베트남 칩(*Pueraria lobata*)의 성분 분석 및 Puerarin과 전분의 추출법 개발

김지수 · 우승혜 · 정현모 · 신유정 · 김은아 · 이예림 · 이은형 · 심재훈

한림대학교 식품영양학과, 한국영양연구소

Component Analysis of the Kudzu (*Pueraria lobata*) Root and Development of Puerarin and Starch Extraction Method

Ji-Soo Kim, Seung-Hye Woo, Hyun-Mo Jeong, Yu-Jeong Shin, Eun-A Kim, Ye-Rim Lee, Eun-Hyeong Lee, and Jae-Hoon Shim

Department of Food Science and Nutrition and the Korean Institute of Nutrition, Hallym University

ABSTRACT Studies have demonstrated potential health benefits of kudzu (*Pueraria lobata*) such as anti-cancer and anti-diabetic effects and prevention of osteoporosis. Kudzu contains the bioactive substance, isoflavone. Puerarin, the major isoflavone in kudzu is found in larger amounts than soybean, which is considered the main source of isoflavone. However, domestic kudzu may be collected at different times. Collected kudzu shows a variation in puerarin content depending on the collection period, so it is difficult to maintain the quality during commercialization. On the other hand, Vietnamese kudzu, which is grown every year, is more suitable for commercialization than domestic kudzu because it is possible to maintain consistent product quality. In this study, the conditions for extracting both puerarin and starch from Vietnamese kudzu were established, and the high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis program was optimized to conduct component analysis. After extraction using 45% (v/v) of ethyl alcohol (EtOH) at 60°C for 1 h, 12.7 mg/g of puerarin from kudzu root was obtained and kudzu residues isolated during the extraction process contained about 74% of starch, which indicates that this extraction method is efficient for the preparation of both puerarin and starch from kudzu root.

Key words: kudzu, isoflavone, puerarin, starch, extraction

서 론

칩(*Pueraria lobata*)은 콩과에 속하는 다년생 덩굴성 관목으로 동남아시아 각지에서 자생하는 두과 식물이며, 세계 각지에서 산과 들에 자생하고 있다(Choi 등, 2008; Liu 등, 2021). 예로부터 칩은 한국, 일본, 중국 등지에서 중요한 약재로 사용되어왔으며, 감기, 고혈압, 당뇨, 숙취 해소 등에 효과적인 것으로 알려져 있다(Kwon 등, 2016). 특히 칩의 뿌리에는 몇 가지의 이소플라본이 함유되어있다고 보고하고 있으며, 대표적으로 푸에라린(puerarin), 다이드진(daidzin), 다이드제인(daidzein), 제니스틴(genistin), 제니스테인(genistein) 등이 있다(Kwon 등, 2016). 이소플라본에 관한 연구 중 대두에 포함되어있는 이소플라본 함량에 관한

연구는 많이 보고되어 있으나(Wang과 Murphy, 1994), 최근 대두에서 관찰되지 않는 이소플라본 중 하나인 puerarin이 칩에 상당량 존재함이 밝혀져 새로운 이소플라본의 공급 원으로써 칩이 이용될 수 있음을 확인해 주었다(Kim 등, 2003). 생리활성 물질인 puerarin은 심장 보호, 항암, 항염증, 통증 완화, 뼈 형성 촉진, 인슐린 저항성 약화, 난소 기능 향상, 심근세포사멸 억제와 같은 기능을 가지는 것으로 알려져 사람에게 광범위한 효과를 나타낸다(Wu 등, 2013; Zhou 등, 2014; Chen 등, 2021a; Chen 등, 2021b). 게다가 독성이 거의 없으며, 최근 몇 년 동안 puerarin이 간, 폐, 신장 및 심장 섬유증과 같은 다양한 섬유성 질환에서 항섬유증 효과를 나타내는 것으로 입증되었다(Zeng 등, 2021). 또한 puerarin은 장내 미생물에 의해 daidzein으로 대사되는

Received 1 September 2021; Revised 22 September 2021; Accepted 12 October 2021

Corresponding author: Jae-Hoon Shim, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Hallymdaehak-gil 1, Chuncheon, Gwangwon 24252, Korea, E-mail: jhshim@hallym.ac.kr

Author information: Ji-Soo Kim (Graduate student), Seung-Hye Woo (Graduate student), Hyun-Mo Jeong (Graduate student), Yu-Jeong Shin (Graduate student), Eun-A Kim (Graduate student), Ye-Rim Lee (Graduate student), Eun-Hyeong Lee (Graduate student), Jae-Hoon Shim (Professor)

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

것으로 밝혀져 puerarin 자체의 활성뿐만 아니라 daidzein에 의한 항알레르기 및 항혈전 활성, 심혈관 질환의 예방 효과까지 나타낸다고 보고되었다(Choo 등, 2002). 이러한 쑤의 다양한 효과로 근래에는 쑤차, 쑤즙 등의 건강기능식품 이외에도 쑤 전분을 활용한 국수, 냉면 등이 제품화되어 판매되고 있다(Kuhm 등, 2004).

그러나 국내산 쑤의 경우 대부분이 채집된 쑤으로 이루어져 있다. 채집 쑤은 채집 시기마다 puerarin 등 유용 물질의 함량이 상이해 제품화 과정에서 품질 유지가 어렵다(Kim 등, 2009). 반면 매년 재배되는 베트남 쑤은 제품의 품질을 일정하게 유지할 수 있어 국내산 쑤보다 제품화에 적합하다. 따라서 베트남 쑤을 사용하여 puerarin 추출 조건을 최적화하려는 연구를 진행하였다.

베트남 쑤의 전분 함량은 약 32%로 베트남산 쑤 전분의 아밀로오스와 아밀로펙틴 분자의 평균 중합도(degree of polymerization)와 사슬수(number of chain)가 가장 많았고 일본과 한국의 쑤 전분이 그 뒤를 이었다. 또한, 베트남산 쑤 전분은 한국과 일본산 쑤 전분과 비교하여 현저히 높은 호화 온도, 전이 엔탈피, 결정화도 등의 특이성을 가지고 있다(Du 등, 2002; Vanhung과 Morita, 2007). 따라서 전분이 많이 함유되어 있는 베트남 쑤에서 전분과 유용 물질을 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 고안하였다.

쑤은 오래전부터 다른 한약재와 같이 주로 열수 추출 방법을 사용해왔으나 쑤에 함유된 이소플라본을 추출 시 에탄올 추출과 같은 용매 추출법이 더 효과적이다. 그 이유는 유용 물질인 puerarin이 물보다 에탄올에서 용해도가 높기 때문이다(Wang과 Cheng, 2005). 또한 Lee(2004)의 연구에 따르면 쑤 열수 추출물보다 에탄올 추출물이 간의 지질과 산화억제에 더 효과적이었다고 한다. 최근 쑤 이소플라본의 다양한 생리활성에 대한 관심이 증가하면서 에탄올을 이용한 쑤 이소플라본 추출물에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에서는 베트남 쑤의 성분 분석과 함께 전분이 다량 함유된 베트남 쑤의 특성을 고려하여 전분을 제거한 후 용매 추출하는 방법을 확립하였으며, 추출 용매인 에탄올의 농도와 온도, 그리고 추출 시간과 비율에 따른 추출량 변화를 분석하여 추출 조건을 개선하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 쑤은 베트남산 쑤(*Pueraria lobata*)이며, (주)세준에프앤비(Hongcheon, Korea)로부터 제공받았다. 이소플라본 분석을 위한 표준물질 및 분석 시약은 TCI(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 추출 용매인 에탄올은 Daejung(Siheung, Korea)에서 구입하였다.

추출 방법

분쇄한 베트남 쑤 10 g과 에탄올 70 mL를 비커에 첨가하

여 적절히 섞어준 후, 채반(700×500×70 mm)을 사용하여 섬유풀과 전분을 분리하였다. 가라앉은 에탄올 전분액은 centrifuge를 사용하여 에탄올과 전분을 분리하였다. 사용된 에탄올은 다시 섬유풀과 함께 1시간 동안 추출하고, 침전된 전분은 drying oven(50°C)에서 건조한 후 전분을 수거하였다. 에탄올 추출물은 HPLC로 정량, 정성 분석을 진행하였다.

HPLC 분석법 최적화

HPLC 분석법은 Yan 등(2005)의 방법을 변형하여 사용하였다. 쑤의 이소플라본을 에탄올로 추출한 후 원심분리하여 상등액을 syringe filter(0.45 µm)로 여과 후 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용한 HPLC는 UltiMate 3000 HPLC system과 UltiMate 3000 RS Variable wavelength Detector(254 nm, Dionex, Waltham, MA, USA)와 Triart C18 column(5.0 µm, 4.6 mm×150 mm; 25°C)으로 분석하였다. 이동상은 water(0.1% TFA)와 acetonitrile(0.1% TFA)을 사용하였으며, flow rate는 1.0 mL/min, injection volume은 10 µL로 하였다. 분석 프로그램은 Table 1과 같다. 유용 성분의 함량은 추출에 사용된 고형분 함량(g) 대비 용출, 추출된 성분의 양(mg)으로 표기하였다.

추출 용매 비율에 따른 puerarin 추출

분쇄한 베트남 쑤 10 g과 50% 에탄올 50, 70, 100 mL(w/v)를 250 mL 삼각플라스크에 각각 첨가하고 shaking incubator를 사용하여 150 rpm으로 교반해 주면서 50°C에서 1시간 동안 추출하였다. 추출액을 원심분리하여 상등액을 취한 후 에탄올로 5배 희석하여 HPLC로 정량 분석을 진행하였다.

Puerarin 추출 시간 개선

추출 용매 비율 실험결과를 바탕으로 베트남 쑤 10 g에 50% 에탄올 50 mL(w/v)를 250 mL 삼각 플라스크에 첨가하여 혼합 후 shaking incubator를 사용하여 150 rpm, 50°C에서 추출을 진행하였다. 총 12시간 동안 추출을 진행하면서 시간대별로 sampling하여 원심분리 후 상등액을 에탄올로 5배 희석하여 HPLC로 정량 분석하였다.

Table 1. HPLC analysis program

Time (min) ¹⁾	B (%) ²⁾
0.0	17.0
9.0	32.0
9.0	35.0
15.0	45.0
15.0	100.0
22.5	100.0
22.5	17.0
30.0	17.0

¹⁾The time of HPLC program.

²⁾The gradient elution of mobile phase B (%).

추출 용매 농도와 추출 온도 개선

추출 용매 비율 및 시간 실험결과를 바탕으로 베트남 쑤 10 g과 40, 45, 50, 70% 에탄올 50 mL(w/v)를 각각 250 mL 삼각 플라스크에 첨가하였다. 첨가 후 shaking incubator를 사용하여 40, 50, 60°C에서 각각 추출을 진행하였다. 추출 후 원심분리하여 상등액을 에탄올로 5배 희석하여 HPLC로 정량 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정 후 평균과 표준편차로 나타내었다. SPSS statistics 21 program(IBM, Chicago, IL, USA)을 사용하여 $P < 0.05$ 의 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

쑤 성분 분석

분쇄 쑤에서 이소플라본을 단시간에 효과적으로 분석할 수 있는 HPLC 분석법을 확립하였다(Table 1). 결과적으로

기존에 연구된 HPLC 분석 프로그램(Wang 등, 2015)보다 단시간에 puerarin을 포함한 다양한 이소플라본(daidzin, daidzein, genistin, genistein)이 효과적으로 빠짐없이 분석이 가능하였다(Fig. 1).

용매 비율에 따른 puerarin 추출량 변화

쑤 추출물의 총 이소플라본 및 puerarin을 최대로 추출하기 위해 추출 용매의 비율을 최적화하고자 하였다. 본 연구에서 에탄올로 추출 용매를 선정한 이유로는 puerarin이 난용성 성분으로서 물보다 에탄올 용해도가 높기 때문이었다(Wang과 Cheng, 2005). 또한, Bebrevska 등(2010)과 Kang 등(2005)의 연구에 따르면 쑤으로부터 이소플라본을 추출하는 용매 중 에탄올을 선정할 경우 산화 스트레스를 줄일 수 있다고 한다. 따라서 용매는 에탄올로 선정하였으며 용매의 비율 조건은 예비실험을 통해 sample을 구성하였다. 결과적으로 추출 용매(50% 에탄올)의 비율에 따라 추출되는 puerarin의 양에는 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2). 따라서 경제적 측면과 실험의 용이성에 따라 쑤 분말과 추출 용매의 비율은 1:5가 적합하다고 판단하였다.

Fig. 1. Isoflavone components analysis using HPLC. (a) The extraction of kudzu (*Pueraria lobata*), (b) puerarin, (c) daidzin, (d) genistin, (e) daidzein, (f) genistein.

Fig. 2. Effects of extraction solvent ratio. There was no significant difference in the amount of puerarin extracted depending on the ratio of the extraction solvent (50% EtOH).

추출 시간에 따른 puerarin 추출량 변화

추출 비율 실험결과를 바탕으로 칩 분말과 50% 에탄올을 1:5 비율로 고정하여 추출을 진행하였다. 12시간 동안 추출을 진행하였고 puerarin 함량은 시간대별로 sampling하여 HPLC로 분석하였다. Choi 등(2017)의 연구에서 추출 시간이 경과될수록 puerarin 함량이 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 추출 시간이 지날수록 puerarin 함량이 증가하였지만, 추출 30분 이후부터는 추출량이 일정하게 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 결과적으로 30분 이후에는 칩 분말에서의 puerarin이 대부분 추출되었음을 확인할 수 있었다. 하지만 추출 시 30분은 충분하지 못한 시간이라 판단하여 puerarin 추출 시간은 1시간으로 설정하였다.

추출 온도 및 용매 함량에 따른 puerarin 추출량 변화

비율과 시간 실험결과를 바탕으로 칩 분말과 에탄올을 1:5 비율로 추출하였으며, 1시간 동안 추출을 진행하였다.

Fig. 3. Effects of reaction time. Based on the ratio test results, extraction was performed in a ratio of kudzu powder and 50% EtOH 1:5.

Fig. 4. Effects of temperature and EtOH concentration. The ratio of kudzu powder was fixed at 1:5, and the concentration of EtOH and extraction temperature were changed to proceed with extraction. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

추출 시 에탄올 농도와 추출 온도를 다양화하였으며, 칩 전분의 호화 방지와 이소플라본의 구조적인 변형을 방지하기 위해 추출 최대 온도는 60°C 이하, 발효의 위험성과 경제성을 고려하여 에탄올 농도는 70% 이하로 sample을 구성하였다. 실제로 대두와 칩의 이소플라본은 주로 100°C 이상의 열처리 시에 구조적인 변형이 보고된 바 있다(Choi 등, 2008; Rostagno 등, 2004). 하지만 칩의 이소플라본인 puerarin 추출 시 Choi 등(2017)의 연구에서 온도가 높을수록 puerarin 함량이 높아지는 것이 보고된 바 있기 때문에 고온이 아닌 수준에서 온도가 높아질수록 puerarin이 더 많이 추출될 수 있다고 판단하였다. 또한, Park 등(1998)의 연구에 따르면 에탄올 추출물의 추출 수율은 에탄올 농도가 영향을 크게 미치는 것으로 밝혀졌다. 결과적으로 농도와 온도가 높을수록 더 많은 puerarin이 추출되는 것으로 나타났으며, 에탄올 농도 45%, 추출 온도 60°C에서 추출량은 12.7 mg/g으로 가장 많은 puerarin이 추출됨을 확인하였다(Fig. 4). Kim 등(2004)에 따르면 국내산 칩의 경우 채집 시기, 성장 정도에 따라서 puerarin 함량에 차이가 나타났다고 보고되어 있다. 이러한 국내산 칩과 베트남 칩을 비교해 보았을 때, 품질을 일정하게 유지할 수 있는 베트남 칩이 국내산 칩보다 제품화에 유리하다고 판단된다.

요 약

칩(*Pueraria lobata*)은 항암, 항당뇨, 골다공증 예방과 같은 다양한 생리활성을 나타내며 활성 물질은 이소플라본으로 알려져 있다. 그중 puerarin은 이소플라본의 주요 공급원으로 알려진 대두보다 칩에 더 많은 양이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 국산 칩의 대부분은 채집 칩으로 구성되어 있다. 채집 칩은 채집 시기마다 puerarin 함량에 차이

가 있기 때문에 상품화 과정에서 품질 유지가 어렵다. 반면 매년 재배되는 베트남 칩은 제품의 품질을 일정하게 유지할 수 있어 국내 칩보다 제품화에 더 적합하다. 따라서 본 연구에서는 베트남 칩에서 puerarin과 전분을 모두 추출하기 위한 조건을 설정하고 HPLC 분석 프로그램을 최적화하여 성분 분석을 수행하였다. 60°C에서 1시간 동안 45%(v/v)의 에탄올을 사용하여 추출한 후, 칩 추출물에서 12.7 mg/g의 puerarin을 추출하였다. 이 추출 방법은 칩에서 puerarin과 전분을 효과적으로 추출할 수 있는 방법이다.

감사의 글

본 연구는 논문은 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(2021R1A6A1A03044501)과 이공분야기초연구사업(2021R1A2C1006192)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bebrevska L, Foubert K, Hermans N, Chatterjee S, Van Marck E, De Meyer G, et al. *In vivo* antioxidative activity of a quantified *Pueraria lobata* root extract. *J Ethnopharmacol.* 2010. 127:112-117.
- Chen C, Li S, Hu C, Cal W, Fu Q, Li J, et al. Protective effects of puerarin on premature ovarian failure via regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway and oxidative stress. *Reprod Sci.* 2021a. 28:982-990.
- Chen F, Chen ZQ, Wang H, Zhu JJ. Puerarin pretreatment inhibits myocardial apoptosis and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction through the PI3K/Akt signaling pathway. *Adv Clin Exp Med.* 2021b. 30:255-261.
- Choi GH, Kim HJ, Park IJ, Kim BG, Kim HY, Jeong JH, et al. Antioxidative activity of roasted *Pueraria lobata* root extracts. *Korean J Food Preserv.* 2017. 24:440-445.
- Choi SW, Kim KS, Hur NY, Ahn SC, Park CS, Kim BY, et al. Effect of heat processing on thermal stability of kudzu (*Pueraria thumbergiana bentham*) root isoflavones. *J Life Sci.* 2008. 18:1447-1454.
- Choo MK, Park EK, Yoon HK, Kim DH. Antithrombotic and antiallergic activities of daidzein, a metabolite of puerarin and daidzin produced by human intestinal microflora. *Biol Pharm Bull.* 2002. 25:1328-1332.
- Du XF, Xu SY, Wang Z. The morphology and characterization of starch from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Int J Food Sci Technol.* 2002. 37:697-701.
- Kang KA, Chae S, Koh YS, Kim JS, Lee JH, You HJ, et al. Protective effect of *Puerariae* radix on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and streptozotocin. *Biol Pharm Bull.* 2005. 28:1154-1160.
- Kim DK, Jang DS, Kim JS, Kim JH. Genetic variations and phylogenetic relationship of and *Pueraria lobata* Ohwi (Fabaceae) and related taxa by RAPD makers. *Korean J Plant Res.* 2009. 22:446-453.
- Kim HY, Hong JH, Kim DS, Kang KJ, Han SB, Lee EJ, et al. Isoflavone content and estrogen activity in arrowroot *Puerariae* Radix. *Food Sci Biotechnol.* 2003. 12:29-35.
- Kim SJ, Park C, Kim HG, Shin WC, Choe SY. A study on the estrogenicity of Korean arrowroot (*Pueraria thunbergiana*). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004. 33:16-21.
- Kuhm H, Lim JH, Lee EJ, Chang KS. Rheological properties of gamma irradiated arrowroot (*Pueraria thunbergiana*. B) starch. *Korean J Food Sci Technol.* 2004. 36:740-743.
- Kwon YR, Nam S, Jeong DS, Kwon RE, Youn KS. Quality characteristics of *Pueraria thunbergiana* extracts depending on drying methods. *Korean J Food Preserv.* 2016. 23:654-659.
- Lee O. Effects of supplementation of *Puerariae* Radix ethanol extract on the antioxidative defense system in rats. *J Nutr Health.* 2004. 37:872-880.
- Liu J, Zhang J, Liao T, Zhou L, Zou L, Liu Y, et al. Thermal inactivation kinetics of kudzu (*Pueraria lobata*) polyphenol oxidase and the influence of food constituents. *Foods.* 2021. 10:1320. <https://doi.org/10.3390/foods10061320>
- Park NY, Lee GD, Jeong YJ, Kwon JH. Optimization of extraction conditions for physicochemical properties of ethanol extracts from *Chrysanthemum boreale*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1998. 27:585-590.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Anal Chim Acta.* 2004. 522:169-177.
- Van Hung P, Morita N. Chemical compositions, fine structure and physicochemical properties of kudzu (*Pueraria lobata*) starches from different regions. *Food Chem.* 2007. 105:749-755.
- Wang H, Murphy PA. Isoflavone composition of american and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem.* 1994. 42:1674-1677.
- Wang LH, Cheng YY. Solubility of puerarin in water, ethanol, and acetone from (288.2 to 328.2) K. *J Chem Eng Data.* 2005. 50:1375-1376.
- Wang P, Zhang H, Yang H, Nie L, Zang H. Rapid determination of major bioactive isoflavonoid compounds during the extraction process of kudzu (*Pueraria lobata*) by near-infrared transmission spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015. 137:1403-1408.
- Wu K, Liang T, Duan X, Xu L, Zhang K, Li R. Anti-diabetic effects of puerarin, isolated from *Pueraria lobata* (Willd.), on streptozotocin-diabetogenic mice through promoting insulin expression and ameliorating metabolic function. *Food Chem Toxicol.* 2013. 60:341-347.
- Yan B, Xing D, Ding Y, Tao J, Du LJ. HPLC method for the determination and pharmacokinetic studies on puerarin in cerebral ischemia reperfusion rat plasma after intravenous administration of *Puerariae* radix isoflavone. *J Pharm Biomed Anal.* 2005. 37:297-301.
- Zeng XP, Zeng JH, Lin X, Ni YH, Jiang CS, et al. Puerarin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis via inhibition of MAPK signaling pathway. *Front Pharmacol.* 2021. 12: 686992. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.686992>
- Zhou YX, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects. *Phytother Res.* 2014. 28:961-975.