

## Piperine 誘導體의 合成 및 中樞抑制作用에 관한 研究(III)

N-Piperoylamino Acid 誘導體

李漢九 · 林中基 · 李殷芳\* · 禹源植\*

成均館大學校 藥學大學 · \*서울大學校 生藥研究所

(Received September 29, 1983)

Han Koo Lee, Joong Ki Lim, Eun Bang Lee\* and Won Sick Woo\*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170 and \*Natural  
Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110, Korea

### Syntheses and Central Nervous Depressant Activity of Piperine Derivatives(III) N-Piperoyl Amino Acids

**Abstract**—Twelve new N-piperoyl amino acids were synthesized by acylation of amino acids with piperoylchloride in order to develop the new central nervous depressants. Silylation of the carboxylic group of amino acids not only precluded side reactions but also facilitated acylation at room temperature without catalysts. The acute toxicity of all the synthesized compounds were lower than that of piperine itself, whereas they showed strong protective effect against the strychnine-induced mortality.

Piperine이 中樞神經抑制作用이 있다는 事實<sup>1,2)</sup>이 밝혀진 후 부터 piperine의 誘導體의 合成 및 藥理作用에 관한 研究가 활발히 전개되었다.<sup>3,4)</sup>

한편, 아미노산이 中樞神經에 작용한다는 것은 既知의 事實이다.<sup>5,7)</sup> Glycine이 脊髓에 특이하게 高濃度로 존재하며 strychnine에 의한 痙攣에 拮抗적으로 작용하고<sup>8)</sup> GABA와 그 代謝酵素가 中樞神經系에 高濃度로 있으며 postsynaptic에 抑制傳達物質로 作用한다.<sup>9)</sup>

그러나 아미노산은 blood-brain barrier를 效果的으로 通過하지 못하고 體內에서 transaminase에 依하여 破壞되기 때문에 그 效果에 對한 臨床研究 및 臨床適用은 벽에 부딪혀 있다.<sup>10)</sup> 아미노酸이 blood-brain barrier를 效果的으로 通過하지 못하는 이유는 아미노산이 結晶狀態에서나 水溶液狀態에서 分子內에 있는 —COOH基의 水素이온이 —NH<sub>2</sub>基에 주어져 分子內鹽(Zwitter ion)을 形成하여 lipid-solubility가 낮은 데 起因할 것으로 생각된다.

著者들은 lipid-solubility를 上昇시키고 neuronal permeability를 높이고 piperic acid의 作用을 附加시킨 강력한 中樞抑制效果를 기대하여 12種의 N-piperoyl amino acid 誘導體를 合成하고 그 藥理作用을 實驗하여 結果를 얻었기에 報告코져 한다.

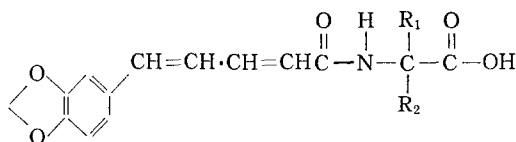
### 實 驗 方 法



아미노산의 Silylation<sup>11)</sup>—Hexamethyl-disilazane (HMDS)에 아미노산을 懸탁시키고 126~136°에서 25~26時間 加熱還流시켰다. 透明해진 反應液을 25mmHg에서 減압증류하여 과량의 HMDS를 유거했다. 각 아미노酸의 silylation 條件은 Table I과 같다.

**Table I**—The optimum conditions for silylation of amino acid.

Amino acids	HMDS (mole ratio*)	Time (hour)
Glycine	6.2	5.5
Alanine	6.2	16.5
Aminoisobutyric acid	6.2	26.0
Amino-n-butyric acid	6.2	4.5
Threonine	6.2	8.0
Valine	7.2	12.1
Leucine	6.2	3.1
Isoleucine	6.2	4.4
Aspartic acid	6.2	3.1
Methionine	6.2	5.3
Phenylalanine	6.2	3.0
Phenylglycine	6.2	2.5

\* Molecular ratio of HMDS to amino acid

**Table II**—N-Piperoyl amino acids.

Com- pound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Mp	Recryst. solvent	Yield	Formular	C		N		IR cm <sup>-1</sup>
							calc	found	calc	found	
<b>I</b>	H	H	207	MIBK <sup>a)</sup>	50.1	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> N	61.09	60.72	5.09	4.98	3350, 1650
<b>II</b>	H	CH <sub>3</sub>	181	MIBK	53.4	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> N	62.29	62.54	4.84	4.80	3200, 1651
<b>III</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	212	MIBK	43.3	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub> N	63.36	62.88	4.62	4.61	3300, 1640
<b>IV</b>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	203	MIBK	63.2	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub> N	63.36	63.04	4.62	4.59	3300, 1650
<b>V</b>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	167	MIBK	54.6	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub> N	60.18	60.04	4.39	4.31	3400, 1640
<b>VI</b>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	141	MIBK	48.0	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub> N	64.34	64.46	4.41	4.50	3250, 1640
<b>VII</b>	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	147	MIBK + PET <sup>b)</sup>	52.7	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> O <sub>5</sub> N	62.54	64.95	4.23	4.21	3250, 1650
<b>VIII</b>	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	178	MIBK + PET	35.7	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> O <sub>5</sub> N	65.24	64.41	4.23	4.18	3250, 1644
<b>IX</b>	H	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	173	MIBK	60.2	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> N	57.66	57.45	4.20	4.10	3300, 1640
<b>X</b>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> S	169	MIBK	61.4	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub> NS	58.43	58.10	4.00	3.90	3370, 1642
<b>XI</b>	H	-CH <sub>2</sub> - 	168	MEK <sup>c)</sup>	51.4	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub> N	69.03	68.79	3.83	3.81	3310, 1638
<b>XII</b>	H	- 	204	MEK	50.0	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub> N	68.31	68.27	3.99	3.95	3310, 1640

a) methylisobutylketone, b) petroleum ether, c) methylethylketone.

**N-Piperoyl Amino Acid**의 合成—Amino acid trimethyl-silylester 25mmole을 methylene-chloride 3.0ml에 녹이고 piperoylchloride 20mmole의 벤젠용액을 濕氣차단하에 10° 이하에서 加했다. 1時間 이 條件을 유지한 후 常溫에서 12時間 反應시켰다. TLC로 反應의 完結을 확인하고 증류수 20ml를 加해 加水分解시킨후 有機溶媒層을 取해 溶媒를 減壓留去하였다. 殘渣를 아세톤에 녹여 불용분을 除去하고 活性炭處理한 후, 再結晶하였다.

各 生成物의 融點, 收得量, 分析值를 Table II에 표시하였다.

### 實驗結果 및 考察

Piperic acid chloride를 使用하여 benzene, toluene, xylene, methylene chloride 및 dioxane 등의 有機溶媒中에서 아미노酸과 反應시켰으나 目的物質을 合成할 수 없었다. 上記 反應系에 pyridine, quinoline, triethylamine 및 dimethylamine등의 有機鹽基를 加하는 方法과 NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 등의 無機鹽基를 加하는 Shotten-Bauman 등의 方法<sup>12)</sup>을 應用해 보았으나 反應이 안 일어나거나 收率이 낮고 副產物 및 未反應物質의 多量 殘留등으로 目的物質의 合成法으로는 不適合했다. 또한 強酸 또는 強鹽基와 長時間 격렬한 條件으로 反應시켰을 경우, 無水物, double amide<sup>13)</sup>, peptide<sup>14)</sup> 등의 生成으로 acid amide만 合成할 수 없었다. 이것은 아미노酸이 有機溶媒에 不溶임에 크게 起因하므로 아미노酸의 carboxyl基를 HMDS로 silylation하여 適當한 有機溶媒에 녹여 acylation했다. 아미노酸의 silylester는 carboxyl基가 保護되어 Zwitter ion 형태가 깨어져<sup>15)</sup> amino基의 acylation을 용이하게 해주고 —COOH基에 의한 副反應을 아울러 막을 수 있었다. Silylester는 methylene chloride 및 chloroform 등의 有機溶媒에 易溶이므로 完만한 反應條件에서도 용이하게 비교적 短時間內에 反應을 시킬 수 있었고 不純物의 제거가 용이했다. Silylation의 速度는 아미노酸의 種類에 따라 다르나(Table I 참조) 일반적으로 normal體가 iso體보다 빨랐다. Silylation시 常用되는 methylene chloride등의 低沸點 有機溶媒下에 鹽基를 축매로 反應시켰으나 目的物質을 얻을 수 없었다.

**藥理作用**—合成化合物의 急性毒性 및 中樞抑制作用에 관한 實驗結果는 Table III에 표시하였다. 이들 12종의 化合物 각 2000mg/kg을 마우스에 경구투여했을때 N-piperoylleucine (VII) 및 N-piperoyl isoleucine (VIII)은 10마리중 3마리가 死亡했을 뿐이고 기타 化合物은 더욱 毒性이 약하게 나타났다. 따라서 이들 化合物의 LD<sub>50</sub>은 2000mg/kg이하이며 LD<sub>50</sub>이 1638.8mg/kg인 piperine 보다도 毒性이 약함을 알 수 있다. 반면에 抗 pentetrazole 痙攣作用은 이들 化合物을 200mg/kg 經口 投與하였을 경우에 N-piperoylglycine (I), N-piperoylleucine (VII), N-piperoylmethionine (X), N-piperoylphenylalanine (XI) 및 N-piperoylphenylglycine (XII)의 5種 化合物에서 50%의 抑制作用을 나타냈으며 이 作用은 piperine의 ED<sub>50</sub>인 211mg/kg에 比較하여 거의 유사한 效力을 갖고 있음을 알 수 있다. 抗 strychnine 痙攣作用은 全 化合物이 piperine보다 強한 抑制作用을 나타냈으며 rotarod 시험에 있어서는 piperine의 ED<sub>50</sub>이 89.1mg/kg이나 이들 化合物 200mg/kg의 用量에서도 piperine 90mg/kg의 用量의 경우보다 弱한 作用을 나타냈다. 이 結果는 이들 化合物이 骨格筋弛緩作用이 거의 없거나 全연 無음을 意味하는 것으로서 抗痙攣藥의 개발을 위하여는 매우 바람직한 結果의 하나로 사료한다. 또한 抗 maximal electroshock 痙攣作用은 piperine 과 마찬가지로, 1300mg/kg의 大量投與에도 나타나지 않았다. Sodium hexobarbital에 의한 睡眠 時間에 미치는 作用은 piperine 18mg/kg에서 거의 100%의 時間延長作用이 있으나 이들 化合物은 그보다 作用이 약하여 N-piperoylglycine(I), N-piperoylvaline (VI), 및 N-piperoylleucine

**Table III**—Acute toxicities and central nervous depressant activities of N-piperoyl amino acids in mice.

Compound	Acute toxicity		scPT <sup>1)</sup>		scSTN <sup>2)</sup>	
	Dose mg/kg p.o.	No. died /No. used	Dcse mg/kg p.o.	No. conv. /No. used	Dose mg/kg p.o.	No. died /No. used
Control				10/10		10/10
Piperine	LD <sub>50</sub> =1636.8		200	4/10	75	5/10
<b>I</b>	2000	1/10	200	5/10	75	3/10
<b>II</b>	2000	0/10	200	6/10	75	2/10
<b>III</b>	2000	1/10	200	9/10	75	3/10
<b>IV</b>	2000	0/10	200	8/10	75	2/10
<b>V</b>	2000	0/10	200	9/10	75	2/10
<b>VI</b>	2000	1/10	200	9/10	75	3/10
<b>VII</b>	2000	3/10	200	5/10	75	5/10
<b>VIII</b>	2000	3/10	200	6/10	75	2/10
<b>IX</b>	2000	0/10	200	6/10	75	2/10
<b>X</b>	2000	1/10	200	5/10	75	2/10
<b>XI</b>	2000	1/10	200	5/10	75	4/10
<b>XII</b>	2000	2/10	200	5/10	75	3/10

	MES <sup>4)</sup>		RR <sup>3)</sup>		ipHB <sup>5)</sup>	
	Dose mg/kg p.o.	No. conv. /No. used	Dose mg/kg p.o.	No. dropped /No. used	Dose mg/kg p.o.	min ± S.E.
Control		10/10		0/10		15.5 ± 2.1
Piperine	1300	10/10	90	5/10	18	29.4 ± 3.27 (p < 0.01) <sup>6)</sup>
<b>I</b>	1300	10/10	200	0/10	30	24.5 ± 1.30 (p < 0.05)
<b>II</b>	1300	10/10	200	2/10	30	17.1 ± 9.30 (N.S.)
<b>III</b>	1300	10/10	200	1/10	30	17.1 ± 1.10 (N.S.)
<b>IV</b>	1300	8/10	200	2/10	30	17.2 ± 7.50 (N.S.)
<b>V</b>	1300	10/10	200	3/10	30	13.2 ± 7.55 (N.S.)
<b>VI</b>	1300	10/10	200	3/10	30	24.1 ± 4.00 (p < 0.05)
<b>VII</b>	1300	10/10	200	0/10	30	20.1 ± 3.00 (p < 0.05)
<b>VIII</b>	1300	10/10	200	2/10	30	15.2 ± 1.00 (N.S.)
<b>IX</b>	1300	10/10	200	2/10	30	15.2 ± 1.00 (N.S.)
<b>X</b>	1300	10/10	200	2/10	30	16.1 ± 1.20 (N.S.)
<b>XI</b>	1300	10/10	200	0/10	30	16.3 ± 3.15 (N.S.)
<b>XII</b>	1300	10/10	200	0/10	30	18.2 ± 2.10 (N.S.)

1) scPT; Subcutaneous pentetrazole (85mg/kg) seizure threshold test. 2) scSTN; Subcutaneous strychnine (1.5mg/kg) mortality test. 3) RR; Rotarod test. 4) MES; Maximal electroshock (50mA, 0.2 sec) seizure test. 5) ipHB, Intraperitoneal hexobarbital (50mg/kg) hypnosis test. 6) Significant as compared with control group. N.S.; Not significant.

(VII) 3종이 30mg/kg을 투여하였을 때 對照群에 比하여 有意性 있는 睡眠時間 延長作用이 있을 뿐이다.

### 結 論

Blood-brain barrier를 효과적으로 通過하여 中樞神經에 抑制的으로 作用하는 藥物을 開發함에 있어서 piperic acid의 아미노酸 誘導體 12種을 새로이 合成하였고, 이들의 中樞神經에 대한 抑制作用, 急性毒性실험등을 對照藥物인 piperine과 比較 檢討하였다.

化合物의 合成에서는 아미노酸의 carboxylic基를 HMDS로서 silylation함으로써 有機溶媒에 易溶인 ester가 되어 常溫에서 용이하게 N-acetylation 시킬 수 있음은 물론, 副反應도 抑制할 수 있었다.

全 化合物은 piperine에 比하여 急性毒性이 弱했으며 抗strychnine作用이 piperine 보다도 強力하게 나타냈다. 특히 抗痙攣藥에 있어서 副作用으로 看做되는 骨骼筋弛緩作用은 piperine에 比하여 거의 없는 程度임은 바람직한 일로 생각된다.

### 文 獻

1. K.H. Shin, H.S. Yun, W.S. Woo and C.K. Lee, Pharmacologically active principle of *Piper retrofractum*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **10**, 69 (1979).
2. W.S. Woo, E.B. Lee and K.H. Shin, Central nervous depressant activity of piperine, *Arch. Pharm. Res.*, **2**, 121 (1979).
3. 林中基·李東雄·李眞榮·金蓮順·禹源植·李殷芳, Piperine 誘導體의 合成 및 中樞抑制作用에 관한 研究(I). 3,4-methylenedioxycinnamic acid 誘導體, 本誌, **26**, 189 (1982).
4. 殷載淳·林中基·金完柱·禹源植·李殷芳, Piperine 誘導體의 合成 및 中樞抑制作用에 관한 研究(II). Piperic acid amide 誘導體, 本誌, **27**, 283 (1983).
5. S. Berl, D.P. Purpura, M. Girado and H. Waelsch, Amino acid metabolism in epileptogenic and non-epileptogenic lesions of the neocortex, *J. Neurochem.*, **4**, 311 (1959).
6. W.D. Willis, Brain behavior and evolution, Basel, 1971, p-4.
7. D.R. Curtis and J.C. Watkins, The pharmacology of amino acids related to  $\gamma$ -aminobutyric acid, *Pharmacol. Rev.*, **17**, 347 (1965).
8. R.A. Davidoff, R. Werman and M.H. Aprison, Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat, *J. Neurophysiol.*, **31**, 81 (1968).
9. K. Obata and K. Takeda, Release of  $\gamma$ -aminobutyric acid into the fourth ventricle induced by stimulation of the cat's cerebellum, *J. Neurochem.*, **16**, 1043 (1969).
10. A. Goldstein, L. Aronow and S.M. Kalman, Principles of drug action, Toronto, 1974, p-187.
11. D. Bouzard and A. Webber, Process for the preparation at the crystalline monohydrate of 7-[D- $\alpha$ -amino- $\alpha$ -(p-hydroxyphenyl) acetamido]-3-methyl-3-cephem-4-carboxylic acid, *U.S. Pat.* 4,160,863 (1979).
12. E. Bauman, Einwirkung von Brom auf Bromamido- $\mu$ -naphthochininoimid and Bromoxy- $\alpha$ -naphthochininoimid. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **19**, 3218 (1886).
13. J. March, *Advanced Org. Chem.*, 2nd ed. 1977, p-384.
14. R.O. Norman, *Principles of Org. Syn.*, 2nd ed., London, 1978, p-354.
15. J.H. Richard and D.J. Cram, *Elements of Org. Chem.*, 湯川泰秀, 花房昭靜 共譯, 基本 有機化學, 東京, 1981, p-243.