

# LC-MS/MS 法测定血浆中阿哌沙班含量

## LCMSMS-1062

**摘要：** 本文建立并验证了岛津 LC-40B X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060RX 联用系统测定血浆中阿哌沙班含量的方法。实验采用沉淀蛋白前处理血浆样品，并利用岛津自动进样器（SIL-40C X3）的“同时注入”功能显著改善色谱峰形，消除溶剂效应影响。所建方法定量下限（LLOQ）可达 0.01 ng/mL，线性范围为 0.01–30 ng/mL，相关系数 0.999；低、中、高浓度质控样品的日内、日间精密度 RSD% 均 ≤6.63%，准确度在 91.7%–106.8% 之间，提取回收率均大于 89%。验证结果表明该方法灵敏度高、特异性好、重现性佳，满足阿哌沙班生物样本分析要求。

**关键词：** LC-MS/MS 血浆 阿哌沙班

### 技术特点：

- ❖ 自动进样器同时注入功能，有效克服溶剂效应，显著改善色谱峰峰形；
- ❖ 灵敏度高，定量下限（LLOQ）可达 0.01 ng/mL，满足痕量检测需求。

阿哌沙班（Apixaban）作为一种高效、可逆、直接且高选择性的 Xa 因子抑制剂，是临床广泛使用的口服抗凝药物，用于预防和治疗静脉血栓栓塞症等。因其治疗窗相对较窄，且药代动力学易受年龄、肝肾功能及药物相互作用等因素影响，准确监测其血药浓度对于个体化用药、药效评估及药代动力学研究至关重要。

液质联用技术（LC-MS/MS）凭借其高灵敏度、高特异性和准确性，已成为阿哌沙班等直接口服抗凝药（DOACs）血药浓度测定的“金标准”。然而，利用液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）法测定血浆中

阿哌沙班含量时，经蛋白沉淀法前处理后的样品直接进入样分析常受到溶剂效应的显著影响，导致目标物色谱峰峰形变差，影响定量的准确性和精密度。常规通过稀释样品或减少进样量虽可缓解此效应，但会牺牲方法的灵敏度。针对这一分析难点，本文采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40B X3 与高灵敏度三重四极杆质谱仪 LCMS-8060RX 联用系统，结合优化后的样品前处理流程，并创新性地应用岛津 SIL-40C X3 自动进样器的同时注入功能，开发一种高灵敏、抗干扰、能有效克服溶剂效应的血浆阿哌沙班定量分析方法，为相关药物研发提供可靠的技术支持。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 LC-40B X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060RX 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40B X3×2	柱温箱：	CTO-40S
自动进样器：	SIL-40C X3	质谱仪：	LCMS-8060RX
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.128		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱： Shim-pack Velox SP-C18（100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm, 岛津（上海）实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03）

流动相： A-0.1% 甲酸水； B- 0.1% 甲酸乙腈

进样体积： 10 μL 同时注入： 水（10 uL）

流速： 0.4 mL/min 柱温： 40°C

洗脱方式： 梯度洗脱，初始浓度为 B 相 10%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
0.50	泵	B Conc	10
4.50	泵	B Conc	95
5.50	泵	B Conc	95
5.60	泵	B Conc	10
9.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式 : ESI+	雾化气流速 : 3.0 L/min
接口温度 : 300°C	干燥气流速 : 10.0 L/min
D L 温度 : 250°C	加热气流速 : 10.0 L/min
加热块温度 : 400°C	扫描模式 : MRM, 参数见表 2

表 2 MRM 参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
阿哌沙班	460.10	443.30*	-21.0	-26.0	-22.0
	460.10	199.20	-15.0	-39.0	-20.0
阿哌沙班 -D3 (IS)	463.00	466.30	-11.0	-24.0	-22.0

注: \* 表示定量离子

### 1.3 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份阿哌沙班适量, 用纯乙腈溶解配制两份 1.0 mg/mL 阿哌沙班储备液。取其中一份储备液用 50% 乙腈溶液逐级稀释成浓度为 0.5、1.5、5、15、50、150、500、1500 ng/mL 的标准工作曲线; 另一份储备液用 50% 乙腈溶液分别稀释成浓度为 1.25、25、1250 ng/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 20  $\mu$ L 加入 980  $\mu$ L 空白血浆中, 依次配制成标准曲线 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 ng/mL; 分别取三个不同浓度质控溶液 20  $\mu$ L 加入 980  $\mu$ L 空白血浆中, 依次配制成 0.025、0.5、25 ng/mL 质控样品。

精密称取阿哌沙班 -D3 适量, 用纯乙腈溶液溶解配制成 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的阿哌沙班 -D4 储备液用 50% 乙腈溶液稀释为 10 ng/mL 内标溶液。

### 1.4 血浆样品前处理方法

取人血浆样品 100  $\mu$ L, 依次加入 10 ng/mL 内标溶液 10  $\mu$ L、乙腈 300  $\mu$ L, 涡旋混合 2 分钟, 13000 rpm/min 离心 10 min, 吸取上清液进样分析, 进样体积 10  $\mu$ L。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 典型 MRM 色谱图与同时注入功能使用

按照 1.4 项下血浆样品前处理方法, 对血浆工作曲线点进行样品前处理, 采用上述液质参数进行检测, 得到阿哌沙班典与内标典型色谱图。实验发现, 经前处理后所得待测样品直接上机检测, 阿哌沙班与内标色谱峰会受到明显的溶剂效应影响。一般而言, 通过稀释或减少进样量可减小基质效应, 但色谱峰强度与方法灵敏度也会降低。岛津 SIL-40C X3 系列自动进样器拥有同时注入功能。启用该功能, 可在不改变任何前处理并保持原始进样体积的情况下, 明显改善色谱峰峰形, 显著减小溶剂效应影响。所得典型色谱图见图 1。

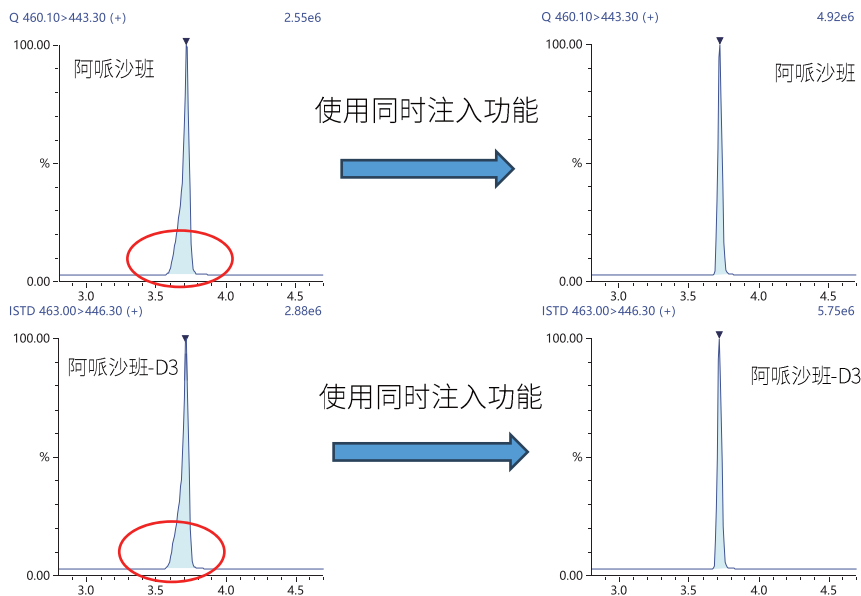


图 1 10 ng/mL 血浆样品使用同时注入前后典型色谱图对比 (左: 未使用同时注入; 右: 使用同时注入)

## 2.2 线性范围

按照 1.4 项下血浆样品前处理方法制备工作曲线, 内标法进行定量分析。以血浆中阿哌沙班浓度与内标浓度 (以 1 计) 的比值 X 为横坐标, 以阿哌沙班峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标, 权重系数为  $1/C^2$ , 进行线性回归分析。所建方法线性范围为 0.01-30 ng/mL, 相关系数 0.999, 结果表明阿哌沙班在 3000 倍浓度范围内线性关系良好, 具体结果图 2。

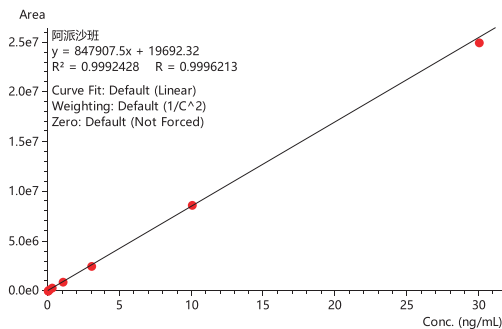


图 2 血浆中阿哌沙班标准曲线

## 2.3 方法灵敏度、精密度与准确度

为考察方法灵敏度、精密度与准确度, 取已配制好的 0.025、0.5、25 ng/mL 质控样品以及定量下限 0.01 ng/mL 样品, 按照 1.4 方法制备, 每个浓度的血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析, 连续测定 3 天, 每日随行标准曲线, 用测得质控样品中阿哌沙班浓度值的 RSD% 值计算其日间和日内差异, 结果见表 3。其中阿哌沙班最低定量限 S/N 平均值为 51.93。结果表明, 各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内, 并符合生物样品检测要求。

表3 阿哌沙班日内精密度与日间精密度 (3天, 每天 n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度 %
LLOQ	0.01	4.84	6.63	91.7-106.7
LQC	0.025	4.98	5.01	91.8-102.4
MQC	0.5	1.48	3.45	94.1-105.3
HQC	25	1.34	3.47	92.3-106.8

## 2.4 回收率

取低、中、高三浓度水平质控样品 (每个浓度重复 6 次), 按照 1.4 方法制备, 以血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与空白血浆按照 1.4 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比, 即  $A1/A2 \times 100\%$ , 考察血浆样本处理方法的提取回收率。实验可见, 使用该样品前处理方法, 各浓度水平阿哌沙班回收率均大于 89%、RSD 小于 3.5%, 具体结果见表 4。

表4 方法回收率结果 (n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率 %	RSD%
LQC	0.025	89.30	3.41
MQC	0.5	93.73	1.21
HQC	25	96.34	0.63

## 2.5 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品 (每个浓度重复 6 次), 通过比较空白血浆后加标样品与浓度一致的标准溶液, 两者的目标化合物面积平均值所得比值即为基质效应, 并计算内标归一化基质效应。结果可见, 使用优化后的样品前处理方法, 各浓度水平基质效应因子均大于 90%, 具体结果见表 5。

表5 基质效应考察结果 (n=5)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应 %	内标基质效应 %	A/A <sub>IS</sub> 基质效应
LQC	0.025	91.28	93.67	97.45
MQC	0.5	96.77	107.31	90.17
HQC	25	95.5	95.99	99.49

## 2.6 系统残留考察 (Carryover)

考察系统残留的影响, 完成标准曲线浓度最高点分析后, 其后分析空白样品中阿哌沙班的峰面积, 空白样品中阿哌沙班及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰, 色谱图见图 3。

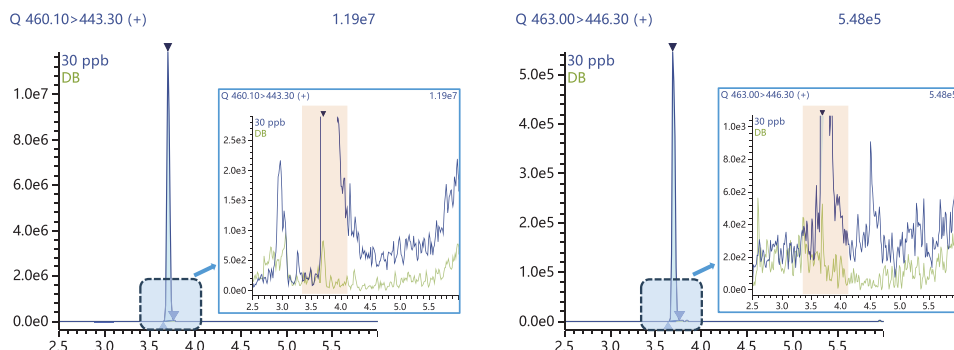


图3 高浓度标样与空白溶液的叠加色谱图

(左: 阿哌沙班、右: 内标物; 蓝色标识: 标线浓度最高点、绿色标识: 空白)

## ■ 结论

本文成功建立了基于岛津 LC-40B X3 与 LCMS-8060RX 联用系统的 LC-MS/MS 方法，用于测定血浆中阿哌沙班含量。通过系统优化，特别是应用岛津 SIL-40C X3 自动进样器的同时注入水功能，有效消除了溶剂效应对阿哌沙班及内标色谱峰的不利影响，显著改善了峰形，在保持高灵敏度（LLOQ: 0.01 ng/mL）和原始进样体积的前提下提升了分析可靠性。经验证，该方法在 0.01-30 ng/mL 范围内线性关系良好（ $r=0.999$ ），日内、日间精密度（ $RSD\% \leq 6.63\%$ ）和准确度（91.7%-106.8%）优异，提取回收率稳定（ $>89\%$ ），基质效应可控，且无残留。综合方法学验证结果，表明该方法灵敏度高、准确可靠、操作简便，完全满足阿哌沙班在生物样本中的定量分析要求，可用于其临床药代动力学研究及新药研发需求。

岛津应用云

