

韓國產 福壽草成分의 Na^+ , K^+ -ATPase活性에 대한 研究

노재섭 · 이경순 · 박응양 · 오갑진
안병태 · 어경춘 · 정도래 · Toshio Nambara*
충북대학교 약학대학 · 일본도호쿠대학 약학부*

Studies on Na^+ , K^+ -ATPase Activity of the Constituents of *Adonis amurensis* in Korea

Jai Seup Ro, Kyong Soon Lee, Woong Yang Park, Kap Jin Oh, Beung Tae Ahn,
Kyong Chun Eo, Do Rae Jeong, Toshio Nambara*
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea and
Pharmaceutical Institute, Tohoku University, Sendai 980, Japan*

Abstract—Four known cardiotonic steroids were isolated from roots of *Adonis amurensis* Regel et Radde and identified as digitoxigenin, cymarín, K-strophanthin and convallatoxin by chromatography on Amberlite XAD-2 resin and silica gel, high-performance liquid chromatography and gel chromatography on Sephadex LH-20. In order to clarify the structure-activity relationship, thirteen related compounds of digitoxigenin were tested for the inhibitory activities for Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase from guinea pig heart. The inhibitory activities of related compounds of digitoxigenin were dependent upon the dicarboxylic acid and amino acid components. The compound having both the arginine and suberic acid moiety showed the higher inhibitory activity. The sulfate and glucuronide of digitoxigenin exhibited much less potency than the parent genin.

Keywords: *Adonis amurensis* · Na^+ , K^+ -ATPase · structure-activity, relationship · digitoxigenin · cymarín · K-strophanthin · convallatoxin

우리나라에서 자생하는 복수초(*Adonis amurensis* Regel et Radde)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 이른봄에 선황색의 꽃이 줄기끝에 피고 삭과는 녹색이다. 근경은 짧고 흑갈색의 수염뿌리가 많다. 이 뿌리를 한방에서 옛부터 강심, 이뇨제로 사용하고 있다.¹⁻³⁾

*Adonis*속 식물의 성분연구로는 *Adonis vernalis*로부터 Kalz 등⁴⁾이 adonitoxin을, Pitra 등⁵⁾이 adonitoxin, adonitoxin-(3-O-acetyl)-L-rhamnopyranoside, 16-hydroxystrophanthin을, Pola-

kova 등⁶⁾이 cymarín, adonitoxin, strophanthin, strophadogenin, acetylodonitoxin을, Junior 등⁷⁾이 3-epiperiplogenin을, Winkler 등⁸⁾이 adonitoxigenin-3-O- α -L-rhamnosido- β -D-xyloside, adonitoxigenin-3-[O- α -L-(2'-O-acetyl) rhamnosido-] β -D-xyloside, adonitoxigenin-3-[O- α -L-(3'-O-acetyl) rhamnosido-] β -D-xyloside를, Reichstein 등⁹⁾이 cymarín을, *A. leiosepale*로부터 Evdokimov¹⁰⁾가 cymarín, K-strophanthin- β 를, *A. aleppica*로부터 Junior 등¹¹⁾이 3-epiperiplogenin, periplorhanoside, strophanthin diginoside, convallatoxin,

convallatoxin을, *A. tianshanica*로 부터 Evdokimov¹²⁾가 strophanthidin, cymarín, K-strophanthin- β , convallatoxin, digitoxigenin, adonitoxin 등을, *A. amurensis*로 부터 Santavy등¹³⁾이 cymarín을, Ponomarenko등¹⁴⁾이 cymarín, convallatoxin, strophanthin, K-strophanthin- β , strophanthidol을, Skorzova등¹⁵⁾이 K-strophanthin- β , adonitoxin, strophanthidin, cymarín등을 각각 분리 보고 하였다.

그러나 우리나라에 자생하고 있는 복수초의 성분과 작용에 관한 현대약학적인 연구보고가 거의 없음을 착안하여 저자들은 국산생약자원 개발 및 신약창출의 차원에서 그 생물화성을 규명하고자 본 연구를 시도하였다. 이에 저자들은 본 약용식물의 뿌리 EtOH extract로 부터 용매분획법과 TLC, HPLC등을 실시하여 4종의 강심성 steroid를 분리하였고, digitoxigenin 관련물질들의 Na⁺, K⁺-ATPase활성억제¹⁶⁻¹⁸⁾를 측정하였기에 그 결과를 보고한다.

실험 방법

재료식물

본 실험에 사용된 복수초(*Adonis amurensis*)는 경기도 용진군 대부분 풍도리 지역에서 1988

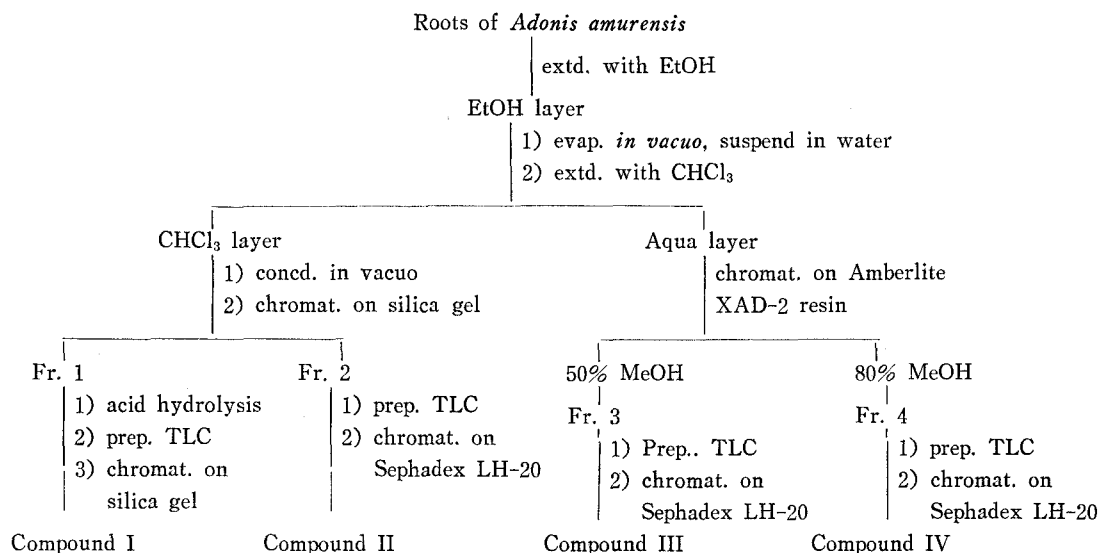
년 4월중에 채집하여 뿌리를 음건, 세절하여 실험재료로 사용하였다.

시약 및 기기

시약은 분석용 특급시약을 사용하였고 column chromatography용 충전제는 Kiesel gel 60 (E. Merck, 70~230 mesh), Sephadex LH-20 (Sigma Co.), Amberlite XAD-2 resin (Rohm & Hass Co.)을 사용하였다. 표준 digitoxigenin, cymarín, K-strophanthin 및 convallatoxin등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다, HPLC는 Waters Associates Co.의 M-45 solvent delivery system, M-481 spectrophotometer, M-730 Data Module이 부착된 것을, column은 Radial Pak C₁₈ (10 cm×0.8 cm i.d.)과 PARTISIL 10-SAX (25 cm×0.4 cm i.d., Whatman Co.), membrane filter는 column guard (0.45 μ m, Nihon Millipore Co.), 초원심 분리는 Beckman L5-65, 용점은 Büchi apparatus 510-K (uncorrected)를 사용하였다.

재료의 분획 및 유효성분의 분리

복수초 뿌리 4.2 kg을 EtOH로 실온에서 3개월간 침출한후 celite로 여과, 여액을 50° 이하에서 감압농축한후 CHCl₃로 추출하여 CHCl₃분획을 얻었다. 이 분획을 CHCl₃ : MeOH(93 : 7) 용매로 부터 시작하여 10 : 1, 9 : 1, 8 : 2, 5 : 5



Scheme I. Separation of Compound I, II, III and IV from Roots of *Adonis amurensis*.

3 : 7 까지 순차적으로 용매극성을 증가시키면서 silica gel column chromatography를 행하여 fraction 1, 2를 얻었다. H₂O분획은 감압하에 유기 용매를 제거, 20배량의 증류수를 가하여 희석한 후 Amberlite XAD-2 resin column (60 cm×2.6 cm i.d.)을 통하여 서서히 유출, 과량의 증류수로 세척한후 50%, 80% MeOH로 용출하여 fraction 3, 4를 얻었다(Scheme I).

Fraction 1을 SiO₂ column에 걸어 CHCl₃-MeOH-H₂O (13 : 7 : 2, lower phase)로 용출시켜, preparative TLC를 행하여 CHCl₃-MeOH-H₂O (80 : 20 : 2.5) Rf 0.48, C-H₂SO₄에 blue, cardenolide 정색시약인 Kedde시약에 blue violet로 양성인 분획을 감압농축하여 무색의 조결정을 얻었다. 이 조결정에 MeOH, 0.1N H₂SO₄를 소량가하여 수용상에서 30분간 환류, 가수분해하였다. 이 반응액에 증류수를 가하고 EtOAc로 3회 반복추출 증류수로 세척 탈수한후 preparative TLC를 행하여 EtOAc-benzene(1 : 1)에 Rf 0.31, CHCl₃-MeOH-H₂O(80 : 20 : 2.5)에 Rf 0.15, C-H₂SO₄에 청색, cardenolide계 특이 발색시약인 Kedde시약에 blue violet로 양성인 분획을 모아 감압농축하여 compound I (mp 253~254°)를 얻었다.

Fraction 2, 3, 4를 SiO₂ column에 걸어 CHCl₃-MeOH-H₂O(80 : 20 : 2.5)로 용출시켜 preparative TLC를 행하여 CHCl₃-MeOH-H₂O(80 : 20 : 2.5)에 Rf 0.78, 0.66, 0.21, C-H₂SO₄에 청색, cardenolide계 특이 발색시약인 Kedde시약에 blue violet로 양성인 분획을 모아 감압농축, Sephadex LH-20 column에 걸어 MeOH로 용출하여

cardenolide계 물질로 추정되는 compound II(mp 147~148°), compound III (mp 231~232°) 및 compound IV (mp 237~240°)를 얻었다(Fig. 1).

HPLC에 의한 성분분리 확인

HPLC용 column은 Radial Pak C₁₈ (8 mm i.d. ×10 cm)을 이동상으로써 CH₃CN : H₂O(2 : 3)을 사용하였으며, 용매 유속은 0.8 ml/min, UV detector 파장은 220 nm, 감도는 0.05 AUFS, chart speed는 0.5 cm/min으로 하여 compound I, II, III 및 IV를 실온에서 분리, 확인하였다.^{19~21)} 표준물질로는 K-strophanthin, convallatoxin, cymarín, digitoxigenin을 사용하였으며 전형적인 표준물질의 HPLC chromatogram은 Fig. 2과 같았다.

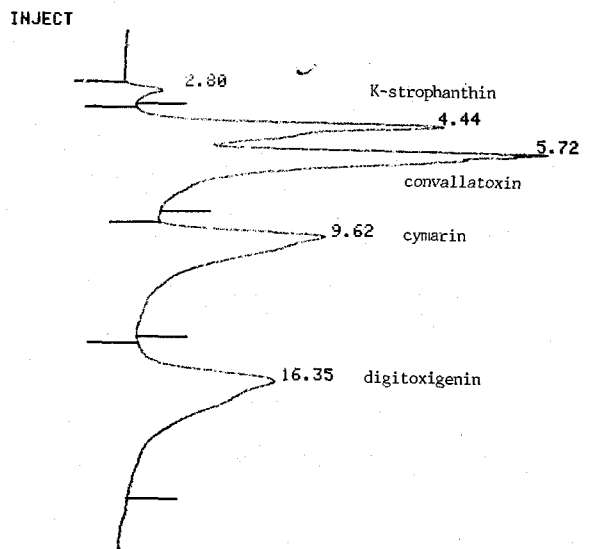
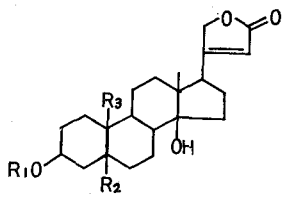


Fig. 2. HPLC chromatogram of standards.



	R ₁	R ₂	R ₃
Compound I	H	H	CH ₃
Compound II	D-cymarose	OH	CHO
Compound III	D-cymarose-2-D-glucose	OH	CHO
Compound IV	D-rhamnose	OH	CHO

Fig. 1. Structures of compound I, II, III and IV.

Na⁺, K⁺-ATPase의 조제

우성 guinea pig (600~800 g)의 심근으로부터 Nakao등²²⁾의 방법으로 Scheme II와 같이 조제하였다. Protein량은 Lowry법²³⁾에 의하여 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 측정하였으며, 활성비는 10 μmol pi/ng protein/hr. 되도록 희석하여 사용하였다.

Na⁺, K⁺-ATPase 활성측정

Na⁺, K⁺-ATPase는 생체막에 널리 분포하며 Na⁺, K⁺의 능동수송에 관여하는 중요한 효소이다.²⁴⁾ 강심작용의 지표로 Na⁺, K⁺-ATPase 활

Guinea pig heart

- washed with 0.25 M sucrose containing 5 mM EDTA (pH 7.4 imidazole)
- homogenize in 0.25 M sucrose (25,000 r.p.m.)
- centrifuge at 1,000 r.p.m. for 5 min.

Supernatant

- ultra centrifuge at 105,000 × g for 60 min.

Pellet

- suspend in 0.25 M sucrose containing 5 mM EDTA (pH 7.4 imidazole)
- ultra centrifuge at 105,000 × g for 60 min.

Pellet

- suspend in H₂O (5 mM Na₂ EDTA, pH 7.4), and add 6.6 M NaI, stirring slowly for 30 min.
- ultra centrifuge at 30,000 × g for 30 min.

Pellet

- washed with H₂O (5 mM Na₂ EDTA)
- ultra centrifuge at 30,000 × g for 30 min. (repeat 3 time)

Pellet

- suspend in H₂O (5 mM EGTA, Tris, pH 7.4)
- store at -20°

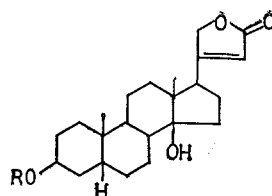
Enzyme

Scheme II. Preparation of Na⁺, K⁺-ATPase from guinea pig heart.

성측정방법이 이용되고 있으며 이의 측정방법으로 최근 Shimada 등¹⁷⁾은 반응 기질에 존재하는 ATP 잔여량과 생성된 ADP 양비를 UV 검출 HPLC로 정량 측정하는 간편하고 감도 및 정밀도가 우수한 방법을 보고하였다.

저자들은 강심성 steroid의 구조활성상관 관계를 관찰하기 위하여 Nakao 등²²⁾의 방법에 따라 조제한 Na⁺, K⁺-ATPase 활성^{25,26)}을 Shimada 등¹⁷⁾의 HPLC에 의한 측정방법에 따라서 ouabain을 표준물질로 하여 compound I 관련물질의 I₅₀을 측정하였다.²⁷⁾ 본 실험에 사용한 compound I 관련물질은 日本 東北大學 藥學部 藥品分析學研究室에서 합성하여 사용하였다.²⁸⁻³⁰⁾ (Fig. 3)

강심성 steroid의 활성을 측정하기 위한 배양액 기질의 조성은 Assay medium (NaCl 100 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA-tris 1 mM, Tris-HCl buffer pH 7.4 50 mM) 200 μl에 조제 효소 (10~39 μg protein) 50 μl 및 각종농도의



- | | |
|-------------------|-------------------------|
| Compound I R=H | Ig R=sub-L-Glu·OH |
| Ia R=suc-L-Arg·OH | Ih R=sub·Gly·OH |
| Ib R=sub-L-Arg·OH | Ii R=sub-L-Pro·OH |
| Ic R=sub-L-Arg·OH | Ij R=sub-L-Tryp·OH |
| Id R=dec-L-Arg·OH | Ik R=sub-bradykinin·OH |
| Ie R=dod-L-Arg·OH | Il R=SO ₃ Na |
| If R=sub-L-Gln·OH | Im R=glucuronyl |
- suc=—CO(CH₂)₂CO— seb=—CO(CH₂)₈CO—
 glu=—CO(CH₂)₉CO— dec=—CO(CH₂)₁₀CO—
 sub=—CO(CH₂)₆CO— dod=—CO(CH₂)₁₂CO—

Fig. 3. Structures of compound I and its related compounds.

강심성 steroid 50 μl을 가하여 37°에서 5분간 preincubation 시킨후 ATP 6mM 50 μl을 추가하여 조제하였으며, 이 배양액을 37° 1시간 배양시켰다. Ice cold 25% trichloroacetic acid 50 μl을 가하여 반응을 종결시키고 1,000 rpm에서 5분간 냉각원심분리하여 상등액을 소량취하여 membrane filter로 여과, 여액 10~20 μl을 HPLC에 주입하여 효소활성을 측정하였다. HPLC column은 이온교환수지 PARTISIL 10-SAX (25 cm × 0.4 cm i.d.), 검출기는 UV 260 nm를 사용 측정하였다.

효소활성억제율 (I₅₀)은 미반응의 기질내의 ATP량과 생성된 ADP량의 chromatogram상의 면적비를 측정하여 계산하였다. 즉 강심성 steroid 무첨가시는 0%, ouabain 첨가시는 100%로 하여 다음의 공식에 의하여 구하였다.¹⁷⁾

$$I = \frac{X_0 - X_i}{X_0 - X_{100}} \times 100(\%)$$

- X : ADP/(ADP+ATP)(peak area ratio)
 X₀ : without addition of an inhibitor
 X₁₀₀ : in the presence of 1 mM ouabain
 X_i : in the presence of an inhibitor

실험 결과 및 고찰

Compound I—Mp 253~254°, 무색주상결정으로써 Kedde 시약에 blue violet색으로 양성반

응을, TLC 전개용매 EtOAc-benzene(1:1)에서 Rf 0.31, CHCl₃-MeOH-H₂O(80:20:2.5)에서 Rf 0.15를, 실험방법에서 기술한 HPLC조건으로 분석한 결과 t_R 16.35로 표준 digitoxigenin과 Rf 및 t_R치가 각각 일치하였다.

Compound II—Mp 147~148°, 무색침상결정으로써 Kedde 시약에 blue violet 색으로 양성반응을 TLC전개용매 CHCl₃-MeOH-H₂O(80:20:2.5)에서 Rf 0.78을 HPLC 측정에서 t_R 9.62로 표준 cymarín과 Rf 및 t_R치가 각각 일치하였다.

Compound III—Mp 231~232°, 백색분말로써 Kedde 시약에 blue violet 색으로 양성반응을 TLC 전개용매 CHCl₃-MeOH-H₂O(80:20:2.5)에서 Rf 0.66을, HPLC 측정에서 t_R 4.44로 표준 K-strophanthin과 Rf 및 t_R치가 각각 일치하였다.

Compound IV—Mp 237~240°, 무색주상결정으로써 Kedde 시약에 blue violet 색으로 양성반응을, TLC 전개용매 CHCl₃-MeOH-H₂O(80:20:2.5)에서 Rf 0.21을, HPLC 측정에서 t_R 5.72로 표준 convallatoxin과 Rf 및 t_R치가 각각 일치하였다.

이상의 TLC 및 HPLC 분석결과로 compound I은 digitoxigenin, compound II는 cymarín, compound III는 K-strophanthin 및 compound IV는 convallatoxin으로 각각 분리확인 하였다.

Compound I 관련물질의 Na⁺, K⁺-ATPase 활성

복수초 뿌리에서 추출분리한 compound I 및 관련물질의 Na⁺, K⁺-ATPase 활성에 미치는 효과를 HPLC 측정방법에 의하여 측정된 결과는 Table I, II 및 III와 같았다.

Table I에서 보는 바와 같이 compound I의 dicarboxylic acid 부위가 다른 homolog들에 있어서는 compound Ia (134.0×10⁻⁷M)를 제외하고는 Ic>Ie>Id>Ib순으로 compound I (47.2×10⁻⁷M)보다 모두 강한 효소억제효과를 나타내었으며, 이중 compound Ic (19.2×10⁻⁷M)가 가장 강한 효소활성억제 효과를 나타내었다.

Amino acid부위가 다른 analog들 중에서는 Table II에서 보는 바와 같이 compound Ib (36.0×10⁻⁷M) 및 compound Ik (43.6×10⁻⁷M)가

Table I. I₅₀ of compound I and its homologs having different dicarboxylic acids

Compound	I ₅₀ (×10 ⁻⁷ M) ^a	Relative potency ^b
Ouabain ^c	15.7±1.63	1.00
I	47.2±6.24	0.33
Ia	134.0±12.0	0.11
Ib	36.0±6.41	0.43
Ic	19.2±0.40	0.81
Id	21.8±2.42	0.72
Ie	20.7±4.12	0.75

a: Mean±SE (n=3)

b: potency relative to ouabain

c: reference compound

Table II. I₅₀ of compound I and its analogs having different amino acids

Compound	I ₅₀ (×10 ⁻⁷ M) ^a	Relative potency ^b
Ouabain ^c	15.7±1.63	1.00
I	47.2±6.24	0.33
Ib	36.0±6.41	0.43
If	290.0±28.6	0.054
Ig	600.0±50.6	0.026
Ih	423.0±28.0	0.037
Ii	428.0±66.5	0.036
Ij	100.0±14.7	0.157
Ik	43.6±8.10	0.36

a: Mean±SE (n=3)

b: potency relative to ouabain

c: reference compound

Table III. I₅₀ of compound I and its analogs having sulfate and glucuronide

Compound	I ₅₀ (×10 ⁻⁷ M) ^a	Relative potency ^b
Ouabain ^c	15.7±1.63	1.00
I	47.2±6.24	0.33
Il	674.0±61.0	0.023
Im	446.0±13.3	0.035

a: Mean±SE (n=3)

b: potency relative to ouabain

c: reference compound

compound I (47.2×10⁻⁷M)보다 강한 효소활성억제효과를 나타내었으나 다른 analog에서는 Ij>If>Ih>Ii>Ig 순으로 compound I 보다는 약

한 효소활성억제 효과를 나타내었다. 이중 compound Ig ($600.0 \times 10^{-7} M$)가 가장 약한 효소활성억제 효과를 나타내었다.

Compound I의 sulfate와 glucuronide에 있어서는 Table III에서 보는바와 같이 compound II ($674.0 \times 10^{-7} M$) 및 compound Im ($446.0 \times 10^{-7} M$)이 모두 genin인 compound I 보다 효소 활성억제 효과를 나타내었다. 즉 dicarboxylic acid 부위가 다른 compound I homolog들에서는 탄소쇄가 길어짐에 따라서 강한 효소활성억제를 나타내었으며, amino acid 부위가 다른 compound I analog들에서는 arginin 이외의 화합물이 약한 효소활성억제 효과를 보이었으며, 또한 sulfate와 glucuronide의 포함체도 그 genin의 활성보다 약한 효소활성억제 효과를 나타내었다.

이상의 실험결과로 보아 dicarboxylic acid 부위와 amino acid 부위의 구조는 생물활성을 나타내는데 크게 관여하는 것으로 추정되었다. 즉 amino acid 잔기의 성질에 의하여 효소-강심성 steroid 복합체의 안정성이 다르기 때문에 효소활성억제에 영향을 주는 것으로 추정되며 또한 이와같은 복합체의 형성에는 genin 부위와 amino acid 부위간에 적당한 dicarboxylic acid 탄소쇄의 거리가 필요하다는 것을 추측할 수 있었으며 이와같은 결과는 작용기서의 해명에 중요한 시사를 제시하였으며 우수한 강심약 개발에 크게 기여하리라고 사료된다.

결 론

새로운 강심약 개발을 목적으로 한국산 복수초 뿌리 EtOH extract에서 TLC, column chromatography 및 HPLC 분석으로 compound I, II, III 및 IV를 분리, 확인하였으며 compound I 관련물질의 Na^+ , K^+ -ATPase 활성을 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Compound I은 digitoxigenin, compound II는 cymarín, compound III는 K-strophanthin 그리고 compound IV는 convallatoxin으로 밝혀졌다.

2. Compound I의 dicarboxylic acid homolog들에서는 탄소쇄가 긴 Ic(digitoxigenin-3-seb-

L-Arg·OH)의 I_{50} , $19.2 \times 10^{-7} M$ 로 가장 강한 효소활성억제를 나타내었다.

3. Compound I의 amino acid analog들중에서는 Ig(digitoxigenin-3-sub-L-Glu·OH)의 I_{50} , $600.0 \times 10^{-7} M$ 로 가장 약한 효소활성억제를 나타내었다.

4. Compound I의 sulfate 및 glucuronide는 그 genin보다 약한 효소활성억제를 나타내었다.

감사의 말씀—본 연구는 1988년도 문교부 학술연구조성비(일반과제)로 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

〈1990년 5월 1일 접수 : 6월 4일 수리〉

문 헌

1. 李昌福, 大韓植物圖鑑, 鄉文社, 서울, p.354 (1980).
2. 金在佶, 原色天然藥物大事(下), 南山堂, p.74 (1984).
3. 江蘇新醫學院, 中藥大辭典(4), p.4641, (1985).
4. Kalz, A. and Reichstein, T.: *Pharm. Acta Helv.* **22**, 437 (1947).
5. Pitra, J. and Čekan, Z.: *Collection Czech. Chem. Comm.* **26**, 1551 (1961).
6. Polakova, A. and Cekan, Z.: *Chem. Ind.* **44**, 1766 (1963).
7. Junior, P. and Wichtl, M.: *Phytochem.* **19**, 2193 (1980).
8. Winkler, C. and Wichtl, M.: *Planta Med.* **52**, 68 (1986).
9. Reichstein, T. and Rosenmund, H.: *Pharm. Acta Helv.* **15**, 150 (1940).
10. Evdokimov, P.K.: *Khim. Prir. Soedin.* (5), 736 (1979).
11. Junior, P., Krüger, D. and Winkler, C.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* **125**, 1945 (1985).
12. Evdokimov, P.K.: *Rastit. Resur.* **15**, 565 (1979).
13. Santavy, F. and Reichstein, T.: *Pharm. Acta Helv.* **23**, 153 (1948).
14. Ponomarenko, A.A., Komissarenko, N.J., Stukkei, K.L. and Korsennikova, E.P.: *Rastit. Resur.* **10**, 63 (1974).
15. Skorzoza, Z.V. and Shnyakin, G.P.: *Rastit. Resur.* **21**, 458 (1985).
16. Hansen, O.: *Pharmacol. Rev.* **36**, 143 (1984).

17. Shimada, K., Ohishi, K. and Nambara, T.: *J. Pharmacobio-Dyn.* 8, 64 (1985).
18. Vignola, R. and Canella, M.: *Planta Med.* 46, 127 (1982).
19. Tittle, G., Habermeier, H. and Wager, H.: *Planta Med.* 45, 207 (1982).
20. Davydov, V. Ya., Gonzalez, M.E. and Kiselev, A.V.: *J. Chromatogr.* 204, 293 (1981).
21. Fujii, Y., Fukuda, H., Saito, Y. and Yamazaki M.: *J. Chromatogr.* 202, 139 (1980).
22. Nakao, T., Tashima, Y., Nagano, K. and Nakao, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 755 (1965).
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
24. Langer, G.A.: *Biochem. Pharmacol.* 30, 3261 (1981).
25. Erdmann, E. and Schoner, W.: *Naunynschmied- eberg's Arch. Pharmacol.* 283, 335 (1974).
26. Brown, L. and Erdmann, E.: *Arzneim-Forsch/ Drug Res.* 34, 1314 (1984).
27. Ondetti, M.A.: *J. Med. Chem.* 6, 10 (1963).
28. Shimada, K. and Nambara, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 19, 1073 (1971).
29. Nambara T., Shimada, K. and Fujii, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 20, 1424 (1972).
30. Fujii, Y., Shimada, K. and Nambara, T.: *Hete- rocycles* 4, 1681 (1976).