

基于 Westgard 多规则理论建立甲氨蝶呤治疗药物监测的室内质控评估方法

朱俊峰¹, 孙娇¹, 雷英琼², 钟里科¹, 方罗^{1*} [1.中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院), 中国科学院基础医学与肿瘤研究所, 杭州 310022; 2.温州医科大学, 浙江 温州 325035]

摘要: 目的 建立甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)血药浓度检测方法, 并应用 Westgard 多规则理论对 MTX 血药浓度监测的室内质量控制进行评价。方法 利用 LC-MS/MS 建立 MTX 血药浓度检测方法并进行方法学验证。对实际治疗药物监测过程中低、中、高 3 个浓度的 MTX 质控样品的检测结果进行统计分析, 绘制 Levey-Jennings 和 Z 分数质控图, 运用 Westgard 多规则法对质控图进行评价。结果 MTX 的定量下限为 10.4 ng·mL⁻¹, 线性范围为 10.4~5 200 ng·mL⁻¹, 各浓度日内、日间准确度及精密度均<15%, 提取回收率为 102.43%~103.26%, 基质效应为 113.58%~118.33%, 符合生物样本定量分析的要求。对 Levey-Jennings 和 Z 分数质控图进行 Westgard 多规则质控评价发现, 2020 年 11 月期间 MTX 的血药浓度监测提出警告 2 次(违反 1_{2s} 规则), 其余样品均在控。结论 建立的 MTX 血药浓度检测方法专属性好, 灵敏度高, 快速准确, 且该方法在 MTX 血药浓度的长期检测中具有较好的稳定性。应用质控图及 Westgard 多规则质控评价方法对保证 MTX 血药浓度检测的可靠性具有重要意义。

关键词: 甲氨蝶呤; 高效液相色谱-串联质谱法; 室内质控; 质控图; Westgard 多规则理论

中图分类号: R917.101; R969.3 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)18-2360-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.18.010

引用本文: 朱俊峰, 孙娇, 雷英琼, 等. 基于 Westgard 多规则理论建立甲氨蝶呤治疗药物监测的室内质控评估方法[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(18): 2360-2366.

Establishment of Internal Quality Control Evaluation Method of Therapeutic Drug Monitoring of Methotrexate Based on Westgard Multi-rule Theory

ZHU Junfeng¹, SUN Jiao¹, LEI Yingqiong², ZHONG Like¹, FANG Luo^{1*} [1. The Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences(Zhejiang Cancer Hospital), Institute of Basic Medicine and Cancer(IBM), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China; 2. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the content determination of methotrexate(MTX) in human plasma and to evaluate the internal quality control of MTX plasma concentration monitoring using Westgard multi-rule theory. **METHODS** LC-MS/MS was used to establish and validate the methodology for the determination of MTX plasma concentration. The results of MTX quality control samples with low, medium and high concentrations in the actual process of therapeutic drug monitoring were statistically analyzed. Levey-Jennings and Z-score quality control charts were drawn, and Westgard multi-rule method was used to evaluate the quality control charts. **RESULTS** The established method met the requirements of quantitative analysis of biological samples with a lower limit of quantitation of 10.4 ng·mL⁻¹, the linearity range was 10.4~5 200 ng·mL⁻¹, the intra-day and inter-day accuracies and precisions were all <15%, the extraction recovery ranged from 102.43% to 103.26%, and the matrix effect ranged from 113.58% to 118.33%. Using Westgard multi-rule quality control evaluation on the Levey-Jennings and Z-score quality control charts found that MTX plasma concentration monitoring during November 2020 had two warnings (violation of 1_{2s} rule), and the rest samples were all under control. **CONCLUSION** The established MTX plasma concentration detection method is specific, sensitive, rapid, accurate, and has good stability in the long-term detection of MTX plasma concentration. The application of quality control charts and Westgard multi-rule quality control evaluation is of great significance to ensure the reliability of MTX plasma concentration detection.

KEYWORDS: methotrexate; LC-MS/MS; internal quality control; quality control chart; Westgard multi-rule theory

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是一种抗叶酸类抗肿瘤药, 它可以竞争性地抑制二氢叶酸还原酶, 阻止二氢叶酸还原为四氢叶酸, 干扰肿瘤细胞 DNA 的生物合成, 从而发挥抗肿瘤作用。目前,

大剂量甲氨蝶呤(high dose methotrexate, HD-MTX)冲击疗法被广泛应用于急性淋巴细胞白血病、骨肉瘤、非霍奇金淋巴瘤等恶性肿瘤的化疗中。在骨肉瘤中, MTX 的治疗剂量甚至可高达 8~

作者简介: 朱俊峰, 男, 博士, 主管药师 E-mail: zhujf@zjcc.org.cn

*通信作者: 方罗, 男, 博士, 主任药师 E-mail: fangluo@zjcc.org.cn

12 g·m⁻²。然而,即使是 500 mg·m⁻² 的 MTX 对患者来说也可能是致死剂量。其毒性大小与高浓度药物在血中的持续时间密切相关,并且 MTX 的体内消除个体化差异很大^[1]。因此,HD-MTX 化疗期间需要对 MTX 进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),用以反映 MTX 在体内的消除情况和指导亚叶酸钙解救^[2]。

临床上常用的 MTX 血药浓度检测方法有化学发光微粒子免疫分析法、酶增强免疫分析法、HPLC 和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等^[3-7]。其中,LC-MS/MS 因其良好的专属性和灵敏度已成为 TDM 检测常用方法。虽然目前已有基于 LC-MS/MS 的 MTX 血药浓度检测方法学报道^[8],但由于仪器、环境、操作人员等因素的影响,检测结果的准确性往往难以持续保证,因此亟须建立更加完善的 MTX 治疗药物监测室内质控评估体系。《治疗药物监测工作规范专家共识(2019 版)》中指出,TDM 的质量控制不仅需要进行药物体内分析技术的方法学考察,也需要制定相关的质量控制标准^[9]。基于此,本研究利用 LC-MS/MS 建立 MTX 血药浓度检测方法,然后应用 Westgard 多规则质控评价方法,对实际 TDM 过程中的随行质控样品测定值进行 Levey-Jennings 和 Z 分数质控图分析,以期完善 MTX 治疗药物监测的室内质控评估体系,为临床提供更可靠的血药浓度检测结果。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

液相色谱-串联质谱检测系统,包含 Jasper™ 液相色谱及配备 ESI 离子源的 SCIEX Triple Quad 4500MD 串联质谱检测器(美国 AB SCIEX 公司);BS124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);HERAEUS MULTIFUGE 3SR+低温离心机(美国 Thermo Scientific 公司);DMT-2500 多管漩涡混合仪(杭州米欧仪器有限公司);CASCADA I 实验室水纯化系统(美国 PALL 公司)。

1.2 试剂

MTX 对照品(批号:100138-201606;纯度:99.8%)、内标(internal standard, IS)甲硝唑对照品(批号:100191-201808;纯度:100%)均购自中国食品药品检定研究院;甲酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);甲醇(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);氨水(浙江三鹰化学试剂有限公司);

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)均购自德国 Merck 公司;超纯水由 CASCADA I 实验室水纯化系统制备。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 储备液的配制 精密称取 10.4 mg MTX 对照品,置于 10 mL 量瓶,用甲醇(含 0.1%氨水)溶解并稀释至刻度,制得 1.04 mg·mL⁻¹ 的 MTX 对照品储备液;同法再制备一份浓度为 1.04 mg·mL⁻¹ 的 MTX 质控样品储备液;精密称取 9.6 mg 甲硝唑对照品,置于 10 mL 量瓶,用甲醇溶解并稀释至刻度,制得 0.96 mg·mL⁻¹ 的 IS 储备液。储备液于-30 °C 保存。

2.1.2 工作液的配制 精密量取 MTX 对照品储备液适量,以 50%甲醇稀释,配置成 104, 520, 1 040, 5 200, 10 400, 26 000, 52 000 ng·mL⁻¹ 的对照品工作液;精密量取 MTX 质控样品储备液适量,以 50%甲醇稀释,配置成 208, 4 160, 41 600 ng·mL⁻¹ 的质控样品工作液;IS 以 50%甲醇稀释为 2 400 ng·mL⁻¹ 的 IS 工作液。

2.1.3 标准样品及质控样品的配制 精密吸取 90 μL 人空白血浆于 1.5 mL EP 管,加入 10 μL 各浓度的 MTX 对照品工作液,制得标准样品,其所含 MTX 浓度为 10.4, 52, 104, 520, 1 040, 2 600, 5 200 ng·mL⁻¹。同法制得 MTX 浓度为 20.8, 416, 4 160 ng·mL⁻¹ 的低、中、高 3 个浓度的质控样品。

2.2 样品前处理

精密吸取 100 μL 患者血浆置于 1.5 mL EP 管,加入 10 μL IS 工作液,然后加入 400 μL 甲醇沉淀蛋白,2 500 r·min⁻¹ 涡旋 3 min 后,以 24 446 × g 高速离心 10 min。吸取上清 100 μL 于新的 EP 管,加入 400 μL 超纯水,混匀后以 24 446 × g 继续离心 5 min,取上清进行 LC-MS/MS 分析。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Kinetex C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm)。流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~2.5 min, 10%→70%B; 2.5~2.75 min, 70%→10%B; 2.75~4.25 min, 10%B; 分析时间 4.25 min;流速 0.3 mL·min⁻¹;柱温 40 °C;进样量为 2 μL。

2.4 质谱条件

采用正离子模式,多反应监测模式(MRM)。MTX 的最优 MRM 参数: *m/z* 455.0/308.1, 去簇电

压(DP)为 100 V, 射入电压(EP)为 10 V, 碰撞能量(CE)为 28 eV, 碰撞室射出电压(CXP)为 10 V, 驻留时间为 200 ms; IS 的最优 MRM 参数: m/z 171.8/128.1, DP 为 55 V, EP 为 10 V, CE 为 20 eV, CXP 为 9 V, 驻留时间为 200 ms; 离子源参数: 气帘气为 40 psi, 离子化电压为 5 500 V, 温度为 550 °C, 喷雾气为 55 psi, 辅助加热气为 60 psi, 碰撞气为 7 psi。MTX 及 IS 的离子扫描图见图 1。

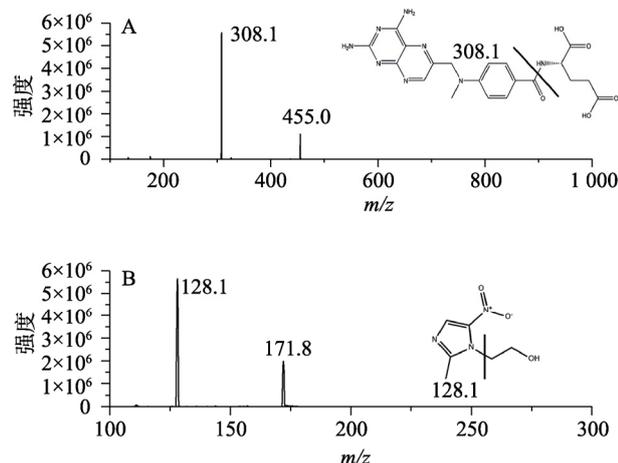


图 1 正离子模式下的子离子扫描图
A-甲氨蝶呤; B-内标(甲硝唑)。

Fig. 1 Product ion plots in positive ion mode
A-methotrexate; B-internal standard(metronidazole).

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性试验 将空白样品(90 μL 空白血浆+10 μL 50%甲醇)、零点样品(90 μL 空白血浆+10 μL 50%甲醇)、定量下限样品(90 μL 空白血浆+10 μL 104 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTX 对照品工作液)、定量上限样品(90 μL 空白血浆+10 μL 52 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTX 对照品工作液)及给药后患者血浆(100 μL), 按“2.2”项下方法处理(其中空白样品以 50%甲醇代替 IS 工作液), 进行 LC-MS/MS 分析, 各样品的 MRM 色谱图见图 2。MTX 和 IS 的保留时间分别为 1.89 min 和 1.55 min, 满足快速分析定量要求。同时, 定量下限浓度的 MTX 响应值为血浆生物基

质响应值的 10 倍以上, 血浆中的内源性成分对 MTX 及 IS 基本无干扰。

2.5.2 线性关系及定量下限 配制 7 个浓度的 MTX 对照品用于建立标准曲线, 按“2.2”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析。以 MTX 对照品浓度为横坐标, MTX 与 IS 的峰面积比值为纵坐标, 进行 $1/x^2$ 加权线性回归, 得 MTX 标准曲线的线性方程为 $y=0.002\ 26x-0.003\ 82$, $r=0.999$, 线性范围为 10.4~5 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。平行对 6 个定量下限样品(MTX 浓度为 10.4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理后进样分析, 按标准曲线回算得 MTX 浓度为 $(9.97\pm 0.50)\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 准确度以 RE(%)表示为 -4.13%, 精密度以 RSD(%)表示为 5.02%, 符合方法学验证要求^[10-11]。RE(%)及 RSD(%)的计算见公式(1)和(2)。

$$\text{RE}(\%) = (\text{测定值均值} - \text{实际值}) / \text{实际值} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{RSD}(\%) = \text{测定值标准差} / \text{测定值均值} \times 100\% \quad (2)$$

2.5.3 精密度和准确度试验 配制定量下限及低、中、高 3 个浓度的质控样品各 6 份, 前处理后进样分析, 代入同日标准曲线方程求得 MTX 的换算浓度, 计算日内准确度 RE(%)和精密度 RSD(%)。不同 3 d 重复以上试验, 同法计算日间准确度和精密度。定量下限及低、中、高 3 个浓度的质控样品各重复进样 6 次, 代入同日标准曲线方程求得 MTX 的换算浓度, 考察重复进样的再现性。结果表明, 日内、日间 RE 表示分别为 -5.48%~2.59%和 -6.44%~-0.58%, 精密度 RSD 分别为 3.15%~5.02%和 4.18%~7.09%。重复进样的再现性 RSD 为 0.75%~5.19%。结果见表 1。

2.5.4 提取回收率和基质效应 配制低、中、高 3 个浓度的质控样品各 3 个, 按“2.2”项下方法处理后, 进样分析得响应值(峰面积)A; 90 μL 空白血浆加入 400 μL 甲醇沉淀蛋白, 离心后取上清 196 μL 分别加入 4 μL 低、中、高 3 个浓度的质控样品工作液和 4 μL IS 工作液混匀, 吸取 100 μL 与 400 μL 超纯水混合, 再次 24 446 $\times g$ 高速离心

表 1 甲氨蝶呤的日内、日间精密度及重复进样的再现性

Tab. 1 Intra-day and inter-day precision of metronidazole and reproducibility of repeated injection

理论浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	日间($n=6$)			日内($n=3$)			重复性($n=6$)		
	测定浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	测定浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	测定浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度 RE/%	精密度 RSD/%
10.4	9.97 \pm 0.50	-4.13	5.02	10.17 \pm 0.66	-2.21	6.49	11.43 \pm 0.46	9.90	4.02
20.8	19.66 \pm 0.75	-5.48	3.81	19.46 \pm 1.38	-6.44	7.09	21.98 \pm 1.14	5.67	5.19
416	426.78 \pm 16.18	2.59	3.79	413.57 \pm 23.73	-0.58	5.74	421.93 \pm 3.15	1.43	0.75
4 160	4 053.67 \pm 127.68	-2.56	3.15	3 944.78 \pm 164.68	-5.17	4.18	4 375.00 \pm 201.15	5.17	4.60

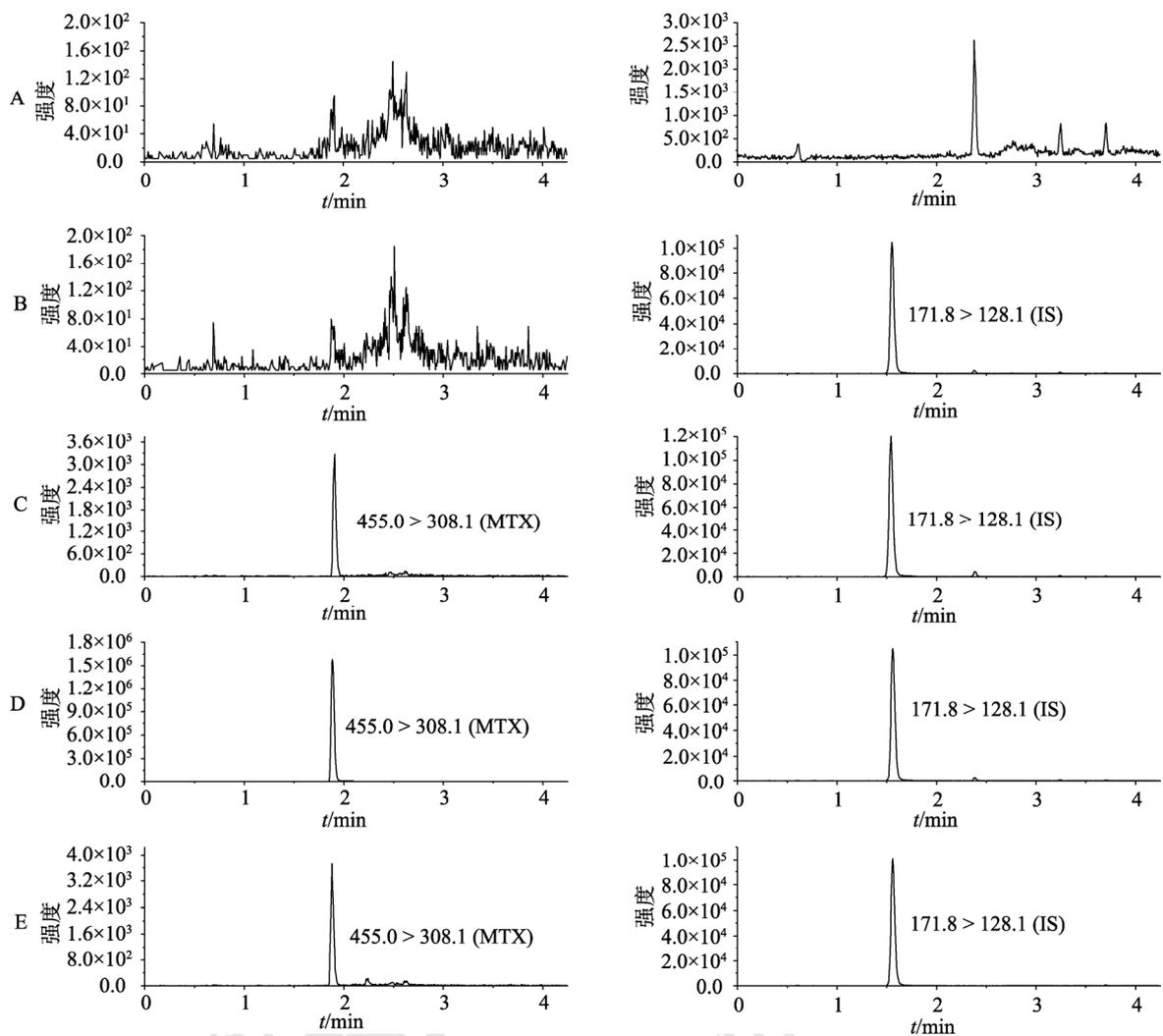


图2 MRM模式色谱图

A-空白样品; B-零点样品; C-甲氨蝶呤定量下限样品; D-甲氨蝶呤定量上限样品; E-给药后患者血浆。

Fig. 2 Chromatograms of MRM pattern

A-blank sample; B-zero sample; C-methotrexate lower limit of quantitation standard sample; D-methotrexate upper limit of quantitation standard sample; E-patient plasma after administration.

5 min 后进样分析得响应值 B ; 以 90 μL 超纯水代替空白血浆, 同上方法处理后进样分析得响应值 C 。计算提取回收率与基质效应, 见公式(3)和(4)。

$$\text{提取回收率}(\%) = A/B \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{基质效应}(\%) = B/C \times 100\% \quad (4)$$

MTX 各浓度质控样品的提取回收率为 102.43%~103.26%, 表明采用甲醇沉淀血浆蛋白能够充分提取血浆中的 MTX。基质效应为 113.58%~118.33%, 表明血浆中的成分可能对 MTX 具有微弱的离子增强作用, 与文献[8]报道相符。

2.5.5 稳定性试验 本研究考察了低、中、高 3 个浓度的质控样品在处理、反复冻融、短期和长期的稳定性。处理后稳定性指样品处理后置于自动进样器 24 h; 冻融稳定性指样品在 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 和室

温之间经历 3 次冷冻-融化循环; 短期稳定性指样品在室温放置 6 h; 长期稳定性指样品在 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 30 d。各浓度平行操作 6 份, 进样分析后按同日标准曲线计算浓度, 计算 RE 和 RSD。处理后稳定性 RE 为 -6.99% ~ -3.37% , RSD 为 2.51% ~ 4.48% ; 冻融稳定性 RE 为 -0.58% ~ 3.75% , RSD 为 1.07% ~ 3.12% ; 短期稳定性 RE 为 -7.34% ~ 4.73% , RSD 为 1.86% ~ 3.34% ; 长期稳定性 RE 为 -14.19% ~ -0.46% , RSD 为 2.89% ~ 3.44% 。以上结果表明 MTX 在相应条件下的稳定性符合生物样本定量分析的要求。

2.5.6 残留效应和稀释效应 在分析定量上限样品后进样空白样品, 重复 3 次, 计算空白样品与定量下限样品中 MTX 响应值的比值。结果表明空

白样品中 MTX 残留为定量下限的(3.11±1.52)%,符合生物样本定量分析的要求。平行配制 6 份 MTX 含量为 20 000 ng·mL⁻¹的标准添加样品,用空白血浆稀释 100 倍后按“2.2”项下方法处理进样分析,其 RE 为-7.54%,RSD 为 3.33%,表明 MTX 浓度超过检测限度时可以通过空白血浆稀释后进行检测。

2.6 Westgard 多规则质量控制评价

2.6.1 Levey-Jennings 质控图

以 2020 年 11 月为例,对实际 TDM 过程中的低、中、高 3 个浓度(换算为摩尔浓度分别是 0.046,0.915,9.154 μmol·L⁻¹)的质控样品的测定值进行统计分析,计算平均值 \bar{x} 和标准差。将各浓度质控样品的平均值 \bar{x} 设为靶值, ($\bar{x} \pm SD$) 为控制线, ($\bar{x} \pm 2SD$) 为警戒线, ($\bar{x} \pm 3SD$) 为失控线。以靶值为中心线,测定日期为横坐标,浓度为纵坐标,绘制 Levey-Jennings 质控图,结果见图 3。进一步运用 Westgard 多规则法的 6 个质控规则,即 1_{2s}、1_{3s}、2_{2s}、R_{4s}、4_{1s}、10_x,对 Levey-Jennings 质控图进行评价。11 月 2 日的低浓度和高浓度质控样品测定值超过 $\bar{x} \pm 2SD$ 的警戒线,触发 1_{2s} 规则,提示警告 2 次;各浓度质控样品的测定值均在 $\bar{x} \pm 3SD$ 的失控线以内,未触发 1_{3s} 失控规则;无连续 2 个质控结果超过 $\bar{x} \pm 2SD$,未触发 2_{2s} 失控规则;无相邻 2 个测定值之差超过 4SD,未触发 R_{4s} 失控规则;无 4 个连续的质控结果超过 $\bar{x} \pm SD$,未触发 4_{1s} 失控规则;无 10 个连续的质控结果落在 \bar{x} 同一侧,未触发 10_x 失控规则。以上结果表明 2020 年 11 月期间的 MTX 血药浓度检测结果没有出现失控的情况。

2.6.2 Z 分数质控图

Z 分数表示 1 个测定值 x 距离平均值 \bar{x} 的相对标准距离,其计算公式见公式(5)。

$$Z \text{ 分数} = (x - \bar{x}) / SD \quad (5)$$

将低、中、高 3 个浓度的质控样品的测定值转换成 Z 分数形式,绘制 Z 分数质控图,结果见图 4。运用 Westgard 多规则法对 Z 分数质控图进行评价,结果与 Levey-Jennings 质控图评价类似。11 月 2 日的低浓度和高浓度质控样品 $Z > 2$,触发 1_{2s} 规则,提示警告 2 次;无质控样品 $Z > 3$ 或 < -3 ,未触发 1_{3s} 失控规则;无连续 2 个质控结果 $Z > 2$ 或 < -2 ,未触发 2_{2s} 失控规则;无相邻 2 个 Z 值之差 > 4 ,未触发 R_{4s} 失控规则;无 4 个连续的质控结果 $Z > 1$ 或 < -1 ,未触发 4_{1s} 失控规则;无 10 个连续的质控

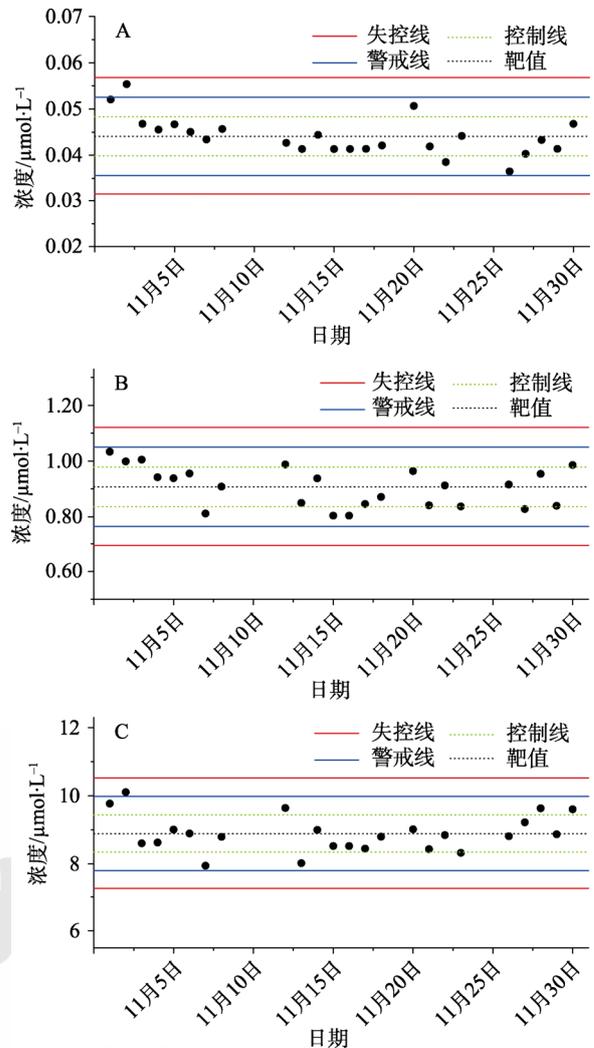


图 3 甲氨蝶呤质控样品的 Levey-Jennings 质控图
A-低浓度质控样品; B-中浓度质控样品; C-高浓度质控样品。

Fig. 3 Levey-Jennings quality control charts of methotrexate quality control samples
A-low concentration of quality control samples; B-medium concentration of quality control samples; C-high concentration of quality control samples.

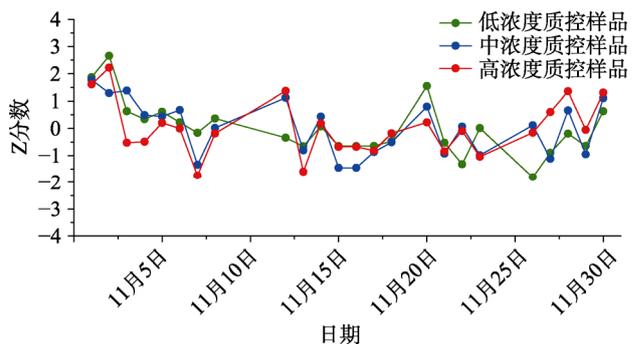


图 4 甲氨蝶呤质控样品的 Z 分数质控图

Fig. 4 Z score chart of methotrexate quality control samples

结果落在正负同一侧,未触发 10_x 失控规则。11 月 2 日虽提示警告,但其后日期质控样品均在控,考虑非系统性误差引起,因此未进一步处理。

2.7 方法应用

将建立的 MTX 血药浓度检测方法应用于临床样本检测。2020 年 11 月共有 48 个 MTX 血样送检,均为非霍奇金淋巴瘤患者在 HD-MTX 化疗后的血样,其中给药后 24 h 血样 15 个,48 h 血样 17 个,72 h 血样 16 个。各时间点血药浓度检测结果显示,患者给药后 24 h 的 MTX 血药浓度为 $(1.475 \pm 1.416) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,48 h 的 MTX 血药浓度为 $(0.174 \pm 0.25) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,72 h 的 MTX 血药浓度为 $(0.046 \pm 0.053) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明 MTX 在患者体内消除的个体化差异很大,见图 5。结合随行质控与 Westgard 多规则理论评价,表明本时段 MTX 血药浓度检测结果稳定可靠,可以有效提示患者 MTX 的消除情况并指导亚叶酸钙解救剂量。

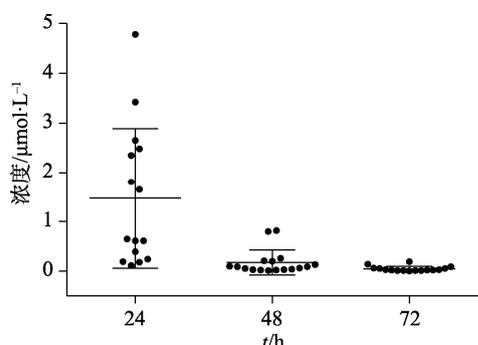


图 5 给药后不同时间点的甲氨蝶呤血药浓度
Fig. 5 Methotrexate plasma concentrations at different time after administration

3 讨论

MTX 的消除延迟可能会造成严重的临床后果,其消除延迟标准为 $C_{24\text{h}} \geq 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{48\text{h}} \geq 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{72\text{h}} \geq 0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 $C_{96\text{h}} > 0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,因此临床上亟须快速、灵敏、准确的 MTX 血药浓度检测方法。当前,基于免疫法的 MTX 血药浓度分析方法最为常见,如化学发光微粒子免疫法等。这类方法虽然检测速度十分快,但 MTX 代谢物对检测结果的干扰较为严重,这种情况在低浓度时尤为明显^[12]。而普通 HPLC 的灵敏度较差,往往需要更多的患者血浆和极大的进样体积,同时分析时间较长^[13]。因此,本实验室利用 LC-MS/MS 技术建立了一种快速、可靠的 MTX 血药浓度检测方法。该方法专属性好,定量下限低至 $10.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0.023 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),且单个样品的分析时间 $< 5 \text{ min}$,完全能够满足临床 MTX 血药浓度监测的需求。

为了进一步保障日常 TDM 过程中的检测质

量,对 TDM 进行室内质量控制评估是必须的。而目前基于 LC-MS/MS 的血药浓度监测室内质控研究仍不完善,且尚无与 MTX 血药浓度监测相关的室内质控研究报告。因此,本研究联合 Lavery-Jennings 和 Z 分数质控图,并应用 Westgard 多规则理论进行质控评价,对 LC-MS/MS 测定 MTX 血药浓度的室内质量控制进行了深入的探索。Lavery-Jennings 质控图分别以 1 倍、2 倍和 3 倍 SD 的偏差作为控制线、警戒线和失控线,可以直观监测精密性,判断是否在控,但只适用于同一水平的质量控制^[14]。而 Z 分数质控图则可将不同水平的质控样品测定值转换在同一张图上进行比较。这 2 种方法虽然操作简便,但仅对随机误差敏感,对系统误差的发现能力较差。而通过 Westgard 多规则理论对两者进行质控评价分析,其 1_{3s} 和 R_{4s} 规则能够敏锐发现随机误差, 2_{2s} 、 4_{1s} 和 10_x 规则能够准确判断系统误差,从而提高了误差检出能力^[15-16]。因此,与单纯根据随行质控判断是否在控的“即刻法”相比,结合 Westgard 多规则理论进行血药浓度质量控制更加合理、有效。目前,Westgard 多规则质控评价方法在 TDM 领域的应用越来越受到关注和认可^[14-19]。本研究利用该方法对 2020 年 11 月期间 MTX 的血药浓度监测进行质量评估,发现警告 2 次,其余样品均在控,提示建立的 LC-MS/MS 在 MTX 血药浓度的长期检测中具有较好的稳定性。

综上所述,本研究利用 LC-MS/MS 技术建立了一种灵敏、快速、可靠的 MTX 血药浓度检测方法。通过联合 Lavery-Jennings 和 Z 分数质控图,并应用 Westgard 多规则理论对其进行质控评价,完善了 MTX 治疗药物监测的室内质控评估体系,提高了 MTX 血药浓度测定的可靠性。

REFERENCES

- [1] 中国临床肿瘤学会(CSCO),中国临床肿瘤学会抗白血病联盟,中国临床肿瘤学会抗淋巴瘤联盟. 大剂量甲氨蝶呤亚叶酸钙解救疗法治疗恶性肿瘤专家共识[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(15): 761-767.
- [2] ZHU T T, ZHAO Y L, FENG L Y, et al. Research progress on the influencing factors and mechanism of elimination delay after high-dose methotrexate chemotherapy[J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2017, 25(1): 49-54.
- [3] WEN R T, YU Z, YU Z Y, et al. Comparison of chemiluminescence microparticle immune assay and enzyme-multiplied immunoassay technique in the determination of methotrexate concentration in plasma[J].

- Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2018, 27(20): 2377-2382.
- [4] LI Y, LIANG G R. Improvement of HPLC determination of methotrexate concentration in human plasma[J]. China Pharm(中国药业), 2013, 22(23): 17-19.
- [5] ZHU L T, YANG L, ZHAO Z G, et al. Correlation between FPIA and HPLC-MS/MS in the determination of methotrexate in human plasma[J]. Cent South Pharm(中南药学), 2015, 13(11): 1146-1150.
- [6] ZHU L T, CHEN R X, YANG L, et al. HPLC-MS/MS method for the determination of methotrexate in human plasma[J]. Cent South Pharm(中南药学), 2015, 13(10): 1025-1029.
- [7] REN X X. Clinical application of the monitoring of methotrexate and its 7-hydroxy methotrexate in human blood using UHPLC-MS/MS[D]. Kaifeng: Henan University, 2016.
- [8] REN X X, WANG Z P, YUN Y L, et al. Simultaneous quantification of methotrexate and its metabolite 7-hydroxy-methotrexate in human plasma for therapeutic drug monitoring[J]. Int J Anal Chem, 2019(2019): 1536532.
- [9] ZHANG X L, MIAO L Y, CHEN W Q. The expert consensus on the standards of therapeutic drug monitoring(2019 edition)[J]. Eval Anal Drug Use Hosp China(中国医院用药评价与分析), 2019, 19(8): 897-898, 902.
- [10] BACH T, BAE S, D'CUNHA R, et al. Development and validation of a simple, fast, and sensitive LC/MS/MS method for the quantification of oxfendazole in human plasma and its application to clinical pharmacokinetic study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019(171): 111-117.
- [11] HU Z Y, ZHANG M M, HE M, et al. Determination of foscarnin in rat plasma with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS): Application to a pharmacokinetic study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019(171): 126-131.
- [12] ESTÈVE M A, DEVICTOR-PIERRE B, GALY G, et al. Severe acute toxicity associated with high-dose methotrexate (MTX) therapy: Use of therapeutic drug monitoring and test-dose to guide carboxypeptidase G2 rescue and MTX continuation[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2007, 63(1): 39-42.
- [13] CHENG B, LIN N M, FANG L. RP-HPLC determination of methotrexate in human plasma[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(5): 598-601.
- [14] CHEN J X, GAO L H, LUO J Q, et al. Application of quality control chart combined with Westgard multi-rule method in quality control of tacrolimus therapeutic drug monitoring and pharmaceutical care[J]. Pharm Care Res, 2019, 19(6): 413-417.
- [15] LI S, WU Y K, YAN X, et al. Evaluation the quality control of blood drug monitoring of vancomycin using Westgard multi-rule theory[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2018, 38(23): 2425-2428.
- [16] WU Y, LI H T, WANG L W, et al. Internal quality control evaluation of therapeutic drug monitoring of lamotrigine by Westgard multi-rule theory[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(19): 2417-2421.
- [17] ZHOU J Y, SUN Z X, XU J. Continuous assessment and analysis of serum of valproic acid[J]. Her Med(医药导报), 2013, 32(4): 534-536.
- [18] LIU Y, OU N, LIU T, et al. Comparison and evaluation of quality control rule for TDM of cyclosporine[J]. China Pharm(中国药业), 2011, 20(15): 46-48.
- [19] ZHANG L J, CHEN L. Enzyme-multiplied immunoassay technique determination of cyclosporine A and tacrolimus blood concentration of quality control[J]. Chin Med Herald(中国医药导报), 2014, 11(36): 79-82, 107.

收稿日期: 2021-12-07
(本文责编: 曹粤锋)