

· 论著 ·

人血浆中甲氨蝶呤的高效液相色谱法测定及其代谢物的质谱定性分析

王漪璇, 毋丹, 曹军宁, 钱隽 (复旦大学附属肿瘤医院肿瘤内科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032)

[摘要] **目的** 建立固相萃取-高效液相色谱法测定人血浆中的甲氨蝶呤浓度, 用于临床治疗的监测, 并通过质谱对甲氨蝶呤的人体代谢物进行定性分析。**方法** 血浆样本经 C₁₈ 固相萃取小柱净化洗脱后直接进样, 以 Diamonsil C₁₈ 分析柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 分离, 流动相为甲醇和 0.5% 乙酸溶液 (含 0.3% 三乙胺), 采用梯度洗脱; 流速为 1.0 ml/min; 紫外检测波长为 306 nm。通过质谱全扫描 (QLMS) 和多反应监测-信息关联采集-增强子离子扫描 (MRM-IDA-EPI) 获得甲氨蝶呤代谢物的质谱信息。**结果** 甲氨蝶呤在 0.05~100 μmol/L 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 提取回收率 >95%, 准确度在 97%~105% 之间, 日内与日间精密度 (RSD) 均 <5%。分析甲氨蝶呤代谢物的质谱信息, 推断该代谢物为 7-羟基甲氨蝶呤。**结论** 本方法灵敏度高、重现性好、操作简便, 适用于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; 固相萃取; 代谢物

[中图分类号] R917.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)02-0143-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.013

Determination of methotrexate in human plasma by HPLC and qualitative analysis of its metabolite by mass spectrometry

WANG Yixuan, WU Dan, CAO Junning, QIAN Jun (Department of Medical Oncology, Cancer Hospital Affiliated to Fudan University; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective** To develop an SPE-HPLC method for the determination of methotrexate (MTX) in human plasma to monitor the clinical drug use of MTX, and to identify the human metabolite of MTX by mass spectrometry. **Methods** MTX was extracted from human plasma using C₁₈ SPE column and analyzed directly after elution. The separation of MTX was performed on Diamonsil C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with a gradient mobile phase of methanol and 0.5% acetic acid solution (containing 0.3% triethylamine) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 306 nm. QLMS and MRM-IDA-EPI scan modes were used to obtain the mass spectrum of MTX metabolite. **Results** The calibration curve of MTX in plasma was linear over the range of 0.05-100 μmol/L ($r=0.9999$). The extraction recovery was above 95% and accuracy was between 97% and 105%. Both intra- and inter-day precision were less than 5%. 7-OH MTX was identified to be the metabolite through the analysis of the mass spectrum. **Conclusion** The method is sensitive, reproducible, easy to operate and suits for monitoring the concentration of MTX in clinical practice.

[Key words] methotrexate; HPLC; solid phase extraction; metabolite

甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 为抗叶酸类抗肿瘤药, 临床上广泛用于白血病、淋巴瘤、骨肉瘤的化疗。但其毒性大且在人体内的代谢存在很大个体差异, 当 MTX 给药后 48 h 血浆浓度在 1.0 μmol/L、72 h 血浆浓度在 0.1 μmol/L 以上时, 会造成严重的甚至致命的毒性反应^[1,2], 必须及时给予亚叶酸钙 (calcium folinate, CF) 解救, 因此大剂量使用 MTX 须及时监测患者的血药浓度。高效液相色谱法 (HPLC) 是治疗药物浓度监测的主要方

法之一。已有很多文献^[3-11]报道, 应用 HPLC 法测定生物样品中 MTX。本研究简化了原本烦琐的固相萃取过程, 洗脱、浓缩一步完成且最低定量限达到 0.05 μmol/L。同时收集患者血浆中 MTX 代谢物, 通过质谱对其进行定性分析, 确证了色谱中 MTX 代谢物为 7-羟基甲氨蝶呤 (7-OH MTX)。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪、G1314A 紫外检测器、HP Chem Station 工作站 V4.01 (美国 Agilent 公司); API 3200 QTRAP 三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子 (ESI) 源、操作软件 Analyst 1.5 (美国 AB SCIEX 公司); Promi-

[作者简介] 王漪璇, 中药师. E-mail: 13564899963@139.com

[通讯作者] 钱隽, 副主任药师. 研究方向: 临床药理学. Tel: (021) 64175590-81112; E-mail: junqian@fudan.edu.cn

nence UFLC 液相色谱系统,包括 LC-20AD 梯度泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱和 DGU-20A3 脱气机(日本岛津公司);Bond Elut C₁₈ 固相萃取小柱(100 mg/ml,美国 Agilent 公司)。

1.2 药品与试剂 MTX 对照品(纯度 99.6%,批号:100138-200603,中国药品生物制品检定所);对氨基苯乙酮(分析纯,批号:28295,上海晶纯试剂有限公司);甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);三乙胺和乙酸均为国产分析纯。

1.3 HPLC 色谱条件(MTX 定量测定) 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, Dikma); 流动相 A 为 0.5% 乙酸溶液(含 0.3% 三乙胺),流动相 B 为甲醇,梯度洗脱见表 1;流速:1.0 ml/min;柱温:25 °C;紫外检测波长:306 nm;进样量:20 μl。

表 1 梯度洗脱程序

HPLC		液质联用	
时间(t/min)	甲醇(%)	时间(t/min)	乙腈(%)
0.0	15	0.0	5
5.0	30	0.5	5
7.0	50	1.2	70
9.0	50	3.2	70
9.5	70	3.3	5
12.0	70	5.0	5

1.4 液质联用(代谢物定性分析)

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Column Technology C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 3 μm);流动相 A 为 2 mmol/L 乙酸铵,乙酸调 pH 值至 4.0,流动相 B 为乙腈。梯度洗脱见表 1;流速:0.3 ml/min;柱温:35 °C。进样量:5 μl。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)正离子检测,采用全扫描(QLMS)和多反应监测-信息关联采集-增强子离子扫描(MRM-IDA-EPI),气帘气(CUR)压力为 30 psi;雾化气(GS1)压力为 35 psi;碰撞气(GS2)为 40 psi,电喷雾电压(IS)为 5 000 V。全扫描质量数范围:50~500;MRM 选择监测离子对: m/z 455→308、 m/z 471→324;IDA 采集阈值:1 000 cps;EPI 扫描速率:1 000 Da/s;扫描质量数范围:50~500。

1.5 标准溶液的配制

1.5.1 工作溶液 精密称取 11.36 mg 的 MTX 对照品,加入甲醇溶解并定容,配制得 1 000 μmol/L 的 MTX 标准储备液。分别用 50% 甲醇稀释至 0.50、1.00、2.50、10.0、25.0、100、250 μmol/L,作为 MTX 标准曲线工作液。吸取 MTX 标准储备液分别用 50% 甲醇稀释至 1.00、10.0、80.0、800 μmol/L,作为 MTX 质控点工作液。精密称取 10.05 mg 的对氨基苯乙酮对照品,加入甲醇溶解并定容,配制得 5 g/L 的内标储备液。将此溶液稀释 50 倍,获得浓度为 100 mg/L 的内标工作液。所有储备液和工作液均保存在 4 °C 冰箱中备用。

1.5.2 血浆标准曲线和质控样品 向健康人空白血浆添加适量 MTX 系列工作溶液,配制成浓度为 0.05、0.10、0.25、1.00、2.50、10.0、25.0、100 μmol/L 的标准曲线样品。向人空白血浆添加 MTX 质控点工作液,得到浓度分别为 0.10、1.00、8.00、80.0 μmol/L 的质控样品。

1.6 血浆样品的处理

1.6.1 液相进样样品 在每毫升血浆样品中加入 10 μl 内标溶液,即获得含内标 1 mg/L 的载样血浆。取 Bond Elut C₁₈ 小柱,先以甲醇 2 ml 活化和超纯水 2 ml 平衡,继加入 0.8 ml 载样血浆,再以 1 ml 生理盐水淋洗,最后用 60% 甲醇溶液(含 40 mmol/L 盐酸)0.4 ml 洗脱。收集洗脱液涡旋 5 s,HPLC 进样 20 μl。

1.6.2 液质联用进样样品 上述固相萃取洗脱液进样 5 μl。收集患者样品 HPLC 进样 10~11 min 的洗脱液(即 MTX 代谢物收集液),混匀后进样 5 μl 分析,并与固相萃取洗脱液的质谱分析结果进行比较。

2 结果

2.1 特异性 MTX 和内标在本实验条件下保留时间分别为 8.5 和 9.4 min。取 6 份不同来源的健康人空白血浆、空白血浆标准添加样品和实测样品,按“1.6.1”项下操作后进样分析,色谱图显示血浆中的内源性杂质均不干扰 MTX 和内标的测定,实测样品的 MTX、内标和血浆样品中其他物质的色谱峰分离完全(图 1)。

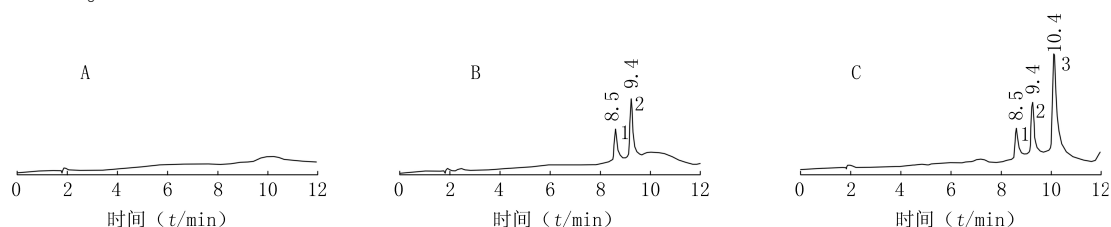


图 1 人血浆中 MTX 的 HPLC 色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆加 MTX (1.00 μmol/L); C. 患者用药 48 h 的实测血浆样品 (1.26 μmol/L); 1. MTX; 2. 内标; 3. 7-OH MTX

2.2 线性范围与最低定量限 浓度为 0.05、0.10、0.25、1.00、2.50、10、25、100 $\mu\text{mol/L}$ 的血浆标准曲线样品,按“1.6.1”项下处理,经 HPLC 分析后,以 MTX 与内标的色谱峰面积之比(Y)对相应的浓度($X, \mu\text{mol/L}$)进行线性加权($1/X^2$)回归,线性回归方程为: $Y=0.2785X-0.000059, r=0.9992$ 。结果表明,MTX 浓度在 0.05 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好,最低定量限为 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 回收率

2.3.1 提取回收率 取浓度为 0.10、1.00、8.00、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 的质控血浆样品平行制备 5 份,按“1.6.1”项下处理后进样测定。另直接用 60% 甲醇溶液(含 40 mmol/L 盐酸)配制相应浓度的 MTX 溶液,进样 20 μl ,以质控样品与相应浓度 MTX 溶液的色谱峰面积之比,计算提取回收率,结果见表 2。以同法测算内标回收率为 93.2%。

2.3.2 方法回收率 4 个浓度的质控样品平行制备 5 份,按“1.6.1”项下操作后进样测定,所得的 MTX 与内标的峰面积比以标准曲线方程计算,测得浓度与相应配制浓度的比值即为方法回收率,结果见表 2。

表 2 MTX 血浆样品的提取回收率和方法回收率($n=5$)

加入量 ($\rho_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	提取回收率 (%)	方法回收率 (%)	RSD(%)	
			提取回收率	方法回收率
0.10	97.74	97.80	3.45	4.03
1.00	96.31	104.80	3.50	1.69
8.00	96.99	103.80	1.67	1.74
80.00	96.47	100.90	1.17	2.27

2.4 精密度 4 个浓度的质控样品平行制备 5 份,按“1.6.1”项下操作后测定,连续 3 d 同法处理进样,考察日内与日间精密度,结果表明本测定方法精密度良好(表 3)。

表 3 血浆样品中 MTX 浓度测定的精密度($n=5$)

加入量 ($\rho_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	精密度($\rho_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		RSD(%)	
	日内	日间	日内	日间
0.10	0.10	0.09	3.27	2.67
1.00	0.98	1.00	3.81	2.72
8.00	8.30	8.35	1.67	1.88
80.00	84.00	83.20	1.17	4.71

2.5 稳定性

2.5.1 样品的室温稳定性 取浓度为 0.10、1.00、8.00、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 的质控血浆样品,在室温 25 $^{\circ}\text{C}$

下放置 4 h 后测定其浓度,结果与其理论浓度偏差 $<8.2\%$, $\text{RSD}<7.2\%$,表明 MTX 于室温条件下 4 h 内稳定性良好。

2.5.2 样品的冻融稳定性 各浓度的质控血浆样品,反复冻融 3 次,每次冻融后分别测定,测得各冻融批次间样品的浓度变化 $<7.3\%$, $\text{RSD}<7.8\%$,表明 MTX 血浆样品反复冻融 3 次稳定性良好。

2.5.3 样品在自动进样器中的稳定性 将各浓度的质控样品按“1.6.1”项下处理后立即进样,并在自动进样器中放置 24 h 后再次进样,比较前后两次进样测定浓度变化 $<4.3\%$, $\text{RSD}<6.0\%$,表明 MTX 血浆样品经前处理后 24 h 内在自动进样器中稳定。

2.5.4 样品存放期的稳定性 将各浓度的质控血浆样品,在 -40°C 冰箱内存放 3 个月后测定其浓度,结果与其理论浓度偏差 $<8.7\%$, $\text{RSD}<5.9\%$,证明 MTX 血浆样品在 -40°C 冰箱内存放 3 个月稳定性良好。

2.6 稀释试验 由于在临床治疗过程中,患者的 MTX 血药浓度值可能超过 100 $\mu\text{mol/L}$,即超出本研究的定量上限,必须经过稀释后才能测定。用空白血浆将含 1 000 $\mu\text{mol/L}$ MTX 的样品稀释 20 倍后测定,测得浓度乘 20 后与实际配制浓度比较,质控样品经过稀释后的准确度为 101%, $\text{RSD}<2.7\%$ 。

2.7 临床应用 本方法已应用于数百例使用大剂量 MTX 化疗患者的血药浓度监测。分析结果显示,MTX 标准曲线和质控样品的重现性良好,患者血浆中内源性杂质、代谢物及合并用药均不干扰待测物峰。绝大多数患者在 72 h 的血药浓度已低于 0.05 $\mu\text{mol/L}$,少数血药浓度不能下降至安全范围的患者在及时加大解救剂量和频率后血药浓度也降低至安全范围,均未发生不可逆的严重不良反应。

2.8 代谢物鉴定 固相萃取处理后的血浆样品经质谱全扫描可见 m/z 为 455 和 471 的离子,分别与 MTX 及其代谢物 7-OH MTX 的质荷比相吻合。根据文献报道^[12,13],设置 m/z 455 \rightarrow 308(MTX)及 m/z 471 \rightarrow 324(7-OH MTX)的多反应监测,并对两组质荷比通道中的色谱峰进行 IDA-EPI 扫描,发现 m/z 471 \rightarrow 324 的通道中有色谱峰的保留时间为 3.1 min,该物质的准分子离子为 m/z 471,主要的特征性碎片离子为 m/z 342、324、191,分别与 MTX 的准分子离子 m/z 455,特征性碎片离子 m/z 326、308、175 各相差 16(图 2),证明两者在质谱中的碎裂方式相同(图 3)。根据 MTX 的分子结构以及两者各碎片离子质荷比的差值均为 16,推测前者在 MTX 的分子结构上发生了羟基取代,且取代位置

为7号位,故推断其为MTX的代谢物7-OH MTX。MTX代谢物收集液通过液质联用进样后,在 m/z 471→324通道中色谱保留时间也为3.1 min,并在

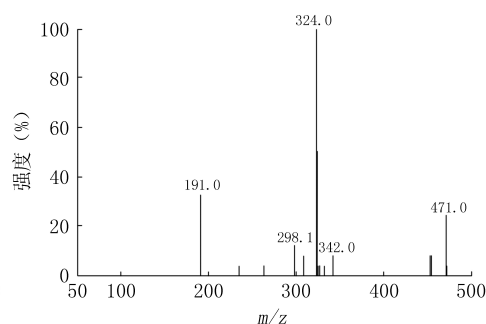
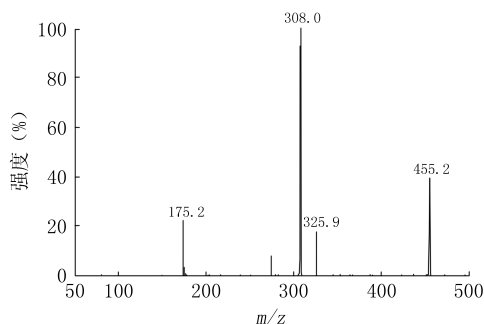


图2 人血浆中MTX的HPLC色谱图 MTX与7-OH MTX二级质谱图

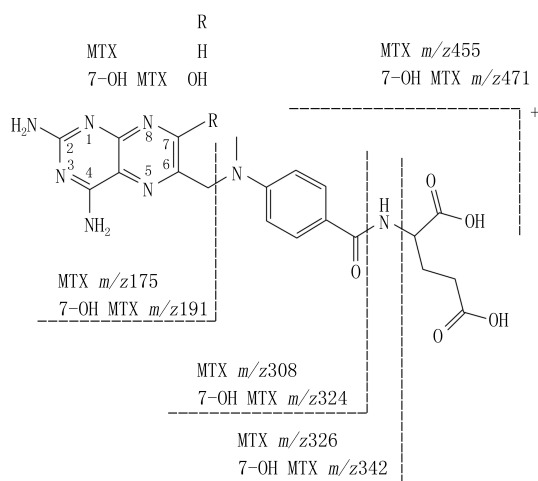


图3 MTX与7-OH MTX的裂解模式

3 讨论

3.1 样品预处理 HPLC色谱法测定生物样品中MTX,主要受样品预处理方法的限制,文献报道的蛋白沉淀^[3-5]、液液萃取^[6,7]等方法均存在内源性杂质去除不完全而干扰待测物的测定、色谱柱污染严重、回收率低等问题^[9,10]。本方法采用固相萃取法,基本去除了血浆样品中的基质干扰,方法特异性高,回收率达95%以上,重现性好,且省去了吹干复溶的步骤,操作简便迅速。

3.2 固相萃取柱的选择 本研究比较了Bond Elut C₁₈、FOCUS、Bond Elut SAX和Bond Elut Plexa PCX等固相萃取柱的提取效率,结果显示Bond Elut C₁₈柱回收率最高。经试验FOCUS柱洗脱液中MTX回收率略低于Bond Elut C₁₈柱,极性杂质较C₁₈柱多;离子交换柱(Bond Elut SAX、Bond Elut Plexa PCX)在保留、淋洗和洗脱的过程中均需调节pH值,且需预先去除血浆中竞争吸附的杂质方可

质谱中产生 m/z 324、191的碎片离子,证明在HPLC中保留时间为10.4 min的物质确为7-OH MTX。

载样,操作较为烦琐。

3.3 内标的选择 本实验考察了甲硝唑、茶碱、氨基甲酸、安定、磺胺、对氨基苯乙酮、对氨基苯乙醚等化合物。结果表明,氨基甲酸、安定、磺胺和对氨基苯乙醚的色谱保留时间与MTX差异较大,茶碱在紫外306 nm处吸收不佳,而甲硝唑在固相萃取过程中回收率较低。最后选择对氨基苯乙酮,其固相萃取的回收率较高,色谱保留时间与MTX相近但不干扰,且在紫外线检测波长306 nm处有较大吸收,适合作为MTX测定的内标化合物。

3.4 样品浓缩 由于临床上以用药72 h MTX浓度低于0.1 μmol/L为安全范围^[1,2],所以MTX浓度的定量限应低于0.1 μmol/L。目前报道的固相萃取方法^[8-11],均需吹干复溶进行浓缩方能够达到预期的定量限,此过程非常耗时。本研究通过减少固相萃取过程中洗脱液的用量,直接完成样品的浓缩。经试验在洗脱过程中使用不同体积的洗脱液(分别为0.2、0.3、0.4、0.5、0.7和1.0 ml),MTX的回收率分别为97.9%、99.3%、99.5%、99.1%、97.3%和99.0%,无明显差异,提示以少量洗脱液可同时完成洗脱和浓缩的过程,省去吹干复溶的操作,从而提高样品前处理的效率。

3.5 质谱定性 在定量分析过程中,对比空白加样血浆与患者血浆样品的液相色谱图,发现10.4 min时出现一色谱峰,见图1C,推测其或为MTX代谢物的色谱峰。由于实验室没有MTX代谢物的对照品,仅依靠HPLC无法确定此色谱峰的物质属性。API 3200 QTRAP是串联四级杆-线性离子阱质谱仪,其Q₃可作为线性离子阱使用,在MRM扫描同时进行增强二级碎片的全谱定性。本研究采用MRM-IDA-EPI组合扫描模式,从患者用药后的血

3 讨论

3.1 流动相的选择 本实验曾参考《中华人民共和国药典(一部)》2010年版中[连翘]含量测定项,使用乙腈-0.4%冰醋酸(15:85)作为流动相进行测定,结果连翘酯苷A峰与相邻杂质峰分离不佳、峰形差;亦曾考察不同的流动相系统:乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱、甲醇-磷酸水溶液梯度洗脱^[4,5]、乙腈-0.4%冰醋酸水溶液等度及梯度洗脱^[6,7]、甲醇-0.2%冰醋酸梯度洗脱,结果以甲醇-0.2%冰醋酸梯度洗脱分离效果最好,峰形最佳。

3.2 供试品制备方法的考察 考察提取溶剂种类时,对甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇等提取溶剂进行比较,发现使用50%甲醇作为提取溶剂时,测得含量较高且峰形最好,因此选择50%甲醇作为提取溶剂。另对提取方式(加热回流、超声处理、浸泡处理),提取时间(30、45、60 min),提取溶剂用量(25、50、100 ml)进行了优选。优选方案为:加溶剂50 ml,超声处理45 min。

3.3 对照品配制用溶剂的选择 连翘酯苷A含酚类结构,其结构较为复杂,在高湿、强光下不稳定^[3]。本研究发现,当使用含有水的甲醇溶液配制时,对照品溶液放置几小时后就会分解(HPLC测定可发现

在主峰前有明显的分解峰,且主峰的峰面积有明显的下降);使用不含水的纯甲醇配制,对照品溶液放置几天后峰面积亦会降低。有研究报道称,酸性介质或抗氧剂的加入有利于改善连翘酯苷A在水溶液中的稳定性^[3]。因此,笔者尝试通过在50%甲醇中加入0.5%冰醋酸作为溶剂配制对照品溶液以提高其稳定性,测定结果表明,此法效果显著,对照品溶液放置20 d后峰面积亦无明显变化。

【参考文献】

- [1] 段富津.方剂学[M].上海科学技术出版社,1995:28.
- [2] 付鹏亮,王东强,李志军.连翘酯苷药理作用研究进展[J].长春中医药大学学报,2011,27(6):1062-1063.
- [3] 王曙宾,郑亚杰.连翘提取物和连翘酯苷A原料中连翘酯苷A的稳定性研究[J].中草药,2010,41(6):909-911.
- [4] 鲍涵,张忠义,张军,等.HPLC法同时测定热毒清颗粒中绿原酸和连翘酯苷A的含量[J].中国药房,2012,23(24):2284-2286.
- [5] 蔡颖.HPLC法测定小儿肺热咳喘口服液中含连翘苷和连翘酯苷A的含量[J].齐鲁药事,2012,31(6):333.
- [6] 刘鹏,宋迎权.HPLC法测定双黄连颗粒中含连翘酯苷A的含量[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(19):158.
- [7] 赵昱玮,于森,南敏伦,等.高效液相色谱法测定银翘解毒片中连翘酯苷A的含量[J].中国医药科学,2011,1(22):114.

【收稿日期】2013-08-10 【修回日期】2014-02-20

【本文编辑】李睿晔

(上接第146页)

浆样品中筛选出主要代谢物7-OH MTX,并获得液质联用的相关特征信息。经比较,色谱峰10.4 min处的物质在液质联用中的色谱与质谱行为与筛选所得7-OH MTX均相符,故确证其为MTX在人体内的代谢物7-OH MTX。

【参考文献】

- [1] Green MR, Chowdhary S, Lombardi KM, et al. Clinical utility and pharmacology of high-dose MTX in the treatment of primary CNS lymphoma[J]. Expert Rev Neurother, 2006, 6(5): 635-652.
- [2] Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs[J]. Br J Clin Pharmacol, 1999, 47: 131-143.
- [3] 彭波. 高效液相色谱法测定甲氨蝶呤的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(11): 951-952.
- [4] 张春燕, 顾健. 反相高效液相色谱法同时测定人血浆中亚叶酸、5-甲基四氢叶酸及甲氨蝶呤的浓度及临床应用[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(7): 543-547.
- [5] 许耘川, 袁向亮, 沈立松. HPLC法测定血清甲氨蝶呤浓度的方法建立及其与荧光偏振法的比较[J]. 检验医学, 2010, 25(9): 701-704.
- [6] 谢军平, 冯玲玲, 匡霞. HPLC测定大剂量甲氨蝶呤患者血药浓度[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 69-72.

- [7] 霍晶, 袁盛华, 方芸, 等. 反相高效液相色谱法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(5): 390-392.
- [8] Turci R, Micoli G, Minoia C. Determination of methotrexate in environmental samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography: ultraviolet or tandem mass spectrometry detection? [J]. Rapid Commun Mass Spectr, 2000, 14: 685-691.
- [9] 周卿, 潘雪君. 固相萃取-高效液相色谱法测定人乳中甲氨蝶呤的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2305-2307.
- [10] 吴雪梅, 丘宏强, 方令平, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定甲氨蝶呤的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(18): 1617-1619.
- [11] 张华年, 文玲莉, 张少文, 等. 固相萃取高效液相色谱法检测生物样本中甲氨蝶呤[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 401-404.
- [12] 曹一辰, 孟祥乐, 朱金辉, 等. LC-MS/MS法测定人血清中甲氨蝶呤及其代谢产物7-羟基甲氨蝶呤的浓度[J]. 中国药师, 2012, 15(2): 191-194.
- [13] Guo PI, Wang XM, Liu LS, 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: 1789-1795.

【收稿日期】2014-04-03 【修回日期】2014-06-26

【本文编辑】李睿晔