

방사성 의약품 합성에 관한 연구(VI)-Aflatoxine-B₁의 방사성 요오드 표지와 그 생리작용

한국원자력연구소 방사유기화학 연구실

김 유 선 · 박 경 배

해생리학 연구실

성 호 경 · 유 용 운

Labelling Aflatoxine-B₁ by Radioactive Iodine

You Sun Kim and Kyung Bae Park

Radio-organic Chemistry Laboratory

Ho Kyung Sung and Yong Wun Ryu

Nuclear Physiology Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute

요 약

Carcinogen으로 알려져 있는 aflatoxine계통 화합물의 방사성 표지반응을 연구하였다. Aflatoxine계통 약품중에서 그 함유량이 가장 큰 ⁷aflatoxin-B₁을 초산(醋酸) 촉매하에 chloramine-T를 사용하여 ¹²⁵I로 표지한 결과 표지화합물을 방사화학적 수율 63.6%로 얻을 수 있었다. 생성물의 화학구조를 I.R. 및 N.M.R.로 검사한 결과 aflatoxine의 benzene 고리에 표지되었음을 확인하였다.

쥐를 시험동물로 삼아 경구 투여후의 대사과정을 부검(剖檢)으로 조사한 결과 간 및 혈액에 방사능이 축적되고 요오드이온은 분리되지 않았음을 확인하였다.

=Abstract=

Labelling aflatoxines, the potential carcinogenic compounds, by radioactive iodine has been studied. The aflatoxine-B₁, which is known to be the most abundant components of aflatoxines in the nature, was labelled by radioactive iodine-125 through an acid catalyst chloramine-T procedure. The radiochemical yield was amounted to 63.6%. The chemical structure of the labelled product was proved to be 6-iodo 5-methoxy coumarine structure of aflatoxine-B₁ molecule by means of I.R. and N.M.R. spectroscopy. The labelled product was orally administered in a test animal (Rat) and examined the accumulation of radioactivity in the body at the definite time interval. The accumulation of the radioactivity was pronounced at the blood and the liver. There was no indication of the decomposition of aflatoxine-B₁-¹²⁵I in the organs of the test animal.

서 론

Aflatoxine에 관하여서는 종래 ¹⁴C으로 표지하는

방법¹⁾ 및 표지된 화합물의 degradation study²⁾, 대사과정 연구³⁾등이 알려져 있으나 γ -선 방출체인 요오드로 표지한 예가 보이지 않고 있다. ¹⁴C 표지물은 반감기가 긴 대신에 약한 β -선 방출체로써 생화학적으로 하

는 부검(剖檢) 시험에는 적합할지 모르지만 의학적 생체내 시험에는 적합되지 못하고 특히 미량의 체내이동을 검사하는 데는 γ -선 표지물이 필요할 것으로 예상되었다. 최근 발표된 논문²⁾에 의하면 aflatoxine의 체내축적(특히 간장)에 의한 조암(造癌) 경향은 aflatoxine과 enzyme에 의한 콤플렉스생성에 의한다 하였고 한편 동물 체내의 대사물로서 aflatoxine-Q₁이 분리되고 있으나³⁾ 그 확인에는 분광분석법을 사용하고 있는 바 이러한 경우에 표지화합물이 있다면 더 확실한 결과를 가져낼수 있을 것으로도 판단된다. 따라서 aflatoxine의 표지물은 이 분야 연구에 유용할 것으로 보인다. 한편 본 연구소에서 시행한 연구^{4,5)}에서 변질미(變質米)중의 aflatoxine 성분을 TLC에 의한 분리확인법으로 검토하고 있는 바 이 경우에도 표지화합물을 tracer로 이용한다면 더 확실한 정량적인 결과를 줄 수 있을 것이 기대된다. Aflatoxine은 그 화학구조가 Fig.1에 표시되어 있드시 B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}로 확인되고 있으나 독소물질에서 B₁이 가장 많이 함유되어 있고 그 구조는 coumarine 및 dihydrofuran의 부분으로 되어 있다. 요오드 표지는 따라서 benzene

고리, 이중결합에 각각 가능할 것으로 예상된다. 한편 강알카리 또는 강산의 존재(예 : HNO₃) 밑에서 요오드와 반응을 진행시킨다면 고리를 개환(開環)시켜 결과적으로 분해를 일으킬 가능성이 있다.

저자들은 이러한 점을 감안하여서 완화된 반응조건, 이중 결합에 요오드가 부가되지 않은 방법들을 모색하여 보았다. 그 전에 연구된 바에 의하면^{7,8)} chloramine-T법은 이중결합에는 반응성이 약하지만 aniline과 같이 활성화된 벤젠고리의 수소를 요오드로 치환시킬 수 있다.

따라서 이 방법을 응용한다면 coumarine의 벤젠고리의 수소를 요오드화할 수 있을 것이 기대되는 바 있었다. B₁ 이외의 aflatoxine 성분들에서도 그 분자내의 기본구조는 coumarine임으로 B₁에 사용된 방법은 이들에게도 응용될 수 있을 것으로 사료되었다. 표지화합물이 얻어진 경우 그 화학구조를 기기분석법으로 확인하고자 하였으며 한편 생체내에서의 안정성에 관한 동물시험을 시행하여 그 실용가치 여부를 평가 분석하여 보고자 하였다.

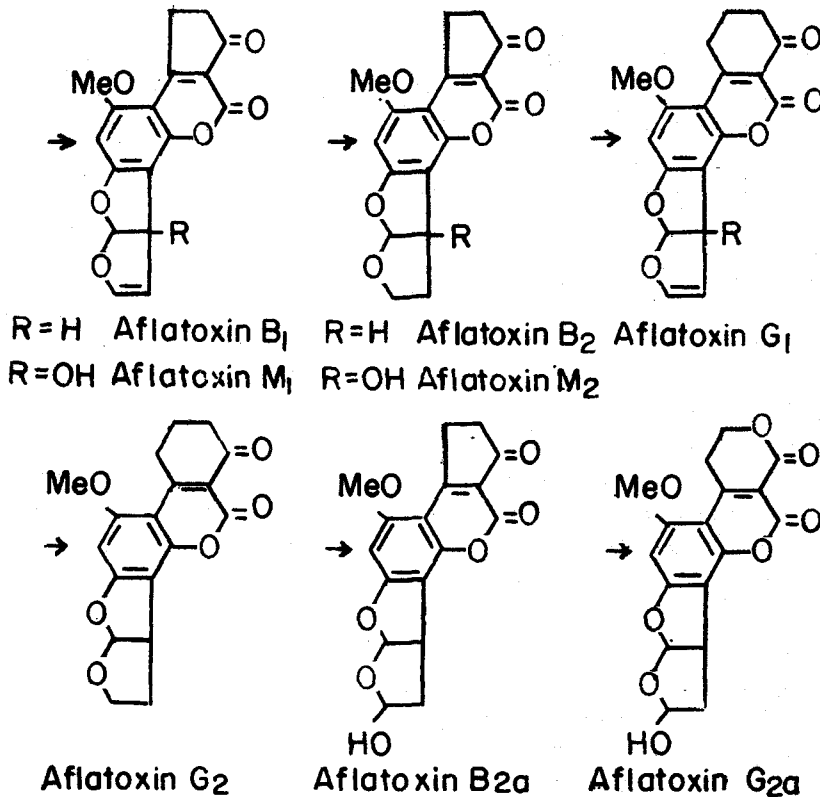


Fig.1 Structures of aflatoxines.

실 험

가. Aflatoxine-B₁의 요오드 표지반응

소형반응장치내에 aflatoxine-B₁ (Caliochem. San, diago Calif. U.S.A.) 4 mg, Na¹²⁵I (carrier.) free) 1 mCi, 초산(醋酸) 3 ml, KI 0.2 ml (1mg/ml) chloro-anime-T (18 mg/10 ml 용액 1 ml)을 혼합하고 교반하면서 반응온도를 20~22°C로 유지하여 반응을 진행시킨다. 2시간 반응시킨 다음 반응액을 silica gel TLC plate (Merck, Art. 5553/0025)에 spot 하고 전개용매 (chloroform : trichloroethylene : n-amyl alcohol: formic acid (80 : 15 : 4 : 1 V/V)로 전개시킨 다음 건조한다.

전개된 plate 을 자외선등(UVSL-25, Ultra Violet Co.)으로 조사(照射)하여 형광성 spot 를 검사한 다음 plate 를 일정한 크기로 잘라서 방사능을 계측하고 각 부분의 계측치를 sample spotting point 로 부터의 거리와 연관시켜 radio-chromatograph curve 를 plot 한다. 이 plot 위에서 생성물의 peak height 를 잔여 각 부분의 peak 의 height 와 비교하여 방사화학적 수율을 정한다(방사화학적 수율: 63.6%). 그 결과는 Fig. 2 에 표시되어 있다. 따로 이 반응액을 preparatory silica gel TLC plate(Merck, PSC-Kieselgel F₂₅₄)에 spot 하여 같은 전개용매로 전개시키고 표지생성물에 해당하는 peak area 를 확인한 다음 이 부분을 scrap 하고 알

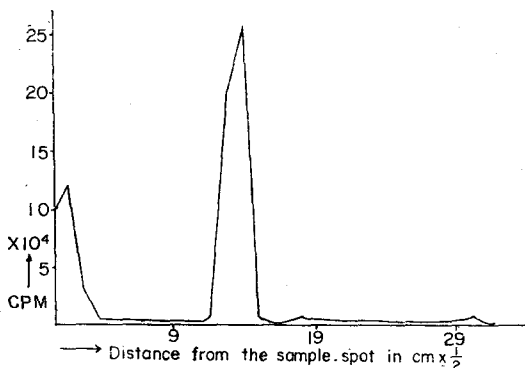


Fig. 2. The TLC of the reaction mixture of labelling aflatoxine by I¹²⁵.
Plate: Silica gel TLC plate (Merck, Art. 5553/0025)
Developing solvent: chloroform: trichloroethylene: n-amyl alcohol: formic acid (80 : 15 : 4 : 1 V/V)

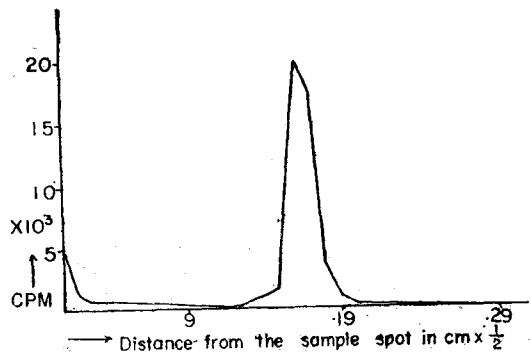


Fig. 3. The TLC of the purified product of aflatoxine-¹²⁵I.
Plate: Same as Fig. 2.
Developing solvent: Same as Fig. 2.

콜 또는 DMSO 로 추출한다. 추출액을 silica gel TLC plate 에 spot 전개, 계측하여 그 순도를 검사한다. Fig. 3 에 순도 검사한 TLC 가 표시되어 있다.

나. 표지생성물의 화학구조 확인

(가)항에서 얻은 알콜 추출액을 감압 증발하여 농축한 다음 농축액을 I.R. N.M.R.로 검사하여 aflatoxine-B₁의 IR 또는 N.M.R. spectrum 과 비교한다. 비교 결과는 결과항목에 기술되어 있다.

다. 동물실험

Aflatoxine-B₁-¹²⁵I 표지화합물을 rat 를 시험동물로 삼아 경구(經口) 투여하고 일정시간이 경과후 부검(剖檢)하여 혈액 및 간의 방사능을 비교검토한다. 그 결과는 제 1 표에 표시되어 있다. 혈액시료를 TLC 로 조사하여 생체내에서의 표지화합물의 구조변화를 조사 검토한다. 그 결과의 일례(一例)가 Fig. 4 에 표시되어 있다.

결과 및 토의

Aflatoxine-B₁ 은 (I) 과 같은 화학구조를 갖고 있어 그 전에 시행한 보통조건⁷⁾ 또는 유기용매법⁸⁾ 을 각각 사용하면 벤젠고리에 요오드표지가 가능할 것으로 보여 여러번 실험을 되풀이하였으나 성공되지 못하였고 초산(醋酸)의 존재하에서 비교적 높은 온도에서 반응시켜 비로서 표지가 가능하였다.

Fig. 2 에 보여주는 바와 같이 반응액중에는 부산물로

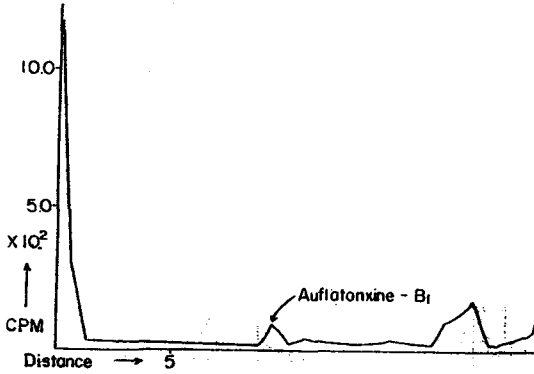
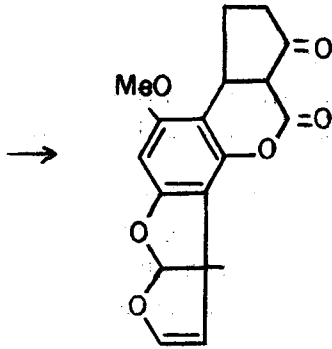


Fig. 4. The TLC of the blood sample from the test animal administered by aulatoxine-¹²⁵I.
Plate: Same as Fig. 2.
Developing solvent: Same as Fig. 2.



(I) Aulatoxine-B₁

생각되는 것이 별로 없었고 추출정제과정만을 거쳐서도 Fig. 3에 보여주는 바와 같이 순수한 주성분이 얻어진 것으로 보아서 (I)에서 이중결합, lactone 고리, alicyclic 수소, furanoid 고리 등에 반응됨이 없이 벤젠고리의 수소만이 요오드로 치환된 것으로 보인다. Aulatoxine-B₁와 그 표지물의 DMSO 용액의 N.M.R. spectra를 조사한 결과에서도 표지물에서는 벤젠고리의 proton signal을 확인할 수 없었다.

이 점을 더 구명하는 방법으로써 표지물을 염소화시켰던 바 이중 결합에 부가된 것으로 판단되는 생성물을 TLC 상에서 확인하였고 한편 HI로 작용시켰던 바 복잡한 여러 생성물을 얻었다. 위의 정성적인 실험조건으로서는 (I)의 벤젠고리의 화살표 위치에 표지된 것으로 판단된다.

표지물을 degradation scheme에 의하여서 분해시켜 보면 이 점이 더 명확하게 확인될 것으로 사료된다. 표지물을 시험동물에 경구적으로 투여하여 부검(剖檢)한 결과(제1표)를 본다면 혈액과 간장에 흡수 측정됨

Table 1. The retention of Aulatoxine-¹²⁵I in a test animal. (administered orally)

Date of Exp.	Amount of administered orally (μ Ci)	Retention* in a test animal**	
		Plasma (cpm)	Liver (cpm)
1st day	8.0	5,200	425
2nd day	4.0×2	1,200	170
3rd day	—	1,300	150
4th day	2.7×3	—	—

*No thyroid uptake was observed

** Rat

이 확실하며 갑상선에 대한 흡수는 확인되지 못하고 있다. 이 점을 감안한다면 표지물은 동물체내에서 분해되지 않음, 즉 요오드 이온이 생성되지 않음을 나타내고 있다. 혈액시료를 TLC로 조사한 결과 Fig. 4와 같다. 혈액중에 보유되어 있는 방사능이 원래 약하여서 다량을 spot 한 결과 원점에서 방사능을 많이 확인할 수 있었으나 이것은 시약자체의 측정에 의한 것이라고 볼 수 있고 peak가 명확하지는 못하지만 aulatoxine-B₁-¹²⁵I의 전개 Rf 값 근처에 방사능이 보이고 여기에서 자외선으로 형광을 확인할 수 있었다. 이 실험결과에 따른다면 표지물은 시험동물체내에서 분해됨없이 혈액에 축적되는 것으로 판단된다. 따라서 표지생성물을 이용한다면 그 화학구조에 손상이 됨 없이 동물체내 시험이 가능한 것이다.

참고 문헌

- 1) D.P.H., Hsieh, and R.L. Wateles: *Applied Microbiology*, **22**, 79 (1971).
- 2) M. Biollay, G. Buchi, and G. Milme: *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5017 (1968).
- 3) G.N. Wogan: *Method Cancer Res.*, **7**, 309 (1973).
- 4) G. Büchi, K.C. Luk, and P.M. Muller: *J. Org. Chem.*, **40**, 3548 (1975).
- 5) H.L. Gurtoo, and C.V. Dave: *Cancer Research*, **35**, 382-9 (1975).
- 6) 이서래, 최언호, 이관영: *The Korean Biochemical Journal*, Vol. 8, No. 1, (1975) pp. 1-9.
- 7) Indem: *Korean Journal of Food Science & Technology*, Vol. 6, No. 3, (1974).
- 8) 김유선, 김중두: *대한화학회지*, **11**, 51 (1967).
- 9) Indem: *대한화학회지*, **12**, 35 (1968).