

## In Vivo 레벨에서 1-아닐리노-8-나프탈렌 설펜네이트(ANS)의 간내 이행 및 담즙배설 과정의 속도론적 해석

배웅탁\* · 정연복† · 한 건

충북대학교 약학대학, \*동아제약 중앙연구소  
(2001년 9월 12일 접수)

### Kinetic Analysis of the Hepatic Uptake and Biliary Excretion of 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate (ANS) *in Vivo*

Woong Tak Bae\*, Youn Bok Chung† and Kun Han

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

\*Research Lab., Dong-A Pharm. Co. Ltd., Korea

(Received September 12, 2001)

**ABSTRACT**—The purpose of the present study was to investigate the hepatic uptake and biliary excretion of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) *in vivo*. The plasma concentration and liver concentration of ANS were determined after its *i.v.* bolus administration at a dose of 30  $\mu\text{mol/kg}$  in rats. The hepatic uptake clearance ( $\text{CL}_{\text{uptake}}$ ) of ANS was 0.1 ml/min/g liver. On the basis of the unbound concentration of ANS, the permeability-surface area product ( $\text{PS}_{\text{influx}}$ ) was calculated to be 10.4 ml/min/g liver, being comparable of *in vitro* data. On the other hand, we determined the plasma concentration, liver concentration and biliary excretion rate of ANS at steady-state after its *i.v.* infusion (0.2-1.6  $\mu\text{mol/min/kg}$ ) in rats. The excretion clearance ( $\text{CL}_{\text{excretion}}$ ) of ANS showed Michaelis-Menten kinetics with increasing the infusion rate. The permeability-surface area product ( $\text{PS}_{\text{excretion}}$ ) based on the unbound concentration in the liver was calculated to be 0.0165 ml/min/g liver, which is negligible compared with the intrinsic clearance ( $\text{CL}_{\text{int}}=3.3$  ml/min/g liver) by rat liver microsomes. The sequestration process of ANS, therefore, was considered to be mainly due to the metabolic process in the liver ( $\text{PS}_{\text{seq}} \approx \text{CL}_{\text{int}}$ ). Furthermore,  $\text{PS}_{\text{efflux}}$  value calculated from  $\text{PS}_{\text{influx}}$  and  $\text{PS}_{\text{seq}}$  was 4.4 ml/min/g liver, which was comparable of *in vitro* data. In conclusion, *in vivo* parameters such as  $\text{PS}_{\text{influx}}$ ,  $\text{PS}_{\text{efflux}}$  and  $\text{PS}_{\text{seq}}$  in the present study showed good *in vivo-in vitro* relationship. Thus, the kinetic analysis method proposed in the present study would be useful to analyze the hepatic transport of drugs *in vivo*.

**Keywords**—1-Anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS), Hepatic uptake, Biliary excretion, Efflux, Clearance

유기음이온계 약물은 혈중에서 대부분 간으로만 이행되어 담즙으로 배설된다. 또한, 혈중에서 일부민과 강력하게 결합(99% 이상)함에도 불구하고 간내로 높은 효율로 이행되는 특성<sup>1-4)</sup> 때문에 약물의 간-담즙 수송 연구의 모델물질로 사용되어 왔으며, 임상에서는 간기능 진단시약으로 사용되고 있다.<sup>5-9)</sup> 음이온은 담즙산,<sup>10-13)</sup> 지방산<sup>14)</sup> 및 색소류(cholephils)<sup>15-18)</sup>로 크게 구별된다. 이들은 간내 이행 과정에서 독립된 수송계를 경유하거나 서로 공유한다.<sup>1,2)</sup> 간기능 검사약으로 사용되고 있는 bromosulphthalein(BSP) 및 indocyanine green(ICG)은 담즙산과  $\text{Na}^+$  비의존성 수송계(multispecific organic anion transporter)를 공유한다.<sup>15,19,20)</sup> ATP 의

존성에 따라 구별하면, BSP 등의 대부분의 색소류는 ATP 비의존성으로 축진화산에 의한다고 보고되고 있다.<sup>21-23)</sup>

유기음이온계 물질인 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS)는 BSP, ICG 등 간기능 검사약과 수송계를 공유하는 것으로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> ANS는 높은 형광성을 나타내어 생체중 미량 분석이 가능하다는 장점을 지니고 있다. 저자 등<sup>3)</sup>은 혈중으로부터 간으로만 이행되는 속도론적 모델에 의해 ANS의 체내동태를 해석하여 보고한 바 있다. 또한, 혈중으로부터 ANS의 소실을 수송계에 의한 이행 및 간세포질내 단백질결합의 두 요인으로 분류하여 각각의 기여율을 보고한 바 있다.<sup>4)</sup> 즉, ANS가 혈중으로부터 효율성 높게 간내로 이행되는 것은 수송계의 기여뿐만 아니라 간세포질내의 강한 단백질결합도 기여하는 것이 밝혀졌다. 한편, 간내로 이행된 ANS는 대부분 비형광성 대사체로 대사되는 것으로 생각된

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Tel : (043)261-2824, E-mail : chungyb@cbucc.chungbuk.ac.kr

다.<sup>24)</sup> 저자 등<sup>3,4,24)</sup>이 보고한 이러한 실험에서는 ANS의 간담즙 수송에 대하여 간세포질내 단백질결합<sup>3,4)</sup> 및 세포내 대사<sup>24)</sup>과정의 중요성을 밝힌 것으로, 각 수송과정을 분리하여 평가하지는 않았다.

이 연구에서는 ANS를 모델물질로 사용하여 약물의 간내 이행 및 담즙배설 과정을 검토하였다. 특히, 간내 유입(influx), 배출(efflux) 및 대사·배설(sequestration) 과정을 분리하여 *in vivo* 레벨에서 평가하는 방법을 검토하였다. *In vivo* 실험으로는 급속정맥주사 및 등속주입의 실험을 하였으며, 약물의 간내이행을 *in vivo* 레벨에서 해석하는 방법의 확립을 목표로 하였다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

1-Anilino-8-naphthalene sulfonate sodium salt(ANS) (Tokyo Kasei Kogyo Co., Japan), diethyl ether(Tedia Co., INC., U.S.A.), methanol(Fisher Scientific Co., Ltd., U.S.A.) 및 heparin(Upjohn., No. 268-5, U.S.A.)을 사용하였으며, 기타 시약은 HPLC급 또는 특급을 사용하였다.

기기로는 형광광도계(MPF-4, Hitachi Co., Japan), 등속주입기(Harvard apparatus, USA), pH 미터(M520, Orion Research Inc., U.S.A.), 저온원심분리기(GS-6KR, Beckman Industries, U.S.A.), 탁상용원심분리기(Microfuge E, Beckman Industries, U.S.A.), 냉동고(OPR-DFU-250, Operon ENG. Co., 한국), 초음파세척기(M2010, Jinwoo ENG. CO., 한국), 진탕기(Eurostar, IKA-Labortechnik Co., Germany), 호모게나이저(Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik Co., Germany) 등을 사용하였다.

### 실험동물

실험동물로는 수흰쥐(200-250 g)를 주식회사 샘타코(경기도, 안성)로부터 구입하여 약학대학 동물사육장에서 항온, 항습 조건하에서 사육한 후 사용하였다.

### 혈장, 담즙 및 간조직 중 ANS 정량

생체시료 중 ANS의 정량은 저자 등<sup>3,4)</sup>이 보고한 방법을 개량하여 사용하였으며, 그 조건은 다음과 같다. 즉, 혈장 및 담즙시료 각각 50  $\mu$ l에 메탄올 3 ml를 가한 다음 추출, 원심분리(3000 rpm, 15분, 4°C)하였다. 상정액을 취하여 형광광도계로 정량하였으며, 여기(excitation) 파장을 390 nm, 형광(emission) 파장을 480 nm, 여기 slit width를 10 nm, 형광 slit width를 5 nm로 고정시켜 사용하였다. 혈장 및 담즙의

검량선은 ANS 0.5-5  $\mu$ M의 농도범위에서 각각 양호한 직선 관계( $r=0.999$ )를 보였다. 간조직 중 ANS 농도 정량을 위해서는 간 20% 균질액 200  $\mu$ l에 메탄올 3 ml를 가한 다음, 혈장과 같은 방법으로 분석하였다.

ANS의 대사체는 대부분 비형광성 물질로 보고되고 있다.<sup>24)</sup> 따라서, 생체내에 미량 존재하는 형광성 대사체가 모델물질인 ANS의 형광광도에 미치는 영향은 무시할 수 있다. 본 실험에서는 저자 등<sup>3)</sup>이 보고한 차스펙트럼의 원리를 이용하여 이를 보정하였다.

### ANS 정맥투여 후 혈장 및 간조직 중 농도 측정

흰쥐를 에텔로 가볍게 마취시킨 후 좌측 대퇴부 동맥 및 정맥에 폴리에틸렌 튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, U.S.A.)를 삽관하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 ANS를 생리식염수에 녹여 정맥투여(30  $\mu$ mol/kg)하였다. 약물투여 후 혈액을 대퇴동맥으로부터 경시적으로 채취하였다. 채취시간은 20, 40초 및 1, 3, 5, 10, 15분에 혈액 200  $\mu$ l를 마이크로튜브에 받아서 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리 후 얻어진 혈장 50  $\mu$ l를 정량에 사용하였다. 간조직 중의 ANS 정량을 위해서는 일정시간에 탈혈시켜 급속 치사시킨 다음, 간 약 1g을 적출하였다. 적출한 간을 pH 7.4 인산염완충액을 사용하여 20% 균질액으로 만든 다음 200  $\mu$ l를 정량에 사용하였다.

### ANS 등속주입 후 혈장중 농도, 담즙배설 및 간조직 중 농도 측정

흰쥐를 에텔로 가볍게 마취시킨 후 좌측 대퇴부 동맥 및 정맥에 폴리에틸렌 튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, U.S.A.)를 삽관하였다. 담즙의 채취를 위해서는 복부를 개복한 다음, 폴리에틸렌 튜브(PE-10)를 담관에 삽관하고, 복부를 다시 봉합하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 ANS의 주입속도를 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6  $\mu$ mol/kg로 변화시키며 각각 등속으로 주입하였다. 약물투여 후 혈장 및 담즙을 경시적으로 채취하였다. 정상 상태에 도달했을 때 전혈액을 탈혈시켜 급속 치사시킨 다음 간 약 1g을 적출하였다. 혈액과 담즙은 마이크로튜브에 받아서 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리한 후 각각 50  $\mu$ l를 정량에 사용하였다. 적출한 간은 pH 7.4 인산염완충액을 사용하여 20% 균질액으로 만든 다음 정량에 사용하였다. 담즙의 비중은 1로 가정하고 중량을 측정하여 담즙의 체적을 계산하였다.

### 정맥주사후 간내 유입 클리어런스( $CL_{uptake}$ ) 산출

정맥주사한 후 초기시간, 즉 1분이내의 시간대에서 ANS

의 혈장중 소실 및 간장으로의 유입(uptake)을 측정하였다. 초기시간대에서는 ANS의 간세포내에서 혈액으로의 배출(efflux) 및 담즙배설, 또한 간장내에서의 대사 분율을 무시할 수 있기 때문이다.

ANS의 간내 이행속도는 다음 식과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{dC_{liver}}{dt} = CL_{uptake} \cdot C_p \quad (1)$$

여기서,  $C_{liver}$ 는 시간  $t$ 에서 간 일정 체적당 ANS의 양(즉, 간중 농도)을,  $CL_{uptake}$ 는 간내 유입과정의 클리어런스를,  $C_p$ 는 ANS의 혈장중 농도를 각각 나타낸다.

(1)식의 양변을 각각 적분하여 나타내면,

$$C_{liver} = CL_{uptake} \cdot AUC_{0-t} \quad (2)$$

가 된다. 여기서,  $AUC_{0-t}$ 는 시간 0에서  $t$ 까지의 혈장중 농도-곡선하 면적을 나타낸다. (2)식의 양변을  $C_p$ 로 각각 나누면,

$$\frac{C_{liver}}{C_p} = \frac{CL_{uptake} \cdot AUC_{0-t}}{C_p} \quad (3)$$

가 된다. 따라서, 얻어진 데이터를 이용하여 (3)식에 나타낸 바와 같이  $AUC_{0-t}/C_p$ 에 대한  $C_{liver}/C_p$ 의 값을 플롯하면 직선식이 얻어지며, 그 기울기로 부터 간내 유입 클리어런스( $CL_{uptake}$ )를 구할 수 있다. 이러한 플롯을 일명 "integration plot"<sup>25-27)</sup>이라 하며 *in vivo* 레벨의 급속정맥주사 실험으로부터 간편하게 간내 유입 클리어런스( $CL_{uptake}$ )를 산출할 수 있는 방법이다.

한편, 혈장중으로 부터 소실되는 ANS를 간장내 유입이 어느 정도 반영하고 있는 가를 나타내는 지표인 간회수율(hepatic recovery ratio, Rh)<sup>25)</sup>은 다음과 같이 산출하였다. 즉, 급속 정맥주사후 1분 이내의 ANS 혈장중 소실은 하나의 지수함수로 감소되었다. 따라서, 초기시간대에서는 1-컴파트먼트 모델을 적용할 수 있다. 1분 동안 혈장중으로 부터 소실되는 ANS의 양(Y)은 다음 식과 같다.

$$Y = \frac{dose \cdot (C_0 - C_{1 \min})}{C_0} \quad (4)$$

여기서, dose는 투여량을,  $C_0$ 는 1분 이내의 초기시간대의 직선을 연장하여 얻은 시간 0에서의 혈장중 초농도를,  $C_{1 \min}$ 은 ANS를 급속 정맥주사한 후 1분에서의 혈장중 농도를 각각 나타낸다.

ANS를 급속 정맥주사한 후 1분에서의 간장중 농도를 측정하여 계산한 간내 유입약물량( $X_{liver, 1 \min}$ )으로부터, 간회수

율(Rh, %)을 다음 식과 같이 산출하였다.

$$Rh (\%) = \frac{X_{liver, 1 \min}}{Y} \times 100 \quad (5)$$

#### 간내 유입에 관한 고유 클리어런스( $PS_{influx}$ ) 산출

비결합형 ANS를 기준으로 *in vivo*에서의 간내 유입에 관한 고유 클리어런스(permeability-surface area product,  $PS_{influx}$ )를 다음과 같이 산출하였다. Well-stirred 모델(venous equilibrium 모델)<sup>28)</sup>에 따르면,  $CL_{uptake}$ 는 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$CL_{uptake} = \frac{Q_{hB} \cdot f_p \cdot PS_{influx}}{Q_{hB} + f_p \cdot PS_{influx}/R_B} \quad (6)$$

여기서,  $Q_{hB}$ 는 간혈류량을,  $f_p$ 는 혈장중 ANS의 비결합형 분율을,  $R_B$ 는 혈장에 대한 혈액 중 약물 농도비( $C_B/C_p$ )를 각각 나타낸다.

#### 정맥내 등속주입(infusion) 실험

주입속도를 변화시키면서 ANS를 정맥내로 주입하여 혈장중 농도를 정상상태(steady-state)로 일정하게 유지시켰다. 정맥내 주입속도( $k_0$ )는 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\begin{aligned} k_0 &= C_{p,ss} \cdot V_1 \cdot k_{el} \\ &= C_{p,ss} \cdot CL_{tot} \end{aligned} \quad (7)$$

여기서,  $C_{p,ss}$ 는 정상상태에서의 혈장중 농도를,  $V_1$ 은 체순환 컴파트먼트의 분포용적을,  $k_{el}$ 은 배설속도정수를,  $CL_{tot}$ 는 전신 클리어런스를 각각 나타낸다.  $V_1$ ,  $CL_{tot}$  및  $k_{el}$  값은 저자 등<sup>3)</sup>의 문헌치를 사용하였다.

ANS를 등속주입하여 정상상태에 도달한 시점에서 혈장중 농도( $C_{p,ss}$ ), 간장중 농도( $C_{liver,ss}$ ), 및 담즙배설속도( $V_{bile,ss}$ )를 측정하였다. 이로부터 혈장중 농도를 기준으로 한 담즙배설 클리어런스( $CL_{biliary}$ ) 및 간장중 농도를 기준으로 한 담관막 투과 클리어런스( $CL_{excretion}$ )를 각각 다음 식으로부터 산출하였다.

$$CL_{biliary} = \frac{V_{bile,ss}}{C_{p,ss}} \quad (8)$$

$$CL_{excretion} = \frac{V_{bile,ss}}{C_{liver,ss}} \quad (9)$$

#### 담관막 투과 고유 클리어런스( $PS_{excretion}$ ) 산출

간내 비결합형 농도를 기준으로 한 ANS의 담즙배설 속도는 전형적인 Michaelis-Menten 포화성을 나타내었다. 따라서 담즙배설 속도를 나타내는 식은 다음과 같이 나타낼 수

있다.

$$V_{\text{excretion}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot C_{\text{liver,u}}}{K_m + C_{\text{liver,u}}} \quad (10)$$

여기서,  $V_{\text{max}}$  및  $K_m$ 은 최대 투과속도 및 Michaelis-Menten 정수를,  $C_{\text{liver,u}}$ 는 등속주입후 정상상태에서의 간중 ANS 비결합형 농도를 각각 나타낸다.

간 조직중 ANS의 비결합형 농도는 간세포질(cytosol)과의 단백결합 실험으로 부터 산출된 파라미터( $R_1=8.22 \mu\text{M}$ ,  $K_{d1}=2.43 \mu\text{M}$ ,  $R_2=578 \mu\text{M}$ ,  $K_{d2}=259 \mu\text{M}$ )<sup>3)</sup>로 부터 다음과 같이 산출하였다.

$$C_{\text{liver,b}} = \frac{R_1 \cdot C_{\text{liver,u}}}{K_{d1} + C_{\text{liver,u}}} + \frac{R_2 \cdot C_{\text{liver,u}}}{K_{d2} + C_{\text{liver,u}}} \quad (11)$$

여기서,  $R_1$  및  $R_2$ 는 고친화성 및 저친화성 부위의 결합용량을,  $K_{d1}$  및  $K_{d2}$ 는 고친화성 및 저친화성 부위의 해리정수를,  $C_{\text{liver,b}}$ 는 등속주입후 정상상태에서의 간중 ANS 결합형 농도를 각각 나타낸다. 간 조직내 ANS의 비결합형 약물농도 비율( $f_u$ )은 다음과 같은 식으로부터 계산하였다.

$$f_u = \frac{C_{\text{liver,u}}}{C_{\text{liver,b}} + C_{\text{liver,u}}} = \frac{C_{\text{liver,u}}}{\frac{R_1 \cdot C_{\text{liver,u}}}{K_{d1} + C_{\text{liver,u}}} + \frac{R_2 \cdot C_{\text{liver,u}}}{K_{d2} + C_{\text{liver,u}}} + C_{\text{liver,u}}} \quad (12)$$

따라서, 간내 비결합형 농도를 기준으로 한 ANS의 담관 막 투과과정의 고유 클리어런스(permeability-surface area product,  $PS_{\text{excretion}}$ )는 (10)식으로 부터 산출된  $V_{\text{max}}$  및  $K_m$  값으로 부터 다음 식과 같이 계산하였다.

$$PS_{\text{excretion}} = \frac{V_{\text{max}}}{K_m} \quad (13)$$

### 결과 및 고찰

#### 정맥주사한 후 ANS의 간내 유입(uptake) 과정

ANS 30  $\mu\text{mole/kg}$ 을 정맥투여한 후 혈장중 농도는 분포 전상에서 급격한 감소를 보였으며, 분포 후상에서는 서서히 감소되었다. 간중 농도는 1분까지 증가하다가 이후 혈장중 소실과 평행하게 감소되었다(Figure 1). 분포전상 및 분포후상에서의 혈장중 소실반감기( $t_{1/2}$ )는 각각 0.102분 및 13.6분으로 나타났다. 1분 이내의 간중 농도와 혈장중 농도를 측정하여 (3)식의 integration plot에 의해 산출한 *in vivo* 간내 유입 클리어런스( $CL_{\text{uptake}}$ )는 0.10 ml/min/g liver이었다(Figure 2).

따라서, 비결합형 ANS를 기준으로 *in vivo*에서의 간내

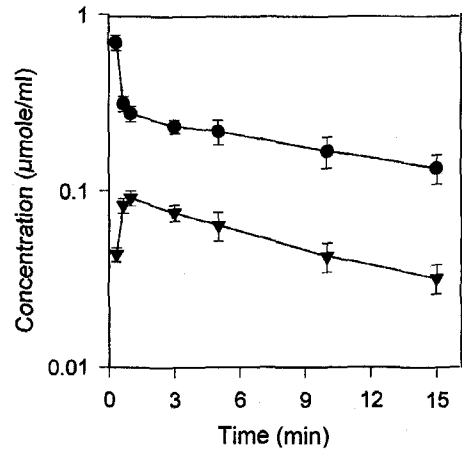


Figure 1-Plasma (●) and liver (▼) concentration profiles of ANS after its i.v. bolus administration at a dose of 30  $\mu\text{mol/kg}$ . Each point represents the Mean  $\pm$  S.E. (n=3).

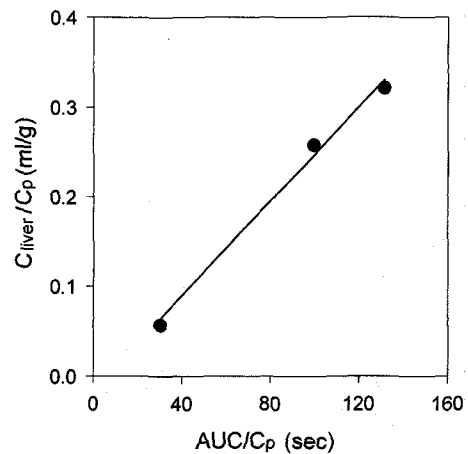


Figure 2-Integration plot of the hepatic uptake of ANS after its i.v. bolus administration at a dose of 30  $\mu\text{mol/kg}$  (n=3).

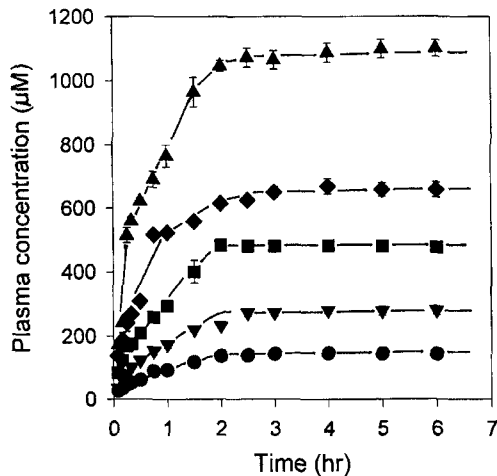
유입에 관한 고유 클리어런스(permeability-surface area product,  $PS_{\text{influx}}$ )를 (6)식에 따라 산출하였다.  $f_p$  및  $R_B$ 는 각각 0.01 및 0.60의 값<sup>3)</sup>을,  $Q_{\text{HB}}$ 는 1.50 ml/min/g liver<sup>29)</sup>의 값을 사용하여 계산한 결과,  $PS_{\text{influx}}$ 의 값은 11.25 ml/min/g liver이었다.

저자 등의 분리간세포(isolated hepatocytes)를 사용한 *in vitro* 실험에서, 세포내 유입과정의  $V_{\text{max}}$  및  $K_m$ 은 각각 300 nmol/min/g liver 및 29.1  $\mu\text{M}$ 의 값이 얻어졌다(unpublished data). 이들 파라미터를 사용하여 그 비율( $V_{\text{max}}/K_m$ )로 부터 산출한 *in vitro* 레벨에서의  $PS_{\text{influx,vitro}}$ 는 13.7 ml/min/g liver의 값을 보였으며, 본 실험의 *in vivo* 정맥주사 결과와 유사(comparable)한 값을 나타내었다. 즉, 양호한 *in vitro-in vivo* 상관성을 나타내었으며, 본 실험에서 단위 급속 정맥주사에 의해 간내 유입 클리어런스를 구하는 실험법의 타당성

을 보여주고 있다. 한편, (5)식에 의해 산출한 간회수율(Rh)은 35%의 값을 나타내었다. 이러한 결과는 간이 ANS의 주된 분포장기임을 나타내주고 있다.<sup>25)</sup>

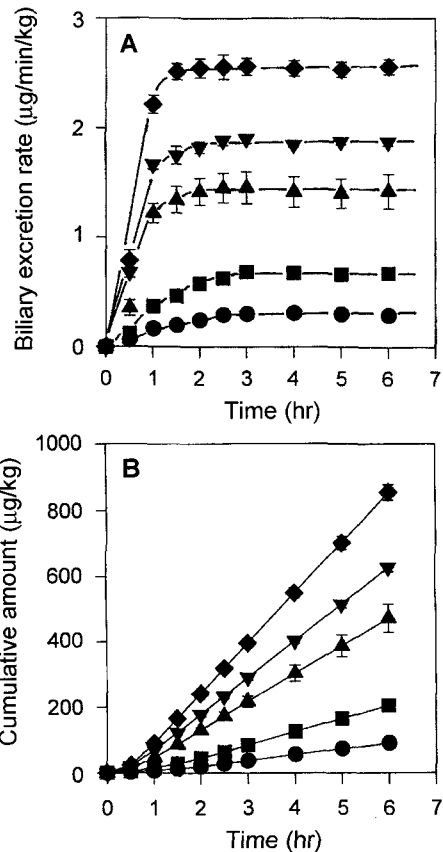
**등속주입한 후 ANS의 담즙배설 과정**

ANS의 주입속도를 변화시켜(0.2-1.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$ ), 정맥내로 등속주입한 후 혈장중 농도, 담즙중 농도 및 간중 농도를 측정하였다. 혈장중 농도 및 담즙배설 속도는 대부분 분포후상 반감기(13.6분)의 7배인 1.59시간대에서 거의 정상상태에 도달되었으나, 고용량(1.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$ ) 주입 등 일부에서 실험적 오차를 보였다. 따라서, 정상상태의 혈장중 농도 및 간중 농도의 실험치는 실험적 오차를 줄이고, 정상상태에 도달 한 후의 정확한 값을 반영하는 3시간대의 값을 사용하였다(Figure 3, 4(A)). 누적 담즙배설량은 각 투여량에서 지속적으로 증가되는 경향을 나타내었다(Figure 4(B)).

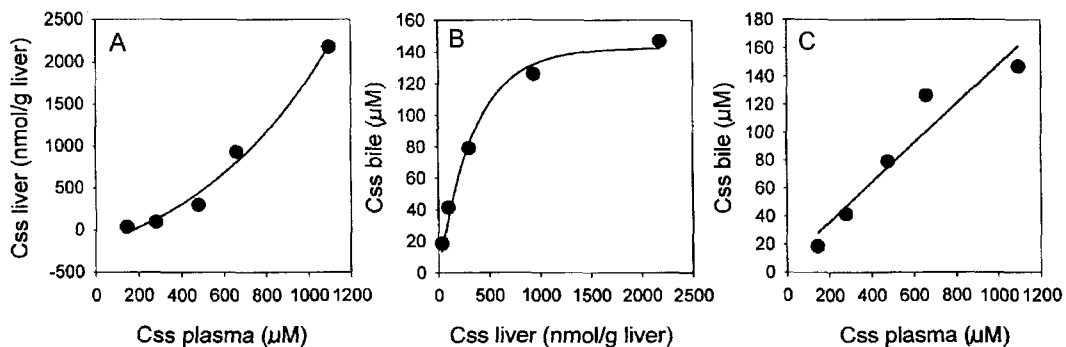


**Figure 3**—Plasma concentration of ANS after i.v. infusion. Each point represents the Mean  $\pm$  S.E. (n=3).  
Keys: (●) 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (▼) 0.4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (■) 0.8  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (◆) 1.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (▲) 1.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$

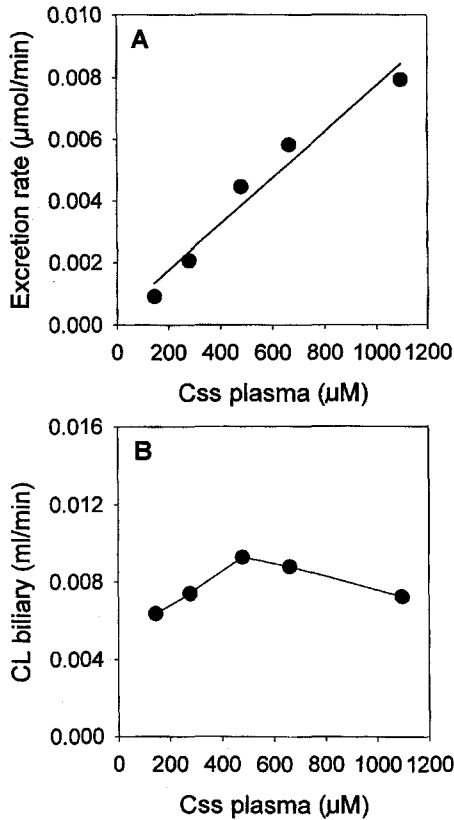
등속주입한 후 정상상태에서의 혈장중 농도, 담즙중 농도 및 간중 농도의 비를 Figure 5에 나타내었다. 정상상태에서 혈장중 농도에 비해 간중 농도가 1.6-2.0배 높은 값을 보였다. 이는 ANS가 농도구배를 역행하여 농축적으로 간조직내



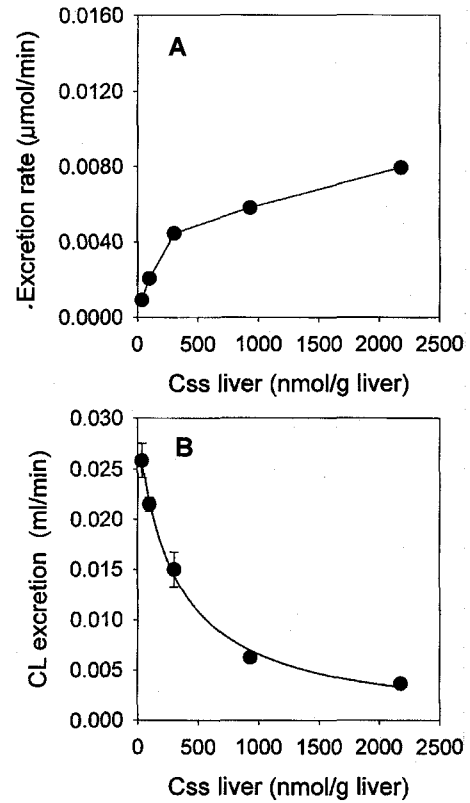
**Figure 4**—Biliary excretion rate (A) and cumulated amount of ANS in the bile (B) after i.v. infusion. Each point represents the Mean  $\pm$  S.E. (n=3).  
Keys: (●) 0.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (■) 0.4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (▲) 0.8  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (▼) 1.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (◆) 1.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$



**Figure 5**—Plots of  $C_{ss,liver}$  vs  $C_{ss,plasma}$  (A),  $C_{ss,bile}$  vs  $C_{ss,liver}$  (B), and  $C_{ss,bile}$  vs  $C_{ss,plasma}$  (C) of ANS at steady-state after i.v. infusion (n=3). The concentrations of plasma, liver and bile were used at steady-state after i.v. infusion of ANS. Each point represents the Mean  $\pm$  S.E. (n=3). Error bars were included in the symbols.



**Figure 6**—Plots of excretion rate (A) and biliary clearance (CL<sub>biliary</sub>) (B) vs plasma concentration at steady-state (C<sub>ss,plasma</sub>) after i.v. infusion of ANS. Each point represents the Mean ± S.E. (n=3). Error bars were included in the symbols.

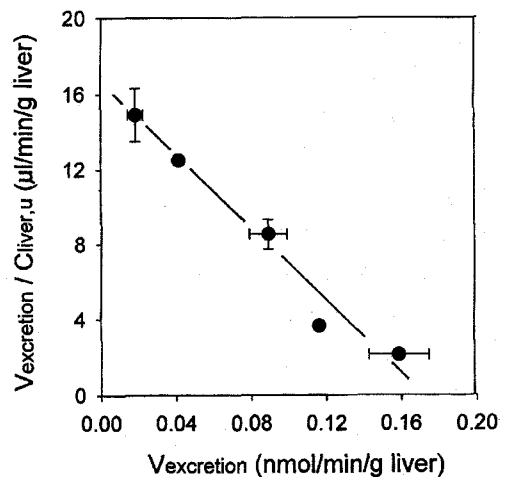


**Figure 7**—Plots of excretion rate (A) and excretion clearance (CL<sub>excretion</sub>) (B) vs liver concentration at steady-state (C<sub>ss,liver</sub>) after i.v. infusion of ANS. Each point represents the Mean ± S.E. (n=3).

로 이행되는 것을 나타내 주는 결과이다. 한편, 혈장중 농도 및 간내 농도에 비해 담즙중 ANS의 농도는 낮게 나타났다. ANS는 간조직내에서 대부분 비형광성 대사체로 변환<sup>24</sup>되어 담즙중으로 배설되기 때문으로 생각된다.

정상상태에서 혈장중 농도, 간중 농도 및 담즙배설속도를 측정하여 담즙배설 클리어런스(CL<sub>biliary</sub>) 및 담관막 투과 클리어런스(CL<sub>excretion</sub>)를 산출하였다(Figure 6, 7). 혈장중 농도를 기준으로한 CL<sub>biliary</sub>는 혈장중 농도의 증가에 의해 큰 차이를 보이지 않았으나, 간중 농도를 기준으로한 CL<sub>excretion</sub>은 ANS의 간중 농도가 증가함에 따라 전형적인 Michaelis-Menten식의 포화현상을 나타내었다. 이러한 결과는 간세포 내에서 모세담관막으로 투과되는 과정에 특수한 수송계가 관여한다는 가능성을 보여주는 결과이다.

간 조직내의 ANS 비결합형 농도를 기준으로 담즙배설속도를 Eadie-Hofstee 플롯한 결과를 Figure 8에 나타내었다. 여기서, 간중 ANS의 비결합형 농도는 저자 등<sup>3</sup>이 간세포질(cytosol)을 사용한 단백질결합 실험에서 산출한 파라미터 (R<sub>1</sub>=8.22 μM, K<sub>d1</sub>=2.43 μM, R<sub>2</sub>=578 μM, K<sub>d2</sub>=259 μM)를



**Figure 8**—Eadie-Hofstee plot of ANS excretion process from the liver. The unbound concentration in the liver (C<sub>liver,u</sub>) was determined with its binding parameters to cytosol.<sup>3</sup> Each point represents the Mean ± S.E. (n=3).

사용하여 (12)식에 따라 계산하였다. ANS의 담관막 투과 과정의 Eadie-Hofstee 플롯은 하나의 직선으로 표시되었으며 (Figure 8), (10)식에 따라 담관막 투과과정의 V<sub>max</sub> 및 K<sub>m</sub>

값을 산출한 결과, 각각 0.170 nmol/min/g liver 및 10.3  $\mu$ M의 값을 나타내었다. 따라서, (13)식에 따라  $V_{max}$  및  $K_m$  값의 비율( $V_{max}/K_m$ )로부터 계산한 결과, 간조직내 비결합형 ANS 농도에 대한  $PS_{excretion}$ 은 0.0165 ml/min/g liver의 값을 보였다.

ANS는 혈중에서 간으로 이행된 후에는 대부분 간내의 마이크로솜계에 의해 비형광성 대사체로 대사되어 소실되는 것으로 보고되고 있다.<sup>24)</sup> 저자 등<sup>24)</sup>이 보고한 ANS의 대사 고유 클리어런스( $CL_{int}$ )는 3.30 ml/min/g liver이었으며,  $PS_{excretion}$  값에 비해 현저하게 큰 값을 보였다. 따라서, ANS의 대사·배설과정(sequestration)은 모약물의 담즙배설( $PS_{excretion}$ ) 보다는 대부분 대사과정( $CL_{int}$ )에 의한 것으로 판단된다.

### 정맥주사 및 등속주입 실험결과로부터 배출(efflux) 과정 해석

등속주입후 일정시간이 경과하여 정상상태에 도달된 후에는 다음 식이 성립한다.<sup>30)</sup>

$$K_{p,ss} = \frac{C_{liver,ss}}{C_{p,ss}} = \frac{PS_{influx}}{PS_{efflux} + PS_{seq}} \quad (14)$$

여기서,  $K_{p,ss}$ 는 정상상태에서의 혈장중 농도에 대한 간내 조직중의 약물농도 분배율을,  $C_{liver,ss}$  및  $C_{p,ss}$ 는 정상상태에서의 간중 및 혈중 약물농도를 나타내고,  $PS_{seq}$ 는 약물의 대사·배설(sequestration) 과정의 고유 클리어런스(permeability-surface area product)를 각각 나타낸다. 따라서, 상기의 급속 정맥주사 및 등속주입의 실험 결과로부터 산출한 파라미터를 사용하여  $PS_{efflux}$  값을 산출하였다. 즉,  $K_{p,ss}$  값은 등속주입의 정상상태에서 산출한 값 1.60을,  $PS_{influx}$ 는 상기의 급속 정맥주사 실험에서 산출한, 11.25 ml/min/g liver의 값을,  $PS_{seq}$ 는 상기의 등속주입에서 산출한  $PS_{excretion}$  (0.0165 ml/min/g liver)과  $CL_{int}$  (3.30 ml/min/g liver)<sup>24)</sup>를 합하여 계산한 3.3165 ml/min/g liver의 값을 사용하였다. 이상의 파라미터로부터 (14)식에 의해 산출한  $PS_{efflux}$  값은 3.71 ml/min/g liver의 값을 나타내었다.

저자 등의 분리간세포(isolated hepatocytes)를 사용한 *in vitro* 실험에서, 세포내 배출(efflux)과정의  $V_{max}$  및  $K_m$ 은 각각 52 nmol/min/g liver 및 10  $\mu$ M의 값이 얻어졌다(unpublished data). 이들 파라미터를 사용하여 그 비율( $V_{max}/K_m$ )로부터 산출한 *in vitro* 레벨에서의  $PS_{efflux,vitro}$ 는 7.32 ml/min/g liver의 값을 보였으며, 본 실험의 *in vivo* 정맥주사 및 등속주입의 결과로부터 계산한 추정치와 유사(comparable)한 값을 나타내었다. 즉, 양호한 *in vitro-in vivo* 상관성을 나타내었으며, 본 실험의 *in vivo* 레벨에서 간내 유입

(uptake), 배출(efflux) 및 대사·담즙배설(sequestration) 과정의 클리어런스를 해석하는 실험법의 타당성을 보여주고 있다.

## 결 론

1. ANS 30  $\mu$ mole/kg을 정맥투여한 후 1분 이내의 초기 시간대에서 혈장중 소실반감기( $t_{1/2}$ )는 0.102분이었으며, 간중 농도를 측정하여 integration plot에 의해 산출한 *in vivo* 간내 유입 클리어런스( $CL_{uptake}$ )는 0.10 ml/min/g liver이었다. 또한, 혈장내 비결합형 ANS를 기준으로 *in vivo*에서의 간내 유입에 관한 고유 클리어런스( $PS_{influx}$ )는 11.25 ml/min/g liver의 값을 보였으며, 양호한 *in vitro-in vivo* 상관성을 나타내었다.

2. ANS의 주입속도를 변화시켜(0.2-1.6  $\mu$ mol/min/kg) 정맥내로 등속주입한 후 혈장중 농도 및 담즙배설 속도는 대부분 분포후상 반감기(13.6분)의 7배인 1.59시간대에서 거의 정상상태에 도달되었으나, 정상상태의 혈장중 농도 및 간중 농도의 실험치는 3시간대의 값을 사용하였다. 간중 농도를 기준으로한  $CL_{excretion}$ 은 ANS의 간중 농도가 증가함에 따라 전형적인 Michaelis-Menten식의 포화현상을 나타내었다. 또한, 간조직내 비결합형 ANS 농도에 대한  $PS_{excretion}$ 은 0.0165 ml/min/g liver의 값을 보였으며, ANS의 대사 고유 클리어런스( $CL_{int}$ =3.30 ml/min/g liver)에 비해 무시할 수 있을 정도로 작은 값을 나타내었다.

3. 급속정맥주사 및 등속주입의 실험 결과로부터 산출한 파라미터를 사용하여  $PS_{efflux}$  값을 산출한 결과, 3.71 ml/min/g liver의 값을 나타내었으며, 양호한 *in vitro-in vivo* 상관성을 보였다.

4. 급속정맥주사 및 등속주입 실험에서 간내 유입(uptake), 배출(efflux) 및 대사·담즙배설(sequestration) 과정을 분리·평가하는 실험법을 제시한 본 연구 결과는 *in vivo* 레벨에서 약물의 간내 이행 및 담즙배설을 해석하는 데 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 말씀

이 연구는 보건복지부 지원 '96보건의료기술개발연구(HMP-96-D-2-1035)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) M. Yamazaki, H. Suzuki and Y. Sugiyama, Recent advances

- in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics, *Pharm. Res.*, **13**, 497-513 (1996).
- 2) H. Kusuvara, H. Suzuki and Y. Sugiyama, The role of p-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1025-1040 (1998)
  - 3) Y.B. Chung, S. Miyauchi, Y. Sugiyama, H. Harashima, T. Iga, and M. Hanano, Kinetic analysis of the dose-dependent hepatic handling of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate in rats, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **18**, 313-333 (1990).
  - 4) Y.B. Chung, S. Miyauchi, Y. Sugiyama, H. Harashima, T. Iga, and M. Hanano, Effect of various organic anions on the plasma disappearance of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS), *J. Hepatology*, **11**, 240-251 (1990).
  - 5) B.F. Goresky, Initial distribution and rate of uptake of Sulfobromophthalein in the liver, *Am. J. Physiol.*, **207**, 13-26 (1964).
  - 6) G. Paumgartner, J. Reichen, Kinetics of hepatic uptake unconjugated bilirubin, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **51**, 169-176 (1976).
  - 7) U. Gartner, R.J. Stockert, W.G. Levine, A.W. Wolkoff, Effect of nafenopin on the uptake of bilirubin and sulfobromophthalein by isolated perfused rat liver, *Gastroenterology*, **83**, 1163-1169 (1982).
  - 8) M. Schwenk R. Burr, L. Schwarz, E. Pfaff, Uptake of bromosulfophthalein by isolated liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **64**, 189-197 (1976).
  - 9) P.D. Berk B.J. Potter, W. Stremmel, Role of plasma membrane ligand bound organic anions, *Hepatology*, **7**, 165-176 (1987).
  - 10) E. Petzinger, and M. Frimmer, Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate, *Biochim. Biophys. Acta.*, **778**, 539-548 (1984).
  - 11) E. Petzinger, N. Muller, W. Folimann, J. Deutscher, and R.K.H. Kinne, Uptake of bumetanide into isolated rat hepatocytes and primary liver cell cultures, *Am. J. Physiol.*, **256**, G78-G86 (1989).
  - 12) K. Ziegler, M. Frimmer, H. Kessler, J. Damm, V. Eiermann, S. Koll, and J. Zarbock, Modified somatostatins as inhibitors of a multispecific transport system for bile acids and phallotoxins in isolated hepatocytes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **845**, 86-93 (1985).
  - 13) B. Zimmerli, J. Valantinas, and P.J. Meier, Multispecificity of Na<sup>+</sup>-dependent taurocholate uptake in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **250**, 301-308 (1989).
  - 14) W. Stremmel, S. Strohmeier, and P.D. Berk, Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3584-3594 (1986).
  - 15) Y. Laperche, A.M. Preaux, and P. Berthelot, Two systems are involved in the sulfobromophthalein uptake by rat liver cells: one is shared with bile salts, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1333-1336 (1981).
  - 16) B.F. Scharschmidt, J.G. Waggoner, and P.D. Berk, Hepatic organic anion uptake in the rat, *J. Clin. Invest.*, **56**, 1280-1292 (1975).
  - 17) M. Schwenk, R. Burr, L. Schwarz, and E. Pfaff, Uptake of sulfobromophthalein by isolated rat liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **64**, 189-197 (1976).
  - 18) A.W. Wolkoff, A.C. Samuelson, K.L. Johansen, R. Nakata, D.M. Withers, and A. Sosiak, Influence of Cl<sup>-</sup> on organic anion transport in short-term cultured rat hepatocytes and isolated rat liver, *J. Clin. Invest.*, **79**, 1259-1268 (1987).
  - 19) M.S. Anwer, and D. Hegner, Effect of Na<sup>+</sup> on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes; evidence for a heterogenous system, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 181-192 (1978).
  - 20) M.S. Anwer, and D. Hegner, Effect of organic anions on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1027-1030 (1978).
  - 21) A. Blom, K. Keulemans, and D.K.F. Meijer, Transport of dibromosulfophthalein by isolated rat hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1809-1816 (1981).
  - 22) J.H. Lin, Y. Sugiyama, S. Awazu, and M. Hanano, Kinetic studies on the deethylation of ethoxybenzamide. A comparative study with isolated hepatocytes and liver microsomes of rat, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2825-2830 (1980).
  - 23) M. Yamazaki, H. Suzuki, Y. Sugiyama, T. Iga, and M. Hanano, Uptake of organic anions by isolated rat hepatocytes: a classification in terms of ATP-dependency, *J. Hepatol.*, **14**, 41-47 (1992).
  - 24) Y.B. Chung and K. Han, Metabolism of an anionic fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) by rat liver microsomes, *Arch. Pharm. Res.*, **21**, 677-682 (1998).
  - 25) M. Yamazaki, H. Suzuki, and M. Hanano, Na<sup>+</sup>-independent multispecific anion transporter mediates active transport of pravastatin into rat liver, *Am. J. Physiol.*, **264**, G36-G44 (1993).
  - 26) D.C. Kim, Y. Sugiyama, H. Satoh, T. Fuwa, T. Iga, and M. Hanano, Kinetic analysis of the receptor dependent uptake of human epidermal growth factor by the tissues of the rat *in vivo*, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 200-207 (1988).
  - 27) S. Yanai, Y. Sugiyama, T. Iga, T. Fuwa, and M. Hanano, Kinetic analysis of the downregulation of epidermal growth factor receptors in rats *in vivo*, *Am. J. Physiol.*, **58**, C593-C598 (1990).
  - 28) K.S. Pang, and M. Rowland, Hepatic clearance of drugs.: Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 625-653 (1977).
  - 29) R.J. Dedrick, D.S. Zaharko, and R. Lutz, Transport and binding of methotrexate *in vivo*, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 662-690 (1973).
  - 30) S. Miyauchi, Y. Sugiyama, Y. Sawada, K. Morita, T. Iga, and M. Hanano, Kinetics of hepatic transport of 4-methylumbelliferone in rats: Analysis by multiple indicator dilution method, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **15**, 25-38 (1987).