

固相萃取 – 高效液相色谱法测定人乳中甲氨蝶呤的含量

周卿¹ 潘雪君²

(1. 贵州省遵义医学院药学院分析化学教研室, 贵州 563003; 2. 贵州省遵义医学院附属医院妇产科, 贵州 563003)

摘要 目的: 建立胎盘植入产妇产后乳中甲氨蝶呤含量测定的固相萃取 – 高效液相色谱法。方法: 乳汁样品经 C_{18} 固相萃取小柱提取后进样测定, 色谱柱为 Agilent ZOBAX SB – C_{18} (4.6 mm × 250 mm 5 μ m) 柱, 流动相为 0.05% 醋酸溶液 – 乙腈 (88 : 12), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 306 nm。结果: 乳汁中甲氨蝶呤在 0.5 ~ 5 μ g · mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好, 高、中、低浓度的方法回收率分别为 99.8%、100.9%、99.1%; RSD 均小于 10%。日内和日间精密度均小于 5.8%。结论: 本方法专属性强, 灵敏度高, 操作简便, 适用于乳汁中甲氨蝶呤含量的测定。

关键词: 抗肿瘤药; 抗代谢药; 甲氨蝶呤; 药物监测; 临床用药监测; 茶碱; 人乳; 固相萃取; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 – 1793(2011)12 – 2305 – 03

SPE – HPLC determination of methotrexate concentration in human milk

ZHOU Qing¹, PAN Xue – jun²

(1. Analytical Chemistry Laboratory of Pharmacy School Zunyi Medical College Zunyi 563003, China;

2. First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College Zunyi 563003, China)

Abstract Objective: To establish a solid phase extraction and high performance liquid chromatography (SPE – HPLC) method for determination of methotrexate in human milk of placenta implantation women. **Methods:** Milk samples were prepared with C_{18} solid phase extraction column. The chromatographic separation was performed on a Agilent ZOBAX SB – C_{18} (4.6 mm × 250 mm 5 μ m) column. The mobile phase consisted of 0.05% acetic acid – acetonitrile (88 : 22), flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 306 nm. **Results:** The linear range for methotrexate was 0.5 – 5 μ g · mL⁻¹. The average recoveries of high, middle and low three concentration were 99.8%, 100.9% and 99.1%, RSD were both less than 10%. The intra – day and inter – day RSD were less than 5.8%. **Conclusion:** The method is accurate, sensitive and simple, and suitable for the determination of methotrexate concentration in human milk.

Key words: antineoplastic; antimetabolite; methotrexate; drug monitoring; Clinical medication monitoring; theophylline; human milk; SPE; HPLC

甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 是 1 种抗叶酸代谢的抗肿瘤药物, 目前用于治疗白血病、淋巴瘤、骨肉瘤以及多种自身免疫性疾病^[1~3]。胎盘植入是指胎盘绒毛因子宫蜕膜发育不良等原因而植入子宫肌层, 是产科较危重的病症, 采用小剂量甲氨蝶呤术后肌肉注射进行保守治疗, 疗效显著^[4~5], 但 FDA 规定甲氨蝶呤在围产期用药危险度分级中属 D 类, 新生儿经乳汁吸收后可能引起骨髓抑制和肝肾功能及胃肠道损害, 因此有必要监测术后产妇乳汁中药物浓度。低剂量甲氨蝶呤虽有报道^[6~7], 但在乳汁中的药物浓度及测定方法未见报道。本文建立 SPE –

HPLC 法测定人乳中甲氨蝶呤浓度, 方法准确可靠, 对临床用药监测及产妇哺乳具有一定的指导意义。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 全自动高效液相色谱仪, DAD 检测器及色谱数据处理系统, 固相萃取仪, BOND ODS – C_{18} 固相萃取柱 (200 mg 3 mL)。TGL – 16 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

甲氨蝶呤对照品 (批号 100138 – 20060303) 及内标茶碱 (批号 100121 – 199903) 均购自中国食品药品检定研究院。乙腈 (色谱纯, 百灵威化学有限公司); 其他试剂均为分析纯; 超纯水。乳汁样品由

遵义医学院附属院妇产科提供。

2 色谱条件

色谱柱: Agilent ZOBAX SB - C₁₈ 柱(4. 6 mm × 150 mm 5 μm); 流动相: 0. 05% 醋酸溶液 - 乙腈(88 : 12); 流速: 1. 0 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 306 nm; 进样量: 10 μL。

3 对照品溶液的配制

精密称取甲氨蝶呤对照品 10 mg ,置于 10 mL 量瓶中 ,加 0. 02 mol · L⁻¹ K₂HPO₄ - 乙腈(20: 80) 溶解并定容至刻度 ,摇匀 ,即得浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的甲氨蝶呤对照品溶液。精密称取茶碱对照品 10 mg ,置于 10 mL 量瓶中 ,加甲醇溶解并定容至刻度 ,摇匀 ,即得浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的茶碱对照品溶液。

4 乳汁样品处理

取待测乳汁样品离心(12000 r · min⁻¹) 10 min ,取中层较为澄清的脱脂乳 2 mL ,加内标液(茶碱 1 mg · mL⁻¹) 25 μL ,10% 的三氯乙酸 400 μL ,漩涡振荡 30 s ,离心(12000 r · min⁻¹) 15 min ,将上清液转入 10 mL 试管中 ,加入 0. 02 mol · L⁻¹ K₂HPO₄ 溶液稀释到 6 mL ,常压下使样品通过 C₁₈ 固相萃取小柱(固相萃取小柱预先用 6 mL 甲醇、6 mL 双蒸水活化) ,再用 15 mL 双蒸水冲洗 ,抽干 ,0. 5 mL 甲醇洗脱样品 ,收集洗脱液 ,混匀后取 10 μL 进样作 HPLC 分析。记录峰面积 ,以内标法定量。

5 方法学考察

5.1 方法专属性 分别取空白乳汁、甲氨蝶呤加空白乳汁、受试者注射药物后乳汁样品 ,按“4”项下方法处理后 ,记录色谱图(见图 1) 。在选定的色谱条件下 ,甲氨蝶呤与内标物峰形良好 ,分离完全 ,其保留时间分别约为 8. 7 min 和 5. 5 min ,其他内源性物质基本不干扰测定。

5.2 线性关系及检测限 于健康人空白乳汁中加入不同量的甲氨蝶呤对照品溶液 ,使浓度分别为 0. 5 , 1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. 0 μg · mL⁻¹ ,按“4”项下方法操作 ,进样 10 μL ,记录样品及内标的峰面积 ,计算其峰面积比值(甲氨蝶呤/内标 R) ,以峰面积比值 R 对乳汁浓度 C 进行线性回归分析 ,求得线性回归方程为:

$R = 1. 453C + 0. 197 \quad r = 0. 9996$

结果表明 ,甲氨蝶呤乳汁浓度在 0. 5 ~ 5. 0 μg · mL⁻¹ 浓度范围内 ,线性关系良好。乳汁样品可进行定量检测的最低浓度为 0. 5 μg · mL⁻¹。

5.3 回收率试验

方法回收率: 配制含甲氨蝶呤低、中、高 3 种浓度为 1. 0 2. 5 4. 0 μg · mL⁻¹ 乳汁样品各 5 份 ,按

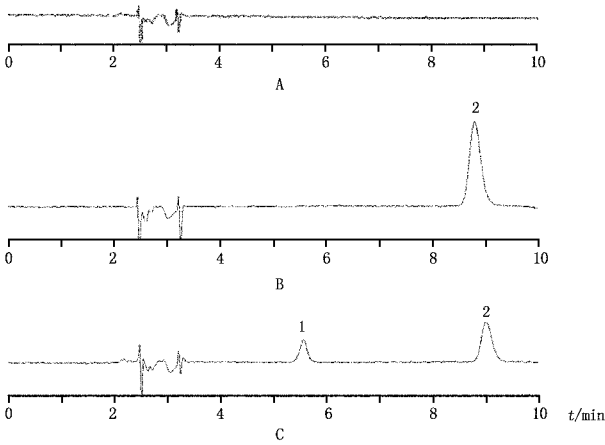


图1 人乳中甲氨蝶呤的 HPLC 图
Fig 1 HPLC chromatograms of methotrexate in human milk
A. 空白乳汁(blank milk) B. 甲氨蝶呤加空白乳汁(2 μg · mL⁻¹) (methotrexate in blank milk) C. 受试者注射甲氨蝶呤后乳汁加内标 (milk with internal standard after an intramuscular injection)
1. 内标(internal standard) 2. 甲氨蝶呤(MTX)

“4”项下方法处理 ,测定色谱峰面积计算浓度 ,并与加入量比较 ,计算方法回收率 ,结果见表 1。

提取回收率: 配制含甲氨蝶呤低、中、高 3 种浓度(1. 0 2. 5 4. 0 μg · mL⁻¹) 乳汁样品各 5 份 ,按“4”项下方法处理 ,进样 10 μL; 另用流动相配制相应浓度甲氨蝶呤标准溶液 ,按相同量进样 ,分别记录峰面积 ,以乳汁样品测得峰面积与流动相中测得峰面积的比值计算提取回收率 ,结果见表 1。

表1 甲氨蝶呤乳汁回收率测定结果(n = 5)
Tab 1 Recoveries of methotrexate in human milk

C/μg · mL ⁻¹	方法回收率 (method recoveries) %	RSD /%	提取回收率 (extraction recoveries) %	RSD /%
1	99. 1	3. 1	91. 3	4. 5
2. 5	100. 9	2. 3	85. 0	3. 7
4	99. 8	3. 1	85. 2	3. 5

5.4 精密度试验 配制含甲氨蝶呤低、中、高 3 种浓度(1. 0 2. 5 4. 0 μg · mL⁻¹) 乳汁样品各 5 份 ,按“4”项下方法处理 ,分别于 1 d 内测定 5 次 ,5 d 内每天测定 1 次 ,测定色谱峰面积并计算浓度 ,计算日内和日间精密度。结果见表 2。

表2 甲氨蝶呤乳汁精密度测定结果($\bar{x} \pm s$ n = 5)
Tab 2 Precision of methotrexate in human milk

C/ μg · mL ⁻¹	日内 (intra - day)	RSD /%	日间 (inter - day)	RSD /%
1	0. 9951 ± 0. 033. 7	1. 0	139 ± 0. 58	5. 8
2. 5	2. 5157 ± 0. 05	2. 1	2. 5229 ± 0. 04	1. 6
4	4. 0688 ± 0. 06	1. 6	3. 9922 ± 0. 09	2. 2

5.5 稳定性试验 用空白乳汁配制含甲氨蝶呤浓

度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乳汁样品,在 -20°C 冰箱中放置,分别在 0, 5, 10, 15, 20, 30 d 取样,按上述方法测定,计算甲氨蝶呤的浓度,结果样品在冷冻条件下放置 30 d 内稳定, RSD 为 5.62%。

5.6 方法应用 5 名术后患者,年龄 25 ~ 32 岁,单次肌肉注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$,给药后按如下时间(1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h)收集乳汁,按“4”项下方法处理,测定乳药浓度,绘制乳药浓度 - 时间曲线,结果见图 2。结果表明:给药后 6 h,甲氨蝶呤药物浓度达到最大值 (1.812 ± 0.5274) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以后逐渐降低,24 h 浓度仅为 (0.525 ± 0.1762) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,36 h 后药物浓度过低,未被检出。

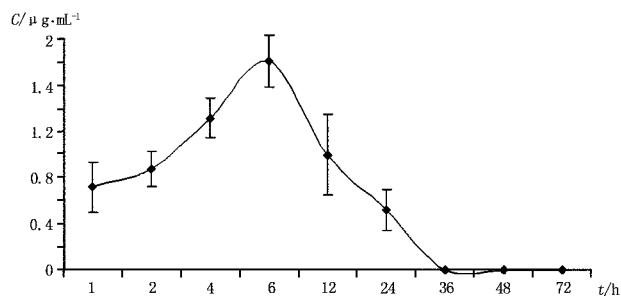


图2 甲氨蝶呤平均乳药浓度 - 时间曲线($n=5$)

Fig 2 Mean serum concentration - time curves of methotrexate

6 讨论

甲氨蝶呤微溶于甲醇、乙腈,易溶于稀碱,采用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$ - 乙腈(20:80)溶解甲氨蝶呤对照品,既可增加甲氨蝶呤的溶解度,又可延长甲氨蝶呤对照品溶液的放置时间,经试验甲氨蝶呤对照品溶液在一个月内稳定。

甲氨蝶呤相对分子质量为 454,大于 200,属弱酸性,从理论上讲,较难通过乳汁分泌,需选择合适的提取方式。文献报道体液中甲氨蝶呤的提取多采用直接除蛋白法和液 - 液萃取法^[8-10]。由于乳汁中含大量蛋白、脂肪、糖类等,采用直接除蛋白法,选取三氯乙酸或高氯酸作为蛋白沉淀剂不能完全除去乳汁中的蛋白,对色谱柱的污染较大;采用液 - 液萃取法,由于乳汁中药物浓度低,甲氨蝶呤不溶于氯仿、乙醚等萃取剂,回收率较低;采用固相萃取法,经三氯乙酸除蛋白后,上 ODS - C_{18} 小柱,用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$ 淋洗 0.5 mL 甲醇洗脱后直接进样,经固相小柱提取浓缩后,药物损失少,杂质不干扰测定,回收率高且稳定,故本文采用固相萃取法提取样品。

比较了 Agilent ODS、Agilent ZORBAX SB - C_{18} 、Agilent XDB - C_{18} 、汉邦 Lichrospher C_{18} 等色谱柱的分离效能,结果发现 Agilent ZORBAX SB - C_{18} 分离

弱酸性物质效果较好,其余色谱柱均出现不同程度的前沿或者拖尾现象。比较了乙腈 - K_2HPO_4 、乙腈 - KH_2PO_4 、乙腈 - 不同 pH 的醋酸缓冲液、乙腈 - 不同浓度的醋酸溶液等流动相,结果发现采用乙腈 - 0.05% 醋酸溶液作为流动相,甲氨蝶呤和内标茶碱得到完全分离,且峰形良好,乳汁中内源性杂质不干扰测定。

应用本文建立的测定方法对 5 名患者使用甲氨蝶呤后乳汁中的药物浓度进行了测定,结果表明,72 h 后乳汁中药物基本消除完全,建议产妇在肌肉注射药物 72 h 之内应暂停哺乳。

参考文献

- 1 YANG Xue(杨雪), ZHU Yi - ping(朱易萍). High - dosage of methotrexate in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia (大剂量甲氨蝶呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病). *J Ped Pharm*(儿科药理学杂志) 2009, 15(2): 6
- 2 HUANG Hui - qiang(黄慧强), LIN Xu - bin(林旭滨). Recent advance on primary central nervous system lymphoma (原发性中枢神经系统淋巴瘤诊治进展). *Chin J Neuro - Oncol*(中国神经肿瘤杂志) 2006, 4(3): 180
- 3 ZHAN Xin - li(詹新立), ZHOU Jiang - nan(周江南), ZHAO Zi - ping(赵自平) et al. Effect of OSMcAb - HSA - MTX conjugate on human osteosarcoma(抗人骨肉瘤单克隆抗体 - 人血清白蛋白 - 甲氨蝶呤偶联物的抗肿瘤作用). *Chin J Experim Surg*(中华实验外科杂志) 2004, 21(3): 345
- 4 ZHANG Chun - yan(张春艳). Clinical study on the treatment of placenta accreta by methotrexate combined with roxithromycin (甲氨蝶呤配伍罗红霉素治疗胎盘植入临床分析). *Clin Misdiagn Misther*(临床误诊误治) 2009, 22(2): 41
- 5 Lalchandani S, Grady M, O'Herlihy C, et al. Conservative management of placenta accrete and unruptured interstitial conual pregnancy using methotrexate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, 107(1): 96
- 6 GE Yong - qian(葛勇前), LU Guo - chun(陆国椿). Quantitation of plasma methotrexate content by HPLC (HPLC 法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2001, 21(6): 418
- 7 CHENG Bin(程斌), LING Neng - ming(林能明), FANG Luo(方罗). RP - HPLC determination of methotrexate in human plasma (RP - HPLC 测定人体血浆中甲氨蝶呤的浓度). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2006, 26(5): 598
- 8 Abdolhoseini M, Ahmad ZM, Saeid R et al. High - performance liquid chromatography determination of methotrexate in plasma. *Iranian J Pharm Res* 2003(2): 149
- 9 GAO Ke - pan(高科攀), WANG Feng(王峰), JIANG Xin - guo(蒋新国) et al. Determination of methotrexate concentration in rats' plasma and cerebrospinal fluid and the application(大鼠血浆和脑脊液中甲氨蝶呤浓度测定及其应用). *Chin J Clin Pharm*(中国临床药理学杂志) 2005, 14(11): 23
- 10 Roberta Turci, Giuseppina Micoli, Claudio Minoia. Determination of methotrexate in environmental samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography: ultraviolet or tandem mass spectrometry detection. *Rapid Commun Mass Spec* 2000, 14: 685

(本文于 2011 年 6 月 30 日修改回)