

Corticoid 活性物質의 開發을 위한 基礎研究(I)

11-Oxo-oleanolic Acid 및 11-Oxo-hederagenin의 Corticoid-5 β -reductase에 대한 阻害效果

韓秉勳 · 李愷禎 · 韓大錫*

서울대학교 生藥研究所 · 서울대학교 藥學大學*

(Received February 1, 1982)

Byung Hoon Han, Hye Jung Lee and Dae Suk Han*

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110 and
College of Pharmacy, Seoul National University*, Seoul 151, Korea

Studies on Triterpenoid Corticomimetics (I)

Inhibition of Corticoid-5 β -reductase by 11-Oxo-oleanolic Acid and 11-Oxo-hederagenin

Abstract—Derivation of triterpenoids and then the screening for corticomimetics among them is our primary interest. C₁₁-oxo-triterpenoids except glycyrrhetic acid are rarely found in the plant kingdom. Based on the facts that C₃ and C₁₁-Oxo-group are essential for the corticoid-like-activity through its competitive inhibition on the corticoid-5 β -reductase, it was attempted to produce artificial inhibitor on the enzyme by introducing C₁₁-oxo group to the triterpenoids of oleanene series such as oleanolic acid and hederagenin. We could obtain the C₁₁-oxo-oleanolic acid m.p. 264~6°, uv λ max 249 and C₁₁-oxo-hederagenin amorp. uv λ max 251 by acetylation, CrO₃-oxid., and deacetylation. Glycyrrhetic acid, a natural 11-oxo-compound and the other 11-oxo-derivatives of oleanolic acid and hederagenin were compared in their inhibitory activity on the corticoid-5 β -reductase. The inhibitory activity of those compound were decreased in the order of C₁₁-oxo-oleanolic acid, C₁₁-oxo-hederagenin, glycyrrhetic acid. This suggests more strong corticomimetic activity of those artificially derived C₁₁-oxo-oleanolic acid and C₁₁-oxo-hederagenin. Their Ki value were 4.6×10^{-4} M and 5.8×10^{-4} M respectively.

천연의 triterpenoid의 구조를 살펴보면 pentacyclic triterpenoid 또는 tetracyclic triterpenoid가 모두 C-11에 산소치환기가 없는 것이 일반적인 특징임을 알 수 있다.¹⁻²⁾ 예외적으로 감초 성분의 하나인 glycyrrhetic acid(이하 GA라 칭함)는 C-11에 산소치환기가 있는데 바로 이 GA가 corticoid-like-activity가 있다고 보고되었다.³⁾ 즉 GA가 C-11에 산소치환기가 있는 corticosteroid와의 구조 유사성으로 인하여 간에서 corticoid를 환원하여 불활성화시키는 효소의 하나인 corticoid-5 β -reductase를 경쟁적으로 저해해 결과적으로 혈중 corticoid농도를 지속시켜주기 때문이고, 이 효소저해에는 C-3의 -OH와 C-11의 산소치환기가 필수적임이 밝혀졌다.⁴⁾

그러나, 아직 다른 부위의 -OH나 -COOH들의 위치변화에 따른 저해효과의 변화는 검토되지 않아⁵⁾ 이에 저자는 천연에 널리 분포하는 12-oleanene, 12-ursene 및 dammarane계열 triterpen-

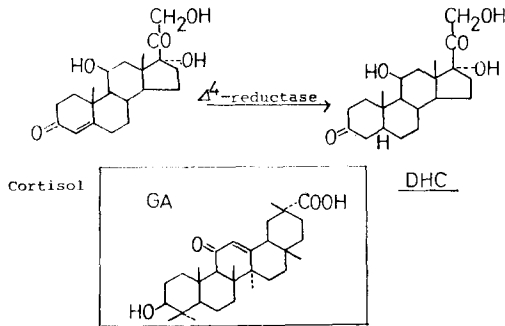


Fig. 1. Corticomimetic mechanism of GA.

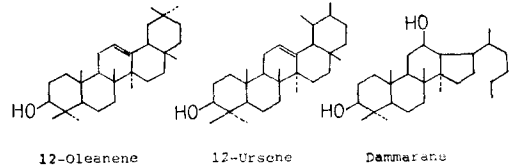


Fig. 2. Overview of triterpenoid structures.

oid의 11위치에 인위적으로 산소를 도입시켜 효소저해에 필수적인 공통구조를 만들고, 다른 부위의 치환기가 달라짐에 따른 corticoid-5 β -reductase 저해에 미치는 영향을 비교해 구조-활성 상관성을 밝혀 보다 나은 corticomimetics를 개발하고자 하였다. 왜냐하면 현재 의약품으로 쓰고 있는 천연 또는 합성 corticoid 제제가 모두 feed back mechanism에 의해 ACTH 분비를 억제하고 그 결과 corticoid생산기관인 부신을 위축시켜 심한 부작용이 유발되고 있어 사용이 제한되고 있기 때문이다.⁶⁾ 한편 천연에 11-oxo-triterpenoid는 제한분포되어 있지만 oleanene, ursene 등 인위적으로 11-oxo-group을 도입할 수 있는 각종 triterpenoid가 광범위하게 분포되어 있어서 이들에게 11-oxo-group을 도입한 다음 corticoid-5 β -reductase에 대한 저해활성을 측정하게 되면 corticomimetics를 간접적으로 검색하는 것에 해당되며, 이로 인하여 선정되는 물질은 천연의 corticoid와는 달리 ACTH-corticoid산생기구에 존재하는 feed back inhibition으로 인한 부작용을 피할 수 있는 가능성이 기대되어 본 연구에 착수하였다. 우선 일차적으로 Fig. 3에 표시된 바와 같이 oleanolic acid와 hederagenin에 몇단계 반응을 거쳐 11-oxo유도체를 만든 다음 이들에 대한 corticoid-5 β -reductase 저해율을 측정하였더니 11-oxo-oleanolic acid > 11-oxo-hederagenin > glycyrrhetic acid 순으로 그 저해활성이 감소함을 알 수 있었다. GA와 비교해 -COOH위치만 다른 11-oxo-oleanolic acid가 월등히 저해율이 높은 것은 기질과 구조 공통부분이외의 관능기들이 효소저해에 상당한 영향을 미치고 있음을 나타내, 본 연구에서 설정한 가설 밑에 합성된 각종 C-11-oxo-triterpenoid들 중에서 corticomimetics를 검색하는 연구에 밝은 전망을 보여주었다.

實驗 方法

機器와 試藥—용접은 Mitamura Heat Block Model—MRK를 사용하여 측정하였고 보정하지 않았다. Column chromatography用으로는 Kiesel gel 60 (Merck)를, TLC用은 precoated Kiesel gel 60 F 254 plate (Merck)를 사용하였으며 전개제로는

benzene: ethylacetate=1:1 (A용매)

benzene: ethylacetate=4:1 (B용매)

benzene: ethylacetate=8:1 (C용매)을 각각 사용하였으며 발색은 50%-H₂SO₄를 분무한 다음 가열하여 발색하였다. UV는 Shimadzu Model MPS-50L을 사용하여 측정하였고 IR은 KBr disk 법을 써서 JASCO IR-S Spectrophotometer로 NMR은 Perkin-Elmer 90MHz를 사용하여 CDCl₃ 또는 CD₃OD의 용매중에서 내부표준물질로 TMS를 사용하여 측정하였으며 δ value로 표시하였다.

NADPH는 Sigma제를, Sucrose 및 EDTA는 특급품을, 그리고 기타 다른 시약은 따로 언급이 없는 한 1급을 사용하였다.

Triterpenoids分離—1) oleanolic acid의 분리. 오가피 methanol ex. 600g에서 ether가용성 분획 80g을 제거한 후 수층에 10%-H₂SO₄ 1l를 MeOH과 1:1의 비율로 넣고 수욕상에서 12hrs동안 reflux하여 oleanolic acid 함유침전을 얻었다. methanol을 증류제거하고 ether로 추출하여 ether층을 5%-alkali와 d-HCl로 반복처리하여 최종 ether층에서 oleanolic acid함유분획 52g을 얻었다. 이를 MeOH에서 반복 재결정하여 흰색결정 14g을 얻고 모액은 A용매로 column에 걸어 oleanolic acid 10g을 얻었다. 표준과 혼용시험하여 용점강하가 없었고 TLC 및 IR로 비교 동정하였다.

2) Hederagenin의 분리. 해동피 5kg의 수성 extract를 BuOH로 추출후 BuOH를 증류제거하여 얻은 BuOH ex. 55g에 10%-H₂SO₄ 200ml를 MeOH과 1:1로 가해 8hrs동안 reflux한 다음 석출된 침전을 ether 추출하고 ether층을 5%-alkali 추출 및 d-HCl로 처리하여 정제한 다음에 생성된 침전을 다시 ether추출후 농축하여 genin혼합물 13g을 얻었다. 이를 ethylacetate에서 재결정하여 정방형의 백색결정 1.9g을 얻었다. 표준과 TLC로 일치실험하고 혼용시험 및 IR spectrum으로 확인하였다.

3) Glycyrrhetic acid의 분리. 감초의 조 saponin 분획 10g을 HAc에서 재결정하여 glycyrrhizin이 풍부한 glycoside분획 5.6g을 얻고 5%-H₂SO₄ 100ml와 MeOH 10ml 가해 수욕상에서 4시간 동안 reflux하여 가수분해 산물인 침전을 얻었다.

이 침전을 ether 추출한 후 농축하여 (1.8g) A용매로 column에 걸고 분리 정제된 glycyrrhetic acid fr.을 농축후 MeOH-water에서 재결정하여 판상무색결정 700mg을 얻었다. 이 물질은 UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 가 252였고 표준과 혼용시험, TLC 및 IR spectrum의 비교로 구조 확인하였다.

11-Oxo-comp의 誘導—1) Oleanolic acid acetate(II)

Oleanolic acid(I) 10g을 pyridine 50ml에 녹인 후 50ml의 acetic anhydride를 가하고 상온에서 저어주면서 3hrs 방치하였다. 반응생성물을 빙수에 가해 석출된 침전을 여과 건조 후 ethylacetate에서 재결정하여 3g의 oleanolic acid acetate를 얻고 모액은 C용매로 column에 걸어 총 8.5g의 acetate를 얻었다. m.p 264-266° IR (cm⁻¹) 1735, 1260, 1370 (acetate), 1700 (acid)

2) Acetyl oleanolic acid methylester(III). Oleanolic acid acetate 3.6g에 ethereal CH₂N₂를 가한후 냉장고에 1夜 방치하고 농축하였다. 반응생성물을 ethyl acetate에서 재결정하여 침상결정을 얻고 모액은 C용매로 column에 걸어 총 2.5g의 acetyl oleanolic acid methylester(III)를 얻었다. m.p 227-230°, NMR 2.05 (3H, acetyl), 3.62 (3H, methoxyl) 5.3 (1H, C₁₂-H), IR(cm⁻¹) 1725, 1240 (acetate).

3) 11-Oxo-acetyl oleanolic acid methyl ester(IV). Acetyl oleanolic acid methyl ester(III) 1.5g을 CCl₄ 12ml에 녹여 80°C로 가온하고, t-butyl chromate sol.⁷⁻⁸⁾ 15ml에 1.8ml의 acetic acid와 4.9ml의 acetic anhydride를 가해, 미리 기온한 시료액에 15분동안 저어주면서 적가하였다. 이 반응액을 80°C에서 12hrs동안 저어주면서 방치한 후 빙욕상에서 냉각시키면서 10%-oxalic acid 36ml를 적가하고 후에 다시 1.5g의 oxalic acid를 가해주었다.⁹⁾ CCl₄층이 분리되면 CCl₄층을 물로 세척한 후 무수망초로 탈수하고 여과후 증류하였다. 이를 benzene에서 재결정하여 1.2g의 11-oxo-acetyl oleanolic acid methyl ester(IV) 침상결정을 얻었다. m.p 238-240°, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 249, NMR 2.1 (3H, -acetyl), 2.39 (1H, C₉-), 3.7 (3H, methoxyl), 5.71 (1H, C₁₂-H), IR (cm⁻¹) 1720, 1240 (acetate),

1660 (α , β -unsatd. ketone).

4) 11-Oxo-oleanolic acid methyl ester(V). 11-oxo-acetyl oleanolic acid methyl ester(IV) 1g을 MeOH에 녹인 후 10%-KOH를 MeOH과 1 : 1로 10ml넣고 수욕상에서 3hrs동안 reflux한 다음 MeOH를 증류제거하고 산을 가해 석출된 침전을 ether로 추출하여 농축후 ether에서 600mg의 침상결정을 얻었다. m.p 196-198°, UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 249, NMR 5.65 (1H, C₁₂-H), 3.65 (1H, methoxyl), 2.3 (1H, C₉-H), IR (cm⁻¹) 3400 (OH), 1725, 1645 (α , β -unsatd, ketone)

5) 11-Oxo-acetyl oleanolic acid(VI). Acetyl oleanolic acid(II) 7g을 HAc 50ml에 녹인후 따로 HAc에 CrO₃ 1.8g을 녹여 1hr동안 반응온도를 16~20°로 유지하면서 시료액에 첨가했다.¹⁰⁾ 다시 1hr방치 후 MeOH 3ml를 가해 반응을 끝내고 1N-HCl 200ml를 가했다. 석출된 반응생성물을 CHCl₃로, 처음엔 emulsion을 막기위해 심한 shaking을 피하면서 반복 추출하여 CHCl₃층을 묽은산과 물로 수회 세척하고 망초로 탈수한 다음 농축하였다(6.4g). 이 반응생성물을 C 용매로 column에 거는 도중 혼합용매 C에서 1.7g의 침상결정을 얻고 모액은 동용매로 column에 걸어 총 2.7g의 11-oxo-acetyl oleanolic acid(VI)를 얻었다. m.p 265~270°, UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 250, NMR 2.05(3H, acetyl), 2.35 (1H, C₉-H), 5.65 (1H, C₁₂-H).

acetyl oleanolic acid의 CrO₃산화 후 반응생성물을 column에 걸어 C 용매로 elution하였더니 처음의 단일 fr. 3.5g을 얻어 benzene에서 재결정하여 침상결정을 얻었다. m.p 250~254°, NMR 2.05 (3H, acetyl), 2.35 (3H, multiplet), IR (cm⁻¹) 1780 (5환 lactone), 1735.

6) 11-Oxo-oleanolic acid(VII). 11-Oxo-acetyl oleanolic acid(VI) 2.5g을 10%-KOH와 MeOH 1 : 1용액 30ml를 가해 수욕상에서 3hrs동안 reflux한 후 MeOH를 증류 제거하고 산을 넣어 석출된 침전을 ether 추출하여 농축하였다. 이를 MeOH에서 재결정하여 정방형의 결정 2.1g을 얻었다. m.p 284~286°, UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 252, NMR 2.35 (1H, C₉-H), 5.7 (1H, C₁₂-H), IR (cm⁻¹) 3400 (—OH), 2500-2700, 1710 (acid), 1646 (α , β -unsatd. ketone).

7) Hederagenin acetate. Hederagenin 1.8g을 pyridine에 녹여 acetic anhydride 25ml를 가해 상법에 의해 acetylation후 반응생성물을 C 용매로 column에 걸어 hederagenin acetate amop. 1.9g을 얻었다. 따로 hederagenin acetate의 동정실험을 행하지는 않았다.

8) 11-Oxo-hederagenin acetate. Hederagenin acetate 1.8g을 HAc에 녹이고 따로 CrO₃ 0.6g을 HAc에 녹여 시료액을 (5)와 같은 방법으로 산화하였다. 반응생성물 1.5g을 C 용매로 column에 걸어 약간 불순하나 UV λ_{\max} 252인 amorphous powder 320mg을 얻었다.

9) 11-oxo-hederagenin. 11-oxo-hederagenin acetate 300mg을 10%-KOH와 MeOH 1 : 1용액 10ml를 가해 수욕상에서 1시간 reflux한 후 MeOH 증류제거후 ether로 추출, ether층을 농축하여 이를 column에 A용매로 elution시켜 약간의 불순물을 함유하는 ketone성 물질 120mg을 분리하였다. 이 물질은 UV λ_{\max} 가 250nm이었고 log ϵ 가 4.3이어서 11-oxo-hederagenin임을 알 수 있어 불순한 채로 효소저해 활성 측정에 사하였다.

酵素反應—용성 rat(b.w. 180~250g)을 망치로 머리를 때터 기절시킨 다음 경동맥을 잘라 실험시키고 빨리 간을 적출하여 미리 ice-box에서 냉각시킨 0.25 M sucrose-1mM EDTA액에 적출한 간을 세척하고 여지로 탈수하여 평량하였다. 주위온도를 3°C이하로 유지하면서 간을 잘게 부순 후 간 무게 3배의 sucrose-EDTA액을 넣고 teflon pestle로 homogenize하였다. 이 homogenate를 10,000g에서 20분간 원심분리하여 그 상등액을 효소원으로 사용하였다.

Corticoid-5 β -reductase에 대한 inhibitor들의 저해율 측정은 Kumagai의 방법을¹¹⁾ 약간 수정하

였다. 기질은 cortisol을 MeOH에 녹인 후 다시 10배 희석해서 2mM로 하였고 NADPH는 6mM, phosphate buffer는 1M, pH 7.0액을 쓸때마다 10배 희석하여 0.1M로 사용하였다. Inhibitor는 0.5%-alkali를 당량 넣어 녹인후 증류수로 50배 희석해 2mM액을 만들었다. 기질, inhibitor, 효소, NADPH를 각각 0.1ml씩 취했고 총 반응액은 0.5ml로 하였으며 효소량이 0.5ml시는 총 반응액을 1ml가 되게 하였다. 시험관 수에 따라서 반응시간을 조절하여 37°C에서 일정시간 incubation후, 5%-KOH를 0.05ml(총 반응액이 1ml인 경우 0.1ml) 넣어 2~4초간 잘 섞어준 다음 CH₂Cl₂ 2.5ml(총 반응액이 1ml시는 5ml)를 가해 Voltar-mixer로 30초간 일정속도로 혼든후 ice-bath에 담겨 냉각해 CH₂Cl₂층의 OD 240을 측정하였다. OD 240 측정치는 같은 조건의 tube를 3개씩하여 평균하였고 매 tube마다 배양시간, KOH 넣는시간 및 추출에 이르기까지의 시간 간격을 동일하게 해주었으며 저해율은 아래와 같이 산출하였다.

$$R = \frac{Iz - I}{Az - A} \times 100$$

R: Inhibition rate Az: OD₂₄₀ at zero time without inhibitor

A: OD₂₄₀ after enz-reaction without inhibitor

Iz: OD₂₄₀ at zero time with inhibitor

I: OD₂₄₀ after enz-reaction with inhibitor

實驗結果 및 考察

11-oxo-oleanolic acid 및 11-oxo-hederagenin 合成—11-oxo-oleanolic acid는 [I]→[II]→[VI]→[VII]의 경로를 거쳐 만들었으며 경로 [I]→[II]→[III]→[IV]→[V]로는 11-oxo-oleanolic acid의 methyl ester를 얻었다. 그리고 11-oxo-hederagenin은 [I]→[II]→[VI]→[VII]의 경로로 만들었다. (Fig. 3)

Acetyl oleanolic acid(II)를 CrO₃-HAc 산화해서 TLC상에 R_f치가 각각 0.8, 0.7, 0.45의 spot가 나오는 혼합물을 얻어 column에 걸어 R_f 0.8, 0.45인 물질을 순수 분리하였다. R_f 0.45를 나타내는 물질은 UV극대흡수파장이 250이며 α, β-unsatd. ketone이 형성되었음을 알 수 있었고, NMR spectrum에서 5.71에 α, β-unsatd. ketone의 C₁₂의 olefinic proton에 의한 peak와 2.35에 ketone에 인접된 C₉의 methyne proton의 peak가 있었고 alkali에 녹아 R_f 0.45의 물질이 11-oxo-acetyl oleanolic acid(VI)임을 확인할 수 있었다. 이 11-oxo-acetyl oleanolic acid(VI)를 deacetylation하여 11-oxo-oleanolic acid(VII)를 얻었다.

[VII]의 UV, NMR, IR의 spectrum을 11-oxo-acetyl oleanolic acid(VI)의 spectrum과 비교하였더니 UV의 λ_{max}에는 변화가 없고 NMR에서 2.05의 acetyl peak와 IR의 1260cm⁻¹의 흡수 peak가 없어져 deacetylation을 확인할 수 있었으며 spectrum의 다른 peak는 (VII)과 (VI)이 일치해

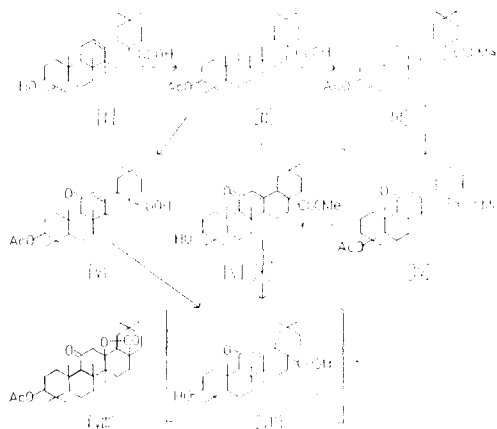


Fig.3—Procedure of synthesis of 11-oxo-compound.

11-oxo-oleanolic acid(VII)의 구조를 확인할 수 있었다.

또한 11-oxo-acetyl oleanolic acid(VI) 분리시 column chromatography에 의하여 분리된 부산물인 R_f 0.8의 물질은 UV의 250nm에서 흡수가 없어 α , β -불포화 ketone이 형성되지 않았음을 알았고 NMR에서 ketone에 인접된 C_9 의 methyne proton과 C_{12} 의 methylene proton으로 인하여 2.35 부근에서 multiplet을 볼 수 있어 일단 산화는 받은 것으로 사료되었다. IR의 1780cm^{-1} 에 5 환 lactone에 의한 흡수 peak가 있어 oleanolic acid acetate기준 double bond에 $-\text{COOH}$ 가 부가해 분자내 lactona이 있는 화합물(VIII)로 추정하였다.

경로 [I]→[II]→[III]→[IV]→[V]는 우선 oleanolic acid(I)를 acetylation과 methylation하여 수산기($-\text{OH}$)와 $-\text{COOH}$ 기를 보호한 후 t-butyl chromate 산화로 11-oxo-acetyl oleanolic acid methyl ester(IV)를 얻었다. 그후 이 물질(IV)을 검화하여 acetyl기와 methyl를 벨러했으나 deacetylation만 되고 C-28의 methyl기가 입체장애¹²⁾로 떨어지지 않아 11-oxo-oleanolic acid의 methyl ester(V)를 얻었으며 물에 녹이기가 어려워 이 물질(V)에 대한 효소반응저지 효과는 측정할 수 없었다.

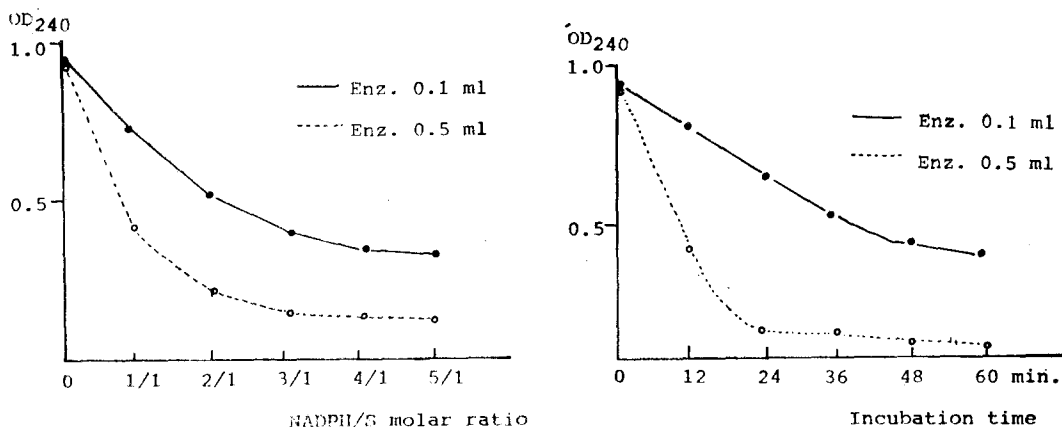


Fig. 4--Reaction velocity/incubation time and NADPH/S molar ratio/enz. concn.

NADPH, 酵素量, 反應時間에 따른 影響—Fig. 4는 효소반응 속도에 미치는 NADPH 첨가량, 반응시간 및 효소량의 변화에 따른 영향을 검토한 것이다. 이 결과에서 효소반응속도가 직선성이 유지되는 범위를 구할수가 있었다. 효소반응 속도에 미치는 저해제의 영향을 정확히 평가하기 위하여는 효소반응 속도가 직선성을 유지하는 범위의 실험조건에서 저해제의 영향을 측정코저 한 것이다.

그 결과 NADPH는 substrate 사용량의 3배이상(Mol 비)은 쓸 필요가 없고 반응시간은 효소량에 달렸지만 대략 0.1ml 사용시는 35분, 0.5ml 사용시는 15분이내로 함이 적합하다는 것을 알았다.

酵素反應 阻害活性 實驗方法 檢討—Fig-5에서 보는 바와 같이 기질로 사용하는 Cortisol의 A ring α , β -불포화 ketone이 UV λ_{max} 가 240인 반면 inhibitor로 첨가한 11-oxo-유도체들도 C-

ring의 α , β -unsatd ketone에 의해 250nm에서 극대흡수를 나타내어 OD₂₄₀ 측정에 간섭이 있었다.

Table I은 zero time에서 1N-HCl이나 alkali를 가하든지 또는 얼음으로 냉각한 다음 substrate 및 inhibitor를 CH₂Cl₂로 추출하여 CH₂Cl₂층의 OD₂₄₀을 측정된 결과이다.

산을 가했을때 S와 S+E의 OD₂₄₀의 차가 0.11이나 있어 산에 의해 세포성분의 용출이 있었음을 알 수 있고 S+I+E의 OD₂₄₀은 S+E의 OD₂₄₀과 I+E의 OD₂₄₀의 加成値에서 크게 오차가 생기고 있음으로 액성을 산성으로 하여 inhibitor 전량추출시도는 좋지 않음을 알았다.

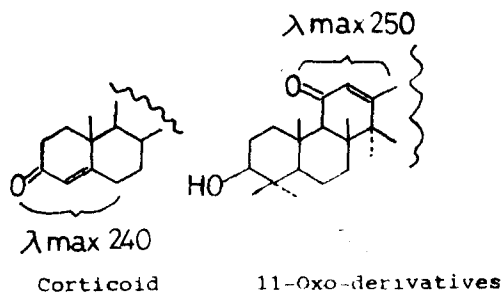


Fig. 5. λ_{max} of corticoid and 11-oxo-derivatives.

Table I—OD₂₄₀ of CH₂Cl₂-extract (zero time).

	Acid	Alkali	Ice-cooling
S	0.70	0.70	0.70
S + E	0.81	0.69	0.67
I + E	0.43	0.02	0.33
S + I + E	1.15	0.67	0.93

(S:Substrate, I:Inhibitor, E:Enzyme)

alkali를 가했을 때는 표에서 보는 바와 같이 inhibitor의 OD₂₄₀치가 0.02로 거의 CH₂Cl₂로 추출되지 않았고 또 S+E와 I+E의 각각의 합이 S와 E를 동시에 넣은 합과 일치함으로 5%-alkali를 효소반응액에 첨가한 다음 CH₂Cl₂로 추출하는 방법을 채택하면 inhibitor 존재시에 OD₂₄₀ 측정에 의하여 효소반응 속도를 정확하게 평가할 수 있다는 것을 알았다.

또 얼음으로 냉각한 다음 추출한 결과에서는 효소반응이 냉각에 의하여 완전하게 저지되지 않음을 알 수 있었고 또한 산을 가했을 때와 마찬가지로 S+I+E의 추출이 완벽하지 못하였다.

阻害率測定—Table II는 합성유도한 11-oxo-oleanolic acid, 11-oxo-hederagenin을 glycyrrhetic acid와 비교해 저해활성을 측정된 것이며 oleanolic acid 및 oleanolic acid acetate와도 저해활성을 동시 비교한 것이다.

그 결과 저해율은 11-oxo-oleanolic acid > 11-oxo-hederagenin > glycyrrhetic acid 순으로 감소

Table II—Inhibitory effect of 11-oxo-derivatives.

Inhibitors ([I]=[S]=2mM)	Inhibition rate (%)
11-Oxo-oleanolic acid	54
11-Oxo-hederagenin	43
Glycyrrhetic acid	23
Oleanolic acid	0
Oleanolic acid acetate	0

Table III—The effects of inhibitor concentrations.

Inhibitors	Molar ratio of I/S	Inhibition %
11-Oxo Oleanolic acid	3/3	41
	2/3	31
	1/3	33
11-Oxo-Hederagenin	3/3	31
	2/3	24
	1/3	15

함을 알았고 oleanolic acid와 acetate 자체는 저해하지 않음을 알 수 있었다.

Table III은 저해제들의 농도를 증가시키기에 따른 효소저해 활성을 측정할 것이다. 저해제농도와 저해율은 직선비례하지는 않지만 전형적인 一次 sigmoid型 kinetic pattern을 나타내고 있다.

Km 및 Ki Value—최고기질 농도(S_1)을 4mM로 하여 2, 3, 4, 5, 6배 희석하고 저해제도를 2 mM로 하여 효소반응시커 반응속도를 Leinweever-Dean-Burk식으로 plot하여 본 결과 competitive inhibition의 kinetic graph를 얻을 수 있었으며 cortisol에 대한 Km 값은 $1.9 \times 10^{-4}M$, 11-oxo-oleanolic acid에 대한 Ki값은 $4.6 \times 10^{-4}M$, 11-oxo-hederagenin에 대한 Ki값은 $5.8 \times 10^{-4}M$ 로 측정되었다.

結 論

1. Oleanolic acid acetate와 hederagerinacetate를 CrO_3 -HAc 산화하고 검화하여 11-oxo-oleanolic acid와 11-oxo-hederagenin을 얻었다.

2. 11-oxo-oleanolic acid 또는 11-oxo-hederagenin 존재하에서 corticoid-5 β -reductase 활성을 측정하는 실험방법을 검토하였으며 효소반응산물에 alkali를 첨가한 다음 CH_2Cl_2 로 추출하여 OD₂₄₀을 측정하는 방법이 적합함을 알았다.

3. 이들 저해제는 경쟁적으로 저해하며 각각의 Ki값은 11-oxo-oleanolic acid가 $4.6 \times 10^{-4}M$, 11-oxo-hederagenin이 $5.8 \times 10^{-4}M$ 로 측정되었다.

本 論文은 1980年度 文教部 學術研究助成費 지원에 의하여 이룩된 것임.

文 獻

1. W. Karrer, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Berkhauser Verlag, p. 797 (1958).
2. A.A. Newman, *Chemistry of Terpens and Terpenoids*, Academic press, p. 239 (1972).
3. A. Kumagai, S. Yano, M. Otomo and K. Takeuchi, *Endocrinol. Japan.*, 4, 17 (1957).
4. Y. Tamura, T. Nishikawa, K. Yamada, M. Yamamoto and A. Kumagai, *Arzneim-Forsch* 29, 4, 647 (1979).
5. S. Barnett J. Pitzele, *Med. Chem.* 17, 2, 191 (1974).
6. A. Brodish, E.S. Redgate and B. Karger, *International Symposium on Brain-pituitary-adrenal Interrelationship*, Cincinnati, (1972).
7. A. Butenandt and E. Hausmann, *J. Paland, Ber.*, 71, 1316 (1938).
8. K. Heusler and A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 35, 284 (1952).
9. D.N. Raol and P. Kurath, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 5660 (1956).
10. A.L. Wilds and C. H. Shunk, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2388 (1950).
11. See the ref. 4
12. D.H.R. Barton and P. De Mayo., *J. Chem. Soc.*, 887 (1954).
13. D. Jerassic and Monsimer H.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2901 (1957).