도토리 추출물 투여 후 갈산의 집단약동학 분석

가톨릭대학교 서울성모병원 임상약리학과¹ 가톨릭대학교 의과대학 약리학교실²
가톨릭중앙의료원 임상연구지원센터³

이종태¹, 도기찬¹, 김지면³, 전상일¹, 한승훈^{1,2}

=Abstract=

Population Pharmacokinetic Analysis of Gallic Acid after Acorn Extract Administration

Jongtae Lee¹, Kichan Doh¹, Jimyon Kim³, Sangil Jeon¹, Seunghoon Han^{1,2}

Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Seoul St. Mary's Hospital,
the Catholic University of Korea, Seoul, Korea1

Department of Pharmacology, College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul, Korea2

Clinical Research Coordinating Center, Catholic Medical Center, Seoul, Korea3

Background: Recently, researches on the pharmacological activity of natural substance are increasing. Acorn is one of promising candidates which is expected to exert anti-aging effects through anti-oxidant activity of gallic acid (GA).

Methods: Crude extract was obtained from acorn which was harvested in Korea, 2009. After random allocation of 18 subjects into different dose groups (1g, 2g and 4g daily), the extract was given orally for 21 days. Full pharmacokinetic studies (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 12 and 24 hr after dose) were done after the first and last doses. The LC/MS/MS system was used to determine the GA in the extract and plasma samples. The results were analyzed using mixed effect methods NONMEM (Ver.6.2).

Results: GA content in the extract was 0.27% (m/m). An one-compartment model was used to describe the PK property. Oral Clearance (CL/F) was 153 L/hr with the between-subject variability (BSV, as RSV %) of 44.5%. The estimated volume of distribution (V/F) was 231 L with the BSV of 37.0%. The population estimates of absorption rate constant (Ka) was 3.23 hr⁻¹ and the relative bioavailability of 4g dose group was 75.4% compared to the other groups.

Conclusion: Population pharmacokinetic parameters for gallic acid were successfully estimated. According to the parameters, it was expected that gallic acid would not be accumulated after repeated once-daily dosing and the extent of gallic acid absorption would be limited in the 4g dose group.

Key words: Cilostazol, Ginkgo biloba extract, Pharmacokinetics, Comparative studies

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 PJ007186)에 의해 이루어진 것임.

교신저자: 한승훈

소 속: 가톨릭대학교 의과대학 약리학교실

주 소: 서울특별시 서초구 반포동 505

전화번호: 02-2258-7881, 팩스: 02-2258-7876, E-mail: waystolove@catholic.ac.kr

접수일자: 10. 12. 15 수정일자: 10. 12. 27 게재확정일자: 10. 12. 28

서 론

최근 천연물신약에 대한 관심이 증가하면서, 각종 천연물로부터의 생체활성물질에 대한 연구가 다수 진행되고 있다. 도토리(*Quercus acutissima* CARR.)는 이러한 관심 대상 농산물 중 하나로서 특히, 그 성분 중 하나인 갈산(gallic acid)이 주요한 생체활성물질로서 인식되고 있다. 갈산은 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Fig.1)로 알려진 유기물로서 오배자 열매, 옻나무, 조록나무, 찻잎, 참나무 껍질과 다른 식물들에서 발견되는 대표적인 Phytochemical이다.¹⁾ 갈산은 일반적으로 제약 산업에 표준 물질 또는 일부 의약품의 합성 시작 물질로 사용되어 왔으나, 최근에는 그 의학적인 효능이 주목 받고 있어, 항진균 및 항바이러스 효과, 암세포 특이적 세포 독성 효과, 지혈 효과, 대사질환 치료 효과 등에 대한 연구가 진행되고 있으며 이와 더불어 강력한 항산화제로서 생체 내에서 자유라디칼 등에 의한 산화적 손상을 감소시킬 것으로 예측되고 있다.^{2),3)} 이러한 의학적 활용 가능성에도 불구하고, 현재까지 수행된 대다수의 연구는 in vitro 실험 혹은 동물실험 수준에 머물러 있어, 인체 투여 시 갈산의 흡수, 분포, 대사 및 제거 등에 대한 정보는 충분치 않다.⁴⁾

본 연구는 건강한 성인을 대상으로 도토리 추출물 투여한 후, 측정되는 갈산의 혈장농도를 통해 집단약동학적 분석을 수행하여, 추가적인 인체 연구에 대한 기초 자료를 마련하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2009년 수행된 “도토리 추출물의 체

내 흡수 및 cholinesterase 활성에 미치는 영향을 평가하기 위한 임상시험”의 일부로서 수행되었으며, 해당 임상시험에 참여한 피험자로서 이상체중 20% 이내의 만 20~50세인 성인이면서 시험 개시 전 한달 이내에 실험실적 검사 및 진찰을 시행하여 선정기준 및 제외기준을 통과한 18명의 건강한 남녀 지원자를 대상으로 하였다. 본 임상시험계획서는 가톨릭대학교 서울성모병원 임상시험심사위원회에서 검토 및 승인되었다. 임상시험에 참여하고자 한 모든 지원자들은 본인이 이해할 수 있는 언어로 임상시험 내용에 대하여 충분히 설명을 들은 후, 동의서에 서명을 하고 자발적으로 임상시험에 참여하였다. 임상시험에 참여한 피험자의 인구학적 특성은 연령 28.8±6.2 세, 신장 169.4±7.1 cm, 체중 63.4±8.7 kg 로 Table.1에 구체적으로 나타내었다. 총 17명의 피험자가 임상시험계획서에 따라 참여를 완료하였으며, 중도 탈락은 1명이었다.

2. 혈장 gallic acid 농도 분석

Gallic acid 표준 물질로는 Sigma-aldrich 사의 SIAL을 이용하였다. Puriss grade로써 순도는 99% 이상이었으며, 내부 표준 물질은 이용하지 않았다.

Human plasma 1 mL에 3M HCl을 100 μ L 가하여 산성화 한 후 MTBE (methyl-tert-butyl ether)로 추출하였으며, 3000 rpm에서 4°C, 10분간 원심분리하고 상층액을 자동시료농축기로 건조시켰다. 증류수 200 μ L를 가하여 재용해시키고 상층액 10 μ L를 HPLC/MS/MS에 주입하여 분석하였다. (HPLC: symbiosys pharma system (spark Holland 사), mass spectrometer는 API4000 (AB SCIEX 사)) 0.1% formic acid를 함유한 증류수(A)와 acetonitrile

Table 1. Participants demographics

Characteristics	Mean $\pm$ SD (range)			
	1g group	2g group	4g group	Total
Number of subjects	6	6	6	18
Age (yrs)	25 $\pm$ 4.1(20-30)	32.2 $\pm$ 6.1(23-42)	29.3 $\pm$ 6.9(22-42)	28.8 $\pm$ 6.2(20-42)
Sex	M(4), F(2)	M(5), F(1)	M(3), F(3)	M(12), F(6)
Height (cm)	171 $\pm$ 8.6(160-179)	170 $\pm$ 5.2(165-178)	167.2 $\pm$ 7.9(158-177)	169.4 $\pm$ 7.1(158-179)
Weight (kg)	64.1 $\pm$ 7.9(54.3-75.6)	65.6 $\pm$ 12.0(55-84.2)	60.5 $\pm$ 5.9(50.7-67.7)	63.4 $\pm$ 8.7(50.7-84.2)

Figure 1. The molecular structure of gallic acid

(B)을 이동상으로, B(%) 5에서 80까지의 gradient 조건을 사용하여 유속 0.5 mL/min 에서 Luan C18 (particle size μ m, 50 * 2.0 mm) 컬럼으로 분석하였으며, ESI (electrospray ionization) negative mode에서의 multiple reaction monitoring (MRM) 으로 m/z 169.0 >124.8에서 정량하였다.

최저정량한계 (LLOQ)는 0.5 ng/mL이었으며, 상관관계수 (r)는 정량범위 0.5~100 ng/mL에서 0.9997 이상이었으며, 측정치의 일내 (intra-day)와 일간 (inter-day) 정밀성(precision)은 3.68% 이내였고, 정확성(accuracy)은 98.46~105.7%로 나타났다

4. 집단약동학적 분석

갈산의 집단약동학적 분석은 NONMEM version 6.2 (Icon Development Solution, Ellicott City, MD, USA)프로그램을 이용하였다. 17명의 피험자로부터 2회(시험 1, 22일)의 경시적 농도 자료를 확보하였으며, 중도 탈락한 1명의 경우, 1회(시험 1일)의 경시적 농도 자료만을 확보하였다. 또한, 갈산의 용량을 결정하기 위한 도토리추출물 수용액 중 갈산 농도 측정으로부터 도토리추출물 1g중 함유된 갈산의 양은 2.7 mg으로 확인되어 이를 도토리추출물 투여량에 비례하여 투여된 갈산의 용량으로 이용하였다.

갈산의 약동학에 대한 선행 연구 결과 등이 충분히 확보되지 않아, 갈산의 흡수, 분포, 제거 등이 1차 속도론적으로 이루어진다는 가정 하에 단일구획모형(1-compartment model) 및 다구획모형(multi-compartmental model) 모두를 평가하여 보다 적합한 모형을 결정하고, 그에 따른 파라미터를 추정하고자 하였다. 모형의 선택을 위해 Akaike Information Criteria (AIC) 등의 수치적 기준은 물론 Goodness-of-fit (GOF) 등의 시각적 기준을 적용하였다. 또한, 가능도비 검정(Likelihood Ratio Test, LRT)에서 3.84를 초과하는 목적함수값(Obje

ctive Function Value, OFV)의 감소와 GOF의 개선을 보이는 파라미터만을 선택하여 모형에 적용하였다.

개인별 약동학적 파라미터가 대수 정규 분포(log-normal distribution)하는 양의 실수라는 가정하에, 각 파라미터 별 개인간 차를 기술하고자 eq. 1 형태의 지수적 모형(exponential model)을 이용하였다.

$$P_i = P_{TV} \times \text{Exp}(\eta_i) \quad (1)$$

P_i 는 i 번째 피험자의 약동학적 파라미터로서, 약동학적 파라미터의 집단 대표값인 P_{TV} 와 분포가 $N(0, \omega^2)$ 을 따르는 i 번째 피험자의 랜덤 변수인 η_i 의 관계로 표현될 수 있다.

개인 내 변이를 포함하는 잔차(residual error)에 대해서는 잔차가 각 관측치에 해당하는 농도 예측치의 크기에 비례하는 모형(비례 모형, proportional model)과 농도추정치와 관계 없이 가법적으로 발생하는 모형(가법 모형, additive model)을 모두 허용한 후, 분석 과정에서 이를 각각 추정 가능하도록 하였으며, Eq.2의 수식을 이용하였다.

$$Y_{ij} = IPRED_{ij} + \sqrt{\varepsilon_{add,ij}^2 + (\varepsilon_{prop,ij} \times IPRED_{ij})^2} \quad (2)$$

Y_{ij} 는 i 번째 피험자의 j 번째 채혈 시간에 측정된 농도이며, $IPRED_{ij}$ 는 특정한 Y_{ij} 에 대하여 약동학적 모형에 의해 예측된 농도이다. $\varepsilon_{add,ij}$ 은 가법 모형에 의한 잔차이며, $\varepsilon_{prop,ij}$ 은 비례 모형에 의한 잔차로서 각각 $N(0, \sigma_{add}^2)$, $N(0, \sigma_{prop}^2)$ 의 분포를 따르며, 각 Y_{ij} 에 따라 특이적으로 결정되는 값이다.

갈산 정량한계 이하의 관측치는 Beal 등(2001)5)이 제시한 F_FLAG 방법을 적용하여 처리하였으며 이를 위한 추정법으로 NONMEM의 LAPLACIA

N 방법을 이용하였다. 정량한계 이상의 관측치에 대한 가능도(likelihood)는 Eq3.과 같이 확장최소제곱(extended least square, ELS)으로 계산하였으며, 정량한계 이하의 관측치는 확률밀도함수를 음의 무한대에서 정량한계까지 적분하여 계산하였다. (Eq.4)

$$l(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi g(t)}} \exp\left(-\frac{(y(t)-f(t))^2}{2g(t)}\right) \quad (3)$$

$$l(t) = \Phi\left(\frac{LOQ - f(t)}{\sqrt{g(t)}}\right) \quad (4)$$

Table 1.에 제시한 인구학적 정보인 성별, 나이, 체중, 키 등에 대하여 공변량 분석(Covariate analysis)을 수행하였다. 후보 변수들에 대하여 각 약동학적 파라미터에 대한 상관관계를 육안적으로 확인하고, 이러한 상관관계가 GAM(Generalized Additive Modeling)을 통해 수치적으로 유의하다고 판단된 경우에만 모형에 적용하여 공변량으로서의 채택 여부를 평가하였다.

5. 모형의 검증

집단약동학 모형의 검증을 위하여 최종적으로 구현된 모형에 대하여 bootstrap 및 Visual Predictive Check (VPC)를 수행하였다. 두 방법 모두 1000개의 표본을 이용하였으며, 각각 95% 신뢰구간 및 90%신뢰구간을 구하여 모형 및 파라미터의 신뢰성을 검증하고자 하였다.

결 과

갈산의 약동학은 단일구획모형(Fig.2)으로서 적

Figure 2. Pharmacokinetic model and parameters

절히 설명 가능하였다. 모형에 따른 파라미터로서 흡수속도상수(k_a), 분포 용적(V/F), 청소율(CL/F)을 추정하였으며, 각 파라미터의 개인 간 변이역시 성공적으로 추정되었다. 모형에 대한 전반적인 수식은 다음과 같다.

$$IPRED_{ij} = \frac{F \cdot Dose}{V} \cdot \frac{k_a}{k_a - CL/V} \cdot (e^{-CL/V \cdot t} - e^{-k_i \cdot t}) \quad (5)$$

$IPRED_{ij}$ 는 i 번째 피험자의 j 번째 채혈 시간에 대해 예측된 농도이며, 모든 파라미터는 해당 개인의 값을 이용한다. t 는 최종 도토리추출물 투여로부터 j 번째 채혈 시간까지 걸린 시간을 의미한다.

갈산의 분포 용적과 청소율은 각각 231 L, 153L/hr로서, 반감기는 1.06 ± 0.25 (mean $\pm$ SD) hr 였으며, 두 파라미터의 개인 별 추정 치는 양의 상관관계를 가짐을 확인하였다. 흡수속도상수의 개인간 변이에 대한 추정치의 상대표준오차(Relative Standard Error, RSE%)는 56%로 비교적 크게 추정되었는데, 이는 갈산의 빠른 흡수속도로 인해 흡수가 주로 일어나는 최고혈장농도 도달시간 이에 대한 농도자료가 충분치 않았기 때문으로 판단된

다.

투여 용량의 증가에 따라 각 용량군별로 갈산 흡수에 차이가 있는가를 확인하기 위해, 최소용량군(A군)의 생체이용률(Bioavailability, F)을 1로 가정하고, 각 군 별로 상대적 생체이용률을 추정한 결과, A군과 B군의 생체이용률은 통계적으로 유의하지 않은 차이를 보였으나, C군의 상대적 생체이용률은 유의한 파라미터로서 모형에 포함되었으며, 그 추정치는 0.754였다.

최종 모형의 집단약동학적 파라미터는 Tab.2에 나타내었으며, 집단 예측치(PRED)와 측정치, 개인별 예측치(IPRED)와 측정치 사이 등을 GOF의 기준으로 scatterplot으로 나타내었다. (Fig.3)

공변량 분석 결과 유의한공변량으로 채택된 변수는 없었으며, 모델 검증을 위하여 시행한 bootstrap 및 VPC 결과, 최종 모형 및 그 추정치들은 양호한 결과를 보였다. (Tab.2, Fig.4)

고 찰

본 연구는 건강한 성인을 대상으로 도토리 추출물을 3주 간 경구 반복 투여하여 측정된 갈산 혈장농도로부터 갈산의 약동학적 특성을 집단약동학적으로 평가하고자 하였다. 본 연구에서는 도토리 추출물 투여 시 갈산이 측정 가능한 정도로 인체에 흡수되는 것을 확인하였으며, 투여 용량에 따라 그 농도에 변화가 있는 것 역시 확인할 수 있었다. 이에 따라 앞서 언급한 것과 같이 항산화효과 등 의학적인 효능을 목적으로 갈산을 투여하는 데에 있어서 도토리 추출물은 하나의 원료물질로 사용 가능할 것으로 보인다.

도토리추출물 용량 증가 시 생체이용률의 감소 현상은 갈산 투여를 목적으로 도토리추출물을 직접 이용하는 데에 하나의 장애 요인이라 하겠다. 본

Figure 3. Goodness-of-fit plot (Left: population prediction, Right: Individual prediction)

Table 2. Final modelparameter estimates

Parameter	Estimate	% RSE	Bootstrap median (95% CI)*
CL/F	153 L/h	9.22	148 (117~185)
V/F	231 L	13.4	226 (153~310)
k_a	3.23 hr ⁻¹	24.8	3.32 (2.29~6.51)
Relative Bioavailability [†]	0.754	26.7	0.742 (0.375~0.996)
Interindividual variability			
ω_{CL}	44.5 %	14.7	0.401 (0.273~0.530)
ω_V	37.0 %	20.0	0.377 (0.188~0.541)
ω_{K_a}	26.7 %	56	0.239 (0.003~0.711)
$\rho_{CL \sim V}$	0.815		0.806 (0.435~0.936)
Residual error			
σ_{add}	0.749 ng/mL	26.2	0.736 (0.0001~1.01)
σ_{prop}	30.9 %	10.6	0.3 (0.222~0.394)

* 95% CIs obtained from bootstrap procedure with 1000 re-sampled datasets

+ Relative bioavailability of 4g group compared to that of other groups

Figure 4. Visual predictive check result. (a),(d):1g daily dosing group: (b),(e):2g daily dosing group: (c),(f):4g daily dosing group

연구에서 도토리추출물 1, 2g군과 비교하여 4g군에서는 상대적 생체이용률이 75.4 %로 추정되었는데 이러한 생체이용률의 감소는 물에 대한 도토리 추출물의 낮은 용해도가 그 원인으로 추측된다. 갈산 0.3mmol(51mg)을 차(tea)의 형태로 단회 투여한 선행 연구 결과⁽⁶⁾와 본 연구를 비교하였을 때, 갈산의 반감기는 1.06 ± 0.06 hr(차) 1.06 ± 0.25 hr(도토리추출물)로 거의 같은 값을 보였다. 하지만, 곡선하면적(AUC)은 $774 \pm 93.6 \mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ (차, 갈산 51mg), $39.98 \pm 20.4 \mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ (도토리추출물, 갈산 5.4mg)으로 투여량으로 표준화한 곡선하면적의 비는 도토리 추출물이 차에 대해 48.6 %로 확인되었다. 이는 투여 형태에 따라 갈산의 흡수가 달라짐을 의미하는 결과로서 갈산 흡수를 증가시키기 위해서는 보다 용해도가 높은 투여 형태

를 이용해야 할 것으로 판단된다.

단일구획모형으로서 구현된 최종 약동학 모형으로부터 추정된 갈산의 반감기는 약 1시간으로, 본 연구에서와 마찬가지로 도토리 추출물을 24시간 간격으로 투여하는 경우, 축적이 발생하지 않는 것으로 판단할 수 있었으며, 이는 실제 농도자료를 통해서도 확인 가능하였다. 이는 통상적인 시간 간격(1일 2-3회)으로 갈산 함유 식품 등을 섭취하는 경우, 갈산의 농도를 장시간 유지하는 것은 물론 반복투여를 통한 약물 농도 상승 효과 등은 기대하기 어려움을 의미한다. 인체를 대상으로 갈산의 농도-효과 관계는 현재까지 정확하게 정립되지 않았으나, 농도와 효과가 비례 관계를 가진다는 일반적인 가정 하에서, 갈산은 이러한 빠른 제거 속도로 인해 그 효능의 발현이 제한적일 가

능성이 높다. 따라서, 이를 임상적으로 활용하기 위해서는 단일 성분으로의 추출 및 농도 유지 등을 위한 제형 개발 등이 선행되어야 할 것으로 예상된다.

천연물을 의료적인 목적으로 이용하고자 하는 노력이 점차 증대되고 있는 가운데, 갈산은 그 항염증효과, 항산화효과 등으로 인해 유력한 후보물질로 각광받고 있다. 도토리추출물 투여를 통해 체내에서 갈산의 유의미한 흡수를 확인하였으며, 그 흡수속도 및 제거속도는 비교적 빠른 것으로 나타났다. 본 연구 결과를 기반으로 추후 신뢰성 있는 생체표지자 등을 이용한 갈산의 약동-약력학적 연구와 용해도 및 제거속도 등을 개선하기 위한 제형 개발 등을 통해 갈산의 임상적 이용을 기대해 본다.

참고문헌

1. Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2001;39:1063-1070.
2. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girao da Cruz MT, Cordeiro MNDS, Milhazes N, Borges F, Marques MPM. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004;12:3581-3589.
3. Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li Z, Takeda T, Ogihara Y, Jiang BY, Chen Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1995;18:1526-1530.
4. Shahrzad S, Bitsch I. Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1988;705:87-95.
5. Beal SL. Ways to Fit a PK Model with Some Data Below the Quantification Limit. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 2001;28:481-504.
6. Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I. Pharmacokinetics of Gallic Acid and Its Relative Bioavailability from Tea in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition*, 2001;131:1207-1210.