약학회지 제28권 제5호 293~297(1984)
Yakhak Hoeji Vol. 28 No. 5

Tranylcypromine의 겉보기 解離恒數 및 分配係數

姜 健 一·鄭 淳 永
淑明女子大學校 藥學大學

(Received September 15, 1984)

Apparent pKa and Partition Coefficient of Tranylcypromine*

Gun Il Kang and Soon Young Chung
College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140, Korea

Abstract—The pKa′ of tranylcypromine was determined by potentiometric titration and ultraviolet spectrophotometric method and found to be 8.08 and 8.15, respectively. The Papp of tranylcypromine between n-heptane and aqueous buffer solution was measured to be 0.90 at pH 7.48 and 4.50 for Pm. The pKa′ of tranylcypromine obtained by means of the partition method was 8.13.

Tranylcypromine(trans-*dl*-2-phenylcyclopropylamine)은 monoamine oxidase (MAO)의 抑制機構를 硏究하기 위한 모델化合物로 많이 이용되어온 藥物이다.[1] 이 약물에 의한 MAO의 抑制를 suicide inhibition으로 설명하려는 報告가 있었으며[2], 著者는 이것을 立證해 주는 代謝産物을 把握하려는 첫번째 試圖로서 쥐를 사용한 ***in vivo*** 대사연구를 行한 바 있다.[3]

이러한 硏究를 隨行하는 과정에서 tranylcypromine의 分析과 代謝硏究 결과를 解析하는데 필요한 pKa 및 分配係數에 대한 報告를 발견할 수 없었으므로 電位差滴定法, 紫外線分光法, 分配係數 測定方法으로 이에 대한 연구를 하여 知見을 얻었기에 報告하고자 한다.

實 驗 方 法

材料 및 試藥—Tranylcypromine sulfate는 Smith Kline and French Laboratories (U.S.A.)로부터 얻었고 tranylcypromine base는 sulfate염을 물에 녹이고 conc. NaOH로 pH 11로 한 다음 $CHCl_3$으로 抽出하여 얻었다. Tranylcypromine·HCl은 tranylcypromine base를 소량의 $CHCl_3$에 녹인 후 HCl gas를 포화한 ether를 加하여 침전을 얻고 文獻의 방법대로[4] ethylacetate-ether로 2回 재결정하였다. 分配실험에 사용한 n-heptane 및 기타 완충액 제조 시약은 Junsei Chemical製 特級시약이었다.

器機—실험에 사용한 pH meter는 미국 Orion Research製의 digital pH/millivolt meter 611이었고, Hitachi Model 200-20 UV-VIS spectrophotometer를 사용하였다. Regression analysis 등의 통계는 Tallarida 등[5]의 program을 이용하여 Apple II microcomputer로 처리하였다.

緩衝液 製造—紫外線分光法과 分配方法에 사용한 완충용액은 다음과 같은 방법으로 製造하였다. pH 4~7.2용액은 0.1M KH_2PO_4 50ml에 0.1M NaOH를 加하여 각각의 pH로 맞추고 100ml로 희석하였고, pH 7.4~9 용액은 0.025M borax 50ml에 0.1MHCl을 加하여 각각의 pH로 調

* Mechanism of the Monoamine Oxidase Inhibition by 2-phenylcyclopropylamines II

節하고 100ml로 하였다. pH 9.2~10.5 용액은 0.025M borax 50ml에 0.1M NaOH을 加하여 각각의 pH로 맞추고 100ml로 하였다.

電位差滴定法에 의한 pKa측정—10^{-2}M tranylcypromine sulfate 또는 tranylcypromine·HCl 20ml에 0.1M NaOH 0.1ml씩을 加하면서 2.0ml를 넣을 때 까지의 pH변화를 측정하였다. 같은 내용으로 공시험을 하였다. Ethanol의 영향을 보기위하여 20%, 10%, 5%, 2.5%의 ethanol을 함유한 tranylcypromine sulfate용액을 제조하여 위와 同一한 실험을 하였다. 실험에서 얻은 0.1M NaOH에 대한 pH의 변화를 graph上에 plot하여 겉보기 解離恒數(pKa′)를 구하였다.

紫外線分光法에 의한 pKa측정—25ml 용량 플라스크에 10^{-2}M tranylcypromine sulfate 5ml와 ethanol 2.5ml를 넣고 각각 0.1M HCl용액 및 pH 4에서 10.5까지의 완충용액과 0.1M NaOH용액을 넣어 25ml로 채워 吸光度 測定 檢體를 만들었다. 같은 방법으로 각각 製造한 blank를 對照로 하여 UV 흡광광도계로 265nm에서의 吸光度를 측정하였다. 이때 吸光度를 잰 후 즉시 측정한 pH를 실제 용액의 pH로 하였다. 0.1M HCl과 0.1M NaOH에서의 吸光度를 각각 D_∞, D_0로 하고 $pKa' = pH + \log\frac{D-D_0}{D_\infty - D}$ (Eq. 1)로부터 pKa′를 구하였다.

겉보기 分配係數(Papp) 측정방법—Screw cap을 가진 원심분리관에 10^{-2}M tranylcypronine base의 n-heptane용액 2.5ml, n-heptane 2.5ml를 넣고 0.015M NaCl을 사용하여 이온强度를 0.025로 조정한 0.01M HCl, 0.01M NaOH 및 pH 4에서 10까지의 완충용액을 각각 5ml씩 넣은 후 28°C에서 2시간 동안 10분 간격으로 20회씩 흔들어주고 3,000 r.p.m.에서 5분간 원심분리하여 30분간 방치 후 n-heptane층과 수층을 분리하였다. 분리한 수층의 pH를 측정한 후 그중 3ml를 取하여 0.5M HCl을 1ml 加한 다음 265nm에서의 吸光度를 측정하였다. 그리고 n-heptane층은 그대로 268nm에서의 吸光度를 측정하였다. 수층과 n-heptane층의 tranylcypromine의 농도는 標準檢定曲線으로부터 구하였다.

Papp로부터 pKa′를 구하는 방법—유기용매층과 수층에서의 非이온화된 분자의 농도를 각각 $[B]_0$, $[B]_w$로 나타내고, 유기용매층과 수층에서의 이온화된 분자의 농도를 각각 $[BH^+]_0$, $[BH^+]_w$로 나타내면 $Papp = \frac{[B]_0 + [BH^+]_0}{[B]_w + [BH^+]_0}$ (Eq. 2)로 표시된다. 이때 이온화된 상태의 分配係數 $Pi = \frac{[BH^+]_0}{[BH^+]_w}$이고, 非이온화된 상태의 分配係數 $Pm = \frac{[B]_0}{[B]_w}$이다. BH^+의 수층에서의 이온화상수 $Ka' = \frac{[B]_w[H^+]}{[BH^+]_w}$이므로 Eq. 2의 식에 Pi, Pm, Ka′의 식을 代入 정리하고 log를 取하면 $pKa' = pH + \log\frac{Pm - Papp}{Papp - Pi}$ (Eq. 3)의 식을 얻는다. 이 식에 각 pH에서 구한 Papp값과 0.01M NaOH 및 0.01M HCl에서 각각 얻은 Pm, Pi를 사용하여 pKa′를 구한다.

實驗結果 및 考察

電位差滴定法에 의한 pKa′측정—Tranylcypromine sulfate를 사용한 실험에서 구한 pKa′는 8.08±0.02 (SD, n=3)이었다. 10^{-2}M Tranylcypromine base가 물에 불완전하게 용해되기 때문에 생길 수 있는 pKa′의 不確實性 與否를 확인하기 위하여 2.5, 5, 10, 20% ethanol함유 용액에서의 pKa′를 구하였다. $1/\epsilon$(ϵ=透電恒數)에 대한 pKa′의 plot의 직선관계[6]로 부터 구한 純粹한 물중에서의 pKa′는 8.20±0.019(SE. n=12)이었고 相關係數는 0.9467, 95% 信賴限界範圍는 8.157~8.243이었다.

실제 他용매 混合 水용액을 사용한 값을 이용하여 純粹한 수용액에서의 정확한 pKa′값을 오차

가 없이 구하기 어렵고, 수용액 사용시의 pKa′값 8.08과 ethanol함유 용액 사용시의 8.20사이의 近似한 差異로 보아 tranylcypronine base의 불완전한 용해로 인한 영향이 pKa′ 8.08에는 없었던 것으로 생각된다.

그리고 20% ethanol함유 용액에서 tranylcypromine sulfate를 사용했을 때 pKa′는 7.93±0.03 (SD. n=3)이었고, tranylcypromine HCl을 사용했을 때는 7.94±0.08(SD. n=3)로 有意性있는 差異가 없었고, 全 실험은 tranylcypromine sulfate를 사용하였다.

紫外線分光法에 의한 pKa′의 측정—Tranylcypromine sulfate 수용액은 λ_{max} 265nm에서 분자 흡광계수(ε)가 303이었다. Tranylcypromine base의 95% ethanol용액은 λ_{max} 268nm에서 ε가 488이었다.

Fig. 1에서와 같이 吸光度는 pH의 支配를 받았으며, 이것은 tranylcypromine의 cyclopropyl ring이 π 전자와 같은 성질을 가지므로 phenyl ring의 conjugation이 延長되어있기 때문으로 생각된다. Eq. 1에서 D_∞와 D_0는 2×10^{-3}M tranylcypromine의 0.1M HCl에서의 흡광도와 0.1M NaOH에서의 흡광도를 각각 사용하여 구하였고, 3回 측정한 D_∞ 및 D_0의 平均값은 각각 0.577±0.013(SD)과 0.946±0.007(SD)이었다.

電位差滴定法에 의하여 구한 pKa′ 8.08에 ±1.0 pH 단위를 취하여 Eq. 1에 의해 계산한 pKa′ 값은 Table I에서와 같이 8.15±0.10(SD. n=11)이었다.

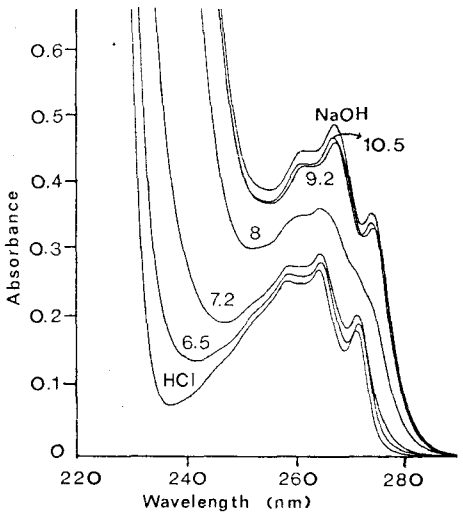

Fig. 1- Ultraviolet spectra of tranylcypromine sulfate (10^{-3}M) at different pHs.

分配方法에 의한 pKa′측정—分配方法에 의한 pKa′측정은 電位差滴定方法이나 紫外線分光法에 비하여 실험 과정이 복잡하고 정확성이 缺如된 방법으로 記述되어 있으나[6] 물에 용해가 제한되어 있는 경우나 紫外線 흡수 spectra의 pH에 따른 변화가 크지 않을 경우,

Table I—pKa′ values of tranylcypromine determined by the ultraviolet spectrophotometric method[a].

pH	Absorbance[b]	pKa′[d]
6.70	0.597	7.94
7.00	0.607	8.05
7.39	0.629	8.18
7.56	0.665	8.06
7.81	0.691	8.16
7.99	0.728	8.15
8.28	0.781	8.19
8.48	0.818	8.21
8.65	0.843	8.24
8.87	0.882	8.19
9.13	0.899	8.29
Mean±SD		8.15±0.10
0.1M HCl(D_∞)[c]	0.577±0.013	
0.1M NaOH(D_0)[c]	0.946±0.007	

[a]Concentration of tranylcypromine sulfate, 2×10^{-3}M; ionic strength 0.025−0.122. [b]Absorbance was measured at 265 nm. [c]Mean±SD of three experiments. [d]These values were calculated using Eq. 1.

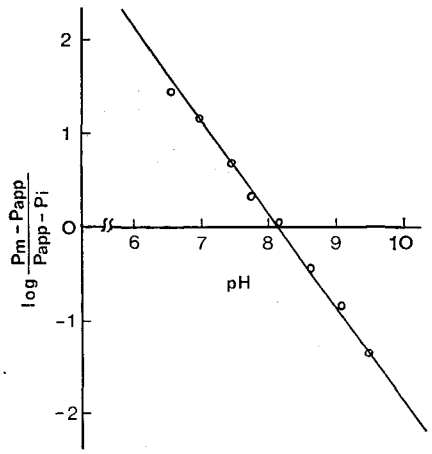

Fig. 2- Plot of log [(Pm-Papp/Papp-Pi)] versus pH. Concentration of tranylcypromine base in n-heptane, 5×10^{-3}M; ionic strength 0.025.

Table II—pKa′ values of tranylcypromine determined by the partition method.

pH	Papp[a]	pKa′[c]
6.57	0.289	8.03
6.95	0.441	8.08
7.46	0.901	8.14
7.77	1.577	8.08
8.15	2.196	8.20
8.63	3.348	8.19
9.04	3.950	8.20
9.45	4.319	8.09
Mean±SD		8.13±0.065
0.01M NaOH(Pm)[b]	4.500	
0.01M HCl(Pi)[b]	0.142	

[a]Concentration of tranylcypromine base in n-heptane, 5×10^{-3}M; ionic strength 0.025; temperature 28°C. [b]Mean of three experiments. [c]These values were calculated using Eq. 3.

예를 들어 verapamil의 pKa측정[7]등에 이용되어왔다.

本실험에서는 tranylcypromine의 分配係數를 측정함과 동시에 分配방법으로 얻은 pKa′값을 電位差滴定方法이나 紫外線分光法과 비교하여 分配方法이 pKa′측정에 이용될 수 있는지를 檢討하고자 하였다.

Tranylcypromine은 수층에서 염산염의 형태로 分析하였으며 全실험에서 再現性있는 分析値를 보여주었다. 그러나 n-heptane층을 분석했을 때는 산성 pH쪽에서 λ_{max}가 분리되지 않았으므로 알칼리성에서의 n-heptane층을 분석하여 수층에서 얻은 分析値의 정확성을 확인한 이외에는 모든 실험에서 구한 Papp는 수층을 분석하여 얻은 것이다.

Verapamil의 경우[7] $[BH^+]_0$가 $[B]_0$에 비하여 무시할 수 있는 값이기 때문에 $pKa=pH+\log\frac{Pm-Papp}{Papp}$의 관계식을 적용하여 pKa′를 구하였으나 tranylcypromine의 경우 0.01M HCl에서 Papp가 0.142로 $Pi\left(\frac{[BH^+]_0}{[BH^+]_w}\right)$가 무시할 수 없는 값이기 때문에 Pi를 포함하였을 때 Eq. 3이 pH와의 관계식으로 이용될 수 있는지 與否를 檢討하였다. 이때 이 식에 적용한 Pm은 0.01M NaOH에서의 Papp로서 4.50이었다.

Fig. 2과 같이 pH에 따른 $\log\frac{Pm-Papp}{Papp-Pi}$의 plot은 기울기가 −0.9636±0.0218(SE. n=8)이고 相關係數는 0.9985이었다. 95% 信賴限界의 範圍는 −0.9102～−1.017이었다. 따라서 실험 조건下에서 Eq. 3이 pKa′측정에 적용 가능한 것으로 생각되며 이식을 이용하여 계산한 pKa′는 Table II에서와 같이 8.13±0.065(SD. n=8)이었다.

Tranylcypromine의 pKa′ 8.13은 1級 amine의 pKa가 일반적으로 10이상인 점에서 특이하게 생각되나 aniline의 pKa가 4.60인 점으로 보아 cyclopropyl ring의 전자밀도의 영향때문으로 생각된다.

또 tranylcypromine의 n-heptane에서의 Pm은 4.50이었고 pH 7.48에서의 Papp는 0.90으로서 pH에 아주 큰 영향이 없이 물에의 분배가 큰 점이 특이하였다.

結 論

Tranylcypromine의 pKa′ 및 分配係數를 電位差滴定法, 紫外線分光法, 分配方法으로 硏究하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 電位差滴定法에 의한 pKa′값은 8.08이었고 紫外線分光法에 의한 값은 8.15이었다.

2) n-heptane을 사용한 分配方法에 의한 pKa′측정이 可能하였으며 이때 구한 pKa′값은 8.13이었다.

3) n-heptane을 사용한 실험에서 tranylcypromine의 pH 7.48에서의 Papp는 0.90이었고 Pm은 4.50이었다.

이들 pKa′값은 방법에 따른 차이가 크지 않았으며 1級 amine으로서의 낮은 pKa′값은 cyclopropyl ring의 전자가 phenyl ring의 전자와 conjugation되어있기 때문으로 생각된다.

本 硏究는 1983~1985年度 韓國科學財團 硏究費의 一部로 수행되었음.

文 獻

1. G.I. Kang, Mechanism of the monoamine oxidase inhibition. *Yakhak Hoeji* **27**, 321 (1983).
2. C.P. Paech, J.I. Salach and T.P. Singer, Suicide inactivation of monoamine oxidase by trans-phenylcyclopropylamine. *J. Biol. Chem.* **255**, 2700 (1980).
3. G.I. Kang and S.Y. Chung, Identification of N-acetyl and hydroxylated N-acetyltranylcypromine from tranylcypromine-dosed rat urine. *Arch. Pharm. Res.* **7**, 65 (1984).
4. *The Merck Index*, Tenth Edition. Merck & Co., Inc. 1983, p. 1369.
5. R.J. Tallarida and R.B. Murray, *Manual of pharmacologic calculations with computer programs.* Springer-Verlag, New York, 1981.
6. R.F. Cookson, The determination of acidity constants. *Chem. Rev.* **74**, 5 (1974).
7. J. Hasegawa, T. Fujita, Y. Hayashi, K. Iwamoto and J. Watanabe, pKa Determination of verapamil by liquid partition. *J. Pharm. Sci.* **73**, 442 (1984).