

HPLC法测定人血清中利奈唑胺浓度及其临床应用

董海燕, 董亚琳*, 王雪, 杨华, 刘娟娟

(西安交通大学医学院第一附属医院, 西安 710061)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法快速测定人血清中利奈唑胺浓度, 并用于危重患者治疗药物监测。方法: 色谱柱: Hypersil ODS柱; 流动相: 乙腈-水 (23: 77), 调整 pH 至 5.0 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 紫外检测波长为 254 nm。应用已建立的方法对 9 例危重患者进行利奈唑胺治疗药物监测, 并合理制定个体化给药方案。结果: 利奈唑胺在 $0.31 \sim 20.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好 ($r = 0.9996$), 最低定量限为 $0.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 绝对回收率为 47.2%, 相对回收率为 102.1%, 日内、日间精密度的 RSD 分别 $< 4\%$ 和 $< 3.5\%$ 。另外, 所监测 9 例危重患者中, 有 4 例患者出现利奈唑胺谷浓度小于最低抑菌浓度的情况。结论: HPLC 法简单、快速、准确、灵敏、重现性好, 可用于临床利奈唑胺的浓度监测。

关键词: 利奈唑胺; 高效液相色谱法; 血药浓度; 治疗药物监测

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2010)02-0199-05

HPLC determination and clinical application of linezolid concentration in human serum

DONG Hai-yan, DONG Ya-lin*, WANG Xue, YANG Hua, LIU Juan-juan

(The First Affiliated Hospital School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract Objective To establish a method of determining serum linezolid in human by HPLC, and use the method for therapeutic drug monitoring in critically ill patients. **Methods** Separation was carried out on a Hypersil ODS column, the mobile phase consisted of acetonitrile-water (23: 77), adjust the pH to 5.0 at the flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. UV detection wavelength was 254 nm. The method has been used for nine critically ill patients for therapeutic drug monitoring and individual dosage regimen of linezolid. **Results** A good linearity was demonstrated between $0.31 \sim 20.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9996$), the lowest limit of quantification of $0.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The absolute recovery was 47.2%, and the relative recovery was 102.1%. The intra-day and inter-day deviation was showed by $\text{RSD} < 4\%$, $< 3.5\%$, respectively. In addition, the monitoring of nine critically ill patients, there are four patients with linezolid trough concentrations less than the minimum inhibitory concentrations. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, sensitive, reproducible and validated for determination of serum linezolid in clinical practice.

Key words linezolid; HPLC; blood drug concentration; therapeutic drug monitoring

利奈唑胺 (linezolid) 是全球第一个人工合成的噁唑烷酮类抗菌药, 2000 年获得美国 FDA 批准上市, 中国于 2007 年开始用于临床。该药用于治疗革兰阳性球菌引起的感染, 对葡萄球菌属、肺炎链球菌属、肠球菌属细菌均具有高度的抗菌活性, 包括其中的甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (MRSA)、青霉素中介肺炎链球菌、万古霉素耐药肠球菌 (VRE), 是治疗革兰阳性菌感染的糖肽类多重耐药的最后防线^[1]。一般情况下, 静脉滴注或口服利奈唑胺 600

mg(成人)或 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (儿童)即可, 无需监测血药浓度, 但是危重感染患者, 如囊性纤维化患者、严重烧伤患者、重度肾功能衰竭患者、器官移植患者等^[2-5], 由于病理生理条件下存在影响药物体内分布和排泄的多种因素 (如水肿、液体治疗、胸腔积液、腹水、烧伤等), 可能造成药物体内过程发生改变 (如分布容积增大、药物稀释, 或肾脏清除改变等), 因此, 对这些危重患者有必要进行血药浓度的监测, 以确保药物的有效治疗, 优化利奈唑胺的临床

* 通讯作者 Tel (029) 85323241; E-mail: dongyalin@medmail.com.cn

使用,减少耐药菌株的产生及不良反应的发生^[6~10]。要达到此目的需建立简便、快速、灵敏、可靠的人血中利奈唑胺定量测定方法,进行危重患者利奈唑胺使用后的血药浓度监测,以此为基础,结合患者药效动力学特点,制定个体化给药方案。

目前,国外有关 HPLC 法测定利奈唑胺浓度常涉及不同的样品处理方式,如,沉淀蛋白^[11~16]、固相萃取^[17~19],这些方法被用于不同生物样本中利奈唑胺浓度的测定,另外,在线提取技术也用于血样、尿样和 Mueller-Hinton 肉汤培养基中利奈唑胺的测定^[20,21],但国内尚未见相关的研究报道。本研究建立了简单的测定人血清中利奈唑胺浓度的 HPLC 法,并将其用于临床血药浓度监测及个体化给药方案的制定。

1 材料

1.1 仪器 Waters HPLC 系统,包括 Waters 510 型高压泵、Waters 498 型紫外检测器、ANASTAR 色谱工作站。

1.2 试剂 利奈唑胺对照品(辉瑞公司,批号 08A30Z56 纯度 100.0%);乙腈(色谱纯,美国 Fisher);甲醇(色谱纯,美国 Fisher);磷酸(化学纯,天津市化学试剂六厂);纯化水。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:Hyersil C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(23:77,磷酸调 H 5.0);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 254 nm;进样量 50 μL。

2.2 对照品储备液制备 称取利奈唑胺对照品适量,配制浓度为 2 mg·mL⁻¹的储备液,4℃冷藏。

2.3 样品处理与测定 精密吸取血清样品 400 μL,加入 400 μL 甲醇涡旋混匀 3 min,室温静置 20 min,离心(10000 r·min⁻¹) 10 min,吸取上清液 50 μL 进样,在上述色谱条件下分离测定,记录色谱峰面积,由利奈唑胺峰面积代入标准曲线方程,求出血清药物浓度。

2.4 方法 对严重感染或存在对利奈唑胺的分布、代谢有影响的病理生理学特征的危重症患者采用 HPLC 法开展治疗药物监测(therapeutic drug monitoring TDM),并对 TDM 数据进行分析,这些患者均为革兰阳性多重耐药菌感染。临床治疗结果分为:有改进或症状缓解为临床有效,持续存在和/或新症状出现为临床无效。开展 TDM 的患者均采用每次 600 mg 每 12 h 一次静脉输注的给药方案,在给予利奈唑胺达稳态后(>24 h),于给药前采血,3000 r

·min⁻¹离心 10 min HPLC 法测定利奈唑胺浓度,之后根据监测结果个体化调整利奈唑胺的给药方案使谷浓度高于 MIC。

3 结果

3.1 方法专属性 利奈唑胺的保留时间为 7.8 min,血清中的内源性杂质不干扰利奈唑胺的测定,色谱图见图 1。

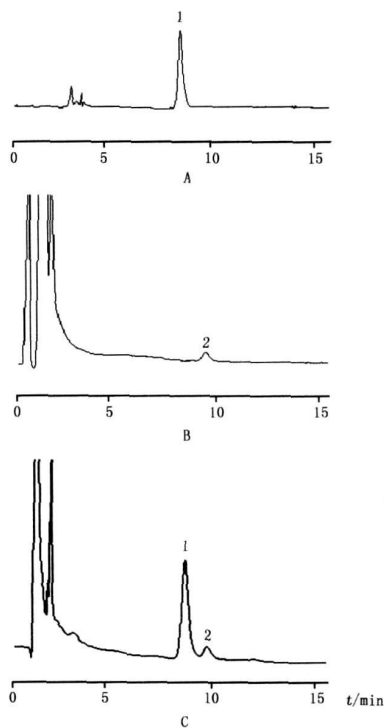


图 1 血清中利奈唑胺的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of linezolid in human serum

A. 利奈唑胺溶液 (linezolid solution) B. 空白血清 (blank serum) C. 血清样品 (serum sample)

1 利奈唑胺 (linezolid) 2 血清中的干扰峰 (interference)

3.2 线性关系考察 取正常人空白血清 1 mL,精密加入不同量对照品溶液,配制含利奈唑胺 20.00 10.00 5.00 2.50 1.25 0.63 0.31 mg·L⁻¹的系列对照品血清。按“样品处理与测定”项下方法操作,以利奈唑胺峰面积(A)对浓度(C)作图,采用最小二乘法进行线性回归,线性回归方程为:

$$A = 6.372 \times 10^4 C - 8.390 \times 10^3 \quad r = 0.9996$$

利奈唑胺浓度在 0.31~20.00 mg·L⁻¹范围内线性关系良好。最低定量限为 0.31 mg·L⁻¹。

3.3 精密度与回收率试验 取空白血清 1 mL 若干份,配制成高、中、低 3 个浓度(10.00 2.50 0.63 mg·L⁻¹)的对照品血清,按“样品处理与测定”项下方法操作,测定其浓度,再与理论浓度相比即为方法回收率。以 3 个浓度对应的相同浓度的对照品溶液进

行分析, 计算提取回收率, 同时计算日内及日间精密度。结果见表 1。

表 1 利奈唑胺测定方法的回收率和精密度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Tab 1 Recovery and precision of linezolid

浓度 (concentration) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	精密度 (precision)				回收率 (recovery) %	
	日内 (intra-day)		日间 (inter-day)		方法回收率 (method recovery)	提取回收率 (extraction recovery)
	测得值 (detected) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD %	测得值 (detected) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD %		
10.00	9.89 $\pm$ 0.18	1.9	10.18 $\pm$ 0.27	2.7	98.86 $\pm$ 1.8	48.82 $\pm$ 0.9
2.50	2.45 $\pm$ 0.05	2.8	2.49 $\pm$ 0.06	2.4	98.00 $\pm$ 1.8	46.41 $\pm$ 0.9
0.63	0.66 $\pm$ 0.02	3.8	0.66 $\pm$ 0.02	3.2	105.1 $\pm$ 3.2	42.05 $\pm$ 1.6

3.4 稳定性 取空白血清 1 mL 若干份, 配制成高、中、低 3 个浓度 (10.00, 2.50, 0.63 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的对照品血清, 分别对室温放置稳定性 (24 h), 样品处理后复溶稳定性 (室温放置 24 h), 长期冷冻稳定性

(-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 20, 40 d), 冻融稳定性 (反复冻融 3 次), 按“样品处理与测定”项下方法操作, 测定其浓度, 并与室温放置 0 h 所测浓度相比较, 考察样品在室温放置、冰冻、冻融时的稳定性。结果见表 2。

表 2 样品稳定性 ($n = 5$)

Tab 2 Stability of sample

浓度 (concentration) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD %				
	室温 (room temperature) 24 h	处理后室温 24 h (room temperature 24 h after treatment)	冷冻 20 d (freezing 20 d)	冷冻 40 d (freezing 40 d)	冻融 3 次 (freeze thawing for three times)
10.00	1.2	3.4	3.1	1.3	3.6
2.50	1.7	0.6	4.5	2.0	2.8
0.63	1.1	1.1	0	1.1	1.1

3.5 治疗药物监测 对 9 例患者的 44 份血样进行了测定。其中, 男性 7 人, 女性 2 人, 平均年龄 53 岁 (19~84 岁)。HPLC 法监测利奈唑胺谷值浓度, 9 例患者平均谷值浓度 ($n = 44$) 为 (5.19 $\pm$ 3.37) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 结果见表 3 (患者 MIC 测定结果均为 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 临床结果评定标准为临床有效: 有改进或症状缓解; 临床无效: 持续存在和/或新症状出现)。

实验结果表明, 在开展 TDM 的 9 例患者中, 5 例患者利奈唑胺的所有谷浓度均高于 MIC, 有 4 例 (第 1, 2, 4, 7 例) 患者曾经出现过利奈唑胺的谷浓度低于 MIC, 在这 4 例患者中有 1 例 (第 1 例) 平均谷浓度也低于 MIC。通过 TDM 与个体化给药方案的制定, 7 例患者最终临床治疗结果全部表现为细菌根除, 治疗有效。

表 3 利奈唑胺的血药浓度监测结果

Tab 3 Monitor results of blood drug level

序号 (No.)	年龄 (years of age) 岁 (age)	浓度范围 (range of concentration) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	平均血药浓度 (average concentration) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	与 MIC 比较 (compared with MIC)	用药时间 (medication time) /d	临床结果评定 (clinical effectiveness evaluation)
1	19	0.68~2.04	1.27 $\pm$ 0.70	< MIC	18	临床有效 (clinical utility)
2	84	0.84~9.06	6.05 $\pm$ 4.53	> MIC	13	临床无效 (clinical failure)
3	44	6.07~7.40	6.65 $\pm$ 0.68	> MIC	12	临床有效 (clinical utility)
4	44	1.16~3.59	2.47 $\pm$ 1.06	> MIC	9	临床有效 (clinical utility)
5	77	4.5~14.21	0.26 $\pm$ 3.53	> MIC	6	临床无效 (clinical failure)
6	77	4.58~5.50	5.15 $\pm$ 0.40	> MIC	15	临床有效 (clinical utility)
7	41	0.84~10.60	4.67 $\pm$ 2.78	> MIC	30	临床有效 (clinical utility)
8	36	2.4~4.0	3.17 $\pm$ 0.68	> MIC	16	临床有效 (clinical utility)
9	55	6.4~8.8	7.59 $\pm$ 1.73	> MIC	4	临床有效 (clinical utility)

4 讨论

4.1 色谱方法选择 曾参照文献[3, 11]报道的色谱条件进行试验, 所用流动相为 30% 甲醇 - 2 g·L⁻¹ 庚磺酸钠 - 1% 磷酸系统, 但离子对系统重现性差, 且需较长的色谱平衡时间。改用乙腈 - 水系统后, 系统稳定性提高。通过调整 H, 分离度得到改善, 利奈唑胺峰保留时间缩短, 经过优化, 流动相最终选定为乙腈 - 水 (23: 77, H 5.0), 峰形对称且能达到完全的基线分离。文献[15, 16]选用依哌唑胺为内标物。依哌唑胺和利奈唑胺的结构相似且保留时间接近, 依哌唑胺为利奈唑胺合成过程中的副产物, 由于无法获得, 所以采用外标法来测定血药浓度。

4.2 利奈唑胺血药浓度监测 采用 HPLC 对危重患者血清样本进行测定, 参照国外有关报道^[22~26], 利奈唑胺的有效谷浓度应保持在 MIC 以上。实验结果表明, 在开展 TDM 的 9 例危重患者中, 5 例患者利奈唑胺的所有谷浓度均高于 MIC, 4 例患者曾经出现过利奈唑胺谷浓度低于 MIC, 其中 1 例平均谷浓度也低于 MIC。分析原因, 这些患者均为危重患者, 血药浓度未达到要求可能与病理生理条件下存在影响药物体内分布和排泄的多种因素有关, 如 4 例患者中有 1 例 (第 2 例) 存在高龄、重度水肿、低蛋白血症, 另外 3 例有严重的肝、肾功能损伤。这些病理生理的改变造成药物体内过程发生变化, 分布容积增大、药物稀释、清除增加。特别是利奈唑胺平均谷浓度低于 MIC 者 (第 1 例), 其血药浓度未达到要求可能与该患者处于持续静脉 - 静脉血滤过 (CVVH) 状态有关。研究报道, 这类患者在 CVVH 期间利奈唑胺会发生明显的清除, 表现为药物谷浓度明显低于健康志愿者及血液透析患者, 可降低约 50%^[27]。因此, 对于危重患者需要通过利奈唑胺治疗药物监测的方法来制定个体化给药方案。

5 结论

利奈唑胺 2007 年开始用于我国临床, 是目前临床上治疗多重耐药金黄色葡萄球菌和万古霉素耐药肠球菌感染的首选药物之一, 它在治疗危重患者感染时发挥着重要的作用。利奈唑胺具有非线性药代动力学特性, 虽然有关药品使用说明上多数均推荐每次 600 mg 每 12 h 一次的给药方案, 但在实际应用过程中发现, 并非所有的患者给予该方案均能达到理想的疗效, 不同的患者 (特别是危重患者) 使用后疗效差异很大。因此, 需要以快速、准确的血药浓度监测为基础, 结合患者的药效学特点, 制定合理的

治疗方案以达到最佳的治疗效果, 同时最大限度地降低耐药突变的出现。基于此, 本研究采用了准确、简单、快捷、灵敏、重现性好 HPLC 法, 并将该方法用于日常危重患者治疗药物监测和个体化给药方案的制定中, 对方法的施行做了初步的验证。结果表明这种方法适合临床利奈唑胺血药浓度的快速监测, 有利于临床推广。

参考文献

- 1 Abena PA, Mathieux VG, Scheiff M, *et al* Linezolid and reversible myelosuppression. *J Am Med Assoc*, 2001, 286: 1973
- 2 Santos RP, Prestidge CB, Brown ME, *et al* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of linezolid in children with cystic fibrosis *Pulmonology*, 2009, 44(2): 148
- 3 Lovering AM, Le FR, Hovseian L, *et al* Pharmacokinetic evaluation of linezolid in patients with major thermal injuries *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(3): 553
- 4 Brier ME, Stalker DJ, Aronoff GR, *et al* Pharmacokinetics of linezolid in subjects with renal dysfunction *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(9): 2775
- 5 Tsuji Y, Hiakari Y, Mizoguchi A, *et al* Pharmacokinetics of repeated dosing of linezolid in a hemodialysis patient with chronic renal failure *J Infect Chemother*, 2008, 14(2): 156
- 6 Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, *et al* Linezolid resistance in a clinical isolate of staphylococcus aureus *Lancet*, 2001, 358: 207
- 7 Ruiz ME, Gueneno C, Tuazon CU. Endocarditis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus: treatment failure with linezolid *Clin Infect Dis*, 2002, 35: 1018
- 8 Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, *et al* Infections due to vancomycin-resistant enterococcus faecium resistant to linezolid *Lancet*, 2001, 357: 1179
- 9 Attassi K, Hershberger E, Alam R, *et al* Thrombocytopenia associated with linezolid therapy *Clin Infect Dis*, 2002, 34: 695
- 10 MacGowan AP. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48 (Suppl 1): 17
- 11 Tobin CM, Sunderland J, White LO, *et al* A simple, isocratic, high-performance liquid chromatography assay for linezolid in human serum. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48: 605
- 12 Tobin CM, Sunderland J, Lovering AM, *et al* A high-performance liquid chromatography (HPLC) assay for linezolid in continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid (CAPDF). *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51: 1041
- 13 Bueger C, Joukhadar C, Muller M, *et al* Development of a liquid chromatography method for the determination of linezolid and its application to in vitro and human microdialysis samples *J Chromatogr B*, 2003, 796: 155
- 14 Bomer K, Bomer E, Lode H. Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18: 253
- 15 Li J, Rayner CR, Dixon S, *et al* Simple method for the assay of lin-

- ezolid in Brain Heart Infusion broth by high-performance liquid chromatography. *Biomol Chromatogr*, 2004, 18: 1
- 16 Boak IM, Li J, Nation RL, *et al*. High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma. *Biomol Chromatogr*, 2006, 20: 782
- 17 Toutain J, Boselli E, Djbarouti S, *et al*. Determination of linezolid in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method. *J Chromatogr B*, 2004, 813: 145
- 18 Phili s Abdel-Hamid ME, Al-Hassawi NA. Determination of linezolid in human plasma by LC-MS-MS. *Analyst*, 2001, 126: 609
- 19 Peng GW, Stryd RP, Murata S, *et al*. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 20: 65
- 20 Ehrlich M, Trittler R, Daschner FD, *et al*. A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high-performance liquid chromatography-integrated sample re-creation. *J Chromatogr B*, 2001, 755: 373
- 21 Boubakar BB, Branly BBN, Claudine Q, *et al*. Determination of linezolid in growth media by high-performance liquid chromatography with on-line extraction. *J Chromatogr B*, 2007, 854: 104
- 22 Cazzola M, Blasi F, Centanni S, *et al*. Advances in the research and development of chemotherapeutic agents for respiratory tract bacterial infections. *Publ Pharmacol Ther*, 2001, 14(5): 367
- 23 Gemmell CG. Susceptibility of a variety of clinical isolates to linezolid: a European intercountry comparison. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(1): 47
- 24 Tubau F, Fernandez-Roblas R, Llares J, *et al*. In vitro activity of linezolid and 11 other antimicrobials against 566 clinical isolates and comparison between NCCLS microdilution and Etest methods. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(4): 675
- 25 Moellering RC. Linezolid: The first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med*, 2003, 138: 135
- 26 MacGowan AP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(Suppl 2): iii7
- 27 Meyer B, Komek GV, Nijkamp M, *et al*. Multiple-dose pharmacokinetics of linezolid during continuous venovenous haemofiltration. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56(1): 172

(本文于 2009 年 12 月 15 日收到)

欢迎订阅 2010 年《药物分析杂志》

《药物分析杂志》是由中国科学技术协会主管, 中国药学会主办, 中国药品生物制品检定所药物分析杂志编辑部编辑出版的学术性期刊。主要栏目有研究论文、交流、综述等。报道化学药物、中药与天然药物、抗生素、蛋白质、多肽类药物、生物技术药物等的分析、质量标准研究、临床药物分析、药物分析基础理论与实践以及新方法、新技术的应用, 并及时报道国家重大研究课题的最新成果。

本刊获 2006 年、2007 年、2008 年中国科协精品科技期刊工程项目 C 类资助。

本刊为我国自然科学核心期刊、中文核心期刊、全国统计源期刊, 被国内外主要检索系统收录。

本刊获 2009 年中国科协精品科技期刊示范项目证书。

本刊坚持质量第一, 面向广大读者, 以其独具的深度与广度展示我国药物分析的现状与发展。

本刊 2005 年开始由双月刊改为月刊, 大 16 开本, 每期 160 页, 国内外公开发行。每期定价 25 元, 全年定价 300 元, 国内邮发代号: 2-237, 国外读者请同中国国际图书贸易总公司(中国国际书店, 北京 399 信箱)联系。欢迎广大读者到当地邮局订阅, 并欢迎有关专业人员集体订购, 价格从优。

本刊已将创刊以来的文章制成光盘, 需要者请与本刊联系。

希望为本刊推广发行者, 价格另议。

地址: 北京市天坛西里 2 号(100050) 联系人: 刘小帅

电话: (010) 67058427 传真: (010) 67012819

编辑部网址: www.ywfxzz.cn 浏览网址: www.nicb.org.cn E-mail: ywf@nicb.org.cn

《药物分析杂志》编辑部