
**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ, МЕТОДОЛОГИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ**

УДК 543.544.5.068.7: 615.2/3: 611.018.54

© Г. А. Фёдорова, М. А. Грачёв, Е. П. Подольская, Н. В. Краснов,
Е. К. Гимбицкая, Е. В. Урсуленко, С. В. Ованесян, О. П. Толмачёва**КОНТРОЛЬ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТОТРЕКСАТА
МЕТОДОМ ВЭЖХ НА КОРОТКИХ КОЛОНКАХ
ПРИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ**

Предложена методика определения метотрексата в сыворотке крови, пригодная для контроля его концентрации при проведении химиотерапевтического лечения. Подготовка пробы заключается в предварительной экстракции липидов гексаном, осаждении белков в присутствии перхлората лития, уксусной кислоты и ацетонитрила. Супернатант инжектируется в хроматограф, и компоненты пробы разделяются на колонке $\varnothing 2 \times L75$ мм с обращенной фазой C 18 в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижных фаз использованы водный раствор 0.2 М перхлората лития (pH 3) и ацетонитрил. Для идентификации пика метотрексата на хроматограмме и подтверждения его гомогенности использовали спектральные отношения и сочетание ЖХ-МС в режиме прямой стыковки. Методика была апробирована для коррекции схемы лечения при проведении химиотерапии у детей с острым лимфобластным лейкозом.

ВВЕДЕНИЕ

Метотрексат (МТХ) (рис. 1) — противоопухолевое средство, которое используют при проведении химиотерапевтического лечения детей с острым лимфобластным лейкозом. МТХ является сильнейшим системным ядом, поэтому лечение высокими дозами МТХ проводится в сочетании с лейковорином, доза которого зависит от результатов определения концентрации МТХ в крови.

Метод ВЭЖХ широко используется для терапевтического лекарственного мониторинга МТХ. Как правило, для рутинного серийного анализа используется изократическое элюирование в бинарных системах MeCN—буфер (pH 2.6–6.0) [1–3] или режим ион-парной хроматографии [4, 5] на стандартной аналитической колонке 4.6×250 мм.

При высоком содержании МТХ подготовка пробы может заключаться в предварительном осаждении белков ацетонитрилом и центрифугировании с последующим удалением ацетонитрила органическим растворителем [1, 6]. При низких концентрациях МТХ подготовка пробы включает стадию концентрирования [2, 5, 7, 8].

В нашу задачу входила оптимизация подготовки пробы и условий хроматографического определения МТХ в сыворотке крови.

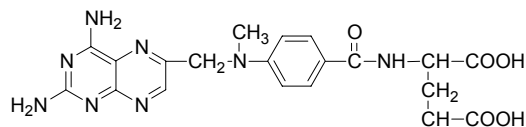
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метотрексат в виде субстанции с содержанием основного вещества $> 98\%$ ("Sigma"), ацетонитрил для ВЭЖХ ("Криохром", Санкт-Петербург, Россия), гексан, перхлорат лития, ортофосфорная,

муравьиная и уксусная кислоты — квалификация не ниже х.ч.

В работе использовали жидкостный хроматограф "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск, Россия). Колонка 2×75 мм с Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Температура колонки 35°C . Подвижные фазы: А — 0.2 М LiClO_4 (pH 2), В — ацетонитрил. Градиентное элюирование: от 5 до 20 % В за 1500 мкл. Скорость потока 150 мкл/мин. Длины волн детектирования 290, 300, 310 и 330 нм.

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе MX 5303, оборудованном электрораспылительным источником ионизации (electrospray ionization, ESI) с ортогональным вводом ионов и времяпролетным масс-анализатором (TOF) (ESI-o-TOF), разработанным в Лаборатории экологической и биомедицинской масс-спектрометрии ИАиП РАН. Спектр получали в режиме съемки положительных ионов. При проведении хромато-масс-спектрометрического анализа в качестве подвижных фаз использовали: А — 0.5% HCOOH в воде (pH 2.5), В — 0.5% HCOOH в ацетонитриле. Скорость потока 150 мкл/мин. Градиент линейный, от 5 до 20 % В за 1500 мкл.

**Рис. 1.** Структурная формула метотрексата

Пробы крови из вены центрифугировали и отделяли сыворотку, которую хранили при -20°C до анализа. Для проведения анализа к 60 мкл сыворотки крови добавляли 0.5 мл гексана, встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали для разделения слоев. Гексановый слой, содержащий липиды, отбрасывали. Аликвоту сыворотки объемом 50 мкл помещали в чистую пробирку, добавляли 50 мкл 0.6 М раствора перхлората лития в ацетонитриле, содержащего 1% уксусной кислоты, встряхивали и центрифугировали. Супернатант (5–20 мкл) хроматографировали.

Идентификацию пика метотрексата на хроматограмме выполняли по времени удерживания, спектральным отношениям и данным МС. Концентрацию метотрексата в исходной сыворотке рассчитывали по градуировочной зависимости, полученной на основе градуировочных растворов. Градуировочные растворы готовили путем добавления стандартного раствора метотрексата к донорской сыворотке. Далее пробы обрабатывались в соответствии с прописью методики. Градуировочная зависимость для метотрексата получена для 5 концентраций ($n = 5$).

Воспроизводимость методики рассчитывали по архивным данным лаборатории. Значение относительного стандартного отклонения в каждом интервале концентраций рассчитывали для группы из 18–20 проб, каждую из которых анализировали дважды.

Оценку правильности выполняли методом добавок. Каждая величина представляет собой среднее значение из восьми независимых определений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для терапевтического лекарственного мониторинга обычно используется стандартная хроматографическая колонка 4.6×250 мм. В последние несколько лет благодаря появлению более совершенного хроматографического оборудования чаще стали применять колонки длиной 100–150 мм и в настоящее время на таких колонках выполняется около 50 % разделений. Применение коротких колонок — один из возможных путей снижения стоимости анализа, т. к. это позволяет сократить длительность анализа и уменьшить расход дорогостоящих растворителей.

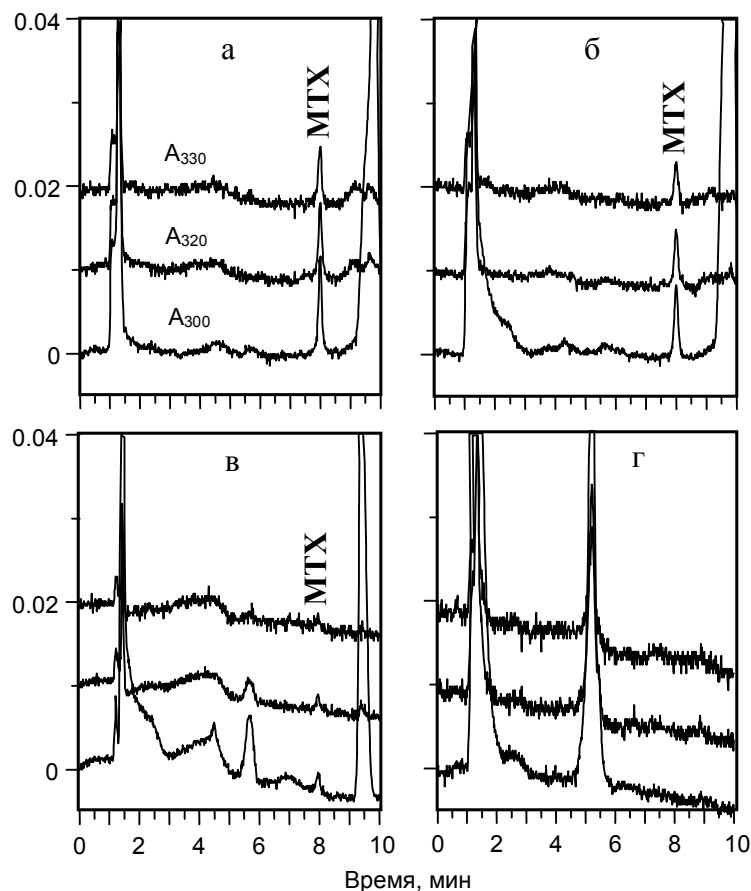


Рис. 2. Хроматограммы обработанной сыворотки крови пациента, проходящего лечение высокими дозами метотрексата (MTX). Объем пробы 20 мкл. Пробы отобраны в процессе инфузии: а — 1.2 мкмоль/л, б — 0.7 мкмоль/л; через 2 часа после окончания инфузии — в (0.2 мкмоль/л) и через 18 часов — г (< 0.01 мкмоль/л)

В настоящей работе предложен экономичный короткоколоночный вариант ВЭЖХ (2×75 мм), который позволяет в 10–20 раз снизить расход растворителей и во столько же раз повысить чувствительность определения по сравнению с хроматографической колонкой стандартных размеров. Выбор градиентного режима элюирования позволяет дополнительно увеличить чувствительность определения МТХ без существенного увеличения длительности анализа. На рис. 2 приведены хроматограммы обработанной сыворотки крови пациента, проходящего лечение метотрексатом. На всех хроматограммах пики МТХ симметричны и полностью отделены от эндогенных соединений сыворотки крови. Детектирование на длине волны 300 нм (второй максимум) значительно снижает число УФ-поглощающих (мешающих) компонентов сыворотки при достаточной чувствительности по определяемому компоненту.

На стадии разработки методики идентификацию пика метотрексата на хроматограмме обработанной сыворотки крови проводили с использованием масс-спектрометрического детектирования методом ESI-MS-TOF в режиме "on-line" (рис. 3).

Разработанная методика апробирована в клинической практике онкогематологического отделения Иркутской государственной областной детской клинической больницы. Методика использована для определения концентрации МТХ в сыворотке крови детей, получающих лечение высокими дозами МТХ (Международный протокол ALL-BFM-90 "Лечение острых лимфобластных лейко-

зов у детей", протокол М). Лечение проводится в четыре приема с перерывами в две недели и заключается во внутривенном введении раствора МТХ в течение 36 часов. Так как МТХ является сильнейшим системным ядом, то через 6, 12, а при необходимости еще через 18 и 24 часа после окончания инфузии МТХ ребенку вводится противоядие — лейковорин. Число введений лейковорина зависит от концентрации МТХ в крови ребенка.

Мониторинг концентрации МТХ в сыворотке крови выполнялся при проведении первой (из четырех) инфузии, для которой доза МТХ определялась из расчета 1000 мг/м^2 поверхности тела ребенка. Для проведения мониторинга пробы крови из вены отбирали по схеме: 9 проб в течение инфузии МТХ, 9–11 проб — после ее окончания.

На рис. 4 приведена зависимость концентрации МТХ от времени в образцах крови пациента, проходящего лечение МТХ по стандартной схеме (1000 мг/м^2). Результаты ВЭЖХ-анализа в сочетании с клиническими данными использованы для изменения схемы дальнейшего лечения: для пациентов, имеющих высокие содержания МТХ в образцах крови в процессе инфузии, рекомендовано уменьшить дозу вводимого препарата на 5–10%; при низкой скорости выведения МТХ после окончания инфузии рекомендовано трижды вводить лейковорин, через каждые 6 часов. Отмечено, что при дальнейшем лечении по измененной схеме осложнений не было.

По разработанной методике был проведен мониторинг 30 пациентов онкогематологического отделения Областной государственной детской клинической больницы г. Иркутска, проходящих лечение высокими дозами МТХ. Отмечено, что около 75 % пациентов нуждаются в изменении "стандартной" схемы лечения.

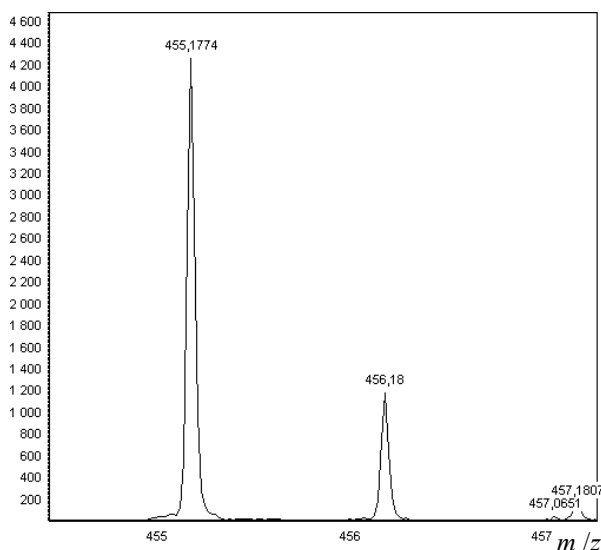


Рис. 3. Масс-спектр стандартного раствора метотрексата ($MH^+ = 455.17$ а.е.м.)

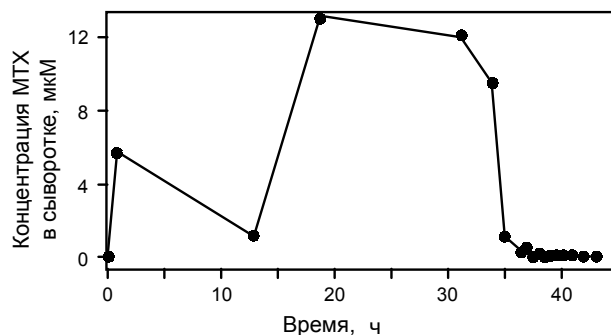


Рис. 4. Изменение концентрации МТХ в сыворотке крови пациента в процессе лечения высокими дозами МТХ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cociglio M., Hillaire-Buys D., Alric C. Determination of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by liquid chromatography for routine monitoring of plasma levels // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 674. P. 101–110.
2. Hirai T., Matsumoto S., Kishi I. Determination of methotrexate and its main metabolite 7-hydroxymethotrexate in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 690. P. 267–273.
3. Florida L., Pietropaolo A.M., Tavazzani M., Rubino F.M., Colombi A. High-performance liquid chromatography of methotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital departments and assessment of occupational exposure // *J. Chromatogr. B.* 1999. V. 726. P. 95–103.
4. Yu Z., Westerlund D. Ion-pair chromatography of methotrexate in a column-switching system using an alkyl-diol silica precolumn for direct injection of plasma // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 742. P. 113–120.
5. Aboleneen H., Simpson J., Backes D. Determination of methotrexate in serum by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B.* 1996. V. 681. P. 317–322.
6. Sparreboom A., Loos W.J., Nooter K., Stoter G., Verweij J. Liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of methotrexate in cancer patients co-treated with docetaxel // *J. Chromatogr. B.* 1999. V. 735, N 1. P. 111–119.
7. McCrudden E.A., Tett S.E. Improved high-performance liquid chromatography determination of methotrexate and its major metabolite in plasma using a poly(styrene-divinylbenzene) column // *J. Chromatogr. B.* 1999. V. 721, N 1. P. 87–92.
8. Albertioni F., Petersson B., Beck O., Rask C., Seideman P., Peterson C. Simultaneous quantitation of methotrexate and its two main metabolites in biological fluids by a novel solid-phase extraction procedure using high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 665. P. 163–170.

Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск (Фёдорова Г.А., Грачёв М.А.)

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Подольская Е.П., Краснов Н.В., Гимбитская Е.К.)

Иркутская государственная областная детская клиническая больница (Урсуленко Е.В., Ованесян С.В., Толмачёва О.П.)

Материал поступил в редакцию 5.06.2006.

CONTROL OF METHOTREXATE CONCENTRATION AT CHEMOTHERAPEUTICAL TREATMENT WITH HPLC ON SHORT COLUMNS

G. A. Fedorova¹, M. A. Grachev¹, E. P. Podolskaya², N. V. Krasnov²,
E. K. Gimbitskaya², E. V. Ursulenko³, S. V. Ovanesyan³, O. P. Tolmacheva³

¹*Limnological Institute of Siberian Branch RAS, Irkutsk*

²*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

³*Irkutsk State Regional Children's Clinical Hospital*

A method of methotrexate determination in blood serum is offered which is applicable to the control of its concentration at chemotherapeutical treatment. The sample is prepared in the following way: lipids are extracted with hexane, and proteins settle in the presence of lithium perchlorate, acetic acid and acetonitrile. The supernatant is injected into a chromatograph, and the sample components are separated on the 2 × 75 mm C 18 RP column in the gradient elution mode. The aqueous solution of 0.2 M lithium perchlorate (pH 3) and acetonitrile are used as mobile phases. Spectral ratios and direct coupling of LC to MS are used for identification of the methotrexate peak on the chromatogram and confirmation of its homogeneity.

This method has been tested for correction of the methotrexate dose during treatment of children with acute lymphoblastic leukemia.