

# 液质联用检测人体血浆中的阿奇霉素

胡万群, 许毓, 刘飞, 芮蕾, 郭庆祥  
(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

**摘要** 采用高效液相色谱串联质谱技术(HPLC-MS/MS)测定人体血浆中阿奇霉素的浓度. 选用 Lichrospher CN 柱, 流动相为  $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=40:60$  (水中含体积分数为 0.1% 的甲酸和质量分数为 0.1% 的醋酸铵), 电喷雾离子源正离子方式检测. 该方法在 2.34~600 ng/mL 范围内线性关系良好, 定量下限为 2.34 ng/mL ( $S/N>10$ ), 回收率 94.13%~97.42%, 基质效应 92.50%~107.87%, 日内和日间测定药物浓度的相对标准偏差(RSD)均小于 10.0%. 用该方法测定了 24 名男性健康志愿者单剂量口服 500 mg 阿奇霉素试剂和参比制剂于 192 h 内的血药浓度, 并进行了生物等效性研究.

**关键词** 阿奇霉素; 人体血浆; 生物等效性; 高效液相色谱串联质谱法

**中图分类号** O657      **文献标识码** A      **文章编号** 0251-0790(2007)11-2046-05

阿奇霉素是十五元大环内酯类抗生素, 其结构与红霉素相似. 在红霉素内酯环的 9a 位上掺入 1 个甲胺基, 将内酯环扩展成十五元环, 形成一类新的大环内酯类抗生素. 临床主要用于治疗敏感细菌引起的感染, 如支气管炎及肺炎等下呼吸道感染、皮肤和软组织感染、急性中耳炎、鼻窦炎、咽炎及扁桃体炎等上呼吸道感染等<sup>[1]</sup>.

近年来, 关于阿奇霉素药代动力学研究较多, 人体血浆中阿奇霉素的测定方法多为微生物法<sup>[2-5]</sup>和高效液相色谱(HPLC)法<sup>[6]</sup>. 但由于阿奇霉素在人体内消除半衰期长( $>40$  h), 造成血浆中药物浓度较低, 所以用上述方法不能很好地描述药物的代谢动力学特征. 王玉花等<sup>[7]</sup>用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法测定人血浆中阿奇霉素浓度, 血浆样品用乙酸乙酯提取, 最低定量限为 2.5  $\mu\text{g/mL}$ ; Chen 等<sup>[8]</sup>采用 HPLC-MS 法测定人血浆中阿奇霉素浓度, 用甲基叔丁基醚-正己烷提取法处理血浆样品, 最低定量限为 2.0 ng/mL; 李晓哲等<sup>[9]</sup>用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定人血浆中阿奇霉素浓度, 最低定量下限为 1.0 ng/mL, 灵敏性较高, 但采用正己烷-二氯甲烷和异丙醇的混和溶液(体积比 300:150:15)处理血浆样品, 提取溶剂毒性较大, 且操作比较繁琐.

本文用 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中阿奇霉素浓度, 采取甲醇直接沉淀的血浆样品处理方法, 根据化学药物制剂人体生物利用率和生物等效性(<http://www.sda.gov.cn/gsz05106/08.pdf>)以及美国 FDA 生物样品分析的指导原则(<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>), 进行了测定人体血浆中阿奇霉素的方法学评价, 并用该方法测定了 24 名男性健康志愿者单剂量口服阿奇霉素 500 mg 后的血药浓度, 进行了生物等效性研究.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

美国 Finnigan 公司 TSQ Quantum Ultra AM 型 LC-MS/MS 联用仪, ESI 离子源, Xcalibur 1.4 数据处理系统; WH-2 型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); Minispain 微型高速离心机(德国 Eppendorf 公司). Lichrospher CN 柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, i. d., 5  $\mu\text{m}$ , 江苏汉邦科技有限公司).

阿奇霉素对照品(中国药品生物制品检定所); 内标红霉素对照品(中国药品生物制品检定所); 甲

收稿日期: 2007-03-22.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20332020)资助.

联系人简介: 许毓, 女, 博士, 副教授, 主要从事有机分析方面研究. E-mail: xyu@ustc.edu.cn

郭庆祥, 男, 教授, 主要从事有机化学研究. E-mail: qxguo@ustc.edu.cn

醇、乙腈和甲酸(Merck 公司, 色谱纯); 醋酸铵(中国医药集团化学试剂有限公司, 分析纯), 自制三重蒸馏水. 通过优化实验选择 HPLC-MS/MS 的工作条件(见表 1), 进行人体血浆中阿奇霉素的测定.

Table 1 HPLC-MS/MS operating conditions\*

Electrospray voltage/kV	4.80	MS <sup>2</sup> fragment for azithromycin	749.38→591.16
Capillary temperature/°C	320	MS <sup>2</sup> fragment for erythromycin	734.33→576.26
Source(CID) energy/eV	14	Mass scan time/s	0.50
Sheath gas pressure/MPa	2.3	Mass scan width	0.20
Auxiliary gas pressure/MPa	0.10	V(Acetonitrile): V(Water) (0.1% HCOOH + 0.1% NH <sub>4</sub> OAc)	40:60
Collision energy for azithromycin/eV	30	Flow rate of mobile phase/(mL·min <sup>-1</sup> , fractional flow ratio 3:1)	1.00
Collision energy for erythromycin/eV	25	Temperature of column/°C	20

\* Electrospray ionization source; positive selected reaction monitoring.

## 1.2 实验过程

1.2.1 标准品溶液的配制 称取 3.00 mg 阿奇霉素对照品于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至所要求的刻度, 此母液的质量浓度为 600.00 μg/mL. 再依次配制成 6.00, 3.00 和 1.50 μg/mL 以及 750.00, 375.00, 187.50, 93.75, 46.88 和 23.44 ng/mL 溶液. 称取 2.00 mg 红霉素对照品于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 应用时再稀释至 0.50 μg/mL.

1.2.2 血浆样品的处理与测定 取 100 μL 血浆于 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μL 内标溶液(0.50 μg/mL), 振荡混匀, 再加入 300 μL 甲醇, 涡旋 2 min, 12100g 离心 10 min, 取上清液 10 μL 进样分析.

1.2.3 标准曲线和质控样品的制备 取 100 μL 空白血浆, 加 10 μL 阿奇霉素标准系列溶液, 配制相当于阿奇霉素血浆浓度为 2.34, 4.69, 9.38, 18.75, 37.50, 75.00, 150.00, 300.00 和 600.00 ng/mL 的样品, 按上述方法操作, 对每一浓度进样 10 μL 的 3 样本进行分析.

取 100 μL 空白血浆, 分别加 10 μL 阿奇霉素标准溶液 46.88, 375.00 ng/mL 和 3.00 μg/mL (低、中、高 3 个浓度), 配制相当于阿奇霉素血浆浓度为 4.69, 37.50 和 300.00 ng/mL 的样品, 作为质控样品. 按“血浆样品的处理”方法操作, 对每一浓度进样 10 μL (5 个样本) 进行分析.

1.2.4 HPLC-MS/MS 测定人体血浆中阿奇霉素的方法学评价 (1) 方法的专属性考察: 阿奇霉素与内标红霉素在 ESI 正离子化方式下, 主要生成 [M + H]<sup>+</sup> 分子离子峰, 分别为 *m/z* 749.38 和 *m/z* 734.33. 选择性地对分子离子峰 [M + H]<sup>+</sup> 进行产物离子扫描(图 1), 可见阿奇霉素与内标红霉素生成的主要碎片离子分别为 *m/z* 591.16 和 576.26, 将两者作为定量分析时监测的产物离子.

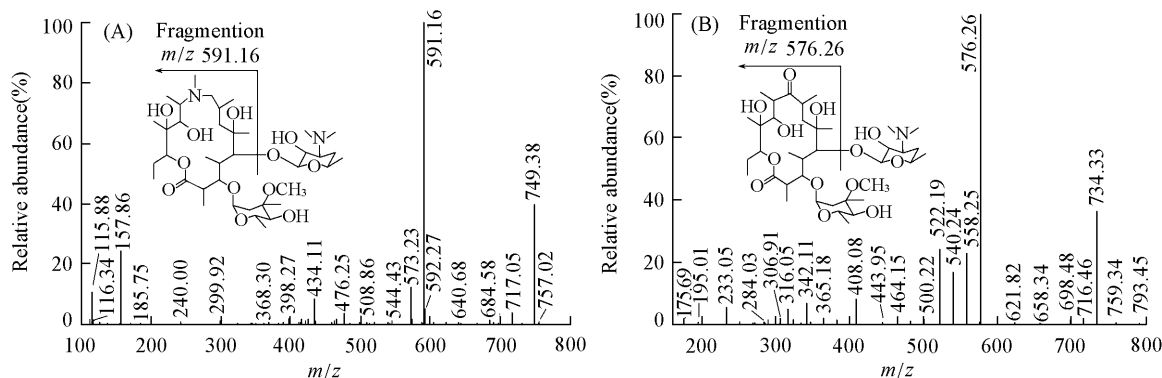


Fig. 1 Product ion scan of [M + H]<sup>+</sup> ion of azithromycin(A) and erythromycin(B)

分别取 100 μL 6 名受试者的空白血浆, 按“血浆样品处理”方法操作(不加内标溶液), 进样 10 μL 分析, 得色谱图 2(A); 分别取 23.44 ng/mL 的标准溶液和内标溶液(0.50 μg/mL) 各 10 μL 加入到空白血浆中, 依同法操作, 得色谱图 2(B); 取受试者口服给药后(96 h)的血浆样品, 依同法操作, 得色谱图 2(C). 由图 2(C)可见, 空白血浆中无内源性物质干扰阿奇霉素和内标红霉素的测定, 阿奇霉素和内标红霉素的保留时间分别为(3.07 ± 0.02) 和(3.30 ± 0.03) min, RSD(%) 分别为 0.65 和 0.91.

(2) 血浆中阿奇霉素标准曲线和定量下限: 取阿奇霉素储备液, 加空白血浆, 按逐级稀释的方法依次配制成相当于阿奇霉素血浆浓度为 2.34, 4.69, 9.38, 18.75, 37.50, 75.00, 150.00, 300.00 和

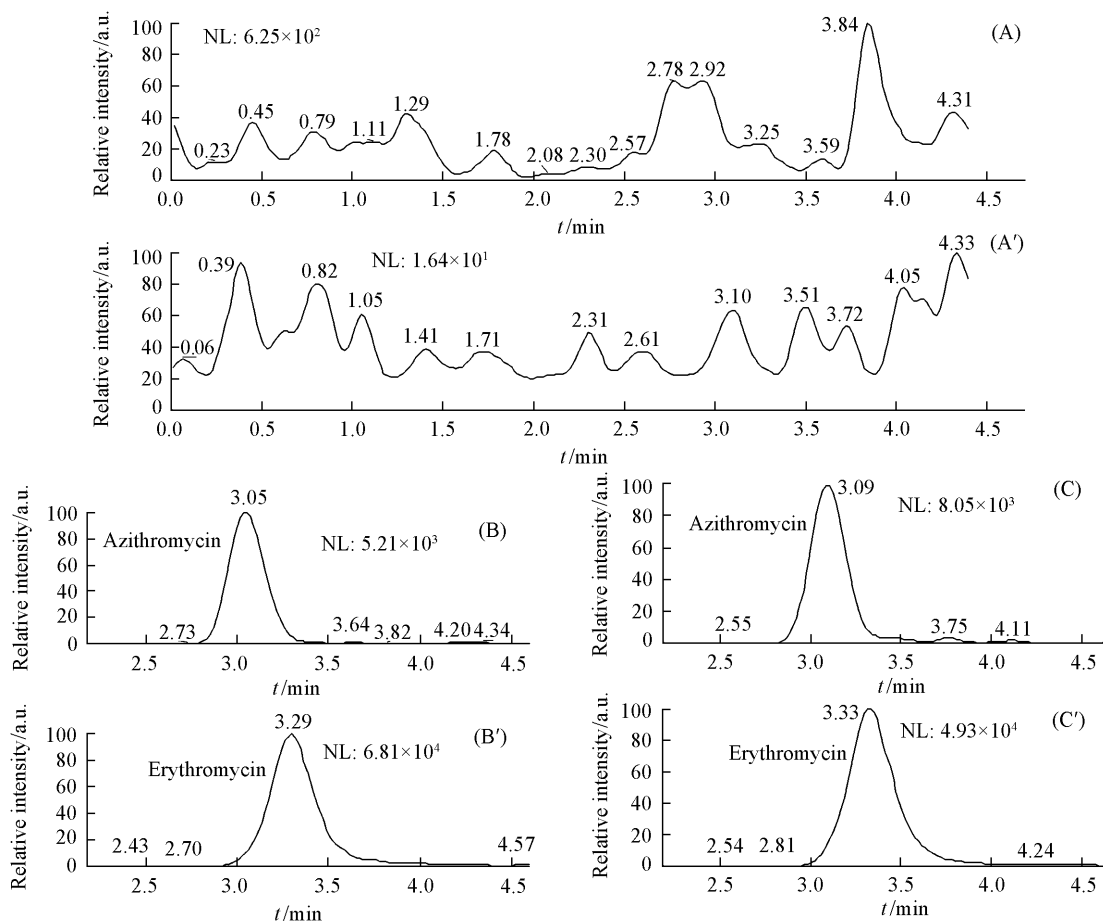


Fig. 2 SRM chromatograms for azithromycin and erythromycin (IS)

(A) Blank plasma; (B) plasma sample spiked with azithromycin and IS(0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

(C) a volunteer plasma sample 96 h after oral dose of 500 mg azithromycin.

600.00 ng/mL 的样品, 对每一浓度进行 3 个样本分析, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 记录色谱图, 以待测物浓度为横坐标, 以待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线. 求得的标准曲线为

$$Y = (0.024 \pm 0.003)X + (0.006 \pm 0.004), \quad r = 0.997 \sim 0.999$$

根据标准曲线, 阿奇霉素的线性范围为 2.34 ~ 600 ng/mL, 定量下限为 2.34 ng/mL ( $S/N > 10$ ).

(3) 精密度试验: 取空白血浆, 配制阿奇霉素低、中、高 3 个浓度(4.69, 37.50 和 300.00 ng/mL) 的质量控制(QC)样品, 对每一浓度的 5 个样本进行分析, 连续测定 3 d, 根据当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度. 再据 QC 此浓度结果计算本法的精密度, 数据见表 2. 日内及日间测定药物浓度的相对标准偏差(RSD)均小于 10%, 符合生物样品分析方法的精密度要求.

Table 2 Precision and accuracy for analysis of azithromycin in human plasma

$\rho(\text{Added C})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho(\text{Found C})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	Intra-run RSD(%)	Inter-run RSD(%)	Accuracy(%)
4.69	5.35 $\pm$ 0.33	6.08	9.06	114.13
37.50	37.14 $\pm$ 2.57	6.90	4.41	99.04
300.00	316.09 $\pm$ 25.26	7.99	4.00	105.36

(4) 回收率和基质效应实验: 取空白血浆, 按“标准曲线和定量下限”方法制备阿奇霉素低、中、高 3 个浓度(4.69, 37.50 和 300.00 ng/mL) 的样品, 对每一浓度进行 5 个样本分析. 进样 10  $\mu\text{L}$ , 获得阿奇霉素相应峰面积  $A_1$  (5 次测定的平均值).

取空白血浆, 加入 300  $\mu\text{L}$  甲醇, 涡旋 2 min, 12100g 离心 10 min, 取出上清液, 加入相应的标准溶液和内标, 配制阿奇霉素低、中、高 3 个浓度(4.69, 37.50 和 300.00 ng/mL) 的样品, 每一浓度进行 5

个样本分析, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 获得阿奇霉素相应峰面积  $A_2$  (5 次测定的平均值). 以  $A_1/A_2$  计算提取回收率, 数据见表 3. 低、中、高 3 个浓度的提取回收率为 94.13% ~ 97.42%.

取不同浓度的对照品溶液, 加入内标, 用甲醇配制阿奇霉素低、中、高 3 个浓度 (4.69, 37.50 和 300.00  $\text{ng/mL}$ ) 的样品, 对每一浓度进行 5 个样本分析, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 获得阿奇霉素相应峰面积  $A_3$  (5 次测定的平均值). 以  $A_2/A_3$  的值计算基质效应, 数据见表 3, 低、中、高 3 个浓度的基质效应为 92.50% ~ 107.87%.

(5) 稳定性实验: 取高、中、低 3 个浓度 (4.69, 37.50 和 300.00  $\text{ng/mL}$ ) 的样本, 按前述方法操作, 对每一浓度进行 5 个样本分析; 分别考察血浆样品于室温放置、在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中反复冻融 3 次及长期冷冻下的稳定性, 结果见表 4. 由表 4 可见, 于室温放置 4, 24 h 和  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中反复冻融 3 次及长期冷冻 75 d 的阿奇霉素的稳定性均较好.

**Table 3 Recovery and matrix effect of azithromycin extracted from human plasma**

$\rho(\text{Added C})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	Recovery(%)	Matrix effect(%)
4.69	94.13	107.87
37.50	97.42	95.09
300.00	97.04	92.50

**Table 4 Stability of azithromycin in human plasma**

Condition	$\rho(\text{Added C})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho(\text{Found C})/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	Precision [RSD(%)]	Accuracy(%)
Short-term stability for 4 h in plasma at room temperature	4.69	4.52	7.81	96.38
	37.50	36.19	3.99	96.51
	300.00	274.85	4.65	91.62
Short-term stability for 24 h in plasma at room temperature	4.69	4.68	5.38	99.79
	37.50	36.07	3.69	96.19
	300.00	282.93	5.05	94.31
Three freeze-thaw cycles	4.69	4.44	11.22	94.67
	37.50	37.09	4.99	98.91
	300.00	323.74	4.95	107.91
Storage in plasma at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 75 d	4.69	4.69	9.59	100.00
	37.50	34.29	7.28	91.44
	300.00	293.77	6.98	97.92

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的选择与优化

阿奇霉素为十五元环大环内酯, 分子量 749.38, 结构式见图 1 插图. 由于分子中含 N, O 原子, 在 ESI 离子化方式下容易得到一个质子, 形成  $[M+H]^+$ , 故采用正离子检测模式. 实验中直接进样一定浓度的阿奇霉素甲醇溶液, 分别用正、负离子模式扫描, 发现正离子模式优于负离子模式.

血浆中的内源性物质复杂, 为避免对分析产生干扰, 采用了选择反应检测 (SRM) 模式, 选用阿奇霉素的碎片离子为检测对象. 采用 SRM 模式时, 质谱仪对一个或几个特征质荷比的离子对进行检测, 扫描时间仅在一个或几个特征离子对间分配, 大大提高了灵敏度. 从图 1 可以看出, 阿奇霉素碎片离子 591.16 的强度比其它碎片高. 为提高灵敏度, 要选择合适的碰撞能, 通过比较不同碰撞能条件下的碎片的强度, 最后确定碰撞能为 30 eV.

### 2.2 色谱条件的选择与优化

考察  $C_{18}$ ,  $C_8$  和 CN 等色谱柱和不同组成比例的溶剂体系, 分析阿奇霉素和内标红霉素标准品溶液和阿奇霉素血浆样品, 选用 Lichrospher CN 柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  i. d.) 色谱柱; 流动相为乙腈-水 (体积比 40:60, 水中含体积分数为 0.1% 的甲酸和 0.1% 醋酸铵), 阿奇霉素在酸性环境中稳定, 加入 0.1% 甲酸有助于待测物的质子化, 0.1% 醋酸铵可改变峰形, 增强峰的对称性. 在此条件下阿奇霉素和内标红霉素峰形最好, 无干扰, 保留时间恒定.

### 2.3 内标和血浆样品处理方法的选择

选作内标药物, 其色谱行为必须与待测药物相近. 相关报道<sup>[7~9]</sup> 选用克拉霉素作内标, 在本实验

中,最先选用克拉霉素作内标时,发现有交叉污染.以红霉素作内标,待测药物阿奇霉素和内标红霉素峰形均好,且二者保留时间相近.

比较了液-液萃取与直接蛋白质沉淀法,作标准曲线,两者均获得良好的线性关系.选择用甲醇直接沉淀法处理血浆样品,经济,快捷,更适宜高通量生物样品分析.

## 2.4 血药浓度测定

24名受试者单次口服500 mg阿奇霉素试验试剂和参比制剂于192 h内的平均血药浓度-时间曲线见图3.

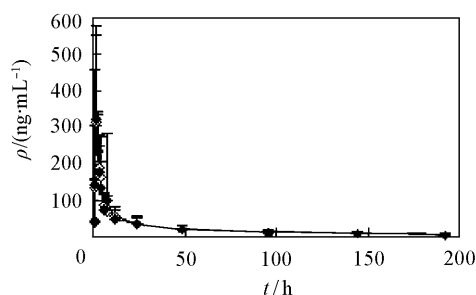


Fig. 3 Mean plasma concentration-time curves for azithromycin after a single oral dose of 500 mg azithromycin to 24 healthy volunteers  
—◆— Test formulation; —◇— reference formulation.

## 参 考 文 献

- [1] WANG Pei(王佩), LI Yu-Zhen(李玉珍). Chin. J. New. Drugs(中国新药杂志)[J], 1996, 5(3): 181—182
- [2] ZHANG Jing(张菁), GUO Bei-Ning(郭蓓宁), ZHANG Ying-Yuan(张婴元). The Chinese Journal of Clinical Pharmacology(中国临床药理学杂志)[J], 1996, 12(2): 89—92
- [3] ZHANG Gui-Jun(张贵军), LI Ke-Xin(李可欣), SUN Chun-Hua(孙春华), *et al.*. China Pharmacy(中国药房)[J], 1998, 9(4): 173—174
- [4] SHI Jing(石晶), SONG Hong-Jie(宋洪杰), LI Zhen(李珍), *et al.*. Chinese Journal of Pharmaceuticals(中国医药工业杂志)[J], 2001, 82(5): 215—217
- [5] LIU Xin(刘新), JI Jing-Juan(纪敬娟), LIU Zhe(刘哲), *et al.*. J. Med. Theor. & Prac.(医学理论与实践)[J], 2006, 19(2): 229—231
- [6] LI Dong(李东), WANG Da-Guo(王大果), NIE Zhong-Yue(聂中越), *et al.*. Chinese Journal of Clinical Pharmacy(中国临床药理学杂志)[J], 2003, 12(6): 355—357
- [7] WANG Yu-Hua(王玉花), CHEN Jun-Jie(陈俊杰), CHEN Ben-Mei(陈本美), *et al.*. Chin. Pharm. J.(中国药理学杂志)[J], 2006, 41(1): 51—53
- [8] Chen Ben-mei, Liang Yi-zeng, Chen Xiang, *et al.*. J. Pharm. Biomed. Anal.[J], 2006, 42: 480—487
- [9] LI Xiao-Zhe(李晓哲), PANG Lai-Xiang(庞来祥), CHEN Xiao-Yan(陈笑艳), *et al.*. Pharm. J. Chin. PLA(解放军药理学学报)[J], 2005, 21(5): 342—346

## Determination of Azithromycin in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

HU Wan-Qun, XU Yu\*, LIU Fei, RUI Lei, GUO Qing-Xiang\*

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract** A simple and sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method was developed and validated for determination of azithromycin in human plasma with erythromycin as the internal standard. Chromatographic separation was performed on a Lichrospher CN column(4.6 mm × 150 mm) with a mixture of acetonitrile and water(containing 0.1% formic acid and 0.1% ammonium acetate, volume ratio 40:60) as mobile phase. Selected ion monitoring was specific for azithromycin and erythromycin(IS). The assay was linear over the mass concentration range 2.34—600 ng/mL and the correlation coefficients for the calibration curves ranged from 0.997 to 0.999. The intra- and inter-day precisions, calculated from quality control samples, were less than 10%. Protein precipitation with methanol was chosen for sample preparation method. The recoveries ranged from 94.13% to 97.04% and matrix effect ranged from 92.50% to 107.87%. The method was applied to bioequivalence study after oral administration of 500 mg azithromycin to 24 healthy volunteers.

**Keywords** Azithromycin; Human plasma; Bioequivalence; HPLC-MS/MS (Ed.: A, G)