

데커시놀추출물의 경구투여후 흰쥐에 있어서의 약물속도론적 연구

김지혜** · 최송암*** · 김동출***†

*충남대학교 약학대학, **(주)아이바이오팜, **(주)싸이제닉
(2003년 7월 14일 접수 · 2003년 9월 5일 승인)

Pharmacokinetic Study of Decursinol Following Oral Administration in Rat

Ji-Hae Kim**, Song-Am Choi*** and Dong-Chool Kim***†

*College of Pharmacy, Chungnam National University, Gung-dong, Yusung-gu, Taejon, South Korea

**#819 Missi 2000 Bldg., 725 Suseo-dong, Kangnam-gu, Seoul, South Korea

***2F, Haechun Bldg., 69-13, Samsung-dong, Kangnam-gu, Seoul, South Korea

(Received July 14, 2003 · Accepted September 5, 2003)

ABSTRACT—The objective of this study is to investigate the pharmacokinetic parameters of decursinol following oral administration in Sprague-Dawley rats. The plasma concentration of decursinol was determined by LC/MS with APCI positive mode. The m/z value of decursinol was observed at 247. Following oral administration of decursinol extract, the apparent clearance was 5.3 ± 2.7 ml/hr/rat, the absorption half life was 2.5 ± 0.41 hr, the elimination half life was 3.05 ± 1.57 hr, and the apparent volume of distribution was 21 ± 12 ml/rat. The LC/MS method was successfully applied to the pharmacokinetic study of decursinol.

Key words—Decursinol, Pharmacokinetics, LC/MS

참당귀(*Angelica gigas*) 근으로부터의 추출물은 전통적으로 빈혈치료, 진정제, 진통제 등으로 사용되어져 왔다.¹⁾ Kang 등²⁾은 참당귀의 근 추출물에서 쿠마린유도체인 데커시놀(decursinol)과 데커신(decursin)을 분리하였고, 이들이 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase)의 활성을 저해하는 것을 보고하였다. 데커신 및 데커시놀의 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase)의 활성 저해효과는 이들 화합물의 인류의 난치병 중의 하나인 알츠하이머병(Alzheimer's disease)의 치료제로서 기대되고 있다. 이와 같이 데커시놀 및 데커신의 다양한 생리활성이 주목 받고 있음에도 불구하고 이들의 체내동태에 대한 정보는 보고되어 있지 않다. 그 이유 중의 하나는 혈중에서의 데커시놀의 정량법의 개발이 어려웠기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 데커시놀의 혈장중에서의 분석법을 개발함과 동시에 생체내동태에 관한 정보를 얻고자 실험을 실시하였다.

실험 방법

시약

본 실험에 사용한 데커시놀 추출물은 Scigenic Co. Ltd로

부터 공급받은 것을 그대로 사용하였다. 메탄올(methanol), 아세토니트릴(acetonitrile), 프로프라놀롤(propranolol), 암모니아아세트이트(ammonium acetate)등은 Sigma사(USA)에서 구입하였다. 그 외 실험에 사용한 시약들은 시판되고 있는 특급시약을 구입하여 사용하였다.

기기

데커시놀의 정량에는 Agilent 1100 system (Agilent, USA)과 JMS-LCmate(Jeol, Japan)로 구성된 LC/MS를 이용하였다. 펌프는 Agilent G1376A CapPump, 주입기는 HP G1329A autosampler, degasser는 G1379A, 컬럼히터는 G1316A Colcom을 이용하였으며, mass 검출에는 APCI probe를 이용하였다. Solid phase extraction(SPE)에는 automatic system인 ASPEC XL-4 system (Gilson, USA)을 사용하였다. SPE용 컬럼에는 bond elute C₁₈ 컬럼(Varian, USA)를 사용하였고, 데커시놀의 분석에는 Capcell Pak C₈ 컬럼 (Shiseido, Japan)을 사용하였다.

실험동물

(♂)샘타코에서 구입한 SD계 흰쥐를 일주일 이상 항온, 습 조건에서 적응시킨 후, 체중 300~400 g의 흰쥐를 실험에 이용하였다.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)821-5936, E-mail : dongchk@cnu.ac.kr

경구투여실험

데커시놀 추출물 8 g을 초순수(Milli-Q water) 16 ml에 녹여 500 mg/ml의 투여액을 조제하였다. 이 용액을 하루밤 미리 절식시켜둔 SD계 흰쥐에게 경구준대를 이용하여 적정량씩 경구투여하였다. 경구투여량은 추출물로서 흰쥐 당 0.5, 0.1 및 0.05 g이었으며, 투여 후 40, 60, 120, 180, 240, 300, 420 및 540분에 200 μ l씩의 혈액을 꼬리정맥에서 채혈하여 즉시 원심분리한 후, 혈장샘플을 -20°C 에서 보관하였다. 샘플은 SPE처리를 한 후, LC/MS 정량법으로 혈장중의 데커시놀 농도를 측정하였다.

혈장샘플의 전처리 방법

SD계 흰쥐로부터 채취한 혈장샘플은 메탄올: 초순수=1:1 혼합액(1% 비타민씨와 0.005% EDTA 함유)으로 2배 희석하여 solid phase extraction (SPE) 컬럼에 가하였다. SPE에는 ASPEC XL-4를 사용하였으며, 그 구성은 다음과 같았다. 즉, 펌프는 syringe size가 1000 μ l이고, tubing size가 25000 μ l인 404 pump를 이용하고, standard tray element는 XL-4 5 rack을 사용하고, rack은 code 45, code 41 및 code 101(4 needles)를 이용하였다. 먼저 Varian bond elute C₁₈ 컬럼에 200 μ l씩의 초순수와 메탄올을 가하여 컬럼을 씻어 준 다음, 2배 희석한 혈장샘플 200 μ l를 SPE 컬럼에 가하였다. 이어서 물 300 μ l로 한번 세척한 다음, 아세트니트릴 600 μ l로 용출하여 분획을 받았다. 이 분획을 메탄올:초순수=1:1혼합액으로 적절히 희석한 후, 50 μ l를 컬럼에 주입하여 데커시놀의 혈장중 농도를 LC/MS로 분석하였다. 혈장샘플의 SPE법에서 데커시놀의 회수율은 109.7 \pm 8.6%이었다.

혈장중 데커시놀의 LC/MS에 의한 정량

채취한 혈장 샘플을 이동상으로 희석하여 검량선의 농도 범위 내에 들도록 적절히 희석해 준 다음, 아래의 검량선 작성에서와 같은 방법으로 처리하였다. 처리한 혈장 샘플 50 μ l를 Capcell PAK C-8 컬럼(5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm I.D., Shiseido, Japan)에 주입하고 이동상으로 메탄올과 10 mM 암모늄아세테이트를 70:30의 비율로 섞은 혼합용액을 1 ml/min의 유속으로 흘려주었다. 컬럼온도는 35 $^{\circ}\text{C}$ 였다. Mass의 APCI probe의 상태는 다음과 같았다: vaporizer 온도, 500 $^{\circ}\text{C}$; orifice-1 온도, 120 $^{\circ}\text{C}$; needle의 discharge potential, 4 kV; nitrogen gas flow, 1 L/min; ring lens voltage, 40 V.

혈장 중 데커시놀의 검량선 작성

먼저 Scigenic사로부터 공급받은 데커시놀 표준품을 DMSO에 녹인 후 메탄올과 초순수(Milli-Q water)를 1:1로

혼합한 용액으로 계열희석하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 제조한 후 이 용액 20 μ l를 컬럼이 연결되지 않은 상태로 주입하여 mass의 scan mode로 데커시놀의 m/z 값을 확인하였다(scan law, exponential; scan speed, 2 sec/scan; interscan delay, 0.5 sec). 데커시놀의 m/z 는 247에서 관찰되었다.

데커시놀의 표준용액을 메탄올과 초순수가 1:1로 혼합된 용액을 이용하여 계열 희석하여 데커시놀의 농도가 각각 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ng/ml가 되도록 데커시놀의 검량선용 샘플을 제조하였다. 내부표준물질로서 프로프라놀올(propranolol, m/z 260)을 최종 농도가 100 ng/ml가 되도록 첨가한 후 이 용액 50 μ l를 Shiseido Capcell PAK C8 컬럼에 주입하여 데커시놀 및 프로프라놀올의 m/z 값인 247, 260를 selected ion monitoring (SIM) mode로 측정하였다.

약물속도론적 파라미터의 분석

데커시놀추출물을 흰쥐에 경구투여한 후, 혈장중 데커시놀 농도의 경시적 변화를 WinNonMix (Pharsight, NC, USA)를 이용하여 해석하였다. 혈장중농도의 해석에는 one-compartment model을 이용하였다.

$$C_p = \frac{k_a \cdot F \cdot D}{V(k_a - k_e)} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}) e^e \quad (1)$$

여기에서 C_p 는 혈장중 데커시놀농도, k_a 는 흡수속도정수, k_e 는 소실속도정수, D 는 투여량, V 는 분포용적, F 는 흡수율을 각각 나타낸다.

$$\begin{aligned} k_a &= (k_a)_0 \exp(\eta_{k_a}) \\ V/F &= (V/F)_0 \exp(\eta_{V/F}) \\ CL/F &= (CL/F)_0 \exp(\eta_{CL/F}) \end{aligned} \quad (2)$$

식 (1)에서 e 은 개체내 오차를 나타내며, 식 (2)의 η 는 각 파라미터의 개체간 오차를 나타낸다. 개체내 오차와 개체간 오차를 모두 승법적으로 모델링하였다. 데커시놀의 혈장중 농도를 위의 식 (1) 및 식 (2)에 first order방법을 이용하여 curve fitting하여 각 개체의 pharmacokinetic parameter와 개체간오차를 계산하였다.

결과 및 고찰

혈장중 데커시놀의 LC/MS에 의한 분석

Figure 1에는 데커시놀의 mass spectra를 보였다. 데커시놀은 APCI positive mode에서 m/z 값 247에서 검출되었다. 혈장 샘플에 데커시놀을 가하고 전술한 solid phase extraction 법에 따라 처리한 샘플을 LC/MS로 분석하였을때 데커

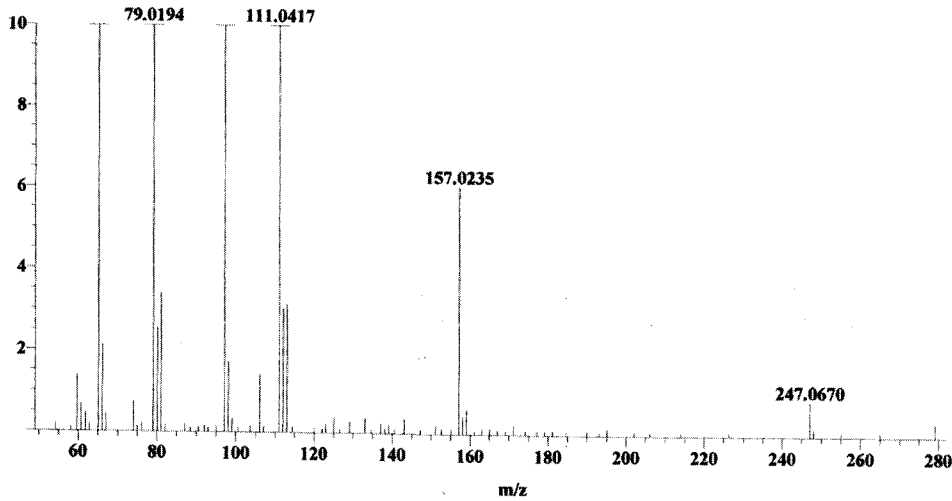


Figure 1—Mass spectra of decursinol (10 µg/ml, 20 µl injection). The mass spectra was obtained by Jeol-LCmate with APCI positive mode.

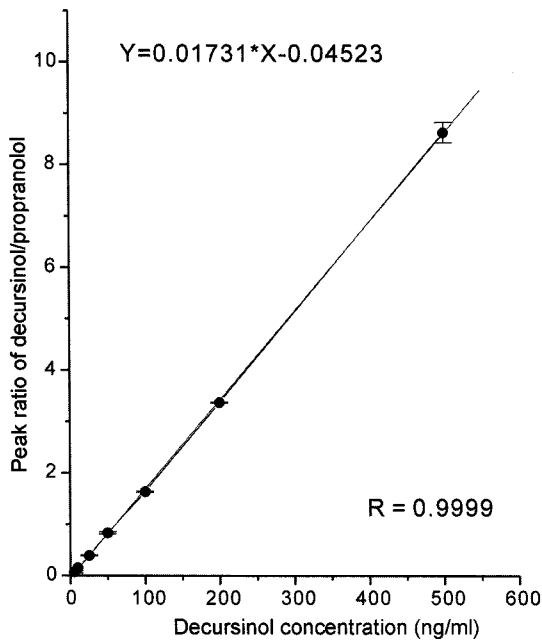


Figure 2—Calibration curve of decursinol. The plasma samples were treated as described in the experiment. A good linear relationship was observed in the concentration range of 5~500 ng/ml ($r=0.999$).

시놀의 유지시간은 3.6분이었으며 내부표준 물질인 프로프라놀올의 유지시간은 3.6분이었다. 본 방법에서 데커시놀 검량선의 농도범위 5~500 ng/ml에서 양호한 직선성이 관찰되었다($r=0.999$). Figure 2에는 데커시놀의 검량선을 나타내었다.

추출물 중의 데커시놀의 함량

Scigenic사로부터 공급 받은 추출물 중의 데커시놀 함량을 실험방법의 항에서 설명한 LC/MS법으로 측정하였다. 추출물중의 데커시놀의 함량은 약 0.15%이었다.

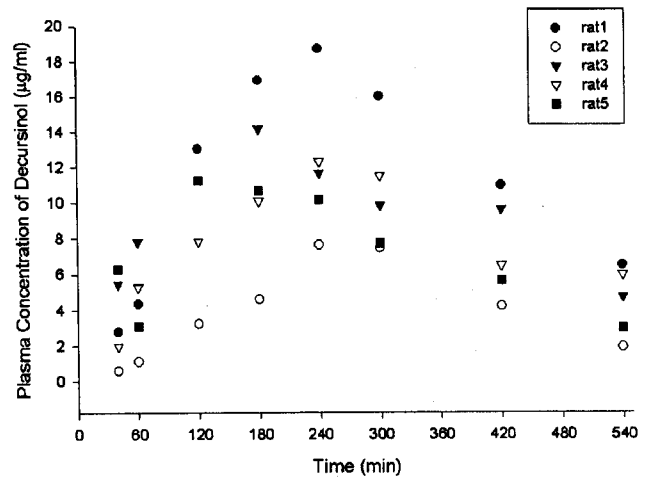


Figure 3—Time profiles of decursinol concentration in plasma following oral administration of 745 µg decursinol in SD rats (N=5).

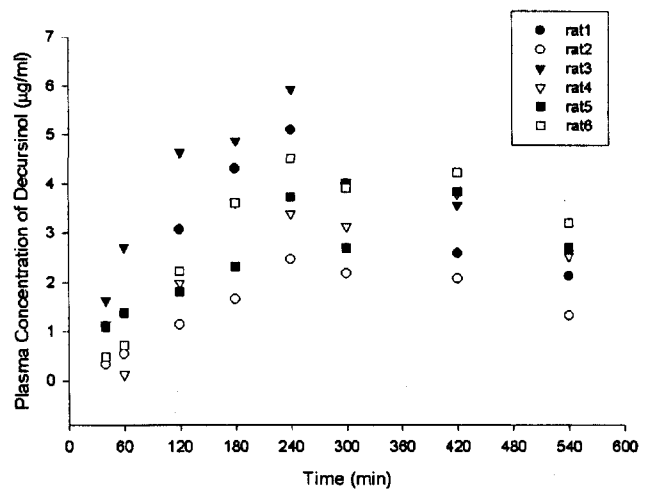


Figure 4—Time profiles of decursinol concentration in plasma following oral administration of 149 µg decursinol in SD rats (N=6).

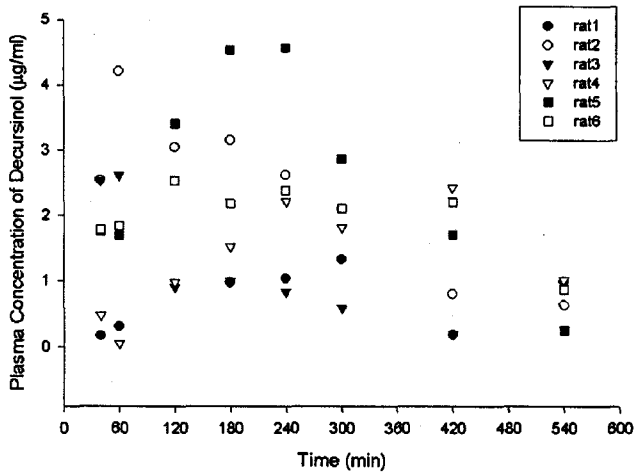


Figure 5—Time profiles of decursinol concentration in plasma following oral administration of 74.5 µg decursinol in SD rats (N=6).

추출물 경구투여후 흰쥐의 혈장중 데커시놀 농도의 경시적 변화.

SD계 흰쥐를 하루밤 절식시킨 후, 추출물 0.5 g, 0.1 g 및 0.05 g을 경구로 투여하였다. 이때 데커시놀의 투여량은 745 µg, 149 µg, 74.5 µg에 해당한다. Figure 3과 4 및 5에는 데커시놀 경구투여량이 745, 149 및 74.5 µg일 때 혈장중 데커시놀 농도의 경시적 변화를 나타내었다.

경구투여후 데커시놀의 약물속도론적 파라미터의 산출

추출물을 3가지 투여량(데커시놀로서 745, 149 및 74.5 µg/rat)으로 경구투여한 후, 흰쥐의 혈장중 데커시놀농도를 실험방법에서 설명한 방법에 따라 해석하였다. Figure 6에는 각 동물에 있어서의 측정값(혈장중 농도)과 모델식 (1) 및 (2)에 의한 예측값의 상관관계를 나타내었다. 모델식으로부

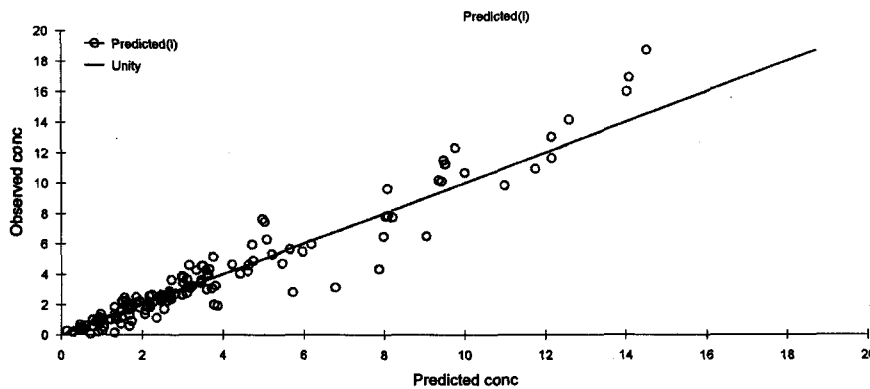


Figure 6—Correlation between observed and predicted plasma concentration of decursinol by the model equation (1) and (2) following oral administration in SD rats.

Table I—Summary of Individual Pharmacokinetic Parameters and Random Errors[#]

Animal No.	Dose (µg/rat)	V/F (ml/rat)	k _a (hr ⁻¹)	CL/F (ml/hr)	k _e (hr ⁻¹)	η _{v/f}	η _{k_a}	η _{CL/F}
1	745	21.3	0.291	4.82	0.226	0.227	0.041	0.024
2	745	57.0	0.224	11.6	0.202	1.21	-0.223	0.898
3	745	19.0	0.284	6.79	0.367	0.115	0.0158	0.395
4	745	28.6	0.258	7.11	0.248	0.525	-0.0801	0.412
5	745	24.6	0.320	9.66	0.392	0.374	0.135	0.719
6	149	15.7	0.284	3.82	0.242	-0.0749	0.0158	-0.209
7	149	32.2	0.237	4.96	0.137	0.760	-0.165	0.0529
8	149	11.9	0.302	3.33	0.280	-0.355	0.0769	-0.345
9	149	22.3	0.239	3.15	0.142	0.273	-0.154	-0.402
10	149	23.0	0.249	3.19	0.139	0.305	-0.116	-0.389
11	149	19.3	0.230	2.54	0.131	0.131	-0.194	-0.616
12	74.5	33.4	0.245	5.62	0.168	0.679	-0.132	0.177
13	74.5	4.24	0.349	3.79	0.894	-1.386	0.222	-0.217
14	74.5	3.46	0.361	8.65	2.502	-1.589	0.257	0.609
15	74.5	20.8	0.246	3.15	0.151	0.206	-0.127	-0.401
16	74.5	7.78	0.392	3.01	0.386	-0.778	0.338	-0.447
17	74.5	9.07	0.305	3.63	0.401	-0.625	0.088	-0.258

[#]The kinetic parameters and random errors were calculated by WinNonMix (Pharsight, NC, USA) using first order method.

터 비교적 양호한 예측이 가능함을 알 수 있다. Table I에는 각 동물별로 구한 속도론적 파라미터들을 정리하여 놓았다. 흡수속도정수(k_a)는 $0.224\sim 0.392\text{ hr}^{-1}$, 흡수반감기는 $1.77\sim 3.09\text{ hr}$ 범위에서 관찰되었으며, 흡수반감기의 평균값은 2.5 hr 로 흡수가 상당히 느리게 진행되는 것이 관찰되었다. 한편, 소실속도정수(k_e)는 $0.131\sim 2.50\text{ hr}^{-1}$, 소실반감기는 $0.28\sim 5.3\text{ hr}$ 의 범위에서 관찰되었고, 소실반감기의 평균값은 3 hr 으로 관찰되었다. 분포용적(V/F)은 $3.46\sim 57\text{ ml/rat}$ 의 범위에서 관찰되었고, 분포용적의 평균값은 $20.8\pm 12.5\text{ ml/rat}$ 이었다. 경구투여후의 전신클리어런스 값(CL/F)은 $2.54\sim 11.6\text{ ml/hr}$ 의 범위에서 관찰되었고, 평균값은 $5.22\pm 2.66\text{ ml/hr}$ 이었다.

결 론

본 논문에서 혈장중 데커시놀의 LC/MS를 이용하여 정량하는 방법을 개발하였다. 프로프라놀올을 내부표준물질로 이용하여 데커시놀 및 내부표준물질의 m/z 값은 247 및 260에서 관측되었으며, 이 분석법을 이용하여 데커시놀의 흰쥐

에서의 약물속도론적 파라미터들을 최초로 보고하였다. 데커시놀의 경구투여후 흰쥐에서 관찰된 겔보기클리어런스는 $5.22\pm 2.66\text{ ml/hr}$, 흡수반감기는 $2.5\pm 0.41\text{ hr}$, 소실반감기는 $3.05\pm 1.57\text{ hr}$ 이었다.

감사의 말씀

이 논문은 2001학년도 충남대학교 자체연구비 및 Scigenic사의 연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) D.J. Jung, A. Porzel, S. Huneck, Gigasol and other coumarins from *Angelica gigas*. *Phytochemistry*, **30**, 710-712 (1991).
- 2) S.Y. Kang, K.Y. Lee, S.H. Sung, M.J. Park and Y.C. Kim, Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products* **64**, 683-685 (2001).