

## 약물과 생체 고분자간의 상호작용(XI)

Cefaclor, cefpiramide, ceftazidime and ceforanide와 소혈청 단백질의  
결합에 관한 연구

김 종 국 · 권 경 희

서울대학교 약학대학

(Received April 15, 1988)

### Drug-Biomacromolecule Interaction (XI)

Binding of cefaclor, cefpiramide, ceftazidime and ceforanide to bovine serum albumin

Chong-Kook Kim and Kyeng-Hee Kwon

College of Pharmacy, Seoul National University Seoul 151, Korea

**Abstract**—Binding of four cephalosporins(cefaclor, cefpiramide, ceftazidime, ceforanide) to bovine serum albumin was studied. Difference spectrophotometry was employed to evaluate the nature and the degree of association of cephalosporin-albumin complex. 2-(4'-hydroxybenzenazo) benzoic acid was used as the uv spectrophotometric probe for measuring the binding of cephalosporins to bovine serum albumin. Competitive bindings between cephalosporins and probe were observed. For the binding of cephalosporins to bovine serum albumin, three binding sites were identified. The binding constants of cefaclor, ceforanide, ceftazidime and cefpiramide were  $12.57 \times 10^{-2} M^{-1}$ ,  $6.49 \times 10^{-2} M^{-1}$ ,  $4.70 \times 10^{-2} M^{-1}$  and  $6.20 \times 10^{-2} M^{-1}$  respectively.

**Keywords**—Cefaclor, ceftazidime, ceforanide, cefpiramide, bovine serum albumin, protein-binding, 2-(4'-hydroxybenzene azo) benzoic acid, difference spectra, drug interaction.

혈장 단백질에 대한 약물의 결합은 약물의 생물학적 활성, 혈중농도, 체내로의 흡수, 분포, 조직내의 이행, 배설등 생체내에서의 약물 효과에 지대한 영향을 주는 인자로 작용한다.<sup>1,2)</sup> 항생제의 경우 생체내에서 혈장 단백질과 결합하지 않는 유리상태의 약물만이 작용부위에서 약효(항균 작용)를 발현하기 때문에<sup>3,4)</sup> 체내의 유효 혈중농도 유지가 필수적인 항균 요법에 있어서 약물과 혈장 단백질간의 결합에 관한 연구는 약효면에서나 제제 설계면에서 중요한 과제로 많은 연구가 실시된 바 있다.<sup>5-8)</sup> 특히 혈장 단백질의 50% 이상을 점하는 albumin이 약물과의 결합에 커다란 영향을 끼친다는 점을 고려해 볼 때, 약물의 bioequivalence 및 유효성을 추정하는 간접적인 지표로서, 유리상태로 존재하는 약물의 농도를 예측하기 위하여 혈장 단백질중에서도 albumin과 결합하는 정도를 구하는 것 또한 중요하

다. 약물과 단백질의 결합등 상호 작용에 관한 연구에는 많은 방법이 이용되고 있다. 이 중 대표적인 방법으로는 equilibrium dialysis(ED)<sup>9)</sup>, thermodynamic methods<sup>10)</sup>, ultrafiltration<sup>11)</sup>, ultracentrifugation,<sup>12)</sup> gel filtration, electrophoresis, partition equilibrium 등이 있으며, 최근에는 optical absorption, fluorescence, NMR, circular dichroism 등 분광학적 방법도 많이 활용되고 있다.<sup>13)</sup>

본 연구에서는 cephalosporin계 항생제를 체내에 투여하였을 때의 약물 거동을 예측하기 위하여 이들 약물과 소혈청 알부민과의 결합양상을 uv difference spectrophotometry법으로 실험하고 그 결과를 검토하였다.

### 실험 방법

실험 재료—본 실험에서 사용한 bovine serum

albumin(BSA) fraction V는 Sigma Co. 제품을 구입하여 사용하였다. BSA의 농도는 280 nm 에서 u.v. 흡광도를 측정하여 몰농도를  $E_{1\%}^{1cm} = 6.67$ 을 기준으로 하여 결정하였으며 albumin의 분자량은 69,000으로 계산하였다. 각각의 실험물질은 시판되고 있는 분말주사제와 Standard 시약을 구입하여 사용하였고 cefaclor는 Eli Lilly and Company로부터 구입하였으며, ceftazidime은 Glaxo의 Fortum, cefpiramide와 ceforanide는 유한(주)에서 공급받았다. uv probe인 2-(4'-hydroxybenzene azo) benzoic acid(이하 HBAB로 표시함)는 INC Pharm. Inc. 제품을 구입하여 사용하였으며 probe의 용매인 methanol은 Merck의 spectroscopic grade를 구입하여 사용하였고, 그외의 모든 용매는 시판 특급품을 사용하였다. 실험에 사용한 buffer는 0.054 M phosphate buffer로써 pH 7.4로 조제하여 사용하였다.

**실험 방법**—pH 7.4인 0.054 M phosphate buffer를 가지고  $1.45 \times 10^{-4}$ M 고농도 BSA 용액을 만들어 사용하였고,  $2.98 \times 10^{-5}$ M을 저농도 BSA 용액으로 사용하였다. 고농도 BSA 용액은 이 농도에서 첨가된 HBAB 전량이 BSA와 결합할 수 있는 농도로 정하였다. Probe인 HBAB는 methanol에 용해시켜  $1 \times 10^{-2}$ M 용액을 만들었다. 고농도 및 저농도의 BSA 용액 4 ml에  $1 \times 10^{-2}$ M HBAB 용액을 5  $\mu$ l씩 순차적으로 가하여 40  $\mu$ l까지 가한 다음 vortex-mixer로 교반시켰다. Phosphate buffer와 BSA 용액을 양측에 넣은 2개의 tandem cell을 각각 reference beam과 sample beam에 평행하게 놓고 base line을 설정하였다. 그 다음 reference beam의 buffer 용액과 sample beam의 BSA 용액에 HBAB를 순차적으로 가하면서, 484 nm에서 spectrophotometer (Shimadzu UV-260)로 difference absorbance를 측정하였다. 이때 10.0mm  $\times$  4.5mm의 Tandem cell을 사용하여 측정하였다. Tandem cell의 배치는 Fig. 1과 같다.

**Data 처리 방법**—HBAB와 BSA와의 결합으로 나타나는 difference absorbance와 cephalosporin계 항생물질의 존재에 의한 흡광도의 감소로부터 HBAB 및 cefaclor, cefpiramide, ceforanide,

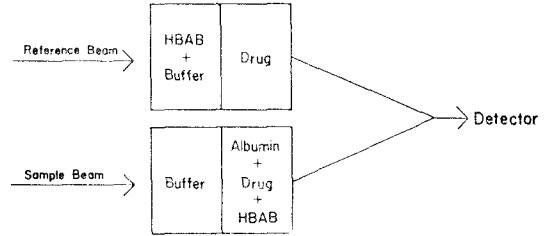


Fig. 1-Tandem cell arrangement for difference spectrophotometry

ceftazidime의 결합상수를 계산하였다. 먼저 Brand<sup>14)</sup> 등의 방법에 따라 HBAB와 BSA와의 결합분율을 다음 식으로 계산하였다.

$$X = \frac{\Delta A_i}{\Delta A_h}$$

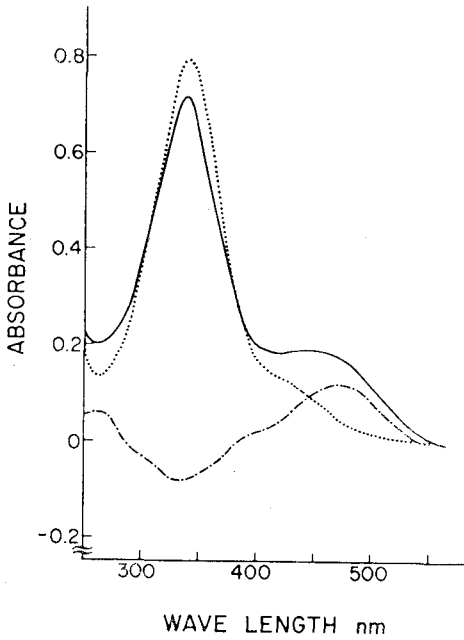
여기서  $\Delta A_i$ 와  $\Delta A_h$ 는 저농도 및 고농도 BSA 용액중에서 나타난 HBAB의 difference absorbance이다. HBAB와 BSA와의 결합상수와 결합부위수는 Scatchard 방정식<sup>15)</sup>을 사용하여 구할 수 있었다.

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

이 식에서 V는 BSA 1 분자당 결합한 HBAB의 분자 수이며, 적절한 HBAB 농도에 결합분율(X)을 곱하고, 이것을 저농도 BSA 용액의 농도로 나누어서 구한 값이다. A는 유리 HBAB 농도로, 적절한 HBAB 농도에 (1-X)값을 곱하여 얻은 유리된 HBAB의 농도이다. n은 BSA 1분자에 HBAB가 결합할 수 있는 결합부위의 수를 나타내며  $K_a$ 는 BSA에 대한 HBAB의 결합상수이다. HBAB 적정으로 얻어진 결합에 관한 data를 Scatchard plot하여 횡축 절편과 직선의 기울기에서 n과  $K_a$ 를 구하였다. 여기서 얻어진  $K_a$ 값과 n값을 Klotz방정식<sup>17)</sup>에 적용시켜 cefaclor, cefpiramide, ceforanide, ceftazidime의 결합상수를 구하였다.

### 결과 및 고찰

유리 상태로 존재하는 HBAB는 가시부에서는 흡수가 없고 uv 영역에서만 흡수를 가진다. 이 HBAB가 BSA와 결합을 하면 현저하게 흡광도가 변화하여 가시부와 uv 영역에 3개의 흡수곡

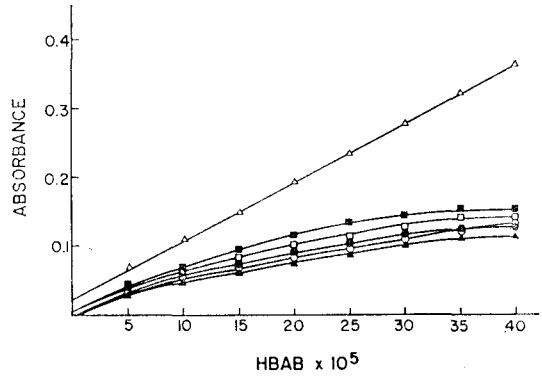


**Fig. 2-Spectral change of HBAB bound to BSA.**  
 ..... ,  $1 \times 10^{-4}M$  HBAB  
 — ,  $1 \times 10^{-4}M$  HBAB and  $2.98 \times 10^{-5}M$  BSA  
 - · - · , difference spectrum of HBAB and BSA

선을 갖는 데, 이와 같은 분광학적 변화는 신속하며 가역적이다.

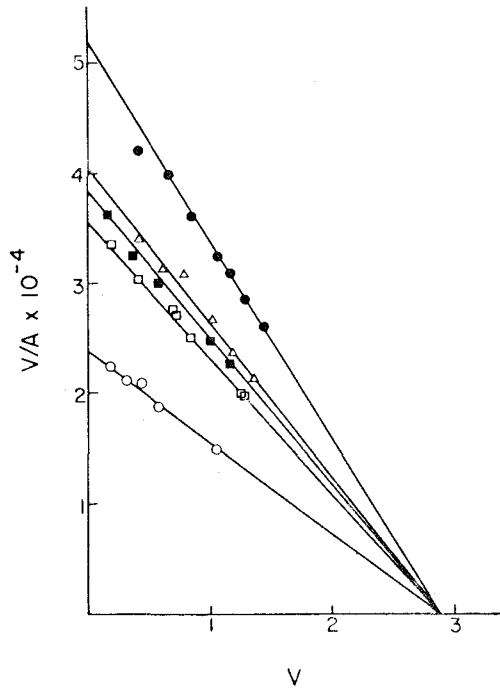
Fig. 2는 pH 7.4의 phosphate buffer에 용해시킨 유리 상태의 HBAB 용액의 uv 흡광도와, BSA와 HBAB가 결합되어 있는 용액의 uv 흡광도를 나타낸 것이다. HBAB와 HBAB-BSA의 difference spectra는 484 nm와 262 nm에서 2개의 positive peak와 345 nm에서 1개의 negative peak를 나타내는 데 484 nm에서의 흡광도가 가장 안정하고 재현성이 높았으므로 본 실험에서는 484 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 처리하였다.<sup>8)</sup>

Fig. 3은 일정농도의 BSA와 약물 용액에 HBAB의 농도를 변화시키면서 측정한 흡수 적정곡선이다. 고농도 BSA용액( $1.45 \times 10^{-4}M$ )에서는 과량의 결합부위가 존재하므로 HBAB의 농도에 따라 difference absorbance가 직선적으로 증가하고 저농도 BSA 용액( $2.98 \times 10^{-5}M$ )에서는 HBAB 농도가 증가함에 따라 결합부위가 포화되므로 적정 곡선이 휘어지게 된다. HBAB와 BSA의 결합에 의한 흡광도가 본 실험에 사용한



**Fig. 3-Difference Absorbance of BSA with HBAB** at high( $\Delta$ ) albumin concentration, at low( $\blacksquare$ ) albumin concentration alone, in presence of  $1 \times 10^{-4}M$  cefaclor( $\nabla$ ), ceforanide( $\circ$ ), cefpiramide( $\blacklozenge$ ) and ceftazidime( $\square$ ).

cephalosporin 계열 약물을 첨가 하면 감소하는 경향을 나타내므로 BSA분자의 동일 결합부위에 HBAB와 이들 약물이 상경적으로 작용하여 HBAB를 치환시켜 결합한다는 것을 알 수 있



**Fig. 4-Scatchard plots for the binding of HBAB to BSA**, in the presence of  $1 \times 10^{-3}M$  cefaclor( $\circ$ ), cefpiramide( $\square$ ), ceforanide( $\blacksquare$ ) and ceftazidime( $\Delta$ ), respectively.

**Table I**-Binding parameters of cephalosporins to bovine serum albumin by u.v. difference spectrophotometry.  
 n: number of binding sites       $K^{obs}$ : observed binding constant

compounds	structure	$K^{obs} \times 10^2 M^{-1}$	n
cefpiramide		6.20	3
cefaclor		12.57	3
ceforanide		6.49	3
ceftazidime		4.70	3

며<sup>16)</sup>, 흡수도의 감소 경향은 약물의 BSA와의 친화성의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

Fig. 4는 HBAB-BSA 결합체 용액에 일정 농도의 약물을 각각 넣어 주었을 때 측정된 흡광도를 Scatchard plot하여 나타낸 것이다. 횡축에서 결합부위의 수를 구하고 직선의 기울기에서 HBAB와 BSA 결합체의 결합상수를 구하였다. 이 그림에서 보듯이 직선의 기울기는 상경 약물인 cephalosporin계 약물을 첨가함으로써 감소되었다.

BSA에 있어서 HBAB가 결합하는 결합부위수는 3개이며 결합상수는  $1.83 \times 10^4 M^{-1}$ 로 측정이

되었다. 이 수치를 Klotz 방정식<sup>17)</sup>에 적용하여 구한 BSA와 실험약물의 결합 부위수와 결합상수를 Table 1에 나타내었다.

약물과 단백질간의 결합체의 안정성은 결합상수에 의해 나타내어 질 수 있으며 BSA 분자내의 모든 아미노산이 약물에 대한 결합부위가 될 수 있다. 실제로 많은 아미노산들이 여러 종류의 결합양상으로 단백질결합을 일으킬 수 있다는 점을 고려해 볼 때, 단백질결합이 임상효과에 많은 영향을 주며 타약물과 병용투여가 빈번한 항생제인 경우, 약물의 단백질과의 결합성향에 대한 연구가 매우 중요하다고 사료된다.

## 참고문헌

- 1) Powig, G., *J. Pharm. Pharmac.* 26, 113 (1974).
- 2) Goldstein, L., Aronow, L. and Kalman, S.W., *Principle of Drug Action* 2nd Ed., Wiely International Inc., p.164 (1975)
- 3) Gibaldi, M., *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, 2nd Ed., Lea & Febiger, p.86 (1977)
- 4) Hsu, P.L., Ma, J.H. and Luzzi, L.A., *J. Pharm. Sci.* 63, 571 (1974)
- 5) Kim, C.K. and Cha, H.S. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* 5, 57 (1980)
- 6) Kim, C.K., Yang, J.S., Ahn, H.Y., Kim, Y.B. and Yu, B.S. *Yakhak Hoeji* 25, 161 (1981)
- 7) Kim, C.K., Lim, Y.S. and Yang, J.S. *Yakhak Hoeji* 27, 257 (1983)
- 8) Kim, C.K., Lim, Y.S. and Yang, J.S. *Yakhak Hoeji* 6, 55 (1983)
- 9) Judis, J., *J. Pharm. Sci.*, 66, 802 (1977)
- 10) Ikai, A. and Tanford, C., *Nature* 230, 100 (1971)
- 11) Mcarthur, J.N., Dawkins P.D. and Smith, M. J.H., *J. Pharm. Pharmacol.* 23, 393 (1971)
- 12) Kaldor, G. Saifer, A and Vecsler, F., *Arch. Biochem. Biophysics* 94, 207 (1961)
- 13) Chignell, C.F., *Crit. Rev. Toxicol.*, 1, 413 (1972)
- 14) Brand, L., Gohlek, J.R. and Rao, D.S., *Biochemistry* 6, 3510 (1967)
- 15) Schatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660 (1949)
- 16) Javidan, S. and Mrtek, R.G., *J. Pharm. Sci.* 62, 420 (1973)
- 17) Klotz, I.M., Trwush, H. and Walker, H.M. *J. Amer. Chem. Soc.* 70, 935 (1948)