

## 【原著・基礎】

## Telithromycin の体液内測定法に関する研究

山崎 浩子<sup>1)</sup>・土田 晃敬<sup>1)</sup>・小幡 淳雄<sup>1)</sup>・鈴木 恵美<sup>1)</sup>Dupront A<sup>2)</sup>・Cousse diere D<sup>2)</sup>・Pascual M H<sup>2)</sup>・三浦 公道<sup>3)</sup><sup>1)</sup>アベンティスファーマ株式会社研究開発本部開発研究所薬物動態研究室\*<sup>2)</sup>Department of Pharmacokinetics, Aventis Pharma<sup>3)</sup>株式会社三菱化学ビーシーエル治験研究部薬物動態グループ

Telithromycin (TEL) のヒト体内動態を検討するにあたり、微生物学的定量法 (bioassay 法)、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法) および高速液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC/MS/MS 法) を開発し、それぞれの分析法についてバリデーションを行った。Bioassay 法は、検定菌に TEL に対して高い感受性を示し、かつ特異性の高い *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を選択し、検定培地に Heart infusion agar (pH 9.0) を用いたアガーウェル拡散法を開発した。バリデーション試験の結果、本法は、ヒト血漿および尿試料において、測定範囲 0.002~0.032  $\mu\text{g eq/mL}$  で良好な精度および真度を示した。定量下限はそれぞれ 0.002 および 0.004  $\mu\text{g eq/mL}$  であった。HPLC 法は、血漿をアセトニトリルで除蛋白後、逆相条件下で分離した化合物を蛍光測定 (励起波長: 263 nm 測定波長: 460 nm) した。この方法の定量下限は、血漿 300  $\mu\text{L}$  を使用して 0.005  $\mu\text{g/mL}$ 、尿 50  $\mu\text{L}$  を使用して 0.5  $\mu\text{g/mL}$  であり、定量範囲はそれぞれ 0.005~1.0  $\mu\text{g/mL}$  および 0.5~100  $\mu\text{g/mL}$  であった。LC/MS/MS 法は、逆相条件下で HPLC 分離後、APCI イオン化法で質量分析した。本法による TEL の定量範囲は、血漿 50  $\mu\text{L}$  を使用して 5~3,000 ng/mL であり、定量下限は 5 ng/mL であった。TEL の安定性を検討した結果、血液中では採血後室温または 4°C で 4 時間、血漿中では、約 -20°C で 12 か月間、尿中では、約 -25°C で 6 か月間安定であった。

**Key words:** telithromycin, bioassay, HPLC, LC/MS/MS, plasma, urine

Telithromycin (TEL) は、フランス、アベンティスファーマ社において合成された新規のケトライド系経口抗菌薬である。今回、TEL の体内動態を検討するにあたり、微生物学的定量法 (bioassay 法)、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法) および高速液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC/MS/MS 法) を開発し、それぞれの方法についてバリデーションならびに生体試料中における安定性を検討したので報告する。

### I. 材料と方法

#### 1. 微生物学的定量法 (bioassay 法)

##### 1) 被験物質

TEL はフランス、アベンティスファーマ社より供与を受け、力価 96.8% 以上のものを使用した (Fig. 1)。

##### 2) 試薬

リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウム、酢酸は試薬特級を使用した。

##### 3) 生体試料

ヒト血漿およびヒト尿は、健康成人より採取したものをプールして使用した。

##### 4) 検量線用標準溶液の調製

TEL を精密に秤量し、少量の酢酸および水で溶解後、

5% ウマ血清含有リン酸緩衝液 (pH 8.0, 1/15 mol/L リン酸塩緩衝液に 5% ウマ血清を含有したもの)、またはヒト血漿で適宜希釈し、検量線用標準溶液を調製した。

##### 5) validation 用試料の調製

既知量の TEL 溶液にヒト血漿を添加し、低、中、高濃度の溶液を調製した。これとは別に、中間濃度のものを補正用標準液 (IS) として調製した。

##### 6) 検定培地

水に Heart infusion agar (HIA, 日本製薬) を懸濁し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH を 9.1~9.2 に調製し、高圧蒸気滅菌後使用した。

##### 7) 検定菌液の調製

37°C で 24 時間培養した HIA 培地上の *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を掻き取り、滅菌生理食塩水に懸濁し、600 nm での透過率が 7~8% の懸濁液とし試験に供した。

##### 8) 検定方法

検定培地 100 mL につき検定菌液 1 mL を接種後、直径 90 mm のプラスチックシャーレに 12 mL ずつ分注し、水平下固化された後、モノホールパンチャー (東洋測器) で 6 個の直径 6 mm の agar well を作成した。寒

\*埼玉県川越市南台 1-3-2

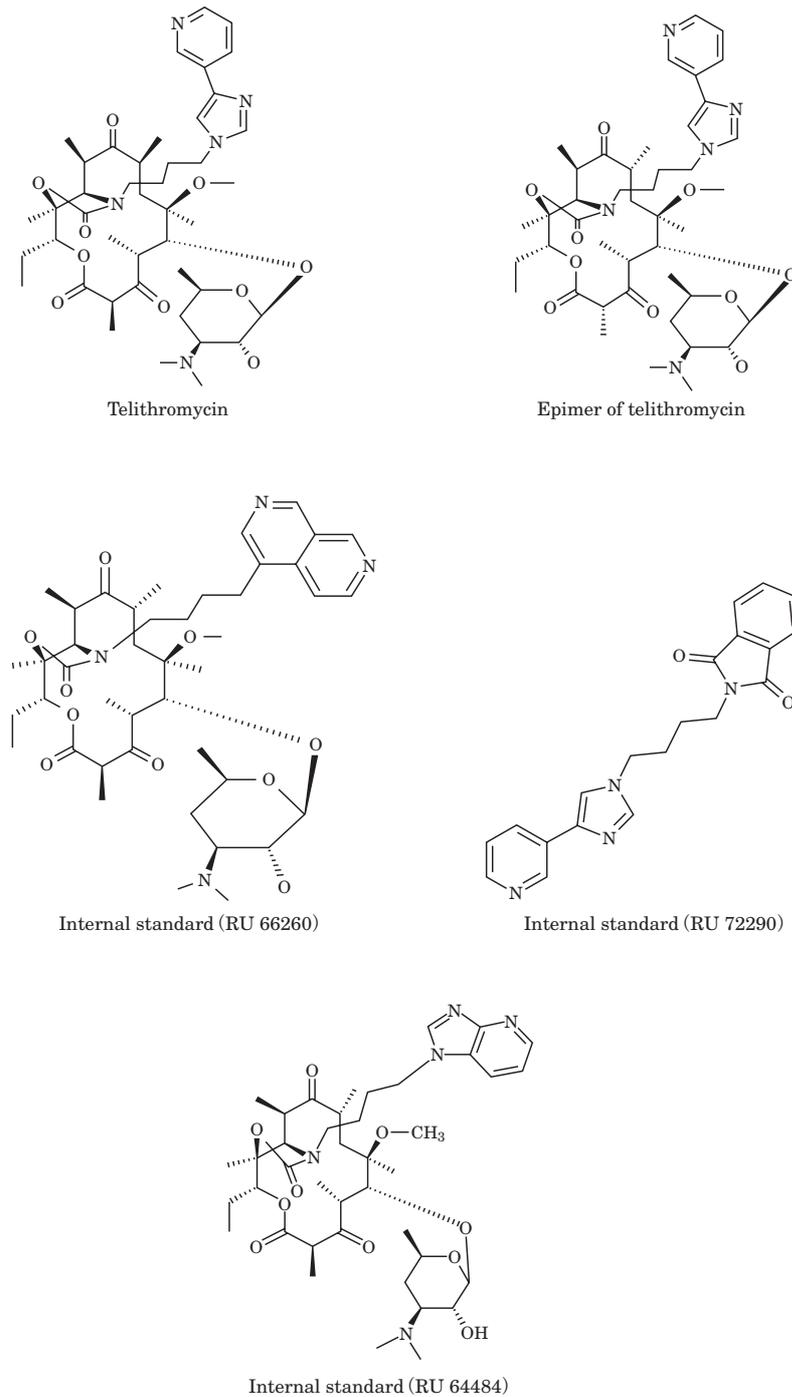


Fig. 1. Chemical structures of telithromycin and internal standards.

天平板の6個の agar well に IS と 2 種の検液をそれぞれ対角をなすように添加し、1 濃度あたり 8 個の well に添加した。37℃ で約 16 時間培養した後、得られた阻止円の直径を測定し、寒天平板間の差を IS にて補正後、作成した検量線から試料中の薬物濃度を求めた。

尿は種々の因子により pH や組成が変動し、また、TEL の尿中濃度が高いことから希釈が必要と考えられた。そこで、検量線用標準溶液および試料希釈溶液として、前述のヒト血漿中濃度測定法において使用した 5% ウマ血清含有リン酸塩緩衝液を用い、ヒト血漿中濃度測定法

に準じて検討した。

希釈倍率の検討は、ヒトプール尿を 5% ウマ血清含有リン酸塩緩衝液で 2, 5 および 10 倍希釈またはヒトプール尿で希釈したときの測定誤差について検討した。

## 2. 高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法)

### 1) 被験物質

TEL および内標準物質 (血漿; RU 66260, 尿; RU 72290) はフランス、アベンティスファーマ社で合成したものをを使用した (Fig. 1)。

### 2) 試薬

アセトニトリル (特級, Carlo Erba), 酢酸アンモニウム (特級, Merck), メタノールおよびエタノール (特級, Carlo Erba)

### 3) 生体試料

ヒト血漿は市販ヒト血漿 (CDTR Pontoise) を使用し, ヒト尿は, 健康成人より採取したものをを使用した。

### 4) 検量線用標準溶液および QC 用溶液の調製

血漿中濃度測定には TEL の一定量を秤量し, エタノールで溶解後, ヒト血漿にて適宜希釈し 8 系列の溶液を調製した。さらに同様に TEL を秤量, 希釈し, 3 系列の QC 用溶液を調製した。

内標準物質はアセトニトリルにて溶解し, 使用時にさらにアセトニトリルで希釈して使用した。

検量線用標準溶液および QC 用溶液 300  $\mu$ L に 3 倍量のアセトニトリルおよび内標準溶液 250  $\mu$ L を加え, ミキサーで 2 分間混合し除蛋白した。上清を試験管に移し, 窒素ガス下で乾固し, この乾燥残渣を 0.05 mol/L 酢酸アンモニウム: メタノール/アセトニトリル (29/24, v/v) = 60 v : 40 v の混合液 150  $\mu$ L で再度溶解し, HPLC にて分析した。

尿中濃度測定には一定量の TEL をアセトニトリルで適宜希釈し, ヒト尿で 8 系列の検量線用標準溶液を調製した。同様に 3 系列の QC 用溶液を調製した。

この検量線用標準検体および QC 用溶液 50  $\mu$ L に内標準溶液 20  $\mu$ L を加え, さらに 0.05 mol/L 酢酸アンモニウム: メタノール/アセトニトリル (29/24, v/v) = 60 v : 40 v の混合液 450  $\mu$ L と混合し, HPLC にて分析した。

### 5) HPLC 分析条件

カラム; Purospher RP-18 e 5  $\mu$ m (Merck), 125  $\times$  4.0 mm

ガードカラム; Purospher RP-18 e (Merck), 4.0  $\times$  4.0 mm

移動相; 0.05 mol/L 酢酸アンモニウム: メタノール: アセトニトリル = 52 v : 29 v : 24 v

流速; 1 mL/分

検出器; 蛍光測定—励起波長 263 nm, 発光波長 460

nm

### 3. 高速液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC/MS/MS 法)

#### 1) 被験物質

TEL および内標準物質 (RU 64484) はフランス, アベンティスファーマ社で合成されたものを使用した (Fig. 1)。

#### 2) 試薬

ギ酸および酢酸アンモニウムおよびアンモニア水は特級試薬を, メタノールおよびアセトニトリルは HPLC 用を用いた。

#### 3) 生体試料

ヒト血漿は健康成人から採取したもの, あるいは市販のヒト血漿 (コージンバイオ) を用いた。

#### 4) カラム

Symmetry C 18 3.5  $\mu$ m 4.6 mm  $\phi$   $\times$  75 mm (Waters)

#### 5) クロマトグラフ条件

流速; 1.0 mL/min.

カラム温度; 40°C

ニードル洗浄液; 50% メタノール溶液

洗浄量; 針内部-1 mL, 針外部-1 mL, 注入口-2 mL

保持時間; 4.5 分

保持時間; TEL = 約 3.8 分

内標準物質 = 約 3 分

注入量; 20  $\mu$ L

#### 6) 質量分析条件

イオン化モード; APCI

検出モード; Positive

測定モード; Selected reaction monitoring (SRM)

モニタリングイオン;

TEL m/z 812.7  $\rightarrow$  655.5

内標準物質 m/z 786.6  $\rightarrow$  629.7

コリジョンオフセット電圧; -30 eV

ヒータヘッドキャピラリー温度; 240°C

コロナ電流; 5  $\mu$ A

ベーパーライザー; 530°C

マルチプライヤー電圧; 1, 100 V

Table 1. Validation items for each assay method

Study item	Bioassay		HPLC		LC/MS/MS
	plasma <sup>a)</sup>	urine	plasma	urine	plasma
Specificity	○	○	○	○	○
Standard curve	○	○	○	○	○
Within-day and between-day variation	○	○	○	○	○
Dilution	○	○	—	—	—
Stability	○	—	○	○	—

<sup>a)</sup>Plasma and/or whole blood

○: Carried out

## 4. validation 試験

Table 1 に示すように各測定法ごとに特異性, 直線性, 日内, 日間変動における真度, 精度を検討した。また, 血漿中, 尿中における薬物の安定性についても検討した。

## II. 結 果

## 1. 微生物学的定量法 (bioassay 法)

## 1) 血漿中濃度の測定

## (1) 特異性の検討

検定菌である *M. luteus* ATCC 9341 に対する血漿および希釈血漿の阻害活性はみられなかった。

## (2) 検量線の検討

血漿あるいは5%ウマ血清含有リン酸緩衝液で10倍および100倍希釈した血漿をマトリックスとして使用し, いずれも0.002~0.032  $\mu\text{g eq/mL}$  の濃度範囲において最小二乗法による直線回帰の式にあてはめ検量線を作成した。この時の相関係数  $r=0.9970$  以上であり, 逆回帰濃度からの Bias は最大-9.7% であった。

## (3) 日内および日間変動の検討

## ① 血漿の日内および日間変動の検討 (Table 2)

・日内変動 (Within-day variation) の結果, すべての試料において CV は 3.8% 以下, Recovery (mean) は 100.0~106.5% であった。

・日間変動 (Between-day variation) の結果, CV は 4.1% 以下, Recovery は 99.6~106.3% であった。

② 10倍または100倍希釈血漿の日内および日間変動の検討 (Table 3)

・10倍希釈時の日内変動は, 5%ウマ血清含有リン酸緩衝液で10倍希釈した血漿または5%ウマ血清含有リン酸緩衝液をマトリックスとして調製した検量線から validation 用試料を定量することにより検討した。その結果, Recovery (mean) はそれぞれ 92.7~103.2% および 93.1~106.2%, CV はそれぞれ 5.0% 以下および 4.6% 以下を示し, 両者間に差は認められなかった。

・100倍希釈時の日内変動は, 5%ウマ血清含有リン酸緩衝液で100倍希釈した血漿または5%ウマ血清含有リン酸緩衝液をマトリックスとして調製した検量線から validation 用試料を定量することにより検討した。その結果, Recovery (mean) はそれぞれ 93.0~108.1% および 95.3~107.1%, CV はそれぞれ 3.5% 以下および 3.8% 以下を示し, 両者間に差は認められなかった。

以上の結果から, 検量線調製に使用したマトリックスにかかわらず, 10倍および100倍希釈とも日内変動の結果は良好であり, マトリックスによる測定誤差は許容できると判断した。そこで, 日間変動の検討は5%ウマ血清含有リン酸緩衝液で調製した検量線を用い, 5%ウマ血清含有リン酸緩衝液で10倍希釈した validation 用試料のみを3日間測定した。その結果, Recovery (mean) は 102.5~104.3%, CV は 5.4% 以下であった (Table 4)。

## (4) 安定性の検討

0.002~0.032  $\mu\text{g eq/mL}$  の安定性検討用試料を -40

Table 2. Within-day and between-day (3 days) variations in recovery yields (%) of telithromycin in plasma (n=5)

	Within-day ( $\mu\text{g eq/mL}$ )			Between-day (3 days) ( $\mu\text{g eq/mL}$ )		
	0.002	0.008	0.032	0.002	0.008	0.032
Recovery (mean)	101.5	106.5	100.0	101.9	106.3	99.6
SD	1.5	1.6	3.8	4.2	1.1	2.8
CV (%)	1.4	1.5	3.8	4.1	1.1	2.8

Table 3. Within-day variation in recovery yields of telithromycin in plasma samples diluted with different diluents and estimated from different calibration curves (n=5)

( $\mu\text{g eq/mL}$ )	×10 diluted plasma samples estimated from calibration curve A <sup>a)</sup>			×10 diluted plasma samples estimated from calibration curve B <sup>b)</sup>			×100 diluted plasma samples estimated from calibration curve C <sup>c)</sup>			×100 diluted plasma samples estimated from calibration curve B <sup>b)</sup>		
	0.002	0.008	0.032	0.002	0.008	0.032	0.002	0.008	0.032	0.002	0.008	0.032
Recovery (mean)	92.7	103.2	101.3	106.2	105.3	93.1	108.1	109.3	93.0	95.3	107.1	99.9
SD	0.9	5.1	2.1	0.9	4.9	1.8	2.5	1.3	3.3	2.4	1.4	3.8
CV (%)	0.9	5.0	2.1	0.8	4.6	1.9	2.3	1.2	3.5	2.5	1.3	3.8

<sup>a)</sup> Calibration curve A was made with the standard samples diluted with plasma diluted 10-fold with phosphate buffer.

<sup>b)</sup> Calibration curve B was made with the standard samples diluted with phosphate buffer.

<sup>c)</sup> Calibration curve C was made with the standard samples diluted with plasma diluted 100-fold with phosphate buffer.

Table 4. Between-day (3 days) variation in recovery yields of telithromycin in plasma diluted 10-fold with phosphate buffer, using calibration curve made from standard samples diluted with phosphate buffer (n=3×5)

	Telithromycin added (μg eq/mL)		
	0.002	0.008	0.032
Recovery (meam)	102.8	104.3	102.5
SD	5.6	2.9	3.6
CV (%)	5.4	2.8	3.5

Table 5. Within-day and between-day variation in linearity of calibration curves made from the standard samples diluted with phosphate buffer containing 5% horse serum and bias from the reverse regression concentrations of telithromycin in human urine

TEL added (μg eq/mL)	Bias (%)		
	within-day <sup>a)</sup>	between-day	
		day-2	day-3
0.002	-2.1	-4.2	-4.1
0.004	1.9	4.3	4.1
0.008	0.4	0.4	2.0
0.016	2.0	3.6	0.7
0.032	-2.2	-3.8	-2.5
Slope	8.515	9.242	9.477
Intercept	32.89	35.21	35.94
r	0.9998	0.9993	0.9995

<sup>a)</sup>Data of within-day variation was used as day-1 in between-day variation

℃凍結保存5日後の測定値は、初期値の95.8~98.6%であった。

## 2) 尿中濃度の測定

### (1) 特異性の検討

検定菌である *M. luteus* ATCC 9341 に対する個別ブランク尿 (n=10) の阻害活性はみられなかった。

### (2) 直線性の検討

検量線用標準液として5%ウマ血清含有リン酸塩緩衝液を用いて、0.002~0.032 μg eq/mL の濃度に調製し

た検量線は、最小二乗法による直線回帰を行った。3回測定した結果、 $r=0.9993$  以上、逆回帰濃度の理論値に対する Bias は -4.2~4.3% の範囲であった (Table 5)。

### (3) 日内および日間変動の検討

試料希釈液として5%ウマ血清含有リン酸塩緩衝液を用いた時の日内および日間変動の検討用の全試料における CV は 5.4% 以下、回収率は 97.2~103.6% であった (Table 6)。

### (4) 希釈倍率の検討

2倍希釈液 (ヒトプール尿と5%ウマ血清含有リン酸塩緩衝液を等量混和したもの) で 0.002~0.032 μg eq/mL に調製した時の Bias は、-2.1~2.3%、5倍希釈液で調製した時の Bias は、-9.6~5.0%、10倍希釈液で調製した時の Bias は、0.002 μg eq/mL で 11.3%、その他の濃度で -3.5~4.2% であった。ヒトプール尿で調製した場合、定量下限の 0.002 μg eq/mL における Bias は 4.4%、0.032 μg eq/mL では -13.8% であった (Table 7)。

## 2. 高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法)

### 1) ヒト血漿中濃度の測定

#### (1) 回収率

TEL の回収率は、0.005, 0.015, 0.15 および 0.75 mg/L の4濃度—5回繰り返して検討した。Table 8 に示したように、CV は 0.005 mg/L で 13.5% とやや大きかったが、0.015~0.750 mg/L では 5.5~7.9% であり、良好であった。内標準物質の回収率については、20回の繰り返して CV は 5.5% であった。

#### (2) 特異性

Fig. 2 に示したように、クロマトグラム上において TEL は epimer と確実に分離でき、TEL および内部標準のピークは血漿の内因性物質による影響を受けないことを確認した。また、TEL の主要な代謝物である RU 72365 および RU 72366 も測定に影響を与えないことを確認した。

### (3) 日内および日間変動の検討

Table 9 に示したように、日内変動において、定量限界の 0.005 mg/L の Inaccuracy は +10.0%、CV は 10.5%、0.015~0.75 mg/L での Inaccuracy は 2.1~5.3%、CV は 3.6% 以下であった。日間変動においては、定量

Table 6. Within-day and between-day variations in recovery yields of telithromycin in urine diluted twofold with phosphate buffer containing 5% horse serum

	Within-day variation			Between-day variation (3 days) <sup>a)</sup>		
	telithromycin added (μg eq/mL) n=5			telithromycin added (μg eq/mL) n=15		
	0.002	0.008	0.032	0.002	0.008	0.032
Mean	103.3	103.6	97.4	100.2	103.1	97.2
SD	2.4	2.4	2.3	5.5	2.5	2.6
CV (%)	2.3	2.3	2.4	5.4	2.4	2.6

<sup>a)</sup>Data of within-day variation was used as day-1 in between-day variation

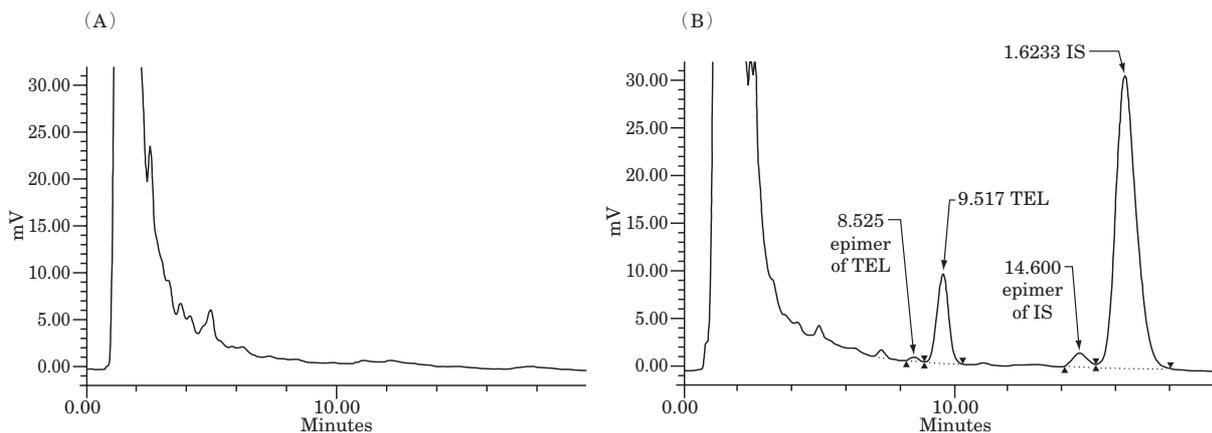


Fig. 2. Chromatograms of blank human plasma (A) and plasma spiked with telithromycin at 0.1 mg/L (B).

Table 7. Bias (%) of telithromycin in urine samples diluted with different diluents

Telithromycin added ( $\mu\text{g eq/mL}$ )	Bias (%)			
	A	B	C	D
0.002	-0.7	0.2	11.3	4.4
0.004	1.2	0.1	-0.4	-5.2
0.008	2.3	5.0	4.2	-6.8
0.016	0.8	1.7	3.4	-9.3
0.032	-2.1	-9.6	-3.5	-13.8

A: 2-fold urine samples diluted with phosphate buffer containing 5% horse serum

B: 5-fold urine samples diluted with phosphate buffer containing 5% horse serum

C: 10-fold urine samples diluted with phosphate buffer containing 5% horse serum

D: urine samples diluted with human urine

限界の 0.005 mg/L の Inaccuracy は +12.0%, CV は 9.8%, 0.015~0.75 mg/L での Inaccuracy は -1.3~2.6%, CV は 5.7% 以下であった。検量線の日間差はみられず、各検量点における逆回帰濃度はいずれも理論値に近似していた (Table 10)。

#### (4) 安定性

0.015, 0.15 および 0.75 mg/L の QC 用試料調製後、室温で 48 および 72 時間オートサンプラー内で放置した場合の測定値は、調製直後の値 (Ref.) と同じで、

Table 8. Recovery yield (%) of telithromycin from spiked human plasma in HPLC method

	Theoretical plasma concentration (mg/L) n = 5			
	0.005	0.015	0.150	0.750
Mean	101.6	103.6	106.6	110.7
SD	13.8	7.2	5.8	8.8
CV (%)	13.5	7.0	5.5	7.9

Inaccuracy は +0.7~+10.7%, CV はいずれも 9.1% 以内であった。凍結させた QC 試料を融解後 24 時間室温で放置した場合、Inaccuracy は +0.1~+3.5, CV は 3.7% 以内であった。同試料を 3 回、凍結-融解を繰り返した場合も TEL は安定で、Inaccuracy は -1.1~+5.3%, CV は 5.3% 以内であった (Table 11)。0.005~0.75 mg/L の 4 濃度の QC 試料を -25°C で 1 か月間保存した場合の Inaccuracy は、-4.0~+5.9%, CV は 3.8% 以内、0.01, 0.10 および 0.50 mg/L の 3 濃度を約 -20°C で 6 か月間保存した場合、相対誤差 (R.E.) はそれぞれ -1.8~+4.0%, CV は 5.3% 以内であった (Table 12)。また、0.01, 0.20 および 1.00 mg/L の 3 濃度を約 -20°C で 12 か月間保存した場合、相対誤差はそれぞれ -12.0~+2.8%, CV は 9.5% 以内であった。内標準物質の標準溶液は、調製後冷蔵庫内で 1 週間保存後の値は新しく調製した試料とまったく差はみられず、CV は 1.5% であった。

Table 9. Within-day and between-day validations on analysis of blank human plasma spiked with telithromycin

	Within-day variation				Between-day variation (5 days)			
	theoretical plasma concentration (mg/L)				theoretical plasma concentration (mg/L)			
	0.005	0.015	0.150	0.750	0.005	0.015	0.150	0.750
Mean	0.00550	0.01560	0.1532	0.790	0.00560	0.01480	0.1484	0.770
SD	0.00058	0.00055	0.0023	0.029	0.00055	0.00084	0.0083	0.016
CV (%)	10.5	3.5	1.5	3.6	9.8	5.7	5.6	2.1
Inaccuracy (%)	+10.0	+4.0	+2.1	+5.3	+12.0	-1.3	-1.1	+2.6

Table 10. Between-day variation in calibration curve parameters and concentrations of the calibration points back-calculated from the equation for the calibration curve

Date ('97)	Theoretical plasma concentration (mg/L)								Slope	Intercept ( $\times 10^{-3}$ )
	0.005	0.010	0.020	0.050	0.100	0.200	0.500	1.000		
17 Dec.	0.006	0.010	0.019	0.049	0.096	0.193	0.486	1.026	6.415	-7.977
19 Dec.	0.006	0.010	0.019	0.049	0.097	0.197	0.490	1.017	6.205	-5.364
20 Dec.	—	0.011	0.020	0.049	0.097	0.193	0.485	1.025	6.354	-6.372
23 Dec.	0.005	0.010	0.020	0.054	0.102	0.202	0.485	1.008	5.755	0.908
24 Dec.	0.005	0.010	0.019	0.050	0.100	0.201	0.494	1.006	5.868	-4.095
Mean	.00550	.01020	.01940	0.0502	0.0984	0.1972	0.4880	1.0164	—	—
SD	.00058	.00045	.00055	0.0022	0.0025	0.0043	0.0039	0.0093	—	—
CV (%)	10.5	4.4	2.8	4.3	2.6	2.2	0.8	0.9	—	—
Inaccuracy (%)	+10.0	+2.0	-3.0	+0.4	-1.6	-1.4	-2.4	+1.6	—	—

Table 11. Stability of blank human plasma spiked with telithromycin after storage for 24, 48 and 72 h at room temperature, and after 3 freeze-thaw cycles

Treatment	Parameter	Theoretical plasma concentration (mg/L)					
		0.015		0.150		0.750	
		ref.	sample	ref.	sample	ref.	sample
After preparation, held for 48 h at room temperature	mean	0.01540	0.0166	0.1516	0.1558	0.7780	0.786
	SD	0.00055	0.0015	0.0013	0.0036	0.0053	0.010
	CV (%)	3.6	9.1	0.9	2.3	0.7	1.2
	inaccuracy (%)	+2.7	+10.7	+1.1	+3.9	+3.7	+4.7
After preparation, held for 72 h at room temperature	mean	0.01560	0.01580	0.1454	0.1510	0.764	0.763
	SD	0.00055	0.00045	0.0055	0.0019	0.012	0.016
	CV (%)	3.5	2.8	3.8	1.2	1.6	2.1
	inaccuracy (%)	+4.0	+5.3	-3.1	+0.7	+1.8	+1.7
After thawing, held for 24 h at room temperature	mean	0.01540	0.01550	0.1516	0.1502	0.7780	0.776
	SD	0.00055	0.00058	0.0013	0.0013	0.0053	0.013
	CV (%)	3.6	3.7	0.9	0.9	0.7	1.6
	inaccuracy (%)	+2.7	+3.3	+1.1	+0.1	+3.7	+3.5
After 3 freeze-thaw cycles	mean	0.01560	0.01580	0.1454	0.1484	0.764	0.768
	SD	0.00055	0.00084	0.0055	0.0011	0.012	0.015
	CV (%)	3.5	5.3	3.8	0.8	1.6	1.9
	inaccuracy (%)	+4.0	+5.3	-3.1	-1.1	+1.8	+2.4

ref. : reference set

## (5) 臨床血漿サンプルの調製条件の検討

TEL 800 mg を経口投与した被験者（健康成人）4 例について、投与 2 および 12 時間後に採血した。遠心分離時の温度条件による測定値への影響を検討するために、血液を冷却の有無により遠心分離した。冷却せずに遠心分離した場合の測定値は、4℃ で遠心分離した場合に比べても測定値に 10% 以上の差はみられなかった。採血後、室温で 2, 24, 48, 72 および 96 時間保存し、4℃ で遠心分離した場合の測定値は、同時間 4℃ で保存した後 4℃ で遠心分離した場合に比べその差は 10% 以下であった。採血後ただちに測定した平均濃度と血液のま

ま 4 時間室温または 4℃ で保存した後に測定した値との差は 2~10% であった。しかし、24~96 時間まで保存した場合、室温および 4℃ でも保存後の測定値は、初期値に対して -6.9~60% まで増大した。

## (6) 臨床血漿サンプルの安定性

2 例の患者の採血サンプル（0.25~72 時間、14 サンプル）について -20℃ で 6 か月間保存した場合、保存前の値との差は -16.9~+11.4%，平均 -4.4% であった。さらに、-20℃ で 12 か月間保存した場合、保存前の値との差は -9.1~+20.6%，平均 +8.9% であった。

## 2) ヒト尿中濃度の測定

Table 12. Stability of blank human plasma spiked with telithromycin after storage for 1 month at  $-25^{\circ}\text{C}$  and 6 months at ca.  $-20^{\circ}\text{C}$ 

Treatment	Parameter	Theoretical plasma concentration (mg/L)						
		0.005	0.010	0.015	0.100	0.150	0.500	0.750
After storage for 1 month at $-25^{\circ}\text{C}$	mean	0.005	—	0.01440	—	0.1540	—	0.795
	SD	0	—	0.00055	—	0.0032	—	0.020
	CV (%)	0	—	3.8	—	2.1	—	2.5
	inaccuracy (%)	0	—	-4.0	—	+2.7	—	+5.9
After storage for 6 months at ca. $-20^{\circ}\text{C}$	mean	—	0.01040	—	0.0970	—	0.4912	—
	SD	—	0.00055	—	0.0032	—	0.0019	—
	CV (%)	—	5.3	—	3.3	—	0.4	—
	RE (%)	—	+4.0	—	-3.0	—	-1.8	—

RE : relative errors, —: not tested

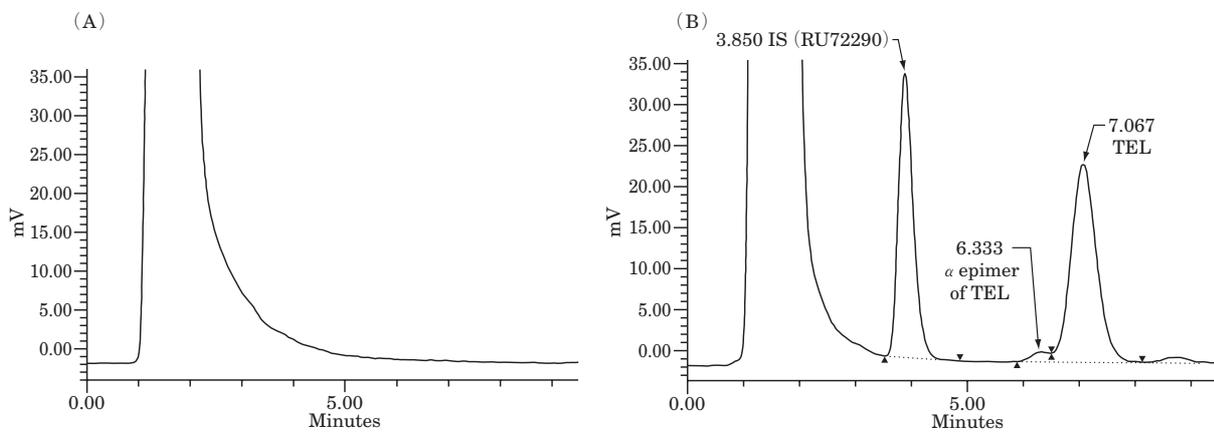


Fig. 3. Chromatograms of blank human urine (A) and urine spiked with telithromycin at 10 mg/L (B).

Table 13. Within-day and between-day variations in analysis of blank human urine spiked with telithromycin

	Within-day variation				Between-day variation (5 days)			
	theoretical urine concentration (mg/L)				theoretical urine concentration (mg/L)			
	0.5	1.5	15.0	75.0	0.5	1.5	15.0	75.0
Mean	0.505	1.405	15.49	77.0	0.552	1.448	15.30	76.8
SD	0.034	0.023	0.12	1.5	0.016	0.027	0.13	1.8
CV (%)	6.7	1.6	0.8	1.9	2.9	1.9	0.8	2.3
Inaccuracy (%)	+1.0	-6.3	+3.3	+2.7	+10.4	-3.5	+2.0	+2.4

## (1) 特異性

クロマトグラム上における TEL および内標物質の保持時間の場所にピーク高さに影響をおよぼす尿中内因物質は認められなかった (Fig. 3)。

## (2) 日内および日間変動の検討

Table 13 に示したように、QC 用 TEL 溶液について、同一日に 5 回測定した場合、1.5~75.0 mg/L での Inaccuracy は  $-6.3 \sim +3.3\%$ 、CV は 1.9% 以内であった。定量下限の 0.5 mg/L での Inaccuracy は  $+1.0\%$ 、CV は 6.7% であった。

日間測定においては、定量限界の 0.5 mg/L の Inaccuracy は  $+10.4\%$ 、CV は 2.9%、1.5~75.0 mg/L

での Inaccuracy は  $-3.5 \sim 2.4\%$ 、CV は 2.3% 以下であった。検量線においても日間差はみられず、各検量点における逆回帰濃度はいずれも理論値に近似していた (Table 14)。

## (3) 安定性

Table 15 に示したように、調製後室温で 48 および 72 時間放置した場合の測定値は、調製直後の値 (Ref.) とほぼ同じで、Inaccuracy は  $+1.0 \sim +5.4\%$ 、CV はいずれも 3.4% 以内であった。凍結させた QC 試料を融解後 24 時間室温で放置した場合、Inaccuracy は  $-1.3 \sim +0.4\%$ 、CV は 1.4% 以内であった。同試料を 3 回、凍結融解を繰り返した場合も TEL は安定で、Inaccuracy は

Table 14. Between-day variations of calibration curve parameters and concentrations of the calibration points back-calculated from the equation for the calibration curve

Number of times	Theoretical urine concentration (mg/L)								Slope	Intercept ( $\times 10^{-3}$ )
	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0	50.0	100.0		
1	0.488	0.948	2.187	5.021	9.721	20.72	47.65	101.8	69.70	5.991
2	0.489	0.987	—	5.136	9.886	20.93	48.20	100.9	70.17	0.562
3	0.493	0.932	2.198	5.015	9.687	20.69	48.21	101.3	70.61	0.689
4	0.480	0.979	2.263	4.836	9.780	20.55	46.12	103.5	70.00	-0.518
5	0.493	0.951	2.163	4.982	9.733	20.77	47.99	101.4	69.93	6.908
Mean	0.4886	0.959	2.203	5.00	9.761	20.73	47.63	101.8	—	—
SD	0.0053	0.023	0.043	0.11	0.077	0.14	0.88	1.0	—	—
CV (%)	1.1	2.4	2.0	2.2	0.8	0.7	1.8	1.0	—	—
Inaccuracy (%)	-2.3	-4.1	+10.2	0.0	-2.4	+3.7	-4.7	+1.8	—	—

Table 15. Stability of blank human urine spiked with telithromycin after storage for 24, 48 and 72 h at room temperature and after 3 freeze-thaw cycles

Treatment	Parameter	Theoretical urine concentration (mg/L)					
		1.5		15.0		75.0	
		ref.	sample	ref.	sample	ref.	sample
After preparation, held for 48 h at room temperature	mean	1.488	1.515	15.58	15.49	76.6	76.8
	SD	0.028	0.023	0.29	0.18	1.1	2.6
	CV (%)	1.9	1.5	1.9	1.2	1.4	3.4
	inaccuracy (%)	-0.8	+1.0	+3.9	+3.3	+2.2	+2.4
After preparation, held for 72 h at room temperature	mean	1.495	1.527	15.32	15.81	77.5	77.7
	SD	0.050	0.049	0.15	0.36	1.0	1.1
	CV (%)	3.3	3.2	1.0	2.3	1.3	1.4
	inaccuracy (%)	-0.3	+1.8	+2.0	+5.4	+3.3	+3.6
After thawing, held for 24 h at room temperature	mean	1.515	1.481	15.36	15.00	76.46	75.33
	SD	0.039	0.021	0.23	0.14	0.75	0.61
	CV (%)	2.6	1.4	1.5	0.9	1.0	0.8
	inaccuracy (%)	+1.0	-1.3	+2.4	0.0	+1.9	+0.4
After 3 freeze-thaw cycles	mean	1.450	1.401	15.67	15.41	78.48	76.73
	SD	0.039	0.030	0.19	0.13	0.75	0.75
	CV (%)	2.7	2.1	1.2	0.8	1.0	1.0
	inaccuracy (%)	-3.3	-6.6	+4.5	+2.7	+4.6	+2.3

ref.: reference set

-6.6~+2.7%, CVは2.1%以内であった。また, TEL添加尿を-25℃で3週間および9か月保存後のInaccuracyは-6.8~+2.3%, CVは6.1%以内であった (Table 16)。内標準溶液を冷蔵庫内で2週間保存した後の測定値は, 調製直後の値と同じで, CVは8.1%であった。2例の臨床尿サンプル各20検体について-25℃で6か月間保存後の測定値は, 採取直後の値に比べ-41.2~+4.1%, 平均-19.2%であった。

### 3. 高速液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC/MS/MS法)

#### 1) 特異性

代表的なクロマトグラムを Fig. 4 に示した。検討した試料のなかには TEL 溶出位置に妨害ピークが認められたものがあつた。しかし, 妨害ピークの面積比は定量下限のピーク面積比の5.8~6.7%であり, 定量性には影響を与えない程度であつた。また, 内標準物質 (RU 64484) 溶出位置に妨害ピークが認められた試料もあつたが, 妨害ピーク的面積は内標準物質のピーク面積の0.1%以下であつた (Table 17)。

#### 2) 検量線

検量線例を Fig. 5 に示した。この結果, 検量線は  $r^2 = 0.9986$ , バックカリキュレーション値の R. E. は -4.4

Table 16. Stability of blank human urine spiked with telithromycin after storage for 3 weeks and 9 months at -25°C

Treatment	Parameter	Theoretical urine concentration (mg/L)					
		1.5		15.0		75.0	
		ref.	sample	ref.	sample	ref.	sample
After preparation, held for 3 weeks at -25°C	mean	1.525	1.398	15.61	14.3	71.1	74.5
	SD	0.077	0.071	0.98	0.67	3.8	2.4
	CV (%)	5.0	5.1	6.3	4.7	5.3	3.2
	inaccuracy (%)	+1.7	-6.8	+4.1	-4.7	-5.2	-0.6
After preparation, held for 9 months at -25°C	mean	—	1.460	—	15.34	—	76.20
	SD	—	0.089	—	0.18	—	0.49
	CV (%)	—	6.1	—	1.2	—	0.64
	inaccuracy (%)	—	-2.7	—	+2.3	—	+1.6

ref.: reference set

Table 17. Confirmation of interfering peaks in samples for the specificity studies

Matrix (Lot no.)	Measured sample name	Peak area		Ratio of peak area	Percent area (%)*
		telithromycin	I. S. (RU 64484)**		
A	blank	322	412	—	—
	0 ng/mL	546	462,544	0.001180	6.7
	5.000 ng/mL	6,799	387,119	0.1756	(100)
B	blank	0	0	—	—
	0 ng/mL	516	452,263	0.001141	6.4
	5.000 ng/mL	6,566	365,864	0.01795	(100)
C	blank	0	0	—	—
	0 ng/mL	537	438,026	0.001226	6.6
	5.000 ng/mL	6,737	362,509	0.01858	(100)
19	blank	182	0	—	—
	0 ng/mL	475	430,424	0.001104	6.1
	5.000 ng/mL	6,775	371,919	0.01822	(100)
24	blank	0	0	—	—
	0 ng/mL	484	426,495	0.001135	6.3
	5.000 ng/mL	6,736	373,774	0.01802	(100)
25091	blank	0	0	—	—
	0 ng/mL	461	425,880	0.001082	5.8
	5.000 ng/mL	7,282	393,066	0.01853	(100)

\*percent area (%) = (Ratio of peak area at 0 ng/mL)/(Ratio of peak area at 5.000 ng/mL) × 100

\*\*Internal standard

—: Not calculated because IS is not used in blank

～3.5%であった。

### 3) 日内および日間変動

(1) 日内変動の測定結果を Table 18 に示した。QC サンプルの真度は R. E. が -2.3～0.8%，精度は CV が 1.0～5.7% であった。

(2) 日間変動の測定結果を Table 19 に示した。QC サンプルの真度は R. E. が -5.8～1.4%，精度は CV が 1.9～12.3% であった。

### III. 考 察

高感度の bioassay 法の開発を目的とし、検定菌としてわが国でよく使用されている<sup>1,2)</sup> *M. luteus* ATCC 9341 を選択し、検定培地として Heart infusion agar

(pH 9.0) を用いて予備検討を行った結果、ブランク血漿の阻害活性もなく、定量限界は 0.001 μg/mL であり、個々の血漿による阻止円の形成状況も一定していた。

validation 試験を実施した結果、得られた真度および精度は、採用基準を満たしており、良好であると考えられた。したがって、本法は良好な精度のもと血漿試料の測定が可能であり、定量限界の点からも臨床試験における Pharmacokinetics が正確に把握できるものと考えられた。一方、臨床での C<sub>max</sub> を考えると、本法の測定範囲の上限を超えると考えられたので、希釈条件の検討を行った。希釈液としてヒト血漿が望ましいが、供給面および費用面から 5% ウマ血清含有リン酸緩衝液を代替

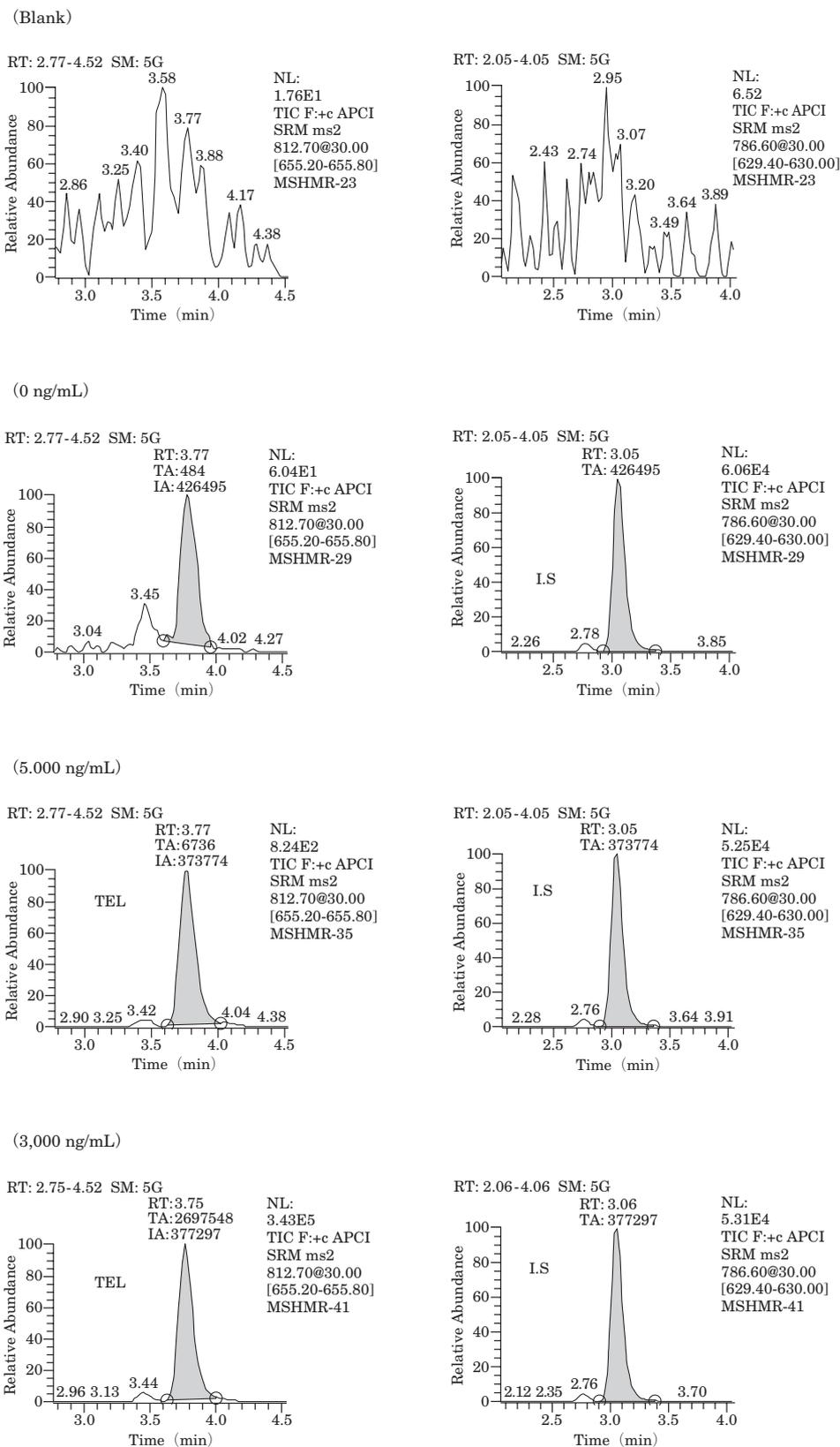


Fig. 4. Chromatograms for specificity.

Table 18. Within-day variation of analysis of human plasma spiked with telithromycin

Theoretical conc. (ng/mL)	Measured value (ng/mL)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	RE (%)
5.000	4.617	4.980	0.285	5.7	-0.4
	5.364				
	5.148				
	4.886				
	4.887				
100.0	95.73	97.68	1.94	2.0	-2.3
	99.45				
	95.46				
	99.28				
	98.48				
3.000	3.041	3.024	30	1.0	0.8
	2.975				
	3.021				
	3.054				
	3.028				

SD: standard deviation, CV: coefficient of variation, RE: relative error

Table 19. Between-day variation of analysis of human plasma spiked with telithromycin

Theoretical conc. (ng/mL)	Number of analysis	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)	RE (%)
5.000	15	4.710	0.580	12.3	-5.8
100.0	15	100.9	4.8	4.8	0.9
3.000	15	3.042	59	1.9	1.4

SD: standard deviation, CV: coefficient of variation, RE: relative error

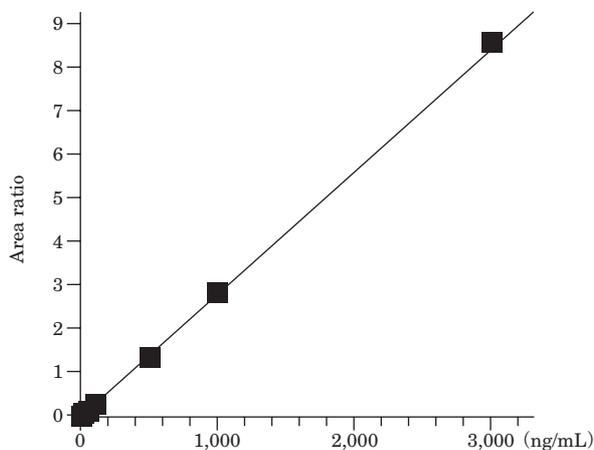


Fig. 5. Standard curve of telithromycin in human plasma.

マトリックスとして用い、測定法の validation 試験を実施した。いずれの条件下でも 5% ウマ血清含有リン酸緩衝液の検量線から得られた結果は、同一のマトリックスの検量線から得られた結果と差がみられず、その真度および精度は良好であった。また、5 日間、 $-40^{\circ}\text{C}$  凍結保存下での血漿試料の安定性は 95.8% 以上であったことから良好であると考えられた。

次いで、ヒト血漿中濃度測定法をもとにして、ヒト尿中濃度測定法の確立を行った。尿は、pH や組成が容易

に変動するため、bioassay を行う場合、検定菌の生育などが影響される可能性がある。したがって、尿試料の pH の緩衝化が必要と考えられ、血漿の場合と同様に 5% ウマ血清含有リン酸緩衝液を検量線用標準液および試料希釈液として用いて validation を行った。さらに、希釈倍率および個体差の有無の検討も実施した。その結果、2, 5 および 10 倍希釈試料を測定した時、Bias 値は定量下限で  $-0.7\sim 11.3\%$ 、その他の濃度で  $-9.6\sim 5.0\%$  と基準を満たしていた。また、5 人の個別尿を 5% ウマ血清含有リン酸緩衝液で 2 倍希釈した試料の測定結果もすべて基準値を満たした。一方、ヒトプール尿で希釈した試料を測定した場合、濃度が高くなるにしたがい Bias 値がマイナス側に大きくなる傾向がみられ、最大で  $-13.8\%$  となり、阻止円形成におよぼすマトリックスの影響が示唆された。

したがって、尿試料の希釈液として 5% ウマ血清含有リン酸緩衝液を使用し、さらに、尿試料を 2 倍以上希釈することで個体差はなく真度、精度よく定量できることが確認された。

また、この bioassay 法に準じて、他のマトリックス (糞便、唾液、喀痰、組織) 中 TEL 濃度測定法も検討した。各マトリックスに応じて、前処理方法を変える必要があったものの、TEL 濃度はいずれのマトリックスにおいても真度、精度とも良好に定量できることが確認

された(成績未発表)。

高感度のHPLC法の確立に際し、最初の除蛋白処理を簡便に行うためアセトニトリルを用いた。アセトニトリルによる除蛋白処理後、特異性の高い蛍光測定を組み合わせることより高感度の測定法を確立することができ、TELの主要な代謝物であるRU 72365およびRU 72366も測定に影響を与えないことを確認した。また、この方法は血漿300  $\mu$ Lで測定可能であるため、マウスのような小動物における薬物動態研究も可能となった。

この測定条件でvalidationを行った結果、許容条件である精度(定量限界で20%以内、それ以上の濃度で15%以内)および真度(定量限界で $\pm 20\%$ 以内、それ以上の濃度で15%以内)を十分に満たしていた。

次いで、TELの安定性を凍結保存中および分析中の温度条件で検討を行った。その結果、いずれの場合も安定であることが証明された。

臨床試験の場を想定した血液採取から血漿凍結までの試料の調製条件として、遠心分離時の温度について冷却なしおよび4 $^{\circ}$ Cの2条件で検討したが、両者間に10%以上の差はみられなかった。血液を遠心分離するまでの時間を室温および4 $^{\circ}$ Cの2条件で2~96時間にわたり検討した。室温および4 $^{\circ}$ C保存いずれの場合も4時間までは2~10%の変化であったが、24~96時間までの保存では-6.9~60%と増大することがわかった。したがって、血液サンプルの処理は4時間までに遠心分離する必要があるが、遠心分離の温度は4 $^{\circ}$ Cまたは冷却なしのどちらでも可能であった。分離された血漿サンプルは分析まで凍結保存しなければならない。

本HPLC法のヒト以外の動物種への適用性を検討した結果、マウス、ラットおよびウサギ血漿でも使用可能であることが示された(成績未発表)。

ヒト尿試料のクロマトグラフ条件(カラム、流動相および検出法)は、ヒト血漿の場合と同様とした。しかし、TELより流出の早い新しい内標準物質、RU 72290を導入したので、測定時間の短縮が可能となった。尿試料の場合は、内標準物質を加えた後、単純に注入溶媒で10倍希釈してカラムに注入すればよく、検体の抽出処置の必要はない。つまりHigh threw putが可能となった。

validation試験として通常求められる項目のうち、いくつかは不要と考えた。直線性の検討は行わなかったが、検量線用の各ポイントの逆回帰濃度からの偏りの平均は非常に小さく(-5.7~+2.0)、検量線を挟んでランダ

ムに分布しており、本法は直線性に優れていることが示された。また、TELおよび内標準物質の回収率も検討していないが、試料調製過程で化合物の損失をもたらす可能性のある検体の抽出操作を組み入れてないので問題にならないと考えられた。TELと2種の代謝物(RU 72365およびRU 72366)とのクロマト上での分離性については、クロマト条件が血漿の場合と同じであるため検討しなかった。

この尿試料の測定方法でvalidationを行った結果、許容条件である精度および真度を十分に満たしていた。

次いで、TELの安定性について、試料調製後、室温で48および72時間オートサンプラー内で放置した場合の安定性、分解の加速条件としての室温で24時間放置後の安定性および試料の再測定を想定した凍結-融解を3回繰り返した時の安定性を調べた結果、いずれの場合も安定であることが証明された。尿試料を-25 $^{\circ}$ Cで6か月間保存してもTELは安定であった。

LC/MS/MS法によるヒト血漿中TEL濃度測定法のvalidationを行った結果、特異性の確認においてTELおよび内標準物質(RU 64484)溶出位置に妨害ピークが認められたものの定量には影響ないと判断した。さらに、個体差による定量への影響は認められず、日内再現性および日間再現性も良好であった。

以上のことから、使用血漿50  $\mu$ Lで、検量線濃度範囲5~3,000 ng/mLにおいて直線一次回帰式 $Y = aX + b$ (Weight =  $1/x^2$ )を検量線として、良好な分析精度でヒト血漿中TELを測定できることが確認された。さらにLC/MS/MS法では、1サンプルあたりの分析時間は約5分と短く、bioassay法、HPLC法、およびLC/MS/MS法のなかで、もっとも短時間に分析できる方法であった。

以上のように各測定法における精度および真度ともに良好であり、医療現場における薬物濃度測定に有用であると考えられる。

#### 文 献

- 1) 長手尊俊, 杉田和彦, 宮地純子, 他: TE-031の体液内濃度測定法に関する研究(第1報) Bioassay法による体液内濃度測定法。日化療会誌 36 (S-3): 170~191, 1988
- 2) 澤田安房, 武藤秀弥, 榎垣一憲, 他: Azithromycinの体液内濃度測定法に関する研究。日化療会誌 43 (S-6): 100~109, 1995

## Studies on measuring methods of the concentration of telithromycin in body fluids

Hiroko Yamazaki<sup>1)</sup>, Akihiro Tsuchida<sup>1)</sup>, Atsuo Obata<sup>1)</sup>, Emi Suzuki<sup>1)</sup>,  
Dupront A<sup>2)</sup>, Coussediere D<sup>2)</sup>, Pascual M H<sup>2)</sup>,  
and Kodo Miura<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Lead Optimization, Drug Innovation & Approval Division,  
Aventis Pharma Ltd., 1-3-2, Minamidai, Kawagoe, Saitama, Japan

<sup>2)</sup>Department of Pharmacokinetics, Aventis Pharma

<sup>3)</sup>Pharmacokinetics Group, Pharmaceutical Research Department, Mitsubishi Kagaku Bio-clinical  
Laboratories

In order to study on human pharmacokinetics of telithromycin (TEL), sensitive bioassay method, HPLC method and LC/MS/MS method were developed and the validation studies of these analytic methods were carried out. As the bioassay method, agar-well diffusion method was developed using *Micrococcus luteus* ATCC 9341, have high sensitivity and high specificity, as a test organism and Heart infusion agar (pH 9.0) as a test medium. The validation studies on the bioassay method resulted in good accuracy and reliability in the range of 0.002–0.032  $\mu\text{g eq/mL}$  in human plasma and urine samples. The lower limit of quantification were 0.002 and 0.004  $\mu\text{g eq/mL}$  for plasma and urine. In HPLC method, plasma samples were deproteinated by addition of acetonitrile and reconstituted in mobile phase, and urine samples was diluted directly in mobile phase composition. These mixtures were chromatographed in reverse phase conditions and detected by fluorimetry at 263 nm (excitation wavelength) and 460 nm (emission wavelength). The limit of quantification was 0.005  $\mu\text{g/mL}$  for a 300  $\mu\text{L}$  aliquot of human plasma and 0.5  $\mu\text{g/mL}$  for a 50  $\mu\text{L}$  aliquot of human urine, respectively. The usable range of concentrations used for the calibration was 0.005 to 1.0  $\mu\text{g/mL}$  in plasma and 0.5 to 100  $\mu\text{g/mL}$  in urine. As LC/MS/MS method, APCI ionization method was employed, and mass spectrometry was conducted after separation by HPLC under reverse phase conditions. The usable range of concentrations used for the calibration was 5 to 3,000  $\text{ng/mL}$  for a 50  $\mu\text{L}$  aliquot of human plasma and the limit of quantification was 5  $\text{ng/mL}$ . The validation studies on these methods revealed good accuracy and reliability. The results of stability studies on TEL in clinical samples, showed that blood samples can be stored at room temperature or at 4°C for a maximum of 4 hours following collection. Plasma samples and urine samples containing TEL in clinical studies can be stored at about -20°C for 12 months and at about -25°C for 6 months, respectively.