한국농화학회지 제 38권 제 6호(1995)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 38, No. 6, pp. 549~553(1995)

갈화(*Puerariae flos*)추출물이 Rat 혈중 Ethanol 농도에 미치는 영향

김정한[1] · 민선식[1] · 김성훈[1] · 홍희도[2] · 김종수[3] · 김수언[1]*

[1]서울대학교 농업생명과학대학 농화학과, [2]한국식품개발연구원, [3]선문대학교 환경공학과

초록 : 갈화(*Puerariae flos*) 추출물이 rat의 혈액, 뇌 및 간의 ethanol 농도를 유의차있게 감소시켰다. 혈중 ethanol의 감소 효과는 ethanol을 투여한지 1시간 경과한 때에 대조군과 가장 많은 차이를 보였으며 열수 추출물이 80% ethanol 추출물보다 혈중 ethanol 농도를 더 크게 감소시킴이 관찰되었다. Ethanol 투여 10분 전에 갈화 추출물 투여가 1시간 전 혹은 10분 후에 투여한 군에 비해서 ethanol 농도 저하에 더 효과적이었으며, 간과 뇌 조직에서도 ethanol의 농도가 저하되는 현상이 관찰되었다. 그러나 이 때 acetaldehyde는 검출되지 않았다. 혈중 ethanol 농도를 가장 효율적으로 감소시키는 갈화 추출물의 적정량은 55.7 mg/kg·body weight이었다. 이번 실험을 위해 새로이 시도된 dichloromethane에 의한 시료 추출과 GC를 이용한 분석법은 간단, 신속하면서도 좋은 분석결과를 보였다(1995년 11월 14일 접수, 1995년 12월 14일 수리).

서 론

Ethanol은 술의 주성분으로서 신체적, 정신적으로 인체에 미치는 효과가 매우 다양하며 광범위하여 그 대사과정과 독성 발현 특성에 대하여 연구가 진행되어 왔다.[1-6] 섭취된 ethanol은 소화관을 통해 흡수되어 섭취 후 20~120분 사이에 최고 혈중 농도에 도달한다. 흡수된 ethanol은 간을 비롯한 거의 모든 장기들에서 대사되는데 일부(약 10%)는 호흡을 통하여 또는 소변 및 땀으로 배설된다. 간에서는 산화 반응을 통한 acetaldehyde로 전환이 주된 대사가 되는데 이는 알코올탈수소효소(ADH), microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS) 및 catalase 등 3가지의 반응 효소계에 의해 진행되는 것으로 알려져 있다.[6] Ethanol의 독성학적 연구도 여러 가지로 이루어졌는데 그 독성은 신경학적 측면에서 관찰될 뿐만 아니라 유전적으로도 영향을 끼친다는 보고가 있다.[4,5] 따라서, 이와 같은 ethanol의 대사 정도나 독성학적 영향을 예측, 평가하는 일은 생체 생리 및 생화학을 비롯한 여러 측면에서 매우 중요한 과정이며 기본적인 지표로서 혈중 에탄올 농도를 측정하여 비교하게 된다.[6,7]

현재 ethanol의 독성을 경감시키거나 독성의 발현을 저해할 수 있는 많은 물질에 대한 다양한 연구와 실험이 있으며[1-3] 최근에는 천연 식품이나 한약 재료로부터 추출한 성분을 함유한 많은 건강 보조 식품이 이와 관련되어 개발되고 있는데, 이들은 흡수된 에탄올의 대사를 촉진하거나 그 흡수를 저해함으로써 해독을 돕고자 하는데 촛점을 두고 있다.

이번 연구의 대상인 칡(*Puerariae lobata*)은 본래 그 뿌리나 줄기, 꽃 등을 약재로 사용해온 한방재로서 daidzein, daidzin 및 puerarin 등[9,10]이 성분으로 알려져 있다. 그 중에서 특히 갈화는 술의 독성을 경감시켜주고 위장을 보호하는 효과 외에도 식욕 부진, 구토, 토혈 등에 대한 효험과 추위에 강해지게 하는 효과도 있다고 한다.[11,12]

본 실험은 전통적으로 숙취 해소에 사용되어 온 갈화 추출물이 혈중 ethanol 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 rat를 실험 동물로 하여 혈중 ethanol 농도의 감소 효과를 다각적 측면에서 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물

서울대학교 실험동물사육장에서 구입한 3주령 Sprague-Dawley rat를 5주 더욱 사육실 환경에 적응시킨 후 체중 200~250 g에 도달한 것을 실험에 사용하였다. 사육 및 실험 기간 동안의 온도는 24~26℃를 유지하였고, rat용 케이지 (대종기기)에 2~5마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 삼양사료의 마우스용 사료를 급이하였고, 음용수로는 증류수를 사용하였다.

갈화추출물

열수 갈화추출물은 1995년 서울경동시장에서 구입한 건조 갈화 20.0 g을 200 ml의 물에서 끓여 추출하였고, 80% ethanol 갈화추출물은 건물 갈화 20.0 g을 80% ethanol 200 ml로 추출하여 ethanol을 제거한 후 증류수로 상기와 같은 농도가 되도록 희석한 것이었다. 이들 추출물은 실험의 목적에 따라 적절히 농도를 조절하여

찾는말 : *Puerariae flos, Pueraria lobata,* ethanol metabolism, ethanol determination, gas chromatography
*연락저자

사용하였다.

시약 및 기구

혈액에서 ethanol과 acetaldehyde의 추출에 사용된 dichloromethane은 Junsei사 (일본)의 특급 제품을 재증류하여 사용하였으며 내부 표준 물질로 200 ppm의 ethyl acetate를 첨가하였다. 투여용 ethanol은 Hayman사 (영국)의 무수 ethyl alcohol을 30% (v/v)의 농도가 되도록 증류수로 희석하여 사용하였으며 acetaldehyde는 Tedia사 (영국)의 특급 시약, perchloric acid는 Aldrich사 (미국) 제품이었다.

사용기기 및 분석조건

분석에 사용한 GC는 Hewlett Packard HP5890이었고 column은 HP-1 (30 m, ϕ=0.53 mm)이었다. 검출기는 FID를 사용하였고 분석 조건은 injector 온도가 200℃, temperature programming으로 55℃에서 2분동안 유지하고, 분당 10℃씩 증가시켜 70℃에서 1분동안 유지시켰다.

분석조건의 확립

최적의 분석조건을 찾기 위해 다양한 column과 내부표준물질로 실험을 시도하였으며 검량선은 200 ppm의 ethyl acetate를 내부표준물질로 함유한 추출용매에 ethanol을 50, 100, 200, 400 ppm으로 가하여 상대면적비로 작성 하였다. 그리고 각 분석치의 유의성은 *t*-test로 검정하였다.

실험물질의 투여[13]

음용수만 제공하고 24시간 절식시킨 rat에 갈화추출액 또는 30% ethanol을 스테인레스스틸 존데 (길이=10 cm)를 사용하여 강제 경구투여하였다. Ethanol의 투여는 순수 ethanol로 환산하여 2.0 ml/kg체중 비율이었고 대조구에는 갈화추출물 대신 생리식염수를 투여하였으며 모든 실험구의 동물은 5~6두로 하였다.

혈액, 간 및 뇌의 추출

Ethanol을 투여하고 일정 시간이 경과한 후 미정맥으로부터 헤파린이 처리된 모세관으로 60 μl의 혈액을 취하였다. 여기에 0.5 ml의 추출용매를 가하고 vortex mixer로 교반한 후 소량의 무수 Na_2SO_4를 처리하여 수분을 제거하고 여과하여 혈중 ethanol 분석에 사용하였다. 경추탈구법으로 희생시킨 실험동물은 해부하여 뇌와 간을 적출하고 무게를 측정한 후 0.5 ml/g의 perchloric acid 용액과 함께 tissue homogenizer (Biospec Products, Model M133/1281-0)로 조직을 균질화하였다. 이어서 인산완충된 생리식염수 (Krebs original Ringer phosphate)[14] 0.5 ml/g조직 무게로 처리하고 교반한 후, 이 중 180 μl를 취하여 0.50 ml의 추출용매로 상기와 같이 추출한 후 분석에 사용하였다.

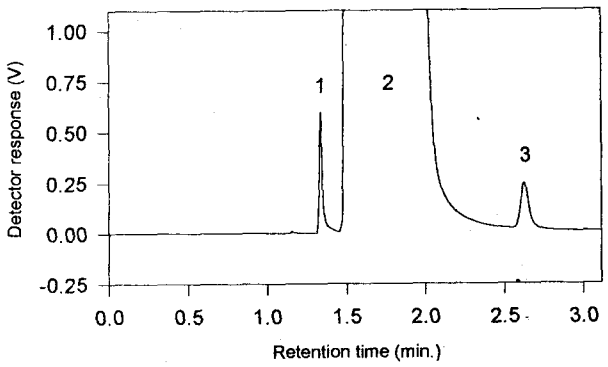

Fig. 1. Standard gas chromatogram of ethanol. Ethanol, 1; dichloromethane, 2; ethyl acetate (as an internal standard), 3.

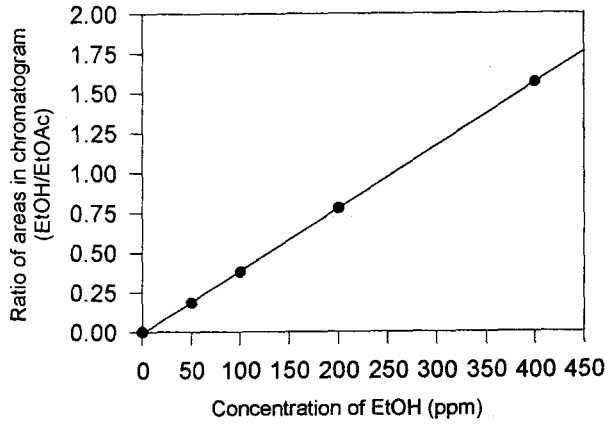

Fig. 2. Calibration for standard ethanol solution.

결과 및 고찰

분석방법의 확립

Ethanol과 acetaldehyde를 혈액이나 장기에서 측정하는 방법은 효소법[7]이 널리 쓰이고 있으며, GC법[8]은 적절한 분리상을 선택하였을 때 이들을 동시에 정량할 수 있는 이점이 있다. 이 실험에서는 dichloromethane을 추출용매로, ethyl acetate를 내부 표준 물질로 사용하고 HP-1 column을 이용 하였을 때, 번거로운 headspace 방법에 의존하지 않고도 정량적으로 두 화합물을 동시에 간단하고도 신속하게 약 4.5분 내에서 분석할 수 있었다 (Fig. 1). 회수율은 100%이었으며 최소 검출한계는 두 화합물 모두 10 ng이었고 검량선은 분석범위에서 직선을 보였다(Fig. 2).

추출 및 분석

혈액, 간, 뇌로부터 ethanol의 추출은 효과적으로 이루어졌고 GC 분석에 다른 불순물들의 방해를 받지 않고 깨끗한 chromatogram을 얻을 수 있었다(Fig. 1). 하지만 acetaldehyde는 정량을 할 만큼 충분한 양이 관찰되지 않았다. 이는 acetaldehyde의 회수가 효과적이었음에 미루어 볼 때, 생성된 acetaldehyde는 매우 빨리 산화되어 혈중 정상 상태 (steady-state)에서 유리 acetaldetyde 농

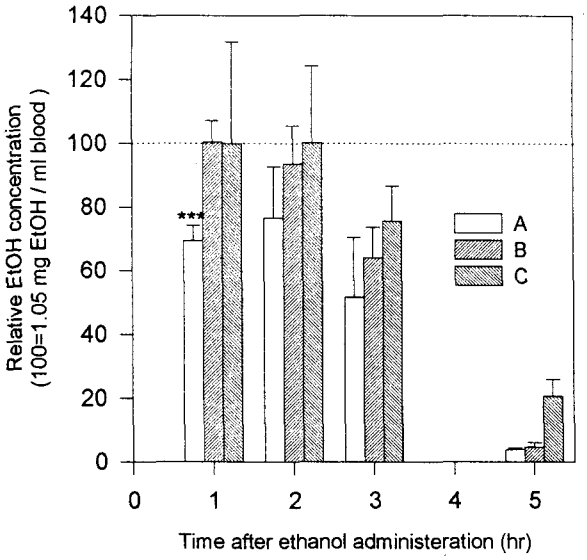

Fig. 3. Effect of the extraction solvent for *Puerariae flos* on the ethanol concentration in blood. A, Fed with hot water extract; B, with 80% EtOH extract; C, with isotonic solution. *** $p<0.005$ compared to the control.

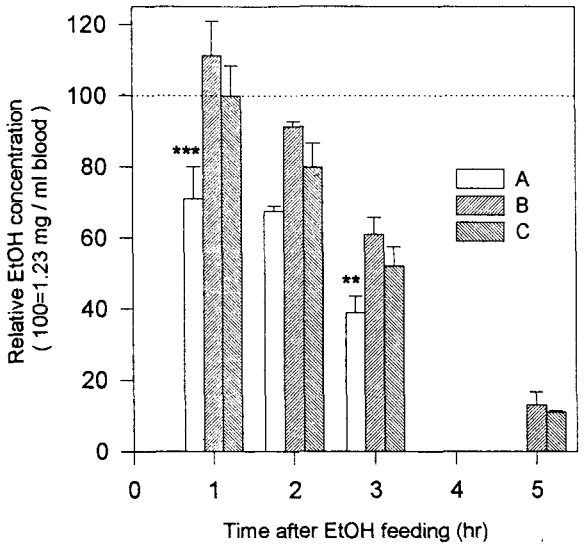

Fig. 4. Effect of administering schedule on the blood concentration of ethanol. A, Fed with extract after 10 min. from ethanol feeding; B, fed before 1 hr. from ethanol feeding; C, fed with isotonic solution after 10 min. from ethanol feeding. *** $p<0.005$ compared to the control; ** $p<0.01$.

도가 낮아지며, 존재하는 aldehyde도 단백질에 결합하여 나타난 결과로 판단된다.

열수 갈화추출물과 80% ethanol 갈화추출물의 혈중 ethanol 감소효과 비교

대조군과 비교하여 혈중 ethanol 농도의 감소는 열수 추출물이나 80% ethanol 추출물에서 모두 관찰되어 갈화의 전통적 처방효과가 증명되었다. 혈중 ethanol 농도는 위장이나 소장에서의 흡수와 간에서의 제거 대사

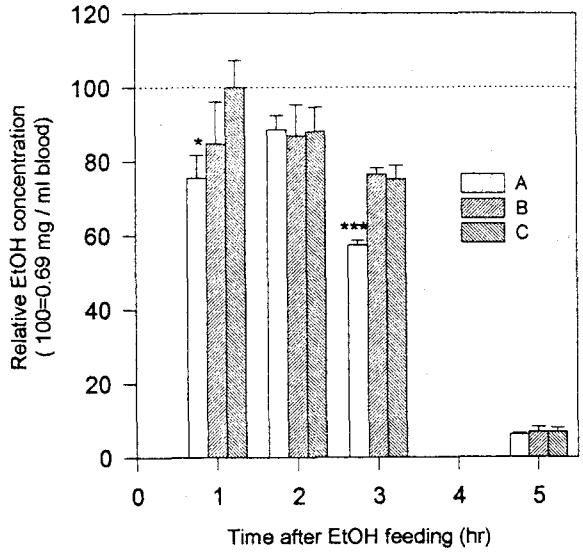

Fig. 5. Effect of administering schedule on the blood concentration of ethanol. A, Fed with extract before 10 min. from ethanol feeding; B, fed after 10 min. from ethaol feeding; C, fed with isotonic solution before 10 min. from ethanol feeding. *** $p<0.005$ compared to the control; * $p<0.05$.

속도에 의해 결정되는데 이상의 결과에서는 갈화추출물이 ethanol이나 acetaldehyde가 간에서 산화되는 대사를 촉진하는데 기인하는지 또는 위장이나 소장에서 흡수가 저해받은 결과인지 직접 결정할수는 없었다. 한편, 열수 갈화추출물이 80% ethanol 추출물에 비해 (99.5% 유의 수준) 더욱 효과가 뛰어난 것으로 나타나(Fig. 3) 전통의 열수추출 방법이 유효성분의 추출에 한층 효과적임을 알 수 있었다. 따라서 열수추출을 이후 실험에 사용하여 갈화추출물의 적정 투여시기 및 최적 투여량을 결정하였다.

갈화추출물 투여시기가 혈중 ethanol 대사에 미치는 효과

열수 갈화추출물을 ethanol 투여 10분 후에 처리한 군은 1시간 전에 처리한 군과 대조군에 비교하여 혈중 ethanol양이 상대적으로 적은 것으로 나타났다(Fig. 4). 특히 혈중 ethanol 농도가 가장 높은 ethanol 투여 1시간 후의 혈중 ethanol 양은 대조군에 비하여 최대 감소인 30%를 보였으며 *t*-test 결과 99.5% 유의 수준에서 차이를 나타내었다. 따라서 이후 실험에서는 혈중 ethanol 농도 감소에 대한 갈화의 효과가 극대화되는 ethanol 처리 1시간 후에 혈액이나 장기의 ethanol 농도를 조사하였다. 대조적으로 ethanol 투여 1시간 전에 갈화추출물을 투여한 군은 대조군보다 혈중 ethanol 양이 10% 정도 많은 것으로 관찰되었다.

투여시간을 바꾸어 열수 갈화추출물을 ethanol 투여 10분 전에 투여한 군은 대조군이나 ethanol 투여 10분 전에 갈화추출물을 투여한 군에 비해 혈중 ethanol 감소 효과가 더 큰 것으로 나타나 (Fig. 5) 그 효과는 상당히

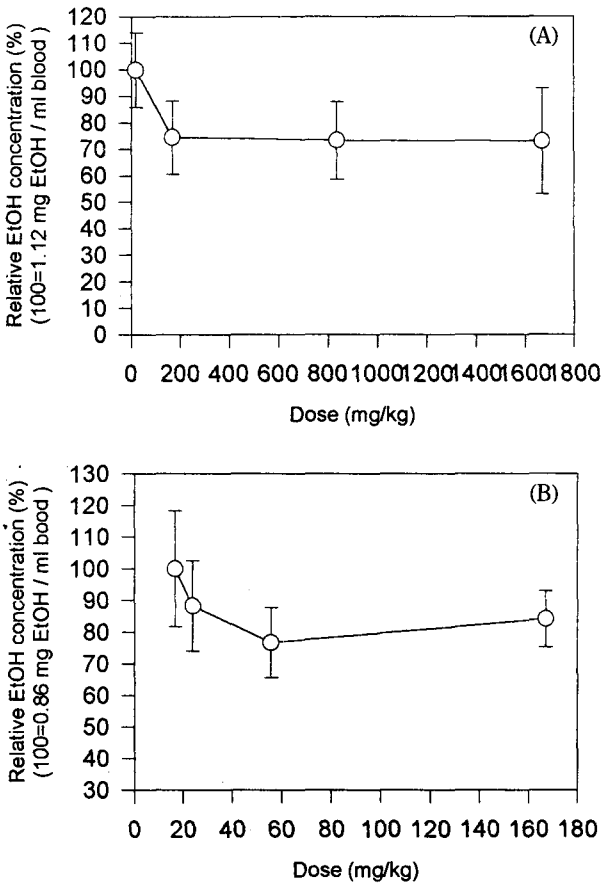

Fig. 6. Dose effect diagram of the hot-water extract of the arrow-root flowers. *** $p<0.005$ compared to the concentration at 16.7 mg/kg feeding; ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

신속하였다. 이는 갈화 추출물이 위장이나 소장에서 직접 ethanol의 흡수를 저해하였거나, ethanol과 함께 흡수된 유효 성분이 ethanol의 대사를 촉진한 결과라고 추측된다. 결론적으로 ethanol 추출보다 열수 추출이 더 좋은 효과를 보였으며 열수 갈화추출물을 ethanol 투여 10분 전에 처리하는 경우가 가장 효과가 뛰어났다. 각 처리군별로 가장 큰 차이를 보이는 시점은 처리 1시간 이후였으므로 이후의 실험에 이를 적용하였다.

장기의 ethanol 농도에 미치는 갈화추출물의 영향

뇌나 간에서도 각각 대조군에 비하여 ethanol 농도가 19%, 8% 낮은 값을 보였으나 뇌에서는 90% 수준의 유의차를 보여 어느 정도 갈화 추출물의 효과가 인정되었으나 주목할 만한 결과는 되지 못하였다.

갈화추출물의 투여 적정량 확립

167 mg/kg, 835 mg/kg, 그리고 1670 mg/kg의 투여는 16.7 mg/kg에 비해 유의성 (99.5%)있는 감소 효과를 나타냈으나 (Fig. 6-A) 이 세군은 서로 비슷한 효과를 보여 16.7 mg/kg과 167 mg/kg사이를 세분화하여 다시 적정량을 구하는 실험을 하였다. 그 결과 (Fig. 6-B) 55.7 mg/kg체중의 수준으로 투여한 군이 가장 좋은 효과를 보였다 (95% 유의수준). 이 값은 체중 60 kg 성인에 대하여 약 3 g 투여와 같으며, 이는 앞에서 언급된 문헌 처방값 5~10 g/성인에 가까운 값이다.

결 론

이상의 실험은 갈화를 숙취 해소에 이용한 전통 한의학의 처방을 확인하였으며 갈화를 건강식품으로 개발할 가능성을 제시하였다. 갈근(*Puerariae radix*)에서는 혈중 알코올 농도 저해를 유도하는 물질로 puerarin이 알려져 있으나[15] 갈화에서는 아직 잘 알려져 있지 않아 앞으로 더욱 연구 되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Smith, L. H. (1982) In 'Medical Disorder of Alcoholism', Vol. 22, pp.1-42. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
2. 정병선 (1991) 알콜의 대사적 영향. 한국식품영양학회지 **4**, 207-211.
3. 김동훈, 김동수, 최종원 (1994) 복어추출물이 갖는 실험동물의 혈중 알코올 농도 감소 효과. 한국식품영양학회지 **23**, 181-191.
4. Svensson, T. and G. Enberg (1980) In 'Biological Effects of Alcohol', pp.535-550.
5. Caballeria, J., E. Baraona and C. S. Lieber (1986) The contribution of the stomach to ethanol oxidation. *Life Sci.* **41**, 1021-1027.
6. Ebihara, K. and A. Nakajima (1988) Effect of acetic acid and vinegar on blood glucose and insuline responses to orally administered sucrose and starch. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1311.
7. Bergmeyer, H. U. (1984) In 'Methods of Enzymatic Analysis', 3rd Ed., pp. 598-6062.
8. Penton, Z. (1987) Gas-chromatographic determination of ethanol in blood with 0.53 mm fused-silica open tubular columns. *Clin. Chem.* **33**, 2094-2095.
9. Shibata, S., M. Harada and T. Murakami (1959) Constituents of Japanese and Chianese crude drugs. II; Antispasmodic action of the constituent of *Pueraria* root. *J. Pharm. Soc. Jap.* **79**, 863-866.
10. Harada, M. and K. Ueno (1975) Pharmacological studies on Pueraria root fractional extraction of *Pueraria* root and identification of its pharmacological effects. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1798-1805.
11. 上海科學技術出版社 (1985) '中藥大辭典, 小學館 編', 제1권, pp.291-292. 小學館, 동경, 일본.
12. 이창복 (1980) '한국 식물 도감', p.488, 향문사, 서울.
13. 이삼열, 정충변 (1989) '임상 병리 검사법', pp.223-225. 연세대학교 출판부, 서울.
14. Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones (1986) In 'Data for Biochemical Research', 3th Ed., p.446. Oxford Univ. Press, New York.
15. 上海科學技術出版社 (1985) '中藥大辭典, 小學館 編', 제1권, pp.295-299. 小學館, 동경, 일본.

Effect of Arrowroot Flower (*Puerariae flos*) Extract on Lowering of Ethanol Concentration in Rat Blood

Jeong Han Kim[1], Sun Sik Min[1], Sung Hoon Kim[1], Heu Do Hong[2], Jong-Soo Kim[3], Soo-Un Kim[1]* ([1]*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea;* [2]*Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyundong, Boondand-gu, Seongnam 463-420, Korea;* [3]*Department of Environmental Engineering, Sun Moon University, Asan-si 336-840, Korea*)

Abstract : Ethanol concentration in blood, brain and liver of rats was shown to be effectively lowered by arrowroot flower extract. The lowering effect for ethanol concentration in blood was maximum when measured after 1 hour from ethanol feeding. Hot water extract was more effective than 80% ethanol extract. The treatment of extract at 10 min. before ethanol feeding gave a better result than that at 10 min after or 1 hour before ethanol feeding. The ethanol concentration in brain and liver was lowered as found in the blood ethanol concentration. Acetaldehyde was not detected either in blood or the tissues. The optimal amount of the *Puerariae flos* was 55.7 mg/kg·body weight. The newly developed analytical method using dichloromethane as extracting solvent was proven to be very effective in terms of speed and simplicity.

*Corresponding author