

## 藥物과 生體高分子間的 相互作用 (Ⅱ)

### Difference Spectra 에 의한 Cephalothin 및 Cefazoline 과 Human Serum Albumin 의 結合에 관한 研究

金鍾國 · 楊智善 · 安海英 · 金良培 · 俞炳高

서울대학교 藥學大學

(Received November 30, 1981)

Chong-Kook Kim, Ji Sun Yang, Hae Young Ahn, Yang Bae Kim and  
Byung Sul Yu

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea.*

### Drug-Biomacromolecule Interactions (Ⅱ)

#### Binding of Cephalothin and Cefazoline to Human Serum Albumin Using Difference Spectrophotometry

**Abstract**—The binding of two cephalosporins, cephalothin and cefazoline to human serum albumin (HSA) was studied by difference spectrophotometry using a spectrophotometric probe, 2-(4'-hydroxybenzeneazo) benzoic acid. The probe is strong visible absorbing material which interacts with serum albumin to give characteristic spectrophotometric peaks and provides the basis for a convenient assay to measure free and bound amounts in the presence of serum albumin and competitive drugs. The results obtained showed that the probe and cephalosporin compete for the same binding site on human serum albumin; thus the probe can be used to gauge the displacement of cephalosporins from human serum albumin. The data were interpreted on the basis of theory of multiple equilibria. The number of binding sites of human serum albumin for 2-(4'-hydroxybenzeneazo) benzoic acid(HBAB), cephalothin and cefazoline appears to be 4. By using this technique the binding constants were found as follows: HSA-HBAB,  $7.89 \times 10^4 M^{-1}$ ; HSA-cepahlathin,  $1.09 \times 10^3 M^{-1}$ ; HSA-cefazoline,  $1.21 \times 10^3 M^{-1}$ .

시험에 사용되는 抗生劑의 種類는 매우 多様하며 이들은 血液內的 構成成分이나 細胞膜 및 細胞內容物質 등과 여러가지 形態로 結合하고 있다. 특히 抗生劑와 血清단백間的 結合은 藥物의 効能, 生體內 利用率, 吸收, 排泄 등에 크게 影響을 미치는 因子로서 알려져 있다<sup>1-4</sup>. 血液中에서 遊離狀態로 存在하는 藥物만이 藥理作用을 나타낸다고 알려져 있으므로, 抗生劑를 投與한 경우에 抗菌性을 나타내는 遊離狀態로 存在하는 抗生劑의 濃度を 豫測하기 爲하여 血清단백과 結合하는 樣狀을 糾明하는 것이 重要한 研究課題로 되어 있다<sup>5-15</sup>.

Cephalosporin 은  $\beta$ -lactam 抗生劑로 抗菌力이 優秀하고 安全性이 크며 또한 penicillin 에 過敏反應을 나타내는 患者에게도 通用할 수 있다는 長點이 있으므로 治療에 널리 使用되고 있다<sup>16)</sup>.

最近 分光學的 方法을 利用하여 血漿內에 存在하는 단백질과 藥物과의 相互作用에 對한 研究가 重要時되고 있으며 이러한 研究는 藥效를 豫測하는데도 많은 도움을 주고 있다.

따라서 著者들은 difference spectrophotometry 를 利用하여 人血清단백(HSA)과 cephalosporin 系列 中에서 cephalothin 및 cefazoline 의 結合性質에 關한 研究를 行하여 知見을 얻었기에 報告하고자 한다.

## 實 驗 方 法

**實驗 材料**—本實驗에 使用한 人血清알부민(HSA), fraction V 는 Sigma Co. 제품을 購入하여 使用하였다. 알부민濃度는 280 nm 에서 UV 吸光度를 測定하여 몰濃度를  $E_{1\%}^{1\text{cm}}=6.67$ 을 기준으로 하여 결정하였으며 알부민의 分子量은 69,000으로 계산하였다.

Cephalothin 은 中근당에서 提供받은 sodium cephalothin 無水物을 使用하였으며 cefazoline 은 유한양행에서 提供받은 sodium cefazoline 無水物을 使用하였다.

UV probe 인 4-[2'-hydrobenzeneazo] benzoic acid (HBAB)는 ICN Pharmaceuticals Inc. 製品을 購入하여 使用하였다.

Probe 의 溶媒로 使用한 methanol 은 spectroscopic grade 를 使用하였으며 그외에 使用한 試藥은 市販하는 特級品을 精製없이 使用하였다.

**實驗 方法**—Difference spectra 는 Pye Unicam RF-510型의 紫外分光光度計를 使用하여 測定하였으며 測定에 使用한 cell 은 10mm×4.5mm tandem cell 을 使用하였다.

pH 7.4, 0.054 M 의 phosphate buffer 로 調製한  $1.5 \times 10^{-4}$ M 溶液을 高濃度 HSA 溶液으로 使用하고  $2.98 \times 10^{-5}$ M 溶液을 低濃度 HSA 溶液으로 使用하였다. 高濃度 HSA 溶液은 이 濃度에서 添加된 probe 全量이 HSA 와 結合할 수 있는 濃度로 定하였다. 高濃度 및 低濃度의 HSA 溶液 2 ml 에 methanol 에 溶解시킨  $1 \times 10^{-2}$ M 의 HBAB 몰 micropipette(Gilson Co.)으로 5  $\mu$ l 씩 順次的으로 加하여 攪拌시켰다.

Phosphate buffer 와 HSA 溶液을 兩測에 넣은 2 個의 tandem cell 을 各各 reference beam 과 sample beam 에 平行하게 놓고 base line 을 그린 後에 reference cell 에 든 buffer 와 sample cell 에 든 HSA 溶液 代身에 probe 으로 滴定한 buffer 와 probe 로 積정한 HSA 溶液을 넣은 後 484 nm 에서 difference absorbance 를 測定하였다. Tandem cell 의 配置는 Fig. 1 과 같다.

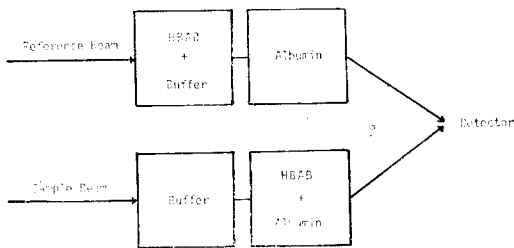


Fig. 1—Tandem cell arrangement for difference spectrophotometry.

또 cephalothin 및 cefazoline 을 各各  $1 \times 10^{-3}$ M 씩 含有하는 低濃度 HSA 溶液에 對하여 上記와 同一하게 滴定하여 difference absorbance 를 測定하였다.

**Data 處理**—HBAB 와 HSA 과의 結合으로 나타나는 difference absorbance 와 cephalosporin 系列의 存在에 依한 吸收強度의 減少로부터 HBAB 및 cephalothin 및 cefazoline 의 結合常數를 計算하였다.

먼저 Brand<sup>17)</sup> 等의 方法에 따라 HBAB 와 HSA

와의 결합분율을 다음 식으로 계산하였다.

$$X = \frac{\Delta A I}{\Delta A h}$$

여기서  $\Delta A I$  과  $\Delta A h$  는 低濃度 및 高濃度 HSA 溶液에 있어서 HBAB 의 difference absorbance 이다.

HBAB 와 HSA 와의 결합상수와 결합부위의 수는 Scatchard 方程式<sup>18)</sup>을 사용하여 求할 수 있다.

$$\frac{V}{A} = nK_a - VK_a \dots\dots\dots(1)$$

이 식에서 V는 HSA 1分子當 結合한 HBAB 의 分子數이며, 滴定한 HBAB 濃度에 結合分율을 곱하고 이것을 低濃度 HSA 溶液의 濃度로 나누어서 求한 값이다. A는 遊離 HBAB 의 濃度로 滴定한 HBAB 濃度에 (1-X)값을 곱하여 얻는다. n은 HSA 1分子에 HBAB 가 結合할 수 있는 結合부위의 數를 나타내며 K<sub>a</sub>는 HBAB 의 結合상수이다. HBAB 滴定으로 얻어진 結合에 關한 data 들을 Scatchard plot 하면 x축 截片과 直線의 기울기에서 n 과 K<sub>a</sub>를 求한다.

여기서 얻어진 K<sub>a</sub> 값과 n 값을 Klotz<sup>19)</sup>方程式에 適用시켜서 cephalothin 과 cefazoline 의 結合상수를 求하였다.

$$K_b = \frac{n[P_o]K_a[A] - K_a[A][PA] - [PA]}{[Bt]K_a[A] - [P_o]K_a[A] + K_a[A][PA] + [PA]} \times \frac{K_a[A]}{[PA]} \dots\dots\dots(2)$$

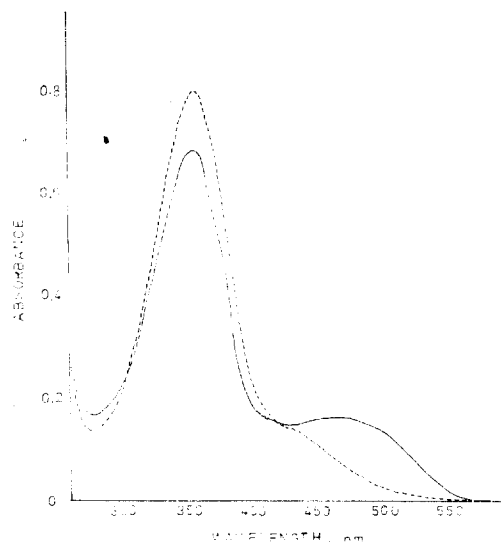
여기서 K<sub>b</sub>는 HBAB 와 相鏡의으로 作用하는 藥物의 結合상수이고 n은 結合부위의 數, [P<sub>o</sub>]는 低濃度 HSA 溶液의 濃度, [Bt]는 測定하고자 하는 藥物의 總濃度이고 [A]와 [PA]는 各 遊離 및 結合 HBAB 의 濃度이다.

**實驗結果 및 考察**

遊離狀態로 存在하는 HBAB 의 紫外吸收 spectrum 과 HSA 이 結合한 HBAB 의 紫外吸收 spectrum 은 Fig. 2와 같다. HBAB 가 HSA 과 結合하면 뚜렷이 吸收度가 變化되는데, 이 分光學的인 變化는 迅速하며 또한 可逆의이다. 두 吸收度の 差異를 나타낸 difference spectra 가 Fig. 3 이다. 이것은 484 nm 와 262 nm 에서 2개의 positive peak 와 345 nm 에서 1개의 negative peak 를 나타내는데 本 實驗에서는 484 nm 의 吸收度を 測定하여 data 를 處理하였다.

Fig. 4는 HSA 와 藥物의 濃度を 一定하게 두고, HBHA 의 濃度を 變化시키면서 滴定한 吸收曲線이다.

高濃度 HSA 溶液에서는 過量의 結合部位가 存在하므로 HBAB 濃度에 따라 difference absorbance 가 直線的으로 增加하고 低濃度 HSA 溶液에서는 HBAB 濃도가 增加함에 따라 結合部位가 飽和되므로 滴定曲線이 휘어지게 된다. cefazoline



**Fig. 2**—Spectral change of HBAB bound to human serum albumin ..... $1 \times 10^{-4}M$  HBAB, — $1 \times 10^{-4}M$  HBAB and  $2.89 \times 10^{-5}M$  human serum albumin in 0.05 M phosphat ebuffer at pH 7.4 and 20°C.

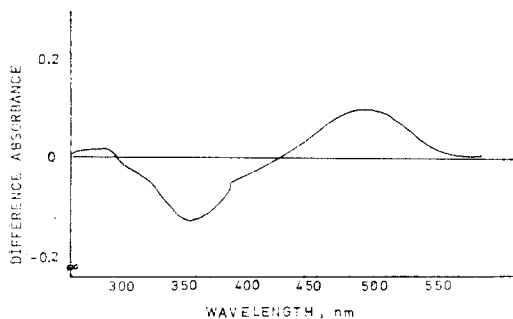


Fig. 3—Difference spectra of HBAB ( $1 \times 10^{-4} M$ ) and human serum albumin ( $2.89 \times 10^{-5} M$ ) in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.4 and  $20^\circ C$ .

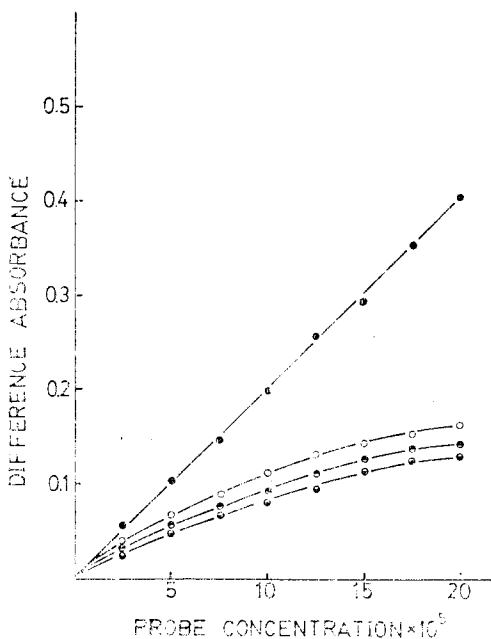


Fig. 4—Absorbance differences as a function of HBAB concentration at higher (●) and lower (○) human serum albumin concentrations. Curves (●) and (○) are the titration curves of lower albumin concentration with HBAB in the presence of cephalothin and cefazoline, respectively.

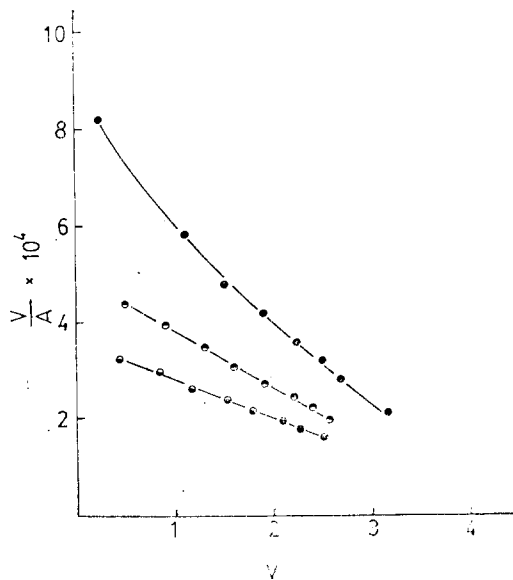


Fig. 5—Scatchard plots of HBAB binding to human serum albumin in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.4 and  $20^\circ C$ . ●, in absence of drug; ●, in presence of  $1 \times 10^{-3} M$  cephalothin; ●, in presence of  $1 \times 10^{-3} M$  cefazoline.

을 添加했을 경우가 cephalothin을 添加했을 경우보다 吸收度를 더 많이 減少시켰다. 이 HBAB와 HSA의 結合에 依한 吸收度가 cephalothin 및 cefazoline이 存在했을 때 減少하는 것으로 보아 HSA分子的 結合部位에서 HBAB와 上記 두 藥物이 相競的으로 結合한다는 것을 알 수 있다. 그리고 cefazoline이 cephalothin보다 吸收度를 더 많이 減少시키므로 HSA와의 親和性이 더 크다는 것을 가리킨다.

이 data를 Scatchard plot하여 Fig. 5와 같이 나타낸다.

Scatchard plot에서  $x$ 축 截片은 4로, 이는 結合部位의 數가 HSA에 있어서 4개임을 나타낸다. 또한 HBAB, cephalothin, cefazoline은 同一하거나 거의 隣接한 結合部位에서 相競的으로 作用하므로 各各의 直線을 延長하였을 때  $x$ 축과 만나는 점은 모두 4 近處였다.

HSA와 결합한 HBAB가 나타내는 직선의 기울기는 결합상수를 나타내고 이 기울기는 경쟁 약물인 cephalothin 및 cefazoline이 추가됨에 따라 감소하고 있다. 본 실험조건에서 HBAB와 HSA의 결합상수는  $7.89 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 이었다. 이들 수치를 Klotz 방정식에適用하여求한 cephalothin과 HSA의 결합상수는  $1.09 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 이었으며, cefazoline과 HSA의 결합상수는  $1.21 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 이었다.

本實驗의 結果에서 나타난 結合部位는 모두 主 結合部位라고 생각된다. HSA分子內의 모든 아미노산이 藥物에 對한 結合部位가 될 수 있으며 실제로 많은 아미노산들은 여러 種類의 結合을 通하여 단백질結合을 일으킬 수 있다<sup>20-21</sup>. 보통 副 結合部位의 結合상數는  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  以下이다. 또, 本實驗의 結果가 Scatchard plot에서 거의 直線으로 나타나는 것으로 보아 이들 結合部位 4個는 모두 同一한 結合力을 나타내는 類似한 性質을 가지고 있다고 思慮된다.

### 結 論

Difference Spectrophotometry를 利用하여 cephalosporin系列과 血清단백과의 結合에 關한 性質을 檢討하였다.

Probe로 使用된 HBAB와 두 藥物, cephalothin 및 cefazoline의 세가지 化合物은 human serum albumin에 있어서 同一한 結合力을 나타내는 4個의 結合部位를 가지고 있다.

本實驗條件에서 두 cephalosporin의 結合상數는 다음과 같다; HSA-cephalothin,  $1.09 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ; HSA-cefazoline,  $1.21 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

本 研究는 1980年度 韓國科學財團의 支援 研究費에 依한 研究結果의 一部分이다. 試料를 提供하여 준 株式會社 종근당과 株式會社 유한양행에 感謝한다.

### 文 獻

1. S.M. Singhvi, A.F. Heald and M.A. Leitz, *J. Lab. Clin. Med.*, **89**, 44(1977).
2. G.N. Rolinson. and R. Sutherland, *Brit. J. Pharmacol.*, 638(1975).
3. S.I. Oroszlan and G.D. Davies, *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 1203(1962).
4. M.C. Meyer and D.E. Guttman, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895(1978).
5. J.H. Perrin and D.A. Nelson, *J. Pharm. Pharmacol.*, **25**, 125(1973).
6. J.H. Perrin, J.J. Vallner and D.A. Nelson, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 3139(1974).
7. E. Tsutsumi, T. Inaba, W.A. Maon and W. Kalow, *ibid*, **24**, 1361(1975).
8. O.J. Bouwsma, J.J. Stewart and J.J. Vallner, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 45(1979).
9. R. Nazareth, T. Sokoloski, D. Witiak and A. Hopper, *ibid*, **63**, 199(1974).
10. H. Zia and H. Kamali, *Can. J. Pharm. Sci.*, (1976).
11. H. Zia and J.C. Price, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1177(1975).
12. *ibid*, 227(1976).
13. I. Moriquchi, S. Wada and H. Sano, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 592(1968).
14. H.W. Jun, L.A. Luzzi and P.L. Hsu, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1835(1972).
15. *ibid*, **64**, 493(1975).
16. Goodman and Gilman, *The pharmacological basis of Therapeutics*, 6th., Macmillan.
17. L. Brand, J.R. Gohlek and D.S. Rao, *Biochemistry*, **6**, 3510(1967).
18. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660(1949).
19. I.M. Klotz, T.H. Triwush and H.M. Walker, *J. Ame. Chem. Soc.*, **70**, 2935(1948).
20. J. Steinhardt, J. Krijn and J.G. Leidy, *Biochemistry*, **10**, 4005(1971).
21. J.B. Swaney and I.M. Klotz, *Biochemistry*, **9**, 2570(1970).