

## 식용 식물자원에서부터 활성물질의 탐색-V. 상추(*Lactuca sativa* L.)의 ACAT 억제 Diterpenoid, Phytol

장태오 · 방면호 · 송명종 · 홍윤희 · 김지영 · 정대균 · 배동근<sup>1</sup>  
권병목<sup>2</sup> · 김영국<sup>2</sup> · 이현선<sup>2</sup> · 김인호<sup>3</sup> · 백남인\*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, <sup>1</sup>안양대학교 식품영양학과,  
<sup>2</sup>한국생명공학연구원, <sup>3</sup>한국식품개발연구원

(2002년 10월 19일 접수, 2002년 12월 16일 수리)

**Key words:** 상추, phytol, ACAT 억제활성

### 서 론

상추는 국화과(Compositae)에 속하는 2년생 초본 식물로 우리 나라 전역에서 채소로 재배하고 있다. 상추는 식용으로 뿐만 아니라 한방에서는 와거(경엽)와 와거자(종자)라 하여 약용으로도 이용해 왔으며, 음증, 하혈에 대하여 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 주요 성분으로는 quercetin, luteolin과 같은 flavonoid 배당체 및 수면 작용을 유발하는 sesquiterpene 화합물인 lactucin 등이 알려져 있다.<sup>2)</sup>

ACAT(Acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase)는 세포 내에서 cholesterol과 long chain fatty acyl CoA를 기질로 하여 cholesterol ester(CE)의 형성을 촉진하는 효소로 소장에서의 cholesterol 흡수, 간에서의 lipoprotein 형성, 혈관 내벽 상처부위 세포에서의 CE의 축적에 관여하고 있다.<sup>3)</sup> 따라서 ACAT 형성을 저해하는 물질은 다량의 CE가 축적되는 것을 막아주게 되어, cholesterol의 체내축적과 동맥경화증의 예방 및 치료 효과를 기대할 수 있다.

본 연구는 우리 일상에서 흔히 이용되는 식용식물자원에서부터 활성물질을 탐색하여 부가가치가 높은 농가의 주요한 소득 작물로 개발하기 위하여 실시하였다.

상추로부터 ACAT억제 활성을 보인 물질을 분리한 후, 그 구조를 phytol로 동정하였다.

### 재료 및 방법

**기기 및 시약.** Column chromatography는 Kiesegel 60 (70~230 mesh)과 LiChrorep RP-18을, TLC는 Kiesegel 60 F254(Merck, Germany)를 사용하였다. IR은 Spectrum One (Perkin Elmer, USA)으로, NMR은 Unity Inova(Varian, USA)로, Polarimeter는 P-1010(JASCO, Japan)으로, EI/MS JMSAX 505-WA(JEOL, Japan)로 측정하였다. 용점은 Fisher Melting

Point Apparatus(Fisher scientific, USA)로 측정하였고 미보정하였다. 효소의 활성은 Packard Delta-200(Turku, Finland)을 이용하여 측정하였다.

**식물시료.** 2000년 7월 수원시 평고 작목반에서 재배한 것을 구입하여 생체를 그대로 사용하였다.

**활성물질의 분리.** 상추 생체 20 kg을 100% MeOH(72 l)로 실온에서 추출한 후, 80% aq. MeOH(22.5 l)로 한번 더 추출하였고, 합한 추출액을 여과하여 감압농축하였다. 농축물을 물(1 l)과 EtOAc(2 l)로 분배·추출하였고, 물층을 다시 n-BuOH(16 l)로 분배, 추출하였으며, 얻어진 분획을 감압농축하여 EtOAc분획(56 g)과 n-BuOH분획(35.7 g) 및 물분획을 얻었다.

EtOAc분획(56 g)을 silica gel(750 g) column chromatography(CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1 → 7:1 → 5:1 → 3:1)를 실시하여 70 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC(CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1)로 확인하여 유사한 분획끼리 모아 감압농축하여 모두 8개의 분획물(CCE-1~CCE-8)을 얻었다.

그 중 2번째 분획(CCE-2, 16.6 g)을 다시 silica gel(250 g) column chromatography(n-hexane:EtOAc = 5:1 → 3:1 → CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1)하여 11개의 분획물(CCE-2-1~CCE-2-11)을 얻었으며, 이 중 4번째 분획(CCE-2-4, 4.2 g)에서 100 mg을 취하여 다시 ODS(50 g) column chromatography(acetone:MeOH:H<sub>2</sub>O = 3:7:1 → 9:3:1)하여 화합물 1(CCE-2-4-2, 70 mg)을 분리하였다.

**화합물 1:** white oil; EI/MS *m/z*: 296(M<sup>+</sup>), 278, 263, 196, 182, 126, 123, 71, 57; [α]<sub>D</sub><sup>18</sup> + 0.2°(c = 1.2, CHCl<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>) 3334, 2954, 2923, 2868, 1669 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) 5.40(1H, tq, *J* = 6.8, 1.4 Hz, H-2), 4.14 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-1), 1.99(2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-4), 1.66 (3H, br. s, H-20), 1.00-1.66(methine & methylene), 0.87(6H, d, *J* = 6.3 Hz, H-16,17), 0.85(3H, d, *J* = 6.1 Hz, H-18), 0.84 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-19); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>c</sub>) 140.14(C-3), 123.11(C-2), 59.34(C-1), 39.85(C-4), 39.34(C-14), 37.40(C-8), 37.34, 37.26(C-10, 12), 36.65(C-6), 32.76(C-7), 32.66(C-11), 27.95(C-15), 25.12(C-5), 24.77(C-13), 24.45(C-9), 22.69(C-17), 22.59(C-16), 19.72, 19.68(C-18, 19), 16.13(C-20).

\*연락처자

Phone: 82-31-201-2661; Fax: 82-31-201-2156  
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

**Table 1. ACAT inhibition activity of fractions obtained from the *Lactuca sativa* L.**

Fractions*	EtOAc fr.	<i>n</i> -BuOH fr.	H <sub>2</sub> O fr.								
Inhibition rate (%)	72.4	32.1	12.4								
Fractions*	CCE-1	CCE-2	CCE-3	CCE-4	CCE-5	CCE-6	CCE-7	CCE-8			
Inhibition rate (%)	55.4	82.1	38.4	32.1	54.7	52.1	56.6				
Fractions*	CCE-2-1	CCE-2-2	CCE-2-3	CCE-2-4	CCE-2-5	CCE-2-6	CCE-2-7	CCE-2-8	CCE-2-9	CCE-2-10	CCE-2-11
Inhibition rate (%)	70.8	56.1	56.5	91.6	57.2	46.8	39.4	38.6	35.4	34.9	31.5
Fractions*	CCE-2-4-1	CCE-2-4-2	CCE-2-4-3	CCE-2-4-4	CCE-2-4-5	CCE-2-4-6	Ginsenoside Ro**				
Inhibition rate (%)	45.2	93.5	13.4	51.2	32.3	43.5	89.2				

\*100 µg of each fraction was treated.

\*\*50 µg was treated.

**ACAT 억제 활성의 측정<sup>3)</sup>.** Microsomal protein 용액 [17.3 mg/ml in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4)] (8 µl), 100 mM DTT (0.8 µl), 400 µM BSA (4 µl), 측정용 시료용액 [4 µl; in water dimethylsulfoxide (9:1, v/v)], 1.5 M phosphate buffer (pH 7.4) (8 µl), 100 µM <sup>14</sup>C-oleoyl-CoA (11.1 MBq/mmol) (5 µl), 그리고 H<sub>2</sub>O(15.2 µl)를 가하여 30°C에서 5분간 반응시킨 후, MeOH(200 µl)를 가하여 효소와 화합물의 반응을 정지시켰다. 반응액을 *n*-hexane으로 추출한 후, 추출액을 petroleum ether-diethyl ether-acetic acid(90:14:2, Rf=0.54)의 전개 용매를 이용하여 분취 TLC로 전개시킨 후, 요오드를 분무하여 cholesterol ester band를 분취하여 scintillation vial에 넣은 후, EX-H solution 4 ml을 첨가하여 방사능을 측정하였다. 각 분취의 ACAT 저해활성(Inhibition %)은 다음 식에 따라 계산하였다.

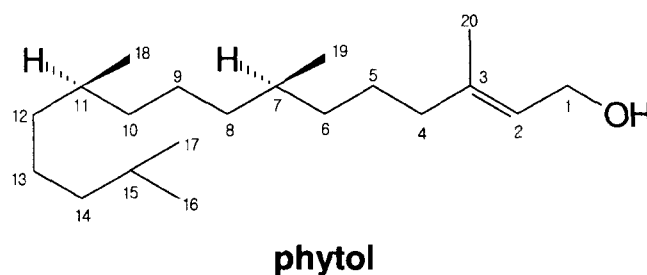
$$\text{저해활성(\%)} = [1 - (T - B / C - B)] \times 100$$

- T: 효소반응액에 시료를 넣은 시험구의 cpm(counts per minute)
- C: 효소반응액에 시료를 넣지 않은 시험구의 cpm(counts per minute)
- B: 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조구 cpm(counts per minute)

## 결과 및 고찰

식용 식물자원으로부터 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 상추를 MeOH로 추출하여 이 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O로 분배 추출하였다. 3개의 분획중 EtOAc 분획에서 ACAT 억제활성이 확인되었고(Table 1), EtOAc 분획에 대하여 활성을 추적해가며 silica gel column chromatography를 반복하여 가장 높은 활성을 나타낸 화합물 1 (Table 1)을 0.015%의 수율로 분리, 정제하였다.

화합물 1은 흰색 오일상의 물질로, <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)에서 triplet-quartet의 olefine methine(δ5.40)과 doublet으로 관측된 oxygenated allyl methylene(δ4.14) 그리고 triplet의 allyl methylene(δ1.99)과 singlet methyl(δ1.66) signal이 관측되었다. 또한 0.84-0.88 ppm에서 4개의 doublet methyl signal이 관측되었다. 그밖에 고자장 영역에서 다수의 methine과

**Fig. 1. The chemical structure of phytol isolated from the leaves of *Lactuca sativa* L.**

methylene signal이 관측된 점으로 볼 때 지방족 사슬구조를 갖는 화합물로 추정할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)에서는 모두 20개의 signal이 관측되었으며, olefine quaternary(δ<sub>c</sub> 140.14) 및 methine(δ<sub>c</sub> 123.11) signal이 관측되었다. 또한 1개의 oxygenated methylene(δ<sub>c</sub> 59.34)과 고자장영역에서 5개의 methyl(δ<sub>c</sub> 22.69, 22.59, 19.72, 19.68, 16.13), 9개의 methylene 및 3개의 methine 탄소 signal이 관측되었다. 이를 종합해 보면 이 화합물은 탄소수 20개의 비환상 diterpene 화합물로 판단되었다. 이 화합물의 각종 스펙트럼 데이터를 문헌 값<sup>4,5)</sup>과 비교한 결과 phytol로 구조결정 하였다(Fig. 1).

Phytol은 isoprenoid 4단위가 결합한 탄소수 20개로 이루어진 비환상 diterpene alcohol 화합물로, 식물조직에서 녹색 색소성분인 chlorophyll의 구성성분으로 porphyrin 고리의 propionic acid와 에스터 결합을 형성하고 있다. 그러나 천연에서 phytol이 유리된 상태로 분리 보고된 바는 극히 드물다. Chlorophyll로부터 phytol을 가수분해하기 위하여 10% KOH로 alkali 가수분해하거나, 여러 가지 lipase를 이용하여 효소 가수분해를 실시하였으나, 모두 반응은 일어나지 않았다.

본 실험에서 phytol은 100 µg/ml의 농도로 처리하였을 때, ACAT 활성을 93.5% 억제하는 것으로 나타났다(Table 1). 인삼에서 분리된 ginsenoside Ro보다는 다소 활성이 낮았으나, IC<sub>50</sub> 값이 77.7 µM로, 한 등<sup>6)</sup>이 돌단풍에서 분리 보고한 ACAT 억제 활성물질인 aceriphylic acid A와는 비슷한 활성을 나타내었다.

한편, 우리 나라에서는 예로부터 육류를 먹을 때 상추와 같이 먹는 경우가 많은데, 상추 중에 다량 함유되어있는 phytol에 의해 ACAT 활성이 억제되어 CE가 체내에 축적되는 것을

막아주게 됨으로써, cholesterol의 체내 축적과 동맥경화증, 고혈압의 예방을 기대할 수 있다. 뿐만 아니라 phytol은 항돌연변이 및 항암 효과를 가지는 것으로 보고되고 있다. 즉 중앙세포에 직접적인 증식억제 효과를 나타내며, UV와 EMS에 의한 *Salmonella*와 돌연변이 유발을 억제하고,<sup>7,8)</sup> 자연살해세포와 대식세포의 활성을 항진시킴으로써,<sup>9,10)</sup> 암의 예방 및 치료에의 응용을 기대할 수 있다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업 및 농림부 농림기술개발연구사업에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

## 참고문헌

- Jung, E. B. and Shin, M. K. (1990) In Hyang Yak Dae Sa Jun Young Lim Sa, Seoul, Korea, pp. 1060.
- Mahmoud, Z. F., Kassem, F. F., Abdel-Salam, N. A. and Zdero, C. (1986) Sesquiterpene lactones from *Lactuca sativa*. *Phytochemistry* **25**, 747-748.
- Izawa K., Nagai M. and Inoue T. (1973) Triterpene acids and bergenin in *Peltoboykinia watanabei* and *Boykinia lycocotifolia*. *Phytochemistry* **12**, 1508.
- Bikram, S., Pawan, K. A. and Raghunath, S. T. (1991) Isolation of *trans*-phytol from *Phyllanthus niriri*. *Chem. Pharm. Bull.* **57**, 98.
- Brown, G. D. (1994) Phytene-1,2diol from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* **36**, 1553-1554.
- Hahn, J.-T., Kim, H.-Y., Park, Y.-D., Lee, Y.-H., Lee, K.-R., Kwon, B.-M. and Baek, N.-I. (2002) Aceriphylllic acid A, a new ACAT inhibitory triterpenoid, from *Aceriphyllum rossii*. *Planta Medica* **68**, 556-558.
- Lawson, T., Nunnally, J., Walker, B., Brensnick, E., Wheeler, D. and Wheeler, M. (1989) Isolation of compounds with antimutagenic activity from Savoy chieftain cabbage. *J. Agri. Food Chem.* **37**, 1363-1367.
- Cho, Y. H., Ahn, S. J., Park, K. Y., Yoo, M. A. and Lee, W. H. (1993) Effects of phytol on the mutagenicity of UV and EMS in *Salmonella* and *Drosophila* mutation assaying systems. *Environ. Mutag. Carcin.* **13**, 92-100.
- Kim, K. H., Chang, M. W., Park, K. Y., Rhee, S. H., Rhew, T. H. and Sunwoo, Y. I. (1993) Antitumor activity of phytol identified from perilla leaf and its augmentative effect on cellular immune response. *Korean J. Nutr.* **26**, 379-389.
- Lee, K. L., Lee, S. H. and Park, K. Y. (1999) Anticancer activity of phytol and eicosatrienoic acid identified from perilla leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1107-1112.

### Development of Biologically Active Compound from Edible Plant Sources -V. Phytol, ACAT (Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase) Inhibitory Diterpenoid From the Leaves of *Lactuca sativa* L.

Tae-O Jang, Myun-Ho Bang, Myoung-Chong Song, Yoon-Hee Hong, Ji-Young Kim, Dae-Kyun Chung, Tong-Kun Pai<sup>1</sup>, Byung-Mok Kwon<sup>2</sup>, Young-Kuk Kim<sup>2</sup>, Hyun-Sun Lee<sup>2</sup>, In-Ho Kim<sup>3</sup> and Nam-In Baek\* (Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Suwon, 449-701; <sup>1</sup>Dept. of Food & Nutrition, Anyang Univ., Anyang, 430-714; <sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon, 305-333; <sup>3</sup>Korea Food Research Institute, Sunghnam, 463-746 Korea)

Key words: *Lactuca sativa* L., phytol, ACAT inhibitory activity

\*Corresponding author