

## HPLC 测定急性淋巴细胞白血病患者 血清中甲氨蝶呤浓度

刘文\*, 邓楠, 戴迎春  
(湖南省人民医院药学部, 长沙 410005)

[摘要] 目的: 建立一快速、准确的 RP-HPLC 方法测定人血清中甲氨蝶呤的浓度。方法: 以阿魏酸内标, 采用 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 以大连依利特 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm) 为分析柱; 流动相乙腈-磷酸缓冲盐溶液(15:85, pH 6.8); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 306 nm; 柱温 30℃。血浆样品用乙腈沉淀蛋白后, 取上清液, 在 60℃ 下经氮气挥干, 残渣用流动相定容, 取 20 μL 进样分析。结果: 色谱峰分离良好, 无干扰。线性方程为  $Y = -1.65 \times 10^{-2} X + 0.355$ ,  $r = 0.9995$ , 高、中、低 3 个浓度的样品萃取回收率均大于 75%。结论: 该方法是一种可靠、快速灵敏的检测方法, 适用于甲氨蝶呤的血药浓度监测。

[关键词] 甲氨蝶呤; 高效液相色谱; 儿童急性淋巴细胞白血病

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0108-03

## Determine Concentration of Methotrexate in Acute Lymphoblastic Leukemia Children by HPLC

LIU Wen\*, DENG Nan, DAI Ying-chun

(Department of Pharmacy of People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method to determine the concentration of methotrexate (MTX) in human plasma. **Method:** The ferulic acid was used as internal standard (I.S.) The analytical column was a Kromasil C<sub>18</sub> column connected with the Agilent 1100 HPLC system. The isocratic mobile phase was the acetonitrile and buffer of phosphate acid (pH 6.8) with the rate of 15:85. The detection UV wavelength was 306 nm and the column temperature was 30℃. The plasma samples, added ferulic acid as internal standard, were deposited down the protein with acetonitrile and the upper phase was evaporated by nitrogen at 60℃. The remains was dissolved with mobile phase, 20 μL was injected into the sampler. **Result:** The chromatography was good and not interfered by the components of the plasma. The linear equation was  $Y = -1.65 \times 10^{-2} X + 0.355$ ,  $r = 0.9995$ . **Conclusion:** This is an accurate, sensitive and convenient method for the determination of MTX in the therapeutic drug monitoring.

[Key words] methotrexate; HPLC; acute lymphoblastic leukemia

甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 是一种二氢叶酸还原酶抑制剂, 是通过抑制细胞内二氢叶酸酶达

到杀灭肿瘤细胞的作用。目前临床采用大剂量甲氨蝶呤配合甲酰四氢叶钙 (CF) 解救 (HDMTX + CF) 治疗儿童急性淋巴细胞白血病 (ALL)<sup>[1]</sup>。在该方案实施过程中, MTX 血药浓度对 CF 剂量及用药次数的选择起着指导作用。MTX 在体内部分经肝细胞代谢转化为谷氨酸盐, 部分通过胃肠道细菌代谢; MTX 主要经肾排泄, 大部分为药物原型。另外有少

[收稿日期] 20100915(003)

[通讯作者] \* 刘文, 硕士, 主管药师, 研究方向: 临床药理学与药代动力学, Tel: 0731-82278323, Fax: 0731-82278321, E-mail: liuwen0917@163.com

量药物原型及代谢产物以结合型形式储存于肾脏和肝脏组织中可长达数月,有研究表明<sup>[2]</sup>细胞内残留的 MTX 是发生细胞毒性作用的主要原因,且其毒性作用持续时间长,严重者甚至导致死亡。由于 MTX 在体内代谢的个体差异明显,为了安全有效地实施 HDMTX 给药,必须对 MTX 用药后的血药浓度实施监测,以确保临床用药安全有效。本文建立了更优化的 HPLC 测定血浆中 MTX 浓度的方法并用于 ALL 患儿的治疗药物监测。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,包括 Agilent G1379A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1316A 柱温箱, G1379B 检测器及手动进器, Agilent 1100 化学工作站。

MTX 对照品(批号 100138-200603)和阿魏酸对照品(批号 110773-200611)由中国药品生物制品检定所提供,甲醇、乙腈为色谱纯,购于 Sigma 公司,水为本院自制二重蒸馏水。健康人空白血清由本院输血科提供。磷酸、三乙胺为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 血样处理** 取 300  $\mu\text{L}$  血清样品,加入内标溶液 50  $\mu\text{L}$  涡旋混合 30 s,再加入乙腈 1 000  $\mu\text{L}$ ,涡旋混合 60 s, 14 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液 1 200  $\mu\text{L}$  置另一干净离心管中,60  $^\circ\text{C}$  氮气挥干,残渣用流动相 60  $\mu\text{L}$  溶解,取 20  $\mu\text{L}$  进样分析。

**2.2 色谱条件及色谱行为** Kromasil  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相乙腈-磷酸缓冲盐溶液(pH 6.8) (15:85);流速 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;检测波长 306 nm;柱温 30  $^\circ\text{C}$ ,灵敏度 0.05 AUFS。

**2.3 标准曲线的制备** 用空白血清和 MTX 贮备液分别配制浓度为 0.018 5, 0.036 9, 0.184 7, 0.369 4, 0.739 3, 1.847, 3.694  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 MTX 系列标准血清样品。同法配制浓度为 0.036 9, 0.369, 1.847  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的质控血清样品,分装于一塑料离心管中置 -20  $^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

**2.4 对照品溶液的配制** 精密称取 MTX 对照品适量,用磷酸盐缓冲液(pH 6.8)溶解配制成贮备液(295.7  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),于 4  $^\circ\text{C}$  冰箱中保存,使用时用磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。精密称取阿魏酸对照品适量,用甲醇溶解配制成浓度为 152.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的内标溶液,于 4  $^\circ\text{C}$  冰箱中保存,使用时用甲醇稀释至所需浓度。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 专属性** 分别取空白血清、对照品溶液、标准血清样品及患者用药后的血清样品,按 2.1 项方法处理后进样分析,考察 MTX 的色谱行为。结果,空白血清图谱在 MTX 出峰处背景干净,无明显杂峰干扰;MTX 峰峰形尖锐且分离良好;MTX 保留时间为 4.4 min 左右,内标物阿魏酸的保留时间为 12.7 min 左右,内源性物质、合并用药(如 CF 等)及 MTX 的代谢产物对 MTX 和内标的测定目标峰均无干扰。见图 1。

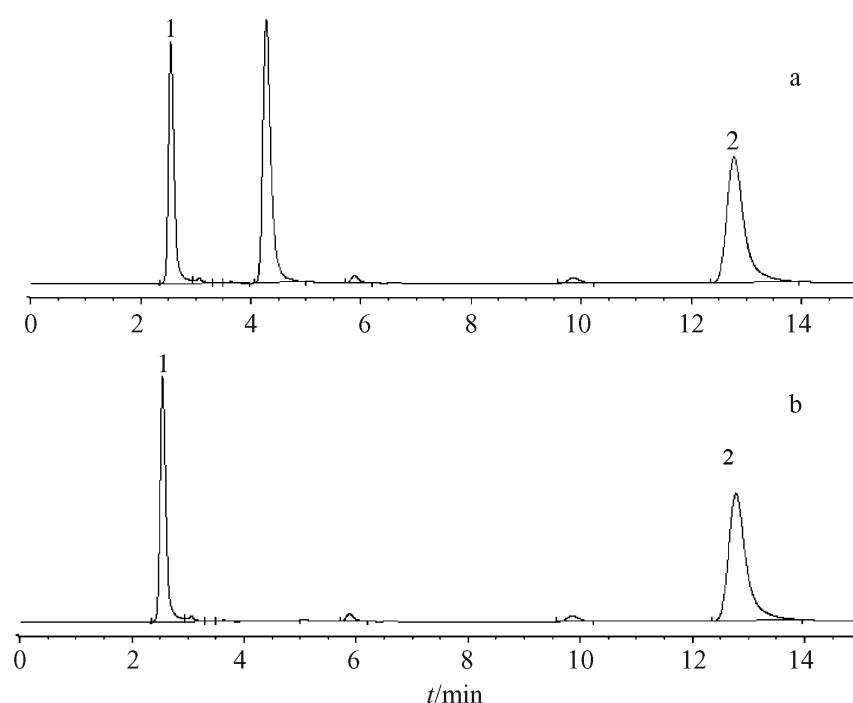


图 1 MTX 血清溶液色谱

a. 血清溶液; b. 阴性; 1. MTX; 2. 阿魏酸

**2.5.2 标准曲线绘制** 用空白血清和 MTX 贮备液分别配制 0.018 5, 0.036 9, 0.184 7, 0.369 4, 0.739 3, 1.847, 3.694  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 MTX 系列标准血清样品,按 2.1 项方法处理后进样分析,测定 MTX 的浓度。以 MTX 浓度( $X$ )为横坐标,MTX 峰面积与内标峰面积比( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程  $Y = -1.65 \times 10^{-2} X + 0.355$ ,  $r = 0.999 5$ 。表明本法的 MTX 检测浓度在 0.018 5 ~ 3.694  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  线性关系良好,血清最低检测浓度为 0.005  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.5.3 精密度及方法回收率** 用空白血清和 MTX 贮备液分别配制 0.036 9, 0.369 4, 1.847  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的质控血清样品,分别作精密度和回收率试验,结果见表 1。

**2.5.4 萃取回收率** 取上述质控血清样品,按 2.1 项方法操作,测得 MTX 峰面积  $M_1$ ,同时配制与各浓度质控样品相同标示量的水溶液直接进样,测得 MTX 峰面积  $M_2$ ,计算各浓度样品提取回收率(萃取

回收率 =  $M_1 / M_2 \times 100\%$ ), 结果见表 1。

表 1 MTX 回收率及精密度(  $\bar{x} \pm s, n=5$  ) %

标示浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	萃取回收率	方法回收率	RSD	
			日内	日间
0.0369	75.4 $\pm$ 4.5	98.1 $\pm$ 3.7	4.0	4.9
0.3694	75.9 $\pm$ 3.0	99.5 $\pm$ 2.8	3.2	3.7
1.847	81.2 $\pm$ 2.9	100.9 $\pm$ 2.6	2.5	1.9

### 2.6 临床样品测定

采用以上方法对临床 40 例 ALL 患儿进行监测, 其中有 17 例患儿在首次应用 MTX 治疗后 48 h 的 MTX 血清浓度高于  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 病人出现了口腔黏膜损伤、恶心等不良反应, 加用甲酰四氢叶酸钙解救后, 症状有所缓解。其余 23 例患者中有 8 例浓度接近  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $0.38 \sim 0.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但并未出现较明显的不良反应, 其余 15 例患者 MTX 测得浓度为  $0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 远低于  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 由此说明 MTX 在 ALL 患儿中具有较大个体差异, 对其进行血药浓度监测非常有必要, 见图 2。

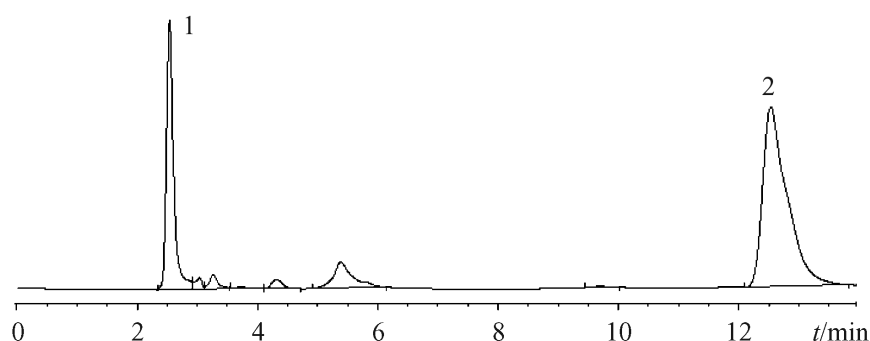


图 2 ALL 患儿血样色谱  
1. MTX; 2. 阿魏酸

### 3 讨论

测定方法的特异性是血药浓度监测方法选择的重要指标之一, 内源性物质、合并用药及药物代谢产物是影响测定方法特异性的主要因素, 其中代谢产物因与待测药物性质相近影响更明显。MTX 的主要代谢产物为 7-羟基甲氨蝶呤, 在不同测定方法中对 MTX 的测定结果有一定影响, 研究表明<sup>[3]</sup> 目前常用的快速检测方法如酶多联免疫测定技术 (EMIT), FPIA 法等均存在抗体交叉反应, 造成 MTX 测定结果偏高, 而 HPLC 强有力的分离效果, 使之成为 MTX 血药浓度测定的理想方法。这也是本文选用 HPLC 的主要原因。

血样处理方法的选择直接影响 HPLC 的应用效果, MTX 血样处理方法常用的有液-液萃取法和直接沉淀法<sup>[4]</sup>, 其中以直接沉淀法更为简便、快捷。采用直接沉淀法处理 MTX 血样时, 沉淀剂的选择至关重要。有文献报道用不同浓度的高氯酸沉淀蛋白后直接进样分析, 此法虽然快速简单, 但灵敏度稍低, 而且高浓度的高氯酸溶液对 HPLC 仪器的管路系统也有一定损伤。本法采用乙腈沉淀血清中蛋白, 再用氮气挥干, 流动相定容, 虽然较直接沉淀法繁琐, 但灵敏度比直接沉淀法要高许多而且对仪器的管路系统没有损伤。阿魏酸在本实验条件下最大吸收峰与 MTX 一致, 保留时间适中, 与目标物质和内源性物质完全分离, 不存在干扰, 因此, 本文参考有关文献<sup>[5]</sup> 选用阿魏酸作内标对 MTX 进行定量分析, 结果显示比用外标法进行定量分析更准确、可靠。

建立的 HPLC 方法测定 ALL 患儿中 MTX 血药浓度, 具有快速、简单、灵敏度高等优点, 非常适合临床 MTX 的浓度监测。

### [参考文献]

- [ 1 ] 张善堂, 杨林海, 孙言才, 等. HPLC 法测定急性淋巴细胞白血病患者血清中甲氨 呤浓度 [ J ]. 中国药房, 2008, 19(11): 825.
- [ 2 ] Fotoohi K, Skyrby T, Sderhill S, et al. Interference of 7-hydroxymethotrexate with the determination of methotrexate in plasma samples from children with acute lymphoblastic leukemia employing routine clinical assays [ J ]. J Chromatogr B, 2005, 817(2): 1391.
- [ 3 ] 薛国菊, 钱文, 田浩, 等. 单剂量肌肉注射甲氨 呤治疗异位妊娠的药物动力学 [ J ]. 华西药理学杂志, 2007, 22(3): 315.
- [ 4 ] 高科攀, 王峰, 蒋新国, 等. 大鼠血浆及脑脊液中甲氨 呤浓度的测定与应用 [ J ]. 中国临床药理学杂志, 2005, 14(1): 23.
- [ 5 ] 苏冀彦, 刘玮锦, 蔡大可, 等. HPLC 法同步测定丽安康片中阿魏酸和淫羊藿苷含量 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 46.

[责任编辑 邹晓翠]