

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 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。C229 では用手前処理法を用いた LC/MS/MS による頑健な高感度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 Favipiravir の分析法を紹介致します (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 Favipiravir 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、上清を回収し、分析に供する手法が一般的です。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 Favipiravir の測定まで 1 試料あたり 6.5 分のサイクルタイムで行いました。

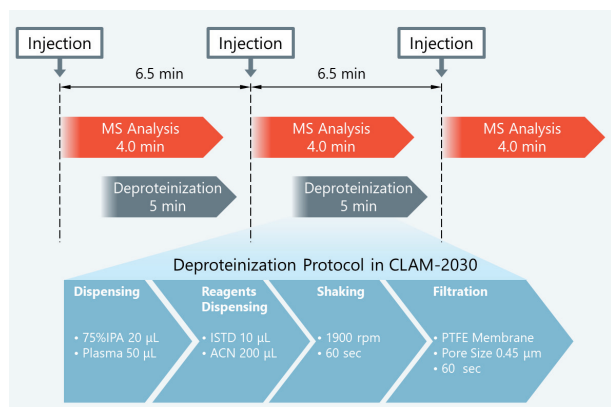


図 2 全自動前処理のワークフロー

分析条件および試料の前処理

測定対象化合物である 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。市販されている EDTA 2K 処理したヒト血漿に Favipiravir を添加し、検量線および QC 用サンプルを作製しました。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 に各化合物の MS クロマトグラムおよび構造式を示します。

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。Favipiravir を添加した血漿サンプルの前処理方法を図 2 に示します。ここでは血漿 50 µL に対して 75%IPA 20 µL、ISTD 10 µL、アセトニトリル 200 µL を添加し、攪拌した後、PTFE メンブレンフィルターによるろ過まで全自動処理したサンプルをそのまま LC/MS/MS 分析に供しました。

*1 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 x 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

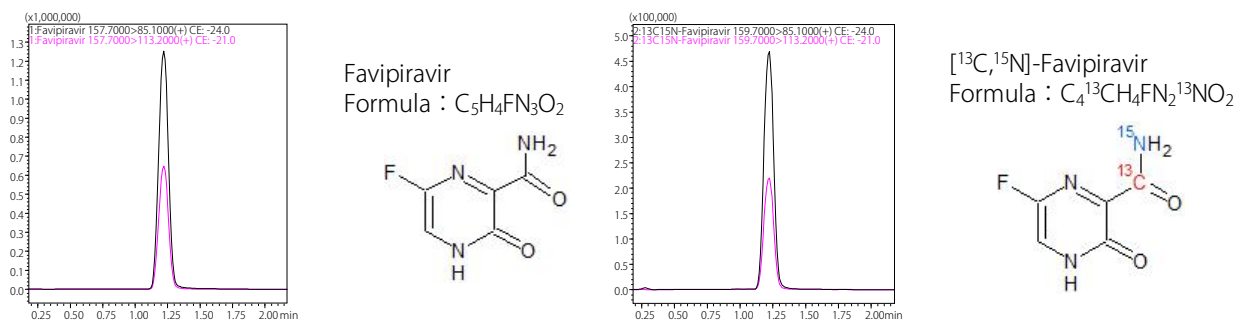


図3 Favipiravir (左)、¹³C,¹⁵N-Favipiravir (右)のMSクロマトグラムおよび構造式

■ 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成した結果を表 3 に示します。設定した定量範囲において R²=0.9987 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、定量下限を含む全濃度範囲において、精度は %RSD 1.0 %–5.6 % でした。また、正確さは 95 %–105 % と 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 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	1.04	4.3	104	
Level 2	2	2.00	1.9	100	
Level 3	5	4.77	2.4	95	
Level 4	10	9.87	1.9	99	
Level 5	20	19.7	3.5	99	
Level 6	50	52.7	1.0	105	
Level 7	100	97.9	5.6	98	

■ 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 1.6 %–3.0 % でした。また、正確さは 94 %–97 % 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 0.2 %–7.6 % でした。また、正確さは 88 %–99 % 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	2.90	2.2	97
	Medium	50	48.3	3.0	97
	High	90	84.8	1.6	94

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	2.95	0.2	98	2.94	7.6	98	2.64	3.7	88
	Medium	50	49.3	1.0	99	47.1	2.8	94	46.0	3.6	92
	High	90	85.8	1.3	95	81.3	1.0	90	79.4	1.7	88

■ まとめ

Favipiravir 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。検量線を作成したところ、良好な直線性を得ました。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。

CLAM、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。

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。