

Bromosulphothalein의 체내동태 평가에 미치는 분석법의 영향: HPLC 법과 UV 흡광광도법의 비교

오주희 · 차유경 · 이영주*

경희대학교 약학대학

(2008년 11월 21일 접수 · 2008년 12월 1일 수정 · 2008년 12월 9일 승인)

Effect of Analytical Method on the Pharmacokinetic Evaluation of Bromosulphothalein: Comparison of HPLC and UV Spectroscopy Method

Ju-Hee Oh, You-Kyoung Cha and Young-Joo Lee*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Hoegi-dong Dongdaemun-gu, Seoul, 130-701, Korea

(Received November 21, 2008 · Revised December 1, 2008 · Accepted December 9, 2008)

ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate the difference of analytical methods for the pharmacokinetic study of bromosulphothalein (BSP), an indicator of hepatobiliary function. The plasma and bile concentrations of BSP after intravenous administration were measured according to custom UV spectroscopy and HPLC, respectively. Plasma concentration of BSP measured by UV spectroscopy was similar to that measured by HPLC. There was no significant difference in the distribution volume, total body clearance, area under the curve and mean residence time of BSP between different analytical method groups. However, bile concentration of BSP measured by UV spectroscopy was overestimated compared with concentration measured by HPLC method. Biliary clearance of BSP obtained from UV spectroscopy method was almost 3 times higher than that obtained from HPLC method. Thus, a feasibility of UV spectroscopy method for high throughput pharmacokinetic evaluation of BSP was limited to the study based on the plasma concentration of BSP, not bile concentration.

Key words – Bromosulphothalein, UV spectroscopy, HPLC, Biliary clearance

Bromosulphothalein(BSP)는 유기음이온계 색소로서 간기능 진단 물질로 오랜 기간 동안 임상에서 사용되어 왔으며, 약물동태학 연구 분야에서도 담즙 배설의 모델 화합물로서 널리 사용되어 왔다.^{1,2)} 특히 BSP의 경우 약물의 담즙 배설에 중요한 역할을 하는 Multidrug resistance-associated protein 2(Mrp2)의 대표적 기질로 Mrp2를 매개로 한 다양한 형태의 *in vivo* 약물동태 실험에 사용되어 왔다.³⁻⁵⁾ 특히 최근에는 BSP의 담즙 배설을 활용하면 P-glycoprotein과 CYP3A에 대한 저해 및 유도 효과를 *in vivo*에서 고효율로 스크리닝 할 수 있다는 주장이 제기되기도 한 바 있다.⁶⁾ 이러한 *in vivo* 모델 물질로서의 BSP의 활용은 비교적 간단한 혈중 BSP의 정량 가능성에 힘입은 바 크다. 그간 생물학적 시료 중 BSP의 농도 측정은 NaOH를 이용하여 알칼리화한 후 일어나는 발색반응을 578 nm에서의 흡광도를 측정하

여 농도를 UV흡광광도법(UV 법)에 의해 정량하는 방법이 널리 사용되어 왔다.⁷⁾

일반적으로 UV를 활용한 정량법의 경우, 그 방법론의 간단함에도 불구하고 대사체와 모약물의 분리가 어렵다는 단점이 있다. BSP의 경우에도 적어도 6개의 대사체가 보고되어 있으며⁸⁾ 상당 부분의 대사체가 담즙으로 이행된다고 보고되어 있음에도⁹⁾ 아직까지 생체시료에서의 BSP 농도 분석시, 특히 혈중농도 분석시, UV 법에 의하여 얼마나 효과적으로 대사체와 모약물이 분리되는 지에 대한 연구는 미진하다. 특히 약물동태학적 평가가 이들 분석법의 차이에 의해 영향을 받을지의 여부에 대한 연구 결과는 아직 부재하다.

본 연구의 목적은 BSP를 흰쥐에게 투여한 후 얻어진 혈액 및 담즙 시료에서 BSP 농도 분석시, UV 법의 정확성을 HPLC법을 표준방법으로 사용하여 비교 분석함으로써 현행 UV 법에 의한 고효율 BSP 분석의 타당성을 검증함과 동시에 분석법의 차이가 BSP의 생체시료 중의 분석 및 약물동태 평가에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)961-9256, E-mail : yj_lee@khu.ac.kr

실험 방법

시료 및 동물

BSP는 Fluka(St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐(270~350 g)는 오리엔트바이오(Seoul, Korea)에서 구입하여, 25°C 온도, 12시간 주기의 명암 조건에서 사육하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

In vivo 약물동태학 연구

흰쥐의 대퇴동맥 및 정맥에 SP45 폴리에틸렌 튜브(Natsme, Japan)를 삽관하여 약물 투여와 혈액 채취에 사용하였다. 담즙은 담관에 연결된 SP10 폴리에틸렌 튜브(Natsme, Japan)를 이용하여 경시적으로 채취하였다.

BSP는 20 mg/kg의 용량으로 대퇴정맥을 통해 투여되었으며, 투여 후 각 1, 3, 5, 7 및 10분에 300 µL의 혈액을 대퇴동맥을 통해 경시적으로 채취하였다. 담즙은 약물투여 전 10분부터 약물투여 후 50분까지 매 10분 간격으로 채취하였다.

혈액 시료는 탁상형 원심분리기를 이용하여 12000 rpm으로 2분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 HPLC 분석에 사용할 시료는 두 배 량의 아세트오니트릴을 사용하여 제단백 한 후 분석시까지 영하 80°C에서 보존하였다.¹⁰⁾ 또한 HPLC 분석에 이용할 담즙의 경우에도 두 배 량의 아세트오니트릴을 사용하여 제단백 한 후 분석시까지 영하 80°C에서 보존하였다. UV 흡광광도법에 의해 분석할 시료는 혈장 및 담즙 상태로 분석시까지 영하 80°C에서 냉동보존하였다.

약물분석조건

UV 법에 따른 BSP의 분석은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 시료를 1 N NaOH를 이용하여 알칼리화 한 후 일어나는 발색을 578 nm에서 OPTIZEN 2120 UV(Mecasys, Korea)를 이용하여 측정하였다.⁷⁾ HPLC법에 따른 분석은 Itagaki 등이 보고한 방법에 따라 시행하였다.¹⁰⁾ HPLC 시스템은 Hitachi L-7110 펌프, L-7250 자동시료주입기 및 Hitachi L-7420 UV 검출기로 구성되었으며, 칼럼은 YMC-Pack Pro C18 RS-303 column (250×4.6 mm)을 사용하였다. 이동상은 아세트오니트릴과 100 mM pH 7.4 인산완충용액을 4:6의 부피비로 혼합한 것을 사용하였다. 검출과장은 279 nm를 사용하였다.

약물동태학적 결과 해석

곡선하면적(AUC)은 사다리꼴공식을 이용하여 구하였으며,

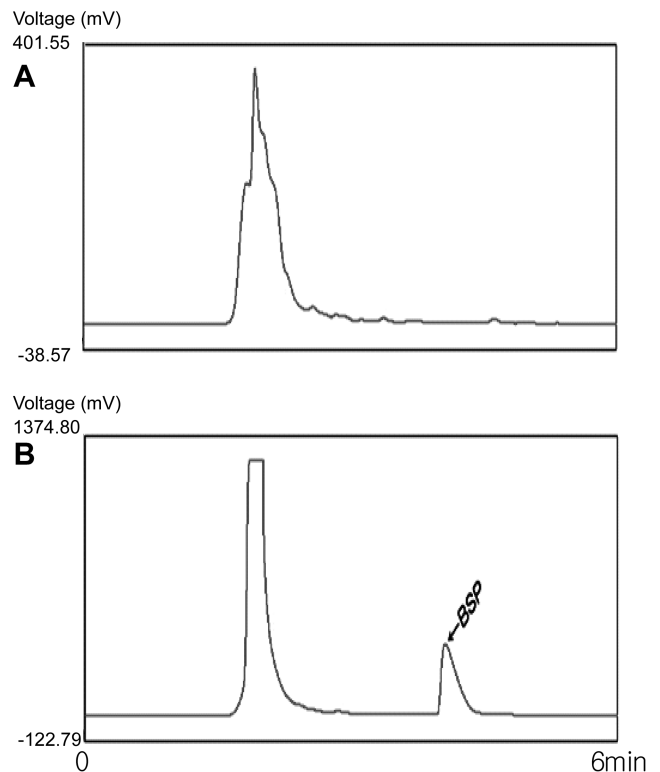


Figure 1— HPLC Chromatogram of A) blank Bile and B) bile sample at 10~20 min after administration of BSP.

전신 및 담즙 클리어런스는 각각 투여 용량 및 담즙 배설 총량을 AUC로 나누어 구했다. 평균체류시간(MRT) 및 분포 용적은 모델비의존적 방식에 따라 구하였다.¹¹⁾ 통계적 해석은 paired t-test를 유의수준 0.05 기준에서 행하였다. 모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

HPLC법과 UV 법에 의해 얻어진 BSP 농도의 상관관계

HPLC법에 따른 혈액 및 담즙 중의 BSP 분리 정량은 양호하게 이루어 졌다(Figure 1). Figure 2는 BSP 투여 후 얻어진 혈중 및 담즙 중 BSP 농도를 각각 HPLC 및 UV 법에 의해 분석한 결과이다. 혈중농도의 경우, 두 분석법간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. HPLC법과 UV 법의 상관도는 $y=1.003x-10.029$ 로서 0.963의 상관계수를 보여 혈중농도 분석에 있어서 두 분석법은 실질적인 농도 차이를 보이지 않았다. 다만 담즙 중 농도의 경우, HPLC법과 UV 법의 상관도는 $y=2.995x-293.688$ 이며 UV 법이 HPLC법보다 거의 3배 이상 과대 평가된 농도를 나타내었으며, 상관계수도 0.756으로 비교적 낮은 상관관계를 나타내었다. 이

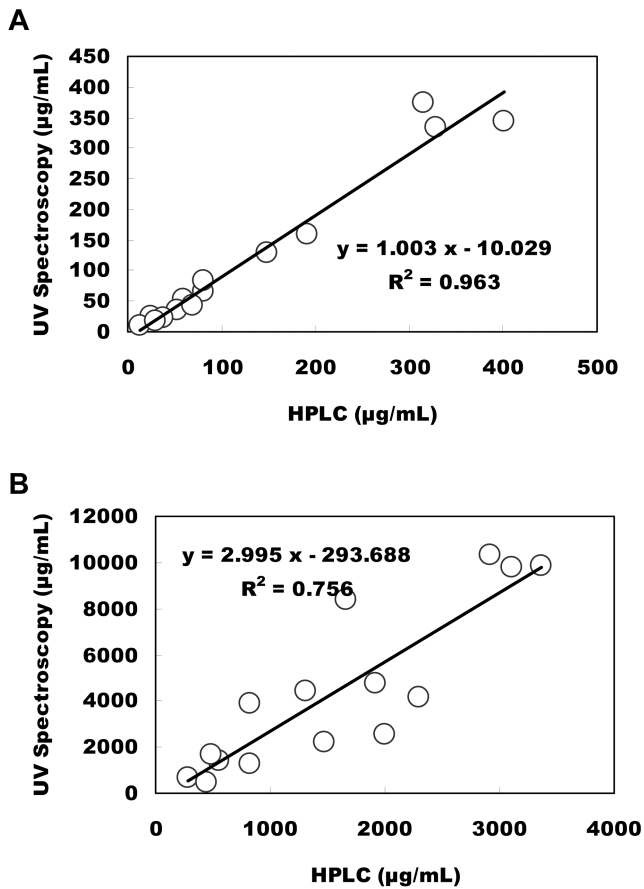


Figure 2—Comparison of analytical method for BSP concentration in plasma and bile: A) plasma concentration and B) bile concentration.

러한 결과는 Sano 등이 보고한 바와 같이 BSP의 상당 부분이 간에서 포합 반응을 거쳐 포합대사체의 형태로 담즙 중으로 배설됨에 따라 담즙 중 BSP의 대사체가 UV 법에 의해 같이 분석된 결과로 여겨진다.⁹⁾ 특히 각 시료에서의 대사체 비율이 각각 다르기에 이로 인한 분석방법의 상관관계도 상이한 결과를 나타낸다고 생각된다. 이에 반하여 혈중 시료의 경우 담즙에서와는 달리 분석에 영향을 미칠 정도의 BSP 대사체가 실질적으로 존재하지 않고 따라서 HPLC 및 UV 법에 의하여 거의 동일한 혈중농도가 계산된 것으로 추정된다. 이러한 결과로부터 현재 신속한 BSP 농도의 정량에 이용되고 있는 UV 법의 경우, 혈중농도 분석에서는 그 타당성이 확보되나 담즙 농도에 있어서는 정확한 값을 측정하지 못함을 확인할 수 있었고, 특히 HPLC법과 UV 법의 상관성이 낮기에 담즙 중 농도의 간이적 추정에도 활용 할 수 있는 비례식의 설정 또한 불가능 하였다.

혈중 BSP 농도곡선 및 담즙 중 BSP 배설곡선

Figure 3은 UV 법과 HPLC법에 의해 분석된 BSP의 혈

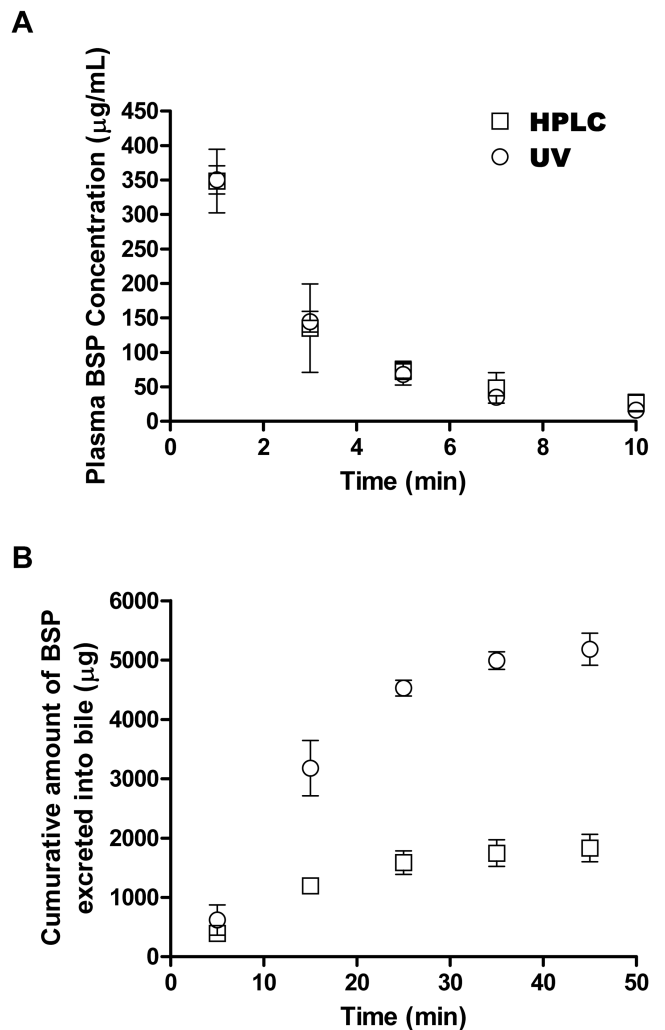


Figure 3—Difference of analytical method for BSP profile: A) plasma concentration-time curves of BSP and B) cumulative bile excretion amount of BSP following the intravenous administration of BSP (20 mg/kg) (mean±SD, n=3).

중농도 곡선 및 담즙 배설 곡선이다. Figure 2에서 예측되었듯이 두 방법에 의해 분석된 BSP의 혈중농도는 거의 일치 하였으나, BSP 담즙배설은 UV 법과 HPLC법 사이에 3배 정도의 차이를 나타내었다. 특히 각 시간대별 담즙 중 BSP 농도에서 UV 법과 HPLC법의 평균 차이는 초기시간 0~10분에서는 1.5배의 차이를 보였으나 20~30분에서는 최고 3.6배의 차이를 보였고 이는 담즙 중 BSP 모약물과 BSP 대사체의 비가 시간에 따라 달라지기 때문으로 추정된다.⁹⁾

분석법에 따른 약물동태학적 해석의 차이

Table I에 두 가지 분석법에 따라 계산된 약물동태학적 파라미터를 기술하였다.

AUC, 반감기, 클리어런스, 분포용적, 평균체류시간(MRT),

Table I—Pharmacokinetic Parameters of BSP. Plasma and Bile Concentrations were Calculated by UV and HPLC Method, Respectively

	HPLC	UV
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$)	1405 \pm 243	1287 \pm 128
T _{1/2} (min)	2.890 \pm 1.570	2.045 \pm 0.137
CL (mL/min/kg)	14.52 \pm 2.45	15.66 \pm 1.64
V _d (mL/kg)	55.79 \pm 21.82	44.86 \pm 0.70
MRT (min)	3.882 \pm 1.483	2.885 \pm 0.288
k (min ⁻¹)	0.290 \pm 0.143	0.340 \pm 0.022
CL _{bile} (mL/min/kg)	4.307 \pm 0.548	13.24 \pm 1.70*

*p<0.01 paired t-test

소실속도정수 등 혈중농도를 기초로 한 파라미터의 경우, 두 분석법 간의 유의성 있는 차이는 없었다. 특히 AUC 및 MRT와 같은 경우, 오차의 누적으로 인하여 작은 혈중농도의 차이에 의해서도 유의적인 차이를 나타내기 쉬운 파라미터임에도 분석법이 실험결과에 영향을 미치지 않았다는 사실은 고효율 분석방법으로서 UV 법의 타당성이 입증되는 예라 할 수 있다. 다만 예상되었던 것처럼 담즙 중 농도에 기반을 둔 담즙으로의 클리어런스의 경우, 3배 정도 뚜렷한 차이를 나타내며 이러한 차이는 Figure 2의 상관관계 식에서 예측된 바와 일치하고 있다. 이러한 사실로부터 UV 법은 혈중농도에 기반을 둔 해석에는 고효율 분석법으로 충분한 정확성을 나타냄이 입증되었으나, BSP가 담즙 배설의 지표물질로 사용될 경우, 즉 담즙 배설 등의 연구에 있어서는 반드시 HPLC 등과 같은 모약물과 대사체를 분리할 수 있는 분석법의 사용이 필수적임을 시사하고 있다.^{12,13)}

결 론

BSP의 혈중농도 분석 및 담즙 중 농도 분석에 기존에 사용되고 있던 고효율 UV 법을 HPLC법을 표준으로 비교한 결과, 담즙 중 농도의 경우, UV 법에 의해 BSP 농도가 3 배 정도 과대 평가 되었으며, 이는 담즙 중의 BSP 포함대사체가 같이 정량되었기 때문으로 추측된다. 이에 반하여 혈중농도의 경우, 실질적으로 UV 법과 HPLC법에 의해 유사한 농도가 계산되었다. 약물동태학적 파라미터의 경우에도 혈중농도에 기반을 둔 AUC, 반감기, 전신클리어런스, 분포용적, 평균체류시간 등의 파라미터에서는 두 분석법간 차이가 발견되지 않았으나, 담즙으로의 클리어런스의 경우에는 3 배 정도의 차이가 관찰되었다. 이러한 결과는 혈중농도를 기반으로 한 BSP의 약물동태학적 평가에 있어서는 기존의 고효율 UV 법으로도 정확한 결과를 얻을 수 있는 반면, 담즙

중 농도를 기반으로 한 해석, 예를 들어 Mrp2를 매개로 한 담즙이행 등의 연구에는 HPLC 등의 포함대사체와 모약물을 분리할 수 있는 분석법의 사용이 필요하다는 점을 제시하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 경희대학교 신입교수 지원과제에 의해 지원되었으므로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 1) G. Whelan, J. Hoch and B. Combes, A direct assessment of the importance of conjugation for biliary transport of sulfobromophthalein sodium, *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 542-557 (1970).
- 2) B. Combes, The Importance of Conjugation with Glutathione for Sulfobromophthalein Sodium (Bsp) Transfer from Blood to Bile, *J. Clin. Invest.*, **44**, 1214-1224 (1965).
- 3) M.A. Gonzalez, M.G. Roma, C.A. Bernal, L. Alvarez Mde and M.C. Carrillo, Biliary secretory function in rats chronically intoxicated with aluminum, *Toxicol. Sci.*, **79**, 189-195 (2004).
- 4) J. Konig, A.T. Nies, Y. Cui, I. Leier and D. Keppler, Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1461**, 377-394 (1999).
- 5) C.C. Paulusma, M.A. van Geer, R. Evers, M. Heijn, R. Ottenhoff, P. Borst and R.P. Oude Elferink, Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione, *Biochem. J.*, **338**, 393-401 (1999).
- 6) K.K. Machavaram, J. Gundu and M.R. Yamsani, Effect of various cytochrome P450 3A and P-glycoprotein modulators on the biliary clearance of bromosulphaphthalein in male wistar rats, *Pharmazie*, **59**, 957-960 (2004).
- 7) B.G. Priestly and G.L. Plaa, Sulfobromophthalein metabolism and excretion in rats with iodomethane-induced depletion of hepatic glutathione, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **174**, 221-231 (1970).
- 8) K. Sano, Y. Totsuka, Y. Ikegami and T. Uesugi, Metabolism of sulphobromophthalein I: positional isomers of sulphobromophthalein monogluthathione conjugate, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1015-1020 (2001).
- 9) K. Sano, Y. Totsuka, Y. Ikegami and T. Uesugi, Metabolism of sulphobromophthalein II. Species differences between rats, guinea-pigs and rabbits, *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 231-239 (2002).
- 10) S. Itagaki, M. Sugawara, M. Kobayashi, K. Miyazaki, T. Hirano and K. Iseki, Comparison of the disposition behavior

- of organic anions in an animal model for Wilson's disease (Long-Evans Cinnamon rats) with that in normal Long-Evans Agouti rats, *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 150-154 (2004).
- 11) M.L. Rocci, and W.J. Jusko, LAGRAN program for area and moments in pharmacokinetic analysis, *Comput. Programs. Biomed.*, **16**, 203-216 (1983).
- 12) C.A. Snel, M.M. Moons, F.G. Russel and G.J. Mulder, Disposition of the bromosulfophthalein-glutathione conjugate in the isolated perfused rat kidney, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**, 1300-1306 (1995).
- 13) S. Tazuma, K. Horikawa, H. Ochi, T. Nishioka, Y. Sunami, S. Yasumiba, Y. Asamoto, K. Tsuboi, K. Nakai, M. Sakamoto, K. Kanno, A. Yamaguchi, Y. Numata and K. Chayama, Dose-dependent conjugation of sulfobromophthalein and hepatic transit time in bile fistula rats: role of the microtubule-dependent vesicle pathway, *Dig. Dis. Sci.*, **46**, 1285-1289 (2001).