

가토에서의 Praziquantel 의 체내 동태

이미정·심창구·이민화·김신근

서울대학교 약학대학

(Received December 11, 1989)

Pharmacokinetics of Praziquantel in Rabbits

Mi Jeong Lee, Chang Koo Shim, Min Hwa Lee and Shin Keun Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstract—Pharmacokinetic studies on praziquantel in rabbits were performed in this paper. The pharmacologically active parent drug was separated from the pharmacologically inactive metabolites by HPLC method. The pharmacokinetic parameters of parent drug were obtained. In vitro partition to blood cells of praziquantel was measured. The mean value ($n = 3$) of partition to blood cells was 44% at concentrations between $1 \mu\text{g/ml}$ and $40 \mu\text{g/ml}$. Therefore, the relatively high partition to blood cells should be considered in further pharmacokinetic studies on praziquantel.

Keywords □ Praziquantel, Pharmacokinetics

Praziquantel (PZQ)은 촌충감염에 효과적인 구충제를 개발할 목적으로 1976년에 Merck 와 Bayer 에 의해 개발된 광범위 구충제이다. PZQ 의 화학구조는 Fig. 1과 같으며 흰 색의 결정성 분말로 쓴 맛을 가지고 있으며 광에 의해 분해되므로 보관시 차광에 주의해야 하는 약물이다. *In vivo* 에서의 이 약의 효과는 장내 기생충의 dislocation 에 일부 기인하고 있는 것으로 알려졌으며 기생충의 비가역적 손상은 주로 PZQ 로 인한 기생충 외피의 단백질분해효소에 대한 감수성 증가 때문으로 추정하고 있다.¹⁾ PZQ 의 체내 동태에 대해서는 주로 ¹⁴C-labelled PZQ 을 이용한 보고들이 나와 있는데,²⁻⁹⁾ Steiner 등에 의하면 rat, beagle dog, rhesus monkey 에서 PZQ 은 정맥주사시 대사속도가 매우 빨라서 24시간 후에는 더 이상 ¹⁴C-radioactivity 가 나타나지 않았다. 경구투여시 혈중 ¹⁴C-radioactivity 는 1시간 이내에 최고에 달해 신속히 흡수됨을 보이며, 6시간 이내에 적어도 50%가 위장에서 흡수된다.²⁾ PZQ 과 그 대사체의

소실 경로는 세 가지로 알려졌다. 첫째, 가장 주된 소실 경로로 50% 이상이 신장을 통해서 배설된다. 둘째, 담즙을 통한 배설로 정맥주사시는 투여용량의 37%, 경구투여시는 투여 용량의 15%가 7시간 이내에 배설된다. 셋째, 위장관 점막을 통한 분비물 들 수 있는데 정맥주사시 1시간 이내에 투여용량의 10% 이상이 분비된다.²⁾ 또한 경구투여시와 정맥주사시의 AUC 를 비교한 결과 ¹⁴C-PZQ 의 80~100%가 흡수됨이 보고되었다.²⁾ 또한, autoradiography 를 이용해 PZQ 의 체내 분포를 살펴본 결과, rat 에서 ¹⁴C-PZQ 은 뇌-혈관 관문을 통과할 수 있는 것으로 보고되었으며, 태아에의 전이는 다른 기관에 비해 무시할 수 있을 만큼 극히 적었다.³⁾ Rat, beagle dog, rhesus monkey 를 이용해서 PZQ 을 정맥주사한 후, 그 plasma 와 뇨를 thin layer chromatography (TLC) 한 결과 plasma 중에서는 미대사체가 발견되지만 뇨에서는 발견되지 않음을 알았는데, 이로 미루어 초회통과 효과가 매우 큼을 알 수 있었고, TLC 로 분리된

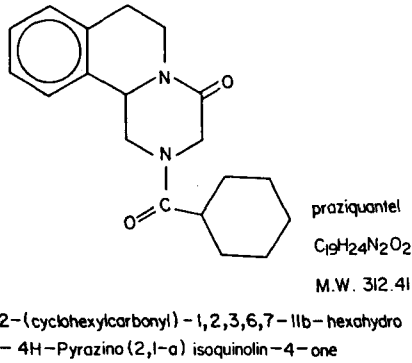


Fig. 1—Chemical structure of PZQ.

PZQ의 대사체들은 매우 다양하며 일부는 glucuronic acid 또는 sulfuric acid와 포합체를 형성하여 배설되는 것으로 보고되었다.⁴⁾ Bühring 등의 보고에 의하면 ¹⁴C-PZQ를 사람에게 투여했을 때, 경구투여한지 4시간 후에 TLC로 분리 가능한 parent drug은 5% 이하로 동물 실험결과와 마찬가지로 신속히 대사됨을 보였다. 또한 serum과 노중의 주요 대사체를 분리해 mass spectrometry로 구조를 본 결과 대부분이 PZQ의 수산화 화합물이었다.^{5,6)} 수유부에게 ¹⁴C-PZQ를 투여했을 때의 plasma 중 농도와 젖 중의 농도를 비교한 보고를 보면, 두 부분은 서로 수동확산에 의해 즉시 농도 평형에 도달했으며, 젖으로 배설되는 총 PZQ의 양은 투여용량의 0.0003%였다.⁷⁾ 한편, PZQ를 mouse liver homogenate와 함께 37°C에서 2시간 동안 incubation 한 결과 항디스토마 효과는 급격히 감소하였고, 미리 phenobarbital로 효소를 유도시킨 liver homogenate와 함께 PZQ를 incubation 시켰을 때는 항디스토마 효과가 완전히 없어졌으므로 parent drug만이 약리활성을 가지고 있다는 보고가 있었다.¹⁰⁾ 그러므로 임상적으로는, 약리활성을 가진 PZQ parent drug의 체내 동태를 파악해야만 의미가 있다. 그런데, 지금까지의 PZQ에 대한 보고들은 대부분 ¹⁴C-radioactivity를 이용해서 정량했기 때문에 parent drug과 대사체가 구분되지 않은 상태로 약물 속도론적 연구가 이루어져 왔다. 이에 저자 등은 근년에 보고된 정량법들¹¹⁻¹⁵⁾ 중 Xiao 등의 HPLC에 의한 parent drug 분리 정량법¹¹⁾을 이용해 rabbit에서의 PZQ의 약물 속도론적 연구를 하고자 하였다. 또한 앞으로의 속도론적 연구의

기초자료로서 PZQ의 혈구 분배율을 측정하였다.

실험방법

1. 시약 및 기기

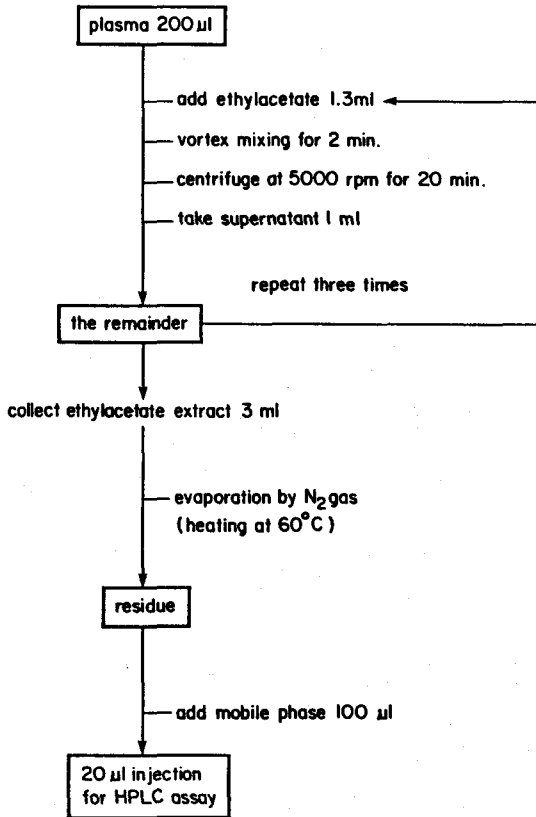
PZQ과 그 cycloheptyl homologue인 내부 표준물질은 신평제약에서 공급받았다. Polyethylene glycol(PEG) 400은 Junsei Chemical Co.의 E. P. grade를, ethylacetate는 Shinyo Pure Chemicals Co.의 G. R. grade를 사용하였다. Acetonitrile은 Merck사의 HPLC용 grade를 사용하였다. 기기로는 Microcentrifuge(Beckman Microfuge B), Centrifuge(Kokusan Ensinki Co., Type H-360A), High performance liquid chromatograph(Shimazu LC-4A) 등을 사용하였다.

2. 실험동물

한국 실험동물 개발원에서 공급받은 Newzealand White 종 rabbit(male, 2~2.3kg)을 사육장에서 일주일간 충분한 사료(삼양사)와 수돗물을 공급하면서 적응시켜 사용하였다.

3. 검량선 작성

PZQ 표준품의 methanol 용액을 0.02 µg/µl의 농도로 만든 후 serial dilution하여 용액 중의 PZQ의 절대량이 각각 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 µg이 되도록 용액을 취해 7개의 conical tube에 넣었다. 또한 내부 표준물질의 methanol 용액을 0.02 µg/µl 농도로 만들어 앞서의 PZQ이 담긴 tube들에 각각 100 µl를 가하고 10초간 vortex mixing한 후 질소가스로 증발시켰다. 그 잔사에 rabbit의 blank plasma 200 µl씩을 각각 넣고 1분간 vortex mixing하였다. 그 다음 Xiao 등의 방법에 따라서 그 plasma 200 µl에 ethylacetate 1.3ml를 가하여 2분간 vortex mixing하여 추출한 후 원심분리(5,000 rpm, 20분간)하여 상층의 ethylacetate 층 1ml를 취하였다. 다시 ethylacetate 1ml를 가하여 2분간 추출한 후 원심분리하여 상층액 1ml를 취하는 조작을 두 번 더 반복하여 총 3ml의 추출액을 모았다. 모아진 ethylacetate 추출액을 질소가스로 증발시켜 잔사를 얻은 후 HPLC mobile phase 100 µl로 다시 녹여 20 µl를 HPLC에 injection하였다(Scheme 1).



Scheme 1—Plasma sample preparation for HPLC assay.

4. 정맥주사용 PZQ 용액의 제조

90% polyethylene glycol 400 액을 용매로 하여 PZQ 40 mg/ml 농도의 용액을 만들었다. 상온에서는 잘 녹지 않아서 60°C로 가열하였으며 다시 상온으로 식혀도 석출하지 않았다. 냉장 보관시 PZQ 이 석출하였으므로 실험할 때마다 다시 용액을 제조하여 투여하였다.

5. PZQ 정맥주사 및 채혈

Rabbit 을 고정틀에 넣어 귀를 반창고로 고정시킨 후 xylene 을 묻혀 혈관을 확장시키고 catheter 를 귀동맥에 삽입하였다. 귀정맥으로 PZQ 용액을 20 mg/kg 용량이 되도록 30초 이내에 주사하였다. 정맥주사 후 5분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 3시간, 4시간 후 귀동맥으로부터 혈액 약 0.5 ml 를 취하여 원심 분리한 후 그 plasma 200 µl 를 취하였다.

6. Plasma sample 전처리

내부 표준물질 2 µg 씩이 잔사로 남아있는 con-

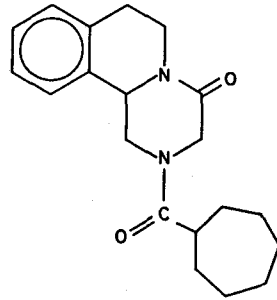


Fig. 2—Chemical structure of internal standard. (cycloheptyl homologue of PZQ)

cal tube 에 plasma sample 200 µl 를 가하고 1분간 vortex mixing 하였다. 그 다음 Scheme 1과 동일한 방법으로 추출하여 HPLC 용 sample 을 제조하였다.

7. HPLC 조건

Column 은 reverse phase C-18 (10 µm), detector 는 U. V. (210 nm), mobile phase 는 45% acetonitrile (acetonitrile : water = 45 : 55) 을 사용하였으며, flow rate 1.7 ml/min 로 측정하였다. 내부 표준물질은 PZQ 의 cycloheptyl homologue 를 사용하였으며, 그 구조는 Fig. 2에 보였다.

8. 혈구 분배 실험

혈구 분배율은 다음 식에 따라 구할 수 있다.¹⁶⁾

$$\text{혈구 분배율 (\%)} = \left[1 - \frac{C_p V_b (1 - Hct)}{X_b} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

C_p 는 plasma 중 약물농도를 나타내며, V_b 는 혈액의 부피, Hct 는 hematocrit 치, X_b 는 혈중 총 약물량을 나타낸다.

Hematocrit 치 측정—Blank whole blood 를 모세관 (V_c -HO75H, Terumo K. K. 제, 전장 75 mm, 외경 1.45~1.65 mm) 에 빨려 올라오게 한 후, 한쪽 끝은 고무로 막고 microcentrifuge 로 원심분리하여 전체 혈액 길이에 대한 혈구 부분의 길이의 비율을 구하였다.

혈구막에 대한 평형도달시간 측정—Screw cap tube 6개에 heparin 액 (5,000 I. U./ml, 중외제약) 100 µl 를 각각 가하고 30초간 vortex mixing 하여 tube 기벽에 골고루 묻힌 후 증발시켰다. 그 다음 PZQ 0.02 µg/µl 용액을 250 µl 씩 각각 가하

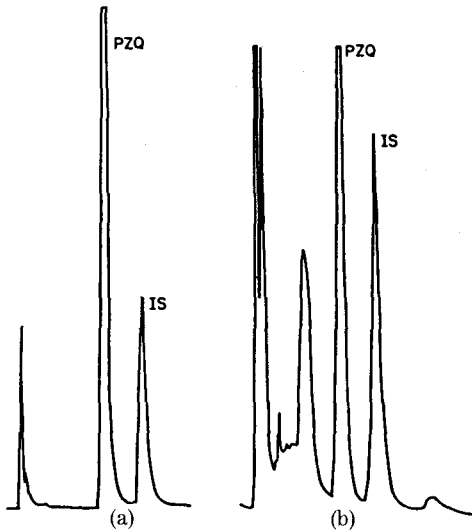


Fig. 3—(a) Chromatogram of plasma spiked with 10 μg PZQ and 2 μg internal standard. (range=0.04)
(b) Chromatogram of plasma sample obtained at 5 minutes after IV injection of 20 mg/kg PZQ. (range=0.02)

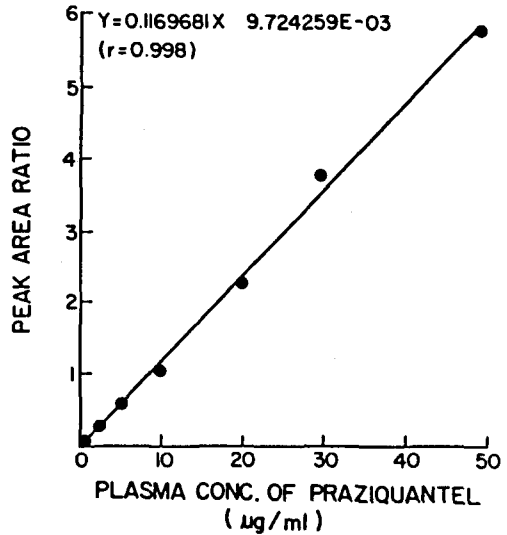


Fig. 4—Calibration curve of PZQ in rabbit plasma by HPLC assay.

고 역시 증발시켰다. 여기에 blank whole blood 1 ml씩을 가한 후, 37°C 항온조에서 진탕하면서 incubation시켰다. Incubation 시작 후 5분, 15분, 30분, 1시간, 1.5시간, 2시간 후에 각각 tube 한 개씩 꺼내어 즉시 5,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 plasma 200 μl 를 취한 후 전술한 방법에 따라 정량하였다.

농도별 혈구 분배 실험—Screw cap tube 5개에 heparin액 (5,000 I.U./ml, 중의제약) 100 ml를 각각 가하고 30초간 vortex mixing하여 tube 기벽에 골고루 묻혀 증발시키고, PZQ 절대량이 각각 1, 5, 10, 20, 40 μg 이 되도록 표준용액을 가해서 증발시켰다. 여기에 blank whole blood 1 ml씩을 가한 후, 37°C 항온조에서 진탕하면서 30분 동안 incubation 한 후 5개의 tube를 모두 꺼내어 즉시 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 plasma 200 μl 를 취한 후 전술한 방법에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

1. PZQ의 검량선

Plasma에서 추출한 PZQ과 내부 표준물질의 HPLC chromatogram을 Fig. 3에 나타냈다.

Retention time 6분대에서 PZQ의 peak가, 8분대에서 내부 표준물질의 peak가 나타났다. PZQ의 peak 면적과 내부 표준물질의 peak 면적의 비율로 구한 검량선은 $Y = 0.1169681X + 9.724259 \times 10^{-3}$ 으로 Fig. 4에 나타냈으며 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50 $\mu\text{g/ml}$ 사이에서 좋은 직선성을 나타냈다.

2. PZQ 정맥주사시의 pharmacokinetic parameters

PZQ 주사액의 비수성 용매로 90% PEG 400을 사용하였는데, rat에게 정맥주사한 결과 독성 때문에 1~2시간 후 죽어버렸으므로 rabbit을 사용하여 실험하였다. Xiao 등¹¹⁾은 PZQ을 투여한 mice serum의 HPLC chromatogram에서 PZQ parent drug과 내부 표준물질의 peak 이외의 다른 peak는 보이지 않았다고 보고하였는데, 본 실험에서는 rabbit을 사용하였으므로 plasma sample 양이 많아서 대사체로 생각되는 peak도 관찰되었다. 즉, Fig. 3의 chromatogram을 보면 blank plasma에 PZQ을 spiking 했을 때는 retention time 3.6분대에서 peak가 보이지 않았는데, PZQ을 정맥주사한 후 얻은 plasma에서는 3.6분대에서 대사체로 생각되는 peak가 관찰되었으며, 이 peak가 정확히 대사체의 peak인지는 확인해 보지 않았다. PZQ 20 mg/kg 정맥주사시의 혈중농도 곡선을 Fig. 5에 나타냈다. 이 곡선은 2-compart-

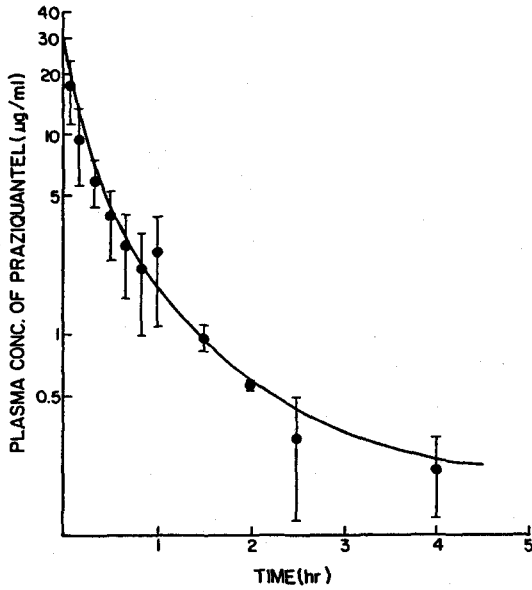


Fig. 5—Plasma concentration curve of PZQ in rabbits following IV injection of 20 mg/kg. (mean±S.D., n=3)

ment 모델로 해석할 수 있었으며 그 pharmacokinetic parameter의 평균치는 Table I과 같았다. 약리활성을 가진 parent drug에 대한 $t_{1/2\beta}$ 가 2.36시간으로, 대사체까지 동시 정량된 ^{14}C -PZQ을 이용한 보고²⁾의 6~8시간보다 훨씬 짧았으므로 앞으로의 투약 계획시 이점을 고려해야함을 알았다.

3. PZQ의 혈구 분배율

앞으로 PZQ에 대한 약물 속도론적 연구를 계속해 나가기 위해서는 그 혈구 분배율을 알 필요가 있다. 즉, PZQ이 다른 대부분의 약물처럼 혈구보다 혈장에 더 잘 분포하는지 여부를 확인해 보아야 한다. 따라서 PZQ의 혈구 분배율에 대한 실험을 하였다.

Hematocrit 치—Hematocrit 치는 평균 0.383 (n=3)으로 정상범위인 0.31~0.44내에 들어 있었다.

Incubation 시간에 따른 혈구 분배율—PZQ이 혈구막에 대한 평형에 도달하는데 걸리는 시간을 알아보기 위해 incubation 시간을 5분, 15분, 30분, 1시간, 1.5시간, 2시간으로 했을 때의 각각의 혈구 분배율을 Fig. 6에 나타냈으며 시간에 따른 혈구 분배율에 거의 차이가 없었으므로 5분 이내에 막평형

Table I—Pharmacokinetic parameters after IV injection of PZQ in rabbits

Parameters	mean value (n=3)
K_{12}	0.47/hr
K_{21}	0.39/hr
K_e	1.70/hr
V_{dss}	3270 ml/kg
$t_{1/2\alpha}$	0.30 hr
$t_{1/2\beta}$	2.36 hr
CL_t	2526.85 ml/hr
AUC	8.47 µg·hr/ml

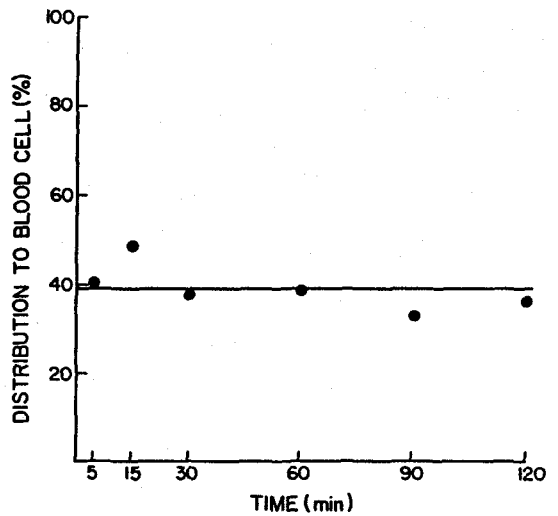


Fig. 6—Distribution to blood cells of PZQ in rabbits as a function of incubation time.

에 도달함을 알 수 있었다.

농도별 혈구 분배율—위의 결과에서 PZQ은 거의 즉시 막평형에 도달함을 알았기 때문에 PZQ의 농도를 각각 1, 5, 10, 20, 40 µg/ml로 하여 30분 동안 incubation 하였으며, (Eq. 1)에 의해 계산한 혈구 분배율은 Table II와 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 농도에 관계없이 일정하게 평균 44%였다. 포화현상이 없는 것으로 보아 본 실험에서 측정된 농도범위(1~40 µg/ml)에서는 농도구배에 의한 단순 확산으로 막평형에 도달한다고 생각되었다. 평균 혈구 분배율이 상당히 높은편인 44%로서, hematocrit 치와 유사한데, 이것은 PZQ이 혈액 전체에 균일하게 분포함을 나타낸다. 즉, 막을 잘 통과한다는

Table II—In vitro distribution to blood cells of PZQ in rabbits. (mean ± S.D., n=3)

Conc. of PZQ in blood (μg/ml)	distribution to blood cell (%)
1	50.25 ± 3.97
5	41.50 ± 3.85
10	42.73 ± 6.81
20	43.40 ± 2.45
40	40.36 ± 0.80

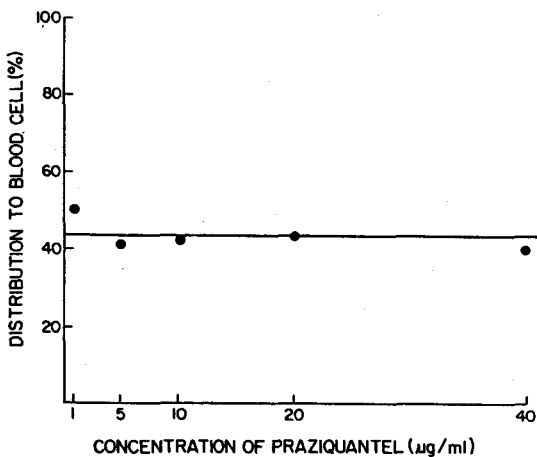


Fig. 7—Distribution to blood cells of PZQ in rabbits after 30 minutes incubation at 37°C as a function of concentration of PZQ.

의미로서 기생충 표피를 잘 통과해 신속히 흡수되어 약효를 나타내는 것과 관련된 것으로 보인다. 이처럼 혈구 분배율이 높으므로 앞으로의 PZQ의 약물 속도론적 연구시 혈구 분배율에 대한 고려가 있어야 할 것으로 생각되며, plasma 중의 농도를 전혈 중의 농도로 환산하려면 다음 두 식을 이용하면 된다.¹⁶⁾

$$f_B = \frac{f_P C_P}{C_B} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$C_B = C_{RBC} H_{ct} + C_p (1 - H_{ct}) \quad (\text{Eq. 3})$$

C_B 는 혈중 총 약물농도, C_p 는 plasma 중 총 약물농도이며 f_B 는 혈중약물의 유리형 분율, f_p 는 plasma 중 약물의 유리형 분율을 나타낸다. C_{RBC} 는 적혈구 중의 약물농도를, H_{ct} 는 hematocrit 치를 나타낸다.

결 론

HPLC를 이용해 약리활성을 가진 PZQ parent drug을 약리활성이 없는 대사체와 분리 정량할 수 있었으며, rabbit에게 PZQ를 정맥주사하였을 때의 혈중농도 곡선으로부터 임상적으로 의미가 있는 PZQ parent drug의 pharmacokinetic parameter들을 계산할 수 있었다. 특히 PZQ parent drug의 $t_{1/2\beta}$ 는 2.36시간으로 대사체까지 동시 정량한 보고의 6~8시간보다 훨씬 짧으므로 투약 계획수립시 이를 고려해야함을 알았다. 또한, rabbit에서의 PZQ의 in vitro 평균 혈구 분배율은 44%로 상당히 높은 편이므로 약물 속도론적 연구시 이를 고려해야함을 알았다.

문 헌

- 1) Gilman, A.G., Goodman, L.S. and Gilman, A.: *The pharmacological basis of therapeutics* 6th ed., Macmillan Publishing Co. Inc., N.Y., p.1024 (1980).
- 2) Steiner, K., Garbe, A., Diekmann, H.W. and Nowak, H.: The fate of praziquantel in the organism. I. Pharmacokinetics in animals. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* 2, 85 (1976).
- 3) Steiner, K. and Garbe, A.: The fate of praziquantel in the organism. II. Distribution in rats. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* 2, 97 (1976).
- 4) Diekmann, H.W. and Bühring, K.U.: The fate of Praziquantel in the organism. III. Metabolism in rat, beagle dog and rhesus monkey. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* 2, 107 (1976).
- 5) Bühring, K.U., Diekmann, H.W., Müller, H., Garbe, A. and Nowak, H.: Metabolism of praziquantel in man. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* 3, 179 (1978).
- 6) Patzschke, K., Pütter, J., Wegner, L.A. Horster, F.A. and Diekmann, H.W.: Serum concentrations and renal excretion in humans after oral administration of praziquantel. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* 3, 149 (1979).
- 7) Pütter, J. and Held, F.: Quantitative studies on the occurrence of praziquantel in milk and plasma of lactating women. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* 4,

- 193 (1979).
- 8) Xiao, S.H., Yu, Y.G., Wang, C.Y., Jiao, P.Y., Yuan, X.J. and Liang, Y.Y.: The uptake and distribution of ^3H -pyquinton in *Schistosoma japonicum*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **16**, 488 (1981).
 - 9) Shao, H.S., Pan, S.R., Jing, X.N., Xu, N.X., Ying, L.Q., Zhu, H.Y., Qian, X.M., Yan, H.Y. and Yao, Q.S.: Absorption, distribution and excretion of ^{14}C -praziquantel in animals. *Acta pharmacologica Sinica*, **2**, 49 (1981).
 - 10) Shen, P.L., Qian, X.M., Zhang, Y.P., Xu, J.M. and Ye, J.F.: Effect in vitro of metabolized praziquantel on *Schistosoma japonicum*. *Acta Pharmacologica Sinica*, **3**, 208 (1982).
 - 11) Xiao, S.H., Brian, A.C. and Leslie, T.W. Jr.: Quantitative determination of praziquantel in serum by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, **275**, 127 (1983).
 - 12) Diekmann, H.W.: Quantitative determination of praziquantel in body fluids by gas liquid chromatography. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* **3**, 139 (1979).
 - 13) Pütter, J.: A fluorometric method for the determination of praziquantel in blood-plasma and urine. *Europ. J. Drug Met. & Pharmacokin.* **3**, 139 (1979).
 - 14) Xu, P.P., Ren, Z.L., Li, Y.X., Lu, M.L., Li, D.A., Xu, H. and Zhao, M.X.: Determination of praziquantel in rabbit plasma and its pharmacokinetic parameters by high performance liquid chromatographic method (HPLC). *Acta Pharmaceutica Sinica*, **18**, 400 (1983).
 - 15) Gao, H.F., Wang, C.Y. and Yang, G.Y.: The spectrofluorometric determination of praziquantel in rabbit plasma. *Anal. Chem. Acta*, **4**, 144 (1984).
 - 16) 심창구: 약물 체내 속도론, 대학사, 서울 p.137 (1985).