

흰쥐에서 항염증제 후보물질 KAL-1120의 HPLC 분석 및 약물동태

신대환 · 이종열 · 박승혁 · 이경복 · 한 건 · 정연복[†]

충북대학교 약학대학, 충북BIT연구중심대학육성사업단

(2010년 3월 29일 접수 · 2010년 4월 13일 수정 · 2010년 4월 15일 승인)

HPLC Analysis and Pharmacokinetics of KAL-1120, a Novel Anti-inflammation Agent, in Rats

Dae Hwan Shin, Jung Yeol Lee, Seong Hyeok Park, Gyeong Bok Lee, Kun Han and Youn Bok Chung[†]

CBITRC, College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea.

(Received March 29, 2010 · Revised April 13, 2010 · Accepted April 15, 2010)

ABSTRACT – A rapid and sensitive reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the determination of *N*-(4-Chlorophenyl)-6-hydroxy-7-methoxy-2-chromanecarboxamide (KAL-1120), a novel anti-inflammation agent, in the rat plasma. The method was applied to analyze the compound in the biological fluids such as bile, urine and tissue homogenates. After liquid-liquid extraction, the compound was analyzed on an HPLC system with ultraviolet detection at 275 nm. HPLC was carried out using reversed-phase isocratic elution with a C₁₈ column, a mobile phase of a mixture of acetonitril (40 v/v%) at a flow rate of 1.0 mL/min. The chromatograms showed good resolution and sensitivity and no interference of plasma. The calibration curve for the drug in plasma was linear over the concentration range of 0.05-50 µg/mL. The intra- and inter-day assay accuracies of this method ranged from 0.06% to 9.33% of normal values and the precision did not exceed 6.28% of relative standard deviation. The plasma concentration of KAL-1120 decreased to below the quantifiable limit at 1.5 hr after the i.v. bolus administration of 2-10 mg/kg to rats ($t_{1/2,(\alpha)}$ and $t_{1/2,(\beta)}$ of 2.15 and 26.7 min at a dose of 2 mg/kg, 3.91 and 33.0 min at a dose of 10 mg/kg, respectively). The steady-state volume of distribution (V_{dss}) and the total body clearance (CL_T) were not significantly altered in rats given doses from 2 to 10 mg/kg. Of the various tissues tested, KAL-1120 was mainly distributed in the lung and heart after i.v. bolus administration. KAL-1120 was detected in the bile by 30 min after its i.v. bolus administration. However, the concentration in the urine after i.v. bolus administration became too low to measure, suggesting that KAL-1120 is mostly excreted in the bile. In conclusion, this analytical method was suitable for the preclinical pharmacokinetic studies of KAL-1120 in rats.

Key words – KAL-1120, Anti-inflammation agent, HPLC, Pharmacokinetics

Nuclear factor(NF)-κB는 분자생물학, 생화학, 세포생물학, 면역학 및 유전학 등 여러 분야에서 다양한 연구가 진행되고 있으며 염증이나 면역반응과 관련된 유전자 발현 조절에 중요한 역할을 한다.^{1,2)} NF-κB에 의해 생합성이 조절되는 물질로는 사이토카인 (cytokine), 케모카인 (chemokine), 유착분자 (adhesion molecule), 급성반응 단백질 (acute phase protein), 세포표면 수용체 (cell surface receptor), 유도성 질소산화물 신타아제 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 와 사이클로옥시게나제 2 (cyclooxygenase 2, COX-2) 등이 있으며 이런 유전자들은 여러 질병을 일으키는 원인으로 보고되고 있다.^{3,4)}

항산화제 중 NF-κB의 활성을 억제하는 물질로는 널리 알

려진 *N*-acetyl-*L*-cystein (NAC)⁵⁾과 α-토코페롤⁶⁾을 비롯하여 알리신 (allicin)⁷⁾, β-카로틴⁸⁾ 및 니테카폰 (nitecapone)과 같은 카테콜 (catechol) 유도체⁹⁾ 등이 보고되고 있다. IκB의 인산화와 NF-κB와의 유리를 억제하여 활성을 억제하는 물질로서는 아스피린¹⁰⁾이 알려져 있으며 *L*-아스코르빈산,¹¹⁾ 글루타민,¹²⁾ 올레안드린 (oleandrin)¹³⁾도 같은 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.

프로테아솜 (proteasome)과 프로테아제 (protease)를 억제하여 NF-κB의 활성을 저해하는 물질로는 PS-341¹⁴⁾, FK506 (tacrolimus)¹⁵⁾ 및 DCIC(3,4-dichloroisocoumarin)¹⁶⁾ 등이 알려져 있다. 이 중 PS-341은 다발성 골수종 치료제로 사용되고 있으며, FK506은 간 또는 골수 이식 수술에서 거부반응 억제에 사용되고 있다. 그 외의 다른 기전에 의해 NF-κB의 활성을 억제하는 약물로는 딜티아젬, 디설피람, 네오마이신 등 다양한 물질 들이 보고되고 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 043)261-2824, E-mail : chungyb@chungbuk.ac.kr
DOI : 10.4333/KPS.2010.40.2.101

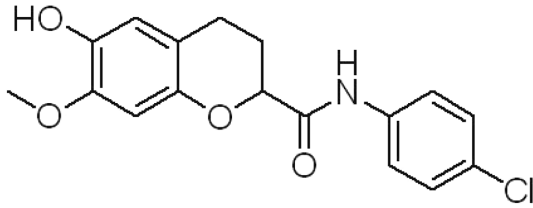


Figure 1—Structure formula of *N*-(4-Chlorophenyl)-6-hydroxy-7-methoxy-2-chromanecarboxamide (KAL-1120). Chemical Formula: $C_{17}H_{16}ClNO_4$ Exact Mass: 333.08. Molecular Weight: 333.77. Elemental Analysis: C, 61.18; H, 4.83; Cl, 10.62; N, 4.20; O, 19.17. m.p.: 130-132°C.

최근 저자 등이 속한 국내의 한 연구진에서 크로만(chroman) 계열 화합물들의 NF- κ B 저해에 의한 항염증 효과를 보고한 바 있다.^{20,21} 즉, 크로만을 모핵으로 하여 여러 치환기들을 도입해 수종의 계열화합물을 합성 후 NF- κ B 저해작용에 대한 구조-활성 상관관계를 밝혀내었다. 일련의 실험결과, 크로만 2번 위치에 클로로페닐아미드(chlorophenylamide)를 치환시킨 *N*-(4-Chlorophenyl)-6-hydroxy-7-methoxy-2-chromanecarboxamide(KAL-1120)에서 가장 높은 활성을 보였다(Figure 1).²¹

본 연구에서는 NF- κ B 활성을 억제하여 항염증 작용을 나타내는 KAL-1120을 신약후보물질로 선정하여 체내동태 특성을 파악하고자 하였다. 즉, 향후 성공적인 전임상시험을 위해 동물(흰쥐)의 생체시료 중 HPLC 분석법을 확립하고 기초적인 체내동태 정보를 제공하고자 하였다.

실험 방법

실험재료 및 기기

N-(4-Chlorophenyl)-6-hydroxy-7-methoxy-2-chromanecarboxamide (KAL-1120)는 충북대학교 약학대학 의약화학연구실에서 공급받아 사용하였다. 에텔(Tedia Co., INC., 미국), 아세트니트릴(Fisher Scientific Co., Ltd., 미국), 메탄올(Fisher Scientific Co., Ltd., 미국) 및 헤파린(Upjohn., No. 268-5, 미국)을 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급 또는 HPLC급을 사용하였다.

기기로는 HPLC(Jasco Co., 일본: Model PU-980 펌프 및 흡광검출기, LC-Net II control borwin 기록기, AS-950-10 자동주입기), pH 미터(M520, Orion Research Inc., 미국), 저온원심분리기(GS-6KR, Beckman Industries, 미국), 탁상용 원심분리기(Microfuge E, Beckman Industries, 미국), 냉동고(OPR-DFU-250, Operon ENG. Co., 한국), 초음파세척기(M2010, Jinwoo ENG. CO., 한국), 진탕기(Eurostar, IKA-Labortechnik Co., 독일) 등을 사용하였다.

실험동물

실험동물로는 체중 200-250 g의 웅성 Sprague Dawley® 흰쥐(rat)를 샘타코(경기도 안성, 한국)로부터 구입하여 약학대학 동물사육장에서 항온, 항습 조건하에서 물(상수)과 사료(삼양유지사료, 강원도, 원주, 한국)를 자유로이 공급하면서 약 1주간의 순화기간을 거친 후, 실험에 사용하였다.

흰쥐의 생체시료 중 KAL-1120의 HPLC분석

본 연구에서는 흰쥐의 생체시료 중 KAL-1120의 HPLC 최적 분석조건을 확립하였다. KAL-1120은 신약 후보물질로서 생체시료 중 분석법은 보고되고 있지 않다. 따라서, KAL-1120 화합물의 계열 물질 특성을 고려하여 다음과 같이 HPLC 분석조건을 검토하여 최적 조건을 확립하였다. 즉, HPLC 칼럼은 분석조건이 우수한 Luna C₁₈ Column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 이동상 용매는 아세트니트릴 : 물 = 40 : 60 v/v% 혼합액을 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 하였고, 흡광검출기 파장은 275 nm에 고정하였다. 생체시료 중 KAL-1120의 추출용매로는 수종의 용매를 사용하여 검토한 결과, 추출률이 우수하고, 가장 재현성이 좋은 아세트니트릴을 사용하였다.

HPLC 분석조건 검증(validation)

검량선 작성

KAL-1120 표준품을 메탄올에 녹이고 1,000 μ g/mL로 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 메탄올로 희석하여 KAL-1120의 혈장 중 농도가 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 μ g/mL가 되도록 혈장시료를 만들었다. 각각의 표준혈장 100 μ L에 아세트니트릴 1.5 mL를 가하여 20분간 진탕 추출하였다. 혼합액을 원심분리(10분, 12000 rpm)한 후 상정액 1.3 mL를 취하여 질소 기류 하에서 완전히 증발시킨 다음, 아세트니트릴 150 μ L를 가하여 10분간 진탕하여 재용해시켰다. 용해된 액을 원심분리(3분, 12000 rpm)한 후 상정액 100 μ L를 HPLC에 주입하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 KAL-1120의 피크면적을 구하여 검량선을 작성하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 재현성을 구하고, 연속하여 5일간 실험을 시행하여 일간 재현성을 구하였다. 또한 별도의 실험에서 담즙, 요 및 조직 시료를 사용하여 검량선을 별도로 작성하였다.

혈장시료의 처리

실험동물인 흰쥐로부터 얻은 혈장 100 μ L로부터 검량선 작성시와 동일한 처리과정을 거친 시료 100 μ L를 HPLC에 주입하였다.

혈장 중 농도 계산

얻어진 크로마토그램으로부터 KAL-1120의 피크면적을 구하여 위에서 얻어진 검량선으로부터 혈장 중 KAL-1120의 농도를 산출하였다.

분석조건의 검증

시험방법과 같이 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램에서 KAL-1120 피크의 유지시간을 확인하고, 분석조건에서 KAL-1120이 기타 혈장 성분들과 잘 분리되는 가를 확인하여 특이성을 평가하였다. Blank 혈장시료, 최종농도가 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 µg/mL가 되도록 표준액을 spike한 혈장시료를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 약물 검량선의 계산식으로부터 직선성을 평가하였다. 또한, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 µg/mL 8가지 농도의 약물 함유 혈장 표준액을 검체처리방법으로 처리하여 분석하여 다음과 같이 정밀성, 정확성 및 감도(정량한계)를 구하였다. 즉, 정밀성은 약물 피크면적의 표준편차를 약물 피크면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(%CV)을 구하고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성(%CV)을 구하였다. 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 감도는 정밀성이 20%이하이고, 정확성이 80-120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다. 이로부터 혈장 중 KAL-1120에 대한 본 HPLC분석법은 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있는 가를 평가하였다.

흰쥐에서 정맥투여 후 혈장 중 농도 측정

흰쥐를 에테르 가볍게 마취시킨 후 좌측 대퇴부 동맥 및 정맥에 폴리에틸렌튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, 미국)를 삽관하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 KAL-1120을 정맥투여하였다. 정맥투여 용량은 2 및 10 mg/kg으로 하였다. KAL-1120투여 후 혈액을 대퇴동맥으로부터 경시적으로 채취하였다. 채취시간은 투여직전, 투여후 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90분으로 총 11점으로 하였다. 혈액 250 µL를 마이크로튜브에 받아서 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리 후 얻어진 혈장 100 µL를 정량에 사용하였다.

흰쥐에서 정맥투여 후 조직분포 실험

흰쥐를 에테르 마취시킨 후 좌측 대퇴부 정맥에 폴리에틸렌 튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, 미국)를 삽관하였다. 흰쥐가 마취에서 깨어난 후 KAL-1120을 정맥투여

(10 mg/kg)하였다. 10, 30 및 60분이 경과하였을 때 각각 흰쥐를 탈혈시켜 안락사 시켰다. 즉시 개복하여 각 조직(간장, 신장, 폐, 심장, 위장, 소장, 대장, 비장, 흉선, 고환, 근육)을 절취하였다. 각 조직을 0°C 생리식염수로 세척하여 표면에 존재하는 혈액을 제거하였다. 적출한 각 조직을 pH 7.4 등장 인산염 완충액으로 균질화시켰다. 시료는 25%의 균질액을 사용하였으며, 최종 조직 농도의 산출에는 이를 보정하였다. 균질액 최종시료 100 µL를 정량에 사용하였으며, 균질액 중 KAL-1120의 농도는 혈장에서와 같은 방법으로 구하였다.

흰쥐에서 정맥투여 후 담즙 및 요 중 배설 실험

흰쥐를 에테르 가볍게 마취시킨 후 개복한 다음 폴리에틸렌 튜브(PE-10, Intramedic, Clay Adams, 미국)를 담관에 삽관하고, 복부를 다시 봉합하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 KAL-1120을 정맥주사하였다. 투여용량은 2 및 10 mg/kg으로 단회투여 하였다. 정맥투여후 담즙을 경시적으로 채취하였다. 채취시간은 투여전, 투여후 0-5분, 5-10분, 10-15분, 15-30분 및 30-45분, 총 6시점으로 하였다. 담즙 시료를 마이크로튜브에 받아서 무게를 측정한다 다음, 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리 후 얻어진 100 µL를 정량에 사용하였다. 담즙의 체적은 담즙의 비중을 1.0으로 가정하여 무게를 측정하여 산출하였으며, 시료 중 KAL-1120의 농도는 혈장에서와 같은 방법으로 구하였다.

요 시료의 채취를 위해서는 약물투여후 흰쥐를 대사케이지(Model: 3700, Tecniplast, 이탈리아)에 넣어 자유롭게 활동시키면서 경시적으로 채취하였다. 투여용량은 2 및 10 mg/kg으로 단회투여 하였다. 채취시간은 투여전, 투여후 0-5분, 5-10분, 10-15분, 15-30분, 30-60분, 60-120 총 7시점으로 하였다. 요 시료는 체적을 산출한 후, 새로운 마이크로튜브에 옮겨서 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리 후 얻어진 100 µL를 정량에 사용하였다. 시료 중 KAL-1120의 농도는 혈장에서와 같은 방법으로 구하였다.

약물동태학적 해석

KAL-1120을 정맥주사한 후 얻은 혈장 중 약물농도-시간 데이터를 다음과 같이 전형적인 선형 2-컴파트먼트 모델에 따라 속도론적으로 해석하였다.

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

정맥주사 후 얻어진 혈장 중 농도(C)-시간(t) 데이터를 위식에 비선형최소자승법으로 피팅 (fitting)하여 각 파라미터

를 산출하였다. 기타 속도론적 파라미터를 구하는 식은 다음과 같다.

$$k_{21} = (A\beta + B\alpha) / (A + B)$$

$$k_{el} = \frac{\alpha\beta}{k_{21}}$$

$$k_{12} = (\alpha + \beta) - (k_{21} + k_{el})$$

$$t_{1/2(\alpha)} = \frac{0.693}{\alpha}$$

$$t_{1/2(\beta)} = \frac{0.693}{\beta}$$

모델비의존적 해석

AUC 같은 파라미터를 산출시 컴파트먼트모델을 미리 가정할 경우 오차가 발생할 수 있다. 따라서, 혈장 중 약물농도-시간 데이터로부터 혈장 중 농도 곡선하 면적(AUC)은 다음 식으로부터 산출하였다.

$$AUC = AUC_t + C_t/\beta$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C dt$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

$$CL_t = \frac{DOSE}{AUC}$$

$$V_{dss} = CL_t \cdot MRT$$

여기서 C_t는 정량한계 이상의 농도에서 마지막으로 측정된 혈장 중 농도를 나타낸다. 시간 0에서 마지막 채혈시간까지의 혈장 중 농도 곡선하 면적(AUC_t)은 사다리꼴 면적 공식

의 합으로부터 산출하였다. 여기서 AUC 및 AUMC는 사다리꼴면적공식 및 extrapolation법의 합으로 산출하였으며, MRT는 평균체류시간, CL_t는 전신 클리어런스, V_{dss}는 정상상태 분포용적을 각각 나타낸다.

결과 및 고찰

흰쥐 혈장 중 KAL-1120의 HPLC 분석조건의 검증

본 연구에서는 흰쥐의 혈장 중 미량분석을 위하여 KAL-1120의 HPLC분석법을 확립하고 이를 검증 (validation) 하였다. 생체시료 중 KAL-1120의 분석법은 현재까지 보고되고 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 다음과 같이 KAL-1120 HPLC분석법을 확립하였다. 즉, 생체시료 중 KAL-1120의 추출용매로는 계열화합물의 분석방법을 모두 검토하여 수종의 용매를 사용하여 실험한 결과, 추출률이 우수하고, 가장 재현성이 좋은 아세토니트릴을 사용하였다. 단, KAL-1120이 신규 화합물로서 내부표준물질을 선정하지 못하였으나, 추출률(95% 이상) 및 재현성이 높았다. 또한 수종의 혼합액을 사용하여 검토한 결과 이동상 용매는 아세토니트릴 : 물 = 40 : 60 v/v% 혼합액을 사용하였다.

시험방법 항과 같이 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Figure 2와 같았다. KAL-1120의 피크 유지시간은 8분대이었으며, 분석조건에서 기타 혈장 성분들과 잘 분리되어 특이성이 있음을 알 수 있었다.

공 혈장시료, 최종농도가 0.05(정량한계), 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 µg/mL가 되도록 혈장시료를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 약물의 검량선의 계산식은 y=28066 x - 0.387 (r=0.9998)로 0.05-50 µg/mL 범

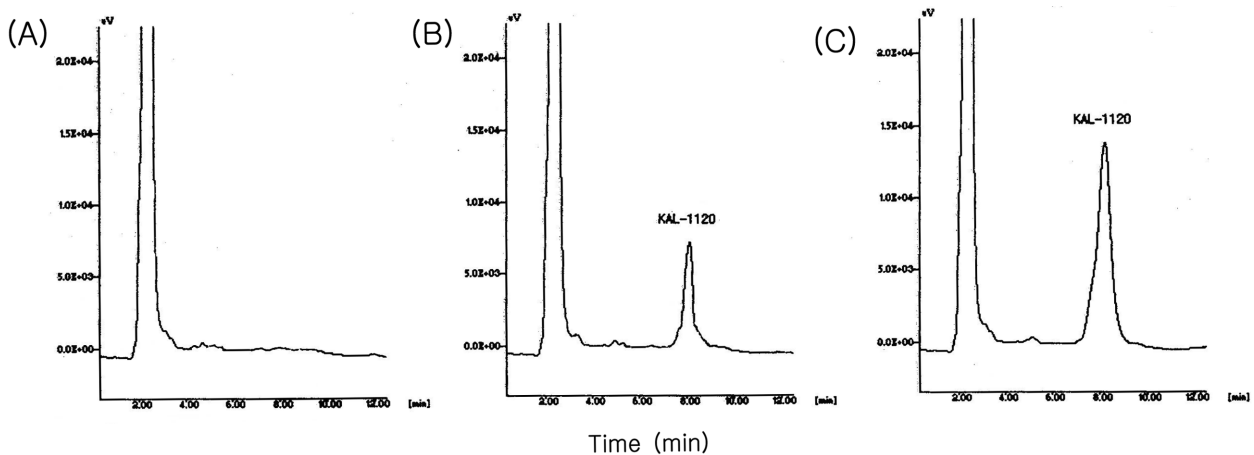


Figure 2—Typical HPLC chromatogram of KAL-1120. (A) Blank plasma, (B) Plasma spiked with KAL-1120 (1.0 µg/mL), (C) Plasma sample at 10 min after i.v. bolus administration of KAL-1120 at a dose of 10 mg/kg. The plasma concentration of KAL-1120 was determined to be 9.52 µg/mL.

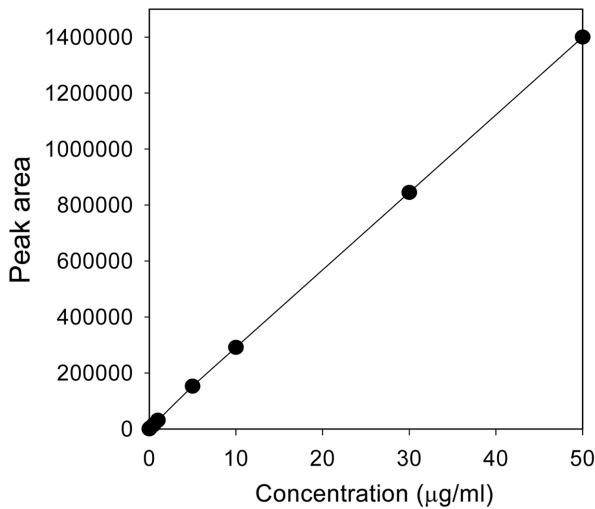


Figure 3—Calibration curve of KAL-1120 in the rat plasma. The curve was linear over the concentration range of 0.05-50 µg/mL. Each point represents the mean of 10 samples.

위에서 양호한 직선성을 나타내었다(Figure 3). 또한, 담즙, 요 및 조직 중 각각의 KAL-1120의 검량선은 혈장의 검량선과 유의한 차이를 나타내지 않았다.

정밀성, 정확성 및 감도(정량한계)를 구하기 위해 최종농도가 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 µg/mL 8가지 농도의 약물함유 혈장 표준액을 상기의 검체처리방법으로 처리하여 분석하였다. 정밀성은 약물 피크면적의 표준편차를 약물 피크면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(%CV)을 구하고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성(%CV)을 구하였다. 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 감도는 정밀성이 20%이하이고, 정확성이 80-120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다. 이때 본 분석방법의 정밀성 CV%는 일내 정밀성이 6.28% 이하, 정량한계농도에서의 일내 정밀성은 6.28% 이하였고, 일간 정밀성은 4.79% 이하, 정량한계농도에서의 일간 정밀성은 3.06%이하이었다. 일내 정확성 편차는 9.14% 이하, 정량한계농도에서의 일내 정확성 편차는 3.33%이하였으며, 일간 정확성 편차는 9.33%이하, 정량한계농도에서의 일간 정확성 편차는 9.33%이하이었다. 정량한계농도(감도)는 0.05 µg/mL이었다(Table I). 이로부터 흰쥐 혈장 중 KAL-1120에 대한 본 HPLC분석법은 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

KAL-1120의 정맥투여 후 혈장 중 소실

흰쥐에 KAL-1120을 단회정맥투여(2 및 10 mg/kg)한 후

Table I—Precision and Accuracy for the Determination of KAL-1120 in the Rat Plasma (n=5)

Concentration (µg/mL)	Precision (C.V.%)		Accuracy %	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
0.05 ^{a)}	6.28	3.06	96.67	90.67
0.1	2.08	2.88	91.86	90.95
0.5	3.13	4.79	100.63	93.01
1	2.40	1.89	109.14	91.51
5	4.13	2.46	107.99	109.32
10	1.21	1.25	100.51	108.05
30	1.32	1.45	100.27	104.23
50	1.49	1.73	100.06	99.58

^{a)}LLOQ : Low limit of quantitation

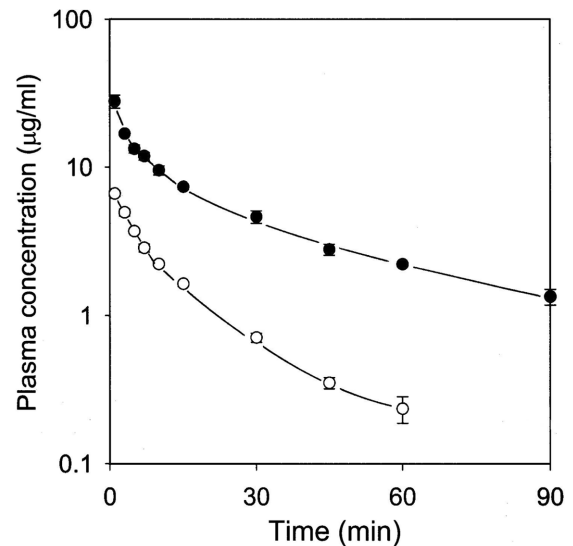


Figure 4—Plasma concentration-time profile of KAL-1120 after its i.v. bolus administration at a dose of 2 mg/kg (○) and 10 mg/kg (●) in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 4 rats.

혈장 중 소실 양상을 Figure 4에 나타내었다. 혈장 중 농도는 10분까지 빠르게 소실되었으며, 이후에는 서서히 소실되는 양상을 나타내었다. 이 연구에서는 3-컴파트먼트 모델로 해석도 가능하나 3-컴파트먼트 모델보다는 2-컴파트먼트 모델의 오차범위가 작게 피팅되었다. 따라서 혈장 중 농도-시간 데이터를 비선형 최소자승법으로 2-컴파트먼트 모델에 피팅하여 산출한 동태학적 파라미터를 Table II에 나타내었다. 2 및 10 mg/kg 용량에서 분포전상(α상)에서의 반감기가 각각 약 3.91 및 2.15분, 분포후상(β상)에서의 반감기는 각각 약 33.0 및 26.7분으로 두 용량 간에는 유의성 있는 차이가 없었다. 또한 전신클리어런스 및 분포용적도 저용량 및 고용

Table II—Pharmacokinetic Parameters of KAL-1120 after i.v. Bolus Administration at the Dose of 2 and 10 mg/kg in Rats^{a)}

Parameter	Dose	
	2 mg/kg	10 mg/kg
A (µg/mL)	6.05±0.119	27.8±6.35
B (µg/mL)	2.00±0.896	11.4±1.26
α (min ⁻¹)	0.213±0.0693	0.416±0.118
β (min ⁻¹)	0.0328±0.0116	0.0274±0.0038
k ₁₂ (min ⁻¹)	0.0924±0.0276	0.224±0.0757
k ₂₁ (min ⁻¹)	0.0793±0.0430	0.138±0.0279
k _{el} (min ⁻¹)	0.0703±0.0288	0.0811±0.0189
t _{1/2(α)} (min)	3.91±1.01	2.15±0.626
t _{1/2(β)} (min)	33.0±17.2	26.7±3.33
AUC (µgminmL ⁻¹)	96.7±5.72	513±19.7
V _{dss} (mL/kg)	541±134	746±53.8
CL _t (mL/min/kg)	20.8±1.20	19.5±0.774

^{a)}Mean±S.E. of 4 rats.

량에서 유사한 값을 보였으며, 두 용량 간에는 유의한 차이가 없었다.

KAL-1120의 담즙 및 요 중 배설

KAL-1120을 단회정맥투여(2 및 10 mg/kg)한 후 담즙배설 양상을 Figure 5에 나타내었다. KAL-1120의 담즙배설속도와 누적담즙배설량은 개체 간 편차를 보였으나, 평균값은 투여용량 간 비례적인 증가를 나타내었다. 담즙배설의 대부분은 빠른 시간대인 15분 이내에 이루어졌고 이 후에는 검출되지 않았다. 요중배설의 경우 경시적으로 시료를 채취해 분

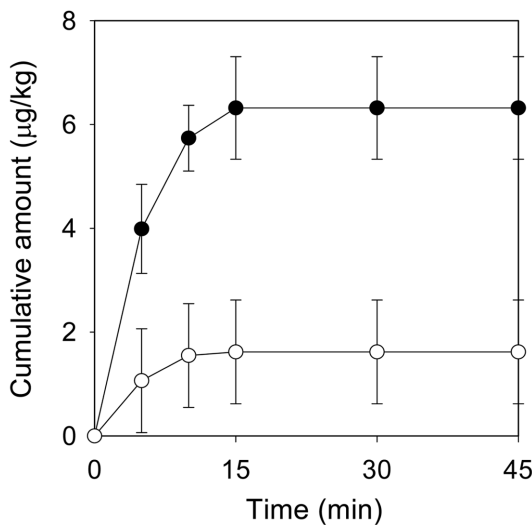


Figure 5—Cumulative biliary excretion of KAL-1120 after its i.v. bolus administration at a dose of 2 mg/kg (○) and 10 mg/kg (●) in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 4 rats.

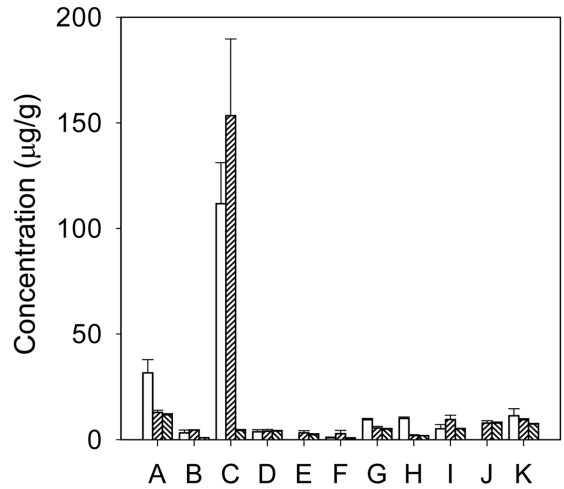


Figure 6—Tissue distribution of KAL-1120 at 10 min (□), 30 min (▨) and 60 min (▩) after its i.v. bolus administration at a dose of 10 mg/kg in rats. Each value represents the mean±S.E. of 4 rats. Keys: (A) Heart; (B) Liver; (C) Lung; (D) Stomach; (E) Large intestine; (F) Small intestine; (G) Spleen; (H) Kidney; (I) Thymus; (J) Testis; (K) Muscle.

석하였으나, 저용량 및 고용량 모두에서 KAL-1120은 검출되지 않았다. 이상을 종합하면 KAL-1120은 정맥투여 후 요 중보다는 담즙으로의 배설이 높은 것으로 생각된다.

KAL-1120의 정맥투여 후 조직 분포

흰쥐에 KAL-1120을 단회정맥투여(10 mg/kg)한 후의 60분까지의 각 조직 및 장기 중 농도를 측정한 결과를 Figure 6에 나타내었다. 각 조직 중 분포는 주요 장기인 폐 및 심장에서 높게 나타났으며, 기타 주요 장기 및 조직으로의 분포성은 유사하게 나타났다. 대부분의 조직 중 농도는 같은 용량(10 mg/kg)을 정맥주사한 30분 후의 혈장 중 농도와 유사한 값을 보였다. 정맥주사한 후 60분이 경과한 시점에서는 혈장 중 농도가 감소함에 따라 각 조직 중 농도도 감소되는 경향을 나타내었다.

결 론

본 연구에서는 흰쥐의 생체시료 중 미량분석을 위하여 KAL-1120의 HPLC분석법을 확립하고 이를 검증 (validation) 하였다. 0.05-50 µg/mL 범위에서 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 흰쥐에서 KAL-1120을 정맥주사(2 및 10 mg/kg)한 후 혈장 중 분포전상 소실반감기는 2.15-3.91분, 분포후상에서는 26.7-33.0분으로 나타났다. 투여용량으로 환산한 정상상태 분포용적 및 클리어런스는 두 용량간의 유의한 차이를 보이지 않

았다. KAL-1120은 주로 폐와 심장에 분포되었으나 이를 제외한 대부분의 조직으로의 분포성은 유사하였다. 또한, KAL-1120은 요에서 검출되지 않았으며 대부분 담즙으로 배설되는 것으로 생각되었다. 본 연구에서 확립된 HPLC분석법 및 기초적인 체내동태 결과는 향후 KAL-1120의 흡수, 분포, 대사 및 배설 (ADME) 과정의 전임상 동물시험에 충분히 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말씀

이 논문은 2008학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) P.A. Baeuerle and D. Baltimore, NF- κ B: ten years after, *Cell*, **87**, 13-20 (1996).
- 2) R. Al-Ashy, I. Chakroun, M.E. El-Sabban and F.R. Homaidan, The role of NF- κ B in mediating the anti-inflammatory effects of IL-10 in intestinal epithelial cells, *Cytokine*, **36**, 1-8 (2006).
- 3) Q.W. Xie, Y. Kashiwarbara and C. Nathan, Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.*, **269**, 4705-4708 (1994).
- 4) K.M. Lee, B.S. Kang, H.L. Lee, S.J. Son, S.H. Hwang, D.S. Kim, J.S. Park and H.J. Cho, Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity, *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 3375-3381 (2004).
- 5) R. Schreck, P. Rieber and P.A. Baeuerle, Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1, *EMBO J.*, **10**, 2247-2258 (1991).
- 6) K.N. Islam, S. Devaraj and I. Jialal, Alpha-Tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells, *Circulation*, **98**, 2255-2261 (1998).
- 7) A. Lang, M. Lahav, E. Sakhnini, I. Barshack, H.H. Fidder, B. Avidan, E. Bardan, R. Hershkovich, S. Bar-Meir and Y. Chowers, Allicin inhibits spontaneous and TNF- α induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells, *Clin. Nutr.*, **23**, 1199-1208 (2004).
- 8) C. Guruvayoorappan and G. Kuttan, Beta-carotene inhibits tumor-specific angiogenesis by altering the cytokine profile and inhibits the nuclear translocation of transcription factors in B16F-10 melanoma cells, *Integr. Cancer Ther.*, **6**, 258-270 (2007).
- 9) Y.J. Suzuki and L. Packer, Inhibition of NF- κ B transcription factor by catechol derivatives, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **32**, 299-305 (1994).
- 10) M.J. Yin, Y. Yamamoto and R.B. Gaynor, The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(κ)B kinase-beta, *Nature*, **396**, 77-80 (1998).
- 11) S.S. Han, K. Kim, E.R. Hahm, S.J. Lee, Y.J. Surh, H.K. Park, W.S. Kim, C.W. Jung, M.H. Lee, K. Park, J.H. Yang, S.S. Yoon, N.H. Riordan, H.D. Riordan, B.F. Kimler, C.H. Park, J.H. Lee and S. Park, L-ascorbic acid represses constitutive activation of NF- κ B and COX-2 expression in human acute myeloid leukemia, HL-60, *J. Cell Biochem.*, **93**, 257-270 (2004).
- 12) G. Chen, J. Shi, M. Qi, H. Yin and C. Hang, Glutamine decreases intestinal nuclear factor kappa B activity and pro-inflammatory cytokine expression after traumatic brain injury in rats, *Inflamm. Res.*, **57**, 57-64 (2008).
- 13) S.K. Manna, N.K. Sah, R.A. Newman, A. Cisneros and B.B. Aggarwa, Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase, *Cancer Res.*, **60**, 3838-3847 (2000).
- 14) J. Adams, The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell*, **5**, 417-421 (2004).
- 15) S. Okamoto, N. Mukaida, K. Yasumoto, N. Rice, Y. Ishikawa, H. Horiguchi, S. Murakami and K. Matsushima, The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization, *J. Biol. Chem.*, **269**, 8582-8589 (1994).
- 16) F. D'Acquisto, L. Sautebin, T. Iuvone, M. DiRosa and R. Carnuccio, Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in J774 macrophages, *FEBS Lett.*, **440**, 76-80 (1998).
- 17) M. Severa, A. D'Ambrosio, L. Giordani, F. Quintieri and E. Coccia, Inhibition of interleukin-12 expression in diltiazem-treated dendritic cells through the reduction of nuclear factor-kappa B transcriptional activity, *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 425-432 (2005).
- 18) W. Wang, H.L. McLeod and J. Cassidy, Disulfiram-mediated inhibition of NF- κ B activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines, *Int. J. Cancer*, **104**, 504-511 (2003).
- 19) J. Garcia-Trapero, F. Carceller, M. Dujovny and P. Cuevas, Perivascular delivery of neomycin inhibits the activation of NF- κ B and MAPK pathways, and prevents neointimal hyperplasia and stenosis after arterial injury, *Neurol. Res.*, **26**, 816-824 (2004).
- 20) B.H. Kim, A.M. Reddy, K.H. Lee, E.Y. Chung, S.M. Cho, H. Lee, K.R. Min and Y. Kim, Inhibitory mechanism of chroman compound on LPS-induced nitric oxide production and nuclear factor-kappaB activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 223-228 (2004).
- 21) J.H. Kwak, B.H. Kim, J.K. Jung, Y. Kim, J. Cho and H. Lee, Structure-activity relationships of 6-hydroxy-7-methoxychroman-2-carboxylic acid N-(substituted) phenylamides as inhibitors of nuclear factor-kappaB activation, *Arch. Pharm. Res.*, **30**, 1210-1215 (2007).