

阿德福韦酯在大鼠体内的药代动力学和组织分布特性研究

徐智儒, 蒋晔, 张晓青 (河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017)

摘要: **目的** 研究阿德福韦酯在大鼠的体内过程特性及绝对生物利用度, 为临床合理用药提供依据。 **方法** 大鼠随机分组, 分别一次性灌胃给药阿德福韦酯 3.0, 1.0, 0.3 mg · Kg⁻¹, 静脉注射 0.54 mg · Kg⁻¹, 采用高效液相色谱法检测阿德福韦在生物样品中的含量, 并计算药代动力学参数。大鼠口服阿德福韦酯后于 0.7, 3, 6h 测定各组织的药物浓度。口服阿德福韦酯 1.0 mg · Kg⁻¹, 24h 内收集胆汁, 测定药物胆汁排出率。用平衡透析法测定药物的人血清蛋白结合率。 **结果** 该药药代动力学过程符合无滞后时间的二室模型, 高、中、低三个剂量的 AUC_(0-∞) 分别为 10.7 ± 1.19, 3.91 ± 0.315, 1.54 ± 0.074 μg · mL⁻¹ · h; t_{max} 在 0.62 ~ 0.76 h 之间, C_{max} 与给药剂量成正比, 分别为 2.26 ± 0.299, 0.758 ± 0.0529, 0.388 ± 0.0269 μg · mL⁻¹; t_{1/2} 为 5.0 ~ 7.3 h; 绝对生物利用度分别为 (53 ± 5.2)%, (51 ± 8.1)%, (42 ± 6.0)%。静脉注射给药阿德福韦后 t_{1/2} (k_e) 为 7.5 ± 0.16 h, AUC_(0-∞) 为 6.35 ± 1.58 μg · mL⁻¹ · h。母体药物阿德福韦在组织中分布情况为肾 > 肝 > 胃, 其他组织中的浓度均远低于血浆中浓度。胆汁累积排泄率低于 2%, 在 0.10 ~ 4.0 μg · mL⁻¹ 的浓度范围内, 人血清蛋白结合率为 < 5%。 **结论** 阿德福韦酯在动物体内迅速吸收, 消除半衰期较长, 胆汁不是该药的主要排泄途径, 血液及主要脏器无药物蓄积。阿德福韦是生物样品中检测到的唯一代谢产物。

关键词: 药代动力学; 高效液相色谱; 阿德福韦酯**中图分类号:** R945.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7693(2005)07-0617-04

Study on pharmacokinetics and tissue distribution of adefovir dipivoxil in rats

XU Zhi-ru, JIANG Ye, ZHANG Xiao-qing (School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

ABSTRACT: OBJECTIVE The pharmacokinetic properties of adefovir dipivoxil were studied in rats. **METHODS** Upon oral administration of adefovir dipivoxil at 0.3, 1.0, 3.0 mg Kg⁻¹, plasma samples were obtained at intervals during the 24 h postdosing and were analyzed for adefovir concentrations by HPLC. Then the pharmacokinetic parameters were calculated. Adefovir levels in rat tissues at different time intervals (0.7, 3, 6h) were determined after oral administration at 1.0 mg Kg⁻¹. The biliary accumulative excretion was determined after oral dose of 1.0 mg Kg⁻¹. The rat of serum protein binding in human was determined by equilibrium dialysis method. **RESULTS** The pharmacokinetic process of rats fitted to two compartments model. At 0.3, 1.0, 3.0 mg Kg⁻¹ doses, C_{max} were 0.388 ± 0.0269, 0.758 ± 0.0529, and 2.26 ± 0.299 g mL⁻¹ and occurred between 0.62 and 0.73 h; t_{1/2}β were between 5.0 and 7.3 h; AUC_(0-∞) were 1.54, 3.91, 10.7 (μg · mL⁻¹) · h and the bioavailabilities of adefovir were 42%, 51%, and 53% respectively. The biliary accumulation excretion in rats was less than 2% within 24 h after oral administration. In vitro binding of adefovir to human serum proteins is < 5% over the adefovir concentration range of 0.10 to 4.0 μg · mL⁻¹. In main tissues, the adefovir concentration was followed as in order C_{kidney} > C_{liver} > C_{stomach}. **CONCLUSIONS** Adefovir dipivoxil was rapidly absorbed in rats with a longer t_{1/2}β. There was no accumulation in blood and main tissues of adefovir. Adefovir was the only metabolite formed of adefovir dipivoxil, which could be detected in plasma, tissue and biliary samples.

阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, 结构式见图 1)是核苷类逆转录酶抑制剂, 具有广谱抗病毒作用, 其对乙型肝炎病毒有强效^[1], 临床上用于慢性乙型肝炎的治疗。阿德福韦酯为前体药物, 显著提高了母体药物的口服生物利用度^[2], 其进入体内后迅速转化为母体药阿德福韦(adeфовir, 结构式见图 1)。关于阿德福韦酯药代动力学的系统研究未见报道, 本实

验采用等度 HPLC—荧光检测方法(阿德福韦与氯乙醛反应式见图 2), 研究了大鼠口服阿德福韦酯的药代动力学特性、组织分布、胆汁累积排泄率及人血清蛋白结合率等, 为临床药代动力学及合理用药提供了理论依据。

1 仪器与试剂

仪器: SP8810 高效液相色谱仪, (美国光谱物理公司 美

作者简介: 徐智儒, 女, 硕士研究生。**通讯作者:** 蒋晔, 教授, 硕士生导师, 主要从事药物分析化学及药物质量研究工作。Tel: (0311) 6266069, E-mail: jiangye@hebm. edu. cn.

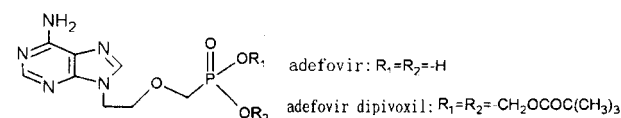


图1 阿德福韦酯和阿德福韦结构式
Fig 1 Structures of adefovir dipivoxil and adefovir

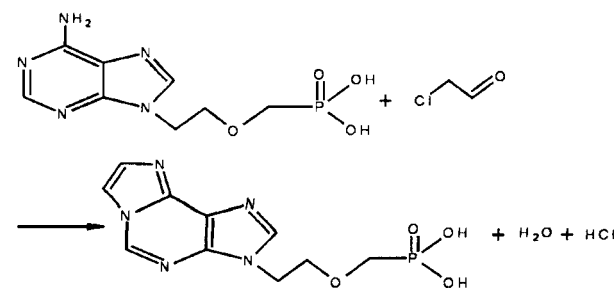


图2 阿德福韦与氯乙醛衍生反应方程式
Fig 2 Reaction equation of adefovir and chloroacetaldehyde

试药:阿德福韦酯(纯度:99.8%,批号:20011110),阿德福韦(纯度99.5% 批号 20011009),PMPA(9-(3 磷酸甲氧基丙基)腺嘌呤)(纯度99.6%,批号 20011112)均由河北医科大学制药厂提供;氯乙醛溶液(45%水溶液)购自 Fluka 公司;乙腈为色谱纯,购自 DIMA 公司;三氯乙酸、乙酸钠、磷酸二氢钠均为分析纯。健康 S D 大鼠由河北医科大学实验动物学部提供,体重 $260 \pm 50g$ 。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil C_8 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , GL Sciences 公司);流动相:乙腈-10 mmol $\cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(2 mmol $\cdot L^{-1}$ 氢氧化四丁基铵,氢氧化钠溶液调节 pH 为 7.0)(10:90);流速:1.5 mL $\cdot min^{-1}$;柱温:40 $^{\circ}C$;激发波长:309 nm;发射波长:425 nm。

2.2 标准溶液及内标溶液的配制

标准溶液的配制:精密称取阿德福韦约 20 mg,溶于适量 pH 6.0 的 10 mmol $\cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液,配制成 40 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的贮备液,于冰箱冷藏。

内标溶液的配制:精密称取 PMPA 约 20 mg 溶于适量 pH6.0 的 10 mmol $\cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液,配制成 20 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的贮备液,作为内标标准溶液,于冰箱冷藏。

2.3 生物样品处理

精密量取健康 SD 大鼠生物样品 250 μL 至盛有内标溶液 50 μL 的具塞离心管中,混匀,加入 20% 三氯乙酸 50 μL 旋涡混匀,离心(4000 r $\cdot min^{-1}$)25 min 后取上清液 200 μL ,分别加入氯乙醛(0.32 mol $\cdot L^{-1}$)及乙酸钠(4 mol $\cdot L^{-1}$)各 50 μL ,混匀,95 $^{\circ}C$ 水浴加热 30 min 后,取出样品,放至室温。精密量取待测样品 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱峰面积。

2.4 标准曲线和线性范围

取空白血浆 250 μL ,依次加入阿德福韦系列工作液及内

标 PMPA 各 50 μL ,配制相当于阿德福韦质量浓度为 0.02, 0.05,0.1,0.2,0.5,1,2,4,8 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的血浆样品,按“血浆样品处理”项下操作。分别精密量取 20 μL 注入色谱仪,记录色谱峰面积,建立标准曲线。以血浆样品中待测物浓度为横坐标,以待测物与内标的峰面积比为纵坐标,求得标准曲线, $A = 1.491C - 4.323 \times 10^{-3}$, $r = 0.9993$ 线性范围为 0.20 $\sim$ 15.8 $\mu g \cdot mL^{-1}$,按信噪比为 3 估计,在血浆中最低检测浓度为 5 $\mu g \cdot L^{-1}$,血浆最低定量浓度为 20 $\mu g \cdot L^{-1}$ 。用阿德福韦系列工作液与流动相配制相同质量浓度的阿德福韦流动相样品,求得标准曲线($A = 1.491C - 1.223 \times 10^{-3}$ $r = 0.9999$),线性范围同上。

2.5 方法回收率及精密度

取空白血浆 250 μL 分别加入阿德福韦标准品溶液及内标溶液,配制成低(0.050 $\mu g \cdot mL^{-1}$)、中(0.40 $\mu g \cdot mL^{-1}$)、高(4.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$)三个浓度的样品。照“样品处理”项下操作,测得峰面积带入血浆标准曲线方程,计算方法回收率见表 1;高、中、低三个浓度的提取回收率见表 1。

表 1 高、中、低 3 种浓度的样品的方法回收率与提取回收率 ($n = 5$)

加入量 Added amount ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	方法回收率 Recovery of method (%)	RSD (%)	提取回收率 Recovery of extraction (%)	RSD (%)
3.990	99.0	1.1	98.7	1.2
0.3990	95.1	3.8	95.1	4.0
0.04988	98.6	3.0	92.0	4.4

2.6 重现性

取高、中、低(4.0,0.4,0.05 $\mu g \cdot mL^{-1}$)三个浓度的样品,测定日内变异和日间变异,结果重现性良好,日内和日间变异系数均小于 5%。

2.7 血药浓度测定

取健康 SD 大鼠,给药前禁食 12 h,但自由饮水。取阿德福韦酯适量,加少量聚乙二醇 400 溶解后,加生理盐水稀释至刻度,按 0.3,1.0,3.0 mg $\cdot kg^{-1}$ 剂量灌胃给药,每剂量组 6 只,分别于给药后 0.25,0.5,0.75,1.0,1.5,2,3,6,12,24 h 眼眶后静脉丛取血约 0.5 mL,离心分离血浆。按“生物样品处理”项下操作,测定血药浓度。

SD 大鼠 6 只,雌雄各半,静脉注射给药阿德福韦生理盐水溶液,剂量 0.54 mg $\cdot kg^{-1}$ (相当于灌胃给药阿德福韦酯 1.0 mg $\cdot kg^{-1}$ 的等摩尔剂量),给药前禁食 12h。分别于给药后 5,15,30,45min,1,2,4,6,8,12,24h 眼眶后静脉丛取血,离心分离血浆,按“生物样品处理”项下操作,测定血药浓度。

2.8 药物在大鼠体内的组织分布

取健康 SD 大鼠,按“2.4”项下给药,剂量为 1.0 mg $\cdot kg^{-1}$,并于给药后 0.7,3,6h 眼眶后静脉丛取血(每时间点 6 只动物),然后将动物断颈处死,迅速取出心脏、肝脏、肾脏、脾、肺、大脑等组织置于生理盐水中,用滤纸吸干表面水分。

称取不同组织,按重量加入生理盐水(1:5)匀浆,制成组织匀浆液,离心(4000 r · min⁻¹)取上清液,进行样品处理测定,计算药物在各组织中的浓度。

2.9 药物在胆汁中的排泄

取健康大鼠 5 只,禁食 12h,按“2.6”项下,剂量为 1.0 mg · kg⁻¹ 给药后,腹腔注射乌拉坦麻醉,切开腹壁,分离总胆管,插入引流管做胆汁引流,并于给药后 0 ~ 4h,4 ~ 8h,8 ~ 12h,12 ~ 24h 分别收集大鼠胆汁,测量其体积,进行样品处理测定,计算药物在胆汁中的含量及累积排泄率。

2.10 药物蛋白结合率

取管状人工半透膜,透析管周长约为 5cm,长约为 12cm,加入 20mL 透析液(0.13 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液,内含 0.15 mol · L⁻¹ 氯化钠,调节 pH 为 7.5),盛于 30mL 广口瓶中,透析管两端用纱线扎紧,长度为 8cm。先将 10mL 透析液代替血清置于透析管内,作平衡对照,确定药物在透析管内外自由扩散达到平衡所需要的时间(即透析平衡时间)。用三种不同浓度的阿德福韦透析液进行试验,37℃ 平衡透析约 8h,取出管内外透析液各 250μL,进行样品处理测定,计算人血清阿德福韦蛋白结合率。药物浓度为 4.0,0.4,0.1μg · mL⁻¹。计算方法:药物蛋白结合率 = (1-滤出液浓度/袋内浓度) × 100%。

2.11 蓄积试验

取健康大鼠,连续 3 天,按“2.6”项下给药,剂量为 1.0 mg · kg⁻¹,停药一天后,第 5 天眼眶后静脉丛取血,然后断头处死,按“2.5”项下操作,进行生物样品处理测定,计算阿德福韦在各组织中的浓度。

3 结果

3.1 大鼠血药浓度、药代动力学参数及绝对口服生物利用度

大鼠静脉给药阿德福韦后,其药时曲线见图 3,药代动力学参数见表 2。大鼠一次性灌胃阿德福韦酯后,各时间点的血药浓度与给药剂量呈线性关系,其药时曲线见图 4。经 3p87 程序计算该药物药代动力学符合无滞后时间的二室模型。该药口服后吸收较快,消除半衰期长,药物在体内的作用时间较长,AUC 及 C_{max} 与给药剂量成正比,药代动力学参数及大鼠口服阿德福韦酯后绝对生物利用度见表 3。绝对生物利用度计算公式: F% = AUC(0 ~ ∞)_{oral prodrug} · Dose_{iv PMEA} / AUC(0 ~ ∞)_{iv PMEA} · Dose_{oral prodrug} × 100。

表 2 静脉给药阿德福韦(0.54mg/kg)药代动力学参数

Tab 2 The pharmacokinetic parameters (± SD) of adefovir in rats after intravenous injection of adefovir(0.54mg · kg⁻¹ n = 6)

药代动力学参数	单位	平均值	SD
T _{1/2α}	h	0.46	0.13
t _{1/2β}	h	7.5	0.16
V/F	mL · kg ⁻¹	93	17
AUC _(0-∞)	μg · h · mL ⁻¹	6.35	1.57
Cl(s)	mL · h ⁻¹ · kg ⁻¹	145	11

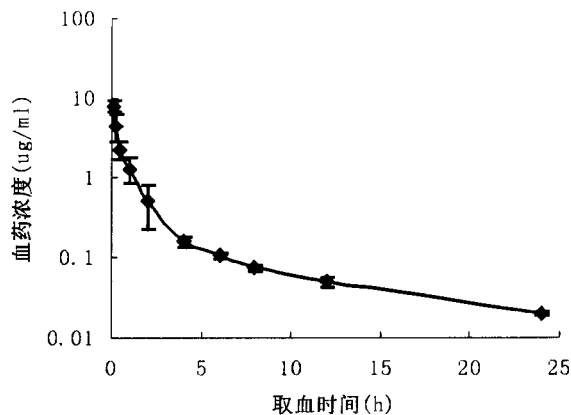


图 3 大鼠静脉给药阿德福韦后平均药-时曲线(0.54 mg · kg⁻¹ n = 6)

Fig 3 The mean plasma concentration-time curve of adefovir in rats after intravenous injection of adefovir(0.54mg · kg⁻¹ n = 6)

表 3 大鼠一次性灌胃阿德福韦酯溶液(0.3,1.0,3.0 mg · kg⁻¹)后的药代动力学参数 (n = 18)

Tab 3 The pharmacokinetic parameters (± SD) of adefovir in rats after oral administration of adefovir dipivoxil solution (0.3, 1.0,3.0 mg · kg⁻¹, n = 18)

剂量 (mg · kg ⁻¹)	AUC _(0-∞) ((μg · mL ⁻¹) · h)	C _{max} (μg · mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2β} (h)	F (%)
3.0	10.7(1.19)	2.26(0.299)	0.68(0.15)	7.3(1.2)	53(5.2)
1.0	3.91(0.315)	0.758(0.0529)	0.73(0.09)	7.2(0.64)	51(8.1)
0.3	1.54 (0.0744)	0.388(0.0269)	0.62(0.014)	5.0(0.04)	42(6.0)

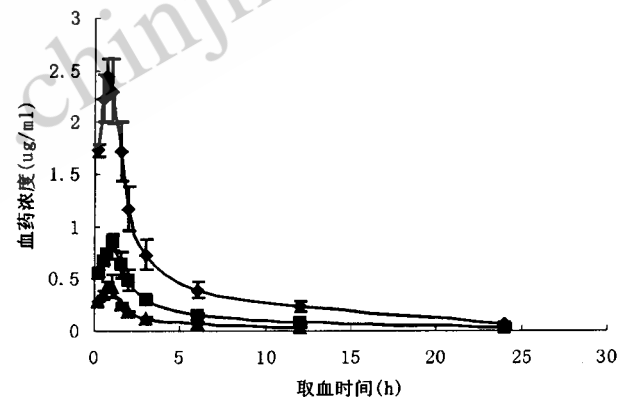


图 4 大鼠灌胃阿德福韦酯后平均药-时曲线(▲0.30, ■1.0, ◆3.0 mg · kg⁻¹, n = 18)

Fig 4 The mean plasma concentration - time curve of adefovir in rats after oral administration of adefovir dipivoxil (▲0.30, ■1.0, ◆3.0 mg · kg⁻¹, n = 18)

3.2 组织分布

大鼠口服阿德福韦酯 1.0 mg · kg⁻¹ 后 0.7,3,6h,母体药物阿德福韦在组织中的分布情况为肾 > 肝 > 胃,心、脑、脾等其它组织中药物浓度均低于血浆中药物浓度,并且在消除相(6 h)肾、肝、胃中药物浓度明显降低。

3.3 大鼠胆汁排泄率

结果显示阿德福韦极少部分从胆汁排出,大鼠口服 24h

后该药由胆汁排泄试验结果见表4。

表4 胆汁中排泄试验测定结果($n=5$)

Tab 4 The biliary accumulation excretion in rats within 24 h ($n=5$)

动物 编号	0~4h (μg)	4~8h (μg)	8~12h (μg)	12~24h (μg)	排泄总量 (μg)	累积排泄 速率(%)
1	2.95	0.427	0.386	1.04	4.80	1.3
2	1.34	1.26	0.941	0.621	4.16	1.6
3	2.35	1.24	0.884	1.13	5.60	1.5
4	2.71	1.69	0.439	1.81	6.65	1.5
5	1.07	1.71	0.507	1.22	4.51	1.7

3.4 药物蛋白结合率及蓄积试验结果

在 $0.10\sim4.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内,阿德福韦人血清蛋白结合率均低于5%(见表5)。连续3天灌胃给药阿德福韦酯 $1.0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,该药在各组织及血液中无蓄积。

表5 人血清蛋白结合率测定结果($n=3$)

Tab 5 Result of serum protein binding rate in human ($n=3$)

血清中药物浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	血清蛋白结合率 (%)	平均血清蛋白 结合率(%)
4.0	4.2	4.3
	3.9	
	4.7	
	3.8	
0.40	4.8	3.9
	3.1	
	2.5	
0.10	2.9	3.3
	4.6	

4 讨论

4.1 大鼠一次性灌胃给药的药代动力学试验结果表明,口服阿德福韦酯后药代动力学参数与国外文献报道相似,Shaw J P等^[3]进行的大鼠口服阿德福韦酯的药代动力学试验中 T_{max} 与 $t_{1/2\beta}$ 分别为1.0和4.8h,本试验中分别为 $0.62\sim0.76\text{h}$ 和 $5.0\sim7.3\text{h}$ 。阿德福韦酯血浆清除率(CI)为 $(145\pm11)\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$,清除速度较慢,并且本品主要从肾脏排泄,

因此肾功能不足的患者应调节用药剂量。

4.2 由药物组织分布结果可知,给药3h时阿德福韦在大鼠主要组织的分布为肾>肝>胃>肺、脑、脾。其中肝脏中较高的药物分布量与其作为阿德福韦酯的作用靶点相一致。阿德福韦在肾脏中有较高的浓度,应注意不能过量服用,否则可能有肾毒性的发生。在血浆及组织中未检测到阿德福韦酯的其他代谢产物。连续3d给药阿德福韦酯 $1.0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,在所研究的组织中尚未发现积蓄现象,血浆中同样未发现积蓄现象。

4.3 口服阿德福韦酯的胆汁排泄速率表明,在用药初期药物胆汁排泄速率相对较快,12h后相对减缓,24h胆汁累积排泄速率均<2%。

4.4 该药的人血清蛋白结合率较低,不同浓度下阿德福韦与人血清蛋白结合率结果比较相近,均<5%,与文献^[4]报道(小于7%)接近。

参考文献

[1] Heijntink RA, Wilde GAD, Kruining J, *et al.* Inhibitory effect of 9-(2-phosphonyl methoxyethyl)adenine (PMEA) on human and duck hepatitis B virus infection[J]. Antiviral Res., 1993, 21: 141.

[2] Cundy KC, Fishback JA, Shaw PC, *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[J]. Pharm. Res., 1994, 11(6): 839.

[3] Shaw JP, Louie MS, Krishnamurthy LVV, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of selected prodrugs of PMEA in rats[J]. Drug metabolism and disposition, 1997, 25(3): 362.

[4] Cundy KC. Clinical Pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir[J]. Clin. Pharmacokine, 1999, 36(2): 127.