

혈액중 지페프로롤의 가스크로마토그래피에 의한 분석

유영찬 · 정희선* · 김은미

국립과학수사연구소

(Received April 20, 1992)

Gas Chromatographic Analysis of Zipeprol in Blood

Young Chan Yoo, Hee Sun Chung* and Eun Mi Kim

National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-097, Korea

Abstract—The abuse of zipeprol, an antitussive agent, is prevalent among young people. Ten fatal cases of zipeprol concentration in blood after its abuse had caused death are discussed.

GC equipped with TSD was used to quantify the drug in postmortem blood and GC/MS to identify the metabolites in urine after preliminary test.

The calibration curve of zipeprol was linear ($r=0.998$) and the recoveries of zipeprol 5, 10 and 20 μg added to 1 ml postmortem blood were 97.2 ± 3.9 , 92.5 ± 3.9 and $86.9\pm 4.6\%$ respectively. The blood zipeprol concentration varied 2.9 to 24.69 $\mu\text{g/ml}$ in 10 fatal cases. All the deaths were young adults with the age of 16-21.

Three metabolites were identified in drug abuser's urine, 2-methoxy-2-phenyl ethylpiperazine, 2-hydroxy-3-methoxy-3-phenyl propylpiperazine and a demethylated zipeprol.

Keywords □ Zipeprol, fatal cases, GC(TSD) & GC/MS, metabolites, zipeprol postmortem blood concentration.

Zipeprol은 비 물핀성 구조를 갖는 진해제로서¹⁾ codeine 및 그 유도체들이 갖는 부작용을 갖지않아 독성이 적은 것으로 알려져 있다.²⁾ 그러나 대량 복용시 opioid류와 유사한 환각작용이 일어날 수 있어 이를 목적으로 간혹 청소년들이 상습복용하는 사례가 소개된 바 있으며,^{3,4)} 우리나라에서도 청소년들이 이를 과량 복용하고 사망하는 등의 사건이 발생하고 있어 사회문제화 되고 있다.

Zipeprol의 생체시료로부터 분석에 대한 보고는 많지 않아, Beckett 등^{5,6)}이 뇨의 액성에 따른 zipeprol 배설 및 대사물을 확인하기 위해 뇨 및 plasma에서 이 약물을 GC로 측정된 보고, Constantin⁷⁾이 zipeprol의 kinetics를 연구하기 위해 미량의 zipeprol을 GC-NPD로 분석한 보고등이 있을 뿐이다. 또한 zipe-

prol은 환각작용을 일으키기 위해서는 상용량의 10배 이상의 약물을 투여 해야 한다고 하나,⁴⁾ 이의 과량 복용에 의한 중독농도등에 대한 보고는 없으며, Yamamoto 등⁸⁾ 흰쥐에 대한 LD₅₀ 등 만이 보고되어 있을 뿐이다.

따라서 zipeprol남용에 의해 사망한자의 혈액에 대하여 TSD가 연결된 GC로 함량 측정법을 확립한 다음 1991년 1월이래 zipeprol 과량복용으로 사망한 10명의 혈액에서 농도를 측정하여 인체에 대한 환각상태의 혈중농도 및 치사농도 범위를 규명하고자 하였으며, zipeprol 남용자의 뇨에서 zipeprol 및 그 대사체를 GC/MS에 의해 확인하였다.

실험방법

시약—Zipeprol 및 cinnarizine은 국내제약회사에서

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

제공받아 당소에서 함량실험을 실시하여 사용하였다. 염화백금산칼륨(K_2PtCl_6)은 Sigma 회사제를, 박층판은 E. Merck사의 Silica gel 60 F 254(0.2 mm)을 사용하였고 기타시약은 모두 특급을 사용하였다.

기기—Gas chromatograph with TSD & FID detector(Varian 4600)with DS 654 Gas chromatograph & Mass spectrometer(Finnigan 4021) Omni-mixer & micro homogenizer(Sorvall)

시료—1991년 1월부터 1992년 4월까지 당 연구소에 의뢰된 zipeprol과 광복용으로 사망한 사람의 혈액(10 예) 및 남용자의 뇨를 시료로 하였다. 대조 혈액은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 단두하여 채혈하였다.

표준용액의 조제—5 mg/ml의 zipeprol EtOH용액을 표준원액으로 하고 이를 희석하여 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml의 표준용액을 조제하였다. 내부표준물질인 cinnarizine은 100 µg/ml의 EtOH용액을 만들어 사용하였다.

TLC에 의한 예비실험—혈액을 취해 추출조작을 한 후 TLC에 점적하여 $CHCl_3 : EtOH(9 : 1)$ 등의 전개용매에 전개시킨 후 254 nm에서 반점을 확인하고, 발색시약으로 드라켄돌프, 염화백금산칼륨시액을 분무하여 확인하였다.

검량선의 작성—Zipeprol 1, 5, 10, 20, 30 µg에 해당하는 표준용액을 취해 내부 표준물질을 넣고 아래 GC조건에 주입하여 얻은 chromatogram에서 면적비로 검량선을 작성하였다.

분석조건은 다음과 같다.

Column : 3% OV-101 2M×3 mm and Megabore DB-5

Detector : TSD

Col. Temp. : 220°C (1) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min.}}$ 260°C (10)

Inj. Temp. : 270°C

Det. Temp. : 280°C

회수율—대조혈액 1 ml에 zipeprol 5 µg, 10 µg, 20 µg을 넣고 하룻밤 방치한 후 다음의 Fig. 1과 같은 추출방법에 따라 추출을 한 후 GC에 주입하여 얻은 chromatogram의 peak에 대해 본 조건에서 작성된 검량선에 따라 함량을 구하였다. 또한 함량을 아는 변사자 혈액 1 ml에 zipeprol 5, 10, 20 µg을 넣고 같은방법으로 회수율 실험을 시행하였다.

시료중 zipeprol의 함량측정—부검에 의해 채취한

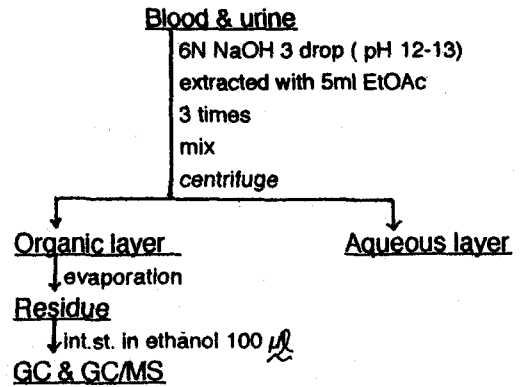


Fig. 1—Procedure for the extraction of zipeprol in blood and urine.

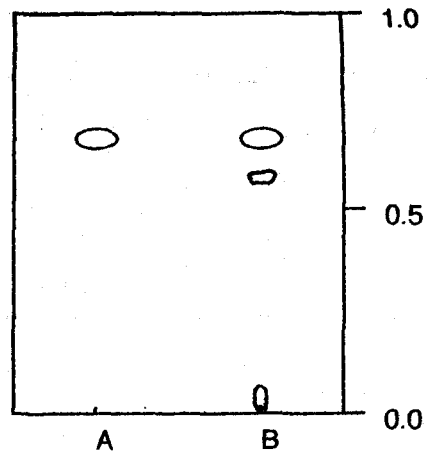


Fig. 2—Thin layer chromatogram of zipeprol and blood extract.

developing solvent; $CHCl_3 : EtOH(9 : 1)$
detection; UV 254

A; zipeprol, B; extract from blood

사망자의 심장 혈액 1 ml를 취해(3회) Fig. 1과 같은 추출조작을 통해 GC분석조건에 따라 실험하여 함량을 구하였다.

Zipeprol 대사체 확인—남용자의 뇨 1 ml를 취해 추출조작을 한 후 GC/MS에 의해 확인하였다.

이때 GC/MS의 분석조건은 다음과 같다.

Column : Fused silica capillary SE-54(25 M×0.25 mm)

Column Temp. : 120°C (1) $\xrightarrow{20^\circ/\text{min.}}$ 250°C (20)

Transfer line : 270°C

Electron energy : 70 eV

Inj. Temp. : 250°C

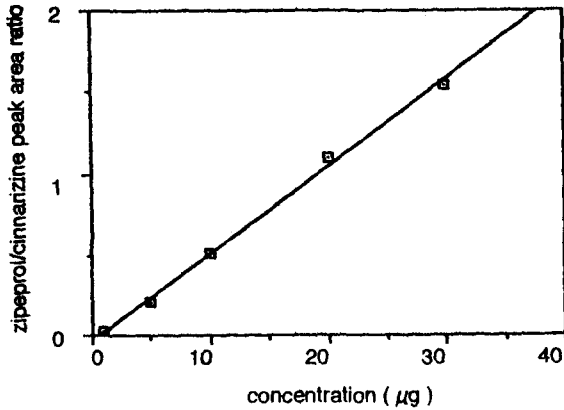


Fig. 3—Calibration curve of Zipeprol.

결 과

TLC에 의한 zipeprol의 분석—Zipeprol 표준품과 사망자의 혈액에서 추출한 성분에 대한 박층 chromatogram은 Fig. 2와 같으며, 드라켄돌프 시액에서 주황색, 연화백금산칼륨 시액에서 violet으로 정색되는 반점으로 R_f값은 0.75이었다.

검량선의 작성—Zipeprol과 구조가 유사한 cinnarizine을 내부 표준물질로 하여 1~30 µg 범위의 zipeprol 농도를 측정할때 Fig. 3과 같이 검량선은 직선이었다.(r=0.998)

회수율의 측정—대조 혈액에 zipeprol 5, 10, 20 µg을 넣고 본 실험방법에 따라 회수율을 측정한 결과는 Table I과 같으며, 5 µg일때 101.97±2.80%, 10 µg일때 96.72±0.90%, 20 µg일때 91.23±0.86%로 RSD값이 0.93~2.75 범위로 양호하였다. 한편 zipeprol과량복용에 의한 사망한 사람의 혈액에 zipeprol 5, 10, 20 µg을 넣고 회수율을 측정할때 Table II와 같이 5 µg에서 97.2±3.9%, 10 µg에서 92.5±3.9%, 20 µg에서 86.9±4.6%이었다.

변사자 혈액중 Zipeprol의 함량—Zipeprol의 과량 복용에 의해 사망한 변사자에 대한 주변상황, 혈중 농도, 성별, 나이, 직업 및 조직의 병리학적소견은 Table III과 같다.

약물의 복용량을 알 수 있는 사례 1, 2, 7, 9 및

Table I—Recoveries of Zipeprol added to 1 ml of rat blood (n=3)

Added amount (µg)	Found amount (µg)	R.S.D.	% recovery
5	5.10±0.14	2.75	101.97±2.80
10	9.68±0.09	0.93	96.72±0.90
20	18.25±0.17	0.93	91.23±0.86

Table II—Recoveries of zipeprol added to 1 ml of postmortem blood (n=3)

Amounts of standard(µg)	Recovery(%) (mean±S.D.)	R.S.D. (%)
5	97.2±3.9	4.01
10	92.5±3.9	4.21
20	86.9±4.6	5.29

10을 보면 그 복용량이 15정 이상 이었고, 혈중농도는 10에에서 2.9~24.69 µg/ml 범위였고 여자가 3명, 남자가 7명이었으며, 나이는 16세~21세 사이였다. 이들의 조직에 대한 병리학적 소견은 특이한 소견이 없는 경우가 대부분 이었다.

대사체의 확인—Zipeprol 남용자의 뇨를 추출하여 본 조건에서 얻은 chromatogram은 Fig. 4에서와 같이 t_R 15분에서 zipeprol(Fig. 5)을 비롯 7분, 9분, 18분에서 미지의 피이크가 검출되었다. 이들 미지 피이크의 질량스펙트럼은 Fig. 6, 7 및 8과 같으며 Fig. 7 및 8의 mass spectra는 분자량과 토막 이온을 볼때 zipeprol의 dealkylation에 의해 생긴 것으로 Beckett등이^{5,6)} 보고한 metabolite I, II와 같았다.

또한 Fig. 6의 대사체는 zipeprol의 분자량보다 15가 적은것으로 보아 CH₃기가 떨어진 demethylation에 의한 대사물로 확인되었다.

고 찰

생체시료중 zipeprol 및 그의 대사체의 분석은 함질소성분에 특이적으로 감응되는 TSD(검출기)를 이용한 GC에서 미량의 성분을 다른 물질의 방해없이 분리정량할 수 있었으며, zipeprol의 대사체는 GC/MS에 의하여 확인하였다.

Zipeprol의 미량분석법으로는 Shin등이⁷⁾ 쥐의 혈액 중에 함유된 미량의 zipeprol을 NPD(검출기)를 이용

Table III—Postmortem zipeprol blood concentrations, personal history and pathologic findings in 10 fatal cases

Case	Age	Sex	Blood concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	History	Pathologic finding	Occupation
1	19	F	24.69 ± 4.87	Ingestion of antitussives 45 tablets of R* and 15 caps of Z* paralysis and died	nonspecific	non
2	17	M	2.90 ± 0.24	Ingestion of 22 caps of Z with liquor coma and died at hospital	unknown	non
3	20	F	4.26 ± 0.41	Died while nose and mouth bleeding	hemorrhage in gastric mucosa	dancer
4	16	M	8.17 ± 1.50	Convulsion, tremor and died	severe fat liver	unknown
5	17	M	10.23 ± 0.59	Overdose of antitussive, paralysis in limb and died	nonspecific	unknown
6	21	M	20.24 ± 1.89	Died while sitting at bus	unknown	student
7	21	M	14.64 ± 1.62	Ingestion of 20 tablets of Z tremor died at the hospital	unknown	unknown
8	19	F	8.82 ± 0.29	Died while sleeping	nonspecific	waiter
9	21	M	15.80 ± 1.37	Ingestion of 37 caps of Z convulsion died in 15 min	nonspecific	non
10	18	M	3.40 ± 0.44	Ingestion of 40 caps of Z died while sitting	congestion in gastric mucosa	DJ

R*; dextromethorphan containing tablet, Z*; zipeprol containing capsule

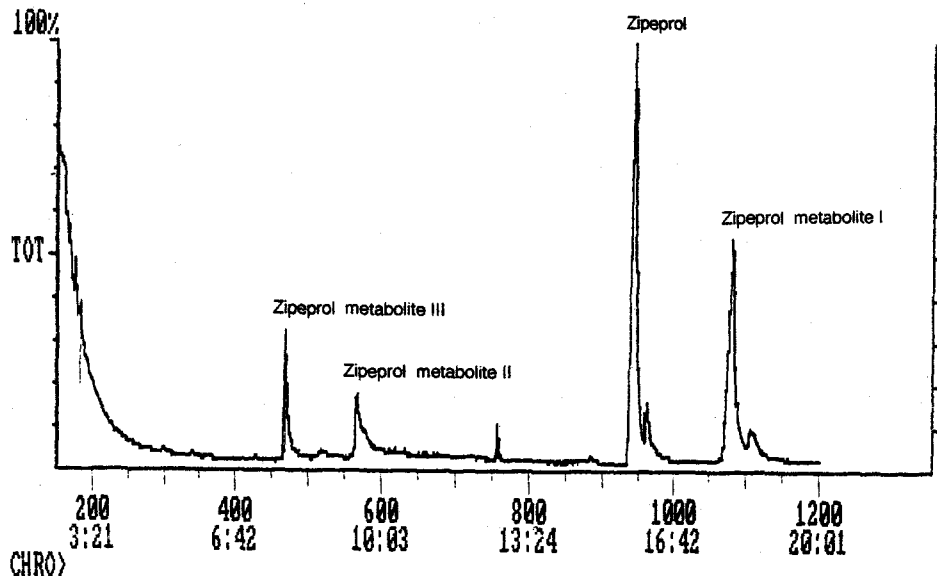


Fig. 4—Gas chromatogram of Zipeprol and its metabolites in abuser's urine.

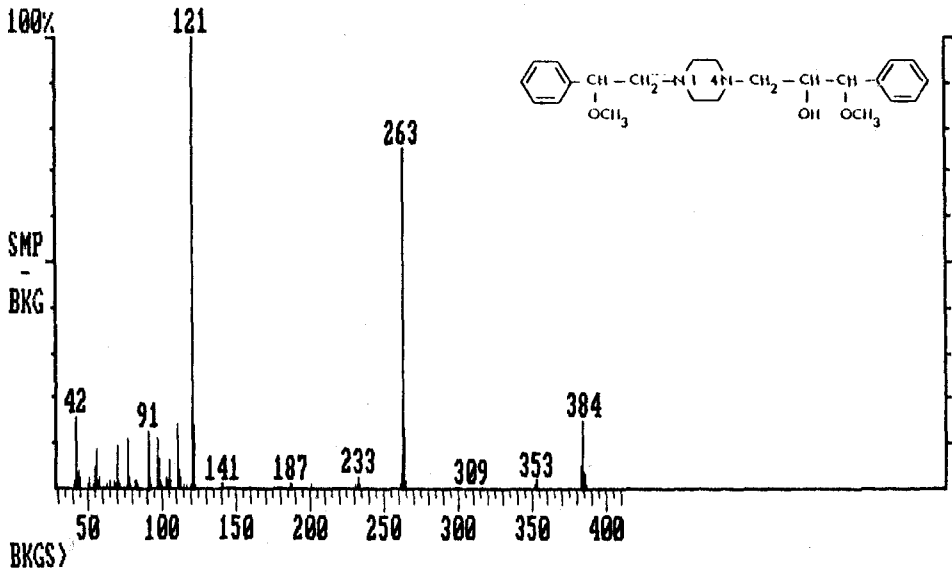


Fig. 5—Mass spectrum of Zipeprol.

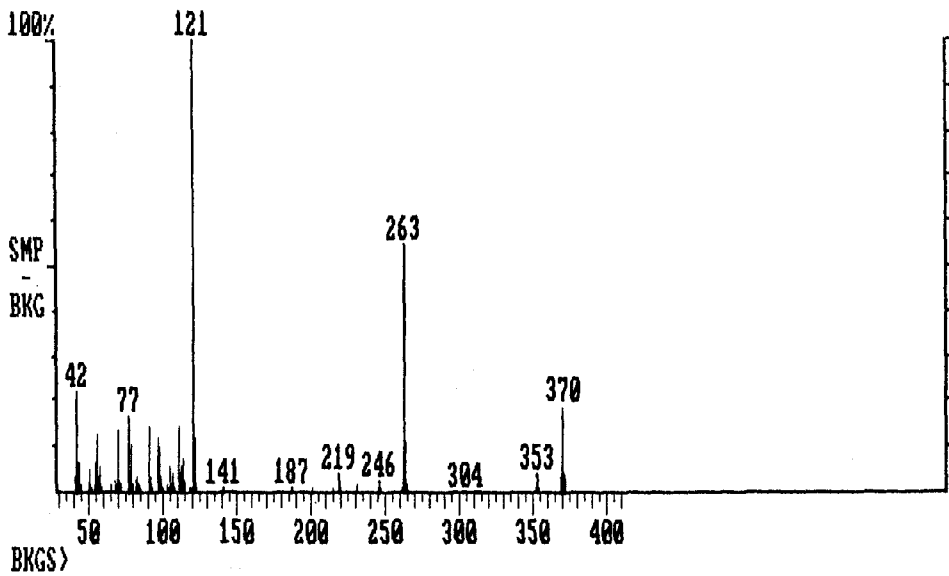


Fig. 6—Mass spectrum of Zipeprol metabolite I.

한 GC에서 내인성 물질의 영향없이 분석한바 있으며, 인체의 zipeprol 대사에 관하여는 Beckett^{5,6)}와 Constantin⁷⁾이 TLC, GC, GC/MS에 의해 확인하여 보고하고 있다.

Zipeprol대사과정은 N-dealkylation, oxidation, hydroxylation, methylation 등이 일어난다고 보고하고

있고, Inoue¹⁰⁾도 2차원의 TLC를 이용하여 대사물질을 동정한 바 있다.

약물 과량 복용 사망자의 혈액중에서 zipeprol의 농도는 TSD를 이용한 GC에서 양호하게 분리 확인되었으며 혈액중 5~20 µg의 농도에서 대조 혈액에서는 91.23~101.97%의 회수율을 나타냈으며, 변사자

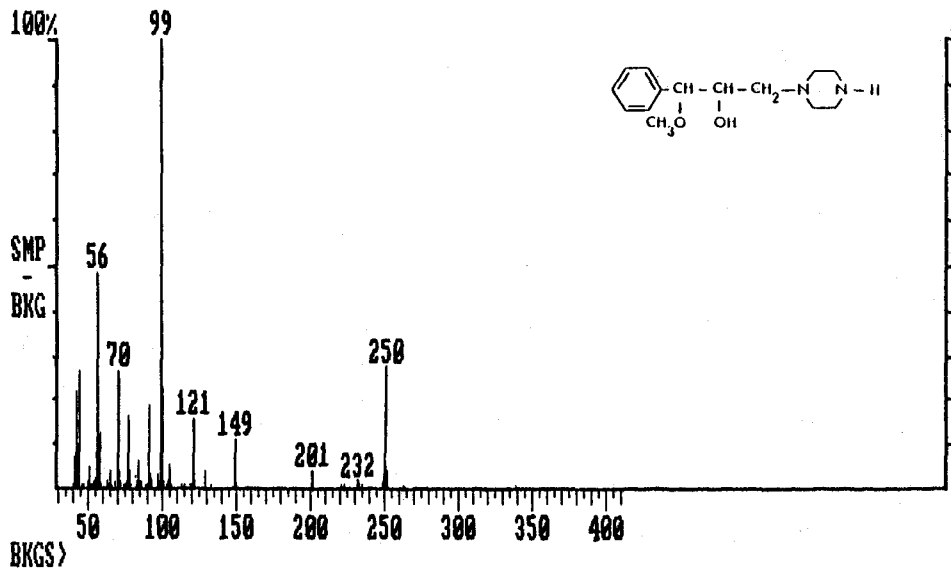


Fig. 7—Mass spectrum of Zipeprol metabolite II.

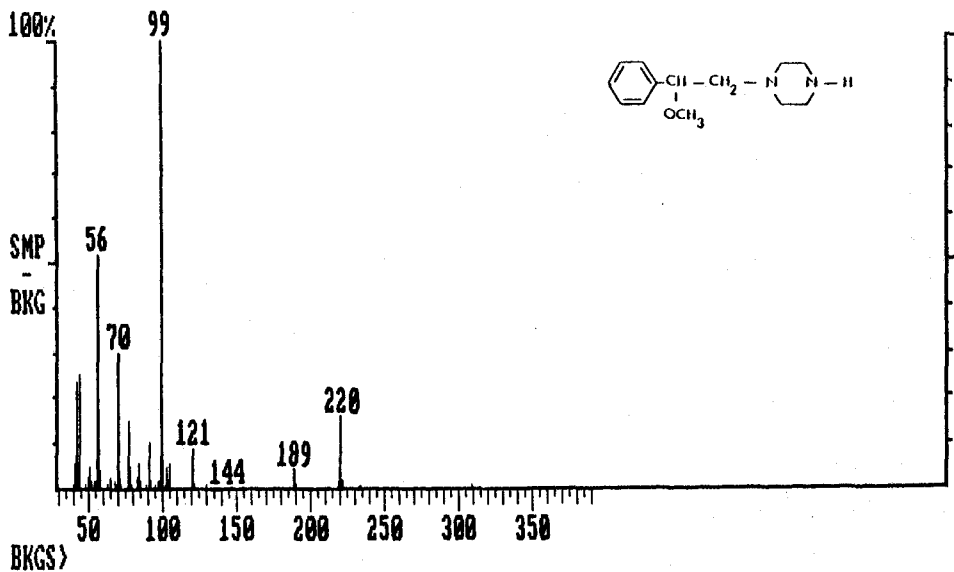


Fig. 8—Mass spectrum of Zipeprol metabolite III.

의 혈액에 첨가할때 회수율은 86.9~97.2%로 우수한 방법 이므로 본 방법을 각 시료에 대한 측정법으로 하였다.

Zipeprol의 인체대사는 N-dealkylation에 의한 2-methoxy-2-phenylethylpiperazine(MW 220) 및 2-hydroxy-3-methoxy-3-phenylpropylpiperazine(MW 250)을 동정한 바 있는데, 본 실험에서도 분자량과

토막이온이 일치되는 성분이 검출되는것으로 보아 2-methoxy-2-phenylethylpiperazine 및 2-hydroxy-3-methoxy-3-phenylpropylpiperazine으로 대사되는것을 확인할 수 있었다. 그러나 Fig.6에서는 토막이온이 zipeprol과 같으며 M-15의 demethylation체가 나타나고 있으나 zipeprol의 대사과정에는 demethylation의 보고는 되어있지 않아 더욱 검토를 요망하고

있다.

Zipeprol의 과량복용에 의해 사망한 사람 10명에 대하여 혈액중 측정 농도는 2.90~24.69 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 이 사례들의 농도차이는 복용량 및 약물복용후 사망까지의 경과시간 등에 따라 다를것으로 사료된다. 복용량을 알수있었던 경우를 보면 사례 1에서는 15캡셀, 사례 2는 22캡셀, 사례 7은 20정, 사례 9는 37캡셀이고 사례 10은 40캡셀을 복용하였다 한다. 이는 일반제제가 75 mg/Cap.인것을 감안하면 1125 mg~3000 mg으로 상용량의 15~40배이며, Moroni등이³⁾ 보고한 중독량인 11~28 mg/kg보다 많은량이며, 과량복용으로 경련을 일으키는 양인 750~975 mg보다 훨씬 많은 량이다.

사례 1의 경우는 dextrometorphane과 혼합 복용한 경우로 복용량에 비하여 혈중농도가 높은것은 혼합투여 약물과의 상가작용에 의한 것인지 중독되었던 사람인지지를 더욱 검토하여야 할 것으로 사료된다.

Zipeprol은 비모르핀계 진해제로 기도평활근의 수축에 의한 완화작용 및 객담작용을 갖고 있으며, 과량복용에 의하여 환각작용을 나타낸다고 한다. 환각작용에 의한 보고로는 Italy에서 발생한 32건의 과량복용의 경우에서 안락감(euphoria)을 얻을 목적으로 습관적으로 약물을 복용한 경우와 1회 치료량인 75 mg의 10~15배 용량을 복용하면 opioid와 같은 환각작용이 일어난다고하여 청소년들이 복용한 예가 보고되어 있다.⁴⁾

Zipeprol의 과량복용에 의한 중독증상으로는 급성 중독이나 계속복용에 의한 축적으로 심한 신경증상이 일어난다하며³⁾ 과량복용에 의한 경련 등이 보고되어 있다.⁴⁾

그러나 zipeprol은 중추신경계에 특이적인 작용은 없고 동물에서 신체적 의존성이 나타나지 않아 탐닉성이 없는 것으로 보고되어 있다.²⁾ 山本 등은 동물 실험에서 zipeprol은 고용량에서 중추흥분작용을 나타내고 저용량에서는 억제작용이 일어난다고 보고하고 있다.⁸⁾ 그러나 과량복용에 의하여 중독치사된 경우는 아직 보고된 바 없다. 우리나라에서 1991년 1월부터 1992년 4월까지 당연구소에 의뢰되어 zipeprol의 중독사로 추정되는 경우의 함량분포에 대하여는 10예로서, 이들의 연령분포는 16~21세로 청소년들이 사용하였으며, 남자가 7명 여자가 3명이었다. 남자의 혈중농도는 2.9~20.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 여자는 4.26~24.69 $\mu\text{g}/\text{ml}$

/ml로 성별차이는 크게 나타나지 않았다. 이것은 山本 등⁸⁾이 동물에서 zipeprol의 LD₅₀과 중독증상에 있어 크게 차이가 없었다는 보고와 일치하였다. 또한 zipeprol의 과량복용에 의해 중독사망한 경우 사망자의 혈중농도와 더불어 각 조직 중의 농도를 측정하므로써 post mortem distribution에 대하여도 검토하여야 할 것이다.

마약이나 향정신성의약품으로 지정되어 있지 않은 zipeprol등을 환각을 목적으로 청소년들이 과량복용하여 중독사망하는 예가 발생되고 있어 국민보건의 관점에서 이들 약물에 대한 관심이 절실히 요구되는 바이다.

결 론

1. 혈액중 zipeprol의 분석은 예비실험을 거쳐 TSD가 연결된 GC 및 GC/MS에 의해 확인하고 정량할때 직선성인 검량선 ($r=0.998$)과 높은 회수율 (대조혈액 : $91.23 \pm 0.86 \sim 101.97 \pm 2.80\%$ 변사자 혈액 : $86.9 \pm 4.6 \sim 97.2 \pm 3.9\%$)이 나타나는 본 분석법이 적합하였다.
2. Zipeprol의 과량복용에 의해 사망한 10예의 혈액중 그 농도범위는 2.90~24.69 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며, 사망자의 연령분포는 16~21세 범위였다.
3. Zipeprol의 대사체로는 남용자의 뇨에서 N-dealkylation에 의한 2-methoxy-2-phenyl ethyl piperazine, 2-hydroxy-3-methoxy-3-phenyl propyl piperazine 및 demethylation에 의한 대사체 I이 동정되었다.

문 헌

- 1) Constantin, M. and Pognat, J.F.: Zipeprol metabolism in man and in the animal. *Drug Res.*, **28**, 64 (1978).
- 2) Cosnier, D., Hache, C., Labrid, C. and Rispat, G.: General pharmacological properties of a new non-opiate antitussive: Zipeprol(3024 CERM) II. Actions on the cardiovascular system, intestinal transit and contral nervous system. *Drug Res.*, **26**, 848 (1976).
- 3) Moroni, C., Cerchiari, E.L., Gasparini, M. and Rota, E.: Overdosage of zipeprol, a nonopioid antitussive agent. *The Lancet*, **Jan. 7**, 45 (1984).

- 4) Ferraro, F. and Berporchia, A.: Convulsion and cerebral odema associated with zipeprol abuse. *The Lancet*, Jan. 7, 45 (1984).
- 5) Beckett, A.H. and Achari, R.: Metabolism and excretion of respilene in aman under acidic urine conditions. *J. Pharm. Pharmac.*, **28**, 57 (1976).
- 6) Beckett, A.H. and Achari, R.: Plasama concentrations and excretion of zipeprol in man under acidic urine conditions. *J. Pharm. Pharmac.*, **29**, 589 (1977).
- 7) Shin, H., Park., J., Lho, D. and Kim, O.: Measurement of zipeprol in rat plasma by gas chromatography with nitrogen-phophorus detection. *J. of Chro.*, **493**, 398 (1989).
- 8) Yamomoto, H., Gomo, T., Tanaka, S., Takeishi, T., Fuzikura, M. and Okumura, M.: Toxicity studies on Zipeprol dihydrchloride, 1-(2-Hydroxy-3-methoxy-3-phenylpropyl)-4-(2-methoxy-2-pohenylethyl)piperazine dihydrochloride. *応用薬理*, **22**, 355 (1981).
- 9) Rispat, G., Burgi, H., Cosnier, P., Duchene-Marulaz, P. and Streichenberger.: General pharmacological properties of a new non-opiate antitussive: Zipeprol (3024 CERM) I. Action on respiratory function and acute toxicity. *Drug Res.*, **26**, 523 (1976).
- 10) Inoue, Y., Kumakura, T., Iwamoto, M., Nakayama, K., Wachi, M. and Aikawa, K.: Absorption, distribution, metabolism and excretion of 1-(2-hydroxy-3-methoxy-3-[phenylpropyl)-4-(2-methoxy-2-phenylethyl)piperazine dihydrochloride (ZPL). *Yakuzaigaku* **41**, 1(1981).