

• 检验技术与方法 •

高效液相色谱法测量患儿血清甲氨蝶呤浓度

张诗海, 孙 丽

(安徽省儿童医院医学检验中心, 安徽合肥 230051)

摘要:目的 建立测定患儿血清中甲氨蝶呤浓度的方法, 用于临床患儿血药浓度监测。方法 色谱柱采用岛津原装柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.025 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (pH 为 5.41)-甲醇 (76:24, V/V), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 313 nm, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 样品经 10% 高氯酸沉淀蛋白后, 取上清液 130 μ L 加 10 μ L 1 mol/L NaOH 后直接进样。结果 血浆中甲氨蝶呤的浓度在 0.00~4.84 μ mol/L 和 4.84~10.00 μ mol/L 范围内与峰面积线性关系良好, $r_1=1$, $r_2=1$, 平均回收率分别为 61.67% 和 71.83%, 日内及日间精密度的 RSD 小于 10% 和 12% ($n=3$)。结论 所用方法简便快速、准确可靠、灵敏度高、重现性好、线性范围宽和成本低, 适于甲氨蝶呤的血药浓度监测。

关键词: 色谱法; 高压液相; 甲氨蝶呤; 血清

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1762-02

HPLC method for determining serum methotrexate concentration in children patients

Zhang Shihai, Sun Li

(Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei, Anhui 230051, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC method for determining the serum methotrexate (MTX) concentration in children patients for monitoring the blood drug concentration in clinic. **Methods** The chromatographic analytical column was the Shimadzu C-18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was 0.025 mol/L NaH_2PO_4 (pH 5.41)-methanol (76:24, V/V). The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 313 nm. The column temperature was set at 35 $^{\circ}$ C. The plasma samples were deposited down the protein with 10% HClO_4 , the supernatant liquid 130 μ L added with 1 mol/L NaOH 10 μ L was directly injected for determination. **Results** The mass concentration of MTX in the range of 0.00–4.84 μ mol/L and 4.84–10.00 μ mol/L showed the good linear relation with the peak area, $r_1=1$, $r_2=1$. The mean recovery rates were 61.67% and 71.83%. Intra-day and inter-day precision were $<10\%$ and 12% , respectively ($n=3$). **Conclusion** The used method is simple, accurate and reliable with high sensitivity, good reproducibility and wide linearity range, which is suitable for the monitoring blood MTX concentration.

Key words: chromatography; high pressure liquid; methotrexate; serum

甲氨蝶呤 (MTX) 是临床常用于小儿急性淋巴细胞白血病和淋巴瘤的化疗药物, 由于受到患者肝脏代谢功能和体内药物浓度蓄积分布等个体差异的影响, 临床常出现药物中毒现象, 监测甲氨蝶呤的血药浓度很是必要。常用于测定甲氨蝶呤的方法主要有微生物法、荧光偏振免疫法和高效液相色谱法。高效液相色谱法以其测量价格便宜、准确而被临床采用。笔者用高效液相色谱法检测血清甲氨蝶呤的方法报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血清和空白血清分别来自于安徽省儿童医院血液科患者和输血科。

1.2 仪器与试剂 LC-20AD 型高效液相色谱仪, SPD-20AD 检测仪器, CTO-20AC 柱温箱, 岛津原装 C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), pHs-3b 型精密酸度计, HC-2518 高速离心机和 SC-2546 低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司生产, FA1004 电子分析天平, MTX 标准品购买于 Sigma 生物制品公司 (Lot: 090M17193V), 甲醇为色谱纯、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、高氯酸等均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 岛津原装 C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.025 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (pH 为 5.41)-甲醇 (76:24, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长为 313 nm。

1.3.2 样品的处理 取 200 μ L 血清样品于一干净 EP 管, 滴

加 10% 高氯酸溶液 40 μ L, 涡旋混合 30 s, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 130 μ L 置另一干净离心管中, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 μ L, 涡旋混合 15 s, 取 20 μ L 进样分析。

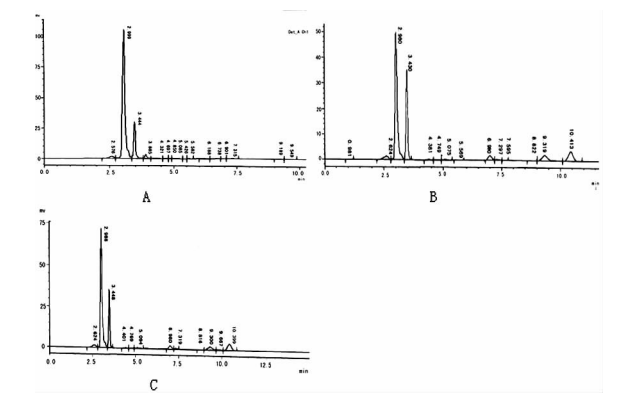
1.3.3 标准品和质控品的处理 取 MTX 对照品适量, 分析天平准确称定, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液配制成 96.82 μ mol/L 的甲氨蝶呤贮备液, 用 0.45 μ m 的滤膜过滤备用。取 190、180、170 μ L 等系列空白血清样品于一干净 EP 管, 加入 96.82 μ mol/L 的甲氨蝶呤贮备液 10、20、30 μ L 等系列标准品和加入 9.682 μ mol/L 的甲氨蝶呤贮备液 10、20、30 μ L 等系列标准品。滴加 10% 高氯酸溶液 40 μ L, 涡旋混合 30 s, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 130 μ L 置另一干净离心管中, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 μ L, 涡旋混合 15 s, 取 20 μ L 进样分析, 每份标本各进样 3 次。质控品配置与标准品步骤相同。

1.3.4 回收率试验 取 190、180、170 μ L 等系列空白纯水样品于一干净 EP 管, 加入 96.82 μ mol/L 的甲氨蝶呤贮备液 10、20、30 μ L 等系列标准品和加入 9.682 μ mol/L 的甲氨蝶呤贮备液 10、20、30 μ L 等系列标准品, 混匀。取 130 μ L 置另一干净离心管中, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 μ L, 涡旋混合 15 s, 取 20 μ L 进样分析。回收率 = 加入相同浓度质控品的空白血清峰面积 / 加入相同浓度质控品的空白纯水峰面积 × 100%。

2 结果

2.1 色谱与分离 在上述色谱分析的条件下, 血清的 pH 值、

内源性物质对甲氨蝶呤的分离没有干扰,甲氨蝶呤的保留时间为 9.3 min,空白血清、空白血清加标准品贮备液,以及服药患者的血清色谱图见图 1。



A:空白血清;B:空白血清加标准品贮备液;C:服药患者的血清。

图 1 血清中甲氨蝶呤的液相色谱图形

2.2 标准曲线与线性关系 将标准贮备液与空白血清稀释配成一系列不同浓度的标准工作液,按前述样品处理方法处理进样,测得的色谱峰面积(Y)与其血浓度(C)进行回归,得回归方程,当浓度 C 小于 4.84 $\mu\text{mol/L}$ 时, $Y = 30\,241.935C - 2\,320.931 (r = 1)$, 当浓度 C 大于 4.84 $\mu\text{mol/L}$ 时, $Y = 15\,779.054X + 6\,7795.9 (r = 1)$, 线性关系均较好,见图 2。

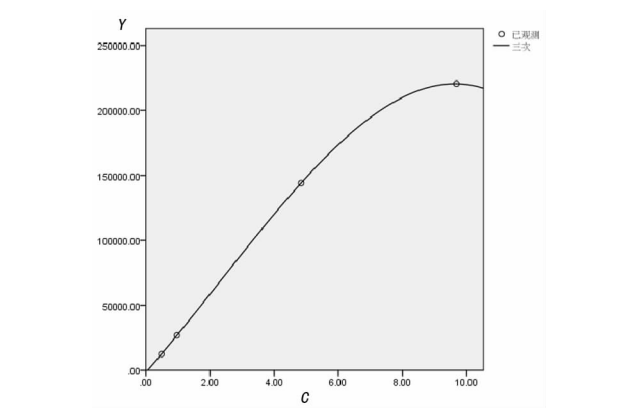


图 2 色谱峰面积(Y)与其血浓度(C)的线性关系直观图

2.3 精密度及回收率结果 见表 1。

表 1 精密度及回收率结果 (%)

加入浓度($\mu\text{mol/L}$)	日间 RSD	日内 RSD	回收率
0.484	11.8	6.7	61.67
0.968	10.6	5.6	68.48
9.682	10.1	9.7	71.83

3 讨 论

甲氨蝶呤用于治疗白血病,血液中甲氨蝶呤浓度小于 10 nmol/L 浓度就能够抑制细胞 DNA 的合成^[1],甲氨蝶呤药物可以通过人体血脑等多个生理屏障,杀伤隐蔽的白血病细胞^[2]。另外,即使在给药浓度相同的情况,个体间由于肝脏和肾脏功能的个体化差异以及药物间相互作用极易出现不同的结果^[3-4]。因此,监测化疗患者的甲氨蝶呤浓度很有必要,正常参考药物浓度监测在 44 h 浓度低于 0.1 $\mu\text{mol/L}$,68 h 浓度低于 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 和 96 h 浓度低于 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 等。甲氨蝶呤在人体内主要代谢物至少存在 3 种代谢产物:7-经基甲氨蝶呤(7-OH MTX),2,4-二氨基-N-ro-甲基叶酸(DAMPA)和 MTX 的聚谷氨酸衍生物。这些代谢产物以及一些内源性物质影响

了免疫方法测定甲氨蝶呤,但对 HPLC 法却不受干扰^[5]。

本文采用的是高效液相色谱的外标法测定甲氨蝶呤,试验采用高氯酸沉淀血清中的蛋白,回收率在 60% 以上,蛋白质与甲氨蝶呤发生共沉淀导致回收率与固体萃取柱法相比较低^[6]。在实际操作中发现甲氨蝶呤不溶解于甲醇或乙腈,因此标准液用氢氧化钠溶液溶解的,碱性可中和高氯酸的酸性,从而可以延长色谱柱的寿命,高氯酸与三氯醋酸相比,杂峰较少,分离效果好^[7-8]。用高氯酸沉淀蛋白的最大的缺点就是没有完全沉淀的蛋白容易使色谱柱堵塞,可在冲洗的时候加上缓冲流动相以延长色谱柱的寿命。在一次做多个标本时候,如果有一个标本蛋白沉淀不太好的话,会出现基线漂移现象^[9],本研究使用进口原装柱一般 10 份标本以内很少发生漂移。日间变异系数在 10% 以上,日内变异系数在 10% 以内,能够满足临床药物监测需要。外标法测定的准确性取决于标准品或质控品的称量的准确性,换句话说,就是取决于分析天平的灵敏度,还取决于加样的精确度,从变异系数看对操作者要求高,内标法能够克服这点。当测得的甲氨蝶呤浓度与 4.84 $\mu\text{mol/L}$ 比较大小后,分别用不同的回归线性来计算。

监测血清中甲氨蝶呤浓度对于肝肾功能不好的患者尤其具有临床意义,中毒患者可以根据测定浓度按文献^[10]中四氢叶酸钙解救,从而避免或减轻溃疡等中毒表现的进一步发展,对患者的化疗效果有积极意义。

参考文献

- Chabner BA, Young RC. Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target Tissues[J]. I Clin Invest, 1973, 52(17): 1804-1811.
- 曹志扬. 大剂量甲氨蝶呤治疗急性淋巴细胞白血病的临床观察[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(12): 1213-1215.
- Dupuis C, Mercier C, Yang C, et al. High-dose methotrexate in adults with osteosarcoma: a population pharmacokinetics study and validation of anew limited sampling strategy [J]. Anticancer Drugs, 2008, 19(2): 267-273.
- Relling MV, Fairclough D, Ayers D, et al. Patient characteristics associated with high-risk methotrexate concentrations and toxicity [J]. J Clin Oncol, 1994, 12(15): 1667-1672.
- Albertion F, Rask C, Eksborg S, et al. Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma[J]. Clin Chem, 1996, 42(1): 39-44.
- Uchiyama M, Matsumoto T, Matsumoto T, et al. Simple and sensitive HPLC method for the fluorometric determination of methotrexate and its major metabolites in human plasma by post-column photochemical reaction[J]. Biomed Chromatogr, 2012, 26(1): 76-80.
- 霍晶, 袁盛华, 方芸, 等. 反相高效液相色谱法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(5): 390-392.
- Seidel H, Andersen A. Variability in methotrexate scran and eerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables[J]. Leuk Res, 2000, 24(3): 193-199.
- 张善堂, 杨林海, 孙言才, 等. HPLC 法测定急性淋巴细胞白血病患儿血清中甲氨蝶呤浓度[J]. 中国药房, 2008, 19(11): 825-827.
- 叶辉, 顾龙君, 陈静, 等. 大剂量甲氨蝶呤静滴后四氢叶酸钙解救方案的探讨[J]. 中华血液学杂志, 2000, 2(2): 92-93.