

## HPLC-ELSD법에 의한 길경의 platycodin D 정량분석

김금숙\*<sup>†</sup> · 김현태\*\* · 성재덕\*\* · 박희생\*\* · 김수동\*\*

\* 작물시험장 특작과, \*\* 영남농업시험장 전작과

### Quantitative Analysis of Platycodin D from *Platycodon grandiflorum* by HPLC-ELSD

Geum Soog Kim\*<sup>†</sup>, Hyun Tae Kim\*\*, Jae Duck Seong\*\*,  
Hee Saeng Park\*\* and Soo Dong Kim\*\*

\* Industrial Crop Division, National Crop Experiment Station, RDA., Suwon, Korea

\*\* Upland Crops Division, National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA., Miryang, Korea

**ABSTRACT** : Platycodin D was isolated from n-butanol extract of *Platycodi radix*(*Platycodon grandiflorum* and identified by the spectroscopic analysis using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR techniques. A new method of analysis of platycodin D by high performance liquid chromatography(HPLC) was established using a reversed phase system with YMC-Pack ODS-AM( 250 X 4.6 mm) column and 30% acetonitrile as a mobile phase. Evaporative light scattering detector was used as detector. The kinds of extraction solvents and methods were examined to determine the efficient extraction condition and HPLC analysis was carried out to establish the optimum drying condition for the root of *Platycodon grandiflorum*. The contents of platycodin D was highest as 0.083% when platycodon roots were dried at 60℃ using dry oven.

**Key words** : *Platycodon grandiflorum*, platycodin D, HPLC, ELSD, Drying condition

## 서 언

길경(*Platycodi radix*)은 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC.)의 뿌리를 말한다. 도라지는 한국, 중국, 일본에 널리 분포하며 길경은 전통 한약재로서 진해 및 거담에 널리 이용되어 왔으며 최근에는 채소로도 많이 이용되고 있다. 이러한 용도이외에도 진정, 해열, 진통 작용 및 항염증, 항궤양, 혈압강하 작용 등에 관한 보고가 있으며(Lee et al., 1974) 또 최근에는 길경의 수추출액이 직접적으로 암세포 증식을 억제하기보다는 기주의 면역체계를 증강시키므로써 항암활성을 발현하는 것으로 보고하였다(Lee et al., 1998; Kim et al., 1998). 특히, Choi et al.(2001)은 쥐를 이용한 동물실험

에서 수추출액이 쥐의 macrophage으로부터 nitric oxide와 중앙 necrosis factor- $\alpha$ 의 생성을 유도하므로써 항암활성을 유도함을 증명하여 항암활성 기작을 제시하였다. Han et al.(2001)은 길경으로부터 분리한 다당류가 T cell이 아닌 B cell과 macrophage를 선택적으로 활성화시키므로써 면역증강 효과를 보여줌을 보고하였다. 한편, 길경은 지방대사에도 관여하여 간지방 축적을 방지하므로써 비만에도 효과적임이 보고되었다(Kim et al., 1995; Han et al., 2000).

길경의 주요 약효성분으로는 triterpenoid saponin인 platycodin A, C, D 등이 밝혀졌으며(Tada et al., 1975; Konishi et al., 1976) 이외에 inulin, betulin, stigmasterol 등이 주요 성분으로 함유되어 있다.

<sup>†</sup> Corresponding author (Phone) : Kims@rda.go.kr, 031-290-6787, E-mail :  
Received 19 June 2002 / Accepted 22 August 2002

Arai et al.(1997)은 길경과 감초의 혼합 열수추출액인 길경탕이 가장 고질적인 질병의 하나인 만성 췌장염을 완하시키는 효과가 있음을 입증하였는데 이들은 또 길경탕의 만성적인 췌장염 치료효능의 주요 활성 성분이 platycodin D임을 보고하였다. 그들은 platycodin D가 cholecystokinin (CCK) 같은 위장내 호르몬이 십이지장에서 분비되도록 하는 기능을 하기 때문에 길경탕이 췌장의 위분비를 촉진하는 것으로 보고하였다. 한편 Ida et al.(1998)은 platycodin D의 분해되지 않은 완전한 전체 구조가 췌장의 위분비량 증가를 촉진하는 데 필수적인 것으로 보고하였다.

Chung et al.(1996, 1997)은 국내산 재배 도라지 3년 근과 24년근의 일반성분, 무기물 및 휘발성분을 분석 비교하였다. Ahn et al.(1996)은 도라지의 뿌리조직으로부터 hairy root를 유도하여 배양 조건에 따른 생육 및 polyacetylene의 생성 양상을 비교하기도 하였다. Saeki et al.(1999)은 일본 시장에서 유통되는 중국산, 한국산, 일본산 도라지 및 일본 식물원 재배산, 야생 도라지 등에서 platycodin A, C, D 함량을 분석 비교하였으며 Higashi et al.(1997)은 길경의 조제방법에 따른 품질을 비교하고 platycodin D의 함량을 정량하였다.

고품질 신품종을 육성하거나 수확 후 품질 관리를 위해서는 품질을 지표성분에 근거하여 객관적으로 평가할 수 있는 기준이 필요한데, 지표성분이란 한약(생약)의 약효를 대변하는 성분으로 해당 생약에만 존재하고 그 생약의 중요한 활성을 대표하는 성분을 말한다. Platycodin D는 위에서 언급했듯이 길경의 대표적인 활성성분으로 길경의 주요 활성을 대표하는 물질로 식의약품안전청에서는 1997년 한약재 표준화 사업의 규격기준 설정을 위한 성분분석법 개발연구에서 platycodin D를 길경의 지표물질로 설정한 바 있다.

본 연구는 길경으로부터 platycodin D를 보다 신속, 정확하게 분리하여 정량 분석하기 위한 방법으로 증기화광산란검출기(Evaporative Light Scattering Detector : ELSD)를 이용한 HPLC 분석법을 제시하고 지표성분 분석을 위한 적절한 건조방법에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

길경(Platycodi radix)은 영남농업시험장에서 육성 중인 밀양 1호를 사용하였다. 밀양 1호는 4월 상순에 파종하고 재식거리는 20×10 cm, 비료의 시비량은 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O가 17-20-20(kg/10a)이 되게 하였고 퇴비는 2000 kg/

10a으로 시비하여 재배하였다. 2년생 도라지를 9월 하순에 수확 후 뿌리를 세척한 후 적당한 크기로 세절하여 건조 후 분쇄하여 시험에 사용하였다.

### 시약 및 기기

길경 추출에 사용된 메탄올 및 분배 추출 등에 사용된 유기용매는 모두 G.R.급을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel 충전제와 precoated TLC plate는 각각 Merck사(Germany)의 Kiesel gel 60(70~230 mesh)와 Kiesel gel 60F254를 사용하였으며, column chromatography용 용매는 G.R.급을 사용하였다. 구조동정을 위한 NMR 분석은 독일 Bruker사의 AVANCE 600 FT-NMR(600MHz) 분광기를 사용하여 측정하였으며 이때 용매는 pyridine-*d*<sub>5</sub>(Sigma Chemical, Co., USA)를 사용하였다.

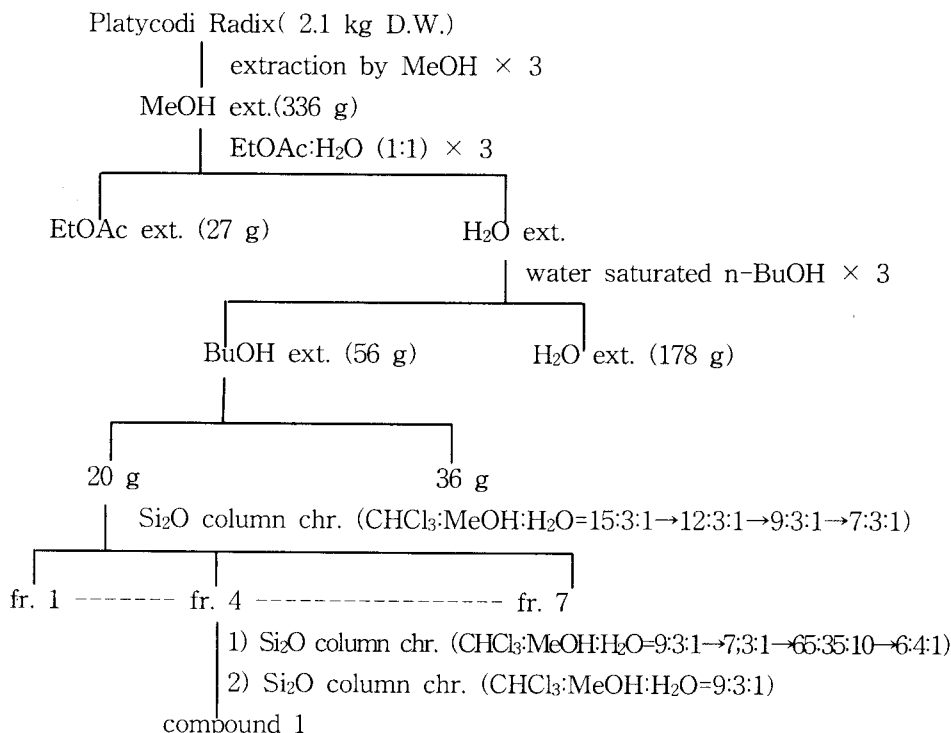
HPLC system은 HP사의 Agilent 1100을 사용하였고 검출기는 ELSD(Evaporative Light Scattering Detector)로서 Alltech사의 500ELSD 모델을 사용하였다. HPLC 컬럼은 YMC사의 YMC-Pack ODS-AM( 250 X 4.6 mm, 5 $\mu$ m)을 정량용으로 사용하였으며 HPLC 용매는 모두 HPLC급을 사용하였다.

### 길경으로부터 지표성분의 분리 및 정제

분쇄한 길경 2.1 kg을 메탄올로 48시간씩 3회 상온에서 추출한 후 회전 진공 농축기에서 감압농축하여 메탄올 추출물(MeOH ext., 336g)을 얻었다. MeOH ext.는 ethylacetate : H<sub>2</sub>O (1 : 1) 용매로 3회 분배 추출하여 물층과 ethylacetate층으로 나누었다. 물층은 동량의 수포화 n-부탄올로 수차례 분배 추출하여 부탄올층과 물층으로 다시 나누고 조사포닌 함유층인 부탄올층은 다시 감압농축하여 부탄올 추출물(n-BuOH ext.)를 얻었다. n-BuOH ext. 20g으로부터 유효성분을 분리하기 위해 silica gel column chromatography를 실시하였다. 이때 용출용매로는 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 혼합용매계를 사용하였으며 순차적으로 극성을 높여가며 기울기 용리로 물질을 분리하였다. 총 3차의 silica gel column chromatography를 실시하여 화합물 1을 분리, 정제하였다(Scheme 1).

### 길경 platycodin D의 추출조건 및 분석법 확립

지표성분 platycodin D의 HPLC 분석 조건을 확립하기 위해 column은 YMC-Pack ODS-AM( 250 X 4.6 mm, 5  $\mu$ m)를 사용하여 column 온도 25°C에서 분석하였으며 이동상의 조건은 30% acetonitrile을 유속 0.8 ml/min의 조건으로 흘려주었다. ELSD의 drift tube 온도는 105°C로 하고 질소 가스의 유속은 2.85SLPM으로 하였다(Table 1).



Scheme 1. Isolation of Platycodin D from Platycodon grandiflorum.

지표성분의 추출방법은 예비시험에서 기존의 환류 추출보다 초음파 추출이 더 효율적이었으므로 초음파 추출로 적절한 추출용매를 구명하였다. 추출용매는 메탄올과 에탄올을 50%, 80%, 99% 조성별로 비교하였다. 시료 0.05 g에 각각의 용매 1 ml씩을 EP tube에 넣고 microson 초음파 추출기로 1분간 총 3회 추출하였으며 추출 후 원심분리기에서 잔류물을 원리분리시켜 제거하고 상층부 추출액만을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC 시료액으로 하였다. 건조방법별 지표성분의 추출에서는 80% MeOH을 사용하여 1회씩 동일한 방법으로 추출하였다.

Table 1. HPLC condition of platycodin D

HPLC condition	
Column	YMC-Pak ODS-AM( 250 X 4.6 mm, 5μm)
Column Temp.	25℃
Mobile Phase	30% Acetonitrile
Flow rate	0.8 ml/min
ELSD (Detector)	Drift tube temp. : 105℃
	N2 gas flow rate : 2.85 SLPM
	ATTN : 2^4

### 길경 일반 성분의 분석

길경시료의 조사포닌 함량은 수포화 부탄올 분획을 용매 분배법으로 회수하여 농축후 시료 건물중에 대한 비율로 나타내었다. 엑스함량은 50% 묽은 에탄올 엑스함량으로 측정하였으며 회분은 1차 연소된 시료를 550℃ 회화로에서 4시간 회화(灰化)한 후 중량법으로 측정하였다.

### 길경제조 건조조건 구명

도라지는 수확 후 세척하여 적당한 크기로 세절하고 그늘에서 1시간 정도 물기를 제거한 후에 건조조건에 따라 양건 또는 열풍건조기에 넣어 건조하였다. 건조조건은 양건, 양건 1일, 양건 2일, 양건 3일 후 50℃에서 건조, 양건 없이 40℃, 50℃, 60℃에서 각각 열풍건조 등 총 7가지 처리조건에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 길경으로부터 platycodin D의 분리 및 정제

길경의 부탄올 추출액으로부터 주요성분인 platycodin D를 분리하기 위해 총 3회의 Si<sub>2</sub>O 컬럼크로마토그래피를 실시하여 최종 화합물 1을 순수 분리하였다. 화합물 1의 구조는 NMR 분광학적 분석으로 동정하였다.

화합물 1의 NMR 스펙트럼 데이터는 문헌과 면밀한 비교 결과 platycodin D의 데이터와 일치하여(Kim et al., 1990) 화합물 1은 platycodin D로 최종 동정하였다(Fig. 1).

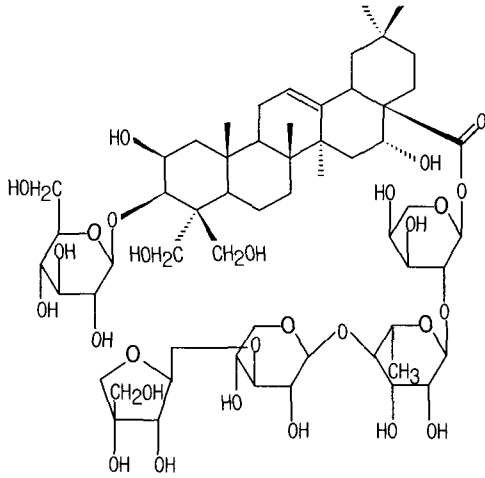


Fig. 1. The structure of compound 1.

**길경 platycodin D의 분석법 확립 시험**

Platycodin D의 정량 분석법을 확립하기 위해 HPLC 분석을 실시하였으며 이때 검출기는 자외선에 대한 특이 파장 발색단이 없는 물질의 검출에 용이한 증기화광산란 검출기(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)를 사용하였다. ELSD는 최근 인삼의 사포닌 분석에 유용하게 이용되고 있어 길경의 사포닌 분석에도 유용할 것으로 예측이 되었다(Park et al., 1996; Fuzzati et al., 1999; Li et al., 2001). 길경의 MeOH 추출액으로부터 platycodin D를 효율적으로 정량분석하기 위해 가장 적절한 ELSD의 조건과 HPLC 컬럼의 조건을 찾아가 하였고 그 결과, 최종 HPLC 분석조건은 table 1과 같이 하여 platycodin D를 시료로부터 효율적으로 정량분석 하였다(Fig. 2). Platycodin D의 HPLC-ELSD 정량분석 조건을 설정한 후 길경 분말시료로부터 이 성분의 회수율을 최대화할 수 있는 추출조건을 재검토하였다. 추출용매별로 platycodin D의 회수율을 정량하였으며 이를 위해 platcondin D의 표준곡선을 구하였다(Fig. 3). Platycodin D 표준곡선은 상관계수 R<sup>2</sup>이 0.999로서 고도의 상관성을 보여 정량분석의 검량선으로 충분히 사용할 수 있었다.

추출용매별 platycodin D의 회수율에서는 50% MeOH과 80% MeOH이 다른 용매조건보다 높은 회수율을 보였는데 80% MeOH은 80% EtOH 보다는 추출지수로서 약 34%정도 더 높은 회수율 보여 가장 적합한 추출용매로 판단되었다(Table 2).

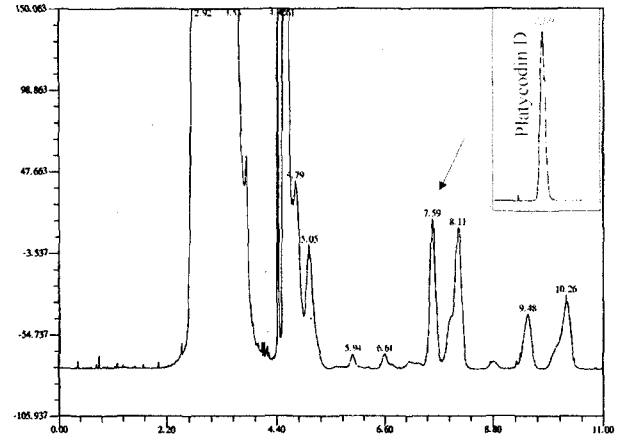


Fig. 2. HPLC profile of 80% MeOH extract from *Platycodon grandiflorum*

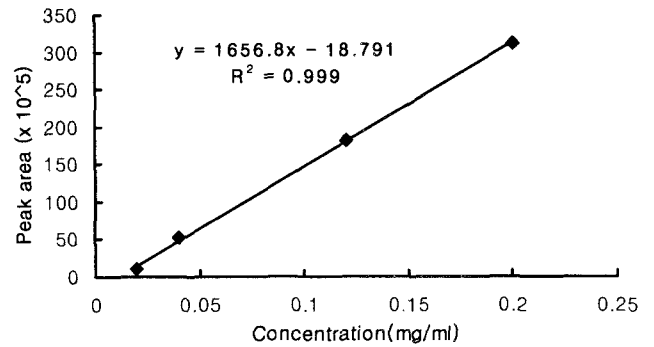


Fig. 3. Standard curve of platycodin D.

Table 2. The contents and recovery rate of platycodin D by different extraction solvents

Extraction solvents	No. of Extraction			Index of Extraction
	1st	2nd	3rd	
99% MeOH	99.7	0.3	-	66
99% EtOH	100	-	-	16
80% MeOH	98.7	1.3	-	100
80% EtOH	100	-	-	83
50% MeOH	98.3	1.7	-	96
50% EtOH	98.6	1.4	-	92

**길경제조 건조조건 구명 시험**

건조조건은 크게 양건, 양건 후 열풍건조기 건조, 직접 열풍건조기 건조로 나누어 실시하였는데 직접 열풍건조한 시료에서 가장 지표성분 함량이 많이 측정되었다. 이러한 결과는 50℃ 열풍건조 시료가 천일건조(양건) 한

시료보다 platycodin D 함량이 더 높다는 Higashi 등 (1997)의 연구와 일치하는 것이었다. 다만 열풍건조 온도를 좀 더 세분화하여 함량을 측정해 본 결과 60℃에서의 열풍건조시 platycodin D 함량이 0.083%로서 양건시 0.045%보다 1.84배 더 높은 함량을 보였다. 묽은 에탄올 엑스 함량도 60℃ 열풍건조시 45.8%로서 양건시 42.8%보다 3% 더 높은 함량을 보였다. Platycodin D의 함량이 고온으로 갈수록 증가되는 것은 건조시간이 단축되므로써 나타나는 효과일 것으로 추정되며 건조시간이 경과하면서 저온건조시 길경의 2차 대사물의 조성에 변이가 생기는 것으로 생각된다. 따라서 platycodin D 고함유 길경을 생산하기 위해서는 수확 후 건조조건으로 양건보다는 열풍건조가 건조, 특히 60℃에서의 열풍건조가 적합할 것으로 판단되었다(Table 3).

**Table 3.** The contents of platycodin D, crude saponin, 50% ethanol extract and ash by different drying methods (%)

Drying conditions	Platycodin D	Crude saponin	50% Ethanol extract	Ash
Under sunshine	0.045	2.43	42.76	4.1
50℃ after 1dy. DUS*	0.043	2.65	41.22	4.2
50℃ after 2dy. DUS	0.048	2.65	40.73	3.9
50℃ after 3dy. DUS	0.044	2.37	36.29	3.9
60℃ in Dry oven	0.083	2.22	45.77	3.3
50℃ in Dry oven	0.063	2.45	46.74	4.2
40℃ in Dry oven	0.057	2.54	47.27	3.9
LSD(0.05)	0.010			
C.V.(%)	10.577			

\* DUS : drying under sunshine

## 적 요

길경의 부탄을 분획으로부터 지표성분을 분리, 정제하기 위해 SiO<sub>2</sub> 컬럼크로마토그래피를 실시한 결과 1종(화합물 1)의 단일 물질을 순수 분리하였으며 화합물 1의 구조는 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 등 분광학적 관측 결과 platycodin D로 확인되었다. Platycodin D의 HPLC 정량법을 검토한 결과, 검출기는 증기화광산란검출기(ELSD)를, 컬럼은 역상컬럼을 사용하여 길경 MeOH 추출액으로부터 효율적인 지표성분 정량이 가능하였다. 추출조건을 재검토한 결과 환류추출보다는 초음파 추출이 더 효율적이었으며 추출용매로는 80% MeOH이 다른 용매조건보다 추출효

율이 우수하였다. 건조조건 검토에서는 platycodin D의 함량이 양건이나 양건과 건조기 혼용건조 보다 건조기 단독 건조시 더 높았으며 특히 60℃ 열풍건조에서 그 함량이 0.083%로서 가장 높았다. 묽은 에탄올 엑스 함량도 건조기만을 이용한 열풍건조가 양건과 건조기 열풍건조를 혼용한 방법보다 4% 정도 더 높았다.

## LITERATURE CITED

- Ahn JC, Hwang B, Tada H, Ishimaru K, Sasaki K, Shimomura K (1996) Polyacetylenes in hairy roots of *Platycodon grandiflorum*. *Phytochemistry* 42(1) : 69-72.
- Arai I, Komatsu Y, Hirai Y, Shingu K, Ida Y, Yamaura H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Sasaki K, Taguchi S (1997) Stimulative effects of saponin from kikyō-to, a Japanese herbal medicine, on pancreatic exocrine secretion of conscious rats. *Planta Medica* 63 : 419-424.
- Choi CY, Kim JY, Kim YS, Chung YC, Seo JK, Jeong HG (2001) Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  from murine macrophages. *International Immunopharmacology* 1 : 1141-1151.
- Chung JH, Cho SH, Shin PG, Ryu JC, Jang DS (1997) Chemical compositions of *Platycodon grandiflorus* (Jacquin) A. De Candolle. *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 40(2) : 148-154.
- Chung JH, Cho SH, Sunwoo S, Kwon JS, Shin PG (1996) Studies on the volatile components of *Platycodon grandiflorus* (Jacquin) A. De Candolle. *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 39(6) : 517-520.
- Fuzzati N, Gabetta B, Jayakar K, Pace R, Peterlongo F (1999) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in *Panax ginseng* roots. *Journal of Chromatography A* 854 : 69-79.
- Han LK, Xu BJ, Kimura Y, Zheng Y, Okuda H (2000). *Platycodi radix* affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity. *Journal of Nutrition* 130(11) : 2760-2764.
- Han, SB, Park SH, Lee KH, Lee CW, Lee SH, Kim HC, Kim YS, Lee HS, Kim HM (2001) Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells. *International Immunopharmacology* 1 : 1969-1978.
- Higashi A, Arimoto K, Iwata Y, Ujita K, Kawai T, Kobayashi Y, Sakurai K, Shimada Y, Takagi A, Taniyama T, Nakajima KI, Hisata Y, Hosoda K, Yamamoto K, Yamamoto Y, Noguchi M (1997) Studies on the effect of preparation methods of platycodon root on its quality. *Natural Medicines* 51(1) : 56-62.
- Ida Y, Hirai Y, Kajimoto T, Shingu K, Miura T, Kuwahara N, Taguchi S, Sasaki K, Kuroiwa Y, Yamamoto T, Arai I, Amagaya S, Komatsu Y (1998) Requirement of the glycosyl

- parts in platycodin D to stimulate pancreatic exocrine secretion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 : 2209-2212.
- Kim KS, Ezaki O, Ikemoto S, Itakura H** (1995) Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 41(4) : 485-491.
- Kim TJ, Lee SI, Lee TH, Ko JS** (1990) Isolation and determination of platycodin D from platycodi radix. *Journal of Korean Society of Analytical Science* 3(3) : 399-404.
- Kim YG, Lee BE, Kim KJ, Lee YT, Gho KB, Chung YC** (1998) Antitumor and immunomodulatory activities of the *Platycodon grandiflorum* cultivated for more than 20 years. *Yakhak Hoeji* 42 : 382-387.
- Konishi T, Tada A, Shoji J, Tanaka O** (1976) The structures of platycodin A and C, monoacetylated saponins of the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 26(2) : 668-670.
- Lee EB** (1974) Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum*. *Korean Journal of Pharmacognogy* 5 : 49-51.
- Lee GY, Hwan EI, Lim ST** (1998) Effect of *Platycodon grandiflorum* DC Extract on the growth of cancer cell Lines. *Korean Journal of Food Science Technology* 30(1) : 13-21.
- Li W, Fitzloff JF** (2001) Determination of 24(R)-pseudoginsenoside F11 in North American ginseng using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 25 : 257-265
- Park MK, Park JH, Han SB, Shin YG, Park IH** (1996) High-performance liquid chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* 736 : 77-81.
- Saeki T, Koide K, Nikaide T** (1999) A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum* by HPLC analysis. *Panta Medica* 65 : 428-431.
- Tada A, Kaneiwa Y, Shoji J, Shibata S** (1975) Studies on the saponins of the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin D. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 23(11) : 2965-2972.