

trans-(3R,5S)-Atorvastatin Ca의 합성 및 Rat에서 고지방식이로 유도된 고지혈증 치료효과

최원식^{1*}, 남석우¹, 이경락¹
¹순천향대학교 생명공학과

Synthesis of *trans*-(3R,5S)-Atorvastatin Ca and Curative Effect on Hyperlipidemia Induced by a High-Fat Diet in Rats

Won-Sik Choi^{*}, Seok-Woo Nam¹ and Gyung-Rak Lee¹

¹Department of Biotechnology, Soonchunhyang University

요 약 고지혈증 치료제인 *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1)은 4개의 입체이성질체가 있으며, 각각의 이성질체들을 선택적으로 제조한다는 것은 매우 어려운 일이다. 본 연구에서는 입체이성질체 중의 하나인 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)을 초산에서 3,5-diketo atorvastatin ester (3)를 Me₄NHB(OAc)₃을 사용하여 환원시켜 *cis*-(3R,5R) (4)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin ester (5)를 각각 1.5%와 98.5%의 비율로 입체선택적으로 제조할 수 있었다. 또한, 고지혈증 치료제인 *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1)과 그의 입체이성질체인 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)을 쥐에서 고지방식에 의해 유발된 고지혈증의 치료효과에 대하여 알아보았고, 이러한 연구의 수행을 위해 2010년 1월에 실험을 실시하였다. 그 결과, 화합물 1과 7의 total cholesterol (TC), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c)과 triglyceride (TG)는 각각 93.0±0.5, 43.5±0.8, 40.4±1.4, 45.6±0.9 mg/dl와 110.0±0.7, 33.3±0.6, 65.8±1.9, 54.8±1.2 mg/dl를 atherogenic index (AI)와 cardiac risk factor (CRF)는 1.14± 0.05 2.14±0.05와 2.31±0.06, 3.31±0.06을 나타냈으며 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)는 51.9±4.6, 16.0±2.1 IU/l 와 75.8±4.4, 35.1±9.7 IU/l 로 두 화합물 모두 고지혈증에 대한 치료효과를 나타내었으나, 화합물 1이 우수한 치료효과가 있는 반면 화합물 7은 치료효과가 낮은 것을 확인하였다. 이러한 결과들로 입체선택적 이성질체의 합성에 대한 새로운 방법을 제시하고, 향후 시판되고 있는 의약품들의 입체이성질체에 대한 임상적 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract *cis*-(3R,5R)-Atorvastatin Ca (1) used for hyperlipidemia have four stereoisomers. However, It is very difficult to prepare stereoselective stereoisomers. In this paper, the reduction of 3,5-diketo atorvastatin ester (3) was performed using Me₄NHB(OAc)₃ in acetic acid as a reductant and showed excellent stereoselectivity in the double reduction of 3,5-diketo atorvastatin ester (3). As a result, reduction of compound 3 by Me₄NHB(OAc)₃ was purely obtained with *cis*-(3R,5R)-atorvastatin ester (4) of 1.5% and *trans*-(3R,5S)-atorvastatin ester (5) of 98.5%. Also, *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1) and *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7) were used to determine efficacy in the treatment of liver damage and hyperlipidemia induced by a high-fat diet in rats and to study the performance of the January 2010 experiment was conducted. As a result, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c), and triglyceride (TG) levels of compound 1 and 7 groups were 93.0±0.5, 43.5±0.8, 40.4±1.4, 45.6±0.9 mg/dl and 110.0±0.7, 33.3±0.6, 65.8±1.9, 54.8±1.2 mg/dl, respectively. Atherogenic index (AI) and cardiac risk factor (CRF) in compound 1 and 7 were 1.14±0.05, 2.14±0.05 and 2.31±0.06, 3.31±0.06, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were 51.9±4.6, 16.0±2.1 IU/l and 75.8±4.4, 35.1±9.7 IU/l. Taken together, while compound 1 treat against high-fat diet-induced hyperlipidemia by attenuating hepatic lipid depots and reducing oxidative stress, compound 7 group had a low curative effect on hyperlipidemia induced by a high-fat diet in rats. These findings suggest that new method about synthesis of stereoselective stereoisomers and indicate that it may consider using in a clinical trial.

Key Words : *cis*-(3R,5R)-Atorvastatin Ca, *trans*-(3R,5S)-Atorvastatin Ca, Me₄NHB(OAc)₃, High-fat diet, Hyperlipidemia

*교신저자 : 최원식(wschoi@sch.ac.kr)

접수일 11년 09월 22일

수정일 (1차 11년 10월 26일, 2차 11년 10월 28일)

게재확정일 11년 11월 08일

lipoprotein-cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c), triglyceride (TG) 측정용 시약키트는 (주)아산제약 제품을 구입하여 사용하였다. 동물시험에 사용할 시료를 제조하기 위하여 ultrasonicator (Branson 2210, Branson, USA)를 사용하였으며, 혈청 분석을 위해 UV spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, USA)를 사용하였다.

2.2 실험동물 및 식이

실험동물은 210±10 g의 7주령 SPF Sprague-Dawley 중립 쥐 수컷(오리엔트 바이오, Korea)을 구입하여 1주일 간 일반식이(AIN-93G pellet, 피드랩코리아, Korea)와 고압 멸균된 지하수를 자율급여하면서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 23±2 °C, 습도 55±15 %, 환기 횟수 15-20회/시간, 명암주기 12 시간(09:00-21:00)의 조건을 유지하였다.

2.3 합성

2.3.1 *tert*-Butyl 7-[2-(4-fluorophenyl)-5-isopropyl-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-1-yl]-3,5-diketoheptanoate (3)의 합성

50ml 플라스크에 염화메틸렌(20ml)과 oxalyl dichloride (0.57 ml, 6.73 mmole)를 가한 후 반응 온도를 -65°C로 조절하였다. Dimethyl sulfoxide(0.92 ml, 13.01 mmole)를 -65°C 이하에서 30분 동안 적가하고 30분간 교반하였다. *tert*-Butyl 7-[2-(4-fluorophenyl)-5-isopropyl-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxy-heptanoate (2) (1.0 g, 1.62 mmole)을 염화메틸렌(5 ml)에 용해시킨 후 30분 동안 -65°C에서 적가 후 같은 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물에 *N,N*-diisopropylethylamine (2.79 ml, 16.07 mmole)을 -65°C에서 30분간 적가하고 반응 온도를 25°C로 조절한 뒤 2시간 동안 교반하였다. 2 *N* HCl (4 ml)을 가하고 20분간 교반 후 유기층을 분리하고 포화 중조 용액(10 ml)과 증류수로 세척 후 무수 황산마그네슘으로 건조하고 감압 농축하였다. 농축액을 silica gel column 크로마토그래피(*n*-hexane:ethyl acetate =1:1=v/v, 30 × 180 mm column, 10 ml fractions)로 정제하여 노란색 결정의 목적물 3 (300 mg, 30%)를 얻었다.

¹H-NMR(CDCl₃, δ) : 1.43-1.45(d, 6H), 1.54-1.58(s, 9H), 2.55(d, 2H), 2.81-2.91(t, 2H), 4.08(t, 2H), 4.13-4.51(m, 1H), 5.27-5.31(t, 2H), 7.19-7.61(m, 5H, aromatic-H), 7.30-8.15(m, 4H, aromatic-H), 7.41-8.15(m, 5H aromatic-H)

2.3.2 (3*R*,5*S*)-*tert*-Butyl 7-[2-(4-fluorophenyl)-5-isopropyl-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxy heptanoate (5)의 합성

아세트산(20 ml)에 NaBH₄ (293 mg, 7.76 mmole)를 용해시키고 25 °C에서 10분간 교반한 후 화합물 3 (1.0 g, 1.63 mmole)을 아세트산(5 ml)에 혼합한 용액을 상온에서 반응물에 가한 후 2 시간 동안 교반하였다. 반응물에 포화 중조 용액(50 ml)과 염화메틸렌(20 ml)를 가하여 10분간 교반 후 층분리한 뒤 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시켜 감압 농축하여 노란색 결정의 화합물(412 mg, 41%)을 얻었다. HPLC 분석(chiralpack AD-H, 244 nm, *n*-hexane:ethanol:trifluoroacetic acid=940:60:1=v/v/v, λ=244 nm) 결과 *cis*-(3*R*,5*R*) (4)와 *trans*-(3*R*,5*S*)-atorvastatin ester (5)의 비율이 각각 34.7%와 65.3%임을 확인하였다.

같은 방법으로 환원제 NaBH(OAc)₃ (1.64g, 7.76 mmole)를 사용하여 백색 결정의 화합물(382 mg, 38%)을 얻었다. 같은 조건에서 HPLC 분석결과 이성질 화합물 4와 5의 비율이 각각 19.9%와 80.1%로임을 확인하였다.

같은 방법으로 환원제 Me₄NHB(OAc)₃ (2.04 g, 7.76 mmole)를 사용하여 백색 결정의 화합물(592 mg, 59%)을 얻었다. 같은 조건으로 HPLC 분석 결과 이성질 화합물 4와 5의 비율이 각각 1.5%와 98.5%임을 확인하였다. 농축물을 silica gel column 크로마토그래피(*n*-hexane:ethyl acetate=1:1=v/v, 30 × 180 mm column, 16 ml fractions)로 정제하여 노란색 결정의 목적물 5 (575 mg, 57%)를 순수하게 얻었다.

¹H-NMR(CDCl₃, δ) : 1.43-1.45(d, 6H), 1.54-1.58(s, 9H), 2.48(d, 2H), 2.76-2.78(t, 2H), 3.21(quin, 1H), 3.54(quin, 1H), 4.02(t, 2H), 4.19-4.22(m, 1H), 5.27-5.31(t, 2H), 7.19-7.61(m, 5H, aromatic-H), 7.30-8.15(m, 4H, aromatic-H), 7.41-8.15(m, 5H aromatic-H)

2.3.3 (3*R*,5*S*)-7-[2-(4-Fluorophenyl)-5-isopropyl-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-1*H*-pyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoic acid (6)의 합성

THF 10 ml에 화합물 5 (1 g, 1.62 mmole)를 용해시킨 후 sodium hydroxide (175 mg, 4.39 mmole)를 증류수(5 ml)에 혼합한 용액을 상온에서 반응물에 적가한 후 5시간 동안 교반하였다. 반응물에 2 *N* HCl 수용액(4 ml)과 ethyl acetate (10 ml)를 가하여 10분간 교반 후 포화 식염수(5 ml)를 가하여 유기층을 분리한 뒤 무수 황산마그네

숨으로 건조시켜 감압 농축하여 백색 결정의 목적물 6 (590 mg, 65%)를 얻었다. 화합물 5와 같은 방법으로 HPLC 분석 결과 화합물 6이 순수하게 제조되었음을 확인하였다.

¹H-NMR(CDCl₃, δ) : 1.43-1.45(d, 6H), 2.44(d, 2H), 2.56-2.67(t, 2H), 3.25(quin, 1H), 3.64(quin, 1H), 4.12(t, 2H), 4.21-4.30(m, 1H), 5.27-5.31(t, 2H), 7.19-7.61(m, 5H, aromatic-H), 7.30-8.15(m, 4H, aromatic-H), 7.41-8.15(m, 5H, aromatic-H)

2.3.4 *trans*-(3R,5S)-Atorvastatin Ca (7)의 합성

메탄올 10 ml와 증류수 25 ml의 혼합 용액에 화합물 6 (1 g, 1.79 mmole)를 용해시킨 후 아세트산갈습(0.2 g, 1.26 mmole)을 증류수 20 ml에 용해한 용액을 가한 후 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 반응물의 유기층을 층분리한 뒤 무수 황산 마그네슘으로 건조시켜 감압 농축한 후 농축물에 diisopropylether (5 ml)를 가하여 1 시간 동안 교반하였다. 침전물을 여과한 뒤 진공 건조하여 백색 결정의 목적물 7 (1.04 g, 98%)을 얻었다. 화합물 5와 같은 방법으로 HPLC 분석 결과 화합물 7이 순수하게 제조되었음을 확인하였다.

¹H-NMR(CDCl₃, δ) : 1.43-1.47(d, 6H), 2.44-2.46(d, 2H), 2.56-2.65(t, 2H), 3.25-3.55(quin, 1H), 3.64-3.75(quin, 1H), 4.12-4.18(t, 2H), 4.21-4.35(m, 1H), 5.27-5.37(t, 2H), 7.16-7.54(m, 5H, aromatic-H), 7.35-8.10(m, 4H, aromatic-H), 7.47-8.17(m, 5H, aromatic-H)

2.4 고지혈증 유도

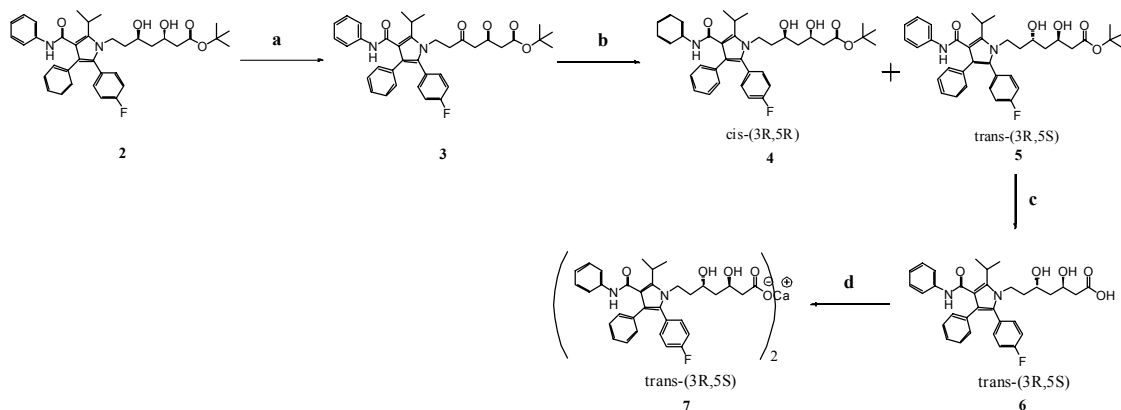
적용사육된 실험동물들을 각각 8마리씩 정상군, 대조군, *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)군으로 분류하였다. 정상군에는 일반식사와 식수를 자율급여하고, 대조군과 실험군에는 고지방 식이(HFD, 45% of calories derived from fat; D12451, 피드코리아, Korea)와 식수를 자율급여하면서 각각 4주 동안 사육하였다. 고지방식이의 조성은 표 1과 같다.

[표 1] 고지방식이 조성 (g/kg diet)

[Table 1] Composition of the experimental diet (g/kg diet)

Diet composition	High-fat diet (HFD)
Casein, 80 Mesh	800
L-Cysine	12
Corn Starch	291
Maltodextrin	400
Sucrose	691
Soybean Oil	225
Lard ^{a)}	1598
Vitamin Mix V10001	40
Energy (kcal)	4057
Fat energy (%)	45

^{a)}Lard: Typical analysis of cholesterol in lard= 0.95 mg/g.



a) oxalyl dichloride, CH₂Cl₂, -65 °C b) reducing agent (NaBH₄, NaBH(OAc)₃, Me₄NHB(OAc)₃, HOAc c) NaOH, THF d) calcium acetate, CH₃OH

[그림 2] 3,5-Diketo atorvastatin ester의 입체선택성 반응에 의한 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 제조.
 [Fig. 2] Synthesis of *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7) by stereoselective reaction about 3,5-Diketo atorvastatin ester.

[표 2] 환원제에 따라 생성되는 3,5-atorvastatin ester의 입체이성질체들의 생성비

[Table 2] The ratio of stereoisomers about 3,5-atorvastatin ester produced by a reducing agent

Entry	Reducing agent	Product (Relative ratio by HPLC)			
		(3R, 5S)	(3S, 5S)	(3R, 5R)	(3S, 5R)
1	NaBH ₄	65.3	0	34.7	0
2	NaBH(OAc) ₃	80.1	0	19.9	0
3	Me ₄ NHB(OAc) ₃	98.5	0	1.5	0

2.5 검액제조 및 투여

cis-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 시료양 100 mg/kg/day에 생리식염수 3 ml를 가하여 30 분 동안 ultrasonicator로 현탁한 후에 사용하였으며 대조 약제인 *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1)은 tablet의 코팅제를 제거하고 분말화하여 제조하였다. 제조된 약물을 1일 1회, 2주 동안 경구 투여용 존테(sondae)를 이용하여 경구투여 하였으며 대조군에는 생리식염수 3 ml만 투여하였다.

약물투여 기간 동안에는 일반식사와 식수를 자율급여 하면서 식이효율을 1주 간격으로 측정하였다.

2.6 시료채취

고지혈증의 유도가 완료되면 실험동물을 24시간 동안 절식시킨 후 디에틸에테르 마취법으로 치사시키고 복부 정중상을 따라 개복하여 대동맥을 통해 채혈하였다. 혈액은 25℃에서 30분 동안 방치한 후 1000 × g에서 20분 동안 원심분리하고, 원심분리를 통해 얻은 혈청을 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하면서 혈액생화학적 분석에 사용하였다.

2.7 혈액생화학적 분석

혈청은 liter당 international unit (IU/ℓ)으로 나타내었다. TC 활성도는 cholesterol oxidase (COD), peroxidase (POD) 효소법[11] 시약키트로 500 nm에서, TG 활성도는 glycerol kinase (GK), glycerophosphate oxidase (GPO), POD 효소법[12] 시약키트로 550 nm에서 HDL-c 활성도는 phospho-tungstic acid 침강법[13] 시약 키트로 500 nm에서 UV spectrophotometer로 비색정량하여 측정하였고, 혈청 *dℓ*당 mg로 나타내었다. LDL-c은Friedwald 법[14]으로 계산하여 혈청 *dℓ*당 mg로 나타내었고, 동맥 경화지수와 심혈관위험지수는 Haguland법[15]으로 계산

하여 측정하였다. 혈청 중 AST와 ALT의 활성도는 Reitman-Frankel법[16]에 의해 제조된 시약 키트를 사용하여 505 nm에서 UV spectro-photometer로 비색정량하여 측정하였고, 감소율은다음의 계산식에 따라 구하였다.

$$\text{감소율(\%)} = 100 - \frac{\text{실험군의 평균값}}{\text{대조군의 평균값}} \times 100$$

2.8 통계처리

모든 실험은 3회 이상 실시하여 분석결과를 평균과 표준편차로 나타내었고, SPSS, Windows statistical package, version 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계 분석하였다. 시험시료를 경구투여한 군 간의 효과를 one-way ANOVA로 분석한 후 Dunnett post-hoc test를 하여 *p*<0.05에서 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 합성

3,5-Diketo ester 화합물을 3,5-dihydroxy ester 화합물로 제조하는 과정에서 여러 가지 입체이성질체가 생성된다. 3,5-Diketo ester 화합물의 환원 방법은 생물학적으로 미생물이나 분리된 효소를 이용하는 법이 있으며 [17-19], 화학적으로는 광활성 촉매를 이용한 입체선택적 비대칭 합성법이 있다[20]. 생물학적 방법의 경우 ketoreductase효소를 이용하여 (±) 3-hydroxy-5-keto ester (15%), (±) 3-keto-5-hydroxy ester (85%)를 얻었으며, 이 racemic체를 diisobutylaluminium hydride (DIBALH)로 환원시켜 (3R,5S)-dihydroxy ester 62%, (3S,5R)-dihydroxy ester 5%, (3R,5R)-dihydroxy ester 26%와 (3S,5S)-dihydroxy ester 7%를 얻었다[21]. 이 반응은 pH와 온도의 영향에 민감할 뿐만 아니라 반응시간이 오래

걸리며 여러 단계를 거치며 수율이 낮고 여러 입체이성질체가 제조되는 결점이 있다.

화학적인 방법의 경우 광활성 촉매를 이용한 입체선택적 비대칭합성법이 대표적인 예이며, 근래에는 유기금속을 homogeneous catalyst로 이용하는 합성법이 있는데, 그 중요한 반응으로는 비대칭 hydroformylation, hydrogenation, hydrocyanation, allylation, hydrosilylation과 hydroboration 등이 있으며, pyrethroids, α -amino acid 및 menthol 합성이 그 대표적인 예이다[22]. Atorvastatin Ca은 4개의 입체이성질체가 존재한다. 현재 고지혈증 치료제로 사용되는 입체구조는 *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1)이며, 이외에도 *cis*-(3S,5S), *trans*-(3R,5S)와 *trans*-(3S,5R) 구조들이 있다. *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1)을 제조하는 과정에서 세 가지 다른 형태의 이성질체들이 불순물로 생성된다. 표준 시료의 chiral column을 이용한 HPLC 분석 결과 여러 atorvastatin Ca 입체이성질체들의 retention time은 *cis*-(3S,5S)가 16.3분, *trans*-(3R,5S)는 21.7분, *cis*-(3R,5R)은 25.6분이었으며 *trans*-(3S, 5R)은 54.3분임을 알았다. 본 연구에서는 화학적인 방법으로 화합물 3을 NaBH₄, NaB(OAc)₃와 Me₄NHB(OAc)₃를 이용하여 환원 반응시켜 표 2과 같은 결과를 얻었다. 표 2에서 보는 바와 같이 NaBH₄는 *cis*-(3R,5R) (4)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin ester (5)가 각각 34.7%와 65.3%를, NaB(OAc)₃는 19.9%와 80.1%를 나타내었으며, Me₄NHB(OAc)₃는 1.5%와 98.5%임을 확인하였다. 이 중 Me₄NHB(OAc)₃이 가장 우수한 입체선택성을 가짐을 알게 되었다. 화합물 3을 Me₄NHB(OAc)₃으로 환원시키고 가수분해하여 아세트산칼슘으로 반응시킨 결과 고지혈증 치료제로 사용되는 *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1)의 입체이성질체 중 하나인 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)을 98%이상의 높은 수율과 순도로 제조할 수 있었다.

3.2 체중 및 식이효율의 변화

cis-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 고지혈증 치료효과 시험에서 체중과 식이효율의 변화는 병변유도가 완료된 시점과 병변유도 후 약물치료가 완료된 시점까지의 측정치로서 각각 표 3, 4에 나타내었다. 4주 동안의 병변유도가 완료된 후의 체중은 460.0±4.9~485.0±3.5 g이었으며, 대조군, 화합물 1과 7 투여군들의 체중은 정상군에 비해 크게 증가되어 고지방식으로 인한 체중 증가가 확인되었다. 2주 동안의 치료가 완료된 후의 최종 체중은 정상군이 457.5±4.8 g으로 확인되었고, 대조군이 485.0±25.6 g으로 가장 높았다. 화합물 1 투여군은 495.0±5.1 g으로 우수한 체중감소효과를 나타

내었으나, 화합물 7 투여군은 500.0±3.7g으로 낮은 체중 감소 효과를 나타내었다.

3.3 혈청 중 콜레스테롤 및 지질 함량의 변화

trans-(3R,5S)-Atorvastatin Ca (7)의 고지혈증 치료효과 시험에서 혈청 중의 TC, TG, HDL-c과 LDL-c은 표 5에 나타내었다. 정상군의 혈청 TC, HDL-c, LDL-c과 TG는 각각 86.7±0.9, 49.9±1.0, 29.7±2.2와 35.4±0.9 mg/dl로 나타났었다. 표 5에서 보는 바와 같이 대조군의 TC, LDL-c과 TG는 각각 129.6±2.0, 86.7±1.3과 63.9±1.3 mg/dl로 가장 높았으며, HDL-c은 30.0±0.9 mg/dl로 가장 낮아 고지방식이 급어로 인하여 혈청 지질 함량이 변화됨을 확인하였다. 병변유도 완료 후 대조군과 비교하였을 때 *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7) 투여군의 TC, LDL-c과 TG는 각각 93.0±0.5, 40.4±1.4와 45.6±0.9 mg/dl와 110.0±0.7, 65.8±1.9, 54.8±1.2 mg/dl로 감소하였고, HDL-c은 43.5±0.8과 33.3±0.6 mg/dl로 증가하여 화합물 1 투여군은 고지혈증에 대하여 우수한 치료효과를 나타내었으나 화합물 7 투여군에서는 치료효과가 낮은 것을 확인하였다. Avisar 등[23]은 사람에서의 고지혈증에 대한 연구에서 atorvastatin Ca의 경우 TC은 217.24 mg/dl에서 191.45 mg/dl로, HDL-c은 41.5 mg/dl에서 43.4 mg/dl로 나타내었으며, Arca 등[24]의 연구에서도 TC는 257.6±39.6 mg/dl에서 198.8±38.0로, HDL-c은 48.6±14.9 mg/dl에서 49.7±17.7 mg/dl로 비슷한 함량의 변화를 보였다. Hiromi 등[25]의 연구에서는 쥐에서의 고지방식에 의한 TC과 HDL-c이 atorvastatin Ca의 경우 각각 108.2±5.8과 47.6±3.2 mg/dl로 나타났으며, 콜레스테롤 및 지질함량의 변화가 본 연구와 유사함을 확인하였다. Gotto 등[26]의 연구에 의하면 중성지방 농도가 일정 농도 올라가면 LDL-c이 더 이상 증가하지 않고 오히려 혈청농도가 감소한다고 알려졌다. 이러한 이유는 중성지방이 많은 LDL입자는 LDL 수용체에 대한 친화력이 낮아서 콜레스테롤이 간으로 흡수되지 않고 혈중에 오랜 시간 존재하나 중성지방이 일정 농도 이상으로 증가하면 간에 있는 지방분해효소(lipase)의 활성이 증가하여 상대적으로 작고 단단한 LDL입자가 많이 생성된다고 보고하였다. 따라서 본 실험결과에서는 LDL-c 함량도 고지방식이군에 비하여 atorvastatin Ca 투여군은 유의적으로 감소함을 볼 수 있었다.

3.4 동맥경화지수와 심혈관위험지수의 변화

trans-(3R,5S)-Atorvastatin Ca (7)의 고지혈증 치료효과 시험에서 동맥경화지수와 심혈관위험지수는 표 6에 나타내었다. 정상군과 대조군의 동맥경화지수와 심혈관

위험지수는 각각 0.74±0.04, 1.74±0.04와 4.06±0.41과 5.06±0.41로 대조군의 경우 정상군에 비해 많은 증가치를 나타내었다.

병변유도 완료 후 *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7) 투여군을 대조군과 비교하였을 때 동맥경화지수와 심혈관위험지수는 각각 1.14±0.05, 2.14±0.05와 2.31±0.06, 3.31±0.06으로 나타났으며, 화합

물 1보다 화합물 7이 동맥경화지수와 심혈관위험지수가 높게 나타났음을 알았다. Song과 Lee[27]에 의하면 동맥경화지수는 동맥경화를 비롯한 심혈관계 질환에 대한 예측인자로 사용될 수 있으며 동맥경화지수를 구하는 방법으로 HDL-c에 대한 TC의 비율[28] (TC/HDL-c)로 측정하였고, TC/HDL-c는 값이 커질수록 동맥경화의 위험이 높다고 보고하였다.

[표 3] 4주 동안의 고지방식에 의해 고지혈증이 유도된 쥐의 체중 및 식이효율 변화

[Table 3] Body weight gain, food intake and FER of rats induced to hyperlipidemia by HFD for 4 weeks

Groups	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain ^{a)} (g)	Food intake (g)	FER ^{b)}
Normal	265.0±1.9	357.5±4.0	92.5.1±4.9	562.0±4.5	0.16±0.009
Control ^{c)}	255.0±3.2*	460.0±4.9*	207.5±4.4*	533.8±3.1*	0.38±0.012*
<i>cis</i> -(3R, 5R) (1)	277.5±3.7*	485.0±3.5*	208.8±20.2*	778.3±67.0*	0.27±0.002*
<i>trans</i> -(3R, 5S) (7)	262.5±2.1*	480.0±5.2*	217.5±5.9*	553.5±4.8*	0.39±0.012*

Data were expressed by mean±SD for 8 rats in each group.

Data followed by the same letter are not significantly different (**p*<0.05).

^{a)}Body weight gain: final weight (g)-initial weight (g); ^{b)}FER: feed efficiency ratio = body weight gain (g) / food intake (g);

^{c)}Control: fed HFD for 4 weeks and normal diet for 2 weeks with untreated.

[표 4] 고지혈증이 유도된 쥐에 2주 동안 *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 투여로 인한 체중 및 식이효율 변화

[Table 4] Body weight gain, food intake and FER of rats for 2 weeks on hyperlipidemia with treated *cis*-(3R,5R) (1) and *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)

Treatment	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain ^{a)} (g)	Food intake (g)	FER ^{b)}
Normal	357.5±4.0	457.5±4.8	100.0±7.6	280.5±4.1	0.36±0.028
Control ^{c)}	460.0±4.9*	485.0±25.6*	25.0±6.3*	244.0±8.6*	0.10±0.024*
<i>cis</i> -(3R, 5R) (1)	485.0±3.5*	495.0±5.1*	10.0±6.0*	279.2±4.7*	0.04±0.010*
<i>trans</i> -(3R, 5S) (7)	480.0±5.2*	500.0±3.7*	20.0±6.0*	275.3±4.0*	0.07±0.022*

Data were expressed by mean±SD for 8 rats in each group.

Data followed by the same letter are not significantly different (**p*<0.05).

^{a)}Body weight gain: final weight (g)-initial weight (g); ^{b)}FER: feed efficiency ratio = body weight gain (g) / food intake (g);

^{c)}Control: fed HFD for 4 weeks and normal diet for 2 weeks with untreated.

[표 5] 고지방식에 의해 유도된 고지혈증에 대한 *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 치료효과

[Table 5] Therapeutic effects of *cis*-(3R,5R) (1) and *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7) on hyperlipidemia induced by HFD in rats

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Total-cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	LDL-cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Normal	-	86.7±0.9	49.9±1.0	29.7±2.2	35.4±0.9
Control ^{a)}	-	129.6±2.0*	30.0±0.9*	86.7±1.3*	63.9±1.3*
<i>cis</i> -(3R, 5R) (1)	100	93.0±0.5*	43.5±0.8*	40.4±1.4*	45.6±0.9*
<i>trans</i> -(3R, 5S) (7)	100	110.0±0.7*	33.3±0.6*	65.8±1.9*	54.8±1.2*

Data were expressed by mean±SD for 8 rats in each group.

Data followed by the same letter are not significantly different (**p*<0.05).

^{a)}Control: fed HFD for 4 weeks and normal diet for 2 weeks with untreated.

[표 6] 고지방식이에 의해 유도된 고지혈증에 대한 *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 동맥경화지수와 심혈관위험지수

[Table 6] Atherogenic index and cardiac risk factor of *cis*-(3R,5R) (1) and *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7) on hyperlipidemia induced by HFD in rats

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Atherogenic index	Cardiac risk factor
Normal	-	0.74±0.04 [*]	1.74±0.04 [*]
Control ^{a)}	-	4.06±0.41 [*]	5.06±0.41 [*]
<i>cis</i> -(3R,5R) (1)	100	1.14±0.05 [*]	2.14±0.05 [*]
<i>trans</i> -(3R,5S) (7)	100	2.31±0.06 [*]	3.31±0.06 [*]

Data were expressed by mean±SD for 8 rats in each group.

Data followed by the same letter are not significantly different (**p*<0.05).

^{a)}Control: fed HFD for 4 weeks and normal diet for 2 weeks with untreated.

3.5 혈청 중 AST, ALT 활성도 및 간 무게비의 변화

4주 간 고지방식을 급여한 쥐에게 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)을 2주간 경구투여 후 혈청 중의 ALT 및 AST를 측정된 결과는 표 7과 같다. 정상군의 혈청 AST, ALT 활성은 각각 42.9±3.6과 13.2±3.1 IU/ℓ 였다. 표 7에서 보는 바와 같이 대조군의 AST활성은 정상군에 비해 약 2.36배 증가한 101.0±7.1 IU/ℓ 을 나타내었고, ALT활성은 정상군에 비해 약 4.16배 증가한 54.7±6.8 IU/ℓ 임을 알았다. *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 투여군에서는 AST와 ALT활성이 51.9±4.6, 16.0±2.1 IU/ℓ 과 75.8±4.4, 35.1±9.7 IU/ℓ 로 화합물 1은 유의적으로 감소하며 치료효과를 보였으나, 화합물 7은 낮은 치료효과를 나타내었다. 실험동물의 체중에 대한 간 조직의 중량비에서 정상군은 2.63±0.14%로 확인되었고, 대조군은 정상군에 비해 약 1.22배 증가

한 3.23±0.07%로 확인되어 고지방식으로 인해 간의 비대화가 진행되었음을 확인하였다. 대조군과 비교하였을 때 화합물 1과 7투여군은 각각 2.96±0.04%와 3.22±0.01%로 나타나 간 조직의 무게비가 감소하는 것으로 확인되었다. Ji 등[29]의 방법에 의해 고지방식이에 의한 ALT와 AST 등을 조사한 결과 atorvastatin Ca의 경우 ALT는 43.40±7.41 IU/ℓ 와 AST는 100.70±6.04 IU/ℓ 를 나타내어 ALT는 본 연구와 유사하였으나 AST에서는 수치의 차이가 있음을 확인하였다. Lee 등[30]은 고지방식으로 증가되어진 ALT와 AST의 활성이 대조군인 고지방식이군에 비하여 감소하는 것을 간세포 내의 효소활성에 영향을 주어 간 기능의 개선효과가 있는 것이라 보고하였고, 본 연구에서도 개선 효과가 유사하게 나타남을 확인하였다.

[표 7] 고지방식이에 의해 유도된 고지혈증에 대한 *cis*-(3R,5R) (1)과 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)의 AST와 ALT

[Table 7] AST and ALT of *cis*-(3R,5R) (1) and *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7) on hyperlipidemia induced by HFD in rats

Treatment	Dose (mg/kg/day)	AST (IU/ℓ)	ALT (IU/ℓ)	Liver index ^{a)} (%)
Normal	-	42.9±3.6	13.2±3.1	2.63±0.14
Control ^{b)}	-	101.0±7.1 [*]	54.7±6.8 [*]	3.23±0.07 [*]
<i>cis</i> -(3R, 5R) (1)	100	51.9±4.6 [*]	16.0±2.1 [*]	2.96±0.04 [*]
<i>trans</i> -(3R, 5S) (7)	100	75.8±4.4 [*]	35.1±9.7 [*]	3.22±0.01 [*]

Data were expressed by mean±SD for 8 rats in each group.

Data followed by the same letter are not significantly different (**p*<0.05).

^{a)}Liver index: (liver weight (g) / final body weight (g)) × 100;

^{b)}Control: fed for 4 weeks and normal diet for 2 weeks with untreated.

4. 결론

3,5-Diketo atorvastatin ester (3)의 환원반응에서 환원제로 NaBH₄, NaBH(OAc)₃와 Me₄NHB(OAc)₃을 사용하여 3,5-atorvastatin ester를 얻었다. 그 중 Me₄NHB(OAc)₃는 아세트산 조건 하에서 우수한 입체선택성을 나타내었다.

Me₄NHB(OAc)₃에 의한 화합물 3의 환원 반응에서 *cis*-(3R,5R) (4)와 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin ester (5)가 각각 1.5%와 98.5%를 나타내었다. 이러한 반응을 이용하여 *cis*-(3R,5R)-atorvastatin Ca (1)의 입체이성질체인 *trans*-(3R,5S)-atorvastatin Ca (7)을 98%의 순도로 제조할 수 있었다. 따라서, 화합물 3의 환원반응에서 Me₄NHB(OAc)₃가 화합물 5를 제조하는 선택환원제로 이용될 수 있다는 것을 제시하였다. 또한, 고지혈증 치료제로 시판되고 있는 화합물 1 (리피로우, (주)종근당, Korea)와 합성한 화합물 7의 고지혈증 개선효과를 알아보기 위하여 specific pathogen - free (SPF) Sprague-Dawley종 흰쥐 수컷에게 고지방식이와 식수를 자율급여 하면서 4주 동안 사육하였다. 제조된 약물을 1일 1회, 2주 동안 경구투여 하였으며, 대조군에는 생리식염수만 투여하였다. 화합물 1과 7군의 체중변화량은 유의적인 차이를 보였으며, 식이효율은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 혈중 AST와 ALT는 대조군에 비해 화합물 1과 7군에서 유의적으로 감소하였다. 실험식이 4주째에 혈청 중 TC, TG 및 LDL-c 함량은 시험 약제들을 경구 투여 하였을 때 유의적으로 감소하였고, HDL-c 함량은 증가하였다. 심순환기 질환의 위험성을 나타내는 지표로 알려진 동맥경화지수와 심혈관위험지수는 화합물 1과 7군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 본 연구에서는 고지혈증 치료제로 시판되고 있는 화합물 1과 그의 입체이성질체인 화합물 7의 고지혈증 치료 비교실험을 실시한 결과 화합물 1 보다 화합물 7이 고지혈증에 대하여 낮은 치료효과가 있음을 실험을 통하여 최초로 확인하였다. 이러한 새로운 입체선택적 환원반응을 응용하여 다른 여러 의약품들에 대한 입체이성질체를 쉽게 제조할 수 있음은 물론, 향후 시판되고 있는 의약품들의 입체이성질체에 대한 임상적 활용이 가능할 것으로 사료된다.

References

[1] H. J. Lee, J. R. Do, J. H. Kwon and H. K. Kim, "Physiological activities of extracts from different parts of *Cudrania tricuspidata*", J. Korean Soc. Food

Sci. Nutr., 40, pp. 942-948, 2011.
 [2] G. M. R. Tombo and D. Bellus, "Chiralitaet und Pflanzenschutz, Angew", Chem., 103, pp. 1219-1241, 1991.
 [3] E. S. Choi, "A structure model development on the cardiovascular disease risk factors among the male manufacturing workers", J. Korean. Acad. Community Health Nurs., 17, pp. 153-165, 2006.
 [4] E. H. Lee, S. J. Tahk, J. H. Shin, Y. W. Lee and R. Song, "Development and a psychometric evaluation of cardiovascular disease-specific quality of life scale for koreans", J. Korean. Acad. Nurs., 37, pp. 313-323, 2007.
 [5] A. Endo, "Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase", J. Med. Chem., 28, pp. 401, 1985.
 [6] T. Hiyama, G. B. Reddy, T. Minami and T. Hanamoto, "Stereoselective reduction of β,δ -diketo ester. A novel strategy for the synthesis of artificial HMG-CoA reductase inhibitors", Bull. Chem. Soc. Jpn., 68, pp. 350-363, 1995.
 [7] L. Czako, A. Szabolcs, A. Vajda, S. Csati, V. Venglovecz, Z. Rakonczay Jr., P. Hegyi, L. Tiszlavicz, T. Csont, A. Posa, A. Berko, C. Varga, S. V. Ilona, I. Boros and J. Lonovics, "Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet aggravates necrotizing pancreatitis in rats", Eur. J. Pharmacol., 572, pp. 74-81, 2007.
 [8] A. Endo, M. Kuroda and K. Tanzawa, "ML-236A, ML-236B, AND ML-236C, New inhibitors of cholesterologenesis produced by penicillium citrinum", J. Antibiot., 29, pp. 1346-1348, 1976.
 [9] B. D. Roth, D. R. Sliskovic and B. K. Trivedi, "Treatment of Hypercholesterolemia", Annu. Rep. Med. Chem., 24, pp. 147-156, 1989.
 [10] J. S. Kim, M. S. Kim, H. J. Park, S. J. Jin, S. Lee and S. J. Hwang, "Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemicalcium using spray-drying and SAS process", Int. J. Pharmac., 359, pp. 211-219, 2008.
 [11] W. Richmond, "Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis", Clin. Chem., 22, pp. 1579-1588, 1976.
 [12] M. W. McGowan, J. D. Artiss and D. R. Strandbergh, "A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglyceride", Clin. Chem.,

- 29, pp. 538-542, 1983.
- [13] A. Noma, K. N. Nakayama, M. Kota and H. Okabe, "Simultaneous determination of serum cholesterol in high and low density lipoprotein with use of heparin, Ca²⁺ and an anion exchange resin", Clin. Chem., 24, pp. 1504-1580, 1978.
- [14] W. T. Friedwald, R. L. Levy and D. S. Fredrickson, "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge", Clin. Chem., 18, pp. 499-502, 1972.
- [15] O. Haglund, R. Loustarinen, R. Wallin, I. Wibell and T. Salden, "The effect of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin", Eur. J. Nutr., 121, pp. 165-172, 1991.
- [16] S. Reitman and S. Frankel, "A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic determination and glutamic pyruvic transaminase", Am. J. Clin. Pathol., 28, pp. 56-63, 1957.
- [17] S. M. Robert, Preparative biotransformation, John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, Edit, 1993.
- [18] L. T. Kanerva, "Biocatalytic ways to optically active 2-amino-1-phenylethanol". Acta. Chim. Scand., 50, pp. 234-242, 1996.
- [19] N. Hoffmann, "Baekherhefe-ein lebendes Reagens fuer die organisch-chemische Synthese", Chemie in unserer Zeit, 30, pp. 201-213, 1996.
- [20] T. Langer, J. Janssen and G. Helmchen, Catalytic asymmetric hydrosilylation of ketons using rhodium(I)-complex of chiral phosphinoxazoline ligands, Tetrahedron Asymmetry, 7, pp. 1599-1602, 1996.
- [21] G. Zhiwei, C. Yijun, G. Animesh, L.H. Ronald and N. P. Ramesh, Synthesis of ethyl and *t*-butyl (3R,5S)-dihydroxy-6-benzoyloxy hexanoates via diastereo- and enantioselective microbial reduction, Tetrahedron, 17, pp. 1589-1602, 2006.
- [22] S. H. Kyung, "Synthesis and application of new type organometallic catalyzt. Synthesis of bisphosphonite-rhodium complexes", Agricultural Chem. Biotechnology, 40, pp. 588-592, 1997.
- [23] I. Avisar, J. G. Brook and E. Wolfovitz, "Atorvastatin monotherapy vs. combination therapy in the management of patients with combined hyperlipidemia", European J. Int. Med., 19, pp. 203-208, 2008.
- [24] M. Arca, S. Natoli, F. Micheletta, S. Riggi, E. D. Angelantonio, A. Montali, T. M. Antonini, R. Antonini, U. Diczfalusy and L. Iuliano, "Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: Reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy", Free Radical Bio. Med., 42, pp. 698-705, 2007.
- [25] K. Hiromi, D. Shoko, D. Kentaro, Y. Toru, O. Yasuyuki, O. Yoshio, K. Tomoko, I. Yoshio, M. Tohru and A. Koji, "Protection against ischemic stroke damage by synergistic treatment with amlodipine plus atorvastatin in Zucker metabolic rat", Brain Research, 1382, pp. 308-314, 2011.
- [26] A. M. Gott and J. A. Farmer, "Drug insight: The role of statins in combination with ezetimibe to lower Ldl-cholesterol", Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med., 3, pp. 664-672, 2006.
- [27] H. G. Song and H. Lee, "The effect of *Persicae semen* herbal-acupuncture at GB34 (*Yangneungcheon*) on a rat model of hyperlipidemia", J. Korean Oriental Med., 32, pp. 151-163, 2011.
- [28] R. Scranton, H. D. Sessp, M. J. Stampfer, J. W. Levenson, J. E. Buring, J. M. Gaziano, "Predictors of 14-year changes in the total cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio in men", Am. Heart J., 147, pp. 1033-1038, 2004.
- [29] G. Ji, X. Zhao, L. Leng, P. Liu and Z. Jiang, "Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats", Lipids Health Dis., 10, pp. 23-32, 2011.
- [30] J. J. Lee, T. M. Ha, Y. M. Lee, A. R. Kim and M. Y. Lee, "Effect of *Brassica rapa* sprouts on lipid metabolism in rats fed high fat diet", J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 39, pp. 669-676, 2010.

최 원 식(Won-Sik Choi)

[정회원]



- 1974년 2월 : 고려대학교 화학과 (이학사)
- 1977년 2월 : 고려대학교 화학과 (이학석사)
- 1985년 2월 : 고려대학교 화학과 (이학박사)
- 1982년 3월 ~ 1989년 2월 : 강릉대학교 화학과 교수
- 1989년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 생명공학과 교수

<관심분야>

유기화학, 유기합성, 천연물화학

남 석 우(Seok-Woo Nam)

[정회원]



- 2007년 2월 : 순천향대학교 유전공학과(이학사)
- 2009년 2월 : 순천향대학교 유전공학과(이학석사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 생명공학과(박사과정)

<관심분야>

유기화학, 유기합성, 천연물화학

이 경 락(Gyung-Rak Lee)

[준회원]



- 2011년 2월 : 순천향대학교 생명공학과(이학사)
- 2011년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 생명공학과(석사과정)

<관심분야>

유기화학, 유기합성, 천연물화학