

Nalidixic Acid의 血球 및 血漿에 對한 吸着

金 信 根

서울大學校 藥學大學

Adsorption of Nalidixic Acid to Human Erythrocytes and Plasma

Shin Keun Kim*

(Received May 6, 1974)

The adsorption of nalidixic acid on human erythrocytes was found to expressed by Freundlich's isotherm. The amount of adsorption of nalidixic acid on erythrocytes increased with an increase of pH.

The adsorption of nalidixic acid on human plasma was found to expressed at Scatchard's equation by the equilibrium dialysis method. An influence of pH on adsorption of nalidixic acid to human plasma proteins was studies at pH 4-10. It was found that the degree of adsorption increase with the increase of pH from 4-6, but decreased above pH 9.

緒 論

藥物이 體內에 吸收되어 血液中에 들어갈때 藥物과 血球 또는 血漿蛋白質과 吸着現象이 일러남이 알려지고, 이 現象은 藥物의 體內에 있어서의 活性濃度, 排泄 및 代謝速度등에 影響을 미치는 因子임은 잘 알려진 事實로 Davis¹⁾ 및 Anton²⁾은 sulfanilamide, sulfadiazine, sulfisoxazole등에 對하여 研究한 結果, 蛋白質과 結合狀態에 있는 sulfamine은 抗菌力을 잃고, 遊離狀態의 것만이 抗菌力이 있음을 報告하고 있으나 Brodie³⁾등은 藥物과 血漿蛋白質의 結合은 藥物의 血漿蛋白質中的 貯藏에 不過하다고 報告하고 있다. 그러나 蛋白結合과 排泄速度 및 持續時間과의 關係의 研究에 의하면 血液中에서 蛋白質과의 結合量이 클수

* College of Pharmacy, Seoul National University.

특 排泄速度가 적고 作用時間이 긴 傾向이 있음이 sulfamine 뿐만 아니라 barbital 誘導體⁴⁾ salicyl酸誘導體⁵⁾등에서도 알려져 있다. 또 最近의 研究로 pentobarbital와 血漿蛋白과의 結合의 비율이 種屬差 및 性差가 있다는 北川등⁶⁾의 報告가 있다. 한편 藥物의 血球에 對한 吸着에 對하여서는 眞下등⁷⁾의 報告가 있다. 이들은 사람의 赤血球의 生理食鹽水浮遊液으로 sulfamine을 實驗한 結果 吸着은 比較的 輕度이고, 抗生物質에서 보는 바와 같이 큰 差가 없음을 報告하고 있다.

著者は 化學療法劑로 gram陽性菌에 對한 抗菌作用은 弱하고, gram陰性菌에 特異적으로 有效하다고 알려진 naphthyridine 誘導體인 nalidixic acid(1-ethyl-4-oxo-7-metnyl-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid)의 血球 및 血漿에 對한 吸着에 對하여 實驗한 結果 知見을 얻었기에 報告한다.

實 驗 方 法

1. 血球에 對한 吸着試驗

採血後 20日 以內의 O型保存血을 4000回轉, 7分間 遠心分離하여 血漿을 除去하고 血漿을 除去한 血球를 生理食鹽水로 洗滌液에 血漿蛋白質이 含有되지 않음을 trichloroacetic acid 試液으로 確認하기 까지 洗滌하였다. 이 血球를 nalidixic acid 2.3×10^{-6} M michaelis等張beronal緩衝液 10 ml에 浮遊시켜 30°에서 平衡에 到達하기까지 가볍게 흔들어 섞는다. 이 血球浮遊液中的 血球數는 6.0×10^5 cells/mm³으로 調製하였다. 血球와는 約 1時間으로 平衡에 到達하였고, 그 上澄液을 定量함으로서 間接적으로 血球에 吸着한 nalidixic acid를 算出하였다.

2. 血漿에 對한 吸着試驗

Klotz등⁸⁾의 方法에 따라 平衡透折法으로 測定하였다. 5% 加熱人血漿蛋白(Plasmanate, 綠十字製) 5 ml를 Visking's cellulose tube에 封入하고, 이것을 nalidixic acid $10^{-3} \sim 10^{-5}$ M/L의 磷酸緩衝液 10ml중에 浸漬하여 平衡에 도達시킨 後 透折外液을 採取하여 nalidixic acid를 定量하였다. 溫度 10°에서 平衡에 到着하는데 3~5日을 要하였다. 蛋白質溶液代身 緩衝液을 넣은 것을 對照로 하였다. pH의 影響測定은 KH₂PO₄, Na₂HPO₄, HCl, NaOH를 組合하여 使用하였다. 但 Cl⁻는 그 濃度가 1/40M를 넘으면 吸着을 阻害하기 始作함으로 pH3.5에서는 實驗을 하지 않았다.

3. Nalidixic acid의 定]

N. Takasagi⁹⁾등의 方法에 따라 檢液 1 ml를 取하여 여기에 0.5M acetate 緩衝液(pH 5)

1 ml를 가한 다음 chloroform 5 ml을 가하여 10분간 振盪한 다음 遠心分離하고 chloroform 層을 分取하여 334 m μ 에서 naphthyridine을 定量하였다.

實驗結果 및 考察

1. 血球에 對한 吸着

a) 濃度の 影響

Nalidixic acid의 pH 7.4에 있어서의 血球에 對한 吸着에 미치는 濃度の 影響은 다음과 같다. 吸着量과 濃度の 關係를 나타내는 Freundrich의 式이 있다.

$$\log \frac{x}{m} = \frac{1}{n} \log C + \log K$$

C는 濃度, x는 吸着量, m는 血球數, n 및 K는 定數이다.

Nalidixic acid의 血球에의 吸着의 結果를 이 式에 代入하여 $\log C$ 에 對하여 $\log \frac{x}{m}$ 를 plot하면 Fig. 1.와 같이 直線關係가 成立함으로 Freundrich의 吸着式에 맞는 吸着現象임을 알 수 있다.

b) pH의 影響

血球가 溶血을 일으키지 않는 範圍 即 pH 5.3~9.6에 있어서의 nalidixic acid의 吸着에 미치는 pH의 影響을 實驗한 結果는 Fig. 2.와 같다.

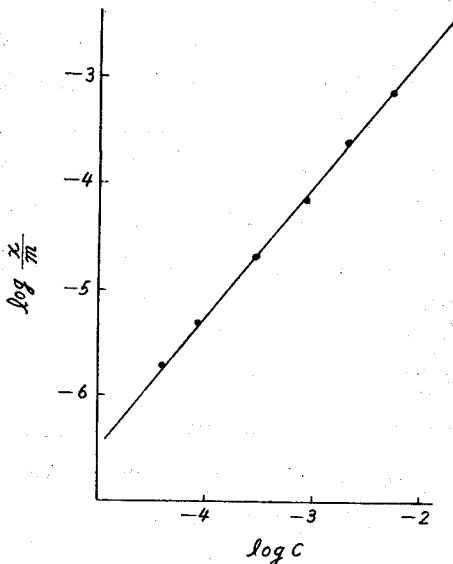


Fig. 1. Adsorption of nalidixic acid on human erythrocytes (pH 7.4).

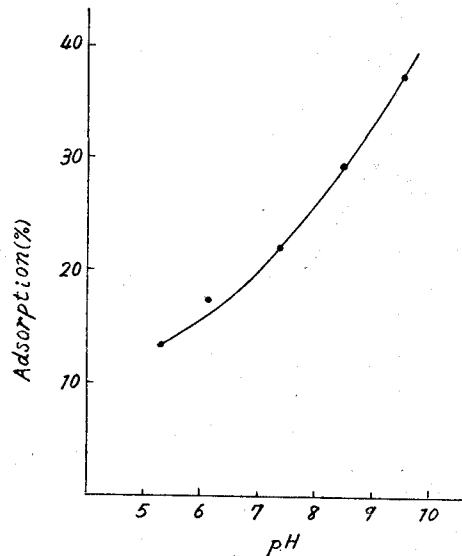


Fig. 2. Influence of pH on adsorption of nalidixic acid on human erythrocytes.

Fig. 2.에서 보는 바와 같이 nalidixic acid의 血球에의 吸着은 alkali性側에서 吸着率 이 增加함을 알 수 있고 pH 7.4에서의 吸着率은 42.6%였다.

2. 血漿에 對한 吸着

透折平衡法이라 既知量의 蛋白質 및 어떤 藥物을 含有한 溶液의 一定容量을 cellulose tube에 넣고 이것을 一定容量의 溶媒中에 浸漬하여 一定溫度下에서 平衡에 到達시킨 後 內液 또는 外液中的 藥物의 量을 定量하여 蛋白質과의 結合을 測定하는 方法이다.

Klotz등¹⁰⁾ 등에 의하면 低分子化合物 또는 ion이 蛋白質과 可逆結合物을 만들 때 結合量과 濃度와의 關係는 Langmuir吸着式에 따른다고 한다.

$$r = \frac{nKC}{1+KC} \dots\dots\dots(1)$$

但 C는 遊離低分子化合物 또는 ion의 濃度, r는 蛋白質 1分子當의 結合量, K는 強度를 나타내는 定數, n는 飽和結合量이다. 또 (1)는 다음과 같이 바꾸어 쓸수 있다.

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{Kn} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{n} \dots\dots\dots(2)$$

또 Scatchard¹¹⁾는 (2)式과 等價인 (3)式을 提唱하고 있다.

$$\frac{r}{c} = Kn - Kr \dots\dots\dots(3)$$

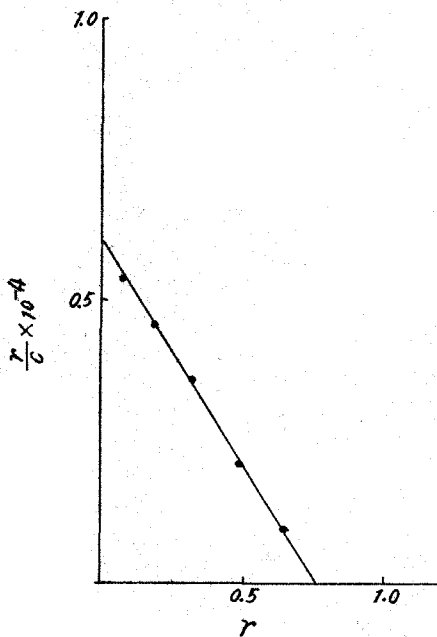


Fig. 3. Adsorption isotherm of nalidixic acid on human blood plasma by Scatchard's equation.

지금 實驗에 使用한 血漿을 모두 albumin(分子量 69,000¹²⁾)이라 假定하면 pH 7.4에 있어서의 nalidixic acid의 濃度와 吸着量과의 關係를 Scatchard式에 따라 plot하면 Fig. 3.을 얻을 수 있다. 이 Fig. 3.에서 보는 바와 같이 直線을 나타내고 있다. 이것은 nalidixic acid와 吸着하는 蛋白質의 部位은 一種類이고, 蛋白質 1分子當에 吸着하는 最終數는 0.78이다. 지금 血漿의 albumin 含有量을 88%(Plasmanate 解說書)로 하면

$$0.78 \times \frac{100}{88} = 0.88$$

即 nalidixic acid가 albumin에만 吸着한다면 그 最大吸着數 n는 0.88이다. 이것은 Yamazaki¹³⁾등이 10°에서 sulfamine에서의 最大吸着數 1.9보다 훨씬 적은 값이다.

b) pH의 影響

溫度 10°의 各 pH에 있어서의 nalidixic acid의 蛋白質과의 平衡濃度 C와 蛋白質分子當의 nalidixic acid의 結合量 r와의 關係는 Fig. 4.와 같다. 이 Fig. 4.에서 보는 바와 같이 nalidixic acid의 結合量은 pH值에 따라 다르나 모두 Langmuir吸着式을 滿足한다. 또 nalidixic acid의 濃度를 $1.5 \times 10^{-4}M$ 로 固定하였을 때의 各 pH에 있어서의 吸着率은 Fig. 5.와 같다. 이 Fig. 5.에서 보는 바와 같이 pH 6에서의 吸着이 最高值를 나타냈다. 이것은 pH가 nalidixic acid의 pKa(5.9) 값 附近에서 急激하게 增加하고 있다. 이것은 pH가 pKa를 넘으면 nalidixic acid의 負 ion의 存在量이 增加하고 이것이 蛋白質에 對하여 中性分子型보다 強하게 吸着하기 때문이라 思料된다.

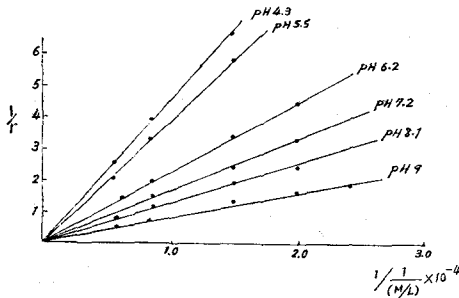


Fig. 4. Binding of nalidixic acid by human blood plasma in various pH values.

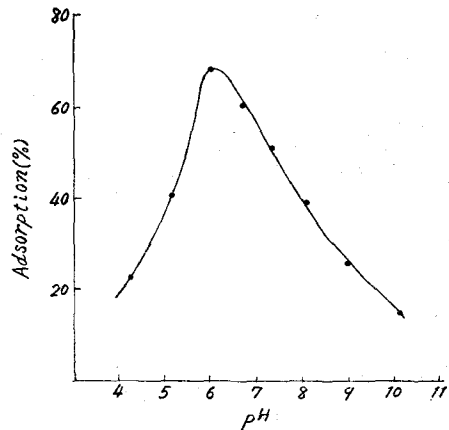


Fig. 5. Influence of pH on adsorption of nalidixic acid on human plasma.

結 論

以上の 實驗結果 및 考察에 의하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

- (1) Nalidixic acid의 pH 7.4에 있어서의 血球에 對한 吸着은 Freundlich의 吸着式에 맞는 吸着現象을 나타낸다.
- (2) Nalidixic acid의 血球에의 吸着은 alkali 性側에서 增加하고 pH 7.4에서의 吸着率은 42.6%였다.
- (3) Nalidixic acid의 透折平衡法으로 血漿에의 吸着을 實驗한 結果 그 吸着은 Scatchard 式에 맞는 吸着現象을 나타냈고 最大吸着數는 0.88이다.
- (4) Nalidixic acid의 血漿의 吸着은 pH 6에서 最高值를 나타내고, Langmuir式에 맞는 吸着이다.

文 獻

- 1) B.D. Davis; *J. Clin. Invest.*, **22**, 753 (1943)
- 2) A.H. Anton; *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **129**, 282 (1960)
- 3) B.B. Brodie, C.A.H. Hogben; *J. Pharm. Pharmacol.*, **9**, 345 (1957)
- 4) L.R. Galdbaum, P.K. Smith; *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **111**, 167 (1954)
- 5) 掛見他: 藥誌, **82**, 536 (1962)
- 6) 北川他: 藥誌, **88**, 1512 (1968)
- 7) 眞下他: 最新醫學, **15**, 1873 (1970)
- 9) N. Takasugi *et. al.*; *Chem. Pharm. Bull.*, **10**, 13 (1968)
- 10) Klotz, I.M. *et al.*; *The Proteine*, **1**, 758 (1953), Academic Press.
- 11) Scatchard, G.: *Ann; N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 (1949)
- 12) Oncley, J.L. *et al.*; *J. Phy. & Colloid Chem.*, **51**, 184 (1947)
- 13) M. Yamazaki *et al.*; *Arch. Pract. Pharm.*, **27**, 40 (1967)