

## 적송잎 용매별 추출물의 총 폴리페놀성 성분에 대한 proanthocyanidin의 함량 분석 및 항산화 활성 검증

이목희 · 김기영<sup>1</sup> · 장민경 · 유기환 · 김성구<sup>1</sup> · 김미향<sup>2</sup> · 이상현\*

신라대학교 생명공학과, <sup>1</sup>(주) 바이오포트 코리아, <sup>2</sup>신라대학교 식품영양학과

Received January 17, 2008 / Accepted January 31, 2008

**Evaluation of Proanthocyanidin Contents in Total Polyphenolic Compounds of Pine (*Pinus densiflora*) Needle Extracts and Their Antioxidative Activities.** Ok Hee Lee, Ki Young Kim<sup>1</sup>, Min-Kyung Jang, Ki Hwan Yu, Sung Gu Kim<sup>1</sup>, Mihyang Kim<sup>2</sup> and Sang-Hyeon Lee\*. Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan, 617-736 Korea, <sup>1</sup>Bioport Korea Co. Busan, 617-736 Korea, <sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan, Korea, 617-736 Korea - Flavonoids in pine needles are known to be effective scavengers of free radical. Especially, proanthocyanidin, a kind of flavonoids possesses cardiovascular protection and antioxidative activities. Here, we evaluated proanthocyanidin contents in total polyphenolic compounds of pine needle extracts prepared by using hot water, ethanol, hexane or sub-supercritical CO<sub>2</sub>. Analyses of total polyphenolic compounds and proanthocyanidin in each extracts indicated that hot water extract contained the highest concentrations, but sub-supercritical extract contained the lowest concentrations. On the other hand, evaluation of proanthocyanidin contents in total polyphenolic compounds in each extracts showed that sub-supercritical extract possessed the highest content, but hot water extract possessed the lowest content. These results indicate that extracts containing high concentrations of both total polyphenolic compounds and proanthocyanidin could be obtained by using hot water or ethanol extractions. Furthermore, extract containing high content of proanthocyanidin out of total polyphenolic compounds could be achieved by using sub-supercritical extraction. Measurement of antioxidative activities of extracts showed that hot water extract possessed the highest activity. In this study, we prepared extracts from pine needles by four different methods and evaluated the antioxidative compounds in extracts that could be used for effective components of functional food products.

**Key words :** Antioxidative activity, pine needle, proanthocyanidin, total phenolic compounds

### 서 론

최근 우리나라는 경제성장에 힘입어 국민들의 생활수준이 향상됨에 따라 식생활이 변화하여 곡류와 채소류의 섭취가 감소하고 지방, 육류 등의 섭취가 증가하는 경향을 보이고 있다. 식생활의 변화로 질병의 양상도 변화하여 비만, 암, 당뇨, 관상동맥질환 등의 질환이 증가하고 있으며 노인 인구 증가로 인한 노령화로 인한 문제도 심각하게 야기되고 있다. 최근 노화, 암, 뇌혈관 질환, 심혈관계 질환 등과 같은 질환의 원인이 free radical의 생성에 관련이 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 항산화 효과를 가지는 식품의 섭취를 통해 노화를 저연시키고 이러한 질병을 예방, 치료하고자 하는 노력이 증가하고 있는 실정이다[15]. 건강에 대한 관심증가는 free radical의 소거능력이 탁월하다고 알려진 flavonoid의 함량이 높은 식물재료를 이용한 건강기능성 제품의 개발로 이어지고 있다[1].

소나무(*Pinus densiflora*)는 상록성 침엽교목으로서 우리나라를 비롯하여 만주, 일본 등지에 널리 분포하고 있다. 동의 보감에 의하면 솔잎은 고혈압, 말초혈액순환 장애로 인한 팔다리 저림, 불면증, 중풍, 신경쇠약 등에 효험이 있다는 기록이 있다[10]. 한방에서는 솔잎을 약술 형태로 복용하는 경우가 많으며 수렴성 소염작용과 통증을 진정시키고 피를 몇게 하며 마비를 풀어 주는 작용으로 인해 상처, 습진, 음, 신경쇠약증, 탈모, 비타민 C 부족 등의 치료에 사용하고 있다. 솔잎의 기능성으로, 지방대사에 미치는 영향[8,9,12,13], 추출물의 항변이원성 및 항산화 효과[6], 효소활성 및 간조직에 미치는 영향[7] 등에 대해 보고되어 있다. 솔잎의 주요성분은 quercetin, kaempferol 등의 flavonoid류,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphene 등의 정유 성분 및 수지, 당류, carotene, 비타민 C 등이 있다[11]. 솔잎에 포함된 flavonoid류 중 그 기능성이 우수한 것으로 알려진 성분이 proanthocyanidin이다[10]. Proanthocyanidin은 anthocyanidin의 폴리 폐놀성 물질로서 플라보노이드 생합성 경로를 통해 합성되는 식물의 이차대사산물로 많은 종류의 식물에 존재하며 알칼로이드 또는 단백질을 침전시키는 고분자(분자량 500~3,000 Da) 물질이다 (Fig. 1)[4]. Proanthocyanidin의 기능성으로 탁월한 항산화

\*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5924, Fax : +82-51-999-5636  
E-mail : slee@silla.ac.kr

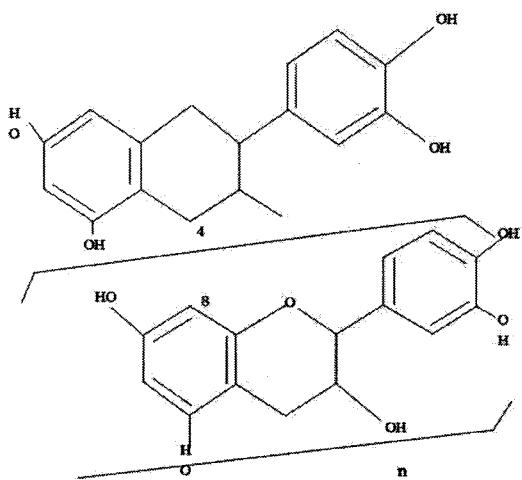


Fig. 1. General structure of proanthocyanidin. (n: 1, 2, 3, ···)

활성을 들 수 있으며, 또한 항균, 항바이러스, 항암, 항염증, 항알러지, 혈관확장 등의 기능성도 보고되고 있다[4]. *In vivo* 실험에서 proanthocyanidin은 비타민 C, E 및 베타카로딘 보다 활성산소 소거능 및 산화적 조직손상을 억제하는 능력이 월등히 높다는 보고도 있다[2].

인체의 노화를 억제하려면 외부로부터 항산화 효소의 생성을 촉진하거나 항산화 작용을 하는 성분을 섭취할 필요가 있다. 솔잎은 체질에 별로 구애를 받지 않아 누구나 쉽게 먹을 수 있으며 각종 질병의 치료와 예방뿐 아니라 강정 효과도 우수하다. 현재 솔잎의 기능성에 대한 연구는 간헐적이지만 지속적으로 이루어지고 있는 실정이지만 이를 이용한 제품개발 및 제품으로서의 기능성을 검정하여 상품성을 창출한 예는 그리 많지 않다.

본 연구에서는 지리산 적송잎의 용매별 추출물에 대한 항산화 활성을 측정하여 제품의 가공법에 따른 활성의 차이를 검증하여 좀 더 나은 가공법 개발에 적용할 수 있도록 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 추출물의 제조

본 실험에 사용한 적송잎은 2007년 7월경 지리산에서 채취하여 60°C에서 열풍건조한 후 미서로 분말화시켜 다음의 4가지 방법으로 추출을 행하였다. 열수 추출물은 적송잎 분말 743 g에 물 4,500 ml을 첨가하여 121°C에서 15분간 추출한 후 여과한 액을 동결건조하여 제조하였다. 에탄올 및 혼산 추출물은 각각 적송잎 분말 250 g에 95% 에탄올 및 혼산을 각각 1,500 ml 씩 첨가하여 상온에서 24시간 침지하여 추출한 후 여과한 액을 동결건조하여 제조하였다. 아임계(Sub-supercritical) 추출물은 적송잎 분말 232 g에 60 kgf/cm<sup>3</sup>의

CO<sub>2</sub> 가스를 이용하여 separator 1은 120°C로, separator 2는 80°C로 설정하여 210분간 추출을 행한 후 여과한 액을 동결건조하여 제조하였다.

### 총 폴리페놀성 성분의 농도 측정

총 폴리페놀성 성분의 농도는 Folin-Ciocalteu법에 의해 비색정량 하였다[14]. 각 추출물을 70% 아세톤 용액으로 10배 희석한 후, 희석시료 50 μl와 0.25 N Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.475 ml를 혼합하여 실온에서 3분 동안 반응시켰다. 여기에 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 0.475 ml 첨가하고 실온에서 60분간 반응시킨 후 724 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 catechin (Sigma)을 사용하여 농도를 계산하였다.

### Proanthocyanidin의 농도 측정

Proanthocyanidin의 농도는 acid butanol에서의 proanthocyanidin의 산화적 분해 (oxidative depolymerization)로 측정하였다[19]. 솔잎추출물 0.1 ml를 메탄올 0.9 ml와 섞은 후, 여기에 5% HCl butanol (v/v) 6 ml와 2% (w/v) FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O (in 2 M HCl) 0.2 ml를 첨가하고 95°C에서 40분간 반응시킨 후 실온까지 냉각시켰다. 반응액에 대해 원심분리(14,000×g, 5분)를 행하여 불용성 성분을 제거한 상층액을 새 tube에 넣고 이를 5% HCl butanol (v/v)로 10배 희석시킨 후, 550 nm에서 즉시 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 96% proanthocyanidin (Grape seed extract, Naturex, Avignon, France)을 사용하여 농도를 계산하였다.

### 적송잎 추출물의 DPPH법에 의한 전자 공여능 조사

적송잎 추출물의 전자 공여능은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma)을 사용하여 측정하였다[18]. 여러 농도의 적송잎 추출물(최종농도: 500, 250, 100, 50, 10 μg/ml) 50 μl에 DPPH (200 μM/ml in ethanol) 150 μl를 혼합한 후 10분간 vortexing을 행하였다. 실온의 차광한 상태에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이에 따른 항산화 활성은 IC<sub>50</sub>으로 나타내었다. 표준물질로 butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma)과 96% proanthocyanidin (Grape seed extract, Naturex)을 같은 농도로 사용하였다.

### 적송잎 추출물의 thiocyanate에 의한 항산화 활성 조사

Osawa의 방법[16]에 따라 linoleic acid (25 mg/ml in EtOH), ferrous chloride (2.45 g/ml in 3.5% hydrochloric acid), ammonium thiocyanate (0.3 g/ml in H<sub>2</sub>O), 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)를 만들어 이것을 stock solution으로 사용하였다. 적송잎 추출물 0.2 ml과 linoleic acid 0.2 ml를 시험관에 넣고 혼합한 후 phosphate buffer 0.4 ml와 증류수 0.2 ml를 가하여 40°C에서 incubation하면서 일정간

격으로 활성을 측정하였다. 활성측정방법은 혼합용액에서 0.1 ml을 취하여 시험관에 넣고 70% ethanol 3 ml, ammonium thiocyanate 용액 0.1 ml, ferrous chloride 용액 0.1 ml를 혼합한 후 정확히 3분 후에 흡광도(500 nm)를 측정하였다. 이때 활성비교를 위하여 BHT 및 96% proanthocyanidin을 표준물질로 사용하였다.

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

적송잎 추출물 1 ml와 linoleic acid (25 mg/ml in EtOH) 1 ml를 시험관에 넣고 혼합한 후 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml와 중류수 1 ml를 가하여 40°C에서 incubation 하면서 일정간격으로 활성을 측정하였다. 활성측정방법은 시료액 0.5 ml를 원심분리관에 넣고 35% trichloroacetic acid 0.25 ml와 0.75% aqueous TBA (Sigma) 0.5 ml를 가하여 혼합한 후 boiling water bath에서 가끔 훈들면서 15분간 처리하고 흐르는 물에 냉각시킨 후 70% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가한 다음 20분 후 15분간 원심분리(3,000×g)를 행하여 상층액에 대한 흡광도(532 nm)를 측정하였다[17]. 이때 활성비교를 위하여 BHT 및 96% proanthocyanidin을 표준물질로 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 적송잎 용매별 추출물의 제조

지리산에서 채취한 적송잎의 분말로부터 각각 4가지 방식으로 추출물을 제조한 결과를 Table 1에 나타냈다. 열수 추출물의 경우, 원료 742.5 g으로부터 추출물 45.3 g을 획득하여 6.1%의 수율로 가장 높은 수율을 나타냈다. 아임계 추출물의 경우, 원료 232.0 g으로부터 추출물 8.0 g을 획득하여 3.5%의 수율을 나타냈으며, 헥산 추출물의 경우, 원료 250.0

g으로부터 추출물 8.2 g을 획득하여 3.3%의 수율을 나타냈다. 에탄올 추출물의 경우, 원료 250.0 g으로부터 추출물 4.7 g을 획득하여 1.9%의 가장 낮은 수율을 나타냈다. 추출물의 양으로 단순 비교할 경우, 열수 추출물에서 가장 높은 수율을 나타냈으며, 에탄올 추출물에서 가장 낮은 수율을 나타냈다.

##### 적송잎 용매별 추출물에 대한 총 폴리페놀성 성분 및 proanthocyanidin 농도 분석

폴리페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물중의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxy기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 나타내며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 가진다는 보고가 있다[4]. 적송잎의 용매별 추출물에 대한 총 폴리페놀성 성분의 농도를 측정한 결과, 추출물 1 g 당 총 폴리페놀성 성분의 농도는 열수 추출물이 124.4 mg으로 가장 높게 나타났고, 에탄올 추출물의 경우 42.9 mg으로 다음으로 높게 나타났다(Table 2). 헥산 추출물의 경우는 3.1 g으로 비교적 낮은 농도를 보였으며, 아임계 추출물의 경우는 1.6 g으로 가장 낮은 농도를 보였다(Table 2). 열수 추출물의 경우 타 추출물에 비해 3배 이상의 높은 농도를 보였다. 적송잎의 용매별 추출물에 대한 proanthocyanidin의 농도를 측정한 결과, 추출물 1 g 당 proanthocyanidin의 농도는 열수 추출물이 4.5 mg으로 가장 높게 나타났으며, 에탄올 추출물의 경우 4.2 mg으로 다음으로 높게 나타났다(Table 2). 헥산 추출물의 경우는 2.0 g으로 낮은 농도를 보였으며, 아임계 추출물의 경우는 1.6 g으로 가장 낮은 농도를 보였다(Table 2). 열수 및 에탄올 추출물의 경우 비슷한 농도를 보였으며, 헥산 및 아임계 추출물에 비해 2배 이상의 농도를 보였다. 적송잎 용매별 추출물에 포함된 총 폴리페놀성 성분에 대한 proanthocyanidin의 함량을 계산한 결과, 총 폴리페놀성 성분의 농도가 가장 높게 나타난 열수 추출물의 경우 3.6%의 가장 낮은 proanthocyanidin 함량을 나타냈다 (Table 2). 또한 총 폴리페놀성 성분의 농도가 비교적 높게 나타난 에탄올 추출물의 경우도 9.8%의 비교적 낮은 proanthocyanidin 함량을 나타냈다(Table 2). 한편, 헥산 추출물의 경우는 총 폴리페놀성 성분에 대한 proanthocyanidin의 함량이 64.5%로 비교적 높은 함량을 나타냈고, 아임계 추출물의 경우는 100%로 가장 높은 proanthocyanidin 함량을 나타냈다(Table 2). 이 결과를 토대로 열수 추출물의 경우는 높은

Table 1. Extraction of pine needles using various solvents

Solvents	Amount of powder (g)	Amount of solvent (ml)	Amount of extract (g)	Yield (%)
Hot water	742.5	4,500	45.3	6.1
Ethanol	250	1,500	8.2	3.3
Sub-supercritical	232	-	8	3.5
Hexane	250	1,500	4.7	1.9

Table 2. Concentrations of total polyphenolic compounds and proanthocyanidin in pine needles extracts

Extracts	Concentration of total polyphenolic compounds (mg/g extract)	Concentration of proanthocyanidin (mg/g extract)	Proanthocyanidin content in total polyphenolic compounds (%)
Hot water	124.4	4.5	3.6
Ethyl alcohol	42.9	4.2	9.8
Hexane	3.1	2.0	64.5
Sub-supercritical	1.6	1.6	100

농도의 총 폴리페놀성 성분을 포함하고 있지만 여기에 포함되어 있는 proanthocyanidin의 함량은 낮은 것을 알 수 있다. 반면, 아임계 추출물의 경우는 비록 추출물의 농도는 낮지만 여기에 포함된 총 폴리페놀성 성분 중 대부분이 proanthocyanidin인 것을 알 수 있다. 즉, 높은 농도의 총 폴리페놀성 성분이 포함된 추출물을 얻기 위해서는 열수 추출법이 적합할 것으로 생각되며, 총 폴리페놀성 성분 중 proanthocyanidin이 주로 포함된 추출물을 얻기 위해서는 아임계 추출법이 활용 가능할 것으로 생각된다.

#### 적송잎 용매별 추출물의 DPPH법에 의한 전자 공여능

DPPH는 매우 안정한 형태의 free radical로서 517 nm에서 광흡수를 나타내는 진한 보라색 화합물이며, free radical 소거 활성을 가지는 항산화 물질에 의해 정량적으로 탈색되므로 항산화제의 검색에 널리 이용되고 있다. 적송잎 용매별 추출물에 대한 DPPH를 이용한 전자 공여능을 분광광도계 분석에 의해 측정하였다. 표준물질인 BHT의 경우는 농도에 의존한 전자 공여능을 나타냈으며 500 µg/ml의 농도에서 약 80%의 높은 전자 공여능을 나타냈다(Fig. 2). 높은 농도의 96% proanthocyanidin의 경우(100~500 µg/ml)는 농도의 존성 없이 약 80%의 높은 전자 공여능을 타나냈다(Fig. 2). 총 폴리페놀성 성분의 농도가 가장 높은 적송잎 열수 추출물의 경우, 250 µg/ml 및 500 µg/ml의 농도에서는 약 70% 전후의 높은 전자 공여능을 나타냈으며 이는 같은 농도의 BHT 및 96% proanthocyanidin의 전자 공여능에 근접한 수치이다(Fig. 2). 에탄올 추출물의 경우는 100~500 µg/ml의 농도에서 약 20~40%의 전자 공여능을 나타냈고, 아임계 추출물의 경우는 50~500 µg/ml의 농도에서 10~20%의 비교적 낮은 전자 공여능을 나타냈다(Fig. 2). 한편, 헥산 추출물의 경우는 가장 낮은 전자 공여능을 나타냈다(Fig. 2). 각 추출물의 전자 공여능은 농도 의존적 경향을 나타냈으며, 열수 추출물에서 가장 높은 전자 공여능을 보였으며, 에탄올 추출물의 경우도 비교적 높은 전자 공여능을 나타냈다.

DPPH radical의 초기농도를 50% 감소시키는데 필요한 항산화제의 농도인 IC<sub>50</sub>을 산출한 결과, 열수 및 에탄올 추출물의 경우 각각 0.013 µg/ml 및 0.91 µg/ml의 농도를 나타냈다(Table 3). 반면, 헥산 및 아임계 추출물의 경우는 모두 10 µg /ml 보다 높은 농도를 나타냈다(Table 3). 이 결과를 토대로 열수 추출물의 경우 항산화 효과를 나타내는 총 폴리페놀성 성분이 높은 농도로 포함되어 있어 가장 높은 항산화 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

#### 적송잎 용매별 추출물의 Thiocyanate에 의한 항산화 활성

적송잎의 각 추출물을 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용한 thiocyanate 방법으로 항산화 활성을 측정한 결과를 Table 4에 나타냈다. 표준물질인 BHT은 농도에 따른 항산화

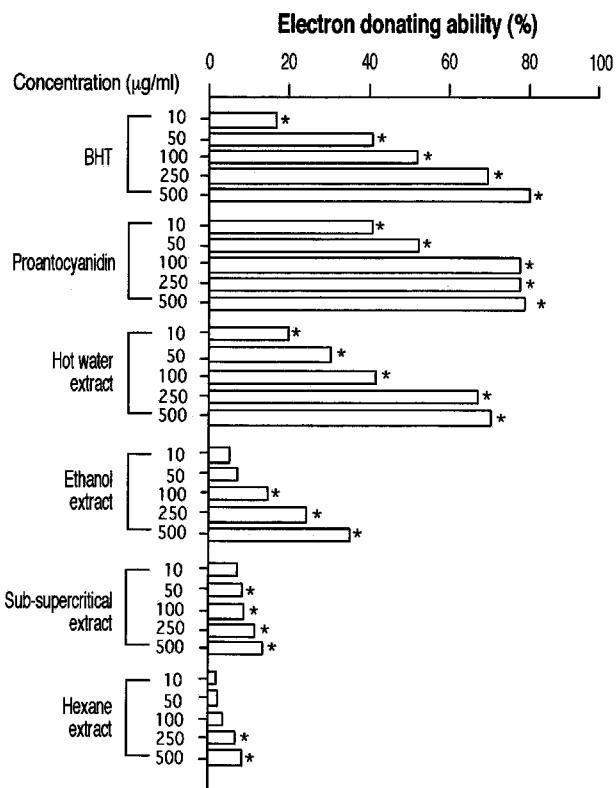


Fig. 2. DPPH radical scavenger activity of pine needle extracts. Means±SEM for three tubes are shown as percentages compared with no treatment (0%). Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test \*  $p<0.0001$  compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results. BHT: butylated hydroxytoluene, Proanthocyanidin: 96% graph seed proanthocyanidin.

Table 3. Antioxidative activity of pine needle extracts estimated from DPPH radical scavenger activity

Extracts	Antioxidative activity (IC <sub>50</sub> , µg/ml)
Hot water extract	0.013
Ethanol extract	0.91
Sub-supercritical extract	>10
Hexane extract	>10

활성 차이가 없이 비슷한 수준의 높은 활성이 6일째까지 나타났다. 또 다른 표준물질인 96% proanthocyanidin 역시 6일째까지 높은 항산화 활성을 나타냈지만 농도 의존적인 활성 경향을 나타냈다. 적송잎 열수 추출물은 500 µg/ml의 가장 높은 농도에서 5일째까지 처리한 경우에서 BHT와 비슷한 정도의 강한 항산화 활성을 나타냈지만 6일째 처리에서 항산화 활성이 현저하게 감소하였다. 열수 추출물도 96% proanthocyanidin과 마찬가지로 전반적인 항산화 활성에 있어 농도 의존적 경향을 나타냈다. 에탄올 추출물 및 아임계 추출물은 처리 2일째까지는 비교적 높은 항산화 활성을 나타냈지

만, 처리 3일째 이후부터는 항산화 활성이 현저하게 감소하였다. 헥산 추출물의 경우 전반적으로 가장 낮은 항산화 활성을 나타냈다.

#### 적송잎 용매별 추출물의 TBA에 의한 항산화 활성

적송잎의 각 추출물을 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용한 TBA법을 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과를 Table 5에 나타냈다. Thiocyanate에 의한 항산화 활성 측정과 마찬가지로 표준물질인 BHT가 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며, 농도 의존적으로 6일째까지 높은 항산화 활성이 지속되었다. 또 다른 표준물질인 96% proanthocyanidin의 경우는 2일째 처리까지는 높은 항산화 활성을 나타냈지만 3일째부터는 항산화 활성이 크게 감소하는 경향을 보였다. 적송잎의 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 헥산 추출물은 모두 비슷한 정도의 항산화 활성을 나타냈으며, 농도 의존적 활성이 경

향을 나타냈다. 하지만 표준물질인 BHT와 비교하여 매우 낮은 항산화 활성을 나타냈다. 아임계 추출물의 경우는 적송잎 추출 시료 중에서 가장 낮은 항산화 활성을 나타냈다.

Choi 등[3]은 식물로부터 열수 및 에탄올을 이용하여 제조한 추출물을 비교한 결과 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 항산화 활성도 강하고 추출수율도 높았다고 보고하였다. Yoo 등[20]은 솔잎 수용액 추출물의 총 폴리페놀성 성분의 함량을 측정하였고 추출시료의 항산화 활성을 측정한 결과 높은 항산화 활성을 나타낸다는 사실을 확인하였다. 본 연구에서는 다양한 용매를 이용한 추출방법에 따른 솔잎 추출시료에 포함된 총 폴리페놀성 성분 및 proanthocyanidin의 함량을 비교하였고 이들 시료의 항산화 활성 차이를 비교하였다. 그 결과, Choi 등의 연구와는 달리 솔잎으로부터 열수를 이용한 추출물이 에탄올 추출물보다 추출수율 및 항산화 활성이 더 높았다. 이러한 결과로 솔잎을 이용한 기능성 식품

Table 4. Antioxidative activity of pine needle extracts in the linoleic acid system that is measured by the thiocyanate method

Treatment	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Antioxidative activity (absorbance at 500 nm)				
		1	2	3	4	5
No treatment	-	1.32±0.05	1.38±0.06	1.31±0.01	1.39±0.04	1.41±0.02
BHT	10	0.44±0.01	0.42±0.01	0.65±0.09	0.65±0.02	0.72±0.04
	50	0.42±0.01	0.42±0.07	0.43±0.00	0.68±0.02	0.72±0.01
	100	0.45±0.06	0.46±0.04	0.43±0.01	0.68±0.06	0.68±0.03
	250	0.42±0.07	0.39±0.06	0.44±0.02	0.76±0.06	0.65±0.05
	500	0.43±0.05	0.45±0.08	0.41±0.02	0.64±0.01	0.65±0.04
Proanthocyanidin	10	0.38±0.06	0.40±0.05	0.52±0.01	0.73±0.04	0.85±0.01
	50	0.43±0.03	0.43±0.07	0.53±0.00	0.72±0.05	0.79±0.06
	100	0.46±0.04	0.40±0.09	0.52±0.01	0.73±0.03	0.90±0.07
	250	0.40±0.04	0.33±0.04	0.53±0.02	0.53±0.02	0.68±0.05
	500	0.38±0.07	0.37±0.05	0.51±0.01	0.51±0.06	0.65±0.04
Hot water extract	10	0.73±0.04	0.61±0.05	0.76±0.03	1.07±0.06	1.07±0.06
	50	0.68±0.04	0.67±0.03	0.69±0.20	1.06±0.07	1.06±0.06
	100	0.72±0.02	0.66±0.04	0.69±0.02	1.13±0.02	1.13±0.05
	250	0.65±0.06	0.60±0.03	0.62±0.06	1.10±0.02	1.10±0.07
	500	0.68±0.06	0.62±0.05	0.62±0.07	0.70±0.01	0.70±0.06
Ethanol extract	10	0.73±0.04	0.75±0.04	0.91±0.02	1.35±0.02	1.35±0.01
	50	0.71±0.07	0.70±0.08	1.06±0.09	1.06±0.02	1.20±0.04
	100	0.72±0.05	0.68±0.10	0.92±0.03	1.04±0.01	1.04±0.04
	250	0.68±0.10	0.78±0.06	0.98±0.05	0.92±0.01	0.92±0.08
	500	0.65±0.05	0.70±0.13	1.00±0.13	1.06±0.05	1.06±0.05
Sub-supercritical extract	10	0.94±0.04	1.05±0.11	1.14±0.02	1.14±0.07	1.22±0.12
	50	0.84±0.18	0.74±0.04	0.93±0.04	1.11±0.01	1.11±0.08
	100	0.80±0.06	0.89±0.03	0.94±0.04	1.26±0.08	1.26±0.01
	250	0.72±0.07	0.85±0.05	0.99±0.06	0.99±0.04	1.16±0.05
	500	0.72±0.12	0.77±0.20	0.95±0.09	0.95±0.09	1.05±0.02
Hexane extract	10	1.11±0.10	1.12±0.01	1.13±0.05	1.33±0.02	1.33±0.10
	50	1.04±0.06	1.04±0.06	1.08±0.03	1.16±0.01	1.29±0.13
	100	0.84±0.06	1.07±0.06	1.15±0.01	1.15±0.04	1.23±0.06
	250	0.78±0.05	0.98±0.05	0.98±0.08	1.04±0.08	1.20±0.10
	500	0.75±0.06	0.97±0.04	1.08±0.03	1.08±0.02	1.13±0.08

BHT: butylated hydroxytoluene, Proanthocyanidin: 96% grape seed proanthocyanidin. Results presented are means±SEM for three samples.

Table 5. Antioxidative activity of pine needle extracts in the linoleic acid system that is measured by the TBA method

Treatment	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Antioxidative activity (absorbance at 532 nm)					
		1	2	3	4	5	6 (days)
No treatment	-	0.89 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.02	1.91 $\pm$ 0.03	2.02 $\pm$ 0.04	2.41 $\pm$ 0.02	2.52 $\pm$ 0.03
BHT	10	0.18 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.01
	50	0.11 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.01
	100	0.07 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.06
	250	0.06 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.02
	500	0.03 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02
Proanthocyanidin	10	0.25 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.03	0.70 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.04
	50	0.19 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.04
	100	0.16 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.01	0.70 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.06
	250	0.12 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.08
	500	0.08 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.07	0.57 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.03
Hot water extract	10	0.66 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.03	1.20 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.06
	50	0.61 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.01	1.28 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.07
	100	0.54 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.01
	250	0.40 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.03	0.94 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.01
	500	0.28 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.03
Ethanol extract	10	0.59 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.01	1.20 $\pm$ 0.04	1.27 $\pm$ 0.03	1.30 $\pm$ 0.07
	50	0.56 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01	0.76 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0.03	1.11 $\pm$ 0.08	1.19 $\pm$ 0.05
	100	0.51 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.01
	250	0.41 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.01
	500	0.33 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.03
Sub-supercritical extract	10	0.60 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.04	1.18 $\pm$ 0.01	1.41 $\pm$ 0.03	1.56 $\pm$ 0.07
	50	0.40 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.03	1.24 $\pm$ 0.01
	100	0.38 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.09	1.10 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.06	1.15 $\pm$ 0.04
	250	0.37 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.01	1.14 $\pm$ 0.01
	500	0.37 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.02	1.10 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.03	1.11 $\pm$ 0.02
Hexane extract	10	0.56 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.03	1.36 $\pm$ 0.09	1.39 $\pm$ 0.01	1.40 $\pm$ 0.03
	50	0.54 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.04	1.15 $\pm$ 0.01	1.20 $\pm$ 0.05	1.36 $\pm$ 0.01
	100	0.41 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	1.10 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.07	1.15 $\pm$ 0.04
	250	0.27 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.01	0.85 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01
	500	0.25 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.02

BHT: butylated hydroxytoluene, Proanthocyanidin: 96% grape seed proanthocyanidin. Results presented are means $\pm$ SEM for three samples.

개발을 위한 추출 가공방법으로 에탄올을 이용한 방법보다 열수를 이용한 방법이 더 효과적일 것으로 생각된다.

## 요약

솔잎에 포함되어 있는 flavonoid들은 free radical 소거능이 탁월하다고 알려져 있다. 이들 중 특히 proanthocyanidin은 심장혈관 보호작용과 항산화 활성에 크게 기여하고 있다. 지리산 적송잎으로부터 열수, 에탄올, 헥산 및 아임계 장치를 이용하여 추출물을 제조하여 총 폴리페놀성 물질 중에 포함된 proanthocyanidin의 함량을 측정하였다. 그 결과, 총 폴리페놀성 물질 및 proanthocyanidin의 농도가 열수 추출물의 경우 가장 높게 나타났으며, 에탄올 추출물, 헥산 추출물, 아임계 추출물 순으로 낮아졌다. 한편, 각 추출물들의 총 폴리

페놀성 물질의 농도에 대한 proanthocyanidin의 함량을 계산한 결과, 아임계 추출물의 경우 가장 높은 함량을 보였고, 헥산 추출물, 에탄올 추출물, 열수 추출물 순으로 낮아졌다. 이러한 결과로 적송잎을 열수 및 에탄올로 추출한 경우 높은 농도의 총 폴리페놀성 물질 및 proanthocyanidin이 포함된 추출물을 얻을 수 있다는 사실을 알 수 있었다. 또한, 아임계 추출물의 경우 비록 추출물에 포함된 총 폴리페놀성 물질의 농도는 낮지만 이들 대부분이 proanthocyanidin으로 이루어진 시료를 얻을 수 있다는 사실을 알 수 있었다. 각 추출물에 대한 항산화 활성을 측정한 결과, 열수 추출물의 경우 가장 높은 활성을 보였으며 에탄올 추출물도 비교적 높은 활성을 타나냈다. 이상의 결과에서 솔잎으로부터 4가지 추출법에 의해 제조된 추출물을 비교 분석한 결과, 열수 추출물에서 가장 높은 기능성 성분 함량 및 항산화 활성을 나타냈으므로

솔잎을 이용한 기능성 식품의 추출 가공법 선택에 있어 좋은 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## References

- Aisling, A. and N. M. O'Brien. 2002. Dietary flavonols. Chemistry, food content and metabolism. *Nutrition* **18**, 75-81.
- Bagchi, D. A., R. L. Garg, M. Krohn, D. J. Bagchi, J. Balmoori and S. J. Stohs. 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen. Pharmacol.* **30**, 771-776.
- Choi, U., D. H. Shin, Y. S. Chang and J. I. Shin. 1992. Screening of natural antioxidant from plant and anti-oxidative effect. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **24**, 149-153.
- Fine, A. M. 2000. Oligomeric Proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical application. *Altern. Med. Rev.* **5**, 114-151.
- Hong, K. S. and J. O. Sung. 1996. Isolation and structure elucidation of proanthocyanidin in bark of *Pinus densiflora*. *Mokchae Konghak* **24**, 81-93.
- Hsu, T., S. Sheu, E. Liaw, T. Wang and C. Lin. 2005. Anti-oxidant activity and effect of *Pinus morrisonicola* Hay. on the survival of leukemia cell line U937. *Phytomedicine* **12**, 663-669.
- Kang, Y. H., Y. K. Park, T. Y. Ha and K. D. Moon. 1996. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver, and liver morphology in rats fed high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 374-378.
- Kang, Y. H., Y. K. Park, T. Y. Ha and K. D. Moon. 1996. Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 367-373.
- Kim, J. D., T. H. Yoon, M. I. Choe, K. J. Ju and S. Y. Lee. 1991. Effect of dietary supplementation with pine lief on lipid parameters in rats. *Kor. J. Gerontol.* **1**, 47-50.
- Korean Translation Committee of Dongeuibogam, 1981.
- Kuk, J. H., S. J. Ma and K. H. Park. 1997. Isolation and characterization of cinnamic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 823-826.
- Lee, Y. H., Y. M. Shin, S. H. Cha, Y. S. Choi and S. Y. Lee. 1996. Development of the health foods containing the extract from *Pinus strobus* leave. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 379-383.
- Lee, Y. H., Y. S. Choi and S. Y. Lee. 1996. The cholesterol-lowering effects of the extract from *Pinus strobus* in chickens. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 188-192.
- Liu, X., M. Dong, X. Chen, M. Jiang, X. Lv and G. Yan. 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chem.* **105**, 548-554.
- Masaki, H., S. Sakaki, T. Atsumi and H. Sakurai. 1995. Active-oxygen scavenging activity of plant extract. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162-166.
- Osawa, T. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf was of *Eucalyptus* leaves. *Agic. Biol. Chem.* **45**, 735-739.
- Ottolenghi, A. 1959. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 355-461.
- Shiow, Y. and J. Ballington. 2007. Free radical scavenging capacity and antioxidant enzyme activity in deerberry. *LWT- Food Sci. Technol.* **40**, 1352-1361.
- Vivas, N., M. Nonier, I. Pianet, N. Vivas de Gaulejac and É. Fouquet. 2006. Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* heartwood: Quantification and structures. *Comptes Rendus Chimie* **9**, 120-126.
- Yoo, J. H., J. Y. Cha, Y. K. Jeong, K. T. Chung and Y. S. Cho. 2004. Antioxidative effects of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts. *J. Life Sci.* **14**, 863-867.