

HPLC 测定大剂量甲氨蝶呤患者血药浓度

谢军平, 冯玲玲*, 匡霞

(开封市第一人民医院, 河南 开封 475000)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定血清中甲氨蝶呤浓度的方法。方法: 采用 Gold 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-磷酸盐缓冲液(19:81, pH 7.2), 检测波长 306 nm, 柱温 35 °C, 样品经高氯酸沉淀蛋白后, 再用氢氧化钠中和, 进样。结果: 血清样品回收率分别为 90.2%, 94.4%, 101.2%, 日内和日间误差 RSD < 9.0%, 最低检测浓度为 0.002 μmol · L⁻¹, 低浓度在 0.01 ~ 1.38 μmol · L⁻¹ 线性良好, $r = 0.9997$; 高浓度在 1.38 ~ 103.5 μmol · L⁻¹ 线性关系良好 $r = 0.9995$ 。结论: 本方法简便、灵敏、线性范围宽、准确。

[关键词] 甲氨蝶呤; 高效液相色谱; 血药浓度; 线性范围宽

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0069-04

Determination of Methotrexate Level in Plasma Using Higher Doses Methotrexate by HPLC

XIE Jun-ping, FENG Ling-ling*, KUANG Xia

(The First Hospital of Kaifeng, Kaifeng 475000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of methotrexate concentration in plasma using higher doses. **Method:** The separation was performed in a Gold column(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol: phosphate buffer (19:81, pH 7.2) and determined at 306 nm. **Result:** The measurable lowest concentration was 0.002 μmol · L⁻¹. The experiment showed that the recovery from plasma was 90.2%, 94.4%, 101.2%. The RSD of within day and between day was less than 9.0%. A good linearity was found in the range of 0.01 ~ 1.38 μmol · L⁻¹ ($r = 0.9997$) and in the range of 1.38 ~ 103.5 μmol · L⁻¹ ($r = 0.9995$). **Conclusion:** The method is simple, sensitive and accurate with wide linear dynamic range.

[Key words] Methotrexate; HPLC; drug concentration; wide linear dynamic range

甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)为叶酸类抗肿瘤药,通过竞争性抑制二氢叶酸还原酶,阻止二氢叶酸还原为四氢叶酸,推迟和阻碍 DNA 和 RNA 的合成而发挥抗肿瘤作用。临床上采用大剂量甲氨蝶呤联合甲酰四氢叶酸钙(Calcium Folate, CF)解救疗法治疗儿童急性淋巴细胞性白血病、骨肉瘤、恶性淋巴瘤等,甲氨蝶呤用量较常用量大数十倍至百倍,甲氨

蝶呤的毒性与其血药浓度有密切的关系^[1-2],尤其与 44,68 h 血药浓度的高低及持续时间关系密切,为保证使用大剂量甲氨蝶呤患者的用药安全,对患者进行甲氨蝶呤血药浓度监测尤为重要。测定甲氨蝶呤的方法现主要有微生物法、免疫法、HPLC 法,微生物法时间长,不能及时反映甲氨蝶呤的浓度;免疫分析法需要进口试剂盒,因价格高而限制了在临床使用;HPLC 具灵敏度高、专一性强、准确度高的特点,故本文改进文献报道^[3]的 HPLC 测定甲氨蝶呤血药浓度,并应用于临床,保障患者用药安全。

1 材料

1.1 仪器 日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪、CTO-10AS 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器、LCsolution

[收稿日期] 20100310(009)

[第一作者] 谢军平,本科,副主任药师,研究方向临床药学,
Tel:0378-5672547, E-mail:xjp630@163.com

[通讯作者] *冯玲玲,本科,主任药师,研究方向临床药学,
Tel:0378-5672547, E-mail:fl57@163.com

工作站、LGR16-W 高速冷冻离心机(北京京立离心机有限公司)、涡旋混合器。

1.2 试药 甲氨蝶呤对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100138-200603),甲醇为色谱纯(天津彪仕奇科技发展有限公司),氢氧化钠、高氯酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠为分析纯试剂,空白血浆为正常人血清。

2 方法与结果

2.1 标准溶液配置 精密称取甲氨蝶呤对照品适量于量瓶中,加入甲醇适量,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 0.1 mL ,摇匀后加甲醇定容,配制成 $230 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的高浓度储备液。取适量该储备液于另一量瓶,加甲醇定容,配制成 $1.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低浓度储备液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

2.2 色谱条件 色谱柱为 Hypersil GOLD 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) 大连伊力特分析仪器有限公司,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,流动相甲醇-磷酸盐缓冲液 (19:81, pH 7.2,) 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为 306 nm 。

2.3 血清样品处理 取血清 0.5 mL 于 1.5 mL 的离心管中,边涡旋边滴加 20% 的高氯酸溶液 $80 \mu\text{L}$, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min ,取上清液 0.3 mL ,加入饱和氢氧化钠溶液 $10 \mu\text{L}$,混匀, $20 \mu\text{L}$ 进样分析。

2.4 线性关系考察 分别精密加入低浓度储备液 $5, 30, 100, 200 \mu\text{L}$,高浓度储备液 $3, 15, 60, 100, 225 \mu\text{L}$,氮气吹干,分别加入空白血清 0.5 mL ,混匀,配制成浓度为 $0.01, 0.07, 0.23, 0.46, 1.38, 6.9, 27.6, 46.0, 103.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列血清样品,按 2.3 项下处理后进样,采用外标法,以甲氨蝶呤浓度 (X) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归,因浓度范围较宽,为提高准确度,标准曲线分两段计算,结果低浓度在 $0.01 \sim 1.38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性良好, $r = 0.9997$;高浓度在 $1.38 \sim 103.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系好, $r = 0.9995$ 。

2.5 专属性考察 空白血浆、标准血清样品及患者用药后的血清样品,按 2.3 项方法处理后进样,考察甲氨蝶呤的色谱行为。结果,空白血清图谱在甲氨蝶呤出峰处无干扰峰、甲氨蝶呤峰形尖锐,保留时间为 11 min ,内源性物质、合并用药(地塞米松、阿糖胞苷、CF)及甲氨蝶呤代谢产物对甲氨蝶呤的测定均无干扰,见图 1。

2.6 绝对回收率与方法回收率试验 取储备液适量,配成浓度分别为 $0.23, 6.75, 45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准

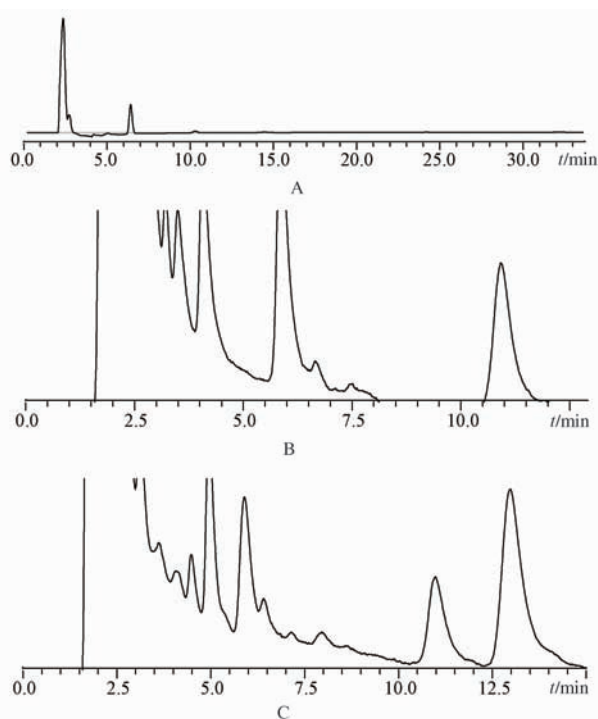


图 1 空白血清(A)标准血清(B)及患者血清(C)色谱图

血样各 3 份。按 2.3 项下样品预处理方法操作,记录样品峰面积;同时配制同样浓度的对照品溶液,直接进样,测得的峰面积与标准血样峰面积分别比较,面积之比得绝对回收率;把上述 3 个标准血样测得的峰面积代入标准方程,计算浓度与其实际之比,得方法回收率。结果见表 1。

表 1 绝对回收率及方法回收率 ($n = 5$)

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	绝对回收率/%	方法回收率/%
0.23	92.7	90.2
6.90	96.1	94.4
46.0	104.1	101.2

2.7 日内、日间误差试验 配制上述 3 种浓度血清样品,按 2.3 项下处理,进样,连测 5 d,计算日内、日间误差,结果见表 2。

表 2 日内、日间误差结果 ($n = 5$)

理论浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	日内误差/%	日间误差/%
0.23	6.5	8.4
6.90	3.6	4.2
46.0	2.4	3.6

3 临床应用结果

监测 2008 ~ 2009 年入住我院血液科及肿瘤科的 12 例使用大剂量甲氨蝶呤的患者,监测其血药浓度,结果见表 3。

表 3 患者基本情况、用药情况及血药浓度

No.	疾病	年龄 /岁	性别	用药剂量 /g · m ⁻²	24 h /μmol · L ⁻¹	44 h /μmol · L ⁻¹	68 h /μmol · L ⁻¹	92 h /μmol · L ⁻¹
1	恶性淋巴瘤	46	女	3.0	62.1	0.86	0.33	0.10
2	浆细胞肉芽肿	52	男	0.2	3.17	0.11	0.03	
3	恶性淋巴瘤	46	女	3.0	20.1	0.02	未检出	
4	急性淋巴细胞白血病	16	女	5.0	42.7	0.37	0.01	
5	急性淋巴细胞白血病	10	女	5.0	26.8	0.37	0.09	
6	急性淋巴细胞白血病	10	女	5.0	78.4	1.6	0.02	
7	急性淋巴细胞白血病	10	女	5.0	68.9	0.43	0.13	0.08
8	急性淋巴细胞白血病	16	女	5.0	13.5	0.79	0.62	0.1
9	急性淋巴细胞白血病	10	女	5.0	19.2	0.46	0.20	0.05
10	急性淋巴细胞白血病	10	女	5.0	62.0	0.75	0.16	0.1
11	恶性淋巴瘤	18	男	0.9	19.6	0.22	0.09	
12	急性淋巴细胞白血病	16	女	5.0	64.8	0.66	0.09	

药物静脉滴注结束时的血药浓度称为稳态血药浓度,文献报道^[4],大剂量甲氨蝶呤化疗时有效血药浓度为 10 ~ 100 μmol · L⁻¹,此浓度反映甲氨蝶呤的治疗效果,部分患者(多为年龄稍大者)的稳态血药浓度处于正常范围的下限,说明甲氨蝶呤的用量存在不足的现象,有文献报道^[5],甲氨蝶呤的用量可用至 1 ~ 10 g · m⁻²,故在监测甲氨蝶呤血药浓度的条件下,可适当增加其用量,以保证临床疗效。44,68 h 甲氨蝶呤的血药浓度是反映其在体内排泄情况的指标^[6],毒性反应与用药后 44,68 h 的血药浓度有关,对于 44,68 h 血药浓度大于安全浓度范围(安全浓度范围分别为 1.0 μmol · L⁻¹, 0.1 μmol · L⁻¹)的患者,加强甲酰四氢叶酸钙的解救剂量与解救次数,所以,患者未出现严重的不良反应,多为 II 度的胃肠道反应。

4 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的影响更明显。HPLC 因强力的分离效果,可将甲氨蝶呤和其主要产物 7-羟基甲氨蝶呤完全分离。甲氨蝶呤大剂量冲击疗法中,常联合甲氨蝶呤、地塞米松、阿糖胞苷三联鞘注,通过观察,地塞米松、阿糖胞苷对甲氨蝶呤的测定没有干扰,HPLC 是甲氨蝶呤血药浓度测定的理想方法。

血样处理方法的选择直接影响 HPLC 的测定效果,甲氨蝶呤血样处理方法常用的有液-液萃取法、

沉淀纯化法^[7]和直接沉淀法,但以后者更为简便、快捷。直接沉淀法处理血样时,沉淀剂的选择至关重要。甲氨蝶呤不溶于甲醇和乙腈,所以甲醇和乙腈不能用来沉淀蛋白质,用三氯醋酸作为蛋白沉淀剂,则血浆杂质峰较多,用高氯酸沉淀蛋白质,杂质峰较少,但可引起基线的漂移,经氢氧化钠调节 pH 后,基线漂移可得到明显改善,并能够防止强酸对进样器造成腐蚀。

大剂量甲氨蝶呤冲击疗法中,血清甲氨蝶呤的稳态血药浓度和代谢后甲氨蝶呤血药浓度相差甚大,标准曲线范围要求较宽,将标准曲线采用分段回归的方法,浓度由低到高,取得较好的结果,本方法灵敏度高,线性良好,线性范围大,日内、日间误差均较小。

该方法应用于临床,共监测 12 例患者血药浓度,对高于安全浓度范围的患者加强甲酰四氢叶酸钙的解救,保障了患者用药安全,无严重毒性反应发生。

[参考文献]

- [1] 刘桂兰,李红丽,殷惠君,等. 儿童髓外白血病中甲氨蝶呤防治剂量的研究(附 13 例报告)[J]. 临床儿科杂志,1993,11(3):17.
- [2] 李照民,陆婉琴,孔令琪,等. 甲氨蝶呤的临床药理-血药浓度与毒性相关的初步观察[J]. 上海第一医学院学报,1980,7:406.
- [3] 曾东向,向芳. 反相高效液相色谱法监测患者血浆中甲氨蝶呤浓度[J]. 医药导报,2004,23(3):194.

[4] Wang Y M, Kim P Y, Lantin E, et al. Dgradation and clearanee of methotrexate in children with osteosarcoma receiving highdose infusion [J]. Edic Pediat Oncology, 1978,4:221.

[5] 李黎波,李金翰,徐峰. 大剂量甲氨蝶呤静滴后解救剂甲酰四氢叶酸钙的个体化用药[J]. 实用癌症杂志, 1995,10(4):261.

[6] 叶辉,顾龙君,陈静,等. 儿童急性淋巴细胞白血病大剂量甲氨蝶呤治疗研究[J]. 中华血液学杂志,2001,22(7):385.

[7] 葛勇前,陆国春. HPLC 法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度[J]. 药物分析杂志,2001,21(6):418.

[责任编辑 顾雪竹]

(上接第 68 页)

菌对照组:取 10 mL 的胆盐乳糖发酵培养基 1 支,加入 1:10 的供试液和金黄色葡萄球菌菌液各 1 mL (约含菌量 10~100 CFU),于 35℃~37℃培养 24 h。试验组检出,阴性组未检出。

2.3.2.3 沙门菌检查法的验证(常规法) ①试验组取供试液 10 mL 及 1 mL 沙门菌悬液加入 100 mL 营养肉汤培养基中,于 35℃~37℃培养 24 h。②阴性菌对照组取供试液 10 mL 及 1 mL 金黄色葡萄球菌悬液(约含菌量 10~100 CFU)加入 100 mL 营养肉汤培养基,于 35℃~37℃培养 24 h。试验组检出,阴性组未检出。

2.4 结果 姜胆咳喘片微生物限度检查方法试验结果为细菌计数采用离心沉淀集菌和培养基稀释联用的方法;霉菌和酵母菌计数采用常规法;控制菌检查采用常规法。

3 讨论

由于姜胆咳喘片是含有多种成分的复方中成药制剂,其中任何具有抑菌作用成分均可影响微生物

限度检查的准确性^[3]。根据本品细菌计数常规法的结果,必须采取其他试验方法去除药物的抑菌作用从而真实反映药物受污染的程度。姜胆咳喘片中各味药多以生药粉入药,故考虑将制备好的供试品溶液采用离心沉淀集菌法来除去大部分药物的抑菌作用,结合培养基稀释法来提高菌落的检出率。

试验证明姜胆咳喘片对白色念珠菌和黑曲霉均无抑菌作用,故霉菌和酵母菌计数采用常规法。姜胆咳喘片对大肠埃希菌和沙门菌无抑菌作用,控制菌检查阳性对照组生长良好,阴性菌对照组未检出,故控制菌检查采用常规法。

[参考文献]

[1] 马越,特玉香,杜平华,等. 16 种中成药微生物限度检查方法验证[J]. 中国药品标准,2005,6(6):12.

[2] 中国药典. 一部[S]. 2005:附录 71.

[3] 赵建英,李爱玲,陆蓓. 含黄芩中药成分微生物限度检查方法的验证[J]. 中国药业,2004,13(11):44.

[责任编辑 顾雪竹]