

솔방울 에틸아세테이트 분획물의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 활성

장태원¹, 남수환², 박재호^{1*}

¹중원대학교 생약자원개발학과, ²천리포수목원

Antioxidant Activity and Inhibitory Effect on Oxidative DNA Damage of Ethyl Acetate Fractions Extracted from Cone of Red Pine (*Pinus densiflora*)

Tae Won Jang¹, Su Hwan Nam² and Jae Ho Park^{1*}

¹Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan 28024, Korea

²Chollipo Arboretum, Taean 32121, Korea

Abstract - Antioxidant activity and inhibitory effect on oxidative DNA damage of ethyl acetate fractions extracted from Cone of Red Pine (*Pinus densiflora*) were investigated to find utilization of Cone, by-product of Red Pine, thrown out after berry shatter, as a new natural plant resource. Cone from *P. densiflora* was extracted with methanol (MeOH) and separated to petroleum ether, ethyl acetate and water fraction. Among them, ethyl acetate fraction was used. The antioxidant activity was conducted by the 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical, 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging assay, Fe²⁺ chelating assay and reducing power assay. The inhibitory effect on oxidative DNA damage was determined by DNA cleavage assay using ϕ X-174 RF I plasmid. The results of DPPH and ABTS radical scavenging activity at 200 μ g/ml of extracts were 86.50% and 95.80% respectively, which were similar figures compared with L-ascorbic acid as control. Fe²⁺ chelating activity was 77.96% and reducing power was 0.77 at 200 μ g/ml. Total phenolic component was 27.29 \pm 0.3 mg/g and Vitamin C content was 1.84 \pm 0.1 mg/g. Also ethyl acetate fraction from Cone has inhibitory effect, using ϕ X-174 RF I plasmid on DNA cleavage assay. In conclusion, Cone, by-product of *P. densiflora*, showed high antioxidant activity and inhibitory effect on oxidative DNA damage. Therefore this study suggests Cone, useless by-product, can be developed as a new natural plant resource with lots of utilization such as an effective antioxidant, natural medicine, food, cosmetics and so on.

Key words - *Pinus densiflora*, DPPH, Reducing power, Fe²⁺ chelating

서 언

현대 사회의 성장과 의학의 발전으로 인간의 평균 수명은 점차 증가 되고 있으나, 많은 요인들에 의해 건강을 위협 받고 있는 현대인들에게 건강에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 많은 요인 중에 환경오염, 흡연과 음주, 환경 호르몬 등은 인체 내의 산화적 스트레스를 일으키는 것으로 밝혀지고 있으며, 산화적 스트레스는 세포 손상과 지질과산화를 유발하므로 여러 가지 병리학적 현상에서 매우 중요하다(Hwang *et al.*, 2011; Li *et*

al., 2011). 이러한 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA에 이르는 비가역적인 변형과 파괴를 유래한다고 알려져 있다(Seifried *et al.*, 2007).

이러한 활성산소종이 암, 동맥경화, 심혈관계질환 뿐만 아니라 다양한 질병에 관련이 있다고 인식되며, 생물분자 자체를 공격하여 세포, 조직, 기관에 이르는 피해를 준다고 보고되고, 긍정적인 측면에서 활성산소는 세균을 죽이는 살균의 생체 방어 작용을 하기도 하지만 일반적으로 인체 내에서 산화를 일으켜 질병을 야기하는 작용을 하며(Maxwell, 1995), 활성산소종에 의한 산화는 곧 노화에 직접적인 영향을 미치고, 노화는 성인병과 같은 만성 질환에 관여하게 되며, 결국 여러 질병에 원인이

*교신저자: parkjh@jwu.ac.kr

Tel. +82-43-830-8614

된다는 보고가 있다(Marnett, 2000). 최근, 활성산소종에 의한 인체 내 손상을 보호하는 항산화물질에 대하여 다양한 연구가 진행되고 있는데, 항산화제를 복용하면 인체가 갖고 있는 산화적 스트레스에 대항하는 방어 기전을 향상시킬 수 있다. 몇 가지 합성 항산화제(synthetic antioxidants)가 질병의 예방과 치료를 위해 제안되었으나 이들의 다양한 부작용과 독성은 문제가 되고 있다. 이에 반해 천연 항산화제, 특히 식품 성분은 일반적으로 안전하다고 받아들여지므로(Hwang *et al.*, 2011; Warnholtz and Münzel, 2000). 합성 항산화제의 부작용인 독성 작용을 대체하기 위하여 천연 항산화제로 사용될 수 있는 식물의 항산화 물질에 대해 다양한 연구가 이루어지고 있다.

천연에서 얻을 수 있는 항산화 물질은 polyphenols 및 flavonoid 계통의 화합물로 알려져 있는데 대부분의 식물에 polyphenol 성분이 함유되어 있다(Choe and Yang, 1982). 이 물질들은 화학반응 중 연쇄반응을 통해 alkyl radical 또는 alkylperoxy radical에 수소를 공여하는 반응을 하고 이 결과 radical을 안정화시켜 제거함으로써 산화를 억제하는 효능을 보인다(Lee *et al.*, 2006). 이러한 산화 반응의 억제를 통해 인체에 대한 radical의 반응들을 보호한다.

소나무(*Pinus densiflora*)는 소나무과의 상록성 침엽교목으로 한국, 일본, 중국등 극동지방에 자생하며 솔잎, 꽃가루 및 수피를 약용 또는 식용으로 사용한다(Lee, 2003). 소나무는 α -pinene, β -pinene, camphene 등으로 조성된 terpenes 같은 정유성분과 polyphenol과 flavonoid류, 무기 및 유기성분, 비타민류 등 다양한 성분이 함유되어 있는데, 이 중 terpenes은 항미생물 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Kuk *et al.*, 1997). 또한 솔잎의 성분 중에는 폴리페놀 성분인 수용성 탄닌의 함량이 높다고 보고되어있다(Chung *et al.*, 1996).

현재까지 소나무의 잎 추출물을 이용한 생리활성, 항산화, 면역 활성, 병원성 및 식중독 미생물에 대한 항균성을 적용한 식품의 효능, 피부미백 및 노화방지 등의 기능성 연구에 대한 많은 보고가 있다(Choi *et al.*, 1997; Park, 1998; Sung and Kim, 2005). 그러나 소나무의 부산물로 버려지는 식물 자원인 솔방울에 대한 항산화 및 산화적 스트레스에 대한 DNA 손상 억제 활성에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 솔방울의 에틸아세테이트 분획물을 통한 항산화 활성 및 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상에 대한 방어 활성을 확인하여, 소나무의 부산물로서 버려지는 솔방울의 실용성을 밝힘으로써 새로운 천연 식물자원으로서의 이용 가능성을 높이고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 솔방울(*Pinus densiflora*)은 충청남도 태안군 천리포수목원에서 수집·동정한 것(voucher number: CLP09-27)을 제공받아 시료로 사용하였다.

본 연구에 사용된 methanol, petroleum ether, ethyl acetate 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sk chemicals (HPLC grade, Korea) 제품을 사용 하였고, 나머지 시약은 Sigma-aldrich (USA) 제품을 사용하였다. 기타시약 및 기기는 별도 표기하였다.

방법

1) Ethyl acetate 분획

실험에 사용된 솔방울은 건조시료 50.0 g을 분쇄한 후, 80% methanol 3 L로 3일간 침지한 후 여과하였다. methanol 추출물을 40°C 이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, JAPAN)로 농축한 후 분별깔대기에 petroleum ether, ethyl acetate 순으로 3 회 반복으로 용매분획 하였다. ethyl acetate 분획물을 감압 환류 냉각장치로 농축하여 실험 전까지 -27°C에 보관하였고, DMSO에 4000 ppm으로 용해하여 실험에 사용하였다.

2) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet 방법(Bondet, 1997)을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300 μ M 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)을 515 nm에서 흡광도 값이 1.00이 되도록 ethanol을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물 40 μ l에 DPPH solution 760 μ l를 첨가한 후 20분 간 37°C에서 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) 은 각 농도별 시료처리에 의한 저해 값(μ g/mL)을 이용하여 로그함수를 이용하여 50% 저해농도를 계산하였다.

3) ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg 등의 방법 (Van den Berg *et al.*, 1999)을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7.4 mM 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 24 시간동안 ABTS radical을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 이 되도록 희석하였다. 각 농도별 추출물 40 µl에 ABTS solution을 760 µl 씩 각각 첨가한 후 20분간 37°C에서 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거 활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

IC₅₀은 각 농도별 시료처리에 의한 저해 값(µg/ml)을 이용하여 로그함수를 이용하여 50% 저해농도를 계산하였다.

4) Fe²⁺ 킬레이팅 활성

Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 Hsu 방법(Hsu *et al.*, 2006)을 참고하여 실험하였다. 술방울의 농도별 추출물 40 µl에 1 mM FeCl₂ 40 µl와 증류수 700 µl를 혼합하여 약 30 초간 실온에서 반응하였다.

이 혼합물에 5 mM ferrozine 40 µl를 첨가하여 Fe²⁺-ferrozine complex를 유도하고 10분 뒤 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fe²⁺ 킬레이팅의 활성(%)은 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 킬레이팅 활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

IC₅₀은 각 농도별 시료처리에 의한 저해 값(µg/ml)을 이용하여 로그함수를 이용하여 50% 저해농도를 계산하였다.

5) 환원력

환원력은 Oyaizu의 방법(Oyaizu, 1986)을 참고하여 측정하였다. 각 농도별 추출액 100 µl에 0.2M potassium phosphate buffer (pH 6.6) 250 µl과 1% potassium hexacyanoferrate (III)

250 µl를 혼합한 후, 50°C에서 20분간 반응시킨 후 찬물로 냉각한 후, trichloroacetic acid (TCA) 250 µl를 첨가하였다. 위 반응액을 2000 g에서 5분간 원심 분리하여 상등액 400 µl에 증류수 400 µl와 0.10% ferric chloride 16 µl를 첨가하여 혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값이 높을수록 환원력이 강한 것으로 평가된다.

6) 총 페놀성 화합물 분석

총 페놀성 화합물 분석은 Folin-Denis 방법(AOAC, 1995)을 참고하여 측정하였다. 건조시료 1 g에 1% acetic acid/diethyl ether 100 ml를 혼합하여 5분간 추출 후 상등액을 제거하였다. 잔여물과 70% acetone을 혼합하여 50 ml를 만든 후 2 시간 동안 교반 추출하였다. 상등액을 filter paper로 걸러낸 후, 70% acetone으로 50 ml 정용하였다. 추출물 50 µl와 증류수 950 µl, folin 500 µl를 혼합한 후, 20% sodium carbonate 2.5 ml 넣고 40분간 실온에서 반응시켰다. 반응물을 흔들지 않고 맑은 액체를 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tannic acid로 정량 직선방정식을 사용하였다.

7) 비타민C 함량 분석

비타민C 함량은 Jagota and Dani (1982)의 방법을 참고하여 측정하였다. 건조시료 0.50 g에 증류수 10 ml 넣은 후, 4500 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 추출하였다. 추출물을 filter paper (No.2)로 걸러낸 후, 200 µl와 trichloroacetic acid (TCA) 800 µl를 넣고 3000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상등액 500 µl와 증류수 1,50 ml, folin 200 µl를 넣고 혼합한 후 10분간 상온에서 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 L-ascorbic acid로 정량 직선방정식을 사용하였다.

8) ϕ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성

ϕ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성은 Jung과 Surh의 방법(Jung and Surh, 2001)을 참고하여 측정하였다.

- Ferric chloride (FeCl₂)을 통한 산화적 스트레스

각 농도별 추출액 40 µl와 4.5 mM FeCl₂ 60 µl와 증류수 700 µl를 넣은 후, 37°C에서 15분 반응하였다. 반응액 20 µl와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 µl를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV 하에서 사진 촬영하였다.

- Ferrous sulfate (FeSO₄)을 통한 산화적 스트레스

각 농도별 추출액 40 µl와 1.5 mM FeSO₄와 1.5 mM hydrogen peroxide (H₂O₂)를 1:1로 혼합한 용액 760 µl를 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응하였다. 반응액 20 µl와 ϕX-174 RF I plasmid DNA 5 µl를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV 하에서 사진 촬영하였다.

통계학적 분석

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 18.0)를 이용하여 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, ANOVA를 통한 P < 0.05 수준에서 Duncan 다중검정법(duncan's multiple range test)으로 사후 검정하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

항산화 활성

최근 사회 및 과학 모든 분야에서의 급속한 발전에 의해 인간의 기대수명이 증가하면서, 동시에 건강한 삶에 대한 관심이 증가하고 있다. 질병을 유발하거나 그러한 환경에 노출될 수 있는 요인에 대한 관심과 더불어 산화적 스트레스와 활성산소종에 대한 우려가 심화되고 있다. 활성산소종(Reactive oxygen specific)은 인체 내의 세포, 조직 등에서 다양한 대사과정에서 필수 불가결적으로 생성되고, 인체 내에서 생성되는 활성산소는 항산화효소와 같은 기체들과의 평형이 무너지고 항상성이 깨어지게 되면, 산화적 스트레스가 발생되게 된다. 그로 인해

노화, 당뇨, 비만과 같은 각종 만성 질병들의 원인이 된다 (Halliwell, 1996). 이를 해결할 수 있는 항산화제에 관한 관심이 집중되었으나, 합성 항산화제인 BHT (butylated hydroxytoluene) 및 BHA (butylated hydroxyanisole) 등의 인체에 대한 독성이 보고된 이후로 점점 기피되고 있다(Sun and Fukuhara, 1997). 이에 따라 최근, 천연물에서 추출한 천연 항산화제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며(Caillet *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2009), 천연 항산화제의 성분은 대부분 식물에 포함되거나 유래된 페놀 화합물로서 그 기능은 유리 라디칼의 생성을 지연시키거나 활성을 저해하는 것을 통해 항산화 물질로서의 역할을 한다고 알려져 있다(Lee *et al.*, 2005).

최근 연구에서 *P. densiflora* 잎의 항산화 활성 및 proanthocyanidins 분석에 대한 연구(Park *et al.*, 2011)를 통해 물 추출물의 강한 항산화 능력, *P. densiflora* 잎의 항산화, 항돌연변이, 항종양 활성에 대한 연구(Kwak *et al.*, 2006), *P. densiflora* 수피에 대한 항산화 및 DNA 손상억제에 대한 연구(Jiang *et al.*, 2012) 등의 연구가 진행되어 *P. densiflora*의 잎뿐만 아니라 여러 부산물에 대한 활성 및 분석이 진행되었다. 하지만 솔방울에 대한 항산화 및 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제에 대한 연구는 미비하다.

따라서 본 연구에서는 솔방울 ethyl acetate 분획물의 총 페놀성 화합물 함량과 비타민 C 함량을 비교 분석하고, 항산화 활성 및 DNA 손상에 대한 방어능력의 평가를 통해 천연 식물자원으로써의 가치를 높이고자 한다.

솔방울 ethyl acetate 분획물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼, ABTS 라디칼 소거활성과 Fe²⁺ 킬레이팅 활성 그리고 환원력을 비교 분석하여 나타냈다.

솔방울 ethyl acetate 분획물의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과(Table 1), 추출물의 농도가 증가하는 것에 따라 활성이 증가하였다. 또한 추출물의 농도 200 µg/ml에서 L-ascorbic acid (93.47%)와 비교하여 솔방울 추출물은 86.50%의 소거 활성을 나타내었고 IC₅₀ (Inhibitor concentration 50%)은 13.97 µg/ml를 보였다. 통계적으로 비교분석하였을 때, 모든 농도에

Table 1. DPPH radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from Cone of *P. densiflora*

Sample	Extracts (µg/ml) (%)					IC ₅₀ (µg/ml)
	200	40	8	1.6	0.32	
<i>P.densiflora</i>	86.50 ± 1.73b	79.33 ± 1.19b	34.81 ± 0.68b	5.58 ± 0.65b	1.58 ± 1.11b ^z	13.97
L-ascorbic acid	93.47 ± 0.06a	88.23 ± 0.05a	76.51 ± 0.11a	20.88 ± 0.05a	5.32 ± 0.49a	5.08

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at p = 0.05.

Table 2. ABTS radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from Cone of *P. densiflora*

Sample	Extracts ($\mu\text{g/ml}$) (%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	200	40	8	1.6	0.32	
<i>P. densiflora</i>	95.80 \pm 1.69a	79.69 \pm 5.91b	56.90 \pm 1.68a	14.98 \pm 3.02a	4.68 \pm 2.93a ^z	7.80
L-ascorbic acid	96.32 \pm 2.89a	93.04 \pm 1.29a	23.85 \pm 1.93b	9.28 \pm 3.21a	5.14 \pm 2.74a	10.49

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

Table 3. Fe²⁺ Chelating activity (%) of ethyl acetate fractions from Cone of *P. densiflora*

Sample	Extracts ($\mu\text{g/ml}$)					IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	200	40	8	1.6	0.32	
<i>P. densiflora</i>	78.0 \pm 0.0b	33.1 \pm 0.1b	23.7 \pm 0.1b	16.2 \pm 0.1a	9.8 \pm 0.2a ^z	52.2
Deferoxamine	95.5 \pm 0.0a	94.3 \pm 0.1a	48.3 \pm 0.0a	10.6 \pm 0.1b	0.7 \pm 0.1b	8.1

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

서 알파벳 a로 표현된 L-ascorbic acid의 활성이 비교적 높았다. ABTS 라디칼 소거활성은(Table 2) 추출물 농도가 증가하는 것에 따라 활성이 증가하였으며 추출물의 농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 L-ascorbic acid (96.32%)와 비교하여 술방울 추출물은 95.80%의 소거 활성을 나타내었다. 특히 추출물의 농도 200, 1.6, 0.32 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 L-ascorbic acid와 통계적으로 유의성 없는 뛰어난 효과를 나타냈으며, 추출물의 농도 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 술방울 ethyl acetate 추출물의 효과가 더욱 뛰어났다. 또한 IC₅₀은 L-ascorbic acid (10.49 $\mu\text{g/ml}$)에 비해 높은 7.80 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.

술방울 ethyl acetate 분획물의 Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 생체 내의 철(iron, Fe)이온의 과잉으로 야기될 수 있는 hydrogen peroxide와의 fenton reaction에 의해 단백질 발현에 대한 직접적인 손상과 산화적 스트레스를 통한 DNA 손상, 세포의 노화 등의 원인인 강력한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 중 hydroxyl radical의 억제를 위한 Fe²⁺ 킬레이팅 반응을 이용한 것이다(Sakanaka *et al.*, 2005; Stohs and Bagchi, 1995). 시료와 함께 철 이온 과다 환자 치료에 철 이온 킬레이팅화 반응을 통해 사용되어 온 deferoxamine으로 비교 분석하였다(Zurlo

et al., 1989; Oliveri *et al.*, 1994; Sonakul *et al.*, 1988; Barman and Foster, 1999; Oliver and Brittenham, 1997; Benz, 2001). Fe²⁺ 킬레이팅 활성을 측정된 결과(Table 3), 각 추출물의 농도가 높을수록 킬레이팅 활성이 높았으며, 추출물 농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 deferoxamine (95.50%)과 비교하여 술방울 추출물은 78.0%의 활성을 보였지만, 추출물 농도 1.6, 0.32 $\mu\text{g/ml}$ 는 술방울 ethyl acetate 분획물의 효과가 통계적으로 더욱 뛰어났다.

환원력은 일반적으로 전자나 수소, 산소 등의 전자의 이동이나 공여가 가능한 물질들이 산화를 통해 활성산소를 발생시키는 것에 대한 억제능력을 뜻한다. 술방울 추출물의 환원력을 평가한 결과 L-ascorbic acid와 비교를 통해 700 nm에서의 흡광도를 배수로 표현한 결과 추출물 농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.77로 높은 수준의 활성을 보였다(Table 4).

총 페놀성 화합물 함량 분석 및 비타민 C 함량 분석

술방울의 총 페놀성 화합물 함량을 분석한 결과(Table 5), 27.3 \pm 0.3 mg/g의 함량을 나타냈으며, 총 페놀성 화합물 함량은 농도별로 희석한 tannic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다.

Table 4. Reducing Power of ethyl acetate fractions from Cone of *P. densiflora*

Sample	Extracts ($\mu\text{g/ml}$) (fold of control)					
	Control ^z	200	40	8	1.6	0.32
<i>Pinus densiflora</i>	1 \pm 0.05a	0.77 \pm 0.13b	0.69 \pm 0.12c	0.12 \pm 0.02d	0.01 \pm 0.0e	0.01 \pm 0.0e ^y

^zControl : L-ascorbic acid

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

Table 5. Total phenolic component and Vitamin C content of ethyl acetate fraction from Cone of *P. densiflora*

	Total phenolic component	Vitamin C
Cone of <i>Pinus densiflora</i>	27.3 ± 0.3 ^z mg/g	1.8 ± 0.1 mg/g

^zEach value is expressed as mean ± SD (n=3).

식물은 많은 페놀성 화합물을 함유하고 있고, 특히 소나무과는 페놀성 화합물을 많이 포함하고 있다(Kuk *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 1996). 페놀성 화합물은 킬레이팅을 통해 금속이온들을 비활성화 시키고 추가적으로 superoxide-driven fenton reaction 과 같은 활성산소종의 기원으로 알려져 있는 반응들을 억제하는 반응에 참여한다(Arorra *et al.*, 1998; Rice-Evans *et al.*, 1997).

최근 연구에서 *P. densiflora* 톱밥에 대한 항산화 및 페놀성 성분분석에 대한 연구(Patra *et al.*, 2015)에서 톱밥에서 추출한 정유성분에서의 페놀성 화합물이 약 5.7%로 나타났으며, 소나무과 식물의 수피의 항산화 활성 탐색에 대한 연구(Ku *et al.*, 2007)에서 *P. densiflora* 수피에서 5.1%의 페놀성 화합물을 포함하고 있다고 밝혔다. 이에 비해 적은 페놀성 화합물 함량을 보이는 솔방울에서 비교적 다른 부산물에 비해 높은 항산화 효과를 보였다.

솔방울의 비타민 C 함량은 1.8 ± 0.1 mg/g으로 분석되었으며, 비타민 C 함량은 L-ascorbic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다(Table 5).

산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 활성

암의 initiation 단계에서 발생하는 DNA 손상은 암발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 initiation 단계에서의 DNA 손상 억제는 항암활성에 있어서 중요한 역할을 한다(Johnson *et al.*, 1996). Ahn and Park (2013)은 항산화 활성이 매우 높은 미선나무(*Abeliophyllum distichum*) 꽃 추출물이 산화적 손상에 의한 DNA 손상을 억제 한다고 보고 하였으며, 높은 항산화 활성을 나타내는 팥(*Phaseolus angularis*) 열수 추출물 처리는 산화적 손상을 받은 NIH 3T3세포에서 DNA 인산화를 억제함으로써 세포내 산화적 손상을 억제한다고 보고하였다(Park *et al.*, 2011). 따라서 본 연구에서는 항산화 활성이 탁월한 솔방울 ethyl acetate 분획물의 산화적 DNA 손상 억제활성을 평가하기 위해 ϕX-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 이용한 비세포적 시스템으로 평가하였다.

솔방울 ethyl acetate 분획은 농도 의존적으로 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상억제 활성을 나타내었다(Fig. 1). 정상적인 plasmid DNA는 supercoiled (SC) 형태로 존재하나 추출물 처리 없이 H₂O₂와 철의 fenton 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼 또는 철 이온 존재 하에서는 산화적 스트레스에 의한 손상을 받아 open-circular(OC)형태로 전환되지만 추출물 처리 후 hydroxyl radical 또는 iron 존재 하에서는 산화적 손상을 억제하여 open-circular(OC)형태로 전환을 억제한다.

적 요

본 연구에서는 솔방울을 새로운 천연 식물자원으로서의 이

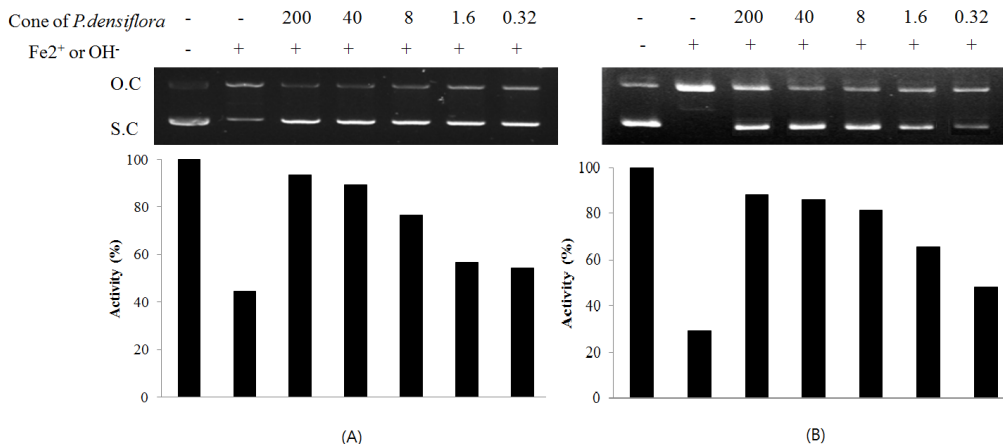


Fig. 1. Inhibition effect of ethyl acetate fraction from Cone of *P. densiflora* against oxidative DNA damage by Fe²⁺ ion (A) and hydroxyl radical (B).

용 가치를 평가하기 위해 솔방울 ethyl acetate 분획물의 항산화 활성과 DNA 손상억제 효과를 조사하였다. 솔방울 ethyl acetate 분획물의 DPPH, Fe²⁺ 킬레이팅 및 환원력 활성은 대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 활성을 나타내었다. 특히 ABTS 소거 활성의 IC₅₀값은 L-ascorbic acid (10.49 µg/ml)에 비해 솔방울 ethyl acetate 분획물(7.80 µg/ml)이 더욱 높은 활성을 보였다. 또한 총페놀성 화합물과 비타민 C 함량은 각각 27.3 mg/g, 1.8 mg/g로 나타났다. Hydroxyl radical과 fenton reaction에 의한 산화적 DNA 손상억제 효과는 모든 농도에서 50% 이상의 높은 손상 억제 효과를 나타냈다. 따라서 본 연구결과를 통한 솔방울 ethyl acetate 분획물의 항산화 활성과 산화적 DNA 손상 억제 효과 입증은 다소 부가가치가 낮게 평가되어온 솔방울은 식품이나 천연 의약품 분야에 새로운 천연소재로서의 활용가치가 높을 것으로 판단된다.

References

- Ahn, J.J. and J.H. Park. 2013. Effects of *Abeliophyllum distichum* Nakai flower extracts on antioxidative activities and inhibition of DNA damage. Korean J. Plant Res. 26(3):355-361.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA. pp. 8-35.
- Arora, A., M.G. Nair and G.M. Strasburg. 1998. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. J. Free Radic. Biol. Med. 24:1355-1363.
- Barman Balfour J.A. and R.H. Foster. 1999. Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in beta-thalassaemia major and other transfusion-dependent diseases. Drugs 58(3):553-578.
- Benz, E.J. 2001. Hemoglobinopathies: In Braunwald, E., A.S. Fauci, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo and J.L. Jameson (eds.), Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th ed. McGraw-Hill, Inc., New York, USA. pp. 666-674.
- Bondet, V., W. Brand Williams and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 30:609-615.
- Caillet, S., H. Yu, S. Lessard, G. Lamoureux, D. Ajdukovic. and M. Lacroix. 2007. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. J. Food Chem. 100(2):542-552.
- Choe, S.Y. and K.H. Yang. 1982. Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). J. Korean Food Sci. Technol. 14(3):283-288 (in Korean).
- Choi, M.Y., E.Y. Choi, E. Lee, T.J. Rhim, B.C. Cha and H.J. Park. 1997. Antimicrobial activities of pine needle (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc) extract. Korean. J. Microbiol. Biotechnol. 25:293-297 (in Korean).
- Chung, H.J., G.H. Hwang, M.J. Yoo and S.J. Rhee. 1996. Chemical composition of pine sprouts and pine needles for the production of pine sprout tea. Korean. J. Soc. Diet. C. 11(5):635-641 (in Korean).
- Halliwell, B. 1996. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. Biochem. Pharmacol. 49(10):1341-1348.
- Hsu, B., I.M. Coupar and K. Ng. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm. *Hyphaene thebaica*. J. Food Chem. 98(2):317-328.
- Hwang, J.Y., H.S. Lee and J.S. Han. 2011. Protective effect of *Sasa borealis* leaf extract on AAPH-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. J. Food Sci. Nutr. 16(1):12-17.
- Jagota, S.K. and H.M. Dani. 1982. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. J. Analytical Biochem. 127(1):178-182.
- Jang, I.C., J.H. Park, E. Park, H.R. Park and S.C. Lee. 2008. Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from cosmos (*Cosmosbipinnatus*) flowers. J. Plant Foods Hum. Nutr. 63(4):205-210.
- Jeon, G.I., M.Y. Yoon, H.R. Park, S.C. Lee and E. Park. 2009. Neuroprotective activity of *Viola mandshurica* extracts on hydrogen peroxide-induced DNA damage and cell death in PC12 cells. J. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1171(1):576-582.
- Jiang, Y., W. Han, T. Shen and M.H. Wang. 2012. Antioxidant activity and protection from DNA damage by water extract from pine (*Pinus densiflora*) bark. Korean. J. Prev. Nutr. Food Sci. 17(2):116-121 (in Korean).
- Johnson, T.M., Z.X. Yu, V.J. Ferrans, R.A. Lowenstein and T. Finkel. 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93(21):11848-11852.
- Jung, Y. and Y. Surh. 2001. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. J. Free Radic. Biol. Med. 30(12):1407-1417.
- Ku, C.S., J.P. Jang and S.P. Mun. 2007. Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. Korean. J. Wood Sci. 53(6):524-528 (in Korean).
- Kuk, J.H., S.J. Ma and K.H. Park. 1997. Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity

- from needle of *Pinus densiflora*. Korean J. Food Sci. Technol. 29(2):204-210 (in Korean).
- Kwak, C.S., S.C. Moon and M.S. Lee. 2006. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). J. Nutr. Cancer. 56(2):162-171 (in Korean).
- Lee, C.B. 2003. An Illustrated Guide to Korean Flora. Hyangmunsa, Seoul, Korea. p. 141 (in Korean).
- Lee, S.Y., E.J. Hwang, G.H. Kim, Y.B. Choi, C.Y. Lim and S.M. Kim. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 13(3):93-100 (in Korean).
- Lee, Y.S., E.J. Joo and N.W. Kim. 2006. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepistanuda*. Korean. J. Soc. Food Sci. Nutr. 35(10):1309-1314 (in Korean).
- Li, S.C., T.C. Chou and C.K. Shih. 2011. Effects of brown rice, rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats. J. Food Res. Int. 44(1):209-216.
- Marnett, L.J. 2000. Oxy radicals and DNA damage. Carcinogenesis 21(3):361-370.
- Maxwell, S.J. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. Drugs 49(3):345-361.
- Oliver, N.F. and G.M. Brittenham. 1997. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. Blood 89(3):739-761.
- Oliveri, N.F., D.G. Nathan, J.H. MacMilan, A.S. Wayne, P.P. Liu, A. McGee, M. Martin, G. Koren and A.R. Cohen. 1994. Survival in medically treated patients with homozygous beta- thalassemia. England J. Med. 331(9):574-578.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese J. Nutr. 44(6):307-315.
- Park, C.S. 1998. Antibacterial activity of ethanol extract of pine needle against pathogenic bacteria. Korean. J. Food Prev. 5(4):380-385.
- Park, Y.S., M.H. Jeon, H.J. Hwang, M.R. Park, S.H. Lee, S.G. Kim and M. Kim. 2011. Antioxidant activity and analysis of proanthocyanidins from pine (*Pinus densiflora*) needles. J. Nutr. Res. Pract. 5(4):281-287.
- Park, Y.M, J.B. Jeong, J.H. Seo, J.H. Lim, H.J. Jeong and E.W. Seo. 2011. Inhibitory effect of red bean (*Phaseolus angularis*) hot water extracts on oxidative DNA and cell damage. Korean J. Plant Res. 24(2):130-138 (in Korean).
- Patra, J.K., S.H. Kim, H. Hwang, J.W. Choi and K.H. Baek. 2015. Volatile compounds and antioxidant capacity of the bio-oil obtained by pyrolysis of Japanese red pine (*Pinus densiflora* siebold and zucc). Molecules 20(3):3986-4006.
- Rice-Evans, C.A., J. Sampson, P.M. Bramley and D.E. Holloway. 1997. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo* ?. J. Free Radic. Res. 26(4):381-398.
- Sakanaka, S., Y. Tachibana and Y. Okada. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). J. Food Chem. 89(4):569-575.
- Seifried, H.E., D.E. Anderson, E.I. Fisher and J.A. Milner. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J. Nutr. Biochem. 18(9):567-579.
- Sonakul, D., K. Thakerngpol and P. Pacharee. 1988. Cardiac pathology in 76 thalassemia patients. Birth Defects Orig. Article Ser. 23(5B):177-191.
- Stohs, S.J. and D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med. 18(2):321-336.
- Sun, B. and M. Fukuhara. 1997. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. Toxicology 122:61-72.
- Sung, K.C. and K.J. Kim. 2005. Tyrosinase activated inhibition effect and analysis of Pine-Needle extract. Korean. J. Oil Chemists. 22(1):71-76.
- Van den Berg, R., G.R. Haenen, H. Van den Berg and A. Bast. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. J. Food Chem. 66:511-517.
- Warnholtz, A. and T. Münzel. 2000. Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? Curr. Control Trials Cardiovasc. Med. 1(1):38-40.
- Zurlo, M.G., P. De Stefano, C. Borgna-Pignatti, A. Di Palma, A. Piga, C. Melevendi, F Di Gregorio, M.G. Burattini and S. Terzoli. 1989. Survival and causes of death in thalassaemia major. Lancet 2(8653):27-30.

(Received 14 September 2015 ; Revised 29 February 2016 ; Accepted 20 April 2016)