

솔잎 추출물의 티로시나아제 활성억제 효과 및 분석

성기천[†] · 김기준

대진대학교 공과대학 화학공학과
(2004년 12월 20일 접수 ; 2005년 2월 18일 채택)

Tyrosinase Activated Inhibition Effect & Analysis of Pine-Needles Extract

Ki-Chun Sung[†] · Ki-Jun Kim

Department of Chemical Engineering, Daejin University, Pocheon 487-711, Korea
(Received December 20, 2004 ; Accepted February 18, 2005)

Abstract : We extracted pine-needles using ethanol as solvent, and we obtained the refined oil component from pine-needles extract. Also we tested the tyrosinase activated inhibition effect with melanin experiment and analysed with ICP/OES and UV/VIS. Accordingly we obtained the next conclusion from the result of this experiment. From the first result of this experiment, we could know that the degree of recovery of refined oil component from pine-needles extract appeared in about 8.0%. From the second result of this experiment, we could know that the tyrosinase activated inhibition rate increased more and more in case of increasing concentration of pine-needles, green-tea, vitamine-C. Also we could know that vitamine-C influences to tyrosinase activated inhibition contained in pine-needles. From the third result of this experiment, we could know that inorganic materials of Ca, Mg, V, Mn, etc contained in pine-needles detected with ICP/OES analysis, and the absorbance of pine-needles extract appeared very high in UV/VIS analysis.

Keywords : pine-needles extract, refined oil component, tyrosinase activated inhibition effect.

1. 서 론

소나무과(Pinus densiflora sieb. et zucc)에 속하는 솔잎은 중국이나 일본, 한국을 포함한 아시아 지역, 유럽 지역, 아메리카 지역 등의 입야에 널리 자생하고 있는 소나무로부터 저비용으로 손쉽게 얻을 수 있는 장점과 솔잎의 천연향, 엽록소, 항균작용, 항산화 작용, 항암작용,

멜라닌 활성억제 작용 등의 약리적 특성을 가지고 있어, 오늘날 솔잎은 기능성 소재 연구개발에 대한 응용가능성과 함께 부가가치가 매우 높은 천연물로 알려져 있다[1]. 솔잎은 예로부터 솔잎차, 솔잎술, 솔잎쥬스, 솔잎녹즙, 솔잎캔디, 솔잎송편 등의 건강식품을 만들어[2,3], 신경통, 관절염, 당뇨병, 고혈압, 피부질환 등의 성인병 치료에 사용된 기록이 전해오고 있으나[4], 오늘날 솔잎의 약리적 특성을 응용한 방향제, 향균제, 항산화제, 항암제, 피부 미백제 및 노화억지

[†]주저자 (e-mail : kcsung@daejin.ac.kr)

제 등의 효능이 인식되면서 의약품이나 화장품 등의 기능성 소재로 연구개발이 이루어지고 있다[5,6]. 술잎을 분석한 자료에 의하면 술잎의 성분에는 테르펜, 폴리 페놀류, 탄닌 계열 등의 방향족 정유성분과 엽록소 성분, 단백질, 지방질, 당질, 섬유질, 칼슘, 철분, 망간, 아연, 비타민-A,C,K 등의 다양한 성분들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[7]. 동의보감이나 본초강목에서도 술잎은 미생물 억제작용, 산화 억제작용, 고혈압 및 뇌졸중 예방작용 등의 장수약으로 전해오고 있다. 술잎에는 사계절 푸른색을 띄는 엽록소가 있고 이 엽록소는 식물체에 대한 광합성 작용으로 영양분을 공급하게 된다. 이 엽록소는 동화색소의 일종인 클로로필(chlorophyll)이라는 식물체내의 천연 색소가 작용하기 때문이다. 클로로필은 4개의 피롤 메탄기에 결합된 고리모양의 테트라 피롤에 시클로 메탄고리가 연결된 포르피린(porphyrin) 유도체로 테트라 피롤 고리의 중앙에 마그네슘(Mg) 원자 1개가 배워된 화합물로 이루어져 있다[8]. 엽록소의 기본구조는 1913년 독일의 화학자 R. M. Willstätter와 A. Stoll에 의해 밝혀졌고, 그후 60년경 미국의 화학자인 R. B. Woodward 등은 피롤 유도체를 포르피린 유도체로 엽록소를 인공적으로 합성하였다[9]. 술잎 추출물은 자외선과 멜라닌에 의해 색소 침착이나 피부 흑화를 억제시킴으로 인해서 피부 미백작용이나 노화 억제작용을 하는 것으로 알려져 있다[10]. 멜라닌은 인간의 피부조직의 세포내에서 티로시나아제(tyrosinase)라는 효소의 생합성 과정에서 만들어진다. 이 효소의 작용으로 아미노산의 일종인 티로신(tyrosin)이 작용하여 멜라닌 세포라고 하는 멜라닌 과립이 생성된다. 멜라닌 과립의 형태와 크기, 색소 침착의 정도는 조직 세포에 따라 다르다. 태양광선은 파장에 따라 자외선, 가시광선, 적외선 등으로 분류되며, 이 중에서 자외선은 일광의 약 6.0%이고, 가시광선은 52.0%, 적외선은 42.0%이다. 자외선은 파장의 범위에 따라 UV-A, UV-B, UV-C로 나누어지고, 자외선의 강도는 고도, 날씨, 계절, 부위 에 따라 차이가 있다. 자외선중 UV-A와 UV-B는 지상에 도달하여 피부에 영향을 주는데, UV-A는 320-400nm의 장파장 자외선으로 진피층에 침투하여 색소 침착이나 피부 흑화를 일으킨다. UV-B는 290-320nm의 중파장 자외선으로 파장이 짧고 에너지가 높아 표피와 진피의 상부까지

침투하여 일광 화상을 일으킨다. UV-C는 200-290nm의 단파장 자외선으로 피부암 발생의 원인이 되기도 한다[11]. 결국 피부가 UV-A, UV-B에 노출되면 멜라닌 세포내의 티로신이 티로시나아제 효소의 생합성 작용으로 산화 반응을 일으켜 멜라닌을 생성하게 된다. 이때 반응성이 높은 활성 산소가 존재하면 멜라닌 생성이 급격히 증가하여 피부에 색소 침착이나 피부 흑화를 일으켜 노화의 원인이 되기도 한다. 일반적으로 천연물을 분리하는 추출법에는 용매를 사용한 수증기 증류법, 메탄올 추출법, 에탄올 추출법, 에테르 추출법, 프로필렌 글리콜 추출법, 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 추출법 등이 있고, 천연물을 분리하는 여과법에는 진공 여과법(vacuum-filtration : VF), 정밀 여과법(micro-filtration : MF), 한외 여과법(ultra-filtration : UF), 나노 여과법(nano-filtration : NF) 등이 있다.

본 연구는 술잎을 용매인 에탄올로 추출시킨 다음 여과한 술잎 추출물을 회전식 진공 증발기로 용매를 분리시킨 후 얻어진 술잎의 정유성분에 대한 멜라닌 실험에 의해 티로시나아제 활성 억제 효과를 확인해 보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 기기

본 실험에서 술잎의 멜라닌 실험을 이용하여 티로시나아제 활성억제 효과를 실험하였다. 멜라닌 실험에서 티로신은 sigma Co.(U.S.A)에서 구입하였고, 대조군으로 녹차(국산)와 비타민-C(국산)는 직접 구입하여, 이를 시료로 사용하였다. 본 술잎 추출 및 멜라닌 실험에서 기기는 Natural extract equipment(국산), Rotary vacuum evaporator(model No. NE-1001s, Eyela Co., Japan)을 사용하였고, 분석기기로는 Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry(model No. Optimar-2,000 DV, Perkin Elmer Co., USA), UV/VIS-spectrophotometer(model No. Uvikon-923, Kontron Co., Italy)를 각각 사용하였다.

2.2. 추출 실험

본 실험은 술잎 50g을 유기용매인 에탄올 450ml에 넣은 후 완전 혼합시키고, 천연물 추출

장치를 사용하였다. 추출온도는 78℃, 추출시간은 약 2시간 동안 항온 수조내에서 가열, 농축 실험을 3회 반복하여 추출하였다.

천연물 추출장치로 부터 얻어진 술잎 추출액을 진공 여과기구로 고품질의 술잎을 여과시켜 제거한 다음 농축된 술잎 추출물을 얻어내었다. 본 실험에서 얻어진 술잎 추출물은 회전식 진공 증발기를 사용하여 휘발성 에탄올성분은 진공으로 증발시키고, 술잎의 정유성분만을 분리하여 얻었다.

2.3. 멜라닌 실험

$$\text{티로시나아제 활성억제율 (IC rate: \%)} = 100 - \frac{\text{시료용액의 반응 후 흡광도}}{\text{대조군의 반응 후 흡광도}} \times 100 \quad \text{---(1)}$$

Mason(1947)[12]의 멜라닌 실험에 의해 이 미 얻어진 술잎의 정유성분을 0.1g, 0.2g, 0.3g, 0.4g씩 증류수 1,000ml에 각각 용해시켜, 시료의 농도가 100µg/ml, 200µg/ml, 300µg/ml, 400µg/ml로 희석하고, 여기에 티로신 0.1g에 증류수 100ml를 용해시켜 첨가하고, 36℃에서 15분간 반응시킨 다음 여과한 시료 용액을 UV/ VIS 분석기기로 370nm에서 흡광도를 측정하여 티로시나아제 활성억제율(IC rate: %)을 다음의 식(1)에서 구할 수 있었다. IC rate은 inhibition concentration rate의 약어이다.

2.4. 기기분석 실험

2.4.1. ICP/OES 측정

술잎 추출물에서 엽록소에 대한 무기성분을 확인하기 위하여 유도결합 플라즈마 분광기를 사용하여 기기분석 하였다. 본 분석기기에 무기 원소로는 Ag, Al, As, Be, Ca, Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, Tl, V, Zn를 표준원소로 사용하였다.

2.4.2. UV/VIS 측정

술잎 추출물의 티로시나아제 활성억제율은 UV/ VIS 분석기기로 흡광도가 370nm에서 농도별로 술잎, 녹차, 비타민-C를 대상으로 비교, 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출 실험결과

술잎 추출물에서 에탄올을 회전식 진공 증발기로 분리시켜 정유성분 약 40g 얻었다. Table 1. 에서와 같이 분리수율은 분리시간과 추출온도에 따라 점점 증가함을 알 수 있었고, 에탄올의 분리수율은 추출시간이 2시간 경과한 후 약 92%를 얻을 수 있었다. 따라서 술잎의 정유성분에 대한 추출수율(%)은 다음의 식(2)에서 약 8.0%로 비교적 높은 결과를 나타냈다.

$$\text{정유 성분 추출수율(\%)} = \frac{\text{술잎에서 추출된 정유성분의 무게(G)}}{\text{술잎용액의 무게(G)}} \times 100 \quad \text{---(2)}$$

Table 1. Degree of Recovery on Refined Oil Component from Pine-Needles Extract

separation time(hrs)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
weight of refined oil component from pine-needles extract according to separation time(G)	500	450	350	150	40
recovery weight of ethanol(G)	0	50	150	350	460
recovery degree of ethanol(%)	0	10	30	70	92

술잎 추출물로부터 에탄올을 분리시켜 얻어진 정유성분에 대한 물리학적 실험자료는 Table 2. 과 같다.

Table 2. Physical Test Data of Refined Oil Component from Pine-Needles Extract

test terms	shape	pH(20℃)	viscosity	remarks
quality control	dark blue-green color	7.5	25,000 cps	-
test data	dark blue-green color	7.5	25,000 cps	-
others data	pine-needles fragrance	distilled water (1% SOL)	brook field	-

3.2. 멜라닌 실험결과

본 멜라닌 실험은 자외선의 흡광도에 대한 실험으로 솔잎 추출물로부터 정유성분을 농도별로 희석시켜 티로신과 반응한 다음 흡광도를 측정하여 티로시나아제 활성억제율에 대한 실험결과이다. 티로시나아제 활성억제 효과는, 솔잎추출물로부터 정유성분의 농도를 UV/VIS 분석기기로 흡광도를 370nm에서 측정하여 티로시나아제 활성억제율(%)을 식(1)에 의해 구하였다. Table 3은 솔잎, 녹차, 비타민-C의 농도변화에 따른 흡광도로 부터 티로시나아제의 활성억제율과의 관계를 나타낸 도표이다.

Table 3. Tyrosinase Inhibition Concentration Rate from Absorbance of UV/VIS-Spectrophotometer according to Concentration Change of Pine-Needles, Green-Tea, Vitamine-C

test terms samples	concentration (μg/ml)	absorbance	tyrosinase inhibition rate(%)	remarks
pine-needles	100	0.549	6.153	
	200	0.413	29.401	
	300	0.386	34.017	
	400	0.220	62.393	
green-tea	100	0.501	14.359	
	200	0.387	33.846	
	300	0.278	49.059	
	400	0.207	64.615	
vitamine-C	100	0.419	28.376	
	200	0.310	47.008	
	300	0.181	69.050	
	400	0.110	81.200	

Table 3에서 솔잎, 녹차, 비타민-C는 농도가 증가함에 따라 흡광도는 감소하였으나, 티로시나아제 활성억제율은 흡광도의 변화에 따라 증가함을 알 수 있다. 최근 기능성 신소재 기술 개발 보고서[13]에 의하면 솔잎의 정유성분에는 테르펜, 폴리 페놀류, 탄닌 계열의 방향족 성분이 함유되어 있어 항염 효과, 멜라닌 생성억제 효과, 항산화 효과, 암세포 증식억제 효과는 있으나, 독성이 없는 점이 특징이다. 일반적으로 카로틴, 헤모글로빈, 멜라닌 등은 피부 색소를 나타내는 기능을 한다. 또한 멜라닌은 피부의 표피내 기저층에서 멜라닌 세포라고 하는 멜라닌 과립에 의해 만들어지는데, 건강인의 피부에는 단위 면적당 약 1,500개의 멜라닌 세포가 존

재하고, 멜라닌 세포의 크기, 모양 및 수는 유전적으로 결정된다[14]. 피부에 자외선을 조사하면 산화되어 갈색이 되는데, 이것은 멜라닌이 자외선을 흡수하여 피부색을 나타낸 것으로 추측된다. 따라서 솔잎 추출성분에는 티로시나아제 활성을 억제하는 작용이 있음을 확인하였고, 이는 피부 흑화나 색소 침착 등을 억제하는 작용이 있어, 고 기능성 소재개발이 가능하다고 본다.

3.3. 기기분석 실험결과

3.3.1. ICP/OES 분석

솔잎의 정유성분과 용매인 증류수를 1:100의 비율로 희석, 용해시킨 후 ICP/OES 분석기기로 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

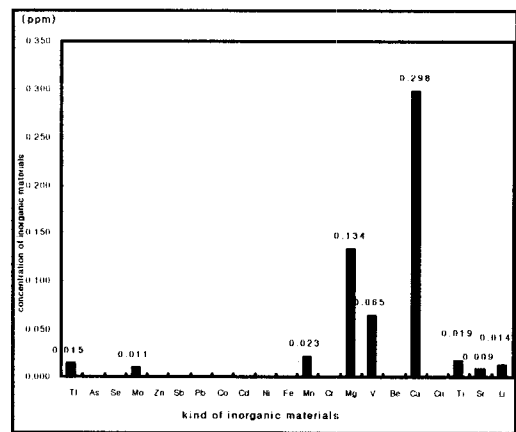


Fig. 1. Weight of inorganic materials in refined oil component of pine-needles.

Fig. 1에서 솔잎의 정유성분 내에는 Ca(0.298ppm), Mg(0.134ppm), V(0.065ppm), Mn(0.023ppm), Ti(0.019ppm)등의 무기물질들이 함유되어 검출되었고, 여기에 중금속이나 독성 물질인 Pb, Cd, As 등은 검출되지 않았으며, 이미 확인된 무기물질들은 솔잎의 엽록소 성분으로 추측된다.

3.3.2. UV/VIS 분석

본 멜라닌 실험에서 UV/VIS 분석기기로 솔잎, 녹차, 비타민-C를 농도별로 흡광도를 370nm에서 측정한 다음, 각 성분들의 흡광도에 따른 티로시나아제 활성억제율을 Fig. 2에 도시하였다.

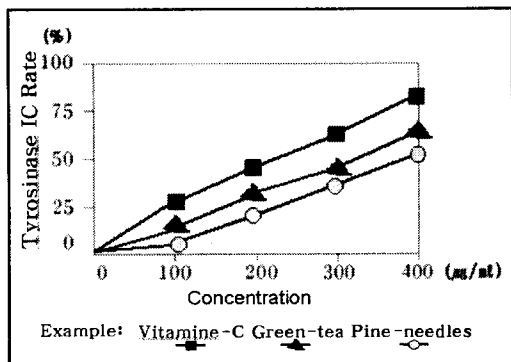


Fig. 2. Inhibition concentration rate of tyrosinase activity according to concentration change of pine-needles, green-tea, vitamine-C.

Fig. 2는 솔잎, 녹차, 비타민-C의 티로시나아제 활성억제율을 도표로 나타낸 것이다. 본 도표에서 솔잎, 녹차의 경우 정유성분의 농도가 증가하면 흡광도는 점점 낮게 나타났으나, 티로시나아제 활성억제율은 점점 증가함을 알 수 있었다. 특히 비타민-C는 솔잎, 녹차 보다 티로시나아제 활성억제율이 매우 높게 나타남을 알 수 있다. 이는 솔잎과 녹차에 티로시나아제 활성을 억제해주는 비타민-C의 성분이 다량 함유되어 있는 것으로 추측된다.

4. 결 론

솔잎 추출물의 멜라닌 및 기기분석 실험결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 본 솔잎의 추출 실험결과 정유성분의 추출수율은 약 8.0% 정도로 나타났다.
2. 본 솔잎 추출물의 멜라닌 실험결과 정유성분의 농도가 증가하면, 티로시나아제 활성억제효과가 증가하는 것으로 나타났다. 솔잎의 추출성분에 비타민-C의 함유로 인하여 피부 미백효능이나 노화 억지제에 관련이 있음을 알 수 있다.
3. 본 솔잎 추출물의 ICP/OES 분석결과 솔잎성분에서 Ca, Mg, V, Mn 등의 무기물질이 다량 검출되었고, 이들 성분들은 솔잎의 엽록소 성

분으로 추측된다. 그리고 UV/VIS 기기분석 결과 티로시나아제 활성억제 효과가 매우 높게 나타난 것은 비타민-C의 함유로 인한 영향을 추측할 수 있었다.

참고문헌

1. K. C. Sung, "Characteristics and Analysis of Natural Pine-Needles Extract", *Journal of The Korean Oil Chemists Society*, **21**(4), 320-326 (2004).
2. J. S. Lee, "송엽과 송화의 성장에 따른 영양성분의 변화에 관한 연구", 한양대학교 대학원, 석사학위 청구논문, 한양대학교 대학원 (1980).
3. S. J. Hwang, "기능성 음료개발", *식품과 위생*, **8**, 56 (1995).
4. E. G. Yim, "솔잎 건강법", 오성출판사, 서울, 68-70 (1996).
5. S. R. Oh, "Studies on the Physiological Functionally of Pine-needles and Mugwort Extracts", *Korean J. Food Sci. Technol*, **27**(6), 978-984 (1995).
6. 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), 73-84 (1976).
7. B. S. Chung, and M. K. Shin, "The Great Dictionary of Traditional and Crude Medicine", *Young Lim Press* (1990).
8. Y. R. Lee, "유기화학", 삼광출판사, 241-244 (1998).
9. J. H. Kim, "생화학" 청문각, **1**(4), 428-431 (2000).
10. K. Maeda, and M. Fukuda, "In Vitro Effectiveness of Several Whitening Cosmetic Components in Human Melanocyte", *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
11. B. J. Ha, "화장품 화학", 수문사, 33-36, (2002).
12. H. S. Mason, "The Chemistry of

- Melanin", *J. Biol. Chem.*, **172**, 83 (1947).
13. 식물자원의 폴리 페놀류 분류와 기능성 신소재 기술개발 보고서, 농림부 (1997).
 14. J. C. Prieto, and M. Quevedo, "Hypotensive Effect of Dopaminergic agonists in the Rats, *Arch Inst. cardiol. Mex.*, **57**(4), 279 (1987).