

## 【原著・基礎】

ヒト血漿中 micafungin およびその代謝物濃度の  
高速液体クロマトグラフィーによる定量法山戸 康弘・金子 勇人・谷本 薫・片島 正貴  
石橋 光治・河村 章生・寺川 雅人・加賀山 彰

藤沢薬品工業株式会社薬物動態研究所\*

Micafungin (MCFG) とその代謝物である M1 (カテコール体) および M2 (メトキシ体) の HPLC によるヒト血漿中濃度同時定量法を確立した。本法は、あらかじめ MCFG の安定化のためにリン酸を添加したヒト血漿を、アセトニトリルで除蛋白した後、分析カラムに逆相系の TSKgel ODS-80 TM, 検出器に蛍光検出器を用いて高速液体クロマトグラフ (HPLC) で分析する方法である。ヒト血漿 50  $\mu\text{L}$  を用いた時、本法における定量範囲は MCFG が 0.05~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , M1 および M2 が 0.05~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、検量線はこの濃度範囲でいずれも良好な直線性を示した。同時再現性, 日差再現性における精度・真度ともに良好であった。MCFG, M1 および M2 は, HPLC 分析試料中で室温下 24 時間まで安定であった。本法を用いてヒト血液中の MCFG, M1 および M2 の安定性を評価したところ, いずれの化合物もヒト全血中で 4 $^{\circ}\text{C}$  保存下 72 時間, リン酸添加ヒト血漿中では室温下 2 時間, 氷冷下 6 時間, -20 $^{\circ}\text{C}$  凍結保存下 21 日および -80 $^{\circ}\text{C}$  凍結保存下 413 日まで, また凍結融解を 4 回繰り返しても安定であった。

**Key words:** micafungin, 血漿中濃度定量法, HPLC

Micafungin (MCFG) は細胞壁 ( $\beta$ グルカン) 合成阻害を主作用とし, *Candida* および *Aspergillus* 属に対して強い抗真菌作用を有する新しい抗真菌薬である。MCFG の活性代謝物としては, *Candida* 属および *Aspergillus* 属に対して MCFG よりやや低い活性を有する M1 および同等の活性を有する M2 が知られている<sup>1,2)</sup>。

MCFG のヒトにおける体内動態を検討するためには, MCFG に加え活性代謝物を含めた血漿中濃度定量法が必要である。そこで, 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による MCFG とその代謝物 M1 および M2 のヒト血漿中濃度同時定量法を検討した。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 標準品および試薬

MCFG, M1, M2 および FR 195743 (内標準物質 (IS)) は, 藤沢薬品工業 (株) で合成されたものを用いた (Fig. 1)。

アセトニトリルおよびエタノールは HPLC 用 (和光純薬工業および林純薬工業) を, その他の試薬は試薬特級を試験に使用した。

#### 2. 標準溶液の調製

2.5 mg 相当 (力価換算値) の MCFG, M1 および M2 を精秤し, エタノールに溶解して 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液 (保存溶液) を調製した後, -20 $^{\circ}\text{C}$  で保存した。各保存溶液は, 401 日間安定であった。検量線作成時には各保存溶液を等量混合後, エタノールで希釈してそれぞれの濃

度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の混合溶液を調製した。この溶液をエタノールで順次希釈して 2.5, 1, 0.25 および 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の混合溶液を調製した。また, MCFG のみ定量の上限が異なるため, 別途 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液をエタノールで希釈して 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶液を調製した。

IS としては FR 195743 を 1 mg 精秤し, 50% (v/v) アセトニトリル/0.02 mol/L リン酸二水素カリウム水溶液に溶解して全量を 10 mL とし, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液を調製し, 4 $^{\circ}\text{C}$  で保存した (保存溶液)。この溶液を 50% (v/v) アセトニトリル/0.02 mol/L リン酸二水素カリウム水溶液で希釈し, 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液を調製して IS 溶液とした。なお, 保存溶液は, 401 日間安定であった。

#### 3. 前処理法

リン酸添加ヒト血漿\* 0.05 mL にエタノール 0.05 mL, IS 溶液 0.05 mL およびアセトニトリル 0.05 mL を添加し, 約 10 秒間ミキサーで混合した後, 10,000 rpm で 1 分間遠心分離した。上清 100  $\mu\text{L}$  を 0.02 mol/L リン酸二水素カリウム水溶液 200  $\mu\text{L}$  と混合し, その 75  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入した。

\*MCFG および代謝物の安定化のために, ヒト血漿 1 mL に対し, 水で 3 倍希釈したリン酸を 10  $\mu\text{L}$  の割合で添加したもの

#### 4. HPLC 条件

血漿から抽出された MCFG, M1 および M2 は, 逆相系の TSKgel ODS-80 TM ( $\phi$  4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ,

\*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

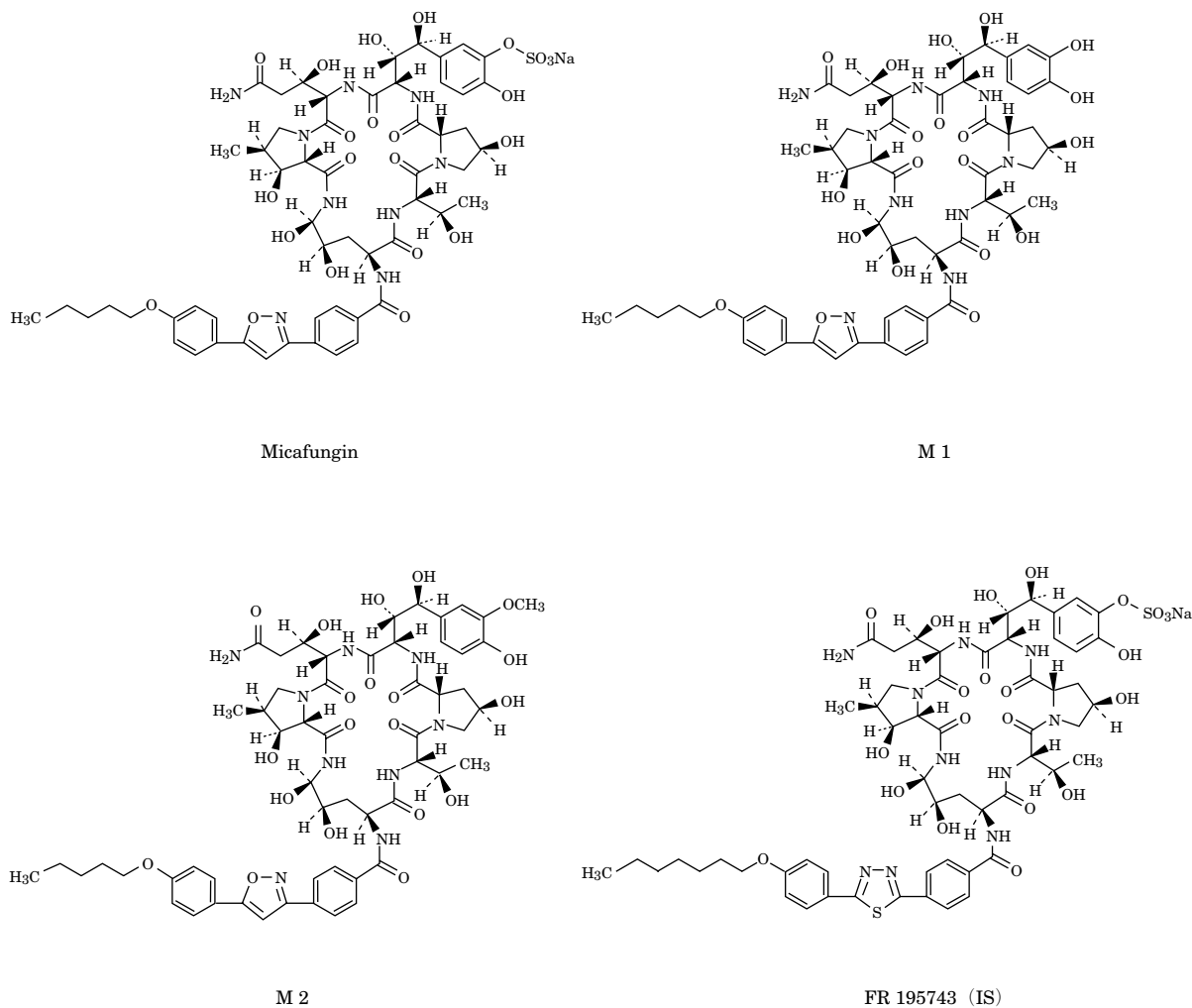


Fig. 1. Chemical structures of micafungin, its metabolites, M 1 and M 2, and internal standard (FR 195743).

Tosoh) を装着した HPLC システム (ポンプ: LC-10 AD (Shimadzu), 自動注入器: WISP 710 B (Waters)) に注入した後, 821 FP 型蛍光検出器 (Ex: 273 nm, Em: 464 nm, Jasco) を用いて検出し, Chromatopac CR 3 A (Shimadzu) を用いて記録した。移動相は 0.02 mol/L リン酸二水素カリウム/アセトニトリル (59/41 (v/v)) を 1 mL/min の流速で送液して, カラム温度は 50°C に設定した。

#### 5. 検量線

前処理法においてエタノールの代わりに, 検量線用標準溶液を添加して定量操作を行い, 得られた内標準物質に対する MCFG, M 1 および M 2 のピーク高さ比 (Y) と濃度 (X) の関係 ( $Y = aX + b$ ) を最小二乗法により求め, 検量線を作成した。重みは  $1/Y$  を用いた。なお, 検量線は MCFG については 0.05~25  $\mu\text{g/mL}$ , M 1 および M 2 については 0.05~10  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲で作成した。

#### 6. 特異性

異なる 6 個体のヒトから得られたブランク血漿に所定量のリン酸を添加した後, 本法にしたがい分析し, ク

ロマトグラム上の MCFG, M 1, M 2 および内標準物質の溶出位置における妨害ピークの有無を確認した。また, リン酸添加ブランク血漿と MCFG, M 1, M 2 および内標準物質を添加したリン酸添加血漿を用い, クロマトグラム上のピーク形状および分離の比較を行った。

#### 7. バリデーション

MCFG, M 1 および M 2 の 3 化合物の濃度が 0.05, 1 および 10  $\mu\text{g/mL}$  となるように添加したリン酸添加血漿を各 5 本ずつと, MCFG を 25  $\mu\text{g/mL}$  となるよう添加したリン酸添加血漿を 5 本調製し, 同時に作成した検量線から濃度を求め, 真度および精度を算出した。同時再現性の試験を 3 日間行い, 日差再現性を評価した。

#### 8. 安定性

ヒトブランクプール血液およびリン酸添加血漿に MCFG, M 1 および M 2 を添加後の室温, 氷冷および 4°C 保存下における全血中安定性, 室温, 氷冷, -20 および -80°C 凍結保存下における血漿中安定性, -20°C 凍結・融解時 (4 回) における血漿中安定性について検討した。血漿を前処理後の HPLC 注入試料の室温での安定性についても検討した。

## II. 結 果

ブランク血漿およびMCFG, M1, M2とISの添加血漿のクロマトグラム例をFig. 2に示した。MCFG, M1, M2およびISのリテンションタイムは、それぞれ約10.2分, 13.1分, 14.1分および18.8分であり、ブランク血漿のクロマトグラム上には定量を妨害するピークは認められず、ピーク形状も良好であった。

ヒト血漿からの検量線をFig. 3に示した。MCFGは0.05~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で、M1およびM2は0.05~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で、ISに対するMCFG, M1およびM2のピーク高さ比(Y)と濃度(X)との間に、相関係数が0.999以上とそれぞれ良好な直線関係が得られた。

同時再現性および日差再現性の結果をTable 1に示した。同時再現性の結果、MCFGの真度は-3.6%~4.0%, 精度はC.V.値7.1%以下, M1の真度は-1.4%~6.0%, 精度はC.V.値6.1%以下, M2の真度は-6.0%~8.0%, 精度はC.V.値5.8%以下であり、良好であ

った。日差再現性においても、MCFGの真度は-3.0%~2.0%, 精度はC.V.値4.3%以下, M1の真度は-0.4%~2.0%, 精度はC.V.値4.3%以下, M2の真度は-1.2%~0.7%, 精度はC.V.値7.2%以下であり、良好であった。

ヒト全血および血漿中MCFG, M1およびM2の安定性試験の結果をTable 2に示した。MCFG, M1およびM2はヒト全血中で室温および氷冷下4時間まで、4℃保存下72時間まで安定であった。また、MCFG, M1およびM2はリン酸添加ヒト血漿中で氷冷下6時間まで安定であった。室温下2時間ではいずれの化合物もほぼ100%の残存率を示したが、6時間後ではM1(2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の残存率が80.6%となったのをはじめ3化合物とも減少傾向にあった。MCFG, M1およびM2はリン酸添加ヒト血漿中で-80℃凍結保存下413日まで安定であった。-20℃下ではMCFGおよびM2は同様413日まで安定であったが、M1は0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$

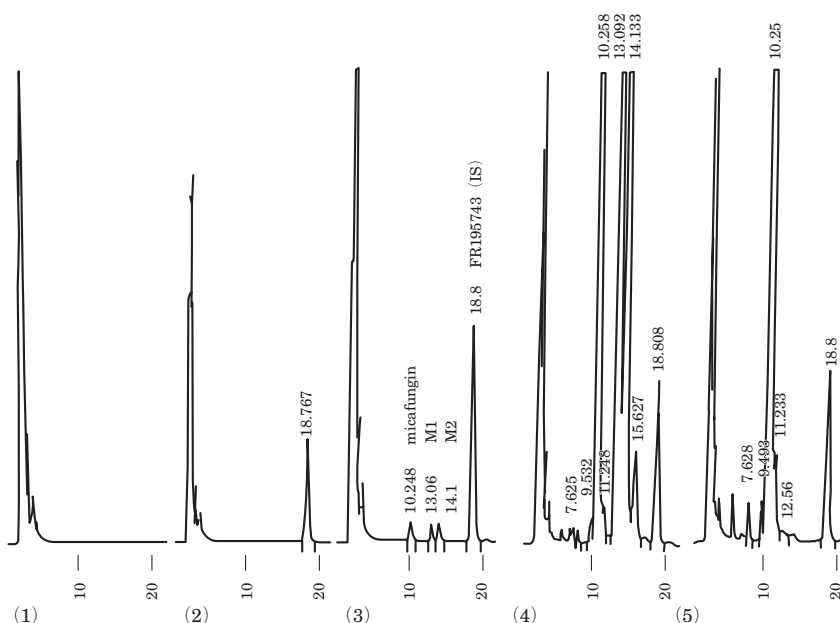


Fig. 2. Representative chromatograms. (1) control plasma, (2) control plasma spiked with internal standard, (3) control plasma spiked with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of micafungin, M1, M2 and internal standard (4) control plasma spiked with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of micafungin, M1, M2 and internal standard, (5) control plasma spiked with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of micafungin, M1, M2 and internal standard.

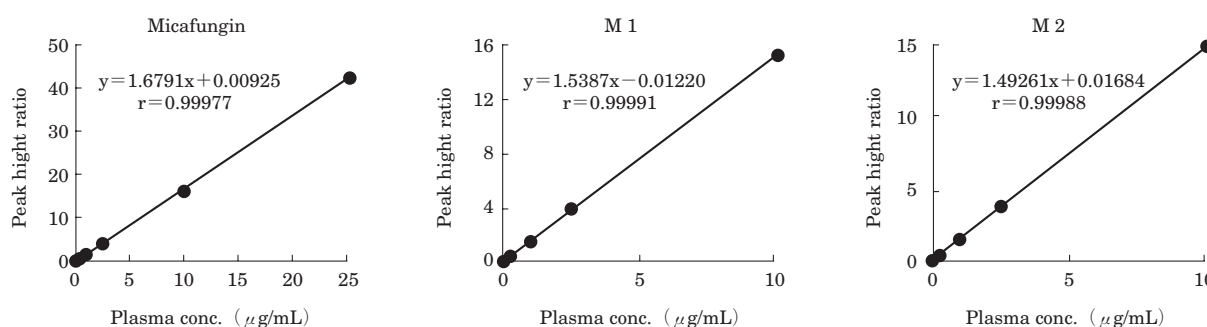


Fig. 3. Typical calibration curves for the determination of micafungin and its metabolite, M1 and M2, in plasma.

Table 1. Intra-day and inter-day precision and accuracy for the determination of micafungin and its metabolite, M 1 and M 2, in plasma

Compound	Nominal conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Day	Intra-day			Inter-day			
			assayed conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	precision (%)	accuracy (%)	assayed conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	precision (%)	accuracy (%)	
Micafungin	0.05	1	0.052	7.1	4.0	0.051	4.3	2.0	
		2	0.051	1.4	2.0				
		3	0.051	3.2	2.0				
	1	1	0.970	0.6	-3.0	0.987	1.9	-1.3	
		2	0.984	1.0	-1.6				
		3	1.006	1.6	0.6				
	10	1	9.640	1.3	-3.6	9.703	1.2	-3.0	
		2	9.801	1.1	-2.0				
		3	9.669	0.7	-3.3				
	25	1	24.944	1.5	-0.2	25.070	1.4	0.3	
		2	25.094	1.4	0.4				
		3	25.174	1.7	0.7				
	M 1	0.05	1	0.053	3.2	6.0	0.051	4.3	0.2
			2	0.051	6.1	2.0			
			3	0.050	2.3	0.0			
1		1	0.986	0.4	-1.4	0.996	1.6	-0.4	
		2	0.990	0.9	-1.0				
		3	1.013	1.7	1.3				
10		1	10.048	1.1	0.5	9.972	1.1	-0.3	
		2	9.975	0.8	-0.3				
		3	9.892	0.8	-1.1				
0.05		1	0.048	5.8	-4.0	0.05	7.2	0.0	
		2	0.054	3.1	8.0				
		3	0.047	4.6	-6.0				
M 2		1	1	1.007	0.5	0.7	1.007	1.6	0.7
			2	0.991	1.0	-0.9			
			3	1.022	1.4	2.2			
	10	1	9.997	1.3	0.0	9.880	1.4	-1.2	
		2	9.804	1.2	-2.0				
		3	9.840	1.0	-1.6				

Mean $\pm$ S.E., n = 5 (intra-day) or n = 15 (inter-day)

で21日目に95.8%であったのが49日目には59.5%に、2.5  $\mu\text{g/mL}$ では105日目まで96.4%以上であったのが153日目には41.3%にそれぞれ急激に減少し、その後は緩やかに減少していった。また、リン酸添加ヒト血漿中MCFG, M 1およびM 2は4回の凍結融解に対して安定であり、HPLC測定試料を室温で24時間放置しても安定であった。

### III. 考 察

MCFGは*Candida*および*Aspergillus*属に対して強い抗真菌作用を有する抗真菌薬であり、その活性代謝物として*Candida*属および*Aspergillus*属に対してMCFGよりやや低い活性を有するM 1および同等の活性を有するM 2が知られている<sup>1,2)</sup>。そこで今回の試験では、MCFGとその代謝物であるM 1およびM 2の血漿中濃度同時定量法について検討した。なお、MCFGは弱塩基性下で不安定であるため、試験にはあらかじめ

リン酸を添加した血漿を用いた。前処理は $\text{CH}_3\text{CN}$ による除蛋白のみであるが、蛍光検出器(Ex: 273 nm, Em: 464 nm)を用いてMCFG, M 1およびM 2をモニターするため、特異性についての問題はなかった。バリデーションの結果、MCFGは0.05~25  $\mu\text{g/mL}$ 、M 1およびM 2は0.05~10  $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な精度および正確さを有することが明らかとなった。さらに、同様な方法によりマウス、ラットおよびイヌなどの実験動物の血漿にも適応可能であった(未発表データ)。また、血液中および血漿中安定性試験より、採血後の血漿分離、測定までの一連の操作をする間に特に安定性の面での問題は認められなかった。ただし、 $-20^\circ\text{C}$ で保存した時の血漿中M 1濃度は経時的に低下したので、血漿試料は $-80^\circ\text{C}$ で保存する必要があると考えられた。

以上より、本定量法はMCFG, M 1およびM 2のヒト血漿中濃度同時定量法として、簡便でありかつ十分信

Table 2. Stability of micafungin and its metabolites, M 1 and M 2

Sample	Condition	Time	Nominal conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Residual (%)			
				micafungin	M 1	M 2	
Blood	room temperature	2 h	0.25	97.1	97.5	97.9	
		4 h		93.9	94.2	95.1	
		2 h	2.5	101.6	97.9	99.8	
		4 h		97.3	96.0	96.5	
	ice-cold bath	4 h	0.25	102.6	101.1	102.1	
				2.5	102.8	100.6	102.2
	4°C	18 h	0.1		96.2	104.0	93.9
		48 h		100.8	99.0	98.6	
		72 h		99.8	95.7	92.3	
		18 h	0.5	101.1	97.9	96.5	
		48 h		100.0	100.1	97.2	
		72 h		98.5	103.0	98.2	
	Plasma	room temperature	2 h	0.25	100.0	104.2	99.6
			6 h		89.3	92.4	89.5
2 h			2.5	100.4	99.2	99.4	
6 h				89.7	80.6	90.2	
ice-cold bath		6 h	0.25	99.6	97.0	98.7	
				2.5	99.7	93.2	99.0
-20°C		21 day	0.25		100.4	95.8	104.4
		49 day		103.2	59.5	107.9	
		54 day		94.0	50.0	96.5	
		105 day		92.9	47.7	102.6	
		153 day		86.5	48.1	89.1	
		413 day		96.8	28.0	93.9	
		21 day	2.5	102.4	104.7	105.7	
		49 day		106.1	104.4	108.7	
		54 day		101.7	104.4	100.6	
		105 day		103.9	96.4	107.5	
		153 day		95.2	41.3	90.7	
		413 day		98.0	31.2	95.9	
-80°C	54 day	0.25	99.2	98.9	102.2		
	105 day		87.7	99.2	95.6		
	153 day		94.8	90.9	97.4		
	413 day		109.9	95.8	92.6		
	54 day	2.5	104.2	98.9	102.4		
	105 day		96.8	99.2	100.2		
	153 day		96.3	94.6	93.6		
	413 day		98.0	97.2	95.0		
freeze/thraw	4 times	0.25	92.5	95.1	91.3		
			2.5	100.3	93.6	94.9	
Extracted plasma	room temperature	24 h		1	103.1	103.7	104.2

Mean $\pm$ S.E., n = 3

頼できる定量法であることが確認された。

#### 文 献

- 金子勇人, 山戸康弘, 寺村有理子, 他: イヌおよびラットにおける micafungin の代謝物。日化療会誌 50(S

-1): 88~93, 2002

- 池田文昭, 大友寿美, 岩井芳美: Micafungin の代謝物 M 1, M 2 および M 5 の抗真菌活性。日化療会誌 50 (S-1): 54~57, 2002

Simultaneous determination of antifungal drug, micafungin, and its two active metabolites in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

Yasuhiro Yamato, Hayato Kaneko, Kaori Tanimoto,  
Masataka Katashima, Koji Ishibashi, Akio Kawamura,  
Masato Terakawa and Akira Kagayama

Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

A sensitive and specific HPLC method has been developed and validated for a new antifungal drug micafungin (MCFG) and its metabolites, M 1 (catechol form) and M 2 (methoxy form) in human plasma. The assay employs protein precipitation with acetonitrile for human plasma, to which phosphoric acid is added for the purpose of stabilization of MCFG, and utilizes fluorescence detection of MCFG and its metabolites. The method provides a linear response from a quantification limit of 0.05 to 25  $\mu\text{g/mL}$  for MCFG and 0.05 to 10  $\mu\text{g/mL}$  for M 1 and M 2 using 50  $\mu\text{L}$  of plasma. The intra-assay and inter-assay precision and accuracy were shown to be acceptable for the pharmacokinetic study. Furthermore, in the matrix for HPLC analysis, MCFG, M 1 and M 2 are stable for over 24 h at room temperature. The stability study showed that MCFG, M 1 and M 2 are stable for up to 72 h at 4°C in blood, and in plasma up to 2 h at room temperature and 6 h under ice-cold conditions. Additionally, these compounds are stable in plasma for up to 21 day at -20°C and 413 day at -80°C, and can be frozen and thawed 4 times without loss of stability.