

황금의 Flavonoid 성분들이 Rat 수정체의 백내장 형성과 Polyol 축적에 미치는 효과

신국현 · 채윤정 · 정명숙 · 이회주*
서울대학교 천연물과학연구소 · *덕성여자대학교 약학대학

Effect of Flavonoids from *Scutellariae Radix* on Cataract Formation and Polyol Accumulation in Rat Lens

Kuk Hyun Shin, Yun Jung Chae, Myung Sook Chung and Hee Ju Lee*
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460
and *College of Pharmacy, Duk Sung Women's University, Seoul 132-032, Korea

Abstract—The ether, ethylacetate and *n*-butanol soluble fractions from the roots of *Scutellaria baicalensis* showed a significant inhibition of lens aldose reductase (AR) activity *in vitro*. During systematic fractionation of the active fractions, 7 flavonoids were isolated and compared their inhibitory activities against rat AR using DL-glyceraldehyde as a substrate, among which baicalin (VII) was found to exhibit the most potent inhibitory activity. Baicalin (VII) and wogonin-7-O-glucuronide (VI), with repeated treatments (30 mg/kg/day, i.p.) throughout the experimental periods caused a significant suppression of cataract formation induced by galactose (40 g/kg/day) as well as the decrease of galactitol accumulation in the rat lens. The flavonoids also exhibited a significant inhibition of sorbitol accumulation in the lenses of diabetic rats induced by streptozotocin (STZ).

Keywords—*Scutellariae* · *Scutellaria baicalensis* · flavonoids · baicalin · wogonin 7-O-glucuronide · aldose reductase · galactose cataract · streptozotocin diabetes · polyol accumulation

대표적인 성인병의 하나인 노인성(당성) 백내장이나 당뇨병의 합병증인 백내장, 신경증, 각막증 및 신증 등은 증가일로에 있으며 치유하여야 할 현대의 난치병임은 주지의 사실이다. 이와 같은 질병들의 발생기전의 하나는 당대사계의 polyol pathway 이상으로 aldose 환원효소에 의하여 생성된 polyol의 축적이 원인임이 증명된 바 있다¹⁻³⁾. 따라서 AR 활성을 저해함으로써

백내장이나 당뇨병의 합병증 유발을 억제할 수 있게 되며, 합성물질⁴⁻⁶⁾ 뿐 아니라 부작용이 적은 것으로 알려진 천연물성분^{7,8)}으로부터 AR 저해성분을 구명코저 하는 연구가 수행되고 있다.

저자 등은 천연약물인 생약으로부터 백내장 억제작용 성분을 구명하기 위한 목적의 일환으로 한방이나 민간에서 노인성 백내장이나 당뇨병 합병증에 유효한 것으로 기재되어 있는 생약 59종의 온수 추출물이 수정체의 AR 효소활성에 미치는 효과에 대하여 검색을 실시한 바 있으며⁹⁾ 비교적 저농도에서도 효소억제활성이 강한

Part 2 in the series "Studies on the inhibitory effects of medicinal plant constituents on aldose reductase and cataract formation".

생약으로 부터 유효성분 구명에 착수하였다.

본 연구에서는 검색과정에서 유효생약으로 판명된 황금으로부터 AR 억제활성이 있는 수종의 flavonoid 성분들을 분리하여 그 억제활성을 비교하였으며 활성이 강한 것으로 증명된 flavonoid 들이 galactose 유발 백내장형성과 galactitol 축적 및 STZ 유발 당뇨병 rat의 수정체 sorbitol 축적에 미치는 효과를 검토한 결과를 보고 한다.

실험재료 및 방법

실험재료 및 기기—황금(Scutellariae Radix)은 경동시장에서 구입한 것을 감정하여 사용하였다. NADPH, DL-glyceraldehyde, galactitol, galactose, PMSF 등은 Sigma Chem. Co. 제품을 구입하여 사용하였으며 pyridine, acetic anhydride, dimethylsulfoxide 등은 Merck 제품을 사용하였다.

Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70~230 mesh, Merck Art. 7734)를, TLC 용은 Kieselgel 60 F₂₅₄를, vacuum liquid chromatography용은 silica gel G(Merck Art. 7729)를 사용하였다. 기타시약은 일급시약을, 추출용매는 화학용을 사용하였다.

¹H-NMR 및 ¹³C-NMR은 Varian FT-80 A 및 Bruker 200 MHz spectrometer를, MS는 Hewlett-Packard 5985 B GC/MS system을, IR은 Perkin-Elmer 281 B spectrophotometer를, GC는 Hewlett-Packard 5840 gas chromatograph를, UV는 Hitachi U 3210과 Gilford system 2600 spectrophotometer를 사용하였다. 원심분리는 Sorvall ultracentrifuge OTD-65 B와 RT-5 B, RT-6000 refrigerated centrifuge 등을 사용하여 실시하였다. 응점은 Mitamura Riken heat block (MRK No. 4204)을 사용하였으며 보정하지 않았다.

Flavonoid 성분의 분리 및 확인—황금 3 kg을 95% methanol로 6시간씩 5회 수욕에서 환류 추출하고 여과한 것을 합하여 감압농축한 다음 ether, ethylacetate, n-butanol로 계통분획한 후 *in vitro*에서 AR 억제활성을 나타낸 분획으로부터 순차적으로 성분분리를 시도하였다(Scheme

I). 즉, ether 분획(44.3 g)은 silica gel column (Merck Art. 7734)에 걸어 benzene으로 용출하였으며 용출된 순으로 compound I 및 II를 순수분리하였고 benzene: ether로 gradient elution을 실시하여 compound III 및 IV를 순차적으로 분리하였다. 또한, ethylacetate 분획(30.2 g)을 CHCl₃: MeOH로 gradient elution을 실시한 결과 흔적량의 compound I~IV가 용출되었고 CHCl₃: MeOH=100:3에서 용출되는 담황색물질은 VLC로 preparative elution하고 methanol로 재결정하여 compound V(94.5 mg)를 순수분리하였다. n-Butanol 분획(310 g)은 silica gel column에 걸고 CHCl₃: MeOH로 gradient elution을 실시한 결과 CHCl₃: MeOH=100:28에서 compound VI를, 100:45에서 compound VII을 순수분리하였다.

Compound I(황색침상결정, mp 200~201°C), compound II(황색침상결정, mp 207~209°C), compound III(황색침상결정, mp 263~265°C), compound IV(황색주상결정, mp 180~181°C), compound VI(미황색무정형분말, mp 218~222°C, yield 5.1 g) 및 compound VII(미황색무정형분말, mp 222~223°C, yield 32.2 g) 등은 spectral data 및 physicochemical data와 문헌기재와 비교하여 각각 oroxylin A(I)¹⁰, wogonin(II)¹⁰, skullcapflavone I(III)¹⁰, skullcapflavone II(IV)¹⁰, wogonin 7-O-glucuronide(VI)¹¹ 및 baicalin(VII)¹¹임을 동정하였다. 이상과 같이 순수분리한 6종의 flavonoid들은 이 식물에서 분리, 확인된 물질들이다.

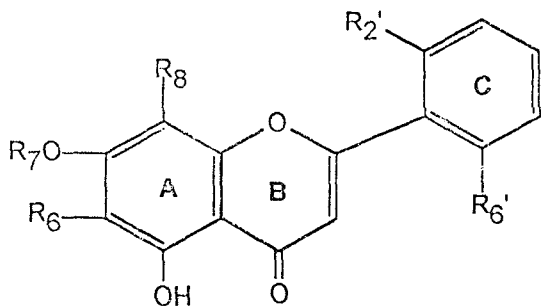
한편, compound V는 분자량 474, mp 171~172°C의 황색결정성 분말로서 화학적반응 및 spectral data를 종합하여 볼 때, wogonin 7-O-glucuronide의 methylester임을 동정하였으며¹¹ compound VI가 용매추출과정에서 변화하여 생성된 artifact임을 알았다.

Compound v(Wogonin glucuronide ester)

mp 171~172°C, yellow powder, Mg-HCl test: yellow; UV, λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ) 274(4.42); λ_{max} (MeOH+AlCl₃) 290(4.43), 330(4.20); λ_{max} (MeOH+NaOMe) 282(4.71); λ_{max} (MeOH+NaOAc) 276(4.41); MS, m/z

(rel. int., %) 474(M⁺, 2.4), 284(M⁺-C₇H₁₂O₆, 64.1), 269(100), 255(25.3), 241(45.3), 139(57.9); IR, ν_{\max} (KBr, cm⁻¹) 3410(OH), 1740(ester), 1660(conjugated carbonyl), 1615, 1590(C=C); ¹H-NMR(80 MHz, DMSO-d₆) δ : 3.86(3 H, s, Ar-OCH₃), 6.68(1 H, s, C₃-H), 7.01(1 H, s, C₆-H), 5.31(1 H, br.s, anomeric proton of glucuronic acid), 7.40~7.60(3 H, m, C₃'~C₅'-H), 7.90~8.15(2 H, m, C₂', C₆'-H), 12.50(1 H, s, C₅-OH, D₂O exchangeable); ¹³C-NMR(50 MHz, DMSO-d₆) δ : 72.2(C-2), 130.8(C-3), 182.6(C-4), 156.2(C-5), 98.8(C-6), 156.2(C-7), 129.6(C-8), 156.2(C-9), 105.4(C-10), 105.5(C-1'), 129.6(C-2'), 126.6(C-3'), 132.6(C-4'), 126.6(C-5'), 129.6(C-6'), 99.7(C-7'), 73.1(C-2''), 75.3(C-3''), 71.5(C-4''), 75.8(C-5''), 169.4(C-6''), 52.0(-COCH₃), 61.7(C₈-OCH₃).

Aldose reductase 활성의 측정—시료가 rat의 lens AR 활성에 미치는 효과의 측정은 전보의 방법에 따라 실시하였다¹²⁾. 즉, rat의 수정체를 homogenization 한 후, 105,000g에서 초원심분리하여 얻은 상등액을 효소원으로 하고 기질로서 10 mM DL-glyceraldehyde, NADPH



Compound	R ₆	R ₇	R ₈	R ₂ '	R ₆ '
I	OCH ₃	H	H		
II	H	H	OCH ₃		
III	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	
IV	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
V	H	GluA methylester	OCH ₃		
VI	H	GluA	OCH ₃		
VII	OH	GluA	H		

0.16 mM, inhibitor를 혼합하여 반응액이 1 ml가 되게 한 후, 기질첨가후 5분간 340 nm에서 흡광도의 감소율을 측정하여 대조군의 그것과의 비로부터 저해율을 산출하였다. 이때 기질만을 제거하고 반응시킨 공시험군의 값을 각각 공제하였다. 흡광도의 변화는 0.100±0.005 absorbance unit/min가 되도록 조절하였다. 효소 단백질의 정량은 Lowry법¹³⁾을 사용하여 실시하였다.

Galactose에 의한 백내장의 유발 및 시료투여—Galactose에 의한 백내장은 Okuda¹⁴⁾ 등의 방법을 약간 수정하여 유발시켰다. 즉, 체중 50~60 g의 웅성 rat를 실험동물로 하고 대조군 및 실험군에 galactose를 생리식염수에 현탁시켜서 40 g/kg/day씩 1일 오전, 오후 2회에 나누어 경구투여하였다. 이때 공시험군에는 생리식염액만을 투여하였다. 백내장 형성의 확인은 1차적으로 pen-light를 사용하여 육안으로 관찰하였고 수정체를 적출하여 densitometer 상에서 나타나는 spectrum의 변화에 의하여서도 백내장 형성 추이를 관찰하였다. 시료는 galactose 투여개시 7일전부터 0.5% CMC에 현탁시켜서 1일 1회 복강내 투여하였으며 이후 10~14일까지 연속 투여하였고 일정한 간격으로 백내장 발생추이를 관찰하였다. 아울러 안와정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈당치를 glucose oxidase법에 의하여 측정하였다. 실험 최종일에 동물을 희생시키고 수정체를 적출하여 galactitol 함량을 측정하였다.

Streptozotocin(STZ)에 의한 당뇨병의 유발 및 시료투여—체중 150 g 이상의 rat의 미정맥에 STZ의 citrate buffer(pH 4.5) 용액 65 mg/kg씩을 투여하고 48시간 후에 안와정맥으로부터 채혈하여 혈중 glucose치를 측정(glucose oxidase method) 하고 300 mg/dL 이상인 것만을 선택하여 대조군 및 실험군으로 하고 시료를 0.5% CMC 현탁액으로 하여 1일 1회 14일까지 복강내 연속투여하였다. 실험 최종일에 채혈하여 혈당치를 측정하는 한편, 실험동물을 희생시키고 수정체의 sorbitol 함량을 측정하였다⁴⁾.

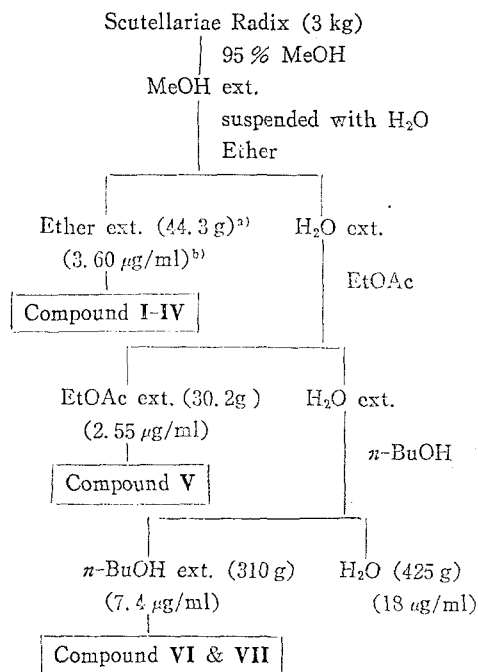
Polyol 함량의 측정—백내장 유발이나 당뇨병 유발시 수정체에 축적되는 sorbitol 및 galactitol 함량은 Beyer-Mears의 방법⁴⁾에 준하여 실시하였다. 즉, 적출한 수정체 1개당 1 ml의 0.3 N

ZnSO₄로 homogenization 한 후, 동량의 0.3 N Ba(OH)₂로 중화시키고 10,000 g에서 20분간 원심분리하고 그 상등액을 취하여 감압농축, 건조한 다음 잔사를 pyridine에 용해, 무수초산으로 상법으로 acetylation시킨 후, CHCl₃로 추출하여 일정량으로 한 후, GC column에 주입하여 chromatogram을 얻고 따로 galactitol 및 sorbitol 표준액으로부터 얻은 표준검량선으로부터 각각의 polyol 함량을 산출하였다. 이때 내부표준 물질로서 α -methylmannopyranoside 를 사용하였다.

실험결과 및 고찰

*In vitro*에서 AR 활성에 미치는 효과

황금의 AR 활성 억제성분을 추적하기 위하여 각종 유기용매의 분획물들이 AR 활성억제효과를 측정 비교한 결과, Scheme I에 표시한 바와 같이 ether, *n*-butanol, ethylacetate, H₂O 분획의 IC₅₀가 각각 3.6 μ g/ml, 7.4 μ g/ml, 2.6 μ g/ml, 18 μ g/ml로서 AR 억제활성이 비극성에



Scheme I. Fractionation of Scutellariae Radix

a) Yield of extract.

b) IC₅₀ values against rat lens aldose reductase. Figures in parentheses indicate a final concentration in reaction mixture.

Table I. Inhibitory potencies of flavonoids from Scutellariae Radix against rat lens aldose reductase

Compound	IC ₅₀ (μ M)
I	52
II	48
III	—
IV	500
V	39
VI	40
VII	13.6

IC₅₀ values were calculated from data plotted on semi-log paper.

서 극성분획까지 광범위하게 나타남을 알 수 있다. 따라서 활성을 나타낸 각 분획으로부터 AR 억제활성이 예상되는 7종의 flavonoid들을 순차적으로 순수분리하였으며 이 물질들의 *in vitro*에서의 AR에 대한 억제활성의 유무를 측정하며 그 구조활성관계를 검토하기 위하여 각 물질들은 3단계의 농도로 하고 각각의 농도에서의 효소억제활성을 측정 한 후 회귀직선 방정식으로 부터 IC₅₀를 구한 결과, Table I에 표시한 바와 같이 baicalin (VII)의 IC₅₀가 13.6 μ M로서 가장 강하고 wogonin 7-O-glucuronide (VI) 및 그 methylester (V)가 각각 40 μ M, 39 μ M로서 약 3배 약하고 oroxylin A (I) 및 wogonin (II)은 좀더 약화되고 skullcapflavone II (IV)는 36배 약화되고 skullcapflavone I (III)은 IC₅₀를 구할 수 없을 정도로 약화되었다. 이상의 결과에 의하면 flavonoid 배당체가 aglycone보다 훨씬 강한 억제활성을 나타내며 aglycone의 A 환이 methoxyl기로 치환될수록 활성이 저하됨을 알았다. A 환의 C-7에 free OH기 있는 baicalin (VII)으로부터 glucuronic acid가 제거된 baicalein의 AR 억제활성이 (IC₅₀: 3.5 μ M)¹⁵⁾ 매우 강한 것으로 보고되었으나 극히 미량으로 본실험에서는 분리되지 않았다. *n*-Butanol 분획물의 양이 Scheme I에서 보는 바와 같이 다른 분획에 비하여 훨씬 크며 이 분획에서 baicalin (VII)과 wogonin 7-O-glucuronide (VI)가 대량분리되었으며 또한 AR 억제활성도 가장 큰 것으로 미루어 이 두 물질들이 황금의 주활성 성분군인 것

으로 인정된다.

Galactose 유발 백내장에 미치는 효과

체중 50~60 g의 rat에 baicalin(VII) 및 wogonin 7-O-glucuronide(VI)를 30 mg/kg/day씩 복강내 주사하고 7일 후 galactose의 투여를 개시하여 10일까지 수정체의 탁도와 투명도의 정도에 따라 백내장 형성 추이를 관찰한 결과, 대조군은 galactose 투여개시후 8일만에 백내장 형성이 시작되어 10일만에 실험동물 모두에서 완전한 백

Table II. Effects of flavonoids on galactose-induced cataract in rat

Group	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Incidence of cataract (%) ^{a)}
Non-treated	—	100(18) ^{b)}
Baicalin (VII)	30	75(10)
Wogonin 7-O-glucuronide (VI)	30	50(18)

Rats were administered with test compounds and vehicle from 7 days prior to onset of galactose treatments (40 g/kg/day) throughout the experimental periods. The cataract formation was judged by the appearance of vacuoles at the lens periphery using a slit lamp.

a) The percentage of incidence of cataract formation on the 10th day of galactose treatments.

b) Number of eyes observed.

Table III. Effects of flavonoids on galactitol accumulation in the course of galactose-induced cataract formation in rat

Group	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Galactitol (μ moles/g lens) ^{a)}	% Inhibition
Normal	—	0.7 \pm 0.1	—
Control (Non-treated)	—	38.2 \pm 2.8	—
Baicalin (VII)	30	21.7 \pm 5.2*	43.2
Wogonin	—	—	—
7-O-glucuronide(VI)	30	24.7 \pm 0.4**	35.3

Galactose treatments (40 g/kg/day) were continued for 14 days and on day 15, galactitol concentrations in the rat lens were measured.

a) Data are expressed as means \pm S.E.

(See Table II).

Significantly different from the control:

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

내장 형성을 보였으나, baicalin(VII) 투여군은 대조군에 비해 수정체의 탁도와 투명도에서 약 25%, wogonin 7-O-glucuronide(VI) 투여군은 거의 50%의 백내장 억제추이를 보였다 (Table II).

한편, 본실험 최종일인 15일만에 rat를 희생시켜 적출한 수정체의 galactitol 함량을 측정하여 그 변화를 관찰한 결과, Table III에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 수정체 g당 galactitol 함량이 38.2 μ mole인 반면 baicalin(VII) 및 wogonin 7-O-glucuronide(VI) 투여군의 경우 각각 21.7 및 24.7 μ mole로서 각각 43 및 35%의 galactitol 축적 억제효과를 보였다. 이와 같은 결과는 백내장 형성의 요인의 하나인 polyol 축적의 억제가 백내장 형성 억제와 상관성이 있음을 암시하고 있다.

STZ 유발 당뇨병 rat의 sorbitol 함량에 미치는 효과

Baicalin(VII)과 wogonin 7-O-glucuronide(VI)가 STZ로 유발시킨 당뇨병성 rat의 수정체 중의 sorbitol 함량에 미치는 효과를 측정할 결과를 Table IV에 표시하였다. STZ를 투여하여 당뇨병을 유발시킨 후, 3일째부터 baicalin(VII) 및 wogonin 7-O-glucuronide(VI)를 30 mg/kg/day씩 14일간 복강내 연속투여하고 15일만에 rat를 희생시켜 채혈하고 수정체를 적출하고 측정된 sorbitol 함량을 측정할 결과, 대조군의 sorbitol 함량이 12.2 μ moles/g인데 비해 baicalin(VII) 투여군은 9.1 μ moles/g, wogonin 7-O-glucuronide(VI) 투여군은 7.8 μ moles/g으로서 각각 대조군에 비해 25% 및 35.7%의 sorbitol 축적 억제효과를 보였다.

한편, 당뇨병이 유발된 대조군 및 baicalin(VII) 투여군의 혈중 glucose 농도는 416~474 mg/dl 수준으로서 정상군에 비해 높은 혈당치를 유지하여 sorbitol 축적억제와는 무관함을 알 수 있다. 그러나, wogonin 7-O-glucuronide(VI) 경우는 15일째의 혈중 glucose 농도가 통계적 유의성은 없으나 대조군에 비해 약 20%의 감소를 보여 혈당강하효과의 가능성을 배제할 수 없다 (Table V).

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때, 황금의

Table IV. Effects of flavonoids on sorbitol accumulation in the lens of diabetic rats induced by STZ

Group	Dose (mg/kg/day)	Sorbitol (μ moles/g lens) ^{a)}	% Inhibition
Control (Non-treated)	—	12.19 \pm 0.73(6) ^{b)}	—
Baicalin (VII)	30	9.13 \pm 1.23*(5)	25.0
Wogonin	—	—	—
7-O-glucuronide (VI)	30	7.84 \pm 0.42*(7)	35.7

Diabetic rats induced by STZ were administered with test compounds i.p. for 14 days consecutively and on day 15, sorbitol concentrations in the lens were estimated.

a) Data are expressed as means \pm S.E.

b) Number of animals tested.

Significantly different from the control :

*p<0.01.

Table V. Blood glucose levels of STZ-induced diabetic rats

Group	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Glucose ^{a)} (mg/dl)	
		Initial	Final
Normal-control	—	—	85.1 \pm 4.0 ^{b)}
STZ-Control	—	548.9 \pm 26.8	415.8 \pm 15.8
Baicalin (VII)	30	535.1 \pm 10.5	474.3 \pm 23.8
Wogonin	—	—	—
7-O-glucuronide (VI)	30	544.4 \pm 20.9	308.4 \pm 22.9

a) Blood glucose concentrations were estimated on day 0 (48 hrs after STZ treatment, Initial) and on day 15 (Final).

b) Means \pm S.E. (See Table IV).

flavonoid 성분인 baicalin(VII) 및 wogonin 7-O-glucuronide (VI)가 galactose로 유발된 백내장의 억제작용의 주작용 성분임을 알 수 있으며 당뇨병성 백내장 유발인자의 하나인 sorbitol의 수정체내 축적을 억제하는 작용이 있는 것으로 보아 이 물질들을 노인성 백내장은 물론 당뇨병성 백내장 자체의 형성 억제 또는 예방효과가 있는 새로운 약물의 model compound로 활용할 수 있으며 앞으로 당뇨병성 신경증과 같은 합병증에 대한 개선효과의 유무를 검토하는 것이 중요한 과

제로 사료된다. 이를 위해 좌골신경이나 신장의 myoinositol 함량과 Na⁺, K⁺ ATPase 활성 등에 미치는 효과를 검토하여야 할 것이다.

감사의 말—이 연구는 한국과학재단 지원 연구비(과제번호 : 901-0302-033-2)에 의한 결과의 일부이며 이에 감사한다. 또한 skullcapflavone I 및 II의 표품을 제공하여 준 본 연구소 윤혜숙 교수에 감사한다.

<1994년 1월 17일 접수 : 1월 25일 수리>

문헌

1. van Heyningen, R.: *Nature* 184, 194 (1959).
2. Kinoshita, J.H.: *Invest. Ophthalmol.* 13, 713 (1974).
3. Pirie, A. and van Heyningen, R.: *Exp. Eye Res.* 3, 124 (1964).
4. Beyer-Mears, A. and Cruz, E.: *Diabetes* 34, 15 (1985).
5. Terashima, H., Hama, K., Yamamoto, R., Tsuboshima, M., Kikkawa, R., Hatanaka, I. and Shigeta, Y.: *J. Pharm. Exp. Ther.* 229, 226 (1984).
6. Inagaki, K., Miwa, I., Yashiro, T. and Okuda, J.: *Chem. Pharm. Bull.* 30, 3244 (1982).
7. Shimizu, M., Ito, T., Terashima, S., Hayashi, T., Arisawa, M., Morita, N., Kurokawa, S., Ito, K. and Hashimoto, Y.: *Phytochem.* 23, 1885 (1984).
8. Aida, K., Tawata, M., Shindo, H., Onaya, T., Sasaki, H., Yamaguchi, T., Chin, M. and Mitsuhashi, H.: *Planta Medica* 56, 254 (1990).
9. Shin, K.H., Chung, M.S., Chae, Y.J., Yoon, K.Y. and Cho, T.S.: *Fitoterapia* LXIV, 130 (1993).
10. Takido, M. and Aimi, M.: *Yakugaku Zasshi* 95, 108 (1975).
11. Tomitori, T., Miyaichi, Y. and Kizu, H.: *Yakugaku Zasshi* 102, 388 (1982).
12. Brubaker, A.N., DeRuiter, J. and Whitmer, W.L.: *J. Med. Chem.* 29, 1094 (1986).
13. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
14. Okuda, J.: *Chem. Pharm. Bull.* 33, 2990 (1985).
15. Xie, M.Z. and Shen, Z.F.: *Acta Pharmaceutica Sinica* 21, 721 (1986).