

## 더덕 추출물과 용매 분획물의 항산화 및 티로시나아제 저해활성

김지영 · 이민기 · 황병순\* · 김기창\*\* · †황인국\*\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 석사전문연구원, \*농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 박사전문연구원,  
\*\*농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 농업연구사

### Antioxidant Activity and Tyrosinase Inhibitory Activities of *Codonopsis lanceolata* Extract and Solvent Fraction

Ji Yeong Kim, Min-Ki Lee, Byung Soon Hwang\*, Gi-Chang Kim\*\* and †In Guk Hwang\*\*

Post-Master, Dept. of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju-gun, 55365, Korea

\*Post-Doctor, Dept. of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju-gun, 55365, Korea

\*\*Researcher, Dept. of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju-gun, 55365, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to investigate the antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of *Codonopsis lanceolata* 50% ethanol extract, and its solvent fractions (*n*-hexane, ethyl acetate (EA), *n*-butanol, water). The main components of the EA fraction were qualitatively analyzed using UPLC Q-ToF/MS. Additionally, a quantitative analysis was performed using UPLC. As a result, the total polyphenol content was 113.36 mg gallic acid/g in the EA fraction, which contained the largest amount of the *C. lanceolata* solvent fractions. Also EA showed the highest antioxidant activity than other fractions. The IC<sub>50</sub> of DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity was 0.03 mg/mL and the IC<sub>50</sub> of ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] radical scavenging activity was 0.049 mg/mL. The EA fraction showed tyrosinase inhibitory activity than other fractions and especially inhibited monophenolase oxidase reaction higher than diphenolase oxidase reaction. The monophenolase oxidase inhibited 55% when the concentration of the EA fraction was 0.25 mg/mL. As a result of Q-ToF/MS analysis, it was confirmed that tangshenoside I and lobetyolin were the main components of EA fraction. Thus, these results suggest that *C. lanceolata* may be used as a potent source of cosmetic agents.

Key words: *Codonopsis lanceolata*, antioxidant activity, mushroom tyrosinase, tangshenoside I, lobetyolin

#### 서론

현대인들의 건강하고 아름다운 삶에 대한 관심이 증가함에 따라 건강 기능 식품 소비 또한 해마다 점차 증가하는 추세이다(Albertazzi 등 2002). 그러나 현대인들은 식생활 패턴과 생활환경의 변화, 스트레스 등으로 건강을 위협 받고 있고, 이로 인해 각종 질병의 원인이 되는 활성 산소(ROS, Reactive Oxygen Species)를 주목하고 있다(Choi 등 2019). 활성산소는 생체 내 정상적인 대사과정에 의해 생성되며, 체내의 생체기능을 저하시켜 암, 당뇨병, 관절염 등과 같은 여러

질환의 원인이 된다(Valko 등 2007). 또한 과잉 생성된 활성 산소로부터 산화적 스트레스가 유발되어 피부 노화의 주요 원인이 될 수 있어 항산화제에 대한 연구를 활발히 진행 중이다(Ryu 등 1997).

멜라닌(melanin)은 자외선으로부터 피부를 보호하기 위해 생성된다. 하지만 과잉 생성될 경우, 기미, 주근깨, 검버섯과 같은 피부 트러블 문제가 생기고, 색소 침착으로 인해 피부 색이 어두워지며, 더 나아가 피부암을 유발하는 원인이 된다. Tyrosinase는 멜라닌 합성초기 단계에 필수적으로 관여하는 산화효소로, 멜라닌 생합성 과정에서 L-tyrosine이 L-DOPA(L-3,

† Corresponding author: In Guk Hwang, Researcher, Dept. of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea. Tel: +82-63-238-3672, Fax: +82-63-238-3843, E-mail: ighwang79@korea.kr

4-dihydroxy phenylalanine)로 산화하는 monophenolase oxidase 반응과 L-DOPA가 L-dopa quinone으로 산화하는 diphenolase oxidase 반응에 각각 관여한다. 이를 저해하게 되면 최종적으로 멜라닌의 과잉 생성을 막을 수 있기 때문에 피부트러블, 피부미백, 피부암 등의 문제를 예방할 수 있다(Park 등 2009; You 등 2009). 현재 부작용을 유발할 수 있는 합성 소재보다 천연소재나 식품 소재로부터 화장품 소재를 찾아가는 추세로 관련 연구들이 활발하게 이루어지고 있다.

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 초롱꽃과에 속하는 다년생 덩굴식물로 우리나라, 일본, 중국에서 주로 자생하며, 해발 300 m 이상의 산간 지역에서 주로 자라기 때문에 우리나라의 경우 강원도 횡성과 제주도 서귀포에서 주로 생산되고 있다(Suh & Eun 1998; Mo 등 2013). 더덕에 함유된 성분으로는 lancemaside A, B, C, D, E, codonopoilate A, B, C, codonoposide I, II와 같은 triterpene 사포닌 계열, lobetyol, lobetyolin, lobetyolinin과 같은 polyacetylene 계열 그리고 tangshenoside I, II, III, IV, VIII 와 같은 phenylpropanoid 계열 등이 있으며(Hwang 등 2018), 이들 중 tangshenoside와 lobetyolin은 *Codonopsis*속 대표성분으로 잘 알려져 있다(Ichikawa 등 2009). 더덕에 대한 생리활성 연구로는 항산화(Suh & Eun 1998), 항염증(Jung & Ryu 2018), 항당뇨(Seong 등 2018) 등의 연구가 보고된 바 있다.

따라서 본 연구에서는 더덕의 화장품 소재 가능성을 확인하기 위해 50% ethanol로 추출 후 용매의 극성을 이용하여 분획을 취하였고, 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성을 확인하였다. 또한 효능이 우수한 더덕 용매 분획층의 주성분을 UPLC Q-ToF/MS를 이용하여 분석하였고, UPLC를 이용하여 정량 분석을 실시하여 천연 화장품 소재로서의 활용을 위한 기초자료로 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 더덕은 2018년 강원도 횡성군 소재 농가로부터 구입하였다. 분석에 사용된 water, ethanol, acetonitrile, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol 등은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였으며, 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구매하여 사용하였다.

### 2. 추출물 및 용매분획물 제조

더덕 추출물 제조는 열풍 건조한 시료 분말 100 g에 50% ethanol 750 mL를 넣고 3시간 동안 교반 추출한 후, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(Union 55R, Hanil Science industrial Co., Inchen, Korea)하여 상등액을 회수하였다. 위 과정을 3회 반복

하여 회수한 상등액을 여과지(Whatman No. 2, Tokyo, Japan)로 여과하고, 감압농축기로 농축하여 추출물을 얻었다. 그 중 일부를 취하여 순차적 용매분획법을 이용하여 분획하였고, 최종적으로 *n*-hexane, ethyl acetate, 수포화 butanol, water 분획물을 확보하였다.

### 3. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

더덕 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정은 Hwang 등(2006)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 추출물 100  $\mu$ L에 2% sodium carbonate 용액 2 mL를 첨가하여 3분간 상온에서 반응시킨 후, 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100  $\mu$ L를 혼합하였다. 30분 동안 반응시킨 후 UV spectrophotometer를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 작성한 후 폴리페놀 함량을 구하였으며, 총 페놀 함량은 mg gallic acid/g로 표시하였다.

더덕 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Hwang 등(2006)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 250  $\mu$ L에 5% sodium nitrite 75  $\mu$ L, 증류수 1 mL를 첨가하여 5분 동안 상온에서 방치하였다. 그 후 10% aluminium chloride 150  $\mu$ L를 첨가하여 6분간 실온에서 반응시킨 후 1 M sodium hydroxide 500  $\mu$ L를 첨가하였다. 11분간 상온에서 반응시킨 후 UV spectrophotometer를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 catechin을 사용하여 표준 검량선을 작성한 후, 총 플라보노이드 함량을 구하였으며, 총 플라보노이드 함량은 mg catechin/g로 표시하였다.

### 4. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

더덕 추출물 및 용매분획물의 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성은 Lee 등(2012)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 추출물 100  $\mu$ L와 0.2 mM DPPH 용액 100  $\mu$ L를 넣고 혼합하여 암실에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 UV spectrophotometer를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, ascorbic acid를 양성대조구로 사용하였다.

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 라디칼 소거 활성은 Jeong 등(2017)에 따라 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 24시간 동안 차광하여 반응시킨 후, 734 nm에서 측정하였다. 시료 추출물 20  $\mu$ L를 희석한 ABTS 용액 180  $\mu$ L를 혼합하여 암실에서 30분간 반응시켰다. UV spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, ascorbic acid를 양성대조구로 사용하였다. 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 산출되었다.

Radical scavenging activity(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

### 5. Mushroom tyrosinase 저해 활성

더덕 추출물의 멜라닌 합성 저해력을 확인하기 위해 Tyrosinase 저해 활성을 Kim 등(2019)을 따라 측정하였다. 더덕 추출물은 DMSO를 사용하여 농도별로 희석하여 사용하였으며, L-tyrosine 과 L-DOPA를 기질로 사용하였고, 475 nm에서 dopachrome을 확인 하여 결과를 나타내었다. L-Tyrosine을 기질로 사용하는 monophenolase oxidase 저해 활성을 측정하는 방법은 다음과 같다. 0.05M phosphate buffer(pH 6.8) 165  $\mu$ L에 5  $\mu$ L의 더덕추출물과 기질인 1.8 mM L-tyrosine을 20  $\mu$ L넣고 마지막으로 tyrosinase(260 unit/mL) 10  $\mu$ L를 혼합한다. 15분 동안 30도에서 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인 하였다. L-DOPA를 기질로 사용하는 diphenolase oxidase 저해 활성을 측정하는 방법은 다음과 같다. 0.05M phosphate buffer (pH 6.8) 165  $\mu$ L에 5  $\mu$ L의 더덕 추출물과 기질인 3.6 mM L-DOPA을 20  $\mu$ L넣고 마지막으로 tyrosinase(260 unit/mL) 10  $\mu$ L를 혼합한다. 8분 동안 30도에서 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인하였다. Tyrosinase 활성 저해능 평가 시, kojic acid를 양성대조구로 사용하였고, tyrosinase 활성 저해능은 아래의 식에 의해 산출되었다.

Tyrosinase inhibition activity(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

### 6. 더덕 EA 분획물 정성 분석

더덕 EA 분획물의 주요 성분들을 분석하기 위해 Q-ToF/MS를 사용하여 실험을 진행하였다. 분석조건으로 CORTECS (2.1 $\times$ 150mm, 1.6 $\mu$ m; Waters, Wexford, Ireland) 칼럼을 사용하였다. 또한 액체크로마토그래피 (Waters Co., Milford, MA, USA)와 연결된 Q-ToF 질량분석기(Waters Micromass, Manchester, UK)를 이용하여 분석하였다. 검출 대표파장은 220~400 nm로, 칼럼 오븐온도는 30 $^{\circ}$ C, 유속은 0.3 mL/min이었다. 이동상으로는 용매 A(Water:formic acid=99.5:0.5, v/v)와 용매 B(acetonitrile:formic acid=99.5:0.5, v/v)를 사용하였다. 용매 구매조건은 B를 5%로 시작하여 20분까지 25%, 25분까지 50%, 30분까지 90%로 증가시킨 다음 2분 동안 유지하다가 35분까지 5%로 다시 감소시키고 40분까지 유지하였다. 또한 질량분석기를 이용한 질량 패턴분석은 positive ion mode로 진행하였다. 질량 분석조건으로 capillary 전압은 3.5 kV, sampling cone 전압은 40 V로 각각 설정하였다. Ion source 및 desolvation 온도는 120 $^{\circ}$ C 및 500 $^{\circ}$ C로 설정하였고, desolvation 가스는 1,020 L/h로 설정하였으며, 질량 스캔 범위는 m/z 100~1200으로 설정하였다. 개별 성분은 관련 문헌을 참고, 각 성분의 질량 단편이온 패턴 분석결과와 비교하여 구조 동정하였다.

### 7. Tangshenoside I과 lobetyolin 정량 분석

EA분획물 내 함유된 tangshenoside I과 lobetyolin의 정량분석을 위해 UPLC(Waters ACQUITY UPLC system, Milford, MA, USA)를 이용하여 분석을 진행하였다. 분석 조건은 column Kinetex XB-C18(2.1 $\times$ 150 mm, 1.7  $\mu$ m)을 사용하였으며, 이동상 용매로 용매 A(0.1% acetic acid를 함유한 물)과 용매 B(acetonitrile)를 사용하였다. 용매 B 5%로 시작하여 3분간 유지한 후 17분까지 95%로 증가시킨 후 3분간 유지하고 22분까지 5%로 감소시켜 25분까지 유지 하였다. 용출 속도는 0.3 mL/min으로 column 내 온도는 40 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 검출기는 PDA(Photo-diode array detector)를 사용하였고, 267 nm의 파장에서 분석하였다. 성분 분석을 위해 사용한 표준품 tangshenoside I는 대구한방산업진흥원로부터 구매하였고 lobetyolin은 Chemface 로부터 구매하여 사용하였다. 각각의 표준품의 retention time을 확인하고 농도별로 희석하여 검량 곡선을 작성한 후, 더덕 EA 분획물을 각각 5 mg/mL로 제조하여 정량실험을 실시하였다.

### 8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicag, IL, USA)을 이용하였다. 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고, 처리 간의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variation)로 분석한 뒤 다중검정범위 (Duncan's multiple range test)를 사용하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석

폴리페놀 및 플라보노이드 화합물은 식품 속에 함유된 대표적인 생리활성 성분으로(Ryu 등 1997) 본 연구에서 더덕 추출물과 그 분획물 들의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 더덕 50% ethanol 추출물의 총 폴리페놀 함량은 12.39 mg gallic acid/g이었고, EA 분획물은 116.04 mg gallic acid/g 으로 용매 분획물 중 가장 높은 함량이었으며, 뒤를 이어 butanol, hexane, water 순으로 높은 함량을 나타냈다. Jeong 등(2013)에서는 더덕 ethanol 추출물의 총 폴리페놀 함량이 15.7 mg gallic acid/g 으로 밝혔고, Ahn 등(2016)에서는 12 mg gallic acid/g 라고 밝혀 본 실험 결과와 유사하였다. 다음은 총 플라보노이드 함량 분석에 대한 결과로 Table 1에 나타내었다. 더덕 50% ethanol 추출물의 총 플라보노이드 함량은 10.45 mg catechin/g이었고, EA 분획물은 82.85 mg catechin/g 으로 용매 분획물 중 가장 높은 함량이었으며, 뒤

**Table 1. Total polyphenol and total flavonoid content from *C. lanceolata***

	50% Etanol extract	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Water
TPC <sup>1)</sup> (mg gallic acid/g)	12.39±0.47 <sup>ab)</sup>	35.49±0.24 <sup>c</sup>	116.04±0.20 <sup>a</sup>	39.13±0.70 <sup>b</sup>	1.25±0.17 <sup>c</sup>
TFC <sup>2)</sup> (mg catechin/g)	10.45±0.47 <sup>c</sup>	11.45±0.41 <sup>c</sup>	82.85±0.97 <sup>a</sup>	20.36±0.11 <sup>b</sup>	0.02±0.03 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>Total polyphenol content

<sup>2)</sup>Total flavonoid content

<sup>3)</sup>Value are shown as mean±S.D. of triplicate. Different small letters in the same row indicate a significant difference at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

를 이어 butanol, hexane, water 순으로 높은 함량을 나타냈다. 폴리페놀류는 phenolic hydroxy기를 가진 방향족 화합물로 다양한 구조와 많은 종류가 보고되고 있으며(Kim 등 2012), 식용 및 약용 식물에 다량 함유되어 있다. 추출물로 용매 분획 시 폴리페놀류는 일반적으로 중간 극성의 용매층에서 높은 함량을 나타낸다고 알려져 있다(Lee 등 2009). 마찬가지로 본 연구에서도 중간극성인 EA 층에서 가장 높은 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 있었음을 확인할 수 있었다.

## 2. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거란 안정적인 질소 라디칼인 DPPH를 소거시키는 항산화 물질을 측정하는 것으로 free radical을 환원시키는 환원력을 측정하여 더덕의 항산화 활성을 측정하고자 하였다(Anczewicz 등 1998). 더덕 50% ethanol 추출물과 hexane, butanol, ethyl acetate, water 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 평가한 결과를 Table 2에 나타내었다. 더덕 시료들의 농도가 높아질수록 DPPH 라디칼 소거능이 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있었으며, DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 높았던 EA 분획물의 IC<sub>50</sub> 값

은 0.03 mg/mL로 나타났다.

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 라디칼 소거란 산화를 유도시키는 과황산칼륨과 반응하여 형성된 ABTS 양이온 라디칼을 소거시킬 때의 항산화력을 측정하는 방법이다(Jeong 등 2017). ABTS 라디칼 소거활성 결과는 Table 2에 나타냈으며, DPPH와 마찬가지로 EA 분획물에서 가장 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. 더덕 시료들의 농도가 높아질수록 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 증가하였으며, EA 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 0.05 mg/mL로 나타났다. 본 연구에서 더덕 EA 분획물을 포함한 모든 시료들의 DPPH 라디칼 소거능이 ABTS 라디칼 소거능보다 높은 활성을 나타내었는데, 이에 대해 Umekawa 등(1999)에서는 DPPH의 경우 free radical을, ABTS의 경우 cation radical 소거능을 측정하기 때문에 각각의 radical과 결합하는 페놀 물질에 따라 라디칼의 제거 능력이 차이가 날 수 있다고 밝혔다. 또한 EA 분획물이 DPPH와 ABTS 라디칼을 가장 높게 저해하였는데, 이에 대해 Ryu 등(1997)에서는 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 항산화 활성과 높은 양의 상관관계를 가지며, 이들로 인해 높은 항산화 활성이 나타난다고 추정 하였다.

## 3. Mushroom tyrosinase 저해 활성

멜라닌은 UV로부터 피부를 보호하지만 과잉 생성될 경우, 기미, 피부 갈변, 피부암을 유발한다. Tyrosinase는 멜라닌 합성 초기 단계에 관여하는 필수 산화효소로 본 실험에서는 더덕의 50% ethanol 추출물과 각 분획물에 존재하는 생리활성 물질의 멜라닌 합성 저해를 측정하고자 실험을 진행하였다. L-Tyrosine이 L-DOPA(3,4-dihydroxy phenyl alanine)로 hydroxylation 되는 monophenolase oxidase 저해능 측정시 더덕 50% ethanol 추출물 0.25 mg/mL의 농도에서 23%의 저해 효과를 보였다(Table 3). 같은 농도에서 EA 분획물은 55%의 저해 효과를 보였고, butanol 분획물은 14%, hexane 분획물은 13%, water 분획물은 7%의 활성 억제 효과를 나타냈으며, 양성대조구로 사용한 kojic acid의 IC<sub>50</sub> 값은 0.02 mg/mL로 나타

**Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity from *C. lanceolata***

	50% Ethanol extract	<i>n</i> -Hexane	Ethyl-acetate	<i>n</i> -Butanol	Water	AC <sup>3)</sup>
DPPH IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (mg/mL)	2.36±0.39 <sup>b2)</sup>	0.75±0.06 <sup>c</sup>	0.03±0.01 <sup>d</sup>	0.79±0.01 <sup>c</sup>	>5 <sup>a</sup>	0.02±0.07 <sup>d</sup>
ABTS IC <sub>50</sub> (mg/mL)	0.98±0.02 <sup>b</sup>	0.65±0.03 <sup>c</sup>	0.05±0.02 <sup>c</sup>	0.55±0.05 <sup>d</sup>	>5 <sup>a</sup>	0.01±0.08 <sup>f</sup>

<sup>1)</sup> Inhibition concentration for 50% free radical scavenging.

<sup>2)</sup> Value are shown as mean±S.D. of triplicate. Different small letters in the same row indicate a significant difference at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup> Ascorbic acid; Positive control

났다. L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 산화되는 diphenolase oxidase 저해능 측정시 더덕 50% ethanol 추출물 0.25 mg/mL 은 4.8 %를 저해했고 EA 분획물의 경우 23.6 %를 저해효과를 보였다(Table 3).

본 실험결과, 더덕 50% ethanol 추출물과 용매 분획물들은 tyrosinase를 저해 효과를 보였고, diphenolase oxidase 반응보다 monophenolase oxidase 반응에서 더 높은 저해 효과를 보였다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높았던 EA 분획물이 가장 높은 저해력을 보였음을 확인하였다. 일반적으로 페놀성 화합물을 함유하고 있는 식물들은 항산화력을 보이는 경향이 많기 때문에 산화 효소인 tyrosinase 로 인해 발생하는 물질들을 환원시켜 멜라닌 생합성 반응을 저해하는 효과가 기대되어진다(Boissy & Manga 2004). 그러나 높은 페놀성 화합물을 함유한 감초, 진교 등의 경우 효과적인 항산화 활성을 가졌지만 tyrosinase 활성 저해력은 미비하였다(Wang 등 2006; Chan 등 2008). 더덕의 경우, 높은 페놀성 화합물이 함유된 EA 분획물에서 가장 높은 tyrosinase 저해활성을 보였고, 페놀성 화합물 함량이 낮을수록 저해효과가 미비하였다. 따라서 tyrosinase 저해활성은 페놀성 화합물의 함량과 높은 상관관계가 있는 것으로 보인다. Cho 등(2011)의 보고에 따르면 아관문 추출물의 경우 0.3 mg/mL에서 48 %의 저해율을 보였고, Im & Lee(2017)에 따르면 차가버섯 추출물이 2.3 mg/mL일 때 50%의 저해율을 나타낸다고 하였다. 이로 보아 본 실험에 사용한 더덕 EA 분획물은 비교적 높은 tyrosinase

저해활성을 가지고 있다고 판단되었으며, EA 분획물 내 존재하는 개별 생리활성 물질의 연구가 더 필요하다고 사료되었다.

#### 4. 더덕 EA 분획물 정성 분석

본 연구에서는 앞서 제시한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 그리고 라디칼 소거능 및 tyrosinase 저해활성과 관련이 있는 더덕 EA 분획물의 성분 탐색을 위해 LC-QToF/MS를 이용하여 주성분을 분석하고자 하였고, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 크로마토그램에서 보이는 peak 들의 ion fragment 데이터를 분석하였고 Fig. 2에 나타내었다. 높은 면적을 갖는 peak 1의 경우,  $m/z$  701과  $m/z$  679 fragment를 확인할 수 있었으며,  $m/z$  701은 tangshenoside I( $m/z$  678.63) 모분자에 Na이 첨가된  $[M+Na]^+$  이며  $m/z$  679는 tangshenoside I( $m/z$  678.63) 모분자에 H가 첨가된  $[M+H]^+$ 로 판단되었다(Ma 등 2014; Xia 등 2017). 따라서 peak 1은 tangshenoside I 으로 추정하였다. 다음으로 높은 면적을 갖는 peak 2의 경우  $m/z$  435, 419 fragment를 확인할 수 있었다(Fig. 2).  $m/z$  435 는 lobetyolin( $m/z$  396.43) 모분자에 K이 첨가된  $[M+K]^+$ 이며,  $m/z$  419는 lobetyolin( $m/z$  396.43) 모분자에 Na이 첨가된  $[M+Na]^+$ 로 판단되었다(Ma 등 2014; Xia 등 2017). 따라서 peak 2는 lobetyolin으로 추정하였다. 그 외에 구조를 추정할 수 있었던 peak 3~8은 Table 4에서 나타내었으며, EA 분획물 분석 결과 tangshenoside I 과 lobetyolin이 주성분으로 함유되어 있음을 확인하였다.

Table 3. Tyrosinase inhibitory activity from *C. lanceolata*

	50% Ethanol extract	<i>n</i> -Hexane	Ethyl-acetate	<i>n</i> -Butanol	Water	KA <sup>4)</sup>
Mono-PO <sup>1)</sup>	23.1±0.06% <sup>2)</sup>	25.6±0.06% <sup>c</sup>	54.9±0.01% <sup>b</sup>	13.7±0.02% <sup>d</sup>	6.7±0.03% <sup>c</sup>	82.4±0.03% <sup>a</sup>
Di-PO	4.7±1.0% <sup>c</sup>	NT <sup>3)</sup>	23.6±2.32% <sup>b</sup>	NT	NT	75 ±0.5% <sup>a</sup>

1) Phenolase oxidase

2) Value are shown as mean±S.D. of triplicate. Different small letters in the same line indicate a significant difference at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

3) Not test

4) Kojic acid; Positive control

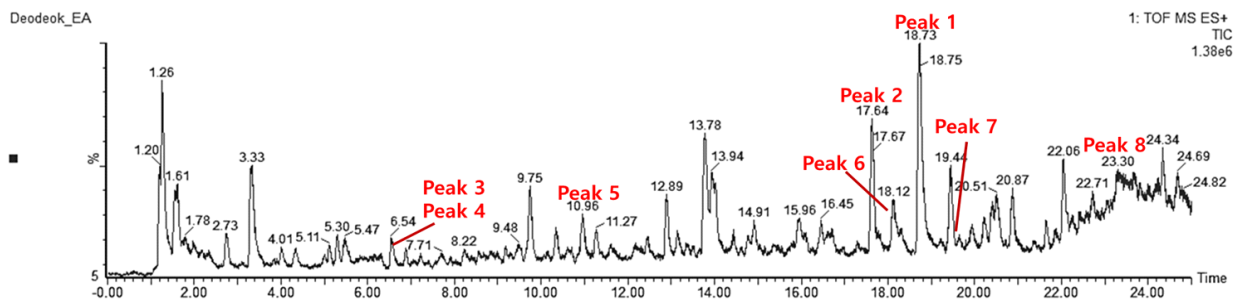


Fig. 1. UPLC Q-TOF/MS TIC chromatograms of *C. lanceolata*

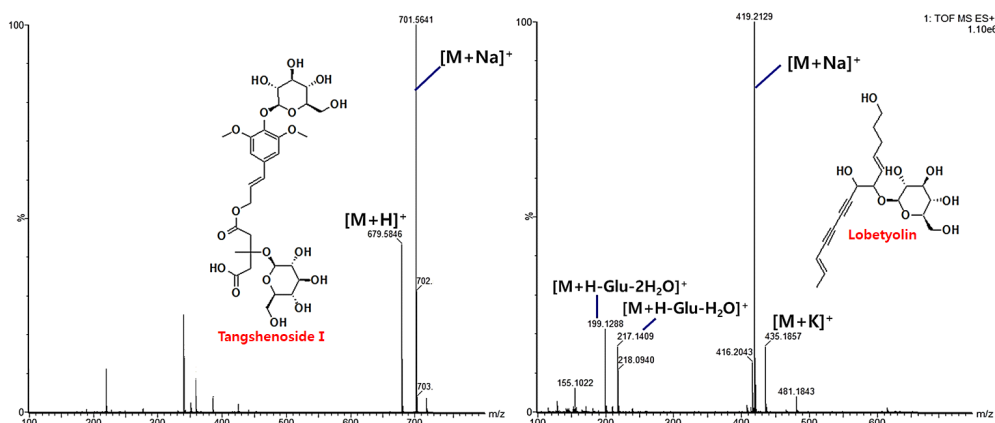


Fig. 2. Positive ion MS spectra of tangshenoside I and lobetyolin

Table 4. Mass fragmentation ions of components in *C. lanceolata*

Peak	Compound	Formula	Rt(min) <sup>1)</sup>	Fragment ions [M+H] <sup>+</sup>	References
1	Tangshenoside I	C <sub>29</sub> H <sub>42</sub> O <sub>18</sub>	18.72	701.5641 [M+Na] <sup>+</sup> , 679.5846 [M+H] <sup>+</sup> 435.1857 [M+K] <sup>+</sup>	(Ma et al 2014) (Xia et al 2017)
2	Lobetyolin	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	17.63	419.2129 [M+Na] <sup>+</sup> , 217.1409 [M+H-Glu-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 199.1288 [M+H-Glu-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 597.2715 [M+K] <sup>+</sup>	(Ma et al 2014) (Xia et al 2017)
3	Lobetyolinin	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub>	19.94	581.2955 [M+Na] <sup>+</sup> , 397.2060 [M+H-Glu] <sup>+</sup>	(Ma et al, 2014) (Xia et al, 2017)
4	Syringin	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	6.88	395.1712 [M+Na] <sup>+</sup> , 411.1436 [M+K] <sup>+</sup>	(Du et al, 2018) (Aga et al, 2012)
5	Chlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	6.88	377.1213 [M+Na] <sup>+</sup> , 163.0543 [Caffeoyl] <sup>+</sup>	(Nugroho et al, 2012)
6	Syringaldehyde	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	10.96	183.0814 [M-H] <sup>+</sup> , 155.0819 [M+H-CO] <sup>+</sup>	(Du et al, 2018) (Tripathi et al, 2010)
7	7-O-ethyl tangshenoside II	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub> NH <sub>4</sub>	23.32	423.1865 [M+Na] <sup>+</sup> , 201.2011 [M+H] <sup>+</sup> , 221.1755 [M+H-Glu-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	(Du et al, 2018)
8	(4E,12Z)-threo-teradeca-4,12-diene-8,10-diyne-1,6,7,14-tetrol	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> Na	18.28	273.1388 [M+Na] <sup>+</sup> , 251.1502 [M+H] <sup>+</sup> , 233.1772 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	(Du et al, 2018)

<sup>1)</sup> Retention time.

Hwang 등(2018)에서 또한 tangshenoside I과 lobetyolin을 EA 분획물의 주성분으로 보고한 바 있으며, EA 분획물의 높은 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성에 tangshenoside I과 lobetyolin이 기여하였을 것으로 추정할 수 있었다.

#### 5. Tangshenoside I과 lobetyolin 정량 분석 및 tyrosinase 저해활성

크로마토그램에서 가장 높은 면적을 보였던 tangshenoside

I과 lobetyolin의 함량을 분석하기 위해 UPLC 분석한 결과는 Table 5와 같다. 더덕 50% ethanol 추출물에 함유된 tangshenoside I의 함량은 2.97 mg/g 이었고, lobetyolin의 함량은 1.2 mg/g 이었다. EA 분획물에 함유된 tangshenoside I의 함량은 37.97 mg/g, Lobetyolin의 함량은 24.03 mg/g으로 확인되었다. 대표적인 폴리페놀 성분인 phenyl propanoid 계열의 tangshenoside I 과 polyacetylene 계열인 lobetyolin 두 성분 모두 중간 극성인 EA 분획물에서 높은 함량을 나타내었다. Tangshenoside I

**Table 5. Tangshenoside I and lobetyolin content in *C. lanceolata***

	50% Ethanol extract	Ethyl acetate fraction
Tangshenoside I (mg/g)	2.97±0.01	37.97±0.03
Lobetyolin (mg/g)	1.2±0.00	24.03±0.16

**Table 6. Tyrosinase inhibitory activity of main component in EA fraction of *C. lanceolata***

	Tangshenoside I	Lobetyolin
Mono-PO <sup>1)</sup>	53.0%±0.21	40.2%±0.02
Di-PO	18.6%±0.09	27.7%±0.13

<sup>1)</sup> Phenolase oxidase

과 lobetyolin의 표준품을 구매하여 tyrosinase 저해활성 연구를 진행한 결과는 Table 6에 나타내었다. Tangshenoside I의 경우 0.25 mg/mL에서 53%의 monophenolase oxidase 저해율을 보였고, 18.6%의 diphenolase oxidase 저해율을 보여 tyrosinase 활성을 저해시켰다. Lobetyolin의 경우 0.25 mg/mL에서 40.2%의 monophenolase oxidase 반응을 저해시켰고, 27.7%의 diphenolase oxidase 저해율을 보여 tyrosinase 활성을 저해시켰다. 이를 통해 EA 분획물 내 tangshenoside I과 lobetyolin의 tyrosinase 저해효과를 확인할 수 있었다. 알려진 보고로는 tangshenoside I은 식후 고혈당을 줄여 2형 당뇨병에 기여하는  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 알려져 있고, lobetyolin은 체내 독소인 요산생성을 억제하여 통풍예방에 기여하는 xanthine oxidase 저해제로 알려져 있지만 두 성분에 대한 생리학적 활성 연구는 미비한 실정이다. 더덕 EA 분획물과 EA 분획물 내 성분들에 대한 다양하고 깊은 생리활성 연구가 필요할 것으로 사려되며, 건강 기능식품 소재 및 화장품 소재로서 더덕의 활용 방안을 모색해야 할 것으로 생각된다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 더덕의 항산화 활성과 멜라닌 생합성 저해 효과를 확인하고자 하였다. 더덕의 50% ethanol 추출물과 극성에 따른 용매 분획물(*n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water)을 이용하여 실험한 결과, 더덕의 총 폴리페놀 함량은 EA(ethyl acetate) 분획물에서 가장 높은 116.04 mg gallic acid/g을 보였고, 총 플라보노이드 함량 또한 EA 분획물이 가장 높은 함량을 보였으며, 82.85 mg catechin/g였다. 또한 항산화능의 지표인 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성을 측정된 결과, EA 분획물이 각각 0.03 mg/mL, 0.05 mg/mL의 IC<sub>50</sub>값을 보여 가장 높은 항산화 활성을 보였으며 tyrosinase 저해활성을

측정한 결과, EA 분획물 0.25 mg/mL에서 55%의 monophenolase oxidase 저해활성을 보였고, 동일 농도에서 23%의 diphenolase oxidase 저해활성을 확인하였다. EA 분획물 내 성분 분석을 위해 Q-TOF/MS를 측정한 결과, 주성분으로 tangshenoside I과 lobetyolin이 있음을 확인하였고, 이를 정량한 결과 EA 분획물에서 37.97 mg/g의 tangshenoside I 함량과 24.03 mg/g의 lobetyolin 함량이 함유되어 있음을 확인하였다. 이를 통해 더덕 50% ethanol 추출물과 EA 분획물의 높은 항산화 활성과 멜라닌 저해활성을 확인하였고, 위 데이터를 기반으로 천연 화장품 소재로서 더덕의 활용 가능성을 제기하는 바이다.

## 감사의 글

본 연구는 2019년도 농촌진흥청 연구사업(과제번호:PJ013541012019) 및 국립농업과학원 전문연구원 과정 지원 사업(과제번호:PJ013541012019)에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- Aga EB, Li HJ, Chen J, Li P. 2012. Chemical constituents from the aerial parts of *Codonopsis nervosa*. *Chin J Nat Med* 10:366-369
- Ahn S, Kim J, Cho H, Park SY, Hwang KT. 2016. Physico-chemical and sensory characteristics of hot water extracts of *Codonopsis lanceolata* root skin and flesh with different heat treatments. *Korean J Food Sci Technol* 48:104-110
- Albertazzi P, Steel SA, Clifford E, Bottazzi M. 2002. Attitudes towards and use of dietary supplementation in a sample of postmenopausal women. *Climacteric* 5:374-382
- Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Ridant AL. 1998. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biol Med* 25:113-120
- Boissy RE, Manga P. 2004. On the etiology of contact/occupational vitiligo. *Pigment Cell Res* 17:208-214
- Chan EWC, Lim YY, Wong LF, Lianto FS, Wong SK, Lim KK, Joe CE, Lim TY. 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem* 109:477-483
- Cho EJ, Ju HM, Jeong CH, Eom SH, Heo HJ, Kim DO. 2011. Effect of phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on antioxidant capacity and tyrosinase inhibition. *Korean J Horti Sci Technol* 29:358-365

- Choi MH, Kim KH, Yook HS. 2019. Antioxidant and antibacterial activity of premature mandarin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:622-629
- Du YE, Lee JS, Kim HM, Ahn JH, Jung IH, Ryu JH, Choi JH, Jang DS. 2018. Chemical constituents of the roots of *Codonopsis lanceolata*. *Arch Pharmacol Res* 41:1082-1091
- Hwang BS, Kim JY, Jang M, Kim GC, Park YH, Hwang IG. 2018. Quantitative analysis of tangshenoside I and lobetyolin from Korean deoduk (*Codonopsis lanceolata*). *Korean J Food Nutr* 31:957-963
- Hwang IG, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38:342-347
- Ichikawa M, Ohta S, Komoto N, Ushijima M, Kodera Y, Hayama M, Shirato O, Sekita S, Kuroyanagi M. 2009. Simultaneous determination of seven saponins in the roots of *Codonopsis lanceolata* by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Nat Med* 63:52-57
- Im DY, Lee KI. 2017. Antioxidative activity and tyrosinase inhibition effect of fractions from the extract of *Inonotus obliquus*. *Korean J Pharmacogn* 48:46-50
- Jeong MJ, Yang J, Choi WS, Kim JW, Kim SJ, Park MJ. 2017. Chemical compositions and antioxidant activities of essential oil extracted from *Neolitsea aciculata* (Blume) Koidz leaves. *J Korean Wood Sci Technol* 45:96-106
- Jeong SM, Kim SY, Kim IH, Go JS, Kim HR, Jeong JY, Lee HY, Park DS. 2013. Antioxidant activities of processed deoduck (*Codonopsis lanceolata*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:924-932
- Jung YH, Ryu MJ. 2018. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Codonopsis lanceolata* skin extracts. *Asian J Beauty Cosmetol* 16:347-357
- Kim JY, Kim JY, Jenis J, Li ZP, Ban YJ, Baiseitova A, Park KH. 2019. Tyrosinase inhibitory study of flavonolignans from the seeds of *Silybum marianum* (milk thistle). *Bioorg Med Chem* 27:2499-2507
- Kim WB, Park SH, Hwang HS, Woo JY, Lee HR, Hwang DY, Choi JH, Lee H. 2012. Antioxidative activities and whitening effects of solvent fraction from *Prunus davidiana* (Carriere) Franch. fruit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:1363-1370
- Lee HJ, Kim MJ, Park JH, Park E. 2012. Antioxidative and antigenotoxic activity of white and yellow *Chrysanthemum morifolium ramat* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:289-294
- Lee NH, Hong J, Kim JY, Chiang MH. 2009. Antioxidant properties and protective effects of *Inula britannica* var. *chinensis* Regel on oxidative stress-induced neuronal cell damage. *Korean J Food Sci Technol* 41:87-92
- Ma XQ, Leung AKM, Chan CL, Su T, Li WD, Li SM, Fong DWF, Yu ZL. 2014. UHPLC UHD Q-TOF MS/MS analysis of the impact of sulfur fumigation on the chemical profile of *Codonopsis radix* (Dangshen). *Analyst* 139:505-516
- Mo JH, Kim MA, Kang EJ. 2013. A comparative study of the physiological activities of skin between *Codonopsis lanceolata* and fermented *C. lanceolata* extracts as cosmetic ingredient. *Korean J Human Beauty Art* 14:49-60
- Nugroho A, Lim SC, Park HJ. 2012. Qualitative analysis of phenolic substances in artemisia capillaris by LC-MS. *Korean J Pharmacogn* 43:302-307
- Park SY, Lee KJ, Yi TH. 2009. Effect of *Buddleja officinalis* MAXIM on melanin biosynthesis and anti-oxidative activity. *J Beau Trichol* 5:33-39
- Ryu SH, Jeon YS, Kwon MJ, Moon JW, Lee YS, Moon GS. 1997. Effect of kimchi extracts to reactive oxygen species in skin cell cytotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26:814-821
- Seong EH, Lee MJ, Kim H, Shin NR. 2018. Changes of efficacy of antioxidant, antidyslipidemic, antidiabetic and microbiological characteristics in fermented and salt-treated fermented *Codonopsis lanceolata*. *J Korean Med Obes Res* 18:106-114
- Suh JS, Eun JS. 1998. Isolation of active components on immunocytes from *Codonopsis lanceolatae*. *J Nutr Health* 31:1076-1081
- Tripathi AK, Sama JK, Taneja SC. 2010. An expeditious synthesis of syringaldehyde from para-cresol. *Indian J Chem* 49B:379-381
- Umekawa H, Takada Y, Furuichi Y, Takahashi T, Achiwa Y, Komiya T, Yoshida S. 1999. Inhibition of eukaryotic DNA polymerase alpha by persimmon (*Diospyros kaki*) extract and related polyphenols. *Biochem Mol Biol Int* 47:795-801
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84
- Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, Lee MH. 2006. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J Ethnopharmacol* 106:353-359



- Xia Y, Liu F, Feng F, Liu W. 2017. Characterization, quantitation and similarity evaluation of *Codonopsis lanceolata* from different regions in China by HPLC-Q-TOF/MS and chemometrics. *J Food Compos Anal* 62:134-142
- You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choe M. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of

*Paeonia suffruticosa* water extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:292-296

---

Received 02 October, 2019  
Revised 18 October, 2019  
Accepted 04 November, 2019