

(7) ロピナビル／リトナビルおよび エファビレンツの血中濃度同時測定法の確立

宇佐美好子 大木 剛* 中井正彦*
鷺坂昌史* 金田次弘

A SIMPLE HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF
LOPINAVIR/RITONAVIR AND EFAVIRENZ

Yoshiko USAMI, Tsuyoshi OKI*, Masahiko NAKAI*,
Masafumi SAGISAKA* and Tsuguhiro KANEDA

抗 HIV 療法において、カレトラ™、すなわちロピナビル (LPV) /リトナビル (RTV) とエファビレンツ (EFV) との併用は強力な効果を有し、薬剤耐性 HIV-1 感染症患者に対するサルベージ療法として使用が増加することが予想される。LPV, RTV および EFV はいずれも、主に肝の薬物代謝酵素チトクローム P-450 (CYP) 3A で代謝され¹⁾⁻³⁾、EFV による CYP3A 誘導が LPV の血中濃度低下を引き起こすことが海外では報告されている。したがって Abbott 社は、EFV 併用時は非併用時よりカレトラを増量して投与することを推奨している⁴⁾。カレトラは2000年9月に米国食品医薬品局で承認された後、その年の12月に日本でも使用が開始されたため、日本人の薬物動態データはなく、EFV との併用に関する日本人のデータもない。この問題を解決すべく、LPV/RTV と EFV 併用後のこれら薬剤の血中濃度、およびそれら濃度と効果の関係を評価するための臨床試験が開始されている。そのために、LPV, RTV および EFV の3剤を同時に測定する簡便な方法の開発を試みた。

結 果

私たちは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた LPV と RTV の同時測定法をすでに確立し、臨床に使用している。その HPLC 条件は、カラム: Waters 社の Radial-Pak Cartridge type Nova-Pak C₁₈ (4 μm, 8×100 mm)、移動相: アセトニトリル: メタノー

ル: 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含んだ 0.01 M 過塩素酸テトラメチルアンモニウム (TMAP) 水溶液=50:5:45 (v/v/v)、カラム温度: 室温、流速: 1.5 ml/min、検出波長: 205 nm である。この条件で LPV/RTV および EFV を同時に測定すると、EFV は LPV に近接して LPV より後に溶出されたが、分離は不十分であった (Fig. 1a)。しかし、適切な分離条件を設定すれば両者の分離は可能であると考え、LPV/RTV の同時測定法を基にして3剤の分離を試みた。

移動相の検討

まず、アセトニトリル、メタノール、TFA を含んだ TMAP 水溶液の比率を45:5:50 (v/v/v) とし、薬剤のカラムへの吸着力を強くした。その分、測定時間が長くなるのを避けるため、流速を1.8 ml/min とした。その結果、EFV と LPV の溶出順序が逆転し、EFV は LPV に先立って溶出されるようになったが、分離は不十分なままであった (Fig. 1b)。次いで TMAP と TFA の濃度をそれぞれ変化させて検討を行った。TFA の濃度のみを0.2%にあげると、EFV と LPV の分離は改善されたが、まだ不十分であった (Fig. 1c)。TMAP の濃度のみを0.02 M にあげると、EFV と LPV の分離はさらに改善されたが、内部標準物質 (IS) のピークがこれらピークに近接する結果となった (Fig. 1d)。最終的に TFA を0.2%に、TMAP を0.02 M にして HPLC を行ったところ、EFV と LPV は完全に分離して溶出された (Fig. 1e)。

国立名古屋病院 Nagoya National Hospital 臨床研究センター *薬剤科

Address for reprints: Yoshiko Usami, Clinical Research Center, Nagoya National Hospital,
4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya 460-0001 JAPAN

Received March 25, 2003

Accepted September 19, 2003

カラム温度の検討

ピーク分離にカラム温度が影響する場合がある。この方法では、カラム温度を上げていくにつれてEFVとLPVの溶出時間の差が大きくなった (Fig. 1f)。両ピークは室温で良好な分離を示したが、室温の変動、移動相組成の微妙な変化等を反映すると思われたので、30°C以上の温度でHPLCを行うのがよいと考えられた。

直線性の検討

ブランク血清にLPV, RTV および EFVを添加して検討した。その結果, LPVは0.060–24.06 µg/ml, RTVは0.010–4.16 µg/ml, EFVは0.047–37.44 µg/mlの間で直線性を示した。相関係数はそれぞれ, 1.000, 0.9998, 0.9994であった。

バリデーション

結果は Table 1 に示した。日内変動については各濃

度それぞれ5回測定を行い、変動係数 (CV%) を算出した。日差変動については各濃度それぞれ5回の測定を3日行い、CV%を算出した。日内CV%は、LPVが1.5–3.1%, RTVが2.5–12.5%, EFVが1.0–4.2%であった。日差CV%は、LPVが2.3–4.0%, RTVが2.8–16.8%, EFVが3.4–7.7%であった。測定の精度は、LPVが100–110%, RTVが101–147%, EFVが99–106%であった。RTVの0.021 µg/mlにおける精度は146.7%であり、この濃度以下では正確な測定が困難であると考えられた。血清からの抽出率は、LPVが77–87%, RTVが77–83%, EFVが81–91%であった。

ま と め

以上の結果から、Waters社のRadial-Pak Cartridge type Nova-Pak C₁₈ (4 µm, 8×100 mm) カラム、アセ

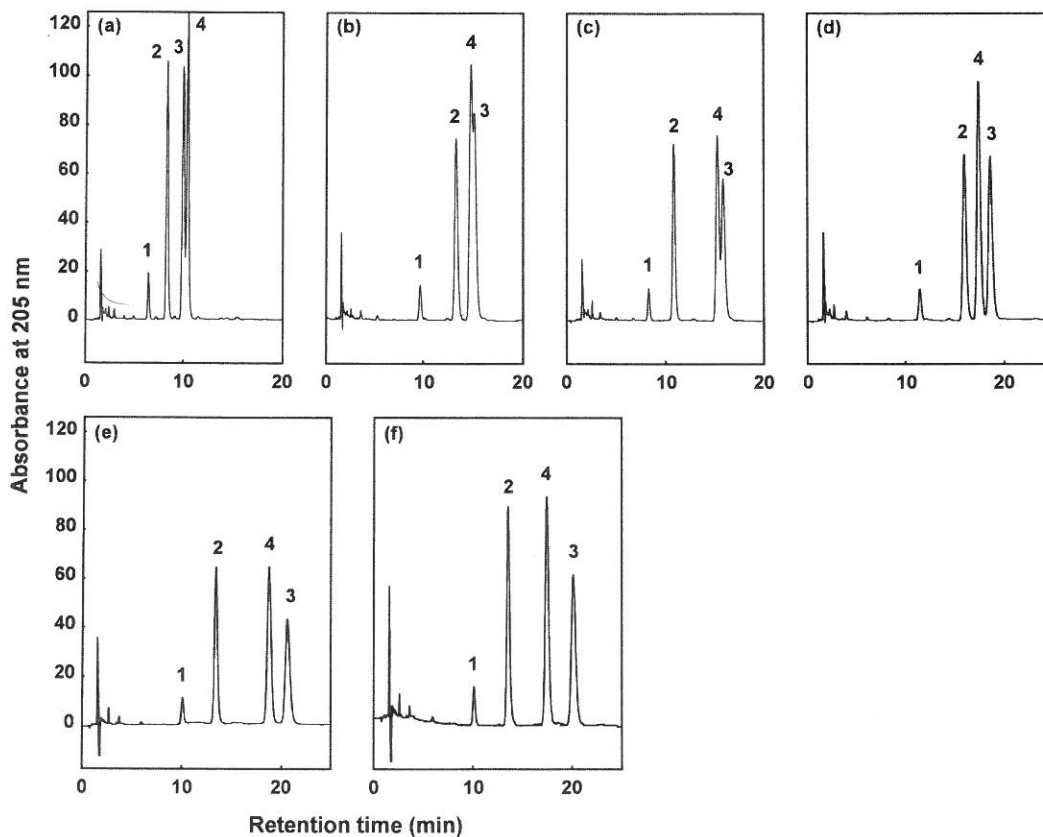


Fig. 1 Chromatograms under different mobile phase solution conditions. LPV, RTV, EFV and the IS were separated with mobile phase solutions of (a) 50 : 5 : 45 acetonitrile/methanol/0.01 M TMAP in 0.1% TFA, (b) 45 : 5 : 50 acetonitrile/methanol/0.01 M TMAP in 0.1% TFA, (c) 45 : 5 : 50 acetonitrile/methanol/0.01 M TMAP in 0.2% TFA, (d) 45 : 5 : 50 acetonitrile/methanol/0.02 M TMAP in 0.1% TFA, (e) 45 : 5 : 50 acetonitrile/methanol/0.02 M TMAP in 0.2% TFA at room temperature. (f) LPV, RTV, EFV and the IS were separated with the same mobile phase solution as (e) at 30°C. Peak 1 : RTV ; 2 : IS ; 3 : EFV ; 4 : LPV.

Table 1 Intraday and interday precision and accuracy for LPV, RTV and EFV

	Expected ($\mu\text{g/ml}$)	Intraday (n=5)		Interday (n=15)		Accuracy (%)	Recovery (%)
		Measured ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)	Measured ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)		
LPV	0.060	0.064 \pm 0.002	2.8	0.066 \pm 0.002	3.2	109.4 \pm 3.5	77.6 \pm 1.9
	0.120	0.129 \pm 0.002	1.3	0.128 \pm 0.004	3.0	106.0 \pm 3.1	86.4 \pm 0.7
	1.203	1.240 \pm 0.038	3.1	1.258 \pm 0.029	2.3	104.6 \pm 2.4	78.8 \pm 0.5
	6.015	6.068 \pm 0.138	2.3	6.314 \pm 0.250	4.0	105.0 \pm 4.2	81.2 \pm 2.1
	24.060	23.331 \pm 0.351	1.5	24.288 \pm 0.837	3.4	100.9 \pm 3.5	84.5 \pm 3.3
RTV	0.021	0.034 \pm 0.004	11.7	0.031 \pm 0.005	16.8	146.7 \pm 24.7	83.0 \pm 9.6
	0.208	0.253 \pm 0.032	12.5	0.240 \pm 0.024	10.0	115.4 \pm 11.6	77.8 \pm 2.5
	1.040	1.050 \pm 0.037	3.5	1.058 \pm 0.033	3.1	101.8 \pm 3.2	77.2 \pm 2.3
	4.160	4.136 \pm 0.102	2.5	4.218 \pm 0.119	2.8	101.4 \pm 2.6	82.8 \pm 0.6
EFV	0.047	0.048 \pm 0.002	4.0	0.049 \pm 0.004	7.7	105.2 \pm 8.1	86.3 \pm 3.9
	0.094	0.095 \pm 0.004	4.2	0.097 \pm 0.006	5.9	103.7 \pm 6.1	90.8 \pm 1.0
	0.936	0.966 \pm 0.036	3.7	0.991 \pm 0.033	3.4	105.9 \pm 3.6	87.3 \pm 2.2
	4.680	4.669 \pm 0.115	2.5	4.951 \pm 0.265	5.4	105.8 \pm 5.7	81.6 \pm 2.3
	18.720	17.389 \pm 0.167	1.0	18.595 \pm 0.917	4.9	99.3 \pm 4.9	84.6 \pm 2.6

トニトリル：メタノール：0.2%TFA を含んだ0.02 M TMAP 水溶液=45：5：50 (v/v/v) の移動相，流速 1.8 ml/min，検出波長205 nm，30°Cの HPLC 条件で 3 剤および IS を良好に分離することができた。EFV は、600 mg，1 日 1 回の食後投与で，その血中濃度は 1-5 $\mu\text{g/ml}$ になることが予想される⁵⁾。一方，LPV/RTV (カレトラTM) は、400 mg/100 mg，1 日 2 回の食後投与で，血中濃度はそれぞれ 1-10 $\mu\text{g/ml}$ ，0.5-1 $\mu\text{g/ml}$ になると思われる⁴⁾。今回の測定法はこの領域で直線性を示しており，再現性，精度も良好であったことから，これら薬物の血中濃度測定に有効であることが示された。この測定法はグラジエント溶離を行う必要がなく，1 検体 25 分で HPLC 分析が終了する非常に簡便な測定法であり，臨床検体を測定するのに有用であるといえる。

文 献

- 1) Kumar GN, Rodrigues AD, Buko AM et al :
Cytochrome P450-mediated metabolism of the

HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **277** : 423-431, 1996

- 2) Kumar GN, Jayanti V, Lee RD et al : In vitro metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ABT-378 : species comparison and metabolite identification. *Drug Metab Dispos* **27** : 86-91, 1999
- 3) Adkins JC, Noble S : Efavirenz. *Drugs* **56** : 1055-1064, 1998
- 4) Product information, Kaletra (lopinavir/ritonavir), Abbott Park, IL : Abbott Laboratories, 2000
- 5) Product information, Sustiva (efavirenz), Wilmington, DE : DuPont Pharmaceuticals Company, 2001

(平成15年 3 月 25 日 受付)

(平成15年 9 月 19 日 受理)