

マイクロダイアリシス法を用いた溶出試験の改良

長井紀章, 村尾卓俊, 伊藤吉將*

Improvement of Dissolution Test Using Microdialysis Method

Noriaki NAGAI, Takatoshi MURAO, and Yoshimasa ITO*

School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

(Received May 8, 2009; Accepted September 8, 2009)

Dissolution testing is a core performance test in pharmaceutical development and quality control. Generally, the HPLC method uses the analysis of dissolution testing. In this study, we attempted to improve the dissolution test by using microdialysis methods. We also investigated the comparison of the conventional HPLC dissolution method (batch-sampling method) and the improved dissolution test (microdialysis method). Histamine H₂-receptor antagonist cimetidine tablets (200 mg), which are used clinically and of which there are also some generic examples, were selected for this comparison, and the dissolution behavior of the tablets by the two methods were found to be similar. On the other hand, standard deviation in the microdialysis method was lower than that of the batch-sampling method. In addition, the microdialysis method can omit many steps such as the filtration, collection and replenishment of sample solutions, and is also able to accomplish continuous sampling of sample solutions. These findings provide significant information that can be used in the pharmaceutical development and quality control of original and generic products.

Key words—dissolution test; microdialysis; quality control; cimetidine; generic product

緒 言

現在, 日本は急速な高齢化に伴い, 欧米先進国とは比較にならない早さで高齢化社会を迎え, 国民医療費の増加が問題となっている。これら国民医療費は 2006 年には 33.1 兆円を超え, 社会保障制度の根幹を揺るがすほどの情勢となり, 国民医療費の抑制は大きな課題となっている。この国民医療費の抑制における取り組みの 1 つとして後発医薬品(後発品)が知られている。後発品は, 先発医薬品(先発品)の特許期限が切れた後に市販される医薬品であり, 薬効成分, 含量及び効能などが先発品のそれと同一で販売され, 先発品の代替が可能である。¹⁾さらに, この後発品は, 物理化学的性質を評価するための規格試験, 安定性を評価するための加速試験及び薬物動態を評価するための生物学的同等性試験を行うことで製造販売承認の取得が得られ, 先発品のように臨床試験の実施は免除されている。このため先発品と比較し, 後発品の製造承認販売に関する審査

期間は短く, 研究開発費も安価となり, 後発品の薬価は先発品に比べ格段に安く設定されている。このような背景から, 医療現場に対しては 2002 年以降医療費の適正化を目的として, 処方箋様式の変更, 後発品を含む処方及び後発品の調剤や情報提供に対する診療報酬上の評価導入などにより先発品医薬品から後発品への代替の促進が行われている。しかしながら, わが国における後発品普及率は, ほかの先進国に比べ低いのが現状である。この要因としては, 医薬分業の遅れ, 一般名処方や代替調剤に対する技能が確立されていないとともに, 医療機関において先発品から後発品へ代替を検討する際, 後発品の効果や製剤自身の純度や品質に対する「疑念」がいまだ完全には取り除けていないのではないかと考えられている。²⁻⁶⁾

これらの背景から, 後発品の普及にはこれまでより正確な製剤品質や純度の評価と先発品との生物学的同等性をより明確にすることが重要と考えられる。溶出試験は製剤間の品質を評価するために用いられる日本薬局方記載の試験法である。⁷⁾また, 日本の「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライ

近畿大学薬学部製剤学研究室

*e-mail: itoyoshi@phar.kindai.ac.jp

ン」では、経口固形製剤に対して溶出試験の実施が必要とされる場合の規定がある。⁷⁾それは、溶出挙動が類似と評価されれば、生物学的同等性判定において、ヒト追加試験が免除されるからである。このため、後発品の純度を含んだ品質確認及び製剤評価の検証を目的とした溶出試験法の改良又は試験工程の簡略化は、後発品普及に向けて極めて重要と考える。そこで本研究ではマイクロダイアリシス法の溶出試験への応用について検討を行った。また、この改良溶出試験法を用い先発医薬品と後発医薬品の製剤比較についても検討した。

実験方法

1. 先発品及び後発品の薬効成分及び剤形の選択
マイクロダイアリシス導入法による溶出試験の検討には、医療現場で汎用され、さらに後発品の種類の多い H₂-受容体拮抗薬シメチジンをを用いた。この

剤形及び主薬含量は、対象後発品の中で最も多い 200 mg 錠を選択した。本研究では、先発品を含めたこれらシメチジン錠計 3 種類 [先発品, タガメット (Lot No. 1364C); 後発品 A, ストマチジン (Lot No. 8L12); 後発品 B, シメチパール (Lot No. 08403)] について検討を行った。

2. 溶出試験法 溶出試験は、TOYAMA 社製溶出試験器 (NTR-1000) を用い、従来法による HPLC を用いた溶出試験 [バッチサンプリング法, Fig. 1 (A)]⁷⁾及びマイクロダイアリシス法による溶出試験法 [マイクロダイアリシス導入法, Fig. 1 (B)] の 2 種類について検討した。両方法とも、日本薬局方の試験法に準じて行い、パドル法 (50 回転/分) を用い、試験液には水又は日本薬局方記載溶出試験用 pH 1.2 及び pH 6.8 緩衝液を使用した。バッチサンプリング法ではベッセル内溶液採取は医薬品投入後 3 分間隔で行い、採取量は注射筒にて 1

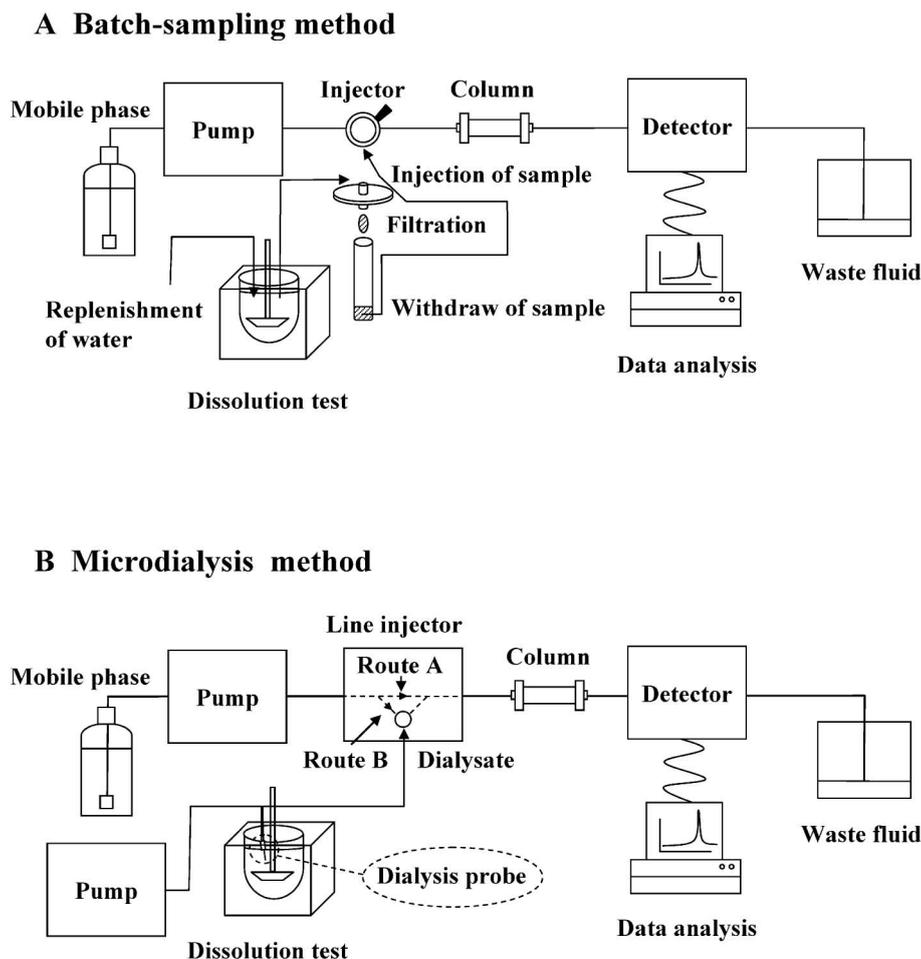


Fig. 1. Diagrams of Dissolution Test by Batch-sampling Method (A) and Microdialysis Method (B)

回 5 ml で行った。また、採取分と同量・同温度の試験液を補充した。試験液採取は、日本薬局方に従い、試験液面とパドルの上端との中間で、容器壁から 10 mm 以上離れた位置から行った。この採取液をフィルター (Minisart® CE, cellulose acetate, 0.45 μm , Sartorius) にてろ過後 HPLC にてシメチジン濃度を測定した。マイクロダイアリス導入法による溶出試験法は、オートインジェクター EAS-20 (エイコム) に接続された再生セルロース膜製透析プローブ (A-I-20-03, 深さ 20 mm, 膜長 3 mm, プローブ部内径 0.04 mm, エイコム) を溶出試験器内に挿入し、他方から ESP-32 (エイコム) にて水を送液 (8 $\mu\text{l}/\text{min}$) することで、ラインインジェクターへ試験液の注入を行い、HPLC 装置 (JASCO 社製, LC-Net II/ADC system, 送液ポンプ PU-2089Plus, 検出器 UV-2075Plus) にてシメチジンの測定を行った。HPLC による測定は、ラグタイム (1 分) を考慮し、透析プローブによるサンプル採取開始 1 分後の溶液を 0 分液として行った。測定は 6 分間隔で行い、医薬品の主薬が完全に溶出するまで行った。HPLC によるシメチジン測定は以下の条件にて行った。カラムは, Inertsil ODS-3 (3 μm , 2.1 \times 50 mm, ジーエルサイエンス) を用い、室温にて移動相 (0.04 M NaH_2PO_4 /アセトニトリル/メタノール/TFA : 345/20/35/0.7 by vol.)⁸⁾ で平衡化した。移動相の流速は 0.25 ml/min とした。バッチサンプリング法及びマイクロダイアリス導入法ともに HPLC への注入試料量は 48 μl とし、検出器 UV-2075Plus (JASCO) にて 242 nm の紫外吸収を測定した。また、先発品及び後発品から得られたデータは溶出試験開始前にシメチジン標準品 (Sigma 社製) 及び HPLC にて作成したシメチジン検量線から実濃度を算出した。本溶出試験では 200 mg のシメチジン錠を用い、試験液量は日本薬局方に従って 900 ml としたため、シメチジン錠中主薬が完全に溶解した際のシメチジン濃度理論値は 222 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。したがって、本論文ではシメチジン濃度 222 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を溶出率 100% として表した。実験は 6 回繰り返し、実験結果は平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で表した。また、標準偏差を用いて溶出試験時における錠剤間の“ばらつき”を比較検討した。

結 果

1. マイクロダイアリス法を用いた溶出試験の透析プローブ固定位置の設定 Figure 2 には本実験で試みた透析プローブの固定場所 (A-D) を、Fig. 3 には Fig. 2 で示す A-D に透析プローブを固定した際のシメチジン検量線を表す。A-D いずれの部位においても高い直線性が認められたものの、透析プローブを透過するシメチジン量に差がみられ、液面に近い A 及び B 点で液中の C, D 点より高値を示した。Figure 4 はパドルの回転数の異なる条件下におけるシメチジン検量線について示す。透析プローブは Fig. 2 の D 位置 (日本薬局方溶出試験試験液採取部位) に設置し測定を行った。パドルの回転数にかかわらず高い相関関係が認められた。一方、回転数の増加に従って、透析プローブを透過するシメチジン量の増加が認められた。このパドル回転数 (50 回転/分) の条件下におけるマイクロダイアリス導入法のシメチジン回収率は、試験液を HPLC へ直接注入した際の約 1.6% であった (直接注入法 $y=318000x$, $R=1.000$, $n=6$)。

2. pH 1.2 及び pH 6.8 試験液がマイクロダイアリス法を用いた溶出試験へ与える影響 Figure 5 に日本薬局方記載 pH 1.2 及び pH 6.8 緩衝液を溶出試験液として用い、マイクロダイアリス導入法によるシメチジンの検量線について示す。透析プ

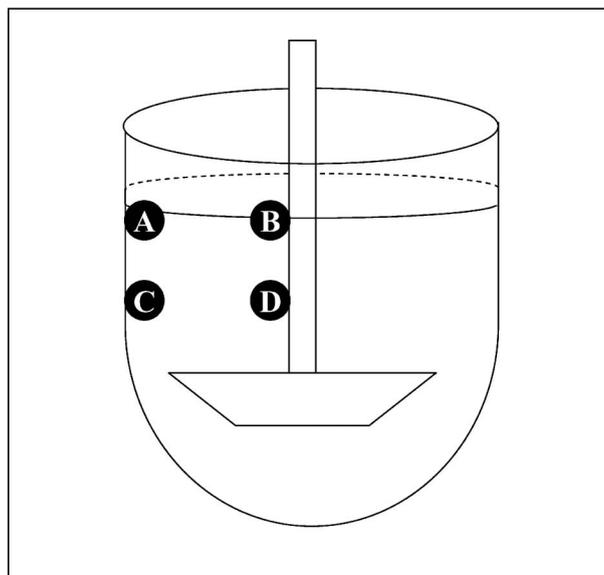


Fig. 2. Positions of Dialysis Probe in Microdialysis Method

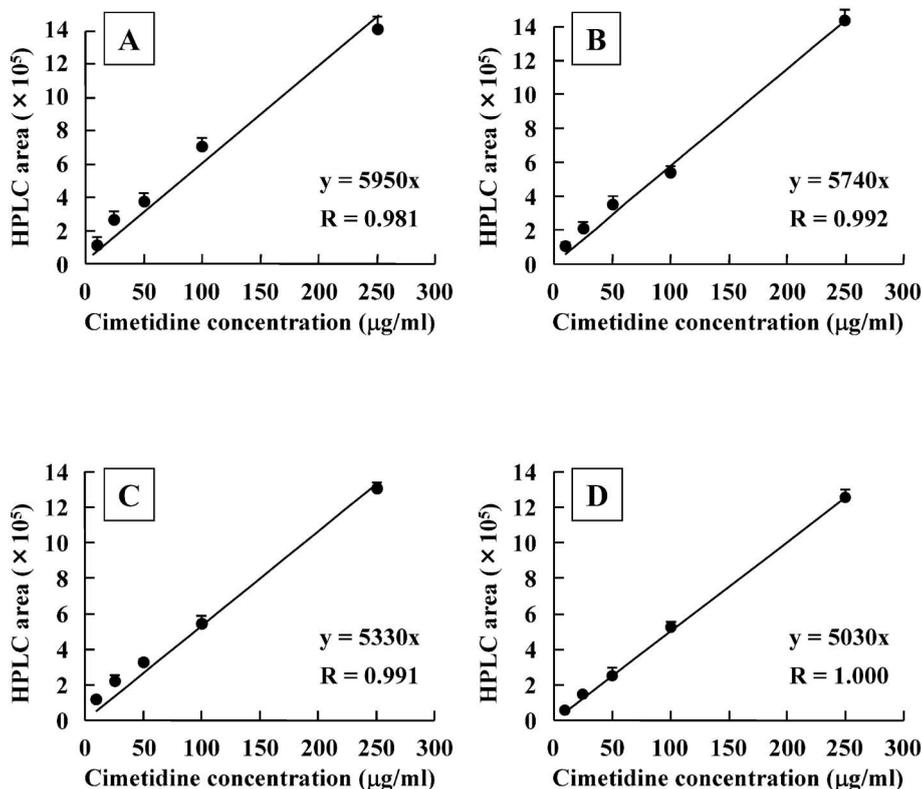


Fig. 3. Effect of Dialysis Probe Positions on Calibration Curves of Cimetidine by Microdialysis Method
The dialysis probe was fixed in A-D shown in Fig. 2. The data are presented as means \pm S.D. of 6 experiments.

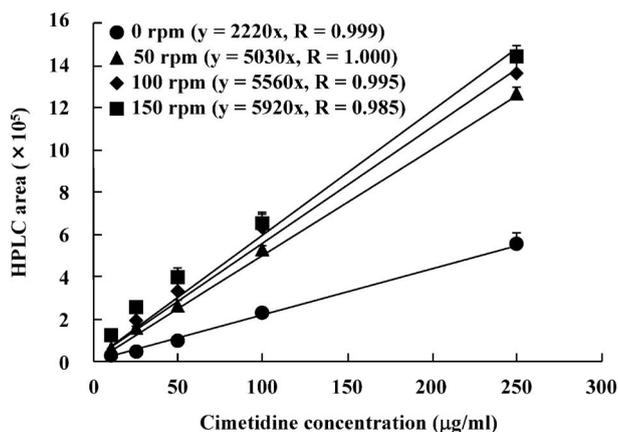


Fig. 4. Effect of Paddle Speed on Calibration Curves of Cimetidine by Microdialysis Method
The data are presented as means \pm S.D. of 6 experiments.

ローブは Fig. 2 の D 位置（日本薬局方溶出試験試験液採取部位）に設置し測定を行った。pH 1.2 及び pH 6.8 溶液いずれにおいても濃度依存的な HPLC ピーク面積の上昇が認められ、さらにいずれの R 値も 0.99 以上と良好な値を示した。一方、シメチジンの透析プローブ透過量は、試験液に水を用いた場合と比較し低値を示した (Figs. 4 and 5,

水 : $y = 5030x$; pH 1.2 : $y = 3810x$; pH 6.8 : $y = 3600x$, $n=6$).

3. マイクロダイアリシス法を用いた溶出試験による後発品シメチジンの品質評価 Figure 6 及び 7 にはバッチサンプリング法及びマイクロダイアリシス導入法を用いたシメチジン錠先発品、後発品の溶出曲線を示す。本実験で用いた 3 種のシメチジン錠いずれにおいても、バッチサンプリング法及びマイクロダイアリシス導入法間のシメチジン溶出挙動に差は認められず、同等の溶出性を示した。一方で、マイクロダイアリシス導入法ではバッチサンプリング法の結果と比較し、溶出時間 9 及び 15 分の溶出率の“ばらつき” (変動係数) は低値であった (Table 1)。先発品、後発品間の比較では、先発品は実験開始から薬物溶出が認められ、開始 15 分でプラトーに達した。後発医薬品においても最終溶出量は同様であり、先発品と差はみられなかったが、プラトーに達するまでの過程でその溶出速度に遅れがみられ、試験開始後 9 分における溶出率は後発品 A では、先発品と比較し明らかな差がみられた (Fig. 7)。しかし、「後発医薬品の生物学的同等性

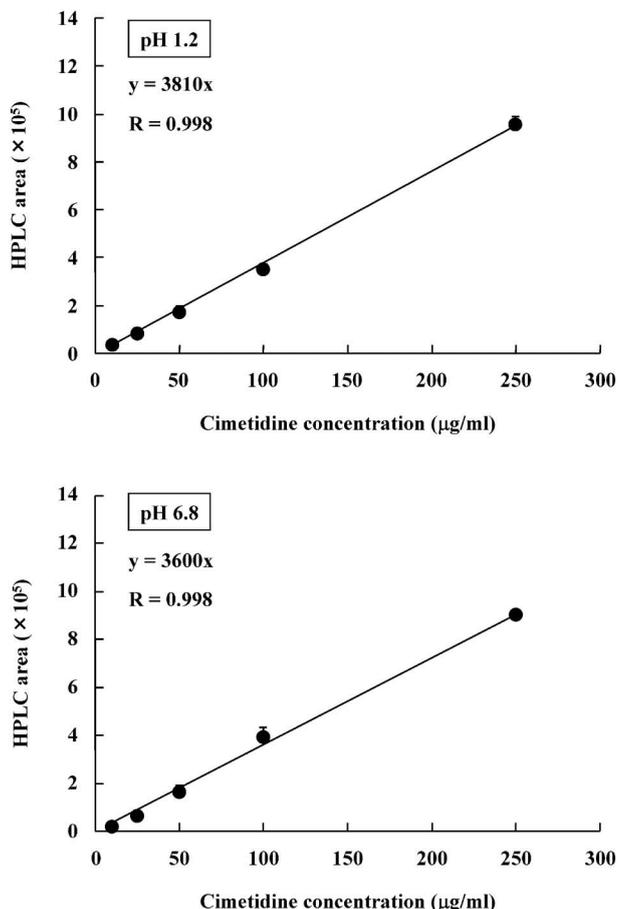


Fig. 5. The Calibration Curves of Cimetidine in pH 1.2 and pH 6.8 Solution by Microdialysis Method
 The data are presented as means \pm S.D. of 6 experiments.

試験ガイドライン」の基準から判定すると、今回試験した後発品は先発品と同等性が認められた。

考 察

溶出試験は日本薬局方に定められている試験法の1つで、錠剤やカプセルなどの内用固形製剤の品質を一定水準に確保し、併せて製剤間の著しい生物学的非同等性を防ぐことを目的として用いられている。近年の溶出試験法としては、ベッセル内溶液をろ過後 HPLC による定量法が用いられている [Fig. 1(A)]。この方法は HPLC により主薬の検出を行うため、複数の成分、吸収のある賦形剤、微量成分がある場合に正確な定量及び純度確認が可能である。また、短時間間隔 (約 2 分間隔) での測定も可能であり、後発品を含んだ製剤の品質及び生物学的同等性の検証に非常に有効な方法として用いられている。しかし、この試験法は一定間隔でベッセル内から採取した溶液をろ過後 HPLC にて測定する

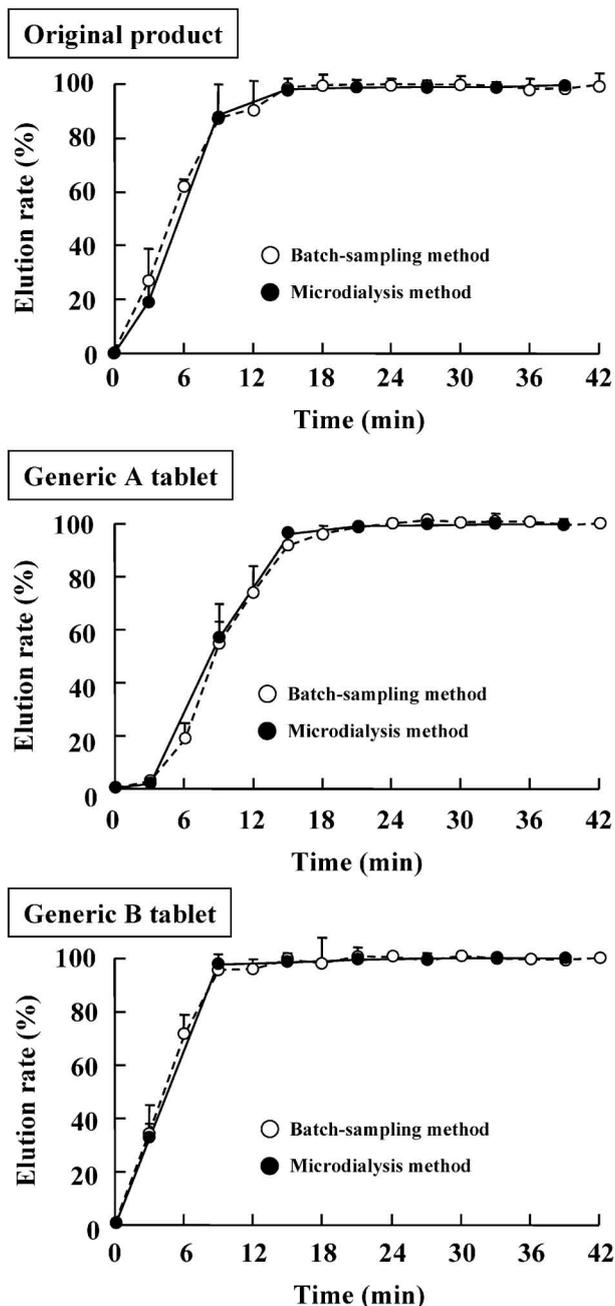


Fig. 6. Comparison of Dissolution Rate for Original and Generic Products of Cimetidine Tablet in Microdialysis Method
 The data are presented as means \pm S.D. of 6 experiments.

ため、ベッセル内からの溶液採取及び補充や溶液の濃度補正計算が必要である [Fig. 1(A)]。本研究では、これらの工程を簡略化すべく、マイクロダイアリシス法を用いた溶出試験法開発を試みた。また、このマイクロダイアリシス導入法を用い先発医薬品と後発医薬品の製剤比較についても検討した。

マイクロダイアリシス法は、微小透析プローブ (直径 0.2–0.5 mm) の半透膜の性質を利用して、物

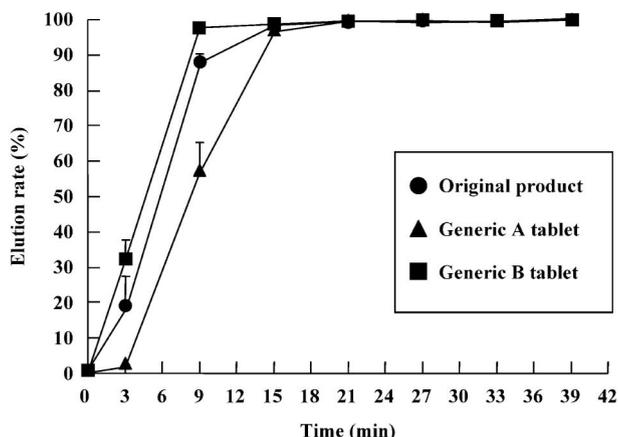


Fig. 7. Comparison of Batch-sampling and Microdialysis Methods Using Original and Generic Products of Cimetidine Tablet

The data are presented as means \pm S.D. of 6 experiments.

Table 1. Comparison of Mean Dissolution Ratio and S.D. for Dissolution Testes to Original and Generic Products between Batch-sampling and Microdialysis Methods

		Batch-sampling method		Microdialysis method	
		Mean (%)	S.D.	Mean (%)	S.D.
Original product	3 min	25.1	13.2	17.9	9.2
	9 min	86.7	14.5	87.7	2.7
	15 min	100.6	3.6	97.6	0.7
Generic A tablet	3 min	3.5	1.1	1.6	0.9
	9 min	53.4	15.4	56.2	8.7
	15 min	90.9	4.5	96.3	1.3
Generic B tablet	3 min	36.0	11.2	32.5	6.0
	9 min	95.4	6.7	97.9	1.6
	15 min	100.0	2.2	98.7	0.9

The data are obtained from 6 experiments.

質を単純拡散により連続的に回収する方法である。この透析プローブは分子量 5000–25000 Da 以下の物質を回収し、透析膜を介して得た試料はろ過や予備精製なしで簡便に分析を行うことができる。この透析膜には多くの種類が存在し、低分子の物質の透析には再生セルロース、セルロースアセテート、ポリアクリロニトリル（神経ペプチド等の回収用）、ポリカーボネート等、透析膜の種類によって大きさや性質の異なる分子を回収することが可能である。シメチジンは分子量 252.34 であるため、本実験では酸、塩基に対して安定であり、低分子の物質用透析プローブとして再生セルロース膜を用いた。

本研究ではまずマイクロダイアリシス導入法を用

いた溶出試験を確立すべく、透析プローブによるシメチジンの測定及び透析プローブの固定位置について検討を行った。その結果、透析プローブの固定位置 (Fig. 2) にかかわらずシメチジンの測定が可能であったが、透析プローブ固定位置の違いにより透析プローブを透過するシメチジン量に差が認められた。さらに、これら透析プローブを透過するシメチジン量は、パドルの回転数増加とともに上昇した。これらの結果から、流速の増加が透析プローブの透過面における溶出薬物の一定供給を行うことにより、シメチジンの透析プローブ透過量が增大するものと考えられた。このため、マイクロダイアリシス法の使用による溶出試験条件として、透析プローブの固定及び設置場所が重要であることが明らかとなった。本研究では、これらをふまえ日本薬局方記載溶出試験の試験液採取部位 (Fig. 2, D 位置) に透析プローブを固定し以後の試験を行った。

一般的に溶出試験液には pH 1.2–pH 6.8 の緩衝液又は水が用いられる。したがって、これら溶液においてマイクロダイアリシス導入法が利用可能かどうかを明らかとすべく、溶出試験で用いられる pH 1.2 及び pH 6.8 溶液を用いシメチジン検量線作成を試みた。pH 1.2 及び pH 6.8 いずれの溶液においても濃度依存的な HPLC ピーク面積の上昇が認められ、相関係数 (R 値) も試験液に水を用いた条件下と同程度の値を示した。これらのことから、再生セルロース膜を用いた透析プローブにより、異なる pH 溶液においてもシメチジン回収が可能であることが明らかとなった。一方、これらマイクロダイアリシス導入法の回収率は、試験液を HPLC へ直接注入した際の約 1.6% と非常に低い回収率であったが、HPLC 法による分析には十分であった。このマイクロダイアリシス導入法の回収率を高めるためにはプローブ膜面積の拡大などが考えられる。

マイクロダイアリシス法が溶出試験に適用可能であることが明らかとなったため、ついで本法を用い先発品及び後発品における溶出性の評価を行った。先発品及び後発医薬品は医療現場で汎用され、さらに後発品の種類の多い H₂-受容体拮抗薬シメチジン錠を用いた。マイクロダイアリシス導入法がバッチサンプリング法と同等の溶出挙動を示すのかを確認することを目的とした 3 分間隔と比較的短い間隔で測定を行ったバッチサンプリング法とマイクロダイ

アリシス導入法の比較実験 (Fig. 6) では, 本研究で用いた3種の医薬品製剤いずれにおいてもシメチジン溶出率が類似するという結果が得られた. この結果は, マイクロダイアリシス法を用いた溶出試験法は, 医薬品の溶出性を正確に表すことを示した. さらに, 同ロットの製剤及び検出器を用いたにもかかわらず, マイクロダイアリシス導入法ではバッチサンプリング法の結果と比較し, 溶出率の“ばらつき”(S.D. 値)が少なかった (Table 1). 従来の溶出試験法では, 各時間毎に溶液を採取するのに対し, 本法では透析プローブにより連続的に溶液の採取を行うため, 従来法のような試験液採取工程が簡略化されている. 従来法と比較して, マイクロダイアリシス法での“ばらつき”低下はこれら試験液採取工程時に生じる“ばらつき”が簡略化により除かれたことに起因するものと示唆された. これらの結果は, 従来のバッチサンプリング法による溶出率の“ばらつき”は, 製剤間の異なりだけでなく, 試験法自身の精度も影響していることを示唆し, 本法 (マイクロダイアリシス導入法) が, 医薬品の溶出性をより明確に表すことが明らかとなった.

先発品及び後発品の溶出挙動の比較では, 先発品は実験開始から主薬の溶出が認められ, 開始15分でプラトーに達した. 一方, 後発医薬品においても最終溶出率は同様であり, 先発品との差はみられなかったが, プラトーに達するまでの過程でその溶出率に差がみられ, 試験開始後9分における溶出率は後発品Aでは, 先発品と比較し明らかな差がみられた (Fig. 7). 先発品の試験15分時における溶出率は約100%であり, 「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」の溶出挙動の同等性の判定では, 標準製剤が15分以内に平均85%以上溶出する場合, 試験製剤が15分以内に平均85%以上溶出するか, 15分における試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率 $\pm 15\%$ の範囲内にあることが示されている. 本研究では先発品及び後発品ともに, 15分以内に平均85%以上溶出しており, 今回の後発品と先発品で同等性が認められた.

近年の後発品販売により, 臨床では経時的な溶出率が重要と考えられる徐放性製剤の先発品と後発品の生物学的同等性が問題視されており, 後発品徐放性製剤の詳細な試験が必要である. したがって, 現在

筆者らは徐放性製剤 (ニフェジピン徐放錠) を用い, マイクロダイアリシス導入法を用いた溶出試験法が徐放性製剤に対しても適用可能であるのかについて検討しているところである.

以上, 本研究では新規製剤評価法開発として, マイクロダイアリシス導入法を用いた溶出試験法の確立を行った. この方法は, 近年のベッセル内溶液のろ過を必要とするHPLCによる溶出試験法とは異なり, マイクロダイアリシスに連結したHPLCを用いることでろ過過程を連続的に行い, ほとんど溶出液に濃度変化を与えず高感度かつ経時的な試験が可能となった. また, 従来のHPLC法と比較し, より“ばらつき”の少ない測定が可能となった. 最新のHPLC法を用いた溶出試験は, 全自動化が進んでおり, 本法のようなベッセル中溶液の採取及び補充過程や溶液の濃度補正計算簡便化への改良は, より安価で精度の高い溶出試験を提供するとともに, 今後多数販売される後発医薬品の品質管理にも十分応用可能と考える.

REFERENCES

- 1) Ogata H., *J. Pract. Pharm.*, **57**, 15–23 (2006).
- 2) Kusumoto M., *J. Pract. Pharm.*, **53**, 2791–2804 (2002).
- 3) Honda T., *J. Exp. Med.*, **210**, 133–135 (2004).
- 4) Tokushima Y., Raku M., Kono E., Toyota K., Sogawa M., Takasugi M., *Yakuji Shinpo*, **2122**, 1119–1123 (2000).
- 5) Nakamura Y., Fukuoka M., Kayano Y., Goto N., Wakiya Y., Masada M., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **31**, 158–163 (2005).
- 6) Onoda M., Kanematsu M., Kitamaru T., Sakai T., Sakagami K., Tanaka K., Hamahata Y., Hirooka T., Fujii K., Matsuda M., Miki H., Mashimo H., Hada R., Arakawa Y., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 1159–1166 (2007).
- 7) Division of Drugs, National Institute of Health Science, “Guideline for Bioequivalence Studies of Generic Products”: (<http://www.nihs.go.jp/drug/DrugDiv-J.html>)
- 8) Ho C., Huang H. M., Hsu S. Y., Shaw C. Y., Chang B. L., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **25**, 379–385 (1999).