

HPLC-MS/MS 法测定白血病患者血浆甲氨蝶呤浓度

王磊, 张阳, 刘红星, 赵建超, 陶蓓蓓

(河北燕达医院陆道培血液肿瘤中心, 河北 三河 065201)

【摘要】目的: 建立测定白血病患者使用大剂量甲氨蝶呤化疗后血浆中甲氨蝶呤浓度的 HPLC-MS/MS 法, 并应用于临床治疗药物监测, 为临床合理用药提供可靠依据。**方法:** 采用多索茶碱作内标, 血浆样品经含内标甲醇沉淀蛋白处理。色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈, 柱温 40 °C, 流速 0.75 mL·min⁻¹, 流动相为含 0.1% 甲酸和 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵的水溶液和含 0.1% 甲酸的甲醇溶液, 梯度洗脱。质谱检测方式为电喷雾离子阱正离子模式, MRM 扫描, 监测甲氨蝶呤 m/z 455.200 → 308.200, 多索茶碱 m/z 267.100 → 181.100。**结果:** 甲氨蝶呤浓度在 0.022~2.200 μmol·L⁻¹ 内线性关系良好, $Y=4.56X+0.081$ ($r=0.996\ 0$)。**结论:** 该方法简便、准确、快速, 检测的特异性及灵敏度高, 适用于甲氨蝶呤的血药浓度测定。

【关键词】 甲氨蝶呤; 高效液相质谱联用; 治疗药物监测

【中图分类号】 R969.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2015)02-0045-04

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2015.02.011

Determination of methotrexate in leukemia patients plasma by HPLC-MS/MS

WANG Lei, ZHANG Yang, LIU Hong-xing, ZHAO Jian-chao, TAO Bei-bei

(Hematology and Oncology Center, Yanda Hospital of Hebei Province, sanhe 065201, China)

【Abstract】Objective: To establish a HPLC-MS/MS method to determine methotrexate in Leukemia patients plasma. **Methods:** The method employs a direct precipitation with methanol containing doxofylline as the internal standard and a reversed phase separation in an Ultimate XB-C₁₈ column. Mobile phase was a mixture of water (containing 2mmol·L⁻¹ ammonium acetate and 0.1% formic acid) and methanol (containing 0.1% formic acid). The flow rate was 0.75 mL·min⁻¹ and the column temperature was 40 °C. Mass spectrometric analysis was performed in positive ion mode and the multiple reaction monitoring transitions of m/z 455.200 → 308.200 and m/z 267.100 → 181.100 were used to quantify methotrexate and doxofylline (internal standard), respectively. **Results:** The calibration curve of methotrexate was linear within range of 0.022~2.200 μmol·L⁻¹, $Y=4.56X+0.081$, $r=0.996\ 0$. **Conclusion:** This method is convenient, accurate and rapid and it is suitable for detecting methotrexate in leukemia patients plasma.

【Keywords】 methotrexate; HPLC-MS/MS; TDM

甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 是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。目前广泛用于治疗淋巴性白血病、淋巴瘤、绒毛上皮癌和骨肉瘤等恶性肿瘤。有研究^[1]表明, 白血病患者 MTX 血药浓度与不良反应和疗效之间存在密切关系且个体差异大、治疗窗窄、毒性大。为安全有效地实施 MTX 给药, 监测 MTX 用药后的血药浓度尤为必要。目前测定 MTX 血药浓度的方法^[2]有微生物法、荧光偏振免疫分析

法、高效液相色谱法。微生物法费时、烦琐; 荧光偏振免疫分析法成本昂贵, 且专一性差, 难以推广, 而且由于代谢产物的存在, 抗体可能交叉反应使测定结果偏高; 高效液相分析法样品处理繁琐、灵敏度不够; 而 HPLC-MS/MS 法^[3]测定 MTX 血药浓度比 HPLC 法专一性强、灵敏度高且分析时间短, 更适合广泛应用。笔者参考相关文献, 建立优化的 HPLC-MS/MS 法测定 MTX 血药浓度的方法并用于白血病患者监测, 为临床合理用药提供依据。

【收稿日期】2014-11-28

【作者简介】王磊, 男, 硕士, 药师, 研究方向: 医院药学, Tel:13930651273, E-mail:rosie1982@163.com

1 材料

1.1 仪器设备

岛津 HPLC 20A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司, 带自动进样器), Qtrap 4 000 离子阱检测器 (美国 AB 公司), 色谱化学工作站 (美国 AB 公司), VORTEX QI LIN BEI ER (其林贝尔涡旋混合器), 全自动高速冷冻离心机 (Thermo Fisher), 电子天平 (瑞士 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

对照品, MTX (批号: 100138), 内标, 多索茶碱 (批号: 100625) (中国食品药品检定研究院); 甲醇、甲酸、醋酸铵为色谱纯, 水为超纯水, 其余均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件

2.1.1 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 50 mm, 5 μm), 流速 0.75 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 流动相 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵 -0.1% 甲酸水溶液 (B)-0.1% 甲酸甲醇溶液 (A), 进样量 1 μL, 洗脱方式: 梯度洗脱, 其中 0.01~0.2 min, A 相浓度从 5%~78%, ~0.4 min A 相浓度从 78%~90%, ~0.6 min A 相浓度从 90%~95%, ~0.8 min A 相浓度从 95%~90%, ~1.0 min A 相浓度从 90%~78%, ~1.2 min A 相浓度从 78%~5%, 保持 1.8 min。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI); 正离子模式^[4]; 离子喷射电压 (IS): 5 500 V; 离子源温度 (TEM): 600 °C; 源内气体 1 (GS1, N₂) 压力: 344.75 kPa; 气体 2 (GS2, N₂) 压力: 413.7 kPa; 空气压缩机压力: 0.4 MPa; 扫描方式为多重反应监测 (MRM); DP 电压: 90 V; 碰撞气 (N₂) 压力: Medium; MTX 的碰撞诱导解离 (CID) 电压为 33 V。内标多索茶碱检测离子对为 267.100~181.100。MTX 和多索茶碱的保留时间分别为 1.4, 1.6 min。MTX 和多索茶碱的碎片离子质谱图见图 1, 色谱图与标准曲线见图 2。

2.2 对照品和内标溶液的配制

精密称取 MTX 对照品 0.500 0 mg, 加甲醇 - 超纯水 (50/50) 溶解并定容至 10 mL, 于冰箱 -80 °C 避光保存^[5]。临用时用甲醇 - 超纯水 (50/50) 稀释成所需浓度的 MTX 对照品溶液 (0.220, 0.550, 1.100, 2.200, 5.500, 11.000,

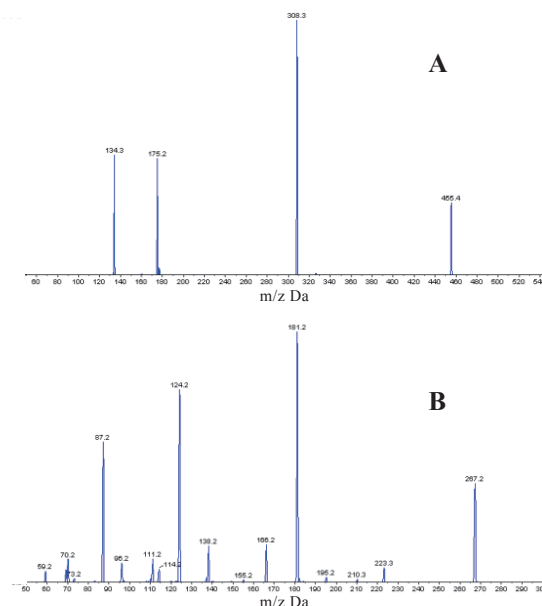


图 1 MTX (A) 和多索茶碱 (B) 的二级扫描碎片离子

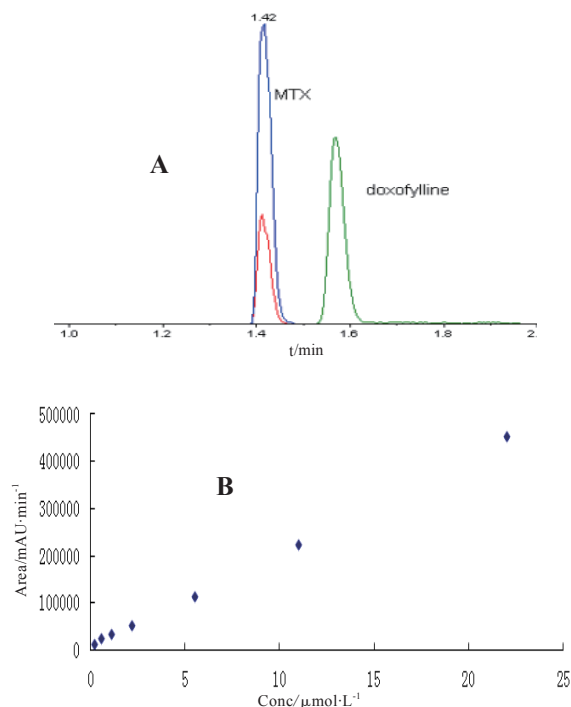


图 2 MTX 和多索茶碱色谱 (A) 及 MTX 标准曲线 (B)

22.000 μmol·L⁻¹)。同理, 用甲醇稀释多索茶碱母液至 0.56 μmol·L⁻¹。

2.3 样品处理

取 100 μL 含药血浆加至 1.5 mL 离心管中^[6], 加入 100 mmol·L⁻¹ 硫酸锌溶液 100 μL, 再加入 0.56 μmol·L⁻¹ 多索茶碱溶液 300 μL, 涡旋 30 s, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。吸取上清液于样品管中, 自动进样 1 μL。

2.4 标准曲线的绘制

取空白血浆 90 μL 7 份, 分别加入浓度为 0.220, 0.550, 1.100, 2.200, 5.500, 11.000, 22.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTX 对照品^[7]溶液 10 μL , 加入 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锌溶液 100 μL , 加入 0.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 多索茶碱溶液 300 μL , 涡旋 30 s, 10 000 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。吸取上清液于样品管中, 自动进样 1 μL 。经 HPLC-MS/MS 分析, 以甲氨蝶呤峰面积与内标峰面积之比 (Y) 作纵坐标, 以血浆甲氨蝶呤浓度 (X) 为横坐标, 得到直线方程为 $Y=4.56X+0.081(r=0.9960)$ 。结果表明, 甲氨蝶呤血药浓度在 0.022~2.200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。标准曲线图 2 (B)。

2.5 精密度试验

取高、中、低 (1.650, 0.605, 0.165 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 种浓度的质量控制 (QC) 样品各 5 个, 连续测定 6 h, 连测 3 d, 根据当天的标准曲线, 计算 QC 样品的

表 1 加入浓度与回收率及精密度试验结果. $n=5$, $\bar{x} \pm s$

加入浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度		日间精密度	
	测得浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	测得浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
0.165	0.165 \pm 0.011	3.67	0.163 \pm 0.015	4.95
0.605	0.601 \pm 0.018	8.62	0.607 \pm 0.013	8.34
1.650	1.643 \pm 0.068	7.56	1.657 \pm 0.055	5.61

表 2 测定 HPLC-MS/MS 方法的回收率结果. $n=5$, $\bar{x} \pm s$

QC 样本 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	加入量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	平均回收率 /%
0.165	0.198	0.189	96.0	
0.605	0.605	0.612	101.0	96.87
1.650	1.320	1.236	93.6	

表 3 HPLC-MS/MS 和 CMIA 检测结果. $n=30$

样本号	X	Y	偏倚	样本号	X	Y	偏倚	样本号	X	Y	偏倚
S001	0.286	0.275	-0.011	S0011	0.11	0.103	-0.007	S0021	0.033	0.035	0.002
S002	0.055	0.062	0.007	S0012	0.757	0.814	0.057	S0022	0.187	0.176	-0.011
S003	0.165	0.169	0.004	S0013	0.508	0.477	-0.031	S0023	0.356	0.374	0.018
S004	0.275	0.262	-0.013	S0014	0.684	0.693	0.009	S0024	0.125	0.132	0.007
S005	0.035	0.044	0.009	S0015	0.031	0.026	-0.004	S0025	0.145	0.132	-0.013
S006	0.161	0.165	0.004	S0016	0.092	0.086	-0.009	S0026	0.015	0.013	-0.002
S007	0.108	0.110	0.004	S0017	0.359	0.328	-0.031	S0027	0.048	0.037	-0.011
S008	0.590	0.605	0.015	S0018	0.139	0.132	-0.007	S0028	0.042	0.051	0.009
S009	0.235	0.242	0.007	S0019	0.119	0.121	0.002	S0029	0.011	0.011	0
S010	0.084	0.077	-0.007	S0020	0.211	0.211	0	S0030	0.163	0.176	0.013

测定浓度, 根据 QC 样品结果计算本法的精密度^[8]。见表 1。

2.6 回收率试验

取高、中、低 (1.650、0.605、0.165 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 种浓度的质量控制 (QC) 样品各 5 个^[9], 按“2.4”项下操作, 每一样品连续进样 3 次。分别加入各浓度的 80%, 100%, 120% MTX, 计算沉淀蛋白后的待测物色谱峰面积, 考察样品的高、中、低 3 个浓度的提取回收率分别为 93.6%, 101.0%, 96.0%, 平均回收率为 96.87%。结果见表 2。

2.7 临床应用

2013 年 6 月—2013 年 10 月 在笔者所在医院白血病患者血浆样本 30 份, 分别为给予 MTX (5 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) 后的 24, 48, 72 h 的血浆, 分别进行 HPLC-MS/MS 法和 CMIA 法检测。CMIA 仪器选用 ARCHITECT i1000 分析仪, 其检测原理基于化学发光微粒子免疫分析, 试剂为雅培公司配备的试剂盒, 均在有效期内使用。结果见表 3。

由表 3 作散点图分析, 见图 3, 30 份标本分别用 HPLC-MS/MS 法和 CMIA 法检测, 结果无明显

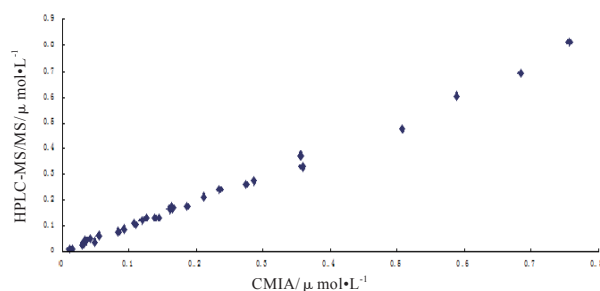


图 3 HPLC-MS/MS 法检测结果与 CMIA 法检测结果的散点分析图

偏倚, HPLC-MS/MS 法检测结果与 CMIA 法检测结果相符^[4-13]; 检测浓度范围在 0.011~0.757 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样本时, $Y=1.0254X-0.0048$, $r^2=0.9946$, 说明二者存在相关性。

3 讨论

MTX 是一种细胞周期 S 期的叶酸类抗代谢类抗肿瘤药^[5-12], 主要用于治疗急性白血病和恶性淋巴瘤等, 由于用量较大, 血药浓度较高, 容易蓄积中毒。MTX 浓度检测方法较多, 有 HPLC 法、放射免疫法 (RIA)、FPIA、CMIA 等。此次实验采用 HPLC-MS/MS 法, 其方法为用多索茶碱作内标, 通过蛋白沉淀法用甲醇沉淀蛋白和提取 MTX, 使 MTX 充分溶解于甲醇。通过岛津 LC-20A 高效液相色谱系统进行分离和富集 MTX, 用 AB Sciex 4000 QTRAP 型质谱仪进行检测。由于 AB Sciex 4000 QTRAP 型质谱仪测定灵敏度和质量精度高, 用于 MTX 的母体药物测定准确度高, 特异性强。CMIA 为免疫检测法, 采用的是两步法, 由于其是非特异性的, 可与待测物发生交叉反应, 但 MTX 代谢产物发生交叉反应较低, 因此 CMIA 测定值与 HPLC-MS/MS 相符, 同时也可能与样本量少和疾病类型有关。本试验建立的 HPLC-MS/MS 方法特异性强, 灵敏度高, 能够满足临床治疗药物监测的要求。

在内标^[9-13]的选择上, 考察了茶碱、氨茶碱、多索茶碱、氟康唑等, 茶碱、多索茶碱等都有较高的回收率, 但血浆内源性物质对检测茶碱和氨茶碱有干扰; 氟康唑和多索茶碱未受内源性物质的干扰, 但多索茶碱的保留时间同 MTX 相近, 而氟康唑的保留时间较长且患者一般服用氟康唑, 影响内标的使用。因此, 最后选定多索茶碱为内标。流动相中加入甲酸, 有利于提高响应, 酸浓度越高, 响应越好, 但对检测系统损害也大, 因此选用 0.1% 甲酸。加入醋酸铵则可以改善峰形, 增加离子对的稳定性。

综上所述, 本试验建立了在白血病患者使用 MTX 后检测其血药浓度的方法, 该方法所需血浆

样品量少, 方法灵敏度高, 适用于临床上大剂量给药后 MTX 的浓度监测及应用于药动学研究, 能够很好的提高治疗药物监测质谱分析中的回收率, 减少了相应基质的影响, 能够提供科学、可靠的试验数据指导临床合理安全用药。

【参考文献】

- [1] 刘桂兰, 李红丽, 殷惠君, 等. 儿童髓外白血病中氨甲蝶呤防治剂量的研究 (附 13 例报告) [J]. 临床儿科杂志, 1993, 11(3): 17-19.
- [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(6): 406-408.
- [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): 194-196.
- [4] Kremer J M, Lee J g. The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. [J]. Arthritis Rheum, 1986, 29(10): 822-831.
- [5] Ramamn A V, Whitworth P, Baildam E M. Use of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. [J]. Arch Dis child, 2003, 88(5): 197-200.
- [6] Tanaka E, Taniguchi A, Urano W, et al. Pharmacogenetics of Disease-modifying anti-rheumatic drugs. [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2004, 18(15): 233-247.
- [7] Assadullahi T P, Dagli E, Warner J O. High-performance liquid chromatography method for serum methotrexate levels in children with severe steroid-dependent asthma. [J]. J Chromatogr, 1991, 565(32): 349-356.
- [8] Rule G, Chapple M, Henion J A. A 384-well solid-phase extraction for LC/MS/MS determination of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in human urine and plasma. [J]. Anal Chem, 2001, 73(25): 439-443.
- [9] Guo P, Wang X, Liu L, et al. Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(15): 1789-1795.
- [10] 李海菊, 王峰, 李焕德. HPLC 监测甲氨蝶呤虹药浓度方法的改进与优化 [J]. 中国药物应用与监测, 2004, 1(1): 51-53.
- [11] 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.
- [12] 王璐璐, 朱林, 倪坤仪, 等. HPLC 研究甲氨蝶呤磁靶向脂质体在小鼠体内的组织分布 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(20): 1572-1575.
- [13] 张强, 徐丽婷, 谢景文, 等. HPLC 法测定人血清中氨甲蝶呤血药浓度 [J]. 解放军药学报, 2000, 16(1): 40-42.