

백삼과 홍삼의 페놀성 성분 함량 및 멜라닌 생성억제효과

황은영 · 공연희 · 이영철 · 김영찬 · 유경미* · 조연옥 · 최상윤[#]

한국식품연구원, *코넬 대학교 식품과학과
(2006년 6월 7일 접수, 2006년 6월 20일 수리)

Comparison of Phenolic Compounds Contents between White and Red ginseng and Their Inhibitory Effect on Melanin Biosynthesis

Eun Young Hwang, Yeon Hee Kong, Young Chul Lee, Young Chan Kim,
Kyung Mi Yoo*, Youn Ock Jo and Sang Yoon Choi[#]

Korea Food Research Institute, Songnam, Korea

*Department of Food Science and Technology, NYSAES, Cornell University, Geneva, NY, USA

(Received June 7, 2006; Accepted June 20, 2006)

Abstract : Quantitative difference in five phenolic acids between white and red ginsengs was measured in this study. As the results, white ginseng has higher contents of cinnamic acid, quercetin and *p*-coumaric acid than red ginseng. Maltol was mainly included in red ginseng. These five compounds were recently reported to have tyrosinase inhibitory effects. These reports led us to investigate the de-pigmenting effect of ginseng products. In our examination of effect on tyrosinase activity, UV-protection and melanin production in melan-a cells, ethylacetate fraction of white ginseng extract and cinnamic acid showed potent de-pigmenting properties. The results indicated that white ginseng might be useful as skin whitening material and cinnamic acid proved to be one of active ingredient.

Key words : ginseng, phenolic compound, melanin, pigment

서 론

고려인삼은 한반도 지역에서 재배되는 *Panax ginseng* C. A. Meyer를 지칭하며 주로 4~6 년 동안 성장한 뿌리를 약용으로 사용한다.¹⁾ 가공방법에 따라 인삼을 그대로 말린 것을 백삼이라 지칭하며 홍삼은 수증기 등으로 찌서 익힌 후 건조한 것을 말한다.²⁾ 고려인삼의 약리작용으로는 해독작용, 당뇨병 및 고지혈증 예방, 면역기능 증진, 항암활성 등이 보고되었으며 주요활성 성분으로는 사포닌 성분이 알려져 protopanaxdiol계, protopanaxtriol계 oleanolic acid계의 ginsenoside가 분리되어 그 화학구조가 밝혀졌다. 그러나 최근 들어 사포닌만으로는 인삼의 생리활성을 설명하는데 한계에 이르러 비사포닌 성분에 대한 연구가 최근 활발히 진행

되고 있다. 인삼의 비사포닌계 성분으로는 항암활성이 뛰어난 polyacetylene 계열과 항당뇨 효과와 혈압강화 효과와 관련 있는 유리 아미노산, 항산화 효과가 뛰어난 phenolic compounds 등이 있다.³⁻⁷⁾ 특히, phenolic compound는 한국산 인삼이 중국산에 비해 높은 함량을 보인다는 보고가 있었다.⁸⁾ 인삼 중 페놀성 성분은 노화억제 유효 활성성분으로 관심의 대상이 되어 수삼으로부터 salicylic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid가 분리되었으며 백삼으로부터 ferulic acid, caffeic acid, gentisic acid, *p*-hydroxybenzoic acid가 분리 보고되었고,^{9,10)} 지질과산화 억제 활성이 강한 홍삼의 에스테르 가용성 산성분획으로부터 maltol이 분리되었다. 이외에 인삼에서 확인된 페놀성 성분들은 cinnamic acid, protocatechuic acid, syringic acid, esculetin 등이 있으며,^{11,12)} 이들 성분 중에서 esculetin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, maltol 등은 멜라닌 생합성 과정에 관여하는 주요효소인 tyrosinase 억제활성이 보고되어 있다.¹³⁻¹⁶⁾

본 연구에서는 백삼과 홍삼에 함유되어 있는 phenolic

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-780-9307; (팩스) 031-709-9876
(E-mail) sychoi@kfri.re.kr

compound인 cinnamic acid, *p*-coumaric acid, esculetin, maltol, quercetin 등의 함량을 정량하여 차이를 비교 하였고, 이를 토대로 미백활성을 검정하여 백삼 ethylacetate 분획물의 미백활성을 발견하여 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험시료

본 연구에 사용된 백삼 시료는 2005 년에 농협에서 제조된 피부직삼을 구입하여 사용하였고 홍삼시료는 KT&G에서 제조한 정관장 홍삼을 구입하여 사용하였다.

유효성분 추출

시료를 마쇄한 후 80% 메탄올/증류수 혼합용매를 사용하여 1 시간 씩 3 회 반복하여 상온에서 초음파 추출한 후 감압 농축하여 추출물을 제조하였다. 제조된 추출물을 ethyl acetate 가용성 분획과 H₂O 가용성 분획으로 나누어 이 중 ethyl acetate 분획을 완전 농축하여 얻은 잔사를 페놀성 성분 분석 및 활성 측정용 시료로 사용하였다.

페놀성 성분 정량

페놀성 성분의 정량은 Jasco Co. (Japan)의 분석용 HPLC를 사용하였다. Bondapak C18 column (4 μ m, 300 $\times$ 3.9 mm)을 사용하여 이동상은 2% acetic acid가 함유된 water (용매 A)와 0.5% acetic acid가 함유된 50% acetonitrile (용매 B)을 gradient를 주어 용출하였다. 용출속도는 0.8 ml/min, column의 온도는 40°C로 유지 하였으며 시료의 검출은 280 nm에서 측정하였다. 분석용 시료는 농축된 추출물을 10 mg/ml로 메탄올에 녹인 후 0.45 μ m syringe filter (Millipore)로 여과하여 사용하였다. 모든 시료는 3 회 반복 실험하여 평균치를 산출하였고 표준물질과의 co-injection을 실시하여 peaks의 일치를 확인하였다.

Tyrosinase 활성억제도

67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 8.0 mM L-dopa 120 μ l와 methanol 40 μ l에 녹인 여러 농도의 검색시료를 96-well microplate에 넣고 tyrosinase (125 U/ml) 40 μ l를 가하였다. 37°C에서 20 분간 incubation한 후 생성된 dopachrome의 양을 492 nm에서 Eilsa Reader를 사용하여 측정하였다.¹⁷⁾

UV-A 와 UV-B 영역에서의 자외선 흡수도 측정

Methanol에 검색시료를 녹여 UV-spectrophotometer를

이용하여 200 nm~500 nm에서의 흡수도를 측정하였다.¹⁸⁾

세포배양

마우스 유래의 melan-a 세포는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin, 200 nM의 phorbol-12 myristate 13-acetate가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.¹⁹⁾

시료처리

24 well plate에 1 $\times$ 10⁵ cells/well의 농도로 세포를 접종하고 세포부착을 위해 24 시간 배양하였다. Well당 990 μ l의 배지를 매일 갈아주면서 10 μ l의 시료를 3 일간 처리 (solvent: 50% propylenen glycol, 30% EtOH, 20% H₂O)

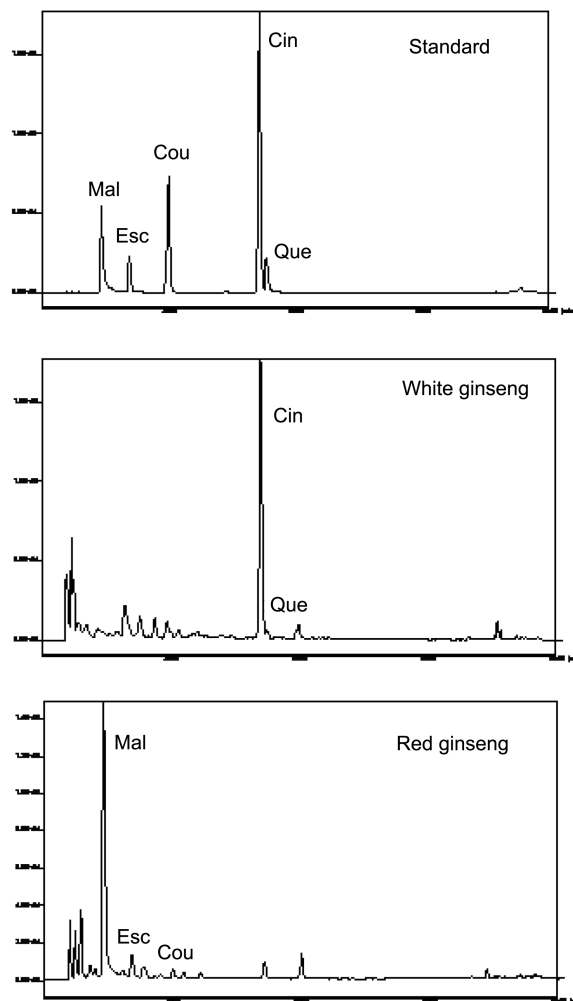


Fig. 1. HPLC chromatogram of each sample. The peak on 9.2, 13.6, 19.7, 33.8, 34.9 min were maltol, esculetin, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, quercetin, respectively. Column: bondapak C18, Solvent system: gradient elution of acetonitrile and water, Flow rate: 0.8 ml/min.

한 후 24 시간 더 배양하였다.

세포생존율 측정

배지 제거 후 PBS로 washing하고 well 당 crystal violet (CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS)를 200 μ l 첨가하였다. 5 분간 상온에서 incubation한 후 물로 2 번 washing 하였다. EtOH 1 ml를 첨가하여 상온에서 10 분간 shaking 한 후 590 nm에서 UV 흡수도를 측정하였다.

멜라닌 생성량 측정

배지 제거 후 PBS로 세척하고 well 당 1 N NaOH 1 ml를 가하여 멜라닌을 녹인 후 400 nm에서 UV 흡수도를 측정하였다.

결과 및 고찰

페놀성 화합물의 함량

백삼과 홍삼을 마쇄하고 80% 메탄올을 사용하여 추출한 후 ethyl acetate 가용성 분획과 H₂O 가용성 분획으로 나누어 완전 감압농축한 각각의 시료의 추출수율은 Table 1과 같다.

백삼과 홍삼시료의 esuletin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, maltol 성분함량을 HPLC를 이용하여 정량한 결과 홍삼과 백삼의 chromatogram 패턴이 매우 다름을 알 수 있었다(Fig. 1). 표준물질인 maltol, *p*-coumaric acid, esculetin, cinnamic acid, quercetin을 메탄올에 녹여 재료 및 방법에 제시된 조건으로 용출시켰을 때 각각 9.2, 13.6, 19.7, 33.8, 34.9 분에서 검출되었다. 백삼과 홍삼의 물 분획물은 이들 성분들이 검출되지 않았으며 ethylacetate 분획의 성분함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 백삼 중에는 cinnamic acid가 1.15%로 가장 많이 함유되어 있었고, 다음

으로는 quercetin이 0.24% 함유되어 있었다. Maltol의 경우는 홍삼의 증숙 과정 중 열처리에 의해 2 차적으로 생성되는 홍삼특유의 성분으로서 백삼에서는 검출되지 않았으며,⁸⁾ 홍삼에서는 증숙과정 중 열처리에 의하여 2 차적으로 생성되는 홍삼 특유의 성분인 maltol의 함량이 3.82%로 다량 함유되어 있었으나 다른 성분들은 상대적으로 적게 검출되었다.

Tyrosinase 활성 저해 효과

Tyrosinase는 멜라닌 생성 초기과정에서 tyrosine과 L-dopa의 산화를 돕는 주요한 효소이다. 앞서 정량한 5 종의 인삼 페놀성 성분이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Esculetin은 200 ppm 농도에서 46.5%의 가장 높은 tyrosinase 저해활성을 나타내었으며 quercetin과 cinnamic acid가 200 ppm에서 각각 35%, 33%의 저해활성을 나타냈다. 한편, 백삼과 홍삼 ethyl acetate 분획물은 200 ppm 농도일 때 각각 13.7%와 10.5%의 저해활성을 보였으나 물 분획물은 저해활성을 나타내지 않았다.

멜라닌 생성과 세포생존율에 미치는 효과

멜라닌의 생성은 멜라닌 생성세포의 melanosome이라는 소기관에서 이루어진다.²⁰⁾ 멜라닌은 자외선 등으로부터 피부를 보호하는 역할을 하지만 이의 과생성은 기미, 주근깨, 검버섯, 피부암 등의 질환을 유발한다. 본 연구에서는 mouse 유래의 멜라닌 생성세포인 melan-a 세포주를 이용하여 각각

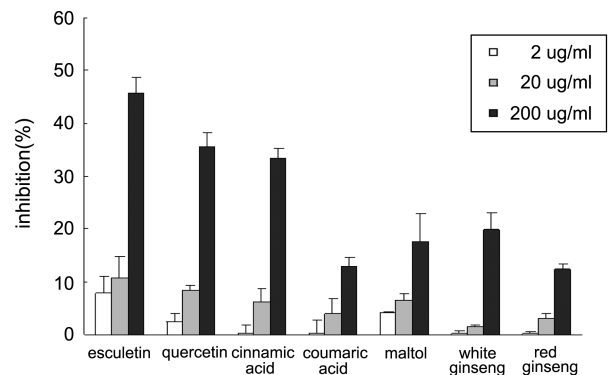


Fig. 2. Inhibitory effects of each sample on tyrosinase activity. Tyrosinase was incubated with test substances and dopa for 20 min. The absorbance was read at 490 nm.

Table 1. Yields of ginseng extracts (%).

Samples	80% Methanol extract	Ethyl acetate fraction extract
White ginseng	26.5 ± 4.2	0.23 ± 0.07
Red ginseng	31.2 ± 5.3	2.63 ± 0.39

Each value represents the % in drying materials

Table 2. Comparison of contents in ethyl acetate fraction of white and red ginseng (%).

Samples	esculetin	cinnamic acid	<i>p</i> -coumaric acid	quercetin	maltol
White ginseng	0.90	1.51	0.19	0.24	0.01<
Red ginseng	0.96	0.06	0.07	0.01<	3.82

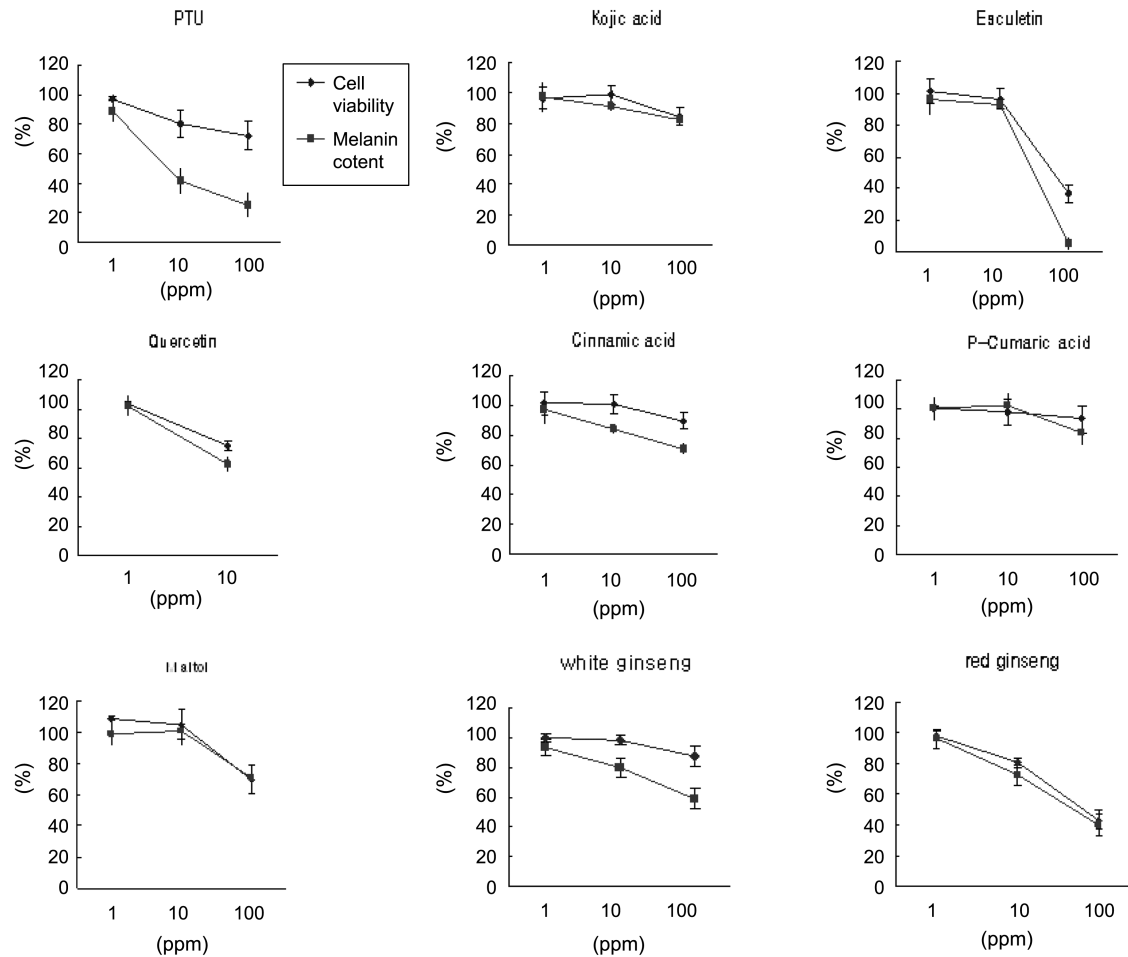


Fig. 3. Effects of each sample on cell growth and melanin production of melan-a cells. Viability and melanin content of vehicle was set to 100%. The cell viabilities and the melanin contents of melan-a cells were determined after 3 days. The data shown representative the mean $\pm$ S.E. of three experiments.

인삼시료와 활성물질들이 세포의 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하였다. 양성 대조군인 phenyl thiourea (PTU)는 100 μ g/ml에서 28.1%의 세포독성을 보였으나 멜라닌 생성율을 74.7% 감소시켰고, kojic acid는 모든 농도에서 세포생존을 대비 멜라닌 생성 억제 활성을 보이지 않았다. 인삼시료는 백삼 ethyl acetate 분획물이 큰 세포독성 없이 10 μ g/ml이상의 농도에서 멜라닌 생성율을 농도 의존적으로 감소시켰으며 100 μ g/ml 처리시 28.6%의 멜라닌 생성이 감소되었다. 홍삼 ethyl acetate 분획물의 경우는 높은 세포독성과 함께 세포생존을 대비 멜라닌 억제 활성이 일어나지 않았다. 인삼에 함유된 tyrosinase 억제활성 성분 중에서는 cinnamic acid가 큰 세포독성 없이 10 μ g/ml 농도에서 17.0%, 100 μ g/ml 농도에서 30.1%의 멜라닌 생성량을 감소시켰으며, quercetin은 10 μ g/ml 이상의 농도에서 세포생존을 대비 13.1%의 멜라닌 감소효과를 나타냈고 esculetin은

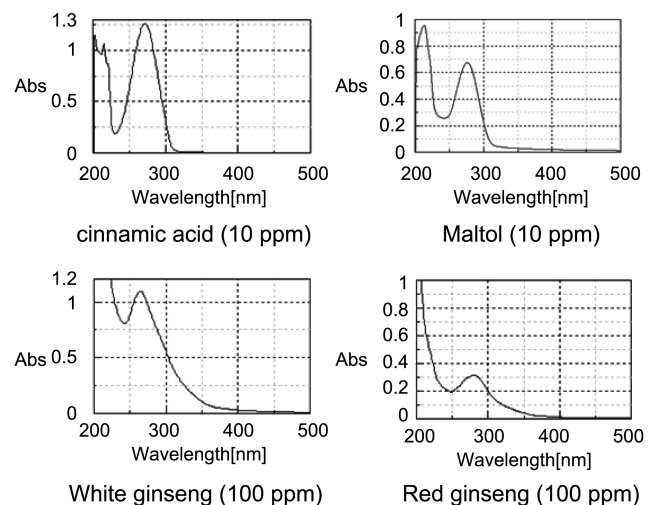


Fig. 4. UV absorption of each sample in UV-A and UV-B. UV-A: 350-370 nm, UV-B: 270-290 nm

고농도인 100 µg/ml 농도에서 멜라닌 감소효과를 보였으나 약간의 세포사멸을 일으켰다. 이밖에 *p*-coumaric acid와 maltol은 유의적인 효과를 나타내지 않았다(Fig. 3). 결과를 종합하여 볼 때 낮은 세포독성과 높은 멜라닌 생성억제활성을 보인 백삼의 ethyl acetate 분획물이 성분 중 가장 높은 활성을 보인 cinnamic acid를 다량 함유하는 정량결과로 미루어 백삼의 melan-a 세포에서의 멜라닌 억제활성에는 cinnamic acid가 주요한 역할을 하는 것으로 판단되어진다.

자외선 흡수도 측정

자외선은 피부에 손상을 일으키며 색소침착을 유발한다. 자외선 영역 중 UV-A (350~370 nm) 영역은 즉시형 색소침착을 일으키며 UV-B (270~290 nm) 영역은 에너지가 높아 일광화상을 유발시키며 지연형 색소 침착을 일으킨다. 각 시료의 200-500 nm 영역의 흡수도를 측정했을 때 백삼 ethyl acetate 분획물과 홍삼 ethyl acetate 분획물 모두 UV-B 영역에서 특징적인 흡수를 나타냈으나 백삼 ethyl acetate 분획물의 흡수도가 높았다. 백삼에 함유된 활성 성분 중에서는 cinnamic acid가 UV-B 영역에서 가장 특징적인 흡수를 나타내었고, 홍삼의 특이성분인 maltol 역시 UV-B 영역의 자외선을 흡수하였다(Fig. 4). 이상의 결과로 미루어 백삼 ethyl acetate 분획물은 피부에 도포시 UV-B차단 효과를 기대할 수 있는 것으로 판단되며 그 주된 활성성분은 cinnamic acid로 보여진다.

요 약

백삼과 홍삼의 quercetin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, maltol, esculetin 함량을 측정한 결과 백삼에는 cinnamic acid가 가장 높은 함량을 보였고, 홍삼에는 증숙과정 중에 생성되는 특이 성분인 maltol이 가장 높은 함량을 나타냈다. 인삼시료 중 백삼의 ethyl acetate 분획물은 melan-a 세포주에서의 세포생존율 대비 멜라닌 생성억제활성 측정, UV-흡수도 측정, tyrosinase 억제활성 측정에서 모두 우수한 활성을 나타내었으며, 이의 활성 성분으로는 cinnamic acid가 주요한 역할을 하는 것으로 판단되어진다. 한편, maltol을 다량 함유한 홍삼 ethyl acetate 분획물은 UV-흡수 활성을 보였으나 다른 유의적인 활성을 나타내지 않았다. 따라서 인삼소재 중 백삼 ethyl acetate 분획물은 피부미백소재로서의 기능을 가지는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구논문은 한국식품연구원 기관고유사업의 지원에 의한 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Ha, D.C., Ryu, G.H. : Chemical components of red, white and extruded root ginseng. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **34**(2), 247-254 (2005).
2. Park, S.Y., Jung, I., Jung, T.L. and Park, M.K. : Difference between steaming and decocting ginseng. *J. Ginseng Res.* **25**(1), 37-40 (2001).
3. Park, C.W. : The studies of pharmacology of ginseng. *Biochemistry News.* **4**, 37-56 (1984).
4. Jin, H.K., Kim, S.H. and Lee, J.K. : Studies of the physiological activity of Korean ginseng. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **10**, 101-108 (1982).
5. Choi, C., Yoon, S.H., Bae, M.J. and An, B.J. : Protein and amino acid composition of Korean ginseng classified by years. *Korean J. Food Sci.* **17**, 1-4 (1985).
6. Choi, H.J., Zhang, Y.B., An, B.J. and Choi, C. : Identification of biologically active compounds from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**(3), 493-497 (2002).
7. Kwak, Y.S., Park, J.D. and Yang, J.W. : Present and prospect of red ginseng efficacy research. *Food Industry and Nutrition* **8**(2), 30-37 (2003).
8. Yoo, B.S., Lee, H.J. and Byun, S.Y. : Differences in phenolic compounds between Korean ginseng and mountain ginseng. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(2), 120-124 (2000).
9. Han, B.H., Park, M.H., Woo, L.K., Woo, W.S. and Han, Y.N. : Studies on the antioxidant components of Korean ginseng. *Korean Biochem. J.* **12**(1), 33 (1979).
10. Han, B.H., Park, M.H. and Han, Y.N. : Studies on the antioxidant components of Korean ginseng(). Identification of phenolic acid. *Arch. Pharm. Res.* **4**, 53-58 (1981).
11. Wee, J.J., Park, J.D., Kim, M.W. and Lee, H.J. : Identification of phenolic antioxidant components isolated from *Panax ginseng*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**(1), 50 (1989).
12. Wee, J.J., Park, J.D., Kim, M.W. and Lee, H.J. : Isolation of phenolic antioxidant components from *Panax ginseng*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**(1), 44 (1989).
13. Masamoto, Y., Murata, Y., Baba, K., Shimoishi, Y., Taba, M. and Takahata, K. : Inhibitory Effects of Esculetin on Melanin Biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **27**(3), 422-425 (2004).
14. Kahn, V. and Benshalom, N. : Effects of Maltol on the Oxidation of DL-Dopa, Dopamin, N-Acetyldopamine (NADA), and Norepinephrine by Mushroom Tyrosinase. *Pigment Cell*

- Res.* **10**, 139-149 (1997).
15. Lim, J.Y., Ishiguro, K. and Kubo, I. : Tyrosinase Inhibitory *p*-Coumaric acid from Ginseng Leaves. *Phytotherapy Res.* **13**, 371-375 (1999).
16. Chun, H.J., Choi, W.H., Baek, S.H. and Woo, W.H. : Effect of Quercetin on Melanogenesis in Melan-a Melanocyte Cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**(3), 245-251 (2002).
17. Shin, N.H., Ryu, S.Y., Choi, E.J., Kang, S.H., Chang, I.M., Min, K.R. and Kim, Y.S. : Oxyresveratrol as Potent Inhibitor on Dopa Oxidase Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 801-803 (1998).
18. Matsuda, H., Higashio, M., Nakai, Y., Iinuma, M., Kubo, M. and Frank, L. : Studies of Cuticle Drugs from Natural Sources. IV. Inhibitory Effects of Some *Arctostaphylos* Plants on Melanin Biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **19**(1), 153-156 (1996).
19. Choi, S.Y., Kim, S., Kim, H., Suk, K., Hwang, J.S., Lee, B.G., Kim, A.G. and Kim, S.Y. : (4-Methoxybenzylidene)-(3-methoxyphenyl) amine, a Nitrogen Analog of Stilbene as a Potent Inhibitor of Melanin Production. *Chem. Pharm. Bull.* **50**(4), 450-452 (2002).
20. Bennett, D., Cooper, P. and Hart, I. : A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumor promotor for growth. *Int. J. Cancer* **39**, 414-418 (1987).