

HPLC システムによるヒト血漿中 ファビピラビルの定量分析

はじめに

2020年現在、新型コロナウイルス（COVID-19）感染拡大防止のため、治療薬やワクチンの開発が世界的急務となっています。治療薬候補の一つであるファビピラビル（商品名：アビガン®）は、新型または再興型インフルエンザウイルス感染症に対して研究・創薬された抗インフルエンザウイルス薬として知られています^{1),2)}。ファビピラビルは主に水酸化体として尿中に排泄される腎排泄性薬剤であり、1日1回の投与では血中濃度を保つことが難しい³⁾ため、ファビピラビルの血中濃度を正しく測定することが必要です。

本報では、質量分析計を用いず HPLC にて、感度良く血漿中ファビピラビルの定量分析可能な手法をご紹介します。

R. Suzuki, Y. Osaka

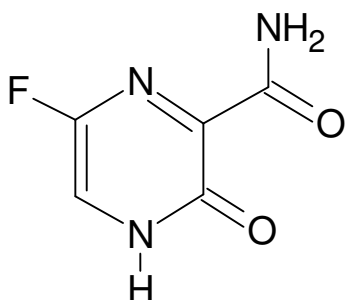


図1 ファビピラビルの構造式

血漿の前処理

HPLC による血漿中低分子化合物の分析では、カラム詰まりや、カラムの劣化を低減させるために、血漿中のタンパク質を除去する前処理を行うことが多くあります。今回は、25 μ L の血漿に 100 μ L のメタノールを添加して攪拌、遠心後の上清を回収することによる除タンパク質処理を行いました（図2）。得られた上清を移動相 A で 15 倍希釈して LC 分析に供しました。

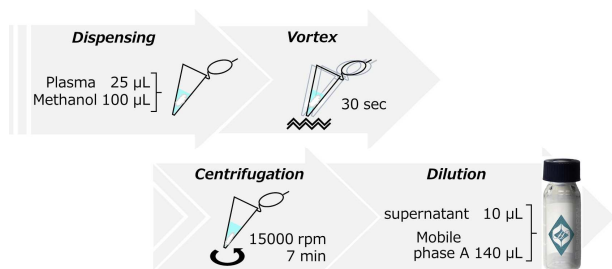


図2 除タンパク質前処理フロー

分析条件

測定対象化合物であるファビピラビル^{*1}は、Alsachim 社から購入しました。市販されている正常ヒト血漿 EDTA-2Na にファビピラビルを添加し、検量線および QC 用サンプルを製しました。表1に示す LC の分析条件を用いて測定を行いました。グラジエントのタイムプログラムは表2に示します。分析カラムは Shim-pack Scepter™ C18-120、ガードカラムは Shim-pack Scepter C18-120 (G) を使用しました。図3にクロマトグラムを示します。

ファビピラビルは 1、10、25、50、100 μ g/mL を検量点とし、n=6 で測定を行いました。

*1 P/N C8720（島津ジーエルシーおよび Alsachim 製品番号）

表1 分析条件

System	: Nexera™ XR
Column	: Shim-pack Scepter C18-120 *2 (150 mm×4.6 mm I.D., 5.0 μ m)
Guard Column	: Shim-pack Scepter C18-120 (G) *3 (10 mm×4.0 mm I.D., 5.0 μ m)
Mobile Phase	: A) 10 mmol/L (sodium) phosphate buffer pH 6.9 B) Methanol
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 30 °C
Injection Volume	: 1.0 μ L
Vial	: TORAST™-H Glass Vial（島津ジーエルシー社製）*4
Detection	: Fluorescence detector (RF-20A) Ex. 360 nm ¹⁾ , Em. 433 nm

*2 : P/N 227-31020-05、*3 : P/N 227-31126-01、*4 : P/N 370-04301-01

表2 タイムプログラム

Time (min)	A.conc	B.conc
0	100	0
2.5	100	0
7.5	30	70
9.5	30	70
9.51	100	0

検量線の作成

設定した定量範囲において、良好な直線性 ($R^2 = 0.999$, Weighting; (1/C)) 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、ファビピラビルの精度は %RSD 0.21%–0.31% でした。また、ファビピラビルの正確さは 92.1%–106% であり、100 \pm 8% 以内となりました。

QC サンプルを用いた妥当性評価

ファビピラビルの血漿中濃度を 2、45、90 μ g/mL に調製した試料を QC サンプルとし、併行精度を評価しました（表4）。併行精度の結果より、ファビピラビルの精度は %RSD 0.18%–0.35% でした。また、ファビピラビルの正確さは 96.5%–100% と 100 \pm 4% 以内となりました。

■まとめ

ファビピラビルを血漿に添加し、HPLCによるファビピラビルの定量分析系を構築しました。

検出器に分光蛍光検出器を用いることで感度良く定量することが可能となりました。

QCサンプルを用いた併行精度評価では、良好な正確さと再現性を得ました。

<参考文献>

- 1) Brian B. Gowen et. al., "Alterations in favipiravir (T-705) pharmacokinetics and biodistribution in a hamster model of viral hemorrhagic fever", *Antiviral Res.*, 2015.
- 2) E. Takashita et. al., "Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir", *Antiviral Res.*, 2016.
- 3) K. Shiraki et. al., "Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections", *Pharmacol. Ther.*, 2020.

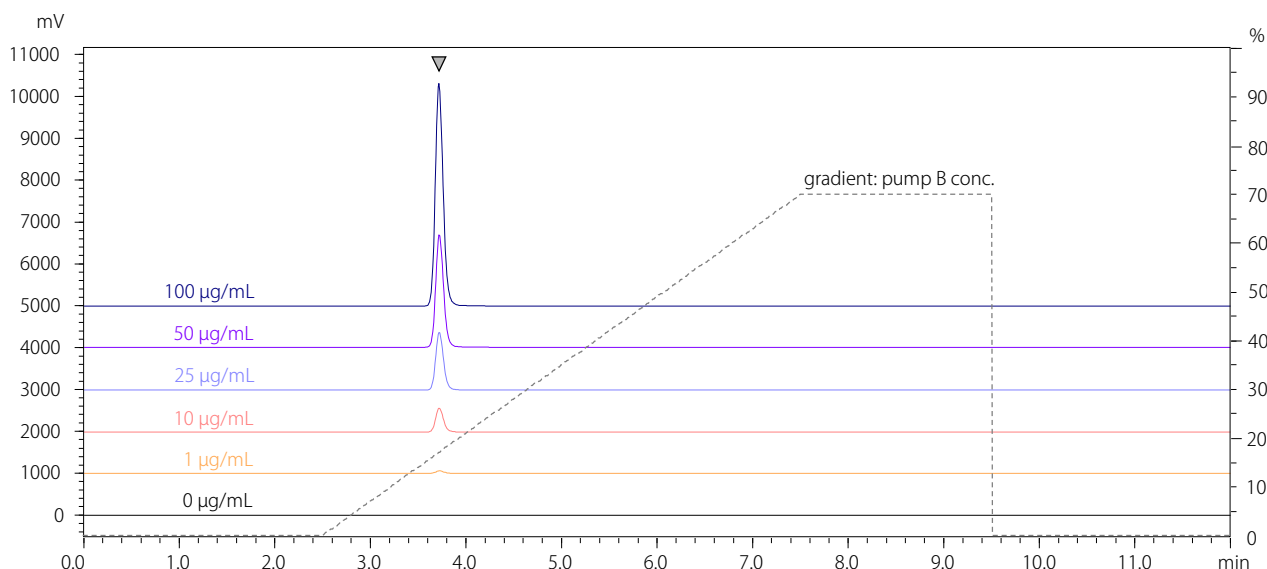


図3 血漿中ファビピラビルのクロマトグラム

表3 血漿中ファビピラビルのLC分析における真度および精度

ID	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n=6)		
		Measured Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Blank	---	---	—	---
Level 1	1	0.921	0.25	92.1
Level 2	10	10.6	0.31	106
Level 3	25	25.8	0.26	103
Level 4	50	49.8	0.21	100
Level 5	100	98.8	0.24	98.8

表4 血漿中ファビピラビル分析の併行精度

Compound	QC Sample	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n=6)		
			Average Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Favipiravir	Low	2	1.93	0.18	96.5
	Medium	45	45.1	0.20	100
	High	90	88.7	0.35	98.5

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。

Shim-pack Scepter および Nexera 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。TORAST は、株式会社島津ジーエルシーの商標です。アビガンは、富士フイルム富山化学株式会社の登録商標です。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7月
A改訂版発行：2020年8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。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ Nexera™シリーズ
超高速液体クロマトグラフ

関連分野

▶ 低分子医薬品

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ