

## 藥物과 生體高分子間的 相互作用(VI)

Nalidixic Acid 및 Probenecid와 牛血清 蛋白間的 結合에 관한 研究

金鍾國 · 林妍秀 · 楊智善

서울대학교 藥學大學

(Received May 12, 1983)

Chong-Kook Kim, Yun-Su Lim and Ji-Sun Yang

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

### Drug-Biomacromolecule Interaction (VI)

#### Binding of Nalidixic Acid and Probenecid to Bovine Serum Albumin

**Abstract**—Binding of nalidixic acid which is used primarily in the treatment of urinary infection and probenecid which is used as a uricosuric agent to bovine serum albumin were studied using difference spectrophotometric method. 2-(4'-Hydroxybenzeneazo) benzoic acid as a spectrophotometric probe was used for measuring the binding of nalidixic acid and probenecid to bovine serum albumin. The association constants of nalidixic acid and probenecid were  $1.58 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $1.70 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectively.

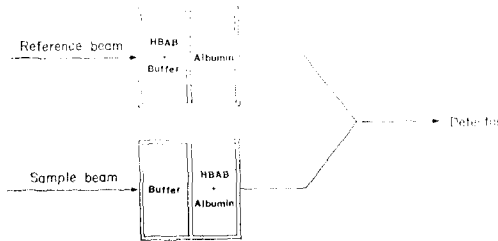
藥物과 血清蛋白과의 結合에 관한 研究는 藥効面에서나 製劑設計面에서 重要な 課題로 되어있다<sup>1-3)</sup>. 이는 藥物이 生體內에서 血清蛋白과 結合하지 않은 遊離狀態의 藥物만이 作用部位에서 藥効를 發現하기 때문이다<sup>4-5)</sup>.

本 研究에서는 penicillin, cephalosporin 혹은 sulfonamide에 過敏性인 尿路疾患 患者에게 이러한 藥物을 代換하여 使用하는 治療劑인 nalidixic acid<sup>6)</sup>와 尿酸의 排泄을 促進시키며 近位細尿管에서 有機酸性藥物의 排泄을 抑制하는 藥物인 probenecid<sup>7)</sup>를 體內에 各各 投與하였을 경우에 藥物의 거동을 예측하고자 이들 藥物과 牛血清알부민(BSA)間的 結合樣狀을 UV difference spectrophotometry法으로 測定하였다.

### 實 驗 方 法

**實驗 材料**—本 實驗에서 使用한 牛血清알부민 fraction V는 Sigma Co. 製品을 購入하여 使用하였다. BSA의 濃度는 280 nm에서 UV吸光度를 測定하여 水 濃度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}=6.67$ 을 基準으로 하여 設定하였으며, BSA의 分子量은 69,000으로 計算하였다. Nalidixic acid는 흥성제약(주)에서 提供 받았으며, probenecid는 韓美藥品工業에서 提供받아 使用하였다. UV probe로 使用한 2-(4'-hydroxybenzeneazo) benzoic acid(HBAB)는 ICN pharmaceuticals Inc. 製品을 購入하여 使用하였다. Probe 溶媒로 使用한 methanol은 spectroscopic grade이며, 그 이외에 使用한 試藥은 市販하는 特級品을 精製없이 使用하였다.

**實驗 方法**—Difference spectra는 Pye Unicam RF-510型的 紫外分光光度計를 使用하여 測定하였으며, 測定에 使用한 cell은 10 mm×4.5 mm tandem cell이다. pH 7.4인 0.054 M phosphate buffer를 溶媒로 하여  $2.98 \times 10^{-5}$  M BSA 溶液을 調製하였으며, 같은 濃度の BSA 溶液에 各各 nalidixic acid와 probenecid를  $2 \times 10^{-4}$  M씩 加하였다. BSA 溶液과 各 藥物이 加해진 두 BSA 溶液에 methanol로 溶解시킨 probe(HBAB)  $1 \times 10^{-2}$  M 溶液을 5  $\mu$ l씩 順次的으로 加하여 40  $\mu$ l까지 加한



**Fig. 1**—Tandem cell arrangement for difference spectrophotometry.

後 thermo-mixer로 攪拌시켰다. phosphate buffer와 BSA 溶液을 兩測에 넣은 2個의 tandem cell을 各各 reference beam과 sample beam에 平行하게 놓고 base line을 그린 다음 reference beam의 buffer 溶液과 sample beam의 BSA 溶液代身에 probe를 加해준 溶液을 順次的으로 넣고 484 nm에서 difference absorbance를 測定하였으며, 이때 實驗은 20°C에서 行하였다.

Tandem cell의 配置는 Fig. 1과 같다.

**Data 處理**—HBAB와 같은 작은 ligand 分子와 BSA 같은 macromolecule의 結合樣狀은 Langmuir type 方程式으로 표시할 수 있다.<sup>9)</sup>

$$\bar{V} = \frac{[PA]}{[P_0]} = nK_a[A] / \{1 + K_a[A]\} \quad (1)$$

여기서,  $\bar{V}$ 는 BSA 1 分子當 結合한 HBAB의 分子數로서, 結合되어 있는 HBAB의 濃度,  $[PA]$ 를 BSA의 總濃度,  $[P_0]$ 로 나눈 것이며,  $[A]$ 는 遊離狀態의 HBAB의 濃度이며,  $n$ 은 BSA 1 分子에 HBAB가 結合할 수 있는 結合部位의 數이고,  $K_a$ 는 結合의 크기를 나타내는 結合常數이다.

HBAB가 BSA와 結合함에 따라 생긴 吸收 spectrum의 變化를 484 nm에서 測定한 값, difference absorbance( $\Delta E$ )는 다음과 같은 關係를 갖고 있다.

$$\Delta E = \Delta \epsilon \cdot [PA] \cdot d \quad (2)$$

여기서,  $\Delta \epsilon$ 는 結合된 HBAB와 結合하지 않은 HBAB의 molar extinction coefficient의 차이이며  $d$ 는 optical path의 길이이므로 일정한 값이다.

$$[PA] = \frac{\Delta E}{\Delta \epsilon} \quad (3)$$

總 HBAB의 濃度,  $[a]$ 는

$$[a] = [PA] + [A] \quad (4)$$

$$[A] = [a] - [PA] \quad (5)$$

(3)式과 (5)式을 (1)式에 代入하면

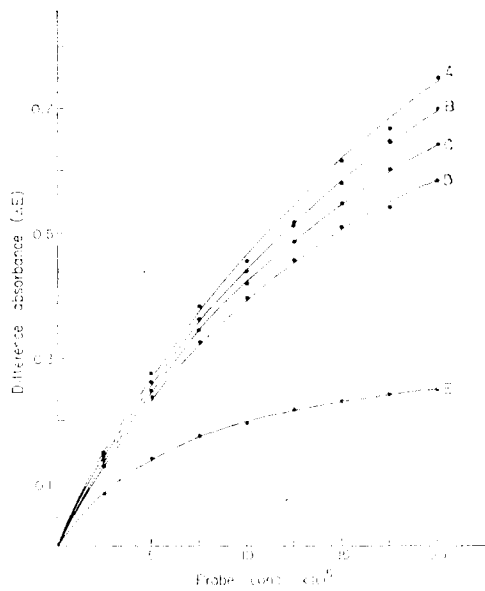
$$\frac{\Delta E}{[P_0] \cdot \Delta \epsilon} = nK \{ [a] - [PA] \} / \{ 1 + K \{ [a] - [PA] \} \} \quad (6)$$

(6)式을 정리하면

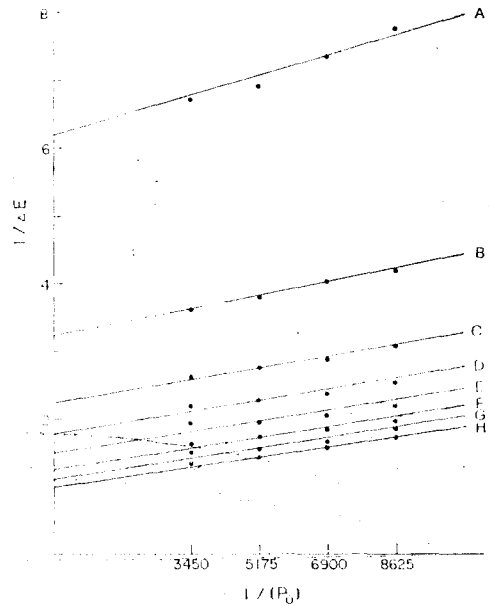
$$\frac{1}{\Delta E} = \left( \frac{1}{n[a]K \cdot \Delta \epsilon} + \frac{1}{n \cdot \Delta \epsilon} - \frac{\Delta E}{n\Delta[a]\Delta \epsilon^2} \right) \frac{1}{[P_0]} + \frac{1}{[a] \cdot \Delta \epsilon} \quad (7)$$

$$\lim_{1/[P_0] \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta E} \cong \frac{1}{[a] \cdot \Delta \epsilon} \quad (8)$$

difference absorbance ( $\Delta E$ )의 最大値는 加한 HBAB가 모두 BSA와 結合할 때 즉,  $[PA] = [a]$



**Fig. 2**-Difference absorbance as a function of HBAB concentration at various BSA concentrations.  
 A.  $2.90 \times 10^{-4}M$ ; B.  $1.93 \times 10^{-4}M$ ; C.  $1.45 \times 10^{-4}M$ ; D.  $1.16 \times 10^{-4}M$  and E.  $2.90 \times 10^{-5}M$



**Fig. 3**-Plots  $1/\Delta E$  versus  $1/[P_0]$ .  
 A.  $2.5 \times 10^{-5}M$ ; B.  $5.0 \times 10^{-5}M$ ; C.  $7.5 \times 10^{-5}M$ ; D.  $1.0 \times 10^{-4}M$ ; E.  $1.25 \times 10^{-4}M$ ; F.  $1.5 \times 10^{-4}M$ ; G.  $1.75 \times 10^{-4}M$  and H.  $2.0 \times 10^{-4}M$  HBAB.

일 때이다. 그러므로, 여러 BSA 濃度에서의  $\Delta E$ 를 測定하고, (Fig. 2),  $1/[P_0]$ 에 對하여  $1/\Delta E$ 를 plot하면 그 y축 截片置로부터  $\Delta E$ 의 最大置( $\Delta E_h$ )를 求할 수 있다. (Fig. 3)

위에서 求한  $\Delta E_h$ 置와 實驗置  $\Delta E_l$ 를 가지고 Brand等<sup>10)</sup>의 方法에 따라 BSA 溶液과 各 藥物의 結合分率을 計算하였다.

$$X = \frac{\Delta E_l}{\Delta E_h} \tag{9}$$

Fig. 4는 HBAB 濃度를 變化시키면서 滴定한 BSA溶液과 各 藥物의 吸收曲線이다.

BSA과 HBAB의 結合分率을 求한 後, Scatchard 方程式<sup>11)</sup>을 使用하여 結合常數와 結合部位의 數를 求하였다. (Fig. 5)

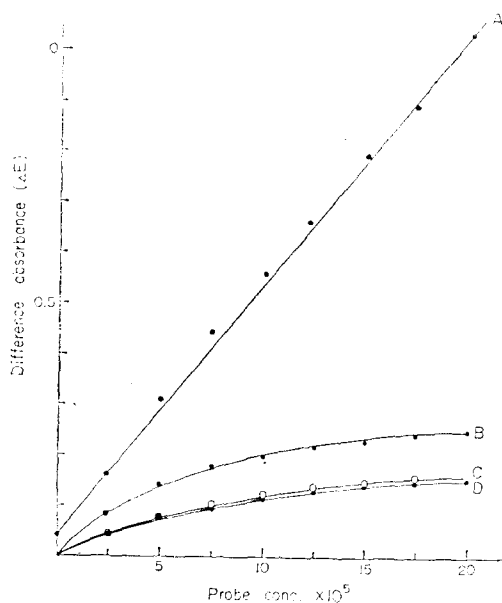
$$\bar{V}/A = nK_a[A] - \bar{V} \cdot K_a \tag{10}$$

여기서,  $K_a$ 는 HBAB의 結合常數이다.

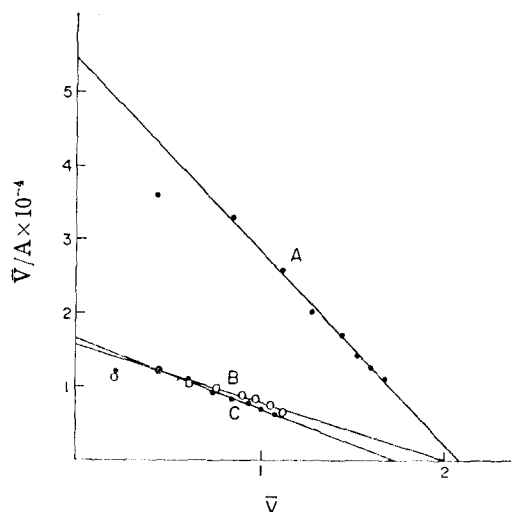
Nalidixic acid와 probenecid의 結合部位의 數는 Scatchard 方程式에서 求하나, 結合常數는 위에서 얻은 HBAB의 結合常數( $K_a$ )와 結合部位의 數( $n$ )을 Klotz 方程式<sup>12)</sup>에 代入하여 求하였다.

$$K_b = \frac{n[P_0]K_a[A] - [PA]K_a[A] - [PA]}{[B_l]K_a[A] - n[P_0]K_a[A] + [PA]K_a[A] + [PA]} \times \frac{K_a[A]}{[PA]} \tag{11}$$

여기서,  $K_b$ 는 BSA에 대하여 HBAB와 相競的으로 作用하는 藥物의 結合常數이며,  $[B_l]$ 는 藥物의 總濃度이다.



**Fig. 4**-Difference absorbance titration curve of BSA with HBAB at high and low concentrations.  
A: theoretical BSA concentration, B:  $2.90 \times 10^{-5}$ M BSA, C: in the presence of  $2 \times 10^{-4}$ M nalidixic acid, D: in the presence of  $2 \times 10^{-4}$ M probenecid.



**Fig. 5**-Scatchard plots of HBAB binding to BSA.  
A: in the absence of drug,  
B: in the presence of  $2 \times 10^{-4}$ M nalidixic Acid,  
C: in the presence of  $2 \times 10^{-4}$ M probenecid.

### 實驗結果 및 考察

Difference spectrophotometry를 이용하여 nalidixic acid 및 probenecid와 BSA간의 결합상수 및 결합部位的 수를 求하였다. Probe로 사용한 HBAB와 nalidixic acid 및 probenecid는 BSA에 同一한 결합력을 나타내는 2個의 部位에 結合하고 있으며 各各의 藥物과 BSA 間의 結合상수는 Table I에 表示한 것과 같다.

Nalidixic acid는 血液中에서 血漿蛋白에 93% 程度가 結合되며, nalidixic acid의 metabolite인 hydroxynalidixic acid는 約 63%가 結合된다고 알려져 있으므로<sup>13,14)</sup> nalidixic acid보다 크다고 생각되는 藥物을 併用投與할 경우에는 두 藥物이 相競的으로 血漿蛋白에 結合하게 되므로 相對的으로 遊離 nalidixic acid의 血中濃度가 증가되어 藥效發現의 增大를 豫測할 수 있다. 특히 Nalidixic acid는 신장 또는 간장 질환 환자에게는 投與하기 어려운 藥物이므로<sup>8)</sup> 他藥物을 同時에

**Table I**-Binding parameters.

	HBAB	Nalidixic Acid	Probenecid
<i>K</i>	$2.66 \times 10^4$	$1.58 \times 10^4$	$1.70 \times 10^4$
<i>n</i>	2.07	1.97	1.72

投與할 필요가 있을 경우에는 신장 및 간장의 기능은 물론이며 同時投與하는 藥物의 血漿蛋白에 대한 結合力을 測定하여 nalidixic acid와 비교검토 하여야 된다.

Probencid는 近位細尿管에 作用하는 藥物로서 신장질환 환자에게는 藥效를 별로 나타내지 않으며<sup>8)</sup> Table I에 표시된것 처럼 단백질합력이 비교적 크므로 他藥物의 血中濃度를 持續시키기 爲하여 併用投與할 경우에는 신장기능의 검사와 더불어 血漿蛋白에 對한 結合力을 比較檢討하여 同時投與하는 藥物의 用量 및 投與時間을 調節하여야 한다.

## 文 獻

1. J. Romer and M.H. Bickel, *J. Pharm. Sci.* **31**, 7 (1979).
2. C.K. Kim, J.S. Yang, H.Y. Ahn, Y.B. Kim and B.S. Yu, *Yakhak Hoeji.* **25**, 161 (1981).
3. *ibid*, **26**, 85 (1982).
4. M. Gibaldi, *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics.*, 2nd Ed. Lea & Fetiger, 89, (1977).
5. P.L. Hsu, J.H. Ma and L.A. Luzzi, *J. Pharm. Sci.* **63**, 571 (1974).
6. R. Gleckman, S. Alvarez, D.W. Jobubert and S.J. Matthews, *Am. J. Hosp. Pharm.* **36**, 1071 (1979).
7. R.H. Kessler and R.S. Gurd, *Am. J. Physiol.*, **197**, 601 (1959)
8. *United States Pharmacopiea Dispensing Information*, U.S.P. Convention Inc., p. 418, (1980).
9. I. Moriguchi, S. Wada and H. Sano, *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 592 (1968).
10. L. Brand, J.R. Glhlek and D. S. Rao, *Biochemistry.* **6**, 3510, (1967).
11. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660 (1949).
13. I.M. Klotz, T.H. Triwush and H.M. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 2395 (1948).
12. L.H. Harrison and C. Cox, *J. Urol.* **104**, 908 (1970)
14. P.D. Hoeprich, *Med. Clin. North Am.* **51**, 1127 (1967).