

阿德福韦酯类似物M₁和M₂在犬体内的生物利用度研究

李澎灏^{1*},周远大^{2#},何海霞²(1.深圳市第二人民医院药学部,广东 深圳 518035;2.重庆医科大学附属第一医院药学部,重庆 400016)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1955-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.13

摘要 目的:研究阿德福韦酯类似物M₁和M₂在犬体内的生物利用度。方法:将犬随机分为阿德福韦酯组、M₁组和M₂组,每组6只,灌服相应药物7 mg/kg,采用高效液相色谱-质谱法检测各组犬给药后0.33、0.67、1、2、3、4、8、12、24、36、48 h阿德福韦的血药浓度,用3p97药动学软件计算药动学参数。色谱柱:Phenomenex C₁₈(2)100 d,预柱:Luna C₁₈(2),流动相:1%甲酸水溶液-甲醇(98:2,V/V),流速:0.2 ml/min;质谱条件:电喷雾电离选择性正离子检测,阿德福韦测定离子质荷比(*m/z*)为274[M+H]⁺,内标更昔洛韦测定离子*m/z*为256[M+H]⁺。结果:阿德福韦酯、M₁和M₂的药动学参数分别为*t*_{max}:(0.69±0.14)、(1.30±0.98)、(1.23±1.00) h,*c*_{max}:(143.19±56.79)、(48.11±18.45)、(79.76±41.68) ng/ml,AUC_{0-48 h}:(2 559.80±896.64)、(966.91±668.36)、(954.16±1 405.65) ng·h/ml,M₁和M₂的生物利用度分别为37.77%和37.27%。结论:M₁和M₂的生物利用度未达临床需求,其原因可能是合成或纯化过程中杂质过多,或者其体内转化有限,尚待进一步探究。
关键词 阿德福韦酯类似物;生物利用度;高效液相色谱-质谱法;犬

Bioavailability Study of Adefovir Dipivoxil Analogs M₁ and M₂ in Dogs
LI Peng-hao¹,ZHOU Yuan-da²,HE Hai-xia²(1.Dept. of Pharmacy, Shenzhen Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518035, China;2.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the bioavailability of adefovir dipivoxil analogs M₁ and M₂ in dogs. METHODS: Dogs were randomly divided into adefovir dipivoxil group, M₁ group and M₂ group with 6 dogs for each group. These groups were given appropriate drugs of 7 mg/kg. The plasma concentrations of adefovir were measured by HPLC-MS 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h after administration. The pharmacokinetic parameters were measured by 3p97 software. The chromatographic condition was as follows: Phenomenex C₁₈(2)100 d column, Luna C₁₈(2) pre-column, 1% formic acid-methanol (98:2, V/V), flow rate of 0.2 ml/min; MS condition: electrospray ionization selective positive ion detection, (*m/z*)274[M+H]⁺ for adefovir and *m/z* 256[M+H]⁺ for ganciclovir. RESULTS: Pharmacokinetic parameters of adefovir dipivoxil, M₁ and M₂ were as follows: *t*_{max}:(0.69±0.14), (1.30±0.98), (1.23±1.00) h; *c*_{max}:(143.19±56.79), (48.11±18.45), (79.76±41.68) ng/ml; AUC_{0-48 h}:(2 559.80±896.64), (966.91±668.36), (954.16±1 405.65) ng·h/ml. The relative bioavailability of M₁ and M₂ were 37.77% and 37.27%, respectively. CONCLUSIONS: The bioavailability of M₁ and M₂ have not achieved clinical requirement. The cause that there was large number of impurity during synthesise or purification and transformation is limited *in vivo*, should be further studied.
KEY WORDS Adefovir dipivoxil analogs; Bioavailability; HPLC-MS; Beagle dogs

表2 各组受试物吸光度检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 2 Results of absorbance determination of test samples in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	吸光度值	自身对照吸光度值	吸光度差值
阴性对照组	0.286 8±0.011 0		0.286 8±0.011 0
阳性对照组	0.983 4±0.060 8		0.983 4±0.060 8
0.23 mg/ml组	1.926 9±0.118 4	0.193 7±0.006 1	1.733 2±0.112 3
0.115 mg/ml组	1.830 2±0.184 7	0.069 6±0.009 0	1.760 6±0.175 7
0.058 mg/ml组	1.648 7±0.078 2	0.025 9±0.004 2	1.622 8±0.074 0
0.029 mg/ml组	0.376 9±0.046 3	0.013 8±0.002 8	0.363 1±0.043 5

0.058~0.23 mg/ml质量浓度下,3 h内出现溶血现象,0.029 mg/ml质量浓度时未见溶血和红细胞凝聚。说明该药物在使用中

* 副主任药师。研究方向:临床药理学。电话:0755-82723342。
E-mail:13802243490@126.com
通信作者:主任药师,教授,博士研究生导师。研究方向:临床药理学。电话:023-68898185。E-mail:zhouyuanda001@163.com

存在发生溶血的不安全因素,由于其临床用量较高,建议降低临床用量。
本试验采用了常规的家兔血^[2],有研究表明兔血细胞溶血活性明显高于羊、牛血细胞,因为兔血细胞脆性大于羊、牛血细胞。本试验方法参照“化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则”^[1],在该原则推荐的肉眼观察方法的基础上增加了显微镜下观察和吸光度测定两种方法,对注射用盐酸米托蒽醌溶血结果的判断更加科学、合理,是对常规溶血试验方法的发展和延伸。
参考文献
[1] 国家食品药品监督管理局.药物研究技术指导原则:化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2005:116-131.
[2] 华志学,马娅,江坤,等.注射用七叶皂苷钠体外溶血作用试验研究[J].中国药师,2009,12(11):1 549.
(收稿日期:2012-07-25 修回日期:2012-09-19)

阿德福韦酯是新一代核苷酸类似物,在体内转化为阿德福韦而产生抗病毒作用。其耐药变异产生较晚、发生率低,对耐药变异株药敏性仍然较高,是目前常用的抗乙型肝炎病毒药物。该类药服用简便、口服吸收好,患者易于接受,常用于抗病毒治疗,在市场的占比比例较大。北京世桥生物制药有限公司研制了阿德福韦酯的类似物 M_1 和 M_2 ,为探讨 M_1 和 M_2 转化为阿德福韦的生物利用度,笔者进行了 M_1 和 M_2 在Beagle犬体内的生物利用度研究。

1 材料

1.1 仪器

LCMS-2010A 液相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司);BF2000 氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司);KA-1000 低速台式离心机、TGL-16 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Sartorius BS210S 电子天平(美国 Sartorius 公司);QL-901 涡旋混匀器(江苏常州国华仪器厂);Milli-Q plus 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

阿德福韦对照品(白色结晶粉末,易溶于水,纯度:98.8%)、阿德福韦酯对照品(白色结晶粉末,易溶于水,纯度:99.0%)、 M_1 试验药(白色结晶粉末,不溶于水,批号:071006-1,纯度:98.5%)、 M_2 试验药(白色结晶粉末,不溶于水,批号:061204-2,纯度:98.5%),上述对照品及试验药由北京世桥生物制药有限公司提供;内标:更昔洛韦(GCLV)标准品(宜昌长江药业有限公司,批号:070201);甲醇为色谱纯,甲酸、异丙醇为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

健康合格一级 Beagle 犬,18 只,♀ ♂ 各半,体质量 8~10 kg,8~12 月龄,环境设施合格证和质量合格证号分别为川实动管第 64 号及川实动管第 63 号,由四川养廉研究所提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与质谱条件

色谱条件:色谱柱:Phenomenex C_{18} (2)100 d(100 mm×2.0 mm,3 μ m),预柱:Luna C_{18} (2)(10 mm×2.0 mm,3 μ m);流动相:1%甲酸水溶液-甲醇(98:2,V/V),流速:0.2 ml/min;进样量:5 μ l。质谱条件:电喷雾电离(ESI)选择性正离子检测,阿德福韦测定离子质荷比(m/z):274[M+H]⁺,内标更昔洛韦测定离子 m/z :256[M+H]⁺;ESI 电压:4.5 kV;雾化器氮气流量:1.5 L/min;检测电压:1.50 kV。阿德福韦对照品和内标的质谱图见图 1。

2.2 血浆样品的处理

精密吸取血浆 0.5 ml,置于 10 ml 具塞离心管中,精密加入内标液(1.7 μ g/ml GCLV)20 μ l,涡旋振荡 2 min,3 500 r/min 离心 10 min,吸取有机层至另一离心管中,于 80 $^{\circ}$ C 水浴,高纯氮气小心吹干,残留物加 1% 甲酸 50 μ l 溶解,涡旋振荡 30 s,然后转移至 EP 管中,16 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行分析。

2.3 专属性考察

取空白血浆、空白血浆+阿德福韦、血浆样品,除空白血浆不加内标外,其余按“2.2”项下方法进行处理,进样分析。结

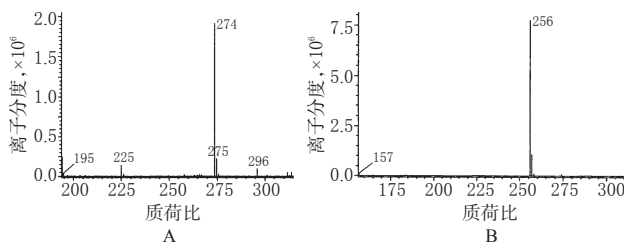


图 1 阿德福韦对照品和内标的质谱图

A. 阿德福韦对照品; B. 内标

Fig 1 MS spectra of adefovir control and internal standard

A. adefovir control; B. internal standard

果,阿德福韦、内标保留时间分别为 4.3、3.1 min,血浆中内源性物质不干扰样品测定,详见图 2。

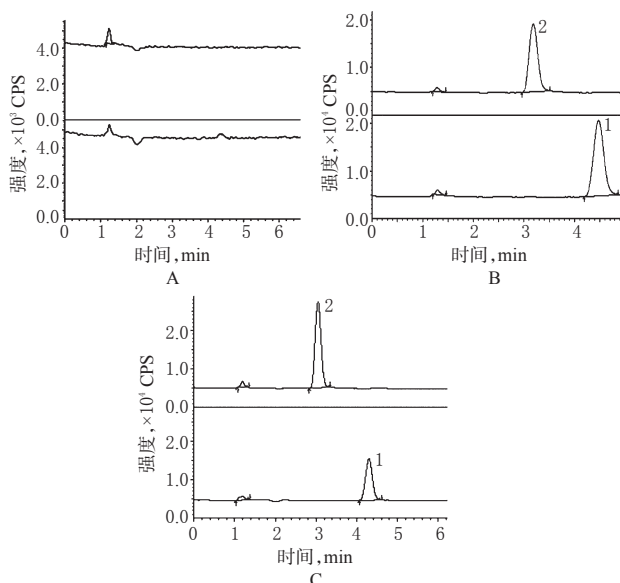


图 2 多反应监测图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+阿德福韦+内标; C. 血浆样品+内标; 1. 阿德福韦; 2. 内标

Fig 2 MRM chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+adefovir+ganciclovir; C. plasma sample+internal standard; 1. adefovir; 2. internal standard

2.4 线性关系考察

精密吸取一定量的空白血浆,置于 10 ml 具塞离心管中,再精密加入阿德福韦对照品溶液适量,制成含阿德福韦质量浓度分别为 5.00、10.00、30.00、75.00、150.00、300.00、600.00、1 200.00 ng/ml 的血浆样品,总体积 0.5 ml,精密加入内标液 20 μ l,其余照“2.2”项下方法处理,进样 5 μ l,测定峰面积。以阿德福韦与内标峰面积的比值(y)对血浆样品的质量浓度(x)进行回归分析,得回归方程为 $y=0.0117x-0.1658$ ($r=0.9953$),结果表明,阿德福韦检测质量浓度的线性范围为 5.00~1 200.00 ng/ml,定量限为 5.00 ng/ml。

2.5 回收率与精密度试验

在避光条件下,用空白血浆配制含阿德福韦质量浓度分别为 10.00、75.00、600.00 ng/ml 的血浆样品,各 5 份,按“2.2”项下方法处理,进样 5 μ l;另用 1% 甲酸配制相应浓度阿德福韦溶液,直接进样,记录峰面积,以血浆样品峰面积与相应浓度的

阿德福韦溶液的峰面积的比值计算萃取回收率。分别在同日内测定5次,按回归方程计算,以测得值与加入值的比值计算方法回收率,并计算日内RSD;连续测定5 d,考察其日间RSD,结果详见表1。

表1 回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of recovery test($\bar{x} \pm s, n=5$)							
加入质量浓度, ng/ml	测得质量浓度, ng/ml	方法回收率, %	日内RSD, %	日间RSD, %	测得质量浓度, ng/ml		萃取回收率, %
					标准液直接进样	萃取后进样	
600.00	623.97±40.80	104.00	6.54	1.02	596.86±4.55	535.00±17.68	89.64
75.00	78.56±7.62	104.74	9.70	1.58	74.97±0.17	66.08±2.26	88.14
10.00	9.53±0.61	95.34	6.40	1.06	9.98±0.33	8.45±0.68	84.67

2.6 稳定性试验

在避光条件下,用空白血浆配制含阿德福韦质量浓度分别为10.00、75.00、600.00 ng/ml的血浆样品,在室温条件下放置,分别于0.4、8、14、20、24 h时取样,按“2.2”项下方法处理后进样测定,记录峰面积。结果,低、中、高水平的血浆样品峰面积的RSD分别为1.80%、1.78%和1.56%,表明血浆样品在室温下避光放置24 h内稳定。

2.7 药动学实验

取犬18只,随机分为阿德福韦酯组、M₁组和M₂组,每组6只,禁食12 h后各组犬灌服相应药物7 mg/kg,于服药后0.33、0.67、1、2、3、4、8、12、24、36、48 h经静脉采血2 ml,肝素抗凝,3 000 r/min离心10 min,分离血浆,−20 ℃冷冻保存,按“2.2”项下方法处理后进样测定,计算血浆中阿德福韦的浓度。采用3p97药动学软件包计算药动学参数。各组犬给药后体内阿德福韦的平均药-时曲线见图3,药动学参数见表2。

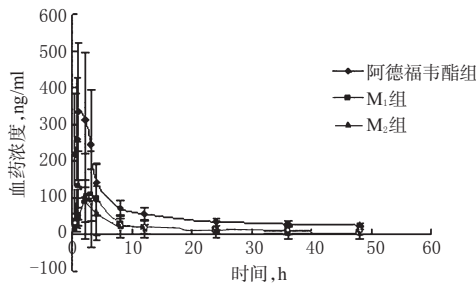


图3 各组犬给药后体内阿德福韦的平均药-时曲线($n=6$)
Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of adefovir in dogs after administration($n=6$)

由表2可见,犬单剂量7 mg/kg灌服药物后,与阿德福韦酯组比较,M₁组和M₂组的 t_{max} 、 $AUC_{0-48 h}$ 、 V_d 均有明显差异($P<0.05$),但M₁组与M₂组间比较无显著性差异($P>0.05$)。提示目前合成的M₁或M₂均纯度不高且不够稳定,在肝内转化的变异性较大,有待纯度进一步提高,以利于筛选。

表2 各组犬给药后体内阿德福韦的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Pharmacokinetics parameters of adefovir in dogs after administration($\bar{x} \pm s, n=6$)

项目	阿德福韦酯组	M ₁ 组	M ₂ 组
C_{max} , ng/ml	143.19±56.79	48.11±18.45	79.76±41.68
t_{max} , h	0.69±0.14	1.30±0.98	1.23±1.00
$AUC_{0-48 h}$, ng·h/ml	2 559.80±896.64	966.91±668.36	954.16±1 405.65
$t_{1/2}$, h	14.48±4.32	14.49±9.66	17.62±7.42
CL, mg/(kg·h)	0.002 5±0.000 6	0.009 7±0.005 8	0.015±0.016
V_d , mg/kg	0.056±0.027	0.11±0.053	0.11±0.095
F , %		37.77	37.27

3 讨论

文献报道,血浆中阿德福韦的检测主要有毛细管色谱法^[1]、液相色谱-质谱-质谱联用法^[2-3]、荧光检测法^[4],而本研究选择采用高效液相色谱-质谱法。结果表明,本研究方法简单易行,方法回收率高、灵敏度高、分离度良好,完全可满足实验要求。

本实验中M₁和M₂均需在体内转化为阿德福韦才能产生抗病毒作用。M₁、M₂在犬体内的 C_{max} 分别为(48.11±18.45)、(79.76±41.68) ng/ml,虽然二者比较有显著性差异($P<0.05$),但二者与对照药阿德福韦酯[(143.19±56.79) ng/ml]比较却均有极显著性差异($P<0.01$),且生物利用度评价不能只关注某项指标,而应考察多项药动学重要参数,如 t_{max} 、 $AUC_{0-48 h}$ 。本实验结果显示,M₁、M₂在犬体内的 F 未达临床需求,其原因之一可能是M₁和M₂在合成或纯化过程中杂质过多,另一原因可能是该化合物在体内转化有限,故难于达临床要求。其更深层次的原因尚待进一步探究。

参考文献

[1] 丁翔宇,蒋晔,李艳荣,等.阿德福韦酯及其有关物质的胶束电动毛细管色谱法快速测定[J].分析测试学报,2007,26(6):914.
[2] 褚扬,武毅,兰静,等.液相色谱-质谱-质谱联用法测定人血浆中阿德福韦的浓度[J].中国医院药学杂志,2007,27(7):894.
[3] Zhao LY, Zhang Y. Determination of adefovir in macaque plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J].Acta Pharm Sinica,2003,38(2):120.
[4] 刘治勇,黄丽华,罗婵,等.HPLC-荧光检测法测定犬血浆中阿德福韦的浓度[J].重庆医科大学学报,2011,36(9):1 091.

(收稿日期:2013-03-27 修回日期:2013-04-07)