

人血浆中 Favipiravir 的测定

前言

Favipiravir (商品名: Favipiravir®) 是由富士胶片 富山化学株式会社开发的一种 RNA 聚合酶抑制剂, 被作为抗流感药物。在本文中, 本公司建立了使用具有出色的可选择性的分析方法 LC/MS/MS (图 1), 对添加在血浆中的 Favipiravir 进行分析的分析系统, 在本文中介绍相关研究成果。

E. Imoto, D. Kawakami



图 1 LCMSTM-8060 的外视图

分析条件及样品的预处理

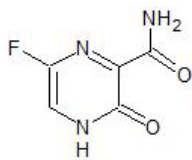
测定目标化合物 Favipiravir (PN: C8720 *1)、及其稳定同位素 [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir (PN: C8853 *1) 均从岛津制作所的集团下属企业 Alsachim 公司购买, [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir 作为内标物质使用。图 2 所示为 Favipiravir 及 [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir 的结构式。在市售的经过 EDTA 2K 处理的人血浆中添加 Favipiravir, 绘制了标准曲线。使用表 1 所示的 LC 及 MS 的分析条件、表 2 所示的 MRM 通道进行了测定。分析色谱柱使用了 Shim-pack Scepter™ 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。

各样品将 Favipiravir 制备为血浆中 1、2、5、10、20、50、100 μg/mL, 作为校准点, 分别以 n=5 绘制标准曲线。使用乙腈制备 [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir (20 μg/mL) 的溶液, 作为 ISTD 使用。

图 4 所示为预处理方法的流程。添加 75%IPA 20 μL、血浆 50 μL、ISTD 10 μL、乙腈 200 μL, 进行充分搅拌后, 将离心分离得到的上清液移至 LC 试剂瓶中, 进行检测。

*1 岛津 GLC 及 Alsachim 产品编号

Favipiravir
分子式: C₅H₄FN₃O₂



[¹³C,¹⁵N]-Favipiravir
分子式: C₄¹³CH₄FN₂¹⁵N¹³O₂

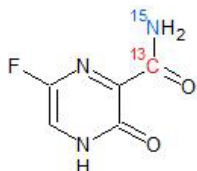


图 2 Favipiravir 及 [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir 的结构式

表 1 LC 及 MS 的分析条件

< LC 分析条件 >		< MS 分析条件 >	
UHPLC	Nexera™ X2	LC/MS/MS 系统	LCMS-8060
分析柱	Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm)	接口	加热 ESI
流动相	A: 0.05% 甲酸 - 水 B: 0.05% 甲酸 - 乙腈	MS 检测模式	MRM (+)
梯度	5 % (0 - 0.30 min) →	加热块温度	400 °C
程序 (%B)	30 % (0.35 min) → 90 % (1.50 - 2.50 min) → 5 % (2.60 - 4.00 min)	DL 温度	250 °C
流速	0.4 mL/min	接口温度	300 °C
柱温箱温度	40 °C	雾化器气体流量	3 L/min
进样量	1.0 μL	干燥气体流量	10 L/min
清洗溶液 (仅外部清洗)	MeOH	加热气体流量	10 L/min

表 2 Favipiravir 及 [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir 的 MRM 通道

化合物名称	离子	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)
Favipiravir	定量离子	157.70	85.10
	定性离子	157.70	113.20
[¹³ C, ¹⁵ N]-Favipiravir	定量离子	159.70	85.10
	定性离子	159.70	113.20

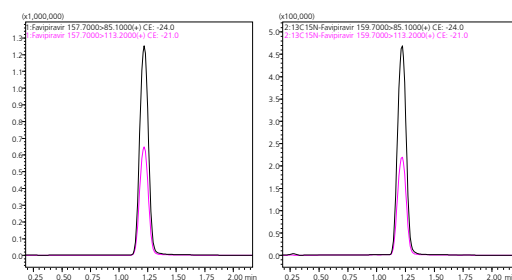


图 3 Favipiravir (左)、及 [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir (右) 的 MS 色谱图

① 试样的添加 ② 搅拌 ③ 离心分离 ④ 分注至试剂瓶

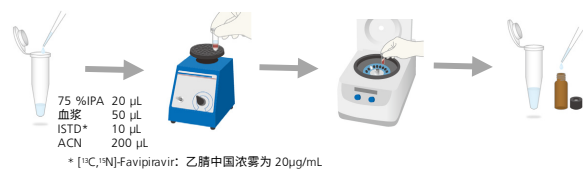


图 4 血浆中 Favipiravir 的预处理流程

标准曲线的绘制

表 3 所示为向血浆添加标准样品绘制的标准曲线的结果。在所设定浓度范围取得了 $R^2=0.9998$ 的良好线性。通过评估准确度（准确性）和精度（重复性）的结果，精度为 %RSD 1.7 %-6.5 %。此外，准确性为 96 %-103 % 和 100 ± 15 % 以内。

表 3 分析血浆中 Favipiravir 时的线性、准确度和精度

Favi piravir					校准曲线
ID	加标浓度 (µg/mL)	平均浓度 (µg/mL)	精密性 %RSD	精确度 %	
空白样品	---	---	---	---	
1 级	1	0.96	2.3	96	
2 级	2	2.00	6.5	100	
3 级	5	4.98	2.3	100	
4 级	10	10.3	1.9	103	
5 级	20	20.5	1.7	103	
6 级	50	49.8	1.9	100	
7 级	100	99.5	1.9	100	

评估使用 QC 样品的分析系统的适用性

将血浆中浓度分别制备为 3、50、90 µg/mL 的试样作为 QC 样品，评估了精密性（表 4）及 3 天的日间重现性（表 5）。精密性的评估结果是，Favipiravir 的精度为 %RSD 1.7 %-4.5 %。此外，准确性为 98 %-104 % 和 100 ± 15 % 以内。日间重现性的评估结果是，Favipiravir 的精度为 %RSD 0.1 %-5.2 %。此外，准确性为 89 %-102 %，在 3 天各自的 QC 样品测定中达成了 100 ± 15 %。

表 4 血浆中 Favipiravir 分析的精密性

化合物	QC 样品	加标浓度 (µg/mL)	批内分析 (n=6)		
			平均浓度 (µg/mL)	精密性 RSD%	精确度 %
Favipiravir	低	3	3.12	2.6	104
	中	50	49.2	4.5	98
	高	90	89.8	1.7	100

表 5 血浆中 Favipiravir 分析的日间重现性

化合物	QC 样品	加标浓度 (µg/mL)	第1天 (n=3) 平均值			第2天 (n=3) 平均值			第3天 (n=3) 平均值		
			平均浓度 (µg/mL)	精密性 RSD%	精确度 %	平均浓度 (µg/mL)	精密性 RSD%	精确度 %	平均浓度 (µg/mL)	精密性 RSD%	精确度 %
Favipiravir	低	3	3.05	0.1	102	2.89	4.6	96	2.67	5.2	89
	中	50	49.0	1.1	98	47.5	1.0	95	46.4	2.2	93
	高	90	90.2	0.4	100	88.3	4.2	98	87.6	2.4	97

分析系统的稳定性试验

为了评估本次建立的分析系统的稳定性及重现性，使用将血浆中浓度制备为 10 µg/mL 的试样，连续测定了 100 次。每次进样得到的面积值用第一次进样得到的面积值归一化和统计的结果如图 5 所示。连续测定 100 次的结果发现，Favipiravir 的 %RSD 为 2.9%， $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Favipiravir 的 %RSD 为 3.2%，具有较高的注入重现性。上述结果表明，本分析系统可以长时间维持高灵敏度分析，具有良好的稳定性。

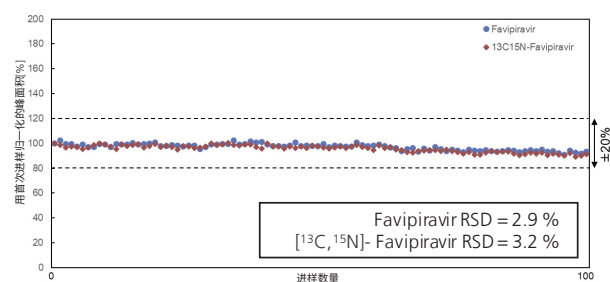


图 5 Favipiravir、及 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Favipiravir 的连续 100 次测定结果用第一次进样得到的面积值归一化，统计各进样结果

结论

建立了血浆中 Favipiravir 测定的 LC/MS/MS 的分析系统。绘制标准曲线后发现，可以得到良好的线性。另外，为评估分析系统的稳定性而进行连续 100 次测定，结果显示可长时间维持高灵敏度的分析，具有良好的稳定性。

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。LCMS、Shim-pack Scepter 及 Nexera 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家所使用的商标。Favipiravir 是富士胶片富山化学株式会社的注册商标。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。本文中有些部分对“TM”和“®”进行了省略。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

※ 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
※ 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020 年 8 月