

Cilastatin sodium (MK-0791) の体液および組織内濃度測定法

亀井啓介・岡崎明彦・岡田則子・濱島健二

日本メルク葯有株式会社研究所

O-フタルアルデヒドを用いたポストカラム法による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により cilastatin sodium (MK-0791) の体液および組織内濃度測定法の検討を行った。

本法による MK-0791 のヒト血漿、尿および胆汁中からの回収率は、imipenem (MK-0787) の存在の有無にかかわらずそれぞれ 75~83% で、変動率 (C. V.) は 6% 以内であった。また各体液での検量線は、0.5~50 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性を示し、さらに組織内 MK-0791 濃度の測定法では、2.5 $\mu\text{g/g}$ まで充分測定可能であった。

MK-0791 の安定性試験では、 -20°C および -80°C で少なくともヒト血漿中では 70 日間、ヒト尿、胆汁中では 56 日間は安定であった。また家兎組織内の MK-0791 も -80°C で少なくとも 42 日間は安定であった。

Imipenem (MK-0787) は、Merck Sharp & Dohme Research Laboratories (MSDRL) において合成されたカルバペネム系抗生物質で、抗菌力に優れ、強い β -lactamase 阻害活性を有する。しかしながら、腎に存在する dehydropeptidase-I (renal dipeptidase) により代謝され良好な尿中回収率が得られない。そこでこの酵素に対して選択的阻害作用を有するが抗菌活性は示さない cilastatin sodium (MK-0791) が合成された。MK-0791 の構造式は Fig. 1 に示すとおりである。

临床上、MK-0791 は MK-0787 との合剤として用いられ、MK-0787 の生体内挙動を知るうえで MK-0791 の生体内挙動を知ることは有用なことから考えられる。そこで、MK-0791 の体液および組織内濃度の測定法について HPLC を用いて検討を行った。なお、測定精度を向上させるため、内部標準法を採用した。さらにヒト体液中および家兎組織内における MK-0791 の安定性についても検討したのでその結果について述べる。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用化合物

MK-0787, MK-0791 および血漿中、組織内 MK-0791

濃度測定時の内部標準物質である S-(p-methylbenzyl)-L-cysteine は、MSDRL において合成されたものを用いた。また、尿、胆汁、脳脊髄液中 MK-0791 濃度測定時の内部標準物質である S-benzyl-L-cysteine は、東京化成工業 (株) 製を用いた。

2. HPLC による定量法

MK-0791 の測定は、DEMETRIADES¹¹⁾ の O-フタルアルデヒドを用いたポストカラム法に基づき一部変更して行った。

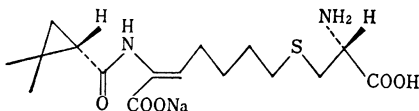
MK-0791 は、MK-0787 と併用投与されるため、尿では MK-0787 の安定化剤として MOPS 緩衝液 [1 M 3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid (pH 6.8)/Ethylene glycol (1:1; v/v)] を、また尿以外の体液および組織では安定化剤として MES 緩衝液 [1 M 2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid (pH 6.0)/Ethylene glycol (1:1; v/v)] を用いた。体液では、緩衝液と等容量に混合したものを試料とした。また組織では、組織重量の 4 倍容量の緩衝液を加えホモジネートを調製したのち、 4°C で 15 分間遠心分離 (3,000 rpm) して得られた上清を試料とした。各試料とも測定に供するまで -80°C にて保存した。

(1) 抽出方法

a. 血漿試料

10 ml の丸底試験管に試料 2.0 ml (血漿 1.0 ml と MES 緩衝液 1.0 ml) をとり、内部標準物質水溶液 0.1 ml (4.0 μg) を加えたのち攪拌した。次にメタノール 3.0 ml を加えて攪拌し、 4°C で 15 分間遠心分離 (3,000 rpm) した。上清約 4 ml を別の 10 ml 細引試験管に移し、 50°C の水浴中で窒素気流下約 0.5 ml まで濃縮し

Fig. 1 Chemical structure of MK-0791



た。攪拌したのち、再び 4°C で 15 分間遠心分離 (3,000 rpm) し上清をフィルター (濾過孔径 0.45 μm) で濾過後、その濾液の 50 μl を HPLC に供した。標準試料として、ブランク血漿に既知量の MK-0791 標準品を添加し、被験試料と同様に処理後、MK-0791 の添加量と内部標準物質に対するクロマトグラム上のピーク高さの比から検量線を作成し、これから MK-0791 の血漿中濃度を算出した。

b. 尿試料

10 ml の丸底試験管に試料 2.0 ml (尿 1.0 ml と MOPS 緩衝液 1.0 ml) をとり、内部標準物質水溶液 0.1 ml (6.0 μg) を加えたのち攪拌した。次に SEP-PAK[®] (C₁₈ カートリッジ) に注入し、0.2 M 炭酸緩衝液 (pH 9) 5.0 ml を 2 回通し、さらに水 1.0 ml を通したのち、窒素気流下で SEP-PAK[®] 内の水を除去した。SEP-PAK[®] にメタノール 6.0 ml を通し、溶出液を別の 10 ml 細引試験管にとり、40°C の水浴中で窒素気流下、約 1.5 ml まで濃縮した。攪拌したのち、試料溶液の 50 μl を HPLC に供した。尿中 MK-0791 濃度は、血漿と同様にして作成した検量線から算出した。

c. 胆汁試料

10 ml の丸底試験管に試料 2.0 ml (胆汁 1.0 ml と MES 緩衝液 1.0 ml) をとり、内部標準物質水溶液 0.1 ml (6.0 μg) を加えたのち、攪拌した。次に 5 N HCl 0.2 ml を加えたのち、クロロホルム 5.0 ml を加え 10 分間振とうした。4°C で 15 分間遠心分離 (3,000 rpm) し、上層を SEP-PAK[®] に注入し、水 0.5 ml を通した

のち、窒素気流下で SEP-PAK[®] 内の水を除去した。SEP-PAK[®] にアセトニトリル/イソプロパノール (25 : 1) 混合溶液 8.0 ml を通し、その溶出液を別の 10 ml 細引試験管にとり、40°C の水浴中で窒素気流下蒸発させたのち、移動相 0.3 ml を加えた。攪拌したのち、4°C で 15 分間遠心分離 (3,000 rpm) し上清をフィルター (濾過孔径 0.22 μm) で濾過後、その濾液の 10 μl を HPLC に供した。胆汁中 MK-0791 濃度は、血漿と同様にして作成した検量線から算出した。

d. 脳脊髄液試料

試料 100 μl (脳脊髄液 50 μl と MES 緩衝液 50 μl) に内部標準物質水溶液 50 μl (0.15 μg) を加えたのち、攪拌した。この試料溶液の 130 μl を HPLC に供した。標準試料として既知濃度の MK-0791 標準水溶液 100 μl を被験試料と同様に処理し、ピーク高さの比から検量線を作成し、これから脳脊髄液中の MK-0791 濃度を算出した。

e. 組織試料

10 ml の丸底試験管に試料 0.5 ml をとり、内部標準物質水溶液 0.1 ml (4.0 μg) を加えたのち攪拌した。その後の操作は胆汁試料の抽出方法に準じた。ただし、濾過孔径 0.22 あるいは 0.45 μm のフィルターを使用した。標準試料として蒸留水と MES 緩衝液混合溶液 (1 : 4; v/v) に、既知量の MK-0791 標準品を添加し、被験試料と同様に処理後、ピーク高さの比から検量線を作成し、これより組織内 MK-0791 の濃度を算出した。

(2) 測定条件

Fig. 2 HPLC chromatograms obtained from blank human plasma (A) and urine (C), plasma (B) and urine (D) spiked with MK-0791 and an internal standard
Peaks; 1=MK-0791, 2=S-(p-methylbenzyl)-L-cysteine, 3=S-benzyl-L-cysteine

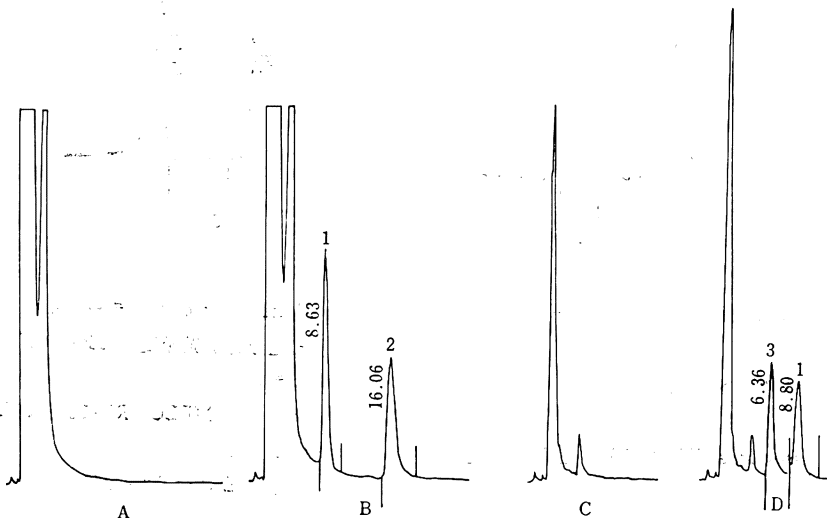


Fig. 3 HPLC chromatograms obtained from blank human bile (E) and cerebrospinal fluid (G), bile (F) and cerebrospinal fluid (H) spiked with MK-0791 and an internal standard. Peaks ; 1=MK-0791, 3=S-benzyl-L-cysteine

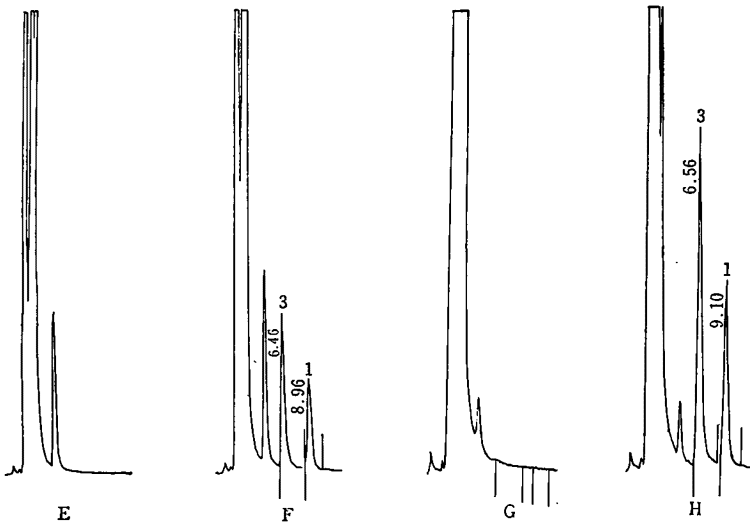
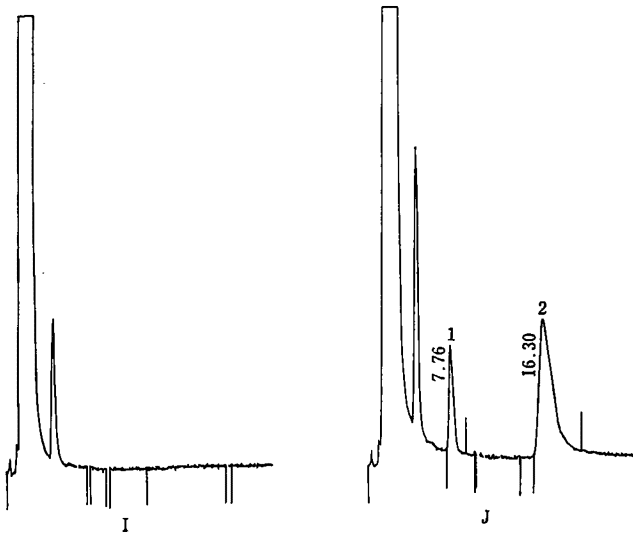


Fig. 4 HPLC chromatograms obtained from blank rat kidney (I) and kidney (J) spiked with MK-0791 and an internal standard. Peaks ; 1=MK-0791, 2=S-(p-methylbenzyl)-L-cysteine



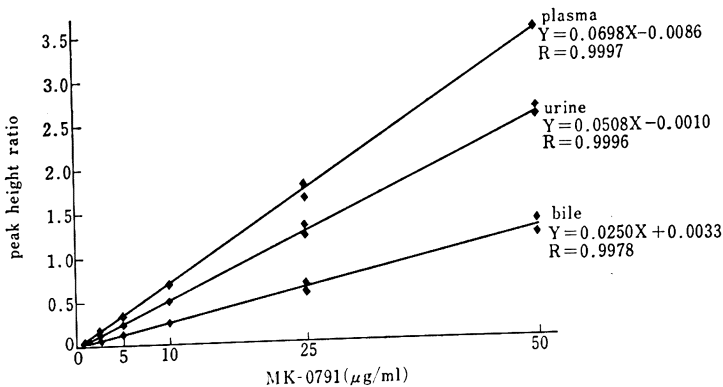
a. 装置

1. Waters associates HPLC 6000 A ポンプ (移動相用)
2. Waters associates 45 型ルーチン専用ポンプ (反応試薬用)
3. Waters associates WISP 710 B (自動試料注入装置)
4. Waters associates システムコントローラー M

720

5. Waters associates データモジュール M730
 6. 日立分光蛍光光度計 650-10 LC
- b. カラム
1. ガード: MPLC RP-18 SPHERI-10 18-GU (Brownlee Labs.)
 2. 分析: ERC-ODS-1162 (4.6×100 mm, Erma Optical Works)

Fig. 5 Calibration curves for MK-0791 in human plasma, urine and bile (n=2)



3. 反応: ステンレススチールカラム (4.6×250mm, Hewlett-Packard) Whatman # 4338-015 ガラスビーズ (40µm) を充てん

4. カラム温度: ガードカラム, 分析カラム, 反応カラムすべて室温

c. 移動相: 水/85% リン酸/イソプロパノール (91.8/0.2/8.0 または 92.8/0.2/7.0, v/v/v%)

d. 反応試薬: O-フタルアルデヒド 1.0g をエタノール 10ml に溶解し, 2-メルカプトエタノール 0.5ml を添加後, ホウ酸緩衝液 (1M KOH 160ml にホウ酸 6.0g を加え, さらに蒸留水で全量 1,000ml とした) 1,000ml に加え, さらに 10% Brij 35 を 3ml 加えて混合

e. 流速: 2.0 ml/min (移動相) および 1.5 ml/min (反応試薬)

f. 波長: 励起 335 nm (スリット幅 10 nm), 蛍光 455 nm (スリット幅 10 nm)

g. 分光蛍光光度計感度: レンジ 0.1 または 0.3

3. MK-0791 の安定性試験

以下に述べる方法で試料を調製し, 分取した。体液試料は -20°C および -80°C で, 組織試料は -80°C で保存した。これら試料を適宜抽出, 測定し MK-0791 の濃度を求めた。

(1) ヒト体液 (血漿, 尿, 胆汁) 中での安定性

a. MK-0791 単独試料

MK-0791 標準溶液 1.0 mg/ml を 0.1, 0.2 ml, また 5.0 mg/ml を 0.1 ml とり, 各々凍結乾燥後, これに体液 20 ml と緩衝液 20 ml を加え, 5.0, 10.0, および 25.0 µg/1.0 ml 体液の試料を調製し, 2.0 ml ずつ分取した。

b. MK-0787 混合試料 (1:1; w/w)

MES 緩衝液または MOPS 緩衝液で 5, 10, 25 µg/

Table 1 Recovery of MK-0791 from human plasma

Amount added (µg/ml)		Recovery (%)	
MK-0791	MK-0787	Mean±S.D.*	C.V. (%)
5.0	—	79.2±2.5	3.2
5.0	5.0	79.6±3.2	4.1
10.0	—	78.2±2.8	3.6
10.0	10.0	78.3±1.7	2.2
25.0	—	81.5±1.9	2.3
25.0	25.0	79.4±2.4	3.0

* n = 5

Table 2 Recovery of MK-0791 from human urine

Amount added (µg/ml)		Recovery (%)	
MK-0791	MK-0787	Mean±S.D.*	C.V. (%)
5.0	—	80.0±3.0	3.7
5.0	5.1	78.4±4.6	5.9
10.0	—	80.9±3.9	4.8
10.0	10.2	74.8±1.5	2.0
25.0	—	78.2±3.5	4.5
25.0	25.4	79.5±1.1	1.4

* n = 5

Table 3 Recovery of MK-0791 from human bile

Amount added (µg/ml)		Recovery (%)	
MK-0791	MK-0787	Mean±S.D.*	C.V. (%)
5.0	—	83.0±2.4	2.9
5.0	5.0	80.1±4.3	5.3
10.0	—	81.7±4.8	5.8
10.0	10.0	79.7±2.4	3.1
25.0	—	81.1±4.6	5.7
25.0	25.0	76.3±3.3	4.4

* n = 5

Table 4 Comparison of MK-0791 stability in human plasma after storage at -20°C and -80°C Stored at -20°C

Day	MK-0791 alone ($\mu\text{g/ml}$)			MK-0791 with MK-0787* ($\mu\text{g/ml}$)		
	5.0**	10.0	25.0	5.0	10.0	25.0
0	4.9	10.6	26.8	5.0	10.4	26.8
14	4.5	8.9	27.2	5.5	12.8	26.5
28	5.1	10.3	24.9	5.5	10.5	25.6
42	5.3	10.9	24.7	5.2	10.4	25.2
56	5.1	9.6	19.3	5.1	8.0	19.8
70	5.2	10.4	26.0	5.1	10.1	27.2
Mean	5.0	10.1	24.8	5.2	10.4	25.2

Stored at -80°C

Day	MK-0791 alone ($\mu\text{g/ml}$)			MK-0791 with MK-0787* ($\mu\text{g/ml}$)		
	5.0**	10.0	25.0	5.0	10.0	25.0
0	4.9	10.6	26.8	5.0	10.4	26.8
14	5.5	10.6	24.0	5.3	10.1	26.4
28	5.0	11.1	25.4	5.2	9.8	24.2
42	5.1	10.5	24.0	4.3	10.5	25.2
56	5.6	9.6	21.3	5.4	10.8	26.8
70	4.7	10.0	26.1	5.1	9.7	24.2
Mean	5.1	10.4	24.6	5.1	10.2	25.6

* MK-0787/MK-0791 (1:1; w/w)

** Amount added ($\mu\text{g/ml}$)Table 5 Comparison of MK-0791 stability in human urine after storage at -20°C and -80°C Stored at -20°C

Day	MK-0791 alone ($\mu\text{g/ml}$)			MK-0791 with MK-0787* ($\mu\text{g/ml}$)		
	5.0**	10.0	25.0	5.0	10.0	25.0
0	4.1	9.4	26.9	3.9	8.3	21.4
14	4.3	10.2	27.5	4.8	9.5	28.1
28	4.8	9.2	23.9	4.7	8.8	25.1
42	5.4	9.9	23.5	5.4	9.9	25.2
56	4.6	9.9	24.3	5.1	10.3	24.6
Mean	4.6	9.7	25.2	4.8	9.4	24.9

Stored at -80°C

Day	MK-0791 alone ($\mu\text{g/ml}$)			MK-0791 with MK-0787* ($\mu\text{g/ml}$)		
	5.0**	10.0	25.0	5.0	10.0	25.0
0	4.1	9.4	26.9	3.9	8.3	21.4
14	4.5	9.8	25.8	4.6	10.4	26.6
28	4.8	9.3	24.3	5.0	10.4	23.1
42	5.3	9.4	24.2	5.2	10.0	24.9
56	4.8	9.6	24.3	5.2	9.8	24.4
Mean	4.7	9.5	25.1	4.8	9.8	24.1

* MK-0787/MK-0791 (1:1; w/w)

** Amount added ($\mu\text{g/ml}$)

Table 6 Comparison of MK-0791 stability in human bile after storage at -20°C and -80°C Stored at -20°C

Day	MK-0791 alone ($\mu\text{g/ml}$)			MK-0791 with MK-0787* ($\mu\text{g/ml}$)		
	5.0**	10.0	25.0	5.0	10.0	25.0
0	6.3	10.2	24.5	5.6	10.8	27.6
15	5.1	11.1	27.6	5.1	10.4	26.8
28	5.2	10.1	24.6	4.9	9.9	25.5
46	5.7	10.4	23.8	5.3	10.0	23.0
56	5.6	10.8	25.2	5.5	9.9	24.7
Mean	5.6	10.5	25.1	5.3	10.2	25.5

Stored at -80°C

Day	MK-0791 alone ($\mu\text{g/ml}$)			MK-0791 with MK-0787* ($\mu\text{g/ml}$)		
	5.0**	10.0	25.0	5.0	10.0	25.0
0	6.3	10.2	24.5	5.6	10.8	27.6
15	4.7	10.1	25.0	4.9	10.9	28.9
28	4.7	10.1	24.9	5.8	10.0	23.6
46	5.4	9.9	25.8	5.5	10.6	24.4
56	5.6	11.3	24.2	5.4	10.2	24.4
Mean	5.3	10.3	24.9	5.4	10.5	25.8

* MK-0787/MK-0791 (1:1; w/w)

** Amount added ($\mu\text{g/ml}$)Table 7 Stability of MK-0791 in rabbit tissues stored at -80°C

Day	MK-0791 ($\mu\text{g/g}$ tissue)							
	Kidney				Uterus			
	Method I		Method II		Method I		Method II	
	20.0*	6.0	20.0	6.0	20.0	6.0	20.0	6.0
0	19.3	4.5	17.9	4.7	18.5	4.8	18.3	4.0
7	18.3	4.8	18.0	5.0	19.1	5.6	18.2	4.7
14	14.4	3.9	17.8	4.0	18.7	4.9	19.3	5.4
29	18.1	5.5	17.2	5.1	16.1	5.3	17.7	2.8
42	19.5	4.4	18.5	5.2	22.5	5.2	19.0	7.9
Mean	17.9	4.6	17.9	4.8	19.0	5.2	18.5	5.0

* Amount added ($\mu\text{g/g}$ tissue)

ml の濃度に調製した MK-0787 溶液を緩衝液として用い、a. の操作に準じ MK-0787 との混合試料を調製した。

(2) 家兎組織内での安定性

MK-0787 および MK-0791 の濃度がともに $5.0 \mu\text{g/ml}$ または $1.5 \mu\text{g/ml}$ となるように MES 緩衝液で MK-0787 と MK-0791 の混合溶液 (1:1; w/w) を調製した。家兎から摘出した腎および子宮に前述の MK-0787/MK-0791 混合溶液を組織重量の 4 倍容量加えてホ

モジネートを調製した。ホモジネート中での MK-0791 の安定性を調べるため、先のホモジネートの一部を用いて 1.5 ml ずつ分取し保存した (第 I 法)。また、ホモジネートを遠心分離して得られる上清中での安定性を調べるため残りのホモジネートを 4°C で 15 分間遠心分離 ($3,000 \text{ rpm}$) し、その上清を 0.5 ml ずつ分取し保存した (第 II 法)。なお第 I 法では抽出時に上記分取したホモジネートを第 II 法と同じ条件で遠心分離し得られた上清の 0.5 ml を抽出に用いた。

II. 結 果

1. HPLC 法

O-フタルアルデヒドを用いたポストカラム法による MK-0791 の体液および組織内濃度の測定に関して検討を行い、その結果得られた標準クロマトグラムを Fig. 2~4 に示した。MK-0791 と内部標準物質との分離は良好で、さらにヒト血漿、尿、胆汁、脳脊髄液およびラット腎、いずれにおいてもクロマトグラム上、内因性の妨害ピークは認められなかった。また MK-0787 と混合した場合でもクロマトグラム上、何の変化も認められなかった。

Fig. 5 にヒト血漿、尿、胆汁における MK-0791 の検量線の 1 例を示した。各体液での相関係数 R は、血漿、尿、胆汁において、それぞれ 0.9997, 0.9996, 0.9978

で、直線性は良好であった。また各体液とも $0.5 \mu\text{g/ml}$ まで十分に検出可能で、組織では $2.5 \mu\text{g/g}$ まで検出可能であった。

本法での MK-0791 の回収率を調べるためにヒト血漿、尿および胆汁に既知濃度の MK-0791 を単独で添加した場合と MK-0787 と混合して添加した場合 (1:1; w/w) について、それぞれ 3 種類の濃度を用いて実験を行った。その結果およびその際の変動率を Table 1~3 にまとめた。これらから明らかなように、血漿、尿、胆汁、いずれの場合も MK-0787 の存在の有無にかかわらず各濃度において、回収率は 75~83% で、しかもその変動率はすべて 6% 未満という良い再現性を示した。

2. MK-0791 の安定性

-20°C および -80°C で保存したヒト血漿、尿、胆汁試料と -80°C で保存した家兎組織試料を適宜抽出し測定して得られた結果を Table 4~7 にまとめた。ヒト体液中では MK-0787 の存在の有無にかかわらず、 -20°C 、 -80°C とともに MK-0791 の濃度の低下は認められなかった。また家兎組織内からの MK-0791 検出実験でも、第 I 法あるいは第 II 法いずれの場合においても MK-0791 の濃度の低下は認められなかった。したがって MK-0791 は、 -20°C または -80°C で少なくともヒト血漿中では 70 日間、ヒト尿、胆汁中では 56 日間安定であり、また家兎組織内では -80°C で少なくとも 42 日間は安定であることが明らかとなった。

III. 考 察

今回の実験により、体液および組織内の MK-0791 濃度の測定法として HPLC による定量法を確立した。また MK-0791 は、体液中では -20°C あるいは -80°C で、また組織内では -80°C で保存した場合、1ヶ月以上安定であることを示した。

CAROLYN ら²⁾は紫外線検出器を用いた血清中 MK-0791 濃度測定法について報告している。しかしながらこの測定法では、エチレングリコール由来のピークがクロマトグラム上夾雑ピークとして認められることから、安定化剤としてのエチレングリコールを含む試料の測定には適当とはいえない。

ヒト血漿、尿、および胆汁に 3 種類の濃度の MK-0791 を添加した後の本法による回収率は、MK-0787 の存在の有無にかかわらず、それぞれ 75~83% と良好な

結果を与えた。このことから各体液とも MK-0787 の存在が MK-0791 の抽出および測定に関して何ら影響を与えていないことが示唆される。さらに変動率がすべて 6% 未満と再現性もよく、検量線の直線性も良好で $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度まで充分測定可能であり、組織内の MK-0791 も $2.5 \mu\text{g/g}$ まで検出可能であった。以上のことから、本法は MK-0791 の体液および組織内濃度の測定に有用であると結論される。

MK-0791 のヒト体液中における安定性試験では、MK-0791 は MK-0787 の存在の有無にかかわらず -20°C および -80°C で長期間安定であった。また家兎組織を用いた MK-0791 の安定性試験で、組織のホモジネートのままで保存した場合 (第 I 法) もホモジネートから上清を分離したのちに保存した場合 (第 II 法) も同じように安定であることが示された。なお、MK-0791 は生体内では主に腎において N-アセチル体代謝されるが³⁾、MES 緩衝液で調製したホモジネートの上清に MK-0791 を添加しても N-アセチル体は生成しないことを確認している。以上のことから MK-0791 はそれ自体、体液および組織内で安定であり、さらに MK-0787 が併存していても MK-0791 の安定性に影響を及ぼさないことが示唆される。したがって MK-0791 の体液試料は -20°C あるいは -80°C で、また組織試料は -80°C で保存すれば安定であり、試料中濃度の測定に影響がないことが示された。

文 献

- 1) DEMETRIADES, J.; S. MAGLIETTO, P. SOUDER & L. WHITE: Analytical procedure for the determination of MK-0791 free acid in plasma, urine and infusion solutions (reverse-phase HPLC, post-column derivatization, fluorescence detection). MSDRL data (unpublished, 1982)
- 2) CAROLYN, M. M. & L. B. JEFFREY: Determination of Imipenem and Cilastatin in Serum by High-Pressure Liquid Chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 78~81, 1984
- 3) 石井康行, 亀井啓介, 柴田雅彦, 堀越純子, 秋山博子, 濱島健二, 早瀬 清: 実験動物種における cilastatin sodium (MK-0791) の生体内動態—MK-0791 および代謝物の血漿中濃度および尿中排泄率—*Chemotherapy* 33(S-4): 323~328, 1985

ASSAY METHODS FOR CILASTATIN SODIUM IN BODY FLUIDS AND TISSUES

KEISUKE KAMEI, AKIHIKO OKAZAKI, NORIKO OKADA and KENJI HAMAJIMA

Research Laboratories, Nippon Merck-Banyu Co., Ltd.

High-performance liquid chromatographic methods using post-column derivatization with o-phthalaldehyde have been developed for the assay of cilastatin sodium (MK-0791) in body fluids and tissues.

Whether MK-0791 was added alone or with MK-0787, the recovery of MK-0791 from human plasma, urine and bile was between 75 and 83% and the coefficients of variation were 6% or less. Calibration curves were linear in the concentration range 0.5~50 $\mu\text{g/ml}$ of MK-0791 and it was possible to detect 2.5 $\mu\text{g/g}$ of MK-0791 in tissues.

MK-0791 was stable in human plasma, urine and bile for at least 70, 56 and 56 days, respectively, when stored at -20°C or -80°C . MK-0791 was stable in rabbit tissues for at least 42 days when stored at -80°C .