Isolation and quantitative analysis of metabolites from *Scrophularia buergeriana* and their hepatoprotective effects against HepG2 Cells

Hyeon Seon Na^{1,2} · Seon Min Oh^{1,3} · Woo Cheol Shin^{1,2} · Jeon Hwang Bo³ ·
Hyoung-Geun Kim³ · Dahye Yoon¹ · Seung Hwan Yang⁴ · Young-Seob Lee¹ ·
Geum-Soog Kim¹ · Nam-In Baek³ · Moon-Soon Lee² · Dae Young Lee¹

현삼 (*Scrophularia buergeriana*)에서 분리한 화합물의 함량분석 및 간세포 보호 효과

나현선^{1,2} · 오선민^{1,3} · 신우철^{1,2} · 황보전³ · 김형근³ · 윤다혜¹ · 양승환⁴ ·
이영섭¹ · 김금숙¹ · 백남인³ · 이문순² · 이대영¹

Received: 14 October 2019 / Accepted: 4 November 2019 / Published Online: 31 December 2019
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

Abstract The roots of *Scrophularia buergeriana* were extracted with 80% aqueous Methanol and the concentrates were partitioned into EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O fractions. The repeated silica gel or octadecyl SiO₂ column, and medium pressure liquid chromatographies for the *n*-BuOH fraction led to isolation of phenylethanoid glycosides and iridoid glycosides. The chemical structures of these compounds were determined as harpagoside (**1**), angoroside C (**2**), aucubin (**3**) and acetoside (**4**) based on spectroscopic analyses including nuclear magnetic resonance and MS. A simple and efficient HPLC with UV detection method for the simultaneous determination of the four compounds (**1-4**) has been developed

and applied to their content determination in the *S. buergeriana*. The roots were extracted by 80% methanol, and the contents of **1**, **2**, **3**, and **4** were determined to 11.5, 7.6, 41.2, and 4.8 mg/g, respectively. Additionally, angoroside C (**2**) and acetoside (**4**) exhibited hepatoprotective effect against ethanol-induced hepatotoxicity in HepG2 cell line.

Keywords HepG2 · Iridoid · Phenylethanoid · Quantitative analysis · *Scrophularia buergeriana*

Dae Young Lee (✉)
E-mail: dylee0809@gmail.com

¹Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Republic of Korea

²Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

³Graduate School of Biotechnology and Department of Oriental Medicine Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

⁴Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu 59626, 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.

서론

최근 생활의 서구화, 알코올 섭취량의 증가 및 음주연령의 낮아짐 등의 원인으로 간질환 환자가 증가하고 있다[1]. 정상적인 간은 중성지방(triglyceride)을 3-5%를 함유하고 있지만, 지방간은 지질대사의 장애로 간 조직에 중성지방이 5% 이상 초과하여 축적된 것으로 정의한다. 지방간은 알코올 이외에도 비만, 당뇨 등의 다양한 원인으로 발생되며 알코올성 지방간(alcoholic fatty liver disease; AFLD)과 비 알코올성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)으로 구분된다[2]. 일반적으로, 알코올이 체내로 흡수되었을 때 시간의 경과에 따라 간의 효소작용에 의해 해독이 되지만 알코올성 지방간은 만성적인 알코올 섭취, 단기간 고용량의 음주 등으로 인한 간 기능의 손상과 장애 등을 유발하여 간의 비대화나 진행도에 따라서 간세포의 괴사 또는 간경화 등 고질적인 질환으로 발전될 수 있다[3]. 현삼

(*Scrophularia buergeriana*)은 현삼과에 속하는 다년생 초본 식물이며 한국, 중국 등 동아시아 지역에 널리 분포해 있다고 알려져 있다[4]. 현삼의 약용부위는 건조한 뿌리를 사용하며, 일반적인 모양은 불규칙하게 구부러지고 긴 원주형으로 길이 4–20 cm, 지름 1–3 cm 정도의 것으로 한약재로 사용한다[5]. 대한약전에서는 현삼의 기원식물로 *Scrophularia buergeriana* Miquel의 뿌리를 한약재로 사용하며, 중국약전에는 *Scrophularia ningpoensis* Hemsley(중국현삼)을 생약재로 사용하고 있다. 동속 식물로는 큰개현삼(*S. nodosa*), 토현삼(*S. koraiensis*), 설령개현삼(*S. borlalin koreana*), 섬현삼(*S. kakesimensis*) 등이 알려져 있다[6–7]. 한방에서는 현삼을 열병, 중창, 인두염, 신경염 및 후두염 치료에 사용되어 왔으며, 다양한 약리작용이 있다고 알려져 있다[8–9]. 현삼을 이용한 생리활성 연구로는 신경보호 효과, 인지기능 개선 효과, 혈압강하 효과, 항염증 효과 등이 보고되어 있다[10–14]. 현삼의 주요성분으로 iridoid 배당체와 phenylpropanoid 계열 화합물이 대표적으로 보고되어 있으며[15–18]. 현삼에서 분리보고된 iridoid 및 배당체는 신경세포 보호, 항산화, 항암, 항염증 활성 등이 보고되어 있다[19–22]. Phenylpropanoid 및 배당체의 생리활성 연구에는 신경세포보호, 항염증 및 항암 활성 등이 보고되어 있다[23–25].

본 연구에서는 선행 연구로부터 얻어진 현삼추출물의 간 기능 개선 효능을 통하여, 현삼의 간기능개선 지표성분 설정 등의 기초연구를 위하여 현삼에서 물질 분리 및 동정하였고, 화합물의 함량을 확인하였으며 HepG2로 유발된 간암세포로부터 간 기능 개선의 활성여부를 확인하고자 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에서 사용된 현삼의 뿌리는 2018년 11월에 안동시 성곡리 농가에서 수확한 1년근을 제공받아 실험을 진행하였으며, 표본시료 (NIHHS18-11)는 국립원예특작과학원 인삼특작부에 보관되어 있다.

시약 및 기기

Column chromatography (c. c.) 용 silica gel (SiO_2) resin은 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) 및 octadecyl SiO_2 (ODS)은 Lichroprep RP-18 (40–60 μm , Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kiesel gel 60 F254와 RP-18 F254s (Merck)을 사용하였다. 물질 정제에 사용된 기기는 YMC LC-Forte/R (YMC Co., Ltd. Kyoto, Japan)를 사용하였다. Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼은 600.167 MHz NMR (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고, IR (infra-red) 스펙트럼은 Perkin model 599B (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 고분해능 질량값의 측정은 UPLC (Waters ACQUITY I-Class, Waters Corp. Milford, MA, USA)가 부착된 HR-Q-TOF (Waters Xevo G2-S QTOF MS, Waters Corp)의 질량분석기를 사용하였다. 정량분석에 사용된 장비는 Agilent 1200 series HPLC system (Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다. 분석을 위한 증류수, Methanol (MeOH) 및 Acetonitrile은

HPLC grade (Fisher Scientific Korea Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였으며, 분석 용매에 첨가한 Formic Acid는 99.0%의 Optima™ LC/MS (Fisher Scientific) 급을 사용하였다. 그 외의 시약 및 용매는 모두 일급 이상의 시약을 구입하여 사용하였다. 세포 생존율 시험에서 사용한 DMEM 배지는 Lonza (Basel, Switzerland)에서 구입하였고, Fetal Bovine Serum (FBS)은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 DMSO는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출 및 성분 분리

건조된 상태의 현삼 뿌리를 5 kg 조분쇄하여 80% MeOH 수용액에 24시간 담가서 실온에서 3회 추출하였다. 얻어진 추출물은 합친 후 감압 농축하여 MeOH 추출물(SB, 2.8 kg)을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물(1 kg)을 EtOAc (4 L)/ H_2O (4 L)로 3회 분배 추출하였고, 다시 H_2O 층을 *n*-BuOH (4 L)로 3회 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 EtOAc 분획(SBE, 25.1 g)과 *n*-BuOH 분획(SBB, 41 g) 및 H_2O 분획을 얻었다. 현삼 *n*-BuOH 분획(SBB, 41 g)에 대하여 SiO_2 c.c. (Φ 8×22.0 cm, CHCl_3 -MeOH- H_2O =7:3:1, 총 10 L 사용)을 실시하여 총 9개의 분획물(SBB-1–SBB-9)을 얻었다. 그 중 SBB-2 (2 g)을 ODS c.c. (Φ 4.5×15.0 cm, MeOH- H_2O =1.5:1, 총 2 L 사용)를 실시하여 총 7개의 분획물(SBB-2-1–SBB-2-7)을 얻었다. 그 중 SBB-2-6 (1.3 g) 분획물에 대하여 중압분취장비(Medium pressure liquid chromatography, YMC LC-Forte/R)를 이용하여 분리를 진행하였다. 이때 사용된 컬럼은 YMC-Pack ODS-A (20 mm×250 mm, 10 μm)를 사용하였으며 이동상의 기울기 조건은 A (H_2O): B (MeOH)=45:55의 조건으로 30분간 10 mL/min의 유속으로 280 nm 파장에서 분리를 진행하였다. 총 3개의 분획(SBB-2-4-1–SBB-2-4-3)을 얻었고, 화합물 1 (SBB-2-4-2, 333.7 mg)을 분리하였다. SBB-5 (2 g)에 대하여 ODS c.c. (Φ 4.5×15.0 cm, MeOH- H_2O =1:1.5, 총 2 L 사용)를 실시하여 총 11개의 분획물(SBB-5-1–SBB-5-11)을 얻었으며 그중 화합물 2 (SBB-5-6, 139 mg)를 분리하였다. SBB-9 (2.5 g)에 대하여 MPLC를 이용하여 분리를 진행하였다. 이때 사용된 컬럼은 YMC-Pack ODS-A (20 mm×250 mm, 10 μm)를 사용하였으며 이동상의 기울기 조건은 A (H_2O): B (Acetonitrile)=90:10의 조건에서 10분간 B를 25%로 증가시키고, 30분간 B를 35%로 증가시켰다. 총 10개의 분획물(SBB-9-0–SBB9-9)을 얻었으며 화합물 3 (SBB-9-1, 673.5 mg)을 분리하였다. SBB-9-7 (148.3 mg)에 대하여 MPLC를 이용하여 분리를 진행하였다. 이때 사용된 컬럼은 YMC-Pack ODS-A (20 mm×250 mm, 10 μm)를 사용하였으며 이동상의 기울기 조건은 A (H_2O): B (Acetonitrile)=72:18 조건으로 60분간 15 mL/min의 유속으로 203 nm 파장에서 분리를 진행하였다. 총 2개의 분획물을 얻었으며, 화합물 4 (SBB-9-7-1, 21.1 mg)을 얻었다.

화합물 1 (harpagoside) White amorphous powder; m.p. 128–131 °C; IR (CaF₂ window) ν_{max} 3354, 1690, 1635, 1512 cm^{-1} ; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD , δ_{H}) and ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD , δ_{C}) in Table 1; Negative ESI/MS m/z 493.1718 [$\text{M}-\text{H}$][−].

Table 1 ^1H -NMR (CD_3OD ; 600 MHz) and ^{13}C -NMR spectral data (CD_3OD ; 150 MHz) of Compounds **1-4** δ in ppm, J in Hz

No.	Compound 1		Compound 2		Compound 3		Compound 4	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	94.6	6.18, br. s	132.9	-	97.77	4.90, d, 7.2	131.5	-
2	-	-	112.8	6.71, d, 2.4	-	-	115.4	6.69, d, 1.8
3	143.9	6.42, d, 6.6	147.6	-	141.6	6.30, dd, 6.0, 1.8	146.2	-
4	106.9	4.94, br. d, 6.0	147.4	-	105.7	5.09, dd, 6.0, 4.8	144.8	-
5	73.4	-	117.1	6.77, d, 7.8	46.3	2.60, m	116.6	6.67, d, 7.8
6	78.1	3.77, d, 3.6	121.2	6.65, dd, 7.8, 2.4	82.8	4.43, overlapped	123.3	6.57, dd, 7.8, 1.8
7	46.2	2.27, br. d, 15.6 2.02, dd, 15.6, 4.2	36.5	2.78, m	130.3	5.76, br. s	36.7	2.80, m
8	88.8	-	72.1	4.00, m	148.0	-	72.1	4.04, m
9	55.6	2.94, s	-	-	47.9	2.89, dd, 9.0, 1.2	-	-
10	22.7	1.53, s	-	-	62.7	4.34, d, 15.0 4.18, d, 15.0	-	-
1'	100.0	4.63, d, 8.4	105.0	4.34, d, 7.8	99.9	4.68, d, 7.8	104.2	4.38, d, 8.4
2'	74.6	3.23, dd, 8.4, 8.4	76.2	3.54, overlapped	74.9	3.21, dd, 7.8, 7.8	76.1	3.54, overlapped
3'	78.2	3.41, dd, 8.4, 8.4	81.6	3.83, dd, 7.8, 7.8	77.9	3.36, dd, 7.8, 7.8	81.6	3.81, dd, 8.4, 8.4
4'	71.8	3.32, overlapped	70.5	4.93, dd, 7.8, 7.8	71.6	3.27, overlapped	70.6	4.92, dd, 8.4, 8.4
5'	77.6	3.30, overlapped	75.0	3.36, br. dd, 7.8, 6.0	78.3	3.26, overlapped	76.3	3.39, br. dd, 8.4, 6.6
6'	62.9	3.94, dd, 12.0, 1.2 3.73, dd, 12.0, 6.0	69.1	3.70, overlapped 3.52, overlapped	61.4	3.85, dd, 12.0, 2.4 3.64, dd, 12.0, 5.4	62.4	3.62, overlapped 3.52, overlapped
1''	135.9	-	127.6	-	-	-	127.7	-
2''	130.0	7.40, m	111.8	7.15, d, 1.8	-	-	117.2	7.05, d, 1.8
3''	129.2	7.59, m	149.3	-	-	-	147.0	-
4''	131.5	7.39, overlapped	151.0	-	-	-	149.9	-
5''	129.2	7.59, m	116.4	6.78, d, 7.8	-	-	115.5	6.78, d, 8.4
6''	130.0	7.40, m	124.4	7.03, dd, 7.8, 1.8	-	-	121.4	6.96, dd, 8.4, 1.8
7''	120.1	6.51, d, 15.6	148.2	7.62, d, 15.6	-	-	148.1	7.59, d, 16.2
8''	146.1	7.67, d, 15.6	115.0	6.33, d, 15.6	-	-	114.8	6.27, d, 16.2
9''	168.7	-	168.4	-	-	-	168.4	-
1'''	-	-	103.1	5.15, d, 1.2	-	-	103.1	5.19, d, 1.8
2'''	-	-	72.3	3.87, dd, 3.0, 1.2	-	-	72.5	3.91, dd, 3.6, 1.8
3'''	-	-	72.1	4.00, dd, 7.8, 3.0	-	-	72.4	4.04, dd, 7.8, 3.6
4'''	-	-	74.1	3.26, overlapped	-	-	73.9	3.29, overlapped
5'''	-	-	70.6	3.53, overlapped	-	-	70.7	3.57, overlapped
6'''	-	-	18.4	1.05, d, 6.0	-	-	18.6	1.09, d, 6.6
1''''	-	-	104.1	4.19, d, 6.6	-	-	-	-
2''''	-	-	72.4	3.71, overlapped	-	-	-	-
3''''	-	-	73.8	3.76, overlapped	-	-	-	-
4''''	-	-	69.6	3.70, overlapped	-	-	-	-
5''''	-	-	66.7	3.83, overlapped 3.52, overlapped	-	-	-	-
OMe	-	-	56.6	3.84, s	-	-	-	-
OMe	-	-	56.6	3.76, s	-	-	-	-

화합물 **2** (angoroside C) White amorphous powder; m.p. 163-164 °C; IR (CaF_2 window) ν_{max} 3355, 1710, 1637, 1601, 1520 cm^{-1} ; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD , δ_{H}) and ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD , δ_{C}) in Table 1; Negative ESI/MS m/z 783.2645 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

화합물 **3** (aucubin) White amorphous powder; m.p. 180-181 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -150° ($c=0.10$, CH_3OH); IR (CaF_2 window) ν_{max} 3355, 1688, 1630 cm^{-1} ; ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD , δ_{H}) and ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD , δ_{C}) in Table 1; Negative ESI/MS m/z 345.1211 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

화합물 **4** (acetoside) White amorphous powder; m.p. 179–182 °C; IR (CaF₂ window) $\nu_{\max}$ 3402, 1710, 1635, 1600, 1520 cm⁻¹; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, δ_{H}) and ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD, δ_{C}) in Table 1; Negative ESI/MS m/z 623.1945 [M-H]⁻.

UPLC-ESI-Q-TOF/MS 분석

분리된 화합물(**1-4**)을 10 ppm의 농도로 희석하여 기기분석에 사용하였다. UPLC가 부착된 Q-TOF/MS 장비를 및 ACQUITY BEH C18 컬럼(2.1 mm x 100 mm, 1.7 μ m)을 사용하였고, 컬럼의 오븐 온도는 30 °C로 설정하였다. 이동상 용매 시스템은 0.1% acetic acid 수용액 (A)와 Acetonitrile (B)로 이루어졌으며, 이동상 조건은 A (H₂O) : B (Acetonitrile)=95:5의 조건에서 7분에 B를 33%로 증가시키고, 8.5분까지 B를 33%로 유지시켰으며, 10분까지 B를 100%로 증가시킨 후 15분에 B를 5%로 감소시켰다. 컬럼 유속은 0.5 mL/min이며, 주입량은 2 μ L이었다. 장비 분석 및 데이터 수집에는 UNIFI software (Ver 1.8.1, Waters Corp., Milford, MA, USA)를 사용하였다.

HPLC를 이용한 정량분석

분쇄한 현삼 시료 50 g을 농축용 플라스크에 평량하고 70% EtOH (400 mL)을 첨가한 후 환류 냉각추출기에서 70 °C로 열수추출을 2회 반복하고 얻어진 추출액을 감압 농축하였다. 농축 후 남아있는 수분 제거를 위하여 동결건조를 진행하였으며 수율은 53%로 현삼 추출 동결건조물(26 g) 얻었다. 얻어진 동결 건조물을 100 mg을 1 mL의 메탄올에 녹이고 0.2 μ m의 13 mm 디스크 필터(Chromdisc Co., Daegu, Korea)로 여과하여 UV 검출기가 장착된 HPLC로 정량분석 하였다. 이때 사용된 컬럼은 역상 컬럼인 Phenomenex Luna C-18 (4.6 mm×150 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 이동상 용매는 0.1% formic acid가 포함된 수용액 (A)와 0.1% formic acid가 포함된 Acetonitrile (B)이며 이동상의 유속은 1 mL/min, 주입량은 10 μ L이었다. 컬럼 오븐온도는 30 °C, 검출기의 흡광도는 203 및 280 nm에서 측정하였다. 이동상 기울기 조건은 A (H₂O) : B (Acetonitrile) =90:10에서 B를 10%로 5분간 진행하고, 5-30분간 B를 90%로 증가시켰으며, 30-35분간 B를 100%로 증가시키고, 이후 35-42분간 B를 다시 10%로 감소시킨 후 42-55분간 B를 10%로 유지하였다. 분리된 화합물 4종을 메탄올에 용해시켜 표준용액을 제조하였으며, 정량분석의 범위는 6.25-400 ppm 사이의 5 농도에서 검량곡선을 작성하였다.

세포 배양

인간 간암 세포인 HepG2 (KCLB, Seoul, Korea) 세포는 10% (v/v) FBS를 첨가한 DMEM 배지 (Lonza, Basel, Switzerland)와 37 °C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기를 사용하여 배양하였다.

세포 생존율 시험

분리된 화합물들의 세포독성 실험은 MTT colorimetric assay 방법을 이용하여 사용하였다[26]. HepG2 세포를 5×10⁴ cells/mL의 농도로 100 μ L씩 96 well plate에 분주하여 배양하였다. 분주 12시간 후에 화합물을 농도 별로 처리하고 24시간 후 50

μ L의 MTT [5 mg/mL in phosphate buffered saline] 시약을 첨가하여 다시 2시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배지를 제거하고 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 형성된 formazan을 용해하고 Microplate reader (Bio-Tek, Vermont, VT, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 화합물들의 에탄올 독성 억제효과를 측정하기 위해 HepG2 세포를 5×10⁴ cells/mL의 농도로 100 μ L씩 96 well plate에 분주하고 12시간 후에 0.5 M의 에탄올과 현삼화합물을 농도 별로 동시에 처리하였다. 처리 24시간 후 위와 같은 방법으로 MTT assay를 수행하였다. 세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{[\text{OD}(\text{compound}) - \text{OD}(\text{Blank})]}{[\text{OD}(\text{control}) - \text{OD}(\text{Blank})]} \times 100$$

통계처리

모든 실험 결과는 mean $\pm$ SD로 나타내었고($n=3$), 각 실험군 간 차이의 통계적 유의성은 Graph-pad prism 5 software를 이용하여 ANOVA 분산분석과 Tukey's multiple comparison test로 유의성 검정을 시행하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

화합물 **1**는 White amorphous powder 형상으로서 TLC 전개 후, 10% 황산 발색 시 갈색으로 발색 되었다. 고분해능 질량분석 장비를 이용하여 측정한 결과, m/z 493.1718 [M-H]⁻ peak의 관측으로 분자식은 C₂₄H₃₀O₁₁ (Calcd. m/z 494.4884)으로 예상하였고 질량 값은 494 [M]⁺로 확인하였다(Fig. 2). ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, δ_{H}) spectrum과 ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD, δ_{C}) 스펙트럼을 통하여 두 개의 oxygenated quaternary (δ_{C} 88.8, 73.4), 하나의 methylene (δ_{C} 46.2; δ_{H} 2.27/2.02)을 제외하고 화합물 **3** (aucubin)과 유사한 iridoid 골격에, 하나의 ester (δ_{C} 168.7), 하나의 aromatic quaternary (δ_{C} 135.9), 다섯 개의 aromatic methine (δ_{C} 131.5, 130.0, 130.0, 129.2, 129.2; δ_{H} 7.59, 7.59, 7.40, 7.40, 7.39), 두 개의 olefin methine (δ_{C} 146.1, 120.1; δ_{H} 7.67, 6.51)을 추가로 관측하여, cinnamic acid가 하나 결합해 있음을 확인하였다(Table 1). 이를 종합해서 문헌과 비교한 결과, harpagoside (Fig. 1)로 구조 동정 하였다[27]. 화합물 **2**는 White amorphous powder 형상으로서 TLC 전개 후, 10% 황산 발색 시 분홍색으로 발색 되었다. 고분해능 질량분석 장비를 이용하여 측정한 결과, m/z 783.2645 [M-H]⁻ peak의 관측으로 분자식은 C₃₆H₄₈O₁₉ (Calcd. m/z 784.7549)으로 예상하였고 질량 값은 784 [M]⁺로 확인하였다(Fig. 2). ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, δ_{H}) spectrum과 ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD, δ_{C}) 스펙트럼을 통하여 화합물 **4** (acteoside)과 매우 유사한 구조에 당이 하나 더 결합했음을 예상하였다. 당에서 유래한 signal들의 chemical shift 및 anomer proton signal의 결합정수($J=6.6$ Hz)로부터 당의 구조가 α -L-arabinopyranose임을 확인하였다. 당의 결합 위치를 확인하기 위하여 gHMBC를 확인한 결과, anomer proton (δ_{H} 4.19, H-1^{'''})이 C-6'의 oxygenated methylene carbon (δ_{C} 69.1)과 cross peak를 보여 α -L-arabinopyranose가 β -D-glucopyranose의 6'

Fig. 1 Chemical structures of compound 1-4 isolated from *S. buergeriana*

번에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 이를 종합해서 문헌과 비교한 결과, angoroside C (Fig. 1)로 구조 동정 하였다[28].

화합물 3은 White amorphous powder 형상으로서 TLC 전개 후, 10% 황산 발색 시 갈색으로 발색 되었다. 고분해능 질량분석 장비를 이용하여 측정된 결과, m/z 345.1211 $[M-H]^-$ peak의 관측으로 분자식은 $C_{15}H_{22}O_9$ (Calcd. m/z 346.3297)으로 예상하였고 질량 값은 346 $[M]^+$ 로 확인하였다(Fig. 2). 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD , δ_H) 스펙트럼에서 하나의 oxygenated olefin methine (δ_H 6.30), 두 개의 olefin methine (δ_H 5.76, 5.29) proton signal를 관측하였으며, 하나의 hemiacetal (δ_H 4.90), 하나의 oxygenated methine (δ_H 4.43), 하나의 oxygenated methylene (δ_H 4.34/4.18) proton signal를 관측하였다. 또한 하나의 hemiacetal [δ_H 4.68 (H-1')], 네 개의 oxygenated methine (δ_H 3.36, 3.27, 3.26, 3.21), 그리고 하나의 oxygenated methylene (δ_H 3.85/3.64) proton signal로부터 하나의 당이 존재함을 예상하였다(Table 1). 이를 통해 화합물 3이 iridoid monoglycoside임을 예상하였다. ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD , δ_C) 스펙트럼에서 당으로부터 유래한 signal들을 제외한 탄소수가 10개임을 확인하였고, 이를 통해 iridoid임을 확인하였다. 또한 당에서 유래한 하나의 hemiacetal [δ_C 99.9 (C-1')], 네 개의 oxygenated methine (δ_C 78.3, 77.9, 74.9, 71.6), 하나의 oxygenated methylene (δ_C 61.4) carbon signal의 chemical shift 및 anomer proton signal의 결합 정수($J=7.8$ Hz, H-1')로부터 세 당의 구조가 β -D-glucopyranose임을 확인하였다. 결합 위치를 확인하기 위하여 gHMBC를 측정된 결과, 하나의 anomer proton (δ_H 4.86, H-1')이 C-2'의 hemiacetal carbon (δ_C 97.77)과 cross peak를 보여 하나의 β -D-glucopyranose가 1번에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 또한 하나의 oxygenated methylene proton signal (δ_H 4.34/4.18, H-10)이 C-7'의 olefin methine carbon signal (δ_C 130.3)과 cross peak를 보여 ethyl기가 C-8에 결합해 있음을

확인하였다. 이를 종합해 문헌과 비교한 결과, aucubin (Fig. 1)으로 구조 동정하였다[29].

화합물 4는 White amorphous powder 형상으로서 TLC 전개 후, 10% 황산 발색 시 분홍색으로 발색 되었다. 고분해능 질량분석 장비를 이용하여 측정된 결과, m/z 623.1945 $[M-H]^-$ peak의 관측으로 분자식은 $C_{29}H_{36}O_{15}$ (Calcd. m/z 624.5871)으로 예상하였고 질량 값은 624 $[M]^+$ 로 확인하였다(Fig. 2). 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD , δ_H) 스펙트럼에서 세 개의 aromatic methine (δ_H 6.69, 6.67, 6.57), 하나의 oxygenated methylene (δ_H 4.04), 그리고 하나의 methylene (δ_H 2.80) proton signal을 통해 하나의 hydroxytyrosol이 존재함을 예상하였고, 세 개의 aromatic methine (δ_H 7.05, 6.96, 6.78)과 두 개의 olefin methine (δ_H 7.59, 6.27) proton signal을 통해 하나의 caffeic acid가 존재함을 예상하였다. 또한 두 개의 hemiacetal [δ_H 5.19 (H-1'), 4.38 (H-1')], 여덟 개의 oxygenated methine (δ_H 4.92, 4.04, 3.91, 3.81, 3.57, 3.54, 3.39, 3.29), 하나의 oxygenated methylene (δ_H 3.62/3.52), 그리고 하나의 methyl (δ_H 1.09) proton signal로부터 각각 다른 두개의 당이 존재함을 예상하였다(Table 2). 이를 통해 이 화합물이 phenylethanoid glycoside임을 예상하였다. ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD , δ_C) 스펙트럼에서 당으로부터 유래한 signal들을 제외한 탄소수가 17개임을 확인하였고, 이를 통해 하나의 hydroxytyrosol과 하나의 caffeic acid가 존재함을 확인하였다. 또한 당에서 유래한 두 개의 hemiacetal [δ_C 104.2 (C-1'), 103.1 (C-1')], 여덟 개의 oxygenated methine (δ_C 81.6, 76.3, 76.1, 73.9, 72.5, 72.4, 70.7, 70.6), 하나의 oxygenated methylene (δ_C 62.4), 그리고 하나의 methyl (δ_C 18.6) carbon signal의 chemical shift 및 anomer proton signal의 결합 정수($J=8.4$ Hz, H-1', $J=1.8$ Hz, H-1')로부터 두 당의 구조가 β -D-glucopyranose와 α -L-rhamnopyranose임을 확인하였다. Kim 등의[30] 연구에서 일반적으로 β -D-glucopyranose

Fig. 2 Ion chromatogram of compounds 1-4 (A) by UPLC-QTOF/MS in negative-ion mode. (B) High resolution mass spectra of harpagoside (1) angoroside C (2) aucubin (3), and acetoside (4)

Fig. 3 HPLC analysis of roots of *S. buergeriana*. (A) Chromatogram of the extraction of roots of *S. buergeriana* at 280 nm and (B) Separation of a standard mixture of compounds 1-4. [harpagoside (1), angoroside C (2), aucubin (3) and acetoside (4)]

의 C-3의 carbon signal은 대개 78.7 ppm에서 관측되나, δ_C 81.6까지 저자장으로 이동한 것으로 보아 α -L-rhamnopyranose가 β -D-glucopyranose의 C-3의 수산기와 결합하여 glycosidation shift가 일어난 것임을 알 수 있었다. 결합 위치를 확인하기 위하여 gHMBC를 측정된 결과, 하나의 anomer proton (δ_H 4.38, H-1')이 C-8의 oxygenated methylene carbon (δ_C 72.1)과

cross peak를 보여 하나의 β -D-glucopyranose가 hydroxytyrosol의 8번에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 또한 하나의 oxygenated methine proton (δ_H 4.92, H-4')이 C-9'의 ester carbon (δ_C 168.4)과 cross peak를 보여 caffeic acid가 β -D-glucopyranose의 4번에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 다른 하나의 anomer proton (δ_H 5.19, H-1'')이 C-3'의 oxygenated methine

Table 2 Quantification of 70% EtOH extracts from *S. buergeriana* compounds 1-4 by HPLC-UV analysis

Compounds	Calibration Curves	r^2	Linear range (ppm)	Content (mg/g)	LOD ¹⁾ (ng/μL)	LOQ ²⁾ (ng/μL)
Harpagoside (1)	$y=145.28x-411.58$	0.989	0.19-200	11.5	2.85	2.90
Angoroside C (2)	$y=11.583x-4.8857$	0.999	0.39-100	7.6	0.68	1.29
Aucubin (3)	$y=0.0886x+0.4503$	0.998	19.53-312.5	41.2	28.78	107.78
Acetoside (4)	$y=35.879x-2.5453$	0.998	0.39-25	4.8	0.01	0.21

¹⁾LOD; Limit of detection, ²⁾LOQ; Limit of quantification **Fig. 4** Effect of compounds on the cytotoxicity in ethanol-damaged HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with 0.5 M ethanol and various concentrations of compounds for 24 h. (B) HepG2 cells were treated with various concentrations of compounds for 24 h. Cell viability was measured using MTT assay. Values are expressed as the mean $\pm$ SD. # $p < 0.001$; control vs. ethanol only treated HepG2 cells, ** $p < 0.01$; ethanol only treated HepG2 cells vs. ethanol and compound-treated HepG2 cells

carbon (δ_c 81.6) cross peak를 보여 α -L-rhamnopyranose가 β -D-glucopyranose의 3번에 결합하고 있음을 확인하였다. 이를 종합해서 문헌과 비교한 결과, acetoside (Fig. 1)로 구조 동정 하였다[31].

화합물 4종의 정량분석을 위해 UV 검출기가 장착된 HPLC를 사용하여 크로마토그램을 분석하였다. 최적의 용매 기온기 조건을 확립하고 분석된 결과의 머무름 시간을 비교하였을 때, harpagoside (1)는 21.7분, angoroside C (2)는 19.5분, aucubin (3)는 4.2분, acetoside (4)는 18.7분에서 검출되었다(Fig. 3). 검량 곡선은 표준물질의 5농도 범위 안에서 측정된 값을 회기 분석을 통해 작성하였다. 상관계수(r^2)는 화합물 4종에 대해 각각 0.989 (1), 0.999 (2), 0.998 (3) 및 0.998 (4)로 매우 높은 값을 보여주었다. 현상에서 분리한 4종의 화합물의 함량분석한 결과, 11.5 mg/g (1), 7.6 mg/g (2), 41.2 mg/g (3), 및 4.8 mg/g (4)으로 확인되었으며 4종의 화합물 중 aucubin이 함량이 높았고 acetoside는 함량이 상대적으로 낮게 나왔다(Table 2).

현상에서 분리한 단일 화합물 4종의 간세포에 대한 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행한 결과, 화합물 모두 HepG2 (100 μ M) 세포에 대한 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 세포손상을 유발하기 위하여 알코올(0.5 M)를 처리하여 독성 유발에 따른 세포의 손상 또는 세포 사멸에 대한 화합물의 간세포 보호효과를 확인하기 위해 알코올 처리에 따른 세포 생존율의 변화를 확인한 결과, 알코올 처리군은 정상 대조군(100%)과 비교하여 세포 생존율이 약 42.2%까지 감소하였다. 알코올 처리 후 화합물 2, 4의 처리군은 각각 74.2% (2) 및 82.1% (4)의 세포 생존율을 나타냈었고, 알코올 처리군과 비교 시 각각 31.2% (2) 및 50% (4)의 증가율을 보였다(Fig. 4A).

Mostafa 등[32] 연구에 의하면 angoroside C는 항산화 활성이 보고되어 있으며, Li 등[33] 연구에서는 acetoside 성분이 H_2O_2 로 유도된 신경세포 사멸을 억제하는 것으로 보고되어 있다. 현상에서 분리한 phenylethanoid 중 angoroside C의 간세포 보호 활성 및 화합물들의 함량분석은 이번 연구에서 처음 보고하였다. 활성 화합물의 간세포 보호효과의 작용 기작 규명을 위해서 분자생물학적인 접근방법을 통한 기전 연구 및 동물 모델을 이용한 *in vivo* 연구가 필요할 것으로 사료된다.

초 록

현상(*Scrophularia buergeriana*) 뿌리를 80% Methanol수용액으로 추출한 뒤, 감압 농축한 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH과 H_2O 층으로 계통 분획을 실시하였다. *n*-BuOH분획에 대하여 silica gel, octadecyl SiO_2 column chromatograph 및 중압분취(MPLC) 장비를 반복 실시하여 4종의 phenylethanoid glycoside 및 iridoid glycoside계의 화합물을 분리하였다. NMR 및 Mass데이터를 해석하여, harpagoside (1), angoroside C (2), aucubin (3) 및 acetoside (4)로 구조 동정하였다. 분리한 4종의 화합물에 대하여 HPLC 분석법을 이용하여 정량분석한 결과, 11.5 mg/g (1), 7.6 mg/g (2), 41.2 mg/g (3), 및 4.8 mg/g (4) 이 현상 뿌리에 함유된 것을 확인하였다. 현상으로부터 분리된 화합물 중 angoroside C 및 acetoside는 에탄올에 의해 저해된 세포 성장률을 검증한 결과, 간암세포종인 HepG2세포에 대해서 간세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

Keywords 정량분석 · 현삼 · HepG2 · Iridoid · Phenylpropanoid

감사의 글 본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21 연구사업(과제번호: PJ01321502)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Lee JH, Park SM, Kim YC, Woo HJ (2001) A clinical study of the effects of *Chungganhaeju-tang* on alcoholic fatty liver. *J Korean Med* 22(4): 107–113
- Baik TH (2016) A case study on a patient with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by using ultrasound. *J Korean Med* 37(1): 151–157
- Kwon TD (2007) The effects of exercise on hepatotoxicity in mice with alcoholic fatty liver. *Gene Expr* 11(3): 257–264
- Park SU, Li X, Eom SH, Lee CY, Lee SY (2010) E-*p*-methoxycinnamic acid production in hairy root cultures of *Scrophularia buergeriana* Miquel. *Arch Biol Sci* 62: 649–652
- Herbal Medicine School Compilation Committee (2013) Pharmacognosy. Dongmyeong Publisher, Gyeonggi-do, Korea, p 224
- Lee HW, Park SY, Choo BK, Chun JM, Lee AY, Kim HK (2007) Quantitative analysis comparison of Korea and China *Scrophulariae radix*. *Kor J Pharmacogn* 38(1): 15–18
- Kim HM, Ahn MJ, SH Lee (2012) Isolation and identification of phytochemical constituents from *Scrophularia takesimensis*. *J Med Plants Res* 6(22): 3923–3930
- Kim SH, Kim DH, Park JH, Choi EJ, Park SH, Lee KY, Jeon MJ, Kim YC, Sung SH (2010) Discrimination of *Scrophularia* spp. according to geographic origin with HPLC-DAD combined with multivariate analysis. *Microchem J* 94(2): 118–124
- Lee MK, Choi OG, Park JH, Cho HJ, Ahn MJ, Kim SH, Kim YC, Sung SH (2007) Simultaneous determination of four active constituents in the roots of *Scrophularia buergeriana* by HPLC-DAD and LC-ESI-MS. *J Sep Sci* 30(15): 2345–2350
- Lee HJ, Spandidos DA, Tsatsakis A, Margina D, Izotov BN, Yang SH (2019) Neuroprotective effects of *Scrophularia buergeriana* extract against glutamate-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Int J Mol Med* 43(5): 2144–2152
- Jeong EJ, Ma CJ, Lee KY, Kim SH, Sung SH, Kim YC (2009) KD-501, a standardized extract of *Scrophularia buergeriana* has both cognitive-enhancing and antioxidant activities in mice given scopolamine. *J Ethnopharmacol* 121(1): 98–105
- Park KH, Ham IH, Choi HY (2008) Hypotensive effect of *Scrophularia buergeriana* and gene analysis of *Scrophularia* Species. *Kor J Herbology* 23(2): 213–223
- Kim SG (2017) Inhibitory effects of *Scrophulariae radix* on β -hexosaminidase release and cytokine production in RBL-2H3 cells. *Kor J Herbology* 32(6): 9–15
- Byun SH, Yang CH, Kim SC (2005) Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cell. *Kor J Herbology* 20(2): 7–16
- Shin H, Medriano CA, Park B, Park YH, Lee KY (2018) Screening and identification of neuroprotective compounds from *Scrophularia buergeriana* using cell extraction coupled with LC-MS. *J Pharm Biomed Anal* 148: 355–360
- Lv PY, Feng H, Huang WH, Tian YY, Wang YQ, Qin YH, Li XH, Hu K, Zhou HH, Ouyang DS (2017) Aucubin and its hydrolytic derivative attenuate activation of hepatic stellate cells via modulation of TGF- β stimulation. *Environ Toxicol Pharmacol* 50: 234–239
- Lin SJ, Jiang SH, Li YM, Zeng JF, Zhu DY (2000) Two novel iridoids from *Scrophularia buergeriana*. *Tetrahedron Lett* 41(7): 1069–1071
- Wu XM, Zhang LQ, Chen XC, Feng L, Xing WX, Li YM (2014) A new iridoid derivative from the roots of *Scrophularia buergeriana*. *Acta Pharmacol Sin* 49(7): 1019–1021
- Kim SR, Lee KY, Koo KA, Sung SH, Lee NG, Kim JW, Kim YC (2002) Four new neuroprotective iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* Roots. *J Nat Prod* 65(11): 1696–1699
- Jeong EJ, Lee KY, Kim SH, Sung SH, Kim YC (2008) Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* in scopolamine-treated mice. *Eur J Pharmacol* 588(1): 78–84
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, Statti GA, Menichini F (2008) Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini Rev Med Chem* 8(4): 399–420
- Zhang L, Zhu T, Qian F, Xu J, Dorje G, Zhao Z, Guo FJ, Li Y (2014) Iridoid glycosides isolated from *Scrophularia dentata* Royle ex Benth. and their anti-inflammatory activity. *Fitoterapia* 98: 84–90
- Kim SR, Kim YC (2000) Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of *Scrophularia buergeriana*. *Phytochem* 54(5): 503–509
- Díaz AM, Abad MJ, Fernández L, Silván AM, De Santos J, Bermejo P (2004) Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: In vitro anti-inflammatory activity. *Life Sci* 74(20): 2515–2526
- Carvalho AA, Andrade LN, de Sousa ÉBV, de Sousa DP (2015) Antitumor phenylpropanoids found in essential oils. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/392674
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Nat Cancer Inst* 82(13): 1107–1112
- Li YM, Jiang SH, Gao WY, Zhu DY (1999) Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochem* 50(1): 101–104
- de Santos J, Lanza AMD, Fernández L, Rumbero A (2000) Isoangoroside C, a phenylpropanoid glycoside from *Scrophularia scorodonia* roots. *Z Naturforsch C* 55(5–6): 333–336
- Ersöz T, Berkman MZ, Taşdemir D, Çaliş İ, Ireland CM (2002) Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Euphrasia pectinata*. *Turk J Chem* 26(2): 178–188
- Kim HG, Oh HJ, Ko JH, Song HS, Lee YG, Kang SC, Lee DY, Baek NI (2019) Lanceoleins A–G, hydroxychalcones, from the flowers of *Coreopsis lanceolata* and their chemopreventive effects against human colon cancer cells. *Bioorg Chem* 85: 274–281
- Andary C, Wylde R, Laffite C, Privat G, Winternitz F (1982) Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanchae rapum-genistae*. *Phytochem* 21(5): 1123–1127
- Mostafa M, Nahar N, Mosihuzzaman M, Makhmoor T, Choudhary MI, Rahman AU (2007) Free radical scavenging phenylethanoid glycosides from *Leucas indica* Linn. *Nat Prod Res* 21(4): 354–361
- Li M, Xu T, Zhou F, Wang M, Song H, Xiao X, Lu B (2018) Neuroprotective effects of four phenylethanoid glycosides on H₂O₂-induced apoptosis on PC-12 cells via the Nrf2/ARE pathway. *Int J Mol Sci* 19(4): 1135