Journal of Life Science **2004**, Vol. 14. No. 5. 863~867 ©JLS

솔잎 추출물의 항산화 효과

유지현 · 차재영 · 정영기[1] · 정경태[1] · 조영수*

동아대학교 생명공학과, [1]동의대학교 생명응용과학과

Received August 9, 2004 / Accepted October 1, 2004

Antioxidative Effects of Pine (*Pinus denstifora*) Needle Extracts. Ji-Hyun Yoo, Jae-Young Cha, Yong-Kee Jeong[1], Kyung-Tae Chung[1] and Young-Su Cho*. *Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714 Korea, [1]Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea* – Antioxidative activities of pine (*Pinus denstifora*) needle extracts were tested *in vitro* experimental models. The concentration of total polyphenolic compound of water extracts from pine needle was 1.61%. In DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl) method, the electron donating activity of 0.1% water extracts from pine needle was as high as BHT (0.05%, w/v). The antioxidative activity was measured by inhibition against lipid peroxidation of rat liver microsome, and this activity was shown in the following : 67.7% at 0.1% concentration>63.1% at 0.05% concentration>28.2% at 0.01% concentration. In antioxidative activity determined by thiocyanate method against lipid peroxidation using linoleic acid, the antioxidative activities at all concentration of 0.01%, 0.05% and 0.1% were much higher than control during 7 days. In TBA method, the antioxidative activity was increased with increasing concentration until 6 days. These results support that water extracts from pine needle contain antioxidative compounds.

Key words – Pind needle, polyphenolic compound, antioxidative activity, DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl)

지속적인 경제성장과 소득증대에 따라 국민들의 전반적인 생활수준은 향상되었으나, 식생활 패턴의 변화로 인해 뇌 혈관계 질환, 심장병, 고혈압 및 당뇨병 등의 순환계 질환과 암으로 인한 사망률이 크게 높아져 건강에 대한 관심이 고조되고 있다[1]. 이러한 각종 질병과 노화 등에 활성산소 및 지질과산화물이 직접적인 원인으로 작용한다는 사실이 알려지면서 비타민을 비롯한 여러 가지 항산화 물질에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 항산화제는 천연 항산화제와 합성 항산화제로 크게 나누는데, 근래 합성 항산화제에 대한 안전성 문제가 대두되면서 천연물로부터 인체에 무해한 항산화성 물질을 탐색하는 연구가 많이 이루어지고 있다. 천연물에 존재하는 대표적인 항산화 물질로는 phenolic compound[5], ascorbic acid [2], tocopherol[25], carotenoids[11], flavonoids[19] 등이 알려져 있으나 합성 항산화제와 비교될 수 있는 경우는 별로 없기 때문에 효과적인 항산화제 개발을 위해서는 이용 가능한 천연물에 대한 보다 광범위한 검색과 연구가 필요한 실정이다.

지금까지 천연 항산화제로 연구 개발된 것을 보면 대부분 catechins, flavonoids, carotenoids와 같은 phenolic compound가 주류를 이루고 있는데, 이러한 연구의 일환으로써 phenolic compound를 함유한 솔잎 추출물에 관심이 많아지고 있다. 솔잎의 성분으로는 α-oinene, β-pinene, camphene 등의 정유성분, quercetin, kaempferol 등 flavonoid류, 수지 등이 있으며, 구성성분으로서는 수분 58.1%, 단백질 4.5%, 지질 3.9%, 당질 19.6%, 섬유소 13.3%, 회분 0.6% 정도가 함유되어 있다고 알려져 있다[9]. 솔잎은 예로부터 중풍을 예방하고 건위, 보혈작용이 있으며, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병과 같은 노화 관련 질환을 예방하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔으며, 솔잎의 기능성에 관한 연구로는 솔잎 첨가 식이가 지질대사에 미치는 영향[17]과 *in vitro* 연구에서는 솔잎 추출물이 암세포 성장을 억제시키는 효과가 있다고 보고되었으나[15] 솔잎 추출물의 지질과산화에 관한 체계적이고 구체적인 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 솔잎에 존재하는 생리활성 물질을 개발하기 위하여 수용성 추출물의 항산화 효과에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 솔잎은 2003년 10월경 경남 합천군 해인사 부근 인근 야산에서 자생하는 소나무(*Pinus denstifora*)에서 잎만을 채취하여 일반 수돗물로 세척하고 다시 증류수로 헹군 후 그늘에서 말린 후 2~3 ㎝ 길이로 세절하여 추출 재료로 사용하였다.

시료의 추출

세절한 솔잎 100 g과 솔잎 중량의 10배의 증류수를 열수

*Corresponding author
Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505
E-mail : choys@daunet.donga.ac.kr

추출기에 넣고 90℃에서 2시간 씩 3 회 반복 추출하였다. 추출액을 모아 여과지(Whatman filter paper No.2)로 여과시킨 후 여과액을 rotatory vacuum evaporator로 감압 농축하고, 농축된 액을 동결건조기로 동결건조 시킨 분말 상태를 수용성 추출물로 하였으며, 이때 수율은 약 1% 정도였다.

DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl) 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 Whatman filter paper No. 2에 여과시켜 만들었다. 이 용액 5 ml에 일정농도(0.01%, 0.05%, 0.1%)의 시료용액 1 ml을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다[12]. 이때 대조구인 BHT는 0.05% 농도로 첨가하여 위에서와 동일한 방법으로 흡광도 감소를 측정하였다. DPPH를 이용한 전자 공여능(electron donating ability; EDA)은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율 (%)로 표시하였다.

EDA (%) = { 1 - (Abs/Abc)}×100

Abc : Absorbance of control treatment at 528 nm

Abs : Absorbance of sample treatment at 528 nm

총 폴리페놀 화합물의 함량 측정

총 폴리페놀 화합물의 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 것을 이용한 Folin-Denis법[24]을 약간 변형시켜 측정하였다. 즉, 시료용액 0.5 ml에 Folin-ciocalteu's phenol reagent 2.5 ml를 첨가하여 잘 혼합하고 5분간 실온에서 방치하였다. 정확히 5분 반응시킨 후 7.5% Na_2CO_3 2 ml를 가하여 혼합하고 50℃에서 5분간 발색시킨 후 760 nM에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. Tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid 1 g을 50% 메탄올용액 1 ml에 녹이고 최종농도가 0, 50, 100, 150, 200, 300 및 500 μg/ml 용액이 되도록 조제하여 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 760 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

간 microsome 분획의 조제

성장기의 정상 흰쥐로부터 개복하여 적출한 간을 냉각된 생리식염수로 즉시 씻고 여과지로 물기를 제거한 후 일정량을 취해 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer (pH 7.4) 4 ml을 넣고 homogenizer로 균질화시켰다. 이 용액을 4℃, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 4겹의 가아제로 여과하고, 여액을 4℃로 설정된 초원심분리기에서 45,000 rpm으로 45분간 원심분리 하여 얻어진 침전물에 1.15% KCl-10 mM phosphate buffer (pH 7.4) 10 ml을 넣은 후 microsome 분획으로 하였다[6].

간 microsome 분획을 이용한 항산화 활성 조사

항산화 활성은 Wong 등의 방법[27]에 따라 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 1.5 ml에 시료 용액 0.2 ml, 간 microsome 분획(1 ml중 1 mg의 단백질 함유) 0.1 ml, 0.1 mM ascorbate 0.1 ml 및 5 mM $FeSO_4$ 0.1 ml를 차례로 가하여 반응액을 잘 혼합한 후 37℃의 shaking water bath에서 1시간 incubation 시켜 과산화를 유도시켰다. 이때 대조구는 시료를 첨가시키지 않고 위에서와 동일한 방법으로 실시하였다. Incubation이 끝나면 Esterbauer 등의 방법[10]에 준하여 3 M trichloroacetic acid와 2.5 N HCl의 혼합용액 0.5 ml를 가하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상층액 1 ml를 취하여 0.67% TBA 1 ml를 가하여 혼합하고 끓는 물 속에서 30분간 가열하여 발색시켰다. 냉각 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 지질과산화의 억제율은 대조구의 흡광도에 대한 저해율 (%)로 비교하였다.

Thiocyanate에 의한 항산화 활성 조사

*Osawa*의 방법[20]에 따라 먼저 linoleic acid (25 mg/ml in EtOH), ferrous chloride (2.45 mg/ml in 3.5% hydrochloric acid), ammonium thiocyanate (0.3 g/ml in H_2O), 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)를 만들어 이것을 stock solution으로 사용하였다. 혼합용액은 시료용액 0.2 ml, linoleic acid 0.2 ml을 시험관에 넣고 혼합한 후 phosphate buffer 0.4 ml와 증류수 0.2 ml를 가하여 40℃에서 incubation 하면서 일정간격으로 측정하였다. 측정방법은 혼합용액에서 0.1 ml을 취하여 시험관에 넣고 70% ethanol 3 ml과 ammonium thiocyanate 용액 0.1 ml, ferrous chloride 용액 0.1 ml를 혼합한 후 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성의 비교를 위하여 BHT를 0.05% 농도로 사용하여 BHT 첨가구로 하였다.

TBA (2-thiobarbituric acid)에 의한 항산화 활성 조사

시료용액 1 ml, linoleic acid (25 mg/ml in EtOH) 1 ml을 시험관에 넣고 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml와 증류수 1 ml를 가하여 40℃에서 incubation 하면서 일정간격으로 측정하였다. 측정방법[21]은 시료액 0.5 ml를 원심분리관에 넣고 35% trichloroacetic acid 0.25 ml와 0.75% aqueous TBA 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 boiling water bath에서 가끔 흔들면서 15분간 처리하여 흐르는 물에 냉각시킨 후 70% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가한 다음 20분 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하고, 그 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 화합물의 함량

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대

사산물로서 일반적으로 항산화 작용이 강한 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 사용한 솔잎 수용성 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량을 tannic acid를 표준곡선으로 하여 측정한 결과 Table 1과 같이 1.61%가 함유되어 있었다. Kang 등[14]은 솔잎 생체 100 g당 총 폴리페놀 함량이 1.80%라고 보고하였는데, 이는 본 실험 결과와 비슷하였으며, 식물 잎에서 추출한 총 폴리페놀 함량이 각각 1.32%, 1.34%라고 보고한 Kim 등[16]의 연구결과와 비슷하였다.

DPPH법에 의한 전자 공여능

DPPH는 비교적 안정한 free radical로써, ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는데, 이러한 DPPH법은 식물 추출물의 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되는 방법이다. 솔잎 수용성 추출물의 항산화 효과를 DPPH radical 제거정도를 측정하여 전자 공여능으로 나타낸 결과, 0.01%, 0.05%, 0.1% 농도에서 각각 18.2%, 64.3%, 70.0%로 나타나 농도 증가에 따라 항산화 활성도 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 1). 특히 0.1% 농도에서 대조구인 0.05% BHT와 비슷한 수준으로 높은 항산화 활성이 나타났다. 이는 Kim 등[17,18]의 에탄올로 추출한 솔잎이 66.47%, 솔잎과 자초복합물이 48.89%의 전자 공여능을 나타낸 결과보다 우수한 전자 공여능 효과를 보였다. 이는 Boo 등[4]이 솔잎으로부터 free radical 제거 작용이 있는 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone을 분리하였으며, 솔잎 추출물의 전자 공여능은 이 물질에 의한 것으로 사료된다.

Table. 1. Concentration of total polyphenolic compound in the Pine needle extract

Sample	Total polyphenolic compound(%)
Pine needle	1.61

간 microsome의 지질 과산화 억제활성

지질 과산화 반응은 여러 가지 독성 화학물이나 약물 또는 당뇨병 등 생체 이상에 의해 간세포에 중대한 손상을 입히는 것으로 알려져 있다[22]. 이러한 기전은 조직 내 세포의 산화적 스트레스의 증가, 즉 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 일어나게 된다. 이러한 지질 과산화 반응으로 형성된 지질 과산화물은 생체 내에서 퇴행성 과정을 유발하고, 암, 노화, 생체막의 변화 및 파괴 등 생체기능에 좋지 못한 효과를 나타내므로[3,23,26] 생체 내에서 지질 과산화물의 제어는 매우 중요하다. 동물 체내에서 생체막 지질의 과산화물 생성 정도를 나타내는 TBARS 함량은 각 조직세포의 microsome에 Fe^{++}/ascorbate을 첨가하여 비효소적으로 유도하는데[27], 솔잎의 수용성 추출물이 TBARS 함량에 미치는 영향은 0.01%, 0.05%, 0.1% 농도에서 각각 28.2%, 63.1%, 67.7%의 지질 과산화 억제효과가 있었다(Fig. 2). 이는 Jun 등[13]의 참오동나무 열매의 수용성, methanol, ethanol 추출물의 0.6% 농도에서 각각 61.0%, 69.0%, 62.0%의 지질 과산화 억제효과가 있다고 보고된 것 보다 더 낮은 농도에서 비슷한 정도의 억제효과를 나타낸 것으로 보아 솔잎 수용성 추출물이 강한 항산화 효과를 가지고 있는 것으로 나타났다.

Linoleic acid 산화 실험계를 이용한 항산화 활성

솔잎의 수용성 추출물을 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용한 thiocyanate 방법으로 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 솔잎 수용성 추출물의 농도에 따른 항산화 활성의 차이는 나타나지 않았으나, 0.01%, 0.05%, 0.1%의 농도에서 모두 반응 7일째까지 대조구에 비해 매우 강한 항산화

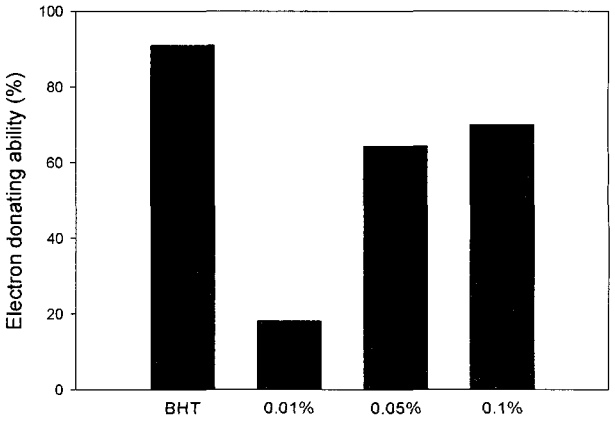

Fig. 1. DPPH electron donating abilities of pine needle extracts depending on concentration. BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%).

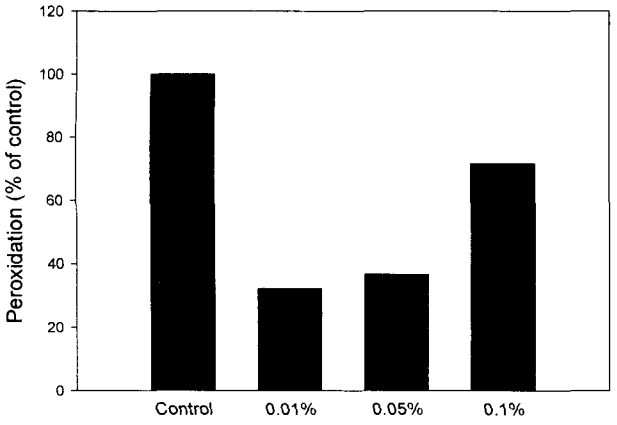

Fig. 2. Antioxidative activity of pine needle extracts in hepatic microsomal system as measured by the TBARS method. BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%).

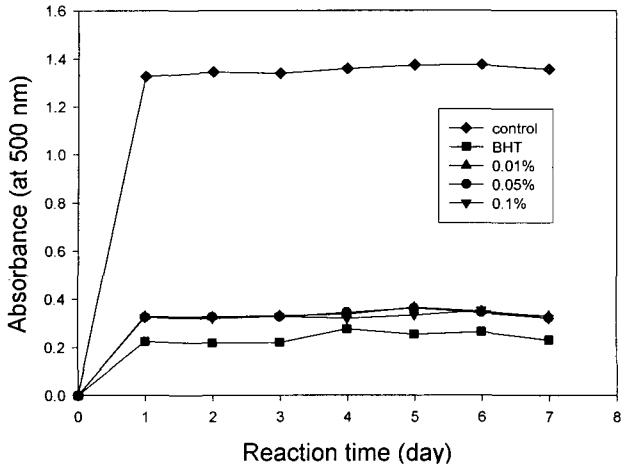

Fig. 3. Antioxidative activity of pine needle extracts in the linoleic acid system that is measured by the thiocyanate method. BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%).

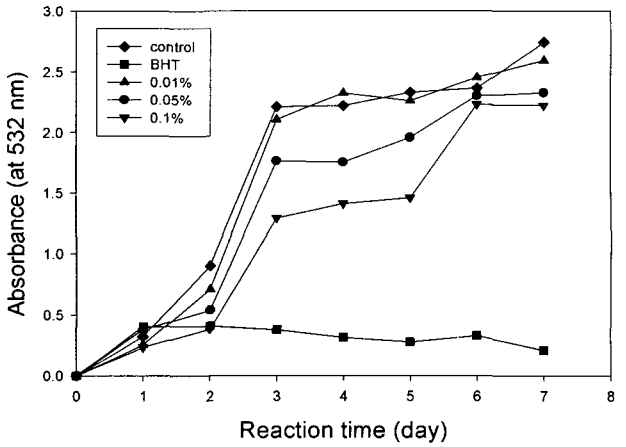

Fig. 4. Antioxidative activity of pine needle extracts in the linoleic acid system that is measured by the TBA method. BHT : butylated hydroxytoluene (0.05%).

활성이 유지되었으며, 0.05% BHT와도 비슷한 수준의 높은 항산화 활성을 나타내었다. 또한 TBA법을 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 반응 6일째까지는 0.1% >0.05%>0.01%의 순으로 농도 증가에 따라 항산화 활성도 높게 나타났으나, 반응 7일째에는 항산화 활성의 차이가 나타나지 않았다. 이들에 비해 대조구로 사용된 0.05% BHT는 매우 강한 항산화 작용을 보였다. Choi 등[8] 및 Chang 등[7]은 식품으로 사용되어 그 안전성이 확인된 각종 식물 및 약재를 ethanol과 물로 추출하여 항산화력을 검색한 결과, ethanol 추출물이 물 추출물 보다 항산화 효과가 강하고 추출수율도 높았다고 하였다. 따라서 솔잎을 각종 유기용매로 추출한 분획으로 항산화 실험을 한다면 보다 강력한 항산화 물질을 분리 할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

식물성 성분 중에서 생리활성 인자를 탐색할 목적으로 솔잎의 수용성 추출물에 의한 항산화 활성을 DPPH법, thiocyanate법, TBA법 및 microsome 생체막 지질 과산화물 생성정도를 TBARS법으로 측정하고, 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 솔잎 수용성 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 1.61% 이었으며, DPPH 측정법에서는 짙은 자색의 탈색되는 정도로 나타내는 전자 공여능이 솔잎 수용성 추출물의 0.1% 농도에서 BHT와 비슷한 수준으로 항산화 활성이 높게 나타났다. 간 microsome을 이용한 생체막 지질 과산화 억제정도는 솔잎 수용성 추출물의 0.1% (67.7%)>0.05% (63.1%)>0.01% (28.2%) 순으로 농도에 비례하여 증가하였다. Linoleic acid 산화 실험계를 이용한 thiocyanate법에서는 0.01%, 0.05%, 0.1%의 농도에서 모두 반응 7일째까지 대조구에 비해 매우 강한 항산화 활성을 보였으며, TBA법에서는 반응 6일째까지는 0.1%>0.05%>0.01%의 순으로 농도 증가에 따라 항산화 활성도 높게 나타났다. 이상의 결과에서 솔잎 수용성 추출물 중에는 *in vitro* 항산화 실험에서 항산화 활성을 나타내는 생리활성 성분이 존재하는 것으로 볼 수 있으므로 천연 항산화제로서의 가능성을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Annual report on the cause of death statistics. 1996. National Statistical Office, Republic of Korea.
2. Bauernfeind, J. C. and D. M. Pinkert. 1970. Food processing with added ascorbic acid. *Adr. in Food Res* **18**, 219.
3. Bidlack, W. R. and A. L. Tappel. 1973. Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids* **8**, 177-178.
4. Boo, Y. C., C. O. Jeon and J. Y. Oh. 1994. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone from pine needles as an antioxidative principle. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **37**, 310-314.
5. Brieskorn, C. H., A. Fuch, J. B. Bredenberg, J. D. Mcchensney and E. Wenkert. 1964. The structure of carnosol. *J. Org. Chem.* **29**, 2293-2299.
6. Cha, J. Y. and Y. S. Cho. 2001. Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentrations of lipid and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. *Korean J. Food Sci. Thechnol.* **33**, 128-134.
7. Chang, Y. S., U. Choi, D. H. Shin and J. I. Shin. 1992. Synergistic of *Rhus javanica* L. ethanol extract containing several synergist. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 149-153.
8. Choi, U., D. H. Shin, Y. S. Chang and J. I. Shin. 1992. Screening of natural antioxidant from plant and antioxidative effect. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 142-148.
9. Chung, B. S. and M. K. Shin. 1990. *The great dictionary of traditional and crude medicine.* pp.3-152. YoungLim Press, Seoul.
10. Esterbauer, H., J. Lang, S. Zadravec and T. F. Slater. 1987. *Methods in Enzymology*, Vol. **152**, Academic Press Inc., New York.

11. Foote, C. S. and R. W. Denny. 1968. Chemistry of singlet oxygen quenching by β-carotene. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6233-6239.
12. Hwang, J. T., H. C. Kang, T. S. Kim and W. J. Prak. 1999. Lipid component and properties of grape seed oils. *Korean J. Food. Nutr.* **12**, 150-155.
13. Jun, B. S., J. Y. Cha and Y. S. Cho. 2001. Antioxidative activities of fruit extracts of *Paulownia tomentosa* Stued. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **8**, 231-238.
14. Kang, Y. H., Y. K. Park, S. R. Oh and K. D. Moon. 1995. Studies on the physiological funtionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 978-984.
15. Kim, E. J., S. W. Jung, K. P. Choi and S. S. Ham. 1998. Cytotoxic effect of the pine needle extracts. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **30**, 213-217.
16. Kim, H. J., J. Y. Cha, M. L. Choi and Y. S. Cho. 2000. Antioxidative activities by water extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 148-152.
17. Kim, J. D., T. H. Yoon, N. Choi, K. J. Im, J. S. Ju and S. Y. Lee. 1991. Effect of dietary supplementation with pine leaf on lipid parameters in rats. *Kor. J. Gerontol.* **1**, 47-50.
18. Kim, S. M, Y. S. Cho and S. K. Sung. 1999. Effect of ethanol extracts in *Pinus densiflora, Lithos permum erythrorhizon* on the lipid oxidation of oil emulsion. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 984-989.
19. Miura, K. and N. Nakatani. 1989. Antioxidative activity of flavonoid from Thyme. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3043-3045.
20. Osawa, T. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf was of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 735-739.
21. Ottolenghi, A. 1959. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 355-461.
22. Plaa, G. L. and H. Witschi. 1976. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **16**, 125-131.
23. Saito, M. 1988. Interaction between lipid peroxide formation and nutritional status. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **41**, 343-349.
24. Swain, T., W. E. Hillis and M. Oritega. 1959. Phenolic constituents of *Ptunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 83-88.
25. Tappel, A. L. 1972. Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **12**, 203-208.
26. Vergroeson, A. T. 1997. Physiological effects of dietary linoelic acid. *Nutr. Rev.* **35**, 1-9.
27. Wong, S. F., B. Holliwell, R. Richimond and W. R. Skowroneck. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radical in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J. Inorganic Biochem.* **14**, 127-134.