

제 3 차 년 도
연 차 보 고 서

의약품의 약동학·대사에 관한 연구

A Study on the Pharmacokinetics & Metabolism of Drugs

연구기관
한국과학기술연구원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 정밀화학분야의 국제공동 연구과제인 "의약품의 약동학·대사에 관한 연구(3차)" 사업의 연차보고서로 제출합니다.

1992. 7.

연구기관 : 한국과학기술연구원
연구책임자 : 정봉철 (선임연구원)
연구원 : 유영숙 (선임연구원)
박종세 (책임연구원)
엄기동 (연구원)
정병화 (연구원)
김태욱 (연구원)
장현경 (연구원)
김영숙 (연구원)

여 백

요 약 문

I. 제목

의약품의 약동학·대사에 관한 연구

II. 연구의 목표 및 중요성

물질특허 개방에 따른 신의약 창출사업의 시급성과 현재 낙후되어 있는 신의약창출에 필요한 기반기술의 기술수준 제고를 위하여 이 방면의 경험이 풍부한 선진국의 권위있는 기관과의 공동연구를 통한 국내 약동학 및 대사에 관한 정보 및 기술의 조속한 국내정착을 꾀하고 이를 바탕으로 신약개발 과정에 크게 이바지하기 위한 일환으로 최근 독성의 문제가 되고 있는 항히스타민류에 대한 생체내의 약동 및 그 대사과정에 관한 실험법을 개발하여 안전성 평가에 활용하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

기본 연구방법을 약동학의 연구 및 대사물질의 확인에 의한 대사경로 추적적으로 구분할 수 있고, H₁ type 의 항히스타민류의 독성학적 연구는 약물에 의한 변이성 및 발암성 정도를 결정하는데에 초점을 맞추어 대부분의 항히스타민 대사연구가 실험동물에 국한됨을 감안해, 그로부터 얻은 결과로서 발암기전을 밝혀 내는데에 적용하고 있다. 본 연구에서는 H type 의 항히스타

민류를 대상으로 인체내의 대사과정에 의해 생성되는 대사산물을 검출, 확인하여 그 대사경로를 규명함으로써, 실험동물로부터 얻은 결과와 비교, 분석하여, 전체적인 그 독성기전을 알아내는데 활용하고자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

약동학 및 대사연구를 위한 기반 확립 단계로서 필요한 장비의 설치 및 그 기본기술을 습득하였다. 항히스타민류를 그 대상약물로 하여 약물의 배설 및 분포에 관한 연구를 수행하여 실험동물에 의한 결과와는 다른 새로운 대사산물을 발견하였고, 그에 따른 배설정도를 평가하였다. 이와같은 약동학, 대사에 관한 연구기술의 확립은 새로운 신약을 개발하는데 있어 신약의 독성기전을 해명하는데에 중요한 역할을 하게 된다.

V. 상대국 연구기관

본 국제 공동연구의 상대국 연구기관으로는 미국의 FDA 산하의 국립 연구기관으로서 Jefferson, Arkansas 에 위치한 National Center for Toxicological Research 이다.

Summary

The metabolic profiles of triprolidine, 2-[1-(4-methylphenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)]pyridine, in human urine and carbinoxamine, 2-[(4-chlorophenyl)-2-pyridinyl-methoxy]-N,N-dimethylethanamine, in rat urine were determined. The urinary extracts obtained with enzyme hydrolysis were derivatized with MSTFA/TMSCl and analyzed by GC/MSD.

The presence of triprolidine, hydroxymethyltriprolidine, triprolidine carboxylic acid and oxotriprolidine carboxylic acid in urine of a human subject orally treated with triprolidine hydrochloride was demonstrated. Triprolidine and hydroxymethyltriprolidine were identified by comparison with authentic standards in chromatographic and mass spectral properties. Triprolidine carboxylic acid was detected as a major metabolite in the urine. Oxo-triprolidine, which is thought to be one of minor metabolite, was tentatively identified by the interpretation of its mass spectral patterns.

On the basis of spectral data obtained from synthesized metabolite of triprolidine, metabolic pathways of triprolidine in human was proposed. These data suggest that in human, the methyl group of phenyl ring can be oxidized firstly to be corresponding aldehyde group during triprolidine elimination, and then reduced to hydroxyl group or oxidized further to carboxylic acid. This triprolidine carboxylic acid can be converted to be

oxotriprolidine carboxylic acid by further oxidation.

The maximum urinary excretion rate of triprolidine and hydroxymethyltriprolidine were 2 to 4 hours after drug administration.

The metabolites detected in the rat urine of orally treated with carbinoxamine maleate were N-demethylcarbinoxamine, desaminocarbinoxamine, carbinol, chlorobenzoylpyridine, N-acetyl conjugates of N-desmethyl and N,N-didesmethylcarbinoxamine. These metabolites were identified by the interpretation of the mass spectrum. Especially it is clear that acetyl conjugation on the free amino group of N-demethylation metabolites occurred in our metabolism study. However, some metabolite from the oxidative deamination was not detected in this metabolism. And confirmation of N-oxide formation in this process needs to be investigated further.

Contents

Chapter 1.	Introduction	11
Chapter 2.	The metabolism and excretion of triprolidine in human urine.....	12
Section 1.	Theoretics and objectives.....	12
Section 2.	Experimentals.....	17
(1)	Reagents and apparatus	
(2)	Sample collection	
(3)	Sample preparation	
(4)	Calibration curve for quantitative analysis	
Section 3.	Results and discussion	24
(1)	Identification of triprolidine and its metabolites and metabolic pathway.	
(2)	Quantitative analysis of triprolidine and its metabolites.	
(3)	Excretion pattern of triprolidine and its metabolites in human urine.	
Section 4.	Conclusions.....	54
Chapter 3.	Synthesis of triprolidine carboxylic acid and hydroxymethyl triprolidine.....	55
Section 1.	Objective	55
Section 2.	Experimentals.....	56
(1)	Reagents	
(2)	Apparatus	
(3)	GC/MSD conditions	

(4) Synthetic procedure of triprolidine carboxylic acid and hydroxymethyl triprolidine.	
Section 3. Results and discussions	61
Section 4. Conclusions	69
Chapter 4. Metabolism of carbinoxamine in rat urine.	72
Section 1. Theoretics	72
Section 2. Objectives.....	74
Section 3. Experimental	77
(1) Reagents and apparatus	
(2) Sample collection	
(3) Sample preparation	
Section 4. Results and discussion	81
Section 5. Conclusions	119
References	

목 차

제 1 장	서론	11
제 2 장	Triprolidine 의 human urine 에서의 metabolism 과 excretion 에 관한 연구	12
제 1 절	이론적 배경 및 실험목적.....	12
제 2 절	실험방법.....	17
	(1) 시약 및 실험기기	
	(2) 시료채취	
	(3) 시료분석방법	
	(4) 정량을 위한 검량선의 작성	
제 3 절	결과 및 고찰.....	24
	(1) Triprolidine 과 그 대사체들의 확인 및 대사경로	
	(2) Triprolidine 및 그 대사체들의 정량분석	
	(3) Human urine 에서의 triprolidine 과 그 대사체들의 시간에 따른 배설경향	
제 4 절	결론.....	54
제 3 장	Triprolidine 의 metabolite 인 Triprolidine carboxylic acid 의 합성에 관한 연구.....	55
제 1 절	실험목적.....	55
제 2 절	실험방법.....	56
	(1) 시약	

(2) 실험기기	
(3) GC/MSD 작동조건	
(4) Triprolidine carboxylic acid 와 Hydroxymethyltriprolidine 의 합성방법	
제 3 절 결과 및 고찰.....	61
제 4 절 결론.....	69
제 4 장 Carbinoxamine 의 rat urine 에서의 metabolism 에 관한 연구.....	72
제 1 절 이론적 배경.....	72
제 2 절 실험목적.....	74
제 3 절 실험방법.....	77
(1) 시약 및 실험기기	
(2) 시료채취	
(3) 시료분석방법	
제 4 절 결과 및 고찰.....	81
제 5 절 결론.....	119
참고문헌	

제 1 장 서론

신약의 개발이 요구되는 현시점에서 합성, 또는 천연물로부터 얻어지는 신약 후보물질의 유효성과 안전성을 평가하기 위해서는 약물의 대사연구를 통한 대사산물의 확인 및 그 대사 경로추적, 그리고 약물의 흡수, 분포 및 배설의 시간적 변화를 조사, 검토하고 약물의 체내특성을 밝혀냄으로써 약효의 강도, 독성의 정도 및 약물투여에 미치는 효과를 연구하는것이 필요하다. 또한 신약허가 규정에는 개발된 신약의 체내대사에 관한 연구를 필수로 요구하고 있다. 즉 의약품의 대사물확인은 물론 그 밝혀낸 대사물의 독성시험까지도 요구하고 있다. 이와 관련해 최근 H_1 type 의 항히스타민의 독성학적 연구는 약물에 의한 변이성 및 발암성 정도를 결정하는데에 초점을 맞추어 대부분의 항히스타민 대사연구는 실험동물에 국한되어 그로부터 얻은 결과로서 발암기전을 밝혀내는데에 적용하고 있다.

본 연구는 H_1 type 의 항히스타민류중 metabolism 에 관한 연구가 부족한 triprolidine 과 carbinoxamine 에 대하여 실험동물 (rat)과 인체내에 대하여 대사산물을 검출하고 그 대사경로를 규명함으로써 그 독성 기전을 알아내는데 활용하고자 한다.

제 2 장 Triprolidine 의 human urine 에서의 metabolism과 excretion 에 관한 연구

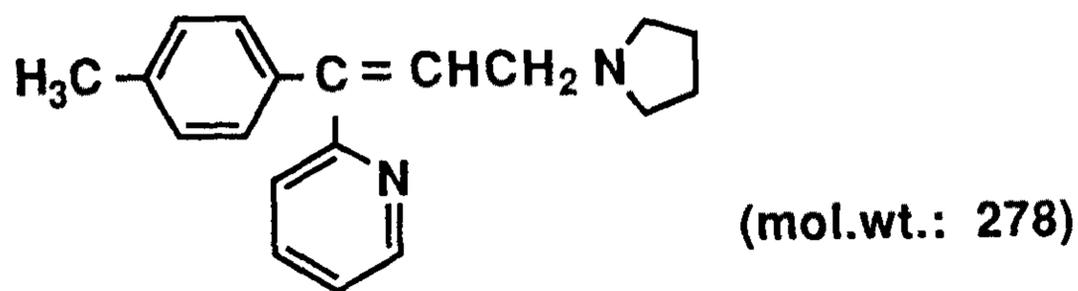
제1절 이론적배경 및 실험목적

Alkylamine 류에 포함되는 propylamine derivative H₁-receptor antagonist 인 triprolidine : 2-[1-(4-methylphenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)] pyridine, 은 정제 또는 시럽제로 널리 사용되는 over the counter drug 이다 (1-2).

Triprolidine 은 1955년에 Adamson 과 Burrow Wellcome 에 의하여 만들어진 이래 allergic condition 치료에 쓰이는(3) 항 히스타민제로 사용되어 왔으며 구조에 따른 항 히스타민 효과는 1971년 Ison 등에 의하여 연구되었다.(4) 또한 동물 (5-6) 과 사람(7-9) 에 대해 antihistamine activity 가 있다고 보고되었으며, 대략의 약효 지속 시간은 4-6(hr) 인것으로 알려져 있다(10). Triprolidine 의 물리화학적 성질 및 구조는 Table 2-1에 나타내었다.

Triprolidine 에 대한 대사체 및 약동학에 대한 연구로는 Findlay (11) 등이 실험 동물로서 rabbit 과 beagle dog 을 사용하여 이들 동물들의 plasma 내에서의 triprolidine의 disposition 과 반감기 ($t_{1/2}$), 분포용적 (Vd), AUC(Area under the concentration curve), bioavailability 를 구하고, 또한 human plasma 에서도 $t_{1/2}$, Vd, AUC 등을 구하여 사람과 동물의 pharmacokinetic data 를 비교한 보고가 있으며, Kutzman(12) 등이 guinea pig liver 의 microsomes 와 NADP generating system 을 이용하여 in vitro 에서의 ¹⁴C-triproclidine 의 metabolism 을 연구하여 metabolite 로서 triprolidine carboxylic acid 와 hydroxymethyl triprolidine 을 확인한 보고(Fig. 2-1), 그리고 rat 에서 triprolidine 을 경구로 투여하고 urine 과 bile 을 채취하여 urine 과

Table 2-1. Structure and physical and chemical properties of triprolidine hydrochloride.



Triprolidine

Physical state	crystalline powder with no more than a slight but unplesant odor.
Melting point	116-118°C
Solubility	Approximately 476mg/ml in water and 556 mg/ml in alcohol at 25°C
Stability	Triprolidine hydrochloride tablets and oral solution should be stored in tight, light-resistant containers at 15-30°C in dry place; the oral solution should be protected from freezing.
Molecular weight	Triprolidine : 278.38 Triprolidine hydrochloride : 314.9
Reference No.	20-21

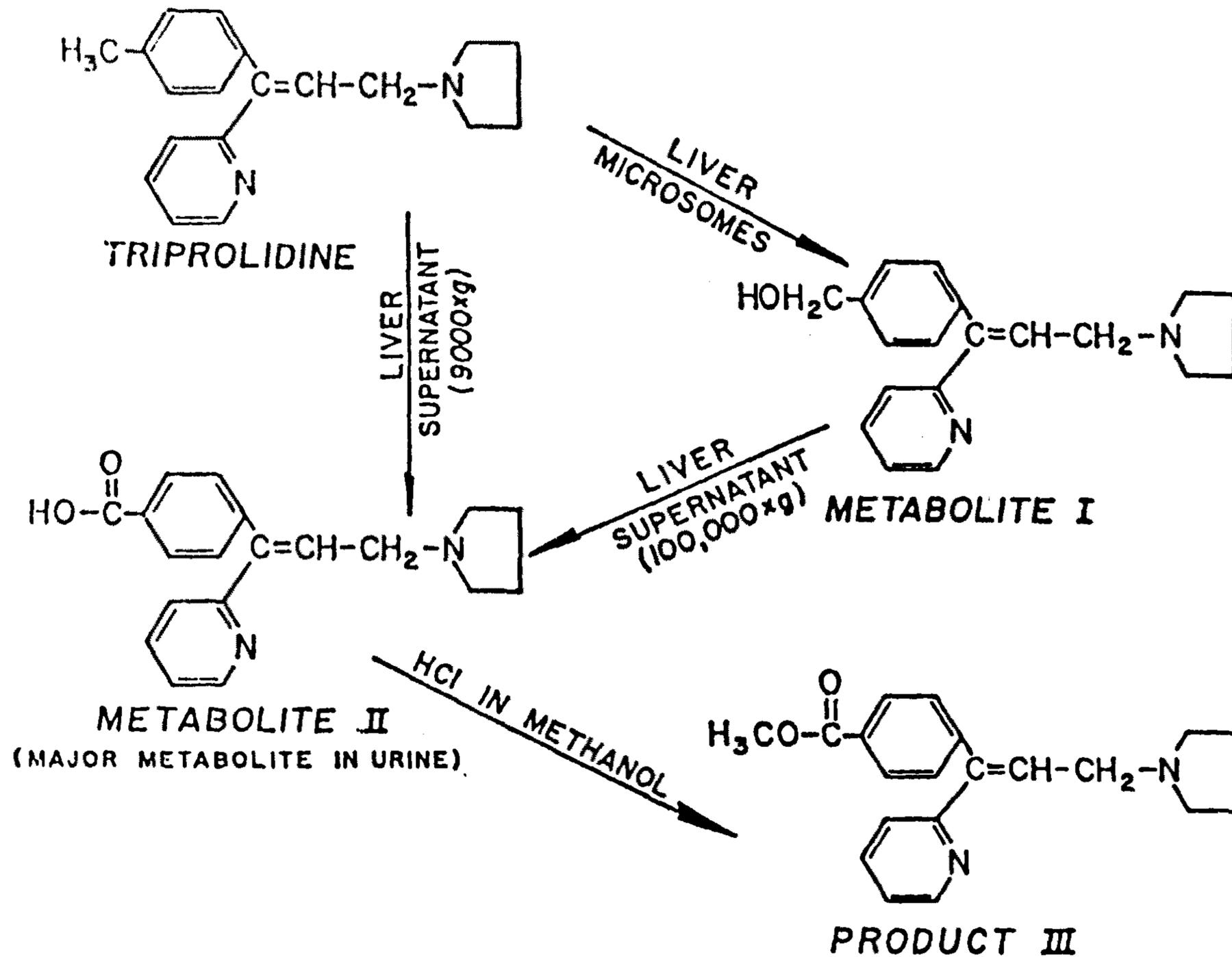


Fig.2-1. Metabolism of triprolidine in vitro by enzyme in guinea pig liver.
 (Reference No. 12)

bile 내에서의 metabolism 과 excretion pattern 을 연구한 보고 (13) (Fig. 2-2.) 등이 있으나 사람에서의 metabolism 에 관한 연구는 미비한 상태이다. 또한 1980년도에 ethylene diamine antihistamine 인 methapyrilene 이 rat hepatocarcinogen 이라는 보고가 Science 지에 발표되면서 이런 유형의 약물들에 대한 독성 및 발암성 연구도 한층 활발해 졌다(14-19).

따라서 본 연구에서는 toxic substance 로 알려진 항 히스타민제인 triprolidine 에 대하여 human urine 에서 생성되는 대사체 및 대사경로를 GC/MS (Gas chromatography-Mass spectrometry) 를 사용하여 밝혀보고자 하였다. 그리고 human urine 내에서의 triprolidine 과 그 대사체들의 시간에 따른 배설량과 속도를 측정하여 경시적인 urine 배설경향을 살펴보고자 하였다.

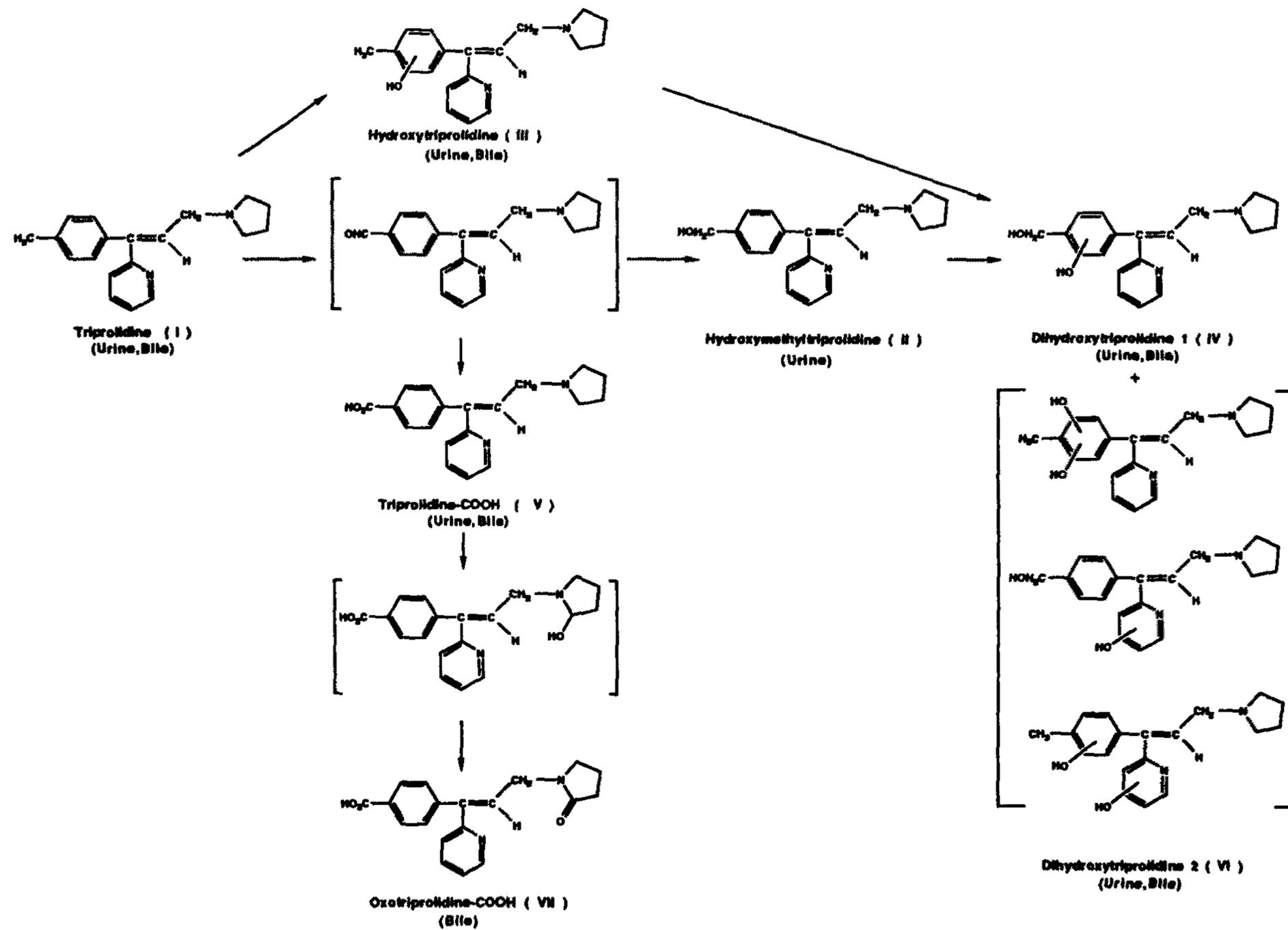


Fig.2-2. Plausible metabolic pathway of triprolidine in rats.
(Reference No. 13)

제 2 절 실험방법

(1) 시약 및 실험기기

가) 시약

Triprolidine hydrochloride (Sigma chemical Co. U.S.A.)

Triprolidine tablet (삼희약품, Korea)

Hydroxymethyltriprolidine (Synthesized by NCTR*)

Tripelennamine (Sigma chemical Co. U.S.A.)

Methanol (Merck, Germany)

K₂HPO₄ (Junsei chemical Co. Japan)

KH₂PO₄ (Junsei chemical Co. Japan)

Ether (J.T. Baker, U.S.A.)

Amberlite XAD-2 resin (100-200 microns, Serva, Germany)

β - Glucuronidase from E. Coli (Boehringer Mannheim, Germany)

: β -glucuronidase activity - 200 U/ml

MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide,

Sigma Chemical Co, U.S.A.)

TMSCl (Trimethylsilylchloride, Sigma chemical Co. U.S.A.)

*NCTR : National Center for Toxicological Research (Jefferson,
AR 72079 in U.S.A.)

나) 시약의 조제

- XAD-2 resin 의 준비 : acetone(2일), methanol(2일), 증류수(3일)로 환류시켜 정제한 다음 증류수에 담아 보관하였다.
- Phosphate buffer(pH 7.0) : 0.2M K_2HPO_4 와 0.2M KH_2PO_4 을 섞어 pH 7.0으로 맞추어 사용하였다.
- 유도체화시약 : MSTFA 와 TMSCl 을 100:1 로 혼합하여 사용하였다.

다) 실험기기

본 실험에서 사용한 분석기기로는 Hewlett-Packard(HP) 5890A Gas Chromatograph(GC)에 direct interface 로 연결된 5970B Series Mass Selective Detector(MSD) 를 사용하였고, 모든 시료는 HP 7673A auto sampler 를 사용하여 GC에 주입하였다. Data analyzing system 으로는 HP 7946 disc drive 가 연결된 HP 5970 MS Chemstation 을 사용하였고 chromatogram 과 mass spectrum 은 HP 2934A Printer 로부터 얻었다. 시료의 추출과정에서 사용한 장치로는 rotary vacuum evaporator (Buchi, Switzerland), Buhler 7400 Tubingen Shaker (Edmond, Germany) Varifuge-F Centrifuge (Heracus, Germany), Heating block (Gebr. Liebisch, Germany) 등이 있다.

라) GC/MSD 작동조건

본 실험에서 사용된 분석기기 작동조건은 다음과 같다.

주입기 온도 : 280°C

주입방법 : split mode(ratio 10:1)

운반기체 및 유속 : He gas, 1.0ml/min

Transfer line 온도 : 300°C

분리관 : SE-30, 길이 17m, 내경 0.2mm, film thickness 0.1 μ m였으며, 분리관의 온도는 150°C에서 5분간 머무르고 10°C/min으로 300°C까지 상승시켰으며 300°C에서 3분간 머물렀다.

(2) 시료채취

건강한 성인남자 2명 (Table 2-2) 에게 약물투여전까지 정상적인 식사를 하게 한후 triprolidine hydrochloride 5mg (토프리딘정 : triprolidine hydrochloride 2.5mg tablet, 2정)을 경구로 투여하고 0-1, 1-2, 2-4, 4-6, 6-10, 10-14, 14-24, 시간간격으로 배설된 뇨를 수집하였다. 약물투여전 blank 뇨를 채취하였으며 수집한 뇨는 분석전 까지 -20°C 냉동고에서 보관하였다.

Table 2-2. Volunteer profiles

	age	Height(cm)	Weigh(kg)
Subject 1	48	169	63
Subject 2	36	180	75

(3) 시료분석방법

Free 와 conjugated fraction 을 분리하여 분석하였던 rat urine 분석시와는 달리, human urine 의 conjugated fraction 에서는 GC-MSD의 SIM (selected ion monitoring)mode 를 사용하여 분석하였을 때 parent drug 인 triprolidine 과 그의

metabolite 들이 발견되지 않았으므로 (22) conjugated fraction 에서는 triprolidine 및 metabolite 들이 소량 존재하거나 존재하지 않는 것으로 생각되어 다음 분석방법과 같은 free 와 conjugated fraction 을 분리하지 않고 한번에 분석하는 실험방법을 택하여 분석 하였다.

가) XAD-2 column 의 준비

내경이 0.5cm 인 disposable glass pasteur pipette 에 glass bead 를 넣어서 아래 부분을 막은 다음, 충분히 세척된 XAD-2 resin 을 높이 2cm 정도로 채워서 만든다.

나) Urine 으로부터 triprolidine 및 대사체의 분리

Human urine 시료를 5ml plastic syringe 로 뽑아서 XAD-2 column 에 흘려주면서 내부표준물질 (internal standard : I.S.) 로 triprolidine 6 μ g 을 넣어준다. 흘려준 urine 은 동량의 증류수로 XAD-2 column 을 씻어주고, free 와 conjugated compound 들을 흡착하고 있는 XAD-2 column 에 methanol 을 1ml 씩 3번 흘려서 stopper 가 있는 원심분리 tube 에 받는다. 그리고 methanol 용액은 vacuum rotary evaporator 로 건조시킨다.

Residue 에 1ml 의 phosphate buffer (pH 7.0) 를 넣은 후 가수분해를 시키기 위하여 β -glucuronidase (from *E. coli*) 25 μ l 를 넣고 50°C 에서 1시간 반응시킨다. 반응후 수층을 잠시 상온에 방치하여 식히고, diethylether 5ml 를 사용하여 5분간 shake 에서 흔들어 추출한다. 혼합된 용액을 2,500rpm 에서 5분간 원심분리하고 -30°C의 freezer 에 넣어 buffer 층을 얼린 다음 ether 층은 다른 원심분리 tube 에 옮긴다. 이 ether 층은 vacuum evaporator 에서 건조시키고 buffer 층은 다시 녹여 ether 로 추출하여 위와 같은 조작을 총 5번

반복한다. 이렇게 하여 모은 residue 는 유도체화 반응을 시키기전에 수분을 제거하기 위하여 P_2O_5/KOH vacuum desiccator 에서 30분간 넣어둔다.

다) 유도체화 반응

MSTFA : TMSCl (100:1) 혼합용액 $50\mu\text{l}$ 를 추출조작후 건조시킨 tube 에 넣고 60°C 에서 15분간 반응시켰다. 반응후 약간 식힌 다음 반응액을 auto sampler 용 vial 에 옮기고 GC/MSD에 injection 하였다. Urine 의 전체적인 analytical procedure 를 Scheme 1 에 나타내었다.

(4) 정량을 위한 검량선의 작성방법

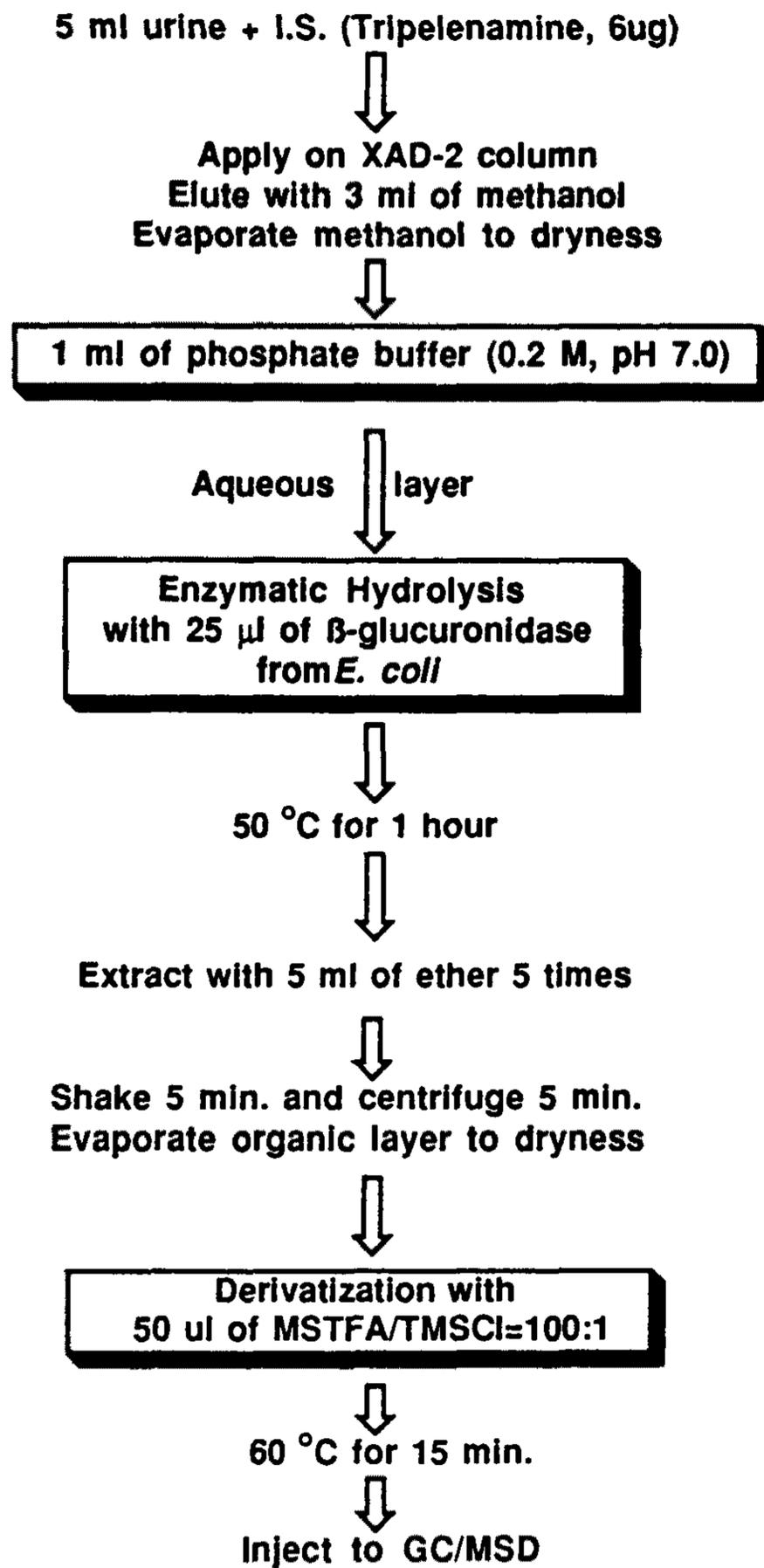
가) 시약의 조제

1. Triprolidine 표준액의 조제

Triprolidine 10mg 을 methanol 10ml 에 녹여 triprolidine 1000ppm 용액을 조제하였다. 이 1000ppm 용액을 다시 methanol 로 10배 희석하여 100ppm 용액을 조제하였다.

2. Hydroxymethyltriprolidine 표준액의 조제

NCTR 에서 합성하여 제공한 hydroxymethyltriprolidine 2.4mg 을 methanol 2.4ml 에 녹여 triprolidine 1000ppm 용액을 조제하였다. 이 1000ppm 용액을 다시 methanol 로 10배 희석하여 100ppm 용액을 조제하였다.



Scheme 1. Analytical procedure for tripelidine and its metabolites in human urine

나) 검량선의 작성

Tripolidine 100ppm 용액을 각각 $1\mu\text{l}$, $2.5\mu\text{l}$, $5\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$, $15\mu\text{l}$ 를 취하여 XAD-2 column 에 loading 시키고, hydroxymethyltriprolidine 100ppm 용액을 $0.5\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$, $2.5\mu\text{l}$, $5\mu\text{l}$ 를 취하여 다시 XAD-2 column에 loading 시킨후, internal standard 인 tripeleennamine ($6\mu\text{g}$)과 blank urine 5ml 을 XAD-2 column에 loading 시켰다.

위와같은 조작을 하여 tripolidine 의 urine 내의 농도가 20, 50, 100, 200, 300ng/ml 가 되게 하고, hydroxymethyltriprolidine 의 농도가 10, 20, 50, 100 ng/ml 가 되게한 후 urine sample 추출시와 동일한 방법으로 조작하여 분석 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

(1) Triprolidine 과 그 대사체들의 확인 및 대사경로.

Triprolidine hydrochloride (토프리딘정, 삼희제약) 5mg 을 사람에게 경구투여 하였다. Blank urine 은 약물투여전에 채취하였다. 시료처리는 free fraction 과 conjugated fraction 으로 나누어 추출하고 GC-MSD 의 SIM Mode 를 사용하여 분석하여 본 결과 conjugated fraction 에서 parent triprolidine 및 다른 대사체들의 peak 가 발견되지 않았으므로(22) scheme. 1 에서와 같이 free 와 conjugated fraction 을 구별하지 않고 한꺼번에 분석하는 방법을 택하여 분석하였다. 분석시 사용한 Macro Program 은 Scheme 2에 나타내었다.

Triprolidine hydrochloride 10mg 을 경구투여한 rat 의 urine 에서는 7개의 metabolite 들이 발견되었던 결과(13)와는 달리 human urine 에서는 parent triprolidine 의 peak 외에 hydroxymethyltriproclidine, triproclidine carboxylic acid, oxotriproclidine carboxylic acid 의 3개의 metabolites 만이 발견되었다. (Fig. 2-3)

Hydroxymethyltriproclidine 은 NCTR 에서 제공한 standard 로, triproclidine carboxylic acid 는 합성한 standard (제2장 참조)로 확인하였다. Parent triproclidine 과 각 metabolite 들의 mass spectrum 은 Fig. 2-4에 나타내었다. Rat 의 경우 triproclidine 의 phenol ring 의 $-CH_3$ group 이 산화되어 hydroxymethyltriproclidine 이나 carboxylic acid 형태가 되고 phenol ring 자체에도 hydroxylation 이 일어나서 hydroxytriproclidine 이나 dihydroxytriproclidine 1, 2(13) 를 형성한 형태의 metabolite 들을 GC-MSD로 검출할 수 있었던 반면 human urine 에서는 phenyl ring 의 $-CH_3$ group 에 hydroxylation 이 진행된 형태인 hydroxymethyltriproclidine 과 triproclidine carboxylic acid 는 관찰되었으나, phenol

```

NAME RTN
      AXT = AXT +1
      IF AXT = 2 THEN
WRITE 701, "#13#10#10TRIPELE  TRIPROLIDINE          HYDROXYMETHYLTR"
PRINT
      I01=91
      I02=208
      I03=296
      A=8.21
      B=11.86
      C=14.81
      NWND=3
      STARTSET "PARAM:RESULTS"
      TH 10, 0
      EOM
      ENDIF
      IF AXT=3 THEN
      I01=197
      I02=209
      I03=297
      A=8.21
      B=11.86
      C=14.81
      NWND=2
      EOM
      ENDIF
      IF AXT=4 THEN
      I01=255
      I02=278
      I03=366
      A=8.21
      B=11.86
      C=14.81
      NWND=1
      EUM
      ENDIF
      IF AXT=5 THEN
WRITE 701, "#13#10#10 OH-TRIPROLIDINE  DIHYDROXYTRL1  TRIPROLIDINE- COOH"

```

Scheme 2. Macroprogram for analysis of triprolidine and its metabolites.

```

PRINT
  I01=296
  I02=384
  I03=310
  A=14.560
  B=15.03
  C=15.16
  NWND=3
  EOM
ENDIF
IF AXT=6 THEN
  I01=297
  I02=385
  I03=311
  A=14.560
  B=15.03
  C=15.16
  NWND=2
  EOM
ENDIF
IF AXT=7 THEN
  I01=366
  I02=454
  I03=380
  A=14.560
  B=15.03
  C=15.16
  NWND=1
  EOM
ENDIF
IF AXT=8 THEN
WRITE 701, "#13#10#10 DIHYDROXYTRI 2 OXO-TRI-COOH"
PRINT
  I01=384
  I02=309
  A=17.060
  B=17.385
  NWND=3
  CON
ENDIF

```

Scheme 2. Continued.

```

IF AXT=9 THEN
  I01=385
  I02=310
  A=17.060
  B=17.385
  NWND=2
  CON
ENDIF
IF AXT=10 THEN
  I01=454
  I02=394
  A=17.060
  B=17.385
  NWND=1
  CON
ENDIF
ENDSET
QUIT
  NAME EOM
  NW=NWND-1
  SH1=NW*0.333
  LWX=0.0 + SHI
  RWX=0.333 + SHI
  WINDOW 1, 0:0.333, LWX:RWX
  WINDOW 2, 0.333 : 0.666, LWX:RWX
  WINDOW 3, 0.666:0.999, LWX:RWX
  CHR A-RTW:A+RTW, I01
  CHR B-RTW:B+RTW, I02
  CHR C-RTW:C+RTW, I03
  DRAW 1, Z
  DRAW 2, Y
  DRAW 3, X
  INT X
  INT Y
  INT Z
  SCR, 500
  CL
  RTN

```

Scheme 2. Continued.

```
NAME CON
  NW=NWND-1
  SH1=NW*0.333
  LWX=0.0+SHI
  RWX=0.333+SHI
  WINDOW 1, 0:0.333, LWX:RWX
  WINDOW 2, 0.333: 0.666, LWX:RWX
  CHR A-RTW:A+RTW, 101
  CHR B-RTW:B+RTW, 102
  DRAW 1, Y
  DRAW 2, X
  INT Y
  INTX
  SCR, 500
  RTN
NAME GO
  TAB HE, '#6:'
  AXT=1
  RTW=0.2
  RTN
```

Scheme 2. Continued.

TRIPLENNAMINE(I.S.)

TRIPROLIDINE

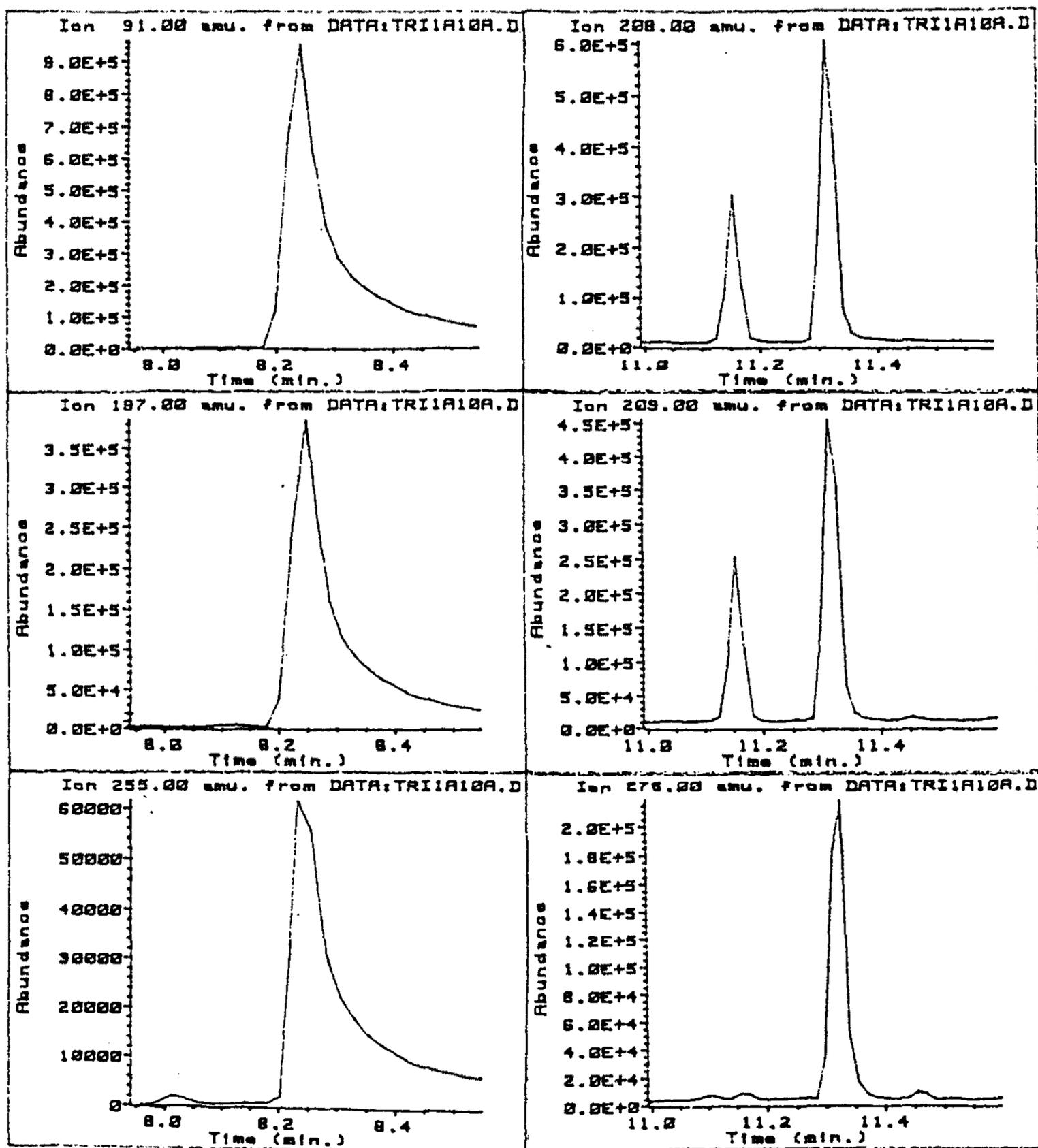


Fig.2-3. The ion chromatogram of triprolidine and its metabolites in selected ion monitoring(SIM) mode in GC-MSD.

HYDROXYMETHYLTRIPROLIDINE

HYDROXYTRIPROLIDINE

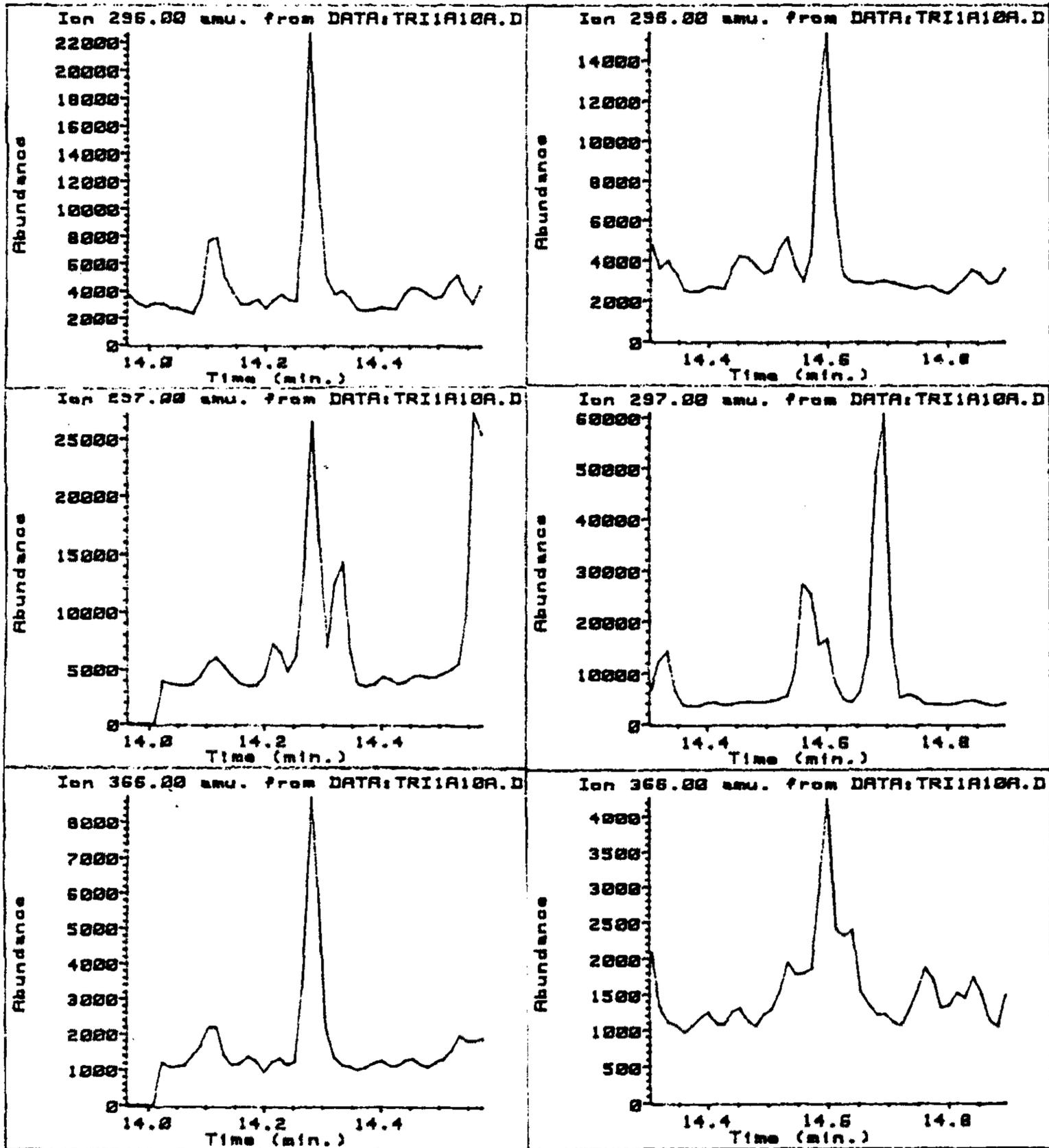


Fig.2-3. Continued.

DIHYDROXYTRIPROLIDINE 1

TRIPROLIDINE CARBOXYLIC ACID

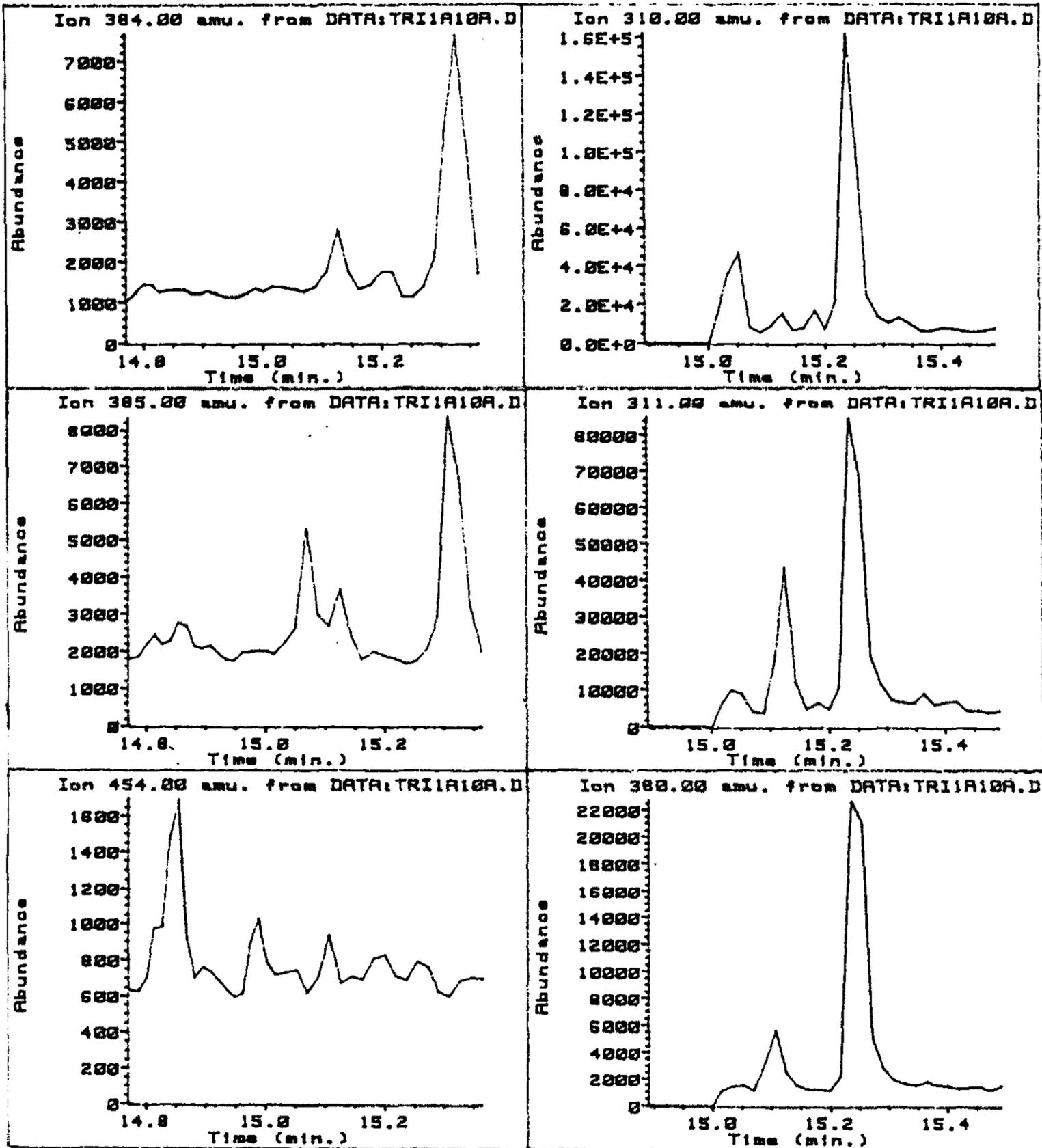


Fig.2-3. Continued.

DIHYDROXYTRIPROLIDINE 2

OXOTRIPROLIDINE CARBOXYLIC ACID

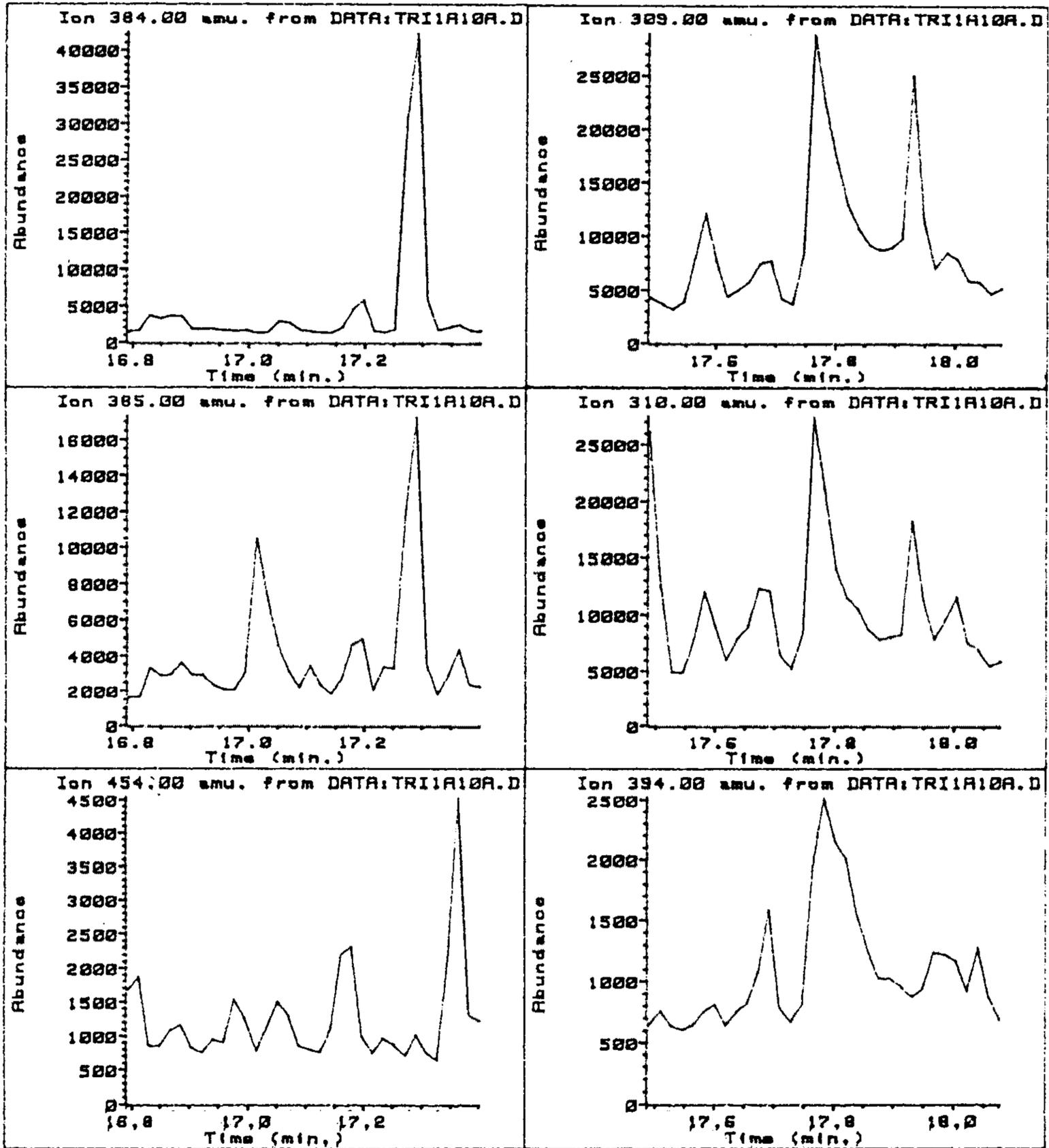


Fig.2-3. Continued.

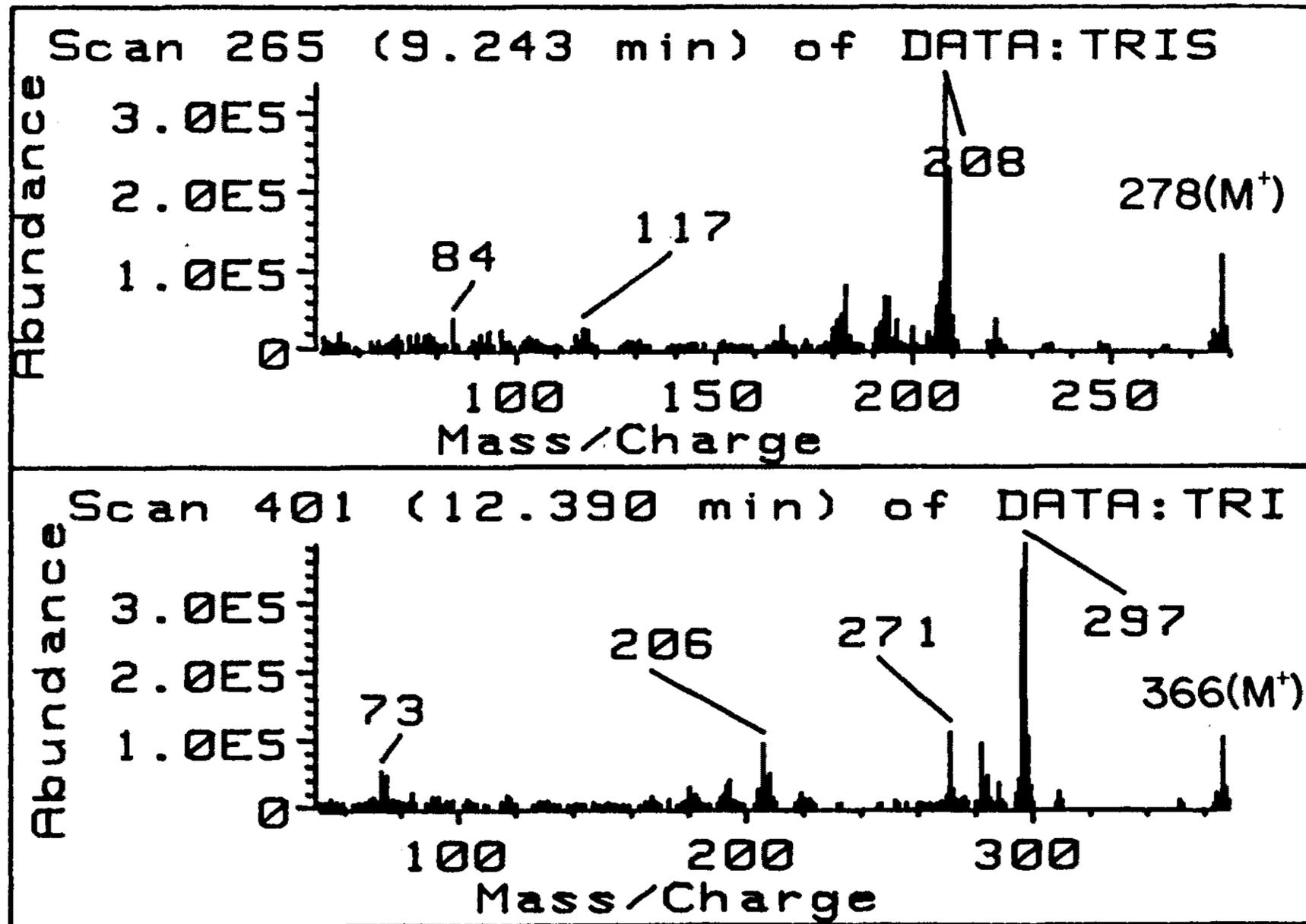


Fig.2-4. Mass spectrum of triprolidine and its metabolites in human urine.

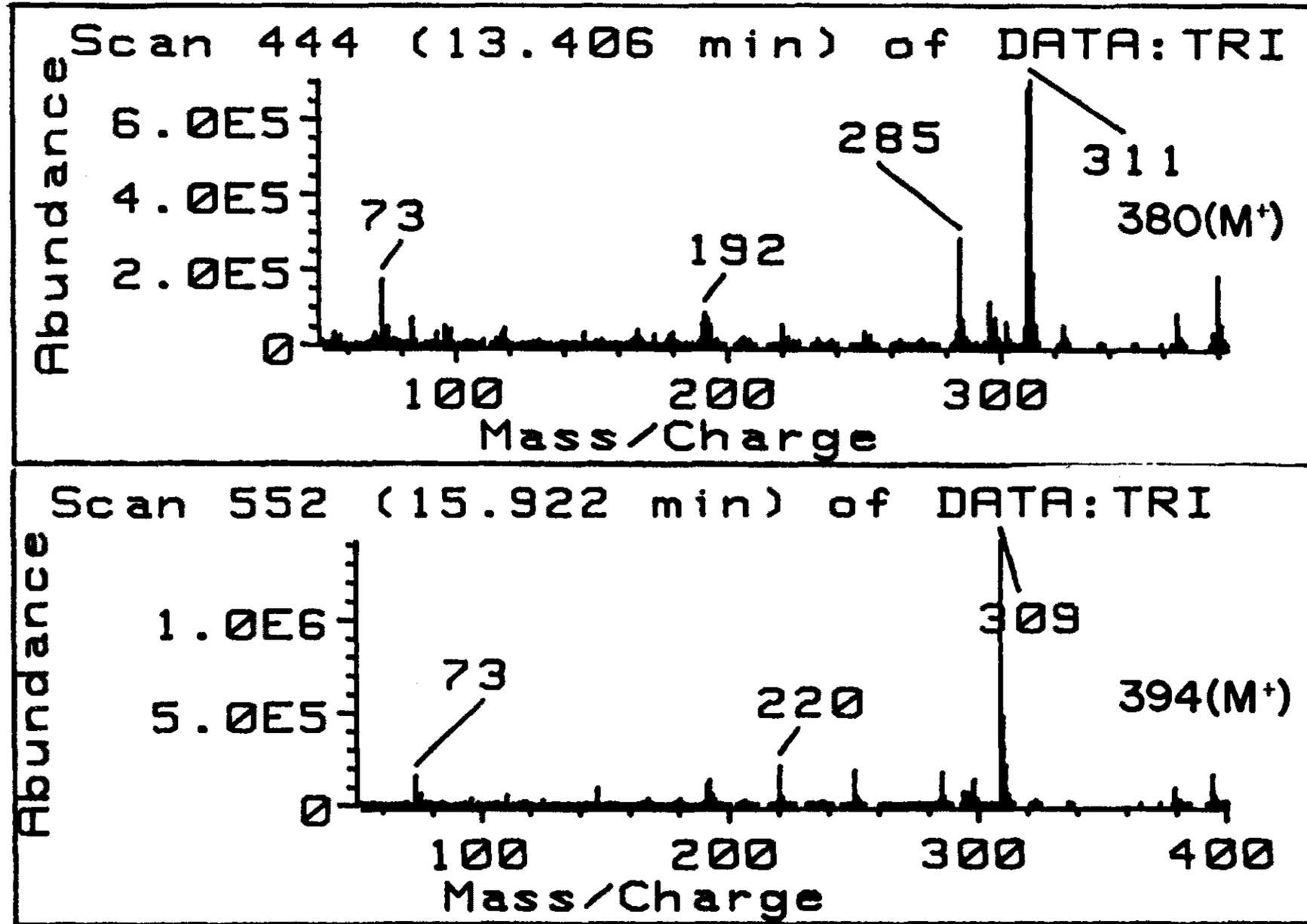


Fig.2-4. Continued

ring 자체에 hydroxylation 이 일어나 하나 혹은 둘의 hydroxyl 기를 갖는 hydroxytriprolidine 이나 dihydroxytriprolidine 1, 2 의 peak 는 발견되지 않았다.

그러므로 triprolidine 이 human urine 으로 대사되어 배설될 때는 rat 의 경우와 같은 phenol ring 자체의 hydroxylation 은 일어나지 않는 것으로 생각된다.

Rat urine 에서 거의 발견되지 않던 oxotriprolidine carboxylic acid 는 human urine 에서는 잘 관찰되었는데 이로 미루어 보아 pyrrolidine ring 의 hydroxylation 은 rat 에서 보다 human 에서 더 잘 일어나는 것으로 생각된다.

Human urine 에서 발견된 대사체들과 위의 고찰들을 토대로 하여 human urine 에서의 triprolidine 의 배설경로를 추정해 보아 Fig. 2-5에 나타내었다.

(2) Triprolidine 및 그 대사체들의 정량분석

사람에게 Triprolidine HCl 제제인 토프리딘정(2.5mg 삼회제약) 2정을 경구로 투여하고 24시간동안 실험방법 (2)와 같은 시간간격으로 urine 을 채취한 후 Scheme 1 의 방법으로 분석하였다.

Fig. 2-4와 같이 human urine 에서는 parent triprolidine 외에 대사체로서 hydroxymethyltriprolidine, triprolidine carboxylic acid, oxotriprolidine carboxylic acid 가 발견되었는데 triprolidine 과 hydroxymethyltriprolidine 에 대해서는 각각의 standard 를 얻을수 있었으므로 각각에 대한 검량선을 작성하여 정량하였으며 triprolidine carboxylic acid 는 합성하는 데는 성공하였으나 (제2장 참조) 정량에 필요한 만큼의 충분한 양을 얻지 못하였고 oxotriprolidine carboxylic acid 는 합성을 시도중에 있어 이 두 metabolite 들은 internal standard 의 height 에 대한

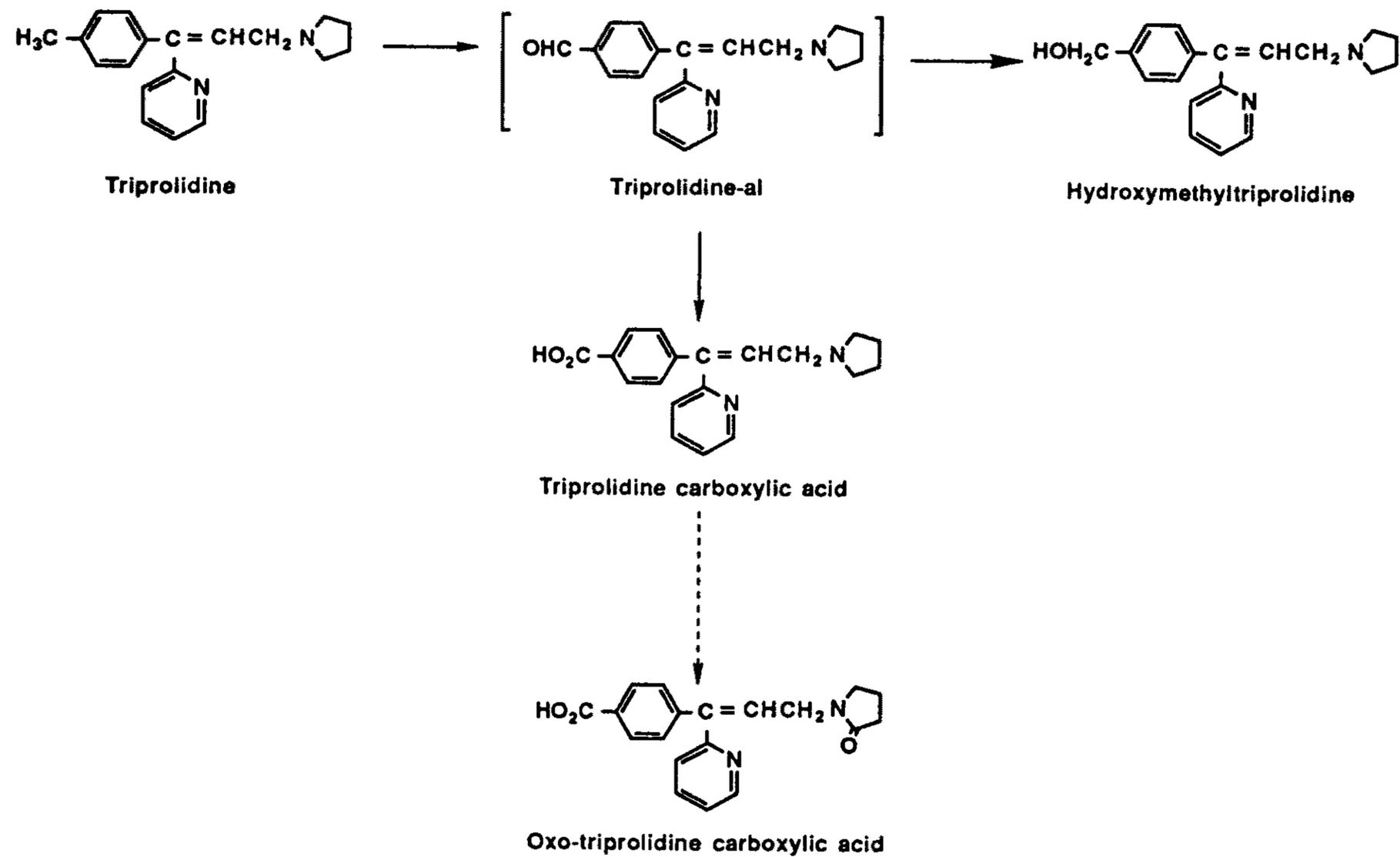


Fig.2-5. Plausible metabolic pathway of triprolidine in human urine.

triprolidine carboxylic acid, oxotriprolidine carboxylic acid 의 height 비(height ratio)로서 각 compound 의 urine 으로의 excretion 경향을 관찰해 보았다.

정량시 검량선은 internal standard 의 peak height 에 대한 triprolidine, hydroxymethyl triprolidine 의 peak height 비, 즉 height ratio 와 검량선 작성시 사용하였던 각 biological sample 내의 triprolidine 과 hydroxymethyl triprolidine 의 concentration 을 plot 하고 직선회귀 (linear regression) 를 하여 작성하였다.

Triprolidine 과 hydroxymethyl triprolidine 의 검량선의 r 값은 각각 0.990, 0.987 이었으며 그 직선회귀 방정식과 그래프는 Fig. 2-6, 2-7, 에 나타내었다.

정량은 human urine 에서 발견된 parent drug 과 metabolite 에 대해서만 하였으며 SIM mode 에서 characteristic ion 으로 사용한 ion 중 하나의 ion 만 택하여 정량에 사용하였다. 정량을 한 compound 들과 각 compound 들의 retention time, relative retention time 을 Table. 2-3에 나타내었다.

(3) Human urine 에서의 triprolidine 과 그 대사체들의 시간에 따른 배설경향

각 시간별로 채취한 urine 을 분석하여 triprolidine 과 hydroxymethyl triprolidine 을 정량하였고 그 각 시간별로 채취한 urine volume 을 그 concentration 과 곱하여 그 시간대에 배설된 excretion amount 를 구하였다.

그리고 각 시간대의 excretion amount 를 더하여 cumulative amount 를 구하였다. (Fig. 2-8, 2-9) Cumulative amount 의 graph 가 24시간에 가까이 갈수록 plateau 도달하는 것이 관찰되었으므로 triprolidine 및 그 대사체들의 urine 으로의 배설은 약물투여후 24시간안에 거의 완결됨을 알 수 있었다.

각 시간대로 배설된 urine 내의 triprolidine 과 hydroxymethyl triprolidine 의

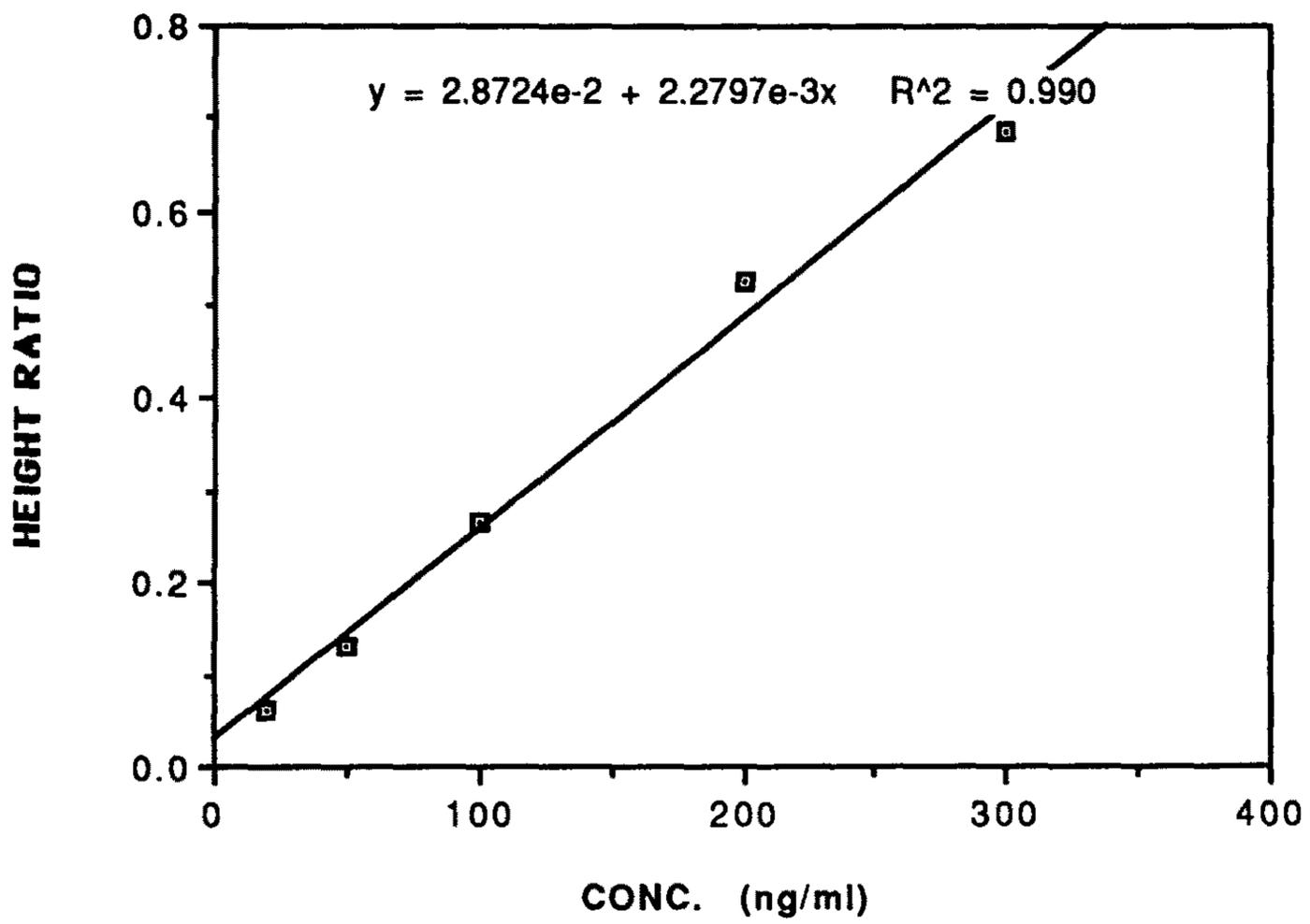


Fig.2-6. Calibration curve for triprolidine in human urine.

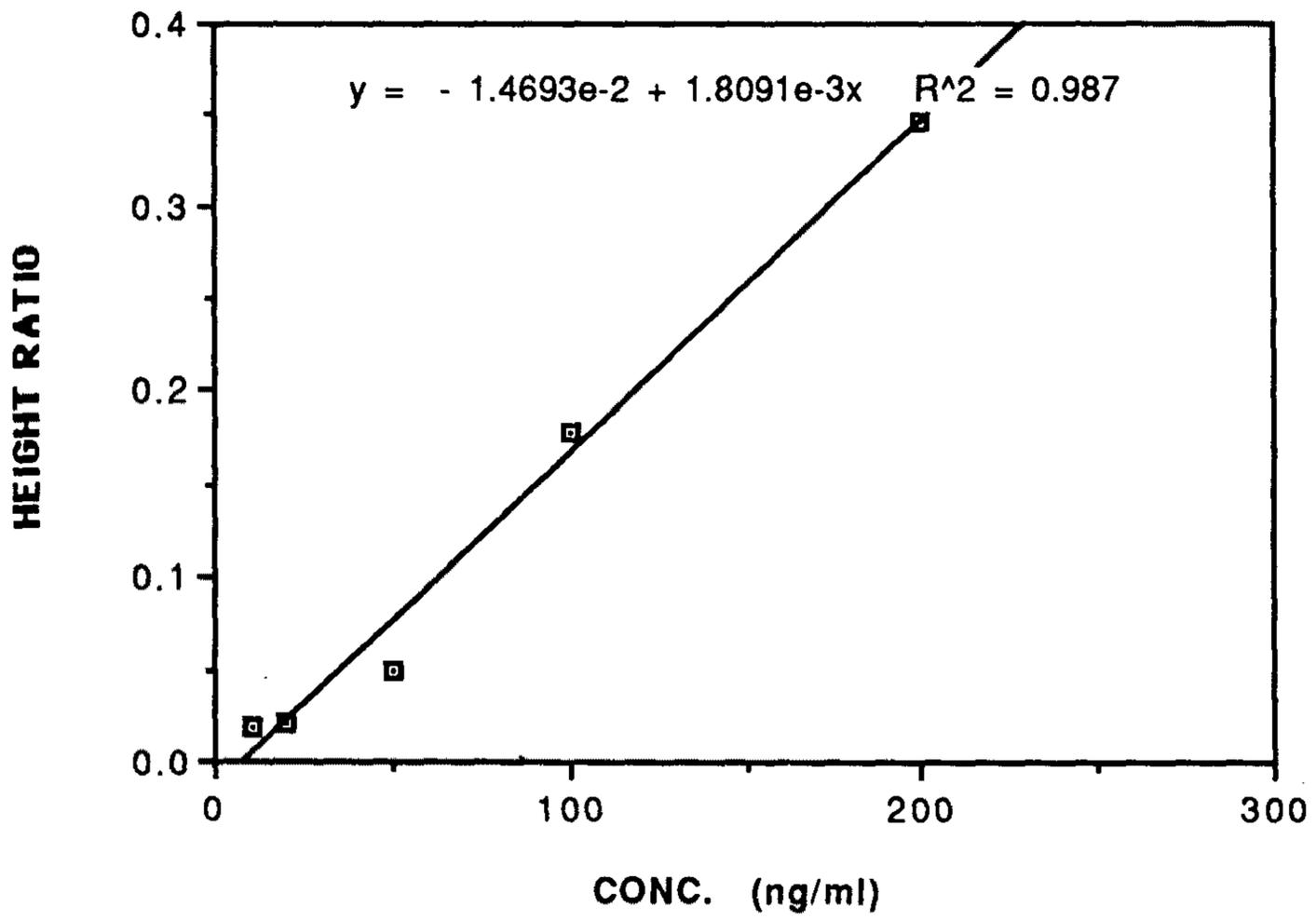
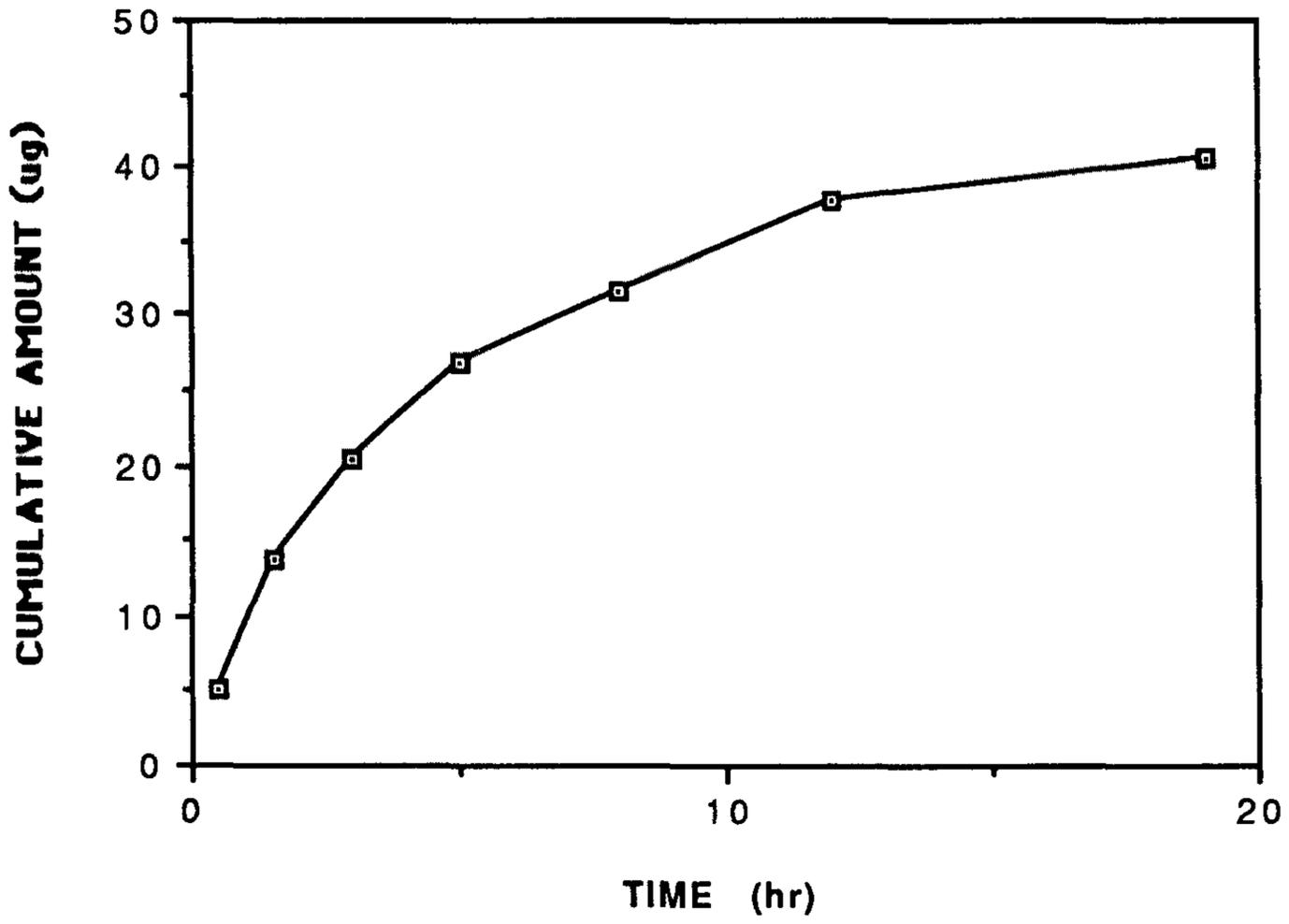


Fig.2-7. Calibration curve for hydroxymethyltriprolidine in human urine

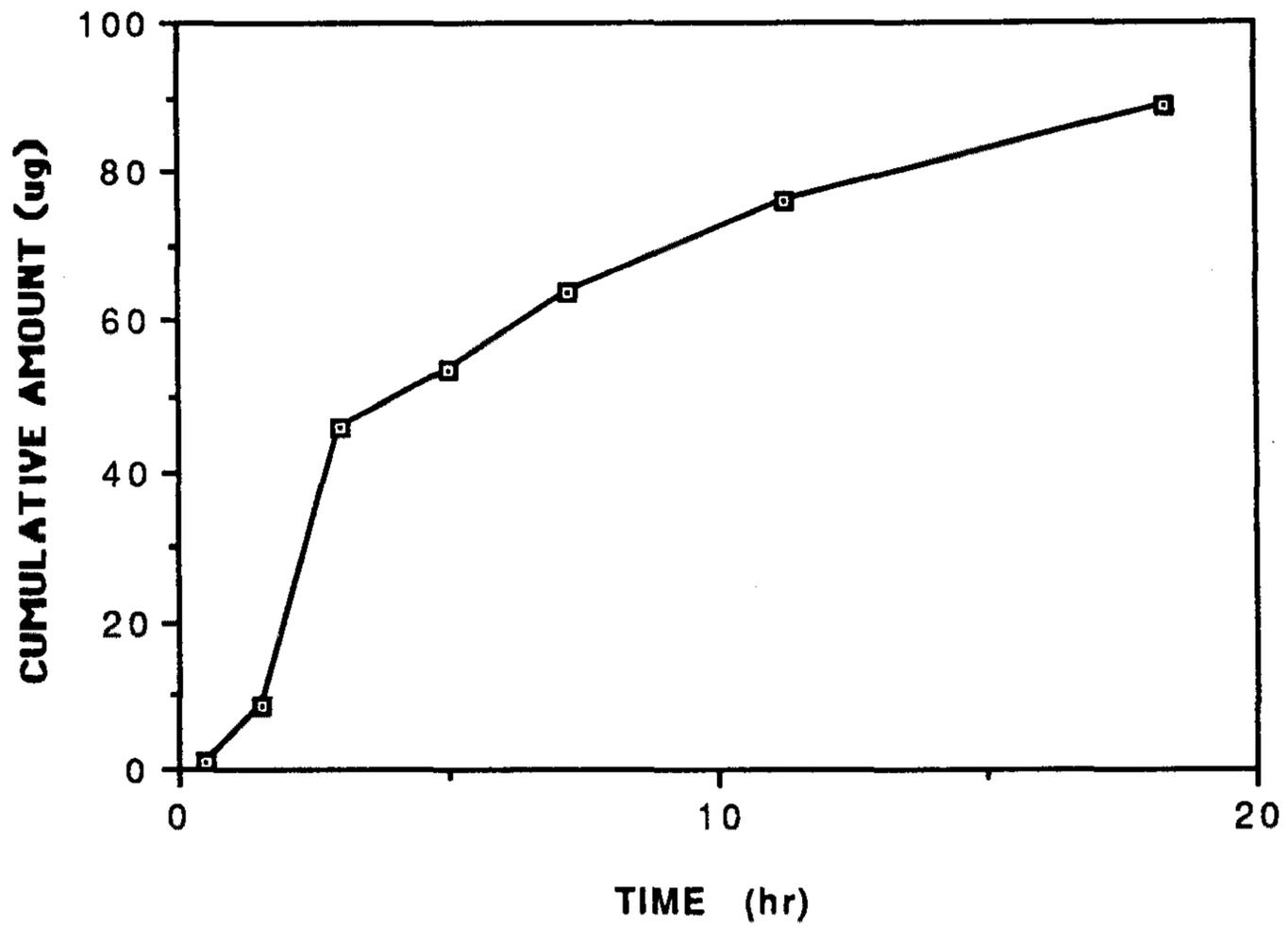
Table 2-3. The retention time, relative retention time and characteristic ion of TMS- derivatized triprolidine and its metabolites.

Compound	Retention time (min.)	Relative retention time (min.)	characterized ion(m/z)
Tripelennamine(I.S.)	8.23	1.00	91, 197*, 255
Triprolidine	11.29	1.37	208*, 209, 278
Hydroxymethyl triprolidine	14.27	1.73	296*, 297, 366
Triprolidine carboxylic acid	15.20	1.85	310*, 311, 280
Oxotriprolidine carboxylic acid	17.70	2.03	309*, 310, 394

* Characteristic ion that was used in quantatitive analysis.



A



B

Fig.2-8. Cumulative amount of triprolidine in human urine.
A:Subject 1 B:Subject 2

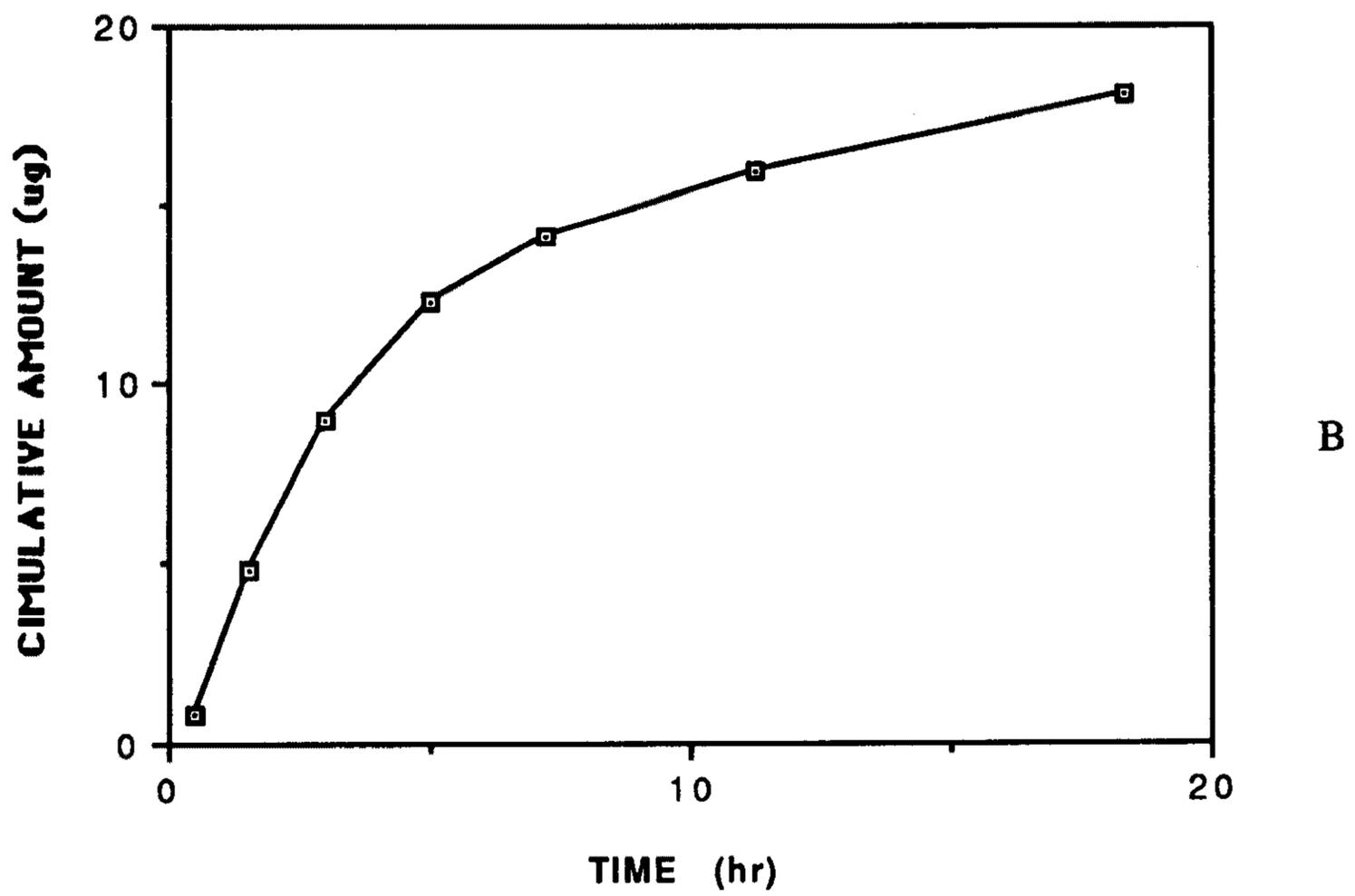
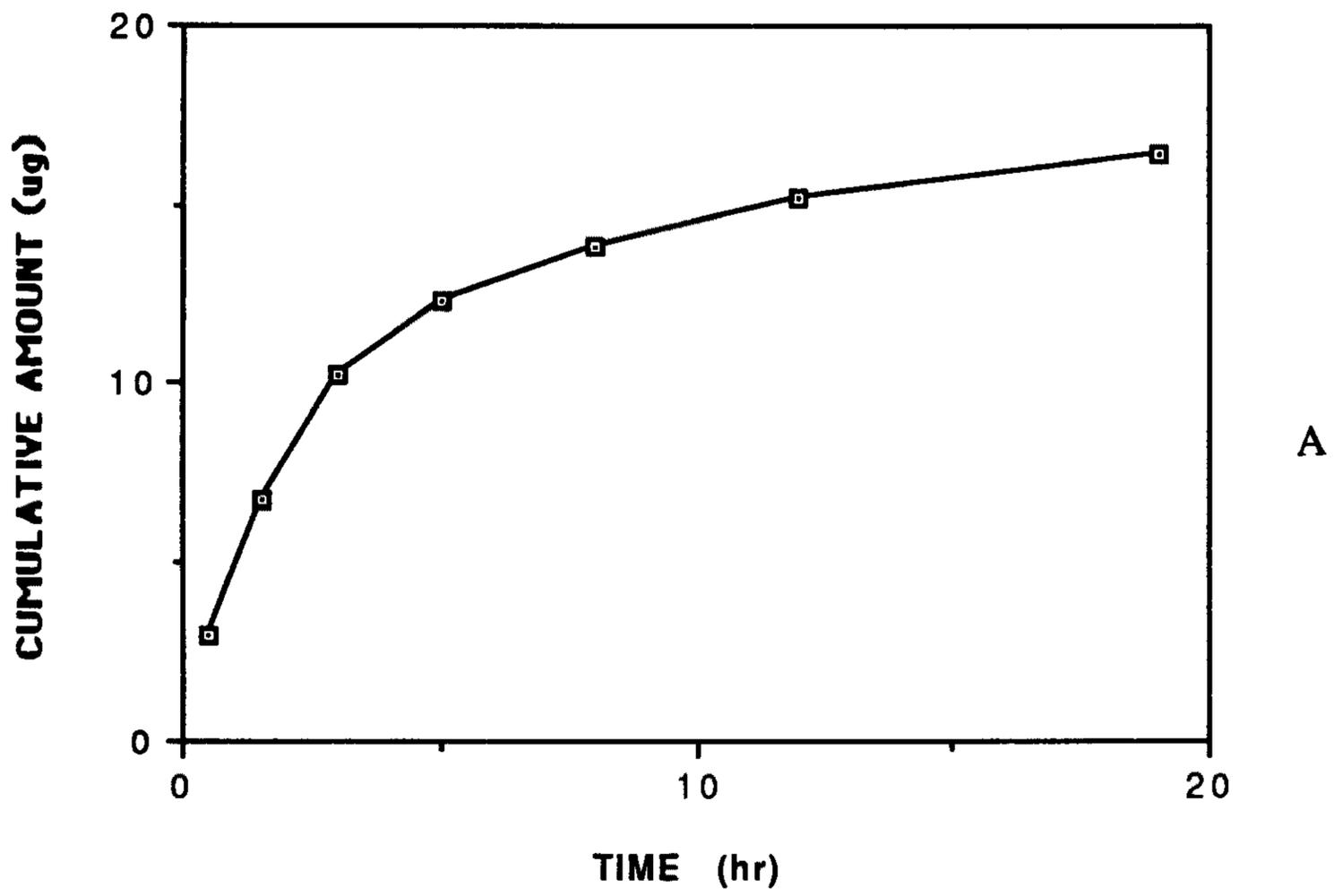
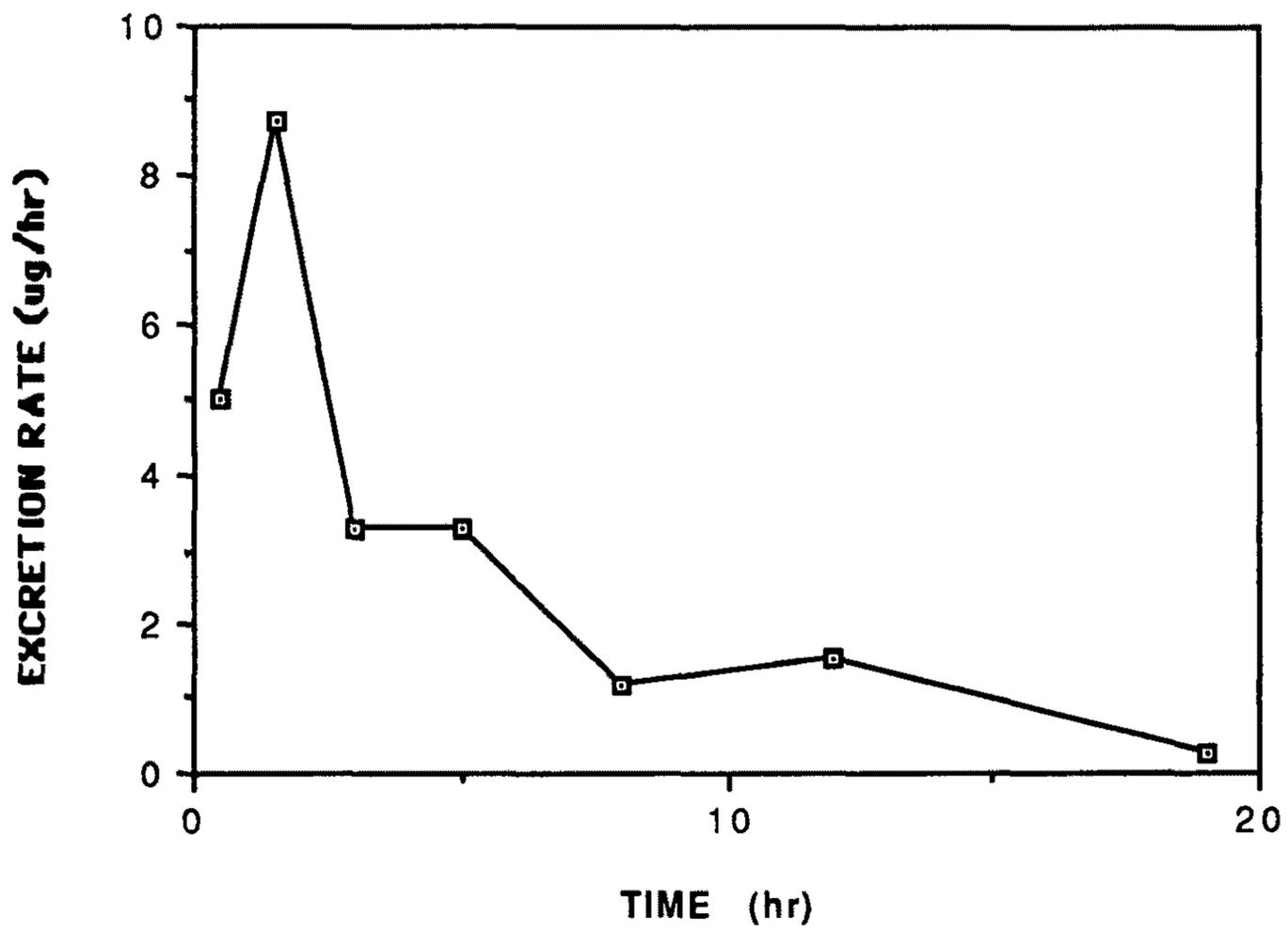


Fig.2-9. Cumulative amount of hydroxymethyltriprolidine in human urine.
 A:Subject 1. B:Subject 2

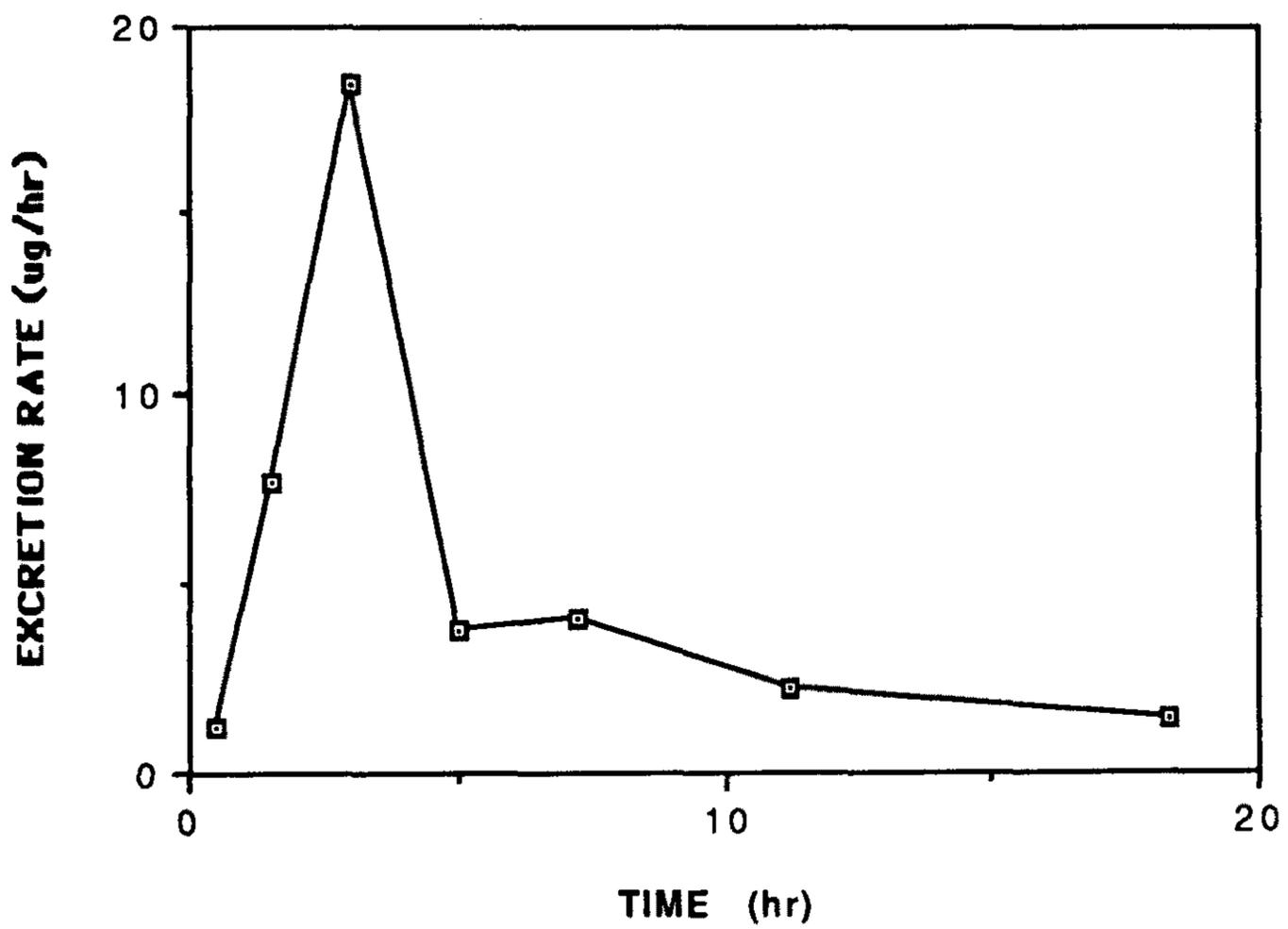
amount(ΔX_u)는 urine 을 채취한 시간간격(Δt)으로 나누어 excretion rate ($\Delta X_u/\Delta t$)를 구하였다. Triprolidine 의 maximum excretion rate 가 관찰된 시간대는 subject 1 에서는 1-2(hr.) subject 2 에서는 2-4(hr)(Fig. 2-10)로 약물투여 4시간 이전에 모두 maximum excretion rate 가 관찰되었으며 hydroxymethyltriprolidine 은 subject 1,2 모두에서 약물투여후 1-2(hr)에 채취한 urine 에서 maximum excretion rate 가 관찰된 후 excretion rate가 계속 감소하였다.(Fig. 2-11)

Triprolidine carboxylic acid 와 oxotriprolidine carboxylic acid 는 표준품을 얻지 못하여 정량을 하지 못하였으므로 각 시간대의 height ratio (compound height/Internal standard height)를 urine volume 과 곱한 값(Δ height ratio)을 시간간격(Δt)로 나누어 excretion rate(Δ height ratio/ Δt)를 구하여 urine 으로 배설되는 경향만을 경시적으로 관찰해 보았다. 또한 각 시간대의 height ratio 를 더하여 cumulative height ratio 를 구하였는데 triprolidine 과 hydroxymethyl triprolidine 과 마찬가지로 24시간에 가까이 갈수록 plateau 에 도달하는 것이 관찰되었으므로 triprolidine carboxylic acid 와 oxotriprolidine carboxylic acid 도 약물투여후 24시간안에 urine 으로 배설이 거의 완결됨을 알수 있었다. (Fig. 2-12, 2-13)

Triproildine carboxylic acid (Fig. 2-14) 는 subject 1에서는 약물투여후 1-2(hr)에 subject 2에서는 약물투여후 2-4(hr) 에 maximum excretion rate 가 관찰된 후 excretion rate 가 계속 감소하였으며, oxotriprolidine carboxylic acid 는 excretion rate 가 계속 증가하다가 subject 1 에서는 약물투여후 2-4(hr), subject 2 에서는 약물투여후 4-6(hr) 에 최고치에 이룬후 계속 감소하였다.(Fig. 2-15) 각 compound 들에 대한 maximum excretion rate 가 관찰된 시간대를 Table 2-4에

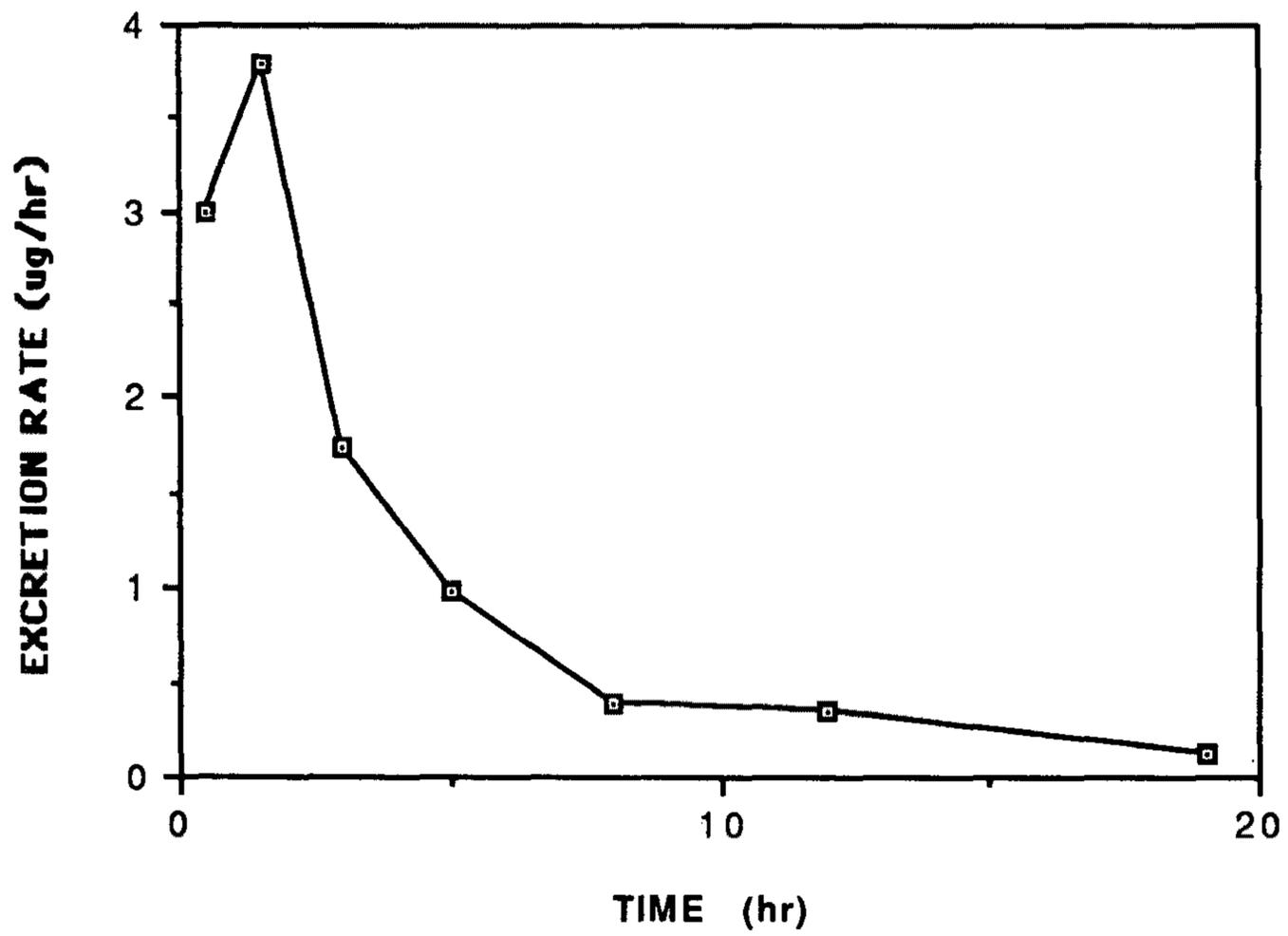


A

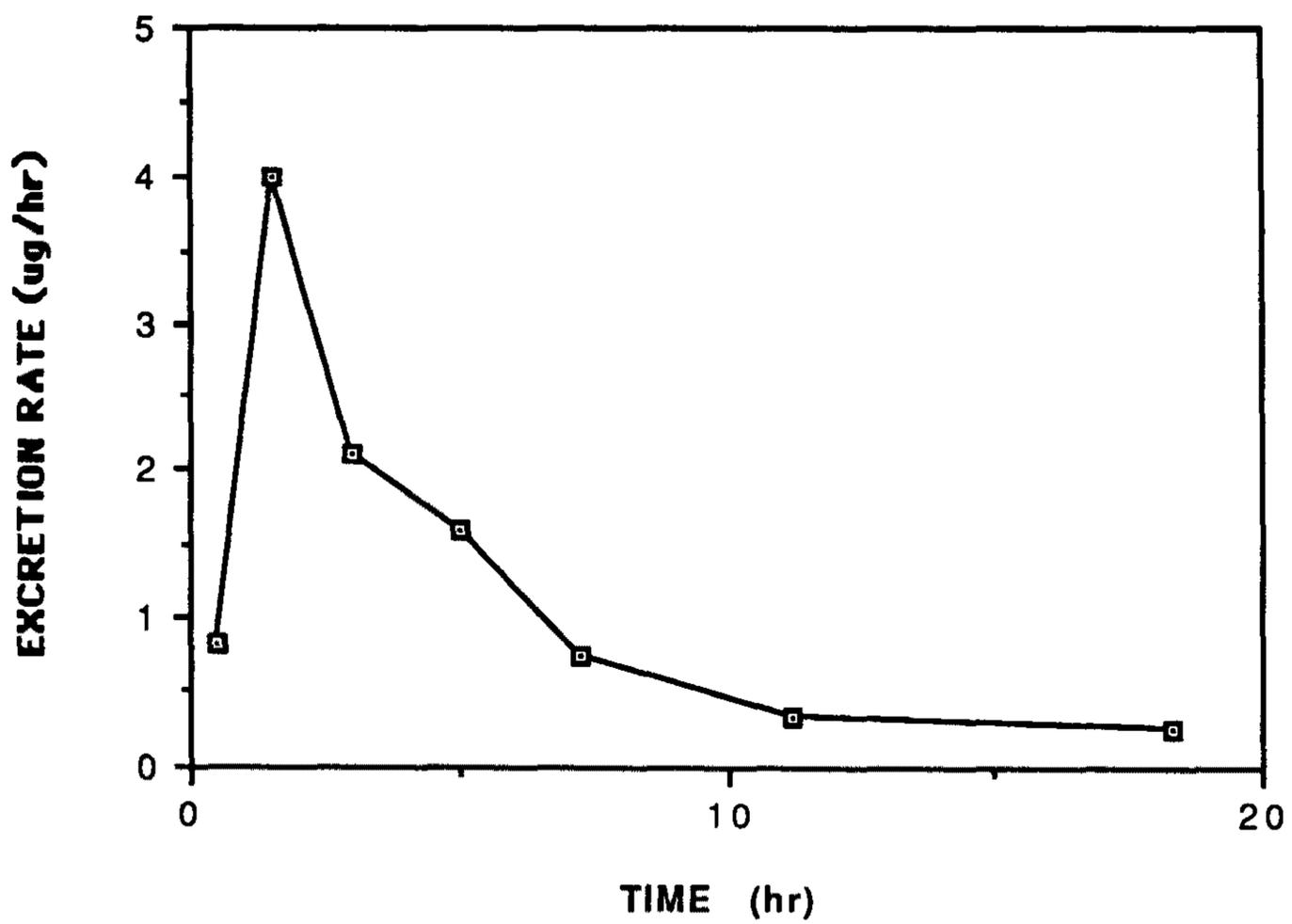


B

Fig.2-10. Excretion rate of triprolidine in human urine.
A:Subject 1. B:Subject 2



A



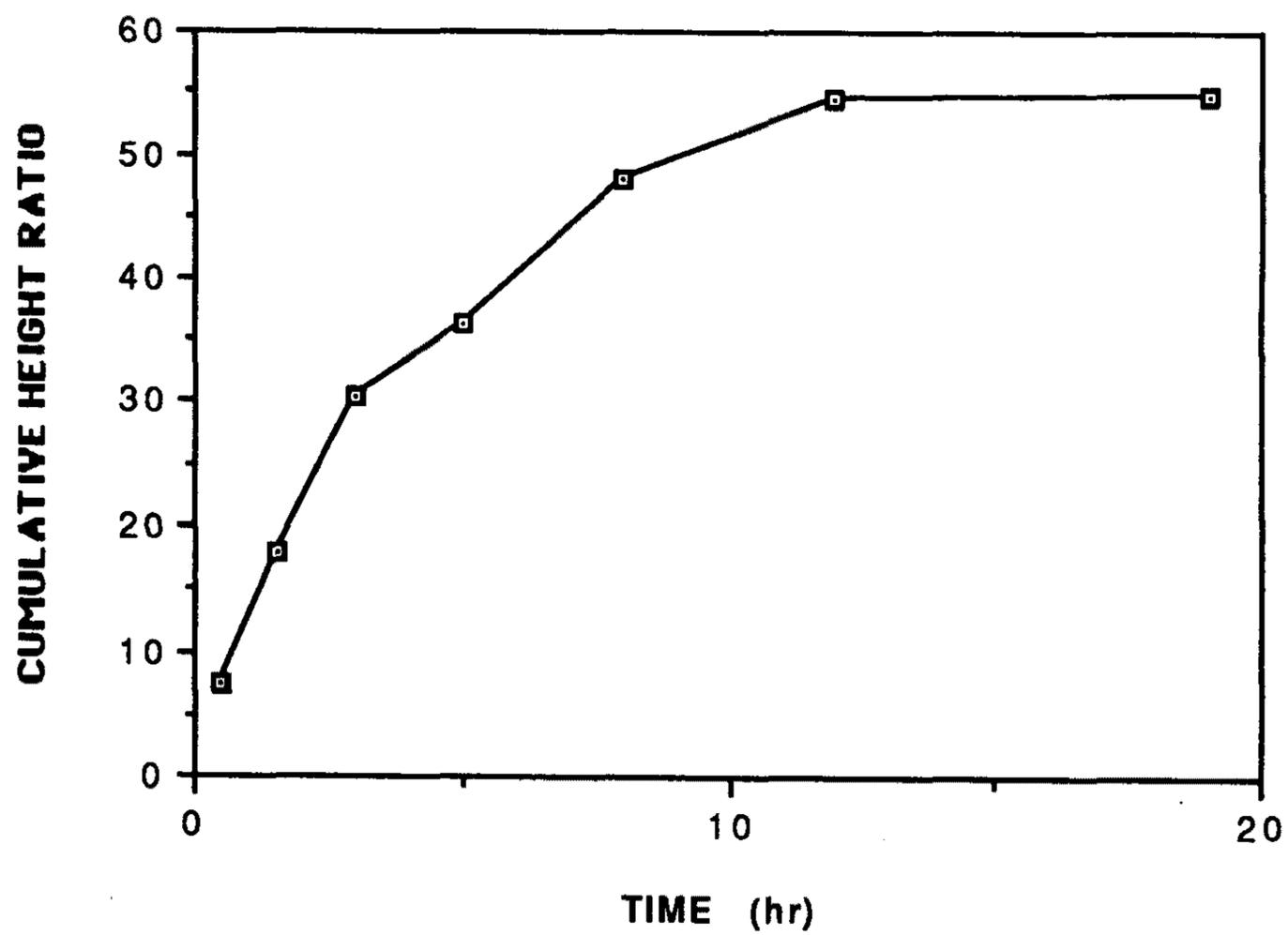
B

Fig.2-11. Excretion rate of hydroxymethyltriprolidine in human urine.
A:Subject 1. B:Subject 2

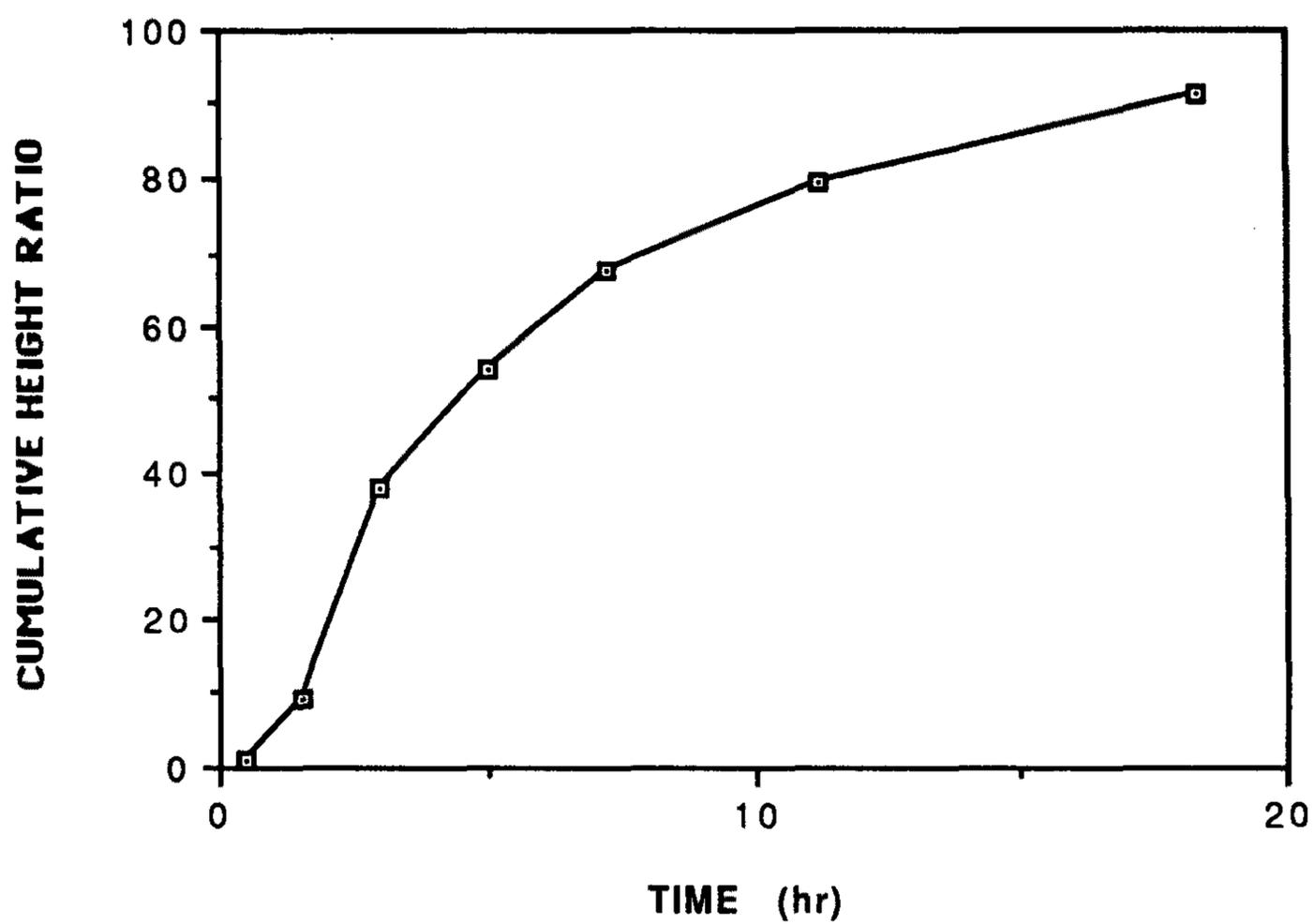
triprolidine carboxylic acid 와 oxotriprolidine carboxylic acid 도 약물 투여후 24시간안에 urine 으로 배설이 거의 완결됨을 알수 있었다. (Fig. 2-12, 2-13)

Triproildine carboxylic acid (Fig. 2-14) 는 subject 1에서는 약물투여후 1-2(hr)에 subject 2에서는 약물투여후 2-4(hr) 에 maximum excretion rate 가 관찰된 후 excretion rate 가 계속 감소하였으며, oxotriprolidine carboxylic acid 는 excretion rate 가 계속 증가하다가 subject 1 에서는 약물투여후 2-4(hr) subject 2 에서는 약물투여후 4-6(hr) 에 최고치에 이룬후 계속 감소하였다.(Fig. 2-15) 각 compound 들에 대한 maximum excretion rate 가 관찰된 시간대를 Table 2-4에 나타내었다.

정량을 할 수 있었던 triprolidine 과 hydroxymethyltriprolidine 에 대하여는 24시간까지 채취하였던 urine 의 각 시간별의 amount 를 더하여 24시간내에 배설된 총량(total amount) 을 구하고 이를 투여한 dose (triprolidine hydrochloride : 5mg, triprolidine : 4.42mg) 에 대하여 몇 % 가 배설되었는지 계산해 보았다. 그 결과를 Table 2-5에 나타내었다. Table 2-5에서 나타낸 바와 같이 triprolidine 과 hydroxymethyltriprolidine 모두 2% 이하의 소량만이 urine 으로 배설됨을 알 수 있었다. 이결과는 rat 의 경우

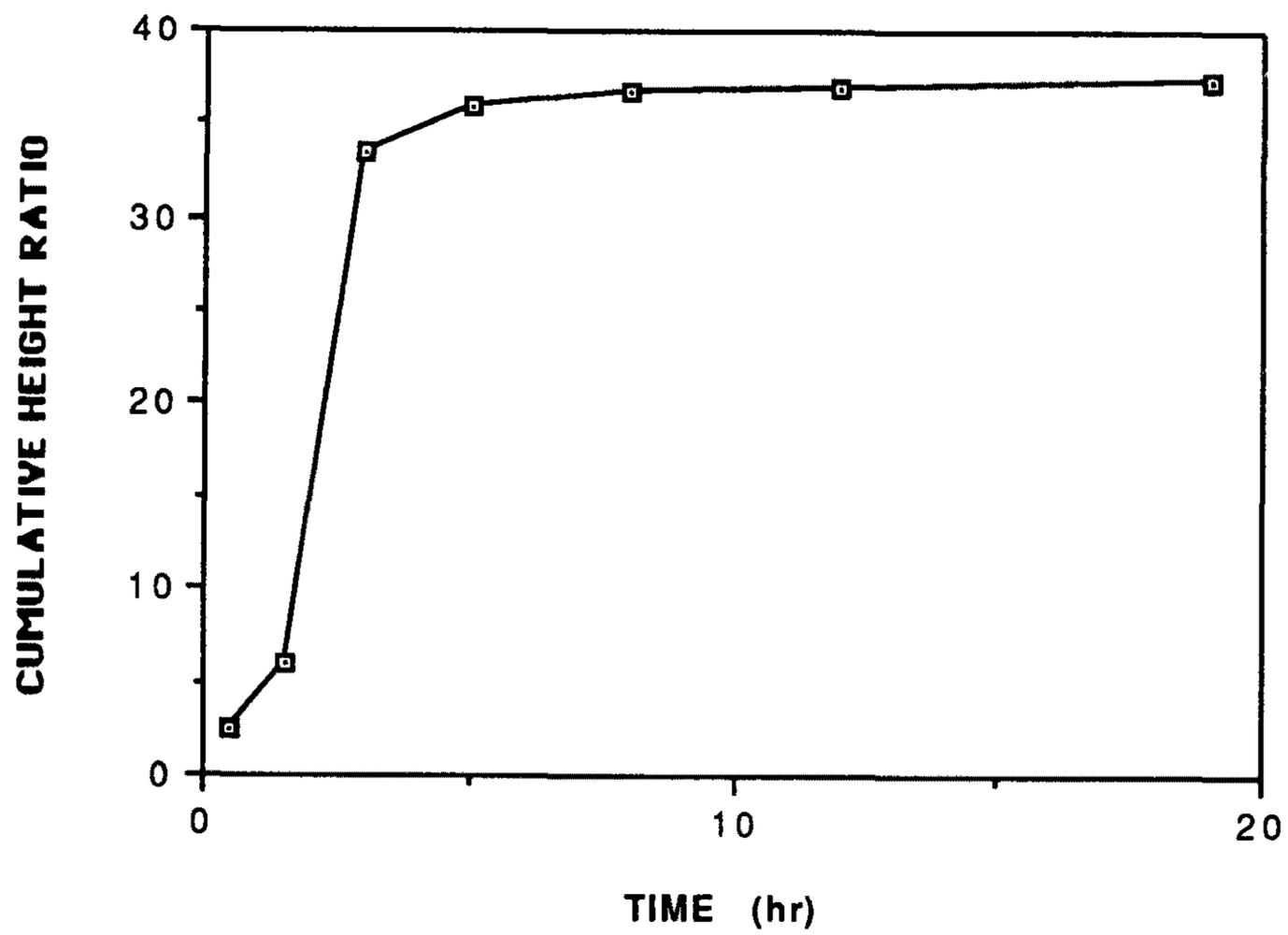


A

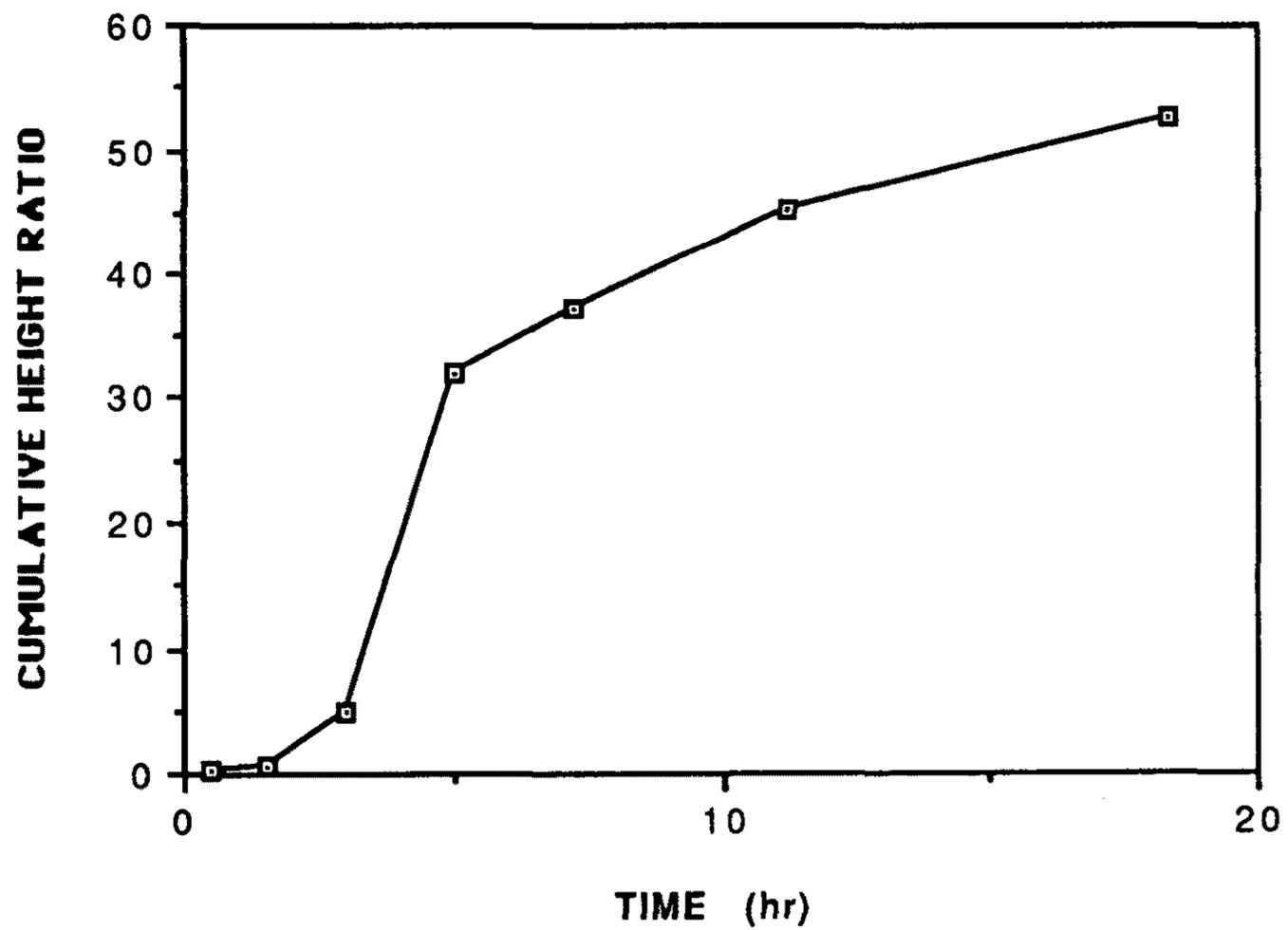


B

Fig.2-12. Cumulative height ratio of triprolidine carboxylic acid in human urine
A:Subject 1. B:Subject 2



A



B

Fig.2-13. Cumulative height ratio of oxotriprolidine carboxylic acid in human urine
A:Subject 1. B:Subject 2.

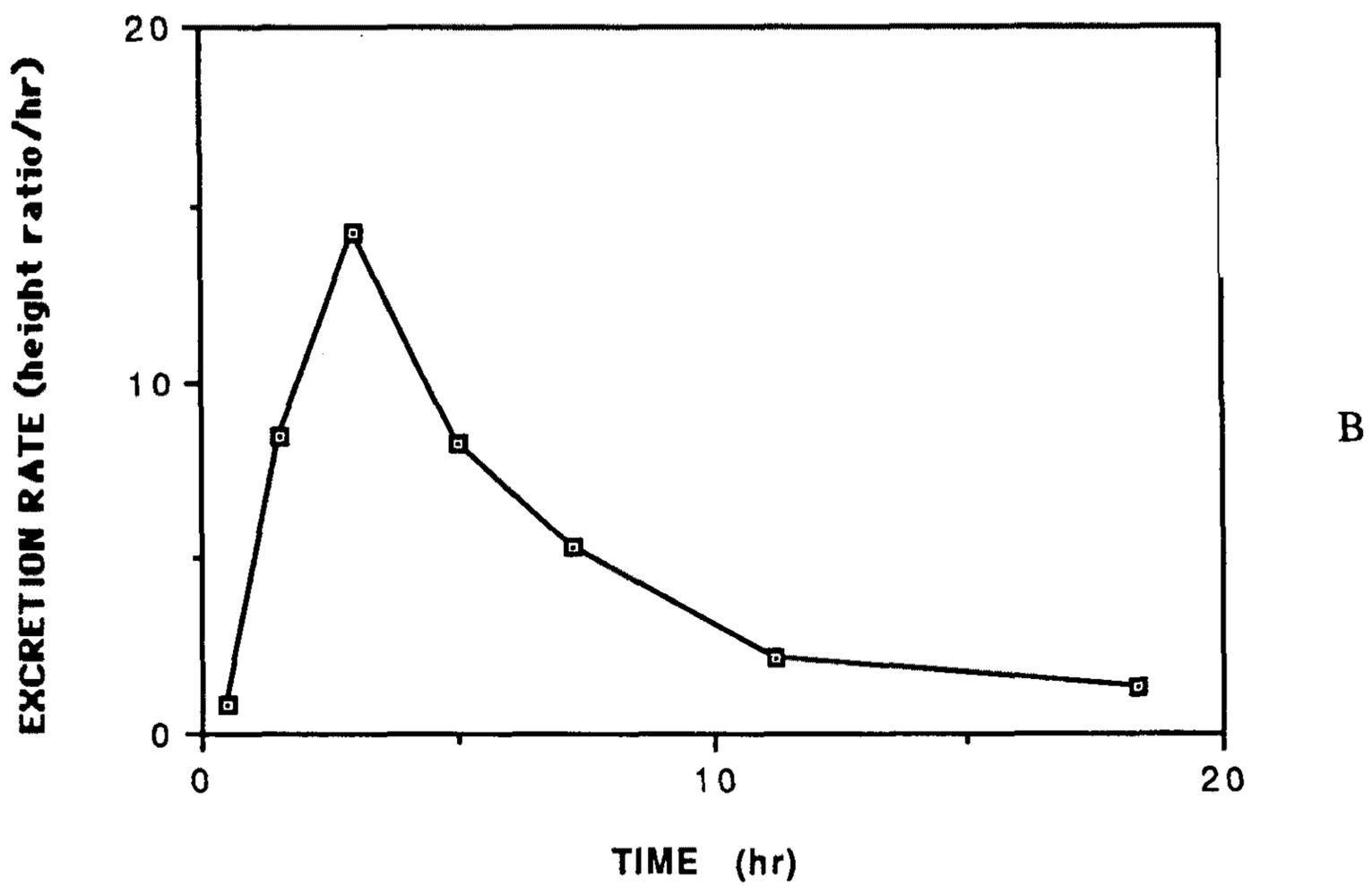
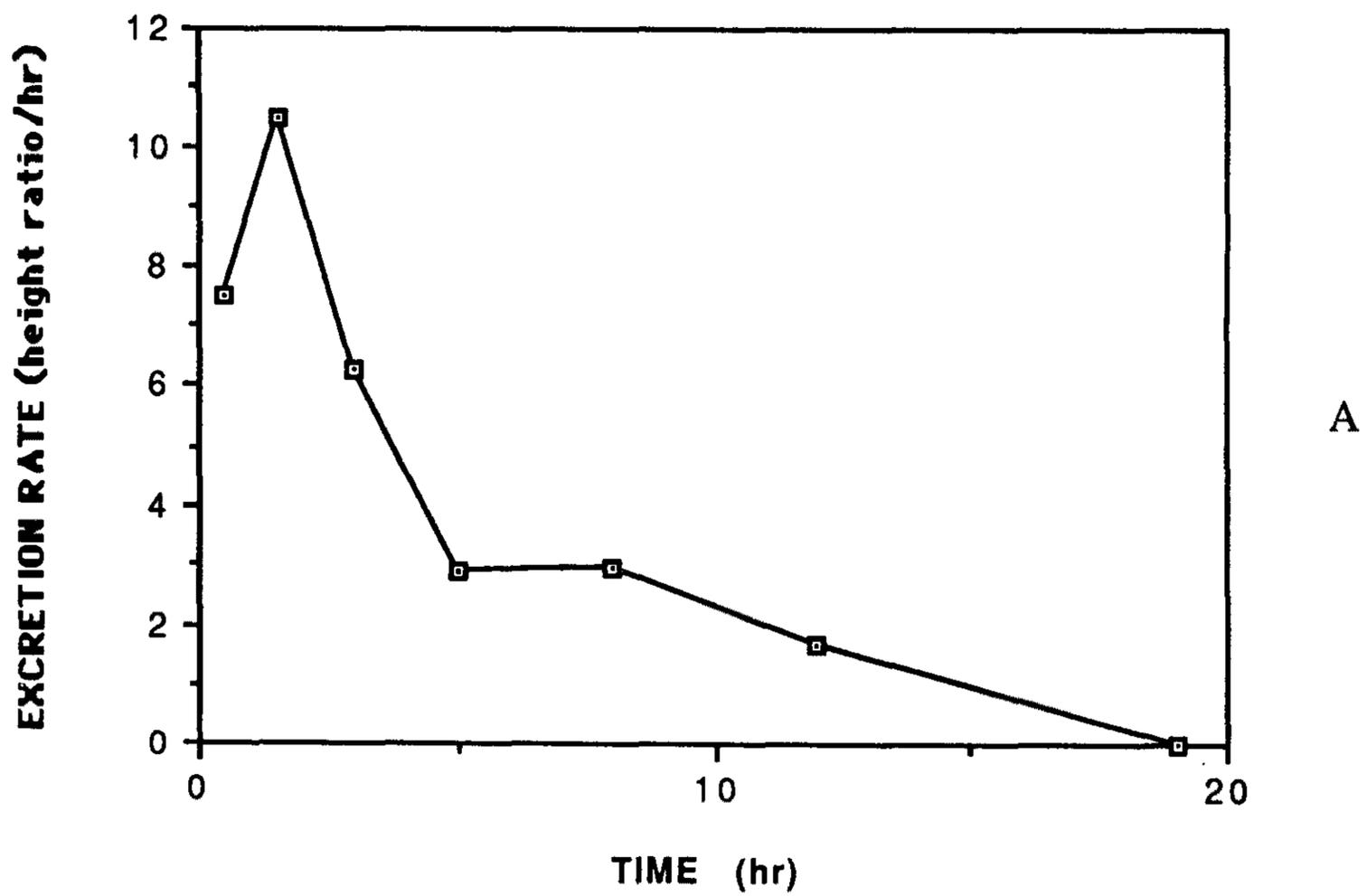
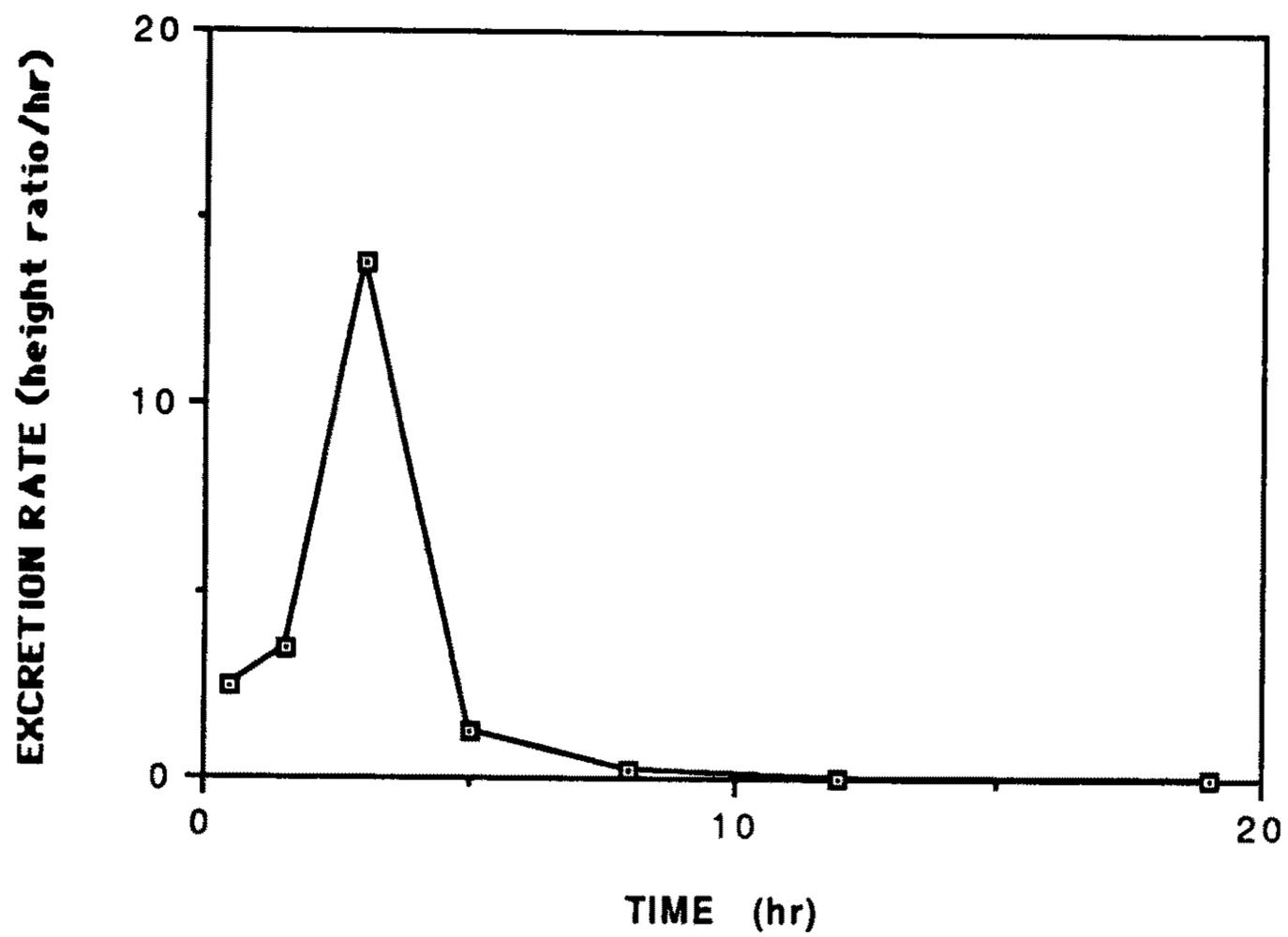
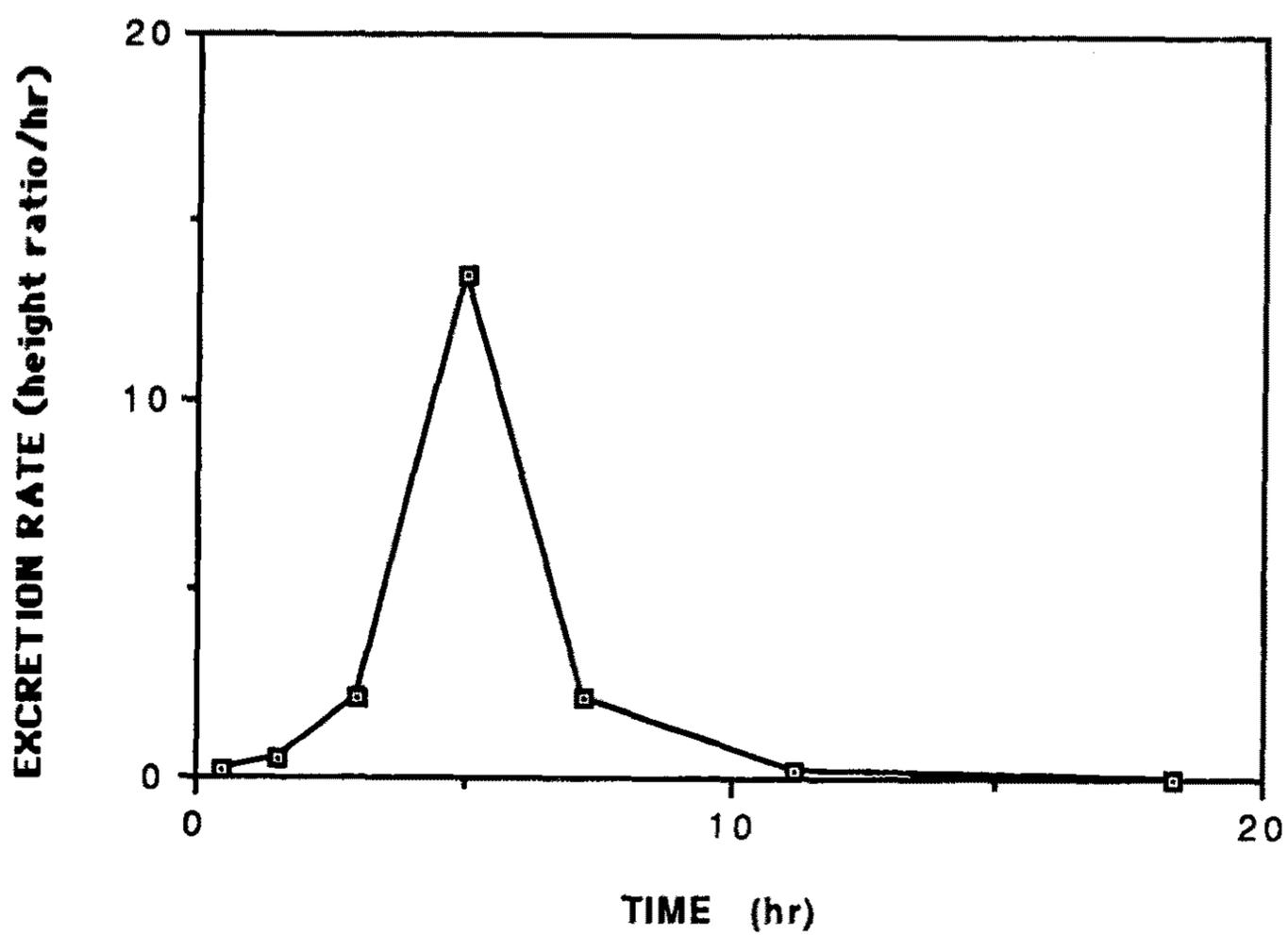


Fig. 2-14. Excretion rate of triprolidine carboxylic acid in human urine.
A:Subject 1. B:Subject 2.



A



B

Fig.2-15. Excretion rate of oxotriprolidine carboxylic acid in human urine.
A:Subject 1. B:Subject 2.

Table 2-4. T_{max}* of triprolidine and its metabolites.

	Tripolidine	Hydroxymethyltriprolidine	Tripolidine carboxylic acid	Oxotripolidine carboxylic acid
Subject 1	1-2(hr)	1-2(hr)	1-2(hr)	2-4(hr)
Subject 2	2-4(hr)	1-2(hr)	2-4(hr)	4-6(hr)

* T_{max} : Time interval when maximum excretion rate was observed.

나타내었다.

정량을 할 수 있었던 triprolidine 과 hydroxymethyltriprolidine 에 대하여는 24 시간까지 채취하였던 urine 의 각 시간별의 amount 를 더하여 24시간내에 배설된 총량(total amount) 을 구하고 이를 투여한 dose (triprolidine hydrochloride : 5mg, triprolidine : 4.42mg) 에 대하여 몇 % 가 배설되었는지 계산해 보았다.

그 결과를 Table 2-5에 나타내었다. Table 2-5에서 나타낸 바와 같이 triprolidine 과 hydroxymethyltriprolidine 모두 2% 이하의 소량만이 urine 으로 배설됨을 알 수 있었다. 이결과는 rat 의 경우 총 dose의 3% 미만이 urine 으로 배설되었던 결과(13) 와 일치하며 triprolidine 의 bioavailability가 4% 정도로 워낙 낮고(11) hydroxymethyltriprolidine외의 대사체들도 정량하지 못하였으며 다른 대사경로로 배설되는 triprolidine 과 그 대사체에 대하여 실험해보지 못하여 위의 결과의 같은 낮은 urinary excreted percentage 를 얻었다고 생각된다.

Table 2-5. Excreted percentage(%) to administered dose of triprolidine and hydroxymethyl triprolidine in human urine collected for 24hrs.

	Tripolidine	Hydroxymethyltriprolidine
Subject 1	2.013	0.041
Subject 2	0.917	0.037

제 4 절 결론

1. Triprolidine 을 사람에게 경구투여한 후 urine 을 분석할 결과, parent drug (triprolidine)외에 hydroxymethyltriprolidine, triprolidine carboxylic acid, oxotriprolidine carboxylic acid 의 peak 를 발견하였다.
2. 사람에게 있어서 triprolidine 의 urine 으로의 대사경로는 phenyl ring 의 -CH₃ group 이 hydroxylation 되어 carboxylic acid 로 진행되며, pyrrolidine ring 에도 산화가 일어나 oxo form 을 형성하는 주로 hydroxylation 과정일것으로 생각된다.
3. Urine 으로의 triprolidine 과 그 metabolite 들의 배설속도는 약물투여후 4hr 정도 에 가장 최고 속도를 나타내었다.
4. Urine 으로 배설된 triprolidine 과 hydroxymethyltriprolidine 의 양은 투여한 dose 에 대하여 0.2% 이하로 매우 적은 양만이 배설되었다.

제 3 장 Triprolidine 의 metabolite 인 triprolidine carboxylic acid 의 합성에 관한 연구

제 1 절 실험목적

제 2 장에서의 실험결과에서 나타나 있는 바와 같이 triprolidine 의 정확한 excretion data 및 pharmacokinetic data 를 얻기 위하여는 정량에 필요한 표준품(standard) 이 절실히 요구되는 바이다. 그러나 triprolidine 의 metabolite 중 hydroxymethyltriproloidine 만을 NCTR에서 합성하여 제공하여 주었고, 다른 metabolite 들은 현재 시판되어 있지 않았으며 다른 연구소에 의뢰하여 제공받을 수도 없는 실정이었다. 그러므로 human urine 에서 관찰되었던 hydroxymethyltriproloidine, triproloidine carboxylic acid, oxotriproloidine carboxylic acid 의 3개의 metabolite 중 이미 표준품이 있는 hydroxymethyltriproloidine 과 triproloidine 의 metabolite 중 가장 높은 peak height 를 나타내었던 triproloidine carboxylic acid 를 합성하여 보고자 시도하였다.

제 2 절 실험방법

(1) 시약

가) 시약

N-Butyllithium (Aldrich Chemical Co. U.S.A.)
Tetrahydrofuran (Aldrich Chemical Co. U.S.A.)
2-Bromopyridine (Aldrich chemical Co. U.S.A.)
4-Cyanomethylbenzoate (Aldrich Chemical Co. U.S.A.)
Potassium carbonate (Junsei chemical Co. Japan)
Diisobutyl aluminum hydride : Dibal H(Aldrich Co. U.S.A.)
MgSO₄ (Kanto Chemical Co. Japan)
Silver oxide (Junsei Chemical Co. Japan)
NaOH (Kanto Chemical Co. Japan)
K₂HPO₄ (Jusei Chemical Co. Japan)
KH₂PO₄ (Junsei Chemical Co. Japan)
Sep Pak cartridge : Packing Material -C₁₈ (Waters, U.S.A.)
2-propanol (Kanto Chemical Co. Japan)
Acetone (J.T. Baker, U.S.A.)
Methylene Chloride (J.T. Baker, U.S.A.)
Hexane (J.T. Baker, U.S.A.)
Ethylacetate (Merck, Germany)
Toluene (J.T. Baker, U.S.A.)
Ether (J.T. Baker, U.S.A.)
Methanol (Merck, Germany)
MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide, Sigma Chemical Co, U.S.A.)
TMSCl (Trimethyl silylchloride, Sigma Chemical Co. U.S.A)

나) 시약의 조제

□ Sep Pak cartridge 의 준비 : 사용하기 전에 methanol 5ml 로 3

번, 증류수 5ml 로 3번elution 시켰다.

□Phosphate buffer (pH 7.0) : 0.2M K_2HPO_4 와 0.2M KH_2PO_4 를 섞어 pH 7.0으로 맞추어 사용하였다.

□유도체화 시약 : MSTFA 와 TMSCl 을 100:1 로 혼합하여 사용하였다.

(2) 실험기기

본 실험의 각 단계에서 합성된 compound 를 확인하기 위하여 Hewlett-Packard (HP) 5890A Gas Chromatograph (GC) 에 direct interface 로 연결된 5970B Series Mass Selective Detector (MSD)를 사용하여 SCAN Mode 로 분석하였다. Data analyzing system 으로는 HP 7946 disc drive 가 연결된 HP 5970 MS Chemstation 을 사용하였고 chromatogram 과 mass spectrum 은 HP 2934A printer 로 부터 얻었다. NMR 은 300MHz Gemini Varian NMR Spectrometer 를 사용하였고 그외의 사용된 기기로는 rotary vacuum evaporator (Buchi, Switzerland), hot plate stirrer (IKA-Labortechnik, Germany), Buchler 7400 Tubingen Shaker (Edmond, Germany) 등이 있다.

(3) GC/MSD 작동조건

본 실험에서 사용된 분석기기 작동조건은 다음과 같다.

주입기 온도 : 280°C

주입방법 : split mode(ratio, 10:1)

운반기체 및 유속 : He gas, 1.0ml/min

Transfer line 온도 : 300°C

분리관 : SE-30, 길이 17m, 내경 0.2mm, film thickness

0.11 μ m 였으며, 분리관의 온도는 150°C에서 5
분간 머무르고 10°C/min 으로 300°C까지 상승
시켰으며 300°C에서 3분간 머물렀다.

(4) Triprolidine carboxylic acid와 hydroxy methyltriprolidine 의 합성방법

Triprolidine carboxylic acid 와 hydroxymethyltriprolidine 을 다음의 4단계를
거쳐 합성하였다.

(가) 4-cyanophenyl-2-pyridyl ketone (I) 의 합성

n-Butyllithium (24.64ml, 1.6M in hexane) 을 -78°C의 dry tetrahydrofuran (15ml)
에 2-bromopyridine (5.56g)이 녹아 있는 용액에 질소 gas 충전하에서 저으면
서 가하고 계속 교반한다. 1시간 후에 dry THF(15ml)에 4-
cyanomethylbenzoate (5g) 가 녹아 있는 용액을 위의 용액에 가하였다. 위
의 실험은 모두 -78°C에서 교반하면서 행하고 이 상태를 몇시간 동안 지
속하였다.

혼합액을 상온에 방치하여 따뜻하게 하고, 약간의 증류수를 가하여 남아
있는 n-butyllithium 을 제거하였다. 수분을 제거하기 위해 유기층에 약간
의 MgSO₄를 가하고 여과하였다. 여과액은 vacuum rotary evaporator 를 사
용하여 건조시켰다. 잔사를 methylene chloride (10ml) 에 녹이고 column
chromatography 에서는 hexane/ethylacetate (v/v=3:1) 용액으로 elution 시켜 정
제하였다. Elution 된 액을 GC/MSD 에 주입하여 그 화합물을 확인하였다.

(제3절 참조)

(나) 2-[1-(4-cyanophenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl) pyridine (II)의 합성

n-Butyllithium (5.2ml, 1.6M in hexane) 을 dry toluene (15ml) 에 triphenyl-2-pyrrolidinoethylphosphonium bromide (1.6g) 을 교반하여 놓은 현탁액에 질소가스 충전하에 치환시킨후에 가하였다. 1시간 후에 합성한 화합물(I) 0.76g 을 dry toluene (10ml) 에 녹인 액을 위의 혼합액에 첨가하였다. 이 현탁액은 처음에는 오렌지색에서 짙은 보라빛으로 변하였고 75°C 에서 overnight 동안 가열한 후에는 맑은 액이 되었다. 이 액은 식힌후 ether (200ml)로 희석하고 HCl(25ml, 2M)을 가한다. 수층은 분리하여 ether 로 세척하고 saturated potassium carbonate (ice) 로 알칼리화 하였다. 이 알칼리 용액을 methylene chloride 로 추출하고, 이 추출된 compound 를 GC/MSD 로 분석하였다. (제3절 참조)

(다) 2-[1-(4-formylphenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)] pyridine (III) 의 합성

정제되지 않은 compound II 를 dry toluene (100ml) 에 녹인 용액에 diisobutylaluminumhydride (Dibal-H, 0.2ml, 1M in toluene)을 질소가스 충전하에 가한다. 40-60°C 에서 수시간 교반한 후 잔류한 Dibal-H 를 없애기 위하여 methanol (2ml) 를 가하고 증류수(2ml)를 가한다. 위의 액을 산 가수분해시켜 imine 을 해당하는 ketone 으로 전환시키고 이 산성용액을 saturated potassium carbonate solution (ice) 으로 알칼리화 시켰다. 이액을 methylene chloride 로 추출하고 유기층을 수분을 제거하기 위하여 MgSO₄ 를 가하고 여과한 후 vacuum rotary evaporator 를 사용하여 건조시켰다. 이 잔사로 GC/MSD 를 이용하여 확인하였다. (제3절 참조)

(라) 2-[1-(4-carboxyphenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)]
pyridine(IV) and hydroxymethyltriprolidine(V)의 합성.

Silver oxide(24mg)을 compound III 의 2.5ml NaOH(4.14mg) 용액에 교반하
면서 가하고 하루동안 이 혼합액을 교반하며 반응시켰다. 반응이 끝난
후 남아 있는 silver oxide 를 제거하기 위하여 이 혼합액을 여과하고
methylene chloride 로 추출하였다. 이 액에서 추출된 생성물을 GC-MS 로
확인한 결과 hydroxymethyltriprolidine 으로 확인되었다 (제3절 참조).

이 혼합액의 acetone 용액에 Jones reagent 를 몇방울 떨어뜨리고 (혼합액이
노란색이 됨) 반응을 종결시키기 위해 2-propanol 을 가한다. 이때 혼
합액의 색은 녹색이 된다. 이때 생성된 compound IV (triprolidine
carboxylic acid)는 어떤 pH 에서도 methylene chloride 에 추출되지 않았으
므로 Sep-Pak cartridge 를 사용하여 분리한 후 phosphate buffer (0.2M, pH 7) 에
서 ether 를 사용하여 추출하고 GC/MSD 를 사용하여 확인하였다. (제3절
참조)

제 3 절 결과 및 고찰

Triprolidine carboxylic acid 는 triphenyl-2-pyrrolidoethyl- phosphonium bromide 와 4-cyanophenyl-2-pyridylketone(I) 을 출발물질로하여 4단계에 걸쳐 합성하였다. 전체적인 합성 Scheme 을 Fig. 3-1 에 나타내었다.

4-Cyanophenyl-2-pyridyl ketone (I)은 Findlay 등(11)이 사용한 방법으로 합성하고 GC/MSD 로 확인하였다. 4-Cyanophenyl-2-pyridyl ketone : compound (I) 의 분자량은 m/z 208 [M^+ ion]으로 확인되었으며, $[M-H]$ ion 에 해당하는 m/z 207 이 크게 관찰되었다. Base peak 는 $[M-C=O]$ fragment ion 으로 추정되는 m/z 180 peak 였다. (Fig. 3-2)

Triphenyl-2-pyrrolidinoethylphosphonium bromide는 Copp 의 제조방법(23) 이 어렵고 compound 를 고체화하는데 긴 시간이 걸리므로 Wittig 등(24) 의 방법으로 제조하였다. 이 compound 의 300MHz 1H -NMR spectrum 을 관찰해본 결과 chemical shift 는 다음과 같았다. ($CDCl_3$) : 7.73(15H, m, -ph), 3.99(2H, m, α - CH_2), 2.95 (2H, m, β - CH_2), 2.34(4H, m, 2- CH_2), 1.51 (4H, m, 3- CH_2) ppm (Fig. 3-3)

2-[1-(4-Cyanophenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)] pyridine : compound (II) 는 compound I 과 triphenyl-2-pyrrolidinoethylphosphonium bromide 를 coupling 하여 제조하였는데 최적조건을 찾지 못하여 대량으로 합성하지

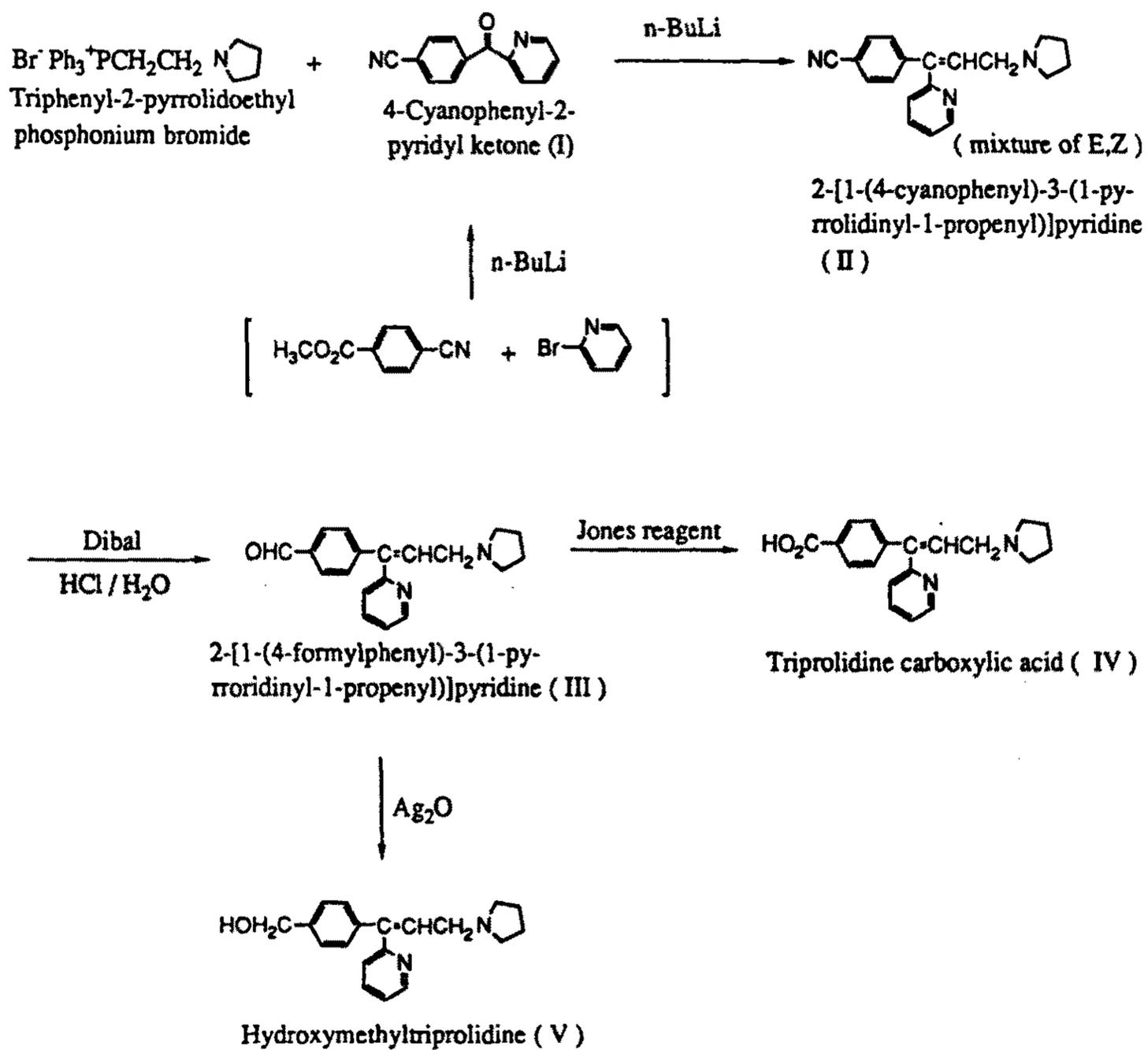


Fig.3-1. Total synthetic procedure of triprolidine carboxylic acid and hydroxymethyltriprolidine.

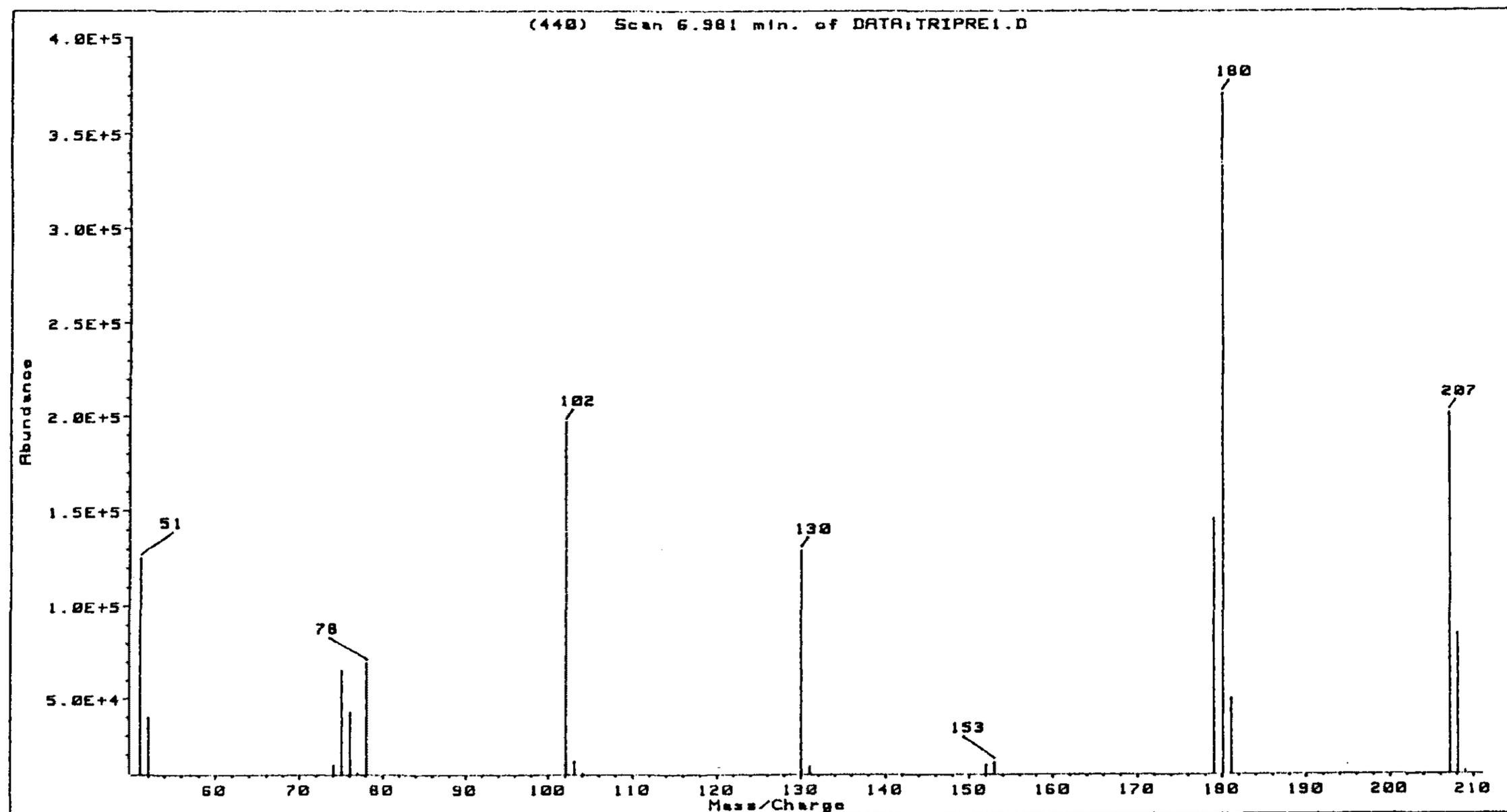


Fig.3-2. Mass spectrum of 4-Cyanophenyl-2-pyridineketone : Compound (I)

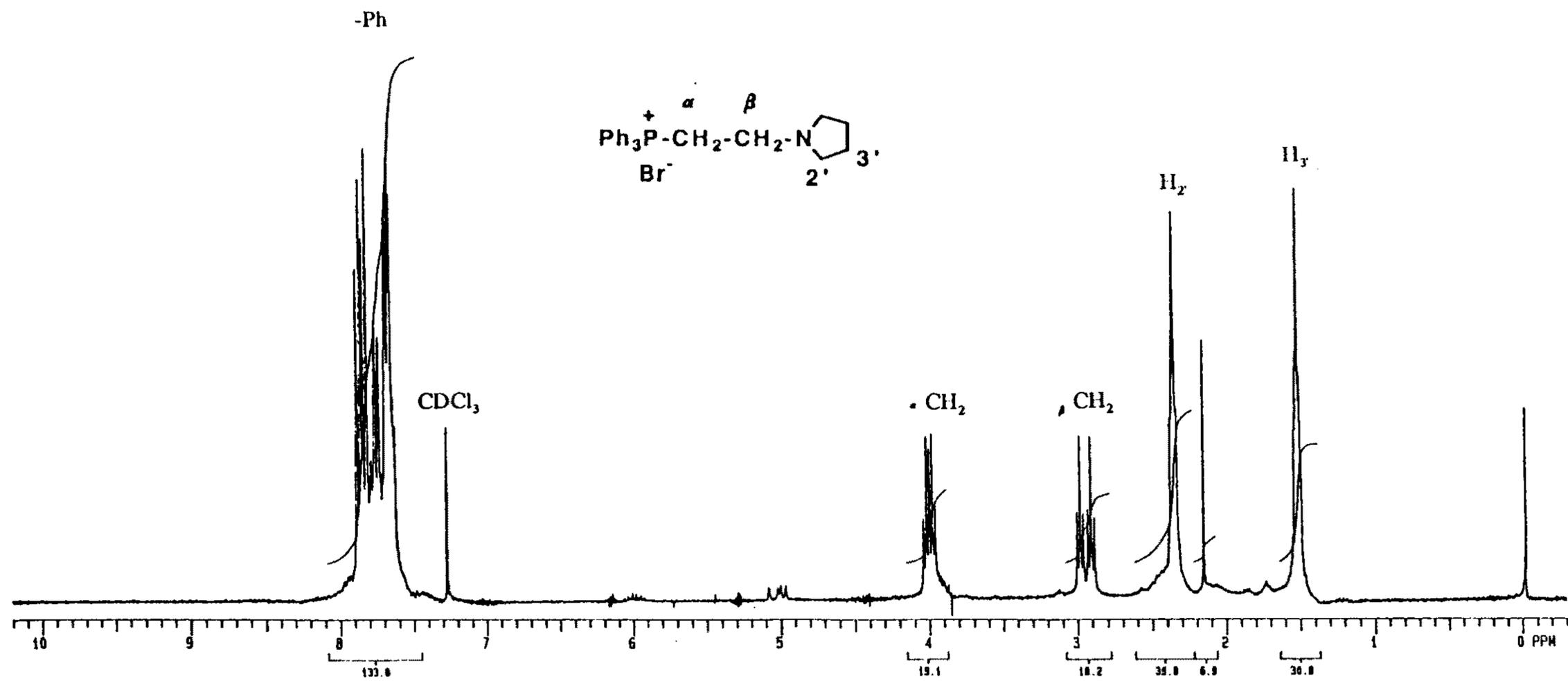


Fig.3-3. NMR spectrum of Triphenyl-2-pyrrolidinoethylphosphonium bromide.

못하였다. Compound II도 GC/MS로 확인하였는데 M^+ ion에 해당하는 m/z 289의 peak가 관찰되었고, base peak인 m/z 219와 m/z 220, 219의 peak 등은 [M-pyrrolidine ring]의 fragment ion에 기인하는 것으로 생각된다. (Fig. 3-4)

2-[1-(4-formylphenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)]pyridine : compound (III)는 compound (II)를 acid hydrolysis 하여 얻고 GC-MSD로 확인하였다. (Fig. 3-5) Compound (III)의 mass spectrum에서는 M^+ ion에 해당하는 m/z 292의 peak가 크게 나타났으며 [M-pyrrolidine ring]의 fragment ion에 해당하는 m/z 223, 222 peak가 관찰되었다. Base peak는 m/z 223의 peak였다.

Compound III를 silver oxide를 사용하여 산화시켜 hydroxymethyltriprolidine : compound V로 전환시키고 분리한 후 TMS로 유도체화시켜 GC-MSD로 확인하였다.(Fig. 3-6) M^+ ion인 m/z 366의 peak와 [M-pyrrolidine ring]의 fragment ion에 해당하는 m/z 297, 296 peak가 관찰되었으며, NCTR에서 합성하여준 authentic hydroxymethyltriprolidine과, compound V의 mass spectrum과 retention time이 같음을 확인하였다.

Compound의 III와 V의 혼합액을 Jones reagent로 산화시켜 triprolidine carboxylic acid : compound IV를 제조하였다. compound IV는 methylene chloride로는 어떤 pH에서도 추출되지 않았으므로 compound IV가 존재하는 혼합액의 수층(ca. pH=7)을 C_{18} Sep-Pak cartridge를 사용하여 분리하였다. Mass spectrum은 TMS 유도체화를 시켜 얻었는데 M^+

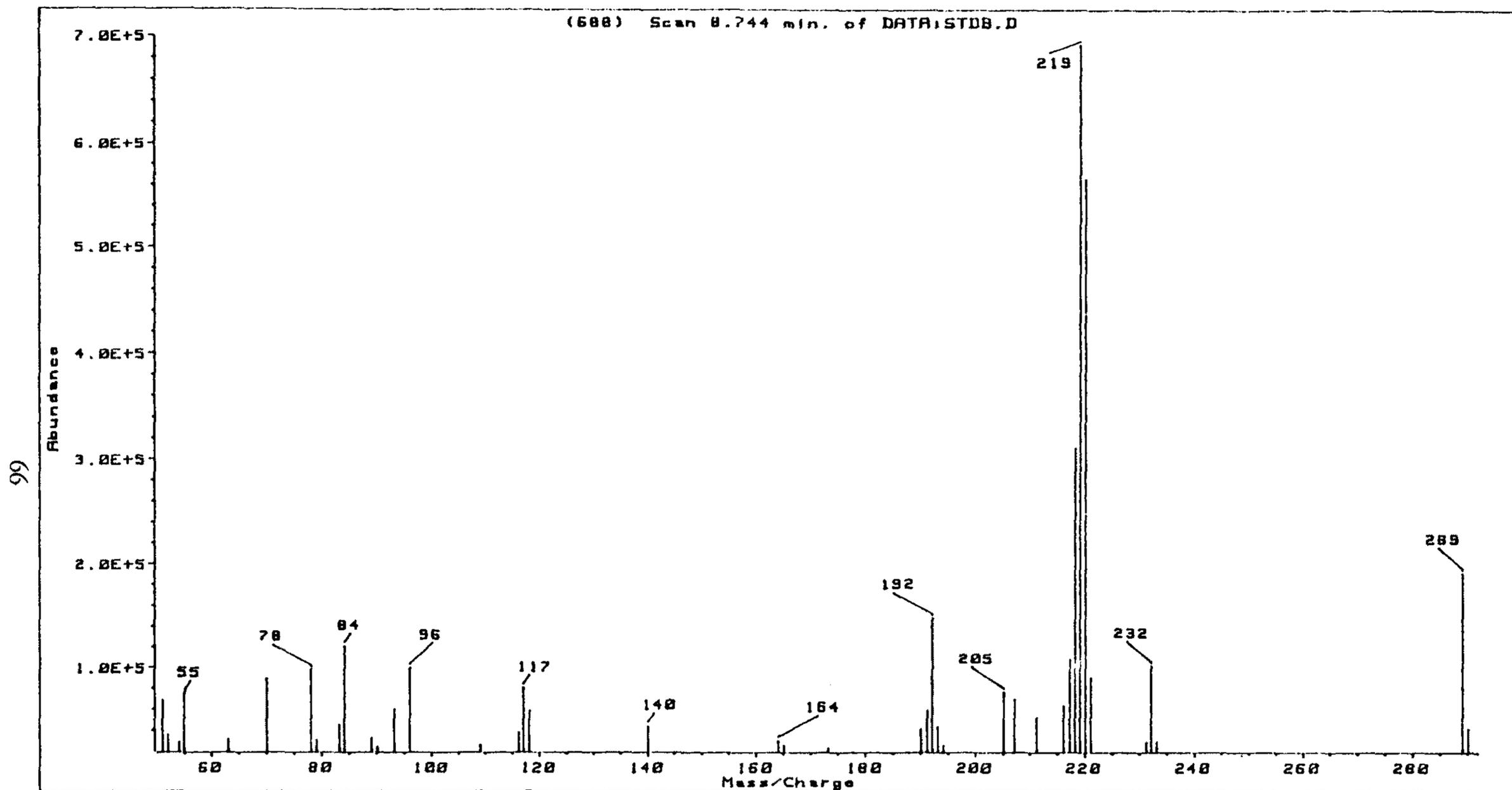


Fig.3-4. Mass spectrum of 2-[1-(4-cyanophenyl)-3-(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)]
pyridine : Compound (II).

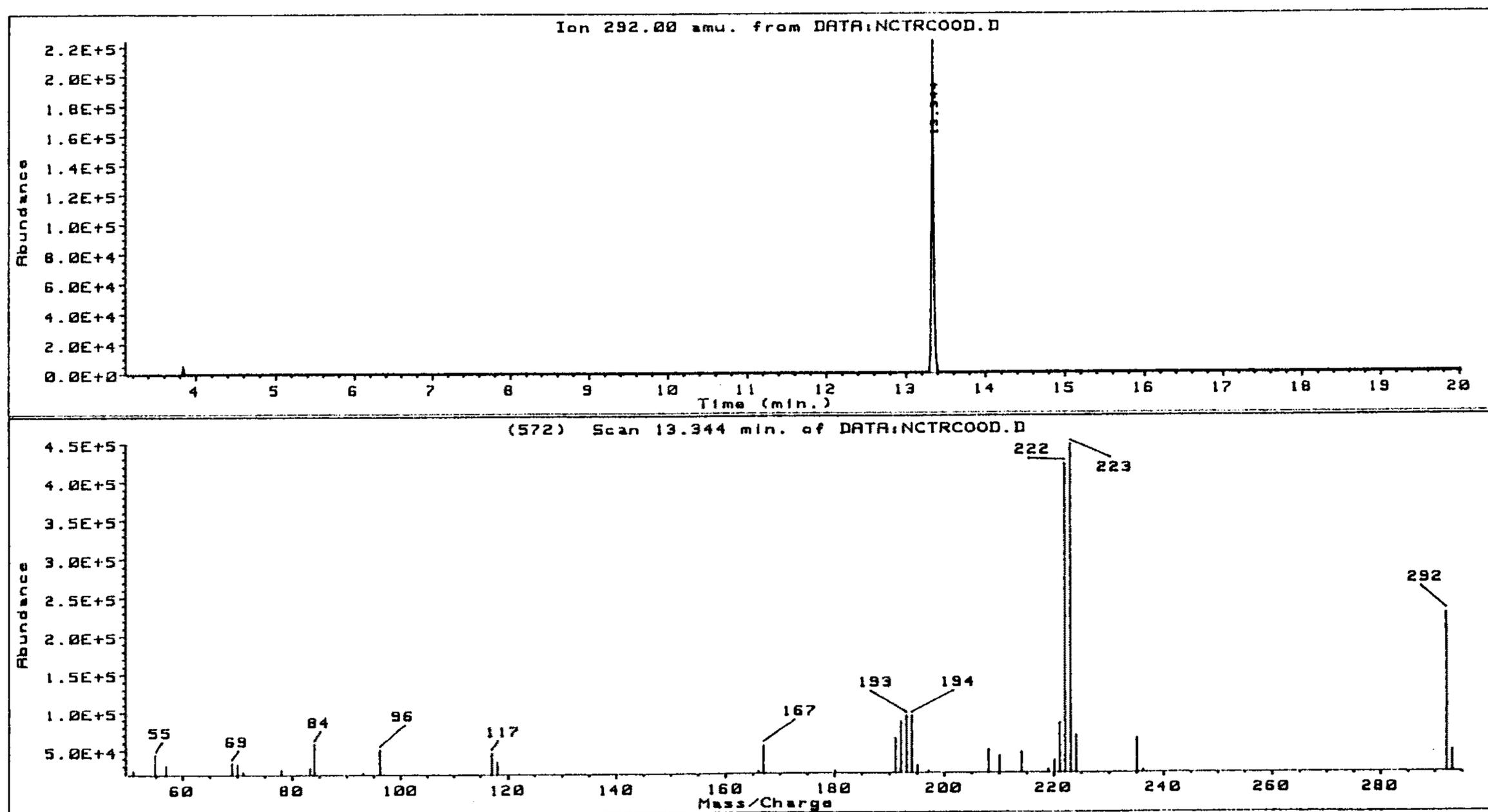


Fig.3-5. Mass spectrum of 2-[1-formylphenyl-3(1-pyrrolidinyl-1-propenyl)]
pyridine : Compound (III)

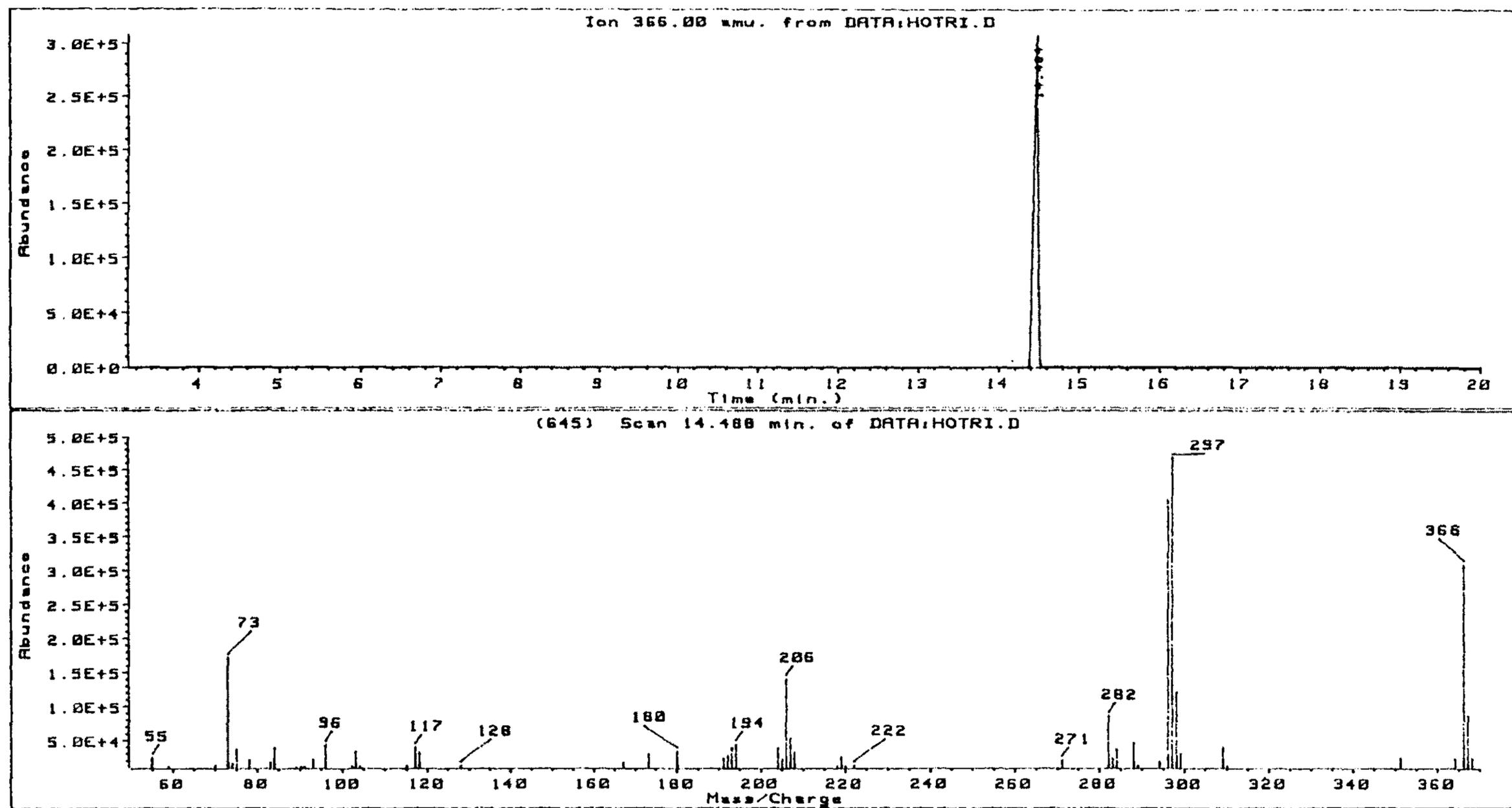


Fig.3-6. Mass spectrum of hydroxymethyltriprolidine : Compound (V)

ion 인 m/z 380의 peak 와 [M-pyrrolidine ring] 의 fragment ion 에 해당하는 m/z 310의 peak 등이 관찰되었다. (Fig. 3-7) 위의 결과를 토대로 triprolidine metabolites 들의 공통된 mass fragment pattern 을 알수 있었는데 이를 Fig. 3-8 에 나타내었다.

제 4 절 결론

Triprolidine 의 human urine 내에서 관찰된 metabolite 중 hydroxymethyltriproclidine 과 triprolidine carboxylic acid 를 합성하여 GC-MSD 로 확인하였다.

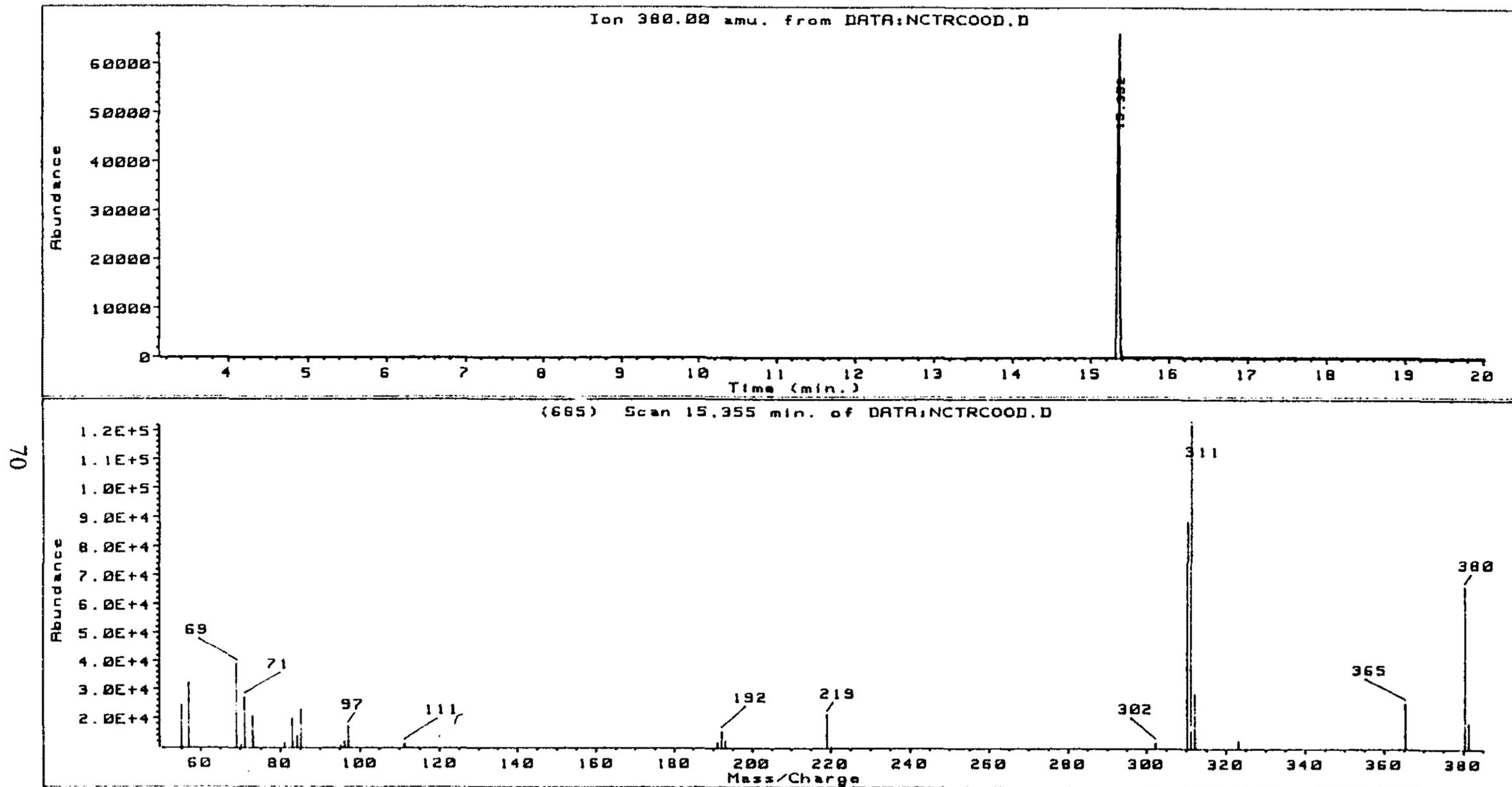
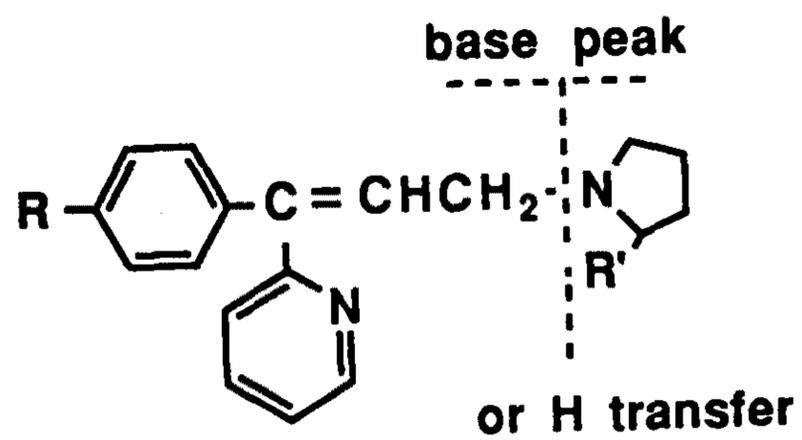


Fig.3-7. Mass spectrum of triprolidine carboxylic acid : Compound (IV).



R : CH₃, CH₂OH, CO₂H

R' : H, O=

Fig.3-8. Common mass fragment pattern of triprolidine and its metabolites

제 4 장 Carbinoxamine 의 rat urine 에서의 metabolism 에 관한 연구

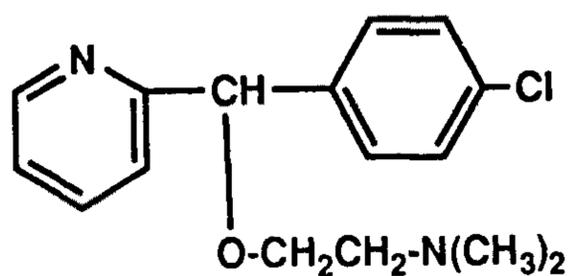
제 1 절 이론적 배경

Carbinoxamine, 2-[(4-chlorophenyl)-2-pyridinyl-methoxy]-N,N-dimethylathanamine 은 구조적으로 ethanolamine(alkanolamine) 유도체인 H₁-receptor antagonist 이다(21). 그 물리화학적 성상은 Table 4-1에 나타내었다. Carbinoxamine 의 antihistamine 효과는 Barouch 등 (26)에 의해 S-(-)antipode 가 S-(+) antipode 보다 우수하다고 보고되었으며 Connell 등(23)에 의해 carbinoxamine 과 pseudoephedrine hydrochloride 복합의 서방성 제제가 nasal allergy 에 의해 유발된 nasal congestion, nose blowing, sneezing, nasal pruritus, rhinorrhea, ophthalmic pruritus, 그리고 snuffle 등의 증상에 효과가 있다고 보고되었다.

그러나 항히스타민제가 그 단독으로나 다른 복합제제로 쓰이거나, ethanol 과 병용시 독성이 나타나며 (27-28) 차량을 운전할때 집중력이 감소되는 원인이 되고 (29-30) 경피흡수제제로 쓰일때 피부에 독성이 나타나는 것으로 (31) 보고 되어 독성학적 연구가 많이 진행되었다. 이러한 관계로 분석학적 연구도 많이 진행되어 gas chromatography (32-35) high performance liquid chromatography (36-37) 그리고 gas chromatography mass spectrometry (35, 38-40) 등에 의한 alkanolamine 류의 antihistamine 의

Table 4-1. Structure and physical and chemical properties of carbinoxamine

maleate.



(mol.wt.: 290.80)

Carbinoxamine

Physical state	white, odorless, crystalline powder
Melting point	117-119 °C
Stability	Carbinoxamine maleate tablets should be stored in tight, light-resistant container at a temperature less than 40°C
Molecular weight	carbinoxamine : 290, 80 carbinoxamine maleate : 406, 90
Pka	8.1
Reference No.	1-2

분석등이 보고되어 있으며, 특히 Hoffman (41) 등은 human serum 에 carbinoxamine 을 spike 하고 gas chromatography와 NP-FID detector 를 이용하여 serum 내의 carbinoxamine 을 정량하는 방법도 보고한 바 있다.

Carbinoxamine 의 대사체에 관한 연구로는 1988년 Maurer 등 (42)이 human urine 내의 carbinoxamine 의 대사체를 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 에 의해 찾아내어 보고한 논문이 있다. 이 논문에서는 carbinoxamine 을 human 에 oral 로 투여하고 urine 을 채취한 후 유기용매로 추출하고 추출한 잔사를 acetylation 하여 metabolite 를 GC-MSD 로 분석하였다. 그 결과 human urine 에서 chlorobenzoyl pyridine, carbinol, desaminohydroxycarbinoxamine, nor carbinoxamine, bisnorcarbinoxamine 의 5개의 metabolite 들을 발견하였다. 그 각각의 mass spectrum 을 Fig. 4-1에 나타내었다.

제 2 절 실험목적

본 연구에서는 toxic substance 로 알려진 항 히스타민제인 carbinoxamine 에 대하여 rat urine 에서 생성되는 대사체를 GC/MS(Gas chromatography-Mass Spectrometry) 를 사용하여 밝혀 보고자 하였다.

또한 GC/MS 를 이용한 분석에 의해 밝혀진 대사체들을 토대로 rat urine 으로의 carbinoxamine 의 대사경로를 제시해 보고자 하였으며 나아가 앞으로의 carbinoxamine 의 pharmacokinetic 실험의 지표로 삼고자 한다.

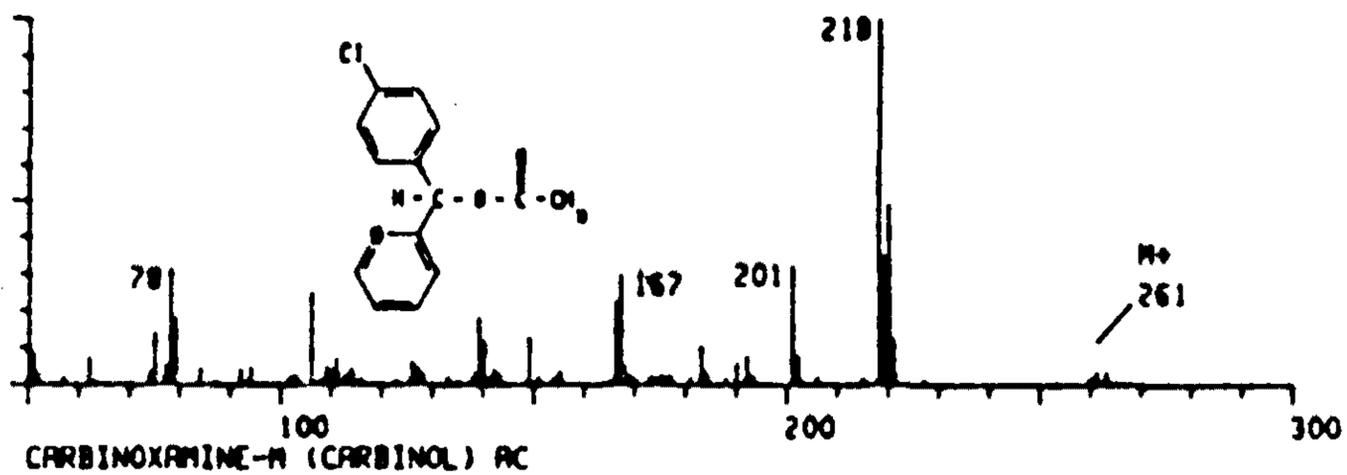
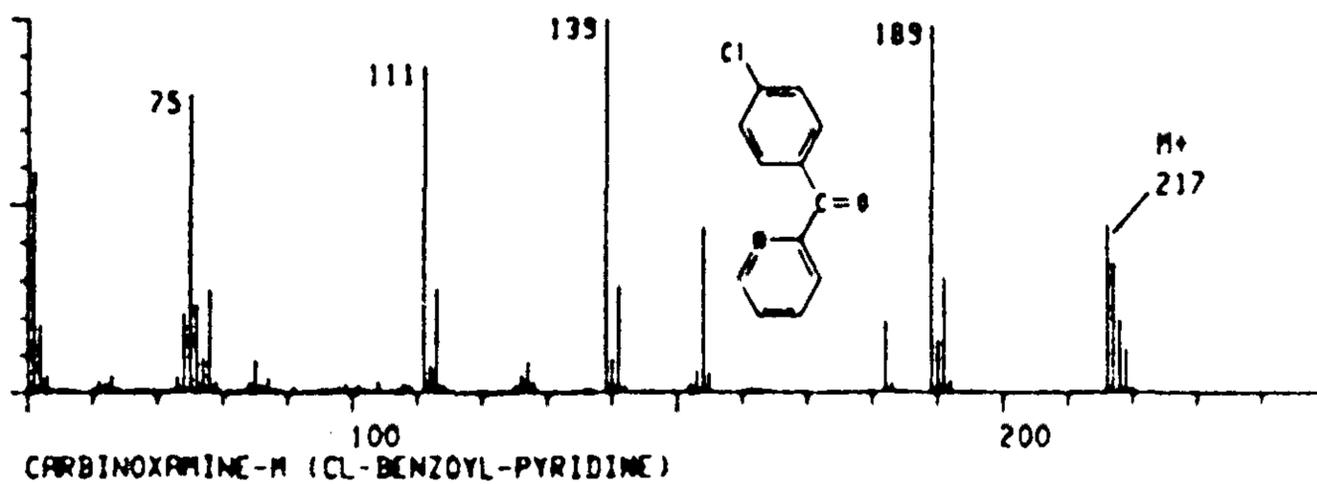
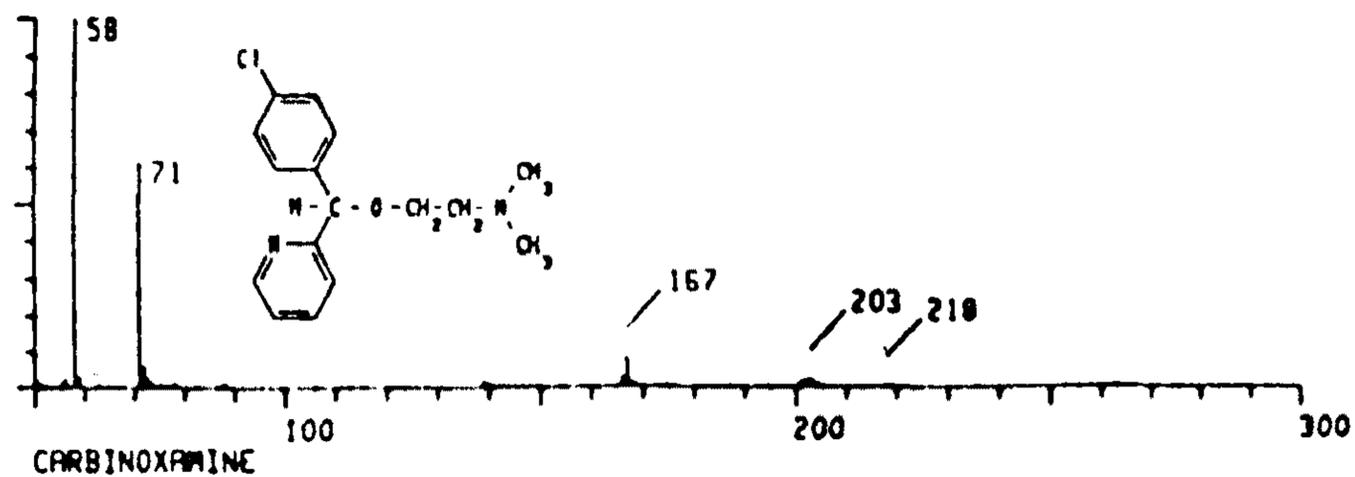


Fig.4-1. Mass spectrum of carbinoxamine and its metabolites in human urine after acid hydrolysis, extraction and acetylation. (Reference No. 42)

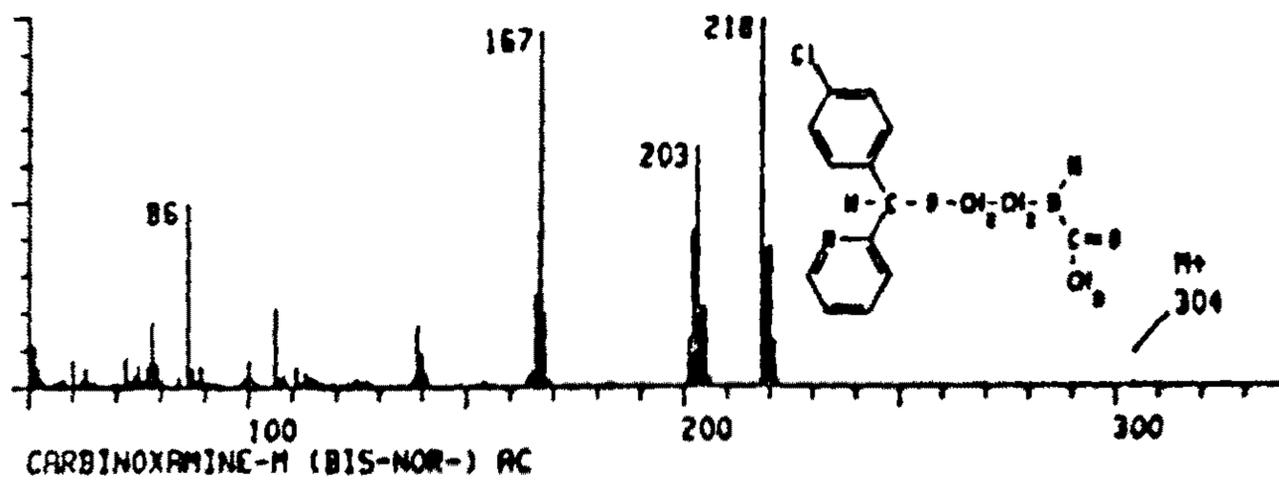
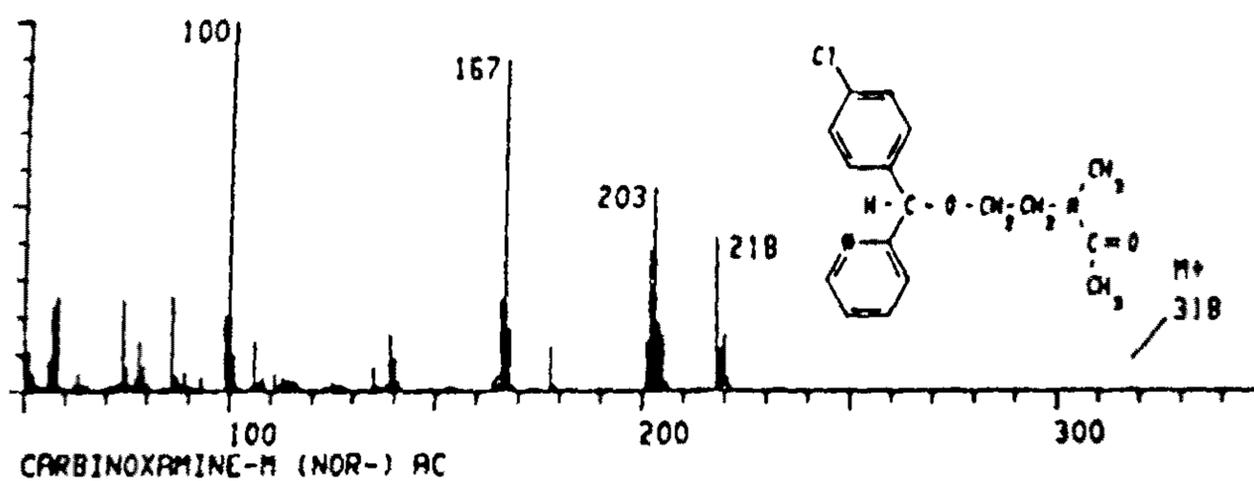
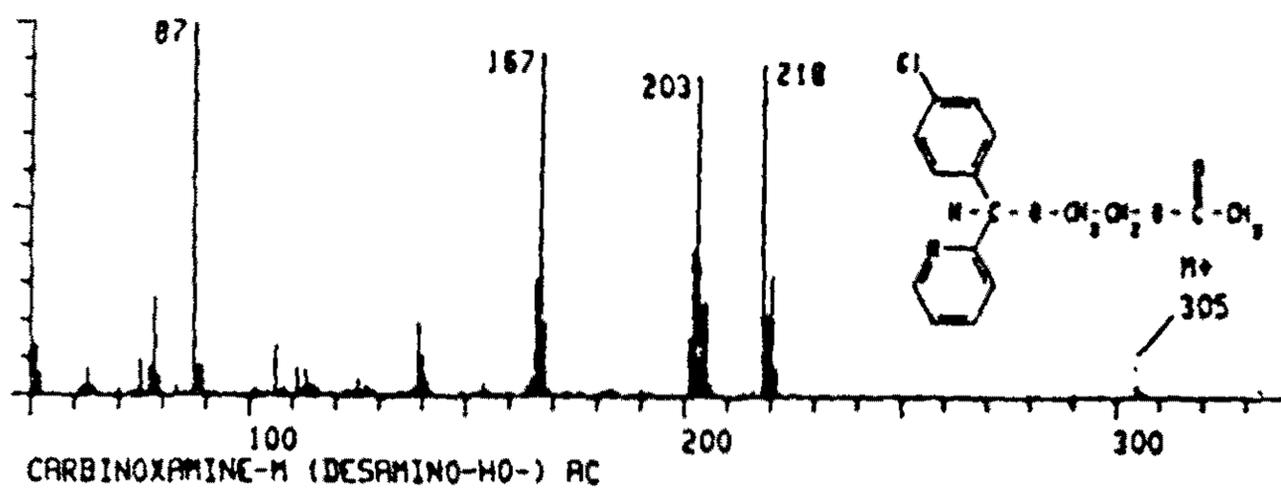


Fig.4-1. Continued.

제 3 절 실험방법

(1) 시약 및 실험기기

가) 시약

Carbinoxamine maleate (Sigma chemical Co., U.S.A.)

Na₂HPO₄ (Junsei chemical Co., Japan)

NaH₂PO₄ (Junsei chemical Co., Japan)

Methanol (J.T. Baker, U.S.A.)

Ether (J.T. Baker, U.S.A.)

Amberlite XAD-2 resin (100-200 microns, Serva, Germany)

β -glucuronidase from *E. Coli* (Boehringer Mannheim, Germany)

: β -glucuronidase activity -200 U/ml

MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide,Sigma chemical Co., U.S.A.)

TMSCl (Trimethylsilylchloride, Sigma chemical Co., U.S.A.)

나) 시약의 조제

□ XAD-2 resin 의 준비 : acetone (2일), methanol (2일), 증류수 (3일)로 환류시켜 정제한 다음 증류수에 담아 보관하였다.

□ Phosphate buffer (pH 7.0) : 0.2M Na₂HPO₄ 와 0.2M NaH₂PO₄ 를 섞어 pH 7.0으로 맞추어 사용하였다.

□ 유도체화 시약 : MSTFA 와 TMSCl을 100:1 로 혼합하여 사용하였다.

다) 실험기기

본 실험에 사용한 분석기기로는 Hewlett-Packard (HP) 5890A Gas chromatograph(GC) 에 direct interface 로 연결된 5988A Mass spectrometer 를 사용하였다. Data analyzing system 으로는 HP 7946 disc drive 가 연결된 HP 5970 MS chemstation 을 사용하였고, chromatogram 과 mass spectrum 은 HP 2934A printer 로 부터 얻었다.

시료의 추출과정에서 사용한 장치로는 rotary vacuum evaporator (Buchi, switzerland), Buhler 7400 Tubingen Shaker (Edmond, Germany) Varifuge-F Centrifuge (Heracus, Germany), Heating block (Gebr. Liebisch, Germany) 등이 있다.

라) GC/MSD 작동조건

Mass spectrometer 는 $300\mu\text{A}$ 의 filament current 에서 사용하였으며 이때 electron energy 는 EI mode 에서 70eV, CI mode 에서 230eV 였다.

CI mode 사용시 reagent gas 로는 methane 을 사용하였으며 ion source 온도는 200°C source pressure 는 1 torr 였다. Column 은 SE 30(Length : 12m, I.D. : 0.2mm, film thickness : $0.33\mu\text{m}$) methyl silicon capillary column 을 사용하였고 carrier gas 로는 He (0.9ml/min)을 사용하였다. Injection mode 는 split mode (ratio 10:1) 를 사용하였고, 주입기 온도는 250°C , transfer line 온도는 280°C 였으며 분리관의 온도는 100°C 에서 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 300°C 까지 상승시켰다.

(2) 시료채취

Wistar 계 웅성 rat 1마리(270g)에 carbinoxamine maleate 13.99mg (carbinoxamine : 10mg) 을 증류수에 녹여 경구투여하고 metabolic cage 안에서 24시간동안 배

설된 뇨를 수집하여 분석전까지 -20°C 냉동고에 보관하였다. 약물투여전 24 시간 동안 rat 를 metabolic cage 을 넣어 blank 뇨를 채취하였으며 실험전까지 rat 는 정상적으로 먹이와 음료를 섭취하게 하였다.

(3) 시료분석방법

Rat urine 시료에서의 Carbinoxamine 및 그 대사체의 분석과정은 다음과 같다.

가) XAD-2 column 의 준비

내경이 0.5cm 인 disposable glass pasteur pipette 에 glass bead 를 넣어서 아래부분을 막은다음, 충분히 세척된 XAD-2 resin 을 높이 2cm 정도로 채워서 만든다.

나) Urine 으로부터 triprolidine 및 그 대사체의 분리

Urine 시료는 5ml 를 plastic syringe 로 뽑아서 XAD-2 column 에 흘려준다. 흘려준 urine 은 동량의 증류수로 XAD-2 column 을 씻어주고, free 와 conjugated compound 들을 흡착하고 있는 XAD-2 column 에 methanol 을 1ml 씩 3번 흘려서 stopper 가 있는 원심분리 tube 에 받는다. 그리고 methanol 용액은 vacuum rotary evaporator 로 건조시킨다.

다) Free form 의 분리

Residue 에 1ml 의 phosphate buffer (pH 7.0)를 넣고 diethyl ether 5ml 를 사용하여 5분간 shaker 에서 흔들어서 추출한다. 혼합된 용액을 2500rpm 에서 5분간 원심분리하고 -30°C 의 freezer 에 넣어 buffer 층을 얼린다음 ether 층을 다른 원심분리 tube 에 옮긴다. 이 ether 층은 evaporator 에서 건조시킨다. Buffer 층은 다시 녹여 ether 로 추출하여 위와 같은 조작을 총 10번

반복한다. 이렇게 하여 모은 residue 는 유도체화 반응을 시키기 전에 수분을 제거하게 위해 vacuum desiccator (P_2O_5/KOH) 에 30분간 넣어둔다.

라) Conjugated form의 분리

Free form 을 추출하고 남은 buffer 층을 $60^\circ C$ heating block 에 잠시 방치하여 수층위에 남아 있는 ether 층을 날려보낸다. 수층을 잠시 상온에 방치하여 식히고, diethylether 5ml 를 사용하여 5분간 shaker 에서 흔들어 추출한다. 혼합된 용액을 2,500rpm 에서 5분간 원심분리하고 $-30^\circ C$ 의 freezer 에 넣어 buffer 층을 얼린 다음 ether 층은 다른 원심분리 tube 에 옮긴다. 이 ether 층은 vacuum evaporator 에서 건조시키고 free form 의 추출과정과 마찬가지로 총 5번 추출조작을 반복한다. 이렇게 하여 모은 residue 는 유도체화 반응을 시키기전에 수분을 제거하기 위하여 P_2O_5/KOH vacuum desiccator에서 30분간 넣어둔다.

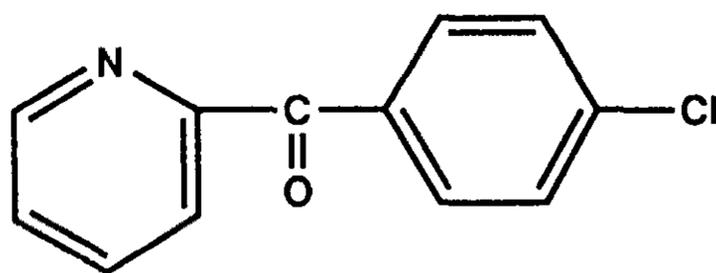
마) 유도체화 반응

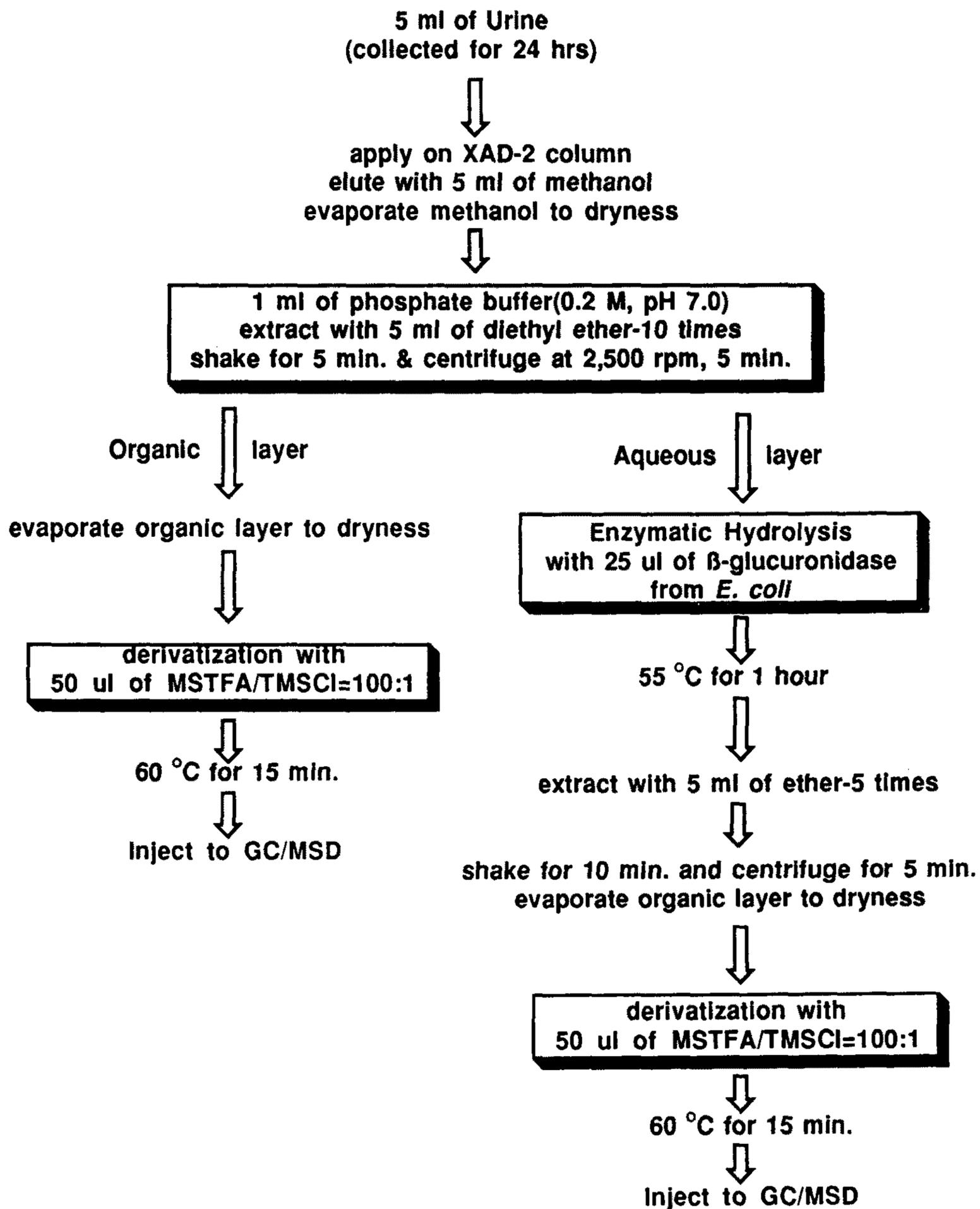
MSTFA : TMSCl(100:1) 혼합용액 100ul 를 추출조작후 건조시킨 tube 에 넣고 $60^\circ C$ 에서 15분간 반응시켰다. 반응후 약간 식힌 다음 반응액을 auto sampler 용 vial 에 옮기고 GC/MSD 에 injection 하였다. Urine 의 전체적인 analytical procedure를 Scheme 3 에 나타내었다.

제 4 절 결과 및 고찰

Carbinoxamine 을 rat 에 경구투여 한 후 24시간동안 채취한 urine 을 Scheme 3 의 방법으로 분석한 결과 free fraction 의 EI spectrum 의 blank urine chromatogram (Fig. 4-2) 에서는 나타나지 않는 11 개의 peak 를 발견 할수 있었으며 (Fig. 4-3) EI mass spectrum 에서는 대부분의 경우 M^+ ion 의 peak 가 관찰되지 않았으므로 CI mass spectrum 으로서 M^+ ion 을 확인 하였다. CI spectrum 의 total ion chromatogram 을 Fig. 4-4 와 Fig. 4-5에 나타내었다.

Peak 1은 CI spectrum (Fig. 4-6) 에서 $[M+H]^+$ 에 해당하는 m/z 218 의 peak 가 가장 크게 나타나고 $[M+C_2H_5]^+$ 에 해당하는 m/z 246의 peak 가 나타났으므로 분자량이 217인 아래와 같은 구조를 갖는 물질일 것으로 추정하였는데 Maurer (Fig. 4-1)의 논문에서의 Cl-Benzoyl-pyridine의 mass spectrum 과 일치하였다. 본 실험과 Maurer 의 실험에서는 유도체화 시약을 다른 것을 사용하였다는 점이 다르다. 이 구조에서는 유도체화가 되지 않을 것으로 생각되므로 이물질은 Cl-Benzoyl-pyridine 일 것으로 생각된다. Peak 1의 EI mass spectrum 은 Fig. 4-7 에 나타내었다.





Scheme 3. Analytical procedure for carbinoxamine and its metabolites in rat urine

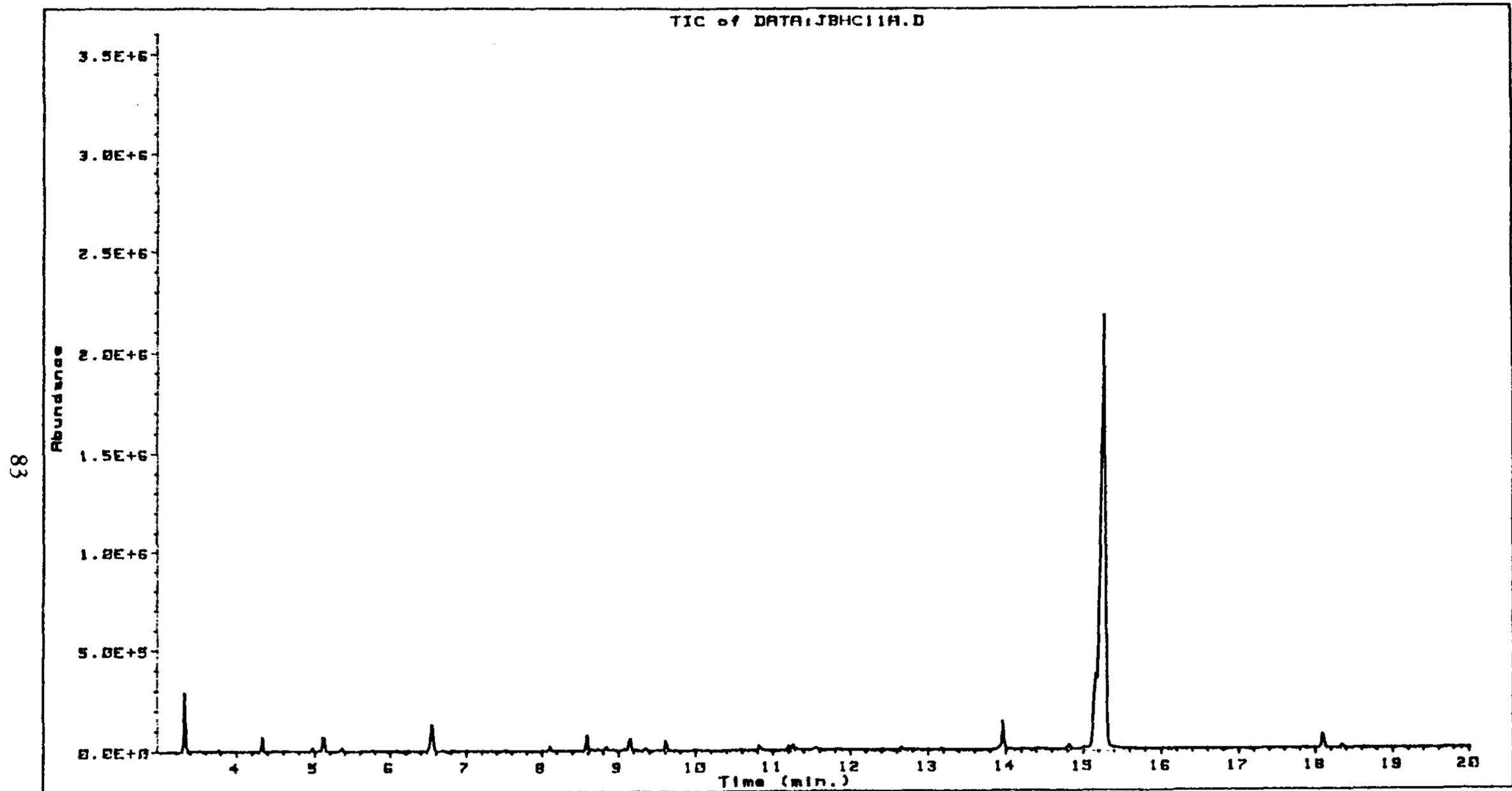


Fig.4-2. Total ion chromatogram of rat blank urine in EI chromatogram.

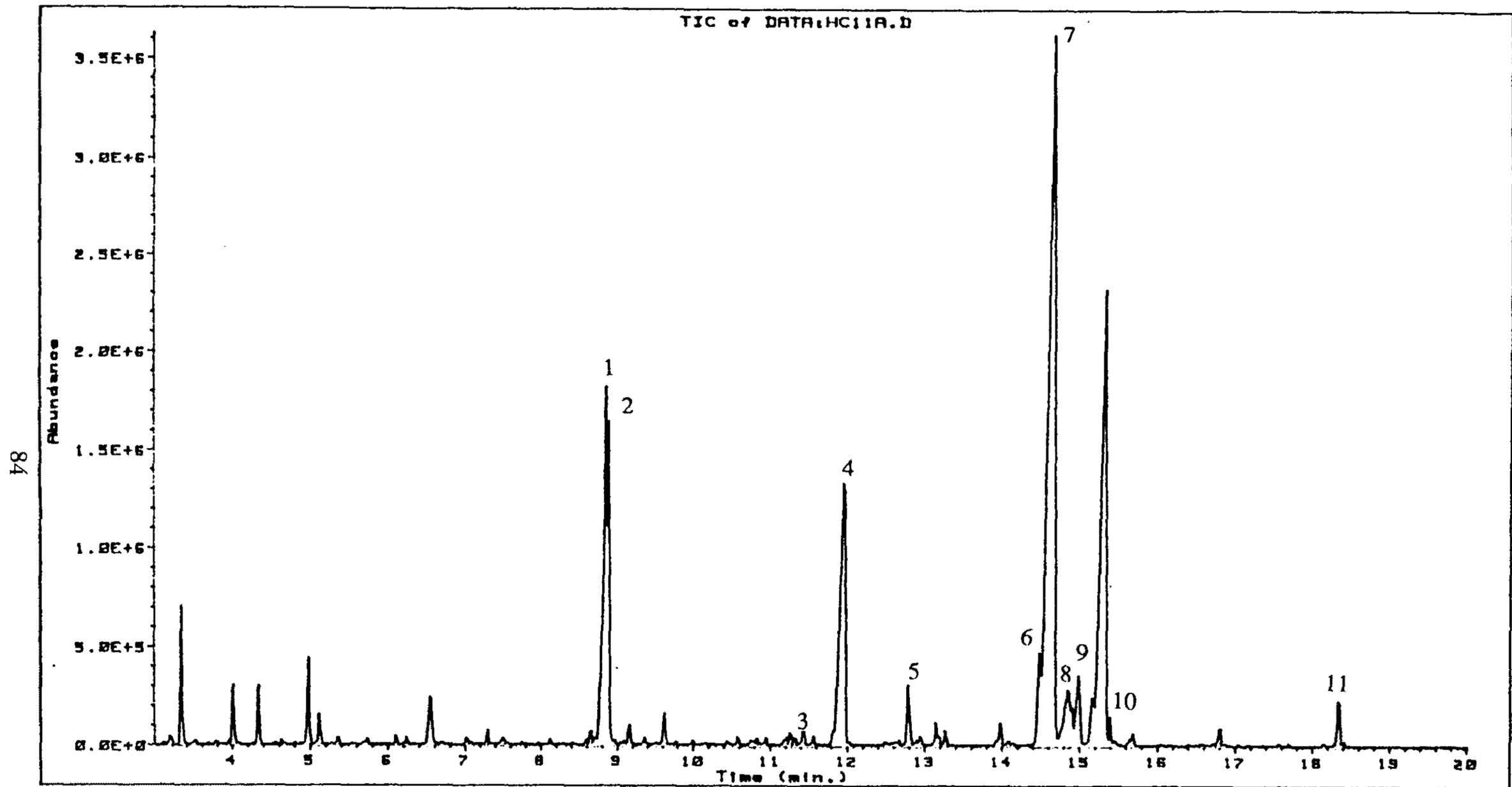


Fig.4-3. Total ion chromatogram of rat urine collected for 24hrs in EI chromatogram.

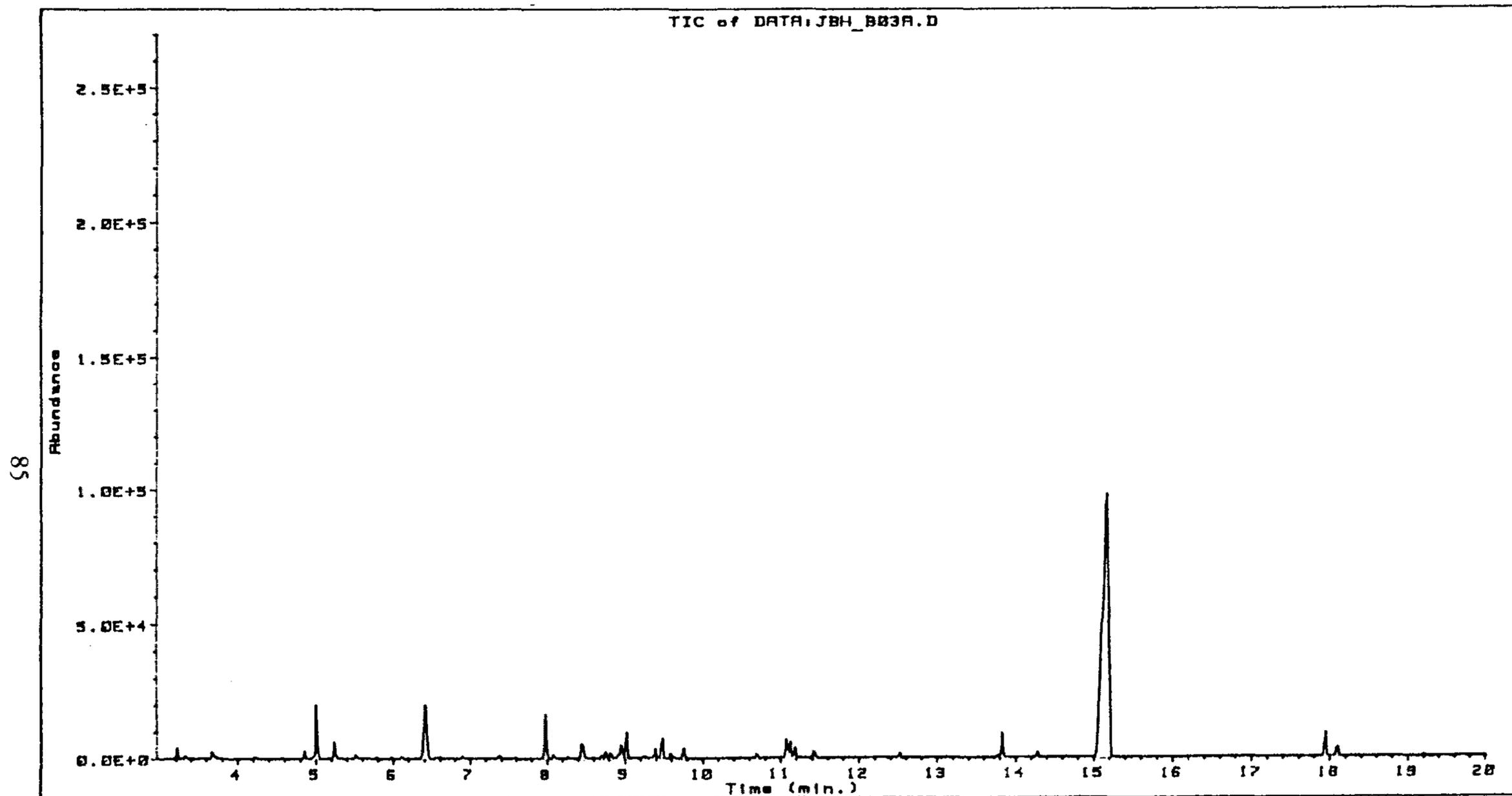


Fig.4-4. Total ion chromatogram of rat blank urine in CI chromatogram.

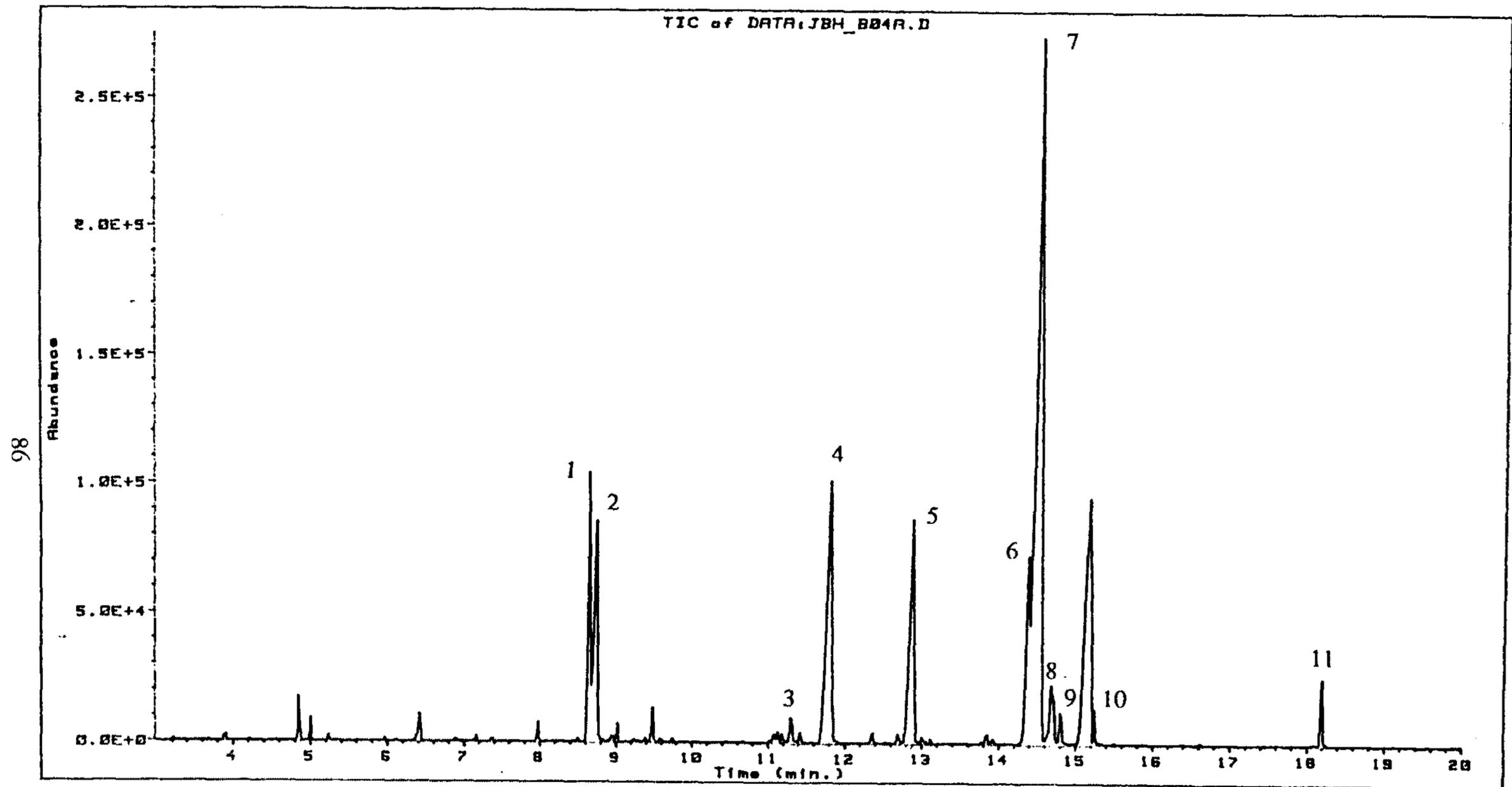


Fig.4-5. Total ion chromatogram of rat urine collected for 24hrs in CI chromatogram.

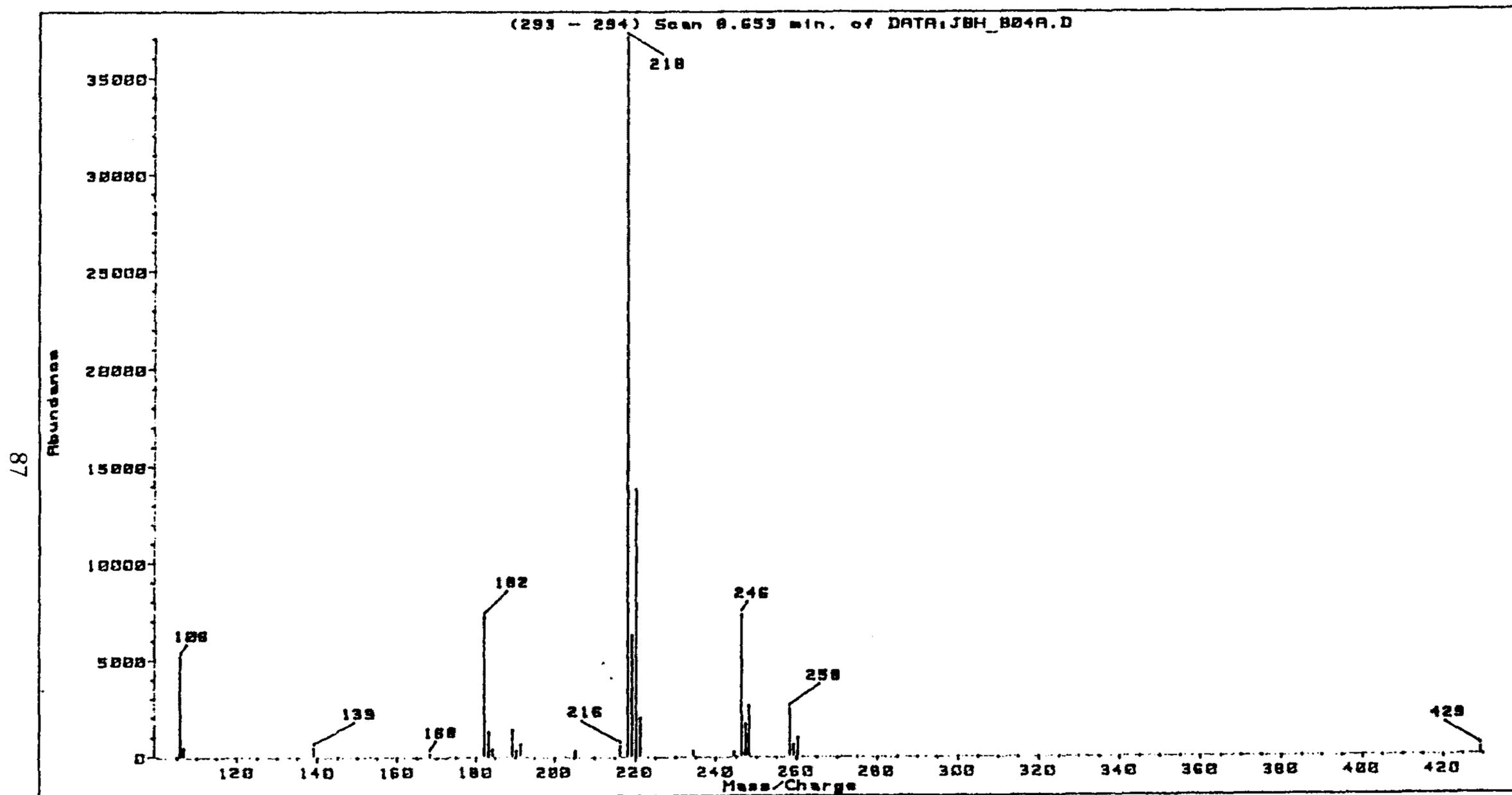


Fig.4-6. CI mass spectrum of peak 1.

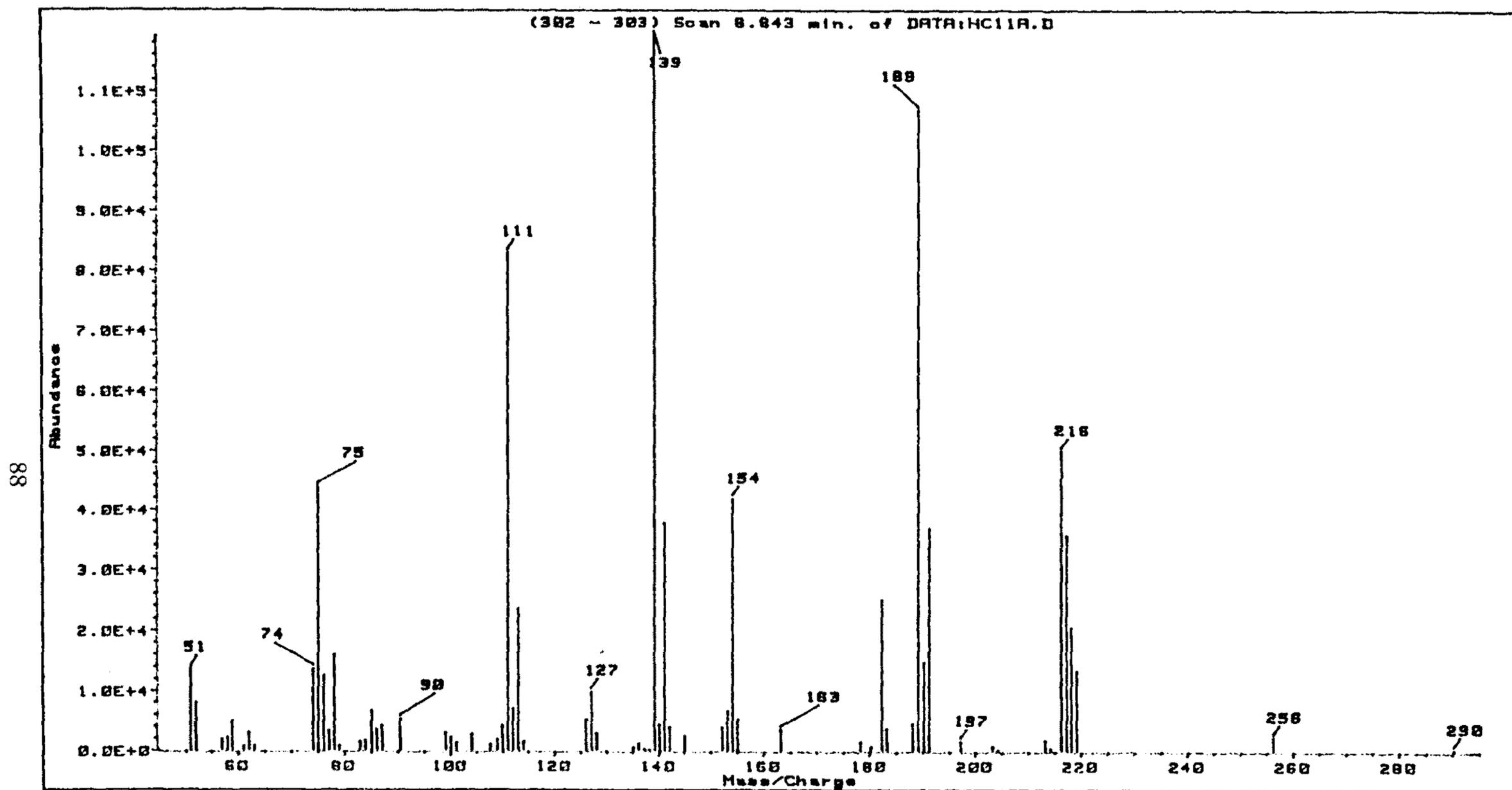
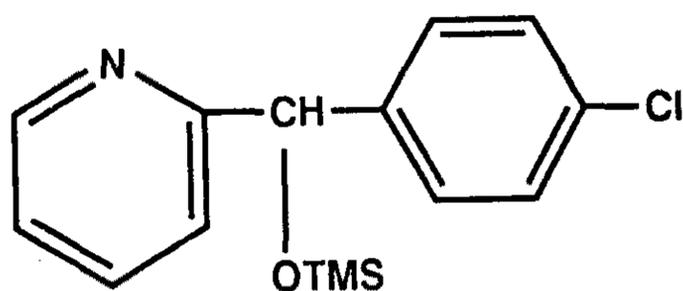


Fig.4-7. EI mass spectrum of peak 1.

Peak 2 는 CI mass spectrum (Fig. 4-8) 으로 보아 $[M+H]^+$ 에 해당하는 m/z 292 의 peak 와 $[M+C_2H_5]^+$ 에 해당하는 m/z 320 의 peak 가 관찰되었으므로 분자량이 291인 것으로 추정되어 아래그림과 같은 분자량 219 을 갖는 구조에 TMS 유도체화가 된 형태일 것으로 생각되었다. Maurer 의 논문에서도 이 구조가 carbinol 이라 명명하여 보고되었다. (42)



Peak 4 의 CI mass spectrum 에서도 $[m+H]^+$ 의 m/z 292 의 peak 와 $[M+C_2H_5]^+$ 에 해당하는 m/z 320 의 peak 가 관찰되어 (Fig. 4-9) 분자량이 peak II 와 동일한 291 인 것으로 추정되었다. 만일 peak 4가 위의 그림과 같은 구조를 갖는 다면 TMS 유도체화된 형태로 나타날 것이므로 peak 2 (Fig. 4-10)와 peak 4의 EI mass spectrum (Fig. 4-11) 을 보았을때 이 구조는 peak 2에 맞는 구조일 것으로 생각되었으며 peak IV 의 구조는 추정하지 못하였다.

Peak 3 는 parent drug 인 carbinoxamine 으로 standard 와 같은 retention time 과 mass spectrum 을 갖음을 확인하였다. Peak 3의 CI mass spectrum 은 Fig. 4-12에, EI mass spectrum 은 Fig. 4-13에 나타내었다.

Peak 5는 CI mass spectrum (Fig. 4-14) 에서 $[M+H]^+$ 에 해당하는 m/z 349

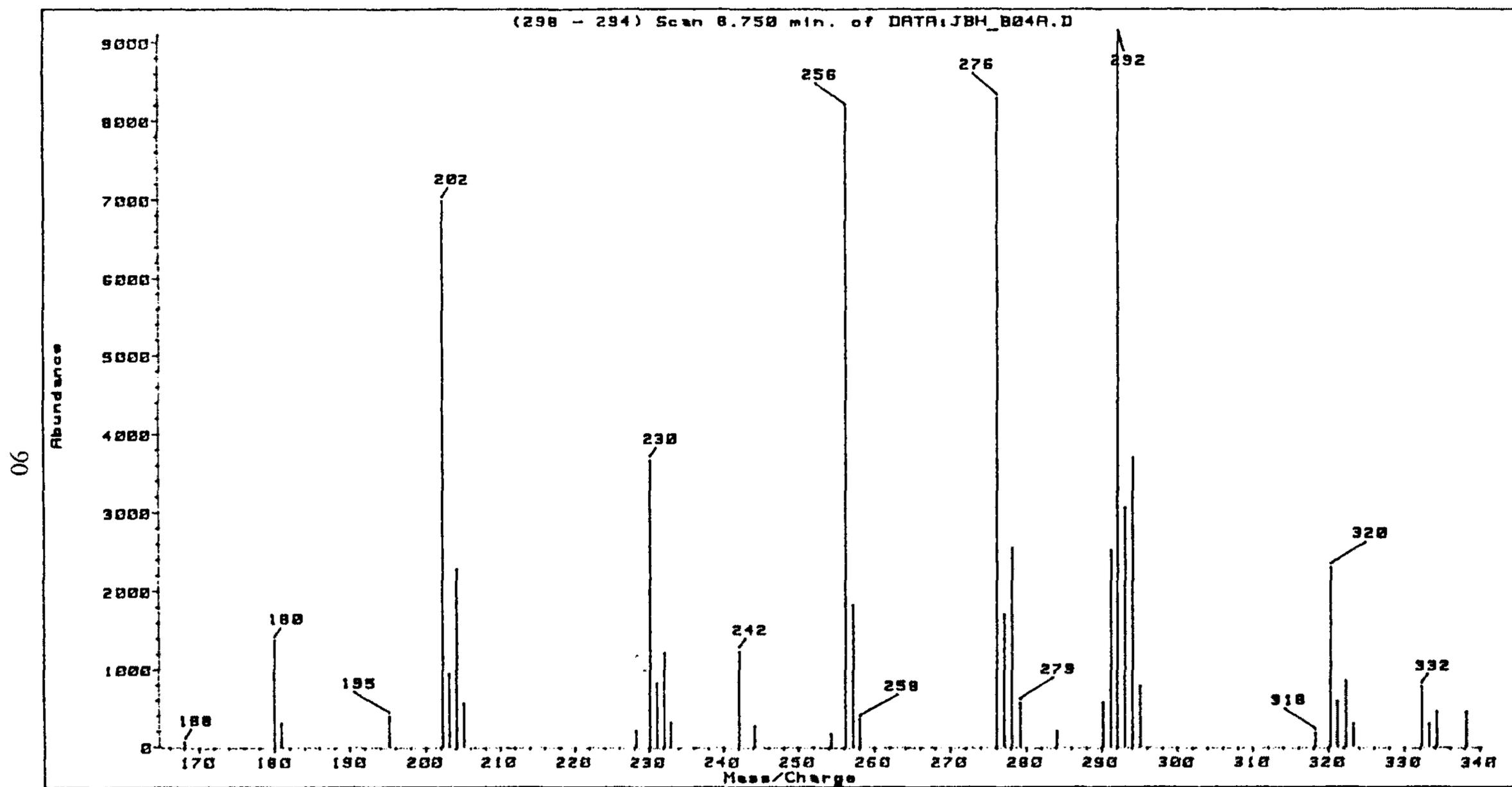


Fig.4-8. CI mass spectrum of peak 2.

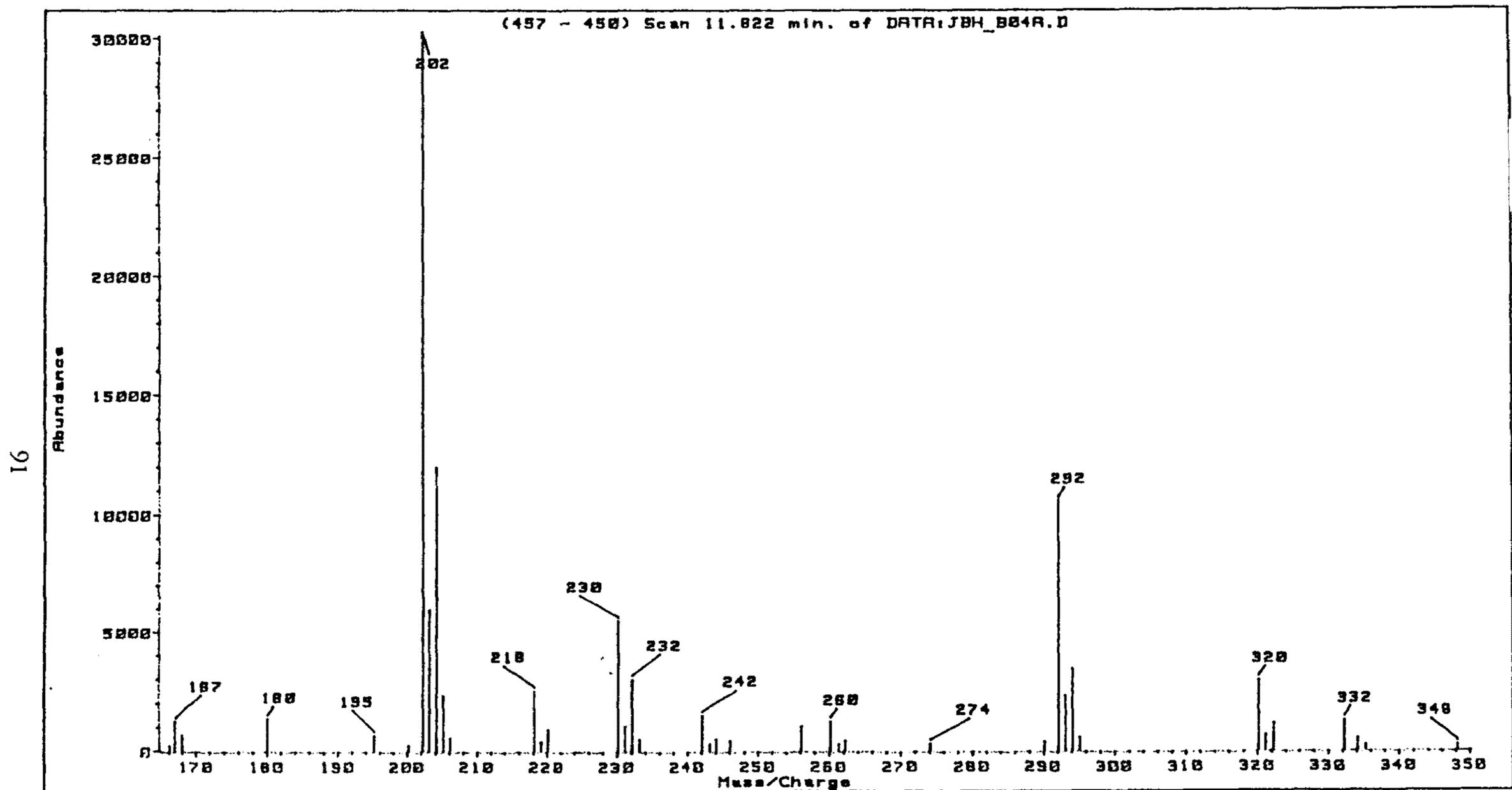


Fig.4-9. CI mass spectrum of peak 4.

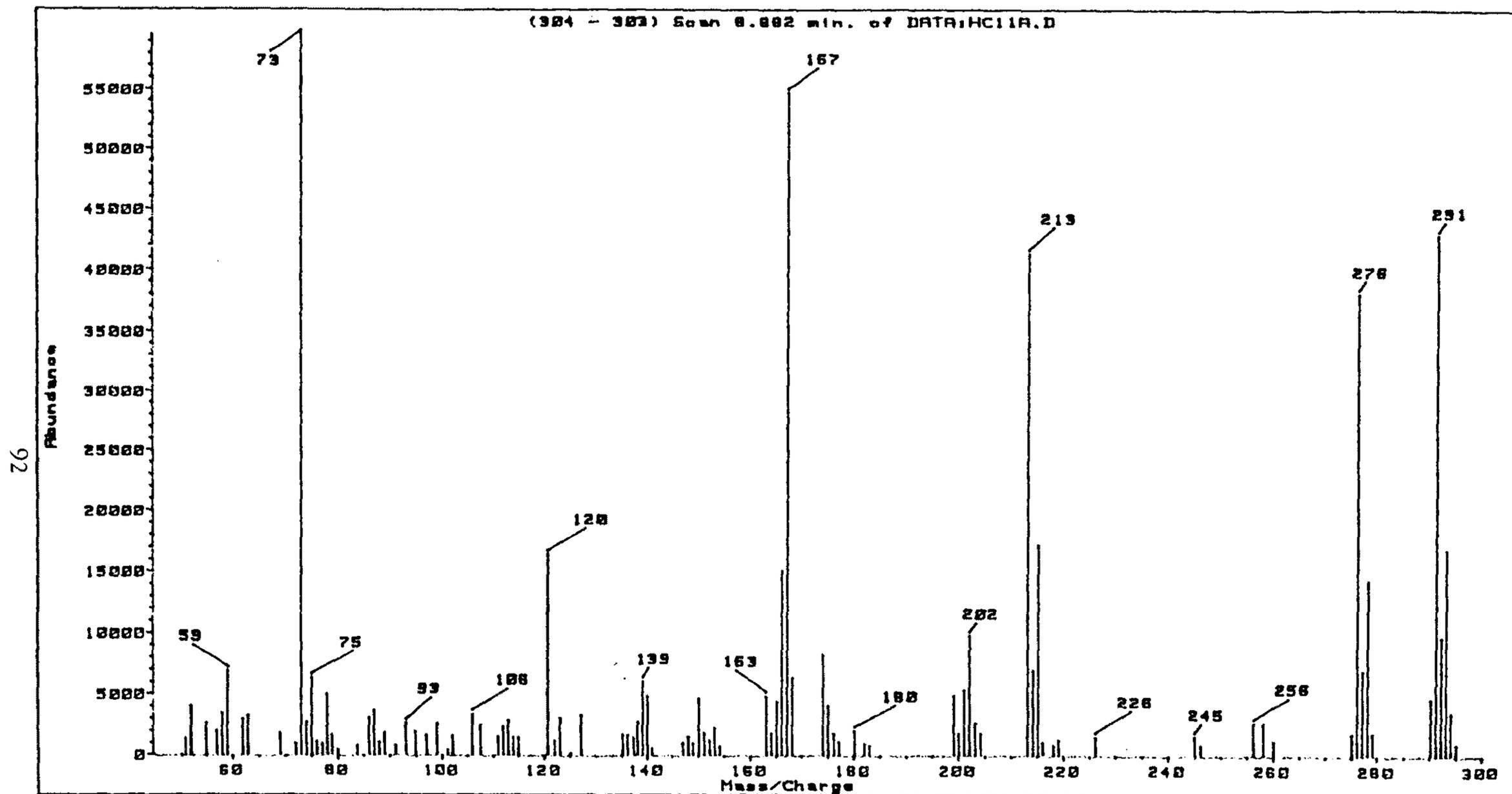


Fig.4-10. EI mass spectrum of peak 2.

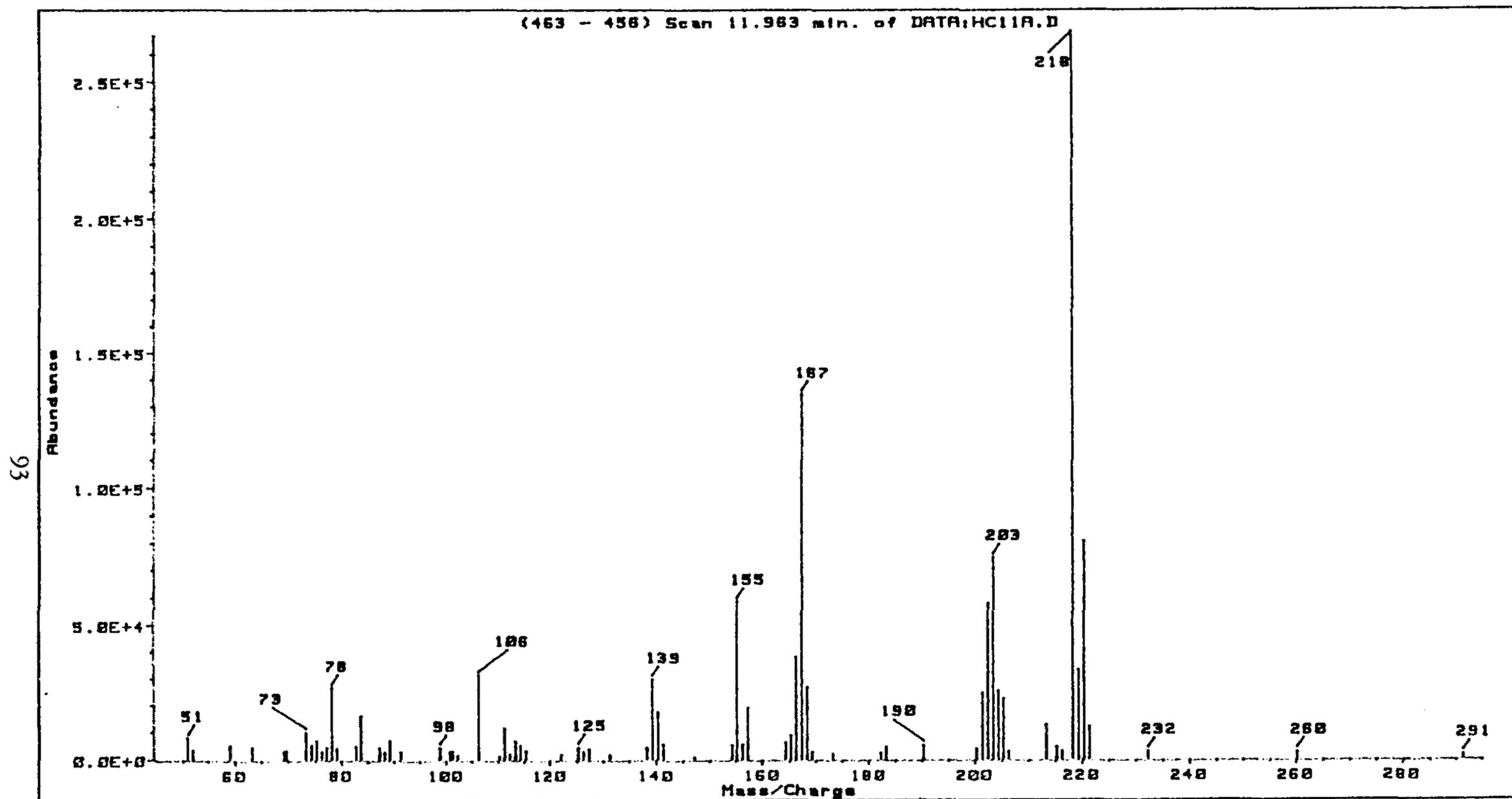


Fig.4-11. EI mass spectrum of peak 4.

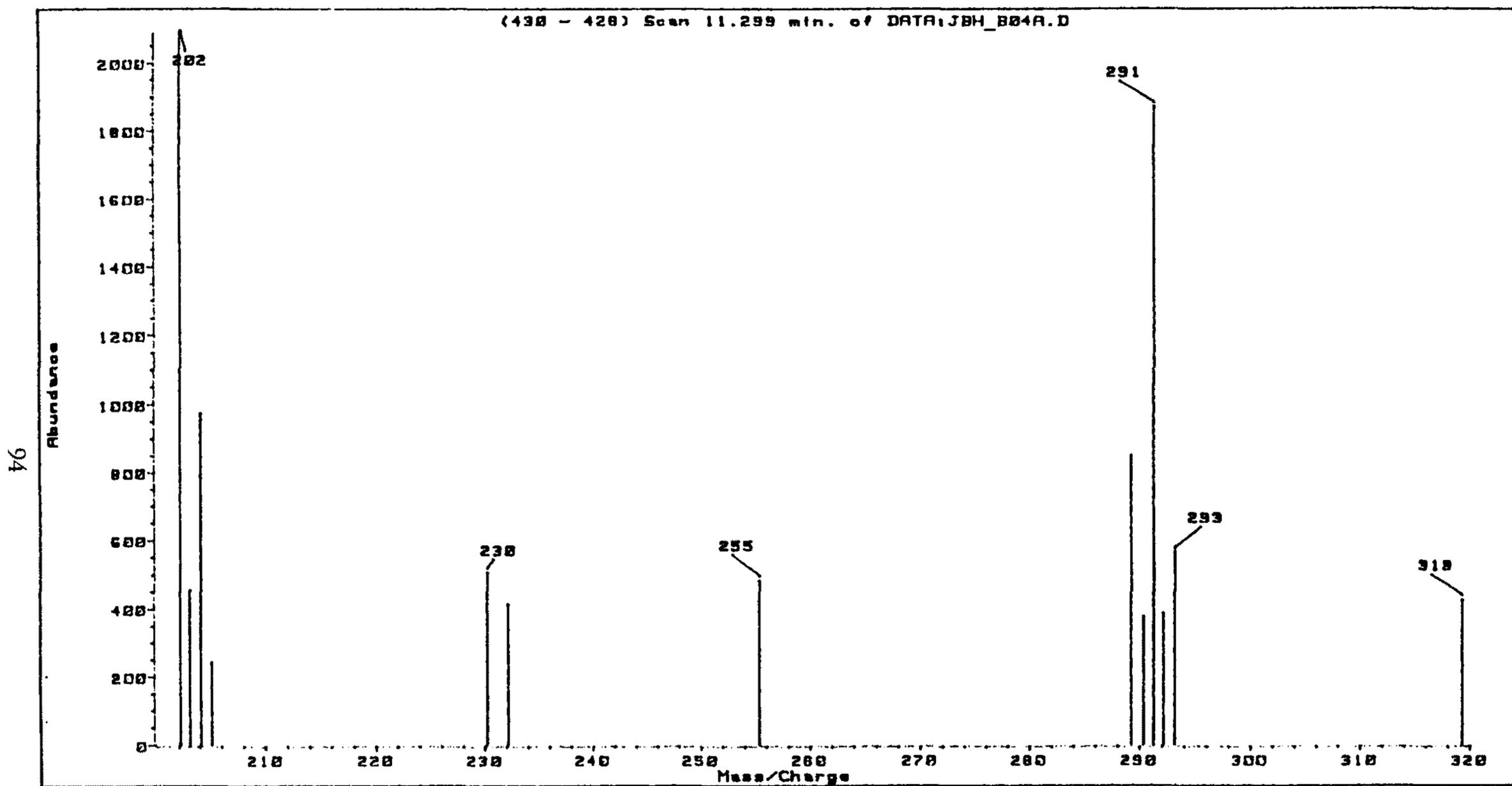


Fig.4-12. CI mass spectrum of carbinoxamine. (peak 3)

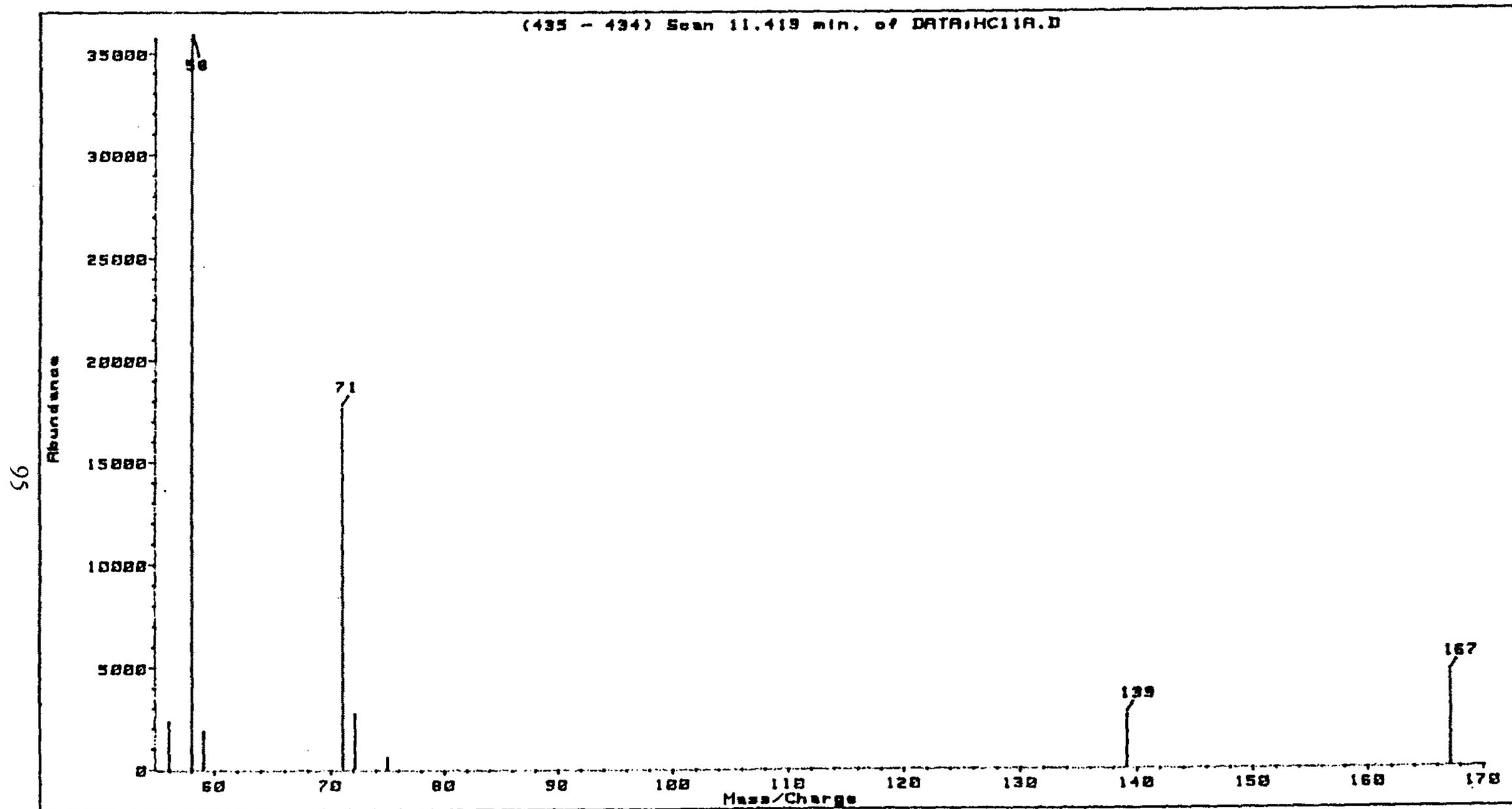


Fig.4-13. EI mass spectrum of carbinoxamine. (peak 3)

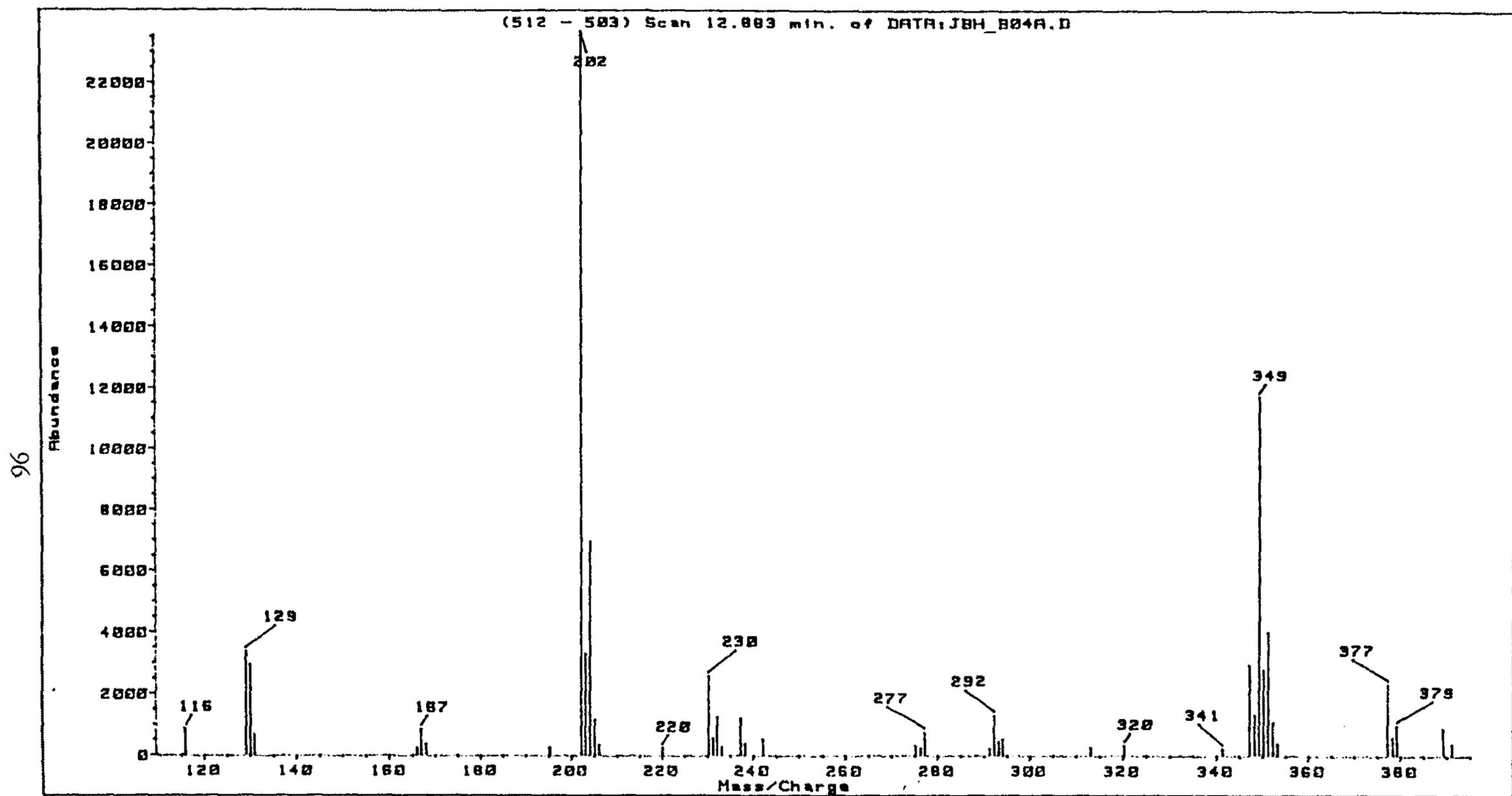
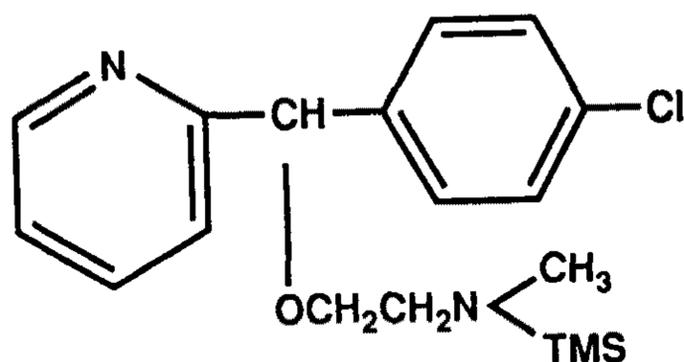
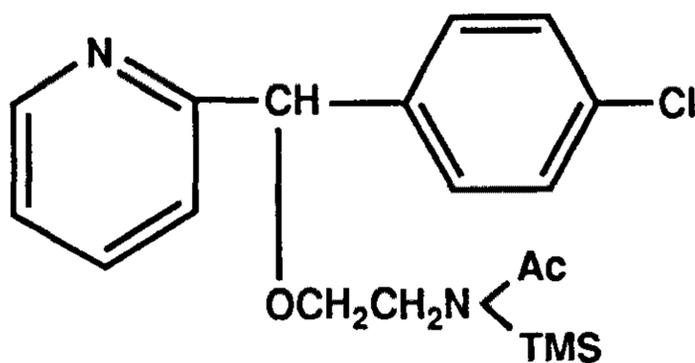


Fig.4-14. CI mass spectrum of peak 5.

의 peak 가 크게 나타나고 $[M+C_2H_5]^+$ 에 해당하는 m/z 377의 peak 가 나타난 것으로 미루어 보아 분자량은 348인 것으로 추정하였으며 이 화합물은 carbinoxamine 의 amine 에 붙어 있는 2개의 methyl기중 하나가 떨어져 나간 demethylcarbinoxamine 에 TMS가 하나 붙은 아래의 그림과 같은 형태의 화합물인 것으로 추정하였다. Maurer 등도 이 구조를 확인하였다. (Fig. 4-1) 그 EI mass spectrum 은 Fig. 4-15 에 나타내었다.



Peak 6는 CI mass spectrum (Fig. 4-16) 에서 $[M+H]^+$ 의 m/z 377 peak 와 $[M+C_2H_5]^+$ 의 m/z 405 의 peak 가 관찰되었으므로 분자량은 376 일 것으로 생각되었으며 그 분자량에 맞는 구조는 carbinoxamine 의 amine 에 붙어 있는 methyl기 2개가 모두 demethylation 되고 다시 N에 acetyl포합과 TMS 유도체화가 동시에 일어난 아래와 같은 구조의 화합물일 것으로 추정하였다. Peak 6의 EI mass spectrum 은 Fig. 4-17 에 나타내었다.



Peak 7은 CI mass spectrum (Fig. 4-18) 에서 $[M+H]^+$ 의 m/z 407의 peak 와

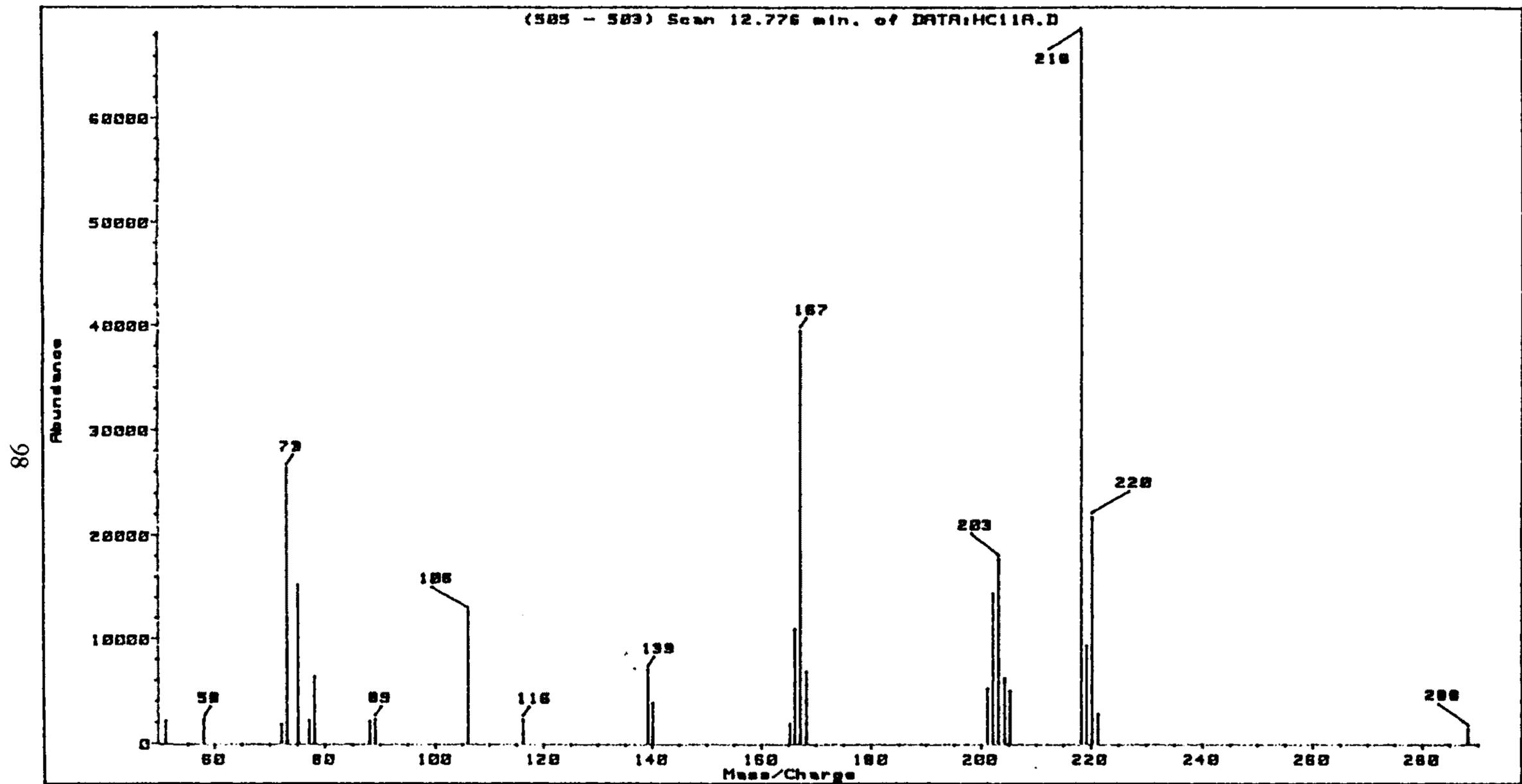


Fig.4-15. EI mass spectrum of peak 5.

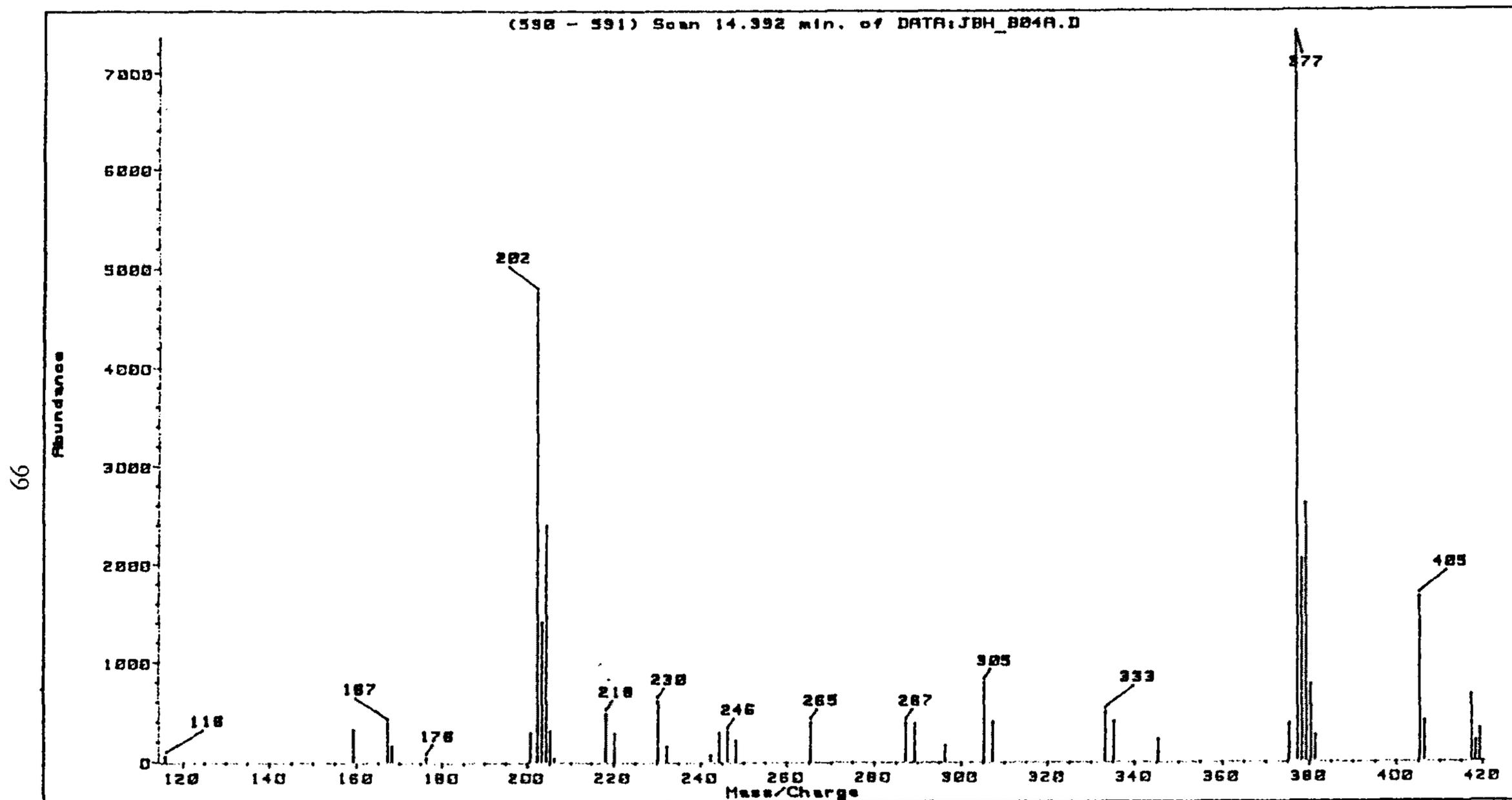


Fig.4-16. CI mass spectrum of peak 6.

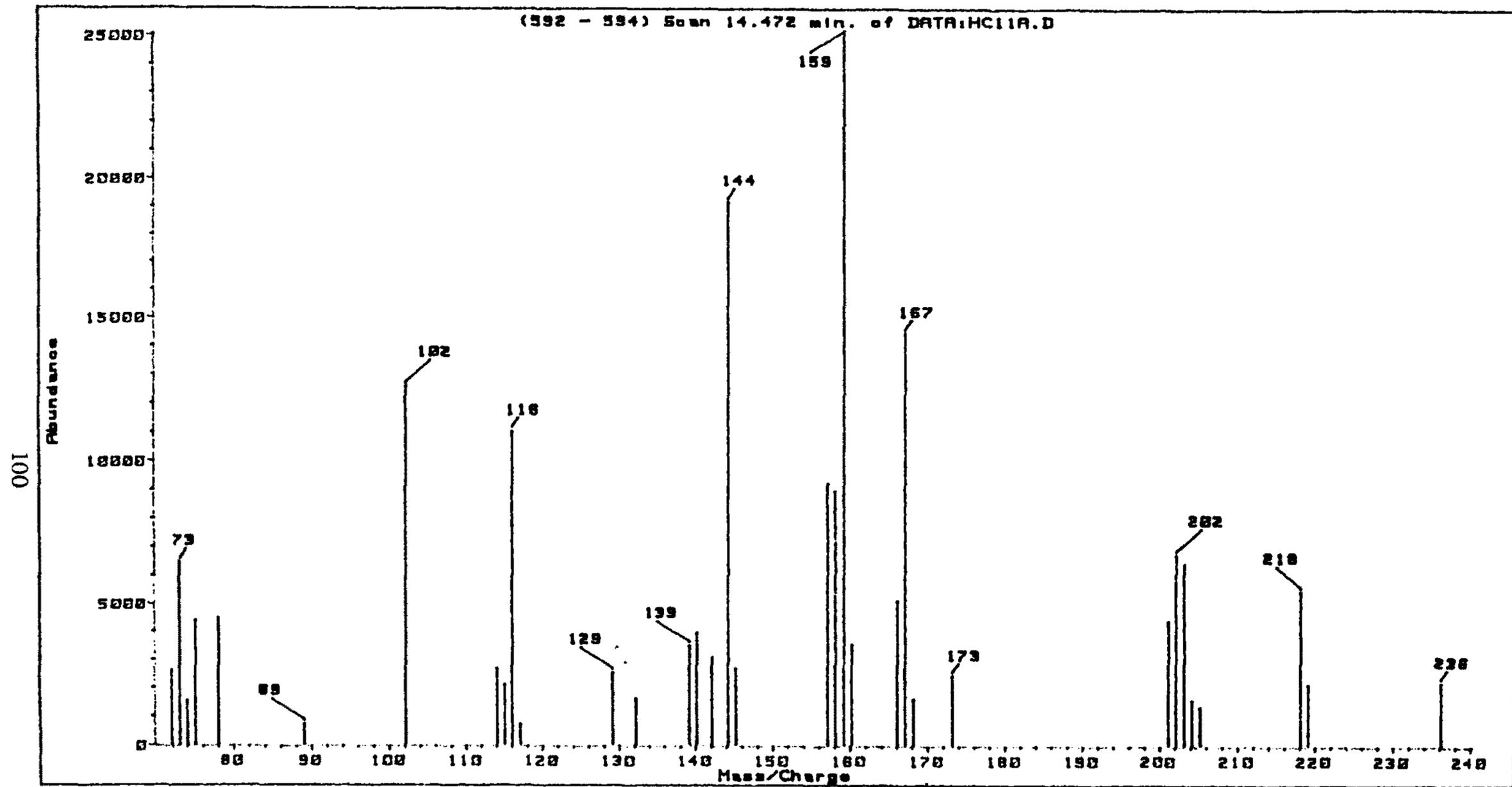


Fig.4-17. EI mass spectrum of peak 6.

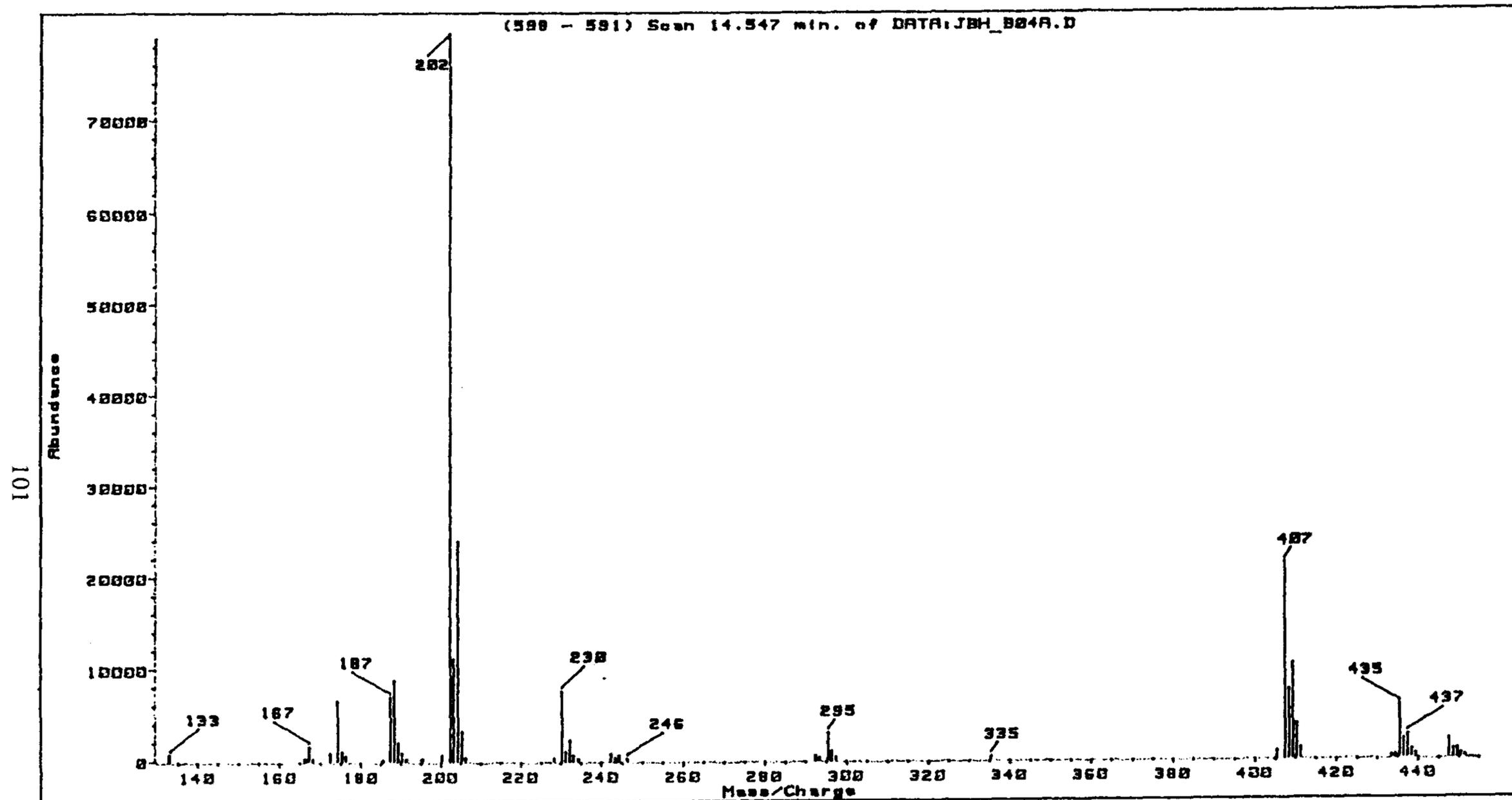
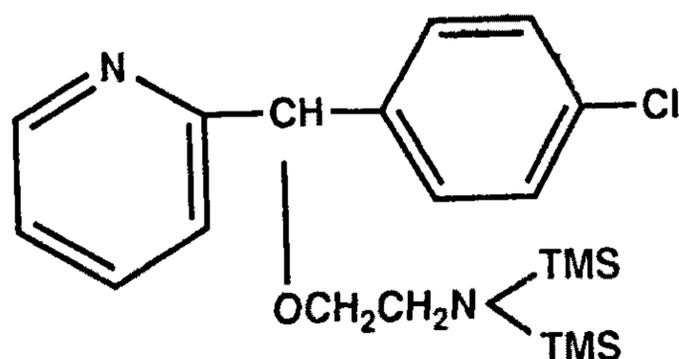


Fig.4-18. CI mass spectrum of peak 7.

[M+C₂H₅]⁺의 m/z 435의 peak가 관찰되었으므로 분자량은 406인 것으로 추정되었다. 이 분자량은 carbinoxamine의 amine에 붙어 있는 2개의 methyl기 모두가 떨어져 나간 didesmethyl carbinoxamine에 TMS 2개가 모두 붙어 있는 형태의 아래 그림과 같은 구조의 화합물일 것으로 추정되었다. EI mass spectrum은 Fig. 4-19에 나타내었다.



Peak 8(Fig. 4-20)과 peak 9 (Fig. 4-21)는 CI mass spectrum에서 보듯이 두 peak 모두 [M+H]⁺의 m/z 305의 peak와 [M+C₂H₅]⁺의 m/z 333 peak가 관찰되었다. 이로 미루어 보아 분자량은 두 peak 모두 304인 것으로 확인되었다. 이 구조중 peak 9의 EI mass spectrum(Fig. 4-23)은 Fig. 4-1의 carbinoxamine metabolite 중 (Bis-NOR carbinoxamine)AC의 mass spectrum과 일치하였다. Mauer의 실험은 유도체화로 acetylation을 하였고 본 실험은 TMS 유도체화를 하였는데도 mass spectrum이 일치하였으므로 이 구조는 carbinoxamine의 amine에 붙어 있던 methyl기 2개가 모두 demethylation되었으나 acetyl conjugation은 하나만 된 아래의 구조와 같은 화합물일 것으로 생각되었다. Peak 8의 구조는 확인하지 못하였으며 그 EI mass spectrum은 Fig. 4-22에 나타내었다.

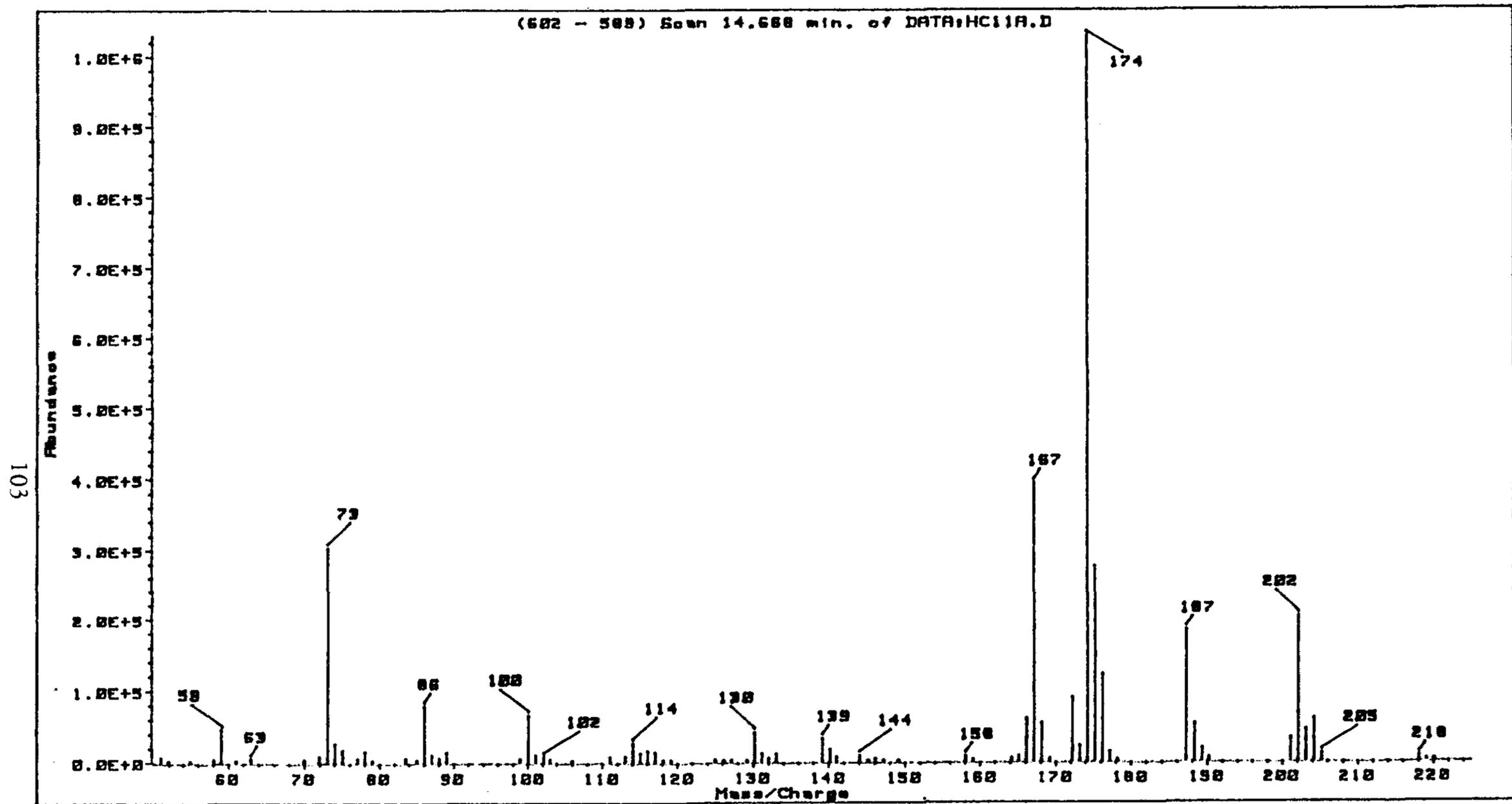


Fig.4-19. EI mass spectrum of peak 7.

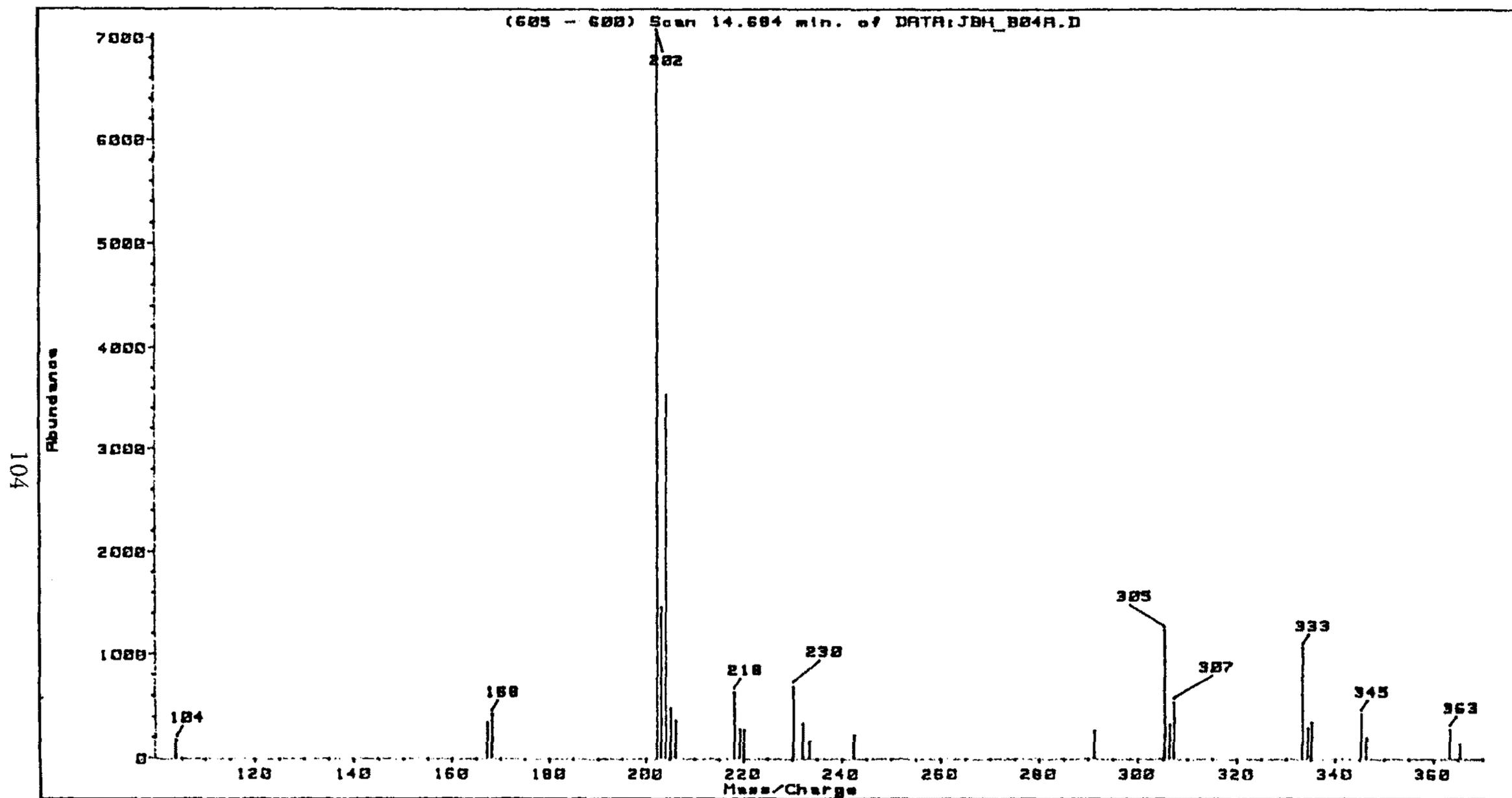


Fig.4-20. CI mass spectrum of peak 8.

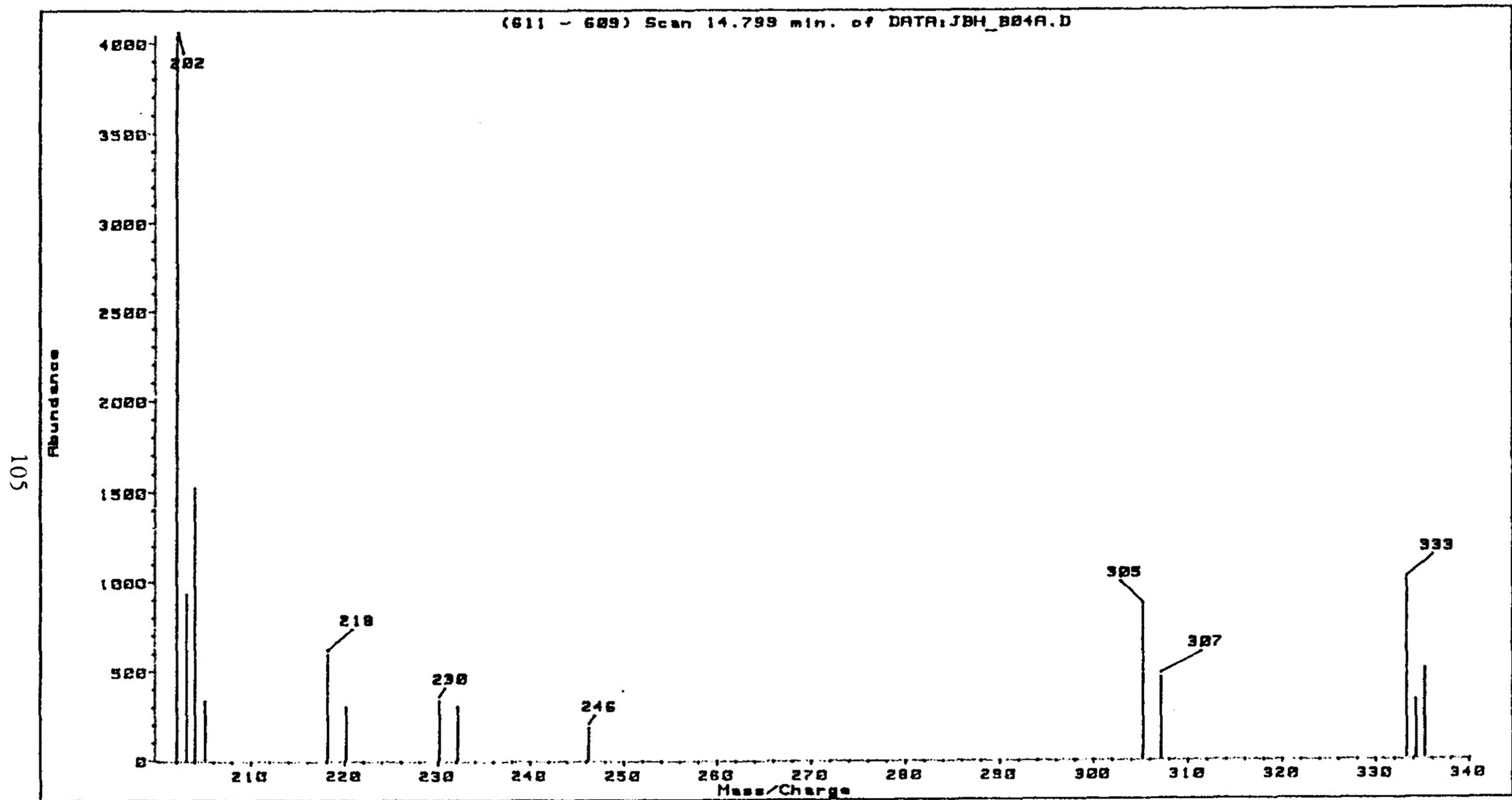


Fig.4-21. CI mass spectrum of peak 9.

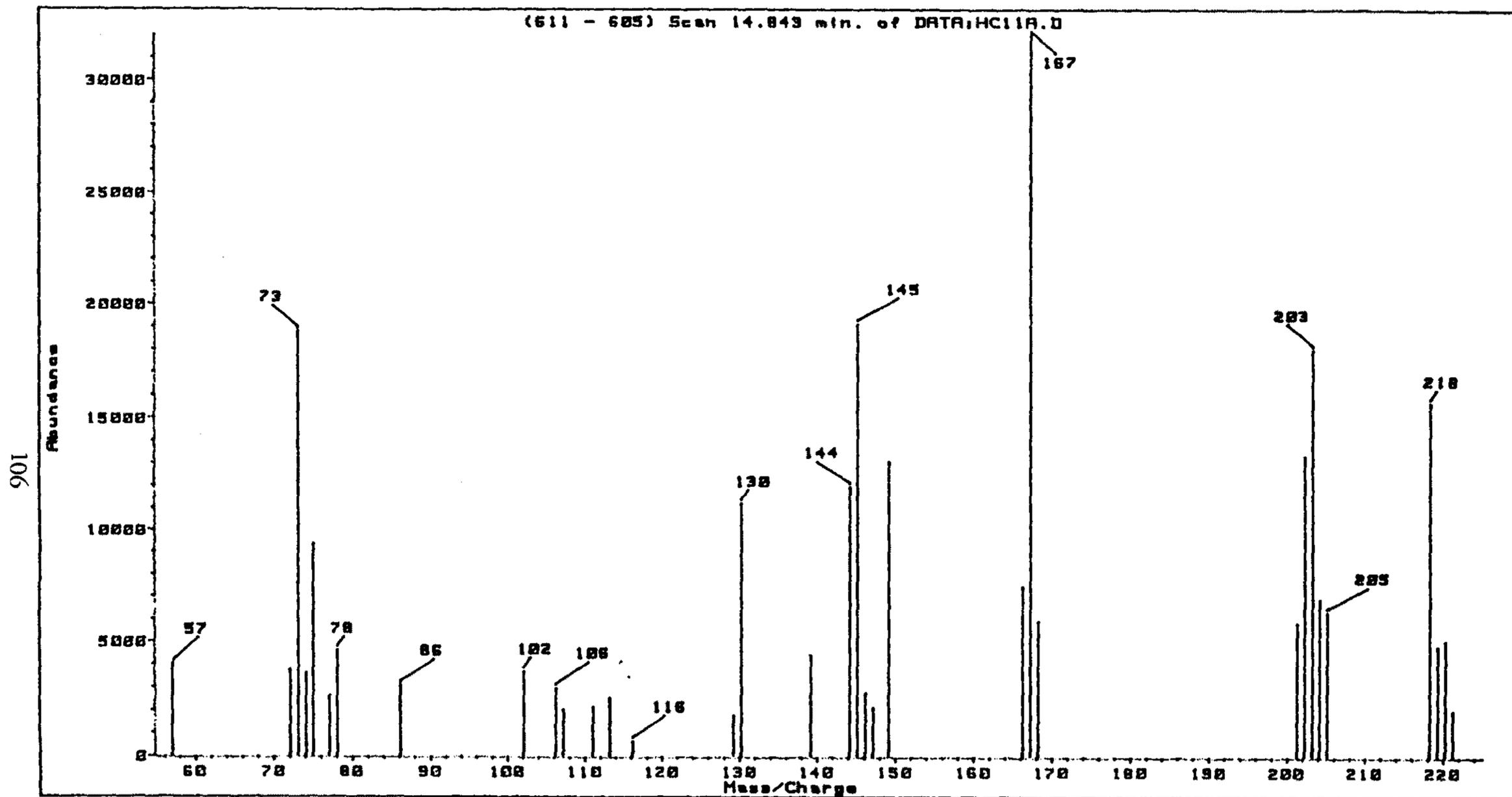


Fig.4-22. EI mass spectrum of peak 8.

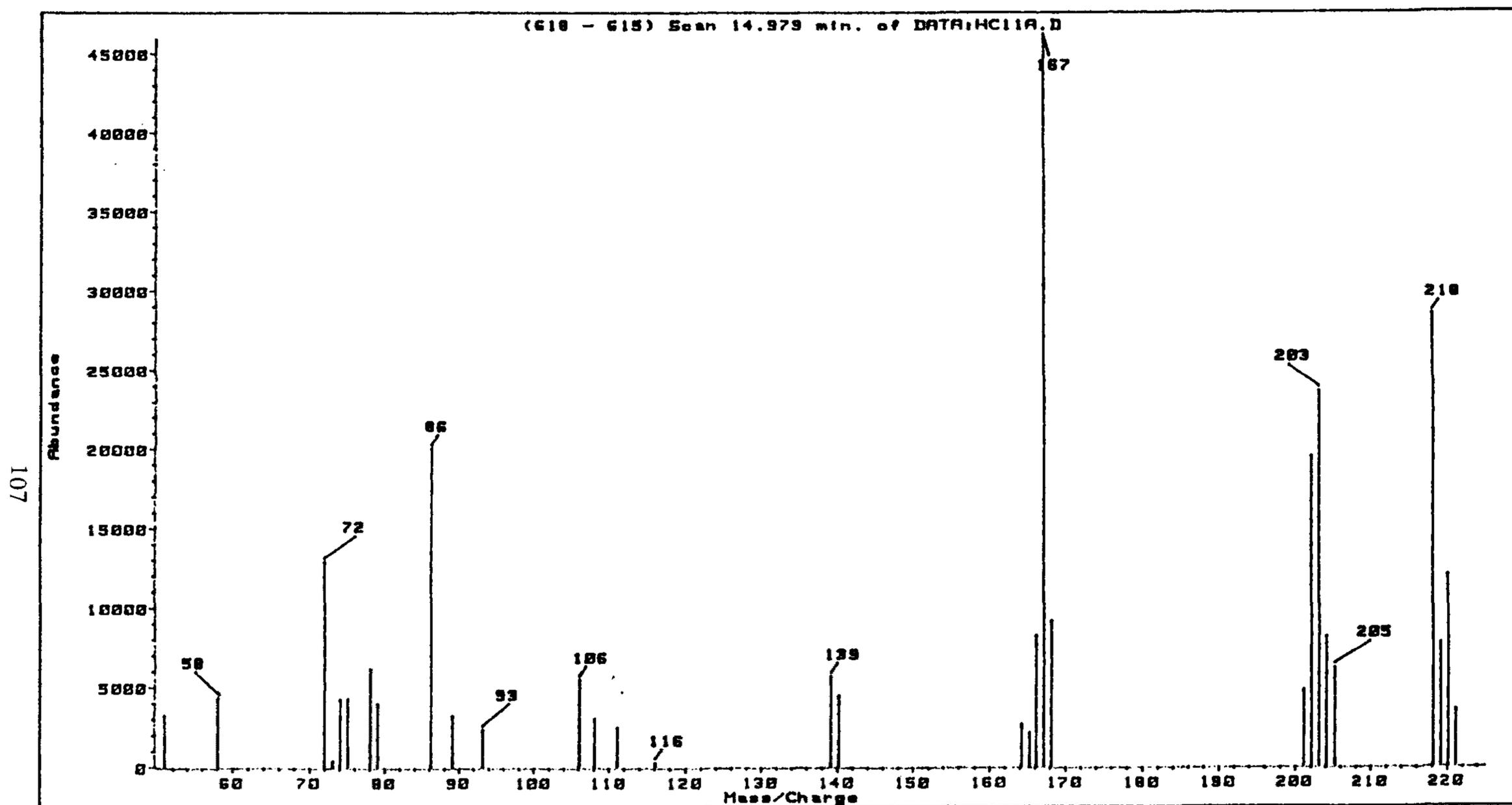
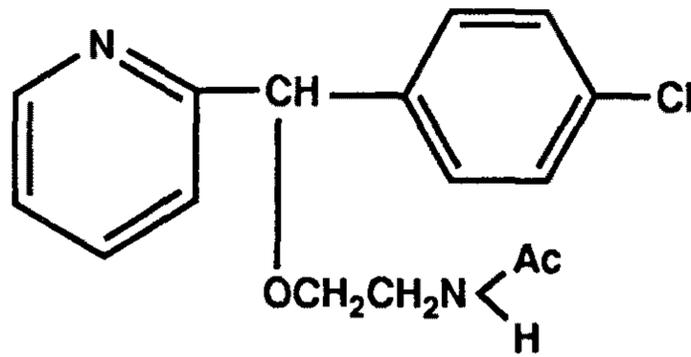
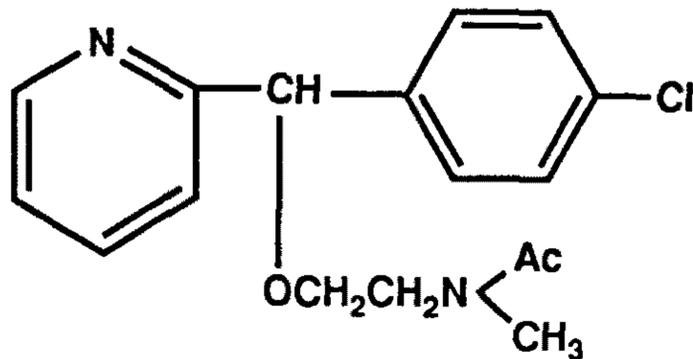


Fig.4-23. EI mass spectrum of peak 9.



Peak 10은 Fig. 4-24 의 CI mass spectrum 에서 보듯이 $[M+H]^+$ 에 해당하는 m/z 319와 $[M+C_2H_5]^+$ 에 해당하는 m/z 347의 peak 가 나타났으므로 분자량 318을 갖는 아래의 구조의 화합물일 것으로 추정하였다.



Carbinoxamine 의 amine 에 붙어있는 2개의 methyl 기중 하나만이 떨어져 나가 demethylation 된 후 여기에 acetyl conjugation 이 된 형태의 화합물이 분자량 318 이므로 위의 구조의 분자량과 일치하였으며 Fig. 4-1 의 carbinoxamine metabolite 중 (Nor-carbinoxamine) AC 의 mass spectrum 과 일치함을 확인하였다. EI mass spectrum 은 Fig. 4-25 에 나타내었다.

Peak 11은 Fig. 4-26의 CI mass spectrum 에서 $[M+H]^+$ 의 m/z 509 peak와 $[M+C_2H_5]^+$ 의 m/z 537 peak 가 나타나 분자량은 508로 확인하였으나, 그 구조는 추정하지 못하였다. Peak 11의 EI mass spectrum 은 Fig. 4-27 에

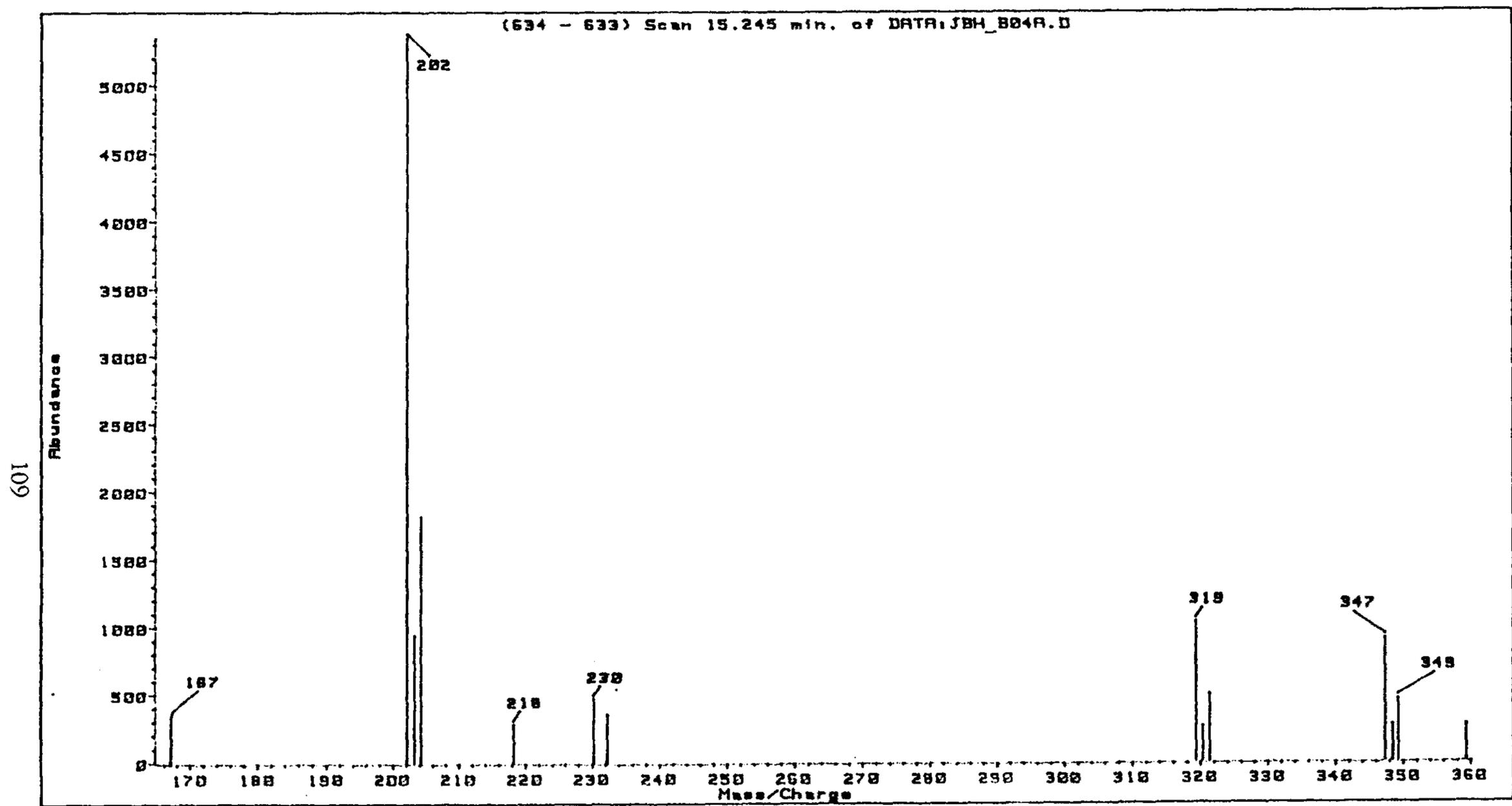


Fig.4-24. CI mass spectrum of peak 10.

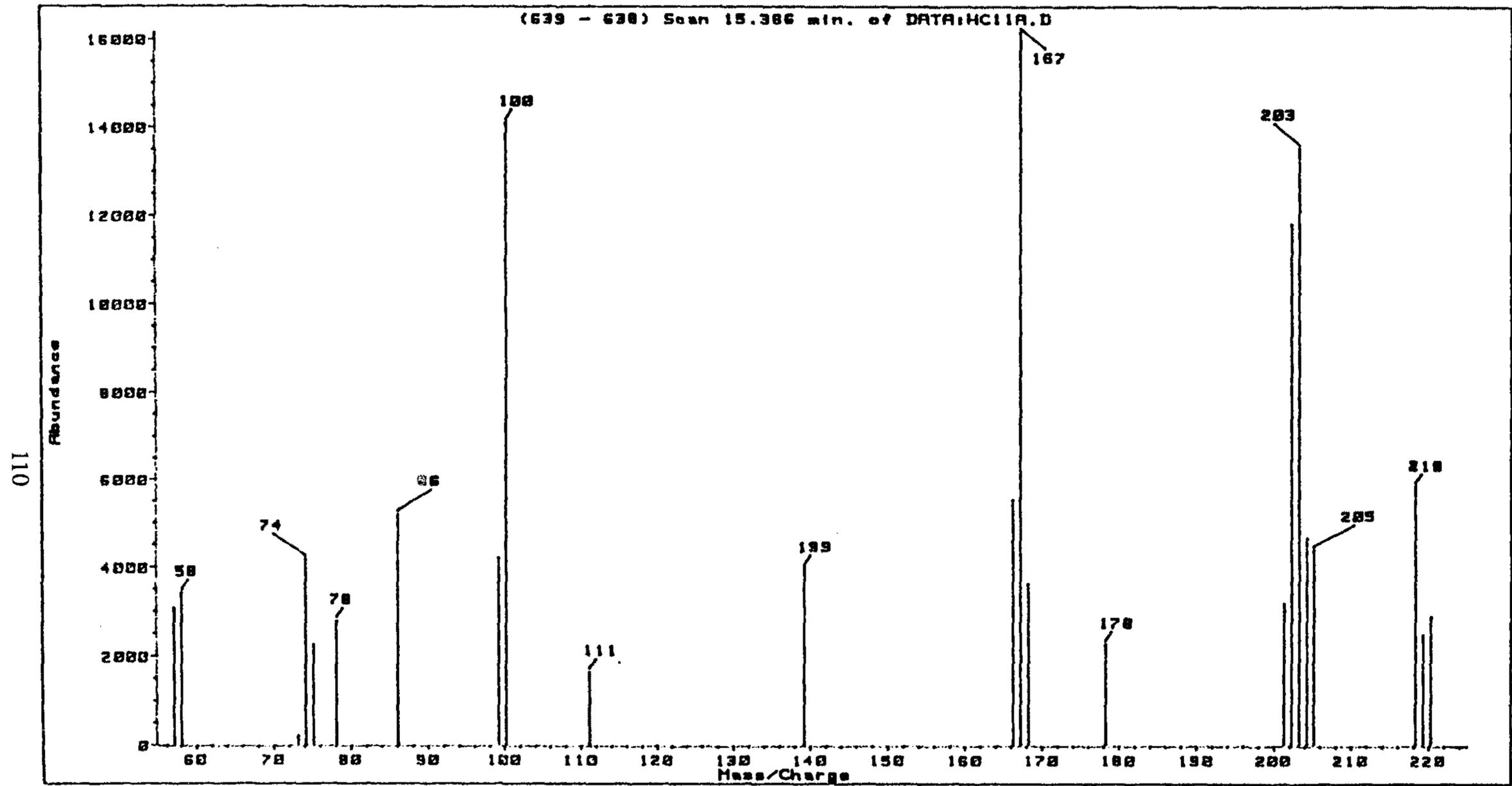
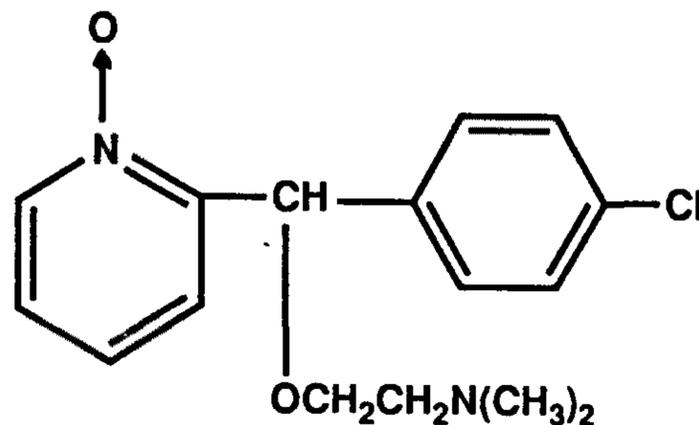


Fig.4-25. EI mass spectrum of peak 10.

나타내었다.

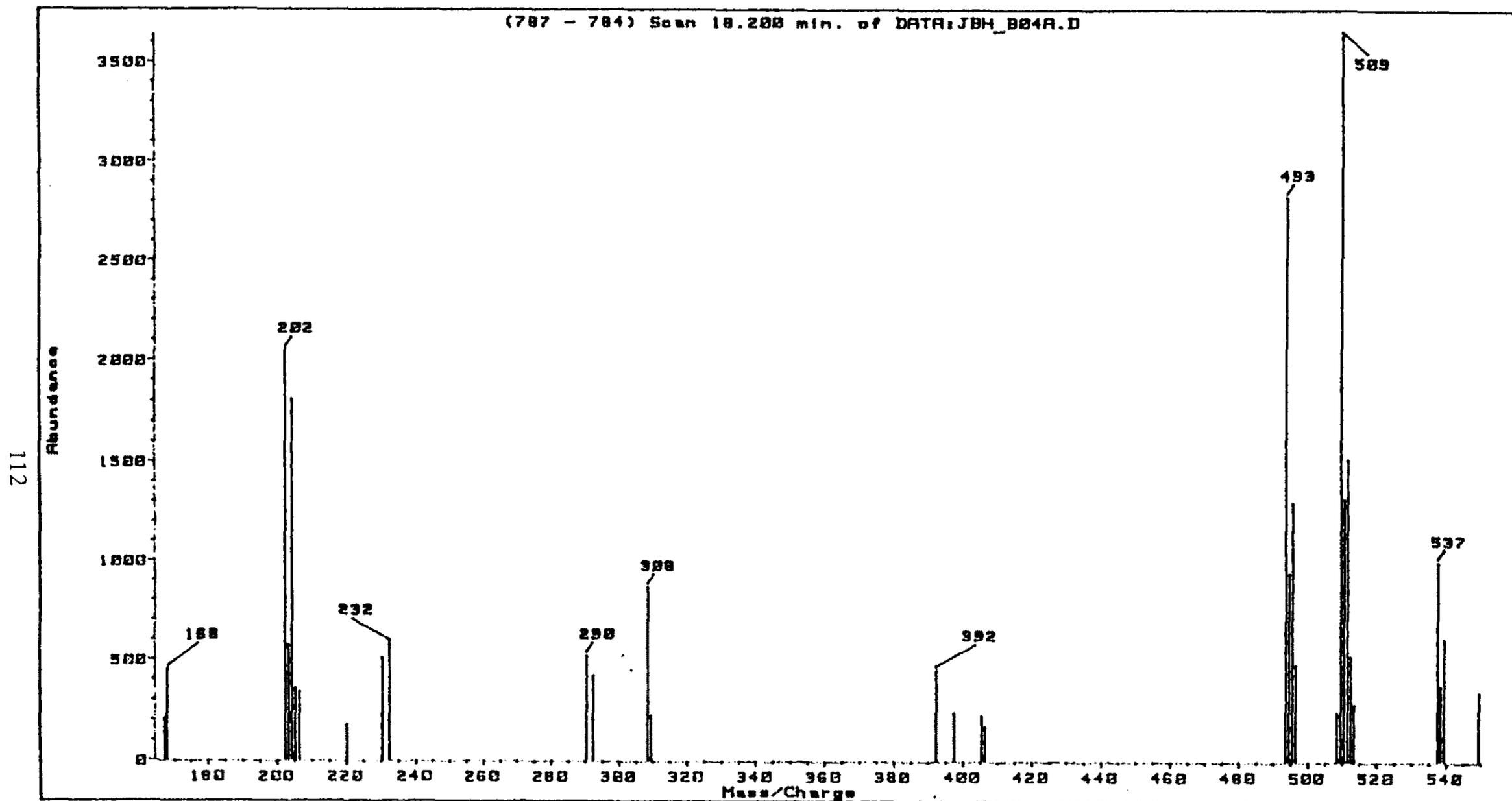
위의 11개의 peak 외에 carbinoxamine 의 pyridine ring 의 N 위치에 N-oxide form 을 형성하는 아래의 그림의 구조를 갖는 대사체가 생성될 수 있다는 가능성도 생각해 보았으나 그 자체로는 CI 나 EI mass spectrum 에서 확인되지 않았는데 이는 carbinoxamine 의 N-oxide 는 GC의 injection port 에서 쉽게 분해되어 다시 원래의 carbinoxamine 으로 되돌아가기 때문일 것으로 생각된다.

위의 결과와 고찰을 정리하여 Table 4-2 에 나타내었다.



Carbinoxamine 의 free fraction을 분석한 후 남은 수층을 β -glucuronidase 로 hydrolysis 시켜 conjugated fraction 을 얻은 후 유도체화하여 분석하여 보았으나, conjugated fraction 에서는 blank urine 에서 발견되지 않는 peak 를 관찰할 수 없었다. (Fig. 4-28)

위의 고찰을 토대로 하여 carbinoxamine 의 rat urine 에서의 metabolic pathway 를 제시하여 Fig. 4-29에 나타내었다.



112

Fig.4-26. CI mass spectrum of peak 11.

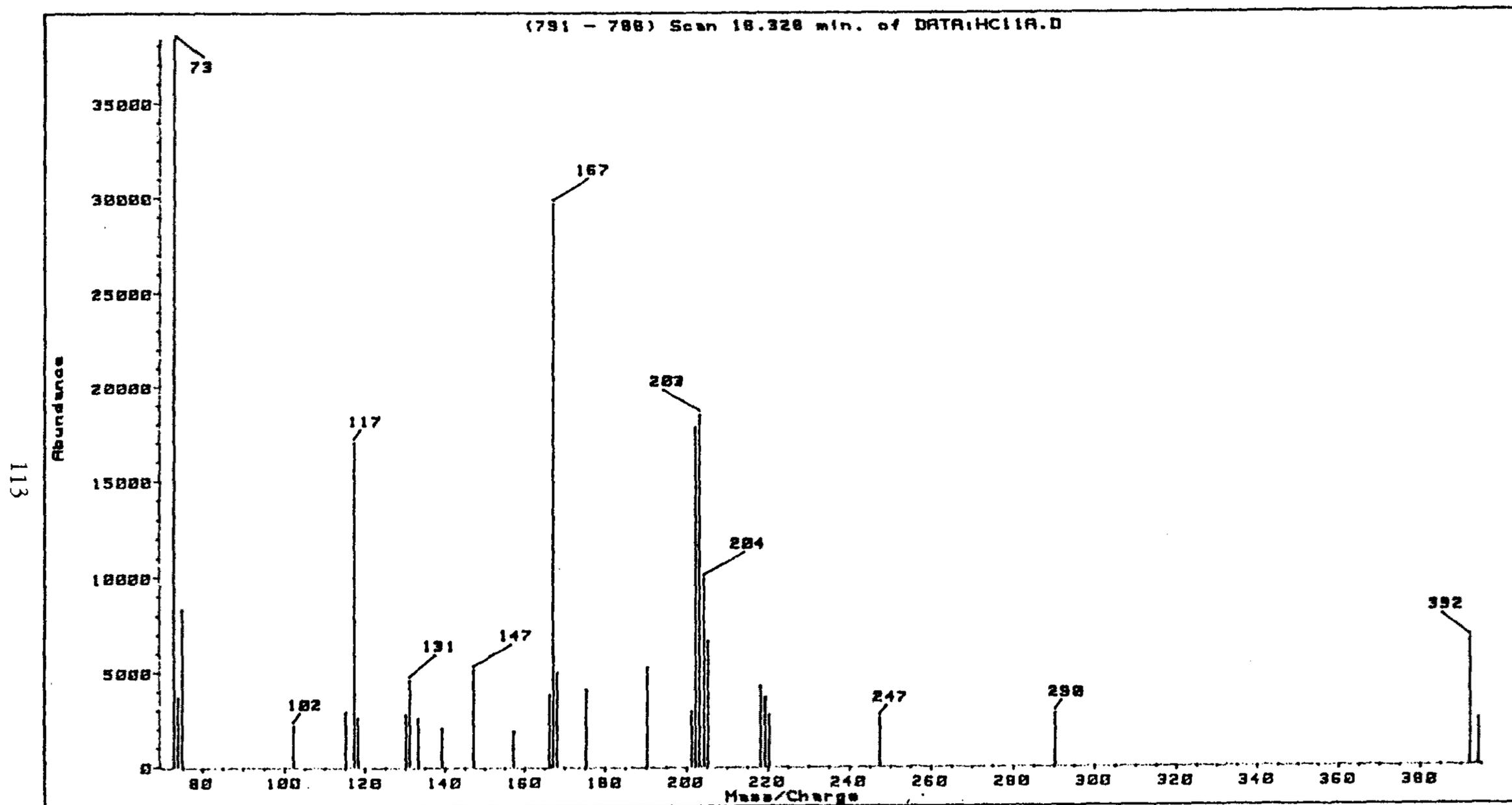


Fig.4-27. EI mass spectrum of peak 11.

Table 4-2. The structure and molecular weight of carbinoxamine and its metabolites.

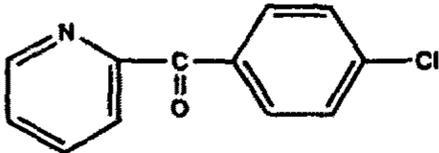
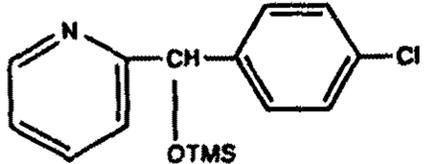
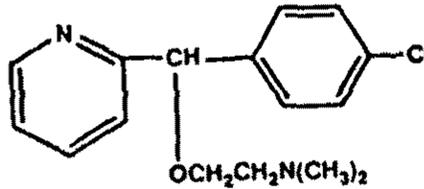
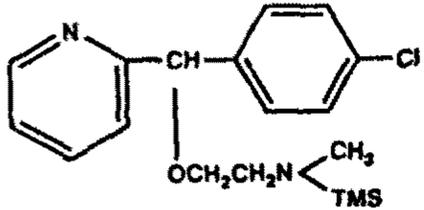
Peak No.	Metabolic Pathway	Molecular Weight	Structure	Remarks
1		217		
2	*O-demethylation	291		
3	Parent drug	290		Carbinoxamine
4		291		NI
5	*Demethylation	348		

Table 4-2. Continued.

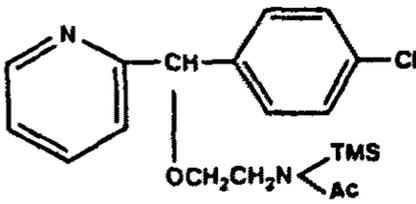
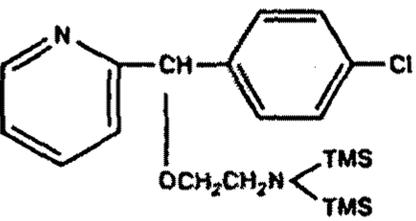
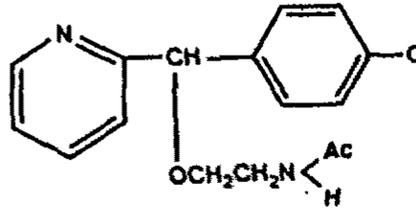
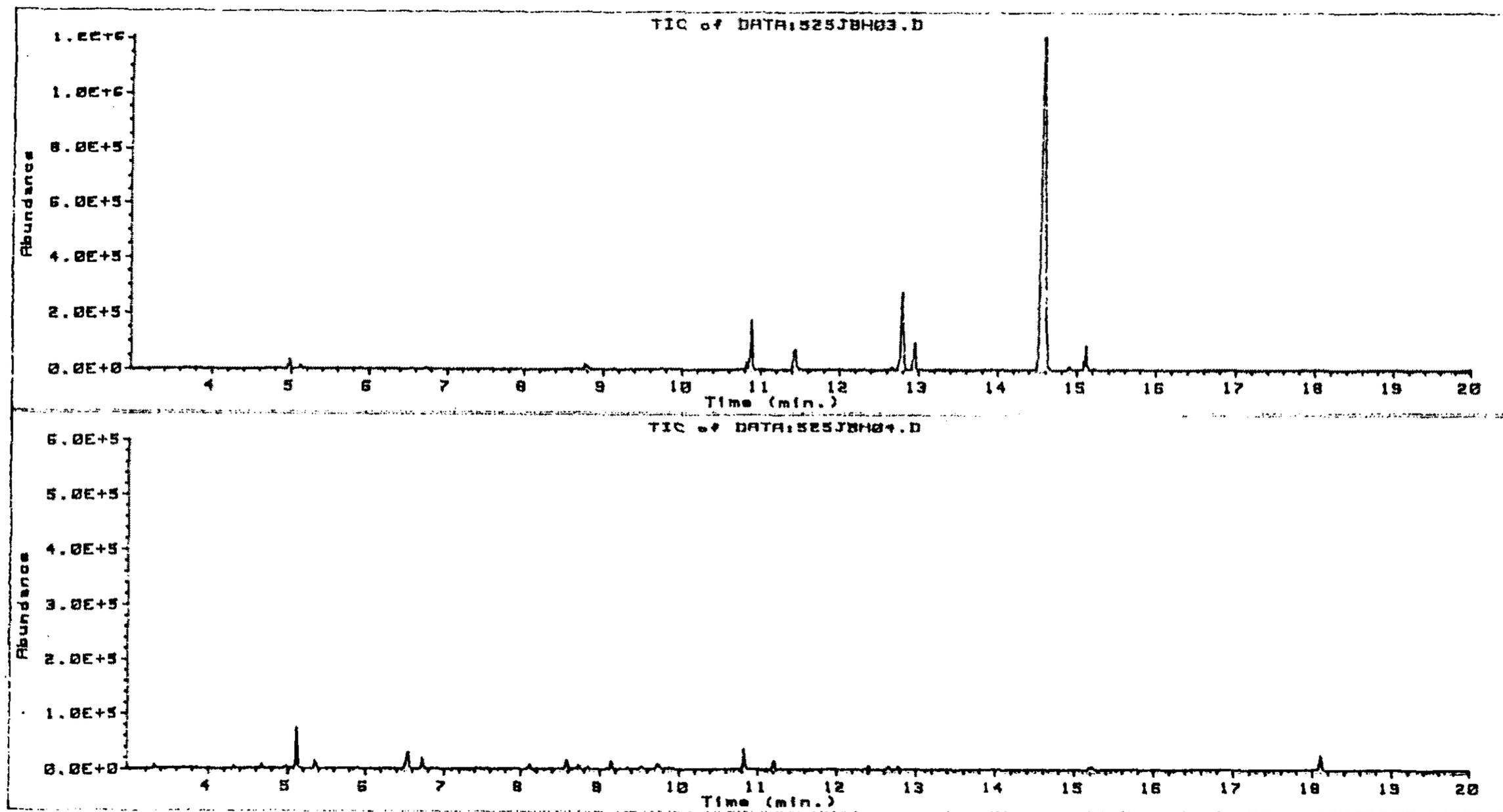
Peak No.	Metabolic Pathway	Molecular Weight	Structure	Remarks
6	*Didemethylation + acetyl conjugation	376		
7	*Didemethylation	406		
8		304		NI
9	Didemethylation + acetyl conjugation	304		

Table 4-2. Continued.

Peak No.	Metabolic Pathway	Molecular Weight	Structure	Remarks
10	Demethylation + acetyl conjugation	318		
11		503		NI
ND	N-oxide formation	306		NI

ND : Not detected
 NI : Not identified
 *TMS derivatized



117

Fig.4-28. Total ion chromatogram of conjugated fraction in rat urine.
A : Blank urine. B : Urine collected for 24 hrs.

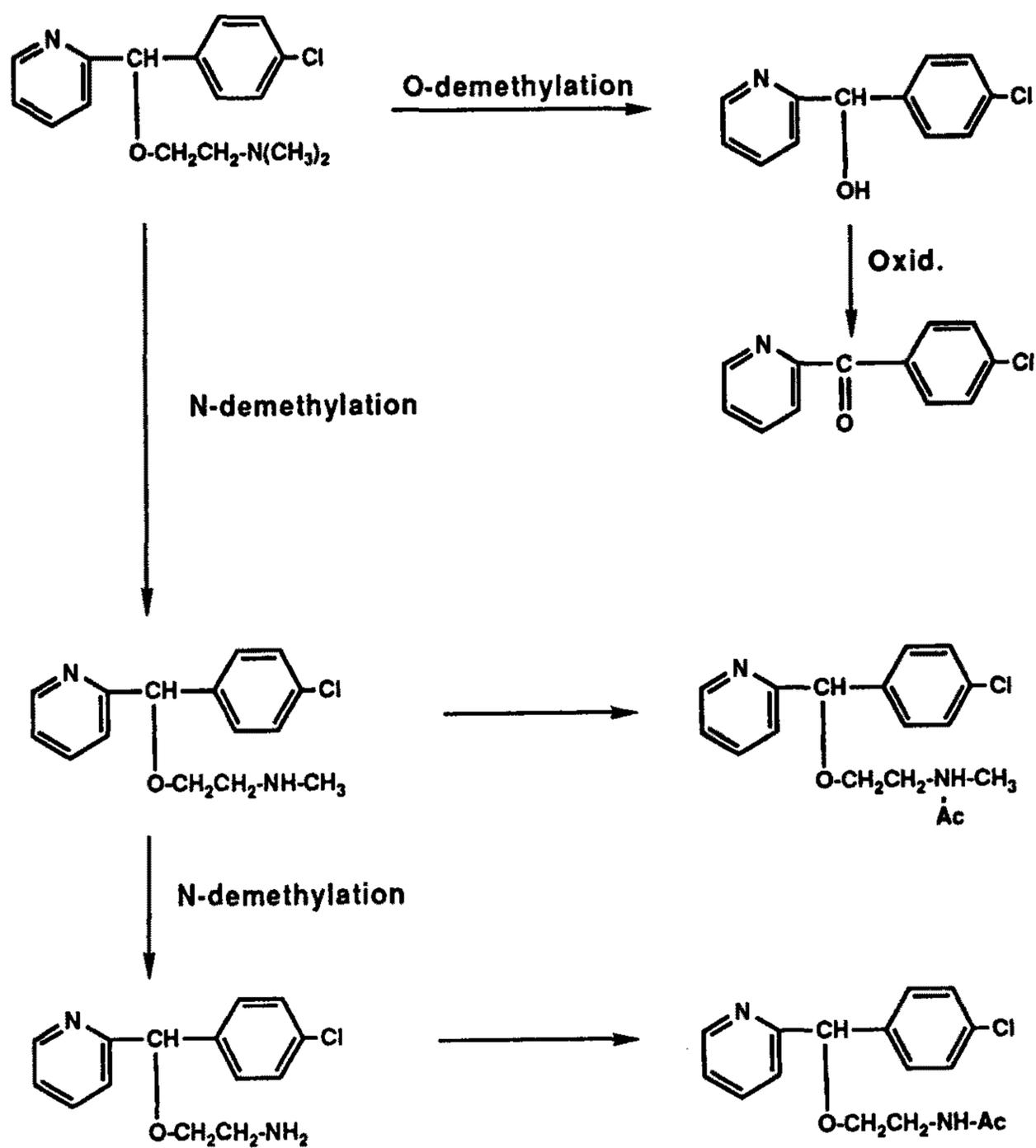


Fig.4-29. Expected metabolic pathway of carbinoxamine in rat urine

제 4 절 결론

1. Carbinoxamine 을 rat에 경구로 투여한 후 24시간 동안 urine 을 채취하고 GC-MSD 의 EI mass spectrum 과 CI mass spectrum 을 분석한 결과 free fraction에서 는 blank urine 에서 발견되지 않은 11개의 peak 를 발견할 수 있었다.
2. 각 peak 의 CI mass spectrum 과 EI mas spectrum 을 근거로 하여 그 분자량을 확인하고 구조를 추정한 결과 carbinoxamine 은 rat urine 에서 O-demethylation, N-demethylation, N-N-didemethylation 된 형태로 urine 으로 배설되며 demethylation 이 된 후 에는 acetyl conjugation 되어 acetyl conjugate 도 형성되는 것으로 생각 되었다. 또한 pyridine 의 N에 N-oxide form 을 형성하는 형태의 대사체가 생성될 수도 있다고 생각되었으나 이는 GC로는 확인하기가 어려워 다른 기기에 의한 확인작업을 수행중에 있다.
3. Carbinoxamine 을 경구투여한 rat urine 의 conjugated fraction 에서는 blank urine 에서 발견되지 않는 peak 를 발견할 수 없었다.

References

1. E.B. Hansen Jr., R.H. Hellich, W.A. Korfmacher, D.W. Miller, and C.E. Cerniglia. : Microbial transformation of antihistaminic drug, triprolidine hydrochloride. *J. Pharm. Sci.* , 77, 259-264 (1988).
2. E.B. Hansen Jr., T.A. Getek, and W.A. Korfmacher. : Application of HPLC-thermospray ionization Mass Spectrometry for the analysis of triprolidine and its metabolite hydroxymethyltriproclidine in biological sample. *J. Anal. toxicol.* 13, 185 (1989).
3. R.L. Deangelis, M.F Kearney and R.M. Welch. : Determination of triprolidine in human plasma by quantitative TLC. *J. pharm. Sci.*, 66, 841 (1977).
4. R.R. Ison and A.F. Casy : Structural influences upon antihistamine activity : 3-amino-1-aryl-(2-pyridyl) propens and related compound. *J. Pharm. Pharmacol.*, 23, 848-856 (1971).
5. A.F. Green. *Br. J. Pharmacol.*, 8, 171 (1953).
6. E.L. Becker, I. Mota, and D. Wang. *Br. J. Pharmacol.*, 34, 330 (1968).
7. F. Glassow. *Br. Med. J.*, 1, 217 (1970).
8. H.P. Wasserman. *Dermatologica*, 130, 201 (1965).
9. A.S.E. Fowle, D.T.D. Hughes, and S.J. Knight. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 3, 215 (1971).
10. W.W. Fike and I. Sunshine. *Anal. Chem.*, 37, 127 (1965).
11. J.W.A. Findlay, R.F. Butz, G.G. Coker, R.L. Deangelic, and R.M. Welch. : Triprolidine radioimmunoassay Disposition in Animals and Humans. *J. Pharm. Sci.*, 73(10), 1339 (1984).
12. R.Kuzman, E. Sernatinger, I. Tsai, and A. Klutch : *Am Importance of fundamental*

- principles in drug evaluation* D. Tedeschi, R. Tedeschi Eds., Raven New York, pp 87-103 (1968).
13. B.H. Jung, K.D. Eom, Y.S. Yoo, B.C. Chung and J.S. Park. : Metabolism of triprolidine in rat. *Yakhak Hoeji*. 36(1), 26-36 (1992).
 14. T.J. Haley. : Physical and biological properties of pyrrolamines. *J. Pharm. Sci.*, 72, 3 (1983).
 15. W. Lijinsky, M. D. Renber, and B.N. Blackwell.. : Liver tumors induced in rats by oral administration of the antihistamine Methapyrilene hydrochloride, *Science*, 209(15), 817-819 (1980).
 16. F.R. Althaus, S.D. Lawrence, G.L. Sattler, and H.C. Pitot. *Mut. Res.*, 103, 213-218 (1982).
 17. W. Lijinsky and G.M. Muschik. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 103, 69-73 (1982).
 18. W. Lijinsky, and P.M. Kovatch. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 111, 71-74 (1986).
 19. M. Habs, P. Shubik, and G. Eisenbrand. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 111, 71-74 (1986).
 20. "The merck index", 9th ed., M. Windholz, Ed., Merck and Co., Rahway, N.J., (1976).
 21. Drug information : Published by Authority of the board of directors of the American Society of Hospital Pharmacist (1989).
 22. 의약품의 약동학·대사에 관한 연구. 제 2차년도 보고서 67, 과학기술처 (1991).
 23. F.C. Copp : Improvements in or relating to the production of quaternary phosphonium compound. *Br. pat.* No. 1161201 (1969).
 24. G. Wittig, H. Egger, P. Duffner : New syntheses of cyclopolyenes. VI. Benzocycloheptatriene, benzocyclooctatriene, and benzocycloocta-tetrane. *Ann.* 619,

- 10-27 (1958).
25. J.T. Connell, A.J. Gold, E.M. Zola, and C.L. Paule. : Efficacy of a timed release antihistamine/decongestant tablet for symptoms of nasal allergy. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 18(3) 244-7 (1984).
 26. V. Barouch, A. Dall, D. Patel and G. Hite. : Stereochemical aspects of antihistamine action 4² absolute configuration of carbinoxamine antipodes, *J. Medicinal Chemistry.* 834 (1971).
 27. K. Wurmli. *Pharm. Acta Helv.*, 200 (1973) .
 28. R.B. Mack N.C. *Med. J.*, 648 (1981).
 29. H.J. Wagner. *Drug Res.*, 1065 (1962) .
 30. D.C.G. Skegg, S.M. Richards and R. Doll. *Br. Med. J.*, 917 (1979) .
 31. P. Rodewald and E. Milsmann. *Pharm. Ztg.*, 2035 (1986) .
 32. F. Pellerin and H. El Makkawi. *Ann. Pharm. Fr.*, 421 (1971).
 33. L.V. Meyer. *Dissertation*. Friedrich-Alexander-Universitat, Erlangen-Nurnberg, (1975).
 34. L.V. Meyer and G. Hauck. *Beitr. Gerichtl. Med.*, 129 (1976).
 35. A. Cailleux, A. Turcant, A. Premel-Cabic and P. Allain. *J. Chromatogr. Sci.*, 163 (1981) .
 36. S.H. Curry, E.A. Brown, O.Y.-P. Hu and J.H. Perrin. *J. Chromatogr.*, 361 (1982).
 37. I. Jane, A. McKinnon and R.J. Flanagan. *J. Chromatogr.*, 191 (1985).
 38. T. Chang, R.A. Okerholm and A.J. Glazko. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 2083 (1974) .
 39. W. Gielendorf and K. Schubert. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 485 (1981).
 40. M. Erkens, in W. Arnold and K. Puschel (Editors), *Entwicklung und Fortschritte der*

Forensischen Chemie. Verlag Helm, Heppenheim. 340 (1982).

41. D.J. Hoffman, M.J. Leveque and T. Thomson. : Capillary GLC Assay for carbinoxamine and hydrocodone in human serum using nitrogen-sensitive detection. *J Pharm Sci.*, 1342 (1983).
42. H. Maurer and K. Pflieger. : Screening procedure for the detection of alkanolamine antihistamines and their metabolites in urine using computerized gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 43 (1988).