

韓國產 附子類 生藥에 관한 연구 (V).

진범 지하부의 成分에 대하여

李 炫 宣 · 鄭 普 燮

서울대학교 약학대학

Studies on Korean Aconitum Species(V).

On the Chemical Constituents of *Aconitum pseudolaeve* var. *erectum*

Hyun Sun Lee and Bo Sup Chung

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—A new aromatic amide, methyl-N-(3-carbamoylpropionyl) anthranilate was isolated for the first time as a natural compound and one known C₁₉-diterpene alkaloid, avadharidine was also obtained from the root of *Aconitum pseudolaeve* var. *erectum*. The LD₅₀ values of water extract and MeOH extract of the root of *Aconitum pseudolaeve* var. *erectum* in mice were 1.23 g(13.6 g crude drug) and 0.77 g(5.13 g crude drug)/kg, *p.o.*, respectively.

Keywords—*Aconitum pseudolaeve* var. *erectum* • Ranunculaceae • aromatic amide • methyl-N-(3-carbamoylpropionyl) anthranilate • C₁₉-diterpene alkaloid • avadharidine • acute toxicity

저자는 前報¹⁾에서 진범 지하부의 alkaloid분획으로 부터 lycoctonine type의 C₁₉-diterpene alkaloid인 lycoctonine과 septentriodine(2)을 분리하여 보고한 바 있다. 계속적인 연구로서 진범 지하부의 수침액과 MeOH냉침액에 대하여 급성 독성실험을 행하였고, alkaloid분획으로부터 새로운 aromatic amide와 C₁₉-diterpene alkaloid 성분을 분리하였기에 보고하는 바이다.

실험 방법

前報¹⁾에서 기술한 方法에 따라 얻은 4개의 alkaloid분획중 fr. 2를 CHCl₃ : NH₄OH (15 : 1, lower phase)용매로 silica gel column chromatography를 행하여 2개의 소분획 fr. 2a와 fr. 2b

로 나누었다.

Compound 3의 분리

Fr. 2b를 EtOAc : MeOH(5 : 1)용매로 silica gel chromatography를 실시하여 compound 3인 백색의 amorphous powder (340 mg)을 얻었다. 이 物質은 dragendorff 시약에 주황색으로 발색되었다.

UV, λ_{max} (EtOH) : 308, 257, 253 nm; IR, ν_{max}^{KBr} : 3420(OH), 3320(NH), 1690(carbonyl), 1590, 1450, 1260, 1090, 760 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃, 80 MHz) δ : 1.09(3 H, t, *J*=7 Hz, N-CH₂-CH₃), 3.14, 3.27, 3.35, 3.39 (each 3 H, s, OCH₃), 7.10(1 H, t, *J*=8 Hz, ArH), 7.56(1 H, t, *J*=8 Hz, ArH) 7.98(1 H, d, *J*=8 Hz, ArH), 8.68 (1 H, d, *J*=8 Hz, ArH), 11.08(1 H, bs, Ar-

NHCO); MS, (70 eV) m/z (rel. int.): 685(M^+ , 2), 668 (M^+-NH_3 , 7), 655 (M^+-OCH_3+H , 70), 654 (M^+-OCH_3 , 23), 556 (92), 555 (41), 436 (70), 202 (22), 174 (100), 146 (20), 202 (22), 174(100), 146(20), 120(48); ^{13}C -NMR and APT spectrum($CDCl_3$, 20 MHz); Table I.

Compound 4의 분리

Fr. 2a를 $CHCl_3$:MeOH(50:1) 용매로 부터 시작하여 30:1, 20:1, 10:1로 순차적으로 용매극성을 증가시키면서 silica gel column chromatography를 행하여 R_f 0.45($CHCl_3$:MeOH=20:1)에 해당하는 분획을 모아 EtOAc에서 재결정하여 백색의 판상결정인 Compound 4(200 mg)를 얻었다. 이 물질은 mp: 140~143°로 방향성이 있으며 anisaldehyde- H_2SO_4 에 노란색으로 발색되지만 10% H_2SO_4 에는 발색되지 않았다.

Anal. Calcd. $C_{12}H_{14}N_2O_4$: C, 57.53, H, 5.64, N, 11.12; Found: C, 57.49, H, 5.72, N, 10.95;

UV, λ_{max} (EtOH): 306, 240 nm; IR, ν_{max}^{KBr} : 3420, 3370(NH_2), 3260, 3200(NH), 1710(ester carbonyl), 1685, 1655 (amide carbonyl), 1590, 1500, 1450(aromatic C=C), 1360, 1240, 760 cm^{-1} ; MS, (70 eV) m/z (rel. int.): 250(M^+ , 4.1), 202(3.0) 174(5.2), 151(100), 146(13.8), 120(13.7), 119(76.3), 100(15.7), 91(5.1), 92 (16.2), 72(9.0) 44(20.6); 1H -NMR(C_5D_5N , 80 MHz) δ : 2.98(4H, s, CO(CH_2)₂ CO) 3.77 (3H, COOCH₃), 7.11(1H, t, $J=8$ Hz, H-5), 8.98(1H, d, $J=8$ Hz, H-3), 7.98(1H, d, $J=8$ Hz, H-6), 7.47(1H, t, $J=8$ Hz, H-4), 11.27 (1H, bs, NH); ^{13}C -NMR(DMSO, 20 MHz): Table II.

급성 독성 실험

실험동물

실험동물은 서울대학교 동물사육장에서 공급 받은 체중 $22 \pm 2g$ 의 마우스(ICR 계) 수컷을 사

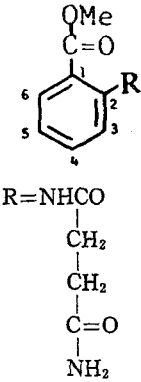
Table I. ^{13}C -NMR chemical shifts and assignments for compound 3, related alkaloids-septentriodine (2), and puberaconitine(3)^a

Carbon No.	Compound 3	2 ^{b)}	3 ^{b)}	Carbon No.	Compound 3	2 ^{b)}	3 ^{b)}
1	83.9(CH) ^b	84.0	83.8	N-CH ₂	50.0(CH ₂)	51.0	50.9
2	26.0(CH ₂)	26.1	25.7	CH ₃	14.0(CH ₃)	14.1	13.7
3	32.2(CH ₂)	31.6	31.7	1-OCH ₃	55.8	55.9	55.7
4	37.6(C)	37.6	37.5	6-OCH ₃	57.8	57.7	57.6
5	43.3(CH)	43.3	43.2	14-OCH ₃	58.2	58.1	58.0
6	91.0(CH)	91.1	90.9	16-OCH ₃	56.3	56.4	56.1
7	88.5(C)	88.7	88.3	-C=O	168.0(C)	168.3	168.0
8	77.6(C)	77.6	77.7	1	114.9(C)	114.7	114.7
9	50.5(CH)	50.4	50.3	2	141.6(C)	141.9	141.6
10	38.0(CH)	38.1	37.9	3	120.7(CH)	120.8	120.7
11	49.1(C)	49.1	49.0	4	134.8(CH)	135.2	134.8
12	28.7(CH ₂)	28.7	28.7	5	122.7(CH)	122.8	122.5
13	46.1(CH)	45.9	45.9	6	130.3(CH)	130.5	130.3
14	83.9(CH)	83.8	83.8	R=NHCO	171.0(C)	170.6	170.7
15	33.8(CH ₂)	33.6	33.6	CH ₂	30.4(CH ₂)	28.9	29.5
16	82.6(CH)	82.5	82.5	CH ₂	33.1(CH ₂)	32.7	29.8
17	64.5(CH)	64.5	64.5	CO	174.3(C)	173.3	170.7
18	69.9(CH ₂)	69.2	69.2	R'	51.0		
19	52.5(CH ₂)	52.5	52.5		R'=NH ₂	R'=OCH ₃	R'=OH

^a Chemical shifts in ppm downfield from TMS, solvent, $CDCl_3$.

^b The character of each carbon was assigned by APT spectra.

Table II. ^{13}C -NMR chemical shifts and assignments for compound 4

Carbon	Compound 4(DMSO)			
	52.4			
	167.6	172.6 ^a	167.9 ^b	
	1	117.4	117.2	114.9
	2	140.1	142.3	141.6
	3	120.9	121.3	120.7
	4	133.7	135.1	134.8
	5	122.9	123.8	122.7
	6	130.5	132.4	130.3
	R=NHCO	170.8	171.3	171.0
	CH ₂	29.9	29.8	30.4
	CH ₂	32.3	33.5	33.1
	C=O	173.2	176.1	174.3
	NH ₂			

^a Values in parentheses are those of N-succinoyl-anthranilic acid.

^b Values for anthranilic acid moiety of avadhari-dine (Compound 3).

용하였고 사료는 삼양유지사료(주)의 고품사료를, 급수는 수도물을 임의로 섭취하도록 하였다.

시료의 조제

진법의 지하부 100g에 증류수 800ml를 가하고 30분간 열탕하여 진법수침액을 얻었다. 또한 진법지하부 30g에 methanol 150ml를 가하여 실온에서 3회(1회 24시간) 추출하여 MeOH냉침액을 얻었다. 이들 추출액을 농축하고 냉동건조시켜 진법수침액 9g(수득율 9%), MeOH냉침액 4.5g(수득율 15%)을 얻었다.

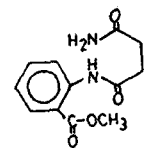
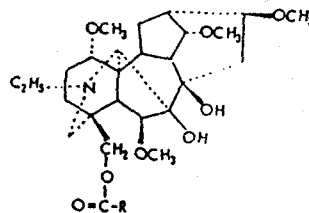
투여량 및 투여방법

위와 같이 조제된 시료를 0.5% CMC용액에 현탁시켜 경구투여하였으며, 투여전 후 2~3시간 절식시켰고 48시간동안 생사여부를 관찰했다. 각 시료의 투여용량은 0.5ml이하가 되도록 하였고 LD₅₀은 up-and-down법으로 실시하였다.

실험결과 및 고찰

Compound 3은 dragendorff 시약에 양성으로 서 진법으로 부터 분리한 물질 2와 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, UV등 유사한 spectral pattern을 보여준다. IR spectrum은 OH와 NH(3420, 3320

cm^{-1}), carbonyl(1690 cm^{-1}), aromatic system의 흡수를 보여주며, ^1H -NMR spectrum은 N-ethyl group(3 H, t, $J=7$ Hz), 4개의 methoxyl group (each 3 H, s, δ 3.14, 3.27, 3.35, 3.39)을 보여준다. 또한 δ 5.66, δ 6.03에서 NH₂에 해당하는 2개의 broad singlet과 δ 11.6에서 1개의 broad singlet인 secondary amide의 proton을 보여주며, 이들은 D₂O처리시 사라짐을 볼 수 있었다. δ 7.10~8.68에서 나타나는 2개의 doublet와 2개의 triplet는 J value 8 Hz로서 이 pattern과, septentriodine (2)에서와 같이 이 물질의 UV spectrum도 308 nm, 253 nm의 흡수를 볼 수 있었으므로, 이 물질 역시 분자내에 anthranoyl기를 가지고 있음을 알 수 있다.^{1,2)} MS spectrum은 m/z 685의 분자이온 peak, NH₃탈락에 의한 m/z 698과 methoxy radical의 탈락에 기인한 m/z 654의 peak를 보여준다. 또한 side chain인 anthranilic acid moiety에 기인한 m/z 202, 174, 146, 120의 일련의 peak를 보여주며 이 같은 pattern은 septentriodine(2)와 puberaconitine(3)에서 찾아볼 수 있었다.^{2,3)} ^{13}C -NMR spectrum은 septentriodine(2)보다 한개의 탄소가 부족한 36개의 carbon signal을 보여준다. Table I에서 볼 수 있듯이 물질 2의 carboxymethyl의 methyl의 group (^1H -NMR : s, δ 3.78, ^{13}C -NMR : 51.0 ppm)의 signal을 찾아 볼 수 없었으며, septentriodine(2)와 비교시 anthranilic acid moiety의 side chain에 해당하는 chemical shift의 차이를 제외하고는 동일한 spectrum을 보여준다. Puberaconitine(3)은 side chain에 succinoyl기를 가지고 있으며 두 methylen carbon이 29.8 ppm과 29.5 ppm에서 나타나고 있는 반면 comp-



Comp. 4

- Comp. 3 R=C₆H₄-o-NHCOCH₂CH₂CONH₂
 2 R=C₆H₄-o-NHCOCH₂CH₂CO₂CH₃
 3 R=C₆H₄-o-NHCOCH₂CH₂COOH

ound 3의 경우 succinoyl기가 succinamoyl기로 됨으로써 저자장으로 이동되어 33.1 ppm과 30.4 ppm에서 나타나는 2개의 methylene carbon을 확인할 수 있었다. 이상의 여러 spectral data로부터 compound 3을 avadharidine^{4,5)}으로 동정했다.

Compound 4는 방향성이 있으며, MS와 원소 분석에 의해서 $C_{12}H_{14}N_2O_4$ (m/z 250, M^+)로 분자식을 정할 수 있었다.

IR spectrum은 primary amine(3420, 3370 cm^{-1}), secondary amine(3260, 3200 cm^{-1}), ester carbonyl(1710 cm^{-1}), 2개의 amide carbonyl(1685, 1655 cm^{-1})과 aromatic system을 보여주며 760 cm^{-1} 의 흡수는 1,2-disubstituted benzene ring의 존재를 예시해준다. 1H -NMR spectrum은 δ 7.01~9.04에서 compound 3과 2의 pattern과 유사한 2개의 doublet와 2개의 triplet를 보여주고 있으며, 이 compound 4 역시 anthranilic acid moiety를 갖는 것을 나타낸다.⁶⁾ 또한 1개의 methoxyl group(3H, s, CO_2CH_3 , δ 3.77)과 CO (HC_2)₂CO(4H, s, δ 2.98)을 보여주며 δ 11.27의 broad singlet는 secondary amide proton signal로서 D_2O 처리시 사라짐을 볼 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum은 12개의 carbon atom을 보여주며, Table I에서 볼 수 있듯이 compound 3의 anthranilic acid moiety의 chemical shift와 거의 일치함을 알 수 있다. MS spectrum은 m/z 250의 molecular ion peak와 amide bond가 개열되면서 keten($-NH_2COCH=CHCO$)이 떨어져 나간 m/z 151의 peak가 base peak로 나타나고 있다. base peak에서 methoxy radical과 CH_3OH 가 떨어져 나간 m/z 120과 m/z 119, 계속해서 CO 의 탈락에 기인한 m/z 92, m/z 91의 peak를 보여준다. 또한 compound 3과 2에서 볼 수 있었던 일련의 peak인 m/z 202, 174, 146, 120을 보여주고 있다. 이상의 결과로부터 compound 4는 methyl-N-(3-carbamoylpropionyl) anthranilate로 구조를 확정했으며 이 물질은 천연에서 처음으로 분리한 것이다.

급성독성

진범의 MeOH냉침액과 수침액의 mouse에 경

구투여시의 LD_{50} 이 0.77 g(5.13 g crude drug), 1.23 g(13.6 g crude drug)/kg으로 상당한 독성이 인정되었다.

결 론

진범(*Aconitum pseudolaeve* var. *erectum*)의 지하부의 alkaloid 분획으로부터 2개의 물질 compound 3과 compound 4를 분리 하였다. Compound 3은 lycocotnine type의 C_{19} -diterpene alkaloid인 avadharidine($C_{36}H_{51}N_3O_{10}$)으로 동정했으며, compound 4는 여러 spectral data로부터 aromatic amide인 methyl-N-(3-carbamoylpropionyl) anthranilate (mp 140~143°, $C_{12}H_{14}N_2O_4$)로 그 구조를 결정했다. 이 물질은 nitrogen을 함유하는 非 alkaloid로서 천연에서 처음 보고되는 바이다. 또한 진범의 급성독성실험결과 MeOH 냉침액과 수침액의 mouse에 경구투여시의 LD_{50} 이 각각 0.77 g과 1.23 g/kg로 상당한 毒性이 인정되었다. 우리나라에서는 中國産 秦艽의 기원식물인 *Gentiana*屬 식물과는 전혀 다른 속으로 *Aconitum*屬 식물인 진범을 동일한 용도로 임상적으로 사용하고 있어 이에 대한 독성 및 임상적 효능의 세밀한 검토 후 사용이 요구된다.

<1989년 2월 1일 접수: 2월 28일 수리>

문 헌

1. 李炫直·鄭普燮, 생약학회지 19(3), 181(1988).
2. Pelletier, S.W. and Sawhney, R.S.: *Heterocycles*, 12, 377(1979).
3. De-quan, Y. and Das, B.C.: *Planta Medica* 49, 85(1983).
4. Shamma, M. and Chinnasamy, P.: *J. Nat. Prod.* 42, 615(1979).
5. Pelletier, S.W., Mody, N.V., Varughese, K.I., Maddry, J.A. and Desai, H.K.: *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6536(1981).
6. Matsuo, M., Matsuo, T., Deguchi, T. and Kasida, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 20, 990(1972).