

식용식물자원으로부터 활성물질의 탐색 -IX. 흰씀바귀 (*Ixeris dentata* forma *albiflora*) 뿌리에서 Sesquiterpene Lactone 화합물의 분리 및 구조 동정; ACAT, DGAT 및 FPTase 효소 활성의 저해

방면호 · 장태오 · 송명종 · 김동현 · 권병목¹ · 김영국¹ · 이현선¹
정인식 · 김대근² · 김성훈³ · 박미현⁴ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹한국생명공학원, ²우석대학교 약학대학,
³경희대학교 동서의학대학원, ⁴(주)이룸라이프

(2003년 12월 15일 접수, 2004년 2월 24일 수리)

식용식물자원으로부터 활성소재를 찾기 위하여 흰씀바귀 뿌리를 80% MeOH로 추출하고, 얻어진 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 용매 분획하였다. EtOAc와 *n*-BuOH 분획에 대하여 column chromatography를 반복하여 4종의 화합물을 분리하였다. 각각에 대하여 2D-NMR을 포함한 스펙트럼 데이터의 해석과 문헌 자료를 조사하여 zaluzanin C (1), 9 α -hydroxyguaian-4(15),10(14),11(13)-triene-6,12-olide (2), 3 β -O- β -D-glucopyranosyl-8 β -hydroxyguaian-4(15),10(14)-diene-6,12-olide (3), 3-O- β -D-glucopyranosyl-8 β -hydroxyguaian-10(14)-ene-6,12-olide (4)로 구조를 결정하였다. 이들 화합물에 대하여 ACAT(Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase), DGAT (diacylglycerol acyl transferase) 및 FPTase(farnesyl-protein transferase)의 활성에 미치는 억제효과를 측정하였다. Compound 1과 Compound 2는 DGAT에 대한 활성억제효과에 있어서 IC₅₀ 값이 각각 0.13 mM, 0.10 mM로 나타났고, FPTase에 대하여는 각각 0.15 mM, 0.18 mM로 나타났으며, ACAT에 대하여는 약한 억제 활성을 나타냈다. 따라서 흰씀바귀는 항암 및 항고혈압의 소재 개발에 있어서 유용한 자원으로 활용될 수 있을 것이다.

Key words: 씬바귀, guaianolide, ACAT, DGAT, FPTase

서 론

흰씀바귀(*Ixeris dentata* forma *albiflora*)는 길가나 들의 양지 바른 곳에서 자라며, 우리나라 전국에 분포하는 국화과의 다년생 초본식물로 식용으로도 널리 이용되고 있으며, 줄기와 잎에 백색 유즙이 있고 쓴맛이 강하다. 한방에서는 그 전초를 황과채(黃瓜菜)라고 하며, 지리(止痢), 소종(消腫), 청열(淸熱), 해독(解毒), 위폐(滯肺), 양혈(涼血) 등의 효능이 있고, 뇨결석(尿結石), 무명종독(無名腫毒), 폐렴(肺炎) 등에 대한 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 주요 성분으로는 수종의 다당류와 60여종의 정유성분과 triterpenoids 그리고 sesquiterpene glycoside 및 flavonoid인 synaroside 등이 분리, 보고되어 있다.^{2,4)} 동물을 이용한 혈압 및 심장수축에 미치는 씬바귀의 영향에 관한 실험 결과가 보고되어 있으나¹⁾ 그 성분이나 활성과 관련하여 연구된 예는 아직 없다. 우리나라에서는 예로부터 민간이나 한방에서 수많은 식물들이 약용으로 사용되어 왔으며, 여러 가지 생약에 대한 다양한 약리학적 조사와 유효성분들의 분리에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.⁵⁾ 하지만 흰씀바귀에 대한 식물 화학적 연구나 생리활성에 관한 연구는 아직 보고된 바가 전혀 없다. 따라서 본 연구는 국내에서 널리 식용으로 이용되고 있

는 산채류인 흰씀바귀 뿌리로부터 주요 이차대사산물을 찾아내고, 구조를 동정하며 생리활성을 검사함으로써 그 유용성을 검증하려고 실시하였다. 흰씀바귀 뿌리에서 수종의 sesquiterpene을 분리, 동정하였다. 또한 각 화합물에 대하여 고혈압과 관련이 깊은 ACAT(Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase), DGAT (diacylglycerol acyltransferase)의 효소활성에 미치는 효과와 암 발단과 관련된 FPTase(farnesyl-protein transferase)의 효소활성에 미치는 효과를 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용한 흰씀바귀(*Ixeris dentata* forma *albiflora*)은 2000년 10월 경기도 양평군 강하면에서 구입하여 동정한 후 사용하였다.

시약 및 기기. Column chromatography용 silica gel은 Merck(Germany)사에서 생산한 silica gel 60(63~200 μ m)를 사용하였고, octadecyl silica gel(ODS)은 Merck사에서 생산한 Lichroprep RP-18(40~63 μ m)을 사용하였다. Thin layer chromatography(이하 TLC라고 함)는 Merck사에서 생산한 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였고, octadecyl silica gel TLC는 Merck사에서 생산한 DC-Fertigplatten RP-18 F₂₅₄를 사용하였다.

NMR은 400 MHz FT-NMR spectrometer(Varian Inova AS 400, Varian, USA)로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin model 599B(Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)로 측정하였으며, 미선

*연락처
Phone: 82-31-201-2661; Fax: 82-31-201-2157
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

Table 1. ¹³C-NMR data of compounds 1, 2, 3 and 4 from the root of *Ixeris dentata* forma *albiflora*

No. of Carbon	compound 1*	compound 2*	compound 3*	compound 4*
1	44.36	38.84	42.19	42.65
2	39.19	30.06	36.43	36.74
3	73.73	33.23	80.05	87.20
4	153.19	151.59	149.91	43.83
5	50.09	51.78	51.16	51.21
6	84.15	86.19	78.57	81.07
7	45.77	40.39	53.99	56.11
8	30.77	39.20	76.87	76.83
9	34.37	74.22	44.89	44.84
10	148.15	151.50	143.82	143.31
11	139.85	139.42	37.40	37.53
12	170.36	170.69	180.34	180.36
13	120.51	120.63	12.16	17.67
14	114.62	112.91	115.43	115.12
15	111.45	109.27	112.39	11.99
1'			101.79	104.23
2'			70.53	70.45
3'			76.66	76.57
4'			64.42	63.55
5'			74.03	74.08
6'			61.61	61.58

*Compound 1, 2: in CDCl₃; Compound 3, 4: in CD₃OD

광도는 Polarimeter P-1020(JASCO, Japan)으로, EI/MS는 JMSAX 505-WA(JEOL, Japan)를 사용하여 측정하였다. UV는 Spectroline(Model ENF-240 C/F, spectronics corporation, USA)를 사용하였다. 용점은 Fisher-Johns 용점측정기(Fisher scientific, USA)를 사용하여 측정하였으며, 미보정하였다.

흰썩바귀의 용매 추출 및 분획. 흰썩바귀 뿌리 생체 27 kg 을 약 2 cm 정도의 크기로 잘라서, 80% MeOH 용액(360 l)에 48시간 담가서 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 EtOAc(2 l×3)/H₂O(2 l)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 n-BuOH(2 l×3)로 분배 추출하였다. 각층을 감압농축하여, EtOAc 분획(IDR-E, 17 g), n-BuOH 분획(IDR-B, 80 g)과 H₂O 분획(IDR-W, 251 g)을 얻었다.

EtOAc 분획으로부터 sesquiterpene의 분리. EtOAc 분획(17 g)으로부터 silica gel(550 g) column chromatography(n-hexane-EtOAc = 7:1 → 3:1 → 1:1, CHCl₃-MeOH = 10:1 → 5:1)를 실시하였으며, 75 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC(n-hexane-EtOAc = 5:1, 2:1, CHCl₃-MeOH = 5:1, 2:1)로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 IDRE-1~IDRE-8의 8개의 분획을 얻었다. 그 중에서 IDRE-6(3.5 g)에 대하여 CHCl₃-MeOH(10:1 → 7:1 → 5:1)를 용출 용매로 사용하여 silica gel(400 g) column chromatography를 실시하여 6개의 분획(IDRE-6-1~IDRE-6-6)을 얻었다. 이 중에서 IDRE-6-2(400 mg)분획을 n-hexane-EtOAc(3:1)를 용출용매로 silica gel(190 g) column chromatography를 실시하여 IDRE-6-2-1(화합물 1, 20 mg)과 IDRE-6-2-2(화합물 2, 15 mg)을 분리 하였다.

화합물 1 (zaluzanin C); white powder(n-hexane-CHCl₃); mp

120°C; IR(KBr, cm⁻¹): 3436(-OH), 1765(C=O); [α]_D +2.9° (c=0.8, CHCl₃); EI/MS m/z (70 eV): 246 [M⁺], 218, 105, 91, 53; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ): 6.20(1H, d, J=3.4 Hz, 13a), 5.50(1H, d, J=3.4 Hz, H-13b), 5.45(1H, dd, J=2.0, 2.0 Hz, H-15a), 5.33(1H, dd, J=2.0, 2.0 Hz, H-15b), 5.01(1H, d, J=1.2 Hz, H-14a), 4.95(1H, d, J=1.2 Hz, H-14b), 4.58(1H, dddd, J=7.6, 2.0, 2.0, 2.0 Hz, H-3), 4.11(1H, dd, J=9.2, 9.6 Hz, H-6), 2.91(1H, br. dd, J=7.6, 8.4 Hz, H-1), 2.86(1H, dd, J=9.6, 7.6 Hz, H-5), 2.84(1H, m, H-7), 2.48(1H, dd, J=6.0, 6.8 Hz, H-9a), 2.32(1H, m, H-2a), 2.25(1H, m, 8a), 2.17(1H, m, H-9b), 1.75(1H, m, H-2b), 1.46(1H, br. s, H-8b); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ): Table 1.

화합물 2 {9α-hydroxyguaian-4(15),10(14),11(13)-triene-6,12-olide}; white powder(n-hexane -CHCl₃); mp 109°C; IR(KBr, cm⁻¹): 3460(-OH), 1766(C=O); [α]_D +0.3°(c=0.9, CHCl₃); EI/MS m/z (70 eV): 246[M⁺], 218, 105, 91; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ): 6.24(1H, d, J=3.4 Hz, 13a), 5.52(1H, d, J=3.4 Hz, H-13b), 5.22(1H, ddd, J=2.0, 2.0, 2.0 Hz, 15a), 5.03(1H, br. s, H-15b), 5.03(1H, br. s, H-14a), 4.83(1H, br. s, 14b), 4.53(1H, dd, J=3.6, 3.6 Hz, H-9), 3.86(1H, dd, J=9.2, 9.2 Hz, H-6), 3.42(1H, ddd, J=8.0, 8.4, 2.4 Hz, H-1), 3.20(1H, m, H-7), 2.88(1H, m, H-5), 2.53(1H, m, H-3a), 2.28(1H, m, H-8a), 2.17(1H, m, H-3b), 1.97(1H, m, H-2a), 1.80(1H, m, H-2b), 1.58(1H, m, H-8b). ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ): Table 1.

n-BuOH 분획으로부터 sesquiterpene의 분리. n-BuOH분획(80 g)에 대하여 silica gel(750 g) column chromatography를 {CHCl₃-MeOH-H₂O = 9:3:1 → 7:3:1 → 65:35:10(아랫층)}

실시하여 분취하였고, 이 분취액을 TLC로 확인하여 유사한 것끼리 모아 10개의 소분획(IDRB-1~IDRB-10)으로 나누었다. 이 중에서 IDRB-5(6.8 g)에 대하여 CHCl₃-MeOH-H₂O = 9 : 3 : 1(아랫층)의 용매를 사용하여 silica gel(230 g) column chromatography를 실시하였다. 얻어진 10개의 소분획(IDRB-5-1~IDRB5-10)중에서, 다섯번째 분획인 IDRB-5-5(1.5 g)을 MeOH과 H₂O(3 : 7)을 사용하여 ODS(150 g) column chromatography를 실시하여 화합물 3(52 mg)을 분리하였다. 또한 IDRB-5-6(461 mg)에 대하여 MeOH-H₂O(3 : 7)을 사용하여 ODS(120 g) column chromatography를 수행하여 화합물 4(74 mg)을 분리 하였다.

화합물 3 {3-*O*-β-D-glucopyranosyl-8β-hydroxyguaian-4(15), 10(14)-diene-6,12-olide}; white powder(*n*-hexane-CHCl₃); mp 120°C; IR(KBr, cm⁻¹): 3425(-OH), 1756(C=O); [α]_D²⁰ -1.5°(c = 1.1, CH₃OH); EI/MS *m/z* (70 eV): 426[M⁺], 326, 311, 244, 229; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD, δ): 5.37(1H, d, *J* = 1.6 Hz H-15a), 5.30(1H, d, *J* = 1.6 Hz H-15b), 5.06(1H, br. s, H-14a), 4.91(1H, br. s, H-14b), 4.60(1H, dd, *J* = 8.0, 5.6 Hz H-3), 4.44(1H, dd, *J* = 9.6, 9.6 Hz H-6), 4.42(1H, d, *J* = 7.6 Hz H-1'), 3.93(1H, m, H-8), 3.85(1H, dd, *J* = 12.6, 1.6 Hz H-6'a), 3.64(1H, dd, *J* = 12.6, 5.4 Hz H-6'b), 3.37~3.19(5H, m, H-2', 3', 4', 5'), 2.94(1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 8.0 Hz H-9), 2.83(1H, dq, *J* = 12.0, 7.2 Hz H-11), 2.65(1H, dd, *J* = 9.6, 8.0 Hz H-5), 2.44(2H, m H-9), 2.30(1H, ddd, *J* = 14.0, 8.0, 8.0 Hz H-2a), 2.07(1H, ddd, *J* = 12.0, 9.6, 3.2 Hz H-7), 1.93(1H, ddd, *J* = 14.0, 8.0, 5.6 Hz H-2b), 1.16(3H, d, *J* = 7.2 Hz H-13). ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ): Table 1.

화합물 4 {3-*O*-β-D-glucopyranosyl-8β-hydroxyguaian-10(14)-ene-6,12-olide}; white powder(*n*-hexane-EtOAc); mp 224~225°C; IR(KBr, cm⁻¹): 3436(-OH), 1748(C=O); [α]_D²⁰ +0.1°(c = 1.4, CH₃OH); EI/MS *m/z* (70 eV): 428[M⁺], 328, 313, 246, 231; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD, δ): 5.08(1H, br. s, H-14a), 4.94(1H, br. s, H-14b), 4.65(1H, br. dd, *J* = 6.0, 6.0 Hz H-3), 4.34(1H, d, *J* = 7.6 Hz H-1'), 4.21(1H, dd, *J* = 10.2, 10.1 Hz H-6), 3.92(1H, br. s, H-8), 3.84(1H, dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz H-3'), 3.65(1H, dd, *J* = 12.0, 5.5 Hz H-5'), 3.21~3.36(4H, m, H-2', H-4', H-6'), 3.17(1H, ddd, *J* = 7.6, 8.6, 2.4 Hz H-1), 2.57(1H, dd, *J* = 13.2, 5.8 Hz H-9b), 2.55(1H, dd, *J* = 10.2, 6.8 Hz H-11), 2.23(1H, overlapping H-9a), 2.21(1H, dd, *J* = 19.0, 8.5 Hz H-2a), 2.18(1H, dd, *J* = 19.0, 3.0 Hz H-2b), 1.99~2.01(3H, in total, H-5, H-7, H-4), 1.79(3H, d, *J* = 7.0 Hz H-13), 1.77(3H, d, *J* = 6.8 Hz H-15). ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ): Table 1.

ACAT 효소활성 측정. ACAT(Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase)의 활성측정은 [¹⁴C] oleoyl-CoA를 기질로 사용하는 방법⁶⁾을 이용하였다. 반응 용액으로는 10 μl 시료액, 4 μl 쥐의 간조직의 microsomal enzyme, 20 μl assay buffer(0.5 M KH₂PO₄, 10 mM DTT, pH 7.4), 15 μl BSA(bovine serum albumin) 40 mg/ml, 2 μl cholesterol 20 mg/ml, H₂O을 가하여 37°C에서 20분간 예비 반응시키고, 이 반응용액에 [¹⁴C] oleoyl-CoA(0.05 μCi, 최종농도 10 μM) 8 μl를 첨가하여 다시

37°C에서 25분간 본 반응시켰다. Isopropanol-heptane(4 : 1, v/v) 1 ml를 가하여 반응을 정지시키고, heptane 0.6 ml와 5배로 희석한 assay buffer 0.4 ml를 첨가한 후 원심분리 하였다. 효소 활성의 측정은 원심 분리하여 얻은 상층액 100 μl에 scintillation cocktail 3 ml를 첨가한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

ACAT 저해도는 방사능으로 표지한 기질과 효소에 검색시료를 넣어 반응시킨후, 생성물의 양을 방사능 측정 장치를 사용하여 측정하였다. 다음의 방법으로 저해도를 계산하였다.

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times [1 - \text{CPM}(T) - \text{CPM}(C2) / \text{CPM}(C1) - \text{CPM}(B)]$$

여기서, CPM(T)는 시료와 효소를 넣었을 때의 counts per minute(CPM); CPM(C1)은 시료는 넣지 않고 효소만 넣었을 때의 CPM; CPM(C2)는 시료는 넣고, 효소는 넣지 않았을 때의 CPM; CPM(B)는 효소와 시료를 넣지 않았을 때의 CPM을 가리킨다.

DGAT 효소활성 측정.⁷⁾ DGAT(diacylglycerol acyltransferase)를 효소원으로 rat의 microsomal protein과 기질로서 *sn*-1,2-diacylglycerol과 [¹⁴C]palmitoyl-CoA를 사용하여 생성된 [¹⁴C]palmitoyl-CoA의 방사능의 양을 측정하였다. 반응액은 175 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 μl의 bovine serum albumin(10 μl/ml), 8 mM의 *sn*-1,2-diacylglycerol을 포함한다. 여기에 MeOH 또는 DMSO에 녹인 시료액 10.0 μl를 가하고 100-200 μg의 microsomal protein을 넣은 다음 25°C에서 10분간 반응시킨 후, stop solution(2-propanol/heptane/H₂O = 80/20/2, v/v/v) 1.5 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 생성된 [¹⁴C]palmitoyl-CoA를 분리하기 위하여 1 ml의 heptane과 0.5 ml의 H₂O를 가하여 진탕한 후 상층액 1 ml를 취하고 여기에 2 ml의 alkaline ethanol 용액(EtOH/0.5 N NaOH/H₂O = 50/10/40, v/v/v)를 가하여 진탕하였다. 상층액 0.65 ml를 취하여 LSC(liquid scintillation counter)로 방사능의 양을 측정하여 다음의 방법으로 DGAT의 효소활성 저해율을 계산하였다.

$$\% \text{ of Inhibition} = (\text{Sc} - \text{Ss}) / \text{Sc} \times 100 = [(\text{Tc} - \text{Nc}) - (\text{Ts} - \text{Ns})] / (\text{Tc} - \text{Nc}) \times 100$$

Sc = specific binding of control,

Ss = specific binding of sample,

Tc = total binding of control,

Ts = total binding of sample,

Nc = nonspecific binding of control,

Ns = nonspecific binding of sample

여기서 Sc는 대조구의 특이적 결합; Ss는 실험구의 특이적 결합; Tc는 대조구의 결합 전체; Ts는 실험구의 결합 전체; Nc는 대조구의 비특이적 결합; Ns는 실험구의 비특이적 결합을 의미한다.

FPTase 효소활성 측정. FPTase(farnesyl-protein transferase) 활성은 SPA(scintillation proximity assay)방법^{7,8)}을 이용하여 실시하였다. FPTase 활성도는 Biotin-KKSKTKCVM(FPTase의 substrate로서 Ki-Ras c-terminal sequence)에 ³H-FPP(farnesyl pyrophosphate)로부터 ³H-farnesyl group의 transfer를 측정함으로써 결정하였다. 반응용액(최종 부피; 100 μl)은 50 mM HEPES,

pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 150-250 mM ³H-FPP(farnesyl pyrophosphate) 60 μM, 1 Ci/μl, 25-50 ng(대략 2.5-5 mM)의 recombinant rat FPTase 또는 10 μl의 부분 정제된 FPTase, 10-200 mM Biotin-KKKSKTKCVIM을 포함시켰으며, 활성 억제제는 DMSO를 녹여 첨가하였다. 첨가 후 60분 동안 37°C에서 반응시키고, 150 μl의 SPA bead/stop reagent를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 시료를 잘 섞은 후 실온에서 30분 동안 방치한 후 liquid scintillation counter로 counting하였다. Biotin-KKKSKTKCVIM에 transfer된 ³H-FPP의 양을 측정함으로써 FPTase 활성을 측정하였다. 효소 억제활성은 vehicle만 넣은 시료에서의 효소 활성도에 대한 퍼센트로 나타내었다.

결과 및 고찰

Sesquiterpene lactone 화합물의 구조 동정. 화합물 1(흰색 분말: CHCl₃)은 [α]_D 값이 +2.9°이고 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고, 10% aq. H₂SO₄로 분무, 건조하고 가열하였을 경우, 보라색으로 발색되었다. IR로부터 수산기(3436 cm⁻¹) 및 carbonyl(1765 cm⁻¹) 작용기를 갖는 것으로 확인되었다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum을 보면 저자장 영역에서 3개의 exomethylene에서 유래한 6개의 olefine signal δ_H 6.20(1H, d, J=3.4 Hz), δ_H 5.50(1H, d, J=3.4 Hz), δ_H 5.45(1H, dd, J=2.0, 2.0 Hz), δ_H 5.33(1H, dd, J=2.0, 2.0 Hz), δ_H 5.01(1H, d, J=1.2 Hz), δ_H 4.95(1H, d, J=1.2 Hz)이 관측되었다. 또한 δ_H 4.58(1H, dddd, J=7.6, 7.6, 2.0, 2.0 Hz)와 δ_H 4.11(1H, dd, J=9.6, 9.2 Hz)에서 두 개의 oxygenated methine signal이 관측되었으며, δ_H 2.91(1H, br. dd, J=8.4, 7.6 Hz)와 δ_H 2.86(1H, dd, J=9.6, 7.6 Hz)와 δ_H 2.84(1H, m)에서 3개의 allyl 위치의 methine signal들이 관측되었고, δ_H 1.46~2.49에서 다수의 methylene signal들이 관측된 점으로 볼 때 이 화합물은 3개의 exomethylene과 2개의 수산기를 가지고 있는 terpenoid 화합물로 추정 할 수 있었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum에서, 15개의 탄소 signal이 관측되어 이 화합물은 sesquiterpene 화합물로 판단되었다. δ_C 170.36에서 한 개의 carbonyl 탄소와, δ_C 139.85, δ_C 148.15, δ_C 153.19에서 관측된 3개의 olefine 4급탄소 signal을 확인하였고, δ_C 111.45, δ_C 114.62, δ_C 120.51에서 3개의 exomethylene의 signal를 확인하였으며, δ_C 73.73, δ_C 84.15에서 각각 두 개의 oxygenated methine signal을 확인하였다. 그리고 고자장 영역에서 3개의 methylene carbon signal과 3개의 methine carbon signal이 관측되었다. 이와 같은 결과를 종합해 보면, 이 화합물은 lactone ring을 가지고, 한 개의 hydroxyl기와 3개의 exomethylene이 존재하는 sesquiterpene lactone 화합물로 규명하였다. 이와 같은 데이터를 문헌과⁹⁾ 비교해 본 결과 *Zaluzania grayana*에서 분리된 zaluzanin C로 동정하였다.

화합물 2(흰색분말: CHCl₃)는 [α]_D 값이 +0.3°이고 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고 10% aq. H₂SO₄로 담가 건조하고, 가열하였을 경우 보라색으로 발색되었다. IR로부터 수산기(3460 cm⁻¹) 및 carbonyl(1766 cm⁻¹)의 작용기를 갖는

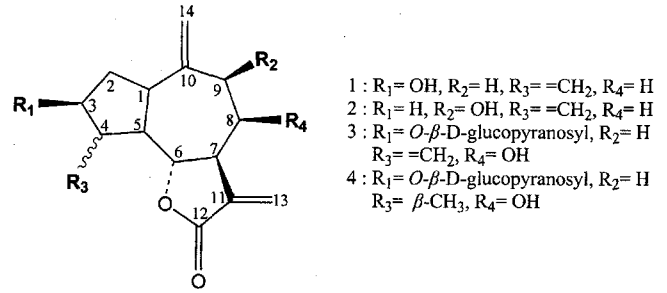


Fig. 1. Estimated chemical structures of compounds 1, 2, 3 and 4 from the root of *Ixeris dentata* forma *albiflora*.

것으로 확인되었다. 화합물 2의 NMR data는 zaluzanin C(화합물 1)와 매우 유사하였다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum의 저자장 영역에서 3개의 exomethylene {δ_H 6.24(1H, d, J=3.4 Hz), δ_H 5.52(1H, d, J=3.4 Hz)}, {δ_H 5.22(1H, ddd, J=2.0, 2.0, 2.0 Hz)}, {δ_H 5.03(2H, br. s)}, {δ_H 4.83(1H, br. s)}, 두 개의 oxygenated methine {δ_H 4.53(1H, dd, J=3.6, 3.6 Hz)}, {δ_H 3.86(1H, dd, J=9.2, 9.2 Hz)}, 3개의 allyl 위치의 methine signal {δ_H 3.42(1H, ddd, J=8.0, 8.4, 2.4 Hz), δ_H 3.20(1H, m), δ_H 2.88(1H, m)}들이 관측되었고, δ_H 1.58~2.53에서 다수의 methylene signal 들이 관측되었다. 따라서 화합물 2는 3개의 exomethylene기를 가지고 있는 guaianolide골격의 sesquiterpene 화합물로 판명되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum 에서, 15개의 탄소 signal이 관측되었다. δ_C 170.69에서 한 개의 carbonyl기와, δ_C 139.42, δ_C 151.50, δ_C 151.59에서 3개의 olefine 4급 탄소, 그리고 δ_C 109.2, δ_C 112.91, δ_C 120.6에서 3개의 exomethylene의 carbon signal을 확인하였으며, δ_C 74.22, δ_C 86.19에서 두 개의 oxygenated methin carbon signal을 확인하였다. 고자장 영역에서 3개의 methylene과 3개의 methine carbon signal이 관측되었다. 이와 같은 결과를 종합해 보면, 화합물 1과는 hydroxyl group 위치만이 다른 sesquiterpene lactones 화합물로 판단되었다. 작용기의 치환위치를 결정하기 위한 gCOSY, gHSQC, gHMBC 등의 2D-NMR을 측정하였다. gCOSY spectrum에서 9번 oxygenated methine proton이 이웃하고 있는 8번 methylene proton 2개와 correlation 하고 있음을 확인하였으며, 7번 methine proton이 8번 methylene proton 및 6번 methine proton과 correlation 하고 있음이 확인되었다. gHMBC spectrum을 통해서 9번에 있는 oxygenated methine proton이 olefine 4급 탄소인 10번과, exomethylene 탄소인 14번과 그리고 methylene 탄소인 8번 및 methine 탄소인 7번과 correlation 하고 있다는 사실로부터 hydroxyl기가 9번에 위치하고 있음을 확인하였다. 이와 같은 방법으로 exomethylene 13, 14, 15번의 위치도 확인할 수 있었다. 이러한 사실로부터 9번에 hydroxyl가 치환된 화합물로 고들빼기(*Ixeris sonchifolia*)에서 분리 보고된¹⁰⁾ 9α-hydroxyguaian-4(15)10(14),11(13)-triene-6,12-olide로 구조를 결정하였다.

화합물 3(흰색 분말: CHCl₃)은 [α]_D 값이 -1.5°이고 TLC상에서 전개시켰을 때 자외선 흡수특성이 없었고 10% aq. H₂SO₄을 분무하고 가열하였을 경우 보라색으로 발색되었다. IR로부터

Table 2. Inhibitory activity of compounds 1, 2, 3 and 4 from the root of *Ixeris dentata* forma *albiflora* on ACAT, DGAT and FPTase* (unit: %)

	ACAT	DGAT	FPTase
1	22.2±1.2	38.6±1.4	69.7±1.7
2	11.7±0.6	51.1±0.9	58.0±1.6
3	2.5±0.4	0.5±0.1	1.9±0.2
4	5.5±0.5	7.9±0.5	11.1±0.1
Phytol	92.0±2.1	-	-
stigma-4-en-6-β-ol-3-one	-	-	74.2±2.0

*The inhibitory values were the mean of triplicate experiments.

터 수산기(3425 cm⁻¹) 및 carbonyl(1756 cm⁻¹)의 작용기를 갖는 것으로 확인하였다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum을 보면 두개의 exomethylene proton signal δ_H 5.06(1H, br. s), δ_H 4.91(1H, br. s), δ_H 5.37(1H, d, J=1.6 Hz), δ_H 5.30(1H, d, J=1.6 Hz)이 관측되었으며, δ_H 4.42(1H, d, J=7.6 Hz)에서 한 개의 hemiacetal signal이 관측되었다. 3개의 oxygenated methine δ_H 3.93(1H, m), δ_H 4.44(1H, dd, J=9.6, 9.6 Hz), δ_H 4.60(1H, dd, J=8.0, 5.6 Hz)이 관측되었고, doublet methyl δ_H 1.16(3H, d, J=7.2 Hz)과 이와 coupling하는 methine proton δ_H 2.83(1H, dq, J=12.0, 7.2 Hz)이 각각 관측되었다. 따라서 화합물 3은 한분자의 당을 가진 sesquiterpene 배당체 화합물로 추정되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum에서도 2개의 exomethylene carbon signal(δ_C 112.39, δ_C 115.43)과 2개의 olefine 4급 carbon signal(δ_C 143.82, δ_C 149.91) 및 3개의 oxygenated methine (δ_C 80.05, δ_C 78.57, δ_C 36.43)과 1개의 methyl signal(δ_C 12.16)이 각각 관측되었다. 또한 D-glucopyranosyl에서 유래한 6개의 signal(δ_C 101.79, δ_C 76.87, δ_C 76.66, δ_C 74.03, δ_C 70.53, δ_C 61.61)이 확인되었다. 한편, 당의 결합위치는 3번 oxygenated methine carbon signal 이 δ_C 80.05에서 관측됨에 따라 glycosidation shift가 인정되어 3번 수산기로 판단되었으며, 이 점은 HMBC 스펙트럼에서 C-1'/H-3, C-3'/H-1'유래의 cross peak가 관측된 점으로부터도 확인할 수 있었다. 또한 이중결합이 환원되어 새로이 생성된 methyl 기의 위치는 HMBC 스펙트럼에서 C-13/H-11, C-12/H-13유래의 cross peak로부터 11번 위치로 판명되었다. 다른 1개의 수산기의 위치는 HMBC 스펙트럼에서 C-8/H-9, C-10/H-8유래의 cross peak로부터 8번으로 판명되었다. 따라서 화합물 3은 벌음썩바귀(*Ixeris debilis*)에서 분리 보고된¹¹⁾ 3β-O-β-D-glucopyranosyl-8β-hydroxyguaian-4(15), 10(14),-diene-6,12-olide로 구조가 규명되었다.

화합물 4(흰색 분말: CH₃OH)은 [α]_D 값이 +0.1°이고 TLC 상에서 자외선 흡수특성이 없었고, 10% aq. H₂SO₄을 분무하고 가열하였을 경우 분홍색으로 발색되었다. IR로부터 수산기(3436 cm⁻¹) 및 carbonyl(1748 cm⁻¹)의 작용기를 갖는 것으로 확인되었다. 화합물 4의 NMR 스펙트럼은 화합물 3과 매우 유사하였다. 화합물 3에 비해 한개의 exomethylene과 1개의 olefine 4급 탄소 signal이 줄고 대신에 1개의 methyl기와 methine 탄소가 더 관측되어 화합물 3의 이중결합 한 개가 환원되어 생성

된 것으로 추정되었다. ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) spectrum을 보면, 1개의 exomethylene(δ_H 4.94(1H, br. s), δ_H 5.08(1H, br. s)과 2개의 doublet methyl δ_H 1.58(3H, d, J=6.8 Hz), δ_H 1.17(3H, d, J=6.8 Hz)이 각각 관측되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD) spectrum에서도 한 개의 이중결합 signal (δ_C 115.12, δ_C 143.31)이 관측되었으며, 2개의 methyl기가 각각 δ_C 11.99, δ_C 17.67에서 관측되었다. methyl기의 결합위치는 HMBC 스펙트럼에서 15번 methyl proton이 4번, 5번 methine carbon과 correlation을 보여주고 있으며, 13번 methyl proton이 11번 methine carbon과 correlation을 보여주고 있음에 따라 4번, 8번 methine carbon에 methyl가 결합한 것으로 판명되었다. 마찬가지로 이중결합의 위치는 14번 exomethylene carbon이 이웃하고 있는 1번 methine proton과 9번 methylene proton과 각각 correlation을 보여주고 있으며, 9번 methylene carbon이 14번은 2개의 exomethylene proton과 correlation을 보여주고 있음에 따라 10번과 결합하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 수산기의 위치는 8번 methine carbon이 이웃하고 있는 9번 methylene과 6번, 11번 methine proton correlation을 확인 하였다. 따라서 8번 carbon에 hydroxyl기가 결합하고 있음을 결정 할 수 있었다. 따라서 화합물 4는 벌음썩바귀(*Ixeris debilis*)에서 분리된¹¹⁾ 3-O-β-D-glucopyranosyl-8β-hydroxyguaian-10(14)-ene-6,12-olide로 규명되었다.

Sesquiterpene lactone 화합물의 약리활성 조사. 지금까지 sesquiterpene lactone들은 antitumoral activity, cytotoxicity, phytotoxicity, antimicrobial activity, insecticidal activity 및 antiinflammatory activity를 비롯한 매우 다양한 생물학적 활성을 가진 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 흰썩바귀에서 분리, 정제한 4종의 sesquiterpene lactone 화합물에 대하여 여러가지 약리학적 활성을 측정하였다.

ACAT는 작용기작이 확실하고 부작용이 없는 새로운 고지혈증 치료제를 개발하기 위한 mechanism-based bioassay의 target 중 하나이다. ACAT은 콜레스테롤과 acyl CoA의 에스테르화에 관여하여 소장에서 콜레스테롤의 흡수, 간장에서 very low density lipoprotein(VLDL)의 합성, 지방세포와 혈관내벽에 cholesterol ester의 축적에 관여하는 등 포유동물에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,^{13,14)} ACAT의 저해 측정은 고지혈증이나 동맥경화증의 치료제를 개발하기 위하여 활용되는 유용한 방법으로 평가되고있다.¹⁵⁾ 화합물 3과 화합물 4는 ACAT에 대한 저해 활성이 각각 2.5%와 5.3%로 저해 활성이 거의 나타나지 않았으며 화합물 1과 화합물 2는 각각 22.2%와 11.7%로 약한 저해 활성을 나타내었다. 기존의 상추에서 분리한 diterpenoid 화합물인 phytol이 92%의 저해 활성을 나타낸 것에 비하면 매우 약한 것으로 나타났다.

DGAT는 지방대사에 관여하는 효소로 알려져 있으며,^{16,17)} 지방산의 생합성 및 비만과 매우 밀접한 관련성이 있다. 4종의 sesquiterpene lactone을 대상으로 DGAT의 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 화합물 2는 51.1%의 저해 활성을 나타내었으며, 화합물 1은 38.6%의 다소 약한 저해 활성을 나타낸 반면에, 화합물 3과 화합물 4는 각각 0.5%와 7.9%로 저해 활성이 거의 나타나지 않았다. 현재까지 보고되어 있는 천연물 유래의

DGAT 저해제는 극히 소수이며 아직까지 합성저해제는 보고된 바가 없다. 화합물 1과 2의 IC₅₀ 값이 각각 0.13 mM과 0.09 mM로 호프(*Humulus lupulus*)에서 분리된 천연유래 DGAT 저해물질인 xanthohumol의 IC₅₀ 값이 0.05 mM인 것과 비교해 볼 때 비교적 활성이 높은 것으로 판명되었다.

FPTase는 세포의 증식과 분화를 조절하는 signal transduction 과정에 관여하는 효소중의 하나로써 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 ras protein에 전달하는 역할을 하며,¹⁸⁾ ras protein은 성장조절인자를 통한 신호전달과정에서 가장 중요한 역할을 하는 단백질로서 ras proto oncogenes에 의해 발현되는 데 이 ras gene은 다양한 사람의 종양에서 oncogenic gene으로서 처음 발견되었고 악성종양과 관련이 있다고 알려져 있기 때문에,¹⁹⁾ FPTase는 효과적인 암 치료제의 개발을 선도하는 훌륭한 target으로 평가되고 있다.^{20,21)} 4종의 sesquiterpene lactone이 FPTase의 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 화합물 1은 69.7%의 저해 활성을 나타내었으며, 화합물 2는 58.0%의 저해 활성을 나타내었다. 화합물 3과 화합물 4는 각각 1.9%와 11.1%로 저해 활성이 거의 나타나지 않았다. 화합물 1은 기존에 싹갓에서 분리된 stigma-4-en-6 β -ol-3-one에서 보인 74%의 저해 활성과 비슷한 것으로 확인되었다. DGAT와 FPTase의 활성억제에 있어서 당이 결합되어 있지 않은 화합물 1과 화합물 2는 당이 결합된 그 외의 화합물들보다 활성이 높게 나타난 것으로 보아 화합물의 극성이 이들의 저해 활성에 연관성이 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 · 한국과학재단 지정 우수연구센터인 경희대학교 식물대사연구센터와 농촌진흥청 바이오그린 21 사업에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Soka, T. (1985) In *Dictionary of Chinese Drugs* (1st ed.) Shanghai Science Technology Shogakukan Press, Tokyo.
- Seto, M., Miyasa, T. and Fukushima, S. (1986) Sesquiterpene lactones from *Ixeris dentata* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 4170-4176.
- Kim, M. K. and Lee, M. S. (1988) Volatile flavor components of *Ixeris dentata* and *Amaranthus mangostanus*. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **31**, 394-399.
- Arai, Y., Kusumoto, Y., Nagao, M., Shiojima, K. and Ageta, H. (1985) Compositae constituents: Aliphatics and triterpenoids isolated from the whole plants of *Ixeris debilis* and *I. dentata*. *Yakugaku Zasshi* **103**, 356.
- Fraga, B. M. (1991) In *Sesquiterpenoids, Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 7. Academic Press, London.
- Ericson, S. K., Shrewbery, M. A., Brooks, C. and Meyer, D. J. (1980) Rat liver acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase: its regulation *in vivo* and some of its properties *in vitro*. *J. Lipid Res.* **21**, 930-941.
- Rosalind, A. and Coleman, A. (1992) Diacylglycerol acyltransferase and monoacylglycerol acyltransferase from liver and intestine. *Methods Enzymol.* **209**, 98-103.
- Reiss, Y., Seabra, M. C., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990) Purification of ras farnesyl: protein transferase. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology.* **3**, 242-245.
- Otmár, S., Holger, B., Bernhard, V., Edward, S. and Manfred, S. (1995) Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR measurements. *Phytochemistry* **39**, 609-612.
- Nishimura, K., Miyase, T., Ueno, A., Noro, T., Kuroyanagi, M. and Fukushima, S. (1986) Sesquiterpene lactones from *Lactuca laciniata*. *Phytochemistry* **35**, 61583-1584.
- Warashina, T., Ishino, M., Miyase, T. and Ueno, A. (1990) Sesquiterpene glycosides from *Ixeris debilis* and *Ixeris repens*. *Phytochemistry* **29**, 3217-3224.
- Geissman, T. A. (1973) In *Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 6. Runeckless, V. C. and Mabry, T. J. (eds.), Academic Press, New York.
- Chang, T. Y. and Doolittle, G. M. (1983) In the enzyme Acyl-Coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase. Vol. XUI, Academic Press, pp. 523-539.
- Catherine, C. Y., Hun, H. Y., Cadigan, K. M. and Chang, T. Y. (1993) Molecular cloning and functional expression of human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 20747-20755.
- Sliskovic, D. R. and White, A. D. (1991) Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and antiatherosclerotic agents. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 194-199.
- Smith, S. J., Cases, S., Jensen, D. R., Chen, H. C., Sande, E., Tow, B., Sanan, R. J., Eckel, R. H. and Farese, R. V. (2000) Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat. Genet.* **25**, 87-90.
- Tomoda, H., Ito, M., Tabata, N., Masuma, R., Yamaguchi, Y. and Omura, S. (1995) Amidepsines, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase produced by *Humicola* sp. FO-2942. *J. Antibiot.* **48**, 937-947.
- Pompliano, D. L., Rands, E., Schaber, M. D., Mosser, S. D., Anthony, N. J. and Gibbs, J. B. (1992) Steady-state kinetic mechanism of ras farnesyl-protein transferase. *Biochemistry* **31**, 3800-3807.
- Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1993) Function and regulation of RAS. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 851-891.
- Janice, E. B. and James, C. M. (1995) Farnesyl transferase inhibitors: the successes and surprises of a new class of potential cancer chemotherapeutics. *Chem. Biol.* **2**, 789-791.
- Kohl, N. E., Wilson, F. R., Misser, S. D., Gometz, R. P., Gibbs, J. B. and Oliff, A. (1994) Protein farnesyl transferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9141-9145.

Screening of Biologically Active Compound from Edible Plant Sources-IX. Isolation and Identification of Sesquiterpene Lactons Isolated from the Root of *Ixeris dentata* forma *albiflora*; Inhibition Effects on ACAT, DGAT and FPTase Activity

Myun-Ho Bang, Tae-O Jang, Myoung-Chong Song, Dong-Hyun Kim, Byoung-Mog Kwon¹, Young-Kuk Kim¹, Hyun-Sun Lee¹, In-Sik Chung, Dae-Keun Kim², Sung-Hoon Kim³, Mi-Hyun Park⁴ and Nam-In Baek* (*The Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Suwon, 449-701*; ¹*Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejon, 305-333*; ²*Department of Pharmacy, Woosuk University, Jeonbuk, 565-701*; ³*Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701*; ⁴*Erom Life Co. Ltd, Seoul, 135-825, Korea*)

Abstract: The root of *Ixeris dentata* forma *albiflora* was extracted with 80% aqueous MeOH and solvent fractionated with EtOAc, *n*-BuOH and water, successively. From the EtOAc and *n*-BuOH fractions, four sesquiterpene compounds were isolated through the repeated silica gel and ODS column chromatographies. The chemical structures were determined as zaluzanin C (**1**), 9 α -hydroxyguaian-4(15),10(14),11(13)-triene-6,12-olide (**2**), 3 β -*O*- β -D-glucopyranosyl-8 α -hydroxyguaian-4(15),10(14)-diene-6,12-olide (**3**), and 3 β -*O*- β -D-glucopyranosyl-8 β -hydroxyguaian-10(14)-ene-6,12-olide (**4**) through the interpretation of several spectral data including 2D-NMR. Some showed the inhibitory effects on DGAT (Diacylglycerol acyltransferase), (IC₅₀ values of **1**, **2**: 0.13, 0.10 mM), the catalyzing enzymes of the intracellular esterification of diacylglycerol and FPTase (Farnesyl-protein transferase), (IC₅₀ values of **1**, **2**: 0.15, 0.18 mM), the farnesylation enzyme for Ras protein charge of cancer promotion.

Key words: *Ixeris dentata* forma *albiflora*, guaianolide, ACAT, DGAT, FPTase

*Corresponding author