

랫트에 있어서 페노바르비탈 전처리가 딜티아젼의 생체내 동태에 미치는 영향

이용복[†] · 고익배 · 이민화*

전남대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학
(1992년 9월 7일 접수)

The Effect of Phenobarbital Pretreatment on the Pharmacokinetics of Diltiazem in Rats

Yong-Bok Lee, Ik-Bae Koh and Min-Hwa Lee*

College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
and *College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received September 7, 1992)

The influence of phenobarbital (PB) pretreatment (75 mg/kg/day, i.p. for 4 days) on the pharmacokinetics of diltiazem (DTZ) and its metabolite, desacetyldiltiazem (DAD), was investigated in rats. DTZ was injected via femoral (3 mg/kg) or portal (10 mg/kg) vein to the control and PB-pretreated rats. DAD was also injected separately via femoral (3 mg/kg) vein to both groups of rats. The intrinsic hepatic plasma clearance of DTZ was found to be significantly increased (6.8-fold) by the PB pretreatment. However, the fraction of an intravenous DTZ dose converted to DAD (F_{mi}) was only slightly (6%) increased and calculated metabolic rate constant of DTZ to DAD was not affected by the pretreatment. On the other hand, plasma free fraction of DTZ was increased (1.8-fold) from $4.24 \pm 0.25\%$ to $7.45 \pm 0.54\%$ by the pretreatment. However, the 1.8-fold increase in the free fraction of DTZ would not explain the 6.8-fold increase in the hepatic intrinsic clearance of DTZ. Therefore, the increase in either the hepatic blood flow or the metabolism other than to DAD was expected as the probable mechanism(s) of the increased hepatic clearance of DTZ. Sequential metabolism of DAD to further metabolites, however, would be a more potential cause of the apparently unchanged metabolism of DTZ to DAD by the PB-pretreatment.

Keywords—Pharmacokinetics, Diltiazem, Desacetyldiltiazem, Phenobarbital, Plasma protein binding, Hepatic intrinsic clearance, Metabolism.

딜티아젼(염산염, 이하 DTZ라 함)은 심장과 혈관 평활근 세포막내로의 칼슘이온 유입통로를 차단함으로써 협심증, 고혈압, 부정맥 및 편두통 등과 같은 심·혈관계 질환 치료에 널리 사용되는 칼슘길항제로서¹⁾ 사람과 동물의 간에서 대사되어 수 많은 산성과 중성 및 염기성 대사체를 생성한다²⁻⁵⁾고 알려져 있다. 또한, DTZ는 탈아세틸화, N-탈메틸화, O-탈메틸화, 벤젠고리수산화 및 산성포합반응 등의 대사경로를 통하여 N-monodesmethyldiltiazem(M_A),

desacetyldiltiazem(DAD), desacetyl-N-monodesmethyldiltiazem(M_2), desacetyl-O-desmethyldiltiazem(M_4)와 desacetyl-N,O-desmethyldiltiazem(M_6) 등과 같은 염기성 대사체들을 생성하며 이들중 M_A 와 DAD는 관상동맥 혈관확장 효과를 나타낸다고 보고⁶⁾되어 있다.

한편, DTZ은 랫트의 간에서 카르복실 에스테라제에 의해 가수분해되어 DAD로 탈아세틸화되며 아스피린은 DTZ 탈아세틸라제 활성을 감소시키나

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

페나세틴이나 리팜피신은 활성도를 변화시키지 않는다⁷⁾고 한다.

대표적인 간대사효소 유도제인 페노바르비탈은 간세포내 사이토크롬 P₄₅₀ 산화효소계^{8,9)}와 에스테라제¹⁰⁾ 및 글루쿠론산 전이효소¹¹⁾와 같은 포합효소들을 활성화시킬 뿐만 아니라 간혈류량 및 담즙유량을 증가¹²⁻¹⁵⁾시키기 때문에 병용투여된 다른 약물들의 클리어란스를 변화시킨다.

본 연구에서는 임상에서 병용되는 페노바르비탈이 DTZ의 체내동태에 미치는 영향을 조사하였다. 즉, 페노바르비탈 나트륨염(이하 PB라 함) 전처리(75 mg/kg/일, 4일간 복강내 투여)가 정맥내(3 mg/kg) 및 간문맥내(10 mg/kg)로 투여된 DTZ의 혈장중 농도추이와 대사물 DAD의 혈장중 농도추이에 미치는 영향을 연구하였다. 또, PB전처리가 정맥내 투여(3 mg/kg)된 DAD의 혈장중 농도추이에 미치는 영향을 약물속도론적으로 검토하였다.

실험 방법

시약 및 기기

PB(대원제약, KP V), DTZ(한일약품, KP V), DAD 염산염(한일약품), 염산디펜히드라민(국제약품, KP V), heptane sulfonic acid(Sigma사), triethylamine(Aldrich사) 및 HPLC용 메탄올, 아세트니트릴(Merck사) 및 n-헥산(Tedia사) 등을 사용하였으며 분석 기기로서 미량원심분리기(Kokusans사, H-31), HPLC(Pye-Unicam, PU 4850) 및 원심분리형 한외여과기(Amicon사, MPS-1) 등을 사용하였다.

실험동물

서울대학교 병원의 실험동물 사육장에서 분양받은 체중 100~150g의 웅성 위스타 랫트를 각 실험군으로 분류하고 물과 사료(제일사료사)를 자유로이 공급하여 2주 이상 동일조건(온도 20~25°C, 상대 습도 50~60%)에서 사육한 후 체중 200~300g 범위의 것을 사용하였다.

실험동물의 전처리

PB 750 mg을 생리식염수 100 ml에 녹인 액을 랫트 kg당 10 ml씩 하루에 한번 4일간 복강내 투여한 PB 전처리군과, 같은 방법으로 생리식염수만을 복강내 투여한 대조군으로 나누어 실험하였다. 두 군 모두 최종투여 후 24시간이 지난 다음 실험을

진행하였다.

Hematocrit(HCT) 측정

각 실험군 모두에서 약물투여 직전과 채혈이 끝난 시점에서 얻어진 선혈을 채취한 즉시 헤파린이 기벽에 묻어 있는 모세관(Superior®, W-Germany, 전장 75 mm, 내경 1.1~1.2 mm)에 약 7 cm 높이로 채우고 모세관의 한쪽 끝을 실리콘 왁스(Superior®, W-Germany)로 막고 12,000 rpm(10,000g)에서 5분간 원심분리한 뒤, 전체 혈액 길이에 대한 적혈구 부위 길이의 비율로 환산하여 표시하였다(Wintrobe법¹⁶⁾).

혈액-혈장 약물농도비(R_b)

생리식염수에 녹인 헤파린(1000 IU/3 ml/kg)을 전처리한 랫트(6마리)에 투여한 후 경동맥에서 선혈을 채혈하여 합하였다. 이로부터 혈액 2 ml씩을 정확히 취하고 여기에 증류수에 녹인 여러가지 농도의 DTZ액 20 µl를 가하여 혈중 DTZ의 농도가 200, 400, 1000, 2000 ng/ml가 되도록 하였다. 37°C에서 예비 실험한 결과 DTZ의 혈구로의 분배평형은 3분 이내에 도달하고 10분간 DTZ의 DAD로의 대사율은 약 1% 이내로 무시할 수 있었으므로 충분히 평형에 도달할 수 있도록 10분간 약하게 진탕한 후 12,000 rpm(10,000g)에서 2분간 원심분리하여 얻어진 혈장중 DTZ 농도로부터 R_b값을 계산하였다.

혈장단백결합

예비실험 결과 37°C 혈액에서 시간이 경과함에 따라 DTZ가 DAD로 대사되기 때문에 장시간 평형 투석에 따른 혈장에서의 대사가능성을 배제하기 위해 랫트(6마리)의 경동맥으로부터 선혈을 채혈한 후 곧바로 원심분리하여 얻은 혈장을 한외여과법^{17,18)}에 따라 실험하였다. YMT막(Amicon사)으로 나누어진 원심분리형 한외여과기(Amicon사, MPS-1)의 시료 투입구에 혈장 300 µl와 여러 농도의 DTZ액 10 µl를 가하고 37°C에서 3분간 약하게 진탕하여 평형에 도달하게 한 후 1000g에서 5분간 원심분리하였다. 여액의 부피가 가한 혈장총액의 20% 미만인 되도록 하여¹⁹⁾ 얻어진 여액중의 DTZ 농도를 측정하였으며 최초 혈장중 약물농도에 대한 여액중의 비결합형 약물농도의 비율로서 혈장중 비결합형 분율(f_p)을 계산하였다. 한편, 한외여과 중의 혈장중 pH는 7.4로 변화가 없었으며 혈장에서의 DTZ의 DAD로의 대사와 DTZ의 YMT막으로의 흡착은 무시할 수 있었다.

약물의 투여

24시간 절식시킨 상기 전처리 실험동물을 가볍게 에텔 마취시킨 후 왼쪽 대퇴 동·정맥에 PE-50 폴리에틸렌관(Intramedic®, Clay Adams사)을 삽입하였다. 간문맥투여군에서는 간문맥에 25게이지 주사침이 장치된 폴리에틸렌관을 간문맥혈류가 저해받지 않도록 삽입하고 cyano-acrylate 접착제(Aron-α®, Toagasei Chemical Industry사)를 사용하여 고정시킨 후 개복부위를 봉합하였다. 체온은 직장온도 probe와 온도조절기 및 heating pad(Bioscience사, CFP 8185)를 통하여 전실험기간 37°C로 유지하여 주었으며 봉합 후 30분간 방치하여 마취에서 회복되었을 때 실험하였다. 대조군과 PB전처리군 랫트에 DTZ 또는 DAD의 수용액을 kg당 3 mg(대퇴정맥 투여군), 또는 kg당 10 mg(간문맥 투여군)의 용량으로 20초에 걸쳐 투여한 후 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240분(간문맥투여군에서만)에 대퇴동맥으로부터 혈액 약 0.3 ml를 취하고 관속에 남아 있는 혈액은 헤파린액(20 IU/ml)을 사용하여 동물체내에 밀어 넣었다. 마지막 채혈이 끝난 직후 방광내 요를 주사침을 통하여 뽑아내어 실험기간 동안 배설된 요와 합하여 배설된 요중 총배설량을 구하였다. 각군의 실험동물 수는 6~8마리이었다.

DTZ와 DAD의 동시정량

혈장중 DTZ와 DAD의 농도는 Verghese 등²⁰⁾과 Wines 등²¹⁾의 HPLC 방법을 다소 수정하여 Table I의 조건에 따라 측정하였으며 내부표준물질로서 디펜히드라민을 사용한 혈장시료의 추출조건은 다음과 같다. 혈장시료 100 μl에 내부표준물질이 녹아 있는 메탄올 용액(1.25 μg/ml) 40 μl를 가한 후 n-헥산 : 이소아밀알코올 용액(98 : 2) 2 ml를 가하여 30분간 진탕추출한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 이 상정액을 100 μl 0.01 N 염산용액이 들어 있는 시험관에 가하여 30분간 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 유기용매층을 제거하고 수용액 50 μl를 취하여 HPLC에 주사하였다. 검량선은 혈장 100 μl에 메탄올에 녹아 있는 여러농도의 DTZ와 DAD 용액을 각각 가하여 상기의 추출조건에 따라 추출한 후 내부표준물질에 대한 시료물질의 피크높이비로서 작성하였으며 분석조건을 검정하기 위하여 일내변동과 연속 3일간의 일간변동을 구하였다. 한편, 요중 DTZ과 DAD의

농도는 혈장중 DTZ과 DAD의 농도정량법에 따라 정량하였다.

통계처리 및 약물속도론적 분석

시간 0부터 ∞까지 혈장중 약물농도-시간 곡선하 면적(AUC)은 trapezoidal 방법에 따라 계산한 값과 최종 채혈시점의 혈장중 약물농도를 최종소실상 기울기로 나누어 외삽하여 구한 값을 더하여 구하였다. 다른 약물속도론적 파라메타 즉 전신 혈장클리어런스(CL), 1차 moment 혈장중 약물농도-시간 곡선하 면적(AUMC), 평균 체류시간(MRT), 정상상태에서의 겉보기 분포용적(V_{ss}), 요중 미변화체 배설분율(f_u), 신장 클리어런스(CL_R), 신장의 클리어런스(CL_{NR}), 간내 평균 체류시간(MRT_h) 및 간초회통과율(F_a)은 일반적인 방법²²⁾에 따라 다음 수식에 의해 구하였다.

$$CL = \text{Dose}/AUC \tag{1}$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C_p \, dt \tag{2}$$

$$MRT = AUMC/AUC \tag{3}$$

$$V_{ss} = CL \cdot MRT \tag{4}$$

$$f_u = X_u/\text{Dose} \tag{5}$$

$$CL_R = X_u/AUC \tag{6}$$

$$CL_{NR} = CL - CL_R \tag{7}$$

$$MRT_h = MRT_{pv} - MRT_{iv} \tag{8}$$

$$F_a = AUC_{pv} \cdot \text{Dose}_{iv}/AUC_{iv} \cdot \text{Dose}_{pv} \tag{9}$$

이때, C_p는 시간 t에서의 DTZ나 DAD의 혈장중 약물농도를 의미한다. X_u는 시간 ∞까지 배설된 요중 총배설량을 의미하나 본 연구에서는 3시간 이후의 요중배설량은 거의 무시할 수 있었기 때문에 3시간까지의 배설량을 X_u값으로 가정하였다. 사용된 첨자 *iv*와 *pv*는 대퇴정맥내 투여와 간문맥내 투여를 의미한다.

한편, 투여량 범위내에서는 DTZ이나 DAD의 대사가 포화되지 않으며, 대사체들의 총배설속도는 DTZ의 총배설속도보다도 훨씬 크며, DTZ으로부터 DAD가 형성되는 속도(K_m)는 체순환혈류의 이행속도와 동일하다고 가정하여, DTZ의 대사분율(F_m)과 DTZ이 DAD로 대사되는 분율(F_{mi}) 및 K_m값(K_{m,ca})을 다음 수식에 따라 구하였다.²³⁾

$$F_m = 1 - f_u \quad (10)$$

$$F_{mi} = (AUC_{m,p})_{iv} \cdot (Dose_m)_{iv} / (AUC_m)_{iv} \cdot (Dose)_{iv} \quad (11)$$

$$K_{m,cal} = 0.693 F_{mi} / t_{1/2,\beta} \quad (12)$$

이때, $AUC_{m,p}$ 는 DTZ 투여후 혈장중 DAD 농도-시간곡선하 면적을, AUC_m 은 DAD 투여 후의 AUC를 의미한다.

전신 혈장클리어런스(CL)와 정상상태에서의 겔보기 분포용적(V_{ss})을 제외한 모든 측정치와 계산치는 산술평균±표준오차(S.E.)로 표시하였으며 CL과 V_{ss} 는 산술평균 대신 조화평균값²⁴⁾을 사용하였다. 각 군간의 차이에 관한 검정은 unpaired Student's t-test에서 $p < 0.05$ 인 경우만을 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

DTZ과 DAD의 HPLC 동시정량

랫트의 대조혈장, 요, DTZ와 DAD 및 내부표준 물질인 디펜히드라민을 스파이킹한 랫트혈장 및 DTZ 투여 후 90분제의 랫트혈장에 대한 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 각 물질의 피크 출현 시간은 DAD는 5.3분, DTZ는 6.5분, 디펜히드라민은 8.7분으로서 각 물질의 분리상태는 양호하였다. 신호대 잡음비(S/N ratio)를 4로 하였을 때 정량한도는

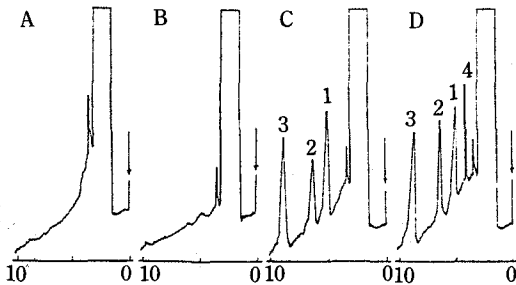


Figure 1—Chromatograms of: (A) blank rat plasma; (B) blank rat urine; (C) rat plasma spiked with diltiazem, desacetyldiltiazem and diphenhydramine (internal standard); (D) plasma sample 90 min after intravenous administration of diltiazem (3 mg/kg). Detector setting: 0.005 a.u.f.s., Recorder setting: 10 mV, ↓ = Injection time. Peaks: 1=DAD; 2=DTZ; 3=Diphenhydramine; 4=Unknown metabolite.

약 10 ng/ml이었으며, 수용액의 평균피크 높이에 대한 추출 시료의 피크 높이 비로부터 구한 추출 회수율(%)은 DTZ은 84.2 ± 3.3 , DAD는 90.4 ± 3.6 이었다. 혈장시료에 대해 구한 DTZ 및 DAD의 검량선은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 각각의 혈장중 농도 20~4000 ng/ml 범위에서 양호한 직선성을 나타냈다. 이 농도범위에 있어서 DTZ와 DAD의 일내변동계수(C.V.)는 9.3% 이하, 일간변동계수는 8.9% 이하이었다.

DTZ의 혈구분배 및 혈장단백결합

Fig. 3과 Table II에 나타낸 바와 같이 혈중 DTZ의

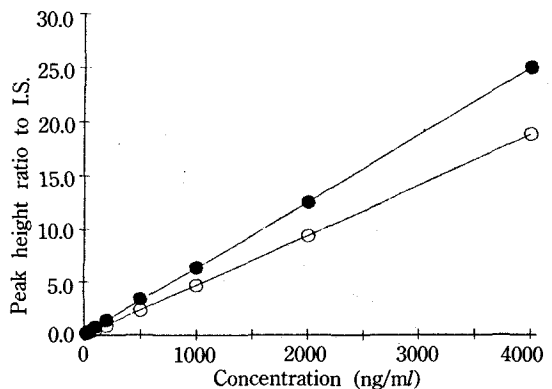


Figure 2—Calibration curves of DTZ(○) and DAD(●) in plasma by the peak height ratio mode (n=3). Linear regression equation: DTZ, $y = 0.00471x - 0.0494$, $r = 0.999$ ($p < 0.01$); DAD, $y = 0.00623x + 0.0918$, $r = 0.999$ ($p < 0.01$).

Table I—HPLC Conditions for the Determination of DTZ and DAD in Rat Plasma and Urine

Parameters	Condition
Mobile phase	Acetonitrile-water-MeOH (50:45:5) (1.5 g heptane sulfonic acid, 8 g sodium acetate, 0.06 ml-triethylamine/l, pH 6.5 with glacial acetic acid)
Stationary phase	Spherisorb® 5 µm ODS (reverse phase, 4.6 mm×250 mm)
Flow rate	1.5 ml/min
Detector	UV (237 nm)
Pressure	105~108 bar
Column temperature	50°C
Injection volumn	50 µl

농도 200~2000 ng/ml 범위내에서는 10분내 혈구 분배비, 즉 혈액/혈장중 농도비(R_B)는 PB전처리의 영향을 받지 않았다.

한외여과법에 따라 여러 혈장중 DTZ 농도에 대해 구한 혈장단백비결합분율(f_p)값을 Fig. 4와 Table II에 나타냈다. 대조군에서 평균 f_p 값은 $4.24 \pm 0.25\%$ 였으며 PB 전처리로 인하여 $7.45 \pm 0.54\%$ 로 유의성 ($p < 0.01$)있게 증가함을 알 수 있었다. 한편, ^{14}C -DTZ를 사용하여 평형투석법에 따라 실험한 Nakamura 등²⁵⁾의 결과에 따르면 랫트혈장에서의 f_p 값은 $16 \pm 0.2\%$ 로 본 실험결과와 차이를 보이고 있다. 이는 장시간의 평형투석에 의해 단백질이 변성되어 그 친화도에 변화가 생겼거나 DTZ이 DAD로 대사된 때문일 수도 있겠으나 이 차이의 원인은 앞으로 규명되어야 하겠다.

PB 전처리를 하면 혈장중 총단백량이 증가하고²⁶⁾ α_1 -acid glycoprotein양이 증가한다.²⁷⁾ 따라서 DTZ의

혈장단백은 PB 전처리에 의해 증가하고 따라서 f_p 는 감소될 것으로 기대된다. 그러나, 본 연구에서는 PB전처리로 인하여 DTZ의 f_p 값이 오히려 유의성 있게 증가하였다. 이는 DTZ와 혈장단백간의 친화도나 결합자리수에 변화가 생겼거나 혈장중 또다른 치환요소가 발생했기 때문일 가능성을 시사하고 있다.

DTZ과 DAD의 혈장중 약물농도 추이

DTZ를 대퇴정맥내(3 mg/kg) 및 간문맥내(10 mg/kg)로 각각 따로 투여하여 얻어진 혈장중 DTZ과 그 대사체인 DAD의 농도추이는 각각 Fig. 5와 6과 같다. 이 그림에서 실선은 비선형 최소자승 회귀분석 프로그램인 RSTRIP²⁸⁾에 의해 stripping하여 초기치를 구한 후, 가중치 2(혈장중 약물농도 제곱의 역수)를 사용하여²⁹⁾ curve fitting한 결과이다. Fig. 5와 6 으로부터 얻은 약물속도론적 파라메타를 Table III과 IV에 나타냈다. DAD를 대퇴정맥내 투여(3 mg/kg)한 후의 혈장중 농도추이 및 속도론적 파라메타를 각각 Fig. 7 및 Table V에 나타냈다.

Table III~V에서 보듯이 대조군 랫트에 있어서 DTZ의 전신혈장클리어런스(CL)는 40.94 ± 1.72 ml/min/kg로서 이는 Kolle 등³⁰⁾이 보고한 사람에 있어서의 CL값 11.5 ± 1.8 ml/min/kg보다는 훨씬 크게 나타났으나 Piepho 등³¹⁾이 보고한 개에 있어서의 CL값 46.1 ± 4.8 ml/min/kg와는 비슷하게 나타났다. 이는 동물 종에 따라 DTZ의 대사·배설 등이 다

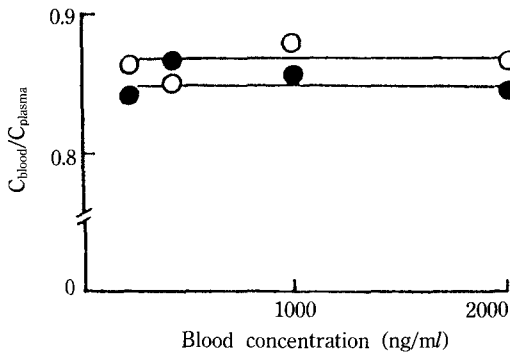


Figure 3—Distribution of diltiazem into red blood cells of control(○) and PB-pretreated(●) rats. Each point represents the mean value of three independent experiments and solid lines are the means of each experimental group.

Table II—Effect of Phenobarbital Pretreatment on the Blood-to-plasma Concentration Ratio (R_B) and the Plasma Protein Binding of DTZ in Rats*

	Control	PB-pretreated
R_B	0.87 ± 0.04	0.85 ± 0.03
Free fraction (%) ^a	4.24 ± 0.25	$7.45 \pm 0.54^*$
Hematocrit	0.47 ± 0.01	0.48 ± 0.01

Phenobarbital sod.(75 mg/kg) was intraperitoneally administered to rat once a day for four days.

^aCalculated by (free/free + bound) concentration $\times 100$.

*Mean \pm S.E. of twelve experiments. * $p < 0.01$

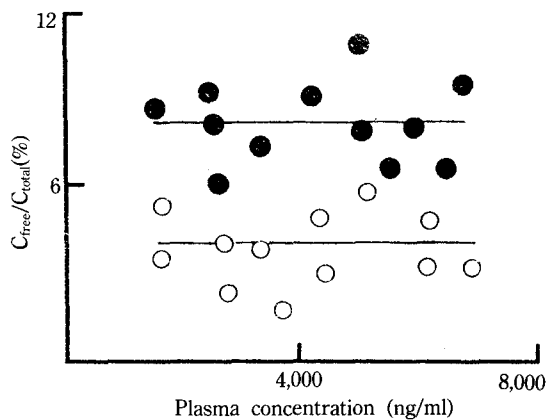


Figure 4—Plasma protein binding of diltiazem in control (○) and PB-pretreated(●) rats by centrifugal ultrafiltration method. Solid lines are the means of each experimental group.

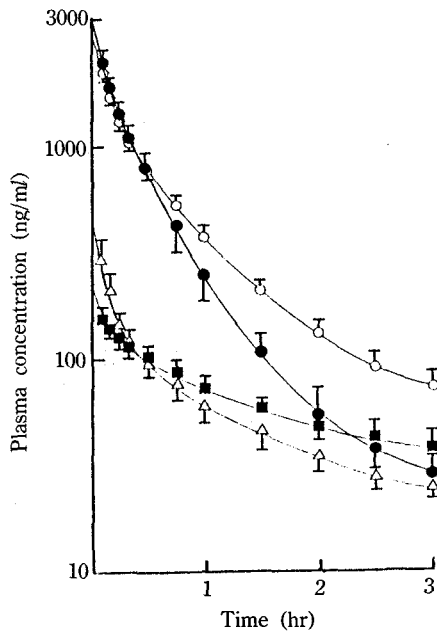


Figure 5—Mean arterial plasma concentration-time profiles of DTZ and its metabolite, DAD, after femoral vein bolus administration of DTZ (3 mg/kg) to rats (n=6). Each solid line was calculated by RSTRIP²⁸. Vertical bar represents the standard error of the mean. Keys: -○-, control DTZ; -■-, control DAD, -●-, PB-pretreated DTZ; -△-, PB-pretreated DAD.

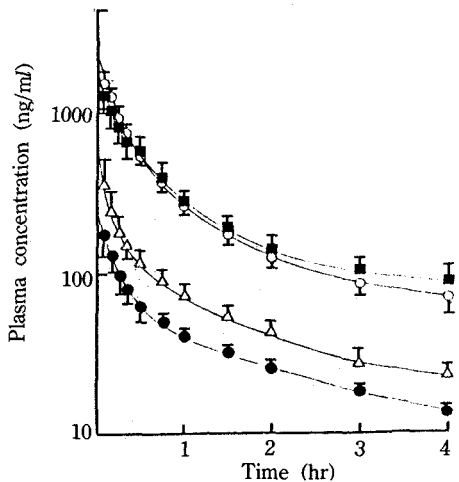


Figure 6—Mean arterial plasma concentration-time profiles of DTZ and its metabolite, DAD, after portal vein bolus administration of DTZ (10 mg/kg) to rats (n=6~8). Each solid line was calculated by RSTRIP²⁸. Vertical bar represents the standard error of the mean. Keys: -○-, control DTZ; -■-, control DAD, -●-, PB-pretreated DTZ; -△-, PB-pretreated DAD.

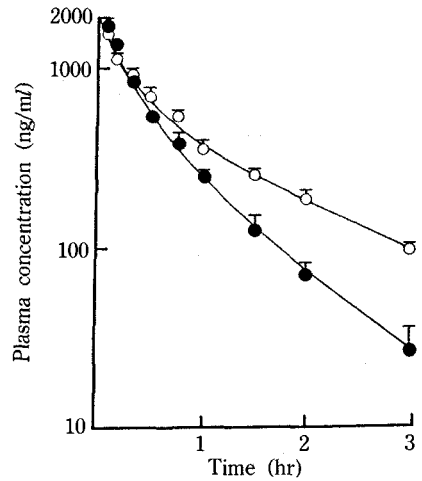


Figure 7—Mean arterial plasma concentration-time profiles of DAD after femoral vein bolus administration of DAD (3 mg/kg) to rats (n=6). Each solid line was calculated by RSTRIP²⁸. Vertical bar represents the standard error of the mean. Keys: -○-, control DAD; -●-, PB-pretreated DAD.

르게 나타나기 때문으로 사료되었다. PB전처리로 인하여 DTZ와 DAD의 CL값이 유의성($p < 0.01$)있게 증가하고 V_{SS} 는 DTZ에서는 차이가 없었으나 DAD에서는 유의성($p < 0.01$)있게 감소하고 있다. 신클리어란스는 PB전처리로 인하여 DTZ와 DAD 모두에서 유의성($p < 0.01$)있게 감소하고 있지만 CL값에 대한 분율이 모두 0.14% 이하로 그 변화는 무시할 수 있었으며 이는 DTZ의 신배설분율은 0.2~4% 정도이고 DAD는 0.3~0.8%라는 Morselli 등³²⁾이 보고한 사람에서의 결과와 비슷하였다.

한편, 이들 결과를 이용하여 MRT_h 및 bioavailability 등을 계산한 결과를 Table VI에 나타냈다. DTZ의 대사분율(F_m)이 거의 1에 가까운 것으로부터 정맥투여된 DTZ는 거의 모두 대사체로 변화하고 DTZ가 DAD로 변화된 분율(F_{mi})이 0.257로 나타나는 것으로부터 DTZ는 DAD 이외의 다른 대사체로 변화하고 있음을 알 수 있었다. 실제로 Sugawara 등³⁾에 의하면 DTZ는 N-탈메칠화를 통하여 산성대사체로 변화한다고 한다.

PB전처리로 인하여 간고유대능이 활성화됨에 따라 간문맥내 투여로부터 구한 DTZ의 간고유클리어란스값이 6.76배 증가하나 F_m 가 0.272로 약 6%만이 증가하고 DTZ로부터 DAD로 대사되는 속도

Table III—Effect of Phenobarbital Pretreatment on the Pharmacokinetics of DTZ after Femoral Venous Injection to Rats (3 mg/kg)*

Parameters	Control	PB-pretreated
AUC (ng·min/ml)	73187.3±3065.5	54715.1±3217.6*
CL (ml/min/kg)	40.94±1.72	55.54±3.74*
MRT (min)	64.90±2.29	46.24±1.63*
V _{SS} (l/kg)	2.49±0.14	2.52±0.08
t _{1/2,β} (min)	59.6±2.7	68.0±3.8*
X _u (μg/kg) ^f	11.4±2.9	2.6±0.7*
f _u (%) ^b	0.38±0.08	0.09±0.02*
CL _R (ml/min/kg)	0.14±0.08	0.04±0.01*
CL _{NR} (ml/min/kg)	40.62±1.64	55.37±3.82*
AUC _{m,p} (ng·min/ml) ^c	19675.3±1548.8	15347.7±1062.5*
X _{u,m,p} (μg/kg) ^d	1.65±0.30	0.46±0.19*

All parameters were calculated by statistical moment analysis. ^aX_u is the urinary excreted amounts of DTZ upto 3 hours. ^bUrinary excreted fraction (f_u, %) calculated by X_u/administered dose. ^cAUC_{m,p} is the area under the concentration-time curve of DAD after DTZ administration. ^dX_{u,m,p} is the urinary excreted amounts of DAD upto 3 hours after DTZ administration. *Mean±S.E. (n=6~8), *p<0.01

Table IV—Effect of Phenobarbital Pretreatment on the Pharmacokinetics of DTZ after Portal Venous Injection to Rats (10 mg/kg)

Parameters	Control	PB-pretreated
AUC (ng·min/ml)	70888.5±5581.4	10617.8±467.3*
CL (ml/min/kg)	141.70±10.44	958.36±42.55*
MRT (min)	144.91±10.18	148.85±7.82
X _u (μg/kg) ^f	2.5±1.1	0.8±0.3*
f _u (%) ^b	0.025±0.007	0.008±0.002*
AUC _{m,p} (ng·min/ml) ^c	78169.0±4143.8	18939.8±1084.9*
X _{u,m,p} (μg/kg) ^d	3.5±1.7	1.20±0.47*

All parameters were calculated by statistical moment analysis and expressed as mean±S.E. of 6~8 experiments. For the meaning of a, b, c, d and *, see Table III.

(K_{m,cal})가 거의 비슷하게 나타나는 것으로 보아 PB에 의해 유도된 에스테라제¹⁰⁾에 의해서는 DTZ의 DAD로의 대사속도가 증가되지 않는 것으로 추정할 수 있겠다. 따라서, PB전처리로 인하여 DTZ의 전 신혈장클리어란스가 증가하고 간초회통과율(F_o)이 감소하는 것은 PB에 의해 간혈류량이 증가했거나¹²⁻¹⁴⁾ 간세포내 사이토크롬 P₄₅₀ 산화효소계가 활성화되어^{8,9)} DTZ의 산화적 탈아미노화 반응에 따른 산

Table V—Effect of Phenobarbital Pretreatment on the Pharmacokinetics of DAD after Femoral Venous Injection to Rats (3 mg/kg)

Parameters	Control	PB-pretreated
AUC (ng·min/ml)	76482.7±3005.3	56450.6±2050.8*
CL (ml/min/kg)	40.61±1.68	55.14±2.63*
MRT (min)	96.1±11.6	46.8±1.2*
V _{SS} (l/kg)	3.89±0.34	2.66±0.10*
t _{1/2,β} (min)	88.3±6.0	40.9±2.4*
X _u (μg/kg) ^f	4.3±1.2	1.3±0.5*
f _u (%) ^b	0.14±0.04	0.04±0.01*
CL _R (ml/min/kg)	0.06±0.01	0.02±0.01*
CL _{NR} (ml/min/kg)	40.57±1.57	55.08±2.46*

All parameters were calculated by statistical moment analysis and expressed as mean±S.E. of 6 experiments. For the meaning of each parameter and symbol(*), see Table III.

Table VI—Effect of Phenobarbital Pretreatment on the Hepatic Metabolism-Related Parameters of DTZ in Rats

Group	MRT _h	F _a	F _m	F _{mi}	K _{m,cal}
Control	80.01	0.291	0.996	0.257	0.0030
PB-pretreated	102.61	0.058	0.999	0.272	0.0028

Parameters were calculated according to eq. 8~12 using the data in Table III~V.

성대사체의 증가 또는 N-탈메칠화 반응에 따른 M_A가 증가되었기 때문으로 추측된다. 그러나, F_{mi}와 K_{m,cal}을 구하는데 있어서 DAD의 형성속도는 체순환혈로의 이행속도와 같다고 가정하였기에 PB전처리는 간내에서 DTZ가 DAD로 대사된 이후 체순환혈로 이행된 정맥투여량의 비율은 약 6% 증가하나 체순환혈로 이행되는 속도에는 영향을 미치지 않는 것으로 고려하는 것이 바람직하며 실제 형성속도는 증가하나 간세포내 성분과 DAD의 결합능이 증가하여 체순환혈로의 이행속도가 감소하고 연속적인 간초회통과효과(sequential first-pass metabolism)³³⁾를 받기 때문인지에 대해서는 시험관내 간세포 대 사실험이나 간관류실험 등을 통하여 구명되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

PB전처리(75 mg/kg/1일, 4일간 복강내 투여)가

DTZ와 그 활성대사체인 DAD의 체내동태에 미치는 영향을 약물속도론적으로 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PB전처리는 원심분리형 한외여과법을 사용하여 구한 DTZ의 혈장단백 비결합형분율을 4.24%에서 7.45%로 약 1.8배 증가($p < 0.01$)시켰으나 혈액-혈장 약물 농도비에는 영향을 미치지 않았다.

2. PB전처리에 의해 DTZ의 간고유클리어란스는 약 6.8배 증가($p < 0.01$)하였다. 이는 PB전처리에 의해 단백질결합분율이 1.8배 증가($p < 0.01$)한 것만으로는 설명될 수 없을 정도의 큰 증가이었다.

3. PB전처리에 의해 DTZ이 DAD로 대사되는 분율(F_{mi}) 및 그 대사속도($K_{m, cat}$)에는 거의 변화가 없었다.

4. 따라서 PB전처리에 의해 DTZ의 간고유클리어란스가 증가한 것은 PB에 의해 간혈류 또는 DTZ → DAD 이외의 대사가 증가된 데에 기인할 것으로 추정되었다. 그러나, PB전처리에 의해 DAD의 대사가 촉진되어 DTZ → DAD로의 대사가 겉보기에 증가하지 않은 것처럼 나타났을 가능성도 추후 검토할 필요가 있다고 생각되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1989년도 교육부 학술연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) M.M. Chaffman and R.N. Brogden, Diltiazem. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy, *Drugs*, **29**, 387 (1989).
- 2) J. Sugihara, Y. Sugawara, H. Ando, S. Harigaya, A. Etoh and K. Kohno, Studies on the metabolism of diltiazem in man, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 24 (1984).
- 3) Y. Sugawara, M. Ohashi, S. Nakamura, S. Usuki, T. Suzuki, Y. Ito, T. Kume, S. Harigaya, A. Nakayo, M. Gaino and H. Inoue, Metabolism of diltiazem. I. Structures of new acidic and basic metabolites in rat, dog and man, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **11**, 211 (1988).
- 4) Y. Sugawara, S. Nakamura, S. Usuki, Y. Ito, T. Suzuki, M. Ohashi and S. Harigaya, Metabolism of diltiazem. II. Metabolic profile in rat, dog and man, *ibid.*, **11**, 224 (1988).
- 5) S. Nakamura, Y. Ito, T. Fukushima, Y. Sugawara and M. Ohashi, Metabolism of diltiazem. III. Oxidative deamination of diltiazem in rat liver microsomes, *ibid.*, **13**, 612 (1990)
- 6) H. Yabana, T. Nagao and M. Sato, Cardiovascular effects of the metabolites of diltiazem in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**, 152 (1985).
- 7) E. Leboeuf and O. Grech-Belanger, Deacetylation of diltiazem by rat liver, *Drug Metab. Disp.*, **15**, 122 (1987).
- 8) F.P. Guengerich, G.A. Dannan, S.T. Wright, M.V. Martin and L.S. Kaminsky, Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450. Electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone. *Biochem.*, **21**, 6019 (1982).
- 9) D.J. Waxman and C. Walsh, Phenobarbital-induced rat liver cytochrome P-450. Purification and characterization of two closely related isozymic forms, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10446 (1982).
- 10) M. Raftell, K. Berzins and F. Blomberg, Immunochemical studies on a phenobarbital-inducible esterase in rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 534 (1977).
- 11) K.W. Bock, D. Jasting, W. Lillieblum and H. Pfeil, Purification of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase, separation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene or phenobarbital, *Eur. J. Biochem.*, **98**, 19 (1979).
- 12) E.E. Ohnhaus, S.S. Thorgeirsson, D.S. Davies and A. Breckenridge, Changes in liver blood flow during enzyme induction, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 2561 (1971).
- 13) E.E. Ohnhaus and J. Th. Locher, Liver blood flow and blood volume following chronic phenobarbitone administration, *Eur. J. Pharmacol.*, **31**, 161 (1975).
- 14) A.S. Nies, G.R. Wilkinson, B.D. Rush, J.T. St-

- rother and D.G. McDevitt, Effects of alteration of hepatic microsomal enzyme activity on liver blood flow in the rat, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1991 (1976).
- 15) C.D. Klaassen, Studies on the increased biliary flow produced by phenobarbital in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **176**, 743 (1971).
 - 16) M.M. Wintrobe, G.R. Lee and D.R. Boggs, *Clinical Hematology* 7th ed., Lea & Febiger, Philadelphia (1974).
 - 17) Y. Imamura, M. Sonoda, K. Arimori and H. Ichibagase, Effect of simultaneous administration of drugs on absorption and excretion. X. Plasma protein binding of carbutamide in rabbits, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 463 (1979).
 - 18) W.F. Bowers, S. Fulton and J. Thompson, Ultrafiltration vs equilibrium dialysis for determination of free fraction, *Clin. Pharmacokin.*, **9**, 49 (1984).
 - 19) M. Hanano, K. Umemura and T. Iga, *Applied Pharmacokinetics—Theory and Experiments—*, Soft Science, Tokyo, 1985, pp.350.
 - 20) C. Verghese, M.S. Smith, L. Aanosen, E.L.C. Pritchett and D.G. Shand, High-performance liquid chromatographic analysis of diltiazem and its metabolite in plasma, *J. Chromatogr.*, **272**, 149 (1983).
 - 21) R.E. Wiens, D.J. Runser, J.P. Lacz and D.C. Dimmitt, Quantitation of diltiazem and desacetyldiltiazem in dog plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 688 (1984).
 - 22) S. Riegelman and P. Collier, The application of statistical moment theory to the evaluation of *in vivo* dissolution time and absorption time, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **8**, 509 (1980).
 - 23) K.S. Pang, A review of metabolite kinetics, *ibid*, **13**, 633 (1985).
 - 24) W.L. Chiou, New calculation method for mean apparent drug volume of distribution and application to rational dosage regimens, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1067 (1979).
 - 25) S. Nakamura, T. Suzuki, Y. Sugawara, S. Usuki, Y. Ito, T. Kume, M. Yoshikawa, H. Endo, M. Ohashi and S. Harigaya, Metabolic fate of diltiazem, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **37**(II), 1244 (1987).
 - 26) Y.B. Lee, I.B. Koh, S.C. Shin and M.H. Lee, The effect of phenobarbital pretreatment on the hepatic clearance of indocyanine green in rats: Relative contributions of enzyme induction and altered liver blood flow, *Yakhakhoeji*, **36**, in press (1992).
 - 27) V.T. Vu, S.A. Bai and F.P. Abramson, Interaction of phenobarbital with propranolol in the dog (II), Bioavailability, metabolism and excretion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **224**, 55 (1983).
 - 28) M.L. Ramson, *RSTRIP-polyexponential curve stripping/least square parameter estimation*, user handbook, kMicromath. Inc., Salt Lake City, Utha (1987).
 - 29) H.G. Boxenbaum, S. Riegelman and R.M. Elashoff, Statistical estimations in pharmacokinetics, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **2**, 123 (1974).
 - 30) E.U. Kolle, H.R. Ochs and K.O. Vollmer, Pharmacokinetic model of diltiazem, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **33**(II), 972 (1983).
 - 31) R.W. Piepho, D.C. Bloedow, J.P. Lacz, D.J. Runser, D.C. Dimmitt and R.K. Browne, Pharmacokinetics of diltiazem in selected animal species and human beings, *Am. J. Cardiol.*, **49**, 525 (1982).
 - 32) P.L. Morselli, V. Rovei, M. Mitchard, A. Durand, R. Gomeni and J. Larribaud, Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in man (observations on healthy volunteers and angina pectoris patients), ed. R.J. Bing, Diltiazem hakone symposium 78, Amsterdam-princeton, *Excerpta Medica*, 152 (1979).
 - 33) K.S. Pang and J.R. Gillette, Sequential first-pase elimination of metabolite derived from a precursor, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **7**, 275 (1979).