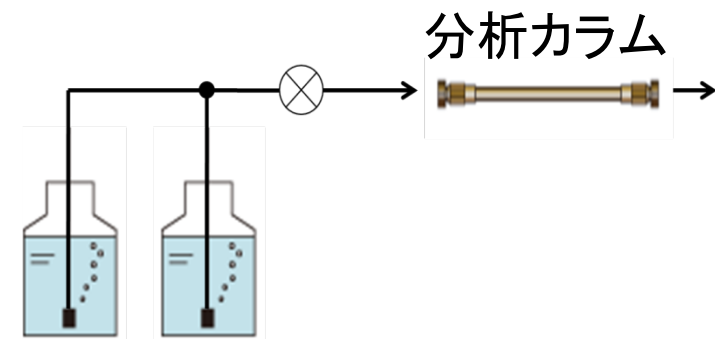
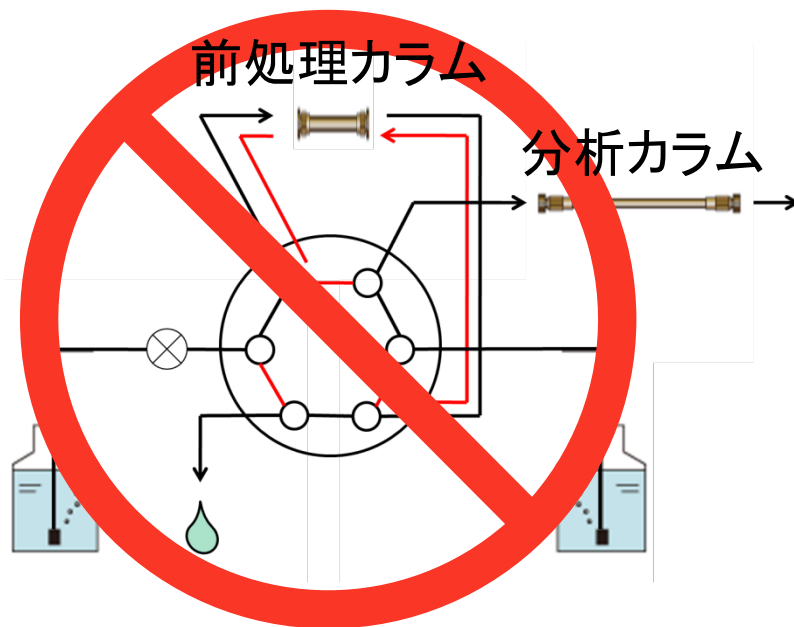

疎水性/親水性ハイブリッドODSカラムを用いた血漿直接注入による 新規ミカファンギン血中濃度測定法の開発

既存の血漿直接注入法における問題点

- 1) 複数のカラムが必要
- 2) 有機溶媒濃度に制限のあるアイソクラティック溶出
- 3) リン酸緩衝液を常用とするため、LC-MS非対応

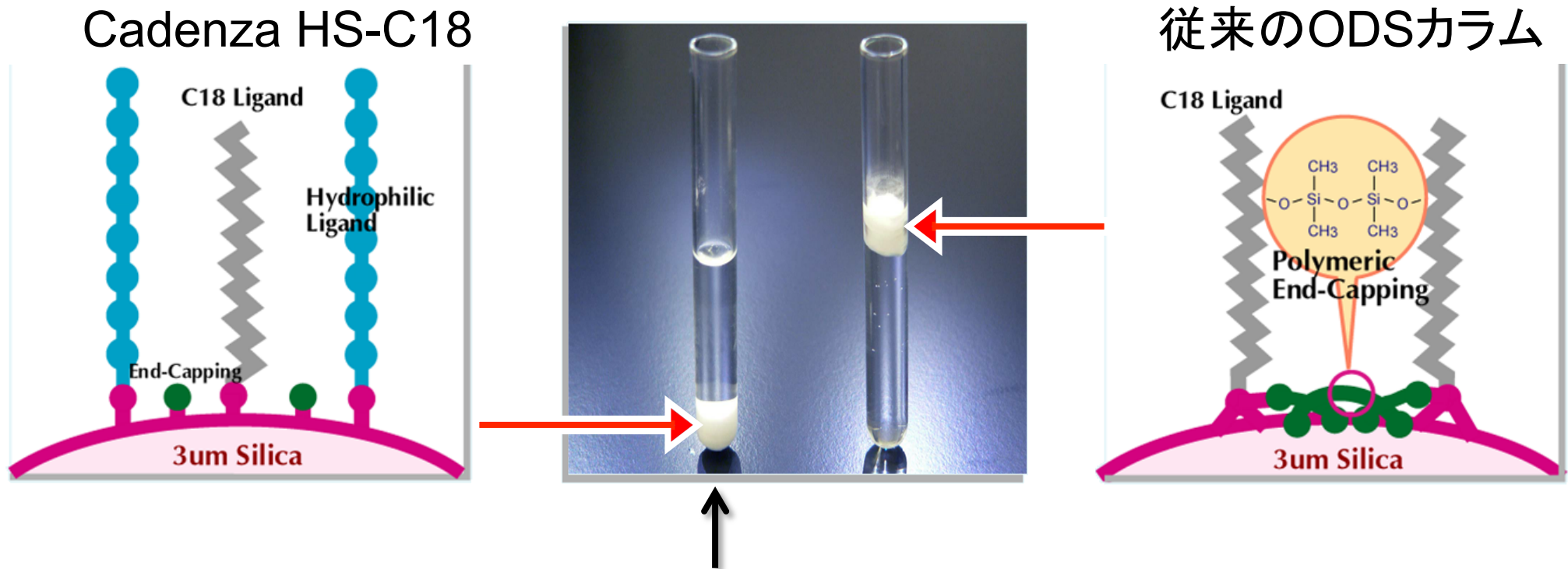


単独のカラムによる
ヒト血漿直接注入測定法を開発

方法 分析カラム

Cadenza HS-C18

充填剤表面に疎水性/親水性ハイブリッドODS固定相を持つC18カラム



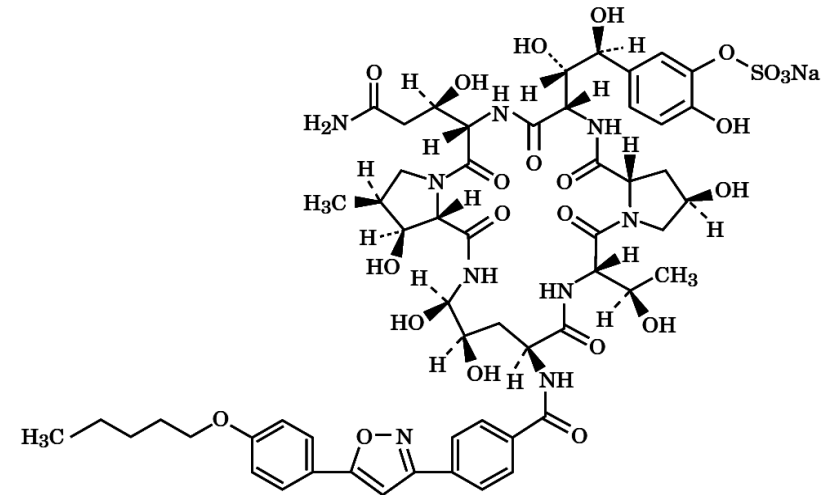
↑
充填剤が水に沈むほど親水性が高い

⇒血漿中タンパク成分の除去と目的物質の分離に最適

分析対象薬物

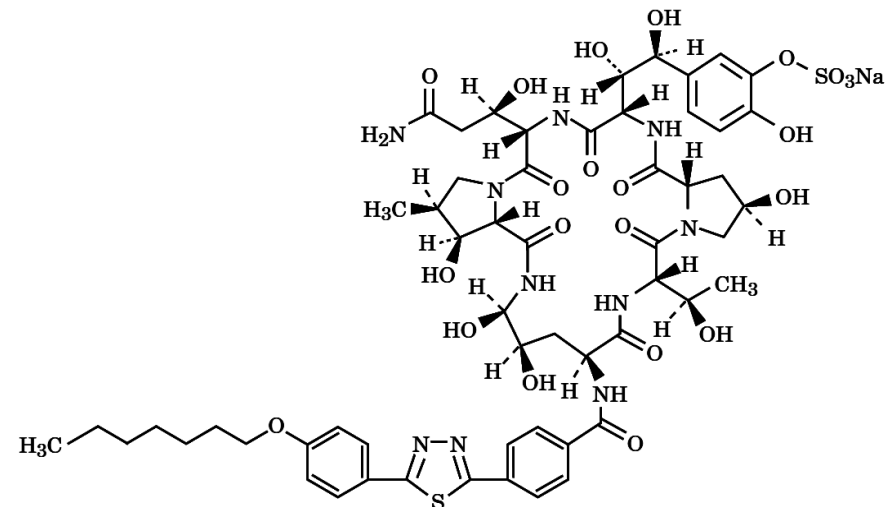
ミカファンギン (MCFG)

- キャンディン系抗真菌薬
- 1,3-β-D-グルカン合成阻害
- カンジダ、アスペルギルス属に活性
- 安全性が高く、多剤との相互作用が少ない



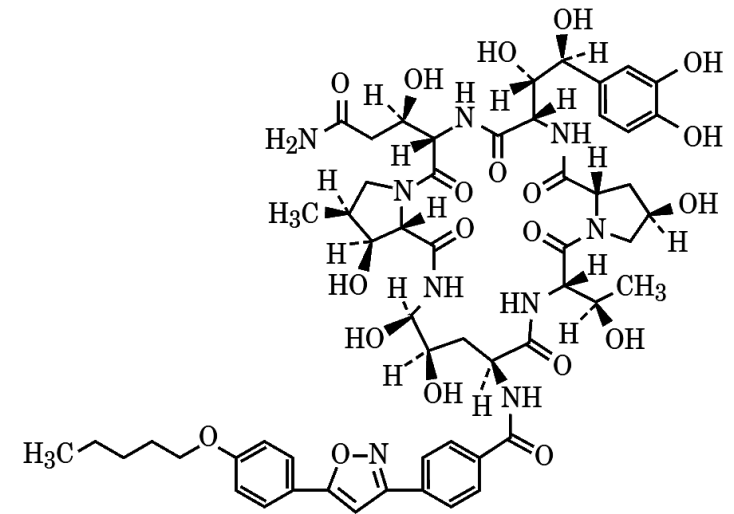
FR195743 (IS)

- ミカファンギンの構造類縁体
- 内標準物質 (IS) として使用



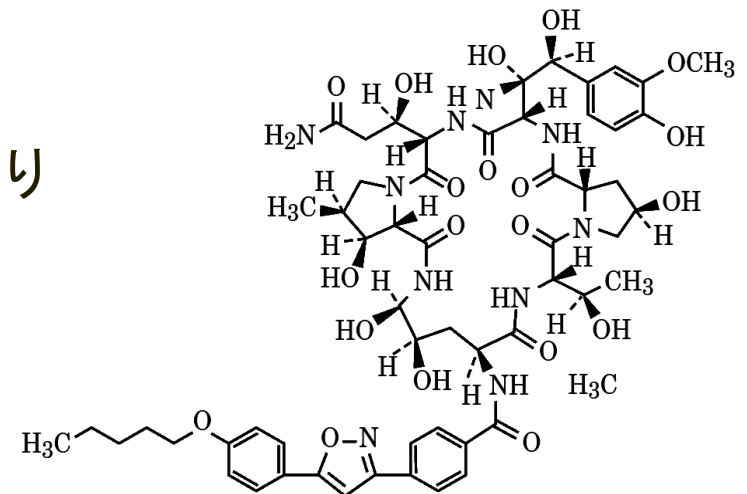
M1 (カテコール体)

- サルファターゼによりMCFGから生成
- 定常状態での血中濃度はMCFGの7%程度



M2 (メキシ体)

- COMT (catechol O-methyltransferase) によりM1から生成
- 定常状態での血中濃度は検出限界以下



抗真菌作用への寄与が少ない

試料調製

MCFG溶液

窒素乾固 (43°C)
リン酸添加ヒト血漿に溶解

0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

100 μL

濾過 (Millex[®]-HV 0.45 μm)

10 μL

HPLC

FR 195743 (IS)溶液

1 mol/L酢酸アンモニウムで希釈

4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

100 μL

HPLC

分析条件

分析カラム Cadenza HS-C18 (3.0 ×150 mm、3 μm)

HPLCシステム 島津LC-10A_{VP}システム

検出 蛍光検出 (Ex : 273 nm、Em : 464 nm)

カラム温度 50°C

流速 0.4 mL/min

移動相 A液) 50 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

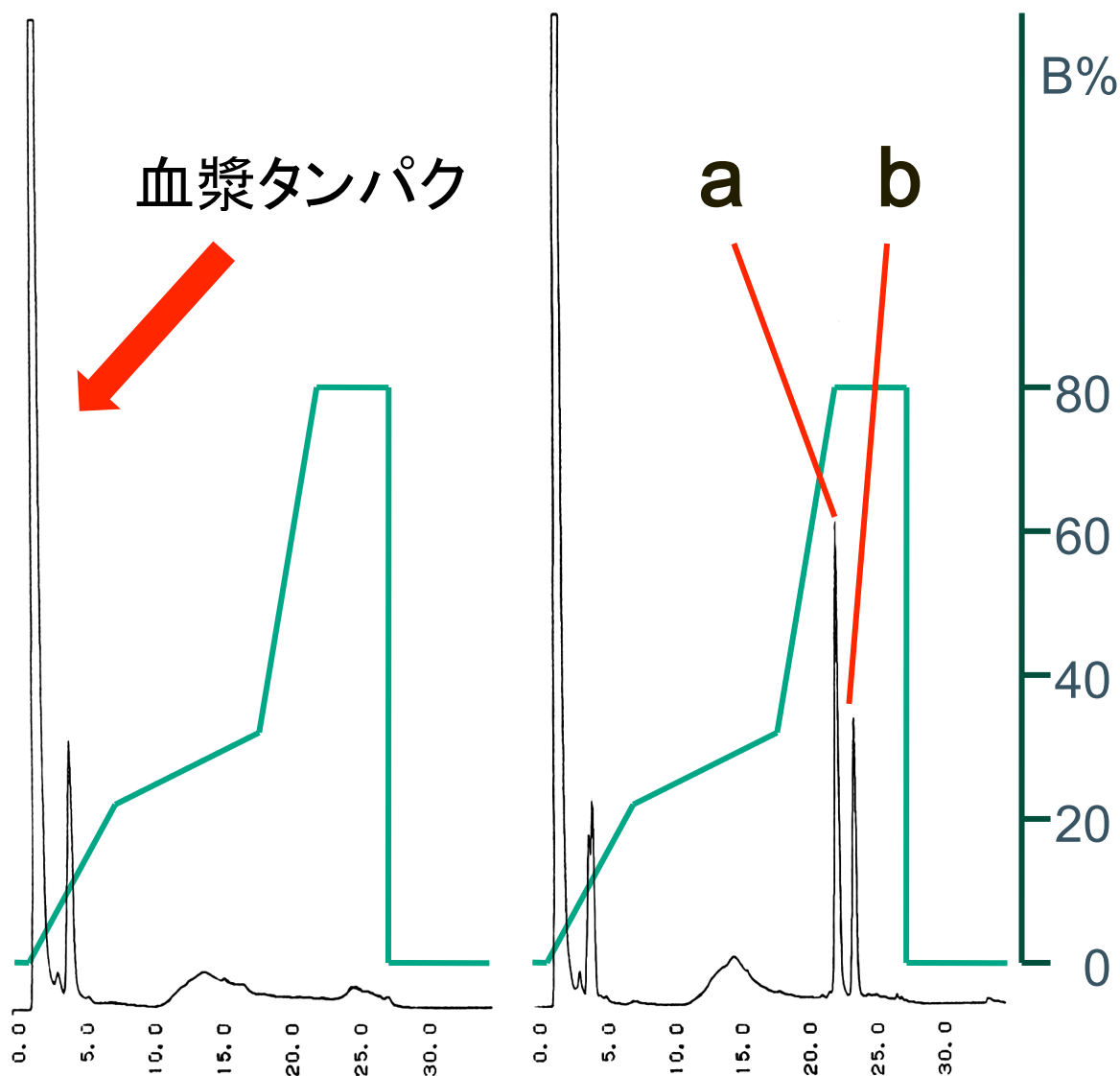
 B液) アセトニトリル

 0% Bを初期条件とするグラジエント溶出

結果

1) ブランク血漿

2) ブランク血漿+MCFG+IS



a : 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MCFG

b : 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FR195743 (IS)

A : 50 mmol/L 酢酸アンモニウム

B : アセトニトリル

0-1 min 0% B

1-6 min 0-22% B

6-16 min 22-32% B

16-21 min 32-80% B

21-26 min 80% B

26-31 min 0% B

カラムパフォーマンス

Compounds	t_R (min)	k'	α	R_s
MCFG	22.4	11.68	—	—
FR195743	23.7	12.44	1.07	2.26

t_R : retention time

k' : capacity factor [$k' = (t_R - t_0)/t_0$]

α : coefficient of separation [$\alpha = k'_2/k'_1$]

R_s : resolution [$R_s = 1.18(t_{R2} - t_{R1})/(W_{0.5h2} + W_{0.5h1})$].

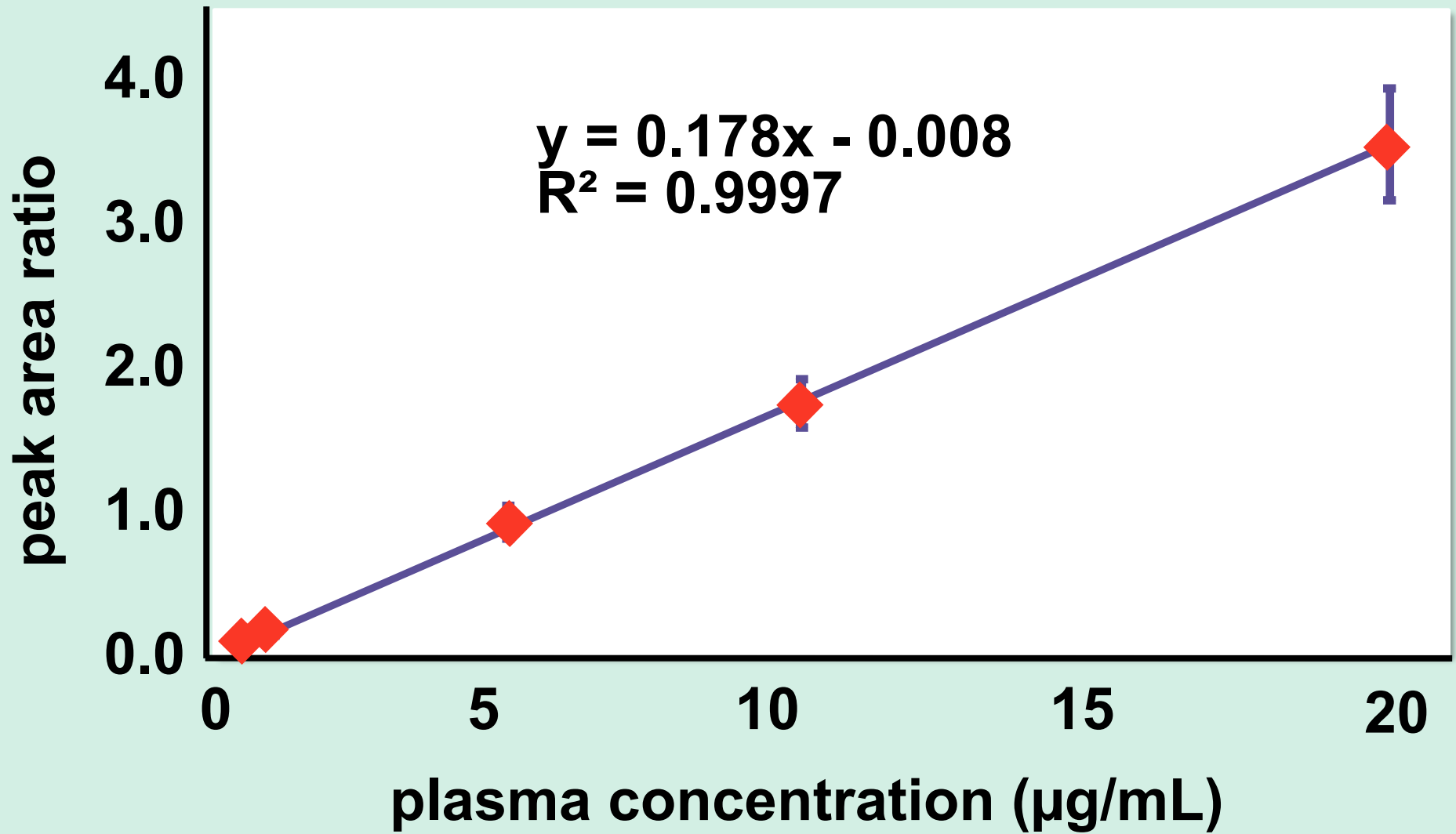
Compounds	N	H (μm)	Tf
MCFG	29,709	5.05	1.28
FR195743	38,238	3.92	1.17

N : number of theoretical plates [$N = 5.55(t_{R2}/W_{0.5})^2$].

H : height equivalent of a theoretical plate [$H = \text{length of column}/N$].

Tf : tailing factor [$Tf = W_{0.05h}/2a_{0.05}$]

検量線



回収率

Intra-day (n=6)

Nominal Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	C.V. (%) [♪]
1 [♪]	103.7	6.3
10 [♪]	99.8	3.9
20 [♪]	107.9	6.5

Inter-day (n=6)

Nominal Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	C.V. (%) [♪]
1 [♪]	115.9	21.2
10 [♪]	110.6	13.6
20 [♪]	115.2	9.3

C.V. : Coefficient of variation

日内、日間変動

Intra-day (n=6)

Nominal Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/ml}$) \downarrow	C.V. (%) \downarrow	Accuracy (%) \downarrow
1 \downarrow	0.95 \pm 0.03 \downarrow	2.7 \downarrow	-4.5 \downarrow
10 \downarrow	9.97 \pm 0.66 \downarrow	6.6 \downarrow	-0.3 \downarrow
20 \downarrow	21.06 \pm 2.06 \downarrow	9.8 \downarrow	5.3 \downarrow

Inter-day (n=6)

Nominal Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/ml}$)	C.V. (%) \downarrow	Accuracy (%) \downarrow
1 \downarrow	0.90 \pm 0.06	6.3 \downarrow	-9.8 \downarrow
10 \downarrow	10.15 \pm 0.84	8.3 \downarrow	1.5 \downarrow
20 \downarrow	19.47 \pm 1.92	9.9 \downarrow	-2.7 \downarrow

C.V. : Coefficient of variation

結論

- 除タンパク等の前処理を必要としない、
血漿直接注入によるMCFGの血中濃度測定を可能とした。
 - 1) 単独のカラムにおいて、血漿直接注入とグラジエント条件
(0%から80%) による測定を可能とした。
 - 2) 移動相に酢酸アンモニウムを用いることで、
LC-MSへの適応が可能となる。

TDMや臨床試験
医薬品開発
環境分析



試料の測定が
簡便かつ迅速に