

[綜 說]

Stable Isotope 化合物의 藥學研究에의 利用

姜 健 一

淑明女子大學校 藥學大學

The Use of Stable Isotope Compounds in Pharmaceutical Research

Gun Il Kang

The use of stable isotope compounds in pharmaceutical research was described with recent 33 references, which include synthesis, selected ion monitoring, pharmacokinetics, drug metabolism, and mechanism of drug action.

Stable isotope는 放射線을 내지 않는 同位 元素로서 ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{34}S 같은 것이 이에 屬한다.

이와 같은 同位元素를 含有한 化合物은 보통의 化合物과 物理的, 化學的 性質이 거의 같으나 mass spectrometry와 같은 分析方法으로 區別할 수 있기 때문에 放射性同位元素로 標識된 化合物과 類似한, 追跡子(tracer)로서의 役割을 할 수 있는 反面, 放射線에 관련된 害毒을 나타내지 않는 有利한 점을 가지고 있다.

Stable isotope로 標識된 化合物의 藥學研究에의 利用은 새로운 分析裝置의 導入과 함께 擴大되어 가고 있으며 藥物代謝研究, 生體에서 얻은 檢體(biological sample)의 分析 및 生物藥劑學과 臨床藥理 分野에서 獨特한 應用이 開發되고 있다.

本 綜說은 이러한 化合物의 藥學에의 利用을 最近의 研究結果를 가지고 實際應用에 관계된 問題點을 強調하여 記述하려는 데에 目的이 있다. 本 綜說과 類似한 形式의 stable isotope化合物의 醫藥化學에의 利用은 Nelson等¹⁾이 1976년까지의 研究結果를 綜合한 바 있다.

Stable Isotope 化合物의 合成

Stable isotope 化合物은 放射性同位元素 化合物에 適用되는 方法과 類似하게 얻을 수 있다 즉, 同位元素標識 中間物質을 利用하여 標識을 잃지 않는 條件에서, 必要한 經濟的인 合成段

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University.

階를 거쳐 最終產物을 얻는 方法과, 가장 많이 利用되는 deuterium 化合物의 경우에는 일정한 觸媒條件에서 ^1H 과 ^2H 의 交換(exchange) 方法을 利用할 수 있다.

放射性同位元素 化合物의 境遇, 放射能을 測定可能한 程度만의 標識가 必要하나 分子形態로서의 不純物은 없어야 하는 反面, stable isotope 化合物은 可能한 限 完全히 標識가 된 化合物로 使用하는 것이 有利하다.

標識部位와 標識量(labeling percent)을 알수 있는 共通된 方法으로는 mass spectrometry 가 있으나 경우에 따라서는 NMR도 유용하게 利用할 수 있다. deuterium 化合物의 경우 IR 도 이용할 수 있는 方法이나 正確한 標識量을 알기는 어렵다. 少量의 混合物 中에서 標識部位와 標識量을 알 수 있는 一般적이고 唯一한 方法이 gas chromatography—mass spectrometry (GC/MS)이다.

Stable isotope 化合物은 放射性同位元素 化合物과는 달리 一般 試藥 購入處를 通하여 얻을 수 있으나, 製造하는 곳에서 구입하는 것이 값이 싸고 特殊構造의 化合物을 가지고 있다.

Merck Sharp & Dohme/Isotopes (P.O. Box 899, Pointe Claire/Dorval, Quebec, Canada H9R 4P7)가 製造供給處이고 미국의 Merck & Co., Inc., Isotopes (4545 Oleatha Ave., St. Louis, MO 63116), Miles Laboratories, Research Division(Elkhart, IN 46514), Monsanto Research Corporation, Stable Isotope Sales(Miamisburg, OH 45342)에서 Stable Isotope를 專門으로 取扱하고 있다.

Selected Ion Monitoring (SIM) :

Stable Isotope 化合物의 藥劑學的 利用

Stable isotope 化合物을 利用한 研究에 使用되는 分析方法인 GC/MS에서 必要한 자료는 total ion current(TIC) profile, mass spectrum, mass chromatogram, SIM chromatogram의 形態로 얻을 수 있다. 이것을 magnetic-sector와 quadrupole mass spectrometer중 magnetic—sector instrument에 適用되는 基本的인 方程式으로 說明하면 다음과 같다.

$m/e = H^2 R^2 / 2V$ 에서 m/e 는 質量과 電荷의 比이며, H 는 磁場의 세기, R 은 이온通過 半徑 그리고 이온에 가해진 accelerating voltage가 V 이다.

R 과 V 가 一定한 條件에서 하나의 mass spectrum은 H 를 scan하여서 얻을 수 있고 이렇게 얻은 시간에 따른 mass와 이온의 수를 computer가 處理하여 TIC profile을 그려낼 수 있다. 이러한 TIC profile을 뽑아낸 자료로부터 mass spectrum 뿐만 아니라 必要한 경우 ion mass와 그 intensity로부터 特定 mass의 이온만을 monitoring 할 수 있으며 이것이 mass chromatogram이다.

이에 대하여 SIM은 몇 개의 選定된 이온(selected ion)을 accelerating voltage 또는 磁場을 재빨리 바꾸므로서 monitoring하는 方法이며 보통 accelerating voltage alternator (AVA)를 이용하여 이와같은 機能을 遂行한다.

이러한 SIM은 stable isotope 化合物을 非標識 化合物(unlabelled compound)과 區別하여 各各 定量的으로 分析할 수 있는 方法으로 multiple ion detection, mass fragmentography 또는 quantitative GC/MS와 같은 用語로 사용되며, 基礎적인 概念과 그 應用에 대하여는 Falkner等²⁾과 Carrington等³⁾에 의하여 자세히 記述되어 있다.

Stable isotope 化合物의 SIM에의 이용은 初期에 内部標準物質(internal standard)로서 大量 使用時 carrier effect의 效果로서 分析感度を 向上시킬 수 있는 점이 強調되었으나, 이러한 장점보다는 뒤의 項에서 설명한 바와 같이 分析誤차를 줄일 수 있는 獨特한 方法으로 評價되어야 할 것이다.

分析感度面에서 SIM은 mass chromatogram에 의하여 얻을 수 있는 類似한 分析에 비하여 data sampling 時間面에서 유리하기 때문에 signal/noise ratio를 向上시켜 picogram까지의 微量分析이 可能하나 TIC profile과 感度面에서 유사하게 생각되는 gas chromatography에 비하여 항상 월등한 方法은 아니다.

그 例로서, GC는 한번의 injection에 의하여 2~3 成分을 한번에 分析할 수 있으나 SIM의 경우 各各 成分에 대하여 別途의 injection이 必要하다. 또한, monitoring하려는 이온과 類似한 이온이 column bleed에 있는 경우와 monitoring ion의 intensity가 낮은 경우 分析感度は 顯著히 低下되며 保持時間(retention time)이 유사한, 微量의 妨害物質이라도 ion intensity가 클 때 微量分析에 致命的인 影響을 주는 境遇도 있다.

그러나 SIM의 長點은 stable isotope 化合物과 非標識 化合物을 區別하여 各各 分析할 수 있는 점으로서 이러한 方法이 가장 有效하게 適用될 수 있는 分野가 藥劑學的 研究分野로서 最近에 Murphy等⁴⁾ 및 Eichelbaum等⁵⁾의 綜說이 發表되어 있다.

本 綜說에서는 이러한 應用의 實際問題點을 包含하여 몇 개의 項目으로 나누어 記述하고자 한다.

Internal Standard—Stable isotope 化合物을 internal standard로 利用할 때 分析하려는 藥物 또는 代謝物과 溶媒에 의한 抽出程度(extractability)가 同一하고 分析을 爲한 誘導體를 製造할 경우도 反應성이 같다. conjugate metabolite의 경우에 酵素에 의한 加水分解가 同一하고, 分析條件下에서 分解程度가 같기 때문에 分析의 簡便성과 誤차를 감소시킬 수 있는 方法이 된다. 또한 抽出時 및 GC column 內에서 carrier effect를 나타내기 때문에 特히 微量의 biological sample 分析에 有利하다.

이 때 chemical ionization(CI)—SIM이 아닌 경우는 monitoring ion이 높은 intensity를 나타내는 部位에 標識하여야 하고, 標識가 된 部位가 檢體 處理過程에서 exchange되지 않아야 한다. 分析하려는 藥物 또는 代謝物과 internal standard와의 mass 差異는 high resolution focussing을 하지 않을 時 2~3amu의 경우가 適當하고 mass 差異가 클 때 AVA에 의한 ion focussing에 誤차를 가져올 수가 있다.

또한 isotopic impurity가 있는 경우에 carrier effect로서의 效果보다는 더 큰 誤차를 가

저을 수 있기 때문에 보통의 分析에서는 大量의 internal standard를 사용하는 데에 조심해야 한다. 특히 carrier effect가 항상 나타나는 것이 아니라는 것도 留意해야 한다⁹⁾.

藥學分野의 分析研究중에서 biological sample 分析은 ml當 nanogram 以下の 藥物이나 代謝物을 正確性, 精密性, 그리고 높은 感度を 가지고 分析할 수 있어야 하는 점에서 特異하다 이러한 점에서 stable isotope 化合物을 internal standard로 사용한 SIM이 可能한 方法일수 있다.

그 한 例로서, 最近에 Kasuya等⁷⁾은 사람 血漿中 dexamethasone을 internal standard로써 [¹³C₆, ³H₃] dexamethasone을 사용하여 分析하였다. 이 研究에서 dexamethasone은 血漿으로부터 HPLC로, 다시 TMS 誘導體의 형태로 GC로 分離되었다. 最終 分析은 CI 方法으로 높은 이온인 m/e 681, m/e 690을 選擇적으로 monitoring하였다.

이러한 選擇적인 分離過程으로 分析感度を 높임과 同時에, stable isotope 化合物을 internal standard로 사용하여 많은 處理過程에서도 分析誤差는 最小화시켜서 ml當 nanogram 以下の 分析이 可能하였다. 이 方法으로 1mg iv 또는 2mg oral dose 量으로 dexamethasone의 血漿농도 profile을 求할 수 있음이 特異하였다.

이 外의 應用은 이미 引用된 綜說文獻에 소개된 많은 分析例를 參照하기 바란다.

Steady State時의 Pulse Dosing—非標識 藥物을 multidose로 投與하여 steady state로 만든 후 stable isotope 化合物을 pulse dose로 투여하여 臨床적으로 同一한 狀態에서 投與한 藥物의 動力學的 資料를 얻어낼 수 있다.

이 方法을 methadone 維持治療(maintenance therapy) 中の 患者에 適用하여⁸⁾ methadone-d₀와 그에 代置하여 1回 投與한 methadone-d₃를 2-dimethylamino-4,4-diphenyl-5-octanone을 internal standard로 사용하여 plasma 中에서 同時에 分析하였다. 이 實驗에서 經口 methadone-d₃의 t_{1/2}(22±2h)는 methadone-d₀(50±20h) 보다 짧았고 體內에 methadone의 multiple pool이 있음이 報告되었다.

Phenobarbital로 長期治療중인 간질병 患者에 [1,3-¹⁵N, 2-¹³C] phenobarbital을 투여하여 steady state 中の 藥物動力學的 資料를 얻은 報告도 있으며⁹⁾ 이와같은 研究가 phenytoin¹⁰⁾ 및 valproic acid¹¹⁾에 관하여도 發表되었다.

이와 거의 類似한 例로서 1-butyryl-4-[α-d₂]-cinnamylpiperazine을 쥐에 투여하여 耐性 狀態로 한 후 1-butyryl-4-[arom-d₅] cinnamylpiperazine을 투여하여 d₂ 化合物과 d₅ 化合物 그리고 代謝物質을 分析하였다¹²⁾. 이 方法에서 internal standard로는 非標識藥物과 그 代謝物質을 이용하였고 耐性의 原因이 肝酵素의 induction에 起因한 藥物의 代謝促進에 의한 것이라고 밝혔다.

Stable isotope 化合物을 사용시 放射性同位元素에 比하여 어린아이나 病弱者 또는 妊産婦에 投與時 毒性이 없는 점에서 人體 實驗에 有利하다는 것이 長點으로 主張되나¹³⁾ 藥物動力學的 同一性(pharmacokinetic equivalence)은 모든 實驗에서, 그리고 특히 사람에 使用시는 藥

理學的 同一性(pharmacological equivalence)을 證明한 후에 使用하는 것이 合理的인 方向인 것 같다.

Phenytoin의 경우에서와 같이¹⁴⁾ 代謝에 영향을 받지 않을 部位에 標識된 [2-¹³C-1,3-¹⁵N₂] phenytoin도 철저한 pharmacokinetic equivalence를 立證한 報告가 있고, methadone-d₅는 kinetic equivalence 뿐만 아니라 鎮痛作用과 毒性이 methadone-d₀와 差異가 없음이 사람에게 사용하기 前에 證明되었다¹⁵⁾.

Enantiomer의 比較代謝 研究—두 個의 enantiomer는 藥物代謝를 包含한 藥物動力學的인 面 및 受容體(receptor)와의 相互作用에 差異가 있기 때문에 藥理效果가 다르고, 이에 關聯된 生物藥劑學, 藥理學에 關連된 여러 현상을 說明하기 爲하여는 enantiomer를 同時에 投與하여 얻은 biological sample로부터 各各의 enantiomer를 分離하여 分析하는 方法이 必要하다.

最近에 Banfield等¹⁶⁾의 報告와 같이 warfarin의 경우 carbobenzyloxy-L-proline을 使用하여 diastereoisomeric ester을 만들고 HPLC로 分離하는 등의 方法으로 RS-warfarin을 經口로 投與하여 S(-)-isomer가 R(+)-isomer에 比하여 t_{1/2}가 짧은 것이 報告되었으나, SIM이 可能한 GC/MS가 갖추어져 있는 實驗室에서는 stable isotope 化合物을 利用할 수 있다.

이와같은 實驗例가 cyclophosphamide(CP)에 대하여 報告되었으며¹⁷⁾ 이 때 (+)-[²H₆]CP와 (-)-[²H₄]CP를 1:1 混合物로 mice에 투여후 尿에서 cyclophosphamide와 두 代謝物의 enantiomer 비율을 決定할 수 있었다. 그러나 이 實驗에서는 藥劑學的 重要性을 가진 結果는 얻지 못했고, 새로운 研究方法의 應用 可能性을 強調하였다.

이와 비슷하게 ²H(+)-propranolol과 非標識 (-)-propranolol을 同時에 개에 투여하여 두 isomer의 대사에 의한 elimination 速度에 差異가 없음이 報告되었다¹⁸⁾.

Mathadone에 關한 研究¹⁹⁾는 人體에 methadone-d₅를 直接 投與한 점이 特異하다. 즉, steady state 狀態에서 enantiomer의 代謝差異를 알기 위하여 methadone 維持치료 患者에 S-(+)- 또는 R(-)-pentadeuteromethadone을 투여하여 活性型인 R(-)-enantiomer의 t_{1/2β} (51.7~61.8h)가 S-(+) isomer (31.8~37.0h)에 比하여 긴 것이 發見되었다.

Bioavailability Study—同一한 사람인 경우도 時間에 따라서 肝血流量等 bioavailability에 영향을 주는 要素가 다르기 때문에 이러한 것을 補償할 수 있는 方法, 即 同一한 條件에서 經口와 정맥經路로 藥物을 투여할 수 있는 方法이 stable isotope 化合物을 이용하여 報告되고 있다.

Absolute bioavailability를 測定하기 위하여 test route와 iv로 stable isotope 化合物과 非標識藥物을 나누어 投與하고 제 3의 internal standard를 使用하여 SIM 分析하면 同一한 條件에서 bioavailability를 求할 수 있다. 이러한 例가 N-acetylprocainamide-¹³C을 사용한 研究²⁰⁾ 및 barbital²¹⁾의 경우에 報告되어 있다.

Relative bioavailability에 關한 研究의 例로, 結晶의 크기가 經口 吸收에 미치는 영향을 보기 위하여 deuterium-labeled benoxaprofen과 benoxaprofen을 同時에 투여하여 分析한

報告도 있다²²⁾.

Biosynthetic Internal Standard—이 方法의 特徵은 stable isotope로 標識된 前驅化合物을 動物에 투여하여 internal standard가 含有된 混合物을 얻고 分析하려는 藥物 또는 代謝物과 internal standard와의 SIM response ratio로서 藥物動力學的 資料를 얻을 수 있고 또한 藥物相互作用에 관한 結論을 얻을 수 있다는 것이다.

이 方法은 構造는 밝혀져 있으나 authentic compound를 얻을 수 없는 경우에 代謝物質의 研究에 利用할 수 있고 stable isotope로 표지된 internal standard가 單離되어서 사용되는 것은 아니나 分析하려는 物質과 同一한 物理的 化學的 性質을 가지고 SIM分析 과정에서 分離되어 分析되기 때문에 分析誤差를 없앨 수 있는 方法이 된다.

이 方法은 最初로 methadone과 diazepam의 相互作用 研究에서 重要視되는 methadone의 conjugate metabolite 分析에 利用되었다²³⁾. 즉 methadone은 代謝物質인 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenyl-1-pyrroline(EMDP)이 계속 대사經路로 들어가 HOEMDP와 DiHOEMDP의 glucuronide conjugate를 形成하며 이 conjugate metabolite의 量的인 變化가 diazepam等과의 interaction에 예민한 것으로 報告되어 있다. ¹⁴C 標識 methadone을 사용하여 加水分解후 TLC 分離定量이 唯一한 研究方法이었으나, 쥐에 EMDP-d₁₀ 化合物을 투여하여 HO-EMDP-d₉과 DiHOEMDP-d₈의 conjugate를 含有한 bile을 얻고 이것을 internal standard의 混合物로 사용하여 methadone 및 methadone-diazepam 투여 후 얻은 檢體와 섞고 一定한 抽出 및 處理 過程後에 非標識 代謝物과 標識 代謝物과의 SIM response ratio를 測定하여 diazepam의 영향이 없음이 報告되었다. 같은 論文에서 이러한 方法으로 藥物動力學的 資料도 얻을 수 있음이 提示되었다.

Marker Drug—Methadone 維持治療 患者가 實際 指示대로 病院에서 提供한 methadone 만을 服用하는지 確認하는 것은 患者의 維持治療에 대단히 重要하기 때문에 여러 方法이 講究되고 있다. 가장 創意的인 생각 중의 하나는 methadone과 methadone-d₃를 一定한 비율로 하여 必要時 患者에 투여하여 그 비율을 測定하여 不法的인 methadone 服用을 抑制할 수 있다는 것이다²⁴⁾. 이 때 methadone-d₃가 실제 患者의 服用藥으로 利用된다는 點에서 特異하며 완벽한 pharmacological equivalence 및 kinetic equivalence 資料가 提示되었다.

Stable Isotope 化合物의 藥物 代謝經路 研究에의 利用

生體內에서의 藥物의 代謝經路에 對한 研究은 그 藥物의 活性과 毒性을 理解하는데 重要하다. minor metabolic pathway인 경우도 藥理學的 重要性을 가질 수 있기 때문에 可能한 모든 代謝經路를 握把할 必要가 있다.

이러한 目的으로 放射性同位元素 化合物이 利用될 수 있으나, 合成에 特別한 施設이 必要하고 사람에게 사용할 수 없다는 理由 以外에 放射性同位元素 化合物을 投與하여 얻은 biological sample로부터 代謝物質을 分離 確認하기 위하여는 適切한 分離후 radio-detector가 必

要하고 別途로 mass spectrometry에 의하여 構造를 確認할 必要가 있다. 즉, 一般的인 경우에 分離와 確認이 나뉘어져 있고 分子構造의 確認을 위한 mass fragmentation pathway의 解釋에 補助的인 手段이 없다.

이에 反하여 stable isotope를 사용하면 GC/MS의 TIC profile로부터 많은 成分中에서 代謝物質의 peak를 區別해낼 수 있고 이곳에서 얻은 mass spectrum으로부터 標識되지 않은 化合物만으로는 不可能한 構造解釋을 도울 수 있는 mass fragmentation에 대한 資料를 얻을 수 있다. 即, 代謝物質의 追跡과 確認이 同時에 可能하다.

代謝經路를 研究하려는 藥物과 그 藥物의 stable isotope 標識化合物을 同量 섞은 混合物를 動物에 投與하여 얻은 biological sample을 GC/MS로 分析하면 代謝 物質에서는 生體內에 本來 存在하는 成分과 區分되게 twin ion이 나타난다.

이 twin ion은 capillary column GC를 쓴 경우와 같이 peak의 分離가 좋은 경우에 많은 endogenous material 속에서 minor metabolite를 區別해낼 수 있는 detector 역할을 할 수가 있고, 構造確認에 必要한 mass fragmentation 研究에 必須的인 端緒를 提供한다.

경우에 따라서는 TIC profile에 가려진 代謝物質을 mass chromatogram의 方法으로 代謝物 및 stable isotope 含有 代謝物에서 나올 수 있는 mass ion을 찾아서 確認해 낼 수 있다.

投與하는 stable isotope 化合物의 標識部位는 代謝에 의하여 除去되지 않고 代謝過程에서 isotope effect를 나타내지 않는 部位임은 自明하다.

Stable isotope 化合物의 標識가 不完全한 경우 이온은 區別되지만 twin ion형태는 分明하지 않을 것이며, 어느 경우에는 非標識化合物은 섞지 않고 標識가 不完全한 化合物만을 投與하여 ion cluster를 보고 代謝物質 部位를 確認하여 metabolite-detector 役割을 할 수도 있으나 실제 ion cluster와 類似한 spectrum은 endogenous material에서도 종종 確認되기 때문에 不確實한 점을 內包하고 있다.

또한 어느 경우에 GC 保持時間은 標識化合物과 非標識化合物과 差異가 있을 수 있기 때문에 twin ion을 보기가 어렵다. 例로서 methadone의 두 phenyl ring의 水素를 deuterium으로 置換한 methadone- d_{10} 은 3% OV-17 column을 사용시 保持時間이 methadone에 比하여 짧았다²⁴⁾.

따라서 이러한 경우는 stable isotope 化合物을 非標識化合物과 別途로 投與하고 mass shift를 보고 代謝物을 確認할 수가 있다. 이러한 경우에 우리는 twin ion technique, ion doublet technique 또는 ion cluster 方法이라는 用語가 不適當하기 때문에 stable isotope 化合物을 利用한 代謝物 確認方法을 stable isotope 방법이라고 하는 것이 適切할 것이다.

最近에 Baba等²⁵⁾은 rutin의 代謝過程研究에 이러한 方法을 이용하여 [2',5',6'- ^3H] rutin을 쥐에 투여하고 20eV에서 $d_0(M^+)$ 와 $d_2[(M+2)^+]$ 를 mass chromatogram 형태로서 monitoring하여 代謝物質 部位를 確認하였다. 이 때 d_2 를 monitoring한 것은 isotopic composition 面에서 d_1 이나 d_3 에 비하여 유리하였기 때문으로 생각된다. 이러한 方法으로 檢出한 3-hydroxy-

phenylacetic acid 등은 endogenous material과 區別이 되었다.

Acetylhydrazine이 反應性이 높은 代謝中間物質로 변하여 cysteine에 의하여 trap되는 機構가 stable isotope 方法으로 報告되었다²⁶⁾. trideuteroacetylhydrazine과 acetylhydrazine을 microsomal fraction과 함께 cysteine을 가하여 培養하여 生成物을 分析한 結果, acetyl-d₃를 包含한 acetyl group 全部가 cysteine에 의하여 trap되어 N-acetylcysteine으로 되는 것이 twin ion으로 確認되었다. 따라서 acetyl₂hydrazine의 酸化過程에서 生成된 反應性이 큰 acylating agent가 ketene이 아님이 證明되었다. 이때 ¹⁴C-acetylhydrazine을 사용하여 反應生成物을 分離하는데 이용하는 過程을 거쳤으나 生成物의 構造는 GC/MS로 分析하여 cysteine에 trap된 acetyl group의 組成을 確認하였다.

이 外의 代謝研究의 例는 引用한 文獻¹⁾의 項目 및 J. Pharm.Sci., Biomed. Mass Spectrom., Drug Metab. Dispos. 등의 잡지에 發表되고 있는 論文을 參考하기 바란다.

Stable Isotope 化合物의 藥理機構 研究에의 利用

藥理活性은 藥物의 構造의인 特性과 密接한 관계가 있으며 藥物과 受容體와의 作用뿐 아니라 吸收에서 排泄에 이르는 모든 段階에서 이 構造의인 特性의 支配를 받는다.

이러한 藥理活性에 關係되는 藥物構造의 特性을 그 藥物構造의 一定部位를 stable isotope로 標識함으로써 나타나는 isotope effect를 觀察하여 研究할 수 있는 것은 自明하다.

Phenol性 hydroxyl group의 形成이 arene oxide를 經由하는, 즉 毒性이 介入될 수 있는 段階인지 아니면 다른 機構에 의한 것인지를 알기 위하여 aromatic ring의 水素를 deuterium으로 置換한 化合物을 利用하여 isotope effect를 測定할 수 있다²⁷⁾.

代謝過程에서의 isotope effect와 藥理作用과의 關係를 研究한 많은 報告가 있으며 例로서 *p*-[1,1-²H] ethoxyacetanilide (phenacetin-d₂)와 *p*-[2,2,2-²H] ethoxyacetanilide(phenacetin-d₃)를 사용하여 hamster에서 phenacetin의 代謝와 毒性에 對한 isotope의 影響을 研究한 報文을 들 수 있다²⁸⁾. Deethylation rate에 isotope effect는 α -methylene deuterium의 경우 나타났으며 phenacetin은 phenacetin-d₂에 비하여 肝壞疽에 관련된 毒性이 더 있었다. 이것은 deethylation route가 이러한 毒性和 關係가 있을 수 있음을 意味하였고 이에 反하여 methemoglobin 形成은 phenacetin이 적어서 이 毒性은 deethylation이 介入되지 않을 段階에서 일어난다는 것을 보여 주었다.

Halothane과 deuterated halothane을 利用한 實驗에서²⁹⁾ 還元에 의하여 생긴 代謝物質의 生成은 抑制되지 않았고 同時에 肝毒性도 減少되지 않았다. 이것은 halothane에 의한 肝毒性이 還元代謝過程을 통한 reactive intermediate에 의한다는 것을 意味하며, deuteration에 起因한 酸化代謝過程의 顯著한 抑制는 C-H bond에 oxygen insertion이 일어난다는 것을 意味하였다.

Stable isotope를 利用한 研究에서 藥理作用에서의 isotope effect를 說明할 수 있는 藥物

代謝面에서의 isotope effect가 發見되지 않는 경우에 受容體와의 結合過程에서의 isotope effect로 結論지을 수 없는 것도 事實이다. 이것은 藥物이나 그 代謝物質의 分析에 의하여 可能한, 表面的으로 나타나는 代謝過程의 isotope effect로는 밝힐 수 없는 또 다른 實驗에 의하여 立證해야 될 다른 可能性이 있기 때문이다.

이러한 例가 deuterated amphetamine을 이용한 研究로서³⁰⁾ aromatic ring의 deuteration이 藥物의 效能에는 영향을 주었으나 血中 平均 peak time에는 差異가 없었다. *in vitro*實驗으로 neuronal uptake에서의 차이 등을 좁혀서 볼 수 있으나 이에 관한 報告는 없다.

In vitro 實驗인 경우도 實際의 實驗結果를 說明하기는 쉽지가 않다. 例로서 deuteriobenzyl-d₇-penicillin을 사용하여 抗포도상 球菌 作用을 測定한 결과, 顯著한 力價의 감소를 確認하였으나³¹⁾ 이것이 受容體 酵素와의 結合段階에서 오는 것인지 作用部位까지의 浸透段階 때문인지는 分明하지 않다.

비슷한 例로서 N-methyl group이 deuterium으로 置換된 morphine의 效能低下는 受容體에 對한 deuterated morphine의 親和力 差異에 의한 것 같이 생각되었으나 N-CD₃에서 C-D cleavage가 같은 水準에서 일어나는 clastic binding 概念에서 볼 때³²⁾ 受容體와의 結合과 함께 受容體의 N-demethylase 部位에서의 isotope effect도 함께 생각해야 할 것이다.

本 綜說은 stable isotope 化合物이 有機反應機構의 糾明³³⁾과 같은 有機化學 分野에서의 應用 못지않게 醫藥學 分野의 研究에 獨特한 位置를 차지할 수 있음을 記述하려고 하였다.

특히 앞으로 國內의 藥學研究에서 藥物代謝, 生物藥劑學 및 臨床藥理 研究가 더욱 활발해 지리라고 생각하며, 有數한 研究機關에 確保되어 있는 GC/MS의 完全한 活用과 함께 stable isotope 化合物을 利用한 研究에 거는 期待는 크다고 할 수 있다.

文 獻

- 1) S.D. Nelson and L.R. Pohl, The Use of Stable Isotopes in Medicinal Chemistry, in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol. 12 (F.H. Clarke, ed.), Academic Press, New York, 1977, p. 319.
- 2) F.C. Falkner, B.J. Sweetman, and J.T. Watson, Biomedical Applications of Selected Ion Monitoring, *Applied Spectroscopy Reviews*, **10**, 51 (1975).
- 3) R. Carrington and A. Frigerio, Mass Fragmentography in Drug Research, *Drug Metab. Rev.*, **6**, 243 (1977).
- 4) P.J. Murphy and H.R. Sullivan, Stable Isotopes in Pharmacokinetic Studies, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 609 (1980).
- 5) M. Eichelbaum, G.E. von Unruh, and A. Somogyi, Application of Stable Labelled Drugs in Clinical Pharmacokinetic Investigations, *Clin. Pharmacokinet.*, **7**, 490 (1982).
- 6) B.J. Millard, P.A. Tippett, M.W. Couch, and C.M. Williams, Evidence for the Lack of the Carrier Effects in the Solvent Extraction and Determination of Octopamine by

- Gas Chromatography Mass Spectrometry, *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 381 (1977).
- 7) Y. Kasuya, J.R. Althaus, J.P. Freeman, R.K. Mitchum, and J.P. Skelly, Quantitative Determination of Dexamethasone in Human Plasma by Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 446 (1984).
 - 8) E. Ånggård, M.-I. Nilsson, J. Holmstrand, and L.-M. Gunne, Pharmacokinetics of Methadone during Maintenance Therapy: Pulse Labelling with Deuterated Methadone in the Steady State, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **16**, 53 (1979).
 - 9) I.M. Kapetanović and H.J. Kupferberg, Stable Isotope Methodology and Gas Chromatography Mass Spectrometry in a Pharmacokinetic Study of Phenobarbital, *Biomed. Mass Spectrom.*, **7**, 47 (1980).
 - 10) A.V. Langenhove, C.E. Costello, J.E. Biller, K. Biemann and T.R. Browne, A Mass Spectrometric Method for the Determination of Stable Isotope Labeled Phenytoin Suitable for Pulse Dosing Studies, *Biomed. Mass Spectrom.*, **7**, 576 (1980).
 - 11) A.A. Acheampong, F.S. Abbott, J.M. Orr, S.M. Ferguson, and R.W. Burton, Use of Hexadeuterated Valproic Acid and Gas Chromatography-Mass Spectrometry to Determine the Pharmacokinetics of Valproic Acid, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 489 (1984).
 - 12) S. Baba, S. Kato, S. Morishita, and H. Sone, Studies on Drug Metabolism by Use of Isotopes. 23. Metabolic Study of 1-Butyryl-4-cinnamylpiperazine in the Rat during Development of Tolerance by Using Two Kinds of Deuterium-Labeled Forms, *J. Med. Chem.*, **21**, 525 (1978).
 - 13) S. Facchetti, Trends in the Use of Stable Isotopes in Quantitative Biomedical Mass Spectrometry, *Annali di Chimica*, **69**, 505 (1979).
 - 14) T.R. Browne, A.V. Langenhove, C.E. Costello, K. Biemann, and D.J. Greenblatt, Kinetic equivalence of stable-isotope-labeled and unlabeled phenytoin, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **29**, 511 (1981).
 - 15) J.C. Hsia, J.C. Tam, H.G. Giles, C.C. Leung, and H. Marcus, Markers for Detection of Supplementation in Narcotic Programs-Deuterium-Labeled Methadone, *Science*, 498 (1976).
 - 16) C. Banfield and M. Rowland, Stereospecific High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Warfarin in Plasma, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 921 (1983).
 - 17) P.J. Cox, P.B. Farmer, A.B. Foster, L.J. Griggs, M. Jarman, R. Kinas, K. Pankiewicz, and W.J. Stec, Application of Deuterium Labelling Mass Spectrometry in a Study of the Metabolism of the Enantiomers of Cyclophosphamide, *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 371 (1977).
 - 18) H. Ehrsson, Simultaneous determination of (-)- and (+)-propranolol by gas chromatography-mass spectrometry using a deuterium labeling technique, *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 662 (1976).
 - 19) M.J. Kreek, D. L. Hachey, and P.D. Klein, Stereoselective Disposition of Methadone in Man, *Life Sci.*, **24**, 925 (1979).
 - 20) J.M. Strong, J.S. Dutcher, W.-K. Lee, and A.J. Atkinson, Jr., Absolute bioavailability in man of N-acetylprocainamide determined by a novel stable isotope method, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **18**, 613 (1976).
 - 21) F. Varin, C. Marchand, P. Larochelle, and K.K. Midha, GLC-Mass Spectrometric Pro-

- cedure with Selected Ion Monitoring for Determination of Plasma Concentrations of Unlabeled and labeled Barbitol following Simultaneous Oral and Intravenous Administration, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 640 (1980).
- 22) R.L. Wolen, R.H. Carmichael, A.S. Ridolfo, L. Thompkins, and E.A. Ziege, The effect of crystal size on the bioavailability of benoxaprofen: Studies utilizing deuterium labeled drug, *Biomed. Mass Spectrom.*, **6**, 173 (1979).
- 23) G.I. Kang, Selected Ion Monitoring Analysis of Conjugated Metabolites of Methadone Using Biosynthetic Internal Standards for the Study of Methadone-Diazepam Interaction, *Arch. Pharm. Res.*, **6**, 7 (1983).
- 24) G.I. Kang, Mass Spectrometric Evidence for N-Hydroxy Metabolic Pathway of Methadone, *Korean Biochem. J.*, **16**, 34 (1983).
- 25) S. Baba, T. Furuta, M. Fujioka, and T. Goromaru, Studies on Drug Metabolism by Use of Isotopes XXVII: Urinary Metabolites of Rutin in Rats and the Roles of Intestinal Microflora in the Metabolism of Rutin, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1155 (1983).
- 26) S.D. Nelson, J.A. Hinson, and J.R. Mitchell, Application of Chemical Ionization Mass Spectrometry and the Twin-Ion Technique to Better Define a Mechanism in Acetylhydrazine Toxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 900 (1976).
- 27) J.E. Tomaszewski, D.M. Jerina, and J.W. Daly, Deuterium Isotope Effects during Formation of Phenols by Hepatic Monooxygenases. Evidence for an Alternative to the Arene Oxide Pathway, *Biochem.*, **14**, 2024 (1975).
- 28) S.D. Nelson, W.A. Garland, J.R. Mitchell, Y. Vaishnav, C.N. Statham, and A.R. Buckpitt, Deuterium Isotope Effects on the Metabolism and Toxicity of Phenacetin in Hamsters, *Drug Matab. Dispos.*, **6**, 363 (1978).
- 29) I.G. Sipes, A.J. Gandolfi, L.R. Pohl, G. Krishna, and B.R. Brown, Jr., Comparison of the Biotransformation and Hepatotoxicity of Halothane and Deuterated Halothane, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 716 (1980).
- 30) S.E. Najjar, M.I. Blake, P.A. Benoit, and M.C. Lu, Effect of Deuteration of Locomoter Activity of Amphetamine, *J. Med. Chem.*, **21**, 555 (1978).
- 31) P.A. Laskar and R.G. Mrtek, Synthesis and Biological Activity of Deuteriobenzyl-d₇-penicillin, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1727 (1970).
- 32) B. Belleau and P. Morgan, Clastic Binding on the Opiate Receptor, *J. Med. Chem.*, **17**, 908 (1974).
- 33) P. Sykes, The uses of isotopes-kinetic and non-kinetic, in *The search for organic reaction pathways*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1974, p.38.