

使用带全自动预处理装置的 LC/MS/MS 系统同时分析人血浆中的瑞德西韦及其代谢产物

■ 前言

瑞德西韦 (商品名称: Veklury[®]) 是 Gilead Sciences 公司 (U.S.) 开发的一种治疗埃博拉出血热的前体药物, 该药物对单链 RNA 病毒具有抗病毒活性, 部分药物会在体内代谢为活性型的 GS-4415241)。C218 介绍了通过使用人工预处理方法的 LC/MS/MS 完成稳定、高灵敏度同时检测的案例。然而, 采用人工预处理方法进行血浆样本的预处理会产生一定的作业负荷。本文为您介绍使用带全自动预处理装置的 LC/MS/MS 系统同时分析人血浆中的瑞德西韦及其代谢产物的方法, 该方法可以避免人工操作造成的偏差和样本拿取错误, 减少样本的暴露风险 (图 1)。

E. Imoto, D. Kawakami



图 1 带全自动预处理装置的 LC/MS/MS 系统 (CLAM™+LC-MS/MS)

■ 血浆中瑞德西韦的全自动预处理

测定 LCMS™ 分析血浆中的低分子化合物时, 通常会收集用有机溶剂脱蛋白后的上清液, 并将其用于分析。在带全自动预处理装置的 LC/MS/MS 系统中, 直接将分离了血浆的采血管放置在系统中, 就可以全自动进行上述预处理 (图 2)。LC/MS/MS 分析的同时进行下一样品的前处理, 因此可大幅缩短分析单个样品所需的时间。

采用本分析方法, 从血浆的预处理至使用 LC/MS/MS 进行瑞德西韦和代谢产物的同时分析, 每个样品的周期时间为 7 分钟。

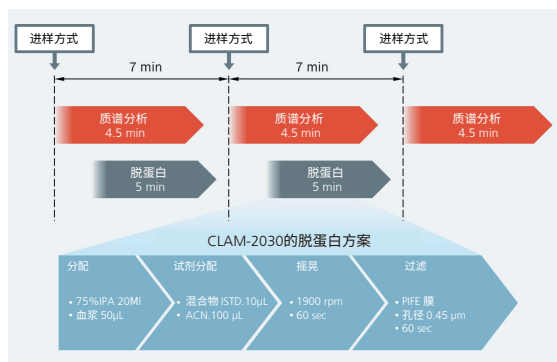


图 2 全自动预处理的工作流程

■ 分析条件及样品的预处理

检测对象化合物瑞德西韦 (P/N: C8799*)、GS-441524 (P/N: C8847*) 及其稳定同位素 [U-Ring-6C6]- 瑞德西韦 (P/N: C8845*)、[5C5]-GS-441524 (P/N: C8855*) 均从岛津制作所的集团下属企业 Alsachim 公司购买, [U-Ring-6C6]- 瑞德西韦、[5C5]-GS-441524 作为内标物质使用。在市售的经过 EDTA 2K 处理的人血浆中添加瑞德西韦和 GS-441524, 配制标准曲线和 QC 用样品。使用表 1 所示的 LC 及 MS 的分析条件、表 2 所示的 MRM 参数进行了检测。分析色谱柱使用了 Shim-pack Scepter™ C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm、P/N: 227-31012-03)。MS 色谱图如图 3 所示。

瑞德西韦将 100, 500, 1000, 2500, 5000ng/mL 作为校准点, GS-441524 将 5, 25, 50, 250, 500ng/mL 作为校准点, 每个校准点分别测定 5 次。使用甲醇制备 [U-Ring-13C6]- 瑞德西韦 (2.5 µg/mL)、[13C5]-GS-441524 (0.25 µg/mL) 的混合溶液, 作为 ISTD 使用。如图 2 的流程所示, 添加血浆的样品 75%IPA 20 µL、血浆 50 µL、ISTD 10 µL、乙腈 100 µL 的添加和搅拌、PTFE 膜过滤器过滤等过程全部进行自动处理, 直接用于 LC/MS/MS 分析。

* 岛津 GLC 及 Alsachim 产品编号

表 1 LC 及 MS 的分析条件

< LC 分析条件 >		< MS 分析条件 >	
UHPLC	Nexera™ X2 Shim-pack Scepter C18-120	LC-MS/MS 系统	LCMS-8060
分析柱	(50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm)	接口	ESI
流动相	A: 0.05% 甲酸-水 B: 0.05% 甲酸-乙腈 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 检测模式	MRM
梯度程序 (%B)		加热块温度	400 °C
流速	0.4 mL/min	DL 温度	200 °C
柱温箱温度	40 °C	接口温度	300 °C
进样量	2.0 µL (同时注入水 20 µL)	雾化器气流量	3 L/min
清洗液 (仅外部清洗)	MeOH: IPA = 1: 1 (v/v)	干燥气流量	10 L/min
		加热气流量	10 L/min

表 2 瑞德西韦及 GS-441524 的 MRM

化合物名称 [分子式]	离子	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)
Remdesivir [C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P]	定量离子	603.05	272.10
	定性离子	603.05	229.00
[¹³ C ₆]-Remdesivir [C ₂₁ ¹³ C ₆ H ₃₅ N ₆ O ₈ P]	定量离子	609.05	278.20
	定性离子	609.05	229.15
GS-441524 [C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₄]	定量离子	291.90	163.05
	定性离子	291.90	173.05
[¹³ C ₅]-GS-441524 [C ₇ ¹³ C ₅ H ₁₃ N ₅ O ₄]	定量离子	296.90	164.10
	定性离子	296.90	174.10

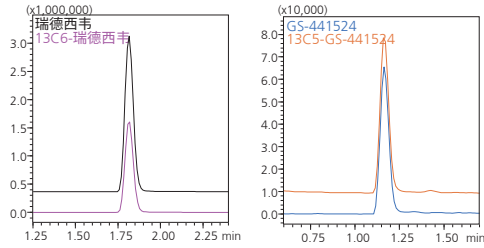


图 3 瑞德西韦、[U-Ring-¹³C₆]-瑞德西韦 (左) 及GS-441524、[¹³C₅]-GS-441524 (右) 的MS色谱图

标准曲线的绘制

使用带全自动预处理装置的 LC/MS/MS 绘制标准曲线的结果如表 3 所示。在所设定的定量范围取得了良好的线性。通过评估准确度 (准确性) 及精度 (重复性) 发现, 在包含定量下限的全浓度范围中, 瑞德西韦的精度为 %RSD 0.5% - 2.9%, GS-441524 的精度为 %RSD 2.4% - 4.9%。另外, 瑞德西韦的准确性为 87.8% - 108%、GS-441524 的准确性为 94.5% - 105%, 瑞德西韦、GS-441524 均在 100±15% 以内。

表 3 使用全自动LC/MS/MS分析血浆中瑞德西韦、GS-441524时的线性、准确度及精度

化合物	Remdesivir				GS-441524				
	ID	加标浓度 (ng/mL)	测定浓度 (ng/mL)	精密度 %RSD	准确度 %	加标浓度 (ng/mL)	测定浓度 (ng/mL)	精密度 %RSD	准确度 %
空白样品	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1 级		100	87.8	0.5	88	5	4.72	2.4	95
2 级		500	539	0.8	108	25	26.2	4.8	105
3 级		1000	1052	1.2	105	50	50.8	4.4	102
4 级		2500	2536	2.9	101	125	125	4.9	100
5 级		5000	4885	2.5	98	250	248	4.1	99

校准曲线	Remdesivir, Plot		GS-441524, Plot	
	方程	R ²	方程	R ²
	y = 3.955692x + 0.03041151	0.9992822	y = 4.547163x + 0.009794575	0.9998735

使用 QC 样品评估分析系统的适用性

将血浆中浓度按瑞德西韦: 100, 750, 1000, 3750 ng/mL、GS-441524: 5, 37.5, 50, 187.5 ng/mL 分别制备的样品作为 QC 样品, 评估了重复性 (表 4) 及 3 天的日间重现性 (表 5)。重复性的评估结果是, 瑞德西韦的重复性为 %RSD 0.9% - 2.0%, GS-441524 的重复性为 %RSD 2.3% - 3.6%。另外, 瑞德西韦的准确性为 90.5% - 106%、GS-441524 的准确性为 88.5% - 91.6%, 均在 100±15% 以内。日间重现性的评估结果是, 瑞德西韦的日间重现性为 %RSD 0.1% - 7.2%, GS-441524 的日间重现性为 %RSD 0.4% - 7.8%。另外, 瑞德西韦的准确性为 82.2% - 107%, GS-441524 的准确性为 86.7% - 92.8%, 在 LLOQ 下为 100±20% 以内, 在其他浓度范围内为 100±15% 以内。

表 4 血浆中瑞德西韦、GS-441524 的分析重复性

化合物	QC 样品	加标 (浓度) ng/mL	批内分析 (n=6)		
			平均 (浓度) ng/mL	精密度 % RSD	准确度 %
瑞德西韦	LLOQ	100	90.5	2.0	91
	低	750	797	1.7	106
	中	1000	1045	0.9	105
	高	3750	3393	2.0	91
GS-441524	LLOQ	5	4.51	3.1	90
	低	37.5	33.2	2.5	89
	中	50	45.2	2.3	90
	高	187.5	171.7	3.6	92

表 5 血浆中瑞德西韦、GS-441524的分析日间重现性

化合物	QC 样品	加标 (浓度) ng/mL	第1天 (n=3)			第2天 (n=3)			第3天 (n=3)		
			浓度 (ng/mL)	精密度% RSD	准确度%	浓度 (ng/mL)	精密度% RSD	准确度%	浓度 (ng/mL)	精密度% RSD	准确度%
Remdesivir	LLOQ	100	91.6	1.1	92	82.2	4.9	82	85.1	1.9	85
	低	750	788	1.8	105	734	1.4	98	770	0.1	103
	中	1000	1037	0.7	104	999	0.7	100	1018	0.6	102
	高	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
	低	37.5	33.1	1.8	88	34.1	2.9	91	32.5	3.2	87
	中	50	44.8	3.2	90	44.5	2.7	89	43.8	0.4	88
	高	187.5	174.0	3.7	93	172.6	3.0	92	167.5	0.7	89

总结

建立了带全自动预处理装置的 LC/MS/MS 分析系统进行血浆中瑞德西韦及其代谢产物 GS-441524 测定的方法。使用 QC 样品对重复性和日间重现性进行评估后，得到了良好的准确性和重现性。

本文件中记载的产品尚未作为医疗器械得到医药品医疗器械法的批准和认证。无法用于治疗诊断目的，无法通过正常程序使用。

1) 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 及 LCMS 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。

Veklury 是 Gilead Sciences Ireland UC 的商标。

此外，本文中出现的公司名称和产品名称是各公司的商标及注册商标。

本文中可能对“TM”和“®”进行了省略。

岛津应用云

