

HPLC를 이용한 桔梗 사포닌 分析法

김현기 · 최재석 · 유대석 · 최연희 · 연구환 · 홍경식 · 이병희 · 김혜진
김은주¹ · 박병근¹ · 정영철² · 김영섭 · 유시용*
한국화학연구원, ¹㈜장생도라지 생명과학연구소, ²진주국제대학교 식품과학부

HPLC Analysis of Saponins in Platycodi Radix

Hyun Ki Kim, Jae Seok Choi, Dae Seok Yoo, Yeon Hee Choi, Gyu Hwan Yon, Kyung Sik Hong,
Byung Hoe Lee, Hye Jin Kim, Eun Ju Kim¹, Byoung Keun Park¹, Young Chul Jeong²,
Young Sup Kim, and Shi Yong Ryu*

Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, Korea 305-606

¹JangSaeng Doraji Research Institute of Biotechnology, JangSaeng Doraji Co. LTD., Jinju 660-833

²Division of Food science, Jinju International University, Jinju, 660-759

Abstract – A rapid and practical HPLC assay was developed for quantitative analysis of saponins in Platycodi Radix. Seven saponin components in Platycodi Radix, *i.e.*, deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ and platycodin D were successfully resolved on C18 column and detected by ELSD. Standard curves were linear over the concentration range 1~2,000 µg/ml ($r^2 > 0.992$). Intra- and inter-day coefficients for variation of seven saponin components were <10% and limit of quantification of them were around 0.7~1.5 µg/ml, respectively. Using this method, contents of seven saponins in various plant materials under different cultivating conditions were estimated.

Key words – *Platycodon grandiflorum*, campanulaceae, saponin, HPLC, quantitative analysis

桔梗은 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 다년생식물 도라지(balloon flower, *Platycodon grandiflorum*)의 뿌리로서 통상적으로 2~3년 근을 식용 또는 약용으로 사용한다.桔梗은 韓方에서 주로 진해, 거담 등의 목적으로 頻用되어 왔으며 최근 들어 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 항염증작용, 항 케양 및 위액분비억제작용, 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사 개선작용, 간 손상 억제작용, 복강 거식세포 활성화 증강 및 면역 활성화증가 등 다양한 활성이 報告되어 있다.¹⁻⁶⁾

桔梗의 함유성분으로는 platycodigenin, polygalacic acid 등 oleanane계 triterpene을 aglycone으로 한 20여종의 사포닌 種들이 1~4% 정도 함유되어 있으며 이들 사포닌 성분들은 桔梗 추출물이 보여주는 다양한 약리활성의 활성성분으로 주목 받고 있다.

最近 우리나라에서는 천연물의약품 및 건강기능식품 등에 관한 범국민적 관심도가 크게 增加하고 있으며 이제껏

주로 韓方에서 사용되고 있던 人蔘, 當歸, 桔梗 등의 생약재를 주원료로 한 각종 건강기능식품들이 속속 개발되고 있으며 이들 제품들의 표준제조공법 및 품질규격화방안 등이 시급히 요구되고 있다. 한편, 현재 生藥材 桔梗의 品質規定에 관하여는 大韓藥典에 간략하게 桔梗가루(Pulvis Platycodi Radicis)의 확인시험법만이 명시되어 있다. 즉, 열수추출물에서 지속성 거품의 발생 여부와 황산 정색반응(Liebermann-Burchard reaction)을 통하여 사포닌의 有無를 관찰하는 고전적인 방법만이 명시되어 있어 桔梗을 원료로 한 건강기능식품의 품질표준화를 위하여 적용할 수 있는 분석방법으로는 부적합하다. 따라서 桔梗 특유의 사포닌 성분들에 대한 정량적인 분석결과를 제시할 수 있는 새로운 분석법의 확립이 절실하게 요구되고 있는 실정이다. 지금까지 報告된 桔梗 사포닌의 분석방법으로는 Saeki 등이 報告한 platycodin A, C 및 D를 지표성분으로 한 HPLC 定量法⁷⁾과 platycodin D를 지표성분으로 하여 ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) 검출기를 사용한 Kim등의 HPLC 定量法⁸⁾등이 報告되어 있다. 본 저자들은 이들 HPLC 방법에 준하여 생약

*교신저자(E-mail): syryu@kriict.re.kr
(FAX): 042-860-7160

재 桔梗에 함유된 platycodin D를 비롯한 각 사포닌 種의 함량 및 분포 pattern을 조사하고자 시도하였으나 이들 HPLC 분석법의 한계점이 발견되어 새롭고 간편한 분석방법을 고안하게 되었다. 우선 Kim 등의 방법은 ELSD 등 고감도의 검출기를 사용한 결과 미량의 사포닌 분석이 가능한 장점이 있는 반면 platycodin D 이외의 사포닌 種, 특히 platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 등 構成糖의 숫자가 platycodin D에 비하여 많은 사포닌 種들의 peak가 모두 overlap 되어 각 사포닌의 분리 정량이 불가능하였으며 Saeki 등의 방법은 platycodin D 및 platycodin D에 비하여 비극성인 사포닌 種, 즉 platycodin A 및 B의 경우에는 우수한 分離能을 보여주었으나 Kim 등의 방법과 마찬가지로 국내산 桔梗에 다량으로 존재하는 platycoside E, dea-

pioplatycoside E 등 platycodin D에 비하여 構成糖의 숫자가 큰 사포닌들은 검출할 수 없었다. 또한 UV 검출기의 한계 상 미량 사포닌의 검출이 어려운 단점이 있었으며 동일한 HPLC 조건 (용출용매)으로 UV 검출기 대신 ELSD 검출기를 사용하여 본 결과 신호대 잡음비(S/N ratio)가 너무 증가하여 미량분석에는 적합하지 아니하였다.

본 보에서는 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 및 platycodin D 등 대표적인 桔梗사포닌 7 種의 동시 정량이 가능한 새로운 HPLC분석 조건을 수립하였으며, 수립된 분석방법에 따라 한국산 3년생 桔梗과 21년생 桔梗, 그리고 중국산 3년생 桔梗 중의 사포닌 함량 및 각 사포닌의 분포 pattern을 비교 분석하였기에 報告하고자 한다.

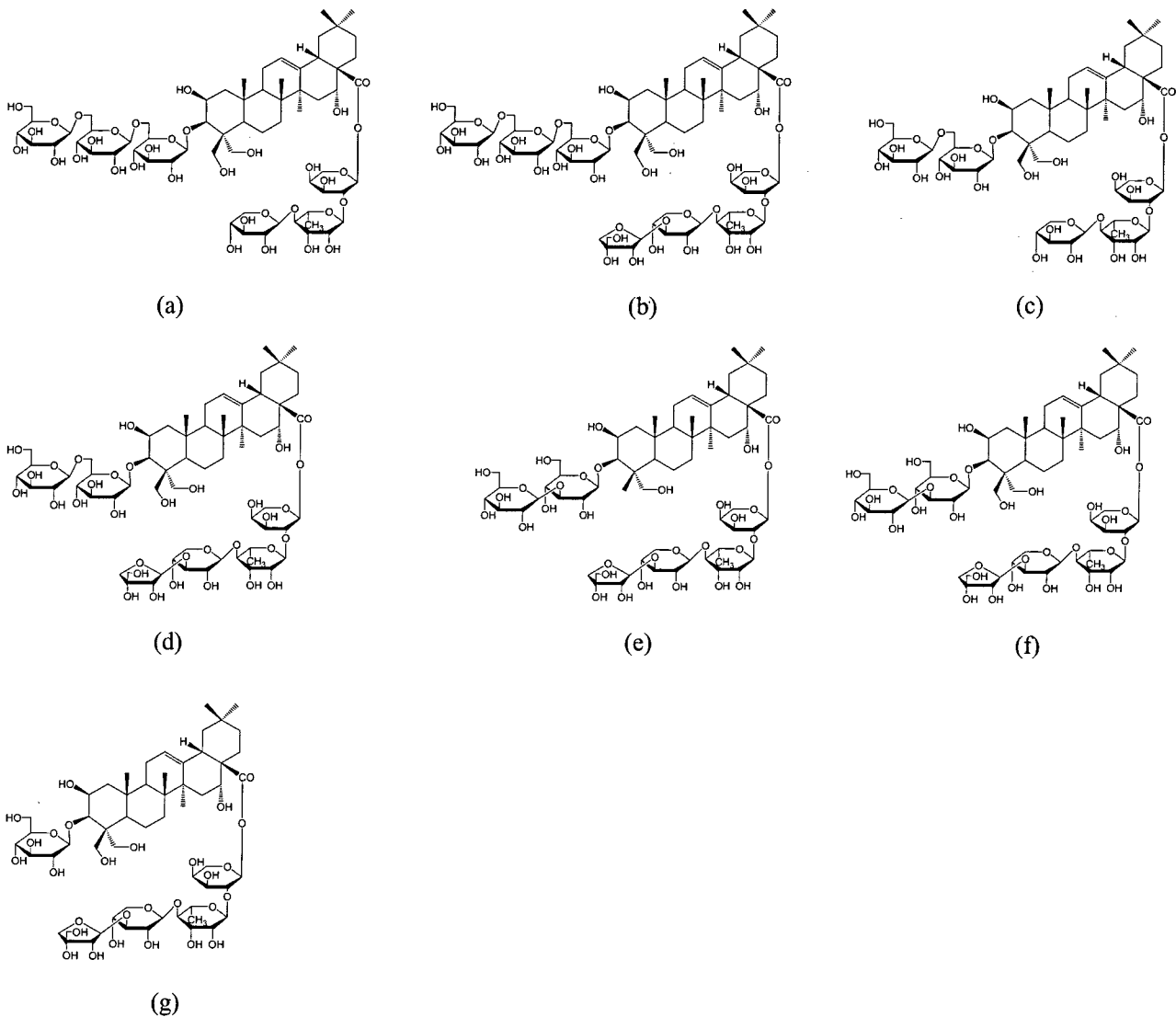


Fig. 1. Chemical structure of saponins from *Platycodon grandiflorum*.

(a) deapioplatycoside E, (b) platycoside E, (c) deapioplatycodin D₃, (d) platycodin D₃, (e) polygalacin D₂, (f) platycodin D₂, (g) platycodin D

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한桔梗은 (주)장생도라지에서 재배한 21년생桔梗(PR-1) 및 3년생桔梗(PR-2)과 대전광역시 소재의 시장에서 구입한 중국산桔梗(PR-3)를 사용하였으며 각 표본들은 한국화학연구원 생약화학연구소(PR-1, 2, 3)에 보관되어 있다. 실험에 사용한 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 및 platycodin D 등 사포닌 표준품은 Kim등⁹⁾의 방법에 따라桔梗으로부터 분리 정제하여 사용하였으며, 각 사포닌 種의 화학구조는 Fig. 1과 같다.

기기 및 시약 실험에 사용된 acetonitrile과 증류수는 HPLC용으로 Burdick & Jackson(MI, USA)으로부터 구입하였고, HPLC장치는 Futecs NS-3000i system (Futecs, 한국)을 사용하였고, column은 Optimapak(4.6×250 mm 5 μm, 100, RStech)을 사용하였다. 검출기로는 ELSD(Softa, USA)를 사용하였고, autosampler는 NS-6000(Futecs, 한국)을 사용하였다.

사포닌 표준용액 및桔梗 檢液의 조제 - deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 및 platycodin D를 각각 1 mg 씩 취하여 증류수 10 ml에 녹여 HPLC용 표준 사포닌 용액을 조제하였다. 또 각桔梗 시료 1 kg씩을 취하여 각각 15 L의 증류수에 넣고 5시간 동안 열수 추출한 후 여과하고

여액을 감압농축 하였다. 감압 농축한 추출물 20 g을 증류수 200 ml에 현탁한 후, 동량의 ethylacetate로 3회 추출하고 수층을 다시 동량의 수포화 부탄올(*n*-butanol)로 3회 추출 하였다. 부탄올 추출물을 각각 감압 농축한 후, 10 mg씩을 취하여 1 ml의 증류수에 녹인 후 PVDF syringe filter (Advantec, Japan), 0.45 μm 13 mm로 여과하여 HPLC용 檢液을 조제하였다.

HPLC 분석방법 - 이동상은 50 mM ammonium acetate solution (NH₄Ac), acetonitrile, methanol을 사용하였으며, solvent A는 NH₄Ac : acetonitrile : methanol = 85 : 10 : 5, solvent B는 NH₄Ac : acetonitrile : methanol = 55 : 40 : 5로 하고, solvent B의 비율을 0%에서 15% (5분), 38% (28분), 40% (33분), 43% (53분), 60% (63분), 100% (71분)로 순차적으로 조절하였다. Column의 온도는 40°C로 유지하였고, 유속은 분당 0.8 ml로 하였다. 검출기로는 ELSD를 사용하였다. Spray chamber의 온도는 25°C, drift chamber와 detection chamber의 온도는 각각 70°C로, 질소압은 55.5 psi로 유지하였다. 檢液의 주입용량은 각각 20 μl로 하였고 3회 반복 실시하였다. 각 사포닌 표준액 및桔梗 시료의 HPLC pattern은 Fig. 2에 나타내었다.

결과 및 고찰

사포닌 표준액의 直線性(linearity) 및 측정범위 검토 - Deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 및 platycodin D 등 정제된 사포닌 표준품을 각각 3단계의 농도(100, 50 및 25 μg/ml)로 조절하여 표준액을 조제하였다. 각 사포닌 표준액 20 μl를 취하여 HPLC를 실시한 후 피크면적을 산출하여 농도변화에 따른 calibration curve를 작성하였다 (Table. 1). Deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 및 platycodin D는 25~100 μg/ml의 농도 범위에서 상관계수(r^2)가 0.99 이상으로 양호한 直線性을 나타내었으며 각 사포닌 검체의 최소 검출한계는 0.7~1.5 μg/ml로 나타났다.

분석조건의 精密度 (Precision) 검토 - 동일한 사포닌 표준액을 1일 1회씩 5일 반복 측정하여 얻어진 HPLC profile로부터 각각 머무름 시간(retention time)과 피크면적(peak area)에 대한 정밀도(日間精密度 intra-day precision)를 조사하였다. 5일 반복 측정된 각 사포닌 표준액의 피크 면적을 기준으로 하여 산출된 표준편차(日間精密度)는, deapioplatycoside E의 경우 3.74%, platycoside E는 4.39%, deapioplatycodin D₃는 2.64%, platycodin D₃는 3.42%, polygalacin D₂는 1.56%, platycodin D₂는 2.23%, platycodin D는 1.55%로 각각 산출되었다. 또한, 5일 반복 측정된 각 사포닌 표준액의 머무름 시간(retention time)에 대한 표준편차

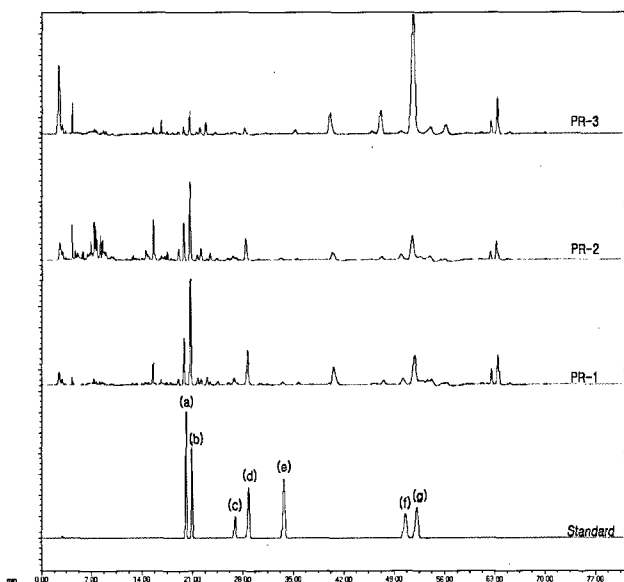


Fig. 2. HPLC pattern of the saponin fractions from Platycodi Radix.

(a) deapioplatycoside E, (b) platycoside E, (c) deapioplatycodin D₃, (d) platycodin D₃, (e) polygalacin D₂, (f) platycodin D₂, (g) platycodin D

PR-1: 21 year old Platycodi Radix cultivated in Korea

PR-2: 3 year old Platycodi Radix cultivated in Korea

PR-3: 3 year old Platycodi Radix cultivated in China

Table I. Calibration curves for the seven saponins of *Platycodi Radix*

| saponin | standard curves | r^2 | limit of quantification ($\mu\text{g/ml}$) |
|----------------------------------|--------------------|--------|--|
| deapioplatycoside E | $y=0.0151x-0.8810$ | 0.9999 | 1.03 |
| platycoside E | $y=0.0127x-0.7599$ | 0.9993 | 0.96 |
| deapioplatycoside D ₃ | $y=0.0142x-1.2955$ | 0.9925 | 0.78 |
| platycodin D ₃ | $y=0.0145x-0.6993$ | 0.9990 | 1.13 |
| polygalacin D ₂ | $y=0.0282x-0.8599$ | 0.9994 | 0.75 |
| platycodin D ₂ | $y=0.0091x-0.6126$ | 0.9992 | 1.32 |
| platycodin D | $y=0.0102x-0.7572$ | 0.9990 | 1.47 |

의 경우, deapioplatycoside E는 0.17%, platycoside E는 0.28%, deapioplatycodin D₃는 0.97%, platycodin D₃는 1.16%, polygalacin D₂는 1.45%, platycodin D₂는 1.52%, platycodin D는 1.42%로 산출되었다. 결론적으로 머무름 시간(retention time)과 피크면적(peak area)에 대한 표준편차는 각각 5% 및 2% 이내로 나타나 양호한日間精密度(intra-day precision)를 보여주었다.

한편, 5시간 간격으로 반복실험을 실시하여 머무름 시간과 피크 면적에 대한 日內精密度를 조사하였다. 피크 면적에 대한 표준편차의 경우, deapioplatycoside E는 3.51%, platycoside E는 2.01%, deapioplatycodin D₃는 3.83%, platycodin D₃는 3.31%, polygalacin D₂는 2.32%, platycodin D₂는 4.94%, platycodin D는 3.58%로 각각 환산되어, 각 사포닌 種의 日內精密度는 모두 5%이내로 나타났다. 한편, 머무름 시간에 대한 표준편차의 경우, deapioplatycoside E는 0.23%, platycoside E는 0.22%, deapioplatycodin D₃는 0.13%, platycodin D₃는 0.08%, polygalacin D₂는 0.07%, platycodin D₂는 0.02%, platycodin D는 0.16%로 환산되었으며, 각 사포닌 種의 日內精密度는 모두 1%이내로 나타났다. 각 사포닌의 日內精密度와日間精密度는 Table. II에 나타내었다.

桔梗 중 사포닌 함량 및 분포패턴 분석 - 21년생 한국산桔梗(PR-1), 3년생 한국산桔梗(PR-2) 및 중국산桔梗(PR-3)의 열수추출물로부터 각각 사포닌 分割을 조제하고 조제된 사포닌分割을 檢液으로 하여 deapioplatycoside E,

Table II. Inter-day & intra-day variability of the retention time of saponins (%)

| saponin | Inter-day (n=5) | Intra-day (n=5) |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| deapioplatycoside E | 0.236 | 0.177 |
| platycoside E | 0.227 | 0.283 |
| deapioplatycoside D ₃ | 0.134 | 0.976 |
| platycodin D ₃ | 0.084 | 1.163 |
| polygalacin D ₂ | 0.072 | 1.458 |
| platycodin D ₂ | 0.024 | 1.520 |
| platycodin D | 0.163 | 1.428 |

platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 및 platycodin D 등 각 사포닌의 함량 및 분포패턴을 비교 검토하였다 (Table. III).

우선 중국산桔梗의 경우 platycodin D가 함유 사포닌의 대부분(88%)을 차지하고 있으며 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂ 등 platycodin D를 제외한 나머지 사포닌의 함량은 한국산桔梗에 비하여 10~20%에 불과하였다. 반면 한국산桔梗은 栽培年수에 관계없이 7종의 사포닌이 고르게 분포되어 있어 Saeki 등의 연구결과와 잘 일치하고 있다.

한국산桔梗의 경우 栽培年수에 따라 총 사포닌의 함량 및 사포닌의 분포패턴이 큰 차이를 보이지는 않았으나 platycoside E 및 deapioplatycoside E 등 platycoside D에

Table III. Contents of each saponins in *Platycodi Radix* ($\mu\text{g/ml}$)

| saponin | PR-1 (Korea, 21 yr) | PR-2(Korea, 3 yr) | PR-3(China, 3 yr) |
|----------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| deapioplatycoside E | 124.11 \pm 0.18 | 84.10 \pm 0.42 | 14.22 \pm 0.21 |
| platycoside E | 339.56 \pm 0.19 | 212.15 \pm 0.53 | 41.65 \pm 0.69 |
| deapioplatycoside D ₃ | 60.85 \pm 2.11 | 55.38 \pm 0.52 | 13.62 \pm 1.63 |
| platycodin D ₃ | 155.68 \pm 0.65 | 109.72 \pm 0.36 | 27.09 \pm 1.18 |
| polygalacin D ₂ | 136.82 \pm 0.37 | 37.29 \pm 0.15 | Trace |
| platycodin D ₂ | 97.73 \pm 0.82 | 128.76 \pm 0.65 | 40.54 \pm 1.49 |
| platycodin D | 442.54 \pm 0.16 | 558.33 \pm 0.45 | 1063.84 \pm 0.75 |

Values represent the mean \pm S.D. (n=3)

비하여 構成糖의 숫자가 큰 사포닌의 함량이 3년생 桔梗에 비하여 21년생 桔梗의 경우에 각각 약 1.5 배 씩 증가되었으며 이들 사포닌들은 중국산 桔梗의 경우에는 거의 검출되지 아니하였다. (Table. II).

그 밖에 한국산 桔梗의 경우 deapioplatycodin D₃, platycodin D₃ 및 polygalacin D₂의 함량은 栽培年수에 따라 큰 차이가 관찰되지 않았으며 platycodin D₂ 및 platycodin D의 함량은 통계적 유의성은 없으나 3년생 桔梗에 비하여 21년생 桔梗의 경우에 오히려 적은 양상을 보여주었다.

이와 같은 연구결과를 종합하여 보면 중국산 桔梗의 경우 platycodin D를 최종 생성물로 하여 사포닌의 생합성과정이 대부분 종료되는 것으로 사료되며 이와는 달리 한국산 桔梗의 경우 platycodin D의 생성 이후에도 계속하여 糖附加(glycosylation) 반응이 진행된 결과 platycodin D₂, platycodin D₃, deapioplatycodin D₃, platycoside E 및 deapioplatycoside E 등 platycodin D에 비하여 構成糖의 숫자가 큰 사포닌 성분들을 생산하는 것으로 사료되며, 이와 같은 糖附加(glycosylation) 반응은 栽培年수가 장기화됨에 따라 계속적으로 진행된 결과, 21년생 桔梗의 경우에는 platycoside E 및 deapioplatycoside E 등 platycodin D에 비하여 構成糖의 숫자가 크게 증가된 사포닌 성분들의 함량이 3년생 桔梗에 비하여 더욱 증가된 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어 연구개발사업 (자생식물이용 기술개발사업) 및 과학기술부 바이오연구사업으로부터 연구비 지원을 받아 수행하였습니다.

인용문헌

1. Kim, Y.P., Lee, E. B., Kim, S. Y., Li, D., Ban, H. S., Lim, S.

- S., Shin, K. H. and Ohuchi, K. (2001) Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med.* **67**: 362-364.
2. Shin, C. Y., Lee, W. J., Lee, E. B., Choi, E. Y. and Ko, K. H. (2002) Platycodin D and D3 increase airway mucin release in vivo and in vitro in rats and hamsters. *Planta Med.* **68**: 221-225.
3. Lee, K.J. and Jeong, H.G. (2002) Protective effect of Platycodi Radix on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, **40**: 517-525.
4. Lee, K.J., You, H.J., Park, S.J., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Jeong, T.C. and Jeong, H.G. (2001) Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen -induced liver damage in mice. *Cancer Lett.*, **174**: 73-81.
5. Choi, C.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Seo, J.K. and Jeong, H.G. (2001) Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from murine macrophages. *International Immunopharmacology*, **1**: 1141-1151.
6. Choi, C.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Hahm, K.S. and Jeong, H.G. (2001) Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Cancer Lett.*, **166**: 17-25.
7. Saeki T, Koide K and Nikaide T (1999) A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum* by HPLC analysis. *Planta Med.* **65**: 428-431.
8. Kim, G.S., Kim, H.T., Seong, J.D., Park, H.S., Kim, S.D. (2002) Quantitative analysis of platycodin d from *Platycodon grandiflorum* by HPLC-ELSD. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **10**: 200-205.
9. Kim, Y.S., Kim, J.S., Choi, S.U., Kim, J.S., Lee, H.S., Roh, S.H., Jeong, Y.C., Kim, Y.K. and Ryu, S.Y. (2005) Isolation of a new saponin and cytotoxic effect of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* on human tumor cell lines. *Planta Med.* **71**: 566-568.

(2007년 4월 30일 접수)