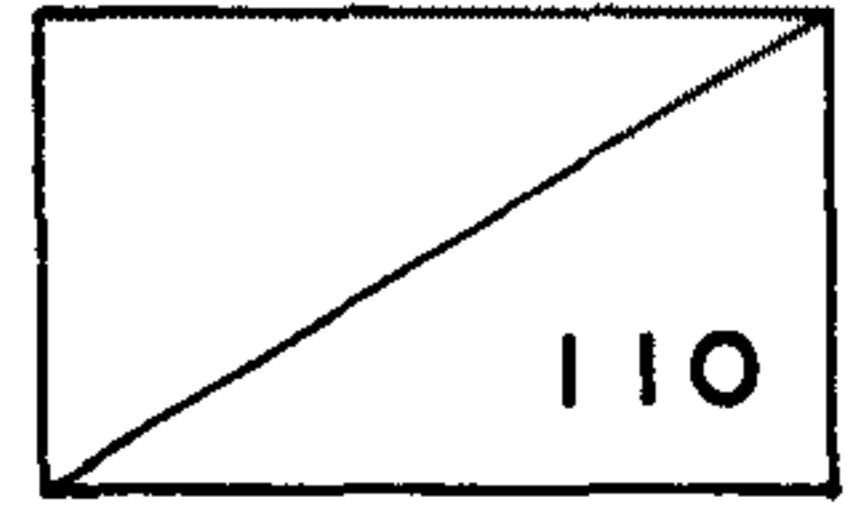


제 4 차 년 도
연 차 보 고 서



화학물질의 약리·대사에 관한 연구

A Study on Pharmacokinetics and Metabolism
of Biologically Active Compounds

연구기관
한국과학기술연구원

寄贈
一九九二年 五月 二十九日
과학기술처
寄贈本

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “화학물질의 약리·대사에 관한 연구(4차)” 사업의 보고서로 제출합니다.

1992 년 4 월

연구기관: 한국과학기술연구원

연구책임자: 박종세(책임연구원)

류재천(선임연구원)

연구원: 김동현(선임연구원)

김명수(선임연구원)

송윤선, 양종순(연구원)

이수용, 박성미(연구원)

홍묘숙, 명승운(연구원)

이태현, 박미숙(연구원)

현성혜, 지명환(연구원)

박세옥, 표희수(연구원)

김연제, 박경수(연구원)

김대기, 김태욱(연구원)

여 백

요 약 문

I. 제 목

화학물질의 약리·대사에 관한 연구

II. 연구의 목표 및 중요성

신약개발의 개발은 현재 당면하고 있는 의·약·화학분야에서 가장 첨예한 과제로 생각되고 있다.

새로운 약품을 창출함에 있어, 새로운 생리활성물질의 합성 및 그 생리활성의 탐색은 물론, 탐색된 생리활성물질들의 생체내에서의 변화를 아는 것은 매우 중요한 일이다. 이들의 생체내에서의 변화 및 거동은 약리학적인 약효 발현에 있어서 뿐만아니라 흡수, 분포, 대사 및 배설 과정등을 통한 화학물질의 안전성 평가에 있어서의 한 좌표가 되기도 하기 때문이다. 그러므로 생리활성물질들의 생체내에서의 활성 및 대사산물, 대사경로등의 연구 및 계속된 연구로 인한 기술축적은 새로운 생리활성 물질의 생체내의 유효성 및 안전성을 규명하는데 있어 핵심부분이 될것이다. 그러므로 이러한 생체내의 변화 및 거동연구를 통해 화학물질의 유효성 및 안전성 평가의 정확성을 기하여 신물질 창출을 앞당기고 이와 수반된 소재공업의 발달을 선도하며 더 나아가 우리나라의 생명과학의 발전 및 국민보건 향상에 이바지 함을 목표로 한다.

Ⅲ. 연구 개발의 내용 및 범위

본 연구의 방향은 생리활성물질의 생체내에서의 거동 및 이에 관련된 약리학적 연구와 대사산물 및 대사경로 등의 연구에 초점을 맞추었다. 노라든가 혈액과 같은 생체시료로부터의 정확한 생리활성물질의 함량 측정법의 개발 및 이를 이용한 생체내에서 새로이 생성된 새로운 대사산물들의 구조 유추 및 확인과 실험동물 및 인간을 이용한 체내배설 기전의 추구 그리고 약물-약물 상호작용에 따른 신장 배설 연구등을 연구하여 앞으로 개발된 새로운 생리활성물질들의 생체내에서의 변화 및 거동에 따른 더욱 유효한 대사물질의 신 의약품화등에 일익을 담당하고자 한 것이다.

우리는 이미 분석이 까다로운 약물인 Steroid제들의 분석법 정립 및 약물동태학적연구, 신장배설기전에 관한 연구들을 수행하여 왔으며, 배설저해제와의 약물-약물 상호 작용에 따른 효과도 살펴 보았다.

이와같은 시도들은 앞으로 의약품 후보물질들의 신약화시에 필수적으로 연구될 분야들의 한예로 정립, 제시하고자 한 것이다.

anabolic steroid 약물들의 human 및 실험동물에서의 흡수, 대사, 배설 단백질결합들의 약동력학적 연구결과를 바탕으로 하여, steroid계의 생합성 및 Hormone Control 에 주요장기인 adrenal (부신)적출 동물에서의 같은 steroid계통인 stanozolol 의 배설에 관한 연구를 수행하였다. 부신적출에 의해 stanozolol 및 그대사산물인 3'-hydroxystanozolol 의 배설은 크게 떨어짐을 알수있었고 그 경향은 3'-hydroxy stanozolol의 배설에 더욱 큰 영향을 주었다.

또한 Human 및 rat 와 같은 실험동물에서의 배설 및 대사에 관한 연구를 바탕으로, 실제 어느약물의 흡수 및 대사에 깊게 관여하는 장내 세균들에 의한 steroid 약물인 stanozolol 의 대사연구를 수행하였다. 항생제 처리에 의한 무균 rat에서의 장내세균에 의한 stanozolol 의 대사관여를 확인하고 실제 Human의 intestinal microflora 에 의한 시험을 해 본 결과 장내세균에 의해 stanozolol 이 대사됨을 알수 있었다.

또한 근육 이완제로 사용되는 chlorzoxazone 의 cytochrome P-450 에 의한 대사와 배설에 관한 연구를 수행하였다. chlorzoxazone 은 *in vitro* 에서 cytochrome P-450 II E1에 의해서만 6-OH chlorzoxazone 으로 대사되었으며 대사체만이 glucuronide 포함체 형태로 urine으로 배설이 일어났다. p-450 II E1의 체내 활성을 변화시키는 ethanol 과 disulfiram을 전처리 하였을때 chlorzoxazone의 혈중농도와 배설속도는 p-450 II E1의 양에 의존하여 증가 또는 감소됨을 줌으로써 약물 대사능력의 개체차가 약물의 disposition에 큰 영향을 미침을 보여 주었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

새로이 개발된 생리활성물질들의 생체내에서의 거동 및 이들의 대사과정과 대사산물들에 관한 연구는 신약개발에 있어서 매우 중요하고 유익한 정보를 제공하고 있음은 주지의 사실이다. 아직까지 많은 연구 기관 및 제약회사에서 이와같은 약동과 대사연구를 통한 신의약품 개발이나 또는 대사 연구의 병행수행을 통한 새로

운 시도등에 많은 관심이 집중되고 있지는 않으나, 생체 내에서의 유효성 및 안전성을 확립하는 것은 이와같은 대사연구, 약동학적 연구등을 통해 이루어지며, 이러한 결과는 더 나아가 생물학적 동등성시험이나 생체내 이용율과 같은 임상실험의 기초 data 로서도 유용한 것이다. 앞으로는 이와같은 약리·대사연구가, 계속 강조하여온 바와같이 기존의 의약품 뿐 아니라 현재 개발중인 합성생리활성 물질이나 천연식물의 성분이나 천연유래의 생리활성물질들의 연구에도 이용되어, 보다 넓은 경험의 축적이 이루어져야 한다고 사료된다.

더불어 흡수를 통한 주요장기에서의 대사에만 국한하지 않고 흡수가 일어날 때의 장내세균에 의한 대사 및 주요장기에서의 대사활성화에 따른 독성발현의 기전연구와 방사능 동위원소 표식화합물을 사용한 흡수, 분포, 대사, 배설연구 즉 whole body(전신생체)에서의 macroautoradiography 에 의한 분포, 각 조직장기에서의 분포, 표적 세포내에서의 분포연구, human에서 유래한 cytochrome 을 이용한 in vitro 대사 연구와 실험동물에서의 대사 및 배설연구 등 방사능 동위원소 표식화합물을 이용한 ADME 연구가 수행되면, 실제 신약화에 필요한 많은 정보가 얻어지리라 사료된다.

Summary

I. Subject

A study on Pharmacokinetics and Metabolism of Biologically Active Compounds(IV)

II. Objectives and Justification

The unknown human diseases have been discovered and the mechanism of onset of disease is being identified due to the rapid progress in the life science. Therefore the development of new therapeutic agents to rescue human being from these diseases is being focused by many scientists. Government, big fine chemical industry and many pharmaceutical companies have been invested to their Research and Development program for new drugs.

For the development of new drugs, it is necessary to find lead compounds, and to develop rapid and accurate screening methods, effectiveness, safety, metabolism, bioavailability, and toxicity evaluation etc. Studies on pharmacokinetics, especially metabolism, excretion, and bioavailability is one of the most important study in new drug development. Occasionally, the metabolites of the drug of interest have proved to be more effective than the parent compounds.

Therefore, the evaluation of the therapeutic efficacy, safety of

newly developed biological active compound, pharmacokinetic analysis, metabolism, and renal excretion play an important role in drug development. The establishment and accumulation of experience for basic techniques on pharmacokinetics, renal excretion, and metabolism would accelerate the development of new drugs.

III. Area and Scope

This study is focused on the pharmacokinetics, renal excretion, and metabolism of biologically active compounds that are very important area in the drug development. The establishment of accurate analysis technique of biological samples such as blood and urine, the elucidation of structure of the metabolites and metabolic pathway, the study on drug disposition and mechanism of excretion, the analysis of the effects of drug interaction on renal excretion would greatly contribute to the new drug development.

We have previously reported the establishment of analytical method of steroids in biological fluids, the elucidation of mechanism of renal excretion of steroids, and the effects of renal excretion inhibitor on anabolic steroid disposition as a part of drug—drug interaction. Those studies would provide us a direction of the research in new drug development.

Based on the results of absorption, metabolism, excretion, and protein binding of anabolic steroids, we investigated the excretion

pattern of stanozolol in adrenalectomized rats. Adrenal is an organ responsible for the biosynthesis of steroids and the homeostasis of hormones. The excretion rates of stanozolol and its metabolite, 3'-hydroxystanozolol was significantly decreased in adrenalectomized rat compared to control rats. The excretion of 3'-hydroxystanozolol is likely to be more affected by adrenalectomy.

In addition, the metabolism of anabolic steroid, stanozolol was studied using intestinal microorganism. Intestinal microorganisms have been known to be able to metabolize certain drugs and toxic chemicals. The metabolism of stanozolol in intestinal microflora was confirmed in rats free from bacteria by the treatment of antibiotics. We also observed the decrease of stanozolol added in culture medium containing the human intestinal microflora.

Studies was also performed on the cytochrome p-450 mediated oxidation and excretion of chlorzoxazone that is widely used as muscle relaxant. Chlorzoxazone was metabolized only to 6-OH chlorzoxazone *in vivo* and *in vitro*, by P-450 II EI and 6-hydroxychloroxazone was excreted into urine as a glucuronide conjugate. Chloroxazone was not detected in urine in our analytical system. When the content of P-450 II EI was modulated by pretreatment of ethanol or disulfiram, the pharmacokinetic behavior and renal excretion of chlorzoxazone were significantly changed compared to control group. These results suggest that drug-metabolizing capacity play an important role in disposition of drugs.








여 백

Contents

Chapter I . Introduction	23
Chapter II . Pharmacokinetic, metabolism and Excretion study	26
Section I . Studies on the excretion of stanozolol in adrenalectomized rat.....	26
1. Introduction	26
2. Materials and Methods.....	27
3. Results and Discussion.....	32
4. References.....	53
Section II . Studies on the metabolism of stanozolol by human intestinal microflora	58
1. Introduction	58
2. Materials and Methods.....	61
3. Results and Discussion.....	70
4. References.....	83
Section III . Studies on the metabolism and disposition of chlorzoxazone	86

1. Introduction	86
2. Materials and Methods.....	88
3. Results and Discussion.....	94
4. References.....	112

Figures

- II -1. Studies on the excretion of stanozolol in adrenalectomized rat
- Fig. 1 : Plasma disappearance curve of stanozolol in rats. 35
- Fig. 2 : Urinary excretion rate vs. time plots in rats. 36
- Fig. 3 : Urinary flow rate vs. duration (min). plot. 37
- Fig. 4 : Calibration curve of stanozolol(A) and 3'-hydroxystanozolol (B) 43
- Fig. 5 : Urinary excretion of stanozolol in sham-operated rat () and adrenalectomized rat (). 44
- Fig. 6 : Urinary excretion of 3'-hydroxystanozolol in sham-operated rat () and adrenalectomized rat (). 45
- Fig. 7 : Urinary accumulative amount of stanozolol in sham-operated rat () and adrenalectomized rat (+). 47
- Fig. 8 : Urinary accumulative amount of 3'-hydroxystanozolol in sham-operated rat () and adrenalectomized rat (+). 48
- Fig. 9 : Change of body weight in sham-operated rat () and adrenalectomized rat (+). 50
- Fig. 10 : Total ion chromatogram of rat urine in sham-operated

group (A) and adrenalectomized group (B).	51
Fig. 11 : Scan mass spectrum of stanozolol (A), 3'-hydroxystanozolol (B) and unknown peak (C) in adrenalectomized rat urine.	52
II -2. Studies on the metabolism of stanozolol by human intestinal microflora.	
Fig. 1. Calibration curve of stanozolol.	71
Fig. 2. Total ion chromatogram of rat urine in GC/MSD.	72
Fig. 3. Scan mass spectrum of stanozolol-OTMS-NHFB in rat urine.	73
Fig. 4. Selected ion monitoring chromatograms of stanozolol-OTMS-NHFB (A) and calusterone-(OTMS) ₂ (B) in rat urine.	74
Fig. 5. Urinary excretion amount vs time plot of stanozolol in normal rat and antibiotic treated germ-free rat.	76
Fig. 6. Urinary accumulative amount of stanozolol in normal rat and antibiotic treated germ-free rat.	77
Fig. 7. Time dependent changes of stanozolol by intestinal microflora in anaerobic culture condition.	78
Fig. 8. Total ion chromatogram of reference culture medium with human intestinal microflora.	79
Fig. 9. Total ion chromatogram of stanozolol treated culture	

medium with human intestinal microflora.	80
Fig. 10. Scan mass spectrum of stanozolol (B) and its metabolites suspected (A, C) with human intestinal microflora.	81
II -3 Studies on the metabolism and disposition of chlorzoxazone.	
Fig 1. Postulated pathway of biotransformation of chlorzoxazone.	95
Fig 2. HPLC chromatograms of incubations assayed for chlorzoxazone 6-hydroxylation.	97
Fig 3. Correlation of catalytic activity between rates of chlorzoxazone 6-hydroxylation and dimethylnitrosamine N-demethylation in different rat liver microsomes.	98
Fig 4. Inhibition of chlorzoxazone 6-hydroxylation in rat liver microsomes by several inhibitors.	99
Fig 5. Gas chromatogram of rat plasma after the administration of chlorzoxazone (50mg/kg) to rats using nitrogen phosphorus detector (NPD).	102
Fig 6. Mean (\pm SD) plasma concentrations of chlorzoxazone (ug/ml) in rats following oral administration of chlorzoxazone (50mg/kg).	103
Fig 7. Gas chromatogram of rat urine after the administration of chlorzoxazone (50mg/kg) to the rats using FID detector.	107
Fig 8. Urinary excretion of 6-hydroxychlorzoxazone in rats following administration of chlorzoxazone (50mg/kg);	108

Fig 9. Cumulative urinary excretion of 6-hydroxychlorzoxazone in rats following administration of chlorzoxazone.109

Tables

II -1. Studies on the excretion of stanozolol in adrenalectomized rat	
Table 1 : pharmacokinetic parameters after intravenous administration of stanozolol (20mg/kg b.w.) with and without probenecid to rat.	33
Table 2 : pH values between two groups in rat urines	38
Table 3 : Urinary excretion of stanozolol by renal clearance method	39
Table 4 : Effect of probenecid on association constant and total protein binding concentration of stanozolol in rat plasma.	40
II -2. Studies on the metabolism of stanozolol by human intestinal microflora	
Table 1. Representative reaction of intestinal bacteria	60
Table 2. Composition of antibiotic mixture.....	64
Table 3. Composition of anaerobic culture medium.....	68

II -3. Studies on the metabolism and disposition of chlorzoxazone. †

Table 1. Immuno Inhibition of Catalytic Activities in Rat Liver

Microsomes 100

Table 2. Pharmacokinetic parameters following oral (50mg/kg)

dose of chlorzoxazone along with other substances. 105

Schemes

II –1. Studies on the excretion of stanozolol in adrenalectomized
rat

Scheme 1 : Extraction and derivatization procedure for stanozolol
analysis 31

II –2. Studies on the metabolism of stanozolol by human
intestinal microflora

Scheme 1 : Extraction and derivatization procedure for stanozolol
analysis in rat urine 66

여 백

목 차

제1장 총 설	23
제2장 약리·약동·대사·배설 연구	26
제1절 부신적출 동물에서의 stanozolol 배설에 관한연구	26
1. 서 론	26
2. 재료 및 방법	27
3. 결과 및 고찰	32
4. 참고문헌	53
제2절 장내세균에 의한 stanozolol의 대사연구	58
1. 서 론	58
2. 재료 및 방법	61
3. 결과 및 고찰	70
4. 참고문헌	83
제3절 Chlorzoxazone 의 대사 및 약동학적 연구와 ethanol, disulfiram 이 미치는 영향연구	86
1. 서 론	86
2. 재료 및 방법	88
3. 결과 및 고찰	94
4. 참고문헌	112

여 백

제1장 총 설

21세기를 불과 몇년 눈앞에 둔 우리나라는 눈부신 경제 성장속에서도 아직도 몇몇 분야는 세계적인 수준에 진입하지 못하고 부단한 노력을 하고 있는 분야들도 있다.

특히 정밀화학분야에서는 수많은 소재 화합물들의 국내 자체 생산, 부가가치가 화학분야 생산품 중 제일높은 농약, 의약 등 여러 소분야에서 힘겨운 노력을 최근 몇년간에 걸쳐 경주해오고 있다. U.R. 이나 지적소유권 보호, 물질 특허제 도입등으로 앞으로 정밀화학분야에서의 세계로의 진입은 결국 그나라 자체의 기술과 노하우의 축적 이외엔 길이 없음이 더 더우기 최근의 정보화 사회, 첨단화 사회에서의 생존 전략이 되고 있다.

이러한 시대적, 현실적 필요성에 부응하여 신의약품 창출을 위한 다방면의 노력이 경주되고 있다. 즉 약학, 의학, 화학, 생물 등 이학분야 관련자들의 부단한 연구노력은 물론, 합성, 생리활성, 그들의 약리, 흡수, 분포, 대사, 배설, 전임상 독성시험, 임상시험, 제제연구 등등 신의약품 개발 단계 단계마다 그 관련 전문가들이 부단한 노력을 경주해 오고 있는 것이다.

이와 같은 요구에 따라 신의약 후보물질들의 생체내에서의 거동 즉, 흡수, 분포, 대사, 배설등의 약동력학적 연구가 필연적으로 대두되어, 생체내에서의 유효성 및 안전성 더 나아가 임상시험의

기초자료로서의 활용성 또한 높은 연구 테마로 자리잡아가고 있다.

물리·화학적 특성등이 밝혀져 나가고 있는 새로운 생리활성 물질들의 생체내 거동에 관한 연구는 이들 화합물의 방사능 표식 화합물을 이용해 이들의 흡수, 분포, 배설등의 연구가 활발하며, 이들의 생체내에서의 대사 연구 또한 필수불가결한 연구과제이다. 또한 이와 더불어 이들의 방사능 표식 화합물들이 용의치 않은 경우에는 이들의 생체시료내에서 즉 뇨, 혈액, 담즙, 장기등에서의 정확한 미량분석기술이 요구되어지고, 이와같은 분석법의 확립에 따라 이들의 흡수, 분포, 대사, 배설과 같은 생체내에서의 동력학적 추이를 추적하고 있다.

선진 여러나라 들 중 자국에서 신 의약품을 창출하여 전세계에 이것을 판매하고 있는 많은 나라들은 이와같은 system을 확립하여 운영하고 있으나, 현재 우리나라는 시작을 한 정도이므로, 많은 외국의 유용한 연구 system을 국내에 정착, 흡수하여 우리 것으로 하여, 국내 신 의약 개발 과정에 접목시켜야 할 것이다. 신의 약이란 함은 어디까지나 생체내에서의 움직임으로, in vitro 보다는 in vivo 즉 whole body 에서의 Absorption Distribution, Metabolism, Excretion 과 같은 체계적인 system 을 확립하고, 이를 토대로 하여 in vitro 약효 발현 기전등을 연구하여 기반기술의 확충 및 실제 응용될수 있는 자료축적등에 모든 힘을 기울여야 할 것이다.

우리는 이미 몇년간의 연구를 통해 신의약품 후보물질의 대두에 대비하여 현재 의약품으로 사용되고, 있는 stanozolol 이라는 steroid 제제를 위주로 그 관련 steroid 들의 연구를 수행하여왔다.

이 steroid 제제들은 극히 미량이 뇨로 배설되기 때문에 이들의 탐지하는 분석방법의 확립 및 표준화 없이는 이와같은 연구가 매우 힘들므로, 초정밀 분석기기인 GC/MSD와 같은 분석기기를 위주로, 실험동물, 그리고 human 에서의 excretion study, probenecid 와의 drug-drug interaction 에 따른 excretion study, protein binding 및 steroid 제제들의 rat 및 human 에서의 metabolite 검출 연구등을 수행하여 왔다.

이와같은 연구경험을 바탕으로 금번 연구에서는 같은 steroid 제인 stanozolol 의 부신적출 동물 model 에서의 배설연구를 통해 선천성, 후천성, 부신부전시의 이들 약물의 배설패턴을 파악하여 약물투여시의 투여량조절 및 steroid 생합성에 관련된 장기인 부신 적출시의 외인성 steroid 배설 패턴을 살펴보고, 또한 같은 화합물의 생체내에서의 흡수시에 장관에서 접촉하는 장내세균에 의한 대사를 살펴보아 장내세균에 의한 영향을 연구하였다. 또한 근육이완제로 널리 알려진 chlorzoxazone 의 in vitro 및 in vivo 에서의 대사 및 약동학적 연구를 수행하였고, 더우기 in vivo study 가 불가능한 human 의 microsome 을 이용한 in vitro 대사연구를 통해 in vivo 특히 human 에서의 대사 양식을 유추할수 있는 방법을 모색하였고 더불어 ethanol과 disulfiram 에 의한 영향 연구도 병행수행 하였기에 보고하고자 한다.

제2장 약리·약동·대사·배설연구

제1절 부신 적출 동물에서의 Stanozolol 배설에 관한 연구

1. 서 론

합성 steroid 의약품인 stanozolol(17β -hydroxy- 17α -methyl- 5α -androstano-(3,2-c) pyrazole)은 생체의 성장을 촉진시키면서, anabolic activity 에 대한 androgenic activity의 ratio가 작아 남성화 효과를 최소화 할수 있는 합성 anabolic steroid이며(1,2), 치료목적 으로서는 재생 불량성 빈혈(aplastic anemia)이나 혈전증 예방등에 사용하는 의약품으로 알려져 왔다(3).

또한 화학구조상으로 stanozolol은 pyrazole ring을 가지고 있어 다른 anabolic steroid 와는 구조적으로 잘 구별되며(4), 이물질 의 기기분석에 있어서는 injection port나 column에서의 흡착이나 pyrazole ring의 극성으로 인하여, 가스 크로마토그래피상에서의 response가 낮기 때문에, 생체시료 등에서의 분석에 많은 어려움을 갖고 있는 화합물이기도 하다(5).

의학적인 용도 이외에도, 이 stanozolol 의 지속적인 오·남용 은 간 및 생식계통의 질환을 유발하는 것으로 보고(6)되고 있고, 이와같은 분석상의 어려운점과 더불어 stanozolol의 anabolic effect 를 이용해 최근에 운동선수들이 body weight 이나 muscle build-up

을 증가시켜 운동능력을 향상시키기 위해 남용하고 있어 운동선수들을 보호하고자 국제 올림픽 위원회에서는 이 stanozolol을 포함한 anabolic steroid 를 금지약물로 규정하고 있다(7,8). 그러나 운동선수들은 doping test 를 통과하기 위해 이 약물의 배설을 은폐시키려고 여러시도를 하고 있는 것으로 알려져, 본 연구실에서는 이 약물의 배설에 미치는 약물중에서 probenecid 와의 약물상호작용(9,10,11)을 rat 및 human에서 계속 연구보고 하여 왔다.

계속하여 우리는 stanozolol이 steroid 약물인점에 착안하여 hormone의 pituitary-adrenal axis에 의한 전달과 steroid 합성등에 주요 역할을 하는 adrenal gland에서의 endogeneous steroid 가 아닌 exogeneous steroid의 효과를 보기위해 adrenalectomized(부신절제) rat를 이용하여 stanozolol의 배설 및 대사를 살펴 보았다.

2. 재료 및 방법

1) 시약 및 기구

① 시 약

stanozolol(한일약품), Entobar(한림제약), 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), β -Glucuronidase (E. Coli ; Boehringer), MSHFB (N-methyl-N-trimethylsilyl - heptafluorobutyramide), MBHFB (N - methyl - bisheptafluorobutyramide ;Macherey & Nagel, F.R.G.), TMS-Cl

(trimethylchlorosilane ; Sigma), TMS - Imidazole (trimethylsilyl imidazole ; Sigma), 및 수술에 필요한 Streptomycin (종근당)과 povidone - iodine(현대약품)을 구입사용하고 그의 필요한 시약은 특급 및 일급 이상을 사용하였다.

② 기 구

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) 기기 및 분석조건

① 기 기

- GC/MSD(HP 5890A/5970B)
- HP59970C MS Chemstation
- HP7946 Disc Drive
- HP2934A Dot Matrix Printer

② 분석조건

- Column : 5% - phenylmethylsilicone (SE-54)

(HP fused silica capillary, 17m(L.) x 0.2mm(I.D.) x

0.33 μ 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 Adrenalectomized Rat

① Animal.

KIST부설 유전공학 연구소에서 SPF Sprague-Dawley male Rat(150±15g)을 분양받아, 1주일간 환경등에 적응시킨후 실험에 사용하였다. 그리고 양육시, 적당량의 tap-water 와 고형사료(삼양사, korea)를 임의로 공급하였다.

② Adrenalectomized Rat.

Entobar (한림제약, 500mg/10ml vial)을 Sprague -Dawley Rat에 i.p. injection(0.2ml)하여 마취시킨후 계속 light ether anesthesia 상태로 유지시켜가며 수술을 하였다. 상법(12, 13)에 따라, 마취된 rat의 등을 위로하여 수술대에 고정시킨후, 등위의 털을 양측면으로 깎고, povidone-iodine 으로 소독한 후 bilaterally 절개하여 신장위쪽의 작은 pink색의 adrenal gland 를 ring-pincet 으로 제거 확인한 후, infection 방지를 위해 streptomycin을 가하고 절개부위를 조심스럽게 봉합한후 다시 봉합부위를 povidone-iodine으로 소독하여 따뜻한 곳에서 rat가 recover 되도록 주의한다. operation으로 인한 출혈 및 통증, stress로 부터, 생기는 오차를 극복하기 위해 대조군은 sham operation 하여 Adrenalectomized rat

과 거의 같은 정도의 stress 를 주었고 수술 완료후 부터 실험기간 동안은 5% D/S(dextrose /saline)액을 공급하였다. 수술후 하루 방치후, 건강하게 활동하며 recover 된것을 확인하고 stanozolol을 경구투여(20mg/kg) 하여 metabolic cage에서 0~6시간, 6~12시간, 12~24시간, 24~48시간, 48~72시간에 걸쳐 urine collection을 하였다. 각군은 5마리로 하였고, 실험기간 동안의 body weight 의 변화를 측정하였다.

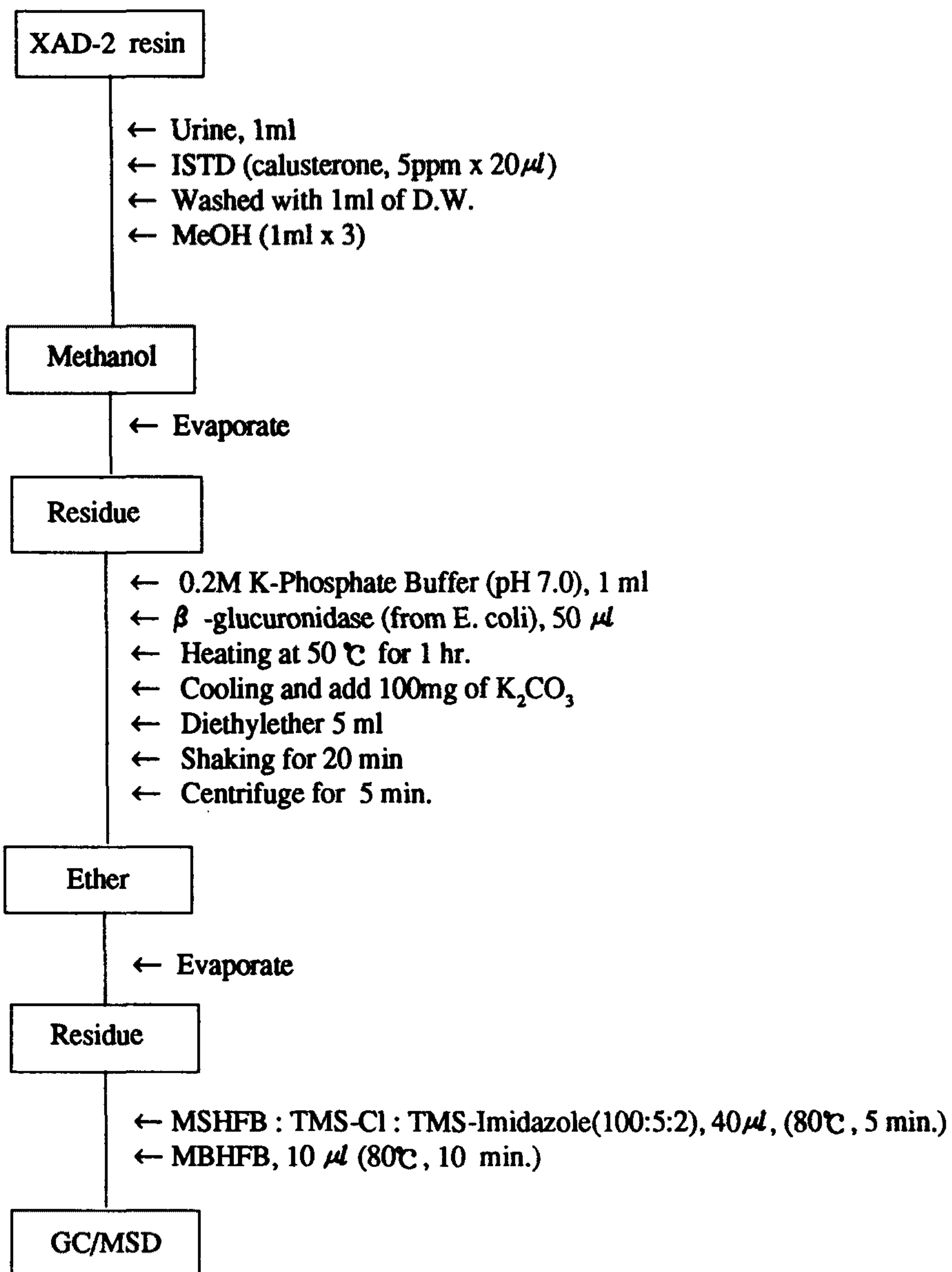
4) Rat urine 에서의 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol 의 분석

① 검량선의 작성

정상 Rat의 urine 1ml에 stanozolol과 3'-hydroxystanozolol 각각을 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000ng/ml의 농도가 되게 하고 내부표준 물질로서는 calusterone 100ng 을 가한후 Scheme 1과 같은 procedure에 의해 clean up 한후 GC/MSD로 분석하여 검량선을 작성하여 정량에 사용하였다.

② Rat urine에서의 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol의 정량

뇨로부터의 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol의 분석은 prof. Donike의 방법(14)을 약간 변형하여 실시 하였다. 대략적인 분석 방법은 scheme 1에 요약정리 하였다. 간략히 설명하면 정해진 시간에 받은 urine을 원심분리 하고 그 상층액을 1ml취하여 XAD-2 resin을 넣은 column을 통과시킨다. 내부표준물질로서는 calusterone (5ppm) 20 μ l 를 가하고 urine sample과 같은 양의 증류수 1ml로 XAD-2 resin 을 씻어 주었다. 증류시킨 methanol 1ml로 column을



Scheme 1. Extraction and derivatization procedure for stanozolol analysis.

3회 elution 시키고 이 methanol elute를 rotary evaporator에서 증발시킨다. Methanol이 증발된후 그 잔사에 0.2M K.-phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml와 glucuronide conjugate form으로 배설되는 stanozolol을 가수분해 하기 위해 β -glucuronidase (100U/ml) 50 μ l를 가하고 50°C에서 1시간 동안 가열하였다. 가열후 test tube는 실온에서 냉각시키고 potassium carbonate 100mg과 diethyl ether 5 ml을 넣고 shaker에서 20분간 추출하였다. 2,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 aqueous layer와 organic layer를 freezer(-30°C)에서 분리하고, ether층을 다른 test tube에 옮기고 이 ether를 증발시킨후, vacuum dessicator (P₂O₅/KOH)에서 수분을 완전하게 제거시켰다. 수분이 완전히 제거된 residue에 MSHFB : TMS - Imidazole (100 : 5 : 2, v/v/v) 40 μ l를 넣고 80°C에서 5분간 유도체화시키고, 재차 MBHFB 10 μ l를 넣고 80°C에서 10분간 heating bloc을 사용하여 가열하였으며, GC/MSD를 사용하여 위에 적은 분석조건에서 분석한 후 검량선을 이용하여 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

우리는 이미 stanozolol의 rat 및 human에서의 대사 및 배설 연구와, probenecid에 의한 stanozolol의 배설 연구등을 보고(9, 10, 11)한 바 있다. 이를 요약하면 rat를 사용한 stanozolol 배설에 미치는 probenecid의 효과는 Table 1에서 볼수 있듯이 probenecid 병용투여군의 분포용적($V_{d\beta}$)은 stanozolol 단독투여군에서의 값보다 유의성($p < 0.01$)있게 증가하였고 β -phase의 반감기는 probenecid 투여

Table. 1. Pharmacokinetic parameters after intravenous administration of stanozolol(20mg/kg b.w.) with and without probenecid to rat.

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

a. Results were given as mean ± S.E.

b. Significant at $p < 0.05$

c. Significant at $p < 0.01$

에 의하여 약 4배 정도 증가하였다. 병용투여군의 AUC는 stanozolol 단독투여군 보다 2.5배이상 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소되었고 전신 clearance는 probenecid 투여군에서 유의성 있게 ($p < 0.01$) 증가함을 알수 있었다. 이와같은 병용 투여군의 분포용적 ($V_{d\beta}$) 및 전신 clearance (CLt)의 증가는 AUC의 감소에 기인한 것으로 해석할수 있었다.

또한 plasma에서의 stanozolol 농도와 probenecid 병용투여에 의한 소실곡선 (Fig. 1)과 시간에 따른 urinary excretion rate (Fig. 2)에서, Fig. 1의 stanozolol의 혈장내 농도가 stanozolol 단독투여군과 probenecid 병용투여군과의 차가 time-dependent하게 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. 2의 0-90분 사이의 probenecid 병용투여군의 urinary excretion rate가 단독투여군보다 더 크게 나오는 현상을 설명하였다.

이와같은 결과를 검토하기 위해 우리는 urinary excretion에 미치는 여러영향 인자들을 검토하였다(15, 16). 우선 뇨의 pH value (Table. 2)와 뇨의 flow rate (Fig. 3)에서 알수 있듯이 stanozolol 단독 투여시나 stanozolol에 probenecid를 병용투여시 모두 큰 차이를 보여 주지 않아 뇨의 pH value나 뇨의 flow rate에 미치는 영향은 없는것으로 유추하였다.

또 하나의 factor로서 시구체 여과속도 (Glomerular Filtration Rate)를 Renal Clearance method로 측정한 결과 (Table 3), probenecid

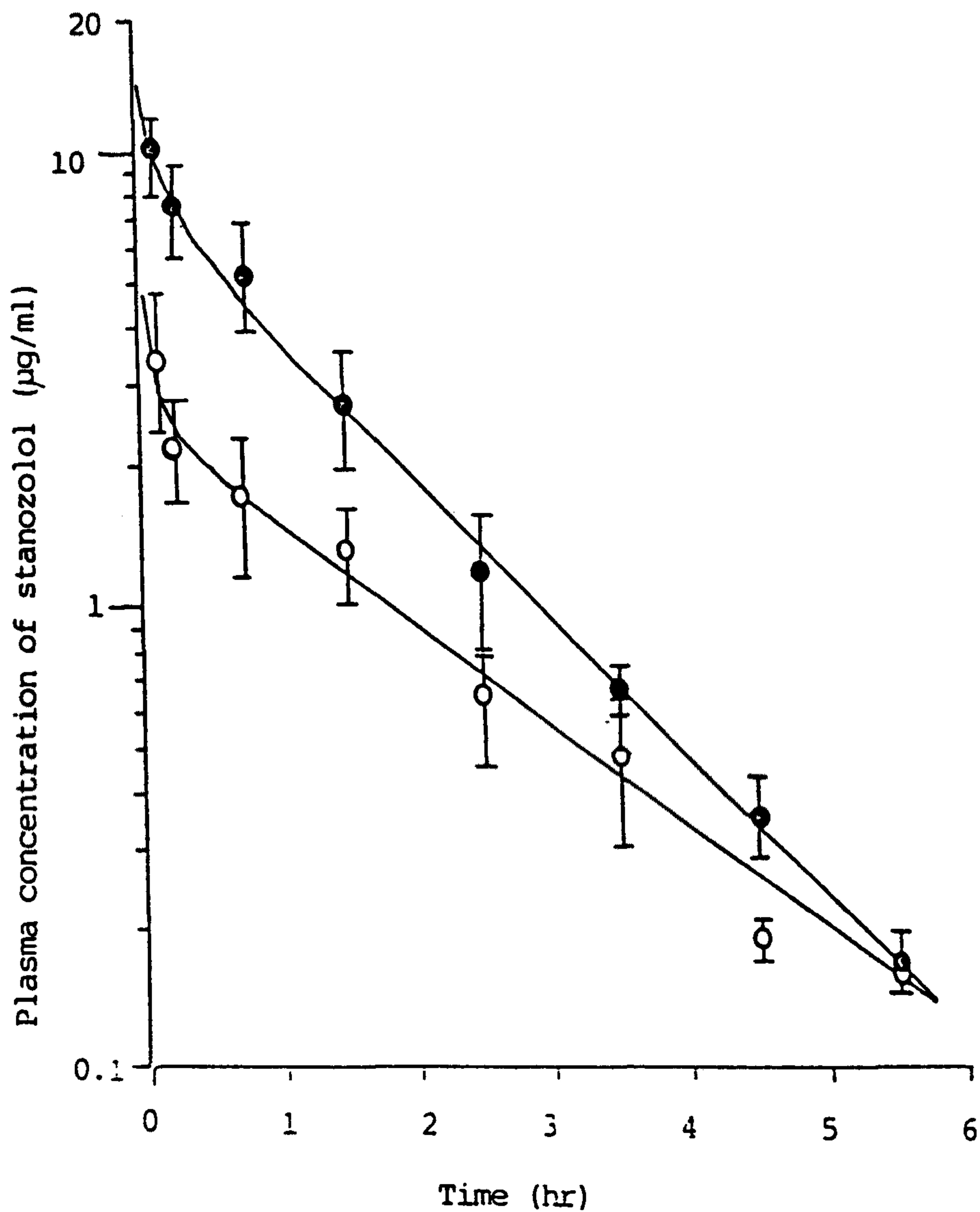


Fig. 1 : Plasma disappearance curve of stanozolol in rats.

—●—●— : stanozolol (n=5)

—○—○— : stanozolol + probenecid (n=6)

Each value represents mean \pm S.E.

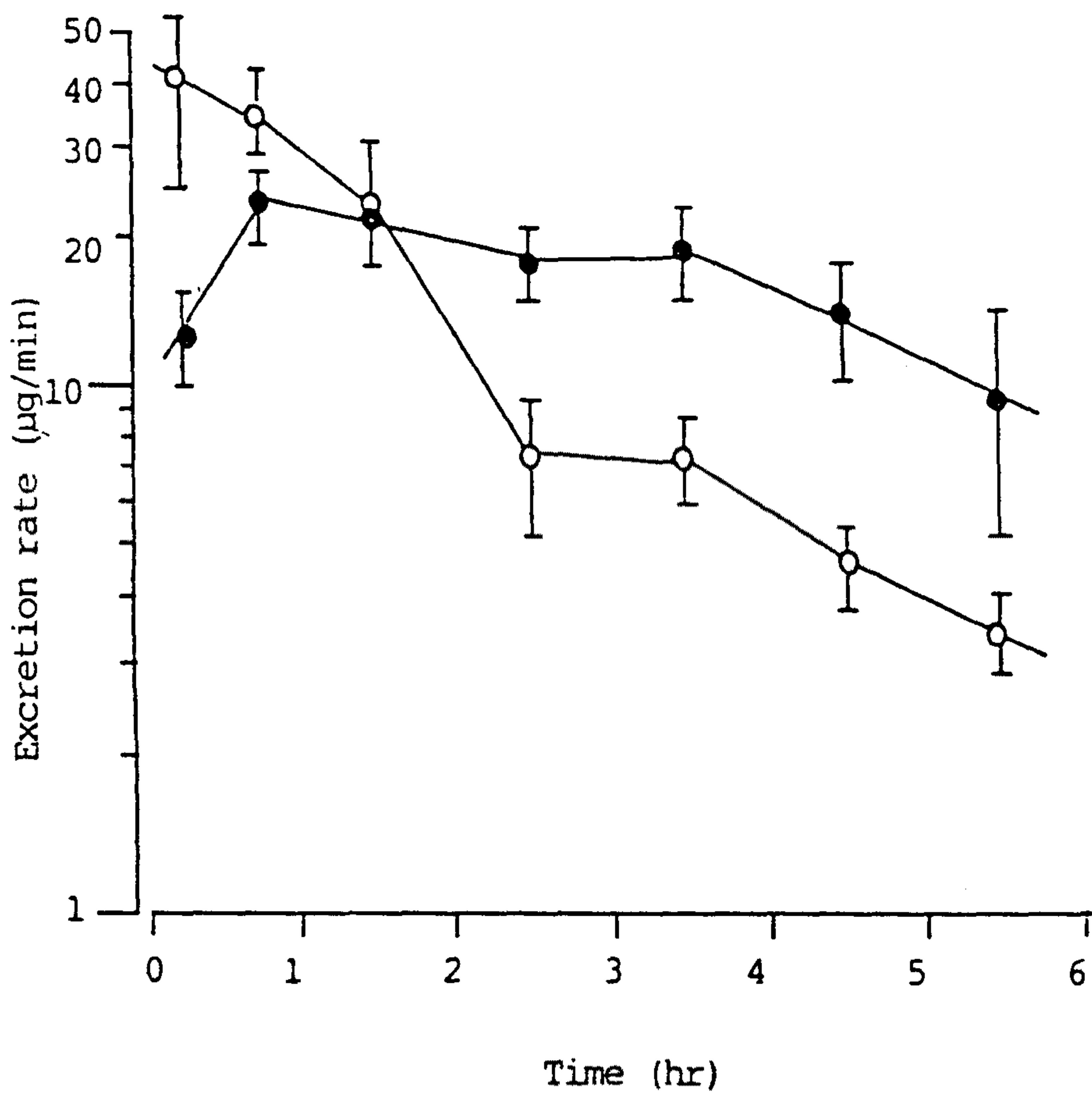


Fig 2. : Urinary excretion rate vs. time plots in rats.

—●—●— : stanozolol (n=5)

—○—○— : stanozolol + probenecid (n=6)

Each value represents mean \pm S.E.

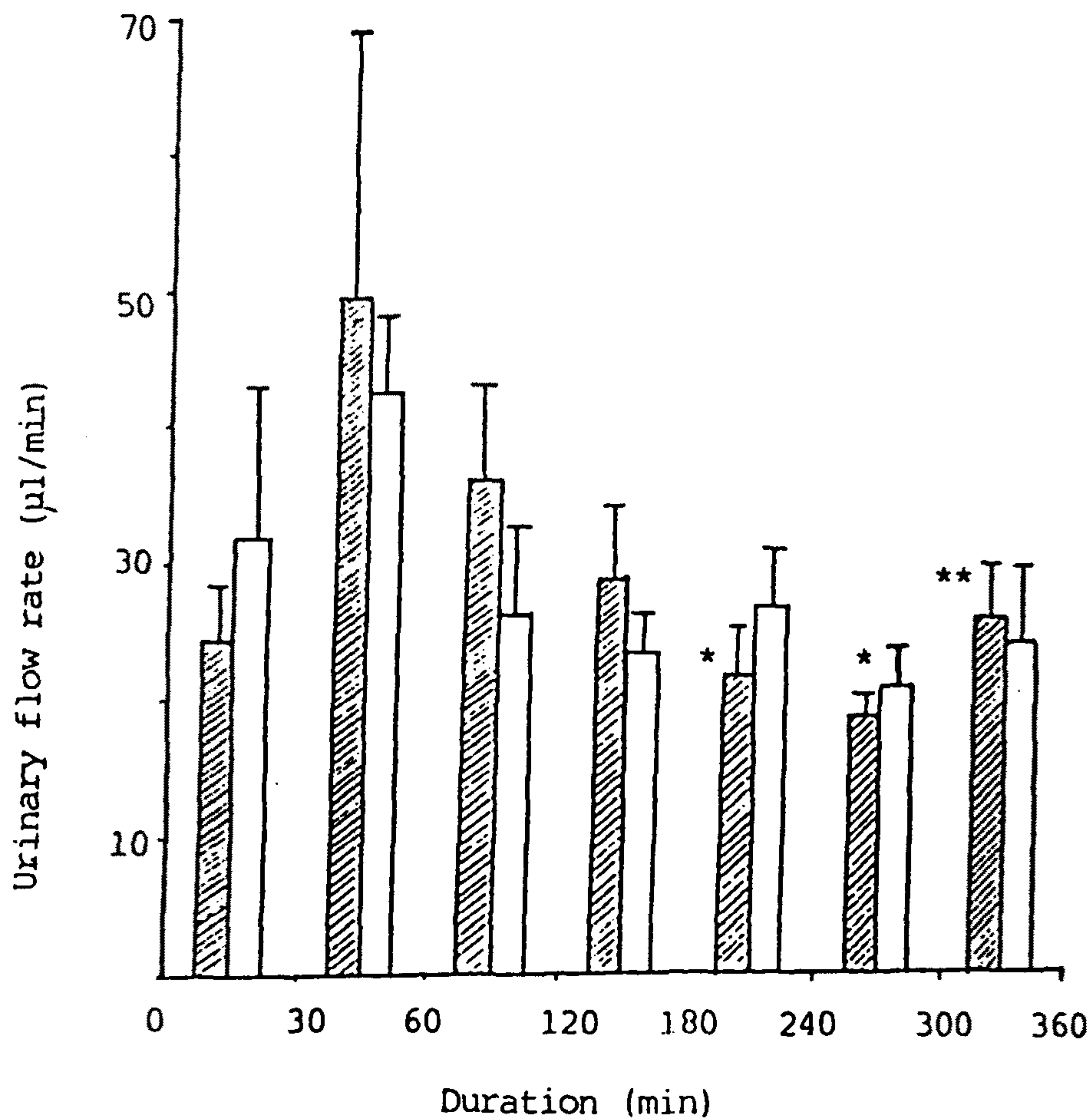




Fig. 3 : Urinary flow rate vs. duration (min.) plot.

 : stanozolol
 : stanozolol + probenecid

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

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

병용투여로 인해 GFR에는 별 영향을 주지 않았고, probenecid 투여로 인해 renal clearance는 약간증가 하였으나 통계학적으로 유의성 있는 증가는 아니었다. 그러나 clearance ratio는 probenecid 병용투여로 인해 11.72에서 17.27로 유의성 있게 ($p < 0.05$) 증가됨을 볼수 있었다.

Table 2 pH values between two groups in rat urine

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.

이상과 같은 결과는 약물 배설에 있어서의 어떤 약물의 효과를 그 약물의 혈액중에서의 protein binding에 미치는 영향을 고려치 않은 결과로 또 하나의 약물 배설에 미치는 영향인자 중에서 stanozolol의 protein binding에 미치는 probenecid의 효과를 검토하여 보았다.

Scatchard plot하여 보면 곡선으로 되는 사실로 미루어, 아마

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

Rat No.	Flow rate (ml/min)	Stanozolol plasma conc. (µg/ml)	GFR (ml/min)	Excretion rate of stanozolol (µg/min)	Stanozolol renal clearance (ml/min)	Clearance 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 ^a

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

도 결합 친화성이 다른 결합부위가 존재함을 유추할수 있었고, PHARM/PCS program(17)을 사용하여, 계산하여 보면 stanozolol 처리 군은 $\frac{C_b}{C_f} = -0.8985769 \cdot C_b + 4.567369$ 라는 방정식으로부터 Kd_1 과 Ka_1 및 $n_1 \cdot P(t)$ 및 $\frac{C_b}{C_f} = -0.01229447 \cdot C_b + 1.407898$ 에서 Kd_2 와 Ka_2 및 $n_2 \cdot P(t)$ 를, stanozolol과 probenecid 병용투여군에서는 $\frac{C_b}{C_f} = -0.6720966 \cdot C_b + 3.296337$ 에서 Kd_1 과 Ka_1 및 $n_1 \cdot P(t)$ 를, $\frac{C_b}{C_f} = 1.633484 \cdot C_b + 0.965098$ 에서 Kd_2 와 Ka_2 및 $n_2 \cdot P(t)$ 를 구하여 Table 4에 정리하였다.

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 ± 0.49	8.985×10^5	114.51 ± 55.09	1.23×10^4
Stanozolol + Probenecid	4.90 ± 0.59	6.720×10^5	590.82 ± 41.2	0.16×10^4

위에서와 같이 protein binding의 association constant를 나타내는 Ka 값은 Ka_1 및 Ka_2 모두 stanozolol 단독투여군에 비해 stanozolol 과 probenecid 병용처리군에서 감소함을 알수 있었다. 이것은 probenecid로 인하여 stanozolol의 protein binding이 억제되는 즉 유리형의 stanozolol이 증가하는 것을 의미하며, 이와 같은 결과는 앞에서 언급했듯이 free(유리형)의 stanozolol의 증가로 인한 분포용적의

증가 원인으로 설명될수 있을 것이다.

이상과 같이 probenecid와 같은 excretion inhibitor와 steroid와 의 drug-drug interaction에 의한 배설연구 결과를 바탕으로 steroid의 생합성 및 대사 등 생리 조절에 중요한 기관인 adrenal gland가 없는 즉 부신적출 동물에서 외부로부터 투여한 anabolic steroid의 배설에 관한 연구를 수행하였다.

adrenal gland(부신)는 epinephrine이나 nor-epinephrine등을 담당하는 adrenal medulla와 corticosteroid의 생산 등을 담당하는 adrenal cortex로 나누어져 있다. 이들의 기능 및 역할등은 이미 많이 밝혀져 있으며, 또한 adrenalectomized animal을 사용한 많은 연구 또한 보고(12, 13, 18,) 되어 있다. 더우기 rat liver microsome에서의 phospholipid의 생합성에 관련된 효소와 adrenalectomy와의 관계(19), adrenalectomy를 이용한 gluco- 또는 mineral corticoid receptor binding관계 (20, 21,) alpha-와 beta-adrenergic receptor(22), adrenalectomy에서의 mineral corticoid인 aldosterone의 역할(23, 24)등등 수 많은 보고가 있어 왔다.

그러나 대부분이 adrenalectomized rat 혹은 rabbit에서의 생리 현상의 연구가 대부분이며, 최근에 adrenalectomized rat에 corticosterone(25)이나 dexamethasone(26)을 투여하여 leucine oxidation, protein synthesis, acid-soluble peptide의 urinary excretion등의 보고가 있을뿐 실제 투여된 exogenous steroid들의 adrenalectomized animal에서의 urinary excretion에 관한 보고가 없어 앞에서 부연한 anabolic steroid인 stanozolol의 배설에 미치는

probenecid의 효과를 바탕으로, 부신 적출(adrenalectomized) rat에서의 stanozolol 배설에 관한 영향을 살펴보았다.

① 검량곡선

Stanozolol 및 stanozolol의 urinary metabolite인 3'-hydroxy stanozolol을 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/ml이 되도록 Blank urine에 spike하고 내부표준물질로 calusterone 100ng을 가하여 앞의 분석방법(scheme 1)에서와 같이 추출 분석하여 검량선을 작성하였다.

Stanozolol은 O-TMS-N-HFB 유도체로 만들어 m/z 581 ion을, 3'-hydroxystanozolol은 N-HFB -(O TMS)₂ 유도체의 m/z 669 ion을 선택하여 내부표준물질인 calusterone-(O TMS)₂에서 생성된 m/z 315 ion에 대한 면적비와 농도를 대조하여 작성하였다.

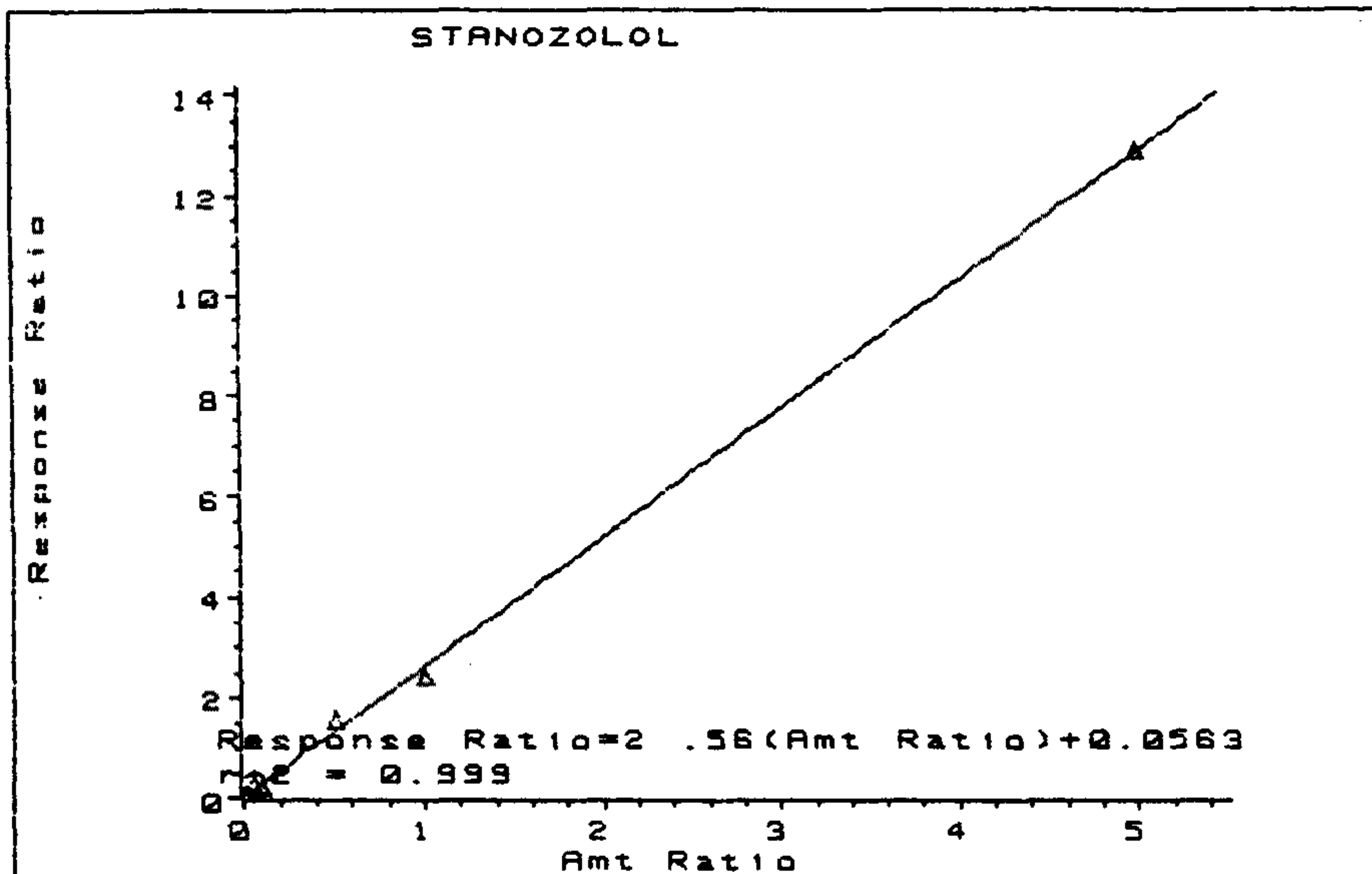
Fig. 4에서 알수 있듯이 stanozolol(A)은 $y=2.56x+0.0563$ 으로 상관계수가 0.999이고, 3'-hydroxystanozolol(B)은 $y=1.20x+0.0646$ 의 직선식에 상관계수가 0.998로서 좋은 직선성을 보여줌을 알수 있었다.

② Stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol의 뇨배설 및 대사산물

Stanozolol (20mg/kg)을 sham-operated control rat과 adrenalectomized rat에 경구투여 하여 시간별로 채취한 urine에서의 stanozolol(Fig. 5) 및 3'-hydroxystanozolol (Fig. 6)의 양을 비교하여 보았다.

우선은 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol의 배설은 0-12시간대에서는 큰차이가 없었으나, 24시간대부터 sham-operated control

(A)



(B)

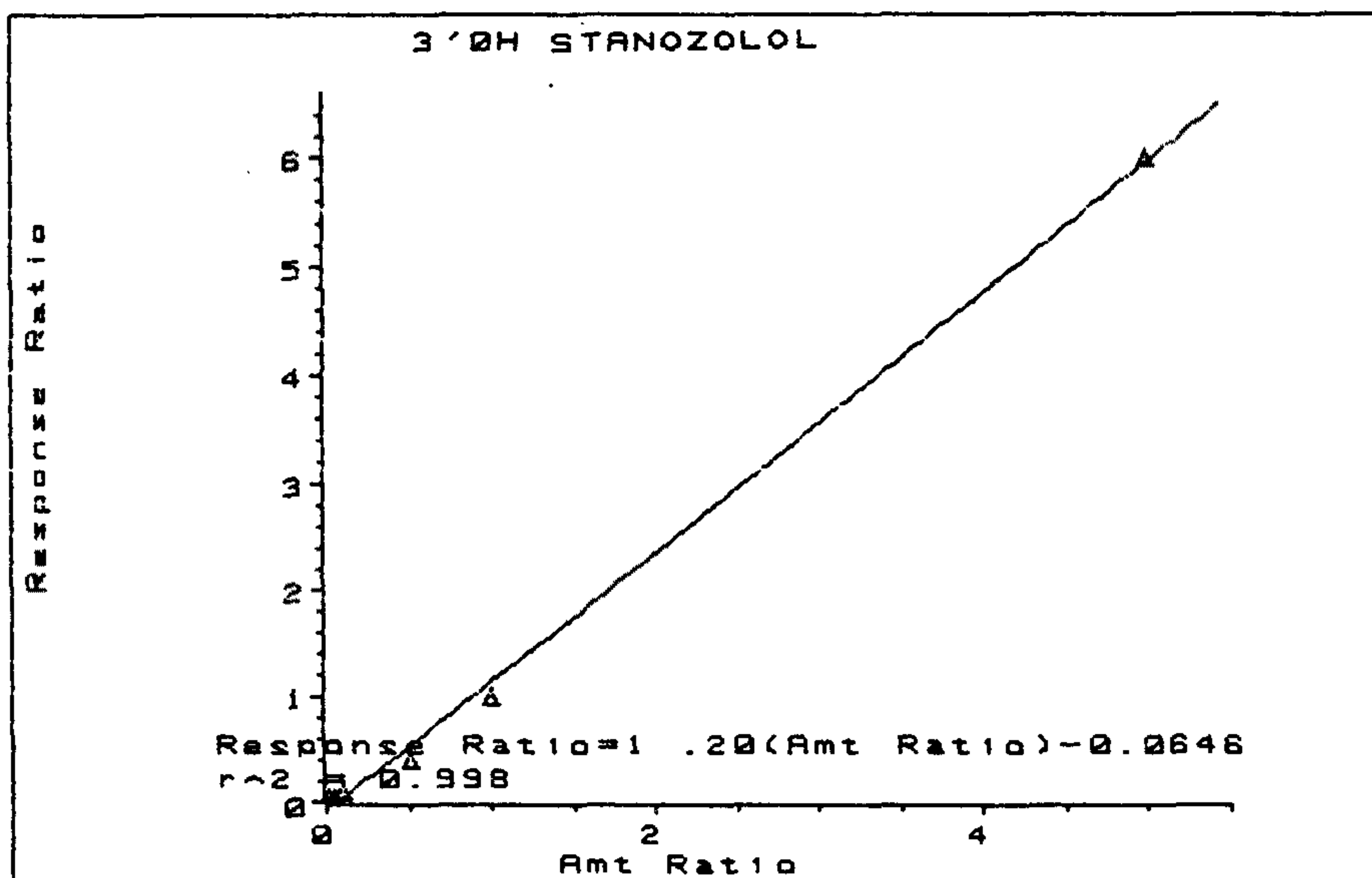


Fig. 4. Calibration curve of stanozolol(A) and 3'-hydroxystanozolol(B)

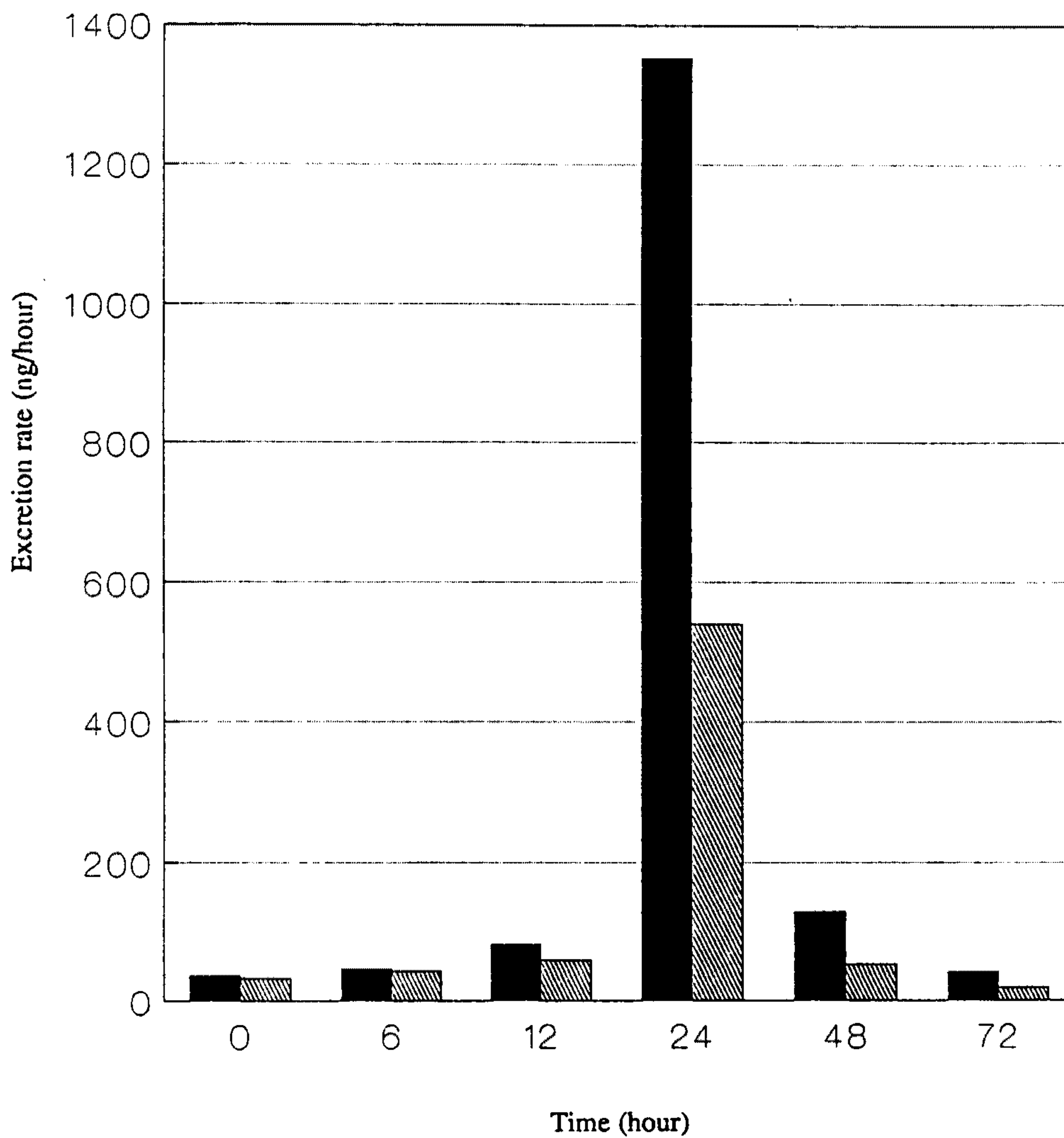


Fig. 5. Urinary excretion of stanozolol in sham-operated rat (■) and adrenalectomized rat (▨).

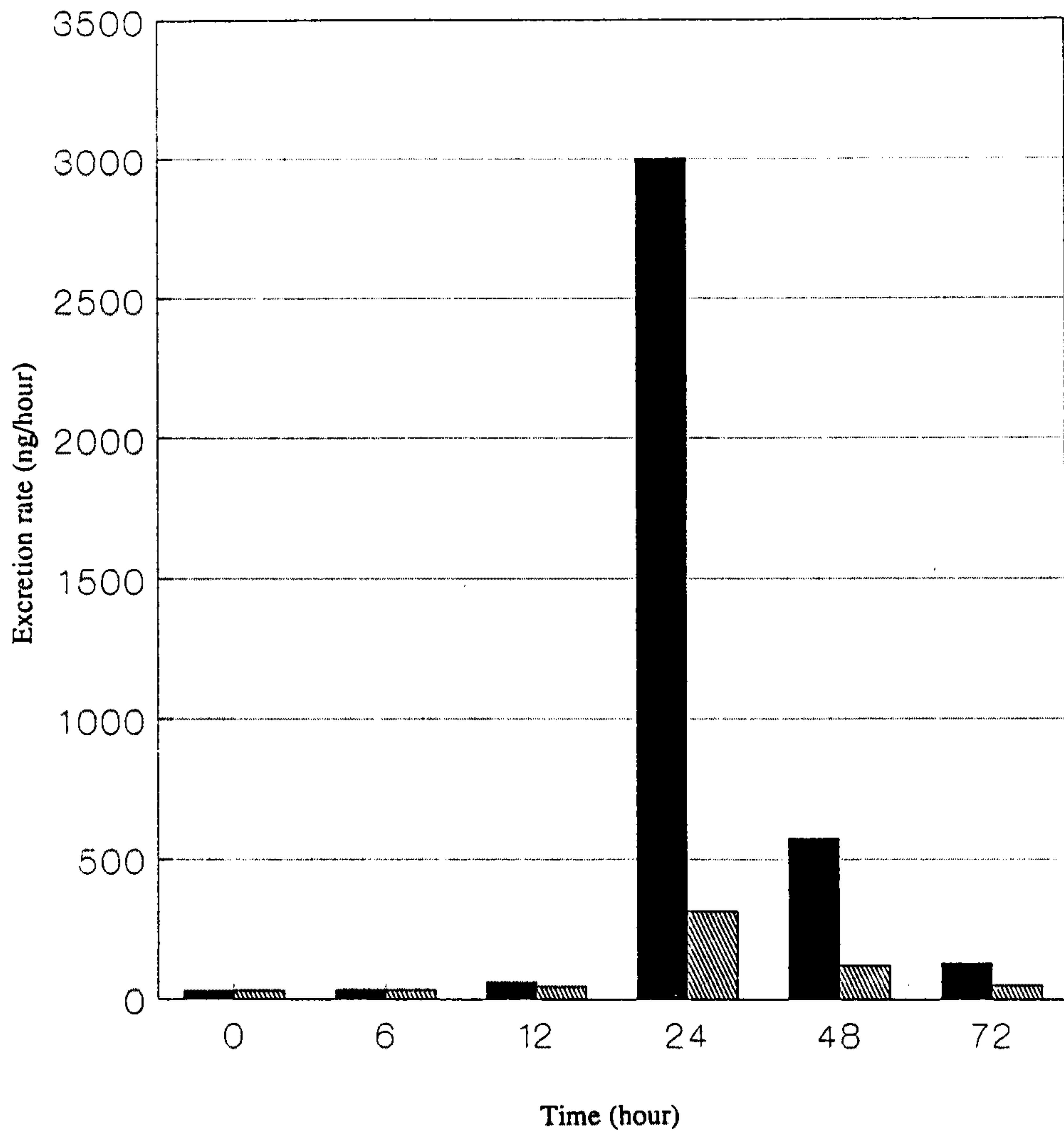


Fig. 6. Urinary excretion of 3'-hydroxystanozolol in sham-operated rat (■) and adrenalectomized rat (▨).

group에 비해 adrenalectomized rat (ADX) group에서 현저히 적음을 알 수 있었고 양적으로는 stanozolol은 약 40% 3'-hydroxy stanozolol은 약 10%정도가 24시간대에 배설됨을 알 수 있어 stanozolol 보다는 3'-hydroxystanozolol의 배설이 현저히 적음을 알 수 있었다.

STZ과 3'-hydroxy STZ 모두 12-24시간 urine에서 최대 배설 속도를 보였으며 24-48시간에서 점차 감소하여 48-72시간 urine에서는 극히 소량만이 배설됨을 알 수 있었다. 이들의 뇨배설량을 누적 뇨배설량으로 환산하여 살펴보면 adrenalectomized rat가 sham-operated rat보다 stanozolol (Fig, 7) 및 3'-hydroxystanozolol (Fig. 8)의 배설이 적음을 확인할 수 있었다. 뇨로 배설된 stanozolol의 총량은 투여량에 대한 비로 환산하여 보면 ADX rat은 0.08%이고 sham-operated rat은 0.132%로 stanozolol 배설은 부신적출(adrenalectomy)로 인해 약 40%정도 감소함을 알 수 있었다.

이와같은 배설량의 감소는 stanozolol의 대사체인 3'-hydroxystanozolol의 배설에서 더욱 현저하여, 배설된 총량을 투여량에 의해 환산해보면 sham group은 0.44%이고, ADX group은 0.074%로서 sham group에 비해 약 16%정도만이 배설됨을 알 수 있었다.

이상의 누적 배설량을 투여용량에 대한 stanozolol 및 3'-hydroxystanozolol로 배설된 총량을 계산해 보면 ADX군은 약 0.15%이고 sham-operated군은 약 0.57%로서, adrenalectomy에 의해 약 70%정도 배설이 저해됨을 알 수 있었다.

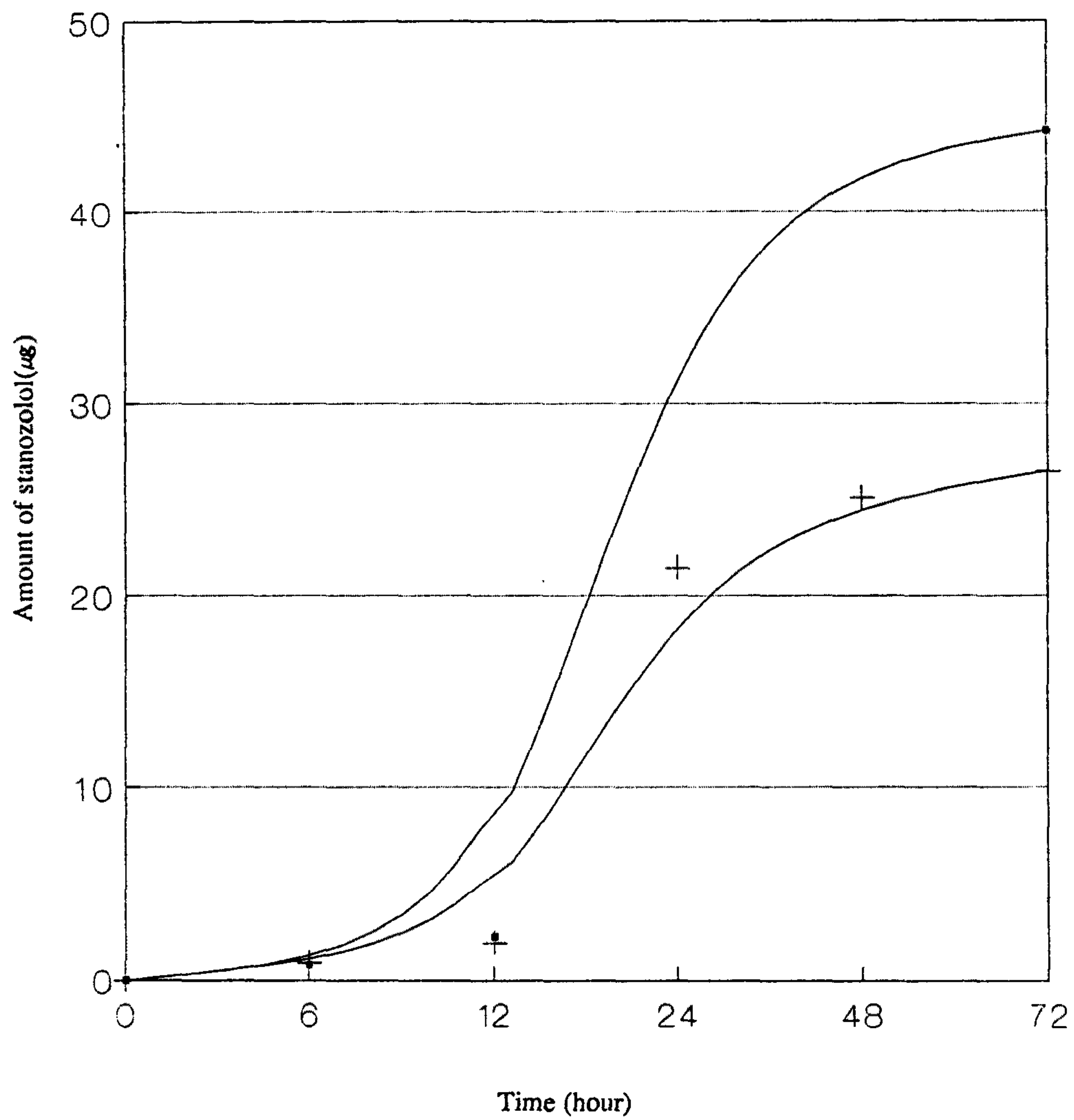


Fig. 7. Urinary accumulative amount of stanozolol in sham-operated rat (■) and adrenalectomized rat (+).

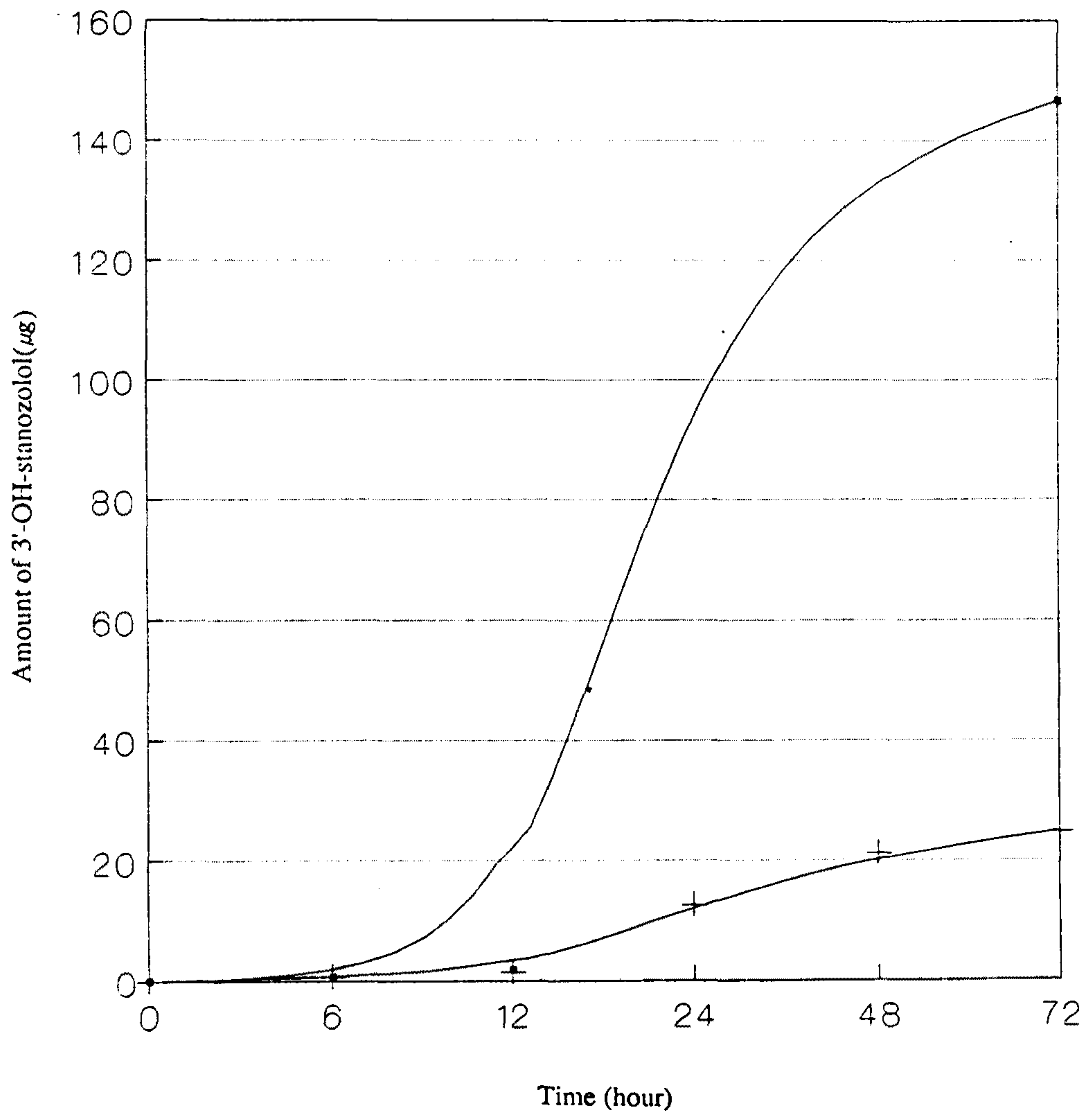


Fig. 8. Urinary accumulative amount of 3'-hydroxystanozolol in sham-operated rat (■) and adrenalectomized rat (+).

또한 이들의 수술로 인한 infection의 위험 등을 검토하기 위해 body weight의 변화를 검토한 결과 (Fig. 9), sham-operated group에서는 sham-operation에도 불구하고 지속적인 정상성장을 보여 주었으나, adrenalectomized rat은 수술로 인한 체중의 일시적 증가를 보였으나 4-5일 후 부터는 지속적인 감소를 보이다가 8일째부터는 사망하기 시작하여 13일째는 모두 사망하였다. 즉 수술후 복수액 등이 저류되어 노랑 배설 또한 상대적으로 적었고 저류로 인한 일시적인 체중증가 현상이 온것으로 사료되었다.

이러한 stanozolol 및 그 대사 산물인 3'-hydroxystanozolol의 배설감소 원인은 exogenous steroid의 생체전환 혹은 steroid류의 대사이상 및 체내저류 등여러가지로 생각 할수 있을 것이다.

이들의 urine의 GC/MSD에서의 Total Ion Chromatogram (Fig. 10)을 살펴 보았다. Fig. 10-A는 sham operated rat urine의 TIC이고, B는 adrenalectomized rat urine의 TIC로서 별로 큰 차이는 보여 주지 않았다.

Fig. 11은 adrenalectomized rat urine에서의 scan mass spectrum이다. (A)는 투여한 stanozolol이며, (B)는 3'-hydroxystanozolol이다. (C)는 6.953분에서 나오는 unknown peak으로서 현재 구조규명을 진행 중이다. Adrenal gland의 생체내에서의 역할은 이미 설명한바 있다.

Adrenalectomized에 의한 endogenous steroid의 배설 및 생리현상에 관한 연구는 수없이 보고 되어 있으나, adrenalectomized후 투여한 exogenous steroid류의 흡수, 분포, 대사, 배설에 관한 보고

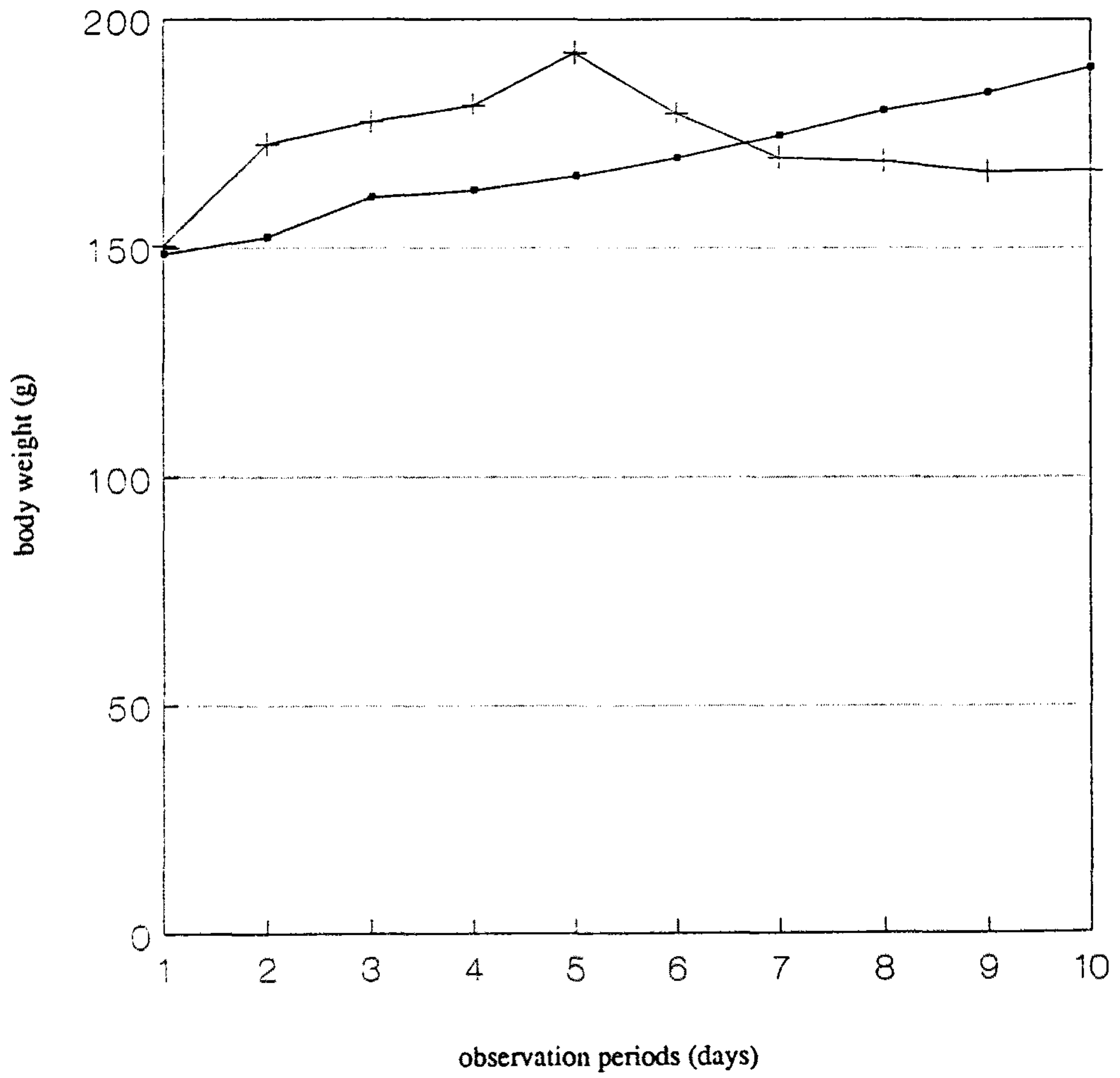


Fig. 9. Change of body weight in sham-operated rat (■) and adrenalectomized rat (+).

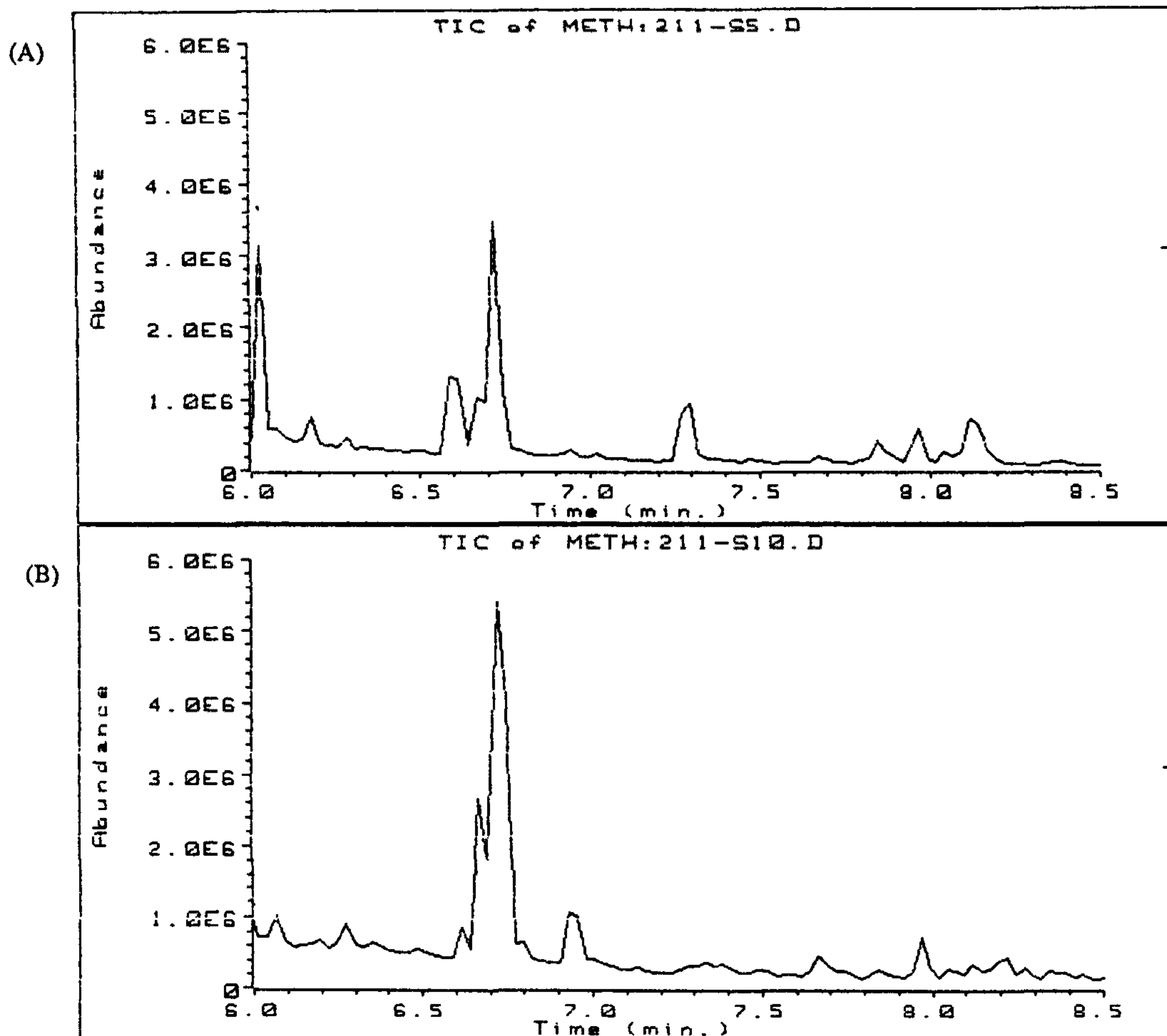


Fig. 10. Total ion chromatogram of rat urine in sham-operated group (A) and adrenalectomized group (B).

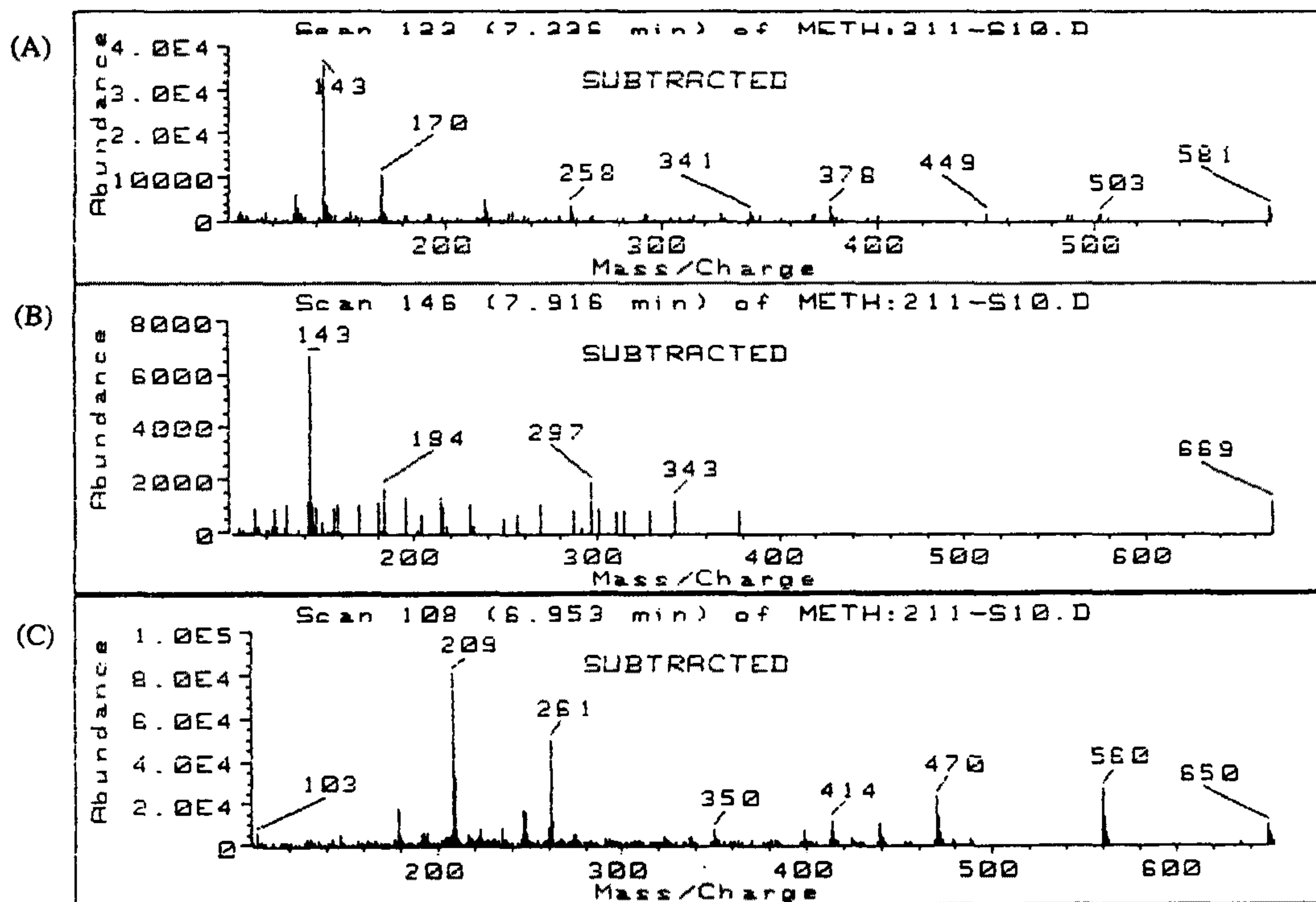


Fig. 11. Scan mass spectrum of stanazolol (A), 3'-hydroxystanazolol (B) and unknown peak (C) in adrenalectomized rat urine.

는 극히 적어 위에서 얻은 결과인 adrenalectomized rat에서의 steroid류인 stanozolol 배설저해의 원인 즉 기전연구는 앞으로 더 추구해야 할 과제라 사료되며, Inborn Error로 인한 대사이상, 후천적인 질병으로 인한 대사이상등의 연구에서 어느 장기부전으로 인한 steroid의 약물 투여는 그약물의 배설등의 인자를 고려하여 투여되어야 하며, 이와 같은 동물 모델에서의 ADME 연구결과를 토대로 많은 data 축적이 있어야 하겠다.

4. 참고 문헌

- 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 δ -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 Meta. [Proc. Int. Symp.], 465–474, 1977.
 - 9) 화학물질의 약리·대사에 관한 연구 (2차), 과학기술처, 1990.
 - 10) 화학물질의 약리·대사에 관한 연구 (3차), 과학기술처, 1991.
 - 11) 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., in the press 1992.
 - 12) Rodgers, J.B., Riley, E.M., Drummey, G.D. and Isselbacher, K.J. : Lipid Absorption in adrenalectomized rats : The role of

- altered enzyme activity in the intestinal mucosa, *Gastroenterology*, 53(4), 547–556 1967.
- 13) Gardiner, S.M. and Bennett, T. : Post–adrenalectomy hypotension in rats ; absence of baroreflex resetting or effect of naloxone, *Clinical Science*, 64, 371–376 1983.
 14. Schanzer, W., Opferman, G. and Donike, M. : Metabolism ; Identification of urinary metabolites, (personnal communication, in the press)
 15. Gilman, A.G. and Goodman, L.S. : The pharmacolical Basis of Therapeutics (7th, Ed.), pp 921–925, MaCmillan Publishing Co., N.Y. 1985.
 16. Møller, J.V. and Sheikh, M.I., : Renal Organic Anion Transport System : Pharmacological, physiological and Biochemical Aspects., *pharmacological Review*, 34(4), 315–358, 1983.
 17. Tallarida, R.J. and Murray, R.B : Manual of Pharmcologic Calculations with Computer Programs, 2nd Ed. with program Disk, PHARM/PCS, Version 4, Springer–Verlag, New York–Berlin–Heidelberg–London–Paris–Tokyo 1987.
 18. Rossier, J., French, E., Gros, C., Minick, S., Guillemin, R. and Bloom, F.E. : Adrenalectomy, dexamethasone or stress alters opioid peptides levels in rat anterior pituitary but not intermediate lobe or brain, *Life sciences*, 25, 2105–2112, 1979.
 19. Cornatzer, W.E., Hoffman, D.R. and Haning, J.A. : The effect of

- hyper and hypothyroidism, hypophysectomy and adrenalectomy on phosphatidylethanolamine methyltransferase, phosphatidyl dimethylethanolamine methyltransferase and Choline phosphotransferase of rat liver microsomes, *Int. J. Biochem.*, 16 (5), 567–570, 1984.
20. Tsai, H.J. and Romsos, D.R. : Glucocorticoid and mineralo-corticoid receptor-binding characteristics in obese(ob/ob) mice, *Am. J. Physiol.*, 261, E 495–9 1991.
21. Farman, N., Oblin, M.E., Lombes, M., Delahaye, F., Westphal, H.M., Bonvalet, J.P and Gasc., J.M. : Immunolocalization of gluco- and mineralocorticoid receptors in rabbit kidney, *Am. J. physiol.*, 260, c226–33(1991).
22. Astancolle, S., Davalli, P. and Corti, A. : Blockade of alpha- and beta-adrenergic receptors can prevent stimulation of liver ornithine decarboxylase activity by glucocorticoid or laparotomy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174(2), 915–21, 1991.
23. Musabayane, C.T., Brimble, M.J., Balment, R.J. and Kelly L. P. : Influence of neurohypophysectomy on the renal actions of aldosterone in the adrenalectomized rat., *Acta Endocrinol., Copenh.*, 122(4), 513–9, 1990.
24. Morris, D.J., Souness, G.W., Saccoccio, N.A. and Harnick, M. : The effects of infusions of ring-A reduced derivatives of aldosterone on the antinatriuretic and kaliuretic actions of

- aldosterone, *Steroids*, 53(1-2), 21-36 1989.
25. Quan, Z.Y. and Walser, M.: Effect of corticosterone administration at varying levels on leucine oxidation and whole body protein synthesis and breakdown in adrenalectomized rat, *Metabolism*, 40(12), 1263-7, 1991.
26. Nam, T.J, Noguchi, T. and Naito, H.: Changes in the urinary excretion of acid-soluble peptides in rats injected with streptozotocin or dexamethasone: a trial to estimate the changes in the rate of whole-body protein degradation in those rats, *Br. J. Nutr.*, 65(1), 37-46 1991.

제 2 절 장내 세균에 의한 Stanazolol의 대사연구

1. 서론

식품, 의약품 등을 비롯한 여러 외인성 화학물질 들 중에서 경구로 투여 되어지는 물질들은 장관(Intestines)을 거쳐 흡수되기 때문에 흡수 되어질때까지는 장내에 존재하는 장내 세균총(Intestinal Flora)과 접하게 된다. 또한 장간순환(Enterohepatic Circulation)을 통해 담즙 등으로 배설되어지는 물질 역시 다시 장으로 배설되어 흡수되므로 마찬가지로 장내세균총과 접촉하게 된다. 즉 이런 화학 물질들은 장내 세균총들의 동화 및 이화작용에 따른 반응물로서 사용될 수 있음을 뜻한다. 이러한 화학물질 들은 장내에 존재하는 세균들에 의해 biotransformation 또는 대사 되어 많은 종류의 생성물이 형성될 수 있고, 이러한 생성물들은 모화합물에 비해 생체내에서의 독성을 증감 시킬수 있는 무시할수 없는 요인이 되기도 한다. 이와같이 장내세균들은 생체내에서의 그 화학물질의 약효발현 및 독성의 증감에 깊은 영향을 주고 있다고 사료되며 장내세균에 관해서는 이미 수 많은 저서(1, 2,)를 통해 많은 연구가 되어져 왔다.

건강한 성인의 장내세균수는 입에서부터 시작되는 Intestinal Tract에 적어도 400여종이 존재하고 그 양은 약 1kg에 해당되며, 여기에 존재하는 세균수는 g wet content당 $10^{10} \sim 10^{14}$ 에 달하는 아주 많은 것으로 보고 되어있다(3-6). 특히 intestinal tract 중 jejunum(공장, 空腸)에서부터 colon(결장, 結腸)사이에 특히 많이 존

재하고 있는 것으로 알려져 있고, bacteria의 농도는 jejunum에서 ileum(회장)쪽으로 갈수록 높다고 한다.

이런 많은 세균들중 99%이상이 혐기성 세균(obligate anaerobes) 들이며, 이들은 Bacteroidaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae., Micrococcaceae, Neisseriaceae, Lactobacillaceae, Propionobacteriaceae, Bacillaceae, Corynebacteriaceae 등이 주요 우성균이라고 알려져 있다 (1-6).

장내세균에 의한 반응으로서는 antibiotics, dopa, tyrosine, steroid, phenolic compounds 등등의 여러 화학물질을 hydrolase, oxidoreductase에 의한 dehydroxylation, decarboxylation, oxidoreduction, transferase에 의한 sulfation등등 여러 반응을 매개하고 있는것으로 알려져 있다. 주요한 장내세균에 의한 반응을 Table 1.에 정리하였다.

더우기 steroid류의 장내세균에 의한 대사에 관한 보고도 있다. 즉 결장암과 steroid의 장내세균 대사와의 관계(7), 장내세균에 의한 estrone 및 bile salt의 desulfation(8, 9), rat 장내에서의 estrone sulfatase의 분포(10), $7\alpha-$, 7β -hydroxysteroid dehydrogenase 활성(11)에 의한 epimerization(12), side chain cleavage(13), bio hydrogenation(14), 17 -keto steroid의 reduction(15)등 많은 연구(16, 17)들이 보고되었다.

이러한 Steroid류는 장내에서 그대로 또는 대사받아 흡수되어 간으로 이행되어 대사를 더 받으며 다시 bile을 통해서 장내로 재 배설 되든지 아니면 혈류를 통해 신장으로 가서 renal excretion 되므로, Steroid의 대사에는 간장에서의 대사 뿐 아니라 장내 세균

Table 1. Representative reaction of intestinal bacteria.

Reaction	Substrate
Hydrolase	
β -glucosidase	rutin, sennoside
β -glucuronidase	conjugates of glucuronic acid
amidase	β -lactam antibiotics
peptidase	peptide hormone, taurine conjugates
carboxylesterase	aspirin, acetyldigitoxin
sulfatase	conjugates of sulfuric acid
phospholipase	lecithin
sialidase	mucin
β -galactosidase	lactulose
Oxidoreductase	
azo \rightarrow amine	azo group pigment
aromatic nitro \rightarrow amino	chloramphenicol
keto, aldehyde \rightarrow alcohol	vaniline
double bond \rightarrow saturated bond	bilirubin, cholesterol
\rightarrow aromatic ring	quinic acid, steroid
dehydroxylation	Dopa
nitrate \rightarrow nitrite \rightarrow ammonia	
hydroxysteroid \rightarrow ketosteroid	steroid
Transferase	
AMP transfer	streptomycin
N-acetylation	aminoglycoside antibiotics
acetylation	chloramphenicol
sulfation	phenolic compounds
The others	
deamination	Dopa
decarboxylation	tyrosine
demethylation	cumarin, hesperidin
dealkylation	metamphetamine, choline
dehalogenation	DDT

총에 의한 대사 또는 무시할수 없다고 할수있다.

그러므로 본 연구에서는 antibiotics으로 처리하여 만든 germ free rat과 conventional rat에서의 anabolic steroid인 stanozolol의 대사 차이를 확인하여 장내세균과 steroid대사와의 관계를 확인한 후, human feces를 가지고 human 장내세균에 의한 stanozolol의 대사를 검토하였다.

2. 재료 및 방법

1) 시약 및 기구

① 시약

실험에 사용한 시약들은 다음과 같이 구입하여 사용하였다. Stanozolol(한일약품, Korea), Calusterone(Upjohn Co., Kalamanzoo, USA), Amberlite XAD-2 resin(particle size : 0.15-0.2mm, Serva Heidelberg, FRG), β -glucuronidase(from E. coli;Boeringer), MSHFB(N-methyl-N-trimethyl-silylheptafluorobutyramide, Macherey and Nagel Co., F.R.G.), MBHFB(N-methyl-bis-heptafluorobutyramide, Macherey and Nagelco., F.R.G.), TMS-Cl(trimethylchlorosilane;Sigma), TMS-Imidazole(trimethylsilyl imidazole ; Sigma), Chloramphenicol, Penicillin, Streptomycin, Nystatin, Erythromycin, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot H_2O$, Na_2CO_3 , Resazurine(Sigma, USA), Cystein (Sigma, USA), Ascorbic acid(Kanto, Japan)을 구입하여 사용하였고

그외 기타 시약은 1급이상을 사용하였다.

② 기구

Centrifuge (Dupont, USA), Autoclave (Yamato Co., Japan),
Vacuum Rotary Euaporator (Bvchi, Switzerland), Shaker (Buchler, F.
R.G.), Heating Bloc (Liebisch F.R.G.), Freezer (Lauda., F.R.G.)

2) 기기 및 분석조건

① 기기

- GC/MSD(HP 5890A/5970B)
- HP 59970C MS chemstation
- HP 7646 Disc Drive
- HP 2934A Dot Matrix Printer

② 분석조건

- Column : 5% -phenylmethylsilicone(SE-54)
(HP fused silica capillary, 17m(L)×0.2mm(I.D.)×0.33um(F.T.))
- Detector Temp. : 300°C
- Injector Temp. : 280°C
- Flow Rate : 0.83ml/min. Helium

- Injection mode : splitless
- Oven temperature : A : 180°C→310°C (35°C/min)
B : 180°C→310°C (15°C/min)
C : 180°C→310°C (3°C/min)

3) 실험동물 및 Human Volunteer.

Rat의 경우는 KIST 부설 유전공학연구소에서 SPF계 Sprague-Dawley male rat (200~250g)를 분양받아, 1주일간 적응시킨후 실험에 사용하였다. 양육시 적당량의 tap water와 고형사료를 임의로 공급하였다. 그리고 human feces의 채취는 건강한 성인남자의 feces를 채취하여 실험에 사용하였다.

4) 실험방법

① 검량선의 작성

배양액(stanozolol이 없는) 5ml에 stanozolol의 stock solution으로 부터 5, 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 첨가시키고 internal standard로서 calusterone을 10 μg 넣고 추출하고 유도체를 만들어서 GC/MSD로 분석하였다.

② Rat에서의 stanozolol의 장내세균에 의한 대사

보통의 흰쥐(conventional rat)와 항생물질로 처리한 장내 무균 쥐(antibiotic treated germfree rat)를 이용하여 stanozolol의 장내세균에 의한 대사 차이를 살펴보았다.

a. 장내 무균 동물의 작성

Conventional rat를 장내무균동물인 germ free rat로 만들기 위하여 Table 2와 같은 조성으로 과량의 항생제 mixture를 20% EtOH 용액에 녹여서 2일에 걸쳐서 2번 반복하여 경구투여 하였다. 장내 무균동물군은 3마리의 Rat로 하였다.

Table 2. Composition of antibiotic mixture

Antibiotics	Amount (mg/Rat/day)
Chloramphenicol	175
Penicillin	12
Streptomycin	20
Nystatin	10
Erythromycin	10

b. Stanozolol의 투여

위에 적은 항생제 mixture를 마지막으로 투여한 후 만 24시간이 경과한뒤 stanozolol(25mg/kg in 30% EtOH solution)을 정상적인 normal rat과 antibiotic treated germfree rat에 각각 경구투여 하였다. 각군은 각각 3마리로 하였다.

c. Urine collection

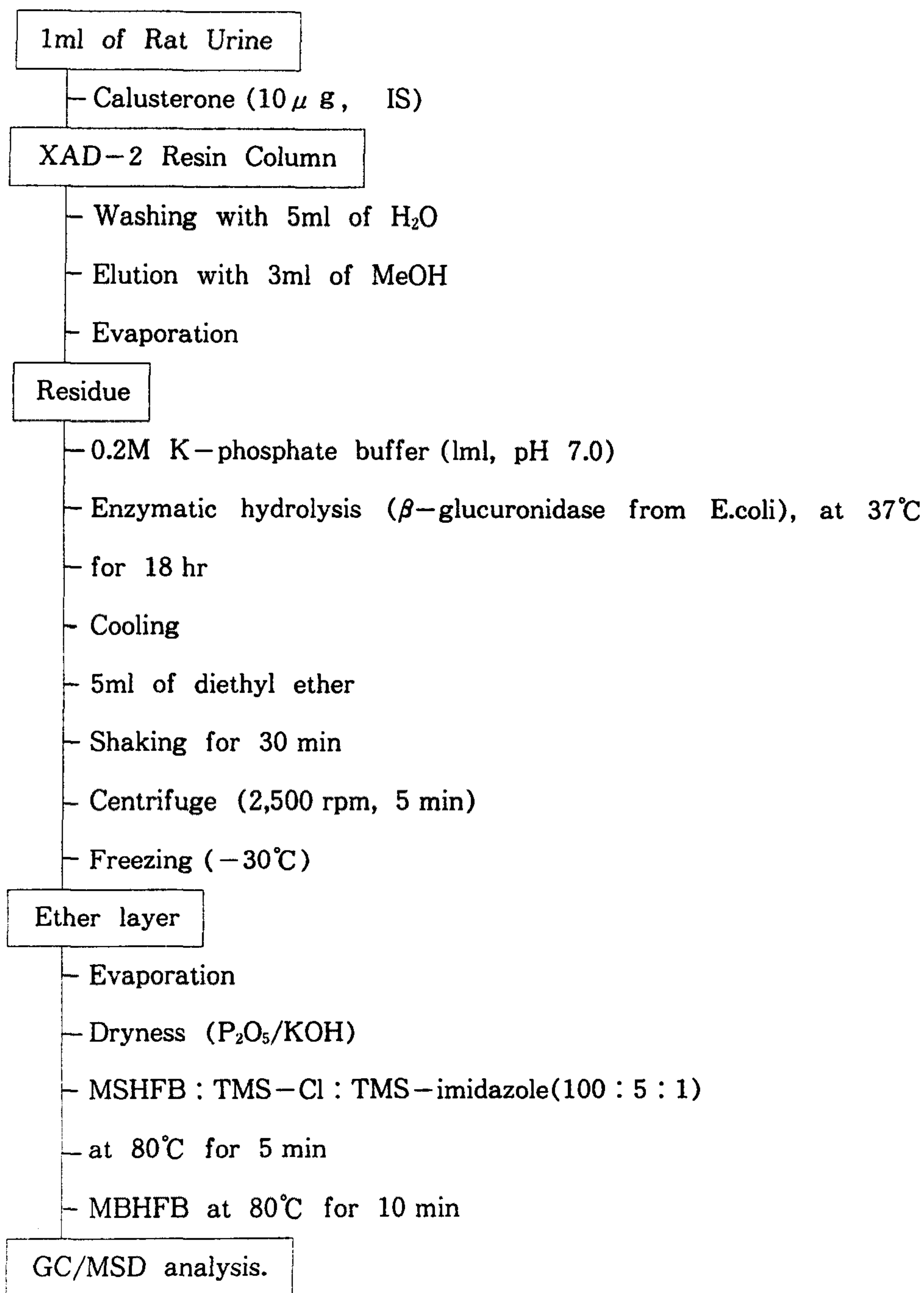
Conventional rat과 antibiotic treated germfree rat을 각각 서로 다른 metabolic cage에 넣고 stanozolol 투여후 5hr, 20hr, 20hr, 48hr, 68hr, 76hr에 urine을 채취하여 분석에 사용하였다.

d. Urine에서의 stanozolol의 분석 및 정량

시간별로 채취한 rat urine 1 ml을 시료로 하여 scheme 1에 정리한 바와 같이 분석하여 정량하였다. 즉 불순물을 제거할 목적으로 urine을 원심분리하여 그 1 ml을 XAD-2 resin column에 charge하였다. 이때 내부표준물질로서 calusterone 10 μ g을 넣었다. 이것을 증류수 5ml로 washing 한후, methanol 1ml씩 3번 반복하여 elution 시켰다. 이 methanol 추출물을 rotary evaporator로 증발건고시킨후 그 잔사에 0.2M K-phosphate buffer(pH 7.0) 1ml과 β -glucuronidase 50 μ l를 넣은후 37 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 enzymatic hydrolysis 시켰다.

여기에 Ether 5ml을 가하여 30분간 shaking하여 추출한후 ether 층만을 취하여 증발시킨후 vacuum dessicator에서 완전히 수분을 제거하도록 하였다.

완전건조 시킨 잔사에 MSHFB mixture(MSHFB : TMS-Cl : TMS-imidazole=100 : 5 : 1)을 40 μ l 넣고 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 가온시켜 유도체화 시킨후 다시 MBHFB 10 μ l를 가한후 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 derivatization 시킨후(18) GC/MSD로 정량하였다. 기기조건 및 temperature program은 앞의 기기 및 분석조건에 나타내었고, GC/MSD의 data acquisition은 scan 방법일때는 oven temperature를 B조건으로 하였고, selected ion monitoring (SIM) 방법일때는 oven temperature 조건을 A조건으로 하여 분석하였다. Stanazolol의 정량을 위해서는 m/z 581 ion($M^+ - 15$)를 Internal standard인 calusterone을 위해서는 m/z 445 ion을 선택하여 사용하였다.



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

③ Human의 장내세균(혐기성 미생물 배양액)에 의한 stanozolol의 대사

서두에서도 언급하였듯이, 장내세균은 99% 이상이 obligate anaerobes 이므로, 장내세균에 의한 in vitro 대사실험에서는 혐기성 조건을 만들어 주어야한다. 그러므로 oxidation-reduction buffer system을 indicator로 하여 oxygen-free gas system을 조합한 방법으로 수행하였고, oxygen을 없애기 위하여 CO₂로 완전히 치환한후 완전히 밀봉하여 실험을 진행시켰다.

a. 혐기성 배양액의 준비.

Oxidation-reduction buffer system을 만들기 위하여 Table 3과 같은 조성으로 하여 즉 A용액 37.5ml, B용액 37.5ml, C용액 50ml 및 0.1% resazurine 1ml, 0.5g cystein·HCl·H₂O와 25% ascorbic acid 2ml을 넣고 증류수를 넣어 1 l로 한후 고압증기 멸균하여 무균상태가 되도록 하였다.

이때 주의 할 사항으로서는 배양액의 색이 맑게 되어야 한다. 색이있는 경우는 아직 완전한 혐기성 배양액이 되지 못한것을 의미한다.

Table 3. Composition of anaerobic culture medium

Solution	Composition	Volume(ml)
A	0.78% K_2HPO_4	37.5
B	0.47% KH_2PO_4 1.18% NaCl 1.2% $(NH_4)_2SO_4$ 0.12% $CaCl_2$ 0.25% $MgSO_4 \cdot H_2O$	37.5
C	8% Na_2CO_3	50
	0.1% Resazurine	1
	25% Ascorbic acid	2
	Cystein	0.5g
	add H_2O	1000

b. Human의 장내 세균 준비

멸균한 위의 혐기성 배양액 일부에 신선한 건강한 성인남자의 인분을 현탁시킨후 멸균한 Gauze로 여과하여 그 여액을 사용하였다. 이것을 2개의 배양액에 넣고 한 배양액은 reference로서 사용하고 또 하나의 배양액엔 기질로서 stanozolol을 $7\mu g/ml$ 이 되도록 첨가하였다.

c. 혐기성 배양조건의 확립 및 배양 시료의 채취

장시간 혐기성 조건하에서 배양이 되도록 하기 위하여 삼각 flask에 고무마개를 하고, 고무마개에는 유리관으로 2개를 삽입하여 한쪽 유리관은 밑의 배양액에 잠기도록 하고 외부의 유리관 끝에는 고무관을 연결하고 집계를 써서 고무관을 조여 외부로부터의 공기유입 억제 및 CO₂치환이 가능토록 장치한다. CO₂의 치환은 배양액에 담긴 쪽의 유리관을 통해 CO₂를 넣어주고 배양액이 CO₂로 완전히 치환되면 두곳 모두 집계로 막는다. 그리고 고무관의 끝은 오염을 막기위해서 aluminum foil로 막아둔다. 이때 만약 CO₂로 완전치환 되지 않았을 경우에는 배양액이 붉은색이 되므로 주의하도록하면서 37°C water bath shaker에서 shaking하며 incubation한다. 시료의 채취는 CO₂ 치환시와는 반대쪽에서 CO₂ gas를 넣어주며 배양후(stanozolol 첨가후) 10, 24, 30, 48시간에 걸쳐 약 50ml씩을 채취하였다. 이때에도 배양액의 색을 확인하여 공기의 유입을 점검해야 한다.

d. stanozolol의 정량 및 metabolites의 검색

앞에서 시간별로 채취한 배양액 5ml에 internal standard로서 calusterone 10 µg을 넣고 pH를 9.5로 맞춘후 5ml의 ether를 가하여 30분간 shaking하는 추출조작을 3번 반복한후 용매를 날리고 MSHFB mixture (MSHFB : TMS-Cl : TMS-imidazole=100 : 5 : 1) 40 µl를 넣고 80°C에서 5분간 반응시킨후, 다시 MBHFB 10 µl를 가하고 역시 80°C에서 10분간 유도체화 한후 GC/MSD로 분석하였다. 기기 및 분석 조건은 앞서와 동일하며 scan 방법일때에는 oven

temperature를 C조건으로 하였고 selected ion monitoring(SIM)조건 일때는 oven temperature를 A조건으로 하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 검량선

Stanozolol은 5~60 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위로 하여 O-TMS, N-HFB의 유도체로 한후 m/z 581 ion을 선택하였고, 이 ion을, 내부 표준물질로 사용한 calusterone-(OTMS)₂의 m/z 445 ion에 대한 넓이와 농도를 대조로 하여 검량곡선을 작성하였다. 검량곡선은 Fig. 1에서 볼수 있듯이 상관계수 $r=0.999$ 의 매우 양호한 직선성을 나타내어 stanozolol의 정량에 아무 지장이 없었다.

2) Rat에서의 stanozolol의 장내세균에 의한 대사

정상적인 rat과 antibiotic treated germ-free rat의 urine에서 배설된 stanozolol의 양을 비교하여 보았다. Fig. 2는 rat urine의 Total Ion Chromatogram을 나타내었다. Fig. 3은 Fig. 2의 9.466분에서 detect되는 stanozolol-OTMS-NHFB의 scan mass spectrum을 나타낸것이다. base peak이 m/z 143으로, molecular ion이 667로 잘 나타나고 있다. Fig. 4는 internal standard인 calusterone-(OTMS)₂ m/z 445 ion(B)과 stanozolol-OTMS-NHFB(A)의 특징적인 ion인 m/z 143, 581, 596 ion들의 selected ion monitoring (SIM) data를 표시

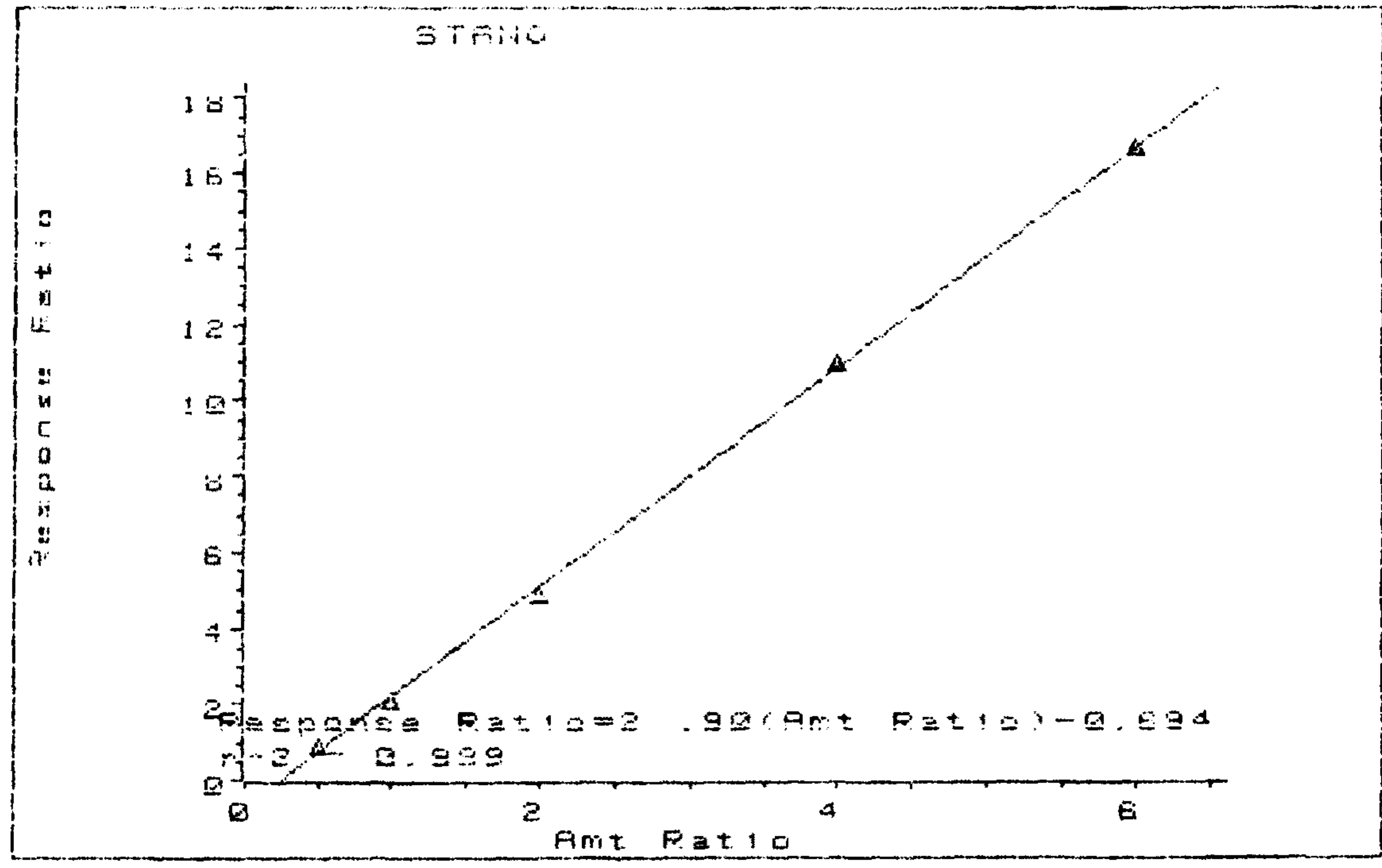


Fig. 1. Calibration curve of stanozolol.

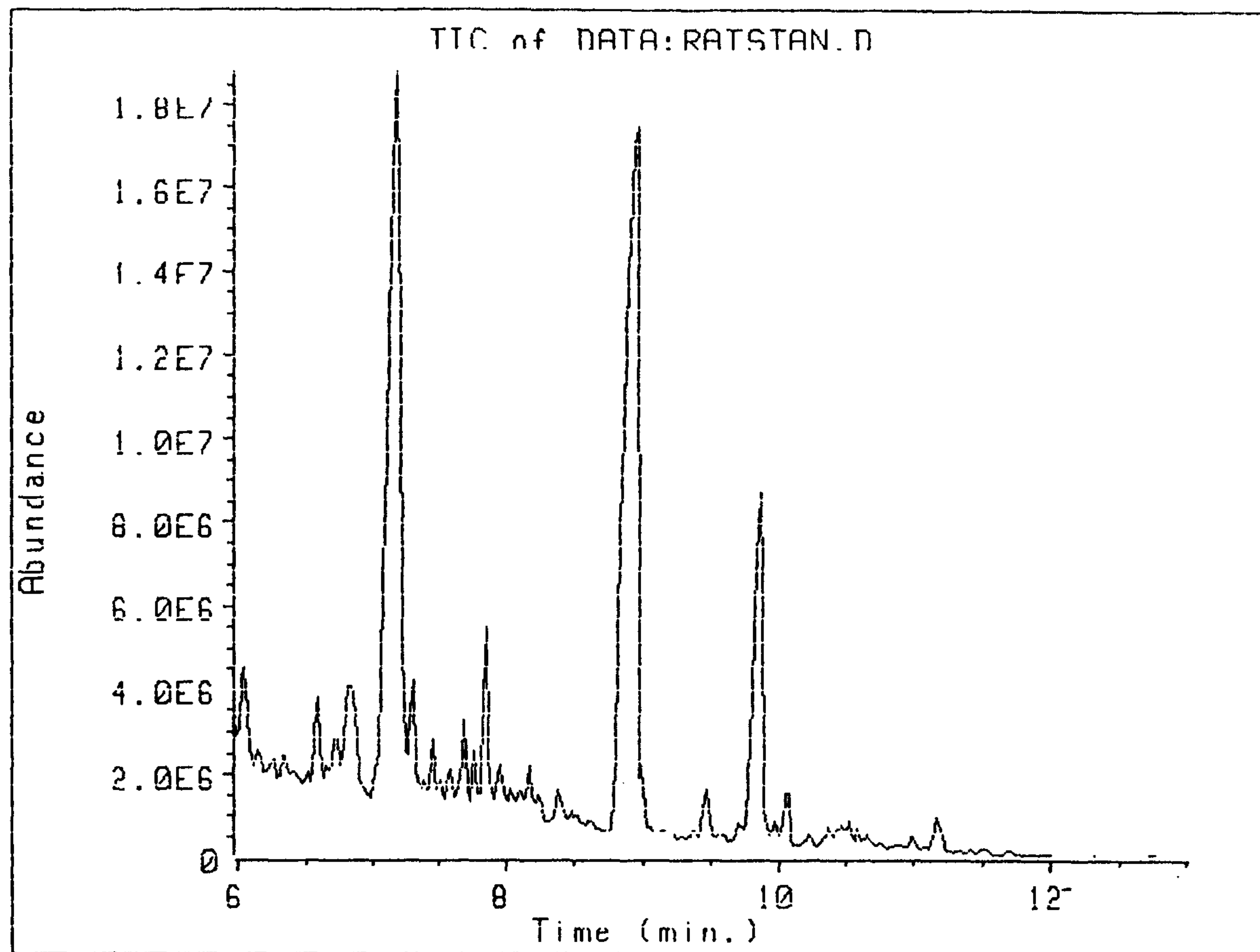


Fig. 2. Total ion chromatogram of rat urine in GC/MSD.

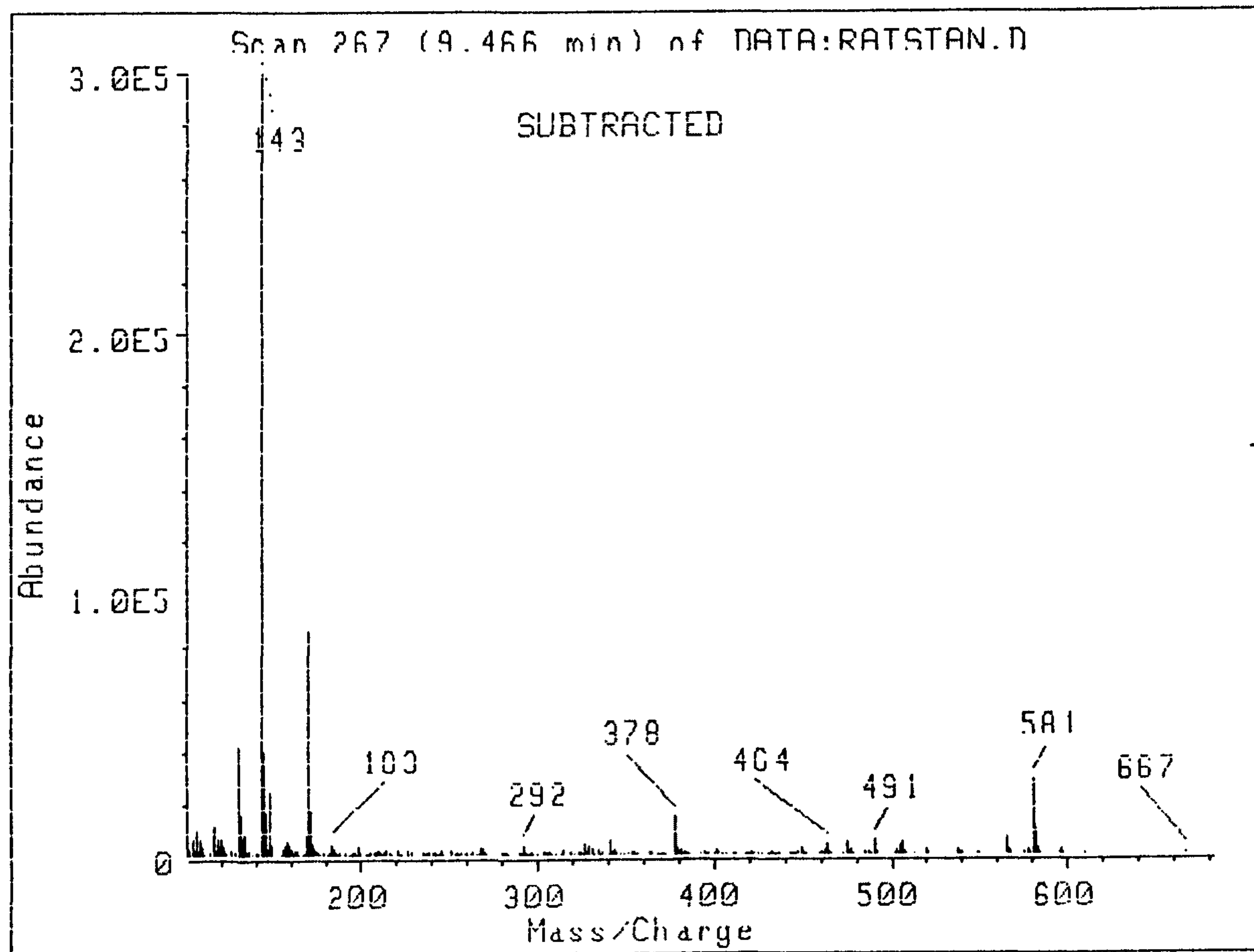


Fig. 3. Scan mass spectrum of stanozolol-OTMS-NHFB in rat urine.

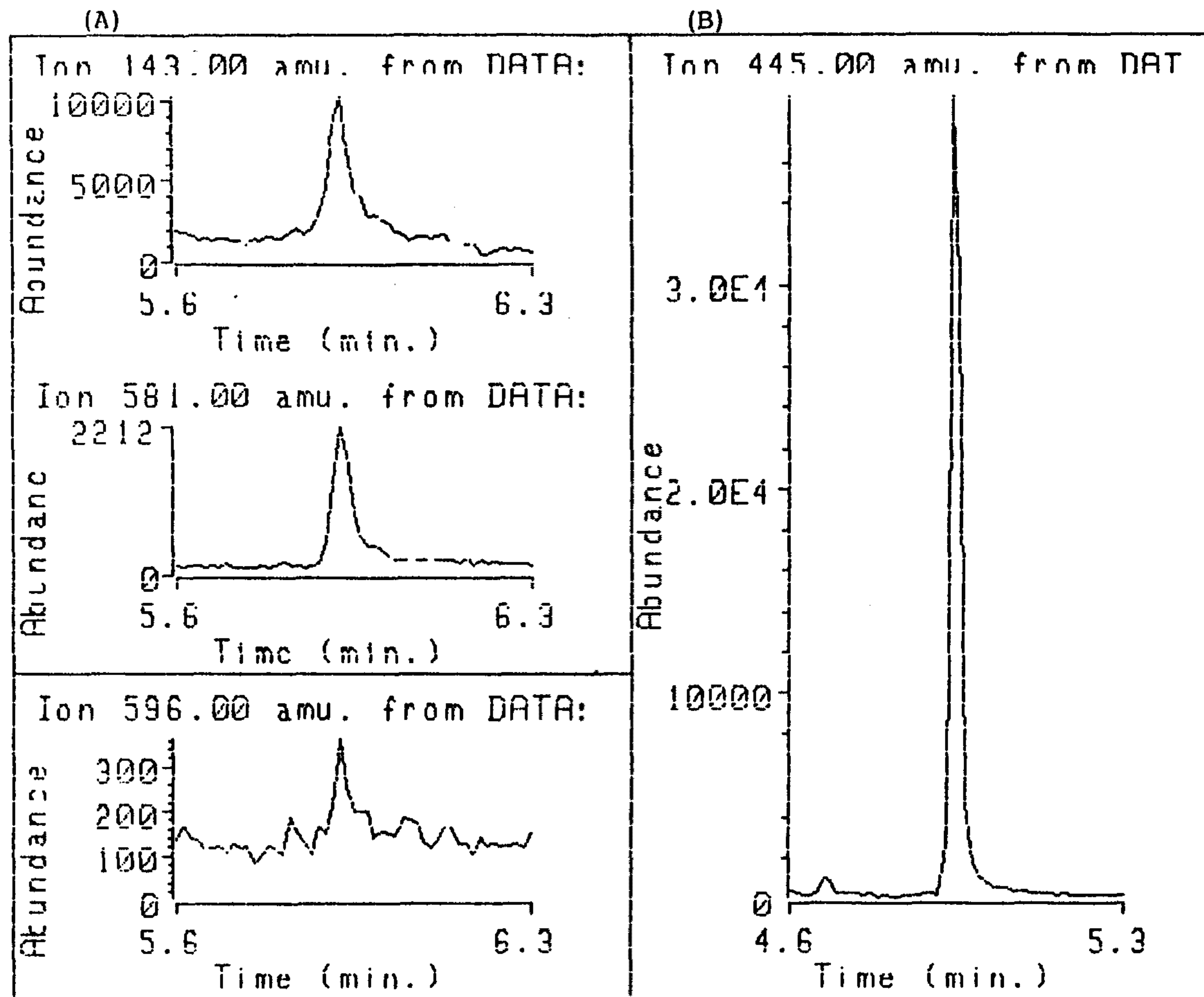


Fig. 4. Selected ion monitoring chromatograms of stanozolol-OTMS-NHFB(A) and calusterone-(OTMS)₂ (B) in rat urine.

하였다.

정상적인 rat과 antibiotic treated germ-free rat에서 stanozolol 투여에 따른 urinary excretion은 Fig. 5에 나타내었다. 두군에서의 stanozolol 배설은 유의성있는 변화를 보여주었고 특히 20-68hr에서는 큰차이가 남을 알수 있었다. 이것을 accumulative amount로 계산하여 Fig. 6에 제시하였다. 여기에서 알수 있듯이 항생제 처리한 장내무균 rat에서는 정상군 보다 stanozolol이 더 많이 배설됨을 알수 있었다. 이런 현상에 대한 해석으로서는 우선 과량의 antibiotic 처리로 인한 상대적인 장내흡수의 문제이고, 또 하나는 장내세균의 관여문제이다.

Stanozolol은 일단 장에서 흡수되어 간에서 대사되어 배설되고 일부는 장간순환에 의해 다시 장내로 배설되어 장내세균등의 대사를 받아 배설되기도 한다. 이과정에서 장내세균에 의한 대사가 항생제 투여로 인하여 저해되고 그 결과 재흡수된 stanozolol이 많이 배설되는 것으로 유추할수 있다.

즉 장내세균의 대사가 anabolic steroid인 stanozolol의 배설에 관여함을 간접적으로 확인 할수 있었다.

3) Human의 장내세균에 의한 stanozolol의 대사

앞의 antibiotic treated germ-free rat에서의 결과를 기초로 실제 human의 feces속의 장내세균에서도 steroid의 대사가 관여되는

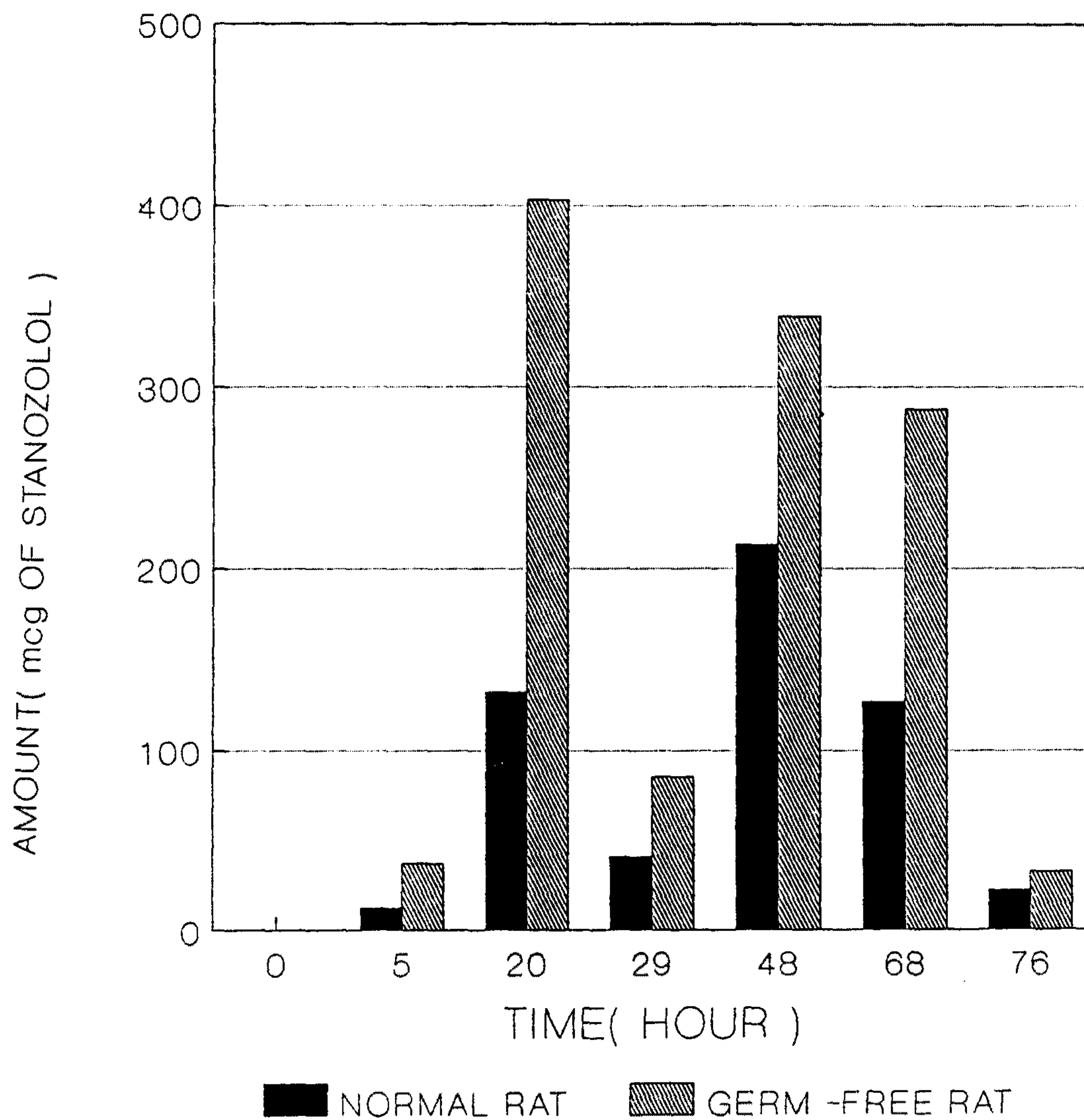


Fig. 5. Urinary excretion amount vs time plot of stanozolol in normal rat and antibiotic treated germ-free rat.

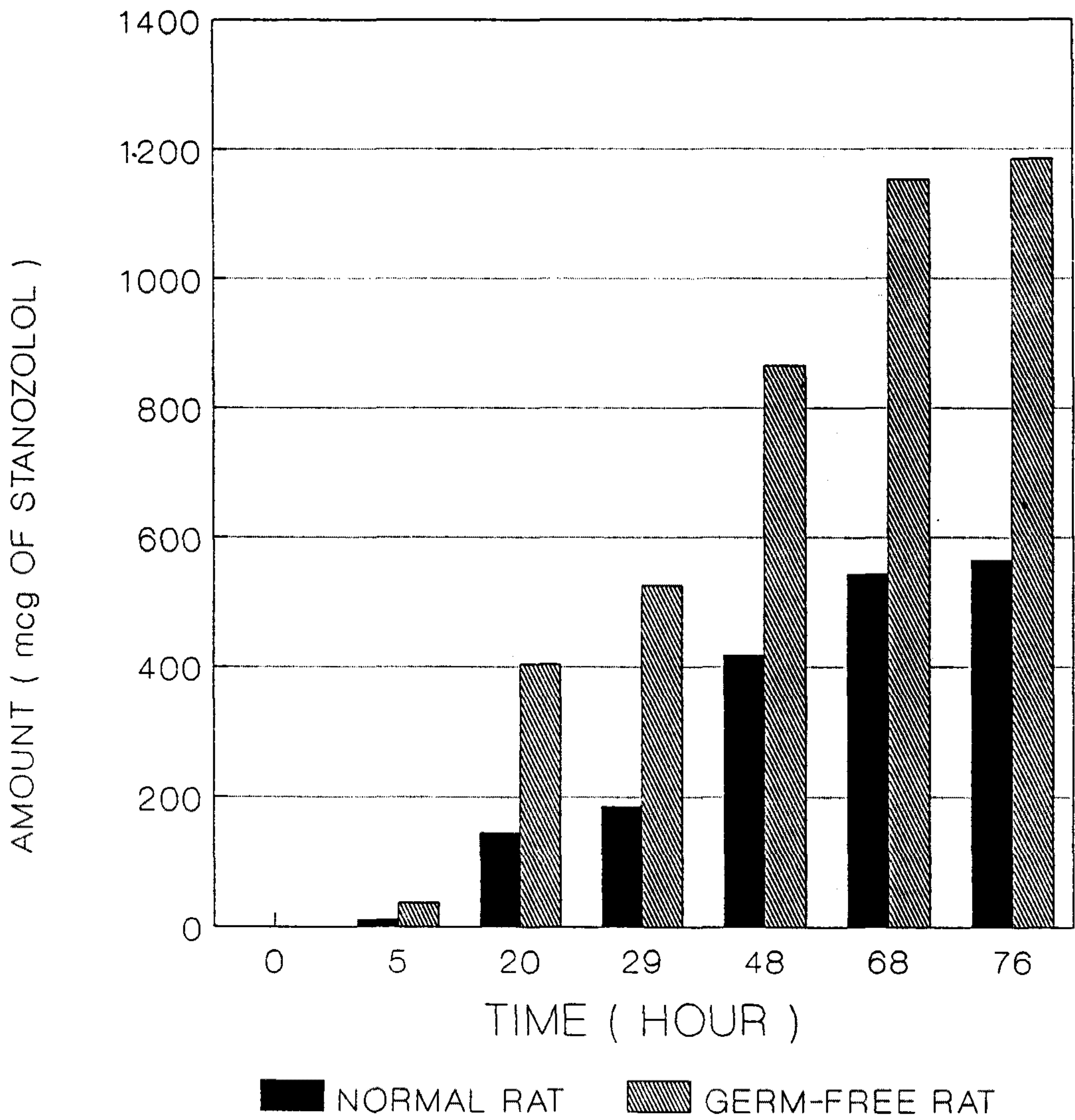


Fig. 6. Urinary accumulative amount of stanozolol in normal rat and antibiotic treated germ-free rat.

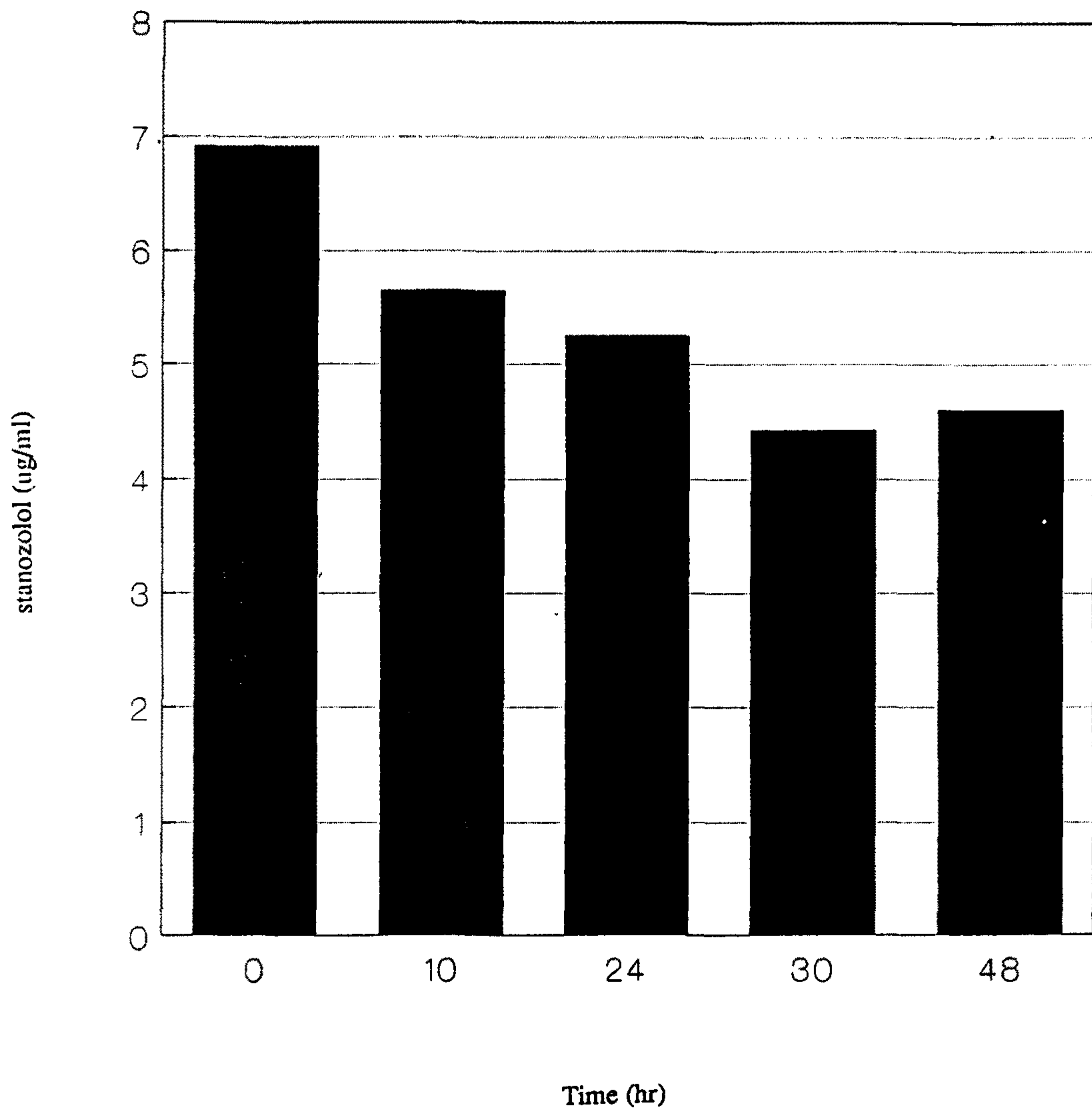


Fig. 7. Time dependent changes of stanozolol by intestinal microflora in anaerobic culture condition.

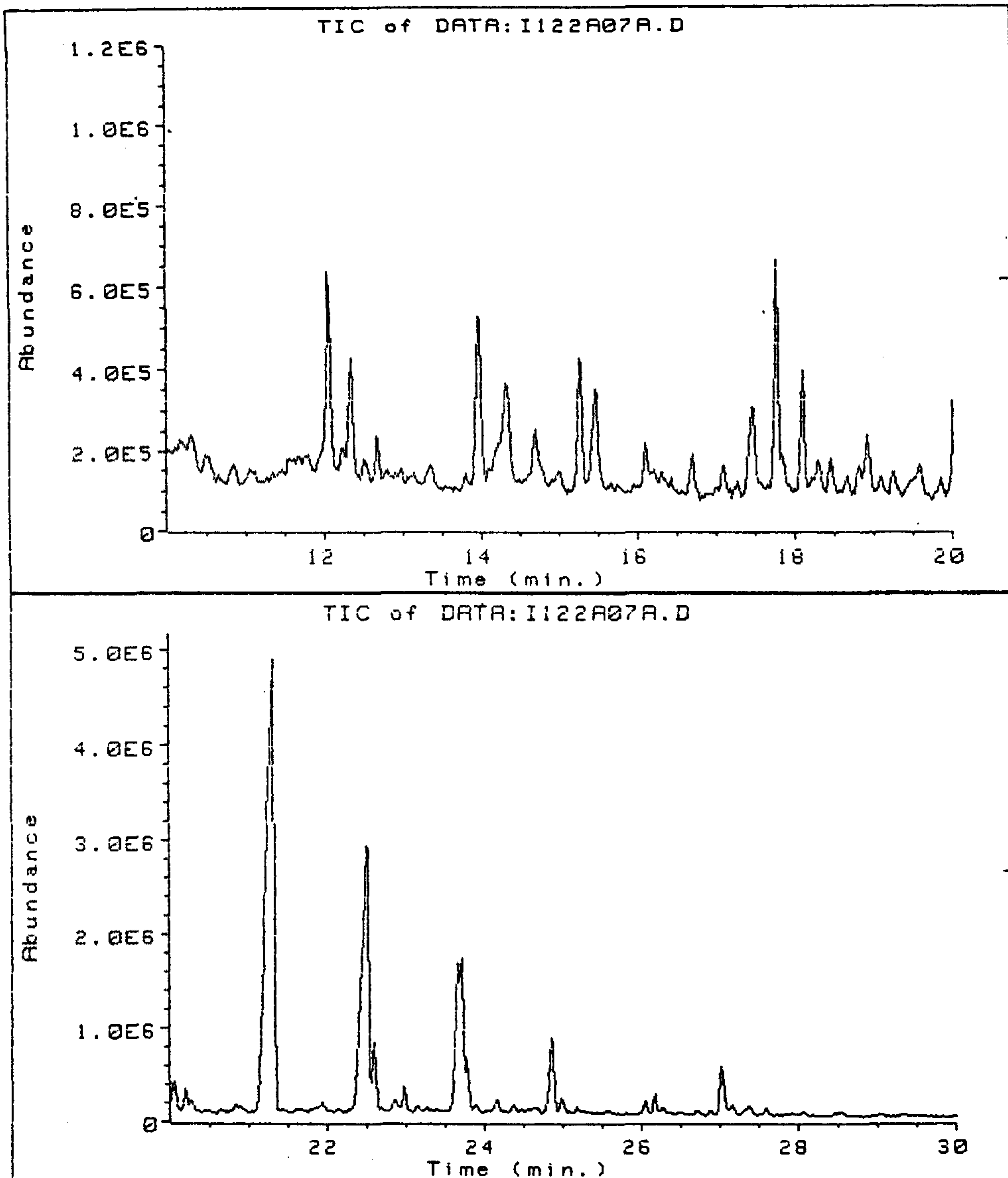


Fig. 8. Total ion chromatogram of reference culture medium with human intestinal microflora.

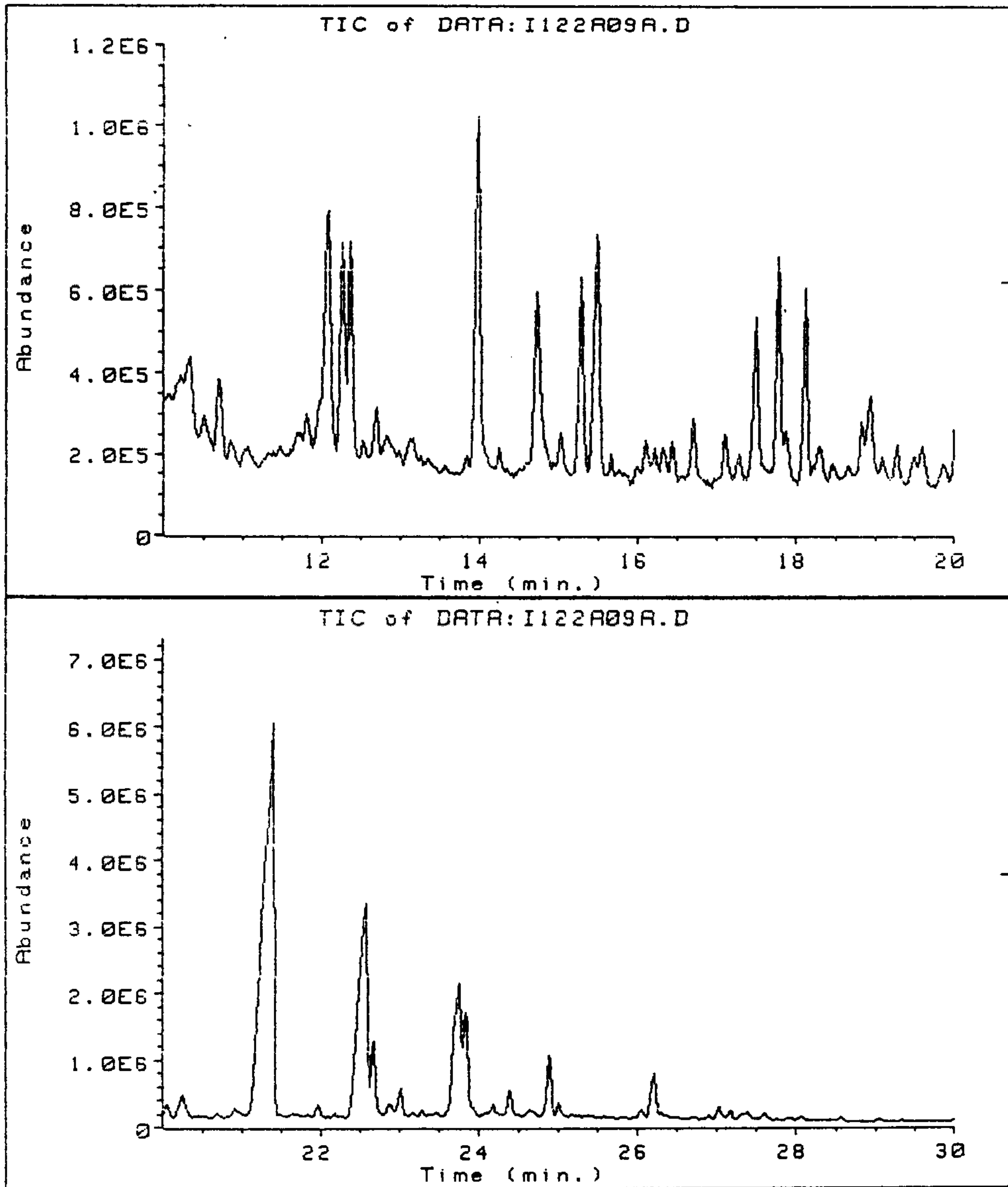


Fig. 9. Total ion chromatogram of stanozolol treated culture medium with human intestinal microflora.

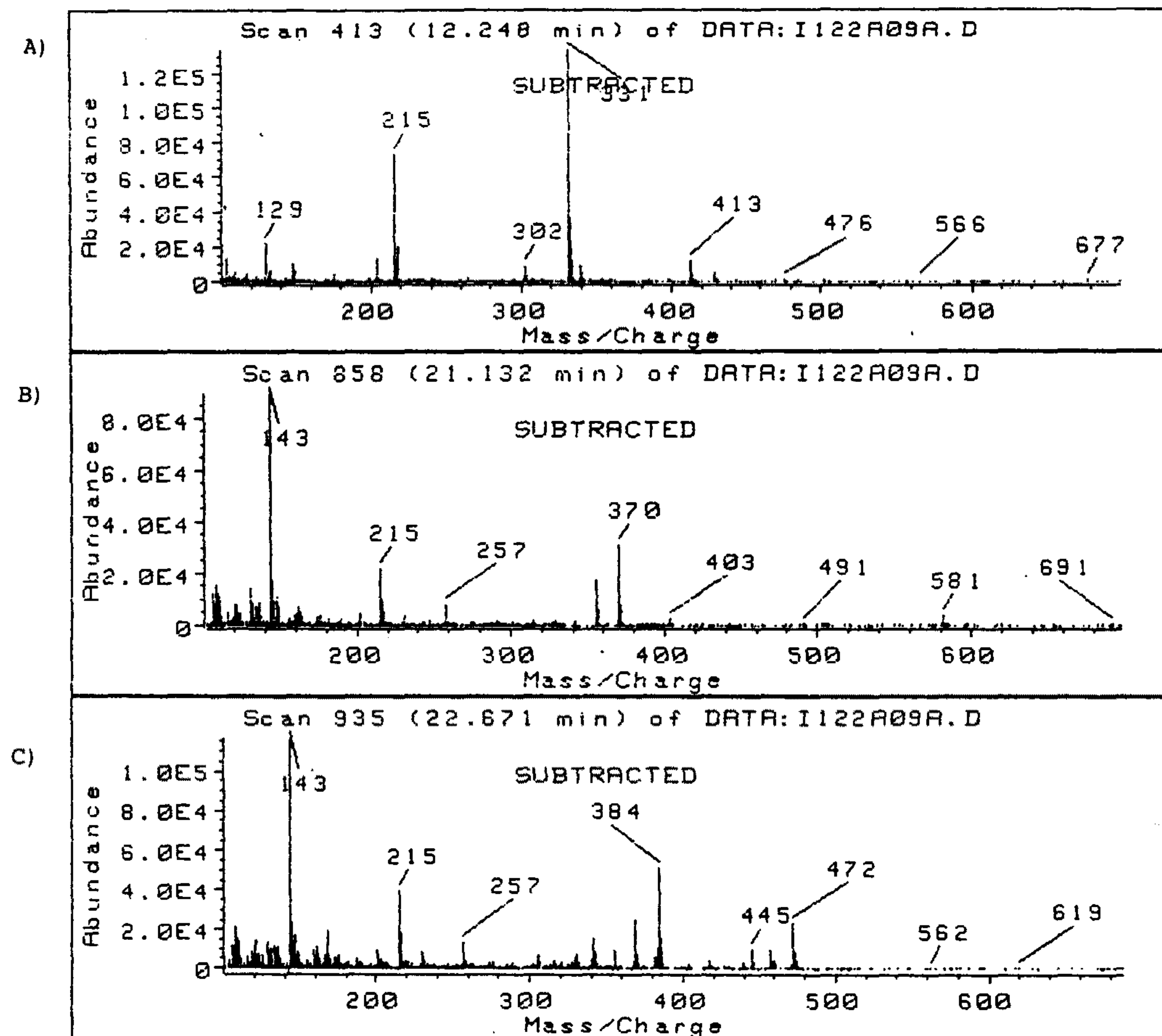


Fig. 10. Scan mass spectrum of stanozolol (B) and its metabolites suspected (A, C) with human intestinal microflora.

지를 살펴보고자 하였다. 여기서도 역시 stanozolol의 정량은 internal standard인 calusterone의 m/z 445 ion에 대한 stanozolol의 m/z 581 ion의 면적비로서 행하였다.

장내세균에 의한 stanozolol의 대사는 Fig. 7에서 알수 있듯이 배양시간이 흐름에 따라 stanozolol의 양이 감소되는 것으로 보아 장내세균에 의해 대사에 관여됨을 알수 있었다.

또한 소실된 stanozolol이 어떤 다른 대사산물로 변하였는가를 check하기 위하여 stanozolol이 들어있지 않은 reference 배양액의 total ion chromatogram(Fig. 8)과 stanozolol 배양액(Fig. 9)의 total ion chromatogram을 비교한 결과 약 12분대, 22분대에서의 차이를 볼 수 있었다. 이들의 scan mass spectrum은 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10의 B, 즉 21·132분의 것은 stanozolol이며 A와 C는 대사산물로서 생각되어지는 것이다. A의 구조는 현재 확인중이며 C는 steroid 핵을 갖는 것으로는 유추할수 있었으나, 그이상의 구조 유추는 어려워, 물질을 분리하여 구조를 규명할 예정이다. 그리고 잘 알려진 대사산물인 3'-hydroxystanozolol은 검출할수 없었다.

이와같은 장내세균에 의한 대사는 또다른 steroid인 oxandrolone의 경우에도 확인되었고(data not shown), 장내세균에 의해 야기되는 steroid류의 대사가 생체내에서 어떤 역할을 할것인가 또 어떤물질로 변화하는가 등을 규명하고자 현재 계속 연구를 진행중이다.

참 고 문 헌

1. Drasar B.S and Hill, M.J. : Human Intestinal Flora, Academic Press, London—New York—San Francisco (1974).
2. Mitsuoka Tomotari(Ed) : A profile of Intestinal Bacteria, Yakult Honsha Co., Ltd (1990).
3. Macdonald, I.A., Bokkenheuser, V.D., Winter, J., McLernon, A.M. and Mosbach, E.H. : Degradation of steroids in the human gut, J. Lipid Research, 24, 675—699 (1983).
4. Holdeman, L.V., Good, I.J. and Moore, W.E.C. : Human fecal flora : a variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress, Appl. Environ. Microbiol., 31, 359—375 (1976).
5. Hentges, D.J., Maier, B.R., Burton, G.C., Flynn M.A. and Tsutakawa, R.T. : Effect of a high—beef diet on the fecal bacterial flora of humans, Cancer Res., 37, 568—571 (1977).
6. Moore, W.E.C., Cato, E.P. and Holdeman, L.V. : Some Current Concepts in intestinal bacteriology, Am.J. Clin. Nutr. 41, S33—S42 (1978).
7. Watanabe Kenjii, Sterol과 장내세균 및 건강유지, New Food Industry, 29(3), 61—75 (1987).
8. Eldere, J.V., Parroentier, G., Robben, J. and Eyssen, H. : Influence

- of an estrone—desulfating Intestinal Flora on the enterohepatic circulation of estrone—sulfate in rats., *J. Steroid Biochem.*, 26(2), 235—239 (1987).
9. Eyssen, H., Eldere, J.V., Parmentier, G., Huijghebaert, S. and Mertens, J.; Influence of microbial bile salt desulfation upon the fecal excretion of bile salts in Gnotobiotic rats, *ibid*, 22(4), 547—554 (1985).
 10. Huijghebaert, S.M., Sim, S.M., Back, D.J. and Eyssen, H. J.: Distribution of estrone sulfatase activity in the intestine of germ free and conventional rats, *ibid*, 20(5), 1175—1179 (1984).
 11. Hirano, S. and Masuda, N.: 7β —hydroxysteroid dehydrogenase activity among intestinal microorganisms, Particularly of *Eubacterium aerofaciens*, *Acta Med. Univ. Kagoshima*, 24(1), 43—47 (1982).
 12. Hirano, S. and Masuda, N.: Epimerization of the 7 —hydroxy group of bile acids by the combination of two kinds of microorganisms with 7α —and 7β —hydroxysteroid dehydrogenase activity, respectively *J. Lipid. Research*, 22, 1060—1068 (1981).
 13. Cerone — McTernon, A.M., Winter, J. Mosbach, E.H. and Bokkenheuser, V.D.: Side—chain cleavage of cortisol by fecal flora, *Biochim. Biophys. Acta*, 666, 341—347 (1981).
 14. Huang, C.T.L., Levine, M.M., Woodward., W.E., Gopalahrishna, G. S., Nalin, D.R., Hornick, R.B. and Nichols, B.L.: Biohydrogenation

- of cholesterol as an index of bacterial 7 α -dehydroxylase activity, *Lipids*, 16(9), 670–676 (1981).
15. Winter, J., O'Rourke–Locascio, S., Bokkenheuser, V.D., Mosbach, E.H. and Cohen, B.I. : Reduction of 17–Ketosteroids by anaerobic microorganisms isolated from human fecal flora, *Biochim. Biophys. Acta*, 795, 208–211 (1984).
 16. Komai, M. and Kimura, S. : Effect of dietary fiber on fecal steroid profiles in germfree and conventional mice., *Nutrition reports International*, 36(2), 365–375 (1987).
 17. Kelsey, M.I., Hwang, K.–K., Huang, S.–K. and Shaikh, B. : Characterizations of microbial metabolites of sulfolithocholic acid by high–performance Liquid chromatography, *J. Steroid Biochem.*, 14, 205–211 (1981).
 18. Schanzer, W. : Untersuchungen Zum Nachweis und Metabolismus von Hormonen und Dopingmitteln, insbesondere mit Hilfe der Hochdruckflussigkeits – Chromatographie, Dissertation, Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln, FRG (1984).

제 3 절 Chlorzoxazone의 대사 및 약동학적 연구와 ethanol, disulfiram이 미치는 영향 연구

I. 서 론

Chlorzoxazone(5-chloro-2(3H)-benzoxazolone)은 골격근 spasm 등의 치료에 사용되는 근육 이완제로서 1958년 처음 개발된 이래 2000만명 이상의 환자에 사용되어온 약물이다(1). Chlorzoxazone은 주로 간에서 6-OH chlorzoxazone으로 대사되어 glucuronide form으로 urine으로 배설된다고 보고되어 있다(2). 또한 최근에는 chlorzoxazone이 human cytochrome P-450 IIE1 효소에 의하여 6-OH chloroxazone으로 대사된다고 알려져 있다(3). Cytochrome P-450 enzyme은 multiple form으로 주로 간에서 존재하며 drug, 발암물질, 천연물등 xenobiotic뿐만아니라 스테로이드, 지방산, 지용성 비타민, eicosanoid등 endogeneous 물질의 산화적 대사에 관여하는 대사에 있어서 중추적 역할을 하는 효소이다(4, 5). Cytochrome P-450 enzyme은 여러 물질들에 의하여 활성이 증가되거나 억제되기도 하는데 이러한 효소 유도제 또는 억제제를 약물과 함께 복용하면 실제 drug의 체내 동태에 큰 영향을 미치게 된다. 또한 병리학적 원인으로 인하여 체내 존재하는 cytochrome P-450의 조성이나 양적 변환도 생기는데 이경우에도 대사 이상으로 인하여 약물 부작용등을 유발할 수 있으므로 전반적인 약물대사능과 약물대사 효소에 영향을 미치는 물질들에 관한 연구가 필요하다.

실제 약물의 pharmacokinetic behavior에서 약물대사의 중요성

은 약물의 대사체가 ① parent drug보다 약리학적 효과가 더 큰 경우도 있고, ② 원하지 않는 부작용을 유발하기도 하며, ③ 신부전증등의 특정 병리학적 상태에서는 체내 축적될 수 있으며, ④ 간 기능 저해시는 효소활성의 억제로 대사체의 생성이 억제되고 결과적으로 parent drug의 체내 배설속도가 저하되며, ⑤ 효소활성 유도시 대사체가 고농도로 존재할수 있기 때문에, 심도있는 대사 연구가 필요하다. Cytochrome P-450 enzyme중 P-450 IIE1 효소는 주로 분자량이 작은 물질의 대사에 관여하며(6) benzene, vinylchloride, ethylcarbamate등의 독성물질이 주로 이 효소에 의하여 대사 활성이 일어난다. P-450 IIE1 효소는 ethanol, acetone, pyridine등의 물질을 전처리하면 활성이 증대된다(7). 또한 ethanol과 acetone등의 organic solvent자체가 P-450 IIE1에 의하여 대사가 되므로 enzyme inhibitor로서 작용한다(8). 특히 사람의 경우 음주로 인하여 체내 P-450 IIE1의 양의 개체차가 상당히 크며 그에 따라 이 효소에 의해 대사되는 약물의 pharmacokinetic behavior에 큰 차이를 나타낸다. 본 실험에서는 chlorzoxazone이 rat liver cytochrome P-450 IIE1에 의해서만 대사되는지를 *in vitro* 실험에서 조사하였고 또한 체내에서 P-450 IIE1 효소활성의 변환을 가져다 주는 ethanol 및 disulfiram을 전처리하였을때 chlorzoxazone의 대사 및 약동학적 형태에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 약물의 disposition과 약물대사 효소활성의 상관관계를 연구하였다.

2. 재료 및 방법

(1) 시약

Chlorzoxazone, 7-hydroxycoumarine, pyridine, acetic anhydride는 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee)에서 구입하였으며, heparin, acetaminophen, 3-methylchloranthrene, 그리고 β -glucuronidase은 Sigma Co.(St. Louis, USA)에서 그리고 MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide)는 Mecherey & Nagel(F.R.G)에서 구입하였다. 6-OH chlorzoxazone과 5-fluoro-2, (3H)-benzoxazolone은 Dr. F.P. Guengerich(Vanderbilt Univ.)로부터 기증받았으며, 그밖의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기 및 기구

- Ultracentrifuge(Beckman, USA)
- Rotary evaporator(Buchi, Switzerland)
- Sorvall centrifuge(Dupont, USA)
- Water bath(Dong-yang, Korea)
- Waters HPLC system(Waters Co. USA)
- GC/FID/NPD(HP 5890A)

(3) 실험동물

KIST 유전공학센터에서 양육된 음성 Spragus-Dawley rat(200-250g)을 사용하였으며, tap-water와 고형사료(삼양사, Korea)를

자유롭게 섭취하도록 하였다.

(4) *In vitro* chlorzoxazone 대사

(a) Rat microsome의 제조

수컷의 SD rat을 control 그룹, 3-methylcholanthrene 처리군(3-MC, 3-MC를 corn oil에 녹여서 40mg/kg 용량으로 하루 1회 3일 동안 경구 투여), phenobarbital 처리군(PB-, phenobarbital을 0.15M NaCl 용액에 녹여 80mg/kg 용량으로 하루 1회 3일 동안 복강투여), 그리고 acetone 처리군(acetone 5mg/kg 용량으로 24시간 전에 경구투여)으로 부터 각각 간을 1.15% KCl 용액으로 perfusion하여 채취하였다. 간을 절편으로 만들어 3 volume의 0.1M KCl과 1mM EDTA 0.1M가 함유된 Tris-acetate buffer(pH 7.4)에 넣고 Teflon glass homogenizer로 균질화하였다. 이를 9000g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하고 105,000g에서 다시 원심분리하여 microsome을 취하였다. 여기에 1mM EDTA와 20%(v/v) glycerol을 함유한 10mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)를 단백질이 10-20mg/ml 이 되도록 첨가한후 균질화하여 -80°C에서 보관하였다.

(b) *in vitro* incubation 및 6-OH chlorzoxazone의 정량

0.1M Potassium phosphate buffer(pH 7.4) 1ml에 NADP⁺ 500 μ g, Glucose-6-Phosphate의 최종농도가 10mM, 그리고 1 I.U.의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, microsome 200 μ g을 첨가하여

37°C에서 2분간 preincubation하고 chlorzoxazone을 최종농도가 50 μ M 되게 첨가하여 반응을 시작하였다. 15분 반응후 43% H₃PO₄ 50 μ l를 넣어 반응을 중단시키고 여기에 internal standard로서 1mM 농도의 5-fluoro-2(3)H-benzoxazolone 10 μ l를 넣고 CH₂Cl₂로 추출하였다. 추출액을 HPLC(Waters 590 pump)를 이용하여 생성된 6-OH chlorzoxazone을 정량하였다. HPLC 조건으로는 partisil C₁₈ column(5 μ m, 15 X 0.46cm, Beckman)을 사용하였고 0.1M K-phosphate buffer와 CH₃CN(75 : 25 v/v)용액을 1.2ml/min유속으로 흘러 287nm에서 모니터링하였다.

(c) Dimethylnitrosamine N-demethylation activity 측정

50mM potassium phosphate buffer(pH 7.7) 1.5ml에 0.5mM NADP⁺, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1 IU ml⁻¹, microsomal protein 150 μ g, 그리고 1.5mM dimethylnitrosamine을 첨가하여 37°C에서 3분간 preincubation한후 glucose-6-phosphate를 10mM 농도가 되게 첨가하여 반응을 10분간 진행하였다. 반응은 0.5ml의 17% HClO₄를 가하여 종결하였다. 2000rpm에서 10분간 원심분리한후 상층액 1ml을 다른 tube에 옮기고 0.4ml의 Nash reagent(30g ammonium acetate, 0.4ml acetylacetone(2, 4-phetanedione), and 0.6ml glacial acetic acid per 100ml)을 가하고 70°C에서 20분간 반응시켰다. 생성된 formaldehyde에 의하여 발색되는 색깔을 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량은 formaldehyde를 이용하여 만든 external standard curve를 사용하였다.

(d) Immunoinhibition

각 cytochrome P-450의 subtype에 특이적인 antibody는 column chromatography를 이용하여 분리된 P-450의 homogeneity를 electrophoresis로 확인하고 이를 토끼에 주사하여 얻은 rabbit anti rat cytochrome P-450 antibody를 Dr. Guengerich(Vanderbilt Univ.)로부터 기증받아 사용하였다. 먼저 쥐의 cytochrome P-450양을 Omura와 Sato(10)의 방법인 reduced-CO versus reduced difference spectrum을 이용하여 정량하고 cytochrome P-450 0.1mole을 0.5ml K-phosphate buffer(50mM, pH 7.4)에 첨가하여 여기에 antibody를 가하여 20분간 preincubation시켰다. 그후 chlorzoxazone, NADPH generating system을 첨가하여 15분간 반응시키고 (b)에서 서술한 방법대로 생성되는 6-OH chlorzoxazone의 양을 정량하였다.

(e) 혈액 채취 및 혈중 chlorzoxazone농도 측정

(1) 약물 투여 및 시료 채취

Rat을 대조군, ethanol 처리군, 그리고 disulfiram 처리군을 각각 3마리씩 구분하고 대조군에서는 생리식염수를 ethanol 처리군은 실험 시작 24시간전에 5ml/kg ethanol을 경구투여하였으며, disulfiram 처리군은 매일 1회 40mg/kg 용량을 경구 투여하여 3일 동안 전처리하였다. 실험 시작전 24시간동안은 사료 공급을 중단하였다. 실험 당일 rat을 sodium pentobarbital(50mg/kg)을 복강으로 주사하여 rat를 마취시키고 femoral vein을 polyethylene tube를

cannulation한후 chlorzoxazone을 50mg/kg(dissolved in polyethylene glycol)을 경구 투여하였다. 약물투여후 20분, 40분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 4시간, 그리고 6시간 경과시에 femoral vien cannula로 부터 혈액 0.25ml을 채취하여 heparin 전처리된 mini tube에 넣고 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 plasma를 얻고 chlorzoxazone 정량때까지 4°C에서 보관하였다. 별개의 실험 group에 chlorzoxazone을 투여하고 metabolic cage에서 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-24, 24-36 시간 간격대로 urine을 채취하여 -20°C에서 냉동 보관하였다.

(2) 혈장내의 chlorzoxazone 정량

혈장 0.1ml에 phosphate buffered saline 0.4ml과 internal standard로서 10 μ l acetaminophen(300ppm)을 첨가하였다. Ethylacetate 1ml을 가하여 교반한후 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 ethylacetate와 수층을 분리하였다. Ethylacetate층을 취하여 Rotary evaporator(Buchi, F.R.G.)로 완전히 말리고 잔사에 20 μ l의 pyridine과 20 μ l의 acetic anhydride를 첨가하여 42°C에서 20분간 처리하여 N-acetylation시켰다. 반응후 pyridine을 완전히 건조시키고 잔사를 ethylacetate 50 μ l에 녹여 NPD가 장착된 GC(HP 5890)에 2 μ l를 주입하여 chlorzoxazone을 정량하였다. Column은 5% -phenylmethylsilicone(SE-54)(HP fused silica capillary, 17m x 0.2mm ; 0.33 μ l film thickness)을 사용하였다. Detector 온도는 300°C, injector 온도는 280°C, 그리고 carrier gas로는 helium을 사용하였으며 유속은 1.5ml/min로 흘려 주었다. 온도 gradient는 100°C에서 240°C까지는 20°C/min로,

240°C에서 300°C까지는 30°C/min, 그리고 300°C에서 2분간 머물렀다. 위의 조건에서 chlorzoxazone의 extraction efficiency는 $78 \pm 7\%$ (four determination)이었다.

(3) Urine내의 6-OH Chlorzoxazone 정량

Urine 0.5ml에 internal standard로서 7-hydroxycoumarine (1000ppm) 50 μ l와 1ml의 potassium phosphate buffer(0.1M, pH 7.0)를 첨가하고, 6-OH chlorzoxazone 의 glucuronide conjugate를 free form으로 변환시키기 위하여 β -glucuronidase(from *E. coli*) 100 Sigma unit를 가하고 50°C에서 1시간 반응시켰다. Free 6-OH chlorzoxazone을 추출하기 위하여 ethylacetate 2ml을 가하고 shaking시킨후, 2000rpm에서 10분간 원심분리하고 ethylacetate 층을 취하였다. Rotary evaporate 상에서 ethylacetate를 완전히 날려 보낸후 남은 잔사에 유도체화시키기 위하여 MSTFA 30 μ l와 acetonitrile 70 μ l를 첨가하여 80°C에서 10분간 반응시키고, 반응 혼합물 1 μ l를 GC/FID에 주입하여 6-OH chlorzoxazone으로 정량하였다. GC의 column 및 분석조건은 (2)에서 기술한 것과 동일한 조건에서 수행하였다.

(4) 통계 처리

Rat plasma내의 chlorzoxazone의 농도 data를 PCNONLIN program(11)을 이용하여 kinetic parameter를 얻었다.

3. 결과 및 고찰

In vitro 에서 chlorzoxazone의 대사

Cytochrome P-450은 phase I 약물대사에서 중추적 역할을 하는 효소로서 현재까지 약 60종 이상의 subtype이 밝혀져 있으며 rat의 경우 10여종의 subtype이 구조 및 특성이 밝혀져 있다(12).

Cytochrome P-450은 broad substrate specificity를 나타내며 기질에 따라 특정 subtype에 의하여 대사되기도 한다. 특히 P-450은 ethanol, phenobarbital, cigarette smoking등의 inducer에 의하여 특정 subtype의 induction이 일어나서 개체간의 약물대사 능력의 차이를 나타내며 또한 체내 drug clearance에 큰 영향을 미치기도 한다.

Rat liver microsome을 이용한 *in vitro* system에서 chlorzoxazone은 6-OH chlorzoxazone으로만 대사되었고 다른 minor metabolite로 알려진 dehalogenated benzoxazolone(13)은 본 실험에서 사용한 분석 조건에서는 검출되지 않았다(Fig. 2). Chlorzoxazone이 rat cytochrome P-450 IIE1에 의하여 대사되는지를 알아보기 위하여 correlation 실험, chemical inhibitor의 사용, 그리고 immuno inhibition 실험을 수행하였다. 먼저 acetone, 3-methylcholanthrene, 그리고 phenobarbital로 P-450을 induction시킨 microsome을 준비하고 cytochrome P-450 IIE1에 의하여 일어나는 dimethylnitrosamine-N-demethylation 반응을 측정하였다. 이 반응은 낮은 농도(<5mM)에서는 P-450 IIE1에 의해서만 반응이 일어나며 고농도에서는 주로 low affinity form인 P

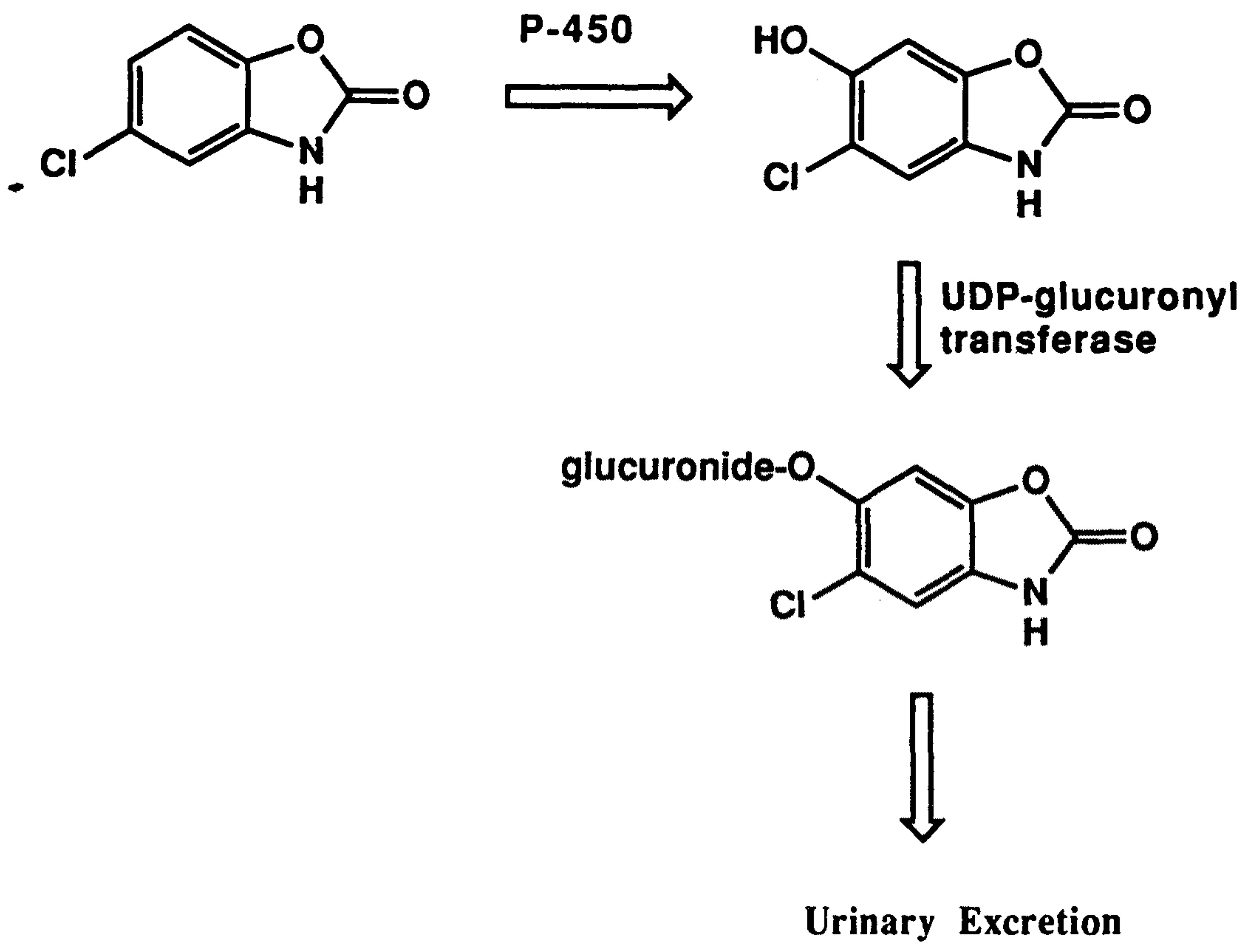


Fig 1. Postulated pathway of biotransformation of chlorzoxazone.

-450 IA2등에 의하여 대사된다(14). 그러므로 본 실험에서는 P-450 IIE1에 의한 대사만을 측정하기 위하여 1.5mM dimethylnitrosamine 농도를 이용하였다. 이와 더불어 각 microsome에 의한 chlorzoxazone-6-hydroxylation 반응을 측정하여 상관관계를 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 두 반응간의 상관관계는 $r=0.867$ 로 높은 correlation을 보여주었다. P-450 IIE1의 selective inhibitor로 알려진 dimethylsulfoxide diethyldithiocarbamate, 그리고 P-450 IIE1의 기질인 dimethylnitrosamine과 ethanol을 같이 반응시켰을때 chlorzoxazone-6-hydroxylation반응은 이들에 의하여 억제됨을 보여 주었다(Fig. 4). Dimethylsulfoxide, dimethylnitrosamine 그리고 ethanol에 의한 반응의 억제는 competitive inhibition을 나타내었으며 diethyldithiocarbamate는 mechanism-based inactivation을 보여주었다(data not shown). Immuno inhibition 실험에서는 토끼의 anti-P-450 IIB1, anti-P-450 IID1, anti P-450 IA2, 그리고 anti P-450 IIE1 항체를 이용하여 해당되는 P-450의 catalytic activity를 억제시킨후 chlorzoxazone-6-hydroxylation 반응을 측정하였다. 또한 immunoglobulin 자체가 반응에 미치는 영향을 보기 위하여 preimmune IgG 전처리를 하여 보았다. Table 1에서 보는바와 같이 preimmune IgG, anti-P-450 IIB1, anti-P-450 IID1, anti-P-450 IA2 항체는 chlorzoxazone-6-hydroxylation 반응에 아무런 영향을 주지 않았고 anti-P-450 IIE1만 dose-dependent inhibition을 나타내었다.

위 correlation 실험에서 dimethylnitrosamine-N-demethylation 반응과 chlorzoxazone-6-hydroxylation 반응간의 높은 상관관계, P-450 IIE1 selective inhibitor 또는 기질과 공동 처리하였을때 반응

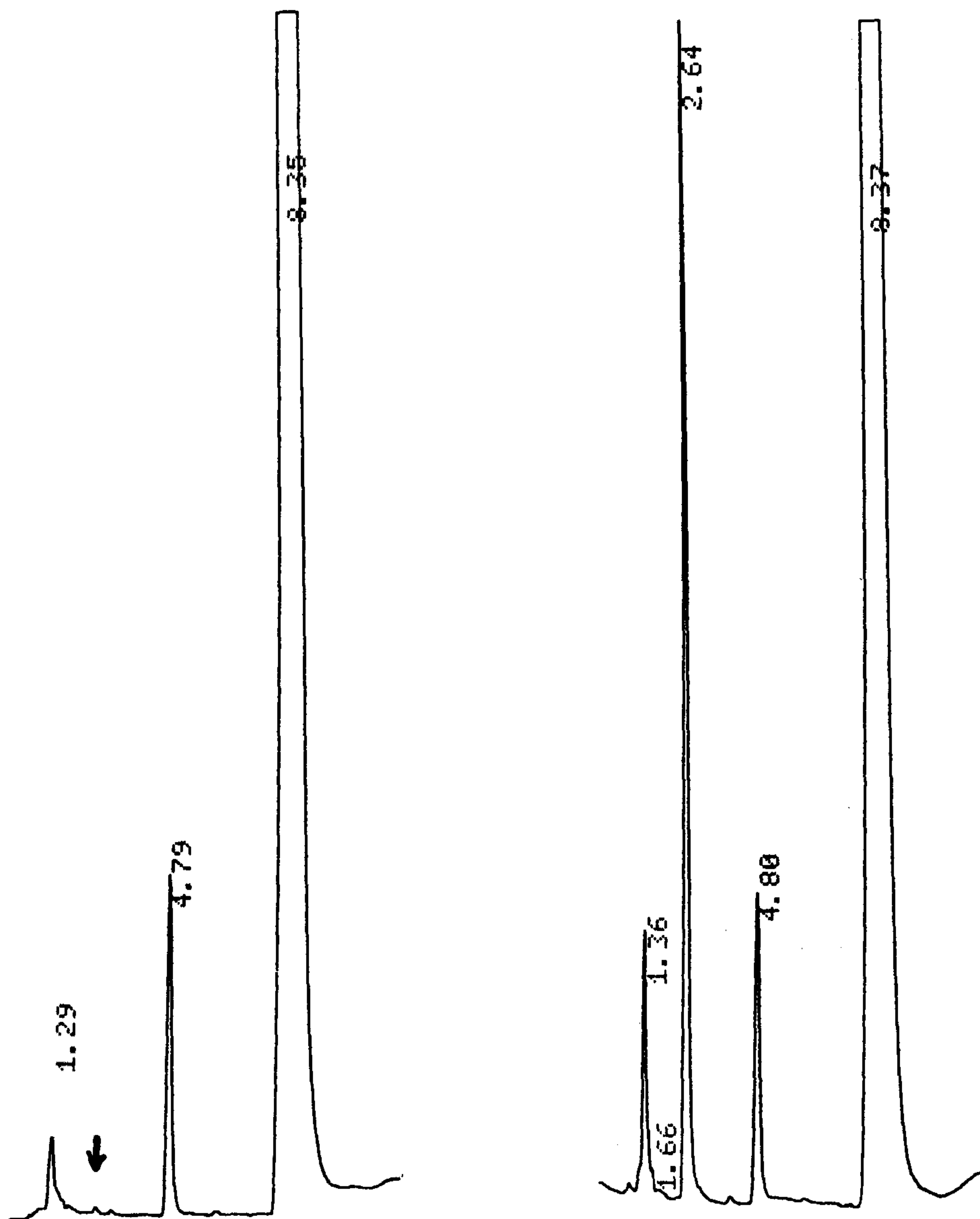


Fig 2. HPLC chromatograms of incubations assayed for chlorzoxazone 6-hydroxylation. Rat liver microsomes were incubated with 0.5 mM chlorzoxazone for 20 min. (A) microsomes incubated without an NADPH-generating system (arrow indicates retention time of 6-hydroxy chlorzoxazone); (B) microsomes plus an NADPH-generating system. The retention times of 6-hydroxychlorzoxazone, 5-fluoro-2(3)H-benzoxazolone (internal standard), and chlorzoxazone are 2.64, 4.80, and 8.37 min, respectively.

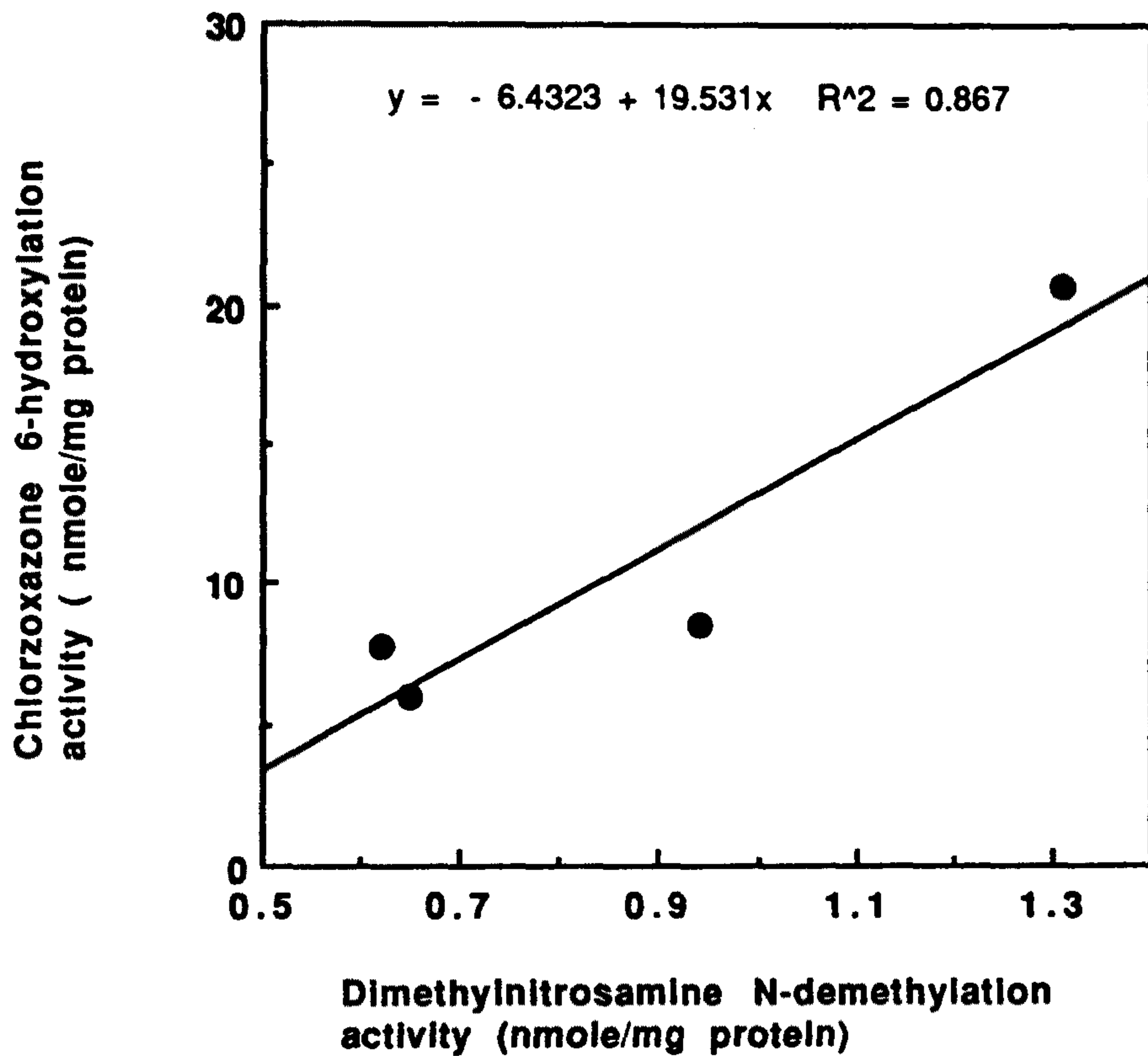


Fig 3. Correlation of catalytic activity between rates of chlorzoxazone 6-hydroxylation and dimethylnitrosamine N-demethylation in different rat liver microsomes. Untreated, phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and acetone-treated microsomes were used in this experiments. Line was drawn by linear regression analysis, and correlation coefficients (r) was calculated.

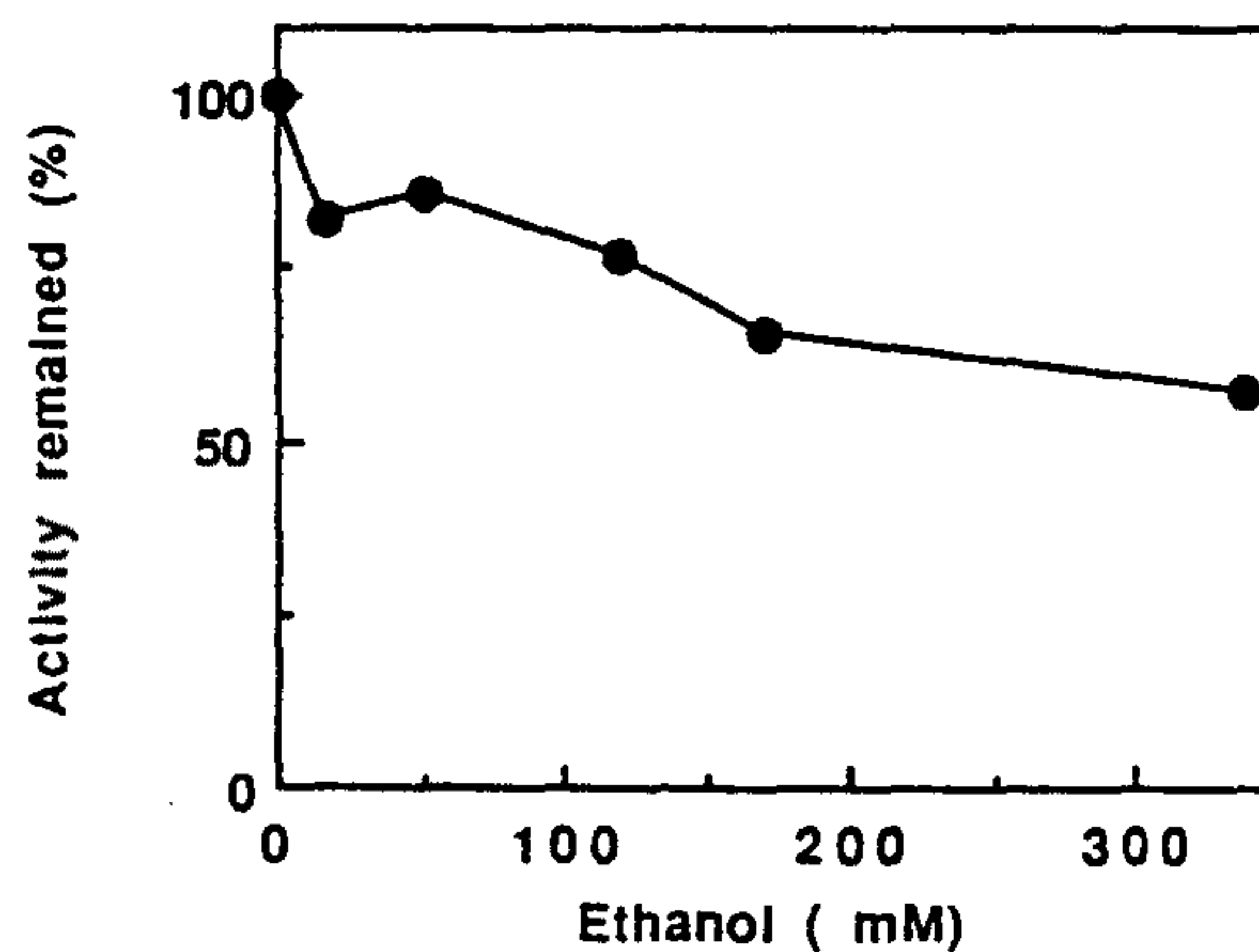
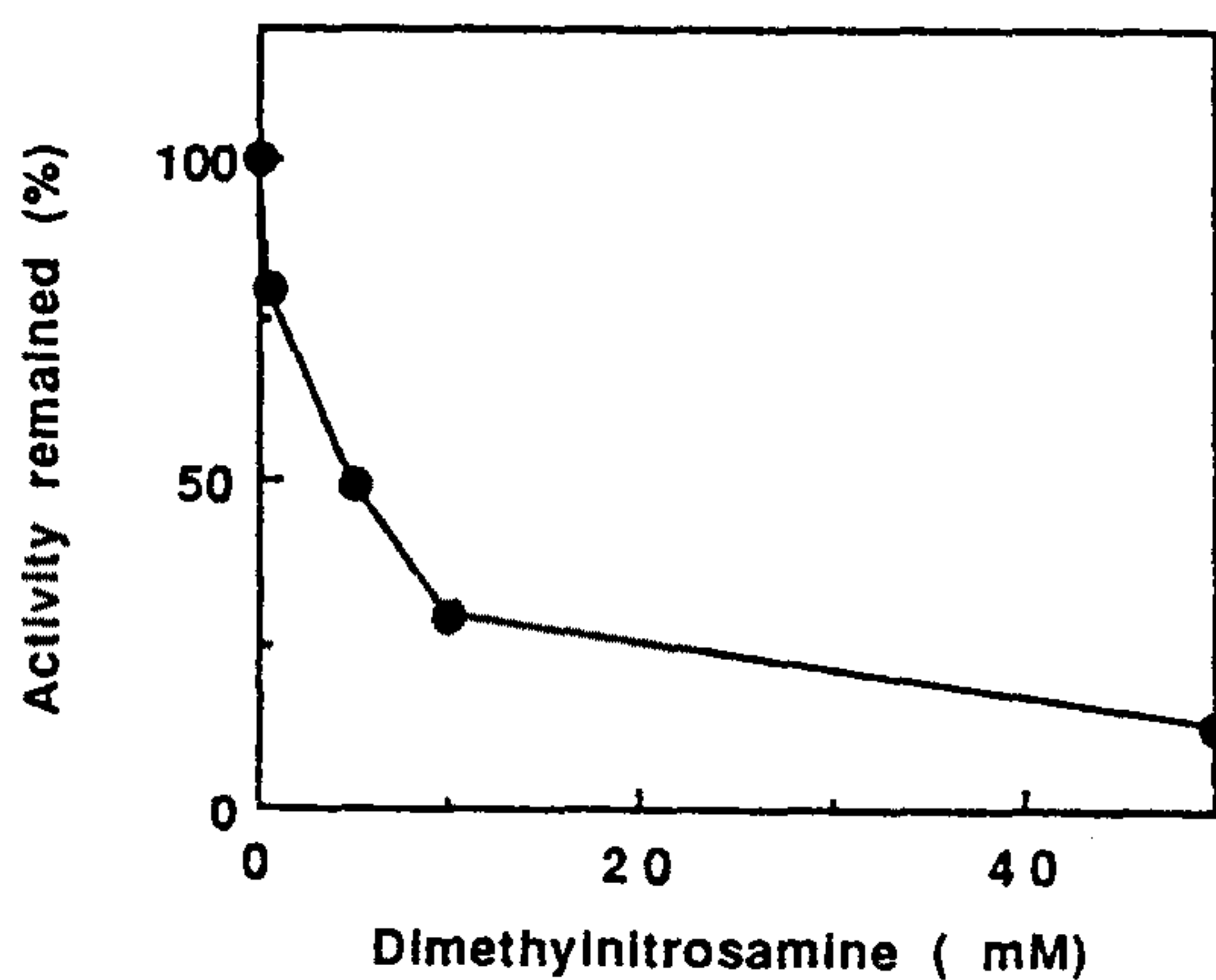
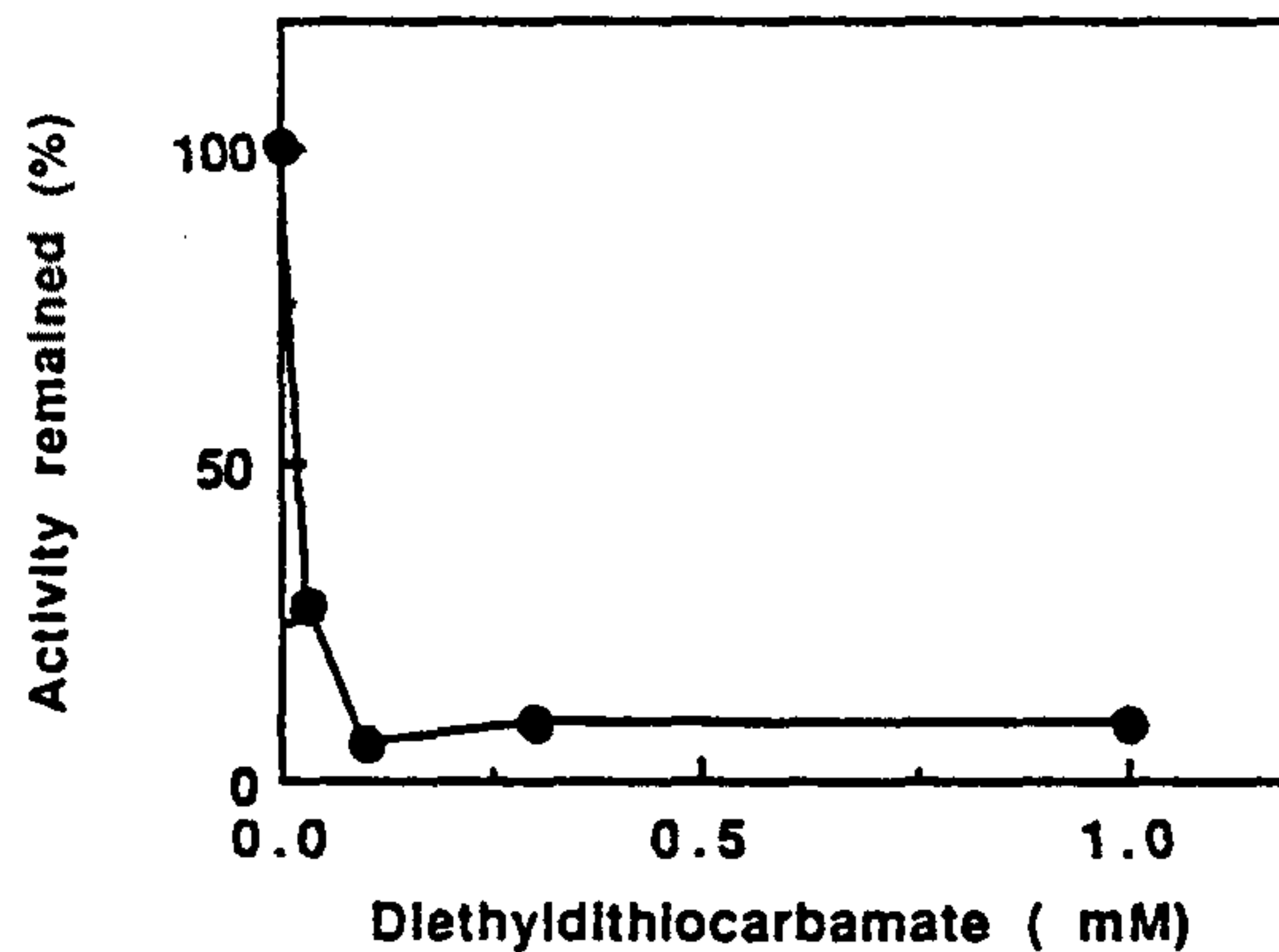
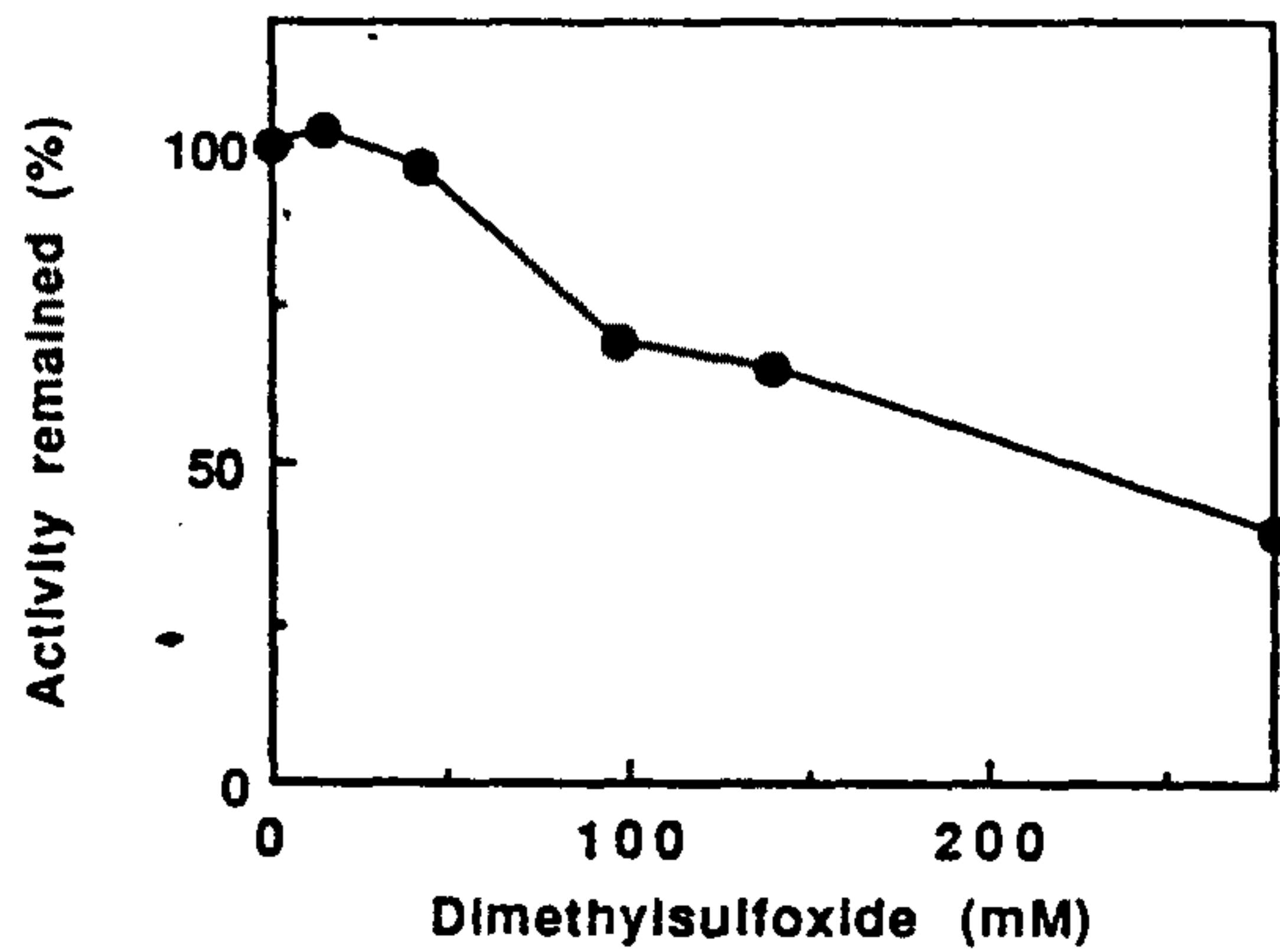


Fig 4. Inhibition of chlorzoxazone 6-hydroxylation in rat liver microsomes by several inhibitors. In all cases chlorzoxazone and inhibitors were added to the microsomes and the reaction was initiated by the addition of an NADPH-generating system.

Table 1. Immuno Inhibition of Catalytic Activities in Rat Liver Microsomes

antibody	% of uninhibited catalytic activity	
	chlorzoxazone	ethylene dichloride
preimmune, 5 mg/ nmol of P-450	95	87
anti-P-450 IIB1, 2 mg/ nmol of P-450	103	90
anti-P-450 IID1,2,3, 5 mg/nmol of P-450	89	73
anti-P-450 IA2, 5 mg/ nmol of P-450	121	108
anti-P-450 IIE1		
0.4 mg/nmol of P-450	72	84
1.5 mg/nmol of P-450	43	21
4.5 mg/nmol of P-450	12	16
10.0 mg/nmol of P-450	2	5

의 억제, 그리고 다른 P-450 subtype의 antibody는 반응억제를 하지 않았으나, P-450 IIE1에 의해 생성된 antibody만 반응을 억제하는 것으로 보아 chlorzoxazone의 대사는 rat의 경우에도 human과 동일하게 P-450 IIE1 subtype에 의해서만 일어난다고 사료된다.

In vitro chlorzoxazone대사 및 배설 연구

본 실험에서 혈장내의 약물의 농도를 측정하기 위하여 Nitrogen-phosphate specific detector가 장착된 GC를 사용하였으며 최저 검출 농도는 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하로서 혈중 chlorzoxazone 농도 분석에 적당하다고 생각된다.

Chlorzoxazone을 $50\text{mg}/\text{kg}$ 의 농도로 경구로 투여하였을때 시간 경과에 따른 혈장내 농도는 Fig. 6에 나타내었다. Chlorzoxazone은 빠른 흡수를 보여 주었으며 약 1.5시간 경과후에 최대 농도에 도달하였으며 최대 농도는 약 $31.66\pm 5.05\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되었다. Chlorzoxazone의 흡수는 개체간의 큰 차이를 보여 주었으며 이는 주로 gastric motility 또는 소장으로서 이행시간의 차이등에 기인한다고 생각되어진다. Chlorzoxazone의 혈중 농도가 최고치에 도달한후 혈장내 약물의 농도는 monoexponential manner로서 감소하며(elimination half life= $3.54\pm 1.12\text{hr}$)이는 체외로의 chlorzoxazone의 배설속도가 빠르다는 것을 의미한다.

Computer를 이용하여 만들어진 혈중농도와 시간의 profile은 특징적인 one-compartment oral absorption model을 나타내었으며 혈중농도는 다음 식으로 표시할 수 있다.

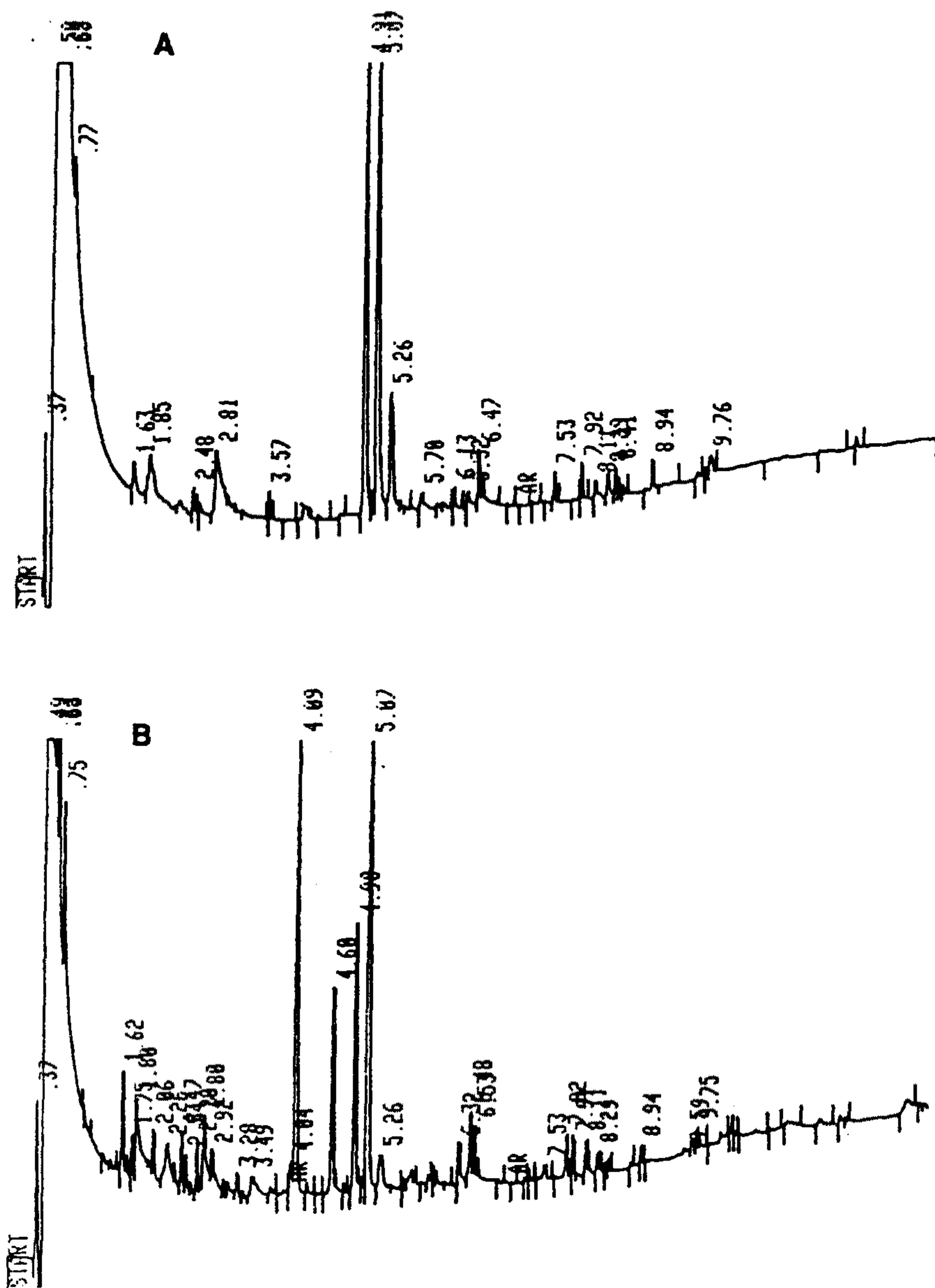


Fig 5. Gas chromatogram of rat plasma after the administration of chlorzoxazone (50 mg/kg) to rats using nitrogen phosphate specific detector (NPD). (A) blank plasma; (B) plasma from chlorzoxazone treated rats. The retention times of chlorzoxazone and acetaminophen (internal standard) are 4.09 and 5.07 min, respectively.

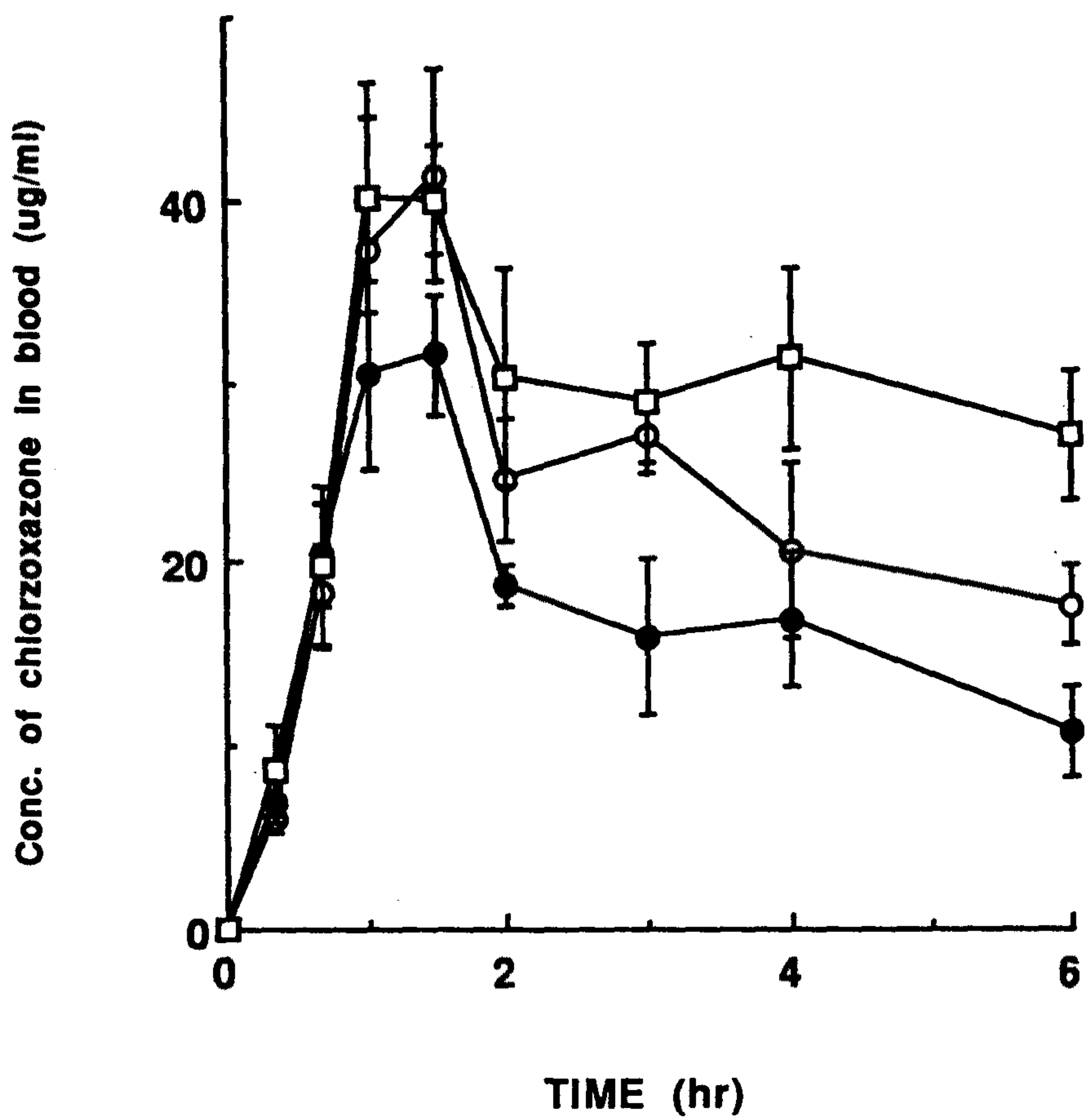


Fig 6. Mean (\pm SD) plasma concentrations of chlorzoxazone (ug/ml) in rats following oral administration of chlorzoxazone (50 mg/kg). Rats were pretreated with ethanol (—●—) or disulfiram (—□—) or nothing (—○—) before chlorzoxazone.

$$C_t = \frac{f \cdot k_a \cdot D}{V(k_a - K)} [e^{-kt} - e^{-k_a t}]$$

C_t : Concentration of chlorzoxazone in plasma at time t.

K_a : apparent first-order absorption rate constant

D : dose

K : apparent first-order elimination constant

V : apparent volume of distribution

이를 이용하여 얻은 약동학적 parameter를 표 2에 나타내었다.

Chlorzoxazone의 urine으로의 배설을 알아보기 위하여 urine내의 chlorzoxazone과 대사체인 6-OH chlorzoxazone의 양을 GC/FID를 이용하여 정량하였다. Urine내의 chlorzoxazone의 양은 사용한 분석 조건에서는 검출이 되지 않았으며 이는 human에서 parent form으로 배설되는 chlorzoxazone의 양이 1%이하라는 보고(2)와 일치한다. β -glucuronidase를 처리하지 않는 urine을 ethylacetate로 추출하여 분석하였을 때 6-OH chlorzoxazone이 검출되지 않은 것으로 보아, 이는 free form으로 배설되지 않고 glucuronide conjugate 형태로 배설되는 현상을 보여주고 있다. Fig. 9에 나타난 것과 같이 시간에 따라 6-OH chlorzoxazone의 urine으로 배설속도 변화를 보면 3시간대에 최대 배설속도($683 \pm 54 \mu\text{g/hr}$)를 나타내었으며 16시간이 경과하면 배설량이 현저히 감소하는 것으로 보아 체내에서 chlorzoxazone의 대사가 빠른 속도로 일어나며 대사가 배설의 rate

Table 2. Pharmacokinetic parameters following oral (50 mg/kg) dose of chlorzoxazone along with other substances.

parameter	normal	EtOH	disulfiram
C_{max} (ug/ml)	31.66 ± 5.05	24.89 ± 3.14	35.74 ± 4.64
T_{max} (hr)	1.87 ± 0.57	1.54 ± 0.44	2.32 ± 0.58
k_a (hr ⁻¹)	0.864 ± 0.424	1.159 ± 0.530	1.095 ± 0.652
K (hr ⁻¹)	0.204 ± 0.136	0.312 ± 0.105	0.114 ± 0.045
AUC (ug*hr/ml)	185 ± 96	129 ± 50	408 ± 349
Urinary excretion 6-OH chlorzoxa- zone (%)	37.6 ± 4.1	46.2 ± 5.7	14.6 ± 2.5

all values are mean ± SD. N=3

-limiting step인 것으로 사료된다. Chlorzoxazone을 경구로 투여하고 36 시간까지의 urine으로 배설되는 6-OH chlorzoxazone의 총량은 투여량의 $37.6 \pm 4.1\%$ 였다. Chlorzoxazone을 경구투여하였을 때 나타나는 혈중농도 변화와 urine으로의 배설을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다. 즉 chlorzoxazone의 분포가 배설보다 빨라서 단순 exponential 감소를 나타내고, 대사는 주로 간에서 일어나며 한개의 major 대사체인 6-OH chlorzoxazone이 생성된다. Chlorzoxazone은 urine으로만 일어난다.

In vitro 실험에서 chlorzoxazone의 대사는 P-450 IIE1에서만 일어나는 것으로 확인되었으며, 따라서 체내의 P-450 IIE1의 activity가 변화되었을 때 chlorzoxazone의 pharmacokinetic의 변화를 알아보기 위하여 P-450 IIE1 inducer인 ethanol과 P-450 IIE1 inhibitor인 disulfiram을 전처리하여 chlorzoxazone의 혈중농도와 urinary excretion의 변화를 조사하여 보았다. Cytochrome P-450 IIE1 효소는 체내에서 약물대사 및 병리학적 측면에서 매우 중요한 역할을 한다. P-450 IIE1은 사람의 경우 음주 및 식생활의 차이점으로 인하여 개체간의 큰 차이를 나타내며 이는 P-450 IIE1에 의해 대사되는 독성물질 또는 약물의 독성 발현에 큰 영향을 미치게 된다. Disulfiram은 aldehyde dehydrogenase inhibitor로서 음주시 체내 acetaldehyde의 축적을 유발함으로써 음주 습관을 치료하는 약물로 사용되었으나 P-450 inhibitor로서도 알려져 왔으며 최근에는 P-450 IIE1 selective inhibitor인 것으로 보고되어 있다(6). Fig. 6과 Fig. 8에서 보는바와 같이 ethanol 처리군에서는 혈중

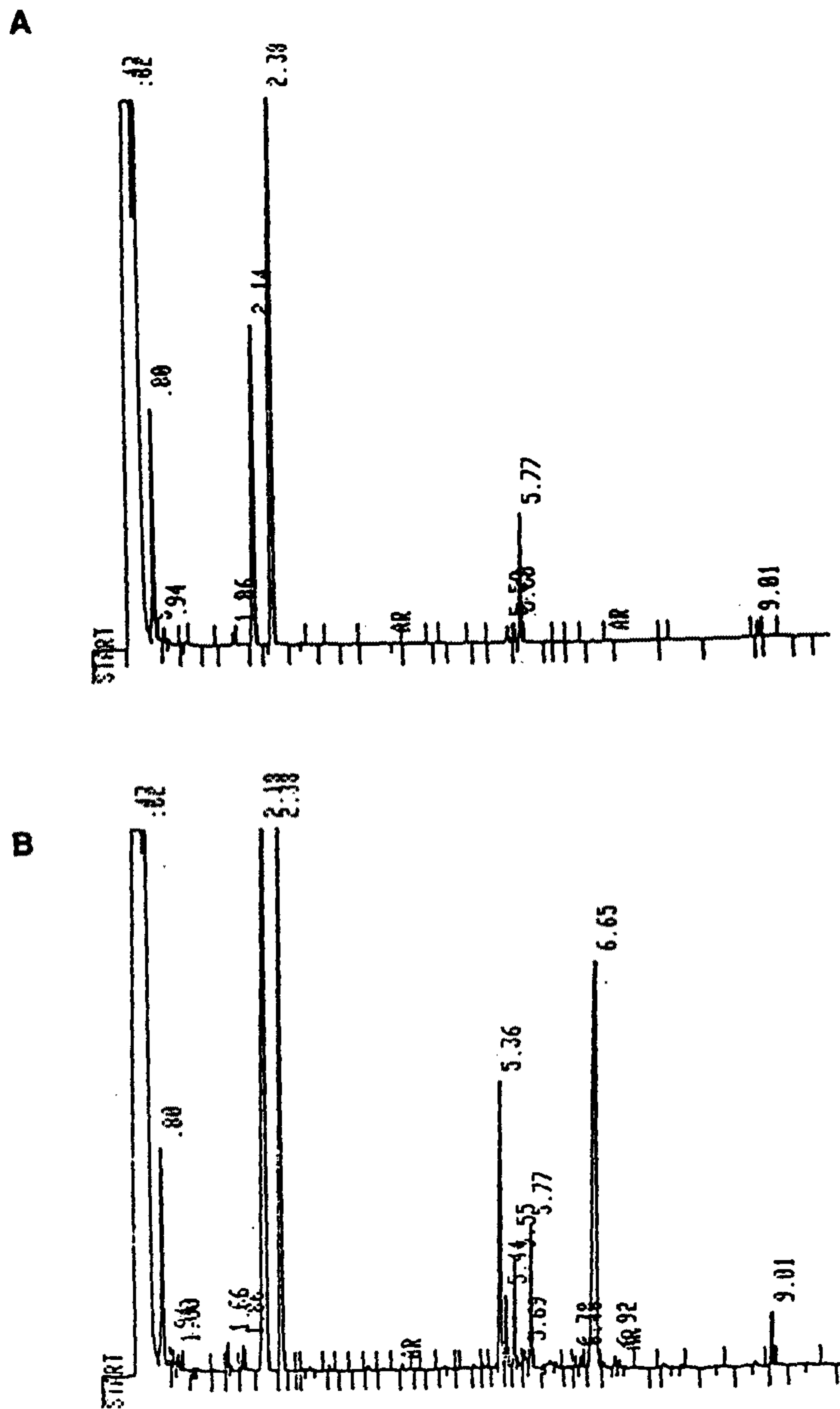


Fig 7. Gas chromatogram of rat urine after the administration of chlorzoxazone (50 mg/kg) to the rats using FID detector. (A) blank urine; (B) urine from chlorzoxazone administered rats. The retention times of 7-hydroxycoumarin (internal standard) and 6-hydroxychlorzoxazone are 5.77 and 6.65 min, respectively.

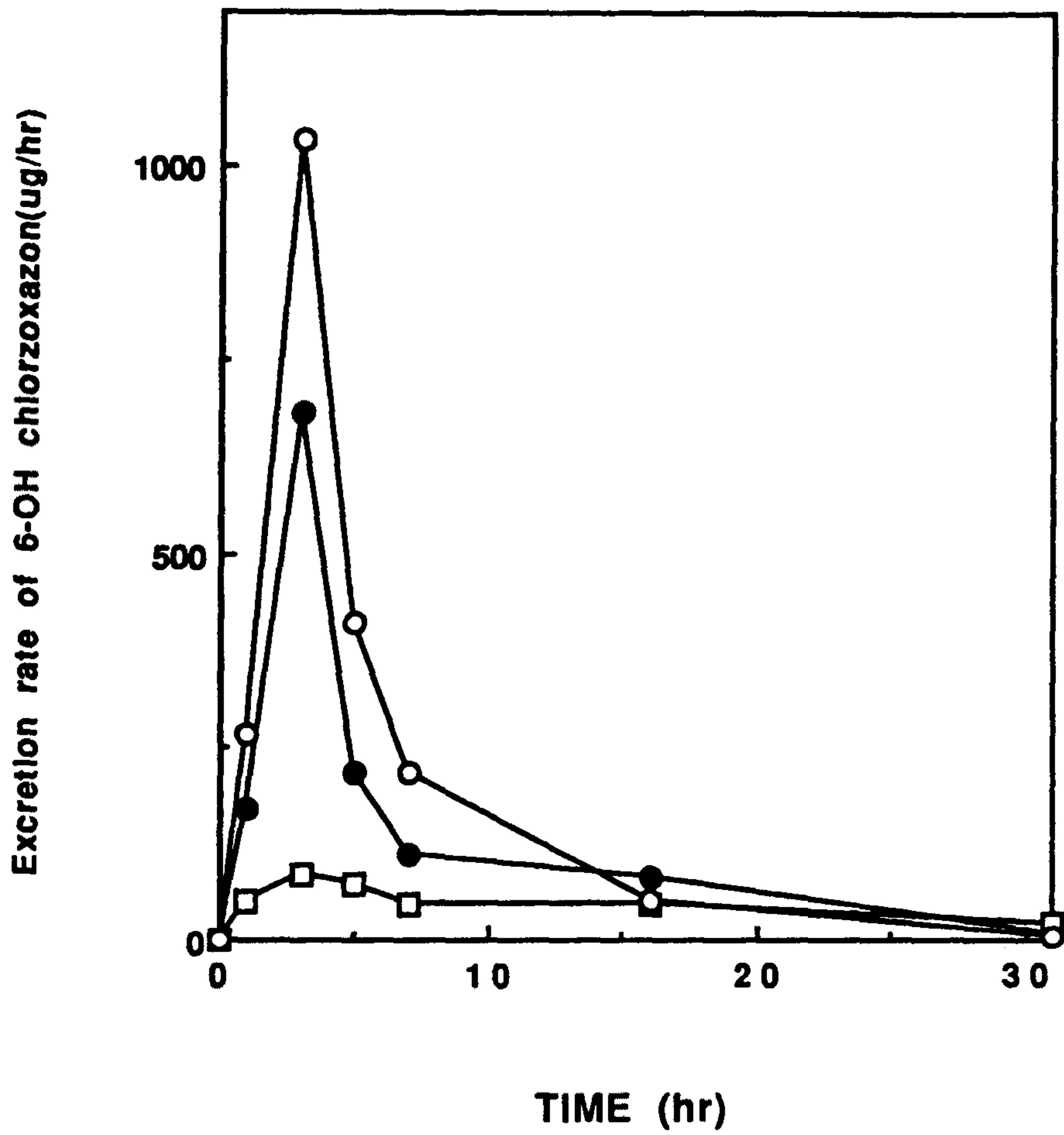


Fig 8. Urinary excretion of 6-hydroxychlorzoxazone in rats following administration of chlorzoxazone (50 mg/kg); no treatment (—●—), ethanol treated group (—○—), and disulfiram treated group (—□—).

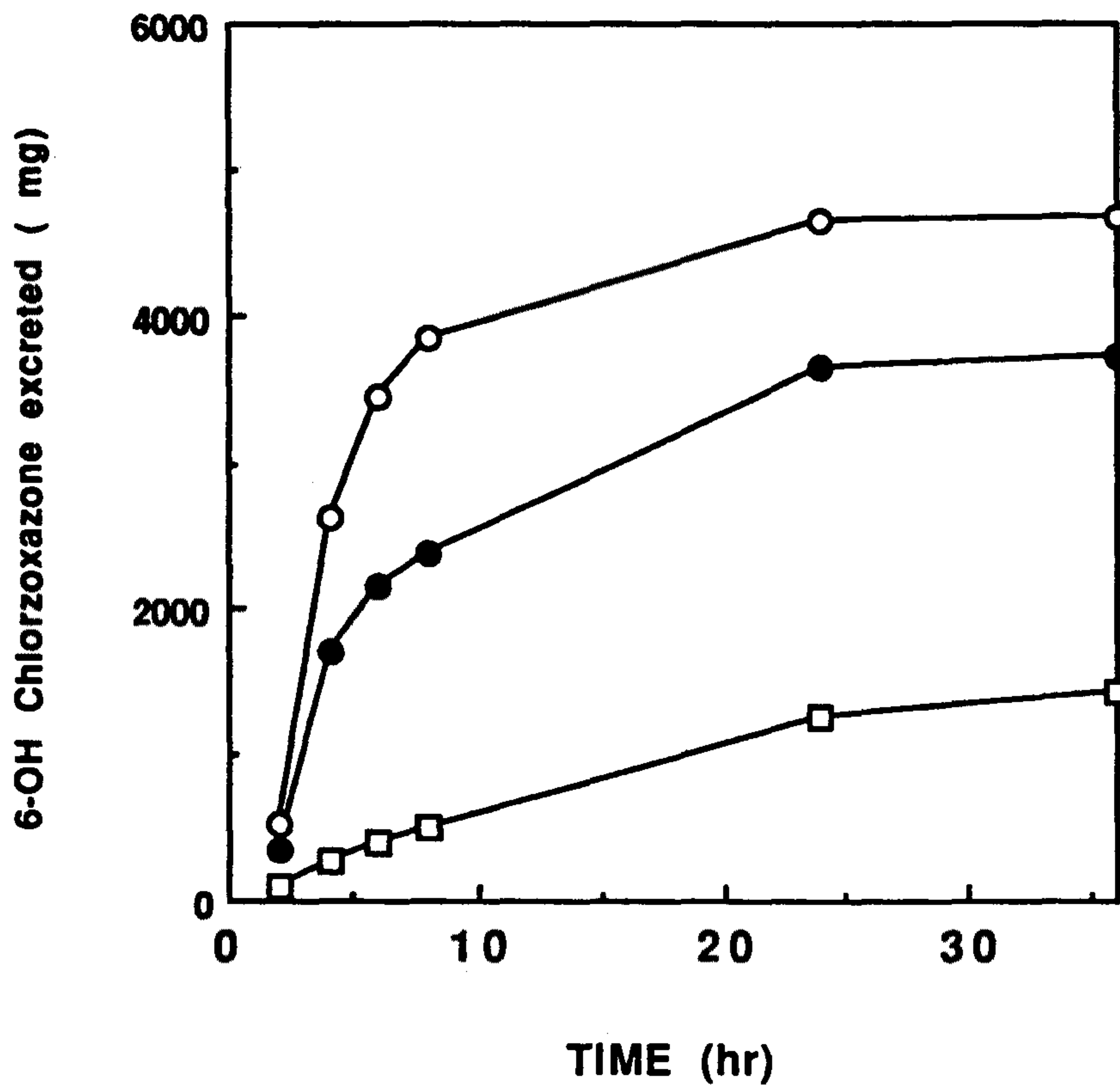


Fig 9. Cumulative urinary excretion of 6-hydroxychlorzoxazone in rats following administration of chlorzoxazone; no treatment (●), ethanol treatment (○), and disulfiram treatment (□).

chlorzoxazone의 농도가 대조군에 비하여 빠른 속도로 감소되었으며 6-OH chlorzoxazone의 urine 배설속도는 증가되었다. disulfiram 처리군에서는 혈중농도 감소 속도가 매우 느렸으며 urine내의 6-OH chlorzoxazone의 양은 현저히 감소하였다.

각 군에서 absorption rate constant는 유의성있는 변화를 보여주지 않았으나 apparent elimination constant 및 AUC는 유의성있는 변화를 나타내는 것으로 보아 이 결과는 체내 chlorzoxazone 대사 효소인 P-450 IIE1 효소의 catalytic activity의 증가 또는 감소에 기인된 것으로 사료된다. Urine내의 6-OH chlorzoxazone의 총 배설량은 대조군의 $37.6 \pm 4.1\%$ 에서 ethanol 처리군에서는 $46.2 \pm 5.7\%$ 로 증가하였고 disulfiram 처리군에서는 $14.6 \pm 2.5\%$ 로 현저히 감소하였다. 일반적으로 약물의 체내 대사속도가 너무 빠르면 혈중 유효농도를 지속시키는데 어려움이 있으며 반대로 대사속도가 억제되면 약물이 체내에 머무르는 시간이 증대됨에 따라 다른 toxic metabolites의 생성을 유발하여 독성을 야기시킬수가 있다. Chlorzoxazone의 경우 side-effect로 hepatic necrosis등 간독성을 유발한다(15). Chlorzoxazone의 독성은 용량 의존성을 나타내지 않는 전형적인 idiosyncratic type 반응이며, 명확하지는 않으나 metabolite에 기인된다고 보고되어 있다(16). 즉 체내에서 P-450 IIE1 효소 활성의 억제로 인하여 6-OH chlorzoxazone으로 대사 경로가 차단되면 다른 대사경로를 통한 알려지지 않은 toxic metabolite로 대사되어 간독성의 유발 위험성이 높아질수 있다.

결론적으로 chlorzoxazone은 체내에서 P-450 IIE1 효소에 의

하여 6-OH chlorzoxazone으로 대사되며, P-450 IIE1의 catalytic activity에 비례하여 urine으로 배설이 된다고 사료된다. 또한 chlorzoxazone이 P-450 IIE1에 의해서만 selective하게 대사됨으로 urinary 6-OH chlorzoxazone의 배설량을 정량함으로써 체내의 P-450 IIE1에 activity를 측정할수 있는 매우 좋은 non-invasive method로 활용될수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Axoury, F.J.(1982) Double blind comparison of Parafon Forte tablet in the treatment of musculoskeletal back conditions. *Curr. Ther. Res.* 26, 189-197.
2. Conney, A.H. and Burns, J.J.(1959). Physiological disposition and metabolic fate of chlorzoxazone(Paraflex) in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 128, 340-343.
3. Peter, R., Bocker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., and Yang, C.S.(1990) Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450 IIE1. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 566-573.
4. Guengerich, F.P.(1987) Cytochrome P-450 enzymes and drug metabolism. In *progress in Drug Metabolism*, Vol. 10, Chap 1, ed J.W. Bridges, L.F. Chasseaud, G.G. Gibson, pp 1-54. London : Taylor & Francis.
5. Wislocki, P.G., Miwa, G.T., Lu, A.Y.H.(1980) Reactions catalyzed by the cytochrome P-450 system. In *Enzymatic Basis of Detoxication*, ed W.B. Jakoby, pp. 135-82. New York : Academic.
6. Guengerich, F.P., Kim, D.H., and Iwasaki, M.(1991) Role of human cytochrome p-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 168-179.

7. Koop, D.R., Laethem, C.L., and Schnier, G.C.(1989) Identification of ethanol-inducible P-450 isozyme 3a(P-450 IIE1) as a benzene and phenol hydroxylase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98, 278-288.
8. Yoo, J.S.H., Cheung R.J., Pattten, C.J., Wade, D., and Yang, C.S. (1987) Nature of N-nitrodimethylamine demethylase and its inhibitors. *Cancer Res.* 47, 3378-3383.
9. Kim, D.H. and Guengerich, F.P.(1990) Formation of the DNA adduct S-[2-(N⁷-guanyl)ethyl] glutathione from ethylene dibromide : effects of modulation of glutathion and glutathione S-transferase levels and lack of a role for sulfation. *Carcinogenesis* 11, 419-424.
10. Omura, T. and Sato, R.(1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378.
11. Metzler, C.M., Elfring, G.L., and McEwen, A.J.(1974) "A User's manual for NONLIN and associated programs".
12. Gonzalez, F.J.(1989) The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol. Rev.* 40, 243-297.
13. Twele, V.R., and Spitteller, G.(1982) Identifizierung von chlorzoxazon-Metaboliten in menschlichen Urin. *Arzneim. Forsch.* 32, 759-763.
14. Yang, C.S., Yoo, J.S.H., Ishizaki, H., and Hong, J.(1990)

Cytochrome P-450 IIE1 : role in nitrosamine metabolism and mechanism of regulation. *Drug. Metab. Rev.* 22, 147-159.

15. Powers, B.J., Cattau, E.L., and Eimmerman, H.J.(1986) Chlorzoxazone hepatotoxic reactions : an analysis of 21 identified or presumed cases. *Arch. Intern. Med.* 146, 1183-1186.
16. Zimmerman H.J.(1978) *Hepatotoxicity.* East Norwalk, Conn. Appleton Century-Crofts, p 430.