

COVID-19研究经验：使用亲水作用色谱配合兼容LC-MS的流动相分析阿奇霉素

Kenneth D. Berthelette, Thomas H. Walter, Nicholas J. Zampa, Jonathan E. Turner

Waters Corporation



需要帮助？如需详细了解沃特世如何为您抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)提供助力，请联系 [新型冠状病毒肺炎\(COVID-19\)疫情创新响应团队](#)

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

阿奇霉素是一种应用广泛的抗生素，在治疗病毒性呼吸道疾病方面取得了一些成功。由于出现COVID-19大流行疫情，有关人员决定对阿奇霉素（联合或不联合其它药物）是否能治疗不同患者人群的COVID-19展开研究。在早期临床研究的推动下，沃特世开始研究改进后的阿奇霉素分析方法。现行USP专论中针对阿奇霉素的分析方法是采用含有磷酸钾缓冲液的流动相以及各种色谱柱填料（从典型的L1填料到更为特殊的固定相）。专论中提供的起始条件非常有用，而使用兼容MS的流动相更能提高通用性。亲水作用色谱(HILIC)与反相分离条件相辅相成，有助于获得出色的分离效果。

优势

- 与引用的反相分离相比，具有对称的窄峰
- 高强度MS信号，得益于使用了有机溶剂浓度高的流动相

简介

阿奇霉素（一种广泛使用的抗生素）和其它大环内酯类抗生素（例如克拉霉素）在治疗病毒性呼吸道疾病（包括流感）方面取得了一些成功^{1,2}。因此，相关组织启动临床研究，考察阿奇霉素（联合或不联合其它药物）作为SARS-CoV-2感染患者的潜在治疗药物所发挥的效果^{3,4}。目前虽然继续在某些COVID-19患者人群中进行一些阿奇霉素试验，但已取消至少一项在住院患者中研究阿奇霉素与羟氯喹联合用药的试验⁵。

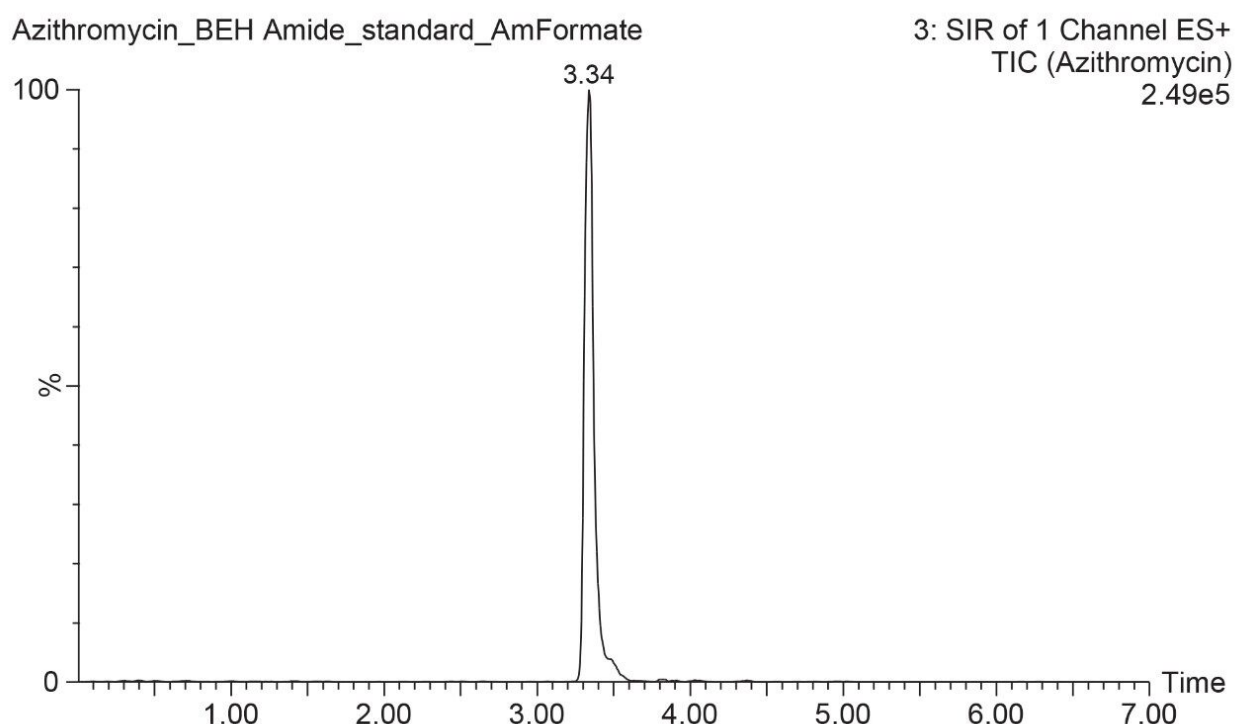
即便如此，虽然相关组织在COVID-19大流行疫情的早期阶段积极开展了阿奇霉素的临床研究，我们仍考察了新的分析方法，以支持改善分析性能的潜在需求。我们考察了不同分析条件，以便对阿奇霉素进行最佳分离和表征。在HILIC模式下，使用通用筛选条件和ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱成功完成了阿奇霉素分析。与常见的反相LC条件相比，在HILIC条件下获得了更窄、更对称的峰形以及高强度MS信号⁶。在生物分析应用中分析低浓度化合物时，这种性能非常有利。

无论阿奇霉素是否用于新型冠状病毒的治疗，这种新型分析方法总体上对于阿奇霉素均有用，在生物分析应用中可进行部分转移，用于需要低浓度分析的类似治疗药物分子。

结果与讨论

阿奇霉素购自Sigma-Aldrich，使用95:5乙腈/水稀释至5 µg/mL。使用ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(2.1 x 50 mm, 1.7 µm)与甲酸铵(10 mM pH 3.0)流动相在配备Xevo TQD质谱仪的ACQUITY UPLC H-Class系统上进行分析。分离所采用的梯度方法如下。等度保持95:5乙腈/水 1 min，然后在7 min内以线性梯度将水的比例提高至70%。之后将色谱柱重新平衡至起始条件供下一次进样使用。整个梯度过程中流动相pH和离子强度保持不变。进样体积1 µL，流速0.5 mL/min。色谱柱温度设定为30 °C。采用正离子电喷雾电离法检测阿奇霉素，并对以下 m/z 通道进行多重反应监测：749->591和749->158⁴。

下方色谱图展示了阿奇霉素的检测结果，获得了出色的对称窄峰。在所述的测试条件下，分析物在水性流动相比例约为30%时流出，该方法可进一步优化。此外，由于保留性能好，分析物不会与未保留的基质化合物（常引起MS灵敏度问题）共流出。相较于引用的反相方法，本方法获得了更清晰的峰形，有助于降低检测限，这一点对于生物样品分析非常重要。此外，相较于反相分离方法，HILIC方法中使用的高有机溶剂浓度流动相还能够提高MS灵敏度。



结论

无论阿奇霉素是否可用于治疗COVID-19，对其进行可靠、稳定的分析在生物分析应用中均很重要。反相LC虽然已经能够成功分析阿奇霉素，但采用HILIC法仍具有多项优势。首先，HILIC能够很好地保留极性分析物，因此有助于实现方法优化，而反相应用则主要局限于水性或弱极性流动相。此外，HILIC采用的高有机溶剂浓度流动相还能够提高MS应用的灵敏度，从而更好地检测生物分析工作流程中常见的低浓度分析物。随着科学家持续加深对阿奇霉素的研究，此类生物分析工作流程变得越来越重要。而HILIC是使分析人员拥有上述优势最简单的途径。

参考文献（如果适用）：

1. Tran DH, Sugamata R, Hirose T, Suzuki S, Noguchi Y, Sugawara A, et al. Azithromycin, a 15-membered macrolide antibiotic, inhibits influenza A(H1N1)pdm09 virus infection by interfering with virus internalization process. J Antibiot (Tokyo). 2019;72(10):759-68.
2. Miyamoto D, Hasegawa S, Sriwilaijaroen N, Yingsakmongkon S, Hiramatsu H, Takahashi T, et al. Clarithromycin inhibits progeny virus production from human influenza virus-infected host cells. Biol Pharm Bull. 2008;31(2):217-22
3. NIH.gov [Internet]. Bethesda: U.S. Department of Health and Human Services; c2020. [2020年7月9日引用]. 参考网站: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-begins-clinical-trial-hydroxychloroquine-azithromycin-treat-covid-19> <<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-begins-clinical-trial-hydroxychloroquine-azithromycin-treat-covid-19>>
4. Maier, S. Newly Diagnosed COVID-19 Patients Needed for Antibiotic Clinical Trial [Internet]. San Francisco: UCSF; 2020 [2020年7月9日引用]. 参考网站: <https://www.ucsf.edu/news/2020/06/417901/newly-diagnosed-covid-19-patients-needed-antibiotic-clinical-trial> <<https://www.ucsf.edu/news/2020/06/417901/newly-diagnosed-covid-19-patients-needed-antibiotic-clinical-trial>>
5. NIH.gov [Internet]. Bethesda: U.S. Department of Health and Human Services; c2020. [2020年7月9日引用]. 参考网站: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-halts-clinical-trial>

hydroxychloroquine <<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-halts-clinical-trial-hydroxychloroquine>>

6. Filist, M; Bus-Kwasnik, K; Ksycinska, H; Rudzki, P. “Simplified LC-MS/MS method enabling the determination of azithromycin in human plasma after a low 100 mg dose administration.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.(2014).184-189.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

Xevo TQD三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134608730>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720006922ZH, 2020年5月