

## 생쥐 간 S9 분획을 이용한 방사성추적자 대사물질의 새로운 체외 측정방법

성균관대학교 의과대학 생명의공학과, 삼성서울병원 핵의학과  
류은경 · 최연성 · 김동현 · 이상윤 · 최 용 · 이경한 · 김병태

### A Novel In Vitro Method for the Metabolism Studies of Radiotracers Using Mouse Liver S9 Fraction

Eun Kyoung Ryu, M.S., Yean Seong Choe, Ph.D., Dong Hyun Kim, B.S., Sang-Yoon Lee, Ph.D., Yong Choi, Ph.D., Kyung-Han Lee, M.D., Byung-Tae Kim, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Department of Biomedical Engineering, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Usefulness of mouse liver S9 fraction was evaluated for the measurement of the metabolites in the in vitro metabolism study of  $^{18}\text{F}$ -labeled radiotracers. **Materials and Methods:** Mouse liver S9 fraction was isolated at an early step in the course of microsomes preparation. The in vitro metabolism studies were carried out by incubating a mixture containing the radiotracer, S9 fraction and NADPH at 37 °C, and an aliquot of the mixture was analyzed at the indicated time points by radio-TLC. Metabolic defluorination was further confirmed by the incubation with calcium phosphate, a bone mimic. **Results:** The radiotracer [ $^{18}\text{F}$ ]1 underwent metabolic defluorination within 15 min, which was consistent with the results of the in vivo method and the in vitro method using microsomes. Radiotracer [ $^{18}\text{F}$ ]2 was metabolized to three metabolites including 4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzoic acid within 60 min. It is likely that the one of these metabolites at the origin of radio-TLC was identical with the one that obtained from the in vivo and in vitro (microsomes) method. Compared with the in vitro method using microsomes, the method using S9 fraction gave a similar pattern of the metabolites but with a different ratio, which can be explained by the presence of cytosol in the S9 fraction. **Conclusion:** These results suggest that the findings of the in vitro metabolism studies using S9 fraction can reflect the in vivo metabolism of novel radiotracers in the liver. Moreover, this method can be used as a tool to determine metabolic defluorination along with calcium phosphate absorption method. (Korean J Nucl Med 38(4):325-329, 2004)

**Key Words:** radiotracer, metabolism, S9 fraction, in vitro method, calcium phosphate

## 서 론

핵의학 영상으로 보다 많은 의학적, 생물학적 정보를 얻기 위해서는 새로운 방사성추적자의 개발이 필수적이다. 그러나, 생체 내에 투여된 방사성추적자로부터 방출되어 핵의학 영상을 구성하게 하는 방사선 신호는 방사성물질들의 위치와 양에 대한 정보를 보여 줄 수 있지만, 방사성물질의 성분은 반영하지 못한다. 따라서, 방사성추적자의 개발에 있어서 체내 대사연구는 획득한 영

상의 정확성을 위하여 필수적인 조사항목이 되어 왔으며, 대사물질의 존재여부와 대사물질이 영상에 미치는 효과에 대한 연구는 새로운 방사성추적자의 발굴만큼이나 비중있는 논점이 되고 있다.<sup>1,2)</sup>

방사성추적자의 대사물질 연구는 실험동물에 방사성추적자를 투여한 후 혈액 및 조직 등을 얻어 분석하는 체내방법이 주로 행하여지며, 사람의 경우에는 혈액을 채취하여 대사연구를 수행한다. 체내 대사물질 연구는 살아있는 실험동물을 사용하기 때문에 고가의 시설이 필요하며, 실험동물을 다룰 수 있는 전문인력과 값비싼 실험동물을 갖추어야 한다. 효율성에서도 실험동물에서 대사물질 분석에 적당한 방사성물질의 농도를 확보하기 위하여 높은 양의 방사능을 투여하여야 하기 때문에 방사선 피폭의 부담이 크다. 따라서 체외에서 대사연구를 수행한다면 이러한 비용 및 시간적 부담을 줄일 수 있을 것으로 생각한다.

- Received: 2004. 8. 2. • Accepted: 2004. 8. 13.
- Address for reprints: Yean Seong Choe, Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine 50 Ilwon-dong, Kangnam-ku, Seoul 135-710, Korea  
Tel: 82-2-3410-2623, Fax: 82-2-3410-2639  
E-mail: yschoe@smc.samsung.co.kr

의약품 뿐만 아니라 방사성추적자의 대사는 간에서 주로 일어난다.<sup>1,2)</sup> 저자들은 간 microsome (마이크로솜)을 이용한 방사성추적자의 대사물질 체외 측정방법을 개발하여 생쥐 혈액을 이용한 체내 측정방법과 그 결과를 비교하여 문헌에 보고한 바가 있다.<sup>3)</sup> 그 결과, 체외방법이 방사성추적자의 체내 대사물질을 예측하는데 유용하다는 것을 확인하였다. 간 S9 분획은 마이크로솜을 얻는 과정에서 분리되기 때문에 마이크로솜에 비하여 짧은 시간 내에 쉽게 얻을 수 있고, 마이크로솜에는 없는 세포질을 함유하고 있어서 세포질에 존재하는 효소들의 역할까지 알 수 있다.<sup>4)</sup> 따라서 이 연구에서는 S9 분획을 사용하여 저자들에 의하여 대사경로가 연구된 방사성추적자의 대사물질을 측정하였으며, 체내 방법 및 마이크로솜을 사용한 체외방법 결과와 비교 분석하여, S9 분획이 대사물질의 체외측정에 사용될 수 있는가를 평가하였다.

## 대상 및 방법

<sup>18</sup>F은 사이클로트론(GEMS, Uppsala, Sweden)에서 <sup>18</sup>O-물을 표적으로 하여 생산하였다. 방사성추적자의 정제는 HPLC (Thermo Separation Products, Fremont, CA U.S.A.)를 사용하여 수행하였으며, 대사물질 측정에는 방사능 TLC (Bioscan, Washington D.C., U.S.A.)를 사용하였다. 인산칼슘과 NADPH는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다.

### 1. 방사성추적자의 합성

3-[1-(3-[<sup>18</sup>F]Fluoromethylbenzyl)piperidin-4-yl]-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one ([<sup>18</sup>F]1)과 3-[1-(4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzyl)piperidin-4-yl]-1-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one ([<sup>18</sup>F]2)은 문헌에 보고된 방법<sup>4)</sup>을 참고하여 합성하였다. 방사성추적자의 합성에 사용된 전구물질은 Sankyo 회사(Tokyo, Japan)에서 기증하였다.

### 2. 생쥐 간 S9 분획의 분리

생쥐 간 S9 분획의 분리는 문헌에 보고된 방법을 참고하여 수행하였다.<sup>5,6)</sup> 생쥐(ICR, 수컷 25-30 g)를 척추탈골을 이용하여 희생시킨 후, 즉시 간을 꺼내어 1.15% KCl 수용액으로 혈액을 말끔히 제거하였다. 간 조각들에 TRIS buffer (0.1 M, pH 7.4)를 넣고 가위로 여러 번 잘게 자르고, 얼음위에서 전동분쇄기로 잘게 부순 후에, 고속 원심분리기를 사용하여 9000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상층인 S9 분획을 얻었다. S9 분획의 단백질량은 Bradford 분석법<sup>7)</sup>에 의하여 측정하였으며, 소량으로 나누어 극저온 냉동고(-60 °C)에 보관하였다.

### 3. 체외 대사물질 측정

합성된 [<sup>18</sup>F]1 또는 [<sup>18</sup>F]2 (0.7-1.0 MBq)를 시험관에 넣고 소량의 에탄올에 녹인 후 phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4)를 넣어 혼합하였다. S9 분획(0.5 mg/mL)을 방사성추적자 용액에 넣고 37 °C에서 3분 동안 예열한 후, NADPH (0.25 mM)를 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응 시작 후 1, 5, 15, 30, 60분에 반응용액을 각각 500 µL를 취하여 셀라이트(celite 545)가 채워진 유리관에 통과시킨 후, 셀라이트관에 에탄올 2 mL을 통과하였다. 이 용액을 방사능 TLC를 사용하여 분석하였다.<sup>3)</sup> 전개용매로는 14:1:0.01 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH-NH<sub>4</sub>OH ([<sup>18</sup>F]1), 10:1:0.01 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH-NH<sub>4</sub>OH ([<sup>18</sup>F]2) 또는 1:1:0.01 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH-Et<sub>3</sub>N 혼합액을 사용하였다.

### 4. 인산칼슘을 이용한 탈불소화 측정

합성된 [<sup>18</sup>F]1 또는 [<sup>18</sup>F]2 (0.7-1.0 MBq)의 반응시간 30분 용액 500 µL를 셀라이트로 거른 뒤, 용액을 인산칼슘 10 mg과 함께 37 °C에서 15분 동안 반응하였다. 반응이 종료된 후, 혼합액을 3000 rpm에서 2분 동안 원심분리하고 상층을 침전층(calcium phosphate)으로부터 조심스럽게 분리하여 각각의 방사능을 측정하였다.<sup>3)</sup> 침전층에 증류수 500 µL를 넣고 vortex로 잘 섞은 후 다시 동일한 방법으로 원심분리하여 각각의 방사능을 측정하였다.

## 결과

### 1. 방사성추적자의 합성과 S9 분획의 분리

[<sup>18</sup>F]1과 [<sup>18</sup>F]2는 12-25%의 방사화학적 수율로 얻어졌다 (Fig. 1). 생쥐의 간에서 분리된 S9 분획의 단백질량은 Bradford 단백질 분석법으로 측정된 결과 24 mg/mL 이었다. S9 분획은 소량으로 나누어 극저온 냉동고에 보관하였으며 장기간 사용하더라도 S9 분획의 활성은 변하지 않았다.

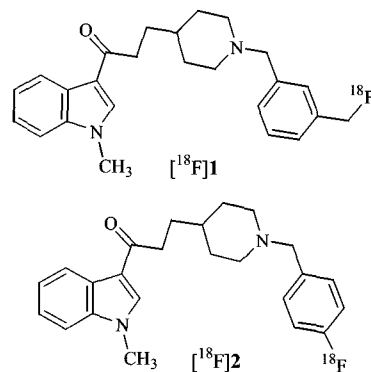


Fig. 1. Structures of [<sup>18</sup>F]1 and [<sup>18</sup>F]2 are shown.

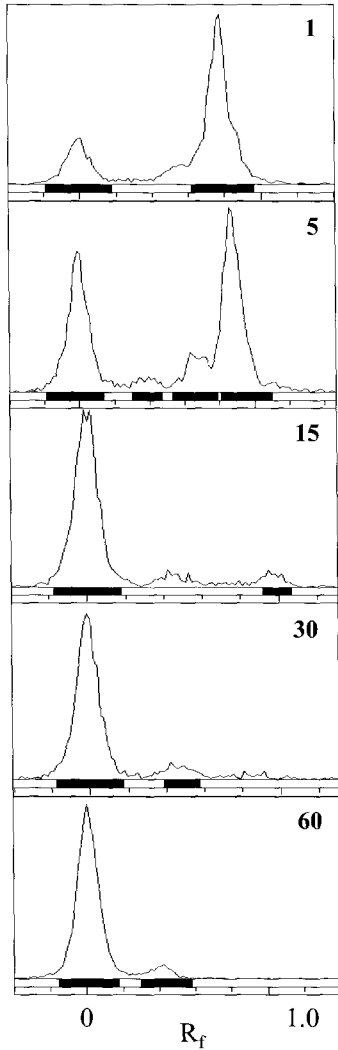


Fig. 2. Radio-thin layer chromatograms of the incubation mixture of  $[^{18}\text{F}]1$  with S9 fraction and NADPH at 1, 5, 15, 30 and 60 min are shown. The  $R_f$  of  $[^{18}\text{F}]1$  was 0.61 and that of  $[^{18}\text{F}]F$  was 0 using a 14:1:0.01 mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH-NH}_4\text{OH}$  as the developing solvents.

## 2. 체외 대사물질 측정

S9 분획을 사용한 대사물질 측정방법에서  $[^{18}\text{F}]1$ 은 15분 이내에 거의 모두 극성이 큰 대사물질로 전환되었다(Fig. 2). Triethylamine을 함유한 극성이 큰 전개용매를 사용한 방사능 TLC에서 원점에 위치한 피크는 이동하지 않았으며,  $[^{18}\text{F}]$ 플루오라이드 이온 표준용액과 함께 방사능 TLC에서 분석한 결과 동일한 화합물임을 확인하였다. 이 결과는 동일한 방사성추적자를 사용하여 저자들이 보고한 체내방법 및 체외방법(마이크로솜) 결과와 일치하였다.<sup>3)</sup> 대사되지 않은 방사성추적자와 대사물질의 비율은 1분에 77:23, 5분에 46:37이었으며 15분 이후에는 대사물질만 검출되었다.

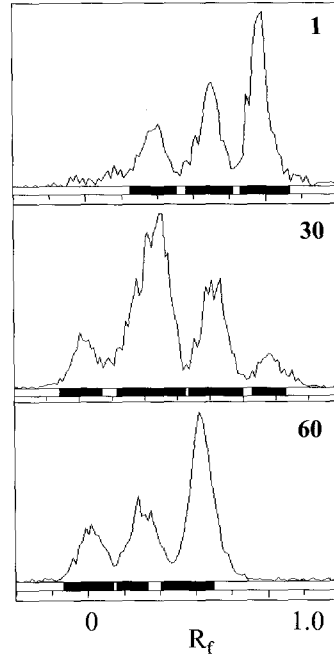


Fig. 3. Radio-thin layer chromatograms of the incubation mixture of  $[^{18}\text{F}]2$  with S9 fraction and NADPH at 1, 30 and 60 min are shown. The  $R_f$  of  $[^{18}\text{F}]2$  was 0.73 and those of the metabolites were 0, 0.28 and 0.52 using a 10:1:0.01 mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH-NH}_4\text{OH}$  as the developing solvents.

$[^{18}\text{F}]2$ 는 시간이 경과함에 따라 점차 대사되어 60분이 지난 뒤, 모두 대사물질로 전환되었으며, 원점의 대사물질(들)을 포함하여 시간에 따라 점차 증가하는 2개의 대사물질을 확인하였다(Fig. 3). 이 중에서 원점에 위치한 대사물질은 마이크로솜을 사용한 체외 대사물질 측정법에서도  $[^{18}\text{F}]$ 플루오라이드 이온이 아닌 매우 극성이 높은 대사물질임을 확인한 바 있으며,  $[^{18}\text{F}]2$ 와 원점사이에 4- $[^{18}\text{F}]$ 플루오로벤조산이 대사물질로 나타남을 이미 확인한 바 있다.<sup>3)</sup> 대사되지 않은 방사성추적자와 대사물질들의 비율은 1분에 44:56, 30분에 7:93, 60분에는 대사물질들만 검출되었다.

## 3. 인산칼슘을 이용한 탈불소화 측정

방사성추적자 대사물질과 인산칼슘과의 반응은 반응용액 속의  $[^{18}\text{F}]$ 플루오라이드 이온의 존재여부와 농도를 잘 반영하였다.  $[^{18}\text{F}]1$ 은 대사로 인한 탈불소화가 일어나 반응용액 속의 거의 모든 방사능이 인산칼슘 침전층에 잔류하였으며 용액층에는 거의 없었다(9:1). 반면에  $[^{18}\text{F}]2$ 의 경우에는 대사물질이 생성되었지만 인산칼슘 침전층에 흡착이 일어나지 않았고 대부분이 상층액에 잔류하였다(1:12). 이 결과로부터  $[^{18}\text{F}]2$ 의 대사물질 중에  $[^{18}\text{F}]$ 플루오라이드 이온은 존재하지 않았으며 대사로 인한 탈불소화는 일어나지 않았다는 것을 알 수 있었다.

## 고찰

화합물 [<sup>18</sup>F]1과 [<sup>18</sup>F]2는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 벤질피페리딘 구조를 가지고 있는 방사성추적자로서, 저자들은 체내연구와 마이크로솜을 사용한 체외연구를 통하여 대사물질을 측정하여 보고한 바가 있다.<sup>3)</sup> [<sup>18</sup>F]1의 경우에는 체내연구와 마이크로솜을 사용한 체외연구에서 벤젠고리에 치환된 플루오로메틸기에서 탈불소화가 일어나 [<sup>18</sup>F]플루오라이드 이온이 주된 대사물질이었다. [<sup>18</sup>F]2의 경우에는 체내연구에서 극성이 큰 하나의 대사물질이 생성되었지만, 마이크로솜을 사용한 체외연구에서는 체내연구에서 얻은 대사물질 이외에 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조산이 생성되는 것을 확인하였다. 이는 피페리딘 N에서 탈알킬화(N-dealkylation) 경로를 통하여 생성된 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조알데히드가 마이크로솜에 있는 효소들에 의하여 산화되어 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조산이 생성된 것으로 보인다.<sup>8,9)</sup>

방사성추적자에서 대사로 인한 탈불소화가 일어날 경우 생성되는 [<sup>18</sup>F]플루오라이드 이온은 방사능 TLC로 측정할 때 원점에 위치하므로 경우에 따라서 분석이 용이하지 않다. 즉 극성이 매우 높은 대사물질이 생길 경우 플루오라이드 이온과 극성 대사물질의 분리가 용이하지 않기 때문이다. 따라서, 이 연구에서는 [<sup>18</sup>F]플루오라이드 이온이 뼈에 흡착되는 성질을 이용하여 뼈의 구성성분인 인산칼슘을 이용하여 [<sup>18</sup>F]플루오라이드 이온의 존재 여부를 측정하였다.

방사능 TLC를 이용하여 [<sup>18</sup>F]1의 대사물질을 측정된 결과, 대사물질이 방사능 TLC의 원점에 위치하였으며, 인산칼슘과 반응한 결과는 대부분의 방사능이 침전층인 인산칼슘에 흡착되어 침전층과 총 상층액의 비율이 약 9:1이었다. 이 결과는 30분의 대사반응 혼합액에서 대사되지 않은 방사성추적자와 대사물질의 비율을 반영하였다. 따라서 [<sup>18</sup>F]1의 대사에서는 [<sup>18</sup>F]플루오라

이드 이온이 주 대사물질이었으며, Fig. 4에 있는 대사경로에 의하여 생성되는 것으로 예상된다.<sup>10)</sup> 이 경우에 탈불소화가 N-탈알킬화 보다 빠르게 일어나 3-[<sup>18</sup>F]플루오로메틸벤조알데히드 또는 3-[<sup>18</sup>F]플루오로메틸벤조산이 생성되지 않은 것으로 보인다. 이 결과는 저자들이 동일한 방사성추적자를 사용하여 생쥐 체내 대사물질 측정 결과 및 마이크로솜을 이용한 체외 대사물질 측정 결과와 일치하였다.<sup>3)</sup> 대사로 인한 탈불소화는 [<sup>18</sup>F]플루오로알킬기를 함유하는 방사성추적자에서 일어날 수 있는데, 특히 벤질 위치 탄소의 높은 반응성 때문에 [<sup>18</sup>F]플루오로메틸기를 함유한 방사성추적자에서 빈번하게 일어나는 것으로 보고되어 있다.<sup>4,10,11)</sup> [<sup>18</sup>F]2의 경우에는 저자들에 의하여 보고된 결과와 일부 다른 경향을 보여 주었는데, 체내방법에서는 극성이 큰 한 개의 대사물질이 검출되었지만 마이크로솜을 이용한 체외방법에서는 이외에도 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조산이 검출되었다.<sup>3)</sup> S9 분획을 사용한 실험에서는 이들 방법에서 검출된 극성 대사물질, 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조산(Fig. 4), 그리고 또 다른 대사물질이 검출되었다. 그러나 이 연구에서는 극성이 큰 전개용매를 사용하였으므로 방사능 TLC에서 대사물질들의 분리가 더 용이하여 다른 대사물질 피크 속에 가려져 있던 대사물질이 검출되었을 가능성이 높다. 그러나 대사물질들의 비율이 마이크로솜 실험에서 얻은 비율과는 다른 양상을 보이는데, S9 분획은 세포질을 포함하고 있어 다른 효소들의 영향을 고려할 때, 대사물질들 간의 비율은 다를 수 있을 것으로 생각된다. 인산칼슘과의 반응에서는 대부분의 방사능이 상층에서 검출되어 침전층과 총 상층액의 비율이 약 1:12이었다. [<sup>18</sup>F]2의 경우에 극성이 큰 대사물질이 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조산이 접합된 이차 대사물질일 가능성이 크기 때문에 일차 대사물질인 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조산은 체외방법에서만 검출되어지는 것으로 생각된다. 따라서 체외방법은 체내방법에서 검출되지 않는 대사물질까지 조사하여 방사성추적자의 새로운 대사경로를

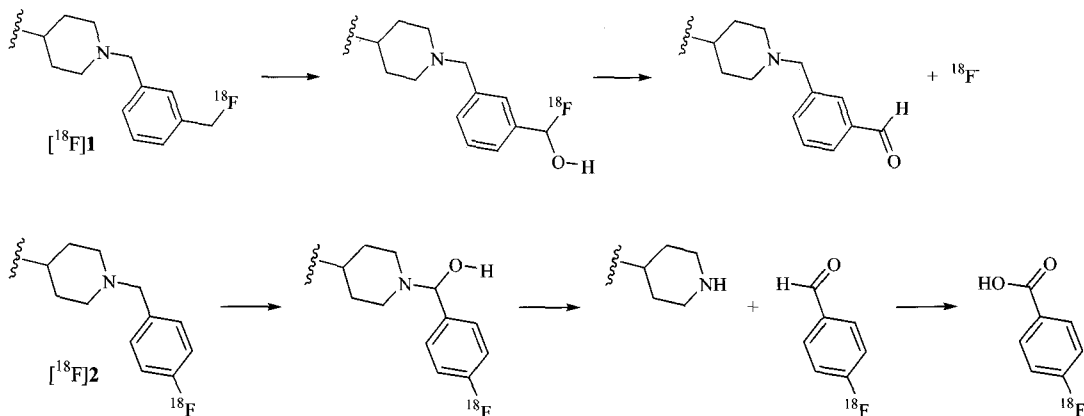


Fig. 4. Proposed main routes of the metabolism of (<sup>18</sup>F)1 and (<sup>18</sup>F)2 are described.

밝힐 수 있는 기회를 제공할 수 있다.

새로운 방사성추적자의 대사안정성 연구는 매우 중요하며 반드시 수행되어야 하는 분야이다. 이 연구에서 보듯이 S9 분획을 이용한 체외 대사연구는 새로운 방사성추적자의 대사물질을 측정하는데 매우 효율적이고 유용하다. 특히 방사성추적자가 체내에서 대사로 인한 탈불소화가 일어날 수 있는가를 정확하게 예측할 수 있어, 실험동물에서 체내분포 실험을 수행하기 전에 미리 그 결과를 예측할 수 있다. 효율적인 측면을 고려하면 체내 대사물질 측정에는 높은 방사능이 필요하고 혈액내 잔류하는 방사성물질의 양이 매우 적기 때문에 신뢰성 높은 데이터를 얻기가 매우 힘들다. 반면에 체외 방법의 경우에는 5개의 시간대에서 분석을 하여도 1 MBq 미만의 방사능량으로도 검출이 가능하고, 방사능 TLC를 사용하여 믿을 만한 데이터를 얻을 수 있기 때문에 효율성 또한 높다고 평가된다. 또한 마이크로솜보다 정제과정이 단순하고 용이한 S9 분획으로도 마이크로솜과 유사한 결과를 얻을 수 있어, 방사성추적자들의 간에서의 대사안정성을 쉽게 예측하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

## 요 약

**목적:** 생쥐 간에서 분리한 S9 분획을 사용하여 방사성추적자의 대사물질을 측정함으로써 S9 분획이 새로운 방사성추적자의 대사물질 측정에 사용될 수 있는가를 평가하였다. **대상 및 방법:** 저자들에 의하여 체내 대사경로가 연구된 방사성추적자를 사용하였으며, 생쥐 간 S9 분획은 마이크로솜을 얻는 과정에서 생쥐의 간으로부터 얻어졌다. 체외 대사물질 측정방법은 방사성추적자에 S9 분획과 NADPH를 넣고 37 °C에서 반응하였으며 해당하는 시간대에 반응용액의 일부를 취하여 대사물질을 방사능 TLC로 측정하였다. 대사로 인한 탈불소화는 뼈 대사물질인 인산칼슘과 반응하여 흡착 정도를 측정함으로써 확인하였다. **결과:** S9 분획을 사용한 체외 대사물질 측정방법에서 방사성추적자 [<sup>18</sup>F]1은 대사로 인한 탈불소화가 일어나 15분 이내에 거의 모두 [<sup>18</sup>F]플루오라이드 이온으로 대사되었다. 이 결과는 동일한 방사성추적자를 사용하여 저자들이 보고한 체내방법 및 마이크로솜을 사용한 체외방법에서 얻은 결과와 일치하였다. 방사성추적자 [<sup>18</sup>F]2는 60분 이내에 모두 대사되었으며, 4-[<sup>18</sup>F]플루오로벤조

산을 포함한 3개의 대사물질이 확인되었다. 이 중에서 원점에 위치한 대사물질은 체내방법 및 마이크로솜을 사용한 체외 대사물질 측정방법에서 얻은 대사물질과 일치하였다. 마이크로솜을 사용한 체외방법에서 얻은 결과와 비교할 때 대사물질은 유사하였으나 대사물질들의 비율은 상이하였으며, 이 결과는 S9 분획에 있는 세포질의 영향으로 여겨진다. **결론:** S9 분획을 사용한 체외 대사물질 측정법은 체내의 간 대사물질을 예측하는데 매우 유용성이 크며, 특히 대사로 인한 탈불소화를 추적하는 데는 인산칼슘을 이용한 흡착법과 함께 높은 신뢰성을 갖는 것이 확인되었다.

## References

1. Delaforge M. Importance of metabolism in pharmacological studies: possible in vitro predictability. *Nucl Med Biol* 1998;25:705-9.
2. Maziere B, Cantineau R, Coenen HH, Guillaume M, Halldin C, Luxen A, et al. PET radiopharmaceutical metabolism-plasma metabolite analysis. In: Stocklin G, Pike VW, editors. *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Methodological Aspects*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1993. p. 151-78.
3. Lee S-Y, Choe YS, Kim DH, Park B-N, Kim SE, Choi Y, et al. A simple and efficient in vitro method for metabolism studies of radiotracers. *Nucl Med Biol* 2001;28:391-5.
4. Choe YS, Oh S-J, Shim I, Naruto S, Chi DY, Kim SE, et al. Syntheses and biological evaluation of <sup>18</sup>F-labeled 3-(1-benzylpiperidine-4-yl)-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)propan-1-ones for in vivo mapping of acetylcholinesterase. *Nucl Med Biol* 2000;27:263-7.
5. Liu K, Guengerich P, Yang SK. Enantioselective hydrolysis of lorazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction. *Drug Met Disp* 1991;19:609-13.
6. Mazel P. General principles and procedures for drug metabolism in vitro. In: La Du BN, Mandel HG, Way EL, editors. *Fundamentals of drug metabolism and drug deposition*. Baltimore: Williams & Wilkins company; 1971. p. 527-45.
7. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
8. Tan P-Z, Baldwin RM, Van Dyck CH, Al-Tikriti M, Roth B, Khan N, et al. Characterization of radioactive metabolites of 5-HT<sub>2A</sub> receptor PET ligand [<sup>18</sup>F]Altanserin in human and rodent. *Nucl Med Biol* 1999;26:601-8.
9. Mach RH, Nowak PA, Moroney DA, Morton TE, Jackson JR, Ehrenkauf RLE. Synthesis and in vivo evaluation of [<sup>18</sup>F]-N-(p-nitrobenzyl)piperone ([<sup>18</sup>F]PNBS) in rats. *Nucl Med Biol* 1993;20:269-78.
10. Lee KC, Lee S-Y, Choe YS, Chi DY. Metabolic stability of [<sup>18</sup>F]fluoroalkylbiphenyls. *Bull Korean Chem Soc* In Press, 2004.
11. Magata Y, Lang L, Kiesewetter DO, Jagoda EM, Channing MA, Eckelman WC. Biologically stable [<sup>18</sup>F]-labeled benzylfluoride derivatives. *Nucl Med Biol* 2000;27:163-8.