

ヒト血漿中 Favipiravir の測定

はじめに

Favipiravir (販売名: アビガン®) は抗インフルエンザ薬として富士フィルム 富山化学株式会社が開発した RNA ポリメラーゼ阻害剤の1種です。本報では、選択性に優れた分析手法である LC/MS/MS (図 1) を用いて、血漿中に添加した Favipiravir の分析系を構築したので、研究成果をご紹介します。
E. Imoto, D. Kawakami



図1 LCMS™-8060 の外観図

分析条件および試料の前処理

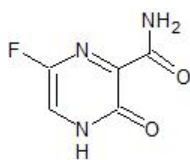
測定対象化合物である Favipiravir (PN: C8720*1)、およびその安定同位体である [¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir (PN: C8853*1) は、いずれも島津製作所グループ会社 Alsachim 社から購入し、[¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir を内部標準物質として用いました。Favipiravir および [¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir の構造式を図 2 に示します。市販されている EDTA 2K 処理したヒト血漿に Favipiravir を添加し、検量線の作成を行いました。測定は表 1 に示す LC および MS の分析条件、表 2 に示す MRM トランジションを用いました。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。

Favipiravir を血漿中 1、2、5、10、20、50、100 μg/mL に調製した各サンプルを検量点として、それぞれ n=5 で検量線を作成致しました。アセトニトリルを用いて [¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir (20 μg/mL) の溶液を作製し、ISTD として用いました。

前処理法のフローを図 4 に示します。75 %IPA 20 μL、血漿 50 μL、ISTD 10 μL、アセトニトリル 200 μL を添加し、十分に攪拌を行った後、遠心分離で得られた上清を LC バイアルに移して測定を行いました。

*1 島津ジーエルシーおよび Alsachim 製品番号

Favipiravir
Formula: C₅H₄FN₂O₂



[¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir
Formula: C₄¹³CH₄FN₂¹³NO₂

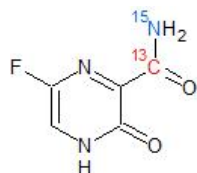


図2 Favipiravir および [¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir の構造式

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	MS 測定モード	MRM (+)
グラジエントプログラム (%B)	5% (0 - 0.30 min) → 30% (0.35 min) → 90% (1.50 - 2.50 min) → 5% (2.60 - 4.00 min)	ヒートブロック温度	400 °C
流速	0.4 mL/min	DL 温度	250 °C
カラムオープン温度	40 °C	インターフェイス温度	300 °C
注入力	1.0 μL	ネプライザーガス流量	3 L/min
洗浄溶液 (外部洗浄のみ)	MeOH	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 Favipiravir および [¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir の MRM トランジション

化合物名	イオン	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
Favipiravir	定量イオン	157.70	85.10
	定性イオン	157.70	113.20
[¹³ C, ¹⁵ N]-Favipiravir	定量イオン	159.70	85.10
	定性イオン	159.70	113.20

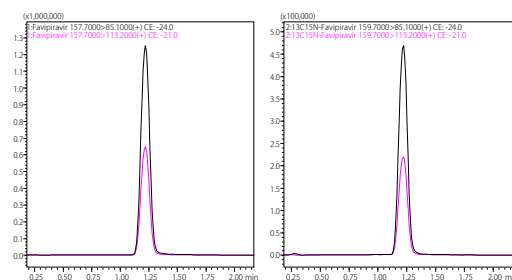


図3 Favipiravir (左)、および [¹³C, ¹⁵N]-Favipiravir (右) の MS クロマトグラム

① 試料の添加 ② 攪拌 ③ 遠心分離 ④ バイアルへ分注

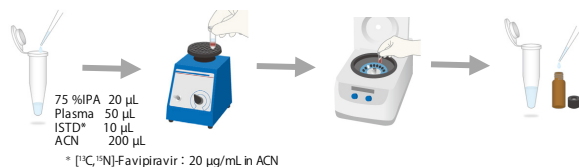


図4 血漿中 Favipiravir の前処理フロー

■ 検量線の作成

血漿に添加したサンプルを用いて検量線を作成した結果を表3に示します。設定した濃度範囲において $R^2=0.9998$ と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、精度は%RSD 1.7%–6.5%でした。また、正確さは96%–103%と100±15%以内となりました。

表3 血漿中 Favipiravir 分析の直線性、真度および精度

Favipiravir					Calibration Curve
ID	Spiked Conc. (µg/mL)	Average Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	
Blank	---	---	---	---	
Level 1	1	0.96	2.3	96	
Level 2	2	2.00	6.5	100	
Level 3	5	4.98	2.3	100	
Level 4	10	10.3	1.9	103	
Level 5	20	20.5	1.7	103	
Level 6	50	49.8	1.9	100	
Level 7	100	99.5	1.9	100	

■ QC サンプルを用いた分析系の妥当性評価

血漿中濃度を 3、50、90 µg/mL に調製した試料を 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、Favipiravir の精度は%RSD 1.7%–4.5%でした。また、正確さは98%–104%と100±15%以内となりました。日差再現性の結果より、Favipiravir の精度は%RSD 0.1%–5.2%でした。また、正確さは89%–102%と3日間のそれぞれのQCサンプル測定において100±15%以内を達成しました。

表4 血漿中 Favipiravir 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	3	3.12	2.6	104
	Medium	50	49.2	4.5	98
	High	90	89.8	1.7	100

表5 血漿中 Favipiravir 分析の日差再現性

Compound	QC Sample	Spiked Conc. (µg/mL)	Day 1st (n=3)			Day 2nd (n=3)			Day 3rd (n=3)		
			Average Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Favipiravir	Low	3	3.05	0.1	102	2.89	4.6	96	2.67	5.2	89
	Medium	50	49.0	1.1	98	47.5	1.0	95	46.4	2.2	93
	High	90	90.2	0.4	100	88.3	4.2	98	87.6	2.4	97

■ 分析系の安定性試験

今回構築した分析系の堅牢性および繰り返し再現性を評価するために、血漿中濃度 10 µg/mL に調製した試料を用いて、100回連続測定を実施しました。各注入時に得られた面積値を1回目の注入時に得られた面積値で正規化し、プロットした結果を図5に示します。100回連続測定の結果、Favipiravir の%RSDは2.9%、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Favipiravir の%RSDは3.2%であり、高い注入再現性を実現することができました。以上の結果から、本分析系は高感度な分析を長時間維持し、高い堅牢性であることが示されました。

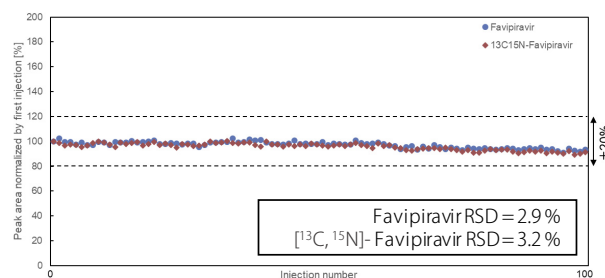


図5 Favipiravir、および $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Favipiravir の100回連続測定結果1回目の注入時に得られた面積値で正規化し、各注入結果をプロット

■ まとめ

Favipiravir を血漿に添加したサンプルを用いて LC/MS/MS の分析系を構築しました。検量線を作成したところ良好な直線性を得ることができ、また、分析系の堅牢性を評価するために100回の連続測定を実施した結果、高感度な分析を長時間維持した高い堅牢性であることが示されました。

本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。

LCMS、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。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」、「®」を明記していない場合があります。