



Quantification of Apixaban in Rat Plasma Using UPLC-MS/MS and its Application to a Pharmacokinetic Study

Xian-guan JIN, Yan-yang YANG, & Ming-lei HU *

Wenzhou People's Hospital,
Wenzhou 325000, China

SUMMARY. An ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed to determine apixaban in rat plasma using diazepam as the internal standard (IS). Sample preparation was accomplished through a protein precipitation procedure with acetonitrile to 0.1 mL plasma sample. The analyte and IS were separated on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) with the mobile phase of acetonitrile and 0.1% formic acid in water with gradient elution at a flow rate of 0.40 mL/min. The injection volume was 2 μL. The detection was performed on a XEVO TQD triple quadrupole tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) by multiple reactions monitoring (MRM) of the transitions at m/z 460.0→443.1 for apixaban and m/z 285.2→193.2 for IS. The linearity of this method was found to be within the concentration range of 1.0-50 ng/mL with a lower limit of quantification of 1.0 ng/mL. Only 3.0 min was needed for an analytical run. The matrix effect was 102.3 to 108.5% for apixaban. The intra- and inter-day precision (RSD%) were less than 9.5% and accuracy (RE%) was within ± 9.0%. The recovery ranged from 83.9 to 87.1%. Apixaban was sufficiently stable under all relevant analytical conditions. The method was also successfully applied to the pharmacokinetic study of apixaban in rats. The pharmacokinetic parameters were demonstrated as followed: $t_{1/2}$ was 2.16 ± 1.21 h, C_{max} was 47.08 ± 17.07 ng/mL, and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ was 236.38 ± 52.59 ng/mL.h.

RESUMEN. Se desarrolló un método de cromatografía líquida de ultra-eficiencia en tándem con espectrometría de masas (UPLC-MS/MS) para determinar apixaban en plasma de rata utilizando el diazepam como estándar interno (IS). La preparación de la muestra se llevó a cabo a través de un procedimiento de precipitación de proteínas con acetonitrilo para 0,1 mL muestra de plasma. El analito y el IS se separaron en una columna Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μm) con la fase móvil de acetonitrilo y ácido fórmico 0,1% en agua y gradiente de elución a un caudal de 0,40 mL/min. El volumen de inyección fue de 2 μL. La detección se realizó en un espectrómetro de triple cuadrupolo Xevo TQD de masas en tándem equipada con ionización por electrospray (ESI) de múltiples reacciones de control (MRM) de las transiciones a m/z 460,0→443,1 para apixaban y m/z 285,2→193,2 para IS. Se encontró que la linealidad del método está dentro del intervalo de concentración de 1,0 a 50 ng/mL, con un límite inferior de cuantificación de 1,0 ng/mL. Sólo se necesitan 3,0 min para una serie de análisis. El efecto de la matriz fue de 102,3 a 108,5% para apixaban. La precisión intra- y entre-días (RSD%) fue < 9,5% y la precisión (RE%) fue de ± 9,0%. La recuperación osciló desde 83,9 hasta 87,1%. Apixaban fue suficientemente estable en todas las condiciones analíticas pertinentes. El método también se aplicó con éxito para el estudio farmacocinético de apixaban en ratas. Los parámetros farmacocinéticos fueron $t_{1/2}$ 2,16 ± 1,21 h, C_{max} 47,08 ± 17,07 ng/mL, y $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 236,38 ± 52,59 ng/mL.h.

KEY WORDS: apixaban, pharmacokinetics, rat plasma, UPLC-MS/MS.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: husie@sohu.com