

## 목향(木香)으로부터 분리된 Sesquiterpene 화합물의 암세포 생육저해에 대한 활성

박현선 · 최은정 · 이용수 · 김건희<sup>#</sup>

덕성여자대학교 식물자원연구소

(Received March 21, 2007; Revised April 16, 2007)

### Sesquiterpene Lactones from *Saussurea lappa* and Their Cell Proliferation Effects on Human Breast Cell Lines

Hyun-Sun Park, Eun Jeong Choi, Yong Soo Lee and Gun-Hee Kim<sup>#</sup>

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University 419 Ssangmun-Dong, Dobong-Gu, Seoul 132-714, Korea

**Abstract** — *Saussurea Radix*, the dried roots of *Saussurea lappa* Clark (Compositae), has been used in oriental traditional medicine for aromatic stomachic. Present study was carried out for the anticancer effect of *Saussurea Radix*. Bioassay-directed fractionation of *Saussurea Radix* led to the isolation of two sesquiterpenes, dehydrocostuslactone (**1**) and costunolide (**2**). The structures of **1** and **2** were elucidated by spectral methods (MS, IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR). These compounds showed a potent cell proliferation activity against human breast cancer cell MCF-7 and MDA-MB-453.

**Keywords** □ *Saussurea lappa*, Compositae, sesquiterpene lactone, guaianolide, germacrane, cell proliferation activity

목향(*Saussurea Radix*)은 국화과(Compositae) 식물 *Saussurea lappa* Clarke의 뿌리를 건조시킨 것으로, 예로부터 강장제 및 향료 등으로 이용되어 왔다. 또한, 한국, 중국, 일본 등지에서는 방향성 건위제로도 이용되어 왔으며, 구토, 소화불량에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 목향에는 1차 대사산물로 inulin이 다량 함유되어 있는데 이와 같은 다당류 즉 식이섬유는 수렴작용, 장의 유동운동 촉진 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 또한 목향의 화학성분으로는 정유성분( $\alpha$ -ionone,  $\beta$ -ionone 및 costol 등, 1~3% 함유)과 alkaloid 성분인 saussurine 등이 보고되어 있으며, 이와 함께 그 주요성분으로서 guaiane형과 germacrane형 sesquiterpene 화합물이 다량 함유된 것으로 알려져 있다.<sup>3-7)</sup> 목향의 활성으로는 항암, 항산화, 항균, 항염증 제제로서의 이용 가능성이 제기되고 있는데,<sup>8,9)</sup> 이 중 sesquiterpene 화합물 dehydrocostuslactone(**1**)과 costunolide(**2**)는 특히 목향의 대표적인 화합물로서 NO생산에 대한 억제활성이 있는 것 또한 보고되어 있다.<sup>10)</sup> 염증부위에서 생산되는 과잉의 NO는 생체 방어의 역할

을 하는 반면, 각종 장기 장애, 염증성 질환을 악화시키는 요인이 되고 있으며, 발암의 과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>11-13)</sup>

본 연구는 국화과 식물에서 유래되는 유효성분의 개발을 목표로 하여, 특히 여성 특유의 암에 관련된 활성물질의 탐색을 목적으로 유방암 세포인 MCF-7과 MDA-MB-453에 대한 성장억제 활성을 지표로 목향의 EtOH 엑스에 대한 활성성분의 분리를 실시하였다.

### 실험 방법

#### 재료의 채집 및 확인

실험에 사용한 목향(*Saussurea lappa*)은 2006년 5월 경상북도 의성에서 채취하여, 일본 고치현 마키노식물원의 Koyama 원장에 의하여 감정을 거친 후 음건하여 이용하였다. 그 표본은 마키노식물원에 보관하였다(표본 번호: MBG-1708212).

#### 시약 및 기기

Silica gel column chromatography에는 Wakosil-200(64~210 mm) 및 Wakosil-300(40~64 mm)을 사용하였으며, 그 밖의 용매는 특급 시약을 사용하였다.

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-901-8496 (팩스) 02-901-8661  
(E-mail) ghkim@duksung.ac.kr

사용된 기기로는, IR은 Spectrophotometer FT-IR 300E(Jasco, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며, Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry(FAB-MS)은 VG Autospec spectrometer (Micromass, Manchester, UK)을, 그리고 Electrospray ionization-mass spectrometry(ESI-MS)은 LCT(Micromass, Manchester, UK)을 사용하여 측정하였다. Nuclear Magnetic Resonance(NMR)은 DPX-300 및 DRX-500(Bruker, Rheinstetten, Germany)을 사용하였으며 내부표준물질로는  $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$  : 7.26 ppm,  $^{13}\text{C}$  NMR : 77.0 ppm)을 이용하였다.

### 추출 및 분리

건조한 목향 1.5 kg을 EtOH 3회 가열 추출하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 엑스 228 g을 얻었다. 이를  $\text{H}_2\text{O}$ 에 현탁하여, hexane,  $\text{CHCl}_3$ , 1-BuOH을 이용하여 순차적으로 추출하여 각각의 fraction을 얻었다. 이들의 fraction에 대하여 cell proliferation 활성에 관한 MTT assay를 실시한 결과를 바탕으로 hexane fraction에 대한 자세한 분리를 실시하였다.

우선, hexane fraction(27 g)의 MeOH 불용물을 제거한 후, MeOH 가용부(HM) 약 24 g을 얻었다. 그 중 우선 일부(300 mg)를 취하여 silica gel column chromatography에 의한 분리를 실시하였다. 이동상(mobile phase)으로 hexane :  $\text{CHCl}_3$ (30 : 70, v/v)을 이용하여 여섯 개의 fraction(HM1~HM6)으로 분리하였다. 그 결과 HM4(78 mg)는 TLC의 발색반응에 의하여 sesqui-

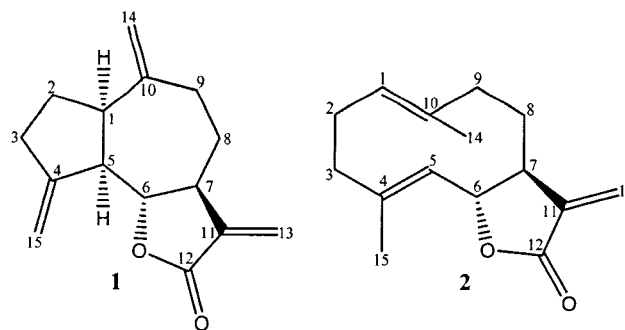


Fig. 1 – Structures of compound 1 and 2.

terpene의 함유가 예상되었다. HM4 대하여 preparative TLC를 실시하여 sesquiterpene의 발색 부위를 UV 254 nm에서 관측하여 취하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진 각각의 부분을  $\text{CHCl}_3$ 을 이용하여 용출시켜, HM41~HM43의 세 개의 fraction을 얻었으며, 그 중 HM42는 각종 NMR 스펙트럼 및 MS와 IR의 측정에 의하여 dehydrocostuslactone(1)으로 구조결정 하였다. 또한, 위의 HM의 나머지 부분 약 23 g에 대하여 hexane :  $\text{CHCl}_3$ (25 : 75, v/v)을 이용한 silica gel column chromatography를 실시, 총 14개의 fraction을 얻었다. 얻어진 fraction 중 sesquiterpene의 함유가 예상된 HM11(4.5 g)을 hexane : EtOAc(85 : 15~6 : 4~4 : 6)의 gradient 용매 조건하에서 silica gel column chromatography에 의한 분리를 실시하여 총 7개의 fraction을 얻었다.

Table I –  $^1\text{H}$  NMR (300MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (75MHz) spectral data for compounds 1 and 2 in  $\text{CDCl}_3$

1				2			
position	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}$	DEPT	position	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}$	DEPT
1	2.84~2.90(1H, m)	45.0	d	1	4.86(1H, m)	127.2	d
2a	1.90(1H, m)	32.5	t	2a	2.35(1H, m)	26.1	t
b	1.85(1H, m)			b	2.14(1H, m)		
3a	2.51(1H, m)	36.2	t	3a	2.58(1H, m)	27.9	t
b	2.47(1H, m)			b	2.05(1H, m)		
4	-	149.1	s	4	-	141.4	s
5	2.84~2.90(1H, m)	51.9	d	5	4.75(1H, d, 9.9)	127.0	d
6	3.95(1H, t, 9.1)	85.2	d	6	4.58(1H, d, 9.9)	81.8	d
7	2.84-2.90(1H, m)	47.5	d	7	2.79(1H, m)	50.3	d
8a	2.24(1H, m)	30.8	t	8a	2.31(1H, m)	40.9	t
b	1.41(1H, m)			b	2.08(1H, m)		
9a	2.44(1H, m)	30.2	t	9a	2.10(1H, m)	39.4	t
b	2.14(1H, m)			b	2.25(1H, m)		
10	-	139.7	s	10	-	136.9	s
11	-	151.2	s	11	-	140.0	s
12	-	170.2	s	12	-	170.4	s
13a	6.20(1H, d, 3.5)	120.1	t	13a	5.53(1H, d, 3.6)	119.6	t
b	5.48(1H, d, 3.5)			b	6.27(1H, d, 3.6)		
14a	4.88(1H, br s)	109.5	t	14	1.43(3H, s)	17.3	q
b	4.80(1H, br s)						
15a	5.25(1H, dd, 0.2, 2.0)	112.5	t	15	1.71(3H, s)	16.0	q
b	5.05(1H, dd, 0.2, 2.0)						

<sup>a</sup>Number of hydrogens, multiplicity, and *J* values in Hz are given in parentheses.

여기서 얻어진 fraction HM112는 TLC에 의해서 sesquiterpene의 함유가 예상되었으며, 그 재결정(CHCl<sub>3</sub>)에 의하여 costunolide(2)를 얻었다. 그 구조는 각종 NMR 스펙트럼 및 MS와 IR에 의하여 결정하였다.

Compound 1 : HRESIMS *m/z* 230.1327(calcd for C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub> 230.1307); IR(film)  $\nu_{max}$  1780, 1706 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR data는 Table I 참조

Compound 2 : HRESIMS *m/z* 232.1482(calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> 230.1463); IR(film)  $\nu_{max}$  1776, 1729 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR data는 Table I 참조

**MTT assay**

위의 과정에서 얻어진 각각의 hexane, CHCl<sub>3</sub>, 1-BuOH fraction 및 화합물 dehydrocostuslactone(1)과 costunolide(2)에 대하여 MTT assay를 실시하였다.

이들의 암세포주에 대한 생육저해효과를 확인하기 위하여, 유방암 세포주 MCF-7과 MDA-MB-453을 KCLB(Korean Cell Line Bank, Korea) 에서 분양 받아 사용하였다. 실험기간동안 세포주는 10%의 FBS(Gibco)가 포함된 RPMI 1640(Gibco) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경이 유지되는 incubator에서 배양하였다. 각 fraction 추출물과 화합물 1 및 2를 다양한 농도 범위(fraction 추출물: 12.5~100 ug/ml, 화합물 1과 2: 12.5~50 ug/ml)에서 24시간 처리한 뒤, MTT(methyl thiazolyl tetrazolium) 용액 첨가로 형성된 formazan crystal을 DMSO로 녹여 microplate reader (SpectraMax Plus; Molecular Devices)기의 흡광도 490 nm에서 확인하였다.

**결과 및 고찰**

중국산 목향(Saussureae Radix)에서 얻어진 EtOH 추출물 물에 현탁시킨 후, hexane, CHCl<sub>3</sub>, 1-BuOH를 이용하여 순차적으로 분배하여, 각각의 fraction을 얻었다. 이들에 대한 cell proliferation assay를 실시하여, Fig. 2의 A에서와 같이 이들 중 활성이 가장 우수한 hexane fraction에 대하여 상세한 분리 및 정제를 수행한 결과, dehydrocostuslactone(1) 및 costunolide(2)를 얻었다.

화합물 1은 HRESIMS에 의하여 그 분자 이온 피크 *m/z* 230.1327을 나타내어, 이들의 분자식을 C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>로 결정하였다. 또한, IR spectrum에서는  $\gamma$ -lactone의 존재를 나타내는 1780 cm<sup>-1</sup>의 흡수 밴드를 관측하였다. <sup>1</sup>H NMR에서는 6.20 및 5.48 ppm, 4.88 및 4.80 ppm, 그리고, 5.25 및 5.05 ppm의 3쌍의 exomethylene proton peak가 관측되었다. 또한, 3.95 ppm의 methine proton의 peak는  $\gamma$ -lactone환의 산소에 인접한 6위의 proton으로 예상되었다. 또한 <sup>13</sup>C NMR 및DEPT 스펙트럼에서는 4개의 tertiary

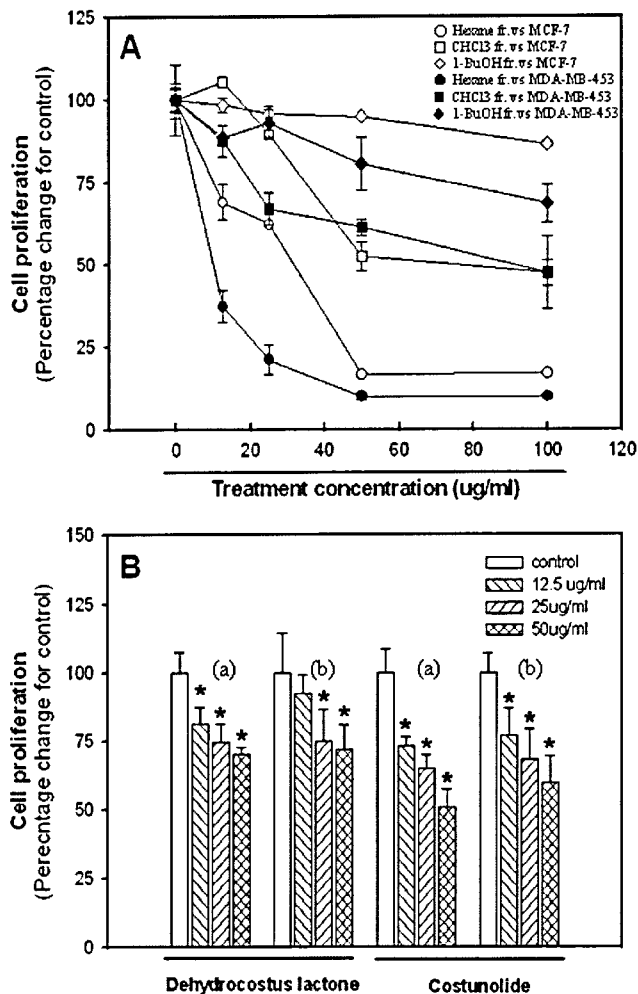


Fig. 2 – Cell proliferation on human breast cancer MCF-7 (a) and MDA-MB-453 (b) cells exposed to either fraction extracts (A) or compound 1 and 2 (B). Cells were exposed to either fraction extracts (A) or compound 1 and 2 (B) at various concentrations (ranging from 12.5 to 50 ug/ml) for 24 h. All data are reported as the percentage change in comparison with the vehicle-only group, which were arbitrarily assigned 100% viability. \**P*<0.05, Significantly different from the control group (the vehicle-only group).

carbon( $\delta_c$  45.0, 47.5, 51.9, 85.2)과 4개의 secondary carbon( $\delta_c$  30.2, 30.8, 32.5, 36.2)과 3개의 olefinic carbon( $\delta_c$  109.5, 112.5, 120.1) 그리고 4개의 quaternary carbon( $\delta_c$  139.7, 149.1, 151.2, 170.2)이 관측되었다. 이들 데이터에서 170.2 ppm의 시그널은  $\gamma$ -lactone환의 carbonyl기에서 유래되는 peak로 예상되었으며, 또한, <sup>1</sup>H NMR에서 예상된 exomethylene의 존재는 각각 <sup>13</sup>C NMR의 120.1, 109.5, 112.5 ppm의 olefin carbon 시그널에 의하여 확인할 수 있었다. 또한, <sup>1</sup>H NMR의 3.95 ppm과 함께 <sup>13</sup>C NMR의 85.2 ppm의 시그널은 산소 관능기에 인접한 tertiary carbon에 해당하는 것으로 예상되었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY의 결과에 의하여 H-1/H-2/H-3의 상관과 H-7/H-8/H-9의 correlation 등이

관측되었으며, H-13/H-14/H-15의 methylene proton 사이의 correlation 역시 관측되었다. 이와 같은 NMR의 결과 및 참고문헌을 종합하여, 화합물 1을 dehydrocostuslactone으로 결정하였다(Table I).<sup>14-16)</sup>

화합물 2는 HRESIMS에 의하여 그 분자 이온 피크  $m/z$  232.1482를 나타내어, 이들의 분자식을  $C_{15}H_{20}O_2$ 로 결정하였다. IR에 의하여  $1776\text{ cm}^{-1}$ 의 흡수 밴드를 관측하였다. 화합물 2의  $^{13}\text{C}$  NMR 및 DEPT의 결과에 의하여, 2개의 methyl carbon( $\delta_{\text{C}}$  16.0, 17.3)과 4개의 tertiary carbon( $\delta_{\text{C}}$  50.3, 81.8, 127.0, 127.2), 5개의 secondary carbon( $\delta_{\text{C}}$  26.1, 27.9, 39.4, 40.9, 119.6) 그리고 4개의 quaternary carbon( $\delta_{\text{C}}$  136.9, 140.0, 141.4, 170.4)이 관측되었다.  $^1\text{H}$  NMR로부터는 1.43, 1.71 ppm의 methyl proton과 5.53, 6.27 ppm의 exomethylene을 확인하였으며, 4.86 ppm과 4.75 ppm의 olefinic proton의 존재가 확인되었다. 이들 proton은  $^{13}\text{C}$  NMR에서 확인된 olefinic carbon( $\delta_{\text{C}}$  127.2, 127.0)과 관련하여 그 위치가 각각 C-1과 C-5에 위치하는 것을 알 수 있었다. 또한 170.4 ppm의 carbonyl peak에 의하여, IR에서도 확인된 바와 같이 화합물 2에는  $\gamma$ -lactone환이 존재하는 것도 확인할 수 있었다. 또한,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY에 의하여 화합물 2는 macrocyclic 화합물인 것을 알 수 있었으며, 이상의 결과 및 참고문헌을 종합하여 화합물 2는 germacrane골격의 costunolide로 그 구조를 확정지었다(Table I).<sup>14-16)</sup>

본 분리과정은 유방암 세포주 MCF-7과 MDA-MB-453에 대한 생육저해 효과를 지표로 이루어 졌다. Fig. 2의 A에 나타낸 바와 같이 hexane fraction이 MCF-7과 MDA-MB-45 두 세포주에 대하여 처리 농도  $50\text{ ug/ml}$ 에 있어서 각각 83.2%와 89.9%의 생육을 저해하였으며,  $\text{CHCl}_3$ (52.6%, 52.4%)과 1-BuOH(13.6%, 31.3%) fraction에 비하여 우수한 암세포에 대한 생육저해 효과를 나타내었다. 또한, hexane fraction에서 분리된 두 화합물 dehydrocostuslactone(1) 및 costunolide(2)에 대하여 동일한 실험을 실시한 결과, 1 및 2는  $12.5\text{ ug/ml}$ 의 농도에서부터 유의적인 생육저해활성을 나타냈으며, 이러한 결과는 농도 의존적인 저해 경향으로 관찰되었다( $p < 0.05$ , Fig. 2의 B). 또한, 최고 처리 농도  $50\text{ ug/ml}$ 에서 화합물 1과 2는 각각 27.9% 및 40.0%의 MDA-MB-453 세포주의 생육을 억제하였으며, 이러한 경향은 MCF-7 세포주에서 보다 뚜렷하게 관찰되었다.

이상의 결과에서 얻어진 화합물 1과 2는 목향의 대표적인 sesquiterpene인 guaiane(azulene(C5-C7)골격과  $\alpha$ -methylene  $\gamma$ -lactone으로 구성)과 germacrane(C10의 macrocycle과  $\gamma$ -lactone으로 구성)골격의 화합물로서, 이들이 나타낸 암세포주 생육저해 활성은 항암제로서의 가능성이 기대된다고 할 수 있으며, 이들 계통 화합물의 항암 활성 유도의 기전연구에 대한 기본정보를 제공하는데 의의가 있다고 사료된다. 또한, 금번 실험의 결과에서 hexane fraction에는 화합물 1과 2 이외에도 다른 활성 물질의

함유가 예상되는 바, 활성 본체에 대한 계속적인 규명이 필요하다고 생각된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-005-J13001).

## 참고문헌

- 1) Sashida, Y. and Yamasaki, K. : 生藥學, 改訂第5版, 南江堂, 東京, pp. 270-271 (1997).
- 2) Moerman, F. T., Van Leeuwen, M. B. and Delcour, J. A. : Enrichment of higher molecular weight fractions in inulin. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3780 (2004).
- 3) Kalsi, P. S., Kaur, P. and Chhabra, B. R. : Plant growth activity of epoxides from dehydrocostus lactone. *Phytochemistry* **18**, 1877 (1979).
- 4) Chillon, R. S., Kalsi, P. S., Singh, W. P., Gautam, V. K. and Chhabra, B. R. : Guaianolide from *Saussurea lappa*. *Phytochemistry* **26**, 1209 (1987).
- 5) Kalsi, P. S., Kaur, G., Sharma, S. and Talwar, K. K. : Dehydrocostuslactone and plant growth activity of derived guaianolides. *Phytochemistry* **23**, 2855 (1984).
- 6) Kalsi, P. S., Chhabra, B. R. and Wadia, M. S. : Chemistry of costunolide. *Tetrahedron* **35**, 1993 (1979).
- 7) Robles, M., Aregullin, M., West, J. and Rodriguez, E. : Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Med.* **61**, 199 (1995).
- 8) Kuroyanagi, M., Ueno, A. and Sato, S. : Structures of sesquiterpenes from *Curcuma aromatica* Salisb. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 53 (1987).
- 9) Wang, Y. and Wang, M. : Study on the quality of *Rhizoma Curcuma*. *Acta. Pharm. Sin.* **36**, 849 (2001).
- 10) Lee, H. J., Kim, N. Y. and Lee, S. H. : A sesquiterpene dehydrocostuslactone inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- $\alpha$  in LPS-activated macrophages. *Planta Med.* **65**, 104 (1999).
- 11) Yuuya, S., Hagiwara, H., Suzuki, T., Ando, M., Yamada, A., Suda, K., Kataoka, T. and Nagai, K. : Guaianolides as Immunomodulators. Synthesis and biological activities of dehydrocostuslactone, mokko Lactone, eremanthin, and their derivatives. *J. Nat. Prod.* **62**, 22 (1999).
- 12) Saroglou, V., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K. and Skaltsa, H. : Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **68**, 1404 (2005).

- 13) Sun, C. H., Syu, W. J., Don, M. J., Lu, J. J. and Lee, G. H. : Cytotoxic sesquiterpene lactones from the root of *Saussurea lappa*. *J. Nat. Prod.* **66**, 1175 (2003).
- 14) Matsuda, H., Kageura, T., Inoue, Y., Morikawa, T. and Yoshikawa, M. : Absolute stereostructures and syntheses of saussureamines A, B, C, D and E, amino acid sesquiterpene conjugates with gastroprotective effect, from the roots of *Saussurea lappa*. *Tetrahedron* **56**, 7763 (2000).
- 15) Wedge, D. E., Galindo, J. C. G. and Macias, F. A. : Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry* **53**, 747 (2000).
- 16) Chhabra, B. R., Gupta, S., Jain, M. and Kalsi, P. S. : Sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa*. *Phytochemistry* **49**, 801 (1998).