

## Piperlongumine 유도체 합성과 Aflatoxin B<sub>1</sub> 생성 억제 효과

이성은 · 최원식<sup>1</sup> · 이현상<sup>1</sup> · 이영행<sup>2</sup> · 박병수\*

서울대학교 농생명공학부, <sup>1</sup>순천향대학교 자연과학대학 유전공학과, <sup>2</sup>원광대학교 화학과

(2003년 5월 27일 접수, 2003년 9월 21일 수리)

필발 열매로부터 추출 및 분리한 piperlongumine (1-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]-5,6-dihydro-1H-pyridin-2-one)이 aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 생성억제에 있어서 탁월한 효과가 입증되어 3,4,5-trimethoxycinnamic acid (TMCA)를 모체로 하여 1-piperidin-1-yl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (1), 1-morpholin-4-yl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (2), 1-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (3), 1-(2-methylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (4), 1-(3-hydroxypiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (5), 1-[3-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)acryloyl]piperidin-2-one (6) 및 ethyl 1-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]piperidin-4-carboxylate (7)의 유도체를 합성하여 구조를 확인하고, 이 화합물들을 이용하여 AFB<sub>1</sub> 생성저해 효과를 측정하였다. *Aspergillus flavus* NRRL 2061로부터 생성되는 AFB<sub>1</sub> 생성저해에 대한 실험한 결과 모든 유도체 화합물에서 활성을 나타내었으며, 특히 화합물 (3)이 1000, 500, 250, 100 및 50 µg/ml에서 100, 95, 90, 53 및 10%의 생성저해를 나타냈다. 이러한 연구 결과 유도체 화합물 (3)은 항진균 독소제 개발을 위한 선도화합물로 이용하여 새로운 농약으로 개발이 가능할 것이라고 판단된다.

**Key words:** 필발, piperlongumine, 1-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propene, aflatoxin B<sub>1</sub>

### 서 론

후추나무과(Piperaceae)는 *Piper* 속에 속하고, 열대 및 아열대에 걸쳐 약 700종 이상이 존재하며 상업적, 경제적 및 의학적으로 가치가 있는 식물로 경제적으로는 세계 향료시장에서 후추 생산에 중요한 위치를 차지하며, 몇몇 종들은 지역적으로 원예용 관엽식물로 재배되고 있다.<sup>1)</sup> 최근 활발히 연구되고 있는 후추과(Piperaceae) 식물들은 열대지역에서 자생하는 식물으로써 고대 힌두교도의 천식과 만성 기관지염에 효과적인 기능성 약품으로 사용되어왔다.<sup>2)</sup> 지금까지 후추나무과의 식물에서 많은 화합물이 분리되어 졌으며<sup>3)</sup> 이 화합물들의 살충<sup>4)</sup> 및 살균활성,<sup>7)</sup> 모기유충에 대한 살충효과<sup>8)</sup> 연구가 수행되었다. 이들 중 piperlongumine은 구조적으로 3,4,5-trimethoxycinnamic acid (TMCA)를 모체로 하여 piperidine을 포함하고 있으며,<sup>9)</sup> 세포독성<sup>10)</sup> 및 진균독소인 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해 활성<sup>11)</sup>이 보고되었다.

진균독소(mycotoxin)는 식품 위생상의 큰 문제로 대두되고 있으며, 농산물의 생육기간, 저장 및 유통 중에 발생하는 곰팡이에 의해 생성되는 독으로서 열에 안정하여 조리과 가공 후에도 분해되지 않고, 이에 오염된 식품을 섭취한 사람이나 동물에게 다양한 암을 유발하는 것으로 보고되었다. 진균독소는 그 종류가 다양하며 현재까지 400여 종이 발견되었으며 이들의 대부분은 *Aspergillus*, *Fusarium*과 *Penicillium*속에 의해서 생성되고 있다. 1969년부터 1979년까지 WHO에서 간암 발생률이 높은 국가를 대상으로 섭취하는 주식의 aflatoxin B<sub>1</sub>의 함량을 측

정하여 10년간의 연구결과 기존의 간암 발생자수와 aflatoxin B<sub>1</sub>의 섭취량과의 관계에서 aflatoxin B<sub>1</sub>의 섭취량이 많은 나라에서 간암발생자의 빈도수가 높은 것으로 나타났다.<sup>12,13)</sup> 이러한 결과는 aflatoxin B<sub>1</sub>의 섭취량과 aflatoxin B<sub>1</sub>의 만성 중독과 간암 발생의 관계를 보여준 예이다.<sup>12,13)</sup> 진균독소로는 aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, GM<sub>1</sub> 및 P<sub>1</sub> 등 여러 종류가 알려져 있으며, aflatoxin M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>과 B<sub>2</sub>는 동물에서 대사 가능한 물질로 알려져 있다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 필발에서 분리·정제한 piperlongumine이 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성 저해 효과가 우수하다는 것이 입증되어 이 물질을 선도화합물로 이용하여 유도체를 합성하기 위하여 TMCA를 출발물질로 사용하여 그 구조의 카르복실기에 아민기, 아미드기, 카르복실기 및 각종 R기를 치환시킨 유도체들을 합성하여 곰팡이 독소인 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성억제 실험을 실시하였다.

### 재료 및 방법

**시약 및 기기.** 본 연구에 사용한 <sup>1</sup>H-NMR spectrophotometer는 Bruker AC-200 spectrometer(200 MHz)를 이용하여 내부 표준물질로 tetramethylsilane를 사용하였고 용매는 CDCl<sub>3</sub>를 사용하였다. UV spectrophotometer는 JASCO사의 V-550, 정량분석을 위해 사용한 HPLC는 SHIMADZU사의 LC-10AT, GC는 SHIMADZU사의 GC-17A와 GC/MS는 SHIMADZU사의 GC/MS-QP5050을 사용하였다. Aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해는 deep freezer와 배양기를 사용하였다. 본 연구에 출발물질로 사용된 TMCA는 Aldrich사 제품을 사용하였으며, piperidine, morpholine, 3,4-dimethylpiperidine, 2-methylpiperidine, 3-hydroxypiperidine hydrochloride, δ-valerolactam 및 ethyl

\*연락처자

Phone: 82-31-290-2412; Fax: 82-31-296-4421

E-mail: bsp67@hanmail.net

isonipicotate는 Aldrich사, Jannssen사, Fluka Chemical Co. 제품을 구입하여 사용하였다.

#### Piperlongumine 유도체들의 합성.

**1-Piperidin-1-yl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone(1)의 합성.** 25 ml 둥근 바닥 플라스크에 염화메틸렌을 5 ml 첨가하고, 온도를 0~5°C로 유지하여 트리에틸아민 0.7 ml (5.0 mmole)를 첨가한 후 0~5°C에서 10분간 교반하였다. 0~5°C에서 TMCA 1.0 g(4.2 mmole)을 첨가한 후 상온에서 10분간 교반하여 완전히 용해시킨 다음, 용액의 온도를 -10~-5°C로 조절하고 pivaloyl chloride 0.53 ml(4.3 mmole)를 가한 후 -10~-5°C에서 2시간 동안 교반하였다. 온도를 -20°C 이하로 조절한 후 piperidine 0.67 ml(6.8 mmole)를 첨가하고, 0~5°C에서 2시간 동안 반응시킨다. 반응액에 0.1 N HCl로 pH를 2.0으로 조절한 후 물을 15 ml 가하여 10분간 교반하고 유기층을 분리하고, 유기층을 무수 MgSO<sub>4</sub>로 탈수하고 여과 농축하였다. 이 농축물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 (1) 1.22 g (수득률: 92%)을 얻었다. 분자식: C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>; R<sub>f</sub>=0.56 (에틸아세테이트 : n-헥산 = 2 : 1); UV λ<sub>max</sub>(nm) = 236; Mass(m/z) 305, 306(M+1), 221(base peak); HPLC(%)=99.2; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 7.52(d, 2H, 2-H, 6-H), δ 6.8(d, 2H, 7-H, 8-H), δ 3.9(s, 9H, 3-H, 4-H, 5-H), δ 1.66(m, 10H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H).

**1-Morpholin-4-yl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone(2)의 합성.** TMCA 1.0 g(4.2 mmole)과 morpholine 0.67 ml(7.6 mmole)를 사용하여 화합물 (1)과 같은 방법으로 합성하여 얻은 농축액을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 (2) 1.16 g(수득률: 90%)를 얻었다. 분자식: C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>; R<sub>f</sub>=0.47 (에틸아세테이트 : n-헥산 = 2 : 1); UV λ<sub>max</sub>(nm) = 228; Mass(m/z) 307, 221(base peak); HPLC(%)=97.7; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 7.5(d, 2H, 2-H, 6-H), δ 6.7(d, 2H, 7-H, 8-H), δ 3.8(s, 9H, 3-H, 4-H, 5-H), δ 1.7(m, 10H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H).

**1-(3,5-Dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone(3)의 합성.** TMCA 1.0 g(4.2 mmole)과 3,5-dimethylpiperidine 0.67 ml(5.0 mmole)을 사용하여 화합물 1과 같은 방법으로 합성하여 얻은 농축액을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 (3) 1.05 g(수득률 : 75%)을 얻었다. 분자식: C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>; R<sub>f</sub>=0.74 (에틸아세테이트 : n-헥산 = 2 : 1); UV λ<sub>max</sub>(nm) = 234; Mass(m/z) 333, 221(base peak); HPLC(%) = 97.6; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 7.5(d, 2H, 2-H, 6-H), δ 6.7(d, 2H, 7-H, 8-H), δ 3.8(s, 9H, 3-H, 4-H, 5-H) δ 2.5, 1.6, 1.2(m, 6H, 9-H, 11-H, 13-H), δ 0.9(d, 6H, 10-H, 12-H)

**1-(2-Methylpiperidine-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone(4)의 합성.** 50 ml 둥근 바닥 플라스크에 염화메틸렌 20 ml를 첨가한 후 TMCA 1.0 g(4.2 mmole)을 넣고 상온에서 완전히 용해시킨 후, 용액의 온도를 -15~-10°C로 조절하고 2-methylpiperidine 0.6 ml(5.1 mmole)를 첨가하였다. 무수조건 하에서 10분간 교반한 후 DCC용액[N,N'-dicyclohexylcarbodiimide 0.95 g(4.6 mmole)에 염화메틸렌 2.0 ml를 가하여 용해]을 반응액에 첨가하였다. 동 온도에서 10분간 교반한 후 상온에서 7시간 동안 반응시키고, 5% NaHCO<sub>3</sub> 용액을 가하여 pH를 8.0으로

로 조절한 후 유기층만 분리하였다. 유기층에 물 200 ml를 첨가하여 10분간 강하게 교반시킨 다음 다시 유기층만 취하여 무수 MgSO<sub>4</sub>를 1.5 g 첨가한 후 30분간 교반하였다. 여과한 후 여액을 감압 농축하여 얻은 농축액을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 (4) 0.13 g(수득률: 84%)을 얻었다. 분자식: C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>; R<sub>f</sub>=0.5(에틸아세테이트 : n-헥산 = 2 : 1); UV λ<sub>max</sub>(nm) = 224; Mass(m/z) 321, 221(base peak); HPLC(%) = 94.1; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 7.5(d, 2H, 2-H, 6-H), δ 6.7(d, 2H, 7-H, 8-H), δ 3.8(s, 9H, 3-H, 4-H, 5-H), δ 1.9, 1.6 (m, 8H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H), δ 1.3(d, 3H, 13-H)

**1-(3-Hydroxypiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone(5)의 합성.** (1) TMCA 용액 제조. 50 ml 둥근 바닥 플라스크에 MC를 15 ml 첨가하고 온도를 0~5°C로 내린 다음 트리에틸아민 0.64 ml(4.6 mmole)를 가한 후 10분간 교반한다. TMCA 1.0 g(4.2 mmole)을 상온에서 첨가한 다음 10분간 교반하고 온도를 -10~-5°C로 내린 후 pivaloyl chloride를 0.52 ml(4.2 mmole) 가하고 -10~-5°C에서 30분간 교반하였다.

(2) 3-Hydroxypiperidine hydrochloride 용액 제조. 25 ml 둥근 바닥 플라스크에 3-hydroxypiperidine hydrochloride 0.46 g (3.3 mmole)을 가하고 isopropyl alcohol을 5 ml 첨가한 후 상온에서 30분간 교반하였다. 3-Hydroxypiperidine hydrochloride가 거의 녹았을때 트리에틸아민 0.71 ml(5.1 mmole)를 가하여 완전히 용해시켰다.

TMCA 용액에 3-hydroxypiperidine hydrochloride 용액을 -10°C 이하에서 서서히 가한 후 -10°C 이하에서 20분간 교반한 다음 상온에서 48시간 동안 교반하였다. 이 혼합물을 5% NaHCO<sub>3</sub> 용액으로 pH를 8로 조절하여 유기층만 취하여 물 25 ml를 첨가한다. 10분간 강하게 교반시킨 다음 유기층에 무수 MgSO<sub>4</sub> 처리 후 30분간 교반하고 여과하였다. 여액을 감압 농축하여 얻은 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 (5) 0.46 g(수득률: 34%)를 얻었다. 분자식: C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>; R<sub>f</sub>=0.23 (에틸아세테이트 : n-헥산 = 2 : 1); UV λ<sub>max</sub>(nm) = 236; Mass(m/z) 319, 320(M+1), 221(base peak); HPLC(%)=94.1; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 7.6(d, 2H, 2-H, 6-H), δ 6.6(d, 2H, 7-H, 8-H), δ 3.9(s, 9H, 3-H, 4-H, 5-H), δ 3.4(d, 1H, 12-H) δ 2.0 -1.8 (m, 4H, 11-H, 13-H), δ 1.7-1.5(m, 4H, 9-H, 10H).

**1-[3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl]piperidin-2-one(6)의 합성.** 50 ml 둥근 바닥 플라스크에 염화메틸렌 20 ml를 가하고 TMCA 1.0 g(4.2 mmole)을 상온에서 가하고 10분간 교반하였다. 완전히 녹은 TMCA 용액의 온도를 -10~-5°C로 조절하고, 다른 용기에 δ-valerolactam 0.458 g(4.6 mmole)을 염화메틸렌 2 ml를 가하고 온도를 -10~-5°C로 내린 다음 트리에틸아민 0.71 ml(5.1 mmole)를 가하여 -10~-5°C에서 10분간 교반시킨 용액을 TMCA 용액에 가하고 10분간 교반하였다. N,N'-dicyclohexylcarbodiimide 0.88 g(4.3 mmole)을 반응액에 가하고 -10~-5°C에서 10분간 교반한 후 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완전하게 진행된 후 물 25 ml를 반응액에 첨가하여 10분간 강하게 교반시킨 다음 유기층을 취하여 무수 MgSO<sub>4</sub> 처리 후 30분간 교반하고 여과하였다. 여액을 감압 농축하여 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 (6) 1.02 g

(수득률: 76%)을 얻었다. 분자식: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>; R<sub>f</sub>=0.39(에틸아세테이트 : n-헥산 = 2 : 1); UV λ<sub>max</sub>(nm)=232; Mass(m/z) 319, 320(M+1), 221(base peak); HPLC(%)=94.1; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 7.6(d, 2H, 2-H, 6-H), δ 6.6(d, 2H, 7-H, 8-H), δ 3.8(s, 9H, 3-H, 4-H, 5-H), δ 2.0 -1.6(t, 4H, 12-H, 9-H), δ 1.5-1.3(m, 4H, 10-H, 11-H).

**Ethyl 1-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]piperidine-4-carboxylate(7)의 합성.** 50 ml 둥근 바닥 플라스크에 염화메칠렌 20 ml를 첨가하고 TMCA 1.0 g(4.2 mmole)을 상온에서 첨가한 후 10분간 교반하여 완전히 녹였다. 이 TMCA 용액의 온도를 -10~-5°C로 내리고 ethyl isonipecotate 0.71 ml(4.6 mmole)를 첨가한 후 반응액에 질소가스를 주입하며 -10~-5°C에서 10분간 교반하였다.

N,N'-dicyclohexylcarbodiimide 0.883 g(4.3 mmole)을 반응액에 가하고 상온에서 48시간 동안 교반한다. 물 25 ml를 반응액에 첨가하여 10분간 강하게 교반하여 유기층만을 취하여 무수 MgSO<sub>4</sub>를 2 g 첨가한 후 30분간 교반하고 여과하였다. 여액을 감압 농축하여 얻은 혼합물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 (7) 1.14 g(수득률: 72%)을 얻었다. 분자식: C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>; R<sub>f</sub>=0.68 (에틸아세테이트 : n-헥산 = 2 : 1); UV

λ<sub>max</sub>(nm)=238; Mass(m/z) 377, 221(base peak); HPLC(%)=99.9; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 4.3(s, 2H, 13-H), δ 3.9(s, 9H, 3-H, 4-H, 5-H), δ 2.5 (m, 1H, 11-H), δ 2.0(t, 9H, 16-H, 9-H), δ 1.7(t, 5H, 14-H, 10-H), δ 1.3(m, 2H, 15-H).

#### Aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해 활성

**실험균주.** 본 실험에 사용한 균주는 *Aspergillus flavus* NRRL 2061로 미국농무성 북부지역 연구센터(USDA, Peoria, IL, USA)에서 분양 받았으며 동결건조된 균주는 agar-plate 배지에서 유지하였다.

**실험방법.** TMCA 유도체 화합물들을 PDA 배지에 첨가하고 멸균한 후 각각의 60 mm 페트리디쉬에 10 ml씩 넣은 후 평판고체배지에 약 200개의 *Aspergillus flavus* NRRL 2061 포자를 접종하고 30°C에서 7일간 배양시킨 후 aflatoxin B<sub>1</sub>의 정량분석을 위한 시료로 사용하였다. 대조군으로는 시료가 첨가되지 않은 PDA 배지를 사용하였으며 각 농도별로 3회 반복하여 실험하였다.

**Aflatoxin B<sub>1</sub>의 정량분석.** 각각의 평판배지를 50.0 ml의 메탄올로 추출한 후 1 ml를 취해 40°C에서 질소가스 주입 하에 농축하였다. 농축액을 200 μl의 n-헥산과 동량의 trifluoroacetic acid를 사용하여 상온에서 10분간 고정시키고 40°C에서 질소가

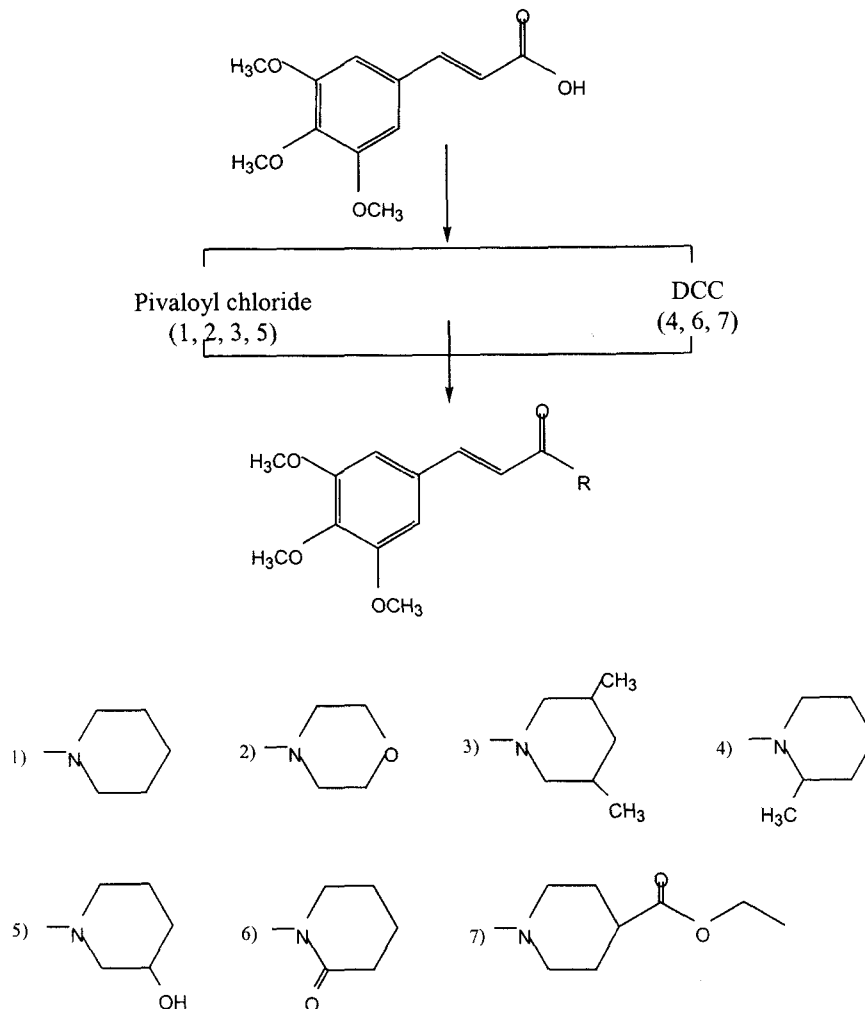


Fig. 1. Synthetic scheme of piperlongumine derivatives.

스 주입하에 재농축 하였다. 그 농축액을 1 ml의 H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (9:1) 혼합용매에 용해시킨 후 20 µl를 HPLC에 주입하였다. 사용된 HPLC의 이동상은 H<sub>2</sub>O:methanol:CH<sub>3</sub>CN(6:2:2), 1 ml/min 유속으로 50 mm guard column과 C<sub>18</sub> 5 µm microsorb column(4.6×250 mm) (Alltech Co. IL, USA)을 사용하여 용출시켰다. Excitation 365 nm, emission 455 nm에서 형광검출기를 사용하여 생성된 aflatoxin B<sub>1</sub>의 양을 측정하였다. Aflatoxin B<sub>1</sub>의 peak는 6.3분 부근에서 나타났다. *Aspergillus*

*flavus*에 의해서 생성되는 aflatoxin B<sub>1</sub>에 대한 시료의 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해 정도는 대조군에 대한 억제율(%)로 나타냈다. 억제율(%) 계산식은 식 1과 같다.

$$\text{억제율(\%)} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (1)$$

A는 대조군의 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성량, B는 시료 처리된 *Aspergillus flavus*에서 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성량이다.

**Table 1. Anti-aflatoxigenic activities of piperlongumine derivatives against *Aspergillus flavus***

Compounds	Conc. (µg/ml)	Aflatoxin B <sub>1</sub>	
		Production amount (µg/plate)	Inhibition (%)
Control		62.5±0.8*	
1	1,000	15.6±0.2*	75
	500	29.7±2.4*	52
	250	38.9±1.9*	38
	100	62.3±2.1*	0
	50	62.3±2.5*	0
2	1,000	10.4±0.8*	83
	500	21.3±1.2*	66
	250	32.4±0.7*	48
	100	45.1±1.8*	28
	50	59.4±2.1*	5
3	1,000	0.0±0.0*	100
	500	3.1±0.2*	95
	250	6.4±1.2*	90
	100	29.1±1.4*	53
	50	55.5±2.1*	10
4	1,000	12.6±2.1*	80
	500	27.2±1.2*	56
	250	40.7±2.5*	35
	100	57.5±2.3*	8
	50	62.6±2.2*	0
5	1,000	20.1±0.2*	49
	500	31.9±2.4*	26
	250	45.7±1.9*	26
	100	59.9±2.1*	3
	50	62.4±2.5*	0
6	1,000	29.4±0.8*	53
	500	40.6±1.2*	35
	250	56.7±0.7*	9
	100	62.0±1.8*	0
	50	62.1±2.1*	0
7	1,000	23.6±2.1*	62
	500	34.2±1.2*	45
	250	50.7±2.5*	19
	100	62.0±2.3*	0
	50	62.6±2.2*	0

<sup>1)</sup>1: 1-piperidin-1-yl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propanone; 2: 1-morpholin-4-yl-3-(3,4,5-trimethoxy phenyl)propanone; 3: 1-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propanone; 4: 1-(2-methylpiperidine-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propanone; 5: 1-(3-hydroxypiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propanone; 6: 1-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]piperidine-4-carboxylate; 7: ethyl-1-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]piperidin-2-one.

<sup>2)</sup>Amount of aflatoxin B<sub>1</sub> production is presented as means±S.E. (n=3).

\*P<0.05, \*\*P<0.01 as compared with the respective control.

<sup>3)</sup>Inhibition (%)=[(A)-(B)/(A)]×100

A: aflatoxin B<sub>1</sub> production of control %, B: aflatoxin B<sub>1</sub> production of sample %

## 결 과

**합성.** 새로운 piperlongumine 유도체들의 합성 방법은 Fig. 1에 나타내었다. TMCA의 카르복실기에 고리형 아마이드계열의 화합물을 치환시킨 유도체를 합성하였다. 화합물 (1),(2),(3) 및 (5)는 pivaloyl chloride을 이용하여 산무수물로 제조하고, 화합물 (4), (6) 및 (7)은 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide와 반응시킨 후 TMCA와 아실화 반응을 수행하여 새로운 piperlongumine 유도체 1~7을 합성하였다. 이들 새로운 piperlongumine 유도체들 (1)~(7)의 합성여부는 <sup>1</sup>H-NMR, GC, GC/MS 및 UV spectrophotometer를 이용하여 구조를 확인하였고, 분석용 HPLC를 이용하여 순도를 결정하였다.

**Aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해 활성.** 합성한 piperlongumine 유도체들의 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해 실험은 1,000, 500, 250, 100 및 50 µg/ml의 농도에서 실시하였으며 그 결과는 Table 1과 같다. 각 화합물들에 대한 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해를 1,000, 500, 250, 100 및 50 µg/ml의 농도로 실험한 결과, 화합물 (1)은 75, 52, 38, 0 및 0%, 화합물 (2)는 83, 66, 48, 28 및 5%, 화합물 (3)은 100, 95, 90, 53 및 10%, 화합물 (4)는 80, 56, 36, 8 및 0%, 화합물 (5)는 68, 49, 26, 3 및 0%, 화합물 (6)은 53, 35, 9, 0 및 0% 그리고 화합물 (7)은 62, 45, 19, 0 및 0%의 활성을 나타내었다. 합성한 유도체 중 화합물 (3) [1-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propene] 이 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성억제 효과가 가장 우수한 것으로 확인하였다.

## 고 찰

후추과 식물은 오래 전부터 위·치아 등의 통증과 천식과 만성 기관지염에 효과적인 기능성 약품들을 비롯한 여러가지 질병을 치료하기 위해 사용되어 왔으므로 전 세계적으로 후추과 식물의 이차대사산물들에 대한 많은 생리활성 연구가 수행되어져 왔다. 특히 국내에서는 한방 및 민간요법에서 두통, 신경통, 건위거담 및 비점막염증 등에 사용되어온 전통 민간 유래 천연 약용식물로 알려져 있다.<sup>14,15)</sup>

필발의 건조된 열매로부터 piperonaline, piperettine, pipereoctadecalidine 및 piperlongumine 같은 화학성분들이 Rao<sup>16)</sup> 등, Tabuneng<sup>17)</sup> 등, Ahn<sup>18)</sup> 등, Chatterjee와 Dutta<sup>19)</sup>에 의하여 보고되어졌고, 그 화합물들의 aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A 생성저해 활성은 Lee 등<sup>11)</sup>이 보고하였다. 따라서 필발 열매로부터 분리한 piperlongumine이 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해 효과가 입증되어, 본 연구에서는 piperlongumine을 선도물질로 이용하여 그 유도체들을 합성하고, piperlongumine과 그 유도체들의 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해실험을 실시하였다. *P. longum* L.로 부터 분리된 piperlongumine의 경우 1000, 500, 250, 100 및 50 µg/ml에서 100, 95, 90, 78 및 50%의 이상의 생성억제 효과를 나타내었으며, 합성한 유도체들 중에서 화합물 (3) [1-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-propene] 이 piperlongumine과 같은 농도에서 100, 95, 90, 53 및 10%로, piperlongumine과 aflatoxin B<sub>1</sub> 생성저해 효과가 유사하게 나타났다. 따라서 천연물에서 분리한 미량의 생리활성 물질에 대한

연구도 중요하지만 실생활에 이용하기 위해서는 대량생산이 필수적이고, 또한 그와 유사한 구조를 갖는 유도체들을 합성함으로써 선도물질로의 대체 가능한 비교실험도 더불어 수행하여야 한다. 본 연구에서는 생리활성 물질의 유도체를 합성하였고, 합성한 유도체가 선도물질과 유사한 생리활성을 나타냄을 확인함으로써, 천연물에서 분리한 생리활성 물질을 합성한 유도체로의 대체와 대량생산의 가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

## 참고문헌

1. Parmer, V. S., Jains, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E. and Boll, P. M. (1997) *Phytochemistry of the genus Piper: Phytochemistry* **46**, 597-673.
2. Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. (1933) In *Indian Medicinal Plants* vol. III, New Delhi, pp. 2128-2130.
3. Sengupta, S. and Ray, A.G. (1987) The chemistry of *Piper* species: a review. *Fitoterapia* **58**, 147-166.
4. Miyakado, M., Nakayama, M.I., Yoshioka, H. and Nakatani, N. (1979) The piperaceae amides I: structure of pipericide, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* L. *Agri. Biol. Chem.* **43**, 1609-1611.
5. Su, H. C. F. and Horvat, R. (1981) Isolation, identification and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. *J. Agri. Food Chem.* **29**, 115-118.
6. Tyagi, O. D., Jensen, S., Boll, P. M., Sharma, N. K., Bish, K. S. and Parmer, V. S. (1993) Lignans and neolignans from *Piper schmidti*. *Phytochemistry* **32**, 445-448.
7. Lee, S. E., Park, B. S., Kim, M. K., Choi, W. S., Kim, H. T., Choi, K. Y., Lee, S. G. and Lee, H. S. (2001) Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* **20**, 523-528.
8. Lee, S. E. (2000) Mosquito larvicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **16**, 245-247.
9. Boll, P. M., Hansen, J. and Simonsen, O. (1984) Synthesis and molecular structure of piplatine (=piperlongumine). *Tetrahedron* **40**, 171-175.
10. Duh, C. Y., Wu, Y. C. and Wang, S. K. (1990) Cytotoxicity pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescences*. *J. Nat. Prod.* **53**, 1575-1577.
11. Lee, S. E., Mahoney, N. E. and Campbell, B. C. (2002) Inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub> biosynthesis by piperlongumine isolated from *Piper longum* L. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 679-682.
12. WHO, Environmental health criteria (1979) Mycotoxin. *WHO Genera*.
13. Sieber, S. M., Correa, P., Dalgard, D. W. and Adamson, R. H. (1979) Induction of osteogenic sarcomas and tumors of the hepatobiliary system in nonhuman primates with aflatoxin B<sub>1</sub>.

- Cancer Res.* **39**, 4545-4554.
14. Lee, E. B., Shin, K. H. and Woo, W. S. (1984) Pharmacological study on piperine. *Arch. Pharm. Res.* **7**, 127-132.
  15. Shin, K. H. and Woo, W. S. (1985) Effects of piperine on hepatic microsomal mixed function oxidase system. *Kor. Biochem. J.* **18**, 9-15.
  16. Rao, J. M., Subrahmanyam, K. and Rao, K. V. J. (1974) Alkaloids from the fruits of *Piper auranticum* Wall. (Piperaceae). *Cur. Sci.* **43**, 76-77.
  17. Tabuneng, W., Bando, H. and Amiya, T. (1983) Studies on the constituents of the crude drug "Piperis Longi Fructus" on the alkaloids of fruits of *Piper longum* L. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 3562-3565.
  18. Ahn, J. W., Ahn, M. J., Zee, O. P., Kim, E. J., Lee, S. G., Kim, H. J. and Kubo, I. (1992) Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* fruits. *Phytochemistry* **31**, 3609-3612.
  19. Chatterjee, A. and Dutta, C. P. (1967) Alkaloids of *Piper longum* Linn. I. Structure and synthesis of piperlongumine and piperlonguminine. *Tetrahedron* **23**, 1769-1781.

---

### Synthesis of Piperlongumine Derivatives Isolated from *Piper longum* L. and their Inhibitory Activity on Aflatoxin B<sub>1</sub> Production

Sung-Eun Lee, Won-Sik Choi<sup>1</sup>, Hyun-Sang Lee<sup>1</sup>, Young-Haeng Lee<sup>2</sup> and Byeoung-Soo Park\* (<sup>8</sup>*School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea; <sup>1</sup>Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam, 336-745, Korea; <sup>2</sup>Department of Chemistry, Wonkwang University, Iksan-si, Chonbuk 570-749, Korea*)

**Abstract:** Anti-aflatoxic studies on synthetic pyridone alkaloids were conducted. Seven derivatives using piperlongumine as a leading compound were prepared from 3,4,5-trimethoxycinnamic acid (TMCA). These derivatives were analyzed for their structural confirmation and purity by HPLC, GC, GC/MS and <sup>1</sup>H-NMR. 1-piperidin-1-yl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (**1**) reaction with piperidine; 1-morpholin-4-yl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (**2**) with morpholine; 1-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (**3**) with 3,5-dimethylpiperidine; 1-(2-methylpiperidine-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (**4**) with 2-methylpiperidine; 1-(3-hydroxypiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propenone (**5**) with 3-hydroxypiperidine hydrochloride; 1-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]piperidin-2-one (**6**) with δ-valerolactam; and ethyl 1-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl]piperidine-4-carboxylate (**7**) with ethyl isonipectotatate were synthesized respectively. All derivatives showed an inhibitory activity on aflatoxin B<sub>1</sub> production. In conclusion, we believe that they might be an agent for the control of mycotoxin in agricultural commodities.

---

Key words: *Piper longum* L., piperlongumine, 1-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propene, aflatoxin B<sub>1</sub>

\*Corresponding author