

# 송엽중의 항산화성 물질이 리놀산의 광산화에 미치는 영향

백태홍·이민수·이준홍

한양대학교 자연대 화학과

## The Effect of Antioxygenic Substances in Pine Needles on the Photooxidation of Linoleic Acid

Paik, Taik-Hong · Lee, Meen-Soo · Yi, Jun-Heung

Dept. of Chemistry, Hanyang University

(Received Sep. 5, 1987)

### ABSTRACT

In order to investigate the effect to antioxygenic substances in Pine Needles on the photooxidation of linoleic acid (linoleic acid 100mg/10ml ethanol) added antioxidants and antioxygenic substances in Pine Needles was irradiated by the tungsten lamp attached with red fitter. The Photo oxidation of linoleic acid (LA) was conformed with Lea method and rhodan method.

The following results were obtained:

1. Photooxidation of LA was greatly increased the presence of photosensitizer. However the Photo oxidation of LA without photosensitizer was smoothly increased by the irradiation.
2. The Photo oxidation of LA without irradiation occured quite lately whether photosensitizer was present or absent.
3. Photooxidation of LA under the presence of photosensitizer was inhibited by the addition of dl- $\alpha$ -tocopherol and the acetone fraction of methanol extract of Pine Needles but was not inhibited by BHT. Photooxidation of LA increased gradually as the addition of BHT increased but decreased gradually as that of acetone fraction increased.

### I. 서론

전보<sup>1)</sup>에서 저자들은 유지의 자동산화에 미치는 송엽중의 항산화성 물질의 영향을 보고하였다.

솔잎은 옛부터 구황식품(救荒食品)으로 이용되어 왔을 뿐 아니라, 증풍을 예방하고 진위, 보혈작용이 있으며, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병과 같이 성인병을 예방하는 탁월한 효능을 갖고 있는 것으로 알려져

있다.<sup>2)</sup>

그러나 지금까지 송엽에 대한 연구로는 주로 수목 분류를 위한 생태학적 연구<sup>3)</sup>와 성분분석에 관한 연구<sup>5, 6)</sup>가 있을 뿐 약리학적 연구나 생화학적 연구는 극히 미비한 상태에 있다.

Panyushikin 등<sup>7)</sup>은 송엽의 클로로포름과 에테르 혼합용액 추출물에 의한 항산화 작용을 조사한 결과 강한 항산화성을 나타내었다고 보고하고 있으나, 송엽 추출물이 어느 정도의 항산화 작용을 나타내는지

아직 보고된 바 없으며, 송엽의 항산화성 물질의 본태를 파악하기에는 아직도 많은 연구가 기대된다.

본 연구에서는 송엽중의 항산화성 물질이 리놀산의 광산화에 미치는 영향과 그 정도를 검토하기 위하여 항산화제인 dl- $\alpha$ -tocopherol과 BHT 그리고 송엽의 methanol 추출물의 acetone 분획이 리놀산의 광산화에 미치는 영향을 *in vitro*에서 Lea 법과 rhodan 법으로 측정하여 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 송엽의 추출

시판 송엽 분말 30 g을 환류냉각기를 부착한 500 ml 둥근바다 플라스크에 넣고 methanol 150 ml를 가하여 65 °C에서 3시간씩 2회 가열 추출한 후 여과하여 감압농축하고, 냉동건조시킨 다음 acetone을 가하여 초록색이 없어질 때까지 반복 추출한 후 추출 용액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 acetone 분획과 잔류물을 얻어 acetone 분획은 감압 농축하여 실험 재료로 사용하였다.

### 2. Thin Layer Chromatography

Silicagel G(Merck Co.제) 5g에 물 12ml를 섞어 microslide(가로 2.5 cm 세로 7.5 cm) 12개에 일정한 두께로 입혀 thin layer plate를 만들고, 110 °C 항온기에서 1시간 동안 활성화 시킨후 탈수기 안에 냉각시켜 사용하였다. 전개액으로는 hexane-ethyl

ether-acetone(2:1:1, v/v/v)를 사용하였으며, 15% 황산 에탄올 용액을 분무하여 가열 탄화시켜 검출하였다.

### 3. 광산화 반응

광산화 반응에 사용한 장치는 Fig. 1과 같이 20 ml의 반응용기에 시료를 넣고 공기 공급 모터를 사용하여 공기를 공급하였다<sup>8)</sup>.

공기 공급 모터에서 공급된 공기는 공기중의 수분을 제거하기 위하여 CaCl<sub>2</sub>를 통과시켰으며, 또한 공기 공급으로 인한 반응용매의 증발을 보충하기 위해 ethanol을 통과시켰다. 광원으로는 300 W tungsten lamp의 환등기를 사용하여 렌즈 앞에 사진용 red filter(Kenko Optical Co. 제)를 부착하여 610 nm의 단색광이 통과하도록 하였으며, 반응용기와 광원 사이의 거리는 30 cm로 하여 상온에서 irradiation 시켰다.

#### 1) 시료의 조제

시료는 Yamashoji 등의 방법<sup>9)</sup>에 따라 다음과 같이 조제하였다.

Linoleic acid 100 mg을 ethanol 10 ml에 녹인 후 photosensitizer인 methylene blue 0.4 mg을 가한 다음 methanol 추출물의 acetone 분획물과 dl- $\alpha$ -tocopherol, butylated hydroxytoluene(BHT)를 각각 10 mg씩 첨가하였다.

#### 2) Hydroperoxide의 측정

Linoleic acid의 hydroperoxide는 Mitsuda의 방법<sup>10)</sup>으로 측정하였다.

시료 0.1 ml를 취하여 95% ethanol 4.7 ml에 녹인 다음 30% ammonium thiocyanate 수용액 0.1 ml 5% ferrous ammonium sulfate의 3.5% HCl 수용액 0.1 ml를 가하여 혼합한 후 정확히 3분간 방치한 다음 10 초 이내에 Spectronic 20을 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. Thin Layer Chromatogram

Methanol 추출물 중에 함유되어 있는 항산화 물질을 분리하기 위해 추출물을 acetone으로 분획하여 methanol 추출물, acetone 분획물 및 잔류물의 thin layer chromatogram은 Fig. 2와 같이 methanol 추출물과 acetone 분획물은 모두 R<sub>f</sub> 값이 0.94, 0.66, 0.44인 성분을 함유하고 있으나 잔류물에서는 검출되지 않았다.

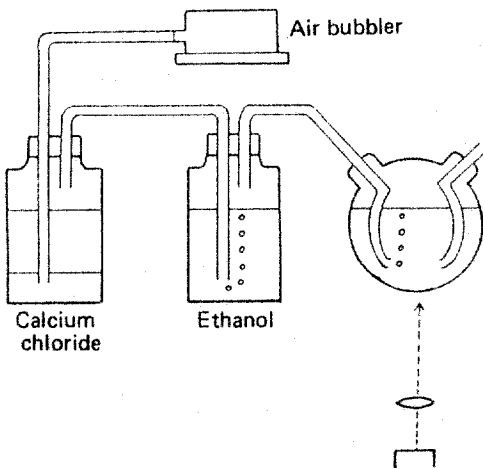


Fig. 1. Apparatus for Photoirradiation

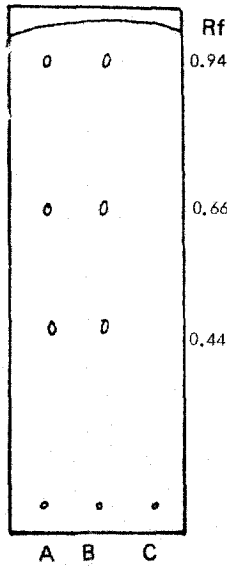


Fig. 2. Thin layer chromatogram of methanol extracts of Pine needles on silica gel G plate.

Detector: Charring with 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ethanol solution

Solvent: Hexane-ethyl ether-acetone(2:1:1, v/v/v)

- A : Methanol extract
- B : Acetone fraction
- C : Residue

## 2. 광증감제의 효과

### 1) 광산화에 대한 효과

광증감제가 리놀산의 광산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 광증감제를 첨가한 리놀산과 첨가하지 않은 리놀산을 각각 광산화시켜 그 산화 정도를 시간에 따라 rhodan 법으로 측정 한 결과는 Table 1과 같다.

광증감제를 첨가하여 4분동안 빛을 조사하였을 때의 흡광도를 100으로 하여 상대적인 흡광도를 나타내었을 때 광증감제를 첨가하지 않았을 때는 1시간이 경과하였을 때 비로서 5이었는데 반해, 광증감제를 첨가하였을 때는 2분 경과 후에 50으로 나타나 광증감제가 존재할 때는 광산화가 매우 빨리 일어남을 알 수 있었다.

### 2) 빛이 없을 때 산화에 대한 효과

빛이 존재하지 않았을 때 리놀산의 산화에 미치는 광증감제의 영향을 알아보기 위해 빛을 차단한 후 광증감제를 첨가한 리놀산과 첨가하지 않은 리놀산에 공

기를 공급하면서 산화시킨 결과는 Table 2와 같이 광증감제의 첨가에 관계 없이 시간이 경과함에 따라 약간의 산화가 일어나는 경향을 나타냈다.

## 3. 자동산화에 미치는 빛의 영향

리놀산의 자동산화에 미치는 빛의 영향을 알아보기 위해 dl- $\alpha$ -tocopherol과 BHT를 첨가한 후 광산화시켜 본 것과 빛을 쬐어주지 않은 것을 자동산화

Table 1. Effect of photosensitizer on the photooxidation of linoleic acid

Time (min.)	Relative absorbance	
	Absence	Presence
2	—	53
4	—	100
6	—	153
8	—	207
10	—	260
60	5	—
120	11	—
180	16	—
240	21	—
300	27	—

Air was bubbled into the solutions. Absorbance was measured at 500nm by rhodan method.

Irradiation: 300W of tungsten lamp attached with red filter (610nm),

Photosensitizer: 0.4mg of methylene blue

Table 2. Effect of photosensitizer on the oxidation of linoleic acid without light

Time (hr.)	Relative absorbance	
	Absence	Presence
1	50	60
2	100	100
3	150	160
4	200	200
5	250	250

Air was bubbled into the solutions. Absorbance was measured at 500nm by rhodan method.

Photosensitizer: 0.4mg of methylene blue

Table 3. Effect of irradiation on the autoxidation of linoleic acid

Addition	O.D value	Relative O.D value
LA	0	0
LA+h $\nu$	0	0
LA+MB	0	0
LA+MB+h $\nu$	0.3	100
LA+MB+ $\alpha$ -toc+h $\nu$	0.21	70
LA+MB+BHT+h $\nu$	0.59	197

LA : Linoleic acid ethanol solution used as substrate was made with 10mg of linoleic acid in 10ml of pure ethanol. dl- $\alpha$ -Tocophera 10mg/10ml of LA, BHT 10mg/10ml of LA. irradiation; for 4 min. under 300W tungsten lamp. The degree of autoxidation of LA was measured by rhodan method.

시킨 결과는 Table 3 과 같이 빛은 자동산화에 거의 영향을 미치지 않았으며 dl- $\alpha$ -tocopherol 은 억제한 반면 BHT 는 오히려 증가시켰다.

#### 4. 송열중의 항산화성 물질이 리놀산의 광산화에 미치는 영향

송열중의 항산화성 물질이 리놀산의 광산화에 미치는 영향을 알아 보기 위해 dl- $\alpha$ -tocopherol, BHT 와 함께 송열의 methanol 추출물의 acetone 분획을 첨가한 시료군과 첨가하지 않은 비교군을 각각 광산화시켜 그 산화정도를 rhodan 법과 Lea 법으로 측정 한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4 와 같다.

Acetone 분획물과 dl- $\alpha$ -tocopherol 을 첨가한 시료에서는 리놀산의 광산화 작용을 억제하였으나, BHT 를 첨가한 시료에서는 리놀산만을 사용한 비교군에 비하여 hydroperoxide 의 생성을 촉진되는 것으로 나타났다.

또한 각 시료에 한시간 빛을 조사하여 Lea 법으로 POV 를 측정 한 결과도 같은 경향을 나타내고 있다.

#### 5. BHT 의 광산화 촉진 작용

대표적 항산화제인 BHT 가 광산화를 촉진한다는 사실을 확인하였기 때문에 그 정도를 알아 보기 위해 첨가량을 달리하여 시료를 조제한 후 비교군과 함께 4분간 광산화시킨 결과는 Table 4 와 같이 첨가 농도가 증가함에 따라 광산화 정도를 증가시켰다.

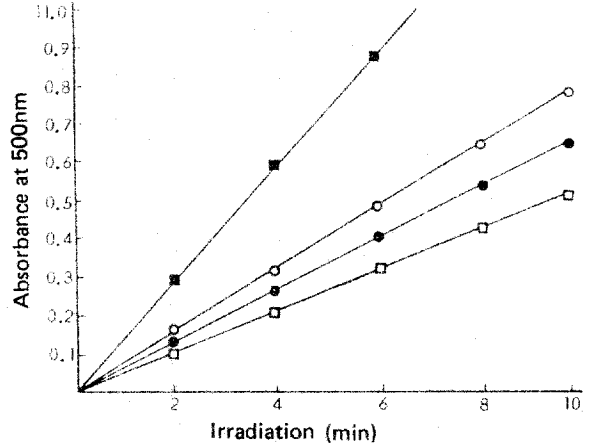


Fig. 3. Effect of antioxidants on the photooxidation of linoleic acid added with Photosensitizer.

Irradiation: 300W of tungsten lamp attached with red filter (610nm) Air was bubbled into the solutions. Absorbance was measured at 500nm by rhodan method.

- : Control (linoleic acid 100mg/10ml ethanol)
- : 0.1% Acetone fraction (methanol extract of pine needles extracted with acetone)
- : 0.1% dl- $\alpha$ -Tocopherol
- : 0.1% Batylated hydroxytoluene(BHT)

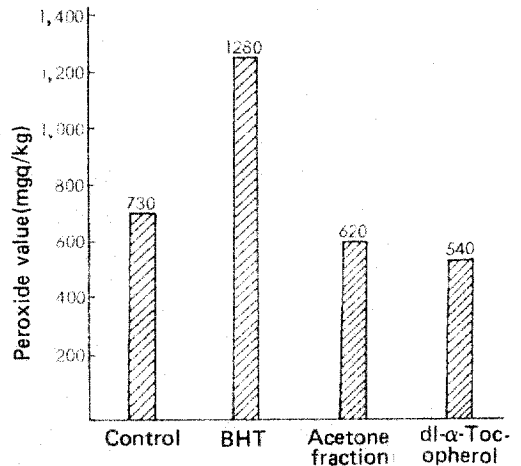


Fig. 4. Effect of Various antioxidants on the photooxidation of linoleic acid after one hour of irradiation. Antioxidants were added to 0.1 percent in weight.

Peroxide value was measured by Lea method. Experimental Condition: refer to Fig. 3.

Table 4. Effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the photooxidation of linoleic acid added with photosensitizer

Addition (mg)	Relative absorbance
Control	100
0.1	95
1	113
5	145
10	197

Air was bubbled into the solutions. Absorbance was measured at 500nm by Rhodan method  
 Control: linoleic acid 100mg/10ml ethanol  
 Irradiation: 300W of tungsten lamp attached with red filter (610nm) for 4 min. at room temperature.

Table 5. Antioxidative effect of acetone fraction on the photooxidation of linoleic acid added with photosensitizer

Addition (mg)	Relative absorbance
Control	100
4	95
8	87
10	82

Acetone fraction: Methanol extract of pine needles extracted with acetone  
 Air was bubbled into the solutions. Absorbance was measured at 500 nm by Rhodan method.  
 Control: Linoleic acid 100mg/100ml ethanol  
 Irradiation: 300W of tungsten lamp attached with red filter (610nm) for 5 min. at room temperature

6. Acetone 분획물의 광산화 억제작용

Acetone 분획물이 광산화를 억제한다는 사실을 확인하였기 때문에 그 정도를 알아 보기 위해 첨가량을 달리하여 시료를 조제한 다음 리놀산의 광산화억제반응을 조사한 결과는 Table 4와 같이 리놀산만을 5분간 광산화시켰을 때의 흡광도를 100으로 하여 상대적 흡광도로 비교하였을 때 acetone 분획물을 4mg 첨가하였을 때 95, 8mg 첨가하였을 때 87, 10mg을 첨가하였을 때 82로 acetone 분획물의 첨가량이 증가함에 따라 linoleic acid의 광산화 억제효과가 증대되었다 (Table 5).

의 이론<sup>16)</sup>과 잘 일치하는 결과였으며 이러한 광산화에 대표적 산화제인 BHT가 오히려 산화를 촉진한다는 사실은 또한 자동산화와는 다른 기구에 의해 광산화가 진행된다는 것을 간접적으로 입증시켜 주고 있다.

반면, 송열의 acetone 분획물은 유지의 자동산화뿐 아니라 광산화도 억제하는 것을 알 수 있어 매우 우수한 항산화물질이 존재함을 확인할 수 있었다.

그러나 송열의 항산화성 물질의 본태를 알기 위하여는 앞으로도 많은 연구가 기대된다.

IV. 고 찰

유지의 자동산화는 주로 free radical 반응에 의해 진행되는 것으로 알려져 있으나<sup>11, 12)</sup> 최근들어 singlet oxygen이 유지의 광산화에 직접 관여하는 것으로 보고되고 있어<sup>13, 14)</sup> 많은 관심의 대상이 되어왔다.

빛의 조사에 의한 지질산화에 대한 반응기구는 그 생성물이 free radical 반응에 의한 생성물과 현격한 차이를 보이고 있어 free radical 반응과는 다른 기구에 의해 반응이 진행된다는 것을 알 수 있다<sup>15)</sup>.

본 실험의 결과에서 알 수 있듯이 빛이 없을때 광증감제는 리놀산의 산화에 영향을 미치지 못하는 반면, 빛이 있을때는 매우 빨리 산화가 이루어 진다는 것은 singlet oxygen은 광증감제가 빛으로부터 energy를 받아 triplet 산소에 전해주어야만 발생한다는 Foote

文 獻

1. 백태홍, 이민수, 한양大 基礎科學論文集, 5, 95(1986)
2. 김봉재, 박인규, 한방동의보감, 민창사, P.81 (1978)
3. 安建鏞, 林有研報, 3, 7(1963)
4. 任慶彬, 서울大 論文集 生農系, 20, 38(1969)
5. 韓哲洙, 全北大 農大論文集, 10, 68(1979)
6. 한상덕, 이돈구, 전상근, 한국임학회지, 50, 49 (1980)
7. Panyushikin, Yu. A, Tsepalov, V.F., Glad, G.P., Emanuel, N.M., Khim. Sel'sk. Khoz, 15, 42 (1977)
8. 이대형, 교육학 석사학위 논문, 서울대학교 대학원 (1985)

9. S. Yamashoji, H. Yoshida and G. Kajimoto, *Argri. Biol. Chem.*, **41**, 7947 (1977)
10. 滿田久輝, 安本教傳, 岩見公和, 榮養と食糧, **19**(3), 60 (1966)
11. M.K. Logan and R.E. Davies *Lipids*, **15**(6) 485 (1980)
12. N.R. Artman, *Advan. Lipid. Research*, **2**, 245 (1969)
13. N.V. Shin Karonko and V.B. Aleskovskii, *Russ. Chem. Rev.*, **51**(5) 407 (1982)
14. O.K. Kearns, *Chem. Rev.*, **71**(4), 395 (1971)
15. K.R. Kopecky and H.H. Reich, *Can. J. Chem.*, **43**, 2265 (1965)
16. C.S. Foote, *Acc. Chem. Res.*, **1**, 104(1968)