

# HPLC法测定人血浆中阿奇霉素浓度及其药动学研究

王裕宏\*(泰州市第四人民医院药剂科,江苏泰州 225300)

中图分类号 R969.1;R978.1\*5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)46-4352-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.46.12

**摘要** 目的:建立测定人血浆中阿奇霉素浓度的方法并研究其药动学行为。方法:血样采用二氯甲烷处理后以高效液相色谱法进样测定。色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-乙腈-水-0.1 mol/L乙酸(39:15:46:0.2),检测波长为210 nm,内标为罗红霉素。结果:阿奇霉素血药浓度在0.40~18.0 μg/ml范围内线性关系良好( $r=0.9996$ );回收率>80%,日内和日间RSD均<10%。结论:本方法简便、快速、准确,适用于阿奇霉素药动学研究及血药浓度监测。

**关键词** 阿奇霉素;高效液相色谱法;药动学;血药浓度

## Determination of Azithromycin in Human Plasma by HPLC and Its Pharmacokinetic Study

WANG Yu-hong(Dept. of Pharmacy, Taizhou Forth People's Hospital, Jiangsu Taizhou 225300, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of azithromycin concentration in human plasma. METHODS: After treated with dichloromethane, the plasma sample was determined by HPLC. The determination was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-water-0.1 mol/L acetic acid (39:15:46:0.2). The detection wavelength was set at 210 nm, and roxithromycin was taken as the internal standard. RESULTS: The linear range of azithromycin was 0.40-18.0 μg/ml ( $r=0.9996$ ); average recovery was higher than 80%, and both intra-day RSD and inter-day RSD were below 10%. CONCLUSIONS: The method is convenient, rapid and accurate, and suitable for the pharmacokinetic study and plasma concentration monitoring of azithromycin.

**KEYWORDS** Azithromycin; HPLC; Pharmacokinetics; Plasma concentration

阿奇霉素(Azithromycin)属于15元环大环内酯类抗生素,化学性质比较稳定。体外试验证明阿奇霉素对临床上多种常见致病菌和微生物均有抗菌作用,如革兰阳性菌、革兰阴性菌、厌氧菌、支原体或衣原体等<sup>[1-2]</sup>。其常用于治疗呼吸道、泌尿生殖系统、皮肤和软组织病毒性感染等。本试验建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定人血浆中阿奇霉素浓度的方法,研究阿奇霉素片在健康志愿者体内的药动学行为,为临床用药提供药动学依据和质量保证。

## 1 材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪,包括LC-10ADVP低压二元梯度泵、CTO-10AVP柱温箱、SCL-10ADVP系统控制器、SIL-20AD自动进样器(日本岛津公司);H-1600RW微型台式高速冷冻离心机(上海利鑫离心机有限公司,离心半径:6 cm);ER-182A

型电子分析天平(日本AND公司);CM-12型氮吹仪(北京康林科技有限责任公司)。

### 1.2 药品与试剂

阿奇霉素片(山东绿因药业有限公司,批号:090814,规格:0.5 g/片);阿奇霉素对照品(天津一方科技有限公司,批号:110715-200802,含量:99.98%,供含量测定用);内标:罗红霉素对照品(天津一方科技有限公司,批号:130351-200303,含量:99.99%);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法<sup>[3-5]</sup>

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-乙腈-水-0.1 mol/L乙酸(39:15:46:0.2);流速:1.0 ml/min;柱温:40 ℃;检测波长:210 nm;内标:罗红霉素。

### 2.2 血浆样品预处理

26(5):481.

- [5] 陈刚,蒋冬香,王玉春.大肠埃希菌的临床分布及其耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2009,19(5):586.
- [6] 孟德宝,黎朝晖,薛学温,等.我院2006-2010年头孢吡肟使用强度与医院内病原菌耐药率相关性分析[J].中国执业药师,2012,9(2):9.

- [7] 唐翠连.某医院临床分离细菌菌株耐药检测结果与分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(8):927.
- [8] 卫生部全国细菌耐药监测网.卫生部全国细菌耐药监测2006-2007年度报告[EB/OL].(2012-04-19)[2013-04-16]. <http://www.clinphar.cn/thread-9309-1-1.html>.
- [9] 林志强,张国伟,王大璇,等.我院细菌耐药率变迁与抗菌药物用量的相关性研究[J].中国药物警戒,2011,8(2):75.

(收稿日期:2014-05-15 修回日期:2014-06-25)

\*副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0523-80185232。E-mail:xiexuanwangyx@163.com

抗凝全血离心,取血浆 500  $\mu\text{l}$  置 15 ml 带盖尖嘴离心管中, 加内标液(0.5 mg/ml 罗红霉素)50  $\mu\text{l}$ 、饱和碳酸钠 100  $\mu\text{l}$ 、二氯甲烷 1 ml, 涡旋混匀萃取 3 min, 15 000 r/min 离心 5 min。采用移液枪吸取上清液, 转移至 15 ml 带盖尖嘴离心管中, 40  $^{\circ}\text{C}$  氮气流吹干, 残渣再用流动相 100  $\mu\text{l}$  溶解, 进样 80  $\mu\text{l}$ , 记录色谱图, 采用内标法以峰面积比定量。

### 2.3 标准贮备液的制备

准确称取阿奇霉素对照品约 10 mg, 置 1 ml 量瓶中, 以乙腈定容, 再用移液枪从中精密吸取 500  $\mu\text{l}$ , 转移至 5 ml 量瓶中, 再用乙腈定容至相应刻度, 即得 1 mg/ml 的标准贮备液, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。另准确称取内标罗红霉素对照品 10 mg, 置 1 ml 量瓶中, 以乙腈定容, 再用移液枪从中精密吸取 500  $\mu\text{l}$ , 转移至 10 ml 量瓶中, 再用乙腈定容至相应刻度, 即得 0.5 mg/ml 的内标贮备液, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 2.4 受试者选择

8 名男性健康志愿者, 年龄 22~24 岁, 体质量 55~75 kg。于试验前接受全身系列体格检查, 体检合格后, 并经医学伦理委员会批准, 受试者对试验过程及可能发生的不良反应表示理解并自愿签署知情同意书。

### 2.5 试验设计

8 名受试者于试验前日晚 8:00 时后禁食, 次日早晨空腹以 200 ml 温开水送服受试药品阿奇霉素片 2 片。服药 2 h 后方可饮水, 4 h 后统一进清淡饮食, 整个试验在医师监护下进行。受试者于服药前及服药后 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、14 h 时取静脉血 4 ml 于肝素化试管中, 离心(3 500 r/min) 5 min 分离出血浆, -40  $^{\circ}\text{C}$  保存待测。

### 2.6 数据处理

根据平均药-时曲线, 应用 DAS2.1 软件进行房室模型拟合, 绘制平均药-时曲线, 并计算药动学参数。

## 3 结果

### 3.1 专属性考察

将口服药物后的血浆按“2.2”项下方法操作, 再取适量注入高效液相色谱仪, 同法处理空白血浆和空白血浆加对照品及内标的血浆。结果阿奇霉素与内标罗红霉素的峰形良好, 保留时间分别为 10.3、7.5 min, 且空白血浆样本在相应位置处基本上未出现内源性物质的干扰, 结果见图 1。

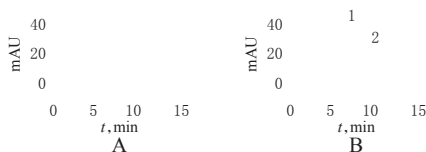


图 1 高效液相色谱

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 阿奇霉素对照品 + 内标; 1. 罗红霉素; 2. 阿奇霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + azithromycin control + internal standard; 1. roxithromycin; 2. azithromycin

### 3.2 标准曲线的制备及最低检测限考察

取空白血浆与阿奇霉素标准贮备液(1 mg/ml)适量, 涡旋

混合, 配制成 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的血浆样本溶液, 再与适量的空白血浆混合, 配制成阿奇霉素质量浓度分别为 0.4、0.8、1、3、6、9、12、18.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的系列标准血样。按“2.2”项下方法处理血浆样本, 进样测定, 记录色谱。以测得的阿奇霉素峰面积(y)对血药浓度(c)进行线性回归, 得回归方程为:  $y=0.009\ 3c-0.002\ 53$  ( $r=0.999\ 6$ )。结果表明, 阿奇霉素血药浓度在 0.4~18.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内线性关系良好, 最低检测限为 400 ng/ml。

### 3.3 回收率及精密度试验

于空白血浆中, 加入适量的阿奇霉素标准贮备液, 配制成 0.6、6、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的阿奇霉素质量控制(QC)样品, 按“2.2”项下方法操作, 测定阿奇霉素的峰面积( $A_1$ ); 另取等量的阿奇霉素标准溶液, 配制质量浓度为 0.6、6、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 按 QC 样品的血浆处理方法操作, 记录阿奇霉素面积为  $A_2$ 。以( $A_1/A_2$ )-之比乘以 100%, 计算提取回收率; 并连续测定 3 次, 计算日内精密度。以同样的方法连续测定 5 d, 计算日间精密度, 同时测定方法回收率。结果表明测得的日内及日间 RSD 均 < 10%, 回收率结果 > 80%, 可见本方法有较好的准确性, 符合生物样本测定方法的要求。回收率及精密度试验结果见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Results of recovery tests and precision( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

加入量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	测得量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	提取回收率, %	方法回收率, %	日内测得量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	日内 RSD, %	日间测得量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	日间 RSD, %
0.6	0.48 $\pm$ 0.04	80.5 $\pm$ 6.8	98.96 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.03	6.7	0.57 $\pm$ 0.04	7.9
6	4.90 $\pm$ 0.45	81.5 $\pm$ 7.3	99.05 $\pm$ 0.03	5.7 $\pm$ 0.5	6.4	5.6 $\pm$ 0.4	7.3
10	8.26 $\pm$ 0.74	82.6 $\pm$ 7.4	100.01 $\pm$ 0.06	9.6 $\pm$ 0.6	7.5	9.7 $\pm$ 0.4	9.2

### 3.4 稳定性试验

采用空白血浆与适量的阿奇霉素标准贮备液混匀, 配制成 0.6、6、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 QC 样品, 按“2.2”项下方法处理, 于室温下放置, 分别在 0、8、16、24 h 时测定, 比较不同时间测定的结果。阿奇霉素的血药浓度变化 < 5%, 表明血浆样品在 24 h 内稳定性良好, 结果见表 2。

表 2 稳定性试验结果

Tab 2 Results of stability test

血药浓度, $\mu\text{g}/\text{ml}$	进样各时间点稳定性, %				多次冻融稳定性	
	0 h	9 h	17 h	24 h	测得量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	RSD, %
0.6	100	99.7	98.6	97.5	0.57 $\pm$ 0.03	7.5
6	100	99.5	98.2	97.3	5.91 $\pm$ 0.05	8.4
10	100	99.4	98.1	97.2	9.85 $\pm$ 0.06	7.9

### 3.5 多次冻融试验结果

取“3.4”项下 3 种 QC 血浆样品, 即时测定; 另于 -40  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存, 解冻测定, 连续 3 次。结果阿奇霉素的血药浓度变化 < 10%, 表明血样经 3 次冻融后稳定性较好, 结果见表 2。

### 3.6 药动学研究结果

8 例健康志愿者单剂量空腹口服阿奇霉素片后的平均药-时曲线见图 2。另采用 DAS2.1 软件对阿奇霉素的药-时曲线进行拟合, 结果表明阿奇霉素药-时曲线符合二室模型, 所求算出的主要药动学参数见表 3。

## 4 讨论

关于阿奇霉素在血浆中的提取方法, 笔者采用了甲醇、乙腈、高氯酸和沸水浴等进行比较分析。在所用的去除蛋白方

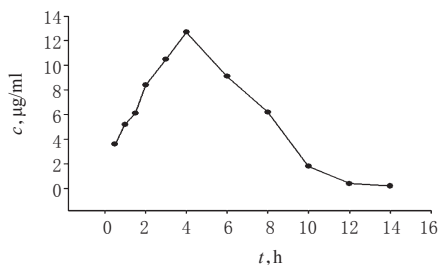


图2 8例健康志愿者单剂量空腹口服阿奇霉素片后的平均药-时曲线

Fig 2 Average plasma concentration-time curve of azithromycin in 8 healthy volunteers after oral administration

表3 8例健康志愿者单剂量空腹口服阿奇霉素片后的主要药动学参数( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of azithromycin in 8 healthy volunteers after oral administration ( $\bar{x} \pm s$ )

药动学参数	结果
$t_{1/2}$ , h	$4.89 \pm 0.25$
$C_{max}$ , $\mu\text{g/ml}$	$12.4 \pm 0.5$
$t_{min}$ , h	$4.24 \pm 0.14$
$AUC_{0-\infty}$ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$	$5\ 553 \pm 137$
$AUC_{0-14}$ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$	$4\ 231 \pm 112$

法中,以甲醇沉淀蛋白报道居多,但沉淀须耗费大量的有机溶剂,且沉淀蛋白效果也不是很好;高氯酸沉淀蛋白虽然用量少,但很难吹干;沸水浴提取效果则比较差,可能与阿奇霉素在其中的溶解度相对比较小有关;而选择乙腈沉淀蛋白时,不但用量少而且吹干也很比较容易。四者比较分析,选择乙腈作为沉淀剂,效果最佳。

笔者在寻找最佳色谱条件时发现,流动相中甲醇和水的

相对比例变化对阿奇霉素、内标罗红霉素及血浆内源性物质的分离效果影响较大。当甲醇比例在50%~70%,阿奇霉素与罗红霉素(内标)保留时间相差不到1 min,且存在与周围内源性物质严重叠加现象;当甲醇比例为39%时,药物、内标和血浆内源物质分离效果得到了很大程度的改善,但峰形仍然出现严重拖尾;当加入适量的醋酸后,能够明显改善各色谱峰的峰形,当pH值为5.2时,阿奇霉素、内标罗红霉素和血浆内源物质均获得良好的分离效果,且峰形也比较对称,响应值高。故确定最终的流动相为甲醇-乙腈-水-0.1 mol/L乙酸(39:15:46:0.2)。

### 参考文献

- [1] 段晓玲,魏青杨,孙秀丽,等.静脉滴注阿奇霉素治疗非淋菌性泌尿生殖道炎106例[J].中国药物与临床,2003,3(6):328.
- [2] 魏国会,贾忠军.阿奇霉素的不良反应[J].中国现代医学杂志,2006,16(10):1 517.
- [3] 李晓哲,庞来祥,陈笑艳,等.阿奇霉素干混悬剂在健康人体的药代动力学及生物等效性评价[J].解放军药理学报,2005,21(5):342.
- [4] 唐世新,李珍,计一平,等.阿奇霉素片人体药动学研究及生物等效性评价[J].药学服务与研究,2007,7(5):364.
- [5] 郭智,张姝,于福贤,等.HPLC-MS法测定人血浆中的阿奇霉素及其人体药动学研究[J].中国新药杂志,2007,16(23):1 986.

(收稿日期:2014-04-18 修回日期:2014-09-10)

## 国家卫生和计划生育委员会召开援非抗疫队伍行前动员会——援非抗疫将加强公共卫生软援助

本刊讯 2014年11月5日,国家卫生和计划生育委员会召开援非抗疫队伍行前动员会。国家卫生和计划生育委员会主任李斌出席会议并讲话。李斌表示,卫生系统将按照党中央、国务院的统一部署,本着积极、务实、有为、有效的原则,综合考虑西非国家疫情发展形势和国际社会援助情况,开展对非援助工作。

国家卫生和计划生育委员会计划11月9日派出第一批12人的公共卫生师资培训队伍抵达塞拉利昂,为西非疫区国家培训公共卫生人员;11月中旬将派出第二批中国疾控中心检测队;同时,国家卫生和计划生育委员会已经选派公共卫生专家担任联合国埃博拉应急特派团团长高级顾问;此外,11月中下旬,我国在西非疫区国援非抗疫人员将达近400人,为指导、协调、统筹前方医疗卫生力量,我国将派出中国政府援非抗疫高级专员赴西非开展工作。

截至目前,我国已累计向疫区3国派出252人开展工作,目前仍有134人坚守疫区国。计划在几个月内,我国将派出累计千余名医务人员和公共卫生专家在西非从事援助抗击埃博拉出血热疫情工作。这些人员陆续将从军队医疗卫生机构抽调派出,主要协助疫区国家开展公共卫生人员培训、实验室检测、留院观察和治疗工作。

李斌指出,加大我国对西非国家抗击疫情的援助力度,有

利于巩固和发展我国与非洲国家传统友谊,展示我国国际人道主义和负责任大国形象。我国公共卫生队伍在援非抗疫中走出国门,将中国在公共卫生和传染病防治领域所积累的经验在非洲分享和传递,这标志着我国援非抗疫重点已经逐步从人道主义援助转向以多种形式支持防疫治病。

据了解,我国向西非疫区国家累计四轮援助约7.5亿,其中包括实施公共卫生援助。下一步技术援非抗疫工作的重点,是充分借鉴国内防控非典等经验,以防控为主,采取公共卫生手段,控制疫情传播扩散。其中,公共卫生师资培训队伍将在我国援外医疗队、军队援非抗疫队伍的支持配合下,在西非疫区3国和有潜在疫情流行风险的周边国家,面向医务人员、基层管理者、社区领袖、政府工作人员、学生、社会卫生工作者和志愿者等开展培训,计划为当地培训医疗护理和社区骨干防控等人员10 000人,并传授我国急性传染病防控经验,如早发现、早报告、早诊断、早隔离、早治疗的“五早”经验等,提高当地埃博拉出血热防控的整体技术水平和能力,加强民众自我防护意识,从而彰显我国援非抗疫的独特优势。

会议由国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽主持。委办公厅、财务司、应急办、疾控局、医政医管局、宣传司、国际司相关负责同志,中国疾控中心、中国健康教育中心、健康报社负责同志参加了会议。