

Diosgenin 유도체 합성과 진통 및 항고지혈 효과

김학순 · 마은숙[#]

대구가톨릭대학교 약학대학

(Received January 25, 2007; Revised February 7, 2007)

Synthetic Derivatives of Diosgenin and Their Antinociceptive and Antihypercholesterolemic Effects

Haksoon Kim and Eunsook Ma[#]

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Hayang 712-702, Korea

Abstract — Twelve epoxy and hydroxydiosgenin derivatives (**DI-1**~**DI-12**) were synthesized from diosgenin (25(*R*)-5-spirosten-3 β -ol). Diosgenin was epoxidized with *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA) to oxidize 25(*R*)-4 α ,5 α -epoxyspirostanane (**DI-1**). Diosgenin was reacted with DDQ to form 25(*R*)-1,4,6-spirostatrien-3-one (**DI-2**), which was treated with 30% H₂O₂ to give 25(*R*)-1 α ,2 α -epoxy-4,6-spirostadien-3-one (**DI-3**) and treated with *m*CPBA to form 25(*R*)-6 α ,7 α -epoxy-1,4-spirostadien-3-one (**DI-7**), respectively. **DI-3** was reduced with NaBH₄ to afford 25(*R*)-1 α ,2 α -epoxy-4,6-spirostadien-3 β -ol (**DI-4**) and reacted with Li metal in absolute ethanol to form 25(*R*)-2-ethoxy-1,4,6-spirostatrien-3-one (**DI-5**). **DI-7** was reduced with NaBH₄ to produce 25(*R*)-3 β ,7 α -dihydroxy-4-spirostene (**DI-8**) and treated with Li metal in liquid ammonia to produce 25(*R*)-7 α -hydroxy-4-spirosten-3-one (**DI-9**). **DI-2** was reduced with NaBH₄ to form 25(*R*)-4,6-spirostadien-3 β -ol (**DI-10**), which was stirred with 30% H₂O₂ to synthesize 25(*R*)-4,6-spirostadien-3-one (**DI-11**) and reacted with *m*CPBA to give 25(*R*)-4 β ,5 β -epoxy-6-spirosten-3 β -ol (**DI-12**), respectively. The antinociceptive effects of synthesized compounds were measured by hot plate method and compound **DI-7** significantly exhibited antinociceptive effect. **DI-2** decreased the serum triglyceride and total cholesterol levels in poloxamer P-407 injected rat.

Keywords □ diosgenin, epoxidation, antinociceptive, antihypercholesterolemic, hot plate method, poloxamer P-407

Diosgenin은 *Dioscorea* 속 식물의 일부에서 발견되는 대표적인 furostanol sapogenin의 일종으로 화학명은 25(*R*)-5-spirosten-3 β -ol이다. *Dioscorea*는 전 세계적으로 600여종의 식물이 존재하며 이 중 25종만이 식용 가능한 것으로 알려져 있다.¹⁾ Diosgenin은 멕시코에서 주로 재배되는 *Dioscorea villosa*를 잘게 분쇄한 야생 Yam(wild yam)으로부터 대부분 얻어진다. 주요 성분인 dioscin을 산가수분해하여 얻을 수 있으며, 다양한 생리활성 작용을 가지고 있는 화합물이다. 민간에서 야생 Yam은 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 기관지 질환, 장관의 염증성 질환, 소염, 진통작용 및 여성의 폐경기 증후군 등의 치료에 사용되어 왔으며,¹⁾ 특히 구조적인 유사성 때문에 progesterone, estrogen, 및 dehydroepiandrosterone(DHEA) 등의 대용품 및 현재 사용되고

있는 합성 steroid 제품의 주된 합성원료로 사용되어 왔다.^{2,4)}

유해수용성 통증은 강력한 통증 유발인자에 의해 조직 손상이 원인이 되어 나타나는 것으로 이 통증의 조절은 염증성 질환 치료의 주요한 요소이다.⁵⁾ Diosgenin은 소염, 진통작용과 염증성 질환 등에 민간에서 사용하고 있으므로 이들 유도체의 유해수용성 통증에 대한 작용이 있을 것으로 예측된다.

또한, Diosgenin은 구조적인 유사성으로 인해 cholesterol 흡수의 효과적인 저해제로 작용하며, 또한 cholesterol을 중성스테롤로 변화시켜 담즙 밖으로의 배설을 촉진함으로써 serum 및 liver cholesterol이 감소되어 고콜레스테롤혈증에 효과가 있음을 보고하였다.⁶⁻¹²⁾ 고혈압을 동반한 atherosclerosis의 치료에도 효과가 있음이 알려져 있다.¹³⁾

Epoxy 화합물은 유기화합물 합성에 있어서 중간체로서 많이 활용되고 있을 뿐만 아니라 자체로도 다양한 활성을 나타내므로 생리활성 물질의 합성에 널리 이용된다. 특히 cyclic α , β -unsaturated carbonyl compound의 경우는 ring size, steric factor 등의 영향으

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3621 (팩스) 053-850-3602
(E-mail) masook@cu.ac.kr

로 시약에 따라 위치선택적인 epoxidation 및 reduction 반응이 일어나므로 입체선택성 있는 화합물의 합성이 가능하다.¹⁴⁾

본 실험에서는 다양한 활성이 예측되는 diosgenin 유도체 개발의 일환으로 diosgenin의 A, B ring을 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone(DDQ)로 산화시켜 cyclic α,β -unsaturated carbonyl compound로 25(R)-1,4,6-spirostatrien-3-one을 합성한 후 시약에 따른 선택성 있는 epoxy 또는 hydroxy된 유도체를 합성하고, 이들 화합물을 대상으로 hot plate method를 이용한 진통 작용과 poloxamer P-407 유발 고지혈증 실험모델을 활용^{15,16)}하여 지질대사에 미치는 효과를 알아보려고 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

모든 무수 반응은 사용하기 전에 별도의 방법으로 정제 및 건조하여 사용하였으며 합성에 필요한 시약은 Aldrich, Fluka, 및 Sigma사의 특급 및 일급을 사용하였다. 용접 측정기는 Gallenamp 용접측정기를 사용하였고 온도 보정은 하지 않았다. ¹H-, ¹³C-NMR 및 NOESY spectrum은 Varian AS 400 MHz spectrometer를 사용하였고 용매는 CDCl₃와 DMSO-d₆를 사용하였으며 chemical shift는 tetramethylsilane를 내부표준물질로 사용하여 δ (ppm) 단위로 표시하였고 coupling constant값은 Hz로 나타내었다. IR spectrum은 Jasco FT-IR 300E spectrometer를 사용하여 측정하였고 Mass spectrum(FAB)은 Tandem mass spectrometer를 이용하여 측정하였다. Medium performance liquid column chromatography는 YAMAZEN MPLC YFLC-AI-580-10V를 사용하였다. 박층크로마토그래피(TLC)는 silica gel plate(Merck, 60F₂₅₄)를 사용하였고 화합물의 정제는 silica gel(Merck 9385, 230~400 mesh)을 이용하여 column chromatography법으로 하거나 재결정으로 하였다.

합성

25(R)-5 α ,6 α -EpoxySpirostan-3 β -ol(DI-1) – 25(R)-5-spirosten-3 β -ol(diosgenin, 1 g, 2.4 mmol)을 chloroform(100 ml)에 용해시키고 mCPBA(480 mg, 2.78 mmol)을 가하여 반응시켜 화합물 DI-1을 얻었다. Crude product는 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane=1 : 5)로 정제하여 백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 960 mg(93%), mp : 200~202°C(202~204°C).¹⁷⁾

25(R)-1,4,6-Spirostatrien-3-one(DI-2) – Diosgenin(5 g, 12 mmol)을 dioxane(125 ml)에 용해시키고 DDQ(10 g, 88 mmol)을 실온에서 가하고 유속 중에서 24시간 반응시킨 후 MPLC(ethyl acetate : n-hexane=1 : 10)로 분리 정제하여 DI-2를 얻었다.

Yield : 3.04 g(62%), mp : 206~208°C(207~209°C).⁴⁾

25(R)-1 α ,2 α -Epoxy-4,6-spirostadien-3-one(DI-3) – 화합물 DI-2(3 g, 7.34 mmol)을 methanol(60 ml)에 용해시키고 5% NaOH-MeOH(0.6 ml)와 30% hydrogen peroxide(6 ml)을 실온에서 가하고 22시간 반응시키고 MPLC(ethyl acetate : n-hexane = 1 : 10)로 분리 정제하여 화합물 DI-3를 순수하게 얻었다.

Yield : 3.04 g(62%), mp : 220~222°C(219~220°C).¹⁸⁾

25(R)-1 α ,2 α -Epoxy-4,6-spirostadien-3 β -ol(DI-4) – 화합물 DI-3(500 mg, 1.18 mmol)을 absolute ethanol(50 ml)에 용해시키고 sodium borohydride(135 mg, 5.53 mmol)을 실온에서 가한 후 18시간 반응시키고 TLC로 출발물질이 사라짐을 확인하고 HCl 수용액을 가하고 1시간 교반하였다. 반응혼합물을 농축하여 ethanol을 제거하고 남은 물층에 methylene chloride를 가하여 추출하고 무수 MgSO₄로 건조, 여과, 농축하여 조결정을 얻었다. 이를 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane=1 : 5)로 정제하여 백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 267 mg(53%), mp : 199~202°C, IR(KBr) cm⁻¹ : 3391, 2947, 2928, 2867, 1450, 1375, ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.82(3H, d, J=6.2 Hz, H-27), 0.88(3H, s, H-18), 0.90(3H, d, J=6.6 Hz, H-21), 1.03(3H, s, H-19), 3.27(1H, br d, J=10.8 Hz, H-26), 3.35~3.46(2H, m, H-26, H-2), 3.51(1H, d, J=4.2 Hz, H-1), 4.43~4.46(1H, m, H-16), 5.23(1H, s, H-4), 5.67(1H, d, J=4.8 Hz, H-6), 5.95(1H, dd, J=2.2, 10.0 Hz, H-7), ¹³C-NMR(CDCl₃) δ : 140.0, 131.3, 128.1, 121.0, 109.4, 80.7, 67.0, 65.7, 62.0, 58.7, 55.9, 45.6, 41.8, 41.1, 39.7, 36.6, 36.5, 31.6, 30.4, 29.0, 21.2, 17.5, 17.3, 16.4, 14.7, FABMS : 427.1 (M+1)⁺, 409.1(M+1-H₂O)⁺.

25(R)-2-Ethoxy-1,4,6-spirostatrien-3-one(DI-5) – 화합물 DI-3(500 mg, 1.18 mmol)을 ethanol(50 ml)와 tetrahydrofuran (5 ml)에 용해시키고 금속 Li 150 mg을 실온에서 소량씩 여러 번 나누어 가하고 격렬히 교반하여 금속 Li가 거의 다 용해되고 난 후 TLC로 출발물질이 사라짐을 확인하고 빙욕 중에서 물을 서서히 가하였다. 반응혼합물을 감압 농축하고 남은 수층을 methylene chloride로 추출하고 추출액을 brine과 물로 수회 세척한 후 무수 MgSO₄로 건조, 여과하여 얻은 여액을 감압 농축하여 미황색의 유상 물질을 얻었다. 이를 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane=1 : 3)로 정제하여 백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 283 mg(53%), mp : 228~229.5°C, IR(KBr) cm⁻¹ : 2955, 2928, 1651, 1454, ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.80(3H, d, J=6.0 Hz, H-27), 0.90(3H, s, H-18), 0.98(3H, d, J=6.7 Hz, H-21), 1.22(3H, s, H-19), 1.43(3H, t, OCH₂CH₃), 3.31~3.51(2H, m, H-26), 3.85(2H, q, OCH₂CH₃), 4.38~4.49(1H, m, H-16), 5.92(1H, s, H-4), 6.03(2H, d, J=8.6 Hz, H-6, H-7), 6.23(1H, dd, J=2.4, 9.8 Hz, H-1), ¹³C-NMR(CDCl₃) δ : 180.3, 161.4, 149.2, 137.2, 126.2, 122.6, 119.7, 108.3, 79.5, 65.9,

62.2, 61.0, 52.4, 48.6, 40.7, 40.3, 40.0, 38.6, 36.8, 30.4, 30.2, 29.3, 28.7, 21.2, 21.1, 16.1, 15.3, 13.5, 13.3, FABMS : 453.1(M+1)⁺.

25(R)-2-Methoxy-1,4,6-spirostatrien-3-one(DI-6) - 화합물 DI-3(500 mg, 1.18 mmol)을 methanol(50 ml)와 tetrahydrofuran(5 ml)에 용해시키고 DI-5의 합성과 동일하게 실시하여 순수한 화합물을 얻었다.

Yield : 119 mg(23%), mp : 178~181°C, IR(KBr) cm⁻¹ : ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.80(3H, d, J=5.8 Hz, H-27), 0.91(3H, s, H-18), 0.98(3H, d, J=6.8 Hz, H-21), 1.23(3H, s, H-19), 3.31~3.50(2H, m, H-26), 3.68(3H, s, OCH₃), 4.38~4.49(1H, m, H-16), 5.92(1H, s, H-4), 6.06(2H, d, J=6.4 Hz, H-6, H-7), 6.24(1H, dd, J=2.4, 9.8 Hz, H-1), ¹³C-NMR(CDCl₃) δ : 181.2, 162.8, 151.0, 138.6, 127.3, 123.5, 119.8, 109.4, 80.5, 67.0, 62.1, 54.9, 53.5, 49.6, 41.8, 41.4, 41.1, 39.6, 37.9, 31.5, 31.3, 30.3, 28.9, 22.3, 22.2, 17.2, 16.4, 14.6, FABMS : 439.1(M+1)⁺.

25(R)-6α,7α-Epoxy-1,4-spirostadien-3-one(DI-7) - 화합물 DI-2(3 g, 7.35 mmol)을 chloroform(300 ml)에 용해시키고 mCPBA(1.47 g, 8.52 mmol)을 실온에서 가하고 교반하여 TLC로 반응의 종결을 확인, 정제하여 백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 1.97 g(63%), mp : 265~267°C(264~265°C).¹⁸⁾

25(R)-3β,7α-Dihydroxy-4-spirostene(DI-8) - 화합물 DI-7(500 mg, 1.18 mmol)을 absolute ethanol(50 ml)에 용해시키고 sodium borohydride(135 mg, 5.53 mmol)를 가하여 화합물 DI-4의 합성 방법과 동일하게 처리하여 미백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 258 mg(53%), mp : 130~133.5°C, IR(KBr) cm⁻¹ : 3410, 2945, 1455, 1367, ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.80(3H, d, J=8.6 Hz, H-27), 0.83(3H, s, H-18), 0.97(3H, d, J=6.4 Hz, H-21), 1.30(3H, s, H-19), 3.26~3.47(3H, m, H-7, H-26), 4.27(1H, m, H-3), 4.50(1H, m, H-16), 5.90(1H, s, H-4), FABMS : 413.1(M+1-H₂O)⁺.

25(R)-7α-Hydroxy-4-spirosten-3-one(DI-9) - 완전히 건조시킨 둥근플라스크에 dropping funnel, cold trap 장치 및 질소가스 유입장치를 한 후에 dry-ice bath에 담그고 liquid ammonia(50 ml)를 가하고 -78°C로 냉각시킨 후 금속 Li를 가하였다. 여기에 무수 tetrahydrofuran(20 ml)에 용해시킨 화합물 DI-7(500 mg, 1.18 mmol)을 서서히 가한 후 반응혼합물을 실온으로 올리고 1시간 동안 격렬히 교반시켰다. 반응혼합물을 다시 -78°C로 냉각시킨 후 NH₄Cl을 소량씩 가하여 백색의 점조성 물질이 생성되면 반응혼합물을 다시 실온에서 1시간 교반 시켰다. 반응혼합물에 물을 가하고 충분히 교반시키고 tetrahydrofuran으로 추출하고 물로 세척한 후 MgSO₄로 건조, 여과하여 여액을 감압 농축하여 pale yellow의 유상물질을 얻었다. 이를 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane=1 : 5)로 정제하여 백

색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 212 mg(42%), mp : 225~227°C, IR(KBr) cm⁻¹ : 3420, 1950, 1654, 1448, ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.80(3H, d, J=6.2 Hz, H-27), 0.83(3H, s, H-18), 0.98(3H, d, J=6.4 Hz, H-21), 1.21(3H, s, H-19), 3.37~3.47(2H, m, H-26), 3.97(1H, br s, H-7), 4.45~4.55(1H, m, H-16), 5.81(1H, s, H-4), FABMS : 429.4(M+1)⁺, 411.4(M+1-H₂O)⁺.

25(R)-4,6-Spirostadien-3β-ol(DI-10) - 화합물 DI-2(1 g, 2.45 mmol)에 absolute ethanol(100 ml), sodium borohydride(370 mg, 9.8 mmol)을 가하고 DI-4의 합성 방법과 동일하게 처리하여 백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 900 mg(89%), mp : 184~186°C.¹⁸⁾

25(R)-4,6-Spirostadien-3-one(DI-11) - 화합물 DI-10(500 mg, 1.20 mmol)을 methanol(10 ml)에 용해시키고 5% NaOH-MeOH(0.25 ml), 30% hydrogen peroxide(0.75 ml)을 가하고 DI-3의 합성 방법과 동일하게 처리하여 미백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 74 mg(15%), mp : 204~205°C.¹⁸⁾

25(R)-4β,5β-Epoxy-6-spirosten-3β-ol(DI-12) - 화합물 DI-10(1 g, 2.43 mmol)을 chloroform(100 ml)에 용해시키고 mCPBA(486 mg, 2.82 mmol)을 실온에서 가하고 교반하여 TLC로 반응의 종결을 확인하고 DI-1과 동일하게 처리하여 백색의 순수한 결정을 얻었다.

Yield : 603 mg(58%), mp : 114~116°C.¹⁸⁾

실험동물

실험동물은 (주)대한 바이오파크(충북 음성)로부터 분양받아 동물 사육실에서 일정한 조건(온도 : 22±1°C, 습도 55±3%, 명암 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨 체중 18±2 g의 ICR계 웅성 mouse와 체중 200±10 g의 Sprague-Dawley계 rat를 각 group 당 6마리씩 사용하였다. 시료의 투여는 실험동물에 5% tween 80에 현탁시켜 100 mg/kg을 경구 투여한 후 1시간 후에 측정하였다. Normal 군은 5% tween 80의 동일 용량을 경구로 투여하였다.

통계처리

통계처리는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

Hot plate 법에 의한 진통효과 측정

Hot plate 법에 의한 진통작용 측정은 실험동물에 시료를 각 각 경구 투여하고 한 시간 후에 70°C hot plate 위에 올려놓고 mouse가 열판에 접촉함과 동시에 뛰어들 때까지의 시간(sec)을 측정하였다.¹⁹⁾ 시험물질은 시험 60분 전에 경구로 투여하였

고 양성대조약물로 morphine과 diclofenac을 사용하였다.

Poloxamer P-407을 이용한 항고지혈 효과 측정

Poloxamer P-407(Pluronic F-127, M.W.=12,600)로 고지혈증을 유도하기 위하여 poloxamer P-407 용액을 cold method에 따라 조제하였으며, 중류수에 용해시켜 시료를 일주일간 투여한 마지막 날 300 mg/kg씩 복강 내 투여하고 24시간 후 처치하였다.

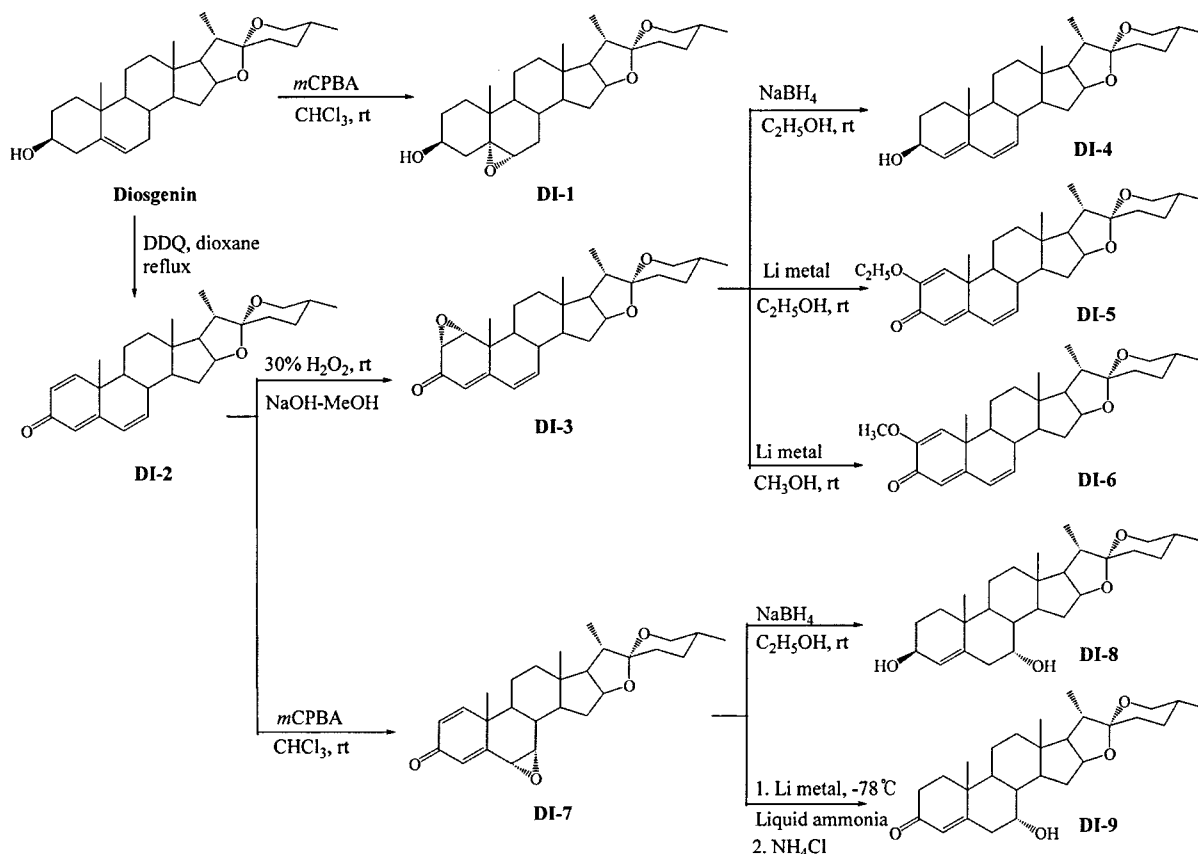
실험동물을 이산화탄소 가스로 가볍게 마취시킨 후 복부 정중선을 개복하여 복부 대동맥에서 혈액을 채취한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리기로 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중의 total cholesterol 함량은 Richmond 등의 효소법²⁰⁾에 의하여 조제된 kit(AM 202-K, Asan)을 사용하여 측정하였다. Triglyceride 함량은 McGowan 등의 방법²¹⁾에 준하여 조제된 kit(AM 157S-K, Asan)을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

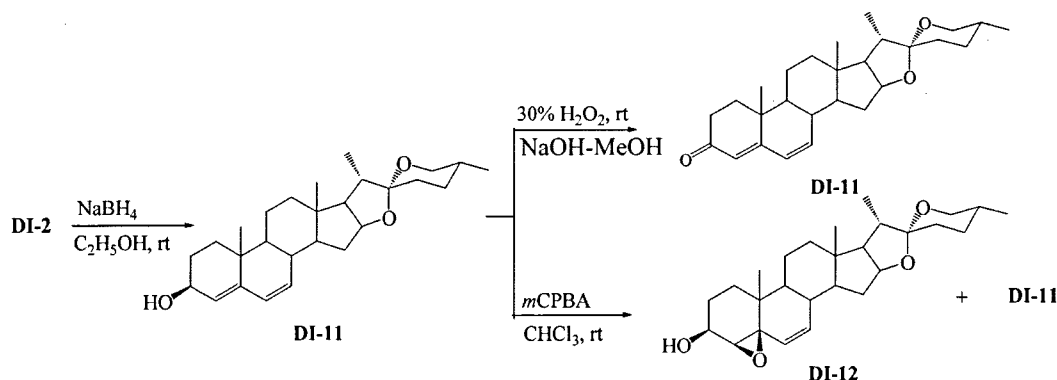
합성

Diosgenin을 출발물질로 사용하여 선택적인 에폭시화 반응과

환원반응을 통하여 12종의 화합물(DI-1~DI-12)을 합성하였으며 합성방법은 Scheme 1, 2에 나타내었다. Diosgenin의 4, 5 위치에 epoxidation 시키기 위하여 *m*CPBA를 사용하여 반응시킨 결과 25(*R*)-5 α ,6 α -epoxyspirostan-3 β -ol(DI-1)이 합성되었다. 5 α ,6 α -Epoxidation에 대한 구조 해석은 C-19번의 methyl proton과 H-5, H-6간의 correlation이 NOESY spectrum에서 관찰됨으로서 확인하였다. Diosgenin의 A, B ring의 적절한 위치에 epoxy기를 도입하기 위하여 먼저 이중결합을 얻고자 DDQ를 사용하여 25(*R*)-1,4,6-spirostatrien-3-one(DI-2)를 합성하고, 이를 hydrogen peroxide와 *m*CPBA로 각각 epoxidation시켜 25(*R*)-1 α ,2 α -epoxy-4,6-spirostadien-3-one(DI-3)와 25(*R*)-6 α ,7 α -epoxy-1,4-spirostadien-3-one(DI-7)을 시약에 따라 위치선택적으로 합성하였다. DI-3를 sodium borohydride로 환원시킨 결과 3번의 carbonyl기가 환원된 화합물인 25(*R*)-1 α ,2 α -epoxy-4,6-spirostadien-3 β -ol(DI-4)가 합성되었다. 생성물의 구조는 IR spectrum의 1669 cm⁻¹의 carbonyl기 흡수band가 사라지고 3391 cm⁻¹에서 OH기의 흡수 band가 얻어졌으며, ¹H-NMR spectrum에서 5.23, 5.67, 5.95 ppm에서 이중결합 수소 3개와 3.35-3.46, 3.27 ppm에서 epoxy환에 결합된 H-1, H-2의 peak가 나타난 것으로 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum의 193.6 ppm에서 나타났던 carbonyl



Scheme 1 – Positionselective epoxidation and reduction methods of diosgenin derivatives.



Scheme 2 – Reaction of 4,6-spirostadien-3 β -ol (DI-10) with 30% H₂O₂ and mCPBA.

carbon peak가 사라짐을 확인하였다. DI-3를 무수 ethanol에서 Li metal과 반응시킨 결과 25(R)-2-ethoxy-1,4,6-spirostatrien-3-one(DI-5)이 생성되었다. 이는 metal dissolving reduction에 의한 epoxy ring cleavage보다는 반응 중에 생성된 ethoxide anion이 치환체로서 2번 위치의 공격으로 생성된 OH와 수소에 대하여 base로 작용하여 dehydration시킨 결과로 생각되었다. 화합물의 구조는 ¹³C-NMR spectrum의 149.2, 137.2, 126.2, 122.6, 119.7, 108.3 ppm에서 6개의 이중결합 carbon을 확인하였고, ¹H-NMR spectrum의 5.92, 6.03, 6.23 ppm에서 이중결합 수소 4개를 확인하였다. 이는 용매로 methanol을 사용한 경우 ¹H-NMR spectrum의 3.68 ppm에서 OCH₃에 해당하는 수소 peak가 singlet으로 나타나는 것으로 보아 25(R)-2-methoxy-1,4,6-spirostatrien-3-one(DI-6)이 합성되었음을 확인할 수 있었으며 이는 사용한 용매의 영향에 의한 것임을 알 수 있었다.

25(R)-6 α ,7 α -Epoxy-1,4-spirostadien-3-one(DI-7)을 출발물질로 사용하여 sodium borohydride와 반응시킨 결과 1, 2의 이중결합과 3번의 carbonyl기가 환원되고 6, 7의 epoxy ring이 개환되어 7번 위치에 OH기가 생성된 화합물인 25(R)-3 β ,7 α -dihydroxy-4-spirostene(DI-8)이 생성되었다. 7번 OH기가 α -configuration인 NOESY spectrum 측정 결과 19번 methyl 수수와 7 β -hydrogen과의 cross peak가 관찰됨으로서 확인 가능하였다. Four neck flask를 -78°C의 dry-ice bath에 담그고 liquid ammonia와 Li를 가하고 교반시킨 후 THF에 녹인 DI-7를 가하여 반응시키고 NH₄Cl을 가하여 반응을 종결시켜 1, 2위치의 이중 결합 환원과 6, 7의 epoxy ring이 개환된 화합물 25(R)-7 α -hydroxy-4-spirosten-3-one(DI-9)를 합성하였다. Metal dissolving reduction은 carbonyl기에 대한 반응성은 나타나지 않았다.

DI-2를 sodium borohydride로 환원시킨 결과 1, 2 및 1, 4-addition 생성물인 4,6-spirostadien-3 β -ol(DI-10)이 합성되었다. DI-10을 이용하여 30% hydrogen peroxide와 mCPBA로 각각 반응시킨 결과 hydrogen peroxide로 반응시킨 경우는 이중 결합에 대한 epoxy ring 생성은 일어나지 않았으며 3번의 OH기가

산화된 화합물인 25(R)-4,6-spirostadien-3-one(DI-11)이 15% 얻어졌다. mCPBA의 경우는 4,5- 위치의 이중결합이 epoxy된 화합물이 생성되었으며 3 β -OH기의 영향으로 peroxy acid의 β attack에 의하여 25(R)-4 β ,5 β -epoxy-6-spirosten-3 β -ol(DI-12)가 주생성물로 DI-11이 minor product로 생성되었다.

Hot plate 법에 의한 진통효과 측정 결과

Hot plate method는 열에 의한 유해 수용기 자극을 통한 동통 반응 시간을 지표로 하여 진통 효과를 측정하는 방법으로 중추성 진통 효과를 알아보는 시험법으로 알려져 있다.^{22,23} 본 실험에서는 양성대조 물질로 중추작용성 진통제인 morphine과 비스테로이드성 소염진통제인 diclofenac을 각각 사용하여 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같다(Table I). 정상군의 동통 반응 시간은 19.5 \pm 1.61초였으며, 25(R)-6 α ,7 α -epoxy-1,4-spirostadien-3-one(DI-7)는 38.2 \pm 13.8초로 morphine 10 mg을 투여한 군 30.6 \pm 0.5초 보다 우수한 진통효과를 나타냈으며, DI-3은 28.6 \pm

Table I – Antinociceptive effects of diosgenin derivatives by hot plate method in mice

Treatment	Dose (mg/kg, po)	Retention time (sec.)
Normal		19.5 \pm 1.61 ^{h,i,1,2)}
DI-1	100	18.1 \pm 4.08 ⁱ
DI-2	100	20.7 \pm 5.52 ^{h,i}
DI-3	100	28.6 \pm 1.82 ^{d,e,f,g}
DI-4	100	16.7 \pm 1.24 ⁱ
DI-5	100	25.2 \pm 5.52 ^{e,f,g,h}
DI-7	100	38.2 \pm 13.8 ^{a,b}
DI-8	100	17.5 \pm 2.12 ⁱ
DI-10	100	28.2 \pm 4.51 ^{d,e,f,g}
DI-12	100	20.2 \pm 1.80 ^{h,i}
Morphine	10	30.6 \pm 0.5 ^{d,e,f,g}
Diclofenac	25	19.6 \pm 2.3 ^{h,i}

The assay procedure was described in the experimental methods.

1) Values represent mean \pm S.D. (n=6).

2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table II – Effects of diosgenin derivatives on the serum triglyceride and total cholesterol levels in poloxamer P-407 injected rat

Treatment	Dose (mg/kg)	Triglyceride mg/dl	Total cholesterol mg/dl
Normal		78.4±7.60 ^{i,1,2)}	69.4±7.30 ^g
Poloxamer P-407	100	1004.1±58.9 ^{b,c}	750.8±52.7 ^{a,b}
DI-1	100	989.0±26.5 ^{c,d,e}	790.6±33.3 ^{a,b}
DI-2	100	763.3±23.1 ^g	580.6±40.5 ^a
DI-3	100	1127.0±70.9 ^{a,b}	760.9±23.6 ^{a,b,c}
DI-4	100	1028.6±63.5 ^{b,c}	784.5±30.0 ^{a,b}
DI-7	100	1097.4±63.4 ^{a,b}	753.2±33.9 ^{b,c}
DI-8	100	1039.1±49.6 ^{b,c}	774.8±29.8 ^{a,b,c}
DI-10	100	923.9±49.6 ^{d,e,f}	810.6±29.8 ^a

The assay procedure was described in the experimental methods.

1) Values represent mean±S.D. (n=6).

2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

1.82초, DI-10은 28.2±4.51초로 morphine과 유사한 효과를 보였다. 진통시간의 증가를 보인 DI-7과 DI-3는 6, 7위치와 1, 2위치에 각각 epoxy ring을 가진 화합물들임을 알 수 있었다. Diclofenac 25 mg 투여군은 hot plate method에서의 진통효과는 19.6±2.3초로 정상군과 차이가 없었다.

Poloxamer P-407을 이용한 항고지혈 효과 측정 결과

Poloxamer P-407은 계면활성제의 하나로 간에서 cholesterol을 합성하는데 가장 중요한 효소 중의 하나인 HMG-CoA reductase의 활성을 증진시킨다. 또한 이 물질은 상피세포 표면에 존재하며 순환하고 있는 혈중 triglyceride의 가수분해에 관여하는 효소인 lipoprotein lipase를 강력히 억제함으로써 고지혈증이나 고콜레스테롤증을 야기 시키므로 이를 이용하여 화합물의 화학적 활성 증진 효과를 측정하고 새로운 실험 model로서 기존의 방법에 비해 고지혈증 발생 기전을 검토하는데 유리한 장점을 가지고 있는 방법으로 이를 이용한 항고지혈효과는 Table II에 나타내었다.

Poloxamer 투여군의 triglyceride가 1004.1±58.9 mg/dl, total cholesterol이 750.8±52.5 mg/dl이었으며 DI-2의 triglyceride가 763.3±23.1 mg/dl, total cholesterol이 580.6±40.5 mg/dl로서 유의성 있는 감소 효과를 나타냈다. Epoxy ring을 가지고 있는 DI-3, DI-4, DI-7, DI-8 등은 오히려 이들 수치를 증가시키는 것으로 나타났다.

결 론

다양한 생리 활성을 나타내는 diosgenin의 위치선택성 있는 epoxy 및 hydroxy diosgenin 유도체 12종을 합성하였고 일부 화

합물에 대하여 hot plate method에 의한 동통 감소 효과를 측정 한 결과 25(R)-6 α ,7 α -epoxy-1,4-spirostadien-3-one(DI-7)이 가장 효과가 우수하였다. Poloxamer P-407을 이용한 항고지혈효과는 DI-2가 total cholesterol 및 triglyceride의 감소 효과를 보이 나 다른 화합물은 효과가 없었다.

감사의 말씀

본 연구는 대구가톨릭대학교의 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

- Dewick, P. M. : *Medicinal Natural Products*, 2nd ed. John Wiley & Sons, p. 237 (2002).
- Datt, K., Datta, S. K. and Datta, P. C. : Pharmacognostic evaluation of potential yams *Dioscorea*. *J. Economic & Taxonomic Botany* 5, 181 (1984).
- Noam, M., Tamir, I., Bauer, E. and Mechoulam, R. : Conversion of ruscogenin into 1 α - and 1 β -hydroxycholesterol. *Tetrahedron* 37, 597 (1981).
- Liu, M., Yu, B. and Hui, Y. : First total synthesis of 25(R)-ruscogenin-1 β -yl-D-xylopyranosyl-(1→3)-(1 β -D-lucopyranosyl-(1→2)- β -D-fucopyranoside, an Ophiopogonin saponin from the tuber of *Liliope muscari* (Decne.). *Tetrahedron Lett.* 39, 415 (1998).
- Ritter, H. L. and Stein, C. : Involvement of cytokines, chemokines and adhesion molecules in opioid analgesia. *Eur. J. Pain* 9, 109 (2005).
- Peifer, J. J. and Guzman, J. : Hypocholesterolemic effects of diosgenin in the rat. *Circulation* 34, III-25 (1966).
- Cayen, M. N. and Dvornik, D. : Effect of diosgenin in lipid metabolism in rats. *J. Lipid Res.* 20, 162 (1979).
- Uchida, K., Takase, H., Nomura, Y., Takeda, K., Takeuchi, N. and Ishikawa, Y. : Changes in biliary and fecal bile acids in mice after treatments with diosgenin and β -sitosterol. *J. Lipid Res.* 25, 236 (1984).
- Thewles, A., Parslow, R. A. and Coleman, R. : Effect of diosgenin on biliary cholesterol transport in the rat. *Biochem. J.* 291, 793 (1993).
- Holland, R. E., Rahman, K., Morris, A. I., Coleman, R. and Billington, D. : Effects of niacin biliary lipid output in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 45, 43 (1993).
- Roman, I. D., Thewles, A. and Colman, R. : Fractionation of liver following diosgenin treatment to elevate biliary cholesterol. *Biochem. Biophys. Acta.* 1255, 77 (1995).
- Accatino, L., Pizarro, M., Solis, N. and Koenig, C. G. : Effects of diosgenin a plant-derived steroid on bile secretion and

- hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. *Hepatology* **28**(1), 129 (1996).
- 13) Laguna, J., Gomez-Puyoy, A., Pena, A. and Guzman-Garcia, J. : Effect of diosgenin on cholesterol metabolism. *J. Atheroscler. Res.* **2**, 459 (1962).
- 14) Yang, D. and Jiao, G.-S. : Highly β -selective epoxidation Δ^6 -unsaturated steroids catalysed by ketones. *Chemistry* **6**(19), 3517 (2000).
- 15) Wout, Z. G. M., Pec. E. A., Maggiore, J. A., Williams, R. H., Palicharla, P. and Johnston, T. P. : Poloxamer 407-mediated changes in plasma cholesterol and triglyceride following intraperitoneal injection to rats. *J. Parenteral Sci. Technol.* **46**, 1037 (1992).
- 16) Johnston, T. T. and Palmer, W. K. : Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1037 (1993).
- 17) Korde, S. S., Baig, M. H. A., Desai, U. R. and Trivedi, G. K. : Differential behavior of (25R)-5,6-epoxyspirostan-22 α -O-3 β -ol and (25R)-5,6-epoxyspirostan-22 α -O-3 β ,4 β -diol toward Dowex. *Steroids* **61**, 290 (1996).
- 18) Ma, E. and Kim, J. : Epoxidation of diosgenin, 25(R)-1,4,6-spirostatrien-3-one and 25(R)-4,6-spirostadien-3 β -ol. *Molecules* **8**, 886 (2003).
- 19) Woolfe, G. and MacDonald, A. D. : The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **80**, 300 (1944).
- 20) Richmond, W. : Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin. Chem.* **22**, 1579 (1976).
- 21) McGowan, W., Artiss, J. D. and Stranbergh, D. R. : A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* **29**, 538 (1983).
- 22) Sandrini, M., Vitale, G. and Pini, L. A. : Central antinociceptive activity of acetylsalicylic acid is modulated by brain serotonin receptor subtypes. *Pharmacology* **65**, 193 (2002).
- 23) Bulka, A., Wiesenfeld-Hallin, Z. and Xu, X. J. : Differential antinociception by morphine and methadone in two sub-strains of Sprague-Dawley rats and its potentiation by dextromethorphan. *Brain Res.* **942**, 95 (2002).