

Dextran-Phthalylsulfathiazole의 합성과 抗菌性

이기창 · 황성규 · 오세영 · 김판기*†

명지대학교 화학공학과, *용인대학교 환경보건학과

Synthesis and Antibiotic activity of Dextran-Phthalylsulfathiazole

Ki-Chang Lee, Sung-Kwy Hwang, Se-Young Oh, Pan-Gyi Kim*†

Department of Chemical Engineering, Myong Ji University, Yongin 449-714, Korea

*Department of Environmental Health, Yongin University, Yongin 449-714, Korea

ABSTRACT—Drug Delivery System (DDS) purpose to getting better remedial result by improving medication from ordinary methods. Applied for DDS, to improve selectivity and continuity during absorbing and delivery step, polymer drug (prodrug) was prepared by the esterification with dextran in such of biodegradable polymer and phthalylsulfathiazole with is efficient for entilitis. The polymer drug was prepared with dextran and phthalylsulfathiazole by the esterification. The synthetic procedures of polymer drug was performed by acid chloride and DCC methods. Polymer drug was synthesized in high yield by acid chloride method than DCC method. The antibiotic activitis of polymer drug exhibited growth-inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* at the concentration of 500 µg/ml in general through *in vitro*. As a result of test, polymer drug has 1/2 MIC than phthalylsulfathiazole. Also, it has high level MIC as much as phthalylsulfathiazole with *Proteus*, *Pseudomonas*. We conducted possibility of DDS as an applied for medicine with synthesized polymer drug by using natrural polymer. We consider that clinical research must be followed to verify safety and efficacy for controlled release, activity and toxicity.

Key words □ Dextran, Phthalylsulfathiazole, Antibiosis, Drug Delivery System (DDS), Polymer drug

Drug Delivery System(DDS)이란 종전의 약품투여 방식의 단점을 개선하여 최상의 약효를 획득하는 체계를 의미한다. 종전의 약품투여 방식에서 약물투여 후 단시간 내에 약물이 체내로 흡수되어 혈중농도가 독성을 나타내는 농도 이상으로 나타나 부작용을 나타낼 우려가 있거나, 또한 배설시간이 너무 빨라 치료에 필요한 유효농도 이하로 혈중농도가 떨어져 과량의 약물투여가 불가피해질 우려가 있었던 약품의 투여방식은 부작용의 가능성이 매우 높고 또한 경제적 손실이 크다고 할 수 있다.^{1,2)} 특히, 항생제와 항암제 등의 약품은 독성농도와 치료 유효농도 사이의 차이가 작아 안전역이 상대적으로 좁으므로 기존의 투여방식을 포함한 약물전달체계를 개선하여야 할 필요가 있다.³⁾ 그러므로 최근에 고분자재료 등의 방법을 이용하여 일정시간 동안 일정량의 약물을 일정한 장소에 방출시키려는 DDS에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. DDS는 의약품 뿐만 아

니라 화장품, 농약 및 생활용품 등에도 다양하게 응용할 수 있다. 또한 이미 상업화된 의약품들이 개발되어 사용되고 있다. 고분자 물질에 저분자 물질인 약을 결합시킨 polymer drug는 최적의 약효와 지속성의 향상, 안정성, 지연성 등을 목표로 한다. 이때 사용되는 polymer는 인체에 무독성이며 발암성, 염증, 알레르기성이 없어야 한다.³⁾ Ascoli 등⁴⁾은 nitrofuran 중합체약을 합성하여 기존의 nitrofuran 단위체약의 항균력과 지속성의 비교를 시험하여 본 결과 항균력은 유사하였고 쥐에 대한 비노기 시험결과에 따르면 지속성이 기존 물질에 비하여 3배 이상이라는 보고가 있었다. 이는 polymer drug의 지속성을 보여주는 예라 할 수 있다. Hodnett⁵⁾는 중합체약의 약효에 대한 연구에서 acrylic acid와 isobutyl vinyl ether의 혼성중합체가 항종양성을 지니고 있음을 보고하였다.

한편, Dextran은 *Leuconostoc mesenteroides*, *Betacoccus arabinosaceus*와 같은 박테리아에 의하여 생성된 D-glucose가 고도로 분기된 polysaccharide로써 Pasteur에 의하여 연구

† Author to whom correspondence should be addressed.

되었으며,⁶⁾ Scheubler는 그 실험식을 결정하고 이를 Dextran 이라고 명명하였다.⁷⁾ dextran은 α -D-glucose분자의 선형 고분자로서 박테리아의 종류와 생성과정에 따라서 구조와 성질이 다르나,⁸⁾ 일반적으로 95%의 α -(1,6)결합의 주사슬과 5%의 α -(1,3)결합의 결사슬을 가진 homopolysaccharide이다. dextran은 수용성과 불용성으로 나누어지는데, 수용성은 α -D-(1,6)-glucopyranose를 골격사슬로 하고 2, 3, 4위치의 탄소에 glucose branch가 있으며 branch의 linkage와 glucopyranosyl 잔여기의 수에 따라서 물리, 화학적인 성질이 다르게 나타난다.⁹⁾ 불용성은 filters, pipelines, stains와 tank의 choking에 이용되고, 또한 치아의 plague를 생성시키는 원인이 된다는 보고도 있다.¹⁰⁾ 천연의 dextran은 5×10^8 정도의 분자량을 가지고 있으나 blood-plasma 대용품으로는 부적당하고, 상업제품인 blood-plasma dextran은 최적 분자량이 40,000~111,000인 선형 중합체로서 48시간 이내에 urine으로 완전히 배설된다. 또한, 혈액 속에서는 cholesterol을 환원시키는 효과가 있음이 알려져 있다.⁹⁾ 이러한 성질로 인하여 dextran은 drug carrier로써 널리 사용되고 있다.

한편, Sulfa제 유래를 알아보면, Domagk 등은 azo색소의 항균작용을 검토하고 Prontosil rubrum을 발견하였으며, Trefouel 등은 Prontosil의 항균작용은 azo기에 기인하는 것이 아니라 생체내에서 환원되는 4-aminobenzene sulfonamide가 작용발현의 실체임을 실험적으로 증명하였다. 항균제인 sulfa제는 요로 감염증, 화상, 장내세균 감염, 안과영역 등에서 중요한 위치를 차지하고 있으며 sulfamine을 모체로 한 수많은 sulfa계 항균제가 개발되었다.^{11,12)} sulfa제의 항균 기전에 관하여는 다양한 설이 제시되어왔다. 그 중에서 세균의 대사에 필요한 PABA(α -aminobenzoic acid)와 pterin과의 축합 반응을 방해하는 competitive inhibition theory이 가장 지지되고 있다. sulfa제는 N¹-치환 이중 방향족 고리에 따라서 항균력에 차이가 있으며 신장독성과 관련하여 산성도 조건에서의 용해도가 중요하다. 경구 또는 비경구제형으로 투여하는데 비경구제형시 나트륨염으로 투여한다.

본 연구에서는 DDS를 응용한 polymer drug를 연구하기 위하여 polysaccharide계통으로 drug carrier로써 널리 사용되는 dextran과 sulfonamide계의 일종인 phthalylsulfathiazole을 이용하여 polymer drug를 합성하였다. 합성한 polymer drug를 7종의 세균에 대하여 *in vitro*를 통한 MICs 항균활성 검사를 실시하였다.

實驗 方法

試藥 및 機器

실험에 사용한 시약 중 drug carrier로써 Dextran(M_w : 15,000~20,000), phthalic anhydride, sulfathiazole은 Aldrich사의 특급시약을 사용하였으며 그 밖의 Thionyl chloride, pyridine, 아세톤 등의 용매는 TCI사 제품과 국산제품을 일반 정제법¹³⁾에 의하여 감압 증류하여 사용하였다.

합성물의 분석과 확인을 위하여 KBr pellet법을 이용하여 화합물에 대한 구조분석은 Bio-RAD FTS형 FT-IR을 사용하였으며, DSC는 각각의 시료 양을 0.3 mg을 취하여 N₂ 기류하에서 승온 속도를 30 °C/min으로 하여 Shimadzu사의 DSC-50을 이용하여 측정하였다. 합성전후 사용한 중합체와 중합체액의 CHNS 원소분석은 LECO CHNS-932, Joseph Mico. elemental analyzer를 사용하였으며, 합성전후 화합물의 형상변화는 RJ. Lee Group의 P-75 personal SEM을 이용하였다.

항균력 측정에 사용된 균주는 *Staphy. aureus* A29213, *Staphy. epidermidis* A12228, *E. coli* A10536, *Klebsiella pneumoniae* A10031, *Proteus mirabilis* A25933, *Sal. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* A10145를 국립보건원에서 분양 받아서 배양하여 실험에 사용하였다.

배지로는 Difco사의 Mueller Hinton Medium, Trptic Soy Broth를 사용하였고, 항균 시험에 이용되는 약물 희석용 완충용액은 0.1 M phosphate(K_2HPO_4 (2.0 g)+ KH_2PO_4 (8.0 g)+D.W(1 l))를 사용하였으며 petri-dish, glass tube, pipet, tip 등은 멸균하여 사용하였다.

合成方法

4'-(2-thiazolylsulfamyl)phthalanilic acid; phthalylsulfathiazole의 합성—Sulfathiazole 11.0 g(0.04 M)과 phthalic anhydride 5.92 g(0.04 M)을 Moore¹⁴⁾의 합성방법에 의하여 아세톤 용매하에서 가열축합 반응시켜서 얻은 황색 결정의 phthalylsulfathiazole 12.0 g을 얻었다.

Phthalylsulfathiazole의 Acid chloride화—Phthalylsulfathiazole을 acid chloride화하여 dextran의 히드록시기와 반응시키기 위하여 acid chloride법을 선택하였다. 실험 방법은 phthalylsulfathiazole 16.0 g(0.04 M)을 DMF 50 ml에 녹인 후, thionyl chloride 6.0 g(0.05 M)을 넣고 100~110°C에서 5시간 동안 교반 환류시킨 후 남아 있는 미반응 물질을 제거하기 위하여 황산 trap으로 감압 증류시켰다. 감압 증류하고 남은 생성물을 CH_2Cl_2 50 ml에 녹여서 acid chloride로 치환된 phthalylsulfathiazole 13.0 g을 제조하였다. 이때 수율은 77%이었다.

Dextran-phthalylsulfathiazole에 의한 Polymer Drug의 합성—Dextran의 경우 물에는 잘 용해되는 반면 대부분의 비극성 용매에는 용해도가 작다. 그러나 acid chloride로

치환된 phthalylsulfathiazole은 물에 거의 녹지 않는다. 따라서 acid chloride로 치환된 phthalylsulfathiazole 8.4 g(0.02 M)을 10% NaOH용액에 녹인 후, dextran 3.1 g(0.02 M)을 증류수 10 ml에 녹여 1시간에 걸쳐 실온에서 적가하여 반응을 진행하였다. 약 24시간 반응시킨 후 증류수와 아세톤으로 3회 세척하여 진공 오븐에서 건조시키고 데시케이터에서 후 건조시켜서 8.0 g의 백색 결정의 polymer drug를 얻을 수 있었다. 수율은 69%였다.

Minimum Inhibitory Concentration(MIC *in vitro*) 抗菌活性

합성한 중합체약의 MIC test는 phthalylsulfathiazole을 대조물질로 하고 미생물은 Gram 양성균 2종과 Gram 음성균 5종을 사용하였다. G(+)균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*를 사용하고, G(-)균으로는 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pnerumoniae*를 사용하였다.

Phthalylsulfathiazole과 Dextran-phthalylsulfathiazole을 각각 2000 µg/ml이 되도록 NaOH에 용해시켜 PBS로 50, 100, 250, 500, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 µg/ml가 되도록 조제하였다. 균액은 시험균을 Tryptic Soy Broth(37°C, 12~18시간에 배양한 균을 Saline으로 희석하여 500 µl씩 접종하고, 37°C, 18~24시간 배양한 다음 균의 성장이 저지되는 최소 균 농도를 설정하였다. 이상의 시험을 5~10회 반복하여 평균 값을 구하였다.

結果 및 考察

Phthalylsulfathiazole의 합성

Sulfathiazole과 phthalic anhydride를 아세톤하에서 가열, 축합반응시켜서 phthalylsulfathiazole을 합성하였다. IR분석 결과, 2800~3100 cm⁻¹부근의 카르복시산의 히드록시기가 감소하고 acid chloride로 치환된 phthalylsulfathiazole의 acid chloride 특성흡수대를 1750~1785 cm⁻¹ 부근에서 확인할 수 있었다. 또한, 문헌값¹³⁾과 유사한 m.p 값을 나타내었으며 이때, m.p값은 271~274°C이었다. DSC값은 219.3°C에서 초기분해온도와 271.2°C에서 최종 분해온도를 나타내었다.

Dextran과 phthalylsulfathiazole을 결합시키는 방법은 크게 히드록시기와 산을 직접 반응시켜 에스테르를 합성하는 직접법과 phthalylsulfathiazole을 acid chloride로 치환시켜 간접적으로 에스테르화를 시키는 간접법으로 나눌 수 있다.

본 연구에서는 간접법을 사용하여 카르복시기를 가지고 있는 phthalylsulfathiazole과 히드록시기를 가지고 있는 천연 고분자와의 에스테르화 반응을 수행하였다. 즉, 에스테르화 반응을 위하여 phthalylsulfathiazole의 카르복시기를 acid chloride로 치환시켜서 이것을 dextran의 히드록시기와 결합시키는 방법을 선택하였다. 이와 같은 반응을 Schotten-Baumann 반응¹⁴⁾이라 한다. 이 반응은 일반적인 산과 알코올의 에스테르화와 달리 가역 반응이 아니다. 또한 이때 생성된 HCl은 히드록시기와 반응하여 RX를 생성하는 부반응을 일으키므로 이것을 방지하기 위하여 pyridine, quinoline 같은 유기 용매를 사용하기도 한다. Phthalylsulfathiazole의 카르복시기를 acid chloride기로 치환하는데에는 thionyl chloride를 사용하는 acid chloride법과 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide(DCC)를 사용하는 DCC법이 있는데 DCC법은 생성물의 용해도가 극히 낮으면 생성된 dicyclohexylurea를 제거할 때 많은 양이 생성물과 함께 소실되므로 일반적으로 수율이 낮다.

Polymer Drug의 합성

Dextran과 acid chloride로 치환된 phthalylsulfathiazole과의 합성은 새로운 에스테르 결합의 도입을 확인하고 히드록시기의 감소를 확인함으로써 polymer drug의 합성을 확인하였다.

Fig. 1(a)가 dextran이다. dextran의 히드록시기가 3300~3600 cm⁻¹ 부근에서 광범위하게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 dextran과 phthalylsulfathiazole의 결합으로 생성된 polymer drug의 Fig. 1(b)에서는 dextran의 히드록시기는 3000~3500 cm⁻¹ 부근에서 감소함을 확인할 수 있었고, 또한 acid chloride로 치환된 phthalylsulfathiazole의 acid chloride의 특성흡수대가 1750~1785 cm⁻¹ 부근에서 사라졌음을 확인할 수 있었다. 그리고 새롭게 에스테르 결

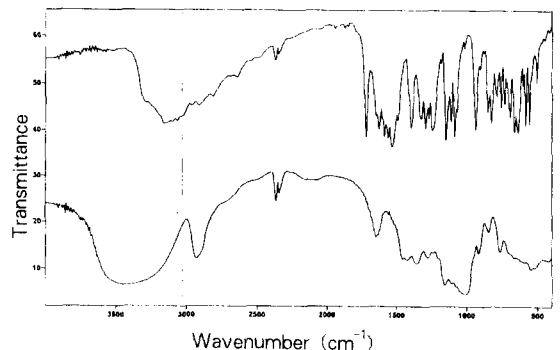


Fig. 1. IR spectrum of Dextran (a) and Polymer drug (b).

Table 1. The chemical composition of dextran and polymer drug

Material	Weight [mg]	Content [%]			
		C	H	N	S
Dextran	2.3050	39.61	6.482	0.210	0.273
Polymerdrug	1.7890	48.92	3.137	10.39	15.83

합을 나타내는 에스테르의 특성흡수대로서 1149 cm⁻¹ 부근에서 C-O 특성흡수대, 1723 cm⁻¹ 부근에서 C=O 특성흡수대를 확인할 수 있었다. 또한, DSC에서는 dextran의 경우 63.3°C에서 T_g가 형성되어 320.2°C에서 최종분해가 되는 T_m을 나타냈다. 그러나 polymer drug의 경우 214°C에서

T_m을 나타내어 최종분해온도가 크게 저하됨을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 dextran내에 인접한 사슬에서 형성된 히드록시기의 수소원자가 치환됨으로서 분자내 수소결합력의 감소로 인하여 분해온도가 감소한다는 것으로 설명할 수 있다. Table 1은 Dextran과 중합체약의 CHNS 원소분석을 나타낸 것이다.

CHNS 원소분석 결과 dextran과 polymer drug을 비교해보면 항균제인 phthalylsulfathiazole이 dextran과 결합되어 있음을 N과 S의 함량의 증가로부터 확인할 수 있었다. SEM을 이용한 합성전후 polymer drug의 형상변화는 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2(a)의 dextran의 구조는 구상 구조이었으나 (b)의 polymer drug으로 합성시 침상구조로 변화됨을 확인하였다. 이와같이 여러 분석 방법으로 Dextran과 phthalylsulfathiazole이 합성되어 새로운 polymer drug이 합성되었음을 확인할 수 있었다.

합성한 polymer drug의 합성반응 경로는 Scheme 1과 같다.

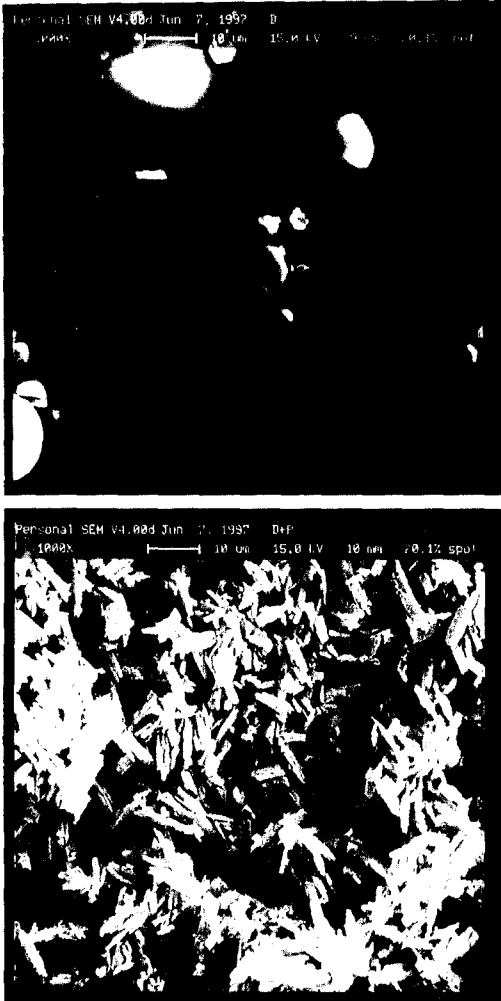
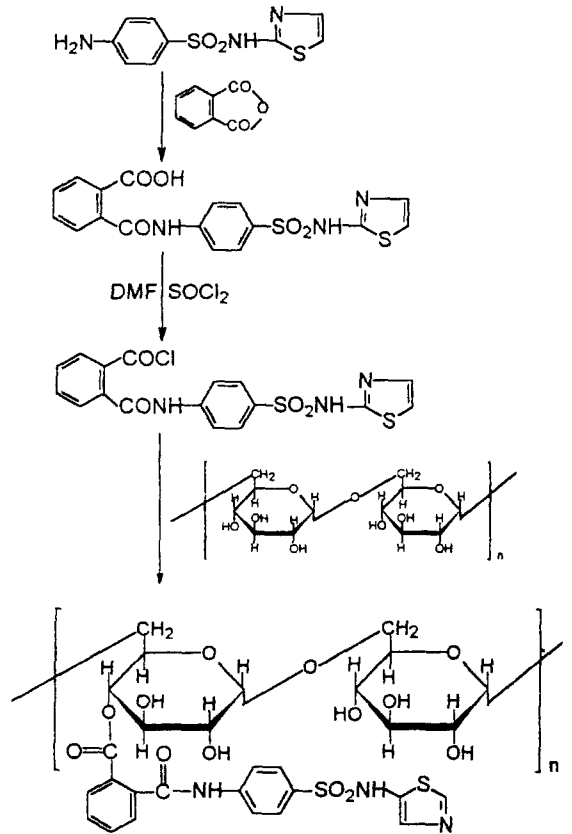


Fig. 2. SEM photograph of Dextran (a) and Polymer drug (b).



Scheme 1

Table 2. MICs of phthalylsulfathiazole

Bacteria	Concentration (µg/ml)										
	Control	50	100	250	500	1000	1250	1500	1750	2000	
<i>Sta. aureus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Sal. typhimurium</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Pseudo. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Kleb. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Sta. epidermidis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	

-: absence of growth, +: presence of growth

Table 3. MICs of polymer drug - Dextran-phthalylsulfathiazole

Bacteria	Concentration (µg/ml)										
	Control	50	100	250	500	1000	1250	1500	1750	2000	
<i>Sta. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>Sal. typhimurium</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Pseudo. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Kleb. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Sta. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

-: absence of growth, +: presence of growth

Polymer drug의 항균활성

Table 2는 phthalylsulfathiazole에 대한 MIC를 나타낸 것이고, Table 3은 합성한 polymer drug에 대한 MIC를 나타내었다. 기존의 항균물질인 phthalylsulfathiazole은 대부분의 세균에 대하여 500 µg/ml에서 성장억제가 나타났다. 그러나 장내 Gram 음성균 중 *Proteus*, *Pseudomonas*의 경우에는 2,000 µg/ml 이상으로 거의 감수성을 나타내지 못하였다. Polymer drug의 경우 phthalylsulfathiazole에 비하여 대부분 높은 MIC를 나타내었고 *Proteus*, *Pseudomonas*의 경우에는 2000 µg/ml 이상으로 거의 감수성을 나타내지 못하였다. 이것은 dextran과 결합한 phthalylsulfathiazole의 항균력이 감소한 결과로 생각된다. Sulfa제 특히 phthalylsulfathiazole에 관한 항균성시험 자료는 거의 없다. 단지,

그람음성 소간균인 *Haemophilus spp*에 대한 sulfonamide 항균력시험에서 256~512 µg/ml의 성적을 나타낸 자료가 있으며, 이외 Dextran이 붙은 항균제의 항균력은 다른 자료와 비교가 불가능하다.¹⁹⁾ 단, Dextran이 붙은 polymer drug은 DDS의 잇점을 갖기 위하여 합성된 것으로서 항균력이 *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*를 제외한 균에 대하여 1/2정도로 감소하였다.

感謝의 글

본 연구는 1997 학년도 명지대학교 부설 산업기술 연구소의 '97 교내 연구비의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

국문요약

생분해성, 무독성의 천연 고분자 물질이며 drug carrier로써 널리 사용되는 dextran과 장내 감염증에 효능이 있는 것으로 알려져 있는 항균제로써 sulfa계의 일종인 phthalylsulfathiazole을 합성하여 새로운 polymer drug을 합성하였다. Polymer drug의 항균활성은 *in vitro*를 통한 MIC를 측정함으로써 확인하였다. MIC는 일반적인 항균

력 측정법인 평판배지 희석법을 사용하였다. 항균력 측정 결과 polymer drug은 phthalylsulfathiazole의 MIC에 2배 가량으로서 항균력이 1/2정도로 나타났다. Polymer drug은 *Proteus*, *Pseudomonas*에 대해서 phthalylsulfathiazole과 마찬가지로 높은 MIC를 나타내었다. 이것은 dextran과 결합된 phthalylsulfathiazole의 항균력이 감소한 결과로 생각된다. 이러한 MIC 측정결과 본 연구에서 천연고분자를 이용한 polymer drug의 DDS 약제로서의 가능성을 확인할 수 있었고, 앞으로 *in vivo*를 통한 polymer drug의 약리, 독성, 체내 동태 평가 등의 안전성과 효능에 대한 임상 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

參考文獻

1. Langer R.S. and Wise D.L.: Medical Applications of Controlled Release, *CRC Press*, U.S.A., Vol. 2, 2, 1984.
2. Lloyd-Jones J.G.: Drug Delivery Systems, Ellis Horwood Ltd., England, 11, 1987.
3. 竹本喜一, 田 岩夫: 醫藥高分子, 講談社, 5, 1978.
4. Ascoli F., Casini G., Ferappi M.: *J. Med. Chem.*, **10**(97), 1967.
5. Hodnett E.M.: Polymers as Antitumor Agents, *Polymer News*, Vol. 8, 323, 1983.
6. Johnson P. and Lloyd-Jones J.G.: Drug Delivery Systems, Ellis-Horwood Ltd., Eng., 7-28, 1987.
7. Scheubler C.: *Z. Ver. Dtsch. Zucker-Lnd.*, 24, 1874.
8. Hehre E.J. and Senti F.R.: *J. Biol. Chem.*, **222**, 759, 1956.
9. Moore J.A.: *Polymer Science and Technology*, Vol. 21, 752, 1956.
10. Sidebotham R.L.: *Dextrans, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30**, 371, 1984.
11. Anand N.: *Medicinal Chemistry, partII*, 4th Ed., Wiley Interscience, New York, 1, 1982.
12. Fullerton D.S.: in Wilson and Gisvolds Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 9th Ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 191, 1991.
13. Perrin D. D., Armarego W. L. F.: *Purification of laboratory Chemicals*, 3rd Ed., 365, 1988.
14. Moore M. L.: *U.S. pats.*, 2,324,013; 2,324,015., 1943.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards : Methods for Dilution Antimicrobial Sceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 4th Ed., Approved Standard. NCCLS Document M7-A2, Villanova, Pa.: 1990.
16. 강희양, 정 찬: Carbamate화합물의 살충효과 및 살균력에 관한 연구, 한국환경위생학회, **23**(1), 62-65 (1997).
17. 이용욱, 박석기: 식품위생미생물시험법, 신광출판사, 116-125 (1996).
18. Brian S. Furniss, Peter W. G.: *Vogel's Textbook of Org. Chem.*, 5th Ed., 1247, 1946.
19. V. Lorian : *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd Ed., Williams & Wilkins, 1-119, 714-722, 1991.