

Radio-HPLC 에 의한 [³H]-Benzo(a)pyrene 대사물의 분석

오은주 · 김현표 · 허문영 · 김경호 · 박만기*

강원대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

(Received August 20, 1990)

Analysis of [³H]-Benzo(a)pyrene Metabolites by HPLC with Radioactive Flow Detection

Eun Joo Oh, Hyun Pyo Kim, Moon Young Heo, Kyeong Ho Kim and Man Ki Park*

College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

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

Abstract—A modified method was investigated for the determination of benzo(a)pyrene metabolites generated by the rat liver microsomes based on the HPLC technique with radioactive flow detection. By adding [³H]-dexamethasone to the B(a)P metabolites mixture metabolized by the microsome, the poor yield of solvent extraction of B(a)P metabolites was compensated.

Keywords □ Radio-HPLC, B(a)P metabolites.

Benzo(a)pyrene[B(a)P]은 환경오염물질로서 대표적인 발암제 중의 하나이다. B(a)P는 그 자체로서는 생물학적으로 무해하나 microsomal cytochrome P-450에 의한 대사물이 유해하다.¹⁾ B(a)P의 효소에 의한 대사기전 및 그 입체화학적 고찰에 관한 총설이 보고되었으며,²⁾ 대표적인 B(a)P 대사물로서 1-mono-hydroxy, 3-mono-hydroxy, 7-mono-hydroxy, 9-mono-hydroxy, 9,10-diol, 4,5-diol, 7,8-diol, 1,6-quinone, 3,6-quinone 과 6, 12-quinone 등을 들 수 있다.^{3,4)}

B(a)P 대사물의 분석법으로 column chromatography,^{5,6)} thin-layer chromatography,⁷⁾ gas chromatography-mass spectrometry⁸⁾ 그리고 HPLC 법 등이 보고되어 있다. Okano 등⁹⁾은 reverse phase HPLC에 의하여 B(a)P 대사물을 분리하고 radio labelled 된 각 성분 분획을 취하여 liquid scintillation counter를 이용하여 미량정량하는 방법을 사용하였다. 최근 HPLC의 radioactive flow detector가 개발되어 신속·정확하게 radio-labelled 된 미량의 B(a)P 대사물을 분석하게 되었

다.¹⁰⁾

저자 등은 쥐의 간 microsome에 의해 대사된 [³H]-B(a)P 대사물을 Okano 등의 방법⁹⁾으로 용매추출하여 Radio-HPLC로 분석을 시도했으나 그 추출률과 재현성이 불량하였다. 이에 [³H]-dexamethasone을 추출률을 보정하기 위한 기준물질로 사용하여 양호한 결과를 얻었다.

실험방법

시약 및 재료—[³H]-B(a)P(61.7 Ci/mmol)과 [³H]-dexamethasone은 Dupont사에서 구입하여 사용하기 직전 아래의 B(a)P 대사물의 분석조건(역상 액체크로마토그래피)으로 정제하여 사용하였다. 실험하기 직전에 [³H]-B(a)P를 specific activity가 0.36 μCi/nmol이 되도록 희석하고 B(a)P 대사물의 분석조건과 같은 조건하에서 HPLC로 정제하였다. [³H]-B(a)P 분획을 취하고 질소가스 농도가 3.4 μCi/10 μl가 되도록 농축하였다. Retention time을 확인하기 위한 B(a)P 대사물

즉 3-monohydroxy, 4,5-diol, 7,8-diol, 9,10-diol, 1,6-dione, 3,6-dione 과 6,12-dione 은 NCI 에서 구입하여 사용하였다. B(a)P, NADPH, vitamin E 및 dexamethasone 은 Sigma 사에서 구입하였고, scintillation cocktail (Flo-Scint II[®]) 용액은 Radiomatic 사에서 구입하여 사용하였다. HPLC 용 용매는 Pierce 사 제품을 사용하였고, 기타 시약들은 모두 특급을 사용하였다.

기기 및 측정조건—Shimadzu HPLC system, 즉 2대의 LC-6A pump, Rheodyne Injector, SPD-6AV UV-VIS spectrophotometric detector, SCL-6A system controller 와 C-R4AD chromatopac data processor 를 사용하였다. 컬럼은 Shimpack CLC ODS (6.0 mm i.d.×15 cm long)을 사용하였다. 또 Radiomatic Flow-one/beta Model A-250 radiation detector (500 μ l flow cell)과 Epson LQ-850 printer 를 사용하였다.

컬럼에서 분리된 각 성분이 UV-VIS detector 를 통과한 후 radiation flow detector 를 통과하도록 연결하였다. 이동상의 유속은 0.8 ml/min, Scintillation cocktail 용액의 유속은 2.4 ml/min 로 하였고, update time 은 2 sec 로 하였다. B(a)P 대사물 및 dexamethasone 의 retention time 은 UV 254 nm 에서 검출한 B(a)P 대사물 표준품 및 dexamethasone 표준품의 retention time 으로 확인하였다. 각각의 B(a)P 대사물의 CTS 값은 해당 peak 의 CTS 값에서 microsomal protein 을 넣지 않은 control 의 해당 시간대의 CTS 값을 뺀 값으로 결정하였다.

실험동물—서울대학교 동물실에서 약 4주 정도된 ICR male mouse 를 구입하여 강원대학교 약학대학 동물사육실에서 다시 2주 정도 키워 약 23g 된 mouse 를 사용하였다. 사료는 삼양유지사료(주)의 mouse 용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%)를 사용하였다. 동물실 조명은 9:00 AM 에 점등, 9:00 PM 에 소등시켜 12시간 간격을 dark-light cycle 을 조절하였다.

간 microsomal fraction 의 조제—mouse 를 decapitation 시켜 간을 꺼내고 0.25 M sucrose 로 간 표면을 씻고 여기에 간 중량의 3배되는 pH 7.4 tris buffer (0.25 M sucrose 함유)를 가하여 ho-

mogenize 시켰다. 이를 10,000×g 로 15분간 2회 원심분리하여 상층액을 얻어 다시 105,000×g 로 1시간 동안 초원심분리하여 pellet 를 취해 여기에 pH 7.5 phosphate buffer 2.0 ml 를 가해 microsomal fraction 를 만들었다. 그리고 microsome 의 protein 양은 Lowry 법¹¹⁾으로 정량하였다.

B(a)P 대사물 표준품과 Dexamethasone 의 HPLC 분석—B(a)P 대사물 즉 3-monohydroxy, 4,5-diol, 7,8-diol, 9,10-diol, 1,6-dione, 3,6-dione 과 6,12-dione 각각 2mg 과 dexamethasone 20 mg 을 각각 200 μ l methanol 에 용해하였다. Shimpack CLC ODS column 을 고정상으로 하고, UV 254 nm 에서 검출하여, 유속 2 ml/min 의 90%, 80%, 70%, 60% methanol 하에서의 retention time 을 측정하였고 capacity factor, selectivity factor 를 계산하였다. 각 표준품의 동량 혼합액을 조제하고 methanol-물의 여러 가지 gradient elution 을 시행하여 분리가 가장 양호한 이동상의 조건을 검토하였다.

B(a)P 대사반응—2.1 mg 의 microsomal protein 을 3.2 μ mol MgCl₂가 함유된 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5)에 가하고 또 0.1 μ mol NADPH 를 가하여 1.0 ml 가 되도록 하였다. [³H]-B(a)P 희석용액 20 μ l (6.8 μ Ci 해당)를 가하여 반응을 시작하였다. 이를 37°C에서 진탕하면서 40분간 incubation 하였다. 얼음에서 냉각시킨 acetone 1.0 ml 를 가하여 반응을 멈추었다.

B(a)P 대사물의 추출—[³H]-Dexamethasone (1 μ Ci/ μ l) 2 μ l 를 [³H]-B(a)P 와 같은 방법으로 정제하여 질소가스로 증발하고 acetone 200 μ l 에 용해한 후, 이 중 20 μ l 를 위의 반응시험관에 넣었다. 1.0 mM vitamin E 를 함유한 ethylacetate 2.0 ml 를 가하여 B(a)P 대사물을 추출하였다. 유기용매층을 분리하고 남은 수층을 1.0 mM vitamin E 를 함유한 acetone-ethylacetate (1:2, v/v) 혼합액 1.0 ml 로 2회 추출을 반복하여 유기용매층을 합하고 무수 MgSO₄로 탈수한 후 질소가스로 증발 건조시켰다. 이를 1.0 mM vitamin E 를 함유한 methanol-tetrahydrofuran (1:1, v/v) 혼합액 50 μ l 에 용해한 후 그 중 20 μ l 를 HPLC 에 주입하였다.

[³H]-Dexamethasone 과 [³H]-B(a)P 의 검량

Table I—Retention behaviors of B(a)P metabolites-Effect of the methanol concentration.

B(a)P Metabolites	*90%		*80%		*70%		*60%	
	<i>k</i>	α	<i>k</i>	α	<i>k</i>	α	<i>k</i>	α
9,10-diol	0.204		0.514		1.248		3.487	
Dexamethasone	0.204	1.000	0.518	1.008	1.294	1.037	3.727	1.069
4,5-diol	0.526	2.578	1.414	2.730	4.113	3.179	12.596	3.380
7,8-diol	0.705	1.340	1.839	1.301	4.954	1.204	15.708	1.247
1,6-dione	1.287	1.826	2.793	1.519	6.489	1.310	18.372	1.170
3,6-dione	1.371	1.065	2.992	1.071	7.326	1.129	20.297	1.105
6,12-dione	1.747	1.274	3.941	1.317	9.333	1.274	27.774	1.368
3-monohydroxy	2.025	1.159	6.453	1.637	23.618	2.531	152.191	5.597

(*k*: capacity factor, α : separation factor, *: concentration of methanol)

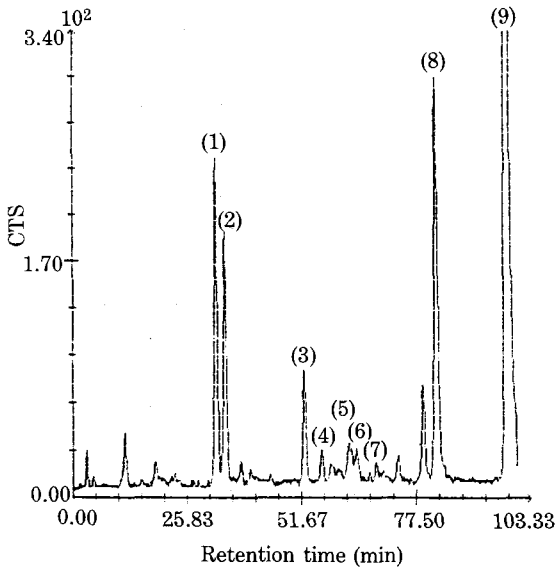


Fig. 1—Chromatogram of B(a)P metabolites generated by liver microsomes and dexamethasone. Liver microsomes were incubated with [³H]-dexamethasone were extracted and separated by HPLC. The CTS of the metabolites and dexamethasone were monitored by a radiation flow detector. (1): 9,10-diol (2): Dexamethasone (3): 4,5-diol (4): 7,8-diol (5): 1,6-dione (6): 3,6-dione (7): 6,12-dione (8): 3-monohydroxy (9): B(a)P.

선의 작성—B(a)P 대사물과 같은 HPLC 분석조건에서 [³H]-Dexamethasone 용액을 0.01~0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ 농도범위에서, [³H]-B(a)P 용액을 0.025~0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ 의 농도범위에서 20 μl 씩 주입하여 각 peak의 CTS 값을 측정하여 농도와의 상관계수를 구하였다.

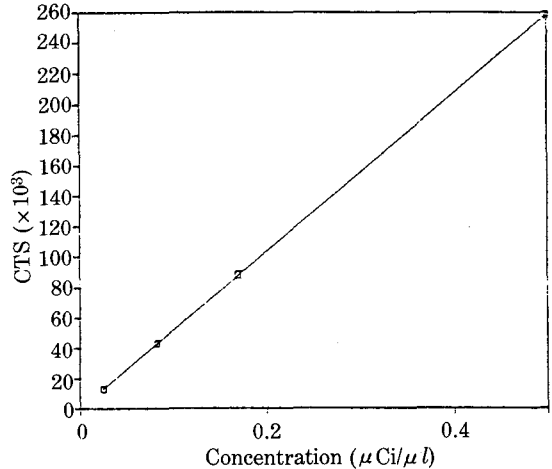


Fig. 2—Calibration curve of [³H]-B(a)P. The best straight line is defined by the eq., $y = 517485x - 7762$ ($r = 0.9986$).

결과 및 고찰

90%, 80%, 70%, 60% methanol에서 각 B(a)P 대사물과 dexamethasone의 capacity factor와 separation factor를 조사하였다(Table I). Elution order는 9,10-diol, dexamethasone, 4,5-diol, 7,8-diol, 1,6-dione, 3,6-dione, 6,12-dione, 3-monohydroxy의 순이었으며 solvent strength가 감소함에 따라 capacity factor와 selectivity가 증가하였으나, 9,10-diol과 dexamethasone은 60% methanol에서의 separation factor가 1.069로 나타나 분리를 위해서는 solvent strength를 더 낮출 필요가 있음을 알 수 있었다.

B(a)P 대사물과 dexamethasone의 혼합물의

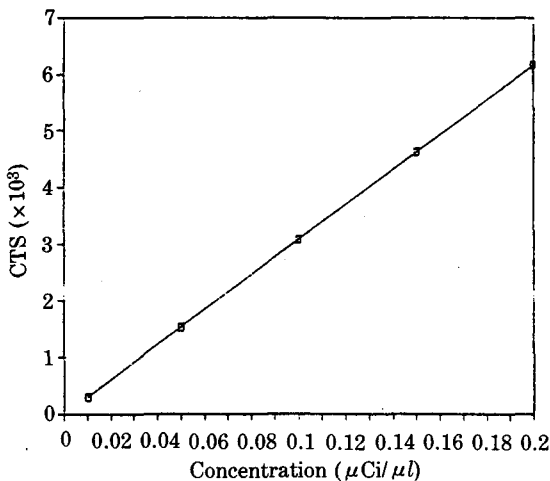


Fig. 3—Calibration curve of $[^3\text{H}]$ -Dexamethasone. The best straight line is defined by the eq., $y = 30834x$ ($r = 0.9993$).

효과적인 분리를 위해 40% methanol (pump A)과 100% methanol (pump B)로 gradient elution을 실시하였다. Total flow rate를 0.8 ml/min로 하고 A pump를 15분간 100% elution하고 그 후 B pump를 55분까지 50%, 70분까지 100%로 하고 105분까지 100%를 유지하는 multiple linear gradient 조건에서 혼합물들을 양호하게 분리할 수 있었다. 이 조건하에서 쥐 간 microsomal protein에 의해 대사된 B(a)P 대사물과 첨가한 dexamethasone의 혼합물을 분리하고 radioactive flow detector로 검출한 전형적인 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

4개의 같은 시료를 분석한 결과 그 측정치의 편

차가 매우 커서 9,10-diol, 4,5-diol, 7,8-diol, 1,6-dione, 3,6-dione, 3-monohydroxy의 경우 각각 69.4 ± 67.5 , 26.1 ± 26.2 , 8.3 ± 9.2 , 18.9 ± 13.9 , 11.1 ± 9.7 , 109.2 ± 108.1 (CTS \pm S.D./mg protein/40 min)로 나타났다. 또한 대사반응이 끝난 후 추출직전에 추출물을 알기 위해 가한 $[^3\text{H}]$ -dexamethasone은 165.5 ± 162.3 (CTS \pm S.D.)로서 그 평균 추출률이 약 26.9%로 매우 불량하였다.

추출물을 보정하기 위해 기준물질로서 대사되지 않은 $[^3\text{H}]$ -B(a)P와 첨가한 $[^3\text{H}]$ -dexamethasone의 농도에 따른 CTS 값을 측정하였다니 각각 0.025~0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ 와 0.01~0.20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ 의 농도범위에서 상관계수가 0.9986과 0.9993으로 양호한 직선성을 나타내었다.

각 시료를 분석한 chromatogram 상의 $[^3\text{H}]$ -B(a)P의 CTS 값을 각 시료에 가한 $[^3\text{H}]$ -B(a)P와 동량을 시료와 같은 분석조건에서 측정하여 얻은 CTS 값과 같게 되도록 chromatogram 상의 B(a)P 대사물들의 CTS 값을 환산하였다. 이 값을 다시 가한 microsomal protein 1 mg 당 CTS 값으로 환산하여 회수율을 보정하였다 (Table II의 방법 II). 또한, 같은 방법으로 첨가한 $[^3\text{H}]$ -dexamethasone을 기준으로 회수율을 보정하였다 (Table II의 방법 III).

$[^3\text{H}]$ -B(a)P를 기준으로 보정한 값들은 $[^3\text{H}]$ -dexamethasone을 기준으로 보정한 값들과 약간의 편차를 보였는데 이는 chromatogram 상의 $[^3\text{H}]$ -B(a)P의 CTS 값은 일부가 대사되고 남은 $[^3\text{H}]$ -B(a)P에 기인한 것이기 때문이라 사료되며,

Table II—Comparison of the values of B(a)P metabolites according to the conversion methods

Method*	9,10-diol		4,5-diol		7,8-diol		1,6-dione		3,6-dione		3-OH		Mean of****
	Values** (CTS \pm S.D.)	R.S.D.*** (%)	Values (CTS \pm S.D.)	R.S.D. (%)	Values (CTS \pm S.D.)	R.S.D. (%)	Values (CTS \pm S.D.)	R.S.D. (%)	Values (CTS \pm S.D.)	R.S.D. (%)	Values (CTS \pm S.D.)	R.S.D. (%)	
Method I	69.4 \pm 67.5	97.3	26.1 \pm 26.2	100.4	8.3 \pm 9.2	110.8	18.9 \pm 13.9	73.5	11.1 \pm 9.7	87.4	109.2 \pm 108.1	99.0	94.70
Method II	262.3 \pm 37.9	14.4	147.9 \pm 36.4	24.6	86.2 \pm 30.5	35.4	133.9 \pm 44.5	33.2	92.1 \pm 29.2	31.7	467.1 \pm 67.8	14.5	25.63
Method III	259.0 \pm 12.6	4.9	97.5 \pm 24.6	25.2	27.7 \pm 3.5	12.6	85.5 \pm 17.9	20.9	44.1 \pm 9.5	21.5	406.2 \pm 86.8	21.4	17.75

*Method I; Without conversion (the raw datas from the chromatograms of B(a)P metabolites generated by liver microsomes. Method II; Conversion of the raw datas with the $[^3\text{H}]$ -B(a)P values from the each chromatogram. Method III; Conversion of the raw data with the value of $[^3\text{H}]$ -dexamethasone add to the each sample.

** Mean of 4 determinations (CTS \pm S.D./mg protein/40 min)

*** Relative standard deviation (%)

**** Mean of relative standard deviations of values of 6 B(a)P metabolites calculated by each method (%)

[³H]-dexamethasone 을 기준물질로 사용한 경우 평균 상대표준편차가 17.75%로서 추출률에 의한 편차를 크게 줄일 수 있었다.

결 론

Radio HPLC를 이용한 B(a)P 대사물의 *in vitro* 실험에서 그 회수율을 보정하기 위한 기준물질로서 [³H]-dexamethasone 의 적용을 검토하였다. 그 결과

1. [³H]-Dexamethasone 은 0.01~0.20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ 농도범위에서 상관계수가 0.9993 으로 매우 양호한 직선성을 나타내었다.
2. B(a)P 대사물과 dexamethasone 은 40% methanol 과 100% methanol 을 이용한 multiple linear gradient elution 으로 양호하게 분리할 수 있었다.
3. [³H]-Dexamethasone 을 기준물질로 사용하였더니 B(a)P 대사물들의 측정치의 평균 상대표준편차가 17.75%로 나타났으며 추출률의 편차를 크게 보정할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 1989년도 문교부 유전공학 연구비의 지원에 의해 이루어졌음을 감사드립니다.

문 헌

- 1) Nebert, D.W. and Gelboin, H.V.: The *in vivo* and *in vitro* induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains and developmental and hormonal states. *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 76 (1969).
- 2) Gelboin, H.V.: Benzo(a)pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidase and related enzymes. *Physiol. Rev.*, **60**, 1107 (1980).
- 3) Selkirk, J.K., Croy, R.G. and Gelboin, H.V.: High pressure liquid chromatographic separation of 10 benzo(a)pyrene phenols and the identification of 1-phenol and 7-phenol as new metabolites. *Cancer Res.*, **36**, 922 (1976).
- 4) Yang, S.K., Selkirk, J.K., Plotkin, E.V. and Gelboin, H.V.: Kinetic analysis of the metabolism of benzo(a)pyrene to phenols dihydrodiols and quinones by high pressure chromatography compared to analysis by aryl hydrocarbon hydroxylase assay, and the effect of enzyme induction. *Cancer Res.*, **35**, 3642 (1975).
- 5) Atrup, H.: Separation of water-soluble metabolites of benzo(a)pyrene formed by cultured human colon. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1727 (1979).
- 6) Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K. and Hemer, A.: Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature*, **252**, 326 (1974).
- 7) Waterfall, J.F. and Sims, P.: Epoxy derivatives of aromatic polycyclic hydrocarbons. The preparation and metabolism of epoxides related to benzo(a)pyrene and 7,8- and 9,10-dihydrobenzo(a)pyrene. *Biochem. J.*, **128**, 265 (1972).
- 8) Takahashi, G., Kinoshita, K., Hashimoto, K. and Yasuhira, K.: Identification of benzo(a)pyrene metabolites by gas-chromatograph-mass spectrometer. *Cancer Res.*, **39**, 1814 (1979).
- 9) Okano, P., Miller, H.N., Robinson, R.C. and Gelboin, H.V.: Comparison of benzo(a)pyrene and (-)-trans-7,8-dihydroxyl-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene metabolism in human blood monocytes and lymphocytes. *Cancer Res.*, **39**, 3184 (1979).
- 10) Gessner, T. and Byczkowski, J.Z.: A simplified method for determination of radioactive metabolites of benzo(a)pyrene using HPLC with radioactive flow detection. *Progress in HPLC.*, **3**, 149 (1988).
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).