[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
21(4) 365-369 (1995)

HPLC による血中ミコナゾール濃度測定法の検討と臨床応用

長谷川洋一*†¹, 野呂岳志†¹, 水野宗道†¹,
近藤栄治†², 服部満美子†², 中原洋介†²,
津下圭太郎†², 内海 真†², 田中正夫†²
国立名古屋病院薬剤科†¹, 同血液内科†²

Measurement of Miconazole Serum Concentration in High-performance Liquid Chromatography

YOICHI HASEGAWA*†¹, TAKESHI NORO†¹, MUNEMICHI MIZUNO†¹,
EIJI KONDO†², MAMIKO HATTORI†², YOSUKE NAKAHARA†²,
KEITARO TSUSHITA†², MAKOTO UTSUMI†² and MASAO TANAKA†²

Department of Pharmacy, National Nagoya Hospital†¹
Blood Disease Center, National Nagoya Hospital†²

(Received October 7, 1994)
(Accepted May 15, 1995)

Miconazole (MCZ) serum concentration was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). We assessed whether the internal standard method produced on intra-assay error, and found that the method gave more precise and more reproducible results than absolute calibration curve method. With 0.5 µg/ml of MCZ, the coefficient of variation produced by that method was 3.41%, whereas that of the absolute calibration curve method was 5.20%. The concentrations of absolute calibration curve method showed higher values than the internal standard method. This indicated that the internal standard method was far more precise in measuring the MCZ serum concentrations than was the absolute calibration curve method.

Keywords—miconazole (MCZ), high-performance liquid chromatography (HPLC), absolute calibration curve method, internal standard method

はじめに

造血器疾患において合併する真菌感染症は、重篤かつ致死的な経過をとることで問題である。したがって、真菌感染症の早期診断が望まれ、抗真菌剤の適正な使用と¹⁻³⁾、真菌症の予防も重要である。

ミコナゾール (MCZ) は抗菌活性に優れ、耐性

を獲得しにくい薬剤として繁用されている。そこで、MCZ の血清中濃度測定法について内部標準法を用いた測定法を検討し、24時間持続点滴投与方法における血清中濃度測定に適用した。

実験材料および方法

1. 試薬

MCZ の標準品は持田製薬株式会社より恵与され、内部標準物質の Econazole (以下 ECZ) は SIGMA 社製を、そしてジエチルエーテルは片山

†^{1,2} 名古屋市中区三の丸4-1-1; 4-1-1, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, 460 Japan

化学工業製を用いた。

アセトニトリル、メタノールは片山化学工業製 HPLC 用を用い、Mobile Phase Modifier として Radial-Pak Reagent D4 (Di-Butyl Amine Phosphate: 以下 D4) は Waters 製のものを使用した。

添加血清は BIO-RAD 社製の Drug Free Serum Lyphochek を用いた。

2. 測定方法

1) 検体処理

血清 1ml および内部標準物質 (ECZ) 100 μ l (10 μ g/ml) を正確に 10ml 共栓試験管にとり、水 1ml および 2N-NaOH 溶液 0.1ml を加えて混合し、更にジエチルエーテル 5ml を正確に加えて、振とう機で10分間振とうした。2000rpm, 5分間遠心分離後、ジエチルエーテル層 4ml を正確にカルチャーチューブに分取し、40°C で蒸発乾固した。冷却後、残渣にメタノール 0.2ml を加えて溶解し、その 20 μ l を測定試料とした。絶対検量線法は内部標準物質を加えず同様に抽出を行った。

2) HPLC

ポンプは Waters 510 HPLC Pump, 検出器は Waters 484 Tunable Absorbance Detector,

カラムヒータは Waters RCM-100, 試料注入は Waters WISP 710B, 定量計算には Waters QA-1TM Data System を用いた。

カラムは Waters : Nova Pack C18 (8mm $\times$ 10cm) を使用した。移動相は 10mM D4/MeOH (200/800, v/v) を用い、流速 1.0ml/min, カラム温度 50°C, 230nm (0.32AUFS) で検出した。

3) 精度

0.5, 1, 2, 5, 10 μ g/ml の濃度になるよう MCZ を Drug Free Serum に添加した。各濃度につき 5 回測定し、絶対検量線法および内部標準法について各々の回収率、再現性を調べ、比較した。

3. 24時間持続点滴投与法

1) 患者

腎機能、肝機能の正常な悪性リンパ腫および急性骨髄性白血病の患者で、化学療法治療中の深在性真菌症が疑われる中心静脈栄養 (以下 IVH) 施行患者 2 例を被検者とした。

2) 薬剤投与計画

MCZ (フロリード F 注) 1200mg をハイカリック 2 号, プロテアミン 12X, ネオラミンマルチ, アデラビン 9 号およびケイツー N を配合した高カロリー輸液内に混合し、24時間の IVH 投与を 7 日間行った。

Fig. 1. Chromatogram of Miconazole (MCZ) from (A) Standard Solution, and (B) Patient Serum

3) 採血

持続点滴開始から1, 2, 4, 6, 10, 18, 24 (1日), 48 (2日), 96 (4日), 168 (7日) 時間後の計9ポイント採血を行った。採血は血清分離剤を含まない採血管にて全血を採取し, 3000rpm, 5分間遠心分離後, 得られた血清を測定検体に用いた。

結 果

1. 精度

本法により得られたクロマトグラムは, Fig. 1に示した。絶対検量線法に基づく回収率 (Table 1) は, 平均103.85%で, 変動係数は $0.5\mu\text{g/ml}$ の5.20%が最も大きかった。さらに, $0\sim 10\mu\text{g/ml}$ において相関係数0.9983, 回帰式 $y=1.075\times 10^{-6}x-0.045$ の直線性が認められた (Fig. 2)。

内部標準法による結果は, 変動係数が最も高い

ものでも3.41%と絶対検量線法に比べ小さかった (Table 2)。回収率は, 平均102.66%の結果となった。また, $0\sim 10\mu\text{g/ml}$ において相関係数0.9999, 回帰式 $y=1.011\times -0.011$ の直線性が認められた (Fig. 3)。

2. 24時間持続点滴投与法

血清中 MCZ 濃度を2症例について測定した。症例1では48時間後まで血清中濃度が上昇し続けその後低下する傾向が認められた。しかし, 96時間以降168時間後まで次第に血清中 MCZ 濃度が低下する傾向が認められた (Fig. 4)。また, 症例2では, 投与後12時間でほぼ定常状態に達した (Fig. 5)。2症例とも絶対検量線に基づく濃度は本法に比べ濃度が高くなる傾向が認められた。

考 察

絶対検量線に基づく MCZ の血中濃度測定法

Table 1. Precision of HPLC in Drug Free Serum Spiked MCZ

conc. ($\mu\text{g/ml}$)	mean ($\mu\text{g/ml}$)	S.D. ($\mu\text{g/ml}$)	C.V. (%)	recovery (%)
0.5	0.48	0.03	5.20	102.00
1	1.02	0.03	3.29	107.17
2	2.07	0.08	3.83	101.49
5	5.19	0.17	3.24	98.90
10	10.83	0.35	3.18	109.69

n=5

Fig. 2. Standard Curve from Drug Free Serum Spiked with MCZ

Table 2. Precision of HPLC in Drug Free Serum Spiked MCZ with Internal Standard

conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	mean ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S. D. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C. V. (%)	recovery (%)
0.5	0.49	0.02	3.41	96.15
1	0.92	0.03	3.03	109.10
2	1.98	0.07	3.34	102.47
5	4.94	0.10	2.11	105.61
10	9.88	0.17	1.71	99.99

n=5

Fig. 3. Standard Curve from Drug Free Serum Spiked with MCZ and ECZ as Internal Standard

Fig. 4. MCZ Serum Concentration from Case 1 of Patients
....., absolute calibration curve method
——, internal standard method

は、その抽出過程でジエチルエーテルを使用するなど溶媒の高い揮発性から測定者や測定時期による値の誤差が生じる可能性が考えられた。そこで内部標準法による血清中 MCZ 濃度測定法を検討

した。内部標準法では変動係数は小さいが、絶対検量線法に基づく濃度に比べ低値を示した。これは、変動係数のバラツキが大きかった絶対検量線法に比べ、バラツキの小さい内部標準法による値

Fig. 5. MCZ Serum Concentration from Case 2 of Patients
 , absolute calibration curve method
 — , internal standard method

の方が測定値の信頼度が高いと考えられる。さらに、MCZのMICは、菌種によっても異なるが $0.04 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ 以下⁴⁾であり、濃度的にも低濃度域であることから、変動係数のバラツキが大きい絶対検量線法より内部標準法を用いて測定を行う方が臨床的に意義があると考えられる。

次に、実際の投与方法であるが一般には、生食または5%ブドウ糖液に希釈し、初回200mgより開始し、以後1回200~400mgを1日1~3回、30~60分以上かけて点滴静注することになっている。しかし、悪心・嘔吐等の副作用の発現頻度が高い。そこで、MIC以上の濃度を持続的に維持させること、副作用を軽減することを目指し、IVHからの24時間持続点滴投与を試みた。今回、報告した2症例はいずれも血液疾患の癌化学療法実施後の重症感染症を併発し、起因菌の同定ができなかった症例である。2症例における絶対検量線法に基づく値は、内部標準法による値に比べて高値を示す傾向が認められた。また、いずれの症

例もMIC濃度に達しており、かつ悪心・嘔吐は認められず、順調に経過した。悪心・嘔吐が投与方法や血中濃度と相関するとすればMCZの血清中濃度の測定は、MICを測定することと同様に意義があると考えられる。今後、副作用と血清中濃度との相関性を検討することが望まれる。

文 献

- 1) 佐野元春, 秋本佳久, 坂下暁子, 中牧 剛, 日野研一郎, 鈴木和郎, 友安 茂, 鶴岡延熹, 化学療法の領域, 5, 119-124 (1989).
- 2) 日野研一郎, 松田 功, 山田一成, 久武純一, 横山明弘, 佐野元春, 友安 茂, 鶴岡延熹, 化学療法の領域, 9, 138-143 (1993).
- 3) 影山慎一, 西井一浩, 片山直之, 田中 泉, 豊田英樹, 南川光三, 脇田喜弘, 和田英夫, 西川政勝, 小林 透, 南 信行, 出口克己, 白川 茂, 新薬と臨床, 42, 1438-1440 (1993).
- 4) 平谷民雄, 山口英世, *Chemotherapy*, 32, 534-540 (1984).