技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）09-1091-03

HPLC-荧光检测法测定犬血浆中阿德福韦的浓度

刘治勇，黄丽华，罗 婵，母昭德
（重庆医科大学药学院药物分析教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：建立 HPLC-荧光法测定 beagle 犬血浆中阿德福韦酯类似物 M1、M2 的代谢物阿德福韦（Adfovir，PMEA）浓度的方法。方法：色谱柱，C_{18}（150×4.6 mm，5 μm）；流动相 A，含 2%乙腈的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液（5 mmol/L 氢氧化四丁基铵，pH 6.0）；流动相 B，含 65%乙腈的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液（5 mmol/L 氢氧化四丁基铵，pH 6.0）；流速，1.0 ml/min；荧光检测，激发波长为 236 nm，发射波长为 420 nm；柱温，35℃；进样量，10 μl。结果：PMEA 血浆浓度在 5.0~750.0 ng/ml 范围内（r=0.999 8），线性关系良好，最低检测限为 2.0 ng/ml。血浆中 PMEA 的相对回收率在 98.36%~99.58%，提取回收率在 79.76%~82.14%，日内 RSD 在 2.12%~3.77%和日间 RSD 在 3.07%~5.96%。结论：本方法准确、可靠、重现性好，适用于 beagle 犬血浆中 PMEA 的含量测定。

【关键词】HPLC-荧光检测法；阿德福韦；替诺福韦；药代动力学
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-07

Determination of PMEA in beagle dog plasma by HPLC with fluorescence detection

LIU Zhi-yong, HUANG Li-hua, LUO Chan, MU Zhao-de
(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method of HPLC-Fluorescence to determine beagle dog plasma concentration of Adefovir, parent drug of analogue of Adefovir dipivoxil-M1, M2. *Methods*: The analyte was separated on a Benetnach C18 column (150×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase were: A, 2% acetonitrile in 25 mmol potassium phosphate buffer with 5 mmol tetrabutylammonium hydroxide, pH 6.0; B, 65% acetonitrile in 25 mmol potassium phosphate buffer with 5 mmol tetrabutylammonium hydroxide, pH 6.0. The flow rate was 1.0 ml/min and the column temperature was maintained at 35℃. The injection volume was 10 μl. *Results*: The calibration curve was linear over plasma concentration range of 5.0~750.0 ng/ml, r=0.999 8. The lower limit of quantification in plasma of beagle dogs was 2.0 ng/ml. Relative recovery of Adefovir in plasma of beagle dogs was 98.36%~99.58%, and absolute recovery was 79.76%~82.14%. The interday precision (RSD%) in plasma was 2.12%~3.77%, and the intraday precision (RSD%) was 3.07%~5.96%. *Conclusion*: The established method has a good selectivity and reproducibility, and is suitable for the determination of Adefovir in plasma of beagle dogs.

【Key words】HPLC - fluorescence detection; adefovir; tenofovir; pharmacokinetics

我国感染慢性乙型肝炎病毒的人数已超过 1 亿[1]，全世界每年因此而死亡约 20 万人[2,3]。目前，市场上治疗乙肝的药物有很多，其中阿德福韦酯（Adefovir dipivoxil，ADV）是目前临床上治疗肝病的一线药之一。虽然这类药物抗病毒疗效好、生物利用度高、不良反应相对较少，但需要长期用药，具有潜在的剂量依赖肾脏毒性，其肾毒性发生率和剂量相关，剂量越大肾毒性的发生率就越高[4]。为了弥补这一缺陷，研发肝靶向性高、肾毒性低的乙肝治疗药物 ADV 类似物具有重要的意义，其中 M1 和 M2 就是两种具有生物活性的新的ADV 类抗乙肝病毒药。由于二者在体内均代谢为活性物质阿德福韦（Adfovir，PMEA），通过测定 PMEA 在 beagle 犬腿静脉血中的浓度，即可反映 M1 和 M2 在动物体内的血药浓度。据文献报道，PMEA 含量测定的方法有毛细管电泳法[5]，LC/MS/MS 法[6,7]。本文建立了经济、准确、灵敏度高的柱前衍生化 HPLC-荧光检测法测定beagle犬血浆中PMEA浓度的方法，为M1和 M2 的临床前药代动力学研究提供了方法学基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

替诺福韦（Tenofovir，PMPA）标准品（纯度>99%，北京世桥生物制药有限公司提供），PMEA 标准品（纯度>99%，北京世桥生物制药有限公司提供），M1，M2（北京世桥生物制药有

作者介绍：刘治勇（1986-），男，硕士，研究方向：药物分析。
通信作者：母昭德，女，副教授，Email：mzd2008@tom.com。

限公司提供）。

动物：体重 8 kg 左右的健康合格 beagle 犬 12 只，雌雄各半，由四川养麝研究所提供。

1.2 试剂和仪器

Agilent1100高效液相色谱仪（G1321A荧光检测器），DZF-1 型真空干燥箱（上海跃进医疗器械厂），超纯水器（Millipore 公司）。

乙腈（色谱纯，江苏汉邦科技有限公司），磷酸二氢钾、氯乙醛、三氯乙酸、四丁基氢氧化铵等试剂为分析纯。

1.3 溶液配制

PMEA 储备液：称取一定量的 PMEA，加超纯水溶解配制成 375 μg/ml 的储备液，于冰箱冷藏保存。

PMPA 储备液：称取一定量的 PMPA，加超纯水溶解配制成 625 μg/ml 的储备液，作为内标标准溶液，于冰箱冷藏保存。

1.4 色谱条件

色谱柱：Benetnach C18（150×4.6 mm，5 μm）；预柱：Phenomenex C18（4×3.0 mm，5 μm）；流动相 A：含 2%乙腈的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液（5 mmol/L 氢氧化四丁基铵，pH 6.0）；流动相 B：含 65%乙腈的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液（5 mmol/L 氢氧化四丁基铵，pH 6.0）；梯度洗脱（见表 1）；流速：1.0 ml/min；激发波长：236 nm，发射波长：420 nm；柱温：35℃；进样量：10 μl。

表 1 梯度洗脱时间表

时间（min）	0～2	<2～17	<17～18
流动相 A（%）	100	100→0	0→100
流动相 B（%）	0	0→100	100→0

1.5 衍生条件

含 PMEA 的标准品溶液减压蒸干后与 200 μl 含 0.68%氯乙醛的 100 mmol/L 乙酸钠溶液（pH 4.5）95 ℃水浴衍生30 min，反应生成高荧光物质 1，N6-乙烯基腺嘌呤衍生物，反应方程式（见图 1）。

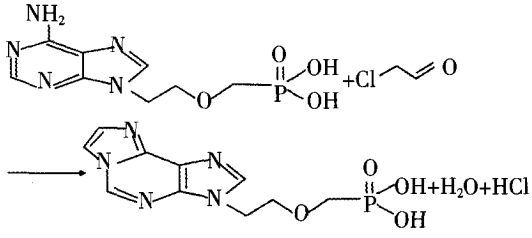


图 1 PMEA 与氯乙醛衍生反应方程

1.5.1 衍生剂氯乙醛浓度 100 μl 含 PMEA 浓度为 750 ng/ml 的标准品溶液减压蒸干后分别与 200 μl 含 0.006 8%、0.01%、0.034%、0.068%、0.1%、0.34%、0.68%、1.0%（v/v）氯乙醛的 100 mmol/L 乙酸钠溶液（pH 4.5）95℃水浴 30 min，室温减压蒸干，复溶于 100 μl 流动相 A，取 10 μl 供 HPLC 分析，以衍生剂氯乙醛浓度对荧光物质峰面积作图。

1.5.2 衍生时间 100 μl 含 PMEA 终浓度为 750 ng/ml 的标准品溶液减压蒸干后分别与 200 μl 含 0.68%氯乙醛的 100 mmol/L 乙酸钠溶液（pH 4.5）95 ℃水浴 10、30、40、60、90、120 min，按“1.5.1”项下操作，以衍生时间对荧光物质峰面积作图。

1.5.3 衍生温度 100 μl 含 PMEA 终浓度为 750 ng/ml 的标准品溶液减压蒸干后分别与 200 μl 含 0.68%氯乙醛的 100 mmol/L 乙酸钠溶液（pH 4.5） 40、60、80、90、95、100℃水浴30 min，按“1.5.1”项下操作，以衍生温度对荧光物质峰面积作图。

1.5.4 衍生 pH 100 μl 含 PMEA 终浓度为 750 ng/ml 的标准品溶液减压蒸干后分别与 200 μl 含 0.68%氯乙醛的 100 mmol/L 乙酸钠溶液（pH 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0）95℃水浴 30 min，按“1.5.1”项下操作，以衍生 pH 对荧光物质峰面积作图。

1.6 血浆样品的处理

取 beagle 犬血浆 80 μl，加内标溶液 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 乙酸钠溶液（pH 4.5），涡旋 1 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 160 μl 于带塞玻璃刻度试管中，95℃水浴衍生 30 min，室温减压蒸干，复溶于 100 μl 流动相 A，取 10 μl 供 HPLC 分析，内标法定量。

2 结 果

2.1 专属性实验

在“1.4”色谱条件下，PMEA 衍生物和 PMPA 衍生物分离完全，峰形良好，空白溶剂无干扰，血浆中内源性物质不干扰测定，PMEA 衍生物和 PMPA 衍生物的保留时间分别约为 9.1 min 和 9.6 min，见图 2。

2.2 衍生条件考察结果

实验结果表明，衍生剂氯乙醛与 PMEA 在衍生剂浓度为 0.68%（pH 4.5）、95 ℃水浴中反应 30 min 生成荧光物质，荧光灵敏度高、效果好。

2.3 线性范围与检测限

取空白血浆 80 μl，置 1.5 ml EP 管中，依次加入 PMEA 系列工作液及 PMPA 储备液各 10 μl，制成 PMEA 浓度分别为5.0、12.5、25.0、62.5、125.0、250.0、500.0、750.0 ng/ml，按“1.6”项下操作。记录色谱峰面积，以血浆 PMEA 浓度 C 为横坐标，以 PMEA 衍生物与 PMPA 衍生物的峰面积比值 R 为纵坐标，建立标准曲线。回归方程为：R=0.010 1C+0.007 2，相关系数 r=0.999 8。结果表明，PMEA 血浆浓度在 5.0~750.0 ng/ml 范围内，线性关系良好。继续稀释并检测线性低浓度样品，按信噪比 3:1 计算得到 PMEA 在血浆中的最低检测限为 2 ng/ml。

2.4 回收率实验

配制含 PMEA 低、中、高 3 种浓度为 12.5、125.0、500.0 ng/ml 的血浆样品各 5 份，按“1.6”项操作。计算浓度，与标示浓度相比得相对回收率为 98.36%~99.58%，RSD≤3.77%；将所得峰面积与未经提取的相同浓度的 PMEA 标准溶液直接进

临床研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1094-03

支气管哮喘患儿诱导痰 IL-17 水平分析

高 惠，罗征秀，刘 超，任 洛，蒋永惠，王莉佳，刘恩梅，符 州
（重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心，重庆 400014）

【摘 要】目的：分析儿童支气管哮喘急性发作期、慢性持续期及临床缓解期诱导痰上清液白细胞介素-17（Interleukin 17，IL-17）、白细胞介素-6（Interleukin 6，IL-6）、转化生长因子-β（Transforming growth factor-β，TGF-β）水平，探讨其在哮喘发病过程中的作用。方法：收集支气管哮喘急性发作期 25 例、慢性持续期 15 例、缓解期 17 例及健康对照儿童 13 例诱导痰，采用 ELISA 法测定诱导痰上清液 IL-17、IL-6 及 TGF-β 水平，比较各组细胞因子水平差异。结果：哮喘患儿急性发作期诱导痰上清液 IL-17 浓度为（855.39±46.89）pg/ml，慢性持续期为（705.63±46.29）pg/ml，临床缓解期为（597.09±60.26）pg/ml，健康对照儿童为（434.12±43.63）pg/ml，哮喘患儿诱导痰上清液 IL-17 水平显著高于健康对照儿童，差异具有统计学意义（$P<0.05$），且哮喘急性发作期 IL-17 水平显著高于慢性持续期、缓解期，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；哮喘患儿急性期 IL-6 水平明显高于其他各组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；各组 TGF-β 水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。结论：诱导痰上清液 IL-6、IL-17 表达增加在哮喘发病中有重要作用。

【关键词】支气管哮喘；诱导痰；白细胞介素-17；白细胞介素-6；转化生长因子-β
【中国图书分类法分类号】R725.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-16

Research on the concentrations of interleukin-17 in induced sputum of patients with asthma

GAO Hui, LUO Zheng-xiu, LIU Chao, REN Luo, JIANG Yong-hui, WANG Li-jia, LIU En-mei, FU Zhou
(*Respiratory Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of IL-17, TGF-β and IL-6 concentrations in the induced sputum of asthma patients of different stages. *Methods*: Sputum IL-17, TGF-β and IL-6 concentrations were measured in 57 patients with asthma including 25 in acute stage, 15 in chronic stage, and 17 in remission stage, and another 13 healthy children were in the control group. They were measured with sandwich enzyme immunosorbent assay (ELISA). *Results*: The IL-17 concentration in different stages was as follows: (855.39±46.89) pg/ml in acute stage, (705.63±46.29) pg/ml in chronic stage, and (597.09±60.26) pg/ml in remission stage, the IL-17 concentration in healthy control group was (434.12±43.63) pg/ml. The mean IL-17 concentration was increased in asthma compared with healthy control group ($P<0.05$). The IL-17 and IL-6 concentrations in acute stage were significantly higher than in chronic and remission stage ($P<0.05$). TGF-β concentration was measured in the different stages, and there

作者介绍：高 惠（1984-），女，硕士，研究方向：呼吸道感染与免疫。
通信作者：罗征秀，女，副教授，Email：luozhengxiu816@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81070015）、重庆市科委基金资助项目（编号：CSTC2009BB5258）、重庆市卫生局基金资助项目[渝卫科教（2009）66 号-2009-2-241]。

小，最低检测限达到 2 ng/ml，适用于 beagle 犬血浆样品PMEA的含量测定及临床前药物动力学研究。

参 考 文 献

[1] 王季午，刘克洲，陈 智.人类病毒性疾病[M].北京：人民卫生出版社，2002.489-490.

[2] Rajan Subramaniam S, Saradhi P P.Rapid multiplication of Phyllanthus fratevnus:a plant with anti-hepatitis viral activity [J].Industrial Crops and Products, 1997, 6(1):35-40.

[3] 陈大明，肖 宏.抗乙型肝炎病毒药物研发现状[J].药学服务与研究，2006，6(3)：193-196.

[4] 王桂爽，蔡皓东.阿德福韦酯和替诺福韦相关性肾小管病[J].药物不良反应杂志，2010，12(1)：31-36.

[5] 丁翔宇，蒋 哗，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)：914-917.

[6] 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)：894-897.

[7] Zhao L Y, Chen X Y, Zhang Y, et al.Determination of adefovir in macaque plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J].Acta Pharm Sinica, 2003, 38(2):120-123.

（责任编辑：冉明会）