

## 랫트에 있어서 딜티아젼의 대사동태에 미치는 페노바르비탈의 효과

이용복<sup>†</sup> · 고익배 · 심창구\* · 김신근\* · 이민화\*

전남대학교 약학대학, \*서울대학교 약학대학  
(1992년 11월 30일 접수)

### Effect of Phenobarbital on the Metabolite Kinetics of Diltiazem in Rats

Yong-Bok Lee<sup>†</sup>, Ik-Bae Koh, Chang-Koo Shim\*, Shin-Keun Kim\* 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 November 30, 1992)

The influence of phenobarbital (PB) pretreatment (75 mg/kg/day, i.p. for 4 days) on the metabolite kinetics of diltiazem (DTZ) was studied in rats in order to elucidate the effect of esterase induced by PB on the formation of DTZ to desacetyldiltiazem (DAD). DAD was injected via portal vein (3 mg/kg) to the control and PB-pretreated rats. The intrinsic hepatic clearance of DAD was significantly increased by PB pretreatment and the absolute bioavailability of DAD was significantly decreased in the PB-pretreated rats. According to the hepatic biotransformation model of DTZ, the fraction of systemic clearance of DTZ which forms DAD ( $G_{mi}$ ) was different from that of DTZ which furnishes the available DAD to the systemic circulation ( $F_{mi}$ ) in control rats. This result shows that DTZ was suspected of the sequential hepatic first-pass metabolism. On the other hand, PB pretreatment enhanced the  $G_{mi}$  value of DTZ by 44%. It may be concluded that the deacetylation of DTZ to DAD in rats is increased by the esterase induced by PB but the transfer rate of DAD immediately formed from DTZ into systemic circulation is not affected by PB due to the 27% decreased absolute bioavailability of DAD resulting from PB pretreatment.

**Keywords**—Metabolite kinetics, Diltiazem, Desacetyldiltiazem, Phenobarbital, Sequential hepatic first-pass metabolism.

Pang<sup>1)</sup>에 의하면 체내에 투여된 약물중 일부는 1차 대사물이 형성되고 있는 동안에도 1차 대사물이 더욱 더 대사되거나 체외로 배설되어 소실되는 연속적인(sequential) 간초회통과 효과를 받는데, 대사물의 형성속도나 조직내로부터 전신순환혈로의 이행속도 차이 때문에 예기치 않은 체내동태나 독작용이 나타날 수 있다고 한다.

Lee 등<sup>2)</sup>에 따르면 칼슘길항제인 딜티아젼(염산염, 이하 DTZ라 함)이 탈아세틸화 과정을 통해 desacet-

yl diltiazem(DAD)으로 대사되어 전신순환혈로 이행되는 속도는 간대사효소 유도제인 페노바르비탈(PB)의 영향을 받지 않는다고 하였다. 그러나, DTZ를 랫트의 정맥 및 간문맥내 투여한 경우의 혈장중 DAD 농도-시간 곡선하 면적의 비 $[(AUC_{m,p})_{pb,DTZ}/(AUC_{m,p})_{iv,DTZ}]$ 를 투여용량으로 normalization한 값이 PB전치리에 의해 1.2에서 0.4로 낮아지는 사실로부터 PB가 DTZ의 DAD로의 형성속도에 영향을 미칠 가능성이 시사되었다. 또한 LeBoeuf 등<sup>3)</sup>은 간

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

homogenate를 이용한 시험관내 실험에서 PB투여에 의해 DTZ의 탈아세틸화 효소가 3.2배 증가한다 하였고, 또 Raftell 등<sup>4)</sup>은 PB 전처리에 의해 탈아세틸화 등의 가수분해 반응에 관여하는 간미크로솜의 에스테라제가 유도된다고 하였다. 따라서, 저자 등이 전보<sup>2)</sup>에서 발표한 결과는 PB가 DTZ의 DAD로의 형성속도를 증가시키고 동시에 DAD의 연속적인 간대사도 증가시켰기 때문에 겉보기상 DTZ→DAD 대사가 PB 전처리에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났을 가능성이 있다.

본 연구에서는 PB 전처리가 DTZ의 DAD로의 대사에 영향을 미치는지를 구명하기 위하여 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 간내에서 DTZ로부터 형성된 DAD의 전신순환혈로의 이행 과정이 DTZ가 DAD로 대사되는 과정과 DTZ로부터 형성된 DAD의 간통과 과정으로 좀더 구체화한 간대사 모델을 설정하였다. 그리고, 이 모델에 따라 PB 전처리군(75 mg/kg/일, 4일간 복강내 투여)과 대조군 랫트에 DAD를 간문맥내 투여(3mg/kg)하여 얻어진 혈장중 DAD의 농도추이와 이 등<sup>2)</sup>이 전보에서 발표한 DTZ와 DAD의 혈장중 농도추이를 같이 이용하여 약물속도론적으로 분석함으로써 각 군에서의 각 이행과정의 분율을 구하여 비교·검토하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

PB(대원제약, KP VI), DTZ(한일약품, KP VI), DAD 염산염(한일약품), 디펜히드라민 염산염(국제약품, KP VI), heptane sulfonic acid(Sigma사), triethylamine(Aldrich사) 및 HPLC용 메탄올, 아세트니트릴(Merck사) 및 *n*-헥산(Tedia사) 등을 사용하였으며, 분석기기로는 미량원소분리기(Kokusans사, H-31) 및 HPLC(Pye-Unicam, PU 4850) 등을 사용하였다.

### 실험동물

서울대학교 병원의 실험동물 사육장에서 분양받은 체중 100~150g의 웅성 위스타 랫트를 물과 사료(제일사료사)를 자유로이 공급하며 2주 이상 동일 조건(온도 20~25°C, 상대습도 50~60%)에서 사육한 후 체중 200~300g 범위의 것을 사용하였다.

PB 전처리군은 PB 750 mg을 생리식염수 100

ml에 녹인 용액을 랫트 kg당 10 ml씩 하루에 한번 4일간 복강내 투여하였으며, 같은 방법으로 생리식염수만을 복강내 투여한 랫트를 대조군으로 하였다. 두 군 모두 최종 투여 후 24시간이 지난 다음 실험을 진행하였다.

### 약물의 투여

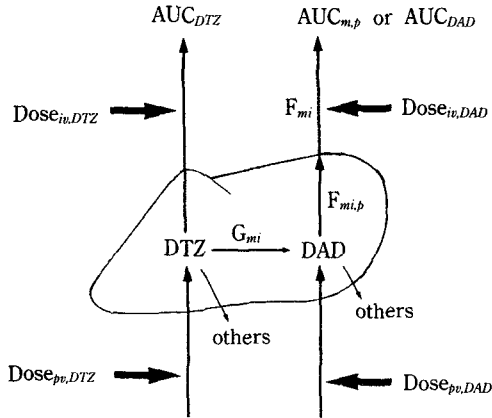
24시간 절식시킨 상기 전처리 실험동물에 에텔로 가볍게 마취시킨 후 왼쪽 대퇴 동 정맥에 PE-50 폴리에틸렌관(Intramedic®, Clay Adams사)을 삽입하였다. 간문맥에는 25개이지 주사침이 장치된 폴리에틸렌관을 간문맥혈류가 저해받지 않도록 삽입하고 cyano-acrylate 접착제(Aron-α®, Toagasei Chemical Industry사)로 고정시킨 후 개복부위를 봉합하였다. 체온은 직장온도 probe와 온도조절기 및 heating pad(Bioscience사, CFP 8185)를 이용하여 전실험기간 동안 37°C로 유지하여 주었으며 봉합 후 30분간 방치하여 마취에서 회복되었을 때 실험하였다. 약물투여는 증류수에 녹인 DAD 용액으로 랫트 kg당 DAD 3mg에 해당되는 양을 간문맥내로 20초에 걸쳐 투여하였으며, 약물투여 후 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 및 180분(대조군에서만) 간격으로 대퇴동맥으로부터 혈액 약 0.3 ml씩을 취했으며, 매 회 채혈 후 관속에 남아 있는 혈액은 헤파린용액(20 IU/ml)으로 동물체내에 밀어 넣었다. 그리고 실험 기간중 자연 방뇨를 취하였으며, 마지막 채혈이 끝난 후는 방광내 잔류하는 요를 주사침으로 취한 후, 이것을 실험기간 동안 채취한 요와 합하여 약물의 요중 총배설량을 구하는 데 이용하였다.

### DTZ와 DAD의 동시정량

혈장중 DTZ와 DAD의 농도는 Verghese 등<sup>5)</sup>과 Wiens 등<sup>6)</sup>의 HPLC 방법을 약간 수정한 이 등<sup>2)</sup>의 방법에 따라 정량하였다.

### DTZ의 DAD로의 간대사 모델

에스테라제는 에스테르뿐만 아니라 아마이드, 할라이드, 펩타이드 등의 가수분해 반응을 촉진시키는 효소군<sup>7)</sup>으로 포유동물의 혈액,<sup>8)</sup> 간,<sup>9)</sup> 신장, 소장, 고환, 중추 신경계와 폐 등의 여러 조직에서의 분포<sup>10)</sup>가 확인되고 있고, 랫트의 간에는 비특이적 카르복실 에스테라제가 있으며<sup>9)</sup> 특히 미크로솜 분획에 국제화되어 있다.<sup>11)</sup> 또한 LeBoeuf 등<sup>3)</sup>의 실험결과에 따르면 DTZ의 탈아세틸라제는 그 대부분이 간내에 존재한다고 하였고, DTZ나 DAD의 요중배설은 모두



**Figure 1**—Diagrammatic representation of the biotransformation of diltiazem (DTZ) to desacetyldiltiazem (DAD) in rat liver. Both DTZ and DAD are only metabolized and excreted in the liver. The fraction of systemic clearance that furnishes the available DAD to the systemic circulation ( $F_{mi}$ ) is the product of the fraction of systemic clearance that forms DAD ( $G_{mi}$ ) and the absolute hepatic availability of DAD ( $F_{mi,p}$ ). See text for the meaning of the other symbols.

1% 미만이었으므로<sup>2)</sup> 무시하고, DTZ의 탈아세틸화 반응이 주로 간에서 일어나는 간대사 모델을 설정하였다(Fig. 1). 이 모델에서는 DTZ나 DAD의 투여 용량 범위내에서 대사포화가 일어나지 않는 선형성이 가정되었으며, 대사체들의 총배설속도는 DTZ의 총배설속도보다도 훨씬 크고, 또한 외부에서 투여된 DAD의 간조직내 이행성은 DTZ로부터 형성된 DAD의 간조직내 이행성과 동일하다고 가정하여 다음과 같은 물질수지식을 세웠다.

한편, DTZ의 전신클리어런스중 DAD로의 대사클리어런스의 분율을  $G_{mi}$ , DTZ의 전신클리어런스중 생성된 DAD가 간세포밖의 전신순환혈로 유출되는 클리어런스의 분율을  $F_{mi}$ , DTZ로부터 형성된 DAD의 간통과율을  $F_{mi,p}$ 라 하면 다음 (1)식이 성립한다.<sup>1)</sup>

$$F_{mi} = F_{mi,p} \times G_{mi} \quad (1)$$

여기에서 외부에서 투여된 DAD의 간통과율( $F_{a,DAD}$ )은  $F_{mi,p}$ 와 같다고 가정하였으므로 다음 (2)식이 성립하며,

$$F_{a,DAD} = F_{mi,p} = \frac{AUC_{pv,DAD} \cdot Dose_{iv,DAD}}{AUC_{iv,DAD} \cdot Dose_{pv,DAD}} \quad (2)$$

또한,  $F_{mi}$ 는 DTZ 정맥투여량중 DAD를 전신순환혈에 내보내는 분율이므로,  $F_{mi}$ 와 DTZ 정맥투여량( $Dose_{iv,DTZ}$ )을 곱하면 DTZ 정맥투여량중 전신순환혈에 들어간 DAD의 양이 될 것이다. 이 값을 DTZ 투여 후 형성된 DAD의 혈장중 농도-시간 곡선하 면적( $AUC_{m,p}$ )으로 나누어 모델비 의존적 방법에 따라 DTZ로부터 형성된 DAD의 전신클리어런스( $CL_{m,p}$ )를 구할 수 있다.

$$CL_{m,p} = F_{mi} \cdot Dose_{iv,DTZ} / (AUC_{m,p})_{iv,DTZ} \quad (3)$$

한편, 가정에 따르면  $CL_{m,p}$ 는 외부에서 투여된 DAD의 전신클리어런스( $CL_{DAD}$ )와 같게 되므로 (4)식을 유도할 수 있고,

$$CL_{DAD} = CL_{m,p} = Dose_{iv,DAD} / AUC_{iv,DAD} \quad (4)$$

따라서 (3)과 (4)식으로부터 (5)식을 얻을 수 있고,

$$F_{mi} = (AUC_{m,p})_{iv,DTZ} \cdot Dose_{iv,DAD} / AUC_{iv,DAD} \cdot Dose_{iv,DTZ} \quad (5)$$

(2)와 (5)식을 (1)식에 대입하면 (6)식이 유도된다.

$$G_{mi} = (AUC_{m,p})_{iv,DTZ} \cdot Dose_{pv,DAD} / AUC_{pv,DAD} \cdot Dose_{iv,DTZ} \quad (6)$$

이때, 사용된 첨자  $m,p$ 는 DTZ 투여 후 형성된 DAD를, DTZ와 DAD는 각각 외부에서 투여된 약물을,  $iv, pv$ 는 각각 정맥 및 문맥내 투여를 의미한다. 한편,  $F_{mi}$ ,  $F_{mi,p}$  및  $G_{mi}$ 를 구하는 데 있어서 필요한 혈장중 약물농도-시간 곡선하 면적(AUC)과 투여용량(Dose)은 본 실험에서 얻어진 DAD 문맥내 투여 후의  $AUC_{pv,DAD}$ 를 제외하고는 모두 이 등<sup>2)</sup>의 실험값을 사용하였다.

**약물속도론적 분석 및 통계처리**

시간 0부터 ∞까지의 혈장중 약물농도-시간 곡선하 면적(AUC)은 trapezoidal 방법에 따라 계산한 값과 최종 채혈시점의 혈장중 약물농도를 최종소실 상 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), 요중 미변화체 배설분율( $f_u$ )은 다음 수식에 의해 구하였다.<sup>12)</sup>

$$CL = \text{Dose}/AUC \quad (7)$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C_p \, dt \quad (8)$$

$$MRT = AUMC/AUC \quad (9)$$

$$f_u = X_u/\text{Dose} \quad (10)$$

이때,  $C_p$ 는 시간  $t$ 에서의 DAD의 혈장중 농도를,  $X_u$ 는 요중 DAD 총배설량을 의미하며 본 계산에서는 3시간 이후 요중배설량은 거의 무시할 수 있었기 때문에 3시간까지의 배설량을 총배설량으로 하였다.

전신 혈장클리어런스(CL)를 제외한 모든 측정치와 계산치는 산술평균± standard error로 표시하였으며 CL은 조화평균값<sup>13)</sup>을 사용하였다. 그리고 각 군간의 파라메타를 통계학적으로 분석하였으며, 이때 unpaired Student's t-test방법을 이용하여  $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성을 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### DAD의 혈장중 농도 추이

DAD를 간문맥내로 투여(3 mg/kg)하여 얻어진 혈장중 DAD 농도를 비선형 최소자승 회귀분석 프로그램인 RSTRIP<sup>14)</sup>에 의해 stripping하여 초기치를 구한 후, 가중치 2(혈장중 약물농도 제곱의 역수)를 사용하여<sup>15)</sup> curve fitting하여 얻어진 결과를 Fig. 2에 표시하였으며 이로부터 얻은 약물속도론적 파라메타를 Table I에 나타내었다.

PB 전처리로 인하여 간고유대능이 활성화됨에 따라 간문맥내 투여로부터 구한 DAD의 간고유클리어런스 값이 1.89배 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 증가하였고, DAD의 신배설분율은 대조군에서 0.05%, PB 전처리군에서 0.03%로 유의성( $p < 0.01$ ) 있는 차이는 있었지만 모두 0.05% 미만으로 그 변화는 무시할 수 있었다(Table I).

#### DTZ에서 DAD로의 형성분율의 변화

DTZ의 간대사 모델에 따라 구한 각 파라메타값들을 Table II에 나타내었다. DTZ에서와 마찬가지로<sup>2)</sup> 대조군과 PB 전처리군에서 모두 DAD의 대사분율( $F_{m,DAD}$ )이 거의 1에 가까운 것으로부터 정맥투여된 DAD는 더욱 더 대사받아 또 다른 대사체로 변화하여 배설됨을 알 수 있었다(Table II).

Table II에 표시한 바 대로 PB 전처리군에서 간

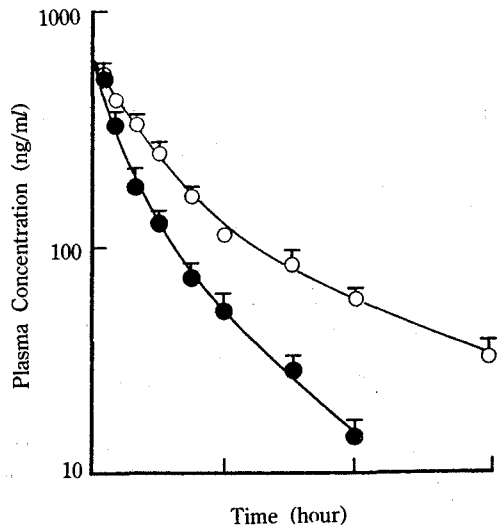


Figure 2—Mean arterial plasma concentration-time profiles of DAD after portal vein administration of DAD (3 mg/kg) to rats (n=6). Each solid line was calculated by RSTRIP.<sup>14)</sup> Vertical bar represents the standard error of the mean.

Keys: —○—, control DAD; —●—, PB-pretreated DAD.

통과율( $F_{a,DAD}$ )이 감소하고 간내 평균체류시간( $MRT_h$ )이 증가한 것은 DAD가 간세포내 효소단백과의 결합이 증가하여 대사촉진을 받았기 때문으로 사료되었다.

대조군 간내에서 DTZ로부터 형성된 DAD의 체순환혈로 귀속된 DTZ의 전신클리어런스 또는 정맥투여량 분율( $F_{mi}$ )은 26%이고 DAD의 간통과율( $F_{a,DAD}$ )이 약 34%이므로 DTZ는 DAD로 투여된 양의 약 76%가 변화하는 것으로 나타났으며, PB전처리로 인하여  $F_{mi}$ 값은 27%로 대조군과 차이가 없으나  $F_{a,DAD}$ 가 25%로 대조군에 비하여 약 27% 감소( $0.338 \rightarrow 0.248$ )하였기에 DTZ의 DAD로의 형성분율( $G_{mi}$ )은 약 110%로 나타났다(Table II). 따라서, PB 전처리로 인해 DTZ의 DAD로의 형성분율이 대조군에 비하여 약 44% 증가( $0.762 \rightarrow 1.097$ )한 것으로 나타났다. 그러나, 그 형성분율이 100%가 넘게 나타난 것은  $F_{mi}$ 와  $F_{a,DAD}$ 를 계산함에 있어서 각 투여경로에 따른 AUC 평균값을 사용하였기에 나타난 개체차일 수도 있고, 간대사모델에서 DTZ로부터 형성된 DAD의 간통과율( $F_{mi,p}$ )과 외부에서 투여된 DAD의 간통과율( $F_{a,DAD}$ )이 같다고 가정하였기 때문일 수 있겠다. 한편, 그

**Table I**—Effect of Phenobarbital on the Pharmacokinetic Parameters of DAD after its Portal Vein Administration to Rats (3 mg/kg)

Parameters <sup>a</sup>	Control		PB-pretreated	
AUC (ng·min/ml)	25835.5±1842.6		13990.8±1651.1*	
CL (ml/min/kg)	116.1±	7.8	219.9±	30.0*
MRT (min)	127.8±	40.4	88.8±	45.7
X <sub>u</sub> (μg/kg) <sup>a</sup>	1.6±	0.4	0.9±	0.2*
f <sub>u</sub> (%) <sup>b</sup>	0.05±	0.01	0.03±	0.01*

<sup>a</sup>Mean± S.E. (n=6).

<sup>a</sup>X<sub>u</sub> is the urinary excreted amounts of DAD upto 3 hours.

<sup>b</sup>Urinary excreted fraction (f<sub>u</sub>, %) calculated by X<sub>u</sub>/administered dose.

\*p<0.01

**Table II**—Effect of Phenobarbital on the Biotransformation of Diltiazem (DTZ) to Desacetyldiltiazem (DAD)

Group	MRT <sub>h,DAD</sub> <sup>a</sup>	F <sub>m,DAD</sub> <sup>b</sup>	F <sub>a,DAD</sub> <sup>c</sup>	G <sub>mi</sub> <sup>d</sup>	F <sub>mi</sub> <sup>e</sup>
Control	31.7	0.999	0.338	0.762	0.257
PB-pretreated	42.0	0.999	0.248	1.097	0.272

<sup>a</sup>MRT<sub>h,DAD</sub> = MRT<sub>pv,DAD</sub> - MRT<sub>iv,DAD</sub>

<sup>b</sup>F<sub>m,DAD</sub> = 1 - fu<sub>iv,DAD</sub>

<sup>c</sup>F<sub>a,DAD</sub> = F<sub>mi,p</sub> = AUC<sub>pv,DAD</sub> · Dose<sub>iv,DAD</sub> / AUC<sub>iv,DAD</sub> · Dose<sub>pv,DAD</sub>

<sup>d</sup>G<sub>mi</sub> = (AUC<sub>m,p</sub>)<sub>iv,DTZ</sub> · Dose<sub>pv,DAD</sub> / AUC<sub>pv,DAD</sub> · Dose<sub>iv,DTZ</sub>, AUC<sub>m,p</sub> is the area under the concentration-time curve of DAD after DTZ administration.

<sup>e</sup>F<sub>mi</sub> = (AUC<sub>m,p</sub>)<sub>iv,DTZ</sub> · Dose<sub>iv,DAD</sub> / AUC<sub>iv,DAD</sub> · Dose<sub>iv,DTZ</sub>

Subscripts, *iv* and *pv*, mean the femoral and portal vein, respectively.

Intravenous data of DTZ and DAD were quoted from reference (2).

형성분율이 거의 100%가 된다는 것은 PB 전처리시 DTZ는 일단 모두 DAD로 변환된 후 또다른 대사체를 형성하게 되는 것으로 Sugawara 등<sup>16)</sup>이 제시한 대사경로에 따르면 산성대사체나 N-monodesmethyldiltiazem(M<sub>A</sub>)은 형성되지 않아야 함을 의미한다. 이에 대해서 더욱 연구가 진행되어 검증될 필요가 있다고 사료된다.

### 결론

PB 전처리(75 mg/kg/일, 4일간 복강내투여)가 DTZ의 DAD로의 대사에 미치는 영향을 간대상모델을 사용하여 약물속도론적으로 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군에서 DAD의 간통과율(F<sub>a,DAD</sub>)은 약 34%였으며, G<sub>mi</sub>와 F<sub>mi</sub>값이 차이가 나는 것으로부터 DTZ는 간내에서 연속적인 간초회통과효과(F<sub>mi,p</sub>)를 받을 것으로 사료되었다.

2. 전보<sup>2)</sup>에서 PB 전처리가 DTZ가 DAD로 대사되는 분율(F<sub>mi</sub>) 및 그 대사속도(K<sub>m,cal</sub>)에 거의 영향을 미치지 않은 것으로 나타난 것은 PB가 DTZ→DAD 대사에 영향을 미치지 않았기 때문이 아니고, DTZ→DAD 대사는 증가(44%)된 반면 DAD가 전신순환혈로 나가는 분율이 감소(27%)하였기 때문으로 설명할 수 있었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 91학년도 교육부 학술연구조성비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) K.S. Pang, A review of metabolite kinetics, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **13**, 633-662 (1985).
- 2) Y.B. Lee, I.B. Koh and M.H. Lee, The effect of phenobarbital pretreatment on the pharmacokinetics of diltiazem in rats, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**, 219-227 (1992).
- 3) E. LeBoeuf and O. Grech-Belanger, Deacetylation of diltiazem by rat liver, *Drug Meta. Disp.*, **15**, 122-126 (1987).
- 4) M. Raftell, K. Berzins and F. Blomberg, Immunochemical studies on a phenobarbital-inducible esterase in rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 534-535 (1977).
- 5) 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**, 149-155 (1983).
- 6) 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**, 688-689 (1984).
- 7) C.H. Walker and M.I. Mackness, Esterase: Problems of identification and classification,

- Biochem. Pharmacol.*, **32**, 3265-3269 (1983).
- 8) W.N. Aldridge, Serum esterases: 1. Two types of esterases(A and B) hydrolysing p-nitrophenylacetate, proprionate and butyrate, and a method for their determination, *Biochem. J.*, **53**, 110-117 (1953).
  - 9) W. Junge, Human microsomal carboxyesterase (E.C. 3.1.1.1). In *Enzymes in Health and Disease*, Wilkinson J.H. (Ed.), Karger, Basel, pp. 54-58 (1978).
  - 10) E. Heymann, Carboxyesterases and amides: In *Enzymatic Basis of Detoxification*, Vol. II, Jakoby W.B. (Ed.), Academic Press Inc., New York, U.S.A., pp. 291-323 (1980).
  - 11) A. Ljungquist and K.B. Augustinsson, Purification and properties of two carboxylesterases from rat liver microsomes, *Eur. J. Biochem.*, **23**, 303-313 (1971).
  - 12) 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**, 509-534 (1980).
  - 13) W.L. Chiou, New calculation method for mean apparent drug volume of distribution and application to rational dosage regimens, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1067-1068 (1979).
  - 14) M.L. Ramson, *RSTRIP-polyexponential curve stripping/least square parameter estimation*, user handbook, Micromath. Inc., Salt Lake City, Utha (1987).
  - 15) H.G. Boxenbaum, S. Riegelman and R.M. Elashoff, Statistical estimations in pharmacokinetics, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **2**, 123-148 (1974).
  - 16) Y. Sugawara, M. Ohashi, S. Nakamura, S. Usuki, T. Suzuki, Y. Ito, T. Kume, S. Horigaya, 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**, 211-223 (1988).