

用中空纤维离心超滤法测定人血浆中甲氨蝶呤的游离浓度

Hollow fiber centrifugal ultrafiltration for the determination of free methotrexate concentration in human plasma

董维冲¹, 郭家良², 高帅帅¹,
李浩然¹, 李芳婷¹, 蒋 晔³,
张志清¹

(1. 河北医科大学 第二医院 药学部, 河北 石家庄 050051; 2. 河北医科大学 第三医院 骨科, 河北 石家庄 050000; 3. 河北医科大学 药学院, 河北 石家庄 050017)

DONG Wei - chong¹,
GUO Jia - liang²,
GAO Shuai - shuai¹, LI Hao - ran¹,
LI Fang - ting¹, JIANG Ye³,
ZHANG Zhi - qing¹

(1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China; 2. Department of Orthopaedics, Hebei Medical University Third Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; 3. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China)

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2024206081); 河北省医学适用技术跟踪基金资助项目 (GZ2024040); 吴阶平医学基金会临床科研专项基金资助项目 (320.6750.2020-04-11)

作者简介: 董维冲(1988-), 副主任药师, 主要从事治疗药物监测研究

通信作者: 张志清, 主任药师, 硕士生导师
Tel: (0311) 66003762

E-mail: 26500007@hebum.edu.cn

摘要:目的 建立一种中空纤维离心超滤(HFCF-UF)结合超高效液相色谱法(UPLC)分析人血浆中甲氨蝶呤(MTX)的游离浓度,并用于临床治疗药物监测。
方法 血清样本500 μL 经HFCF-UF处理,色谱柱为Waters UPLC BEH C_{18} 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为甲醇:0.05 mol $\cdot$ L⁻¹磷酸缓冲盐(pH = 6.2) = 17:83,流速为0.2 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为302 nm。对该方法的专属性、线性关系、定量下限(LLOQ)、精密度、回收率和稳定性进行考察,并用于临床血浆样品的测定。**结果** 人血浆中游离MTX在0.05~10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内线性关系良好, $y = 0.297x + 0.001$ ($r^2 = 0.999$),MTX游离血药浓度分析的LLOQ为0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,方法回收率为95.77%~100.52%,MTX绝对回收率为84.09%~92.93%,批内、批间相对标准偏差(RSD)均不大于7.0%。该方法成功用于52例用MTX冲击化疗患者体内MTX的游离浓度测定,该52例患者的MTX平均游离血药浓度为0.68 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,最大值为9.32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,最小值为0.056 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论** 本研究所建方法简便、准确、灵敏,适用于临床MTX治疗药物监测。

关键词: 甲氨蝶呤; 游离浓度; 中空纤维; 离心超滤; 治疗药物监测

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.04.020

中图分类号: R979.1 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)04-0548-04

Abstract: Objective To establish a hollow fiber centrifugal ultrafiltration (HFCF-UF) coupled with ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) method for the analysis of free methotrexate (MTX) concentration in human plasma and apply to clinical therapeutic drug monitoring. **Methods** Plasma samples 500 μL were prepared with HFCF-UF. A Waters UPLC BEH C_{18} column (50.0 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol and 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.2) (17:83, v/v) at a flow rate of 0.2 mL $\cdot$ min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 $^{\circ}\text{C}$. The detected wavelength was 302 nm. The specificity, linear relationship, lower limit of quantification (LLOQ), precision, recovery rate and stability of this method were investigated, and it was applied to the determination of clinical plasma samples. **Results** The good linear relationship were obtained between concentration of free MTX in human plasma from 0.05 - 10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $y = 0.297x + 0.001$ ($r^2 = 0.999$). The LLOQ of MTX free plasma concentration analysis was 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The method recovery rates of free MTX were

95.77% – 100.52%。The absolute recovery rates of free MTX was 84.09% – 92.93%。The intra-day and inter-day relative standard deviation (RSD) were all less than 7.0%。It was successfully used to analyze free MTX concentration in 52 plasma samples from patients with MTX chemotherapy. The average free plasma concentration of MTX in these 52 patients was $0.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, with the maximum value of $9.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the minimum value of $0.056 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** The developed method is simple, accurate and sensitive, which is suitable for the analysis of free MTX on clinical therapeutic drug monitoring.

Key words: methotrexate; free concentration; hollow fiber; centrifugal ultrafiltration; therapeutic drug monitoring

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)为二氢叶酸还原酶抑制药,用于治疗白血病、淋巴瘤、绒毛膜上皮癌等恶性肿瘤及其他相关疾病,其治疗指数低、药物不良反应大^[1]。临床常用大剂量 MTX (high dose MTX, HD-MTX) 冲击化疗,HD-MTX 比小剂量更有效,但可引起严重毒性^[2]。因此,推荐 MTX 进行常规血药浓度监测^[3-4]。只有非结合的游离形式的药物才能到达靶部位产生疗效和药物不良反应^[5],监测 MTX 游离浓度比总浓度更加准确^[6]。本研究用中空纤维离心超滤(hollow fiber centrifugal ultrafiltration, HFCF-UF)技术预处理样本,并结合超高效液相色谱法(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)建立人血浆中 MTX 的游离浓度分析方法,为临床 MTX 治疗药物监测提供一种准确、简便的监测手段。

材料与方法

1 材料

药品 MTX 标准品,规格:每瓶 400 mg,含量:99.8%,批号:100138-201606,中国食品药品检定研究院生产;替硝唑标准品,规格:每瓶 100 mg,含量:99.6%,批号:12060343,石家庄第四制药有限公司生产。

仪器 UPLC H-CLASS 超高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产品;10 KD HFCF-UF 装置(中空纤维壁厚 150 μm ,内径 1000 μm ;超滤玻璃管高 7 cm,内径 3.5 mm),河北和平医疗设备厂产品。

2 测定方法

本研究方法学建立和生物样本检测由河北医科大学第二医院药学部完成。

色谱条件 Waters UPLC BEH C_{18} 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为甲醇:0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸氢二钾(磷酸调 pH 至 6.2) = 17:83,检测波长为 302 nm,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 2 μL ,流速为 0.2 mL $\cdot$ min⁻¹。

溶液制备 称取 MTX 对照品 11.3 mg 于 50 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得到浓度为

500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,用水稀释储备液,制备一系列标准溶液,浓度为 200、100、50、20、10、5、2 和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。称取替硝唑对照品 25 mg,加入 100 mL 的容量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀得 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标储备溶液。用水稀释成 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标工作溶液。取 MTX 系列标准溶液 25 μL 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标工作液 25 μL ,加入空白血浆超滤液 450 μL ,涡旋混匀。制备浓度为 10.00、5.00、2.00、1.00、0.50、0.20 和 0.10 和 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MTX 线性标准血浆超滤液样本,同样方法制备浓度为 8.00、1.00 和 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTX 血浆超滤液质控样本。

血浆样品处理 取血浆样本 475 μL ,加入内标(25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 替硝唑) 25 μL ,涡旋混匀,置于 HFCF-UF 装置中,将中空纤维(15 cm)折成 U 型插入细玻璃管中,在 $2.4 \times 10^3 \times g$ 下离心 5 min 后,用注射器将中空纤维腔内的超滤液通过中空纤维的另一端推出,所得超滤液直接进行 UPLC 分析。

3 方法学验证

专属性 空白血浆超滤液、空白血浆超滤液加标样本、临床患者血浆样本按照“血浆样品处理”后进行 UPLC 分析,分析所得的色谱图。

标准曲线与定量下限(lower limit of quantification, LLOQ) 取“溶液制备”项下配制的浓度为 10.00、5.00、2.00、1.00、0.50、0.20 和 0.10 和 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTX 线性标准血浆超滤液样本,按“血浆样品处理”方法处理后进行 UPLC 分析,以相应的 MTX 和内标峰面积比(A_1/A_2)对浓度(C)进行线性回归分析,计算 MTX 游离浓度分析的标准曲线。以信噪比为 3 和 10 分别计算 MTX 游离浓度分析的检测限(limit of detection, LOD)和 LLOQ。

精密度与回收率 取“溶液制备”项下制备的低、中、高 3 个浓度(0.05、1.00 和 8.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 MTX 质控血浆超滤液样本,分别按“血浆样品处理”操作后进行 UPLC 分析,每个浓度重复 5 份,计算峰面积比,按标准曲线计算真实浓度,以所得真实浓度与理论浓度的比值计算方法的相对回收率。在同一个

分析批内,以所得峰面积比计算3个浓度的批内精密度,在不同的3个分析批内,计算批间精密度。按“溶液制备”项下方法制备3个浓度的MTX质控血浆超滤液样本,每个浓度制备5份,按照“血浆样品处理”操作后,进行UPLC分析,所得的峰面积与相应浓度超滤液样本直接进样所得峰面积比值计算提取回收率。

稳定性 按“溶液制备”项下方法制备3个浓度的血浆超滤液质控样本,在室温下放置12 h,用于评价室温稳定性。在-40℃下连续3个冻融循环,用于评价冻融循环稳定性。在-40℃下放置21 d,用于考察冰冻稳定性。样本处理后再室温放置8 h,用于考察室温放置稳定性。以当日随行标准曲线计算质控样本中MTX的游离浓度,并计算MTX血浆超滤液质控样本经上述条件处理后所得真实浓度的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

非特异性吸附 3种不同膜材的中空纤维(聚砜、聚偏氟乙烯和聚丙烯腈)用于考察非特异性吸附。按“溶液制备”项下方法制备低、中、高3个浓度(0.05、1.00和8.00 μmol·L⁻¹)的血浆超滤液样本经HFCE-UF后,所得中空纤维腔内、腔外溶液进行UPLC分析,与不经HFCE-UF处理直接进行UPLC分析所得的峰面积比计算回收率。

4 方法学应用

本研究经河北医科大学第二医院伦理委员会批

准(伦理批号:2024-R095),选取2019年9月至2021年2月于我院儿科和血液内科用大剂量MTX化疗的32例患者(男15,女17)的52个样本,年龄1~65岁,于化疗后48 h或72 h、96 h抽取静脉血2 mL于含有EDTA抗凝剂的采血管中,在4.0×10³×g下离心5 min,得到的血浆样本按先前建立的总浓度方法测定MTX总浓度^[7],剩余血样按照本实验所建方法进行游离浓度分析。

结 果

1 方法学评价

专属性 在本试验条件下,游离MTX和内标与杂质峰分离良好,且峰形良好,内源性物质不干扰测定,MTX和内标的保留时间分别为4.1和3.6 min,见图1。

标准曲线与定量下限 血浆中游离MTX在0.05~10.00 μmol·L⁻¹浓度内线性关系均良好, $y = 0.297x + 0.001$ ($r^2 = 0.999$,权重因子1/ C^2)。MTX血药浓度分析的LOD和LLOQ分别为1.25×10⁻²和0.05 μmol·L⁻¹。

精密度与回收率 MTX游离浓度分析准确度和精密度均良好,批内和批间精密度RSD均小于7.0%,结果见表1。其内标(1.25 μg·mL⁻¹替硝唑)提取回收率为97.3%。

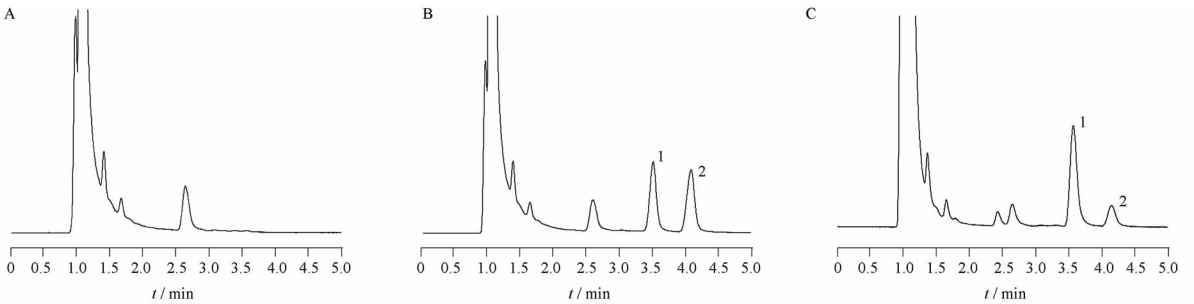


图1 甲氨蝶呤(MTX)的超高效液相色谱法(UPLC)色谱图

Figure 1 Ultra-performance liquid chromatography(UPLC) chromatograms for methotrexate (MTX)

A: Blank plasma ultrafiltrate; B: Blank plasma ultrafiltrate spiked with 2 μmol·L⁻¹ MTX and 1.25 μg·mL⁻¹ internal standard; C: Clinical plasma sample; 1: Peak for internal standard; 2: Peak for MTX.

表1 用UPLC检测MTX游离血药浓度分析的回收率和精密度

Table 1 The recovery and precision of MTX free plasma concentration analysis were detected by UPLC

C(μmol·L ⁻¹)	Intra-day precision(n=5)			Inter-day precision(n=15)			Relative recovery(%)	Absolute recovery(%)
	Measured	RSD	RE	Measured	RSD	RE		
	(μmol·L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	(%)	(%)	(μmol·L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	(%)	(%)		
0.05	0.05±0.00	3.92	-4.01	0.05±0.00	6.50	-1.26	95.99	92.93
1.00	0.96±0.01	1.16	-4.23	0.95±0.02	1.65	-4.82	95.77	84.09
8.00	8.04±0.04	0.45	0.52	8.18±0.12	1.51	2.20	100.52	90.82

RSD: Relative standard deviation; RE: Relative error.

稳定性 低、中、高 3 个浓度的 MTX 质控样本在室温放置 12 h、冻融循环 3 次和长期冰冻 30 d 的稳定性良好, RSD 均小于 10%。

非特异性吸附 低、中、高 3 个浓度的 MTX 和内标用聚丙烯腈材质的 HFCE-UF 处理后, 回收率接近 100%, 可用于后续实验。而聚砜、聚偏氟乙烯材质的 HFCE-UF, 存在明显的非特异性吸附, 其腔内溶液回收率分别约为 25% 和 50%。

2 血浆样本测定结果

本实验所建方法成功用于我院 52 例血浆样本中游离 MTX 浓度测定, MTX 监测结果的平均游离浓度为 $0.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最大值 $9.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最小值为 $0.056 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。52 例患者血浆中 MTX 的血浆蛋白结合率均值为 52.18%, 变化范围为 12.27 ~ 83.42%。

讨 论

目前, 文献报道常用的游离血药浓度测定前处理方法有平衡透析法、离心超滤法^[8-9]。平衡透析法需要较长的透析时间, 且样本被稀释, 不适宜临床常规治疗药物监测^[10], 离心超滤法操作简便省时, 但是容易受到分子筛和非特异性吸附的影响, 且离心后得到较大和不固定的滤液体积, 影响分析方法的准确度和精密度^[11]。因此均未见用于 MTX 游离血药浓度监测的报道。本实验用 HFCE-UF 方法分析人血浆中 MTX 的游离浓度, 样本无需稀释, 前处理过程只需一步 5 min 的普通离心, 得到固定且体积恒定的超滤液, 可直接用于 UPLC 分析, 结果准确、精密, 成功用于我院 MTX 常规治疗药物监测。

本研究测定的 52 例患者血浆中 MTX 的血浆蛋白结合率均值为 52.18%, 与文献报道的一致^[12], 但存在较大的个体差异 (12.27% ~ 83.42%)。其中 1 例患儿经历 3 次 HD-MTX 化疗, 均以初剂量每次 $15 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 的亚叶酸钙解救, 每 6 h 解救 1 次, 其 48 h 的 MTX 总浓度分别为 0.37 、 0.74 和 $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 仅仅根据总浓度结果是仍需继续解救, 然而本研究发现该患儿 3 次游离浓度均较低, 分别只有 0.11 、 0.12 和 $0.09 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此药师建议医师可以考虑停止亚叶酸钙解救, 且未发生药物不良反应。另有 2 例患儿, 其 48 h MTX 总浓度分别为 0.82 和 $0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 只参考 MTX 总浓度测定结果可以按照常规亚叶酸钙剂量解救, 然而发现其游离浓度均较高, 分别为 0.58 和 $0.64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此药师建议医师适当增加解救

剂量或次数, 以免发生药物不良反应。MTX 游离血药浓度测定结果可以为临床治疗药物监测提供更加准确的用药依据, 而本实验建立的方法为临床 MTX 游离药物测定提供了简便、准确的分析手段。

参考文献:

- [1] BLUETT J, RIBA - GARCIA I, VERSTAPPEN S M M, *et al.* Development and validation of a methotrexate adherence assay [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78 (9): 1192—1197.
- [2] TAYLOR Z L, MIZUNO T, PUNT N C, *et al.* MTXPK.org: A clinical decision support tool evaluating high - dose methotrexate pharmacokinetics to inform post - infusion care and use of glucarpidase [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 108 (3): 635—643.
- [3] RAMSEY L B, BALIS F M, O'BRIEN M M, *et al.* Consensus guideline for use of glucarpidase in patients with high - dose methotrexate induced acute kidney injury and delayed methotrexate clearance [J]. *Oncologist*, 2018, 23 (1): 52—61.
- [4] SVAHA T, MELLGREN K, HARILA - SAARI A, *et al.* Delayed elimination of high - dose methotrexate and use of carboxypeptidase G2 in pediatric patients during treatment for acute lymphoblastic leukemia [J/OL]. *Pediatr Blood Cancer*, 2017, 64 (7): e26395. 2016 - 12 - 14 [2024 - 06 - 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27966809/>.
- [5] ZHANG F L, XUE J P, SHAO J W, *et al.* Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17 (9—10): 475—485.
- [6] 陈冰, 蔡卫民. 游离药物浓度监测及其应用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2008, 24(3): 255—259.
- [7] 董维冲, 赵晓晓, 张学琴, 等. 超高效液相色谱法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(21): 3519—3521.
- [8] 刘睿, 谢跃生, 潘桂湘, 等. 药物血浆蛋白结合率测定方法的研究进展[J]. 天津中医药, 2007, 24(6): 526—528.
- [9] SAARI T I, FECHNER J, IHMSEN H, *et al.* Determination of total and unbound sufentanil in human plasma by ultrafiltration and LC - MS/MS: Application to clinical pharmacokinetic study [J/OL]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 66: 306—313. 2012 - 04 - 03 [2024 - 06 - 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22522038/>.
- [10] RAKHILA H, ROZEK T, HOPKINS A, *et al.* Quantitation of total and free teriflunomide (A77 1726) in human plasma by LC - MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55 (2): 325—331.
- [11] LI W, LIN H, SMITH H T, *et al.* Developing a robust ultrafiltration - LC - MS/MS method for quantitative analysis of unbound vadimezan (ASA404) in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879 (21): 1927—1933.
- [12] JOUYBAN A, SHAGHAGHI M, MANZOORI J L, *et al.* Determination of methotrexate in biological fluids and a parenteral injection using terbium - sensitized method [J]. *Iran J Pharm Res*, 2011, 10 (4): 695—704.

(收稿日期 2024 - 07 - 31)