

천연 솔잎추출물의 특성 및 분석

성기천

대진대학교 이공대학 화학공학과
(2004년 9월 1일 접수 ; 2004년 11월 9일 채택)

Characteristics and Analysis of Natural Pine-Needles Extract

Ki-Chun Sung

Department of Chemical Engineering, Daejin University, Pochun 487-711, Korea
e-mail : kcsung@daejin.ac.kr

(Received September 1, 2004 ; Accepted November 9, 2004)

Abstract : We have extracted the natural pine-needles to use ethanol in solvent, and could obtain the refined oil component from pine-needles extract. We have tested the antimicrobial effect from microbe experiment and analyzed with ICP/OES, GC/MS. we could obtain the next conclusion from the result of this experiment. In the first result of this experiment we could know that in case of increasing concentration of pine-needles, the number of microbe decreased more and more. Also we could know that the refined oil component of pine-needles appeared the sterilization effect of S-aureus and E-coli after 96hrs and 120hrs. So we could know that the refined oil component of appeared effect to microbe. In the second result of this experiment we could know that inorganic materials of Ca, Mg, V, Mn etc from pine-needles detected to ICP/OES analysis and the aromatic compounds from refined oil component of pine-needles was certificated to GC/MS analysis.

Keywords : natural pine-needles extract, refined oil component, antimicrobial effect.

1. 서 론

최근 국민들의 인체건강이나 피부미용에 대한 관심이 크게 인식되면서부터 천연물을 이용한 기능성 소재의 연구개발이 꾸준히 검토되고 있다[1]. 특히 천연물을 소재로한 기능성 원료[2]는 인삼, 당귀, 홍삼, 은행, 감초, 대두, 영지, 계피, 창포, 작약, 마늘, 양파, 울무, 쑥, 녹차, 솔잎추출물 등이 있고, 이중 솔잎추출물은 방향성, 염색소작용, 향균성, 멜라닌 활성억제작용 등에 대한 약리적 특성을 가지고 있다[3].

소나무과(pinus densiflora sieb, et zucc)에 속하는 솔잎[4]은 중국이나 일본, 한국 등 전 아시아 지역의 임야에서 널리 자생하는 소나무로부터 저비용으로 손쉽게 얻을 수 있는 장점과 약리적 효능이 있어, 오늘날 부가가치와 응용가치가 매우 높은 천연물로 알려져 있다[5]. 또한 솔잎은 예로부터 한방 또는 민간요법으로 솔잎차나 솔잎술, 솔잎즙이나 솔잎쥬스, 그리고 솔잎송편을 만들어[6,7] 신경통, 당뇨병, 고혈압, 피부질환 등의 성인병치료에 사용된 기록이 전해오고 있으나[8], 오늘날 솔잎이 인체건강이나 피부

미용에 대한 항균제, 항암제, 항산화제, 피부미백제 및 노화방지제로 효능이 인식되면서부터 의약품이나 화장품등의 기능성 소재에 대한 연구개발이 진행되고 있다[9,10].

솔잎을 분석한 자료에 의하면 솔잎에는 테르펜(terpene), 페놀화합물(phenolics), 탄닌(tannin)등의 정유성분과 엽록소성분, 무기 및 유기성분, 비타민류 등의 다양한 성분들이 함유되어 있는 것으로 기록되어 있고[11], 이중 테르펜(C₁₀H₁₆)는 불포화 탄화수소인 이소프렌(C₅H₈)의 분자구조를 이루고 있으며, 테르펜 유도체로는 모노-테르펜 (C₁₀H₁₆), 세스퀴-테르펜 (C₁₅H₂₄), 디-테르펜(C₂₀H₃₂)등이 있으며, 현재까지 소나무과의 솔잎성분에는 약 4,000여종의 테르펜류가 있는 것으로 밝혀져 있다[12]. 솔잎의 정유성분 중 테르펜 성분은 Table 1에서와 같이 다양한 방향족 성분들이 약 7-12%가 함유되어 있는데, 이들 성분들의 물리적 특성은 방향성과 항균성에 영향이 있는 것으로 알려져 있다[13]. 페놀 화합물은 솔잎의 정유성분 100g중 1.305g이 존재하는데, 이 화합물은 식물체의 대사 작용에 의해 생성되는 물질로 benzoic acid, cinnamic acid, p-coumaric acid, guinic acid, caffeic acid, ferulic acid 등의 방향족 산의 성분들이 함유되어 있으며, 탄닌은 ellagic acid 와 catechin 등의 성분이 솔잎의 정유성분 100.0g 중 0.690g(약 0.7%)이 존재하는데, 이 성분은 식물체의 미생물 방어와 세포의 성장을 억제하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다[14]. Park[15]은 솔잎추출물로 항균력을 시험하였는데, 솔잎추출물을 그람양성균인 S-aureus와 L-monocytogenes에 0.5%이상 첨가하여 배양하였을 경우 미생물의 증식이 현저히 억제되었고,

그람음성균인 E-coli와 S-typhimurium에 1.0% 이상 첨가하여 배양하였을 경우 대체로 미생물의 증식에 강한 내성을 나타낸 것으로 조사되었다. Kim[16]등은 솔잎분말을 매일 5.0% 기준으로 4주간 흰쥐에 사육한 결과 솔잎분말을 사육한 쥐의 체중과 혈당치가 모두 현저하게 감소된 것으로 나타났다.

솔잎에는 4계절 푸른색을 띄는 엽록소가 있고, 이 엽록소는 Fig. 1에서와 같이 식물체의 광합성작용(1)으로 식물체의 영양분을 공급하는데, 이는 동화색소의 일종인 클로로필(chlorophyll)이라는 색소가 작용하기 때문이다. 클로로필은 4개의 피롤메탄기에 결합된 고리모양의 테트라피롤에 시클로메탄 고리가 연결된 포르피린(porphirine) 유도체로 테트라피롤 고리의 중앙에 마그네슘(Mg) 원자 1개가 배워진 화합물로 구성되어 있다[17,18].

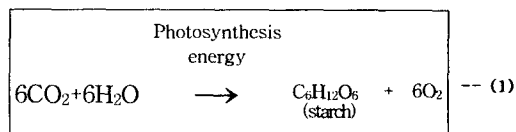


Fig. 1. Photosynthesis process of plant.

일반적으로 천연물을 분리하는 추출법에는 용매를 사용한 수증기 증류법, 메탄올 추출법, 에탄올 추출법, 에테르 추출법, 프로필렌 글리콜 추출법, 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 추출법 등이 있으며, 천연물을 분리하는 여과법에는 진공여과법(vacuum-filtration : VF), 정밀여과법(micro-filtration : MF), 한외여과법(ultra-filtration : UF), 나노 여과법(nano-filtration : NF) 등이 있다.

Table 1. Physical Characteristics of Terpene Component

name	characteristics	molecular formula	d ₁₅ ¹⁵	N _D ²⁰	MP(°C)
α,β-pinene		C ₁₀ H ₁₆	0.8584-0.8600	1.4658-1.4663	-57.0
bonyl acetate		CH ₃ COOC ₁₀ H ₁₇	0.9910	1.4639	27.7
borneol		C ₁₀ H ₁₇ OH	—	1.010-1.020	204.0
camphene		C ₁₅ H ₂₄	0.8486	1.4605	55.0
phellandrene		C ₁₀ H ₁₇	0.8480	1.4769	—

본 연구는 천연 솔잎을 용매인 에탄올로 추출시킨 다음 여과한 솔잎추출물을 회전식 진공증발기로 용매를 분리시켜 얻어진 솔잎의 정유성분에 대한 항균 실험을 통하여 그 특성을 확인해 보고저 하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 기기

본 실험에서 솔잎(*pinus densiflora sieb, et zucc*)은 경기도 포천시 선단동 왕방산에 자생하는 소나무로부터 채취하여, 물로 세척하고, 수분을 건조시킨 다음 과쇄기로 짧게 분쇄하여, 이를 재료로 사용하였고, 본 추출 실험에서 유기용매는 93%-에탄올(국산)을 사용하였다. 본 특성 실험은 솔잎의 항균실험에 대하여 약리적 효능 및 효과를 검토하였다. 먼저 항균실험에 적용된 균주는 *staphylococcus aureus* (*S-aureus*)와 *E-coli*를 한국 미생물보존센터(KCCM)에서 구입, 사용하였다. 미생물 실험에서 NA배지는 시약용으로 beef extract (USA) 0.3g과 peptone (USA) 0.5g과 Agar (USA) 1.5g, NaCl (국산) 0.5g에 증류수 100ml를 가하여, 이를 액체 배지로 만들어 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 natural extract equipment (국산), rotary vacuum evaporator (model No. NE-1001s, EYELA Co., Japan), incubator (국산), electron microscope (Japan), colony counter (국산), centrifuge (국산), shaking incubator (국산)을 사용하였고, 분석기기는 Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry (model No. OPTIMAR-2,000 DV, PERKIN ELMER Co., USA), Gas Chromatography/Mass Spectrometry (model No. HP-6890, Hewlett Packard Co., USA)를 각각 사용하였다.

2.2. 추출실험

본 실험은 솔잎 500g에 유기용매인 에탄올 4,500ml를 가하여, 완전 혼합시킨 후 천연물 추출장치를 사용하여 추출온도와 추출시간은 78℃, 3시간 동안 water bath 내에서 가열, 농축시켜 3회 반복 추출하였다. 천연물 추출장치 내에서 추출하여 얻어진 솔잎 추출액을 진공여과기구를 사용하여 고형의 솔잎을 제거하고 농축

된 솔잎추출물을 여과하였다.

본 실험은 상기 여과과정에서 얻어진 솔잎추출물을 회전식 진공증발기를 사용하여 휘발성 에탄올 성분을 진공으로 증발시키고, 솔잎의 정유성분을 분리하였다.

2.3. 항균실험

솔잎의 정유성분 1, 5, 10g을 증류수 100ml에 각각 희석하여 시료의 농도가 1.0, 5.0, 10.0%의 수용액상태로 용해시킨다. 다음은 본 정유성분의 수용액에 1, 5, 10g을 취한 후, 각각의 NA배지 100ml에 vortex로 혼합하고 72℃ 가열하여 액체상태로 만든 다음 이를 냉각시켜 42℃에서 액체 NA배지의 시료 용액을 petri-dish에 10ml씩을 취하고 여기에 접종균인 *S-aureus*와 *E-coli*의 생균수가 10.0×10CFUS/ml를 시료용액의 표면에 접종하여 시료용액의 농도가 100, 500, 1,000ppm이 되게 고형화시킨다. 본 배양실험은 배양온도와 배양시간이 36℃, 5일(120hrs)간 shaking incubator 내에서 시료용액이 농도별로 시간경과에 따라 미생물의 증식이나 소멸 상태에 따른 항균실험 결과를 관찰한다. 여기서 대조균은 시료용액을 사용하지 않고 증류수만을 사용하여 비교하였다. CFUS는 colony formation unit(균집 형성단위)의 약어이다.

2.4. 기기분석

2.4.1. ICP/OES 측정

솔잎의 정유성분에서 엽록소에 대한 무기성분을 확인하기 위하여 유도결합 플라즈마 분광기를 사용하여 분석하였다. 본 분석기기에 표준 무기원소로는 Ag, Al, As, Be, Ca, Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, Tl, V, Zn을 사용하였다.

2.4.2. GC/MS 측정

솔잎의 성분확인을 위하여 솔잎의 정유성분 1g에 용매인 클로로포름 100ml를 희석하여 용해시킨 시료용액을 GC/MS 분석기기를 사용하여 측정하였다. GC/MS의 측정장비와 조건에서 detector는 HP Mass-5973과 column은 HP-5MS(30m×0.25mm×0.25μm)을 사용하였고 injection temperature는 250℃, detector temperature는 280℃에서 측정하였으며, carrier gas는 He 1ml/min에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항균실험 결과

본 항균실험은 평판배양법[19]에 따라 액체 NA배지 100.0ml에 솔잎의 정유성분 100ppm (PN-RO : 1G/DI-water : 99G)의 농도로 42℃에서 균일하게 희석하여 혼합하고, 이미 멸균처리한 petri-dish에 10G씩을 취한 다음 여기에 미생물인 S-aureus균과 E-coli균을 10.0×10CFU/ml씩을 각각 접종하였다. 본 배양 실험은 shaking incubator내에서 배양온도가 36℃, 배양시간이 120hrs로 유지하여 시료용액의 시간경과에 따른 미생물의 항균실험 결과를 측정하여 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 S-aureus균을 첨가한 sample-①의 경우 초기 미생물의 농도가 10.0×10CFU/ml에서 48hrs 경과에는 5.0×10CFU/ml로 50%의 감균현상을 나타내었고 96hrs 부터는 100%의 멸균현상을 나타내었다. 그러나 control-②의 경우 초기 미생물의 농도 10.0×10CFU/ml에서 48hrs 경과 시에는 50.0×10CFU/ml로 500%의 증균현상을 나타내었고 120hrs 경과 후에는 1,000×10CFU/ml로 10,000%의 증균현상이 나타남을 알 수 있다. 또한 E-coli균을 첨가한 sample-①의 경우 초기 미생물의 농도 10.0×10CFU/ml에서 48hrs 경과 시에는 4.0×10CFU/ml로 40%의 감균현상을 나타내었고, 120hrs 경과 시에는 100%의 멸균현

상을 나타내었다. 그러나 control-②의 경우 초기미생물의 농도 10.0×10CFU/ml에서 48hrs 경과 시에는 40.0×10CFU/ml로 400% 증균현상을 나타내었고, 120hrs 경과 시에는 900.0×10CFU/ml로 9,000%의 증균현상이 나타남을 알 수 있다. 여기서 PN-RO pine-needles refined oil(솔잎의 정유성분)이다.

3.1.1. S-aureus균의 항균실험 결과

본 실험은 액체 NA배지 100.0ml에 솔잎의 정유성분을 100ppm(PN-RO : 1G/DI-water : 99G), 500ppm(PN-RO : 5G/DI-water : 95G), 1,000ppm(PN-RO : 10G/DI-water : 90G)으로 농도를 점점 증가시켜 42℃에서 각각 희석하여 혼합하였고, 이미 멸균처리한 petri-dish에 10G씩을 취한다음 여기에 미생물인 S-aureus균 10.0×10CFU/ml(100germs)씩을 접종하였다. 본 배양실험은 shaking incubator내에서 배양온도가 36℃, 배양시간이 120hrs로 유지시켜 시료용액의 농도변화와 시간경과에 따른 S-aureus균의 항균실험 결과를 Fig. 2에 나타냈었다. 그리고 비교실험으로 솔잎의 정유성분이 전혀 첨가하지 않은 대조군의 경우는 Fig. 3에 도시하였다.

Fig. 2에서 솔잎의 정유성분에 대한 농도와 반응시간을 증가시킬 경우 S-aureus 균의 성장이 현저히 감소함을 알 수 있다. 솔잎의 정유성

Table 2. Measurement Result on the Cultivation State of Microbe against Pine-Needles according to Time Passage

time passage in incubation(hrs)	S-aureus		E-coli	
	sample-① (CFU/ml)	control-② (CFU/ml)	sample-① (CFU/ml)	control-② (CFU/ml)
0	10.0×10	10.0×10	10.0×10	10.0×10
(Germs) 24	7.0×10	30.0×10	6.0×10	20.0×10
48	5.0×10	50.0×10	4.0×10	40.0×10
72	1.0×10	150.0×10	2.0×10	100.0×10
96	0	400.0×10	1.0×10	300.0×10
120	0	1,000×10	0	900.0×10

<Example>

.Sample① : This added only natural pine-needles refined oil component 100ppm in NA culture medium.

.Control② : This added only distilled water which pine-needles did not add in NA culture medium.

분의 농도를 1,000ppm 이상 첨가할 경우 반응 시간이 96시간 경과시에는 완전 멸균됨을 알 수 있다. 그러나 Fig. 3에서 솔잎의 정유성분을 전혀 첨가하지 않은 대조군의 경우 반응시간이 경과함에 따라 S-aureus 균의 성장이 급격히 증가함을 알 수 있다.

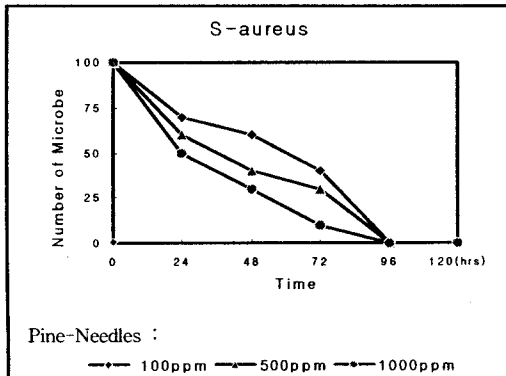


Fig. 2. Antimicrobial result of S-aureus according to concentration change and reaction time on the refined oil Component of Pine-Needles(100, 500, 1,000ppm).

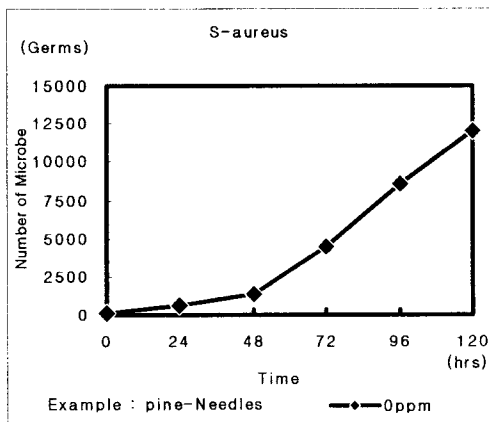


Fig. 3. Antimicrobial result of S-aureus according to concentration change and reaction time on the refined oil component of Pine-Needles (0ppm).

따라서 본 미생물 실험결과 솔잎의 정유성분에는 S-aureus 균에 항균효과가 있는 것으로 나타났다.

3.1.2. E-coli균의 항균실험 결과

본 실험은 액체 NA배지 100ml에 솔잎의 정유성분을 100ppm (PN-RO : 1G/DI-water : 99G), 500ppm (PN-RO : 5G/DI-water : 95G), 1,000ppm (PN-RO : 10G/DI-water : 90G)으로 농도를 점점 증가시켜 42°C에서 각각 희석하여 혼합하였고, 이미 멸균처리한 petri-dish에 10G씩을 취한다음 여기에 미생물인 E-coli균 10.0×10CFU/ml (100germs)씩을 접종하였다. 본 배양실험은 shaking incubater내에서 배양온도가 36°C, 배양시간이 120hrs으로 배양조건을 유지하여 본 시료용액의 농도변화와 시간경과에 따른 E-coli균의 항균실험 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 그리고 비교실험으로 솔잎의 정유성분이 전혀 첨가하지 않은 대조군의 경우는 Fig. 5에 도시하였다.

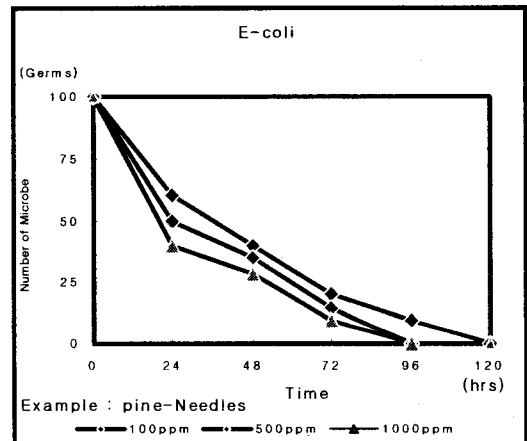


Fig. 4. Antimicrobial result of E-coli according to concentration change and reaction time on the refined oil component of Pine-Needles(100, 500, 1,000ppm).

Fig. 4에서 솔잎의 정유성분에 대한 농도변화와 반응시간을 증가시킬 경우 E-coli균의 성장이 현저히 감소함을 알 수 있다. 정유성분의 농도를 1,000ppm 이상 첨가할 경우 반응시간이 96시간 경과 시에는 미생물이 완전 멸균됨을 알 수 있다.

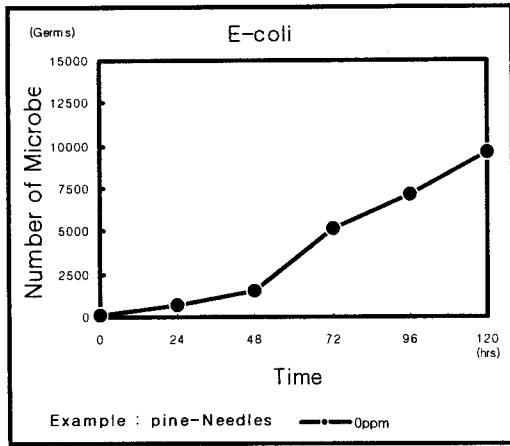


Fig. 5. Antimicrobial result of E-coli according to concentration change and reaction time on the refined oil component of Pine-Needles (0ppm).

그러나 Fig. 5에서 솔잎의 정유성분을 첨가하지 않은 대조군의 경우 반응시간이 경과함에 따라 E-coli 균의 성장이 급격히 증가함을 알 수 있다.

따라서 본 미생물 실험결과 솔잎의 정유성분에는 E-coli균에 항균효과가 있음을 확인하였다.

3.2. 기기분석 확인

3.2.1. ICP/OES 분석

솔잎의 정유성분과 용매인 증류수를 1:100의

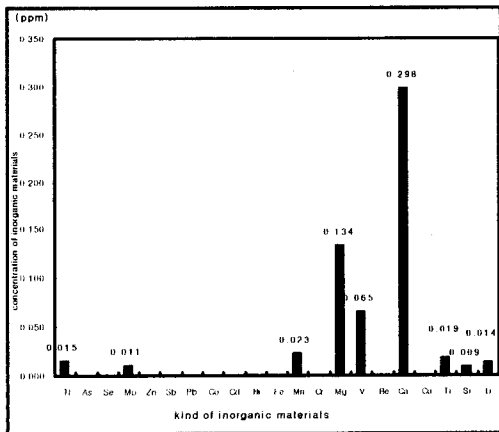


Fig. 6. Concentration of inorganic materials in refined oil component of Pine-Needles.

비율로 희석, 용해시켜 ICP/OES로 기기 분석한 결과 Fig. 6에 나타내었다.

Fig. 6에서 솔잎에는 Ca (0.298ppm), Mg (0.134ppm), V (0.065ppm), Mn (0.023ppm), Ti (0.019ppm)등의 무기물질들이 검출되었고 중금속이나 독성물질인 Pb, Cd, As 등은 검출되지 않았으며, 이미 확인된 무기물질들은 솔잎의 염록소 성분으로 추측되었다.

3.2.2. GC/MS 분석

솔잎의 정유성분과 용매인 클로로포름을 1:100의 비율로 희석, 용해시켜, 이를 GC/MS로 분석한 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

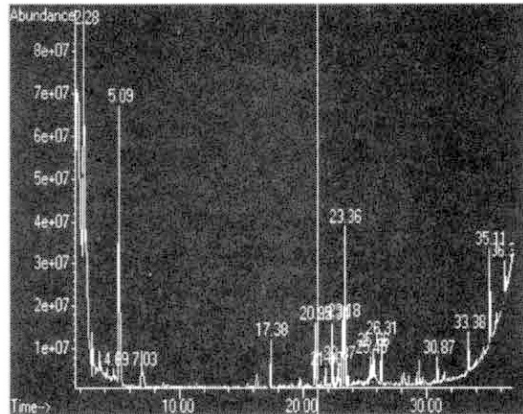


Fig. 7. Analysis result on organic compounds of Pine-Needles with GC/MS.

Fig. 7에서 나타난 솔잎의 정유성분에는 다양한 방향족 성분들이 검출되었다. 특히 솔잎의 정유성분에서 benzoic acid (2.28), α,β,γ -pinnene (20.36, 20.99), camphene (5.09), α,β,γ -phellandrene (11.28, 15.26), α,β,γ -terpinene (11.28,13.80,17.38), α -carene (23.36), bonyl acetate (36.72), benzene (36.99) 등의 방향족 성분들이 확인되었다.

4. 결론

천연 솔잎추출물을 여과, 분리시킨 정유성분의 항균 및 기기분석에 의한 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 솔잎의 미생물 실험결과 정유성분의 농도와 반응시간을 증가시키면 미생물의 생균수가 점점 감소하였다. 정유성분의 농도가 100ppm 이상에서 S-aureus는 96hrs, E-coli는 120hrs에서 미생물의 멸균이 확인되었으나 대조군의 경우 반응시간이 길어짐에 따라 미생물의 생균수가 점점 증가하였다. 이는 솔잎의 정유성분이 미생물에 항균효과가 있음을 나타내었다.
2. 본 솔잎의 정유성분을 기기분석한 결과 ICP/OES 분석에서 Ca, Mg, V, Mn, Ti 등의 무기물질이 검출되었는데, 이는 솔잎의 엽록소 성분으로 추측되며, GC/MS 분석에서 benzoic acid, α,β,γ -pinnene, α,β,γ -phellandrene, α,β,γ -terpinene, α -carene, bonyl acetate, α -camphene, benzene 등 방향족 성분들의 검출이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 대전대학교 2004년도 교내연구비 지원과 관련된 연구로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. D. S. Choi and H. Y. Ko, "Food Functional Chemistry", p. 235, Jigu Munhwasa, Seoul (1995).
2. 박호균, "천연물로부터 신규물질의 개발에 관한 연구", pp. 1-327, 한국과학기술연구원, UCN793(1)-4627-6, 4 (1992).
3. 박종철, "기능성 식품의 천연물 과학", pp. 37-138, 도서출판 효일 (1992).
4. J. J. Moon, Studies on Antimicrobial Effects of Pine-needles, *Pinus Densiflora Sieb, et Zucc, Korea vet Res*, **33(4)**, 701 (1993).
5. J. K. Park, "Hanbangdaejun", Dongyang Communication Press, p. 134, Taegu (1984).
6. 이정숙, "송엽과 송화의 성장에 따른 영양성분의 변화에 관한 연구", 한양대학교 대학원 석사학위 청구논문, 한양대학교 대학원 (1980).
7. 황수진, 기능성 음료개발, 식품과 위생, **8**, 56 (1995).
8. 임용규, "솔잎건강법", pp. 68-70, 오성출판사, 서울 (1996).
9. S. R. Oh, Studies on the Physiological Functionally of Pine-needles and Mugwort Extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27(6)**, 978 (1995).
10. H. W. Cho and K. S. Byo, Pharmacognostical Investigation on the Oriental Medicine(II), Botanical Origin of Usual Vegetable Drugs, *Kor. J. Pharmacogn*, **7(1)**, 73 (1976).
11. B. S. Chung and M. K. Shin, "The Great Dictionary of Traditional and Crude Medicine", Young Lim Press (1990).
12. 이범중, "천연물 화학", pp. 11-20, 자유아카데미 (2004).
13. 이영행, "유기화학", pp. 1050-1055, 자유아카데미 (1994).
14. J. H. Kuk, S. J. Ma, and K. H. Park, Isolation and Characterization of Cinnamic acid with Antimicrobial Activity from Needle of *Pinus Densiflora*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 823 (1997).
15. C. S. Park, Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Pine Needle against Pathogenic Bacteria, *Korean J. Pastharvest Sci. Technol.*, **5(4)**, 380 (1999).
16. J. D. Kim, Effect of Dietary Supplementation With Pine-leaf on Lipid Parameter in Rats, *Korean J. Gerontol.* **1(1)**, 47 (1991).
17. 이영래, "유기화학", pp. 241-244, 삼광출판사, 서울 (1998).
18. 김재호, "생화학", **1(4)**, pp. 428-431, 청문각, 서울 (2000).
19. 이규식, "미생물학실습", pp. 1-329, 원광대학교 출판국 (1992).