량 (nmole/mg protein)을 정량하였다.

5-2. 산화단백질의 함량 측정

혈청 및 피부조직 균질물 중의 산화단백질 (oxidized protein: OP)의 함량은 Levine 등 (1990)의 방법에 따라 carbonyl group의 생성량을 측정하였다. 0.1 ml의 시료에 30% trichloroacetic acid (TCA)를 0.5 ml을 혼합한 다음, $800 \times g$ 에서 10분간 저온 원심분리한 후 상층액을 제거한 뒤 잔사에 10 mM dinitrophenyl hydrazine (DNPH) 0.5 ml 첨가, 15분마다 혼합하며 1시간 동안 실온에 방치 후 $800 \times g$ 에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 잔사에 ethanol/ethyl acetate (v/v 1:1) 3.0 ml을 첨가하여 실온에서 10분 방치한다. 다시 $800 \times g$ 에서 10분간 원심분리 후 잔사를 얻은 뒤, 6 M guanidine (20 mM potassium phosphate buffer, pH 2.3) 1.0 ml을 첨가·혼합하여 37°C의 항온 수조에서 15분간 가온한 후, $800 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl기의 양은 360 nm와 370 nm사이의 파장에서 분자흡광계수 ($E=22,000$)를 이용하여 계산하였다.

6. 활성산소종 제거효소의 활성 측정

6-1. 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 측정

Oyanagui 등 (1984)의 방법에 따라 수퍼옥시드 디스무타아제 (superoxide dismutase : SOD)의 활성은 혈청 및 피부조직 균질물을 인산완충용액 (pH 8.2)으로 30배로 희석한 용액 0.1 ml에 증류수 0.5 ml, A시약 (52.125 mg of hydroxylamine + 102.1 mg of hypoxanthine/250 ml D.W) 0.2 ml, B시약(20

μl xanthine oxidase + 0.9939 mg EDTA/26.7 ml phosphate buffer, pH 8.2) 0.2 ml를 첨가·혼합하여 37°C 항온수조에서 40분간 가온한 후 C시약 (300 mg of sulfanilic acid + N-1-naphthylethyene diamine acid/500 ml of 16.7% acetic acid) 2.0 ml을 첨가·혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 분광광도계를 사용, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의해 수퍼옥사이드 디스무타아제 (unit/mg protein)를 정량하였다.

6-2. 카탈라아제의 활성 측정

Rigo 등 (1977)의 방법에 따라 혈청 및 피부조직 균질물 중의 카탈라아제 (catalase : CAT)활성의 측정은 시험관에 인산완충용액 (130 mM, pH 7.0) 250 μl , 증류수 330 μl , 피부조직 균질물 20 μl 에 15 mM의 과산화수소용액 900 μl 을 첨가, 5초간 잘 섞은 다음, 즉시 분광광도계를 사용하여 240 nm에서 시간에 대한 흡광도의 변화를 2분간 측정하여 1분 동안 과산화수소가 제거되는 속도를 계산하여 효소의 활성을 측정하였다.

7. 분석결과의 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였고, 각 군간의 유의성 검정은 Student's t-test (Steel등, 1960)로 실시하였다.

III. 결 과 및 고 찰

1. *In vitro* 실험

1-1. 프리 라디칼 소거능 평가

활성산소 (reactive oxygen species)는 조직세포의 지질뿐만 아니라 단백질과 DNA까지 공격하여 과산화지질 (lipid peroxide : LPO), 산화 단백질 (oxidized protein : OP) 및 8-OHdG를 생성하면서 노화를 촉진한다(Halliwell, 1987; Freeman et al., 1982; Cross et al., 1987; Southorn et al., 1988; Yu, 1993). 또한 활성산소는 피부 조직에도 영향을 끼쳐 피부 노화를 촉진하는데 이러한 활성산소의 제거능을 측정하는 방법으로 DPPH 라디칼 제거법이 폭넓게 사용되어지고 있다. DPPH (1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)는 불안정한 상태여서 수소 원자를 제공해주는 전자공여체와 반응하여 안정한 분자로 전환되며, 진보라색의 DPPH의 색이 변하여 흡광도가 감소하는데 이를 통해 프리 라디칼 소거 활성을 측정할 수 있다.

본 실험에서도 DPPH 라디칼 소거능을 이용하여 계통적 분석법에 따라 얻어진 황정 메탄올 추출물 CHCl_3 , EtOAc, n-BuOH, H_2O fraction의 프리 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 2에서 보는바와 같다. 비교 대조그룹인 L-ascorbic acid의 프리 라디칼 50% 소거능인 IC_{50} 은 $2.7 \mu\text{g/ml}$ 이었고, 황정 분획물 IC_{50} 은 각각 37.88, 42.81, 87.86 및 $234.66 \mu\text{g/ml}$ 로서 프리 라디칼 소거능은 $\text{CHCl}_3 > \text{EtOAc} > \text{n-BuOH} > \text{H}_2\text{O fraction}$ 순으로 나타났다. 따라서 CHCl_3 분획물이 황정의 분획물 중 DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 높다는 사실을 확인할 수 있다. 참당귀의 DPPH Radical 소거 활성과 항산화 효과에 관한 연구 (Kang et al., 2004)에서 참당귀의 메탄올추출물과 열수추출물이 $500 \mu\text{g/ml}$ 에서 DPPH 라디칼 소거능이 각각 47.1% 및 45.6%로 나타났는데 이와 비교했을 때 황정 분획물의 DPPH 라디칼 소거능은 매우 높음을 알 수 있다.

1-2. 폴리페놀 함량 측정

페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물의 하나로 녹차, 우롱차 및 감잎차와 같은 차 종류와 사과, 포도종자 및 미성숙 과일 등에 함유되어 있다. 이들은 다양한 구조와 분자량을 가지고 있으며 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가진다. 폴리페놀의 이러한 뛰어난 전자 공여 능력은 SOD와 유사한 효과를 나타내어 산화를 억제해주기 때문에 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가진다(Kim et al., 2000). 여기서는 tannic acid 표준곡선을 이용하여 황정 분획물 중의 총폴리페놀 함량을 측정하였다(Table 3).

황정 각 분획물의 총폴리페놀 함량을 살펴보면 Table 3과 같다. 폴리페놀 함량은 황정 클로로포름 분획물이 16.49%였으며 황정 에틸아세테이트 분획물이 14.60%의 폴리페놀을 함유하고 있었다. 다음으로 황정 부탄올 분획물이 12.97%, 황정 수용성 추출물이 5.58% 순으로 나타났다. 따라서 황정 각 분획물의 폴리페놀 함량은 $\text{CHCl}_3 > \text{EtOAc} > \text{n-BuOH} > \text{H}_2\text{O}$ fraction 순으로 나타났다. 따라서 CHCl_3 분획물이 황정의 분획물 중 총폴리페놀 함량이 가장 높다는 사실을 확인할 수 있었다.

국내산 식용성 식품중의 총폴리페놀 화합물 함량을 분석한 결과를 보면, 참깨, 들깨, 도토리, 살구씨 및 호박씨 등에 각각 0.27%, 0.83%, 0.23%, 0.12% 및 0.13%를 함유하고 있었으며 (Lee et al., 1994), 한약재 추출물의 총폴리페놀 함량을 분석한 연구 결과를 보면 구기자, 국화 및 감초 등에 각각 1.66%, 1.32%, 및 1.31%의 총폴리페놀 함량이 나타났다(Park, 2002). 위와 같은 연구결과와 비교해 볼 때 황정 추출물은 상당히 많은 양의 폴리페놀을 함유하고 있었는데 그 중에서도 특히 황정 클로로포름 분획물이 가장 높은 값을 나타내어 천연 항산화제로서의 이용가치를 확인할 수 있었다.

Table 2. Effects of *Polygonatum odoratum* on DPPH value.

Samples	IC ₅₀ ^a (μ g/ml)
CHCl ₃ fr.	37.88
EtOAc fr.	42.81
BuOH fr.	87.86
H ₂ O fr.	234.66
L-ascorbic acid	2.7

^aInhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentrations

Table 3. Total polyphenol contents of *Polygonatum odoratum* extracts.

Samples	Total polyphenols (%)
CHCl ₃ fr.	16.49
EtOAc fr.	14.60
BuOH fr.	12.97
H ₂ O fr.	5.58

1-3. 티로시나아제 활성 저해능 평가

티로시나아제는 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인 물질로 알려져 있는 피부에 존재하는 흑색색소인 멜라닌 색소의 생합성 과정에 관여하는 물질이다. 티로신으로부터 티로시나아제에 의해 생합성된 멜라닌이 피부의 국소에 과다하게 침착되면 주근깨, 검버섯과 같은 색소 침착, 피부 노화 및 피부암까지 유발될 수 있다(Kim et al., 2004). 따라서 티로시나아제의 활성을 억제함으로써 멜라닌 색소의 형성을 막아 이를 예방할 수 있다. 현재 티로시나아제 저해제가 미백 화장품이나 의약품에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Kang et al., 2004). 그래서 미백에 관련된 화장품이나 의약품에 티로시나아제 활성 저해능이 있는 물질이 많이 사용되고 있다.

황정 클로로포름 분획물의 티로시나아제의 활성 저해능을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 황정 클로로포름 분획물은 0.5 g/ml의 농도에서 티로시나아제의 활성이 17% 정도 저해되었고, 반면 대조군인 아스코르브산의 경우는 0.5 g/ml의 농도에서 98%로 거의 100%에 가까운 티로시나아제 활성 저해능을 나타냈다. 황정 클로로포름 분획물 1 g/ml의 농도에서 티로시나아제의 활성 저해능은 17% 정도로 티로시나아제 저해능이 0.5 g/ml의 농도일 때와 큰 차이가 없었다.

결과적으로 황정 클로로포름 분획물은 티로시나아제의 활성을 약간 저해하기는 하나 그 효능은 아스코르브산에 미치지 못한 것으로 나타났다. 미백효과로서 기능성 화장품 소재로 이용되고 있는 알부틴(albutin)이 50 μ g/ml 농도에서 약 50%의 티로시나아제 활성 저해능을 나타낸다는 결과와 비교해도 크게 떨어지는 결과였다(Park, 2006).

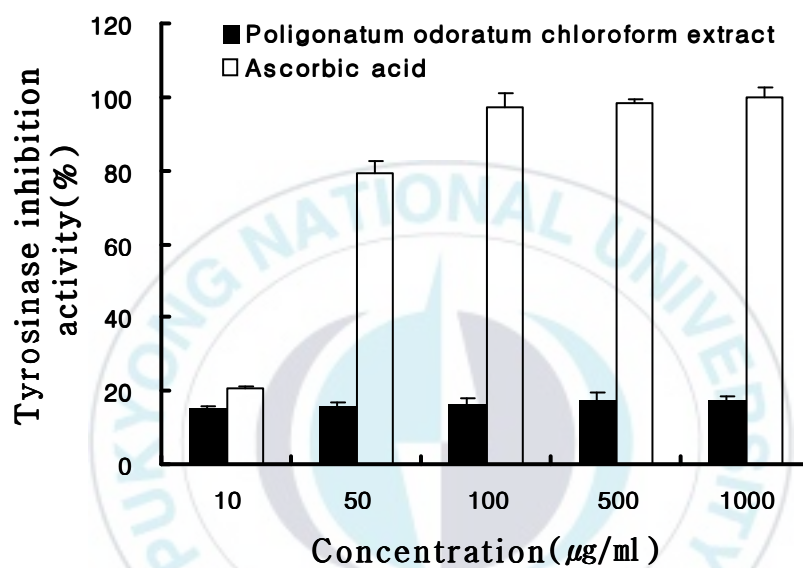


Fig. 3. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction(POCF) on tyrosinase inhibition activity.

1-4. 엘라스타아제 활성 저해능 평가

엘라스타아제는 진피 내 피부탄력을 유지하는 데 중요한 기질 단백질인 엘라스틴을 분해하는 효소이다. 피부 진피의 그물망 구조 결합을 끊어 피부의 탄력을 떨어뜨리고 주름을 생기게 하는 효소로 알려져 있다(Lee et al., 1999a, Lee et al., 2003). 따라서 엘라스타아제의 활성을 저해시켜 피부의 탄력을 유지하고 주름 생성을 억제시켜 피부노화를 지연시킬 수 있다.

황정 클로로포름 분획물의 엘라스타아제의 활성 저해 효과는 Fig. 4와 같다. 황정 클로로포름 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 58%의 엘라스타아제 활성 저해능을 나타냈고, 대조군인 아스코르브산은 같은 농도에서 56%의 활성 저해능을 나타내어 황정 클로로포름 분획물은 아스코르브산과 비슷한 활성 저해능을 나타냈다. 그러나 1 g/ml 의 농도에서는 아스코르브산이 황정 클로로포름 분획물보다 23% 높은 89%의 엘라스타아제 활성 저해능을 나타냈다. 황정 클로로포름 분획물이 추출물임에도 불구하고 아스코르브산에 비교해 볼 때 높은 활성을 보여주었다.

노화억제와 관련이 있다고 추정되는 각종 약용식물 중에서 elastase 저해물질을 탐색한 연구 결과를 보면 복분자 메탄을 추출물이 50 mg/ml 에서 85%의 높은 엘라스타아제 활성 저해능을 나타냈다(Kwak et al., 2005).

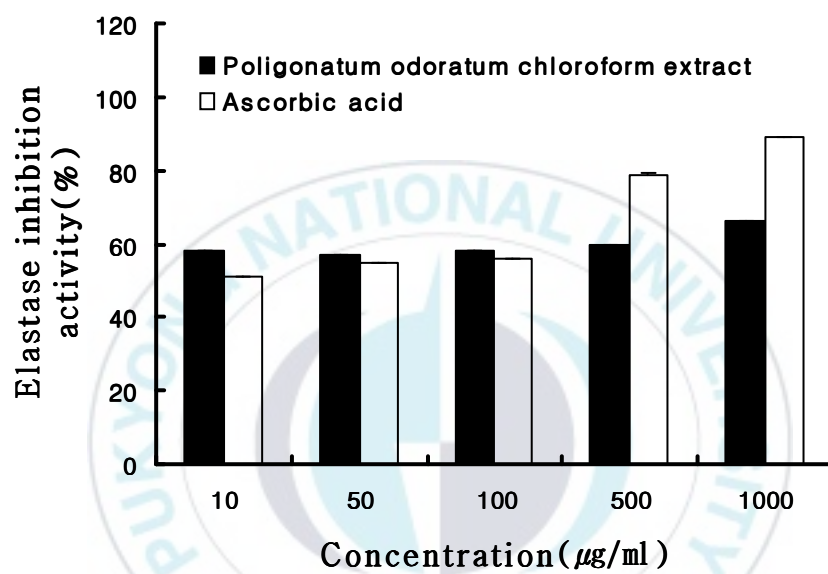


Fig. 4. Effects of *Poligonatum odoratum* chloroform fraction(POCF) on elastase inhibition activity.

2. 체중 변화, 사료 및 에너지 효율의 평가

황정 클로로포름 분획물 (*Polygonatum odoratum* chloroform fraction : POCF)의 농도를 달리하여 조제한 식이를 CD계 rats에 4주 동안 투여하였을 때 실험군의 체중 변화, 사료 및 에너지 효율의 변화를 평가하여 Table 4와 Fig. 5에 나타내었다.

황정 클로로포름 분획물 (POCF-25, POCF-50, POCF-75 및 POCF-100)을 급여한 후 4주 동안의 랫트의 체중 변화를 보면 POCF-75, POCF-100 섭취 그룹에서 76.2 ± 8.5 , 79.2 ± 4.4 g으로 대조그룹 (85.9 ± 7.2 g : 100.0%)과 비교하여 볼 때 각각 11% 및 8%의 체중 감소 효과가 나타났다.

사료 섭취에 대한 체중증가의 지표로 사용되는 사료효율 (feed efficiency : FE)을 살펴보면 POCF-75, POCF-100 섭취 그룹에서 FE는 9.2 ± 1.0 및 9.0 ± 0.5 g/g으로서 대조군의 FE (9.6 ± 0.8 g/g : 100.0%) 대비 각각 4% 및 6% 정도 감소하였다. Lim 등(2000)의 연구에 따르면 등글레 부탄올 분획물을 섭취한 Sprague dawely계 수컷 흰쥐에서 체중감소 효과가 나타났다고 보고하고 있다. 또한 섭취 에너지에 대한 체중 증가를 나타내는 에너지효율 (energy efficiency : EE)도 사료효율과 마찬가지로 같은 결과가 나타났다.

따라서 황정 클로로포름 분획물의 장기투여는 체중증가를 억제하는 효과도 있을 것으로 기대된다.

Table 4. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on body weight, food intake, feed and gross efficiency of CD rats for 4 weeks

	Control	POCF-25	POCF-50	POCF-75	POCF-100
Body weight gain(g)	85.9±7.2 ^a 100.0%	87.3±6.7 101.6% ^b	93.1±11.4 108.4%	76.2±8.5* 88.7%	79.2±4.4 92.2%
Total food intake(g)	897.7 100.0%	840.6 93.6%	905.2 100.8%	831.7 92.7%	877.8 97.8%
Diet energy(kcal/g)	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
Total energy intake(kcal)	3949.9	3698.7	3982.7	3659.6	3862.2
Feed efficiency ^c	9.6±0.8 100.0%	10.4±0.8 108.5%	10.3±1.3 107.5%	9.2±1.0 95.7%	9.0±0.5 94.3%
Gross efficiency ^d	21.8±1.8 100.0%	23.6±1.8 108.5%	23.4±2.9 107.5%	20.8±2.3 95.7%	20.5±1.1 94.3%

POCF-25, POCF-50, POCF-75 and POCF-100 : *Polygonatum odoratum* chloroform fraction of 25, 50, 75 and 100 mg/kg added to control group; ^aMean±SD with 7 CD rats ; ^bPercent of control value; *p<0.05 compared with control group. ^cFeed efficiency=[Body weight gain(g)/Food intake(g)]×10²; ^dGross efficiency=[Body weight gain(g)/Energy consumed(kcal)]×10³.

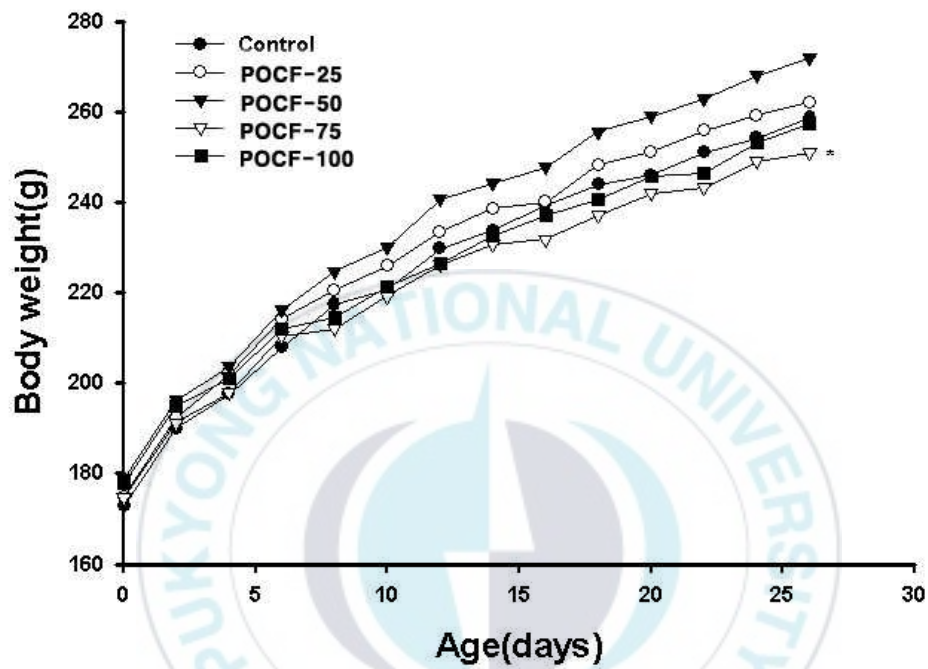


Fig. 5. Feeding effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on body weight changes in CD rats for 4 weeks.

POCF-25, POCF-50, POCF-75 and POCF-100 : *Polygonatum odoratum* chloroform fraction of 25, 50, 75 and 100 mg/kg added to control group; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; ^{*}p<0.05 compared with control group.

3. 황정 클로로포름 분획물 섭취시 혈액의 항산화능 평가

3-1. 단백질 함량의 변화

황정 클로로포름 분획물을 농도별로 4주간 투여한 후 혈청의 단백질 함량을 측정해 본 결과는 Table 5와 같았다. 황정 클로로포름 분획물의 POCF-25 그룹을 제외한 모든 섭취그룹에서 단백질 함량이 용량 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있는데 특히 POCF-50과 POCF-100 그룹의 단백질 함량이 67.61 ± 1.03 , 70.03 ± 0.99 mg/g protein으로 대조군 단백질 함량 (64.43 ± 2.30 mg/g protein : 100%) 대비 각각 약 4.9%와 8.7%정도 증가하였다.

따라서 황정 클로로포름 분획물의 투여량에 따라 용량 의존적으로 단백질의 함량이 증가되는 것으로 보아 황정 분획물의 섭취는 피부조직 중의 단백질 합성에도 상당한 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다.

Table 5. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on protein contents in serum of CD rats for 4 weeks

Groups	Protein contents(mg/g protein)	
Control	64.43 ± 2.30^a	—
POCF-25	63.49 ± 1.55	98.5% ^b
POCF-50	66.26 ± 1.35	102.8%
POCF-75	$67.61 \pm 1.03^*$	104.9%
POCF-100	$70.03 \pm 0.99^{**}$	108.7%

POCF-25, POCF-50, POCF-75 and POCF-100 : *Polygonatum odoratum* chloroform fraction of 25, 50, 75 and 100 mg/kg added to control group; ^aMean $\pm$ SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with control group.

3-2. 수퍼옥시드 라디칼의 생성량 평가

수퍼옥시드 라디칼 (superoxide radical : $O_2^{\cdot-}$)은 삼중항산소 (triplet oxygen)가 일중항산소 (1O_2)로 변화하거나 직접 전자를 받아들여 ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$) 생성된다. 이것은 다시 hydrogen peroxide로 되고, hydroxyl radical ($\cdot OH$)을 생성하기 때문에 free radical damage 중의 초기단계에서 가장 강력한 활성산소로서 보고되어 있다.

따라서 체내에서 superoxide radical의 생성은 가장 강력한 hydroxyl radical의 생성을 유발하여 생체 내에서 단백질의 SH기나 DNA에 반응하여 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성 등 생체구성 분자의 구조적 변화를 야기한다. 이로 인해 효소활성의 저하와 DNA, 지질 및 단백질 등을 손상시킬 뿐만 아니라 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화물을 유발시켜 동맥경화, 간질환, 심장병 및 암 등의 여러 가지 질병을 초래하며 노화를 촉진하게 된다.

황정 클로로포름 분획물 투여에 의한 혈청 중의 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량을 비교하여 보면 Table 6과 같다. 황정 클로로포름 분획물의 모든 투여군에서 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량이 용량 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히 황정 클로로포름 분획물 POCF-75 및 POCF-100 투여군에서 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량은 각각 63.32 ± 4.49 및 61.99 ± 4.32 nmol/mg protein으로 대조군의 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량 (70.43 ± 4.28 nmol/mg protein : 100.0%) 대비 각각 89.9% 및 88.0%로서 10% 와 12% 정도의 유의적인 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성 억제효과가 인정되었다.

3-3. 히드록시 라디칼의 생성량 평가

히드록시 라디칼 (hydroxyl radical : $\cdot\text{OH}$)은 정상적인 대사과정이나 환경호르몬, 과음과 과식, 여러 가지 스트레스, 자외선 및 방사선 등에 의해 발생한 프리 라디칼 중 하나인 superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$)이 H_2O_2 와 반응하여 생성된 것으로 프리 라디칼 중에서 가장 강력한 활성산소로 알려져 있다.

황정 클로로포름 분획물 투여에 의한 혈청 중의 hydroxyl radical의 생성량을 비교하여 보면 Table 7과 같다. Table 7에서 보는 바와 같이 혈청에서의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성량은 황정 클로로포름 분획물의 모든 투여군에서 억제효과가 인정되었는데 특히 POCF-75 및 POCF-100 투여군은 대조군의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼 (3.64 ± 0.20 nmol/mg protein : 100.0%)에 비해 각각 12.0% 및 14.1% 정도 감소하여 유의적인 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성 억제효과가 인정되었다.

마찬가지로 POCF-25 및 POCF-50 투여군의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성량도 대조군의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성량 대비 94.5% 및 92.4%로서 각각 5% 및 8% 정도의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성 억제효과가 인정되었으나 유의성은 없었다.

따라서 POCF 투여는 활성산소 중에서 가장 독성이 강한 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 6. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on superoxide radical formation in serum of CD rats for 4 weeks

Groups	Superoxide radical formation	
	(nmol/mg protein)	
Control	70.43±4.28 ^a	–
POCF-25	69.20±5.84	98.3% ^b
POCF-50	67.72±5.32	96.2%
POCF-75	63.32±4.49*	89.9%
POCF-100	61.99±4.32*	88.0%

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; *p<0.05, compared with control group.

Table 7. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on hydroxyl radical formation in serum of CD rats for 4 weeks

Groups	Hydroxyl radical formation	
	(nmol/mg protein)	
Control	3.64±0.20 ^a	–
POCF-25	3.44±0.20	94.5% ^b
POCF-50	3.36±0.21	92.4%
POCF-75	3.20±0.12**	88.0%
POCF-100	3.13±0.24**	85.9%

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; **p<0.01, compared with control group.

3-4. 산화단백질의 함량 평가

지질과 함께 생체막에 존재하면서 세포 소기관을 보호하는 단백질은 활성산소 (reactive oxygen species : ROS)에 의해 산화되어 carbonyl기를 형성하여 (Oliver et al., 1987) 질병·암·노화를 유발하게 된다. Starke (1987)는 랫트에서의 단백질 산화정도를 산소 농도별로 측정하였으며, Lee의 연구(2006)에서는 랫트의 뇌조직에서 황정 추출물이 활성산소에 의한 산화적 스트레스에 미치는 영향을 보고하기도 하였다.

혈청 내의 단백질 성분이 활성산소의 공격을 받아 생성되는 carbonyl group의 생성량을 측정하여 산화단백질 (oxidized protein ; OP)의 함량을 평가하여 보았다. 황정 클로로포름 분획물 투여 그룹의 혈청조직의 단백질 산화량을 비교하여 보면 Table 8에서 보는 바와 같다. 혈청조직에서 황정 클로로포름 분획물 POCF-100 투여군에서 산화단백질 함량이 2.34 ± 0.14 nmol/mg protein으로 대조그룹 (2.76 ± 0.21 nmol/mg protein: 100%) 대비 84.7% 정도의 유의적인 감소 효과가 인정되었다. POCF-25, POCF-50 및 POCF-75 그룹에서 산화단백질 함량은 대조그룹에 대비하여 각각 3%, 9% 및 12% 정도의 감소하는 경향을 보여주었으나 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과는 황정 추출물이 뇌조직에서 활성산소에 의한 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시키는 결과 (Lee, 2005)와 마찬가지로 황정 클로로포름 분획물이 혈청조직에서도 활성산소에 의한 단백질 산화를 억제 할 것으로 기대되며 특히 POCF-100이 그 활성이 높음을 알 수 있었다.

3-5. 과산화지질의 함량 평가

Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS)는 free radical에 의해 유도된 지질 과산화반응에 의하여 생성된 반응 생성물로 대부분의 포유동물 조직에서 발견된다. TBARS의 축적은 생체 내 조직의 노화현상과 관련이 있다. 노화에 따른 과산화지질 (lipid peroxide: LPO)의 변화를 보면 과산화지질은 연령의 증가에 따라 점차 증가하며 (Player, 1977), 활성산소에 의한 과산화지질 생성과 세포손상은 식이제한 (dietary restriction)에 의해서 막을 수 있다고도 보고되어 지고 있다(Choi et al., 1989).

황정 클로로포름 분획물을 농도별로 쥐에게 투여한 결과 혈청에서 지질과산화에 의한 TBARS 함량을 살펴보면 Table 9와 같다. 황정 클로로포름 분획물 투여군 POCF-25, POCF-50, POCF-75 및 POCF-100 그룹의 TBARS 함량은 14.91 ± 1.42 , 14.85 ± 0.67 , 14.38 ± 1.90 및 14.34 ± 1.86 으로 대조그룹 (15.98 ± 1.16 : 100%)에 대비하여 각각 7.0%, 7.0%, 10.0% 및 10.0%의 감소효과를 보였으나 유의성은 확인할 수 없었다. 그렇지만 황정 클로로포름 분획물의 섭취는 혈청내의 과산화지질의 생성에 의한 TBARS 생성을 어느 정도 억제할 것으로 기대된다.

Table 8. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on oxidized protein (OP) content in serum of CD rats for 4 weeks

Groups	Oxidized protein contents (nmol/mg protein)	
Control	2.76±0.21 ^a	–
POCF-25	2.68±0.28	97.0% ^b
POCF-50	2.52±0.23	91.2%
POCF-75	2.39±0.33	86.7%
POCF-100	2.34±0.14 ^{**}	84.7%

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; ^{**}p<0.01, compared with control group.

Table 9. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on lipid peroxide (LPO) content in serum of CD rats for 4 weeks

Groups	Lipid peroxide (LPO) contents (nmol/mg protein)	
Control	15.98±1.16 ^a	–
POCF-25	14.91±1.42	93.3% ^b
POCF-50	14.85±0.67	93.0%
POCF-75	14.38±1.90	89.9%
POCF-100	14.34±1.86	89.7%

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value.

3-6. 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 평가

최근에 노화와 관련한 활성산소의 방어체제로 생체 내 항산화효소에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 항산화 효소는 식이제한에 의해 증가될 수 있으며 (Lee et al., 1999; Cuohua et al., 1997), 적당한 운동에 의해 증가될 수 있고 (Kim et al., 1996). 또한 다양한 천연물 추출물도 항산화효소를 증가시킬 수 있다. 이에 관한 연구로는 장기간의 부추식이 ICR 마우스의 항산화시스템에 미치는 영향 (Lee et al., 2002), 도토리추출물이 흰쥐의 체내 항산화효소계에 미치는 영향 (Sung et al., 1997), 당뇨병 흰쥐에서 식이 제한 급여가 장기의 항산화 효소 활성도 및 체중에 미치는 영향 (Lee et al., 2001) 등의 연구가 있다. 본 연구에서는 황정 클로로포름 분획물이 활성산소 제거효소인 SOD, CAT의 활성 변화에 미치는 영향을 분석하여 보았다.

산소대사의 유해 작용에 대하여 가장 강력한 방어효소의 하나로 알려져 있는 Superoxide dismutase (SOD)는 Superoxide radical 제거작용을 한다. 산소를 사용하는 생물들은 SOD 및 그에 상응하는 방어기구 없이는 살아갈 수가 없으며 SOD의 농도가 높은 동물의 수명이 길다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다. SOD 효소는 삼중항산소 (triplet oxygen : $^3\text{O}_2$)가 어떤 유해인자에 의하여 생성된 superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) $\rightarrow$ hydrogen peroxide (H_2O_2)로 변화되는 반응을 제거하는 방어 효소로 작용한다.

황정 클로로포름 분획물을 투여한 랫트 혈청에서 SOD 활성을 측정한 결과는 Table 10과 같다. 황정 클로로포름 분획물을 투여한 모든 그룹에서 SOD의 활성은 대조그룹 (50.19 ± 3.39 unit/mg protein; 100%) 대비 약 7%~16% 정도로 용량 의존적으로 증가함을 보여주었으며 그 유의성은 POCF-75, POCF-100 그룹에서만 확인할 수 있었다.

따라서 앞선 superoxide radical 결과와 superoxide dismutase 활성

에 미치는 황정 클로로포름 분획물 투여 결과를 연관시켜 활성산소 제거효과를 평가하여 보면 황정 클로로포름 분획물은 활성산소의 생성 반응 중 초기 단계에 개입하여 Superoxide radical의 억제효과를 나타내며 특히 POCF-75, POCF-100 그룹은 그 효과가 클 것으로 보여진다. 7개월이라는 장기간 동안 부추식이를 한 ICR 마우스의 경우 대조군에 비해 SOD 활성이 343%의 유의성 있는 높은 활성을 나타냈다는 연구 (Lee et al., 2002)를 보면 황정을 장기간 섭취할 경우 SOD 활성 제거효과가 클 것으로 보인다.

3-7. 카탈라아제의 활성 평가

CAT효소는 활성산소 중 중간 생성물인 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 hydroxyl radical ($\cdot OH$)로 변화하는 반응을 제거하기 위해 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 H_2O 로 무독화 (detoxification)시킨다.

황정 클로로포름 분획물을 각 농도별로 투여하여 CD 랫트의 혈청에서 카탈라아제 활성을 평가하여 본 결과는 Table 11과 같다. POCF-100 투여군의 카탈라아제 활성은 202.58 ± 33.35 nmol/mg protein/min으로 대조 그룹 (151.89 ± 31.69 nmol/mg protein/min; 100%) 대비 약 33% 정도의 유의적인 증가 효과가 나타났으며 POCF-25, POCF-50 및 POCF-75 투여군의 카탈라아제 활성을 보면 각각 176.02 ± 14.32 , 180.23 ± 16.41 및 187.98 ± 24.67 nmol/mg protein/min으로 대조군 대비 15~23% 정도의 카탈라아제 활성 증가효과가 나타났으나 그 유의성은 인정되지 않았다.

Table 10. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on superoxide dismutase activity in serum of CD rats for 4 weeks

Groups	Superoxide dismutase activity (unit/mg protein)	
Control	50.19±3.39 ^a	–
POCF-25	53.63±1.51	106.9% ^b
POCF-50	54.38±4.10	108.4%
POCF-75	57.03±3.01 [*]	113.6%
POCF-100	58.01±2.68 ^{**}	115.6%

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, compared with control group.

Table 11. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on catalase activity in serum of CD rats for 4 weeks

Groups	Catalase activity (nmol/mg protein)	
Control	151.89±31.69 ^a	–
POCF-25	176.02±14.32	115.9% ^b
POCF-50	180.23±16.41	118.7%
POCF-75	187.98±24.67	123.8%
POCF-100	202.58±33.35 [*]	133.4%

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; ^{*}p<0.05, compared with control group.

4. 황정 클로로포름 분획물 섭취시 피부조직의 항산화능 평가

4-1. 단백질 함량의 변화

황정 클로로포름 분획물을 농도별로 CD 랫트에 4주간 투여한 후 피부조직 균질물의 단백질 함량을 측정해 본 결과는 Fig. 6과 같다. 황정 클로로포름 분획물의 POCF-25 그룹을 제외한 모든 투여그룹에서 단백질 함량이 용량 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있는데 특히 POCF-100 그룹의 단백질 함량이 45.05 ± 1.20 mg/g protein으로 대조군 단백질 함량 (41.65 ± 1.07 mg/g protein : 100%) 대비 약 8%정도 유의적으로 증가하였다.

앞선 황정 클로로포름 분획물의 투여량에 따른 혈청에서의 단백질 함량이 용량 의존적으로 증가하였는데, 황정 클로로포름 분획물의 투여가 CD 랫트의 피부조직 중의 단백질함성에도 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.

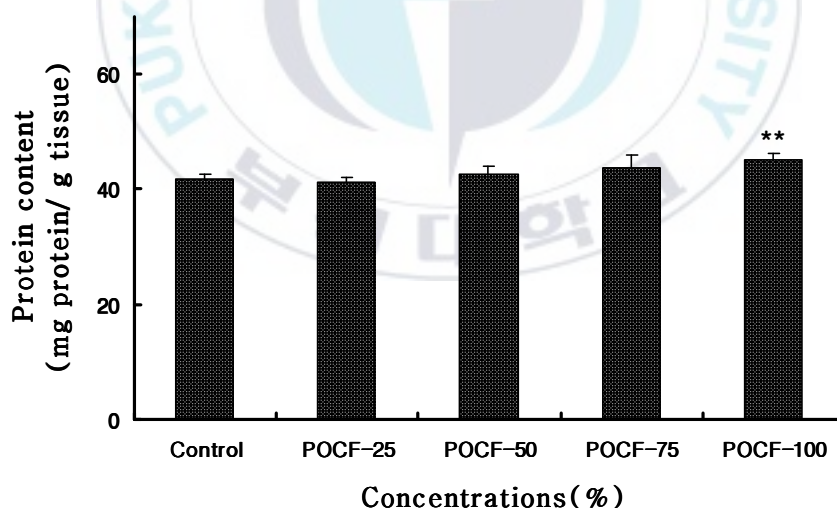


Fig. 6. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on protein content in skin of CD rats for 4 weeks

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; **p<0.01, compared with control group.

4-2. 수퍼옥시드 라디칼의 생성량 평가

황정 클로로포름 분획물 투여에 의한 피부조직에서의 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량을 비교하여 보면 Fig. 7과 같다. 황정 클로로포름 분획물의 모든 투여군에서 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량이 용량 의존적으로 감소하는 경향을 나타냈는데, 특히 황정 클로로포름 분획물 POCF-75 및 POCF-100 투여군에서 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량은 각각 48.02 ± 5.83 및 48.27 ± 3.75 nmol/mg protein으로서 대조군의 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼 생성량 (51.58 ± 2.75 nmol/mg protein : 100.0%) 대비 93.1% 및 93.6%로서 7% 정도의 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성 억제효과가 나타났으며 유의성은 확인할 수 없었다. 앞선 황정 클로로포름 분획물 투여에 의한 혈청 중의 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼의 생성량과 비교하여 보면 투여 농도별로 비슷한 감소 경향을 나타내고 있으나 그 정도는 혈청에서의 결과보다 못 미친다.

식품 소재물 추출물의 식이가 쥐의 피부조직의 활성산소종 생성에 미치는 영향에 관한 연구로는 장기간의 부추식이 ICR 마우스의 간과 피부조직의 활성산소종 생성에 미치는 영향 (Moon et al., 2003)에 관한 연구와 김치 종류를 달리한 식이가 Hairless mice의 간과 피부에서 산화억제 및 광산화에 미치는 영향 (Ryu et al., 2004)에 관한 연구가 있다. Moon 등은 2% 및 5%의 부추 첨가 식이군에서 ICR 마우스 피부조직의 $O_2^{\cdot-}$ 라디칼 함량이 대조군에 비해 7개월에 30% 가량 저하되었으며, 13개월에서는 60% 가량 저하되어 부추의 섭취기간이 늘어날수록 활성산소 억제효과가 커짐을 보고하였다.

이와 같이 황정 추출물도 장기간의 섭취가 피부조직에 있어서 높은 활성산소 억제효과를 나타낼 것으로 기대된다.

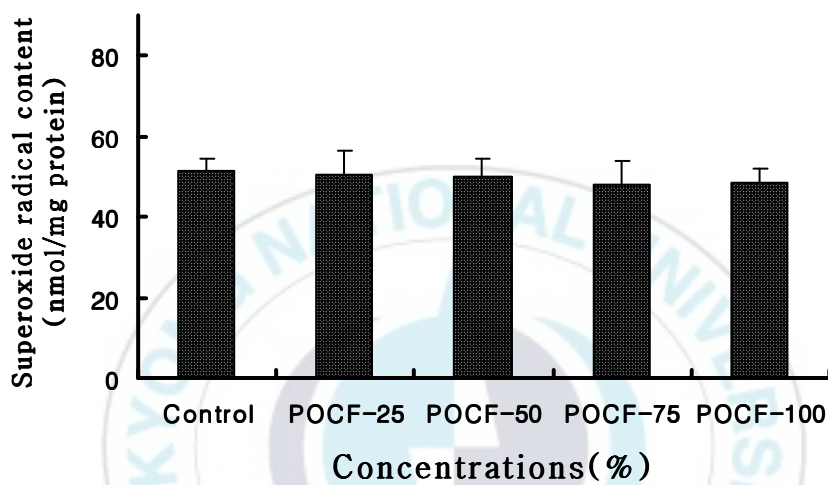


Fig. 7. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on superoxide radical formation in skin of CD rats for 4 weeks

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value.

4-3. 히드록시 라디칼의 생성량 평가

황정 클로로포름 분획물 투여에 의한 피부조직 중의 히드록시 라디칼의 생성량을 비교하여 보면 Table 8과 같다. Table 8에서 보는 바와 같이 피부조직에서의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성량은 황정 클로로포름 분획물의 모든 투여그룹에서 억제 효과가 인정되었는데 특히 POCF-50, POCF-75 및 POCF-100 투여군은 대조군의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼 (2.83 ± 0.11 nmol/mg protein : 100.0%)에 비해 7%~14% 정도 감소하여 유의적인 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성 억제효과가 인정되었다. 앞선 황정 클로로포름 분획물 투여에 의한 혈청 중의 hydroxyl radical의 생성량과 비교해 봤을 때 매우 비슷한 감소 경향을 보여 주었다.

마찬가지로 POCF-25 투여군의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성량도 대조군의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성량 대비 95.9%로 4% 정도의 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성 억제효과가 나타났으나 유의성은 없었다. Moon 등은 부추 첨가 식이가 ICR 마우스의 피부조직에서 $\cdot\text{OH}$ 라디칼 함량이 연령증가에도 불구하고 농도 의존적으로 점차 감소하는 경향을 나타냈다고 보고했다.

황정 클로로포름 분획물 투여에 의한 혈청 및 피부조직 중의 hydroxyl radical의 생성량 실험 결과를 봤을 때 POCF 투여는 활성산소 중에서 가장 독성이 강한 $\cdot\text{OH}$ 라디칼의 생성을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

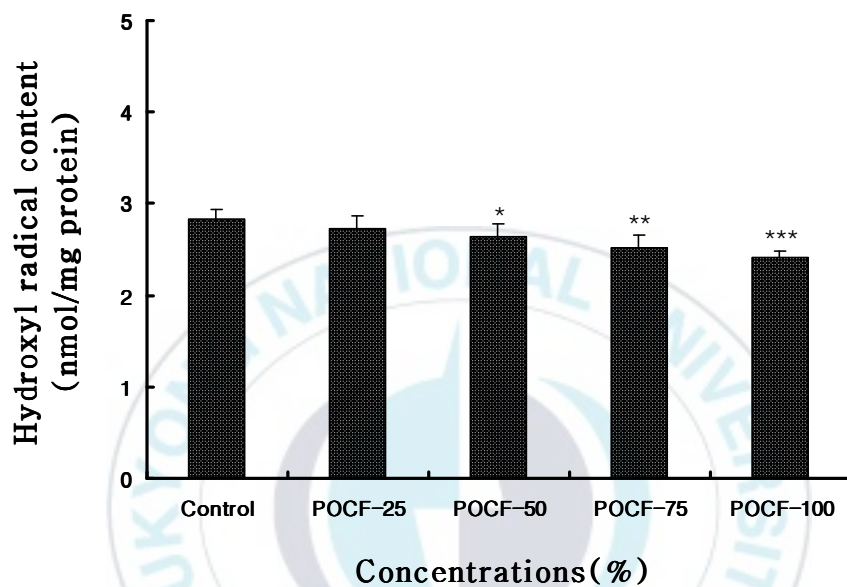


Table 8. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on hydroxyl radical formation in skin of CD rats for 4 weeks

Refer to the comment in Table 4; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, compared with control group.

4-4. 산화단백질의 함량 평가

황정 클로로포름 분획물 투여 그룹의 피부조직의 단백질 산화량 (oxidized protein ; OP)을 비교하여 보면 Fig. 9에서 보는 바와 같다. POCF-75, POCF-100 섭취군에서 피부조직의 산화단백질 함량이 각각 1.45 ± 0.11 , 1.39 ± 0.11 nmol/mg protein으로서 대조그룹 (1.63 ± 0.12 nmol/mg protein: 100%) 대비 각각 88.6% 및 84.9% 정도의 유의적인 감소효과가 있었다. 황정 클로로포름 분획물 POCF-25 및 POCF-50 그룹은 산화단백질 함량이 대조 그룹 대비 각각 5% 및 9% 정도의 감소하였으나 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과는 황정 추출물이 뇌조직에서 활성산소에 의한 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시키는 결과 (Lee, 2005)와 마찬가지로 황정 클로로포름 분획물이 피부조직에서도 활성산소에 의한 단백질 산화를 억제 할 것으로 기대되며 특히 POCF-100으로 투여 할 경우 그 효과는 증대될 수 있을 것 같다.

4-5. 과산화지질의 함량 평가

황정 클로로포름 분획물을 농도별로 쥐에게 투여한 결과 피부조직에서 지질과산화에 의한 TBARS 함량을 살펴보면 Fig. 10과 같다. 황정 클로로포름 분획물 투여군 POCF-50, POCF-75 및 POCF-100그룹의 TBARS 함량은 10.63 ± 0.84 , 10.15 ± 0.82 및 10.06 ± 0.70 nmol/mg protein으로 대조그룹 (11.55 ± 0.29 nmol/mg protein : 100%) 대비 각각 8.0%, 12.0% 및 13.0%의 유의적인 감소효과를 보였다. 황정 클로로포름 분획물 투여로 혈청에서 TBARS 함량이 용량 의존적으로 감소하였지만 유의성을 확인할 수 없었던 것과 다른 결과였지만 황정 클로로포름 분획물의 투여가 혈청과 피부조직 중의 지질과산화에 의한 TBARS 생성을 어느 정도 억제할 것으로 기대된다.

Ryu 등은 김치 식이를 20주간 섭취한 hairless mouse의 피부 균질액에서의 지질산화 정도를 측정한 결과 대조군에 비해 배추김치, 갓김치 및 부추김치 섭취군의 TBARS 함량이 각각 19.7%, 21.7% 및 29.4% 감소하였음을 보고하였다.

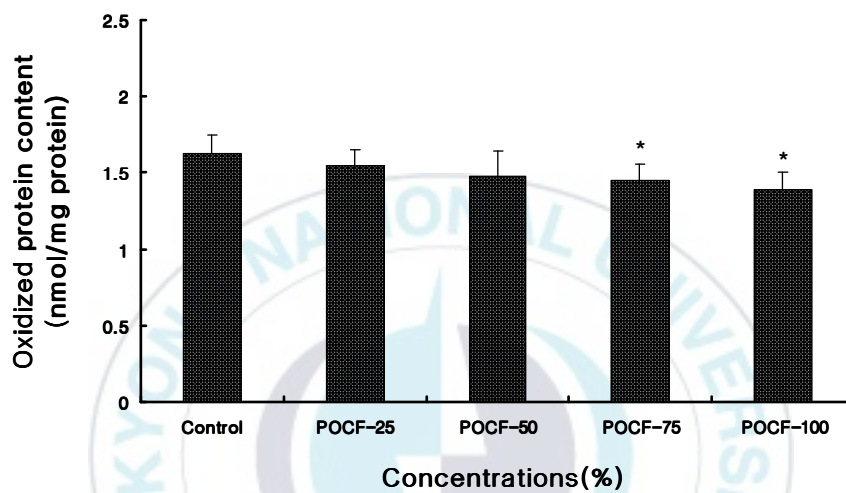


Fig. 9. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on oxidized protein (OP) content in skin of CD rats for 4 weeks

Refer to the comment in Table 5; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; *p<0.05, compared with control group.

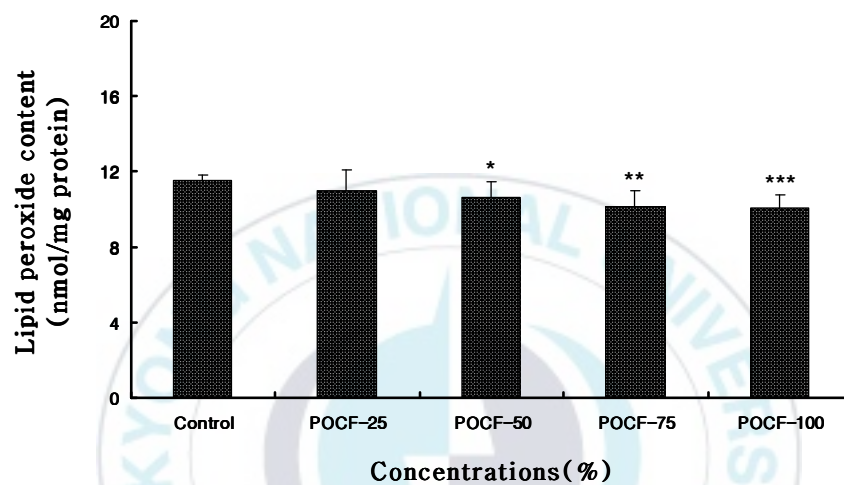


Table 10. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on lipid peroxide (LPO) content in skin of CD rats for 4 weeks

Refer to the comment in Table 4; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, compared with control group.

4-6. 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 평가

황정 클로로포름 분획물을 투여한 랫트 피부조직에서 superoxide dismutase 활성을 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. 황정 클로로포름 분획물을 투여한 모든 그룹에서 superoxide dismutase 활성은 대조그룹 (39.72 ± 1.54 unit/mg protein; 100%) 대비 약 5%~10% 정도로 용량 의존적으로 증가하였고 그 유의성은 POCF-100 그룹에서만 확인할 수 있었다.

마찬가지로 황정 클로로포름 분획물 POCF-25, POCF-50, POCF-75 그룹을 보면 superoxide dismutase 활성이 대조그룹 대비 각각 5%, 7% 및 10% 정도의 증가하는 경향을 보여주었으나 그 유의성은 인정되지 않았다.

4-7. 카탈라아제의 활성 평가

황정 클로로포름 분획물을 각 농도별로 투여하여 CD 랫트의 피부조직에서 카탈라아제 활성을 평가하여 본 결과는 Fig. 12와 같다. Fig. 12에서 보는 바와 같이 황정 클로로포름 분획물 POCF-75 및 POCF-100 투여군의 카탈라아제 활성이 각각 172.73 ± 26.22 및 177.36 ± 30.30 nmol/mg protein/min으로 대조 그룹 (140.04 ± 15.13 nmol/mg protein/min; 100%) 대비 약 23~26% 정도의 유의적인 증가 효과가 나타났다. POCF-25 및 POCF-50 투여군의 카탈라아제 활성을 보면 대조군 대비 9~17% 정도의 카탈라아제 활성이 증가하였으나 유의성은 인정되지 않았다.

Hasan mukhtar는 쥐의 피부에 있어서 녹차의 항암 및 소염 효과를 보고한 바 있는데, 황정 클로로포름 분획물을 투여한 그룹에서의 superoxide dismutase 활성과 catalase 활성이 증가한 결과를 볼 때 항산화 효소계의 증가에 의한 면역체계의 강화가 항암 및 항동맥경화 등의 효과를 가져올 것으로 기대된다.

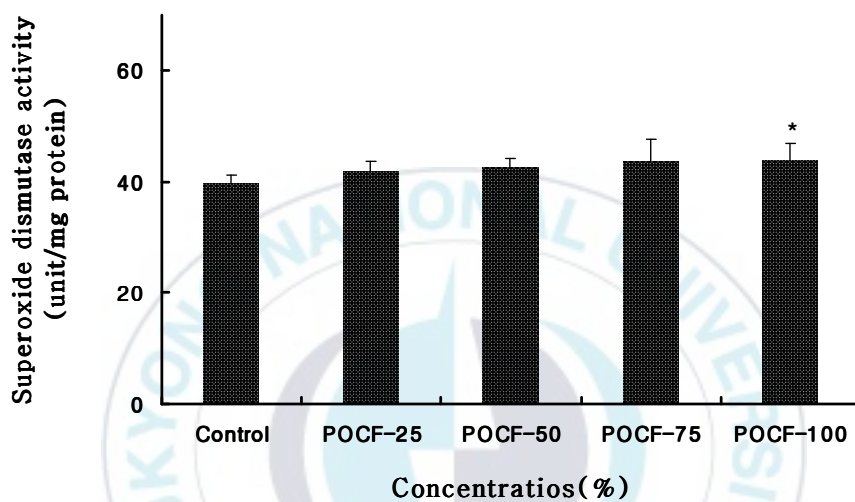


Fig. 11. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on superoxide dismutase activity in skin of CD rats for 4 weeks

Refer to the comment in Table 4; ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; *p<0.05, compared with control group.

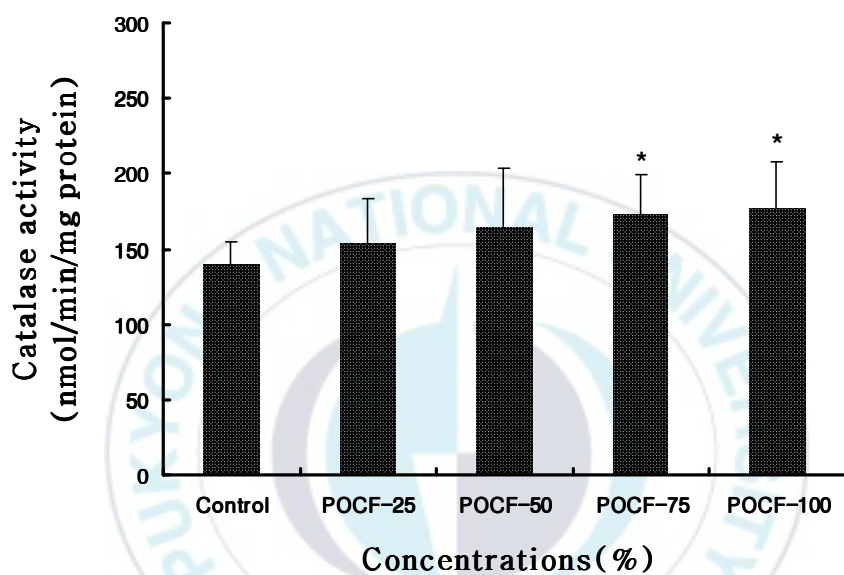


Fig. 12. Effects of *Polygonatum odoratum* chloroform fraction (POCF) on catalase activity in skin of CD rats for 4 weeks

Refer to the comment in Table 4: ^aMean±SD with 7 CD rats; ^bPercent of control value; *p<0.05, compared with control group.

IV. 요 약

오늘날 노년인구가 증가되면서 노화에 대한 관심이 높아지고 노화와 관련된 많은 연구가 이루어지고 있다. 피부는 전신 중에서 가장 접근하기 쉬우며 유전인자, 환경의 영향을 쉽게 관찰할 수 있는 기관이기 때문에 노화현상을 연구하는데 매우 적합한 연구대상이라 여겨진다. 이에 본 연구에서는 황정 80% 메탄올 추출물을 용매분획하여 얻어진 CHCl_3 , EtOAc, BuOH, H_2O 분획물을 사용하여 생리활성을 검토하였으며, 이들 분획물 중에서 활성이 가장 높게 나타난 CHCl_3 분획물을 사용하여 경구 투여시 CD 랫트의 혈청과 피부조직에 있어서의 항노화 효과를 알아보았다.

1. *In vitro* 법에 의한 항산화능 측정

프리라디칼 소거작용을 알기 위해 황정 각 분획물과 아스코르브산의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과, 50% DPPH 소거 효과를 나타내는 황정 클로로포름 분획물의 농도가 $37.88 \mu\text{g/ml}$ 로 황정 분획물 중 가장 높은 프리라디칼 소거능을 가진 분획물임을 알 수 있었다. 또한 항산화 효과를 알기 위해 tannic acid를 표준곡선으로 하여 황정 각 분획물의 폴리페놀 함량을 측정한 결과, 황정 클로로포름 분획물이 16.49%로 총폴리페놀 함량이 가장 높음을 알 수 있었다.

미백효과를 알기 위해 측정한 황정 클로로포름 분획물의 티로시나아제의 활성 저해능은 1 g/ml 의 농도에서 티로시나아제의 활성이 17% 저해효과를 나타냈으나 그 효능이 아스코르브산에 미치지 못했다. 엘라스타아제 활성 저해능은 황정 클로로포름 분획물의 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 58%였고 1 g/ml 의 농도에서는 89%의 저해능을 나타내어 황정 클로로포름 분획물이 피부의 탄력이나 주름형성 예방에 도움이 될 것으로 기대된다.

2. 경구 투여시 혈청에 있어서의 항산화 효과

황정 클로로포름 분획물을 CD 랫트에 투여하여 혈청에 미치는 항산화 작용 및 산화적 스트레스를 알아보았다. 황정 클로로포름 분획물 (*Polygonatum odoratum* chloroform fraction ; POCF)을 매일 25, 50, 75 및 100 mg/kg BW로 CD 랫트에 4주간 투여하고, 무첨가군을 대조군 (control)으로 하였다. 그 결과, 단백질함량은 3~9% 증가하였으며, 활성산소 중 슈퍼옥시드 라디칼 함량은 황정 클로로포름 분획물 POCF-75 및 POCF-100 투여군에서 대조군 대비 10~12% 정도로 유의적으로 감소하였으며($p<0.05$), 히드록실 라디칼 함량도 POCF-75 및 POCF-100 투여군에서 대조군 대비 12.0~14.1% 정도 감소하여 유의적인 히드록실 라디칼 활성 억제효과가 인정되었다($p<0.001$). 또한 산화적 스트레스로서 산화단백질 (oxidized protein: OP)의 함량은 POCF-100 투여군에서 대조그룹 대비 84.7% 정도의 유의적인 감소효과를 보였으며($p<0.01$), 과산화지질 (lipid peroxide: LPO) 함량은 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 항산화효소인 superoxide dismutase 활성은 POCF-75, POCF-100 그룹에서 13~15%의 유의적인 증가가 있었고($p<0.05$, $p<0.01$), catalase 활성은 POCF-100 그룹에서 33%의 유의적인 증가를 보여 주었다($p<0.05$).

3. 경구 투여시 피부조직에 있어서의 항산화 효과

황정 클로로포름 분획물을 CD 랫트에 투여하여 피부조직에 미치는 항산화 작용 및 산화적 스트레스를 알아보았다. 황정 클로로포름 분획물을 농도별로 CD 랫트에 4주간 투여한 후 피부조직 균질물의 단백질 함량을 측정해 본 결과 POCF-25 그룹을 제외한 모든 투여그룹에서 단백질 함량이 2~8% 용량 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 활성산소 중 슈퍼옥시드 라디칼 함량은 황정 클로로포름 분획물의 모든 그룹에서 대조군

대비 2~7% 정도로 감소하였으나 유의성은 없었으며, 히드록실 라디칼 함량은 POCF-50, POCF-75 및 POCF-100 투여군에서 대조군 대비 7%~14% 정도로 감소하여 유의적인 히드록실 라디칼 생성 억제효과가 인정되었다($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$). 또한 산화적 스트레스로서 산화단백질 (oxidized protein: OP)의 함량은 POCF-75, POCF-100 투여군에서 대조그룹 대비 각각 88.6% 및 84.9% 정도로 유의적인 감소효과를 나타냈으며 ($p<0.01$), 과산화지질 (lipid peroxide: LPO) 함량은 POCF-50, POCF-75 및 POCF-100그룹에서 대조그룹 대비 각각 8.0%, 12.0% 및 13.0%의 유의적인 감소효과를 보였다($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$). 항산화효소인 superoxide dismutase의 활성 증가는 POCF-100 그룹에서만 그 유의성을 확인할 수 있었으며($p<0.01$), catalase 활성은 POCF-75 및 POCF-100 투여군에서 대조군 대비 약 23~26% 정도의 유의적인 증가효과가 나타났다 ($p<0.01$).

이와 같이 황정은 노화 억제 관련 생리활성 물질로서 뛰어난 항산화 효과를 나타낸 천연소재로 평가되었다. 특히 황정은 물대신 마시는 음료로 이용할 수 있으므로 피부미용을 위한 기능성음료 및 건강보조음료 등 기능성 식품으로 이용가치가 있을 것으로 기대된다.

V. 참 고 문 헌

- An, B. J., Kwak, J. H., Park, J. M., Lee, J. Y., Park, T. S., Lee, J. T., Son, J. H., Jo, C. R., Byun, M. W., Inhibition of enzyme activities and the antiwrinkle effect of polyphenol isolated from the *Persimmon leaf (Diospyros kaki folium)* on human skin. *Dermatol Surg.* 31 (7): Part 2 (2005).
- Andrew, P. W. Ageing and the free radical theory. *Respiration physiology.* 128: 379~391 (2001).
- Association of Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed. Washington (DC): Association of analytical chemists Inc. (1984).
- Choi, J. H. and Yu, B. P., The effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. *AGE* 12 : 133~136 (1989).
- Choi, J. H. and Yu, B. P., Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *AGE* 13: 61~64 (1990).
- Chung, Y. A. and Lee, J. K., Antioxidative properties of phenolic compounds extracted from *Black rice*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32 (6): 948~951 (2003).

- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. A., McCord, J. M. and Harman, D., Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107: 526~545 (1987).
- Cuohua, C., Ronald, L. P., Richard, G. C. and Yu, B. P., Effect of dietary restriction on serum antioxidant capacity in rats. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 25: 245~253 (1997).
- Flood, J. F. and Moriey, J. E., Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol. Aging*. 14: 153~157 (1993).
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D., Biology of disease : Free radical and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412~426 (1982).
- Gutfinger, T., Polyphenols in olive oils. *J. Am Oil Chem. Soc.* 58: 966~968 (1981).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 128: 347~350 (1981).
- Halliwell, B., Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1: 258~364 (1987).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 128 347~350 (1981).

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Free radicals in biology and medicine. Third edition. Oxford university press. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 31: 1454 (1999).
- Harman, D., Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry *J. Gerontol.* 11 ; 298~300 (1956).
- Harman, D., Free radical theory of aging. The free radical diseases. *AGE* 7 : 111~131 (1984).
- Kang, H. S., Kim, H. R., Byun, D. S., Park, H. J. and Choi, J. S., Rosmarinic acid as a tyrosinase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Sciences*. 10: 80~84 (2004).
- Kang, S. A., Han, J. A., Jang, K. H. and Choue, R. W., DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of *Cham-Dang-Gui* (*Angelica gigas*), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33 (7): 1112~1118 (2004).
- Kwak, Y. J., Lee, D. H., Kim, N. M. and Lee, J. S., Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *J. Medicinal Crop sci.* 13: 213~216 (2005).
- Kim, J. D., Yu, B. P., McCarter, R. J. M., Lee, S. Y. and Herlihy, J. T. H., Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 83~88 (1996).

- Kim, H. J., Jun, B. S., Kim, S. K., Cha, J. Y. and Cho, Y. S., Polyphenolic compound contents and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29 (6): 1127~1132 (2000).
- Kim, J. A., Choi, Y., Son, A. R., Park, S. H., Xu, G. H., Lee, J. G., Oh, I. S., Kim, J. J., Chang, H. W., Chung, S. R., Jang, T. S. and Lee, S. H., Inhibition effect of some natural polyphenols isolated from *Euphorbiaceae* plants on melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* 35: 157~163 (2004).
- Lee, H. J., Lee, M. K. and Park, I. S., Characterization of mushroom tyrosinase inhibitor in *Sweet potato*. *J. Life. Sci.* 16: 396~399 (2006).
- Lee, J. H. and Lee, S. R., Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 310~316 (1994).
- Lee, J. W., Yu, B. P. and Herlihy, J. T., Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free radical biology and medicine.* 26: 260~265 (1999).
- Lee, J. W. and Do, J. H., Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanum* and antioxidative activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29 (5): 943~947 (2000).

- Lee, K. K., Kim, J. H., Cho, J. J. and Choi, J. D., Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity and their antiinflammatory effects. *Inter. J. Cosm. Sci.* 21 (2): 71~82 (1999a).
- Lee, M. J., Ryu, B. M., Lee, Y. S. and Moon, G. S., Effect of long term *Buchu*(*Chinese chives*) diet on antioxidative system of ICR mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31 (5): 834~839 (2002).
- Lee, M. S., Effects of *Polygonatum odoratum* on neurotransmission in brain. *Pukyong national university M. S. Paper.* (2006)
- Lee, S. Y., An, J. H. and Cho, H. Y., Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *crataegus pinnatifida bunge* in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechno.* 46 (1): 60~65 (2003).
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R., Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1986: 464~478 (1990).
- Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J., Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265~275 (1951).

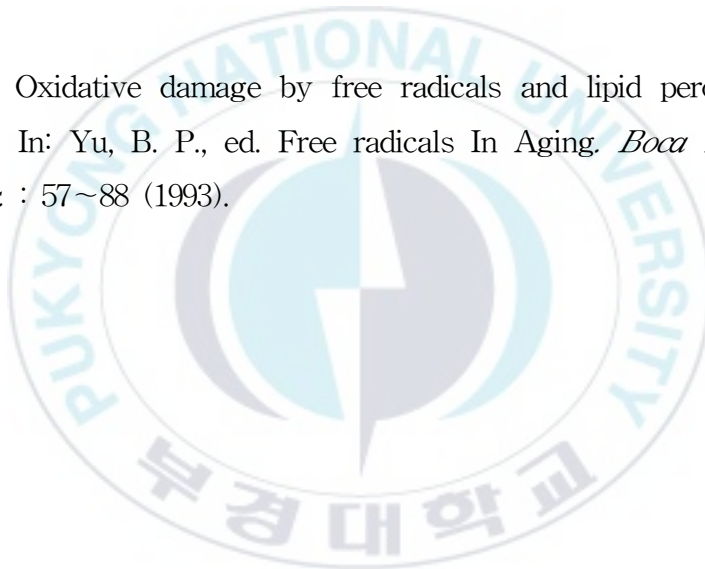
- Lim, S. J. and Park, H. J., The effect of BuOH fraction of *Polygonatum odoratum* with selenium on blood glucose level and lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetic rats. 33 (7): 703~711 (2000).
- McCord, J. M. and Fridovch, I., Superoxide dismutase. An enzymic function for erythro cuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244 (22): 6049~6055 (1969).
- Moon, G. S. and Lee, M. J., The long term effect of *Buchu (Chinese chives)* Diet on ROS formation in the liver and skin tissue of ICR mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32 (3): 444~449 (2003).
- Oliver, C. N., Levine, R. L. and Stadtman, E. R., A role of mixed function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging. *J. Am. Geriatr. Soci.* 35: 947~956 (1987).
- Oyanagui, Y., Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 42: 290~296 (1984).
- Park, S. H., Anti-aging and Anti-wrinkle effects of *Mugwort Artemisia vulgaris* extract on mouse skin. Pukyong national university Ph. D. Paper. (2006)
- Park, Y. S., Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 12 (1) (2002).

- Player, T. J., Mills, D. J. and Horton, A. A., Age-dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH dependent lipid peroxidation. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 78: 1397~1402 (1977).
- Rigo, A. and Rotilio, G., Simultaneous determination of superoxide dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal. Biochem.* 81: 157~166 (1977).
- Ryu, B. M., Ryu, S. H., Lee, Y. S., Jeon, Y. S. and Moon, G. S., Effect of different Kimchi diets on oxidation and photooxidation in liver and skin of Hairless Mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33 (2): 291~298 (2004).
- Southorn, P. A. and Powis, G., Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.* 63: 390~408 (1988).
- Starke, P. E., Oliver, C. N. and Stadtman, E. R., Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration. *FASEB J.* 1: 36~39 (1987).
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H., Principles and procedures of statistics. McGrawhill. *New York* (1960).
- Sung, I. S., Park, E. M., Lee, M. K., Han, E. K., Jang, J. Y. and Cho, S. Y., Effect of *Acorn* extracts on the antioxidative enzyme system. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26 (3): 494~500 (1997).

Tschesche, H., Engelbrecht, S. and Wenzel, H. R., Leucocyte elastase: neutrophil elastase from *polymorphonuclear granulocytes*. Method of enzymatic analysis. 5: 176 (1985).

Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, T. and Okuda, T., Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenol on DPPH radical. *Chem. Pharm. Bull.* 37 (7): 1919~1921 (1989).

Yu, B. P., Oxidative damage by free radicals and lipid peroxidation in aging. In: Yu, B. P., ed. Free radicals In Aging. *Boca Taton. CRC Press.* : 57~88 (1993).



감사의 글

2년간의 석사과정을 무사히 마치고 논문을 완성하게 되어 너무 행복합니다. 지금의 이 행복을 느낄 수 있게 물심양면으로 도와주신 사랑하는 모든 사람들에게 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

학부 2학년 때부터 석사과정을 마치기까지 생화학 실험실에서 대학 생활과 대학원 생활을 하면서 많은 것을 보고 듣고 배웠습니다. 먼저 항상 할아버지와 같은 엄함과 따뜻함으로 지금까지 저를 이끌어 주신 최진호 교수님께 깊은 감사의 말씀을 전합니다. 때로는 날카로운 지적으로 회초리를 주셨으며 때로는 포근한 웃음으로 잘못을 보듬을 수 있는 마음을 가르쳐 주셨습니다. 앞으로 사회생활을 하면서 교수님의 많은 가르침을 생각하겠습니다.

그리고 역시 학부 때부터 대학원 과정 동안 저에게 많은 가르침을 주신 훌륭한 교수님들께 감사드리고 싶습니다. 먼저 부족한 논문을 심사해 주시고 열심히 지도해 주신 김형락 교수님, 남택정 교수님께 감사드리며 항상 따뜻함으로 저희를 보살피 주시고 이끌어 주신 류홍수 교수님, 변대석 교수님, 최재수 교수님, 류은순 교수님께도 감사드립니다.

우리는 인생을 살면서 많은 사람들을 만나게 됩니다. 이 분들은 저의 인생에 있어서 없어서는 안 될 소중한 사람들입니다. 먼저 저의 까마득한 선배님이신 이종수, 박시향, 김남주 선배님께 감사드리며 즐거운 학부 생활을 보낼 수 있게 도와주신 김대익, 김지영, 백승진, 이민수 선배님께도 감사드립니다. 그리고 저의 벗이자 언니인 심신님과 부족한 선배를 믿고 따라준 석효진, 이정민, 황윤희, 안현지 후배님께 감사드립니다. 또한 항상 밝은 미소로 대학원 생활을 하는데 빛이 되어 주신 황혜정, 김인혜, 윤나영, 정희진, 권미성, 김민수 선배님께 감사드리며 저의 든든한 친구인 김현진, 김윤정, 안필석님과 그 외 많은 도움을 주신 식품생명과학과 선후배님들께도 감사의 인사를 드립니다.

마지막으로 저를 위해 평생을 헌신하며 살아오신 사랑하는 부모님과 티격태격 싸우며 함께 자란 예쁜 언니와 귀여운 막내 동생에게 감사의 마음을 전하며 이 논문을 바치고 싶습니다. 감사합니다.