

## 더덕 사포닌인 lancemasides의 최적 추출 방법 구명

이민주<sup>1</sup> · 남주희<sup>1</sup> · 엄인석<sup>1</sup> · 강창근<sup>2,3</sup> · 노일래<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 농학과, <sup>2</sup>경상대학교 수의학과, <sup>3</sup>경상대학교 농업생명과학연구원

### Determination the optimum extraction method for saponin lancemasides in *Codonopsis lanceolata*

Min Ju Lee<sup>1</sup>, Ju Hee Nam<sup>1</sup>, In Eeok Um<sup>1</sup>, Chang Keun Kang<sup>2,3</sup>, and Il Rae Rho<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agronomy, Gyeongsang National University

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

<sup>3</sup>Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

**Abstract** This study was conducted to select the optimal extraction method of *codonopsis lanceolata* saponin. To investigate the lancemasides content depending on each extraction method, various extractions were performed: reflux (methanol and butanol), hot water, as well as ultrasonic bath (40 kHz; continuous irradiation/interval irradiation) and ultrasonicator (20 kHz) extractions. From the result, the overall lancemasides content were the highest in ultrasonic bath (MeOH; continuous irradiation) extraction, followed by ultrasonic bath (water; continuous irradiation)>ultrasonic bath (MeOH; interval irradiation)>ultrasonicator (MeOH)>hot water>MeOH reflux>BuOH reflux extractions in that order. Sample drying method prior to ultrasonic bath extraction was more effective shade drying than freeze drying. Effective duration and temperature of extraction was 2 hr at 64°C. And ingredient change diverted from aster saponin Hb to lancemasides was identified by extraction condition such as extraction time and temperature.

**Keywords:** fraction, mass, reflex extraction, ultrasonic bath, ultrasonicator

## 서 론

더덕(*Codonopsis lanceolata* Trautv.)은 다년생 초본의 덩굴성 식물로 초롱꽃과에 속한다. 더덕은 일반적으로 우리나라 전 지역에서 재배가 가능하고 우리나라 뿐만 아니라 중국, 일본, 등지에 분포되어 있다.

더덕은 전통적으로 진해, 거담, 두통에 효과가 있는 것으로 알려져 있고(Kim과 Chung, 1975), 최근에는 현대인들의 주요 관심인 사포닌, 플라보노이드, 페놀과 같이 노화를 예방하는 항산화 성분을 포함하고 있다(Chae와 Jung, 2013; Jin과 Wang, 2013; Kim 등, 2004). 더덕의 사포닌 성분 중 lancemaside A는 비만예방(Choi 등, 2013; Han 등, 1998), 대장염 완화(Joh 등, 2010; Kim 등, 2014b), 기억력 및 불면증 개선(Jung 등, 2012), 항염증(Joh와 Kim, 2010)등에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있어 소비자들의 관심이 증가하는 추세이다. 이에 따라 더덕의 재배면적은 2010년 1,647 ha에서 2017년 2,610 ha로 증가하였고, 생산량도 2010년 7,859 톤에서 2017년 8,167 톤으로 증가하여 특용작물 중 인삼과 오미자 다음으로 국내에서 많이 재배되고 있다(MAFRA, 2018).

더덕은 단백질, 당질, 섬유질, 비타민, 칼슘 등 일반 식물들이 가지는 성분을 가지고 있을 뿐만 아니라 주요 약리작용의 성분으로 알려진 사포닌이라는 성분을 함유하고 있다. 더덕의 사포닌은 triterpenoid saponin으로 lancemasides, codonolalides, eclalbasaponin, echinocystic acid 등 20여종 정도 있는 것으로 보고되고 있으나(He 등, 2015), lancemaside A, lancemaside B, lancemaside C, lancemaside E, lancemaside G, foetidissimoside A, aster saponin Hb 등이 더덕의 주요한 사포닌이며, 이 중 lancemaside A가 더덕 뿌리에서 가장 풍부하게 존재하는 주 사포닌인 것으로 알려져 있다(Ichikawa 등, 2009).

더덕 사포닌(lancemasides)의 추출은 건조, 추출, 농축, 분획, 동결건조 등의 여러 과정을 거쳐 얻어지는데 건조, 추출, 분획 과정에 있어서 연구자마다 다소 차이가 있다. 건조는 열풍 건조나 음건을 주로하고, 추출은 메탄올을 용매로 한 환류 추출(Kim 등, 2008), 진탕 추출(Han 등, 1998), 초음파 추출(Choi 등, 2006; Kim 등, 2014a), 초고압 추출(Park 등, 2010), 열수 추출(Lee, 2002; Park 등, 2009; Wang 등, 2011) 등 다양한 추출 방법이 이용되고 있다. 추출 시 용매는 유기 용매인 메탄올, 부탄올, 에탄올 등을 주로 사용하는데, Ichikawa 등(2009)이 메탄올의 농도에 따른 추출 수율을 실험 한 결과 70%로 추출 했을 때 가장 많은 사포닌을 얻었으며, Kim 등(2008)이 추출 용매에 따른 실험을 실시한 결과 에탄올, 메탄올에서 많은 사포닌을 추출했다고 보고되고 있으나 경제적 효율 등을 고려하면 메탄올이 적절한 것으로 알려지고 있다. 또한 추출 후 분획을 실시할 때 분획 층은 주로 비극성-극성 물질들이 추출되도록 용매를 사용하고 있다. 주로 methanol, hexane, chloroform, ethyl ether, ethyl acetate, butanol,

\*Corresponding author: Il Rae Rho, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea  
Tel: +82-55-772-1877  
Fax: +82-55-772-1879  
E-mail: irno12@gnu.ac.kr  
Received January 24, 2019; revised March 15, 2019;  
accepted March 28, 2019

water층 등으로 계통 분획하여 각 분획층 별 추출물을 실험 목적에 맞게 다양한 실험에 이용하고 있다. 사포닌 추출을 위해서는 분획 층 중 methanol 층(Ichikawa 등, 2009), butanol 층(Joh 등, 2010) 또는 water 층(Choi 등, 2013)을 이용하거나 분획없이 초음파 추출(Kim 등, 2014a)을 하는 등 더덕의 사포닌 추출은 각 연구자마다 사용되는 추출 방법이나 추출 조건이 다양하여 더덕의 사포닌 함량에 대한 혼선이 발생할 수 있다.

따라서 본 연구는 더덕의 사포닌 추출에 이용되어 왔던 추출 방법들을 상호 비교하여 더덕의 주요 사포닌인 lancemasides의 최적 추출 방법을 구명하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 전처리

거창에서 수확한 2년생 더덕 10 kg을 수세하고 음건한 후 분쇄하여 40 mesh 체로 거른 후 처리당 더덕 분말 10 g을 1반복으로 3반복하여 각 용매를 분말의 10배가 되도록 하여 추출하였다.

### 추출 방법

환류 추출 및 분획(reflux and fraction extraction): 70% 메탄올로 2시간 환류 추출하여 여과 후 감압농축(R-520, Ilshin, Daejeon, Korea)하고 여기에 60 mL의 증류수를 가하여 회수한 후 물 층과 동량의 hexane, ethyl acetate, butanol, water 층 순으로 분획하였다(Shibata 등, 1966). 분획한 각 층을 감압농축하여 초저온 냉동고(deep-freezer)에 보관 후 동결건조기(FD8508, Ilshin Biobase, Dongducheon, Korea)로 48시간 동결건조하였다. 건조 시료는 HPLC grade water로 시료 무게의 100배 희석하여 LC-MS/MS 분석에 이용하였다.

열수 추출(hot-water extraction)의 경우 수포화 부탄올(BuOH; water saturated butanol)과 70% 메탄올로 1시간 2회 환류 추출하여 여과 후 감압농축하고 동결건조 후 분석에 이용하였다.

열수 추출(hot-water extraction): 증류수로 1시간 1회 끓는 물에 추출하여 여과 후 감압농축하고 동결건조 후 분석에 이용하였다.

초음파 추출(ultrasonicator, ultrasonic bath); Ultrasonicator 추출은 70% 메탄올로 2시간 1회, 음파 진동수는 pulse on 4초, pulse off 10초(04/10)로 하여 초음파 추출기(VCX130(20 kHz, 130 W), Sonic & Material Inc., Newtown, CT, USA)로 추출한 후 여과, 감압농축하고 동결건조 후 분석에 이용하였다. 초음파 추출기의 추출 시간 및 음파 진동에 따른 사포닌 추출 함량을 구명하기 위해 추출 시간은 1, 2시간으로 설정하였고 음파 진동은 pulse on 2초, pulse off 10초(02/10), pulse on 6초, pulse off 10초(06/10), pulse on 10초, pulse off 10초(10/10)로 설정하여 추출을 실시하였다. Ultrasonic bath 추출은 70% 메탄올과 물(증류수)로 2시간 1회 54°C에서 초음파 세척기(JAC-3010 (40 kHz, 200 W), Kodo, Hwaseong, Korea)를 이용하여 초음파 조사를 달리하여 추출 하였다. 추출은 interval irradiation (on 0.5초/off 0.5초)와 continuous irradiation로 나누어 추출하였고, 여과 후 감압농축하고 동결건조 후 분석 시료로 이용하였다.

초음파(ultrasonic bath)의 최적 추출 방법 구명을 위해 시료를 건조하는 방법에 따라 더덕을 세절하고 동결건조와 음건(상온에서 건조)하여 선별된 초음파 추출 방법에 준하여 추출을 실시하였다. 최적 추출 시간 및 온도 구명을 위해 1-4시간 동안 한 시간 간격으로 추출 시간 실험을 실시하였고, 추출 온도는 34, 44, 54, 64, 70°C에서 추출을 실시하였다.

### LC-MS/MS 분석

LC-MS/MS (Qtrap, AB Sciex Co., Framingham, MA, USA) 분석은 Ichikawa 등(2009)의 방법과 Kim 등(2014a)의 방법을 참조하여 분석하였다. Column은 YMC-Pack Pro C18 RS Column (150×2.0 mm×I.D., 5 μm, YMC Korea Co., Ltd., Seongnam, Korea)을 사용하였고 column의 온도는 40°C로 설정하였다. 이동상은 0.1% formic acid in water:acetonitrile (70:30, v/v; Daejung Chemicals and Metals Co., Ltd., Siheung, Korea)를 이용하였고, 유속은 0.2 mL/min, injection volume 20 μL씩 주입하여 분석하였다.

Mass spectrometer는 negative ion mode selected ion monitoring (SIM) 하에서 작동하였다. Electrospray ionization (ESI)는 4.5 kV spray voltage로 수행하였다. Capillary voltage는 -40 V, tube lens offset은 130 V로 각각 고정하여 수행하였다. Capillary temperature는 400°C로 고정하였다. Sheath gas와 auxiliary gas로 사용된 nitrogen는 각각 35, 5 arbitrary units로 유지하였다. Lancemaside A는 *m/z* 1,189, lancemaside B는 *m/z* 1,351, lancemaside G는 *m/z* 1,205, aster saponin Hb는 *m/z* 925로 분석하였다. 내부 표준 물질로는 ginsenoside Rg1 (Ambo Institute, Daejeon, Korea)을 이용하여 최종 농도를 0.01, 0.1, 1, 10 ppm 농도로 희석하여 정량 분석에 이용하였다.

### 통계분석

본 연구의 실험 데이터는 처리당 3반복으로 측정하였고, 수집된 데이터는 SPSS (SPSS version 21, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 실시한 후, Duncan's multiple range test (DMRT)을 통해 5% 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 추출 방법에 따른 lancemasides 함량

현재까지 더덕 사포닌인 lancemasides 추출하기 위해 메탄올을 이용한 환류 추출 추출이 가장 많이 이용되고 있는데(Choi 등, 2006; Kim 등, 2014b; Park 등, 2010), 더덕의 주요 사포닌인 lancemasides의 최적 추출 방법 구명을 위해 기존에 가장 많이 이용되어진 환류 추출 후 분획 층에 따른 lancemasides 함량을 분석한 결과 water 층에 가장 많이 존재하였고 그 다음이 butanol 층이었고, hexane과 ethyl acetate 층은 lancemasides가 없거나 극소량 존재하였다(Table 1). 이것은 hexane과 ethyl acetate가 water, butanol에 비해 비극성 물질로 더덕 사포닌은 극성이 강해 water 층에서 lancemasides 함량이 높은 것으로 사료된다(Choi 등, 2006). Water 층의 lancemasides의 성분은 lancemaside A>lancemaside G>lancemaside B>aster saponin 순이었고, butanol 층도 lancemaside A>aster saponin>lancemaside G>lancemaside B 순으로 많이 함유하고 있어 분획 층과 관계없이 lancemaside A의 함량이 가장 높다는 것을 확인할 수 있었다. Ichikawa 등(2009)은 더덕 주요 사포닌은 7종이라고 하였는데 본 연구에서는 7종 중 4종이 검출되었고 나머지는 검출되지 않거나 극 미량으로 존재하였는데 이것은 더덕 시료의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

환류 추출 및 분획에 의한 lancemasides의 정제, 추출은 과정이 복잡할 뿐만 아니라 많은 시간과 노력이 요구되는 문제점이 있다. 따라서 더덕의 사포닌인 lancemasides를 효율적으로 추출하기 위해 환류 추출(MeOH, BuOH), 열수 추출(hot water), 초음파 추출(ultrasonicator (20 kHz), ultrasonic bath (40 kHz; continuous

irradiation, interval irradiation)) 등 추출 방법에 관한 실험을 수행하였다. 그 결과 총 lancesmasides 함량은 ultrasonic bath (MeOH; continuous irradiation)>ultrasonic bath (water; continuous irradiation)>ultrasonic bath (MeOH; interval irradiation)>ultrasonicator (MeOH)>열수 추출>MeOH 환류 추출>BuOH 환류 추출 순으로 높았고, 메탄올 환류 추출과 부탄올 환류 추출은 다른 추출 방법에 비해 그 함량이 매우 낮았다. 특히 MeOH 환류 추출은 환류 추출 후 분획 과정을 거친 것(Table 1)과 비교해 보았을 때도 lancesmasides의 함량이 매우 낮음을 확인할 수 있었다(Table 2.). 따라서 ultrasonic bath (40 kHz)와 ultrasonicator (20 kHz)을 이용한 초음파 추출이 열수 추출, 환류 추출(MeOH, BuOH)과 분획 추출보다 lancesmasides 함량이 높다는 것을 확인할 수 있었다. 기존 연구에서 많이 사용하였던 환류 추출 시 3회 추출이나 1회 추출은 예비 실험 결과 큰 차이가 없어 1회 환류 추출 후 water 층과 초음파 추출을 비교해 보았을 때 초음파 추출(ultrasonic bath)에서 약 2.8배 가량 높게 추출되었다. 또한 추출 효율이 가장 높은 초음파 추출(ultrasonic bath; continuous irradiation)시 용매로 물(증류수)과 메탄올을 비교해 보았을 때 메탄올로 추출하는 것이 더 효과적임을 확인할 수 있었다(Table 2).

**초음파 추출의 최적 추출 방법**

Ultrasonicator (20 kHz)의 음파 진동 및 추출 시간에 다른 lancesmasides 함량 변화를 조사한 결과, ultrasonicator의 초음파의 진동인 pulse는 10초 간격으로 6초 조사(이하 06/10) 했을 때 lancesmasides 함량이 가장 높았고, 그 다음으로 02/10, 10/10순으로 높았다(Table 3). 추출 시간은 1시간이 2시간보다 lancesmasides 함량이 높았다. 초음파 추출에서 ultrasonicator (20 kHz)의 추출 시간과 음파 진동을 달리하여도 ultrasonic bath (40 kHz)보다 lancesmasides 추출 함량이 낮아 ultrasonic bath 추출이 보다 더 효율적이라는 것을 확인할 수 있었다(Table 2, Table 3). Lee와 Um (2008)에 따르면 초음파 주파수가 낮을수록 회절과 정제파가 강하고 입자가속도가 작은 특징이 있어 천연물을 추출하는데 일반적으로 20-90 kHz를 사용한다고 하였으나 Lee 등(2012)은 시료 조직에 따라 파장의 침투력이 추출 효과를 결정 짓는 중요한 변수라고 하여 시료 조직에 따라 최적 주파수가 달라질 수 있음을 보고하였다. Wu 등(2001)은 인삼의 ginsenoside 추출 시 초음파 주파수는 ultrasonicator (20 kHz)와 ultrasonic bath (40 kHz) 중 ultrasonic bath에서 우수하였고 추출 시간은 1-2시간이 적절하다고 하여 본 실험결과와 유사한 결과를 나타내었으나 초음파 주

**Table 1. Lancesmasides content in MeOH reflex extracts of *Codonopsis lanceolata* according to fraction layer**

Fraction extraction	Aster saponin Hb	Lancesmaside A	Lancesmaside B	Lancesmaside G	Total
	(mg/g)				
Hexane	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01 <sup>c</sup>
Ethyl acetate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BuOH	0.54 <sup>b</sup>	0.77 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.41 <sup>a</sup>	1.81 <sup>b</sup>
Water	0.04 <sup>a</sup>	1.60 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	2.30 <sup>a</sup>

Each value is a mean (n=3). Different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test (DMRT).

**Table 2. Lancesmasides content in *Codonopsis lanceolata* according to extraction method**

Treatment	Aster saponin Hb	Lancesmaside A	Lancesmaside B	Lancesmaside G	Total
	(mg/g)				
Reflex (MeOH)	0.10 <sup>c</sup>	0.52 <sup>d</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.20 <sup>c</sup>	0.87 <sup>c</sup>
Reflex (BuOH)	0.01 <sup>d</sup>	0.02 <sup>e</sup>	n.d.	0.01 <sup>c</sup>	0.04 <sup>c</sup>
Hot Water	0.31 <sup>ab</sup>	2.83 <sup>e</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.78 <sup>ab</sup>	4.18 <sup>b</sup>
Ultrasonicator (MeOH)	0.27 <sup>b</sup>	3.11 <sup>bc</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.26 <sup>c</sup>	4.30 <sup>b</sup>
Ultrasonic bath (MeOH) (Continuous irradiation)	0.10 <sup>c</sup>	6.26 <sup>a</sup>	0.46 <sup>ab</sup>	0.99 <sup>a</sup>	7.81 <sup>a</sup>
Ultrasonic bath (MeOH) (Interval irradiation)	0.23 <sup>b</sup>	4.32 <sup>b</sup>	0.36 <sup>ab</sup>	0.91 <sup>a</sup>	5.83 <sup>ab</sup>
Ultrasonic bath (Water) (Continuous irradiation)	0.56 <sup>a</sup>	4.76 <sup>b</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	6.05 <sup>ab</sup>

Each value is a mean (n=3). Different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test (DMRT).

**Table 3. Lancesmasides content in ultrasonicator (20 kHz) extracts according to extraction times and pulse**

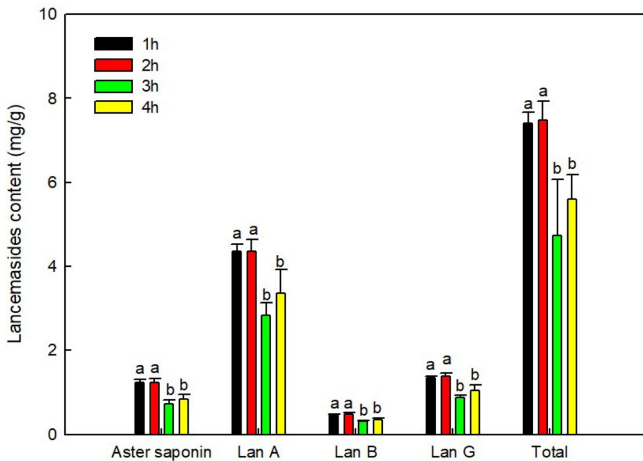
Treatment		Aster saponin Hb	Lancesmaside A	Lancesmaside B	Lancesmaside G	Total
		(mg/g)				
1 h	02/10 <sup>1)</sup>	0.27 <sup>b</sup>	3.22 <sup>ab</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.66 <sup>b</sup>	4.40 <sup>b</sup>
	06/10	0.31 <sup>a</sup>	3.49 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	4.82 <sup>a</sup>
	10/10	0.22 <sup>b</sup>	2.66 <sup>cd</sup>	0.24 <sup>bc</sup>	0.57 <sup>bc</sup>	3.67 <sup>cd</sup>
2 h	02/10	0.25 <sup>b</sup>	3.06 <sup>bc</sup>	0.26 <sup>bc</sup>	0.63 <sup>bc</sup>	4.20 <sup>bc</sup>
	06/10	0.20 <sup>c</sup>	2.61 <sup>de</sup>	0.23 <sup>bc</sup>	0.55 <sup>cd</sup>	3.60 <sup>de</sup>
	10/10	0.18 <sup>c</sup>	2.37 <sup>e</sup>	0.21 <sup>c</sup>	0.51 <sup>d</sup>	3.27 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup>02/10: pulse on 2 s., pulse off 10 s., 06/10: pulse on 6 s., pulse off 10 s., 10/10: pulse on 10 s., pulse off 10 s. Each value is a mean (n=3). Different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test (DMRT).

**Table 4. Lancemasides content according to sample dry method before ultrasonic bath (40 kHz) extracts in *Codonopsis lanceolata***

Treatment	Aster saponin Hb	Lancemaside A	Lancemaside B	Lancemaside G	Total
	(mg/g)				
Freeze drying	0.02 <sup>b</sup>	0.74 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>
Shade drying	2.04 <sup>a</sup>	2.36 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.62 <sup>a</sup>	5.27 <sup>a</sup>

Each value is a mean (n=3). Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test (DMRT).



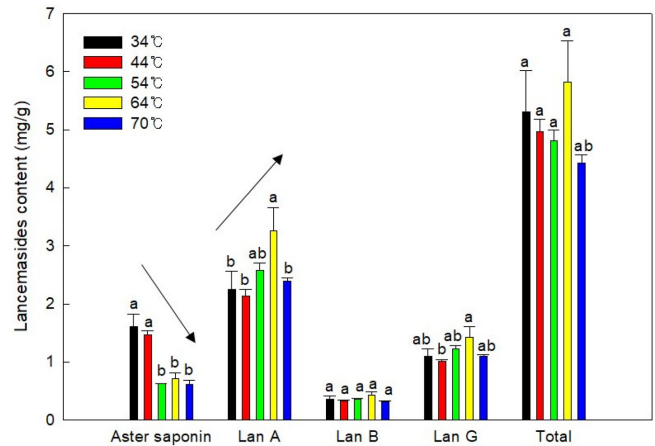
**Fig. 1. Comparison of lancemasides content in ultrasonic bath (40 kHz) extracts according to extraction times.** Aster saponin; aster saponin Hb, Lan A; lancemaside A, Lan G; lancemaside G, Lan B; lancemaside B. Vertical bars represent standard error of the means (n=3). Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test (DMRT).

파수와 사포닌 함량 추출 간에는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ultrasonic bath를 이용한 초음파 추출의 최적 추출 방법을 구명하기 위해 추출 전 시료 건조 방법, 추출 온도, 추출 시간에 관한 실험을 수행한 결과 더덕의 건조 방법에 따른 lancemasides 함량은 모든 종류의 lancemasides 성분들이 동결건조를 시키는 것보다 음건하였을 때 더 높았고 총 lancemasides 함량도 동결건조보다 음건이 약 4.8배 높게 나타났다(Table 4). Lee 등(2014)은 도라지의 건조 방법에 따른 사포닌 함량을 조사한 결과 도라지 사포닌인 platycodin류는 열풍 건조가 동결건조보다 사포닌 함량이 더 높다고 하여 더덕, 도라지와 같은 초롱꽃과의 사포닌은 동결건조보다 음건이나 열풍건조가 사포닌 추출에 더 적절한 방법이라 사료된다.

Ultrasonic bath추출 시 추출 시간에 따른 lancemasides 함량을 분석한 결과 모든 lancemasides 성분들이 1, 2시간이 3, 4시간 보다 더 높은 함량을 보였다. 1시간과 2시간의 lancemasides 함량은 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 2시간이 다소 높은 경향이 었다(Fig. 1). Lee 등(2015)은 홍삼 추출 과정에 따라 고분자 진세노사이드가 가수분해되어 저분자 진세노사이드가 형성된다고 하였고, Kim 등(1998)은 인삼 사포닌의 경우 추출 온도, 추출 시간, 용매 효과 및 인삼 자체가 함유하고 있는 유기산류로 인해 사포닌 가수분해가 발생한다고 하였다. 따라서 본 연구에서도 초음파 추출 시간이 사포닌의 가수분해에 영향을 미쳐 다른 성분으로 변화되거나 더덕에서 아직 밝혀내지 못한 희귀 사포닌으로 분해되어 그 함량이 감소된 것으로 사료된다.

추출 온도 실험은 추출 용매인 메탄올의 끓는점인 64°C를 기

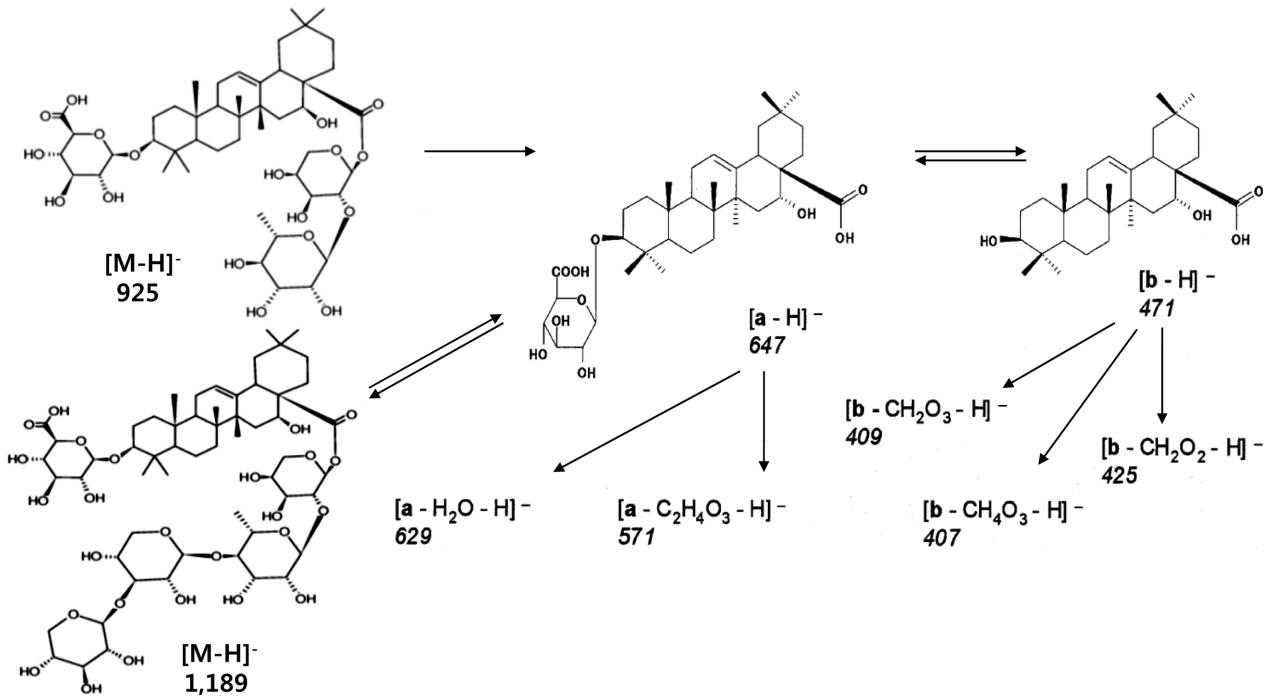


**Fig. 2. Comparison of lancemasides content in ultrasonic bath (40 kHz) extracts according to extraction temperature.** Aster; aster saponin Hb, Lan A; lancemaside A, Lan G; lancemaside G, Lan B; lancemaside B. Vertical bars represent standard error of the means (n=3). Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test (DMRT).

준으로 하여  $\pm 10^\circ\text{C}$  간격으로 34-70°C까지 실험을 실시하였다. 그 결과 aster saponin은 34, 44°C에서 가장 높았고 온도가 높아질수록 함량이 낮아지는 경향을 보였다. Lancemaside A, G는 64°C까지 온도가 높아질수록 함량이 높아지는 경향을 보이다가 70°C부터 다시 낮아졌다(Fig. 2). Lancemaside B의 함량은 다른 lancemaside에 비해 함량이 다소 적었으며 추출 온도 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 총 lancemaside함량은 처리간 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 64°C에서 가장 높은 경향을 보였다. 그리고 70°C에서는 모든 종류의 lancemasides 함량이 다른 온도에 비해 낮아 더덕의 사포닌 추출에 적합하지 않은 온도라는 것을 확인하였다(Fig. 2).

#### 추출 조건에 따른 lancemasides의 성분 변화

홍삼의 경우 85°C에서 ginsenoside의 추출 시간이 길어짐에 따라 Rd, Rf, Rg2, Rg3, Rh1 및 Rh2의 함량은 증가하고 Rb1, Rb3, Re 및 Rg1 등은 오히려 크게 감소 한다고 하였다. 이것은 온도 안전성이 낮은 Rb1, Rb3, Re 및 Rg1 등의 ginsenosides가 가수분해되어 Rg3로 전환된 것으로 추정하고 있다(Lee 등, 2008; Lee 등, 2013). 홍삼과 마찬가지로 더덕의 lancemasides 함량을 분석한 결과 aster saponin과 lancemaside A 사이에서 부의 상관관계를 보이는 경향이 있어, 더덕의 사포닌 성분 중 열에 약한 aster saponin이 분해되고 이것이 주로 lancemaside A로 전환된 것으로 보여진다. 즉, 질량분석에서 aster saponin의 분자량 [M-H]<sup>-</sup>은 m/z 925인데 MS<sup>2</sup>에서 product ion은 647 (100%), MS<sup>3</sup>에서 629 (83%), 585 (97%), 571 (29%), 471 (100), MS<sup>4</sup>에서는 425 (25%), 409 (25%), 407 (100%)로 각각 분리된다(Fig. 3). 반면 lancema-



**Fig. 3. Schematic diagram of the proposed fragmentation of aster saponin Hb ( $m/z$  925) and lancemside A ( $m/z$  1,189) in the native ion mode.** The deprotonated molecules ( $[M-H]^-$ ) were observed as the base peak in the MS spectrum. Numbers mean molecular weight of  $[a$  or  $b$ -molecular formula] in the native ion mode.  $a$  and  $b$  show unknown substances. The  $m/z$  647 was produced in the  $MS^2$  spectrum of the  $m/z$  925 and 1,189  $[M-H]^-$  ion. Six main product ions were observed at the  $m/z$  629, 571, and 471 in the  $MS^3$  spectrum and the  $m/z$  409, 407, and 425 in the  $MS^4$  spectrum.

side A의 분자량  $[M-H]^-$ 은  $m/z$  1,189이고  $MS^2$ 에서, 647 (100%),  $MS^3$ 에서 629 (89%), 571 (42%), 471 (100%),  $MS^4$ 에서는 425 (23%), 409 (29%), 407 (100%)로 각각 분리된다(Ichikawa 등, 2009). 여기서  $MS^2$ 의 product ion  $m/z$  647이 aster saponin과 lancemside A에 공통적으로 생성되는데 이것은 prosapogenin이 되고, 이것이 aglycone형태로 분해되면  $m/z$  471이 되는데 이것은 echinocystic acid가 된다(Ushijima 등, 2008). 홍삼은 증삼과정에서 온도 증가에 따라 당잔기(glycosyl residue)가 제거 되고 선택적 수산기의 공격에 의해 새롭게 생성된다고 알려져 있다(Nam 등, 2013). 따라서 더덕의 사포닌도 온도 증가에 따라 당잔기가 제거 된 aglycone형태로 되고 이것이 수산기의 공격적 결합에 의해 새롭게 lancemside A, B, G의 형태로 합성되는 것으로 사료된다. 홍삼의 경우 온도 증가에 따라 7종의 ginsenoside (Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rd) 함량은 감소되고 prosapogenin 5종의 ginsenoside (Rh1, Rg2, 20R-Rg2, Rg3, Rh2)은 증가되었다고 하나 총 ginsenoside 함량은 오히려 감소되었다(Wang 등, 2007)는 보고와 같이 더덕에서 aster saponin이 열에 의해 분해되어 다시 lancemside A, B, G등으로 합성되어진 것으로 보이며, 총 함량에 있어서 64°C까지는 큰 변화가 없으나 70°C에서는 다소 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

따라서 더덕 사포닌의 최적 추출 방법은 ultrasonic bath (MeOH)를 이용한 초음파 추출이었고, 추출 전 시료 건조 방법은 음건, 추출 시간은 2시간, 추출 온도는 64°C에서 추출 하는 것이 효과적임을 확인할 수 있었고 추출 온도 및 시간에 따라 lancemasides 내의 성분 변화가 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 초음파 추출은 기존에 주로 이용하던 환류 추출 및 분획을 실시했을 때 보다 사포닌 함량이 높았을 뿐만 아니라 추출 시간, 추출 비용, 노동력을 절감할 수 있을 것이라 사료된다.

## 요 약

본 연구는 더덕 사포닌의 최적 추출 방법을 구명하기 위해 수행되었다. 추출 방법에 따른 lancemasides 함량을 조사하기 위해 환류 추출(MeOH, BuOH), 열수 추출(Hot water), 초음파 추출(ultrasonic bath (40 kHz; continuous irradiation, interval irradiation), ultrasonicator (20 kHz))을 실시하였다. 그 결과, 총 lancemasides 함량은 ultrasonic bath (MeOH; continuous irradiation) 추출에서 가장 높았고, ultrasonic bath (water; continuous irradiation) 추출>ultrasonic bath (MeOH; interval irradiation) 추출>ultrasonicator 추출>열수 추출>메탄올 환류 추출>부탄올 환류 추출 순으로 높았다. 따라서 더덕 사포닌의 최적 추출 방법은 MeOH을 이용한 초음파(ultrasonic bath, 40 kHz) 추출이었고, 추출 전 시료 건조 방법은 동결건조보다 음건으로 건조하는 것이 lancemasides 추출에 더 효과적이었다. 또한 초음파 추출 시 추출 시간은 2시간, 추출 온도는 64°C에서 추출 하는 것이 효과적임을 확인할 수 있었다.

따라서 초음파(ultrasonic bath)추출은 기존에 주로 이용하던 환류 추출 및 분획을 실시했을 때 보다 많은 양의 사포닌(lancemasides)을 추출할 수 있었다. 그리고 추출 시간과 온도와 같은 추출 조건에 따라 aster saponin Hb가 lancemside류로 성분 변화가 일어나는 것을 확인하였다. 특히 추출 온도가 증가함에 따라 aster saponin의 함량이 줄어들고, lancemside A의 함량이 증가하는 것으로 보아 추출 온도가 사포닌 성분 변화에 영향을 주는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(PJ013834)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Chae HS, Jung SS. A study on the quality characteristics of yanggaeng with *Codonopsis lanceolata* skin extracts. Korean J. Food & Nutr. 26: 990-995 (2013)
- Choi MY, Oh HS, Kim JH. Changes of physicochemical properties of cultivated *Codonopsis lanceolata* stored at various storage conditions. Korean J. Plant Res. 19: 59-67 (2006)
- Choi HK, Won EK, Jang YP, Choung SY. Antiobesity effect of *Codonopsis lanceolata* in high-calorie/high-fat-diet-induced obese rats. Evid. Evid-Based Compl. Alt. 210297 (2013)
- Han EG, Sung IS, Moon HG, Cho SY. Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the levels of lipid in rats fed high fat diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 940-944 (1998)
- He JY, Ma N, Zhu S, Komatsu K, Li ZY, Fu WM. The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): a review of phytochemistry, bioactivity and quality control. J. Nat. Med. 69: 1-21 (2015)
- Ichikawa M, Ohta S, Komoto N, Ushijima M, Koderia Y, Hayama M, Shirota O, Sekita S, Kuroyanagi M. Simultaneous determination of seven saponins in the roots of *Codonopsis lanceolata* by liquid chromatography-mass spectrometry. J. Nat. Med. 63: 52-57 (2009)
- Jin TY, Wang MH. Quality characteristics of *Codonopsis lanceolata* tea manufactured with sugar. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 753-758 (2013)
- Joh EH, Kim DH. Lancemaside A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by targeting LPS/TLR4 complex. J. Cell. Biochem. 111: 865-871 (2010)
- Joh EH, Lee IA, Han SJ, Chae SJ, Kim DH. Lancemaside A ameliorates colitis by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in TNBS-induced colitis mice. Int. J. Colorectal Dis. 25: 545-551 (2010)
- Jung IH, Jang SE, Joh EH, Chung J, Han MJ, Kim DH. Lancemaside A isolated from *Codonopsis lanceolata* and its metabolite echinocystic acid ameliorate scopolamine induced memory and learning deficits in mice. Phytomedicine 20: 84-92 (2012)
- Kim CS, Choi KJ, Kim SC, Ko SY, Sung HY, Lee YG. Controls of the hydrolysis of ginseng saponins by neutralization of organic acid in red ginseng extract preparations. J. Ginseng Res. 22: 205-210 (1998)
- Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 696-701 (2008)
- Kim JP, Chon IJ, Cho HK, Ham IH, Whang WK. The antioxidant and the antidiabetic effects of ethanol extract from biofunctional foods prescriptions. Korean J. Pharmacogn. 35: 98-103 (2004)
- Kim JH, Chung MH. Pharmacognostical studies on *Codonopsis lanceolata*. Korean J. Pharmacogn. 6: 43-47 (1975)
- Kim JA, Moon HK, Choi YE. Triterpenoid saponin contents of the leaf, stem and root of *Codonopsis lanceolata*. Korean Soc. Med. Crop Sci. 22: 1-7 (2014a)
- Kim EJ, Yang WS, Park JG, Kim HG, Ko JY, Hong YD, Rho HS, Shin SS, Sung GH, Cho JY. Lancemaside A from *Codonopsis lanceolata* modulates the inflammatory responses mediated by monocytes and macrophages. Mediat. Inflamm. 2014: 405158 (2014b)
- Lee JH. Immunostimulatory effect of hot-water extract from *Codonopsis lanceolata* on lymphocyte and clonal macrophage. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 732-736 (2002)
- Lee JH, Cho SH, Yun MY, An SK, Jang HH, Lee SN, Song GY. Anti-wrinkle effect of rare ginsenosides, produced from ginsenoside Rd. Kor. J. Aesthet. Cosmetol. 13: 909-916 (2015)
- Lee BJ, Jeon SH, Lee SW, Chun HS, Cho YS. Effect of drying methods on the saponin and mineral contents of *Platycodon grandiflorum* Radix. Korean J. Food Sci. Technol. 46: 636-640 (2014)
- Lee SH, Kang JI, Lee SY. Saponin composition and physico-chemical properties of Korean red ginseng extract as affected by extracting conditions. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 256-260 (2008)
- Lee KJ, Ma JY, Kim YS. Identification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa*) using ultrasonic wave and dipping method. Biotechnol. Bioprocess Eng. 27: 33-39 (2012)
- Lee GS, Nam KY, Choi JE. Ginsenoside composition and quality characteristics of red ginseng extracts prepared with different extracting methods. Korean Soc. Med. Crop Sci. 21: 276-280 (2013)
- Lee KJ, Um BH. Extraction of useful component from natural plants using ultrasound system. Biotechnol. Bioprocess Eng. 23: 101-108 (2008)
- MAFRA (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs). Special Crops Production Performance 2017. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, Korea, pp. 22-23 (2018)
- Nam KY, Choi JE, Park JD. Transformation techniques for the large scale production of ginsenoside Rg3. Korean Soc. Med. Crop Sci. 21: 401-414 (2013)
- Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 1898-1902 (2010)
- Park SJ, Seong DH, Park DS, Kim SS, Gou JG, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. Chemical compositions of fermented *Codonopsis lanceolata*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 396-400 (2009)
- Shibata S, Tanaka O, Ando T, Sado M, Tsushima S, Ohsawa T. Chemical studies on oriental plant drugs. XIV. Protopanaxadiol, a genuine saponin of ginseng saponins. Chem. Pharm. Bull. 14: 595-600 (1966)
- Ushijima M, Komoto N, Sugizono Y, Mizuno I, Sumihiro M, Ichikawa M, Hayama M, Kawahara N, Nakane T, Shirota O, Sekita S, Kuroyanagi M. Triterpene glycosides from the roots of *Codonopsis lanceolata*. Chem. Pharm. Bull. 56: 308-314 (2008)
- Wang CZ, Aung HH, Ni M, Wu JA, Tong R, Wicks S, He TC, Yuan CS. Red american ginseng: Ginsenoside constituents and antiproliferative activities of heat-processed *Panax quinquefolius* roots. Planta Med. 73: 669-674 (2007)
- Wang L, Xu ML, Hu JH, Rasmussen SK, Wang MH. *Codonopsis lanceolata* extract induces G0/G1 arrest and apoptosis in human colon tumor HT-29 cells-involvement of ROS generation and polyamine depletion. Food Chem. Toxicol. 49: 149-154 (2011)
- Wu J, Lin L, Chau FT. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. Ultrason. Sonochem. 8: 347-352 (2001)