

## HPFA를 이용한 HSA와 (S)-perillyl Alcohol의 단백질 결합력

송명석 · 王德先 · <sup>1</sup>구윤모 · †노경호  
<sup>1</sup>초장밀분리연구센터, 인하대학교 공과대학 화학공학과  
(접수 : 2003. 1. 30., 게재승인 : 2003. 4. 29.)

### Protein Binding of (S)-perillyl Alcohol in HSA using High-Performance Frontal Analysis

Myong Seok Song, Dexian Wang, Yoon-Mo Koo<sup>1</sup>, and Kyung Ho Row†

<sup>1</sup>Center for Advanced Bioseparation Technology and Department of Chemical Engineering  
Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea  
(Received : 2003 1. 30., Accepted : 2003. 4. 29.)

An on-line frontal analysis HPLC system was developed to determine the unbound concentration of (S)-perillyl alcohol, an potential anti-cancer agent, in human serum albumin (HSA) solution. The analysis was performed on a Develosil 100 Diol 5 (10 cm x 4.6 mm I.D.) high-performance frontal analysis (HPFA) column. Sodium phosphate solution was used as the mobile phase (pH 7.4, ionic strength 0.17) at a flow rate of 1 mL/min. UV wavelength was set at 205 nm. A injection volume of 600  $\mu$ l was chosen to ensure the compound eluted formed a zonal peak with a plateau. By Scatchard analysis, it was found that the binding constant(K) and binding number(n) of (S)-perillyl alcohol to molecular HSA were  $2.05 \times 10^6$  [ $M^{-1}$ ], 0.00428, respectively.

**Key Words** : HPFA, (S)-perillyl alcohol, human serum albumin, binding parameter

#### 서론

Human Serum Albumin (HSA)과 같은 혈장 단백질과 인체 내의 약리성분 (drug)의 결합은 평형 관계에 의하여 이루어진다. 인체 내에서 혈장 단백질과 결합되지 않은 약리성분 (unbound drug)은 쉽게 상처 부위로 도달하여 치료 효과가 높지만, 혈장 단백질과 결합된 약리성분 (bound drug)은 분자 크기 때문에 혈관벽을 통과하기 어렵고, 약리성분이 상처 부위로 이동하기가 쉽지 않아서 치료 효과가 줄어들게 된다. 약리성분의 전달현상을 규명하기 위해서는 혈장 단백질과 약리성분의 결합력에 대한 연구가 선행되어야 한다. 단백질과 결합되지 않은 약리성분의 농도는 체내의 전체 약리성분의 농도보다 약리효과에 큰 영향을 미치게 된다. 즉, 간장의 물질 대사 비율, 신장 배설물 비율, 생체막 분할 비율과 같이 약리효과를 나타내는 특성은 혈장 단백질과 결합된 약리성분과 결합되지 않은 약리성분의 비율로 나타낼 수 있다. 결과적으로, 약리성분의 결합력을 정량적으로 분석하는 것은 치

료 효과 연구에 있어 가장 중요한 기준이 된다.

혈장 단백질과 약리성분의 결합 에너지 연구에 있어 가장 많이 이용되는 방법이 HPLC를 이용하는 것이다. 그러나 일반적으로 HPLC를 이용하는 분석 방법에는 생체막을 통한 약리성분의 흡착과 혈장 단백질과 결합된 약리성분이 생체막을 통과하기 어렵다는 한계를 가지고 있다. 따라서, 혈장 단백질에 결합되지 않은 약리성분의 농도는 낮고, 약리성분의 결합력을 측정하기에는 어렵다는 문제점을 해결하기 위해 새로운 연구 방법인 high-performance frontal analysis (HPFA)를 이용하여 결합력을 측정하였다(1-3). HPFA는 직접 시료 주입으로 쉽고 간단하게 혈장 단백질과 결합되지 않은 약리성분의 농도를 결정할 수 있는 크로마토그래피 방법이다(1-5). HPFA를 이용하는 방법은 생체막 사용 시에 발생하는 문제가 없으며, 혈장 단백질에 결합된 약리성분이 HPFA 컬럼 내부에서 혈장 단백질에 결합되지 않은 약리성분과 함께 이동되고 농도가 높은 혈장 단백질과 결합하고 있는 약리성분의 분석에 대해서도 적당하다(5). HPFA를 이용한 약리성분의 결합 매개변수를 측정하는 연구는 약학, 의학 분야에서 새로운 관심 분야로서 연구가 진행되어지고 있다(6).

Perillyl alcohol (POH)은 *d*-limonene의 생리활성물질이며, 꿀의 껍질에서 주로 발견되는 monoterpene 류의 화합물이다. POH는 꿀겉질 이외에도 라벤더, 박하, 셀러리의 열매에서도 많이 포함되어 있다. 또한 POH는 키랄 물질로서 (S)-perillyl

† Corresponding Author : Center for Advanced Bioseparation Technology and Department of Chemical Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea  
Tel : +82-32-860-7470 Fax : +82-32-872-0959  
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

alcohol (S-POH)과 (R)-perillyl alcohol (R-POH)의 형태로 존재한다. Fig. 1에서는 각각의 POH에 대한 구조식을 보여주고 있다. POH의 이성질체 중 의학적, 약학적으로 효능이 있다고 생각되는 물질은 S-POH이다. 이 물질은 구조상 화학적 부작용이 없고, 독성이 낮고, 질병에 대한 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(7-9) 피부암(10,11), 폐암(12), 간암(13), 췌장암(14)등의 가능성 있는 항암제로서 많은 연구가 진행되고 있다.

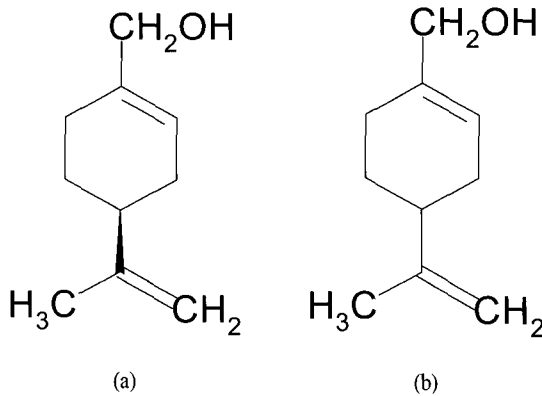


Figure 1. Chemical structure of perillyl alcohol. (a) S-POH (b) R-POH.

본 연구에서 제안한 on-line HPFA 방법을 사용하여 HSA와 항암제로서 약리성분을 가지는 S-POH의 결합 매개변수와 단위 HSA에 대한 S-POH의 결합 위치의 수 (binding site number)를 계산하는 것이 연구의 목적이다.

이 론

HPFA는 일반적인 실리카의 역상 또는 정상 HPLC와는 다르게 특수한 HPLC 컬럼을 사용한다(15). 사용되는 컬럼은 크기 분배 또는 배제에 의해 분리되는 gel filtration chromatography (GFC) 컬럼이 주로 이용되며 혈장 단백질과 같은 분자 크기가 큰 물질은 통과시키고, 분자 크기가 작은 약리성분은 컬럼에 흡착시키고, 전처리를 하지 않고 직접 시료를 주입하여 단백질을 분석할 수 있다. 이러한 컬럼의 특성은 전체 약리성분의 농도(혈장 단백질에 결합되거나 결합되지 않은 약리성분의 합)를 측정하는데 중요하다. 일반적으로 작은 주입 부피로서 혈장 단백질과 약리성분의 혼합 용액을 이러한 HPLC 컬럼에 직접 주입하면, 시료는 이동상에 의하여 희석되고, 혈장 단백질과 결합된 약리성분이 신속하게 혈장 단백질과 분리되어진다. 따라서 전체 약리성분이 고정상에서 흡착되고, 단일한 피크로 용출된다. 이동상에 유기 용매를 첨가하게 되면 혈장 단백질과 결합된 약리성분은 더 빨리 분리되고, 피크의 효율이 좋아지게 된다. 시료의 주입 부피가 증가하게 되면 단백질 결합에 의한 피크가 낮은 효율을 갖게 되므로 이를 방지하기 위해서는 주입 부피를 충분히 작게 하여야 한다(5). 시료 주입 부피를 작게 하면 약리성분의 농도는 피크의 면적이나 높이로서 정량적 분석에 의해서 구할 수 있지만, 혈장 단백질의 결합과 관련된 약리성분의 농도는 어떠한 정보는 알 수 없다.

반면에 HPFA는 어떠한 유기 첨가제를 넣지 않은 pH=7.4

의 인산완충용액을 사용하여 평형관계를 단순하게 하고 과량으로 시료를 주입하였다. Fig. 2는 HPFA의 일반적인 도식도이다. (a)에서는 시료를 과량으로 HPFA 컬럼에 직접 주입할 때, 혈장 단백질과 결합된 약리성분이 탈착되고, 결과적으로 (c)에서 보는 것처럼 컬럼의 위 부분 근처에서 평형영역이 생기게 된다. 이 영역에서의 평형은 세공의 외부 및 내부로 나눌 수 있다. 세공 내부에서의 크로마토그래피적인 고정상과 이동상간의 평형관계와 세공 외부에서 혈장 단백질과 약리성분의 결합에 관한 평형이다. 이러한 평형관계에 의하여 세공 내부의 고정상에서 약리성분의 농도는 세공 외부의 이동상 속의 혈장 단백질과 결합되는 약리성분의 농도와 같게 된다. 이 때는 용출 농도 곡선이 평평하게 된다.

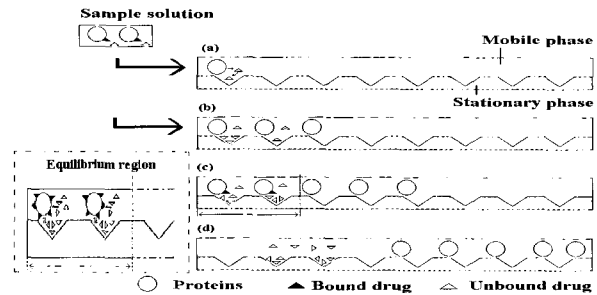


Figure 2. Schematic view of high-performance frontal analysis.

결합에 대한 평형은 혈장 단백질의 결합력이 가역적이고 동역학적으로 빠르게 진행되어지기 때문에 혈장 단백질과 약리성분이 분리되는 동안 일정하게 유지된다. (d)에서 보는 것처럼 컬럼 내부에 혈장 단백질과 결합되지 않은 약리성분의 영역이 발생하게 된다. 이 약리성분의 영역은 평평한(plateau) 영역으로 사다리꼴 형태로 용출되고, 평평한 영역에서 약리성분의 농도는 초기의 시료 용액의 혈장 단백질과 결합되지 않은 약리성분의 농도와 같게 된다. 이 평평한 영역은 이전에 언급한 2개의 평형을 객관적으로 확인시켜 준다. 평평한 피크의 높이는 혈장 단백질과 결합되지 않은 약리성분의 농도와 일치하게 된다. HPFA 방법은 이러한 원리를 이용하는 것이다(6).

HPFA의 결합에 대한 평형은 약리성분과 혈장 단백질이 분리되는 동안 일정하게 유지되며 다음 식으로 표시할 수 있다(2-3,16).

$$\frac{r}{C_u} = nK - rK \tag{1}$$

식 (1)에서 r은  $C_b/C_p$ 이고,  $C_b$ ,  $C_p$ ,  $C_u$ 는 혈장 단백질과 결합된 약리성분의 농도, 혈장 단백질의 농도, 결합되지 않은 약리성분의 농도이다. K와 n은 결합 매개변수와 단위 혈장 단백질에 대한 약리성분의 결합 위치의 수를 나타낸다. 관계식 (1)에서 기울기 -K와 절편 nK를 구할 수 있어서 궁극적으로 n, K를 얻을 수 있다. 식 (1)을 r에 대해서 나타내면 다음과 같다.

$$r = \frac{nK C_u}{1 + K C_u} \tag{2}$$

이 된다. 식 (2)에서 보는 것과 같이 시료에서 혈장 단백질과 약리성분의 혼합 용액에 대해서 시료가 Langmuir관계로서 결합되어 있음을 알 수 있다. 좌변의  $r$ 은 혈장 단백질과 결합된 약리성분의 평형관계를 나타내는 항이고, 우변 분자에서의  $nK$ 는 혈장 단백질과 결합할 수 있는 최대의 약리성분의 농도에 관한 항이다(16).  $n$ 이 큰 값을 갖는다면 혈장 단백질에 결합되는 약리성분의 농도가 크게 되고, 혈장 단백질과 약리성분의 결합력이 크다는 것을 의미한다.  $K$ 가 매우 작은 경우, 혈장 단백질과 결합되지 않은 약리성분의 농도 ( $C_u$ )는 다음과 같이 근사적으로 표현된다.

$$r = nK C_u \quad (3)$$

식 (3)에서  $r (=C_b/C_p)$ 은  $C_u$ 가 증가함에 따라서 비례적으로 증가한다. 이 경우에서 비례상수로서  $nK$ 는 다음 식을 이용하여 계산 할 수 있다.

$$nK = C_b / (C_p C_u) \quad (4)$$

식 (2)에서  $K$ 값이 매우 큰 경우, 일정한 약리성분의 농도에서  $C_u$ 는 작게 되고,  $r = n$ 으로 표현된다. 따라서  $C_b/C_p$ 는 단위 혈장 단백질에 대한 약리성분의 결합 위치의 수로 되어서  $C_u$ 에 관계없이 항상 일정하다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험을 위하여 혈장 단백질과 약리성분으로 Human Serum Albumin (HAS)과 (S)-perillyl alcohol (S-POH)을 각각 Fluka Co.와 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였고, 컬럼은 일본의 Nomura사의 diol-silica column (Develosil 100Diol5, 100 x 4.6 mm I.D.)을 미국의 Phenomenex Co.로부터 구입하였다. 이동상은 인산완충용액을 사용하였다. 이동상의 pH와 I (이온세기)를 조절하기 위하여 sodium phosphate monobasic dihydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )와 sodium phosphate dibasic heptahydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )를 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였다. 인산완충용액을 제조하기 위하여 사용되어진 물을 2차 증류수로 감압펌프 (Division of Millipore, Waters)와 filter (FH-0.45 $\mu\text{m}$ )를 이용하여 사용하여 필터를 한 후 사용하였다.

### 실험 기기

본 실험에 사용되어진 장치는 온도를 유지하기 위하여 컬럼 오븐(CTS30 HPLC column oven, 영린기기), 펌프(M930 solvent delivery pump, 영린기기), 486 검지기 (M 720 Absorbance detector, 영인과학), Reodyne injection valve (5 ml sample loop)로 구성되어 있다. 데이터 저장 시스템은 Autochromin (Ver. 1.42, 영린기기)을 PC에 설치하여 사용하였다. 기존의 HPFA에 의한 연구는 HPFA 컬럼과 분석용 컬럼을 밸브를 이용하였지만(2-4), 본 연구의 on-line HPFA에서는 HPFA 컬럼만을 사용하여 기존 HPLC와 마찬가지로 실험을 수행하였다.

### 시료의 전처리

이동상과 HSA와 S-POH의 혼합 용액의 용매로 사용되는 인산완충용액을 제조하기 위하여 Sorensen's 인산완충용액 제조 방법에 의하여 sodium phosphate monobasic dihydrate와 sodium phosphate dibasic heptahydrate를 각각 0.2 M으로 물에 녹여 19/81 Vol.%로 혼합하여 pH = 7.4로 하였다. 이 경우 I = 0.17이었다. S-POH과 같은 약리물질은 낮은 농도에서만 인산완충용액에 녹는다. 따라서 사용되어진 S-POH는 3  $\mu\text{M}$ 으로 20 ml의 인산완충용액에 녹여 만들었다. 약리성분과는 달리 HSA는 인산완충용액에 잘 녹았고, HSA의 농도는 700  $\mu\text{M}$ 이었다. 각각의 S-POH과 HSA를 50/50 Vol.%로 혼합하고, 컬럼 오븐으로 37°C에서 3시간 보관하여 HSA와 S-POH가 350  $\mu\text{M}$ 과 1.5  $\mu\text{M}$ 으로 결합된 시료를 준비하였다.

### 결합되지 않은 S-POH 농도의 결정

HSA와 S-POH의 혼합 용액 1000  $\mu\text{l}$ 를 시료 주입 루프에 넣어 주입한다. HPFA에 의한 결합 매개변수의 결정은 HPFA 컬럼으로 주입되는 시료가 희석되지 않게 하는 것이 가장 중요하다. 따라서 시료 주입은 유량과 시간을 이용한 제한적 주입 (restricted injection)방법을 이용하여 HPFA 컬럼으로 주입하여 용출곡선이 평평한 영역을 갖게 되는 최적의 주입 부피를 포함하였다(1, 17). 주입 부피는 50, 180, 400, 600, 800  $\mu\text{l}$ 으로 하였다. 주입 부피가 600  $\mu\text{l}$ 이상에서는 용출곡선이 평평한 영역을 갖게 되었다. 실험에서 이동상은 인산완충용액이고, UV wavelength는 205 nm이고, 실험 온도는 컬럼 오븐을 이용하여 37°C를 유지하였다.

### Scatchard 분석

HSA의 농도를 350  $\mu\text{M}$ 으로 고정하고, S-POH의 농도를 0.5에서 1.5까지 0.25  $\mu\text{M}$ 씩 증가시킨 HSA와 S-POH 혼합 용액을 37°C로 유지되는 컬럼 오븐에서 3시간 유지시켜 다른 시료를 제조하였다. 주입 부피는 HSA와 결합되지 않은 S-POH의 농도 측정으로 얻은 주입 부피로 한다. 주입 부피는 HSA와 S-POH의 혼합 용액의 용출곡선으로 선정할 수 있다. HSA와 결합되지 않은 S-POH의 농도를 계산하기 위하여 S-POH의 농도가 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0  $\mu\text{M}$ 인 시료에 대해서 피크의 높이를 실험적으로 측정하였다. 이 때 주입 부피는 앞서 결정한 주입 부피를 제한적 주입 방법을 이용하였고 S-POH의 농도의 변화에 따른 피크 높이를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

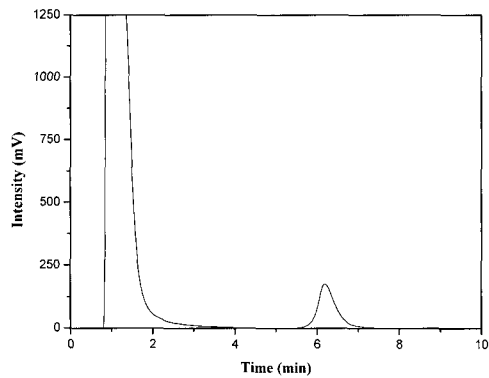
### 결합되지 않은 S-POH 농도의 결정

본 실험에서 주입 부피는 제한적 주입 방법에 의하여 시료 주입 루프에 시료를 컬럼에 주입하고자 하는 부피의 2~3배의 과량부피를 넣고, 유량과 주입시간을 조절하여 일정한 농도를 신속하게 주입하는 방법이다. 1회 주입 시에 사용되는 시료 양이 많게 되고 주입 루프의 용량이 커지게 되는 단점이 있지만, 주입되는 시료가 용매에 의하여 희석되지 않고, 일정한 농도로 컬럼으로 주입되는 장점이 있다. 컬럼에 주입되는 시료가 희석되면, 600  $\mu\text{l}$ 이상의 주입 부피에서도 S-POH의 용출곡선의 피크가 평평하게 되지 않고 단일 피크

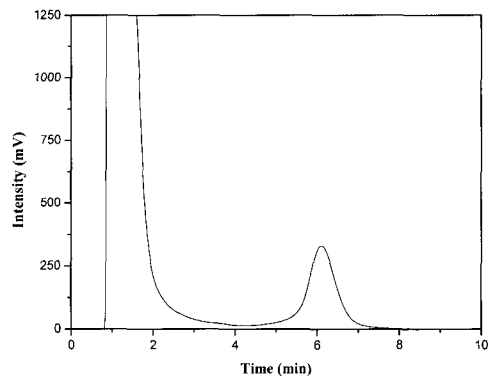
로 나타나기 때문이다. 따라서 본 실험과 같은 frontal analysis에서는 제한적 주입 방법을 이용하여 컬럼에 주입되는 시료의 농도를 일정하게 주입하는 것이 매우 중요하였다 (1, 17).

HSA와 S-POH의 결합력에 대한 지표로서 결합 배개변수를 구하고자 한다. 이러한 목적을 위해서 시료에서 HSA와

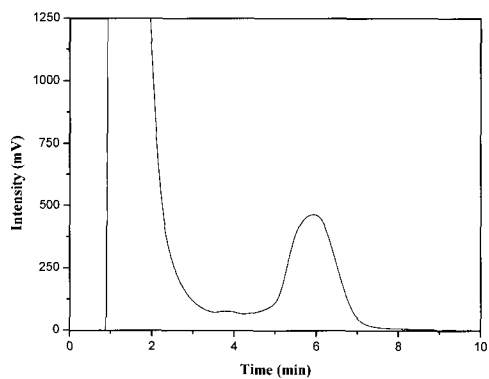
결합되지 않은 S-POH의 농도를 구해야 한다. 단일 실험으로는 HSA와 결합된 S-POH의 농도를 구할 수 없고 HSA와 S-POH의 농도에서, 주입 부피를 증가시키면서 실험을 수행하였다. HPFA 컬럼은 주로 물을 사용하였고, 결합 평형을 간단하도록 이동상은 인산완충용액만을 사용하는 HPFA 컬럼을 사용하였다. 컬럼에 HSA(350  $\mu$ M)와 S-POH(1.5  $\mu$ M)의



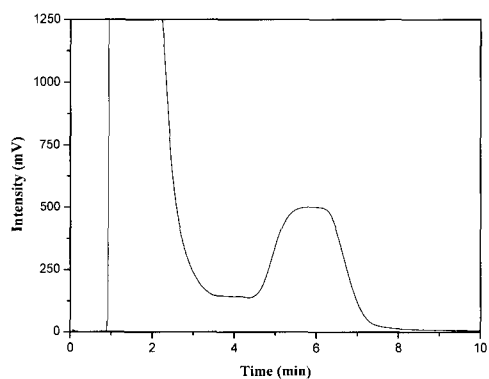
(a) 50  $\mu$ l



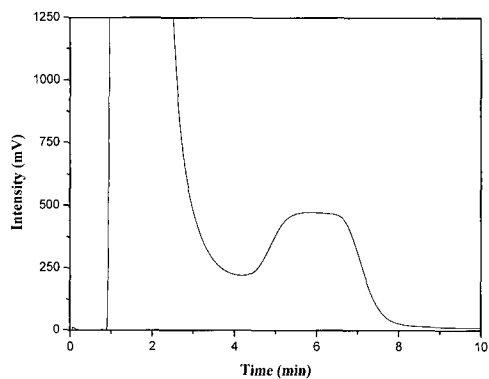
(b) 180  $\mu$ l



(c) 400  $\mu$ l



(d) 600  $\mu$ l



(e) 800  $\mu$ l

Figure 3. Effect of injection volume on elution profiles of 1.5  $\mu$ M S-POH and 350  $\mu$ M HSA mixed solution. (sodium phosphate buffer (pH=7.4, I=0.16), 1 ml/min flow rate, 205 nm UV wavelength, 50-800  $\mu$ l injection volume. at 37  $^{\circ}$ C)

결합된 시료를 주입하면, HPFA 컬럼 안에서 HSA와 S-POH 혼합 용액은 결합 평형에 의하여 재배치되어 분자 크기가 큰 HSA가 바로 용출이 되고, 분자 크기가 작은 S-POH가 이동상과 고정상에 의한 흡착과 탈착의 평형단계와 HSA와 S-POH의 결합에 의한 평형단계의 2번의 평형을 이룬 후 용출된다(18). Fig. 3는 주입 부피에 따른 HSA와 S-POH의 용출곡선이다. HSA가 먼저 용출되고 S-POH가 후에 나온다. 그림에서 보는 것처럼 시료의 주입 부피를 증가하여 실험을 하면 일정 주입 부피(예를 들면 이 실험에서는 600  $\mu\text{l}$ ) 이후로는 HSA 이후에 용출되는 S-POH의 용출곡선의 피크가 평평하게 되어 frontal analysis가 적용할 수 있다. Fig. 4는 주입 부피에 따른 피크 높이를 나타낸 그림이며, S-POH의 피크 높이는 600  $\mu\text{l}$ 보다 작은 주입 부피에서는 증가하였지만, 주입 부피가 600  $\mu\text{l}$  이상일 때는 피크 높이가 거의 일정하게 유지되었다. 이 주입 부피보다 많은 량의 주입 부피를 증가하게 되어도 주입 부피에 S-POH의 용출곡선의 피크 높이가 증가하지 않고 일정하게 유지된다. HSA과 결합되지 않은 최대의 S-POH의 농도는 S-POH의 용출곡선이 평평하게 되는 주입 부피 이후로는 증가하지 않고 일정하였다. 결과적으로 주입 부피가 600  $\mu\text{l}$  이상일 때 비로소 HSA과 결합되지 않은 S-POH의 농도가 최대가 됨을 알 수 있었다(19). 본 연구에서 600, 800  $\mu\text{l}$ 의 주입 부피로 Scatchard 분석을 수행하였다.

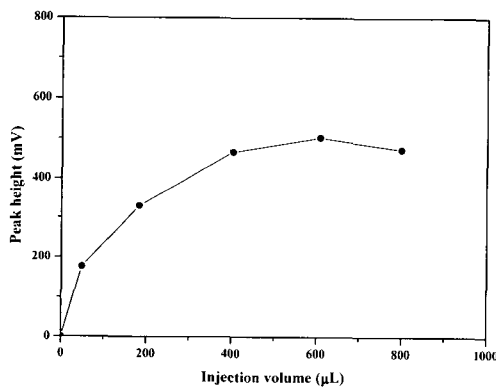


Figure 4. Relationship between peak height and injection volume of mixed sample(HSA and S-POH) solution. (sodium phosphate buffer (pH=7.4, I=0.16), 1 ml/min flow rate, 205 nm UV wavelength, 50-800  $\mu\text{l}$  injection volume at 37  $^{\circ}\text{C}$ )

**Scatchard 분석**

주입 부피가 600  $\mu\text{l}$  이상일 때, HSA와 결합되지 않은 평평한 영역에서의 S-POH의 농도를 측정 할 수 있다는 것을 알고, HSA의 농도를 일정하게 고정하고, S-POH의 농도에 따른 HSA에 결합하지 않은 S-POH의 농도를 측정하였다. Fig. 5에서는 HAS의 농도를 350  $\mu\text{M}$ 로 고정하고 S-POH의 농도는 0.5  $\mu\text{M}$ 에서 1.5  $\mu\text{M}$ 까지 0.25  $\mu\text{M}$ 로 변화시켜 혼합한 시료의 용출곡선을 나타내었다. Fig. 6에서 보는 것처럼 시료의 S-POH의 농도가 증가함에 따라서 각각의 시료의 S-POH의 피크 높이 증가함을 알 수 있었다. 용출곡선에서 시료의 S-POH의 농도 증가에 따른 피크 높이의 증가는 HSA와 결합

하는 S-POH의 농도가 증가함을 나타낸다. 또한, 주입 부피가 600  $\mu\text{l}$ 에서 5개의 다른 농도의 시료가 모두 HSA와 결합되지 않은 S-POH의 농도는 용출곡선 피크와 평평한 영역에서 얻을 수 있었다. HSA와 결합되지 않은 S-POH의 농도를 측정하기 위해서 S-POH의 농도에 따른 높이를 구하여 Scatchard analysis를 적용하였다. 따라서 S-POH의 농도가 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\mu\text{M}$ 인 5개의 시료의 농도와 용출곡선의 높이에 관한 실험식을 얻었다. Fig. 6에서는 S-POH의 농도와 용출곡선 높이의 관계를 나타내었고 실험식은 다음과 같이 표시되었다.

$$y = 0.0012796 x \tag{5}$$

x와 y는 용출곡선의 높이와 S-POH의 농도를 각기 나타내고, 이 실험식은 상관도( $r^2$ )는 0.9780으로 실험식과 매우 잘 일치하였다. Table 1에서는 HSA의 농도가 350  $\mu\text{M}$ 으로 고정하고 여러 가지 S-POH의 농도에 대해서 HSA에 결합되지 않거나 결합된 S-POH의 농도를 계산한 결과이다. 용출곡선의 높이는 S-POH의 농도가 증가함에 따라 증가한다.

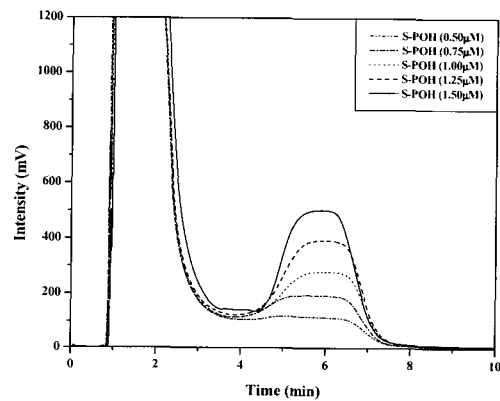


Figure 5 Chromatograms of HSA and S-POH with variation of S-POH concentration. (HSA (350  $\mu\text{M}$ ), sodium phosphate buffer (pH=7.4, I=0.16), 1 ml/min flow rate, 205 nm UV wavelength, 600  $\mu\text{l}$  injection volume at 37  $^{\circ}\text{C}$ )

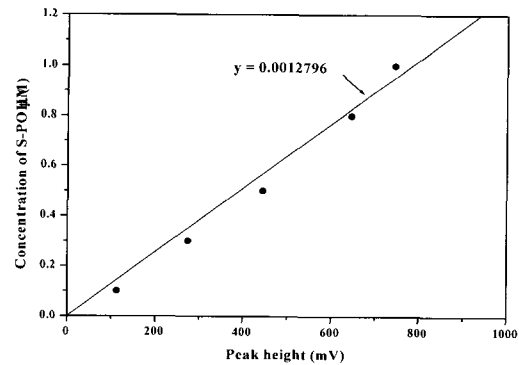


Figure 6. Correlation of peak height and S-POH concentration. (sodium phosphate buffer (pH=7.4, I=0.16), 1 ml/min flow rate, 205 nm UV wavelength, 600  $\mu\text{l}$  injection volume at 37  $^{\circ}\text{C}$ )

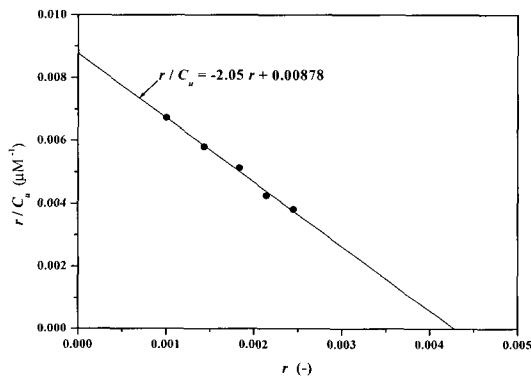
**Table 1.** Result of Scatchard analysis with different concentrations of S-POH

sample no.	concentration	average peak height [mV]	unbound drug [ $\mu\text{M}$ ]	bound drug [ $\mu\text{M}$ ]	$r$ [-]	$r/C_u$ [ $\mu\text{M}^{-1}$ ]
1	S-POH (0.50 $\mu\text{M}$ )	116.392	0.1489	0.3511	0.001003	0.006735
2	S-POH (0.75 $\mu\text{M}$ )	193.487	0.2476	0.5024	0.001435	0.005798
3	S-POH (1.00 $\mu\text{M}$ )	279.471	0.3576	0.6424	0.001835	0.005132
4	S-POH (1.25 $\mu\text{M}$ )	392.487	0.5022	0.7478	0.002136	0.004254
5	S-POH (1.50 $\mu\text{M}$ )	501.792	0.6421	0.8579	0.002451	0.003817

\* concentration of HSA fixed to 350  $\mu\text{M}$ .

\*\* term of average peak height : 5.69 - 6.09 (min)

결합 매개변수( $K$ )와 단위 HSA에 대한 결합 위치( $n$ )는 식 (1)을 이용하여 얻었다. Table 1에서는 각각의 시료에 대하여  $r$  과  $r/C_u$ 를 계산한 결과도 포함되어 있다. 이 결과를 식 (1)에 적용하면 Fig. 7과 같은 선형식을 얻을 수 있다. 결합 매개변수( $K$ )는  $2.05 \times 10^6$  [ $\text{M}^{-1}$ ]이고, 단위 HSA에 대한 S-POH의 결합 위치의 수( $n$ )는 0.00428이었고, 상관도( $r^2$ )는 0.9927이었다.



**Figure 7.** Scatchard plot for calculation of the binding constant between HSA and S-POH.

### 요 약

의학, 약학적으로 작용이 뛰어난 약리성분이 인체 내에서 상처 부위에 얼마나 빨리 도달하여 치료를 하는지를 알기 위하여 혈장 단백질과 약리성분의 결합력을 연구하는 새로운 연구 분야가 HPFA이다. 본 연구는 인체 내에 존재하는 혈장 단백질과 항암제로서 알려져 있는 (S)-perillyl alcohol의 결합력과 결합 매개변수를 구하기 위하여 on-line frontal analysis HPLC system을 적용하였다. Develosil 100 Diol 5 (10 cm x 4.6 mm I.D.)의 HPFA 컬럼을 이용하였고, 이동상은 인산완충용액(pH = 7.4, I = 0.17)을 이용하였다. UV wavelength 205 nm에서 실험을 수행하였고, 주입 부피는 본 실험 조건인 혈장 단백질이 350  $\mu\text{M}$ 일 경우에 최대의 혈장 단백질과 결합되지 않은 약리성분의 농도를 갖게 되는 600  $\mu\text{l}$ 으로 정하였다. Scatchard analysis를 통한 연구 결과로 혈장 단백질인 HSA와 (S)-perillyl alcohol의 결합 매개변수( $K$ )와 단위 HSA에 대한 S-POH의 결합 위치의 수( $n$ )는 각각  $K = 2.05 \times 10^6$  [ $\text{M}^{-1}$ ],  $n = 0.00428$ 로 실험적으로 구하였다.

### 감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 초정밀분리기술센터 연구비 지원에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Qiao, M., X. Guo, and F. Li (2002), Chemiluminescence detection coupled to high-performance frontal analysis for the determination of unbound concentrations of drugs in protein binding equilibrium, *J. Chromatogr. A* **952**, 131-138.
2. Shibukawa, A., N. Ishizawa, T. Kimura, Y. Sakamoto, K. Ogita, Y. Matsuo, Y. Kuroda, C. Matayatsuk, T. Nakagawa and I.W. Wainer (2002), Plasma protein binding study of oxybutynin by high-performance frontal analysis, *J. Chromatogr. B* **768**, 177-188.
3. Shibukawa, A., Y. Yoshikawa, T. Kimura, Y. Kuroda, T. Nakagawa, and I. W. Waine (2002), Binding study of desethyloxybutynin using high-performance frontal analysis method, *J. Chromatogr. B* **768**, 189-197.
4. Shibukawa, A., Y. Kuroda, and T. Nakagawa (1999), Development of high-performance frontal analysis and the application to the study of drug-plasma protein binding, *Trends Anal. Chem.* **18**(8), 549-556.
5. Shibukawa, A., T. Sawada, C. Nakao, T. Izumi, and T. Nakagawa (1995), High-performance frontal analysis for the study of protein binding of troglitazone (CS-045) in albumin solution and in human plasma, *J. Chromatogr. A* **697**, 337-343.
6. Shibukawa, A., Y. Kuroda, and T. Nakagawa (1999), High-performance frontal analysis for drug-protein binding study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**, 1047-1055
7. Crowell, P. L., R. R. Chang, Z. Ren, C. E. Elson, and M. N. Gould (1991), Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-Limonene and its metabolites, *J. Biol. Chem.* **266**, 17679-17685.
8. Crowell, P. L., W. S. Kennan, J. D. Haag, S. Ahmad, S. Vedejs, and M. N. Gould (1992), Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene, *Carcinogenesis* **13**, 1261-1264.
9. Crowell P. L., Z. Ren, S. Lin, E. Vedejs, and M.N. Gould (1994), Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation, *Biochem. Pharm.* **47**, 1405-1415.
10. Barthelman, M., W. Chen, H. L. Gensler, C. Huang, Z. Dong, and G. T. Bowden (1998), Inhibitory effects of perillyl alcohol on UVB induced murine skin cancer and AP-1 transactivation, *Cancer Res.* **58**, 711-716.
11. Stratton, S. P., R. T. Dorr, and D. S. Alberts (2000), The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer, *European J. Cancer* **36**, 1292-1297.

12. Lantry, L. E., Z. Zhang, F. Gao, K. A. Crist, Y. Wang, G. J. Kelloff, R. A. Lubet, and M. You (1997), Chemopreventive effect of perillyl alcohol on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced tumorigenesis in (C3H/HeJ X A/J) F1 mouse lung, *J. Cell Biochem.* **27**, 20-25.
13. Mills, J. J., R. S., Chari, I. J. Boyer, M. N. Gould, and R. L. Jirtle (1995), Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol, *Cancer Res.* **55**, 979-983.
14. Stark, M. J., Y. D. Burke, J. H. McKinzie, A. S. Ayoubi, and P.L. Crowell (1995), Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol, *Cancer Lett.* **96**, 15-21.
15. Pinkerton, T. C. (1991), High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection, *J. Chrom. A*, **544**, 13-23.
16. Rosas, M. E. R., A. Shibukawa, Y. Yoshikawa, Y. Kuroda, and T. Nakagawa (1999), Binding study of semotiadil and levosemotiadil with  $\alpha$ -acid glycoprotein using high-performance frontal analysis, *Anal. Biochem.* **274**, 27-33.
17. Anderson, D.J. (1993), High-Performance Liquid Chromatography (Direct Injection Techniques), *Anal. Chem.* **65**, 434R-443R.
18. Rosas, M. E. R., A. Shibukawa, K. Ueda, and T. Nakagawa (1997), Enantioselective protein binding of semotiadil and levosemotiadil determined by high-performance frontal analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 1595-1601.