HPLC 测定利奈唑胺的血药浓度

李锦燊，吴洪文(广西医科大学第四附属医院，广西 柳州 545005)

摘要：目的 建立人血浆中利奈唑胺浓度测定的高效液相色谱法。**方法** 以苯巴比妥为内标，血浆样品用乙腈沉淀蛋白，采用 Luna C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)分析。流动相为乙腈-水(25∶75)，流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 251 nm，柱温 35 ℃。 **结果** 本法在 0.1～40 mg·L^{-1} 内线性关系良好(r=0.999 9)，检测限为 0.05 mg·L^{-1}，日内、日间 RSD 均小于 4%。**结论** 本方法简单、灵敏、准确，适用于利奈唑胺临床血药浓度监测及人体药动学研究。

关键词：利奈唑胺；高效液相色谱法；血药浓度

中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2010)04-0353-03

HPLC Determination of Linezolid Plasma Concentration

LI Jinshen, WU Hongwen (*The No.4 Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method to determine the concentration of linezolid in human plasma. **METHODS** With phenobarbital as internal standard, the protein plasma sample was precipitated with acetonitrile. The separation was carried out using Luna C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase of acetonitrile-water (25∶75) at a flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 251 nm and the column temperature was 35 ℃. **RESULTS** The linear range was 0.1–40 mg·L^{-1} (r=0.999 9), and the LOQ was 0.05 mg·L^{-1}. The intra-day and inter-day precision were both less than 4%. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, accurate and suitable for the study of therapeutic drug monitoring and the pharmacokinetic study of linezolid.

KEY WORDS: linezolid; HPLC; plasma concentration

利奈唑胺(linezolid)是第 1 个应用于临床的唑烷酮类抗生素，选择作用于细菌 50S 核糖体亚单位上与 30S 亚基的结合点，以阻止 70S 起始复合物的形成，从而抑制细菌蛋白质的合成。由于该药作用机制独特，与其他药物无交叉耐药性，在临床对耐药革兰阳性(G^+)球菌感染的治疗已显示出优势，主要用于治疗 G^+ 菌引起的感染，包括由 MRSA 引起的疑似或确诊院内获得性肺炎(HAP)、社区获得性肺炎(CAP)、复杂性皮肤或皮肤软组织感染(SSTI)以及耐万古霉素肠球菌(VRE)感染[1]。本试验参考文献[2]，以苯巴比妥为内标，建立了利奈唑胺血药浓度的高效液相色谱测定法，该法操作简单、灵敏、准确，适用于利奈唑胺的血药浓度监测与药动学研究。

1 材料

日本岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪(包括 SPD-10AVP 检测器、LC-10AVP 泵、SCL-10AVP 系统控制器、CLASS-VP Ver 6.12 SP1 工作站)；KDC-16H 型高速离心机(科大中佳公司)；利奈唑胺对照品(美国 Pifer 公司，批号：AS-C01Z01，含量：99.3%)；苯巴比妥对照品(中国药品生物制品检定所，批号：171222-200504，纯度>99%)；乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯；利奈唑胺注射液(规格：300 mL∶0.6 g，批号：08C01Z01，生产企业：Fresenius Kabi Norge AS，Norway)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Luna C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：乙腈-水(25∶75)；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：251 nm；柱温：35 ℃。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取利奈唑胺对照品 50 mg，置 25 mL 量瓶中，加水溶解并定容，配成浓度为 2 g·L^{-1} 储备液(于 4 ℃下保存)。精密量取储备液适量用水分别稀释成浓度为 1，2，6，20，60，200，400 mg·L^{-1} 的对照品溶液。

作者简介：李锦燊，男，硕士，主管药师 Tel: (0772)7311697 E-mail: lijinshen73@yahoo.com.cn

2.2.2 内标溶液的配制　精密称取苯巴比妥对照品适量，置 25 mL 量瓶中，加 60%乙腈溶解并定容，配制成 160 mg·L^{-1} 的内标溶液。

2.3 血样处理与测定

精密吸取血浆样品 200 μL，置 1.5 mL 离心管中，精密加入内标溶液 20 μL，涡旋混合 30 s 后加入乙腈 300 μL，涡旋振荡 1 min，15 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液 20 μL 进样。在“2.1”色谱条件下，血浆中内源性杂质均不影响利奈唑胺和内标物的分离测定，利奈唑胺与内标保留时间分别为 7.8 min 和 5.2 min。空白血浆、空白血浆+对照品及血浆样品色谱图见图 1。

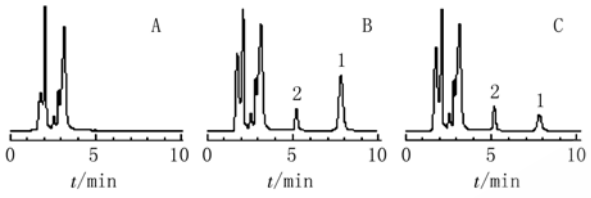

图 1 高效液相色谱图

A–空白血浆；B–空白血浆+对照品(利奈唑胺和内标苯巴比妥)；C–血浆样品；1-利奈唑胺；2–苯巴比妥

Fig 1 HPLC chromatograms

A–blank plasma; B–plasma spiked with linezolid and phenobarbital; C–plasma sample; 1–linezolid; 2–phenobarbital

2.4 标准曲线的制备

精密吸取空白血浆 180 μL，置于 1.5 mL 离心管中，分别加入不同浓度的利奈唑胺标准溶液 20 μL，涡旋 30 s 混匀，使其浓度分别为 0.1，0.2，0.6，2，6，20，40 mg·L^{-1}。按“2.3”项下方法操作，以利奈唑胺峰面积与内标峰面积之比 Y 值为纵坐标，利奈唑胺浓度 C 为横坐标进行线性回归，求得回归方程为：Y=0.226 4C–0.020 9，r=0.999 9。利奈唑胺在 0.1~40 mg·L^{-1} 内血药浓度与峰面积比有良好线性关系，利奈唑胺的定量限为 0.1 mg·L^{-1} (RSD=7.7%，n=5)，检测限为 0.05 mg·L^{-1} (S/N=3)。

2.5 回收率及精密度

分别于 180 μL 空白血浆中加入低、中、高 3 种浓度的利奈唑胺标准溶液 20 μL，旋涡 30 s 混匀，使其浓度分别为 0.2，2，20 mg·L^{-1}。按“2.3”项下方法操作，将利奈唑胺峰面积与内标峰面积之比 Y 代入标准曲线计算利奈唑胺血药浓度，以测得值与加入值之比计算方法回收率。另以水配制相应系列浓度的利奈唑胺溶液，不经提取直接测定，以此为标准，将 2 组峰面积相比，计算利奈唑胺提取回收率。以 1 d 内测得的利奈唑胺浓度计算日内精密度，以连续测定 5 次每天测得的利奈唑胺浓度计算日间精密度。结果高、中、低 3 种浓度的平均方法回收率为(101.0±2.3)%(n=15)，日内 RSD 不大于 2.1%，日间 RSD 不大于 3.4%。结果见表 1。

表 1 回收率及精密度(n=5, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Recovery and precision (n=5, $\bar{x}\pm s$)

加入量/ mg·L^{-1}	实测值/ mg·L^{-1}	提取回收率/%	方法回收率/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
0.2	0.207±0.002	110.8±4.7	103.3±1.2	1.2	3.4
2	2.02±0.04	104.7±3.1	100.8±2.2	2.1	2.0
20	19.80±0.16	104.6±2.9	99.0±0.8	0.8	1.7

2.6 稳定性试验

配制质量浓度为 0.2，2，20 mg·L^{-1} 的利奈唑胺血浆样品，分别在室温、冰冻、反复冻融条件下保存后，按“2.3”项下方法操作，考察利奈唑胺血浆样品稳定性；另外，对利奈唑胺血浆样品经处理后室温放置 12 h 的稳定性进行了考察。结果表明，利奈唑胺血浆样品在–20 ℃保存 15 d (RSD<3.8%)、室温 20 ℃放置 12 h (RSD<5.2%)、经 3 个冷冻-融解循环处理后(RSD<2.9%)及处理后的血浆样品室温放置 12 h (RSD<2.7%)稳定性良好。

2.7 临床应用

住院患者经药敏试验与临床诊断后，选用利奈唑胺注射液 600 mg，静脉滴注 1 h，Bid。在患者连续用药 5 次后，于第 6 次给药前 30 min(谷浓度)及给药后 60 min(峰浓度)抽取静脉血，分取血浆，按“2.3”项下方法处理后，测定利奈唑胺的药物浓度。在监测的 6 例患者中，谷浓度的最低值为 2.02 mg·L^{-1}，最高值为 7.51 mg·L^{-1}，平均值为(4.7±2.1)mg·L^{-1}，峰浓度的最低值为 11.82 mg·L^{-1}，最高值为 22.64 mg·L^{-1}，平均值为(16.9±3.9)mg·L^{-1}。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

利奈唑胺血药浓度的HPLC测定方法国外已有报道[2-4]，本试验选择最简单的乙腈-水(25∶75)为流动相，不加入缓冲盐，血样经处理后可以达到满意的分离效果，利奈唑胺的保留时间较合适，峰形较

好，利奈唑胺能和内标物峰分离完全，且不受血浆中内源性杂质的干扰。

3.2 内标的选择

根据文献[2-4]报道，采用的内标物为利奈唑胺的类似物，或选用左氧氟沙星，但必须采用梯度洗脱。本试验选择苯巴比妥为内标物，在优化的色谱条件下，内标物与血浆的内源性物质以及利奈唑胺均实现较好的分离，而且内标物和利奈唑胺吸收很稳定。

3.3 血样处理方法的选择

文献[3-4]采用固相萃取方法进行血样预处理，操作较繁琐，所需费用也较高，而文献[2]采用 5%三氯醋酸-甲醇(3∶1)沉淀蛋白后加入 0.1% NaOH 溶液中和再进样，操作也比较繁琐。本试验参考文献[5]采用 1.5 倍的乙腈沉淀蛋白后直接进样，此法血浆中内源性杂质及代谢物不干扰测定，基线噪音小，操作简便。

REFERENCES

[1] CUI X L, ZHAO Z G. Pharmacology and clinical evaluation of linezolid [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2008, 18(6): 530-533.

[2] BOAK L M, LI J, NATION R L, et al. High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20(8): 782-786.

[3] TOUTAIN J, BOSELLI E, DJABAROUTI 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]. J Chromatogr B, 2004, 813(12): 145-150.

[4] PENG G W, STRYD R P, MURATA S, et al. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 1999, 20(12): 65-73.

[5] ZENG J Z. Biopharmaceutical Analysis(生物药物分析) [M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1998: 28.

收稿日期：2009-07-29