

SB-31의 Glycyrrhizin을 지표로 한 Rat과 Rabbit에서의 약물동태 및 심혈관계에 대한 효과 연구

강원구 · 박용순 · 이동흠^a · 권광일
충남대학교 약학대학, ^a한보제약 주식회사

Pharmacokinetics of Anticancer Agent SB-31 in Rats & Rabbits and the Cardiovascular Effect on the Isolated Perfused Rat Heart & Blood Coagulation

Won Ku Kang, Yong Soon Park, Dong Heum Lee^a and Kwang Il Kwon
College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea
^aHanbo Pharmaceutical Co., Gongju city 314-920, Korea

SB-31 which contains *Pursatilla*, *Licoris* and *Ginseng* extracts was recently proved as an anticancer agent. In a preclinical effort to be applied this drug to human, pharmacokinetics of SB-31 was carried out in rats and rabbits. Glycyrrhizin(GZ), a saponin of *Licoris* was used as a standard ingredient for the pharmacokinetics of SB-31. The rat's blood, bile and urine samples were serially collected in femoral vein, common bile duct and bladder, respectively, after bolus i.v. injection at a dose of 1 or 1/5 ampul/rat and rabbit's blood samples from the marginal ear vein at a dose of 1 or 3 amp./rabbit. GZ and glycyrrhetic acid(GA), a major metabolite of GZ in the physiological samples were analysed by HPLC with UV detection. The decline of GZ in plasma concentration was generally biexponential at each dose. GZ was almost completely recovered in bile within 18 hour. GA wasn't detected in the samples with UV detector. In the rat, Vss and Kel at a dose of 1 and 1/5 ampul of SB-31 were 98.06 ± 6.07 ml, 0.33 ± 0.05 hr⁻¹ and 65.46 ± 11.19 ml, 0.68 ± 0.25 hr⁻¹, respectively. Those in rabbits at a dose of 3 and 1 ampul of SB-31 were 235.24 ± 30.72 ml, 0.13 ± 0.36 hr⁻¹ and 341.32 ± 28.58 ml, 0.27 ± 0.04 hr⁻¹, respectively. "WinNonlin" was utilized for the compartmental analysis. A two-compartment model was chosen as the most appropriate pharmacokinetic model. The data were best described by using a weighting factor of $1/y^2$. To evaluate the effect of SB-31 on cardiovascular system, serially diluted SB-31 was directly injected into coronary artery in the isolated perfused rat heart and the effect of PSF, PSH, saponins of *Pursatilla*, and SB-31 on PT, APTT of healthy human plasma was examined. Except the positive inotropic effect of ten times diluted solution of SB-31, there was no significant effect on LVDP, (-dp/dt)/(+dp/dt), heart rate and coronary flow in comparison with that of vehicle. SB-31 had no effect on PT but slightly delayed APTT about 6.9~11.5%. There was no significant effect of PSF and PSH on PT & APTT. Conclusively, SB-31 did not show any notable toxic effects on cardiovascular system. (Kor. J. Clin. Pharm. 1998; 8(2): 122-132)

□ Keywords - SB-31, Glycyrrhizin, Pharmacokinetics, Rat, Rabbit, Rat heart, PT, APTT

항암제의 개발을 위해 여러 각도에서 다양한 물질
들이 스크리닝되고 있는데 이중 생약제제나 미생물의

교신저자: 권 광 일

305-764 대전광역시 유성구 궁동 220
충남대학교 약학대학
TEL. 042-821-5937, FAX. 042-823-6781

대사산물과 같은 천연물은 세포독성을 나타내는 선도
물질을 찾아내는데 중요한 원천이 되고 있다. 최근 할
미꽃 뿌리의 추출물이 주성분인 SB-31은 동물실험 결
과 우수한 항암효과가 증명되었다.¹⁾

SB-31 주사제 1 앰플(5 ml)에는 주성분으로 백두옹

(생규) 150 mg, 미삼(약전) 75 mg(진세노사이드 Rb₁으로서 82.5 µg) 및 감초(약전) 22.5 mg(글리시리진산으로서 0.45 mg)이 함유되어 있다.

할미꽃(*Pulsatilla koreana* Nakai: 백두옹)의 뿌리에는 해열작용과 수면작용을 나타내는 아네모닌, 프로토아네모닌과 항말라리아 작용, 항진균 작용, P-388이나 폐암세포에 세포독성을 나타내는 lupane type의 betulinic acid 외 3종의 monodesmosides (pulsatilla saponin A, B, D)와 2종의 bisdesmosides (pulsatilla saponin F, H) 등이 있다.²⁻⁵⁾ 미삼(*Ginseng Radix Palva*)은 인삼의 가는 뿌리로서 주성분은 사포닌이며 oleanane계에는 ginsenoside R₀가 있고 그 외에는 dammarane계로서 20S-protopanaxadiol인 ginsenoside Rb₂, Rc, Rd가 있으며 20S-protopanaxatriol인 Re, Rf, Rg₁, Rg₂ 등이 있다.

감초(*Glycyrrhizae Radix*)는 *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* 또는 동속식물의 뿌리와 주출경을 그대로 또는 껍질을 벗긴 후 사용한다. 주성분은 glycyrrhizin (GZ)이며(Fig. 1) glycyrrhetic acid (GA)에 두 개의 glucuronic acid가 연결된 triterpene glucuronide이다.

GZ는 부신피질 및 estrogen 호르몬양 작용과 항염증작용, 해독작용, 항알레르기 작용, 고지혈증 개선작용, 위점막세포내 cyclic AMP 농도증가작용, phospholipase A₂ 저해작용, 항 virus 작용, interferon 유기 작용 등이 있으며 최근에는 여러 형태의 간염치료 및 간보호작용에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

GZ는 경구 투여시 점막투과성이 좋지 않아 흡수가 잘 안되며 장내 세균에 의해서 주대사체인 GA로 전

환되고 초회통과효과(first-pass effect)로 인해 생체이용율이 매우 낮다.⁶⁾

동물실험 결과 항암효과가 있는 것으로 밝혀진¹⁾ 정맥주사제 SB-31의 약물동태를 연구하기 위해 이 약을 rat과 rabbit에 정맥주사하였고, rat로부터는 혈액과 담즙 및 요를, rabbit으로부터는 혈액을 각각 채취하여 주성분의 하나인 GZ를 지표로 하여 분포 및 배설 양상을 연구하였다. 두 실험동물로부터 채취된 샘플내의 GZ와 GA의 농도는 HPLC를 통해 측정되었다.

SB-31이 심혈관계에 미치는 영향을 관찰하기 위해 rat의 적출심장을 이용하여 관상혈관 및 심근에 미치는 영향을 살펴보고⁷⁾ 혈액응고기전에 미치는 영향을 관찰하기 위해 건강한 성인의 혈장에 SB-31과 백두옹의 성분중 pulsatilla saponin F(PSF)와 H(PSH)를 각각 가한 후 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하였다.

실험방법

SB-31의 약물동태 연구

실험재료

1) 혈액, 담즙 및 요 채취에 사용된 시약 및 기구

Urethane과 α-chloralose, glycyrrhizin 표준품은 Aldrich Chem. Co.로부터 구입하였다. 헤파린[5000 I.U./ml, (주)녹십자]과 주사용 증류수 및 주사용 생리식염수 [(주)중외제약] 등이 사용되었다. 담관 및 혈관에 삽입한 PE-10 및 PE-50 tube는 Dural사로부터 구입하였고 rabbit을 고정시키기 위한 기구는 직접 고안한

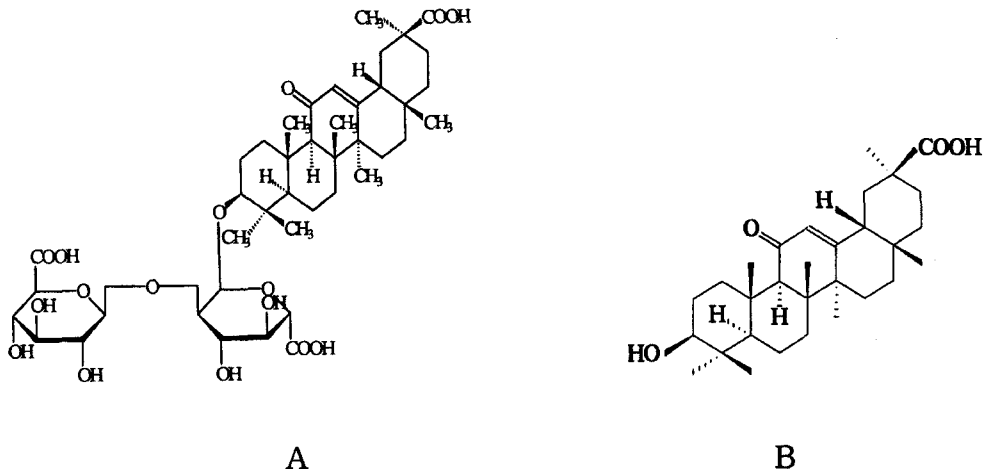


Fig. 1. Structures of glycyrrhizin(A) and glycyrrhetic acid(B).

것을 사용하였다.

2) 분석에 사용된 기기 및 시약

분석기기로는 Shimadzu 10A HPLC System을 이용하였으며 이는 CBM-10A Communication Bus Module, SPD-10A UV-VIS detector, CTO-10A column oven, LC-10A pump, SIL-10A auto injector로 구성되어 있다.

시약으로는 acetonitrile, methanol (HPLC grade, Merck®), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Duksan Chemical Co), H_3PO_4 (Showa Chemical Co), CH_3COOH (Showa Chemical Co.) 등이 사용되었다.

3) 투여 약물

SB-31 주사제 앰플은 한보제약으로부터 공급받아 사용하였다. Rat 고용량군에는 동결 건조된 1 앰플 (GZ 450 μg 함유)을 1 ml 주사용수에 녹인 후, 저용량군에는 동결 건조되지 않은 1/5 앰플 (GZ 90 μg 함유, 1 ml)을 각각 주사하였고, rabbit 고용량군에는 동결 건조된 3 앰플 (GZ 1350 μg 함유)을 2 ml 주사용수에, 저용량군에는 동결 건조된 1 앰플 (GZ 450 μg 함유)을 주사용수 1 ml에 녹인 후 각각 주사하였다. SB-31의 "원료약품 및 분량"에 의하면 1 앰플중에는 22.5 mg의 감초추출물을 포함하고 있는데 이 양은 GZ로서 환산하면 450 μg 에 해당되며 고용량군과 저용량군에 각각 투여된 SB-31내의 GZ 함유량은 이로부터 계산되었다.

4) 실험 동물

본 실험에 사용된 웅성 Sprague Dawley rat과 rabbit은 삼육 실험 동물농장에서 구입한 후 일정온도 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) 및 습도(55~60%)가 유지되고 명암 주기가 12시간 단위로 조절되는 충남대학교 약학대학 실험 동물실에 고형사료(삼양)와 식수를 무제한 공급하여 사육하였으며 rat과 rabbit은 체중이 각각 300 g과 2.5 kg에 도달했을 때 사용하였다.

Rat에 있어서의 체내동태실험

Urethane(800 mg/kg)과 α -chloralose(80 mg/kg)를 복강내 주사하여 마취시킨후 femoral artery에 헤파린 처리된 식염수로 채워진 의료용 PE-10 tube를 삽입하였고 tube를 노출시킨 상태로 봉합하였다. 꼬리 정맥을 통하여 SB-31을 주사한 후 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 및 360분에 각각 0.3 ml씩 채혈하였고 즉시 Eppendorff tube에 옮겨 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석시까지 -20°C 에 냉동보관하였다. 채혈된 양과 동량의 생리식염수를 femoral artery에 넣어 주었다. 복부 중장을 절개하여 PE-10 tube를 common bile

duct에 깊게 삽입하고 주사 후 0~1, 1~2, 2~4, 4~6, 6~9, 9~12, 12~15, 15~18시간에 각각 모아진 담즙의 부피를 측정하고 분석시까지 냉동 보관하였다. 손실된 체액을 보충하기 위해 2시간 간격으로 피하에 생리식염수 1 ml씩을 주사하였다.

하복부 중장을 절개하여 방광을 노출시킨 후 가능한 한 혈관이 적게 분포되어 있는 곳에 주사기를 넣어 채취하였다. 약물 투여 전 방광에 고여 있는 urine을 주사기를 넣어 빼어내었고 주사 후 2, 4, 6, 9, 12, 15 및 18시간에 방광에 고여있는 뇨를 뽑아내어 부피를 측정하고 분석시까지 냉동보관하였다.

Rabbit에 대한 체내동태실험

토끼를 고정대에 넣어 움직이지 못하게 한 후 marginal ear vein에 SB-31 고용량과 저용량을 각각 주사하였다. 헤파린으로 처리된 23G, 1 ml 주사기를 사용하여 다른 쪽 귀의 정맥에서 각 0.5 ml의 혈액을 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 및 600분에 채취하였다. 즉시 원심분리후 혈장을 분리하고 분석시까지 냉동 보관하였다.

혈액, 담즙 및 요종의 glycyrrhizin 및 glycyrrhetic acid 농도 분석

GZ 및 GA 표준품을 측정 후 계열 회석하여 표준용액을 제조하였다. Rat의 혈장과 담즙 및 요 각 90 μl 에 표준 용액 10 μl 를 가한 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 spiked sample로부터 검량선을 작성하였다. Rabbit의 혈장도 rat과 같은 방법으로 하였다. 채취한 체액 및 spiked sample 100 μl 에 acetonitrile을 동량섞고 5초간 vortexing한 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하였고 상정액을 autosampler용 vial에 옮겨 분석하였다.

HPLC 분석조건은 reversed-phase column(μ -Bondapak C_{18} 300 3.9 mm I.D., 10 μm , Waters Associates, MA, U.S.A.)을 사용하여 혈장 샘플을 분석하였는데 GZ 분석을 위한 이동상(mobile phase)은 pH 2.7 0.06 M NaH_2PO_4 buffer : methanol을 2:5의 비율로 제조하였으며, GA 분석에 쓰인 이동상은 methanol:H₂O:HAc=83:17:0.5의 혼합용매였다. 분석시 이동상의 유속(flow rate)은 1.0 ml/min, 검출파장(detection wavelength)은 245 nm였고 column의 온도는 35°C 로 조절하였으며 injection volume은 50 μl 로 하였다.⁸⁻¹⁰⁾

Pharmacokinetic parameters

Non-compartmental analysis를 위해 rat과 rabbit의 시간별 혈중농도로부터 trapezoidal rule에 의해 혈중

농도-시간 곡선하면적(AUC; area under the plasma concentration versus time curve)과 AUMC(area under the moment curve) 값을 계산한 후 AUMC를 AUC로 나누어 약물의 평균체류시간(MRT; mean residential time)을 구하였다. 각 혈중농도의 소실기로부터 최종 상소실속도상수(Kel)를 계산하여 이로부터 반감기($t_{1/2}$)를 계산하였다. 클리어런스(Cl)는 dose/AUC로부터, 정상상태의 분포용적(Vss)은 $\text{dose} \times \text{AUMC} / \text{AUC}^2$ 으로부터 각각 구하였다.

Compartmental analysis를 위해 "WinNonlin"을 이용하였다. 이로부터 α 와 A, β 와 B 및 K_{12} , K_{21} 등을 산출하였고 central compartment의 분포용적(Vc)은 $\text{dose} / (A+B)$ 로부터 계산하였다.

SB-31의 심혈관계에 대한 영향

Rat 적출심장에 대한 연구

1) 실험재료

① 시료 및 시약

마취에 사용한 sodium pentobarbital은 한림 제약으로부터, Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 제조에 사용된 시약은 Sigma(미국)와 덕산 약품으로부터 최고 순품을 구입하였다. 실험에 소요된 기타 유기 용매들은 특급 시약을 사용하였다.

② 사용기기

Langendorff Apparatus(H.S.E., Germany), Plugsys bridge amplifier(H.S.E., Germany), Isotec pressure transducer(H.S.E., Germany), Linearcorder mark 8 WK 3500(Graphtec, Japan), Rodent ventilator (Ugobasile 7025, Italy), Physiograph(H.S.E. WR 3310, Germany; Modular 8000, Modular Instruments Inc., USA) 등을 사용하였다.

2) 흰쥐 심장 적출 및 perfusion

흰쥐를 sodium pentobarbital(30 mg/kg i.p.)로 마취시킨 후 heparin(1000 I.U./kg i.v.)을 꼬리정맥에 투여하고 심장을 적출하였다. 즉, 기관에 cannula(PE240)를 삽입하고 rodent ventilator를 이용해 인공호흡시키며 *in situ* 상태에서 대동맥 cannula를 대동맥에 삽입한후 역행성 관류하에 심장을 적출해 Langendorff apparatus에 재빨리 매달고 심장에 붙어있는 불필요한 조직을 제거한 후 정압 관류(75 mmHg) 하에서 산소로 포화된 37°C의 생리액으로 관류하였다. 에탄올과 증류수 혼합액(1:1 v/v)으로 채운 고무 풍선(latex balloon)을 매달은 금속 cannula를 폐정맥을 통해 좌심실에 삽입시키고 풍선에 전달되는 좌심실압을 isovolu-

metric하게 측정하기 위해 pressure transducer에 연결하였다. 심장을 15분간 안정화되도록 한 후 LVEDP(left ventricular end diastolic pressure)를 5 mmHg로 주고 이 풍선 부피를 전 실험기간 동안 유지시켰다. 생리액은 modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(조성 $\langle \text{mM} \rangle$: 116 NaCl, 4.7 KCl, 1.1 MgSO₄, 1.17 KH₂PO₄, 24.9 NaHCO₃, 2.52 CaCl₂, 8.32 Glucose, 2.0 Pyruvate)를 사용하였으며 온도는 37°C를 유지시켜 주고 실험을 진행하는 동안 계속 95% O₂와 5% CO₂의 혼합 gas를 통해 주어 pH를 7.4로 하였다. 심장의 온도는 심장을 실험 전 기간에 걸쳐 37°C의 생리액에 담금으로서 일정하게 유지하였다.⁷⁾

3) 측정 parameters

심장 수축 기능과 심박동수(HR, heart rate) 및 관상 혈류(CF, coronary flow)를 측정하여 심장 기능 및 관상 혈관 기능을 평가하였다. 심장 수축 기능을 평가하는 parameter인 좌심실 발생압(LVDP; left ventricular developed pressure)은 좌심실 최대 수축기압(LVP; left ventricular peak systolic pressure)과 이완기말 좌심실압(LVEDP; left ventricular end diastolic pressure)의 차이로부터 산출하였고 이의 미분치인 dp/dt도 산출하였다.^{11,12)}

총 관상 혈류량은 심장을 담긴 chamber로부터 1분 동안 overflow되는 액의 양으로 측정하였으며 각 parameter의 vehicle에 대한 유의성은 t-test를 통해 검정하였다.

4) 검액의 조제 및 투여

생리액을 대조로 하였으며 SB-31 앰플은 생리액을 가해 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵배로 희석하여 각각 0.5 ml씩 bolus injection하였다. 위 두 검액들은 투여하기 전 37°C의 항온조에 담가 관류액의 온도와 동일하게 하였다.

혈액응고에 미치는 영향

1) 혈장 채취

12시간 이상 절식한 건강한 성인의 혈액을 21G바늘을 이용하여 채혈한 후 3.8% Na-citrate용액과 9:1의 비율로 섞고 1000 g에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다.

2) 기기 및 시약

PT와 APTT를 측정하기 위해 Automated Coagulation Laboratory(ACL)-100을 이용하였다. PSF와 PSH는 서울대학교 천연물연구실로부터 제공받았고 Na-citrate는 Showa chemical Co.에서, calcium throm-

boplastin, cephalin 및 calcium chloride는 Instrumentation laboratory사로부터 구입하였다.

3) 실험방법

① SB-31 및 PSF, PSH 검액제조

SB-31을 주사용수로 희석하여 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 및 10^{-4} 배 희석액을 제조하였다. Pursatilla saponin F와 H 일정량을 주사용수에 녹인 후 희석하여 1000, 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 용액을 각각 제조하였다.

② PT, APTT의 측정

혈액응고 측정장치의 chamber에 PT-fibrinogen과 APTT lyophilized silica 및 CaCl_2 용액을 넣고 rotor를

미리 설치하여 37°C 로 incubation시켜 놓았다. 혈장 450 μl 에 위에서 제조한 검액 50 μl 를 각각 가한후 sample rack에 넣고 측정하였으며 rack의 pool칸에는 50 μl 주사용수를 가한 blank 혈장을 넣어 대조혈장으로 사용하였다.

결 과

SB-31의 약물동태연구

HPLC 분석을 통한 혈장, 담즙 및 요중의 glycyrrhizin 및 glycyrrhetic acid 농도

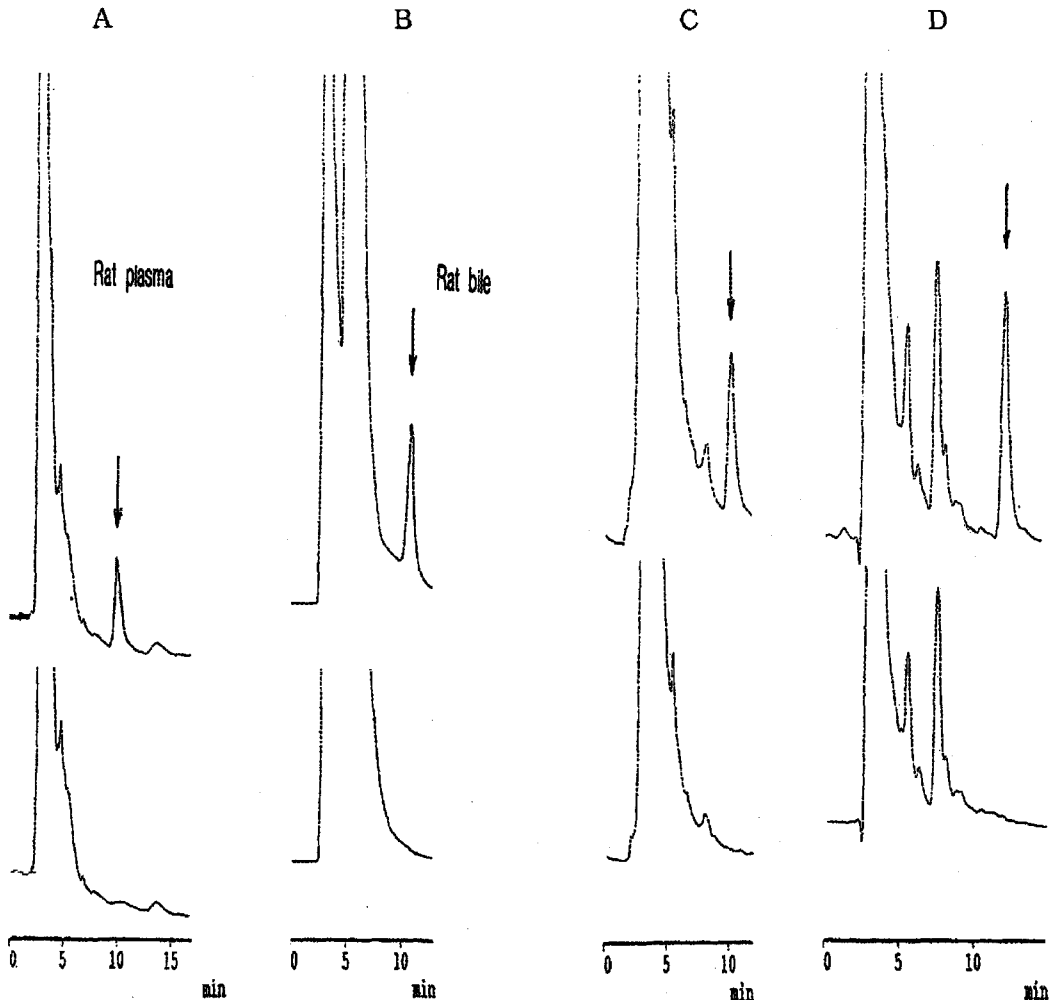


Fig. 2. Chromatograms of GZ in rat plasma and bile and GZ/GA in rabbit plasma [A: plasma sample of rat containing 3.5 $\mu\text{g/ml}$ of GZ, B: bile sample of rat containing 5.2 $\mu\text{g/ml}$ of GZ, C: plasma sample of rat containing 5.8 $\mu\text{g/ml}$ of GZ, D: spiked plasma of rabbit containing 2 $\mu\text{g/ml}$ of GA. The lower traces indicate blank samples].

기록지에 나타난 GZ peak의 면적으로부터 구한 rabbit과 rat의 혈장에서의 검량선은 $Y(\text{area})=7886.82 \times X(\text{conc.}) - 735.73(R=0.996)$ 이었고 담즙에서는 $Y(\text{area})=8481.06 \times X(\text{conc.}) - 76.20(R=0.997)$ 의 상관관계가 있었다. Retention time은 10.3분이었고 측정한계는 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 였다. GA 정량에 쓰인 검량선의 식은 $Y(\text{area})=32703.40 \times X(\text{conc.}) - 892.31(R=0.999)$ 이었고 retention time은 12분이었으며 측정한계는 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 였다. Rat의 혈장과 담즙내 GZ와 rabbit 혈장의 GZ 및 GA 분석시 chromatograms를 Fig. 2에 나타내었다.

Rat에 대한 glycyrrhizin의 체내동태

1) Glycyrrhizin의 혈중농도 변화

혈중 GZ의 시간별 농도변화를 Fig. 3에, 약물동태 parameter는 Table 1에 각각 나타내었다. 약물 주사후 30분까지는 혈중농도가 빠르게 감소하는 distribution phase를 나타내다가 그 이후에는 완만하게 감소(elimination phase)하는 형태를 나타내었다.

고용량군의 $AUC_{0 \rightarrow 6 \text{ hr}}$ 값은 $9.39 \pm 0.56 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$, MRT값은 $2.04 \pm 0.15 \text{ hr}$ 였으며 클리어런스(CI)는 $48.57 \pm 2.77 \text{ ml/h}$ 였다. “WinNonlin”에 의해 fitting된 그래프(2-compartment micro model, no lag time, I.V. bolus injection, weighting factor= $1/y^2$)로부터 산출된 약물동태 parameter를 보면 A, B, α , β 값은 각각 $8.49 \pm 1.15 \mu\text{g/ml}$, $2.99 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$, $5.8 \pm 1.0 \text{ h}^{-1}$, $0.30 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ 로 계산되었다. 한편 K_{12} , K_{21} 은 각각

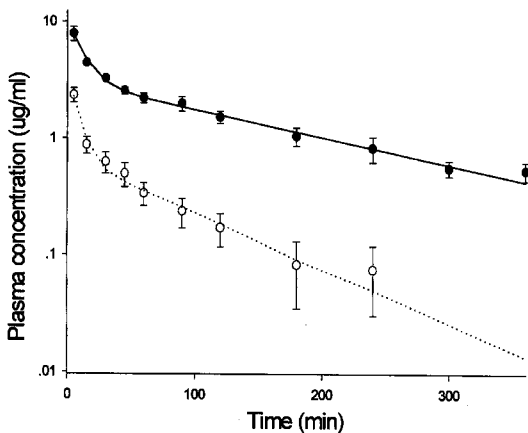


Fig. 3. Time course of plasma glycyrrhizin concentrations after intravenous administration of 1 ampul/rat(●, 450 μg as glycyrrhizin) or 1/5 ampul/rat(○, 90 μg as glycyrrhizin) of SB-31 in rats (mean S.E.M., n=5). The solid and dotted lines represent the fitted results to I.V. two-compartment model at each dose.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of glycyrrhizin after intravenous injection of high dose(1 ampul/rat, 450 μg as glycyrrhizin) or low dose (1/5 ampul/rat, 90 μg as glycyrrhizin) of SB-31 in rats (mean \pm S.E.M., n=5)

Pharmacokinetic parameter	High dose	Low dose
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$)	9.39 ± 0.56	1.44 ± 0.18
MRT (hr)	2.04 ± 0.15	1.00 ± 0.15
Cl (ml/hr)	48.57 ± 2.77	67.42 ± 9.85
$t_{1/2}$	2.26 ± 0.29	1.47 ± 0.34
Vc (ml)	39.20 ± 10.14	30.51 ± 6.35
Vss (ml)	98.06 ± 6.07	65.46 ± 11.19
K_{12} (hr^{-1})	3.24 ± 0.48	4.56 ± 0.78
K_{21} (hr^{-1})	1.86 ± 0.36	2.04 ± 0.9
A ($\mu\text{g/ml}$)	8.49 ± 1.15	2.3 ± 0.62
B ($\mu\text{g/ml}$)	2.99 ± 0.16	0.75 ± 0.13
α (hr^{-1})	5.76 ± 1.02	8.7 ± 3.6
β (hr^{-1})	0.3 ± 0.012	0.66 ± 0.06

$3.24 \pm 0.48 \text{ h}^{-1}$ 및 $1.86 \pm 0.36 \text{ h}^{-1}$ 였고, central compartment의 분포용적(Vc)과 정상상태의 분포용적(Vss)은 각각 $39.20 \pm 10.14 \text{ ml}$, $98.06 \pm 6.07 \text{ ml}$ 로 산출되었다.

저용량군에서는 $AUC_{0 \rightarrow 4 \text{ hr}}$ 값이 $1.44 \pm 0.18 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ 였고 이로부터 구한 MRT값은 $1.00 \pm 0.15 \text{ hr}$ 였으며 클리어런스(CI)는 $67.42 \pm 9.85 \text{ ml/h}$ 였다. “WinNonlin”에 의해 산출된 A, B, α , β 값은 각각 $2.3 \pm 0.62 \mu\text{g/ml}$, $0.75 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$, $8.7 \pm 3.6 \text{ h}^{-1}$, $0.66 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ 로 계산되었다. 한편 K_{12} , K_{21} 은 각각 $4.56 \pm 0.78 \text{ h}^{-1}$, $2.04 \pm 0.9 \text{ h}^{-1}$ 였으며 Vc와 Vss는 각각 $30.51 \pm 6.35 \text{ ml}$ 와 $65.46 \pm 11.19 \text{ ml}$ 였다.

2) 담즙을 통한 glycyrrhizin의 배설

약물 주사 후 0~1, 1~2, 2~4, 4~6, 6~9, 9~12, 12~15, 15~18시간에 각각 모아진 담즙의 농도를 분석한 후 미리 측정해 놓은 부피로부터 담즙을 통해 배설된 GZ의 양(μg)을 계산하였다. 담즙을 모은 시간의 중간점(0.5, 1.5, 3, 5, 7.5, 10.5, 13.5, 17.5시간)을 x축으로, 시간별로 누적시킨 GZ의 양을 y축으로 하여 Fig. 4에 나타내었다. 고용량군(GZ로서 450 μg)에서는 투여량의 71.18%, 저용량군(GZ로서 90 μg)에서는 투여량의 92.22%에 해당하는 GZ가 담즙으로 배설되었다.

3) 요를 통한 glycyrrhizin의 배설

Rat을 고용량군과 저용량군으로 나누어 약물을 각각 꼬리정맥으로 주사한 후 2, 4, 6, 9, 12, 15 및 18시간에 그 시간까지 모아진 urine을 방광으로부터 직접 주사기로 채취하였다. 18시간까지의 뇨를 분석한 결과 본 실험방법의 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 의 감도로는 고용량군과

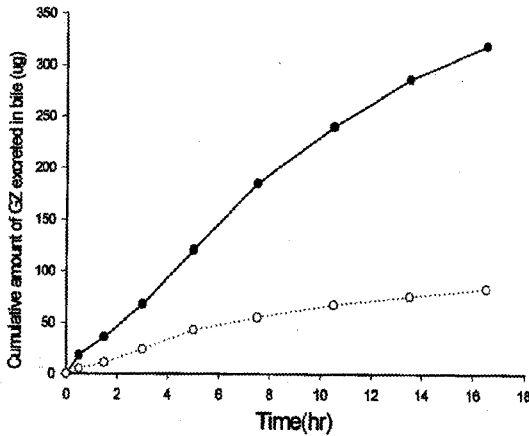


Fig. 4. Biliary excretion of glycyrrhizin after intravenous administration in rats. After intravenous administration of high [1 ampul/rat(●), 450 μg as glycyrrhizin] and low [1/5 ampul/rat(○), 90 μg as glycyrrhizin] dose of SB-31, the recoveries of glycyrrhizin excreted in bile within 18 hour were 71.17% (320 μg) and 92.22% (83 μg), respectively.

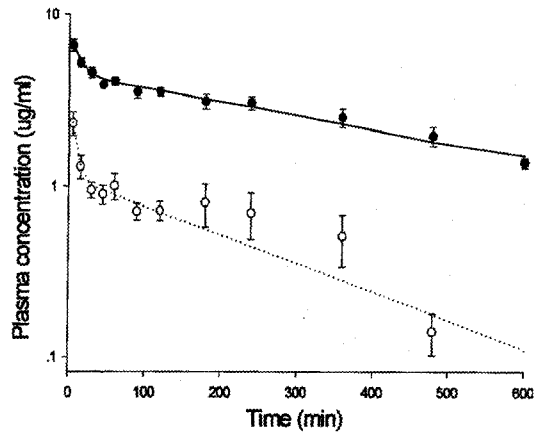


Fig. 5. Time course of plasma glycyrrhizin concentrations after intravenous administration of 3 ampul/rabbit(●, 1350 μg as glycyrrhizin) or 1 ampul/rabbit(○, 450 μg as glycyrrhizin) of SB-31 in rabbits (mean S.E.M, n=5). The solid and dotted lines represent the fitted results to I.V. two-compartment model at each dose.

저용량군 모두에서 GZ가 검출되지 않았다.

Rabbit에 대한 glycyrrhizin의 체내동태

Rabbit을 고용량군과 저용량군으로 나누어 SB-31을 정맥주사한 후 GZ 및 GA의 혈중농도를 측정하여 얻은 시간별 농도변화를 Fig. 5에 나타내었으며 약물동태 parameter는 Table 2에 표시하였다.

Rat의 경우와 비슷하게 약물 주사 후 30분까지는 빠른 소실을 보인 후 완만하게 감소되는 양상을 나타내었다.

고용량군에서의 AUC_{0-10hr} 값은 $27.7 \pm 3.49 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$, MRT값은 $4.81 \pm 0.09 \text{ hr}$ 였다. 클리어런스(CI)는 $50.93 \pm 5.93 \text{ ml}/\text{h}$ 였다. “WinNonlin”에 의해 fitting된 그래프(2-compartment micro model, no lag time, I.V. bolus injection, weighting factor= $1/y^2$)로부터 산출된 A, B, α , β 값은 각각 $7.66 \pm 0.82 \mu\text{g}/\text{ml}$, $4.42 \pm 0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$, $4.68 \pm 0.17 \text{ h}^{-1}$, $0.12 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ 로 계산되었다. 한편 K_{12} , K_{21} 은 각각 $18.42 \pm 0.92 \text{ h}^{-1}$, $2.76 \pm 0.84 \text{ h}^{-1}$ 로 산출되었고 Vc와 Vss는 각각 $111.75 \pm 18.80 \text{ ml}$, $235.24 \pm 30.72 \text{ ml}$ 이었다.

저용량군에서는 AUC_{0-8hr} 값이 $4.46 \pm 0.34 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$, MRT값은 $3.21 \pm 0.11 \text{ hr}$ 였다. 클리어런스(CI)는 $103.82 \pm 9.35 \text{ ml}/\text{h}$ 였다. “WinNonlin”에 의해 fitting된 그래프로부터 산출된 약물동태 parameter를 보면 A, B, α , β 값은 각각 $3.25 \pm 1.09 \mu\text{g}/\text{ml}$, $1.02 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$,

$9.6 \pm 4.2 \text{ h}^{-1}$, $0.24 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ 로 계산되었다. 한편 K_{12} , K_{21} 은 각각 $6.3 \pm 3.42 \text{ h}^{-1}$, $2.94 \pm 0.66 \text{ h}^{-1}$ 로 산출되었고 Vc와 Vss는 각각 $105.39 \pm 36.87 \text{ ml}$ 와 $341.32 \pm 28.58 \text{ ml}$ 였다.

Rabbit의 혈장내에서 GA는 측정한계 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로는 검출되지 않았다.

SB-31의 심혈관계에 대한 영향

Table 2. Pharmacokinetic parameters of glycyrrhizin after intravenous injection of high dose(3 ampul/rabbit, 1350 μg as glycyrrhizin) or low dose(1 ampul/rabbit, 450 μg as glycyrrhizin) of SB-31 in rabbits (mean ± S.E.M., n=5)

Parameter	High dose (3 amp./rabbit)	Low dose (1 amp./rabbit)
AUC (μg·hr/ml)	27.7±3.49	4.46±0.34
MRT (hr)	4.81±0.09	3.21±0.11
t _{1/2} (hr)	5.30±0.36	2.82±0.40
Vc (ml)	111.75±18.80	105.39±36.87
Vss (ml)	235.24±30.72	341.32±28.58
CI (ml/hr)	50.93±5.93	103.82±9.35
K ₁₂ (hr ⁻¹)	18.42±0.92	6.3±3.42
K ₂₁ (hr ⁻¹)	2.76±0.84	2.94±0.66
A (μg/ml)	7.66±0.82	3.25±1.09
B (μg/ml)	4.42±0.15	1.02±0.12
α (hr ⁻¹)	4.68±0.17	9.6±4.2
β (hr ⁻¹)	0.12±0.01	0.24±0.01

Rat 적출심장에 대한 연구

적출 심장에 대해 SB-31을 일정 농도로 희석 후 농도별로 주입하여 좌심실 발생압(LVDP), $(-dp/dt)/(+dp/dt)$, 심박동수(HR), 관상 동맥 혈류(CF)에 대한 효과를 관찰후 결과를 비교하였다.

LVDP 변화를 보면 vehicle 투여시 투여 이전의 83.0 mmHg에서 6.6% 증가한 88.5 mmHg를 나타내었다. 10^{-3} 배 희석 농도까지는 7% 정도의 증가된 LVDP를 나타내어 대조액과 차이가 없었으나 10^{-2} 배 희석액 투여시는 93.0 mmHg로 양성변력작용(positive inotropic effect)를 나타내며 12.0% 증가하였으나 대조군에 비해 유의성 있는 차이($P < 0.05$)는 없었다. 심근의 이완 상태를 나타내는 $(-dp/dt)/(+dp/dt)$ 의 변화율을 보면 10^{-3} 배 희석 농도까지는 0.71~0.72로 vehicle이 8% 감소된 것과 비교하면 변화가 없었으나 10^{-2} 배 희석액에서는 0.68로 대조군에 비해 11.7% 감소하였으나 유의성 있는 차이($P < 0.05$)는 아니었다. 각 농도에서의 LVDP와 $(-dp/dt)/(+dp/dt)$ 의 변화는 Fig. 6과 7에 각각 나타내었다. 심박동수(HR)는 약물 투여전의 266.3 회/min에서 vehicle이나 약물 투여시 모두 4~6회 정도 일시적으로 증가했다가 원상태로 회복되었는데 농도에 따른 영향은 없었고 vehicle과 비교했을 때에도 유의성 있는 차이는 없었다. SB-31 희석액 투여시의 효과는 10초에서 15초 정도 나타난 후 바로 원상태로 회복되어 심혈류량(CF)의 변화는 관찰할 수 없었다. vehicle 투여후 낮은 농도부터 차례로 2분간격을 두고 bolus injection 하였는데 약물 투여 전의 심혈류량은

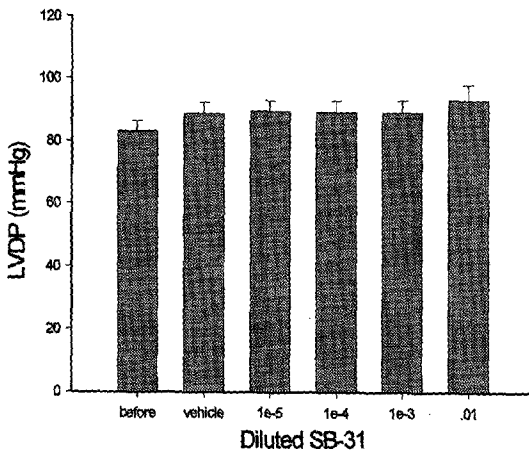


Fig. 6. Change of LVDP followed by bolus injection of SB-31 in the isolated perfused rat heart (mean \pm S.E.M, n=5).

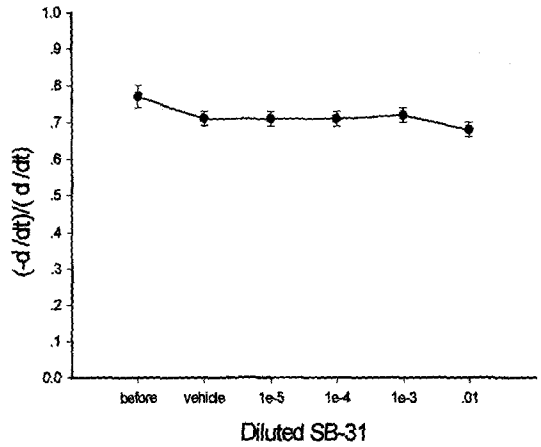


Fig. 7. The ratio of $-dp/dt$ and $+dp/dt$ followed by bolus injection of SB-31 in the isolated perfused rat heart (mean \pm S.E.M, n=5).

평균 17~18 ml/min를 나타냈으나 차츰 15~16 ml/min로 감소하였으나 약물농도에 따른 효과를 측정할 수는 없었다.

혈액응고에 미치는 영향

대조혈장의 PT와 APTT는 각각 13.3 ± 0.2 초와 39.2 ± 1.0 초를 나타내었는데 PSF와 PSH가 각각 1~1000 μ g/ml 가해진 혈장의 PT와 APTT는 모두 대조혈장에 비해 1% 미만의 미미한 변화를 보였고 농도에 따른 차이도 없었으며 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 3).

Table 4에 나타낸 것과 같이 대조혈장의 PT는 12.3 ± 0.6 초이었고 SB-31희석액이 가해진 혈장은 농도와 관계없이 2% 정도의 증가를 나타내었으나 유의성 있는 차이는 아니었다. 대조혈장의 APTT는 33.3 ± 1.6 초이었는데 가해진 SB-31의 농도에 따라 증가되었다. SB-31이 10^{-5} 배로 희석된 혈장에서는 5.9%, 10^{-4} 와

Table 3. Effect of Pursatilla saponin F (PSF) and H (PSH) on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) in human plasma (mean \pm S.E.M.)

Concentration	Prusatilla saponin F		Prusatilla saponin H	
	PT (sec.)	APTT (sec.)	PT (sec.)	APTT (sec.)
Reference	13.3 ± 0.2	39.2 ± 1.0	13.3 ± 0.2	39.2 ± 1.0
0.1 μ g/ml	13.4 ± 0.2	39.9 ± 1.3	13.2 ± 0.3	39.7 ± 1.2
1 μ g/ml	13.2 ± 0.3	39.9 ± 1.1	13.1 ± 0.3	39.8 ± 1.2
10 μ g/ml	13.3 ± 0.2	39.8 ± 1.0	13.1 ± 0.4	39.5 ± 1.2
100 μ g/ml	13.4 ± 0.3	39.7 ± 1.3	13.4 ± 0.4	39.5 ± 1.3

Table 4. Effect of SB-31 on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) in human plasma

Diluted SB-31	PT (sec)	APTT (sec)	Increasing % of APTT
Reference	12.3±0.6	33.3±1.6	
10 ⁻⁵	12.7±0.6	35.3±1.1	5.9%
10 ⁻⁴	12.6±0.7	35.8±1.4	6.9%
10 ⁻³	12.7±0.6	36.1±1.39	7.7%
10 ⁻²	12.6±0.5	37.4±71.2	11.5%

10⁻³배로 희석된 혈장에서는 각각 6.9, 7.7% 증가하였으며 10⁻²배로 희석된 혈장에서는 11.5%의 증가를 나타내었으나 대조혈장에 비해 모든 농도에서 유의성 있는 차이는 없었다.

고 찰

SB-31의 약물동태 연구

Rat에 대한 체내동태

혈중 GZ는 투여후 분포되는 시기와 분포 후 소실되는 시기가 뚜렷이 구별되는 two-compartment의 배설되는 양상을 나타내었다. “WinNonlin”으로 fitting한 결과 실측된 혈중농도와 예측된 값과의 상관계수는 고용량과 저용량에서 각각 0.9997과 0.9987이었으며 model의 적정성을 나타내어 주는 AIC(Akaike index of criterion) 평균값은 각각 -15.65와 -29.05로 나타났다.

고용량군과 저용량군에서의 배설반감기(Kel)는 각각 2.26±0.29 hr와 1.47±0.34 hr로 고용량군의 배설반감기가 유의성 있게 길어졌으며, AUC의 비교에서 고용량군은 9.39±0.56 µg·hr/ml, 저용량군은 1.44±0.18 µg·hr/ml로 실제 투여된 약물의 양은 5배였으나 AUC값은 6.5배 정도로 높게 나타났다.

GZ는 대부분 담즙으로 배설되고 뇨로는 배설되지 않았다. 다른 연구⁹⁾에서는 40~120 mg/kg을 투여했을 때 1% 정도가 뇨로 배설되었다는 보고가 있는데 0.09 mg과 0.45 mg의 적은 양이 투여된 이번 연구에서는 뇨로의 배설을 관찰할 수 없었다.

GZ는 경구투여시 장내의 세균에 의해 분해되어 주 대사체인 GA로 전환, 흡수되어 혈중 및 담즙에서 관찰되는데 이번 연구에서와 같은 정맥 투여시 GA는 매우 낮은 혈중농도를 나타낼 것으로 예상되었으며 역시 본 시험에서의 0.1 µg/ml 측정 감도로는 검출되지 않았다. 또한 biliary fistular model의 경우에는 담

즙이 장간순환을 하지 못하고 체외로 빠져나가는 상황으로 GA의 혈중농도는 더 낮아졌던 것으로 보였다.

Rabbit에 대한 체내동태

혈중 GZ는 rat의 경우와 비슷하게 투여후 30분까지 조직으로의 빠른 분포를 나타내었고 그 후에는 서서히 배설되는 양상을 나타내었다. “WinNonlin”으로 fitting한 결과 실측된 혈중농도와 예측된 값과의 상관계수는 고용량과 저용량에서 각각 0.996과 0.997이었으며 AIC값은 각각 -11.51과 -39.84이었다.

고용량군과 저용량군에서의 배설반감기(Kel)는 각각 5.30±0.36 hr와 2.82±0.40 hr로 고용량군의 배설반감기가 저용량군에 비해 약 1.9배로 유의성 있게 길어졌으며, AUC의 비교에서 고용량군은 27.7±3.49 µg·hr/ml, 저용량군은 4.46±0.34 µg·hr/ml로 실제 투여된 약물의 양은 3배였으나 AUC값은 6.2배 정도로 높게 나타났다. Biliary fistular model의 rat과는 달리 담즙이 체외로 배설되지 않고 장간순환을 하는 rabbit의 경우 GZ가 GA로 전환된 후 재흡수될 수 있는데¹⁰⁾ 본 연구에서는 검출되지 않았다. 이는 비록 대사된 후 재흡수되었더라도 자외선 검출기로 측정될 수 없는 낮은 농도였기 때문으로 보여졌다.

SB-31의 심혈관계에 대한 영향

암세포 뿐 아니라 정상세포에도 독성을 나타내는 항암제의 사용은 여러 가지 가능한 부작용을 고려해야 한다. 특히 정맥주사용으로 사용되는 제제의 경우 항암제가 target site에 도달되어 효과를 나타내기 이전에 우선적으로 심장순환계를 거치게 되는데 이 과정에서 혈전을 유발하거나 혈액을 응고시키는 등의 혈액독성이나 심장에 부담을 주는 등의 부작용을 나타낼 수 있다. 특히 생약추출물 제제는 일반적인 화학 약물의 주사제에 비해 용해도가 떨어져 침전이나 현탁이 되기 쉬우므로 심혈관계에 대한 독성의 여부는 매우 중요한 의미를 가질 수 있을 것이다. 심장에 대한 직접적인 작용을 관찰하기 위해 rat의 심장을 적출하여 SB-31을 일정 농도로 희석하여 투여한 결과 생리액 투여시와 비교해서 별다른 차이를 보이지 않았다. 100배 희석액까지는 심근수축력(LVDP)과 심근의 이완상태(-dp/dt와 +dp/dt의 비율) 모두 대조액과 비교했을 때 차이가 없었다. 100배 희석액에서는 심근수축력이 증가되는 양성변력작용을 나타내었고 심근의 휴식율이 다소 떨어졌으나 고농도인 점과 대조액 투여시의 변화를 비교해 본다면 심장에 대한 부담

은 매우 적은 것으로 보였다. 10~15초 정도 짧은 기간 효과를 나타낸후 바로 wash out되었으며 심박동수와 심혈류량에도 영향을 나타내지 않았다.

PSF와 PSH는 모두 혈액응고에 영향을 주지 않았다. 또 SB-31 희석액은 PT에는 영향이 없었으나 APTT는 증가시켰다. 물론 고농도에서 6~12% 정도의 적은 증가로 유의한 약효를 기대할 수는 없으며 생약 추출물 주사제에서 우려되는 혈액독성은 나타나지 않았다.

결 론

백두옹과 인삼 및 감초 등을 주성분으로 하는 항암제 SB-31을 rat과 rabbit에 정맥 주사한 후 glycyrrhizin을 지표로 하여 분포 및 배설양상을 연구하였다. Rat 고용량군에는 SB-31 1 앰플(GZ로서 450 µg)을, 저용량군에는 1/5 앰플(GZ로서 90 µg)을 각각 주사한 후 혈액과 담즙 및 뇨를 채취하였다. Rabbit의 경우 고용량군에는 3 앰플 (GZ로서 1350 µg)을, 저용량군에는 1 앰플(GZ로서 450 µg)을 각각 투여한 후 채혈하였고 각 시간별로 모아진 혈액, 담즙 및 뇨중 GZ와 그 대사체인 glycyrrhizin의 농도는 HPLC를 통해 분석되었다.

심혈관계에 대한 영향을 관찰하기 위해 rat의 적출 심장을 이용하여 심장에 대한 직접적인 효과를 측정하였고 혈액응고측정기를 사용하여 SB-31 및 백두옹의 성분인 Pursatilla saponin F와 H에 의한 PT와 APTT의 변화를 실험하였다.

1. Rat 고용량군과 저용량군에서의 주요 약물동태 파라미터를 보면, 반감기($t_{1/2}$)는 각각 2.26 ± 0.29 h, 1.47 ± 0.34 h였으며 분포용적(V_{ss})은 98.06 ± 6.07 ml와 65.46 ± 11.19 ml였고, 청소율(CI)은 48.57 ± 2.77 ml/h와 67.42 ± 9.85 ml/h였으며 두 군에서 투여량의 71.18%와 92.22%가 각각 담즙으로 배설되었으며 뇨중 배설은 검출되지 않았다.

2. Rabbit 고용량군과 저용량군의 주요 약물동태 파라미터를 보면, 반감기($t_{1/2}$)는 각각 5.30 ± 0.36 h, 2.82 ± 0.40 h였으며 분포용적(V_{ss})은 235.24 ± 30.72 ml와 341.32 ± 28.58 ml였고, 청소율(CI)은 50.93 ± 5.93 ml/h와 103.82 ± 9.35 ml/h였다.

3. Rat의 혈액, 담즙 및 뇨와 rabbit의 혈액 중 glycyrrhetic acid는 검출되지 않았다.

4. Rat의 적출 심장에 대한 약효 실험에서 SB-31 10⁻³배 이하의 농도에서는 LVDP와 (- dp/dt)/(+dp/dt)

의 변화가 없었고, 10⁻²배 투여시 심근수축력이 12.0% 증가하는 양성 변력 작용(positive inotropic effect)이 관찰되었으며 11.7% 심근의 휴식율이 감소되는 효과를 나타냈으나 대조액 투여시에 비해 유의성 있는 차이는 아니었다($P > 0.05$). 심박동수는 약물 투여시 일시적으로 4~7회 증가하였으나 대조액 투여시와 유의한 차이가 없었고 심혈류량에도 변화가 없어 심장에 직접적인 독성은 관찰되지 않았다.

5. PSF와 PSH는 PT와 APTT에 영향이 없었고 SB-31은 PT에는 영향이 없었으나 APTT를 10⁻⁵~10⁻³배 희석액 투여시에는 5.9~7.7%, 10⁻²배 투여시에는 11.5% 증가시켰다.

감사의 말씀

본 연구에 사용된 PSF와 PSH는 서울대학교 천연물 연구소 강삼식 교수로부터 제공받았고 한보제약의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. 김상용 외. 각종 암세포주에 대한 SB-31의 항암효과, 대한암학회지 1994; 26(6): 959-963.
2. Martin ML, et al. Pharmacologic effects of lactones isolated from Pulsatilla alpina subsp. apifolia, Ethnopharmacol. 1988; 24(2-3): 185-191.
3. Bringmann G, et al. Betulinic acid: isolation from Triphyophyllum peltatum and Ancistrocladus heyneanus, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester, Planta Med. 1997; 63(3): 255-257.
4. Ekabo OA, et al. Antifungal and molluscicidal saponins from Serjania salzmanniana, J Nat Prod 1996; 59(4): 431-435.
5. Kang SS. Saponins from the roots of Pursatilla koreana. Arch Pharm Res 1989; 12(1): 42-47.
6. Wang Z, et al. Mechanism of gastrointestinal absorption of glycyrrhizin in rats, Biol Pharm Bull 1994; 17(10): 1399-1403.
7. Grover GJ, et al. Pharmacological profile of cromakalim in the treatment of myocardial ischemia in isolated rat heart and anesthetized dogs. J Cardiovasc Pharmacol 1990; 16: 853-870.
8. Tsai TH, et al. Determination of glycyrrhizin in rabbit plasma by HPLC with photodiode-array ultraviolet detection and its pharmacokinetics application, J Chromatogr 1992; 576(1): 170-173.
9. Raggi MA, et al. HPLC determination of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in biological fluids, after licorice extract administration to humans and rats, Boll Chim Farm 1994; 133(11): 704-708.

10. Xin YZ, et al. Determination of glycyrrhizin and its metabolites glycyrrhetic acid in rabbit plasma by HPLC after oral administration of licorizin, J Chromatogr 1989; 495: 343-348.
11. 권광일 외. Urokinase의 적출심장의 심근허혈에 대한 보호작용과 *in vitro* 및 *ex vivo* 항혈전작용 실험. Kor J Clin Pharm 1992; 2(1): 1-9.
12. 권광일 외. Ginkgolide B 및 ginkgoflavonoids의 *in vitro*와 *ex vivo* 및 임상에서의 항혈전 작용. 약학회지 1995; 39(3): 337-345.