

Dextrin과 β -cyclodextrin이 생체 내에서 헛개나무 추출물의 알코올성 손상으로부터 간보호에 미치는 영향

홍철이^{1*} · 김진범 · 노혜지 · 나천수

¹(주)네추럴F&P, 농업회사법인 (주)생명의 나무

Effects of Dextrin and β -cyclodextrin on Protective Effect of *Hovenia dulcis* Fruit Extract Against Alcohol-induced Liver Damage in vivo

Cheol Yi Hong^{1*}, Jin Beom Kim, Hae-Ji Noh and Chun-Soo Na

¹Research Institute, Natural F&P Co. LTd., Seoul 138-200, Korea

Lifetree Biotechnology Institute, Lifetree Biotech Co. LTd., Gyeonggi-do 441-813, Korea

(Received November 3, 2014/Revised December 20, 2014/Accepted February 28, 2015)

ABSTRACT - β -cyclodextrin has an ability to protect compounds from oxidative reaction by collecting them within its ring-like structure. So, In harsh condition (40°C), marker compound, quercetin, was dramatically reduced in *Hovenia dulcis* fruit extract containing dextrin at 4 and 8 week compared to 0 week, but not that containing β -cyclodextrin. To evaluate the effects of dextrin and β -cyclodextrin on protective effect of *H. dulcis* fruit extract against alcohol-induced liver damage, The mice were orally injected alcohol, *H. dulcis* fruit extract/dextrin (HD) and *H. dulcis* fruit extract/ β -cyclodextrin (HCD), respectively, for 7 days. The mice orally administrated with alcohol significantly enhanced the serum concentration of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in serum compared to the control group. HD and HCD significantly decreased the levels of serum ALT and AST and serum LDH activities compared to alcohol group. And also alcohol group significantly increased the level of total cholesterol compared to the control group, but HD and HCD significantly reduced it compared to the alcohol group. However, the levels of TG in blood were not significantly changed in all groups. The activities of alcohol dehydrogenase (ADH) were significantly increased in HD and HCD group although those of aldehyde dehydrogenase showed an increasing tendency. This data suggested that HD and HCD were able to induce alcohol degradation in the liver tissues. All together, the results showed that HCD demonstrated their ability to protect liver from alcohol-induced damage on equal terms with HD.

Key words : dextrin, β -cyclodextrin, *Hovenia dulcis* extracts, alcohol, liver

헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunb)는 갈매나무과의 교목으로 일명 지구자나무 또는 괴조라고도 하며, *Hovenia* 속 나무 열매는 본초학이나 식물도설에서 주독해독, 정혈, 이뇨, 갈증해소 및 해독작용을 한다고 알려졌다¹⁾. 헛개나무의 잎, 줄기 및 열매로 만든 차는 주독제거와 과음 시 부작용으로 나타나는 황달, 지방간, 간경화증 등의 간 기능 보호에 효능이 우수하며²⁾. 헛개나무과병추출물이 간 손상과 관련된 ALT와 AST를 감소시키는데 탁월한 효과가 있다는 것을 밝혔다³⁾. 이와 더불어 헛개나무의 알코올 대사 촉

진 및 D-galactosamine, lipopolysaccharide와 사염화탄소로 유도한 급성 간손상 동물모델이나 알코올에 의한 만성 간손상 동물모델에서 간독성을 저해하는 효과에 대한 연구가 다수 보고되었다³⁻⁵⁾. 최근에 헛개나무과병추출물을 투여한 마우스가 투여하지 않은 마우스보다 수영시간이 현저히 증가함으로써 지구성 운동능력을 향상시킨다는 효능이 밝혀졌으며⁶⁾, 이러한 운동능력의 향상은 운동 후 피로의 회복력을 헛개나무 추출물이 증진시킨다고 알려졌다⁷⁾.

헛개나무 추출물의 80-90%는 당이 차지하고 있으며 당이 많은 식물 추출물의 산업적 이용에는 여러가지 제약요인이 있지만 그 중에서 가장 중요한 것이 당으로 인한 흡습으로 분말제조 시 많은 손실이 불가피하다는 점이다. 그러므로 보통의 경우 분무건조법에 의한 분말제조 시 이러

*Correspondence to: Cheol Yi Hong, Research Institute, Natural F&P Co. LTd., Seoul, 138-200, Korea
Tel: 82-31-291-1158, Fax: 82-31-292-1158
E-mail: cyhong@hanmail.net

한 손실을 줄이기 위해 부형제를 사용한다. 부형제는 원재료의 물성과 형상을 유지하면서 생리학적 효능을 방해하지 않는 소재로서 투여량에 영향을 주지 않으며 제품의 형태를 안정적으로 유지하기 위하여 사용된다. 또한 부형제는 주성분의 양이 적은 경우에 일정 용량, 중량을 주어 취급하기 쉬운 단위로 개선할 목적으로 첨가하는 것으로 주로 starch, dextrin, lactose, glucose, maltose, gelatin, arabic gum, methyl cellulose 등을 이용한다. 이들 중 dextrin은 glucose와 maltose를 제외한 전분의 가수분해 생성물을 말하며 분해정도를 나타내는 dextrose equivalent (DE)에 따라 각기 다른 성질을 가지나 일반적으로 흡습성이 낮고 용해분산성이 우수하며 조직감 개선효과가 있어 널리 사용되고 있다⁸⁾. 또한 cyclodextrin (CD)은 전분에 효소(cyclodextrin glucanotransferase; CGTase)를 작용시켜 얻어진 환상구조의 물질로 강한 포집능을 가져 향기를 보호할 뿐만 아니라 산소, 열, 빛에 대한 안정성을 강화시키는 등의 기능이 있어 다방면에서 사용되고 있다⁹⁾. 하지만 효능을 나타내는 주성분과 같이 사용하였을 때 CD가 가지고 있는 포집능력 때문에 포집능력이 없는 dextrin과 동일한 효과를 나타내는 지는 알려지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 가지고 있는 헛개나무과병추출물의 산업적 이용성을 확대하고자 부형제로 당량이 다른 dextrin (DE = 8-10) 및 β -cyclodextrin의 첨가에 따른 헛개나무과병추출물의 지표성분의 안정성을 검토하고 각각의 부형제와 함께 제조된 헛개나무과병추출분말의 생체 내 효능에서 차이가 있는지를 조사하고자 한다. 특히, 포집능력이 있는 β -cyclodextrin의 첨가가 인체 내에서 추출물의 효능에 영향을 미치는 지에 대해 확인함으로써 기능성 소재의 산업적 이용성을 확대하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물의 사육 및 군의 분류

5주령 C57BL/6 수컷생쥐(Daehan Bio Link, Korea)를 구입하여 1주일간 순화시킨 후 체중을 측정하고 사용하였으며, 평균체중을 균등하도록 군당 10마리씩 negative control 군, 5 mg alcohol 투여군, 500 mg 헛개나무 추출분말/dextrin 투여군, 500 mg 헛개나무 추출분말/ β -cyclodextrin 투여군 등 총 4군으로 나누었다. 사육조건은 케이지 당 3~4마리씩 사육하였으며, 온도는 20.0~25.0°C, 상대습도는 41.2~58.5%, 조도는 150~300Lux로 오전 7시부터 오후 7시까지 12시간 명암주기 (조명시간)로 사육하였으며, 건양대학교 의과대학 동물윤리위원회 규정 (승인번호:14-03-A-01)을 준수하여 사육하였다.

헛개나무과병 추출분말 제조 및 경구 투여

헛개나무과병을 물과 1:10(W/V)의 비율로 95°C 에서 4

시간 동안 추출하고 추출물의 고형분 함량이 40%가 되도록 농축하였다. 고형분 40%의 농축액은 부형제인 dextrin 또는 β -cyclodextrin을 6:4(부형제:헛개나무추출분말)의 비율로 혼합하고 분무건조(spray-dry)하여 헛개나무과병추출분말을 얻었다. 헛개나무과병추출분말은 실온에서 보관하고 본 실험의 재료로 사용하였다.

헛개나무과병추출분말의 지표성분인 quercetin의량은 Tosoh ODS column (4.6 × 150 mm, 5 μ m)을 이용하여 Agilent Technologies 1200 Series HPLC system (Model Agilent Technologies 1200 Series DAD SL G1315C, USA)를 이용하여 분석하였으며, 측정파장은 350 nm이며, 2% 초산-45% 아세토나이트릴과 2%초산-증류수를 사용하였다. 본 실험에 사용된 헛개나무과병추출분말의 quercetin의 함량은 11.1 μ g/g으로 측정되었다.

추출물은 1일 1회씩 7일 동안 총 7회 반복하여 경구투여 하였다. 투여용량은 5 mL 알코올 또는 5 mL 알코올/500 mg/kg 헛개나무 추출분말을 각각 투여하였고, 헛개나무 추출분말은 주사용수 (1차 증류수)에 현탁하고, 투여액량은 10 mL/kg으로 산출하여 투여하였다. Negative control군은 부형제인 주사용수를 투여하였다.

지표성분 안정성 분석

액상시제품(350 mL)을 헛개나무과병추출분말 하루 복용량 2,460 mg이 들어가도록 부형제인 dextrin 혹은 β -cyclodextrin을 4:6의 비율로 제조하였다. 제조된 액상시제품을 120°C에서 15분간 살균한 뒤 가혹조건(40°C)에서 0 주, 4주, 8주 동안 보관하였다가 시제품 중의 quercetin 량을 측정하였다.

Quercetin 표준물질을 사용하여 20, 10, 5, 2.5, 1 μ g/mL의 농도로 표준용액을 제조하였다.

액상시료를 quercetin 10~30 μ g에 상당하는 양을 정밀히 측정하여 농축플라스크에 전량 옮긴 후, 환류추출장치를 이용하여 100°C에서 가온 추출하였다. 가온추출이 끝난 시료 용액은 냉각시킨 후 10분간 3360 × g에서 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 시료용액은 분액 여두에 옮긴 후 ethyl Acetate을 가하여 액체-액체 추출한 다음, 상분리가 완료되면 상층액을 모두 회수하여 60°C에서 감압 농축하였다. 농축이 완료된 잔류물은 메탄올로 용해시켜 최종 5 mL로 정량하였으며, 정량된 이 용액 2 mL을 취한 후 0.2 μ m 실린지 필터를 사용하여 여과하고 HPLC로 분석하였다.

식이 및 체중측정

실험동물의 식이는 실험동물용 고형사료(Rodent diet 2918C; Harlan Teklad, Indianapolis, IN, USA)를 음수와 함께 자유 급여하였다. 체중측정은 투여시작일부터 조직 적출일까지 매일 1회 측정하였다.

혈액채취 및 조직적출

각 군별로 마지막 투여 후, isoflurane으로 마취하여 개복하고, 복대동맥에서 혈액을 채취하여 serum-separating tube 및 heparinized tube에 보관하였으며, 간 조직을 적출하고, 중량을 측정하였다. 중량을 측정한 간 조직은 액체 질소를 이용하여 급속동결 시키고 초저온고(-80 ~ -60°C)에서 보관하였다.

혈액생화학학적 검사

Serum-separating tube 및 heparinized tube의 채취된 혈액은 각각 3360 × g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 혈액생화학분석기(7080, Hitachi, Japan)를 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GPT) lactate dehydrogenase (LDH) 및 triglyceride (TG), low density lipid (LDL), high density lipid (HDL) 및 total cholesterol (TC)를 측정하였다.

Alcohol dehydrogenase 및 aldehyde dehydrogenase 활성도 측정

Alcohol dehydrogenase (Sigma, MAK053)와 Aldehyde dehydrogenase (Sigma, MAK082)의 활성도는 채취한 간 조직을 이용하여 제조사에서 제공한 방법대로 수행하였다.

통계분석

실험결과는 SAS (Statistical Analysis System, Version 8.20, USA)를 이용하여 통계 분석하였다. 대조군과 시험물질 투여군 간에 Folded-F 검정법을 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산성인 경우 Student t-test 를 실시하였고(유의수준: 양측 0.05 및 0.01), 등분산성이 기각되면 Aspin-Welch t-test 를 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

결과 및 고찰

헛개나무 지표성분의 안정성

가혹조건(40°C)에서 지표성분인 quercetin의 함량을 측정

Table 1. The stability evaluation of marker compound by dextrin and β -cyclodextrin as an excipient in harsh condition (40°C)

Week	Quercetin contents (μ g/ml)	
	HD	HCD
0	0.078	0.078
4	0.045	0.074
8	0.017	0.072

Table 3. Measurement of feed and water intake

	Control	Alcohol	HD	HCD
Feed (g)	21.1 \pm 1.2	12.7 \pm 2.5*	14.2 \pm 2.0	14.0 \pm 1.8
Water (g)	58.8 \pm 8.0	29.0 \pm 5.0*	31.0 \pm 4.9	27.2 \pm 2.3

*p < 0.05: Significantly different between the control and alcohol group by student t-test.

한 결과(Table 1), 일반 dextrin을 사용한 헛개나무과병추출분말의 초기농도는 0.078 μ g/mL, 4주 후 농도는 0.045 μ g/mL, 8주 후 농도는 0.017 μ g/mL로 분석되어 초기에 비해 8주 후 지표성분 함량이 78.2% 감소하였다. β -cyclodextrin을 사용한 헛개나무과병추출분말의 초기 농도는 0.078 μ g/mL, 4주 후 농도는 0.074 μ g/mL, 8주 후의 농도는 0.072 μ g/mL로 분석되어 초기에 비해 8주 후 지표성분 함량이 7.7% 감소하였다. 이는 헛개나무과병추출물의 지표성분인 quercetin이 β -cyclodextrin에 의해 포집되어 산화적 반응이 억제됨으로써 달성되어지는 것으로 사료된다.

체중 및 장기무게 변화

시험기간 동안 각 군별 체중은 음성대조군에 비해 알코올 투여군이 알코올 투여 4주와 7주에서 감소(P < 0.05) 하였는데(Table 2), 이는 알코올을 투여함으로 인한 사료섭취량 및 음수량의 감소에 기인한 것으로 사료된다(Table 3). 음수량과 사료섭취량의 경우 알코올을 투여한 모든 군이 음성대조군에 비해 감소하였으나, 알코올 투여군에 비해 HD 또는 HCD 투여가 통계적으로 유의한 변화를 야기하지는 않았다(Table 3). 그러나, 간의 무게를 측정한 결과 7일간 투여 후 음성대조군에 비해 알코올 투여군에서 증가(p = 0.031) 하였고, 알코올 투여군에 비해 HD 투여군에서

Table 2. Measurement of body and liver weight

Weight	Sample	Control	Alcohol	HD	HCD
Body weight (g)	0 day	19.5 \pm 0.3	19.6 \pm 0.3	19.7 \pm 0.2	19.5 \pm 0.5
	4 day	19.3 \pm 0.6	18.4 \pm 0.6*	18.6 \pm 0.5	18.3 \pm 0.3
	7 day	19.2 \pm 0.5	18.1 \pm 0.3*	18.4 \pm 0.3	18.3 \pm 0.3
Liver weight (g)		0.80 \pm 0.05	0.86 \pm 0.05*	0.82 \pm 0.06*	0.80 \pm 0.07*

*p < 0.05: Significantly different between the control and alcohol group or alcohol and HD and HCD group by student t-test.

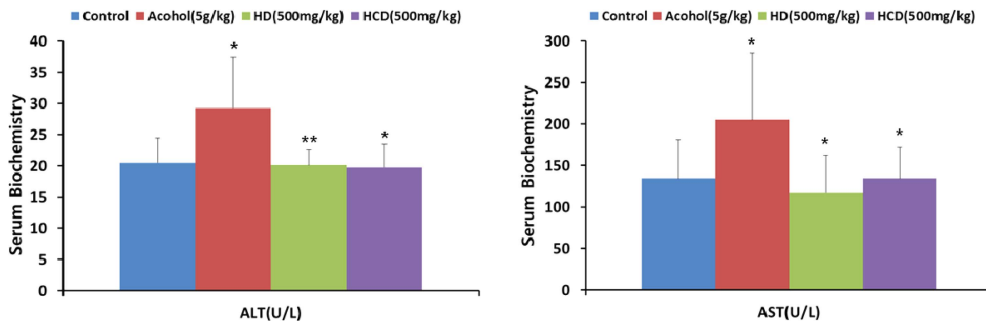


Fig. 1. Comparison of serum concentration of ALT and AST. Mice were fed with alcohol and HD or HCD for 7 days. Blood levels of ALT and AST were determined as described in materials and methods. Values are mean \pm S.D. of 10 mice in each group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significance difference between the control and alcohol group or alcohol and HD and HCD group.

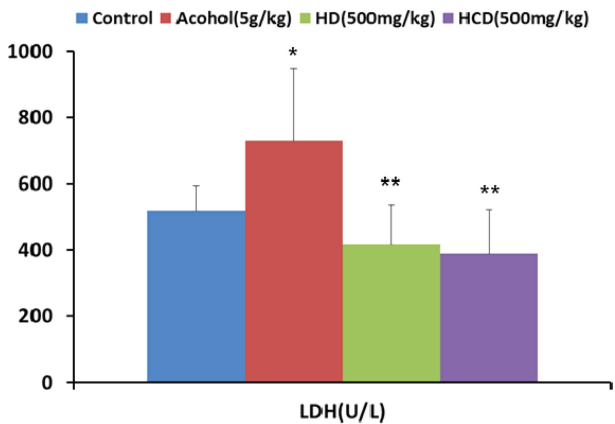


Fig. 2. Comparison of serum LDH activity. Mice were fed with alcohol and HD or HCD for 7 days. The activities of LDH were measured as described in materials and methods. Values are mean \pm S.D. of 10 mice in each group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significance difference between the control and alcohol group or alcohol and HD and HCD group.

는 감소($p = 0.037$)하였고, HCD 투여군 역시 알코올 투여군에 비해 감소($p = 0.043$) 하였다(Table 2). 이러한 결과로부터 dextrin보다 β -cyclodextrin이 헛개나무과병추출물 내에 존재하는 알코올성 간손상을 개선하는 물질의 활성화에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다고 추측할 수 있다.

혈액 생화학적 지표분석

간손상의 지표인 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)의 혈중 농도를 측정된 결과 음성대조군에 비해 알코올 투여군에서 각각 증가하였으며(ALT: $p = 0.016$, AST: $p = 0.048$), 알코올만을 투여한 대조군에 비해 HD 투여군에서 낮게 나타났으며(ALT: $p = 0.009$, AST: $p = 0.024$), HCD의 투여군에서도 낮게 나타났다(ALT: $p = 0.01$, AST: $p = 0.04$) (Fig. 1).

HD 투여군과 HCD 투여군에서 ALT, AST 농도의 차이는 나타나지 않았다. 한편 lactate dehydrogenase (LDH)의 활성을 비교한 결과, 음성대조군에 비해 알코올만을 투여한 군이 증가하였으며($p = 0.021$), 알코올 대조군에 비해 HD ($p = 0.004$) 및 HCD ($p = 0.002$) 투여군에서 낮게 나타났다. HD와 HCD사이에서는 HCD 투여군이 상대적으로 낮은 농도를 나타냈으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

Total cholesterol의 경우, 음성대조군에 비해 알코올 투여군에서 증가하였으며($p = 0.006$), 알코올 대조군에 비해 HD ($p = 0.007$) 및 HCD ($p = 0.001$) 투여군에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 한편, TG는 음성대조군에 비해 알코올 투여군에서는 증가되지 않았으며, 알코올 투여군과 HD 또는 HCD 투여군 사이에서도 차이가 없었다(Fig. 3B).

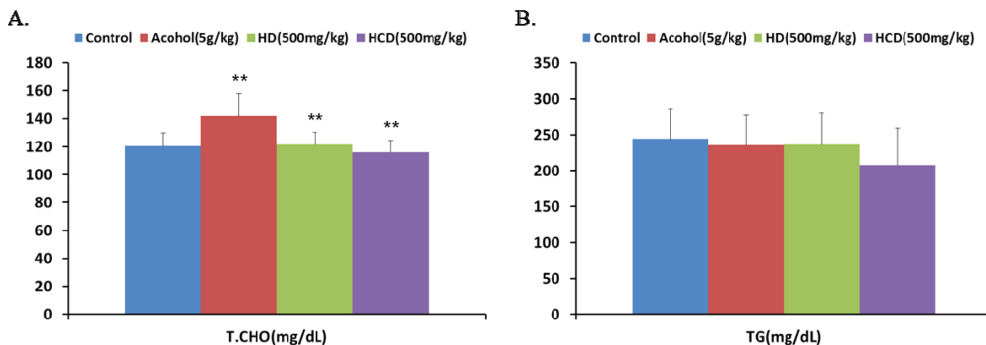


Fig. 3. Comparison of the levels of serum T.CHO and TG. Mice were fed with alcohol and HD or HCD for 7 days. The blood levels of T.CHO (A) and TG (B) were measured as described in materials and methods. Values are mean \pm S.D. of 10 mice in each group. ** $p < 0.01$, significance difference between the control and alcohol group or alcohol and HD and HCD group.

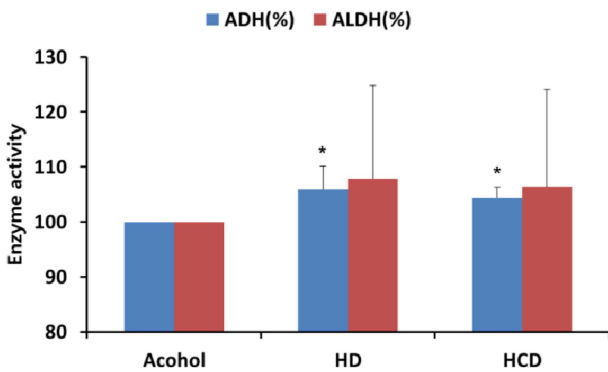


Fig. 4. Comparison of the activities of ADH and ALDH in liver tissues. Mice were fed with alcohol and HD or HCD for 7 days. The activities of ADH and ALDH were measured as described in manufacturer's procedures. Values are mean \pm S.D. of 10 mice in each group. * $p < 0.05$, significance difference between the control and alcohol group or alcohol and HD and HCD group.

그럼에도 불구하고, TG의 혈중 농도가 알코올이나 HD를 투여한 군보다 HCD 투여군에서 더 감소하는 경향을 보였다. 이는 알려진바와 같이¹⁰⁻¹²⁾, β -cyclodextrin이 지질대사에 영향을 미쳤을 가능성을 배제할 수 없다.

혈중 alcohol dehydrogenase 및 aldehyde dehydrogenase 활성도 측정

혈중 알코올탈수소효소 및 알데히드탈수소효소의 활성도를 측정한 결과, 알코올 투여군에 비해 HD 투여군($p = 0.024$)과 HCD 투여군($p = 0.035$)에서 알코올탈수소효소의 활성도가 증가하였고 알데히드탈수소효소의 활성도는 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 4). 이 결과는 부형제로써 dextrin이나 β -cyclodextrin을 사용하는 것에 무관하게 헛개나무과병추출물이 혈중 알코올의 분해에 관여하는 효소의 활성을 증가시킨다는 것을 의미한다.

결론

β -cyclodextrin은 환상고리모양의 구조에 화합물을 포집함으로써 산화적 반응으로부터 화합물을 보호하는 능력을 가지고 있다. 이러한 능력에 기인하여, 가혹조건(40°C)에서, 지표성분인 quercetin 함량이 dextrin이 포함된 헛개나무과병추출물에서 0주에 비해 4주와 8주에서 현저하게 감소하였고 β -cyclodextrin이 포함된 헛개나무과병추출물에서는 거의 변화가 없었다. 본 연구에서 알코올성 간손상에 대한 헛개나무과병추출물의 보호 효능에 대해 dextrin과 β -cyclodextrin이 미치는 영향을 평가한 결과, 부형제로 사용한 β -cyclodextrin은 구조가 선상구조를 갖는 dextrin과 차이를 보이고 포집능력에 있어서 dextrin과 다름에도 불구하고 부형제로 사용되었을 때 주 성분의 생체 내 기능적 효과를 저해하거나 지연시키지 않고 dextrin과 유사한

정도의 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

본 연구의 결과는 HD와 HCD가 간 조직에서 알코올 분해를 유도할 수 있다는 것을 제안하며, HCD가 HD와 동등하게 알코올에 의해 유도된 간 손상을 보호할 능력이 있다는 것을 증명하였다. 이러한 사실에 근거하여, 기능성 식품소재의 부형제로써 dextrin을 사용하는 대신 β -cyclodextrin을 사용할 수 있으며, 특히 액상에서 안정성이 떨어지는 지표성분을 안정화시키고 천연추출물의 약리효능을 보존하기 위해서도 β -cyclodextrin의 사용은 유용하리라 사료된다.

References

1. 김태정: 한국의 자원식물 III, 서울대학교출판부, p. 72 (1996).
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경준.: 중약대사전, 청담 p. 5078 (1998).
3. Na C.S., Chung N.C., Yang K.H., Kim S.H., Chung H.S., Dong M.S.: Hepatoprotective and blood alcohol lowering effects of fruit peduncle extract of *Hovenia dulcis* var. koreana in the in vitro and in vivo animal models. *YAKHAK HOEJI*, **48**, 34-40 (2004).
4. Kim M.H., Chung Y.T., Lee J.H., Park Y.S., Shin M.K., Kim H.S., Kim D.H., Lee H.Y.: Hepatic detoxification activity and reduction of serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB from Korea and China. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **8**, 225-233 (2000).
5. Kim O.K.: Protective effects of extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **30**, 1260-1265 (2001).
6. Na C.S., Hong C.Y., Na D.S., Kim J.B., Yoon S.Y., Lee S.B., Dong M.S.: Hotwater Extract of *Hovenia dulcis* Peduncle Improves Exercise Performance and Anti-fatigue Effect in Mice. *Natl Prod Sci*, **44**, 1-8 (2013a).
7. Na C.S., Yoon S.Y., Kim J.B., Na D.S., Dong M.S., Lee M.Y., Hong C.Y.: Anti-fatigue activity of *Hovenia dulcis* on a swimming mouse model through the inhibition of stress hormone expression and antioxidation. *Am J Chin Med.*, **41**, 945-955 (2013b).
8. Kim W.J., Ku K.H.: Optimization of heating and addition of water, oil and dextrin for uncompressed SPI tofu preparation. *Korean J Food Sci Technol.*, **26**, 37-43 (1994).
9. Shahidi F., Han X.Q.: Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **33**, 501-547 (1993).
10. Wang S.G., Yoon E.Y., Lim Y.H.: Effects of Indigestible Dextrin on Bowel Function and Serum Lipid in Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **25**, 560-567 (1996).
11. Park B.S.: Effect of dietary β -cyclodextrin on the cholesterol content of tissue in swine. *Ann Anim Resour Sci*, **18**, 38-46 (2007).
12. Jeon S.M., Choi M.S.: Comparison of the effects of cyclodextrin-naringin inclusion complex with naringin on lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. *J East Asian Soc Dietary Life*, **20**, 20-29 (2010).