

HPLC-MS/MS 间接测定类风湿关节炎患者红细胞中多聚谷氨酸化甲氨蝶呤的浓度

杜思颖^{1,2}, 吕佩瑜², 温悦², 林小青², 欧阳华^{2*} (1. 厦门大学药学院, 福建 厦门 361102; 2. 厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361004)

摘要: 目的 建立检测类风湿关节炎患者红细胞中多聚谷氨酸化甲氨蝶呤 (methotrexate polyglutamates, MTXPGs) 浓度的 HPLC-MS/MS 法。方法 采用间接测定法, 以同位素甲氨蝶呤- d_3 为内标, 分别测定游离甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 和总 MTX (MTX + MTXPGs), 从而计算出红细胞中 MTXPGs 浓度。为测定游离 MTX, 全血样品经反复冻融、甲醇沉淀蛋白后, 经 LC-MS/MS 进样分析, 采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式, 多反应监测 (MRM)。为测定总 MTX, 样品 (反复冻融后) 与 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸 37°C 孵育 2.5 h, 酶促 MTXPGs 转化为 MTX, 蛋白沉淀后进样分析。结果 全血 MTX 质量浓度在 $1 \sim 300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r=0.9994$), 检测限 (LOD) 为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 准确度 (RE) 在 $\pm 5\%$ 内, 日内和日间精密度 (RSD) 分别低于 7.96% 和 10.88%。结论 本方法快速、灵敏, 具有高专属性和重现性, 成功应用于临床上类风湿关节炎患者红细胞中 MTXPGs 浓度的监测。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 多聚谷氨酸化甲氨蝶呤; 甲氨蝶呤; 红细胞; 类风湿关节炎

doi: 10.11669/epj.2019.22.012 中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2019)22-1876-06

Indirect Determination of Erythrocyte Methotrexate Polyglutamates in Patients with Rheumatoid Arthritis by HPLC-MS/MS

DU Si-ying^{1,2}, LÜ Pei-yu², WEN Yue², LIN Xiao-qing², OUYANG Hua^{2*} (1. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-MS/MS method for determining erythrocyte methotrexate polyglutamates (MTXPGs) in patients with rheumatoid arthritis (RA). **METHODS** The indirect method was applied to determine the concentrations of free methotrexate (MTX) and total MTX (MTX + MTXPGs) respectively by using isotope MTX- d_3 as the internal standard, and then concentration of erythrocyte MTXPGs was calculated. To determine free MTX, whole blood (after freeze-thaw cycles to break blood cells) was precipitated with methanol, and then analyzed by LC-MS/MS. Multiple reactions monitoring (MRM) was performed with electrospray ionization (ESI) at a positive ion mode. To determine total MTX, whole blood (after freeze-thaw cycles) was incubated with $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ascorbic acid at 37°C for 2.5 h to enzymatically convert the MTXPGs to MTX, and the protein was precipitated for sample analysis. **RESULTS** The calibration curve of MTX was linear over the range of $1 \sim 300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9994$) and the limit of detection (LOD) was $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The accuracy (RE) was within $\pm 5\%$ and the intra- and inter-day precisions (RSD) were less than 7.96% and 10.88%, respectively. **CONCLUSION** This method is rapid, sensitive, highly specific and reproducible, which is successfully applied for the erythrocyte MTXPGs monitoring in patients with RA.

KEY WORDS: HPLC-MS/MS; methotrexate polyglutamate; methotrexate; erythrocyte; rheumatoid arthritis

小剂量甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 因其疗效确切、价格低廉为国内外治疗类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的首选药物^[1-4]。95% MTX 在服药后 24 h 内进入红细胞, 在叶酰聚谷氨酸合成酶 (FPGS) 的作用下, 转变成多聚谷氨酸化甲氨蝶呤 (methotrexate polyglutamates, MTXPGs), MTXPGs 长

期滞留, 持续发挥药理作用^[5]。Dervieux 等^[6-7]报道, MTX 存在显著的个体差异, 同一剂量下, 部分患者治疗有效, 而有 10% ~ 37% 的患者会出现胃肠道不适、肝功能异常等不良反应^[8-9], 且与红细胞中 MTXPGs 浓度密切相关。因此, 临床开展 MTXPGs 浓度监测十分必要。

基金项目: 福建省科技计划项目资助 (2018J01394)

作者简介: 杜思颖, 女, 硕士研究生, 研究方向: 临床药学 * 通讯作者: 欧阳华, 女, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 临床药学
Tel: (0592) 2992439 E-mail: Oyh820@126.com

MTXPGs 分析方法主要有放射化学配体结合法、酶分析法、高效液相色谱法 (HPLC) 和荧光偏振免疫分析法 (FPIA) [10-44]。然而这些方法费时费力、特异性低、成本高,不适合临床监测。液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) [15] 是目前测定 MTX 及其代谢物的较好选择,该方法简单、快速、灵敏度高、专属性强,但文献 [16-17] 报道的方法多为直接测定法,操作复杂且需要特殊的光氧化装置。在本实验中,我们采用同位素 MTX- d_3 为内标,通过间接测定法检测红细胞中 MTXPGs 含量,为 RA 患者的临床合理化用药提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

LC20ADXR 高效液相色谱仪(日本岛津公司); API 5500 质谱仪、液质联用工作站 Analyst 1.6.4(美国 AB SCIEX 公司); 涡旋仪(美国 VWR 公司); 离心机(北京大龙公司); 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 恒温水浴锅(嘉兴俊思电子有限公司); 超纯水机(美国 Thermo 公司)。

1.2 药品与试剂

甲氨蝶呤片(湖南正清制药集团股份有限公司,每片 2.5 mg,批号: H19983205); MTX 对照品(中国药品生物制品检定所,400 mg,纯度 99.8%,批号: 100138-201606); 内标 MTX- d_3 (加拿大 TRC 公司,1 mg,纯度 99.0%,批号: M260677); 抗坏血酸(河北科隆多生物科技有限公司); 甲酸、甲醇、乙腈为色谱纯; 水为超纯水。试验中所使用的空白全血由厦门大学附属中山医院输血科提供。

2 方法

2.1 方法原理

本实验采用间接测定法检测红细胞中 MTXPGs 浓度,原理是将全血反复冻融使红细胞裂解,释放 MTXPGs 并与血浆混合; 在血浆中 γ -谷氨酰水解酶 (GGH) 的催化作用下 MTXPGs 向 MTX 转化,而添加的抗坏血酸所产生的酸性环境可以加速转化反应; 37 °C 恒温避光孵育 2.5 h 即可转化完全。经酶水解的全血检测后得到总 MTX (MTX + MTXPGs) 浓度,而未经酶水解的全血检测后得到游离 MTX 浓度。全血 MTXPGs 浓度即为总 MTX 浓度与游离 MTX 浓度之差。最后根据红细胞体积比换算成红细胞中 MTXPGs 的

浓度 [18]。

2.2 测定条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为资生堂 CAPCELL PAK MGII C_{18} 柱 (2.1 mm \times 50 mm, 5 μ m); 流动相 A 为 0.1% 甲酸, B 为乙腈; 流速为 0.4 mL \cdot min⁻¹; 柱温为 40 °C; 进样量为 1.5 μ L。梯度洗脱条件 (B%): 0 ~ 0.50 min: 5% \rightarrow 90%; 0.50 ~ 1.50 min: 90%; 1.50 ~ 1.51 min: 90% \rightarrow 5%; 1.51 ~ 3.00 min: 5%。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式,多反应监测 (MRM); MTX 的离子对为 m/z 455.3 \rightarrow 308.3, MTX- d_3 的离子对为 m/z 458.4 \rightarrow 311.2。离子喷射电压 5 500 V, 温度 500 °C, 雾化气 (GAS1): 206.85 kPa, 辅助气 (GAS2): 275.80 kPa, 气帘气 (CUR): 206.85 kPa, MTX 和 MTX- d_3 均为去簇电压 (DP): 120 V, 碰撞能量 (CE): 27 eV。

2.3 溶液配制

2.3.1 工作溶液 精密称量 MTX 对照品 1.102 mg, 溶解于 11.02 mL 的二甲基亚砜中,以制备 100 μ g \cdot mL⁻¹ 的 MTX 储备溶液。临用时用体积分数 50% 甲醇稀释至 20, 40, 200, 800, 2 400, 4 800, 6 000 ng \cdot mL⁻¹, 作为 MTX 标准曲线工作液。另吸取 MTX 储备液分别用体积分数 50% 甲醇稀释至 20, 60, 3 000, 4 500 ng \cdot mL⁻¹, 作为 MTX 质控工作液。

精密称量 MTX- d_3 对照品 1.117 mg, 溶解于 11.17 mL 的二甲基亚砜中,以制备 100 μ g \cdot mL⁻¹ 的内标储备溶液,用甲醇稀释至 100 ng \cdot mL⁻¹, 作为内标工作液。以上储备溶液和工作液均保存于 4 °C 冰箱。

2.3.2 标准曲线和质控样品 取健康人空白全血, 分别加入质量浓度为 20, 40, 200, 800, 2 400, 4 800, 6 000 ng \cdot mL⁻¹ 的 MTX 对照品溶液, 稀释成质量浓度为 1、2、10、40、120、240、300 ng \cdot mL⁻¹ 的标准曲线样品。将 MTX 质控工作液加到人空白全血中, 获得质量浓度为 1、3、150、225 ng \cdot mL⁻¹ 的极低、低、中、高浓度的质控样品。

2.4 全血样品前处理

2.4.1 游离 MTX 样品处理 移取 0.1 mL 全血样品至 1.5 mL EP 管中, 冻融 3 次破坏红细胞后, 加入 100 μ L 超纯水, 50 μ L 内标工作液混匀。然后加入 550 μ L 甲醇沉淀样品, 涡旋振荡 3 min, 再以 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 3 min。吸取上清液 1.5 μ L 注入 LC-MS/MS 中进行分析。

2.4.2 总 MTX (MTX + MTXPGs) 样品处理 移取

0.1 mL 全血样品(反复冻融后)至 1.5 mL EP 管中,加入 100 μL 的 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸溶液。涡旋混合 30 s 后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2.5 h,GGH 酶促 MTXPGs 转化为 MTX。向转化液中加入 50 μL 内标工作溶液,然后同“2.4.1”项下方法处理后进样分析。

3 结果

3.1 专属性

取健康人空白全血、空白全血加入 MTX 或内

标、空白全血加入 MTX 和内标以及患者用药后的全血样品,根据“2.4”项下方法进样分析,得到的色谱图见图 1,MTX 和内标 MTX- d_3 的保留时间均为 1.09 min。可以看出,空白全血中的内源性杂质无干扰,MTX 和内标的检测通道不会引起串扰;患者孵育后血样的 MTX、内标和内源性杂质的色谱峰完全分离,图 1。

3.2 标准曲线与定量下限

质量浓度为 1、2、10、40、120、240、300 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准曲线样品,按“2.4.1”项下方法

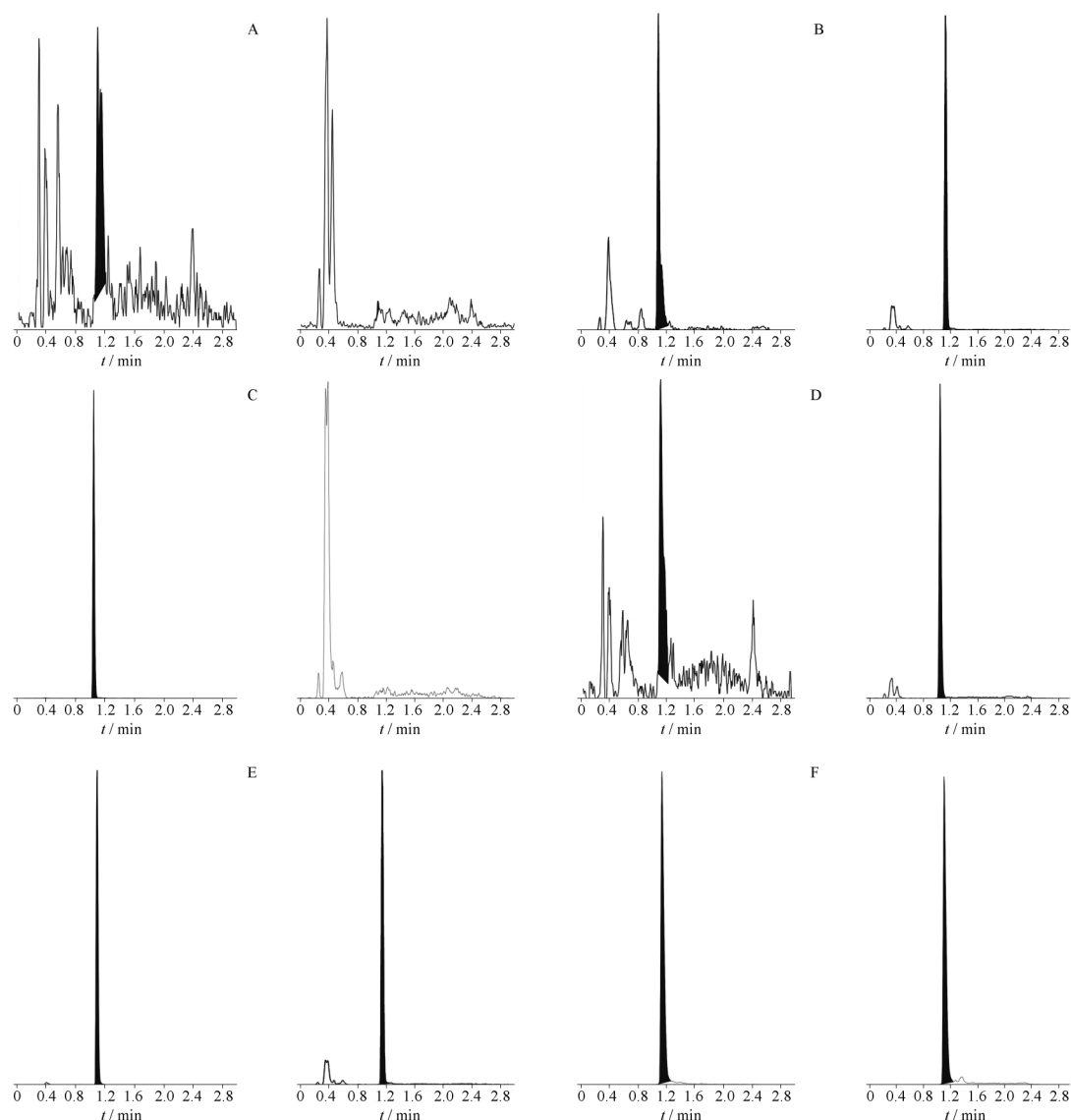


图 1 全血 MTX 和 MTX- d_3 (内标)的色谱图

A - 空白全血; B - 空白全血加入 MTX(LLOQ, $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和内标; C - 空白全血加入 MTX($300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); D - 空白全血加入内标(D 图中 MTX 峰面积小于 B 图中 MTX 峰面积的 20%); E - 空白全血加入 MTX($40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和内标; F - 患者用药(MTX)后的实测孵育全血样品;左 - MTX;右 - 内标

Fig. 1 Chromatography of MTX and MTX- d_3 (internal standard, IS) in whole blood

A - blank whole blood; B - blank whole blood with MTX at an LLOQ level ($1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and IS; C - blank whole blood with MTX ($300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); D - blank whole blood with IS (the MTX peak area in picture D is less than 20% of the MTX peak area in picture B); E - blank whole blood with MTX ($40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and IS; F - incubated whole blood sample from a patient receiving MTX therapy; left - MTX; right - IS

处理经 LC-MS/MS 分析后,将 MTX 峰面积与内标峰面积的比值(Y)作为纵坐标,全血 MTX 浓度与内标浓度的比值(ρ)作为横坐标,拟合得到直线方程: $Y=0.0472\rho+0.0387$ ($r=0.9994$)。结果显示,全血 MTX 质量浓度在 $1\sim 300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,定量下限(LLOQ)为 $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当信噪比(S/N)=5 时,检测限(LOD)为 $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3 准确度、精密度和提取回收率

取 LLOQ、低、中、高浓度的质控样品($n=6$)连续 3 d 进样分析,根据当天的标准曲线测定样品浓度,从而算出方法的准确度(RE)和日内、日间精密度的(RSD)。结果(表 1)表明,该方法准确、精密,符合《中国药典》2015 年版《生物样品定量分析方法验证指导原则》的要求。

同时,另取 0.1 mL 空白全血,除用 $50\ \mu\text{L}$ 甲醇代替 $50\ \mu\text{L}$ 内标工作液外,其余按“2.4.1”项下方法处理,用获得的上清液稀释 MTX 和内标 MTX- d_3 溶液至相应浓度。经 LC-MS/MS 分析,通过质控样品与相应浓度 MTX 溶液的峰面积之比,计算提取回收率(表 1)。

3.4 稳定性

取 $3, 150, 225\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、中、高浓度质控样品($n=6$)分别在以下稳定性考察条件下:反复冻融 3 次、 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存 30 d、常温处理后样品在自动进样器存放 12 h,按“2.4.1”项下方法进行 LC-MS/MS 测定,考察方法的冻融稳定性、长期稳定性和室温稳定性。结果表明,MTX 全血样品在各稳定性考察条件下均稳定,RE < 7.1%, RSD < 12.3%,符合生物样本

检测要求(表 2)。

3.5 方法重现性

选取 10% 患者全血样品进行试验样品再分析(incurring sample reanalysis, ISR),由此考察患者实际血样测定的准确度。第一次检测时,从患者全血中取出 0.2 mL 血样,按“2.4”项下方法,通过 LC-MS/MS 分析,得到游离 MTX 浓度为 A_1 、总 MTX 浓度为 B_1 ,余下血样保存在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱;30 d 后,再取出 0.2 mL 患者全血,根据当天的标准曲线分析得到游离 MTX 浓度为 A_2 、总 MTX 浓度为 B_2 。各计算出游离 MTX、总 MTX 的两次检测结果的偏差分别为: $2(A_2 - A_1)/(A_2 + A_1) \times 100\%$ 、 $2(B_2 - B_1)/(B_2 + B_1) \times 100\%$ 。结果游离 MTX、总 MTX 的偏差均在 $\pm 15\%$ 以内,表明该检测方法具有良好的重现性。

3.6 基质效应

取 6 份不同来源的人空白全血各 0.1 mL ,除不加内标外,其余按“2.4.1”项下方法处理,用获得的空白上清制备低、高浓度($3, 225\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 MTX、MTX- d_3 溶液,记作 set₁;同时,用体积分数 90% 甲醇将 MTX、MTX- d_3 稀释成相应浓度的溶液,记作 set₂。进样分析,测得 MTX 与内标峰面积,按公式:MTX(内标)基质因子 = MTX(内标)在 set₁ 中峰面积/在 set₂ 中峰面积,内标归一化基质效应因子(基质效应) = MTX 基质因子/内标基质因子。结果低、高浓度 MTX 的基质效应分别为 $(92.69 \pm 8.30)\%$ 和 $(113.40 \pm 6.80)\%$,RSD 分别为 8.95% 和 5.99%,符合生物样本检测要求。

表 1 全血中甲氨蝶呤测定的准确度、精密度和提取回收率。 $n=6$

Tab. 1 Accuracy, precision and extraction recovery of MTX in whole blood. $n=6$

ρ_{added} / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	Intra-day			Inter-day			Extraction recovery /%
	$\rho_{\text{found}}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	RSD/%	$\rho_{\text{found}}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	RSD/%	
1	0.97 ± 0.08	-3.37	7.96	0.96 ± 0.10	-4.14	10.88	-
3	2.95 ± 0.21	-1.70	7.13	2.95 ± 0.20	-1.58	6.88	72.47
150	156.20 ± 9.07	4.10	5.81	154.10 ± 10.38	2.73	6.73	70.12
225	228.75 ± 6.79	1.67	2.97	234.20 ± 10.95	4.10	4.68	76.85

表 2 全血中甲氨蝶呤的稳定性试验结果。 $n=6$

Tab. 2 Stability of MTX in whole blood samples. $n=6$

ρ_{added} / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	Freeze-thaw stability(3 freeze-thaw cycles)		Long-term stability($-80\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 d)		Autosampler for 12 h	
	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%
3	7.1	7.7	7.1	3.8	2.9	12.3
150	2.0	5.2	7.6	6.1	2.7	3.8
225	7.1	4.4	0.8	5.4	6.7	3.5

3.7 临床初步应用

监测 8 例口服 $10 \text{ mg} \cdot \text{W}^{-1}$ MTX 的 RA 患者红细胞中 MTXPGs 浓度,患者平均年龄为 (50.63 ± 11.29) 岁,体重为 (52.75 ± 10.09) kg,肝肾功能正常,服药周期均为 8 周。患者均于第 8 周服药后第 7 天(即第 9 周服药前)采血,将全血储存于 -80°C 冰箱待分析。采用已建立的 LC-MS/MS 测定血药浓度,结果显示(表 3),平均 MTXPGs 浓度为 $(16.10 \pm 6.63) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,可见服用相同剂量、相同周期的 MTX,不同患者的血药浓度差异大。

另监测 37 例口服小剂量 MTX 的 RA 患者红细胞中 MTXPGs 浓度,男性 8 人,女性 29 人,患者平均年龄为 (54.83 ± 12.14) 岁,体重为 (54.99 ± 8.91) kg,均规律口服相同剂量 $(10 \text{ mg} \cdot \text{W}^{-1})$ 的 MTX,服药周期为 3 ~ 139 个月。患者均于服药后第 7 天采血,将全血储存于 -80°C 冰箱待分析。采用已建立的 LC-MS/MS 检测,患者红细胞中平均 MTXPGs 浓度为 $(25.18 \pm 13.44) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4 讨论与结论

由于 RA 患者口服 MTX 剂量小 $(5 \sim 25 \text{ mg} \cdot \text{week}^{-1})$,红细胞中 MTXPGs 聚合物(MTX-PG₂₋₇)含量低,检测达到 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 数量级,因而对分析方法的要求极高。目前文献[10-14]报道的放射化学配体结合法费时费力,且需要放射性同位素;抑制二氢叶酸还原酶(DHFR)的酶分析法特异性不强,易受到内源性物质的干扰;较为常用的 HPLC-荧光检测法样品制备相对繁琐,灵敏度不高且需要昂贵的在线光化学反应器;而 FPIA 需要特定的试剂盒,成本较高;故以上方法均不适合临床的常规监测。而 LC-MS/MS 具有较高的灵敏度、选择性和鉴别性,并且具有缩短分析时间的能力,因此本实验采取 LC-MS/MS。

目前,测定红细胞中 MTXPGs 方法有直接测定法和间接测定法两种方法。直接测定法^[13]需配备特殊的柱后光氧化装置,分离和检测每种 MTXPG 难度大且花费高,不适用于临床检测。因此本实验采用间接测定法,体外将 MTXPGs 转化为 MTX,通过 LC-MS/MS 检测 MTX 浓度进而计算 MTXPGs 浓度。参考文献[18-19],预实验考察了抗坏血酸浓度、温度、时间对 MTXPGs 转化程度的影响,得到 MTXPGs 转化为 MTX 的最优条件为: $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸环境下, 37°C 避光孵育 2.5 h。

本实验的样品前处理方法采用甲醇直接沉淀蛋白法,较常用的 MTX 提取法——液液萃取法和固相萃取法操作简便且重复性高。选用 MTX-*d*₃ 作为内标,比较茶碱、多索茶碱、氨基蝶呤、甲硝唑等内标,同位素内标能够很好地克服 LC-MS/MS 分析中的基质效应,并且避免操作、进样和仪器响应等的偏差,使 MTX 的检测具有很好的专属性。本法只需全血样品 0.2 mL,单个样品的进样分析时间为 3 min,定量下限达 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,较文献[10-19]报道的方法具有简单快速、高灵敏度和高专属性优点。

本方法初步应用于 8 例 RA 患者口服 MTX 后的结果表明,服用相同剂量、相同周期的 MTX,不同患者 MTXPGs 浓度差异很大,与国内外研究一致^[7,20],因此为实现个体化用药,提高 RA 患者疗效、减少不良反应,临床监测红细胞中 MTXPGs 浓度十分必要。同时,本方法应用于 37 例 RA 患者口服 MTX $(10 \text{ mg} \cdot \text{W}^{-1})$,持续 3 ~ 139 个月后的血药浓度监测,结果显示,红细胞中平均 MTXPGs 质量浓度为 $(25.18 \pm 13.44) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Dervieux 报道^[13],70 例每周接受小剂量 MTX $(10 \sim 25 \text{ mg} \cdot \text{W}^{-1})$,持续 6 ~ 240 个月治疗的 RA 患者红细胞中平均 MTX-PGs 质量浓度为 $53 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,较本法测定的浓度高,这可能是由于种族的差异(中国人 vs 美国人)、

表 3 MTX 治疗 RA 患者后红细胞中 MTXPGs 浓度

Tab. 3 Concentrations of erythrocyte MTXPGs in RA patients receiving MTX therapy

Sample No.	Gender	Age/years	BW/kg	BMI	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{week}^{-1}$	Duration/weeks	$\rho/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	Female	59	51.5	20.12	10	8	10.91
2	Female	61	46.0	20.44	10	8	21.05
3	Female	48	48.0	20.78	10	8	9.26
4	Female	50	49.0	21.21	10	8	14.04
5	Female	56	55.0	22.60	10	8	26.87
6	Female	38	37.0	16.44	10	8	6.87
7	Male	29	64.0	21.38	10	8	22.98
8	Male	64	71.5	24.45	10	8	16.82

检测方法的差异(LC-MS/MS vs HPLC)及给药剂量、服药周期和患者人数的差异造成。而中国广东地区报道^[18]的静脉注射 MTX(10~15 mg·W⁻¹,持续3个月以上)的 RA 患者红细胞中 MTXPGs 的平均恒定质量浓度为 10.1 ng·mL⁻¹,较本法测定的浓度稍低,可能是由于给药途径的差异(口服 vs 静脉注射)、前处理方法的差异(蛋白沉淀法 vs 液液萃取法)以及地区的差异(闽南 vs 广东)造成。后期可增加研究人数来探讨 RA 患者的疗效、不良反应与 MTXPGs 浓度的相关性,以及基因多态性对 RA 患者的影响。

综上所述,本实验采用同位素内标 MTX-d₃建立了间接测定 RA 患者红细胞中 MTXPGs 的 LC-MS/MS 方法,该方法所需全血样品量少,操作简便,具有高灵敏度和良好的准确性、重现性,可应用于临床红细胞中 MTXPGs 浓度监测及药动学研究。

REFERENCES

- [1] Chinese Association of Rheumatology and Immunology Physicians. Chinese expert-based consensus for methotrexate in rheumatic diseases[J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 2018, 57(10): 719-722.
- [2] SINGH J A, SAAG K G, BRIDGES J R S L, et al. 2015 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(1): 1-26.
- [3] SMOLEN J S, LANDEWE R, BIJLSMA J, et al. EULAR Recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(6): 960-977.
- [4] KAMEDA H, FUJII T, NAKAJIMA A, et al. Japan college of rheumatology guideline for the use of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Mod Rheumatol*, 2019, 29(1): 31-40.
- [5] YAMAMOTO T, SHIKANO K, NANKI T, et al. Folypolyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35615.
- [6] DERVIEUX T, GREENSTEIN N, KREMER J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(10): 3095-3103.
- [7] LUO Y, WZ Z, WANG Y, et al. Correlation of methotrexate polyglutamate concentration in erythrocyte with methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis patients[J]. *J Third Mil Med Univ* (第三军医大学学报), 2011, 33(5): 473-476.
- [8] DEN BOER E, DE ROTTE M C J F, PLUIJM S M F, et al. Determinants of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels in rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2014, 41(11): 2167-2178.
- [9] SALLIOT C, VAN DER HEIJD D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(7): 1100-1104.
- [10] KAMEN B A, WINICK N. Analysis of methotrexate polyglutamate derivatives *in vivo* [J]. *Methods Enzymol*, 1986, 122: 339-346.
- [11] SCHRØDER H, HEINSVIG E M. Enzymatic assay for methotrexate in erythrocytes[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 1985, 45(7): 657-659.
- [12] NEGREI C, CARUNTU C, GINGHINA O, et al. Qualitative and quantitative determination of methotrexate polyglutamates in erythrocytes by high performance liquid chromatography[J]. *Rev Chim*, 2015, 66(5): 607-610.
- [13] DERVIEUX T, LEIN D O, MARCELLETTI J, et al. HPLC Determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(10): 1632-1641.
- [14] HAYASHI H, FUJIMAKI C, TSUBOI S, et al. Application of fluorescence polarization immunoassay for determination of methotrexate-polyglutamates in rheumatoid arthritis patients[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2008, 215(1): 95-101.
- [15] SILVA M F, RIBEIRO C, GONCALVES V M F, et al. Liquid chromatographic methods for the therapeutic drug monitoring of methotrexate as clinical decision support for personalized medicine: a brief review[J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(5): e4159.
- [16] VAN HAANDEL L, BECKER M L, LEEDER J S, et al. A novel high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for improved selective and sensitive measurement of methotrexate polyglutamation status in human red blood cells[J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2009, 23(23): 3693-3702.
- [17] DEN BOER E, MEESTERS R J, VAN ZELST B D, et al. Measuring methotrexate polyglutamates in red blood cells: a new LC-MS/MS-based method[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(5): 1673-1681.
- [18] MO X, WEN Y, REN B, et al. Determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after low-dose methotrexate therapy in chinese patients with rheumatoid arthritis[J]. *J Chromatogr B*, 2012, 907: 41-48.
- [19] LI H, LUO W, ZENG 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]. *J Chromatogr B*, 2007, 845(1): 164-168.
- [20] TAKAHASHI C, KANEKO Y, OKANO Y, et al. Association of erythrocyte methotrexate-polyglutamate levels with the efficacy and hepatotoxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a 76-week prospective study[J]. *RMD Open*, 2017, 3(1): e000363.

(收稿日期: 2019-05-29)