

葡聚糖木炭吸附法测定多肽类候选药物的血浆蛋白结合率

张莉¹, 江程^{1,2}, 陈思敏¹, 姚婷¹, 向宁铃¹, 苏梦翔^{1,2*}, 狄斌^{1,2}(¹中国药科大学药学院, 南京 210009; ²江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 南京 210009)

摘要 由于某些多肽类药物在半透膜上具有非特异性吸附或者在血浆中的稳定性较差, 在测定其蛋白结合率时不能适用于经典的平衡透析法和超滤法。运用葡聚糖木炭吸附法结合液质联用技术, 基于候选药物吸附至葡聚糖木炭的初始速率动力学原理, 选择7条具有相同氨基酸序列、不同构型的磷酸化六肽为研究模型肽, 测定了其在大鼠血浆中的蛋白结合率, 总结了影响多肽候选药物蛋白结合率变化的氨基酸位点规律。研究表明, 葡聚糖木炭吸附法作为一种血浆蛋白结合率测定的补充方法, 适用于传统实验技术无法测定的多肽或者有机候选药物。

关键词 多肽药物; 血浆蛋白结合率; 葡聚糖木炭吸附法; 成药性评价; 液相色谱-质谱联用

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)05-0522-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200503

引用本文 张莉, 江程, 陈思敏, 等. 葡聚糖木炭吸附法测定多肽类候选药物的血浆蛋白结合率[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(5): 522 - 529.

Cite this article as: ZHANG Li, JIANG Cheng, CHEN Simin, *et al.* Determination of plasma protein binding of peptide drug candidates by dextran-coated charcoal[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(5): 522 - 529.

Determination of plasma protein binding of peptide drug candidates by dextran-coated charcoal

ZHANG Li¹, JIANG Cheng^{1,2}, CHEN Simin¹, YAO Ting¹, Xiang Ningling¹, SU Mengxiang^{1,2*}, DI Bin^{1,2}¹School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;²Jiangsu Key Laboratory of Drug Molecular Design and Drug Optimization, Nanjing 210009, China

Abstract The conventional equilibrium dialysis and ultrafiltration methods cannot be used to determine the protein binding of some peptides because of their non-specific adsorption on the semipermeable membrane or poor stability in the plasma. The method of dextran-coated charcoal adsorption combined with LC-MS/MS were used. Based on the kinetic principle of initial rate of candidate drugs absorbed to dextran-coated charcoal, seven phosphorylated peptides with the same amino acid sequence and different configurations in rat plasma were selected as the study model using; the protein binding in rat plasma were determined; the amino acid distribution rules affecting the changes in protein binding rates of peptide candidate drugs were summarized. The results suggest that the dextran charcoal adsorption method, as a supplementary method for the determination of plasma protein binding, is suitable for peptides or organic drug candidates that cannot be determined by traditional techniques.

Key words peptides; plasma protein binding; dextran-coated charcoal adsorption; druggability evaluation; LC-MS/MS

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872833, No. 81773693)

研究候选药物血浆蛋白结合率(plasma protein binding, PPB)是评价药物成药性的重要指标^[1]。游离药物进入血液循环后会不同程度地与血浆蛋白结合成为结合型药物;两种形式的药物

收稿日期 2020-06-02 * 通信作者 Tel: 025-83271350 E-mail: sumengxiang@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81872833, No. 81773693)

处于动态平衡中,影响药物的吸收、分布、代谢及排泄,进而影响药物的半衰期和药效^[2]。现有的血浆蛋白结合率测定方法有平衡透析法、超滤法、超速离心法和光谱法等。其中最常用的是平衡透析法和超滤法,这两种方法均是在结合平衡状态下通过半透膜对游离型和结合型药物进行分离测定,但如果候选药物在半透膜上产生吸附,或者候选药物在血浆中不稳定,在未达到平衡点则可能已经降解,上述方法就不适用。需要设计其他方法来测定血浆蛋白结合率。

葡聚糖木炭(dextran-coated charcoal, DCC)吸附法是另一种测定药物血浆蛋白结合率的方法,其基本原理是利用含葡聚糖涂层的木炭能够选择性地吸附游离药物,而不能吸附蛋白结合型药物的特性,通过测定药物在DCC上的吸附动力学,拟合动力学曲线,求出药物的血浆蛋白结合率。其最大优势是可以避免膜的非特异性吸附,且不需要长时间的平衡。该法最初应用于放射免疫分析法中游离药物和结合配体的分离,随后运用于HIV蛋白酶抑制剂SC-52151^[3]、化合物西替考马(centchroman^[4])、西洛司特(cilomilast^[5])、度洛西汀(duloxetine^[5])、依那普利(enalapril^[6])及S016-1271^[7]等的蛋白结合率的测定,上述报道大多都与经典方法进行了对比,证实了该方法的可靠性。

多肽药物由于氨基酸序列和构型的原因经常具有膜吸附的现象,无法应用经典的超滤法和平衡透析法。为了研究多肽候选药物中氨基酸构型(D型或L型)对血浆蛋白结合率的影响规律,本研究设计了7条具有相同氨基酸序列、但氨基酸构型(D型或L型)随机变化的磷酸化六肽候选药物,运用DCC吸附法测定了其在大鼠血浆中的蛋白结合率。该法操作简单,不需要专门的设备,作为一种血浆蛋白结合率测定的补充方法,可以适用于传统实验技术无法测定的多肽或者有机候选药物。

1 材 料

1.1 药品与试剂

7条六肽候选药物(本实验室自制,纯度大于80%,序列和构型见表1);奥曲肽对照品(上海源叶生物科技有限公司,纯度99%);杜氏磷酸盐缓冲液(D-PBS, pH 7.4, 碧云天生物技术有限公司);葡聚糖木炭(DCC, 美国Sigma-Aldrich有限公司);

乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);超纯水(实验室自制);空白血浆由健康成年的SD雄性大鼠提供(SPF级,北京维通利华,许可证号:SCXK(京)2019-0010)。

Table 1 Amino acid sequence and configuration of peptides

| Peptide | N→C terminal(D or L configuration) |
|---------|---|
| 1 | Ac-P-L-H-S _p T-A-NH ₂ (L-L-L-L-L-L) |
| 2 | Ac-P-L-H-S _p T-A-NH ₂ (D-D-L-D-L-D) |
| 3 | Ac-P-L-H-S _p T-A-NH ₂ (D-D-L-D-L-L) |
| 4 | Ac-P-L-H-S _p T-A-NH ₂ (L-D-L-D-L-L) |
| 5 | Ac-P-L-H-S _p T-A-NH ₂ (D-L-L-D-L-L) |
| 6 | Ac-P-L-H-S _p T-A-NH ₂ (L-D-L-D-L-D) |
| 7 | Ac-P-L-H-S _p T-A-NH ₂ (L-D-L-L-L-L) |

1.2 仪 器

Shimadzu液相色谱仪,配有DGU-20A5真空脱气机、LC-10AD二元泵、SIL-20AC自动进样器、CTO-20A柱温箱(日本岛津公司);API4000型串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源(Turbo Spray)及Analyst1.6.2数据处理系统(美国Applied Biosystem Sciex公司);百万分之一分析天平(德国Mettler Toledo公司);ZLS-1真空离心浓缩仪(湖南赫西仪器装备有限公司);Allegra X-30R冷冻高速离心机(美国Beckman公司);10 kD MWCO超滤管(Amicon Ultra-0.5 mL, Millipore公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈色谱柱(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm);以0.1%甲酸-水溶液为水相,0.1%甲酸-乙腈溶液为有机相,进行梯度洗脱(0~8 min, 5% B→30% B; 8~9 min, 30%B; 9~9.1 min, 30% B→5% B; 9.1~12 min, 5% B);流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;进样体积:10 μL;柱后分流比:3:2。采用电喷雾离子源(ESI),在多反应监测(MRM)模式下同时对模型肽(m/z 746.5→390.3, 去簇电压DP为75 V,碰撞电压CE为34 V)和内标奥曲肽(m/z 510.4→120.1, 去簇电压DP为64 V,碰撞电压CE为36 V)进行正离子模式检测。

2.2 DCC吸附法的吸附动力学原理

药物与血浆蛋白及DCC的作用是可逆的。当加入葡聚糖木炭后,血浆样品溶液中会存在3种形

式的药物,具体的动力学模型图见图1。

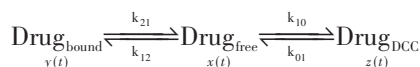


Figure 1 Kinetics model of compound in plasma with dextran-coated charcoal (DCC)

当溶液中的血浆蛋白和加入DCC的浓度足够使药物与血浆蛋白及DCC结合的位点数远小于饱和点,游离药物与血浆蛋白结合和游离药物吸附于DCC的过程可以视为一级动力学,则有:

$$\frac{-dx(t)}{dt} = k_{12}x(t) - k_{21}y(t) + k_{10}x(t)[\text{DCC}]_{\text{plasma}} - k_{01}z(t) \quad (1)$$

$$\frac{-dy(t)}{dt} = k_{21}y(t) - k_{12}x(t) \quad (2)$$

其中, $x(t)$ 、 $y(t)$ 、 $z(t)$ 分别为血浆中游离药物浓度、与血浆蛋白结合药物浓度、吸附于DCC上的药物浓度; k_{12} 、 k_{21} 、 k_{10} 、 k_{01} 分别为血浆蛋白结合速率常数、血浆蛋白解离速率常数、DCC吸附速率常数、DCC解离速率常数; $[\text{DCC}]_{\text{plasma}}$ 为血浆溶液中DCC的浓度。

根据公式(1)和(2),血浆中总药物变化率可以表示为:

$$\frac{-d[\text{Drug}]_{\text{plasma}}}{dt} = -\left(\frac{dx(t)}{dt} + \frac{dy(t)}{dt}\right) = k_{10}x(t)[\text{DCC}]_{\text{plasma}} - k_{01}z(t) \quad (3)$$

令 $f_u = x(t)/[\text{Drug}]_{\text{plasma}}$,即表示游离药物占总血浆药物浓度的百分比。公式(3)可以转化为:

$$\frac{-d[\text{Drug}]_{\text{plasma}}}{dt} = k_{10}f_u[\text{Drug}]_{\text{plasma}}[\text{DCC}]_{\text{plasma}} - k_{01}z(t) \quad (4)$$

若只考虑反应的初始速率,即 $t=0$ 时刻的总药物浓度变化,则有:

$$\nu_{\text{plasma}} = -\left[\frac{d[\text{Drug}]_{\text{plasma}}}{dt}\right]_{t=0} = k_{10}f_u[\text{Drug}]_{\text{plasma}}^{t=0}[\text{DCC}]_{\text{plasma}}^{t=0} - k_{01}z(0) \quad (5)$$

而 $t=0$ 时,药物吸附到DCC的浓度 $z(0)=0$,故有:

$$\nu_{\text{plasma}} = k_{10}f_u[\text{Drug}]_{\text{plasma}}^{t=0}[\text{DCC}]_{\text{plasma}}^{t=0} \quad (6)$$

当药物在含DCC的PBS缓冲液中,则无药物

与血浆蛋白结合的过程,总药物浓度在缓冲盐溶液中的变化率则为:

$$\frac{-d[\text{Drug}]_{\text{PBS}}}{dt} = k_{10}[\text{Drug}]_{\text{PBS}}[\text{DCC}]_{\text{PBS}} \quad (7)$$

$$\text{在 } t=0 \text{ 时, } \nu_{\text{PBS}} = k_{10}[\text{Drug}]_{\text{PBS}}^{t=0}[\text{DCC}]_{\text{PBS}}^{t=0} \quad (8)$$

根据公式(6)和公式(8),

$$\frac{\nu_{\text{plasma}}}{\nu_{\text{PBS}}} = \frac{k_{10}f_u[\text{Drug}]_{\text{plasma}}^{t=0}[\text{DCC}]_{\text{plasma}}^{t=0}}{k_{10}[\text{Drug}]_{\text{PBS}}^{t=0}[\text{DCC}]_{\text{PBS}}^{t=0}} \quad (9)$$

当加入空白血浆和PBS缓冲液中的药物浓度相同时, $[\text{Drug}]_{\text{plasma}}^{t=0} = [\text{Drug}]_{\text{PBS}}^{t=0}$,得到公式:

$$f_u = \frac{\nu_{\text{plasma}}}{\nu_{\text{PBS}}} \frac{[\text{DCC}]_{\text{PBS}}^{t=0}}{[\text{DCC}]_{\text{plasma}}^{t=0}}, \quad \text{血浆蛋白结合率}(\%) = (1 - f_u) \times 100 \quad (10)$$

2.3 溶液的制备

2.3.1 模型肽储备液及工作溶液的配制 分别取7条模型肽适量,精密称定,用溶剂乙腈-水(5:95)溶解并稀释制成质量浓度为2.00 mg/mL的储备液。以溶剂乙腈-水-甲酸(5:95:0.1)稀释成各自浓度下的标准曲线样品工作溶液。由于7条模型肽在质谱中的响应灵敏度不同,配制了不同质量浓度的溶液:其中 peptide-1、peptide-4 ~ peptide-7 条肽的工作溶液质量浓度分别为:2.5, 5, 7.5, 10, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$; peptide-2 的工作溶液质量浓度为:7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 $\mu\text{g/mL}$; peptide-3 的工作溶液质量浓度为:10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 。同法配制质控样品工作溶液。

2.3.2 内标储备液及工作溶液的配制 取奥曲肽对照品适量,精密称定,用溶剂乙腈-水(5:95)溶解并稀释制成质量浓度为1.98 mg/mL的内标储备液。以溶剂乙腈-水-甲酸(5:95:0.1)稀释制成质量浓度为495.0 ng/mL的内标溶液。

2.3.3 标准曲线及质控样品的配制 精密吸取空白血浆或PBS缓冲液50 μL 置于1.5 mL EP管中,平行7份。再分别加入不同质量浓度的线性标准工作溶液5 μL ,涡旋30 s使之混匀,配制成相应质量浓度的血浆样品或PBS缓冲液(其中 peptide-1、peptide-4 ~ peptide-7 条肽的样品质量浓度为250, 500, 750, 1 000, 5 000, 7 500, 10 000 ng/mL, peptide-2 的样品质量浓度为750, 1 000, 2 500, 5 000, 7 500, 10 000, 25 000 ng/mL, peptide-3 的样

品浓度为 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$)。按“2.5”项下自“精密加入奥曲肽内标工作溶液 5 μL ”起同法处理,取 10 μL 进样分析。

2.3.4 不同浓度 DCC-PBS 缓冲液及 DCC-血浆溶液的配制 取 DCC 粉末约 40 mg,精密称定,加入 PBS 缓冲液 10 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡箱使成质量浓度为 4 mg/mL 的 DCC-PBS 混悬液。再分别用 PBS 缓冲液稀释制成质量浓度为 0.04, 0.1 及 0.4 mg/mL 的 DCC-PBS 混悬液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,使用前需重新振摇均匀。

取质量浓度分别为 0.4 和 4 mg/mL 的 PBS 混悬液,4 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液,加入相同体积的空白血浆溶液,混匀后分别配制成 0.4 和 4 mg/mL 的 DCC-血浆混悬液。

2.4 吸附实验

分别以 PBS 缓冲液和血浆为基质对 7 条模型肽在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡箱中进行动力学吸附实验。以 24 孔板作为吸附容器,吸附反应时间点分别为 0, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 min, 对应 8 个吸附反应孔。首先在每个反应孔中分别加入相应质量浓度的 DCC-空白血浆溶液或 DCC-PBS 缓冲液(0 min 吸附反应时间点对应的孔中加入不含 DCC 的相同体积的空白血浆溶液或 PBS 缓冲液)360 μL , 从第 1 个反应孔内加入对应质量浓度的待测药物工作溶液 40 μL 后开始计时,在第 5, 10, 15, 20, 23, 25, 30 min 依次在相应的反应孔内加入相同体积的待测药物工作溶液(对应的吸附反应时间即为 30, 25, 20, 15, 10, 7, 5, 0 min),室温下 3 500 r/min 离心 1 min,弃去下层活性炭,吸附反应终止,上清液即为待测溶液。

2.5 样品前处理方法

取“2.4”项下吸附实验待测溶液 50 μL ,精密加入乙腈-水-甲酸(5:95:0.1)5 μL 及奥曲肽内标工作溶液 5 μL ,涡旋 30 s 使之混匀;再加入乙腈-甲酸(100:1)100 μL 沉淀蛋白,涡旋 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 110 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 下真空离心挥干,加入乙腈-水-甲酸(5:95:0.1)50 μL 复溶,离心,取上清液 10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。随行配制血浆和 PBS 标准曲线,按内标法计算浓度。

2.6 数据处理

以时间为横坐标,不同时间点浓度为纵坐标,

进行最小二乘拟合,得一元二次方程($y = ax^2 + bx + c$),对该方程微分后($\frac{dy}{dx} = 2ax + b$),求出曲线在 $t=0$ 处的初始速率,即 ν_{buffer} ($\nu_{\text{buffer}} = -b$) 和 ν_{plasma} ($\nu_{\text{buffer}} = -b$)。根据“2.2”项下推导的公式结合各基质下对应 DCC 的浓度来计算该多肽的蛋白结合率。

3 结果

3.1 专属性

取大鼠空白血浆和 7 条模型肽各自血浆样品,按照血浆样品处理方法操作后进行 LC-MS/MS 分析,结果表明本方法专属性良好(图 2)。

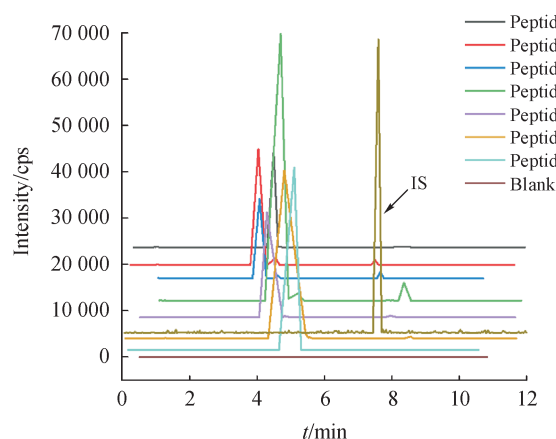


Figure 2 Chromatograms of blank plasma, blank plasma spiked with seven model peptide and IS (octreotide), respectively

3.2 提取回收率和基质效应

按照“2.3.3”项下配制低、中、高 3 种不同质量浓度的 7 条模型肽的血浆质控样品,按照“2.5”项下方法处理血浆,进行 LC-MS/MS 分析。以低、中、高 3 个质量浓度的大鼠血浆质控样品测得的色谱峰面积为 A_1 ;空白血浆样品经提取后加入对应质量浓度的标准溶液测得的色谱峰面积为 A_2 ;对应质量浓度纯标准品溶液测得的色谱峰面积为 A_3 ;计算回收率为 A_1 与 A_2 的比值,基质效应为 A_2 与 A_3 的比值。实验结果(表 2)表明,7 条模型肽及内标奥曲肽的提取回收率良好,基质效应影响小。

3.3 线性关系

将 7 条模型肽血浆标准曲线样品及 PBS 标准曲线样品按照“2.5”项下血浆样品的前处理方法,进行 LC-MS/MS 分析。分别以待测多肽的质量浓

Table 2 Matrix effect and recovery of model peptide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| Peptide | $c/$ (ng/mL) | Matrix effect/% | RSD/% | Recovery/% | RSD/% |
|---------|-----------------|--------------------|-------|-------------|-------|
| 1 | 750 | 93.93±1.44 | 1.53 | 90.09±4.05 | 4.50 |
| | 1 000 | 103.52±3.05 | 2.94 | 82.86±1.64 | 1.97 |
| | 5 000 | 107.75±3.57 | 3.31 | 82.57±1.06 | 1.29 |
| 2 | 1 000 | 110.74±9.05 | 8.18 | 99.67±11.60 | 11.64 |
| | 5 000 | 122.99±3.96 | 3.22 | 93.16±4.56 | 4.89 |
| | 10 000 | 100.89±2.04 | 2.02 | 86.74±1.48 | 1.71 |
| 3 | 2 500 | 108.99±2.96 | 2.71 | 93.38±0.88 | 0.94 |
| | 5 000 | 102.58±4.08 | 3.98 | 93.50±2.39 | 2.56 |
| | 10 000 | 106.62±0.75 | 0.70 | 84.16±0.75 | 0.89 |
| 4 | 750 | 102.45±4.89 | 4.77 | 90.67±2.12 | 2.34 |
| | 1 000 | 101.93±4.73 | 4.64 | 89.99±1.14 | 1.27 |
| | 5 000 | 98.82±2.52 | 2.55 | 89.67±1.99 | 2.22 |
| 5 | 750 | 86.15±12.54 | 14.56 | 89.31±3.84 | 4.30 |
| | 1 000 | 94.81±7.92 | 8.36 | 99.18±7.17 | 7.22 |
| | 5 000 | 98.07±9.43 | 9.61 | 91.03±4.50 | 4.94 |
| 6 | 750 | 95.11±10.86 | 11.42 | 95.89±7.16 | 7.47 |
| | 1 000 | 98.55±11.30 | 11.46 | 95.17±10.32 | 10.84 |
| | 5 000 | 97.13±4.99 | 5.14 | 86.64±3.34 | 3.86 |
| 7 | 750 | 92.74±3.38 | 3.64 | 95.86±1.92 | 2.00 |
| | 1 000 | 101.97±2.13 | 2.09 | 107.18±6.92 | 6.46 |
| | 5 000 | 92.49±3.65 | 3.94 | 93.48±4.33 | 4.63 |
| IS | 50 | 122.42±3.80 | 3.11 | 105.62±1.77 | 1.68 |

度为横坐标(x , ng/mL),多肽与内标峰面积的比值为纵坐标(y)进行加权线性回归,加权因子为 $1/x^2$,具体方程见表3。结果表明,peptide-1、peptide-4~peptide-7均在250 ng/mL~10 μ g/mL范围内线性关系良好,peptide-2在750 ng/mL~25 μ g/mL范围内线性关系良好,peptide-3在1~50 μ g/mL范围内线性关系良好。

Table 3 Linear regression equation of model peptide

| Peptide | Plasma | PBS |
|---------|---|---|
| 1 | $y=6.26 \times 10^{-4}x+0.0168 (r=0.9996)$ | $y=6.39 \times 10^{-4}x+0.0756 (r=0.9957)$ |
| 2 | $y=9.39 \times 10^{-5}x+0.00504 (r=0.9994)$ | $y=1.23 \times 10^{-4}x+0.117 (r=0.9921)$ |
| 3 | $y=1.47 \times 10^{-4}x+0.0019 (r=0.9997)$ | $y=2.05 \times 10^{-4}x+0.0229 (r=0.9932)$ |
| 4 | $y=3.82 \times 10^{-4}x-0.0409 (r=0.9976)$ | $y=5.98 \times 10^{-4}x-0.114 (r=0.9960)$ |
| 5 | $y=2.48 \times 10^{-4}x-0.00404 (r=0.9984)$ | $y=3.37 \times 10^{-4}x-0.0015 (r=0.9993)$ |
| 6 | $y=5.54 \times 10^{-4}x-0.0252 (r=0.9958)$ | $y=3.24 \times 10^{-4}x+0.00229 (r=0.9980)$ |
| 7 | $y=7.78 \times 10^{-4}x-0.0745 (r=0.9992)$ | $y=9.85 \times 10^{-4}x-0.0607 (r=0.9976)$ |

3.4 模型肽在血浆及PBS缓冲液中的稳定性

考察了37 $^{\circ}$ C下7条模型肽低、中、高3个质量浓度在血浆和PBS缓冲液中的稳定性。如表4所

示,7条模型肽30 min内在血浆和PBS缓冲液中稳定性良好。

Table 4 Stability for peptide-1-7 in plasma and PBS buffer ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| Peptide | $c/$ (ng/mL) | $c_{\text{plasma}}/$ (ng/mL) | RSD/% | $c_{\text{PBS}}/$ (ng/mL) | RSD/% |
|---------|-----------------|---------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| 1 | 750 | 744.80±46.55 | 6.25 | 710.6±69.85 | 9.83 |
| | 1 000 | 976.90±81.96 | 8.39 | 969.6±52.55 | 5.42 |
| | 5 000 | 4970.5±168.5 | 3.39 | 4826±283.77 | 5.88 |
| 2 | 1 000 | 970.70±20.58 | 2.12 | 929.2±63.56 | 6.84 |
| | 5 000 | 5286.5±75.60 | 1.43 | 4 942±158.64 | 3.21 |
| | 10 000 | 10 498±616.23 | 5.87 | 9 795±217.45 | 2.22 |
| 3 | 2 500 | 2672.2±80.97 | 3.03 | 2 144.3±20.80 | 0.97 |
| | 5 000 | 4 999.0±37.49 | 0.75 | 4 893.5±68.02 | 1.39 |
| | 10 000 | 10 674±11.74 | 0.11 | 9 790±199.72 | 2.04 |
| 4 | 750 | 688.8±23.01 | 3.34 | 787.8±31.59 | 4.01 |
| | 1 000 | 1 011.9±78.02 | 7.71 | 988.7±48.35 | 4.89 |
| | 5 000 | 5 250.5±317.13 | 6.04 | 4 909±311.23 | 6.34 |
| 5 | 750 | 778.7±26.16 | 3.36 | 712.1±29.98 | 4.21 |
| | 1 000 | 1 045.4±22.89 | 2.19 | 874.8±17.93 | 2.05 |
| | 5 000 | 4 642.5±189.41 | 4.08 | 4 966.5±370.99 | 7.47 |
| 6 | 750 | 743.1±50.31 | 6.77 | 857.0±71.30 | 8.32 |
| | 1 000 | 1 068.8±23.73 | 2.22 | 887.4±44.64 | 5.03 |
| | 5 000 | 5 139.5±53.45 | 1.04 | 4 994.5±194.29 | 3.89 |
| 7 | 750 | 723.4±36.82 | 5.09 | 730.4±12.20 | 1.67 |
| | 1 000 | 1 025.2±78.22 | 7.63 | 1011.0±81.28 | 8.04 |
| | 5 000 | 4 990.0±209.08 | 4.19 | 4 948.0±101.43 | 2.05 |

3.5 吸附动力学曲线

根据“2.4”项下吸附实验过程,分别对7条模型肽在3个质量浓度下进行动力学吸附试验,各吸附时间的药物浓度经“2.5”项下样品处理方法同法处理后,用LC-MS/MS进样分析。以各吸附时间为横坐标,上清液药物质量浓度为纵坐标,进行质量浓度-时间曲线的拟合,peptide-1~peptide-7的结果分别见图3。每条曲线的初始吸附速率(ν_{buffer} 或 ν_{plasma})见表5。

4 讨论

4.1 葡聚糖木炭吸附法

曾采用超滤法进行上述7条模型肽的蛋白结合率测定,发现7条模型肽在超滤管上存在20%~50%的吸附,故选择DCC吸附法测定。该方法最初由Yuan等^[3]提出应用于HIV蛋白酶抑制剂SC-52151蛋白结合率的测定,随后Khurana等^[4]同样

Table 5 Kinetics of adsorption to dextran-coated charcoal (DCC) for model peptides

| Peptide | <i>c</i> /(ng/mL) | $\nu_{\text{buffer}}/$ (ng·mL ⁻¹ ·min ⁻¹) | $\nu_{\text{plasma}}/$ (ng·mL ⁻¹ ·min ⁻¹) | Plasma protein binding/% |
|---------|-------------------|---|---|-----------------------------|
| 1 | 750 | 9.56 ^a | 14.58 ^c | 84.75 |
| | 1 000 | 5.44 ^a | 9.06 ^c | 83.33 |
| | 5 000 | 106.50 ^c | 200.80 ^d | 81.15 |
| 2 | 1 000 | 13.31 ^a | 20.31 ^c | 84.74 |
| | 5 000 | 233.41 ^c | 250.83 ^d | 89.25 |
| | 10 000 | 524.87 ^c | 534.13 ^d | 89.82 |
| 3 | 2 500 | 4.74 ^c | 2.40 ^d | 94.93 |
| | 5 000 | 12.80 ^c | 7.11 ^d | 94.44 |
| | 10 000 | 173.28 ^c | 77.69 ^d | 95.52 |
| 4 | 750 | 2.50 ^b | 0.83 ^c | 91.70 |
| | 1 000 | 16.50 ^b | 4.00 ^c | 93.94 |
| | 5 000 | 117.11 ^c | 99.59 ^d | 91.50 |
| 5 | 750 | 3.74 ^b | 0.15 ^c | 99.02 |
| | 1 000 | 29.05 ^b | 5.75 ^c | 95.05 |
| | 5 000 | 232.13 ^c | 29.63 ^d | 98.72 |
| 6 | 750 | 8.24 ^b | 4.50 ^c | 86.36 |
| | 1 000 | 18.27 ^b | 8.86 ^c | 87.88 |
| | 5 000 | 129.78 ^c | 127.33 ^d | 90.19 |
| 7 | 750 | 15.49 ^b | 10.73 ^c | 82.69 |
| | 1 000 | 21.97 ^b | 13.67 ^c | 84.45 |
| | 5 000 | 65.91 ^c | 138.01 ^d | 79.06 |

^a[DCC]=0. 04 mg/mL; ^b[DCC]=0. 1 mg/mL; ^c[DCC]=0. 4 mg/mL; ^d[DCC]=4 mg/mL

运用该动力学模型测定了另一在滤膜上吸附严重的西替考马的结合率。该研究指出当含药物的血浆溶液加入DCC后,同时存在3种形式的吸附解离过程:(1)游离型药物吸附在DCC上;(2)游离型药物与血浆蛋白结合;(3)结合型药物从血浆蛋白中解离。该试验以含药物的PBS溶液作为对照,加入合适浓度的DCC后,药物在短时间内几乎被完全吸附;若溶液中同时存在DCC、血浆蛋白及药物,当结合型药物与血浆蛋白解离时,游离型药物会快速被DCC吸附,残留在上清液药物浓度即为结合型药物浓度。上清液药物浓度与药物总浓度的比值即为上清液药物剩余百分比。通过测定不同时间点加入DCC后血浆样品上清液药物浓度,以吸附时间为横坐标,上清液药物剩余百分比为纵坐标,进行非线性拟合得到双指数曲线,吸附时间在0 min时上清液药物剩余百分比即为所测的药物蛋白结合率。上述方法无需达到平衡即可进行测定,但均未考虑药物在吸附过程中是否会发生降解。Wenlock等^[6]测定依那普利在大鼠血浆

中的蛋白结合率时,发现除了上述3种形式的吸附解离过程,还存在药物的降解反应,对上述方法进行优化,建立了新的吸附初始速率动力学模型,只需考查DCC吸附的初始速率而非对全时吸附过程进行分析,能够在更短时间内测定化合物的结合率。优化后的吸附初始速率动力学可以进一步延伸到稳定化合物的测定。本研究借助吸附初始速率动力学原理,测定了7条模型肽的结合率。在最长吸附时间点的选择上,由于所测多肽在血浆中稳定性较好,为了确保吸附过程浓度变化更为显著,选择了30 min作为吸附节点。该实验方法操作简单,不需要专门的设备,能够适用于传统实验技术测定不了的待测物,可以作为血浆蛋白结合率测定的补充方法。

4.2 DCC浓度的选择

选择合适的DCC浓度是本法的关键因素之一。本法的原理是运用一级动力学模拟吸附曲线方程,吸附模型成立的前提是溶液中的血浆蛋白及葡聚糖木炭上的吸附点数量远大于药物结合的

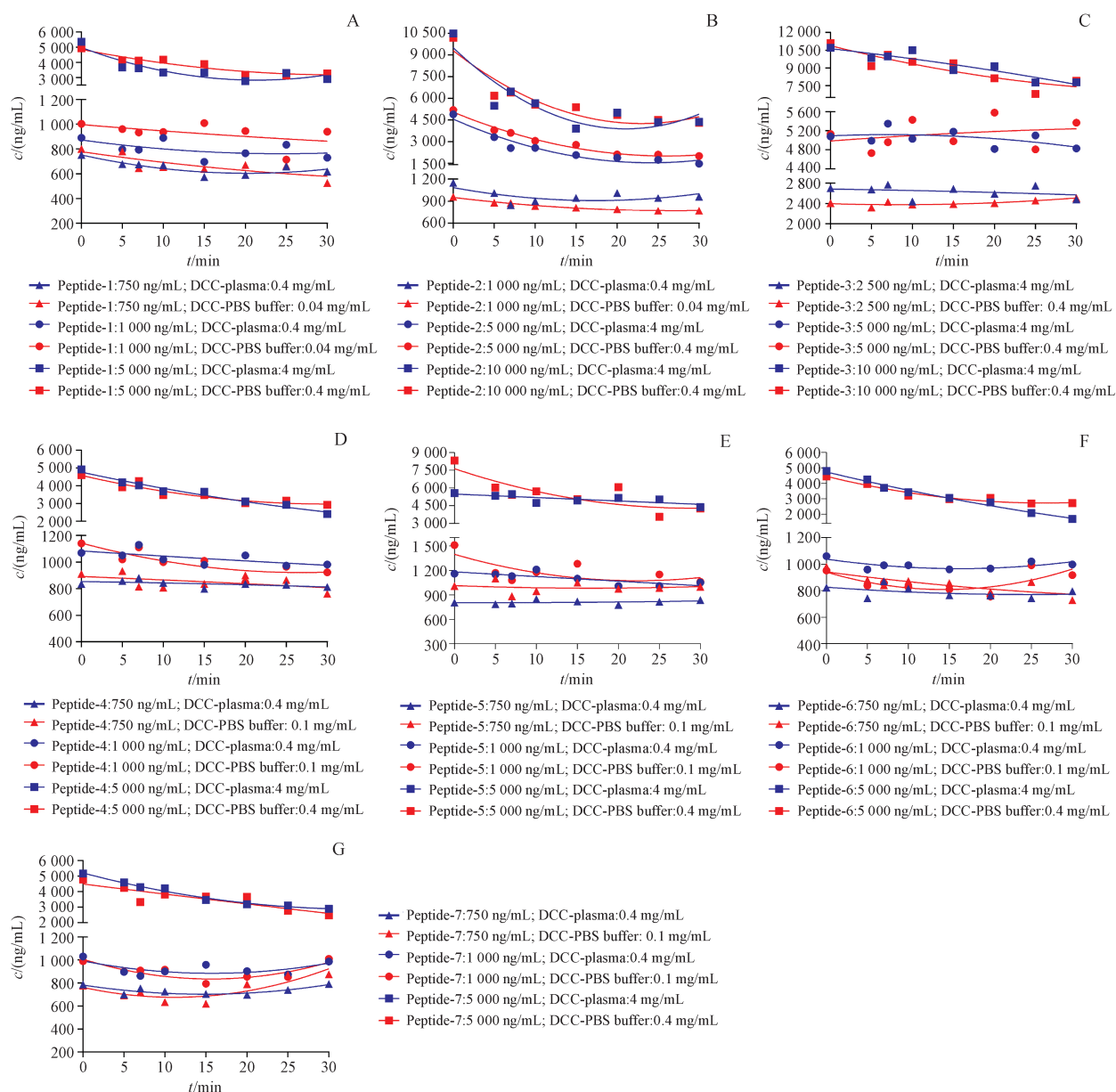


Figure 3 Adsorption of model peptide to DCC in plasma and DCC in PBS buffer

A: peptide-1; B: peptide-2; C: peptide-3; D: peptide-4; E: peptide-5; F: peptide-6; G: peptide-7

饱和点数量,当测定药物的浓度增大时,反应体系提供的血浆蛋白量及木炭的浓度也应相应提高。白蛋白和 α 1-酸性白蛋白为血浆中两种最主要的药物结合蛋白,白蛋白的相对分子质量约为 66 kD,浓度范围为 500 ~ 750 mmol/L (35 ~ 50 mg/mL), α 1-酸性白蛋白在血浆中的浓度约为 15 mmol/L (0.5~1.0 mg/mL)^[1]。本实验选择 360 μ L 的空白血浆体系,能够完全满足药物与血浆蛋白之间的结合符合一级动力学;对于蛋白结合率较高的候

选药物,由于游离药物的浓度较低,在选择 DCC 的浓度时应确保血浆中加入 DCC 的量大于在 PBS 中,否则在短时间内不能准确地测定化合物的浓度变化或者需要更长时间的吸附过程。Berezhkovskiy^[5]考察过不同药物在葡聚糖木炭上的饱和吸附浓度;0.1 mg/mL 的 DCC 可以满足至少 6 μ mol/L 的药物结合。本试验中发现,peptide-2 和 peptide-3 的质谱响应较低,故提高了反应体系中候选多肽的浓度;测定 peptide-4~peptide-7 时,发现 30 min 内

其在0.04 mg/mL的DCC-PBS缓冲液中的吸附变化较小,因此增大DCC的质量浓度至0.1 mg/mL。

4.3 D/L构型对多肽蛋白结合率的影响

多肽药物中氨基酸的D/L构型改变可能会导致化合物的稳定性和生物活性发生显著变化^[8]。因此,本课题组在候选药物筛选时基于Ac-PLHSp-TA-NH₂的序列设计了完全由6个天然L-型氨基酸组成,或者在不同氨基酸位点进行D、L构型转换的7条多肽。研究发现:(1)从peptide-3和peptide-2、peptide-4和peptide-6的结合率测定结果可知,仅将C端L构型的丙氨酸替换为D构型后,蛋白结合率降低了4%~7%;(2)对比peptide-2和peptide-6的测定结果,仅将N端脯氨酸由L构型替换为D构型,蛋白结合率大致相同,约为88%;(3)在多肽的中间序列,peptide-4和peptide-7间仅发生L-丝氨酸到D-丝氨酸的替换,蛋白结合率由82%提高到92%;而peptide-3和peptide-5、peptide-1和peptide-7间均将L亮氨酸替换为D亮氨酸后,蛋白结合率未发生明显变化,peptide-1和peptide-4间同时将丝氨酸和亮氨酸的L-构型替换为D构型后,蛋白结合率仍然增大。这说明针对上述序列的磷酸化六肽,不同位置L→D构型的替换对蛋白结合率的影响各不相同,其中N端氨基酸构型替换对结合率几乎没有影响,C端氨基酸构型替换后结合率降低,中间序列氨基酸构型替换使结合率增大。总体来说,当氨基酸序列中D-构型氨基酸的数量增多时,该磷酸化六肽的蛋白结合率会一定程度地增高。

5 结论

对于在半透膜上具有非特异性吸附或者在血

浆中的稳定性较差的候选药物,不适用于经典的平衡透析法和超滤法来测定其血浆蛋白结合率,本研究选择了在超滤膜上的有吸附现象的7条六肽候选药物作为研究模型,采用葡聚糖木炭吸附法进行血浆蛋白结合率的测定,无需特殊设备,操作简单,用时少,可以作为经典方法的有效补充。

参考文献

- [1] Zhang F, Xue J, Shao J, *et al.* Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs [J]. *Drug Discovery Today*, 2012, **17**(9/10): 475-485.
- [2] Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discovery*, 2007, **2**(1): 51-64.
- [3] Yuan JH, Yang DC, Birkmeier J, *et al.* Determination of protein-binding by *in-vitro* charcoal adsorption [J]. *J Pharmacokinetic Biopharm*, 1995, **23**(1): 41-55.
- [4] Khurana M, Paliwal JK, Kamboj VP, *et al.* Binding of cephalexin with human serum as determined by charcoal adsorption method [J]. *Int J Pharm*, 1999, **192**(2): 109-114.
- [5] Berezhkovskiy LM. Determination of drug binding to plasma proteins using competitive equilibrium binding to dextran-coated charcoal [J]. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*, 2006, **33**(5): 595-608.
- [6] Wenlock MC, Barton P, Austin RP. A kinetic method for the determination of plasma protein binding of compounds unstable in plasma: specific application to enalapril [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, **55**(3): 385-390.
- [7] Puttrevu SK, Laxman TS, Tripathi AK, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method development and validation of S016-1271 (LR8P), a novel cationic antimicrobial peptide for its application to pharmacokinetic studies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, **169**: 116-126.
- [8] Ollivaux C, Soyez D, Toullec JY. Biogenesis of D-amino acid containing peptides/proteins: where, when and how [J]? *J Pept Sci*, 2014, **20**(8): 595-612.