

DPP-4 抑制剂 LGT-6 在不同种属血浆中蛋白结合率的比较[△]

廖伟科^{1,2*}, 杨华丽³, 王忠元³, 陈瑞^{1,2}, 汤磊^{1,2}, 崔杏^{1,2}, 朱高峰^{1,2#}(1.贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550004; 2.贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3.贵州省人民医院药剂科, 贵阳 550002)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)14-1728-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.14.11

摘要 目的:建立二肽基肽酶4抑制剂 LGT-6 在不同种属血浆中蛋白结合率的测定方法并比较差异。方法:采用平衡透析法,以磷酸盐缓冲液为透析外液,将 3、30、300、3 000 nmol/L 的 LGT-6 分别在大鼠、猴、人血浆(即透析内液)中平衡 48 h。以甲苯磺丁脲为内标,采用超高效液相色谱-串联质谱法测定透析内、外液中 LGT-6 的浓度,计算血浆蛋白结合率。以 ACQUITY UPLC HSS T3 为色谱柱,以水(含 0.01% 甲酸)-乙腈(含 0.01% 甲酸)为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.6 mL/min,柱温为 40 ℃,进样量为 2 μL;离子源为电喷雾离子源,监测模式为多反应监测模式,采集模式为正离子模式,定量分析用离子对分别为 m/z 487.0→434.3 (LGT-6)、 m/z 271.1→172.0(内标)。结果:在 3、30、300、3 000 nmol/L 浓度下,LGT-6 在大鼠血浆中的蛋白结合率分别为(96.25±0.97)%、(84.16±1.24)%、(78.25±0.61)%、(66.63±0.95)%,在猴血浆中的蛋白结合率分别为(98.54±0.58)%、(87.27±1.01)%、(79.35±0.86)%、(66.69±0.54)%,在人血浆中的蛋白结合率分别为(99.40±1.03)%、(84.48±1.15)%、(77.62±0.77)%、(66.93±0.48)%。在相同浓度下,LGT-6 在大鼠、猴和人血浆中的蛋白结合率没有明显差异($P>0.05$);在相同种属血浆中,不同浓度 LGT-6 的血浆蛋白结合率组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),且有随药物浓度的升高而降低的趋势。结论:成功建立了测定 LGT-6 血浆蛋白结合率的方法。在相同浓度下,LGT-6 在大鼠、猴、人血浆中的蛋白结合率没有明显的种属差异,但有明显的浓度依赖趋势。

关键词 二肽基肽酶4抑制剂;LGT-6;平衡透析法;超高效液相色谱-串联质谱法;血浆蛋白结合率;不同种属血浆

Comparison of Protein Binding Rate of DPP-4 Inhibitor LGT-6 in Different Species of Plasma

LIAO Weike^{1,2}, YANG Huali³, WANG Zhongyuan³, CHEN Rui^{1,2}, TANG Lei^{1,2}, CUI Xing^{1,2}, ZHU Gaofeng^{1,2}
(1. Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang 550004, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Dept. of Pharmacy, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for determining protein binding rate of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor LGT-6 in different species of plasma, and to compare their difference. METHODS: By equilibrium dialysis, LGT-6 (3, 30, 300, 3 000 nmol/L) was equilibrated in rat, monkey and human plasma (i. e. internal dialysis solution) for 48 h, using phosphate buffer as the external dialysis solution. The concentration of LGT-6 in internal and external dialysis solution was determined by UPLC-MS/MS using tolbutamide as internal standard, and the plasma protein binding rate was calculated. The determination was performed on ACQUITY UPLC HSS T3 column with water (containing 0.01% formic acid)-acetonitrile (containing 0.01% formic acid) as mobile phase at the flow rate of 0.6 mL/min. The column temperature was 40 ℃, and the sample size was 2 μL. The ion source was electrospray ion source, and the multiple ion monitoring mode was used to carry out positive ionization scanning. The ion pairs for quantitative analysis were m/z 487.0→434.3 (LGT-6), m/z 271.1→172.0 (internal standard), respectively. RESULTS: At the concentrations of 3, 30, 300, and 3 000 nmol/L, the protein binding rates of LGT-6 in rat plasma were (96.25±0.97)%, (84.16±1.24)%, (78.25±0.61)%, (66.63±0.95)%; the protein protein binding rates in monkey plasma were (98.54±0.58)%, (87.27±1.01)%, (79.35±0.86)%, (66.69±0.54)%; the protein binding rates in human plasma were (99.40±1.03)%, (84.48±1.15)%, (77.62±0.77)%, (66.93±0.48)%. At the same concentration, the protein binding rates of LGT-6 in rat, monkey and human plasma had no significant difference ($P>0.05$). In the same species of plasma, there were significant differences in the

[△] 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合支撑[2019]2761号);贵州省高层次创新型人才“百层次人才”项目(No.黔科合平台人才[2016]4015)

* 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:创新药物研发。电话:0851-86908318。E-mail:641212891@qq.com

通信作者:高级实验师,硕士生导师,硕士。研究方向:药物分析与药动学。电话:0851-86908318。E-mail:64949824@qq.com

plasma protein binding rates of different concentration of LGT-6 among those groups ($P<0.05$), and it decreased with the increase of drug concentration. CONCLUSIONS: The method for the determination of plasma protein binding rate of LGT-6 is successfully established. The data revealed that the protein binding rate of LGT-6 is concentration-dependent, there was no obvious species difference on protein binding

rates of LGT-6 in rat, monkey and human plasma under the same concentration.

KEYWORDS Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor; LGT-6; Balanced dialysis; UPLC-MS/MS; Plasma protein binding rate; Different species of plasma

随着发病率和致死率的逐年上升,糖尿病已成为全球最大的公共卫生事件之一^[1]。相比于传统的双胍类、磺酰脲类、噻唑烷酮类、美脲类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、胰岛素(易引起体质量增加、胃肠道不适、低血糖风险高等)和新型治疗药物胰高血糖素样肽1受体激动剂(需皮下注射给药)、钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂(存在潜在的降低血压及引起生殖感染的风险)等,二肽基肽酶4(DPP-4)抑制剂以其独特的降糖机制以及较高的安全性引起了人们越来越多的关注^[2-8]。经典的DPP-4抑制剂如沙格列汀、阿格列汀等均为每天给药1次。然而,2型糖尿病是需要终身服药的慢性代谢性疾病,患者对该病的治疗需求已经逐渐从每天给药1次向每周给药1次转变^[9-10]。尽管长效抑制剂格列汀和奥格列汀已于2015年在日本获批上市^[11-2],然而其原研企业均表示不会再寻求每周给药1次的糖尿病药物在除日本以外的国家上市^[11-12]。因此,研发出具有自主知识产权的长效DPP-4抑制剂对于提高患者用药依从性、降低长期给药可能带来的严重副反应等具有重要研究意义。

LGT-6的化学名为8-[(3R)-3-氨基-1-哌啶基]-7-(2-丁炔-1-基)-3,7-二氢-3-甲基-1-[1-(4-甲基噻唑啉-2-基)乙基]-1H-嘌呤-2,6-酮(结构式见图1),是本课题组前期以利格列汀为先导化合物,经过化学结构修饰而获得的DPP-4抑制剂,其降糖活性、药动学性质均优于利格列汀^[13]。药物的血浆蛋白结合率是指药物入血后与血浆中所有蛋白结合的量占药物总量的百分比,是反映药物在体内吸收、分布、代谢、排泄过程的重要药动学参数之一。药物被吸收后,只有没有与血浆蛋白结合的游离药物才能通过生物膜并作用于靶器官而发挥药理作用,故测定药物与血浆蛋白的结合率在新药研发及临床研究中非常重要^[14-15]。血浆蛋白结合会影响药物在组织和血液中的药动学特征以及后期相关制剂的给药方案;此外,血浆蛋白结合率也是设置人体暴露安全范围和临床试验剂量的重要依据。为此,本研究采用平衡透析法结合超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定LGT-6在不同种属血浆中的蛋白结合率,为该化合物后期的药效学、药理学和临床研究提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LC-30AD型UPLC仪(日本Shimadzu公司)、TQ-6500+型质谱检测仪(美国AB Sciex公司)、Thermo型恒温培养箱(上海一恒仪器有限

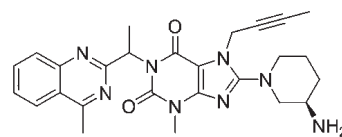


图1 DPP-4抑制剂LGT-6结构式

Fig 1 Structure of DPP-4 inhibitor LGT-6

公司)、JN300-2型氮气吹扫仪(苏州吉米诺仪器有限公司)、X1型高速离心机(香港基因有限公司)、FA805N型十万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司)、HH-2型数显恒温水浴锅(邦西仪器科技有限公司)、HC-100型制冷型恒温混匀仪(北京昊诺斯科技有限公司)、DW-86L486型-80℃立式超低温保存箱和BCD-248WDPM型-20℃冰箱(青岛海尔集团)等。

1.2 主要药品与试剂

LGT-6对照品(批号20200804)由贵州医科大学高等药物化学重点实验室合成,经高效液相色谱和核磁共振结构鉴定纯度>99.0%;甲苯磺丁脲对照品(内标,批号HY-B0401-46070,纯度>99.0%)购自美国MedChem-Express公司;透析袋(截留分子量8~14 kDa)购自北京兰杰柯科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇、乙腈、乙酸乙酯和甲酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,实验用水为蒸馏水。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级SD大鼠,雌雄各半,12周龄,体质量为200~230 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0014。

1.4 血浆

健康人血浆(货号PL030320T)由北京四正柏生物科技有限公司提供;猴血浆由美迪西普亚医药科技上海有限公司提供;大鼠血浆取自“1.3”项下SD大鼠。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

以ACQUITY UPLC HSS T3(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)为色谱柱,以水(含0.01%甲酸)为流动相A、乙腈(含0.01%甲酸)为流动相B进行梯度洗脱(0~2 min, 10%B; 2~7 min, 10%B→95%B; 7~9 min, 95%B; 9~11 min, 95%B→10%B, 11~14 min, 10%B);流速为0.6 mL/min;柱温为40℃;自动进样器温度为4℃;进样量为2 μL。

离子源为电喷雾离子源,离子源电压为5 500 V,离

子源温度为 500 ℃;采用多反应监测模式,采集模式为正离子模式;气帘气压力为 20 psi,雾化气压力为 50 psi,辅助加热气压力为 60 psi;LGT-6 的去簇电压为 134 V,碰撞电压为 34 V,入口电压为 10 V,碰撞室出口电压为 10 V,定量分析用离子对为 m/z 487.0→434.3;内标的去簇电压为 70 V,碰撞电压为 18 V,入口电压为 10 V,碰撞室出口电压为 10 V,定量分析用离子对为 m/z 271.1→172.0。

2.2 溶液的制备

精密称取 LGT-6 对照品和内标对照品各适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇 0.2 mL 使其溶解,再以 PBS 定容,摇匀,制成浓度均为 100 μmol/L 的 LGT-6、内标贮备液。

2.3 大鼠血浆的采集

取 SD 大鼠 12 只,雌雄各半,于股动脉取血 2 mL,置于装有肝素钠溶液的 EP 管中,于 4 ℃ 下以 3 500 r/min 离心 10 min,分离上层血浆,于 -80 ℃ 冷冻贮存,备用。

2.4 样品处理

取透析内液(血浆样品)与透析外液(PBS)各 100 μL,分别置于 EP 管中,依次加入甲醇 600 μL、内标贮备液 100 μL,涡旋混匀后,于 4 ℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于 37 ℃ 下用氮气流吹干,残渣加水 400 μL、乙酸乙酯 600 μL 复溶,涡旋混匀,静置分层后,取乙酸乙酯层,于 37 ℃ 下用氮气流吹干,残渣再用甲醇 100 μL 复溶,于 4 ℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按“2.1”项下条件进样测定。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 分别取空白透析外液(PBS)和大鼠、猴、人空白血浆各适量,以甲醇替代内标,其余按“2.4”项下方法处理,制成空白透析外液样品和大鼠、猴、人的空白血浆样品(下同)。取 LGT-6 对照品和内标对照品各适量,以甲醇溶解稀释制成 LGT-6 浓度为 10 mmol/L、内标浓度为 1 mmol/L 的混合对照品溶液。将 LGT-6 浓度为 300 nmol/L 的 PBS 与人、猴和大鼠的空白血浆平衡 48 h 后,取透析内液按“2.4”项下方法处理,制成血浆样品。将空白透析外液样品、空白血浆样品、混合对照品溶液、血浆样品按“2.1”项下条件进样测定,记录色谱图,结果见图 2(因为人、猴与大鼠的空白血浆样品、血浆样品色谱图基本一致,所以省略人和猴的血浆样品色谱图,以大鼠血浆样品的色谱图作为代表)。由图 2 可见,LGT-6 和内标色谱峰的峰形良好,保留时间分别约为 7.5、8.7 min,血浆中的内源性物质和空白透析外液均不干扰 LGT-6 的分析测定,表明方法专属性良好。

2.5.2 标准曲线绘制 精密量取“2.2”项下 LGT-6 贮备液,用 PBS 逐级稀释制成浓度分别为 18 000、6 000、

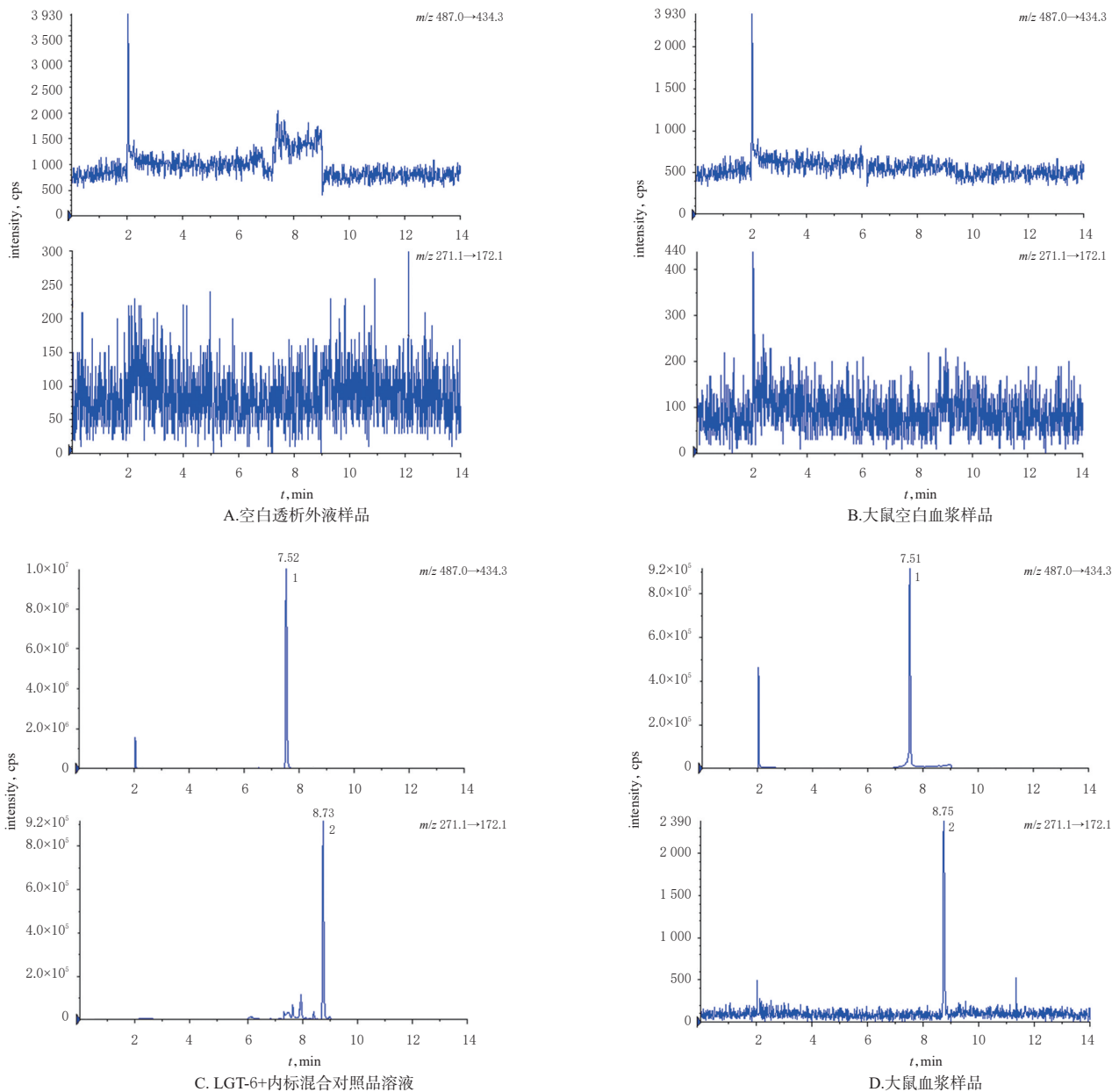
2 000、600、200、60、20 nmol/L 的系列样品溶液。取上述系列样品溶液各 50 μL,分别加入大鼠、猴和人空白血浆 950 μL,涡旋混匀。各取上述血浆样品 100 μL,按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积。以 LGT-6 的浓度为横坐标(c , nmol/L)、LGT-6 与内标峰面积的比值为纵坐标(y),采用加权最小二乘法(加权系数为 $1/c$)进行线性回归。结果,LGT-6 在大鼠、猴、人血浆中的回归方程分别为 $y=1.28c+0.36(R^2=0.9989)$ 、 $y=1.09c+0.27(R^2=0.9991)$ 、 $y=1.32c+0.45(R^2=0.9985)$,其检测浓度的线性范围均为 1~900 nmol/L,定量下限均为 1 nmol/L。

2.5.3 精密度与准确度试验 按“2.5.2”项下方法制备 LGT-6 定量下限浓度(1 nmol/L)和低、中、高浓度(3、50、720 nmol/L)的质控样品各 6 份,按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积,考察日内精密度;连续测定 5 d,考察日间精密度。以实测浓度与理论浓度的百分比考察准确度。结果,LGT-6 定量下限浓度和低、中、高浓度质控样品在大鼠、猴和人血浆中的日内、日间 RSD 均小于 10%,准确度为 90.46%~105.77%,符合生物样品定量分析方法的相关要求^[6],详见表 1。

2.5.4 基质效应试验 取大鼠、猴、人空白血浆各适量,按“2.4”项下方法处理后,加入相应浓度的 LGT-6 样品溶液 100 μL,制成 LGT-6 低、中、高浓度(3、50、720 nmol/L)的质控样品各 6 份,按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积(A_1)。以甲醇为溶剂,配制与前者浓度对应的 LGT-6 对照品溶液各 6 份,按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积(A_2),按如下公式计算基质效应:基质效应= $A_1/A_2 \times 100\%$ 。结果,LGT-6 低、中、高浓度质控样品的基质效应均符合生物样品定量分析方法的相关要求^[6],详见表 2。

2.5.5 稳定性试验 按“2.5.2”项下方法制备 LGT-6 低、中、高浓度(3、50、720 nmol/L)的质控样品,分别置于 4 ℃ 下冷藏 12 h、室温(约 20 ℃)下静置 12 h、反复冻融(4~37 ℃)3 次后,按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积。每样品平行 6 份,考察其稳定性。结果,各质控样品中 LGT-6 含量的 RSD 均小于 10%,表明其在上述条件下稳定性良好,详见表 3。

2.5.6 稀释可靠性考察 按“2.5.2”项下方法制备 LGT-6 浓度为 3 600 nmol/L 的标准血浆样品,用 PBS 稀释 5 倍至质控样品浓度(720 nmol/L),每浓度平行 6 份。按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算 LGT-6 浓度,再计算准确度和精密度。结果,准确度为 103.77%~105.27%,精密度 RSD 均小于 10%,表明用 PBS 稀释血浆样品不影响血浆样品的定量准确性,详见表 4。



注: 1. LGT-6; 2. 内标

Note: 1. LGT-6; 2. internal standard

图2 LGT-6和内标的典型MRM图

Fig 2 Typical MRM chromatograms of LGT-6 and internal standard

2.6 平衡渗透实验

2.6.1 透析袋吸附能力的测定 透析袋先用水浸泡1 h,再用20%乙醇浸泡20 min,结束后用水冲洗3次,于4℃保存,备用(透析袋处理方法下同)。参照文献[17]方法确证透析袋的吸附能力:取空白血浆1.0 mL(V_1)加入透析袋内,放入LGT-6浓度分别为3、30、300、3 000 nmol/L(c_1)的PBS溶液(配制方法同“2.5.2”项)30 mL(V_2)中,置于37℃恒温培养箱中平衡,每浓度平行6份。取上述透析外液,按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算药物浓度(c_2),并按如下公式计算吸附率:吸附率

(%) = $\frac{[c_1 \times V_1 - c_2 \times (V_1 + V_2)]}{(c_1 \times V_2)} \times 100\%$ 。结果,透析袋对LGT-6的吸附率均不超过4%,表明该透析袋对LGT-6只有微量吸附,不会对测试造成显著影响^[16],详见表5。

2.6.2 平衡时间的确定 将处理后的透析袋一端结扎,朝袋中加入空白血浆1 mL,排除空气后将另一端也结扎。将透析袋悬浮于装有PBS溶液(其中LGT-6的浓度分别为3、30、300、3 000 nmol/L)30 mL的广口瓶中,放入37℃恒温培养箱中进行透析,分别于4、8、12、24、48、72 h时取透析内液和透析外液,按“2.4”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积,代入回归方

表1 LGT-6的精密性与准确度试验结果(%)

Tab 1 Results of precision and accuracy tests of LGT-6(%)

种属	理论浓度, nmol/L	日内RSD(n=6)	日间RSD(n=5)	准确度(n=6)
大鼠	1	3.58	8.21	90.46
	3	2.59	9.03	92.05
	50	3.21	7.50	101.82
	720	4.05	7.36	105.77
猴	1	2.69	7.84	91.63
	3	2.74	4.27	91.26
	50	5.46	6.09	96.83
	720	3.98	8.13	102.34
人	1	4.01	5.99	93.00
	3	3.56	4.04	94.55
	50	6.88	5.71	103.71
	720	4.50	6.72	98.59

表2 LGT-6的基质效应试验结果($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

Tab 2 Results of matrix effect tests of LGT-6($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

种属	3 nmol/L	50 nmol/L	720 nmol/L
大鼠	94.64 ± 2.31	96.12 ± 8.14	90.01 ± 4.34
猴	103.85 ± 5.33	93.49 ± 4.38	96.75 ± 5.71
人	94.54 ± 6.35	97.07 ± 3.95	95.09 ± 3.22

表3 LGT-6的稳定性试验结果(n=6, %)

Tab 3 Results of stability tests of LGT-6(n=6, %)

种属	理论浓度, nmol/L	RSD		
		4 °C冷藏12 h	室温静置12 h	反复冻融3次
大鼠	3	5.32	4.78	4.12
	50	3.18	5.00	3.27
	720	4.01	5.66	6.70
猴	3	4.26	4.09	4.98
	50	3.05	4.8	5.92
	720	5.02	4.91	6.53
人	3	2.07	3.41	5.01
	50	5.25	6.70	4.65
	720	2.75	4.88	5.19

表4 LGT-6的稀释可靠性考察结果(n=6, %)

Tab 4 Investigation results of dilution reliability of LGT-6(n=6, %)

种属	浓度, nmol/L	准确度	精密度的RSD
大鼠	720	104.28	3.94
猴	720	105.27	5.02
人	720	103.77	3.68

表5 透析袋对不同浓度LGT-6的吸附率结果($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

Tab 5 Adsorption rate result of different concentrations of LGT-6 by dialysis bag($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

种属	3 nmol/L	30 nmol/L	300 nmol/L	3 000 nmol/L
大鼠	1.25 ± 0.97	2.16 ± 0.22	0.65 ± 0.11	3.30 ± 0.95
猴	0.54 ± 0.28	1.27 ± 0.45	2.35 ± 0.86	2.69 ± 0.14
人	1.40 ± 0.63	1.48 ± 0.23	3.45 ± 0.20	2.13 ± 0.68

程计算其中LGT-6浓度,并按如下公式计算血浆蛋白结合率:蛋白结合率(%) = $(D_i - D_f) / D_i \times 100\%$ (式中, D_i 为透析内液的药物浓度; D_f 为透析外液的药物浓度,即游

离药物浓度)。结果,平衡48 h时,LGT-6的血浆蛋白结合率与72 h时比较无明显差异,说明48 h时透析已经达到平衡状态,因此将平衡时间定为48 h,详见表6。

表6 不同平衡时间对LGT-6血浆蛋白结合率的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 6 Effects of different equilibration time on protein binding rate of different concentration of LGT-6($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

LGT-6浓度, nmol/L	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
3	81.04 ± 2.38	88.60 ± 4.65	93.07 ± 1.20	96.25 ± 0.97	96.32 ± 2.45
30	69.24 ± 1.95	76.85 ± 2.04	81.36 ± 3.76	84.16 ± 1.24	83.81 ± 1.72
300	63.16 ± 1.54	71.03 ± 3.11	75.58 ± 2.63	78.25 ± 0.61	78.54 ± 2.74
3 000	51.53 ± 1.39	58.98 ± 2.60	63.04 ± 1.44	66.63 ± 0.95	66.82 ± 3.06

2.6.3 药物血浆蛋白结合率的测定 将处理后的透析袋一端结扎,朝袋中精密加入空白血浆1 mL,固定透析袋的另一端,使透析袋保持垂直且内有一定的空气,再将透析袋悬浮于装有PBS(其中LGT-6的浓度分别为3、30、300、3 000 nmol/L) 10 mL的平底玻璃管中,调节透析袋内、外液面,使两者保持在同一平面上,并且确保透析袋不接触管壁,最后将管口密封,在4 °C下平衡静置48 h。在透析结束后,精密量取透析内液和透析外液(先用10%的高氯酸溶液检测是否有蛋白外漏,有外漏的样品舍弃)各100 μL,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.1”项下条件进样测定5次,记录峰面积,代入回归方程计算其中LGT-6浓度。同时,考虑到LGT-6浓度为3 000 nmol/L的样品浓度超出方法学线性浓度范围,取3 000 nmol/L的样品时,先用空白血浆或PBS稀释5倍后,再同法处理、分析。各样品中LGT-6蛋白结合率的计算同“2.6.2”项,结果见表7。

表7 不同浓度LGT-6在大鼠、猴和人血浆中的蛋白结合率测定结果($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Tab 7 Protein binding rates of different concentrations of LGT-6 in rat, monkey and human plasma($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

种属	3 nmol/L	30 nmol/L	300 nmol/L	3 000 nmol/L	F	P
大鼠	96.25 ± 0.97	84.16 ± 1.24	78.25 ± 0.61	66.63 ± 0.95	323.0	<0.000 1
猴	98.54 ± 0.58	87.27 ± 1.01	79.35 ± 0.86	66.69 ± 0.54	323.0	<0.000 1
人	99.40 ± 1.03	84.48 ± 1.15	77.62 ± 0.77	66.93 ± 0.48	323.0	<0.000 1

使用GraphPad Prism v 7.0软件,对相同浓度下不同种属和相同种属下不同浓度LGT-6的血浆蛋白结合率进行单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果,在相同浓度下,LGT-6在大鼠、猴、人血浆中的蛋白结合率比较差异无统计学意义($P>0.05$);在相同种属血浆中,不同浓度LGT-6的血浆蛋白结合率组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),且有随着药物浓度的升高而降低的趋势。

3 讨论

药物由于受各种复杂多变的环境(例如酶、酸碱等条件)所影响,其血浆蛋白结合率会发生改变,导致药物在体内的分布及消除发生改变,随之影响靶组织中游离药物的浓度,从而使药物药效及毒性发生变化^[18]。因此,在新药的开发阶段进行血浆蛋白结合率的研究具有重要意义。目前,用于测定药物血浆蛋白结合率的方法有很多,包括平衡透析法、超滤法、凝胶过滤法、超速离心法和白蛋白微球测定法等,其中平衡透析法是较为经典、常用的方法^[19]。该法操作简单、吸附作用较小、干扰因素较少^[19],因此本研究选择了平衡透析法。

本研究采用平衡透析法结合 UPLC-MS/MS 法测定 4 种不同浓度 LGT-6 在大鼠、猴和人血浆中的蛋白结合率。结果显示,在相同浓度下,LGT-6 在大鼠、猴和人血浆中的蛋白结合率没有明显差异,表明 LGT-6 与上述血浆蛋白的结合没有明显的种属差异。在相同种属血浆中,LGT-6 与血浆蛋白的结合有随浓度升高而降低的趋势。其中,在低浓度时,其血浆蛋白结合率较高,表明低浓度 LGT-6 与 DPP-4 的结合呈现高亲和力;随着 LGT-6 浓度的升高,LGT-6 与 DPP-4 的结合逐渐达到饱和,血浆中游离的 LGT-6 浓度随着药物浓度的增加而进一步增加,导致其在各种属血浆中的蛋白结合率有所下降。此外,由于 LGT-6 在低浓度下有很强的血浆蛋白结合能力,因此,笔者在接下来的研究中需选择在临床有可能联合应用的高血浆蛋白结合率药物进行体外药物竞争结合实验,以考察其对 LGT-6 蛋白结合率的影响,保证临床用药安全。

综上所述,本研究成功建立了测定 LGT-6 血浆蛋白结合率的方法。在相同的浓度下,LGT-6 在大鼠、猴、人血浆中的蛋白结合率没有明显的种属差异,但有明显的浓度依赖趋势。

参考文献

[1] GUARIGUATA L, WHITING D R, HAMBLETON I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2):137-149.

[2] TAHRANI A A, BAILEY C J, DEL P S, et al. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment[J]. *Lancet*, 2011, 378(9786):182-197.

[3] REUSCH J E, MANSON J E, JOANN E M. Management of type 2 diabetes in 2017: getting to goal[J]. *JAMA*, 2017, 317(10):1015-1016.

[4] DEACON C F, LEBOVITZ H E. Comparative review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulphonylureas[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, 18(4):333-347.

[5] ANTZA C, NIRANTHARAKUMAR K, DOUNDOULAKIS

I. The development of an oral GLP-1 receptor agonist for the management of type 2 diabetes: evidence to date[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 22(13):2985-2996.

[6] KELLY M S, LEWIS J, HUNTSBERRY A M, et al. Efficacy and renal outcomes of SGLT2 inhibitors in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease[J]. *Postgrad Med*, 2019, 131(1):31-42.

[7] SINGH M, ANOOOP K. Risks associated with SGLT2 inhibitors: an overview[J]. *Curr Drug Saf*, 2018, 13(2):84-91.

[8] LI N, WANG L J, JIANG B, et al. Recent progress of the development of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151:145-157.

[9] SUZUKI K, HASEGAW K, WATANABE M. Efficacy and patient satisfaction of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor after switching from once-daily DPP-4 inhibitor to once-weekly regimen[J]. *J Clin Med Res*, 2018, 10(8):641-647.

[10] STOIMENIS D, KARAGIANNIS T, KATSOULA A, et al. Once-weekly dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(9):843-851.

[11] BURNES C B. Omarigliptin: first global approval[J]. *Drugs*, 2015, 75(16):1947-1952.

[12] MCKEAGE K. Trelagliptin: first global approval[J]. *Drugs*, 2015, 75(10):1161-1164.

[13] 廖伟科, 汤磊, 郑萍, 等. 黄嘌呤类化合物及药物组合物和应用, 中国: ZL201810134311.5[P]. 2020-01-17.

[14] 张伦会, 曾敏, 杜美容, 等. 抗肿瘤新化合物 LS-177 在不同种属中血浆蛋白结合率的测定[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(2):221-228.

[15] 陈茂林, 周世文. 超滤法结合高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑蛋白结合率[J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(8):727-731.

[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:466-472.

[17] 巩泉泉, 刘萍, 徐华雷, 等. 去铁酮大鼠血浆蛋白结合率的实验研究[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2009, 47(12):130-132.

[18] KRATOCHWIL N A, HUBER W, MÜLLER F, et al. Predicting plasma protein binding of drugs: revisited[J]. *Curr Opin Drug Disc*, 2004, 7(4):507-512.

[19] 马智宇. 新剂型药物血浆中游离药物浓度研究方法概述[J]. *上海医药*, 2019, 40(7):74-77.

(收稿日期:2021-02-04 修回日期:2021-05-26)

(编辑:邹丽娟)