

식용 식물자원에서부터 활성물질의 탐색 -X. 능소화(*Campsis grandiflora* K. Schum.)로부터 지질화합물의 분리 및 FPTase 저해 효과 측정

김동현 · 송명중 · 한경민 · 방면호 · 권병목¹ · 김성훈² · 김대근³ · 정인식 · 박미현⁴ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹한국생명공학연구원, ²경희대학교 동서의학대학원,
³우석대학교 약학대학, ⁴(주)이플라이프

(2004년 5월 3일 접수, 2004년 8월 30일 수리)

능소화를 80% MeOH 용액으로 추출하고, 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배, 추출하였다. 이 중 EtOAc 분획을 silica gel 및 octadecylsilica gel(ODS) column chromatography로 정제하여 4종의 화합물을 분리하였다. 각 화합물의 화학구조는 NMR, MS 및 IR 등의 스펙트럼 데이터를 해석하여, linoleic acid의 methyl ester, linolenic acid의 methyl ester, β -sitosterol 및 daucosterol로 동정하였다. Daucosterol은 $14 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 의 IC₅₀ 값으로 FPTase의 활성을 저해하였다.

Key words: 능소화, linoleic acid, linolenic acid, β -sitosterol, daucosterol, FPTase 활성 억제

서 론

능소화(*Campsis grandiflora* K. Schum.)는 능소화과(Bignoniaceae)의 낙엽 덩굴성 목본으로 길이는 10 m에 달하며 줄기는 황갈색이고 가지에 기근(氣根)이 생겨서 벽에 붙어 올라간다. 꽃은 정생(頂生)하는 원추화서(圓錐花序)에 5-15개가 달리며, 지름 4-5 cm로 비교적 크고, 꽃받침은 길이 3 cm로써 5개로 갈라지며 열편(裂片)은 피침형(披針形)이다. 8-9월에 개화하며 화관의 색이 주황색이나 겉은 적황색이다. 한방에서는 7-9월 막 피기 시작한 꽃을 햇볕에 말려 생혈약, 통경약으로서 산후병, 월경불순, 이뇨제, 해열제로 사용하고, 어혈로 인하여 여자의 생리가 없는 현상 및 적취(積聚)에 쓴다. 또한 산후의 유방염에도 사용하고, 혈열로 피부가 가려울 때 물을 넣고 달여서 복용하며 임신 중에는 사용을 금한다.¹⁾ 능소화는 꽃으로부터 essential oil의 정성, 정량분석²⁾과 주두(柱頭)로부터 페놀 및 봉소화합물의 정성, 정량분석³⁾에 관한 연구가 이루어져 있을 뿐 성분연구, 특히 생리활성과 관련된 연구 사례는 보고되어진 바 없다.

본 연구에서는 능소화의 EtOAc 분획으로부터 column chromatography를 수행하여 4종의 화합물을 분리 동정하였고, 각 화합물에 대한 farnesyl-protein transferase(FPTase) 저해 활성을 측정하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

기기 및 시약. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400 (Varian, USA)으로, IR 스펙트럼은 Spectrum One(Perkin-Elmer,

USA)으로, Polarimeter는 P-1010(JASCO, Japan)으로, EI/MS와 FAB/MS는 JMSAX 505-WA(JEOL, Japan)로 측정하였다. GC는 GC-14B(Shimadzu, Japan)로, GC/MS는 JMS-700(JEOL, Japan)으로 측정하였으며, 녹는점은 Fisher-John's Meting Point Apparatus(Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였고, 미보정하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Germany)을 octadecylsilica gel(ODS)은 LiChrorep RP-18(Merck, Germany)을 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F₂₅₄와 RP-18 F₂₅₄를 사용하였고, 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

식물시료. 경동시장에서 능소화(중국산)를 구입하였고, 표본시료(KHU03027)는 경희대학교 생명공학원 천연물화학실 시료실에 보관되어 있다.

활성물질의 분리. 능소화 6 kg에 80% MeOH 용액(45 l×3)을 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 여액을 45°C에서 감압농축하고, 이 농축물을 물(4 l)과 ethyl acetate(EtOAc, 4 l×3)로 분배 추출하였으며, 물층은 다시 *n*-butanol(*n*-BuOH, 4 l×3)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 EtOAc분획(114 g), *n*-BuOH(297 g) 및 물분획(1.9 kg)을 얻었다.

EtOAc 추출물(CGE)을 silica gel column(Φ9×20 cm) chromatography (*n*-hexane-CHCl₃-MeOH = 30 : 10 : 1 → CHCl₃-MeOH = 50 : 1 → 30 : 1 → 10 : 1 → 5 : 1 → 3 : 1)를 실시하여 15개의 분획물(CGE1~CGE15)을 얻었다. 그 중 CGE2(1.1 g) 분획을 silica gel c.c.(*n*-heptane-*n*-hexane-EtOAc = 35 : 20 : 1, Φ5.5×11 cm)를 이용하여 12개의 분획물(CGE2-1~CGE2-12)을 얻었고, CGE2-2(539 mg)를 다시 ODS c.c.(MeOH-H₂O = 6 : 1 → acetone-CH₃CN, Φ3.8×9 cm)로 정제하여 화합물 1(CGE2-2-3, 46 mg)과 화합물 2(CGE2-2-6, 155 mg)를 분리하였다.

화합물 1: Yellow oil, EI/MS *m/z*: 292(M⁺); ¹H-NMR(400

*연락처자

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

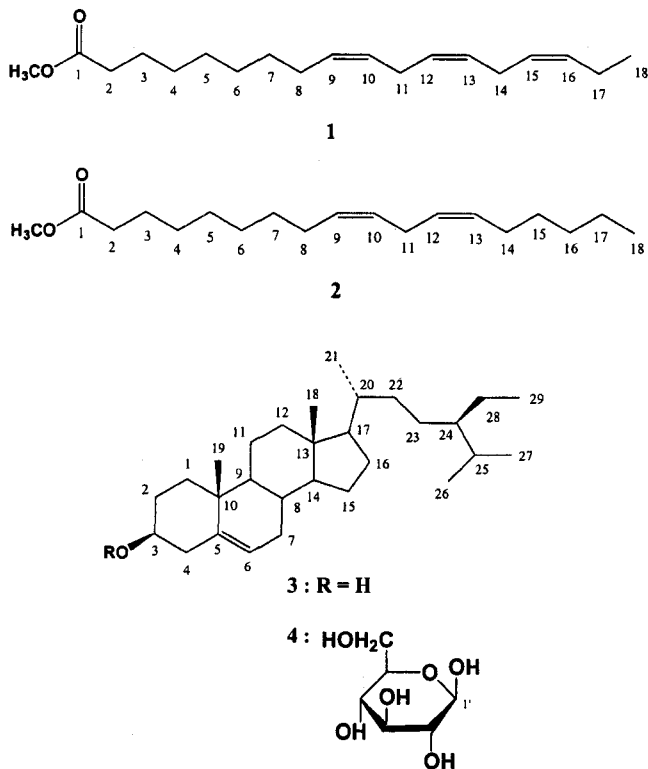


Fig. 1. Chemical structures of lipids from the flower of the *Campsis grandiflora* K. Schum.

MHz, CDCl₃, δ) 5.33(6H, m, olefinic-H), 3.62(3H, s, OCH₃), 2.79~1.28(20H, CH₂ × 10), 0.95(3H, t, $J=7.6$ Hz, terminal methyl); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ C) 174.07(ester), 131.81, 130.12, 128.15, 128.12, 127.61, 126.99(olefinic-C), 51.41(OCH₃), 34.11, 29.59, 29.18, 29.14, 29.12, 27.23, 25.64, 25.56, 24.97, 20.59(methylene), 14.32(terminal methyl).

화합물 2: Colorless oil, EI/MS m/z : 294(M⁺); ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.30(4H, m, olefinic-H), 3.60(3H, s, OCH₃), 2.73~1.22(24H, CH₂ × 12), 0.84(3H, t, $J=7.0$ Hz, terminal methyl) ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ) 173.94(ester), 129.94, 129.78, 127.85, 127.71(olefinic-C), 51.29(OCH₃), 34.01, 31.50, 29.56, 29.32, 29.13, 29.09, 29.06, 27.17, 27.15, 25.59, 24.91, 22.56(methylene), 14.03(terminal methyl).

CGE7(26 g) 분획을 silica gel c.c.(CHCl₃-EtOH = 35:1 → 25:1 → 15:1, $\Phi 7 \times 14$ cm)를 이용하여 18개의 분획물(CG7-1~CG7-18)을 얻었다. 그 중에서 CGE7-1(4.5 g)에 대하여 silica gel c.c.(*n*-hexane-EtOAc = 10:1, $\Phi 6 \times 12$ cm)를 이용하여 13개의 분획물(CG7-1-1~CG7-1-13)을 얻었고, 다시 그 중 CGE7-1-8(557 mg)을 ODS c.c.(MeOH-H₂O = 7:1, $\Phi 4.5 \times 9$ cm)하여 화합물 3(CG7-1-8-12, 152 mg)을 분리하였다. 또한 CGE7-15(722 mg)을 silica gel c.c.(CHCl₃-EtOH = 18:1, $\Phi 4.5 \times 12$ cm)로 정제하여 화합물 4(CG7-15-8, 28 mg)를 분리하였다.

화합물 3: White powder(*n*-hexane-CHCl₃), mp 140°C, EI/MS m/z : 414(M⁺); [α]_D -37°($c=0.6$, CHCl₃); IRv(CHCl₃, cm⁻¹) 3400, 1640, 1050, 802, 830, 845; ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-d₅, δ _H) 5.43(1H, d, $J=4.0$ Hz, H-6), 3.85(1H, m,

H-3), 1.07(3H, s, H-19), 1.00(3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.91(3H, d, $J=7.8$ Hz, H-26), 0.87(3H, d, $J=7.8$ Hz, H-27), 0.88(3H, t, $J=8.2$ Hz, H-29), 0.69(3H, s, H-18); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ _C) 141.34(C-5), 120.63(C-6), 70.74(C-3), 56.44(C-14), 55.80(C-17), 50.01(C-9), 45.57(C-24), 43.03(C-4), 42.05(C-13), 39.56(C-12), 37.38(C-1), 36.44(C-10), 35.96(C-20), 33.76(C-22), 32.16(C-7), 31.78(C-8), 31.72(C-2), 29.02(C-25), 28.11(C-16), 25.97(C-23), 24.10(C-15), 22.95(C-28), 20.94(C-11), 19.55(C-26), 19.18(C-19), 18.79(C-27), 18.59(C-21), 11.74(C-29), 11.59(C-18).

화합물 4: Colorless crystal(pyridine-MeOH-H₂O), mp 285~286°C, FAB/MS m/z : 577(M⁺+1); [α]_D -44.6°($c=0.9$, pyridine); IRv(KBr, cm⁻¹) 3320, 3030, 2935, 1645; ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-d₅, δ _H) 5.34(1H, br. s, H-6), 5.04(1H, d, $J=7.6$ Hz, anomeric-H), 3.93(1H, m, H-3), 0.98(3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.93(3H, s, H-18), 0.88(6H, d, $J=8.8$ Hz, H-26,27), 0.87(3H, t, $J=7.4$ Hz, H-29) ¹³C-NMR(100 MHz, pyridine-d₅, δ _C) 140.27(C-5), 121.33(C-6), 101.99(C-1'), 78.06(C-3'), 77.95(C-5'), 77.55(C-3), 74.80(C-2'), 71.15(C-4'), 62.31(C-6'), 56.33(C-14), 55.75(C-17), 49.85(C-9), 45.55(C-24), 42.01(C-13), 39.48(C-4), 38.86(C-12), 37.01(C-1), 36.45(C-10), 35.93(C-20), 33.74(C-22), 31.72(C-7), 31.59(C-8), 29.79(C-2), 29.00(C-25), 28.10(C-16), 25.92(C-23), 24.07(C-15), 22.94(C-28), 20.84(C-11), 19.55(C-27), 18.98(C-19), 18.78(C-26), 18.58(C-21), 11.74(C-29), 11.55(C-18).

화합물 1 및 2의 GC/MS 분석. 각 시료 CGE2-2-3(화합물 1, 1 mg/1 ml), CGE2-2-6(화합물 2, 1 mg/1 ml)로부터 각 3 μ l를 취하여, FID가 설치된 GC(GC-14B, Shimadzu, Japan)의 주입구에 넣고, 탈착시켜 분석하였다. 분석용 컬럼은 DB-5(30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μ m, J&W, Folsom, CA, USA)를 사용하였으며, GC의 injector 온도는 320°C, oven 온도는 처음 5분 동안 200°C로 유지하였고, 승온 속도를 15°C/min으로 하여 최종온도가 320°C가 되도록 한 후 10분간 320°C를 유지하도록 하였다. 분석한 화합물을 동정하기 위하여, GC(Agilent technologies, USA)와 연결된 mass spectrometer(JMS-700, JEOL, Japan)를 사용하였고, 분석용으로 사용한 컬럼(HP-5, 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μ m, USA) 이외의 모든 분석 조건은 GC 조건과 동일하였다. GC로 분석한 각 peak의 최종적인 확인은 GC-MS의 library 분석을 바탕으로 확인하였다.

FPTase(Farnesyl-Protein Transferase) 억제활성. FPTase 활성은 [³H]-scintillation proximity assay(SPA) 방법을 이용하여 실시하였다.^{4,5)} FPTase 활성은 Biotin-KKKSKTKCVIM(FPTase의 기질로서 Ki-Ras C-terminal sequence)에 [³H] farnesyl pyrophosphate로부터 [³H] farnesyl group의 전이를 측정함에 의해 결정된다. 반응용액(최종 부피: 100 μ l)은 50 mM HEPES, pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 150~250 nM [³H]farnesyl pyrophosphate(60 μ M, 1 Ci/ μ l), 5 μ g의 부분 정제된 FPTase, 10~200 nM Biotin-KKKSKTKCVIM를 포함하고 있으며, 시료는 DMSO(vehicle)에 녹여 첨가하였다. 60분 동안 37°C에서 반응시킨 후 150 μ l의

STOP/bead 시약을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 시료를 잘 섞은 후 실온에서 30분 동안 방치한 후 1450 Microbeta Counter (Wallac)를 이용하여, Biotin-KKKSKTKCVIM에 transfer된 [³H] farnesyl의 양을 측정함에 의해 FPTase 활성을 측정하였다. 효소 억제활성은 vehicle만 넣은 시료에서의 효소 활성도에 대한 퍼센트(%)로 나타내었으며, 각 실험은 3반복 하였다.

결과 및 고찰

능소화로부터 얻어진 MeOH 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 순차 분획하고 각 분획은 감압농축하여 3개의 분획을 얻었다. EtOAc 분획을 silica gel column chromatography와 ODS column chromatography로 정제하여 4개의 화합물 **1**(46 mg), **2**(155 mg), **3**(152 mg) 및 **4**(28 mg)를 분리하였다.

화합물 **1**은 노란 oil상 물질로서 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 5.33(6H, m)의 signal로부터 olefinic methine proton 6개가 존재함을 확인하였고, δ2.79에서 δ1.28 사이에서 10개의 methylene proton signal과 δ0.95(3H, t, *J*=7.6 Hz)에서 triplet의 말단 methyl proton signal이 관측되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 19개의 탄소 signal이 확인되었으며, δ174.07에서 esteric carbon과 δ131.81, δ130.12, δ128.15, δ128.12, δ127.61 및 δ126.99에서 6개의 olefinic carbon, 그리고 δ51.41에서 methoxy 기가 관측되었다. 따라서 화합물 **1**은 octadecatrienoic acid methyl ester로 구조 규명되었다. 또한 GC/MS를 이용하여 재료 및 방법에서 제시한 조건으로 분석한 결과 5분 18초에서 단일 peak가 관측되었으며, 이 화합물의 EI/MS spectrum에서 M⁺ 이온 peak가 *m/z* 292에서 관측되었다. 이 결과를 토대로 library를 검색한 결과 화합물 **1**을 linolenic acid의 methyl ester로 동정하였다.

화합물 **2**는 무색의 oil상 물질로서 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ5.30(4H, m)의 signal로부터 olefinic methine proton 4개가 존재함을 확인하였고, δ2.73~δ1.22 사이에서 12개의 methylene proton signal과 δ0.84(3H, t, *J*=7 Hz)에서 triplet의 말단 methyl proton signal이 관측되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 19개의 탄소 signal이 확인되었으며, δ173.94에서 esteric carbon과 δ129.94, δ129.78, δ127.85 및 δ127.71에서 4개의 olefinic carbon, 그리고 δ51.29에서 methoxy 기가 관측되었다. 따라서 화합물 **2**는 octadecadienoic acid methyl ester로 구조 규명되었다. 또한 GC/MS를 이용하여 화합물 **1**과 동일한 조건으로 분석한 결과 5분 12초에서 단일 peak가 관측되었으며, 이 화합물의 EI/MS spectrum에서 M⁺ 이온 peak가 *m/z* 294에서 관측되었다. 이 결과를 토대로 library를 검색한 결과 화합물 **2**를 linoleic acid의 methyl ester로 동정하였다.

화합물 **3**은 무색의 분말로서 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ5.43 (1H, d, *J*=4.0 Hz)의 signal로부터 olefinic methine proton과 δ3.85(1H, m)의 signal로부터 oxygenated methine proton을 확인하였다. 또한 δ2.11~δ1.00에서 다수의 methylene과 methine proton signal을 확인하였고, δ1.07(3H, s)과 δ0.69(3H, s)에서 2개의 singlet, δ1.00(3H, d, *J*=6.4 Hz), δ0.91(3H, d, *J*=7.8

Hz) 및 δ0.87(3H, d, *J*=7.8 Hz)에서 3개의 doublet 그리고 δ0.88(3H, t, *J*=8.2 Hz)에서 1개의 triplet methyl proton signal을 확인하였다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 탄소수 29개의 탄소 signal이 확인되었으며, δ141.34와 δ120.63에서 1개의 이중결합, δ70.74에서 1개의 oxygenated methine signal을 확인하였다. 또한 δ19.55, δ19.18, δ18.79, δ18.59, δ11.74 및 δ11.59에서 6개의 methyl signal이 관측되었다. 이를 종합하여 NMR spectrum을 비교한 결과²⁾ 화합물 **3**은 여러 가지 식물에 널리 함유되어있는 sterol인 stigmasterol(β-sitosterol)로 동정하였다.⁶⁾

화합물 **4**는 무색의 결정 물질로서 ¹H-NMR 스펙트럼과 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 화합물 **3**과 거의 유사하였고, 비당부 이외에 당 한 분자의 signal을 확인할 수 있었다. 이러한 당 signal은 ¹³C-NMR의 당부의 chemical shift를 검토한 결과 D-glucopyranose로 판명되었다.⁷⁾ 또한 ¹H-NMR에 있어서 δ5.04 (1H, d, *J*=7.6 Hz)에서 관측되는 anomeric proton의 coupling constant 값이 7.6 Hz인 것으로 보아 β 결합하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 화합물 **4**는 β-sitosterol의 3번 hydroxyl기에 D-glucopyranose가 β- 결합한 daucosterol로 동정하였다.⁸⁾

화합물 **1**, **2**, **3** 및 **4**에 대하여 FPTase 저해 활성을 측정된 결과 화합물 **4**(daucosterol)는 14±0.04 μM의 IC₅₀ 값으로 FPTase의 활성을 저해하였다. 알려진 FPTase 저해물질인 Stachybotrys kampalensis에서 분리된 kampanol A의 IC₅₀ 값 13 μM⁹⁾보다는 다소 활성이 낮으나 Artemisia sylvatica에서 분리된 artanomaloide의 IC₅₀ 값 22 μM¹⁰⁾보다는 좋은 활성을 보였다. 특히 daucosterol은 β-sitosterol과 마찬가지로 식물체에 다수 존재하는 물질이면서 지금까지는 보고된 생리 활성이 거의 없었으나 본 실험 결과 FPTase 저해 활성을 보이고 있어 향후 daucosterol에 대한 항암 효능에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 및 한국과학재단 우수연구센터사업(경희대 식물대사연구센터)에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Jung, E. B. and Shin, M. K. (1990) In 'Hyang Yak Dae Sa Jun', Young Lim Sa (3rd ed.) Seoul, Korea.
- Ueyama, Y., Hashimoto, S., Furukawa, K. and Nii, H. (1989) The essential oil from the flowers of *Campsis grandiflora* (Thumb.) K. Schum. from China. *Flavour Fragr. J.* **4**, 103-107.
- Dhakre, G., Singh, J. and Chauhan, S. V. S. (1994) Analysis of phenolics and boron in the stigma of seedless *Campsis grandiflora* K. Schum. *Indian J. Exp. Biol.* **32**, 816-818.
- Lee, S. H., Kang, H. M., Song, H. C., Lee, H. S., Kim, S. H. and Kwon, B. M. (2000) Sesquiterpene lactones, inhibitors of farnesyl protein transferase, isolated from the flower of *Artemisia*

- sylvatica*. *Tetrahedron* **56**, 4711-4715.
5. Donaldson, M. J., Skoumas, V., Watson, M., Ashworth, P. A., Ryder, H., Moore, M. and Coombes, R. C. (1999) XR3054, structurally related to limonene, is a novel inhibitor of farnesyl protein transferase. *Eur. J. Cancer* **35**, 1014-1019.
 6. Woo, M. H., Lee, E. H., Chung, S. O. and Kim C. W. (1996) Constituents of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*. *Kor. J. Pharmacognosy*. **27**, 389-396.
 7. Seo, S., Tomita, Y., Tori, K. and Yoshimura, Y. (1978) Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3331-3339.
 8. Ahn, E. M., Lee, M. H., Rho, Y. D. and Baek, N. I. (1998) Isolation of daucosterol from the rice hull of *Oryza sativa* L. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 486-488.
 9. Singh, S. B., Zink, D. L., Williams, M., Polishook J. D., Sanchez, M., Silverman, K. C. and Lingham, R. B. (1998) Kampanols: Novel Ras farnesyl-protein transferase inhibitors from *Stachybotrys kampalensis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2071-2076.

Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources-X. Isolation of Lipids from the Flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. and their Inhibitory Effect on FPTase

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

Abstract: The flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. was extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extract was partitioned with EtOAc, *n*-BuOH and H₂O. From the EtOAc fraction, four compounds were isolated through the repeated silica gel and ODS column chromatographies. From the result of physico-chemical data including NMR, MS and IR, the chemical structures of the compounds were determined as linolenic acid methyl ester, linoleic acid methyl ester, β -sitosterol and daucosterol. Daucosterol inhibited FPTase activity with IC₅₀ values of $14 \pm 0.04 \mu\text{M}$.

Key words: *Campsis grandiflora* K. Schum., linoleic acid, linolenic acid, β -sitosterol, daucosterol, FPTase

*Corresponding author