

# HPLC – 荧光法研究阿德福韦前药的大鼠组织分布

黄丽华<sup>1,2</sup>, 刘志勇<sup>1,2</sup>, 罗婵<sup>1,2</sup>, 母昭德<sup>1\*</sup>

(1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2. 重庆市高校药物工程研究中心, 重庆 400016)

**摘要 目的:** 建立大鼠组织中阿德福韦(PMEA)含量测定的柱前衍生化 HPLC – 荧光检测法, 研究新型阿德福韦前药 M1、M2 在 Wister 大鼠组织中的分布情况。**方法:** Benetnach C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱前衍生化; 流动相 A: 含 2% 乙腈的 25 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲溶液(5 mmol · L<sup>-1</sup> 氢氧化四丁基铵, pH 6.0), 流动相 B: 含 65% 乙腈的 25 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲溶液(5 mmol · L<sup>-1</sup> 氢氧化四丁基铵, pH 6.0), 梯度洗脱; 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 35 °C; 荧光检测波长为 λ<sub>ex</sub> 236 nm 和 λ<sub>em</sub> 420 nm。以泰诺福韦(PMPA)为内标, 测定 Wister 大鼠肝、肾中的药物浓度, 比较新型前药 M1、M2 与阿德福韦酯(ADV)的组织分布特点。**结果:** 组织匀浆中 PMEA 线性关系、最低检测限、准确度、精密度均符合分析要求。大鼠肝组织中药物浓度: M2 > M1 > ADV, 肾组织中药物浓度: ADV > M1 > M2。**结论:** 该方法准确、稳定, 灵敏度高, 可用于 PMEA 的检测及药动学研究。在大鼠组织中 M2 比 M1 和 ADV 具有更强的肝靶向性和更弱的肾靶向性, 具有继续研发的价值。

**关键词:** 阿德福韦(PMEA); 泰诺福韦(PMPA); 阿德福韦酯(ADV); 前药; HPLC – 荧光检测法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 – 1793(2011)04 – 0637 – 04

## HPLC – fluorescence study on tissue distribution of adefovir prodrugs in rats

HUANG Li – hua<sup>1,2</sup>, LIU Zhi – yong<sup>1,2</sup>, LUO Chan<sup>1</sup>, MU Zhao – de<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Chongqing Academy Engineering Research Center for Medicines, Chongqing 400016, China)

**Abstract Objective:** To establish a pre – column derivatization HPLC – fluorescence method for the determination of adefovir (PMEA) in rat's tissues, and study the tissue distribution of new adefovir prodrugs in Wister rats. **Methods:** Pre – column derivatization; A Benetnach C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. Mobile phase A, 2% acetonitrile in 25 mmol · L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate buffer with 5 mmol · L<sup>-1</sup> TBAOH (pH 6.0); mobile phase B, 65% acetonitrile in 25 mmol · L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate buffer with 5 mmol · L<sup>-1</sup> TBAOH (pH 6.0), gradient elution. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, and the column temperature was 35 °C with the fluorescence detection set at λ<sub>ex</sub> 236 nm and λ<sub>em</sub> 420 nm. Take tenofovir (PMPA) as internal standard, the concentration of PMEA in liver and kidney of Wister rats were tested, and the tissue distribution characteristic of M1, M2 and ADV were compared. **Results:** All the validation data, such as linearity, detection limit, accuracy and precision, were within the required limits. Drug concentration in rats' liver: M2 > M1 > ADV, in kidney: ADV > M1 > M2. **Conclusions:** This method is accurate, stable and sensitive. It can be used to investigation of PMEA in rats. In tissues of rats, M2 has better targeting to the liver than M1 and ADV and lower targeting to the kidney. The following study of M2 is of value.

**Key words:** adefovir (PMEA); tenofovir (PMPA); ADV; prodrug; HPLC – fluorescence detection method

阿德福韦酯( adefovir dipivoxil, ADV) 是目前已  
经批准上市的核苷类抗慢性乙肝病毒治疗药物, 化  
学名为 9 – [2 – ( 双三甲氧基乙酰氧甲基) – 甲氧

磷酸基乙基] 腺嘌呤, 口服后在体内代谢为母体药  
物阿德福韦( adefovir, PMEA) 而起效<sup>[1]</sup>。ADV 以  
PMEA 形式通过肾小球和肾小管主动分泌经肾脏排

\* 通讯作者 Tel: (023) 68485161; E – mail: mzd2008@tom.com

泄。研究表明口服 ADV 存在肾毒性反应,其发生率与严重程度与剂量及用药时间呈正相关,从而限制了临床用药剂量与治疗时间<sup>[2]</sup>,但乙肝患者的抗病毒治疗是一个长期的过程,因此,开发疗效高、肝靶向性强、肾毒性低的新的 ADV 前体药物具有重要的现实意义和广阔的市场前景。

M1 和 M2 是一类新筛选的阿德福韦前体药物,其结构与 ADV 类似,见图 1。三者在体内代谢为活性物质 PME A 而起效,因此可通过测定 PME A 的浓度,反映 ADV、M1 和 M2 在动物体内的组织分布浓度。本研究旨在建立 HPLC-荧光检测法,准确测定 PME A 在 Wister 大鼠肝组织中的浓度,进而研究 ADV、M1 和 M2 的组织分布情况,为抗 HBV 新药的进一步开发提供一定的试验数据和理论依据。

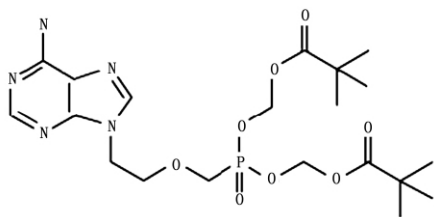


图 1 阿德福韦酯结构式

Fig 1 The structural formula of ADV

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1100 高效液相色谱仪(G1321A 荧光检测器); XW-80A 旋涡混合器(上海精科实业有限公司); TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂); BS210S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司); DZF-1 型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂); 恒温水浴箱(北京市长风仪器仪表公司); 超纯水器(MILLIPORE)。

**1.2 药品与试剂** PME A 对照品,纯度 >99%,北京世桥生物制药有限公司; PMPA 对照品,纯度 >99% 北京世桥生物制药有限公司; ADV、M1、M2,北京世桥生物制药有限公司; 乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾、三氯乙酸、氯乙醛、四丁基氢氧化铵等其余试剂为分析纯。

**1.3 动物** 体重(200 ± 10) g 的 Wister 大鼠 100 只,雌雄兼用,由重庆医科大学动物实验中心提供。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

**对照品储备液:** 精密称取 PME A 对照品一定量,加超纯水配制成 375 μg · mL<sup>-1</sup> 的对照品储备液。

**内标储备液:** 精密称取 PMPA 对照品一定量,加

超纯水配制成 625 μg · mL<sup>-1</sup> 的内标储备液。

临用时取对照品储备液和内标储备液分别稀释成一定浓度的 PME A 对照品溶液和 PMPA 内标溶液。

**2.2 样品预处理** 取 Wister 大鼠肝(肾)组织匀浆 80 μL,加入 PMPA 内标溶液 20 μL,置 1.5 mL EP 管中,加入 10% 三氯乙酸 60 μL,混匀,室温减压蒸干,复溶于 200 μL 含 0.68% 氯乙醛的 100 mmol · L<sup>-1</sup> 乙酸钠溶液(pH 4.5),涡旋 1 min,12000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液 160 μL 于带塞玻璃刻度试管中,95 °C 水浴衍生 30 min,室温减压蒸干,复溶于 100 μL 流动相 A,进样 10 μL。

### 2.3 试验条件

**2.3.1 衍生化条件** 含 PME A 和 PMPA 的组织样品经过处理后复溶于 200 μL 含 0.68% 氯乙醛的 100 mmol · L<sup>-1</sup> 乙酸钠溶液(pH 4.5),95 °C 水浴衍生 30 min,PME A 反应生成高荧光物质 1,6-乙基腺嘌呤衍生物,PMPA 也在结构相应位置反应接上乙基成为高荧光物质,见图 2。

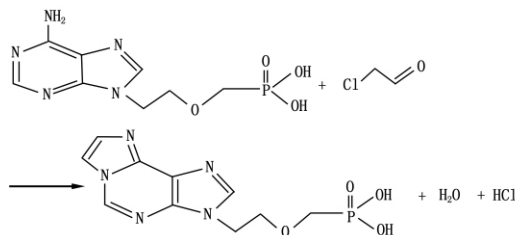


图 2 阿德福韦与氯乙醛衍生反应方程式

Fig 2 Reaction equation of adefovir and chloroacetaldehyde

**2.3.2 色谱条件** 色谱柱: Benetnack C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 预柱: Phenomenex C<sub>18</sub>(4 mm × 3.0 mm, 5 μm); 流动相 A: 含 2% 乙腈的 25 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲溶液(5 mmol · L<sup>-1</sup> 氢氧化四丁基铵,pH 6.0); 流动相 B: 含 65% 乙腈的 25 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲溶液(5 mmol · L<sup>-1</sup> 氢氧化四丁基铵,pH 6.0),洗脱梯度如下: 0 ~ 2 min 100% A, 2 ~ 15 min B 由 0 变为 100%, 15 ~ 16 min B 由 100% 变为 0, 16 ~ 23 min 100% A; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL; 荧光检测器(λ<sub>ex</sub> 236 nm, λ<sub>em</sub> 420 nm)。

### 2.4 专属性考察

照“2.3.2”项下的试验条件,分别考察空白溶剂、PMPA 与 PME A 衍生物、空白组织以及空白组织中 PMPA 与 PME A 衍生物的出峰状况,典型图谱见图 3。结果表明,在肝、肾组织中 PME A 衍生物和

PMPA 衍生物的保留时间分别约为 9.1 min 和 9.6 min, 色谱峰分离度大于 1.5, 峰形良好。

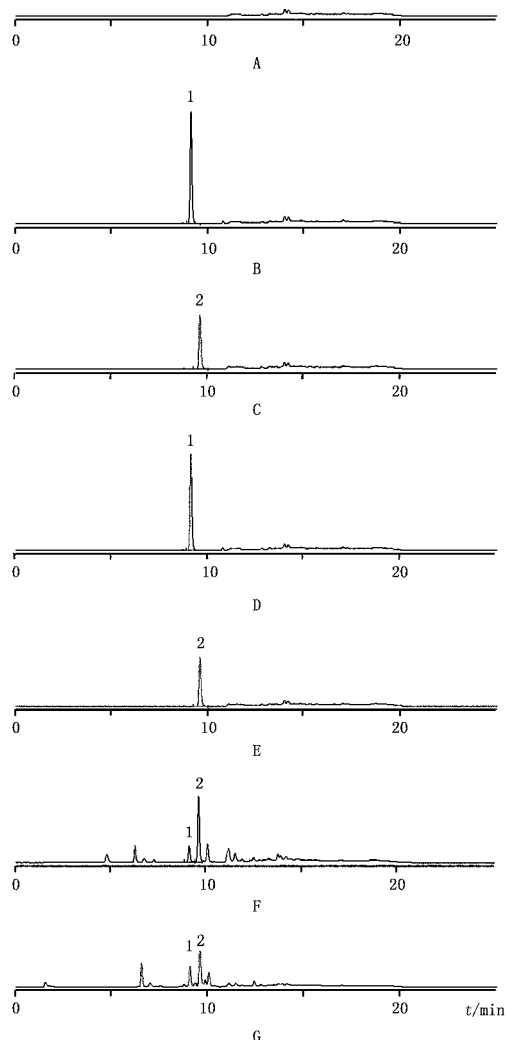


图3 肝、肾组织中 PMPA 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of PMPA in liver & kidney

A. 空白溶剂( blank solvent) B. 肝中 PMPA 对照( standard PMPA in liver) C. 肝中 PMPA 对照品( standard PMPA in liver) D. 肾中 PMPA 对照( standard PMPA in kidney) E. 肾中 PMPA 对照品( standard PMPA in kidney) F. 肝中 PMPA + PMPA( PMPA + PMPA in liver) G. 肾中 PMPA + PMPA( PMPA + PMPA in kidney)

1. PMPA 衍生物( derivatives of PMPA) 2. PMPA 衍生物( derivatives of PMPA)

## 2.5 标准曲线和线性范围

取空白肝匀浆 80  $\mu\text{L}$ , 置 1.5 mL EP 管中, 依次加入 PMPA 对照品系列工作液及 PMPA 内标溶液 (100.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 各 10  $\mu\text{L}$ , 配制含 PMPA 2.5, 5.0, 8.0, 10.0, 16.0, 20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肝组织样品, 按“2.2”项下方法处理, 记录色谱图和峰面积, 以 PMPA 与 PMPA 衍生物的峰面积比值  $Y$  为纵坐标, 以组织中 PMPA 浓度  $X$  为横坐标做线性回归。回

归方程为:

$$Y_{\text{肝}} = 0.0956X_{\text{肝}} + 0.0167 \quad r = 0.9998$$

线性范围为 2.5 ~ 20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

取空白肾匀浆 80  $\mu\text{L}$ , 置 1.5 mL EP 管中, 依次加入 PMPA 对照品系列工作液及 PMPA 内标溶液 (50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 各 10  $\mu\text{L}$ , 配制成含 PMPA 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肾组织样品, 按“2.2”项下方法处理, 得出肾组织标准曲线。

回归方程为:

$$Y_{\text{肾}} = 0.2085X_{\text{肾}} + 0.0235 \quad r = 0.9997$$

线性范围为 0.5 ~ 12.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.6 最低检测限** 配制系列浓度的 PMPA 肝组织和肾组织, 按“2.2”项下方法处理。进样 10  $\mu\text{L}$ , 以信噪比  $S/N=3$  计算, PMPA 在肝、肾组织中的最低检测限均为 2  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.7 回收率试验** 配制含 PMPA 浓度为 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肝组织各 5 份, 含 PMPA 浓度为 1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肾组织各 5 份, 按“2.2”项下方法处理。计算检测量, 与加入量相比计算相对回收率。与未经提取的 PMPA 溶液检测浓度相比计算绝对回收率。

结果表明, 肝、肾组织样品中 PMPA 浓度的相对回收率均在 98.3% ~ 99.6% 范围内, RSD 为 2.21 ~ 5.1%; 绝对回收率均在 78.7% ~ 82.0% 范围内, RSD 为 2.2% ~ 3.3%。

**2.8 精密度** 配制含 PMPA 浓度为 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肝组织各 5 份, 含 PMPA 浓度为 1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肾组织样品各 5 份, 按“2.2”项下方法处理, 计算日内精密度。

连续 5 d 配制含 PMPA 浓度为 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肝组织样品各 1 份, 含 PMPA 浓度为 1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肾组织样品各 1 份, 分别于当天按“2.2”项下方法处理, 计算日间精密度。

结果表明, 肝、肾组织中 PMPA 浓度的日内和日间精密度 RSD 均在 2.2% ~ 5.7% 范围内。

## 2.9 稳定性考察

配制含 PMPA 浓度为 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肝组织各 10 份, 含 PMPA 浓度为 1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的肾组织各 10 份, 于当天各取 1 份按“2.1.2”项下方法处理, 在 0, 4, 8, 14, 20, 24 h 分别进样 10  $\mu\text{L}$ , 计算日内稳定性。其余组织置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱保存, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20 d 各取出 1 份解冻, 按“2.2”项下方法处理, 进样分析, 计算冰冻稳定性。

结果表明,肝、肾组织中 PMEA 日内稳定性和冰冻稳定性考察中浓度均在 93.2% ~ 104.5% 范围内。

### 3 动物实验

取 Wister 大鼠 90 只,随机分为 3 组,每组 30

只。给药前禁食 12 h,按  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $1.0 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) 的剂量分别灌服 ADV、M1 和 M2。每组分别于给药后 0.5, 1, 2, 6, 12 h 活杀 6 只,取肝、肾,匀浆,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,分离上清液,用建立的 HPLC-荧光检测法分析,结果见表 1。

表 1 ADV、M1、M2 在组织的分布 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\pm \text{SD}$ ,  $n=6$ )

Tab1 Concentration of ADV, M1, M2 in the organs

| 器官<br>(organs) | 化合物<br>(component) | 0.5 h           | 1 h              | 2 h              | 6 h              | 12 h            |
|----------------|--------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| 肝(liver)       | ADV                | $1.95 \pm 0.26$ | $4.64 \pm 0.56$  | $8.51 \pm 0.68$  | $5.00 \pm 0.17$  | $2.19 \pm 0.13$ |
|                | M1                 | $4.42 \pm 0.37$ | $16.88 \pm 0.57$ | $10.12 \pm 0.55$ | $6.68 \pm 0.58$  | $3.48 \pm 0.39$ |
|                | M2                 | $7.05 \pm 0.86$ | $24.26 \pm 1.68$ | $13.28 \pm 1.39$ | $12.05 \pm 0.77$ | $7.97 \pm 1.16$ |
| 肾(kidney)      | ADV                | $5.02 \pm 0.62$ | $11.23 \pm 1.27$ | $22.11 \pm 1.24$ | $12.08 \pm 0.86$ | $4.28 \pm 0.56$ |
|                | M1                 | $2.15 \pm 0.28$ | $4.34 \pm 0.47$  | $12.16 \pm 1.05$ | $7.03 \pm 0.81$  | $2.87 \pm 0.32$ |
|                | M2                 | $2.05 \pm 0.34$ | $4.13 \pm 0.35$  | $11.34 \pm 0.84$ | $4.52 \pm 0.53$  | $1.61 \pm 0.14$ |

将表 1 中的数据用 SPSS 软件进行处理,对不同时间点的 PMEA 在不同组织的分布进行比较得出  $p$  值,结果显示服药后 0.5 h 到 12 h, 3 种前药在肝、肾中药物含量均具有显著性差异。在肝中浓度  $M2 > M1 > \text{ADV}$ , 表明 M2 在病灶部位的药物浓度较高,靶向性较好。在肾中浓度  $\text{ADV} > M1, M2$ , 但 M1 和 M2 在 0.5 h 到 2 h 内在肾中的浓度无显著性差异, 6 h 后两者有显著性差异:  $M1 > M2$ , 表明 M2 在肾中残留药量小,而两者均较 ADV 残留量小。

### 4 讨论

4.1 阿德福韦的测定方法,文献报道的有 HPLC-DAD 测定法<sup>[3]</sup>、柱前衍生 HPLC-荧光测定法<sup>[4]</sup>和 LC-MS/MS 测定法<sup>[5~7]</sup>。本实验选用柱前衍生化 HPLC-荧光法,通过对衍生剂、流动相、内标及蛋白沉淀方法的筛选,最终确定本文所述的检测方法,用于同时测定大鼠肝、肾组织中 PMEA 的含量。方法专属性强,准确性好,灵敏度高。

4.2 本研究建立检测方法首次对阿德福韦酯类前药 M1 和 M2 进行组织分布研究。对 3 种前药在组织中药物浓度的比较结果显示前药 M2 提高 PMEA 在肝中的分布,比 M1、ADV 更具有肝靶向性,而其在肾脏中沉积更少,大大降低了肾毒性的产生,有利于肝炎的治疗。因此 M2 可以被认为是具有较高疗效和较低副作用的候选化合物,有望成为更好的抗慢性肝炎药物,具有继续研发的价值。

### 参考文献

- 1 ZHANG Chuan-hai(张传海), WANG Hai-yan(王海燕). Research progress of adefovir(阿德福韦的研究进展). *Hebei Med J(河北医药)*, 2006, 28(5): 415
- 2 Lin CC, Xu C, Zhu NQ, et al. Single-dose pharmacokinetics and Metabolism of [ $^3\text{H}$ ] remofovir in rats and cynomolgus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(3): 925
- 3 ZHOU Cai-ju(周采菊), LI Ying(栗莹), HUANG Hua-rui(黄华瑞). RP-HPLC determination of adefovir dipivoxil and its related substances(反相高效液相色谱法测定阿德福韦酯的含量及其有关物质). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2008, 28(3): 424
- 4 XU Zhi-ru(徐智儒), JIANG Ye(蒋萍), ZHANG Xiao-qing(张晓青). Determination of adefovir in biological samples of rats by HPLC with fluorescence detection(高效液相色谱-荧光检测法测定大鼠生物样品中阿德福韦). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2004, 24(5): 505
- 5 Sun DQ, Wang HS, Wang BJ, et al. Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for the determination of adefovir in human serum and urine. *Pharm Biomed Anal*, 2006, 42(20): 372
- 6 CHU Yang(褚扬), WU Yi(武毅), LAN Jing(兰静), et al. Detection of adefovir in human plasma by LC/MS/MS(液相色谱-质谱-质谱联用法测定人血浆中阿德福韦的浓度). *Chin Hosp Pharm J(中国医院药学)*, 2007, 27(7): 894
- 7 WANG Hai-sheng(王海生), GAO Yan-hui(高彦慧), SUN De-qing(孙德清), et al. Determination of adefovir in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry(液相色谱-质谱/质谱联用法测定健康志愿者血清中阿德福韦). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2008, 28(2): 202

(本文于 2010 年 7 月 9 日收到)