

# Hesperetin의 I-131 표지 및 生體 分布 分析을 통한 歸經 연구

김성규<sup>1#</sup>, 함인혜<sup>1</sup>, 부영민<sup>1</sup>, 김호철<sup>1</sup>, 조정혁<sup>2</sup>, 최호영<sup>1\*</sup>

1: 경희대학교 한의과대학, 2: 한국과학기술연구원 의약화학연구센터

## Study on the Attributive Channel Theory of Herbal Medicine by the Pharmacodynamic Research of I-131 Labelled Hesperetin

Sung Kyu-Kim<sup>1#</sup>, Inhye Ham<sup>1</sup>, Youngmin Bu<sup>1</sup>, Hocheol Kim<sup>1</sup>, Jung-Hyuck Cho<sup>2</sup>,  
Hoyoung Choi<sup>1\*</sup>

1 : College of Oriental Medicine, Kyunghee University

2 : Medicinal Chemistry Research Center, Korea Institute of Science and Technology

### ABSTRACT

**Objectives :** This study was to verify the Attributive Channel theory of herbal medicine.

**Methods :** [<sup>131</sup>I]iodohesperetin was synthesized, separated, and refined from hesperetin, the major component of Citrus species, followed by observing the biodistribution in an organism of C57 BL/6 mice with and without Lewis Lung Carcinoma.

**Results :** Iodohesperetin 27.5 mg was obtained through column chromatography after a reaction with 50 mg of Hesperitin and 8 mg of NaI. The radiochemical yield of [<sup>131</sup>I]iodohesperetin synthesis was 25 % when checked with Radio TLC chromatography. [<sup>131</sup>I]iodohesperetin was most largely distributed in the stomach, lung and liver of C57BL/6 mouse. The highest %ID/g in stomach was 40 min, in lung and liver was 20 min after injection. The % ID/g of tumor tissue was comparable with that of blood.

**Conclusions :** The fact that [<sup>131</sup>I]iodocurcumin was most largely distributed in the stomach, lung and liver was related with the Attributive Channel theory. And there was no significant finding related to tumor cells.

---

**Key words :** Attributive Channel, I-131, Hesperetin, biodistribution

---

\*교신저자 : 최호영, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 02-961-9372 · Fax : 02-965-9372 · E-mail : hychoi@khu.ac.kr  
#제1저자 : 김성규, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 02-961-9372 · Fax : 02-965-9372 · E-mail : omdkim@hanmail.net  
· 접수 : 2008년 2월 26일 · 수정 : 2008년 3월 12일 · 채택 : 2008년 3월 17일

## 서론

歸經은 한약재가 臟腑와 經絡에 선택적으로 작용하여 질병을 치료하는 것으로<sup>1,2)</sup>, 약물의 체내 작용 기전에 관한 정보를 제공하고 있으며, 임상에서 약물 선택의 중요한 근거가 된다<sup>3,4)</sup>. 歸經하는 臟腑와 經絡이 다르면 약물의 치료 작용 역시 다를 수 있다<sup>5)</sup>.

최근 한약의 효능에 대한 연구가 다양한 분야에서 활발하게 진행되고 있으나, 기초 藥性 이론인 性味, 歸經, 升降浮沈 등에 대한 연구는 많이 보고되고 있지 않다<sup>6)</sup>. 중국에서는 50년대 이후로 歸經에 대한 문헌 정리, 임상관찰 및 실험연구 등을 진행하여 보고하고 있다. 그 중 Li 등<sup>7)</sup>은 황련의 주성분 isoquinoline계 alkaloid <sup>131</sup>I-berberine, 郭 등<sup>8-10)</sup>은 梔子の <sup>3</sup>H-gardenoside, 淫羊藿의 <sup>3</sup>H-icarin, 川芎의 <sup>3</sup>H-chuanxiangzine, 柴胡의 <sup>3</sup>H-saikosaponine, 白首烏의 <sup>3</sup>H-chryshphenol, 芍藥의 <sup>3</sup>H-paeoniflorin 등 방사성 동위원소가 표지된 한약재 유효성분을 생쥐의 꼬리정맥에 주사한 후, 생체 내 분포, 대사 및 배설 등을 분자영상기법을 통하여 관찰하고, 약동력학적으로 분석하여 각각의 한약재의 歸經과의 상관성을 연구 보고한 바 있다.

陳皮는 운향과(Rutaceae)에 속한 귤(*Citrus unshiu* Markovich) 및 동속 근연식물의 성숙한 과실의 과피이며, 脾肺에 歸經하며, 理氣 調中, 燥濕 化痰, 健脾 化中의 효능으로, 胸腹脹滿, 不思飲食, 嘔吐, 咳嗽痰多 등의 치료에 상용되는 한약재이다<sup>11,12)</sup>. 陳皮의 주활성 성분인 hesperidin은 flavonoid계 화합물로서 세분하면 flavanone계 화합물이다. Hesperidin은 임신 중 섭취도 안전할 만큼 독성이나 부작용이 없으며<sup>13)</sup>, 고지혈증 억제작용, 항산화 작용, 항암 작용 등이 있는 것으로 보고된 바 있다<sup>14-16)</sup>.

Hesperetin은 hesperidin이 체내에서 당 분해 효소에 의해 가수 분해되어 rhamnose와 glucose로 구성된 disaccharide인  $\beta$ -7-rutinoside가 분리된 aglycone 형태의 산물이며, 위·장으로 흡수된 후 생체 내에서 생리활성 작용을 통하여 간으로 운반되고, 다시 혈액으로 이동되어 신장에서 배설 되는 것으로 추정되고 있다<sup>17)</sup>.

陳皮의 주성분인 hesperetin의 생체내 분포를 관찰하고, 특히 hesperudin이 항암효과가 있다는 것에 착안하여, 병태학적 발암 모델에서의 생체내 분포를 분석하여 한의학적 귀경이론을 재평가하고자 한다.

## 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 실험 동물

체중 30g 내외인 C57BL/6계 수컷 mouse(샘타코(주), 한국)를 사용하였으며, 실험동물용 고형사료(샘타코 실험동물용 배합사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주 이상 실험실 환경(온도 22±2℃, 밤/낮 12시간)에 적응시킨 후 사용하였다. 본 실험은 '경희대학교 한의과대학 동물실험 윤리위원회'의 지침을 따랐다.

#### 2) 시약

Hesperetin은 미국 Sigma사의 제품으로 순도는 95 %였다. 박층 크로마토그래피(TLC, Thin Layer Chromatography) 전개판은 층 두께 0.25 nm의 silica gel 60 F254(Merck, Germany)를 사용하였으며, 중력 column chromatography용 silica gel은 입자크기 0.06~0.20 nm, 70~230 mesh의 silica gel 60 (Merck, Germany)를 사용하였다.

#### 3) 기기

수소 핵자기공명 스펙트럼은 500 MHz JEOL FT-NMR spectrometer를 이용하여 tetramethylsilane (TMS)을 기준으로(0 ppm) 하여 얻었으며, 방사성 동위원소 Iodine-131은 한국원자력연구소에 설치된 하나로 원자로에서 얻었다. Radio chromatogram은 Bioscan사의 System 200 imaging scanner와 Auto changer 3000으로 측정하였으며 HPLC는 Waters 2490을 이용하였다.

#### 4) 통계

각 群 間의 실험결과 분석은 Student's t-test를 하여 有意性(P<0.05수준)을 검증하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) Iodoheperetin의 합성

Hesperetin 50 mg(0.165 mmol)를 10 ml의 methanol에 녹이고 이 용액에 각각 3 ml의 0.5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>와 0.4 M peracetic acid를 순차적으로 가해주었다. 8 mg의 NaI을 1 ml의 0.01 M NaOH 용액에 녹인 후 위의 용액에 가해준 뒤 상온에서 20분간 교반하였고 3 ml

의 0.048 M NaHSO<sub>3</sub>와 6ml의 0.06 M NaHCO<sub>3</sub>을 순차적으로 가한 뒤 다시 20분간 교반하여 감압 증류한 후 methanol을 제거하고 column chromatography를 하였다.

### 2) [<sup>131</sup>I]iodohesperetin 의 합성

Methanol 2 ml에 3 mg의 hesperetin을 녹인 후, 500μl를 취하여 reaction vial에 넣은 후, [<sup>131</sup>I]NaI/0.1M NaOH 용액(2 mCi/100 μl)을 첨가하였다. 100 μl의 peracetic acid 와 50μl의 0.5M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>의 용액을 순차적으로 가한 후 상온에서 20분간 반응을 시킨 후 방사성 박층 chromatography를 통하여 표지화합물의 합성을 확인하였다.

### 3) [<sup>131</sup>I]iodohesperetin 의 분리 및 정제

반응물에서 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin을 분리하기 위하여 HPLC (X-terra C<sub>18</sub> column, CH<sub>3</sub>CN : 0.5% acetic acid = 20 : 80)를 이용하였다. 분리한 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin의 용액을 질소기체로 purging하여 용매를 건조시킨 후, radio TLC chromatography를 통하여 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin의 방사화학적 정제수율을 확인하였다. 이동상은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 4 : 1 이고 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin의 확인은 iodohesperetin과의 머무름 시간 비교 방법을 사용하였다.

### 4) [<sup>131</sup>I]iodohesperetin의 약동력학적 연구

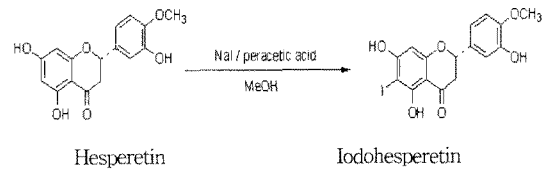
암세포 모델 mouse의 장기와 tumor 조직에서 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin의 분포 비율을 알아보기 위해 Lewis Lung Carcinoma (LLC) 암세포를 C57BL/6 mouse 의 다리에 피하 주사하여 암세포를 이식 후 약 20일 동안 사육하여 암 직경이 1 cm 정도 되었을 때 실험에 사용하였다.

HPLC를 이용하여 분리한 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin을 질소가스 환경에서 가열을 하여 농축 하였다. 농축이 된 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin에 saline을 섞어주어 약물(100 μCi/1 ml)을 각 시간 실험군당 5마리의 mouse 에 꼬리정맥 주사한 후 각각 10, 20, 40, 60 분 후 희생하고, 혈액 및 근육, 지방, 심장, 폐, 간, 비장, 위, 소장, 신장, 뇌, 뼈 등의 장기와 종양을 적출하여 각 장기의 무게와 장기에 포함된 [<sup>131</sup>I]iodohesperetin의 방사능을 측정 하였다. 결과는 조직 그램 당 주사량의 백분율(Percentage of Injected Dose per Gram : %ID/g)로 표시하였다. (mouse 총 중량 30 g 중 아래 각종 organ 의 피부, 털, 비근육 조직 : 총 5.76 g)

## 실험 결과

### 1. Iodoesperetin의 합성 및 확인

Hesperetin 50 mg(0.165 mmol)을 NaI와 반응시킨 후 column chromatography를 통하여 27.5 mg (0.064 mmol)의 생성물(수득률 38.8 %)을 얻었다(Rf = 0.55, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 6 : 1)(Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of Iodoesperetin

방사성 요오드 표지를 하기 위한 예비 실험으로서 sodium iodide 를 요오드화제로 반응시켜 C6-C3 고리의 벤젠핵에서 두 개의 OH기 사이의 수소를 요오드로 치환하였다.

### Hesperetin

R<sub>f</sub> = 0.7 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 6 : 1)

<sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 12.14(s, 1H), 9.10(s, 1H), 6.92(m, 2H), 6.86(m, 1H), 5.86(m, 2H), 5.43(d, 1H), 3.77(s, 3H), 3.18(m, 1H), 2.68(m, 1H)

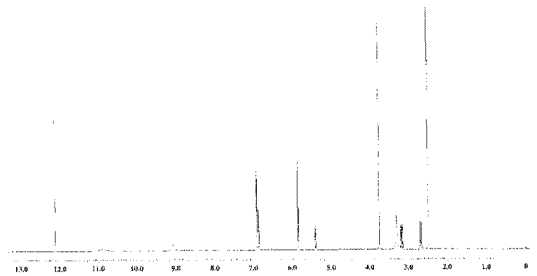


Fig. 1. <sup>1</sup>H NMR spectrum of hesperetin

Hesperetin의 <sup>1</sup>H (proton) NMR(양성자 핵자기 공명) 스펙트럼에서는 12.14 ppm에서 OH 양성자가 공명을 일으키고, 이는 3개의 OH 양성자 중 C6-C3 고리의 양성자 중 수소 결합을 한 것으로 추정되고, 9.10 ppm에 나온 것은 C-6의 OH 양성자로 사료된

다. 6.92 ppm, 6.86 ppm, 5.86 ppm의 다중선은 벤젠 고리의 5개 양성자의 공명으로 추정되고, 5.43 ppm의 이중선은 나머지 하나의 OH 양성자로 사료된다. 3.77 ppm의 단일선은 CH<sub>3</sub>(메틸)기의 공명으로 해석되고, 3.18 ppm과 2.68 ppm의 다중선은 CH<sub>2</sub>(메틸렌)기로 사료된다(Fig. 1).

### Iodohesperetin

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 13.19 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 6.94 (m, 2H), 6.89 (m, 1H), 6.12 (m, 1H), 5.58 (d, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.22 (m, 1H), 2.90 (m, 1H)

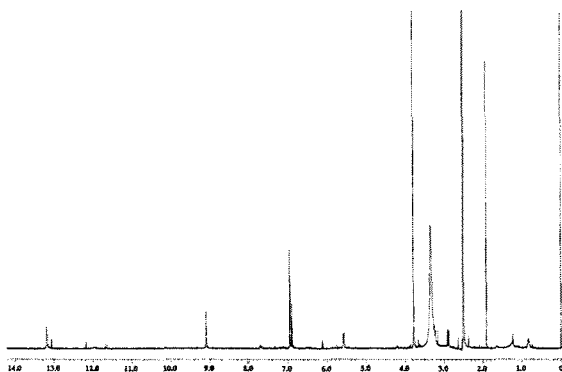


Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of iodohesperetin

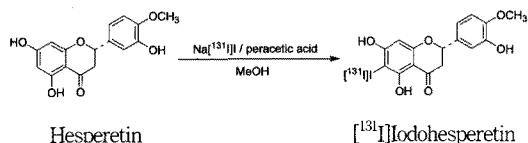
Iodohesperetin의 <sup>1</sup>H(proton) NMR (양성자 핵자기 공명) 스펙트럼에서는 13.19 ppm에서 OH 양성자가 공명을 일으키고, 이는 3개의 OH 양성자중 C6-C3 고리의 양성자중 수소 결합을 한 것으로 추정되고, 9.10 ppm에 나온 것은 C-6의 OH 양성자로 사료된다. 6.94 ppm, 6.89 ppm, 6.12 ppm의 다중선은 벤젠 고리의 4개 양성자의 공명으로 추정되고, 5.58 ppm의 이중선은 나머지 하나의 OH 양성자로 사료된다. 3.77 ppm의 단일선은 CH<sub>3</sub>(메틸)기의 공명으로 해석되고, 3.22 ppm과 2.90 ppm의 다중선은 CH<sub>2</sub>(메틸렌)기로 사료된다. 요오드 치환으로 양성자가 하나 줄어서 나타났다(Fig. 2).

## 2. [<sup>131</sup>I]Iodohesperetin의 합성

Iodohesperetin 합성에서 얻어진 요오드화 조건으로 방사성 요오드 표지 sodium iodide를 요오드화제로 반응시켜 C6-C3 고리의 벤젠핵에서 두 개의 OH기 사이의 수소를 요오드로 치환 하는 방법으로 목

적 화합물을 합성하였다(Scheme 2).

방사성 박층 chromatography를 통하여 표지화합물의 합성을 확인하였다. 방사 화학적 표지수율은 radio TLC chromatogram의 peak의 면적비로 산출하면 25%(R<sub>f</sub> = 0.34, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 4 : 1)이었다(Fig. 4).



Scheme 2. Preparation of [<sup>131</sup>I]iodoherperetin.

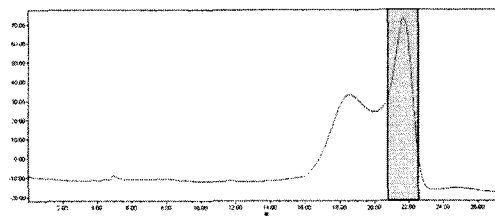


Fig. 3. HPLC chromatogram of crude [<sup>131</sup>I]iodoherperetin

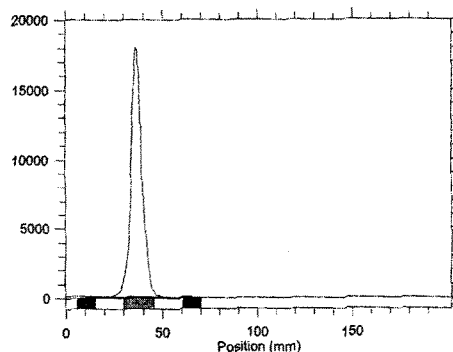


Fig. 4. Radio TLC chromatogram of purified [<sup>131</sup>I]iodoherperetin

## 3. [<sup>131</sup>I]Iodoherperetin의 분리 및 정제

HPLC를 이용하여 [<sup>131</sup>I]iodoherperetin을 분리한 결과 머무름시간 22분 근처에서 [<sup>131</sup>I]iodoherperetin을 분리하였다. Radio TLC chromatogram로 확인한 [<sup>131</sup>I]iodoherperetin의 방사화학적 정제수율은 약 98%이었다(R<sub>f</sub> = 0.34, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 4 : 1)(Fig. 3).

상기 Scheme 2에서 합성된 목적화합물 함유 반

응 혼합액에서 목적 화합물을 분리, 정제하기 위하여 HPLC 기기를 사용하였고, 머무름 시간 22분 근방에서 목적화합물을 분리, 수득하였다(Fig. 3).

또한 이렇게 HPLC에서 분리, 수득된 목적 화합물  $^{131}\text{I}$ iodohesperetin의 용액을 질소기체로 purging 하여 용매를 건조시킨 후, radio TLC chromatogram을 통하여 반응시 주입된 방사능과 반응 후 얻어진 방사능의 세기를 비교하여  $^{131}\text{I}$ iodohesperetin의 방사화학적 정제수율 98 %를 확인하였다(Fig. 4).

#### 4. $^{131}\text{I}$ iodohesperetin의 약동력학 연구

주사 10분 후에 측정된 %ID/g의 data를 살펴보면, 혈액(blood)의 측정치  $1.74 \pm 0.12$ 를 기준으로 이보다 높은 흡수를 보이는 장기는 간(liver), 폐(lung), 위(stomach), 신장(kidney) 순으로 나타났다. 암(tumor) 세포는 혈액보다 약간 낮은 측정치를 보였다. 이 결과로 hesperetin은 혈액에 흡수 된 후 즉시 간으로 이동되고 폐로도 전달되며 위에도 상당량 흡수 되는 것을 알 수 있다. 총 주사 방사선량은  $812334.56 \text{ count/dpm}$  ( $\text{dpm} = \text{decay/min}$ )이었다.

주사 20분 후에 측정된 %ID/g의 data를 살펴보면, 혈액(blood)의 측정치  $1.93 \pm 0.17$ 를 기준으로 이보다 높은 흡수를 보이는 장기는 위(stomach), 간(liver), 폐(lung), 신장(kidney) 순으로 나타났다. 암(tumor) 세포는 10분에서와 같이 혈액 보다 약간 낮은 측정치를 보였다. 이 결과로 hesperetin은 10분에서 20분으로 시간이 흐를수록 위에 더 많이 흡수되고 그 뒤를 간, 폐, 신장 순으로 뒤를 알 수 있다. 그러나 위, 간, 폐는 표준 편차의 범위 내에서 서로 비슷한 측정치를 나타내었다.

주사 40분 후에 측정된 %ID/g의 data를 살펴보면, 혈액(blood)의 측정치  $1.07 \pm 0.24$ 를 기준으로 이보다 높은 흡수를 보이는 장기는 위(stomach), 간(liver), 폐(lung), 신장(kidney), 심장(heart), 뇌(brain) 순으로 나타났다. 암(tumor) 세포는 40분에서는 혈액과 유사한 측정치로 나타났다. 이 결과로 hesperetin은 20분에서 40분으로 시간이 흐를수록 혈중 농도는 줄어들고 있어 체외로 배설이 시작되었음을 알 수 있고, 위에는 20분에서 보다 더 많이 흡수되고 그 뒤를 간, 폐, 신장 순으로 뒤를 알 수 있다. 그러나 간, 폐는 20분에서 보다 줄어든 측정치를 나타내었다. 이는 위보다 간, 폐에서 이탈(wash-out) 되고 있음을 나타낸다. 또한 혈액보다 심장과 뇌의 흡수가 높아지기 시작하였다.

Table 1. Biodistribution of  $^{131}\text{I}$ iodohesperetin in C57BL/6 Mice with Tumor(%ID)

	10 min	20 min	40 min	60 min
Blood	1.74 ±0.12	1.93 ±0.17	1.07 ±0.24	0.72 ±0.08
Muscle	0.25 ±0.08	0.32 ±0.08	0.16 ±0.18	0.15 ±0.11
Fat	0.15 ±0.05	0.21 ±0.04	0.18 ±0.06	0.11 ±0.04
Heart	1.40 ±0.05	1.62 ±0.11	1.58 ±0.08	1.31 ±0.16
Lung	5.04 ±0.11	5.38 ±0.14	3.46 ±0.09	1.82 ±0.21
Liver	5.22 ±0.12	5.47 ±0.27	4.03 ±0.14	3.05 ±0.24
Spleen	0.59 ±0.18	0.88 ±0.11	0.21 ±0.22	0.24 ±0.16
Stomach	4.82 ±0.25	5.55 ±0.09	6.09 ±0.14	4.56 ±0.14
Intestine	0.54 ±0.07	0.74 ±0.18	0.72 ±0.21	0.69 ±0.18
Kidney	2.89 ±0.12	3.22 ±0.27	3.13 ±0.11	1.87 ±0.13
Brain	1.32 ±0.03	1.34 ±0.24	1.12 ±0.12	0.84 ±0.07
Bone	0.53 ±0.16	0.68 ±0.09	0.57 ±0.35	0.32 ±0.14
Tumor	1.52 ±0.22	1.62 ±0.13	1.02 ±0.12	0.84 ±0.15

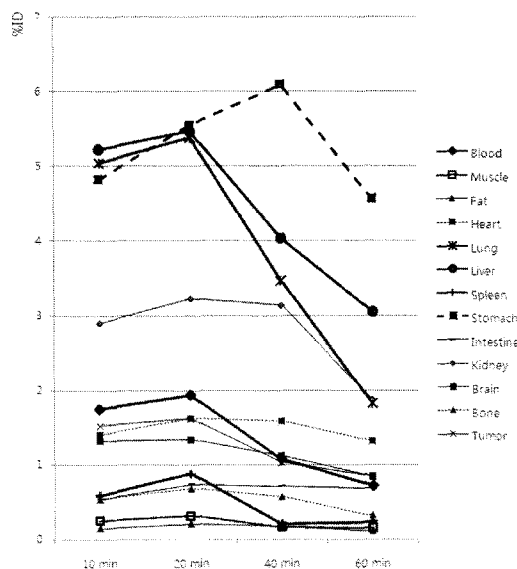


Fig. 5. Biodistribution of  $^{131}\text{I}$ iodohesperetin in C57BL/6 mice with tumor

주사 60분 후에 측정된 %ID/g의 data를 살펴보면, 혈액(blood)의 측정치인  $0.72 \pm 0.08$  보다 높은 흡수를 보이는 장기는 위(stomach), 간(liver), 신장(kidney), 폐(lung), 심장(heart), 뇌(brain) 순으로 나타났다.

즉  $^{131}\text{I}$ iodohesperetin은 C57BL/6 mouse의 장기 조직 중에서 다른 장기에 비하여 폐, 간, 위에 가장 많이 분포하고 있었다. 각 장기에서의 위를 제외한 대부분의 조직 및 기관에서 20분에 가장 높게 분포

하고 있었으며, 위는 40분에 가장 높았다. 이는 hesperetin이 체내 투여 후 위에서는 주사 후 40분까지 계속 흡수되고, 나머지 장기에서는 투여 후 20분이 지나면 이탈이 일어남을 보여주고 있었다. 암세포에는 주사 후 혈액과 유사한 측정치를 나타내고 있었다(Table 1, Fig. 5).

## 고찰

한의학에서의 歸經은 약물의 흡수 및 체내 분포에 관한 것으로, 뇌질환, 암 등의 진단 및 치료제 개발에 중요한 자료를 제공할 수 있다.

최근에는 신약 개발 목적 외에 약물의 체내 분포(biodistribution) 연구가 활발히 진행되고 있고, 21세기 들어 새롭게 부각되는 분자 영상(molecular imaging) 분야에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 인체의 특정 부위를 예로 들면 뇌, 전립선 등은 BBB(Blood-Brain Barrier) 등이 있어 약물이 농도차에 의해 흘러 들어가지 못하고, 능동적인 흡수, 혹은 흡수 후 대사로 구조 변형에 의한 약물 분포만 가능하다.

본 연구의 대상인 hesperetin은 운향과(Rutaceae)에 속하는 귤(*Citrus unshiu* Markovich) 껍질 즉 陳皮에 많이 함유되어 있는 성분이다. 陳皮의 주요한 생리 활성성분인 hesperidin(hesperetin-7-O-β-D-rutinoside,  $C_{28}H_{34}O_{15}$ , 분자량 610.55)이 체내에서 가수 분해된 산물이 hesperetin (methoxyflavone,  $C_{16}H_{14}O_6$ , 분자량 302.27)이다. 순수한 hesperidin은 용점 258°C-261°C의 연노랑색의 침상결정체이며 약알칼리에 잘 녹고 methanol에는 조금 녹으나 유기 용매에는 불용성이다. 물에는 1 : 50 정도 녹는다<sup>18)</sup>.

Hesperidin과 naringin은 체내로 들어가 장관내의 당분해 효소에 의해 가수분해를 받아 그들의 aglycone 형태인 hesperetin 및 naringenin으로 각각 전환되어 장관에 흡수된 후 생체 내에서 생리활성을 나타내며, 혈액 및 간장 등의 조직 내에서 이들 aglycone형태로 검출되고 있다<sup>13)</sup>.

즉 당이 결합된 형태의 flavonoid가 소화 과정에서 가수분해 작용을 받아 당이 유리된 후 그들의 aglycone 형태로 흡수되어 혈액, 요, 혈구 등에 이동되어 검출되는 것으로 나타났다. 그러므로 주성분인 hesperetin의 생체 내 분포를 관찰하고, 특히 hesperetin이 항암효과를 가진 것<sup>16,17)</sup>에 착안하여, 병태학적 발암 모델에서의 생체 내 분포를 분석하여 한의학의 귀경이론을 현대

과학적 관점에서 해석하고자 하였다.

핵의학영상법에 사용되는 방사능 동위원소는 영상기에 따라 SPECT 핵종과 PET용 핵종으로 구분된다. SPECT용 핵종은 단일광자(γ선)를 방출하는 핵종이며(Tc-99m, I-123, Tl-201, Xe-133, I-131, Ga-67, In-111, Cr-51), PET용 핵종은 양전자 방출 동위원소(C-11, N-13, O-15, F-18, Ga-68, Rb-82, I-124)로, SPECT 용으로는 Tc-99m이 가장 널리 사용되는 방사성 동위원소이다. 이는 반감기(6시간)와 적절한 세기의 방사능을 보유하고 있기 때문이다. 그러나 표지(labeling)를 위해서는 O, S, N 등 전자공여 원소가 필수적으로 2개 이상 분자 내에 존재하여야 하는 단점이 있다. 그럼에도 불구하고 generator가 상용화되어 kit에 saline만 부어주면 바로 측정에서 얻을 수 있어 가장 널리 사용되는 핵종이다<sup>19-24)</sup>.

요오드의 경우 I-123과 I-131은 단일광자를 방출하는 핵종으로 SPECT용으로 이용되고 있으며, I-124의 경우 양전자를 방출하여 PET용으로 사용된다. 같은 요오드 물질로서 두 핵의학영상기에 사용할 수 있다는 점에서 많은 관심이 고조되고 있다<sup>25,26)</sup>.

유기화합물의 동위원소 표지반응은 기존 유기화학반응과 같이 친핵성 치환반응과 친전자성 치환반응으로 분류될 수 있다. 단 표지반응에 있어서 방사능에 노출 되지 않도록 차폐를 하여야 하며, 극미량의 시료를 취급하는 반응이므로 시료와 용매의 순도, 수분 노출을 고려하여야 한다<sup>27)</sup>.

Hesperetin 등 유효 생리활성 물질의 방사성 iodine 표지 방법은 동위원소 교환방법으로서 이는 요오드를 방사성요오드로 교환하는 방법으로 방사성 추적자의 상용생산에 사용된다. 방사성요오드가 교환되는 정도는 전구물질과 방사성요오드의 몰비율에 직접 비례하기 때문에 전구물질 양이 증가할수록 방사화학적 수율이 증가한다. 따라서 이 방법은 높은 비방사능이 필요하지 않은 방사성추적자를 생산할 때 사용한다<sup>28)</sup>.

본 연구에서는 iodine-131을 사용하여 hesperetin을 표지(labeling)하는 것을 선택하였다. 이는 hesperetin이 테크네슘(Tc-99m)으로 표지(labeling)하기 위한 O, S, N 등의 전자 공여 원자를 두 개 이상 함유하지 못해 표지가 불가능하기 때문이다. 이와 반면에 Iodine-131은 친전자성 치환 반응으로 hesperetin의 벤젠 고리 중 OH(hydroxyl) 작용기 사이에 있는 수소를 치환하는 방법으로 쉽게 iodine을 도입할 수 있기 때문에 선택 되었다. F-18, C-11 등 PET용 동위 원소의 치환은 방법이 매우 복잡하고,

별도의 발생기를 설계 제작하여야 하며, 동물용 PET 등의 기기를 사용해야하는 어려움이 있어 PET의 장점인 우수한 data 획득에도 불구하고 본 연구에서의 범위를 넘어서는 것으로 사료 된다. 향후 진행되는 연구에서 수행될 경우 매우 우수한 해상도 결과가 기대된다.

본 연구에서는 50 mg(0.165 mmol)의 hesperetin과 8 mg의 NaI를 반응시키고, column chromatography를 통하여 27.5 mg(0.064 mmol)의 iodoesperetin(수득률 38.8%)을 얻을 수 있었다. 또한 3 mg의 hesperetin과 [<sup>131</sup>I]NaI/0.1M NaOH 용액 (2 mCi/100 µl)을 반응시켜 방사 화학적 표지수율 25%의 [<sup>131</sup>I]iodoesperetin을 얻을 수 있었다(Fig. 3).

[<sup>131</sup>I]iodoesperetin의 체내 약동력학적 연구는 C57BL/6 mouse를 이용하여 표지된 [<sup>131</sup>I]iodoesperetin을 꼬리정맥에 주사한 후 10, 20, 40, 60분 후 희생하고 혈액 및 근육, 지방, 심장, 폐, 간, 비장, 췌장, 위, 소장, 신장, 뇌, 뼈, 종양 등의 장기를 적출하여 무게와 방사능을 측정하였다.

총 주사된 방사선량에 대한 각 장기(organ)의  $\gamma$  counter로 측정된 g당 방사능의 백분율인 %ID/g (Percentage of Injected Dose per gram)를 계산하였다. 예를 들어 총 주사 방사선량이 812334.56 count/dpm(decay/min)이고 blood의 g당  $\gamma$  counter로 측정된 방사능이 14134.62 count/g이면 %ID/g는  $14134.62/812334.56 \times 100 = 1.74\%$ 로 계산하여 분석하였다.

Hesperetin의 방사성 요오드 동위 원소 표지 화합물인 [<sup>131</sup>I]iodoesperetin은 내부 장기 중 주로 물질 대사에 관련된, 예를 들면 위장, 간장, 폐, 신장에 주로 흡수, 분포되며 지속 시간이 20분-40분으로 비교적 긴 것으로 나타났다. 각 장기에서의 흡수 최고치를 나타내는 시간은 위를 제외하고는 모두 20분 이었고, 위는 40분에 정점을 나타내었다. 이는 hesperetin이 체내에 들어 온 후 대사 과정을 충분히 거치는 것을 뒷받침 하고 있다. 陳皮의 歸經은 脾, 肺이고 실험에서 나타난 [<sup>131</sup>I]hesperetin이 최고 수준의 분포를 보이는 조직은 胃, 肺, 肝으로 나타나 전통적 歸經과 다소 상응하고 있다.

내부 장기 중에서 물질의 소화, 흡수에 관련되는 비장과 소장에서의 흡수는 낮게 나타났다. 매우 낮은 흡수도에서의 지속 시간은 의미가 없는 것으로 사료되며, 이 결과는 hesperetin이 소화, 흡수되는 시간이 짧고 바로 대사 관련 장기로 이동하는 것으로 생각한다. 지방세포(fat), 근육, 골격 등의 소화, 흡수,

대사 등에 관련 되지 않은 부위에 흡수 및 분포가 낮게 나타나고 있는데, 이는 hesperetin이 이들 부위에서의 이용률이 매우 낮은 것을 의미하는 것이라고 생각한다.

또한 한약재인 薑黃의 주성분인 curcumin을 방사성 I-131로 표지하여 마우스에 투여한 후 歸經을 조사 연구한 보고<sup>23)</sup>와 비교하여 볼 때, curcumin의 경우는 위(stomach) 외의 다른 장기 및 부위에서의 흡수, 분포가 거의 미미했던 결과와 매우 다르게 hesperetin은 위장 외에도 간, 폐 등에 대하여 높은 흡수, 분포도를 보여 주고 있다. 특히 curcumin에서 암세포에의 흡수가 매우 약한데 비해 본 연구에서는 hesperetin의 높은 암세포로의 흡수는 항암제로 개발될 가능성을 열어 주는 결과로서 주목된다.

또한 Lewis Lung Carcinoma(LLC) 암세포에의 흡수(up-take) 실험에서 혈액과 유사한 측정치의 흡수를 나타내고 있었다.

최근 hesperetin이 인체 소화기암세포(AGS, HT-29)의 증식억제에 유효한 효과가 있다는 보고를 감안하면 간이나 위 조직에 관련된 hepatoma 혹은 stomach cancer cell line에 대한 대사 연구도 필요할 것으로 생각한다. 또한 투여 경로를 다양하게 하여 경구 투여에 의한 체내대사 과정을 거친 후 나타나는 약동력학적 연구가 필요하며, 표지용 방사성 동위 원소의 경우 핵의학 영상에서 가장 많이 사용되는 Tc-99m을 표지용 동위 원소로 활용한 연구 혹은 C-11 등 PET용 표지 물질의 합성을 통한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

歸經이론을 현대적 관점에서 해석하고자 진피 속 한약재의 주성분인 hesperetin에서 [<sup>131</sup>I]iodoesperetin을 합성, 분리, 정제한 후 생체내의 분포를 관찰하였다. 특히 hesperetin이 항암효과를 가진 것에 착안하여, 병태학적 발암 모델에서의 생체 내 분포를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Hesperetin 50 mg(0.165 mmol)을 NaI와 반응시킨 후 column chromatography를 통하여 27.5 mg(0.064 mmol)의 생성물(수득률 38.8%)을 얻었다.
2. 방사성 박층 chromatography를 통하여 표지화합물의 합성을 확인할 수 있었다. 방사 화학적 표지수율은 radio TLC chromatogram의 peak의 면적비

로 산출하면 25 %이었다.

3. HPLC를 이용하여 [<sup>131</sup>I] iodohesperetin을 분리한 결과 머무름시간 22분 근처에서 [<sup>131</sup>I] iodohesperetin을 분리하였다. Radio TLC chromatogram로 확인한 [<sup>131</sup>I] iodohesperetin의 방사화학적 정제수율은 약 98 %이었다.

4. [<sup>131</sup>I] Iodohesperetin은 C57BL/6 mouse에서 위, 폐, 간에 가장 높은 체내 분포를 나타내었다. 특히 위는 40분, 폐와 간은 20분에 가장 높은 분포를 나타내고, 서서히 감소하는 것으로 나타났다.

5. [<sup>131</sup>I] iodohesperetin 이식한 Lewis Lung Carcinoma (LLC) 암세포 조직에는 혈액과 유사한 분포를 나타내었다.

연구결과 陳皮의 성분인 hesperetin은 원래 陳皮가 歸經하는 肺, 脾와 관련있는 장기에 높게 분포하고 있었다. 그러나 향후 陳皮의 다른 성분 및 다양한 실험 모델에 대한 연구를 통하여 종합적인 검토가 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 高曉山. 中藥藥性論. 北京: 人民衛生出版社. 1992: 362-75.
2. 汪國華, 徐儀方, 張文惠. 從中藥有效成分的體內分布探討中藥歸經理論的含意. 江西中醫學院學報. 1997; 9(4): 32-3.
3. 宋小莉. 中藥歸經理論現代實驗研究綜述. 山東中醫藥大學學報. 2001: 76-8.
4. 梁愛華, 薛寶云. 歸經實驗研究現況及展望. 中國中藥雜誌. 1996; 25(1): 58-9.
5. 張瑜. 中藥的歸經與藥物作用的選擇性. 中國中醫基礎醫學雜誌. 2004; 10(8): 67-70.
6. 越宗江, 胡會欣, 張新雲. 中藥歸經理論現代化研究. 北京中醫藥大學學報. 2002; 25(1): 5-7.
7. Zejun Li, Yu Wei, Taiwei Chu. Radioiodination, biodistribution and pharmacokinetics of berberine in mice. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2005; 265(3): 355-9.
8. 郭順根, 賁長恩, 越崩云, 楊美娟. 3H-Gardenoside 整体放射自顯影及圖象分析與梔子歸經的關係. 北京中醫藥大學學報. 1996; 19(4): 28-30.
9. 郭順根, 賁長恩, 越崩云, 楊美娟. 3H-Icariin 定量分布與淫羊藿歸經關係的研究. 北京中醫藥大學學報. 1997; 20(1): 40-2.
10. 賁長恩, 郭順根. 中藥歸經理論研究述評. 北京中醫藥大學學報. 1999; 22(2): 2-7.
11. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울: 永林社. 1991: 392.
12. 國家中醫藥管理局 <中華本草> 編委會. 中華本草. 上海: 上海科學技術出版社. 1999; 4: 885-99.
13. Pizzomo Jr, Murray MT. In textbook of natural medicine: Churchill Livingstone. Edinburgh. 1999: 79.
14. Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Lo Curto RB. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid: Part 2. Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in the rat. Farmaco. 1995; 50: 595-9.
15. 김호정, 배계현, 이혜진, 은종방, 김미경. 감귤 과피로부터 분리한 hesperidin이 흰쥐의 지방과 cadmium 대사 및 항산화능에 미치는 영향. 한국영양학회지. 1999; 32(2): 137-49.
16. 김호정, 우희중. 기능성 식품과 사료 소재로서의 Flavonoids의 항암 효과. Kor J Lab Ani Sci. 1998; 14(1): 87-91.
17. Garg A, Garg S, Zaneveld JD, Singla AK. Chemistry and Pharmacology of the Citrus Bioflavonoid Hesperidin. Phytother Res. 2001; 15: 655-69.
18. 차재영, 김현정, 김성규, 이용재, 조영수. 감귤류 플라보노이드가 지질과산화물 함량에 미치는 영향. KorJ Postharvest Sci Tech. 2000; 7(2): 211-7.
19. Meikle SR, Dahlbom M. Positron Emission Tomography, Nuclear Medicine in clinical diagnosis and treatment. Church Livingston. 1994: 2.
20. Brix G, Henze M, Knopp MV, Lucht R, Doll J, Junkermann H, Hawighorst H and Haberkorn U. Comparison of pharmacokinetic MRI and [<sup>18</sup>F] fluorodeoxyglucose PET in the diagnosis of breast cancer: initial experience. Eur Radiol. 2001; 11: 2058-70.
21. Browne E and Firestone RB. Table of Radioactive Isotopes. New York: John Wiley. 1986.
22. Lambrecht RM Positron Emitting Radionuclides - Present and Future Status in Radiopharmaceuticals II. New York: Soc Nucl Med. 1971.
23. Stoecklin G and Wolf AP. Eds. Radiochemistry related to life science. Radiochim Acta. 1983; 34: 1(Special issue).



24. Qaim S M. Production of Positron Emitting Radionuclides using Cyclotrons in Progress in Radiopharmacy. Eds. Cox PH, Sampson SJ and Lazarus CR. Martinus Nijhoff Publishers. Dorodrecht. 1986 : 85.
25. Wagner HN, Szabo Z, Buchanan JW. Radiotracer production. Principles of Nuclear Medicine. Philadelphia : WB Saunders. 1995.
26. Snyder SE, Kilbourn MR. Chemistry of fluorine-18 radiopharmaceuticals. In: Welch MJ, Redvanly CS, editors. Handbook of Radiopharmaceuticals. Chichester : Wiley. 2003 : 195-227.
27. 최연성. 분자영상 방사성추적자의 생산에 사용되는 방사성동위원소 표지방법. 2004 ; 38(2) : 121-30.
28. 고창순. 핵의학. 고려의학. 1997.
29. 윤홍일, 조정혁, 유국현, 박정훈, 함인혜, 최호영. I-131 표지 Curcumin의 약동력학적 분석을 통한 歸經 연구. 대한본초학회지. 2007 ; 22(2) : 181-8.