

低剂量甲氨蝶呤给药类风湿性关节炎病人血浆浓度的测定

莫小兰¹, 王伟华², 温预关², 任斌¹, 陈杰¹, 陈孝¹

(1. 中山大学附属第一医院药学部, 广东 广州 510080 2. 广州市脑科医院, 广东 广州 510370)

摘要: 目的 建立一种快速、灵敏地测定类风湿性关节炎病人血浆中低浓度甲氨蝶呤 (MTX) 的方法。方法 采用高效液相色谱 (HPLC) 串联质谱电喷雾检测 (LC/MS/MS) 法, 色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 柱, 流动相为乙腈 (1% 甲酸): 甲酸铵水溶液 (20 mmol/L) = 30:70, 流速为 0.2 ml/min, 柱温为 25℃。样品提取采用液-液萃取的方法, 即先用三氟乙酸沉淀蛋白, 再用乙酸乙酯提取。提取的样品经电喷雾离子源正离子化后, 通过三重四级杆串联质谱仪, 采用多反应监测 (MRM) 对甲氨蝶呤 (m/z 455.2⁺ 308.2) 和内标多索茶碱 (m/z 267.1⁺ 181.1) 进行测定。结果 甲氨蝶呤血药浓度在 1~100 ng/ml 范围内线性关系良好 ($r = 0.9998$), 分析方法的最低检测限为 0.5 ng/ml 其高、中、低 (50、10、2 ng/ml) 3 个浓度的平均提取回收率分别为 41.2%、49.2% 和 43.4%, 日内 ($n = 5$)、日间 ($n = 3$) 相对标准偏差值 (RSD) 均 < 15%。结论 本方法简单快捷、灵敏、准确、重现性好, 可用于低剂量给药的类风湿性关节炎病人的临床血药浓度监测和药动学研究。

关键词: 甲氨蝶呤; LC/MS/MS; 类风湿性关节炎

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1673-4610(2009)05-0026-05

Determination of Plasma Methotrexate by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry after Low-dose Methotrexate Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis

MO Xiao-lan¹, WANG Wei-hua², WEN Yu-guan², REN Bin¹, CHEN Jie¹, CHEN Xiao¹

(1. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou Guangdong 510080 China

2. Guangzhou Brain Hospital, Guangzhou Guangdong 510370 China)

Abstract: Objective To establish a LC/MS/MS method for the determination of plasma concentration of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Methods After precipitated by trifluoroacetic acid and extracted by acetoacetate, methotrexate was analyzed with a LC/MS/MS system using Ultimate XB-C₁₈ column at a column temperature of 25℃ with the mobile phase consisted of acetonitrile (1% formic acid) and 20 mmol/L ammonium formate solution (30:70 V/V), pumped at a flow rate of 0.2 ml/min. An Agilent 6410 triple quad mass spectrometer system equipped with an electrospray ionization ion-trap source was used as the detector and operated in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) using the precursor to product combinations of m/z 455.2⁺ 308.2 and m/z 267.1⁺ 181.1 was performed to detect methotrexate and doxofylline, respectively. Results The calibration curves of methotrexate were linear at a concentration range 1-100 ng/ml ($r = 0.9998$) with both RSD of intra-day and inter-day lower than 15%. The average extraction recoveries were 41.2% (50 ng/ml), 49.2% (10 ng/ml), and 43.4% (2 ng/ml), respectively with a lowest limit of 0.5 ng/ml. Conclusion The determination of methotrexate concentration in plasma is simple, accurate, and reliable. Thus this method is suitable for the blood drug concentration monitoring of methotrexate and pharmacokinetic study in patients with rheumatoid arthritis.

Key words: methotrexate; LC/MS/MS; rheumatoid arthritis

甲氨蝶呤为叶酸类抗代谢药物, 自 20 世纪 80 年代中期以来, 低剂量甲氨蝶呤就因为有效、安全、经

济而被广泛地应用于治疗风湿免疫性疾病, 如类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等^[1-3]。但甲氨蝶呤的治疗

基金项目: 广东省医院药学研究基金 (编号: 2008B020)

作者简介: 莫小兰, 硕士研究生。E-mail: mxh0818@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈孝, 主任药师, Tel: 020-87755766-8420, E-mail: frankychen@yahoo.com

个体差异大, 有文献报道^[4]约只有 50%~ 60% 用甲氨蝶呤治疗的病人可以获得较好的疗效。部分病人会出现胃肠道反应、肝脏毒性、黏膜损害、骨髓抑制等不良反应。甲氨蝶呤药动学、药效学个体差异大, 实行个体化给药具有重要的临床意义。

目前, 甲氨蝶呤常用的检测方法为荧光免疫分析法^[5-6]、高效液相分析法^[7, 8]和液质联用^[9-12]的检测方法。但因荧光免疫分析法需有专门 TDx 分析仪和昂贵的试剂盒, 成本较高; 高效液相分析法样品处理繁琐、昂贵、灵敏度不够; 文献报道^[9-12]的液质联用的检测方法都采用固相萃取的方法, 繁琐、昂贵且重复性不佳, 满足不了低剂量给予甲氨蝶呤病人的血药浓度检测要求。因此, 本实验建立了一种在低剂量给予甲氨蝶呤病人检测血药浓度的 LC/MS/MS 方法。

1 材料

1.1 仪器

1200 HPLC 仪, 包括 6410 三重四极杆串联质谱仪、色谱化学工作站 (软件版本编号 B101101) (美国 Agilent 公司); 涡旋混合器 (原上海医科大学仪器厂); 电子天平 (瑞士 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

甲氨蝶呤 (Schircks Laboratories Switzerland 批号: 014, 含量: > 99.5%); 内标多索茶碱注射液 (100mg/10ml 浙江北生药业汉生制药有限公司, 批号: 08102202); 乙腈、甲酸、甲酸铵、三氟乙酸为色谱纯, 水为超纯水, 其余均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱: Ultimate XB-C18 柱 (3 μm, 2.1 mm × 100 mm); 流动相: 乙腈 (1% 甲酸) - 20 mmol/L 甲酸铵 (30:70 V/V); 流速: 0.2 ml/min; 柱温: 25°C。

采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 干燥气流速: 8 L/min; 干燥气温度: 350°C; 雾化气压力: 279.25 kPa; 毛细管电压: 4000 V; 采用多反应监测 (MRM), 甲氨蝶呤检测离子对为 m/z 455.2⁺ → 308.2, 四级杆停留时间为 0.2 s, 裂解电压为 160 V, 裂解能量为 16 U, 电子倍增器电压为 400 V; 内标多索茶碱检测离子对为 m/z 267.1⁺ → 181.1, 四级杆停留时间为 0.2 s, 裂解电压为 120 V, 裂解能量为 20 U, 电子倍增器电压为 400 V。甲氨蝶呤和多索茶碱的保留时间分别为 1.68 min 和 2.09 min。甲氨蝶呤和多索茶碱的碎片离子质谱图见图 1。

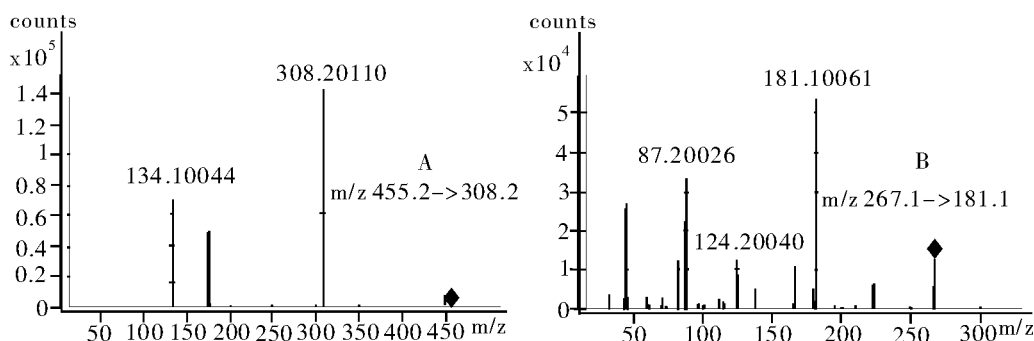


图 1 甲氨蝶呤 (A) 和内标多索茶碱 (B) 的二级扫描碎片离子图

2.2 对照品和内标溶液的配制

精密称取甲氨蝶呤对照品 0.84 mg 加乙腈 - 超纯水 (50:50 V/V) 溶解并定容至 10 ml 于冰箱 - 80°C 避光保存。临用时用乙腈 - 超纯水 (50:50 V/V) 稀释成所需浓度的甲氨蝶呤对照品溶液 (20, 40, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/ml)。同理, 用乙腈 - 超纯水 (50:50 V/V) 稀释多索茶碱母液至 4 μg/ml。

2.3 样品处理

0.1 ml 含药血浆加至 1.5 ml 离心管中, 加入 4 μg/ml 多索茶碱溶液 5 μl, 涡旋 30 s, 加入 0.1 ml

三氟乙酸, 涡旋 1 min, 20 000 × g 离心 3 min, 吸取上清液转入 2 ml 离心管中, 再加入乙酸乙酯 1.5 ml 涡旋 1 min, 20 000 × g 离心 5 min, 吸取有机层, 37°C 真空干燥。进样前加入 50 μl 流动相溶解, 快速振荡 30 s 溶解残渣, 吸取 8 μl 进样。

2.4 标准曲线的绘制

取空白血浆 95 μl 7 份, 分别加入浓度为 20, 40, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/ml 的甲氨蝶呤对照品溶液 5 μl, 振荡 30 s 使血药浓度相当于 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml 然后按 “2.3” 项方法处理。经 LC/MS/MS 分析, 测得甲氨蝶呤峰面积与内标峰面

积之比 (Y) 作纵坐标, 以血浆甲氨蝶呤浓度 (X) 为横坐标, 得到直线方程为: $Y = 18.2535X - 0.0228$ ($r = 0.9998$)。结果表明, 甲氨蝶呤血药浓度在 1~100

ng/ml 范围内线性关系良好。当信噪比 (S/N) = 10 时, 最低检测浓度为 0.5 ng/ml。LC/MS/MS 色谱见图 2。

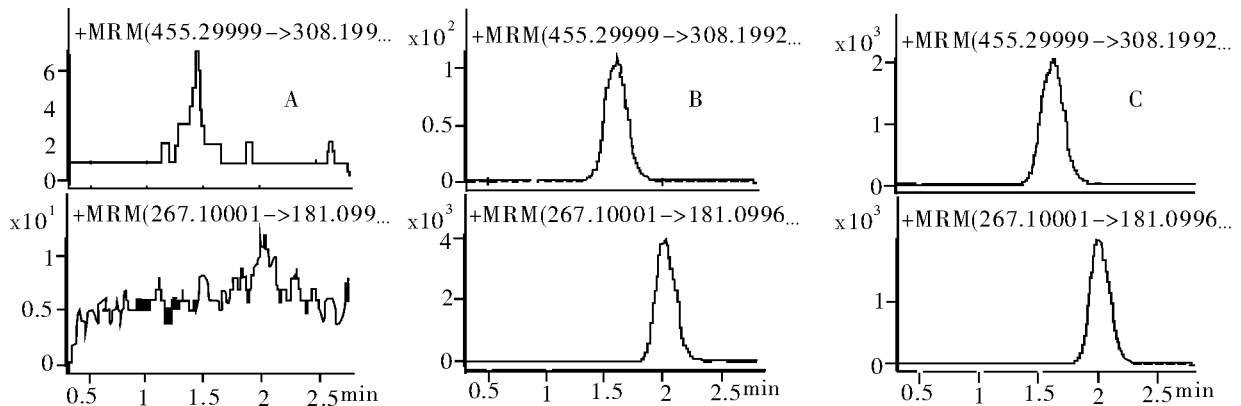


图 2 甲氨蝶呤和多索茶碱的色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 甲氨蝶呤标准溶液 + 内标; C. 患者注射药物后的血浆样品

2.5 回收率及精密度试验

取高、中、低 (5Q 1Q 2 ng/ml) 3种浓度的质量控制 (QC) 样品各 5个, 连续测定 3h, 根据当天的标准曲线, 计算 QC样品的测定浓度, 根据 QC样品结果计算本法的准确度 (方法回收率) 和精密度。同

时, 另取空白血浆 100 μl 除不加系列对照品溶液和内标外, 按“2.3”项下方法操作, 用获得的上清液稀释甲氨蝶呤和内标溶液至相应浓度, 进样分析, 获得相应峰面积。以每一浓度 2种处理方法的峰面积比值计算提取回收率 (表 1)。

表 1 加入浓度与回收率及精密度试验结果 (mean ± SD)

加入浓度 (ng/ml)	日内精密度 (n=5) 测得浓度 (ng/ml)	RSD(%)	日间精密度 (n=3) 测得浓度 (ng/ml)	RSD(%)	提取回收率 %(n=5)	相对回收率 %(n=5)
2	1.87 ± 0.07	3.82	1.91 ± 0.14	7.32	43.42	93.54
10	9.85 ± 0.38	3.88	9.68 ± 0.82	8.47	49.17	98.48
50	48.2 ± 3.45	7.16	49.8 ± 3.26	6.55	41.15	96.41

2.6 血浆样品的稳定性试验

按“2.3”项下方法分别配制高、中、低 (5Q 1Q 2 ng/ml) 3种浓度的 4组血浆样品, 分别在室温 (放置 4h)、长期冻存 (-80℃冻存 1月) 和冻融 (冻融 2次) 条件下进行色谱测定, 并考察提取液在进样仓中 6h的稳定性 (表 2)。

2.7 介质效应

制备 MTX (5Q 1Q 2 ng/ml各 5个样品) 的 100 μl 标准溶液, 进行 LC/MS/MS分析, 得峰面积为 A; 取 100 μl 空白血浆数份, 按上述“2.3”项处理, 用所得溶液配制 MTX 质控浓度 (每浓度各 5个样品)

的溶液 100 μl 进行 LC/MS/MS分析, 得峰面积为 B, 依“(B/A) × 100%”计算绝对介质效应。通过不同来源生物样品绝对介质效应的相对标准偏差 (RSD) 来反映相对介质效应的大小。如绝对介质效应值为 100%, 则不存在介质效应; 如 < 100%, 则认为存在介质效应 (离子抑制); 如 > 100%, 则认为存在介质效应 (离子增强); 相对介质效应的 RSD数值应在 ±15% 范围内 (表 3)。结果表明, 虽然血浆对 MTX存在一定的离子抑制作用, 但 RSD均在 ±15% 范围内, 不影响 MTX的检测。

表 2 不同储存条件血浆样品稳定性试验结果 (n = 5)

储存条件	加入浓度 (ng/ml)	测得浓度	
		Mean ± SD	E ^a (%)
-80°C/1月	2	2.04 ± 0.16	2.00
	10	9.24 ± 0.90	-7.60
	50	50.87 ± 3.39	1.74
-80°C/冻融2次	2	1.94 ± 0.21	-3.00
	10	8.96 ± 0.38	-10.40
	50	47.49 ± 1.41	-5.02
室温4 h	2	2.06 ± 0.09	-3.00
	10	10.14 ± 0.79	1.40
	50	47.04 ± 3.71	-5.92
提取液室温6 h	2	2.06 ± 0.08	3.00
	10	9.53 ± 0.78	-4.70
	50	45.0 ± 2.15	-10.00

^a 平均相对误差 = 100 × (总的平均测得浓度 - 加入浓度) ÷ 加入浓度

表 3 不同浓度介质效应试验结果 (n = 5)

加入浓度	介质效应(mean ± SD, %)	RSD(%)
2	32.4 ± 2.0	6.17
10	31.4 ± 2.92	9.30
50	30.8 ± 2.03	6.59

2.8 临床检测

6例类风湿性关节炎患者, 男性 3例, 女性 3例, 年龄 24~ 45岁, 肝肾功能正常。首次静脉推注甲氨蝶呤 10~ 15 mg, 于给药后立即在另一只手臂采静脉血, 为 0 h血样, 其他按如下时间点采血: 0.5、1、2、4、24 h, 测每个时间点血样浓度, 所得药时曲线见图 3。

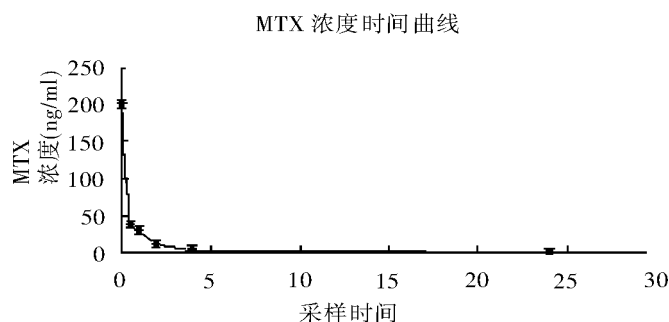


图 3 6个类风湿性关节炎病人给药后的浓度 - 时间曲线

3 讨论

甲氨蝶呤是一种细胞周期 S期的抗代谢类抗肿瘤药, 主要用于治疗急性白血病和恶性淋巴瘤等, 常用量为每次 0.1~ 1 g。由于用量较大, 血药浓度较高, 测定较容易, 用 HPLC 法或荧光法测定其血药浓度即可。目前, 甲氨蝶呤小剂量 (每次 10~ 15 mg 每周 1次) 用于治疗类风湿性关节炎取得较好疗效。由于给药量小, 血浆药物浓度低, 检测不易。本试验首次在国内建立了 LC/MS/MS检测类风湿性关节炎患者血浆中低剂量给药的甲氨蝶呤的测定方法。该法检测限可达 0.5 ng/ml, 每个样品检测只需 3 min, 较文献报道的 HPLC或荧光的方法更灵敏、快捷、准确。方法应用于 6例类风湿性关节炎患者使用甲氨蝶呤后的结果表明, 小剂量甲氨蝶呤在 24 h内基本清除完毕, 与文献^[13]报道相似。

甲氨蝶呤为两性化合物, 偏水溶性, 难于直接用有机溶剂提取。文献报道^[14, 15]的前处理方法多为直接沉淀蛋白法或沉淀后用有机溶剂提取, 但检测浓度未能达到 1 ng/ml 级别, 难以应用于类风湿性关节炎病人小剂量使用 MTX 时的浓度检测。本实验基于质谱条件, 避免所用试剂对色谱和质谱系统的损害, 不能采用高氯酸、三氯乙酸、硝酸银等直接沉淀蛋白法。单用甲醇、乙腈、丙酮等作为沉淀剂, 或先用这些沉淀剂沉淀, 或用缓冲盐调节 pH 值, 然后用乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醚或乙酸乙酯 - 氯仿等混合有机溶剂提取, 皆存在提取回收率低、灵敏度不够等缺点。本试验采用三氟乙酸先沉淀蛋白并调节 pH 值, 再用乙酸乙酯提取, 挥干后再重溶进样的方法, 可以明显提高回收率, 并且纯化样品, 有效的保护色谱柱。

在内标的选择上, 考察了茶碱、氨茶碱、多索茶碱、甲硝唑、阿魏酸、替硝唑等, 茶碱、多索茶碱和甲硝唑等都有较高的回收率, 但血浆内源性物质对检测茶碱有干扰; 甲硝唑和多索茶碱未受内源性物质的干扰, 但多索茶碱的保留时间同甲氨蝶呤相近, 而甲硝唑的保留时间较长。因此, 最后选定多索茶碱为内标。

流动相中加入甲酸, 有利于提高响应, 酸浓度越高, 响应越好, 但对检测系统损害也大, 因此选用1%的甲酸。加入甲酸铵则可以改善峰形。

综上所述, 本实验建立了在类风湿性关节炎患者

小剂量使用甲氨蝶呤后检测其血药浓度的方法, 该方法所需血浆样品量少, 方法灵敏度高, 适用于临床上低剂量给药后甲氨蝶呤的浓度监测及应用于药动学研究。

(收稿日期: 2009-05-05)

参考文献

- 1 Kerner M, Lee JK. The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1986, 29: 822-831.
- 2 Ramanan AV, Whitworth P, Baildan EM. Use of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Arch Dis Child*, 2003, 88: 197-200.
- 3 Tanaka E, Taniguchi A, Urano W, *et al*. Pharmacogenetics of disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2004, 18: 233-247.
- 4 Węla-Hojenska A, Orzechowska-Juzwenko K, Swierkot J *et al*. Monitoring methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 42: 434-441.
- 5 Ritzo C, Albertoni F, Cosic K, *et al*. Therapeutic drug monitoring of methotrexate on the pediatric oncology ward: can blood sampling from central venous accesses substitute for capillary finger punctures? *Ther Drug Monit*, 2007, 29: 447-451.
- 6 Hayashi H, Fujimaki C, Tsuboi S *et al*. Application of fluorescence polarization immunoassay for determination of methotrexate-polyglutamates in rheumatoid arthritis patients. *Tohoku J Exp Med*, 2008, 215: 95-101.
- 7 Li H, Luo W, Eng Q, *et al*. Method for the determination of blood methotrexate by high performance liquid chromatography with online post-column electrochemical oxidation and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomol Life Sci*, 2007, 845: 164-168.
- 8 Dalrymple M, Stamp LK, O'Donnell JL, *et al*. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, 58: 3299-3308.
- 9 Guo P, Wang X, Liu L, *et al*. Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43: 1789-1795.
- 10 Barbieri A, Sabatini L, Indiveri P, *et al*. Simultaneous determination of low levels of methotrexate and cyclophosphamide in human urine by micro liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20: 1889-1893.
- 11 Qian M, West W, Wu J, *et al*. Development of a dog microdialysis model for determining synovial fluid pharmacokinetics of anti-arthritis compounds exemplified by methotrexate. *Pharm Res*, 2003, 20: 605-610.
- 12 Rule G, Chapple M, Henion J. A 384-well solid-phase extraction for LC/MS/MS determination of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in human urine and plasma. *Anal Chem*, 2001, 73: 439-443.
- 13 Freeman AJ. Intermediate dose methotrexate (IDM) in children with acute lymphocytic leukemia (ALL). An update. *Sangre (Barc)*, 1985, 30: 1007-1033.
- 14 Palmisano F, Guerrieri A, Zambonin PG, *et al*. Determination of methotrexate in untreated body fluids by micellar liquid chromatography. *Anal Chem*, 1989, 61(9): 946-950.
- 15 Assadullahi TP, Dagli E, Warner JO. High-performance liquid chromatography method for serum methotrexate levels in children with severe steroid-dependent asthma. *J Chromatogr*, 1991, 565: 349-356.