약학회지 제42권 제 3 호 257~264(1998)
Yakhak Hoeji Vol. 42, No. 3

불소기가 치환된 새로운 티베인 유도체 합성 -진통작용 검색 및 친화력 검토를 중심으로-

김근재 · 김수만#
한남대학교 화학과
(Received February 12, 1998)

Synthesis of Fluorinated New Thebaine Derivatives

Keun-Jae Kim and Su-Man Kim#
Department of Applied Chemistry, Han Nam University, Ohjeong-Dong Dong-Gu, Daejeon, Korea

Abstract—5-Methylthebaine was obtained by treating thebaine with n-butyllithium and methylfluorosulfonate. Hetero Diels-Alder reaction of thebaine and 5-methylthebaine with trifluoroacetaldehyde afforded 14-β-(triflu-oro-2-hydroxyeth-yl)-codeine (2) and 14-β-(trifluoro-2-hydroxyethyl)-5-methylcodeinone (9). 6α-OH compound(4) was obtained by employing $CeCl_2$ and $NaBH_4$. After synthesized a derivative substituted for 3-OH (5), using boron tribromied, We synthesized a new derivative that make double bond in C-7, C-8 into epoxide (6), (10). Through inspecting an influence on struc-ture-activity and analgetic action, we are going to examine which opioid acceptor has a selectivity.

Keywords □ 14-β-(trifluoro-2-hydroxyethyl)-codeinone. 14-β-(trifluoro-2-hydroxyethyl)-5-methylcodeinone. structure-activity. analgetic action.

보다 높은 진통효과와 습관성 없는 Morphine 유사체를 합성하기 위한 관심이 여러 학자들의 연구대상이 되어옴에 따라[1] 일찍이 1800년경부터 아편에서 추출한 Morphine 계통의 진통제를 임상적으로 사용하여 왔다.[2] 그러나 Morphine 계통의 진통제는 진통효과는 좋으나 습관성이나 독성이 강함에 따라 사용이 제한되어 현대 의학에서는 체내 수용체와의 상호작용에 관한 연구가 활발해지면서 몰핀 구조 중에서 그 구조를 변형시키거나,[3] 작용기를 변화시킴으로서 강한 진통작용은 있으면서, 습관성이 없는 몰핀유사체를 합성하려는 시도가 계속되고 있으며 실용화 되고 있다.[4] Thebaine은 진통제로 사용하기에는 독성이라는 큰 단점이 있지만 C-ring에 전자를 풍부히 갖고 있는 diene system으로,[5] 본 연구에서는 지금까지 연구되지 않은 thebaine과 5-methylthebaine 골격 내에 Hetero Diels-Alder 반응을 통하여[6] 불소기를 도입하고 각각의 화합물의 C_7과 C_8에 있는 이중결합을 epoxide로 합성하여 생리활성을 비교하여 보고 기존에 개발된 thebaine 유도체들 보다 생리활성이 높으면서도 습관성과 독성이 없는 새로운 진통제를 개발하고자 하였다. 이와 같이 불소기가 도입된 thebaine 유도체들은 아직까지 연구된 바 없는 것으로써 이미 불소기가 화합물 내에 반응을 통해 들어감으로써 생리활성이 크게 증가된다는 것은 다른 여러 화합물에[7] 대하여 알려져 왔기 때문에 thebaine과의 반응을 통한 불소기의 분자내 도입은 화합물의 생리활성 효과를 크게 증대시킬 수 있는 가능성뿐만 아니라 morphine이 가지고 있는 독성과 습관성에 대한 역작용 효과의 가능성도 크게 기대되어진다.[8] 본 연구의 최종적인 목표는 새로운 opioid 합성물질로부터 독성과 습관성이 없거나 현존 약물보다 현저히 경한 새로운 중추작용 진통물질의 개발에 있다. 새로운 약

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-629-7467 (팩스) 042-629-7469

물의 작용을 연구함에 있어 방사면역측정법을 이용하여 수용체의 약물에 대한 친화력 상수(Kd 또는 Ki)를 측정함은 가장 보편적이며 효과적인 방법이다.[9] 이러한 수용체결합 실험과 기능적 실험을 통하여 밝혀진 opioid 수용체의 종류는 μ, δ, κ 그리고 ε와 σ 수용체가 있으나 일반적으로 μ, δ 그리고 κ 수용체를 주된 형으로 지칭한다.[10] 따라서 합성된 thebaine 유도체 (6), (10)의 opioid 수용체작용 여부 및 작용수용체의 형을 확인하기 위하여 guinea pig의 대뇌 피질 세포막 표본에서 각 opioid 수용체에 선택적인 방사성 동위원소 표지약물([^{3}H]DAMGO, [^{3}H]DPDPE, [^{3}H]U69593)의 결합에 대한 것을 얻은 thebaine 유도체의 영향을 검색하여 μ, δ 및 κ 수용체에 대한 선택적인 약물을 찾고자 하였다.[11]

실험방법

시약 및 기기 - 시약은 Alderich사, Tokyo Kasei사의 EP급 또는 GR급 시약을 정제하여 사용하였으며 융점측정은 Fisher-Johns사의 melting point apparatus를 사용하여 1.2 mm capillary로 측정하였다. 그러나 이들의 값은 보정하지 않았다. ^{1}H NMR Spectra는 1~10%(V/V)용액으로 얻었으며, chemical shift는 내부표준 용액인 tetramethyl silane으로부터 downfield로 δ(ppm)값으로 나타냈으며, IR Spectra는 Shimadzu IR-435 Spectrometer나 DiGi Lap Biored Ft-80 High resolution FT IR spectrophotometer를 사용하여 얻었으며, 모든 IR값은 reciprocal centimeter로 나타내었다. Mass Spectra는 Jeol JMS-DX303GC/MS와 Shimadzu GCMS-QP 5000을 70eV와 20 eV로 사용하였다. Columm chromatography는 silica gel(Merck 230~400 mesh)를 사용하였으며, 진통작용 및 활성검색은 뇌실내 척수강으로 투여된 화합물의 진통작용이 어떤 type의 opioid 수용체가 연계되어 유발되는지를 규명하였다.

7-oxy-8-trifluoromethyl-6.14-endo ethenohydrothebaine(1)의 합성 - Sealed tube에 thebaine 3.11 g (10 mmol)을 넣고 benzene 5 m*l*로 녹인 후 -78°C 상태에서 25 m*l* two-neck flask에 황산 5 m*l*를 넣고 온도를 서서히 100°C까지 가열한다. 그 후에 trifluoroacetaldehyde를 질소가스로 조절하면서 1 hr동안 syringe로 서서히 과량 첨가한다. 그 후 50°C 하에서 24시간 동안 환류반응하고 반응액을 식힌 후 감압증류하여 생성된 침전물을 물에 녹인 후, chloroform으로 추출하였다. 추출액을 소금물로 씻은 후, magnesium sulfate로 건조하고, 여과액을 감압증류하여 얻어진 화합물을 silica gel을 사용하여 EtOAC/n-Hexane(2:1)로 칼럼크로마토그래피로 정제하여 흰 결정체를 얻었다.

수득률 : 3.72 g(91%), mp : 114°C

^{1}H-NMR($CDCl_3$), δ : 2.36(3H, s, NMe), 3.54 (3H, s, H-6, OCH_3), 3.81(3H, s, H-3, OCH_3), 4.57 (1H, s, *J*=1.1Hz, H-5), 5.60(1H, d, *J*=8.8Hz, H-7), 6.15(1H, d, *J*=8.7Hz, H-8), 6.59(1H, d, *J*=8.2 Hz, H-1), 6.67(1H, *J*=8.2Hz, H-2) MS(m/z) : 409

14-β-(trifluoro-2-hydroxyethyl)-codeinone(2)의 합성 - Hetero Diels-A-lder 화합물 2 g(4.9 mmol)과 질소기류 하에서 건조된 tetrahydrofuran 20 m*l*에 녹이고 Conc. HCl 2 m*l*를 첨가하여 5시간 동안 상온에서 교반시킨 후 얼음중탕 하에 증류수 30 m*l*를 첨가하고, potassium carbonate로 pH=11까지 중화한 후 chloroform으로 추출하였다. 추출액을 소금물로 씻은 후, magnesium sulfate로 건조하고, 여과액을 감압증류하여 얻어진 화합물을 silica gel을 사용하여 칼럼크로마토그래피(용리제EtOAC/n-Hexane(2:1))로 정제하여 흰 결정체를 얻었다.

수득률 : 1.7 g(88%), mp : 163°C

^{1}H NMR($CDCl_3$), δ : 2.37(3H, s, NCH_3), 3.30 (1H, d, H-9), 3.81(3H, s, H-3, OCH_3), 4.99(1H, s, H-5), 5.71(1H, q, *J*=7.3Hz, H-17), 6.11(1H, d, *J*=10.2Hz, H-7), 6.54(1H, dq, *J*=10.2Hz, *J*=3.0 Hz, H-8), 6.62(1H, d, *J*=8.3Hz, H-1), 6.69(1H, d, *J*=8.2Hz, H-2) : MS(m/z) : 394, 296, 229 : IR (KBr) Cm^{-1} : 3485. 1675(C=O).

C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-7.8-epoxy-codeinone (3)의 합성 - 100 m*l* round bottom flask에 14-β-(trifluoro-2-hydroxyethyl)-codeinone 0.4 g(102 mmol)을 30% hydrogen peroxide 0.5 m*l*와 증류수 10 m*l*를 넣고 25~30°C 하에서 교반하면서 1N NaOH로 pH=8까지 서서히 첨가한 후 2시간 후에 chloroform으로 추출하고 추출액을 소금물로 씻은 후 magnesium sulfate로 건조하고, 여과액을 감압증류하여 얻어진 화합물을 칼럼크로마토그래피로 정제하였다.

수득률 : 0.386 g(92.6%), mp : 220~221°C

MS(m/z) : 411 : ^{1}H NMR($CDCl_3$) δ : 2.37(3H, s, N-Me), 3.87(3H, s, H-3, O-Me), 5.81(1H, s, H-5), 6.05(1H, d, H-8), 6.63(2H, s, H-1 and H-2), 6.72(1H, d, H-7) : ^{13}C NMR : 61.5 ppm, H-7), 47.3 ppm, H-8).

IR (KBr) Cm^{-1} : 1281.87(epoxide)

6α-hydroxy-14-trifluoromethyl-carbinolic-codeine(4)의 합성 - 14-β-(t-rifluoro-2-hydroxyethyl)-codeinone 1.18 g(3 mmol)과 $CeCl_3$. $7H_2O$ 1.11 g(3 mm-ol)을 메탄올 10 m*l*에 녹인 후 sodium borohydride 114 mg(3 mmol)을 stirring하는 중에 조금씩 첨가한다. 활발하게 반응이 진행되며 온도가 35~40°C로 올라간다. stirring을 5분 정도 지속시킨 후 이 용액을 묽은 염산으로 중화한다. 이 화합물을 ether로 추출하고 magnesium sulfate로 건조하고, 여과액을 감압증류한 후 silica gel을 사용하여 칼럼크로마토그래피(용리제 EtOAC/n-Hexane(2:1))로 분리하여 cis isomer 70%를 얻었다.

mp : 184~185°C. MS(m/z) : 397

^{1}H NMR($CDCl_3$) δ : 1.60(s, H-18, OH), 2.34 (3H, s, N-Me), 2.98(d, *J*=7.5Hz,H-6, OH), 3.26 (1H, d, *J*=5.0Hz, H-9), 3.84(3H, s, H-3, OCH_3), 4.59(1H, t, *J*=7.5Hz, H-6), 5.08(1H, d, *J*=7.5Hz, H-5), 5.35(1H, dm, *J*=10.3Hz, H-8), 5.57(1H, q, *J*=8.1Hz, H-18), 5.88(1H, d, *J*=10.3Hz, H-7)

C_{14}-trifluoromethyl-carbinolic-morphine(5)의 합성 - 6α-hydroxy-14-tr-ifluoromethyl-carbinolic codeine 0.5 g(1.26 mmol)과 3 m*l*의 methylene chloride로 녹인 용액에 5 m*l*의 boron tribromide를 -78°C 하에서 30분간 질소충전 하에 서서히 첨가하여 2시간 후에 TLC로 확인한 후 감압하에 용매를 증발시킨 후 얼음물 하에 ammonia로 농축하고 chloroform으로 25 m*l* 씩 4회 추출하여 유기층을 magnesium sulfate로 건조한 후 여과액을 감압증류한 후 silica gel을 사용하여 칼럼크로마토그래피(7% MeOH in $CHCl_3$)로 분리하여 흰 결정체를 얻었다.

수득률 : 0.3 g(62.5%), m.p : 222~223°C

MS(m/z) : 383$(M)^+$, 215, 59, 58. ^{1}H NMR(CD_3-OD) δ : 1.23(1H, s, H-3, OH), 2.27(3H, s, N-Me), 4.92(1H, s, H-5), 5.31(1H, dm, H-8), 5.45(1H, q, H-8), 5.65(1H, d, H-7), 6.38(1H, d, H-1, *J*=(1,2)= 8.0Hz), 6.45(1H, d, H-2, *J*=(2.1)= 8.0Hz).

C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-7.8-epoxy-morphine (6)의 합성 - C_{14}-tri-fluoromethyl carbinolic morphine 0.4 g(1.05mmol)을 Round-bottom flask에 넣고 30% H_2O_2 0.5 g(4.5 mmol)과 증류수 10 m*l*를 넣고 25~30°C 하에서 교반하면서 1N NaOH를 서서히 첨가하여 pH를 8.0으로 조절한 후 1시간 후에 chloro-form으로 추출하고, 추출액을 소금물로 씻은 후 magnesium sulfate로 건조하였다. 이 여과액을 감압증류하여 얻어진 화합물을 칼럼크로마토그래피로 정제하여 62%의 결정체를 얻었다.

수득률 : 0.26 g(62%). m.p : 212~213°C

MS(m/z) : 399. ^{1}H NMR($CDCl_3$) δ : 2.36(3H, s, N-Me), 5.05(1H, d, H-5), 5.32(1H, m, H-8), 5.60 (1H, q, H-18), 5.89(1H, d, H-7), 6.63(2H, q, H-1 and H-2).

5-methylthebaine(7)의 합성 - 150 m*l* one neck flask에 질소를 채우고 thebaine 0.5 g(1.6 mmol)을 넣고 감압상태에서 건조시킨다. 질소 분위기를 단 syringe로 무수tetrahydrofuran 40 m*l*를 가하여 용해시키고 -78°C에서 20분간 더 교반한 후 0.16 m*l* methyl fluorosulfate를 적가한 후 20분간 교반한다. 그리고 상온으로 올려 2시간 교반하여 주면 엷은 붉은색 용액이 된다. 이 용액에 증류수 0.5 m*l*를 천천히 가하여 준 후 용매를 감압 하에서 천천히 날려 보낸다. 그리고 진공 하에서 THF를 완전히 날려 보낸다. 그후 chloroform 60 m*l*를 가하여 용해시키고 증류수로 2회 세척후 무수 magnesium sulfate로 건조하고 감압농축하여 결정화 시킨 후 에탄올 0.5 m*l*를 약간 가열하여 넣어 준다. 그후 0°C에 방치하여 둔 후 찬 에탄올로 세척하여 주고 ether로 재결정하여 결정체를 얻었다.

수득률 : 0.25 g(57%). mp : 157~158°C

MS(m/z) : 325, 310, 269, 188. IR(KBr) Cm^{-1} : 2917, 2857, 1617, 1450, 1115, 910, 870. ^{1}H NMR δ : 1.76(3H, s, H-5, Me), 2.45(3H, s, NMe), 3.53 (3H, s, H-6, OMe), 3.80(3H, s, H-3, OMe), 4.90 (1H, d, *J*=6Hz, H-8), 5.50(1H, d, *J*=6Hz, H-7), 6.57(2H, s, H-1 and H-2).

7-oxy-8-trifluoromethyl-6.14-endoethenohydro-5-methylthebaine(8)의 합성 - 5-methylthebaine 1 g (3 mmol)을 benzene 2 m*l*를 sealed tube에 넣고 녹인 후 -78°C 상태에서 25 m*l* two-neck flask에 황산 3.5 m*l*를 넣고 syringe를 이용하여 trifluoroacetal-

dehyde hemiethyl acetal 2 m*l*를 100°C 하에서 질소가스로 조절하면서 1시간 동안 적가하여 과량의 trifluoroacetaldehyde가 sealed tube에 첨가됨을 확인한 후 50°C 하에서 24시간 동안 환류반응하고 반응액을 식힌 후 감압증류하여 생성된 침전물을 silica gel을 사용하여 칼럼크로마토그래피(용리제 EtOAC/n-Hexane(2:1))로 분리하여 엷은 핑크색 결정체를 얻었다.

수득률 : 1.2 g(93.1%), mp : 140°C

Ms(m/z): 423. ^{1}H NMR($CDCl_3$) δ : 1.71(1H, m, H-15 eq), 1.74(3H, s, H-5, Me), 2.45(3H, s, NMe), 3.55(3H, s, H-6, OMe), 3.83(3H, s, H-3, OMe), 4.91(1H, d, H-7), 5.53(1H, d, H-8), 6.59 (2H, m, ArH)

C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-5-methylcodeinone (9)의 합성 - 7-oxy-8-trifluoromethyl-6.14-endoethenohydro-5-methylthebaine 1 g(2.3 mmol)과 질소기류 하에서 건조된 tetrahydrofuran 20 m*l*에 녹이고 Conc-HCl 3 m*l*를 첨가하여 상온에서 3시간 동안 교반시킨 후 얼음중탕 하에 증류수 20 m*l*를 첨가한 후 potassium carbonate로 pH=11까지 중화한 후 chloroform으로 추출하였다. 추출액을 소금물로 처리한 후 magnesium sulfate로 건조하고 감압증류하여 얻어진 화합물을 silica gel을 사용하여 칼럼크로마토그래피(용리제 EtOAC/n-Hexane(2:1))로 정제하여 엷은 분홍색 결정체를 얻었다.

수득률 : 0.79 g(81.7%). mp : 171°C

^{1}H NMR($CDCl_3$) δ: 1.80(3H, s, H-5, Me), 2.31 (3H, s, NMe), 3.77(3H, s, H-3, OMe), 4.84(1H, d, H-7), 5.47(1H, d, H-8), 6.59(2H, m, ArH). MS(m/z): 409. IR(KBr) Cm^{-1} : 3381, 2659, 1715, 1483, 919.

C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-7.8-epoxy-5-methylthebaine(10)의 합성 - C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-5-methylcodeinone 0.2 g(0.49 mmol)을 Round bottom flask에 넣고 30% H_2O_2 0.5 g(4.5 mmol)과 증류수 10 m*l*를 넣고 25~30°C 하에서 교반하면서 1N NaOH를 서서히 첨가하여 pH를 8로 조절한 후 48시간 동안 교반하였다. 이 용액을 chloroform으로 추출하고 추출액을 소금물로 씻은 후 magnesium sulfate로 건조하였다. 이 여과액을 감압증류하여 얻어진 화합물을 칼럼크로마토그래피로 정제하여 결정체를 얻었다.

수득률 : 0.19 g(90%). mp : 181°C

MS(m/z) : 424. ^{1}H NMR($CDCl_3$) δ : 1.80(3H, s, H-5, Me), 2.31(3H, s, NMe), 3.76(3H, s, H-3, OMe), 6.24(1H, d, H-7), 6.37(1H, d, H-8), 6.56 (1H, d, H-1), 6.62(1H, d, H-2). IR(KBr) Cm^{-1} : 1293.

척수강으로 투여된 (6)과 (10)의 진통작용 검색 - 무게가 23~25 g 되는 male ICR mouse를 이용하였다. 이 생쥐들은 cage당 5마리가 되게 키워졌으며 22±0.5°C가 되도록 방 온도가 조절되어 졌으며 12h light-dark cycle이 규칙적으로 바뀌어지도록 장치가 된 방에 머무르게 하였다. 이 생쥐들은 단 1번만 사용되어 졌다. 척추 상부와 척수강 injection은 각각 Haley와 Mc-Mormick(1957)과 Hyden과 Wilcox(1980) 방법에 의하여 수행되었다. Injecti-on volume은 척추 상부와 척수강으로 각각 5 μ*l*로 투여하였다. 진통작용을 측정하기 위해서는 tail-flick test를 이용하였다(D'Amour and Smith, 1941). 생쥐의 꼬리에 빛을 쪼임으로써 생쥐가 통증을 느껴 꼬리를 움직이는(flick) 시간까지를 측정한다. 이 검사법은 척수(spinal cord) 동통회로에 대한 약물의 효과를 검색하는 방법이다. 간단히 부연설명하면, 생쥐를 양전히 왼손으로 hold하면서 꼬리의 dorsal 부분이 tail-flick apparatus(EMDIE Instrument Co., Maidens, VA, USA, Model TF6)에 위치하게 한 다음 radiant heat를 쪼임으로써 tail-flick 반응을 시작하게 한다. Radiant heat의 세기는 control latency가 3~5초 사이가 되도록 조절해 준다. Tail-flick의 inhibition은 "percentage of the maximal possible effect(% MPE)"로 표시하며, 이는 [(T1-T0)/(T2-T0)] ×100의 공식에 의하여 계산되어 지는데 T0와 T1은 각각 tail-flick 반응의 약물투여 전과 후에 측정된 latency를 가리키며 T2는 cut-off 시간을 가리키는데 생쥐의 꼬리의 손상을 감소시키기 위하여 10초로 조정되어 있다. 진통효과에 대한 tail-flick test를 행하여 ED_{50} 값을 구하기 위해서는, 최소한 서로 다른 세가지 약물용량에 대해서 각기 실험을 행하여졌고 각각의 약물용량에 사용되는 동물은 8~9마리 이상의 동물을 사용하여 얻어지는 실험값을 사용되었다. ED_{50} 값과 신뢰도 95%는 Lichfield와 Wilcoxon(1949)의 방법을 이용하여 구한다. Statistical analysis는 One-way analysis of variance(ANO-VA) test를 이용하였으며 posthoc test를 같이 사용하였다. P value가 0.05보다 작

을 때 통계적으로 유의하게 차이가 남(statistical significance)으로 결론지었다. 본 연구에서는 새로이 합성된(6)과 (10)을 척수강으로 투여될 때에 진통작용이 유발되는지를 검색하기 위하여 여러 용량의 (6)과 (10)을 척수강으로 투여한 뒤 10, 20, 30, 45 그리고 60분 후에 tail-flick test를 행하였다.

Morphine의 Opioid μ, δ, κ-수용체에 대한 친화력의 검토 - 실험동물로는 웅성 백서(체중 150~250 g, Sprague-Dawley)와 웅성 guinea pig(체중 250~350 g Hartley)을 사용하였다. Guinea pig를 단두하고 그 뇌를 적출하여 얼음 위에서 미리 냉각시킨 Petri dish에 위치하고, 피질을 잘라 내어, 10배 용량의 냉각된 변형 Krebs-HEPES 완충용액(25 mM HEPES, 118 mM, NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM $CaCl_2$, 2.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)에 넣고 Teflon g-lass 분쇄기를 사용하여 70회 전의 속도에서 분쇄, 균질화하였다. 이 균질액을 4℃, 27,000×g에서 15분간 원심하여 침전물을 얻어, 이를 20배 용량의 동일 완충액에 희석하여 얼음 위에서 60분간 배양하여 수용체 결합에 영향을 줄 수도 있는 내인성 물질들이 유리되도록 하였다. 다음 이 현탁액을 위와 동일한 조건에서 원심을 3회 반복하였다. 최종 원심 후 얻어진 침전물은 얼음으로 냉각한 완충액을 사용하여, 2% (w/v)의 농도로 희석하여 -70℃에 보관하였다. 이 상태로 보관된 세포막 표본의 수용체 상태를 확인하기 위해 1개월에 1회씩, 본 실험에서 표식자로 사용할 dipremorphine의 Kd치를 측정하여 비교하였다. Guinea pig의 대뇌피질 세포막 표본을 실온에서 용해한 후, Tefl-on glass 분쇄기를 5회 통과시켜 얼음 위에 두었다. 시험관은 polystylene을 사용하며, 실험시작 30분 전에 미리 냉각하고, 10 μM의 bacitracin과 1 μM의 leupeptin을 반응액에 첨가하여 peptides의 분해를 최대한 억제하였다. 경쟁약물로 peptides를 사용할 때는 비특이적 결합을 감소시키기 위하여 약물희석시 bovine serum albumine을 100 μg/ml의 완충액을 사용하였다. 각 tube의 총용량은 0.5 ml이 되게 하며, 약물 한 농도당 3시험관을 반복 측정하도록 하였다. 얼음 위에 위치한 시험관에 경쟁약물 50 μl, 완충액 100 μl, 세포막 표본 250 μl(300~500 μg protein/tube)를 각각 투여하였다. 총결합량(total binding)을 측정하는 시험관과 비특이적 결합(non-specific binding)을 측정하는 시험관에는 각각 경쟁약물 대신 완충액 50 μl, 또는 10 μM 결합자용액 50 μl를 투여하였다. 본 연구에서 각 opioid 수용체 형에 따른 결합실험의 조건은 다음의 표와 같다.

Table I—Experimental condition of opioid μ-, δ-, κ-opioid receptor binding

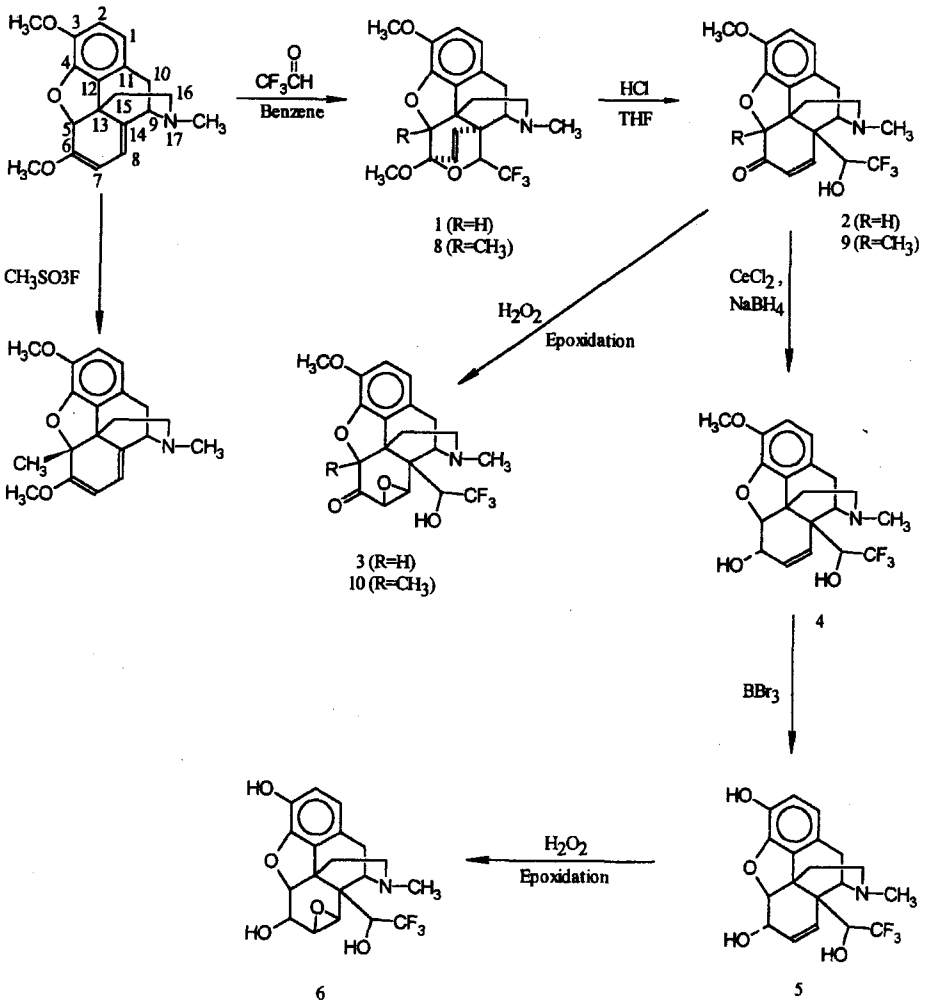
Type of Receptor	μ	δ	κ
Radioligand	[^{3}H]DAMGO 1 nM	[^{3}H]Naltrindole 1 nM	[^{3}H]U69593 1 nM
Buffer	Tris. 50 mM	Tris. 50 mM	Tris. 50 mM
Tissue	Guinea Pig. Cortex	Guinea Pig. Cortex	Guinea Pig. Cortex
Incubation Condition	37℃, 20 min	37℃, 45 min	37℃, 20 min
Nonspecific Binding	DAMGO, 10 μM	Naltrindole, 10 μM	U69593, 10 μM

본 연구에서는 수용체 결합을 보다 생리적인 조건하에서 관찰하고자 37℃에서 행하였다. 이 시험관들을 37℃ 항온 수조에 옮겨서 10분간 전 배양한 후, 100 μl의 [^{3}H]-ligand를 투여하고 20분간 배양하여, 수용체 부위에서 표식된 약물이 평형상태가 되도록 한다. 배양시간이 끝나면, 4 ml의 냉각된 완충액을 가하고, cell harvester(Inotech, 1H-101, Swiss)를 사용하여, Whatman GF/B 여과지를 통하여 급속여과시켜 반응을 종료시킨다. 여과지는 다시 4 ml의 완충액으로 2회 더 수세한 다음, liquid scintillation vial에 옮겨 담고, 0.5 ml의 ethyl alcohol로 적신 후, 3 ml의 counting cocktail(Aqualuma, Lumac)을 가하여, 잘 흔들어 균질하게 하여, chemoluminescence가 방사능 측정에 영향에 미칠 수 있으므로 12시간 암실에 보관하였다가 Packard TriCarb liquid scintill-ation counter로 방사능을 측정한다. 표본의 단백질 정량은 Lowry 등의 방법으로 하였다. [^{3}H]ligand의 수용체결합에 대한 각 경쟁물질들의 작용은 LIG-AND 프로그램을 이용하여 분석한다. 이 프로그램은 nonlinear leat-squares curve fitting algorithm을 이용한 것으로 하나 혹은 그 이상의 결합 부위를 동시에 검정할 수 있는 것이며 다른 분석 방법에 비교하여 다음 몇가지 잇점을 갖고 있다. 종속변수로 특이결합량(specific binding) 대신 총결합량(total binding)을 사용하기 때문에 특이결합량을 구하기 위하여 비특이결합량(non-s-pecific binding)을 제함으로써 야기될 수 있는 오차를 피할 수 있으며, 수용체결합 곡선의 양단과 중앙부의 측정치가 각각

다르게 중점이 주어지므로 곡선의 양단에서 주로 나타나는 측정치의 변이에 의한 곡선의 왜곡을 최소화할 수 있으며, 곡선의 fittness의 적합성을 검정할 수 있으므로 곡선이 두 개 이상의 기울기를 가질 때 결합에 참여하는 수용체에 수가 몇 개인지 그리고 각각의 친화력과 결합부위 수를 알 수 있도록 하는 점이다.

결과 및 고찰

Thebaine을 trifluoroacetaldehyde와 90°C에서 benzene 용매하에서 24시간 동안 sealed rube 속에서 질소충진 하에서 Hetero Diels-Alder adduct(1)을 얻었다(Scheme I). 이 구조를 spectroscopy date로 살펴보면 proton NMR에서 (1)의 화합물은 특정 피크인 H-5가 4.57 ppm에서 나타나고, vinyl proton이 5.60 ppm과 6.15 ppm에서 나타나는 것으로 확인되었다. 그리고 이 화합물을 H-ydrolysis시키기 위하여 Conc-HCl : THF(1:10)으로 실온에서 7시간 동안 반응하여 88%의 수득률로 (2)를 합성하였다. 이 화합물의 합성 확인은 H-6 O-Me peak가 3.54 ppm에서 나타나지 않음으로 확인할 수 있었으며 IR에서 3460 cm^{-1}에서 OH기의 특성 피크를 볼 수 있었으며 1685 cm^{-1}에서 carbonyl기의 특성 피크를 확인할 수 있었다. 또한 proton NMR에서 H-8 가 6.54 ppm으로 이동하였고



Scheme I — Synthesis of the C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-7.8-epoxy-codeinone and C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-7.8-epoxy-morphine, C_{14}-(1-hydroxy-2-trifluoroethyl)-7.8-epoxy-5-methylthebaine.

2.98 ppm에서 새로운 OH 피크가 singlet으로 나타남을 확인하였다. Ketone group을 선택적으로 환원하기 위하여 cerium chloride와 sodium boro-hydride를 사용하여 cis isomer(70%)를 칼럼크로마토그래피로 분리하였다(4). proton NMR로 살펴보면 OH 피크가 각각 1.64 ppm과 3.04 ppm에서 나타나고 3.84 ppm에서 H-3, OMe, 2.34 ppm에서 N-Me피크를 확인할 수 있었다. IR에서는 1685 cm^{-1}의 카르보닐기의 특성 피크가 사라짐으로 확인할 수 있었다. 이렇게 얻은 cis-isomer를 H-3, OMe의 methyl을 제거하기 위하여 몰수를 다양하게 변화하면서 실험하여 본 결과 몰비가 1:4이었을 때 가장 좋은 수득률을 얻을 수 있었다(5). proton NMR로 살펴보면 3.80 ppm에서 singlet으로 나타났던 H-3, OMe피크가 사라지고 H-3, OH 피크가 1.23 ppm에서 단일 피크가 확인할 수 있었다. IR에서는 3460 cm^{-1}에서 강하게 흡수띠를 볼 수 있었다. Hydrolysis adduct(2)에 30% hydrogen peroxide와 증류수를 실온에서 반응하여 epoxide 화합물(4)를 95%의 수득률로 얻어졌다. 이 화합물은 ^{13}C-NMR로 살펴보면 C_7과 C_8 peak는 128.03과 145.60 ppm에서 나타났던 것이 61.5 ppm과 47.3 ppm에서 새로운 피크가 나타났다. proton NMR에서는 C_6의 carbonyl과 epoxide의 deshilding effect로 인하여 H-7가 6.72 ppm으로 이동하였다 IR에서는 epoxide peak가 1281.87 cm^{-1}에서 확인할 수 있었다. 또한 epoxide 유도체 (6)은 m-chlorobenzonic acid와 H_2O를 사용하여 epoxide를 시도하였으나 C_{14}의 입체장애로 m-chloroperbenzoic acid는 실행되지 않았다. Thebaine을 -78°C 하에서 n-BuLi와 methyl fluorosulfate를 질소충진하에서 반응시킨 후 상온에서 교반환류시켜 화합물 (7)을 Scheme I에서와 같이 57%의 수득률로 얻었다. 화합물 (7)의 확인은 proton NMR에서 살펴보면 H-5, peak가 5.29 p-pm에서 사라지고 1.74 ppm에서 새로운 methyl peak가 나타남으로서 확인할 수 있었다. 화합물 (8)의 합성은 5-methylthebaine을 sealed tube에서 benze-ne과 trifluoroacetaldehyde로 Hetero Diels-Alder 반응을 통하여 얻었다. 화합물 (8)의 확인은 proton NMR로 살펴보면 H-5가 1.74 ppm에서 나타나고 v-inyl proton인 H-8 가 5.50 ppm down field로 이동하였다. 화합물 (9)의 합성은 화합물 (8)을 THF와 HCl로 3시간 반응하여 얻었다. proton NMR로 살펴보면 H-6, OMe peak가 3.54 ppm에서 사라지고 IR에서 1715 cm^{-1}에서 carbonyl 특성 피크와 3381 cm^{-1}에서 강한 흡수띠가 히드록시 피크임을 확인할 수 있었다. 또한 화합물 (10)을 얻기 위하여 화합물 (9)에 30% H_2O_2와 증류수를 사용하여 90%의 수율로 얻었다. proton NMR로 살펴보면 H-5가 1.80 ppm에서 확인되고 IR에서는 1293 cm^{-1}에서 확인할 수 있었다. 이렇게 합성된 화합물 (6)과 (10)을 척수강으로 투여하여 진통작용 여부를 검색하기 위하여 여러용량을 척수강으로 투여한 뒤 10, 20, 30, 45 그리고 60분 후에 tail-flick test를 실시하였다. 화합물 (6)과 (10)은 척수강으로 투여되었을 때 용량의존적으로 진통작용을 유발시킴을 확인하였다.

Table II — Comparison of binding affinities of selective ligand, three Diels-Alder adducts of thebaine and morphine, a prototype analgesic opioid for three major types of opioid receptors μ, δ and κ in guinea pig coryex membrane preparation

Drug	Affinity constant (nM)		
	μ([^{3}H]DAMGO)	δ([^{3}H]NTI)	κ([^{3}H]U69
DAMGO	3.2±0.1	ND	ND
NTI	ND	4.2±0.2	ND
U69	ND	ND	6.7±0.3
(6)	142.6±4.2	4356.3±210.5	4784.6±152.1
(10)	2531.7±112.1	3654.6±215.4	3793.3±118.5
Morphine	3.1±0.09	576.9±9.7	494.2±15.8

Experimental condition of opioid μ^-, δ^- and κ^-opioid receptor binding weresummerized in table 1 in "Materials and Methods". Affinity constant (Kd or Ki, nM) was calculated by a computer software of nonlinear curve-fitting algorithm(LIGAND). Each value represents the mean with SEM from at least 3 independent experiments performed in triplicate.

새로운 진통제의 모색을 위하여 합성한 (6), (10)인 thebaine의 Diels-Alder adducts의 opioid μ, δ 그리고 κ 수용체에 대한 친화력을 검정하였다. (6)은 [^{3}H]DAMGO의 결합을 morphine에 비해서는 다소 약하게 억제하여 μ 수용체에 대하여 비교적 높은 친화력을 갖음을 보였으며, [^{3}H]NTI 또는 [^{3}H]U69의 수용체결합은 거의 영향을 미치지 못하여 μ-opioid 수용체에 선택성을 갖음을 시사하였다. (6)의 각 opioid 수용체의 구별능은 μ 수용체와 δ 또는 κ-수용체에 대한 친화력의 비는 약 30배의 차이를 보여 μ와 δ 또는 κ 수용체의 구별능을 가짐으로서 약물의 선택성을 의미하는 것으로 약물의 부작용의 감약을 위해 그 개발가치가 있을 것으로 사료된다.

그리고 본 연구에서 (6)에 methyl기를 첨가한 (10)은 [^{3}H]DAMGO, [^{3}H]NTI 또는 [^{3}H]U69의 수용체 결합에 영향을 주지 못하여 opioid 수용체에 대한 친화력이 거의 없음을 보였던 바, 이는 methyl기가 첨가되므로 해서 opioid activity를 잃음을 시사하는 것으로 향후 opioid 수용체에 대한 결합자의 합성에 있어 중요한 정보를 제시하는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구에 지도하여 주신 지도교수님과 약리효과를 측정하는 데 도움을 주신 전북대학교, 한림대학교의 의과대학 약리학교실 팀에게 감사를 드립니다.

문 헌

1) Holms, H. L. : *The Alkaloids*. Vol. II, ed., Manske, R. H. F and Holms, H. L., Academic press Inc., New York, pp. 2-216 (1952).
2) Wolf, M. : *Burger's Medical chemistry*. part II, 4th, ed., New York, p. 724 (1981).
3) Bently, K. W. : *Rodd,s Chemistry of carbon compounds*. 4th, ed., Coffey, S. Elsevier Scintific Publishing Co., Amsterdam, pp. 268-301 (1978).
4) May, E. L., Sargent, L. J. : *Analgesic*. vol. 5, ed., by Desteven, G. Academic press Inc., New York, pp. 124 (1965).
5) Bentley, K. W. : *The Alkaloids*. vol. VII, ed., by Manske, R. H. F. Academic Press Inc., New York, pp. 3-156 (1971).
6) Rapoport, H. and Sheldrick, P. : The Diels-Alder rection with thebaine. Thermal rearrangement of some accucts from acetylenic dienophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1636 (1963).
7) Zirkle, C. L., and Kaiser, C. : *Medicinal chemistry*. 4th. ed. part II., Wiley-Interscience., New York, 1410 (1770).
8) Tani, J., Yamada, Y., Oine, T. Ochiai, T., Ishida, R. and Inoue, I. : Studies on biologically active halogenated compounds. *J. Med. Chem.* **22**, 95 (1979).
9) Jones, S. L. and Gebhart, G. F. : Inhibition of spinal nociceptive transmition from the midbrain, pon, and medulla in the rat., activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Res.* **460**. 281 (1988).
10) Suh, Harold. H., and Leon, L. F. : δ-but not μ-opioid receptors in the spinal cord are involved in antinociception induced by β-endrophin given intracerebroventricularly in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **253**. 981 (1990).
11) Suh, Harold. H. and Leon, L. F. : Tseng. Different types of opioid receptors mediating analgesic induced by morphine, DAMGO, DPDPE, DADLE and β-endrophine in mice. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. **342**. 67 (1990).