

利奈唑胺单抗的制备及其荧光免疫层析检测法的建立*

沈敏敏¹, 杨志行², 郭彦飞², 杨水新^{1**}

(1. 湖州市中心医院, 湖州 313000; 2. 中科院湖州营养中心, 湖州 313000)

摘要 目的: 建立一种简便、快速、特异的利奈唑胺血药浓度荧光免疫层析检测法。**方法:** 将脱乙酰利奈唑胺定向合成具有单一羧基结构的利奈唑胺衍生物。采用碳二亚胺法将利奈唑胺衍生物与牛血清蛋白和卵清蛋白分别偶联制备完全抗原。将利奈唑胺-牛血清蛋白偶联物免疫 Balb/c 小鼠制备单克隆抗体。荧光标记利奈唑胺单抗, 将利奈唑胺-卵清蛋白完全抗原和羊抗兔 IgG 抗体喷涂于硝酸纤维素膜分别作为检测线和质控线, 以竞争性免疫抑制反应模式建立了利奈唑胺血药浓度荧光免疫层析检测法。基于以上检测方法建立利奈唑胺的标准曲线, 并对该检测法进行方法学评价。并采用 HPLC 方法测定, 对两方法的结果进行比较。**结果:** 通过优化体系, 所建立的检测法 $IC_{50}=5.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性范围为 $0.78 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 灵敏度为 $0.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 精密度均小于 10%, 回收率为 78.4%~123%。与 14 种与利奈唑胺结构相似以及联合用药相关药物无明显交叉反应。分别检测 67 份临床利奈唑胺血样与 HPLC 法对比, 发现 2 种方法相关性较好, $R^2=0.929$, 大于 0.90。**结论:** 本实验成功建立了一种操作简便、快速、高灵敏度、特异性强的利奈唑胺荧光免疫层析检测方法, 为进一步临床血药浓度监测的应用打下了基础。

关键词: 利奈唑胺; 利奈唑胺衍生物; 抗原; 单克隆抗体; 荧光免疫层析检测; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)07-1266-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.07.16

Preparation of linezolidmab and establishment of its fluorescent immunochromatographic assay*

SHEN Min-min¹, YANG Zhi-xing², GUO Yan-fei², YANG Shui-xin^{1**}

(1. Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China; 2. Huzhou R&D Center for Nutrition and Health, Shanghai Institutes for Biological Sciences of Chinese Academy, Huzhou 313000, China)

Abstract Objective: To establish a simple, rapid, specific fluoroimmunoassay method for the determination of plasma concentration of linezolid. **Methods:** Deacetylation linezolid was used to synthesize linezolid derivatives with single carboxyl structure. The complete antigen was prepared by coupling the linezolid derivatives with bovine serum albumin and ovalbumin by carbodiimide method. The monoclonal antibody was obtained by immunizing Balb/c mice with linezolid-bovine serum albumin conjugate, which was labeled with fluorescence subsequently.

* 湖州市科技局公益性技术应用研究(一般)项目, 2013GYB12

** 通信作者 Tel:(0572)2709718; E-mail: hzpharma@126.com

第一作者 Tel:(0572)2709718; E-mail: shenminmin_357@126.com

The linezolid-ovalbumin and goat anti-rabbit antibody IgG were immobilized on the nitrocellulose membrane as the test line and control line, the competitive immunosuppression model was adopted to establish linezolid plasma concentration of fluorescence immunochromatographic assay. Based on the above detection methods, the standard curve of linezolid was established, and the method was validated by methodology. HPLC method was used to compare the results of the two methods. **Results:** By optimizing the system, we established the assay, of which IC₅₀ was 5.28 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the linear range was 0.78–50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the sensitivity was 0.61 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the precision was less than 10%, the recovery rate was 78.4%–123%. No cross-reaction was found in 14 kinds of drugs whose structures were similar to linezolid or usually combined use with linezolid. At last, this assay and HPLC were used to detect 67 clinical linezolid blood samples, the results showed that the correlation between the two methods was better, and the $r^2=0.929$, greater than 0.90. **Conclusions:** In this study, we successfully established a simple, rapid, high sensitivity and specific immunochromatographic method for the detection of linezolid, which contributed to the foundation for the further application of clinical plasma concentration monitoring.

Keywords: linezolid; linezolid derivative; antigen; monoclonal antibodies; immunochromatographic assay; high performance liquid chromatography

利奈唑胺 (linezolid) 是第一个用于临床的新型噁唑烷酮类抗菌药物^[1], 抗菌作用机制为选择性作用于细菌 50S 核糖体亚单位上与 30S 亚基的结合点, 阻止 70S 起始复合物的形成, 从而抑制细菌蛋白质的合成。利奈唑胺由于其独特的抗菌机制及良好的耐受性^[2], 对社区和医院各种感染的阳性细菌具有广谱抗菌作用。随着利奈唑胺在临床上的广泛应用, 利奈唑胺的耐药菌株和不良反应 (包括腹泻、皮疹、头痛^[3], 乳酸中毒^[4], 甚至严重的骨髓抑制^[5-6]等) 开始出现, 特别是危重感染患者。由于患者不同的病理生理条件, 存在影响药物体内分布和排泄的多种因素 (如水肿、体液治疗和腹水等)^[7], 可能导致药物体内过程发生了一些改变。因此, 需要进行利奈唑胺血药浓度的监测, 以确保药物的有效治疗^[8-9], 优化利奈唑胺的临床使用, 减少耐药菌株的产生及不良反应的发生^[10]。以快速准确的利奈唑胺血药浓度检测为基础, 结合患者的药效学特性, 制定针对不同个体合理的治疗方案以达到最佳的治疗结果, 同时最大限度地降低耐药突变频率和长期不良反应, 达到利奈唑胺的临床用药合理性^[11-12]。

利奈唑胺的检测方法, 目前国外文献报道有 LC-MS 和 HPLC。LC-MS 检测对仪器要求高, 国内难以普及。国内有利奈唑胺 HPLC 检测的报道^[13-14], 但采用外标法, 且方法的回收率低。虽然此方法特异性强、灵敏度高、精确, 但是样本前处理操作步骤烦琐, 成本高, 再加上设备昂贵、花费大、操作技能要求

高等原因, 故不适合大批量样品的筛选检测。免疫分析法 (如酶联免疫法、胶体金法以及荧光免疫层析法), 由于其在抗原抗体的定性定量方面有独特的优势, 同时具有操作简便、分析样本大等优点, 弥补了理化分析的不足, 在小分子药物检测中起着越来越重要的作用。酶联免疫吸附测定法可同时检测多个样品, 但是检测时间长, 不适用于床旁即时检测。荧光免疫层析技术是时间分辨荧光预相增强和纳米微球包裹结合的技术, 将预增强的荧光离子通过聚苯乙烯微球进行包裹和修饰, 将荧光效率提高了上千倍, 使得检测灵敏度较其它方法如胶体金方法高 2~3 个数量级。该方法具有操作简单、快速, 无需大型检测仪器设备^[15-16], 更适用于现场及时检测, 是快速检测发展的趋势。

对于小分子免疫法检测, 影响免疫分析法检测质量的根本原因是抗体的特异性与亲和性, 这些性质又取决于免疫半抗原的分子结构, 所以免疫半抗原分子设计与选择是产生特异性抗体和建立小分子药物含量快速检测技术最关键的步骤。本实验通过对利奈唑胺进行定向衍生化, 获得具有单一羧基结构的半抗原, 与蛋白质载体分子偶联制备了完全抗原, 免疫小鼠制备特异性单抗。基于荧光免疫层析法建立了利奈唑胺血药浓度即时定量检测法。

1 实验材料

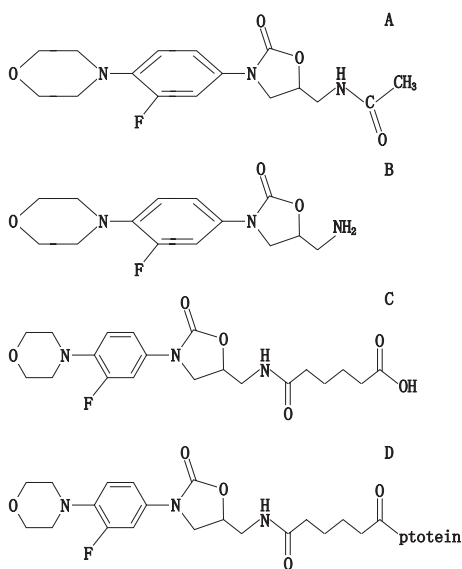
脱乙酰利奈唑胺 (深圳振强生物技术有限公司), BALB/c 小鼠 (上海西普尔必凯实验动物有限

公司), 弗氏佐剂、HAT、HT、PEG(1500)、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)(Sigma), 抗兔 IgG 抗体(杭州启泰生物技术有限公司), SP2/0 细胞(南京军事医学科学院朱进老师惠赠), Quick Start Bradford Protein Assay Kit(美国伯乐公司), Alexa Fluor® 647 荧光染料(ThermoFisher), FCR-I 单通道荧光免疫分析仪(湖州申科生物科技有限公司), 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), Hypersil ODS2 色谱柱(英国 Hypersil 公司)。

2 实验方法

2.1 利奈唑胺半抗原衍生物的制备

在室温条件下, 将与利奈唑胺(图 1-A) 结构类似的脱乙酰利奈唑胺化合物(400 mg, 2.71 mmol) 如图 1-B 所示, 在二氯甲烷/四氢呋喃(30 mL/15 mL) 中溶解, 向其中加入用二氯甲烷/四氢呋喃(5 mL/2 mL) 溶解的氧杂环庚烷-2, 7-二酮。将此混合物在室温条件下搅拌 30 min, 然后向此混合物中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液(20 mL), 继续搅拌 5 min。此反应混合液用二氯甲烷(15 mL \times 3) 洗涤之后, 去除有机相, 用浓盐酸将水相 pH 调到 5。将沉淀物过滤收集, 用冰水洗, 最后真空干燥得 6-((3-氟-4-吗啉苯基)-2-氧唑烷基) 氨基)-6-含氧正己酸(即: 利奈唑胺衍生物) 如图 1-C 所示。



A. 利奈唑胺(linezolid) B. 脱乙酰利奈唑胺(deacetyl linezolid) C. 利奈唑胺衍生物(linezolid derivative) D. 利奈唑胺人工抗原(linezolid artificial antigen)

图 1 利奈唑胺相关化合物结构式

Fig. 1 The structures of linezolid-related compounds

2.2 利奈唑胺完全抗原(免疫原和包被原)的制备

称取利奈唑胺衍生化合物 40 mg, 溶解于 DMF 2 mL 中, 形成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的终浓度, 取其中 90 μL 与 EDC ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 8 μL 混合, 再加入 NHS ($50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 12 μL , 均匀混合后在搅拌条件下反应 15~60 min。

将上述反应混合液离心($1600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 后加入到 $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清蛋白溶液 1 mL 中(或加入到 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卵清蛋白溶液 1 mL 中) 在室温搅拌条件下反应 1~5 h 后, 用磷酸缓冲液透析 4 次, 12 h 换 1 次液。收集透析液, 用美国伯乐(BIO-RAD) 公司的 Quick Start Bradford Protein Assay Kit 测定免疫原和包被原的浓度。得到的利奈唑胺人工抗原(免疫原和包被原) 结构式如图 1-D 所示, 图中 protein 为牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA) 或卵清蛋白(ovalbumin, OVA)。偶联好的完全抗原进行紫外扫描鉴定。

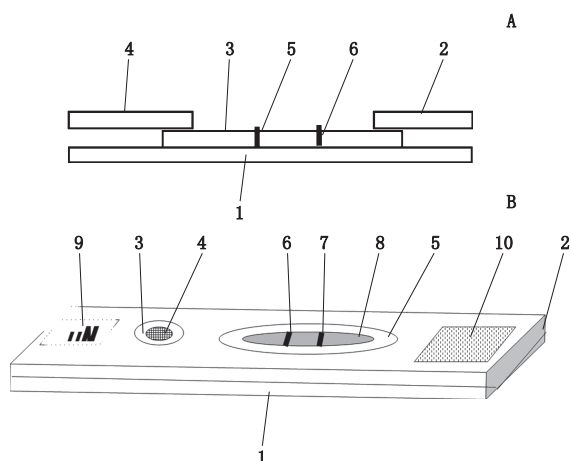
2.3 利奈唑胺单克隆抗体的制备

将上述得到的利奈唑胺免疫原稀释成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取免疫原 500 μL 与等体积的弗氏完全佐剂混合后, 乳化完全, 免疫 BALB/c 小鼠。免疫程序采用经典免疫程序, 4 次免疫后的小鼠经腹腔注射约免疫原 100 μg 再次加强免疫, 3 d 后, 取该小鼠脾脏用于融合。取 SP2/0 细胞与脾细胞进行融合, HAT 和 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞^[17]。

取 BALB/c 小鼠(6~7 周龄), 于腹腔注射石蜡油 0.5 mL, 7 d 后, 腹腔注射 1×10^6 阳性杂交瘤细胞 0.5 mL。观察小鼠生长情况, 8 d 左右后及时采集腹水。利用 Protein G Resin 亲和纯化纯化单克隆抗体。并利用竞争法 ELISA 检测抗体活性。

2.4 利奈唑胺荧光免疫层析检测法建立

2.4.1 利奈唑胺荧光免疫层析试纸条制备组装 1) 用包被缓冲液(磷酸缓冲液) 分别将制备得到的利奈唑胺包被原(利奈唑胺-OVA) 和兔抗体 IgG 稀释到适当浓度($0.4 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。在 $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ 的温度下, 将稀释后的利奈唑胺-OVA 和兔抗体 IgG 均匀喷于硝酸纤维膜上(分别形成检测线和质控线), 在 12%~30% 的湿度条件下烘干 3 h 左右, 干燥保存备用; 2) 在黑色 PVC 基片上分别依次粘贴步骤 1) 所得到的包被好的硝酸纤维素膜、玻璃纤维纸和吸水纸形成检测卡(图 2-A), 按照要求切割成适当宽度^[18]; 3) 将步骤 2) 所得到的试纸条装入卡盒的下盖中, 盖上上盖, 形成完整的带卡盒检测卡(图 2-B)。



A. 未装塑料卡的试纸卡 (test strip without plastic cover): 1. 黑色 PVC 基片 (black PVC substrate) 2. 吸水纸 (absorbent paper) 3. 硝酸纤维素膜 [nitrocellulose membrane] 4. 玻璃纤维 (glass fiber) 5. 质控线带 (C 线) [quality control line (C line)] 6. 检测线带 (T 线) [test line (T line)]

B. 有塑料卡盒的利奈唑胺检测卡 (test strip with plastic cover): 1. 下盖 (lower lid) 2. 上盖 (upper lid) 3. 加样窗口 (the sample port) 4. 玻璃纤维 (glass fiber) 5. 检测窗口 (test port) 6. 质控线带 (C 线) [quality control line (C line)] 7. 检测线带 (T 线) (test line (T line)) 8. 硝酸纤维素膜 (nitrocellulose membrane) 9. 利奈唑胺标志 (LIN) [linezolid label (LIN)] 10. 条形码识别区域 (barcode recognition area)

图 2 未装塑料卡盒和装塑料卡盒的利奈唑胺检测卡结构

Fig. 2 The structure of test strip without plastic cover and with plastic cover

2.4.2 检测分析液制备 根据说明书标记抗体方法, 将 Alexa Fluor® 647 分别荧光标记上述得到的单克隆抗体以及抗兔 IgG 抗体。用含有 1%BSA 的 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 磷酸缓冲液将荧光标记后的利奈唑胺抗体和抗兔 IgG 抗体稀释配制成检测分析液。 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4.3 检测及标准曲线建立 使用空白混合人血清作为基质, 分别配制 0、0.39、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25 和 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列利奈唑胺对照品。取稀释 1 000 倍后的系列对照品溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 与检测分析液 $60 \text{ } \mu\text{L}$ 均匀混合后, 取 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 加入到检测卡的加样窗口, 反应 10 min 后, 在 FCR 系列单通道荧光免疫分析仪上读数, 根据样本的 T 线信号与 C 线信号比值 (T/C 值) 与对照品浓度建立标准曲线。并写入 IC 卡内置 FCR-I 单通道荧光免疫分系仪中。

2.5 方法学评价

2.5.1 灵敏度以及线性范围 将 $0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品连续检测 10 次, 分别计算其 T/C 值的平均值 (\bar{X})、标准偏差 (SD)。灵敏度的计算方式为, $\bar{X}-2 \times \text{SD}$ 的 T/C 值在上述建立的标准曲线里所对应的利奈唑胺

浓度。

分别重复检测曲线上各个浓度点, 每个重复 5 次, 分别计算其 T/C 值的平均值 (\bar{X})、标准偏差 (SD) 以及精密度 (RSD)。高浓度上限和低浓度下限 RSD 小于 15% 的范围为检测曲线的线性范围。

2.5.2 精密度 分别利用已经建立的利奈唑胺检测体系检测浓度为 2.5、20 和 $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利奈唑胺对照品, 各重复检测 15 次, 计算检测高、中、低浓度利奈唑胺的精密度 (RSD)。

2.5.3 回收率 选择线性范围内高、中和低 3 个区域, 每个区域选择 2 个浓度点 (40 、 38 、 22 、 18 、 4.5 和 $2.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为检测对象进行回收率试验。即: 选择在低浓度利奈唑胺 (初始浓度 C_0 , C_0 不得大于 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 混合人血清阳性样本中添加利奈唑胺标准品, 使得加标样本终浓度为 ($40+C_0$)、($38+C_0$)、($22+C_0$)、($18+C_0$)、($4.5+C_0$) 和 ($2.5+C_0$) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6 个浓度点样本, 每个点重复检测 3 次, 分别计算回收率 (R)。

$$R = (\text{实测总浓度 } C_x - \text{初始浓度 } C_0) / \text{理论加标量} \times 100\%$$

2.5.4 特异性试验 分别将甲氧苄啶、阿奇霉素、奥美拉唑、氟康唑、替考拉宁、万古霉素、盐酸多巴胺、苯丙氨酸、L-酪氨酸、色氨酸、氨苄、头孢氨苄、头孢呋酮和头孢唑林等 14 种与利奈唑胺结构相似以及联合用药相关药物对照品配制一系列的浓度梯度, 各个分别稀释 1 000 倍后, 取 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 进行检测。根据浓度对应的 T/C 值, 建立每个药物的抑制曲线, 计算出相应的 IC_{50} 值。根据公式: 交叉反应率 (%) = (利奈唑胺 IC_{50} / 其他药物 IC_{50}) $\times 100\%$, 计算交叉反应率。

2.5.5 临床血样检测与 HPLC 法比较 参考董海燕等^[13] 的建立的检测利奈唑胺 HPLC 法, 本实验建立了利奈唑胺测 HPLC 法。利用这 2 种方法, 分别检测利奈唑胺用药患者的血清样本 67 例, 进行数据比对。

3 试验结果

3.1 利奈唑胺半抗原衍生物的制备

以化合物脱乙酰利奈唑胺为原料, 通过氨基和羧基共价缩合反应制备得到利奈唑胺衍生物白色固体 245 mg , 收率: 47%。 $^1\text{H-NMR}$ 鉴定图谱如图 3 所示, 说明利奈唑胺半抗原衍生物合成成功, 有单一羧基活性基团存在, 利于完全抗原的制备。

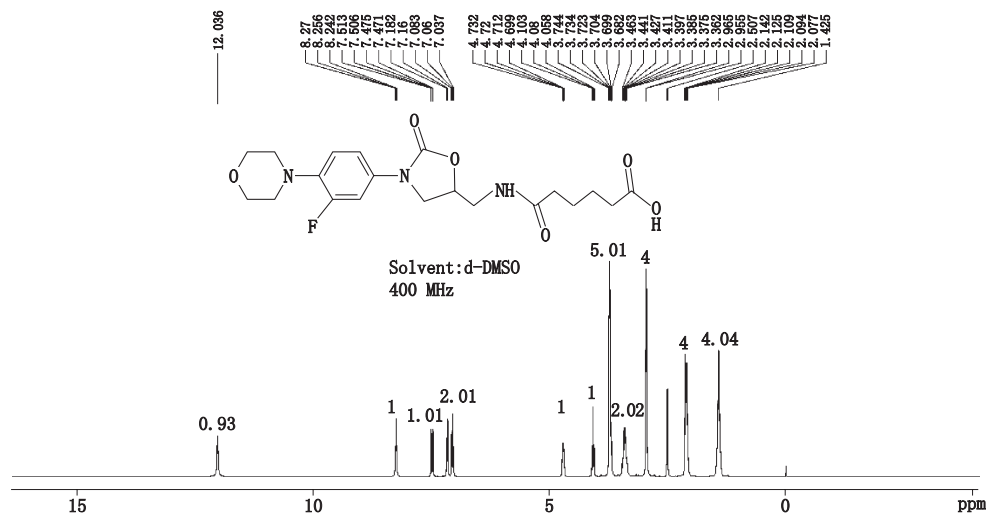


图3 利奈唑胺半抗原衍生物 ¹H-NMR 鉴定图谱
Fig. 3 The ¹H-NMR identification of linezolid hapten derivative

3.2 利奈唑胺完全抗原的制备

将制备好的完全抗原(免疫原和包被原)进行紫外扫描鉴定,扫描图谱如图4所示,完全抗原利奈唑胺-BSA和利奈唑胺-OVA紫外扫描图谱波峰不同于利奈唑胺衍生物、OVA和BSA等的扫描图谱。说明完全抗原偶联成功。

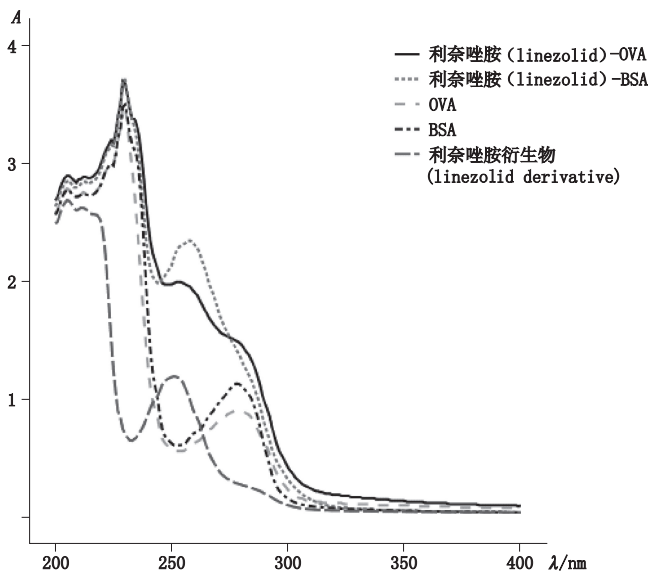


图4 利奈唑胺免疫原和包被原紫外扫描图谱
Fig. 4 The ultraviolet scanning map of linezolid immunogens and coating antigen

3.3 利奈唑胺单克隆抗体的制备效价检测

杂交瘤细胞融合后,经过HAT筛选和ELISA法筛选得到3株分泌利奈唑胺抗体的杂交瘤细胞。ELISA法具体步骤:①包被利奈唑胺检测抗原于96孔板,过夜包被,并洗涤3次。②封闭液封闭后,洗涤

3次。③96孔板第一列加入PBS 50 μL作为对照,第2、3、4、5、6列分别加入50 μL不同浓度(50、10、5、1、0.5 ng·mL⁻¹)利奈唑胺对照品。④96孔板从上到下,每行加入50 μL不同稀释梯度的抗体(1~128万倍),37° 孵育1 h洗涤3次。⑤加入HRP标记二抗,37° 孵育1 h后洗涤3次,加入显色液100 μL,15 min后加入终止液50 μL,酶标仪450 nm读数。将通过腹水制备的利奈唑胺单克隆抗体经过纯化后进行ELISA抑制效果检测。检测结果如表1、2和3所示。1号抗体稀释16万倍时灵敏度可以达到0.5 ng·mL⁻¹,2号抗体稀释4万倍时灵敏度可以达到1 ng·mL⁻¹,3号抗体稀释1万倍时灵敏度可以达到0.5 ng·mL⁻¹。考虑到建立的荧光免疫层析法检测利奈唑胺是微克级别,所以不需要太敏感抗体,所以2号抗体作为下一步建立检测体系的优选抗体。

表1 不同利奈唑胺浓度对1号抗体抑制情况

Tab. 1 Inhibition efficiency of different linezolid concentrations to 1# antibody

抗体稀释倍数(万倍) (antibody dilution factor)	不同利奈唑胺浓度 (different linezolid concentrations)/(ng·mL ⁻¹)					
	0	50	10	5	1	0.5
1	3.29	0.58	1.06	1.42	2.52	2.96
2	2.60	0.34	0.61	0.81	1.70	2.31
4	2.18	0.24	0.31	0.44	1.05	1.73
8	1.47	0.12	0.20	0.24	0.57	1.04
16	0.92	0.11	0.14	0.16	0.37	0.64
32	0.53	0.09	0.11	0.12	0.20	0.31
64	0.35	0.13	0.13	0.14	0.19	0.26
128	0.24	0.10	0.11	0.10	0.12	0.15

表 2 不同利奈唑胺浓度对 2 号抗体抑制情况

Tab. 2 Inhibition efficiency of different linezolid concentrations to 2# antibody

抗体稀释倍数(万倍) (antibody dilution factor)	不同利奈唑胺浓度 (different linezolid concentrations)/(ng · mL ⁻¹)					
	0	50	10	5	1	0.5
1	2.13	0.60	1.21	1.43	2.08	2.23
2	1.52	0.28	0.62	0.86	1.25	1.46
4	1.01	0.23	0.42	0.47	0.76	0.97
8	0.60	0.15	0.20	0.26	0.43	0.46
16	0.32	0.10	0.16	0.17	0.26	0.29
32	0.19	0.08	0.10	0.11	0.15	0.19
64	0.18	0.13	0.13	0.14	0.15	0.15
128	0.12	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10

表 3 不同利奈唑胺浓度对 3 号抗体抑制情况

Tab. 3 Inhibition efficiency of different linezolid concentrations to 3# antibody

抗体稀释倍数(万倍) (antibody dilution factor)	不同利奈唑胺浓度 (different linezolid concentrations)/(ng · mL ⁻¹)					
	0	50	10	5	1	0.5
1	0.85	0.21	0.27	0.27	0.52	0.68
2	0.50	0.13	0.20	0.16	0.27	0.38
4	0.35	0.13	0.15	0.15	0.21	0.25
8	0.21	0.09	0.11	0.09	0.13	0.16
16	0.14	0.09	0.09	0.08	0.10	0.11
32	0.10	0.07	0.08	0.08	0.12	0.09
64	0.13	0.12	0.12	0.11	0.12	0.11
128	0.10	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07

3.4 利奈唑胺荧光免疫层析检测法标准曲线

将配置的 0、0.39、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25 和 50 μg · mL⁻¹ 系列利奈唑胺对照品进行检测得到的 T/C 值(检测线与质控线峰面积比值)数据如表 4 所示,从 0~50 μg · mL⁻¹ 浓度对应不同的 T/C 值,每个浓度点之间 T/C 值区分跨度大。利用 Logit-log 直线回归法,根据表 4 中的数据,绘制标准曲线如图 4 所示。令 $p=OD/OD_0$, $q=1-p$, $y=\ln(p/q)$, $x=\lg(\text{浓度})$ 其中:OD 为 T/C 值,OD₀ 为浓度为 0 的 T/C 值的均值,回归方程:

$$y=a+b \cdot x \quad R^2=0.998$$

表 4 荧光免疫层析法检测不同浓度利奈唑胺对照品

Tab. 4 Immunochromatographic assay for different concentrations linezolid reference substances

利奈唑胺浓度 (linezolid concentrations)/(μg · mL ⁻¹)	T/C 值 (T/C value)
0	6.2
0.39	5.95
0.78	5.34
1.56	5.15
3.125	4.27
6.25	2.72
12.5	1.50
25	0.84
50.0	0.48

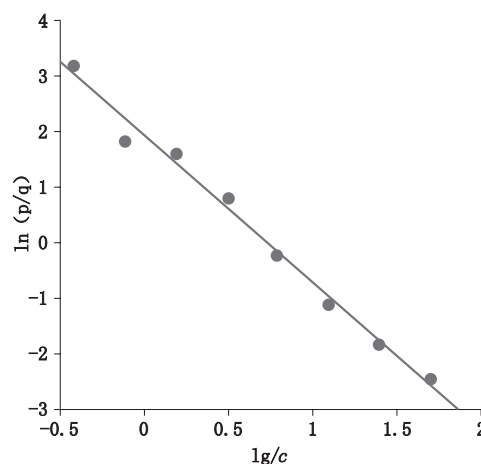


图 4 利奈唑胺荧光免疫层析检测标准曲线

Fig. 4 Standard curve of linezolid by fluorescence immunochromatographic assay

其中 $a=1.92$, $b=-2.66$ 。线性较好,计算得 $IC_{50}=5.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.5 方法学评价

3.5.1 灵敏度以及线性范围 将 0 μg · mL⁻¹ 样品通过荧光免疫层析法重复检测 10 次,数据如表 5 所示,其 T/C 值的平均值 $X=5.92$ 、 $SD=0.17$, $X-2 \times SD=5.73$,将表 5 数据中的 $X-2 \times SD$ 的 T/C 值作为 y 值代入图 4 标准曲线对应的方程中的到的浓度值为 $0.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,即分析灵敏度为 $0.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 5 重复检测 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 利奈唑胺样本结果Tab. 5 The results of repeated tests for linezolid at $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

序号 (number)	T/C 值 (T/C value)
1	5.94
2	6.18
3	6.35
4	5.95
5	5.84
6	6.31
7	5.92
8	6.06
9	5.96
10	6.26
平均值 (average value, \bar{X})	5.92
SD	0.17
$\bar{X}-2 \times \text{SD}$	5.73

分别重复检测曲线上接近高低浓度各个浓度点标准品,每个重复 10 次,检测数据如表 6 所示,并计算其 T/C 值的平均值(\bar{X})、标准偏差(SD)以及精密度(RSD)。表 6 显示各个浓度的 T/C 值 RSD 在 0 浓度和 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度大于 10%,即高浓度上限和低浓度下限 RSD 小于 10%,所以线性范围为 $0.78 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 6 重复检测不同浓度对照品 T/C 值的 RSD

Tab. 6 The RSD of repeated tests for different concentrations of reference substance T / C value

序号 (number)	不同浓度对照品 (different concentrations of reference substance) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)					
	0	0.39	0.78	1.56	12.5	50
1	6.400	5.730	4.950	4.420	1.420	0.500
2	7.470	6.220	6.120	4.380	1.420	0.470
3	5.720	5.770	4.560	5.240	1.540	0.520
4	5.940	5.600	5.510	5.590	1.450	0.470
5	5.090	5.980	5.650	5.210	1.320	0.480
6	6.630	4.690	6.040	5.270	1.600	0.470
7	6.750	6.310	5.890	4.770	1.510	0.410
8	5.900	5.200	5.700	5.010	1.480	0.440
9	6.030	5.770	5.630	4.510	1.650	0.420
10	6.690	6.470	5.220	5.100	1.530	0.500
\bar{X}	6.262	5.874	5.527	4.950	1.492	0.468
SD	0.632	0.557	0.465	0.390	0.091	0.034
RSD/%	10.088	11.481	8.418	7.880	6.090	7.202

3.5.2 精密度 利用已经建立的利奈唑胺检测体系检测浓度为 2.5 、 20 和 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利奈唑胺对照品,各重复检测 15 次,检测结果如表 7 所示,计算的检测高、中、低浓度利奈唑胺的数据的精密度(RSD)均小于 10%。

表 7 重复检测高、中、低浓度利奈唑胺对照品结果

Tab. 7 The results of repeated tests for linezolid with high, medium and low concentration

序号 (number)	高浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (high concentration)	中浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (medium concentration)	低浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (low concentration)
1	44.10	18.13	1.83
2	41.28	17.18	2.15
3	46.08	19.91	2.02
4	37.98	21.39	2.16
5	41.31	20.29	1.69
6	43.14	18.56	1.76
7	42.26	19.82	2.20
8	38.55	18.56	2.15
9	38.90	16.81	1.81
10	46.95	18.67	1.92
11	45.93	17.89	1.89
12	47.97	17.29	1.82
13	44.10	19.15	2.15
14	46.99	18.22	2.22
15	43.51	22.49	1.79
\bar{X}	43.27	18.71	1.98
SD	3.10	1.53	0.18
RSD/%	7	8	9

3.5.3 回收率 分别检测初始浓度样本,以及加标样本 ($40+C_0$)、($38+C_0$)、($22+C_0$)、($18+C_0$)、($4.5+C_0$) 和 ($1.5+C_0$) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个样本重复检测 3 次,计算加标样本的回收率。检测计算结果如表 8 所示。高、中、低 3 个区域范围的回收率范围在 78.4%~123.4%。

3.5.4 特异性 将 14 种与利奈唑胺结构相似以及联合用药相关药物对照品的一系列的浓度梯度进行检测,并分别建立每个相关药物的抑制曲线,计算出相应的 IC_{50} 值以及交叉反应率。(公式:交叉反应率(%) = (利奈唑胺 IC_{50} / 其他药物 IC_{50}) $\times 100\%$) 结果如表 9 所示,甲氧苄啶、盐酸多巴胺阿奇霉素、L-酪氨酸和头孢呋酮与利奈唑胺无任何交叉反应;奥美拉唑、氟康唑、替考拉宁、万古霉素、多巴胺、苯丙氨酸、色氨酸、氨苄、头孢氨苄、和头孢唑林等其余药物与利奈唑胺的交叉反应均小于 0.000 1%。说明本利奈唑胺检测体系特异性较好。

表 8 高、中、低浓度加标回收试验结果

Tab. 8 The results of standard added recovery tests of high, medium and low concentration

样本类型 (sample type)		总浓度实测均值 (average of actual measured total concentration, C_x)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	理论加标量 (theory standard added quantity)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	计算加标量 (calculated standard added quantity)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery) /%
初始样本 (initial sample)		3.76	0	—	—
高浓度 (high concentration)	$40+C_0$ $38+C_0$	37.39 34.28	40 38	33.24 30.52	83.1 80.3
中浓度 (medium concentration)	$22+C_0$ $18+C_0$	23.85 25.97	22 18	20.09 22.21	91.3 123.4
低浓度 (low concentration)	$4.5+C_0$ $2.5+C_0$	7.29 6.17	4.5 2.5	3.53 2.41	78.4 96.4

表 9 14 种药物分别与利奈唑胺检测体系交叉反应的结果

Tab. 9 The respective results of cross-reaction of 14 kinds of drugs with linezolid detection system

药物名称 (drug name)	IC_{50} / ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	交叉反应率 (rate of cross- reaction)
甲氧苄啶 (trimethoprim)	N/A	—
阿奇霉素 (azithromycin)	75.6	<0.000 1%
奥美拉唑 (omeprazole)	157.2	<0.000 1%
氟康唑 (fluconazole)	129	<0.000 1%
替考拉宁 (teicoplanin)	12.6	<0.000 1%
万古霉素 (vancomycin)	235	<0.000 1%
多巴胺 (dopamine)	N/A	—
苯丙氨酸 (phenylalanine)	59	<0.000 1%
L-酪氨酸 (L-tyrosine)	N/A	—
色氨酸 (tryptophan)	519	<0.000 1%
氨苄 (amp)	526	<0.000 1%
头孢氨苄 (cephalexin)	216.2	<0.000 1%
头孢哌酮 (cefoperazone)	N/A	—
头孢唑林 (cefazolin)	53.8	<0.000 1%

3.5.5 临床血样检测与 HPLC 法比较 依据本实验建立的利奈唑胺血药浓度 HPLC 检测法,该方法条件为:色谱柱: Hypersil ODS2 柱;流动相: 乙腈 -0.01% 磷酸 (27:73);流速: $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量: $20 \mu\text{L}$;紫外检测波长: 254 nm;柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。利用 HPLC 法和荧光免疫层析法,分别检测 67 例利奈唑胺用药患者的血清样本,进行数据比对,进行相关性分析。结果如图 5 所示。2 种不同的方法检测临床样本相关性较好 $R^2=0.929$,大于 0.90。

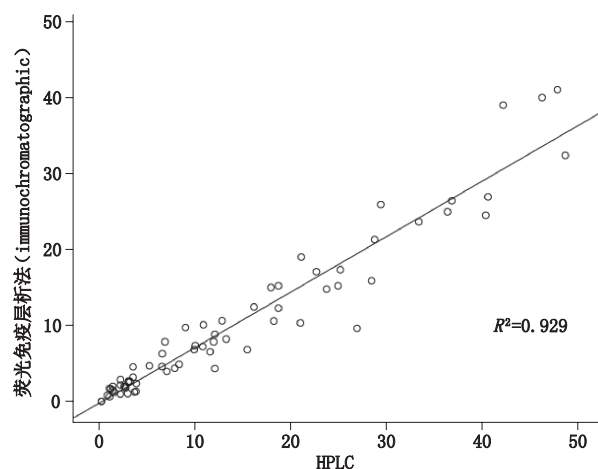


图 5 荧光免疫层析法与 HPLC 法检测临床样本数据比较

Fig. 5 The comparison of clinical data between HPLC and immunochromatographic assay

4 讨论

利奈唑胺作为上市新药,在治疗革兰氏阳性菌感染方面有独特的功效,且不良反应相对较少,在临床取得了很好的疗效。但同时也应注意对其引起血小板降低、骨髓抑制、乳酸中毒等相关不良反应的监测,加强用药安全。对于特殊人群的利奈唑胺治疗,有必要进行血药浓度的监测,以确保药物的有效治疗^[19],减少耐药菌株的产生及不良反应的发生^[20-21]。以快速准确的利奈唑胺血药浓度检测为基础,结合患者的药效学特性,制定针对不同个体合理的治疗方案以达到最佳的治疗结果,同时最大限度地降低耐药突变频率以及长期使用利奈唑胺引起的不良反应,达到利奈唑胺的临床用药合理性。

目前基于免疫学原理的小分子快速检测技术质量的关键是小分子半抗原抗体的好坏,然而抗体的质量又取决于高效的小分子抗原结构。本实验通过独特的小

分子抗体制备途径,即:将利奈唑胺半抗原定向衍生化成具有单一羧基结构的衍生物,通过与BSA偶联制备高效的完全抗原。经过免疫小鼠,采用杂交瘤技术制备了高特异性的利奈唑胺单克隆抗体。基于荧光免疫层析法成功建立了利奈唑胺血药浓度快速检测技术。荧光免疫法的关键是抗体,本实验获得了3株单克隆抗体,但是可用于建立高效检测技术的抗体只有1株。

本实验建立荧光免疫层析法利奈唑胺检测技术特异性较好,与14种相关药物都无交叉反应;灵敏度 $0.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测范围 $0.7 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,精密度的小于10%,高中低浓度回收率78.4%~123.4%。通过检测临床样本与HPLC法比较,相关性较好。用本实验制备的试纸卡对利奈唑胺临床样本进行初步的检测,体现出该方法有快速、准确定量、特异性好和实用性等优点。如果将该方法应用于临床利奈唑胺血药浓度的检测,将有效克服了当前利奈唑胺血药浓度检测中操作费时,响应时间长,对操作人员技术要求高等缺陷,作为利奈唑胺治疗特殊人群有效治疗、合理用药优选辅助工具,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] ZABRANSKY RJ. Linezolid; the first of a new class of antimicrobial agents [J]. *Clin Microbiol Newsl*, 2002, 24 (4): 25
- [2] ITANI KM, BISWAS P, REISMAN A, *et al*. Clinical efficacy of oral linezolid compared with intravenous vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-complicated skin and soft tissue infections: a retrospective, propensity score-matched, case-control analysis [J]. *Clin Ther*, 2012, 34 (8): 1667
- [3] STEVENS DL, DOTIER B, MADARAS-KLLEY K. A review of linezolid; the first oxazolidinone antibiotic [J]. *Expert Rev Antiinfect Ther*, 2004, 2 (1): 51
- [4] MUTSCHLER M, TROJAN S, DEFOSSE JM, *et al*. Severe sepsis caused by a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a 10-year-old girl after multiple trauma [J]. *Int J Infect Dis*, 2013, 17 (6): 466
- [5] ATTASSI K, RSHBERGER E, ALAM R. Thrombocytopenia associated with linezolid therapy [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 34 (5): 695
- [6] CHEN C, GUO DH, CAO X, *et al*. Risk factors for thrombocytopenia in adult chinese patients receiving linezolid therapy [J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2012, 73 (6): 195
- [7] GREEN SL, MADDOX JC, HUTTENBACH ED, *et al*. Linezolid and reversible myelo-suppression [J]. *J Am Med Assoc*, 2001, 285 (10): 1291
- [8] CATTANEO D, ORLANDO G, COZZI V, *et al*. Linezolid plasma concentrations and occurrence of drug-related haematological toxicity in patients with gram-positive infections [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41 (6): 586
- [9] TRAUNMÜLLER F, MAURIC O, POPOVIC M, *et al*. Rapid and sensitive determination of the antibiotic linezolid in low plasma volumes by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48 (5): 325
- [10] LOVERING AM, LE-FLOCH R, HOVSEPIAN L, *et al*. Pharmacokinetic evaluation of linezolid inpatients with major thermal injuries [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63 (3): 553
- [11] RAMÍREZ E, GÓMEZ-GIL R, BOROBIA AM, *et al*. Improving linezolid use decreases the incidence of resistance among gram-positive micro-organisms [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41 (2): 174
- [12] PEA F, FURLANUT M, COJUTTI P, *et al*. Therapeutic drug monitoring of linezolid: a retrospective monocentric analysis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (11): 4605
- [13] 董海燕,董亚琳,王雪,等. HPLC法测定人血清中利奈唑胺浓度及其临床应用 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30 (2): 199
- [13] DONG HY, DONG YL, WANG X, *et al*. HPLC determination and clinical application of linezolid concentration in human serum [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30 (2): 199
- [14] 张永煌,张善堂,张蕾,等. 重症感染患者血清中利奈唑胺的浓度测定与临床应用评价 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26 (3): 564
- [14] ZHANG YH, ZHANG ST, ZHANG L, *et al*. Concentration determination of linezolid in human serum of patients with severe infections and evaluation of clinical application [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2016, 26 (3): 564
- [15] OH SW, KIM YM, KIM HJ, *et al*. Point-of-care fluorescence immunoassay for prostate specific antigen [J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 406 (1-2): 18
- [16] LI Z, WANG Y, WANG J, *et al*. Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip [J]. *Anal Chem*, 2010, 82 (16): 7008
- [17] 中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心. 人胱抑素C的荧光免疫层析检测卡及检测试剂盒和检测体系: 中国, CN204188615U [P]. 2015. 03. 04
- [17] SHANGHAI INST BIOL SCIENCES. Fluorescence immunochromatography detection card, detection kit and detection system for human cystatin C; China, CN204188615U [P]. 2015. 03. 04
- [18] 胡佳丽,于东升,刘小雷,等. 荧光免疫层析法快速测定牛奶中头孢氨苄残留量 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26 (4): 362
- [18] HU JL, YU DS, LIU XL, *et al*. Rapid detection of cefalexin residues in milk by fluorescent immunochromatography assay [J]. *Chin J Food Hyg*, 2014, 26 (4): 362
- [19] DARIO C, GIOVANNA O, VALERIA C, *et al*. Linezolid plasma concentrations and occurrence of drug-related haematological toxicity in patients with Gram-positive infections [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41 (6): 586
- [20] LOVERING AM, HOVSEPIAN L. Pharmacokinetic evaluation of linezolid inpatients with major thermal injuries [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63 (3): 553
- [21] MORATA L, GÓMEZ-CERQUERA JM, MANZANEDO L, *et al*. Risk factors associated with high linezolid through plasma concentrations [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2016, 17 (9): 1183

(本文于2016年7月21日收到)