

닭에서 *Pinus strobus* 잎추출물의 혈청콜레스테롤저하 효과

이윤형·최용순*·이상영*

해태제과(주)

*강원대학교 식품·생명공학부

The Cholesterol-Lowering Effects of the Extract from *Pinus strobus* in Chickens

Yoon-Hyung Lee, Yong-Soon Choi* and Sang-Young Lee*

Haitai Confectionary Co., Seoul 140-190, Korea

*Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Abstract

In vivo hypocholesterolemic effects of the extract of *Pinus strobus* leave were evaluated in chickens. When chickens were orally administered with methanol extract(100mg/chicken) dissolved in 50% ethanol every day for 2 weeks, there was no significant effect on lowering cholesterol by feeding the methanol extract. In second experiments, each groups of chickens were orally administered with 200, 350 or 500mg/day of the methanol extract for 2 weeks. There was no dose-dependent response, although the concentration of serum cholesterol was significantly lower in the extract (200mg/day) administered-group than those of the other groups. The methanol extract was refractionated using various extractants. Only administration of ethyl acetate extract(100mg/chicken/day) lowered the concentration of serum cholesterol by 20%. The results suggest that the *Pinus strobus* extract has a mild cholesterol-lowering effect in chickens.

Key words: *Pinus strobus*, cholesterol, chicken

서 론

최근 국민생활수준의 향상은 국민들의 건강에 대한 관심이 증대함과 동시에 건강 지향적인 식품, 소위 기능성 식품의 개발은 매우 흥미있는 연구분야가 되어 왔다(1-3). 혈청 콜레스테롤 농도의 과도한 증가는 소위 동맥경화 발생의 주요한 위험인자로 알려져 왔으며, 국내에서도 순환기계질환 발생의 증가와 더불어 혈청 콜레스테롤 농도를 조절하고자 하는 식품, 영양적 연구가 활발히 진행되어 왔다(4,5). 특히, 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추고자 하는 경우, 생체내 콜레스테롤 생합성을 저해하는 방법이 매우 유효 적절한 방법으로 보고되고 있어, *in vitro*에 의한 콜레스테롤 생합성 저해물질의 스크리닝은 지질대사조절 물질을 개발하는데 효과적이고 유효한 방법이 될 수 있다(6). 저자 등은 식품이나, 민간요법으로 내려오는 식물체로부터 HMG-

CoA reductase 효소 활성 저해물질을 검색하여 이미 보고한 바 있다(7,8).

소나무잎은 예로부터 구황식물로 알려져 왔으며, 예전에는 동맥경화의 민간요법으로 이용되어 왔다(9). 저자 등(7)은 몇 종류의 소나무잎의 추출물이 HMG-CoA reductase 활성을 저해시키는 것을 확인한 바, 특히 *Pinus strobus*계의 잎 추출물이 강력한 저해 효과를 나타내어, 이를 이용하여 기능성 식품으로 개발하고자 닭을 이용하여 지질대사에 미치는 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

시료의 조제

본 실험에서 사용한 잎은 임업육종연구소로부터 구하여 수세, 풍건, 세절하였다. 추출할 시료량의 20배의 메탄올(Wako Chemicals Co, 특급)을 가하여 3회에

*To whom all correspondence should be addressed

걸쳐 16시간 환류냉각하며 추출한 여액을 감압농축하였다. 농축액에 소량의 물을 가한 후 동결건조하여 메탄을 추출물로 하였다. 다음 메탄을 추출물에 대하여 진보(7)와 같이 chloroform, ethyl acetate, butanol 및 물을 이용하여 계통적으로 분획, 감압농축하여 동결건조하였다. 시료는 -20°C로 보관하면서 매일 일정량 tube를 이용 경구투여하였다.

실험동물의 사육

닭은 콜레스테롤 합성 저해제에 의한 혈청 콜레스테롤 저하효과가 발현하는 실험동물로 보고되고 있다 (6). 3주령의 암컷 White Leghorn cockerel을 강원대학교 동물사육장으로부터 구입하여 2주간 예비사육하여 환경에 적응시켰다. 실험 1에서는 메탄을 추출물의 효과를 검토하기 위하여 한군을 5마리로 배치하여, 2주간 메탄을 추출물 100mg을 50% 에탄올 0.5ml에 녹여 아침 경구투여하였다. 실험 2에서는 메탄을 추출물의 투여용량별 효과를 알아보기 위해 동일조건의 동물을 구입하여 군당 메탄을 추출물 200, 350 혹은 500mg을 매일 2주간 경구투여하였다. 실험 3에서는 메탄을 추출물의 극성별 용매추출 분획물의 지질 농도에 미치는 효과를 검토할 목적으로 실험 1에서와 동일 조건의 동물을 이용하여, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물분획물 각각 100mg을 50% 에탄올 0.5ml에 녹여 매일 2주간 경구투여하였다. 대조군은 50% 에탄올 0.5ml를 투여하였다. 전 실험기간 시판사료(삼양유지사료, 원주)를 투여하였으며, 2주 후 12시간 절식시켜, 도살하여 간장 및 혈액을 얻었다. 혈액은 30분간 상온에서 방치한 후 상법에 따라 혈청을 분리한 후 분

석하거나, 냉동 보관하였다.

실험방법

혈청 콜레스테롤(Cholesterol-C test kit, Wako Chemical Co., Japan), 중성지방(Triglyceride G test kit, Wako Chemical Co., Japan) 및 인지질(Phospholipid test kit, Wako Chemical Co., Japan)의 측정은 시판 측정키트를 사용하였다. 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 VLDL 및 LDL을 dextran sulfate로 침전시킨 후 키트를 이용하여 측정하였다. 혈청 유리지방산 농도는 Brunk와 Swanson의 방법(10)에 따라 측정하였다. 간장의 지방질은 Folch법(11)에 따라 추출 정제하였다. 간장지질중 총 콜레스테롤 농도는 Sperry-Webb법(12), 중성지질은 Fletcher(13) 및 인지지방질은 Rouser 등(14)의 방법에 따라 비색법으로 측정하였다. 결과에 대한 통계분석은 ANOVA에 의하여 유의성을 검정하여 각군간의 차이는 LSD로 분석하거나, 때로는 Student t-test로 검정하였다.

결 과

메탄추출물의 효과

P. strobus 잎의 메탄을 추출물의 투여가 닭의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 효과를 관찰할 목적으로 2주간 하루 100mg의 추출물을 경구투여하였다. 실험기간중 실험동물의 체중 증가, 간장 중량 및 식이 섭취량에 실험군간 유의한 차이는 없었다(데이터 보이지 않음). Table 1은 혈청 지질 농도에 미치는 추출물의

Table 1. The concentrations of serum lipids in chickens fed on diets containing methanol extract of *Pinus strobus* leave

Groups	TC	TG	PL	FFA	HDL-C	HDL-C/TC
			(mg/dl serum)			(%)
Control	167±3.2	86.7±4.1	243±7.3	10.0±0.2	80.9±4.0	48.3±2.0
Methanol	150±7.9	88.8±3.0	220±25	10.2±0.7	76.4±7.6	50.5±2.9

Mean±S.E. of 5 chickens

TC : Total cholesterol, TG : Triacylglycerol, PL : Phospholipids, HDL-C : HDL-cholesterol

Table 2. The concentrations of liver lipids in chickens fed on diets containing methanol extract of *Pinus strobus* leave

Groups	Cholesterol	Triacylglycerol	Phospholipids
		(mg/g liver)	
Control	1.66±0.13	7.16±0.92	41.1±1.4
Methanol	1.24±0.18	8.22±0.71	41.9±1.6

Mean±S.E. of 5 chickens

효과를 나타내고 있다. 본 실험시 사용한 닭의 체중은 평균 1200g으로 체중 kg당 투여량은 평균 83mg이었다. 추출물 투여 1주일 후 혈청 콜레스테롤 농도는 대조군 174±6.7 mg/dl, 실험군 152±6.5mg/dl로 실험군에서 유의하게 낮았으나, Table 1에서 보는 바와 같이 2주일 후 추출물의 유의한 혈청 콜레스테롤 저하효과는 관찰되지 않았다. 다른 혈청 지질 농도에 대한 추출물의 유의한 저하효과는 없었다. Table 2는 간장 지질 농도를 나타내고 있으나 유의한 저하효과는 없었다. 따라서 추출물의 투여량을 달리하여 동일조건에서 지질 농도에 미치는 효과를 검토하였다.

투여량을 달리한 메탄올추출물의 효과

본 실험에서는 추출물의 투여량을 200mg, 350mg, 500mg/day로 하여 실험 1에서와 동일한 조건에서 실험하여 투여량에 따른 혈청 콜레스테롤 농도의 응답을 검토하였다. 닭의 체중 증가율, 사료 섭취량, 간장 중량 등에 유의한 차이는 없었다. Table 3은 혈청 콜레스테롤의 농도를 나타낸 것이다. 하루 100mg의 추출물을 투여하였을 때와는 달리, 200mg, 350mg, 500mg 투여시 혈청 콜레스테롤 농도는 투여 일주일 후 유의하게 감소되었으나(p<0.05), 2주째 500mg투여군의 혈청 콜레스테롤 농도는 상승하는 결과를 나타내었다. 그러나 200, 350mg씩 투여한 군의 혈청 콜레스테롤 농도는 대조군에 비하여 현저하게 낮았다. 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 추출물 투여에 의하여 감소하였으나, HDL-총 콜레스테롤 농도간 유의한 차이는 보이지 않아 적어도 지방단백질의 농도비에는 영향을 주지는 않는 듯하다.

극성 용매 추출물투여의 효과

메탄올 추출물을 2주간 200mg 투여시 혈청 콜레스테롤 농도는 약 13%의 저하효과를 나타내었다. 따라서

Table 3. The dose-dependent response of serum cholesterol level in chickens fed on diets containing methanol extract of *Pinus strobus* leave

Groups	Total cholesterol(mg/dl serum)	
	1 week	2 week
Control	169±3.5 ^a	168±3.2 ^a
Methanol		
200mg	146±3.3 ^b	142±3.6 ^b
350mg	148±5.6 ^b	147±2.8 ^{bc}
500mg	146±8.3 ^b	157±5.3 ^c

Mean±S.E. of 5 chickens

^{abc}Values in the same column with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

Table 4. The concentrations of serum cholesterol in chickens fed on diets containing various solvent extracts of *Pinus strobus* leave

Groups	Total cholesterol(mg/dl serum)	
	1 week	2 week
Control	173± 6.8 ^{ab}	167± 3.2 ^a
Water	183± 4.8 ^b	166± 7.9 ^a
Butanol	157±12.6 ^a	163± 7.4 ^a
Ethyl acetate	149± 9.2 ^a	134± 7.5 ^b
Chloroform	165± 4.6 ^{ab}	159±11.8 ^a

Mean±S.E. of 5 chickens

^{ab}Values in the same column with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

본 실험에서는 혈청 콜레스테롤 농도 저하효과를 발휘하는 유효성분의 분리를 위하여 극성 정도에 따라 추출한 분획물을 마리당 하루 100mg씩 2주간 투여하였다. Table 4는 투여기간 혈청 콜레스테롤 농도를 나타낸 것이다. 투여 1주 후 혈청 콜레스테롤 농도는 에틸아세테이트분획 투여군, 부탄올층 분획군에서 감소하는 경향을 보였으며, 이러한 효과는 2주 투여기간 후 에틸아세테이트층 투여군에서 지속되었다. 그러나 다른 추출물분획물의 유의한 혈청 콜레스테롤 농도 저하효과는 관찰되지 않았다. 따라서 메탄올 추출물의 혈청 콜레스

Table 5. The concentrations of serum lipids in chickens fed on diets containing various solvent extracts of *Pinus strobus* leave

Groups	FFA	TG	PL	HDL-C
	(mg/dl serum)			
Control	10.0±0.2 ^a	86.7±4.1	243± 7.3	80.9±4.0 ^{ab}
Water	10.7±0.3 ^a	84.8±4.1	243± 5.4	80.7±2.0 ^{ab}
Butanol	12.1±0.4 ^{ab}	83.7±1.6	239± 9.9	81.2±4.0 ^{ab}
Ethyl acetate	11.5±1.3 ^{ab}	91.8±3.9	223±22	72.1±6.4 ^a
Chloroform	13.3±1.3 ^b	89.7±6.6	254±15	90.1±7.8 ^b

Mean±S.E. of 5 chickens

^{ab}Values in the same column with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

See the Table 1 for the abbreviations

Table 6. The concentrations of liver lipids in chickens fed on diets containing various solvent extracts of *Pinus strobus* leave

Groups	Cholesterol	Triacylglycerol (mg/g liver)	Phospholipids
Control	1.78±0.07 ^{ab}	7.16±0.92 ^a	41.1±1.4
Water	1.90±0.06 ^a	11.2±1.72 ^{ab}	41.1±2.2
Butanol	1.85±0.17 ^a	12.6±3.2 ^{ab}	41.9±1.2
Ethyl acetate	1.48±0.07 ^{ab}	10.0±1.52 ^{ab}	40.7±1.5
Chloroform	1.43±0.10 ^b	15.5±1.4 ^b	41.0±1.0

Mean±S.E. of 5 chickens

^{ab}Values in the same column with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

테롤 농도 저하효과는 특히 에틸아세테이트 분획물에 의하여 발견되며, 다른 추출물은 오히려 에틸아세테이트층의 콜레스테롤 저하효과를 상쇄시키고 있음을 시사한다. 실험한 각 군간 유리지방산, 중성지질, 인지질 농도에 추출물의 효과는 보이지 않았다(Table 5). 투여 2주 후 HDL-콜레스테롤 농도는 에틸아세테이트군에서 약간 감소하는 경향을 보인 반면, 클로르포름분획물 투여군에서는 약간 상승하는 효과를 나타내었다. 그러나, HDL-C/총 콜레스테롤 농도비에 유의한 차이는 없었다. 유리지방산 농도는 대조군에 비해 클로르포름 분획물 투여군에서 유의하게 높았으며, 중성지질 및 인지질 함량에 추출물에 의한 차이는 없었다. 간장 중 콜레스테롤 농도는 에틸아세테이트, 클로르포름추출물투여군에서 낮았으나, 중성지질은 대조군에 비하여 클로르포름추출물 투여군에서 높았다. 간장 인지질 함량에 유의한 차이는 없었다(Table 6).

고 찰

예로부터 솔잎은 구황식물, 향신료, 또는 혈관계 질환의 치료를 위한 민간요법으로 이용되어 왔다. 저자 등(7)은 이미 *Pinus strobus*계의 잎 추출물이 *in vitro*에서 현저하게 HMG-CoA reductase 활성을 저해하는 것을 보고하였으며, 본 연구에서는 닭을 이용하여 *in vivo*에서 혈청 콜레스테롤 저하효과가 있는지를 확인하였다. 2주 간 200mg의 메탄올 추출물을 경구투여시 혈청 콜레스테롤 농도는 약 13% 저하하였다. 그러나 투여량을 500mg까지 증가시켜도 혈청 콜레스테롤 농도의 부가적인 감소는 관찰되지 않았다. 또한 중성지질에 대한 조절효과도 관찰되지 않아 간장으로 부터 지방단백질의 분비나 uptake 과정에 관여하지 않는 듯하다. 이는 투여물에 의해 HDL-/총 콜레스테롤 농도의 비가 크게 변화하고 있지 않은 점에서도 예측할 수 있을 것이다.

닭은 일반 흰쥐나 마우스와는 달리 이미 개발되어

있는 콜레스테롤 합성 저해제투여에 의하여 혈청 콜레스테롤 농도가 저하하는 응답을 나타낸다(6). 이런 점에서 추출물 투여에 의한 혈청 콜레스테롤 농도의 저하는 합성저해에 의해 일어날 수 있을 것으로 예측된다. 김 등(9)은 흰쥐에 솔잎을 20% 사료에 혼합하여 4주간 투여시 혈청 콜레스테롤 농도에 유의한 변화가 없었음을 보고하였다. 만약, 솔잎성분이 생체내에서 콜레스테롤합성을 억제하는 효과를 예상한다면, 흰쥐에서 기대되는 효과를 얻을 수 없었음은 당연하다 하겠다.

Pinus strobus 잎의 메탄올 추출물이 혈청 콜레스테롤 농도를 감소시키는 결과로부터 유효성분의 분포를 확인하기 위하여 극성별로 분획하여, 하루 100mg씩 2주간 투여한 결과 혈청 콜레스테롤 농도 저하효과는 에틸아세테이트층에서 약 20% 감소효과가 관찰되었으며, 물층, 부탄올층, 클로르포름층에서는 저하효과를 관찰하지 못하였다. 따라서 솔잎의 콜레스테롤 농도 저하효과를 나타내는 물질은 에틸아세테이트층에 많이 들어 있는 것으로 예측되어진다. 저자 등(7)이 이미 보고한 바와 같이 *P. strobus* 잎추출물의 분획물의 *in vitro* HMG-CoA reductase 활성 저해효과는 에틸아세테이트층 분획물 99%, 부탄올층 분획물 95%, 물층분획물 14%, 클로르포름층 분획물 16%로 나타나, 에틸아세테이트층 분획물의 혈청 콜레스테롤 농도의 저하효과는 콜레스테롤 합성저해에 기인되었을 가능성이 매우 크나, 그러나 부탄올층 분획물 투여시 그러한 효과는 투여 1주 후 관찰되었으나, 2주까지 지속하지는 못하였다. 따라서 에틸아세테이트 분획물을 제외한 다른 분획물은 일시적인 혈청 콜레스테롤 저하효과가 있다 하더라도 지속적으로 혈청 콜레스테롤 농도를 감소시키지는 못하는 듯하다. 본 실험에서 닭의 하루 사료 섭취량은 약 150g으로 하루 100mg 경구투여시 사료에 혼합된 양은 0.07%에 해당되며, 하루 83mg/kg 정도의 추출물이 투여되었다. 실험기간 실험군간 체중 증가량, 사료섭취량, 간장중량 등에 군간 차이는 없어, 외견상 닭의 성장에 추출물의 불리한 효과는 없는 듯하다.

결론적으로, *Pinus strobus* 잎의 추출물의 투여는 닭에서 혈청 콜레스테롤 농도 저하효과를 나타냈다. 그 효과는 에틸아세테이트 분획물에서 발현되었으며, 닭의 성장에 외견상 저해효과는 없었다.

요 약

닭을 실험모델로 *Pinus strobus* 잎의 메탄올 추출물 투여에 의한 콜레스테롤 저하효과를 검토하였다. 닭에 메탄올 추출물 100mg을 50% 에탄올용액 0.5ml에 녹여 2주간 매일 경구투여하였을 때, 유의한 추출물의 투여효과는 관찰되지 않았다. 두번째 실험에서는 메탄올 추출물의 투여량을 하루 200, 350 또는 500mg으로 달리하여 2주간 경구투여하였다. 2주 후 하루 200mg을 투여한 군은 다른 군에 비하여 유의하게 낮은 혈청 콜레스테롤 농도를 나타내었으나, 투여량의 증가에 의한 추가적인 저하효과는 관찰되지 않았다. 메탄올 추출물은 여러가지 추출용매로 재분획되었다. 그 중에서 에틸아세테이트 추출물(100mg/일)은 혈청 콜레스테롤 농도를 20%까지 감소시켰다. 이러한 결과로부터 *Pinus strobus* 잎의 메탄올 추출물의 투여는 닭에서 혈청 콜레스테롤 농도 저하의 개선효과가 있음이 시사된다.

문 헌

1. 千葉英雄 : 食品の生體調節機能. 學會出版センター, 東京, p.3(1992)
2. 지성규 : 기능성 식품. 광일문화사, 서울, p.100(1992)
3. 정연강, 백홍근 : 기능화시대를 맞는 식품산업. 신한중

4. 최용순, 이상영 : 혈청콜레스테롤과 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. 한국영양식량학회지, **21**, 580(1992)
5. 조성희 : 지방질과 동맥경화증. 한국영양식량학회지, **23**, 170(1994)
6. Endo, A. : Chemistry, biochemistry and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. *Klin Wochenschr.*, **66**, 421(1988)
7. 이윤형, 신용복, 이재은, 최용순, 이상영 : 식물추출물로부터 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase의 활성저해제의 탐색. 한국생물공학학회지, **6**, 55(1991)
8. 최용순, 서정호, 김천호, 김영미, 함승시, 이상영 : 흰쥐에 있어서의 메밀채소의 투여가 지질대사에 미치는 효과. 한국영양식량학회지, **23**, 212(1994)
9. 김종대, 윤태현, 최면, 임경자, 주진순, 이상영 : 솔잎 첨가식이 흰쥐의 혈청 지방질대사에 미치는 영향. 한국노화학회지, **1**, 47(1991)
10. Brunk, S. D. and Swanson, J. R. : Colorimetric method for free fatty acids in serum validated by comparison with gas chromatography. *Clin Chem.*, **27**, 924(1981)
11. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanly, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497(1957)
12. Sperry, W. M. and Webb, M. : A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, **187**, 97(1950)
13. Fletcher, M. J. : A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chem. Acta*, **22**, 393(1968)
14. Rouser, G., Siakatos, A. N. and Fleischer, S. : Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography. *Lipids*, **1**, 85(1966)

(1996년 1월 29일 접수)