

韓國產 *Aristolochia* 屬 식물의 성분 연구(I)

鄭 普 燮

서울대학교 약학대학 약용식물학교실

Studies on the Components of the Genus *Aristolochia* Plants in Korea(I)

Bo Sup CHUNG

Department of Pharmaceutical Botany, College of Pharmacy, Seoul National University
Seoul, Korea

The stems of *Aristolochia manshuriensis* KOMAROV collected in Kang-won-do, Korea, have been shown to contain aristolochic acids I and II and debilic acid. β -Sitosterol and the ester of linolic acid were isolated from the petroleum ether: ether(1:1) extracts of the stem by using column chromatography.

서 론

*Aristolochia*속 식물은 우리나라에 2종 자생되고 있으며 그중 *Aristolochia manshuriensis*는 江原, 慶南北一帶에 많이 分布되어 있는 낙엽 활엽 관목이다. 이 植物의 줄기는 民間에서 甘草의 代用으로 쓴다고 하며(江原) 그밖에 虫毒 및 酒毒등의 解毒에 쓰인다⁷⁾ 中國에서는 木通이라 稱하며 利尿, 淋疾, 腫瘍 등에 使用되고 있다^{1,2,15,16)}.

이 植物의 成分 研究에 대하여는 1958년에 Hsü가 처음으로 「Mu-Tongnen-A」라는 物質을 分離했으나 이 物質이 現在 알려져 있는 aristolochic acid I (AA-I)과는 示性式이나 용점 등으로 보아 전혀 相異한 物質이었으며 그후 1964년 다시 이 物質이 aristolochic acid임을 立證했다고 Hsü가 보고했으나^{1,2,13)}, 詳細한 報文은 入手하지 못하였다. 歐州産인 *A. clematidis*에서는 AA-I 및 -II등이 分離되었으며 이에 대한 藥理作用도 밝혀진 바 있다^{3,4,5,8,12)}. 著者は 이 植物의 用途에 興味를 느껴 많이 研究된 바 있는 *A. clematidis*(草本性)의 成分 其他 藥理作用 및 抗菌効果등을 비교 검토하고 또 이 植物에서는 전혀 연구된 바 없는 精油成分을 分離할 目的으로 이 研究에 着手하였다.

실험방법 및 결과

1) 실험재료

1972년 11월 강원도 정선지방에서 채집한 標本을 절단해서 陰乾시키고 分쇄하였다. petroleum ether-ethyl ether(1:1)로 2週間 冷浸하여 黃褐色액기스 약 4.8%를 얻었다.

액기스의 酸價 및 鹼化價를 測定하니 각각 20 및 52.11을 나타냈다. 酸價 및 鹼化價의 測定은 毒藥 實驗(7)에 준하였다.

2) Column에 의한 액기스의 分析

精油成分을 分離할 目的으로 다음 Scheme I과 같이 처리하여 acid fraction, hydrocarbons 및 alcohol류, 그리고 carbonyl fraction으로 區分했다. Scheme I과 같이 처리한 결과 crude extract에 대한 含量比는 acid fraction이 15%, hydrocarbon류가 80%, 그리고 carbonyl fraction이 2%이었다. 이中 炭化水素類 및 alcohol류가 大部分을 차지 하였으므로 이 部分을 column으로 分離하여 8종의 fraction을 얻었으며 다음 Table I에 表示된 바와 같이 fraction No. 5와 8에 대해서 mass, IR, NMR등의 spectral data에 의해서 ester 및 β -sitosterol로 推定되는 物質을 분리하였다 (Table II).

Scheme I. Isolation procedure.

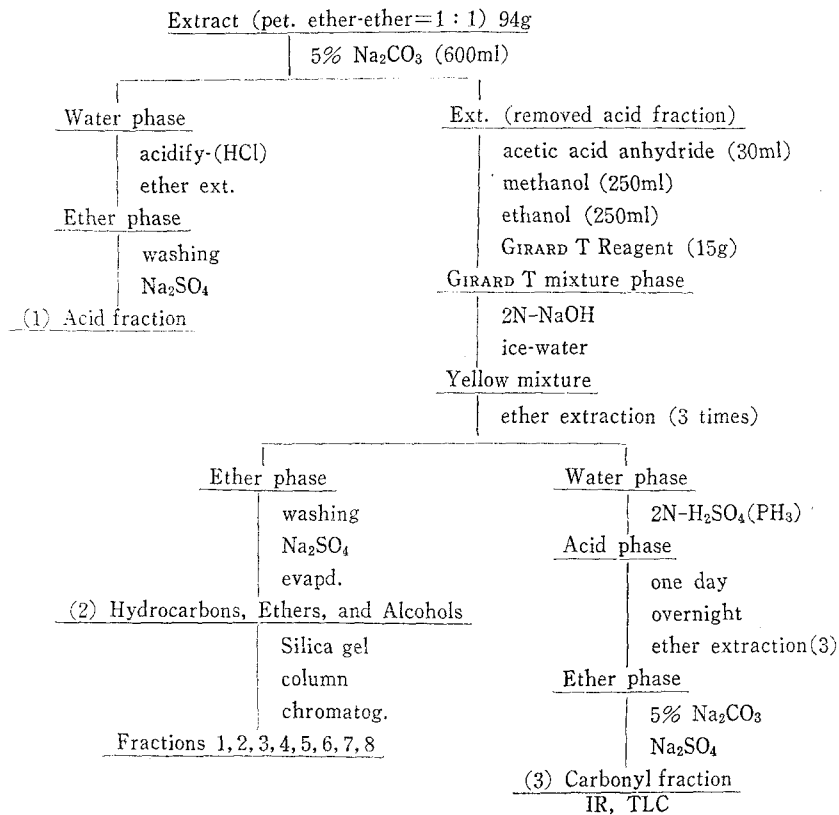


Table I. R_f values and coloration of the fractions.

Fraction No.	1	2	3	4	5	6	7	8
R _f value	0.85	0.83	0.3	0.3	0.1	0.05	0.05	start(99+3)
Coloration	orange-red	red-violet	dark-red	red-violet	red-violet	dark-red	dark-red	violet(solid)

Adsorbent=Kiesel gel 60 (0.063~0.200mm), Ext.=10g, Column ϕ=3cm, length=2m,
Solvent system=hexane-ethylacetate(99:1), Coloring reagent=anisaldehyde+H₂SO₄.

위에서 각각 얻은 fraction은 이미 *Aristolochia*속 식물에서 terpenoids로서 報告된 바 있는 α-pinene, cadinene borneol, α-terpineol, methylonylketone, camphor, aristolone등과 R_f値를 비교했으나 이들 중에서 다만 aristolone과 R_f値 및 呈色反應이 一致되었을 뿐이다.

그리고 比較的 量이 많은 fractions 3, 4, 5 및 8에 대하여는 각각 그 spectroscopy를 測定하여 linolic acid의 ester 및 β-sitosterol임을 확인했다.

測定에 使用된 UV spectrometer는 DMR 21(Zeiss), IR는 457 (Perkin-Elmer), NMR spectrometer는 A₆₀ (Varian), mass spectrometer는 RMU-6D(Hitachi-Perkin-Elmer: ion source 200°C, 70/eV)이었다.

각 fraction에 대한 spectral data는 다음과 같다.

Fract. 3=²⁰n_D=1.5280

IR spectrum (film): ν=1735(s), 1170(m)

NMR spectrum(CDCl₃): δ(ppm)=5.3(m), 1.8(s), 1.4(s), 1.1~0.9(m)

Fract. 4=IR spect. (film): ν=1735(s) MW 220 (mass)

Fract. 5=IR spect. (film): ν=1745(s), 1160(m)

위의 결과로 보아 1745(s)와 1160(m)는 포화 olefin 산의 ester(-CH₂-C=O-OR)의 특징을 나타내는 band로 사료된다. Fract. 5는 다시 alcoholic KOH 10m/l로 진탕해서 petroleum ether-ether(1:1)로 진탕시켜 alkali fraction을 얻고 다시 水層을 0.5N HCl로 진탕

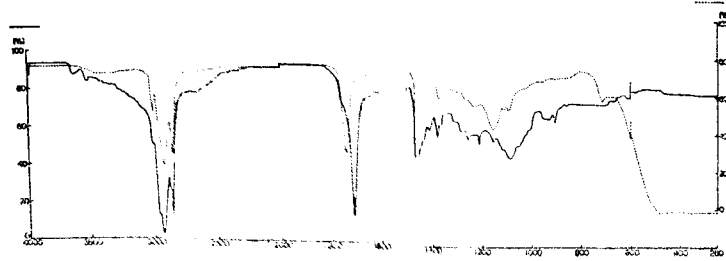


Fig. 1. Comparison of IR spectra between fraction 5 and its recovered fraction of the saponified products.
: fraction 5.
 —: recovered fraction of the saponified products.

시켜 酸性으로해서 petroleum ether-ether(1:1)로 추출
 해서 물로 세척 건조하여 얻은 物質의 IR를 측정하고
 비교한 것은 다음과 같다 (Fig. 1 참조.)

NMR spectrum δ (ppm)=0.9 ($-\text{CH}_3$, 3H)
 δ (ppm)=1.22 (CH_2)n, δ (ppm)=1.8~2.4($-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$,
 $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$, 8H) δ (ppm)=2.8 ($-\text{CH}_2-$, 2H)

δ (ppm)=4.25 ($-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{COR}$, -2H) δ (ppm)=
 5.38($-\text{CH}=\text{CH}-$, 4H)

이 결과를 종합해 볼때 해당하는 構造式은 CH_3-
 $(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ 로
 추정된다. 또한 molecular ion peak에 의해서도 分子量이
 linolic acid의 ester에 해당하는 278을 인정할 수 있다.

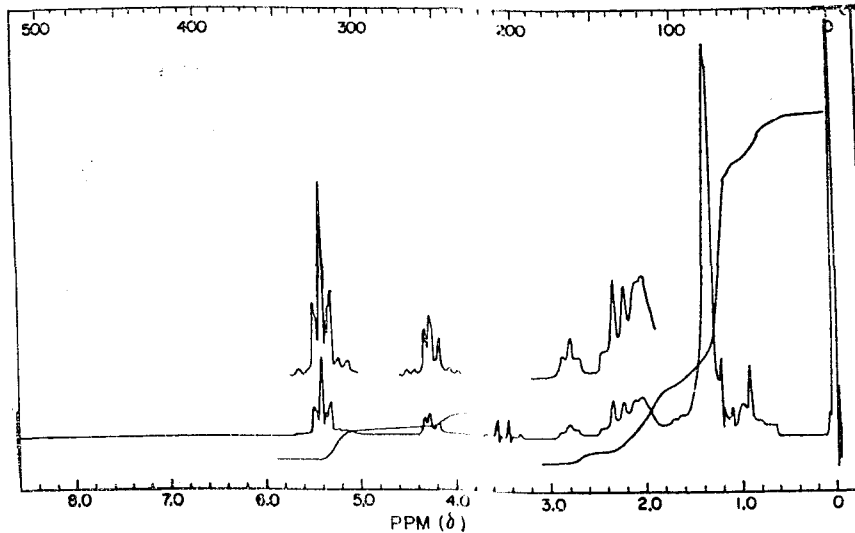


Fig. 2. NMR spectrum of fraction 5.

Fract. 8은 白色의 固形物質이 있으며 mp 135°, SAL-
 kowski反應 陽性, IR 및 Mass spectra 測定결과는 다음
 과 같다.

IR spect. (KBr)=3410, 1650, 1465, 1380, 1051,
 1018, 955, 878, 838 cm^{-1}

Mass spectrum M^+ 414

m/e 396, 303, 255, 231, 213, 199, 161, 155, 147,
 145, 119, 107의 fragment ion을 볼 수 있다. 以上의 反
 應 및 spectral data를 綜合 分析 할때 β -sitosterol이라
 추정된다, M^+ 414는 β -sitosterol의 分子量과 一致된다.

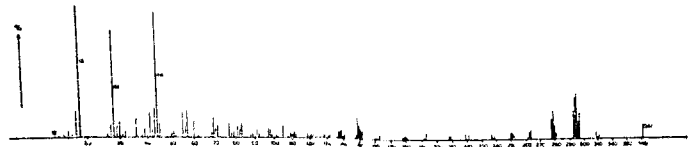


Fig. 3. Mass spectrum of isolated AA-I by Scheme II-B.

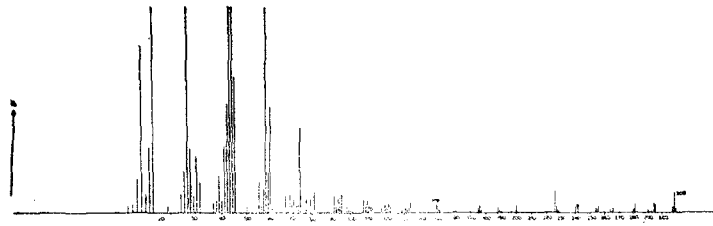


Fig. 4. Mass spectrum of isolated AA-II by Scheme II-B.

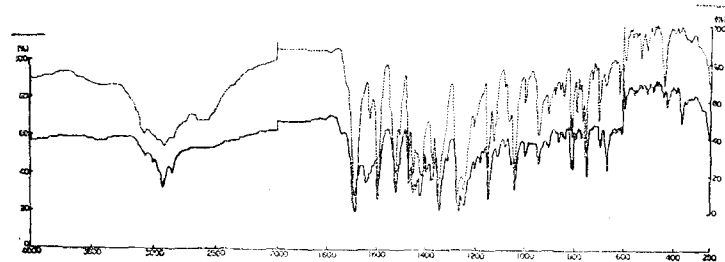


Fig. 5. IR spectra of aristolochic acid I.

— : isolated A. acid. : standard A. acid.

3) Aristolochic acid의 分離 및 定量

Scheme II (A and B)

<p>A) Material (200g)</p> <p>↓ ½N-KOH</p> <p>Alkali phase</p> <p>↓ HCl (pH 2~3)</p> <p>ethyl acetate</p> <p>Ethyl acetate phase</p> <p>↓ Na₂SO₄</p> <p>evapd,</p> <p>Crude crystal</p> <p>↓ TLC</p> <p>methanol</p> <p>Crystal</p>	<p>B) Material(300g)</p> <p>↓ 0.5% H₂SO₄ (PH₃)</p> <p>CH₂Cl₂</p> <p>Methylene chloride phase</p> <p>↓ 2% NaOH</p> <p>dil. H₂SO₄</p> <p>Residue</p> <p>↓ dimethylformamide</p> <p>add water</p> <p>ice box</p> <p>Crude crystal (orange)</p> <p>↓ TLC</p> <p>Me OH recryst.</p> <p>Crystal (B)</p> <p>mp 275~276°</p>
--	--

分離法(A)에 의한 結晶은 展開溶媒로서 benzene, methanol, acetic acid (85:10:5)에 의해서 전개시켜 Rf值 0.65 部位의 單一層 部分을 取해서 methanol에 溶出시킨 것이다. 이미 알려져 있는 AA-I과는 mp가 一值되지 않았고 다만 IR spectrum에서 λ_{max}^{MeOH} μ :5.93 (C=O), 1560(s), 1350(s)에서 C-NO₂ radical의 강한 吸收 band만 인정될 뿐이었다.

分離法(B)에 의하여 얻은 結晶은 mp 275~6°로 文獻記載와 一致되며 UV, IR의 spectrum 특징으로는 표준(aristolochic acid의 Na鹽의 加水分解物)과 一致되지

는 않았으나 다만 UV λ_{max} $m\mu(e)$: 390nm에서 最大 吸收, NMR spectrum에 있어서는 δ :7.5에서 benzene-ring, δ :6.35 ethylene dioxide, δ :4.85에서 CH₃-O-Ar를 인정할 수 있고 mass spectrum에서는 分子量의 341의 molecular ion peak를 나타내어 AA-I의 分子量과 一致됨을 알수 있었다(Fig. 3 and 4). 그리고 IR spectrum에 있어서는 표준과 거의 一致되는 吸收 band를 나타내고 있다 (Fig. 5). 그러나 本物質도 TLC에 의해서 분리하면 3~4個의 spot를 나타내므로 單一物質이 아님을 예측하게 된다 (Fig. 6).

가) 定量: 方法(B)에 준해서 추출하고 따라서 UV로 定量했다. 재료 10g를 formic acid와 CH₂Cl₂ (1%) 100ml로 완전히 침출하고 여액 0.2ml를 取해서 preparative TLC에 의해서 분리시키고 이것을 methanol 5ml에 녹히고 이것의 0.5ml를 cuvette(ml)에 넣어 UV로 定量하여 다음과 같이 산출하였다(extinction coefficient; 5939, E=0.30).

$$C_{Mol} = \frac{0.30}{5939} [\text{Mol } l^{-1}] = \frac{3 \cdot 10^{-1}}{5939 \cdot 10^{-3}} = 0.5 \cdot 10^{-4} \text{ Mol } l^{-1}$$

$$C = 0.5 \cdot 341 \cdot 10^{-4} g \ l^{-1} = 170 \cdot 10^{-4} g \ l^{-1} = 1.7 \cdot 10^{-2} g \ l^{-1}$$

$$5ml \text{ 中에는 } \frac{1.7 \cdot 10^{-2} \cdot 5}{1000} = 8.5 \cdot 10^{-4} g$$

$$0.1g \text{ 재료중에는 } 8.5 \cdot 10^{-4} g, 1g \text{ 에는 } 8.5 \cdot 10^{-4} \times 10 = 8.5 \cdot 10^{-3} = 0.085\%$$

4) Methyl ester의 生成

50ml의 후라스크에 toluenesulfomethyl nitroamide를 取하고 ether를 넣고 完全히 녹인다.

Table II. R_f values and mass spectra of methyl ester.

Adsorbent	R _f value		Mass spectrum m/e
	Kiesel gel GF ₂₅₄	Al ₂ O ₃ GF ₂₅₄	
Solvent:	Benzene-acetone(98+2)	Benzene	()=Weak intensity
A-acid II Me-ester	0.50~0.55	0.40~0.44	325, 294, 279, 264, 250, 236, 208
Debilic acid Me-ester	0.50~0.55	0.40~0.44	(369), (338), 323, 308, 293
A-acid I Me-ester	0.42~0.45	0.35~0.36	355, 324, 309, 294, 279, 266, 251, 238, 154
Unknown	0.30~0.35	0.28~0.29	414, 412, 400, 398, 340, 323, 293, 284, 279, 256

여기에 비등석을 넣고 5% KOH 10ml를 注入한다. 이때 미리 준비한 ice bath에서 과잉 발열을 억제시킨 다음 수욕상에서 水溫을 40°로 유지시키면서 反應시켜 ether와 같이 증류되는 CH₃N₂로 ether에 物質 20g을 녹인 受器中에서 약 20分間 反應시켰다. methyl化 生成與否는 표품과 같이 R_f value로 비교 고찰했으며 反應受器는 장치로부터 分離시킨 다음 室溫에서 1日間 放置시킨 다음 試料로 사용하였다.

가) Methyl ester의 TLC

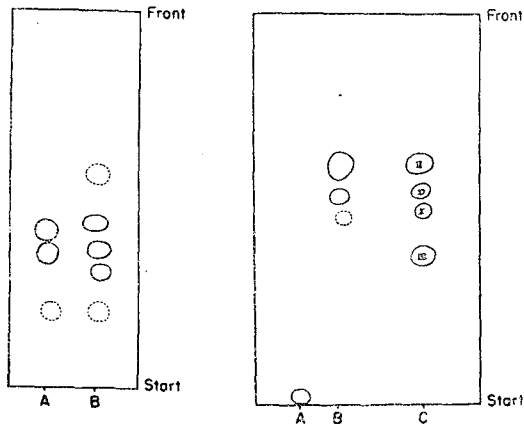


Fig. 6

Adsorbent : Kiesel gel GF₂₅₄ Solvent : benzene-acetone (98 : 2)
 A : A-acid (St.) B : methyl ester of A-acid (St.)
 Adsorbent : Al₂O₃ 254 Solvent : benzene
 A : A-acid (St.) B : methyl ester of A-acid (Ext.)
 C : methyl ester of isolated A-acid

결론

1) 한국산 등침을 분쇄하여 pet. ether-ether (1 : 1)로 냉침하고 여과 농축한 extract를 다시 GIRARD T reagent로 처리해서 세가지 fraction으로 구분했다. 이들 중에서 大部分을 占有하는 炭化水素類를 column으로 分離해서 8개의 fraction을 얻고 fraction 5 및 8에 대하여

는 spectroscopic data에 의해서 linolic acid의 ester로 사료되는 物質과 β-sitosterol을 분리 확인했다.

2) phenanthrene 母核에 NO₂基를 갖는 有機酸의 一種인 aristolochic acid I과 II 및 debilic acid를 분리 확인했다. 이 植物에서는 aristolochic acid II와 debilic acid가 현재까지 報告된 바 없으므로 이를 추가보고하는 바이다.

사 의

이 研究는 서독 국가장학금 DAAD 의 장학기금에 의해서 서독 Münster대학교 약화학연구소에서 이루어졌으므로 관계 당국에 감사를 드리며 아울러 협조해 주신 동대학의 Prof. Dr. SCHULTE 및 Prof. Dr. G. RÜCKER에게 감사를 드리는 바이다.

<1974. 8. 30 접수>

문헌

- Hsü, C.F. : *Hua Hsüch Pao* 22, 144(1956); ref. C.A. 52, 6715 (1968).
- Hsü, C.F.: *Hua Hsüch Pao* 25, 40 (1959); ref. C.A. 54, 17792 (1960).
- GANSHIRT, H.: *Pharmazie* 8, 584 (1953).
- GIRARD, A. und SANDULESCO, G.: *Helv. chim. Acta* 19, 1095 (1936).
- HEGNAUER, R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*, 3, 184, Birkhäuser Verlag, Basel, (1964).
- CHÜN, H.K. et al: *Yao-ts'ai hsüch (Drogenkunde)*, Remin weisheng ch'u-pan-sha, Peking, (1961).
- LEE, S.J.: *Korean Folk Medicine*. Seoul National University Press, (1965), p. 47.
- MÖSE, J.R, and PORTA, J.: *Arzneimittelforschung* 24, 52 (1974).
- ORZECOWSKI, G.: *Dtsch. Apoth.* 17, 347 (1965).
- PATT, P.: *Arzneimittelforschung* 15, 90 (1965).

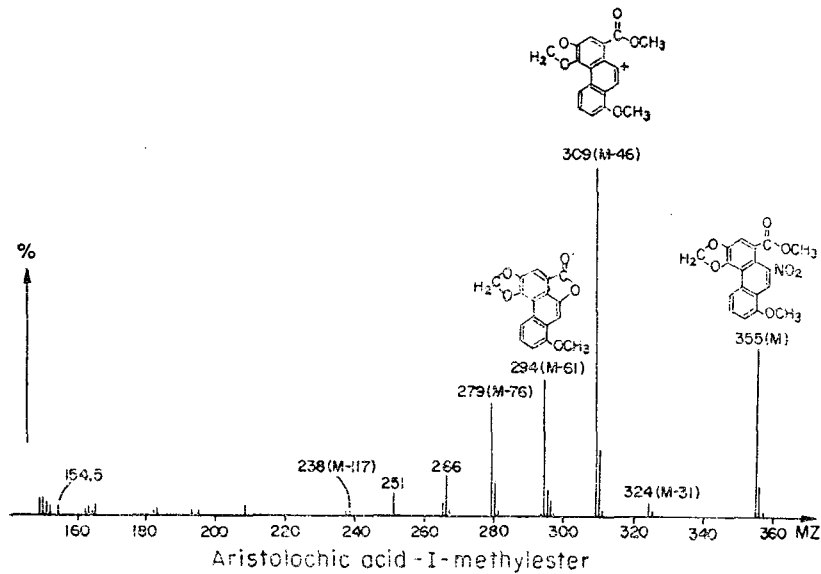


Fig. 7. a) Mass spectrum of A-Acid I methyl ester.

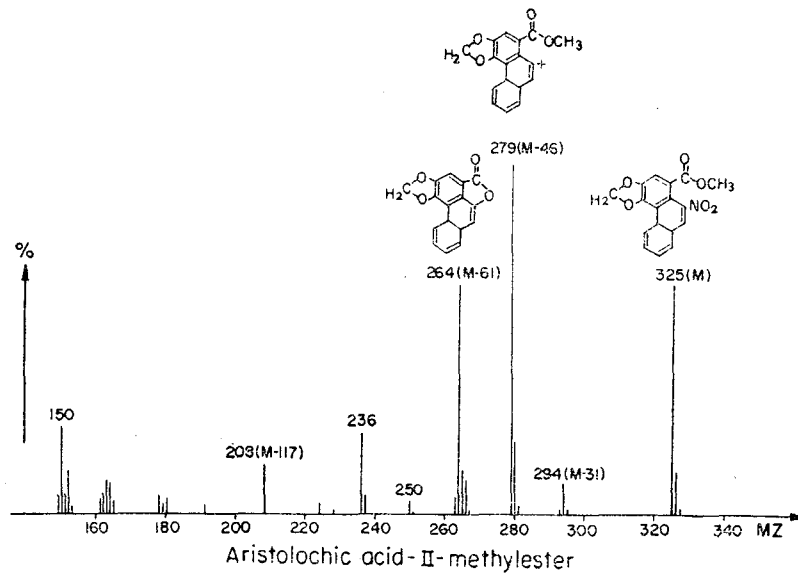


Fig. 7. b) Mass spectrum of A-Acid II methyl ester.

- | | |
|---|--|
| 11) PAILER, M., Bergthaller, P. and SCHADEN, G.:
<i>Monatsh. Chem.</i> 96, 864 (1965). | 14) SMOLENSKI, S.J., SILINIS, H. and FARNSWORTH, N.R.:
<i>Lloydia</i> 36, 359 (1973). |
| 12) SCHUNACK, W., MUTSCHLER, E. and ROCHELMMEYER,
H.: <i>Pharmazie</i> 20, 685 (1985). | 15) KU, Y.T. and TSENG, K.F.: <i>K'ohsüch T'und Pao</i>
1957, 761. |
| 13) SCHUNACK, W., MUTSCHLER, E. and ROCHELMMEYER,
H.: <i>Pharmazie</i> 22, 118 (1967). | 16) 中國衛生出版社:「葯材學」, pp. 271~273 (1959). |