

使用带全自动预处理装置的 LC/MS/MS 系统进行人血浆中 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。C229 应用报告中介绍了通过使用人工预处理方法的 LC/MS/MS 完成稳定、高灵敏度测定的案例。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 系统分析人血浆中 Favipiravir 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 Favipiravir 的全自动预处理

在通过 LCMS™ 分析血浆中的低分子量化合物时, 通常使用有机溶剂进行蛋白沉淀处理, 然后收集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。

从血浆的预处理到通过 LC/MS/MS 测定 Favipiravir 的过程, 每个样品的分析时间为 6.5 分钟。

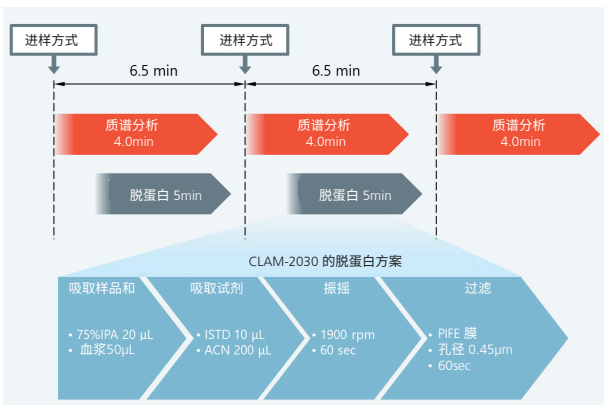


图 2 全自动预处理的工作流程

■ 分析条件及样品的预处理

测定目标化合物 Favipiravir (PN: C8720^{*1})、及其稳定同位素标准品 [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir (PN: C8853^{*1}) 均从岛津制作所集团下属企业 Alsachim 公司购买, [¹³C,¹⁵N]-Favipiravir 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 Favipiravir, 配制了标准曲线和 QC 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)。图 3 所示为各化合物的 MS 色谱图及结构式。

各空白血浆中 Favipiravir 浓度为 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 2 显示了 Favipiravir 的血浆样品的预处理方法。向 50 µL 的血浆内添加 20 µL 的 75% IPA 水溶液、10 µL 的 ISTD、200 µL 乙腈, 混匀, 之后使用 PTFE 膜过滤器过滤等过程全部为自动处理, 处理后的样品直接用于 LC/MS/MS 分析。

*1 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	LC/MS/MS 系统	LCMS-8060
分析柱	Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm x 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 (+)
梯度程序 (%B)	5% (0 - 0.30 min) → 30% (0.35 min) → 90% (1.50 - 2.50 min) → 5% (2.60 - 4.00 min)	加热块温度	400 °C
流速	0.4 mL/min	DL 温度	250 °C
柱温箱温度	40 °C	接口温度	300 °C
进样量	1.0 µL	雾化气流量	3 L/min
清洗溶液 (仅进样针外部清洗)	MeOH	干燥气流量	10 L/min
		加热气流量	10 L/min

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

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

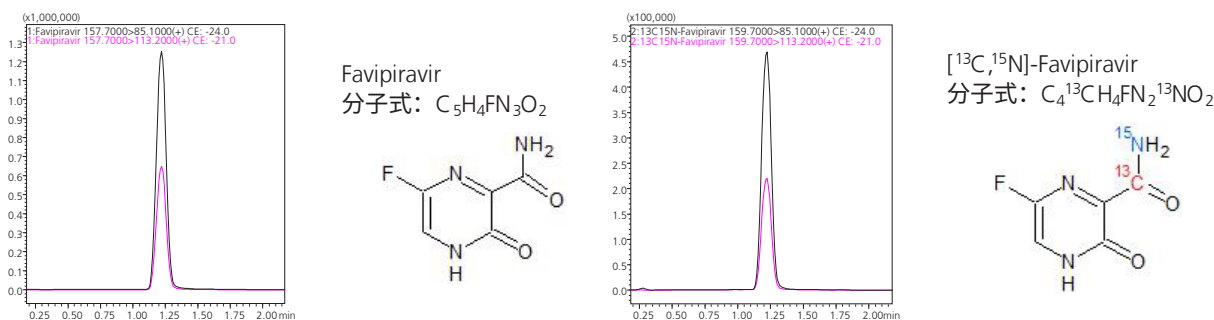


图3 Favipiravir (左)、¹³C,¹⁵N-Favipiravir (右)的MS色谱图及结构式

标准曲线的绘制

表3所示为使用带全自动预处理装置的LC/MS/MS绘制标准曲线的结果。在所设定的定量范围取得了 $R^2=0.9987$ 的良好线性。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,精度为%RSD 1.0%-5.6%。此外,准确度为95%-105%,在 $100 \pm 15\%$ 范围以内。

表3 使用全自动LC/MS/MS分析血浆中Favipiravir时的线性、准确度及精密度

Favipiravir					校准曲线
ID	加标浓度 (μg/mL)	平均浓度 (μg/mL)	精密度 %RSD	精确度 %	
空白样品	---	---	---	---	
1级	1	1.04	4.3	104	
2级	2	2.00	1.9	100	
3级	5	4.77	2.4	95	
4级	10	9.87	1.9	99	
5级	20	19.7	3.5	99	
6级	50	52.7	1.0	105	
7级	100	97.9	5.6	98	

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,评估了并行精度(表4)及3天的日间重现性(表5)。并行精度的评估结果是,Favipiravir的精度为%RSD 1.6%-3.0%。此外,准确度为94%-97%,在 $100 \pm 15\%$ 范围以内。日间重现性的评估结果是,Favipiravir的精度为%RSD 0.2%-7.6%。此外,准确度为88%-99%,在3天各自的QC样品测定中达成了 $100 \pm 15\%$ 。

表4 血浆中Favipiravir分析的并行精度

化合物	QC样品	加标浓度 (μg/mL)	批内分析 (n=6)		
			平均浓度 (μg/mL)	精密度 RSD%	精确度 %
Favipiravir	低	3	2.90	2.2	97
	中	50	48.3	3.0	97
	高	90	84.8	1.6	94

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)	精密度 RSD%	精确度 %	平均浓度 (μg/mL)	精密度 RSD%	精确度 %	平均浓度 (μg/mL)	精密度 RSD%	精确度 %
Favipiravir	低	3	2.95	0.2	98	2.94	7.6	98	2.64	3.7	88
	中	50	49.3	1.0	99	47.1	2.8	94	46.0	3.6	92
	高	90	85.8	1.3	95	81.3	1.0	90	79.4	1.7	88

结论

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Favipiravir测定的方法。绘制标准曲线后发现,具有良好的线性。使用QC样品对重复性和日间重现性进行评估后,得到了良好的准确度和重现性。

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。

CLAM、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。

岛津应用云

