

# 설파제와 푸로세미드 약물상호작용(제 1보) 설파제의 우혈청 단백질결합에 대한 푸로세미드의 치환효과

이진환·최준식<sup>†</sup>·이종기·범진필\*

조선대학교 약학대학 · \*조선대학교 병설 간호전문대학  
(1989년 2월 20일 접수)

## Drug Interaction of Sulfonamides and Furosemide (I) Displacement Effect of Furosemide on Protein Binding of Sulfonamides in Bovine Serum Albumin

Jin Hwan, Jun Shik Choi<sup>†</sup>, Chong Ki Lee and Jin Pil Burm\*  
College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea and  
\*Junior College of Nursing, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
(Received February 20, 1989)

The displacement of protein bound sulfonamides (sulfisoxazole, sulfamethoxazole, sulfisomidine) by furosemide was investigated in bovine serum albumin by equilibrium dialysis method. Furosemide ( $2 \times 10^{-4}M$ ) in bovine serum albumin ( $7.24 \times 10^{-5}$ ,  $1.45 \times 10^{-4}$ ,  $2.89 \times 10^{-4}M$ ). Sulfisoxazole and furosemide were bound reversibly to bovine serum albumin and competitive for the same binding sites when administered together. Consequently, dosage regimen of sulfisoxazole should be adjusted carefully when sulfisoxazole is administered along with furosemide.

**Key words** — protein binding, displacement, sulfisoxazole, sulfamethoxazole, sulfisomidine, furosemide, bovine serum albumin, equilibrium dialysis, dosage regimen

약물의 단백질결합은 약물상호작용에 큰 영향을 준다.<sup>1)</sup> 동일한 단백질결합 부위에 결합하는 많은 약물은 병용투여시 친화력이 높은 약물이 경쟁적으로 치환하여 타 약물의 유래형태가 증가하기 때문에 투여설계시 중요한 문제가 된다.<sup>2-10)</sup> Anton<sup>11)</sup>은 페닐부타존이 설파제의 단백질결합을 50% 이상 감소시켜 항균작용이 증가되었으며, 분포 및 배설에도 영향을 주었다고 보고하였으며<sup>12)</sup> 또한 설파제의 단백질결합에 대한 산성 약물과 염기성 약물의 치환효과를 검토한 결과 단백질결합력이 큰 산성 약물이 영향을 주었다고 보고하였다.<sup>13)</sup>

저자 등은 화학요법제로 광범위하게 사용되는 설파제의 유효성을 높이고 부작용을 최소로 하기

위해, 단백질결합율이 높은 이뇨제로 푸로세미드를 선택하여 설파제의 단백질결합에 미치는 치환효과를 검토하였다.

### 실험방법

#### 재료 및 기기

시료로는 설프이속사졸(SS), 설파메톡사졸(SM), 설프이소미딘(SO) 및 푸로세미드(FM)는 Sigma사 제품을 사용하였고, 우혈청알부민(BSA) Fraction V와 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid(ANS)는 Sigma사 제품을 썼고 투석튜브는 Visking사제 No. 3(25mm/w, 15.9

<sup>†</sup>이 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

mm/D, MW 12,000)을 사용하였다. 기타 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

기기로는 복광식 difference 형광분광광도계 (Shimadzu) 및 흡광도측정기 (Bauch and Lomb) 등을 사용하였다.

#### 단백결합 측정

ANS을 사용하여 형광 probe 법<sup>14)</sup>으로 측정하였다. BSA를 pH7.4 인산염완충액에 녹여 고농도 ( $1.38 \times 10^{-5}M$ ) 및 저농도 ( $1.38 \times 10^{-6}M$ ) 용액을 만들고 저농도 BSA 용액 중에 설파제와 푸로세미드를  $1 \times 10^{-4}M$ 이 되도록 녹이고  $1 \times 10^{-3}M$  ANS 메탄올용액을 넣어  $1 \sim 10 \times 10^{-6}M$ 이 되도록 순차적으로 가한 후 ANS-BSA 복합체의 형광강도를 여기파장 375nm, 형광파장 470nm에서 형광분광광도계로 측정하였다. 그 결과를 Scatchard 플롯<sup>15)</sup>를 하여 단백질결합정수 ( $K$ )와 결합부위의 수 ( $n$ )를 각각 구하였다.

#### 설파제의 단백질결합에 대한 푸로세미드의 치환 실험

평형투석법<sup>16-17)</sup>에 의해 투석 튜브를 6.5cm로 잘라 적당량의 증류수를 넣고 100°C에서 4시간 끓인 후 꺼내어 증류수로 세척하고 끝을 2번 묶고 BSA 용액, 설파제용액 그리고 치환제로 FM 용액을 3ml가 되게 넣어 묶은 후 인산염완충액 (pH7.4) 20ml에 잠기게 하여 37°C에서 자석식 교반기로 혼합하면서 20시간 투석하였다. 튜브 내의 설파제 농도는  $2 \times 10^{-4}M$ 로 하였으며 BSA는  $7.24 \times 10^{-5}M$ ,  $1.45 \times 10^{-4}M$  및  $2.89 \times 10^{-4}M$  세 가지 농도에서 FM 농도 ( $5 \times 10^{-5}M$ ,  $1 \times 10^{-4}M$  및  $2 \times 10^{-4}M$ )에 따른 치환의 영향을 실험하였다. 투석 평형에 도달한 후 튜브 외액을 취하여 Bratton 등<sup>18)</sup>의 방법에 의해 설파제의 유리약물 농도 ( $C_f$ )을 구한 후 총농도 ( $C_t$ )로부터 다음 식에 의해 단백질결합율을 구하였다.

bound drug %

$$= \frac{\text{concentration inside } (C_t) - \text{concentration outside } (C_f)}{\text{concentration inside } (C_t)} \times 100$$

#### 실험결과 및 고찰

##### 단백결합정수 및 결합부위의 수

설파제와 FM의 첨가에 따른 ANS-BSA 복합

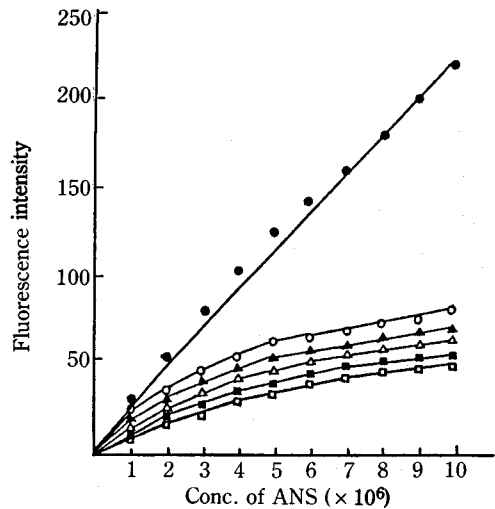


Figure 1—Relative fluorescence intensity of BSA as a function of ANS concentration with addition of sulfonamide and furosemide

Key: ●, BSA of high conc.; ○, BSA of low conc.; ▲, BSA of low conc. with SO; △, BSA of low conc. with SM; ■, BSA of low conc. with SS; □, BSA of low conc. with FM.

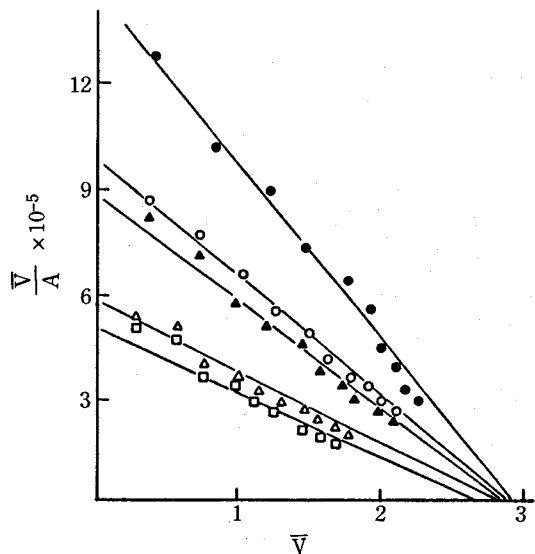


Figure 2—Scatchard plots of ANS binding to BSA of low concentration in the presence of sulfonamide and furosemide.  $\bar{V}$  is the number of moles of bound probe per mole of BSA.  $A$  is the concentration of free probe.

Key: ●, ANS alone; ○, SO; ▲, SM; △, SS; □, FM

체의 형광강도는 Fig. 1과 같다. 약물이 ANS의 결합부위와 동일한 단백질결합 부위에서 경쟁적 치

**Table I—Parameter for Protein Binding.**

Drug	Parameter	
	<i>n</i>	<i>K</i>
ANS	2.93	$5.11 \times 10^5$
Sulfisoxazole	2.89	$2.14 \times 10^4$
Sulfamethoxazole	2.85	$1.10 \times 10^4$
Sulfisomidine	2.80	$9.46 \times 10^3$
Furosemide	2.68	$2.44 \times 10^4$

*n* is number of binding sites on BSA.  
*K* is association constant of drug ( $M^{-1}$ ).

환으로 SO, SM, SS, FM 순으로 점차 감소되었다. ANS-BSA 복합체의 약물첨가에 따른 Scatchard plot 는 Fig. 2와 같고 Klotz 방정식에 따라 구한 결합정수와 결합부위의 수는 Table I 과 같았다. BSA 에 대한 결합부위의 수는 3으로 생각되며 단백질 결합정수의 크기는 FM>SS>SM>SO 순이었다.

**설프이속사졸의 단백질결합에 대한 푸로세미드의 치환효과**

SS 의 단백질결합에 대한 FM 의 치환효과는

**Table II—Displacement of Furosemide on Protein Binding of Sulfisoxazole in Bovine Serum Albumin.**

Concentration of albumin ( $\times 10^4 M$ )		Sulfisoxazole alone, $2 \times 10^{-4} M$	% Protein binding with furosemide added ( $\times 10^4 M$ )		
			0.5	1.0	2.0
			0.724	bound form	$87.5 \pm 9.21$
	free form	$12.5 \pm 4.41$	$12.9 \pm 3.22$	$13.6 \pm 1.18$	$14.8 \pm 1.49^*$
	% RPF	100.0	103.2	108.8	118.4
1.45	bound form	$89.0 \pm 7.81$	$88.7 \pm 5.92$	$88.0 \pm 4.45$	$85.5 \pm 6.21^*$
	free form	$11.0 \pm 1.14$	$11.3 \pm 1.43$	$12.0 \pm 1.58$	$14.5 \pm 2.12^*$
	% RPF	100.0	102.7	109.1	131.9
2.89	bound form	$92.0 \pm 7.82$	$91.5 \pm 8.29$	$90.0 \pm 9.24$	$89.2 \pm 4.31^{**}$
	free form	$8.0 \pm 0.40$	$8.5 \pm 0.68$	$10.0 \pm 1.42^*$	$10.8 \pm 1.89^{**}$
	% RPF	100.0	106.3	125.0	135.0

Mean value  $\pm$  S.E. RPF means relative percent of free form. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

**Table III—Displacement of Furosemide on Protein Binding of Sulfisomidine in Bovine Serum Albumin.**

Concentration of albumin ( $\times 10^4 M$ )		Sulfamethoxazole alone, $2 \times 10^{-4} M$	% Protein binding with furosemide added ( $\times 10^4 M$ )		
			0.5	1.0	2.0
			0.724	bound form	$73.0 \pm 6.21$
	free form	$27.0 \pm 1.82$	$27.2 \pm 1.92$	$27.7 \pm 4.01$	$29.2 \pm 2.11$
	% RPF	100.0	101.0	102.3	108.1
1.45	bound form	$74.5 \pm 6.24$	$73.6 \pm 3.11$	$73.4 \pm 2.29$	$71.6 \pm 5.28^*$
	free form	$25.5 \pm 1.29$	$26.4 \pm 2.88$	$26.6 \pm 0.98$	$28.4 \pm 0.96$
	% RPF	100.0	103.5	104.3	111.4
2.89	bound form	$75.7 \pm 6.24$	$74.5 \pm 4.11$	$74.1 \pm 6.29$	$72.2 \pm 6.28^*$
	free form	$24.3 \pm 2.99$	$25.5 \pm 1.09$	$25.9 \pm 1.81$	$27.8 \pm 0.98^*$
	% RPF	100.0	104.9	126.6	114.4

Mean value  $\pm$  S.E. RPF means relative percent of free form. \* $p < 0.05$

**Table IV — Displacement of Furosemide on Protein Binding of Sulfamethoxazole in Bovine Serum Albumin.**

Concentration of albumin ( $\times 10^4 M$ )		Sulfisomidine alone, $2 \times 10^{-4} M$	% Protein binding with furosemide added ( $\times 10^4 M$ )		
			0.5	1.0	2.0
0.724	bound form	74.9 $\pm$ 6.28	74.4 $\pm$ 4.49	73.8 $\pm$ 6.24	73.5 $\pm$ 5.38
	free form	25.1 $\pm$ 1.09	25.6 $\pm$ 4.38	26.2 $\pm$ 1.18	26.5 $\pm$ 2.96
	% RPF	100.0	102.0	104.4	105.6
1.45	bound form	75.4 $\pm$ 5.44	75.1 $\pm$ 6.21	74.8 $\pm$ 4.31	74.6 $\pm$ 3.89
	free form	24.6 $\pm$ 1.29	24.9 $\pm$ 0.98	25.2 $\pm$ 0.96	25.4 $\pm$ 1.18
	% RPF	100.0	101.2	102.4	103.3
2.89	bound form	76.1 $\pm$ 4.11	75.1 $\pm$ 8.92	75.0 $\pm$ 4.88	74.8 $\pm$ 3.28
	free form	23.9 $\pm$ 1.09	24.9 $\pm$ 4.11	25.0 $\pm$ 2.11	25.2 $\pm$ 0.96
	% RPF	100.0	104.2	104.6	105.2

Mean value  $\pm$  S.E. RPF means relative percent of free form.

Table II와 같다. SS의 단백질결합율은 BSA 농도 증가에 따라 증가하였으며 FM의 농도 증가에 따라 감소하였다. BSA  $7.24 \times 10^{-5} M$ 에서 SS 단백질결합율은 87.5%에서 고농도의 FM으로 치환되어 85.2%로 감소하였으며 상대적 유리형 백분율은 118.4%로 유의성있게 증가하였다. BSA  $1.45 \times 10^{-4} M$ 에서는 89%에서 고농도의 FM으로 치환되어 85%로 감소하였으며 상대적 유리형 백분율은 131.9%로 유의성있게 증가하였다. 또한 BSA  $2.89 \times 10^{-4} M$ 에서는 92%에서 중, 고 농도의 FM으로 치환되어 90.0% 및 89.2%로 각각 감소하였으며 백분율은 125.0% 및 135.0%로 각각 유의성있게 증가하였다.

**설파에톡사졸의 단백질결합에 대한 푸로세미드의 치환효과**

SM 단백질결합에 FM 치환의 결과는 Table III과 같다. SM의 단백질결합율은 BSA 농도가 증가됨에 따라 증가하였으며 FM의 농도 증가에 따라서는 감소하였다. BSA  $7.24 \times 10^{-5} M$ 과  $1.45 \times 10^{-4} M$ 에서 SM 단백질결합율은 각각 73.0% 및 74.5%에서 FM 농도 증가에 따라 각각 감소하였으나 유의성은 없었다. 그러나 BSA  $2.89 \times 10^{-4} M$ 에서는 단백질결합율이 75.7%에서 고농도의 FM 존재로 치환에 의해 72.2%로 감소하였으며 상대적 유리형 백분율은 114.4%로 유의성있게 증가하였다.

**설프이소미딘의 단백질결합에 대한 푸로세미드의 치환효과**

SO 단백질결합에 대한 FM의 치환효과는 Table IV와 같다. SO의 단백질결합율은 BSA 농도가 증가됨에 따라 증가하였으며 FM의 농도 증가에 따라서는 감소하였다. BSA의 농도  $7.24 \times 10^{-5} M$ ,  $1.45 \times 10^{-4} M$  및  $2.89 \times 10^{-4} M$ 에서 SO의 단백질결합율은 74.9%, 75.4% 및 76.1%로 FM의 공존농도가 증가됨에 따라 각각 감소하였으나 유의성은 없었다.

이상의 결과에서 SS는 BSA 농도와 FM 농도 증가에 따라 유리형이 최고 35%까지 유의성있게 증가하였으나 SM과 SO의 BSA 단백질결합에 대한 FM의 치환효과는 별로 인정되지 않았다. Anton<sup>13)</sup>과 Piasky<sup>19)</sup>는 산성 약물과 염기성 약물은 단백질결합 부위가 서로 다르며, 산성 약물은 알부민과 염기성 약물은  $\alpha$ -acid glycoprotein과 lipoprotein과 주로 결합을 잘 하며 Kunin<sup>20)</sup>은 단백질결합력이 높은 설파제는 친화력이 크다고 보고하였다. Klotz 방정식<sup>15)</sup>에 의해 구한 SS와 FM의 단백질결합정수는 거의 유사하게 높게 나타났으며 SM과 SO의 결합정수는 상대적으로 낮았다. 그러므로 SS와 FM은 pKa가 3.9와 5.0인 산성 약물로서 BSA의 동일한 단백질결합 부위에서 서로 경쟁적으로 작용하여 결합정수가 큰 FM이 강력한 치환제로 작용하여 SS의 유리형 농도가

증가된 것으로 사료된다. 이상에서 SS와 FM의 병용투여시는 투여설계의 재조정이 필요하다고 사료된다.

## 결 론

설프이속사졸(SS), 설프아메톡사졸(SM), 설프이소미딘(SO), 푸로세미드(FM)의 단백결합 파라미터와 SS, SM 및 SO( $2 \times 10^{-4}M$ )의 우혈청알부민( $7.24 \times 10^{-5}M$ ,  $1.45 \times 10^{-4}M$ ,  $2.89 \times 10^{-4}M$ )과의 단백결합에 대한 FM 농도( $5 \times 10^{-5}M$ ,  $1 \times 10^{-4}M$  및  $2 \times 10^{-4}M$ )에 따른 치환효과를 실험한 결론은 다음과 같다.

1. 단백결합정수(K)는  $FM > SS > SM > SO$ 의 순이었다.
2. SS와 BSA( $2.89 \times 10^{-4}M$ )간의 단백결합에 FM 농도  $1 \times 10^{-4}M$ 에서 상대적 유리형 백분율이 125.0% 증가하였고, BSA( $7.24 \times 10^{-5}M$ ,  $1.45 \times 10^{-4}M$  및  $2.89 \times 10^{-4}M$ )와 SS간의 결합에 있어서  $2 \times 10^{-4}M$  FM의 첨가로 상대적 유리형 백분율이 각각 118.4%, 131.9% 및 135.0%로 증가하여 유의성있게 SS가 치환되었다.
3. SM과 BSA( $2.89 \times 10^{-4}M$ ) 결합에 있어서는  $2 \times 10^{-4}M$  FM의 첨가로 상대적 유리형 백분율이 114.4%로 증가하였으나 SO는 유의성있게 치환되지 않았다.
4. 이상의 결론에서 SS와 FM의 병용투여시 투여계획의 조정이 필요하다고 사료된다.

## 문 헌

- 1) M.C. Meyer and D.E. Guttman, The binding of drugs by plasma proteins, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895 (1968)
- 2) R.C. Luders and D. Chao, Effect of pizoprofen on protein binding of warfarin and tolbutamide in human plasma, *ibid.*, **70**, 1370 (1981)
- 3) R.M. Welch, A method for studying the interation of drugs with bishydroxycoumarin in dogs, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **226**, 259 (1973)

- 4) R.A. O'Reilly, The binding of sodium warfarin to plasma albumin and its displacement by phenylbutazone, *ibid.*, **226**, 292 (1973)
- 5) R.N. Pinckard and R.S. Farr, The influence of acetylsalicylic acid on the binding of acetrizoate the human albumin, *ibid.*, **266**, 341 (1973)
- 6) D.G. Fraser, T.M. Ludden, R.P. Evens and E.W. Sutherland, Displacement of phenytoin from plasma binding sites by salicylate, *Clin Pharmacol. Ther.*, **27**, 165 (1980)
- 7) C.T. Viswanathan and R.H. Lery, Plasma protein binding interaction between valprolic and salicylic acids in rhesus monkeys, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 1279 (1981)
- 8) Y. Imamura, K. Arimori, M. Sonoda and H. Ichibaga, Effect of simultaneous administration of drugs on absorption and excretion XII, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1819 (1982)
- 9) J. Sato, Y. Sawada, Y. Sugiyama, T. Iga and M. Hanano, Effect of heparin injection on plasma protein binding of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate and salicylate in rats, *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 720 (1980)
- 10) M.W. Whitehouse, I. Kippe, J.R. Klinenberg, L. Schlosstein, D.S. Campion and R. Bluestone, Increasing excretion of urate with displacing agents in man, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **226**, 309 (1973)
- 11) A.H. Anton, The relation between in binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **129**, 282 (1960)
- 12) A.H. Anton, A drug induced change in the distribution and renal excretion of sulfonamides, *ibid.*, **134**, 291 (1961)
- 13) A.H. Anton, Increasing activity of sulfonamides with displacing agents, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **226**, 273 (1973)
- 14) H.S.U. Par-Hsu, K.H.M. Joseph, H.W. Jun and L.S. Luzzi, Structure relationship for binding of sulfonamides and penicillins to bovine serum albumin by fluorescence probe techniques, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 27 (1974)
- 15) I. M. Klotz, H. Trwush and H. M. Walker,

- The binding of organic ions by proteins; Competition phenomena and denaturation effects, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2935 (1948)
- 16) S.H. Curry, *Manual of Laboratory Pharmacokinetics*, Vail Ballou Press Inc, N.Y., 1983, p. 76
- 17) E. Woo and D.J. Greenblatt, Pharmacokinetic and clinical implications of quinidine protein binding, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 466 (1979)
- 18) P. Bratton and A. Marshall, *J. Biol. Chem.*, **125**, 539 (1939)
- 19) K.M. Piasky, Disease induced changes in the plasma binding of basic drugs, *Clin. Pharmacokinetics*, **5**, 246 (1980)
- 20) C.M. Kunin, Enhancement of antimicrobial activity of penicillins and other antibiotics in human serum by competitive serum binding inhibitors, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**, 69 (1964)