

## 제초제 Paraquat 중독치료의 최신 지견

순천향대학교 천안병원 내과, 농약중독 연구소

홍 세 용

### 서 론

유해산소 (reactive oxygen species, ROS) 형성이 질병의 발생이나 유지에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 질환으로는 허혈성 심질환, 급만성 신부전과 신사구체염, 폐혈증, 당뇨, 고지혈증, 약물중독, 항암제의 부작용, 기타 독극물 중독 등 다양하다.

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride)는 세계에서 가장 흔히 사용되는 제초제로 식물의 광합성 (photosynthesis) 동안에 ROS가 생성되어 세포벽과 원형질을 파괴하여 제초효과를 나타낸다. Paraquat가 인체에 흡수되면 체내에서도 ROS를 형성하며 이것이 독작용의 주원인이다. 따라서 ROS 형성을 억제하는 것이 paraquat 중독 치료의 근간이라고 할 수 있다. Multiple organ failure 중에서 신장, 간장 등의 손상은 대부분 호전되나 유독 폐 손상만은 수일 내에 급속히 진행하여 저산소증으로 사망하게 된다. 독성이 매우 강하여 적은 양이라도 인체에 흡수되면 치명적이며 우리나라에서 가장 많은 희생자를 내는 농약이다. 정확한 통계는 없으나 필자가 근무하는 병원에서 1년간 치료받은 환자가 약 300여명이고 이중 50% 가량이 사망하는 것으로 미루어 국내에서 연간 천명 이상이 이 약에 중독되고 500명 이상이 사망할 것으로 추측된다.

인체에서 ROS에 대한 방어기전은 superoxide dismutase, catalase, glutation peroxidase 등의 효소계와 vitamin A, vitamin C, vitamin E, glutathione, bilirubin, urate 등의 비효소계로 분류할 수 있다. 그러나 paraquat 중독처럼 ROS 형성이 짧은 기간에 다량으로 형성되는 경우에는 생리적인 방어기전만으로는 ROS를 효과적으로 제거할 수가 없어 치명적인 조직 손상이 초래된다.

이 경우에는 얼마나 빨리 antioxidant를 효과적으

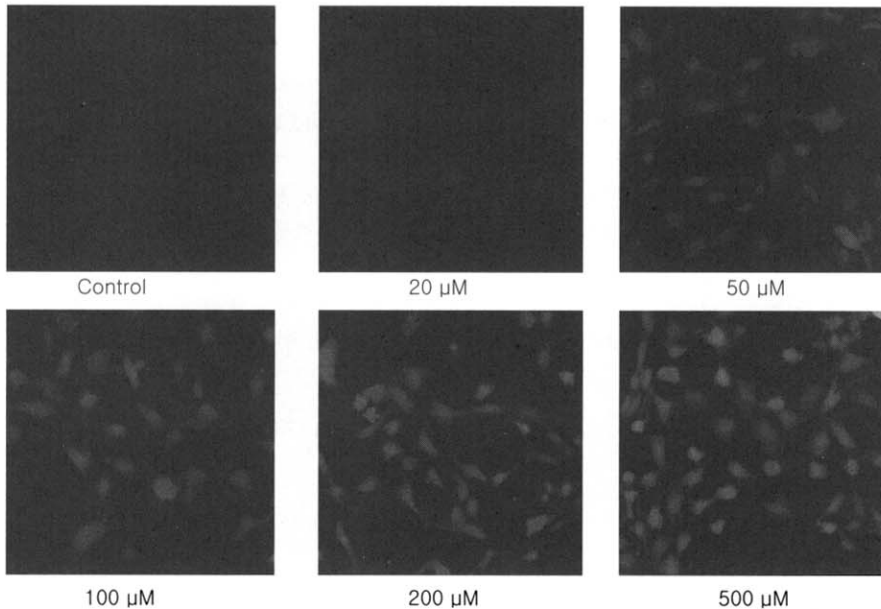
로 증가시켜주느냐가 치료의 핵심부분이라고 할 수 있다. 혈장내의 antioxidant들은 다양하지만 uric acid, protein thiol, ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol 등의 순서로 중요하다.

그러나 ROS가 생성되는 곳은 세포 안쪽이기 때문에 세포 밖의 antioxidant가 세포 내에 영향을 미치는 것은 아니다 (Fig. 1). 임상에서 사용 중이거나 연구 중인 항산화 물질로는 과일이나 채소, 적포도주 등의 음식 외에도 melatonin, alpha-tocopherol, urate, dexamethasone, butylated hydroxytoluene, vitamin B, aminoacids (sulfhydryl group), vitamin C, glutathione, N-acetyl cysteine, thiocctic acid 등이 있다. 짧은 시간 내에 항 산화력을 대폭 증가시킬 수 있는 것은 정맥주사가 가능한 약제임을 고려한다면 현재 우리나라에서 시판되는 정맥주사용 항 산화제는 vitamin C, glutathione (GSH), N-acetyl cysteine (NAC), thiocctic acid, 그리고 vitamin E 등이 고려의 대상이 될 수 있겠다. 그러나 불행히도 이들을 paraquat 중독환자에서 antioxidant로 사용하고자 할 때 소위 "therapeutic window (치료영역)"를 이루는 치료 농도, 그리고 약리역동학에 기초한 초기 투여양 혹은 유지양에 관한 지침이 없다. 저자는 이런 의문에 답하기 위하여 지난 10여년간 개인적으로 많은 관심을 기울여왔다. 비록 그 결과가 미완성적인 상태이지만 그간의 연구결과들을 문헌 고찰과 함께 소개하고자 한다.

### 본 론

#### 1. Vitamin C

Vitamin C는 antioxidant로서의 역할 이외에도 항암 (anticarcinogenic) 효과, folate, amine, glucose, iron, cyclic nucleotide, cholesterol, 기타 여러 약제들의 대사에 관여한다. 이 외에도 백혈구의 기능을 증



**Fig. 1.** Production of reactive oxygen species (ROS) by paraquat treatment in a dose-dependent manner in Swiss 3T3: After 40 minutes incubation of the cells with 20-500 M paraquat, intracellular ROS generation was assessed with 2,7-dichlorofluorescein and a laser scanning confocal microscope (Magnification, 400).

가시키고 interferon, carnitine 등의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. Fujimoto 등은 vitamin C가 paraquat의 신장내 축적을 방해하여 신장조직내 paraquat의 양을 감소시킨다고 보고하였다.

정상 성인에서 하루에 필요한 vitamin C의 권장량은 아직까지 확실한 지침은 없다. 미국 국립 식품 영양 학술위원회 [Food and Nutrition Board of National Academy of Sciences, U.S.A.]에서는 1989년 이후 60 mg을 추천하여오고 있으나 최근에는 100-200 mg으로 상향조정하려는 움직임을 보이고 있다.

Paraquat 중독환자에서 vitamin C는 antioxidant로 자주 사용되고 있으나 짧은 기간 동안에 다량의 ROS가 형성되어 치명적인 손상을 야기하는 급성 중독 상태에서 적극적으로 항산화능력을 최대한으로 증가시키고자 할 때 적절한 투여량에 대하여서는 지금까지 보고된 지침이 없다. 저자는 한국인에서 vitamin C의 약리 역동학 (pharmacokinetics)을 조사하고 치료 영역 (therapeutic window)과 효과적인 최소한의 양이 어떻게 설정이 되어야 할지를 알아보려고 하였다.

**1) Vitamin C의 측정**

Photometric method로 측정하였던 바 측정원리는

ascorbic acid가  $Cu^{+2}$ 에 의하여 산화되어 dehydroascorbic acid를 형성하는데 이것은 2,4-dinitrophenylhydrazine와 반응하여 붉은 색으로 발색 (bis-hydrazone) 한다. 요약하면 해파린 처리한 혈장 0.5 mL를 metaphosphoric acid 2 mL에 넣고 vortex 한 다음  $2,500 \times g$ 로 10분간 원심 분리한다. 상층액 1.2 mL에 DTCS (thiorea solution 5 mL, copper sulfate solution 5 mL, 2,4-dinitrophenylhydrazine 100 mL) 0.4 mL을 가한다.  $37^{\circ}C$ 에서 3시간 동안 방치한 다음 12 mol/L sulfuric acid 2 mL를 가한 다음 520 nm에서 흡광도를 읽었다.

**2) 한국인 성인에서 vitamin C와 TAS의 분포**

한국인 성인 남녀 50명을 대상으로 측정한 vitamin C와  $0.48 \pm 0.01$  mg/dL, TAS치는  $2.22 \pm 0.16$  mmol/L이었으며 나이, 성별에 따른 차이는 없었다 ( $p > 0.05$ ).

**3) Vitamin C 혈중농도가 TAS에 미치는 영향**

**In vitro:** Normal pooled plasma에 vitamin C를 가하여 1 mg/dL에서 100 mg/dL 사이의 다양한 농도를 만든 다음 TAS를 측정한 결과 vitamin C는 TAS치와 유의한 상관관계를 보였다 {[TAS (mmole/

L)=0.036×vit. C (mg/dL)+2.32], R-squared: 0.976, p=0.0001, Fig. 1).

**In vivo**: Vitamin C 50 mg/kg를 정맥주사하고 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 9시간 후에 채혈 한 다음 같은 시료에서 동시에 측정된 vitamin C 농도와 TAS 사이에는 유의한 직상관 관계가 있었다 {[TAS (mmole/L)=0.078×vit.C (mg/dL)+2.00], R-squared: 0.488, p=0.0001, Fig. 1}.

**4) Vitamin C 역동학 (Fig. 2)**

Vitamin C의 약리 역동학적인 수치들은, distribution volume 32.0±14.4 L, area under curve (AUC): 36.4±11 3 mg.hour/dL, plasma clearance 2.13±1.36 L/hour, 반감기 (T1/2): 10.2±7.8 hour, Cmax (maximum concentration): 17.1±7.1 mg/dL, Tmax 0.64±0.24 hour이었다 (Fig. 1).

60 kg 체중의 한국인에서 vitamin C의 distribution volume은 32.0±14.4 L이었다.

급성 Paraquat 중독처럼 짧은 시간에 ROS 형성이 극적으로 증가할 때 적절한 vitamin C의 투여량은 얼마인가?

100-1,000 mM에서 세포내 ROS 형성은 complete suppression을 보인다.

Aascorbic acid MW : 171.1

1 M=176.1 gm/L

1 mM=17.61 mg/L=1.76 mg/dL

Target plasma concentration©: 1-10 mM=1.76-17.6 mg/dL

Plasma clearance (CL): 2.13 L/h

Volume of distribution (Vd): 32 L

F: Bioavailability: 1 (IV)

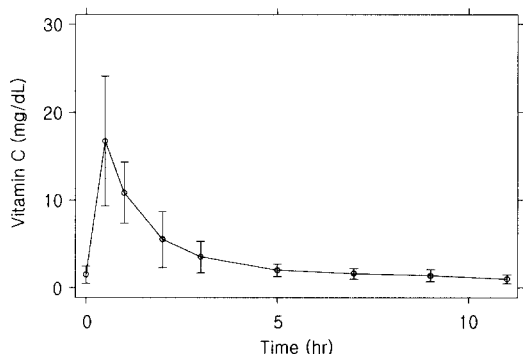


Fig. 2.

Loading dose=Vd×C/F=32L×1.76 mg/dL/L=563.2 mg

Maintenance dose=CL×Css=2.13 L/h×17.6 mg/L=37.488 mg/h

한편 저자들의 시험관 실험 (In vitro)에서 vitamin C의 혈중 농도는 1 mg/dL에서 100 mg/dL 사이에서 TAS치와 비례관계를 보였다. 이러한 저자들의 결과는 할 수만 있다면 vitamin C의 혈중 농도를 100 mg/dL 이상으로 올려야 함을 시사한다. 이런 정도의 농도를 유지하기 위해서는 32 g의 vitamin C (32×1,000 mg/L)를 정맥 주사 해야 하는데 이는 하루에 추천되는 vitamin C의 양 (100-200 mg)에 비하여 수백배에 해당되는 양이다.

Vitamin C를 과량 사용하면 부작용으로 오심, 구토, 설사 등의 소화기증세가 나타날 수 있으며 요중 oxalate의 배설이 증가하거나 신결석, 용혈 등을 초래할 수도 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 Kang 등의 보고에 따르면 vitamin C는 paraquat에 의한 이미 심한 폐손상 시에는 ROS에 의한 조직손상이 더욱 심해질 수도 있는데 이는 손상받은 세포에서 나오는 metal ion의 존재여부가 중요하다고 하였다.

**2. Glutathione**

많은 sulphhydryl compounds가 paraquat 중독 치료에 사용되거나 연구되어 왔는데 그 이유는 세포 내에서 reduced glutathione (GSH) 감소하면 paraquat 독성이 심해진다는 사실이 일찍부터 알려졌기 때문이었다. GSH은 세포 내에 다량 포함되어며 세포내 환경이 ROS로부터 안전할 수 있는 중요한 역할을 한다. 세포 내에서는 mM 수준으로 세포 밖 (uM)에 비하여 1,000배나 높은 농도를 유지한다.

이처럼 높은 농도 차이로 인하여 일반적으로는 세포 밖의 GSH가 안으로 들어가는 것은 몹시 어렵다. 시험관 실험에서 alveola type 2 cell은 배양액내 GSH 농도를 높이면 paraquart에 의한 손상이 억제된다는 연구 결과가 있다. 그러나 GSH를 생체에 주입하면 혈중에서 매우 빠른 속도로 산화되어버린다. 일단 산화되면 다시 환원되지 않는 한 항 산화제 역할은 없기 때문에 이 경우에는 GSH 농도보다는 GSH reductase 활성이 더 중요하다고 할 수 있다.

최근에 우리는 시험관 실험에서 paraquart에 의하여 형성된 ROS를 억제하기 위한 세포외액내 GSH 농도

가 1 mM 정도임을 알았다 (Fig. 1) (in press, J Korean Med Sci, 2003). 이 농도를 유지하기 위해 서라면 GSH의 초기 투여양 (loading)과 유지량 (maintenance dose)이 얼마나 되어야 할 것인지는 이 의 약리 역동학적인 성상에 따라 결정된다. 이에 관한 연구로는 서양인을 대상으로 10여년 전에 발표된 논문이 있으나 동양인을 대상으로 한 연구는 없다. 이에 저자는 정상 한국인 성인 남녀를 대상으로 실시한 GSH의 약리 역동학적 연구 결과를 소개하고자 한다.

### 1) Glutathione measurement

Samples were prepared and derivatized for HPLC analysis using procedures (with slight modifications) as described previously. Briefly, 0.1 mL of serum was mixed with 0.1 mL of 25 mM dithiothreitol and 0.05 mL of 0.1 M Tris (pH 8.5) for the measurement of total glutathione. The GSH-OPA adducts were separated on a 4.6 250 mm Luna C18 column (5 m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) using two Waters 510 pumps, a 717 autosampler, and a 474 fluorescence detector (Milford, MA, USA), and detected at 420 nm with excitation at 340 nm. The amount of GSSG was obtained by subtracting the amount of GSH from the amount of total glutathione.

#### (1) Pharmacokinetics of glutathione

(Fig. 3-5)

GSH, GSSG 그리고 total glutathione의 Basal plasma concentrations은 각각  $4.3 \pm 5.5 \mu\text{M}$ ,  $9.7 \pm 6.8 \mu\text{M}$  and  $14.0 \pm 12.1 \mu\text{M}$ 이었다.

GSH, GSSH, 그리고 total glutathione의 elimination rate constants는 각각  $0.070 \pm 0.026 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.066 \pm 0.012 \text{ min}^{-1}$  and  $0.066 \pm 0.014 \text{ min}^{-1}$ , elimination half-life는 각각  $10.9 \pm 3.3 \text{ min}$ ,  $10.8 \pm 2.0 \text{ min}$  and  $10.9 \pm 2.2 \text{ min}$ 이었다.

Systemic clearance는  $309.2 \pm 360.9 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  (GSH),  $10.6 \pm 3.7 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  (GSSH) and  $9.8 \pm 3.8 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  (total glutathione)이었다.

Apparent volume of distribution은  $5.528 \pm 6.935 \text{ L kg}^{-1}$  (GSH),  $0.164 \pm 0.061 \text{ L kg}^{-1}$  (GSSH) and  $0.151 \pm 0.058 \text{ L kg}^{-1}$  (total glutathione)이었다.

이상의 결과를 토대로 하였을 때 60 kg 성인에서

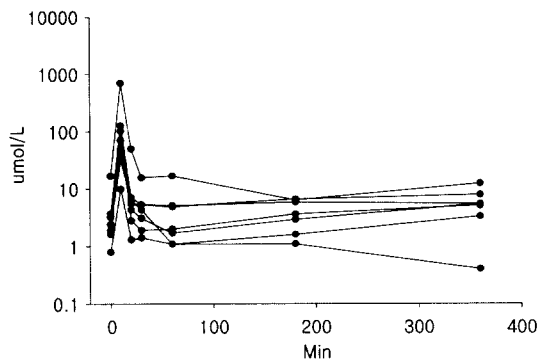


Fig. 3. Plasma concentration of GSH after the intravenous administration of  $1.85 \text{ gm}^2$  of GSH.

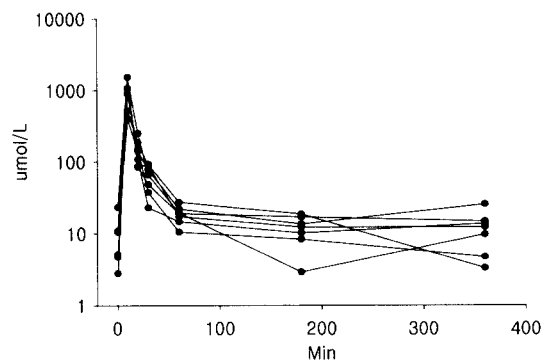


Fig. 4. Plasma concentration of oxidized glutathione after the intravenous administration of  $1.85 \text{ gm}^2$  of GSH.

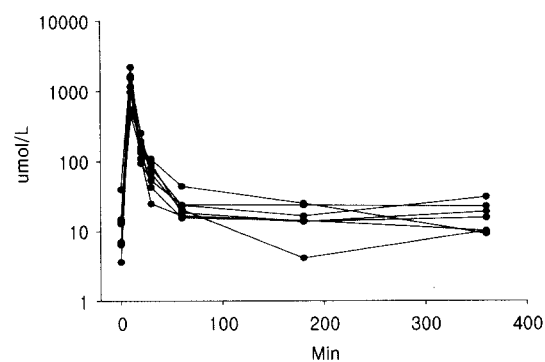


Fig. 5. Plasma concentration of total glutathione after the intravenous administration of  $1.85 \text{ gm}^2$  of GSH.

GSH 혈중농도를 1 mM로 유지하기 위해서는 loading dose :  $1.69 \text{ g kg}^{-1}$ , optimal infusion rate :  $5.70 \text{ g hr}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ 이었다. 이상의 결과는 GSH 혈관주사를

통하여 혈중 농도를 1 mM로 유지하는 것이 불가능한 것임을 보여주고 있다.

### 3. N-acetyl-L-cysteine

N-acetyl-L-cysteine은 시험관 내에서 항 산화제의 효과가 탁월한 것으로 알려져 있다. NAC-deacetylating enzyme에 의하여 acyl 기가 떨어지면 cysteine이 되고 이는 세포벽을 쉽게 통과할 수 있어 세포 내의 glutathione 합성이 촉진된다. Glutathione은 세포 내에서 항 산화작용을 하며 일부는 세포 밖으로 배출되어 다른 장기로 이동하는 것으로 알려져 있다. 그러나 파라콰트 중독처럼 유해산소가 극적으로 많이 형성되고 따라서 항 산화 효과가 짧은 시간 내에 극적으로 증가되어야 하는 경우에 N-acetyl-L-cysteine을 정맥 내 주입해야 할 것이다. 그러나 정맥 내 N-acetyl-L-cysteine 주사 시에 적절한 투여양에 대하여서는 알려진 바가 없다.

저자들은 세포 내에 형성된 유해산소를 억제하기 위하여 필요한 세포 배양액내의 N-acetyl-L-cysteine 농도를 보고한 바 있다. 이 농도를 유지하기 위해서 필요한 용량을 밝히기 위해서 인체 내에서 N-acetyl-L-cysteine의 반감기, clearance, distribution volume 등의 약리 역동학적인 연구를 실시하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

Clearance :  $1.85 \pm 1.28$  L/min  
Vd :  $208.8 \pm 59.8$  L  
t 1/2 :  $100.7 \pm 68.4$  min  
Target concentration : 2 mM이라고 하면 -  
Loading dose :  $2 \text{ mM} \times 208.8 \text{ L} = 0.418 \text{ mol} = 68.1 \text{ g}$ , 60 kg(성인), kg당 1.1 g IV  
Maintenance dose =  $68.1 \text{ g} \times 0.693 / 100.7 = 0.468 \text{ g} / \text{min}$

결론 : NAC 역시 GSH와 같이 reduced form 혹은 intact form을 혈중에 오래 머무르게 하는 것은 불가능하다. 즉 너무나 많은 양을 주입해야만 한다.

NAC는 혈중에서 활성적으로 cyst(e)ine, glutathione 등과 결합하는데 이 자체가 산화과정이다. 아직 까지 이들 산화형 NAC가 항 산화효과에 미치는 영향에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 현재로는 NAC를 혈관주사 하여서 세포내 항 산화 효과를 증가시키고자 하는 시도는 무모해 보인다. 그러나 전체적인 SH 기의 pool을 증가시킬 것이기 때문에 추가

연구가 있어야 할 것이다.

## 결 론

Vitamin C와 GSH, 혹은 NAC 등을 주사하여 세포내 항 산화 효과를 증가시키고자 하는 노력은 실제적으로 불가능해 보인다.

Vitamin C는 비교적 안정된 항 산화제이나 iron 유무에 따라서 오히려 ROS 형성을 촉진할 수 있기 때문에 적절한 투여양을 산정하기가 쉽지 않다.

GSH와 NAC는 혈중에서 너무나 불안정하고 바로 산화되는 단점 때문에 효과적인 혈중 농도를 유지시키기 어렵다.

향후 thiocctic acid, quercetin 등 새로운 항 산화제에 대한 임상적인 연구를 통하여 활로가 모색되어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Bismuth C, Garnier R, Dally S, Fournier PE : Prognosis and treatment of paraquat poisoning : A review of 28 cases. *J Toxicolo Clin Toxicolo* 19:461-474, 1982
- 2) Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL : Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 68:1081-1087, 1998
- 3) Frei B, England L, Ames BN : Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6377-6381, 1989
- 4) Galley HF, Howdle PD, Walker BE, Webster NR : The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic Biol Med* 23:768-774, 1997
- 5) Kang SA, Jang YJ, Park H : In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage : dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res* 28:93-107, 1998
- 6) Lawton JM, Conway LT, Crosson JT, Smith CL, Abraham PA : Acute oxalate nephropathy after massive ascorbic acid administration. *Arch Intern Med* 145:950-951, 1985
- 7) Leinonen J, Rantalaiho V, Koivula T, et al. : The association between the total antioxidant potential of plasma and the presence of coronary heart disease and renal dysfunction in patients

- with NIDDM. *Free Radic Res* **29**:273-281, 1998
- 8) Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, et al.: Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* **27**:484-490, 1997
  - 9) Minakata K, Suzuki O, Saito S, Harada N: Ascorbate radical levels in human sera and rat plasma intoxicated with paraquat and diquat. *Arch Toxicol* **67**:126-130, 1993
  - 10) Newaz MA, Nawal NN: Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and total antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* **11**:1480-1485, 1998
  - 11) Serafini M, Maiani G, Ferro LA: Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* **128**:1003-1007, 1998
  - 12) Smith LL: Mechanism of paraquat toxicity in lung and liver relevance to treatment. *Human Toxicology* **6**:31-36, 1987
  - 13) Stocker R, Frei B: Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma. In: Helmut Sies (Eds.), *Oxidative Stress*. Academic Press Inc., San Diego p213-238, 1991
  - 14) Wen Y, Cooke T, Feely J: The effect of pharmacological supplementation with vitamin C on low-density lipoprotein oxidation. *Br J Clin Pharmacol* **44**:94-97, 1997
  - 15) Anderson ME: Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv Pharmacol* **38**:65-78, 1997
  - 16) Reed DJ, Ellis WW, Meck RA: The inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione metabolism of isolated rat kidney cells by L-(alpha S, 5S)-alpha-amino-3-chloro-4, 5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT-125; NSC-163501). *Biochem Biophys Res Commun* **94**:127-137, 1980
  - 17) Rajpert-De Meyts E, Shi M, Chang M, Robison TW, Groffen J, Heisterkamp N, et al.: Transfection with gamma-glutamyl transpeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* **114**:56-62, 1992
  - 18) Abbott WA, Bridges RJ, Meister A: Extracellular metabolism of glutathione accounts for its disappearance from the basolateral circulation of the kidney. *J Biol Chem* **259**:15393-15400, 1984
  - 19) Levi J, Jacobs C, Kalman SM, McTigue M, Weiner MW: Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: I. Effects of sulfhydryl groups in rat kidneys. *J Pharmacol Exp Ther* **213**:545-550, 1980
  - 20) Brown LA, Bai C, Jones DP: Glutathione protection in alveolar type II cells from fetal and neonatal rabbits. *Am J Physiol* **262**:L305-L312, 1992
  - 21) Hagen TM, Brown LA, Jones DP: Protection against paraquat-induced injury by exogenous GSH in pulmonary alveolar type II cells. *Biochem Pharmacol* **35**:4537-4542, 1986
  - 22) Cereser C, Guichard J, Draï J, Bannier E, Garcia I, Boget S, et al.: Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **752**:123-132, 2001
  - 23) Lash LH, Jones DP: Transport of glutathione by renal basal-lateral membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* **112**:55-60, 1983
  - 24) Harada D, Naito S, Hiraoka I, Otagiri M: In vivo kinetic analysis of covalent binding between N-acetyl-L-cysteine and plasma protein through the formation of mixed disulfide in rats. *Pharm Res* **19**(5):615-620, 2002
  - 25) Yamauchi A, Ueda N, Hanafusa S, Yamashita E, Kihara M, Naito S: Tissue distribution of and species differences in deacetylation of N-acetyl-L-cysteine and immunohistochemical localization of acylase I in the primate kidney. *J Pharm Pharmacol* **54**(2):205-212, 2002
  - 26) Chavez-Cartaya R, Jamieson NV, Ramirez P, Marin J, Pino-Chavez G: Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following experimental warm liver ischaemia. Is there a real physiological benefit? *Transpl Int* **12**(3):213-221, 1999
  - 27) Harada D, Naito S, Hiraoka I, Otagiri M: In vivo kinetic analysis of covalent binding between N-acetyl-L-cysteine and plasma protein through the formation of mixed disulfide in rats. *Pharm Res* **19**(5):615-620, 2002