

Bis (β -amino-alkyl-oxo) oxalate 유도체의 납 중독 해독에 관한 연구

崔姬珂 · 劉美禮 · 盧榮洙 · 鄭聖顯 · 丁世榮

慶熙大學校 藥學大學

Studies on the Bis (amino-alkyl-oxo) Oxalate Derivatives As a Antidote of Lead poisoning

Seun Ah Choi, Mi Rhe You, Young Soo Rho
Sung Hyun Chung and Se Young Choung

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, Korea

ABSTRACT

The effects of bis (β -amino-ethyl-oxo) oxalate and bis (α -amino-methyl-oxo) oxalate on the toxicity of lead acetate in rat were examined.

Rats were given intraperitoneally at the dose of lead acetate 45 mg/kg.

The exposure of lead acetate showed the 70% decrease of ALAD (δ -amino levulinic acid dehydratase) activity in red blood cell.

In vivo 122 mg/kg administration of bis (β -amino-ethyl-oxo) oxalate and bis (α -amino-methyl-oxo) oxalate showed the 50% increase of ALAD activity, whereas 149 mg/kg administration of Ca-EDTA had no effect.

In vitro, the same results were obtained.

Both compounds had hemolytic activity at concentrations higher than that required for showing the 50% ALAD activity increase in vivo.

緒 論

최근 급격한 자동차 대수의 증가로 자동차 배기가스에 의한 환경오염을 가중시키고 특히 Pb의 인체 내 축적은 날로 심각해져 가고있다.

납의 독성에 대해서는 체중감소¹⁾, 백혈구감소²⁾,

혈중 alkaline phosphatase 및 hematocrit치 감소^{3,4)}, hemoglobin 합성저해, 적혈구 생존기간의 단축⁵⁾, 신장암⁶⁾, 면역반응의 저하⁷⁾ 및 ceratogenic effect⁸⁾ 등의 연구보고가 있다.

Hemoglobin 합성억제는 빈혈증상을 나타내며 이는 heme 합성과정의 효소인 δ -amino levulinic acid dehydratase (ALAD)⁹⁻¹³⁾, heme synthase의 활

성억제에 기인한다. 또한 이들 효소의 억제도 전구체인 ALA의 혈청 및 뇨중의 농도가 현저하게 상승¹⁴⁾하고 적혈구 및 뇨중의 coproporphyrin의 증가가 나타나 Pb 폭로의 지표로서 사용되어진다.

Pb에 의한 중독의 치료에는 일반적으로 chelate agent^{15~19)}의 투여에 의한 체내 Pb의 빠른 배설이 유효한 것으로 되어 있으며 실제 중금속 해독제로서는 2,3-dimer captopropanol (BAL), Ca-EDTA 등이 사용되어지고 있다.

그러나 최근들어 BAL은 중금속 배설을 촉진하나 중금속의 체내분포를 유도하여 중추신경계에 대한 독성을 높이고 Ca-ETA도 필수금속의 배출에 의한 체내 금속의 평형 파괴로 생체독성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

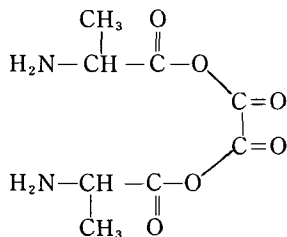
따라서 저자들은 독성이 비교적 약하며 납의 배설을 촉진시켜 납중독을 해독할 수 있는 Chelate agent의 필요성을 느끼고 본 연구실에서 합성한 compound I 과 compound II^{20,21)}의 용혈독성 및 *in vitro*, *in vivo*에서의 ALAD activity 회복에 미치는 영향을 검토하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고코자한다.

實驗方法

1. 合成方法

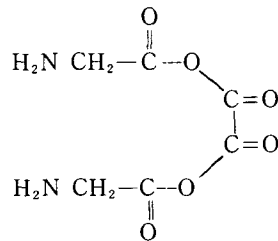
1) Bis (β -amino-ethyl-oxo) oxalate (이하 compound I 로 약칭)

β -alanin을 dimethylformamide에 용해후 dimethyl-oxalate를 소량씩 적하 하면서 240°C ~250°C에서 3시간 가열 반응시켰다. 반응 완결후 용매를 증발하여 얻은 결정을 EtOH로 2회 재결정하여 백색 결정성 물질을 얻었다. Mass, NMR 및 IR로 단일 물질임을 확인하였다.



2) Bis (α -amino-methyl-oxo) oxalate (이하 compound II 로 약칭)

Glycin을 dimethylformamide에 용해후 dimethyl-oxalate를 소량씩 적하하면서 240~250°C에서 4시간 가열 반응시켰다. 반응 완결후 용매를 증발하여 얻은 결정을 EtOH로 2회 재결정하여 백색 결정성 물질을 얻었다. Mass, NMR 및 IR로 단일 물질임을 확인하였다.



2. 實驗動物 및 投與方法

체중 350 g내외의 Wistar계 male rats를 12日 동안 실온의 조건하에서 시판사료로 사육하며 4마리를 1군(단 control은 2마리)으로 실험하였다. Pb의 투여는 Pb(Ac)₂의 형태로 45 mg/kg을 증류수 0.5 ml에 용해하여 복강내로 1회 투여 하였고, compound I (122 mg/kg), compound II(122 mg/kg) 및 Ca-EDTA(149 mg/kg)을 각각 saline, 0.5 ml에 용해하여 Pb투여후 격일로 5회 꼬리정맥에 투여하였다.

3. 溶血實驗

건강한 rats의 혈액을 심장으로부터 heparin채혈을 하여 Tris Bufferd Saline(이하 T.B.S.라함)으로 희석, 300 g에서 5분간 원심분리후 상등액과 buffy coat를 제거했다. 동일 조작을 2회 반복하여 적혈구를 분리했다. 분리된 적혈구 2×10^8 cells에 대해 compound I, II Ca-EDTA를 각각 0.05 mg, 0.1 mg, 0.5 mg 및 1 mg가하고 T.B.S.를 가하여 전용액이 1 ml가 되도록 하였다. 37°C에서 30분간 incubation 시킨 후 30,0 g에서 1시간 동안 원심분리하여 상등액을 취하고 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 100% 용혈은 sodium dodecyl sulfate 5 mg/ml를 가해서, 0%는 T.B.S. 용액만을 사용하여

비교하였다.

4. ALAD activity 測定法

Pb(Ac)₂를 전부투여한 rats의 혈액을 심장으로 부터 heparin채혈하여 그 50 μl를 1.45 ml 증류수를 가한 각 test tube에 넣은 다음 준비된 신선한 50 mM ALA 1 ml를 가하고 37°C에서 1시간 incubation하였다. 반응을 정지시키기 위해 10% trichloroaceticacid 1 ml와 saturated copper sulfate solution 0.05 ml를 가하고 500 g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액 1 ml를 취해 Ehlich's reagent 1 ml를 가하고 5분후 555 nm에서 흡광도를 측정하였다.

· ALA; NaHCO₃를 가해 pH 7.0을 맞춘후 사용했다.

· Ehlich reagent; para-dimethyl aminobenzaldehyde 1g에 glacial acetic acid 34 ml와 74% perchloric acid 16 ml를 가해 만들었다.

結 果

1. 용혈작용

Fig. 1에서 보는 바와 같이 Ca-EDTA와 compound I, compound II의 용혈독성을 in vitro에서 본 결과 rat RBC 2×10⁸ cells에 대해 1 mg/ml에서 Ca-EDTA가 20%정도 용혈을 나타내는데 비해 compound I, compound II는 거의 100% 가까운 용혈 독성을 나타냈다. 또한 compound I 과 compound II의 용혈독성은 거의 비슷하게 나타났다.

이 실험결과에 의해 compound I, compound II, Ca-EDTA가 거의 용혈성이 없다고 생각되는 농도까지 Pb(Ac)₂ (45 mg/kg)을 전 투여한 rat의 적혈구에 대해 in vitro에서 ALAD activity를 측정했다.

2. in vitro ALAD activity 변화

Fig. 2에서 보는 바와 같이 compound I 0.5 mg/kg에서는 거의 100% ALAD activity가 회복

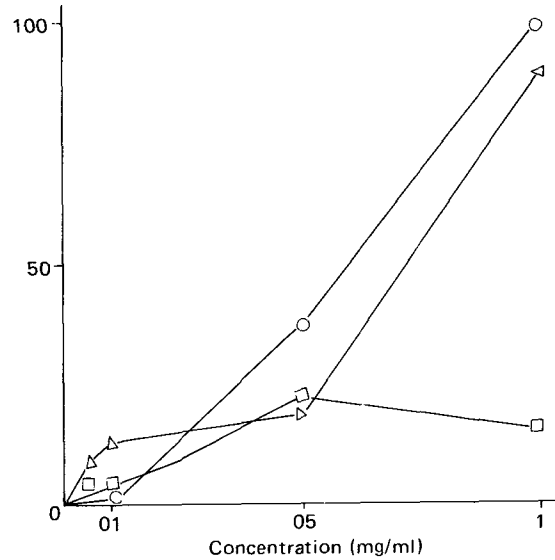


Fig. 1. Hemolytic activities of bis (β-amino-ethyl-oxo) oxalate and bis (α-amino-methyl-oxo) oxalate in vitro

○; Bis (β-amino-ethyl-oxo) oxalate
 △; Bis (α-amino-methyl-oxo) oxalate
 □; Ca-EDTA
 Rat RBC; 2×10⁸ cells/ml for one compound sample
 Incubation condition; 37 c, 30 min

된 것에 반해 Ca-EDTA 0.5 mg/ml에서는 control 과 거의 차이가 없었으며, compound II 경우에는 0.1 mg/ml에서는 58%로 compound I 과 비슷한 정도의 ALAD activity 회복을 보였다.

단, 0.5 mg/ml에서는 용혈이 일어나므로 실험이 불가능했다.

3. in vivo ALAD activity 변화

In vivo에서 compound I, compound II의 ALAD activity회복 효과를 본 결과를 Table 1에 나타냈다.

Pb(Ac)₂에 대한 Ca-EDTA 효과는 Ca-EDTA 투여 1일후 약 20% ALAD activity 증가를 보였으나 계속된 투여에도 별 변화를 보이지 못했고 compound I 경우에는 투여 1일후 약 10% ALAD activity 증가를 보였으며 12일후에는 약 30%까지 증가되었다.

또한 compound II 경우에는 투여 1일후 약 20%

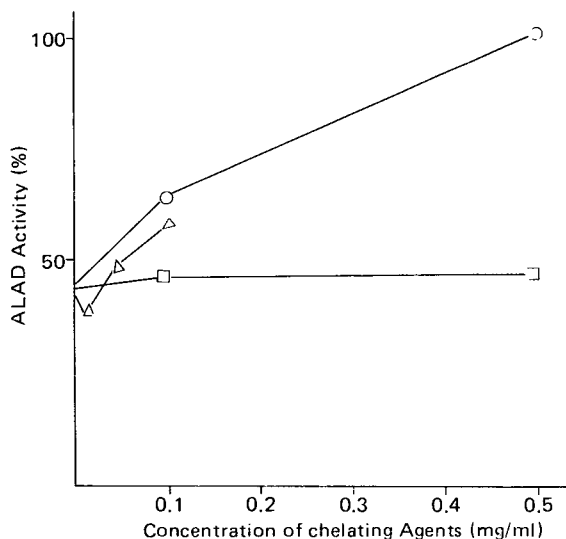


Fig. 2. Effects of chelating agents in lead poisoned rats in vitro.

○ Ala-oxa Bis (β -amino-ethyl-oxo) oxalate
 △ Gly-oxa Bis (α -amino-methyl-oxo) oxalate
 □ Ca-EDTA

Rat RBC; 10^9 cells/ml

$$\% = \frac{\text{ALAD activity of each case}}{\text{ALAD activity of control}}$$

Significant different from control $p < 0.05$

Table 1. Effects of chelating agents in lead poisoned rats in vivo. $n=4$

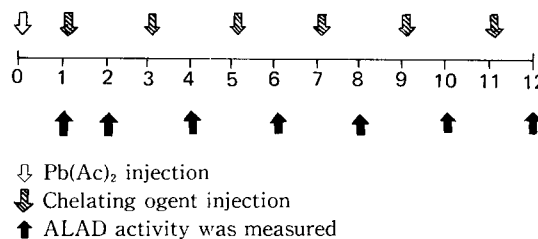
Treat	Day	1 day	2 days	12 days
Control		94.5±9.0	94.5±9.0	95.3±5.5
Pb(Ac) ₂		31.0±12.4	29.0±4.9	40.0±12.0
Pb(Ac) ₂ Compound I		25.0±3.8	37.0±2.9	58.0±5.8
Pb(Ac) ₂ Compound II		18.4±5.3	41.0±4.4	76.8±21.1
Pb(Ac) ₂ EDTA		19.0±4.5	41.0±5.8	43.0±12.3

The rats were injected i.p with Pb(Ac)₂ (45 mg/kg) After 1 day, ALAD activity was measured and saline or chelating agents (122 mg/kg) were injected intravenously.

$$\% = \frac{\text{ALAD activity of each case}}{\text{ALAD activity of control}}$$

Significant different from control $p < 0.05$

ALAD activity 증가를 보였으며 12일후에는 약 50%까지 증가되었다. 이 실험중 Pb(Ac)₂ 투여 12



일후의 ALAD activity 자연회복은 약 10%정도이다. 위 결과로 보면 두 화합물이 Ca-EDTA보다 현저한 ALAD activity 회복을 나타내나 in vitro 경우에는 (Fig. 2) 거의 차이가 나타나지 않고 in vivo 경우에 (Table 4) compound II가 compound I보다 현저하게 큰 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

이는 compound I이 생체내에서 빠른 속도로 대사가 되거나 혈액내 albumin과 결합력이 커 적혈구를 투과하는 양이 적어지기 때문일 가능성을 시사하고 있다.

結 論

Rat에 Pb를 투여한후 Chelating agent (compound I, compound II), Ca-EDTA를 투여하여 Pb에 의해 저하된 ALAD activity의 회복을 보았다.

Compound I, compound II는 in vitro, in vivo에서 Ca-EDTA보다 현저한 ALAD activity의 회복을 나타냈다.

특히 compound II는 in vitro, in vivo에서 Ca-EDTA보다 현저한 ALAD activity의 회복을 나타냈다.

특히 compound II는 in vivo에서 122 mg/kg을 12일 투여에 의해 거의 80%에 가까운 ALAD activity의 회복을 보였다.

Compound I, compound II, Ca-EDTA의 독성을 비교하기 위해 rat RBC에 대한 용혈작용을 보았다.

In vitro에서 compound I, compound II는 Ca-EDTA보다 높은 용혈작용을 보였으나, in vivo에서 Pb 중독을 해독시키기 위해 투여한 농도와 비

교해 불때 현격한 차가 나므로 실제 in vivo에서는 큰 문제가 없을 것으로 사려된다.

参 考 文 献

1. Cardona Edward, Lessler Milton A; Time course of hematologic changes during chronic lead poisoning. *Pro. Soc. Exp. Biol, Med.* **145**, 663~668 (1974)
2. Stowe Howard D, Goyer Robert A., Krigman Martin M.: Experimental oral lead toxicity in young dogs. *Arch. Pathol.* **95**, 2:106~116 (1973)
3. Tanimoto Yoshifumi, Hirata Mariko and Suzuki Shuzo: Variation of blood enzymes in rabbits with lead intoxication. *Igahu To Seibutsugaku.* **89**, 4:247~250 (1974)
4. Gelman Benjamin B. and Mchaelson I. Arthur: Neonatal lead toxicity and in ritro lipid peroxidation of rat brain. *J. Toxicol. Environ, Health* **5**, 4:671~682 (1979)
5. Zielhus, R.L: Dose-response relationships for inorganic lead. *Int. Arch. Occup, Health* **35**, 1~18 (1975)
6. Sunderman, F.W: Carcinogen effect of metals *Fed, Proc.* **37**, 10 (1978)
7. Gallagher, K. et al: Trace metal modification of immunocompetence. *Clin, Immunol & Immuno patho*, **13**(4), 369~77 (1979).
8. Scanlon, J: Fetal effect of lead exposure. *Pediatrics*, **40**, 145~146 (1972)
9. Sven Hernberg, MD; Jorma Nikkanen; Guy Mellin; Helena Lilius, Helsinki; δ -Aminolevulinic acid dehydrase as a Measure of Lead Exposure: *Arch Environ Health* **21**, 140~145 (1970)
10. Birgitta Haeger-Aronsen, MD; Mohammed Abdwlla, MS; Benyt I. Fristedt, MD, lund, Sweden. Effect of Lead on δ -aminolevulinic acid dehydrase activity in red blood cells. *Arch Environ Health*, **23**, 440~455 (1971)
11. Joseph B. Weissberg, B.A., Fred Lipsechutz and Frank A. Oski, M.D; *The New England Journal of Medicine*: **284**, 565~569 (1971)
12. P.M. Kuhnert, P.Erhard, B.R. Kuhnert: Lead and δ -aminolevulinic acid dehydratase in RBC's of urban mothers and fetuse: *Environmental Reserch* **14**, 73~80 (1977)
13. Jill Thomposn, D.D. Johes, W.H Beasley; The Effect of metal ions on the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase; *British Journal of Industrial Medicine*; **34**, 32~36 (1977)
14. De Bruin A; Effect of lead exposure in the level of δ -ALAD activity. *Med. Lar*, **59**, 411~418 (1968)
15. Shoji Kojima, Morio Kiyozumi and Kazuhiro Saito; Studies on poisonous metals II; Effect of chelating agents on excretion of cadmium through bile and gastrointestinal mucosa in rats; *Chem. Pharm. Bull*, **24**, 16~21 (1976)
16. S. Kojima, Kazuyoshi Kaminaka, Morio Kiyozumi and Toshiya Honda; Comparative effects of throe chelating agents on distribution and excretion of cadimium in rats; *Toxicology and Applied Pharmacology* **83**, 516~524 (1986)
17. S.Kojima, Morio Kiyozumi, Toshiya Honda, Kazuyoshi Kaminaka, Yoshiaki Oda and Yoshinobu Senba; Effect of N-benzyl-D-glucamine dithiocarbamate on distribution and excretion of cadmium in rats; *Toxicology*, **45**, 93~102 (1987)
18. S.Kojima, Morio Kiyozumi, Toshiya Honda, Yoshinobu senba, Kazuyoshi Kaminaka and Mizuo Ohnishi; Studies on poisonous metals. XVIII, Effects of several dithiocarbamates on tissue. Distribution and excretion of cadmium in rats; *Chem. Pharm. Bull*, **85**, 3838~3844 (1987)
19. Morio Kiyozumi, Hideak Shimada, Toshiya Honday and S. Kojima; Studies on poisonous metals, XIX. Comparative effects of chelating agents on distribution and excretion of inorganic mercury in rats; *Chem. Pharm, Bull*, **36**,

- 2599~2606 (1988)
20. Hideaki Shimada, Morio Kiyozumi, Toshiya Honda, and S. Kojima; Studies on poisonous metals. XX. Effects of chelating agents on distribution and excretion of inorganic mercury in rats; *Yakugaku Zasshi*, **108**, 1209~1214 (1988)
21. 대한 약학회 강연 요지집 : **37**, 44 (1988)
22. 대한 약학회 강연 요지집 : **37**, 82 (1988)