

Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统 测定人血浆华法林浓度

LCMSMS-364

摘要：本文建立了一种使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定人血浆中华法林的方法。该方法使用岛津 Nexera MX 平行液相三重四极杆质谱联用系统在 2 min 内完成分析，采用同位素内标华法林-d5 定量，定量限为 4 ng/mL，依据临床血药浓度建立线性测定范围为 40-4000 ng/mL，相关系数为 0.9999。低、中、高各浓度水平样品的准确度在 91.92-102.7% 之间。使用该方法分析了临床口服华法林片剂患者的血液样品，具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，采用 Nexera MX 超高速 LCMS 联用分析系统显著缩短分析时间，是一种快速、准确和高通量的临床医学检验人血浆中华法林含量的检测方法，适合临床医学检验分析。

关键词：LCMSMS 华法林 Nexera MX 平行液相质谱系统

乳华法林钠 (warfarin sodium) 作为一种双香豆素类抗凝药物，因其化学结构与维生素 K 的结构相似，可在体内通过维生素 K 依赖的多作用靶点来抑制凝血因子 IIa、VIIa、IXa、Xa 来发挥抗血栓作用。华法林是目前最为常用的口服抗凝药物，适用于预防和治疗血栓栓塞性疾病，药效慢而持久，对需长期维持抗凝者适合选用该药物。临床上用华法林防治血栓栓塞性疾病，可极大地降低栓塞的发病率和死亡率。但是，华法林使用过量会出现过度抗凝的情况，易造成出血倾向，因此临床对检测其血药浓度十分重视。并且华法林使用的个体差异大，不同的患者使用华法林的剂量不同。世界卫生组织建议用国际标准化比值 (International Normalized

Ratio INR) 作为抗凝监控指标，INR 需要保持在 2.0-3.0 之间。华法林的安全性和有效性需要密切监测，必要时调整华法林剂量，以达到一个精准化给药的治疗。目前，临床常用的监测方法有 HPLC 法、自动生化仪等方法，但这些方法存在灵敏度低，样品检测通量低等缺点。

本研究用 Nexera MX 平行液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统分析了临床口服华法林片剂患者的血液样品，具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，采用 Nexera MX 超高速 LCMSMS 联用分析系统显著缩短分析时间，是一种快速、准确和高通量的临床医学检验人血浆中华法林含量的检测方法，适合临床医学检验分析。

实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为：LC-30AD×4 输液泵，DGU-20A_R×2 在线脱气机，SIL-30AC_{MP} (自动进样器)，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪配 ESI 电离源，LabSolutions Ver.5.91 色谱工作站。

1.2 分析条件

色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GIST (2.1 mm I.D. × 50 mm L, 2.0 μm)

流动相：A 相 /C 相：(0.1% 甲酸) 水，
B 相 /D 相：甲醇

柱温：40°C

梯度：采用梯度洗脱的方式，梯度程序见表 2、表 3 和表 4

流速：0.4 mL/min

进样体积：2 μL

质谱条件：

离子源：ESI，正离子模式

雾化气流速：3.0 L/min

干燥气流速：10 L/min

驻留时间：100 ms

接口温度：300°C

MRM 参数：见表 1

DL 温度：250°C

接口电压：4.0 kV

表1 MRM参数

No.	名称	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	华法林	Warfarin	81-81-2	309.10*	163.05	-16.0	-14.0	-30.0
				309.10	251.05	-15.0	-18.0	-17.0
2	华法林-d5	Warfarin-d5	75472-93-4	314.35*	256.10	-22.0	-19.0	-13.0
				314.35	43.15	-12.0	-27.0	-30.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

华法林和华法林-d5（结构式见图1）标准溶液配制：使用甲醇溶液分别制备浓度为 2 mg/mL 和 1 mg/mL 的华法林和华法林-d5 的储备溶液。加入适当体积甲醇稀释储备溶液，制备浓度为 400、1200、2000、4000、12000、20000 和 40000 ng/mL 的华法林标准工作溶液，华法林-d5 使用甲醇稀释储备溶液至终浓度为 400 ng/mL 备用。所有储备溶液储存在 4°C，所有工作溶液在使用前均新鲜制备。

吸取 90 μL 人血浆，分别加入 10 μL 华法林各浓度点标准工作曲线溶液，依次配制成浓度为 40、120、200、400、1200、2000 和 4000 ng/mL 的标准曲线，加入 10 μL 华法林-d5 内标工作溶液，涡旋混合后加入 290 μL 甲醇沉淀蛋白，样品涡旋 5 分钟后以 13,000 g，4°C 离心 10 分钟，取上清液 150 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

样品前处理方法：90 μL 口服华法林钠片剂患者血浆样品加入 10 μL 甲醇和 10 μL 华法林-d5 内标工作溶液，涡旋混合加入 290 μL 甲醇沉淀蛋白，样品涡旋 5 分钟后以 13,000 g，4°C 离心 10 分钟，取上清液 150 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

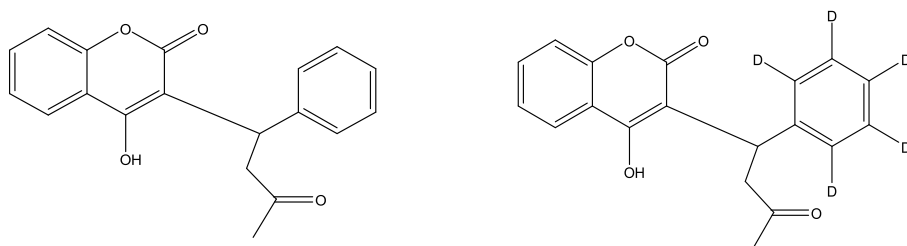


图1 华法林和华法林-d5的化学结构式

1.4 MX 系统流路图及各流路梯度设置

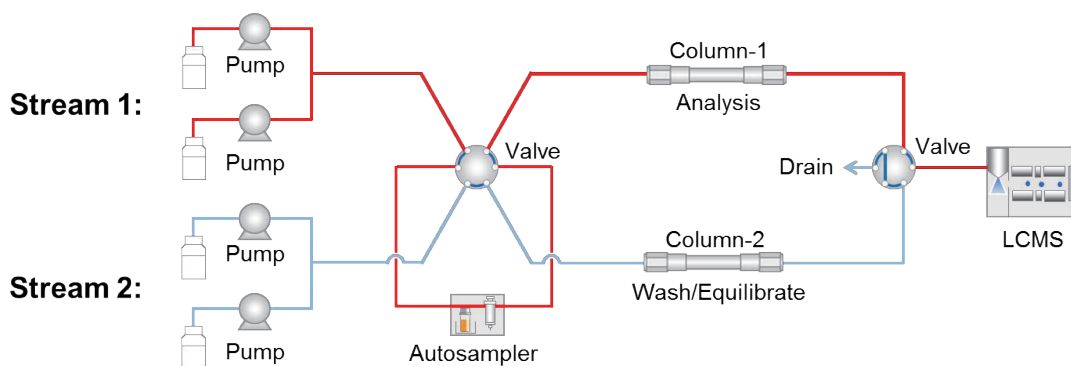


图2 MX系统流路图

表2 分析流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	70
0.50	Pumps	Pump B Conc.	70
1.5	Pumps	Pump B Conc.	100
2.00	Controller	Stop	

表3 冲洗平衡流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	100
0.50	Pumps	Pump B Conc.	100
0.60	Pumps	Pump B Conc.	70
2.00	Controller	Stop	

表4 常规液相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	70
1.50	Pumps	Pump B Conc.	100
2.50	Pumps	Pump B Conc.	100
2.51	Pumps	Pump B Conc.	70
4.00	Controller	Stop	



图3 MX系统液相梯度曲线图

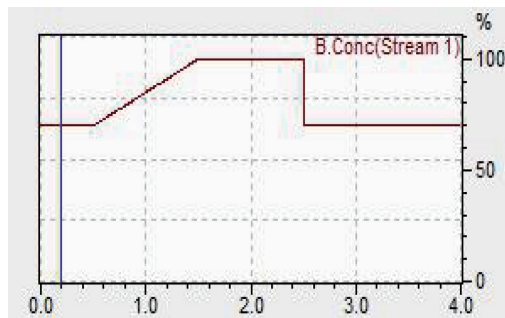


图4 常规液相梯度曲线图

结果与讨论

2.1 专属性考察

分别考察空白替代基质、空白替代基质加标和实测血浆样品，结果表明，替代基质对华法林及其内标华法林-d5的检测均无干扰（见图5）。

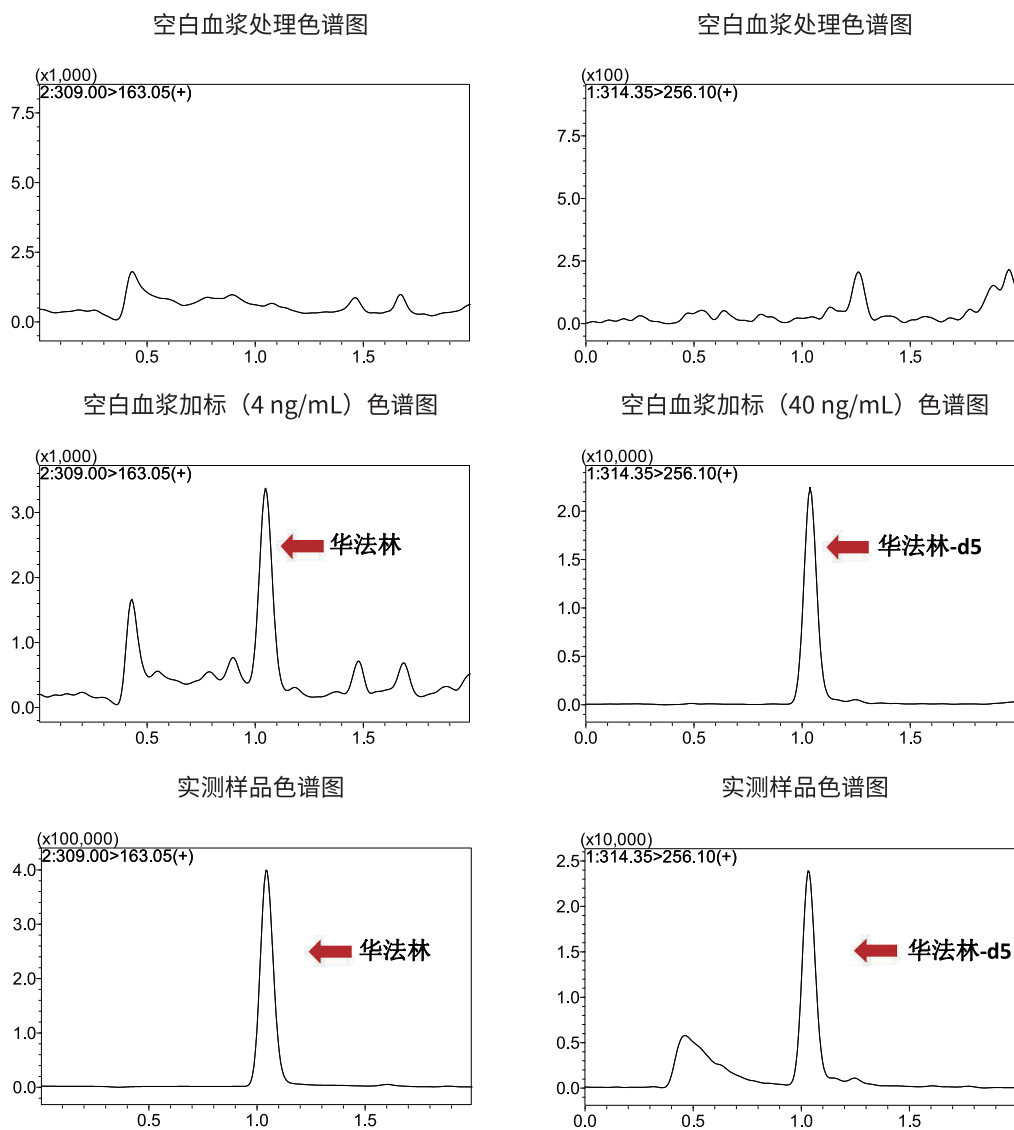


图5 华法林及其内标华法林-d5专属性考察图

2.2 标准曲线、检出限 (LLOD) 和定量限 (LLOQ)

用血浆基质和标准工作液配制成 40、120、200、400、1200、2000 和 4000 ng/mL 标准曲线样品，按照 1.3 中的样品前处理方法进行处理。分析测定后，按照 $S/N > 3$ 为最低检测限，最低检测限为 2 ng/mL； $S/N > 10$ 为最低定量限，华法林的最低定量限为 4 ng/mL（见图 5）。以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作标准曲线（图 6）。在 40-4000 ng/mL 浓度范围内线性良好，线性方程、线性范围和相关系数见表 5。

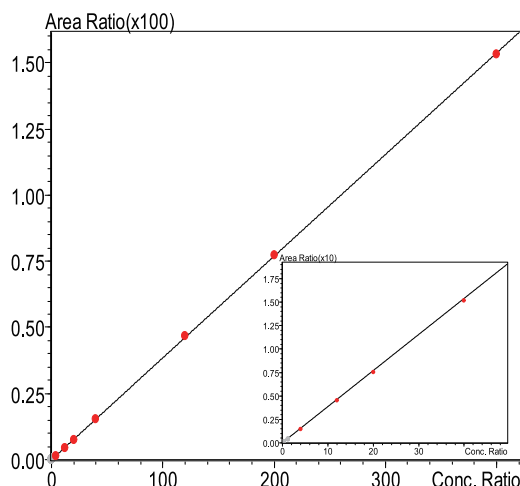


图6 华法林标准曲线图

表5 各组分工作曲线及相关系数 (1/c加权)

No.	名称	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 r	准确度 (%)
1	华法林	40-4000	$Y=0.1538X-0.0146$	0.9999	88.50-114.8

2.3 测定重复性

用血浆基质配制低、中、高三个浓度的质控样品，得浓度为低 (120 ng/mL)、中 (400 ng/mL) 和高 (1200 ng/mL) 的样品，按照 1.3 中的样品前处理方法进行处理，连续进样 12 次，计算 Stream1 (6 次) 和 Stream2 (6 次) 双流路分析样品时保留时间和峰面积的重现性。结果 (表 6) 表明：保留时间的 RSD 值小于 0.23%，峰面积比的 RSD 值小于 3.18%。

表6 Nexera MX双流路系统测定华法林精密度 (n=12)

针次	120 ng/mL		400 ng/mL		1200 ng/mL	
	保留时间 (min)	面积比	保留时间 (min)	面积比	保留时间 (min)	面积比
1	1.045	4.75	1.045	16.59	1.044	51.24
2	1.049	4.73	1.048	15.02	1.049	48.69
3	1.045	4.84	1.044	15.83	1.044	48.95
4	1.049	4.68	1.047	15.42	1.048	47.11
5	1.045	4.75	1.044	15.46	1.045	48.08
6	1.047	4.55	1.048	15.43	1.048	47.53
7	1.045	4.88	1.044	14.85	1.044	48.31
8	1.043	4.59	1.049	14.69	1.047	47.48
9	1.045	4.76	1.044	15.56	1.044	46.70
10	1.047	4.74	1.048	15.57	1.049	48.68
11	1.044	4.70	1.044	15.50	1.044	47.79
12	1.047	4.78	1.050	15.23	1.050	47.05
RSD (%)	0.18	1.97	0.22	3.18	0.23	2.52

2.4 质控样品准确度考察

用血浆基质和标准工作液配制低（120 ng/mL）、中（400 ng/mL）和高（1200 ng/mL）三个浓度的质控样品，按照 1.3 中的样品前处理方法进行处理。连续进样 6 次，计算低、中、高不同浓度 Nexera MX 平行液质联用系统测定的准确度（表 7）。

表7 华法林在Nexera MX双流路系统的准确度考察（n=6）

配制浓度 (ng/mL)	(min)	面积比	测定浓度 (ng/mL)	准确度 (%)
120	1.045	4.35	110.3	91.92
	1.047	4.44	114.8	95.67
	1.046	4.37	110.4	92.01
	1.050	4.25	113.6	94.64
	1.045	4.42	115.3	96.11
	1.054	4.24	113.2	94.34
400	1.045	14.95	378.0	94.50
	1.048	14.53	372.7	93.17
	1.045	14.38	375.0	93.76
	1.049	14.42	373.9	93.48
	1.045	14.33	377.7	94.42
	1.049	14.54	388.8	97.21
1200	1.045	46.89	1180.5	98.37
	1.049	46.69	1197.3	99.78
	1.045	47.40	1227.5	102.3
	1.049	47.21	1232.7	102.7
	1.046	46.04	1214.2	101.1
	1.049	45.40	1219.2	101.6

2.5 提取回收率和基质效应

考察待测组分在不同浓度下基质效应的影响，以及该条件下的血浆提取回收率。配制待测组分标准添加血浆样品，按照样品前处理操作后测定响应值（C 组）；将空白血浆蛋白沉淀后标准添加待测组分测定响应值（B 组）；用流动相配制相应浓度不含基质的纯样品溶液测定响应值（A 组）。绝对基质效应的计算值为 B 组样品与 A 组样品的色谱峰面积比；提取回收率的计算值为 C 组样品与 B 组样品的色谱峰面积比。结果（表 8）显示：华法林的基质效应在 98.74-102.03% 之间，提取回收率在 97.98-99.82%。

表8 华法林在血浆样品中的基质效应和提取回收率考察（n=6）

浓度 (ng/mL)	基质效应 (%)		提取回收率 (%)	
	平均值	RSD (%)	平均值	RSD (%) (%)
1200	98.74	1.63	98.61	2.96
400	101.39	2.13	99.82	1.61
120	102.03	2.15	97.98	1.06

2.6 残留实验

在高浓度样品（1200 ng/mL）分析结束后进样空白样品，考察华法林和华法林-d5的残留。结果如图7所示：高浓度样品进样分析后华法林和华法林-d5无残留。

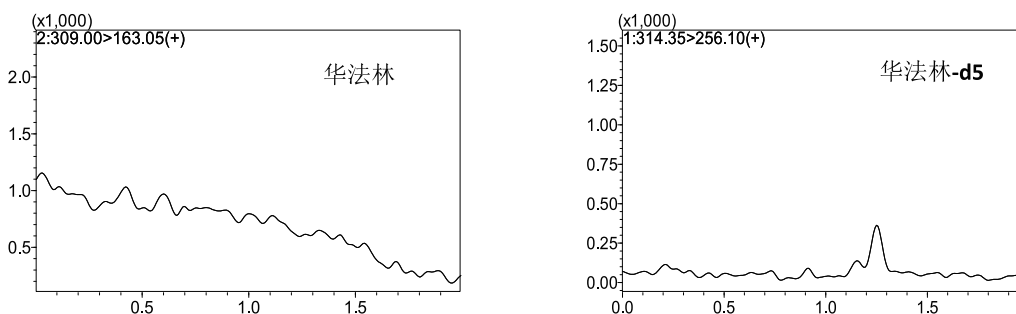


图7 华法林和华法林-d5残留考察色谱图

2.7 实测9名患者血液样品

收集口服华法林钠片剂患者的血浆样品，使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定人血浆中华法林的浓度，使用实测样本考察 MX 系统检测的重复性和灵敏度，结果见表9。

表9 Nexera MX双流路系统测定患者血浆浓度

样品	保留时间 (min) (min)	面积比	测定浓度 (ng/mL)	(Mean±SD)
Sample-001	1.045	59.92	1558.3	1540.0±48.3
	1.049	58.39	1518.3	
	1.045	55.94	1454.7	
	1.049	60.03	1561.0	
	1.045	59.72	1552.9	
	1.048	61.33	1594.8	
Sample-002	1.044	17.64	458.6	454.5±7.9
	1.044	17.85	464.1	
	1.043	17.01	442.3	
	1.045	17.23	448.1	
	1.043	17.61	457.8	
Sample-003	1.048	17.54	456.0	733.9±17.7
	1.044	27.92	726.1	
	1.049	28.82	749.4	
	1.044	27.43	713.2	
	1.046	29.27	761.1	
Sample-004	1.044	27.97	727.4	1086.1±16.3
	1.047	27.94	726.5	
	1.045	40.91	1063.7	
	1.047	42.46	1104.1	
	1.045	42.16	1096.2	
	1.050	41.41	1076.9	
	1.045	41.35	1075.3	
	1.050	42.32	1100.5	

	1.044	20.45	531.9	
	1.048	20.89	543.1	
Sample-005	1.044	20.83	541.8	544.1±8.4
	1.044	20.78	540.3	
	1.045	21.33	554.6	
	1.042	21.25	552.6	
	1.044	51.00	1326.3	
Sample-006	1.043	46.48	1208.6	320.0±10.2
	1.044	50.34	1309.0	
	1.047	49.38	1284.2	
	1.044	48.63	1264.5	
	1.043	49.35	1283.2	
Sample 007	1.043	50.13	1303.5	1225.3±3.0
	1.042	46.68	1213.9	
	1.043	47.83	1243.9	
	1.043	46.45	1208.0	
	1.043	45.61	1186.0	
	1.048	46.02	1196.8	
Sample-008	1.044	30.71	798.6	800.7±13.7
	1.038	30.15	783.9	
	1.044	31.41	816.9	
	1.048	31.00	806.2	
	1.043	31.25	812.6	
Sample-009	1.047	30.22	785.8	868.8±15.1
	1.044	32.62	848.3	
	1.044	33.74	877.3	
	1.044	33.58	873.1	
	1.048	33.68	875.9	
	1.044	32.77	852.1	
	1.045	34.07	886.0	

2.8 Nexera MX 效率及性价比

应用 Nexera MX 系统完成一个人血浆样本中华法林含量测定用时 2 min，而常规 LCMS 分析方法用时 4 min。以 100 个样本为例，使用 Nexera MX 系统测定仅需用时 200 min，而常规 LCMS 测定需要 400 min，因此 Nexera MX 系统可以将常规 LCMS 分析时间缩短一半。在性价比方面，在常规 LCMS 系统上增加两台 LC-30AD 输液泵及流路切换阀即可升级为 Nexera MX 系统，在批量分析大量样本时，硬件成本及 Nexera MX 系统的分析效率是一个优质的选择。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定人血浆中华法林的方法。该方法使用岛津 Nexera MX 平行液相三重四极杆质谱联用系统在 2 min 内完成分析, 采用同位素内标华法林-d5 定量, 定量限为 4 ng/mL, 依据临床血药浓度建立线性测定范围为 40-4000 ng/mL, 相关系数 0.9999。低、中、高各浓度水平样品的准确度在 91.92-102.7% 之间。该方法分析了临床口服华法林片剂患者的血液样品, 使用双流路分析检测样品, 充分利用了系统冲洗、色谱柱平衡的时间, 具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点。采用 Nexera MX 超高速 LCMS 联用分析系统显著缩短分析时间, 将常规液相 4 min 才能够完成的梯度洗脱程序缩短为 2 min, 血液样品的分析通量提高至原来的 2 倍, 与常规 LCMS 方法相比较, 是一种快速、准确和高通量的临床医学检验人血浆中华法林含量的的检测方法, 适合临床医学检验分析。