

진범의 새로운 Aromatic Amide 성분

李 炫 宣 · 安 榮 國 · 韓 大 錫

서울대학교 약학대학

A New Aromatic Amide from the Roots of *Aconitum pseudolaeve* var. *erectum*

Hyun Sun Lee, Young Kook Ahn, and Dae Suk Han

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

Abstract—A new aromatic amide isolated from the hexane soluble fraction of the root of *Aconitum pseudolaeve* var. *erectum* has been characterized as methyl-N-(2-acetaminobenzoyl) anthranilate on the basis of spectroscopic data, and a monoglyceride was also isolated and identified as glycerol-1-hexadecanoate from the fraction.

Keywords—*Aconitum pseudolaeve* var. *erectum* · Ranunculaceae · aromatic amide · methyl-N-(2-acetaminobenzoyl) anthranilate · monoglyceride · glycerol-1-hexadecanoate

진범(*Aconitum pseudolaeve* var. *erectum* Nakai)은 숲속의 그늘에서 자라는 多年草로서, 그 뿌리는 鎮痛 및 鎮痙藥으로 사용되고 있으며, 유연식물로는 흰진범(*Aconitum longicassidatum* Nakai)과 줄오독도기(*Aconitum pseudolaeve* Nakai var. *voluble* Nakai)가 보고 되어 있다.^{1,2)} 저자는 前報에서 진범지하부의 alkaloid분획으로부터 lycoctonine type의 C₁₉-diterpene alkaloid인 lycoctonine, septentriodine, avadharidine과 aromatic amide인 methyl-N-(3-carbamoyl propionyl) anthranilate를 분리 보고한 바 있으며, 또한 진범지하부의 수침액과 냉침액에 대한 급성독성시험을 행하여, 中國産 秦艽의 기원식물인 *Gentiana*속 식물과는 전혀 다른 *Aconitum*속 식물인 진범을 동일한 용도로 사용하고 있어 이에 대한 독성 및 임상적 효능의 세밀한 검토후 사용을 지적한 바 있다.^{3,4)}

계속적인 연구로서 진범지하부의 n-hexane 분획으로부터 천연에서 새로운 aromatic amide 성분인 methyl-N-(2-acetaminobenzoyl) anthranilate와 monoglyceride 성분을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 방법

실험재료 및 기기—진범은 1986년 9월 강원도 태백시부근 산지에서 지하부를 채집하여 음건후 조말로 하여 사용하였다. 용점은 Gallenkamp melting point apparatus를 사용하여 측정했으며, IR spectrum은 Beckmann IR-20A spectrophotometer를 사용하여 KBr disc법으로 측정하였고, UV spectrum은 LKB(Biochrom) Ultra-spec 4050UV spectrophotometer를, NMR spectrum은 TMS를 내부표준물질로 하여 Bruker WP-80SY 및 Bruker AM-200-SY spectrometer를 사용하였고, MS spectrum은 Hewlett-packard model HP5985B GC/MS system을, 원소분석은 Perkin-Elmer 20C elemental analyser를 사용하였다.

추출 및 분획—진범지하부 17 kg을 조말로 하여 MeOH 30 l씩 3회(1회 48시간) 실온에서 추출하였다. 추출액을 45° 이하에서 농축한 후 n-hexane으로 추출하여 n-hexane 분획을 얻었다. 이 분획 55 g을 n-hexane : EtOAc(15 : 1) 용매

로부터 시작하여 10:1, 5:1, 3:1, 1:1까지 순차적으로 용매극성을 증가시키면서 silica gel column chromatography를 행하여 3개의 분획 fr. 1, fr. 2, fr. 3을 얻었다.

Compound I의 분리—Fr. 2를 n-hexane: EtOAc (3:1) 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 Rf 0.36에 해당하는 분획으로부터 mp 178~180°, 무색주상결정(n-hexane+EtOAc) 120 mg을 얻었다. 이 물질은 anisaldehyde-H₂SO₄에 노란색으로 발색되며 10% H₂SO₄에는 발색되지 않았다.

Anal. Calcd. C₁₇H₁₆N₂O₄; C, 65.38, H, 5.13, N, 8.97; Found: C, 65.56, H, 5.20, N, 9.07; UV, λ_{max}(EtOH): 316, 260, 226 nm; IR, ν_{max}^{KBr}: 3325, 3245 (-NH-), 1690, 1660 (carbonyls) 1610, 1580, 1520, 1430, 1300, 1280, 760 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ: 2.22(3H, s, NHCOCH₃), 3.96(3H, s, CO₂ Me), 7.13~7.26(2H, m, H-5 and H-5'), 7.49~7.69 (2H, m, H-4 and H-4'), 7.87 (1H, dd, J=1.2 and 8 Hz, H-6), 8.10(1H, dd, J=1.6 and 8 Hz, H-6'), 8.67(1H, d, J=8.6 Hz, H-3'), 8.77(1H, d, J=8.4 Hz, H-3), 11.2 (1H, bs, >NH), 12.0(1H, bs, >NH); ¹³C-NMR and APT spectrum (CDCl₃, 50 MHz): Table I 참조; MS, (70eV) m/z(rel. int.): 312(M⁺, 0.6), 162(33.9), 151(100), 120(53.8), 119 (43.3), 92(31.3), 91(4.5), 43(40.7).

Compound I의 알칼리가수분해—Compd. I 30 mg에 5% methanolic KOH 5 ml를 가하고 수욕상에서 1시간동안 반응시켰다. 이 반응액을 농축하고 10 ml의 냉수를 가하여 N-HCl로 pH 3으로 한후 CHCl₃로 3회(1회 10ml) 추출하고 농축하였다. 이를 MeOH로 재결정하여 백색의 침상결정(mp. 214~216°)인 Compd. I-a를 얻었다.

IR, ν_{max}^{KBr}: 3400, 3200 (>NH), 3440~2440 (COOH), 1690 (ester carbonyl), 1660 (amide carbonyl), 1610, 1582, 1538, 1450 (aromatic system), 1240, 758 cm⁻¹; ¹H-NMR(C₆D₆N, 80 MHz) δ: 2.2(3H, s, NHCOCH₃), 7.0~7.7 (4H, m, H-4, 5, 4', 5'), 8.13(1H, dd, J=7.8 and 1.4 Hz, H-6), 8.50(1H, dd, J=7.8 and

1.6 Hz, H-6'), 8.95(1H, d, J=8.3 Hz, H-3'), 9.12(1H, d, J=8.3 Hz, H-3), 11.5(1H, bs, -NH), 13.2 (1H, bs, COOH); MS, (70eV) m/z(rel. int.): 298(M⁺, 0.6), 280(14.5), 235 (46.5), 162(50.0), 146(56.1), 137(100), 120 (65.0), 119(75.1), 92(62), 91(14).

Compound II의 분리—Fr. 3을 n-hexane: EtOAc(3:1) 용매로 SiO₂ column chromatography를 실시하여 백색무정형의 물질 98 mg을 얻었다. 이 물질은 10% H₂SO₄에 적갈색으로 발색되었다.

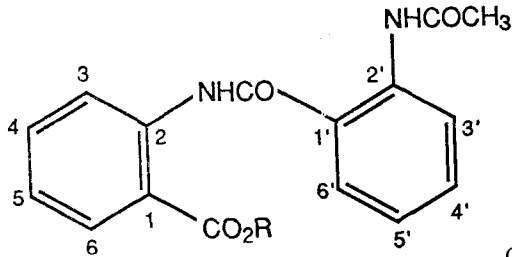
IR, ν_{max}^{KBr} cm⁻¹; 3320(OH), 1735 (ester carbonyl), 1475, 1398, 1225, 1200, 1180, 720; ¹H-NMR (CDCl₃, 80 MHz) δ: 0.88(t, -CH₂-CH₃), 1.26(methylene protons), 2.34(-COCH₂-), 3.65(-CH₂OH), 3.92(-CH₂-CHOH-CH₂OH), 4.15(-CH₂OCO-); ¹³C-NMR and APT spectrum (CDCl₃, 50 MHz); 13.9(CH₃), 22.4, 24.3, 29.0, 29.2, 29.4, 29.6, 31.8, 34.1(CH₂), 63.4(CH₂), 65.0(CH₂), 70.2(CH), 174.2(C).

Compound II의 TMS화—Compd. II 약 2 mg을 무수 pyridine 0.5 ml에 녹인 후 hexamethyl disilazane(HMDS) 100 μl와 trimethyl chlorosilane(TMCS) 50 μl를 가하여 55°에서 45분간 반응시킨 후 분석에 사용했다.

MS, (70eV, TMS) m/z(rel. int.); M⁺(not observed), 459(5.5), 371(40.7), 218(10.3), 129(53.0), 75(26.4), 73(100), 43(97.8), 41 (48.6).

실험결과 및 고찰

Compd. I은 MS와 원소분석으로부터 C₁₇H₁₆N₂O₄(M⁺, m/z 312)의 분자식을 갖는 것을 알 수 있었다. IR spectrum은 secondary amide(3325, 3245 cm⁻¹), carbonyls(1690, 1660 cm⁻¹), aromatic system의 존재를 보여주며, 760 cm⁻¹의 흡수는 1,2-disubstituted benzene ring의 존재를 예시한다. ¹H-NMR spectrum은 1개의 N-acetyl group (3H, s, δ 2.22), 1개의 methoxy group(3H, s, δ 3.96)과 2개의 secondary amide proton에 기인

Compd. I : R=CH₃

Compd. I-a : R=H

한 broad singlet를 δ 11.2과 12.0에서 보여준다.

δ 8.77과 δ 8.67에서 각각 J value 8.4 Hz와 8.6 Hz로 proton 1개에 해당하는 ortho-coupled doublet가 나타나며, δ 8.10에서 J value 8 Hz의 ortho-coupled doublet와 J value 1.6 Hz의 meta-coupled doublet, δ 7.84에서 J value 8 Hz의 ortho-coupled doublet와 1.2 Hz의 meta-coupled doublet가 각각 proton 1개에 해당되어 나타나고 있다. 또한 δ 7.49~7.69와 δ 7.13~7.26 사이에서 각각 2개의 proton에 기인한 multiplet를 볼 수 있었으며, 이같은 ¹H-NMR pattern은 서로 유사한 2개의 1,2-disubstituted benzene ring이 서로 연결된 것을 보여준다.

¹³C-NMR spectrum은 52.6 ppm에서 -OCH₃, 25.4 ppm에서 -NHCOCH₃, 168.5 ppm에서 ester carbonyl carbon을 보여주며, 2개의 amide carbonyl carbon이 170.0 ppm에서 나타나고 있으며, 이외에도 4개의 4급 carbon과 8개의 3급 carbon 등 12개의 aromatic carbon을 보여준다.

알칼리 가수분해물인 compd. I-a의 IR spectrum의 3440~2400cm⁻¹의 흡수와 ¹H-NMR spectrum의 δ 13.2에서 broad singlet는 carboxylic acid의 존재를 보여주며, δ 3.96에서 singlet로 나타났던 methoxy group의 signal은 찾아볼 수 없었다. 이같은 정보로부터 이 물질은 각각 ortho 위치에 methyl ester와 acetamide를 갖는 aromatic ring이 서로 연결되고 있음을 추정할 수 있다.

MS spectrum은 m/z 312(M⁺)의 분자이온에서 amide bond가 개열되면서 생성된 m/z 151(100), 과 m/z 162(33.9), m/z 151에서 methoxy radical의 탈락에 의한 m/z 120(53.8), CH₃OH의 탈락에 기인한 m/z 119(43.3)을 볼 수 있으며, 계속해서 CO의 탈락으로 m/z 92, m/z 91의 특징

적인 peak를 보여준다. 이같은 MS fragmentation pattern은 본 식물로부터 분리된 methyl-N-3-(carbamoyl propionyl) anthranilate의 그것과 아주 유사하게 나타나고 있어 이 물질은 두개의 aromatic ring이 서로 amide bond로 연결되고 있음을 보여준다.⁴⁾ 일반적으로 benzoic acid의 ortho-position에 α -hydrogen을 갖는 group이 치환된 경우 ortho-effect에 의해 분자이온으로 부터 water를 잃기 쉽다.¹⁰⁾ Compd. I-a의 m/z 280(M⁺-H₂O)은 이로써 설명될 수 있으며, 이는 이 물질이 두개의 1,2-disubstituted benzene ring이 amide bond로 서로 연결되어 있음을 보여주는 증거가 될 수 있다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 compd. I은 methyl-N-(2-ace-

Table 1. Carbon-13-chemical shifts for compd. I¹

Carbon	Compd. I (CDCl ₃)	Carbon	Compd. I (CDCl ₃)
1	115.9(C)	1'	120.5(C) ²
2	140.4(C)	2'	141.1(C)
3	120.7(CH) ²	3'	121.6(CH)
4	134.7(CH)	4'	133.1(CH)
5	123.1(CH) ³	5'	123.2(CH) ³
6	131.1(CH)	6'	127.9(CH)
-C=O	168.5(C)	NHCO	170.0
$\begin{array}{c} \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	52.6	$\begin{array}{c} \\ \text{CH}_3 \end{array}$	25.4
-C=O	170.0	NH	

¹ Chemical shifts in ppm downfield from TMS and the character of each carbon was assigned by APT spectrum.

^{2,3} These assignments may be interchanged.

taminobenzoyl) anthranilate로 그 구조를 결정했다. 이 물질은 2개의 anthranilic acid 유도체가 amide bond로 연결된 것으로 천연에서 처음 보고되는 성분이다.

Compd. II의 MS spectrum에서 분자이온은 나타나지 않았으며, IR spectrum은 OH(3320 cm^{-1})와 ester carbonyl(1735 cm^{-1})을 보여준다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 methyl proton(3H, t, δ 0.88), methylene proton(m, δ 1.26), $-\text{COCH}_2-$ (δ 2.34)은 지방산 ester의 전형적인 pattern을 보여준다.⁵⁾ 또한 δ 3.65에서 $-\text{CH}_2\text{OH}$, δ 3.92에서 $-\text{CHOH}$ 의 methine proton과 δ 4.15에서 fatty acid의 acyl기와 연결된 $-\text{CH}_2\text{OCO}-$ 의 methylene proton을 보여주며, 이는 이 화합물이 glycerol의 1번 위치에 지방산이 결합된 1-mono-glyceride임을 나타낸다. $^{13}\text{C-NMR}$ 의 APT spectrum에서 63.4 ppm(CH_2), 65.0 ppm(CH_2), 70.2 ppm(CH)의 signal은 각각 glycerol의 1번, 3번, 2번 탄소에 해당하며, 174.2 ppm에서 carbonyl carbon을 볼 수 있다. 또한 13.9 ppm의 methyl과 22.4~34.1 ppm의 methylene carbon을 볼 수 있으며, 이는 이 물질이 포화지방산으로 이루어짐을 보여준다.

Glyceride의 구조분석 방법으로는 GC^{6,7)} $^{13}\text{C-NMR}$, GC-MS⁸⁾, acyl유도체, TMS 유도체를 이용한 MS등이 이용되고 있다. 본 실험에서는 Compd II의 trimethyl silyl ether 유도체의 MS fragmentation pattern을 비교하여 fatty acid의 종류 및 결합부위를 결정했다. monoglyceride는 TMS 유도체의 MS pattern으로부터 지방산의 종류 및 결합위치를 구별할 수 있다.⁹⁾ 일반적으로 이들의 parent ion peak는 관찰하기 힘들며, parent ion으로 부터 methyl radical이 떨어져 나간 (M^+-15) peak를 볼 수 있다. 특히, methylene trimethylsilyl ether radical이 떨어져 나간 [$\text{M}^+-\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$]와 m/z 218의 peak intensity는 1-과 2-mono-glyceride를 구별하는 지표로 자주 이용되고 있다.⁹⁾

Compd. II의 TMS유도체의 MS spectrum에서 m/z 459 (M^+-15) peak를 볼 수 있으며, 이로

부터 이 물질의 분자량이 330으로 palmitic acid가 지방산으로 결합되어 있음을 알 수 있다. 또한 m/z 371과 m/z 218의 relative intensity는 40.7%와 10.3%로서 1-palmitin의 그것과 유사하게 나타났다. 이상의 결과로서 compd. II는 glycerol의 1번위치에 palmitic acid가 결합된 glycerol 1-hexadecanoate로 동정했다.

결 론

진범(*Aconitum pseudolaeve* var. *erectum*)지하부의 *n*-hexane 분획으로부터 compd. I과 compd. II를 분리하였다. Compd. I은 분자식 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ 로서 2개의 anthranilic acid유도체가 amide bond로 결합된 methyl-N-(2-acetaminobenzoyl) anthranilate로 그 구조를 결정했으며 천연에서 처음으로 분리된 물질이다. Compd. II는 glycerol-1-hexadecanoate로 동정했다.

감사의 말씀: 본 연구는 故 鄭普燮教授님의 지도로 이루어졌으며, 교수님의 영전에 이 논문을 받칩니다.

(1989년 11월 10일 접수: 12월 1일 수리)

문 헌

1. 李昌福: 大韓植物圖鑑, 鄉文社, p.360(1982).
2. 鄭台鉉: 韓國植物圖鑑, 新志社, p.136(1956).
3. 이현선, 정보섭: 생약학회지 19, 181(1988).
4. 이현선, 정보섭: 생약학회지 20, 6(1989).
5. 高木 徹: 油脂·脂質의 機器分析, 幸書房, 東京, p.86 (1976).
6. Itabashi, Y., Takagi, T.: *Lipids* 15, 205(1979).
7. Myher, J.J., Kuksis, A.: *Lipids* 9, 382(1973).
8. Myher, J.J., Marai, L., Kuksis, A.: *J. Lipid Res.* 15, 586(1974)
9. Johnson, C.B., Holman, R.T.: *Lipids* 1, 371 (1966)
10. Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H.: *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day, INC., 22 (1967).