



Doctoral Thesis

Beitrag zur Methodik und Auswertung der Proteinbindung von Arzneistoffen

Author(s):

Hämmig, Heinrich

Publication Date:

1978

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000312312> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH 6303

**Beitrag zur Methodik und Auswertung
der Proteinbindung von Arzneistoffen**

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

HEINRICH HÄMMIG
eidg. dipl. Apotheker
geboren am 12. August 1948
von Volketswil (Kt. Zürich)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H.G. Weder, Referent
Prof. Dr. K.H. Winterhalter, Korreferent

1978

7. Zusammenfassung

Die Bindung von Arzneistoffen an Proteine (vor allem Serumalbumin) ist ein wichtiger Parameter in der Pharmakokinetik. Eine einfache, schnelle, genaue und reproduzierbare Durchflussdialysemethode zur Bestimmung der Proteinbindung wurde entwickelt. Weitere Vorteile sind die Möglichkeit zur Automatisierung und die geringen Kosten, welche die Methode für klinisch-chemische Routineanalysen geeignet erscheinen lassen: Das Reaktionsgemisch aus Protein und Arzneistoff im Reaktionskompartiment wird durch eine für das Protein undurchlässige, für den Arzneistoff aber passierbare Membran vom Durchflusskompartiment getrennt. Während eine Pufferlösung das Durchflusskompartiment durchströmt, reichert sie sich durch Dialyse mit Arzneistoff an. Weil sich rasch ein konstantes Verhältnis (Fließgleichgewicht) zwischen der Konzentration c_{FC} im Dialysat und der freien Arzneistoffkonzentration F_{RC} im Reaktionskompartiment einstellt, ist eine quantitative Auswertung leicht möglich. Präzision und Reproduzierbarkeit der Resultate werden dabei vor allem durch die spezielle Geometrie der Dialysezelle bedingt.

Die Methode wurde durch Untersuchung der Dialysekinetik und durch Vergleich mit Gleichgewichtsdialysen abgesichert. Das Bindungsverhalten von 14 Arzneistoffen gegenüber Rinderserumalbumin wurde mit dieser Durchflussdialysemethode sowie mittels UV-Differenzspektroskopie untersucht. Um die gesammelten Daten optimal auswerten zu können, wurde ein einfaches, aber mathematisch korrektes Iterationsverfahren zur Bestimmung sowohl von Scatchardparametern (site binding constants) als auch von stöchiometrischen Assoziationskonstanten entwickelt. Das Verfahren ist für moderne Kleinrechenanlagen (z.B. Hewlett Packard 9825A) geeignet.

Alle gemessenen Bindungsisothermen konnten mit höchstens drei Scatchardparametern (mit ganzen Bindungsstellenzahlen) befriedigend beschrieben werden.

Die UV-Differenzspektren jedoch konnten nur mit stöchiometrischen Assoziationskonstanten korreliert werden, offenbar weil der Bindungsmechanismus im Differenzspektrum viel grössere Auswirkungen hat als in der Bindungsisotherme. Für einige sehr schwach an Serumalbumin bindende Arzneistoffe konnte überhaupt kein Zusammenhang zwischen Bindungsisotherme und Differenzspektrum hergestellt werden.

Für Phenylbutazon, das am eingehendsten untersucht wurde, scheint eine kooperative Interaktion mindestens zwischen der Bindung eines zweiten und eines dritten Ligandmoleküls gesichert; dieses Ergebnis wird im Zusammenhang mit Arbeiten anderer Autoren diskutiert.

Summary

The binding of drugs to protein (mainly serum albumine) is an important fact in pharmacokinetics. We have established a simple, fast, precise and reproducible technique for continuous dialysis to measure the binding of drugs to proteins. An automation of this low cost method is possible, therefore it can be used in clinical routine analysis. Protein and drug are mixed in the reaction chamber (RC). The RC is separated from the flow chamber (FC) by a semipermeable membrane, which is permeable to the drug. In the buffer solution which is pumped through the FC the drug increases by dialysis from the RC to the FC. A constant ratio (steady state) between the drug concentration c_{FC} in the dialysate and the free drug concentration F_{RC} in the RC allows to calculate free (F_{RC}) and bound (B_{RC}) drug in the RC. Accuracy and reproducibility of the results is very high due to the sophisticated design of the dialysis cell.

The kinetics of the continuous dialysis were examined and some experimental results were compared with equilibrium dialysis control experiments to confirm the reliability of the method.

The binding of 14 drugs to bovine serum albumine was investigated by the continuous dialysis method and by UV difference spectroscopy.

A simple but mathematically correct computer procedure was developed to obtain the total information content of the experimental data. The procedure is well performed on modern small computers (e.g. HP 9825A) and either "site binding constants" or stoichiometric association constants may be calculated.

Each observed binding isotherm could be described sufficiently by 3 (or less) site binding constants (class of binding sites). Nevertheless the UV difference spectras could only be correlated with stoichiometric association constants, perhaps

because of the sensitivity of the difference spectra to changes in the binding mechanism. The difference spectra of some weak bound drugs could not be correlated to the binding process.

Some additional investigations on the binding of phenylbutazone to bovine serum albumine showed clearly a cooperative process at least between the binding of the second and the third molecule; these findings were discussed in relation to the results of other authors.