

## 藥 — 藥 相互作用 研究(Ⅳ)

Warfarin 의 혈장단백 결합에 대한 Niflumic Acid 및 Phenylbutazone 의 영향 비교

趙 允 成 · 梁 仲 益

서울대학교 藥學大學 · 東亞製藥株式會社

(Received March 30, 1980)

Yun Sung Chough and Joong Ik Yang

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151 and Dong-A Pharmaceutical Company, Ltd.,  
Seoul 131, Korea

### A Comparative Study of the Influence of Niflumic Acid and Phenylbutazone on Warfarin-Plasma Protein Binding

**Abstract**—To determine *in vitro* effects of phenylbutazone and niflumic acid on warfarin binding to rabbit serum protein, warfarin was added to the rabbit plasma, and the bound fraction was determined by warfarin-protein complex fluorescence. The bound fraction was decreased by phenylbutazone and niflumic acid. From this effect niflumic acid was found to have the more potent ability to displace warfarin from protein binding sites than phenylbutazone.

warfarin 은 매우 낮은 치료계수를 가지고 있으므로 다른 약물과의 상호작용을 예측하는 것은 두 약물의 동시투여시 대단히 중요하다.

warfarin 과 다른 약물의 상호작용중 가장 중요한 것은 혈청단백에서의 상경적 결합에 의한 유리상태의 warfarin 농도의 증가에 기인한 항혈액응고 효과의 변화이다. Aggeler 등은 phenylbutazone 이 warfarin 과 상호작용을 나타낸다고 보고하였으며, Solomon 및 Schogie<sup>2)</sup>는 *in vitro* 연구에서 단백 결합에 영향을 주어 warfarin 과 상호작용을 일으킬 수 있는 약물을 보고하고 있다. Seller 및 Koch-Wesser<sup>3)</sup>도 diazoxide, ethacrynic acid, mefenamic acid 및 nalidixic acid 등이 warfarin 을 단백으로부터 치환시켜 warfarin 의 약효가 증가되는 것을 보고하였다. 이들 약물 이외에도 최근에 수많은 신약들이 등장하고 있으며 이들 약물이 warfarin 과 상호작용을 일으킬 것인가를 미리 확인해 볼 필요가 생긴다.

Herny 등<sup>4)</sup>은 사람및 소의 혈청 알부민이 warfarin 과 단백결합을 하여 여기파장 365nm 및

형광파장 415nm 에서 형광을 나타낸다고 보고하였다.

지자들은 이와같은 사실들에 근거하여 warfarin 과 어떤 약물의 상호작용을 예측할 수 있는 간이실험법을 발견하기 위해 본 연구를 진행시켰다.

### 實驗方法

試藥—1) warfarin-Sigma 제 warfarin 를 적당량 정확히 취하여 최소량의 0.1N-NaOH 용액으로 희석시킨뒤 tris buffer (pH 7.4)로 희석하여  $2 \times 10^{-8}M$ 로 만들었다.

2) niflumic acid: Sigma 제 niflumic acid 를 같은 방법으로  $2 \times 10^{-8}M$ 을 만들었다.

3) phenylbutazone: Sigma 제 phenylbutazone 을 같은 방법으로  $2 \times 10^{-8}M$ 을 만들었다.

4) 가토 혈장 단백질: 가토10마리로 부터 각각 2 ml 씩의 혈액을 귀정맥으로 부터 채취하고 모두 합친후 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 이때 항응고제로는 0.1M oxalate 용액(0.7% NaCl 용액)을 혈액 9 용량에 대해 1 용량의 비율로 가하였다. 이 혈장단백을 tris buffer 로 희석하여 최종농도가 0.025ml/ml 되도록 하였다.

5) 가토 혈청 알부민(RSA): tris buffer (pH 7.4)로 용해시켜 0.2mg/ml 의 용액으로 하였다  
定量方法—가토혈청알부민과 혈장의 warfarin 과의 결합에 의한 형광스펙트라를 Chignell<sup>5)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 이때 여기과장은 319nm였고 형광파장은 392nm였다. 가토혈장단백 용액에 0.025ml/ml 의 농도가 되도록 warfarin 용액을 가한 시료의 형광강도를 측정한 후 그 시료에 niflumic acid 용액 및 phenylbutazone 용액을 점차적으로 증량하여 혈장단백과 warfarin의 결합에 의한 형광강도가 감소하는 것을 관찰하였다. 이때 여기과장과 형광파장은 상기와 동일하였다.

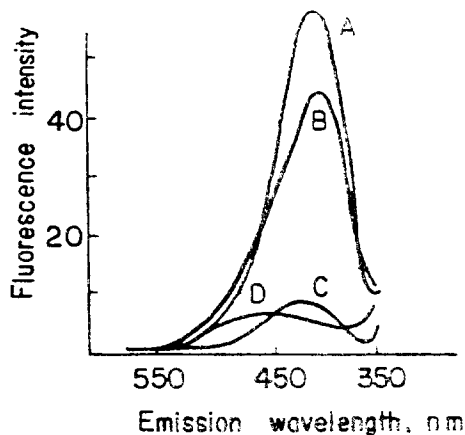


Fig. 1—Fluorescence emission spectra of RSA-warfarin complex (A), rabbit plasma-warfarin complex (B), warfarin (C), and rabbit plasma (D) in pH 7.4 tris buffer. Ex wavelength: 319 nm. (Plasma concentration 0.025 ml/ml)

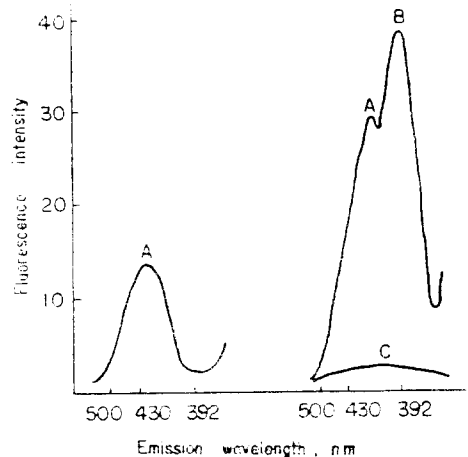


Fig. 2—Fluorescence emission spectra of rabbit plasma (0.2 ml/ml) in pH 7.4 tris buffer (A). Spectra B is the emission spectra of warfarin-plasma complex by addition of warfarin (10 mcg/ml), and spectra C is the spectra of warfarin in pH 7.4 tris buffer. (Ex. 319 nm)

實驗結果

warfarin 용액에 가토의 혈장을 가졌을 때 319nm의 여기파장에 의하여 형광파장 392nm에서 최대 형광강도를 가지는 형광스펙트라를 나타내었으며(Fig. 1), 이 형광스펙트라는 토끼혈청알부민(以下 RSA라 함) 용액에 warfarin을 가하여 생기는 스펙트라와 동일하였다. 가토혈장은 0.2ml/ml의 농도에서 319nm의 여기파장에 의하여 형광파장 439nm에서 최대형광강도를 가지는 형광스펙트라를 가지고 있었으며 RSA 용액은 상기조건에서 형광스펙트라를 나타내지 않았다(Fig. 2의 A).

또한 0.2ml/ml의 가토혈장에 warfarin 10 $\mu$ g/ml 농도를 가하였을 때의 상기조건에서의 형광스펙트라는 Fig. 2의 B와 같다. 또한, 가토혈장 0.025ml/ml 용액과 warfarin의 결합에 의하여 생기는 형광강도는 상기조건에서 warfarin을 0.2~20 $\mu$ g/ml까지의 농도범위에서 직선적으로 증가하였다(Fig. 3).

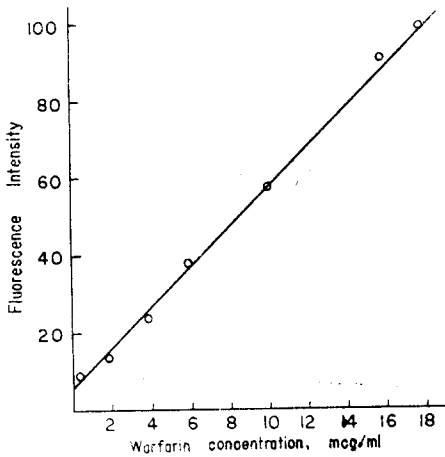


Fig. 3—Fluorescence titration curve of rabbit plasma with warfarin in pH 7.4 tris buffer.

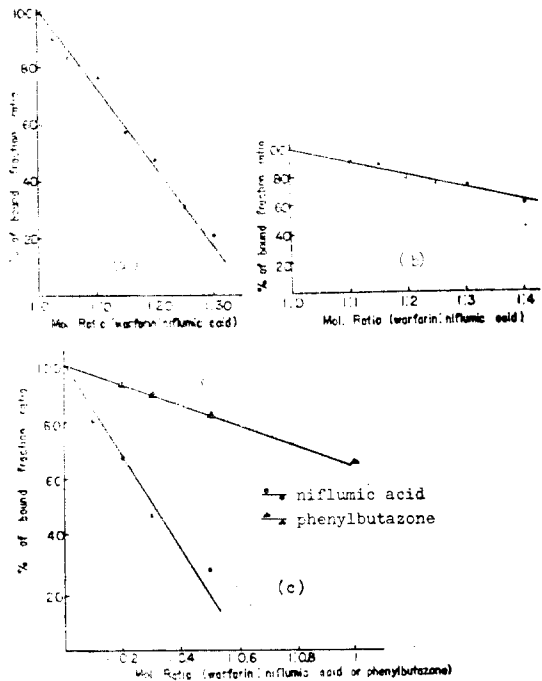


Fig. 4—Effect of niflumic acid on plasma protein binding of warfarin in rabbit.

- (a) Plasma concentration: 0.2ml/ml, warfarin concentration: 1 $\mu$ g/ml.
- (b) Plasma concentration: 0.2ml/ml, warfarin concentration: 10 $\mu$ g/ml:
- (c) Plasma concentration: 0.025ml/ml, warfarin concentration: 1.54 $\mu$ g/ml.

Fig. 4의 (a) 및 (b)는 각각 혈장농도 0.2 ml/ml에 warfarin 1  $\mu\text{g/ml}$  및 10  $\mu\text{g/ml}$  농도를 가하여 생성시킨 형광파장 392 nm에서 형광강도를 100%로 하고 niflumic acid를 증량 첨가하면서 얻어진 형광강도의 감소를 나타낸 것이다. Fig. 4의 (c)는 혈장농도 0.025 ml/ml에서 warfarin만을 1.54  $\mu\text{g/ml}$  가하여 생성시킨 단백 결합의 형광이 niflumic acid 및 phenylbutazone의 증량 첨가에 의하여 감소하고 있음을 보여주어 주고 있다. 즉 niflumic acid가 phenylbutazone보다 형광을 크게 감소시킨다.

### 考 察

warfarin은 여기파장 319 nm에 의하여 형광파장 392 nm에서 최대형광을 나타내는 물질이다. 이 warfarin 고유의 형광을 가토혈장이 4배나 증가시켰다. 이 형광스펙트라는 RSA 용액과 warfarin에 의하여 동일한 여기파장에서 생성되는 스펙트라와 동일한 점에서 가토혈장중 albumin과의 결합에 의한 것으로 사료된다(Fig. 1).

Henry 등<sup>4)</sup>은 사람 및 소의 혈청 알부민과 warfarin과의 결합에 의한 형광은 365 nm의 여기 파장에 의하여 형광파장 415 nm에서 최대형광강도를 나타내었으나 이런 조건에서는 혈장중 알부민 이외의 성분들에 의한 방해때문에 warfarin과 혈장성분과의 결합에 의한 형광을 측정하기 어려웠으며 319 nm의 여기 파장에 의하여 형광파장 430 nm에서 나타나는 알부민 이외의 혈장 성분에 기인한 형광스펙트라를 분리할 수 있었다(Fig. 2).

가토혈장과 warfarin의 결합에 의한 형광은 niflumic acid 또는 phenylbutazone을 가하였을 때 감소되었으며 이는 알부민분자에 결합되었던 warfarin이 치환되어 유리 warfarin 농도가 증가함을 의미한다. 이와같은 albumin으로부터 warfarin을 치환할 수 있는 능력은 Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 phenylbutazone보다 niflumic acid가 강한 것으로 나타나고 있으며, 따라서 phenylbutazone과 warfarin의 동시 투여時 발생하는 상호작용보다 더 강력한 상호작용이 niflumic acid에 의하여 일어날 수 있으리라 사료되었다.

### 結 論

1) warfarin과 혈청단백과의 결합에 의하여 생기는 형광과 다른 약물의 첨가에 의한 그 형광의 감소로부터 두 약물의 상호작용을 예측할 수 있다.

2) niflumic acid는 phenylbutazone보다 warfarin-혈청단백 결합을 치환시키는 힘이 크며 따라서 두 약물의 동시투여는 유의할 필요가 있다.

이 연구는 79년도 문교부 연구비로 충당되었음.

### 文 獻

1. P. M. Aggeler, R. A. O'Reilly, L. Leong, and P. E. Kowitz, *New Engl. J. Med.*, **276**, 496(1967).
2. H. M. Solomon and J. J. Schrogie, *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1219(1967).
3. E. M. Sellers and J. Koch-Wesser, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **11**, 514(1970).
4. R. A. Henry and W. D. Wosilait, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 267(1975).
5. C. F. Chignell, *Fluorescence News*, **5**, 1(1970).