

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

王海生¹, 高彦慧², 孙德清¹, 王本杰³, 郭瑞臣^{3*}

(1. 山东大学第二医院 药剂科, 济南 250033; 2. 山东大学药学院, 济南 250012;

3. 山东大学齐鲁医院 临床药理研究所, 济南 250012)

摘要 目的: 建立测定人血清中阿德福韦的液相色谱 - 质谱/质谱联用(LC - MS/MS)方法。**方法:** 血清样品经甲醇沉淀蛋白, 上清液吹干, 200 μL 流动相复溶, 离心, 取 40 μL 进样。色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 - 水 - 甲酸(20: 80: 0.1, $v/v/v$), 流速 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 采用电喷雾离子化四极杆串联质谱, 多反应监测方式测定样品浓度。监测离子对分别为 m/z 274 \rightarrow m/z 162 (阿德福韦) 和 m/z 226 \rightarrow m/z 135 (内标阿昔洛韦)。**结果:** 阿德福韦在 1.25 ~ 160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好($r = 0.9992, n = 5$), 最低定量限为 1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。低、中、高 3 种浓度质控样品的日内、日间精密度小于 8.64%, 方法回收率 99.20% ~ 101.98%, 阿德福韦提取回收率 56.50% ~ 59.26%。**结论:** 该方法灵敏度高, 定量准确, 适用于阿德福韦酯人体药代动力学研究。

关键词: 阿德福韦; 液相色谱 - 质谱/质谱联用; 血清药物浓度

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2008)02 - 0202 - 05

Determination of adefovir in human serum by liquid chromatography - tandem mass spectrometry

WNAG Hai - sheng¹, GAO Yan - hui², SUN De - qing¹, WANG Ben - jie³, GUO Rui - chen^{3*}

(1. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China;

2. Pharmaceutics College of Shandong University, Jinan 250012, China;

3. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract Objective: To develop a liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC - MS/MS) method for the determination of adefovir in human serum. **Methods:** The analyte was isolated from serum by protein precipitation with methanol, the supernatant was evaporated to dryness and reconstituted with 200 μL of mobile phase, then 40 μL was injected for analysis. A Diamonsil C_{18} column(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) and mobile phase consisted of methanol - water - formic acid (20: 80: 0.1, $v/v/v$) at a flow rate of 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ were used to separate adefovir and IS. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transition of m/z 274 \rightarrow m/z 162 and m/z 226 \rightarrow m/z 135 were used to quantify adefovir and aciclovir (IS), respectively. **Results:** A good linearity was obtained in the concentration range of 1.25 - 160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9992, n = 5$). The lower quantitative limit was 1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The inter - and intra - day RSDs were less than 8.64%, the method recoveries were within 99.20% - 101.98% and the extraction recoveries were within 56.50% - 59.26%. **Conclusion:** The method is sensitive and accurate, and proves to be suitable for human pharmacokinetics study of adefovir dipivoxil.

Key words: adefovir; LC - MS/MS; serum concentration

阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)是新型抗乙型肝炎病毒药物, 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, 2002 年由 FDA

批准在美国上市。阿德福韦酯属腺嘌呤核苷类似物, 口服后经过体内非特异性酯酶水解, 迅速转化为阿德福韦(adeфовir, ADF, 结构式见图 1), 血中检测

不出前体药和单酯,而阿德福韦消除前不被代谢,以原形自尿中排泄^[1]。阿德福韦酯临床常用剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,慢性乙型肝炎患者单次口服阿德福韦酯 10 mg 后, C_{max} 为 $(18.4 \pm 6.26) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。文献^[2,3]采用高效液相色谱-荧光检测法测定生物样品中阿德福韦,须对阿德福韦进行柱前衍生化,使之与氯乙醛反应生成高荧光物质 N^1, N^6 -二烯腺嘌呤衍生物,同时流动相中加入离子对试剂,需时长,操作复杂。赵丽艳等^[4]采用 LC-MS/MS 法测定猕猴血浆中阿德福韦,样品经甲醇沉淀蛋白后直接进样,虽操作简单,但最低定量限为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,不适用于人体阿德福韦血浓度测定及其药代动力学研究。阿昔洛韦(结构式见图 1)与阿德福韦结构相似,易于获取,本文旨在以阿昔洛韦为内标,建立一种灵敏度高、定量准确的 LC-MS/MS 方法,用于阿德福韦人体血浓度的测定及其临床药代动力学研究。

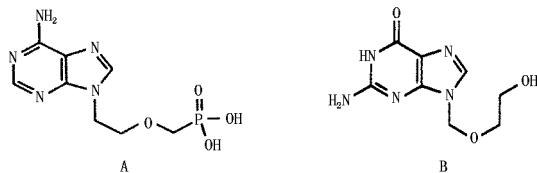


图 1 阿德福韦(A)和阿昔洛韦(B)的化学结构式

Fig 1 Structures of adefovir (A) and acyclovir (B)

1 仪器与试剂

API 4000 型液相色谱-质谱-质谱联用仪(美国 Applied Biosystem Sciex 公司),配有电喷雾源(ESI)及 Analyst 1.3 数据处理系统; Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科学技术公司),配有 G1312A 二元梯度泵, G1315B 二极管阵列检测器, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱; XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司); ABOIT 高速离心机(美国雅培公司); CX-250 超声清洗器(北京医疗设备二厂); 梅特勒-托利多 AX205 Delta Range 电子天平(瑞士梅特勒公司)。

阿德福韦对照品(含量 99.2%,批号:030127)由齐鲁制药有限公司提供,内标阿昔洛韦对照品(批号:140630-200001)购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯, TEDIA COMPANY INC 生产; 水为自制去离子重蒸馏水; 甲酸为分析纯,淄博市临淄天德精细化工研究所生产。

2 色谱及质谱条件

Diamonsil C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-甲酸(20:80:0.1); 流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

离子源为 ESI 源; 电喷雾电压(IS) 5400 V; 离子源温度(TEM) $450 \text{ }^\circ\text{C}$; 气帘气(CUR) 103.35 kPa; 雾化气(GS1) 413.40 kPa; 辅助气(GS₂) 310.05 kPa; 碰撞电压(CE) 14 V; 扫描方式为多反应监测(MRM), 正离子方式, 用于定量的离子对分别为 m/z 274 \rightarrow m/z 162(阿德福韦)和 m/z 226 \rightarrow m/z 135(内标阿昔洛韦), 扫描时间为 0.1 s。

3 样品处理

取血清 0.5 mL 置 2 mL 离心管中, 加入重蒸馏水 50 μL 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿昔洛韦水溶液(内标) 50 μL , 涡旋 30 s, 加入甲醇 1.0 mL, 涡旋 1 min, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 移取上清液, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中氮气吹干。残渣加流动相 200 μL 溶解, 涡旋 1 min, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 40 μL 进样分析。

4 结果

4.1 质谱分析 采用正离子方式检测, 于一级全扫描质谱图中获得阿德福韦准分子离子峰 $[M + H]^+$ m/z 274(图 2-A), 选择该准分子离子峰进行碰撞诱导电离, 脱去磷酸甲氧基, 生成主要碎片离子 m/z 162(图 2-A'), 用于定量。内标阿昔洛韦准分子离子 $[M + H]^+$ m/z 226(图 2-B), 脱去 2-羟乙氧甲基和氨基, 生成主要碎片离子 m/z 135(图 2-B'), 用于定量。

4.2 方法专属性 取志愿者空白血清 0.5 mL, 按“3”项下处理后测定, 得空白血清色谱图(图 3-A); 取空白血清分别加入已知浓度的阿德福韦对照品溶液和内标阿昔洛韦溶液, 同法操作, 得阿德福韦和阿昔洛韦色谱图(图 3-B); 取志愿者血清, 加入已知浓度的内标溶液, 同法操作, 得志愿者血清色谱图(图 3-C)。阿德福韦和内标阿昔洛韦的保留时间分别为 6.44 min 和 6.82 min, 空白血清中内源性物质不干扰阿德福韦及内标阿昔洛韦测定。

4.3 线性关系考察 取空白血清 0.5 mL, 依次加入阿德福韦对照品溶液 50 μL , 配成浓度为 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品血清, 除不加入 50 μL 水外, 按“3”项下方法操作并测定, 建立标准曲线。以对照品血清中待测物浓度为横坐标, 待测物与内标的峰面积比为纵坐标, 采用加权($W = 1/C^2$)最小二乘法^[5]进行线性回归, 得回归方程:

$$Y = 0.0476X + 0.00685 \quad r = 0.9992$$

线性范围为 1.25 ~ 160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 定量下限为 1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

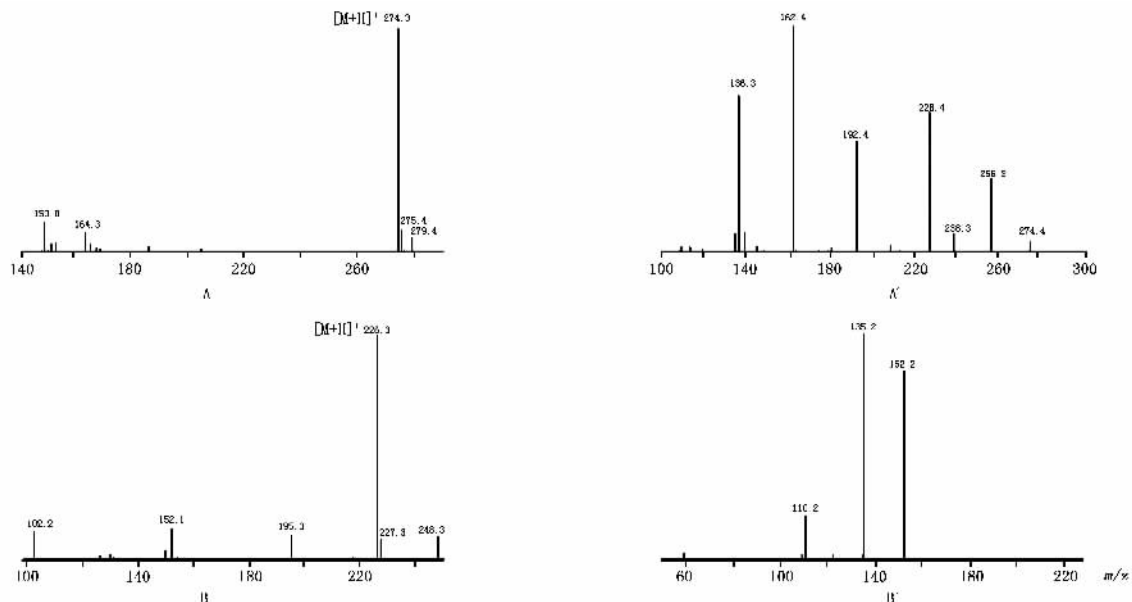


图2 阿德福韦(A, A')和阿昔洛韦(B, B')全扫描质谱图

Fig 2 Full scan mass spectrograms of adefovir(A, A') and acyclovir(internal standard) (B, B')

A, B. 一级全扫描质谱图(MS full scan) A', B'. 二级全扫描质谱图(MS² full scan)

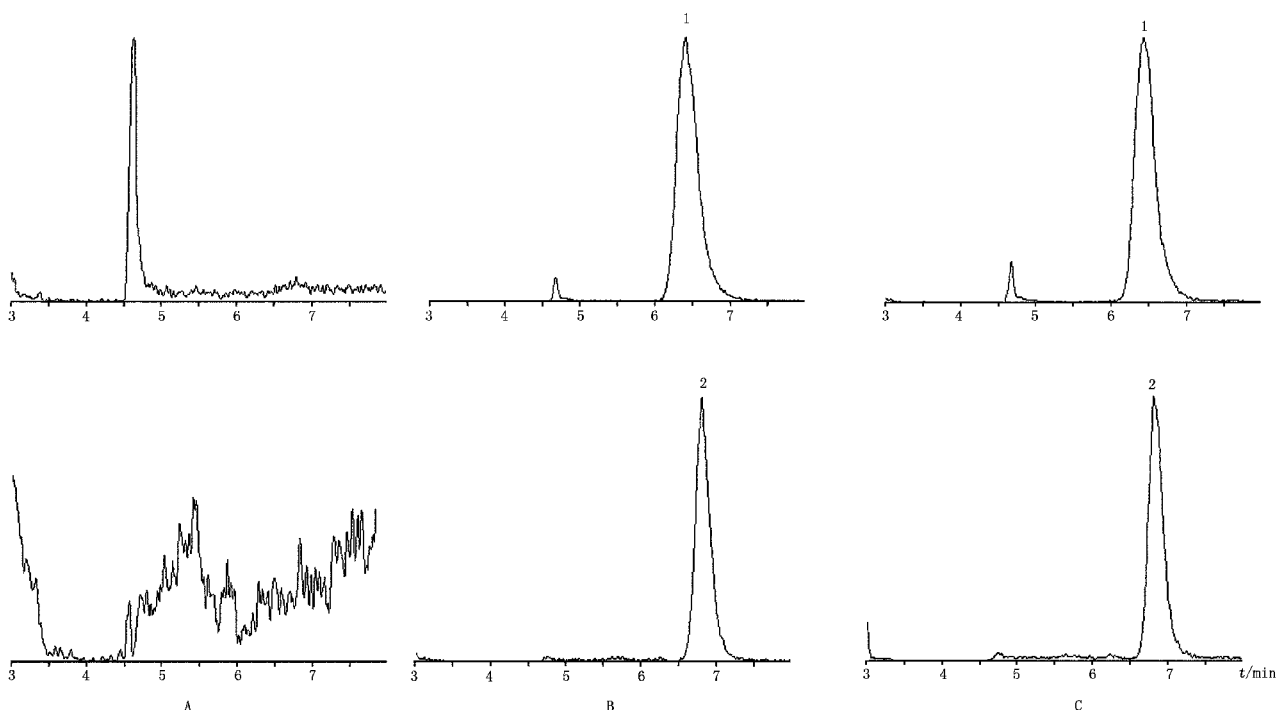


图3 典型色谱图

Fig 3 Typical chromatograms

A. 空白血清(blank serum) B. 空白血清加阿德福韦及阿昔洛韦 (serum spiked with 40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ adefovir and 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ aciclovir) C. 志愿者单次口服 20 mg 阿德福韦酯后 3 h 的血清样品(a volunteer serum sample 3 h after an oral dose of 20 mg adefovir)

1. 阿德福韦(adefovir) 2. 内标阿昔洛韦(aciclovir, internal standard)

4.4 精密度与回收率试验 以空白血清配制低、中、高(2.5, 20, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 个不同浓度的质控样品, 按“4.3”项下方法操作, 每个浓度同 1 d 测定 5

次, 计算日内 RSD, 每 1 d 测定 1 次, 连续 5 d, 计算日间 RSD。质控样品与线性关系考察同时进行, 以当日线性关系计算质控样品浓度及日内、日间

RSD, 评价方法的精密度。分别取低、中、高 3 个不同浓度(2.5, 20, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的系列溶液, 按“4.3”项下操作, 计算沉淀蛋白后的待测物色谱峰面积与不加空白血清同法操作获得的色谱峰面积比值, 考察样品的提取回收率, 结果见表 1。

表 1 精密度与回收率(n=5)
Tab 1 Precision and recovery

加入量 (added) / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	日内(intra-day)		日间(inter-day)		方法回收率 (method recovery) /%	提取回收率 (extraction recovery) /%
	测得量 (found)	RSD	测得量 (found)	RSD		
	/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	/%	/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	/%		
2.50	2.48	8.64	2.49	2.94	99.20	56.50
20.00	20.05	5.95	21.34	3.32	100.25	58.75
80.00	81.58	4.98	76.64	7.45	101.98	59.26

4.5 稳定性试验 Sparidans RW^[6] 等采用高效液相色谱法测定阿德福韦血浆浓度, 血浆样品室温放置 3 d, 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 4.5 个月, 或经过 4 个冷冻-解冻循环, 阿德福韦均保持稳定。本文根据需要, 分别配制低, 中, 高(2.5, 20, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 个浓度的质控样品各 3 份, 考察阿德福韦稳定性。结果表明阿德福韦血浆样品室温放置 24 h 稳定性良好, 低、中、高浓度质控样品的 RSD 分别为 7.7%, 6.0%, 5.9%。

4.6 药代动力学研究 9 名健康男性志愿者筛选合格后, 随机分入 3 个剂量组, 禁食 10 h 后, 按照“三向交叉拉丁方”方案空腹口服阿德福韦酯 10, 20, 40 mg, 清洗期 1 周。于服药前(0 h)和服药后 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h 抽取肘静脉血 4 mL, 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血清, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。在血清样本测定过程中, 每 1 d 建立 1 条标准曲线, 同时配制低、中、高(2.5, 20, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 个浓度的质控样品, 每个浓度进行双样本分析, 以评价当日结果的可靠性。血清样品结果见表 2, 主要药代动力学参数见表 3, 药-时曲线见图 4。

5 讨论

阿德福韦生物样品测定方法文献采用 9-(3-磷酸甲氧基丙基)腺嘌呤(PMPA)为内标^[2~4], PMPA 不易获取。本文以阿昔洛韦为内标, 通过改变血清样本处理方法及流动相条件, 使内源性物质不干扰阿德福韦及内标测定, 方法专属性强, 阿德福韦和阿昔洛韦保留时间适中, 可用于阿德福韦人体药代动力学的研究。

表 2 健康志愿者单次口服不同剂量阿德福韦酯后阿德福韦平均血清浓度($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab 2 Mean serum concentration of adefovir after single oral administration of adefovir dipivoxil of 10 mg, 20 mg and 40 mg respectively

时间 (time)/h	剂量(dose)/mg		
	10	20	40
0.50	13.62 \pm 7.16	34.88 \pm 16.00	53.41 \pm 27.27
0.75	17.19 \pm 5.98	40.82 \pm 16.29	72.63 \pm 27.45
1.00	20.12 \pm 4.95	41.49 \pm 12.39	78.57 \pm 22.30
1.50	22.14 \pm 5.90	39.50 \pm 7.76	72.47 \pm 17.00
2.00	19.69 \pm 4.31	37.96 \pm 6.94	67.64 \pm 15.25
2.50	18.24 \pm 3.85	34.79 \pm 7.39	60.82 \pm 12.83
3.00	17.27 \pm 3.67	32.74 \pm 7.30	54.87 \pm 10.34
4.00	15.56 \pm 3.08	29.81 \pm 8.17	50.16 \pm 10.14
6.00	14.27 \pm 3.32	26.80 \pm 7.47	41.96 \pm 9.73
8.00	12.27 \pm 2.70	22.66 \pm 7.83	33.39 \pm 11.94
12.00	8.36 \pm 2.35	14.93 \pm 5.07	23.11 \pm 9.24
24.00	2.32 \pm 0.72	4.73 \pm 1.77	8.87 \pm 2.90

表 3 健康志愿者单次口服不同剂量阿德福韦酯后阿德福韦主要药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of adefovir after single oral administration of adefovir dipivoxil of 10 mg, 20 mg and 40 mg respectively

参数 (parameter)	剂量(dose)/mg		
	10	20	40
$t_{1/2}$ /h	6.8 \pm 0.8	7.4 \pm 1.1	7.7 \pm 1.8
V_d/F /mL \cdot kg ⁻¹	7.0 \pm 2.0	7.4 \pm 2.9	8.1 \pm 2.1
CL/F /mL \cdot h ⁻¹ \cdot kg ⁻¹	0.63 \pm 0.13	0.68 \pm 0.12	0.91 \pm 0.29
AUC_{0-24} / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	229 \pm 37	434 \pm 111	707 \pm 186
$AUC_{0-\infty}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	233 \pm 37	438 \pm 111	712 \pm 185
MRT/h	7.8 \pm 0.6	7.9 \pm 0.4	8.1 \pm 0.8
C_{max} / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 \pm 5	48 \pm 8	85 \pm 19
T_{max} /h	1.3 \pm 0.4	1.1 \pm 0.6	1.1 \pm 0.4

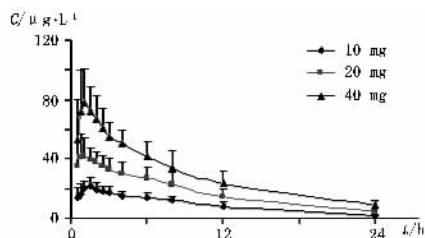


图 4 健康志愿者单次口服 10, 20, 40 mg 阿德福韦酯后平均血清浓度-时间曲线(n=9)

Fig 4 Mean serum concentration - time curves of healthy volunteers after single oral administration of adefovir of 10, 20, 40 mg

阿德福韦不溶于氯仿、二氯甲烷、乙醚等有机溶剂,不宜用有机溶剂提取,故采用沉淀蛋白法。分别采用甲醇、10%三氯乙酸、丙酮、乙腈作为蛋白沉淀剂,结果发现,三氯乙酸影响内标稳定性;同体积甲醇、丙酮、乙腈处理血清样品,甲醇效果最佳,但甲醇影响内标峰形,引起内标峰拖尾,而将上清液吹干后用流动相溶解,则可消除内标峰拖尾现象。

采用甲醇和水以一定比例混合作为流动相,血清杂质与阿德福韦分离效果不佳;流动相中加入一定浓度的甲酸,不但有助于分析物的质子化,改善峰形,而且可以降低血清杂质的影响^[7]。通过优化,甲醇-水-甲酸(20:80:0.1, *v/v/v*)最终被用作流动相,此条件下阿德福韦及内标保留时间适中,无血清杂质干扰。

临床药代动力学研究采用三向交叉拉丁方设计。全部志愿者随机进入3个试验组,每组志愿者每次试验时分别接受不同剂量的试验药。3次试验后,每名志愿者均按拉丁方设计的顺序接受过高、中、低3个剂量,可有效消除个体差异所带来的误差。

本方法以阿昔洛韦为内标,用LC-MS/MS法测定阿德福韦血清浓度,阿德福韦线性范围为1.25~160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,最低定量限为1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,适用于阿德福韦人体药代动力学研究。

参考文献

- 1 Cundy KC, Fishback JA, Shaw JP, *et al.* Oral bioavailability of the antiretroviral agent 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) from three formulations of the prodrug bis(pivaloyloxymethyl)-PMEA in fasted male cynomolgus monkeys. *Pharm Res*, 1994, 11(6): 839
- 2 Shaw JP, Louie MS, Krishnamurthy VV, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of selected prodrugs of PMEA in rats. *Drug Metab Dispos*, 1997, 25(3): 362
- 3 Hughes WT, Shenep JL, Rodman JH, *et al.* Single-dose pharmacokinetics and safety of the oral antiviral compound adefovir dipivoxil in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(4): 1041
- 4 ZHAO Li-yan (赵丽艳), CHEN Xiao-yan (陈笑艳), ZHANG Yong (张勇), *et al.* Determination of adefovir in monkey plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液相色谱-质谱-质谱联用法测定猕猴血浆中阿德福韦). *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2003, 38(2): 120
- 5 ZHONG Da-fang (钟大放). Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with weighted least squares method (以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线若干问题). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(5): 343
- 6 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 Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 736(1-2): 115

(本文于2007年11月22日修改回)