

## 산조인 및 대추, 대추나무로부터 단리한 아포르핀과 환상 펩티드 알칼로이드의 생쥐에 대한 진정작용

한병훈\* · 박명환\* · 한용남

서울대학교 천연물과학연구소, \*(주)대웅제약 중앙연구소

(Received February 19, 1993)

### Sedative Activity of Aporphine and Cyclopeptide Alkaloids Isolated from the Seeds of *Zizyphus Vulgaris* var. *Spinosus*, and the Fruits and Stem Bark of *Zizyphus Jujuba* var. *Inermis* in mice

Byung Hoon Han\*, Myung Hwan Park\* and Yong Nam Han

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, and

\*Daewoong Pharm. Co., Ltd., Seongnam 462-120, Korea

**Abstract**—The objective of this study was to evaluate the sedative activity of four aporphine alkaloids (APA) and nine cyclopeptide alkaloids(CPA), which had been isolated from the seeds (sanjoin) of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosus*, and the fruits and stem bark of *Zizyphus jujuba* var. *inermis*. The assessment of sedative activity was carried out, employing a hexobarbital-induced sleeping time method in mice. When the relative sedative potency of sanjoinine-A(CPA) was given as one unit, those of nuciferine (APA), lysicamine (APA), chlorpromazine (positive control), and sanjoinine -Ahl (an epimer of sanjoinine-A) were 13, 6.5, 5, and 3, respectively. The sedative activities of other CPAs were much lower than those of sanjoinine-A and -Ahl, and other APAs were not active. On heat treatment, nuciferine and lysicamine were degraded into some artifacts which exhibited no sedative activity, while sanjoinine-A was converted into sanjoinine-Ahl which showed more potent sedative activity. These results suggested that nuciferine and sanjoinine-A were major sedative components of native sanjoin, and that sanjoinine-A and its epimeric artifact, sanjoinine-Ahl were the active principles of roasted sanjoin. It provides a scientific basis for heat-processing (roasting) of this Oriental medicine.

**Keywords** □ *Zizyphus vulgaris*, *Zizyphus jujuba*, sedative, cyclopeptide alkaloid, aporphine alkaloid.

산조인은 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 멧대추나무(*Zizyphus vulgaris* Lamark var. *spinosus* Bunge)의 씨로서 한방에서 불면증 치료의 목적으로 널리 사용되고 있는 생약이다.<sup>1-4)</sup> 저자 등은 산조인의 유효성분 연구를 수행하여 알칼로이드 성분이 산조인의 진정작용 활성물질임을 입증한 바 있다.<sup>5,6)</sup>

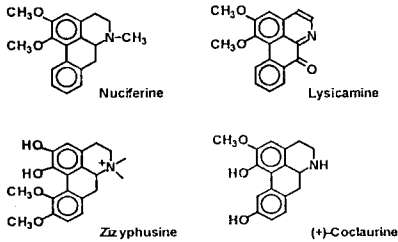
산조인으로부터 총 14종의 알칼로이드를 단리하였는데 산조인 알칼로이드는 크게 aporphine alkaloid (APA) 계열과 cyclopeptide alkaloid(CPA) 계열 화합

물로 분류된다.<sup>6-8)</sup> 대추나무(*Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder)의 줄기껍질로부터는 CPA만을 12종 단리하였으며, 대추로부터는 각각 1종의 APA, CPA 및 daechualkaloid-A를 단리하여 보고한 바 있다.<sup>6)</sup>

본 연구의 목적은 단리한 이들 알칼로이드 중에서 진정작용을 측정할 수 있을 만큼의 시료가 확보된 13종의 APA와 CPA(Chart 1)에 대하여 진정작용을 서로 비교하여 구조-활성상관성을 밝히고자 하였다.

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

1. Aporphine Alkaloids (APA)



2. Cyclopeptide Alkaloids (CPA)

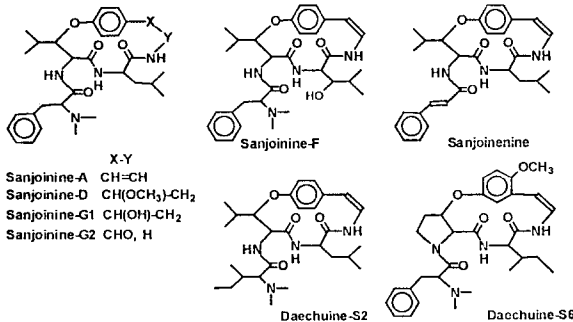


Chart 1—The Structures of Zizyphus Alkaloids.

실험 재료 및 방법

**실험재료**—실험에 사용된 알카로이드 중에서 sanjoinine-A(frangufoline), -D, -F, -G2, sanjoinine, nuciferine, zizyphusine, (+)-coclaurine은 산조인으로부터, daechuine-S2(=frangulanine), daechuine-S6는 대추나무로부터, lysicamine은 대추로부터 분리한 것이다. Sanjoinine-Ah1은 sanjoinine-A를 열처리하여 제조한 것이며(아래 참조), dihydrosanjoinine-A는 sanjoinine-A를 palladium-carbon으로 환원하여 제조하였다.

**Hexobarbital에 의한 수면시간 연장효과**—실험동물은 체중 22~24g의 dd계 웅성 마우스를 사용하였으며 한 군을 10마리로 하였다. 알카로이드 검체는 생리식염수에 녹이거나 또는 1% CMC로 현탁시켰고, 체중 20g당 0.2 ml의 검체를 경구투여하였다. 약물투여 1시간 후에 hexobarbital sodium 생리식염액을 50 mg/kg 용량으로 1 주사하고 정향 반사소실로부터 회복될 때까지의 수면시간(단위, 분)으로 측정하였다.

**알카로이드의 열처리**—Sanjoinine-A 40 mg을 0.6 ml 용량의 stainless steel vessel에 넣고 MeOH/물 혼액(2 : 1) 0.5 ml를 가한 다음 stainless steel cap (Swagelock)으로 단단히 막고 미리 210°C로 가열해 놓은 GC oven 중에서 15분간 가열한 다음 식히고 내용물을 커내어 용매를 날려 보낸 다음 CHCl<sub>3</sub>/MeOH (20 : 1) 용매로 silica gel plate 상에서 preparative TLC를 행하였다. 여기에서 R<sub>f</sub> 0.4의 band를 긁어모아 추출 농축하여 sanjoinine-Ah1 10.2 mg을 얻었다.

Nuciferine, lysicamine을 각각 30 mg씩 취하여 MeOH/물 (1 : 1) 0.5 ml에 녹이고 210°C에서 15분간 또는 200°C에서 30분간 가열하였다. 냉각후 용매를 제거하고 잔사를 진정작용 측정용 검체로 사용하였다. 이 잔사를 cyclohexane/EtOAc/MeOH(35 : 15 : 4)용매로 silica gel plate 상에서 TLC하였을 때 nuciferine 및 lysicamine은 모두 분해되었음을 확인하였다.

실험결과

산조인, 대추나무 줄기껍질, 대추로부터 단리한 알카로이드 중에서 헥소바르비탈로 유도한 생쥐의 수면시간 연장효과를 측정할 수 있을 정도로 검체가 확보된 13종의 알카로이드에 대하여 진정 작용을 측정하였으며 그 결과를 Table I에 정리하였다. 대조군의 수면시간에 대한 데이터는 각 알카로이드의 작용을 측정할 때 마다 얻은 15회 실험의 평균치로 나타내었는데 그 값은 22.3±4.8분이었다. 대조약물로 chlorpromazine을 사용하였으며, 각 알카로이드 시료와 함께 적어도 두 용량에서 수면시간을 측정하였다. Table I을 용량-반응곡선으로 나타낸 것이 Fig. 1이다.

Fig. 1에서 대조군의 수면시간 보다 33% 수면을 연장시킨 효과를 기준으로 각 시료의 상대적인 진정 작용을 비교하여 다시 Table I의 relative activity항에 나타내었다. 여기서 보는 바와 같이 알카로이드의 진정작용은 sanjoinine-A의 활성을 1로 하였을 때 이 보다 작용이 강한 알카로이드는 nuciferine(13배), lysicamine(7배), sanjoinine-Ah1(3배)이었다. 특히 nuciferine은 chlorpromazine 보다 약 2.5배 강하였다. 반면에 sanjoinine-A보다 작용이 적은 알카로이드는 sanjoinine-D(1/5), -G2(1/5), -F(1/7)였으며, 작용이

**Table I**—Effect of several alkaloids on hexobarbital induced sleeping time in mice

Sample tested	Dose (mg/kg)	No. of animals	Sleeping time $\pm$ S.D.(min)	Prolongation %	Relative activity
Control	—	150	22.3 $\pm$ 4.8	100	—
Sanjoinine-A	1	10	26.1 $\pm$ 2.7	117 <sup>c</sup>	1
	3	40	28.1 $\pm$ 4.4	126 <sup>a</sup>	
	10	60	38.3 $\pm$ 5.5	172 <sup>a</sup>	
Sanjoinine-Ahl	1	10	32.8 $\pm$ 4.7	147 <sup>a</sup>	3
	3	20	36.3 $\pm$ 5.3	163 <sup>a</sup>	
	10	10	46.0 $\pm$ 9.0	206 <sup>a</sup>	
Sanjoinine-D	10	20	24.2 $\pm$ 6.0	109	1/5
	30	10	33.9 $\pm$ 7.3	152 <sup>a</sup>	
Sanjoinine-F	10	10	25.0 $\pm$ 6.4	112	1/7
	30	10	30.8 $\pm$ 9.6	138 <sup>a</sup>	
Sanjoinine-G2	10	40	28.3 $\pm$ 6.6	127 <sup>a</sup>	1/5
	30	20	30.8 $\pm$ 11.8	135 <sup>a</sup>	
Sanjoinenine	10	20	19.4 $\pm$ 7.7	87	0
	30	20	25.8 $\pm$ 6.7	116 <sup>b</sup>	
Dihydrosanjoinine-A	10	10	16.3 $\pm$ 4.3	73	0
	30	10	21.0 $\pm$ 8.3	94	
Daechuine-S2	10	10	23.1 $\pm$ 8.4	104	0
	30	10	26.0 $\pm$ 7.2	117 <sup>c</sup>	
Nuciferine	1	10	40.1 $\pm$ 8.4	180 <sup>a</sup>	13
	3	10	47.4 $\pm$ 10.4	213 <sup>a</sup>	
Lysicamine	1	10	34.3 $\pm$ 8.5	154 <sup>a</sup>	7
	3	10	44.7 $\pm$ 10.4	200 <sup>a</sup>	
Daechuine-S6	3	10	22.7 $\pm$ 5.6	102	0
	10	10	44.7 $\pm$ 10.4	114 <sup>d</sup>	
Zizyphusine	10	10	20.0 $\pm$ 5.9	90	0
	33	10	22.2 $\pm$ 6.9	100	
Coclaurine	10	10	23.3 $\pm$ 4.3	104	0
	33	10	22.9 $\pm$ 6.0	103	
Chloropromazine	2.5	10	39.3 $\pm$ 2.5	176 <sup>a</sup>	5
	5	10	47.6 $\pm$ 9.5	213 <sup>a</sup>	

<sup>a,b,c,d</sup> Significantly different from the control group;  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.02$ ,  $p < 0.05$ , respectively.

거의 없거나 전혀 없는 것은 sanjoinenine, zizyphusine, coclaurine, daechuine-S2, -S6였다. Nuciferine 및 lysicamine의 열분해 산물은 작용이 전혀 없었다.

## 고 찰

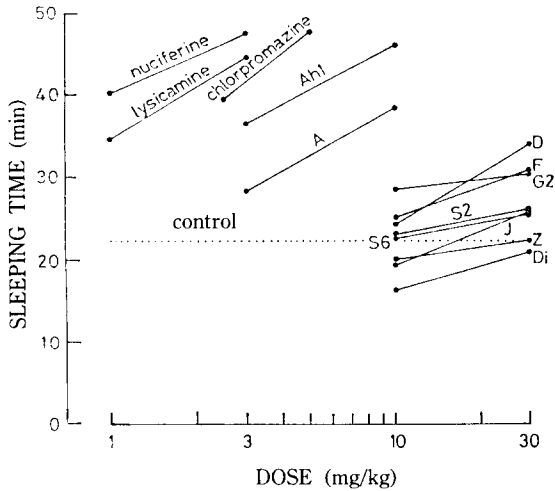
### Aprophine Alkaloid의 구조와 합성

Nuciferine, lysicamine은 sanjoinine-A보다 각각 13배, 7배 더 진정작용이 강하였으나, (+)-coclaurine과 같이 C환이 개환되면 작용이 없었다. Zizyphusine과

같은 4급 아민은 진정작용이 없었다. Nuciferine, lysicamine을 열처리하면 분해되며 분해산물은 진정작용이 없었다.

### Cyclopeptide Alkaloid의 구조와 합성

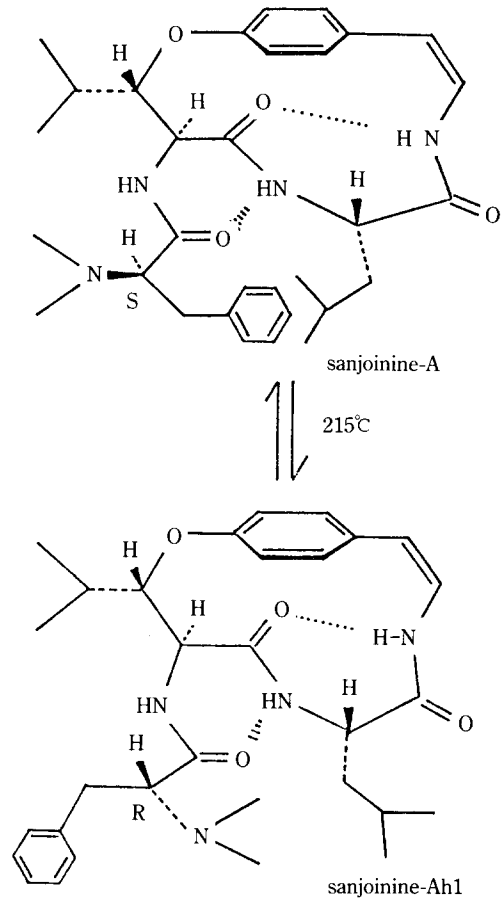
현재까지 저자 등과 외국연구자들이 단리한 CPA는 60여 종에 달하며 CPA의 화학구조의 특징을 요약하면, 환을 구성하는 부분은 3요소로서 1종의 방향족 아민과 2종의 아미노산이 에테르 결합과 펩티드 결합으로 환을 이룬다. 방향족 아민의 종류에 따라 13, 14, 15환을 형성하고 있다. 이러한 환의 결사슬로서



**Fig. 1**—Dose-response curves for several alkaloids. A, Ah1, D, F, G2: sanjoinine-A, -Ah1, -D, -F, -G2; S2, S6: daejuine-S2, -S6; J: sanjoinenine; Z: zizyphusine; Di: dihydro-sanjoinine-A.

1~2개의 아미노산이 결합되어 있다. 산조인에서 단리한 CPA 7종은 모두 14환이며, 대추나무껍질 및 대추에서 단리한 CPA 14종 중에서 14환의 것이 5종이며, 13환의 것이 9종이었다.<sup>6)</sup> 이들 CPA중에서 급면 진정작용을 측정된 것이 8종으로 Sanjoinine-A의 활성을 1로 하였을 때 이 CPA의 열처리 epimer인 sanjoinine-Ah1은(Fig. 2참조) 진정작용이 3배 증가되었고, sanjoinine-D, -G2, -F는 sanjoinine-A에 비해 1/5, 1/5, 1/7의 활성 밖에 없으며, sanjoinenine, frangulanine(=daejuine-S2), daejuine-S6는 작용이 거의 없었다. 이들 CPA의 구조-활성 상관성을 살펴보면 아래와 같다.

**13환 CPA는 진정작용이 없다**—Chart 1에서 보는 바와 같이 13환 CPA인 daejuine-S6가 14환 CPA인 sanjoinine-A의 화학구조상에는 유사성이 있다. 결사슬 아미노산이 서로 공통인 N,N-dimethylphenylalanine이며, 환을 구성하는 3요소 중에서 두개의 아미노산이 S6에는 isoleucine, β-hydroxyproline이, A에는 leucine, β-hydroxyleucine이 존재하므로 서로 구조 유사성이 있다고 볼 수 있다. 그러나 또다른 요소인 방향족 아민의 구조상의 차이로 S6는 진정작용이 없고, 14환 CPA인 A는 진정작용이 강하므로 13환 CPA는 진정작용이 없다고 추론할 수 있다.



**Fig. 2**—Sanjoinine-A was transformed into its epimer, sanjoinine-Ah1 on heat treatment.

**14환 CPA의 N,N-Dimethylphenylalanine는 진정 작용 발현에 필수불가결하다**—Chart 1에서 보는 바와 같이 daejuine-S2는 sanjoinine-A와 같이 14환 CPA이며 환의 구조는 완전히 같지만 결사슬 아미노산은 A의 경우 N,N-dimethylphenylalanine이며 S2의 경우 N,N-dimethylisoleucine이다. 결사슬 아미노산이 양쪽 모두 소수성인 점은 같으나 A는 작용이 강하고 S2는 작용이 매우 약하다. 또 sanjoinenine과 같이 결사슬에 phenyl기는 있으나 질소(염기성)가 없어도 작용이 없다. 그러므로 14환 CPA가 진정작용을 나타내기 위해서는 N,N-dimethylphenylalanine의 존재가 필수불가결하다고 볼 수 있다. 이 아미노산 대신에 tyrosine, tryptophane과 같은 aromatic 아미노산의

유도체가 발견되거나 합성된다면 흥미있는 결과가 얻어질 것으로 생각된다.

**p-Hydroxystyrylamine의 Olefine부분과 진정작용 발현**—CPA의 환을 구성하는 3요소인 한 개의 방향족 아민과 두 개의 아미노산 중에서 방향족 아민이 p-hydroxystyrylamine인 경우의 CPA는 모두 14환을 이룬다.<sup>6)</sup> p-Hydroxystyrylamine의 olefine부분이 환원되거나 산화되어 수식된 CPA는 진정작용이 감소하거나 소실한다. 예를 들면, sanjoinine-A의 olefine부분이 환원된 dihydrosanjoinine-A, 산화되어 -OCH<sub>3</sub>기가 부가된 sanjoinine-D, 산화되어 개환된 sanjoinine-G2는 모두 진정작용이 소실되거나 감소된다. 그러므로 p-hydroxystyrylamine의 olefine구조가 진정작용 발현에 관련된다.

**CPA의 소수성과 진정작용**—Sanjoinine-F는 sanjoinine-A의 leucine잔기의 C<sub>3</sub>에 수산기가 있는 것으로 그 외는 화학구조가 서로 같지만 극성 증가로 인하여 F의 진정작용이 현저히 감소하였다. Sanjoinine-D도 olefine부분에 -OCH<sub>3</sub>기의 부가로 인하여 극성이 증가된 결과로 진정작용이 감소된 것으로도 생각할 수 있다.

**Sanjoinine-A 및 -Ahl의 공간구조와 진정작용**—Sanjoinine-Ahl은 sanjoinine-A를 열처리하여 얻은 A의 epimer로서 A를 구성하는 아미노산 중에서 결사슬 아미노산인 N,N-dimethylphenylalanine만이 L형 (S)에서 D형 (R)으로 전환된 화합물이다.<sup>10)</sup> 이러한 configuration 차이로 Ahl이 A보다 진정작용이 3배 강하게 나타나므로 Ahl과 A의 conformation구조를 면밀히 분석하여 본 결과 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 N,N-dimethylphenylalanine의 phenyl기가 A에 있어서는 leucine의 isobutyl기와 접근하고 있는데 반하여 Ahl에서는 서로 멀리 떨어져 있으며 모체의 환으로부터 떨어져 있음을 알게 되었다.<sup>11)</sup>

**산조인의 수치(修治)와 진정작용**—산조인은 한방에서 정신신경 안정제의 목적으로 사용할 때는 열판에서 炒(修治과정)해서 사용하는 것이 관례이다. 어떤 한의서 중에는 산조인을 심신 �약으로 인한 과도한 불면증에도 쓴다고 하는데 이 때는 열처리하지 않은 것을 쓴다고 하였다.<sup>1-3)</sup> 또 다른 한의서에서는 산조인을 볶으면 수면효과가 증대되나 너무 높은 온도에서 열처리하거나 또는 열처리 시간이 길면 오히려 그 효과가 약화된다고 하였다.<sup>4)</sup>

산조인에서 단리한 APA계열 알칼로이드 중에서 수면시간 연장효과가 가장 큰 것이 nuciferine이었는데 대조약물로 사용한 chlorpromazine보다 2.5배 강하였다. 그런데 nuciferine을 가열하면 다소 약효가 떨어지는 lysicamine(대추에서 단리한 것과 동일)으로 전환된 후 곧 완전히 분해하였다.<sup>5)</sup> 이와는 달리 산조인에서 단리한 CPA계열 알칼로이드 중에서 sanjoinine-A가 비교적 함량이 많은데 이를 가열하면 진정효과가 3배 더 강한 sanjoinine-Ahl로 전환되면서 A와 Ahl이 평형을 이룬다. 다른 CPA도 열처리하면 epimer로 변하므로<sup>5)</sup> 이와 같은 근거로 볼 때 산조인을 수치지하지 않고 사용할 때는 산조인의 nuciferine과 sanjoinine-A가 주 성분으로 작용하는 것으로 생각되며 볶은 산조인의 경우 sanjoinine-A와 이것의 열평형 epimer인 -Ahl이 주 성분으로 작용하는 것으로 생각된다. 최근 저자 등은 sanjoinine-A 및 -Ahl이 세포내 Ca 이온결합 단백질인 calmodulin과 강하게 결합함을 밝혔는데,<sup>12)</sup> 이 결과로 보아 CPA는 단순한 수면연장 작용을 갖는 화합물이 아닌 것으로 추정하고 있다. 현재 sanjoinine-A를 합성 중에 있고 이것이 성공하면 여러가지 새로운 CPA도 합성될 수 있으므로 CPA의 구조와 활성 관계가 더욱 알려질 것으로 전망된다.

## 문 헌

- Huh, J.: Dong Eui Bo Gam, Namsandang Pub., Korea, p. 78 & p. 1216 (1981).
- Namba, T.: Coloured Illustrations of Wakan-Yaku, Boyuksa Pub., p. 321 (1980).
- Lee, H. S.: Folkmedicine, Gye-chuk munhwasa, Korea, p. 102 (1975).
- 陳存仁: 漢方醫藥大事全, 講談社, 日本, vol. 4, p. 36 (1982).
- Han, B. H. and Park, M. H.: Alkaloids are the sedative principles of the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosa*, *Arch. Pharm. Res.*, **10**(4), 203 (1987).
- Han, B. H., Park, M. H. and Park, J. H.: Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants, *Pure & Appl. Chem.*, **61**(3), 443 (1989).
- Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N.: Cyclic peptide and peptide alkaloids from seeds of *Zizy-*

- phus vulgaris*, *Phytochem.*, **29**(10), 3315 (1990).
- 8) Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N.: Arophine and tetrahydrobenzylisoquinoline alkaloids from the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinusus*, *Arch. Pharm. Res.*, **12**(4), 263 (1989).
- 9) Han, B. H. and Park, M. H.: Sedative activity and its active components of *Zizyphi fructus*, *Arch. Pharm. Res.*, **10**(4), 208 (1987).
- 10) Han, B. H., Park, J. H., Park, M. H., Han, Y. N. and Park, M. K.: Absolute configuration of sanjoinine-A (frangufoline) and its heat induced artifact: sanjoinine-Ahl, *Arch. Pharm. Res.*, **10**(3), 200 (1987).
- 11) Han, B. H., Park, J. H., Han, Y. N., Park, M. H. and Park, M. K.: Three-dimensional conformation of sanjoinine-A and its heat induced artifact, in manuscript.
- 12) Han, Y. N., Han, B. H., Kim, K. E. and Hwang K. H.: Binding of sanjoinine-A to calmodulin, in manuscript.