

적송잎 추출물의 proanthocyanidin 함량 분석 및 항산화 활성 검증을 통한 추출공정 확립

이옥희 · 김기영¹ · 장민경 · 유기환 · 유병홍¹ · 김성구¹ · 김미향² · 이상현*

신라대학교 생명공학과, ¹(주) 바이오포트 코리아, ²신라대학교 식품영양학과

Received June 16, 2008 / Accepted July 25, 2008

Establishment of the Extraction Process by Evaluation of Proanthocyanidin Contents and Antioxidative Activities of Pine (*Pinus densiflora*) Needle Extracts. Ok Hee Lee, Ki Young Kim¹, Min-Kyung Jang, Ki Hwan Yu, Byung Hong Yoo¹, Sung Gu Kim¹, Mihyang Kim² and Sang-Hyeon Lee*. Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan, 617-736 Korea, ¹Bioport Korea Co. Busan, 617-736 Korea, ²Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan, Korea, 617-736 Korea - We evaluated proanthocyanidin contents out of total polyphenolic compounds in two pine needle extracts prepared by combined extraction methods and compared their antioxidative activities. Amounts of total polyphenolic compounds of sub-supercritical hotwater precipitate (SSHP) and sub-supercritical hotwater supernatant (SSHS) were 225.4 and 116.6 mg/g, respectively. Amounts of proanthocyanidin of SSHP and SSHS were 9.9 and 3.6 mg/g, respectively. Thus, the ratio of proanthocyanidin contents over total polyphenolic compounds of SSHP and SSHS were 4.3 and 3.9%, respectively. Antioxidative activities (IC₅₀) of SSHP and SSHS measured by DPPH radical scavenging were 41.5 and 50.7 µg/ml, respectively. These results indicate that two combined extracts, SSHP and SSHS showed higher antioxidative activities than extract prepared by hot water or sub-supercritical. In conclusion, extraction procedures for SSHP and SSHS could be useful methods for preparing the effective components of functional food products.

Key words : Antioxidative activity, pine needle, proanthocyanidin, total phenolic compound

서 론

최근 우리나라는 의학의 발달과 더불어 평균 수명이 증가하여 2020년에는 78.1세에 달할 것으로 예상되고 있으며, 노인 인구도 증가하여 2020년에는 전체 인구의 13.2%까지 증가할 것으로 추산되고 있어 노화로 인한 문제도 심각한 실정이다[18]. 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 지연시키고 이러한 질병을 예방, 치료하고자 하는 노력이 증가하고 있는 실정이다[17]. 건강에 대한 관심 증가는 free radical의 소거능력이 탁월하다고 알려진 flavonoid의 함량이 높은 식물재료를 이용한 건강기능성 제품의 개발로 이어지고 있다[1]. 현재까지 이용되고 있는 항산화제는 인공합성품이 대부분이어서 그 위해성이 끊임없이 대두되고 있고 소비자들의 거부감으로 이어지고 있는 실정이다. 이에 따라 근래에는 인류가 예로부터 안전하게 섭취해왔던 식물들로부터 항산화 효과가 있는 물질을 분리하여 이용하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다[21].

소나무(*Pinus densiflora*)는 상록성 침엽교목으로서 우리나라를 비롯하여 중국이나 일본 등 전 아시아 지역의 임야에서

널리 자생하고 있다. 따라서 솔잎은 저비용으로 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있으며, 항균, 항산화 및 항암 작용 등의 생리활성이 우수하여 기능성 식품 개발을 위한 고부가가치 천연소재로 평가받고 있다[7]. 동의보감에 의하면 솔잎은 모발을 나게 하며 오장을 편안하게 하여 수명을 연장시키고, 고혈압, 말초혈액순환 장애로 인한 팔다리 저림, 불면증, 중풍, 신경쇠약 등에 효험이 있다는 기록이 있다[11]. 한방에서는 솔잎을 약술 형태로 복용하는 경우가 많으며 수렴성 소염작용과 통증을 진정시키고 피를 멎게 하며 마비를 풀어 주는 작용으로 인해 상처, 습진, 음, 신경쇠약증, 탈모, 비타민 C 부족 등의 치료에 사용하고 있다. 솔잎의 기능성으로, 지방대사에 미치는 영향[9,10,14,15], 추출물의 항변이원성 및 항산화 효과[6], 효소 활성 및 간 조직에 미치는 영향[8] 등에 대해 보고되어 있다. 솔잎은 수분 58.1%, 단백질 4.5%, 지질 3.9%, 당질 19.6%, 섬유소 13.3%로 구성되어 있으며, 주요 성분은 quercetin, kaempferol 등의 flavonoid류, α -pinene, β -pinene, camphene 등의 정유 성분 및 수지, 당류, carotene, 비타민 C 등이 있다[12]. 솔잎에 포함된 flavonoid류 중 그 기능성이 우수한 것으로 알려진 성분이 proanthocyanidin이다[11]. Proanthocyanidin은 anthocyanidin의 폴리 페놀성 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 항

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5924, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

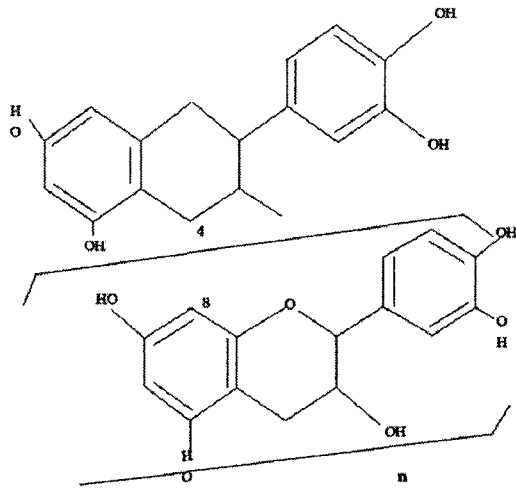


Fig. 1. General structure of proanthocyanidin. (n : 1, 2, 3, ...)

산화 활성을 들 수 있으며, 또한 항균, 항바이러스, 항암, 항염증, 항알러지, 혈관확장능 등의 기능성도 보고되고 있다 [5]. *In vivo* 실험에서 proanthocyanidin은 비타민 C, E 및 베타카로틴 보다 활성산소 소거능 및 산화적 조직손상을 억제하는 능력이 월등히 높다는 보고도 있다[2].

술잎은 체질에 별로 구애를 받지 않아 누구나 쉽게 복용할 수 있으며 항산화 효과 또한 우수하다[13]. 현재 술잎의 기능성에 대한 연구는 간헐적이지만 지속적으로 이루어지고 있는 실정이지만 이를 이용한 제품개발 및 제품으로서의 기능성을 검증하여 상품성을 창출한 예는 그리 많지 않다. 본 연구에서는 지리산 적송잎 추출물의 proanthocyanidin 함량 분석 및 항산화 활성을 측정하여 추출공정을 확립하고 제품의 가공법 개선에 적용할 수 있도록 하고자 한다.

재료 및 방법

추출물의 제조

본 실험에 사용한 적송잎은 2007년 7월경 지리산에서 채취하여 60°C에서 열풍건조한 후 믹서로 분말화시켰다. 열수 추출물은 적송잎 분말 743 g에 물 4,500 ml을 첨가하여 121°C에서 15분간 추출한 후 여과한 액을 동결건조하여 제조하였다(Fig. 2). 아임계(Sub-supercritical) 추출물은 적송잎 분말 232 g에 60 kgf/cm³의 CO₂ 가스를 이용하여 separator 1은 120°C로, separator 2는 80°C로 설정하여 210분간 추출을 행한 후 여과한 액을 동결건조하여 제조하였다(Fig. 2). 적송잎 추출물의 효율적인 추출공정을 확립하기 위하여 아임계 추출을 행한 추출물을 다시 열수를 이용하여 추출하는 방법으로 2가지의 추출물을 제조하였다. 아임계 열수추출물의 제조는 다음과 같이 행하였다. 적송잎 분말 518 g에 60 kgf/cm³의 CO₂ 가스를 이용하여 separator 1은 120°C로, separator 2는 80°C로 설정하여 180분간 추출을 행하였고, 추출물

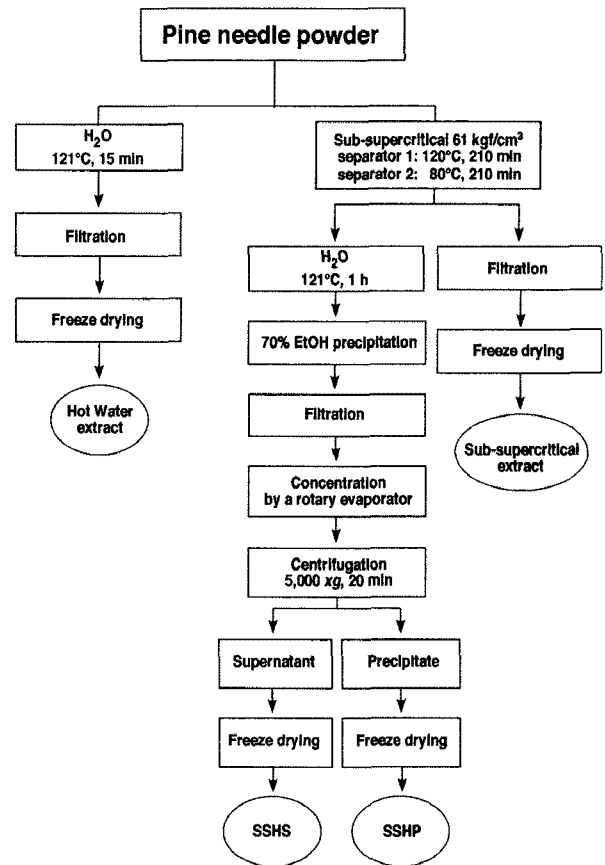


Fig. 2. Schematic diagram of the extraction processes of pine needle.

에 물 4,000 ml를 첨가하여 121°C에서 60분간 추출을 행하였다. 추출물에 99% 에탄올을 최종농도 70%가 되도록 첨가하고 이에 따른 침전물을 Whatman 1 여과지로 여과하여 제거한 액을 Rotary Evaporator (Eyler Co. LTD., Japan)로 농축한 후 원심분리(5,000× g, 20분)를 행하고 상층액과 침전물을 각각 따로 동결건조하여 아임계 열수추출 상층액(SSHS)과 아임계 열수추출 침전물(SSHP)을 제조하였다(Fig. 2).

총 폴리페놀성 성분의 농도 측정

총 폴리페놀성 성분의 농도는 Folin-Ciocalteu법에 의해 비색정량 하였다[16]. 각 추출물을 70% 아세톤 용액으로 10배 희석한 후, 희석시료 50 μl과 0.25 N Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.475 ml를 혼합하여 실온에서 3분 동안 반응시켰다. 여기에 1 M Na₂CO₃를 0.475 ml 첨가하고 실온에서 60분간 반응시킨 후 724 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 catechin (Sigma)을 사용하여 농도를 계산하였다.

Proanthocyanidin의 농도 측정

Proanthocyanidin의 농도는 HCl butanol에서의 proanthocyanidin의 산화적 분해(oxidative depolymerization)로

측정하였다[23]. 솔잎추출물 0.1 ml를 메탄올 0.9 ml와 섞은 후, 여기에 5% HCl butanol (v/v) 6 ml와 2% (w/v) FeNH₄(SO₄)₂ · H₂O (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.

DPPH법에 의한 전자 공여능 조사

적송잎 추출물의 전자 공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma)를 사용하여 측정하였다[22]. 여러 농도의 적송잎 추출물 (최종농도: 500, 250, 100, 50, 10 µg/ml) 50 µl에 DPPH (200 µM/ml in ethanol) 150 µl를 혼합한 후 10 분간 vortexing을 행하였다. 실온의 차광한 상태에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이에 따른 항산화 활성은 IC₅₀으로 나타내었다. 표준물질로 butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma)와 96% proanthocyanidin (Grape seed extract, Naturex)을 같은 농도로 사용하였다.

Thiocyanate에 의한 항산화 활성 조사

Osawa의 방법[19]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 H₂O), 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 일정간격으로 활성을 측정하였다. 활성측정방법은 혼합용액에서 0.1 ml를 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.

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 증류수 1 ml를 가하여 40°C에서 incubation하면서 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 흔들면서 15분간 처리하고 흐르는 물에 냉각시킨 후 70% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가한 다음 20분 후 15분간 원심분리(3,000× g)를 행하

여 상층액에 대한 흡광도(532 nm)를 측정하였다[20]. 이때 활성비교를 위하여 BHT 및 96% proanthocyanidin을 표준물질로 사용하였다.

결과 및 고찰

적송잎 추출물의 제조

지리산에서 채취한 적송잎의 분말로부터 열수, 아임계, 아임계 열수를 이용하여 추출물을 제조한 결과, 열수 추출물의 경우, 원료 742.5 g으로부터 추출물 45.3 g을 획득하여 6.1%의 수율을 나타냈으며, 아임계 추출물의 경우, 원료 232.0 g으로부터 추출물 8.0 g을 획득하여 3.5%의 수율을 나타냈다. 아임계 열수추출 상층액(SSHS)의 경우, 원료 518.0 g으로부터 56.7 g을 획득하여 10.9%의 수율로 가장 높은 수율을 나타냈다. 아임계 열수추출 침전물(SSHP)의 경우, 2.7 g을 획득하여 0.5%의 수율로 가장 낮은 수율을 보였다.

적송잎 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]. 적송잎 추출물에 대한 총 폴리페놀성 성분의 농도를 측정한 결과, 추출물 1 g 당 총 폴리페놀성 성분의 농도는 열수 추출물이 124.4 mg으로 비교적 높게 나타났으며, 아임계 추출물의 경우는 1.6 mg으로 가장 낮은 농도를 보였다(Table 1). 또한, 아임계 열수추출 상층액(SSHS)의 경우 116.6 mg이었으며, 아임계 열수추출 침전물(SSHP)의 경우 225.4 mg의 농도로 가장 높은 농도를 보였다(Table 1).

적송잎 추출물에 대한 proanthocyanidin의 농도를 측정한 결과, 추출물 1 g 당 proanthocyanidin의 농도는 열수 추출

Table 1. Concentrations of total polyphenolic compounds and proanthocyanidin in pine needles extracts

Extract	Concentration of total polyphenolic compounds (mg/g extract)	Concentration of proanthocyanidin (mg/g extract)	Proanthocyanidin content in total polyphenolic compounds (%)
Hot water extract	124.4	4.5	3.6
Sub-supercritical extract	1.6	1.6	100
SSHS	116.6	3.6	3.9
SSHP	225.4	9.9	4.3

물이 4.5 mg으로 나타났으며, 아임계 추출물의 경우는 1.6 mg의 농도를 보였다(Table 1). 아임계 열수추출 상층액(SSHS)의 경우 3.6 mg이며, 아임계 열수추출 침전물(SSHP)의 경우 9.9 mg의 농도를 나타냈다(Table 1).

적송잎 추출물에 포함된 총 폴리페놀성 성분에 대한 proanthocyanidin의 함량을 계산한 결과, 총 폴리페놀성 성분의 농도가 높게 나타난 열수 추출물의 경우 3.6%의 가장 낮은 proanthocyanidin 함량을 나타냈다(Table 1). 아임계 열수추출 상층액(SSHS) 및 아임계 열수추출 침전물(SSHP)의 경우 각각 3.9 %와 4.3%으로 열수 추출물 보다 높은 proanthocyanidin 함량을 보였다(Table 1). 따라서 술잎에 포함된 항산화 성분인 총 폴리페놀성 성분 및 proanthocyanidin을 보다 효율적으로 추출하기 위해서는 기존의 열수 추출법 보다 아임계 열수 추출법이 더 적합할 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. 3). 높은 농도의 96% proanthocyanidin의 경우(100~500 µg/ml)는 농도 의존성 없이 약 80%의 높은 전자 공여능을 나타냈다(Fig. 3). 적송잎 열수 추출물의 경우, 250 µg/ml 및 500 µg/ml의 농도에서 약 70% 전후의 높은 전자 공여능을 나타냈으며, 아임계 추출물의 경우는 50~500 µg/ml의 농도에서 10~20%의 비교적 낮은 전자 공여능을 나타냈다(Fig. 3). 한편, 아임계 열수추출 상층액(SSHS)의 경우 200~500 µg/ml 농도가 표준물질인 BHT의 500 µg/ml 농도와 근접한 수치가 나타났으며, 아임계 열수추출 침전물(SSHP)의 경우 50 µg/ml의 농도에서 BHT와 96% proanthocyanidin의 10~50 µg/ml의 농도보다 비교적 높은 수치가 나왔다(Fig. 3). 각 추출물의 전자 공여능은 농도 의존적 경향을 나타냈으며, 아임계 열수추출 상층액(SSHS)에서 가장 높은 전자 공여능을 보였다.

DPPH radical의 초기농도를 50% 감소시키는데 필요한 항산화제의 농도인 IC₅₀을 산출한 결과, 열수 및 아임계 추출물의 경우 각각 113 µg/ml 및 500 µg/ml의 농도를 나타냈다(Table 2). 한편, 아임계 열수추출 상층액(SSHS) 및 아임계 열수추출 침전물(SSHP)의 경우 각각 50.7 µg/ml 및 41.5 µg/ml의 농도를 나타냈다(Table 2). 이 결과로 아임계 열수 추출물의 경우 다른 추출물에 의한 추출물들 보다 높은 항산화 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

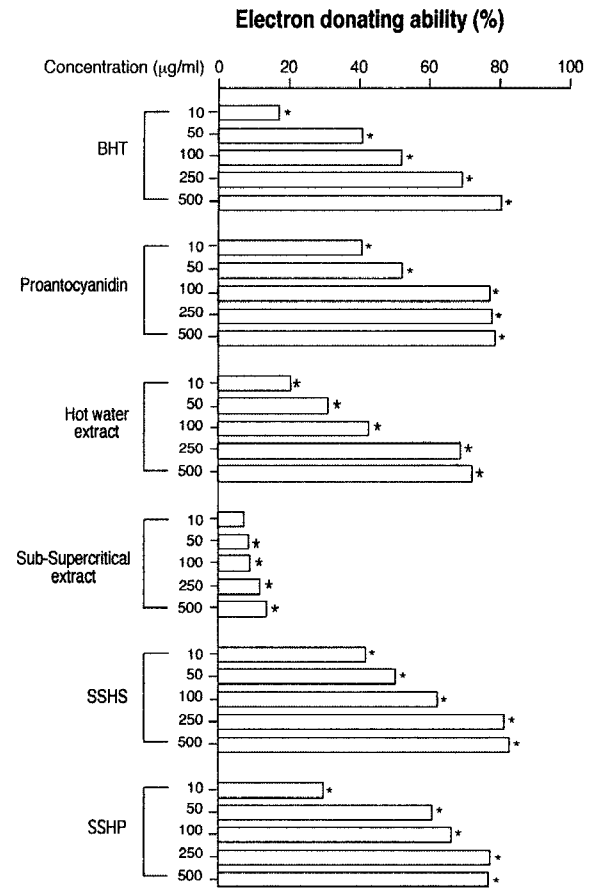


Fig 3. DPPH radical scavenger activity of pine needle extracts. Means±SEM for three tubes are shown as percentages compared with no treatment (0%). Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * p<0.0001 compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results. BHT: butylated hydroxytoluene, Proanthocyanidin: 96% graph seed proanthocyanidin.

Table 2. Antioxidative activity of pine needle extracts estimated from DPPH radical scavenger activity

Extract	Antioxidative activity (IC ₅₀ , µg/ml)
Hot water extract	113
Sub-supercritical extract	>500
SSHS	50.7
SSHP	41.5

적송잎 추출물의 Thiocyanate에 의한 항산화 활성

적송잎의 각 추출물들의 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용한 thiocyanate 방법으로 항산화 활성을 측정한 결과를 Table 3에 나타냈다. 표준물질인 BHT는 농도에 따른 항산화 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

Table 3. Antioxidative activity of pine needle extracts in the linoleic acid system that is measured by the thiocyanate method

Treatment	Concentration (µg/ml)	Antioxidative activity (Absorbance at 500 nm)					
		1	2	3	4	5	6 (days)
No treatment	-	1.32±0.05	1.38±0.06	1.31±0.01	1.39±0.04	1.41±0.02	1.52±0.02
BHT	10	0.44±0.01*	0.42±0.01*	0.65±0.09*	0.65±0.02*	0.72±0.04*	0.74±0.03*
	50	0.42±0.01*	0.42±0.07*	0.43±0.00*	0.68±0.02*	0.72±0.01*	0.70±0.01*
	100	0.45±0.06*	0.46±0.04*	0.43±0.01*	0.68±0.06*	0.68±0.03*	0.73±0.03*
	250	0.42±0.07*	0.39±0.06*	0.44±0.02*	0.76±0.06*	0.65±0.05*	0.73±0.05*
	500	0.43±0.05*	0.45±0.08*	0.41±0.02*	0.64±0.01*	0.65±0.04*	0.70±0.01*
Proanthocyanidin	10	0.38±0.06*	0.40±0.05*	0.52±0.01*	0.73±0.04*	0.85±0.01*	1.04±0.03*
	50	0.43±0.03*	0.43±0.07*	0.53±0.00*	0.72±0.05*	0.79±0.06*	1.03±0.04*
	100	0.46±0.04*	0.40±0.09*	0.52±0.01*	0.73±0.03*	0.90±0.07*	0.91±0.04*
	250	0.40±0.04*	0.33±0.04*	0.53±0.02*	0.53±0.02*	0.68±0.05*	0.75±0.08*
	500	0.38±0.07*	0.37±0.05*	0.51±0.01*	0.51±0.06*	0.65±0.04*	0.71±0.06*
Hot water extract	10	0.73±0.04*	0.61±0.05*	0.76±0.03*	1.07±0.06*	1.07±0.06*	1.97±0.06
	50	0.68±0.04*	0.67±0.03*	0.69±0.20*	1.06±0.07*	1.06±0.06*	1.95±0.06
	100	0.72±0.02*	0.66±0.04*	0.69±0.02*	1.13±0.02*	1.13±0.05*	1.88±0.07
	250	0.65±0.06*	0.60±0.03*	0.62±0.06*	1.10±0.02*	1.10±0.07*	1.21±0.01*
	500	0.68±0.06*	0.62±0.05*	0.62±0.07*	0.70±0.01*	0.70±0.06*	1.08±0.01*
Sub-supercritical extract	10	0.94±0.04*	1.05±0.11*	1.14±0.02*	1.14±0.07*	1.22±0.12*	1.36±0.02*
	50	0.84±0.18*	0.74±0.04*	0.93±0.04*	1.11±0.01*	1.11±0.08*	1.28±0.03*
	100	0.80±0.06*	0.89±0.03*	0.94±0.04*	1.26±0.08*	1.26±0.01*	1.43±0.01
	250	0.72±0.07*	0.85±0.05*	0.99±0.06*	0.99±0.04*	1.16±0.05*	1.27±0.02*
	500	0.72±0.12*	0.77±0.20*	0.95±0.09*	0.95±0.09*	1.05±0.02*	1.12±0.01*
SSHS	10	0.4±0.04*	0.54±0.07*	0.43±0.02*	0.57±0.01*	0.79±0.05*	0.79±0.08*
	50	0.55±0.04*	0.46±0.01*	0.46±0.02*	0.5±0.02*	0.75±0.09*	0.75±0.04*
	100	0.61±0.05*	0.45±0.01*	0.42±0.01*	0.55±0.05*	0.78±0.01*	0.78±0.06*
	250	0.63±0.05*	0.44±0.01*	0.4±0.04*	0.45±0.01*	0.69±0.01*	0.69±0.04*
	500	0.66±0.07*	0.46±0.03*	0.43±0.02*	0.63±0.05*	0.66±0.01*	0.66±0.09*
SSHP	10	0.41±0.05*	0.56±0.01*	0.42±0.01*	0.49±0.04*	0.66±0.01*	0.66±0.02*
	50	0.93±0.05*	0.4±0.08*	0.44±0.02*	0.48±0.03*	0.77±0.02*	0.77±0.05*
	100	0.74±0.03*	0.32±0.04*	0.43±0.02*	0.51±0.02*	0.61±0.05*	0.61±0.08*
	250	0.86±0.02*	0.36±0.03*	0.45±0.03*	0.51±0.03*	0.67±0.08*	0.67±0.03*
	500	0.63±0.04*	0.39±0.02*	0.43±0.00*	0.44±0.04*	0.69±0.03*	0.69±0.05*

BHT: butylated hydroxytoluene, Proanthocyanidin: 96% graph seed proanthocyanidin. Results presented are means±SEM for three samples. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * $p < 0.001$ compared with no treatment.

높은 농도에서 5일째까지 처리한 경우에서 BHT와 비슷한 정도의 강한 항산화 활성을 나타냈지만 6일째 처리에서 항산화 활성이 현저하게 감소하였다. 아임계 추출물은 처리 2일째까지는 비교적 높은 항산화 활성을 나타냈지만, 처리 3일째 이후부터는 항산화 활성이 현저하게 감소하였다. 아임계 열수추출 상층액(SSHS)과 아임계 열수추출 침전물(SSHP)에서는 표준물질인 BHT와 마찬가지로 전반적인 항산화 활성에 있어 농도에 따른 항산화 활성 차이가 없이 비슷한 수준의 높은 활성이 6일째까지 나타났다.

적송잎 추출물의 TBA에 의한 항산화 활성

적송잎의 각 추출물을 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용한 TBA법을 이용하여 항산화 활성을 측정된 결과를 Table

4에 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 추출물은 표준물질과 비교하여 낮은 항산화 활성을 나타냈으며 농도 의존적 활성 경향을 나타냈다. 아임계 추출물의 경우는 적송잎 추출 시료 중에서 가장 낮은 항산화 활성을 나타냈다. 아임계 열수추출 상층액(SSHS)은 표준물질인 BHT에 비해서는 낮은 항산화 활성을 나타냈지만 적송잎의 열수추출물에 비하여 높은 활성을 나타냈으며 농도 의존적 활성 경향을 나타냈다. 아임계 열수추출 침전물(SSHP) 역

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

Treatment	Concentration (µg/ml)	Antioxidative activity (Absorbance at 532 nm)					
		1	2	3	4	5	6 (days)
No treatment	-	0.89±0.02	1.57±0.02	1.91±0.03	2.02±0.04	2.41±0.02	2.52±0.03
BHT	10	0.18±0.03*	0.53±0.05*	0.63±0.04*	0.52±0.02*	0.68±0.04*	0.79±0.01*
	50	0.11±0.04*	0.40±0.06*	0.51±0.05	0.48±0.01*	0.58±0.05*	0.66±0.01*
	100	0.07±0.06*	0.34±0.07*	0.35±0.06*	0.35±0.02*	0.40±0.05*	0.43±0.06*
	250	0.06±0.08*	0.20±0.01*	0.23±0.08*	0.33±0.07*	0.34±0.04*	0.33±0.02*
	500	0.03±0.03*	0.09±0.03*	0.07±0.08*	0.11±0.03*	0.12±0.01*	0.16±0.02*
Proanthocyanidin	10	0.25±0.02*	0.25±0.04*	0.68±0.03*	0.70±0.02*	0.73±0.06*	0.96±0.04*
	50	0.19±0.03*	0.20±0.01*	0.60±0.04*	0.67±0.03*	0.81±0.01*	0.86±0.04*
	100	0.16±0.04*	0.19±0.01*	0.57±0.05*	0.64±0.01*	0.70±0.02*	0.73±0.06*
	250	0.12±0.05*	0.15±0.03*	0.53±0.06*	0.59±0.04*	0.69±0.01*	0.71±0.08*
	500	0.08±0.06*	0.07±0.04*	0.52±0.07*	0.57±0.06*	0.62±0.03*	0.63±0.03*
Hot water extract	10	0.66±0.07*	0.71±0.06*	0.95±0.03*	1.12±0.03*	1.20±0.02*	1.22±0.06*
	50	0.61±0.01*	0.66±0.03*	0.88±0.01*	0.97±0.01*	1.28±0.01*	1.13±0.07*
	100	0.54±0.01*	0.59±0.04*	0.83±0.01*	0.94±0.02*	0.99±0.05*	0.93±0.01*
	250	0.40±0.04*	0.48±0.02*	0.63±0.01*	0.86±0.03*	0.94±0.02*	0.96±0.01*
	500	0.28±0.03*	0.31±0.02*	0.47±0.03*	0.67±0.03*	0.88±0.04*	0.89±0.03*
Sub-supercritical extract	10	0.60±0.02*	0.70±0.01*	1.15±0.04*	1.18±0.01*	1.41±0.03*	1.56±0.07*
	50	0.40±0.02*	0.43±0.01*	1.01±0.01*	1.13±0.04*	1.23±0.03*	1.24±0.01*
	100	0.38±0.04*	0.38±0.02*	0.97±0.09*	1.10±0.01*	1.13±0.06*	1.15±0.04*
	250	0.37±0.06*	0.39±0.04*	0.90±0.04*	1.12±0.01*	1.13±0.01*	1.14±0.01*
	500	0.37±0.07*	0.37±0.02*	0.76±0.02*	1.10±0.08*	0.99±0.03*	1.11±0.02*
SSHS	10	0.43±0.05*	0.42±0.01*	0.36±0.01*	0.99±0.02*	1.16±0.01*	1.16±0.03*
	50	0.52±0.06*	0.41±0.01*	0.31±0.02*	0.73±0.01*	1.02±0.01*	0.99±0.04*
	100	0.28±0.07*	0.27±0.03*	0.25±0.01*	0.54±0.02*	0.56±0.04*	0.74±0.01*
	250	0.22±0.05*	0.27±0.04*	0.25±0.07*	0.45±0.03*	0.37±0.01*	0.56±0.06*
	500	0.21±0.06*	0.24±0.03*	0.20±0.08*	0.39±0.04*	0.25±0.05*	0.34±0.06*
SSHP	10	0.16±0.07*	0.30±0.02*	0.42±0.05*	0.87±0.03*	1.27±0.03*	1.29±0.08*
	50	0.14±0.09*	0.24±0.02*	0.37±0.02*	0.77±0.02*	0.95±0.02*	0.99±0.03*
	100	0.10±0.01*	0.14±0.06*	0.25±0.03*	0.61±0.01*	0.88±0.03*	0.92±0.05*
	250	0.13±0.06*	0.16±0.08*	0.13±0.01*	0.39±0.07*	0.58±0.07*	0.59±0.06*
	500	0.06±0.07*	0.13±0.01*	0.09±0.04*	0.29±0.01*	0.36±0.01*	0.37±0.01*

BHT: butylated hydroxytoluene, Proanthocyanidin: 96% graph seed proanthocyanidin. Results presented are means±SEM for three samples. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * $p < 0.001$ compared with no treatment.

시 아임계 열수추출 상층액(SSHS)과 비슷한 활성경향을 보였다.

본 연구에서는 두 가지 추출법을 조합한 추출공정에 의해 제조된 추출물과 각각의 단일 추출법에 의해 제조된 솔잎 추출시료에 포함된 총 폴리페놀성 성분 및 proanthocyanidin의 함량을 비교하였고 이들 시료의 항산화 활성 차이를 비교하였다. 그 결과, 솔잎으로부터 일반적인 열수를 이용한 추출물보다 아임계 열수추출물의 추출수율 및 항산화 활성이 더 높게 나타났다. 이러한 결과로 솔잎을 이용한 기능성 식품의 개발을 위한 추출 가공법으로 열수 및 아임계 추출법을 각각 단독으로 이용한 방법보다 아임계 열수추출법을 이용한 방법이 더 효과적인 것으로 판명되었다. Choi 등[3]은 식물로부터 열수 및 에탄올을 이용하여 제조한 추출물을 비교한 결

과 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 항산화 활성도 강하고 추출수율도 높았다고 보고하였다. Yoo 등[24]은 솔잎 수용액 추출물의 총 폴리페놀성 성분의 함량을 측정하였고 추출시료의 항산화 활성을 측정한 결과 높은 항산화 활성을 나타낸다는 사실을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 기능성 솔잎추출제품 제조를 위한 보다 효율적인 추출공정 확립을 위하여 두 가지 추출법을 조합한 추출법에 의해 얻어진 솔잎 추출물들의 proanthocyanidin 성분, 총 polyphenolic 함량 및 이들을 항산화 활성을 측정하였고 기존의 단독 추출법에 의한 추출물들과의 비교를 행하였

다. 아임계 열수추출 침전물(SSHP)과 아임계 열수추출 상층액(SSHS)의 총 폴리페놀성 성분의 농도는 각각 225.4 및 116.6 mg/g으로 타 추출물들에 비하여 높은 농도를 보였으며, proanthocyanidin 농도 또한 각각 9.9 and 3.6 mg/g으로 비교적 높게 나타났다. 또한, 적송잎 추출물에 포함된 총 폴리페놀성 성분에 대한 proanthocyanidin의 함량을 계산한 결과, 아임계 열수추출 침전물(SSHP) 및 아임계 열수추출 상층액(SSHS)의 경우 각각 4.3%와 3.9%로 열수 추출물(3.6%)보다 높은 proanthocyanidin 함량을 보였다. DPPH radical scavenging으로 아임계 열수추출 침전물(SSHP) 및 아임계 열수추출 상층액(SSHS)의 항산화 활성(IC₅₀)을 측정한 결과 각각 41.5 및 50.7 µg/ml로 타 추출물들에 비하여 높은 활성을 나타냈다. 또한, thiocyanate법과 TBA법으로 측정한 linolic acid system에 의한 항산화 활성의 경우도 아임계 열수추출 상층액(SSHS)과 아임계 열수추출 침전물(SSHP)에서 높은 활성이 나타났다.

결론적으로, 두 가지 추출법을 조합한 추출물인 아임계 열수추출 상층액(SSHS)과 아임계 열수추출 침전물(SSHP)은 단독 추출법에 의한 추출물들 보다 높은 항산화 활성을 보여준다는 사실을 확인할 수 있었고, 이러한 추출공정은 식품소재로부터 기능성 성분을 보다 효과적으로 추출할 수 있는 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

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 antioxidative 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.
- Kim, A. Y. and S. C. Kang. 2007. Quality Evaluation by the Addition of Pine Needle and Artemisia princeps Extracts in Vinegared Kochujang. *J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 167-177.
- 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 leaf on lipid parameters in rats. *Kor. J. Gerontol.* **1**, 47-50.
- Korean Translation Committee of Dongeubogam, 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, O. H., K. Y. Kim, M. K. Jang, K. H. Yu, S. G. Kim, M. Kim and S. H. Lee. 2008. Evaluation of proanthocyanidin contents on total polyphenolic compounds of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts and their Antioxidative Activities. *K. J. Life Sci.* **18**, 213-219.
- 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.
- National Statistical Office (Republic of Korea). 1996. The expectancy of future population.
- 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.
- Park, G. Y., H. S. Lee, I. D. Hwang, H. S. Jung. 2006. The functional effects of fermented pine needle extract. *K. J. Bio. Bioeng.* **21**, 376-383.
- 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.