

## 강진향(降眞香)의 항암활성 성분

박종대 · 이유희 · 백남인 · 김신일 · 안병준\*  
한국인삼연구초연구원, 충남대학교 약학대학\*

### Isolation of Antitumor Agent from the Heartwood of *Dalbergia odorifera*

Jong Dae Park, You Hui Lee, Nam In Baek, Shin Il Kim and Byung Zun Ahn\*  
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, and  
\*College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

**Abstract**—Through bioassay-guided separation of the chemical constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*, an 2'-O-methoxyisoliquiritigenin(1) was isolated as cytotoxic principle. 1 showed potent cytotoxic activity against the three kinds of human cancer cell lines (A-549, SK-MEL-2 and SK-OV-3) with similar activity to 5-Fluorouracil.

**Keywords**—*Dalbergia odorifera* · Leguminosae · 2'-O-methoxyisoliquiritigenin · cytotoxicity · antitumor agent

최근 산업발전에 따른 환경오염, 식생활의 변화, 스트레스 증가 등에 따라 암은 성인병에 있어서 최고의 사망률을 기록하고 있으며 현대사회의 가장 큰 문제가 되고 있는 질병중의 하나이다. 이러한 맥락에서 항암제의 개발에 관한 연구는 전 세계적으로 광범위하게 수행되고 있고 시의성은 있지만 아직 획기적인 의약품이 발견되지 않은 것은 이에 수반되는 부작용이라 할 수 있다. 따라서, 천연물로부터 부작용 및 독성이 적고 선택적인 항암효과를 나타내는 새로운 항암제의 개발을 위해 선도물질을 창출하려는 노력은 많은 과학자에 의해 경주되고 있는 실정이다.

이에, 본 연구실에서도 천연자원으로부터 항암제 개발연구의 일환으로 약 350여종의 식물에 대한 *in vitro*에서 수종의 인체 암세포에 대해 항암검색을 하였으며<sup>1)</sup> 이 중 강진향이 의미있는 항암효과를 보여주었다.

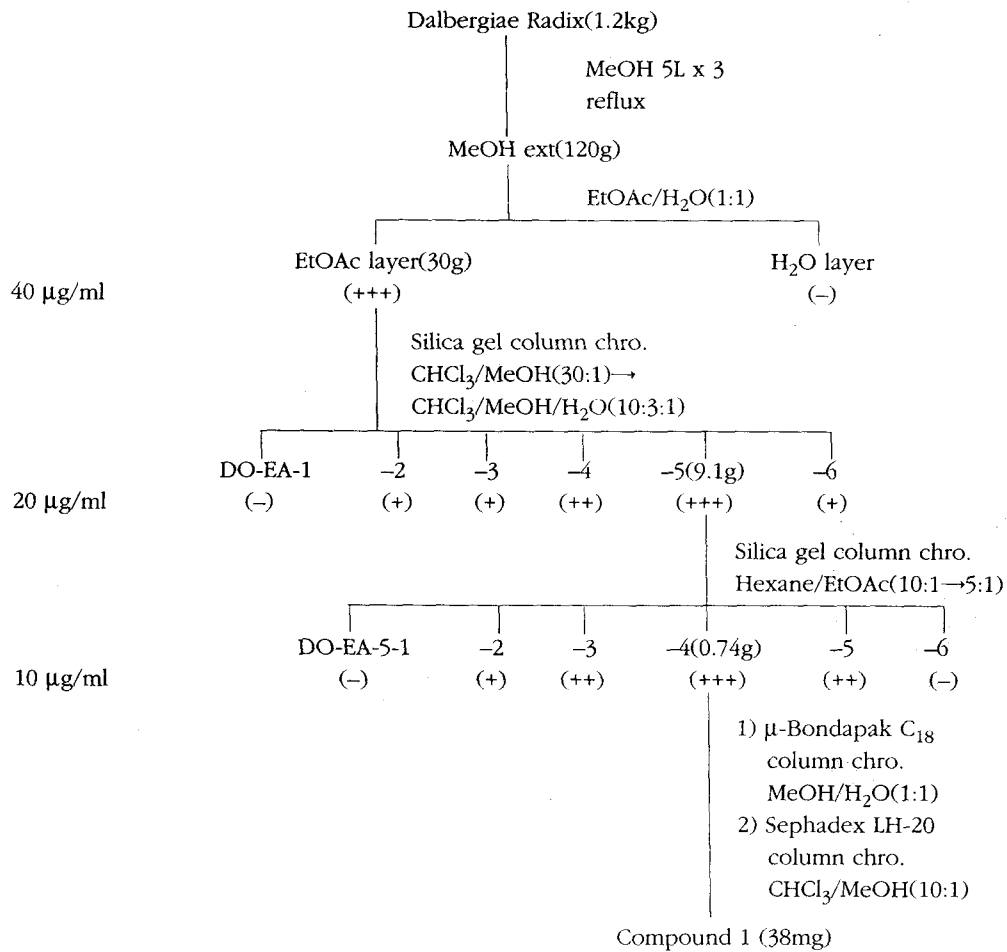
강진향(*Dalbergiae Radix*)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 강향단(降香檀)(*Dalbergia odorifera* T. Chen)의 根部心材로 이 식물은 낙

엽교본으로서 길이가 10여 m까지 자라고 잎은 호생한다. 근부심재는 적갈색-갈자색으로 광택이 있고 단단하며 약재로서 근부를 취하여 외피를 제거한 후 사용한다. 한방에서는 鎮痛, 通氣, 行瘀, 止血의 목적으로 사용된다.<sup>2)</sup> 강진향의 성분으로는 (3R)-Vestitol, (3R)-Claussequinone, Formononetin, Medicarpin 등의 Isoflavonoid 및 Biisoflavonoid 그리고 Arylbenzofuran 등이 함유되어 있다.<sup>3,4,5)</sup> 저자등은 강진향의 EtOAc 가용성 분획이 수종의 인체 암세포에 대해 강한 항암활성을 보여 주었기 때문에 그 활성분획으로부터 항암성분을 분리하였기에 보고하고자 한다.

### 실험 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용된 강진향은 대건 광역시 한약 건재상으로부터 1993년 10월경 건조품을 구입하여 감정후 사용하였다.

**기기** - 용점은 Fisher-John Apparatus를 사용하여 측정하였으며 온도를 보정하지 않았다. <sup>1</sup>H-



**Fig. 1.** Isolation of cytotoxic compound from Dalbergiae Radix.

NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker Model AMX400을 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로서 TMS를 사용하였다. Mass spectrum은 Varian Mat 212/MS를 사용하여 측정하였다.

활성성분의 분리 - 강진향(Dalbergiae Radix, 1.2kg)을 분쇄하여 MeOH(5 L)로 상온에서 24시간씩, 3회 추출한 것과, 잔사를 수욕상에서 reflux하여 2회 추출한 것을 합해 감압농축하여 메탄을 엑기스(120g)을 얻었다. 메탄을 엑기스를 물에 현탁 시킨후 EtOAc로 분배하여 인체 암세포에 강한 활성을 보여주는 EtOAc 가용성 분획(30g)을 얻었다. 이 활성분획을 Gradient silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 30:1 → CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=10:3:1)하여 6개의 소분

획을 얻었다. 그 중 활성이 강한 DO-EA-5분획(9.1g)을 반복 Silica gel column chromatography(Hexane/EtOAc = 10:1 → 5:1) 하여 활성을 보여주는 DO-EA-5-4 분획(0.74g)을 얻었다. DO-EA-5-4 분획을  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>-column chromatography (MeOH/H<sub>2</sub>O = 1:1)와 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10:1)를 병행하여 활성이 강한 Compound 1 (38 mg)를 얻었다. (Fig. 1)

Compound 1: pale yellow crystal mp 169-171°, EI-MS *m/z*: 270(M<sup>+</sup>), 176, 163, <sup>1</sup>H-NMR(acetone-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.90(3H, s, -OMe), 6.51(1H, dd, *J*=8.4, 2.8 Hz, H-5'), 6.56(1H, d, *J*= 2.8Hz, H-3'), 6.87(2H, d, *J*=8.4Hz, H-3,5), 7.48(2H, s,

$\alpha$ ,  $\beta$ -H), 7.58(3H, d,  $J=8.4$ Hz, H-2,6,6'), 9.10(2H, br. s, ArOH).  $^{13}$ C-NMR(acetone- $d_6$ ,  $\delta$ ): 126.0(C-1), 130.2(C-2), 115.8(C-3), 159.6(C-4), 115.8(C-5), 130.4(C-6), 124.0(C-1'), 160.4(C-2'), 99.2(C-3'), 162.6(C-4'), 107.8(C-5'), 132.2(C-6'), 120.2(C- $\alpha$ ), 141.3(C- $\beta$ ), 188.9(C=O), 55.6(OMe).

**항암활성 검정** - 인체 암세포인 SK-OV-3(Adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2(Melanoma) 및 A549(Lung carcinoma) cell들은 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종 세포 농도가  $1 \times 10^5$  cell/ml가 되도록 배지로 희석하였다. 이 세포현탁액을 24 well culture plate 각 well에 1 ml씩 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 preincubation하였다. 생약자원의 용매 분획물의 세포독성을 검색할 경우에는 실험할 검체를 DMSO/EtOH (1:1)에 20 mg/ml 농도로 조제하였다. 이것을 배지로 10배 희석하여 희석액 40  $\mu$ l/well을 넣고 각 well당 최종 2 ml가 되도록 배지를 넣었다. 이때의 검체의 농도는 40  $\mu$ g/ml가 된다. 대조군은 용매만을 넣어 배양하였으며 검체당 duplicate로 하여 평균값을 취하였다.

세포독성을 나타내는 유효 성분을 분리하는 과정에서 얻은 분획물과 순수분리된 단일성분 및 그 유도체의 효과를 검색할 때는 DMSO나 EtOH을 사용하여 20 mg/ml 농도로 만든 검체 용액을 필요에 따라 배지를 이용해서 적당한 농도로 희석하여 일정량씩 24 well plate에 가하고 각 well당 최종 2 ml가 되도록 배지를 넣었다. 그 후 48시간 배양하였다. 대조군은 용매만을 넣어 배양하였다. 각 검체당 최소한 5개 농도를 사용하였고, 각 농도당 duplicate로 하여 평균값을 취하였다.

배양 후 상등액의 배지를 조심스럽게 제거하고 cold 12% TCA를 각 well에 1.5 ml씩 가하고, 4°C에서 1시간 방치한 후 TCA를 버리고 H<sub>2</sub>O로 5회 세척하여 공기중에서 완전히 건조하였다. 여기에 1% 초산용액에 녹인 0.4% SRB 용액을 각 well에 0.5 ml씩 가하여 상온에서 1시간 방치 염색한 후 과량의 SRB를 1% 초산액으로 5회 세척하고 공기중에서 완전히 건조하였다. 각 well에

10 mM Tris.를 적당량 가하여 색소를 녹여 내어 96 well plate를 사용하여 microplate reader로 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포성장율(Y%)는 suspended cell line을 이용해서 검색할 때와 같은 식에 따라 계산하였다.

$$Y(\%) = \frac{T-Co}{C-Co} \times 100$$

이때, T는 배양종료시의 처치군의 흡광도, C는 배양종료시의 대조군의 흡광도이며 Co는 검체 처리시의 대조군의 흡광도이다.

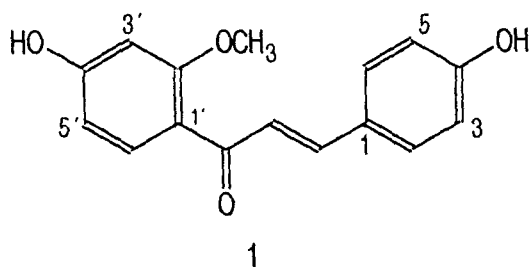
생약 자원의 용매분획물의 효과를 검색한 경우에는 검체군의 세포성장율로 효과의 정도를 정하였다. 즉, 검체의 세포성장율(Y)이 30% 수준이면 +++, 30<Y≤60%이면 ++, 60<Y≤90%이면 +, >90%이면 -로 표시하였다. 또한, 순수분리된 단일성분 또는 그 유도체의 ED<sub>50</sub>( $\mu$ g/ml) 값은 세포성장율(Y%)과 검체농도를 Logit-Log paper를 이용하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

**Compound 1의 구조** - 항암활성이 강한 강진향의 EtOAc 가용성 분획으로 부터 Activity-guided fractionation에 의해 분리한 미황색 결정은 FeCl<sub>3</sub>에 오렌지 색으로 정색되어 Phenolic 화합물로 추정 할 수 있었다.

$^1$ H-NMR spectrum에서는 3.90ppm(3H, s)에서 -OCH<sub>3</sub>에 유래하는 것으로 보이는 1개의 peak 및 9.10ppm(br, s)에서 phenolic hydroxy group에 기인하는 1개의 peak를 관찰할 수 있었다. 7.48ppm(2H, s)에서  $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone의 olefinic ketone에 기인하는 peak가 보이며 6.51ppm(1H, dd,  $J=8.4, 2.8$ Hz), 6.56ppm(1H, d,  $J=2.8$ Hz) 및 7.58ppm(1H, d,  $J=8.4$ Hz)에서 ABX type에 유래되는 1,2,4-trisubstituted aromatic group을 관찰 할 수가 있었다. 더우기, 6.87ppm(2H, d,  $J=8.4$ Hz) 및 7.58ppm(2H, d,  $J=8.4$ Hz)에서 한 쌍의 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> type의 1,4- 및 1',4'-disubstituted group들을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과로 부터 이 화합물은 isoliquiritigenin의 골격을 가진 화합물로 생각 할 수 있었

**Table 1.** Cytotoxic activities of active compound isolated from *Dalbergiae Radix* against human cancer cell lines



Compound <sup>b)</sup>	ED <sub>50</sub> (μg/ml) <sup>a)</sup>		
	A549	SK-MEL-2	SK-OV-3
1	4.2 <sup>c)</sup>	5.8	4.6
5-Fluorouracil	1.8	4.7	4.2

a) ED<sub>50</sub> value represents the concentration of a compound required for 50% inhibition of cell growth.

b) Each compound was examined with five concentrations in duplicate.

c) The values were the range from at least four experiments.

다. 또한, EI-MS fragmentation pattern( $m/z$  176, 163)으로부터 methoxyl group은 B환에 결합되어 있으며 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 hydroxyl group이 수소결합에 기인해서 10 ppm 이하의 저자장에서 관찰되지 않아 methoxyl group은 C-2'에 치환된 것을 알 수 있었다. 더군다나, <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 chemical shift가 isoliquiritigenin과 거의 일치하였으나 C-1', C-2' 및 C-3'의 signal이 각각 +10.8, -4.2 및 -3.4 ppm shift 한점으로 미루어 위의 사실을 잘 뒷받침 해주었고 문헌치와 비교하였을 때 완전히 일치하였다.<sup>4)</sup>

따라서 이 화합물은 이 식물에서 분리 보고된 2'-O-methoxyisoliquiritigenin으로 동정하였다.<sup>4)</sup>

항암활성 - 3종의 인체 암세포(A549, SK-Mel-

2, SK-OV-3)에 대한 *in vitro*에서 Compound 1의 항암활성을 측정하였으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

Compound 1은 A549, SK-MEL-2, SK-OV-3 cell에 대한 ED<sub>50</sub>값이 각각 4.2, 5.8 및 4.6 μg/ml로서 강한 활성을 보여주었다. 대조 약물로서는 기존의 항암제로 잘 알려진 5-fluorouracil을 사용하였는데 각각 1.8, 4.7 및 4.2 μg/ml로서 compound 1과 비슷한 양상을 보여주었다. 더우기 강진항은 prostaglandin생합성의 억제제로서 cinnamylphenol 및 odoriflavene이 active compound로 알려져 있으나<sup>6)</sup> 아직 인체 암세포에 대해 항암활성을 보여주는 화합물은 보고된바 없다. 따라서 이 화합물은 더욱더 광범위한 항암실험을 통하여 개발 가능성에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

(1995년 9월 23일 접수)

### 참고문헌

1. 김신일, 박종대, 백남인, 이유희: 식물자원으로 부터 항암제 개발, 과학기술처, p.41 (1991).
2. 정보섭, 신민교: 도해 향약(생약)대사전(식물편), 영림사, 서울 p.675 (1990).
3. Yahara, S., Saijo, R., Nohara, T., Konishi, R., Yamahara, J., Kawasaki, T., and Miyahara, K.: Novel bi-isoflavonoids from *Dalbergia odorifera*, *Chem.Pharm.Bull.*, **33**, 5130 (1985).
4. Yahara, S., Ogata, T., Saijo, R., Konishi, R., Yamahara, J., Miyahara, K. and Nohara, T.: Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. I, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 979 (1989).
5. Ogata, T., Yahara, S., Hisatsune, R., Konishi, R. and Nohara, T.: Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. II, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2750 (1990).
6. Goda, Y., Katayama, M., Ichikawa, K., Shibuya, M., Kikuchi, F. and Sankawa, U.: Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Dalbergia odorifera*, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5606 (1985).