

96 h, 菌体个头很小, 难准确计数, 如不在伞棚灯下观察, 极易漏检。这种情况甚至会出现培养的第 5 天, 延长培养至第 7 天才可清楚分辨疑似菌, 并且随着培养时间的延长, 菌落数量会有大幅度的增加。这也说明, 低营养的培养基需要较长的培养时间才能得到更多的菌落数量, 但是延长培养时间带来的好处应与方法的时效性平衡。

在纯化水检测方法的选择上, 3 国药典中只有美国药典允许采用平皿法。分析 2 种检测方法的优缺点: 薄膜过滤法相比平皿法的优势在于可通过冲洗来去除样本中的抑菌成分, 但这个作用在制药用水微生物控制中可被忽略, 另外更重要的是薄膜过滤法可以检测更大的样本量, 以保证所得到的数据更具有统计学意义; 而平皿法也有其费用低, 检测方法简便的优势。因此, 在微生物

污染水平较高的水系统采用平皿法即可得到准确数据, 而低污染水平的水系统则更适合选择样本量大的薄膜过滤法。当前, 制药企业 GMP 规定, 企业应根据长期监测数据制订微生物污染的警戒限和行动限水平。因此, 在监控水系统时, 可根据预期微生物的数量来决定检测样品的取样量, 应在可准确计数的范围内尽量选择大样本量上膜, 持续跟踪水系统的微生物状态。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 411-412.
- [2] EP 7.0 Vol 2 (欧洲药典 7.0 版. 二卷) [S]. 2011: 2319-3226.
- [3] USP 35/NF 30 Vol 1 (美国药典 35 版. 一卷) [S]. 2012: 886-907.

收稿日期: 2013-04-23

HPLC 测定人血清中甲氨蝶呤浓度

康斯丹, 黄巧玲* (杭州市第三人民医院, 杭州 310009)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定人血清中甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)浓度的方法。方法 以茶碱为内标, 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为磷酸盐缓冲液(pH 6.6)-甲醇(82:18), 检测波长为 MTX 306 nm 和茶碱 254 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃。结果 MTX 浓度分别在 0.03~1.65 μmol·L⁻¹($r=0.999\ 9$)和 1.65~66.08 μmol·L⁻¹($r=0.995\ 8$)内线性关系良好, 平均方法回收率 97.6%。平均萃取回收率 68.5%, 日内、日间 RSD 均<5%, 血清最低检测浓度为 0.03 μmol·L⁻¹。结论 该方法灵敏、准确, 线性范围宽, 适用于临床甲氨蝶呤的血药浓度监测。

关键词: 甲氨蝶呤; 高效液相色谱法; 血药浓度; 骨肉瘤

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)06-0738-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.025

Determination of Methotrexate Concentration in Human Plasma by HPLC

KANG Sidan, HUANG Qiaoling* (The Third Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method to determine the concentration of methotrexate(MTX) in human plasma. **METHODS** Theophylline was used as the internal standard. The analytical column was Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase was phosphate buffer solution with pH 6.6-methanol(82:18). The UV determine wavelength of MTX was 306 nm and theophylline was 254 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 ℃. **RESULTS** The calibration curves of MTX were linear at a concentration range from 0.03 to 1.65 μmol·L⁻¹($r=0.999\ 9$) and 1.65 to 66.08 μmol·L⁻¹($r=0.995\ 8$). The intra-day and inter-day precision were both less than 5%. The average method recovery was 97.6% and the average extraction recovery was 68.5%, with a lowest limit of 0.03 μmol·L⁻¹. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate, wide linear range, suitable for plasma concentration monitoring of MTX.

KEY WORDS: methotrexate; HPLC; plasma concentration; osteosarcoma

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是一种二氢叶酸还原酶抑制剂,通过抑制细胞内二氢叶酸酶达到杀灭肿瘤细胞的作用。但 MTX 药动学个体差异大,对骨髓、胃肠道及肾脏有较大的毒性,可产生严重的不良反应^[1]。临床常用大剂量 MTX 和四氢叶酸钙联合治疗淋巴瘤、骨肉瘤和急性白血病,以减轻 MTX 的不良反应。及时监测 MTX 血药浓度,指导解救疗法,保证患者用药的合理性、安全性十分重要。本实验利用 DAD 检测器的特性,采用乙腈沉淀蛋白,内标法双波长测定,方法快速、简便、准确性好,适用于血药浓度常规监测。

1 仪器与试剂

Agilent1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括 AgilentG1322A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 检测器以及 Agilent1200 化学工作站。MTX 对照品(批号: 100138-201104, 纯度: 99.4%)和茶碱对照品(批号: 100121-201104, 纯度: 100%)由中国药品生物制品检定所提供, 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为蒸馏水, 磷酸盐为分析纯, 空白血清由我院检验科提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液(pH 6.6)-

甲醇(82:18); 检测波长: 306 nm 和 254 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取 MTX 对照品适量, 加流动相定量溶解稀释制成浓度为 660.8 μmol·L⁻¹ 的对照品溶液, 备用。

2.2.2 内标溶液的配制 精密称取茶碱对照品适量, 加流动相定量稀释制成浓度为 64.50 μmol·L⁻¹ 的溶液。

2.3 血清样品处理方法

精密吸取患者血清 0.3 mL, 加入茶碱内标溶液 50 μL, 涡旋 10 s, 加乙腈 1 mL, 涡旋 60 s, 16 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液 1 mL 置另一离心管中, 60 ℃ 氮气吹干, 残渣用流动相 120 μL 溶解, 离心, 上清液过滤后取 20 μL 进样。

2.4 专属性考察

分别取空白血清、标准血清(空白血清+MTX 对照品溶液)样品及患者用药后的血清样品, 按“2.3”项下方法处理后进样分析。MTX 保留时间 14 min 左右, 内标物茶碱的保留时间 11.7 min 左右, 两者峰型尖锐且分离度良好, 见图 1。从样品血清图谱可见内源性物质、合并用药(四氢叶酸钙、阿糖胞苷、地塞米松)在此时间段内均无出峰, 说明以上因素对 MTX 和内标物的测定均无干扰。

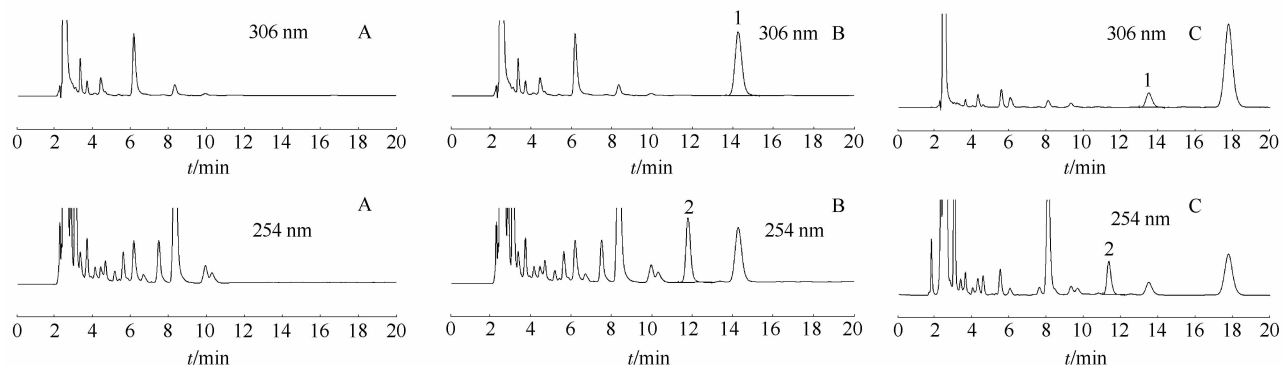


图1 高效液相色谱图

A-空白血清; B-标准血清; C-样品血清; 1-甲氨蝶呤; 2-茶碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A-blank serum; B-serum standard; C-serum samples; 1-MTX; 2-teophylline

2.5 标准曲线及线性范围

取 MTX 对照品溶液适量, 用空白血清稀释制成浓度分别为 0.03, 0.07, 0.16, 0.66, 1.65, 6.61, 16.52, 33.04, 66.08 μmol·L⁻¹ 的 MTX 标准血清样品。按“2.3”项下方法处理后进样分析。以 MTX

浓度(X)为横坐标, MTX 峰面积与茶碱峰面积的比值为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 为减少误差, 将标准曲线分低浓度和高浓度 2 段进行线性回归, 得回归方程 $Y_1=0.5483X+0.0017$, $r=0.9999$ 和 $Y_2=0.6042X-0.0736$, $r=0.9958$ 。表明 MTX 检测浓度

分别在 0.03~1.65 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.65~66.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好, 最低检测浓度为 0.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6 稳定性试验

配制 6 个浓度的 MTX 血清样品(0.03, 0.16, 0.66, 6.61, 16.52, 66.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 8 份, 其中 4 份置于室温保存 12, 24, 48, 72 h 后, 再按“2.3”项下方法处理后进样分析, 记录结果, 得 6 个浓度的 MTX 血清样品 RSD 分别为 3.42%, 4.82%, 4.13%, 4.09%, 3.88%, 3.57%。另 4 份于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下冻存 1, 3, 7, 10 d 后, 再按“2.3”项下方法处理后进样分析, 记录结果, 得 6 个浓度的 MTX 血清样品 RSD 分别为 4.81%, 4.15%, 3.67%, 4.59%, 2.78%, 3.97%。

结果表明, MTX 血清样品在室温下放置 72 h 与-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 10 d 内的测定结果均无明显变化, 说明 MTX 血清样品在上述储存条件下有很好的稳定性。

2.7 精密度试验

配制 6 个浓度的 MTX 血清样品(0.03, 0.16, 0.66, 6.61, 16.52, 66.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 于单日内测定 6 次 MTX 浓度, 记录结果, 计算日内精密度; 每日测定 1 次 MTX 浓度, 连续 6 d, 记录结果, 计算日间精密度。结果见表 1。

表 1 精密度试验结果($n=6, \bar{x} \pm s$)
Tab 1 Precision of test results($n=6, \bar{x} \pm s$)

标示浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度		日间精密度	
	测得值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	测得值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
0.03	0.028 8 $\pm$ 0.002 2	4.89	0.030 5 $\pm$ 0.002 5	4.93
0.16	0.159 3 $\pm$ 0.004 7	2.68	0.160 3 $\pm$ 0.008 7	4.07
0.66	0.672 3 $\pm$ 0.027 3	2.58	0.673 2 $\pm$ 0.029 2	3.11
6.61	6.566 5 $\pm$ 0.154 5	4.19	6.578 3 $\pm$ 0.140 3	4.10
16.52	16.033 3 $\pm$ 0.764 3	4.15	16.076 2 $\pm$ 0.884 8	4.65
66.08	65.952 8 $\pm$ 2.212 2	2.33	66.033 7 $\pm$ 2.618 3	2.68

2.8 回收率试验

配制 6 个浓度的 MTX 血清样品(0.03, 0.16, 0.66, 6.61, 16.52, 66.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 6 份, 按“2.3”项下方法处理后进样分析, 记录 MTX 峰面积为 M_1 , 并依照标准曲线计算测得值, 以测得值与加入值之比作为方法回收率(R_1)。另用水溶液配制成各浓度的 MTX 和内标溶液, 直接进样, 记录 MTX 峰面积为 M_2 , 以峰面积之比 M_1/M_2 作为萃取回收率(R_2)。平均方法回收率 97.6%, 平均萃取回收率 68.5%, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果($n=6, \bar{x} \pm s$)
Tab 2 Recoveries of test results($n=6, \bar{x} \pm s$)

标示浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	方法回收率		萃取回收率	
	R_1 /%	RSD/%	R_2 /%	RSD/%
0.03	96.2 $\pm$ 6.2	4.75	65.2 $\pm$ 3.6	3.48
0.16	96.5 $\pm$ 3.3	3.29	69.0 $\pm$ 4.7	3.82
0.66	95.6 $\pm$ 2.9	3.17	66.0 $\pm$ 3.8	3.59
6.61	96.9 $\pm$ 3.7	3.58	70.2 $\pm$ 5.2	4.67
16.52	100.4 $\pm$ 5.1	3.98	71.9 $\pm$ 3.4	3.25
66.08	99.9 $\pm$ 3.8	3.64	68.8 $\pm$ 5.5	4.80

2.9 重复性试验

取同一患者的血清样品 6 份各 0.3 mL, 按“2.3”项下方法处理后进样分析, 记录峰面积, 依照标准曲线计算 MTX 含量, 结果 6 份样品的 RSD 为 1.42%, 表明方法的重复性较好。

3 临床应用

骨肉瘤患者 I, 女, 40 岁, 静脉注射 MTX 14.0 g, 给药后 18 h 给予四氢叶酸钙片解救, 于 MTX 给药后 24, 48, 72 h 抽取静脉血 2 mL, 取血清按“2.3”项下方法操作。结果测得 24, 48 h 的 MTX 浓度分别为 1.80, 0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 72 h 的 MTX 浓度低于检测限, 提示 MTX 血药浓度低于安全浓度^[2], 可以停止四氢叶酸钙解救, 该患者未出现明显不良反应。骨肉瘤患者 II, 男, 16 岁, 静脉注射 MTX 13.5 g, 给药后 18 h 给予四氢叶酸钙片解救。测得 24, 48, 72 h 的 MTX 浓度分别为 9.16, 0.44, 0.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示 72 h 血药浓度仍高于安全浓度, 继续使用四氢叶酸钙解救, 于 MTX 给药后 96 h 测得血药浓度结果 0.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 已降至较为安全范围内, 停止解救, 患者除口腔溃疡、恶心外未出现较严重不良反应。

4 讨论

MTX 血药浓度常用测定方法有荧光偏振免疫法、HPLC 等^{[3]119-120}。前者试剂盒昂贵, 且 MTX 代谢产物的存在可能使检测结果偏高。HPLC 能将 MTX 与其代谢产物分离, 专一性强, 特异性高, 结果准确, 这也是笔者采用 HPLC 的主要原因。

常用的血样的处理方法有直接沉淀法、液-液萃取法、离线固相萃取法^{[3]123-124}, 以直接沉淀法最为简便、实用。在选择蛋白沉淀剂时, 多数文献采用高氯酸和三氯醋酸作为沉淀剂^[4-6], 笔者实验发现二者沉淀样品色谱图杂质峰多, 且与内标物和 MTX 峰的分离效果不佳, 后实验又发现

甲醇沉淀不及乙腈完全,所以选用乙腈作为蛋白沉淀剂。

实验中发现,当缓冲液 pH 值越大,MTX 峰的保留时间越大,当 pH 值在 6.6 时,MTX 峰的保留时间适中,峰型较好,且与其他内源性物质峰、MTX 代谢产物峰、溶剂峰等互不干扰。提取色谱峰的紫外扫描光谱,发现 MTX 的最大吸收波长为 306 nm。在选择内标物时,曾用阿魏酸、甲硝唑等实验,发现其保留时间分别在 5 min 和 7 min,与内源性物质峰叠加。后发现茶碱在 254 nm 处有最大吸收,且不受其他物质干扰,利用 DAD 检测器的特点,将检测波长选为 MTX 306 nm 和茶碱 254 nm,提高了检测灵敏度,结果满意。

大剂量 MTX 配合四氢叶酸钙片解救是目前骨肉瘤化疗中最重要的方案之一。大剂量 MTX 在提高疗效的同时,化疗不良反应也随之增加,有文献^[7]报道大剂量 MTX 的化疗致死率接近 6%。文献^[2]指出,MTX 的浓度如 24 h>10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、48 h>1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、72 h>0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,有可能出现不可逆的不良反应。因此,在大剂量 MTX 化疗过程中应采取一些必要措施以尽可能减少不良反应的发生。四氢叶酸钙片解救是降低大剂量 MTX 不良反应的重要手段。笔者建议,在大剂量 MTX 静滴结束后 18 h 开始分次给予四氢叶酸钙片解救,解救剂量一般为 q6h 口服 15 mg。对 MTX 用药后 24, 48, 72 h

血药浓度进行检测,若大于安全值,则增加四氢叶酸钙片的解救次数及剂量,必要时改为静脉滴注,直至 MTX 浓度降至较安全范围内,同时进行碱化尿液,使尿 pH 值>7 以促进 MTX 排泄,防止 MTX 在体内蓄积造成不可逆的不良反应。

REFERENCES

- [1] BI S J, WANG A L, GUO X J. High-dose methotrexate chemotherapy adverse reactions of observation and prevention [J]. China Health Innov(中国医疗前沿), 2012, 7(16): 84-85.
- [2] FOTOHI K, SKARBY T, SODERHALL 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 Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 817(2): 139-144.
- [3] LI J H. Method and Application of Clinical Therapeutic Drug Monitoring(临床治疗药物监测的方法和应用) [M]. Vol 1. Beijing: People's Medical Press, 2003: 119-120, 123-124.
- [4] XIE J P, FENG L L, KUANG X. Determination of high-dose methotrexate in patients with blood drug concentration by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(11): 69-71.
- [5] ZHOU J Y, SUN Z X, ZHANG Q F. Determine of methotrexate concentration in human plasma by HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2011, 14(3): 373-374.
- [6] MAO Y L, WANG F. Determine of methotrexate concentration in human plasma by HPLC [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2008, 6(6): 678-680.
- [7] JIANG Z J, ZHANG Z Y, HUANG HY, et al. Modern Oncology(现代肿瘤学) [M]. Vol 2. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 2000: 1369-1370.

收稿日期: 2013-11-21

格列齐特片(II)含量测定和有关物质检测方法改进

黄朝辉¹, 蔡丹丹², 周征¹(1.宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048; 2.宁波戒毒研究中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 解决中国药典 2010 年版收载的格列齐特片(II)药品标准中含量测定和有关物质检测方法中供试溶液不稳定的问题。方法 以乙腈取代 40%乙腈水溶液为溶剂配制供试品溶液, 采用 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈-三乙胺-三氟醋酸(60:40:0.1:0.1), 流速为 1.5 mL·min⁻¹, 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 235 nm, 样品盘温度为室温。结果 格列齐特片(II)含量测定和有关物质检测项下各供试溶液在 24 h 内稳定。含量测定在 20~500 mg·L⁻¹ 内线性关系良好, r 值为 0.999 9, 加样回收率为 100.1%, 分析方法的定量下限为 0.5 mg·L⁻¹, 检测限为 0.1 mg·L⁻¹。结论 该方法解决了原标准中供试溶液极不稳定的弊端, 提高了检测结果的可信度和检测效率。

关键词: 格列齐特片(II); 含量测定; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)06-0741-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.026