

全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムによる ヒト血漿中のRemdesivirおよび代謝物の一斉分析

はじめに

Remdesivir (販売名:ベクルリー®) はエボラ出血熱の治療薬として Gilead Sciences 社 (U.S.) が開発した一本鎖 RNA ウイルスに対して抗ウイルス活性を示すプロドラッグであり、一部が生体内で活性型の GS-441524 へ代謝する事が知られています¹⁾。C218 では用手前処理法を用いた LC/MS/MS による頑健な高感度同時測定を紹介致しました。一方で、用手前処理法による血漿検体の前処理には一定の作業負荷を伴います。本報では、手技によるバラツキ・検体の取り違い・検体への暴露リスクを低減できる全自動前処理装置付き LC/MS/MS システムによる Remdesivir およびその代謝物の一斉分析法を紹介いたします (図 1)。

E. Imoto, D. Kawakami



図 1 全自動前処理装置付き LC/MS/MS システム (CLAM™+LC-MS/MS)

血漿中 Remdesivir の全自動前処理

LCMS™による血漿中低分子化合物の分析では、有機溶媒により除タンパク処理を行った後の上清を回収、分析に供することが多くあります。全自動前処理装置付き LC/MS/MS システムでは血漿を分離した採血管を直接システムにセットするだけで上述した前処理を全自動で行います (図 2)。LC/MS/MS による分析と次の試料の前処理を並行して実行するため、1 試料あたりの所要時間を大幅に短縮することが可能となります。この分析では血漿の前処理から LC/MS/MS による Remdesivir および代謝物の一斉分析まで 1 試料あたり 7 分のサイクルタイムで行いました。

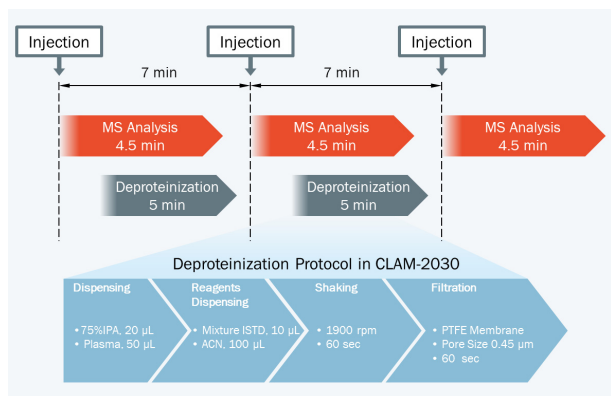


図 2 全自動前処理のワークフロー

分析条件および試料の前処理

測定対象化合物である Remdesivir (P/N:C8799*)、GS-441524 (P/N : C8847*) およびその安定同位体である[U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir (P/N : C8845*)、¹³C₅-GS-441524 (P/N : C8855*) は、いずれも島津製作所グループ会社 Alsachim 社から購入し、[U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir、¹³C₅-GS-441524 を内部標準物質として用いました。市販されている EDTA 2K 処理したヒト血漿に Remdesivir および GS-441524 を添加し、検量線および QC 用サンプルを作製しました。表 1 に示す LC および MS の分析条件、表 2 に示す MRM の取得パラメータを用いて測定を行いました。分析カラムは Shim-pack Scepter™ C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm, P/N : 227-31012-03) を使用しました。図 3 に MS クロマトグラムを示します。

Remdesivir は 100, 500, 1000, 2500, 5000 ng/mL、GS-441524 は 5, 25, 50, 250, 500 ng/mL を検量点とし、それぞれ n=5 で測定を行いました。メタノールを用いて[U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir (2.5 µg/mL)、¹³C₅-GS-441524 (0.25 µg/mL) の混合溶液を作製し、ISTD として用いました。血漿添加サンプルは、図 2 のフローに示す、75 %IPA 20 µL、血漿 50 µL、ISTD 10 µL、アセトニトリル 100 µL 添加・攪拌、PTFE メンブレンフィルターによるろ過まで全自動処理され、そのまま LC/MS/MS 分析に供されます。

* 島津ジーエルシーおよび Alsachim 製品番号

表 1 LC および MS の分析条件

<LC 分析条件>		<MS 分析条件>	
UHPLC	Nexera™ X2	LC-MS/MS システム	LCMS-8060
分析カラム	Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm)	インターフェイス	加熱 ESI
移動相	A: 0.05 % 酢酸-水 B: 0.05 % 酢酸-アセトニトリル 5 % (0 - 0.30 min) → 30 % (0.35 min) → 70 % (1.50 min) → 90 % (1.80 - 2.80 min) → 5 % (2.90 - 4.50 min)	MS 測定モード	MRM (+)
グラジエントプログラム (%B)		ヒートブロック温度	400 °C
流速	0.4 mL/min	DL 温度	200 °C
カラムオープン温度	40 °C	インターフェイス温度	300 °C
注入量	2.0 µL (水 20 µL 共注入)	ネブライザーガス流量	3 L/min
洗浄溶液 (外部洗浄のみ)	MeOH : IPA = 1 : 1 (v/v)	ドライイングガス流量	10 L/min
		ヒーティングガス流量	10 L/min

表 2 Remdesivir および GS-441524 の MRM トランジション

化合物名 [組成式]	イオン	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
Remdesivir [C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P]	定量イオン	603.05	272.10
	定性イオン	603.05	229.00
¹³ C ₆ -Remdesivir [C ₂₁ ¹³ C ₆ H ₃₅ N ₆ O ₈ P]	定量イオン	609.05	278.20
	定性イオン	609.05	229.15
GS-441524 [C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₄]	定量イオン	291.90	163.05
	定性イオン	291.90	173.05
¹³ C ₅ -GS-441524 [C ₇ ¹³ C ₅ H ₁₃ N ₅ O ₄]	定量イオン	296.90	164.10
	定性イオン	296.90	174.10

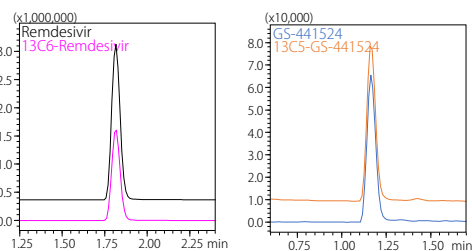


図3 Remdesivir、[U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir (左)、および GS-441524、[¹³C₅]-GS-441524 (右) のMSクロマトグラム

■ 検量線の作成

全自動前処理装置付き LC/MS/MS を用いて検量線を作製した結果を表 3 に示します。設定した定量範囲において良好な直線性を得ました。真度 (正確さ) および精度 (再現性) を評価した結果、定量下限を含む全濃度範囲において、Remdesivir の精度は %RSD 0.5% - 2.9% であり、GS-441524 の精度は %RSD 2.4% - 4.9% でした。また、Remdesivir の正確さは 87.8% - 108%、GS-441524 の正確さは 94.5% - 105% であり、Remdesivir、GS-441524 とともに 100 ± 15% 以内となりました。

表 3 全自動 LC/MS/MS を用いた血漿中 Remdesivir、GS-441524 分析の直線性、真度および精度

Compound	Remdesivir				GS-441524				
	ID	Spiked Conc. (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Spiked Conc. (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Blank	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Level 1		100	87.8	0.5	88	5	4.72	2.4	95
Level 2		500	539	0.8	108	25	26.2	4.8	105
Level 3		1000	1052	1.2	105	50	50.8	4.4	102
Level 4		2500	2536	2.9	101	125	125	4.9	100
Level 5		5000	4885	2.5	98	250	248	4.1	99

Calibration Curve	Remdesivir_Pos		GS-441524_Pos	
	Conc. Ratio (ng/mL)	Area Ratio	Conc. Ratio (ng/mL)	Area Ratio
	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.2	0.5	0.1	0.5
	0.4	1.0	0.2	1.0
	1.0	3.0	0.5	3.0
	2.0	6.0	1.0	6.0

■ QC サンプルを用いた分析系の妥当性評価

血漿中濃度を Remdesivir: 100, 750, 1000, 3750 ng/mL、GS-441524: 5, 37.5, 50, 187.5 ng/mL にそれぞれ調製した試料を QC サンプルとし、併行精度 (表 4) および 3 日間の日差再現性 (表 5) を評価しました。併行精度の結果より、Remdesivir の精度は %RSD 0.9% - 2.0%、GS-441524 の精度は %RSD 2.3% - 3.6% でした。また、Remdesivir の正確さは 90.5% - 106%、GS-441524 の正確さは 88.5% - 91.6% と 100 ± 15% 以内となりました。日差再現性を評価した結果、Remdesivir の精度は %RSD 0.1% - 7.2%、GS-441524 の精度は %RSD 0.4% - 7.8% でした。また、Remdesivir の正確さは 82.2% - 107%、GS-441524 の正確さは 86.7% - 92.8% であり、LLOQ において 100 ± 20% 以内、その他の濃度域で 100 ± 15% 以内となりました。

表 4 血漿中 Remdesivir、GS-441524 分析の併行精度

Compounds	QC Sample	Spiked Conc. (ng/mL)	Intra-Assay (n=6)		
			Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Remdesivir	LLOQ	100	90.5	2.0	91
	Low	750	797	1.7	106
	Medium	1000	1045	0.9	105
	High	3750	3393	2.0	91
GS-441524	LLOQ	5	4.51	3.1	90
	Low	37.5	33.2	2.5	89
	Medium	50	45.2	2.3	90
	High	187.5	171.7	3.6	92

表 5 血漿中 Remdesivir、GS-441524 分析の日差再現性

Compounds	QC Sample	Spiked Conc. (ng/mL)	Day 1st (n=3)			Day 2nd (n=3)			Day 3rd (n=3)		
			Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Remdesivir	LLOQ	100	91.6	1.1	92	82.2	4.9	82	85.1	1.9	85
	Low	750	788	1.8	105	734	1.4	98	770	0.1	103
	Medium	1000	1037	0.7	104	999	0.7	100	1018	0.6	102
	High	3750	3765	1.3	100	3441	1.3	92	3994	7.2	107
GS-441524	LLOQ	5	4.54	4.3	91	4.54	7.7	91	4.50	7.8	90
	Low	37.5	33.1	1.8	88	34.1	2.9	91	32.5	3.2	87
	Medium	50	44.8	3.2	90	44.5	2.7	89	43.8	0.4	88
	High	187.5	174.0	3.7	93	172.6	3.0	92	167.5	0.7	89

■ まとめ

Remdesivir とその代謝物である GS-441524 を血漿に添加し、全自動前処理装置付き LC/MS/MS による分析系を構築しました。QC サンプルを用いて併行精度および日差再現性を評価したところ、良好な正確さおよび再現性を得ました。

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

<参考文献>

- Richard T et al., "Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19", ACS Cent. Sci.

Shim-pack Scepter, CLAM, 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。
ベクルリーは、Gilead Sciences Ireland UC の商標です。
その他、本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していません。

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6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。