

## 미녹시딜의 신나밀 유도체에 관한 물성 및 활성연구

신준수, 신영아, 박정일, 문동철<sup>1</sup>, 김박광\*

서울대학교 약학대학, 충북대학교 약학대학<sup>1</sup>

### Properties and Activity of the Cinnamyl Chloride with Minoxidil

Joon-Su SHIN, Young-Ah SHIN, Jeong-Hill PARK, Dong-Cheul MOON<sup>1</sup> and Bak-Kwang KIM\*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chungbuk National University, Chungju 360-763, Korea

(Received July 22, 1996; accepted September 19, 1996)

**Abstract** – We have synthesized the cinnamyl derivative of minoxidil, N-2-cinnamylamino-4-amino-6-piperidinopyrimidine 3-oxide(MINAMYL). Physicochemical properties and structural analysis on this compound were examined. And also, we have screened its antiallopecic effect.

**Keywords** □ N-2-cinnamylamino-4-amino-6-piperidinopyrimidine 3-oxide(MINAMYL), cinnamyl chloride, minoxidil, blackmouse(C57BL/6), antiallopecic effect

미녹시딜은 말초혈관 확장제로서 중증의 고혈압 환자 치료에 사용되어 왔으나, 고혈압 환자에게서 다모증 현상이 나타난 이후 남성형 원형탈모증 치료제로서 연구 개발되었다. 이 약물은 남성형 탈모증 환자 중 약 77% 정도에게서 효과가 있는 것으로 보고되면서 대표적인 발모제로 널리 사용되어왔다.

그러나 미녹시딜이 가지는 발모촉진 작용은 모발의 성장이 투약 중지와 더불어 중지되며, 치료전의 상태로 환원되는 기간이 짧은 단점이 있다.

이와 같은 점을 보완하기 위한 다양한 연구 중의 하나로써 미녹시딜에 신나밀 클로라이드를 가한 다음 축합반응을 이용하여 N-2-cinnamylamino-4-amino-6-piperidinopyrimidine 3-oxide (이하 MINAMYL 이라 칭함)을 만들어 이 화합물의 액성영향, 경시변화, 결합구조 및 정량법 등 제반 물성에 대하여 검토하였고, 이 물질의 육모효과를 검색하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

### 실험방법

#### 시약 및 기기

신나밀 클로라이드는 시판품 (Sigma Chem. Co.)을 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였으며, 미녹시딜은 중

외제약주식회사로부터 기증받았다. 완충액은 Gershon, Rex 및 Bower 방법에 따라 조제하였다. 그의 기타시약은 시판 특급품을 사용하였다. 기기로는 UV는 Valian사의 DMS200, IR은 Elmer사의 Series 1600, pH meter는 Orion사의 model 920A, Rotary Evaporator는 Buchi사의 Rotavapor RE11, HPLC는 Water사의 u6k injector, 510 pump, 486 UV-vis Detector, 746 Datamodule), Electrothermal capillary melting point apparatus 및 Shaker (SGI사의Elvis), MS는 VG Trio-II GC/MS system, Clipper (Oster #40), Microscope 및 NMR 등을 사용하였다.

#### 미녹시딜 유도체 합성

미녹시딜 1.23 g(5.89 mmole)을 250 ml 환저플라스크에 넣고, 질소 기체로 치환시킨 후 무수 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 120 ml 및 pyridine 954 μl(11.784 mmole)을 주입하여 녹인 다음 빙욕상에서 신나밀 클로라이드 863 μl(5.892 mmole)를 적가한 후 10시간 교반하였다. 여기서 얻은 백색 침전을 acetone으로 수회 세척한 다음 메탄올에 녹여 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1로 칼럼 크로마토그래피를 행하여 product(수율 73%)를 얻었다.

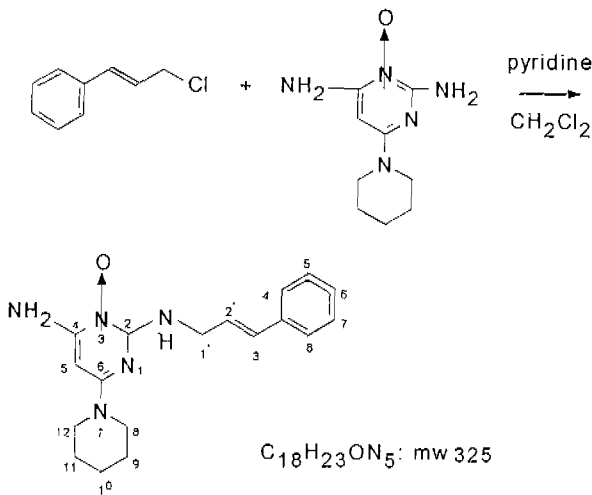
#### 성상

Minamyl (N-2-cinnamylamino-4-amino-6-piperidinopyrimidine 3-oxide) 1 mg을 취하여 물, 메탄올, 에탄올,클로로포름 및 아세톤에 대한 용해도를 조사하였다.

#### 액성변화에 따른 UV 흡광스펙트럼

1×10<sup>-5</sup> M Minamyl 수용액의 흡광스펙트럼을 확인하였

\* To whom correspondence should be addressed.



Scheme 1

으며, pH영향을 검토하기 위해 9개의 10 ml 용량플라스크에  $1 \times 10^{-4}$  M Minamyl 수용액 1 ml와 pH 2-7인 완충액 5 ml씩을 각각 가한 다음 탈이온수로 표선을 맞추고 blank를 대조로 하여 최대 흡광파장 283 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 정량법

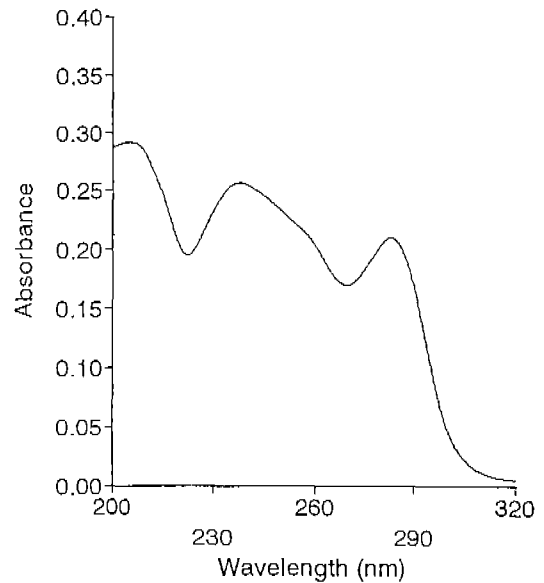
흡광광도법에 의한 정량: Minamyl 16.25 mg을 정확히 취하여 500 ml 용량플라스크에 넣고 탈이온수에 녹인 다음 표선을 맞추어 시료원액( $1 \times 10^{-4}$  M)을 조제하였다. 시료원액 1-5 ml를 각각 10 ml용 용량플라스크에 넣고 여기에  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  완충액(pH 6.0) 5 ml 및 탈이온수로 표선을 맞추어 조제한 표준액을 최대 흡광파장 283 nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다.

#### 미나밀의 구조

Minamyl은 분자량 325(C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>ON<sub>5</sub>)인 백색분말로서 원소 분석, UV, IR(KBr disc법), MS(EI) 및 NMR(500MHz)등을 측정하여 구조를 확인하였다.

#### 육모효과시험

Minamyl의 육모 시험방법은 Implant method에 의한 육모물질의 효능을 평가하였다. 시험물질은 5% minamyl (50% propylene glycol, 50% alcohol), Vehicle은 30% alcohol (50% propylene glycol, 20% DDW), 양성대조군으로서 2% minoxidil(50% propylene glycol, 30% alcohol, 20% DDW)를 도포하였다. 시험방법은 1) black mouse(C57BL/6), 생후 45-53일, 23-27 g을 이용하여 clipper(Oster #40) 및 electric shaver로 등부위의 모를 제모 처리하여 실험동물로서 사용한다. 2) 제모처리 익일부터 시험물질을 1일 2회 피부에 도포시키고, 3주간동안 시간경과에 따른 모의 성장정도를 hair score 및 모낭 조직학적관찰을 통하여 검색한다. 3) hair score는 모의 복원정도 및 복원면적을 기준으로 0-3

Fig. 1. UV spectrum of Minamyl ( $1.3 \times 10^{-5}$  M).

grade로 부가한다.

#### 결과 및 고찰

##### 성상

Minamyl(N-2-cinnamylamino-4-amino-6-piperidinopyrimidine 3-oxide)은 mp 152-160 °C인 백색분말로서, 1 mg을 용해시키는데 필요한 용매량은 물, 메탄올 및 에탄올에는 모두 0.5 ml 이하, 클로로포름 1.0 ml 이하이며, 아세톤에는 불용이었다.

##### 액성변화에 따른 UV 흡광스펙트럼

$1 \times 10^{-5}$  M Minamyl 수용액의 흡광스펙트럼을 Fig. 1에 표시한 바와같이 흡수 피이크의 파장은 237 및 283 nm였다. pH영향을 검토하기 위하여  $1 \times 10^{-4}$  M Minamyl 수용액을 pH 2-7인 완충액을 써서 blank를 대조로 하여 최대 흡광파장 283 nm에서 흡광도를 측정된 결과 경시변화는 거의 나타나지 않았다. 이후 본 실험에 있어서는  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  완충액(pH 6.0) 및 max 283 nm를 사용하였다.

##### 정량법

흡광광도법에 의한 정량: Minamyl  $1 \times 10^{-4}$  M 시료원액을 조제한 다음, 시료원액 1-5 ml를 각각 10 ml용 용량플라스크에 넣고 여기에  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  완충액(pH 6.0) 5 ml 및 탈이온수로 표선을 맞추어 조제한 표준액을 최대 흡광파장 283 nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한 결과 검량선 식은  $Y=0.1972 \times 10^5 X + 0.00019$ (상관계수:0.9999)로서 양호한 직선성을 나타내었으며, 이것을 사용하여 시료검액을 정량하였다.

##### 미나밀의 구조

Minamyl은 분자량 325(C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>ON<sub>5</sub>)인 백색분말로서 원소

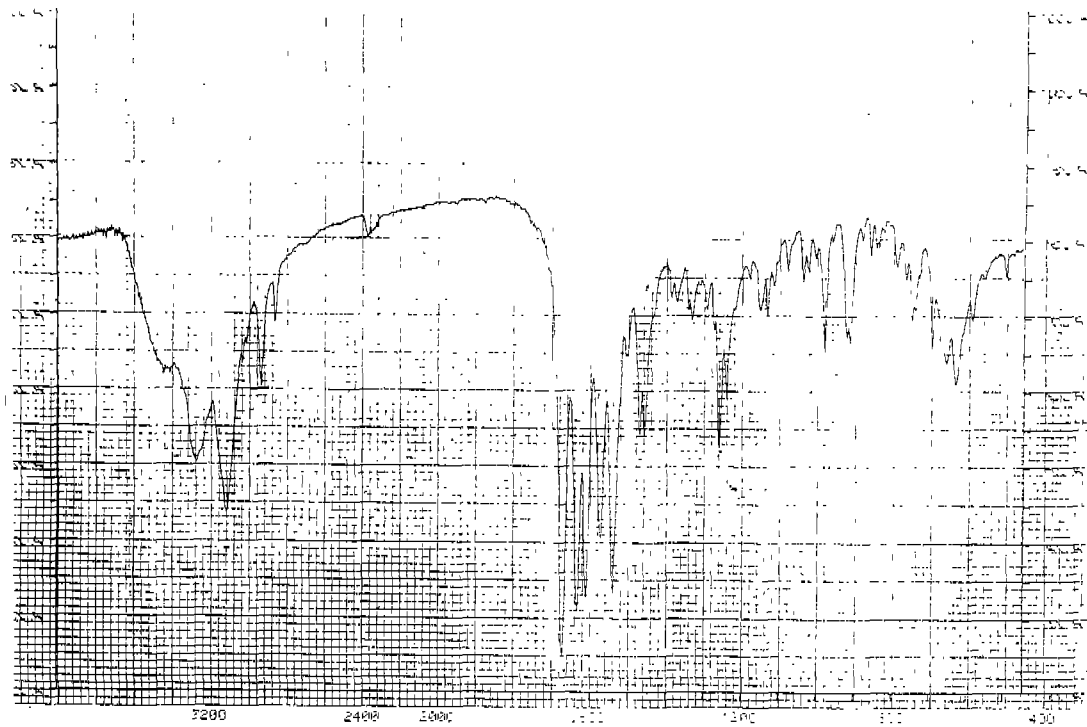


Fig. 2. IR spectrum of Minamyl (KBr).

분석, UV, IR, MS 및 NMR 등을 측정하여 분석한 결과 구조를 아래와 같이 확인하였다.(Fig.2-4) UV 흡광스펙트럼의 최대흡수 피크 파장은 237 및 283 nm였고, KBr disc법으로 측정한 IR 스펙트럼은 3280  $\text{cm}^{-1}$  근처에 NH, 3108  $\text{cm}^{-1}$  에 방향족 CH, 2940  $\text{cm}^{-1}$  에 지방족 CH, 1673  $\text{cm}^{-1}$  에 pyrimidine의 C=C, 1635  $\text{cm}^{-1}$  에 C=N, 1540  $\text{cm}^{-1}$  에 C=C 또는 C=N, 1330  $\text{cm}^{-1}$  에 C-N, 1260  $\text{cm}^{-1}$  에 N-O등을 확인할 수 있었으며, 1250-1000  $\text{cm}^{-1}$  에 C-O를 나타내는 피크는 없었다. 그리고 MS 스펙트럼에 있어서는 325[M] 피이크를,  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼의 경우에는 1.455-1.586(m)과 3.437-3.456(t)에 나타나는 peak는 piperidine의 10개 proton, 4.766-4.779(d)에  $1'\text{CH}$  proton 2개, 5.315(s)에 나타나는 peak는 pyrimidine의 5CH proton, 6.569-6.630(q)에 나타나는 peak는  $2'\text{CH}$  proton, 6.753-6.784(d)에 나타나는 peak는  $3'\text{CH}$  proton, 7.302-7.331(t)에 나타나는 peak는  $6'\text{CH}$  proton, 7.362-7.392(t)에 나타나는 peak는  $5',7'\text{CH}$  proton 2개, 7.431-7.446(d)에 나타나는 peak는  $4',8'\text{CH}$  proton 2개, 7.756(s)에  $\text{NH}_2$  proton 2개, 7.940(s)에 NH proton 등 위의 기기분석 데이터로부터 미녹시딜의 2-amino기가 신나밀 클로라이드와 결합된 N-2-cinnamylamino-4-amino-6-piperidinopyrimidine-3-oxide (MINAMYL:  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{ON}_5$ , mw 325)로 동정되었다.

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{ON}_5$  (mw: 325): C 66.46%, H 7.08%, O 4.92%, N 21.54%, found: C 72.16%, H 8.73%, O 00.00%, N 17.33%

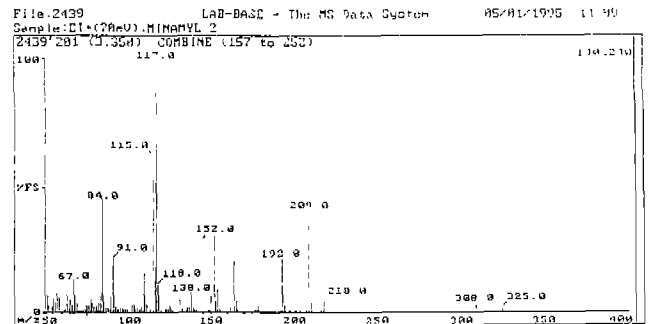


Fig. 3. MS spectrum of Minamyl.

수득율: 73%, mp: 152-160  $^{\circ}\text{C}$ , Rf: 0.29 ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH=4:1)

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  - nm: 237, 283 nm

IR  $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\cdot \text{cm}^{-1}$ : 3440, 3280(NH), 3108(aromatic CH), 2927 (aliphatic CH), 1663(pyrimidine C=C), 1625(C=N), 1602, 1562(C=C or C=N), 1530, 1449(pyridine C=C or C=N), 1321(C-N), 1251(N-O), 691

MS(EI,m/z,rel.int.): 325[M] (1.45), 308 (3.87), 209(49.25), 192(30.8), 164(20.71), 152(33.4), 117(100), 110(19.40), 91.0 (19.59), 84(53.73), 57(18.28)

$^1\text{H-NMR}$  (500MHz): 1.455-1.586 3.437-3.456 (10H,m,piperidine), 4.766-4.779 (2H,d,J=6.5Hz,  $1'\text{CH}$ ), 5.315 (1H,s, 5CH), 6.569-6.630 (1H,q, $2'\text{CH}$ ), 6.753-6.784 (1H,d,J=15.5Hz,  $3'\text{CH}$ ), 7.302-7.331 (1H,t,J=7.5Hz,  $6'\text{CH}$ ), 7.362-7.392 (2H,t,

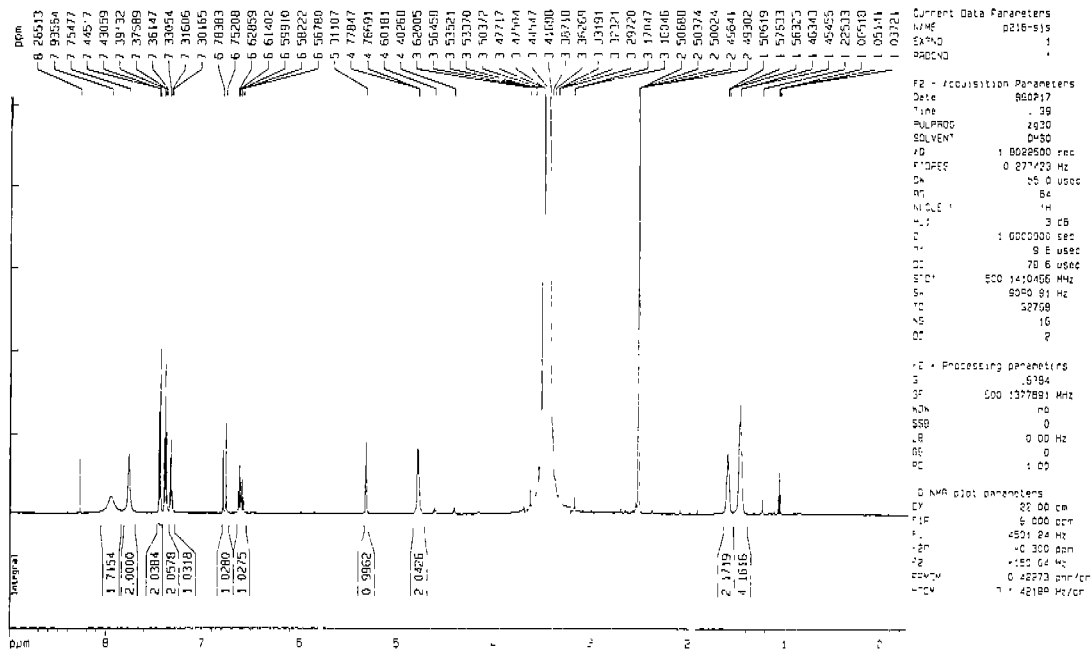


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Minamyl.

Table I. Hair growth score of black mouse (C57BL/6)

Treatment	Hair growth score (0-3)					
	0	9	13	15	17	20 22 (d)
Minamyl (5%)	0	0.05	0.21	0.43	0.64	1.16 1.54
Minoxidil (2%)	0	0.03	0.16	0.40	0.77	1.45 1.88
Vehicle (30% alc)	0	0.06	0.19	0.43	0.47	0.96 1.36

MNX (2%): in 50% propylene glycol, 30% alcohol, 20% DDW

Minamyl (5%): in 50% propylene glycol, 50% alcohol

Vehicle: in 50% Propylene glycol, 30% alcohol, 20% DDW

J=7.5Hz, 5',7'CH), 7.431-7.446 (2H,t,J=7.5Hz,4',8'CH), 7.756(2H,s,NH<sub>2</sub>), 7.940 (1H,s,NH)

육모효과시험결과

육모효과는 Implant method에 의하여 평가하였다. 시험 물질은 5% minamyl(50% propylene glycol, 50% alcohol), Vehicle은 30% alcohol(50% propylene glycol, 20% DDW), 양성대조군으로는 2% minoxidil(50% propylene glycol, 30% alcohol, 20% DDW)를 사용하여 시험하였으며 그 결과는 Table I에 표시하였다.

Table I에 나타난 바와 같이 Minamyl의 육모효과는 도포를 시작한 날로부터 15일경까지는 Vehicle(음성대조군) 및 Minoxidil(양성대조군)과 비슷하였고, 17일째 되는날에는 Vehicle에 비해 Minoxidil 및 Minamyl의 육모활성이 약간 증가하였으며, 22일째는 Minoxidil 및 Minamyl이 현저한 육모효과를 나타내었다. 이상의 결과로부터 Minamyl은 시간이 경과함에 따라 vehicle보다는 높지만 Minoxidil보다는

다소 떨어지는 모의 복원효과를 나타내었다. 그러나 본 물질은 추후 진행될 Minoxidil의 다양한 유도체 합성에 있어서의 lead compound로서, 이번 육모시험의 결과는 앞으로의 실험방향을 설정하는데 매우 중요한 기초자료가 되리라고 생각된다

결론

Minamyl(N-2-cinnamylamino-4-amino-6-piperidinopyrimidine 3-oxide)은 분자식 C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>ON<sub>5</sub>(mw: 325), mp 152-160 °C인 백색분말로서 물, 메탄올, 에탄올, 클로로포름 등에 용해되지만 아세톤에는 불용이었다. UV 흡광스펙트럼의 흡수 피이크 파장은 237 및 283 nm였다. 수용액의 경우 pH 2-7.5 범위내에서는 거의 흡광도 변화가 없었으며, 또한 경시변화도 나타나지 않았다. 이 화합물의 메탄올용액의 CHCl<sub>3</sub>:MeOH (4:1)에서의 R<sub>f</sub>=0.29 이었다. 그외 기타 물성으로 1-5×10<sup>-5</sup> M Minamyl 표준액에 대하여 최대 흡광파장 283 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 구한 검량선 식은 Y=0.1972×10<sup>5</sup>X+0.00019(상관계수:0.9999)로서 양호한 직선성을 나타내었다. 그리고 육모시험결과는 미녹시딜에 비해 다소 떨어지는 모의 복원효과를 나타내었다.

감사의 말씀

이 연구는 1995년도 과기처 G7 선도기술개발사업 연구비의 일부로 수행되었으며, 이에 심심한 사의를 표하는 바이다.

## REFERENCES

- Grunwald, E. and Winstein, S. (1948). *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 846; A.H. Fainberg and S. Winstein, *ibid.* **78**, 2770.
- (a) Gilmore, E., Well, E. and Chidsey, C. (1970). III. (1956). *N. Engl. J. Med.* **282**, 521. (b) Gottlieb, T. B., Katz F. H. and Chidsey, C. III. (1972). *Circulation* **45**, 571 (1972). (c) Limas, C. J. and Frcis. (1973). E. D. *Am. J. Cardiol.* **31**, 355 (1973) (d) Pettinger, W. A. and Mitchell, H. C. (1973). *N. Engl. J. Med.* **289**, 167 (1973) (e) Pettinger, W. A. and Mitchell, H. C. *Clin. Pharmacol. Ther.* **14**, 143 (1973)
- Katritsky, A. R. and Laapowski, J. M. (1971). Chemistry of the Heterocyclic N-oxides, Academic Press, New York, N. Y., p22-140
- McCall, J. M., Aiken, J. W., Chidester, C. G., Ducharme, D. W. and Wendling, M. G. (1983). Pyrimidine and Triazine 3-oxide sulfates: A New Family of Vasodilators, *J. Med. Chem.* **26**, 1791-1793.
- Carlson, R. G. and Feenstra, E. S. (1977). Toxicologic Studies with the Hypotensive Agent Minoxidil, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **39**, 1-11.
- Kim, K. S., Shin, J. S., Kang, K. H., Suh, Y. G. and Kim, B. K. (1995). Condensation of salicylic acid with minoxidil, *J. pharm. Chem. Bull.* **39**, 511.
- (a) Merck Index 19th ed. p2288 (b) 日本 中外製薬 富山 御殿 研究所, 日本薬學會 發表 (1993)
- Shugar, G. J. and Ballinger, J. T. Chemical Technician's Ready Reference Handbook, 3rd ed. 655
- Rex M.C. Dawson, Elliott, D. O., Elliott, W. H. and Jones, K. M. Data for Biochemical Research, 3rd ed. 429
- Bower and Bates. (1995). *J. Res. Natm. Bur. Stand.* **55**, 197.