

Validation du dosage de l'Apixaban, un nouvel anticoagulant oral direct, par méthode *LC-MS/MS*.

Gauvreau, Danny^{1,2,3}; Hétu, Pierre-Olivier^{1,3}.

¹Département de biochimie, Centre hospitalier universitaire de Montréal (CHUM), Montréal, QC. ²Service de biochimie, Hôpital Verdun, CIUSSS du Centre-Est-de-l'île-de-Montréal, Montréal, QC. ³Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC

Résumé

Objectif : Développer et valider une méthode rapide d'analyse sensible et spécifique pour le dosage d'Apixaban (Eliquis®), un anticoagulant oral de nouvelle génération inhibiteur du facteur Xa, dans le plasma et le sérum humain.

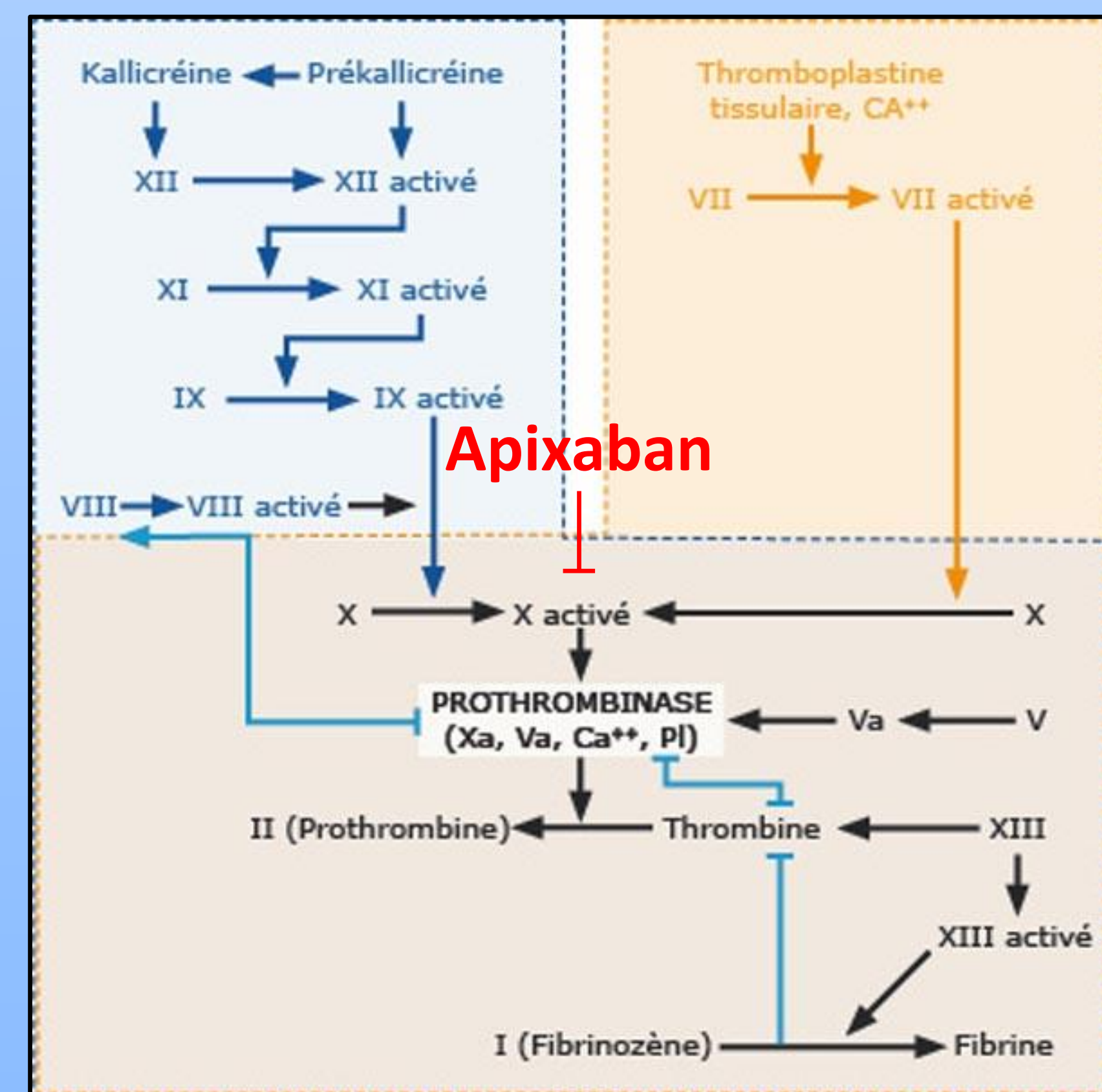
Méthodes : Les échantillons de sérum ou de plasma ont été traités avec du méthanol 100% pour précipiter les protéines et la concentration d'Apixaban a ensuite été déterminée par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (*LC-MS/MS*). La chromatographie a été faite sur une colonne XB-C₁₈ (4,6x100 mm) à l'aide d'un gradient méthanolique en présence d'acétate d'ammonium et d'acide formique. L'Apixaban (m/z 460,2 → 443,2) a été quantifié par spectrométrie de masse par rapport à un standard interne.

Résultats : La méthode développée est précise (CV intra-essai <3%, n=5 et inter-essai <8%, n=8 à 30, 100 et 300 mg/L) et elle montre une bonne exactitude (exactitude moyenne de 97%, n=8). Le rendement d'extraction est de 101±6% (n=11) pour une concentration de 300 mg/L d'Apixaban et la méthode est libre de suppression d'ion et ne montre pas de rémanence significative. La comparaison avec une méthode chromogénique (STA®-Liquid Anti-Xa) est bonne ($y = 0,9x + 9,8$, R²=1, n=7). Des études de stabilité montrent que l'Apixaban est stable dans le sérum pour au moins 7 jours (22°C, 4°C et -20°C) et que les échantillons peuvent être soumis à 3 cycles de congélation/décongélation sans perte significative.

Conclusion : Nous avons développé et validé une méthode de dosage de l'Apixaban par *LC-MS/MS* offrant une meilleure spécificité, une sensibilité accrue et une imprécision inférieure aux méthodes chromogéniques couramment utilisées.

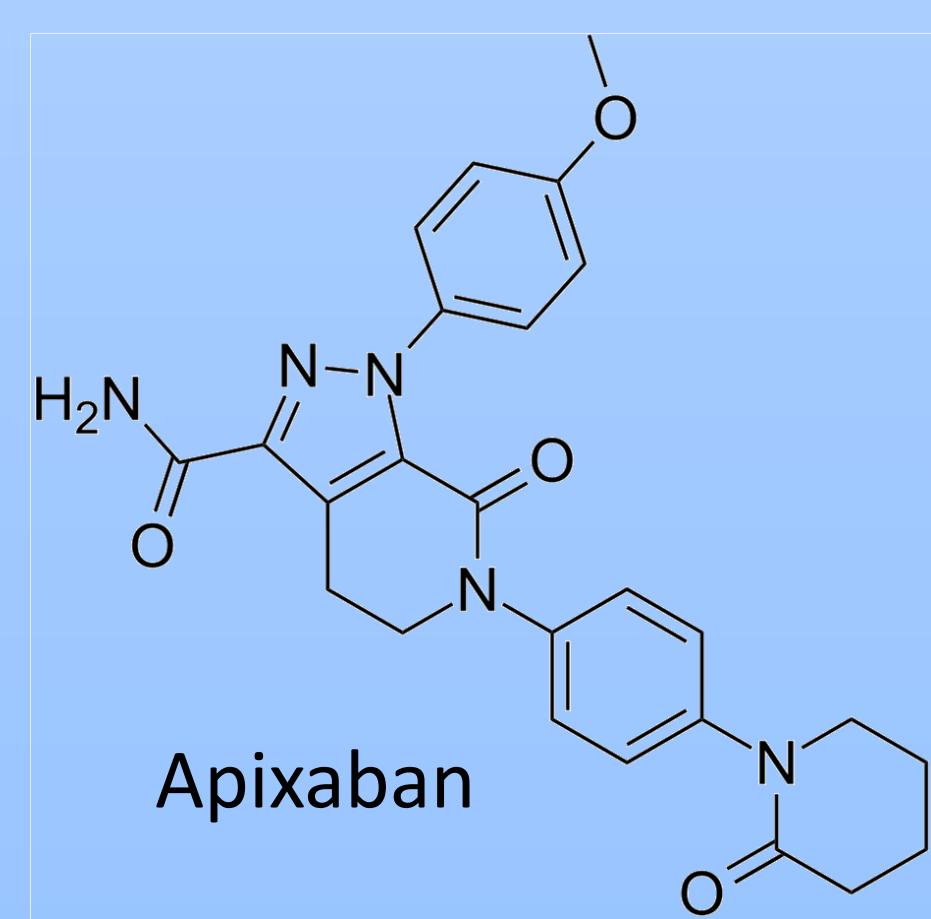
Introduction

L'apixaban (**Eliquis®** – *Bristol Myers Squibb*) est un anticoagulant oral direct de nouvelle génération et est spécifique du facteur X activé (Xa). L'apixaban inhibe l'activation des plaquettes en bloquant sélectivement et de façon réversible le site actif du facteur Xa sans avoir recours à un cofacteur pour son activité. Il inhibe la thrombine libre, la thrombine liée au thrombus et l'activité de la prothrombinase sans avoir d'effet direct sur l'agrégation plaquettaire. L'apixaban cause moins de saignement majeur et d'hémorragies intracrânienne que la warfarine (Coumadin®).



Cascade de coagulation

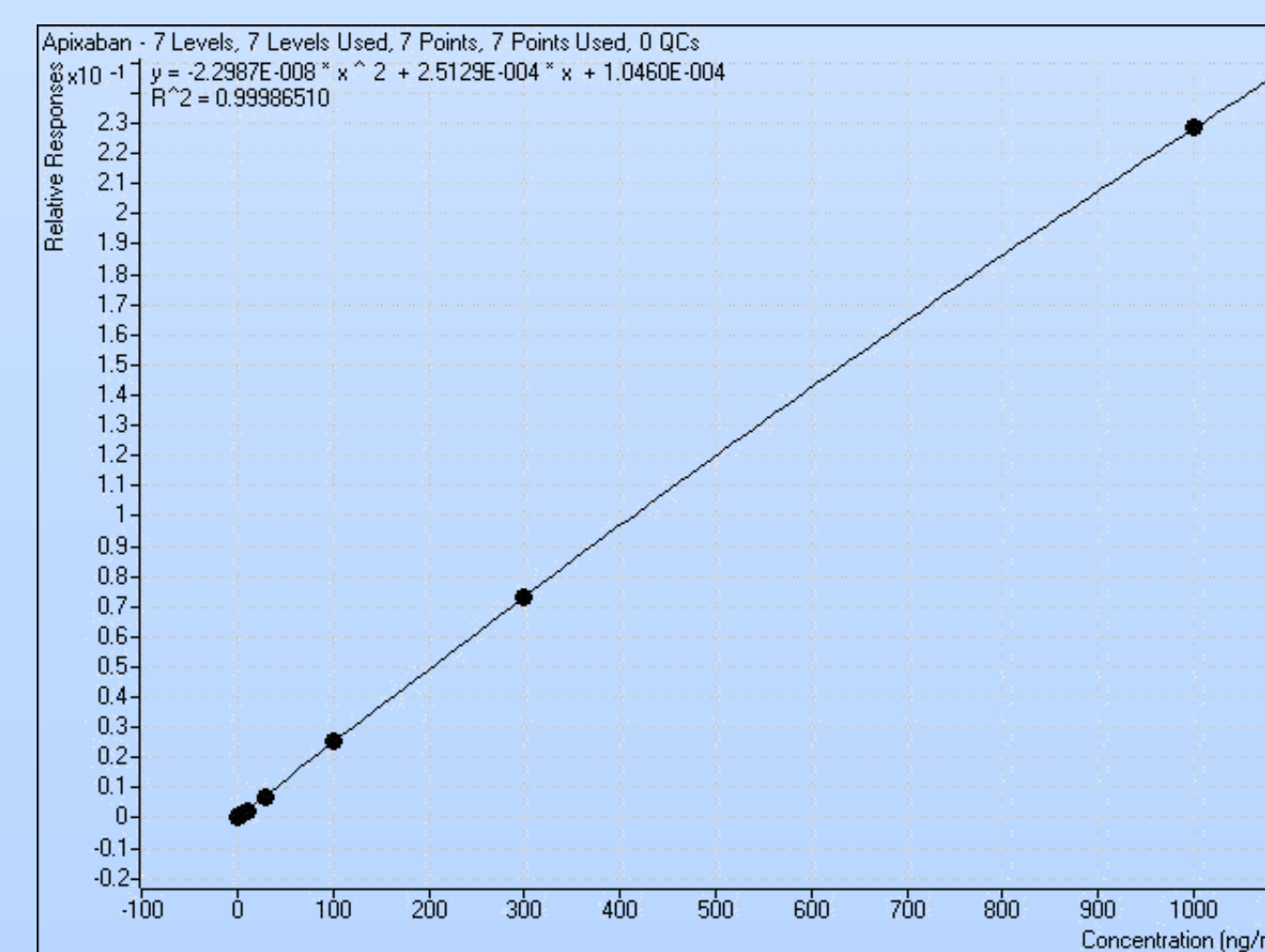
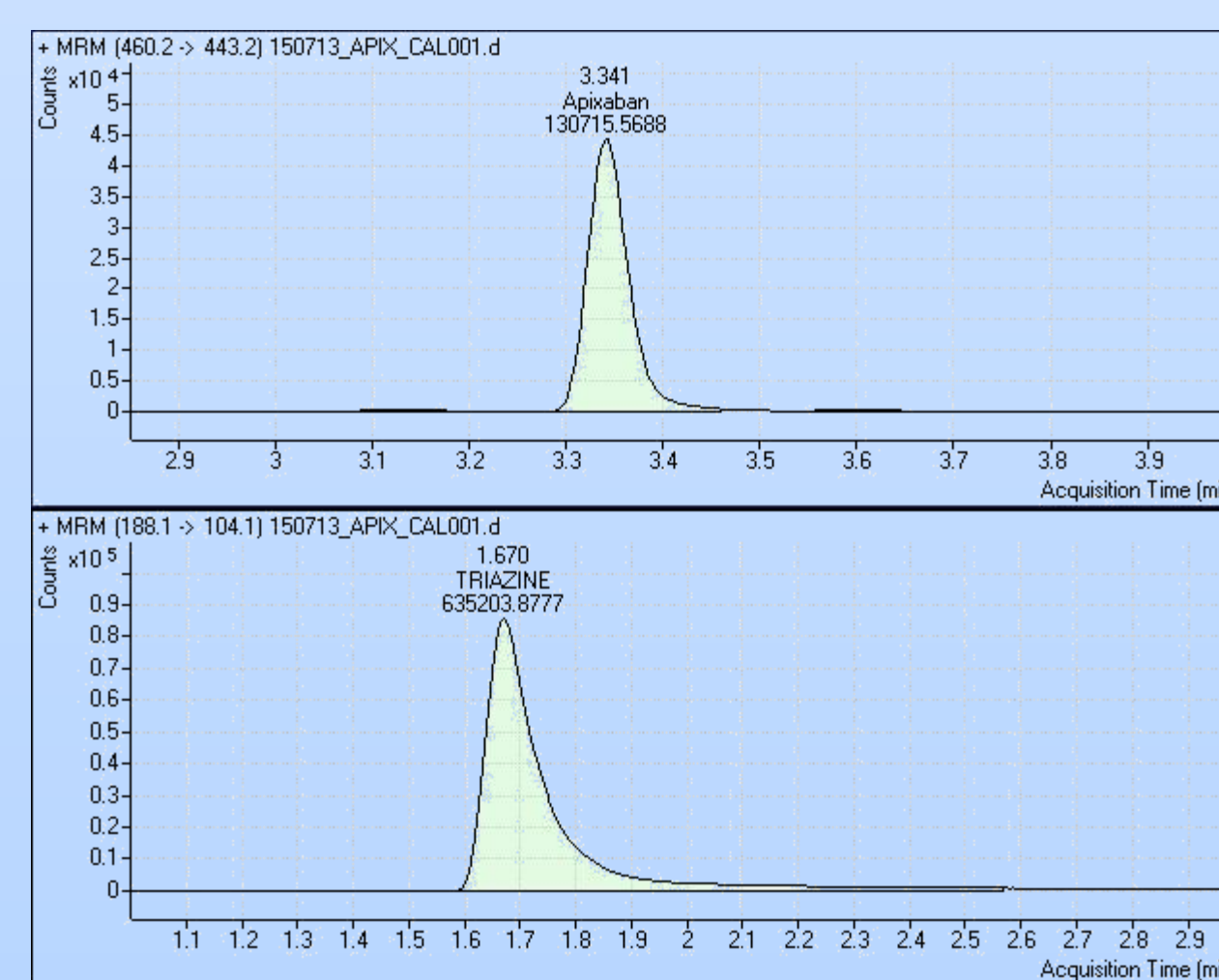
chez les sujets atteints de fibrillation auriculaire non valvulaire¹. La posologie est de 2,5 ou 5 mg BID pour des C_{max} de 62 ng/mL et 128 ng/mL respectivement chez des volontaires sains². L'apixaban ne requiert pas de suivi en routine. Par contre une évaluation quantitative de la présence ou de son effet anticoagulant peut être demandé dans un contexte d'urgence tel que lors de saignements abondants, lors de survenu d'événements thrombotiques et avant une chirurgie.



Il est indiqué pour le traitement de la thrombose veineuse profonde ou de l'embolie pulmonaire, la prévention de la thromboembolie veineuse chez les patients ayant subi une arthroplastie totale de la hanche ou du genou ainsi que pour la prévention d'accident vasculaire cérébral et d'embolie systémique

Méthodes

À l'aide de la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (*LC-MS/MS*), nous avons optimisé un protocole d'analyse d'apixaban et de son standard interne (Triazine) avec les paramètres suivants : **Échantillon** : précipitation des protéines à l'aide du méthanol 100%; **LC** : colonne C₁₈ de dimension 4,6x100 mm maintenue à 25 °C, phase A : acétate d'ammonium 10 mM + 0,4% acide formique, phase B : méthanol 100%; **MS/MS** : mode MRM (suivi de réaction multiple) d'ionisation positive d'Apixaban (460,2 – 443,2 m/z), Triazine (188,1-104,1 m/z).



Résultats

Suivant l'optimisation, nous avons évalué la méthode d'analyse de l'apixaban par *LC-MS/MS* et nous avons obtenus les résultats suivants :

Limite de blanc (LB - moyenne blancs + 1,65*E.T. blancs) = **0,61 µg/L**

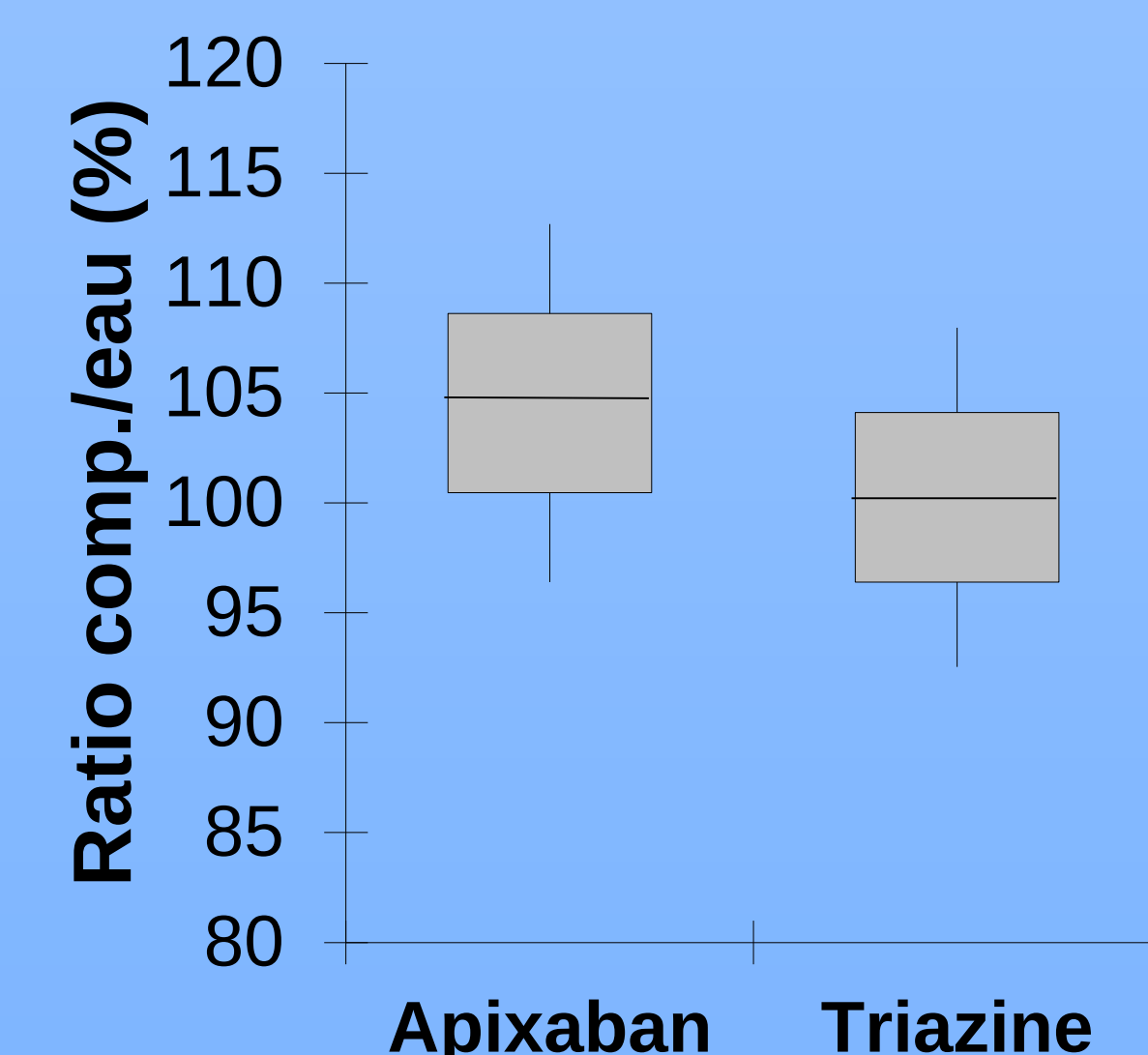
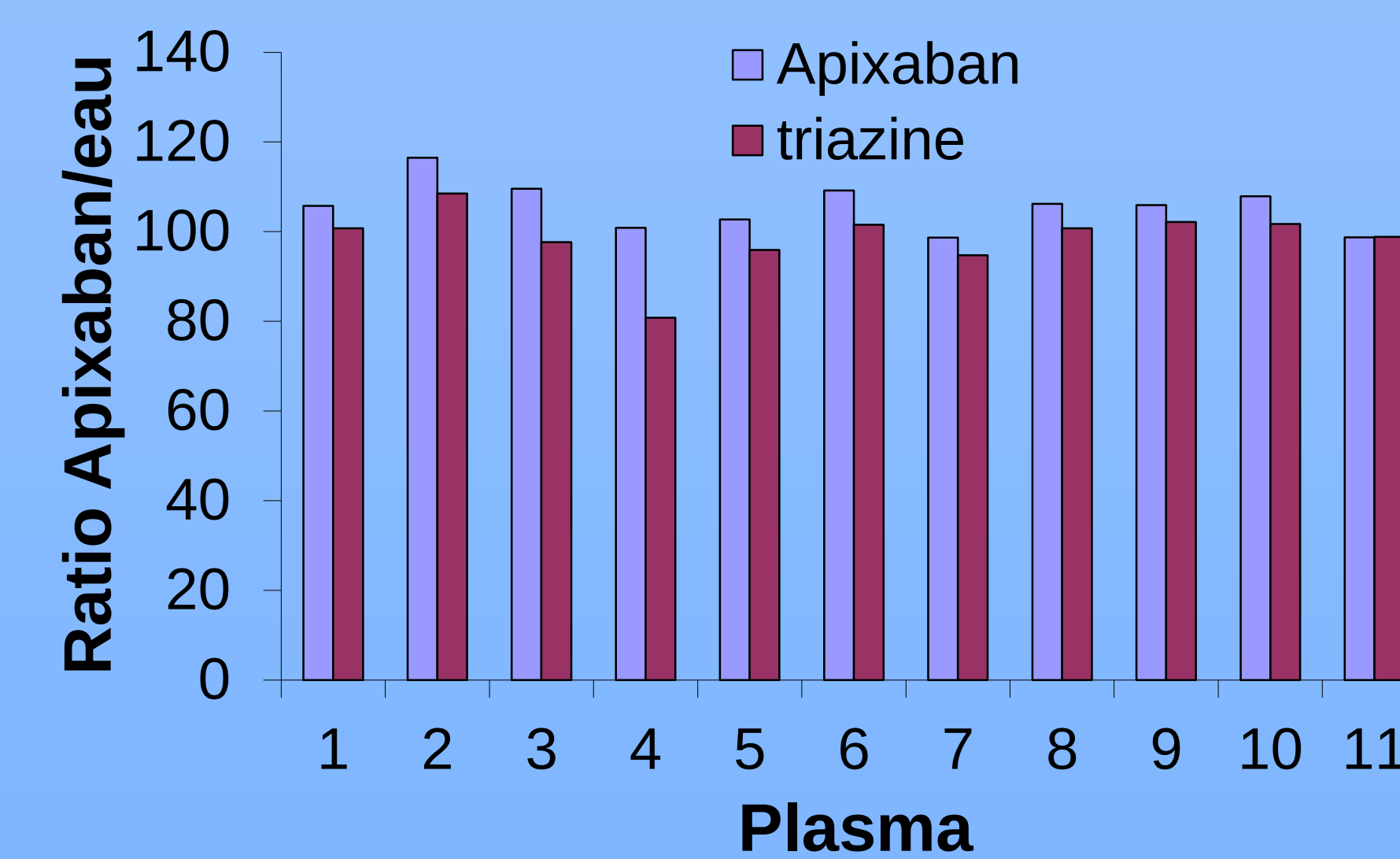
Limite de détection (LD - limite de blancs + (1,65/1-¼ F)*E.T.) = **0,76 µg/L**

Limite de quantification (LQ – c95 de 1 µg/L) = **0,79 µg/L**

Rendement d'extraction ou récupération (n=11) = **101,7 ± 6 %** pour un ajout dosé de 300 µg/L d'apixaban

Évaluation de méthode		Concentration utilisées (µg/L)		
		30	100	300
Intra-série (n=5)	Imprécision (CV %)	1,3	2,6	2
	Exactitude (%)	96	102	98
Inter-série (n=8)	Imprécision (CV %)	6	7,6	6,4
	Exactitude (%)	94	101	96

Un **test de suppression** d'ion entre différents sérums (n=11) et une solution aqueuse:

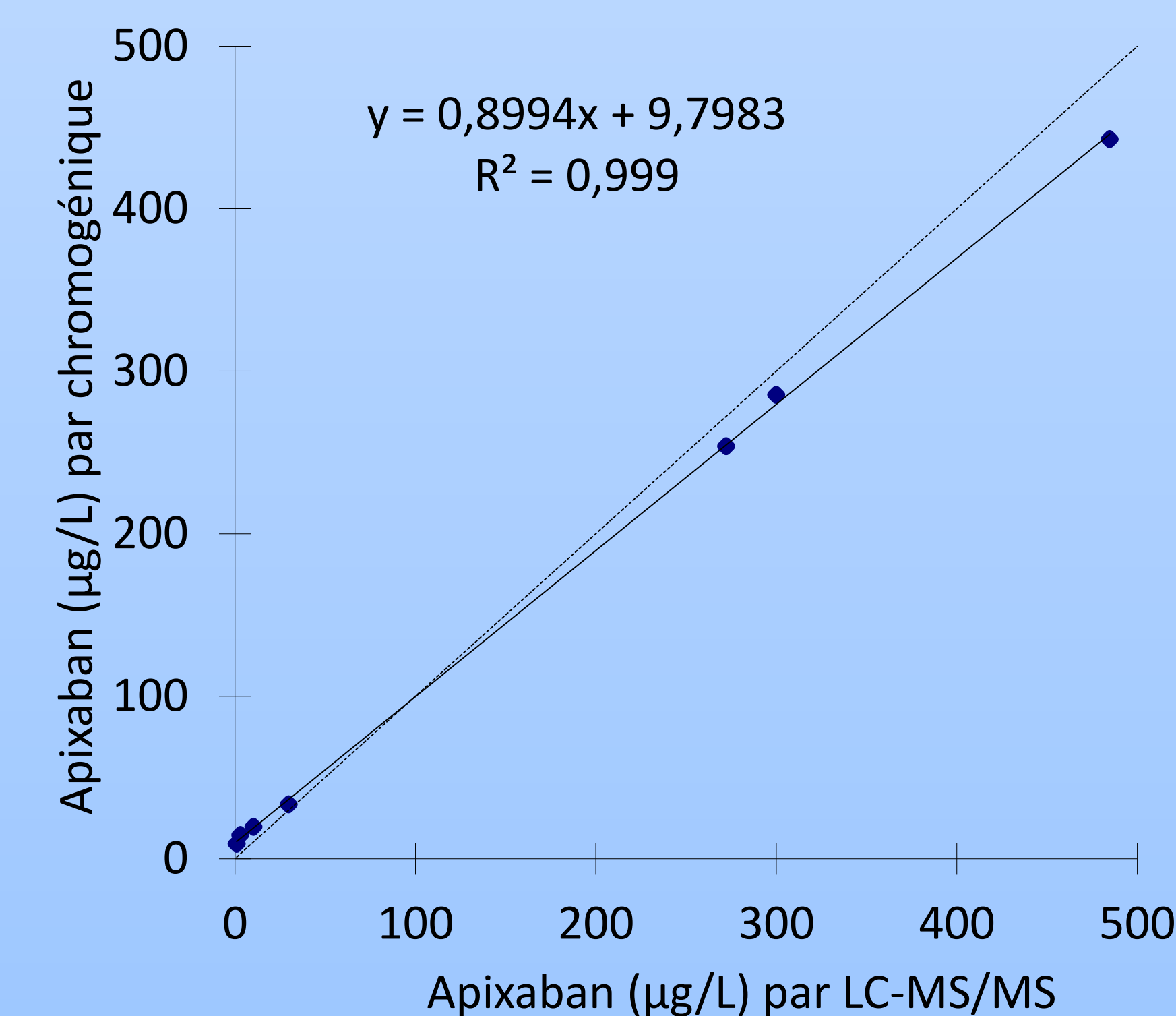


Résultats (suite)

Stabilité	Concentrations utilisées (µg/L)					
	30			300		
Conditions analysées (ratio J0)						
Jours	1	3	7	1	3	7
Température pièce	100,7	92,3	94,6	103,5	89,9	88,2
4 °C	99,7	96,3	98,8	102,7	90,8	93,1
-20 °C	101,7	98,5	97,1	nd	nd	nd
3 cycles gel/dégel	102,3			98,5		

Une analyse de **rémanence** pour des concentrations de 1 mg/L et 1 µg/L ($k=[L1-L3/H3]*100$)= **-0,005 ±0,005%** et les moyennes de L1 et L3 ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à l'aide d'un test de T.

Effet de matrice, une légère baisse de récupération pour des concentrations de 1, 3, 10, 30, 100, 300 et 1000 µg/L sont retrouvée pour des plasmas EDTA (**92,6 ± 9,1 %**) et d'héparine (**90,6 ± 15,4 %**) comparé au sérum.



Une analyse de **comparaison** (n=7) avec une méthode chromogénique (STA®-Liquid Anti-Xa), utilisée au CHUM, nous donne une bonne corrélation. La méthode chromogénique mesure l'activité résiduelle du facteur Xa et est inversement proportionnelle à la concentration d'apixaban.

Conclusion

La méthode de dosage de l'apixaban par *LC-MS/MS* est validée pour les types d'échantillons de sérum et plasma EDTA et héparine (dosage impossible par la méthode chromogénique). De plus, elle présente une imprécision inférieure à 8%, une bonne exactitude (97% en moyenne), une récupération très acceptable. Le dosage par *LC-MS/MS* est souhaitable car il offre une spécificité, une sensibilité accrue et une imprécision inférieure aux méthodes chromogéniques utilisées.

Références

- Heidbuchel H. *et al.* European Heart Rhythm association pratical guide on the use of new oral anticoagulans in patiens with non-valvular atrial fibrillation. **Europace**. 2013. 15, 625-51
- Frost C. *et al.* Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor Xa inhibitor, in healthy subjects. **Br J Clin Pharmacol**. 2013. 76(5):776-86.