

복합 고온 전처리 더덕 추출물의 미백 활성 탐색

김지선* · 김지웅** · 권희석*** · 임혜원**** · 이현용**†

*강원대학교 의생명소재공학과, **서원대학교 식품공학과, ***한국 코스모 화장품, ****세바바이오텍

Screening of Skin Whitening Activity of *Codonopsis lanceolata* Extract by Complex Steaming Process

Ji Seon Kim*, Ji Woong Kim**, Hee Seok Kwon***, Hye Won Lim**** and Hyeon Yong Lee**†

*Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Chungju 361-742, Korea.

***Hankook Cosmo Cosmetics Co., Bucheon 421-808, Korea.

****Shebah Biotech Co., Chuncheon Bioindustry Foundation Hi-tech Venture Town, Chuncheon 200-161, Korea.

ABSTRACT : According to previous reports, antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* could be increased by a steaming process. This study was performed to improve its antioxidant activity and skin whitening activities of *C. lanceolata* by high pressure and stepwise steaming complex process. The complex processed *C. lanceolata* showed highest free radical scavenging activity as 45.21%, and for phenol and flavonoid contents, complex processed *C. lanceolata* contained higher than those from conventional extraction process or steaming process alone. The Cytotoxicity of all *C. lanceolata* extracts also showed low cytotoxicity against human fibroblast cell (CCD-986sk) as 4.49 ~ 10.40%. In whitening activity, high inhibition of tyrosinase activity was estimated as 25.08% by adding the extracts from complex process. We found that whitening and antioxidant activity of complex processed *C. lanceolata* extract was higher than those obtained from conventional extraction and a steaming process because various kinds of antioxidant compounds could be easily released by combined process, compared to one of each process.

Key Words : High Pressure Process, Stepwise Hot Steaming Process, Antioxidative activity, Skin Whitening, *Codonopsis lanceolata*

서 언

현대과학의 발전에 의해 평균 수명이 늘어나고 삶의 질이 높아짐에 따라 젊음을 유지하고 싶은 욕구가 강해지며 피부의 노화와 손상에 대해 관심이 고조되고 있다. 이에 따라 건강기능 식품이나 화장품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 천연물 유래의 항장 효능이 각광 받고 있다. 천연물 유래 항장 제품들은 일반 합성화합물에 비해 신체에 거부감이 적으며 예로부터 식품이나 약용으로 많이 접하여 사람들로 하여금 쉽게 접근할 수 있게 한다.

우리의 인체 내에서는 물질의 대사와 에너지 생산을 위하여 필수적으로 산소를 이용하고 있다. 이중 일부의 산소가 불완전하게 전자를 흡수함에 따라 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 유도되며 과잉생산된 활성산소종은 신체의 불균형을 초래하여 산화적 스트레스를 유발한다. 산화적 스트레스란 생체 내에 영향을 미치는 스트레스 요소로서 산화적 스

트레스에 의해 신체 내에서는 free radical이 생성되어 세포와 조직에 손상을 가하고 지속적인 DNA 손상을 일으켜 피부를 포함한 신체 내의 압, 노화, 피사 등을 유발하게 된다 (Lee and Min, 2006; Fang *et al.*, 2002). 또한 활성산소가 다량 생성 시 체내에서는 멜라닌 색소를 분비하여 자외선에 의한 활성산소의 생성을 막는다 (Park, 1997).

멜라닌 (Melanin)은 흑갈색 알갱이의 색소로서 피부, 털, 눈 등에 존재한다 (Ha *et al.*, 2009). 일정량 이상의 자외선을 흡수하여 인체를 보호하는 역할을 한다. 그러나 멜라닌의 과잉 생성은 탈색, 점, 주근깨, 색소 침착과 같은 피부 노화를 일으킨다 (Wang, 2006). 이러한 멜라닌의 생합성 과정에 작용하는 주요 효소에는 tyrosinase를 들 수 있는데 tyrosinase는 polyphenol oxidase의 일종이다. 색소 세포내에서 tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)으로 변환하고 효소적 산화 반응에 의한 단계를 거쳐 dopaquinone, dopachrome으로 변환하여 melanin을 생합성한다 (Lerner and Fitzpatrick, 1950).

†Corresponding author: (Phone) +82-43-299-8471 (E-mail) hyeonl@seowon.ac.kr

Received 2012 December 7 / 1st Revised 2013 January 11 / 2nd Revised 2013 January 31 / 3rd Revised 2013 February 4 / Accepted 2013 February 5

더덕은 한국, 중국, 일본의 산간지방에서 널리 야생하는 다년생 초본으로 예로부터 약용, 식품으로 섭취되어 안전성이 입증되었으며, 사삼이라 하여 인삼에 버금가는 효능이 있는 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 2010). 진해, 거담 등의 효능이 대표적인 효능으로 알려져 있으며 혈청지질의 감소 (Han *et al.*, 1998), 면역력 증가 (Ryu, 2008), 항암 (Cho *et al.*, 2011), 항산화 등의 효능들이 보고되어진다. 이러한 더덕의 활성을 증가시키기 위한 방법으로는 초고압, 증숙, 발효 등이 알려져 있다 (Park *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2012). 더덕의 상품가치로 허품인 더덕을 초리라 부르며 이는 상품가치가 없기에 약용으로 쓰이지 못하며 폐기처리가 된다.

증숙공정은 증기를 이용해 열처리를 하여 작물의 구성성분들의 변화를 야기 시키거나 새로운 화합물을 만들어내며 작물의 조직을 파괴, 유용성분의 용출을 극대화 시킨다. 예로부터 인삼에 증숙공정을 적용하여 G-Rg3, G-Rh2 같은 새로운 사포닌의 생성을 확인하였으며 phenolic acid의 증가를 증명하였다 (Nam, 2005; Kang *et al.*, 2006). 더덕은 인삼의 ginsenoside와 같은 codonopsida라는 사포닌이 존재하나 인삼보다 연구가 활발히 진행되고 있지 않아 그 역할과 효능이 명확히 규명되어 있지 않다. 증숙공정과 더불어 초고압 공정은 짧은 시간 내에 약용작물의 유효성분을 추출할 수 있으며 순도가 높은 단일 성분과 불순물이 거의 없는 추출물을 얻을 수 있다. 작용기전은 증숙공정과 유사하며 작물의 세포막이 파괴되어 세포 안으로 용매의 침투가 가능하여 보다 많은 성분이 세포 밖으로 쉽게 용출되어 나오게 된다 (Bennett *et al.*, 1998).

본 연구진은 이전의 연구에서 증숙공정에 의해 상품가치가 없는 하급더덕인 초리의 항산화 활성을 증가하여 경제적 가치를 증가시켰으며, 본 연구에서는 초고압 복합처리를 통해 추가적인 항산화 증진과 더불어 향장 소재로 활용가치가 있는 미백 활성에 대하여 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 증숙 더덕의 제조 및 초고압 공정

시료는 강원도 횡성지역에서 2012년 8월에 채취한 것을 사용하였다. 깨끗이 세정한 후 마하스팀기 (Daechang stainless, Korea)를 사용하여 50, 60, 90°C로 2시간씩 단계별 증숙을 실시하고, 추가로 100°C에서 3시간 증숙하였다. 증숙을 거친 더덕은 다시 12시간 건조시킨 후 위와 같은 증숙공정을 5번 반복 실시하였다. 증숙 더덕의 유효기간을 늘리기 위해 20~30°C에서 24시간 동안 음건하여 시료로 사용하였다.

초고압 공정은 증숙 더덕 100 g 을 비닐 팩에 70% 에탄올 200 ml 와 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출장치 (Ilshin Autoclave, Korea)를 이용하여 3,000 bar 압력으로 25°C에서 30분간 초고압 추출을 실행하였다.

2. 추출물 제조 및 수율

수직 환류냉각기가 부착된 추출 flask를 사용하여 초고압 복합처리된 증숙더덕을 100 g씩 10배수 (v/w)의 70% 에탄올 용매를 사용하여 80°C에서 24시간 추출하였다. 대조군으로는 초고압 처리를 하지 않은 증숙 더덕을 100 g씩 같은 방법으로 70% 에탄올 용매를 사용하여 80°C에서 24시간 추출한 다음 여과한 여액을 회전식 진공농축기 (EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Japan)를 이용하여 농축시킨 후 동결건조기 (PVTF A 10AT, ILSIN, Korea)를 사용하여 분말 상태로 준비하여 실험에 사용하였다.

3. 세포 및 시약

Human dermal fibroblasts는 CCD-986sk으로 한국세포주은행 (KCLB)로부터 동결 상태로 구입하였다. 또한 melanocyte인 B16 F10 (KCLB No. 80008)도 한국세포주은행으로부터 동결 상태로 구입하였다. CCD-986sk와 B16F10을 각각 RPMI1640 배지와 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA), 1% gentamycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하여 사용하였다. 그 외 사용된 모든 시약들은 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

4. 정상세포 독성 측정

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Co., USA) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann 방법 (Mosmann, 1983)을 변형하여 실시하였다. 세포는 CCD-986sk를 사용하였다. 각 세포를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5 µg/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 10 µl acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Tyrosinase 억제 효과 탐색

Tyrosinase을 기질로 이용한 tyrosinase 효소활성의 저해는 Ishihara (Ishihara *et al.*, 1993) 등의 방법을 변형시켜 사용하였다. Test tube에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 0.4 ml, 1.5 mM tyrosine solution 0.4 ml, 시료용액 0.2 ml의 혼합액에 효소액 (100 units/ml) 0.1 ml를 첨가하여 30°C에서 microplate reader로 475 nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의해 tyrosinase 효소활성 저해율을 구하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = [1 - (S-B)/C] \times 100$$

S: 효소액 및 시료용액 첨가시 흡광도 변화값

B: 효소액 대신 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 첨가시의 흡광도 변화값

C: 시료용액 대신 시료를 녹인 용매 첨가 시 흡광도 변화값

6. B16F10 melanoma cell을 이용한 melanogenesis 저해 측정

Melanin 생성 세포인 B16F10을 10% FBS, 1% antibiotics를 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5%, CO₂ 조건에서 배양하였다. 추출물에 의한 melanin 생성량 변화를 확인하기 위해 B16F10 cell을 1.5 × 10³ cells/well의 농도로 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에 현탁시켰다. 현탁세포 (5 ml)를 tissue culture flask에 넣은 후 1일간 부착시킨다. 부착한 후에 검정 시료를 첨가한 후, 5% CO₂ 조건으로 37°C에서 5일간 배양하였다. 배양을 마친 B16F10 cell을 phosphate buffered saline (PBS)로 씻고 trypsinization 하였다. 세포를 coming tube에 모은 후 1 × 10⁶ cell/ml 당 1N NaOH 용액 1 ml 을 넣어 세포를 녹인 다음, microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 melanogenesis 저해율을 구하였다 (Komiyama *et al.*, 1993).

$$\text{Inhibition of melanogenesis (\%)} = [1 - (\text{Ab}_{\text{sample}}/\text{Ab}_{\text{control}})] \times 100$$

7. DPPH 자유라디칼 소거활성

DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Dietz등 (Dietz *et al.*, 2005)의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 96 well plate에 용매를 ethanol로 하여 제조한 0.1 mM DPPH용액 200 μ l 와 0.156, 0.313, 0.625, 1.250 mg/ml의 농도로 조절된 샘플을 80 μ l 을 혼합하여 25°C에서 20분 동안 암실에 방치 한 후 525 nm에서 흡광도 측정하였다. 측정값은 DPPH radical scavenging activity (%), 즉 라디칼 소거능과 무 처리군의 흡광도를 100%로 보았을 때 50%의 흡광도를 나타내는 시료의 양을 측정하여 ED₅₀값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)}$$

$$= \frac{\text{control O.D} - \text{sample O.D}}{\text{control O.D}} \times 100$$

8. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Denis 방법에 의하여 비색 정량하여 측정하였다 (Gutfinger, 1981). 추출물을 증류수에 10 mg/ml로 용해한 용액 1 ml 과 Folin 시약을 1 ml 을 혼합한 뒤 3분간 정치하여 발색 시킨 후 1 ml 의 10% sodium carbonate 용액을 서서히 가하였다. 이 혼합액을 90분간 정치한 후 spectrophotometer (UV 1600 PC, Shimadzu, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도 측정하였다. 표준품으로 gallic acid (0 ~ 100 μ g)의 검량선 이용하여 총 페놀 함량을 측정하였다.

총 플라보노이드 함량은 각 시료 0.5 ml 에 10% aluminum

nitrate 0.1 ml 및 1 M potassium acetate 0.1 ml, ethanol 4.3 ml 를 가하여 혼합한 후 실온에서 40분간 정치한 다음 spectrophotometer (UV 1600 PC, Shimadzu, Japan)를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Moreno *et al.*, 2000). 표준품으로 quercetin (0 ~ 100 μ g)의 검량선을 이용하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

9. HPLC 분석을 통한 phenolic acid 함량 비교

Phenolic acid의 함량을 비교하기 위해 HPLC (Agilent 1260 series, Aglient technologies., USA), ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (Agilent, USA, 5 μ m, 4.6 × 250 mm)을 사용하여 정량분석 하였으며, 이동상은 0.1% 포름산이 함유된 10% acetonitrile (용매 A)과 0.1% 포름산이 함유된 acetonitrile, methanol 혼합용액 (methanol : acetonitrile : D.W (4 : 4 : 2 (v/v)) (용매 B)을 사용하였다. 용출조건은 gradient mode로 프로그램은 다음과 같다. 초기 0~15분 고정 (A : 95%, B : 5%), 15~23분 변환 (A : 60%, B : 40%), 23~33분 고정 (A : 60%, B : 40%), 33~42분 변환 (A : 0%, B : 100%), 42~45분 변환 (A : 95%, B : 5%), 45~50분 고정 (A : 95%, B : 5%), 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μ l 로 하였고, 검출기는 UV detector (280 nm)를 사용하였다. 시료는 0.25 μ m syringe filter로 여과하여 실험에 사용하였으며, standard로는 gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, *t*-ferulic acid (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다.

10. 통계처리

데이터는 모두 평균 ± SEM으로 나타내었다. 대조군을 포함한 각 실험 그룹의 평균 차는 일원분산분석 (one-way ANOVA)을 통해 그 값을 구하였다. 한편 이들 분석을 실시하기 위해 통계용 소프트웨어 패키지인 SPSS 10.0 (SPSS institute, Chicago, IL)을 사용하였다. 이렇게 구하여진 평균값의 차이는 P < 0.05의 조건에서 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 정상세포 독성

미백활성 평가를 하기 전 실험으로 정상세포에 대한 독성을 알아보기 위해 인간 피부 섬유아세포의 한 종류인 CCD-986sk 를 사용하여 일반 더덕, 증숙더덕, 초고압 복합처리 증숙 더덕 추출물 세포 독성을 확인하였으며 Fig. 1를 통해 그 결과를 정리하였다. 일반 더덕 추출물의 경우 0.125, 0.250 mg/ml 의 농도에서 오히려 세포가 더 자라는 경향을 보였으며 최고농도 1.000 mg/ml 의 농도에서 5.39%의 세포 독성을 보여 매우 낮은 세포 독성을 확인 할 수 있었다. 증숙 더덕 추출물과 초고압 복합 처리 증숙 더덕 추출물의 경우 비슷한 양상을 보였으

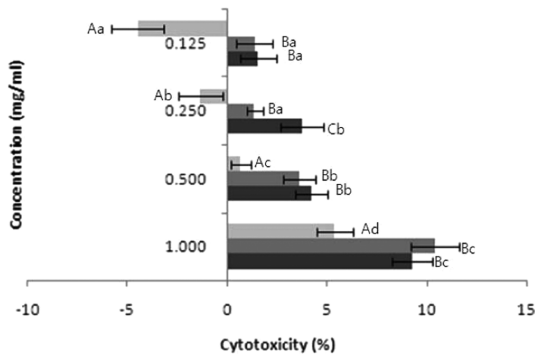


Fig. 1. Cytotoxicity of *Codonopsis lanceolata* extracts in CCD-986sk. FC; Fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HSC; High pressure extracted & steamed *C. lanceolata* extract. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

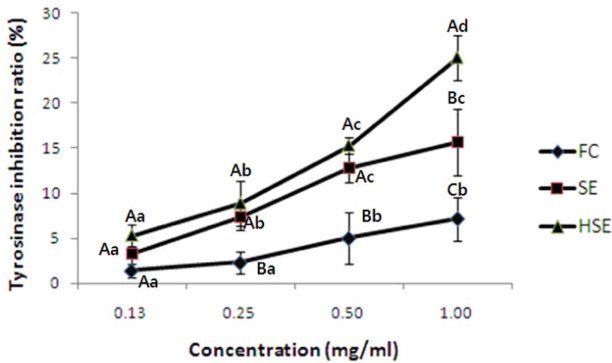


Fig. 2. Tyrosinase inhibitory activity of *codonopsis lanceolata* extracts. FC; Fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HSC; High pressure extracted & steamed *C. lanceolata* extract. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

며 농도 의존적으로 세포 독성이 증가함을 확인하였다. 또한 최고농도 1.000 mg/ml의 농도에서 10% 내외의 세포독성을 보여 두 추출물 모두 세포독성이 높지 않은 것으로 나타났다. 미백활성이 보고된 고로쇠의 경우 같은 농도 범위에서 10~20%의 세포독성을 가지며 (Jeong *et al.*, 2010), 이와 같이 정상세포에 대한 독성이 미미함을 확인한 것을 바탕으로 미백활성을 측정하여 향장 제형으로의 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. Tyrosinase 저해 활성

더덕 추출물의 미백 활성을 확인하기 위한 실험으로 tyrosinase 저해 활성을 확인하여 Fig. 2에 정리하였다. 0.13 ~ 1.00 mg/ml의 농도에서 일반 더덕 추출물의 경우 1.41 ~ 7.18%의 낮은 tyrosinase 저해활성을 나타냈으며 증숙 더덕 추출물의 경우 같은 농도 범위에서 3.20 ~ 15.70%, 초고

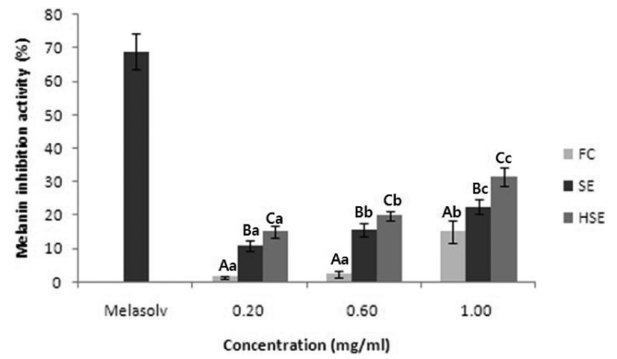


Fig. 3. Melanin contents inhibitory activity of *codonopsis lanceolata* extracts. FC; Fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HSC; High pressure extracted & steamed *C. lanceolata* extract. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

압 복합 처리 증숙 더덕의 경우 5.28 ~ 25.08%의 tyrosinase 저해활성을 확인하였다. 미백 활성으로 잘 알려진 가래나무 추출물 (300 μ g/ml 농도 대비 60%) (Lee *et al.*, 2010)보다 미미한 활성이지만 증숙 및 초고압 복합공정으로 인해 tyrosinase 저해 활성이 2~2.5배 상승하여 미백 활성에 대한 가능성을 확인할 수 있었다. tyrosinase는 기질인 L-tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 합성하고 이는 phenylalanine-3,4-quinone으로 산화되어 최종 멜라닌으로 합성된다 (Solano *et al.*, 2006). 이렇게 생성된 멜라닌은 적정량이 존재할 경우 자외선으로부터 피부를 보호할 수 있는 보호 역할을 하나 적정량 이상이 존재할 경우 색소 침착 및 점, 주근깨 등의 원인이 된다. 이러한 멜라닌의 과잉생산의 주된 원인은 활성산소이며 활성산소의 소거는 tyrosinase의 활성을 저감시켜 멜라닌 생성을 억제한다 (Kim *et al.*, 2011). 본 실험에 적용한 초고압 및 증숙공정에 의해 더덕 내 항산화 물질의 효과적인 용출이 일어났으며 이로 인한 항산화 활성의 증가로 활성산소가 감소하게 되어 이는 tyrosinase의 저해 활성에 영향을 미친 것으로 사료된다. 다음으로 공정별 추출물의 첨가에 따른 melanoma cell의 멜라닌 합성 저해 활성을 통해 증가된 미백활성에 대해 확인해 보았다.

3. B16F10 melanoma cell의 melanin 생성 저해 활성

멜라닌 합성 저해 활성을 알아보기 위해 melanoma cell인 B16F10 cell을 이용하여 더덕 추출물의 미백 활성을 알아보았으며 Fig. 3를 통해 도식화 하였다. positive control인 melasolv의 멜라닌 생성 저해 활성은 69.23%를 나타내었으며 최고농도 1.00 mg/ml에서 일반 더덕 추출물의 경우 15.01%, 증숙 더덕 추출물의 경우 22.46%, 초고압 복합 증숙 더덕의 경우 31.52%를 나타내며 tyrosinase 저해 활성과 같은 증가

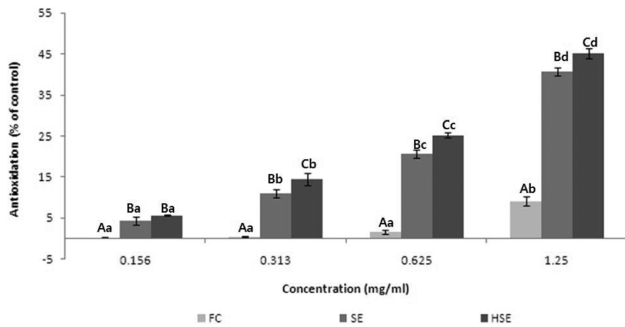


Fig. 4. DPPH radical scavenging ability of *Codonopsis lanceolata* from several cultivation. FC; Fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HSC; High pressure extracted & steamed *C. lanceolata* extract. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

양상을 나타냈다. positive control인 melasolv에 비해 낮은 활성을 나타내었지만 증숙과 초고압 공정을 통해 더덕의 미백활성이 크게 증진됨을 확인할 수 있었다.

4. DPPH 자유라디칼 소거능

초고압 복합 처리를 통한 증숙 더덕의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH 자유라디칼 소거능을 확인하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타냈다. DPPH는 안정된 자유라디칼로서 천연물의 항산화 활성을 알아보기 위해 많이 쓰이고 있는 실험 재료이다. 517 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 환원을 하게 되면 517 nm에서 흡광도가 감소하게 된다.

더덕 추출물들의 DPPH 자유라디칼 소거능을 확인해 본 결과 최대 농도 1.25 mg/ml에서 일반 더덕은 9.156%, 증숙 더덕 40.61%, 초고압 복합처리 증숙 더덕 45.21%의 자유라디칼 소거능을 나타내었다. 일반 더덕과 증숙 더덕의 자유라디칼 소거능을 비교하면 30% 이상의 자유라디칼 소거능이 증진되었으며, 초고압 복합처리를 한 증숙 더덕 보다 약 5% 정도의 자유라디칼 소거능 증진을 확인할 수 있다. 녹차 (64.3%), 작약 (57.1%), 생강 (48.3%) (Jung *et al.*, 2004)보다 작은 값이지만 증숙 및 초고압으로 인한 항산화도 증가는 높은 것으로 확인하였다. 이는 증숙과정 중에 증기의 영향으로 세포벽의 조직이 확장하고 수축을 반복하고 그 결과 느슨해진 세포벽으로 유용 물질이 많이 용출됨과 더불어 동시에 더덕 내에 남아있는 잔류 유용성분이 초고압 복합 공정을 통해 추가적으로 용출이 되었을 것으로 사료된다. 이러한 자유라디칼 소거능에 대한 원인을 확인하기 위해 총 페놀 및 플라보노이드를 측정하여 항산화 활성을 뒷받침 하고자 하였다.

5. 총 페놀 및 플라보노이드 함량

공정별 더덕 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측

Table 1. Comparison of total phenol contents in *Codonopsis lanceolata* extracts.

| Content (mg/g) | FC | SC | HSC |
|----------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Phenol | 4.15±0.50 ^A | 10.45±1.10 ^B | 13.48±0.70 ^{C*} |
| Flavoid | 6.57±0.20 ^A | 12.11±0.40 ^B | 14.12±0.80 ^C |

FC; Fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HSC; High pressure extracted & steamed *C. lanceolata* extract. *Mean with difference letter (A-C) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

Table 2. Compare of phenolic acid in the extracts of *Codonopsis lanceolata* from HPLC analysis.

| Phenolic acids content (µg/g) | FC | SC | HSC |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Gallic acid | - | 402.0±7.8 ^A | 453.0±13.4 ^{B*} |
| p-hydroxybenzoic acid | 469.0±9.4 ^A | 290.0±11.6 ^B | 267.0±10.9 ^C |
| Caffeic acid | 141.0±11.1 ^A | 21.0±7.4 ^B | 45.0±8.5 ^C |
| Vanillic acid | 37.0±10.7 ^A | 51.0±4.7 ^B | 70.0±3.9 ^C |
| trans-ferulic acid | 79.0±5.6 ^A | 260.0±10.2 ^B | 299.0±7.8 ^C |
| Total | 726.0±36.8 ^A | 1024.0±41.7 ^B | 1134.0±44.5 ^C |

FC; Fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HSC; High pressure extracted & steamed *C. lanceolata* extract. *Mean with difference letter (A-C) within same standard are significantly different at $p < 0.05$.

정하여 Table 1에 정리하였다. 총 페놀 함량은 일반 더덕, 증숙 더덕, 초고압 복합처리 증숙 더덕 각각 4.15, 10.45, 13.48 mg/g의 함량을 나타내었으며 초고압 복합처리를 통해 9.33 mg/g의 페놀함량 증진을 확인하였다. 총 플라보노이드 함량의 경우 일반 더덕, 증숙 더덕, 초고압 복합처리 증숙 더덕에서 각각 6.57, 12.11, 14.12 mg/g의 함량이 확인되었으며 초고압 복합 처리를 통해 7.55 mg/g의 플라보노이드 함량 증진이 일어남을 확인하였다. 이는 DPPH 자유라디칼 소거능의 결과 값과 유사한 경향을 나타내었으며, 페놀 및 플라보노이드 함량의 증진을 통해 항산화 활성의 증진이 명확하게 관찰되었다. 이전의 연구를 통해 이러한 항산화 물질은 피부 노화 및 탈색을 일으키는 활성산소를 환원시키어 피부 등 신체기관 산화방지, 멜라닌 색소 형성억제에 효과적임을 확인하였다 (Cha *et al.*, 1999; Bernadette *et al.*, 1998). 이에 근거해 초고압 복합처리 더덕 추출물이 활성산소를 소거함에 따른 미백활성을 나타낼 것으로 사료된다. 하지만 항산화 활성이 뛰어난 물질임에도 불구하고 세포 독성이 높으면 천연물 이용가치가 떨어지게 된다. 이에 따라 본 연구진은 인간 피부 섬유아세포의 종류인 CCD-986sk를 이용하여 세포 독성을 확인하였다.

6. HPLC 분석을 통한 phenolic acid 함량 비교

DPPH 자유라디칼 소거능과 총 페놀 및 플라보노이드 함량 확인으로 증숙 및 초고압 공정을 통한 항산화 활성 증진을 확

인하였으며, HPLC를 이용하여 phenolic acid 함량을 비교함으로써 증가한 항산화력을 확인하고자 하였다. 분석 결과는 Table 2로 정리하였다. Gallic acid의 함량을 비교한 경우를 보면 일반 더덕에서 gallic acid의 함량은 측정되지 않았으며, 증숙을 실시하였을 때 약 400 µg/g의 함량을 보였으며 초고압을 복합 처리한 더덕 추출물의 경우 약 450 µg/g의 함량을 보였다. *p*-hydroxybenzoic acid와 caffeic acid의 함량은 증숙 및 초고압 공정을 처리했을 때 함량이 감소함을 확인할 수 있었으며, vanillic acid는 증숙 초고압 복합 처리를 하였을 경우 약 두 배 정도의 증진을 보였다. *t*-ferulic acid의 경우 gallic acid 증가와 같은 패턴을 보였으며 일반더덕 추출물에 비해 증숙공정을 처리한 추출물에서 3배 이상의 함량 증진을 보였으며 초고압을 복합처리 할 경우 약 40 µg/g의 추가적 함량 증진을 나타내었다. 이는 증숙 및 초고압 공정을 통하여 파괴된 세포벽을 통하여 용출 증진이 일어났거나 위의 공정을 통해 phenolic acid 전환이 일어난 것으로 사료된다.

우리는 이러한 증숙 및 초고압 공정을 통해 항산화의 증가와 더불어 미백활성과의 상관관계를 확인하고자 하였다. 초고압 및 증숙공정의 복합처리를 통해 더덕의 자유티라디칼 소거능이 30% 이상 증진이 되었으며 페놀 및 플라보노이드는 2~3배 증가하는 결과를 확인하였다. 미백활성에 있어서는 초고압 및 증숙공정을 통해 일반더덕의 미미한 미백 활성을 2~2.5배 증진시킨 결과를 확인하였으며, 이는 공정과정 중간에 더덕내의 조직이 느슨해지고 이로 인해 유용성분들의 용출이 용이해짐에 따른 더덕의 항산화 활성 및 미백활성의 증진과 관련 있다고 사료된다. 위의 실험결과를 바탕으로 증숙 및 초고압 공정을 통해 더덕 내의 gallic acid와 ferulic acid의 양이 증가함을 알 수 있었으며, ferulic acid는 tyrosinase 저해 기능이 보고되었고 (Sawabe *et al.*, 2006), gallic acid 또한 멜라닌 생합성 저해능이 보고되었다 (Kim, 2007). 이러한 더덕내의 ferulic acid 등의 phenolic acid와 페놀성 화합물들이 증숙공정을 통해 증가하여 항산화 및 미백활성이 일어났다고 사료된다. 이미 많은 연구자들에 의해 항산화와 미백활성의 상관관계가 보고되었으나 (Seo *et al.*, 2010; Jee, 2009; An *et al.*, 2006; Yang and Choe, 2011) 더덕에 대한 미백 활성 연구는 미미하여 앞으로 추가적인 연구가 진행되어야 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원(과제번호: A103017)에 의하여 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

An BJ, Lee JY, Park TS, Pyeon JR, Bae HJ, Song MA, Baek

- EJ, Park JM, Son JH, Lee CE and Choi KI. (2006). Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *Curcuma longa* L. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 14:168-172.
- Bennett PB, Marquis RE and Demchenko I. (1998). High pressure biology and medicine. University of Rochester Press. Rochester. New York, USA. p.1-428.
- Bernadette EK, Marianne D and Bernhard P. (1998). Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid and α -tocopherol. Experimental Dermatology. 38:45-48.
- Cha JY, Kim SY, Jeong SJ and Cho YS. (1999). Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. Korean Journal of Life Science. 9:389-394.
- Cho YR, Kim SH, Yoon HJ, Hong SY, Ko HY, Park EH, Kim MD and Seo DW. (2011). Anti-tumor effects of *Codonopsis lanceolata* extracts on human lung and ovarian cancer. Food Engineering Progress. 15:1-5.
- Dietz BM, Kang YH, Liu G, Egglar AL, Yao P, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, Mesecar AD and van Breemen RB. (2005). Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. Chemical Research in Toxicology. 18:1296-1305.
- Fang YZ, Yang S and Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 18:872-879.
- Gutfinger T. (1981). Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists' Society. 58:966-967.
- Ha SK, Moon EJ, Lee MJ, Park HM, Yoo ES, Oh MS and Kim SY. (2009). Effect of the BuOH soluble fraction of *Cinnamomum camphora* on melanin biosynthesis. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:293-300.
- Han EG, Sung IS, Moon HG and Cho SY. (1998). Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the levels of lipid in rats fed high fat diet. Korean Journal of Society of Food Science and Nutrition. 27:940-944.
- Ishihara K, Takemura T, Hmada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K and Hearing J. (1993). Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor. Journal of Investigative Dermatology. 2:126-131.
- Jeong MH, Kim SS, Kim JS, Lee HJ, Choi GP and Lee HY. (2010). Skin whitening and skin immune activities of different parts of *Acer mono* and *Acer okamotoanum*. Journal of Korean Forest Society. 99:470-478.
- Jee SO. (2009). Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry(*Morus alba* L.) root bark extracts. Korean Journal of Plant Resources. 22:145-151.
- Jung LS, Yoon WB, Park SJ, Park DS and Ahn JH. (2012). Evaluation of physicochemical properties and biological activities of steamed and fermented deodeok(*Codonopsis lanceolata*). Korean Journal of Food Science and Technology. 44:135-139.
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE and Baek NI. (2004). Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 47:135-140.
- Kang KS, Kim HY, Pyo JS and Yokozawa T. (2006). Increase in

- the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29:750-754.
- Kim JS, Seo YC, Choi WY, Kim HS, Kim BH, Shin DH, Yoon CS, Lim HW, Ahn JH and Lee HY.** (2011). Enhancement of antioxidant activities and whitening effect of *Acer mono* sap through nono encapsulation processes. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:191-197.
- Kim SS, Jeong MH, Seo YC, Kim JS, Kim NS, Ahn JH, Hwang B and Lee HY.** (2010). Comparison of antioxidant activity by high pressure extraction of *Codonopsis lanceolata* from different production areas. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:248-245.
- Kim YJ.** (2007). Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30:1052-1055.
- Komiyama K, Takamatsu S, Yakahashi Y, Shinse M, Hayashi M, Tanaka H, Iwai Y and Omura S.** (1993). New inhibitors of melanogenesis, OH-3084 K1 and K2. *The Journal of Antibiotics*. 46:1520-1525.
- Lee GW, Lee JY and Cho YH.** (2010). Whitening effect of the extracts from *Juglans mandshurica*. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 25:18-24.
- Lee JH and Min DB.** (2006). Nutraceuticals, aging, and food oxidation. In *Handbook of Functional Lipids*. Taylor & Francis Group LLC CRC Press. Florence, Kentucky, USA. p.325-350.
- Lerner AB and Fitzpatrick TB.** (1950). Biochemistry of melanin formation. *Physiological Reviews*. 30:91-126.
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 71:109-114.
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63.
- Nam KY.** (2005). The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Journal of Ginseng Research*. 29:1-18.
- Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB and Lee HY.** (2010). Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. *Journal of the Korean Society of Food Science Nutrition*. 39:1898-1902.
- Park SN.** (1997). Skin aging and antioxidants. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 23:75-132.
- Ryu HS.** (2008). Effects of *Codonopsis lanceolata* extracts on mouse immune cell activation. *Korean Journal of Society of Food Science and Nutrition*. 21:263-268.
- Seo EJ, Hong ES, Choi MH, Kim KS and Lee SJ.** (2010). Antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 42:750-754.
- Sawabe A, Satake T, Aizawa R, Sakatani K, Nishimoto K, Ozeki C, Hamada Y and Komemushi S.** (2006). Toward use of the leaves of *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *Acuta kudo* (red perilla) with Japanese dietary pickled plum(Umeboshi). *Journal of Oleo Science*. 55:413-422.
- Solano F, Briganti S, Picardo M and Ghanem G.** (2006). Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Research*. 19:550-571.
- Wang KH.** (2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*. 106:3593-3599.
- Yang SJ and Choe TB.** (2011). Antioxidant activity and whitening effect of *Forsythiae fructus* extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:472-477.