

Application News

No.L570K

High Performance Liquid Chromatography

HPLC를 이용한 플라스마 내 아비간(Favipiravir, Avigan)의 정량적 분석

Quantitative Analysis of Favipiravir Spiked in Plasma Using by HPLC

2020년을 기점으로 글로벌 코로나바이러스병 2019(COVID-19) 대유행을 극복하기 위한 의약품과 백신 모두의 개발이 시급합니다. COVID-19의 유망한 약물 후보물질인 Favipiravir(브랜드명:아비간-Avigan)은 항인플루엔자 약물로 분류되어 독감 바이러스 및 재신생 독감 바이러스 모두에 대해 평가 및 개발되었습니다. 아비간은 주로 수산화물로서 Urine에서 제거된 신장 배설 과정을 거칩니다. 특히 이 약물의 혈장농도는 하루 한 번 복용하는 식이요법 때문에 조절이 어렵습니다. 따라서 약의 정확한 수치를 감시하는 것이 중요합니다.

본 자료에서는 질량분석기가 아닌 HPLC만을 이용하여 Favipiravir의 정량적 고감도 플라스마 분석을 위한 접근법을 소개합니다.

R. Suzuki, Y. Osaka

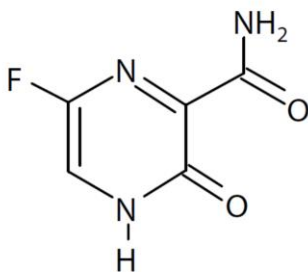


Fig. 1 Structural Formula of Favipiravir

■ 샘플 준비

혈장 및 혈청 검체는 일반적으로 분석 컬럼의 막힘과 열화를 방지하기 위하여 단백질 제거 과정이 필요합니다. 본 연구에서는 다음과 같이 단백질 제거 과정이 수행되었습니다. 먼저 플라스마 25uL와 메탄올 100uL를 잘 섞어 원심분리 하였습니다. 다음으로, 상등액을 회수하여 HPLC 분석에 사용할 이동상과 함께 15개로 희석 하였습니다.(Fig.2)

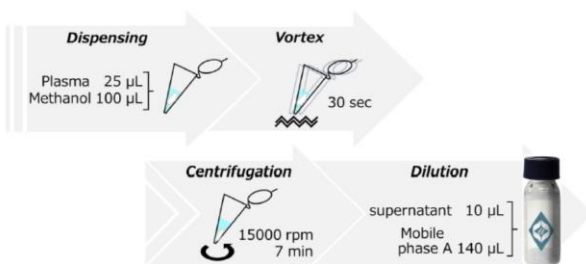


Fig. 2 Deproteinization Protocol

■ HPLC 분석

Favipiravir*1은 ALSACHIM으로부터 구입되었습니다. 검정곡선과 검증샘플(Quality control, QC sample)은 건강한 인간 혈장을 Favipiravir로 스파이크하여 준비하였습니다. 측정은 Table1.에 나타난 HPLC 분석 조건을 사용하여 수행되었습니다. 용출을 위한 시간 프로그램은 Table 2.와 같습니다. Favipiravir는 보호 컬럼(Guard Column)과 Shim-pack Scepter™ C18-120을 사용하여 분리되었습니다. 크로마토그램은 Fig.3과 같습니다. 플라스마에 스파이크한 1, 10, 25, 50 및 100ug/mL(n=6)의 Favipiravir 표준용액을 사용하여 검정곡선을 작성 하였습니다.

*1:P/N C8720(Alsachim's product number)

Table 1 Analytical Conditions

System	: Nexera™ XR
Column	: Shim-pack Scepter C18-120 ^{*2} (150 mm × 4.6 mm I.D., 5.0 µm)
Guard Column	: Shim-pack Scepter C18-120 (G) ^{*3} (10 mm × 4.0 mm I.D., 5.0 µm)
Mobile Phase	: A) 10 mmol/L (sodium) phosphate buffer pH 6.9 B) Methanol
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 30 °C
Injection Volume	: 1.0 µL
Vial	: TORAST-H Glass Vial (Shimadzu GLC) ^{*4}
Detection	: Fluorescence detector (RF-20A) Ex. 360 nm ⁽¹⁾ , Em. 433 nm

*2: P/N 227-31020-05, *3: P/N 227-31126-01, *4: P/N 370-04301-01

Table 2 Time Program

Time (min)	A.conc	B.conc
0	100	0
2.5	100	0
7.5	30	70
9.5	30	70
9.51	100	0

■ 교정곡선

이 정량범위에서 양호한 선형성을 얻었습니다. (R²=0.999, Weighting; (1/C)). 정확도, 정밀도 평가를 통해서 전체 농도 범위에서 다음과 같은 결과를 얻었습니다. Favipiravir 정밀도(%RSD)는 0.21%~0.31%이며 정확도는 92.1%~106%로 허용범위 내 100±0.8%로 나타났습니다.

■ QC시료에 대한 밸리데이션 시험

QC 검체처럼 플라스마에 스파이크된 2, 45, 90 µg/mL(n=6)에서 Favipiravir를 사용하여 유효성 검사를 수행하였습니다.(Table 4). 유효성 검사에서 0.18%~0.35% 사이의 정밀도(%RSD)를 기록했으며 정확도는 96.5%~100%이며 허용한계는 100±4.0%이었습니다.

■ 결론

SHIMADZU는 HPLC를 이용하여 혈장내 Favipiravir 수준을 평가하기 위한 정량적 분석 방법을 구축하였습니다. 이 시스템은 형광 검출기를 이용한 고감도 정량 분석을 제공합니다. QC 시료를 이용한 유효성 검사에서, 우수한 정확도와 정밀도를 얻었습니다.

<References>

- (1) Brian B. Gowen et. al., "Alterations in favipiravir (T-705) pharmacokinetics and biodistribution in a hamster model of viral hemorrhagic fever", Antiviral Res., 2015.
- (2) E. Takashita et. al., "Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre-and post-administration of favipiravir", Antiviral Res., 2016.
- (3) K. Shiraki et. al., "Favipiravir, an anti-influenza drug against lifethreatening RNA virus infections", Pharmacol. Ther., 2020.

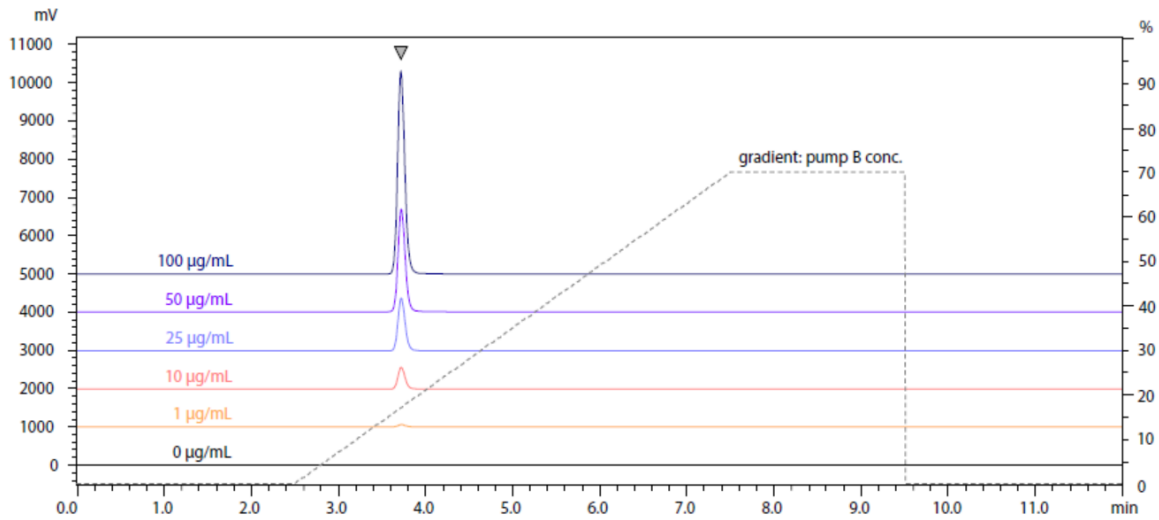


Fig. 3 Chromatograms of Favipiravir in Plasma and Gradient Profile

Table 3 Accuracy and Precision of Favipiravir in Plasma

ID	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n=6)		
		Measured Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Blank	---	---	---	---
Level 1	1	0.921	0.25	92.1
Level 2	10	10.6	0.31	106
Level 3	25	25.8	0.26	103
Level 4	50	49.8	0.21	100
Level 5	100	98.8	0.24	98.8

Table 4 Repeatability of Favipiravir in Plasma

Compound	QC Sample	Spiked Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n=6)		
			Average Conc. (µg/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Favipiravir	Low	2	1.93	0.18	96.5
	Medium	45	45.1	0.20	100
	High	90	88.7	0.35	98.5