

Bond Elut Plexa SPE を用いた HPLC による血漿中のトリアゾール類の 同時定量

アプリケーションノート

臨床研究

著者

Jean-Baptiste Gordien and
Jean-Marc Bernadou
Université Victor Segalen Bordeaux 2 et
Hôpital Haut-Lévêque CHU de Bordeaux
Laboratoire de Pharmacocinétique
Clinique et Pharmacie Clinique
France
Elisabeth Korte
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

トリアゾール系全身性抗真菌薬は、多くの薬物相互作用の原因となる個人内、個人間変動が多いという薬物動態学的特性を有しています。そのため、血漿中のトリアゾール濃度の測定が必要です。最近まで、トリアゾール系抗真菌薬の同時検出および同時定量のメソッドは存在しませんでした。本研究の目的は、ヒト血漿中の 5 種類の全身性抗真菌薬 (フルコナゾール、ポリコナゾール、ケトコナゾール、ボサコナゾール、イトラコナゾール) およびトリアゾール代謝物であるヒドロキシ-イトラコナゾールの高速かつ高感度の分析方法を、前臨床研究やバイオ医薬品研究向けに開発することです。このアプリケーションノートでは、自動固相抽出 (SPE) および UV 検出 HPLC 分析を使用したトリアゾールの分析について説明します。



Agilent Technologies

材料とメソッド

サンプル前処理

SPE プロセスは Agilent Bond Elut Plexa カートリッジを使用して ASPEC XLi システム上で自動化されています。

1. 300 μL の血漿に 750 μL の内部標準リネゾリド (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、pH 2 を添加
2. Bond Elut Plexa 充填剤を MeOH 1 mL と H₂O 1 mL でコンディショニング
3. サンプル 1 mL を添加
4. 1% NH₄OH 1 mL、H₂O:MeOH (70:30) 1 mL で洗浄
5. MeOH 1 mL で溶出
6. 50 °C にて N₂ で蒸発させて濃縮
7. H₂O:MeOH (50:50) 80 μL で再度希釈

本分析は、米国食品医薬品局 (FDA) バイオ分析メソッドバリデーション [1] の推奨に基づき実施しました。

分析条件

カラム:	フェニル、4.6 × 150 mm		
サンプル前処理:	Agilent Bond Elut Plexa、30 mg (部品番号 12109301)		
溶離液:	A: Na ₂ HPO ₄ 緩衝液、pH 7 B: アセトニトリル		
注入量:	25 μL		
グラジエント:	時間 (分)	B%	流量 (mL/min)
	0	25	1.0
	4	25	1.0
	5	55	1.1
	11	55	1.1
	12	80	1.3
	14	80	1.3
	15	25	1.0
	19	25	1.0
検出器:	UV、フルコナゾール用 210 nm、バンド幅 12 nm、 その他の分析物用 260 nm、バンド幅 12 nm		

結果と考察

開発した分析法は FDA バリデーションの基準を満たしており、信頼性と再現性が高く、生体試料マトリックス内の分析物の定量測定に使用できます。図 1~6 は、検量線、標準物質、ブランク血漿、トリアゾール類が含まれた血漿サンプルのクロマトグラムを示しています。表 1 はバリデーションデータの精度、相対標準偏差、毎日のサンプリングでのこれらの抗真菌化合物の濃度を示しています。分析時間は 15 分以内でした。

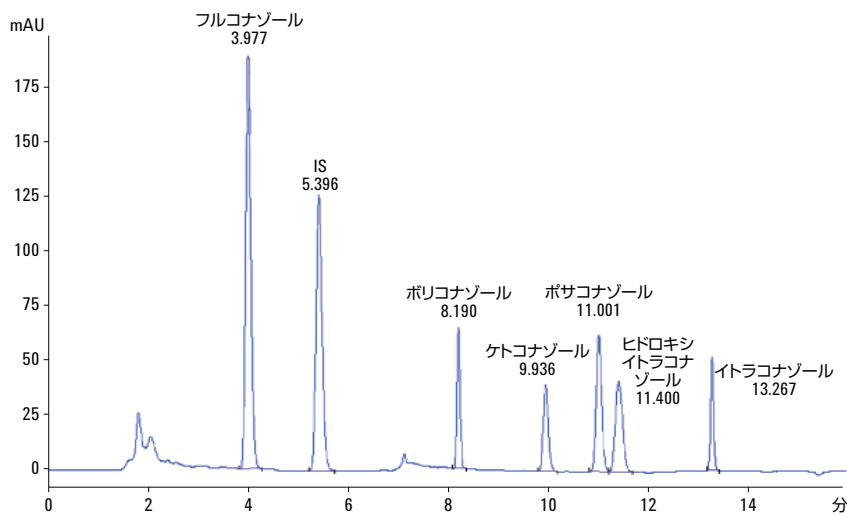


図 1. 品質管理のためのクロマトグラム

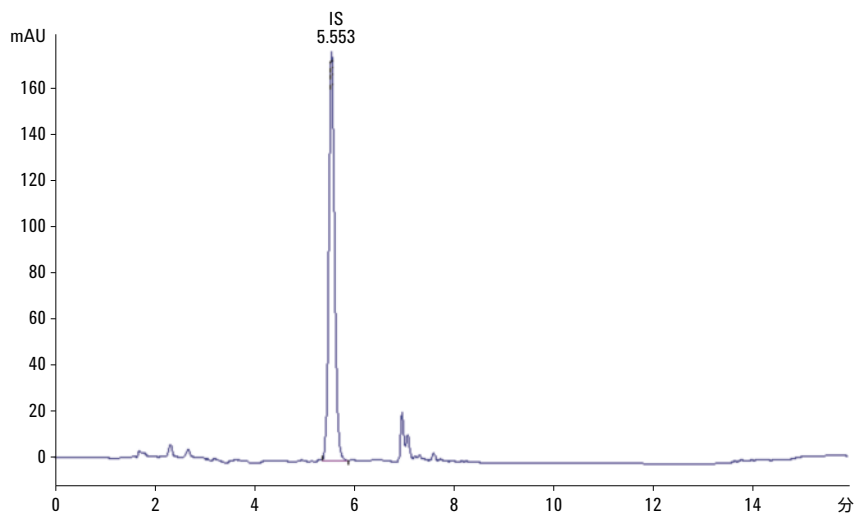


図 2. Agilent Bond Elut Plexa を使用して固相抽出した後のブランク血漿のクロマトグラム

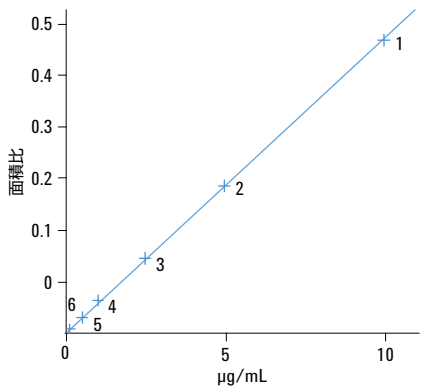


図 3. ポリコナゾールの検量線 ($R^2 = 0.9998$) 1 = 10 µg/mL、2 = 5 µg/mL、3 = 1 µg/mL、4 = 0.5 µg/mL、5 = 0.25 µg/mL、6 = 0.1 µg/mL

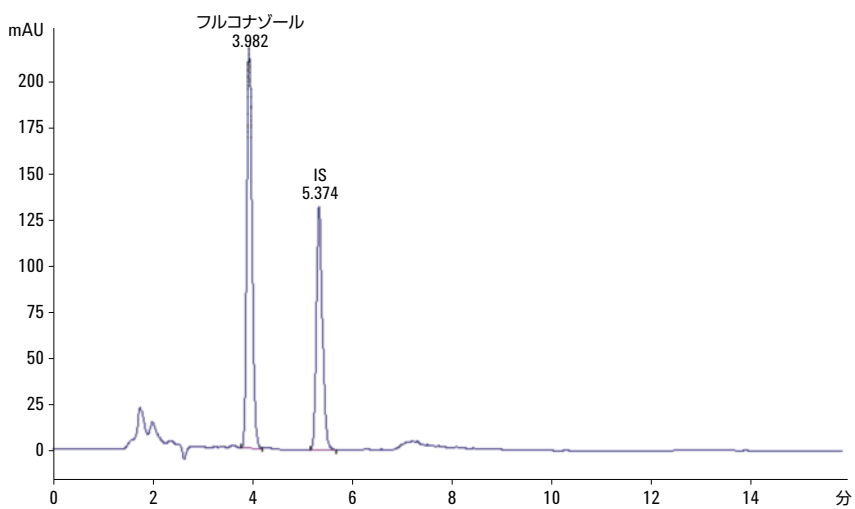


図 4. フルコナゾールが含まれた血漿サンプルのクロマトグラム

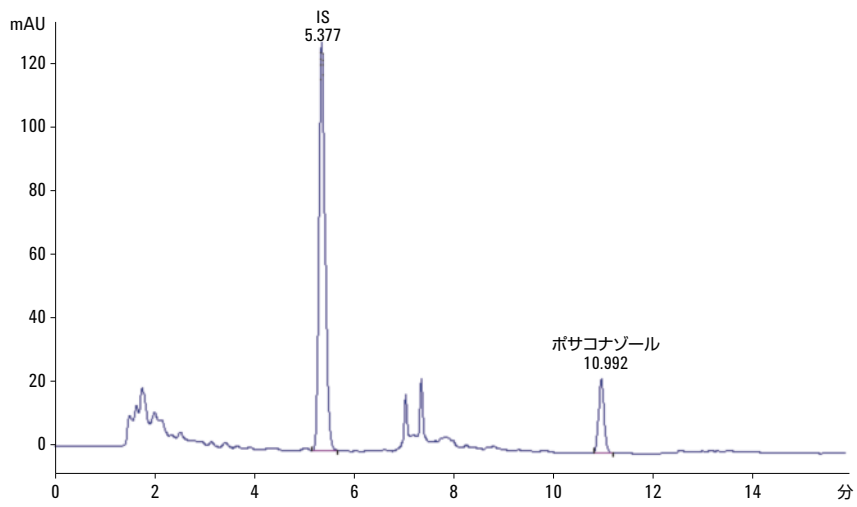


図 5. ポサコナゾールが含まれた血漿サンプルのクロマトグラム

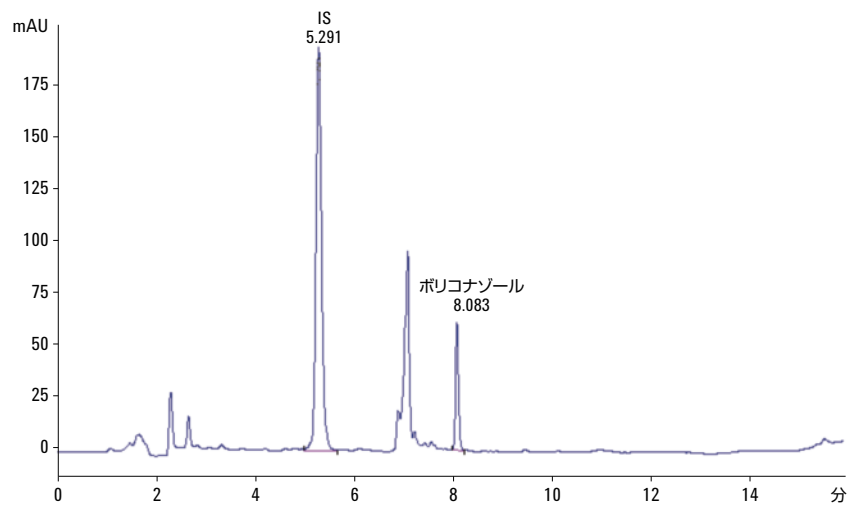


図 6. ポリコナゾールが含まれた血漿サンプルのクロマトグラム

結論

前臨床研究やバイオ医薬品研究を成功させるには、薬物および代謝物の定量評価のための高選択性、高感度の分析メソッドが必要です。このアプリケーションノートに示されている高速で特異的かつ感度の高いメソッドは、臨床研究アプリケーションにおいて全身性抗真菌薬を最適化する場合に理想的です。自動化メソッドを用いて、同じ分析条件で抗真菌薬を測定することにより、貴重な時間を節約できます。

参考文献

1. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, (May 2001).

詳細

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

表 1.5 種類のトリアゾール系抗真菌薬とイトラコナゾール代謝物の分析による毎日のバリデーションデータ (n = 6)

トリアゾール	濃度 (µg/mL)	精度 (%)	RSD (%)
フルコナゾール			
0.15	0.161 ± 0.011	107.3	6.83
3.75	3.670 ± 0.021	97.9	0.57
15.00	15.270 ± 0.253	101.8	1.66
ボリコナゾール			
0.15	0.143 ± 0.012	95.3	8.39
1.50	1.510 ± 0.004	100.5	0.24
7.50	7.350 ± 0.107	98.0	1.46
ボサコナゾール			
0.15	0.147 ± 0.014	98.0	9.52
1.50	1.540 ± 0.123	104.0	7.97
7.50	7.250 ± 0.406	96.7	5.61
ケトコナゾール			
0.15	0.162 ± 0.010	108.0	6.25
1.50	1.450 ± 0.088	96.7	6.07
7.50	7.460 ± 0.309	99.5	4.14
ヒドロキシイトラコナゾール			
0.30	0.311 ± 0.034	110.3	10.27
1.50	1.540 ± 0.141	102.7	9.16
7.50	7.590 ± 0.445	101.2	5.86
イトラコナゾール			
0.30	0.285 ± 0.029	95.0	10.18
1.50	1.570 ± 0.132	104.7	8.41
7.50	7.400 ± 0.512	98.7	6.92

www.agilent.com/chem/jp

研究目的にのみ使用できます。診断目的では使用できません。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

May 31, 2013

5991-2552JAJP



Agilent Technologies