

In Vitro Antioxidant and Anticancer Potential of n-Hexane Extract from Ginseng Marc

Man-Jin In · Hee Jeong Chae · Dong Chung Kim*

인삼박 n-Hexane 추출물의 *in vitro* 항산화 및 항암 활성

인만진 · 채희정 · 김동청*

Received: 28 January 2014 / Accepted: 6 March 2014 / Published Online: 30 September 2014
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

Abstract A lipid-soluble extract in ginseng marc was prepared by n-hexane extraction to evaluate its antioxidant and anticancer potential. A hexane extract of ginseng marc (HEGM) possessed a 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl free radical scavenging activity which was related to the amount of total phenolics. Also, HEGM showed a potent inhibitory activity on human non-small cell lung cancer (A549, $GI_{50}=34.0 \mu\text{g/mL}$) and colon cancer (SNU-C4, $GI_{50}=45.2 \mu\text{g/mL}$) cells proliferation *in vitro* in a concentration-dependent manner as did the hexane extract of ginseng with GI_{50} values of $20.0 \mu\text{g/mL}$ in A549 and $37.0 \mu\text{g/mL}$ in SNU-C4. These results imply that HEGM can be utilized as an antioxidant and anticancer substance.

Keywords anticancer activity · antioxidant activity · ginseng marc · lipid-soluble extract

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 동아시아에서 일찍부터

M.-J. In · D. C. Kim
Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University,
Hongseong 350-701, Republic of Korea

H. J. Chae
Department of Food Science and Technology, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea

*Corresponding author (D.C. Kim: kimdc@chungwoon.ac.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다양한 질병의 예방과 치료, 건강증진을 위하여 널리 사용되고 있는 생약재이며, 최근 건강에 대한 관심 증가와 천연물 선호 추세에 따라 그 수요가 증가하고 있다. 인삼은 탄수화물, 단백질, 지방, 무기질 등의 영양소와 인삼의 주요한 약리작용 성분인 ginsenosides (saponin), 항암효과로 주목 받는 polyacetylene 계 화합물, 노화억제 및 항피로 효과가 보고된 phenolic 화합물, 그리고 혈당강하 및 면역조절작용 등이 보고된 산성다당체 등의 성분을 함유하고 있다(Attele 등, 1999; Park 등, 2001). 또한, 인삼은 항산화, 항암, 항염증, 항바이러스, 기억력 개선, 면역증진, 신경조절, 간 보호, 혈당저하 및 지방흡수 조절작용 등의 생리활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(Kwak 등, 2003). 인삼은 홍삼과 백삼으로 1차 가공되고, 이를 원료로 음료, 농축액, 분말, 차 등의 2차 가공품으로 만들어져 이용된다. 대부분의 인삼 가공품은 인삼을 물 또는 알코올로 가열 추출하여 제조한 추출물을 이용하여 생산되고 있으며, 추출물 제조과정에서 다량의 인삼 잔사물, 즉 인삼박이 부산물로 배출된다(Sung 등, 1985). 인삼박에는 50–60%의 전분뿐만 아니라 인삼의 중요한 약리성분인 조사포닌(Joo와 Cho, 1984), 지용성 화합물(Lee 등, 2009)과 산성다당체(Choi와 Hwang, 2011) 등이 함유되어 있으나 아직까지 인삼박의 활용은 매우 미미한 형편이다. 즉, 인삼박의 활용에 대한 연구로는 동물실험을 통한 인삼박의 이용가치 평가(Lee 등, 1991), 볶음처리한 인삼박 성분의 변화(Park과 Kim, 1995), 사료로 활용(Lee 등, 1996), 인삼박을 첨가한 약주 제조(Lee 등, 1999), 버섯 균사체 배양용 배지(Park 등, 2005), 산성 다당체 분리의 원료(Choi와 Hwang, 2011) 및 버섯 균사체 배양을 이용하여 잔존 ginsenoside의 생물전환(Hsu 등, 2013) 등이 있을 뿐이다. 또한 인삼박의 생리활성에 관하여는 인삼을 물로 추출한 후 남은 잔사를 n-hexane으로 다시 추출하는 것이 인삼박에 잔존하는 지용성 항암성분을 효율적으로 이용할 수 있다고 보고(Lee 등, 2009)되어 있는 정도이다. 따라서 본 연구에서는 인삼박에 잔존하는 지용성 추출물의 항산화 및 항암활성을 인삼 지용성 추출물의 활성과 비교하여 인삼박의 생

Table 1 Content of total phenolic and relative panaxynol in HEG and HEGM

	Yield ¹⁾ (%)	Total phenolics ¹⁾ (ppm)	Relative panaxynol (%)
Hexane extract of ginseng (HEG)	0.81±0.03	20.36±0.88	100
Hexane extract of ginseng marc (HEGM)	0.77±0.04	16.71±0.75	63

¹⁾Data were shown on the basis of dry ginseng and ginseng marc power, respectively.

리활성에 관한 기존의 보고(Lee 등, 2009)를 보완함으로써 대부분 폐기되는 인삼박 및 홍삼박의 활용도 향상에 기여하고자 하였다.

인삼을 온수로 추출하고 남은 잔사인 건조 인삼박을 농협(Korea)에서 제공받아 인삼박 10배(w/w)의 n-hexane을 추출용매로 항온 진탕조에서 4시간 동안 진탕하여 지용성 성분을 추출하였다. 추출된 용액은 여과지(No. 2, Whatman International Ltd., England)로 여과하고 감압농축하여 n-hexane을 제거한 후 멸균 membrane filter (0.2 µm)로 여과하여 hexane 추출물(hexane extract of ginseng marc; HEGM)을 제조하였다. 농협에서 제공받은 6년근 건조 백삼에서 동일한 방법으로 얻어진 인삼의 hexane 추출물(hexane extract of ginseng; HEG)을 대조군으로 사용하였다. HEG와 HEGM의 총 폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Ciocalteu 시약이 폴리페놀 화합물에 의하여 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용한 방법(Folin과 Denis, 1912)을 이용하여 측정하였으며, 표준물질로는 chlorogenic acid를 사용하였다. HEG와 HEGM에서 추출물의 수율은 각각 0.81%와 0.77%이었으며(Table 1), HEG보다 HEGM에서 수율이 다소 낮게 나타난 것은 인삼 추출물을 제조하는 과정에서 분자량이 작은 지용성 성분의 일부가 추출되었기 때문인 것으로 사료되었다. HEG의 총 폴리페놀 화합물 함량은 추출물 100 g 기준으로 218.7±9.4 mg 함유되어 있어 인삼의 메탄올 추출물을 유기용매로 분획한 경우 n-hexane 분획의 총 폴리페놀 화합물 함량과 매우 유사하였으며(Kim 등, 2007), 이를 인삼 건물 기준으로 환산하면 20.36 ppm으로 계산되었다. 또한 HEGM의 총 폴리페놀 함량은 추출물 100 g 기준으로 188.8±8.5 mg, 인삼박 건물 기준으로 16.71 ppm으로 HEG의 82% 수준이었다(Table 1). 다양한 생리활성이 보고된 마늘에서 에탄올 추출물(Chung과 Kim, 2008)의 수율을 이용하여 계산한 마늘 중 총 폴리페놀 화합물의 함량은 20.6 ppm으로 HEG와 유사하였으나, 추출용매의 극성도가 감소하면 추출량이 감소하므로 인삼과 인삼박은 마늘보다 총 폴리페놀 화합물 함량이 높을 것으로 사료되었다.

체내에서 생성된 free radical은 강력한 산화제로 신체 구성요소에 산화적 손상을 초래하고 돌연변이, 암, 고혈압, 류머티즘 등 만성질환의 원인이 되기도 한다(Yen과 Chen, 1995). 폴리페놀 화합물은 식물에 널리 분포하는 이차 대사물로 구조적으로 phenolic hydroxyl기가 존재하므로 free radical 소거활성이 우수하다(Amin과 Yazdnparsat, 2007). 본 연구에서도 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical 소거활성(Blois, 1958)으로 폴리페놀을 함유하고 있는 HEG와 HEGM의 항산화 활성을 비교하였다. 그 결과(Fig. 1), 추출물의 농도 증가에 비례하여 소거활성은 증가하였고, HEG의 활성이 HEGM보다 다소 우수하였으며 이는 총 폴리페놀 화합물 함량차이에 기인하는 것으로 판단되었다. DPPH radical 절반의 소거활성을 나타내는 IC₅₀을 비교하면 HEG는 1.71 mg/mL, HEGM은 2.07 mg/mL이었다. 마늘을 70% 에탄올로 추출한 경우 고형분 중 총 폴리페놀 함

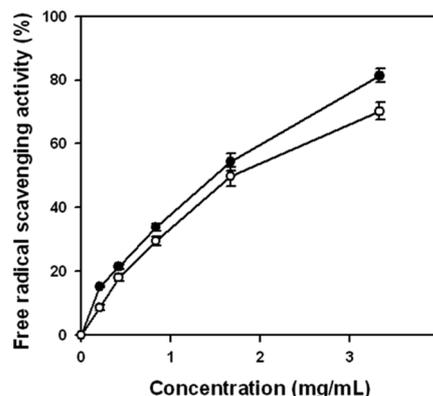


Fig. 1 DPPH radical scavenging ability of hexane extract of ginseng (closed circle) and hexane extract of ginseng marc (open circle). Data were means and SD of triplicate measurements.

량은 0.308 mg/g, DPPH radical에 대한 IC₅₀이 3.07 mg/mL라는 보고(Lee 등, 2012)와 비교하면 HEG와 HEGM의 radical 소거활성이 마늘의 에탄올 추출물보다 우수한 것으로 판단되었다. 즉, Table 1과 Fig. 1의 결과는 인삼 가공 부산물인 인삼박에도 황산화 활성을 갖는 성분이 인삼의 80% 이상 잔존하고 있음을 나타내고 있다.

HEG와 HEGM에 함유된 인삼의 지용성 polyacetylene계 화합물 중 대부분을 차지하는 panaxynol의 함량을 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Varian CP-3800 GC, Varian 320 MS, USA)로 분석하고(Liu 등, 2007), HEG에서의 함량을 기준으로 하여 상대값으로 나타내었다(Table 1). HEGM의 총 폴리페놀 화합물 함량이 HEG의 82%인 것에 비해, HEGM에서 항암활성을 보이는 panaxynol의 함량은 HEG의 63%로 낮게 나타났으나 이는 polyacetylene계 화합물의 불안정한 특성(Washida와 Kitanaka, 2003)에 기인한 것으로 인삼 추출물 제조과정에서 panaxynol이 일부 분해된 것으로 판단되었다. HEG와 HEGM의 인체 암세포 증식억제 효과를 인체 폐암세포(human non-small cell lung cancer cell, A549)와 대장암세포(human colon cancer cell, SNU-C4)를 대상으로 조사하였다. 정상세포에 대한 독성은 인체 배아 폐 상피세포(human embryonic lung epithelial cell, L132)로 조사하였으며, 대조군으로 항암 물질인 indol-3-carbinol을 처리하여 비교하였다. 세포의 배양과 처리는 전보(Lee 등, 2009)와 동일하게 실시하였으며 생육은 Cell Counting Kit-8을 이용하여 측정하고(Itano 등, 2002), 암세포의 생육을 50% 억제하는 시료의 농도인 GI₅₀값을 구하였다(Nakatsu 등, 2007). HEG와 HEGM 공히 추출물의 농도에 비례하여 암세포의 생육을 억제하였으며, 폐암세포에 낮은 농도(25–50 µg/mL)로 처리한 조건에서 HEG의 활성이 HEGM보다 다소 우수하였고 그보다 높은 농도에서는 HEG와 HEGM 모두 유사한 정도의 암세포 증식억제 효과를 보였다(Fig. 2). 폐암세포(A549)에 대한 HEG의 GI₅₀

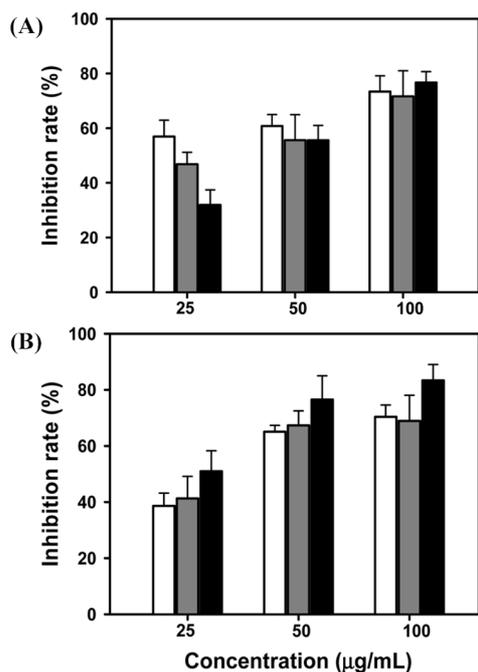


Fig. 2 Effects of hexane extract of ginseng (white bar), hexane extract of ginseng marc (gray bar), and indol-3-carbinol (black bar) as a positive control on human non-small cell lung (panel A) and colon (panel B) cancer cells growth. Data were means and SD of triplicate measurements.

은 20.0 µg/mL로, HEGM은 34.0 µg/mL로 조사되어 대조구인 indol-3-carbinol (GI₅₀=44.1 µg/mL) 보다 HEG와 HEGM의 폐암세포 증식억제 효과가 우수하였으며(Fig. 2A), 대장암세포(SNU-C4)에 대하여는 indol-3-carbinol (GI₅₀=25.3 µg/mL)이 HEG (GI₅₀=37.0 µg/mL)와 HEGM (GI₅₀=45.2 µg/mL)보다 효과적이었다(Fig. 2B). 본 연구에서 암세포 증식억제에는 HEG가 HEGM보다 다소 효과적이었다, 이는 panaxynol 함량의 차이 (Table 1)를 근거로 인삼의 지용성 성분 중 항암효과가 있는 것으로 알려진 polyacetylene계 화합물의 함량차이에 기인하는 것으로 사료되었다. 간암세포(HepG2)와 유방암세포(MCF-7)에 대한 인삼과 인삼박 추출물의 암세포 증식억제에 대한 기존의 보고(Lee 등, 2009)에서도 본 연구와 동일하게 인삼 추출물이 더 효과적이었다. 정상세포인 인체 배아 폐 상피세포(L132)에 대한 독성 실험 결과에서 indol-3-carbinol, HER과 HERM의 GI₅₀은 각각 75.8, 162.8과 155.9 µg/mL로 측정되어 폐암세포(A549)와 대장암세포(SNU-C4)에 비하여 세포 증식억제 효과가 미약하였다. 그러므로 HEG와 HEGM은 정상 세포에 대한 독성이 상대적으로 적으면서도 암세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다.

이상의 결과로부터 활용도가 낮은 인삼박에는 여전히 황산화 활성과 항암 활성을 갖는 지용성 성분이 인삼과 유사한 수준으로 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 인삼박을 사료와 같은 단순한 용도뿐만 아니라 생리활성 성분을 얻을 수 있는 효과적인 원료로 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

초 록

인삼 추출물 제조 부산물인 인삼박의 지용성 성분을 n-hexane으로 추출하고, 추출물의 항산화 및 항암 활성을 인삼의 n-hexane 추출물과 비교하였다. 인삼박의 hexane 추출물(HEGM)의 총 폴리페놀 화합물 함량은 188.8 mg/100 g으로, 인삼의 hexane 추출물(HEG)의 82%를 함유하고 있었다. HEGM의 DPPH 유리 라디칼 소거활성은 IC₅₀이 2.07 mg/mL이었고, 이는 총 폴리페놀 함량과 상관관계를 갖는 것으로 나타났다. HEG가 농도에 비례하여 인체 폐암세포(A549, GI₅₀=20.0 µg/mL)와 대장암세포(SNU-C4, GI₅₀= 37.0 µg/mL)의 생육을 억제하는 것과 동일한 양상으로 HEGM도 폐암세포(GI₅₀=34.0 µg/mL)와 대장암세포(GI₅₀=45.2 µg/mL)의 생육을 효과적으로 억제하였다. 따라서, 본 연구는 인삼박에서 얻어진 HEGM이 항산화 및 항암 활성을 갖는 자원으로서의 활용 가능성을 보여주었다.

Keywords 인삼박 · 지용성 성분 · 항산화 활성 · 항암 활성

References

Amin A and Yazdnparsat R (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem* **104**, 21–9.

Attele AS, Wu JA, and Yuan CS (1999) Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* **58**, 1685–93.

Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199–200.

Choi YJ and Hwang KH (2011) Analysis of the extraction conditions of soluble acidic polysaccharides from ginseng marc. *Kor J Pharmacogn* **42**, 82–8.

Chung JY and Kim CS (2008) Antioxidant activities of domestic garlic (*Allium sativum* L.) stems from different areas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 972–8.

Folin O and Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* **12**, 239–43.

Hsu BY, Lu TJ, Chen CH, Wang SJ, and Hwang LS (2013) Biotransformation of ginsenoside Rd in the ginseng extraction residue by fermentation with *lingzhi* (*Ganoderma lucidum*). *Food Chem* **141**, 4186–93.

Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T et al. (2002) Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 3609–14.

Joo HK and Cho GS (1984) A study on the production of single cell protein from ginseng-cake extract using *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* **12**, 203–9.

Kim JS, Moon GS, Kim HO, and Lee YS (2007) Antioxidant properties of ginseng (*P. ginseng* C.A. Meyer) extracts by organic solvent fractionation. *J Food Sci Nutr* **12**, 267–72.

Kwak YS, Park JD, and Yang JW (2003) Present and its prospect of red ginseng efficacy research. *Food Ind Nutr* **8**, 30–7.

Lee IS, Yang EJ, Jeong YJ, and Seo JH (1999) Fermentation process and physiochemical characteristics of *Yakju* (Korean cleared rice wine) with addition of ginseng powder. *Korean J Postharvest Sci Technol* **6**, 463–8.

Lee JS, Kim ES, and Kim HJ (1991) Effects of ginseng-cake on growth and biochemical components of rats. *J Korean Soc Food Nutr* **20**, 329–36.

Lee SD, Yoo G, Chae HJ, In MJ, Oh NS, Hwang YK et al. (2009) Lipid-soluble extracts as the main source of anticancer activity in ginseng and ginseng marc. *J Am Oil Chem Soc* **86**, 1065–71.

Lee SK, Lee BD, Chee SH, and Jung KK (1996) Effects of addition of wheat

- bran or rice straw to air-tightly stored ginseng meal on storage and palatability and dry matter digestibility in goat. *Kor J Anim Nutr Feed* **20**, 536–42.
- Lee YR, Woo KS, Hwang IG, Kim HY, Lee SH, Lee J et al. (2012) Physicochemical properties and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) with different heat and pressure treatments. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 278–82.
- Liu JH, Lee CS, Leung KM, Yan ZK, Shen BH, Zhao ZZ et al. (2007) Quantification of two polyacetylenes in *Radix ginseng* and roots of related *Panax* species using a gas chromatography–mass spectrometric method. *J Agric Food Chem* **55**, 8830–5.
- Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, Kanno J et al. (2007) Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. *Mol Pharmacol* **72**, 1171–80.
- Park EM, Kim SJ, Ye EJ, Bae MJ, and Jo KC (2005) Effect of mycelia extracts of mushroom-cultured ginseng by-product on proliferation in cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **34**, 323–9.
- Park KM, Kim YS, Jeong TC, Jeo CO, Shin HJ, Lee YH et al. (2001) Nitric oxide is involved in the immunomodulating activities of acidic polysaccharide from *Panax ginseng*. *Planta Med* **67**, 122–6.
- Park MH and Kim KC (1995) Changes in physicochemical components of ginseng marc by roasting process. *Korean J Ginseng Sci* **19**, 144–52.
- Sung HS, Yoon SK, Kim WJ, and Yang CB (1985) Relationship between chemical components and their yields of red ginseng extract by various extracting conditions. *Korean J Ginseng Res* **9**, 170–8.
- Washida D and Kitanaka S (2003) Determination of polyacetylenes and ginsenosides in *Panax* species using high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull* **51**, 1314–7.
- Yen GC and Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* **43**, 27–32.