

## 흰쥐 간 Microsome 효소에 의한 Tranlycypromine 으로부터 Cinnamaldehyde 의 생성

홍석길·강건일

숙명여자대학교 약학대학

(Received March 26, 1990)

### Formation of Cinnamaldehyde from Tranlycypromine by Rat Liver Microsomes

Suk Kil Hong and Gun Il Kang

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — In order to clarify mechanism of the formation of cinnamaldehyde (CNA) in incubation mixtures of tranlycypromine (TCP) with rat liver microsomes, the CNA formed under various incubation conditions were analyzed. For the purpose, HPLC method of the analysis of CNA was developed.

The formation of CNA was found to be dependent on the incubation time and the amounts of microsomes added. In addition, exclusion of NADPH or NADP of NADPH-generating system in incubation mixtures resulted in the formation of markedly decreased amounts of CNA to 8.5 and 2.4%, respectively, relative to the amounts formed each in a standard system. The small amounts measured were comparable to those formed by incubation without microsomes or with boiled microsomes.

The results clearly suggested that CNA is a metabolic product of TCP by rat liver microsomes though further studies are needed to suggest details of the steps to the formation of CNA from TCP and of the enzymatic entities involved in the formation of CNA.

**Keywords** □ Tranlycypromine, cinnamaldehyde, rat liver microsomes, HPLC.

Tranlycypromine (*trans-dl*-2-phenylcyclopropylamine)은 모노아민 산화효소(MAO, EC 1.4.3.4)의 자살억제제<sup>1)</sup>로 뇌중 norepinephrine, dopamine, serotonin 과 같은 신경전달물질의 농도를 증가시킴으로써 항우울작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 이 약물은 MAO 억제에 기인한 부작용에도 불구하고 정신과 영역에서 널리 사용되고 있으나<sup>3)</sup> 약물의 활성 및 독성을 파악하는데 필수적인 대사연구는 그리 되어 있지 않다.

흰쥐를 사용한 tranlycypromine 의 *in vivo* 대사연구에서 Alleva<sup>4)</sup>는 hippuric acid 를, 그리고 저자 등의 연구실에서 N-acetyltranlycypromine 과 phenyl-hydroxylated N-acetyltranlycypromine 의 glucuronide conjugate 를 검출한 바

있고<sup>5)</sup> Baker 등<sup>6)</sup>에 의하여 ring-hydroxytranlycypromine 이 대사산물로 보고되었다. *In vivo* 대사산물에서 관찰된 산화대사 과정의 중요성에 착안하여 저자 등에 의해 최초로 행해진 microsome 효소에 의한 대사연구에 의하면<sup>7)</sup> tranlycypromine 은 화학적 분해과정에 의해 hydrocinnamaldehyde 로 변환되며 이로부터 대사과정에 의해 cinnamaldehyde 와 hydrocinnamyl alcohol 이 생성되고 또한 계속 대사산물로서 acetophenone, benzaldehyde, benzoic acid 및 benzyl alcohol 이 형성됨을 보고하였다. 이 중 cinnamaldehyde 는 화학적 분해산물인 hydrocinnamaldehyde 가 대사에 의하여 benzylic oxidation 되고 그후 탈수과정에 의해 형성되는 것으로 생각되며 공 실험에서 관찰된 미량

의 cinnamaldehyde는 hydrocinnamaldehyde로부터 공기 중 자동산화과정에 의하여 생성되는 것으로 추정하였다.

주요 *in vitro* 대사산물로 검출된 cinnamaldehyde는 tranlycypromine의 약리 독성면에서 중요시 되리라 생각된다. Cinnamaldehyde의 aldehyde기는 생체내 화합물의 아미노기와 Schiff 염기를 형성할 수 있을 뿐만 아니라<sup>8,9)</sup> 이중결합에 thiol기와 같은 친핵성기가 1,4-첨가됨으로써 단백질 포함체를 형성하여 접촉성 감각제로서 작용할 가능성도 있다. 또한 cinnamaldehyde는 glutathione과의 S-conjugation 대사산물로서 mercapturic acid 화합물의 검출이 보고된 바 있으므로<sup>10)</sup> 생체내 방어물질인 glutathione을 고갈시키며 또한 이 상태에서 세포내 단백질과 결합한다고 생각할 수 있으므로 그 생체내 형성은 약리 독성면에서 중요하리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 microsome 효소에 의한 tranlycypromine으로부터 cinnamaldehyde의 생성을 자세히 파악하기 위하여 cinnamaldehyde의 생성을 여러 배양조건에서 정량적으로 분석하고자 하였고 이러한 목적으로 cinnamaldehyde의 HPLC에 의한 분석방법을 확립하였다.

### 실험방법

시약 및 동물—Tranlycypromine 황산염은 Smith Kline & French Laboratories(U. S. A.)로부터 얻었고 이로부터 tranlycypromine 염산염을 제조하여 사용하였다. Bovine albumin, NADPH 4Na(NADPH), NADP Na(NADP), glucose-6-phosphate 2Na(G-6-P), 그리고 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P DH)는 Sigma Chemical Co. (U. S. A.)에서 구입하였고 CO 가스는 Aldrich Chemical Co. (U. S. A.)에서 구입하여 사용하였다. Acetonitrile, water, methanol, 그리고 ethyl acetate는 Pierce Chemical Co.의 HPLC grade를 사용하였고 cinnamaldehyde(Fluka Chemie AG, Switzerland), 2,4-dinitrophenylhydrazine(2,4-DNPH, Junsei), isoctane(Junsei), 그리고 기타 시약들

은 시약 특급품을 국내에서 구입하여 사용하였다.

체중 200g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 고형사료(삼양 동물사료)와 상수로 사육하여 사용하였다. 흰쥐 각각을 3일간 연속하여 phenobarbital(75 mg/kg, i. p.) 처리하였고 최종 투여 후 24시간 동안 절식시킨 후 뇌충격으로 희생시킨 후 즉시 간을 적출하여 사용하였다.

기기—용접은 sybron thermolyne(Olympus, Japan)으로 측정하였고 보정하지 않았다. IR은 Shimadzu model 435 infrared spectrometer로 측정하였고, NMR의 측정은 Varian EM-360A 60 MHz spectrometer를 사용하였다. HPLC는 Waters사의 Waters 501 HPLC pump와 absorbance detector model 441을 YOUNG IN/D520 computing integrator에 연결하여 사용하였다. Sorvall superspeed 냉동 원심분리기(Sorvall RC 2-B)와 Beckman L7-55 초원심분리기를 사용하였으며 모타작동식 Potter Elvehjem type의 유리 homogenizer와 Teflon 수지봉을 사용하여 효소를 제조하였다.

**2,4-Dinitrophenylhydrazone의 합성**—Cinnamaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone은 Shriner 등의 방법<sup>11)</sup>에 의해 cinnamaldehyde와 2,4-dinitrophenylhydrazine으로부터 얻어 ethyl acetate로 재결정하였다. mp. 260°C (문헌,<sup>12)</sup> 255°C). IR(KBr)cm<sup>-1</sup>; 1640(C=C), 1620(C=N), 1520 & 1330(NO<sub>2</sub>). NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 6.85-7.04(m, 2H, CH=CH), 7.25~7.54(m, 5H, arom. H), 7.75~8.03(m, 2H, arom. H & CH=N), 8.25(dd, 1H, arom. H), 9.12(d, 1H, arom. H).

내부표준물질로 사용한 butyrophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone은 *n*-butyric acid로부터 Vogel<sup>13)</sup>의 방법에 의해 butyrophenone을 얻은 후 cinnamaldehyde의 경우와 동일한 방법에 의해 2,4-dinitrophenylhydrazone을 얻었고 무수 EtOH로 재결정하였다. mp. 194-5°C. IR(KBr)cm<sup>-1</sup>; 1620(C=N), 1520 & 1330(NO<sub>2</sub>). NMR(CDCl<sub>3</sub>/DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.9~1.4(t, 3H, CH), 1.4~2.2(m, 2H, CH), 2.65~3.16(t, 2H, CH), 7.15~7.76(m, 3H, arom. H), 7.76~8.2(m, 2

H, arom. H), 8.2-8.7(m, 2H, arom. H), 9.25 (d, 1H, arom. H).

**간 microsome 의 제조**—이미 보고한 방법<sup>7</sup>에 따라 phenobarbital 처리한 원취의 간으로부터 제조하였다. 단백질 함량은 Lowry 등<sup>14</sup>의 방법으로 bovine albumin 을 표준물질로 하여 측정하였고 cytochrome p-450의 함량은 CO-difference spectroscopy 방법<sup>15</sup>으로 측정하였다. 제조한 효소원의 단백질 함량은 20.5 mg/ml 이었고 cytochrome p-450 함량은 2.54 nmole/mg protein 이었다.

**배양 조건**—표준 배양 혼합액은 microsome(0.3 ml, protein 6.15 mg), 0.5 M 인산완충액 (pH 7.6)에 녹인 NADPH(1.4 ml; 1.2 μmol) 또는 NADPH-generating system (1.4 ml; NADP 1.5 μmol, G-6-P 15 μmol, G-6-9 DH 3 unit, MgCl<sub>2</sub> 15 μmol)과 증류수에 녹인 tranlycypromine(0.3 ml, 1.5 μmol)을 가하여 전체 용량 2.0 ml로 하였다. 이것을 진탕 수욕에서 30분간 37°C에서 배양시킨 후 즉시 냉각한 40% perchloric acid 0.5 ml를 가하여 반응을 중단시켰다.

Microsome 양 및 배양시간에 따른 cinnamaldehyde의 생성을 파악하기 위한 목적으로 microsome 양을 0, 0.03, 0.06, 0.1, 0.2, 0.3 ml로 변화시킨 검체와 배양시간을 0, 5, 10, 20, 30분으로 변화시킨 검체를 각각 2개씩 제조하였다. 이 때 조효소는 NADPH를 사용하였다.

표준 배양조건을 변화시켜서 조효소로 NADPH 또는 NADPH-generating system을 사용한 경우에 대해서 각각 조효소를 가하지 않은 검체, tranlycypromine을 가하지 않은 검체, 그리고 100°C에서 10분간 끓인 microsome을 사용한 검체를 각각 3개씩 제조하였다. NADPH-generating system을 사용한 경우의 조효소를 가하지 않은 검체는 NADP만을 제외시켰다.

**분석 검체의 제조**—Perchloric acid를 가한 배양액을 원심분리(2500 rpm, 10분)하여 단백질을 제거한 후 상등액 2.0 ml를 취하여 내부표준물질인 butyrophenone-2, 4-dinitrophenylhydrazone의 methanol 용액(0.2 mM) 0.1 ml를 가하고 NADPH를 사용한 경우에는 0.8 ml 6 M HCl에

녹인 2, 4-DNPH(10 μmol)을, NADPH-generating system을 사용한 경우에는 2 ml 6 M HCl에 녹인 2, 4-DNPH(30 μmol)을 각각 가하여 30초간 vortexing 한 후 실온에서 1시간 방치하였고 분석할 때까지 냉동 보관하였다. 여기에 NADPH를 사용한 검체의 경우는 10 M NaOH 0.7 ml와 2.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.25 ml를 가하고, NADPH-generating system을 사용한 검체의 경우는 10 M NaOH 1.5 ml와 2.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 ml를 가하여 pH 8 정도로 조정한 후 NADPH를 사용한 경우에는 isooctane 4 ml, NADPH-generating system을 사용한 경우는 isooctane 6 ml로 5분간 vortexing 하여 2회씩 추출하고 원심분리(2500 rpm, 10분)하여 isooctane 층을 분리하여 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조한 후 60°C에서 질소가스로 농축하여 그 잔사를 ethyl acetate 0.2 ml에 용해시켜 분석검체로 하였다. 제조한 검체를 10 μl씩 주입하여 HPLC로 분석하였다.

검량선의 작성은 100°C에서 10분간 끓인 후 냉각한 microsome 0.3 ml, NADPH 용액 1.4 ml 및 증류수 0.2 ml의 혼합용액에 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mM의 cinnamaldehyde의 methanol 용액 0.1 ml씩을 각각 가하여 전체 용량 2.0 ml로 한 후 즉시 냉각한 40% perchloric acid 0.5 ml를 가하여 분석 검체 제조시와 동일한 방법으로 처리하여 분석하였다.

**HPLC 분석**—Waters 제품인 μBondapak C<sub>18</sub> (10 μm, 30 cm×3.9 mm i. d.)칼럼을 사용하였으며 254 nm UV 검출기를 사용하여 분석하였다. 이동상으로 acetonitrile과 물 60:40(v/v) 혼합용액을 사용하여 유속 1.5 ml/min으로 분석하였고 이때의 압력은 1500 psi였다. 검출기의 감도는 0.05 AUFS였으며 시료의 분석은 실온에서 하였다. 분석하고자 하는 물질의 내부표준물질에 대한 피이크 높이의 비로서 계산하였다.

## 결과 및 고찰

**분석법의 확립 및 검량선의 작성**—Microsome 효소와의 배양 혼합액 중에 생성된 cinnamaldehyde의 분석은 혈장 중 acetaldehyde의 분석<sup>16</sup>과 유사

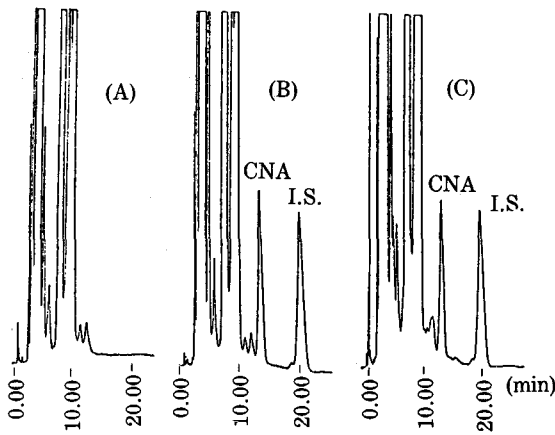


Fig. 1—HPLC chromatograms of analytical samples from (A) incubation mixture deleting tranlycypromine and without internal standard (I.S.), (B) above incubation mixture (A) spiked with cinnamaldehyde (CNA, 20 nmole) and internal standard (20 nmole), and (C) whole incubation mixture spiked with internal standard.

하게 2, 4-dinitrophenylhydrazone 유도체로 하여 pH 8 정도에서 isooctane 추출과정에 의해 분석 검체를 제조하여 HPLC로 분석하였다. Tranlycypromine 및 내부표준물질을 가하지 않은 microsome 만의 배양 검체의 chromatogram을 Fig. 1 (A)에 나타내었고 내부표준물질 20 nmole 과 함께 cinnamaldehyde 20 nmole 을 가한 검체의 chromatogram은 Fig. 1(B)에 나타내었다. 실제 tranlycypromine 을 microsome 과 배양 후 내부표준물질을 가하여 제조한 검체의 분석 chromatogram은 Fig. 1(C)와 같다.

Cinnamaldehyde hydrazone 분석의 내부표준물질로서 같은 aldehyde류로서 *m*-OH, *p*-NO<sub>2</sub>, *p*-acetamidobenzaldehyde 와 단순한 ketone 으로 4'-methoxy, 3', 4'-dimethoxyacetophenone 의 hydrazone 을 제조하여 검토하였으나 검토한 HPLC 분석 조건에서 내인성 물질과 중첩되어 적합하지 않았다. Propiophenone 과 butyrophenone 의 hydrazone 의 경우는 실험항목에 기술한 HPLC 분석 조건에서 cinnamaldehyde hydrazone 의 retention time ( $t_r$ )이 13.1분인데 비해서 각각에 대해  $t_r$  14.3분, 19.6분으로 내인성 물질과 중첩되지는 않으나 propiophenone 은 피이크 분리

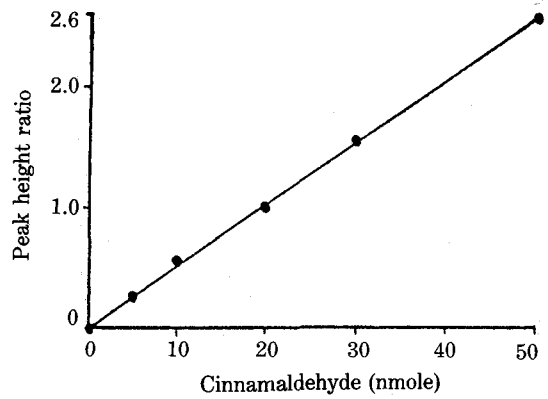


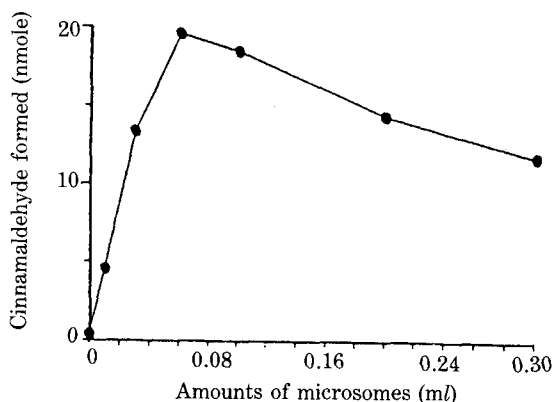
Fig. 2—Calibration curve for the analysis of cinnamaldehyde. Calibration curve equation (0-50 nmole range):  $y = 5.112 \times (r^2 = 0.999)$ ,  $y = \text{peak-height ratio}$ ,  $x = \text{concentration}$ .

가 완전하지 않았다. 따라서 butyrophenone hydrazone 을 내부표준물질로 사용하였고 실온에서 hydrazone 형성 능력이 aldehyde에 비해 낮은 것을 고려하여 butyrophenone-2, 4-dinitrophenylhydrazone 자체로 배양 혼합액에 가하였다.

검량선은 cinnamaldehyde 5-50 nmole 정도 범위에서 내부표준물질과의 피이크 높이 비로서 작성하였고 (Fig. 2), 원점을 통과하는 기울기 5.112의 직선을 얻었고 이 때 상관관계수  $r^2 = 0.999$ 의 좋은 상관관계를 나타내었다.

**효소원의 농도 및 배양시간에 따른 cinnamaldehyde의 형성**—Microsome 효소원의 농도변화에 따른 cinnamaldehyde의 생성은 Fig. 3에 나타내었다. 효소의 농도가 증가함에 따라 효소원 0.06 ml 사용시까지의 cinnamaldehyde의 생성이 증가되나 그 이상의 농도에서는 농도가 증가할수록 점차 cinnamaldehyde의 생성이 감소되었다. 관찰된 최대의 cinnamaldehyde 양은 효소원 0.06 ml 사용하였을 때 19.6 nmole 이었고 0.3 ml의 표준배양 조건에서는 11.7 nmole의 cinnamaldehyde가 형성되었다. 또한 효소를 가하지 않은 경우에도 0.41 nmole 이 관찰되었다.

배양시간 변화에 따른 cinnamaldehyde의 생성은 Fig. 4에 나타내었다. 배양하지 않은 검체에서도 0.66 nmole의 cinnamaldehyde가 관찰되었고 5분간 배양조건에서 11.6 nmole의 cinnamaldehyde가 생성되었으며 20분 배양시까지의 같은 양의 생성

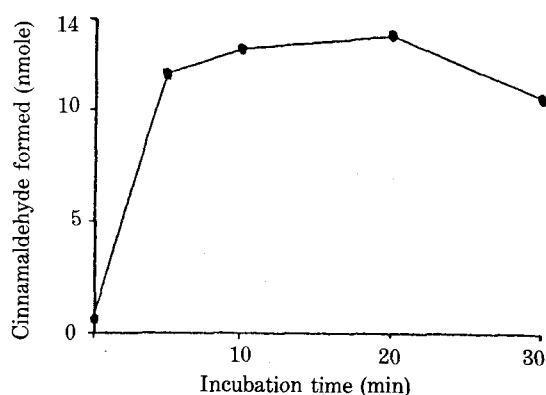


**Fig. 3**— Formation of cinnamaldehyde from tranilcypromine by various amounts of rat liver microsomes. The incubation mixture contained 1.5  $\mu$ mol tranilcypromine and 1 ml microsomes is equivalent to 52.08 nmole cytochrome p-450.

이 유지되었으나 30분 표준배양조건에서는 10.5 nmole로 감소되었다.

효소원의 농도 및 배양시간에 따라 cinnamaldehyde의 생성량이 변화되는 것으로 보아 cinnamaldehyde는 효소의 작용에 의해 즉 대사과정에 의해 형성된다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 전혀 효소를 사용하지 않은 검체와 배양을 하지 않은 검체에서도 미량 형성되는 것은 배양 및 분석 검체 제조 과정 중에 tranilcypromine의 화학적 분해에 의한 것으로 생각된다. 일정농도 이상의 효소원을 사용하였을 때와, 그리고 일정시간 이상 배양하였을 시에 cinnamaldehyde의 생성이 감소되는 것은 cinnamaldehyde의 생성과 계속되는 대사과정에 의한 다른 대사산물의 변환과의 경쟁에서 후자의 영향이 크기 때문인 것으로 생각된다.

배양조건 변화에 따른 cinnamaldehyde의 형성—조효소로 NADPH 및 NADPH-generating system을 사용하여 배양조건을 변화시켜서 cinnamaldehyde의 생성량을 분석하였고 그 결과를 Table I에 나타내었다. 표준배양조건에서 생성된 cinnamaldehyde의 양은 NADPH를 사용한 경우,  $11.10 \pm 0.80$  nmole 이었고 NADPH-generating system을 사용한 경우는  $17.11 \pm 1.58$  nmole 이었다. 이것은 사용한 tranilcypromine의 0.74 및 1.14%에 해당되는 양이다. 끊어서 활성을 소실시킨 microsome을 사용하거나 microsome을 전



**Fig. 4**— Formation of cinnamaldehyde from tranilcypromine during various incubation times with rat liver microsomes.

**Table I**— Formation of cinnamaldehyde from tranilcypromine by rat liver microsomes under various conditions

Experimental conditions	Cinnamaldehyde formed (nmole) <sup>a</sup>
<b>NADPH</b>	
Standard incubation <sup>b</sup>	$11.10 \pm 0.80$ (100)
NADPH omitted	$0.94 \pm 0.15$ (8.5)
Microsomes omitted	$0.40 \pm 0.06$ (3.6)
Boiled microsomes <sup>c</sup>	$1.48 \pm 0.24$ (13.3)
Tranilcypromine omitted	0
<b>NADPH-generating system</b>	
Standard incubation <sup>b</sup>	$17.11 \pm 1.58$ (100)
NADP omitted	$0.41 \pm 0.09$ (2.4)
Boiled microsomes <sup>c</sup>	$0.66 \pm 0.38$ (3.9)
Tranilcypromine omitted	0

<sup>a</sup> Results are mean values  $\pm$  S.D. (n=3) with percentages relative to that of standard incubation in parentheses.

<sup>b</sup> The standard incubation system (2.0 ml) contained: microsomes, 15.62 nmole cytochrome p-450; tranilcypromine, 1.5  $\mu$ mol; NADPH, 1.2  $\mu$ mol or NADPH-generating system consisting of 1.5  $\mu$ mol NADP, 15  $\mu$ mol G-6-P, 15  $\mu$ mol MgCl<sub>2</sub>, and 3 unit G-6-P DH.

<sup>c</sup> Boiled at 100°C for 10 min.

혀 사용하지 않은 검체에서는 표준배양조건에서 생성되는 양의 3~13% 정도의 cinnamaldehyde가 관찰되었다. 그리고 tranilcypromine을 가하지 않은 배양 검체에서는 cinnamaldehyde가 전혀 관찰

되지 않았고 이것으로서 cinnamaldehyde의 분석에 방해 물질이 없음을 확인하였다. NADPH 또는 NADP를 사용하지 않았을 때에는 표준배양조건에서 생성되는 양의 8.5 및 2.4%에 해당되는 cinnamaldehyde의 생성이 관찰되었다. 이것은 microsome에 의한 cinnamaldehyde의 생성이 NADPH에 엄격히 의존함을 나타내는 것이다.

**Cinnamaldehyde의 생성기전**—Cinnamaldehyde의 형성이 효소원 0.06 ml/ 사용시까지 증가하는 것과 NADPH가 필수적으로 필요하다는 것으로 보아 cinnamaldehyde는 tranlycypromine이나 그 대사산물의 화학적 분해산물이라고 하기보다는 대부분이 microsome 효소의 작용에 의해 생성되는 것이 확실하다. 대사에 의해 cinnamaldehyde로 변환될 수 있는 가능한 화학구조는 hydrocinnamaldehyde이며 실제로 tranlycypromine과 hydrocinnamaldehyde의 Schiff 염기는 microsome 배양 검체에서 검출된 바 있다.<sup>7)</sup> Cytochrome p-450에 의한 benzylic oxidation은 잘 알려져 있으므로<sup>17)</sup> hydrocinnamaldehyde가 cytochrome p-450에 의해 benzylic oxidation된 후 탈수과정에 의해 cinnamaldehyde가 생성되는 것으로 생각된다.

Hydrocinnamaldehyde는 배양조건인 pH 7.6에서 tranlycypromine이 화학적으로 분해되어 형성되는 것이 확인되었으며<sup>7)</sup> Walborsky와 Ronman<sup>18)</sup>에 의해 1-methyl-2,2-diphenylcyclopropylamine의 경우에 보고된 것과 같이 유리 염기 상태에서 cyclopropyl 고리가 깨어진다면 tranlycypromine의 pK<sub>a</sub>가 8.13이라는 사실로 보아<sup>19)</sup> 사용한 배양조건에서 tranlycypromine의 화학적 분해에 의해 hydrocinnamaldehyde가 형성될 수 있다. Tranlycypromine으로부터 hydrocinnamaldehyde를 형성하는 화학적 분해과정과 이것으로부터 cinnamaldehyde를 형성하는 대사과정 중 어느 과정이 반응속도 결정단계인지는 분명치 않으나 효소에 의한 hydrocinnamaldehyde의 산화과정이 반응속도 결정단계라면 hydrocinnamaldehyde는 즉시 분해산물로서 충분한 양이 형성되고 이것에 microsome이 작용하여 5분에 최대의 cinnamaldehyde를 형성하나 그후 계속 산화과정에 의해 생

성된 cinnamaldehyde의 양이 감소되며 동시에 대사산물에 의한 효소작용의 억제에 의하여 cinnamaldehyde의 양이 더욱 감소될 수 있다는 것으로 생각할 수 있다.

앞서 설명한 cinnamaldehyde의 생성기전은 hydrocinnamaldehyde의 benzylic oxidation에 의한 것이나 이와 동시에 tranlycypromine과 효소와의 직접 작용에 의한 생성도 배제할 수 없다. Tranlycypromine에 의한 MAO의 자살억제에 의해 cinnamaldehyde가 생성됨이 보고된 바 있고<sup>1)</sup> 실제 microsome 내의 MAO는 조효소로 NADPH를 필요로 할 수 있다는 것이 보고되어 있으며<sup>20)</sup> 본 실험에서 조효소를 사용하지 않은 경우에 cinnamaldehyde가 거의 생성되지 않는 것으로 보아 cinnamaldehyde의 생성은 cytochrome p-450에 의한 benzylic oxidation과 동시에 MAO의 작용에 의한 것으로 생각할 수 있으나 작용하는 효소의 비중에 관해서는 각 효소의 선택적인 억제제를 사용한 좀더 자세한 연구가 필요하다. 또한 cyclopropylamine은 cytochrome p-450의 자살억제제로서 보고된 바 있으므로<sup>21,22)</sup> MAO와 유사한 기전으로 tranlycypromine이 cytochrome p-450의 자살억제제로 작용하여 cinnamaldehyde가 생성될 가능성도 배제할 수 없으나 tranlycypromine이 cytochrome p-450의 자살억제제로 작용하지 않는다는 것도 보고된 바 있으므로<sup>23)</sup> 분명하지 않다.

## 결 론

원래 microsome과 tranlycypromine의 배양에서 생성되는 cinnamaldehyde의 생성기전을 분명히 하기 위하여 cinnamaldehyde의 HPLC 분석방법을 확립하였으며 여러 배양조건에서 생성되는 cinnamaldehyde를 분석하였다. 그 결과 배양시간 및 microsome 양의 증가에 따른 cinnamaldehyde 생성의 증감 경향단계를 관찰하였으며 NADPH를 제외시킨 경우 및 NADPH-generating system에서 NADP를 제외시킨 경우에 표준조건의 8.5 및 2.4%로 현저히 감소된 cinnamaldehyde 생성을 확인하였다. 이러한 생성량은 microsome을 가하

지 않거나 끊인 **microsome** 을 사용할시와 유사한 정도의 것이었다. 이러한 사실로부터 **cinnamaldehyde** 는 **microsome** 효소에 의한 **tranilcypromine** 의 산화 대사산물임을 입증하였으나 그 생성단계와 작용하는 효소에 관하여는 좀더 자세한 연구가 필요하다.

**감사의 말씀**

본 논문은 1989년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

**문헌**

- 1) Silverman, R.B.: Mechanism of inactivation of monoamine oxidase by *trans*-2-phenylcyclopropylamine and the structure of the enzyme-inactivator adduct. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14766 (1983).
- 2) Neff, N.H. and Yang, H.-Y.T.: Another look at the monoamine oxidases and monoamine oxidase inhibitor drugs. *Life Sci.*, **14**, 2061 (1974).
- 3) Baldessarini, R.J.: Monoamine oxidase inhibitors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic*, 7th ed. (Gilman, A.G. et al. eds.), Macmillan Publ. Co., New York, p. 423 (1985).
- 4) Alleva, J.J.: Metabolism of tranilcypromine-C<sup>14</sup> and *dl*-amphetamine-C<sup>14</sup> in the rat. *J. Med. Chem.*, **6**, 621 (1963).
- 5) Kang, G.I. and Choi, H.K.: Detection of N-acetyltranilcypromine and glucuronide of phenyl-hydroxylated N-acetyltranilcypromine from tranilcypromine-dosed rat urine. *Arch. Pharm. Res.*, **9**, 99 (1986).
- 6) Baker, G.B., Hampson, D.R., Coutts, R.T., Micetic, R.G., Hall, T.W., and Rao, T.S.: Detection and quantitation of a ring-hydroxylated metabolite of the antidepressant drug tranilcypromine. *J. Neural Transmission*, **65**, 233 (1986).
- 7) Kang, G.I. and Hong, S.K.: Biotransformation of tranilcypromine in rat liver microsomes. *Arch. Pharm. Res.*, **11**, 292 (1988).
- 8) Senma, M., Fujiwara, N., Sasaki, S., Toyama, M., Sakaguchi, K., and Takaoka, I.: Studies on the

- cutaneous sensitization reaction of guinea pigs to purified aromatic chemicals. *Acta. Dermatovener.*, **58**, 121 (1978).
- 9) Majetti, V.A. and Suskind, R.R.: Mechanisms of cinnamaldehyde sensitization. *Contact Dermatitis*, **3**, 16 (1977).
- 10) Delbressine, L.P.C., Klippert, P.J.M., Reuvers, J.T.A., and Seutter-Berlage, F.: Isolation and identification of mercapturic acids of cinnamic aldehyde and cinnamyl alcohol from urine of female rats. *Arch. Toxicol.*, **49**, 57 (1981).
- 11) Shriner, R.L., Fuson, R.C., and Curtin, D.Y.: *The systematic identification of organic compounds*, 5th ed., John Wiley & Sons, New York, p. 320 (1964).
- 12) Behforouz, M., Bolan, J.L., and Flynt, M.S.: 2,4-Dinitrophenylhydrazones: A modified method for the preparation of these derivatives and an explanation of previous conflicting results. *J. Org. Chem.*, **50**, 1186 (1985).
- 13) Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Rogers, V., Smith, P.W.G., and Tatchell, A.R.: *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, 4th ed., Longman, London, p. 774 (1976).
- 14) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forr, A.L., and Randall, R.T.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 15) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
- 16) Lucas, D., Menez, J.F., Berthou, F., Pennec, Y., and Floch, H.H.: Determination of free acetaldehyde in blood as the dinitrophenylhydrazone derivative by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.-Biomed. Appl.*, **382**, 57 (1986).
- 17) Trager, W.F.: Oxidative functionalization reactions. *Concepts in Drug Metabolism*, Part A, Jenner, P. and Testa, B. eds., Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, p. 177 (1980).
- 18) Walborsky, H.M. and Ronman, P.E.: Cyclopropylamine rearrangement. *J. Org. Chem.*, **38**, 4213 (1973).
- 19) Kang, G.I. and Chung, S.Y.: Apparent pKa and partition coefficient of tranilcypromine. *Yakhak Hoeji*, **28**, 293 (1984).
- 20) Blume, V.H.: Biotransformation von Amphetamin-Derivaten durch Rattenleber-Mitochondrien. 2.

- Mitt.: Oxidative Desaminierung von Amphetamin und Reduktion von Phenylaceton. *Arzneim. Forsch.*, **31**, 994 (1981).
- 21) Macdonald, T.L., Zirvi, K., Burka, L.T., Peyman, P., and Guengerich, F.P.: Mechanism of cytochrome p-450 inhibition by cyclopropylamines. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2050 (1982).
- 22) Guengerich, F.P., Willard, R.J., Shea, J.P., Richards, L.E., and Macdonald, T.L.: Mechanism-based inactivation of cytochrome p-450 by heteroatom-substituted cyclopropanes and formation of ring-opened products. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6446 (1984).
- 23) Dupont, H., Davies, D.S., and Strolin-Benedetti, M.: Inhibition of cytochrome p-450-dependent oxidation reactions by MAO inhibitors in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1651 (1987).