

反向模式-强阳离子交换-反向模式二维色谱法测定 人血浆中甲氨蝶呤浓度

盛阳昊^{1,2} 刘丹琦^{1,2} 王萍^{1,2} 周伯庭^{*1,2}

¹(中南大学湘雅医院药学部,长沙410008) ²(中南大学药学院,长沙410013)

摘 要 建立了反向模式-强阳离子交换-反向模式(Reversed phase-strong cation exchange-reversed phase)二维色谱平台测定人血浆中甲氨蝶呤浓度的方法。样品经三氯醋酸沉淀蛋白后,在ASTON C₈一级柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm)上完成初分离,通过六通阀切换,经ASTON SCX中间级(20 mm × 4.6 mm, 5 μm)二次分离和储存,在SAC C₈二级柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm)上完成最后分离,并测定。一级柱流动相为10 mmol/L 醋酸铵-乙腈(90:10, V/V, 以醋酸调至pH 3.8),流速为1.0 mL/min;中间级流动相为10 mmol/L H₃PO₄溶液(pH 3.0);二级柱流动相为50 mmol/L 醋酸铵-乙腈(87:13, V/V, 以醋酸调至pH 5.2),流速为1.2 mL/min,检测波长306 nm。单次分析时间4 min,线性范围0.09~5.1 μmol/L,检出限为0.005 μmol/L,日内RSD小于1.8%,日间RSD小于3.5%,相对回收率99.1%~101.25%,绝对回收率85.7%~86.4%。本方法简便、准确,适合日常血药浓度监测和药代动力学研究。

关键词 二维色谱; 甲氨蝶呤; 高效液相色谱法

1 引言

甲氨蝶呤(MTX)为二氢叶酸还原酶抑制剂,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,发挥抗肿瘤作用,被广泛用于治疗急性淋巴细胞白血病等恶性肿瘤疾病。临床上采用大剂量甲氨蝶呤联合甲酰四氢叶酸钙(Calcium folinate, CF)解救疗法治疗儿童急性淋巴细胞性白血病,由于该疗法都是超常规大剂量静脉滴注,易产生严重的甚至致命的毒性反应,例如肾衰竭、骨髓抑制、肝损害、胃肠道反应、皮肤黏膜反应等,且剂量与血药浓度个体差异大,必须开展MTX血药浓度检测^[1]。测定甲氨蝶呤的方法现主要有荧光偏振免疫法(FPIA)^[2]和高效液相法^[3~8]。荧光偏振免疫法需要进口免疫试剂盒,因价格高而限制了在临床使用;高效液相具有专一性强、准确度高的特点,大多数文献都是基于一维色谱与不同的检测器联用,如紫外^[3~5]、荧光^[6]、质谱^[7,8]等,其中,液相色谱-质谱联用法灵敏度高,分析速度快,但预处理过程复杂,且购置仪器成本较高。本研究采用二维色谱平台,加上压缩控制流路抑制大体积进样和二维色谱死体积大而引起的峰展宽,运用SCX中间级对色谱网络进行串联修改,实现了样品的大通量快速检测,显著减少了人为干预度和单次分析时间,适用于大样本临床药物浓度测定和药代动力学研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RP-SCX-RP 二维色谱平台:3个LC-20A泵、CBM-20A色谱控制器、SIL-20A自动进样器(改装500 μL进样环)、DGU-20A自动脱气机、SPD-20A紫外检测器、2个FCV-42AH六通阀,以上各组成单元均购自日本岛津公司;FLC2420柱温箱、ASTON C₈一级色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm)、ASTON SCX中间级(20 mm × 4.6 mm, 5 μm)、SAC C₈二级柱为(100 mm × 4.6 mm, 5 μm),均购自长沙ANAX分析仪器有限公司;电子天平;PHS-3S pH计(上海精科),XW-80A涡旋混合器(上海青浦西仪器厂);高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司)。

2014-08-19 收稿;2014-09-25 接受

* E-mail: botingzhou0918@126.com

MTX 对照品(中国药品生物制品检定所);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);乙酸铵(美国 TE-DIA 公司);乙二醇、三氯乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);去离子水由美国 Millipore 纯水机制备;患者血清取自中南大学湘雅医院小儿科。

2.2 对照品溶液和质控血清样品的制备

取 MTX 对照品适量,准确称定,用甲醇溶解和少量 DMF 助溶,并定容至 25 mL,制成 51.54 $\mu\text{mol/L}$ 贮备液。取上述标准品储备溶液适量,分别加乙二醇稀释,制成各标准工作溶液。用空白血清和 MTX 贮备液分别配制浓度为 0.0879, 0.2474, 0.6185, 1.546, 3.092 和 5.154 $\mu\text{mol/L}$ 的 MTX 系列标准血清样品。同法配制浓度为 0.2474 和 3.092 $\mu\text{mol/L}$ 的质控血清样品,分装于 1.5 mL 塑料离心管中,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

2.3 血清样品预处理

取 200 μL 血清样品,加入 10% 三氯乙酸溶液 600 μL ,涡旋混合 30 s, 14500 r/min 高速离心 10 min, 取上清液 200 μL 进样分析。

2.4 RP-SCX-RP 二维色谱平台测定流程及条件

本二维色谱平台一级柱与二级柱之间通过中心切割作为传输模式,具体采用间接传递技术,并用中间级作为二次分离和储存、转运的场所。

图 1 为具体运行原理图, PUMP1 所对应的一级柱流动相为 10 mmol/L 醋酸铵-乙腈(90: 10, V/V, 以乙酸调至 pH 3.8), 流速为 1.0 mL/min; PUMP2 辅助流路流动相为 10 mmol/L H_3PO_4 溶液(pH 3.0); PUMP3 所对应的二级柱流动相为流动相为 50 mmol/L 乙酸铵-乙腈(87: 13, V/V, 以乙酸调至 pH 5.2), 流速为 1.2 mL/min, 检测波长为 306 nm。

如图 1 所示, 六通阀 1 和 2 在图中状态均为 On(阀中实线表示相连通), 其切换另一状态为 Off。在被测组分进样时, 六通阀 1 和 2 均为 On, 同时 Pump 2 启动, 运用模拟梯度压缩技术来解决二维色谱平台死体积大和大体积进样时峰展宽问题; 然后被测组分在一级柱中分离, 同时停止 Pump 2, 六通阀 1 和 2 分别为 Off 和 On; 接着通过切换阀切换流路, 六通阀 1 和 2 均为 Off, 此时一级柱与中间级相连, 转移被测组分, 并再一次用启动 Pump 2, 进一步减少峰展宽, 改善峰型。最后通过再一次的阀切换流路, 六通阀 1 和 2 均为 On, 将中间级中的被测组分转移到二级柱, 完成最后的分离与检测。

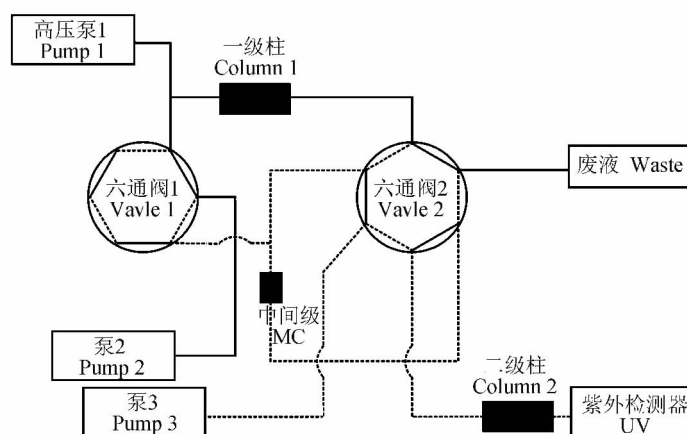


图 1 反向模式-强阳离子交换-反向模式二维色谱平台工作原理图

Fig. 1 Schematic diagram of reversed phase-strong cation exchange-reversed phase (RP-SCX-RP) two-Dimensional liquid chromatography platform

3 结果与讨论

3.1 二维色谱网络构建和时间复杂度分析

医院药学部门的大通量药物分析二维色谱平台构建, 需重点考察耐久度、经济性、时间复杂度 3 个重要评估要素。

在复杂生物基质中小分子药物的测定中, 二级色谱柱之间常用的传递技术为反冲和中心切割^[9], 反冲模式去杂质能力较中心切割模式差, 使一级柱头上的强保留物质反冲入二级柱, 造成二级柱压力升高, 降低耐久度, 同时也会增加二级柱的分离难度以及增加二级柱的负载, 造成二级柱寿命降低, 于是本实验选择中心切割作为平台的传递技术。

运用 RAM(Restricted access media) 柱和贯流色谱柱直接进样已成为发展趋势, 但商品 RAM 柱成本

较高,耐久性不好,不适合医院药学部门的大通量样本检测。而贯流色谱柱粒径较大,柱效低,中心切割范围增大一倍以上,因此本研究采用 C_8 柱与沉淀蛋白取上清进样,样品相对干净,对不同药物的平均柱寿命比 RAM 相比有较大提高,经济性良好,相比于离线固相萃取和液液萃取,人为干预程度明显减少,能得到更好的准确度与精确度。

医院药学部门因日常 TDM 监测样品种类多,通量大,必须减少单次分析的时间。基于自动进样器增加通量的方法是对色谱网络进行并联修改^[10,11],但此种方式并不适合中心切割,因为两根并联柱不同,多次进样后损坏程度也不同,切割时间窗口不易制定,且当样品通量较大时,自动进样器的批处理表容易出错。据此,本研究对色谱网络进行串联修改,引入了 SCX 中间级,将被测组分储存在中间级,使一级柱进下次样品时,中间级的组分被转移到二级柱并同时进行分析,缩短单次循环的时间,使大通量的样品检测时间复杂度大大降低。中间级除担负减少时间复杂度的任务外,还可以进一步分离杂质,净化了到达二级柱的组分,减小二级柱负载。具体原理为通过调整辅助压缩流路的 pH 值,使 MTX 保留在 SCX 柱上。通过观察不同 pH 值对色谱峰面积的影响。发现在 pH 3.0 ~ 5.5 之间,随着 pH 值增加,保留量减少,故调整辅助压缩流路 pH = 3。

3.2 大体积进样和峰展宽控制

大体积进样可以根据分析物质的灵敏度要求提高进样量(常规进样量 0 ~ 500 μL ,最大可改装 1000 μL 的进样环),获得更低的定量限,扩大了紫外检测器的应用范围,满足日常 TDM 和药代动力学中代谢物的检测要求。

考虑到大体积进样的应用与二维色谱的柱外效应,本研究运用梯度模拟压缩技术,在柱头部控制峰展宽。梯度模拟压缩具体运行行为:在进样和被测组分从第一级色谱转移到中间级时,同时开启 Pump 2,使 Pump 2 所控制的流动相(10 mmol/L H_3PO_4)进入色谱流路,并根据流速和管路长度计算出关泵时间。

如图 2 所示,当 $t = 0$ 时,被测组分在柱端进口处,由于辅助压缩流路的开启,被测组分后部的一段流动相有机相浓度由 φ_1 减小为 φ_2 ,设浓度 φ_1 的流动相洗脱速度为:

$$u_1 = u_0 / (1 + k_1)$$

浓度 φ_2 流动相洗脱速度为:

$$u_2 = u_0 / (1 + k_2)$$

其中, u_0 为流动相线速度, k_1 和 k_2 分别为被测组分在不同浓度流动相中的保留因子。由于 $u_1 > u_2$,峰展宽在柱头被压缩,当 $t = t_f$ 时,有机相浓度较高的流动相头部“追上”了被测组分头部,整个柱头压缩过程结束。

本实验中 MTX 进样 200 μL ,峰展宽约为 0.6 min,比一般小体积进样(小于 50 μL)的文献峰宽明显变窄^[3~5],可看出运用此技术后效果良好。因大体积进样带来的灵敏度提高效果显著,检出限为 0.005 $\mu\text{mol/L}$,低于普通配备紫外检测器的高效液相,略高于液相色谱-质谱联用法^[7,8],效费比最高。若要得到液-质联用的检出限水平,还可以继续加大进样量(进样环最大可改装到 1000 μL)。

3.3 方法的线性关系、检出限

取 MTX 系列标准血清样品,按 2.3 节方法处理,以峰面积对浓度进行线性回归,线性方程为 $y = 111772.5x - 683.993$, $r = 0.99998$, y 为样品峰面积, x 为 MTX 浓度,检出限可达 0.005 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.4 精密度和回收率

取高中低 3 个浓度(0.0879, 1.546, 5.154 $\mu\text{mol/L}$)的 MTX 系列标准血清样品各 5 份,按 2.3 节处理,测定 5 次,分别计算方法回收率、日间精密度。3 个浓度连续测定 5 天,计算日间精密度。另取绝对进样量相当于各浓度 100% 含量的标准对照品溶液进样,计算绝对回收率(表 1),日内 RSD 小于 1.8%,日间 RSD 小于 3.5%,相对回收率

表 1 甲氨蝶呤精密度和回收率

Table 1 Precision and recovery for determination of methotrexate (MTX) in plasma

浓度 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	日间 RSD Inter-day RSD (%)	日内 RSD Intra-day RSD (%)	相对回收率 Relative recovery (%)	绝对回收率 Absolute recovery (%)
0.0879	3.5	1.2	99.1	85.7
1.546	2.9	1.8	101.2	86.4
5.154	2.9	0.98	99.3	86.3

99.1% ~ 101.2% ,绝对回收率 85.7% ~ 86.4% 。本方法的精密度和回收率良好 ,符合临床体内药物分析要求。

3.5 专属性与样品分析

空白血浆色谱图空白血浆加 MTX 分别见图 3a 图 3b ,空白血浆图谱在 MTX 出峰处背景干净 ,无杂峰干扰 ,治疗常用合并药物(如阿糖胞苷、柔红霉素、地塞米松)不出峰。取本院小儿科病人血浆按照 2.3 节进样色谱图见图 4c。可见经过二维色谱分离后 ,MTX 峰形尖锐且为基线分离 ,减少了低浓度时的积分误差。

应用本方法对使用大剂量 MTX 治疗小儿科患者进行血药浓度监测 ,两名患者均为女性 ,年龄分别为 6 岁和 10 岁 ,检测时间点为给药后 44 和 68 h ,所有的血浆样品采集后立刻测定。44 h 检测结果分别为 1.525 和 0.658 $\mu\text{mol/L}$,其中第一位患者血药浓度超过 44 h 血药浓度标准(> 1 $\mu\text{mol/L}$) ,提示需要用四氢叶酸钙解救; 68 h 继续测定第一位患者 ,血药浓度为 0.058 $\mu\text{mol/L}$,达到小于 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的安全浓度。可停止解救。

4 结 论

本方法采用反向模式-强阳离子交换-反向模式

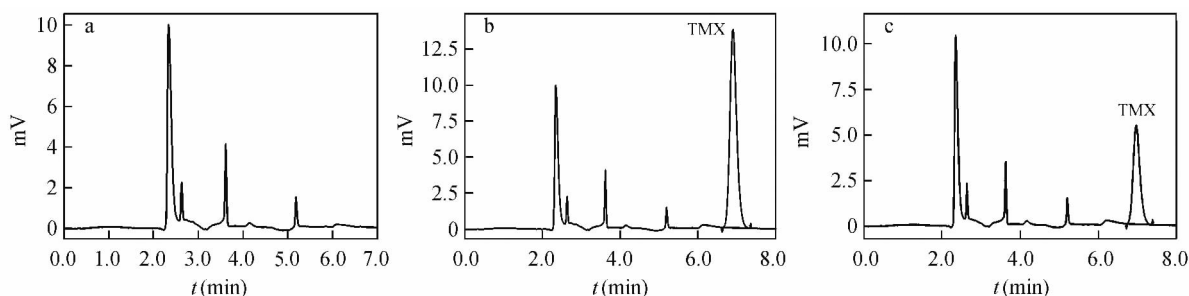


图3 人血浆中 MTX 色谱图

Fig.3 Chromatograms of MTX in human plasma

a. 空白血浆(Blank plasma) ; b. 空白血浆加 MTX(Blank plasma + MTX) ; c. 血浆样品(Plasma sample) 。

(RP-SCX-RP) 二维色谱平台测定人血浆中甲氨蝶呤浓度 ,运用大体积进样提高灵敏度 ,模拟梯度压缩技术控制峰展宽 ,并采用串联修改色谱网络 ,大大减少了单次分析时间复杂度 ,人为干预度小、简便、准确 ,适合临床甲氨蝶呤药物浓度检测和药动力学研究。

References

- 1 CHEN Xin-Qian , JIN You-Yu , TANG Guang. *Contemporary Clinical Pharmacology*. Beijing: People's Medical Publishing House , 2003: 672
陈新谦,金有豫,汤光. 新编药理学. 15 版. 北京: 人民卫生出版社 , 2003: 672
- 2 den Boer E , Koch B C , Huisman R , de Jonge R. *Ther Drug Monit* , 2014 , 36(6) : 819 - 823
- 3 LI Yuan-Dong , LI Yan , LIANG Ning-Sheng. *Chin Hosp Pharm J* , 2007 , 27(8) : 1090 - 1093
黎远冬,李艳,梁宁生. 中国医院药学杂志 , 2007 , 27(8) : 1090 - 1093

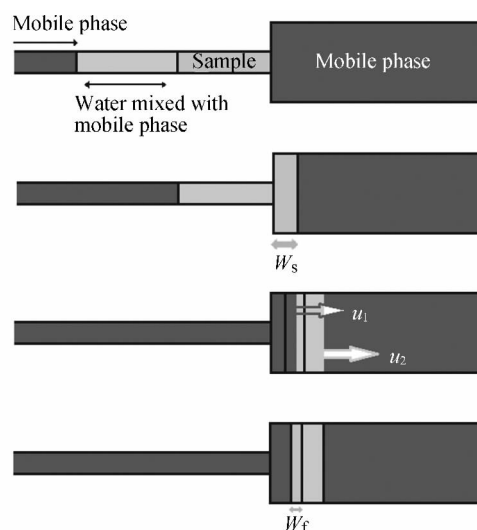


图2 模拟梯度压缩原理图

Fig.2 Schematic diagram of band compression under step gradient elution

样品(Sample) : 水与流动相混合部分(water mixed with mobile phase) ; 流动相(mobile phase) 。

u_1 : 被测组分在浓度 φ_1 的流动相洗脱速度 u_2 - 被测组分在浓度 φ_2 的流动相洗脱速度 W_s 、 W_f - 不同时间段的峰展宽

u_1 : Elution speed of sample on the concentration of φ_1 mobile phase; u_2 : Elution speed of sample on the concentration of φ_2 mobile phase; W_s , W_f : Band broadening in begin and end time.

- 4 Aboleneen H , Simpson J , Backes D. *J. Chromatogr. B* , **1996** , 681(2) : 317 – 322
- 5 Michail K , Moneeb M S. *Journal of Pharmaceu. Biomed. Anal.* , **2011** , 55(2) : 317 – 324
- 6 Yu Z , Westerlund D , Boos K S. *J. Chromatogr. B* , **1997** , 689(2) : 379 – 386
- 7 Rodin I , Braun A , Stavrianidi A , Shpigun O. *J. Chromatogr. B* , **2013** , 937: 1 – 6
- 8 Mo X , Wen Y , Ren B , Chen J , Xu C S , Wang X D , Huang M , Chen X. *J. Chromatogr. B* , **2012** , 907: 41 – 48
- 9 Ramsteiner K A. *J. Chromatogr. A* , **1986** , 456: 3 – 20
- 10 Ong V S , Cook K L , Kosara C M , Brubaker W F. *International Journal of Mass Spectrometry* , **2004** , 238(2) : 139 – 152
- 11 Cass R T , Villa J S , Karr D E , Schmidt D E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , **2001** , 15(6) : 406 – 412

Platform of Reversed Phase-Strong Cation Exchange-Reversed Phase Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography for Determination of Methotrexat in Plasma

SHENG Yang-Hao^{1 2} , LIU Dan-Qi^{1 2} , WANG Ping^{1 2} , ZHOU Bo-Ting^{* 1 2}

¹(The Pharmacy Department of Central South University Xiangyang Hospital , Changsha 410008 , China)

²(The Pharmacy of Central South University , Changsha 410008 , China)

Abstract A two-dimensional HPLC method was developed for the determination of methotrexat (MTX) in human plasma. The samples were treated with trichloroacetate for sedimentation and high speed centrifugation , and the obtained supernatant was taken for analysis. The analytes in sample were separated on the first dimension column (ASTON C₈ 100 mm × 4.6 mm , 5 μm) , and trapped on the middle column (ASTON SCX 20 mm × 4.6 mm , 5 μm) using valve-switching technique for purification and storage. Finally , the trapped analytes were transferred to the second-dimension column (SAC C₈ 100 mm × 4.6 mm , 5 μm) for the second separation. The mobile phase used for the first dimension was 10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile(9: 1 , V/V , pH = 3.8) with a flow rate of 1 mL/min and the mobile phase used for middle column was 10 mmol/L phosphoric acid (pH = 3.0) . The mobile phase used in second-dimension was a mixed solution of 50 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile (87: 10 , V/V , pH = 5.2) . UV detection was carried out at 306 nm and completed in 4 min. The calibration curve showed a linearity range from 0.0879 to 5.154 μmol/L ($r = 0.99998$) . The LOQ was 0.005 μmol/L. The intra-and inter-day precisions were lower than 1.5% and 1.8% , respectively. The relative recovery and the absolute recovery were 99.1% – 101.2% and 85.67% – 86.35% , respectively. The assay is simple , accurate , reproducible , and suitable for the therapeutic drug monitoring of MTX in the hospital and the study on the pharmacokinetics of MTX.

Keywords Two-dimension liquid chromatography; Methotrexat; High performance liquid chromatography

(Received 19 August 2014; accepted 25 September 2014)