

Mise au point et validation d'une technique de dosage du méthotrexate par chromatographie liquide haute performance

N. JEBABLI,
A. KLOUZ,
S. TRABELSI,
H. BEN ABDA,
R. BEN ALI,
M. LAKHAL,
C. BELKAHIA

Laboratoire de Pharmacologie
Clinique, Centre National
Tunisien de Pharmacovigilance,
Tunisie

Introduction

Le méthotrexate (MTX) est un anticancéreux du groupe des anti-métabolites. Son effet est dose dépendant mais il n'existe pas de fourchette de concentrations plasmatiques bien définie pour ce médicament. On définit plutôt un seuil de toxicité.

L'utilisation clinique du méthotrexate est confrontée à plusieurs problèmes, les variations inter et intra-individuelles ainsi que le risque de survenue d'effets indésirables notamment la néphrotoxicité. Compte tenu de ces variations, la détermination de la concentration circulante est indispensable, afin de permettre d'administrer aux malades les quantités adéquates d'acide folinique [1].

Il existe différentes méthodes analytiques pour doser le méthotrexate, des méthodes immunochimiques par polarisation de fluorescence (TDX[®]) [1-2-3-4], des méthodes

Résumé : Le méthotrexate est un anticancéreux du groupe des antimétaboliques. Son potentiel toxique et la variabilité inter et intra-individuelle de sa pharmacocinétique, rendent nécessaire l'adaptation des protocoles thérapeutiques en fonction des concentrations plasmatiques. Dans ce travail nous décrivons une technique de dosage du méthotrexate par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) mise au point dans notre laboratoire et utilisable en routine, en recourant à une détection UV. Nous décrivons également les conditions opératoires optimisées de cette technique de dosage, dont la température et le débit d'élution, la composition et le pH de la phase mobile et les modalités d'extraction.

Les procédures de validations de notre technique montrent que l'imprécision de la reproductibilité et de la répétabilité est respectivement de 3,65% et de 3%. La linéarité a été vérifiée pour les concentrations comprises entre 0,03 et 500 $\mu\text{mol/l}$ avec un coefficient de corrélation de 99%. La limite de détection est de 0,02 $\mu\text{mol/l}$.

Nous avons en dernier lieu comparé deux techniques de dosage du MTX : la Chromatographie Liquide à Haute Performance et la Technique Immunologique par Polarisation de Fluorescence (FPIA)

La technique que nous avons mise au point est donc simple, rapide, fiable, reproductible, et surtout adaptée aux conditions techniques d'un laboratoire de pharmacologie clinique de routine.

Mots clés : Méthotrexate - Validation - HPLC/UV

immunoenzymatiques directes (EMIT[®]) [1-5].

Ces techniques ont l'avantage d'être facile et relativement rapide à réaliser. Toutefois ; la variation importante des concentrations plasmatiques du MTX en fonction du temps des protocoles d'hyperhydratation et des protocoles d'administrations, oblige l'utilisateur des techniques à réaliser de multiples protocoles de dilution (au moins 4 pour la technique la plus utilisée en routine de laboratoire qui est la technique immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA)). Ces protocoles de dilution sont sources d'erreurs et de dépense supplémentaires.

Ainsi, le but de notre travail est de mettre au point une technique de dosage du méthotrexate par HPLC, fiable, facile à réaliser en pratique quotidienne et ensuite de la valider enfin de la comparer à la Technique Immunologique par Polarisation de Fluorescence (FPIA)

Matériel et méthodes

Patients et prélèvements

Nous avons effectué une étude chez 34 patients atteints de Leucémie Aiguë Lymphoblastique (LAL) au Service de Pharmacologie Clinique du Centre National de Pharmacovigilance.

Les prélèvements des malades nous ont été adressés du service d'Hématologie de l'Hôpital Aziza Othmana de Tunis, du service de Pédiatrie "B" de l'Hôpital d'enfants de Tunis et du Centre National de Greffe de Moelle Osseuse. Les malades ont reçu une forte dose de MTX (5 à 8 g/m²) en bolus intraveineux pendant 24 heures, puis les prélèvements ont été effectués à des temps différents par rapport à la fin de la perfusion : H₂₄ : 24 heures après la fin de la perfusion, H₃₆, H₄₈, H₇₂, H₉₆, H₁₂₀.

Les échantillons de sang veineux (3 à 5 ml) ont été prélevés sur tubes héparinés, après une centrifugation durant cinq minutes à 4000 tours par minute, on a récupéré le plasma.

Tous les prélèvements étaient accompagnés d'une fiche de renseignement qui comprenait les informations suivantes : Le nom et prénom du patient, âge, poids, le nom du médecin traitant, service, Hôpital d'accueil et médicaments associés. Les malades prenant la spécialité Bactrim® ont été exclus de notre étude.

Concernant la prise de méthotrexate : nom de spécialité, posologie et rythme d'administration, date du début du traitement, dernière modification de la posologie, dernière prise, date du prélèvement.

Motif de la prescription, les effets indésirables et les éventuelles pathologies associées.

Les médicaments associés : nom de spécialité, posologie.

Les effets indésirables

Le dosage des échantillons plasmatiques a été effectué par deux méthodes : HPLC (méthode mise au point) et FPIA (méthode de référence) par TDx®.

Appareillage

• HPLC

Une pompe L-6000 Merck, une colonne RP18 avec un diamètre intérieur de 4 mm et de porosité 5 µm, 250 mm, Merck. Un détecteur UV-Visible 4200 Merck ; un four L-5025 Merck. Les chromatogrammes sont enregistrés et les calculs de concentration sont effectués par

un intégrateur D-2500.

• FPIA

Automated fluorescence polarisation analyzer : 600volt-amps, 50 /60Hz, (laboratoire Abbott diagnostic division) Le TDx® Abbott utilisé est un analyseur automatique basé sur la mesure de la polarisation de fluorescence des complexes antigène anticorps formés (Fluorescence Polarisation Immuno Assay : FPIA). Les réactifs sont prêts à l'emploi et le paramètre analysé reconnu par l'appareil grâce à une identification par code à barres.

Solvants et réactifs

Acétonitrile 114291 Merck

Chloroforme 102444 Merck

Méthotrexate 9929 Sigma

Sulfaméthoxazole 7507 Sigma

Tous les réactifs et solvants utilisés dans notre travail sont de qualité HPLC.

Les tests statistiques

Les données ont été analysées au moyen du logiciel «BIOSTAT».

L'étude de la corrélation et des liaisons entre deux variables quantitatives a été réalisée par le coefficient de corrélation. La comparaison entre les deux techniques a été effectuée par le test ANOVA série appariée

Préparation des solutions

La phase mobile est constituée de 80% de tampon phosphate 40 mM (pH = 6,1) et de 20% de méthanol pur à 99%. Diluer 5,6 g de sodium dibasique anhydre dans un litre d'eau de qualité HPLC sans oublier d'ajuster le pH à 6,1 par l'ajout d'acide orthophosphorique à 85% (toujours conserver le tampon à 4°C).

Ce mélange est agité avec un agitateur magnétique pendant 10 min et l'éluant obtenu sera filtré à 0,45 µm (conservation à 4°C). La solution mère de méthotrexate (1651 µmol/l) est préparée dans le carbonate monosodique ainsi que la gamme d'étalonnage qui varie de 0,03 à 500 µmol/l. La solution mère de sulfaméthoxazole (SMX) (2 mg/ml) est préparée dans une solution constituée de phase mobile/méthanol (5/5)

Analyse qualitative des chromatogrammes obtenus

Le volume de l'échantillon après extraction est injecté

dans la boucle d'injection (50 μ l). La durée totale de l'injection est de 15 minutes.

L'analyse qualitative consiste à déterminer le coefficient de résolution entre les pics afin d'avoir une idée sur l'efficacité de la séparation

$$(R_S = 2 (TR_{SMX} - TR_{MTX}) / (W_{MTX} + W_{SMX}))$$

W_{MTX} et W_{SMX} sont les largeurs à la base des pics relatives aux solutés qui ont pour temps de rétention TR_{MTX} et TR_{EI} .

Quantification du Méthotrexate extrait

Le calcul de la concentration du MTX se fait en fonction de la hauteur des pics de MTX et de son étalon interne (EI) obtenue sur le chromatogramme et de la valeur de la constante de proportionnalité K' relative au chromatogramme témoin.

Validation de la méthode

Le calcul du coefficient de variation (CV) a permis d'évaluer les paramètres de validation. Dans notre travail nous nous sommes fixés un $CV < 5\%$.

Résultats

A- Conditions Chromatographiques

Optimisation des différents facteurs d'élution et de quantification :

• Choix de l'étalon interne

Notre technique de dosage étant quantitative, l'utilisation d'un étalon interne (EI) a été impérative. Sachant que les molécules comme le triméthoprime et le sulfaméthoxazole (SMX) sont proches structuralement du MTX, ainsi elles ont été testées comme étalon interne.

Dans les conditions de travail initiales choisies arbitrairement, l'injection de triméthoprime n'a montré aucun pic, pour le SMX un pic à 8 min. Ce dernier a été retenu car le pic de MTX et du SMX sont suffisamment séparés avec un temps d'analyse compatible avec un usage de routine de ce dosage.

• Optimisation de la longueur d'onde

Une quantité constante de MTX et de SMX a été injectée à différentes longueurs d'onde (de 257 à 330 nm). Nous avons obtenu à une longueur d'onde égale à 297 nm une bonne absorbance du MTX.

• Optimisation de la température

Après avoir varié la température entre 30°C et 70°C et déterminé les coefficients de résolution (R_S entre [0,77 ; 1,2]) nous avons retenu une température d'élution égale à 40°C (R_S égale à 1,2).

• Optimisation du débit

La variation du débit d'élution entre 0,7 ml/min et 1 ml/min montre des coefficients de résolution variant entre [0,70 ; 1,03]. Nous avons choisi un débit d'élution égal à 1 ml/min ayant un R_S de 1,2.

• Optimisation de la phase mobile et de son pH

Notre phase mobile initiale est constituée de 80% de tampon phosphate 40 mM (pH = 6,1) et de 20% de méthanol, mais dans ces conditions et même en optimisant la composition de ces derniers nous n'avons pas eu une bonne séparation entre les pics de MTX/EI. L'ajout progressif d'acétonitrile à cette phase mobile tout en diminuant la proportion de méthanol nous a permis d'avoir une bonne résolution entre les pics pour une phase mobile constituée de 82% de tampon phosphate, 12% de méthanol et 6% d'acétonitrile (R_S égale à 1,76). La variation du pH, a permis d'avoir de meilleures conditions de séparation à un pH = 4 (R_S égale à 1,77)

B- Procédure d'extraction

La quantification du MTX étant réalisé sur une matrice biologique, une étape d'extraction doit être réalisée afin d'éliminer les molécules exogènes et endogènes qui peuvent interférer avec la détection et la quantification du MTX. Ainsi une déprotéinisation est nécessaire, pour la réaliser, plusieurs réactifs ont été utilisés. Notre choix s'est porté sur l'acétonitrile. Le chloroforme a été utilisé comme solvant d'extraction nous avons obtenu une phase organique inférieure qui est le chloroforme, une phase médiane constituée de protéines dénaturées et une phase supérieure qui est l'acétonitrile qui contient les deux molécules.

50 μ l de la phase supérieure a été injecté dans le système chromatographique dans les conditions suivantes : $T^\circ = 40^\circ\text{C}$, débit = 1 ml/min ; longueur d'onde égale à 297 nm et une phase mobile constitué de (tampon phosphate/méthanol/acétonitrile). Le chromatogramme obtenu montre deux pics successifs de MTX et du SMX (figure 2).

C- Validation

• Etude de la linéarité

L'évaluation de la linéarité a été effectuée pour des concentrations allant de 0,03 à 500 $\mu\text{mol/l}$. L'étude de la régression a été réalisée par l'évaluation du coefficient de corrélation ($R = 0,99$), la pente (0,866) et l'ordonnée à l'origine (1,007). L'homogénéité des variances a été étudiée par le test de *Cochran*. Elle ne montre aucune valeur aberrante ou suspecte dans notre travail. (figure 1)

• Evaluation de la précision

Elle exprime la variabilité maximale des résultats. Le but de cet essai est la détermination de l'imprécision, de la répétabilité et de la reproductibilité pour une concentration connue de 0,4 $\mu\text{mol/l}$. Les recouvrements des moyennes, l'intervalle de confiance, le CV et l'écart-

15 min d'injection. Le dosage par TDx[®] d'un carrousel entier de 20 échantillons nécessite 10 à 30 min.

Le dosage du MTX par TDx[®] est plus rapide que par HPLC.

• Le coût de chaque technique

Le coût du dosage du MTX par HPLC, mis à part l'investissement initial pour l'acquisition du matériel (verreries: tubes à fond rond, seringue Hamilton, kit de filtration, éprouvette, etc ...), est relativement bas : 7 Dinars. Il résulte essentiellement de la consommation de solvants et de colonnes de chromatographie.

Le coût du dosage du MTX par TDx[®] est de 15 Dinars.

• Conservation des réactifs

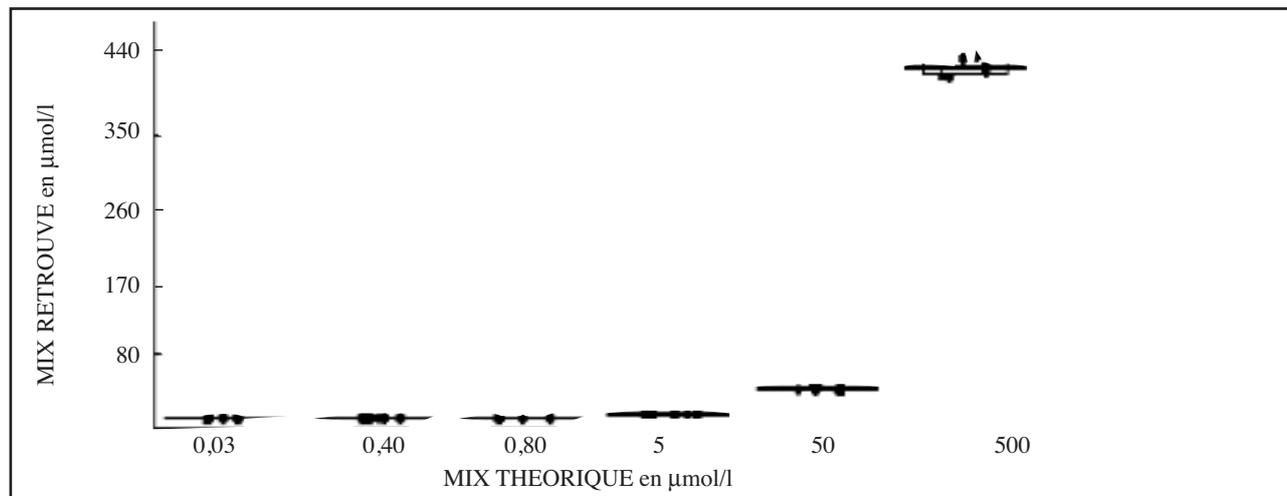


Figure 1 : Représentation de l'homogénéité des variances

Cette figure représente l'étude de l'homogénéité des variances par le test de *Cochran*.

Elle ne montre aucune valeur aberrante ou suspecte dans notre travail.

type sont mentionnés sur le tableau I.

• Limite de quantification et de détection

Les limites de quantification et de détection sont respectivement égales à 0,03 $\mu\text{mol/l}$ et 0,02 $\mu\text{mol/l}$.

D- Comparaison

Afin de comparer les deux techniques de dosage (FPIA et HPLC), nous avons pris en considération ces différents points :

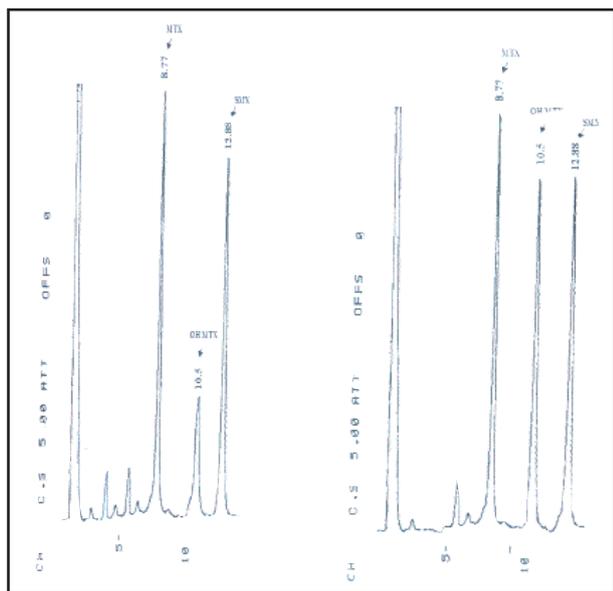
• Temps d'analyse

Pour réaliser le dosage d'un seul échantillon par HPLC il nous a fallu au moins 30 min pour l'extraction du MTX,

Les réactifs de TDx[®] nécessitent une gestion de stock en prenant en considération les dates de péremption des réactifs et d'achat plus complexe qu'avec les réactifs HPLC.

• Personnel qualifié

La HPLC exige une formation particulière des techniciens. Nous avons effectué 34 dosages par les deux techniques appropriées dont la moyenne des concentrations vaut 0,31 $\mu\text{mol/l}$ pour la chromatographie liquide avec un minimum de 0,02 $\mu\text{mol/l}$ et un maximum 1,33 $\mu\text{mol/l}$ alors que par la technique immunologique nous avons une moyenne de 0,25 $\mu\text{mol/l}$ avec des concentrations



Chromatogramme du témoin Chromatogramme du malade

Figure 2 : Tracés chromatographiques

Chromatogrammes d'un témoin et d'un malade représentant le pic de méthotrexate à 8,77 min et de son étalon interne le sulfaméthoxazole un pic à 12,88 min

les deux techniques avec $p = 0,18$ ($p > 5\%$)

Discussion

Le dosage du MTX par HPLC nécessite comme il a été rapporté dans la littérature plusieurs étapes : l'utilisation d'un EI, une déprotéinisation, une étape d'extraction et l'analyse chromatographique.

Dans notre travail après avoir testé différents étalons internes notre choix s'est porté sur le SMX en suivant une approche structurale. La littérature rapporte l'utilisation soit d'une méthode d'étalonnage externe [11] soit d'autres étalons internes comme l'aminoptérine ou le 7-hydroxyméthotrexate [10].

Sachant que le MTX se fixe à plus de 50% aux protéines plasmatiques [6] une étape de déprotéinisation doit être réalisée afin d'éliminer les molécules pouvant interférer avec le MTX et son EI. Dans la littérature plusieurs réactifs ont été utilisés, Il s'agit d'acétone [8], de butanol [8], de diéthyl éther [7], d'acide trichloroacétique [16] ou d'acétonitrile [10] ce dernier a été adopté dans notre travail pour la réalisation de la déprotéinisation.

Tableau I : Résultats de l'évaluation de la précision, des recouvrements et des intervalles de confiance de la méthode

	Concentration ($\mu\text{mol/l}$)	Moyenne des concentrations \pm Ecart type ($\mu\text{mol/l}$, n=6)	CV (%)	Moyenne des recouvrements	Intervalle de Confiance
Inter-jour	0,4	0,35 \pm 0,0126	3,61	87,5 \pm 3,16	[82,3-92,7]
Intra-jour	0,4	0,36 \pm 0,0109	3	89,4 \pm 2,73	[87,23-92,76]

L'étude de l'imprécision, de la répétabilité et de la reproductibilité sont résumés dans ce tableau qui représente : les recouvrements des moyennes, l'intervalle de confiance, le CV et l'écart-type.

allant de 0,03 $\mu\text{mol/l}$ à 1,64 $\mu\text{mol/l}$.

La valeur de la médiane pour la HPLC est de 0,115 $\mu\text{mol/l}$ et de 0,145 $\mu\text{mol/l}$ pour FPIA

L'estimation de la droite de régression, la pente est égale 0,73 avec une probabilité $< 0,0001$ et l'ordonnée à l'origine est égale à 0,026 ce qui n'est pas significativement différent de zéro ($p = 0,57$). Une corrélation acceptable $r = 0,80$ entre les résultats obtenus par les deux techniques de dosage.

L'étude statistique en ANOVA 1 facteur et séries appariées montre bien une différence non significative entre

Une étape d'extraction par le chloroforme a été réalisée afin d'éliminer les molécules qui peuvent interférer avec le MTX et son EI. La littérature rapporte l'extraction solide/ liquide se faisant avec les cartouches d'extraction [6-13-14-15] et même des techniques de dosage ne faisant pas appel à une extraction [16].

La détection du MTX à été faite à des longueurs d'onde allant de 295 nm à 313 nm [2-6-7-10-14-16]. Dans notre technique nous avons opté pour une longueur d'onde égale à 297 nm, laquelle nous a permis

d'avoir la meilleure détection.

La température d'élution habituellement utilisée dans la littérature est généralement la température ambiante. Dans notre travail nous avons opté pour une température de 40°C. Par ailleurs le débit d'élution décrit dans les publications varie de 1 à 1,5 ml/min. Notre choix s'est porté sur un débit de 1 ml/min (R_s égale à 1,2)

D'après les références bibliographiques l'étude de la linéarité a été effectuée de 0,03 à 0,30 $\mu\text{mol/l}$ avec un coefficient de corrélation $R = 0,99$ [6-10] et de 0,15 à 1 $\mu\text{mol/l}$ avec $R = 0,99$ [13-16]. Dans notre analyse la linéarité est allée de 0,03 à 500 $\mu\text{mol/l}$ avec des coefficients de variations allant de 1,42 à 3,41% et un coefficient de corrélation égal à 0,99 ($P < 0,001$). L'étude de la précision inter et intra-journalière dans notre travail est de 3,61% et 1,58%. Dans la littérature elle varie de 3% à 4% [6-10-13-16]. (tableau II)

Il n'est pas possible de choisir exclusivement une technique de dosage sur des arguments analytiques, il faut considérer le prix des réactifs, l'équipement et le personnel nécessaires, la rapidité de l'analyse la situation clinique du patient, la nature et le volume de l'échantillon. En effet, si le coût des réactifs nécessaires à la technique immunologique est un inconvénient majeur par rapport à la technique chromatographique, leur réalisation qui est beaucoup plus rapide ne nécessite pas de main

d'œuvre spécialisée.

Il est certain cependant que la chromatographie reste la technique de référence [12-17] qui a la plus grande gamme d'applications

Conclusion

Nous avons donc mis au point une technique simple de dosage du MTX par HPLC. Cette technique a nécessité l'utilisation d'un étalon interne. Notre choix s'est porté sur le sulfaméthoxazole moyennant une extraction Liq/Liq. Cette technique nous a permis d'avoir un pic de MTX et de son étalon interne bien définis avec un bon coefficient de résolution.

La validation de notre technique montre qu'elle est linéaire dans la plage des concentrations allant de 0,03 $\mu\text{mol/l}$ à 500 $\mu\text{mol/l}$ avec un coefficient de corrélation $R_{\text{liq/liq}} = 0,9994$, reproductible avec un $CV_{\text{liq/liq}} = 3,61\%$, répétable avec un $CV_{\text{liq/liq}} = 1,58\%$. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,02 et 0,03 $\mu\text{mol/l}$. Notre technique est donc valide, fiable, facilement réalisable même en urgence.

L'application clinique de cette méthode en comparaison avec le dosage par FPIA montre une corrélation acceptable. En effet, même si on constate une différence de l'ordre de 17% entre les deux techniques, elle reste non significative ($p < 0,05$).

Tableau II : Comparaison des résultats trouvés par rapport à la littérature

Etudes	Linéarité	Precision (CV%)		R
		Inter-journalière	intra-journalière	
Notre étude	0,03 à 500 $\mu\text{mol/l}$	3,61	1,58	0,99
Aboleenn [6] Cociglio [10]	0,03 à 0,3 $\mu\text{mol/l}$	3	4	0,99
Turci [13] Nadège [16]	0,15 à 1 $\mu\text{mol/l}$	3,5	3,8	0,99

Références

1- Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs, Clin Pharmacol, 1999 ; 47 : 131-143.

2- Najjar TA, Matar KM, Alfawaz IM. Comparaison of a new high-performance liquid chromatography method with fluorescence polarization immunoassay for analysis of methotrexate, Therapeutic Drug Monitoring Ther Drug Monit 1992 ; 14 : 142-146.

- 3- Press J, Berkovitch M, Laxer R, Giesbrecht E, Silverman E, Klein J, and Koren G. Evaluation of therapeutic drug monitoring of methotrexate in saliva of children with rheumatic diseases, *Therapeutic Drug Monitoring* 1995 ; 17:247-250.
- 4- Sakamoto S, Matsuhisa T, Miyoshi K, Naruse R, Urayama H, Shimokawa T, Okabe K, Toki H, Motoi M, Moriwaki S. Serum monitoring of methotrexate (MTX) and 7-hydroxymethotrexate concentration in patients treated with MTX using high-pressure liquid chromatography (HPLC) and comparison of serum MTX levels between HPLC method and fluorescence polarization immunoassay (FPIA), *Gan To Kagaku Ryoho* 1991 ; 18 : 1119-25.
- 5- Albertioni F, Rask C, Eksborg S, Poulsen JH, Pettersson B, Beck O, Schroeder I, Peterson C. Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma, *Clin Chem* 1996 ; 42 : 39-44.
- 6- Aboleneen H, Simpson J, Backes D. Determination of methotrexate in serum by high-performance liquid chromatography, *J Chromatography B Biomed Appl* 1996 ; 681 : 317-22.
- 7- Albertioni F, Pettersson B, Beck O, Rask C, Seidemen 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 Chromatography B Biomed Sci Appl* 1995 ; 665 : 163-70.
- 8- Assadullahi TP, Dagli E, Warner JO. High-performance liquid chromatography method for serum methotrexate levels in children with severe steroid-dependant asthma, *J Chromatography* 1991 ; 565 : 349-56.
- 9- Cairnes DA, Evans WE. High-performance liquid chromatographic assay of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 4-deoxy-4-amino-N10-methylpteroic acid and sulfamethoxazole in serum, urine and cerebrospinal fluid, *J Chromatography* 1982 ; 231 : 103-10.
- 10- Cociglio M, Hillaire-Buys D, Alric C. Determination of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by liquid chromatography for routine monitoring of plasma levels, *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1995 ; 674 :101-10.
- 11- Floridia L, Pietropaolo AM, Tavazzani M, Rubino FM, Colombi A. High-performance liquid chromatography of methotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital départements and assessment of occupational exposure, *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1999 ; 726 : 95-103.
- 12- Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation techniques, *Annales de Biologie Clinique* 1999 ; 57 : 685-95.
- 13- Turci R, Fiorentino ML, Sottani C, Minoia C. Determination of methotrexate in human urine at trace levels by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000 ; 4 : 173-9.
- 14- Turci R, Micoli G, Minoia C. Determination of methotrexate in environmental samples by solid phase extract and high performance liquid chromatography : ultraviolet or tandem mass spectrometry detection ? *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000 ; 14 : 685-91.
- 15- Watson E, Cohen JL, Chan KK. High-pressure liquid chromatographic determination of methotrexate and its major metabolite, 7-hydroxymethotrexate, in human plasma, *Cancer Treat Rep* 1978 ; 62 : 381-7.
- 16- Nadège L, Mathieu F, Stéphanie B, Alain Thuillier, and Christine Fernandez. In vitro stability of methotrexate in blood and plasma samples for routine monitoring, *Therapeutic Drug Monitoring* 2003 ; 25 : 81-87.
- 17- So N, Chandra DP, Alexander IS, Webster VJ, O' Gorman Hughes DW. Determination of serum methotrexate and 7-hydroxymethotrexate concentrations, Method evaluation showing advantages of high-performance liquid chromatography, *J Chromatography* 1995 ; 337 : 81-90.