

크로마토그래프法에 의한 Hippuran¹³¹I의 純度試驗

金 純 玉

誠信女子師範大學 科學教育科

(Received May 21, 1977)

Soonok Kim (*Dept. of Science Education, Sung-Shin Women's Teachers College, Seoul 122*): Purity Test of Hippuran-¹³¹I by Chromatography

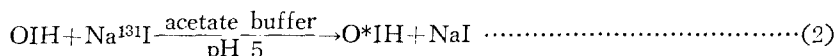
The purified *o*-iodohippuric acid-¹³¹I, *o*-iodobenzoic acid-¹³¹I, sodium iodide-¹³¹I and mixtures of those compounds were applied to radio paper or radio thin layer chromatography to select the developing solvents with useful separation efficiency. The separation efficiencies were checked by radiochromatogram scannings. It has been found that the two dimensional radio paper chromatography using the solvent systems of 8% phenol and butanol—glacial acetic acid—water (4 : 1 : 1 v/v) and the radio thin layer chromatography using alumina gel plate and butanol—glacial acetic acid—water (4 : 1 : 1 v/v) are both efficient. In this method, the Rf value of *o*-iodohippuric acid-¹³¹I, *o*-iodobenzoic acid-¹³¹I and the unbound ¹³¹I is 0.48, 0.85 and 0.15, respectively.

腎臟機能 檢査用으로 가장 많이 사용되고 있는 放射性 醫藥品인 Hippuran-¹³¹I(sodium *o*-iodohippurate, O*IH)은 신장에서 除去率의 측정이나 nephrography 등 실제 사용에 있어서 그 放射化學的 純度(radiochemical purity, RCP)가 크게 문제 되고 있음을 여러 문헌¹⁻⁷⁾에서 강조하고 있는데 그 이유는 방사성 불순물이 많을 경우 신장을 통한 제거가 빨리 이루어지지 않기 때문이다. O*IH 중에는 이와 유사한 불순물이 존재함을 종이크로마토그래피(PC)로 Anghileri⁶⁾, Hosik⁷⁾ 및 Brown¹⁸⁾등이 알아내었으나 그 不純物이 무엇인지를 확인하지는 못하였다. 1964년에 W. Hartrodt⁹⁾가 Whatman No. 1 종이와 n-BuOH—2N—HAc(1 : 1)을 展開溶媒로 하는 PC로 Rf(O*IH) 0.86~0.87, Rf(O*IB) 0.89~0.90 Rf(*I⁻)0.22~0.23임을 알아내고 주된 불순물은 OIH 合成 中間體인 OIB(*o*-iodobenzoic acid)임을 확인 하였다. 또 R.S. Mani¹⁰⁾등은 1966년에 n-BuOH—HAc—H₂O(4 : 1 : 1 v/v) 또는 n-BuOH—acetone—H₂O(5 : 5 : 1 v/v)를 展開溶媒로 하는 PC에서 Rf(O*IH) 0.82 및 0.50, Rf(O*IB) 0.92 및 0.64, Rf(*I⁻) 0.14 및 0.30로 각각 나타났다고 보고하여 放射性 不純物이 O*IB임을 재차 확인한바 있다. Butanol과 빙초산 및 물을 전개용매로 사용한 방법에서는 O*IH와 O*IB의 Rf치 차이는 매우 근소하여 경우에 따라서는 분리되지 않아 확인이 되지 않았다고 한다. L.Varga^{1,2)}등은 1967년에 역시 不純物이 O*IB임을 Benzene—HAc—H₂O(2 : 2 : 1 v/v)을 展開溶媒로 하는 PC로 확인하였다

고 하며 이 때 $R_f(O^*IH)$ 0.48~0.52, $R_f(O^*IB)$ 0.88~0.92, $R_f(*I^-)$ 0.0~0.05라고 하여 O^*IH 와 O^*IB 가 효과적으로 분리된다고 하였다. 이 결과로 美國藥典^{16,17)}에는 이 방법을 채택, 展開溶媒 Benzene—HAc—H₂O(2 : 2 : 1 v/v)를 써서 PC를 행하여 O^*IH 의 방사화학적 순도를 결정하도록 규정하고 있으나 이 방법에 따라 실시할 경우 만족할만 하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 이들 같은 機能基를 가진 類似化合物을 분리하기 위한 새롭고 효과적인 방법을 확립하여 이 방사성 의약품의 日常生産 및 品質管理에 있어서 중요한 방사화학적 순도를 효과적으로 결정하도록 하는 연구를 진행시켰다.

實 驗

O^*IH 및 O^*IB 의 제조— OIH 는 미국 Mallinckrodt社 製品(mp 171~173°)을 그대로 사용, NaI^{131} (KAERI 제품) 1~2 mCi와 섞어 同位元素 交換反應시켜 제조 하였다¹³⁾.



O^*IH 의 제조방법과 같이 처리하여 OIB (mp 162°)는 미국 Fisher社 製品를 사용하여 O^*IB 를 제조하였다.

크로마토그래피— O^*IH 및 $*I^-$, O^*IB 및 $*I^-$, O^*IH , O^*IB 및 $*I^-$ 를 whatman No. 1 종이를 쓰는 PC 또는 Al_2O_3 나 SiO_2 겔판을 쓰는 上昇展開 박층크로마토그래피(TLC)로 분리 실험하였다. 展開溶媒는 Table I에 표시한것들을 사용하였다. 전개가 끝나면 종이 또는 겔판을 風乾하고 크로마토그램 走査裝置(packard model 7201)로 주사하여 얻은 피크 크기의 비로부터

Table I—The R_f values in the chromatography systems applied in present work

No.	Stationary phase (supporting material)	Mobile phase (developing solvent)	R_f				
			O^*IH	O^*IB	$*I^-$	$*IO_3^{-a)}$	$*IO_4^{-a)}$
1	Whatman No. 1 paper	n-BuOH—HAc—H ₂ O (4:1:1)	0.83	0.86	0.21	—	0.0
2	Whatman No. 1 paper	C ₆ H ₆ —HAc—H ₂ O ^{b)} (2:2:0.5)	0.87	0.87	0.55	0.03~0.15	0.0
3	Whatman No. 1 paper	C ₆ H ₆ —HAc—H ₂ O ^{b)} (2:4:1)	0.86	0.87	0.55	0.13	0.0
4	Whatman No. 1 paper	Upper layer of the mixture; C ₆ H ₆ —HAc—H ₂ O(2 : 2 : 1)	0.87	0.87	0.55	0.13	0.0
5	SiO ₂ gel plate(Kodak)	HAc—H ₂ O(3 : 97)	0.72	0.72	0.1~0.2	0.4	0.0~0.2
6	SiO ₂ gel plate(Kodak)	EtOH—H ₂ O—25% ammonia (100 : 12 : 16)	0.80	0.80	0.38	0.0	0.0
7	Whatman 3mm paper (2 dimensional)	(1) 8% C ₆ H ₅ OH (2) n-BuOH—H ₂ O (4:1:1)	0.84 0.75	0.12 0.75	0.84 0.14	— —	— —
8	Al ₂ O ₃ gel plate(Kodak)	n-BuOH—HAc—H ₂ O (4:1:1)	0.48	0.85	0.15	0.0	0.0

^{a)} $*IO_3^-$, $*IO_4^-$ are both impurities often present in small amount in Na^*I solution. However, in the fresh solution of good quality, the amount of such impurities are negligible. The radiochemical purity of Na^*I solution can be checked by means of a paper chromatography technique using 75% methanol as a developing solvent. The R_f values of $*I^-$, $*IO_3^-$ and $*IO_4^-$ are 0.10, 0.42 and 0.0, respectively.

^{b)} The originally proposed solvent mixture in the literature^{11,12)}, benzene—HAc—H₂O(2 : 2 : 1), was modified to 2 : 2 : 0.5 or 2 : 4 : 1 since the mixture made with the original mixing ratio was not homogeneous.

RCP(%)를 구하고 Rf 차이 차이의 대소로부터 分離效果를 검토하였다.

$$RCP(\%)(*A) = \frac{\text{피이크 } *A \text{의 넓이}}{\text{피이크 } *A \text{의 넓이} + \text{피이크 } *B \text{의 넓이}} \times 100 \dots\dots(3)$$

한편 각 피이크의 확인에 OIH, OIB, O*IH, O*IB, *I-(+*IO₃⁻, *IO₄⁻)등을 사용하고 bromphenol blue에 의한 呈色反應, 紫外線에서의 螢光發光에 의한 검출¹⁴⁾, O*IH 제조시의 反應時間 차이에 따르는 피이크 크기의 변화 관찰등의 세가지 방법을 모두 사용하였다(Table I, Fig. 1~3). 二元展開 PC에 있어서는 전개후 autoradiography를 실시하였다.

結果 및 考察

O*IH 및 O*IB의 제조——同位元素 交換反應을 6시간동안 進行시키고나서 O*IH를 분리정제하고 그 일부를 취해 放射能을 계측하였으며 나머지는 증발건고시켜 전체 무게를 재었다. 결과 O*IH의 比放射能(specific activity)은 10 μCi/mg, O*IB는 7 μCi/mg 정도 이었다.

사용한 Na*I의 RCP는 75% MeOH를 쓰는 PC를 실시했을 때 *IO₃⁻ 3%, *IO₄⁻ 2%등 不純物은 5%이였으며 *I-가 95% 이상이어서 미국약전의 기준에 적합하였다.

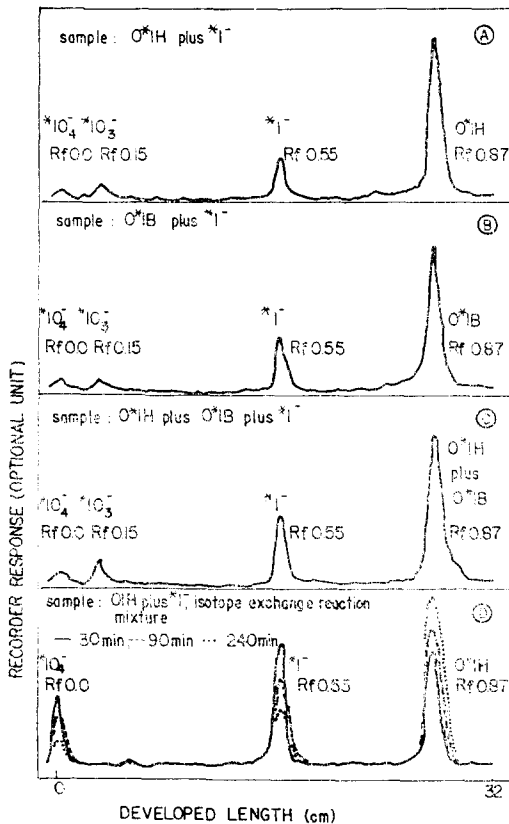


Fig. 1—Sketch of paper chromatogram scans (Whatman No. 1. paper, n-BuOH—HAc—H₂O (2 : 2 : 0.5 v/v)).

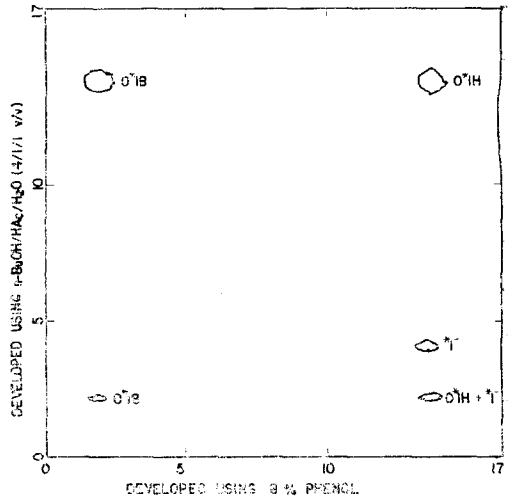


Fig. 2—Sketch of a autoradiogram obtained in the two dimensional paper chromatography.

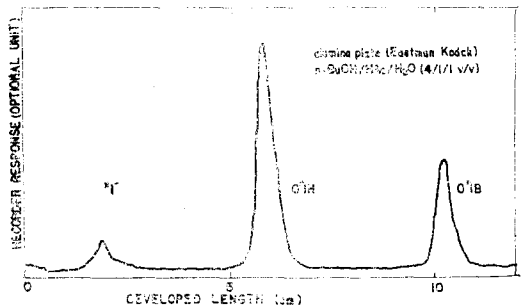


Fig. 3—Sketch of thin layer chromatogram scan.

크로마토그래피—O*IH 중의 有機不純物은 O*IB 임을 Mani 및 Hartrodt 등이 확인하였는데 그와 같은 이유는 OIB가 OIH 합성중간체인 때문이다.

Table I이 보여주는 바와 같이 기보된 方法으로는 O*IH와 O*IB가 거의 분리가 힘들다. 더구나 O*IH와 O*IB의 효과적인 분리를 위해 L. Varga^{11,12)}등에 의해 제안된 溶媒系(No. 2, 3 Table I)는 Anghileri¹⁶⁾ Tubis¹⁵⁾등이 제시한 溶媒系(No. 1 Table I) 보다는 더 분리효과가 좋지 않아(Table I, Fig. 1) 전혀 분리되지 않는것 같다. 그리고 L. Varga 등이 주장하는 方法에 따라 본 연구에서 합성 정제한 O*IH의 RCP를 결정한 결과 단지 3%에 불과하며 나머지 97%가 放射性 不純物로 확인되기도 하였다. L. Varga 등에 의하면 $Rf=0.55(0.48\sim 0.52^{11,12})$ 는 O*IH의 피이크라고 하였으나 본 연구의 확인으로는 이것이 *I⁻의 피이크 이었고 $Rf=0.0^{11,12)}$ 은 *I⁻의 피이크라고 하였으나 본 연구에서 확인한 바로는 *IO₃⁻(+*IO₄⁻)의 피이크 이었다(Table I).

본 연구에서 실제로 각 피이크의 확인에 O*IH, O*IB 등이 화학적량이 미량인 관계로 각각의 carrier로서 OIH, OIB 등을 사용 螢光發光 確認實驗 및 呈色反應 確認實驗을 하였다. 첫째 bromphenol blue에 의한 크로마토그램상의 純粹物質(authentic material)과 비교한 呈色反應에서 OIH(O*IH)는 청색, O*IB(OIB)는 황색으로 선명한 차이를 보였으며, 둘째 紫外線燈($\lambda=3660\text{Å}$)에 의해 OIH(O*IH)에서만 형광을 볼 수 있어 문헌¹⁴⁾의 내용과 일치 하였다. 셋째, 반응시간을 다르게 하며 試料를 채취하여 PC를 한 결과 O*IH($Rf=0.87$)의 피이크는 점점 커지고 반대로 *I⁻($Rf=0.55$)의 피이크는 점점 작아지는 것을 확인할 수 있었으며 이것은 O*IH의 生成反應이 진행중인 것으로 미루어 당연한 결과라고 할 수 있다(Fig. 1).

이상의 實驗結果들을 종합할 때에 L. Varga 등의 데이터와 일치되지 않으며 또 O*IH와 O*IB는 그 溶媒로는 분리되지 않았다. 그런 결과로 본 연구에서 합성한 O*IH의 放射化學的 純度가 3%로 나타난 것이다. 文獻^{16,17)}의 方法은 PC를 함에 있어서 0.2% KI, 1.0% Na₂CO₃, 1.0% Na₂S₂O₃등을 시료점적에 앞서 점적하는데 이것은 非結合 *I⁻가 양이 追躡子 레벨임과 放射性化合物의 불안정에 기인되는 吸着, 방사선에 의한 自動酸化등을 방지하기 위한 조작이라고 생각된다. 사용하는 溶媒系는 가능한 유기불순물의 분리에 부적당하며 더구나 용매가 균일하게 섞여지지 않아 아랫층을 展開槽에 일단 넣고 증기포화 시킨후 윗층 용매를 켜서 전개하는등의 번잡한 조작에 관하여는 의심이 생긴다. 실제로 같은 용매이면서 그 組成比만이 조금 달라질때 Rf 값에 약간의 차이는 생기나 分離能에는 큰 차이를 보이지 않았다.

Fig. 1의 A, B, C 및 Table I에서 보는 바와 같이 O*IB와 O*IH의 분리는 안되었기 때문에 본 연구에서는 水溶性 polyhydroxy 化合物(당류 등)의 분리는 비교적 활성화 하지 않은 TLC 판(따라서 PC나 셀룰로즈 박판에 의한 TLC 등이 좋음)에서 phenol 용매에 의해 분리가 된다는 사실¹⁸⁾에 착안하고 이를 PC에 적용했던바 이들 두 화합물 O*IB와 O*IH는 큰 Rf치 차이로 잘 분리되었다. 그러나 O*IH와 *I⁻의 분리가 안되어 이것은 아미노산류의 분리에 많이 쓰는 n-BuOH—HAc—H₂O(4:1:1 v/v)조성 용매를 적용, 분리하였다(Table I, No. 7 Fig. 2).

그러나 二元展開는 복잡하므로 Table I의 No. 8 및 Fig. 3이 보이는 바와같이 TLC에 의한 더 간단한 方法을 확립하였다. 이 方法에 의하면 O*IH, O*IB 및 *I⁻가 거의 같은 간격으로 떨어져 분리되며 약 10cm 전개하는데 한시간 남짓 걸린다. 본 연구에서 合成精製한 O*IH의 RCP는 이 方法에 의하면 97% 정도이어서 美國藥典 기준인 97%에 달하므로 적격인 放射性 醫藥品이었다. O*IB와 *I⁻들은 3% 이하였다.

結 果

n-BuOH—HAc—H₂O(2 : 2 : 1 v/v)를 展開溶媒로 하는 PC 로는 O*IH 중의 가장 가능한 불순물인 O*IB 가 전혀 분리가 안되었다. 이에 본 연구에서는 이들 두 化合物 및 非結合 *I-를 효과적으로 분리하기 위하여 n-BuOH—HAc—H₂O(4 : 4 : 1 v/v)를 展開溶媒로 하고 알루미늄 젤판을 固定相으로 하는 TLC 를 실시한 바, 한시간내에 10 cm 이상 전개되며 O*IB, O*IH 및 *I-등 각각의 Rf 값은 0.85, 0.48, 0.15로써 확연히 분리되었다.

文 獻

1. M.K. Burbank, W.N. Tauxe, F.T. Maher and J.C. Hunt, Proc. Staff. Mtgs. *Mayo Clinic*, **36**, 372 (1961).
2. I. Mascham, T.A. Hosick, H. Schmid and F.C. Watts, *Nucl. Med.*, **4**, 70 (1963).
3. R.H. Greenlaw and W.D. Hudgins, *ibid.*, **5**, 453 (1964).
4. W.N. Tauxe, M.K. Burbank, F.T. Maher and J.C. Hunt, *ibid.*, **39**, 761 (1964).
5. C.D. Farmer, W.N. Tauxe, F.T. Maher and J.C. Hunt, *ibid.*, **6**, 532 (1965).
6. L.J. Anghileri, *ibid.*, **4**, 155 (1963).
7. T.A. Hosick, F.C. Watts and I. Meschan, *ibid.*, **5**, 551 (1964).
8. D.W. Brown, N.J. Phelps and D.L. Palmer, *ibid.*, **6**, 287 (1965).
9. W. Hartrodt, *ibid.*, **4**, 423 (1965).
10. R.S. Mani and R.J.V. Pravarakan, *Curr. Sci(Bangalore)*, **35**, 16 (1966).
11. L. Varga, I. Keleman and A. Kovach, *J. Nucl. Med.*, **9**, 604 (1967).
12. *ibid, Acta Pharm. Hungarica*, **38**, 15 (1968).
13. J. Kim, *J. Korean Nucl. Soc.*, **4**, 186 (1968).
14. British Pharmacopeia, 1968, p-918.
15. M. Tubis, W.H. Bland, J.S. Endow and S.S. Rawaly, *J. Nucl. Med.*, **5**, 532 (1964).
16. United States Pharmacopeia XVIII, 1970, p-639.
17. United States Pharmacopeia XXV, 1975, p-261.
18. J. Kim and H.C. Pyun, *J. Korean Chem. Soc.*, **12**, 138 (1968).