

液相色谱-串联质谱法测定阿德福韦及其前体化合物在大鼠血浆中的浓度

孟繁华, 郭继芬*, 仲伯华, 赵毅民
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: **目的** 建立测定大鼠血浆中阿德福韦(PMEA)及其前体药物 APD2、PMEA-CA 的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。**方法** 分别采用不同的血浆样品处理方法和色谱条件测定 PMEA 及其前体化合物。测定 PMEA 时,血浆样品经甲醇沉淀蛋白后,用 Discovery C₁₈ 柱分离,以甲醇-0.5% 甲酸(20:80, V/V)为流动相,9-(3-膦酸甲氧基丙基)腺嘌呤为内标,采用 ESI 源以多反应监测方式对血浆样品中的 PMEA 进行定量分析。测定 APD2 和 PMEA-CA 时,血浆样品经固相萃取后,用 Hypersil ODS2 柱分离,以甲醇-5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(70:30, V/V)为流动相,格列本脲为内标,采用 ESI 源以多反应监测方式对血浆中 APD2 和 PMEA-CA 进行定量分析。**结果** PMEA 和 PMEA-CA 线性范围为 25~5 000 μg·L⁻¹, ADP2 的线性范围为 10~2 500 μg·L⁻¹, 日内、日间精密度均 <5.5%。**结论** 本方法专属性强、灵敏度高,适用于 PMEA 前体药 APD2 及 PMEA-CA 的临床前药代动力学研究。

关键词: 阿德福韦; 阿德福韦前体药物; 液相色谱-串联质谱法; 药代动力学

中图分类号: R917.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-0440(2009)03-0214-05

Determination of adefovir and its prodrugs in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MENG Fan-hua, GUO Ji-fen, ZHONG Bo-hua, ZHAO Yi-min

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To establish a specific and sensitive LC-MS/MS method for the determination of adefovir(PMEA) and its prodrug ADP2 and PMEA-CA in rat plasma. **Methods** Adefovir and internal standard 9-(3-phosphonylmethoxypropyl) adenine were isolated from plasma by protein precipitation with methanol, then separated on a Discovery C₁₈ column. The mobile phase for determining adefovir consisted of methanol and 0.5% formic acid (20:80, V/V). ADP2, PMEA-CA and internal standard glibenclamide were extracted by SPE, then separated on a Hypersil ODS2 column. The mobile phase for determining ADP2 and PMEA-CA consisted of methanol and 5 mmol·L⁻¹ NH₄OAc (70:30, V/V). The protonated analytes generated in the positive ion mode were monitored through multiple reaction monitoring in an electrospray ionization source. **Results** The linear concentration ranges of the calibration curve for PMEA, ADP2 and PMEA-CA were 25-5 000 μg·L⁻¹, 10-2 500 μg·L⁻¹, and 25-5 000 μg·L⁻¹, respectively. The inter- and intra-day precision values were below 5.5% for all quality control samples. **Conclusion** The method is proved to be suitable for pharmacokinetic studies of adefovir and its prodrug with the advantages of high sensitivity and specificity.

收稿日期:2009-01-07

作者简介:孟繁华,女,助理实验师,研究方向:药物分析,Tel: 010-66931614

* 通讯作者:郭继芬,女,副研究员,研究方向:药物分析,Tel: 010-66931614, E-mail: guojifen@sohu.com

Key words: adefovir; prodrug of adefovir; LC-MS/MS; pharmacokinetics

阿德福韦(adefovir, PME A, 结构式见图 1A)是环磷酸腺苷的一种同系物,具有广谱抗病毒活性,但 PME A 的口服生物利用度很低,作为治疗慢性肝炎的药物相当不利。阿德福韦酯(adefovir dipivoxil, ADV),是 PME A 的双特戊酸甲基酯,是核苷类逆转录酶抑制剂,亦具有广谱抗病毒活性,用于治疗慢性乙型肝炎。ADV 为前体药物,经口服吸收进入体内后迅速转化为活性母体药 PME A 而发挥药效^[1,2]。研究表明,口服 ADV 具有较明显的剂量依赖性肾脏毒性,由于乙肝患者的治疗需要长期给药,因而严重限制了临床用药的剂量。因此,本所药物化学研究室合成了 PME A 的前体药物 ADP2 及 PME A-CA。为了解 ADP2 和 PME A-CA 在生物体内的药代动力学特征,建立了测定 ADP2、PME A-CA 及其代谢产物 PME A 的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。

有文献报道用高效液相色谱-荧光检测法测定生物样品中的 PME A,但这一方法需要对 PME A 进行柱前荧光衍生化,操作繁琐^[3,4]。也有文献报道用 LC-MS/MS 方法测定 PME A 的血药浓度来研究其药代动力学特性^[5-9]。本实验在现有文献的基础上,采用不同的血浆样品处理方法和色谱条件,分别以 9-(3-磷酸甲氧基丙基)腺嘌呤(PMPA, 内标 1)和格列本脲(内标 2)为内标,建立了测定大鼠血浆中 PME A 及其前体化合物 ADP2 和 PME A-CA 的 LC-MS/MS 法。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂及动物

API 3000 型串联质谱仪(配有 Turbo Ionspray 离子化源以及 Analyst 1.1 数据处理系统,美国 ABI 公司);Agilent 1100 四元梯度泵和自动进样器(美国 Agilent 公司);固相萃取仪(美国 Supelco 公司);Bakerbond C₁₈(100 mg, 1 mL)固相萃取柱(美国 J. T. Baker 公司)。

PME A 对照品、PME A 前体药物 ADP2、PME A-CA 及 9-(3-磷酸甲氧基丙基)腺嘌呤(PMPA, 内标 1)均由军事医学科学院毒物药物研究所药物化学研究室提供;格列本脲(内标 2)购自中国药品生物制品检定所。

1.2 色谱条件

1.2.1 测定 PME A 的色谱条件 分析柱为 Disco-

very ODS(250 × 4.6 mm, I.D., 5 μm), C₁₈ 保护柱(4.0 × 3.0 mm, I.D.);流动相为甲醇-0.5% 甲酸(20:80, V/V);流速为 0.5 mL · min⁻¹;进样量为 20 μL;柱温为 24℃;内标为 PMPA(4 mg · L⁻¹)。

1.2.2 测定 ADP2、PME A-CA 的色谱条件 分析柱为 Hypersil ODS2 柱(150 × 4.6 mm, I.D., 5 μm), C₁₈ 保护柱(4.0 × 3.0 mm, I.D.);流动相为甲醇-5 mmol · L⁻¹ NH₄OAc(70:30, V/V);流速为 0.5 mL · min⁻¹;进样量为 20 μL;柱温为 24℃;内标为格列本脲(84 μg · L⁻¹)。

1.3 质谱条件

离子源为电喷雾离子化(Turbo Ionspray)源;正离子方式检测;喷射电压为 4 000 V;源温度为 350℃;雾化气为 8;卷帘气为 11;碰撞气为 5;扫描方式为多反应监测,用于定量分析的离子反应分别为质荷比 m/z 274.4 → m/z 162.4 (PME A, CE 40 V), m/z 288.1 → m/z 176.1 (PMPA, CE 35 V), m/z 514.1 → m/z 162.4 (ADP2, CE 60 V), m/z 736.2 → m/z 274.2 (PME A-CA, CE 45 V), m/z 494.0 → m/z 396.1 (格列本脲, CE 20 V);扫描时间为 150 ms。相应的二级全扫描质谱图如图 1 所示。

1.4 血浆样品处理

1.4.1 测定 PME A 的血浆样品处理方法 取血浆 200 μL,置 1.5 mL 塑料离心管中,加内标溶液(4 mg · L⁻¹ PMPA 水溶液)50 μL,加甲醇 500 μL 混匀,涡流 3 min,离心 10 min(6 000 × g),分取上清液置 10 mL 试管中,于 45℃ 下空气挥干,残余物用 150 μL 水溶解,吸取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

1.4.2 测定 ADP2 和 PME A-CA 的血浆样品处理方法 取血浆 200 μL,置 1.5 mL 塑料离心管中,加内标溶液(84 μg · L⁻¹ 格列本脲)50 μL,加水 200 μL 混匀,涡流 3 min,离心 10 min(6 000 × g),分取上清液至已活化好的 SPE C₁₈ 柱,先用 2 × 1 mL 水冲洗,再用 1 mL 甲醇洗脱,将甲醇洗脱液于 45℃ 下空气挥干,残余物用 70% 甲醇 150 μL 溶解,吸取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

1.5 血浆样品采集

12 只 SD 大鼠,雌雄各半,随机分为 2 组,给药前禁食 16 h,分别灌胃给予 40% 二甲亚砜混悬的 ADP2 和 PME A-CA,给药剂量均为 10 mg · kg⁻¹,于给药前和给药后 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0,

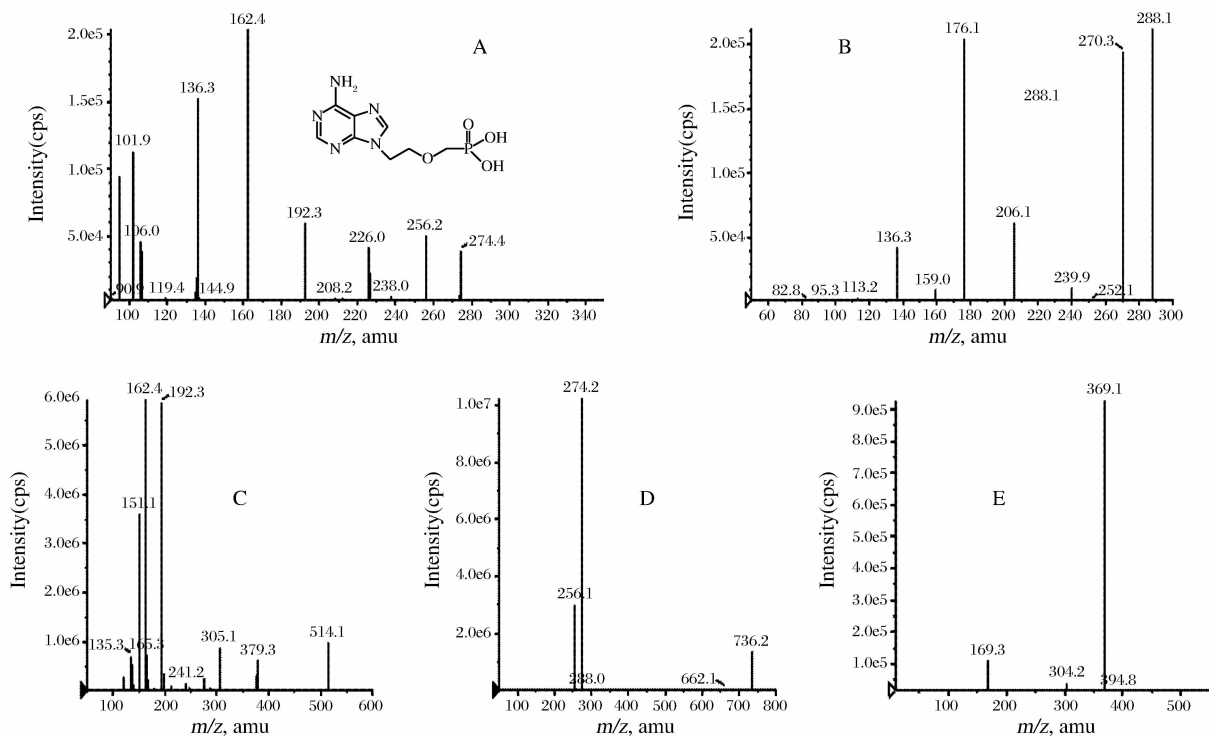


Fig 1. Product ion mass spectra of PME A, PMPA, ADP2, PME A-CA, and glibenclamide. A: PME A; B: PMPA; C: ADP2; D: PME A-CA; E: glibenclamide

3.0, 6.0, 12.0, 24.0 h 大鼠眼底静脉丛采血 0.5 mL, 离心 10 min ($1\ 000 \times g$), 分离出血浆, 按 1.4.2 项下操作, 测定血药浓度。

2 结果

2.1 标准曲线

取空白大鼠血浆 200 μL , 分别加入 PME A、ADP2 和 PME A-CA 标准系列溶液 50 μL , 其余分别按 1.4.1 和 1.4.2 项下操作, 取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析, 记录色谱图。以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算^[10], 求得 PME A 的标准曲线回归方程为 $Y = 0.000\ 239 X + 0.000\ 569$ ($r = 0.999\ 3$, $1/x^2$ 加权), 线性范围为 25 ~ 5 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; ADP2 的回归方程为 $Y = 0.003\ 68 X + 0.001\ 85$ ($r = 0.998\ 0$, $1/x^2$ 加权), 线性范围为 10 ~ 2 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; PME A-CA 的回归方程为 $Y = 0.001\ 75 X - 0.001\ 44$ ($r = 0.996\ 9$, $1/x^2$ 加权), 线性范围为 25 ~ 5 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 精密度与准确度

取空白大鼠血浆 200 μL , 加 PME A、ADP2 和 PME A-CA 标准系列溶液 50 μL , 配制成低、中、高

(PME A 和 PME A-CA 为 25, 500, 5 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; ADP2 为 10, 250, 2 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度的血浆样品各 6 份做为 QC 样品, 连续测定 3 d, 其余分别按 1.4.1 和 1.4.2 项下依法操作, 并与标准曲线同时进行, 计算 QC 样品浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的精密度和准确度, 分别以相对标准偏差 (RSD) 和相对误差 (RE) 表示, 结果见表 1, 均符合生物样品分析的指导原则。

2.3 方法专属性

取空白大鼠血浆 200 μL , 除不加标准溶液外, 分别按 1.4.1 和 1.4.2 项下依法操作, 进样 20 μL , 得色谱图, 如图 2A 和 3A; 将一定浓度的 PME A、ADP2 和 PME A-CA 标准溶液分别加入空白血浆, 依同法操作, 得色谱图, 如图 2B 和 3B, 待测物的保留时间分别为 6.5, 4.7 和 6.2 min, 内标物的保留时间分别为 6.9, 4.1 和 4.1 min; 取给药后收集的血浆样品, 依同法操作, 得色谱图, 如图 2C、3C 和 3D。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰 PME A、ADP2 和 PME A-CA 的测定。

2.4 PME A 前体化合物血药浓度的测定

大鼠单次口服 ADP2 或 PME A-CA 后, 完全、快速水解为其活性代谢产物 PME A, 血浆中未检测到

Tab 1. Accuracy and precision for the analysis of PME A, ADP2 and PME A-CA in rat plasma

	Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		RSD/%		Relative error/%
	Added	Found	Intra-day	Inter-day	
PME A	25.0	24.6	4.3	2.1	-1.7
	500	491.7	2.8	4.3	-1.7
	5000	4935	3.2	5.5	-1.3
ADP2	10.0	10.2	2.8	1.0	2.0
	2250	245	3.9	3.5	-2.1
	2500	2490	3.2	4.4	-0.4
PME A-CA	25.0	25.5	4.4	4.0	2.1
	500	512	3.7	2.2	2.4
	5000	5060	2.2	1.7	1.2

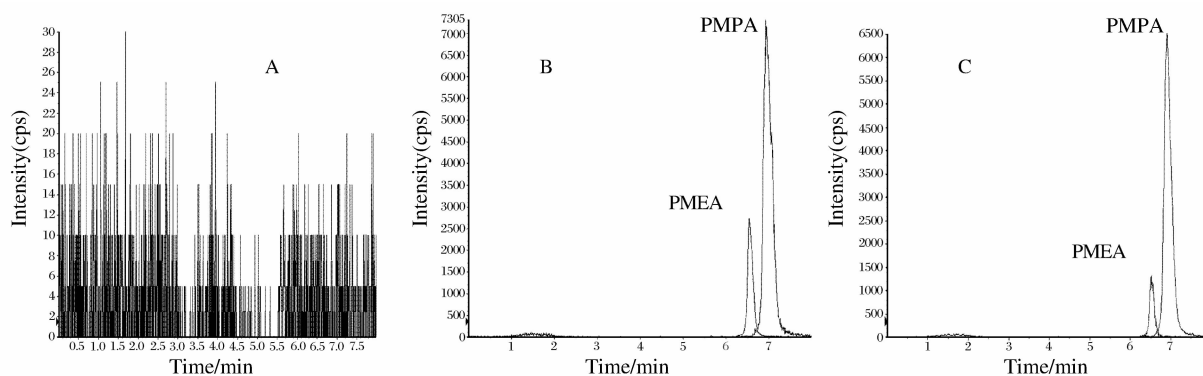


Fig 2. MRM chromatograms for PME A, PMPA, ADV. A: drug-free plasma; B: plasma ($200 \mu\text{L}$) spiked with $1250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PME A and $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PMPA; C: rat plasma sample 0.25 h after oral administration of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ADV.

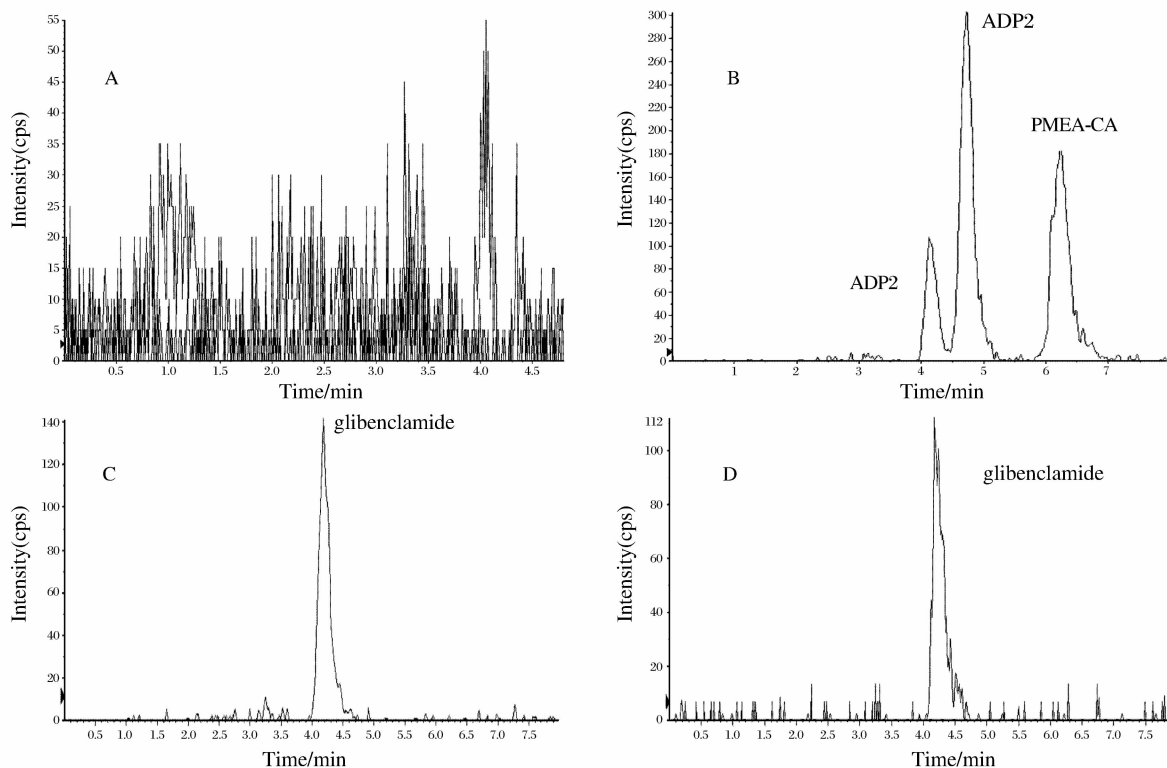


Fig 3. MRM chromatograms for ADP2, PME A-CA and glibenclamide. A: drug-free plasma; B: plasma ($200 \mu\text{L}$) spiked with $250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ADP2, $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of PME A-CA and $84 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ glibenclamide; C: rat plasma sample 0.25 h after oral administration of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ADP2; D: rat plasma sample 0.25 h after oral administration of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PME A-CA.

原形药物 ADP2 和 PMEAC-A, 所测得的代谢物 PMEAC-A 的平均血药浓度-时间曲线见图 4。

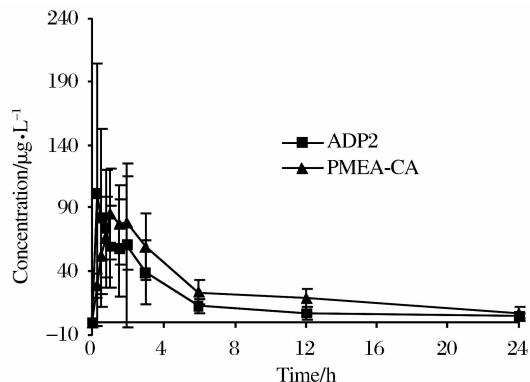


Fig 4. Mean plasma concentration-time profiles for PMEAC-A after the administration of a single oral dose of 10 mg · kg⁻¹ ADP2 or PMEAC-A to rats.

3 讨论

前体药物 ADP2 和 PMEAC-A 在生物样品中的浓度测定尚未见文献报道, 由于这两个前体化合物与其活性代谢物 PMEAC-A 的极性相差较大, 因此无法用测定 PMEAC-A 的色谱条件和生物样品预处理方法对其进行测定。通过对多种色谱柱和流动相进行比较后, 我们选用 Hypersil ODS2 柱对 ADP2 和 PMEAC-A 进行分离, 以甲醇-5 mmol · L⁻¹ NH₄ OAc (70:30, V/V) 为流动相, 发现该条件下待测物峰形良好、质谱响应亦较高。并分别对沉淀蛋白法、液-液萃取法和固相萃取法 (SPE) 进行了考察, 发现采用 SPE 法处理样品, 能够获得较高且稳定的提取回收率。通过选取上述色谱条件和血浆样品处理方法, 成功地对血浆中两种前体化合物原形 ADP2 和 PMEAC-A 同时进行定量。

药动学结果表明, ADP2 和 PMEAC-A 进入大鼠体内后完全、快速水解为其活性代谢产物 PMEAC-A, 其血浆中未检测到原形 ADP2 和 PMEAC-A。这与文献报道的其他 ADV 的体内药动学性质相似^[5~9]。

参 考 文 献

- [1] Cundy KC, Fishback JA, Shaw JP, *et al.* Oral bioavailability of the antiretroviral agent 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEAC-A) from three formulations of the prodrug bis(pivaloyloxymethyl)-PMEAC-A in fasted male cynomolgus monkeys[J]. *Pharm Res*, 1994, 11(6):839-843.
- [2] Benhamon Y, Bochet M, Thibault V, *et al.* Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus: an open-label pilot study[J]. *Lancet*, 2001, 358(9283):718-723.
- [3] Naesens L, Balzarini J, De Clercq E. Acyclic adenine nucleoside phosphonates in plasma determined by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Clin Chem*, 1992, 38(4):480-485.
- [4] Sparidans RW, Veldkamp A, Hoetelmans RM, *et al.* Improved and simplified liquid chromatographic assay for adefovir, a novel antiviral drug, in human plasma using derivatization with chloroacetaldehyde[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 736(1/2):115-121.
- [5] Kearney BP, Ramanathan S, Cheng AK, *et al.* Systemic and renal pharmacokinetics of adefovir and tenofovir upon coadministration[J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(8):935.
- [6] Chen XY, Liu D, Zhu L, *et al.* Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry procedure for the quantification of adefovir in human plasma[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(13):1893-1898.
- [7] Bi HC, Zhong GP, Zhou S, *et al.* Determination of adefovir in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19:2911-2917.
- [8] Liu YF, Xu GF, Xu C, *et al.* Ultra sensitive method for the determination of 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2004, 803(2):293-298.
- [9] Zhao LY, Chen XY, Zhang Y, *et al.* Determination of adefovir in monkey plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Acta Pharmaceut Sin*, 2003, 38(2):120-123.
- [10] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. *药物分析杂志*, 1996, 16(5):343-346.