

## 일반메밀과 쓴메밀의 식초 추출물의 알코올 대사 및 숙취개선 효능 평가

김수정<sup>1†</sup>, 손황배<sup>2†</sup>, 박아현<sup>3</sup>, 이종남<sup>4</sup>, 박수형<sup>4</sup>, 남정환<sup>1</sup>, 김도연<sup>1</sup>, 장동철<sup>5</sup>, 김윤희<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구소, 농업연구사, <sup>4</sup>농업연구관, <sup>2</sup>농촌진흥청 기술협력국 수출농업지원과, 농업연구사,  
<sup>3</sup>(주)동남의화학연구원, 연구원, <sup>5</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 기획조정과, 농업연구관,  
<sup>6</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 재배환경과, 농업연구관

### Evaluation of the Effects of Hangover-Releasing Agent Containing Vinegar Extract in Common Buckwheat and Tartary Buckwheat on Alcohol Metabolism and Hangover Improvement

Su Jeong Kim<sup>1†</sup>, Hwang Bae Sohn<sup>2†</sup>, A Hyun Park<sup>3</sup>, Jong Nam Lee<sup>4</sup>, Su Hyoung Park<sup>4</sup>,  
Jung Hwan Nam<sup>1</sup>, Do Yeon Kim<sup>1</sup>, Dong Chil Chang<sup>5</sup> and Yul Ho Kim<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Researcher and <sup>4</sup>Senior Researcher, Highland Agriculture Research Institute, National Institute of Crop Science,  
Rural Development Administration, Pyeongchang 25342, Korea

<sup>2</sup>Researcher, Technology Cooperation Bureau, Rural Development Administration, Jeonju 54875, Korea

<sup>3</sup>Researcher, Efficacy research team, Southeast Medi-Chem Institute Co., Ltd, Busan 48308, Korea

<sup>5</sup>Senior Researcher, Planning & Coordination Division, National Institute of Crop Science, Rural Development  
Administration, Wanju 55365, Korea

<sup>6</sup>Senior Researcher, Crop Cultivation and Environment Research Division, National Institute of Crop Science,  
Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea

**Abstract** - The aim of this study was to explore the effects of vinegar extract from seed of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and seed of tartary buckwheat (*F. tataricum* Gaertner) on acute ethanol-induced hangover in Sprague-Dawley rats. Vinegar extract from buckwheat is rich choline, quercetin and its glycoside, rutin known as flavonoid antioxidants. The test extract containing buckwheat was proven to alleviate hangovers through a significant reduction in the concentration of alcohol and acetaldehyde in the context of an alcohol-induced hangover model. Hepatic alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activities were significantly higher in buckwheat vinegar-treated rats than in ethanol-treated rats. Moreover, tartary buckwheat vinegar upregulated antioxidant enzyme such as superoxide dismutase and Catalase activities in liver tissues. These results suggest that buckwheat vinegar extract could alleviate ethanol-induced hangover symptoms by elevating activities related to hepatic ethanol-metabolizing enzymes against ethanol induced metabolites, and in particular, tartary buckwheat should be further developed to be a novel anti-hangover material.

**Key words** – Alcohol metabolism, Buckwheat, Choline, Hangover, Rutin

\*교신저자: E-mail kimyuh77@korea.kr

Tel. +82-31-695-0658

† These authors contributed equally to this work.

## 서 언

알코올 소비는 스트레스 해소나 사고 등의 수단으로 현대사회에서 매우 일반적 현상이다(Seitz *et al.*, 2018). 그러나, 과음은 메스꺼움, 구토, 현기증, 무기력, 두통, 근육통 등을 동반하여 위장질환 및 생체리듬을 방해하고 인지기능을 저하시킬 뿐만 아니라 간경화, 간암 등의 알코올성 질환을 유발할 수 있다(Swift and Davidson, 1998; Woo *et al.*, 2021).

숙취의 주원인인 아세트알데하이드(acetaldehyde)는 술이 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)에 의해 분해되는 과정에서 생성되는 중간대사 산물이므로(Lee *et al.*, 2019) 혈중 알코올 농도를 최대한 빨리 낮추는 것이 간 손상의 완화와 숙취해소에 효과적이다(Liu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2011).

숙취 증상을 완화시키기 위해 천연물을 활용한 식·약 소재가 다양하게 개발되었다. 대표적인 천연물 소재로는 헛개나무(Kim *et al.*, 2006), 갈근(Lee *et al.*, 2001), 콩나물(Kim *et al.*, 2014) 등이 있다. 헛개나무의 flavonol 성분 중 hovenodulinol(Kim *et al.*, 2006), 갈근의 iso-flavone 성분 중 puerarin(Oh *et al.*, 1990), 콩나물의 asparagine(Park, 1994)과 같은 유용물질이 인체내 ADH와 아세트알데하이드 탈수소효소(Acetaldehyde Dehydrogenase, ALDH)에 작용하여 숙취해소에 도움이 되는 것으로 보고되고 있다(Choi and Jung, 2016).

메밀은 건강 식품으로서(Kim *et al.*, 2022a) 해열 및 소화 작용(Kim and Kim, 2018), 항균 작용(Hwang *et al.*, 2006), 동맥경화 예방(Marshall *et al.*, 1982), 항산화 및 항염 작용(Kim *et al.*, 2019), 항당뇨 작용(Kim *et al.*, 2022b) 등 다양한 생리활성이 보고되어 왔다. 특히, 메밀에 많이 함유된 콜린(choline)은 아세틸콜린, 인지질, 베타인, 혈소판 활성화 요소의 전구체로서 간 기능 개선, 두뇌 발달, 신경 기능 및 신진대사 유지, 해독 작용의 효능이 있다(Horiuchi *et al.*, 2003). 메밀의 주요 기능성분인 루틴 또한 강력한 항산화 효과가 있어 간세포 보호 등에 콜린 성분과 시너지 효과를 줌으로써(Kim and Kim, 2018) 알코올 해독과 숙취해소에 효과를 나타낸다(An *et al.*, 2017).

또한, 신맛과 특유의 향을 가진 천연물질을 함유한 식초추출물이 알코올 대사 개선이나 숙취해소에 효과가 있다는 연구결과(Jeong *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999)가 보고되었으며, 이를 활용한 다양한 숙취해소 음료가 개발되고 있는 추세이다(Cho *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2012).

본 연구에서는 메밀의 식초추출물을 *in vivo* 조건에서 숙취 유발 동물모델에 식이하고 에탄올 투여 후 시간 경과에 따른 알

코올 대사, 혈중 알코올 농도, 아세트알데하이드 변화를 조사하여 숙취 개선 효과를 검토하였다. 또한, 숙취와 관련된 알코올 분해능의 변화를 추적할 수 있는 ADH와 ALDH 효소 활성을 측정하여 메밀 종류별로 숙취개선 효능을 비교하고 활용 가능성을 검토 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에는 농촌진흥청 국립식량과학원에서 육성한 일반메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench)인 ‘양절메밀(Yangjul-memil)’과 쓴메밀(*Fagopyrum tataricum* Gaertner)인 ‘황금미소(Hwangguem-miso)’ 2품종을 강원도 평창군 대관령면(북위 37.40°, 동경 128.45°, 750 m)에 위치한 시험포장에 재배하여 수확한 종실을 실험재료로 사용하였다.

메밀 종실을 120분간 물에 불린 후 약 100°C 압력솥에서 30분간 쪄낸 다음 건조기에서 40±2°C 조건으로 3일간 건조(수분함량 13.5%)시켰다. 시료 중량 기준으로 식초(오뚜기 현미식초 원액, 산도 6%)를 10배 첨가하여 14일간 상온(20–25°C)에서 추출한 후 여과기로 침전물을 제거하여 식초 추출물을 제조하였다. 이 추출물은 산도가 강해 실험동물의 경구투여를 위해 생수로 2배 희석하여 사용하였다(Fig. 1).

### 루틴, 퀘세틴 및 콜린 분석

수확한 메밀 종실을 -70°C의 초저온냉동고(deep freezer, Ilsin BioBase Co. Ltd., Yangju, Korea)에 24시간 보관한 후 동결건조기(Freeze dryer, Iksan BioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에서 96시간 건조하여 분석에 사용하였다. 또한, 실험동물에 경구투여를 위해 메밀 식초 추출물을 사용하였다. 메밀의 루틴 분석은 Kim *et al.* (2017)의 방법에 따랐다. UV 검출기가 장착된 UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph, Acquity UPLC I-Class, Waters Corporation, Milford, MA, USA) 기기에 분석 컬럼(Acquity UPLC CSH C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm particle size, Waters Corporation, Milford, MA, USA)을 장착하여 온도는 30°C, 검출 파장(detection wavelength)은 259 nm로 시료 주입량은 1 μL로 설정하였다. 이동상으로 용매 A (1% Formic acid in water, v/v)와 용매 B (0.1% Formic acid in acetonitrile, v/v)를 사용하여 유속 0.25 mL/min으로 흘려주었다. 용매 이송은 구배(gradient) 방식으로, 용매 B를 7%의 농도로 처음 시작하여 2분에서 11분까지 17%로 증가시킨 후 11

분에서 13분까지 25%로 다시 증가시킨 다음 19분까지 그 농도로 유지하였다. 이후 용매 B를 19분에서 21분까지 25%에서 7%로 감소시킨 후 23분까지 2분동안 7%의 농도로 안정화하였다. 루틴(rutin, Extrasynthese, Genay, France)과 퀘세틴(querctetin, Extrasynthese, Genay, France)의 표준물질을 사용하여 검량선을 작성하고 각 시료의 함량을 산출하였다.

메밀의 콜린 함량은 Phillips (2012)의 방법에 따라 MS/MS (Triple quad 4500, AB SCIEX, Framingham, MA, USA)를 장착한 LC (Liquid Chromatograph, 1260 Infinity II LC, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 기기에 분석 칼럼(InfinityLab poroshell 120 hilic column, 2.1x150 mm, 2.7 micron, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 장착하여 30°C 온도로 설정하여 분석하였다. 이동상으로 용매 A (10 mM ammonium formate in 0.2% formic acid, w/v)와 용매 B (100% acetonitrile)를 사용하여 유속 0.4 mL/min으로 흘려주었다. 용매 이송은 gradient 방식으로, 용매 A를 10%의 농도로 처음 시작하여 8분까지 90%로 증가시킨 후 8.1분에서 다시 10%로 감소시킨 다음 13분까지 그 농도로 유지하였다. 표준물질로 순도 99%의 콜린 클로라이드(choline chloride, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)와 콜린 클로라이드-D9 (choline chloride trimethyl-D9, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)을 사용하여 검량선을 작성한 다음 각 시료의 콜린 함량을 산출하였다.

### 실험동물 및 사육조건

실험동물로 5주령의 수컷 랫드(Sprague Dawley Rat, Hanabio tech, Seongnam, Korea)를 구입하여 적절한 생육환경인 온도 21±2°C, 습도 50±10% 조건에서 12시간 주기의 명암에 충분히 적응시킨 다음 실험에 착수하였다(Fig. 1). 실험 진행 전에 각 개체의 체중을 측정하여 각 군간 평균 체중이 균일하도록 실험군을 설정하여 진행하였다. 순화 및 실험 기간 중 실험동물에 AIN-93G 식이(1314 forti diet, Altromin, 32791 Lage, Germany)를 공급하였고, 식이와 음수는 실험동물이 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험 처리는 정상군(Normal, NOR), alcohol 대조군(Alcohol control, CON), 일반메밀군(Seed of Common Buckwheat, SCB), 쓴메밀군(Seed of Tartary Buckwheat, STB)으로 총4군(군당 5마리)으로 구분하여 수행하였다. 정상군을 제외한 나머지 실험군(대조군, 일반메밀군, 쓴메밀군)은 숙취 유도를 위해 랫드에 3 g/kg 농도의 에탄올을 10 mL/kg (body weight) 용량으로 경구투여하였다. 정상군(NOR)은 현미 식초만을, 대조군(CON)은 현미식초+알코올, 일반메밀식초군(SCB)은 일반메밀식초+알코올, 쓴메밀식초군(STB)은 쓴메밀식초+알코올을 투여하였다.

실험 종료 후 모든 실험동물을 CO<sub>2</sub>로 안락사시킨 다음 개복하여 복부대동맥에서 채혈하였다. 채혈 후 육안으로 실험동물의 간, 비장, 신장에 대해 외관상 병변을 검사하고 장기의 무게를 측정하였다(Table 1). 실험동물의 내부 장기를 육안으로 관찰한 결과 간, 비장, 신장 등 주요 장기에 외관상 어떤 병변도

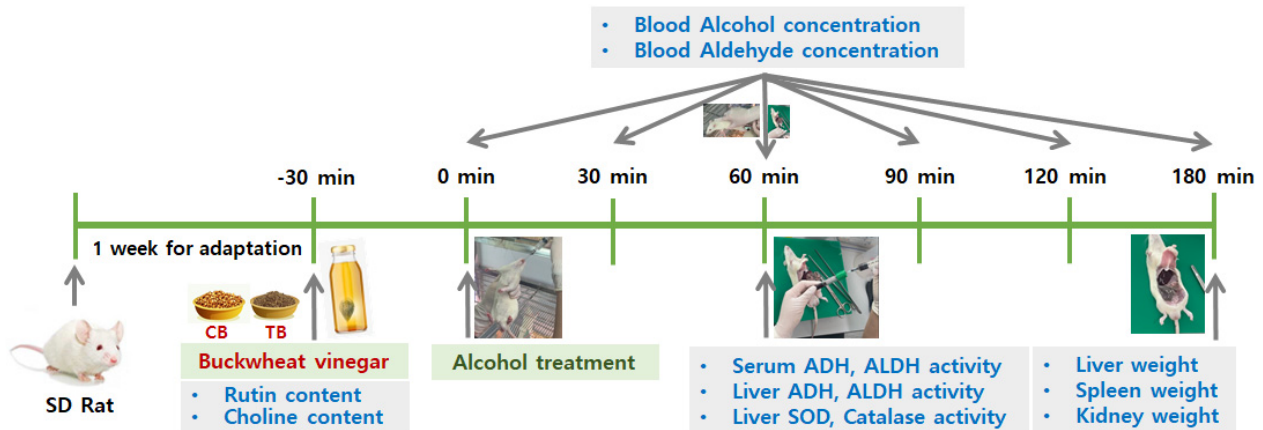


Fig. 1. Scheme for buckwheat vinegar treatment of hangover mice in experiment. Sprague Dawley (SD) rats were divided into 4 groups: NOR, CON, SCB and STB. NOR, Normal mice fed with vinegar extract group; CON, Alcohol induced hangover mice fed with vinegar extract group; SCB, Alcohol induced hangover mice fed with seed of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with vinegar extract group; STB, Alcohol induced hangover mice fed with seed of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) with vinegar extract group.

Table 1. Tissue weight of liver, spleen, kidney in EtOH-induced mice fed with vinegar extract from common and tartary buckwheat seed

Tissue <sup>z</sup>	Liver weight (g)	Spleen weight(g)	Kidney weight (g)
NOR	7.273±0.336 <sup>y</sup> n.s.	0.425±0.018 <sup>n.s.</sup>	1.809±0.032 <sup>n.s.</sup>
CON	7.701±0.215	0.483±0.028	1.972±0.022
SCB	7.304±0.530	0.557±0.073	1.797±0.141
STB	7.418±0.142	0.541±0.013	1.893±0.052

<sup>z</sup>Sprague Dawley (SD) rats were divided into 4 groups: NOR, CON, SCB and STB. NOR, Normal mice fed with vinegar extract group; CON, Alcohol induced hangover mice fed with vinegar extract group; SCB, Alcohol induced hangover mice fed with seed of common buckwheat with vinegar extract group; STB, Alcohol induced hangover mice fed with seed of tartary buckwheat with vinegar extract group.

<sup>y</sup>Data shown are the mean±SD (n=5). The variables in four treatment including two buckwheat materials expressed no significant (n.s.) in tissue weight.

발견되지 않았으며, 장기 무게 측정 결과에서도 모든 실험군의 주요 장기에서 유의적인 무게 차이가 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에 영향을 줄만한 실험동물 요인은 없었으며, 정상적인 실험이 수행된 것으로 판단되었다. 모든 동물 실험 과정은 동남 의화학연구원 동물실험윤리 위원회(SEMI Institutional Animal Care and Use committee)의 승인을 받은 후 진행되었다(승인 번호: SEMI-21-008).

**혈중 알코올(Alcohol) 및 아세트알데하이드(Acetaldehyde) 함량**

혈중 알코올 및 아세트알데하이드 정량을 위해 랫드를 4개군으로 나누어 식초추출물(정상군, 대조군, 일반메밀군, 쓴메밀군)을 10 mL/kg (body weight) 용량으로 1회 경구투여하고, 30분 후 정상군을 제외한 3개군(대조군, 일반메밀군, 쓴메밀군)에 에탄올을 10 mL/kg (body weight) 용량으로 동일한 방법으로 1회 경구투여하였다. 에탄올 투여 전과 투여 30, 60, 90, 120, 180분 후에 꼬리에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 30분간 보관한 후 원심분리(3,500 rpm, 15분)하여 혈청을 분리한 다음, 일부는 시간별 혈중 알코올 농도 측정에, 나머지는 아세트알데하이드 농도 측정에 사용하였다. 혈중 에탄올의 정량은 alcohol assay kit (colorimetric, STA-620, Cell Bio labs, INC., San Diego, CA, USA)를 사용하여 따라 측정하였다. 분리된 혈청 10 μL에 증류수 87 μL, 10X assay buffer 10 μL, 100X enzyme mixture 1 μL, 50X colorimetric probe 2 μL를 혼합하여 37°C 암실에서 30분간 배양 후 570 nm에서 흡광도(SPECTRA max M2, Molecular Devices, San Jose, Ca, USA)를 측정하였다. 혈중 아세트알데하이드의 농도는 aldehyde quantification assay kit

(colorimetric, ab112113, abcam, Boston, MA, USA)를 사용하여 Abcam사의 protocol에 따라 측정하였다. 분리된 혈청 10 μL에 diluent buffer 40 μL와 yellow indicator (in assay buffer) 50 μL를 혼합하여 상온에서 30-60분간 배양한 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시간별로 농도 변화를 그래프로 나타내어 혈중 농도-시간 곡선하 면적(Area Under the Curve, AUC)을 구하였다. 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 정량은 표준물질을 이용하여 검량선을 작성한 후 농도를 산출하였다.

**혈액과 간조직의 Alcohol Dehydrogenase (ADH) 및 Acetaldehyde Dehydrogenase (ALDH) 활성 측정**

혈액과 간조직의 ADH 및 ALDH 활성은 *in vivo*에서 ADH kit (Alcohol dehydrogenase assay kit, KA3785, Abnova, Taiwan)와 ALDH kit (ALDH activity assay kit, ab155893, abcam, USA)를 사용하여 측정하였다. 시간별로 혈중 알코올의 농도 변화를 확인하여 혈중 알코올의 농도가 최고치인 시간인 알코올 투여 60분에 실험동물을 안락사시켜 복부대동맥에서 채혈 후 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액을 혈청분리관에 담아 30분간 실온에서 반응한 후 3,500 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 -20°C에 보관하고, ADH와 ALDH 측정에 사용하였다. 부검 시 적출한 간 조직은 무게 측정 즉시 -20°C에 동결 보관하였다가 각 분석 항목별 용액에 분쇄하여 상층액을 분석에 사용하였다. ADH 분석용 간 조직은 생리식염수에 조직과 생리식염수의 비율을 1:4로 하여 분쇄 후 4°C, 10,000 rpm 15분간 원심분리하여 사용하였다. 분쇄한 효소 상층액 20 μL을 2개의 well에 각각 분주 후 한 well에는 working reagent (substrate 5 μL, MTT solution 14 μL, NAD solution 9 μL, Diaphorase 1 μL,

assay buffer 55  $\mu$ L)를 80  $\mu$ L 분주하였고, 나머지 well에는 blank working reagent (MTT solution 14  $\mu$ L, NAD solution 9  $\mu$ L, Diaphorase 1  $\mu$ L, assay buffer 60  $\mu$ L)를 80  $\mu$ L 분주 후 잘 혼합하였다. Microplate reader를 이용하여 565 nm에서 흡광도 측정 후 30분 뒤 한번 더 측정하였다. ALDH 분석용 간 조직은 키트 내 구성품인 assay buffer를 이용하여 조직과 assay buffer의 비율을 1 : 4(w : v)로 하여 분쇄 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 사용하였다. 상층액 25  $\mu$ L에 assay buffer를 25  $\mu$ L 넣고 reaction mix를 50  $\mu$ L 분주 후 잘 혼합하여 실온에서 5분 반응시킨 후 흡광도를 450 nm에서 측정하였고, 30분 후에 흡광도를 다시 측정하여 ALDH 효소 활성을 평가하였다.

**간 조직의 Superoxide Dismutase (SOD) 및 Catalase 측정**

정상군과 실험군(대조군, 일반메밀군, 쓴메밀군)의 간 조직을 신속히 분리하여 Beauchamp and Fridovich (1971) 방법으로 알코올 투여 60분 후 SOD와 Catalase의 활성 변화를 측정하였다. 이를 위해 랫드 Superoxide Dismutase (SOD) ELISA Kit (MBS2707324, Mybio-source, San Diego, CA, USA)와 랫드 Catalase ELISA Kit (MBS726781, Mybio-source, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

SOD 분석을 위해 인산완충용액 (0.01 mol/L Phosphate-buffered Saline, PBS)에 간 조직과 PBS의 비율을 1:20으로 혼합하여 분쇄 후 10,000 x g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 이용하였다. 상층액 100  $\mu$ L를 37°C에서 1시간 배양한 다음 detection reagent A를 100  $\mu$ L 추가 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 그 다음 세척 후 detection reagent B를 100  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 30분 추가 배양 및 세척 후 각 well에 substrate solution을 90  $\mu$ L 넣었다. 암상태로 37°C에서 10-20분 배양 후 stop solution 50  $\mu$ L를 넣고 혼합 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Catalase 분석을 위해 인산완충용액 (0.02 mol/L PBS)에 간 조직과 PBS의 비율을 1:1(w/v)로 하여 분쇄 후 1,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리 후 실험에 이용하였다. 상층액 100  $\mu$ L에 balance solution 10  $\mu$ L 추가 후 conjugate를 50  $\mu$ L 넣고 잘 혼합하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 세척 후 substrate A와 B를 각 50  $\mu$ L씩 넣고 37°C에서 15-20분간 배양 후 stop solution을 50  $\mu$ L 넣고 혼합 한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계분석**

메밀식초 종류별 숙취해소 효과에 대한 데이터는 평균값과 표준편차로 표시하였으며, ANOVA test (SAS Statistics ver. 9.4) 실시 후,  $p < 0.05$  수준에서 Fisher's PLSD 방법으로 사후 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**메밀의 루틴, 퀘세틴 및 콜린 함량**

메밀 종실과 식초추출물의 루틴, 퀘세틴, 콜린 함량은 Table 2에 나타내었다. 쓴메밀 종실의 루틴 함량은 1,578.6 mg/100 g으로 일반메밀 종실보다 55배 높았으며, 퀘세틴 함량은 18.1 mg/100 g로 1.5배 높았다. 쓴메밀 식초추출물의 루틴 함량은 117.9 mg/100 g으로 일반메밀 식초추출물보다 19배 높았다(Table 2; Fig. 2). 쓴메밀 식초추출물에서 콜린 함량은 6.2 mg/100 g으로 나타나 쓴메밀 종실(3.4 mg/100 g) 및 일반메밀 식초추출물(5.9 mg/100 g)보다 통계적으로 유의미하게 높았다(Table 2; Fig. 3)

메밀의 대표적인 기능성 물질인 루틴은 플라보노이드 성분 중 하나로, 미국 건강보조식품 목록에 포함되어 있으며(Gullón *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2022a), 항염, 항산화, 항암, 항바이러

Table 2. Rutin, quercetin and choline contents in fresh seed and vinegar extract from common buckwheat and tartary buckwheat

Material <sup>z</sup>	Rutin (mg/100 g)	Quercetin (mg/100 g)	Choline (mg/100 g)
FCB	28.8±1.0 <sup>y***</sup>	12.4±0.33 <sup>***</sup>	3.5±0.01 <sup>***</sup>
FTB	1,578.6±2.2	18.1±0.61	3.4±0.01
SCB	6.2±0.1	1.1±0.03	5.9±0.04
STB	117.9±0.1	1.8±0.01	6.2±0.01

<sup>z</sup>Material was cultivated in Deagwallyeong, Pyeongchang. FCB or FTB, fresh seed of common or tartary buckwheat treated group; SCB or STB, seed of common or tartary buckwheat with vinegar extract group.

<sup>y</sup>Data shown are the mean±SD (n=6). The variables in four treatment including two buckwheat materials expressed.

<sup>\*\*\*</sup>significant at  $p < 0.001$ .

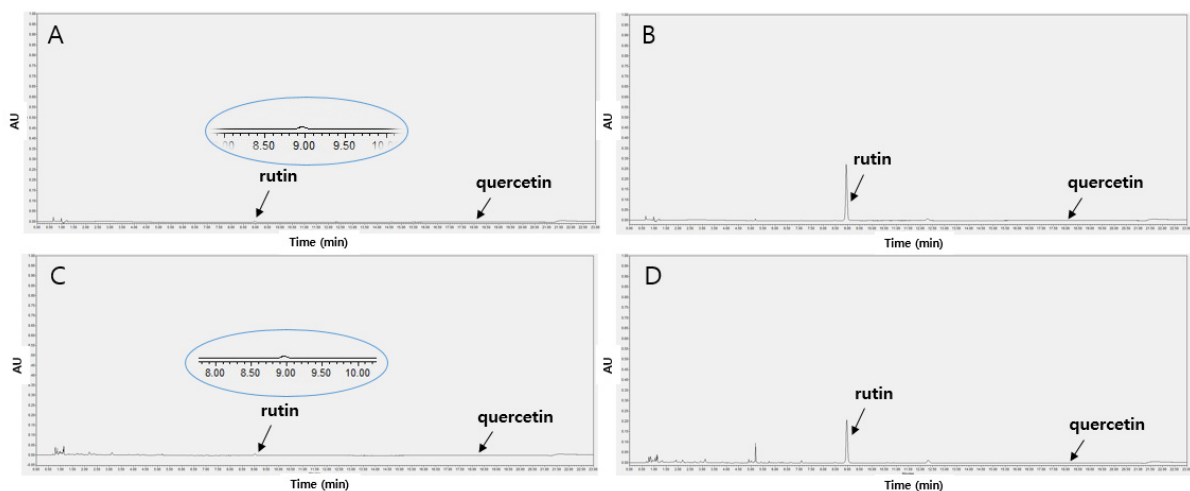


Fig. 2. UPLC analysis of rutin and quercetin contents in fresh seed and vinegar extract from common buckwheat and tartary buckwheat. A, fresh seed of common buckwheat; B, fresh seed of tartary buckwheat; C, vinegar extract of common buckwheat; D, vinegar extract of tartary buckwheat. All chromatograms passed through spectrofluorometric detector at 259 nm. Retention time of all chromatograms were as follows: (1), Rutin (9.022 min); and (2) quercetin (18.039 min).

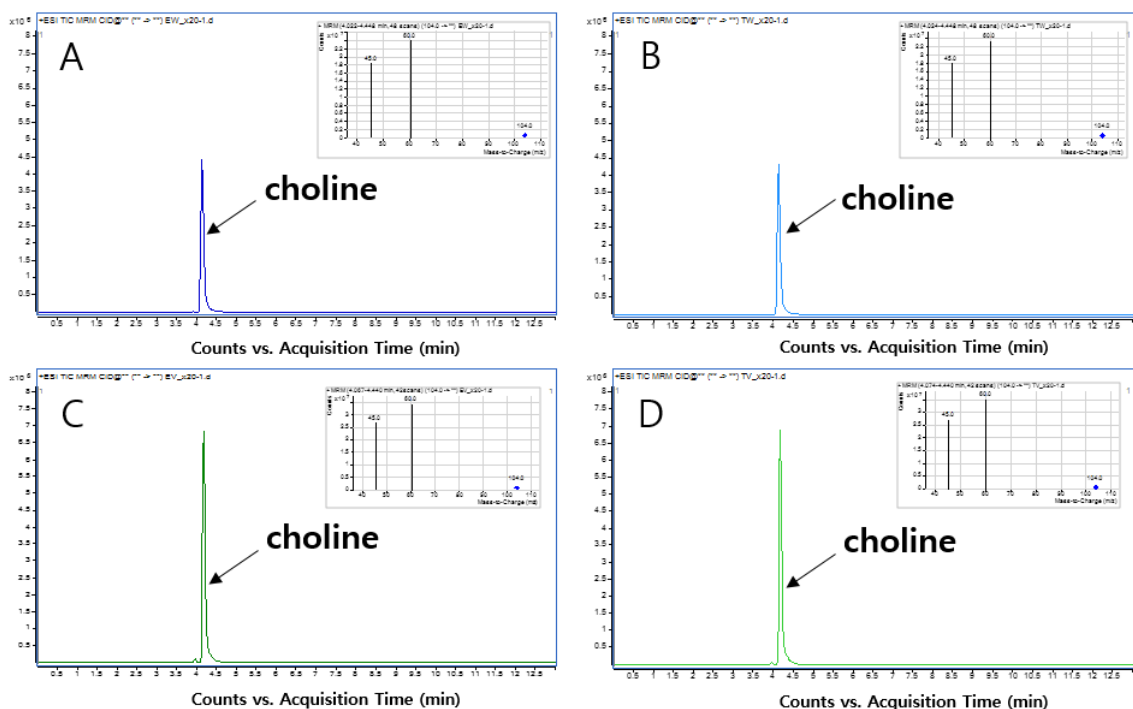


Fig. 3. HPLC-MS chromatogram of choline from the fresh seed and vinegar extract from common buckwheat and tartary buckwheat. A, fresh seed of common buckwheat; B, fresh seed of tartary buckwheat, C, vinegar extract of common buckwheat; D, vinegar extract of tartary buckwheat. Retention time of all chromatograms were as follows: (1), choline (4.155 min); and (2) Choline-d9 (4.159 min).

스 및 간 보호 효과 등 광범위한 생체활성 기능이 확인되어 일반 의약품 영양보조제로 많이 사용되고 있다(Ganeshpurkar and Saluja, 2017). 또한 루틴의 활성은 강력한 항산화능에서 기인

하며(Gullón *et al.*, 2017), 혈중 알코올 농도를 유의하게 감소 시키고, ADH, ALDH, superoxide dismutase (SOD) 및 Catalase 등 효소 활성에 관여하여 알코올 독성으로부터 간을 보호 하는



효과가 있다고 보고되었다(Song *et al.*, 2014).

콜린은 세포막에서 인지질의 합성, 메틸 대사, 콜린성 신경전달 등에 작용하는 중요한 성분으로 1998년 미국식품영양위원회 의학 연구소에서 필수 영양소로 지정되었다(Zeisel and Blusztajn, 1994). 이러한 루틴과 콜린 성분을 함유한 메밀 식초추출물이 숙취해소와 관련성이 있으리라 판단된다.

### 혈중 알코올(Alcohol) 및 아세트알데하이드(Acetaldehyde) 함량

메밀의 알코올 분해 효과를 비교하기 위하여 알코올을 섭취한 랫드에 메밀 식초추출물을 투여해 혈중 알코올과 아세트알데하이드의 농도를 시간대별로 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

실험시작전 정상군(NOR)의 혈중 알코올 농도는 221  $\mu\text{M}$ 로 나머지 실험군인 대조군(CON), 일반메밀군(SCB), 쓴메밀군(STB)의 218–234  $\mu\text{M}$ 과 비슷하였다. 그러나, 알코올 투여 이후 실험군의 혈중 알코올이 상승하여 60분에 최대치에 도달하였다(Fig. 4A). 그러나, 혈중 알코올 농도는 대조군(CON) 2,006  $\mu\text{M}$ 에 비해 일반메밀군(SCB)에서 12.5%, 쓴메밀군(STB)에서 16.5%로 떨어졌다. 또한, 혈중 알코올 농도-시간 곡선하면적(AUC) 값도 대조군(211,360)에 비해 일반메밀군에서 11.5%, 쓴메밀군에서 36.0%로 유의적으로 감소하였다(Fig. 4B).

혈중 아세트알데하이드 농도는 대조군에서는 시간이 경과할수록 증가하였으나, 일반메밀군은 120분(13.57  $\mu\text{M}$ )에 최고치에 도달한 후 감소하였고, 쓴메밀군의 경우 90분(14.14  $\mu\text{M}$ )에 최고치에 도달한 후 감소하였다(Fig. 4C).

일반적으로 알코올의 90%는 간에서 대사과정을 거치는데

(Lieber, 1992), 이때 세포질의 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH), 소포체의 CYP2E1 (cytochrome P4502E1), 퍼옥시좀의 Catalase에 의해 알코올은 아세트알데하이드로 산화된 후 미토콘드리아로 이동하여, 비특이적인 아세트알데하이드 탈수소효소(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)에 의해 초산(acetic acid,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ )으로 산화되어 최종  $\text{H}_2\text{O}$ 와 이산화탄소( $\text{CO}_2$ ) 등으로 배출된다(Kee *et al.*, 2003). 이 때 알코올을 과량 섭취시 체내 독성이 강한 아세트알데하이드가 축적되어 숙취증상과 함께 간세포를 손상시킨다(Lieber, 1992). 숙취가 해소될수록 아세트알데하이드 농도는 낮아졌다고 하였다(Cha *et al.*, 2009).

Na *et al.* (2018)은 황칠나무 처리군이 알코올만 섭취시킨 대조군에 비해 혈중 알코올 농도가 17% 낮았다고 보고하였는데, 본 연구에서도 메밀 식초추출물을 투여한 실험군에서 혈중 알코올과 아세트알데하이드 농도가 모두 현저히 감소되어 숙취해소에 효과가 인정되었다. 특히 일반메밀군보다 쓴메밀군에서 더욱 효과적인 것으로 판단되었다.

### 혈액과 간조직의 ADH 및 ALDH 활성 측정

메밀이 알코올 대사에 미치는 영향을 비교하기 위해 알코올을 섭취한 랫드에 2종의 메밀 식초추출물을 투여한 후 혈액과 간 조직의 ADH와 ALDH 효소를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 혈중 ADH 효소 활성은 대조군(1.305 U/L)보다 일반메밀군(2.037 U/L)과 쓴메밀군(2.559 U/L)에서 각각 56%, 96% 증가하였다(Fig. 5A). 간 조직의 ADH 효소 활성도 대조군(0.722 U/L)보다 일반메밀군(2.316 U/L)과 쓴메밀군(2.508 U/L)에서

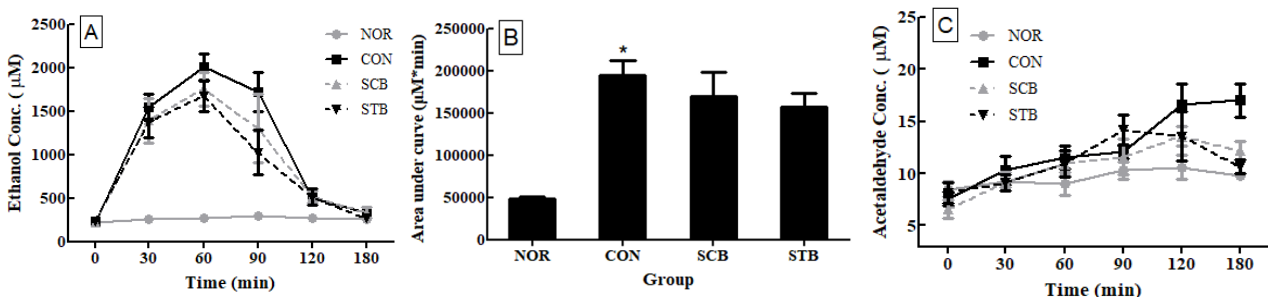


Fig. 4. Changes in blood alcohol (A), Area under curve (AUC) (B) and acetaldehyde (C) level in alcohol-induced hangover mice model fed with vinegar extract from common and tartary buckwheat seed. NOR (●), Normal mice group with vinegar extract; CON (■), Alcohol-induced hangover mice group with vinegar extract; SCB (▲), Alcohol induced hangover mice fed with seed of common buckwheat with vinegar extract; STB (▼), seed of tartary buckwheat treated group. Values are expressed Mean $\pm$ SE on groups of five experiments. Data shown are the mean $\pm$ SD (n=5). The variables in four material including two buckwheat materials expressed \*significant at  $p < 0.05$  vs NOR.

각각 220%, 247% 증가하여 메밀 식초추출물이 알코올 분해에 효과가 있었다(Fig. 5B).

또한, 간이나 혈액에 남아 있을 수 있는 숙취의 원인인 아세트알데하이드 분해 효소인 ALDH의 활성을 비교하였다. 혈중 ALDH 효소의 활성은 대조군(2,641 mU/mL)보다 일반메밀군(3,144 mU/mL)에서 19%, 쓴메밀군(3,194 mU/mL)에서 21% 증가하였다(Fig. 5C). 간 조직의 ALDH 효소 활성도 대조군(1,200 mU/mL)보다 일반메밀군(1,693 mU/mL)에서 41%, 쓴메밀군(1,768 mU/mL)에서 47% 증가하여 메밀처리군에서 숙취개선 효과가 뛰어났다(Fig. 3D). 이처럼 혈액과 간 조직의 ADH와 ALDH 효소 활성은 메밀처리군에서 증가하는 경향을 보여 숙취 해소 효과가 모두 인정되었으며, 특히 쓴메밀군에서 그 효과가 더 우수하였다.

이전 연구에서는 헛개나무 열수 추출물(Kim *et al.*, 2006)과 콩나물 당 칩지액(Kim *et al.*, 2014) 처리군이 대조군에 비해 ADH 효소 활성이 증가하였다고 보고하였다. Choi and Jung (2016)도 모링가 잎 에탄올 추출물의 ADH 농도는 322.4%, ALDH 농도는 298.6% 높아졌다고 하였다. 이 외에도, Hong *et*

*al.* (2012)은 오이식초가 아세트알데하이드를 제거하는 ALDH 활성이 대조군에 비해 29% 높아 알코올 독성을 완화시켰다고 하였다(Huang *et al.*, 2022). 이러한 결과는 메밀의 루틴과 콜린 성분의 ADH 및 ALDH 효소 활성을 통해 숙취해소에 큰 영향을 준 것으로 판단된다.

### 간조직의 SOD 및 Catalase 측정

2종의 메밀 식초추출물이 알코올 대사에 미치는 영향을 비교하기 위해 알코올 투여 실험동물의 간 조직에서 SOD와 Catalase 농도를 측정하였다(Fig. 6). 간 조직 중 SOD 농도는 대조군(1,617 ng/mL)보다 일반메밀군에서 2,285 ng/mL로 (\* $p < 0.05$ ) 유의하게 증가하였다. 또한, 쓴메밀군에서 2,972 ng/mL로 (# $p < 0.005$ ) 고도로 유의하게 증가하였으며, 일반메밀군보다 23% 높은 SOD 농도를 보였다.

Catalase 농도는 대조군(7,953 ng/mL)보다 쓴메밀군(17,010 ng/mL)에서 고도로 유의하게 증가하였으며(† $p < 0.0001$ ), 일반메밀군(10,672 ng/mL)에서도 유의하게 증가하였다(\* $p < 0.05$ ). 특히, 쓴메밀군이 일반메밀군보다 Catalase 농도가 37% 높았다.

에탄올 대사는 간 조직 뿐만 아니라 다른 인체 조직의 산화적

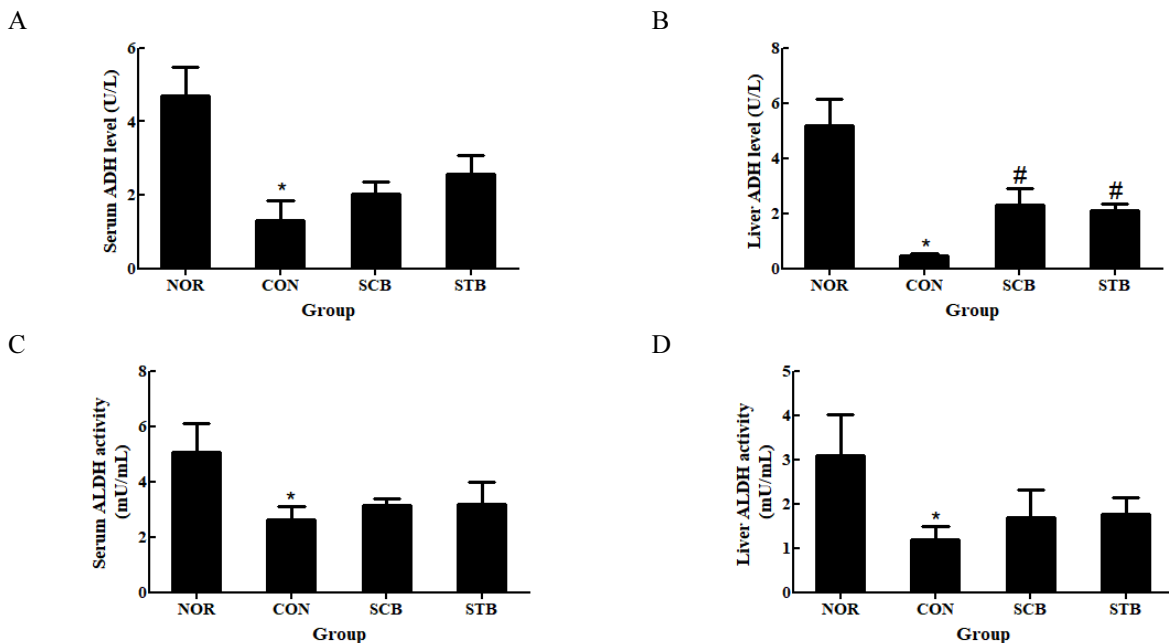


Fig. 5. Changes in Alcohol dehydrogenase ADH activity of serum and liver (A and B), Aldehyde dehydrogenase ALDH activity of serum and liver (C and D) in alcohol-induced hangover mice model fed with vinegar extract from common and tartary buckwheat seed. NOR, Normal mice group; CON, Alcohol-induced hangover mice group; SCB, seed of common buckwheat treated group; STB, seed of tartary buckwheat treated group. Values are expressed Mean±SD on groups of five experiments. Data shown are the mean±SD (n=5). The variables in four material including two buckwheat materials expressed \*significant at  $p < 0.05$  vs NOR, # significant at  $p < 0.05$  vs CON.



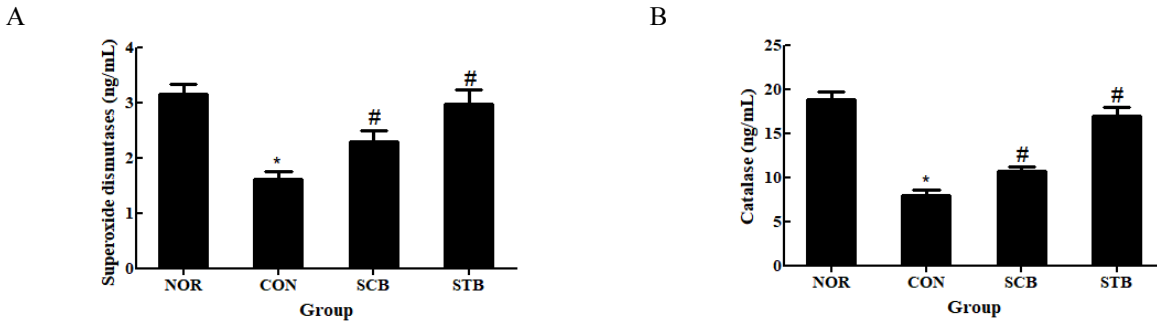


Fig. 6. Changes in Superoxide dismutase (SOD) and Catalase level of liver (A and B) level in alcohol-induced hangover mice model fed with vinegar extract from common and tartary buckwheat seed. NOR, Normal mice group; CON, Alcohol-induced hangover mice group; SCB, seed of common buckwheat treated group; STB, seed of tartary buckwheat treated group. Values are expressed Mean±SD on groups of five experiments. Data shown are the mean±SD (n=5). The variables in four material including two buckwheat materials expressed \*significant at  $p < 0.05$  vs NOR, # significant at  $p < 0.05$  vs CON.

스트레스와 지질과산화의 원인이며(Abdellah *et al.*, 2001), 간 세포의 미토콘드리아는 알코올로 유발된 간의 산화적 스트레스의 완화에 중요한 역할을 한다(Wheeler *et al.*, 2001). 같은 추출물은 알코올만 투여한 대조군에 비해 간 조직의 SOD와 Catalase의 활성이 증가되어 간 손상을 억제하였다(Lee *et al.*, 2001). 본 연구에서도 메밀 식초추출물을 투여했을 때 대조군에 비해 유의적인 수준으로 SOD와 Catalase 효소의 활성에 영향을 주어 알코올 대사로 인한 간 조직의 활성 산소 제거에 도움을 주었을 것으로 판단된다. 쓴메밀인 ‘황금미소’에서 그 효과가 우수하였는데, 이는 뛰어난 항산화 관련 효소 활성을 높여 간 조직의 활성산소를 제거해 주기 때문인 것으로 추측된다.

## 적 요

메밀은 루틴과 콜린을 많이 함유한 기능성 작물로 항산화, 항염증, 항당뇨 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 일반메밀과 쓴메밀 식초추출물의 알코올대사와 숙취해소에 대한 효능을 비교 평가하기 위해 혈중 알코올 분해능, 혈액과 간조직의 Alcohol dehydrogenase (ADH) 및 Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 효소 측정, 간 조직의 Superoxide Dismutase (SOD)와 Catalase 농도를 분석하였다. 루틴 함량은 쓴메밀 종실에서 일반메밀 종실보다 55배 높았다. 콜린 함량은 쓴메밀 식초 추출물에서 약간 높게 나타났다. 알코올 분해능은 대조군에 비해 쓴메밀군에서 36.0%의 알코올 농도 감소 효과를 보여 유의한 알코올 분해 효과가 인정되었다. 혈중 아세트알데하이드 농도는 대조군에서는 시간이 경과할수록 증가하였으나, 일반메밀군은 120분, 쓴메밀군은 90분에 최고치 도달 후 감소하여 숙취

개선 효능이 확인되었다. 또한, 혈액과 간 조직의 ADH와 ALDH 효소 활성은 대조군에 비해 메밀처리군에서 증가하는 경향을 보여 숙취해소 효과가 모두 인정되었으며, 일반메밀군보다 쓴메밀군에서 더 우수하였다. 간 조직의 SOD와 Catalase 활성도 일반메밀보다 쓴메밀군에서 각각 23%, 37% 고도로 유의미하게 높았다. 이상의 결과를 요약하면, 일반메밀과 쓴메밀 식초추출물은 모두 숙취해소에 효과가 있었으며, 특히 루틴 함량이 높은 쓴메밀 ‘황금미소’는 일반메밀보다 숙취해소 소재로 개발하는데 활용 가능성이 높을 것으로 판단되었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 작물시험연구(연구과제명: 고품질 다용도 메밀 품종개발 2단계, 루틴 고함유 쓴메밀 품종 육성, 과제번호 PJ016068032023)의 지원으로 수행되었음.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Abdellah, M., C. Demelliers, S. Amsellem, D. Pessayre and B. Fromenty. 2001. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:737-743.

- An, Y.J., S.M. Cho, M.S. Kim, H.H. Moon, D.S. Park, N.G. Jeon, Y.J. Lee and C.H. Han. 2017. Hangover relieving effect of *Sanghwang mushroom* mycelium cultured in germinated buckwheat. Korean J. Vet. Res. 57(3):147-154.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44:276-287.
- Cha, J.Y., H.J. Jung, J.J. Jeong, H.J. Yang, Y.T. Kim and S.Y. Lee. 2009. Effects of amino acids on the activities of alcohol metabolizing enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). J. Life Sci. 19(9): 1321-1327.
- Cho, K.H., H.J. Choo, M.G. Seo, J.C. Kim, Y.J. Shin, G.H. Ryu and Y.S. Hah. 2017. Effect of *Semisulcospira libertina* extracts from different extraction processes on liver cell toxicity and ethanol metabolism. Food Eng. Prog. 21(2): 158-166.
- Choi, Y.J. and K.I. Jung. 2016. Anti-diabetic, alcohol-metabolizing, and hepatoprotective activities of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaf extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 45(6):819-827.
- Ganeshpurkar, A. and A.K. Saluja. 2017. The pharmacological potential of rutin. Saudi Pharm. J. 25:149-164.
- Gullón, B., T.A. Lú-Chau T.A., M.T. Moreira, J.M. Lema and G. Eibes. 2017. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. Trends Food Sci. Technol. 67:220-235.
- Hong, S.M., H.S. Moon, J.H. Lee, H.I. Lee, J.H. Jeong, M.K. Lee and K.I. Seo. 2012. Development of functional vinegar by using cucumbers. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 41:927-935.
- Horiuchi, Y. R. Kimura, N. Kato, T. Fujii, M. Seki, T. Endo, T. Kato and K. Kawashima. 2003. Evolutional study on acetylcholine expression. Life Sci. 72(15):1745-1756.
- Huang, X.H., S. Zhang, Y. Li, S. Yang, N. Li, G. Zeng, F. Chen and X. Tuo. 2022. Insight into the binding characteristics of rutin and alcohol dehydrogenase: Based on the biochemical method, spectroscopic experimental and molecular model. J. Photochem. Photobiol. B, Biol. 228:112394.
- Hwang, E.J., S.Y. Lee, S.J. Kwon, M.H. Park and H.O. Boo. 2006. Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic activities of *Fagopyrum esculentum* Moench extract in germinated seeds. J. Korean Med. Crop Sci. 4:1-7.
- Jeong, Y.J., K.I. Seo and K.S. Kim. 1996. Physicochemical properties of marketing and intensive persimmon vinegars. J. East Asian Soc. Dietary Life. 6:355-363.
- Kee, J.Y., M.O. Kim, I.Y. You, J.Y. Chai, E.S. Hong, S.C. An, H. Kim, S.M. Park, S.J. Youn and H.B. Chae. 2003. Effects of genetic polymorphisms of ethanol-metabolizing enzymes on alcohol drinking behaviors. Korean J. Hepatol. 9:89-97.
- Kim, K.M., H.J. Jung, H.M. Sung, J.H. Wee, T.Y. Kim and K.M. Kim. 2014. Study of the antioxidant and alcohol-degrading enzyme activities of soybean sprout sugar solutions. Korean J. Food Sci. Technol. 46:581-587.
- Kim, S.J. and Y.H. Kim. 2018. Agricultural Guide Buckwheat. Rural Development Administration, Jeonju, Korea. pp. 7-90 (in Korean).
- Kim, S.J., H.B. Sohn, G.H. Kim, Y.Y. Lee, S.Y. Hong, K.D. Kim, J.H. Nam, D.C. Chang, J.T. Suh, B.J. Koo and Y.H. Kim. 2017. Comparison and validation of rutin and quercetin contents according to the extraction method of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Korean J. Food Sci. Technol. 49:258-264.
- Kim, S.J., H.B. Sohn, J.H. Nam, J.N. Lee, J.T. Suh, D.C. Chang and Y.H. Kim. 2022a. Selection and application of pollinating insects to improve seed production of buckwheat in net house. Korean J. Plant Res. 35(1):10-22.
- Kim, S.J., H.B. Sohn, J.M. Choi, E.J. Cho, J.H. Nam, J.N. Lee, J.T. Suh, D.C. Chang and Y.H. Kim. 2022b. Anti-diabetic effects of common buckwheat and tartary buckwheat in type II diabetes animal model. Korean J. Food Sci. Technol. 54 (1):17-27.
- Kim, S.J., H.B. Sohn, K.T. Lee, J.S. Shin, S. Kim, J.H. Nam, S.Y. Hong, J.T. Suh, D.C. Chang and Y.H. Kim. 2019. Anti-inflammatory effects of seed ethanolic extracts of the common buckwheat and tartary buckwheat are mediated through the suppression of inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. Korean J. Food Sci. Technol. 51(6): 565-575.
- Kim, S.M., S.H. Kang, J.Y. Ma and J.H. Kim. 2006. A study on the extraction and efficacy of bioactive compound from *Hovenia dulcis*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 21:11-15.
- Lee, D.S., I.H. Ryu, G.S. Lee, Y.S. Shin and S.H. Joen. 1999. Optimization effect against lipase activity in preparation of aloe vinegar by *Acetobacter* sp. and inhibitory. J Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42:105-110.
- Lee, D.Y., M. Kim, D. Yoon, Y. Lee, G. Kim and Y.C. Yoo. 2019. Ginseng berry prevents alcohol-induced liver damage by improving the anti-inflammatory system damage in mice

- and quality control of active compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 3522.
- Lee, M.K., S.Y. Cho, J.Y. Jang, M.S. Cho, S.M. Jeon, M.K. Jang, M.J. Kim and Y.B. Park. 2001. Effects of *Puerariae flos* and *Puerariae radix* extracts on antioxidant enzymes in ethanol treated rats. *Am. J. Chin. Med.* 29:343-354.
- Lieber, C.S. 1992. Metabolism of ethanol: *In* Lieber, C.S. (ed.), *Medical and Nutritional Complications of Alcoholism*, Vol. I, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (USA). pp. 1-35.
- Liu, Y.S., M.H. Yuan, C.Y. Zhang, H.M. Liu, J.R. Liu, A.L. Wei, Q. Ye, B. Zeng, M.F. Li, Y.P. Guo and L. Guo. 2021. *Puerariae lobatae* radix flavonoids and puerarin alleviate alcoholic liver injury in zebrafish by regulating alcohol and lipid metabolism, *Biomed. Pharmacother.* 134:111121.
- Marshall, H.G., Y. Pomeranz and G. Chapter. 1982. Buckwheat description, breeding, production and utilization: *In* Pomeranz, Y. (ed.), *Advanced in Cereal and Technology*, Vol. V, Am. Ass. Cereal Chem. Incorporated, St. Paul, MN (USA). pp. 157-212.
- Na, J.R., E. Kim, S.Y. Park, K.H. Lee, E.S. Jeong, J.S. Kim, Y.J. Kim and S.O. Kim. 2018. Eliminatory effect of mixture including hot water extract of *Dendropanax moribifera* Lev. On alcohol-induced blood alcohol concentration and hangover in Rat. *J. Chitin Chitosan.* 23(4):267-276.
- Oh, M.J., K.S. Lee, H.Y. Son and S.Y. Kim. 1990. Antioxidative components of *Pueraria* root. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22(7):793-798.
- Park, S.C. 1994. Effect of bean sprout extracts on metabolism and bio-logical functions of ethanol *in vitro* and *in vivo*. *Korea Soybean Soc.* 11:121-130.
- Phillips, M.M. 2012. Analytical approaches to determination of total choline in foods and dietary supplements. *Anal. Bioanal. Chem.* 403:2103-2112.
- Seitz, H.K., R. Bataller, H. Cortez-Pinto, B. Gao, A. Gual, C. Lackner, P. Mathurin, S. Mueller, G. Szabo and H. Tsukamoto. 2018. Alcoholic liver disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 4:16.
- Song, K, S. Kim, J.Y. Na, J.H. Park, J.K. Kim, J.H. Kim and J. Kwon. 2014. Rutin attenuates ethanol-induced neurotoxicity in hippocampal neuronal cells by increasing aldehyde dehydrogenase 2. *Food Chem. Toxicol.* 72:228-233.
- Wheeler, M.D., M. Nakagami, B.U. Bradford, T. Uesugi, R.P. Mason, H.D. Connor, A. Dikalova, M. Kadiiska and R.G. Thurman. 2001. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J. Biol. Chem.* 276:36664-36672.
- Woo, M.S., J.H. Cha, Y.H. Kim, H.T. Kang, H.D. Kim, K.W. Cho, S.S. Park and J.H. Lee. 2021. Evaluation of the effects of Hangover-releasing agent containing freeze-dried mature silk worm larval powder (SMSP) on alcohol metabolism and hangover improvement. *Korean J. Food Sci. Technol.* 53(1): 72-77.
- Wu, C., R. Dai, J. Bai, Y. Chen, Y. Yu, W. Meng and Y. Deng. 2011. Effect of *Elaeagnus conferta* Roxb (Elaeagnaceae) dry fruit on the activities of hepatic alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in mice. *Trop. J. Pharm. Res.* 10(6):761-766.
- Zeisel, S.H. and J.K. Blusztajn. 1994. Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 14:269-296.

(Received 16 May 2023 ; Revised 30 May 2023 ; Accepted 31 May 2023)