

## Warfarin, Dansylsarcosine의 알부민결합에 미치는 유리지방산의 영향

건국대학교 의과대학 약리학교실

배 진 우

=Abstract=

### Influences of Free Fatty Acid on the Albumin Binding of Warfarin and Dansylsarcosine

Jin-Woo Bae

*Department of Pharmacology, Medical College of Kon-Kuk University*

There are some reports about the influences of free fatty acids on the albumin binding of drugs. But they were concerned to the limited free fatty acids, mostly of azapropazone-warfarin binding site bound drugs and determination of dissociation and association constants by stopped flow technique. These data were not enough to make conclusions for the general tendency of free fatty acid to albumin binding. Therefore the influence of various saturated fatty acids of C<sub>10-20</sub>, oleic acid and linoleic acid as unsaturated fatty acids to albumin binding of warfarin and dansylsarcosine were studied by equilibrium dialysis. The concentration of free drug was determined by spectrophotometer according to the molar ratios of 0, 0.5, 1, 2 and 4 between free fatty acid and albumin. There were significant increasing in the free drug concentration of warfarin and dansylsarcosine when the molar ratio for capric acid, lauric acid and palmitic acid was 4. The free warfarin concentration was increased significantly at a molar ratio of 4 between oleic acid and albumin. Therefore the albumin binding of drugs can be varied significantly by increased free fatty acid of diabetics and cause to the pharmacokinetic variation between healthy and diabetics.

**Key Words:** Albumin binding, Free fatty acids, Warfarin, Dansylsarcosine, Equilibrium dialysis

### 서 론

생체내에 투여된 약물은 혈장단백질과 결합하여 운반되므로 혈장단백질은 중요한 약물의 운반과 저장의 기능을 한다. 약물의 혈장단백질과의 결합

도는 약물에 따라 매우 상이하여 warfarin, phenylbutazone, tolbutamide 및 diazepam등과 같이 95% 이상 결합하는 약물이 있는 반면 10% 정도의 결합도를 나타내는 Gentamicine등도 있다(Müller, 1982). 만약 약물의 혈장단백질과의 결합도가 저하되면 수용체와 결합하여 실질적 약물효과를

나타낼 수 있는 유리약물(free drug)의 농도가 증가되므로 치료량의 약물투여에도 불구하고 중독을 일으키는 중요한 원인으로 알려져 있다. 이런 현상은 특히 단백질과의 결합도가 높은 약물이 치료 지수가 낮은 경우이며 특히 신부전증환자에 잘 일어날 수 있다. 약물의 혈장단백질과 결합도가 변화되는 원인으로는 신장질환이나 영양실조등에서 볼 수 있는 hypoalbuminemia, 약물간의 상호작용, 산도의 변화 및 개체의 연령 등이 크게 작용하는 것으로 알려져 있다(Menke 등, 1988; Viani 등, 1991). 그외에도 당뇨병환자의 혈당상승에 따른 혈장단백질의 비효소적 당화반응(nonen-zymatic protein glycosylation)이 약물의 혈장단백질과의 결합도를 현저히 저하시킨다는 보고도 있었다(Tsuciya 등, 1984). 혈장단백질 중 가장 높은 농도를 차지하고 있는 알부민은 약산성약물의 대부분과 diazepam 등 일부의 약염기성약물 및 강심배당체와 결합하므로 azapropazone-warfarin 결합부위(binding site)와 indol-benzodiazepine 결합부위 및 digitoxin 결합부위가 있는 것으로 알려져 있다(Sjöholm 등, 1979).

약물의 단백질결합에 미치는 지방산에 관한 연구는 stopp-flow technique에 의하여 dansylsarcosine과 warfarin의 해리상수(Kd)와 결합상수(Ka)에 대한 연구와 (Rietbrock 등, 1985, Menke 등, 1988, Menke 등, 1989) furosemide (Colombo 등 1982), valproic acid (Gatti 등, 1987) 및 sulfioxazole(Ruiz-Cabello 등, 1984)에 관한 연구가 있었다. 이들 연구는 약물의 단백질간의 신속한 반응(fast reaction)을 측정하였거나 주로 azapropazone-warfarin의 결합부위에 관계하는 약물에 대하여 탄소수가 16~18의 지방산을 이용한 연구였으므로 더 많은 종류의 지방산에 대하여 조사할 필요가 있고 유리약물의 농도를 직접 측정할 수 있어 약물의 단백질결합의 연구에 흔히 사용되는 평형투석법(equilibrium dialysis)을 이용하여 알부민에 존재하는 두 결합부위와 결합하는 약물의 대표격으로 사용되는 warfarin과 dansylsarcosine을 이용함으로써 약물과 알부민의 결합에

미치는 지방산의 영향을 보다 포괄적으로 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 시 약

지방산은 모두 Sigma제품으로 capric acid (C10), lauric acid(C12), palmitic acid(C16) stearic acid(C18), arachidic(arachic) acid(C20)의 포화지방산과 oleic acid, linoleic acid의 불포화지방산을 이용하였으며 지방산이 제거된 bovine serum albumin(BSA, Sigma A6003)과 Dansylsarcosine(DS, 1-dimethylamino-5-naphthalino-sulfonyl-N-methyl-glycine, Sigma)을 이용하였다. Dansylsarcosine은 indol-benzodiazepine의 결합부위와 결합하는 표지자(marker)로서 사용하였다.

### 2) 알부민의 용해

BSA를 인산완충용액(0.067M, pH7.4, 0.6% NaCl)에 용해하여 72.4  $\mu$ M의 알부민용액을 생산하였다.

### 3) 지방산의 용해 및 지방산과 알부민의 혼합 용액의 생산

지방산을 2)에서 생산된 용액에 첨가하여 자력 교반기를 이용하여 용해하였으며 지방산과 알부민의 몰농도의 비(ratio)가 0, 0.5, 1, 2, 4가 되도록 알부민용액으로 희석하였다. 지방산이 전혀 포함되지 않는 구를 대조구로 하였다.

### 4) 약물과 알부민의 결합 및 유리약물의 분리

3)에서 생산된 용액을 평형투석기(Fisher Scientific Co. US)의 투석막(Spectra/Por dialysis Disc, M.W. Cutoff 6-8000)에 의해 분리된 cell에 1ml를 주입하고 반대편 cell에는 인산완충용액에 용해한 warfarin(144.8  $\mu$ M)이나 dansylsarcosine(289.6  $\mu$ M)용액을 1ml주입하여 섭씨 37도의 수조에서 3 시간동안 12 rpm으로 평형투석을 실시하였다.

## 5) 유리약물의 농도 측정

평형투석의 종료후 약물을 주입한 cell에서 채취한 용액의 광학적밀도(optical density)를 분광광도계(Contron 860, 스위스)를 이용하여 측정하고 표준곡선에서 약물의 농도를 구하였다. Warfarin 310 nm, dansylsarcosine는 328 nm의 주파수를 이용하였다.

## 6) 통계처리

모든 실험은 3~5회 반복하였으며 oleic acid의 경우만은 7~8회 반복실험 하였다. 지방산과 알부민의 농도의 비(ratio)에 따른 유리약물의 평균값에 대한 유의성을 검정하고자 분산분석(ANOVA)

을 실시하였고 유의성이 인정( $P < 0.05$ )될 경우 어느 농도의 지방산의 투여가 유리약물의 농도에 영향을 미치는지를 농도비가 0인 구를 대조구로 하여 t-test를 실시하였다. 모든 통계처리는 SAS를 이용하였다.

## 결 과

위의 실험에 얻어진 결과를 Table 1과 2에 기록하였으며 각 실험치의 비교를 위하여 Fig. 1~4를 이용하였다.

Fig. 1은 여러종류의 포화지방산의 농도가 증가함에 의하여 변화하는 warfarin의 알부민과의 결합도를 나타내는 것으로 지방산의 농도가 알부민의 2배까지는 변화가 없으나 그의 비가 4배로 증

**Table 1.** Free warfarin concentration( $\mu\text{M}$ ) at different molar ratios between free fatty acids and albumin (Mean  $\pm$  S.D)

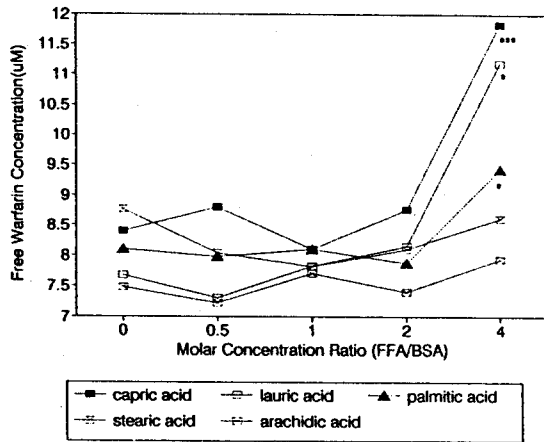
Ratio(FFA/BSA) Fatty acid	0	0.5	1.0	2.0	4.0
Capric acid	8.4 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 2.7	8.1 $\pm$ 1.0	8.8 $\pm$ 0.7	11.8 $\pm$ 0.4
Lauric acid	7.6 $\pm$ 0.7	7.3 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.7	8.2 $\pm$ 1.7	11.2 $\pm$ 1.5
Palmitic acid	8.1 $\pm$ 1.3	8.0 $\pm$ 0.5	8.1 $\pm$ 0.9	7.9 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 1.0
Stearic acid	8.8 $\pm$ 1.1	8.0 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 1.3	8.1 $\pm$ 1.5	8.6 $\pm$ 0.7
Oleic acid	7.6 $\pm$ 0.9	7.3 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.9	7.3 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 0.9
linoleic acid	8.4 $\pm$ 1.3	10.3 $\pm$ 3.2	8.2 $\pm$ 1.1	8.5 $\pm$ 1.4	9.9 $\pm$ 1.1
Arachidic acid	7.5 $\pm$ 0.9	7.2 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.8	7.4 $\pm$ 1.2	7.9 $\pm$ 0.5

**Table 2.** Free dansylsarcosine concentration( $\mu\text{M}$ ) at different molar ratios between free fatty acids and albumin (Mean  $\pm$  S.D)

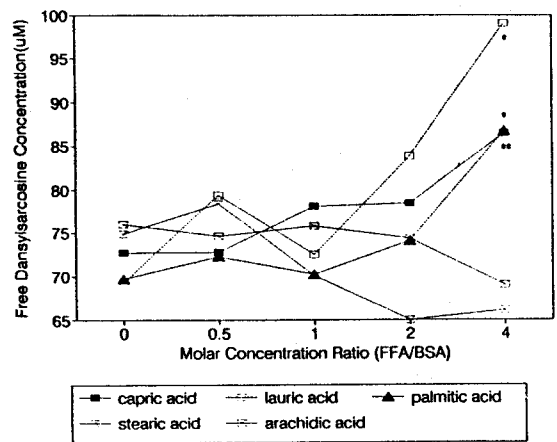
Ratio(FFA/BSA) Fatty acid	0	0.5	1.0	2.0	4.0
Capric acid	72.7 $\pm$ 2.5	72.8 $\pm$ 3.2	78.1 $\pm$ 1.6	78.5 $\pm$ 2.2	86.5 $\pm$ 5.2
Lauric acid	69.3 $\pm$ 1.3	79.4 $\pm$ 1.3	72.5 $\pm$ 8.9	83.9 $\pm$ 7.8	99.0 $\pm$ 6.3
Palmitic acid	69.6 $\pm$ 1.6	72.3 $\pm$ 5.7	70.2 $\pm$ 1.7	74.1 $\pm$ 1.9	86.8 $\pm$ 7.6
Stearic acid	74.9 $\pm$ 5.4	78.4 $\pm$ 5.9	70.1 $\pm$ 4.9	65.0 $\pm$ 0.1	66.1 $\pm$ 5.1
Oleic acid	72.0 $\pm$ 3.8	73.7 $\pm$ 5.4	72.9 $\pm$ 11.0	73.4 $\pm$ 3.7	78.9 $\pm$ 2.3
linoleic acid	76.0 $\pm$ 9.8	74.7 $\pm$ 3.7	75.8 $\pm$ 3.7	74.4 $\pm$ 3.3	69.0 $\pm$ 4.2
Arachidic acid	76.0 $\pm$ 9.8	74.7 $\pm$ 2.7	75.8 $\pm$ 3.7	74.4 $\pm$ 3.3	69.0 $\pm$ 4.2

가됨에 의하여 유리약물의 농도가 증가되는 것을 보여 주고 있고 통계적으로는 capric acid는 P <

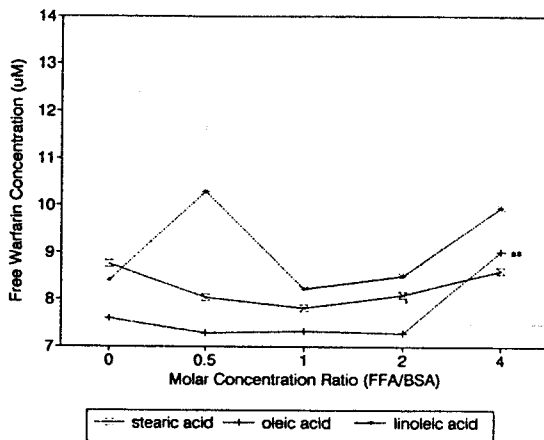
0.001, palmitic acid와 lauric acid는 각각 P < 0.05 의 유의성으로 유리약물의 농도가 증가하였으나



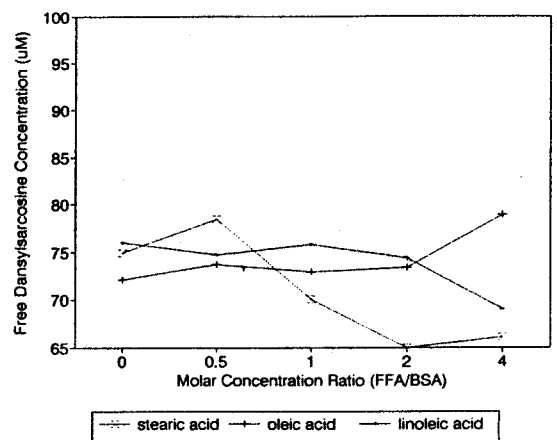
**Fig. 1.** Relationship between free warfarin concentration and molar ratios of free fatty acid/bovine serum albumin. The free warfarin concentration for capric acid, lauric acid and palmitic acid in molar ratio 4 differed significantly to the ratio 0. \*: P < 0.05, \*\*\*: P < 0.001



**Fig. 2.** Relationship between free dansylsarcosine concentration and molar ratios of free fatty acid/bovine serum albumin. The free dansylsarcosine concentration for capric acid, lauric acid and palmitic acid in molar ratio 4 differed significantly to the ratio 0. \* P < 0.05, \*\*P < 0.01



**Fig. 3.** Relationship between free warfarin concentration and molar ratios of free fatty acid/bovine serum albumin. The free warfarin concentration for oleic acid in molar ratio 4 was significant different to the ratio 0. \*\*: P < 0.01



**Fig. 4.** Relationship between free warfarin concentration and molar ratios of free fatty acid/bovine serum albumin. The free dansylsarcosine concentration was not significant different between any ratio for stearic acid, oleic acid and linoleic acid.

stearic acid와 arachidic acid의 투여구는 유의성이 없었다.

Fig. 2는 여러종류의 포화지방산의 농도가 증가함에 의하여 변화하는 dansylsarcosine의 알부민과의 결합도를 나타내는 것으로 지방산과 알부민의 농도비가 2배까지는 유의적인 변화를 나타내지 않았으나 그 비가 4배로 증가되었을 경우 capric acid lauric acid는 각각  $P < 0.05$ 로, palmitic acid는  $P < 0.01$ 로 유의적인 증가를 보였으며 stearic acid와 arachidic acid 투여구는 유의적 차이를 보이지 않았다.

Fig. 3과 4는 탄소수가 18인 포화지방산과 불포화지방산에 의한 차이를 조사하고자 포화지방산인 stearic acid와 불포화지방산인 oleic acid, linoleic acid의 첨가에 의한 warfarin과 dansylsarcosine의 알부민과의 결합도를 나타낸 것으로 oleic acid의 농도가 알부민의 4배로 증가될 경우 warfarin의 알부민과의 결합이 유의하게( $P < 0.01$ ) 저하되는 것을 보여 주었고 다른 경우는 통계적으로 의미 없는 것으로 나타났다.

## 토 론

약물과 혈장단백질과의 결합도를 측정하는 방법에는 여러가지가 있으나(Scholten, 1978) 일반적으로 많이 사용하고 있는 평형투석법을 이용하여 분리된 약물을 분광광도계로 측정하였으며 사용된 약물은 알부민의 중요한 약물 결합부위에 결합하는 약물 중 대표적 약물인 warfarin과 dansylsarcosine을 사용함으로 지방산이 약물의 알부민결합에 미치는 보다 포괄적인 경향을 추리하고자 하였다. 투석은 약물의 농도가 평형에 도달하기 위하여 필요한 1.5시간의 두배인 3시간 동안 실시함으로써 확실히 평형에 도달하고자 하였으며 약물을 알부민과 투석후 유리약물의 광학적밀도를 0.1이상 되도록 함으로 측정에 오차가 적도록 하였다. 그리고 약물을 투여하지 않은 공시험에 대한 광학적 밀도는 지방산의 농도의 증가에 관계 없이 310 nm에서의  $0.005 + 0.002$ (Mean + S.D.  $n = 15$ )

를 328 nm에서는  $0.007 + 0.003$ (Mean + S.D.  $n = 15$ )로 매우 낮아 약물농도의 계산시 공시험에 대한 값을 고려하지 않았으며 Fig. 1, 2, 3, 4에 표준편차를 표시할 공간이 없어 표 1과 표 2를 도입하여 표시하였다. Fig. 1과 2에 나타난 바와 같이 탄소수가 16개 이하의 포화지방산인 capric acid, lauric acid 및 palmitic acid의 농도가 알부민 농도의 4배로 증가될 경우 warfarin과 dansylsarcosine의 유리약물의 농도가 유의하게 저하되었으나 탄소수가 18이상인 stearic acid와 arachidic acid의 경우는 유의한 변화를 보이지 않았으며 탄소수가 18개의 포화지방산과 불포화지방산에 대한 조사에서는 oleic acid이 농도가 알부민의 4배가 될 경우 warfarin의 유리약물이 유의하게 증가됨을 보였다. 다른 연구자의 결과를 살펴보면 stopped-flow technique에 의하여 측정된 dansylsarcosine의 알부민과의 해리상수(Kd)는 탄소수가 10~16개의 포화지방산의 농도가 알부민의 2배가 될때까지는 변화가 없었으나 3배이상일 경우 현저히 상승하였고 탄소수가 18개 이상의 포화지방산의 첨가에 의하여서는 그의 농도와 관계없이 변화가 없는 것으로 발표되었으며(Menke등, 1989), diazepam과 sulfioxazole의 유리약물은 건강인보다 당뇨병환자의 경우 훨씬 높았고 활성탄소에 의하여 유리지방산을 제거함으로써 그 유리약물의 농도가 저하되었다는 보고도 있으며(Ruiz-Cabello등, 1984) 지방산의 농도가 알부민의 4배이하 일때의 1%에 달하던 furosemide의 유리약물의 농도는 그의 비가 9.34로 증가함에 의해 6%로 증가되었다는 보고도 있다(Colombo 등, 1982). 건강인과 당뇨병환자의 혈장에 함유된 지방산의 농도를 측정 한 결과 건강인의  $0.829 \pm 0.112$  mEq/l(Mean  $\pm$  S.E.  $n = 10$ )에 당뇨병환자에서는  $2,431 \pm 1.627$  mEq/l(Mean  $\pm$  S.E.  $n = 30$ )을 나타내었으므로 당뇨병환자의 지방산과 알부민과의 농도비는 건강인보다 거의 3.6배에 달하였고 지방산 중 특히 oleic acid의 농도가 증가됨을 보여주고 있어 본 실험의 Fig. 3의 결과로 보아 oleic acid가 인체에서의 약물결합에 영향을 미치는 것을 암시하였다(Colombo 등,

1984). 또한 valproic acid의 유리약물은 건강인의  $6.2 \pm 1.2\%$ 에 비해 당뇨병자의 경우  $7.6\% \pm 1.6\%$ 로 유의하게( $P < 0.01$ ) 증가되었으나 phenytoin의 경우는 유의성이 없었다는 발표도 있었다( $8.2 \pm 1.1\%$  vs.  $8.4 \pm 1.2\%$ )(Gatti 등, 1982).

이런 결과는 본 실험의 결과와 대체적으로 일치하는 경향을 보이므로 다음과 같은 결론을 내릴 수 있었다.

1) 탄소수가 10~16개의 유리지방산인 capric acid, lauric acid, palmitic acid의 경우 warfarin과 dansylsarcosine의 알부민 결합이 유의하게 억제되었다.

2) 유리지방산과 알부민과의 농도의 비가 4배 경우에도 stearic acid와 arachidic acid는 약물의 결합에 영향을 주지 않았다.

3) Oleic acid의 농도가 알부민의 4배가 될 경우 warfarin의 알부민 결합이 유의성 있게 억제되었으며 dansylsarcosine의 결합에는 영향을 주지 않았다.

4) 당뇨병자의 증가된 유리지방산은 알부민과 결합도가 큰 약물의 경우 약동학적인 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되었다.

## 참 고 문 헌

- Colombo R and Pinelli A: *Effect of in vivo increase of free fatty acids on human plasma protein binding of furosemide. Pharmacology* 25: 73-81, 1982
- Gatti G, Crema F, Attardo-Parrinello G, Fratino P, Aguzzi F and Perucca E: *Serum protein binding of phenytoin and valproic acid in insulin-dependent diabetes mellitus. Therapeutic Drug Monitoring* 9: 389-391, 1987
- Menke G, Wörner W and Kratzer W: *Two mechanisms of free fatty acid inhibition of drug binding to human serum albumin: fast reaction studies. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 313: 269-274, 1988
- Menke G, Pfister P, Sauerwein S, Rietbrock I, Woodcock BG and Rietbrock N: *Age-dependence and free fatty acid modulation of binding kinetics at the benzodiazepine binding site of serum albumin in neonates and adults determined using fast reaction studies. Br J Clin Pharmacol* 23: 439-445, 1988
- Menke G, Wörner W, Kratzer W and Rietbrock N: *Kinetics of drug binding to human serum albumin: allosteric and competitive inhibition at the benzodiazepine binding site by free fatty acids of various chain lengths. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 339: 42-47, 1989
- Müller WE: *Die Plasma-proteinbindung von Pharmaka. Med Mo Pharmacol* 10: 302-310, 1982
- Rietbrock N, Menke G, Reuter G, Laßman A and Schmeidl R: *Influence of palmitate and oleate on the binding of warfarin to human serum albumin: stopped-flow studies. J Clin Chem Biochem* 23: 719-723, 1985
- Ruiz-Cabello F and Erill S: *Abnormal serum protein binding of acidic drugs in diabetes mellitus. Clin Pharmacol Ther* 26: 691-695, 1984
- Scholtan VW: *Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten der Serumproteinbindung von Arzneimitteln. Arzneimittel.-Forsch/Drug Res* 28(11): 1037-1047, 1978
- Sjöholm I, Ekman B, Kober A, Ljungstedt-Pahlman I, Seiving B and Sjödin T: *Binding of drugs to human serum albumin: XI. Mol Pharmacol* 16: 767-777, 1979
- Tsuchiya S, Sakurai T and Sekiguchi SI: *Non-enzymatic glucosylation of human serum albumin and its influence on binding capacity of sulfonyleureas. Biochem Pharmacol* 33(19): 2967-2971, 1984
- Viani A, Cappiello M and Pacifici GM: *Binding of Diazepam, Salicylic acid and digitoxin to albumin isolated from fetal and adult serum. Dev Pharmacol Ther* 17: 100-108, 1991