

## 고로쇠 Coumarinolignan의 $\beta$ -Cyclodextrin 포접화합물 제조 및 암세포증식 억제활성

임순호<sup>1</sup> · 정다운<sup>2</sup> · 윌리엄스다렌<sup>2</sup> · 게클러커트<sup>3</sup> · 김경근<sup>4</sup> · 신부안<sup>4</sup> · 이익수<sup>5</sup> · 김현정<sup>6\*</sup>  
<sup>1</sup>동신대학교 제약공학과, <sup>2</sup>광주과학기술원 생명과학부, <sup>3</sup>광주과학기술원 나노바이오재료전자공학과,  
<sup>4</sup>전남대학교 의과대학, <sup>5</sup>전남대학교 약학대학, <sup>6</sup>목포대학교 약학대학

### Anti-Proliferative Effects of $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes with Coumarinolignans from *Acer mono*

Soon-Ho Yim<sup>1</sup>, Da-Woon Jung<sup>2</sup>, Darren R. Williams<sup>2</sup>, Kurt E. Geckeler<sup>3</sup>, Kyung Keun Kim<sup>4</sup>,  
Boo Ahn Shin<sup>4</sup>, Ik-Soo Lee<sup>5</sup> and Huyn Jung Kim<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Dongshin University, Jeonnam 520-714, Korea

<sup>2</sup>School of Life Sciences, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea

<sup>3</sup>Department of Nanobio Materials and Electronics, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea

<sup>4</sup>Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-746, Korea

<sup>5</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>6</sup>College of Pharmacy and Natural Medicine Research Institute, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

**Abstract** – Two coumarinolignans, cleomiscosins C (**1**) and D (**2**) were isolated from the heartwood of *Acer mono*, together with four compounds, 5-*O*-methyl-(*E*)-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**3**), 5-*O*-methyl-(*E*)-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**4**), scopoletin (**5**), and (*E*)-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**6**). Of them, cleomiscosins C (**1**) and D (**2**) were applied to preparing inclusion complex molecules with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) to improve the very poor solubility in cell media. The CD complexes of **1** and **2** exhibited an enhancement of water solubility which is feasible to measure their cytotoxicity using a spectrophotometer in a cell-based assay. Anti-proliferative activity of these complex molecules was successfully estimated on HCT116 human colon cancer cells, and cleomiscosin D (**2**) showed anti-proliferative effects at the concentration of 1.95~31.2  $\mu$ g/mL in a dose-dependent manner.

**Key words** – *Acer mono*, Coumarinolignans, Cleomiscosins,  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complex, Anti-proliferation

단풍나무속(*Acer* genus)은 단풍나무과(Aceraceae)에 속하는 식물로 북반구 온대지역에 두루 분포하며 약 200여종에 이른다고 알려져 있다.<sup>1)</sup> 그 중 고로쇠나무(*Acer mono* Maximowicz)는 한국, 일본, 중국, 몽골 및 러시아 극동지방 등에 분포하는 낙엽성 큰키나무로서,<sup>1,2)</sup> 그 줄기껍질을 지금 축(地錦槭)이라 하여 풍습골통(風濕骨痛) 골절(骨折), 타박상(打撲傷)을 치료하는데 이용해왔으며, 민간에서는 봄에 수액(水液)을 채취하여 위장병 치료에 사용하였다.<sup>2)</sup> 고로쇠나무의 생리활성과 식물화학성분에 대한 기존 연구로는, 고로쇠나무 수액이 골다공증 완화효능<sup>3)</sup>과 스트레스성 위염에 따른 위점막 손상에 대한 보호능<sup>4)</sup>을 나타냄이 동물실험을 통

해 최근 보고되었으며, 고로쇠나무 잎으로부터 간보호활성 물질인 stilbenoid 배당체 및 flavonoid 성분이 분리, 보고된 바 있다.<sup>5,6)</sup> 위와 같이 고로쇠나무에 대한 연구는 수액 또는 채취가 용이한 잎을 대상으로 주로 이루어져왔으며 고로쇠나무의 심재(心材)나 줄기껍질에 대한 성분 또는 활성 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

천연물 기원의 생리활성 2차대사산물을 탐색하는 연구의 일환으로, 본 연구실은 고로쇠나무 심재의 EtOAc 추출물에 대한 성분조사 및 분리실험을 진행하였고, 그 결과 2종의 주요 coumarinolignan 성분, cleomiscosin C(**1**) 및 cleomiscosin D(**2**)와 더불어 3종의 stilbene 배당체, 5-*O*-methyl-(*E*)-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside(**3**), 5-*O*-methyl-(*E*)-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside(**4**)

\*교신저자(E-mail): hyunkim@mokpo.ac.kr  
(Tel): +82-61-450-2686

및 (*E*)-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside(**6**), 그리고 1종의 coumarin 물질인 scopoletin(**5**)이 규명되었다.

한편, 고로쇠나무 심재의 주요화합물 coumarinolignan 성분 **1**과 **2**의 암세포 증식억제 효능을 세포주를 이용하여 평가하는 중, 두 화합물이 세포배지에서 용해되지 않고 석출되는 것이 발견되었다. 이는 친수성(親水性) 배지 환경에서 두 화합물의 극도로 낮은 용해성이 해당 생리활성의 결과 획득에 장애가 된 것으로 판단되었으며, 이에 난용성 coumarinolignan 화합물 **1** 및 **2**의 가용화를 위해  $\beta$ -cyclodextrin을 이용하여 포접화합물을 제조하고, 이 포접화합물을 세포에 적용하여 암세포증식 억제효능을 측정하였다.  $\beta$ -Cyclodextrin( $\beta$ -CD)은 7개의 D-glucopyranose가  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)-glycosidic bond를 형성하여 만들어진 환상(環狀) 올리고당으로서 내측에 소수성(疏水性)의 공간(空腔)과 외측에 친수성(親水性)이 있는 수산기가 배열된 원통(cylinder) 형의 구조를 지니고 있다. 이러한 특성으로 인해  $\beta$ -CD는 내부에 도입된 난용성의 Guest 화합물과 포접복합체(抱接複合體)를 형성할 수 있기 때문에 지용성 약물의 수용성과 용해도를 증가시키는 친수성 담체로 널리 이용되고 있다.<sup>7-9)</sup>

본 논문에서는 고로쇠나무 심재로부터 분리된 7종의 페놀성 화합물의 화학구조를 보고하고, 그 중 주요물질인 2종의 coumarinolignan 화합물을 적용하여 제조된  $\beta$ -CD 포접화합물 및 이 복합체를 바탕으로 얻어진 해당 coumarinolignan 화합물 2종의 암세포 독성효능에 대해 기술하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 이용된 고로쇠나무(*Acer mono Maximowicz*)는 2009년 4월에 전남 광양에서 채취되었으며, 목포대학교 약학대학 김현정교수가 감정한 후 줄기껍질과 심재를 분리하여 음건하였다. 표본(No. P2009AMH)은 목포대학교 약학대학 표본실에 보관되어 있다.

**기기 및 시약** - 1D 및 2D를 포함한 NMR 스펙트럼은 Varian사의 INOVA 500 MHz NMR(<sup>1</sup>H: 499.998 MHz)과 VNMRs 600 MHz NMR spectrometer(<sup>1</sup>H: 600.006 MHz)를 이용하여 측정하였다. MS는 Varian 320-MS TQ mass spectrometer를 이용하여 negative electrospray ion(ESI) mode에서 측정하였으며, CD(circular dichroism) 스펙트럼은 JASCO J-810 spectrometer를 이용하였다. HPLC는 DAD (diode array detector)가 장착된 Agilent사의 HP1100 series를 이용하였으며, column으로 Waters사의 SunFire™ C18 (4.6×150 mm, 5  $\mu$ m) 및 SunFire™ Prep C18 OBD(5  $\mu$ m, 19×150 mm)를 이용하였다. Column chromatography는 Merck사의 silica gel 60(70-230 mesh)을 적용하였다.

**추출 및 분리** - 고로쇠나무 심재 4.30 kg을 잘게 분쇄하고 25 L의 MeOH로 상온에서 3회 추출한 후 감압농축하여

134.0 g의 추출물을 획득하였다. 이 추출물을 증류수에 현탁한 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH를 이용, 순차적으로 분획하여 각각 *n*-hexane(8.02 g), EtOAc(17.06 g), *n*-BuOH(27.58 g) 분획물을 얻었다. 심재 EtOAc 분획물 일부를 silica gel 60 chromatography에 적용하고 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(0.5% formic acid 함유) 조건으로 극성을 증대(24:1 $\rightarrow$ 20:1 $\rightarrow$ 15:1 $\rightarrow$ 10:1 $\rightarrow$ 6:1 $\rightarrow$ 3:1 $\rightarrow$ 1:1, 100% MeOH)시키면서 용출하여 총 12종의 분획(F01-12)을 획득하였다. 화합물 분리정제를 위해 최종적으로 각 분획에 대하여 semi-preparative HPLC를 적용하였고, 그 결과, MeCN-0.1% formic acid 함유 H<sub>2</sub>O를 이용, 13:87 $\rightarrow$ 50: 50 조건에서 50분 동안 용출하여 분획 F03에서 화합물 **1**과 **5**를, 분획 F04에서 화합물 **2**를, F09에서 화합물 **3**을 획득하였으며, 분획 F10 (MeCN-0.1% formic acid 함유 H<sub>2</sub>O 조건, 13:87 $\rightarrow$ 40:60, 50분)에서 화합물 **6**을, F11 분획(MeCN-0.1% formic acid 함유 H<sub>2</sub>O 조건, 20:80 $\rightarrow$ 25:75, 40분)에서 화합물 **4**를 획득하였다.

**Cleomiscosin C(1)**: UV  $\lambda_{max}$  (in HPLC solvent) 232 (sh), 327 nm; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.97 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 6.92 (1H, s, H-5), 6.75 (2H, s, H-2'/6'), 6.35 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 4.96 (1H, d, *J*= 8.0 Hz, H-7'), 4.37 (1H, ddd, *J*=8.0, 4.3, 2.0 Hz, H-8'), 3.79 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (6H, s, 3'/5'-OCH<sub>3</sub>), 3.66 (1H, dd, *J*=12.5, 2.0 Hz, H-9'a), 3.39 (1H, dd, *J*=12.5, 4.3 Hz, H-9'b); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.08 (C-2), 147.98 (C-3'/5'), 145.30 (C-6), 144.88 (C-4), 138.04 (C-9), 137.06 (C-7), 136.20 (C-4'), 131.72 (C-8), 125.72 (C-1'), 113.28 (C-3), 111.30 (C-10), 105.62 (C-2'/6'), 100.76 (C-5), 77.76 (C-8'), 76.62 (C-7'), 59.87 (C-9'), 56.13 (3'/5'-OCH<sub>3</sub>), 55.84 (6-OCH<sub>3</sub>).

**Cleomiscosin D(2)**: UV  $\lambda_{max}$  (in HPLC solvent) 232 (sh), 327 nm; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.95 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-4), 6.94 (1H, s, H-5), 6.77 (2H, s, H-2'/6'), 6.32 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-3), 4.96 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-7'), 4.36 (1H, ddd, *J*=7.8, 4.2, 2.0 Hz, H-8'), 3.84 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (6H, s, 3'/5'-OCH<sub>3</sub>), 3.62 (1H, dd, *J*=12.3, 2.0 Hz, H-9'a), 3.36 (1H, dd, *J*=12.3, 4.2 Hz, H-9'b); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.05 (C-2), 148.00 (C-3'/5'), 145.28 (C-6), 144.87 (C-4), 138.06 (C-9), 136.93 (C-7), 136.23 (C-4'), 131.97 (C-8), 125.70 (C-1'), 113.19 (C-3), 111.11 (C-10), 105.59 (C-2'/6'), 100.97 (C-5), 78.22 (C-8'), 76.27 (C-7'), 59.91 (C-9'), 56.12 (3'/5'-OCH<sub>3</sub>), 55.86 (6-OCH<sub>3</sub>).

**5-O-methyl-(E)-resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (3)**: UV  $\lambda_{max}$  (in HPLC solvent) 306, 320 nm; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.39 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2'/6'), 7.07 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H- $\beta$ ), 6.91 (1H, brs, H-2), 6.90

(1H, d,  $J=16.0$  Hz, H- $\alpha$ ), 6.77 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-3'/5'), 6.74 (1H, brs, H-6), 6.58 (1H, t,  $J=2.0$  Hz, H-4), 4.94 (1H, d,  $J=7.3$  Hz, H-1"), 3.94 (1H, dd,  $J=12.3, 2.0$  Hz, H-6"), 3.80 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.70 (1H, dd,  $J=12.3, 6.5$  Hz, H-6"), 3.45~3.48 (3H, m, H-3", 4", 5"), 3.38 (1H, m, H-2"); ESI-MS  $m/z$  403 [M-H].

**5-O-methyl-(E)-resveratrol-3-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside(4):** UV  $\lambda_{max}$  (in HPLC solvent) 215, 307, 320 nm; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.39 (2H, d,  $J=9.0$  Hz, H-2'/6'), 7.06 (1H, d,  $J=16.3$  Hz, H- $\beta$ ), 6.90 (1H, d,  $J=16.3$  Hz, H- $\alpha$ ), 6.84 (1H, brs, H-2), 6.78 (2H, d,  $J=9.0$  Hz, H-3'/5'), 6.76 (1H, brs, H-6), 6.59 (1H, t,  $J=2.0$  Hz, H-4), 4.98 (1H, d,  $J=2.5$  Hz, H-1"), 4.90 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-1"), 4.05 (1H, m, H-6"), 3.97 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-4"), 3.89 (1H, d,  $J=2.5$  Hz, H-2"), 3.81 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.75 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-4"), 3.61 (1H, m, H-5"), 3.61 (1H, m, H-6"), 3.54 (2H, s, H-5"), 3.46 (1H, m, H-3"), 3.46 (1H, m, H-2"), 3.37 (1H, brt,  $J=8.5$  Hz, H-4"); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 162.4 (C-5), 160.5 (C-3), 158.7 (C-4'), 141.5 (C-1), 130.4 (C- $\beta$ ), 130.3 (C-1'), 129.2 (C-2'/6'), 126.7 (C- $\alpha$ ), 116.7 (C-3'/5'), 111.1 (C-1"), 108.6 (C-2), 106.8 (C-6), 103.2 (C-4), 102.6 (C-1"), 80.7 (C-3"), 78.3 (C-2"), 78.1 (C-3"), 77.0 (C-5"), 75.2 (C-4"), 75.1 (C-2"), 71.7 (C-4"), 68.9 (C-6"), 65.9 (C-5"), 56.0 (5-OCH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$  535 [M-H].

**Scopoletin(5):** UV  $\lambda_{max}$  (in HPLC solvent) 230, 296, 341 nm; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.85 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-4), 7.09 (1H, s, H-5), 6.76 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-3), 3.90 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 164.3 (C-2), 153.1 (C-8a), 151.5 (C-7), 147.2 (C-6), 146.3 (C-4), 112.7 (C-3), 112.7 (C-4a), 110.0 (C-5), 104.1 (C-8), 56.9 (6-OCH<sub>3</sub>).

**(E)-Resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside(6, trans-piceid):** UV  $\lambda_{max}$  (in HPLC solvent) 210, 310, 321 nm; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.37 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-2'/6'), 7.02 (1H, d,  $J=16.3$  Hz, H- $\beta$ ), 6.85 (1H, d,  $J=16.3$  Hz, H- $\alpha$ ), 6.79 (1H, brs, H-2), 6.77 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-3'/5'), 6.62 (1H, brs, H-6), 6.45 (1H, t,  $J=2.0$  Hz, H-4) 4.90 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-1"), 3.94 (1H, dd,  $J=12.0, 2.0$  Hz, H-6"), 3.72 (1H, dd,  $J=12.0, 6.0$  Hz, H-6"), 3.50 (1H, m, H-5"), 3.47 (1H, m, H-3"), 3.45 (1H, m, H-2"), 3.38 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-4"); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 160.6 (C-3), 159.7 (C-5), 158.6 (C-4'), 141.6 (C-1), 130.4 (C- $\beta$ ), 130.1 (C-1), 129.1 (C-2'/6'), 126.8 (C- $\alpha$ ), 116.6 (C-3'/5'), 108.4 (C-6), 107.1 (C-2), 104.2 (C-4), 102.5 (C-1"), 78.4 (C-5"), 78.2 (C-3"), 75.1 (C-2"), 71.6 (C-4"), 62.7 (C-6");

ESI-MS  $m/z$  389 [M-H].

**$\beta$ -Cyclodextrin( $\beta$ -CD)을 이용한 Cleomiscosin 포접화합물 제조** – Cleomiscosin C(1) 및 cleomiscosin D(2)가 로딩된 CD 나노입자는 고속진동마쇄기(高速振動磨碎機, high-speed vibration milling system)에서 고체상반응(solid-state reaction)을 통해 만들어졌다(Retsch Co. Ltd., MM 200). 각 cleomiscosin 화합물과 CD는 두 개의 스테인리스 mixing balls과 함께 스테인리스 스틸 capsule 안에 넣어진 후, 상온 20 Hz에서 60분 동안 격렬하게 마쇄되었다. 고속진동마쇄를 통해 얻은 물질을 증류수에 1 mg/mL 농도로 녹이고, 8000 g에서 10분 동안 원심분리(Hanil Science Industrial, MICRO 17TR)하여 포접되지 않은 free cleomiscosin을 제거하였다. 이 과정을 추가 반복하여 상등액을 취합하고 동결 건조하였으며(Samwon Engineering, SFDSM12), 제조된 입자의 모양과 표면전하를 SEM 및 ELS-Z의 zeta-potential 모드에서 각각 측정하여 확인하였다. 입자의 hydrodynamic size를 검사하기 위하여 동결 건조된 시료를 물에 녹이고 ultra-sonication을 1분 동안 실시(Sonics and Materials Inc., Model VC 750)한 후, ELS-Z를 이용하여 DLS (dynamic light scattering) 모드에서 검정하였다. 생성된 포접복합체에서 cleomiscosin 화합물의 부하율(loading efficiency)은 UV-Vis spectroscopy(Hitachi spectrometer U-2000)를 통해 확인되었다.

**암세포증식 억제활성 평가** – 세포의 증식 및 생존율은 MTT법에 의해 평가되었다. 사람 유래 HCT116 대장암세포(HCT116 colon cancer cells)와 암-연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts)를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에 분주하고 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 유지하였다. 그 후 각 세포를 96 well plate에 동일하게 분주하고( $6 \times 10^3$  cells/well), 24시간 동안 배양하였다. 이어 기존의 culture media를 제거하고 serum-free media로 교체한 후, cleomiscosin과  $\beta$ -CD 포접복합체를 일정 농도로 가하여 48시간 동안 배양하였다. 세포의 활성도(cell viability %)를 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 용액(1 mg/mL)을 가하고 3시간 동안 더 배양하였다. 상등액을 제거한 후, 생성된 formazan을 DMSO 200  $\mu$ L로 녹여 내고 microplate reader(BioRad, Versamax) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하여 평균값(means $\pm$ SD)을 구하였으며, DMSO 대조군의 흡광도값을 기준으로 세포생존율을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

고로쇠나무 심재에 존재하는 화합물의 분리를 위해 해당 원재료에 대한 MeOH 추출물을 제조하였고, 이를 대상으로

용매극성에 따른 분획을 시행하여 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 등 4종의 분획물을 획득하였다. 이어 EtOAc 분획물에 silica gel chromatography, HPLC 등을 적용하여 총 6종의 화합물을 분리하였다(Fig. 1). 효율적인 성분분석을 위해 각 화합물의 HPLC profile과 UV spectra가 DAD (diode array detector)를 바탕으로 190-400 nm에서 스캔하여 수집되었다. 화합물 1, 2 및 5의 UV 스펙트럼을 확인한 결과, 이 화합물들은 330 nm 근처에서 강한 흡수피크를 보여주었으며, 이는 해당 화합물들이 coumarin 유도체임을 시사하였다. 특히 화합물 1과 2는 동일한 UV 흡수 스펙트럼을 나타내었으며, 이는 두 화합물이 구조적으로 이성체임을 드러내었다. 화합물 3, 4 및 6 또한 서로 유사한 UV 흡수 형태를 보여주었으며, 307 및 320 nm에서 나타나는 전형적인 흡수피크는 이 화합물들이 stilbene 유도체임을 시사하였다(Fig. 2).

화합물 1과 2는 모두 백색의 과우더 형태로 분리되었다. 화합물 1의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 δ<sub>H</sub> 6.35 및 7.97(각 1H, d, *J*=9.5 Hz)과 δ<sub>H</sub> 6.92(1H, s)에서 coumarin 모핵에 해당하는 proton signals과 더불어 δ<sub>H</sub> 6.75(2H, s)에서 두 개의 aromatic protons을, δ<sub>H</sub> 4.96(1H, d, *J*=8.0 Hz)과 δ<sub>H</sub> 4.37(1H, ddd, *J*=8.0, 4.3, 2.0 Hz)에서 두 개의 oxymethine 기를 확인하였고, δ<sub>H</sub> 3.66(1H, dd, *J*=12.5, 2.0 Hz)과 δ<sub>H</sub> 3.39(1H, dd, *J*=12.5, 4.3 Hz)에서 hydroxymethylene기를, δ<sub>H</sub> 3.79(3H, s) 및 δ<sub>H</sub> 3.77(6H, s)에서 세 개의 methoxy기를 보여주었다. 이 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼 또한

coumarin의 구성요소인 α,β-unsaturated lactone을 δ<sub>C</sub> 160.08 (C=O), 113.28(CH), 144.88(CH)에서, 그리고 aromatic ring을 δ<sub>C</sub> 100.76(CH), 145.30(C), 137.06(C), 131.72(C), 138.04(C), δ 111.30(C)에서 나타내었으며, phenylpropanoid의 구성요소인 1,3,4,5-tetrasubstituted aromatic ring이 δ<sub>C</sub> 125.72(C), 105.62(2×CH), 147.98(2×C), δ 136.20(C)에서, oxygenated aliphatic carbons에 해당하는 δ<sub>C</sub> 76.62(CH), 77.76(CH) 및 δ<sub>C</sub> 59.87(CH<sub>2</sub>)과 함께 관찰되었다. 추가적인 2D NMR 분석과 함께, 이상의 데이터를 기존문헌에 보고된 바와 비교하여<sup>10,11)</sup> 이 화합물의 구조는 cleomiscosin C(aquillochin)임을 확인할 수 있었다.

화합물 2의 NMR 데이터는 cleomiscosin C(1)와 아주 유사하게 나타났으나, C-7'과 C-8'의 chemical shift값에서 차이를 나타내었다. 화합물 1과 비교할 때, 화합물 2는 C-7'의 경우 δ<sub>C</sub> 76.27(-0.35 ppm)로 upfield shift로 관찰되었으며, C-8' carbon의 경우 downfield shift로 δ<sub>C</sub> 78.22(+0.46 ppm)에서 관찰되었다. 이 결과는 기존 보고된 문헌과 비교되었으며,<sup>11,12)</sup> 이를 토대로 화합물 2의 구조가 cleomiscosin D임을 확인할 수 있었다. 두 coumarinolignan 물질은 circular dichroism spectroscopy에서 흡수밴드를 나타내지 않았다. 또한 HPLC 크로마토그램 상에서 보인 각 성분의 분리형태, 즉, retention time(*t<sub>R</sub>*)의 차이(cleomiscosin C > cleomiscosin D)가 이들의 congeners인 cleomiscosin A와 B의 결과(cleomiscosin A > cleomiscosin B)와 동일한 양식으로 나타남이 확인되었다.<sup>13,14)</sup>

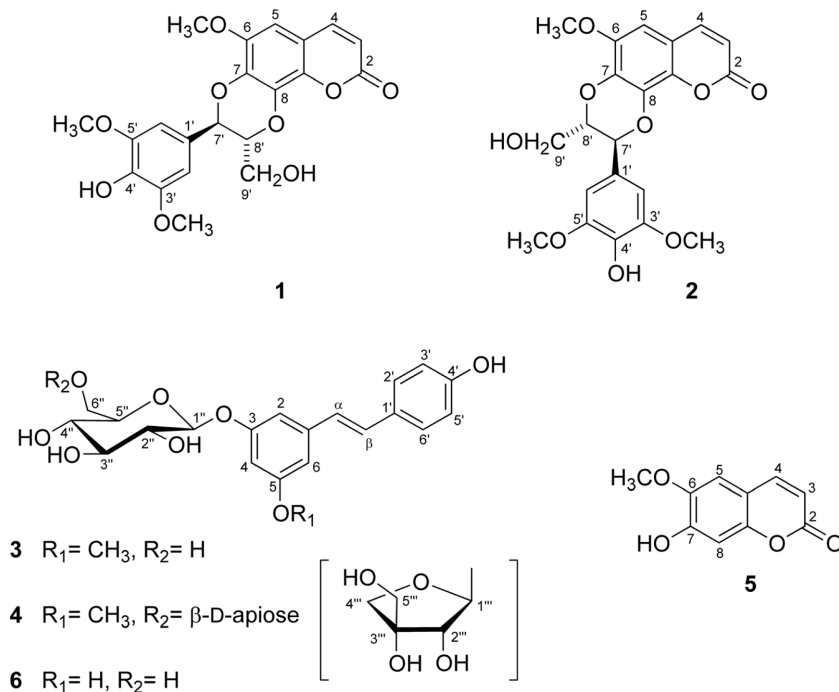
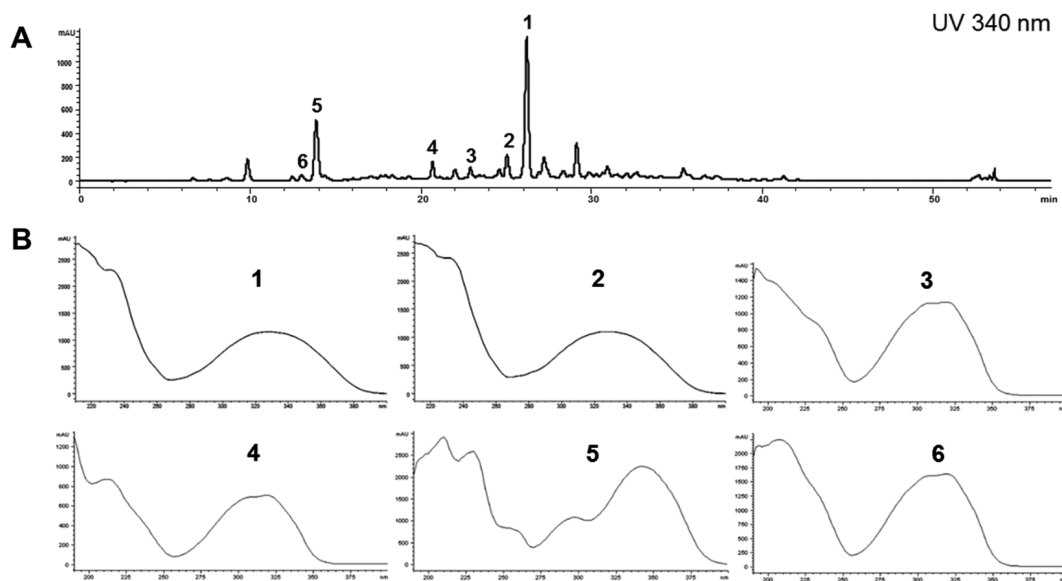


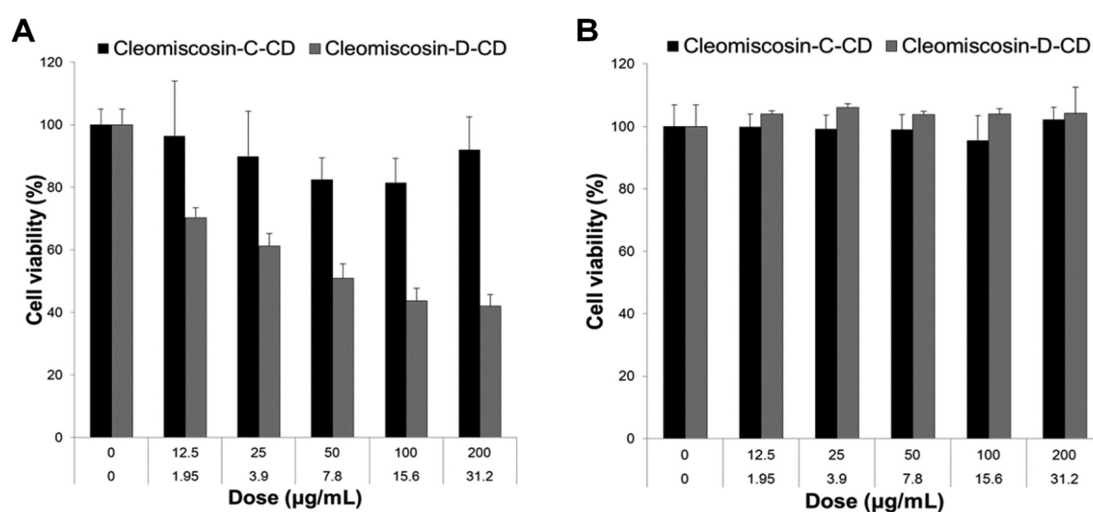
Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-6.

화합물 3, 4와 6은 NMR spectrum에서 모두 (*E*)-resveratrol aglycone에 해당하는 1,3,5-trisubstituted aromatic ring과 1,4-disubstituted aromatic ring, 그리고 *trans*-olefinic bond ( $J=16$  Hz)의 signals을 보여주었으며, 동시에 당(糖)에 대응하는 전형적인  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ -NMR 피크를 나타내어 3종 모두 배당체 화합물임을 시사해 주었다. 이 중 화합물 3과 4는 한 개의 methoxyl기( $\delta_{\text{H}} \sim 3.80$ )가 존재함을 드러내었고, 그

결합위치는 (*E*)-resveratrol aglycone의 C-5임을 HMBC를 통해 확인할 수 있었다. 또한 각 aglycone에 결합된 당의 종류와 위치는 2D NMR과 문헌비교를 통해 이루어졌는데,<sup>5)</sup> 화합물 3과 6에 존재하는 당은 하나의  $\beta$ -D-glucopyranose로 규명되었으며, 화합물 4에는 이당류인  $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranose가 존재함을 알 수 있었다. 각 당의 결합위치는 HMBC 스펙트럼에서 당의 anomeric proton



**Fig. 2.** HPLC profile and UV spectra for compounds 1-6. Analytic HPLC was performed by a gradient solvent system of MeCN- $\text{H}_2\text{O}$  (0.1%  $\text{HCOOH}$ ) (13:87 $\rightarrow$ 50:50) with a Waters SunFire<sup>TM</sup> (4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{M}$ ) for 50 min followed by an isocratic elution with 100% MeCN for 10 min. (A) HPLC chromatograms of 1-6 in the EtOAc fraction from heartwood of *A. mono*; 1 ( $t_{\text{R}}$  26.24 min), 2 ( $t_{\text{R}}$  25.08 min), 3 ( $t_{\text{R}}$  22.93 min), 4 ( $t_{\text{R}}$  20.70 min), 5 ( $t_{\text{R}}$  13.90 min), 6 ( $t_{\text{R}}$  13.04 min). (B) UV spectra of 1-6 obtained by diode array detector.



**Fig. 3.** Anti-proliferation activities of cleomiscosins with  $\beta$ -cyclodextrin inclusion (CD) complexes. They displayed *in vitro* cytotoxicity of both cleomiscosin C-CD (black bar) and cleomiscosin D-CD (gray bar) nanoparticles in HCT116 colon cancer cells (A), and cancer-associated fibroblasts (B). Each dose ( $\mu\text{g/mL}$ ) in the lower line corresponds the amount of cleomiscosin that is loaded in the cleomiscosin-CD nanoparticle described in the upper line.

과 aglycone의 carbon 사이에 나타나는 correlation 피크를 토대로 C-3 위치로 규명하였다. 상기 분석을 바탕으로 화합물 3, 4와 6의 구조는 5-O-methyl-(E)-resveratrol-3-O-β-D-glucopyranoside(3), 5-O-methyl-(E)-resveratrol-3-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside(4)와 (E)-resveratrol-3-O-β-D-glucopyranoside(6)로 판명되었다. 기존 연구된 고로쇠나무(*A. mono*) 유래의 2차 대사산물로서, 앞으로부터 화합물 3 및 4의 존재가 보고되어 있으며 이 화합물들은 간세포보호 활성을 나타냄이 알려져 있다.<sup>5,6)</sup>

화합물 5는 coumarin 모핵에 해당하는 proton signals이 δ<sub>H</sub> 7.85와 6.20(각 1H, d, J=9.0 Hz)에서 나타났고 δ<sub>H</sub> 7.09와 6.76에서 aromatic protons(1H, s)이, 또한 δ<sub>H</sub> 3.90에서 하나의 methoxyl기가 나타나는 것을 확인하였다. 각 피크의 위치, coupling constants 및 HMBC correlation 결과를 문헌<sup>15)</sup>과 비교하여 이 화합물은 scopoletin임이 확인되었다.

고로쇠나무 심재로부터 나온 주요 coumarinolignoid 성분이자, 난용성 화합물인 cleomiscosin C(1)와 D(2)에 대한 암세포증식 억제효능이 사람유래 대장암세포 HCT116에서 MTT법으로 평가되었다. 세포배지 환경에서 화합물 1과 2는 극도로 낮은 용해성으로 인해 세포배지 환경에서 다시 석출되어 세포막에 침전을 형성하는 현상을 일으켰으며, 이는 MTT법의 장애요소로 나타났다. 이를 개선하기 위하여 cleomiscosin C(1)와 D(2)가 로딩된 β-cyclodextrin(β-CD) 나노입자를 제조하였으며, 이 복합체는 고속진동마쇄계(high-speed vibration milling system)에서 β-CD와 함께 고체상 반응(solid-state reaction)에 의해 생성되었다. 상기 방법을 거쳐 생성된 각 cleomiscosin-CD 포접화합물에 함유되어 있는 cleomiscosin의 함유량(percentage compound content)은 UV spectroscopy에 의해 15.6%로 확인되었다.

화합물 1과 2의 암세포증식 억제효능은 수용성이 증대된 cleomiscosin-CD 복합체를 이용하여 성공적으로 측정되었다(Fig. 3). 나노입자 cleomiscosin C-CD는 최대 200 μg/mL 농도에서도 HCT116 세포에 대한 증식 억제효능을 나타내지 않았다. 반면, cleomiscosin D-CD 포접화합물은 12.5~200 μg/mL 농도, 즉, 1.95~31.2 μg/mL의 cleomiscosin D가 농도의존적으로 암세포의 증식을 억제함을 보여주었다. 더구나 해당 동일농도에서 cleomiscosin D는 암-연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts)에 세포증식 억제 효능을 나타내지 않는 것으로 확인되었으며, 이 결과로 판단컨대 이 화합물이 HCT116 대장암세포에 대한 세포독성만을 선택적으로 나타냄을 시사하였다.

## 결 론

단풍나무과(Aceraceae)에 속하는 고로쇠나무(*Acer mono* Maximowicz) 심재로부터 총 6종의 페놀성 성분을 분리하였

으며, 그 화학구조는 각각 cleomiscosin C(1)와 cleomiscosin D(2), 5-O-methyl-(E)-resveratrol-3-O-β-D-glucopyranoside(3), 5-O-methyl-(E)-resveratrol-3-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside(4)와 scopoletin(5), 그리고 (E)-resveratrol-3-O-β-D-glucopyranoside(6)으로 밝혀졌다. 이 중 주요 coumarinolignoid 성분이자 난용성 화합물인 cleomiscosin C(1)와 cleomiscosin D(2)의 암세포증식 억제효능을 HCT116 대장암세포주를 이용하여 MTT법으로 평가하였다. 이는 화합물의 수용성 증대를 목표로 β-cyclodextrin을 이용한 cleomiscosin-CD 포접화합물을 제조한 후 in vitro assay에 적용함으로써 성공리에 이루어졌으며, 세포활성 결과는 cleomiscosin D(2)가 HCT116 암세포에 대한 선택적인 증식 억제효능을 나타냄을 증명하였다. 이에 본 연구결과는 고로쇠나무의 성분분석 및 생리활성 연구의 기초자료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 천연물 유래 난용성화합물의 생물활성평가를 수월하게 진행할 수 있는 방법의 예시 중 하나로 제시될 수 있으리라 사료된다.

## 사 사

본 논문은 2012학년도 목포대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. van Gelderen, D. M., de Jong, P. C. and Oterdoom, H. J. (1994) *Maples of the world*. Timber Press, Portland.
2. Bae, K. H. (2000) *The medicinal plants of Korea*. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., Seoul, p 302.
3. Lee, G. S., Byun, H. S., Kim, M.-H., Lee, B. M., Ko, S. H., Jung, E. M., Gwak, K. S., Choi, I. G., Kang, H. Y., Jo, H. J., Lee, H. J. and Jeung, E. B. (2008) The beneficial effect of the sap of *Acer mono* in animal with low-calcium diet-induced osteoporosis-like symptoms. *Br. J. Nutr.* **100**: 1011-1018.
4. Park, C. H., Son, H. U., Son, M. and Lee, S. H. (2011) Protective effect of *Acer mono* Max. sap on water immersion restraint stress-induced gastric ulceration. *Exp. Ther. Med.* **2**: 843-848.
5. Yang, H., Sung, S. H. and Kim, Y. C. (2005) Two new hepatoprotective stilbene glycosides from *Acer mono* leaves. *J. Nat. Prod.* **68**: 101-103.
6. Yang, H., Lee, M. K. and Kim, Y. C. (2005) Protective activities of stilbene glycosides from *Acer mono* leaves against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in primary cultured rat hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4182-4186.
7. Sharma, U.S., Balasubramanian, S. V. and Straubinger, R. M. (1995) Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (taxol) complexes with cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* **84**: 1223-1230.

8. Zheng, Y., Haworth, I. S., Zuo, Z., Chow, M. S. S. and Chow, A. H. L. (2005) Physicochemical and structural characterization of quercetin- $\beta$ -cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* **94**: 1079-1089.
9. Karan, M., Sahoo, N. G., Li, L. and Judeh, Z. (2011) Dissolution enhancement of artemisinin with  $\beta$ -cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* **59**: 646-652.
10. Ray, A. B., Chattopadhyay, S. K. and Kumar, S. (1985) Structures of cleomiscosins, coumarino-lignoids of *Cleome viscosa* seeds. *Tetrahedron* **41**: 209-214.
11. Tanaka, H., Ishihara, M., Ichino, K. and Ito, K. (1988) Total synthesis of coumarinolignans, aquillochin (cleomiscosin C) and cleomiscosin D. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 3833-3837.
12. Kumar, S., Ray, A. B., Konno, C., Oshima, Y. and Hikino, H. (1988) Cleomiscosin D, a coumarino-lignan from seeds of *Cleome viscosa*. *Phytochemistry* **27**: 636-638.
13. Chattopadhyay, S. K., Kumar, S., Kaur, R., Tandon, S. and Rane, S. (2009) Identification and quantification of two anti-hepatotoxic coumarinolignoids cleomiscosin A and cleomiscosin B in the seeds of *Cleome viscosa* using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **23**: 340-356.
14. Chattopadhyay, S. K., Kumar, S., Tripathi, S. and Gupta, A. K. (2007) High-performance liquid chromatographic method for identification and quantification of two isomeric coumarinolignoids-cleomiscosin A and cleomiscosin B-in extracts of *Cleome viscosa*. *Biomed. Chromatogr.* **21**: 1214-1220.
15. Siddiqui, B. S., Sattar, F. A., Ahmad, F. and Begum, S. (2007) Isolation and structural elucidation of chemical constituents from the fruits of *Morinda citrifolia* Linn. *Arch. Pharm. Res.* **30**: 919-923.

(2015. 5. 6 접수; 2015. 6. 1 심사; 2015. 6. 4 게재확정)