

인삼의 부위별 페놀성 성분 함량 및 멜라닌 생성억제효과

황은영 · 최상윤[†]

한국식품연구원

Quantitative Analysis of Phenolic Compounds in Different parts of *Panax ginseng* C.A. Meyer and Its Inhibitory Effect on Melanin Biosynthesis

Eun Young Hwang and Sang Yoon Choi[†]

Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea.

ABSTRACT : Comparison of four phenolic compounds among three different parts of *Panax ginseng* C.A. Meyer was performed in this study. Contents of esculetin, *p*-coumaric acid, quercetin, maltol in the ethyl acetate fraction were determined by HPLC analysis. The main root has a highest concentration of *p*-coumaric acid and the leaf has a highest concentration of quercetin and esculetin. This ethyl acetate fraction of the leaves exhibited higher depigmenting activity and lower cell toxicity than the other parts of ginseng. In addition, it showed that quercetin and esculetin among phenolic compounds highly inhibited melanin biosynthesis in ginseng. It implies that leaves of ginseng may be used as skin whitening herb. Quercetin and esculetin proved to be active compounds in the leaves of ginseng.

Key words : *Panax ginseng*, melanin biosynthesis, quercetin, esculetin

서 언

고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과 (Araliaceae) 인삼속 (*Panax*)에 속하는 다년생 초본류로서 한 방에서는 그 뿌리를 약용으로 사용하고 있다 (Ha & Ryu, 2005). 주된 약리효능으로는 사포닌 성분을 중심으로 많은 연구가 이루어지기 시작하여 중추신경계 조절, 항스트레스, 항피로, 발육촉진, 각종체내대사물질 조절, 조혈작용, 항균력 등에 관한 연구가 보고되어 있다 (Park, 1984; Jin *et al.*, 1982). 그러나 사포닌만이 인삼의 활성을 나타내는지에 대한 의문으로 비사포닌에 대한 연구가 진행되어 알카로이드 성분, anthocyanin 색소, 함유소 화합물 펩티드, 다당체 성분, 정유 성분 등에 관한 연구가 보고된 바 있으며 (Choi *et al.*, 1985; Choi *et al.*, 2002), salicylic acid와 vanillic acid 등의 항산화성 페놀성 물질들이 분리되어 보고되었고 10여종 이상의 페놀성 물질이 밝혀지기도 하였다 (Han *et al.*, 1981; Wee *et al.*, 1990). 이들 페놀성 물질의 생리활성은 고혈압 억제, 항암, 항산화, 미백활성 등이 알려져 있으며 (Choi *et al.*, 2003; Han *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1987), 특히 중국산 인삼에 비해 한국산 인삼이 esculetin 등의 phenolic compound 함량이 높다고 보고된 바가 있다 (Yoo *et*

al., 2000). 본 연구에서는 인삼의 부위에 따른 페놀성 화합물의 함량을 정량, 비교하였으며, 이중 인삼 잎 추출물의 미백활성을 발견하여 보고하는 바이다. 본 연구에서 쓰여진 미백활성 측정 방법으로는 tyrosinase 억제활성, melan-a 세포주에서의 세포독성과 멜라닌 생성량에 미치는 영향, UV 흡수도 측정등을 사용하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

본 연구에 사용된 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 2005 년에 충청도 금산에서 채취된 수삼 5 kg을 수집하여 증류수로 세척 후 주근 (뿌리), 세근 (잔뿌리), 잎 부분으로 분리하고 45°C에서 36시간 열풍 건조하여 사용하였고 esculetin, *p*-coumaric acid, quercetin, maltol은 Sigma-Aldrich co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 유효성분 추출 및 분석

건조 인삼을 마쇄한 후 80% 메탄올/증류수 혼합용매를 사용하여 상온에서 1시간 씩 3회 초음파 추출한 후 감압 농축하여 추출물을 제조하였다. 제조된 추출물을 ethyl acetate (EA)

[†]Corresponding author: (Phone) +031-780-9307 (E-mail) sychoi@kfri.re.kr
Received January 31, 2006 / Accepted Jun 29, 2006

가용성 분획과 H₂O 가용성 분획으로 나누어 완전농축하여 사용하였다.

3. High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

HPLC는 Jasco Co. (Japan)의 분석용 liquid chromatography를 사용하였다. Column은 Bondapak C18 (4 μm, 300×3.9 mm)을 사용하였고, 이동상은 2% acetic acid가 함유된 water (용액 A)와 0.5% acetic acid가 함유된 50% acetonitrile (용액 B)을 초기 10% 용액 B에서 60분 후 55% 용액 B로 gradient를 주어 0.8 ml/min의 속도로 용출하였다. Column의 온도는 40°C로 유지 하였으며 시료의 검출은 280 nm에서 측정하였다. 분석용 시료는 농축된 추출물을 10 mg/ml로 메탄올에 녹인 후 0.45 μm syringe filter (Millipore)로 여과하여 사용하였다. 모든 시료는 3회 반복 실험하여 평균치를 산출하였고 표준물질과의 co-injection을 실시하여 peak의 일치를 확인하였다.

4. Tyrosinase 활성억제도 측정

8.0 mM L-dopa (67 mM phosphate buffer, pH 6.8에 녹임) 120 μl와 methanol 40 μl에 녹인 여러 농도의 검색시료를 96-well microplate에 넣고 tyrosinase (125 U/ml) 40 μl를 가하였다. 37°C에서 20분간 incubation한 후 생성된 dopachrome의 양을 ELISA reader (E09090, Molecular devices co.)를 사용하여 492 nm에서의 흡수도를 측정하였다 (Shin *et al.*, 1998).

5. UV-A 와 UV-B 영역에서의 흡수도 측정

시료의 자외선 흡수도는 검색시료를 methanol에 10 ppm으로 녹여 200 nm~600 nm에서 UV 흡수도를 측정하여 실시하였다 (Matsuda *et al.*, 1996).

6. 세포배양

마우스 유래의 멜라닌 생성세포인 melan-a 세포주는 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.

7. Cell viability 측정

24 well plate에 1×10⁵ cells/well의 농도로 세포를 접종하고 24시간 배양하였다. 각 well당 990 μl의 배지를 매일 갈아주면서 10 μl의 시료를 3일간 처리 (solvent: 50% propylene glycol, 30% EtOH, 20% H₂O)한 후 1 일간 더 배양하였다.

세포생존율에 미치는 영향을 측정하기 위하여 배지제거 후 PBS로 washing하고 crystal violet (CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS)를 200 μl 첨가하였다. 5분간 상온에서 incubation한 후 물로 2번 washing 하였다. 여기에 EtOH 1 ml를 첨가하여 상온에서 10분간 shaking한 후 590 nm에서 UV 흡수도를 측정하였다 (Choi *et al.*, 2004).

Table 1. Yields of dried ginseng extracts.

Samples	80% Methanol extract (%)	EA fraction (%)	H ₂ O fraction (%)
Main root	26.1	1.31	22.7
Root hair	42.7	2.32	35.9
Leaves	39.0	3.82	31.7

Each value represents the % in drying materials (w/w).

8. Melanin함량 측정

Melanin 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배지 제거 후 PBS로 washing 하고 1 N NaOH 1 ml를 가하여 melanin을 녹인 후 400 nm에서 UV 흡수도를 측정하였다 (Choi *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006).

결 과

1. 페놀성 화합물의 분석

지금까지 보고 되어진 인삼에서 확인된 페놀성 성분들은 maltol, salicylic acid, cinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vaillie acid, gentisic acid, protocatechuic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, esculetin, ferulic acid caffeic acid, esculetin 등이 있다 (Park *et al.*, 1990; Wee *et al.*, 1989; Yoo *et al.*, 2000). 이 중에서 미백활성이 보고된 물질은 esculetin, *p*-coumaric acid, quercetin, maltol 등이 있다 (Chen & Kubo, 2002; Masamoto *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 1999; Khan & Ben, 1997). 건조 인삼을 마쇄하고 80% 메탄올을 사용하여 추출한 후 EA 가용성 분획과 물 가용성 분획으로 나누어 완전 감압농축한 각각의 시료의 추출수율은 Table 1과 같다. TLC (전개용매: EA/Hexane = 1/1)를 이용하여 물에 불용성인 이들 4종의 미백활성성분이 모두 EA 분획으로 전이되고 물 분획에는 거의 존재하지 않음을 확인한 후, 각 인삼시료의 EA 분획물의 활성성분함량을 HPLC를 이용하여 정량하였다. 표준 물질인 maltol, *p*-coumaric acid, esculetin, quercetin 등을 메탄올에 녹인 후 Bondapak C18 column을 사용하여 제시된 조건으로 용출시켰을 때 각각 9.2, 13.6, 19.7, 34.9분에서 검출되었다 (Fig. 1). 건조 인삼 물 분획물에서는 표준물질들이 거의 검출되지 않았으며 E.A. 분획물의 인삼부위별 미백활성 물질 함량을 측정 한 결과는 Table 2와 같다. *p*-Coumaric acid 함량은 건조인삼의 주근에서 1.52%, 세근에는 0.33%, 잎에는 0.21%로 세근이나 잎에 비해 주근에 가장 많이 함유되어 있었다. Esculetin의 함량은 주근과 세근에 비해 잎에 0.64%로 비교적 많이 함유되어 있는 결과를 보였으며, quercetin 또한 주근과 세근에는 거의 함유되어 있지 않았으며 잎에 0.16%가 함유되어 있었다. Maltol의 경우는 홍삼의 제조 과정 중 열처리 의해 2차적으로 생성되는 홍삼특유의 성분으로서 (Yoo *et al.*, 2000), 본 건조인삼에서는 검출되지 않았다.

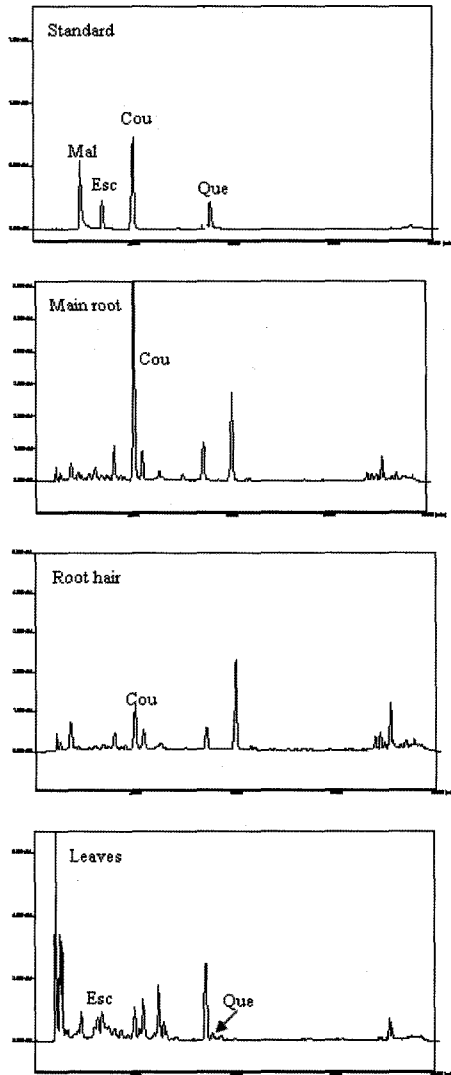


Fig. 1. HPLC chromatogram of various ginseng EA fractions. The peak on 9.2, 13.6, 19.7, 34.9 were maltol, esculetin, *p*-coumaric acid, quercetin, respectively. Column: Bondapak C18, Solvent system: gradient elution of acetonitrile and water, Flow rate: 0.8 ml/min.

Table 2. Contents of phenolic compounds in various parts of dried ginseng EA fraction (% w/w).

Samples	<i>p</i> -Coumaric acid	Esculetin	Quercetin	Maltol
Main root	1.52	0.10	0.01 <	0.01 <
Root hair	0.33	0.09	0.01 <	0.01 <
Leaves	0.26	0.64	0.16	0.01 <

2. Tyrosinase 활성 저해 효과

멜라닌 생성 초기과정에 주요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 인삼에 함유된 미백활성 물질 중에서는 esculetin이 가장 우수

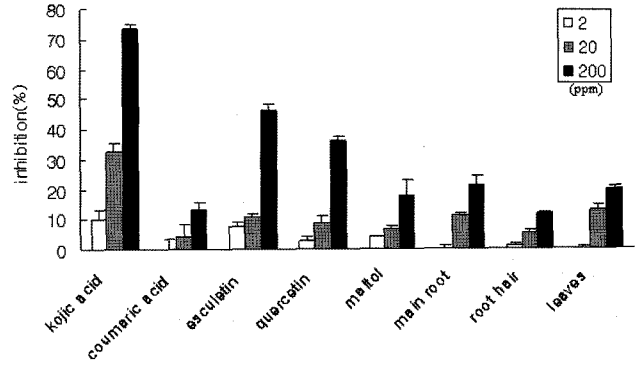


Fig. 2. Inhibitory effect of tyrosinase activity based on various samples. Kojic acid was used as positive control.

Table 3. Cell growth and melanin production of melan-a cells based on various samples.

Samples	Concentrations (ppm)	Cell viability (%)	Melanin contents (%)
Phenyl thiourea	1	97.4 ± 2.8	89.3 ± 4.3
	10	80.8 ± 4.8	44.2 ± 8.5
	100	71.9 ± 7.4	24.9 ± 7.7
Kojic acid	1	96.6 ± 6.9	97.1 ± 4.1
	10	98.6 ± 6.6	91.0 ± 6.5
	100	84.3 ± 4.9	81.9 ± 5.8
<i>p</i> -Coumaric acid	1	101.8 ± 3.8	101.0 ± 2.7
	10	98.5 ± 5.8	103.2 ± 4.6
	100	93.8 ± 6.7	84.5 ± 6.1
Esculetin	1	101.3 ± 5.2	96.0 ± 4.3
	10	96.4 ± 6.2	91.1 ± 2.9
	100	36.3 ± 7.0	5.0 ± 4.3
Quercetin	1	104.1 ± 9.1	102.5 ± 8.4
	10	75.0 ± 6.2	61.9 ± 8.0
	100	-	-
Maltol	1	108.6 ± 9.4	98.8 ± 5.6
	10	104.5 ± 6.3	100.8 ± 4.7
	100	69.5 ± 6.0	70.4 ± 5.0
Main root	1	88.1 ± 6.4	85.0 ± 7.1
	10	62.0 ± 4.8	46.8 ± 6.9
	100	35.5 ± 6.5	26.9 ± 6.1
Root hair	1	78.3 ± 3.6	80.0 ± 8.5
	10	48.8 ± 8.2	44.1 ± 6.4
	100	22.6 ± 5.9	22.1 ± 4.8
Leaves	1	97.0 ± 1.9	89.3 ± 4.3
	10	79.7 ± 5.3	57.9 ± 6.2
	100	60.0 ± 7.1	32.9 ± 6.9

Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

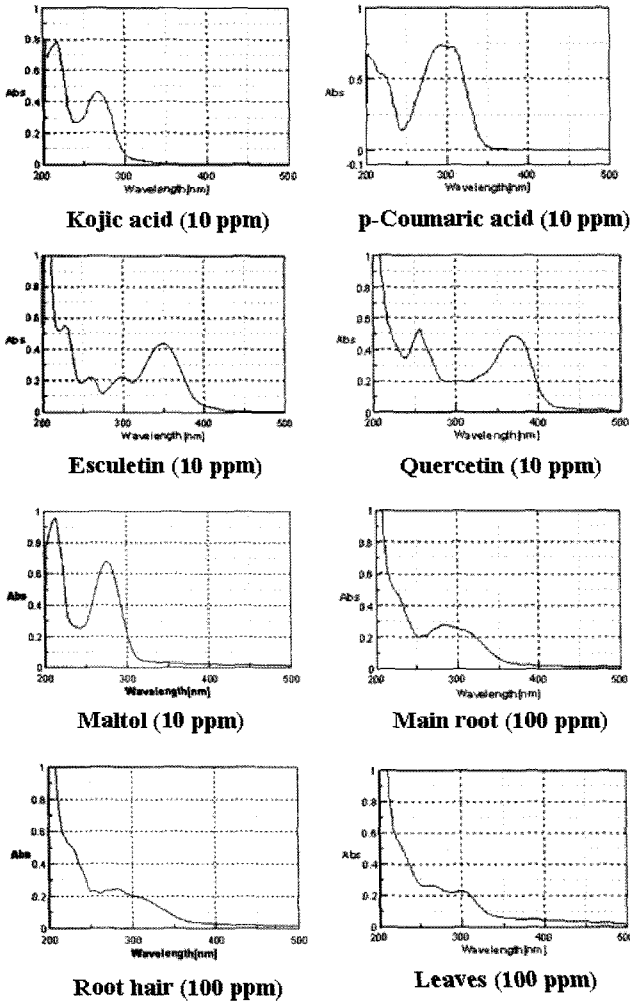


Fig. 3. Absorption of each sample in UV-A and UV-B band. UV-A; 350-370 nm, UV-B; 270~290 nm.

한 tyrosinase 저해활성을 나타내었으며 quercetin, maltol, *p*-coumaric acid의 순서로 나타났다. Esculetin과 quercetin을 포함한 잎의 EA분획시료는 200 ppm 농도일 때 20.1%의 저해활성을 보였으며, 특이적으로 주근의 E.A.분획시료 역시 비슷한 저해활성을 나타냈다. 이들은 esculetin과 quercetin 등의 단일 활성물질에 비해 동일 농도에서 낮은 활성이나 여러 가지 성분이 섞여있는 추출물임을 감안 할 때 비교적 높은 저해활성을 나타내었다.

3. Cell viability와 melanin 생성 억제 효과

Melanin의 생성은 피부의 표피와 진피사이에 주로 존재하는 melanocytes에서 이루어진다. Melan-a 세포주는 mouse 유래의 멜라닌 생성세포로써 멜라닌을 생합성한다 (Bennett *et al.*, 1987). 각각의 인삼시료와 활성물질들을 melan-a 세포주에서 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 3일간 처리 후 세포의 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하여 결과 양상

대조군인 phenyl thiourea (PTU)는 100 μ g/ml에서 약 25%의 세포독성을 보였으나 멜라닌 생성률을 74.7% 감소시켰다. 한편 대조물질로써 사용된 kojic acid (Cabanis *et al.* 1994)는 세포생존을 대비 멜라닌생성을 억제시키지 못하였다. 인삼에 함유된 성분 중에는 100 μ g/ml 이상의 농도에서는 색소로 인해 효과를 측정할 수 없었으나 quercetin이 10 μ g/ml의 농도에서 유의적인 멜라닌 감소효과를 나타냈으며, esculetin은 고농도인 100 μ g/ml 농도에서 세포 생존을 대비 멜라닌 감소 효과를 보였다. 이밖에 *p*-coumaric acid와 maltol은 유의적인 효과를 나타내지 않았다. 건조 인삼시료 중에서는 잎의 EA 분획물이 100 μ g/ml 농도에서 27%의 멜라닌 생성 감소효과를 나타내었으나 세근의 EA 분획물은 높은 세포독성을 나타내었다 (Fig. 3). 이밖에 각 시료의 물 분획물은 멜라닌 감소효과가 미약하였다.

4. UV 흡수특성

자외선 영역 중 UV-A (350~370 nm)는 파장이 길어 피부 진피층까지 침투 할 수 있으며 유리를 통과할 수 있는 자외선 영역으로 즉시형 색소침착을 일으킨다. 반면 UV-B (270~290 nm) 영역은 UV-A에 비해 파장이 짧아 피부 깊숙이 침투하지 않지만 에너지가 높아 일광화상을 유발시키며 노출 후 72시간 이후부터 색소침착이 나타나는 지연형 색소침착을 일으킨다. 각 시료의 200~500 nm 영역의 흡수도를 측정했을 때 각 인삼 EA 분획물 시료는 100 ppm 농도까지 UV-A와 UV-B 영역에서 특징적인 흡수를 나타내지 못하였으나 단일성분인 quercetin은 10 ppm 농도에서 UV-A 영역과 UV-B 영역 모두에서 흡수도를 보였고, esculetin은 UV-A영역에서 특징적인 흡수를 나타내어 (Fig. 4) 피부에 도포시 UV 차단효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

국내산 인삼의 부위별 quercetin, *p*-coumaric acid, maltol, esculetin의 함량을 측정한 결과 잎에서는 quercetin과 esculetin이 주근에서는 *p*-coumaric acid가 다량 함유되어 있었다. 이중 잎의 EA 분획물은 melan-a 세포주에서 뛰어난 멜라닌 생성억제 활성을 보였으며, 이의 주요성분인 quercetin과 esculetin이 tyrosinase 활성억제도, melan-a 세포주에서의 멜라닌 생성억제도, UV-흡수도 측정에서 모두 우수한 활성을 나타내는 결과로 미루어 인삼의 잎은 피부미백을 목적으로 하는 기능성 소재로 이용될 수 있는 가능성을 가지는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구논문은 한국식품연구원 기관고유사업의 지원에 의한 연구결과이며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Bennett D, Cooper P, Hart I** (1987) 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.
- Cabanes J, Chazra S, Garcia CF** (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:982-985.
- Chen QX, Kubo I** (2002) Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 50(14):4108-4112.
- Choi C, Yoon SH, Bae MJ, An BJ** (1985) Protein and amino acid composition of Korean ginseng classified by years. *Korean J. Food Sci.* 17:1-4.
- Choi HJ, Zhang YB, An BJ, Choi C** (2002) Identification of biologically active compounds from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(3):493-497.
- Choi M, Shin GJ, Choi GP, Do JH, Kim JD** (2003) Synergistic effects of extracts from Korean red ginseng, *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. and *Rubus coreanus* Miq. on antioxidative activities in rats. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11(2):148-154.
- Choi SY, Kang NJ, Kim H** (2006) Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14(1):27-30.
- Choi SY, Kim S, Hwang JS, Lee BG, Kim H, Kum SY** (2004) Benzylamide derivative compound attenuates the ultraviolet B-induced hyperpigmentation in the brownish guinea pig skin. *Biochem. Pharmacol.* 67:707-715.
- Choi SY, Kim S, Kim H, Suk K, Hwang JS, Lee BG, Kim AJ, Kim SY** (2002) (4-Methoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl) amine, a nitrogen analog of stilbene as a potent inhibitor of melanin production. *Chem. Pharm. Bull.* 50(4):450-452.
- Ha DC, Ryu GH** (2005) Chemical components of red, white and extruded root ginseng. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* 34(2): 247-254.
- Han BH, Park MH, Han YN** (1981) Studies on the antioxidant components of Korean ginseng (III). Identification of phenolic acid. *Arch Pharm Res.* 4:53-58.
- Han BH, Park MH, Wee JJ** (1985) Studies on antioxidant components of Korean ginseng (V). The mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid. *Korean Biochem. J.* 18:337-340.
- Jin HK, Kim SH, Lee JK** (1982) Studies of the physiological activity of Korean ginseng. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 10:101-108.
- Kahn V, Ben-shalom N** (1997) Effects of maltol on the oxidation of DL-DOPA, dopamine, N-acetyldopamine (NADA), and norepinephrine by mushroom tyrosinase. *Pigment Cell Res.* 10: 139-149.
- Lee SE, Lee SW, Bang JK, Yu YJ, Seong NS** (2004) Antioxidant activities of leaf, stem and root of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12(3):237-242.
- Lim JY, Ishiguro K, Kubo I** (1999) Tyrosinase Inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves. *Phytother. Res.* 13:371-375.
- Masamoto Y, Murata Y, Baba K, Shimoishi Y, Tada M, Takahata K** (2004) Inhibitory effects of esculetin on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 27(3):422-425.
- Matsuda H, Higashino M, Nakai Y, Inuma M, Kubo K, Frank L** (1996) Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. Inhibitory effects of some *Arctostaphylos* Plants on Melanin Biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 19(1):153-156.
- Park CW** (1984) The studies of pharmacology of ginseng. *Biochemistry News. The Biochemical Society of The Republic of Korea.* 4:37-56.
- Park JD, Kim MW, Wee JJ** (1987) Isolation and identification of free phenolic acids in Korean ginseng. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19:392-396.
- Park SN, Choi SW, Boo YC** (1990) Effects of flavonoids of ginseng leaves on erythrocyte membranes against singlet oxygen caused damage. *Korean J. Ginseng Sci.* 14(2):191-199.
- Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim YS** (1998) Oxyresveratrol as potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:801-803.
- Wee JJ, Park JD, Kim MW, Lee HJ** (1989) Isolation of phenolic antioxidant components from *Panax ginseng*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32(1):44-49.
- Wee JJ, Park JD, Kim MW** (1990) Structural study on permethyl ether of new polyphenolic compound isolated from panax ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.* 14:27-29.
- Yoo BS, Lee HJ, Byun SY** (2000) Differences in phenolic compounds between Korean ginseng and mountain ginseng. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15(2):120-124.