

# LCMS-8050 液相质谱联用测定人血浆华法林浓度

## LCMSMS-363

**摘要：**本文建立了一种使用岛津 LCMS-8050 液相质谱联用测定人血浆华法林的方法。该方法使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆质谱在 3 min 内完成分析，采用同位素华法林 -d5 为内标定量，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 0.9995，各浓度水平样品的准确度在 90.8-111.1% 之间。使用该方法分析了临床口服华法林制剂患者的血液样品，具有分析速度快、灵敏度高和重现性好的特点，采用 LCMS-8050 液相质谱联用仪可以作为临床治疗药物监测人血浆华法林的一种方法。

**关键词：**LCMSMS 华法林 LCMS-8050 液相质谱联用

华法林 (warfarin) 是目前临床使用最为广泛的香豆素类抗凝药物，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 发挥抗血栓作用。临床上用于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。华法林的剂量受性别、年龄、体重、饮食、基因多态性等因素的影响，使得临床疗效个体差异很大，不同的患者需要华法林的剂量不同。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目的。

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 LCMS-8050 三重四极杆质谱仪分析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 LCMS-8050 液相质谱联用仪可以作为临床治疗药物监测人血浆华法林的一种方法。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5R</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 型柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪配 ESI 电离源，LabSolutions Ver5.91 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 mmL, 2.0 μm)

流动相：A 相：(0.1% 甲酸) 水，B 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

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

表2 液相梯度洗脱程序表

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	60
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.51	Pumps	Pump B Conc.	60
3.00	Controller	Stop	

### 1.3 血浆样品制备

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 200 ng/mL 备用。所有储存溶液储存在 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 标准曲线样品，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。

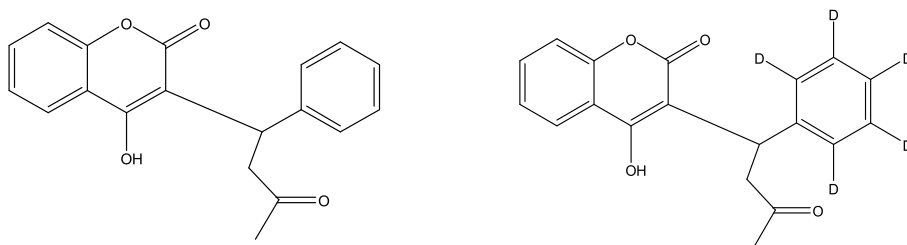


图1 华法林和华法林-d5的化学结构式

## ■ 结果与讨论

### 2.1 专属性考察

分别考察空白血浆、空白血浆加标和实测血浆样品，按照 1.3 项样品处理方法处理血浆，结果如图 2 所示。结果表明，血浆基质对华法林及其内标华法林-d5 的检测均无干扰。

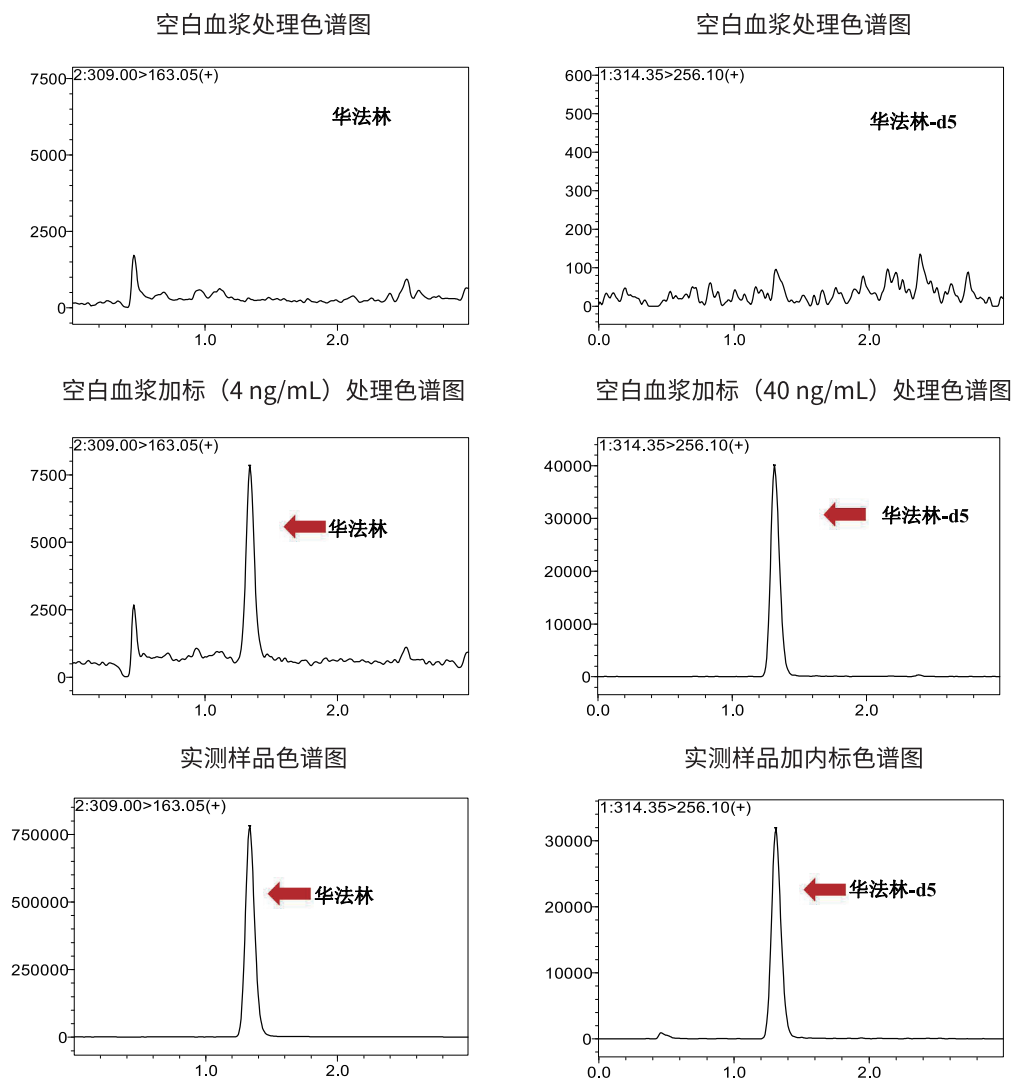


图2 华法林及内标华法林-d5专属性考察图

### 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，华法林最低检测限为 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 2)。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 3)。结果显示华法林在 40-4000 ng/mL 浓度范围内线性良好，线性方程为  $Y = 0.8438X + 0.5567$  (1/c 加权)，相关系数为 0.9995，准确度范围为 90.80-111.1%。

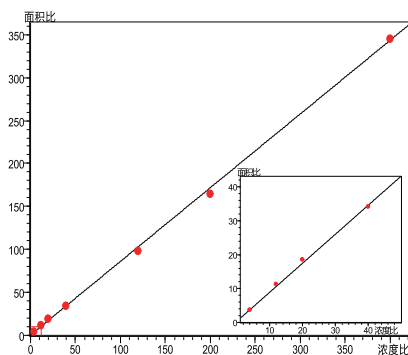


图3 华法林标准曲线图

### 2.3 测定重复性

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，计算样品分析的保留时间和峰面积的重现性。结果（表 3）表明：保留时间的 RSD 值小于 0.14%，峰面积比的 RSD 值小于 1.75%。

表3 LCMS-8050测定华法林精密度 (n=6)

浓度 (ng/mL)	120			400			1200		
	保留时间 (min)	面积比	准确度 (%)	保留时间 (min)	面积比	准确度 (%)	保留时间 (min)	面积比	准确度 (%)
	1.336	10.32	97.1	1.339	34.24	96.49	1.339	99.51	94.25
	1.335	10.97	103.5	1.337	34.16	96.26	1.337	97.55	92.29
	1.335	11.80	111.5	1.341	33.96	95.69	1.337	95.70	91.41
	1.337	11.77	111.2	1.340	34.48	97.17	1.337	97.62	91.93
	1.339	11.59	109.5	1.339	33.71	94.98	1.336	95.01	91.03
	1.340	11.44	108.0	1.338	34.57	97.91	1.335	95.62	91.18
RSD (%)	0.157	4.760	4.919	0.106	0.947	0.938	0.099	1.752	1.749

### 2.4 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。结果显示（表 4）：华法林的基质效应在 100.9-105.9% 之间，提取回收率在 103.8-112.3%。

表4 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	100.9	5.48	105.1	0.68
400	105.9	3.75	103.8	3.72
120	101.1	4.83	112.3	4.28

## 2.5 残留实验

由在高浓度样品（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4所示。结果表明，高浓度样品进样分析后华法林和华法林-d5无残留。

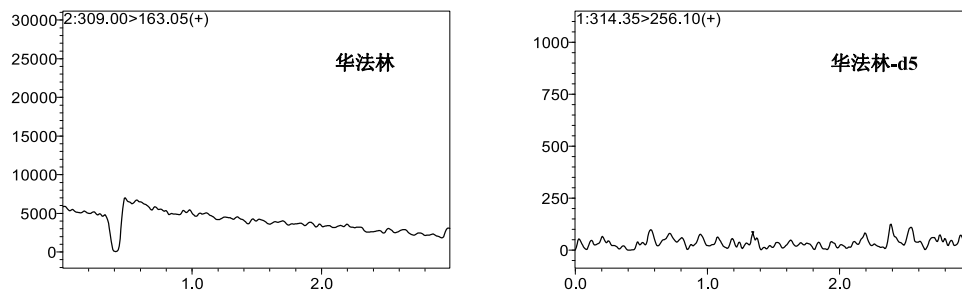


图4 华法林和华法林-d5残留考察色谱图

## 2.6 实测6名患者血液样品

收集口服华法林钠片剂患者的血浆样品，按照1.3中的样品前处理方法进行处理。使用岛津LCMS-8050液相色谱质谱仪测定，考察该方法测定人血浆华法林浓度的重复性、灵敏度和准确性，结果见表5。

表5 LCMS-8050液相色谱质谱联用系统测定患者血浆华法林浓度

样品	保留时间 (min)	面积比	测定浓度 (ng/mL)	(Mean±SD)
Sample-001	1.333	24.68	277.9	284.2 ± 10.0
	1.329	24.74	279.1	
	1.326	26.23	295.7	
Sample-002	1.328	27.48	309.8	307.8 ± 10.2
	1.327	26.30	296.7	
	1.326	28.08	316.7	
Sample-003	1.333	79.22	894.1	901.0 ± 33.2
	1.332	77.13	871.8	
	1.330	83.77	937.2	
Sample-004	1.330	82.09	925.1	909.5 ± 13.5
	1.333	79.90	901.3	
	1.333	79.99	902.2	
Sample-005	1.331	72.07	814.8	821.2 ± 16.7
	1.334	74.62	840.2	
	1.332	71.76	808.6	
Sample-006	1.333	72.74	816.9	820.3 ± 3.1
	1.336	72.77	822.9	
	1.335	72.62	821.1	

## ■ 结论

人血浆华法林样品经过蛋白沉淀处理后，使用岛津 LCMS-8050 液相质谱联用仪可准确测定。该方法使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆质谱在 3 min 内完成分析，采用同位素华法林 -d5 为内标定量，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 0.9995，各浓度水平样品的准确度在 90.8-111.1% 之间。使用该方法分析了临床口服华法林制剂患者的血液样品，具有分析速度快、灵敏度高和重现性好的特点，采用 LCMS-8050 液相质谱联用仪可以作为临床治疗药物监测人血浆华法林的一种方法。