

## *p*-Methoxycinnamic Acid의 尿代謝物에 對하여

禹 源 植\*

(Received September 10, 1964)

Won Sick Woo: Urinary Metabolites of *p*-Methoxycinnamic Acid

The metabolism of *p*-methoxycinnamic acid (*p*-MCA) has been studied in man and rabbits. Possible compounds were examined for metabolites by crystallization and by paper chromatography, which excreted after administration of *p*-MCA by stomach tube and intravenous injection. *p*-Methoxyhippuric acid was isolated from urine. Although pure glucuronide was not crystallized from urine, product was obtained by basic lead salt method, which gave *p*-methoxybenzoic acid (*p*-MBA) on hydrolysis and gave an intense naphthoresorcinol reaction. No evidence for the demethylation of *p*-MCA was found. These results are indicating that *p*-MCA may be mainly converted to *p*-MBA by  $\beta$ -oxidation and excreted as its conjugates with glycine and glucuronic acid. Its oxidation does not appear to be dependent on intestinal micro-organisms.

*p*-Methoxycinnamic acid(*p*-MCA<sup>1</sup>)는 1887年 PERKIN<sup>1)</sup>이 合成한 物質이나 天然에서는 遊離狀 態로 *Pyrola incarnata* FISCH.<sup>2)</sup> *Scrophularia Oldhami* OLIVER<sup>3)</sup>에서 發見되었으며 ethylester 로서 *Kaempferia galanga* L.<sup>4)</sup> *Hedycium spicatum* HAMILTON<sup>5)</sup>에 存在한다는 것이 報告되어 있을 뿐이다.

著者<sup>3,6)</sup>는 *p*-MCA 自體에 解熱作用이 있음을 밝힌바 있으며 아울러 antirheumatic action 을 가진 鎮痛解熱劑의 共通作用으로 認定되고 있는 adrenal ascorbic acid 含有量을 低下시키는 作用도 있다고 發表한 바있다. 그러므로 著者は 本物質을 醫藥品으로 使用할 境遇 *p*-MCA 를 投與時 이것이 生體內에서 어떻게 變化되는지를 究明코져 사람 및 家兎에 本物質을 投與하고 排泄된 尿에서 그것의 代謝產物을 調査한 結果 *p*-MCA가 生體內에서 酸化되어 *p*-methoxybenzoic acid (*p*-MBA)가 되고 glycine 또는 glucuronic acid와 抱合되어 排泄됨을 實驗的으로 立證하였기에 이를 報告한다.

### 實 驗

投與量 및 尿의 採取. — 健康한 成人(50kg)에 sodium *p*-methoxycinnamate(Na *p*-MCA)

\* Drug Research Institute, Seoul National University, Seoul, Korea

<sup>1</sup> The following abbreviations are used: *p*-MCA, *p*-methoxycinnamic acid; Na *p*-MCA, sodium *p*-methoxycinnamate; *p*-MBA, *p*-methoxybenzoic acid; *p*-HCA, *p*-hydroxycinnamic acid; *p*-HBA, *p*-hydroxybenzoic acid.

0.5 g을 二回(4時間間隔)經口的으로 投與하고 12時間內에 排泄한 尿를 모아 實驗에 使用하였다. 家兔(2.0~2.5 kg)에 對하여는 體重 kg當 3% Na *p*-MCA 水溶液 3 ml를 靜脈注射하여 5時間內에 排泄한 尿와 3% Na *p*-MCA 水溶液을 kg當 10 cc式 經口的으로 投與하고 24時間 以內에 排泄하는 尿를 檢體로 使用하였으며 投與前 24時間에 排泄한 같은 사람 및 家兔의 尿를 對照로하였다. 尿는 모다 HgCl<sub>2</sub> 飽和溶液 5 ml가 드리있는 容器에 받았다.

**Paper chromatography.**—常法에 依하여 施行하였으며 그 條件, 展開液, 檢出試液 및 代謝產物로 推定되는 各物質과 glycine의 Rf 値는 Table I과 같다.

*p*-MCA 및 *p*-hydroxycinnamic acid (*p*-HCA)는 Knoevenagel法<sup>7)</sup> 및 Zincke-Leisse法<sup>8)</sup>에 依하여 合成하였으며 *p*-MBA는 anisaldehyde를 酸化하여 얻었고 *p*-hydroxybenzoic acid (*p*-HBA)는 市販品을 使用하였다. 모두 含水 EtOH로 再結晶하여 使用하였으며 glycine은 paper chromatography 用試藥(E. Merk社製)을 使用하였다.

TABLE I.—Chromatographic Behavior of *p*-MCA, related Substance investigated and Glycine.  
Solvent mixture: A, BuOH-3% aqueous ammonia(1:1); B, isopropyl alcohol-0.3% aqueous ammonia (1:1); C, 20% aqueous KCl; D, BuOH-HAC-H<sub>2</sub>O (4:1:5).

The ascending method was used with Whatman No. 1 paper at room temp.

Detecting reagents: a, 0.4% bromphenol blue; b, iodine vapor; c, diazotized sulfanilic acid and 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; d, nynhidrin.

Abbreviations: Bl, blue; Br, brown; R, red; Y, yellow; V, violet.

Compound	Rf in solvent mixture				color with detecting reagent			
	A	B	C	D	a	b	c	d
<i>p</i> -MCA	0.39	0.87	—	—	Bl	Br	—	—
<i>p</i> -MBA	0.31	0.82	—	—	Bl	—	—	—
<i>p</i> -HCA	0.18	0.77	0.39	—	Bl	Br	R	—
<i>p</i> -HBA	0.12	0.71	0.65	—	Bl	Br	Y	—
Glycine	—	—	—	0.20	—	—	—	V

**代謝產物의 抽出.**—尿에 *d*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 加하여 pH1로 調節하고 朝比奈 自動抽出機를 使用하여 Et<sub>2</sub>O로 24時間 抽出하고 Et<sub>2</sub>O 抽出液을 NaHCO<sub>3</sub> 飽和溶液으로 抽出後 다시 *d*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 加하여 pH1로 調節하여 Et<sub>2</sub>O로 抽出하고 Et<sub>2</sub>O를 溜去後 殘査(一部는 EtOH에 溶解하여 paper chromatography 用에 使用, fraction I)에 6 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 ml을 加하여 水浴上에서 3時間 分解시킨後 *d*-NaOH를 加하여 中和시키고 다시酸을 加하여 pH1로 하고 Et<sub>2</sub>O로 抽出 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 脫水後 Et<sub>2</sub>O을 溜去한 殘査를 EtOH에 溶解하고 이를 paper chromatography 用 材料로 하였다(fraction II).

### 結果 및 考察

**Paper chromatography에 依하여 確認된 代謝物.**—모든尿에서 檢出된 代謝物을 Table II에 表示하였다.

*p*-MCA는 모든 尿의 fraction II에서 檢出되었으나 fraction I에서는 靜注한 家兔尿에서 不確實하게 檢出되었다. 이는 一時에 大量投與로 말미암아 *p*-MCA가 미처 生體內에서 變化되기前에 排泄된 것이 아니면 抽出過程에 抱合된 것의 一部가 分解되어 生成된 것으로 生覺

TABLE II. — Metabolites detected by Paper Chromatography in the Urine of Man and Rabbits. Rf. values and properties of the spots agreed with those of the authentic compounds used as reference compounds and given in Table I.

Compound	Fraction I	Fraction II
<i>p</i> -MCA	-a (-)b	+ (-)
<i>p</i> -MBA	+ (-)	+++ (-)
<i>p</i> -HBA	+ (+)	+ (+)

a. Obscurely detected in urine from rabbits administered by *i.v.* injection.

b. Results from normal urine appeared in parentheses. Fraction I, not hydrolyzed; Fraction II, hydrolyzed.

解되어 생성된 것으로 생覺된다.

*p*-HBA가 試驗群에서 檢出되었다 하더라도 正常尿에서도 檢出되었으므로 本實驗만으로서 *p*-HBA가 *p*-MCA의 代謝產物인지의 與否를 論斷하지는 못하나 Bray等<sup>10,11,12)</sup>에 依면 *p*-nitroanisole, *p*-methoxyanisole, *p*-cyanoanisole 등은 demethylation 되어 *p*-nitrophenol, methoxyphenol, *p*-cyanophenol 등으로 되고 glucuronic acid 또는 sulfuric acid와 抱合되어 尿 排泄됨을 發表하였으며 anisole은 酸化되어 *p*-methoxyphenol로 되나 demethylation이 일어나지 않음을 指摘하고 *p*-methoxybenzylchloride, *p*-methoxybenzyl alcohol은 酸化되어 *p*-MBA로 되고 *p*-MBA自體를 投與하면 아무 變化없이 排泄되어 glycine 또는 glucuronic acid와 抱合되어 있음을 發表하였다. 이와같은 現象은 methoxyl基에 對하여 *p*位에 抱合될 수 있는 基 變化될 수 있는 側鎖가 있든가 또는 비어있어서 酸化될 수 있을 때에는 demethylation이 일어나지 않으나 이 變化가 不可能할 때 비로소 demethylation이 일어난다고 생각할 수 있으 적어도 本實驗에서 檢出된 *p*-HBA는 *p*-MCA의 代謝產物로 指摘하는 것 보다는 Booth等<sup>13)</sup> 指摘한 바와 같이 tyrosine의 代謝產物일 것이라고 思料되는 바이다. 한편 Quick<sup>14,15)</sup> cinnamic acid,  $\beta$ -phenyl propionic acid,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -phenyl propionic acid 등은 모두 生體 液에서 酸化되어 benzoic acid로 變하고 glucuronic acid 또는 glycine과 抱合되어 排泄됨을 指摘하고 있다. 이는 *p*-MCA가 生體內에서  $\beta$ -oxydation에 依하여 酸化되어 *p*-MBA로 있다는 뒷받침이 될 수 있다. 이와 같은 變化는 經口的으로 投與한 때나, 靜注하였을 때 尿代謝物에 差가 없음으로 腸內細菌에 依한 것이 아니라 生體自體內에서의 變化라고 生 된다.

*p*-Methoxyhippuric acid의 分離 및 同定. — Na *p*-MCA를 經口的으로 投與한 家兎尿의 fraction I을 少量의 無水 EtOH에 溶解하고 冷所에 放置하면 結晶性物質이 析出된다. 이를 Et<sub>2</sub>O에 溶解하고 Et<sub>2</sub>O를 溜去하여 남은 殘渣에서 熱 toluene 可溶物質을 抽出除去後 다시 EtOH로 數回再結晶하면 m.p. 172°의 板狀結晶을 얻는다. 本物質은 *p*-dimethylaminobenzaldehyde 試液과 作用시키면 橙色의 呈色反應이 일어나고 酸으로 加水分解後 水解物에서 glycine 및 *p*-MBA를 paper chromatography로 確認하였고 水解物 一部를 Et<sub>2</sub>O로 抽出하고 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 脫水 Et<sub>2</sub>O를 溜去後 殘渣를 EtOH로 再結晶하면 m.p. 184°의 針狀結晶을 얻는다. 이 物質은 *p*-MBA와 混融試驗을 하여도 融點이 降下하지 않는다.

*p*-Methoxybenzoyl-D-glucuronide의 分離 및 推定. — *p*-MCA를 經口的으로 投與한 家兎

된다.

모든尿의 fraction II에서 檢出된 *p*-MCA는 그 spot의 크기와 呈色強度로 미루어 보아 極히 微量 存在하는 것으로 生覺되며 이것은 *p*-MCA가 大部分 生體內에서 酸化되고 그 小部分만이 抱合되어 排泄된다고 思料된다. fraction I에 檢出된 *p*-MBA는 *p*-MBA를 家兎에 投與時 遊離狀態로서는 거의 排泄되지 않는다는 報告<sup>7)</sup>에 미루어보아 이것도 아마 抽出過程때에 抱合된 것이 一部

尿 200 ml에 HAc 3滴을 加하고 Pb(Ac)<sub>2</sub>溶液을 加하여 沈澱物을 除去後 濾液에 NH<sub>4</sub>OH를 加하여 pH 9로 調節後 鹽基性錯酸鉛溶液을 加하여 얻은 沈澱物을 물에 懸垂하고 H<sub>2</sub>S를 通하여 Pb를 完全히 除去하고 濾液을 40°以下에서 減壓濃縮後 眞空乾燥器에서 乾燥하고 Et<sub>2</sub>O 加溶分을 抽出除去하고 EtOH에 녹여 再三 結晶化를 試圖하였으나 結晶을 얻지 못하였다. 그러나 이 syrup 狀物質은 naphthoresorcinol reagent에 依하여 強한 反應을 示하였으며 本物質을 N-NaOH로 水解後 酸性(pH 1)으로 하여 Et<sub>2</sub>O로 抽出 Et<sub>2</sub>O를 溜去하고 EtOH로 再結晶하여 얻은 m.p. 184°의 針狀結晶은 *p*-MBA와 混融試驗을 하여도 融點이 降下하지 않음으로 *p*-methoxybenzoyl-D-glucuronide로 推定하는 바이다.

尿에서 *p*-methoxyhippuric acid를 얻었으며 비록 *p*-methoxybenzoyl-D-glucuronide를 結晶形으로 얻지 못하였다고 하더라도 그 化學的性質로 보아 또 *p*-MBA를 家兎 및 사람에 投與時 glucuronide로도 大量 排泄된다는 報告<sup>9,10,16</sup>에 미루어보아 *p*-MCA는 生體內에서 酸化하여 *p*-MBA가 된後 glycine 및 glucuronic acid와 抱合되어 排泄됨은 틀림없는 事實이라고 思料되는 바이다.

## REFERENCES

1. W. H. Perkin, *J. Chem. Soc.*, London, **31**, 389 (1877)
2. H. Inouye and Y. Kanaya, *J. Pharm. Assoc. (Japan)*, **78**, 301 (1958)
3. W. S. Woo, *J. Pharm. Soc. Korea*, **7**, 55 (1963)
4. Van Romburgh, *Chem. Zentr.*, (1900) II. 970
5. J. C. Thresh, *Pharm. J. Trans.*, **15**, 361 (1884)
6. W. S. Woo, *Seoul Univ. J.*, **14**, (C), 119 (1963)
7. E. Knoevenagel, *Ber.*, **31**, 2585 (1898)
8. Th. Zincke and Fr. Leisse, *Ann.*, **322**, 220 (1902)
9. H. G. Bray, B. G. Humphris, W. V. Thorpe, K. White and P. B. Wood, *Biochem. J.*, **59**, 163 (1955)
10. H. G. Bray, V. M. Craddock and W. V. Thorpe, *Biochem. J.*, **60**, 225 (1955)
11. H. G. Bray, S. P. James, W. V. Thorpe and M. R. Wasdell, *Biochem. J.*, **54**, 225 (1954)
12. H. G. Bray, S. P. James and W. V. Thorpe, *Biochem. J.*, **70**, 570 (1958)
13. A. N. Booth, M. S. Masri, D. J. Robbins, O. H. Emerson, F. T. Jones and F. DeEds, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2649 (1960)
14. A. J. Quick, *J. Biol. Chem.*, **77**, 581 (1928)
15. A. J. Quick, *J. Biol. Chem.*, **80**, 515 (1928)
16. A. J. Quick, *J. Biol. Chem.*, **97**, 403 (1932)