

## 全自動前処理LC-MS/MSシステムを用いた抗凝固剤の分析

直接経口抗凝固薬／新規経口抗凝固薬 (Direct / Novel Oral Anticoagulants; DOACs / NOACs) はワルファリンなどのビタミン K 拮抗薬の代替療法として血栓塞栓症の治療や予防に用いられます。

本報では、DOACs/NOACs 5 種 (ダビガトラン、リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバンおよびベトリキサバン) を含む抗凝固剤 9 種について、全自動 LCMS 前処理装置 CLAM™-2000 および高速液体クロマトグラフ質量分析計からなる全自動前処理 LC-MS/MS システムを用いた測定に関する研究成果をご紹介します。

E. Imoto, D. Kawakami, T. Tsukamoto, T. Minohata

### ■ LC-MS/MS 用抗凝固剤分析キット DOSINACO™

凝固剤の測定にあたっては、LC-MS/MS 用抗凝固剤分析キット DOSINACO を使用しました。DOSINACO キットは 9 種の抗凝固剤 (アセノクマロール、アピキサバン、アルガトロバン、ベトリキサバン、ダビガトラン、エドキサバン、フルインジオン、リバーロキサバンおよびワルファリン) の検量線試料およびコントロール試料に加え、各々の安定同位体ラベル化体を含みます。この安定同位体ラベル化体は内部標準物質として使用することで、分析結果の信頼性向上に寄与します。

#### Sample preparation for CLAM-2000

1. Take 20  $\mu$ L of Extraction buffer to sample cup
2. Add 20  $\mu$ L of samples/calibrators/controls
3. Add 155  $\mu$ L of Extraction buffer
3. Add 12.5  $\mu$ L of Internal Standard
4. Shake in 2 min at 1,900 rpm
5. Filtrate in 2 min

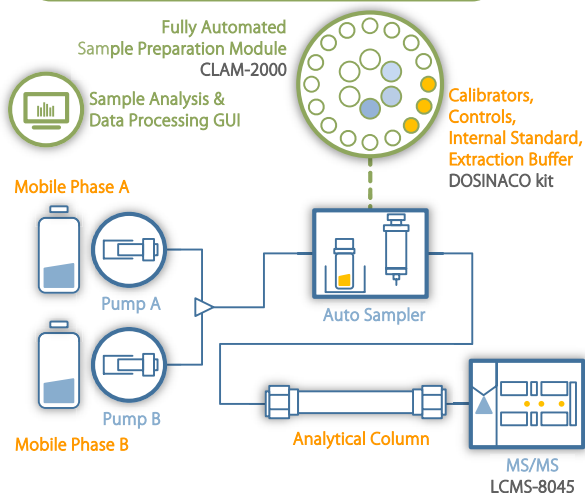


図1 CLAM-2000 および LC-MS/MS による DOSINACO 分析の模式図

CLAM-2000 にセットされた試料は、除タンパクされた後、フィルターを過され、LC-MS/MS 部へ搬送されて分析に供されます。これらの一連のプロセスは全自動で行われ、手技による介入は発生しません。

表1 抗凝固剤および安定同位体ラベル化体の MRM トランジション

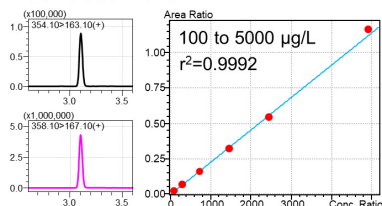
Molecules	Transitions MRM (1)	Transitions MRM (2)
Acenocoumarol	354.10>163.10	354.10>296.10
Apixaban	460.20>443.20	460.20>199.10
Argatroban	509.20>384.20	509.20>70.00
Betrixaban	452.10>324.10	452.10>279.10
Dabigatran	472.20>289.20	472.20>144.20
Edoxaban	548.20>366.20	548.20>152.10
Fluindione	241.10>175.10	241.10>194.10
Rivaroxaban	436.10>145.10	436.10>231.10
Warfarin	309.10>251.10	309.10>163.10

Molecules	Transitions MRM (1)	Transitions MRM (2)
[ <sup>2</sup> H] <sub>4</sub> -Acenocoumarol	358.10>167.10	358.10>300.10
[ <sup>13</sup> C, <sup>2</sup> H] <sub>4</sub> -Apixaban	469.20>452.20	469.20>199.10
[ <sup>13</sup> C] <sub>6</sub> -Argatroban	515.20>390.20	515.20>70.00
[ <sup>13</sup> C] <sub>6</sub> -Betrixaban	458.10>330.10	458.10>285.10
[ <sup>13</sup> C] <sub>6</sub> -Dabigatran	478.20>295.20	478.20>144.20
[ <sup>2</sup> H] <sub>4</sub> -Edoxaban	554.20>372.20	554.20>158.10
[ <sup>13</sup> C] <sub>6</sub> -Fluindione	247.10>181.10	247.10>200.10
[ <sup>13</sup> C] <sub>6</sub> -Rivaroxaban	442.10>145.10	442.10>237.10
[ <sup>2</sup> H] <sub>4</sub> -Warfarin	315.10>257.10	315.10>163.10

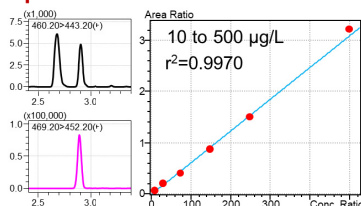
### ■ 分析結果

DOSINACO キット付属の検量線試料および既知濃度のコントロール試料を用いて、全自動前処理 LC-MS/MS システムによる測定系の評価を行いました。検量線範囲 (NOACs 10 - 500  $\mu$ g/L、ワルファリン 100 - 5000  $\mu$ g/L) にて、寄与率  $r^2 > 0.99$  となりました。コントロール試料の再現性 (N=3) はいずれも 15%以下と良好でした。

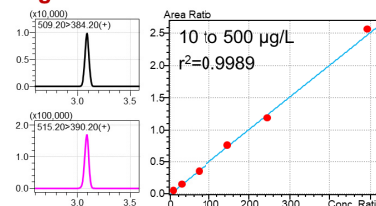
**Acenocoumarol**



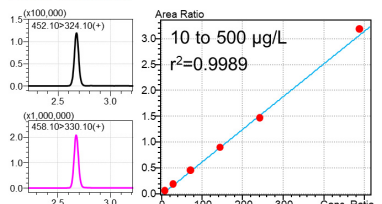
**Apixaban**



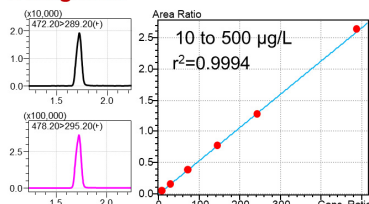
**Argatroban**



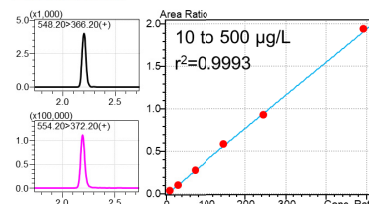
**Betrixaban**



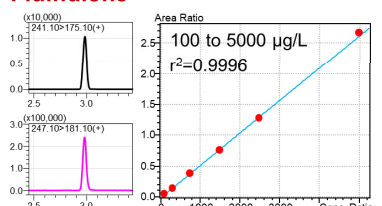
**Dabigatran**



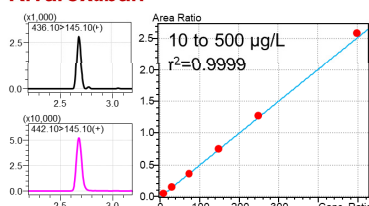
**Edoxaban**



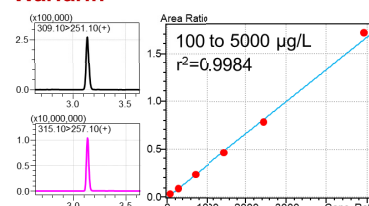
**Fluindione**



**Rivaroxaban**



**Warfarin**



Black peak :unlabeled compound  
Pink peak :labeled compound

	Acenocoumarol				Apixaban				Argatroban			
	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4
Target conc. (µg/L)	184.7	843.5	1716.9	3551.1	18.0	82.5	170.3	337.7	17.7	80.7	171.0	349.7
Average (µg/L)	185.9	858.3	1765.9	3536.8	17.8	79.0	162.3	323.3	17.2	81.8	172.6	333.6
CV (%)	1.8%	1.9%	1.7%	2.2%	10.6%	5.4%	6.0%	5.8%	5.5%	3.1%	3.2%	3.6%
Deviation (%)	0.6%	1.7%	2.9%	-0.4%	-1.0%	-4.2%	-4.7%	-4.3%	-2.9%	1.4%	0.9%	-4.6%

	Betrixaban				Dabigatran				Edoxaban			
	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4
Target conc. (µg/L)	17.8	80.5	169.9	341.4	17.8	81.3	168.9	343.3	18.7	84.5	174.3	355.4
Average (µg/L)	18.4	81.6	167.3	338.2	17.8	82.6	168.7	336.4	17.5	84.6	174.3	361.3
CV (%)	3.8%	1.6%	1.6%	1.9%	2.4%	1.3%	1.2%	1.0%	8.7%	5.3%	4.7%	5.2%
Deviation (%)	3.3%	1.4%	-1.5%	-0.9%	-0.1%	1.6%	-0.1%	-2.0%	-6.2%	0.1%	0.0%	1.7%

	Fluindione				Rivaroxaban				Warfarin			
	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4
Target conc. (µg/L)	181.5	855.7	1763.5	3733.2	18.8	73.6	171.7	328.1	177.9	802.0	1681.3	3468.8
Average (µg/L)	198.1	856.6	1795.8	3691.4	18.3	81.2	170.8	345.2	177.8	819.5	1692.1	3453.5
CV (%)	6.4%	2.9%	2.9%	4.2%	7.4%	5.6%	6.0%	8.1%	1.8%	1.4%	1.0%	2.2%
Deviation (%)	9.1%	0.1%	1.8%	-1.1%	-2.7%	10.3%	-0.5%	5.2%	-0.1%	2.2%	0.6%	-0.4%

図2 抗凝固剤9種の検量線、MRM クロマトグラム (L1: 検量線下限および内部標準物質) およびコントロール試料 (Control1~4) の分析結果

表2 分析条件

System	: CLAM-2000 + Nexera™ X2 + LCMS™-8045		
Protocol for CLAM-2000	: Extraction buffer disp. 20 µL - Sample disp. 20 µL - Extraction buffer disp. 155 µL - IS solution disp. 12.5 µL - Mixing 1900 rpm, 120 sec - Filtration 120 sec		
Column	: DOSINACO analytical column		
Mobile Phase	: DOSINACO mobile phase A, B		
Pump Flow	: 0.5 mL/min		
Time Program	: B conc. 2% (0 - 0.5 min) - 50% (2.5 min) - 98% (3 - 5 min) - 2% (5.01 - 7 min)		
Column Temp.	: 50 °C		
Ionization	: ESI-positive		
Interface Temp.	: 400 °C	DL Temp.	: 200 °C
Block Heater Temp.	: 400 °C	Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min
Heating Gas Flow	: 15 L/min	Drying Gas Flow	: 5 L/min

DOSINACO キットは LCMS による血中薬物濃度モニタリングに必要な標準品、移動相等を組み合わせたものです。(医薬品医療機器法に基づく体外診断用医薬品には該当しません。)

人に対する血中薬物濃度モニタリングにおいては、医師の指示等の下でお使いください。

CLAM、DOSINACO、Nexera、および LCMS は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所**

分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年5月

島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。