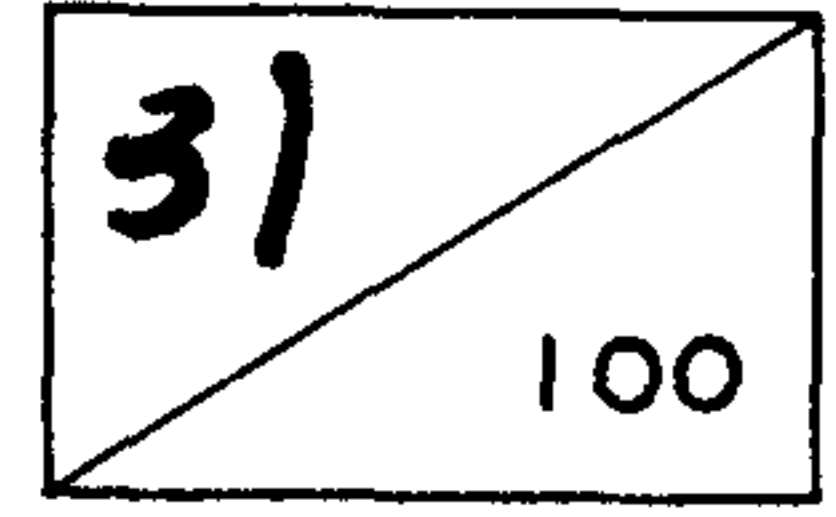


제 3 차 년 도  
연 차 보 고 서



# 화학물질의 약리·대사에 관한 연구

A Study on Pharmacokinetics and Metabolism  
of Biologically Active Compounds

연구기관  
한국과학기술연구원

寄贈	
과학기술연구원	一九九一年八月二十日

과 학 기 술 처

## 제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "화학물질의 약리·대사에 관한 연구 (3차)" 사업의 보고서로 제출합니다.

1991년 7월

연구기관 : 한국과학기술연구원  
연구책임자 : 박종세 (책임연구원)  
연구원 : 박송자 (책임연구원)  
노동석 (책임연구원)  
류재천 (선임연구원)  
유영숙 (선임연구원)  
김동현 (선임연구원)  
권오승, 최정은 (연구원)  
김태욱, 엄기동 (연구원)  
김연제, 백형기 (연구원)  
김승기, 이정애 (연구원)  
표희수, 김미숙 (연구원)  
송윤선, 양종순 (연구원)  
현성혜, 홍묘숙 (연구원)  
장현경, 서자원 (연구원)

# 요 약 문

## I. 제목

화학물질의 약리·대사에 관한 연구

## II. 연구의 목표 및 중요성

새로운 의약품을 창출함에 있어, 새로운 생리활성물질의 탐색은 물론, 탐색된 생리활성물질들의 생체내에서의 거동을 아는 것은 매우 중요한 일이다. 이들의 거동은 약리학적인 약효 발현에 있어서 뿐만 아니라 대사과정등을 통한 안전성 평가에 있어서의 한 좌표가 되기도 하기 때문이다. 그러므로 생리활성물질들의 생체내에서의 활성 및 대사산물, 대사경로등의 연구 및 기술축적은 새로운 생리활성 물질의 생체내의 유효성 및 안전성을 규명하는데 있어 핵심부분이며, 이러한 연구를 통해 신물질 창출을 앞당기고 이와 수반된 소재공업의 발달을 선도하며 더 나아가 우리나라의 생명과학의 발전 및 국민보건 향상에 이바지 함을 목표로 한다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 방향은 생리활성물질의 생체내에서의 거동 및 이에 관련

된 약리학적 연구와 대사산물 및 대사경로 등의 연구에 초점을 맞추었다. 노라든가 혈액과 같은 생체시료로부터의 정확한 생리활성물질의 함량 측정법의 개발 및 이를 이용한 새로운 대사산물들의 구조 유추와 실험동물 및 인간을 이용한 체내배설 기전의 추구 및 약물-약물 상호작용에 따른 신장 배설 연구등을 연구하여 앞으로 개발될 새로운 생리활성물질들의 생체내 거동에 따른 더욱 유효한 대사산물의 신 의약품화등에 일익을 담당하고자 한 것이다.

구체적으로, 생체시료로부터의 분석이 까다로운 steroid 계 약물의 분석법의 정립 및 분석법 정립에 따른 이들의 체내 약물동태학적 연구와 신장배설에 따른 기전연구등을 수행하였으며, 신장 배설기전 해석에 따른 단백결합 실험 결과 및 실제 인간에서의 steroid 와 다른 약물, 예를 들어 배설저해제와의 실제 병용투여에 따른 약물-약물 상호작용등을 살펴보고, 유사한 steroid 들의 대사산물 연구를 통해, 앞으로 시도될 새로운 의약품 후보물질들의 신약화시에 필연적으로 연구될 대사산물들의 연구의 한 예로서 제시하고자 하였다.

즉 Anabolic steroid 인 stanozolol 의 pharmacokinetic data 를 참조하여, stanozolol 의 배설기전연구 및 probenecid 에 의한 배설저해 작용등을 protein binding assay 를 통해 유추해본 결과, probenecid 로 인해 stanozolol 과 혈장단백과의 association constant 의 증가 즉 free 형태의 stanozolol 양이 증가함을 나타내었고, 이는 이전의 연구결과에서 보고한 probenecid 로 인한 stanozolol 의 체내 분포용적의 증가의 결과로 잘 설명될 수 있다고 사료되었다.

또한 실험동물이 아닌 human 에 직접 투여하여 stanozolol 의 배설

에 관한 probenecid 의 영향을, stanozolol 과 그 대사산물인 3'-hydroxystanozolol에 대해 살펴본 결과, probenecid 는 stanozolol 뿐 아니라 그 대사산물인 3'-hydroxystanozolol 의 배설 또한 억제하는 것으로 사료되었다.

또한, 이와 구조가 유사하나 잘 연구되어 있지 않은 furazabol, calusterone 과 같은 steroid 의 rat 와 human 생체내에서의 대사연구를 통해 추정가능한 metabolite 들을 밝히고자 하였다. Rat 를 이용한 calusterone 의 urinary metabolite 로서는, 두개의 dihydroxylated calusterone 이 GC/MSD 분석을 통해 추정되었고, 그 중 하나는 6, 16 - dihydroxycalusterone 으로 유추하였으나, 또하나는 16번 위치에서의 hydroxylation 은 유추가능하나 또 한군데의 hydroxylation site 의 유추는 아직 불명이며, 계속 추구중에 있다. 또 furazabol 의 human 에서의 urinary metabolite 로서는 furazabol 의 glucuronide form 과 16-hydroxyfurazabol 이 유추되었다. 이들의 인체 내에서의 거동은 매우 빠른 대사 및 뇨로의 배설을 보여주었다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

새로이 개발된 생리활성물질들의 생체내에서의 생리활성 및 이들의 대사과정과 대사산물들의 연구는 매우 중요하고 유익한 정보를 제공하고 있음은 주지의 사실이다. 아직까지 많은 연구 기관 및 제약회사에서 이와같은 대사연구를 통한 신의약품 개발이나 또는 대

사 연구의 병행수행을 통한 새로운 시도등에 많은 관심이 집중되고  
있지는 않으나, 생체 내에서의 유효성 및 안전성을 확립하는 것은  
이와같은 대사연구, 약동학적 연구등을 통해 이루어지며, 이러한 결  
과는 더 나아가 생물학적 동등성시험이나 생체내 이용율과 같은 임상  
실험의 기초 data 로서도 유용한 것이다. 앞으로는 이와같은 약리  
· 대사연구가 기존의 의약품 뿐 아니라 현재 개발중인 합성생리활성  
물질이나 천연식물의 성분이나 천연유래의 생리활성물질들의 연구에  
도 이용되어, 보다 넓은 경험의 축적이 이루어져야 한다고 사료된다.  
더불어 흡수를 통한 주요장기에서의 대사에만 국한하지 않고 흡수  
가 일어날 때의 장내세균에 의한 대사 및 주요장기에서의 대사활성  
화에 따른 독성발현의 기전연구와 생체전신대사기법을 이용한 생체  
전신대사 및 분포 연구가 병행수행되면, 신물질창출에 많은 도움이  
되리라 사료된다.

## **Summary**

### **I. Subject**

**A Study on Pharmacokinetics and Metabolism of Biologically Active Compounds (III).**

### **II. Objectives and Justification**

Recently, in accordance with the rapid progress in science and technology, new drug development is being focused by many scientists. So, government, big fine chemical industry and many pharmaceutical companies have been invested to their Research and Development program.

For the development of new drugs, it is necessary to find lead compounds, and to develop rapid and accurate screening methods, effectiveness, safety, metabolic pathway, bioavailability, and toxicity evaluation etc. Of these many studies, one of the most important study is pharmacokinetics, especially metabolism and excretion, and bioavailability. Occasionally, the metabolites of the drug of interest have sometimes proved to be more effective than that of the parent compound.

Therefore, to evaluate the therapeutic efficacy and safety or toxicity of newly developed biological active compounds, a study on pharmacokinetics, in vivo and in vitro metabolism, and renal excretion mechanisms play an important role in

drug development. The establishment and accumulation of experience for basic techniques on pharmacokinetics, renal excretion and metabolism are very important to the development of new drugs.

### III. Area & Scope

This study is focused on pharmacokinetics, renal excretion, and metabolism comprising the main aspects of drug development. Chapter I, the general explanation, and objective of the study is described. Chapter II is composed of two sections, one is the effect of probenecid on renal excretion and protein binding of stanozolol, an anabolic steroid, and the other section is excretion study on the interaction of stanozolol and probenecid in human. In our previous report which was a study on pharmacokinetics and metabolism of biologically active compound (II), we elucidated that the establishment of analytical method using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) of stanozolol in biological samples such as urine and blood. And also, we compared the effect of probenecid on the excretion of stanozolol in rats. Therefore, we obtained the area under the curve (AUC) of the probenecid-treat group was significantly ( $p < 0.01$ ) lower than control group, but the volume of distribution of  $\beta$ -phase and total clearance in the probenecid-treated group was significantly high ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). pH values and flow rate of urine between probenecid-treated and non-probenecid treated groups did not show a statistically significant difference.



According to the results of the renal clearance, significant differences of glomerular filtration rate or renal clearance was not observed, but the clearance ratio of treatment showed significantly increased from 11.72 to 17.27.

Under the data described above from our previous studies, we also try to check the effect of probenecid on the protein binding of stanozolol because the amounts of protein binding of stanozolol are one of the factors to change the rate of excretion.

The free form of stanozolol is also increased by probenecid treatment which is analyzed by ultrafiltration technique using GC/MSD. From the above results, the increment in the volume of distribution of stanozolol by probenecid treatment can be explained that the decrease of association constant between stanozolol and plasma proteins by probenecid treatment which means the increase of free form of stanozolol.

The section II in the chapter II is described the excretion study on the interaction of stanozolol and probenecid in human. The pharmacokinetic data from our previous results are obtained from the laboratory animals such as rats. So, we try to determine the effect of probenecid on stanozolol excretion using human volunteers. In this study, not only stanozolol but also its metabolite 3'-hydroxystanozolol studied. The results were shown that the excretion of stanozolol and 3'-hydroxystanozolol also inhibited by the co-treatment of probenecid in human urine.

In chapter III, the urinary metabolites of steroid are mainly described. The section I of chapter III, we try to find and elucidate the chemical structure of

calusterone metabolites after oral administration in rats by GC/MSD. We deduced the two urinary calusterone metabolites as dihydroxylated form of calusterone in rats.

One is supposed to be the 6, 16-dihydroxycalusterone by the interpretation of fragment ions of E.I. scan mass spectrum in GC/MSD. The other is also expected to be the dihydroxylated calusterone, one of hydroxylation sites is supposed at carbon 16 but the another hydroxylation site is not clear.

The section II of chapter III is described the kinetics and the urinary metabolite of furazabol which is another anabolic steroids in human with GC/MSD. From this study, it is elucidated that the furazabol glucuronide conjugate is main metabolite of furazabol in human. And also, 16-hydroxyfurazabol is clarified another metabolite of furazabol in human. The kinetic behaviors of furazabol and its metabolite, 16-hydroxyfurazabol are also studied. The results of kinetic study, the furazabol and 16-hydroxyfurazabol are rapidly metabolized and excreted to urine in human.

# Contents

Chapter I. Introduction .....	21
Chapter II. Pharmacological and Pharmacokinetic Study	
Section I. Effect of probenecid on renal excretion and protein binding of stanozolol, an anabolic steroid.....	23
1. Introduction .....	23
2. Materials and Methods .....	25
3. Results and Discussion .....	33
4. References .....	49
Section II. Excretion study on the interaction of stanozolol and probenecid in human .....	52
1. Introduction .....	52
2. Materials and Methods .....	53
3. Results and Discussion .....	60
4. References .....	74

**Chapter III. Metabolism Study**

**Section I. A study on the urinary metabolites of calusterone in rats..... 76**

1. Introduction .....	76
2. Materials and Methods .....	78
3. Results and Discussion .....	84
4. References .....	94

**Section II. A study on the urinary metabolites of furazabol in human ..... 95**

1. Introduction .....	95
2. Materials and Methods .....	96
3. Results and Discussion .....	101
4. References .....	123

## Figures

### II-1 : Effect of probenecid on renal excretion and protein binding of stanozolol, an anabolic steroid.

Fig. 1 : 약물의 생체내 이행

Fig. 2 : Plasma disappearance curve of stanozolol in rats.

Fig. 3 : Urinary excretion rate vs. time plots in rats.

Fig. 4 : Urinary flow rate vs. duration ( min.) plot.

Fig. 5 : Calibration curve of stanozolol.

Fig. 6 : Effect of probenecid on stanozolol - protein binding in Scatchard plot.

### II-2 : Excretion study on the interaction of stanozolol and probenecid in human.

Fig. 1 : Scan spectrum of stanozolol-N-HFB-OTMS(A) and 3'-hydroxystanozolol -N-HFB-(OTMS)<sub>2</sub> (B).

Fig. 2 : Calibration curves of stanozolol (A) and 3'-hydroxystanozolol (B).

Fig. 3 : Excretion rate vs. time plots of stanozolol and 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 20mg stanozolol to volunteers.

Fig. 4 : Excretion rate vs. time plot of stanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without-( • ) and with-(+) probenecid treatment to human volunteers.

Fig. 5 : Excretion rate vs. time plot of 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- ( • ) and with - (+) probenecid treatment to human volunteers.

Fig. 6 : Urinary accumulative amount of stanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- ( • ) and with - (+) probenecid treatment to human volunteers.

Fig. 7 : Urinary accumulative amount of 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- ( • ) and with - (+) probenecid treatment to human volunteers.

### **III-1 : A study on the urinary metabolites of calusterone in rats.**

Fig. 1 : Total ion chromatogram and scan mass spectrum of calusterone-di-OTMS standard.

Fig. 2 : Total ion chromatogram of normal rat urine (A), and calusterone-administered rat urine (B) in free fraction.

Fig. 3 : Total ion chromatogram of normal rat urine (A) and calusterone-administered rat urine (B) in conjugate fraction.

Fig. 4 : Scan mass spectrum of calusterone metabolite I suspected as 6, 16-

dihydroxy calusterone in rat urine after TMS derivatization.

Fig. 5 : Scan mass spectrum of calusterone metabolite II suspected as dihydroxy calusterone in rat urine after TMS derivatization.

Fig. 6 : Chemical structures of calusterone and its metabolites I and II.

### III-2 : A study on the urinary metabolites of furazabol in human.

Fig. 1 : Calibration curve of furazabol after TMS-derivatization.

Fig. 2 : Chemical structures of furazabol and its possible metabolites.

Fig. 3 : Scan mass spectrum of furazabol-OTMS derivative.

Fig. 4 : Selected ion monitoring chromatograms of furazabol-OTMS (A) and Calusterone-di-OTMS (B) in the human urine sample.

Fig. 5 : Scan mass spectrum of 16-hydroxyfurazabol-di-OTMS derivative.

Fig. 6 : Selected ion monitoring chromatograms of the di-OTMS derivative of 16-hydroxyfurazabol (A) and calusterone (B) in human urine sample.

Fig. 7 : Scan mass spectrum of unidentified furazabol metabolite in human urine.

Fig. 8 : Excretion rate vs. time plot of furazabol in the case of K human.

Fig. 9 : Excretion rate vs. time plot of furazabol in the case of M human.

Fig. 10 : Urinary accumulative amount of furazabol after oral administration of 5 mg furazabol to K human.

Fig. 11 : Urinary accumulative amount of furazabol after oral administration of 5 mg furazabol to M human.

Fig. 12 : Excretion rate vs. time plot of furazabol between K and M human.

Fig. 13 : Urinary excretion vs. time plot of 16-hydroxyfurazabol between K and M human.



## **Tables**

### **II-1 : Effect of probenecid on renal excretion and protein binding of stanozolol, an anabolic steroid**

Table 1 : Pharmacokinetic parameters after intravenous administration of stanozolol (20mg/Kg) to rat .

Table 2 : pH values between two groups in rat urines.

Table 3 : Urinary excretion of stanozolol by renal clearance method.

Table 4 : Effect of probenecid on association constant and total protein binding concentration of stanozolol in rat plasma.

### **II-2 : Excretion study on the interaction of stanozolol and probenecid in human.**

Table 1 : Kinetic parameters of stanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- and with- probenecid treatment to human volunteers.

Table 2 : Kinetic parameters of 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- and with- probenecid treatment to human volunteers.

**III-2 : A study on the urinary metabolites of furazabol in human.**

Table 1 : Concentration of furazabol in K human urine after oral administration of 5 mg furazabol

Table 2 : Concentration of furazabol in M human urine after oral administration of 5 mg furazabol.

Table 3 : Urinary excretion of 16-hydroxyfurazabol after oral administration of 5 mg furazabol to K human.

Table 4 : Urinary excretion of 16-hydroxyfurazabol after oral administration of 5 mg furazabol to M human.

## **Schemes**

**II-1 : Effect of probenecid on renal excretion and protein binding of stanozolol, an anabolic steroid**

**Scheme 1. Procedure for protein binding experiments of stanozolol.**

**II-2 : Excretion study on the interaction of stanozolol and probenecid in human.**

**Scheme 1. Extraction and derivatization procedure for stanozolol analysis**

**III-1 : A study on the urinary metabolites of calusterone in rats**

**Scheme 1 : Extraction and derivatization procedure for calusterone analysis in rat urine.**

**III-2 : A study on the urinary metabolites of furazabol in human.**

**Scheme 1 : Extraction and derivatization procedure for furazabol analysis in human urine.**

여 백

# 목 차

제 1 장 총 설 .....	21
제 2 장 약리·약동학적 연구	
제 1 절. Stanozolol 의 신배설 및 단백결합에 미치는 probenecid 의 영향연구 .....	23
1. 서론 .....	23
2. 재료 및 방법 .....	25
3. 결과 및 고찰 .....	33
4. 참고문헌 .....	49
제 2 절. Human 에서의 stanozolol 과 probenecid 의 약물 상호작용에 따른 배설연구.....	52
1. 서론 .....	52
2. 재료 및 방법 .....	53
3. 결과 및 고찰 .....	60
4. 참고문헌 .....	74

### 제 3 장 대사연구

제 1 절. Rat 에서의 calusterone 의 Urinary Metabolite 에 관한 연구.....	76
---	----

1. 서론 .....	76
2. 재료 및 방법 .....	78
3. 결과 및 고찰 .....	84
4. 참고문헌 .....	94

제 2 절. Human 에서의 Furazabol 의 Urinary Metabolite 에 관한 연구 .....	95
--	----

1. 서론 .....	95
2. 재료 및 방법 .....	96
3. 결과 및 고찰 .....	101
4. 참고문헌 .....	123

## 제 1 장 총 설

20세기 후반에 들어와, 우리나라는 모든 분야에 걸쳐 눈부신 성장을 거듭하고 있다. 특히 정밀화학분야에서 제약산업계에 미친 물질특허제도 도입의 영향은 성숙된 우리의 국력의 과시는 물론, 이 제도의 도입으로 파생된 생명과학 및 화학분야에서의 신물질 창출의 열기는 날로 더해가는 현실이다.

이와같은 신물질 창출을 위한 다방면의 전문가들의 다각적인 노력의 결실로, 최근에는 많은 신약 후보물질들이 대두되는 커다란 성과를 올리고 있다. 이제는 이와같은 신약후보물질들을 후보가 아닌, 신약화시키기 위한 노력의 집중이 요구되고 있다.

이와같은 요구에 따라 이들 물질들의 생체내에서의 거동 및 흡수, 대사, 배설등의 약동학적 연구 및 대사연구가 필연적으로 대두되어, 이들 약물의 체내 유효성 및 안전성, 또 제제화를 위한 기초자료로, 더 나아가 임상실험에 이용할 기본자료로서의 활용성이 매우 크게 요구되어지고 있다. 더우기 대사산물의 연구를 통해, 모화합물보다 활성이나, 안전성이 보다 큰 대사산물의 유추와 구조활성연구의 접합을 통해 신물질 창출의 보다 빠른 지름길을 제공할 수 있을 것이다.

물리, 화학적 특성등이 밝혀져 나가고 있는 새로운 생리활성 물질들의 약동학적 연구 및 대사연구를 위해서는 생체내에서의 뇨나 또는 혈액과 같은 생체 시료에서의 정확한 함량 측정 및 정확한 구조확인 연구가 수행되어야 하므로 이들의 분석기술을 확립하고자 하였고, 분석법 확립에

따른 생체내에서의 흡수, 분포, 대사, 배설과 같은 동력학적 약물의 동태파악과 이에 수반된 유효성의 추이 및 대사산물들의 추적을 통한 대사경로의 유추등을 연구하였다.

특히 stanozolol 의 신장배설과 관련시켜 stanozolol 의 혈중 단백결합에 미치는 probenecid 의 영향연구를 통해 신장배설 기전파악에 좀 더 접근하고자 하였고, 실제 이와같은 stanozolol 과 probenecid 의 drug-drug interaction 이 인간에서도 합리적으로 일어나는지를 연구하였다. 또 여러약물들이 있겠으나 우선은 분석이 어렵다고 하는 steroid 들 중에서 calusterone 및 furazabol 에 초점을 맞추어 실험동물인 rat 에서의 urinary metabolites 들의 구조유추 및 대사연구와, human 에게 경구투여한 후의 urine 으로 배설되는 모약물 및 그 대사체들의 연구를 병행수행하였기에 보고하고자 한다.



## 제 2 장 약리·약동학적 연구

### 제1절 : Stanozolol 의 신배설 및 단백결합에 미치는 Probenecid 의 영향 연구.

#### 1. 서론

Stanozolol ( $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -methyl- $5\alpha$ -androstando-(3,2-c) pyrazole) 은 신체성장을 촉진시키고 anabolic activity 에 대한 androgenic activity 의 ratio 가 작아서 남성화 효과를 최소화 시키는 합성 anabolic steroid 이며 (1,2), 재생불량성 빈혈 (aplastic anemia) 이나 혈전증 예방 (prophylaxis of vascular thrombosis) 등의 치료목적으로도 사용되는 의약품이다(3).

Stanozolol 은 pyrazole ring 을 가지고 있어 대부분의 다른 anabolic steroid 와 잘 구별되며(4), 분석상에 있어서 injection port 나 column 에서의 흡착이나 pyrazole ring 의 극성으로 인하여, 가스 크로마토그래피상에서의 response 가 낮기 때문에 sensitivity 를 높이는 것이 문제로 되어 왔다(5).

의학적인 용도이외에, 이 stanozolol 의 지속적인 오·남용은 생식계통 및 간의 질환을 유발하는 것으로 보고(6) 되고 있어, 이와같은 분석상의 어려움점과 더불어 stanozolol 의 anabolic 효과를 이용한 운동선수들의 남용을 막고 운동선수들을 보호하고자 국제올림픽위원회(IOC)에서는 이 stanozolol 을 포함한 anabolic steroid 를 금지약물로 규정하고

있다(7, 8). 그러나 운동선수들은 doping test 를 통과하기 위한 수단으로 이 약물의 배설을 은폐시키려고 여러 시도를 하고 있으며, 이러한 은폐목적으로 사용되는 대표적인 약물이 probenecid 로 알려져 있다.

Probenecid 는 유기산약물이 세뇨관을 통하여 분비되는 것을 상경적으로 억제함으로써 유기산 약물의 뇨배설을 감소시키고 혈중 농도를 상승시키는 약물로 알려져 있으며, 이에 해당하는 대표적인 유기산으로는, penicillin (9, 10), furosemide(11) 등이 보고되어 있다.

지금까지 anabolic steroid 와 probenecid 의 상호작용은 별로 보고되어 있지 않으며 (12, 13), anabolic steroid 의 대표적인 약물인 stanozolol 이 일부운동선수에 의해 남용되고 있는 사실에 입각하여, 앞서 보고한 보고(12)에 이어 stanozolol 이 신장배설 기전 및 약물의 안전성이나 유효성을 결정하는 중요한 요소인 체내 동태학적 연구의 한분야인 drug-drug interaction 에 관해 stanozolol 의 신장배설 및 단백결합에 미치는 probenecid 의 영향을 연구하고자 하였다. Stanozolol 및 probenecid 의 구조식은 다음과 같다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 시약 및 기구

#### ① 시약

Stanozolol (한일약품, Korea), Probenecid (대웅제약, Korea), Calusterone (Upjohn, Co., Kalamanzoo, USA), Bovine serum albumin (Sigma, USA), MSHFB(N-methyl-N-trimethylsilylheptafluorobutyramide), MBHFB(N-methyl-bis-heptafluorobutyramide; Macherey & Nagel, F.R.G.), TMS-Cl(trimethylchlorosilane; Sigma), TMS-Imidazole(trimethylsilylimidazole ; Sigma), Heparin (Sigma, USA), Krebs-Ringer Bicarbonate Solution (composition(M); NaCl(0.154), KCl(0.154), CaCl<sub>2</sub>(0.11), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.154), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.154), NaHCO<sub>3</sub>(0.154)), 그외 기타시약은 1급이상을 사용하였다.

#### ② 기구

- MPS-1 (micropartition system; membrane base, reservoir, clip, cap, O-ring, Amicon Division, W.R. Grace & Co., MA, U.S.A.)
- Sorvall centrifuge (Dupont, U.S.A.)
- Water bath(Dong Yang, Korea)

- YMT membrane (YM30, 14MM, Amicon Division, W.R. Grace & Co., MA., U.S.A.)
- Freezer (Lauda, F.R.G.)
- Rotary evaporator(Buchi, Switzerland)

## 2) 기기 (Instruments) 및 분석조건

### ① 기기

GC/MSD (HP 5890A/5970B)

HP 59970C MS Chemstation

HP 7946 Disc Drive

HP 2934A Dot Matrix Printer

### ② 분석조건

Column : 5%-phenylmethylsilicone (SE-54)

(HP fused silica capillary, 17m(L.) x 0.2mm(I.D.) x  
0.33  $\mu$ m(F.T.))

Detector Temp. : 300°C

Injector Temp. : 280°C

Flow rate : 0.83 ml/min. Helium

Injection mode : splitless

Oven Temp. : 180°C → 310 °C(25°C/min.)

### 3) 실험동물 및 시료제조

#### ① Animal

KIST 유전공학센터에서 양육된 Sprague-Dawley 웅성 rat (250±50g)를 사용하였으며 구입후 1주일이상 실험실에 적응시킨 후 혈액을 채혈하여 실험에 사용하였다. 양육시 적당량의 tap-water 와 고형사료(삼양사, Korea) 를 임의로 공급하였다

#### ② Sample preparation

Rat 의 경동맥으로부터 전체혈액을 채혈한 후, plasma 를 얻기 위하여 3,000 rpm 에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 또 4% Bovine serum albumin solution 은 100ml의 Krebs-Ringer Bicarbonate solution 에 4g 의 Bovine serum albumin 을 녹여서 만들었다. Krebs-Ringer Bicarbonate buffer 의 조성(M)은 NaCl(0.154), KCl(0.154), CaCl<sub>2</sub>(0.11), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.154), MgSO<sub>4</sub>(0.154), NaHCO<sub>3</sub>(0.154)이며, HCl을 사용하여 pH 7.4로 맞추어 사용하였다.

### 4) Protein Binding Experiments

Protein binding은 MPS-1(micropartition system, Amicon Division, W.R.

Grace & Co., USA)을 사용하여 ultrafiltration 방법으로 실험하였다 (14,15,16,17). Rat 로 부터 얻은 rat plasma 를 각 test tube 에 2970 $\mu$ l 씩 분주하고 각농도의 stanozolol stock solution 을 30  $\mu$ l 씩 가하여 전체 volume 이 3ml 인 혼합액을 만든다. 각 용액의 최종농도( $\mu$ M)는 1.5, 7.5, 10.0, 30.0, 50.0, 100.0, 150.0 이 되도록 하였다.

또한, Plasma 와 유사한 조성의 4% Bovine serum albumin solution 에 위와 같은 농도의 stanozolol 을 가하여 실험하였다.

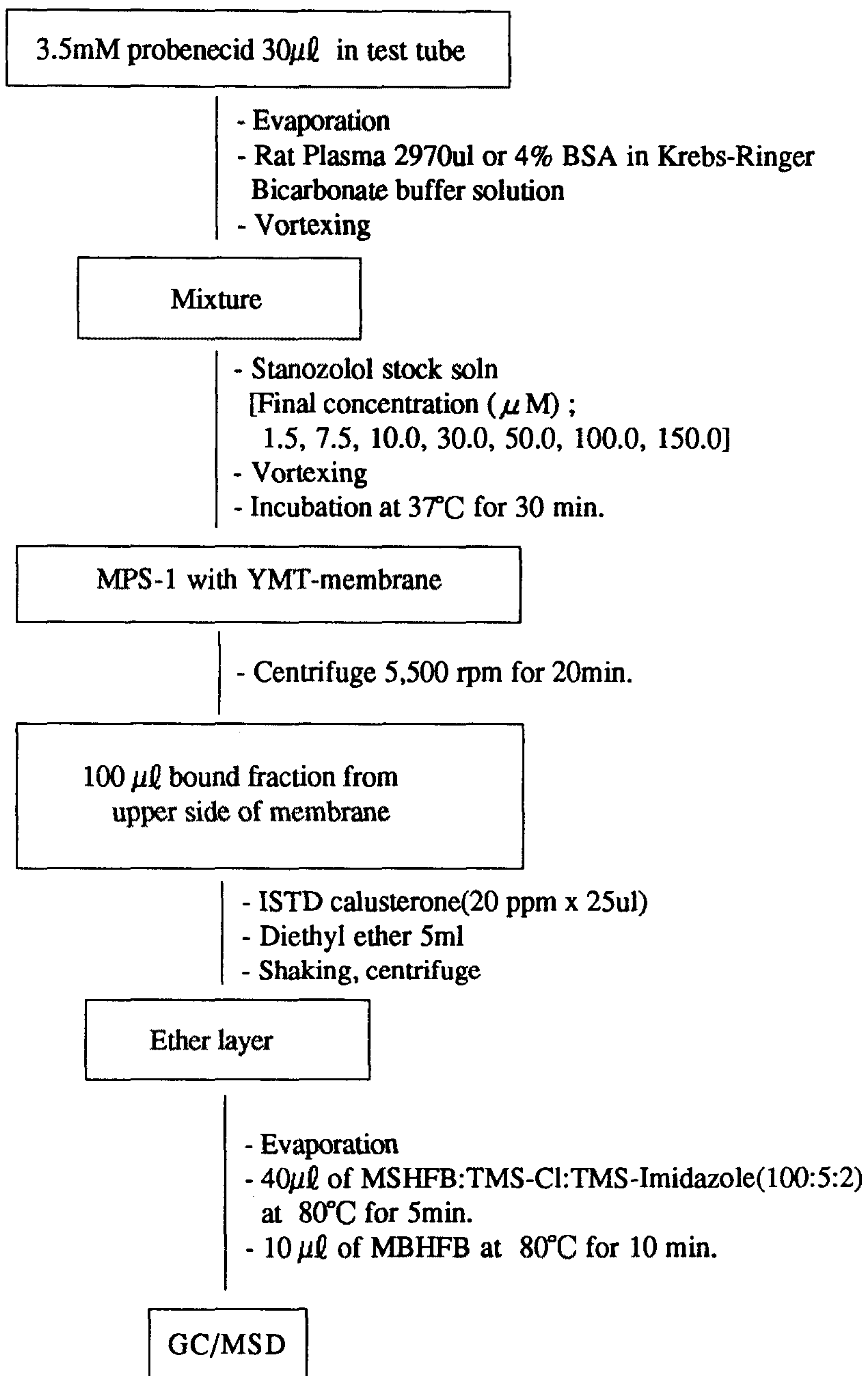
대조군은 각 test tube 에 rat plasma 를 가하고 stanozolol stock solution을 가하여 혼합한 액을 37°C water bath 에서 30분간 incubation 하고 약물과 protein 사이에 binding reaction 을 시킨후 전체 반응액 3ml 중 1ml 씩을 취하여 YMT membrane (YMT-30, 14MM)을 끼운 MPS-1 의 reservoir 에 넣고 5,500 rpm 에서 20분간 원심분리 하였다.

실험군은 methanol에 녹인 3.5 mM probenecid 30 $\mu$ l 를 각 test tube 에 넣고 vacuum rotary evaporator 에서 solvent 를 날려 보낸후, rat plasma 를 가하고 vortexing 하여 probenecid 와 plasma 가 잘혼합되게 하고 각 test tube 에 stanozolol stock solution 을 가하여 stanozolol 의 최종농도가 1.5, 7.5, 10.0, 30.0, 50.0, 100.0, 150.0 ( $\mu$ M)가 되도록 하게한 후, 대조군과 같은 조건으로 incubation 하고, MPS-1 에서 ultrafiltration 하였다. 원심분리후 YMT-membrane 의 upper side 에 존재하는 protein bound stanozolol 의 분석을 위해 100 $\mu$ l 씩을 취하고, membrane 의 lower side 로 filtration 된 volume 을 측정하여 free fraction 의 volume 을 확인하였다.

## 5) Stanozolol 의 정량

Scheme 1 에서 정리하여 나타낸바와 같이 , Binding experiments 에 서 YMT-membrane 의 upper side 에 존재하는 protein bound stanozolol fraction  $100\mu\text{l}$  를 취하여 각 test tube 에 넣고 internal standard 로서 20ppm calusterone  $25\mu\text{l}$  를 가하고, 혼합한 후, stanozolol의 추출을 위해 5ml 의 ether를 가하고 20분간 shaking 한 후 층분리를 위해 2,500rpm 에서 5분간 원심분리한다.

$-30^{\circ}\text{C}$  freezer에서 aqueous layer 와 organic layer 를 완전히 분리하 여, 분리된 ether 층을 vacuum rotary evaporator 에서 증발시키고 수 분을 완전히 건조시킨후 잔사에 MSHFB:TMS-Cl:TMS-Imidazole(100:5:2)  $40\mu\text{l}$  를 가하여  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 유도체화시키고, MBHFB  $10\mu\text{l}$  를 가한 후  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가열하여 재차 유도체 화 시켜 GC/MSD로 정량하였다. 기기조건 및 temperature programing 은 앞의 기기 및 분석조건에 나타내었고, GC/MSD 의 data acquisition 은 selected ion monitoring (SIM) 방법을 사용하였으며, stanozolol의 정량을 위해서는  $m/z$  581 ion( $M^{+}-15$ )을, internal standard 인 calusterone 을 위해서는  $m/z$  315 ion 을 선택하여 정량에 이용하 였다.



Scheme 1. Procedure for protein binding experiments of stanozolol



## 6) Protein binding parameter의 통계처리

Rat plasma 에 stanozolol 및 probenecid 를 가하고 YMT-membrane 을 부착한 MPS-1 (membrane partition system)을 이용하여 ultrafiltration method 로 실험한 data 를 PHARM/PCS program(18) 중의 Scatchard plot 에 적용하여 protein binding 에 관한 parameter 를 얻었다.

단백질과 결합한 약물의 농도는 다음의 식으로 표현할수 있다.



여기서 P는 약물과 결합하고 있지 않은 단백질의 결합부위 농도이며,  $C_f$ 는 유리형 약물농도,  $C_b$ 는 결합형 약물농도이다. 이 반응이 평형상태에 이르면 다음식으로 변형할 수 있으며

$$K_d = \frac{[P][C_f]}{[C_b]}$$

$K_d$  는 약물과 protein 과의 해리상수 (dissociation constant) 이며, 그역수 ( $1/k_d$ ) 는 결합상수 ( $k_s$ , association constant) 를 의미한다. 그리고

단백질 1 분자당의 결합부위의 수를  $n$ , total protein concentration 을  $[P_t]$  로 할때, total binding site의 농도는

$$n[P_t] = [P] + [C_b]$$

로 표현할 수 있으며, 단백질 한분자당 결합하고 있는 약물의 몰 수  $r$  은 다음식으로 표시될수 있다.

$$r = \frac{[C_b]}{[P_t]} = \frac{[C_b]}{\frac{K_d \cdot [C_b]}{[C_f]} + [C_b]} = \frac{n[C_b]}{\frac{K_d \cdot [C_b]}{[C_f]} + \frac{[C_b + C_f]}{[C_f]}}$$

$$= \frac{n \cdot [C_f]}{K_d + [C_f]}$$

그러므로,

$$\frac{r}{C_f} = \frac{n-r}{K_d} = \frac{n}{K_d} - \frac{r}{K_d}$$

$$\frac{C_b}{C_f} = \frac{nP_t}{K_d} - \frac{1}{K_d} \cdot C_b$$

이상과 같은 식을 바탕으로 하여  $C_b$  및  $C_b/C_f$ 를 계산하여 PHARM/PCS Program (18) 에서 Scatchard plotting 하여  $n \cdot P_t$  와  $K_d$  값을 구하여, 이를 protein binding 의 parameter 로 이용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

어느 한 약물의 약효발현을 위해서는 작용부위에서의 약물농도가 매우 중요한 요소가 된다. 그러나 작용부위에서의 정확한 약물농도 측정은 매우 어려우므로, 정량이 용이한 혈중의 약물 농도 측정이 주목되어 왔다.

Fig. 1 에서 보여지듯이, 경시적인 혈중농도 변화는

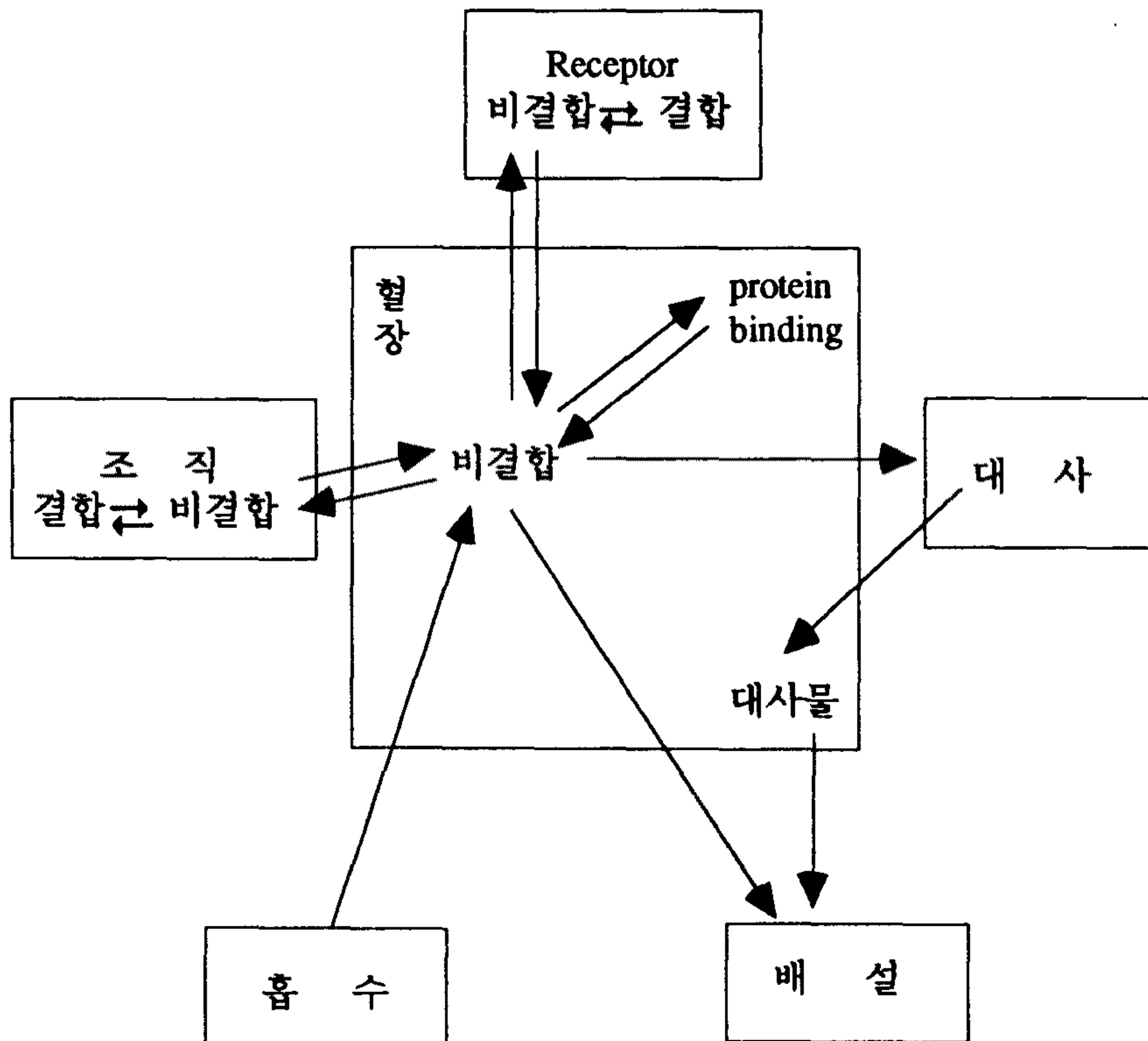


Fig. 1. 약물의 생체내 이행 (14)

(1) 투여부위에서의 흡수속도, (2) 간장등에 의한 대사속도, (3) 조직, 작용부위에의 분포속도, (4) 신장등에서의 체외로의 배설속도등이 관계하고 있다는 것은 분명하다. 그러나 어느 약물이라든가 화학물질이, 이런 변화과정에 영향을 끼친다고 하는 관점에서 정리해 보면,

- (1) 투여부위(소화관 등)에서의 흡수성의 변화
- (2) 저장, 수송부위 (혈장 단백질 등)에 있어서의 결합성의 변화, 치환현상
- (3) 작용부위 (receptor) 에의 약물 결합성의 변화
- (4) 약물대사효소의 움직임에 따른 유도, 저해 현상
- (5) 신장등에 있어서의 약물배설의 촉진과 저해 현상
- (6) 체액 전해질 평형의 변화

등이 된다고 알려져 있다.

이와같은 지식을 바탕으로, 우리는 이미 앞에서의 연구(12, 13)를 통해 stanozolol 의 배설에 미치는 probenecid 의 영향을 실험동물인 rat 를 사용하여 pharmacokinetic 연구결과를 얻어 보고한바 있다. 즉 stanozolol 단독 투여군 및 stanozolol 과 probenecid 병용투여군에서 약물동력학적 parameter 를 (Table 1) 보면 probenecid 병용투여군의 분포용적( $V_{d\beta}$ )은 stanozolol 단독 투여군에서의 값보다 유의성 ( $p<0.01$ )있게 증가하였고  $\beta$ -phase 의 반감기는 probenecid 투여에 의하여 약 4배 만큼 증가하였다. 병용투여군의 AUC 는 stanozolol 단독투여군 보다 2.5배이상 유의성 있게 ( $p<0.01$ ) 감소되었다. 또한 전신 clearance 는 probenecid 투여군에서 유의성 있게 ( $p<0.01$ ) 증가하였다. 이와같은 병용 투여군의 분포용적 ( $V_{d\beta}$ ) 및 전신

Table 1. Pharmacokinetic parameters after intravenous administration of stanozolol (20mg/kg) to rat.

Parameters	Treatment <sup>a</sup>	
	Without probenecid(n=5)	With probenecid(n=6)
$K_{12}, \text{min}^{-1}$	$0.0092 \pm 0.0041$	$0.0049 \pm 0.0012$
$K_{21}, \text{min}^{-1}$	$0.0348 \pm 0.0015$	$0.0047 \pm 0.0013$
$K_e, \text{min}^{-1}$	$0.0128 \pm 0.0018$	$0.0103 \pm 0.0012$
$V_{dss}, \text{ml.kg}^{-1}$	$2311.9 \pm 441.8$	$15528.1 \pm 5891.6$
$V_{d\beta}, \text{ml.kg}^{-1}$	$2385.8 \pm 577.7$	$24281.1 \pm 7633.1^b$
$AUC, \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{min}$	$891.9 \pm 126.8$	$347.3 \pm 48.8^c$
$t_{1/2\alpha}, \text{min}$	$28.9 \pm 6.9$	$40.3 \pm 5.4$
$t_{1/2\beta}, \text{min}$	$66.8 \pm 12.2$	$257.4 \pm 59.1^b$
$CLt, \text{ml.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$	$24.2 \pm 3.3$	$64.2 \pm 10.3^c$

a. Results were given as mean  $\pm$  S.E.

b. Significant at  $p < 0.05$

c. Significant at  $< 0.01$  †

clearance (CLt) 의 증가는 AUC 가 감소하였기 때문이라고 생각된다.

또한 plasma 에서의 stanozolol 농도와 probenecid 병용투여에 의한 소실곡선 (Fig. 2) 과 시간에 따른 urinary excretion rate (Fig. 3)에서, Fig. 2 의 stanozolol 의 혈장내 농도가 stanozolol 단독투여군과 probenecid 병용투여군과의 차가 time-dependent 하게 줄어들며, 약 5시간 이후에는 거의 큰 차이를 보여 주지 않는 사실, 그리고 약 90분까지는 두 군에서 혈장내 농도가 큰 차이를 보여주고 있다는 사실로 미루어, Fig. 3 의 0-90분 사이의 probenecid 병용투여군의 urinary excretion rate 가 단독투여군보다 더 크게 나오는 현상을 설명하였다.

뇨의 배설속도에 영향을 미치는 factor로서 아래와 같은 여러가지 요소들을 고려할수 있다고 알려져 있다 (9, 19).

- ㉠ 사구체여과속도(GFR)
- ㉡ 뇨의 flow rate
- ㉢ 뇨의 pH
- ㉣ 사구체의 약물수송기전
- ㉤ 혈장과의 단백결합 정도
- ㉥ 세뇨관의 수송기전
- ㉦ 약물의 화학적구조 및 lipophilicity (pka)
- ㉧ 약물의 metabolism

그러나 위의 여러 factor 중에서 뇨의 pH value (Table 2) 나 뇨의 flow rate

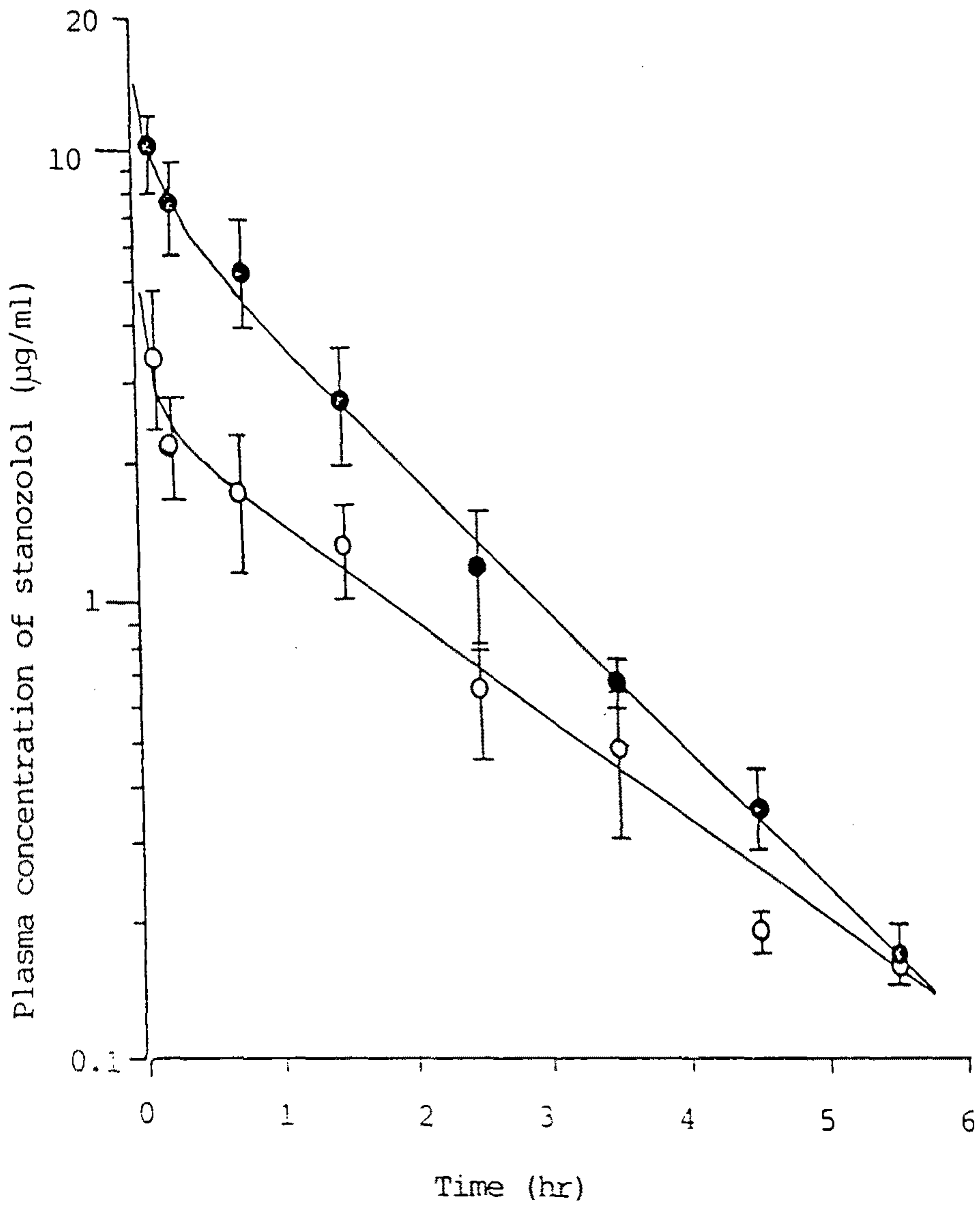


Fig. 2 : Plasma disappearance curve of stanozolol in rats.

—●—●—: stanozolol (n=5)

—○—○—: stanozolol + probenecid (n=6)

Each value represents mean  $\pm$  S.E.

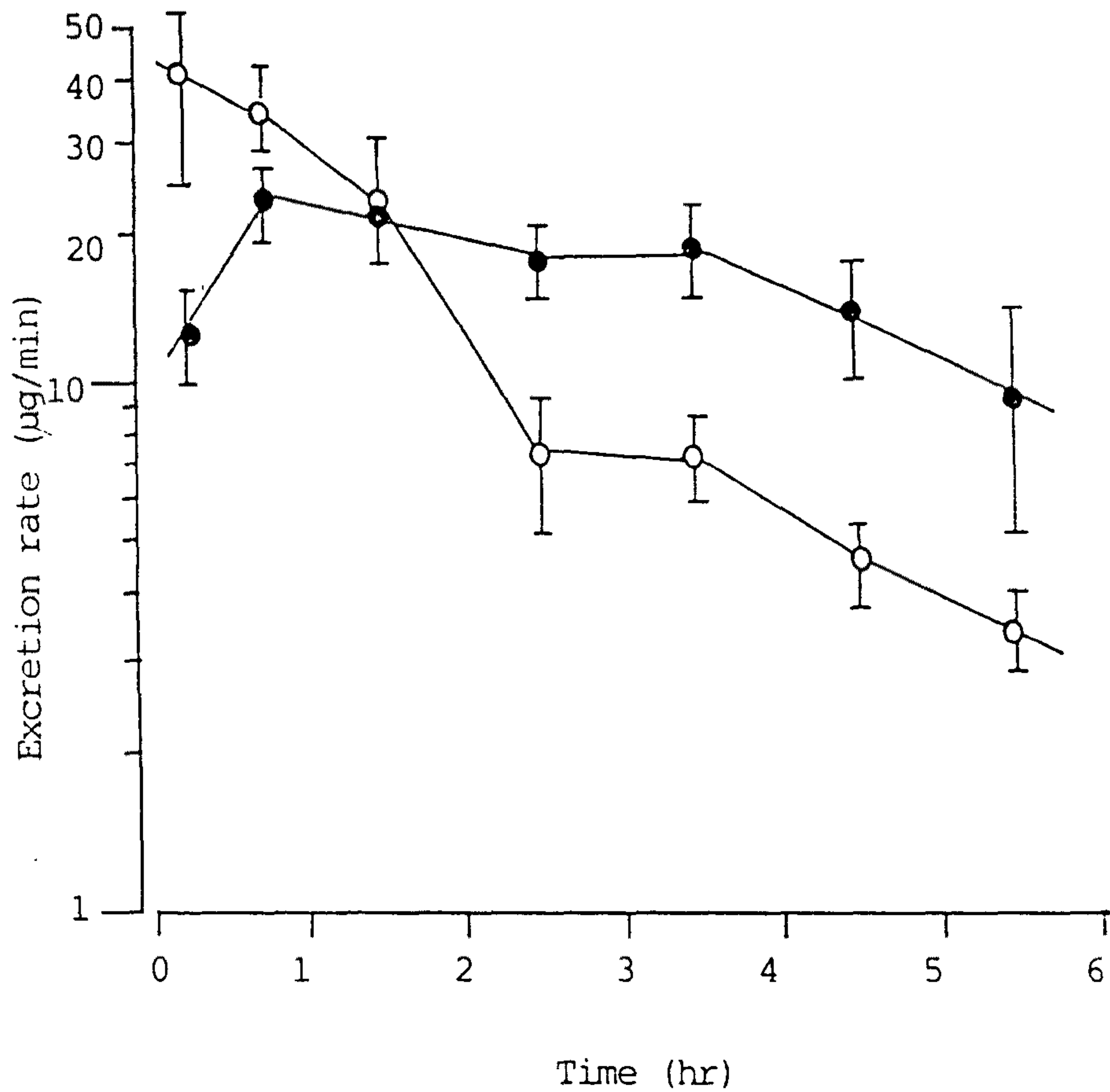


Fig. 3 : Urinary excretion rate vs. time plots in rats.

—●—●— : stanozolol (n=5)

—○—○— : stanozolol + probenecid (n=6)

Each value represents mean  $\pm$  S.E.



Table 2. pH values between two groups in rat urines.

Collection time	Without probenecid	With probenecid
0 - 30	6.3±1.3	8.1±1.8
30 - 60	5.8±0.4	6.8±1.7
60-120	6.6±1.6	7.1±1.3
120-180	6.1±0.9	7.7±1.9
180-240	5.6±0.6	6.8±1.3
240-300	6.5±0.2	6.8±1.5
300-360	6.0±0.4	7.8±2.2

Each value represents mean ± S.D. of 6 rats.

(Fig. 4)은 stanozolol 단독투여 및 probenecid 병용투여에 따라 별다른 영향을 받지 않은, 즉 두군사이에 유의성 있는 차이를 보여 주지는 않았다.

또 하나의 factor 인 Glomerular Filtration Rate 를 renal clearance method 에 의해 측정된 결과 (Table 3), Probenecid 의 병용투여는 GFR 을 변화시키지 않았으며, stanozolol 의 renal clearance 는 증가하였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 그러나 renal clearance 를 GFR 로 나눈 값인 clearance ratio 는 11.72 에서 17.27로 probenecid 병용투여군에서 유의성 있게 ( $p < 0.05$ ) 증가됨을 알수있었다.

이상까지의 pharmacokinetic data 를 종합하여 보면 앞서 보고하였듯이 rat 를 사용한 동물실험에서 stanozolol 과 probenecid 를 병용투여시 stanozolol 단독 투여군에 비교하여 AUC 가 유의성 있게 감소하였으며, 병

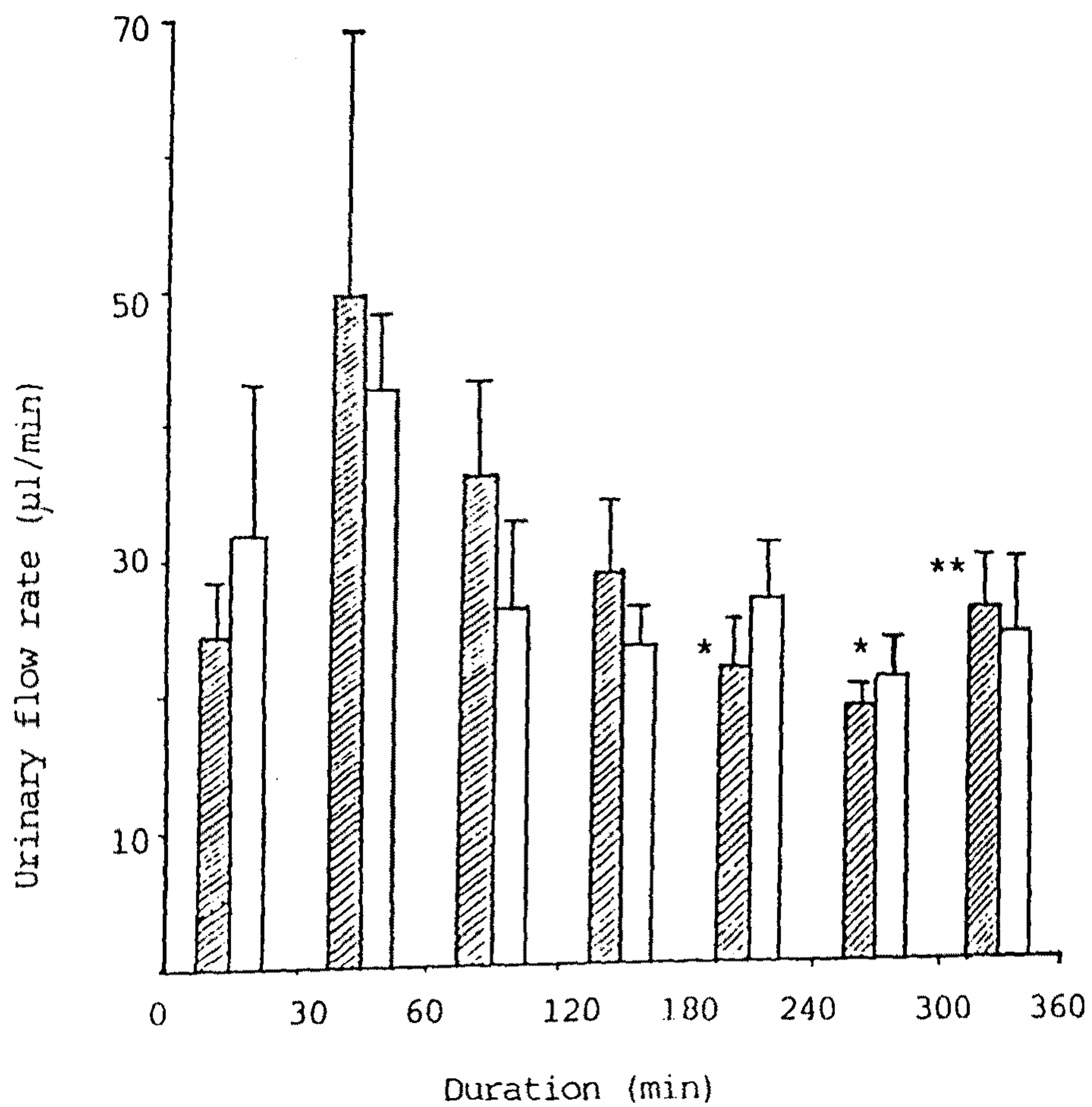


Fig. 4 : Urinary flow rate vs. duration (min.) plot.



: stanozolol



: stanozolol + probenecid

Each value represents mean  $\pm$  S.E. of 6 rats

(\* n=5, \*\* n=3)

Table 3. Urinary excretion of stanozolol by renal clearance method.

Rat No.	Flow rate (ml/min)	Stanozolol plasma conc. (ug/ml)	GFR (ml/min)	Excretion rate of stanozolol (ug/min)	Stanozolol renal clearance (ml/min)	Clarence ratio
<u>Treatment without probenecid</u>						
A	0.09 ±0.01	5.26 ±0.37	1.17 ±0.01	46.68 ±5.77	11.20 ±0.66	10.24 ±0.66
B	0.05 ±0.01	4.46 ±0.46	0.85 ±0.11	20.12 ±3.91	5.07 ±1.39	5.33 ±1.45
C	0.16 ±0.01	1.80 ±0.18	2.34 ±0.37	34.62 ±2.75	19.58 ±1.79	9.08 ±1.96
D	0.17 ±0.01	4.00 ±0.23	4.46 ±0.71	46.09 ±2.62	11.75 ±1.25	2.71 ±0.17
E	0.13 ±0.02	1.79 ±0.15	1.28 ±0.27	44.87 ±13.15	35.87 ±7.42	31.22 ±5.48
Mean	0.12 ±0.02	3.46 ±0.64	2.02 ±0.59	38.48 ±4.55	16.69 ±4.76	11.72 ±4.52
<u>Treatment with probenecid</u>						
A	0.16 ±0.03	1.39 ±0.05	3.40 ±1.41	45.58 ±7.32	33.61 ±6.77	18.43 ±7.03
B	0.15 ±0.01	1.75 ±0.06	1.73 ±0.08	47.37 ±6.57	27.26 ±3.95	15.61 ±1.52
C	0.19 ±0.01	2.06 ±0.33	2.02 ±0.24	31.79 ±0.78	16.95 ±2.97	8.27 ±0.50
D	0.15 ±0.03	2.17 ±0.48	3.67 ±0.37	38.67 ±2.93	20.44 ±4.69	6.17 ±2.04
E	0.11 ±0.02	1.15 ±0.03	1.38 ±0.26	47.53 ±7.58	41.39 ±6.44	37.87 ±14.02
Mean	0.15 ±0.01	1.70 ±0.17	2.44 ±0.41	42.19 ±2.74	27.86 ±3.99	17.27 ±5.03 <sup>a</sup>

a. Significant at  $p < 0.05$  in Student's paired t-test.

용투여군에서 분포용적 ( $V_{d\beta}$ ) 및 전신 clearance (CLt) 는 유의성있게 증가함을 알 수 있었다.

또한, 뇨의 pH 나 flow rate 는 두군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았으며 Clearance ratio는 probenecid 투여로 11.72에서 부터 17.27로 유의성 있게 증가되는 점등으로 미루어, 혈장에서 stanozolol 의 소실이 probenecid 에 의하여 증가한 것은 clearance ratio 가 증가한 것에 기인하였음을 보고하였다.

이미 앞에서도 언급하였듯이 뇨의 배설속도를 변화시킬수 있는 요소로서 여러가지 factor 가 있으며, excretion ratio 는 다음식으로 표현할 수 있다.

$$E.R = 1 + \frac{S - A}{GFR \cdot P_f}$$

여기에서 S는 세뇨관의 secretion rate, A는 재흡수 rate, GFR 은 사구체여과 속도이며,  $P_f$ 는 뇨 sampling 의 mid point 에서 채취한 혈장중의 유리형의 약물농도이다. 위식에서 볼수 있듯이 excretion rate 에는 혈장중의 유리약물농도 ( $P_f$ )가 관여하므로, 또하나의 factor 인 혈장중의 유리약물 농도를 구하기 위해 in vitro 에서 rat plasma 를 사용하여 stanozolol 의 단백질 결합에 미치는 probenecid 의 영향을 검토하였다.

혈장단백 (주로 albumin 분획)은 약물과 결합하여 약물의 저장고로서 뿐만 아니라 수송 및 적절한 조직부위에서의 방출이라고 하는 매우 중요

한 역할을 하고 있다. 이와같은 결합형 약물은 약리학적으로 불활성이거나, 약물이 대사되던가, 조직에 축적된다든가 또는 체외로 배설될 때는 그때그때에 따라 결합형이 서서히 약리학적으로 활성인 비결합형으로 변환되는 것이다.

혈청 또는 혈장 단백질에 대한 약물의 결합양식에 대하여는 현재까지 충분하게 이해되어 있지는 않으나, 많은 약물이 생체내의 단백질과 광범위하게 결합한다고 알려져 있다. 성인의 혈장에 함유되어 있는 총단백질량은 약 200g 정도라고 알려져있고, 그 총표면적은 단백질분자를 완전한 구형이라고 생각할 경우  $130,000\text{m}^2$  정도가 되어, 저분자인 약물은 그 표면에 거의 무한에 가깝게 결합할수 있다고 생각되나, 실제 albumin 분자의 1-2 개소에 binding 하는데 불과하다.

또한 혈장 단백질의 농도는  $4.5 \times 10^{-4}\text{M}$  정도로 알려져 있으며, 분자량이 300인 경우의 약물은, 계산해 보면 혈장 1ml 당  $180 \mu\text{g}$ 이 포화결합량으로서 산출된다.

이와같이 중요한 약물발현 수송에 중요한 역할을 하는 단백질결합 실험의 측정에는 여러가지 방법, 예를 들면 평형투석법 (equilibrium dialysis method), 한외여과법 (ultrafiltration method) (16, 17), 흡수 spectrum 법, 형광 spectrum 법과 같은 spectrum을 이용한 방법등 여러방법이 고안되어 널리 사용되고 있으나, 본 실험에서는 최근에 kit 화 되어 널리 애용되고 있는 MPS-1(micropartition system) 을 사용하여 stanozolol 의 protein binding 실험을 한후, YMT-membrane 의 upper side 에 존재하는 bound fraction  $100\mu\text{l}$  를 취하여 protein bound 된 stanozolol 을 정량하고 PHARM/PCS program 상의 Scatchard plot 에 data 를 적용시켜 parameter 를 구하였다.

우선은 정량을 위하여 rat plasma 에 stanozolol ( $\mu\text{g/ml}$ ) 을 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 의 농도로 spike 하여 앞에 서술한 방법에 따라 전처리하여 GC/MSD 로 분석하여 calibration curve 를 Fig. 5 에 나타내었다.

Stanozolol 의 최종농도( $\mu\text{M}$ ) 를 1.5, 7.5, 10.0, 30.0, 50.0, 100.0, 150.0 이 되도록하고, 3.5mM probenecid  $30\mu\text{l}$  를 가해 stanozolol 의 binding 에 미치는 probenecid 의 영향을 계산하여 plot 해 보면 Fig. 6 과 같이 된다.

이와같이 Scatchard plot 이 결합친화성이 다른 결합부위가 존재시 곡선이 된다는 사실에 비추어 볼때 결합친화성이 다른 결합부위가 존재함을 알 수 있다. PHARM/PCS program 의 Scatchard plot에 data 를 적용하였을때,

stanozolol 처리군은  $\frac{C_b}{C_f} = -0.8985769 * C_b + 4.567369$  라는 방정식으로부터  $Kd_1$  과  $Ka_1$  및  $n_1 \cdot P(t)$ 를  $\frac{C_b}{C_f} = -0.01229447 * C_b + 1.407898$  에서  $Kd_2$  와  $Ka_2$  및  $n_2 \cdot P(t)$  를, stanozolol 과 probenecid 병용투여군에서는  $\frac{C_b}{C_f} = -0.6720966 * C_b + 3.296337$  에서  $Kd_1$  과  $Ka_1$  및  $n_1 \cdot P(t)$ 를,  $\frac{C_b}{C_f} = 1.633484 E - 0.3 * C_b + 0.965098$  에서  $Kd_2$  와  $Ka_2$  및  $n_2 \cdot P(t)$  를 구하여 Table 4 에 정리 하였다.

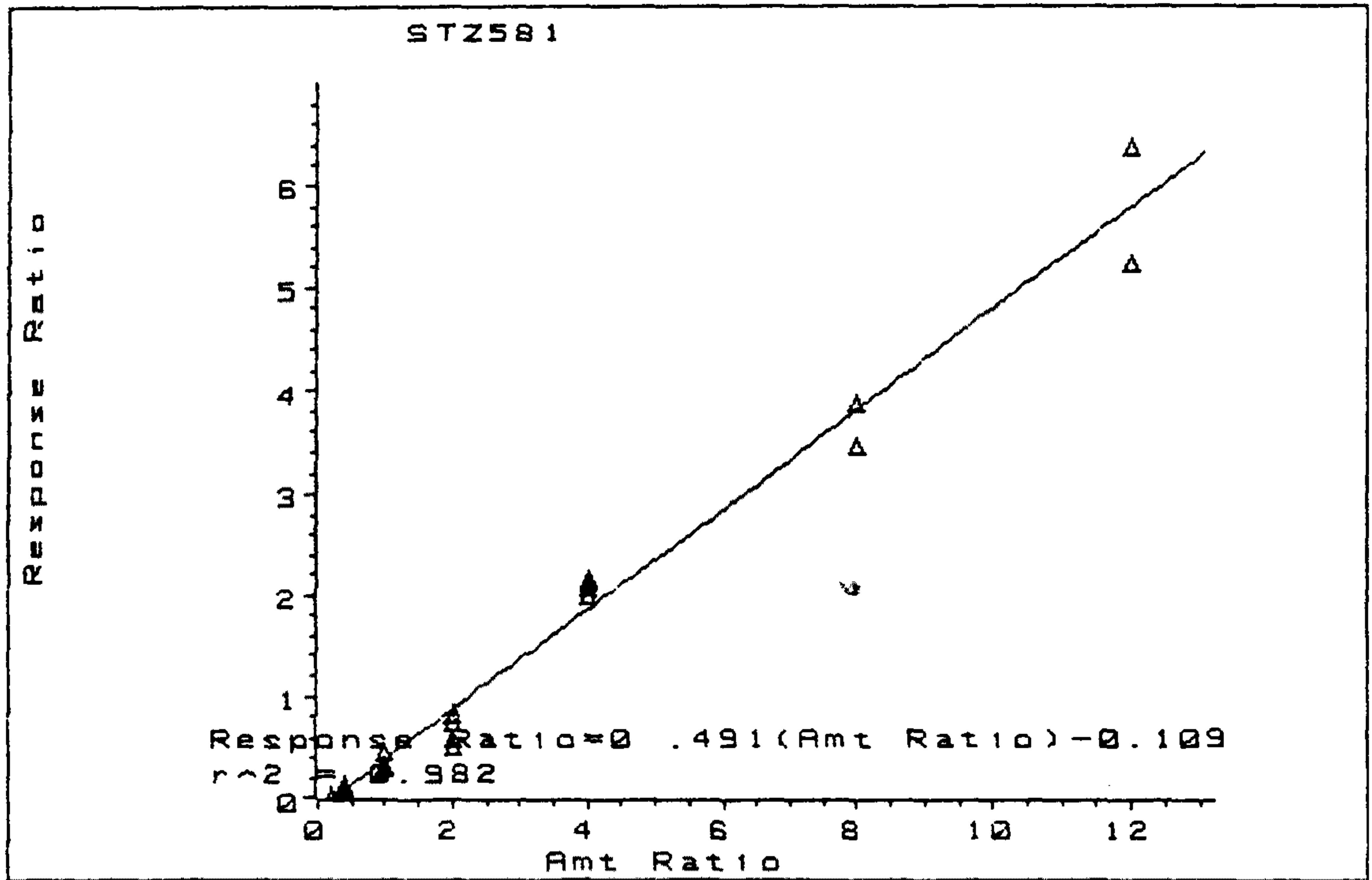


Fig. 5 : Calibration curve of stanozolol.

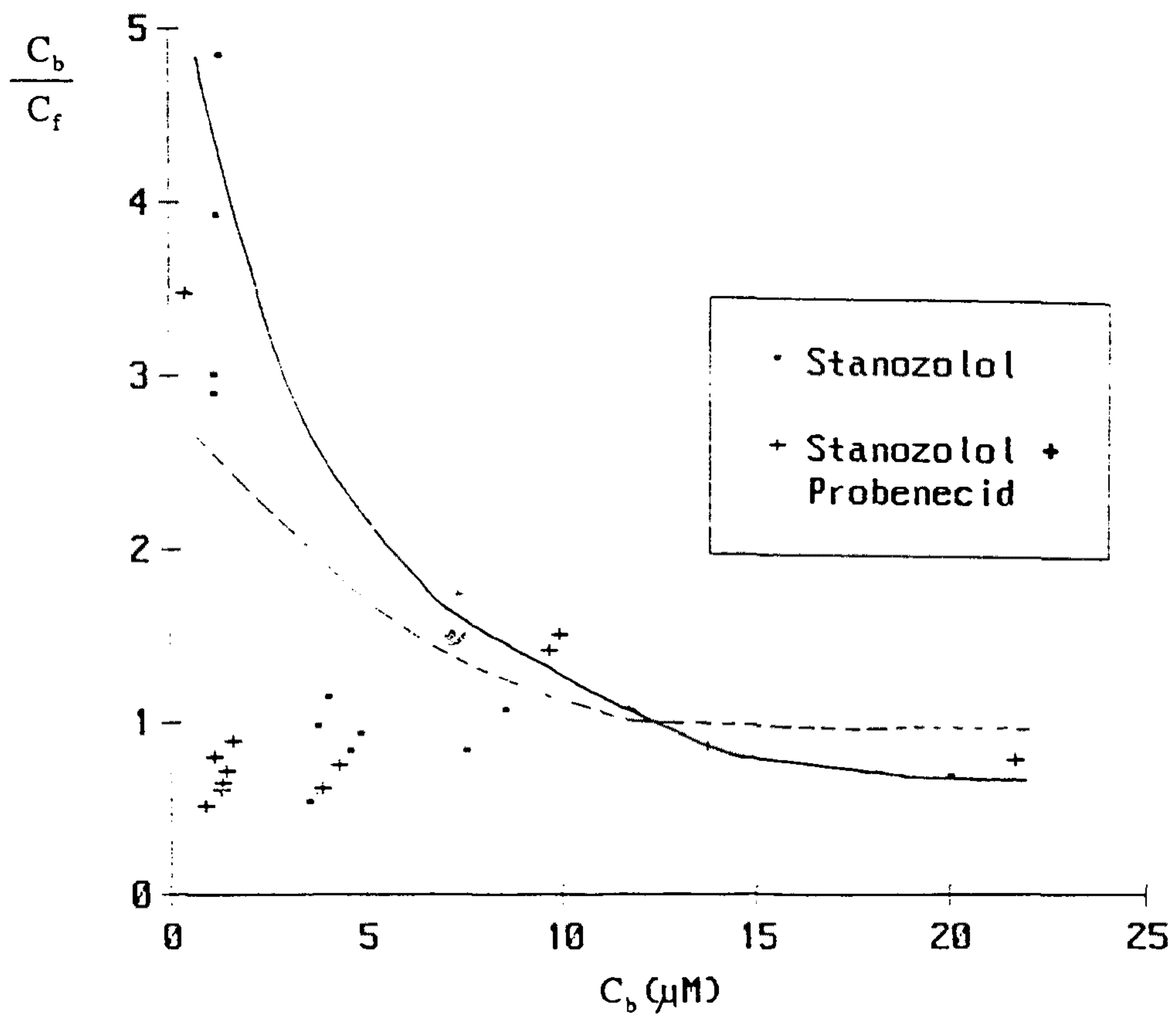


Fig. 6 : Effect of probenecid on stanozolol - protein binding in Scatchard plot.



Table 4. Effect of probenecid on association constant and total protein binding concentration of stanozolol in rat plasma.

	$n_1 \cdot P(t) (\mu M)$	$Ka_1 (M^{-1})$	$n_2 \cdot P(t) (\mu M)$	$Ka_2 (M^{-1})$
Stanozolol	$5.08 \pm 0.49$	$8.985 \times 10^5$	$114.51 \pm 55.09$	$1.23 \times 10^4$
Stanozolol + Probenecid	$4.90 \pm 0.59$	$6.720 \times 10^5$	$590.82 \pm 41.2$	$0.16 \times 10^4$

Protein binding 의 association constant 를 나타내는  $Ka_1$  및  $Ka_2(M^{-1})$  값은 stanozolol 만을 처리한 군에서는  $Ka_1$  이  $8.985 \times 10^5$  이었으며 stanozolol 과 probenecid 병용처리군에서는  $6.720 \times 10^5$  으로 association constant 가 감소하였으 며,  $Ka_2 (M^{-1})$  또한  $1.23 \times 10^4$  에서  $0.16 \times 10^4$  으로 감소하였다. 이것은 probenecid 로 인하여 stanozolol 의 protein binding 이 억제되는 즉 유리형의 stanozolol 이 증가하는 것을 의미하고 있다. Rat 혈청에서 total protein concentration 인  $P(t)$  의 정확한 량을 예측하기는 어려우나 앞에서 언급하였듯이 혈청에서  $400 \mu M$ 로 가정할때 binding site  $n_1$  및  $n_2$  의 값은 대부분 1이하로 나타난다. 단지 stanozolol 과 probenecid 군의  $n_2$  만이 1 을 넘는 것이 되는데 이는 다른 문헌에서와 비교할때 차이가 나는 점으로 좀더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

우리는 앞에서 rat 를 사용한 동물실험에서 stanozolol 과 probenecid 를 병용투여시에는 stanozolol 단독투여시에 비교하여 AUC 의 유의성 있는 감소, 분포용적 및 전신 clearance 의 유의성 있는 증가, 그리고 clearance

ratio 의 유의성 있는 증가등을 보고하였다. 이를 혈청과 단백결합의 관점에서 유추해보면 probenecid 로 인한 association constant 의 감소는 즉 probenecid 투여로 인해 stanozolol 의 free fraction 이 증가하였고 이러한 free form 의 stanozolol 의 증가는 앞에서 보고한 유의성있는 분포용적의 증가의 원인으로 설명될 수 있을 것이다.

또다른 요소로서, 약물의 포합체는 수용성의 증가로 인해 protein binding 이나 reabsorption 이 감소하기 때문에 hormone 의 신배설에 영향을 미칠수 있다고도 보고(19) 되고 있다. 이 또한 고려되어야할 factor 이고, 보다 정확한 신배설 기전연구및 protein binding assay 를 위하여는 radioisotope labelled stanozolol 과 같이 radioisotope 를 사용한 실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

#### 4. 참고문헌

- 1) K. Little and L. Munuera, Some mechanisms of action of stanozolol (stromba) and its interactions with cortisone. *Current Therapeutic Research*, 12 (5), 291-305, 1970.
- 2) Remington's pharmaceutical sciences (17th Ed.), pp. 939-944, 1985, Mack press.
- 3) G.G. Thompson, M. Small, G.D.O. Lowe, C.D. Forbes, B.K. Park, G. Scobie, and M.J. Brodie, Effect of stanozolol on  $\delta$ -aminolaevulinic acid synthase and hepatic monooxygenase activity in man and rat. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26, 587-590, 1984.
- 4) Hea-Young P. Choo, Oh-Seung Kwon, and Jongsei Park, Quantitative determination of stanozolol and its metabolite in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Analyt. Toxicol.*, 14, 109-112, 1990.
- 5) R.J. Ward, C.H.L. Shackleton and A.M. Lawson, Gas chromatographic-Mass spectrometric methods for the detection and identification of anabolic steroid drugs. *Br. J. Sports Med.*, 9 (2), 93-97, 1975.
- 6) H.A. Humpt and G.D. Rovere, *Am. J. Sports Med.*, 12, 469, 1984.
- 7) IOC Medical Commission, Games of XXI Olympiad Montreal, 1976.
- 8) R.J. Ward, A.M. Lawson and C.H.L. Shackleton, Screening by gas chromatography-mass spectrometry for metabolites of five commonly used anabolic steroids. *Mass Spectrum Drug Metab. [Proc. Int. Symp.]*, 465-474, 1977.

- 9) A.G. Gilman and L.S. Goodman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (7th Ed.), pp. 921-925, MacMillan Publishing Company. NY. 1985.
- 10) M. Gibaldi, D. Davidson, M.E. Plaut and M.A. Schwartz. Modification of penicillin distribution and elimination by probenecid, *Int. Z. Klin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 3, 182-189, 1970.
- 11) P. Chennavasin R. Seiwel, D.C. Brater and W.M.M. Liang. Pharmacodynamic analysis of the furosemide-probenecid interaction in man. *Kidney International*, 16, 187-195, 1979.
- 12) 화학물질의 약리.대사에 관한 연구 (2차), 과학기술처, 1990.
- 13) J.-C. RYU, O.-S. Kwon, Y.-S. Song, J.-S. Yang, J.-W. Seo and J. Park, Effect of Probenecid on the Pharmacokinetics and Renal Excretion of Stanazolol, an Anabolic Steroid, in Rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (submitted), 1991.
- 14) 村田 敏郎, 有田 降一, *生物藥劑學*, 南江堂, Kyoto, P.229-255, 1975 (Japan)
- 15) M. Hanano, K. Umemura and T. Iga, *Applied Pharmacokinetics - Theory and Experiment*. pp. 237-430, Soft Science, Inc., Tokyo, 1985.
- 16) 佐野光司, 단백질합 「Radioisotope : 약물대사실험법」, p. 553-565, Maruzen Publishing Co., 1981, Tokyo.
- 17) Amicon News, No. 12, 1980
- 18) R. J. Tallarida and R.B. Murray, *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*, 2nd Ed. with program Disk, PHARM/PCS, Version 4, Springer - Verlag, New York - Berlin - Heidelberg - London -Paris - Tokyo

(1987)

- 19) J.V. Møller and M.I. Sheikh, Renal Organic Anion Transport System :  
Pharmacological, Physiological and Biochemical Aspects., Pharmacological  
Review, 34(4), 315-358, 1983.

## 제 2 절 Human 에서의 Stanozolol 과 Probenecid 의 약물상호작용에 따른 배설연구

### 1. 서 론

Stanozolol (1,2) 에 관해서는 이미 앞절 서론부분에서 의약품으로서의 용도(3) 와 이의 남용에 따른 분석상의 문제점(4, 5) 등에 관해 설명한바 있다. 또한 probenecid와 유기산약물간의 상호작용(6,7,8) 은 보고되어 있으나 anabolic steroid 와의 상호작용은 동물을 이용한 실험(9,10)을 제외하고 human 에서의 실제 excretion 을 inhibition 시키는 data 가 없어 실제 human volunteer 에게 투여한후의 urine 을 분석하여 stanozolol 의 신배설에 미치는 probenecid 의 영향을 살펴보고자 하였다.

우리는 이미 앞에서(4,9), stanozolol 의 human 에서의 대사산물로서 3'-hydroxystanozolol 의 GC/MSD 에서의 확인및 정량과 detection limit 을 결정하여 stanozolol 은 1 ng/ml 로, 3'-hydroxystanozolol 은 1 ng/ml 이하로 보고한 바 있다.

또한 stanozolol 의  $t_{1/2\alpha}$  및  $t_{1/2\beta}$  는 각각 7.7과 38.5 시간으로, 3'-hydroxystanozolol 의 반감기는 약 15.1시간이며, stanozolol 은 7.5시간에서, 3'-hydroxystanozolol 은 18.5시간에서 최대 excretion 이 일어남을 이미 보고하였다. 이와같은 stanozolol 단독투여시 human 에서의 stanozolol 및 그 대사체인 3'-hydroxystanozolol 의 동태에 관한 기초자료를 가지고, 실제 유기산들의 신배설 저해제로 잘 알려진 probenecid 에 의해 steroid 인 stanozolol 및 그 대사체 3'-hydroxystanozolol 의 배설에 미치는 영향을 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 시약 및 기구

#### ① 시약

Probenecid (대웅제약, 500mg/Tab), Heparin-Na (Sigma), Pentobarbital-Na Amp. (50mg/ml, 한림제약), Stanozolol (한일약품), Calusterone (Upjohn Co., Kalamanzoo, USA), Ambelite XAD-2 resin (Particle size ; 0.15 -0.2mm, Serva Heidelberg. FRG), 0.2M K-Phosphate buffer (pH 7.0),  $\beta$ -Glucuronidase (E. Coli ; Boehringer), MSHFB (N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutyramide), MBHFB (N-methyl-bis-heptafluorobutyramide ; Macherey & Nagel, F.R.G.), TMS-Cl (trimethylchlorosilane ; Sigma), TMS-Imidazole (trimethylsilyl imidazole ; Sigma), 그외 필요한 시약은 특급 및 일급 이상을 사용하였다.

#### ② 기구

Centrifuge (Dupont, U.S.A.)  
Vortex mixer (VMR, U.S.A.)  
Vacuum rotary evaporator (Buchi, Switzerland)  
Shaker (Buchler, F.R.G.)  
Heating Bloc (Liebisch, F.R.G.)  
Freezer (Lauda, F.R.G.)

## 2) Human Volunteer

신체건강한 volunteer 3명(평균체중 약 60kg)으로부터 이 실험에 참가하겠다는 동의를 구한 후 실험을 시작하였다. 먼저 3명의 volunteer로부터 blank 뇨를 받은후 단독투여군과 병용투여군의 뇨를 모았다. 단독투여군은 stanozolol 정 (2mg/Tab x 5정 ; Bestanabol , Hanil Pharm. Co Korea) 10mg 을 경구투여한 후 56시간 까지 뇨를 모았으며 모아진 뇨는 분석할때까지 -5°C 에서 보관하였다. 병용투여군은 동일한 volunteer를 사용하여 단독투여군의 뇨를 받은 후 실험하였다. 우선 probenecid (500mg/Tab x 2정 ; 대응제약, Korea ) 1g 을 복용시키고, 1시간이 경과한 후 단독투여군에서와 같은 용량의 stanozolol 10mg을 투여하여 56시간까지의 뇨를 모았으며, 단독투여군과 같이 뇨의 분석전까지 -5°C 에서 보관하였다. 단독투여군과 병용투여군 모두에서 56시간 동안 뇨를 받는 시간 간격은 0-1, 1-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-21, 21-24, 24-28, 28-32, 32-36, 36-45, 45-48, 48-52 그리고 52-56 시간이었고, 뇨를 받는 기간 동안 부족한 뇨의 부피를 보충하기 위하여 물 (200-300ml) 을 마시게 하였다.

## 3) Stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 의 분석방법

### ① 검량곡선의 작성

Human volunteers 의 Blank 뇨 5ml 에 stanozolol 및 3'-hydroxystano-



zolol stock solution 을 가하여 각각 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 700, 1000ng/ml 의 농도가 되게하고, 내부표준물질로서 calusterone (20 ppm) 25 $\mu$ l 를 가한후 Scheme 1 과 같은 procedure 로 분석하였다. 얻은 결과로 부터 stanozolol 과 3'-hydroxystanozolol 각각의 검량선을 작성하고 이 검량선을 통해 각 물질의 정량에 이용하였다.

## ② 기기 및 분석조건

### - 기기

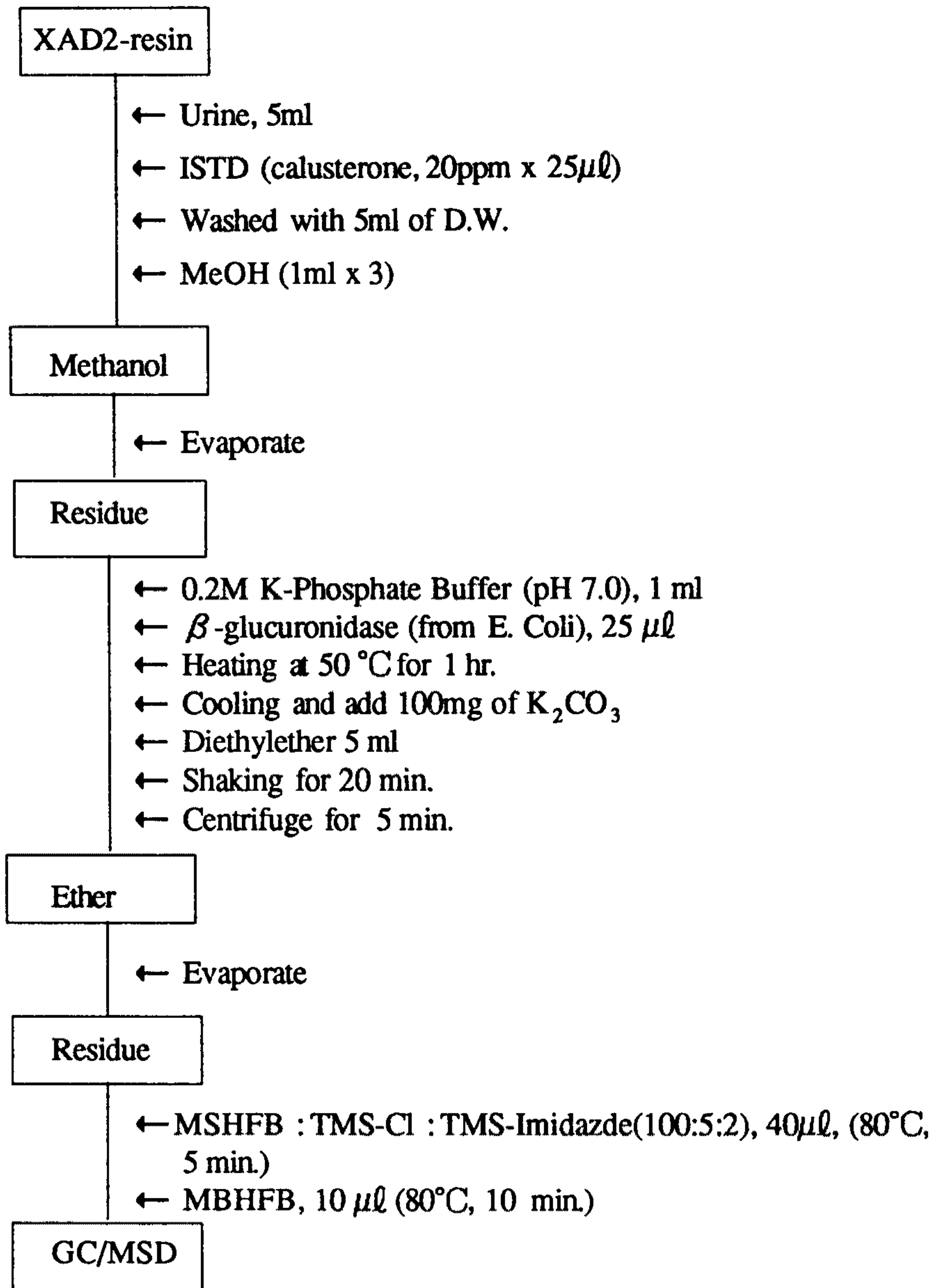
- . GC/MSD (HP 5890A/5970B)
- . HP 59970C MS Chemstation
- . HP 7946 Disc Drive
- . HP 2934A Dot Matrix Printer

### - 분석조건

- . Column : 5%-phenylmethylsilicone (SE-54)  
(HP fused silica capillary, 17m(L.) x 0.2mm(I.D.) x 0.33  $\mu$ m(F.T.))
- . Detector Temp. : 300°C
- . Injector Temp. : 280°C
- . Flow rate : 0.83ml/min. Helium
- . Injection mode : splitless
- . Oven Temp. : 180°C  $\rightarrow$  310°C (25°C/min.)

③ Human volunteer 의 urine 에서의 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol의 정량

뇨에서의 stanozolol 분석법은 M. Donike 등의 방법(11) 을 수정하여 사용하였다(Scheme 1). 정해진 시간에 받은 urine 을 원심분리하고 그 상층액을 5 ml 취하여 XAD-2 resin 을 넣은 column 을 통과시킨다. 내부표준물질로서는 calusterone (20 ppm) 25 $\mu$ l 를 가하고 urine sample 과 같은 양의 증류수 5ml 로 XAD-2 resin 을 씻어 주었다. 증류시킨 methanol 1ml 로 column 을 3회 elution 시키고 이 methanol elute 를 rotary evaporator 에서 증발시킨다. Methanol 이 증발된후 그 잔사에 0.2M K.-phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml 와 glucuronide conjugate form 로 배설되는 stanozolol 을 가수분해 하기 위해  $\beta$ -glucuronidase (100U/ml) 25 $\mu$ l 를 가하고 50°C에서 1 시간 동안 가열하였다. 가열후 test tube 는 실온에서 냉각시키고 potassium carbonate 100mg 과 diethyl ether 5 ml 을 넣고 shaker 에서 20분간 추출하였다. 2,500rpm 에서 5분간 원심분리하여 aqueous layer 와 organic layer 를 freezer (-30°C)에서 분리하고, ether 층을 다른 test tube 에 옮기고 이 ether 를 증발시킨후, vacuum dessicator (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH) 에서 수분을 완전하게 제거시켰다. 수분이 완전히 제거된 residue에 MSHFB:TMS-Cl:TMS-Imidazole (100:5:2, v/v/v) 40  $\mu$ l 를 넣고 80°C에서 5분간 유도체화시키고, 재차 MBHFB 10 $\mu$ l 를 넣고 80°C에서 10분간 heating bloc 을 사용하여 가열하였으며, GC/MSD 를 사용하여 위에 적은 분석조건에서 분석한 후 검량선을 이용하여 정량하였다.



Scheme 1. Extraction and derivatization procedure for stanozolol analysis

#### ④ GC/MS 의 data acquisition

GC/MS의 selected ion monitoring (SIM) 방법을 사용하여, splitless mode 에서 분석하여 data 를 얻었다. stanozolol 은 (Fig. 1A)  $m/z$  143 (D-ring cleavage), 581 ( $M^+-15$ ), 596 ( $M^+$ )을, metabolite 인 3'-hydroxystanozolol 은 (Fig. 1B)  $m/z$  143, 378, 669 ( $M^+-15$ ), 684( $M^+$ )를 선택하였으며, 내부표준물질인 calusterone 은  $m/z$  315를 선택하여 data를 얻었다. 이 이온들 중에서 calusterone 은  $m/z$  315, stanozolol 은  $m/z$  143 또는 581을, 그리고 3'-hydroxystanozolol 은  $m/z$  669 를 사용하여 정량분석에 이용하였다.

#### 4) Pharmacokinetic Parameter 및 통계처리

Human volunteer 에 stanozolol 단독 또는 stanozolol 과 병용하여 probenecid 를 경구투여한 후 시간별로 채취한 urine 으로부터, stanozolol 및 그 대사체인 3'-hydroxystanozolol 의 농도를 정량하여 personal computer (Acer 1100 Series 20C)를 사용하여 MULTI Program (12,13,14) 으로 Excretion rate-time plot 의 방법에 의해, 배설속도 상수, AUC, 반감기, 최대배설시간 및 최대배설속도등을 구하였다.

Stanozolol 과 3'-hydroxystanozolol 의 56시간까지 배설된 누적량을 시간별로, 0.5hr, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0, 16.5, 22.5, 26, 30, 34, 40.5, 46.5, 50.5, 54.0, 56.0 의 각 시간별 누적량을 계산하여 stanozolol 의 누적량 및 3'-hydroxystanozolol 의 누적량을 구하였다. 또한 각군의 모든

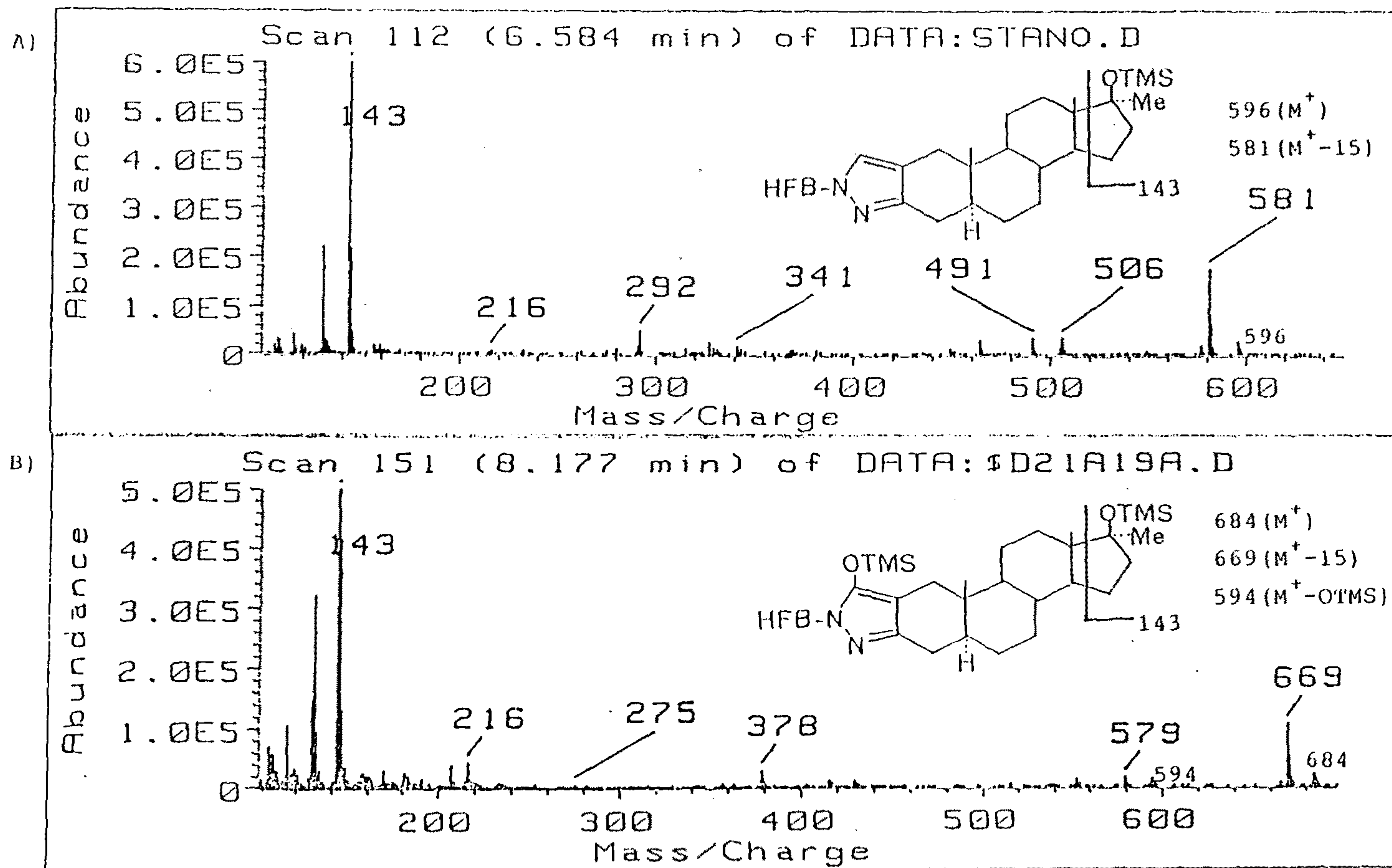


Fig. 1 : Scan spectrum of stanozolol-N-HFB-OTMS(A) and 3'-hydroxystanozolol-N-HFB-(OTMS)<sub>2</sub>(B).

data 는 mean  $\pm$ S.E. 로 표시하였으며, 두군의 유의성을 검정하기 위하여 paired Student's t-test 에 의하여 유의성검정을 하였다. 통계적으로  $P < 0.05$  인 값을 유의성이 있는 것으로 판단하였으며 PHARM/PCS program (15)을 사용하여 통계처리하였다.

### 3. 결과 및 고찰

우리는 이미 앞의 보고(9,10)등을 통해, 화학구조상으로 pyrazole ring 을 갖고 있어, 분석상의 어려움이 큰 anabolic steroid 인 stanozolol 의 분석법 정립 및 human 및 animal 에서의 stanozolol 의 kinetics 및 renal excretion study 등을 보고한바 있다. 본 연구에서는 위에서 얻은 결과들이 실제로 human 에서 probenecid 에 의해 어떤 영향을 받는지를 연구하고자 한것이다.

#### 가) 검량곡선

Blank urine 에 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm 의 stock solution 을 spike 하여 최종농도가 1ng/ml, 2ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml, 500ng/ml, 700ng/ml, 1000ng/ml 이 되게하여 1-1000ng/ml 범위내에서 검량선을 작성하였

다. Stanozolol은 O-TMS-N-HFB 의 유도체를 만들어서 m/z 581을, 3'-hydroxystanozolol 은 N-HFB-(O-TMS)<sub>2</sub> 유도체의 m/z 669를 선택하였다. 이들 두 ion은 calusterone-(O-TMS)<sub>2</sub> 에서 형성된 m/z 315를 내부표준물질로 하여 그 면적비와 농도를 대조하여 검량곡선을 작성하였다. 위와같은 방법으로 구한 검량곡선은 Fig. 2.에 나타난 바와 같이 stanozolol (Fig. 2A)에서는  $y=0.556x-0.169$  의 직선식을 얻었으며 상관계수(r) 는 0.985로 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 3'-hydroxystanozolol (Fig. 2B) 또한  $y=0.351x - 0.060$  의 직선식을 나타내었으며, 0.995의 상관계수를 보여주어 1-1000ng/ml 범위내에서 좋은 직선성을 나타냄을 알수 있었다.

나) Excretion rate -time plot 및 kinetic parameter.

앞에서도 언급하였듯이, 앞의 결과보고(4,9)에서 human volunteer 에게 20mg 의 stanozolol 을 경구투여하여 urine 으로 배설된 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 의 영향등을 이미 살펴보았다. 즉 stanozolol 은 72시간까지 총배설된량의 67%가 24시간 이내에, 88%가 48시간 이내에 배설됨을 알수 있었고, 3'-hydroxystanozolol 은 24시간 이내에 50%, 48시간 이내에 85%가 신장을 통하여 배설됨을 알수 있었다. Stanozolol 과 3'-hydroxystanozolol 로 배설된 총량은 경구투여량의 3% 이었다. Excretion rate 와 시간에 대한 plot 으로부터 구한 반감기는, stanozolol 의  $t_{1/2\alpha}$  및  $t_{1/2\beta}$  가 각각 7.7, 38.5 시간이었으므로 약 48시간까지는  $t_{1/2\alpha}$  가 7시간이어서 비교적

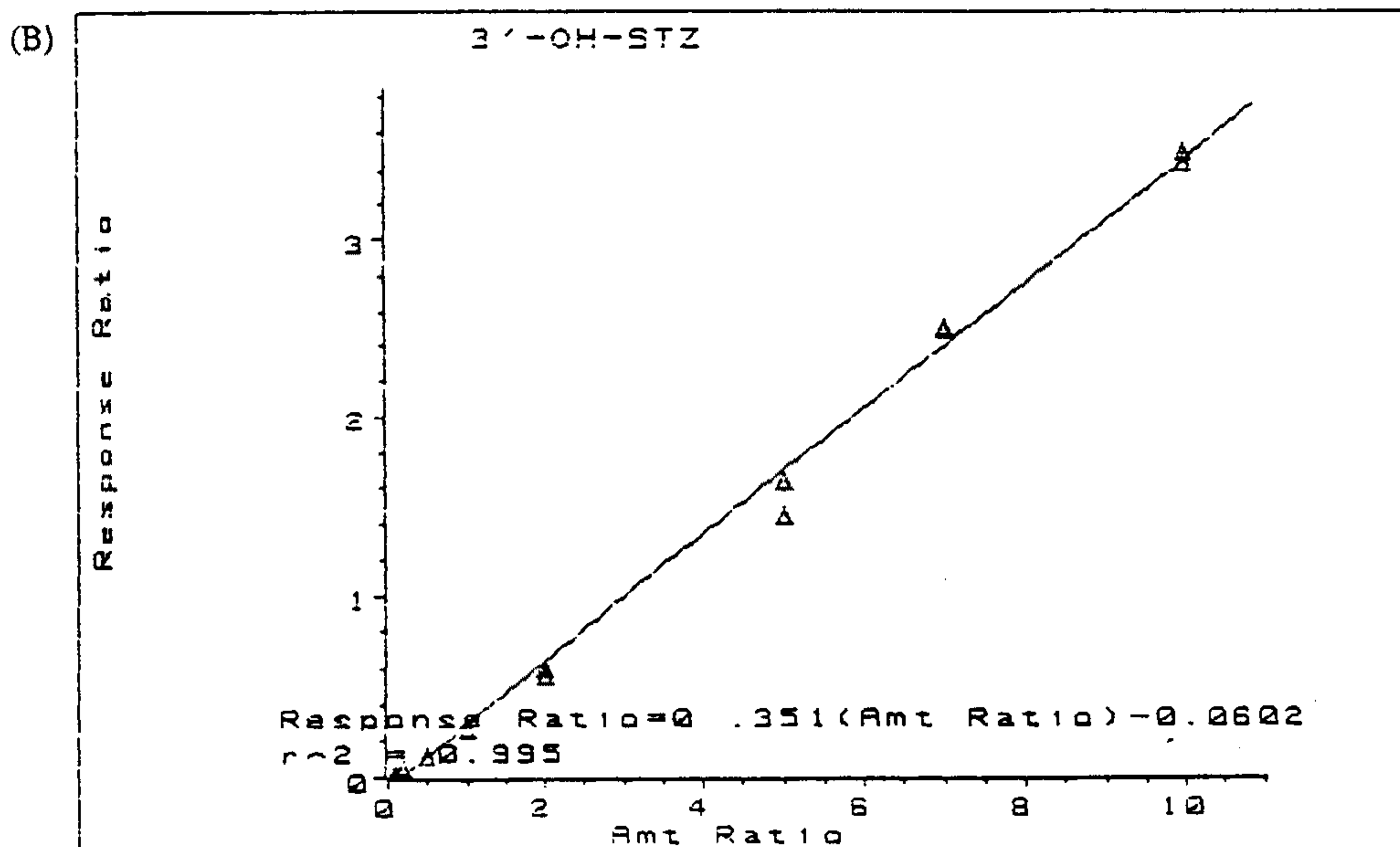
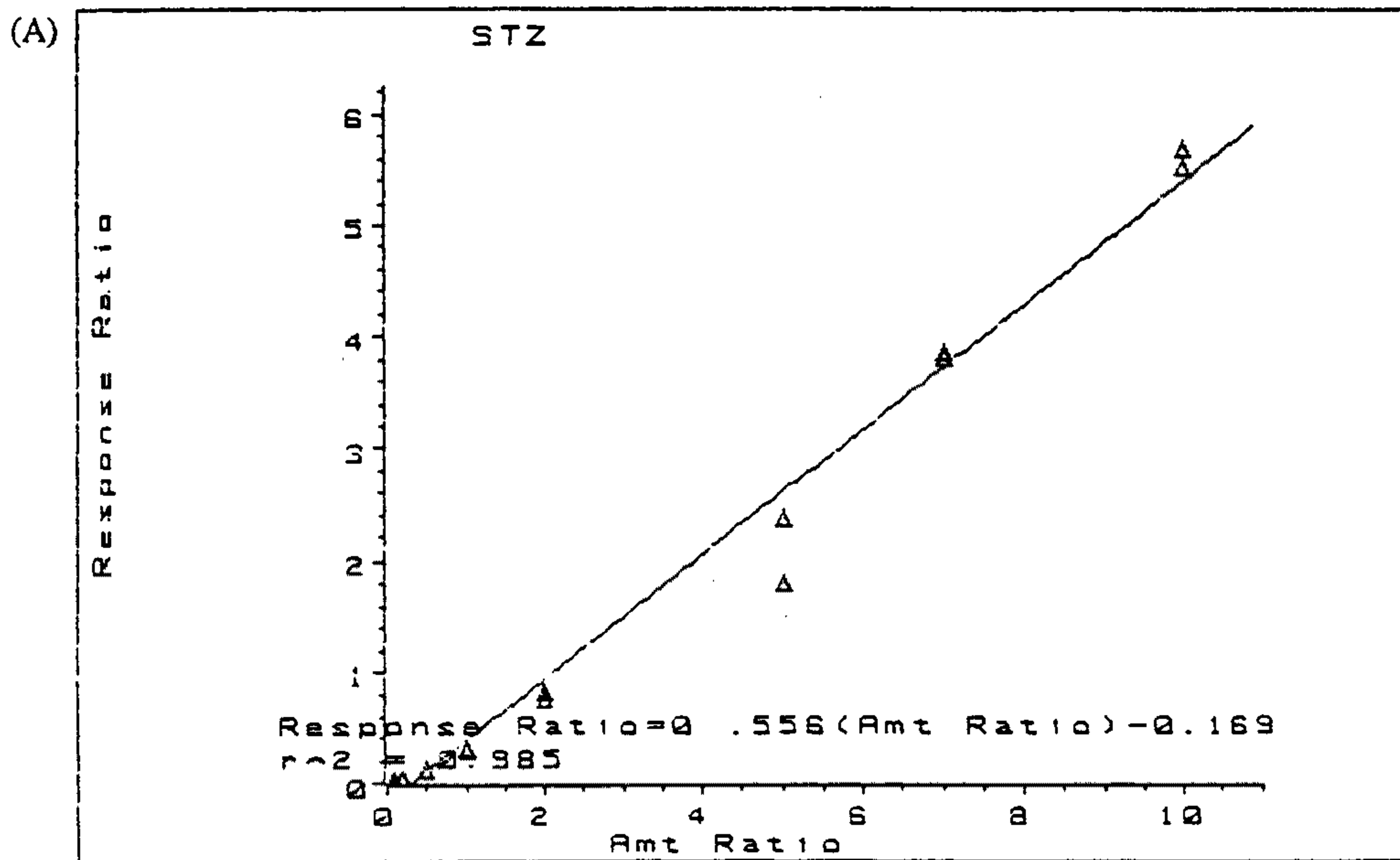


Fig. 2 : Calibration curves of stanozolol (A) and 3'-hydroxystanozolol (B).



빠르게 분포 및 배설이 일어나나, 그 이후에는 매우 느리게 체내에서 소실된다고 보고하였다(Fig. 3).

3'-hydroxystanozolol 의 반감기는 15.1시간이었고, stanozolol 에서는 7.5시간, 3'-hydroxystanozolol 에서는 18.5시간에서 최대 excretion 이 일어남을 또한 알 수 있었다.

Fig. 3 에 제시된 stanozolol 과 3'-hydroxystanozolol 의 반감기 및 최대배설시간등이, 본 실험에서의 data 와 약간의 차이를 보이는 것은 human 개개인에 따른 개체차 즉 이전 실험시의 human 과 이번 실험시의 human 사이의 차이 및 투여량의 상이 등의 factor 에 의한 것으로 간주되나, 본 연구에서는 위와같은 기초지식을 활용하여 stanozolol 과 그 대사체 3'-hydroxystanozolol 의 배설에 미치는 probenecid 의 영향을 살펴보았다.

#### ① Stanozolol 의 excretion rate-time plot 및 kinetic parameter

Human volunteer 에게 stanozolol 만을 단독 경구투여하였을때와, probenecid 와 stanozolol 을 병용투여 하였을때 뇨로 배설되는 stanozolol 의 excretion rate-time plot 를 Fig. 4.에 나타내었다. stanozolol 투여후 0-10 시간 까지는 병용투여군의 excretion rate 가 단독투여군에 비하여 줄어들었지만, 그 이후는 비슷한 배설속도를 나타내었다.

Fig. 4.로 부터 구한 parameter는 Table 1 에 나타내었으며, Table 1 에서 보여주는 것처럼 같은 stanozolol 단독투여군 내에서 또는

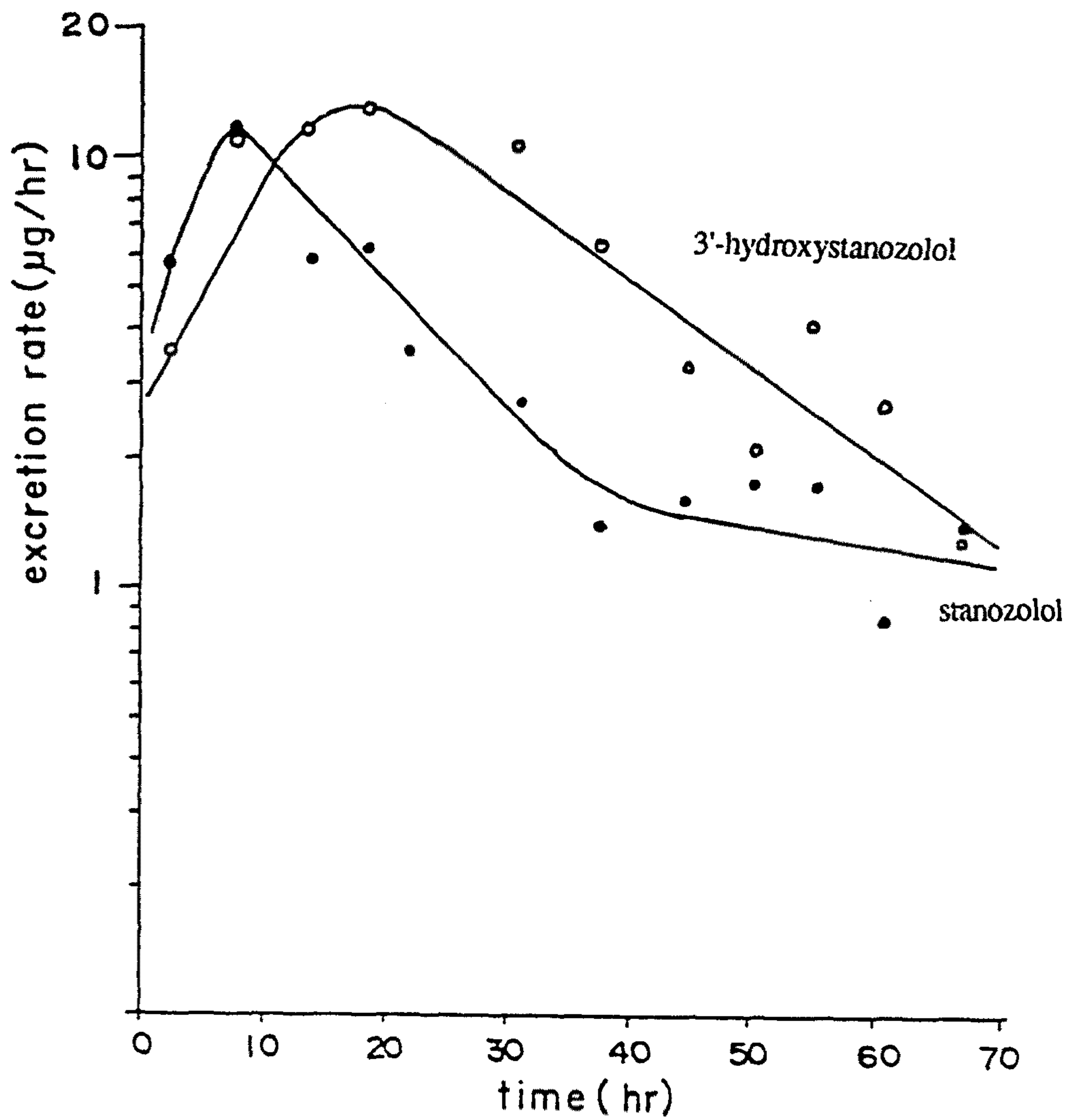


Fig. 3 : Excretion rate vs. time plots of stanozolol and 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 20mg stanozolol to volunteers.

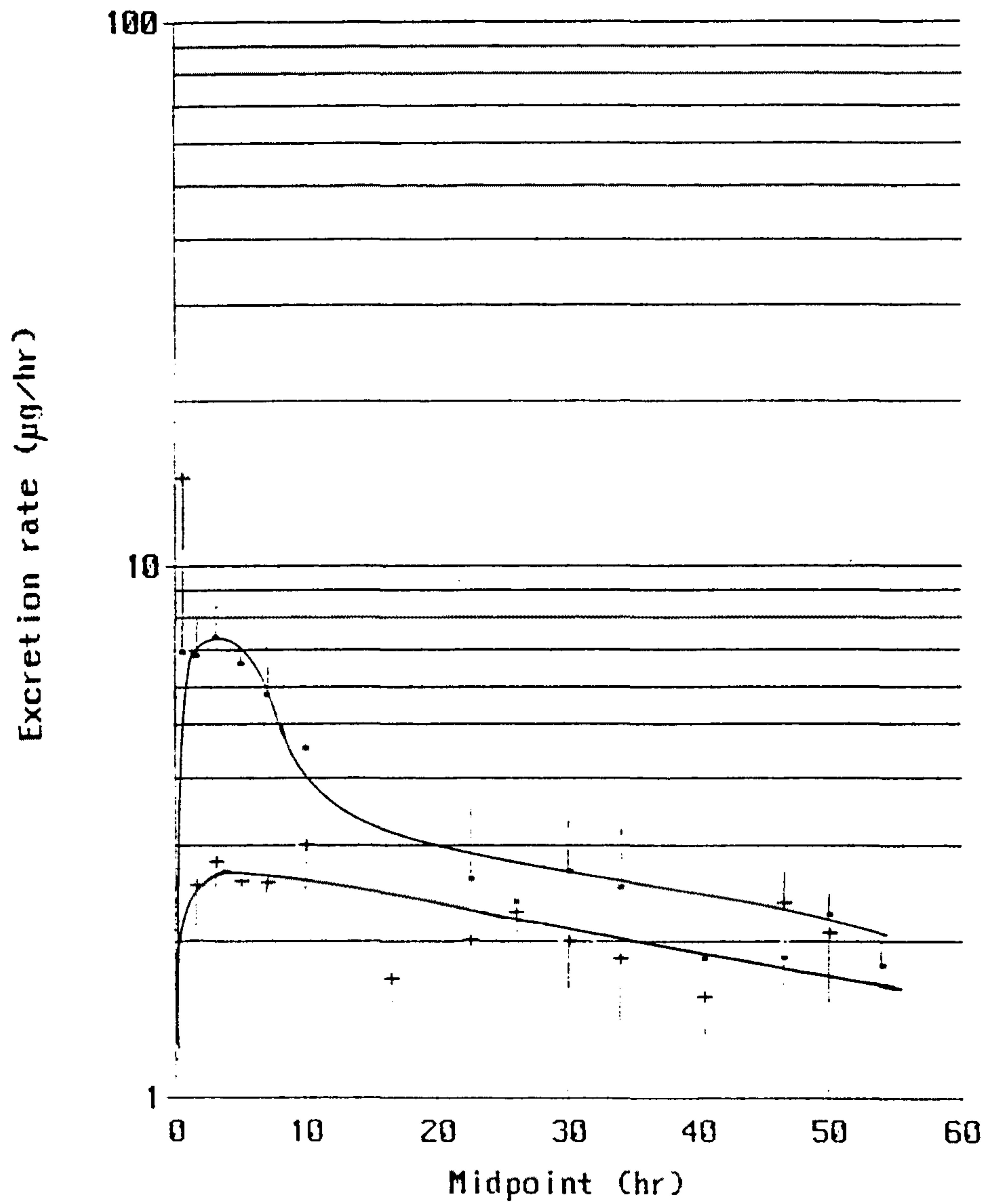


Fig. 4 : Excretion rate vs. time plot of stanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without-(•) and with-(+) probenecid treatment to human volunteers.

Table 1. Kinetic parameters of stanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without-and with-probenecid treatment to human volunteers.

	Stanozolol				Stanozolol + Probenecid				Statistical Significance
	A	B	C	mean ± S.E.	PA	PB	PC	mean ± S.E.	
Ka(hr <sup>-1</sup> )	0.04817	2.0714	0.17950	0.7664±0.6536	0.98375	0.79725	1.03549	0.9388±0.0724	N.S.*
Ke(hr <sup>-1</sup> )	0.01375	0.02495	0.02329	0.0237±0.0035	0.00308	0.01629	0.01225	0.0105±0.0039	P<0.01
AUC <sup>0-∞</sup> (μg)	201.05	192.00	203.46	198.83±3.49	756.78	411.29	235.29	467.78±153.17	N.S.
t <sub>max</sub> (hr)	36.43	2.16	13.08	17.22±10.11	5.88	4.98	4.50	5.12±0.40	N.S.
ER <sub>max</sub> (μg/hr)	1.68	4.54	3.49	3.24±0.84	2.29	6.18	2.29	3.59±1.29	N.S.
t <sub>1/2β</sub> (hr)	50.40	27.78	29.76	35.98±7.23	225.0	42.54	56.57	108.04±58.62	N.S.

\* N.S. = Not Significant

stanozolol 과 probenecid 병용투여군내에서의 개체차이에 따른 여러수치의 차이는 비록 크나, 통계학적으로 처리해 보면  $K_a$ ,  $AUC$ ,  $t_{max}$ ,  $ER_{max}$ ,  $t_{1/2}$  등은 두 group 사이에서 유의성있는 차이를 보이지 않았고, 단지 배설속도상수 ( $K_e$ ) 가 병용투여군이 단독투여군보다 약 2배로 유의성 ( $P<0.01$ ) 있게 감소됨을 알 수 있었다. 이와같은 결과로 유추할 수 있는 것은 probenecid 의 투여는 stanozolol 의 배설을 유의성 있게 감소시킴을 의미한다고 해석될 수 있다.

② 3'-Hydroxystanozolol 의 excretion rate-time plot 및 kinetic parameter.

Stanozolol 을 단독경구투여한 군과 stanozolol 과 probenecid 병용투여군에 있어서 뇨로 배설된 stanozolol 의 대사체인 3'-hydroxystanozolol 의 excretion rate-time plot 을 Fig. 5 에 나타내었다. 또한 이로부터 구하여진 kinetic parameter 를 Table 2 에 나타내었다.

대사체인 3'-hydroxystanozolol 의 최대 excretion 이 일어나는 시간 ( $t_{max}$ ) 은 단독투여군이 4.40시간이고, 병용투여군은 17.58시간으로서 유의성 ( $P<0.05$ ) 있게 증가함을 나타내었다. 또한 그시간에서의 최대배설 속도 ( $ER_{max}$ ) 는 단독투여군의  $15.66 \mu\text{g/hr}$  에서 병용투여군의  $5.02 \mu\text{g/hr}$  로 감소되었다. 이로부터 probenecid 는 뇨에서 3'-hydroxystanozolol 의 최대배설이 일어나는

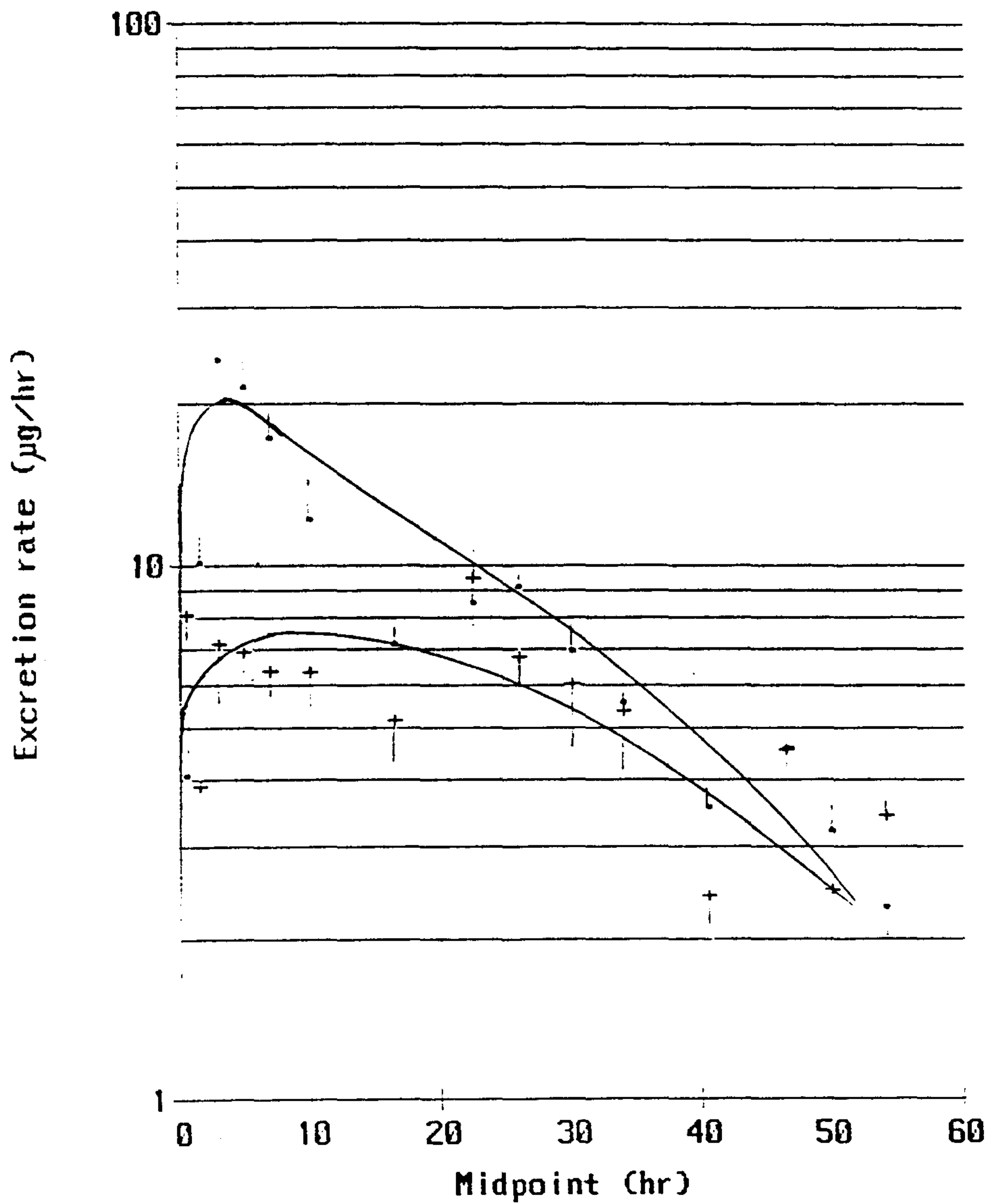


Fig. 5 : Excretion rate vs. time plot of 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- (•) and with - (+) probenecid treatment to human volunteers.

Table 2. Kinetic parameters of 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without-and with-probenecid treatment to human volunteers.

	Stanozolol				Stanozolol + Probenecid				Statistical Significance
	A	B	C	mean $\pm$ S.E.	PA	PB	PC	mean $\pm$ S.E.	
$K_a$ , ( $hr^{-1}$ )	0.61589	1.71529	0.42492	0.9187 $\pm$ 0.4021	0.09360	0.12640	0.08815	0.1027 $\pm$ 0.0120	N.S.*
$K_e$ , ( $hr^{-1}$ )	0.03661	0.03596	0.04197	0.0382 $\pm$ 0.0019	0.04326	0.01625	0.02879	0.0294 $\pm$ 0.0078	N.S.
$AUC^{0-\infty}$ , ( $\mu g$ )	520.20	408.88	537.63	488.90 $\pm$ 40.33	280.80	361.30	266.48	302.86 $\pm$ 29.51	N.S.
$t_{max}$ (hr)	4.87	2.30	6.04	4.40 $\pm$ 1.10	15.30	18.58	18.85	17.58 $\pm$ 1.14	P<0.05
$ER_{max}$ , ( $\mu g/hr$ )	15.93	13.54	17.51	15.66 $\pm$ 1.15	6.26	4.35	4.46	5.02 $\pm$ 0.62	P<0.05
$t_{1/2\beta}$ (hr)	18.93	19.27	16.51	18.24 $\pm$ 0.87	16.02	42.65	24.07	27.50 $\pm$ 7.88	N.S.

\* N.S. = Not Significant

시간 ( $t_{max}$ ) 을 약 3배로 지연시켰고, 최대배설속도( $ER_{max}$ ) 는 단독투여시의 15.66  $\mu\text{g/hr}$  에서 부터 병용투여시의 5.02  $\mu\text{g/hr}$  로 유의성( $P<0.05$ ) 있게 감소시켰는데, 이로 부터 probenecid 는 3'-hydroxystanozolol 의 배설을 마찬가지로 유의성 있게 저해 하고 있음을 알수 있었다.

$AUC^{0-\infty}$  및 반감기 ( $t_{1/2}$ )는 두군에서 유의성 있게 변화하지는 않았지만  $AUC^{0-\infty}$  는 probenecid 병용투여에 의해 약간 감소하였고, 반감기 ( $t_{1/2}$ ) 는 probenecid 투여에 의해 약간 증가되는 경향을 보여주었다.

이상과 같이 stanozolol 및 그 대사산물인 3'-hydroxystanozolol 의 배설에 미치는 probenecid 의 영향을 excretion rate-time plot 에 의해 유추해 본 결과, stanozolol 도 또 그 대사산물인 3'-hydroxystanozolol 도 probenecid 병용투여에 의해 현저하게 urine 으로의 배설이 저해됨을 알 수 있었다. 이와 같은 저해효과를 좀더 확실하게 보여주기 위해 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 의 뇨로의 누적 배설량을 계산하여 보았다.

### ③ Stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 의 누적량의 계산.

Stanozolol 단독 또는 probenecid 와 병용하여 경구투여후 30분 부터 56 시간 까지 뇨로 배설되는 stanozolol (Fig. 6) 및 3'-



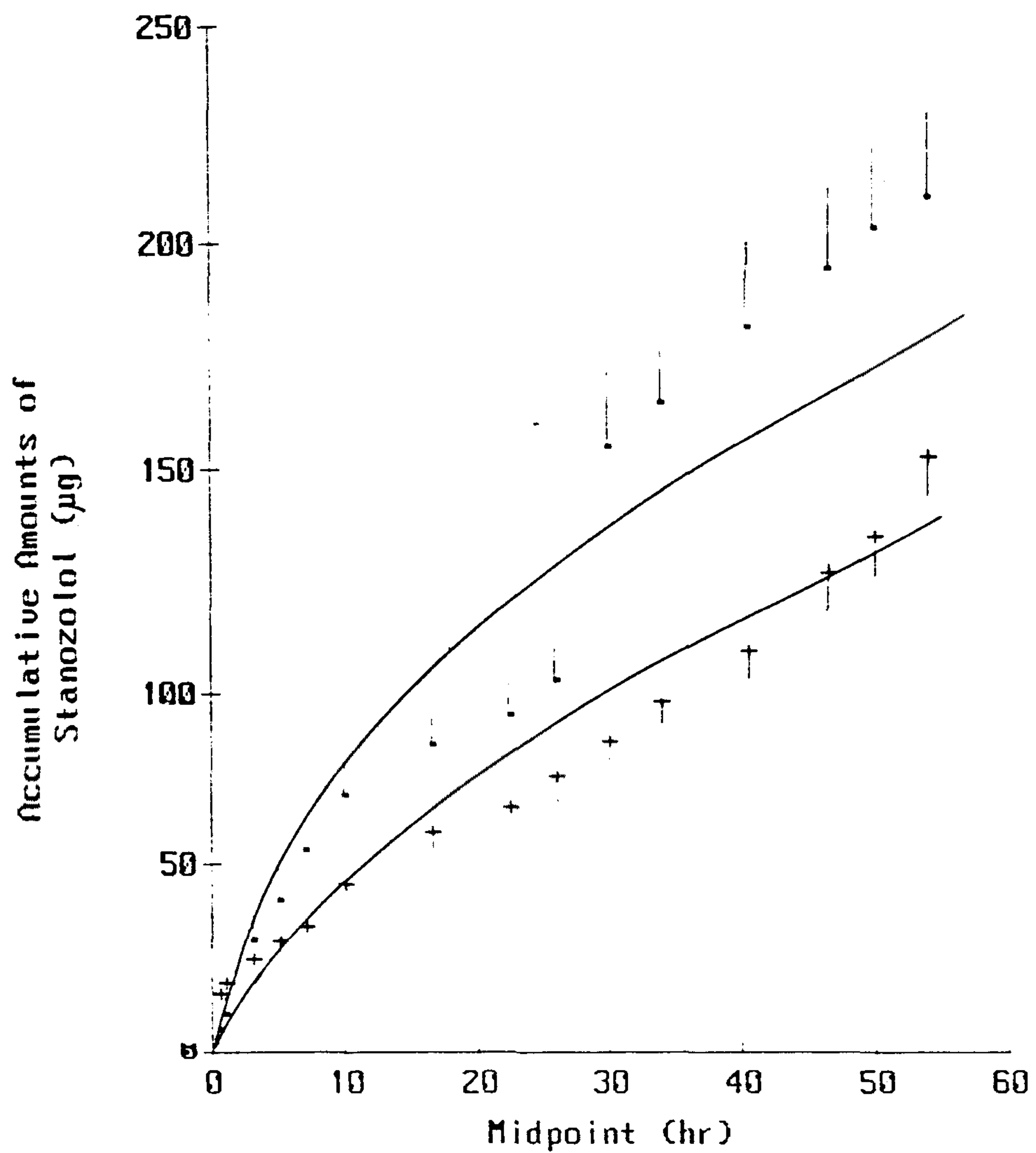


Fig. 6 : Urinary accumulative amount of stanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- (•) and with - (+) probenecid treatment to human volunteers.

hydroxystanozolol (Fig. 7)의 누적 배설량을 계산하여 plot 하여 보았다.

Fig. 6.은 뇨로 배설된 stanozolol 의 누적량 및 probenecid 에 의해 영향을 받은 stanozolol 의 뇨로의 누적 배설량을 보여주고 있다. 확연하게 알 수 있듯이 probenecid 는 앞에서의 kinetic parameter 와 잘 일치된 stanozolol 의 배설저해효과를 보여주고 있다. 56시간까지의 stanozolol 단독투여군의 총누적배설량은 약  $209.6 \pm 57.5 \mu\text{g}$  이었고, probenecid 병용투여군은  $152.3 \pm 17.4 \mu\text{g}$  을 나타내었다. 또한 단독투여군 및 병용투여군에서 배설된 총량을 환산하면 투여된 stanozolol의 각각  $2.1 \pm 0.6\%$  및  $1.5 \pm 0.2\%$  이었다.

Fig. 7은 stanozolol 을 투여한 후 56시간 까지 뇨로 배설된 3'-hydroxystanozolol 누적 배설량을 나타낸 것이다. 배설된 총량을 stanozolol 의 투여량에 의해 환산해 보면, 단독투여군은  $4.3 \pm 0.8\%$  이었으며, 병용투여군은  $3.0 \pm 0.6\%$  가 배설됨을 알수 있었다.

이상의 누적 배설량을 투여용량에 의한 비로 환산해 보면 stanozolol 단독투여의 경우 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 로 배설된 총량은 약 6.4% 이며, probenecid 병용투여군에서 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 로 배설된 총량은 4.5%이었다. 즉 단독투여 경우의 총누적 배설량을 100%로 보았을때 probenecid 에 의해 약 70% 즉 30% 정도의 배설저해 효과를 나타낸것임을 알 수 있다.

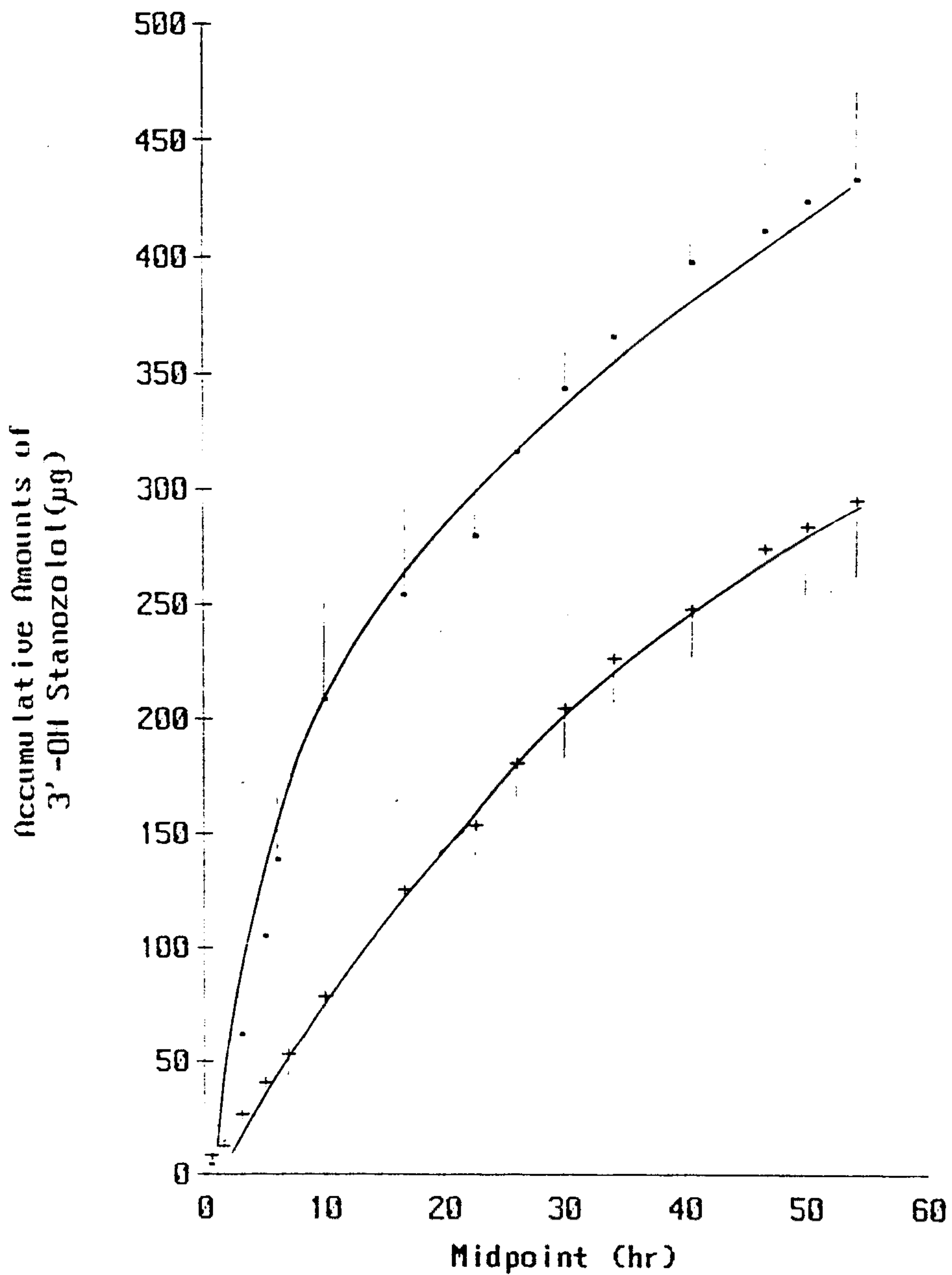


Fig. 7 : Urinary accumulative amount of 3'-hydroxystanozolol after oral administration of 10mg stanozolol without- (•) and with - (+) probenecid treatment to human volunteers.

#### 4. 참고문헌

- 1) K. Little and L. Munuera, Some mechanisms of action of stanozolol (stromba) and its interactions with cortisone. *Current Therapeutic Research*, 12 (5), 291-305, 1970.
- 2) Remington's pharmaceutical sciences (17th Ed.), pp. 939-944, 1985, Mack press.
- 3) G.G. Thompson, M. Small, G.D.O. Lowe, C.D. Forbes, B.K. Park, G. Scobie, and M.J. Brodie, Effect of stanozolol on  $\delta$ -aminolaevulinic acid synthase and hepatic monooxygenase activity in man and rat. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26, 587-590, 1984.
- 4) Hea-Young P. Choo, Oh-Seung Kwon, and Jongsei Park, Quantitative determination of stanozolol and its metabolite in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Analyt. Toxicol.*, 14, 109-112, 1990.
- 5) R.J. Ward, C.H.L. Shackleton and A.M. Lawson, Gas chromatographic-Mass spectrometric methods for the detection and identification of anabolic steroid drugs. *Br. J. Sports Med.*, 9 (2), 93-97, 1975.
- 6) A.G. Gilman and L.S. Goodman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (7th Ed.), pp. 921-925, MacMillan Publishing Company. NY. 1985.
- 7) M. Gibaldi, D. Davidson, M.E. Plaut and M.A. Schwartz. Modification of penicillin distribution and elimination by probenecid, *Int. Z. Klin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 3, 182-189, 1970.
- 8) P. Chennavasin R. Seiwel, D.C. Brater and W.M.M. Liang. Pharamcodynamic

analysis of the furosemide-probenecid interaction in man. *Kidney International*, 16, 187-195, 1979.

- 9) 화학물질의 약리.대사에 관한 연구 (2차), 과학기술처, 1990.
- 10) J.-C. RYU, O.-S. Kwon, Y.-S. Song, J.-S. Yang, J.-W. Seo and J. Park, Effect of Probenecid on the Pharmacokinetics and Renal Excretion of Stanozolol, an Anabolic Steroid, in Rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (submitted), 1991.
- 11) W. Schanzer, G. Opferman, and M. Donike, Metabolism of Stanozolol : Identification of urinary metabolites. in the press.
- 12) M. Gibaldi and D. Perrier, *Pharmacokinetics* (2nd Ed.), pp. 45-111, Marcel Dekker, Inc., NY, 1982.
- 13) Y. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nagagawa, A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharm. Dyn.*, 4, 879-885, 1981.
- 14) Shim, C.K. and Chung, S.J. (1983). Curve fitting in pharmacokinetics through MULTI-program for microcomputer, *J. Pharmaceutical Sci. in Seoul National University*, 8, 37-47.
- 15) R. J. Tallarida and R.B. Murray, *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*, 2nd Ed. with program Disk, PHARM/PCS, Version 4, Springer - Verlag, New York - Berlin - Heidelberg - London -Paris - Tokyo (1987).

## 제 3 장 대사연구

### 제 1 절 : Rat 에서의 calusterone 의 urinary metabolite 에 관한 연구

#### 1. 서론

Drug 의 metabolite 확인은 그 약물의 약리효과 및 작용기전을 밝히며, 그약물의 독성을 평가하는데 있어서 필수적으로 이해되어야할 부분이다. 따라서 본 보고에서는 steroid 제인 calusterone 의 metabolite 에 관한 연구를 보고하고자 한다.

일반적으로 남성 hormone 이 갖는 androgenic effect 는 극소화시키고, 높은 anabolic effect 를 갖는 합성 hormone 들을 anabolic steroid 라고 하며, 이러한 합성 anabolic steroid 들은 빈혈, 왜소증, 유방암 등의 치료에 널리 사용되고 있다.

그러나 최근 이러한 질병치료이외에 운동선수들이 능력향상을 도모할 목적으로 anabolic steroid 를 남용하고 있다. 이러한 anabolic steroid 의 지속적인 남용은 생식계와 간의 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다.(6) 그러므로 국제올림픽위원회(IOC)에서는 윤리적 및 의학적 이유에서 anabolic steroid 의 사용을 금하고 있다.

Calusterone ( $7\beta$ ,  $17\alpha$ -dimethyltestosterone) 은 1969년에(1) 합성된 이래 Advanced or disseminated mammary cancer 치료에 유용하다고 알려져 있다. Horn(2) 등은 rat adrenocarcinoma 에 대한 calusterone 의 직접적인 효과에 관해 발표하였으며, 항암효과기전(3)에 관한 연구도 보고된바

있다. 또한 calusterone 이 progesterone receptor 의 antagonist 로 작용하여 anti-progesterone effect(4)를 갖는 다는 보고도 있다.

그러나 calusterone 의 metabolite 에 관하여는 많은 연구가 되어 있지 않으며 다만 1979년 Segaloff(5) 등이 isotope 를 이용한 radioactivity 측정 및 Gas Liquid Chromatography (GLC) 와 Thin-Layer Chromatography (TLC) 등을 사용하여, 대사체로서 unchanged metabolite 와  $5\alpha$ -dihydro derivative 그리고,  $3\alpha$ - or  $3\beta$ -hydroxy group 및  $5\alpha$ -or  $5\beta$ -skeletal conformation 에 차이가 있는 isomer등을 metabolite 로서 추정하여 보고하였을 뿐이다.

이에 본실험에서는 calusterone 을 rat 에 경구투여하였을 때의 뇨중의 대사체를 GC/MSD 를 사용하여 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 시약 및 기구

#### ① 시약 :

- . Calusterone (Upjohn Co., Kalamanzoo, USA) ; 10mg/ml in carboxymethyl cellulose solution
  - . Ambelite XAD-2 resin (particle size ; 0.15 - 0.2mm, Serva Heidelberg, FRG),
  - . 0.2M K-Phosphate buffer (pH 7.0),
  - .  $\beta$ -Glucuronidase (from E. Coli ; Boehringer Mannheim GmbH),
  - . MSHFB(N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutyramide ; Macherey & Nagel, F.R.G.),
  - . TMS-Cl (trimethylchlorosilane ; Sigma)
  - . TMS-Imidazole (trimethylsilylimidazole ; Sigma)
  - . Methanol, Diethylether (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, U.S.A.)
- 그외 필요한 시약은 특급 및 일급 이상을 사용하였다.

#### ② 기구

- . Centrifuge (Heraeus, German)
- . Vortex mixer (VMR, USA)
- . Vacuum rotary evaporator (Buchi, Switzerland)



- . Shaker (Buchler, F.R.G.)
- . Heating Bloc (Liebisch, F.R.G.)
- . Freezer (Lauda, F.R.G.)

## 2) 기기 (Instruments) 및 분석조건

### ① 기기

- . GC/MSD (HP 5890A/5970B)
- . HP 59970C MS Chemstation
- . HP 7946 Disc Drive
- . HP 2934A Dot Matrix Printer

### ② 분석조건

- . Column : 5%-phenylmethylsilicone (SE-54)  
(HP fused Silica Capillary 17m (L.) x 0.2mm(I.D.) x  
0.33  $\mu$ m(F.T.)
- . Detector Temp. : 300°C
- . Injector Temp. : 280°C
- . Flow rate : 0.83 mL He/min.
- . Injection mode : Splitless
- . Data acquisition : Scan mode
- . Ionization mode : Electron impact.
- . Ionizing potential : 70 eV

### ③ Temperature program

- . Initial temperature : 150°C
- . Initial time : 1.00 min.
- . Rate : 10°C/min.
- . Final temperature : 310°C
- . Final time : 3 min.
- . Total time : 20 min.

### 3) 실험동물

KIST 의 유전공학센터에서 사육된 Wistar 웅성 rat (200±30g)을 사용하였으며 실험동물은 구입후 1주이상 환경에 적응시킨후 실험하였다. Tap water 와 고형사료 (삼양사, Korea)는 임의로 적당량을 공급하였다.

### 4) 실험방법

#### ① 시료 투여 및 Sampling

Calusterone 을 경구투여한 rat 로부터 metabolic cage 를 사용하여 모

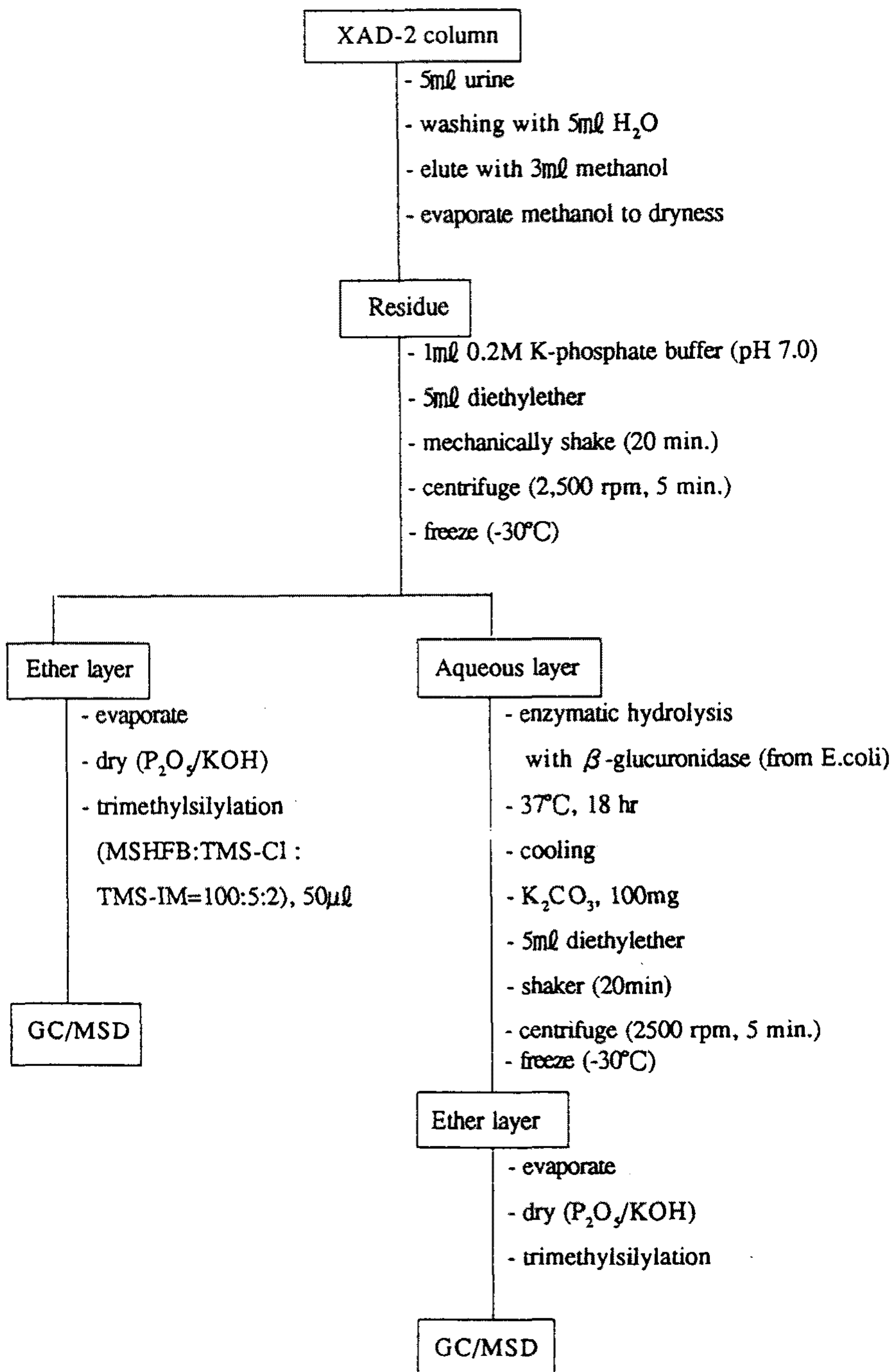
든 urine 을 손실없이 받아 추출한 후 유도체화 시키고 GC/MSD 로 분석 하였다. 우선 calusterone (10mg/ml/rat) 을 P.O 로 투여한 후 24, 48시간 후에 얻은 urine 을 실험군의 urine 으로 하였으며, 대조군은 calusterone 의 용매로 쓰인 1% carboxymethylcellulose 용액을 투여한후 24시간 동안 모은 urine 을 sample 로 하였다. 대조군 과 실험군 모두 각각 3마리를 한군으로 하여 실험하였다.

## ② Rat 의 뇨에서 calusterone 의 분석

뇨에서 calusterone 의 분석방법은 M. Donike 등의 방법을 수정하여 사용하였으며(7) 대략적인 procedure 는 Scheme 1 에 제시하였다. 대조군으로 부터 얻은 urine 과 calusterone을 투여한 rat 로 부터 얻은 urine 을 2,500rpm 에서 5분간 원심분리한후, 상층액을 5ml 취하여 XAD-2 resin column 을 통과시키고 sample 과 같은 양의 증류수로 세척하였다. Methanol 3 ml 을 1ml 씩 3회에 나누어 column 을 통과시켜 loading 되어 있는 calusterone 및 그대사물을 elution 시키고, 이 methanol elute 를 rotary evaporator 에서 증발시킨다. 이 residue에 0.2M-K-phosphate buffer (pH 7.0) 1ml 을 가하여 vortexing 한 후 여기에 diethylether 5 ml 을 가하여 20분간 shaking 하고, 2,500 rpm 에서 5분간 원심분리한 후, 두층을 freezer (-30°C)에서 분리한다. Free fraction 분석을 위하여 ether 층을 evaporation 한 후 vacuum dessicator (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH) 에서 수분을 완전히 제거하였다. 이 residue 에 MSHFB: TMS-Cl : TMS-Imidazole (100:5:2, v/v/v) 50 µl 를 넣고 80 °C 에서 10분간 가열하여 유도체화 시키고 GC/MSD를 사용하여

앞의 분석조건에서 분석하였다.

앞서 분리된 두층중 phosphate aqueous layer 는 conjugated fraction 의 분석을 위해 사용하였다. Aqueous layer 에  $\beta$ -glucuronidase 50 $\mu$ l 를 가하고 37°C에서 18시간 동안 가온한후 냉각시키고 potassium carbonate 100mg 과 diethyl ether 5 ml 을 넣고 shaker 에서 20분간 추출한 후 원심분리하고 freezer (-30°C)에서 층을 분리하여 ether 층을 증발시켜 free fraction 과 같은 조건으로 유도체화 시키고 GC/MSD 로 분석 하였다.



Scheme 1. Extraction and derivatization procedure for calusterone analysis in rat urine.

### 3. 결과 및 고찰

Calusterone 의 in vivo 에서의 metabolite 를 추적하기 위하여 rat에게 calusterone (10mg/rat) 을 경구투여하여 얻은 urine 을 앞에 설명한 바와 같이 추출하고 유도체화 시킨후 GC/MSD 로 분석하였다.

Fig. 1은 calusterone standard 를 유도체화 시켜 앞의 기기분석조건하에서 분석한 후의 total ion chromatogram 및 scan mass spectrum 이다.

Calusterone standard 는 2분자의 trimethylsilyl (TMS) group 이 치환되는 형태로 유도체화 되며 retention time 은 앞의 temperature program 하에서 13.817분이었다. Fig. 1 에 나타난 m/z 143 ion 은 17-methyl-17hydroxy steroid 의 OTMS 유도체가 보여주는 D-ring cleavage 에 의해 나타나는 특징적인 ion 으로서 거의 모든 steroid 에서 base peak 으로 나타난다.

그리고, m/z 315(D-ring fragment)등이 나타나며, m/z 460 ion 은 calusterone 의 3번과 17번의 OTMS 유도체를 나타내는 ion 이고, 그로부터 쉽게 CH<sub>3</sub>가 이탈되어 m/z 445 ion 을 나타낸다.

Fig. 2 는 free steroid 의 분석법에 따라 분석할때 보여진 total ion chromatogram 이다. Fig. 2 의 A는 정상 rat 의 urine 에서, Fig.2 의 B는 calusterone 경구투여후의 rat urine 에서 보여주는 total ion chromatogram 으로서, 두 chromatogram 을 비교해 보면 retention time 이 약 14분에서 17분에 걸쳐 여러 unknown peak 들이 나타남을 알 수 있어 일단 대사산물로서 사료되어 구조규명을 시도하였다.

마찬가지로 Fig. 3 은 conjugate steroid 의 분석법에 따라  $\beta$ -glucuronidase enzyme hydrolysis 후의 normal rat urine (Fig. 3A) 과

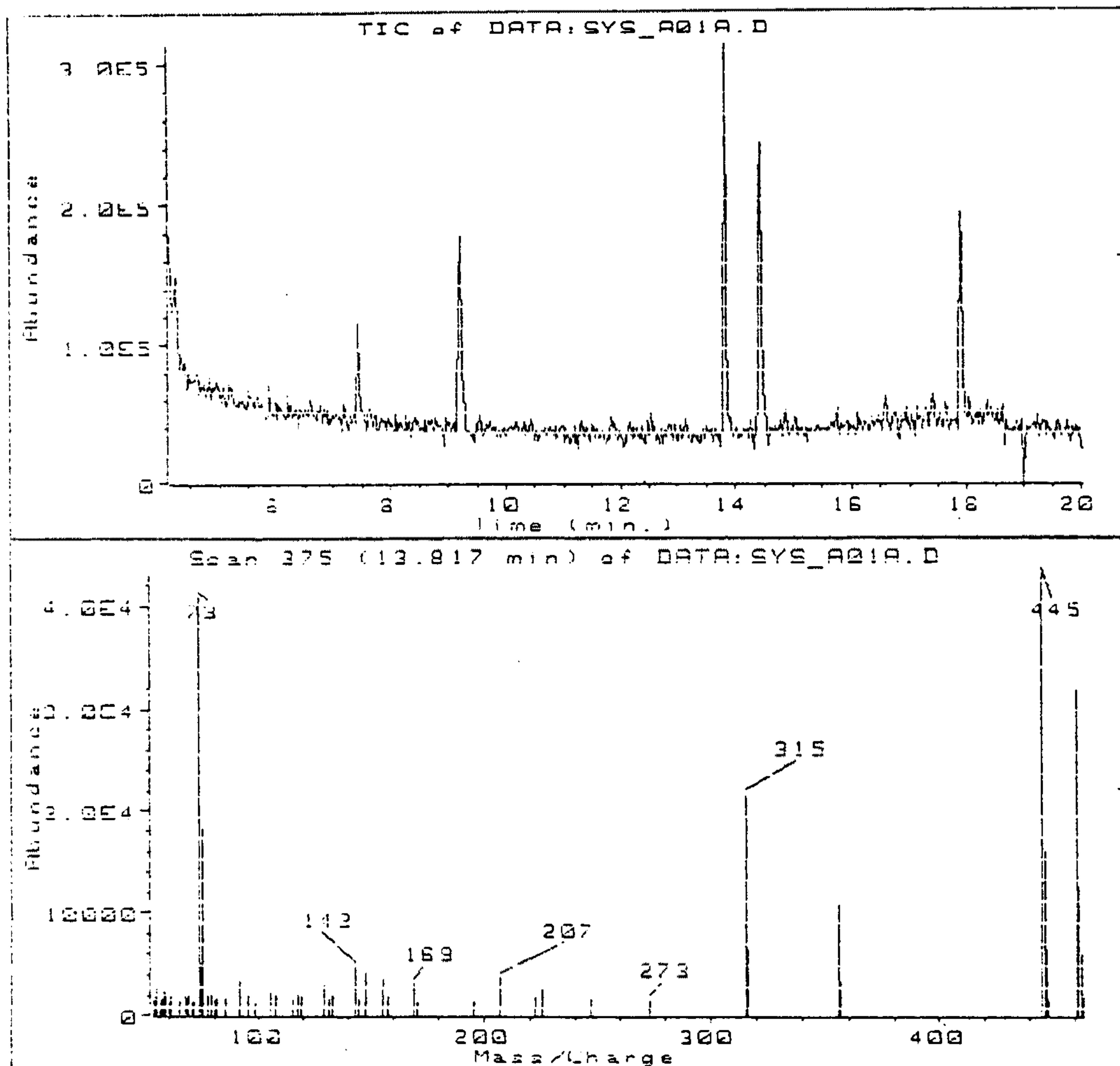


Fig. 1 : Total ion chromatogram and scan mass spectrum of calusterone-di-OTMS standard.

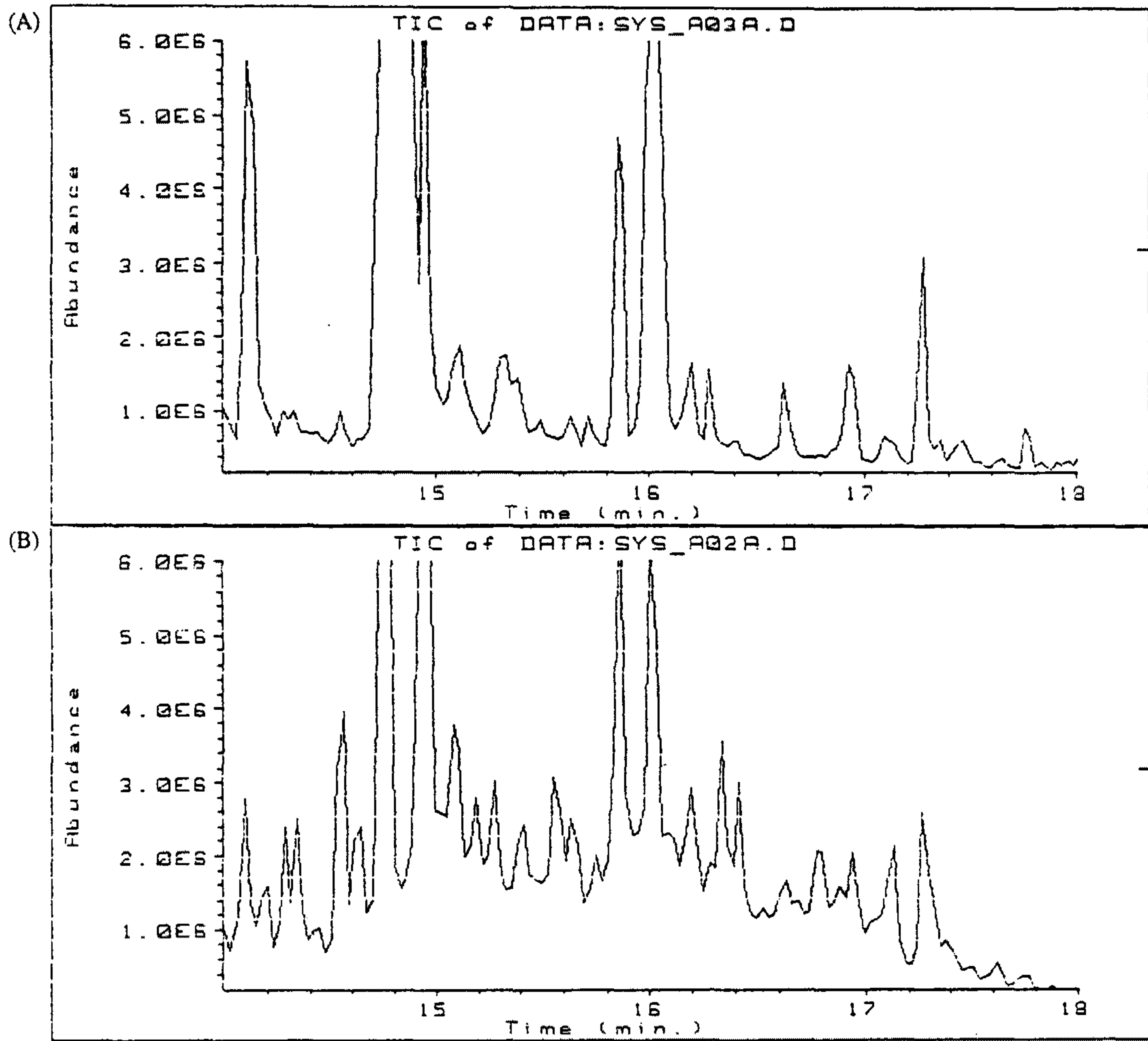


Fig. 2 : Total ion chromatogram of normal rat urine (A), and calusterone-administered rat urine (B) in free fraction.



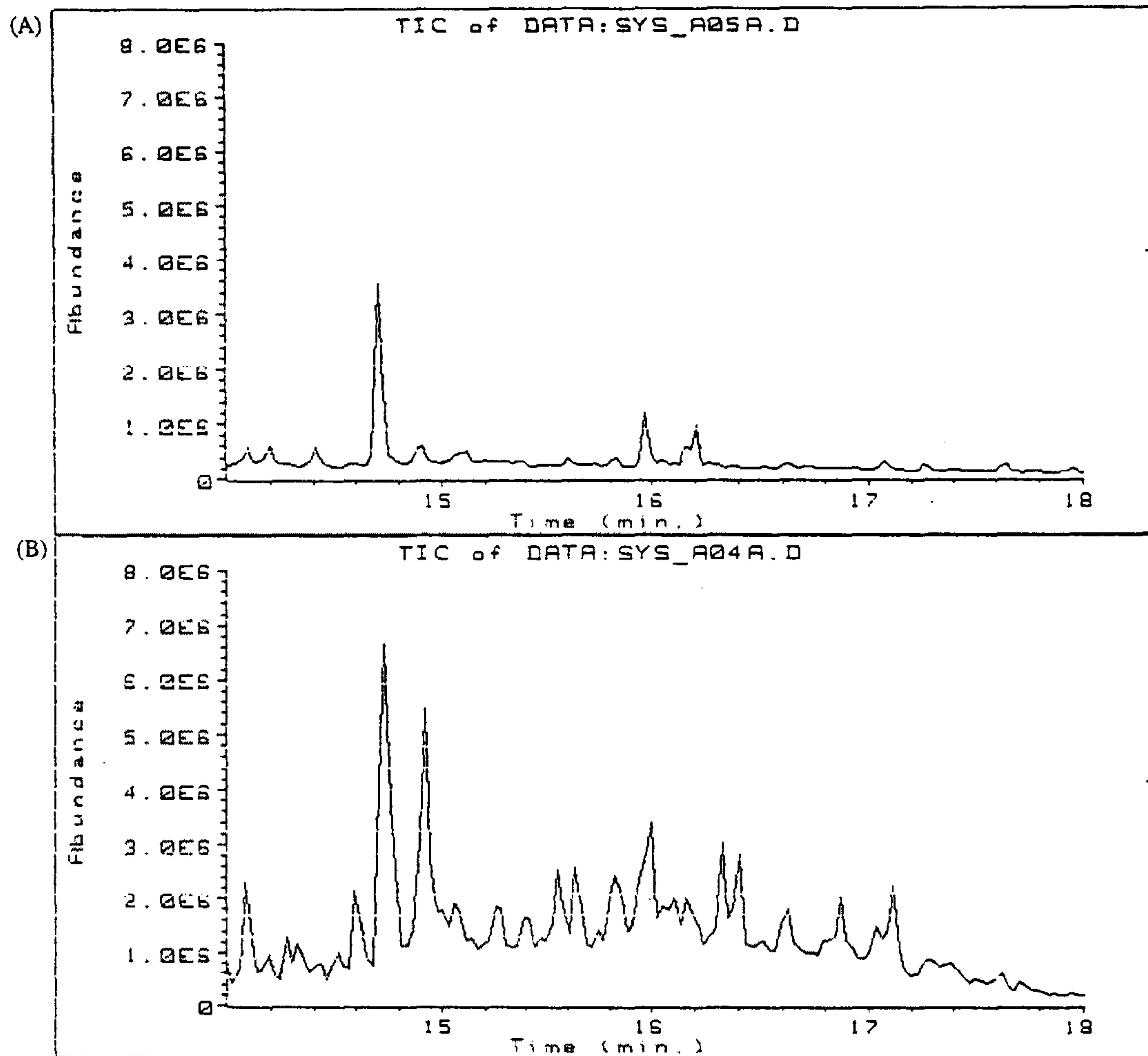


Fig. 3 : Total ion chromatogram of normal rat urine (A) and calusterone-administered rat urine (B) in conjugate fraction.

calusterone 경구투여후의 urine (Fig. 3B)에서 보여지는 total ion chromatogram 을 보여주고 있다. Free fraction 과 마찬가지로 retention time 이 약 14분에서 17분에 걸쳐 대사산물로 예상되는 peak 들이 보임을 알수 있었다.

Metabolite 로 예상되는 여러 peak 들이 total ion chromatogram 상에서 보여지나, 각 peak 들의 scan mass spectrum 을 가지고 구조해석을 시도한 결과, 구조해석이 우선 가능한 두개의 metabolite peak 의 scan mass spectrum 을 Fig. 4 와 Fig. 5 에 제시하였다.

우선은 retention time 이 15.607분에서 보여진 peak의 scan mass spectrum 을 Fig. 4에 제시하였다. m/z 231 ion 은 17-methyl-17-hydroxy steroid 의 16번 위치에 OTMS 유도체가 도입되었을때 보여지는 특징적인 ion 으로서, 이를 통해 calusterone 즉  $17\beta$ -hydroxy- $7\beta$ , 17-dimethyl-4-androstene-3-one 가 rat 의 생체내에서 대사되어 16번위치에 hydroxylation 이 일어남을 알 수 있었다. 또다른 특징적인 ion 으로서 m/z 285 ion 은 6번위치에 -OTMS 유도체가 도입된 B ring 의 cleavage 가 일어났을때 나타나는 특징적인 fragment ion 이다. 또한 m/z 640 ion 은 6번과 16번 위치 모두에 hydroxylation 되어 거기에 OTMS 유도체가 되었을 때의 ion peak 으로서, 이와같은 결과를 가지고, 15.607분에서의 peak 는 6, 16-dihydroxy calusterone 으로 유추할 수 있었다.

또하나의 retention time 14.635 분에서 나타난 peak 의 scan mass spectrum 을 Fig. 5 에 나타내었다. 여기서는 steroid 의 base peak 으로 잘 나타나는 m/z 143 ion 과, 앞의 Fig. 4 에 서로 설명하였듯이 16번에 hydroxylation 되어 OTMS 된후의 특징적인 fragment 로 나타나는 m/z

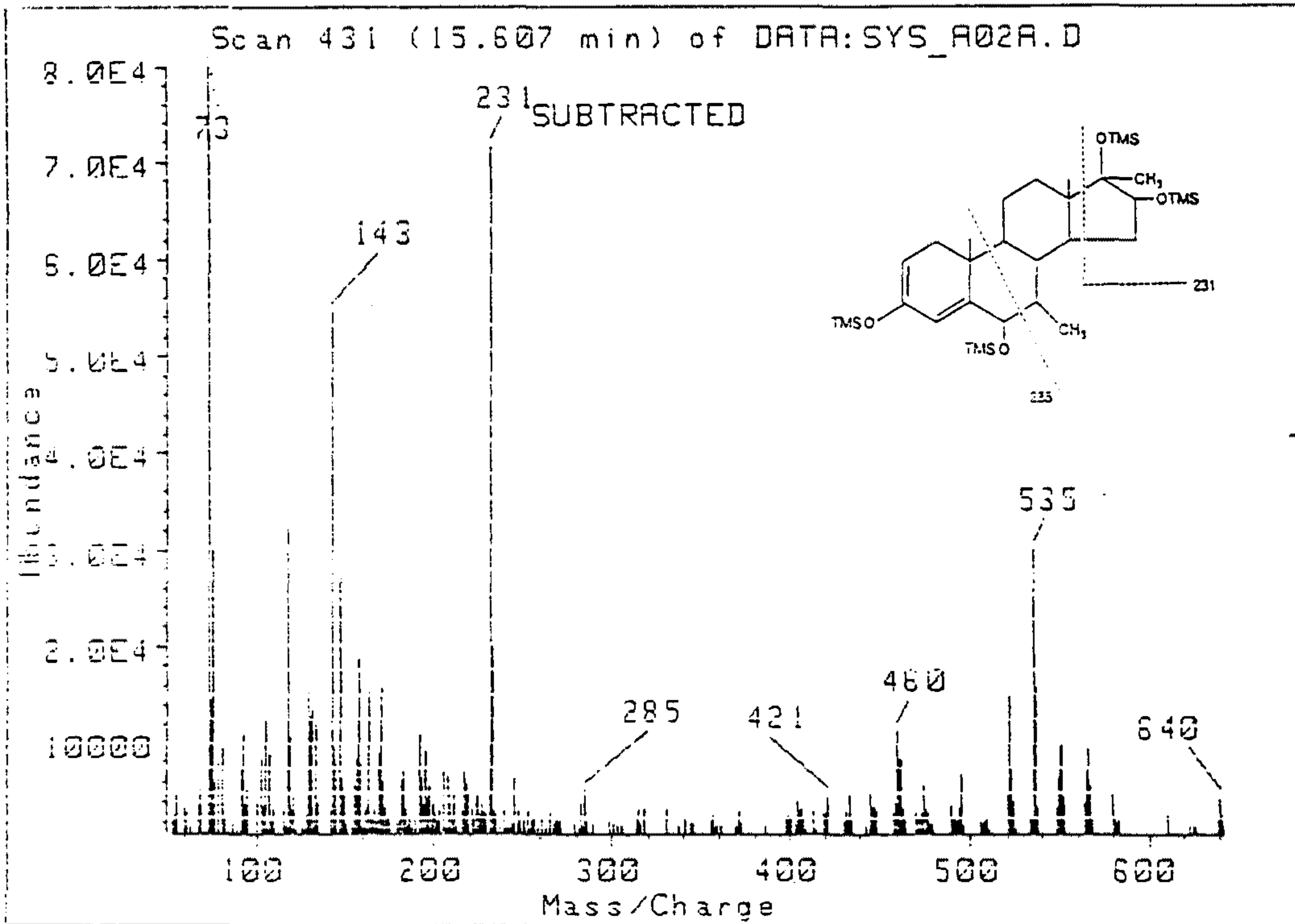


Fig. 4 : Scan mass spectrum of calusterone metabolite I suspected as 6, 16-dihydroxy calusterone in rat urine after TMS derivatization.

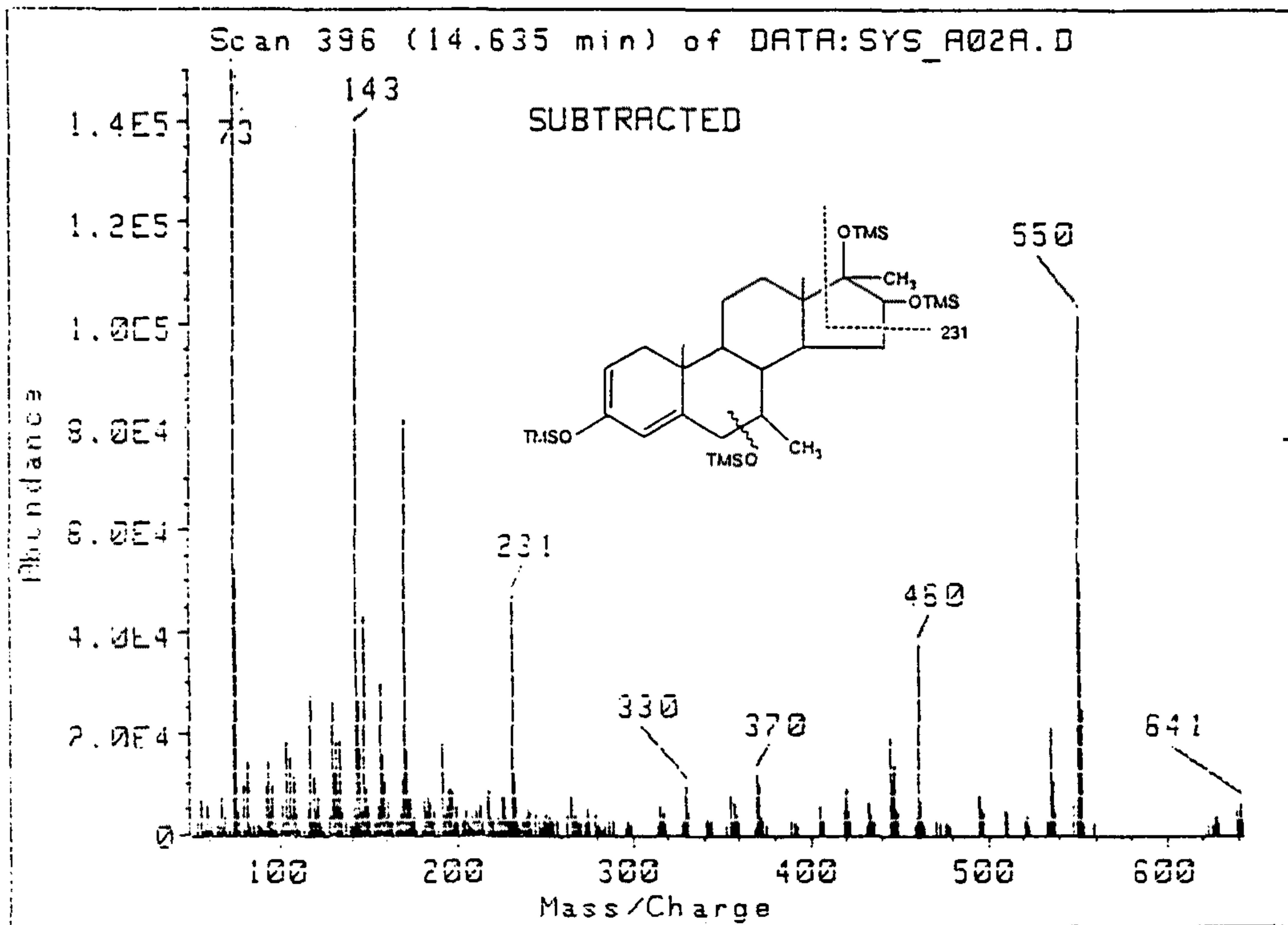


Fig. 5 : Scan mass spectrum of calusterone metabolite II suspected as dihydroxy calusterone in rat urine after TMS derivatitation.

231 ion, 그리고 OTMS 유도체화된 후  $m/z$  640 ion 으로부터  $m/z$  90 (OTMS) 씩 떨어져 나가는 pattern 즉  $m/z$  550,  $m/z$  460,  $m/z$  370 ion 출현 등으로 미루어, 이 대사산물은 dihydroxylated calusterone 으로 추정되나 hydroxylation 이 일어나는 위치로서는,  $m/z$  231 ion 부터 C-16 위치에 일어나는 것은 유추되나, 또다른 하나의 hydroxylation 의 위치는 현재 규명중이다. Calusterone 및 그 metabolite 들로 추정된 dihydroxydated calusterone 의 구조를 Fig. 6 에 나타내었다.

GC/MSD 로 분석했을 때 calusterone 자체는 거의 찾아볼수 없었고, metabolite 로 추정되어지는 dihydroxy-calusterone 의 retention time 은 14.635분과 15.607 min. 이었다. 또한 free fraction 과 conjugated fraction 을 나누어 추출한 결과 free fraction 으로 더 많은 대사산물들이 검출되며, 시간별로는 24시간안에 대부분의 metabolite 들이 배설됨을 알 수 있었다.

이미 서론에서도 언급한바와 같이 Segaloff 등의 보고(5) 에서 논의된 대사산물들을, 본 연구에서는 탐지가 어려웠으며 또 그들이 예측 또는 탐지 할 수 없었던 dihydroxylated calusterone이 본 연구결과 대사산물로 유추될 수 있었다. 또한 calusterone 의 대사연구는 거의 전무한 점으로 미루어보아 steroid 의 일반적인 in vivo 에서의 대사양식 즉 hydroxylation 과 reduction 등에 치중하여 연구하였으며, 역시 일반적인 steroid 의 대사양식과 같은 pattern 의 대사산물의 생성을 나타냄을 알 수 있었다.

유방암 치료제 및 anabolic steroid 로 쓰이고 있는 calusterone 의 metabolite 규명에 관한 연구는 아직 미비한 상태이다. 그러나 이 약

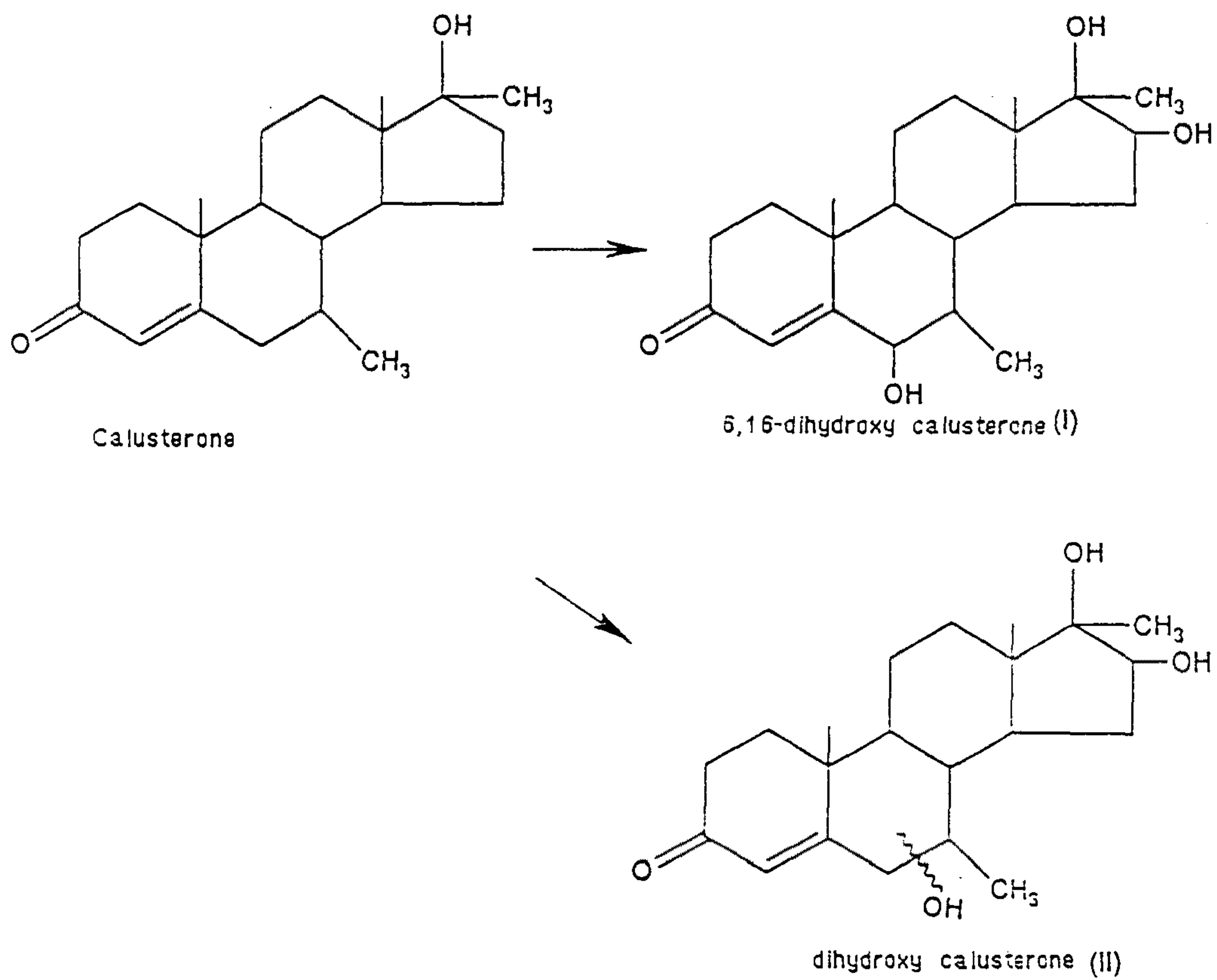


Fig. 6 : Chemical structures of calusterone and its metabolites I and II.

물의 정확한 약리효과 및 작용기전과 독성등을 평가하는데 있어서 calusterone 의 metabolite 에 대한 이해가 반드시 필요하리라 사료되며, 예상되는 metabolite 를 직접 합성하여 생체에서의 대사와 비교검토하는일 또한 의미있는 연구라고 생각된다.

#### 4. 참고 문헌

1. Babcock et al. United States Patent, 3, 937, 827, (1976)
2. H. Hom, I. Erlichman and I.S. Levij, : Anti-Tumour Efficacy of Calusterone against DMBA-Induced Rat Mammary Adenocarcinoma in vivo and in Organ Culture, British J. of Cancer, 33, 336-341, (1976)
3. David K. Fukushima, Barnett Zumoff, Wilma Bulkin, and Leon Hellman, : Effect of  $7\beta$ ,  $17\alpha$ -Dimethyltestosterone(Calusterone) on Cortisol Metabolism in Women with Advanced Breast Cancer., J. Clin. Endocrinol. Metab., 43, (1), 38-45, (1976)
4. Urmila Verma and Kresho R. Laumas, ; Screening of Anti-Progestins Using in Vitro Human Uterine Progesterone Receptor Assay System, J. Steroid Biochemistry, 14, 733-740, (1981)
5. Albert Segaloff, Byrnes T. Carriere and R. Bruce Gabbard, ; The in Vivo Metabolism of  $7\beta$ -,17-Dimethyltestosterone-6,7- $^3\text{H}$ , Steroids, 34(7), 835-847, (1979)
6. H.A. Humpt and G.D. Rovere, Am. J. Sports Med., 12, 469, (1984)
7. M. Donike, : Screening Procedure in Doping Control., Koln, Deutschland, (1983).



## 제 2 절 Human 에서의 Furazabol 의 urinary metabolite 에 관한 연구

### 1. 서 론

Furazabol ( $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -methyl- $5\alpha$ -androstand[2,3-c] furazan) 은 신체성장을 촉진시키고 anabolic activity 에 대한 androgenic activity 의 ratio 가 작아, 남성화 효과를 최소화 할수 있는 합성 anabolic steroid 이며, 스테로이드의 A ring 에 furazan ring 을 가지고 있는 heterocyclic steroid 로서 생리 화학적 활성이 매우 커서 anabolic 과 hypolipidaemic agent 로서 임상학적으로 널리 이용되어 지는 의약품이다(1-4).

Pyrazole ring 을 가지고 있는 anabolic steroid 인 stanozolol ( $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -methyl- $5\alpha$ -androstand[3,2-c]-pyrazole)은 그것의 대사과정에 있어서 생물학적 활성을 증가시키는 heterocycle 이 modify 되는 metabolite 들을 생성한다(5). 그러므로 furazabol 의 대사연구에 있어서도, furazan ring 이 modify 되는지의 여부를 결정하는 대사연구가 중요시되어 진다. 쥐의 뇨, 변속에서 이 화합물의 흡수, 분배 그리고 배설과 그것의 대사체들에 대한 간단한 정보는 이미 보고되어 있으나(6) 이 보고서에서는 oral administration 후 사람의 뇨속에서의 furazabol 대사체들의 결정과 kinetic 을 연구하고자 하였다.

1985년 이후, furazabol 은 body weight 나 muscle build-up 을 증가시켜 운동능력을 향상시키기 위하여 운동선수들이 종종 남용하고 있다는 정보가 있었으며, 이러한 남용은 생식계와 간의 질환을 유발시키는 것으로 의료계에서는 보고되고 있다(7). 그러나, International Olympic Committee

의 Medical Commission 에서는 furazabol 의 검출에 있어서 계속 negative 결과를 보고하여 왔다(8). 이것은 furazabol 이 모든 Doping 실험실에서 screening 되지 않았기 때문인 것으로 사료된다.

따라서 본 보고서에서는 human urine 속에 furazabol 양을 결정하는 방법을 제시하며 더욱기 oral administration 후, furazabol의 excretion study 를 하여, 가능한 metabolite 존재와 약리학적인 정보를 제시하고자 하였으며, 이로인해 anabolic steroid 를 검출하는데 도움이 되고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 시약 및 기구

- ① 시약 : Furazabol (Daiichi Seiyaku Co.), calusterone (Upjohn Co., kalamanzoo, USA), Amberlite XAD-2 resin (particle size ; 0.15 - 0.2 mm, Serva Heidelberg, FRG), 0.2M k-phosphate buffer (pH=7.0),  $\beta$ -Glucuronidase (from E. Coli; Boebring), MSHFB (N-methyl-N-trimethylsilylheptafluorobutyramide, Macherey and Nagel Co., FRG), TMS-Cl (trimethyl chlorosilane ; Sigma), TMS-imidazole (trimethylsilylimidazole, Sigma) 그외 필요한 시약은 특급 및 일급 이상을 사용하였다.

- ② 기구 : - Centrifuge (Dupont, USA)  
- Vortex mixer (VMR, USA)  
- Vacuum rotary evaporator (Buchi, Switzerland)  
- Shaker (Buchler, FRG)  
- Heating Bloc (Liebisch, FRG)  
- Freezer (Lauda, FRG)

## 2) 기기 (instruments) 및 분석조건

- ① 기기 : - GC/MSD (HP5890A/5970B)  
- HP 59970C MS Chemstation  
- HP 7946 Disc Drive  
- HP 2934A Dot Matrix Printer

## ② 분석조건

- Column : 5% -phenylmethyl silicone (SE-54)  
(HP fused silica capillary, 17m(L.) x 0.2mm (I.d.) x 0.33um (F.T.))
- Detector Temp. : 300°C
- Injector Temp : 280°C
- Flow rate : 0.83 ml/min. Helium
- Injection mode : splitless
- Oven temp : 180°C → 310°C(25°C/min.)

### 3) Human volunteer

신체 건강한 남성 (몸무게 70Kg) 두사람에게 furazabol 정제 5mg 을 경구투여하여 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 21, 24, 28, 32, 36, 45, 48시간에 걸쳐 모든 뇨시료를 모았다. 약물복용직전의 blank 및 약물복용후의 시간별 뇨를 모아 분석할 때 까지 냉장고 (4°C) 에서 보관하였다.

### 4) Furazabol 의 검량선 작성

인간의 blank 뇨 5ml 에 furazabol 의 stock solution 으로 부터 80, 200, 400, 1000, 2000 ng/ml 가 되도록 첨가시켰다. Calusterone 을 내부표준물질로 사용하기 위하여 80ng/ml이 되도록 첨가시켜, 추출하고 유도체를 만들어서 분석하였으며 각농도에 대해 3번씩 반복 실험을 하였다. 그리고 detection limit 를 결정하기 위하여 furazabol 각각의 stock solution 으로부터 10, 20, 30, 50 ng/ml 의 range 로 blank 에 첨가시켜 (n=3) 분석하였다.

### 5) 뇨에서의 furazabol 의 분석

① Human volunteer 의 urine 에서의 furazabol 의 정량.

Urine 5ml 를 사용하여 분석하였으며 위에서 설명한 내부표준물질의 농도를 제외하고는 5)-② 항에서와 같은 방법으로 뇨로 배설되는 furazabol 을 정량하였다.

② Human volunteer의 urine 에서의 excretion 연구.

Urine 5ml 을 시료로 하였고, furazabol 의 분석법은 M. Donike 등의 방법(14)에 따라 수행하였다 (Scheme 1). 정해진 시간에 받은 Urine 을 5ml 씩 취하여, XAD-2 resin 을 넣은 column 에 통과시키고, 내부 표준 물질로는 calusterone 400ng 을 가하여 sample과 같은 양의 증류수로 씻어 주었다. 증류시킨 methanol 1ml 로 3회에 걸쳐 elution 시킨 후 이 methanol elute 를 rotary evaporator 로 증발시킨다. 이 residue 에 0.2M K-phosphate buffer (pH 7.0) 1ml 와 glucuronide conjugate form으로 배설되는 furazabol 대사체들을 가수분해하기 위하여,  $\beta$ -glucuronidase (100units/ml) 250 $\mu$ l 를 가하고 50°C 에서 1 시간 동안 가열하였다. 이 test tube 를 실온에서 냉각시키고 potassium carbonate 100mg 과 diethyl ether 5 ml 를 넣고 shaker 에서 10분동안 추출하였다. 원심분리하여 두층을 freezer(-30°C)에서 분리하고 ether 층을 다른 test tube 에 옮기고 이 ether 를 증발시킨후, vacuum desiccator(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH) 에서 완전하게 수분을 제거시켰다. 이 residue 에 MSHFB : TMS-Cl : TMS-imidazole (100:5:2, v:v:v) 50 $\mu$ l 를 넣고 80°C 에서 15분간 가열한 후 GC/MSD 에서 분석하였다.

**XAD-2 column**

- 5ml urine
- calusterone (400ng)
- elute with 3ml methanol
- evaporate

**Residue**

- K-phosphate buffer 1ml (pH 7.0, 0.2M)
- enzyme hydrolysis( $\beta$ -glucuronidase from *E. coli*), at 50°C for 1hr.
- cooling
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100mg
- 5ml diethyl ether
- shake (10 min.)
- centrifuge (2500 rpm, 5 min.)
- freeze (-30°C)

**Ether layer**

- evaporate
- dry (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH) (30 min.)
- trimethylsilylation at 80°C for 15min.

**GC/MSD**

**Scheme 1. Extraction and derivatization procedure for furazabol analysis in human urine.**

### 3. 결과 및 고찰

Human volunteer의 urine 에서의 furazabol 및 그 대사산물로 확인된 16-hydroxyfurazabol 의 분석과 그들의 pharmacokinetics 를 excretion study 를 통해 알아보았다.

#### ① 검량선

80-2000ng/ml 범위내에서 furazabol 은 O-TMS의 유도체로 만들어서 m/z 387 을 선택하였다. 이 이온은 calusterone-(O-TMS)<sub>2</sub>에서 형성된 m/z 315 를 내부표준물질로 하여 그 높이비와 농도를 대조하여 검량곡선을 그렸다. Furazabol 은 Fig. 1 에서 보여지듯이 r = 0.984 의 양호한 직선성을 나타내어 정량을 하는데 아무 지장이 없었다.

#### ② Detection limit 의 결정

Detection limit 를 결정하기 위하여 10-30 ng/ml 의 furazabol 농도에서 실험하였다. Furazabol 에서 blank 뇨의 면적비에 대한 unchanged furazabol 의 면적비를 고려할때 Furazabol 의 Detection limit 는 약 20ng/ml 이하임을 알 수 있었다.

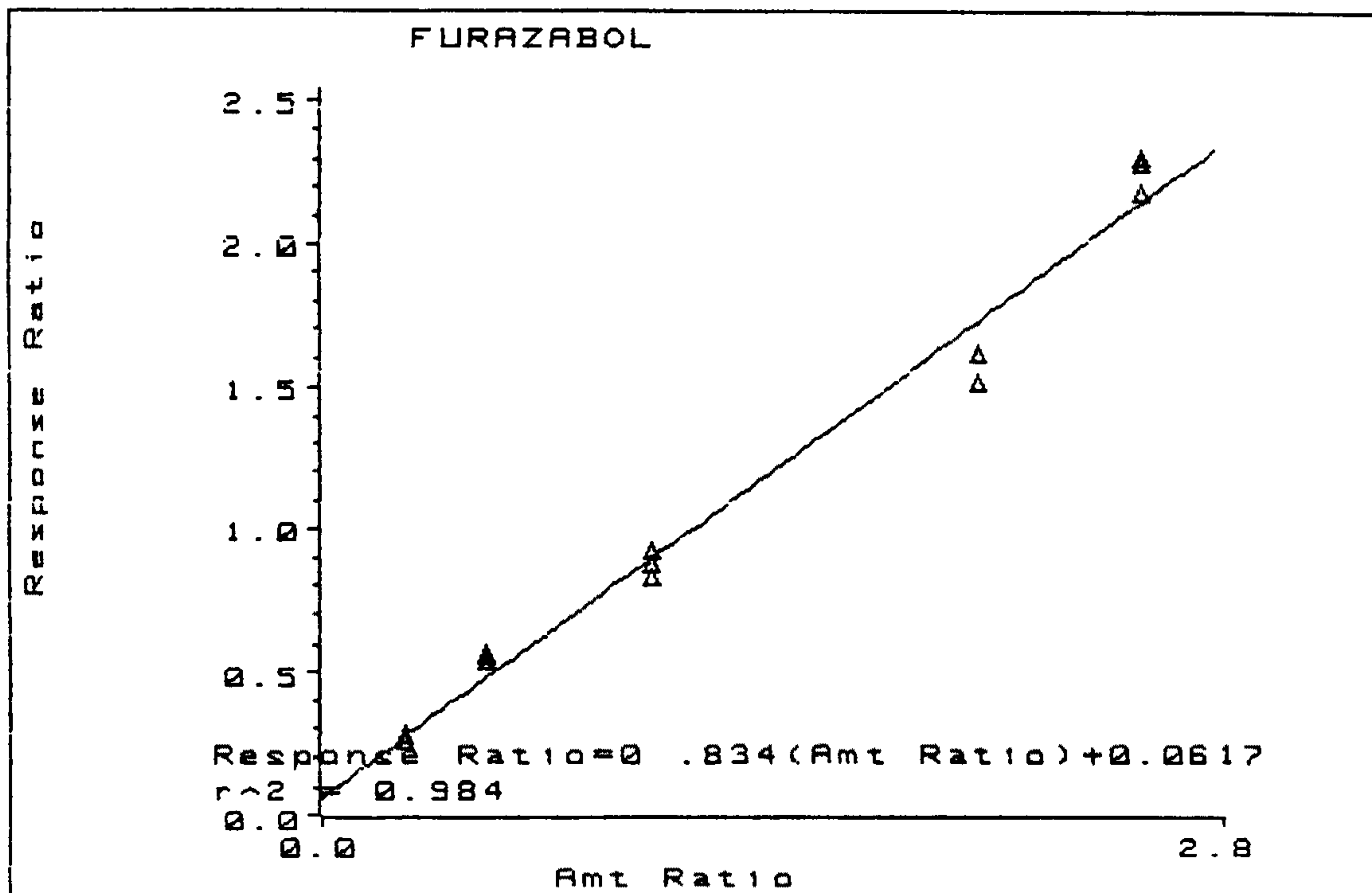


Fig. 1 : Calibration curve of furazabol after TMS-derivatization.



### ③ Furazabol 의 대사산물

실험동물 및 인간의 뇨에서 유추될 수 있는 furazabol 의 대사산물들을 Fig. 2 에 도시하였다. 본 연구에서는 앞서도 설명하였듯이 glucuronidase enzyme hydrolysis에 의해 furazabol 이 detect 되고 free fraction 에서는 거의 detect 되지 않는 것으로 보아 main metabolite 는 furazabol 의 glucuronide form 으로 사료된다.

Furazabol-OTMS의 Scan Mass Spectrum은 Fig. 3에 나타내었고, Internal standard 인 calusterone 의 315 ion 및 furazabol-OTMS 의 selected ion monitoring (SIM) mode 에서의  $m/z$  143, 387, 402 의 특징적 ion 들의 chromatogram 은 Fig. 4 에 나타내었다.

Gradeen 등은(15) 최근에 furazabol 의 human 에서의 metabolite 로서 16-hydroxyfurazabol 을 보고하였다. 또한 Takegoshi 는 furazabol 의 많은 metabolite 들을 합성하여 또한 보고(16)한 바 있다. 본 연구에서도 retention time 이 11.521 분에서 16-hydroxyfurazabol 로 유추되는 물질을 detect 할 수 있었다. 유도체화하여, 16-hydroxyfurazabol-di-OTMS 의 scan mass spectrum (Fig.5) 및 16-hydroxyfurazabol-di-OTMS 의 특징적인 ion 인  $m/z$  218, 231, 490 ion 들의 SIM chromatogram (Fig. 6) 을 Gradeen 등의 data 와 비교한 결과, 본연구에서도 16-hydroxyfurazabol이 대사산물임을 확인할수 있었다.  $m/z$  218 과 231은 furazabol 의 steroid 분자의 cyclopentane ring 인 D-ring 속의 carbon-carbon cleavage 에 의한 것으로 사료된다. Furazabol 의 furazan ring 은 in vivo 에서는 별로 영향을 받지 않는

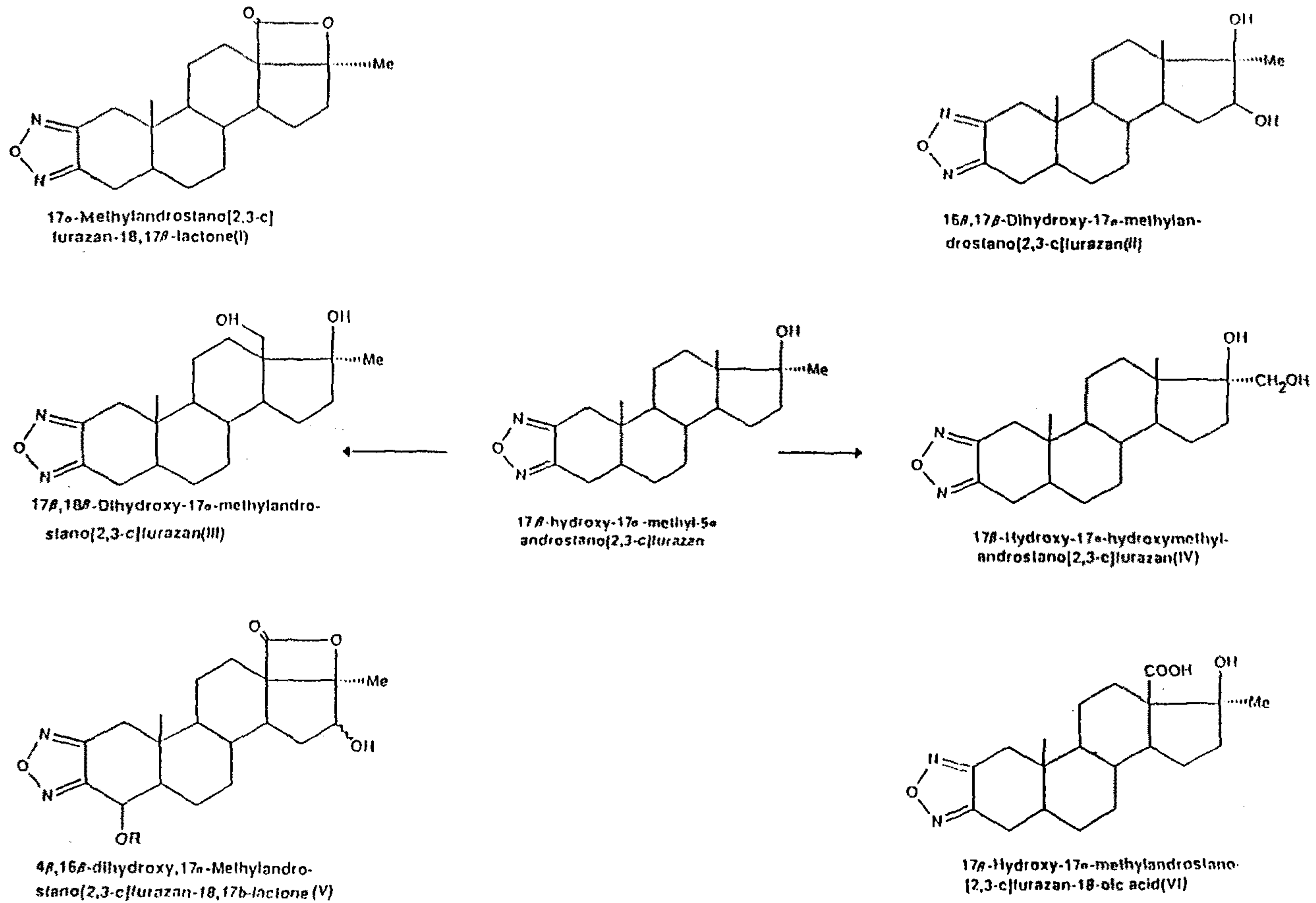


Fig. 7. Chemical structures of furazabol and its possible metabolites.

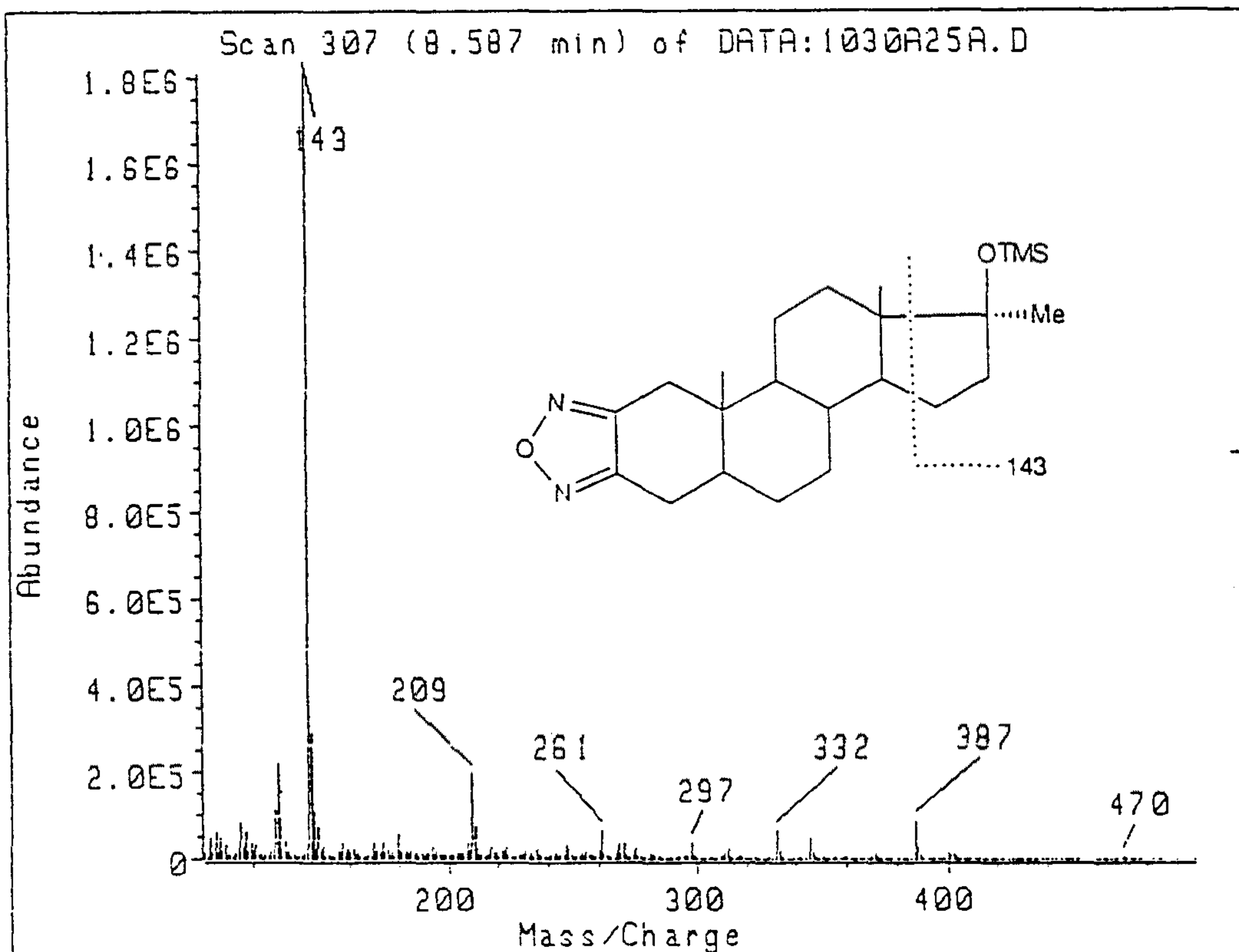


Fig. 3 : Scan mass spectrum of furazabol-OTMS derivative.

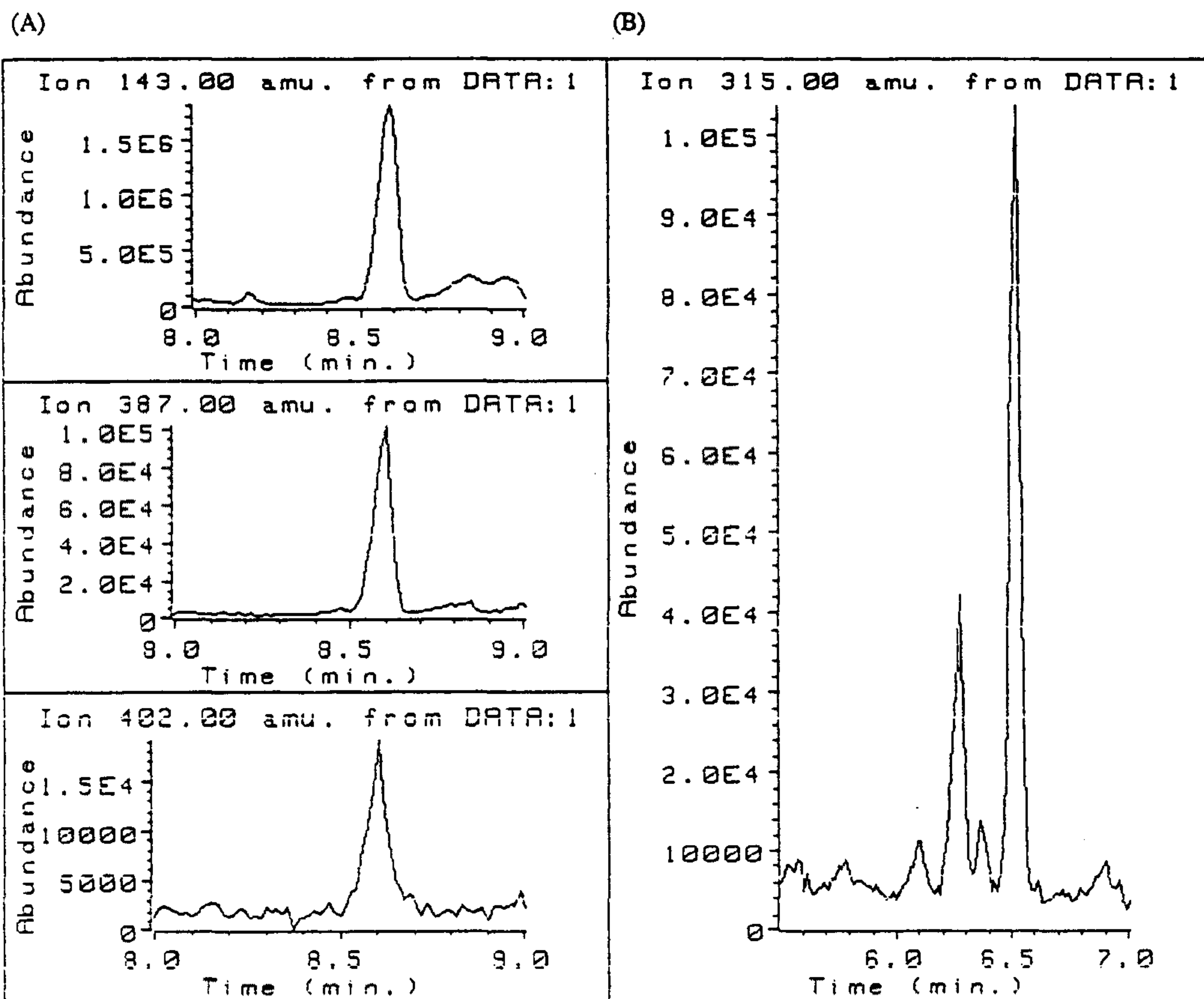


Fig. 4 : Selected ion monitoring chromatograms of furazabol-OTMS (A) and Calusterone-di-OTMS (B) in the human urine sample.

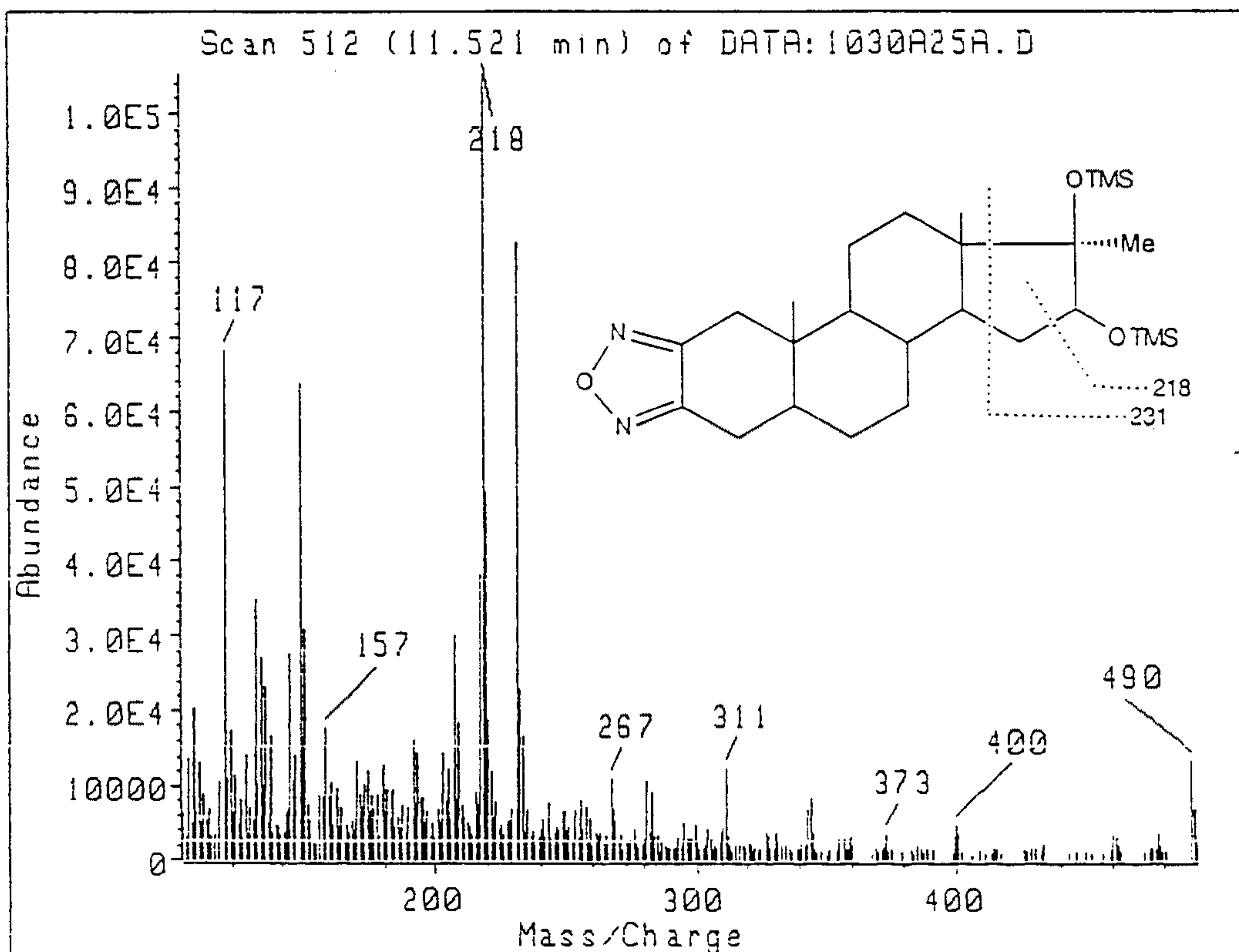


Fig. 5 : Scan mass spectrum of 16-hydroxyfurazabol-di-OTMS derivative.

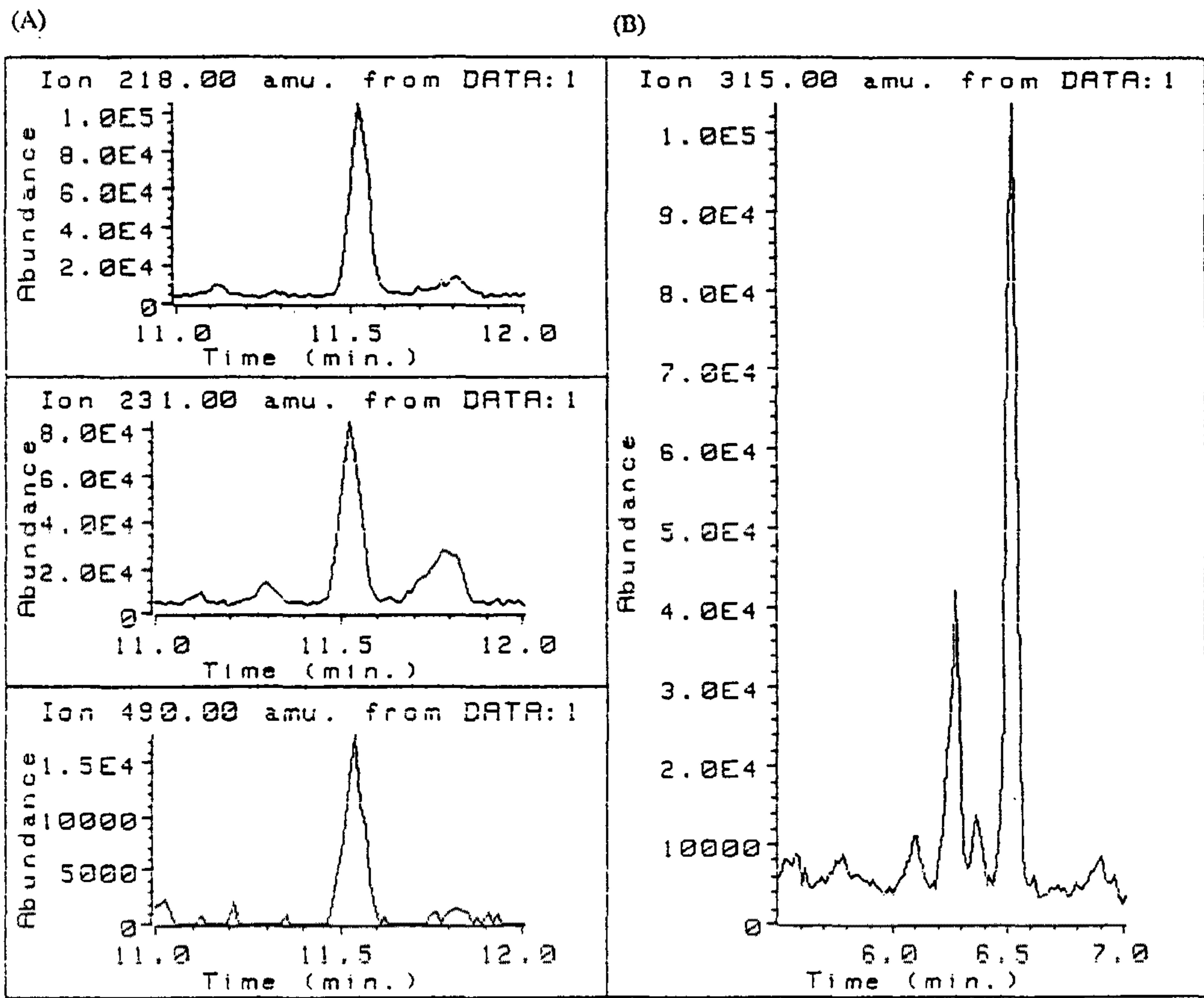


Fig. 6 : Selected ion monitoring chromatograms of the di-OTMS derivative of 16-hydroxyfurazabol (A) and calusterone (B) in human urine sample.

것으로 알려져 있다(9). 이것은 furazabol 이 화학적으로 안정함을 의미하며, 3,4-disubstituted furazan 의 화학적구조에 기인하는 것으로 사료된다.

Fig. 7 은 아직까지는 구조가 확인되지는 않았으나 furazabol 의 metabolite 로 추정되는 retention time 이 8.773 분에 나타나는 물질의 Scan Mass Spectrum 을 제시하였다. Fig. 2 에 제시한 가능한 furazabol 의 metabolite 중 base peak 이 247인점, 275 ion 들의 특징적인 ion 으로 미루어보아 metabolite III 로 유추되나, 조금 더 연구해야 할 것으로 사료된다.

#### ④ 약물동력학적 거동

앞에서 언급하였듯이 두사람의 human volunteer 를 가지고 본 연구를 수행하였으나, 두사람의 경우의 excretion pattern 및 대사능력의 차이로 인해 K 인 사람의 경우와 M 인 사람의 경우 각각의 data 를 case 별로 보고하고자 한다.

우선 Fig. 8 은 K 인 사람의 경우에 있어서 excretion rate 에 대한 time plot 한 것이다. Fig. 9 는 M 인 사람의 경우이다. 최대 excretion rate 은 K 인 경우는 투여후 1시간 정도에서, M 인 경우는 3시간 정도에서 일어남을 알 수 있었다. 각 시간별로 K 인 사람 (Table 1) 과 M 인 사람 (Table 2) 의 urine 에서의 furazabol 농도를 측정하여 Table 1과 2에 나타내었다. Excretion rate-time plot 으로부터 구한 생물학적 반감기 ( $t_{1/2}$ )는 K 인 경우가 약 1.87시간

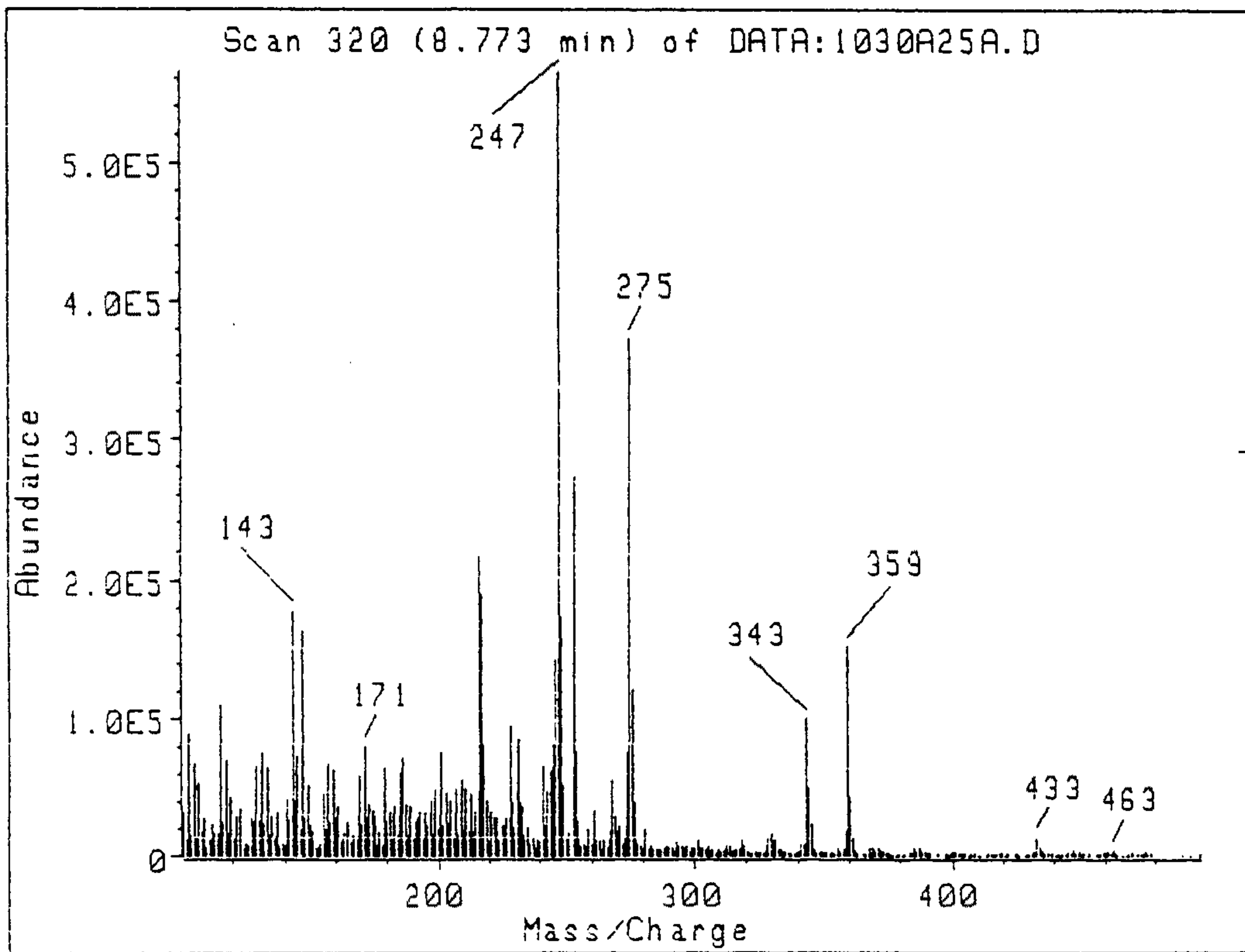


Fig. 7 : Scan mass spectrum of unidentified furazabol metabolite in human urine.



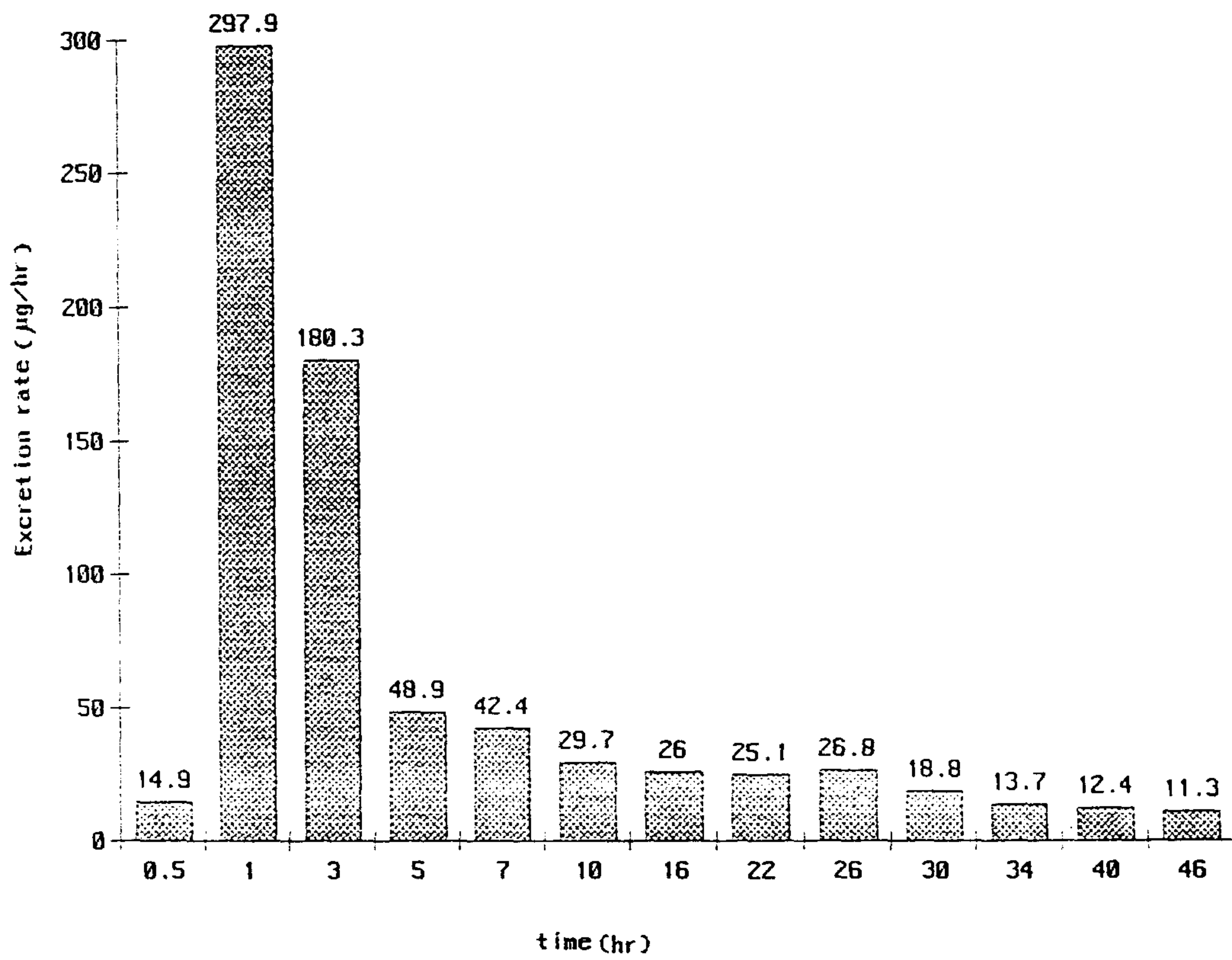


Fig. 8 : Excretion rate vs. time plot of furazabol in the case of K human.

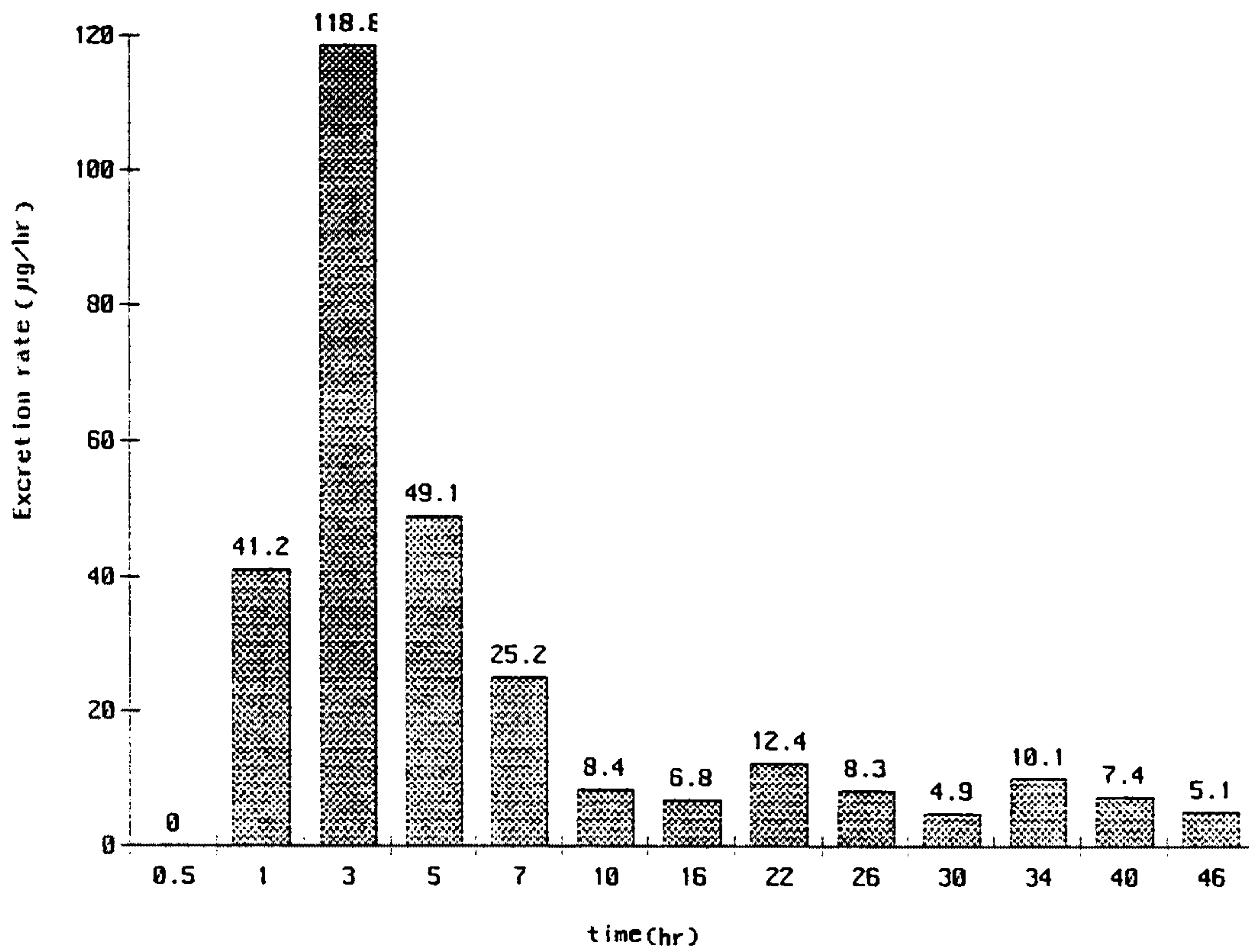


Fig. 9 : Excretion rate vs. time plot of furazabol in the case of M human.

Table 1. Concentration of Furazabol in K Human Urine After Oral Administration of 5mg furazabol.

Time (hr)	Urine Volume (ml)	Conc ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (%)	Amount ( $\mu\text{g}$ )	Excretion Rate ( $\mu\text{g/hr}$ )
1	92.5	0.16	1.3	14.9	14.9
2	263	1.13	1.1	297.9	297.9
4	151	2.39	0.7	360.6	180.3
6	59.5	1.64	2.1	97.7	48.9
8	125	0.68	1.0	84.8	42.4
12	132.5	0.90	2.5	118.7	29.7
20	170	1.38	2.7	234.0	26.0
24	80	0.94	0.9	75.3	25.1
28	306	0.35	0.8	107.3	26.8
32	120	0.63	2.7	75.0	18.8
36	187	0.29	0.9	54.7	13.7
45	222	0.50	0.8	111.3	12.4
48	48	0.71	0.9	34.0	11.3

Table 2. Concentration of Furazabol in M Human Urine After Oral administration of 5mg furazabol .

Time (hr)	Urine Volume (ml)	Conc ( $\mu$ g/ml)	RSD (%)	Amount ( $\mu$ g)	Excretion Rate ( $\mu$ g/hr)
1	85.5	0	0	0	0
2	103	0.40	1.3	41.2	41.2
4	190	1.25	1.2	237.6	118.8
6	105	0.93	0.8	98.1	49.1
8	126	0.40	1.2	50.4	25.2
12	253	0.13	2.3	33.4	8.4
20	470	0.12	2.4	54.5	6.8
24	126	0.39	1.2	49.6	12.4
28	235	0.14	0.9	33.0	8.3
32	101	0.19	3.0	19.4	4.9
36	167.5	0.24	1.4	40.2	10.1
45	215	0.27	1.0	58.9	7.4
48	87	0.23	0.8	20.4	5.1

이고, M 인 경우가 약 1.29시간 으로 계산되어, 매우 빠른 배설이 일어남을 알 수 있었다.

Furazabol 의 누적 뇨배설량을 plot 하여 보았다. K인 경우(Fig. 10) 와 M 인 경우 (Fig. 11) 의 전체누적 배설량은 K인 경우가 투여량의 약 33.4% 정도를, M 인 경우가 약 14.8% 의 배설을 나타내었다. Furazabol 은 48시간까지의 총배설된 량의 77.2% 가 24시간 이내에, 91.6%가 36시간 이내에 배설됨을 알 수 있었다.

또한 16-hydroxyfurazabol 로 확인된 furazabol 의 주요대사산물에 관해 정리해 보았다. K 인 사람의 경우 (Table 3) 과 M 인 사람의 경우 (Table 4) 에 있어 시간에 따른 16-hydroxyfurazabol 의 생성률을 정리 하였다. 16-hydroxyfurazabol 의 표준품이 없는 관계로 인하여 정확한 정량이 불가능하여 internal standard 인 calusterone 의 m/z 315 ion 의 height 에 대한 16-hydroxyfurazabol 의 m/z 218 ion 의 height 에 대한 ratio 에 시간별로 취한 urine volume 을 곱하여 정리한 것이다.

여기서 알 수 있듯이 대략 16-hydroxyfurazabol 은 측정량의 82.5%가 24시간 이내에, 94.7% 가 36시간 이내에 배설됨을 볼수 있어 앞서 furazabol의 배설 pattern 과 그 대사산물인 16-hydroxyfurazabol 의 배설 pattern 은 같은 양상을 보임을 알 수 있었다.

본 연구에서는 앞서 언급한대로 두사람의 human volunteer 를 선정하여 실험하였다. 두사람사이의 excretion pattern 의 이해를 용

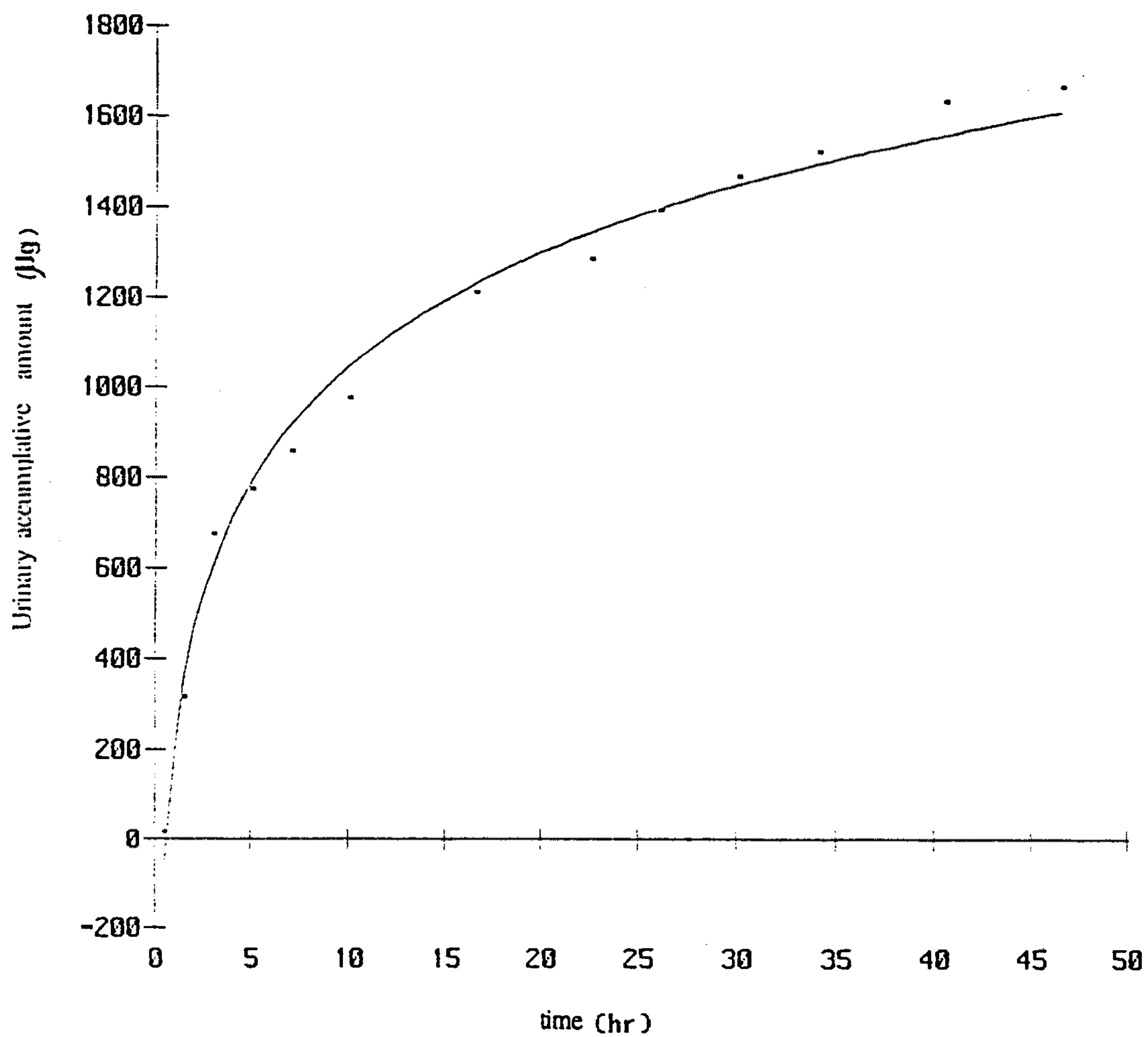


Fig. 10 : Urinary accumulative amount of furazabol after oral administration of 5 mg furazabol to K human.

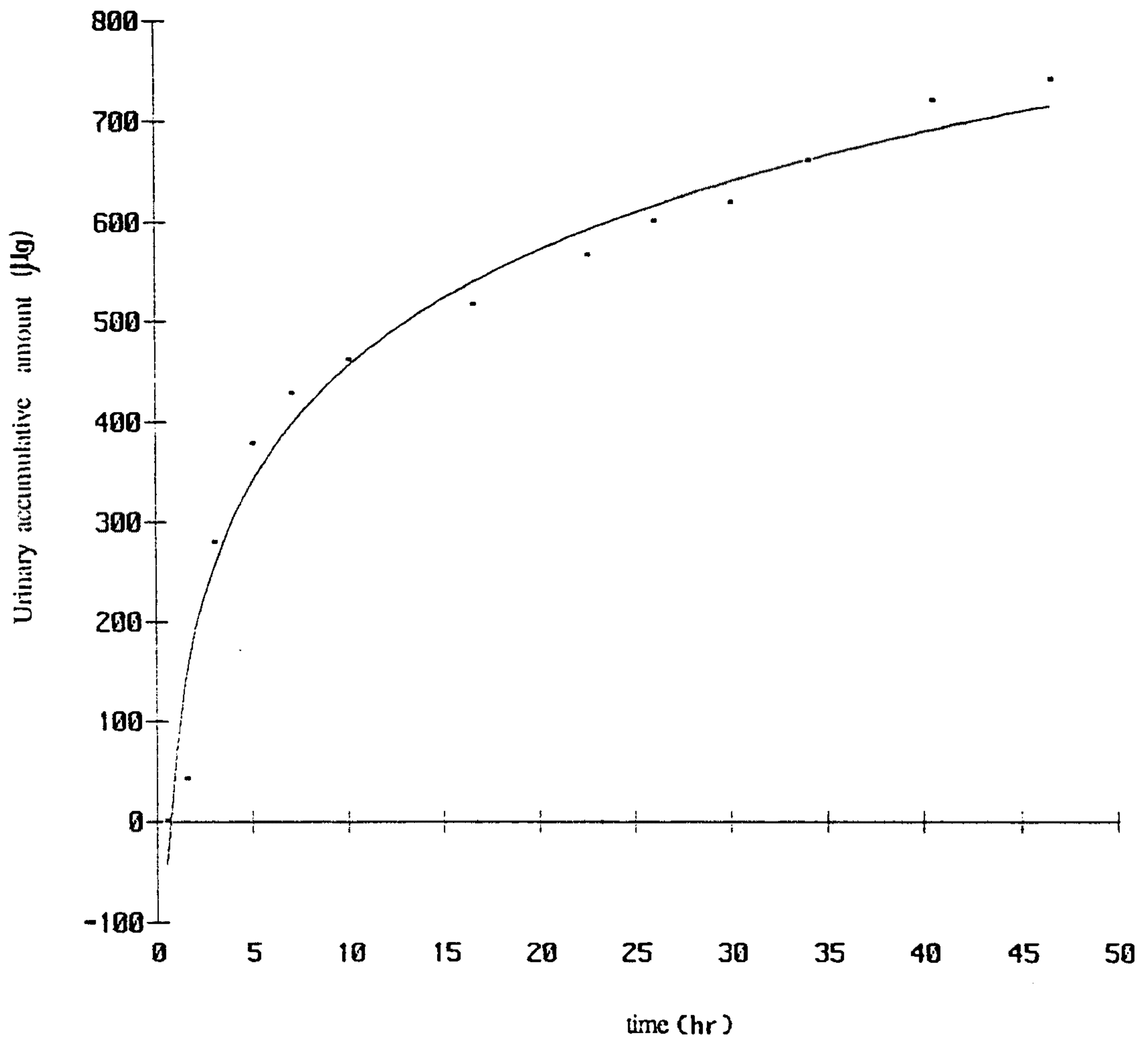


Fig. 11 : Urinary accumulative amount of furazabol after oral administration of 5 mg furazabol to M human.

Table 3. Urinary excretion of 16-hydroxyfurazabol after oral administration of 5 mg furazabol to K human.

Time (hr)	Urine Volume (ml)	$\frac{\text{Height (m/z 218)}}{\text{Height (m/z 315)}}$	Height ratio x Volume
1	92.5	0.01	0.19
2	263	0.34	17.9
4	151	0.13	3.8
6	59.5	0.29	3.4
8	125	0.13	3.3
12	132.5	0.11	3.0
21	170	0.06	2.2
24	80	0.13	2.1
28	306	0.04	2.5
32	120	0.07	1.6
36	187	0.03	1.2
45	222	0.04	1.6
48	48	0.07	0.7



Table 4. Urinary excretion of 16-hydroxyfurazabol after oral administration of 5 mg furazabol to M human.

Time (hr)	Urine Volume (ml)	$\frac{\text{Height (m/z 218)}}{\text{Height (m/z 315)}}$	Height ratio x Volume
1	85.5	0	0
2	103	0.08	8.0
4	190	0.16	29.5
6	105	0.11	11.0
8	126	0.04	5.0
12	253	0.01	2.5
21	470	0.01	2.0
24	126	0.02	2.5
28	235	0.01	1.5
32	101	0.01	1.0
36	167.5	0.01	2.5
45	215	0.01	2.0
48	87	0.02	1.5

이하계 하기위하여 furazabol 의 excretion rate-time plot 을 Fig. 12 에, 그 대사산물인 16-hydroxyfurazabol 의 pattern 을 Fig. 13 에 나타내었다. 이 그림에서도 알수 있듯이, 두사람의 개체차이로 인한 흡수, 분포, 대사, 배설의 차이는 상당히 다름을 알 수 있었다.

이상의 결과로 부터 furazabol은 free-fraction 보다 conjugated form 으로 더 잘 배설(약 10배 정도, 예비실험 결과)됨을 알수 있어, furazabol 의 대사에 있어 furazabol-glucuronide 가 주요한 대사산물이임을 알 수 있었다.

또다른 metabolite 인 16-hydroxyfurazabol 의 경우는 microbiological hydroxylation 에 의한 conjugate form 의 형태로 bile 로 배설된다는 보고(9)가 있다. 또  $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -methyl steroid 들의 경우 rabbit(10,11) 이나, human(12,13)에서  $16\beta$ -hydroxylated metabolite 가 생성된다고 잘 알려져 있다. 이와같은 대사양식은 metabolic hydroxylation 있어서  $17\alpha$  위치의 methyl group 의 존재에 의한 효과임이 지적되고 있다. 마찬가지로 furazabol 역시 C-17 의  $\alpha$  위치에 methyl 기가 존재하며 따라서  $16\beta$ -hydroxylated metabolite 의 확인은 이미 보고된 내용과 잘일치된다고 하겠다. 그러나 본 연구에서의 Human 개체에 따른 개체차등의 커다란 차이로 인한 furazabol 의 배설 및 16-hydroxylation 등은 in vivo 에서의 대사 및 배설연구에 있어, 주의를 요하는 결과라 하겠다.

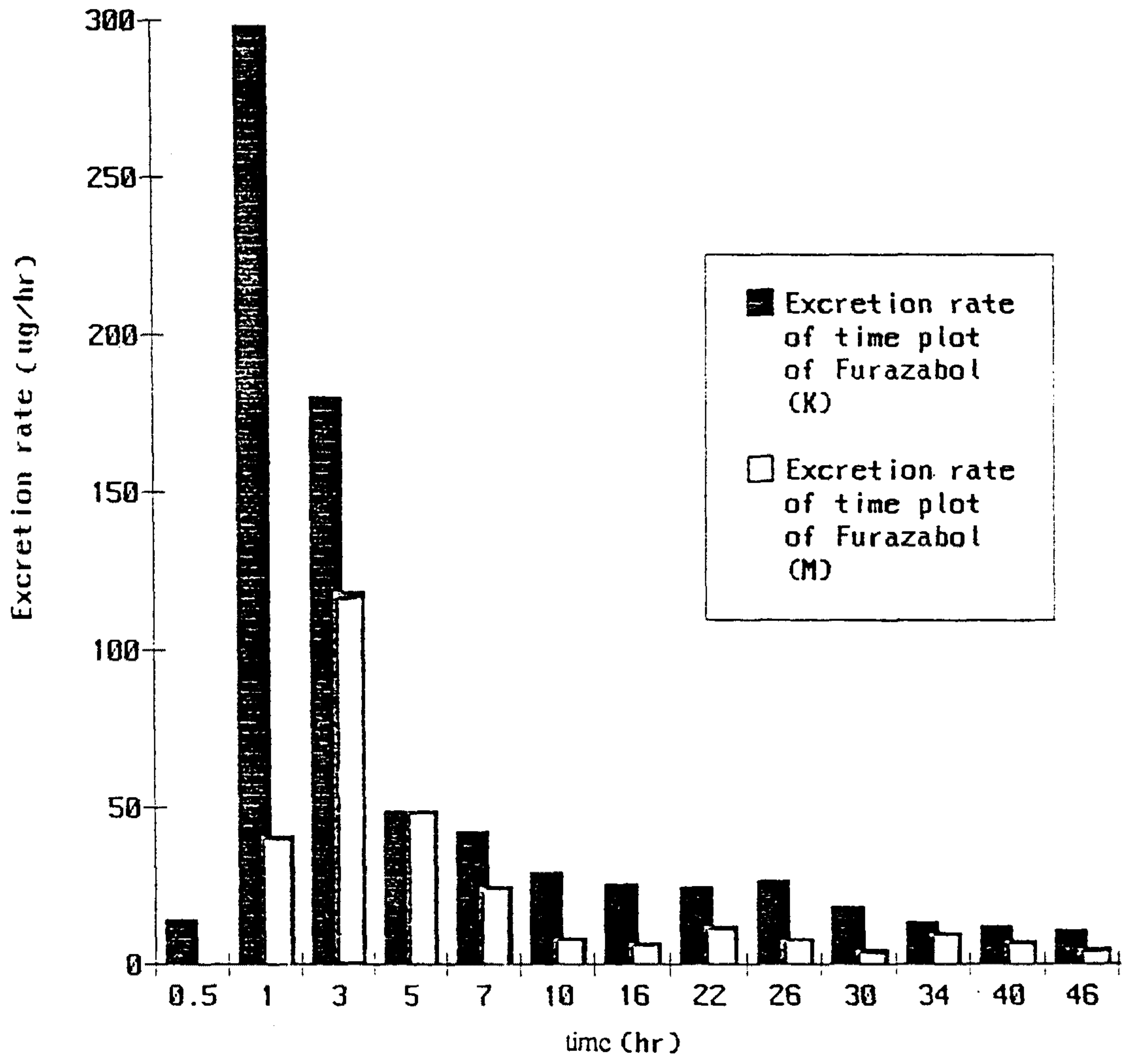


Fig. 12 : Excretion rate vs. time plot of furazabol between K and M human.

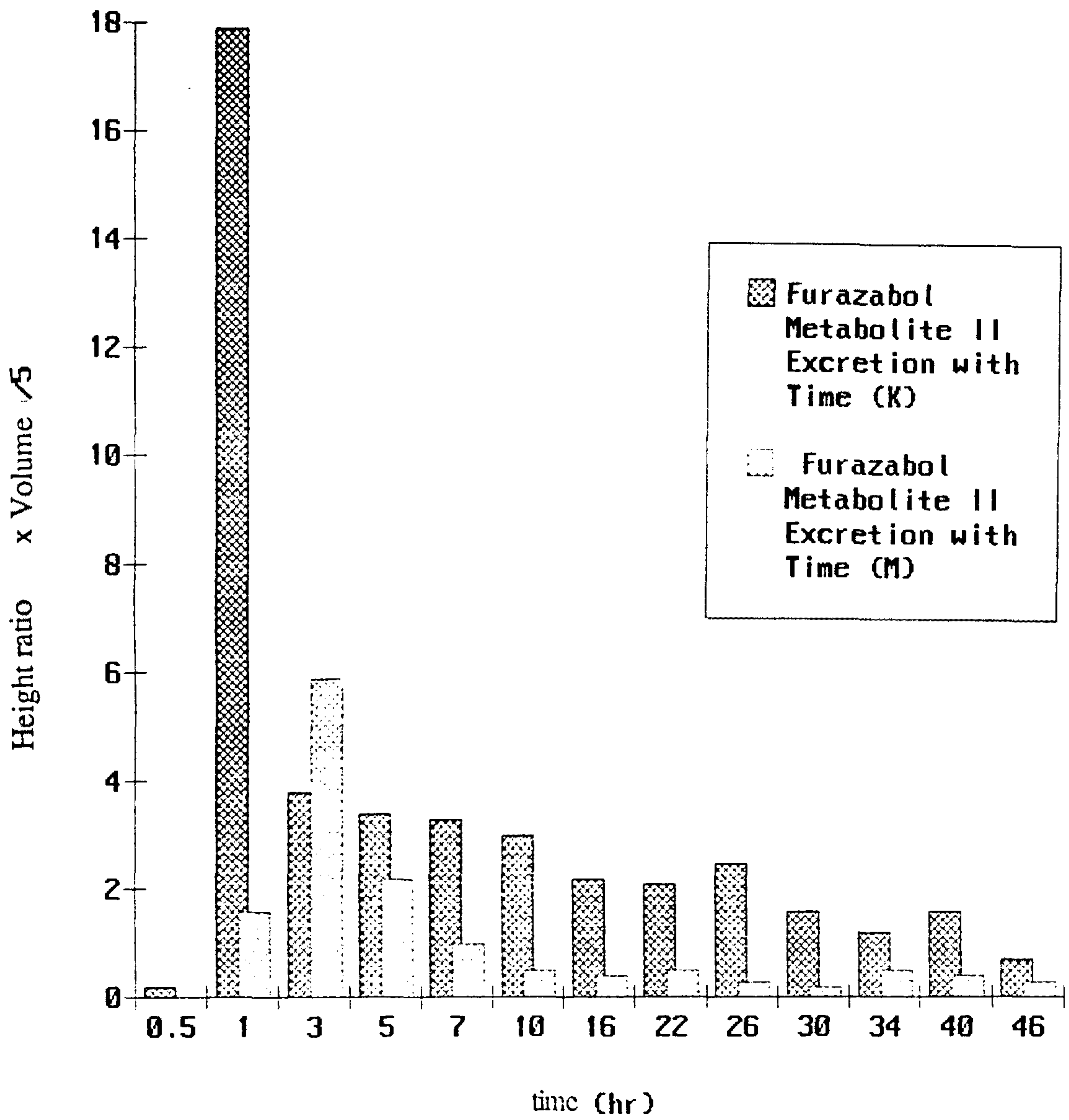


Fig. 13: Urinary excretion vs. time plot of 16-hydroxyfurazabol between K and M human.

#### 4. 참고문헌

1. M. Muroo, Chiryō, 49, 146, 1967.
2. H. Suzuki, Shinyaku To Rinsho, 15, 31, 1966.
3. Y. Goto, K. Murakami, A. Horisada and M. Goto, Rinsho To Kenkyu, 43, 172, 1966.
4. N. Kimura, A. Nishimoto, Y. Mizuguchi, M. Kitamura, A. Yoshinaga, Y. Fuyuno, T. Fukamizu, H. Nakayama, T. Arima, M. Yamada, Y. Oki, S. Fukano and Y. Ohtsuka Rinsho To Kenkyu, 43, 150, 1966.
5. N.J. Dooranbos and C.P. Dorn, J. Pharm. Sci., 54, 1219, 1965.
6. H. Tachizawa, T. Takegoshi, M. Chonan, T. Akimoto, and A. Kasahara, Clinical Report, 4, 2055, 1970.
7. Tachizawa et al, 기초와 임상, 4(10), 31, 1970 from Miotolon Tablet Brochure, Tai-ichi Pharm. Co., Japan.
8. Communication from the sub-commission of Doping and Biochemistry of Sport of the Medical Commission of the International Olympic Committee, 1989.
9. T. Takegoshi, H. Tachizawa, and G. Ohta, Investigation on Steroids. XII. Metabolites of Furazabol ( $17\beta$ -Hydroxy- $17\alpha$ -methyl- $5\alpha$ -androstano[2, 3-C] furazan) Administered to Rats, Chem. Pharm. Bull., 20, 1243-1259, 1972.
10. T. Watabe, S. Yagishita, and S. Hara, J. Med. Chem., 13, 311, 1970.
11. T. Watabe, S. Yagishita, and S. Hara, Biochem, Pharmacol., 19, 1485, 1970.
12. K. Schubert and K. Wehrberger, Endokrinologie, 55, 255, 1969.
13. K. Schubert and G. Schumann, Endokrinologie, 56, 1, 1970.

14. Schanzer, W. (1984), Untersuchungen Zum Nachweis und Metabolismus von Hormonen und Dopingmitteln, insbesondere mit Hilfe der Hochdruckflusskeits chromatographie, Dissertation, Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule, Köln, FRG.
15. C.Y. Gradeen, S.C. Chan and P.S Przybylski, Urinary Excretion of Furazabol Metabolite, J. Anal. Toxicol., 14, 120-122, 1990. \0... \\\0 0
16. T. Takegoshi, Investigations on Steroids. XIII. Synthesis of the compounds related to the metabololites of Furazabol ( $17\beta$ -hydroxy- $17\alpha$ -methyl- $5\alpha$ -androstano[2, 3-C] furazan), Chem. Pharm. Bull., 20(6), 1260-1271, 1972.

Table 1. Concentration of Furazabol in K Human Urine After Oral Administration of 5mg furazabol.

Time (hr)	Urine Volume (ml)	Conc ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (%)	Amount ( $\mu\text{g}$ )	Excretion Rate ( $\mu\text{g/hr}$ )
1	92.5	0.16	1.3	14.9	14.9
2	263	1.13	1.1	297.9	297.9
4	151	2.39	0.7	360.6	180.3
6	59.5	1.64	2.1	97.7	48.9
8	125	0.68	1.0	84.8	42.4
12	132.5	0.90	2.5	118.7	29.7
20	170	1.38	2.7	234.0	26.0
24	80	0.94	0.9	75.3	25.1
28	306	0.35	0.8	107.3	26.8
32	120	0.63	2.7	75.0	18.8
36	187	0.29	0.9	54.7	13.7
45	222	0.50	0.8	111.3	12.4
48	48	0.71	0.9	34.0	11.3

Table 2. Concentration of Furazabol in M Human Urine After Oral administration of 5mg furazabol .

Time (hr)	Urine Volume (ml)	Conc ( $\mu$ g/ml)	RSD (%)	Amount ( $\mu$ g)	Excretion Rate ( $\mu$ g/hr)
1	85.5	0	0	0	0
2	103	0.40	1.3	41.2	41.2
4	190	1.25	1.2	237.6	118.8
6	105	0.93	0.8	98.1	49.1
8	126	0.40	1.2	50.4	25.2
12	253	0.13	2.3	33.4	8.4
20	470	0.12	2.4	54.5	6.8
24	126	0.39	1.2	49.6	12.4
28	235	0.14	0.9	33.0	8.3
32	101	0.19	3.0	19.4	4.9
36	167.5	0.24	1.4	40.2	10.1
45	215	0.27	1.0	58.9	7.4
48	87	0.23	0.8	20.4	5.1



Table 3. Urinary excretion of 16-hydroxyfurazabol after oral administration of 5 mg furazabol to K human.

Time (hr)	Urine Volume (ml)	$\frac{\text{Height (m/z 218)}}{\text{Height (m/z 315)}}$	Height ratio x Volume
1	92.5	0.01	0.19
2	263	0.34	17.9
4	151	0.13	3.8
6	59.5	0.29	3.4
8	125	0.13	3.3
12	132.5	0.11	3.0
21	170	0.06	2.2
24	80	0.13	2.1
28	306	0.04	2.5
32	120	0.07	1.6
36	187	0.03	1.2
45	222	0.04	1.6
48	48	0.07	0.7

Table 4. Urinary excretion of 16-hydroxyfurazabol after oral administration of 5 mg furazabol to M human.

Time (hr)	Urine Volume (ml)	$\frac{\text{Height (m/z 218)}}{\text{Height (m/z 315)}}$	Height ratio x Volume
1	85.5	0	0
2	103	0.08	8.0
4	190	0.16	29.5
6	105	0.11	11.0
8	126	0.04	5.0
12	253	0.01	2.5
21	470	0.01	2.0
24	126	0.02	2.5
28	235	0.01	1.5
32	101	0.01	1.0
36	167.5	0.01	2.5
45	215	0.01	2.0
48	87	0.02	1.5