

# 优化的HPLC法测定人血清中甲氨蝶呤的浓度及临床应用

柳惠斌\*, 韩 静, 买尔旦·马合木提\*(新疆医科大学附属肿瘤医院, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R969.1; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)14-1283-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.14.13

**摘要** 目的: 建立及优化测定人血清中甲氨蝶呤(MTX)浓度的方法。方法: 血样采用15%高氯酸溶液处理后采用高效液相色谱法(HPLC)进样测定。色谱柱为大连依利特 ODS C<sub>18</sub>, 流动相为甲醇-10 mmol/L 磷酸二氢钾(20:80, 用氢氧化钠调 pH 6.5), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 35 ℃, 紫外检测波长为 303 nm。结果: MTX 血药浓度在 0.1~64 μmol/L 范围内线性关系良好( $r=0.9995$ )。MTX 低、中、高 3 种浓度的日内 RSD 分别为 2.70%、1.08%、0.94%, 日间 RSD 分别为 4.36%、2.71%、1.95% ( $n=5$ ), 提取回收率分别为 70.9%、78.3%、75.4%, 最低检测限为 0.03 μmol/L。结论: 优化后的方法准确可靠、灵敏度高、重现性好, 适用于大剂量 MTX 血药浓度监测。

**关键词** 甲氨蝶呤; 高效液相色谱; 血药浓度

## Concentration Determination of Methotrexate in Human Serum by Optimized HPLC and Clinical Application

LIU Hui-bin, HAN Jing, Maierdan · Mahemuti (The Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish and optimize HPLC method for concentration determination of methotrexate (MTX) in human serum. METHODS: Blood samples were treated with 15% Perchloric acid solution. The determination was performed on ODS C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-10 mmol/L potassium dihydrogen phosphate (20:80, pH adjusted to 6.0 using sodium hydroxide) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was set at 35 ℃, and UV detection wavelength was set at 303 nm. RESULTS: The linear range of MTX was 0.1-64 μmol/L ( $r=0.9995$ ). Intra-day RSDs of low, medium and high concentrations of MTX were 2.70%, 1.08% and 0.94%, and inter-day RSDs of them were 4.36%, 2.71% and 1.95%, respectively ( $n=5$ ). The extraction recoveries were 70.9%, 78.3% and 75.4%, respectively. The lowest detection limit was 0.03 μmol/L. CONCLUSIONS: The optimized method is accurate, reliable, sensitive and reproducible, and can be used for the serum concentration monitoring of large-dose MTX in the clinic.

**KEYWORDS** Methotrexate; HPLC; Serum concentration

甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)为二氢叶酸还原酶抑制剂,大剂量 MTX 化疗在临床上广泛用于治疗白血病、淋巴瘤、骨肉瘤等恶性肿瘤及其他相关疾病。MTX 治疗指数低、毒性强,且个体代谢差异明显,大剂量给药后较易引起骨髓抑制、神经毒性、肾小管阻塞和损伤等严重不良反应。血药浓度监测能有效反映 MTX 在体内的浓度变化过程,为临床个体化治疗与解救提供参考,从而大大提高临床用药的安全性,增强疗效。目前测定 MTX 血药浓度常用的方法有高效液相色谱(HPLC)法及荧光偏振免疫分析(FPIA)法, FPIA 法需要专用试剂盒、成本昂贵,而 HPLC 法具有专属性强、灵敏度高、成本低的优点,更适于在临床推广应用。本文建立了以高氯酸直接沉淀蛋白,以 HPLC 外标法测定人血清 MTX 浓度的分析方法,现将结果报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪,包括 PDA 紫外检测器,Empower 3 数据采集处理工作站(美国 Waters 公司);Labofuge<sup>®</sup>400/400R 高速低温离心机(美国贺利氏公司);HSC-24A 氮吹仪(天津恒高科

\* 副主任药师,博士研究生。研究方向:抗肿瘤药物分子药理学及体内药物分析。电话:0991-7819430。E-mail:1047893820@qq.com

# 通信作者:主任药师,硕士研究生导师。研究方向:天然药物的药理作用研究及有效成分分析。电话:0991-7968007。E-mail:maierdan60@sina.com

技发展有限公司);VORTEX-5 微型涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

MTX 标准品(中国药品生物制品检定研究院,纯度:99%,批号:GFWS-W755);甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾、氢氧化钠、高氯酸等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:大连依利特 ODS C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-10 mmol/L 磷酸二氢钾(20:80, 用氢氧化钠调 pH 6.5);紫外检测波长:303 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:35 ℃;进样量:5 μl。在该色谱条件下,甲氨蝶呤(MTX)标准品与患者血清中 MTX 的保留时间一致,均为 5.63 min,且血清中内源性杂质对测定无干扰,方法专属性较好,色谱见图 1。

### 2.2 标准溶液的配制

准确称取 MTX 标准品适量溶于甲醇中,并加入 1 mol/L NaOH 0.1 ml,混匀后加甲醇定容,配成 1 mmol/L 贮备液,置 4 ℃冰箱中保存,使用时稀释至所需浓度。

### 2.3 血清样品的处理

精密吸取血清样品 100 μl,滴加 15% 高氯酸溶液 100 μl,涡旋混合 30 s,以离心半径为 8 cm、10 000 r/min 离心 20 min,取上清液 180 μl 置于另一干净离心管中,加入 4 mol/L 氢氧化钠溶液 10 μl 涡旋混合 30 s,取 5 μl 进样分析。

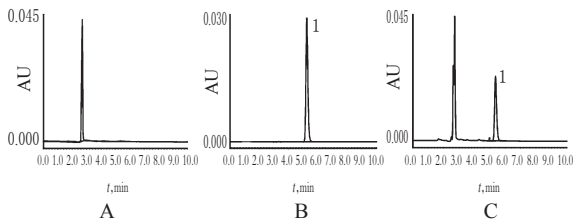


图1 高效液相色谱图

A. 空白血清; B. MTX 标准溶液(32 μmol/L); C. 标准血清样品(32 μmol/L); 1.MTX

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank serum; B. MTX reference solution (32 μmol/L); C. serum standard (32 μmol/L); 1.MTX

## 2.4 标准曲线的制备与最低检测限考察

精密吸取 MTX 贮备液适量,分别加入正常人空白血清 100 μl 使 MTX 血清样品终浓度分别为 0.1、0.5、1.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 μmol/L。采用“2.3”项方法处理血清后,取 5 μl 进样测定,记录样品峰面积。以 MTX 浓度(x)为横坐标、测得的 MTX 峰面积平均值(y)为纵坐标求得直线回归方程为  $y = 5.81 \times 10^3 x + 2.23 \times 10^3$  ( $r = 0.9995$ )。以样本信噪比为 3 作为最小可检测的信号,得最低检测限为 0.03 μmol/L。

## 2.5 精密度及提取回收率试验

取空白血清 100 μl,分别加入 MTX 贮备液适量,配制成低、中、高(0.5、4.0、32.0 μmol/L)3种浓度的样品,按“2.3”项方法对样品处理进样,测得 MTX 峰面积  $A_1$ ;同时配制与上述浓度血清样品相同浓度的 MTX 甲醇标准品溶液直接进样,测得 MTX 峰面积  $A_2$ ,计算各浓度样品提取回收率(提取回收率 =  $A_1/A_2 \times 100\%$ ),结果见表 1。另自配制样品之日开始,每日取低、中、高 3 种浓度血清样品测定,10 个工作日内完成 5 次测定,计算日间 RSD 值;各浓度血清样品单日内重复测定 5 次,计算日内 RSD 值,结果见表 1。

表 1 提取回收率及精密度试验结果(n=5)

Tab 1 Results of recovery and precision tests(n=5)

质量浓度, μmol/L	精密度		提取回收率 ( $\bar{x} \pm s$ ), %
	日内 RSD, %	日间 RSD, %	
0.5	2.70	4.36	70.9 ± 6.37
4.0	1.08	2.71	78.3 ± 3.29
32.0	0.94	1.95	75.4 ± 4.16

## 2.6 稳定性试验

配制低、中、高(0.5、4.0、32.0 μmol/L)浓度的 3 组血清样品,按“2.3”项方法处理后分别于 4 °C 放置或 -20 °C 冻存,在 0、2、4、12、24、48 h 各时间点测得的浓度见表 2。结果表明,血清样品按“2.3”项方法处理后 48 h 内测定,结果差异无统计学意义。

表 2 除蛋白后不同时间的 MTX 血药浓度测定结果( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

Tab 2 Serum concentrations of MTX at different time points after protein precipitation( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

时间, h	测得浓度, μmol/L (4 °C)			测得浓度, μmol/L (-20 °C)		
	0.5	4.0	32.0	0.5	4.0	32.0
0	0.50 ± 3.38	4.06 ± 1.68	32.6 ± 2.23	0.50 ± 2.95	4.03 ± 1.95	32.1 ± 2.84
2	0.50 ± 2.40	3.96 ± 1.06	31.8 ± 3.39	0.52 ± 3.58	3.91 ± 3.02	33.3 ± 3.04
4	0.51 ± 3.24	4.32 ± 2.95	32.2 ± 2.86	0.49 ± 2.62	4.11 ± 3.02	30.9 ± 4.09
12	0.48 ± 3.20	4.12 ± 1.87	31.9 ± 4.02	0.50 ± 3.25	3.96 ± 2.72	32.1 ± 3.65
24	0.49 ± 2.37	4.05 ± 3.05	32.1 ± 3.09	0.48 ± 2.62	4.09 ± 2.95	31.6 ± 4.15
48	0.52 ± 2.74	3.88 ± 2.62	32.4 ± 3.87	0.51 ± 1.58	4.05 ± 3.26	32.9 ± 3.64

## 2.7 取血后不同时间加入高氯酸对血药浓度的影响

采集正常人血清充分混合后立即精密吸取 100 μl 置于 1.5 ml 离心管中,加入 MTX 贮备液使其终浓度为 4.0 μmol/L 并于 4 °C 放置;于加入 MTX 后的 0、2、4、12、24、48 h 时按“2.3”项方法处理血清样品,考察样品前处理方法对 MTX 稳定性的影响,即血清中的 MTX 是否会发生降解。结果表明,血清中 MTX 在 4 °C 放置,于 48 h 内血药浓度测定结果与 0 h 比较均无明显差异,结果见图 2。

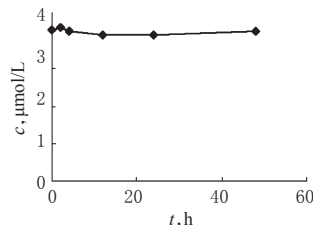


图 2 不同时间血清中 MTX 检测结果

Fig 2 Determination results of MTX at different time points

## 2.8 临床应用

恶性淋巴瘤患者 20 例,男性 17 例,女性 3 例,年龄(36.3 ± 4.3)岁,体质量(65.8 ± 3.9)kg,给药前肝肾功能正常。MTX 按 3 g/m<sup>2</sup> 剂量输液泵持续给药 24 h,给药结束后立即用四氢叶酸钙(CF)解救,首次解救剂量为 50 mg/m<sup>2</sup>,以后每 6 h 以 15 mg/m<sup>2</sup> 剂量静脉推注 CF 直至 MTX 血药浓度低于 0.1 μmol/L 停止解救。于开始滴入 MTX 后 24、48、72 h 时分别抽取静脉血 2 ml,离心分离血清后,按“2.3”项方法处理并测定,其中 6 例/次在 72 h 时间点未能检出,结果见表 3。

表 3 患者血清中 MTX 浓度的测定结果

Tab 3 Determination results of MTX in serum samples

时间, h	例数	浓度( $\bar{x} \pm s$ ), μmol/L	变异系数, %
24	31	36.50 ± 6.93	20.53
48	31	0.78 ± 1.16	59.62
72	25	0.10 ± 0.43	75.37

由表 3 可见,各时间点 MTX 血药浓度呈现明显的个体差异,其中以 48 h 和 72 h 时的个体差异最明显。

## 3 讨论

大剂量 MTX(3~8 g/m<sup>2</sup>)化疗是临床上治疗急性白血病、骨肉瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤的常规疗法,剂量过大时部分患者会产生骨髓抑制、肾脏毒性、黏膜毒性,严重者致死亡<sup>[1]</sup>。有研究证明,MTX 的毒性与其暴露于正常浓度上限的时间密切相关,而 MTX 的血药浓度可能与用药剂量、联合用药及患者年龄等多种因素有关,故针对不同个体采用统一的解救方式不能很好预防严重不良反应,血药浓度监测即显得尤为重要。

血液样本处理方法的选择直接影响 HPLC 法测定结果的准确性。文献报道常用的蛋白沉淀剂有甲醇、乙腈、三氯乙酸及高氯酸<sup>[2-5]</sup>。本试验分别选用上述 4 种试剂除蛋白,并进行对比试验研究。结果发现:甲醇、乙腈二者的提取回收率均低于 40%,可能与 MTX 在纯甲醇或乙腈中溶解度小、沉淀吸附、氮吹过程导致的损失有关;三氯乙酸提取回收率虽然能达到 70% 以上,但杂质峰较多干扰测定;而选用高氯酸时,笔者考察了不同体积比高氯酸沉淀蛋白的效果,结果显示等体积比高氯酸(15%)沉淀蛋白,不但杂质峰干扰小,低、中、高 3 个浓度的提取回收率均能满足检测要求。样品提取液中加入 4 mol/L 氢氧化钾溶液中和酸性,有利于保护仪器管路及色谱柱。

# 我院2010年7月—2013年6月ICU革兰阴性杆菌分布及耐药性分析

蔡旭镇\*, 黄丽娜, 张泽伟, 郑少锋, 吴珊珊(揭阳市人民医院, 广东 揭阳 522000)

中图分类号 R969.3;R378.2;R446.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)14-1285-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.14.14

**摘要** 目的:了解我院重症监护病房(ICU)革兰阴性(G<sup>-</sup>)杆菌的分布及耐药情况,为临床合理、规范地使用抗菌药物提供参考。方法:采用WHONET 5.4软件,对我院2010年7月—2013年6月ICU患者送检标本中分离的593株G<sup>-</sup>杆菌的分布及耐药状况进行回顾性分析。结果:我院ICU分离率最高的G<sup>-</sup>杆菌依次是鲍曼不动杆菌(189株,占31.9%)、肺炎克雷伯菌(125株,占21.1%)、大肠埃希菌(77株,占13.0%)、铜绿假单胞菌(60株,占10.1%)。593株G<sup>-</sup>杆菌对常用抗菌药物均表现出不同程度的耐药性,耐药率较低的是亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星。对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星,鲍曼不动杆菌的耐药率分别为70.9%、87.3%、84.1%,铜绿假单胞菌的耐药率分别为36.7%、35.0%、25.0%,肺炎克雷伯菌的耐药率分别为8.0%、21.6%、13.6%,大肠埃希菌的耐药率分别为5.2%、11.7%、10.4%。结论:我院ICU住院患者G<sup>-</sup>杆菌的耐药性较严重,耐药率较低的只有亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星,临床医师应尽量以药敏试验结果为参考合理选用抗菌药物。

**关键词** 重症监护病房;革兰阴性杆菌;耐药性

## Distribution and Drug Resistance of Gram-negative Bacilli in Our Hospital from Jul. 2010 to Jun. 2013

CAI Xu-zhen, HUANG Li-na, ZHANG Ze-wei, ZHENG Shao-feng, WU Shan-shan (Jieyang Municipal People's Hospital, Guangdong Jieyang 522000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To understand the distribution and drug resistance of Gram-negative (G<sup>-</sup>) bacilli in intensive care unit (ICU), and to provide reference for rational and standard use of antibiotics in the clinic. METHODS: Using WHONET 5.4 software, the distribution and drug resistance of 593 G<sup>-</sup> bacilli strains isolated from ICU patients during Jul. 2010 to Jun. 2013 were analyzed retrospectively. RESULTS: In our hospital, the G<sup>-</sup> bacilli with highest isolation rates in the ICU were *Acinetobacter baumannii* (189 strains, 31.9%), *Klebsiella pneumoniae* (125 strains, 21.1%), *Escherichia coli* (77 strains, 13.0%) and *Pseudomonas aeruginosa* (60 strains, 10.1%). 593 strains of G<sup>-</sup> bacilli showed different degrees of drug resistance to the commonly used antibiotics, and showed the lower drug resistance rates to imipenem, piperacillin/tazobactam and amikacin to imipenem, piperacillin/ tazobactam, amikacin, the resistance rates of *A. baumannii* were 70.9%, 87.3%, 84.1%; the resistance rates of *P. aeruginosa* were 36.7%, 35.0% and 25.0%; the resistance rates of *K. pneumoniae* were 8.0%, 21.6%, 13.6%; the resistance rates of *E. coli* were 5.2%, 11.7% and 10.4%. CONCLUSIONS: Drug resistance of G<sup>-</sup> bacilli in ICU inpatients is serious, only imipenem, piperacillin / tazobactam and amikacin show lower drug resistance. Clinicians should try best to use antibiotics according to the result of drug sensitivity test.

**KEYWORDS** Intensive care unit; Gram-negative bacilli; Drug resistance

文献报道,血中含有的胞苷脱氨酶能引起抗肿瘤药阿糖胞苷(Ara-c)脱氨降解为无活性的阿糖尿苷<sup>[6]</sup>。MTX同Ara-c结构类似,分子中也含有伯氨基,为考查血清中该类酶是否能引起MTX的降解、转化,本文检测了血清中MTX的稳定性。试验结果表明,采血后立刻离心,并将血清放置于4℃保存,48h内其测定结果与0h无显著性差异,为临床采血后标本处理给出了合理化建议。

采用本方法检测MTX血药浓度,其灵敏度、准确性及重现性均可满足临床血药浓度监测及药动力学研究的要求,为MTX的临床药理研究、实现个体化给药、避免或减少蓄积中毒提供了重要依据。

### 参考文献

[1] 詹其林,丁美琪,潘民,等.大剂量甲氨蝶呤治疗急性淋巴

\* 副主任药师。研究方向:临床药学、药事管理。电话:0663-8660319。E-mail:15302520828@163.com

细胞白血病和淋巴瘤副作用观察[J].内科急危重症杂志,2008,14(4):207.

[2] 李金恒.临床治疗药物监测的方法和应用[M].北京:人民卫生出版社,2003:122.

[3] 刘文,邓楠,戴迎春.HPLC测定急性淋巴细胞白血病患儿血清中甲氨蝶呤浓度[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):108.

[4] 余忠,肖晶晶.HPLC法测定甲氨蝶呤的血药浓度[J].中外健康文摘,2012,9(16):65.

[5] 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.

[6] 马普,王志海.高效液相色谱法测定阿糖胞苷的血药浓度[J].基层医学论坛,2003,7(6):524.

(收稿日期:2013-09-11 修回日期:2013-10-12)