Rational and efficient approach to the preparation of the active fractions of *Scutellaria baicalensis*

Doo-Young Kim¹ · Won Jun Kim¹ · Jung-Hee Kim¹ · Sei-Ryang Oh¹ · Hyung Won Ryu¹

황금(*Scutellaria baicalensis*) 유효분획물 제조의 합리적이고 효율적인 접근방법

김두영¹ · 김원준¹ · 김정희¹ · 오세량¹ · 류형원¹

Received: 1 December 2018 / Accepted: 27 December 2018 / Published Online: 31 March 2019
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

Abstract *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Scutellariae Radix*) has been widely used as a dietary ingredient and traditional herbal medicine such as diuretic, hyperlipidemia, antibacterial, anti-allergy, anti-inflammatory and anticancer properties. In this study, the isolation of biomarkers or bioactive compounds from complex *S. baicalensis* extracts represents an essential step for de novo identification and bioactivity assessment. The bioactive fraction consisted of eight compounds which was chromatographed on an analytical high performance liquid chromatography column using two different gradient runs. A simulative replacement of the analytical column with a medium pressure liquid chromatography and open column allowed the determination of gradient profile to allow sufficient separation in the preparative scale. From the optimized method, eight standard compounds have been identified in the fractions. In addition, MS, UV, HRMS detection was provided by ultraperformance liquid chromatographyequadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QToF-MS) of all fractions. Therefore, this scale up procedure was successfully applied to a *S. baicalensis* extract.

Keywords High performance liquid chromatography · Medium pressure liquid chromatography · Open column · *Scutellaria baicalensis*

서론

천연물화학 연구분야에서 활성유도분획법(bioassay-guided fractionation)과 스케일 업 분취방법은 효율적인 기술이며, 20세기 초반 분석 연구자, 약리학자 및 독성 연구 학자들이 널리 사용했던 것으로 보이지만 실제로 1950년대부터 공식적으로 개념화 되어 현재 정부 및 연구 기관을 비롯한 학계와 전 세계 실험실에서 천연물소재를 이용한 치료제를 발견하는데 사용되고 있다[1,2]. 또한 최근에는 천연물소재를 이용한 신약개발에서 원료소재(BRM, Botanical Raw Material)와 원료의약품(DS, Drug Substance) 표준화(CMC, Chemistry, Manufacturing, Control)의 처음부터 최종단계까지 활용되는 연구방법들 중 하나이다. 천연물소재 연구는 일반적으로 추출물에서 활성을 스크리닝 하기 위한 분석법에서 수행되는 다음의 5 단계 워크플로우로 구성된다. 1) 용매를 사용하여 분쇄시료로부터 대사 물질을 추출하고, 2) 추출된 추출물의 크로마토그래피법에 의한 분획화, 3) 각 분획물들의 생리활성 검정 스크리닝, 4) 생리활성 분획으로부터 선정된 대사체의 분리, 5) 분리된 순수 단일성분들의 구조분석 그리고 생리활성의 효능 평가와 메커니즘 규명으로 진행된다. 때때로 활성유도분획법과 스케일 업을 이용한 생리활성 물질들을 분리하는 동안 몇 가지 실패와 함정이 있다. 이러한 이유는 생리활성 화합물이 반복적인 칼럼을 통해 분리 중에 분해되거나 생리활성 화합물이 매우 낮은 농도로 존재하여 효율적으로

Hyung Won Ryu (✉)
E-mail: ryuhw@kribb.re.kr

¹Natural Medicine Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 30, Yeongudanji-ro, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28116, Republic of Korea

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.

분리 할 수 없고, 다양한 화합물들과 생리활성 사이에서 복합적인 시너지 효과(MCMT, multi-component multi-target)에 의해 일어날수 있다[3-5].

본 연구에서 사용된 약재인 속 썩은 풀의 뿌리인 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 주로 동아시아 일대에 서식하고 한방에서 농혈 등의 약으로 쓰며 해열, 이뇨, 항균, 항진균, 혈압강하, 혈당상승 효능 등이 보고된 중요한 약재이다[6-8]. 효능의 주요성분으로 flavone 계열의 baicalin, wogonoside와 그들의 aglycone인 baicalein wogonin가 주성분으로 알려져 있고 과학적인 효능 규명 연구로 anti-cancer[9], hepatoprotection[10], antibacterial[11], antiviral[12], antioxidant[13], anticonvulsant[14], neuroprotective[15] 결과들이 보고 되었다. 선행연구에서 다양한 생리활성과 동속(꿀무꽃속, *Scutellaria* genus)에서 200종 이상의 많은 화합물들을 분리 보고한 결과[7,16]를 토대로 황금의 활성 유도 분획 물로부터 수십밀리그램 수준의 미량성분들을 순수분리하기 위해 분석부터 분취까지 방법을 표준절차방법으로 확립하고 분석을 통해 지표성분들을 추적하고 나아가 분리 및 구조 동정을 완료하였다. 또한, 각각 제조된 표준 유효분획물들에 대해 지표성분 8종의 분광학적 정보를 통해 스케일 업 생산 배치별 동등성을 입증하여 제조법에 대한 유효성을 검증하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용한 중국산 황금 10 kg은 2017년 1월 국내 유통 도매 경동시장 진흥건재약업사에서 구매하여 확보하였고, 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행(Korea Plant Extract Bank)에서 동정하고 식물표본실에 증거표본을 보관하였다(PBC-448, 485).

시약 및 기기

Ethanol (EtOH) 용매(SK chemical, KR)는 추출물 제조를 위해 사용하였으며, 타겟 화합물 분석과 분리를 위해 high performance liquid chromatography (HPLC)용 methanol (MeOH, Honeywell, Moris Plains, NJ, USA)과 acetonitrile (ACN, Honeywell, Moris Plains, NJ, USA), formic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), leucine enkephalin (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 ultraperformance liquid chromatographyequadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QToF-MS, Waters, Milford, MA, USA), PDA (Waters, Milford, MA, USA), HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), preparative-HPLC (PLC, Gilson, Middleton, WI, USA), Armen MPLC (Gilson, Middleton, WI, USA), K-Preb LAB MPLC (YMC, Kyoto, Japan) 기기를 이용하여 진행하였다. 구조분석을 위해 Bruker Biospin Advance II 900 NMR spectrometer (^1H NMR 900 MHz, ^{13}C NMR 225 MHz), Bruker AVANCE III HD 700 (^1H NMR 700 MHz, ^{13}C NMR 175 MHz) Bruker AM400 (^1H NMR 400 MHz, ^{13}C NMR 100 MHz, Billerica, MA, USA)에 DMSO- d_6 (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA)를 사용하여 분석하였다.

황금 추출물 제조

음건한 황금 10 kg을 다목적 분쇄기(DSMP-370, Korea)를 이용하여 잘게 분쇄하고 94% ethanol (94% EtOH)을 가하여 실온에서 24시간 3회 반복 추출한 후 여과하였다. 얻어진 여액을 감압 농축하여 94% EtOH 추출물(1.14 kg, 수율 11.4%)을 얻었다.

UPLC-QToF-MS 분석조건

황금 칼럼분획물의 지표물질의 정성분석을 위해 UPLC-QToF-MS 분석은 BEH C_{18} (2.1×100 mm, 1.7 μm) 칼럼관과 PDA 검출기, MS를 장착한 UPLC에 유속 0.4 mL/min, 용매는 0.1% formic acid가 포함된 증류수(A)와 ACN (B)을 사용하여 수행하였다. UPLC 이동상의 용매조성은 0.0-1.0 min 20% B, 1.0-11.0 min 60% B, 11.0-12.0 min 60-100% B, 12.0-13.4 min 100% B, 13.4-13.5 min 20% B 조건을 이용하였으며, 시료는 2 μL (1 mg/mL) 주입하여 분석을 실시하였다.

HPLC-DAD 분석조건

황금의 지표성분 화합물들의 위치를 확인하기 위해, HPLC에 YMC ODS AQ (250×4.6 mm, 5 μm) 칼럼관과 diode array detection (DAD) 검출기를 장착하고 칼럼오븐의 온도를 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 각 분획물에 대한 분석을 진행하였다. A용매는 0.1% formic acid가 포함된 증류수로, B용매는 0.1% formic acid가 포함된 MeOH으로 준비하였다. HPLC 이동상 조건은 0.0-5.0 min 50% B, 5.0-50.0 min 50-75% B, 50.0-55.0 min 75% B, 55.0-57.0 min 75-50% B, 57.0-60.0 min 50% B를 유속 1.0 mL/min로 흘렸으며, 시료는 5 μL (1 mg/mL) 주입하여 분석을 실시하였다(Table 1).

분취기기 및 개방형칼럼을 이용한 황금 유효분획물 제조

Preparative-HPLC에 YMC ODS AQ (250×20 mm, 10 μm) 칼럼관을 장착하여 HPLC와 동일한 분석조건에서 유속을 20.0 mL/min로 변경하여 흘렸으며, 시료는 1.0 mL (100 mg/mL) 주입하여 분취를 실시하였다. Armen MPLC에는 YMC ODS AQ (250×50 mm, 10 μm) 칼럼관을 장착하고 초기 이동상 조건을 수정하여 0.0-10.0 min 40% B, 10.0-70.0 min 40-60% B, 70.0-72.0 min 60-76% B, 72.0-95.0 min 76-100% B, 95.0-100.0 min 100% B, 100.0-105.0 min 100-40% B, 105.0-120.0 min 40% B를 유속 50.0 mL/min로 흘렸으며, 시료는 1 mL 또는 7 mL (1 g/mL) 주입하여 분취를 실시하였다. K-Preb LAB MPLC에는 YMC ODS AQ (550×50 mm, 10 μm) 칼럼관을 장착하고 이동상 초기 조건을 수정하여 0.0-5.0 min 50% B, 5.0-15.0 min 50-60% B, 15.0-35.0 min 60-80% B, 35.0-55.0 min 80-100% B, 55.0-57.0 min 100% B, 57.0-67.0 min 100-50% B, 67.0-88.0 min 50% B를 유속 80.0 mL/min로 흘렸으며, 시료는 10 mL (1 g/mL) 주입하여 분취를 실시하였다. 개방형칼럼(open column, 15×45 cm)에서는 추출물(100.0 g)을 Asahi C18 충전제(2.23 kg)에 충전하고 이동상 조건을 MeOH과 DW를 혼합하여 50% (4 L)→70% (2 L)→100% (4 L)를 흘려 대량 분획물을 얻었다(Table 1).

단일화합물 분리 및 구조분석

황금추출물에서 활성유도분획법을 위해 11개의 칼럼분획물들(SB Frs. 1-10)을 준비하여 MG53-IRS-1 결합 억제(MID, MG53-IRS-1 dissociator) 스크리닝을 통해 가장 우수한 SB Fr. 10번 칼럼분획물을 확인하였다(data not shown). SB Fr. 10번을 대량 확보 가능한 합리적이고 효율적인 방법인 개방형칼럼 분취 방법으로 확보된 표준 유효분획물을 prep-HPLC에 Waters Atlantis T3 칼럼을 사용하여 증류수(A), MeOH (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0-5 min 50% MeOH, 5-30 min 100% MeOH, 30-35 min 100% MeOH, 35-36 min 50% MeOH, 36-46 min 50% MeOH 조건으로 세부 분획물(SB Frs. 10-1~10-6)을 반복하여 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 지표성분들을 분리하고자 하였다. SB Fr. 10-2를 prep-HPLC에 Acclaim™ polar advantage II (PAII) 칼럼을 사용하여 증류수(A), ACN (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0-5 min 50% (B), 5-50 min 75% (B), 50-55 min 75% (B), 55-57 min 50% (B) 조건으로 SB Fr. 10-2-1 (5, skullcapflavone II, 31.0 mg), SB Fr. 10-2-2 (1, 5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavone, 30.0 mg)를 분리하였다. SB Fr. 10-3을 prep-HPLC에 Acclaim™ PAII 칼럼을 사용하여 증류수(A), ACN (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0-5 min 50% (B), 5-50 min 75% (B), 50-55 min 75% (B), 55-57 min 50% (B) 조건으로 SB Fr. 10-3-1 (7, dihydrooxylin A, 16.0 mg), SB Fr. 10-3-2 (2, wogonin, 30.0 mg), SB Fr. 10-3-3 (1, 5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavone, 5.0 mg)를 분리하였다. SB Fr. 10-4을 prep-HPLC에 Acclaim™ PAII 칼럼을 사용하여 증류수(A), ACN (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0-5 min 50% (B), 5-50 min 75% (B), 50-55 min 75% (B), 55-57 min 50% (B) 조건으로 SB Fr. 10-4-1 (4, 5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone, 18.0 mg), SB Fr. 10-4-2 (2, wogonin, 33.0 mg)를 분리하였다. SB Fr. 10-5을 prep-HPLC에 Acclaim™ PAII 칼럼을 사용하여 증류수(A), ACN (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0-5 min 50% (B), 5-50 min 75% (B), 50-55 min 75% (B), 55-57 min 50% (B) 조건으로 SB Fr. 10-5-1 (6, oroxylin A, 20.0 mg), SB Fr. 10-5-2 (3, 5,7-dihydroxyflavone, 2.0 mg)를 분리하였다. SB Fr. 10-6을 prep-HPLC에 Acclaim™ PAII 칼럼을 사용하여 증류수(A), ACN (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0-5 min 50% (B), 5-50 min 75% (B), 50-55 min 75% (B), 55-57 min 50% (B) 조건으로 SB Fr. 10-6-1 (6, oroxylin A, 27.0 mg), SB Fr. 10-6-2 (8, 5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone, 12.6 mg)를 분리하였다. 순수하게 분리/정제한 생리활성물질의 구조를 동정하기 위하여 NMR, MS, UV 등의 분광학적인 기기를 사용하였다. 먼저, ¹H-, ¹³C-NMR에서 수소와 탄소의 개수와 chemical shift 값으로 기본적인 골격을 예상하였고, 2D-NMR (COSY, HMQC, HMBC, DEPT)에서 수소-탄소의 연관관계를 통해 치환기의 정확한 위치와 탄소 차수를 확인하여 물질의 구조를 확인하였고 선행문헌의 화합물들을 확인하여 구조를 결정하였다[16-25].

Peak 1 (5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavone)

노란색 분말, HRESIMS $m/z=301.0737$ [$M+H$]⁺ (calcd for C₁₆H₁₃O₆, 301.0712), $\lambda_{\max}$ (MeOH) 220, 269, 336 nm. ¹H-

NMR (900 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 7.04 (1H, s, H-3), 6.86 (1H, s, H-6), 7.04 (1H, m, H-3'), 7.39 (1H, m, H-4') 6.98 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-5'), 7.85 (1H, dd, $J=7.9, 1.2$ Hz, H-6'), 3.74 (3H, s, 8-OCH₃), 12.97 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (225 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 156.9(C-2), 108.5 (C-3), 182.3 (C-4), 152.8 (C-5), 94.4 (C-6), 158.0 (C-7), 131.5 (C-8), 152.7 (C-9), 104.0 (C-10), 117.4 (C-1'), 156.9 (C-2'), 117.2 (C-3'), 132.9 (C-4'), 119.5 (C-5'), 128.6 (C-6'), 60.0 (8-OCH₃).

Peak 2 (wogonin)

노란색 분말, HRESIMS m/z 285.0736 [$M+H$]⁺ (calcd for C₁₆H₁₃O₅, 285.0763), $\lambda_{\max}$ (MeOH) 249, 278, 320 nm. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 6.99 (1H, s, H-3), 6.31 (1H, s, H-6), 8.07 (1H, dd, $J=6.0, 2.0$ Hz, H-2'), 7.61 (3H, m, H-3', 4', 5'), 8.07 (1H, dd, $J=6.0, 2.0$ Hz, H-6'), 3.86 (3H, s, 8-OCH₃), 12.50 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 162.9 (C-2), 105.1 (C-3), 182.0 (C-4), 156.3 (C-5), 99.2 (C-6), 157.7 (C-7), 127.8 (C-8), 149.6 (C-9), 103.6 (C-10), 130.9 (C-1'), 126.2 (C-2'), 129.2 (C-3'), 132.0 (C-4'), 129.2 (C-5'), 126.2 (C-6'), 61.0 (8-OCH₃).

Peak 3 (5,7-dihydroxyflavone)

노란색 분말, HRESIMS $m/z=255.0650$ [$M+H$]⁺ (calcd for C₁₅H₁₁O₄, 255.0657), $\lambda_{\max}$ (MeOH) 268, 313 nm.

Peak 4 (5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone)

노란색 분말, HRESIMS $m/z=315.0868$ [$M+H$]⁺ (calcd for C₁₇H₁₅O₆, 315.0869), $\lambda_{\max}$ (MeOH) 278, 320 nm. ¹H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 6.94 (1H, s, H-3), 8.05 (1H, dd, $J=6.4, 1.6$ Hz, H-2', 6'), 7.59 (3H, m, H-3', 5'), 3.86 (3H, s, 8-OCH₃), 3.76 (3H, s, 6-OCH₃), 12.6 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (175 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 162.6 (C-2), 102.3 (C-3), 182.0 (C-4), 148.4 (C-5), 132.0 (C-6), 145.7 (C-7), 131.0 (C-8), 151.3 (C-9), 104.6 (C-10), 132.0 (C-1'), 126.2 (C-2'), 129.3 (C-3'), 128.4 (C-4'), 129.3 (C-5'), 126.2 (C-6'), 61.1 (8-OCH₃), 60.0 (6-OCH₃).

Peak 5 (skullcapflavone II)

노란색 분말, HRESIMS m/z 375.1052 [$M+H$]⁺ (calcd for C₁₉H₁₉O₈, 375.1080), $\lambda_{\max}$ (MeOH) 266, 310, 352 nm. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 6.34 (1H, s, H-3), 6.62 (1H, dd, $J=8.4, 1.2$ Hz, H-3'), 7.32 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-4'), 6.62 (1H, dd, $J=8.4, 1.2$ Hz, H-5'), 4.01 (3H, s, 7-OCH₃), 3.82 (3H, s, 6-OCH₃), 3.80 (3H, s, 8-OCH₃), 3.75 (3H, s, 6'-OCH₃), 12.64 (1H, s, 5-OH), 10.15 (1H, s, 2'-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 162.4 (C-2), 111.9 (C-3), 182.5 (C-4), 146.2 (C-5), 135.8 (C-6), 152.6 (C-7), 132.5 (C-8), 148.5 (C-9), 108.9 (C-10), 106.3 (C-1'), 156.6 (C-2'), 108.8 (C-3'), 132.5 (C-4'), 102.3 (C-5'), 158.3 (C-6'), 60.6 (6-OCH₃), 61.5 (7-OCH₃), 61.7 (8-OCH₃), 55.9 (6'-OCH₃).

Peak 6 (oroxylin A)

노란색 분말, HRESIMS m/z 285.0746 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{16}H_{13}O_5$ 285.0763), λ_{max} (MeOH) 250, 264, 314 nm. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H 6.95 (1H, s, H-3), 6.63 (1H, s, H-8), 8.05 (1H, dd, $J=6.4$, 1.6 Hz, H-2'), 7.58 (3H, m, H-3', 4', 5'), 8.05 (1H, dd, $J=6.4$, 1.6 Hz, H-6'), 3.76 (3H, s, 6-OCH₃), 10.79 (1H, s, 7-OH), 12.92 (1H, s, 5-OH); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ_C 163.2 (C-2), 104.6 (C-3), 182.2 (C-4), 152.7 (C-5), 130.7 (C-6), 157.6 (C-7), 94.4 (C-8), 152.5 (C-9), 104.3 (C-10), 131.5 (C-1'), 126.4 (C-2'), 129.1 (C-3'), 132.0 (C-4'), 129.1 (C-5'), 126.4 (C-6'), 59.9 (6-OCH₃).

Peak 7 (dihydrooroxylin A)

노란색 분말, HRESIMS m/z 287.0898 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{16}H_{15}O_5$, 287.0919), λ_{max} (MeOH) 231, 295 nm. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H 5.56 (1H, dd, $J=13.0$, 3.0 Hz, H-2), 2.49 (1H, dd, $J=17.1$, 3.0 Hz, H-3), 3.24 (1H, dd, $J=17.1$, 13.0 Hz, H-3), 6.01 (1H, s, H-8), 7.37-7.52 (5H, s, H2'-6'), 3.66 (3H, s, 6-OCH₃), 12.16 (1H, s, 5-OH); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ_C 78.4 (C-2), 42.1 (C-3), 196.6 (C-4), 157.8 (C-5), 129.1 (C-6), 159.6 (C-7), 95.1 (C-8), 155.1 (C-9), 101.8 (C-10), 138.7 (C-1'), 126.6 (C-2', 6'), 128.5 (C-3', 4', 5'), 60.0 (6-OCH₃).

Peak 8 (5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone)

노란색 분말, HRESIMS m/z 345.0964 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{18}H_{17}O_7$, 345.0974), λ_{max} (MeOH) 277, 337 nm. 1H -NMR (700 MHz, DMSO- d_6) δ_H 7.22 (1H, s, H-3), 7.07 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3'), 7.40 (1H, m, H-4'), 7.00 (1H, m, H-5'), 7.87 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 3.82 (3H, s, 6-OCH₃), 3.89 (3H, s, 7-OCH₃), 4.01 (3H, s, 8-OCH₃), 12.73 (1H, s, 5-OH); ^{13}C -NMR (175 MHz, DMSO- d_6) δ_C 162.1 (C-2),

106.2 (C-3), 182.8 (C-4), 148.9 (C-5), 135.7 (C-6), 158.4 (C-7), 132.6 (C-8), 145.4 (C-9), 103.9 (C-10), 117.6 (C-1'), 158.4 (C-2'), 117.0 (C-3'), 133.1 (C-4'), 119.0 (C-5'), 128.2 (C-6'), 61.0 (6-OCH₃), 61.8 (7-OCH₃), 61.4 (8-OCH₃).

결과 및 고찰**활성유도분획법으로 황금 유효분획물 선정**

제2형 당뇨병 치료를 위한 새로운 타겟으로 인슐린 신호전달을 조절하는 MG53 신규 단백질을 타겟으로 황금추출물에서 활성 유도분획법을 통해 칼럼분획물로부터 MG53-IRS-1 결합 억제 [26] 스크리닝을 통해 가장 높은 저해활성을 갖는 유효분획물 Fr. 10번을 선발하였고 MID에 활성을 나타낸 타겟 성분을 순수 분리 연구를 실시하였다(data not shown). 그러므로 유효성분 규명 및 *in vivo* 실험을 위한 활성이 강하게 나타난 Fr. 10번과 동등하고 유사한 패턴으로 지표물질들이 다량 함유된 표준 유효분획물 대량제조가 필요하여 분취 스케일 업 연구를 실시하였다.

분취를 위한 HPLC 분석조건 확립

산업적 활용을 위해서는 비용단가 문제가 가장 큰 이슈이며 개발 초기단계 전부터 원료소재 확보를 비롯한 분석, 생산 등에 대해 고민하여 진행해야 한다. 최적의 분석조건을 확립하기 위해서는 산업적으로 활용이 어려운 ACN이 아닌 MeOH 용매를 기본으로 하는 분석조건을 확립하였다. 선행문헌을 통해 다양한 분석조건을 검토하였지만 목표로 하는 유효분획물에 포함된 지표성분 8종을 분석하기 위한 최적의 분석조건은 확인되지 않았다. 반복적인 분석조건 개발 및 검정을 통해 확립된 분석조건은 Table 1과 같으며, 크게 4개의 peak를 검출할 수 있는 조건을 확인하였다(Fig. 1A). 검출된 4개의 peak들은 flavone의 구조로 매우 유사한 극성과 형태로 존재하여 MeOH을 사용한 분석조건에서 낮은 resolution과 overlapping으로 정확하게 분리되

Table 1 Comparative description of various preparative column chromatographic techniques for the determination of eight standard compounds in *S. baicalensis* extracts

(A)		(B)		(C)		(D)		(E)		(F)
YMC ODS AQ 250×4.6 mm, 5 μ m (1 mg/mL inj. 5 μ L) Flow: 1.00 mL		YMC ODS AQ 250×20 mm, 10 μ m (100 mg/mL inj. 1 mL) Flow: 20.00 mL		YMC ODS AQ 250×50 mm, 10 μ m (1 g/mL inj. 1 mL) Flow: 50.00 mL		YMC ODS AQ 250×50 mm, 10 μ m (1 g/mL inj. 7 mL) Flow: 50.00 mL		YMC ODS AQ 250×50 mm, 10 μ m (1 g/mL inj. 10 mL) Flow: 80.00 mL		C18 Asahi 15×45 cm, 75 μ m 2.23 kg (100 g)
Time	B (%)	Time	B (%)	Time	B (%)	Time	B (%)	Time	B (%)	B (%)
(Initial)	50	(Initial)	50	(Initial)	40	(Initial)	40	(Initial)	50	50 (4 L)×5
5.00	50	5.00	50	10	40	10	40	5	50	
50.00	75	50.00	75	70	60	70	60	15	60	
55.00	75	55.00	75	72	76	72	76	35	80	70 (2 L)×8
57.00	50	57.00	50	95	100	95	100	55	100	
60.00	50	60.00	50	100	100	100	100	57	100	100 (4 L)×3
				105	40	105	40	67	50	
				120	40	120	40	88	50	
Weight (mg)	-			179.1		1232.4		1684.4		12740
Yield (%)	-			17.9		17.6		16.8		12.7

Fig. 1 The target fraction consisting of eight compounds was chromatographed on an analytical high performance liquid chromatography (HPLC) column using two different gradient run for preparative HPLC, MPLC, and open column optimization. (A) HPLC chromatogram, (B) preparative HPLC chromatogram, (C-D) MPLC (Armen) chromatogram, (E) YMC K-Preb300 chromatogram of *S. baicalensis* extract

지 않았다. 그러나 표준 유효분획물에 포함된 8종의 지표성분들을 순수 분리하여 NMR을 이용한 구조동정과 분리된 표준품을 이용한 MS 성분비교 추적을 통해 화합물들이 peak 1,2, peak 3,4, peak 5,6, peak 7,8번이 각각 하나의 peak로 존재하는 것을 확인하였다.

분석에서 분취까지 스케일 업 연구

Preparative-HPLC, MPLC, 개방형칼럼과 호환되는 효율적이고 예측 가능한 순수 단일성분 분리 및 정제 최종목표를 달성하기 위해서는 분석 HPLC와 분취 칼럼크로마토그래피 사이에서 동등한 선택성과 성능이 보장되어야 한다. 그러므로 스케일 업을 위한 크로마토그래피 이론에 대해 이해하고 숙달해야 한다. 또

한 gradient elution 방법을 수정보완하고 추출물 샘플 주입 중 분취 장비의 역압(Back pressure)의 증가로 일어나는 초기 유속 감소를 피하기 위해 충분히 잘 녹이는 용매와 초기 유속을 저속으로 하여 확산을 방지하고 스테인레스 상업용 분취용 칼럼과 최대 100-200 bar의 압력을 견딜 수 있는 2개의 분취용 Armen MPLC과 K-Preb LAB기기를 사용하여 겪게 되는 문제를 해소하였다.

HPLC 분석조건에서 확인된 MeOH/DW를 이동상으로 하는 gradient elution과 유속 1.0 mL/min 조건에서 확인된 분석조건을 기반으로 칼럼의 직경이 18.9배 늘어남에 따라 동일한 조건에서 prep. scale-up calculator (<https://ymc.de/preparative-lc-scale-up-calculator.html>)를 이용하여 유속을 약 20.0 mL/min로

Fig. 2 HPLC chromatograms of each fraction of *S. baicalensis* extract

증가시켜 preparative-HPLC와 Armen MPLC 분취실험을 진행하였다. Preparative-HPLC결과에서는 100 mg 추출물에서 HPLC 비교로 동일한 패턴을 보임을 확인(Fig. 1B)하여 MPLC에 추출물 1 g 로딩하여 Frs. 7+8번(179.1 mg)을 17.9%의 수율, 추출물 7 g일때는 Frs. 7+8번(1232.4 mg)을 17.6%의 수율로 비슷한 결과를 확인하였다(Fig. 1C, D). 황금 추출물을 10 g을 로딩한 K-Preb LAB에 스케일 업 진행에서는 칼럼 직경이 118.1배 늘어남에 따라 유속을 약 100.0 mL/min로 증가시켜 Frs. 2-5번(1684.4 mg)을 16.8%의 수율로 유사하게 확보하였다(Fig. 1E). 연속적으로 대량 표준 유효분획물 스케일 업 제조를 위해 개방형칼럼을 이용하여 황금추출물 100 g을 유사한 이동상 조건 50% MeOH 20 L, 70% MeOH 16 L, 100% MeOH 12 L 순서로 용출하는 칼럼크로마토그래피를 실시하고, 이를 5회 반복하여 표준 유효분획물을 대량으로 Frs. 2+3번(127.4 g)을 12.7%의 수율로 확보하고 HPLC, preparative-HPLC, MPLC 크로마토그램과 동일한 패턴을 나타냄을 최종확인 하였다(Fig. 2). 초기 활성유도분획법으로 선정한 활성 분획물 Fr. 10번과 동일한 표준 유효분획물을 확보하기 위해 스케일 업 진행한 각각의 시료들(Armen MPLC Frs. 7+8, K-Preb LAB Frs. 2-5, 개방형칼럼 Frs. 2+3)에 대해 샘플농도 1,000 ppm으로 TLC (전개용매 70% MeOH) 및 UPLC-QToF-MS로 추출물 및 표준 유효분획물을 fingerprint 및 profiling 비교분석하여 동등성을 확인하였다(Figs. 3, 4). 반복적인 분취방법을 통해 최종 MG53-IRS-1 결합 억제제 저해 효능이 있는 표준화된 제조공정을 확립하였고 preparative-HPLC, MPLC, 개방형칼럼 유효분획물의 제조량

과 회수율은 Table 1과 같으며, 분석 및 분취조건에서 확립된 크로마토그래피 조건 및 제조공정에 대한 표준절차방법을 구축하였다.

표준 유효분획물의 지표성분 MS분석

선행문헌에 황금추출물을 이용한 LC-UV/MS분석에서 다양한 성분들에 대한 분석법과 성분들에 대한 분광학적인 정보[20,21]를 토대로 표준 유효분획물내에 성분 profile하기 위해 UPLC-QToF-MS 분석하여 15분안에 검출되는 유효/지표성분 8종을 확인하였다(Fig. 4). Peak들은 $[M+H]^+$ 의 positive 모드에서 이온형태로 301, 285, 284, 315, 375, 285, 287, 345의 m/z (mass-to-charge ratio) 값을 확인하였다. Table 2를 보면 UVvis 최대흡광도, 머무름시간(t_R), 분자식, 예상화합물명을 확인할 수 있다. 분석된 peak 8개는 peak 1 (5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavone, t_R =5.25 min, $C_{16}H_{12}O_6$), peak 2 (wogonin, t_R =6.94 min, $C_{16}H_{12}O_5$), peak 3 (5,7-dihydroxyflavone, t_R =7.09 min, $C_{15}H_{10}O_4$), peak 4 (5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone, t_R =7.12 min, $C_{17}H_{14}O_6$), peak 5 (skullcapflavone II, t_R =7.27 min, $C_{19}H_{18}O_8$), peak 6 (oroxilin A, t_R =7.38 min, $C_{16}H_{12}O_5$), peak 7 (dihydrooroxilin A, t_R =7.49 min, $C_{16}H_{14}O_5$), peak 8 (5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone, t_R =7.80 min, $C_{18}H_{16}O_7$)로 Reaxys[®]와 NMR 구조동정된 성분라이브러리 그리고 온라인 데이터베이스 PubChem, ChemSpider로 예상화합물들 정보를 비교 확인하였다. 특히 peak 3은 표준 유효분획물에서 분리된 함량이 낮아 NMR 정보 확인이 어려워 기존문헌 MS결과 비교로 예상가능

Fig. 3 Thin layer chromatography (a) *S. baicalensis* extracts, (b) Armen fractions 7 and 8, (c) YMC K-Preb300 MPLC fractions 2-5, (d) Open Column fractions 2 and 3. TLC condition: developing solvent, MeOH : H₂O = 7:3 (v/v); visualization, UV 254, 366 nm; 5% H₂SO₄, visible; Loding, 5,000 ppm

Fig. 4 Base peak intensity (BPI) chromatograms in positive ion mode from extracts (A), representative fraction (B) by UPLC-QToF-MS

Table 2 Spectral characteristics of the metabolites (1-8) detected by UPLC-PDA-QToF-MS in *S. baicalensis* active fraction

Peak	ESI-MS t_R (min)	ESI-MS (m/z) [M+H] ⁺	Molecular formula	Identification
1	5.25	301.0737	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavone
2	6.94	285.0736	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	wogonin
3	7.09	255.0650	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	5,7-dihydroxyflavone
4	7.12	315.0868	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone
5	7.27	375.1052	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	skullcapflavone II
6	7.38	285.0746	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	oroxylin A
7	7.49	287.0898	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	dihydrooroxylin A
8	7.80	345.0964	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone

한 화합물 dihydrooroxylin A로 확인하였다[20,27].

결론적으로 최근까지 크로마토그래피 기술 발달로 천연물소재를 이용한 분석에서 분취로 효과적인 스케일 업 방법이 많이 보고되었지만 황금소재를 이용한 MG53-IRS-1 결합 억제 활성 유도분획법(bioassay-guided fractionation)을 통해 HPLC분석에서 MPLC, 개방형칼럼 분취 스케일 업 연구를 통해 표준 유효분획물을 쉽게 대량으로 제조할 수 있는 조건 및 제조공정에 대한 표준절차방법을 처음 확립하였다. 또한 유효성이 검증된 TLC, HPLC, UPLC-QToF-MS 크로마토그램을 통해 fingerprint 및 profile을 비교하여 각각의 분취된 표준 유효분획물들은 8개의 flavone 지표성분을 함유하는 동등한 분획물임을 확인하였다. 이로부터 분리된 8개의 지표성분은 NMR 구조동정 및 MS분석을 통해 분광학적 정보를 생산하여 구축하였고, 추후 MG53-IRS-1 결합 억제 활성 검증, 메커니즘 규명, *in vivo* 연구 용도로 적극 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

초 록

Scutellaria baicalensis Georgi (*Scutellariae Radix*)는 이노제, 고지혈증, 항박테리아, 항알레르기, 항염증제 및 항암제와 같은 건강보조식 및 전통 생약으로도 널리 사용되어 왔다. 본 연구에서 복잡한 *S. baicalensis* 추출물에서 지표 물질 또는 유효화합물들을 분리하는 것은 신원 확인 및 생리활성 평가를 위한 필수적인 단계다. 8개의 성분들로 구성된 타겟 분획물을 두개의 gradient elution를 사용하여 고성능 액체 크로마토 그래피에서 분석하였다. 중압 액체크로마토그래피 및 개방형칼럼으로 분취를 시뮬레이션함으로써 예비실험에서 충분히 분리가 되도록 용리 조건을 결정할 수 있었다. 최적 분취방법으로 확보된 표준 유효분획물로부터 8개의 지표성분들이 포함된 것을 확인하였다. 또한, 분획물은 UPLC-QToF-MS 비교 분석으로 MS, UV, HRESIMS 결과를 확인할 수 있었다. 따라서, 스케일 업 실험법

은 *S. baicalensis* 추출물에 성공적으로 적용될 수 있었다.

Keywords 개방형칼럼 · 황금 · High performance liquid chromatography · Medium pressure liquid chromatography

감사의 글 본 연구는 KRIIB 기관고유사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Nothias LF, Nothias-Esposito M, da Silva R, Wang M, Protsyuk I, Zhang Z, Sarvepalli A, Leyssen P, Touboul D, Costa J, Paolini J, Alexandrov T, Litaudon M, Dorrestein PC (2018) Bioactivity-based molecular networking for the discovery of drug leads in natural product bioassay-guided fractionation. *J Nat Prod* 81(4): 758–767
- Weller MG (2012) A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, effect-Directed Analysis and related Techniques. *Sensors (Basel)* 12(7): 9181–9209
- Bucar F, Wube A, Schmid M (2013) Natural product isolation - how to get from biological material to pure compounds. *Nat Prod Rep* 30: 525–545
- Colegate SM, Molyneux RJ (1993) Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination, 2ed edn. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, Florida
- Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75(3): 11–335
- Eghbaliferiz S, Taleghani A, Tayarani-Najaran Z (2018) Scutellaria: Debates on the anticancer property. *Biomed Pharmacother* 105: 1299–1310
- Shang X, He X, He X, Li M, Zhang R, Fan P, Zhang Q, Jia Z (2010) The genus Scutellaria an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacology* 128(2): 279–313
- Zhao Q, Chen XY, Martin C (2016) Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Sci Bull* 61(18): 1391–1398
- Luo R, Wang J, Zhao L, Lu N, You Q, Guo Q, Li Z (2014) Synthesis and biological evaluation of baicalein derivatives as potent antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 24(5): 1334–1338
- Tan Y, Lv ZP, Bai XC, Liu XY, Zhang XF (2006) Traditional Chinese medicine Bao Gan Ning increase phosphorylation of CREB in liver fibrosis in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacology* 105: 69–75
- Yang ZC, Wang BC, Yang XS, Wang Q, Ran L (2005) The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of Staphylococcus aureus. *Colloids Surf B Biointerfaces* 41: 79–81
- Lam TL, Lam ML, Au TK, Ip DTM, Ng TB, Fong WP, Wan DCC (2000) A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 67(23): 2889–2896
- Gao ZH, Huang KX, Yang XL, Xu HB (1999) Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica Biophysica Acta Bioenerg* 1472(3): 643–650
- Park HG, Yoon SY, Choi JY, Lee GS, Choi JH, Shin CY, Son KH, Lee YS, Kim WK, Ryu JH, Ko KH, Cheong JH (2007) Anticonvulsant effect of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Eur J Pharmacol* 574: 112–119
- Lee HH, Yang LL, Wang CC, Hu SY, Chang SF, Lee YH (2003) Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate- and glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Research* 986: 103–113
- Olennikov DN, Chirikova NK, Tankhaeva LM (2010) Phenolic Compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Russ J Bioorganic Chem* 36(7): 816–824
- Huang WH, Chien PY, Yang CH, Lee AR (2003) Novel Synthesis of Flavonoids of *Scutellaria baicalensis* GEORGI. *Chem Pharm Bull* 51(3): 339–340
- Kikuchi Y, Miyaichi Y, Yamaguchi Y, Kizu H, Tomimori T (1991) Studies on the nepalese crude drugs. XII. on the phenolic compounds from the root of *Scutellaria prostrata* JACQ. ex BENTH. *Chem Pharm Bull* 39(4): 1047–1050
- Li C, Homma M, Ohkura N, Oka K (1997) (S)-Dihydrorooxylin A in human urine following oral administration of the traditional Chinese medicines: Daisaiko-to and Shosaiko-to. *Tetrahedron Asymmetry* 8(8): 1145–1147
- Liu T, Cui Y, Tian X, Li S, Han F, Ji B, Zhao Y, Yu Z (2017) Detection of chemical constituents in Gegenqinlian decoction by ultra-high performance liquid chromatography coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Methods* 9: 5890
- Matsuura Y, Miyaichi Y, Tomimori T (1994) Studies on the Nepalese crude drugs. XIX. On the flavonoid and phenylethanoid constituents of the root of *Scutellaria repens* Buch.-Ham. ex D. Don. *Yakugaku Zasshi* 114(10): 775–788
- Miyaichi Y, Hanamitsu E, Kizu H, Tomimori T (2006) Studies on the Constituents of Scutellaria Species (XXII). Constituents of the roots of *Scutellaria amabilis* HARA. *Chem Pharm Bull* 54(4): 435–441
- Sonoda M, Nishiyama T, Matsukawa Y, Moriyasu M (2004) Cytotoxic activities of flavonoids from two Scutellaria plants in Chinese medicine. *J Ethnopharmacology* 91(1): 65–68
- Tomimori T, Miyaichi Y, Imoto Y, Kizu H, Tanabe Y (1983) Studies on the constituents of *Scutellaria* Species. II. on the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria baicalensis* GEORGI (2). *Yakugaku Zasshi* 103(6): 607–611
- Yang ZW, Xu F, Liu X, Cao Y, Tang Q, Chen QY, Shang MY, Liu GX, Wang X, Cai SQ (2017) An untargeted metabolomics approach to determine component differences and variation in their in vivo distribution between Kuqin and Ziqin, two commercial specifications of *Scutellaria Radix*. *RSC Adv* 7: 54682
- Yi JS, Park JS, Ham YM, Nguyen N, Lee NR, Hong J, Kim BW, Lee H, Lee CS, Jeong BC, Song HK, Cho H, Kim YK, Lee JS, Park KS, Shin H, Choi I, Lee SH, Park WJ, Park SY, Choi CS, Lin P, Karunasiri M, Tan T, Duann P, Zhu H, Ma J, Ko YG (2013) MG53-induced IRS-1 ubiquitination negatively regulates skeletal myogenesis and insulin signaling. *Nat Commun* 4: 2354
- Liu G, Ma J, Chen Y, Tian Q, Shen Y, Wang X, Chen B, Yao S (2009) Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria baicalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216(23): 4809–4814