Biomedical Science Letters 2021, 27(3): 154~160
https://doi.org/10.15616/BSL.2021.27.3.154
eISSN : 2288-7415

Original Article

Isolation and Quantitative Analysis of Chemical Constituents in *Codonopsis lanceolata*

Yeongdon Ju[1,2,*], Jeong Wook Jeon[3,] and Kyung-Yae Hyun[4,†,***]**

[1]*Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea*
[2]*Clinical Trial Specialist Program for in Vito Diagnostics, Brain Busan 21 Plus Program, the Graduate School, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea*
[3]*Nutricare Co Ltd, Gangwon-do 25250, Korea*
[4]*Department of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea*

Codonopsis lanceolata has numerous chemical constituents that includes polyphenols, saponins, tannins, triterpene, alkaloids, and steroids. The extract of *C. lanceolata* was partitioned with Haxane, CH_2Cl_2, EtOAc, *n*-BuOH and MeOH. The determination of structure for lancemaside G, lancemaside B, lancemaside A were based on physicochemical and HPLC chromatogram data, including NMR and HR-MS. In addition, tangshenoside I and lobetyolin were identified in the material separation process for the extract of *C. lanceolata*, and content analysis was performed using HPLC. The compounds were confirmed as lancemaside G, lancemaside B, lancemaside A, tangshenoside I, and lobetyolin.

Key Words: *Codonopsis lanceolata*, Lancemaside G, Lancemaside B, Lancemaside A, Tangshenoside I, Lobetyolin

서 론

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 초롱꽃과에 속하는 다년생 덩굴식물로 뿌리는 직근으로 땅속 깊이 들어 있어 형상이 인삼, 도라지와 유사하며, 우리나라, 일본 및 중국 등에서 주로 약용과 식용으로 이용하고 있다(Choi and Choi, 1999; Kim et al., 2010). 우리나라의 경우 강원도 및 제주도에서 주로 생산되고 있다(Kim et al., 2010). 천연물, 농수산물 및 약용식물을 대상으로 생리 활성 평가 및 물질 분리에 대한 연구는 지속적으로 진행되어 왔고, 더덕을 대상으로 기능성 식품 및 화장품 등 다양한 목적으로 연구들이 진행되었다(Shim and Chun, 2012; Chung et al., 2014). 더덕은 전통 의학에서 널리 사용되었으며 기관지염, 기침, 경련, 정신 신경증, 암, 비만, 고지혈증, 부종 간염, 대장염 및 폐 손상과 같은 질병과 증상에 효과가 있다. 또한 polyphenols, saponins, tannins, triterpene, alkaloids, 및 steroids 등 다양한 생물학적 활성화합물을 지니고 있다(Hossen et al., 2016). 이 중 더덕의 saponin 성분은 강력한 항 염증 작용을 보인다고 알려져 있다(Byeon et al., 2009). 더덕의 saponin은 lancemaside A, lancemaside B, lancemaside C, lancemaside E, lancemaside G, foetidissimoside A, aster saponin Hb 등이 있다. 이 중 lancemaside A 성분이 더덕 뿌리에서 가장 풍부하게 존재한다고 알려져 있다(Shirota et al., 2008). 특히 더덕의 saponin 성분 중 lancemaside A는 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid의 작용으로 대장염을 완화하고 항 염증 활성과 관련이 있다고 보고되었다(Lee et al., 2019; Kim et al., 2014). 따라서 본 연구에서 더덕 추출물의 주요

Received: August 13, 2021 / Revised: September 13, 2021 / Accepted: September 14, 2021
*Graduate student, **Researcher, ***Professor.
†Corresponding author: Kyung-Yae Hyun. Department of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea.
Tel: +82-51-890-2683, Fax: +82-0505-182-6877, e-mail: kyhyun@deu.ac.kr
©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.
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.

한 성분인 saponin을 정제하여 지표성분의 함량 분석을 실시하여 더덕에서 유래한 생리활성물질에 대해 이용성을 확인하는 기초자료를 확보하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에서 사용한 더덕은 강원도 동횡성농협에서 구입한 더덕으로 (주)뉴트리케어에서 추출을 진행하였으며, 각각의 시료를 desiccator에 보관하여 사용하였다. 분석에 사용된 Distilled water, methanol, ethanol, acetic acid 등의 시약은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 등급을 사용하였다.

표준용액 제조

Tanshenoside I 및 Lobetyolin 각각의 표준품 적정량을 정밀하게 달아 메탄올(MeOH)로 용해하여 약 1.0 mg/mL가 되게 녹여 표준원액으로 하였다. 상기용액을 표준원액(stock solution)으로 하며 메탄올로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

시험용액 제조

Tanshenoside I 및 Lobetyolin 각각의 시료 50 mg을 칭량한 후 25 mL 부피의 플라스크에 넣어 50% 에탄올(EtOH)로 정용하고, 20분 동안 초음파 추출을 진행한 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

추출물 및 용매분획물 제조

더덕 추출은 강원도 동횡성농협에서 구입한 3년근 건조 더덕 절편 3.5 kg을 50% 주정 20 L 사용하여 50℃에서 20시간 추출을 진행하였다. 식품의약품안전처의 기능성원료 표준화 지침서를 참조하여 최적의 추출용매 조건을 설정하였으며, 기능성분 및 지표성분을 분석하기 위하여 50%의 주정조건으로 설정하여 실험을 진행하였다. 추출시간은 8시간에서 24시간 사이의 조건으로, 추출온도는 20℃에서 80℃ 사이의 조건으로 진행하였으며 그 결과 50℃에서 20시간의 조건으로 추출하였을 때 추출함량이 가장 높게 나타나 해당 조건으로 실험을 진행하였다. 또한 감압건조를 실시하여 열풍건조의 조건으로 50℃에서 3일간 건조한 후, 총 104.3 g의 조 추출물을 획득하였다. 추출물 용매분획은 분별 깔때기를 이용하여 진행하였다. 농축된 더덕 추출물(104.3 g)을 물(700 mL)에 녹인 후,

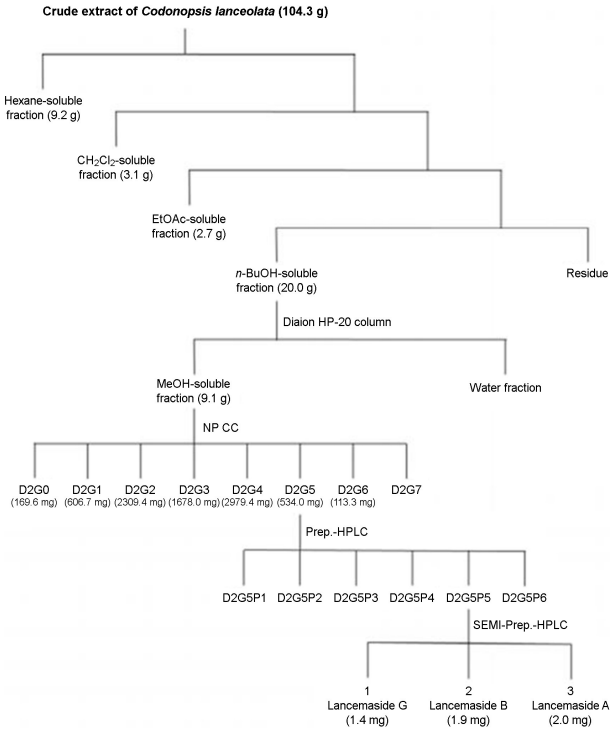

Fig. 1. Flow diagram the extract and fractionation of *Codonopsis lanceolata*. The concentrated *Codonopsis lanceolata* extract (104.3 g) was dissolved in water (700 mL). Then, fraction was carried out with hexane (9.2 g), methylene chloride (3.1 g), ethyl acetate (2.7 g), and butanol (20 g), respectively. The methanol fraction (9.1 g) was obtained using a Diaion HP-20 column.

헥산(Hexane), 메틸렌클로라이드(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(Ethyl acetate, EtOAc), 부탄올(*n*-BuOH)로 각각 용매분획을 실시하였다. 얻어진 추출물의 부탄올 분획(20.0 g)에서 당을 제거하기 위해 Diaion HP-20을 이용하여 증류수로 당을 제거하고, 메탄올 분획 9.1 g을 획득하였다(Fig. 1).

HPLC 분석조건

더덕 추출물에 함유되어 있는 tangshenoside I 및 lobetyolin 표준품을 HPLC로 분석한 검출시간(Retention time, RT)과 시료를 표준품과 동일한 조건으로 분석한 결과와 비교하여 동정하였고, 시료용액에 일정량의 표준품을 첨가하여 동시에 HPLC에서 분석을 실시하여 검출된 peak의 모양 및 검출시간을 측정하여 확인하였다. Tangshenoside I의 경우 16.87분, Lobetyolin의 경우 18.95분으로 나타났다. 또한 본 실험의 분석조건에서 표준물질의 분리 상태는 양호하였고, 전 처리한 더덕 시료의 chromatogram을 비교하여 각각의 성분의 peak가 분리되는지 확인한 결과 각 성

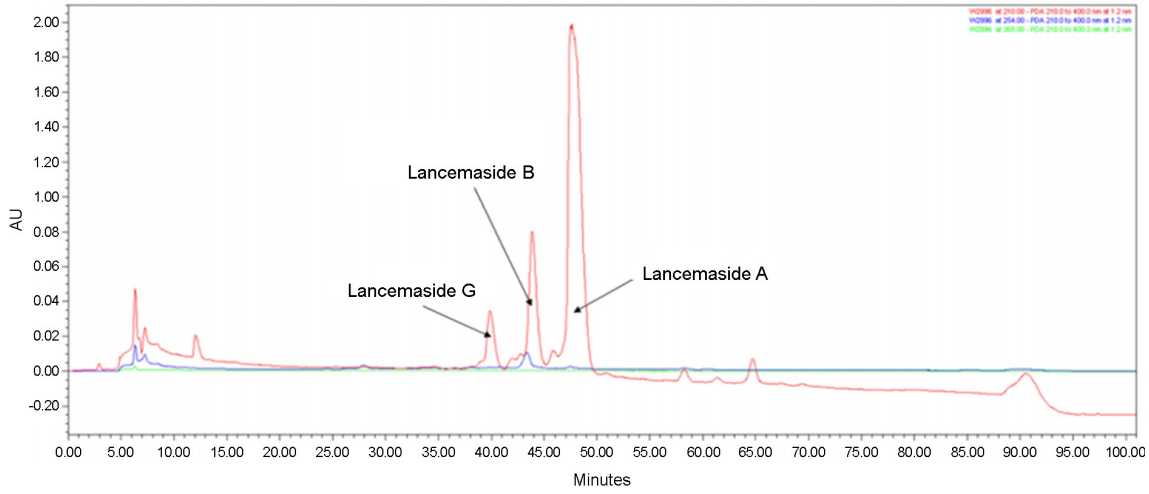

Fig. 2. HPLC chromatograms of three lancemaside compounds in *Codonopsis lanceolata* extracts. Compound 1: lancemaside G, Compound 2: lancemaside B, Compound 3: lancemaside A.

분들은 다른 peak와 간섭이 없이 분리되었음을 확인하였고, 표준용액 peak의 검출시간과 더덕 추출물의 검출시간이 일치하였다. 분석조건은 HPLC (Shimadzu HPLC system)를 이용하였고, ACE 5 (4.6 × 250 mm, 5 μm) column을 사용하였다. 이동상 용매는 0.1% acetic acid(용매 A), acetonitrile (용매 B)를 사용하여 gradient를 주어 tangshenoside I과 lobetyolin을 동시에 분석하였다. 이동상 농도 구배조건은 용매 B를 5%로 시작하여 3분 동안 유지하였고, 17분까지 95%로 증가시킨 다음 3분 동안 유지하다가, 22분까지 5%로 감소시키고 25분까지 유지하였다. 용출 속도는 0.5 mL/min, column의 온도는 30℃로 유지하였고, 검출기는 UV detector, 검출 파장은 267 nm에서 측정하였다.

결 과

HR-MS 및 HPLC 분석

메탄올 분획(9.1 g)을 Normal phase open column chromatography (EtOAc:MeOH:Water, 9:3:1)를 이용하여 8개의 분획(D2G0-D2G7)으로 나누었고, 분획 D2G5 (534.0 mg)을 Preparative HPLC (40%→100% MeOH, gradient system)를 이용하여 6개의 분획(D2G5P1-P6)으로 나누었다. High resolution electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer (HR-ESI-QTOF-MS) profile 분석을 통해, lancemaside 계통의 saponin 물질들이 분포되어 있는 것으로 보이는 분획 D2G5P5을 확인하였으며, 해당 분획을 Semi-preparative HPLC (55%→80% MeOH, gradient system)

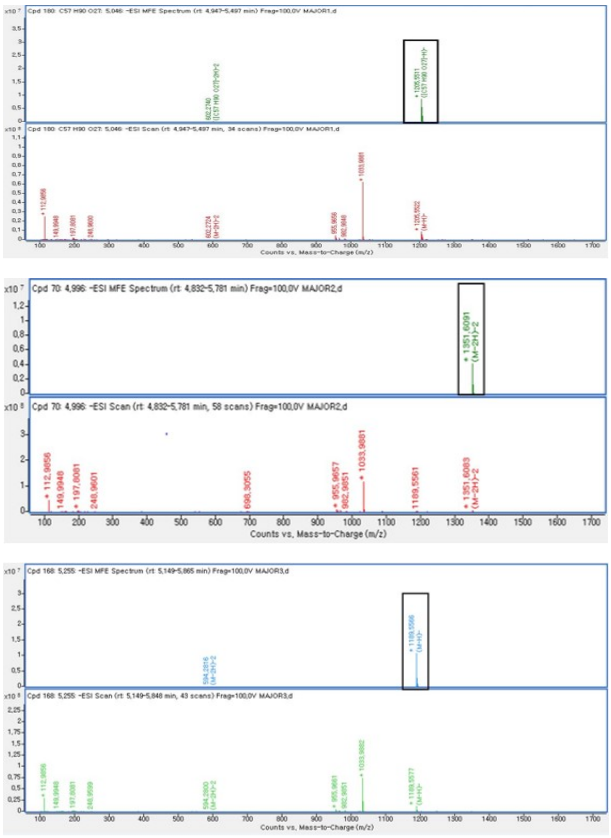

Fig. 3. HR-MS data of three lancemaside compounds in *Codonopsis lanceolata* extracts. Compound 1: lancemaside G ($C_{57}H_{90}O_{27}$), Exact Mass; 1206.5586, *m/z*; 1205.5522 $[M-H]^-$, Compound 2: lancemaside B ($C_{63}H_{100}O_{31}$), Exact Mass; 1352.6249, *m/z*; 1351.6091 $[M-2H]^{2-}$, Compound 3: lancemaside A ($C_{57}H_{90}O_{26}$), Exact Mass; 1190.5643, *m/z*; 1189.5566 $[M-H]^-$.

를 이용하여 지표물질 1 (lancemaside G), 2 (lancemaside B), 3 (lancemaside A)을 분리하였다(Fig. 1, Fig. 2).

성분 구조 동정

더덕 추출물에서 총 3종의 지표물질을 분리하였고 지표물질의 여부를 알아보기 위해서 HR-ESI-QTOF-MS [10% →100% Acetonitrile (MeCN), gradient system]를 사용하여 메탄올 분획에서 지표물질의 분자량이 있음을 확인하였다. 또한 화학적 구조를 규명하기 위해 pyridine-d_5에 녹여 ^{1}H-NMR (Nuclear magnetic resonance) 및 HR-MS (High-resolution mass spectrometer) data를 활용하여 결정하였다 (Table 1, Fig. 3). Electrospray ionization mass spectrum을 측정한 결과 첫 번째 화합물은 *m/z* 1205.5522에서 $[M-H]^-$에 기인하는 peak를 관찰하여 분자량 1206.5586을 확인

Table 1. ^{1}H (850 MHz) NMR data (pyridine-d_5) of three compounds isolated from *Codonopsis lanceolata*

Position	Compound 1		Compound 2		Compound 3	
	δ_H (*J* in Hz)		δ_H (*J* in Hz)		δ_H (*J* in Hz)	
H-1	2.20,	Overlap	1.37,	Overlap	1.40,	d (12.0)
	1.15,	s	0.87,	Overlap	0.87,	Overlap
2	4.71,	s	2.28,	Overlap	2.23,	d (11.0)
			1.86,	Overlap	1.85,	Overlap
3	3.42,	Overlap	3.40,	Overlap	3.38,	dd (12.0)
5	0.97,	d (11.0)	0.78,	d (12.0)	0.79,	d (12.0)
9	1.74,	Overlap	1.73,	Overlap	1.73,	*t* (8.5)
12	5.58,	s	5.64,	Overlap	5.58,	br. s
16	5.26,	s	5.27,	s	5.26,	s
18	3.58,	d (13.0)	3.51,	Overlap	3.56,	d (14.5)
19	2.77,	*t* (13.0)	2.77,	*t* (13.0)	2.76,	*t* (13.5)
	1.34,	s	1.33,	Overlap	1.30,	br. d
21	2.42,	t like	2.43,	Overlap	2.41,	*t* (10.5)
	1.29,	Overlap	1.30,	Overlap	1.30,	Overlap
22	2.31,	Overlap	2.30,	Overlap	2.30,	t
	2.20,	Overlap	2.17,	Overlap	2.18,	t
23	1.34,	s	1.27,	s	1.27,	s
24	1.37,	s	0.95,	s	0.97,	s
25	1.50,	s	0.80,	s	0.81,	s
26	1.11,	s	1.07,	s	1.05,	s
27	1.82,	s	1.82,	s	1.81,	s
29	1.00,	s	0.98,	s	1.00,	s
30	1.15,	s	1.12,	s	1.13,	s
glcA-1	5.02,	Overlap	5.03,	Overlap	5.02,	d (7.5)
5	4.54,	d (9.0)	4.71,	Overlap	4.69,	d (9.0)
ara-1	6.51,	s	6.40,	Overlap	6.49,	br. s
rha-1	5.70,	s	5.84,	s	5.69,	br. s
6	1.70,	s	1.71,	d (6.0)	1.70,	br. s
xyl-1	5.18,	d (7.5)	5.15,	d (7.0)	5.17,	d (7.5)
xyl-1'	5.23,	d (7.5)	5.21,	d (7.5)	5.22,	d (7.5)
glc-1			5.12,	d (7.5)		

Reference; Ushijima et al. Triterpene glycosides from the roots of *Codonopsis lanceolata*, 2008

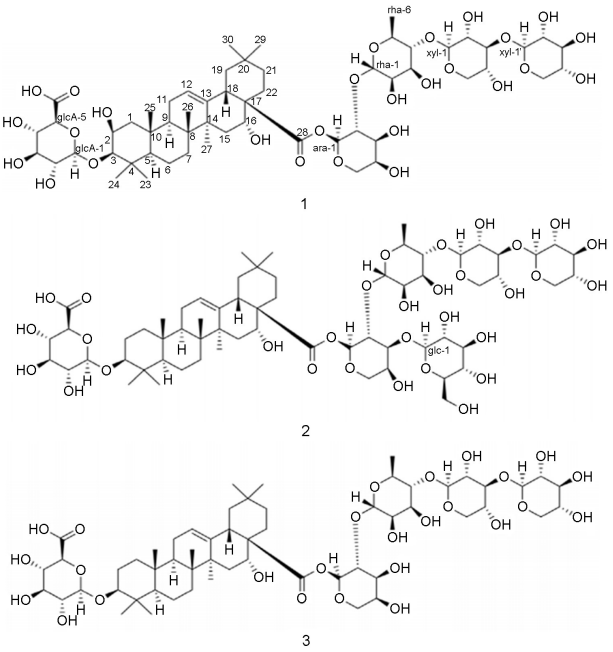

Fig. 4. Schematic diagram of the proposed fragmentation of three compounds in *Codonopsis lanceolata* extracts. 1: lancemaside G, 2: lancemaside B, 3: lancemaside A.

할 수 있었다. 두 번째 화합물은 *m/z* 1351.6091에서 $[M-2H]^{2-}$에 기인하는 peak를 통해 분자량 1352.6249를 확인하였고, 세 번째 화합물은 *m/z* 1189.5566에서 $[M-H]^{-}$에 기인하는 peak를 관찰, 분자량 1190.5643을 확인할 수 있었다. 따라서 분리한 3개의 화합물은 lancemaside G, lancemaside B, lancemaside A로 동정하였다(Fig. 4). 또한 Saponin 계열 lancemaside 3종 화합물의 분리량은 lancemaside G의 경우 1.4 mg, lancemaside B는 1.9 mg, lancemaside A는 2.0 mg으로 나타났으며 lancemaside 계통 물질들 중 lancemaside A의 분리량이 가장 많은 것을 확인하였다.

함량 분석

더덕 추출물의 물질분리 과정에서 주요한 peak 2개가 검출되었고, 각각 tangshenoside I, lobetyolin으로 확인하였다(Fig. 5). 따라서 더덕의 tangshenoside I 및 lobetyolin의 함량을 확인하기 위해 분석을 진행하였다. 본 연구의 실험값은 3회 반복하였고, 기기 분석을 통해 산출한 함량값을 기준으로 평균 및 표준편차를 나타내었다(Table 2). 또한 더덕의 주요한 성분 분석을 위해 분석법에 대해 직

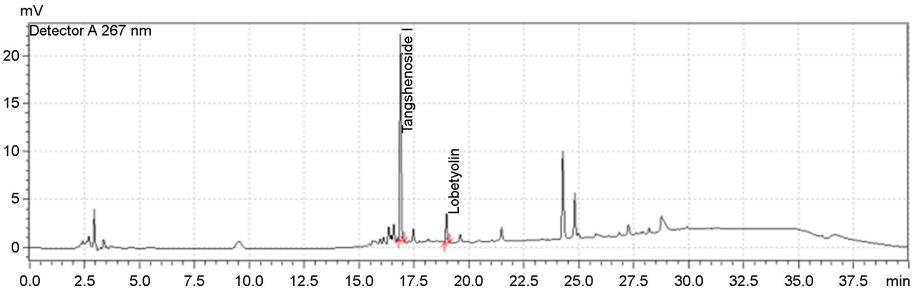

Fig. 5. HPLC chromatogram of tangshenoside I and lobetyolin in powder of *Codonopsis lanceolata* extracts. Absorbance: 267 nm.

Table 2. The contents of tangshenoside I and lobetyolin in *Codonopsis lanceolata* powder

Compound	No.	Mean ± S.D.[1] (mg/g, dry weight)		
		Tangshenoside I	Lobetyolin	Total
Codonopsis lanceolata powder	1	3.65±0.04	1.56±0.02	5.21±0.06
	2	3.49±0.00	1.50±0.00	4.99±0.00
	3	3.74±0.03	1.60±0.02	5.34±0.04

[1] Mean ± S.D. in triplicate (n=3)

Table 3. Preparation of calibration curve for tangshenoside I and lobetyolin

Compound	Range	Regression equation	R^2
Tangshenoside I	0.78~24.93	y = 11830x + 1045.4	1
Lobetyolin	0.88~28.27	y = 3924.7x + 677.28	1

선성(linearity)을 확인하였다. 직선성을 평가하기 위해 6단계의 농도(0.78~28.27 ppm) 표준품을 분석하였고, 이를 통해 얻은 chromatogram에서 peak의 면적과 농도 간의 상관관계로 검량선을 작성하였다(Table 3). 모든 검량선은 해당 농도 범위에서 높은 상관계수를 나타내었다(R^2=1).

고 찰

본 연구는 더덕의 주요 성분인 saponin의 정제 및 유효성분의 함량 분석을 통해 더덕 유래 생리활성물질 및 이용성 증진 연구의 기초자료를 확보하고자 하였다. 더덕 추출물에서 총 3종의 화합물을 분리할 수 있었고, 분리한 3개의 화합물은 lancemaside G, lancemaside B, lancemaside A로 동정하였다. 특히, 화합물 lancemaside A는 더덕에서 분리한 saponin 계통 lancemaside 물질들 중 가장 많은 양을 지닌 것으로 나타났다. 또한 더덕 추출물의 물질분리 과정에서 tangshenoside I 및 lobetyolin을 더덕에서 많은 양을 차지하고 있는 주요 화합물로 확인하였으며, HPLC를 통해 tangshenoside I 및 lobetyolin을 동시 분석하고, 더덕 분말의 tangshenoside I 및 lobetyolin의 함량이 각각 3.49~3.74 mg/g, 1.50~1.60 mg/g으로 나타난 것을 확인하였다. 더덕에서 분리한 saponin 계열 lancemaside 화합물 중 가장 많은 양으로 확인된 lancemaside A의 경우 염증의 조절 및 억제에 관한 연구들이 활발하게 이루어지고 있다(Kim et al., 2014; Joh and Kim, 2010). 뿐만 아니라 심혈관계 질환 개선 효과를 확인하여 이를 바탕으로 건강기능식품을 개발하는 연구도 진행 중이다(Han et al., 2018; Shin et al., 2019). 실험에서 확인한 tangshenoside I 및 lobetyolin은 *Codonopsis* 속 식물의 주요한 화합물로, *Codonopsis* 속의 지표성분으로 선정한 연구결과 및 우리나라 지역별 더덕의 tangshenoside 및 lobetyolin을 정량 분석한 연구결과를 통해 더덕의 지표물질 사용 가능성을 확인할 수 있었다(Ichikawa et al., 2009; Hwang et al., 2018). 하지만 더덕의 tangshenoside I 및 lobetyolin을 이용한 기능성 연구는 다른 화합물에 비해 다양하고 많은 연구가 이루어지지 않고 있어 더덕에서 추출한 tangshenoside I 및 lobetyolin을 기능성분으로 사용하기 위해서는 추가적인 실험이 필요한 상황이다. 따라서 본 연구의 결과를 통해 더덕의 생리활성물질 및 이용성 증진 연구를 지속하는데 기초자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by 2020 Regional Specialized Industry Promotion (Non-R&D) Project of Hongcheon Institute of Medicinal Herb (HIMH) and Brain Busan 21 Plus (BB21+) Project.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Byeon SE, Choi WS, Hong EK, Lee J, Rhee MH, Park HJ, et al. Inhibitory effect of saponin fraction from *Codonopsis lanceolata* on immune cell-mediated inflammatory responses. Arch Pharm Res. 2009. 32: 813-822.

Choi MS, Choi PS. Plant Regeneration and Saponin Contents in *Codonopsis lanceolata* L.. Korean J Med Crop Sci. 1999. 7: 275-281.

Chung KH, Jo HJ, Yoon JA, Song BC, An JH. Free Radical-scavenging Activities of Amaranth (Amaranthus spp. L.) Seed Extracts. Food Eng Prog. 2014. 18: 116-123.

Han AY, Lee YS, Kwon SH, Lee HS, Lee KW, Seol GH. *Codonopsis lanceolata* extract prevents hypertension in rats. Phytomedicine. 2018. 15: 119-124.

Hossen MJ, Kim MY, Kim JH, Cho JY. *Codonopsis lanceolata*: A Review of Its Therapeutic Potentials. Phytother Res. 2016. 30: 347-356.

Hwang BS, Kim JY, Jang M, Kim GC, Park YH, Hwang IG. Quantitative Analysis of Tangshenoside I and Lobetyolin from Korean Deoduk (*Codonopsis lanceolata*). Korean J. Food Nutr. 2018. 31: 957-963.

Ichikawa M, Ohta S, Komoto N, Ushijima M, Kodera Y, Hayama M, et al. Simultaneous determination of seven saponins in the roots of *Codonopsis lanceolata* by liquid chromatography-mass spectrometry. J Nat Med. 2009. 63: 52-57.

Joh EH, Kim DH. Lancemaside A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by targeting LPS/TLR4 complex. J Cell Biochem. 2010. 111: 865-871.

Kim E, Yang WS, Kim JH, Park JG, Kim HG, Ko J, et al. Lancemaside A from *Codonopsis lanceolata* modulates the inflammatory responses mediated by monocytes and macrophages. Mediators Inflamm. 2014. 2014: 405158.

Kim JA, Moon HK, Choi YE. Triterpenoid Saponin Contents of the Leaf, Stem and Root of *Codonopsis lanceolata*. Korean J

Med Crop Sci. 2014. 22: 1-7.

Kim NY, Chae HS, Lee IS, Kim DS, Seo KT, Park SJ. Analysis of Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Codonopsis lanceolata* Skin. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010. 11: 1627-1633.

Kim SS, Jeong MH, Seo YC, Kim JS, Kim NS, Woon WB, et al. Comparison of Antioxidant Activities by High Pressure Extraction of *Codonopsis lanceolata* from Different Production Areas. Korean J Med Crop Sci. 2010. 18: 248-254.

Lee MJ, Nam JH, Um IE, Kang CK, Rho IR. Determination the optimum extraction method for saponin lancemasides in *Codonopsis lanceolata*. Korean J Food Sci Technol. 2019. 51: 103-108.

Shim SB, Chun YJ. The Study on Skin Safety and Efficacy of *Codonopsis lanceolata* Root Fermentation Extract. JKAIS. 2012. 11: 5623-5627.

Shin YK, Han AY, Hsieh YS, Kwon SH, Kim JH, Lee KW, et al. Lancemaside A from *Codonopsis lanceolata* prevents hypertension by inhibiting NADPH oxidase 2-mediated MAPK signalling and improving NO bioavailability in rats. J Pharm Pharmacol. 2019. 71: 1458-1468.

Shirota O, Nagamatsu K, Sekita S, Komoto N, Kuroyanagi M, Ichikawa M, et al. Preparative separation of the saponin Lancemaside a from *Codonopsis lanceolata* by centrifugal partition chromatography. Phytochem Anal. 2008. 19: 403-410.

Ushijima M, Komoto N, Sugizono Y, Mizuno I, Sumihiro M, Ichikawa M, et al. Triterpene glycosides from the roots of *Codonopsis lanceolata*. Chem Pharm Bull. 2008. 56: 308-314.

https://doi.org/10.15616/BSL.2021.27.3.154

Cite this article as: Ju Y, Jeon JW, Hyun KY. Isolation and Quantitative Analysis of Chemical Constituents in *Codonopsis lanceolata*. Biomedical Science Letters. 2021. 27: 154-160.