

高速液体クロマトグラフィーによる 後発品レバミピド錠の溶出試験

Evaluation for dissolution test between original and generic rebamipide tablets
using high-performance liquid chromatography

每 熊 隆 誉¹
宮 口 良¹
池 田 光 真²
浦 上 悠²
藤 原 孝 子²
宮 本 佳 奈²
増 田 憲 俊²
手 嶋 大 輔¹

MAIGUMA takayoshi¹, MIYAGUCHI ryo¹,
IKEDA mitsumasa², URAKAMI yuu²,
FUJIWARA takako², MIYAMOTO kana²,
MASUDA noritoshi², TESHIMA daisuke¹

1 就実大学薬学部薬学科 2 金光薬品株式会社

1. 緒言

ムコスタ[®]錠の主成分であるレバミピドは、胃粘膜のプロスタグランジンE₂およびE₂の産生を促進し、胃粘膜の血流および胃粘液量を増加させることで胃粘膜を保護し、胃炎および胃潰瘍を改善・抑制する。また、薬剤性胃炎にも効果があるために、他剤と併用されることの多い薬物でもある。

ムコスタ[®]錠の後発医薬品として、現在34種が上市されている¹⁾。これらの後発医薬品は先発医薬品と同一成分を含有し、溶出試験および生物学的同等性試験の結果から市販が承認されたものであるため、先発医薬品のような多額の開発費を必要としない。したがって後発医薬品は低価格である。それゆえ日本政府は医療費削減のため後発医薬品の使用を積極的に勧めているが、日本の後発品使用率は世界的に見ると非常に少ない。2008年における日本ジェネリック製薬協会の調査によると²⁾、ジェネリック使用率は、数量ベースでアメリカが68.6%、ドイツが63.7%、イギリスは60.9%であるのに対して、日本は20.3%である。欧米諸国における使用率が高い理由として、代替調剤および一般名処方などが挙げられる。それゆ

えに、本邦においても2008年4月より条件付代替調剤が承認されたが、依然として、その利用率・普及率が伸び悩んでいる。その背景として、厚生労働省医政局による報告書³⁾では、医療機関や保険薬局などでは、どのようにジェネリック医薬品を選べばよいかわからない、あるいは、どのようなものが地域で多く使用されているのかわからないなどの声が挙がっていた。さらに、ジェネリック医薬品に不安を抱く医師も未だ少なからずいるとのことであった。

医療用医薬品の品質再評価の実施に伴い、製剤の溶出性等に係る品質情報の提供のため、その結果等を取りまとめた医療用医薬品品質情報集（以下、オレンジブック）が、品質再評価結果の通知ごとに年4回程度発行されている。オレンジブックでは、公的溶出試験として溶出成分の検出・定量に吸光度法を用い、先発医薬品と後発医薬品の溶出挙動を比較している。この吸光度法は、主成分、添加物および分解物など様々な要因が溶出率に影響を及ぼすため、主成分のみの溶出挙動を反映しているとは言い難い。

今回、吸光度法によるオレンジブックの公的溶出試験を実施すると同時に、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）を用いた成分レバミピドの分離定量を行うことで公的溶出試験における成分検出法の妥当性を検討した。併せて、HPLC法により先発医薬品であるムコスタ[®]錠、および、後発医薬品の錠剤中に含まれる添加剤を分離したのちに純粋な成分としてのレバミピドの溶出挙動を比較し、それらの溶出挙動における同等性を考察した。

2. 方法

2-1. 医薬品および試薬

使用した医薬品および試薬は全て特級品を用いた。各医薬品および試薬は以下の会社より購入した。ムコスタ[®]錠100（先発医薬品）：大塚製薬株式会社、レバミピド錠100mg「サワイ」[®]（後発医薬品）：沢井製薬株式会社、レバミピド原末：LKT Laboratories, Inc.、アセトニトリル：関東化学株式会社、テトラヒドロフラン：Nacalai tesque、酢酸：関東化学株式会社、クエン酸（無水）：Nacalai tesque、リン酸水素二ナトリウム・12水：Nacalai tesque、塩酸：Nacalai tesque、塩化ナトリウム：Nacalai tesque、メタノール：関東化学株式会社

2-2. 溶出試験法

試験液には、第十六改正日本薬局方の溶出試験第1液（以下pH1.2の試験液）、および溶出試験第2液を用いた。また、McIlvain緩衝液の調製は、0.025Mのクエン酸と0.05Mのリン酸水素二ナトリウムを用い、それらの混合比を変えることでpHを調節した。使用機器および器具として、富山産業株式会社より購入した溶出試験器：NRT-6100A DISSOLUTION TESTER、オートサンプラー：PAS-615 AUTO SAMPLER-W、フィルター：Fine Filter F-72を用いた。溶出試験の試験条件として後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン^{4), 5)}に示された酸性薬物としての試験条件をレバミピド錠（rebamipide, pka = 3.3, 25℃）の溶出試

験に適応した (Table 1)。

Table 1 酸性薬物を含む製剤におけるパドル法の条件

回転数 (rpm)	pH
50	①1.2
	②5.5~6.5 [†]
	③6.8~7.5 [†]
	④水
100	①、②、③のうちいずれか一つ [†]

[†] 標準製剤が規定された試験時間内にその含量の平均85%以上が溶出する条件で、溶出の遅い試験液を選択する。いずれの試験液においても、標準製剤が規定された試験時間内にその含量の平均85%未満の場合には、最も早い溶出液を選択する⁴⁾。

2-3. HPLC法における溶出濃度測定⁶⁾

移動相の組成として、水：アセトニトリル：テトラヒドロフラン：酢酸が128：64：6：2となるように調製した。各種液を混合した後、超音波で10分間脱気した。HPLCの使用機器として、ポンプ：LC-10AD (SHIMADZU)、カラムオープン：CTO-10Avp (SHIMADZU)、検出器：SPD-M10Avp (SHIMADZU)、カラム：TSK-GEL ODS-80Tm (TOSOH) を使用した。流量：1.2mL/min、検出波長：254nm、カラム温度：40℃、注入量：40μLの測定条件で行なった。

2-4. 統計処理

すべてのデータは平均値±標準偏差で示し、2郡間の比較にはt-testを用いた。危険率が5%未満の場合に統計学的に有意な差があると判定した。統計処理には、Microsoft Excel® 2003の分析ツールを用いた。

3. 結果

3-1. HPLCによるレバミピドの分離状況

レバミピドを移動相で溶解した120μg/mLのクロマトグラムを示した (Fig. 1)。

保持時間3.6分にレバミピドのシャープな分離ピークが出現した。

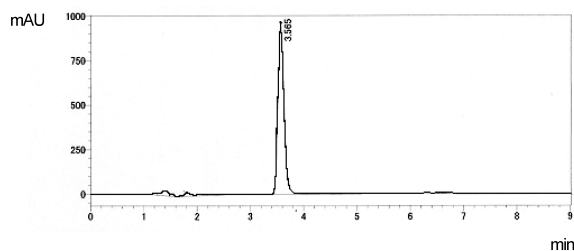


Fig. 1 HPLCにて測定したRebamimideクロマトグラム
Rebamipide標準液 (120μg/mL)、保持時間；3.565min.

3-2. HPLCによる検量線

HPLCの検量線を以下に示す。良好な直線性が得られ、相関係数は $r = 0.99989$ であった (Fig. 2)。

3-3. HPLC測定精度

レバミピドのHPLC法による再現性をみるために、定量濃度と回収率の日内・日間変動を測定した。日内における変動係数は1.07-7.38%以下であり、日間における変動係数は3.14-8.41%以下であった (Table 2およびTable 3)。

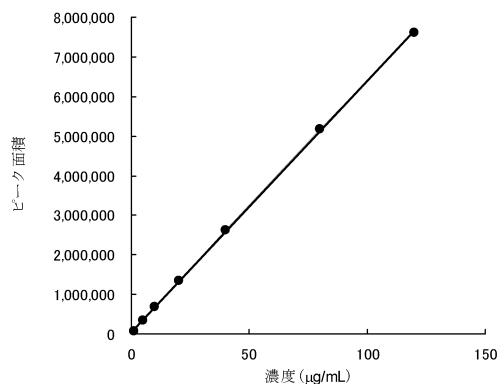


Fig.2 レバミピドの検量線
 $y = 63378x + 51392$ $r = 0.99989$

Table 2 日内変動 $n=5$

濃度 (μg/mL)	定量濃度 (μg/mL)	回収率 (%)
100	95.12 ± 7.02 (7.38)	95.12%
50	48.75 ± 0.52 (1.07)	97.50%
15	15.08 ± 0.17 (1.13)	100.52%

() : 変動係数、Mean ± SD

Table 3 日間変動 $n=5$

濃度 (μg/mL)	定量濃度 (μg/mL)	回収率 (%)
100	99.44 ± 6.41 (6.45)	99.44%
50	48.34 ± 4.07 (8.41)	96.68%
15	15.11 ± 0.47 (3.14)	100.73%

() : 変動係数、Mean ± SD

3-4. 各種測定法における溶出率の比較

各製剤と各試験条件における溶出挙動をFig. 3に示す。先発品に関して、HPLC法、吸光度法254nm、および吸光度法326nmの3つの方法で溶出率を算出した。溶出率が最大となる試験時間120分における先発品の溶出率(平均値)は、試験液が水の場合には、それぞれ9.63%、15.99%、および11.40%であり、pH1.2の試験液では、それぞれ0.66%、1.25%、および0.88%であった。一方、レバミピドが溶出しやすいpH6.0の試験液における先発品の溶出率は、それぞれ96.88%、94.59%、および97.47%であった。今回用いた試験液の中で、最も溶出し易いpH6.8の試験液での溶出率は、試験時間60分において、それぞれ100.99%、97.22%、および107.16%であった。さらに、pH6.8の試験液でパドルの回転数を100rpmに増加させた場合の先発品の溶出率は、それぞれ93.99%、101.77%、および99.98%となり、回転数が50rpmの

ときと比べて溶出の立ち上がりが約5分速くなっていた。以上、先発品に関して述べたが、後発品に関しても同様の結果が得られた。

公的溶出試験に定められたレバミピド錠の溶出規格における規定時間に従い、試験開始後60分での溶出率について比較検討を行った (Table 4)。HPLC法と吸光度法-254nmを比較したところ、水およびpH6.8-100rpmの条件のとき、統計学的に有意な溶出率の増加が認められた。また、HPLC法と吸光度法-326nmを比較したところ、試験液が水のとみに限り溶出率の有意な増加が認められた。

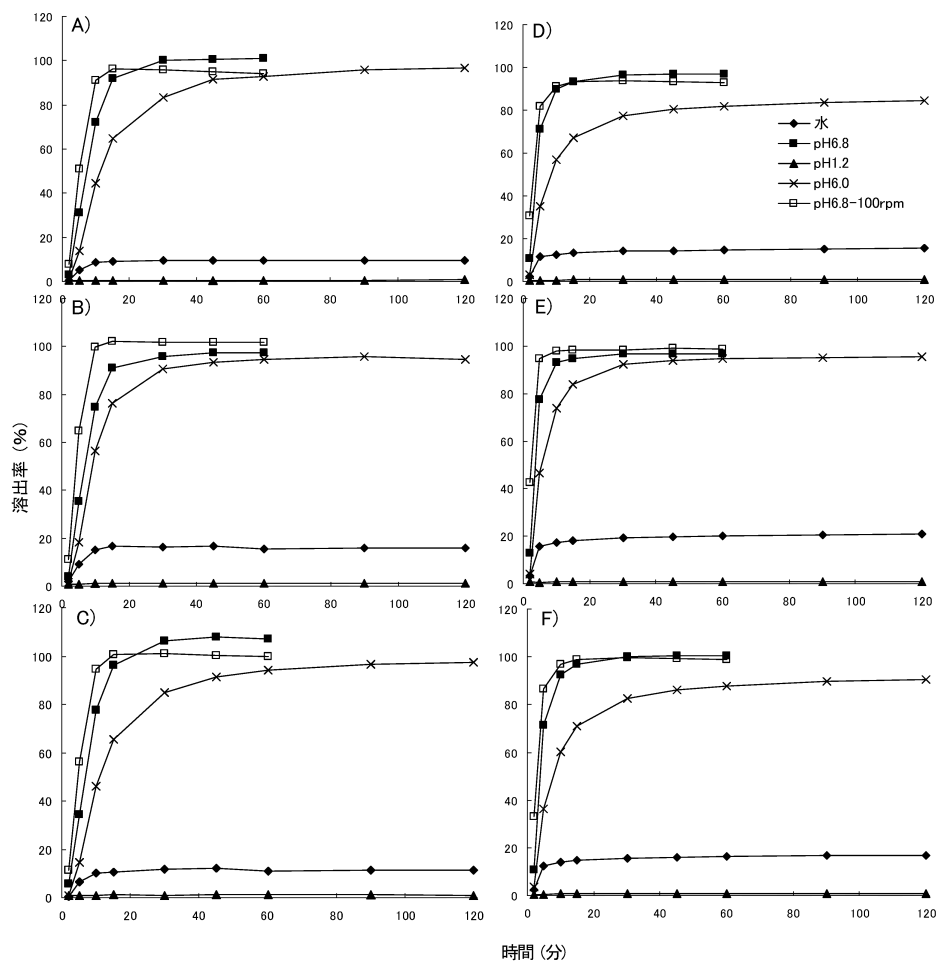


Fig. 3 各製剤と各試験条件における溶出挙動。

- A) 先発品のHPLC法による溶出挙動；B) 先発品の吸光度法-254nmによる溶出挙動；
 C) 先発品の吸光度法-326nmによる溶出挙動；D) 後発品のHPLC法による溶出挙動；
 E) 後発品の吸光度法-254nmによる溶出挙動；F) 後発品の吸光度法-326nmによる溶出挙動

Table 4 各種測定法の規定時間における溶出率 (%) の比較

	HPLC法 254nm	吸光度法 254nm	p 値	吸光度法 326nm	p 値
水	9.470 ± 0.175	15.491 ± 4.246	0.002**	11.108 ± 2.035	0.032*
pH1.2	0.545 ± 0.021	1.082 ± 1.081	0.151	1.076 ± 1.125	0.170
pH6.0	92.725 ± 2.244	94.719 ± 3.765	0.171	94.211 ± 1.484	0.100
pH6.8	100.987 ± 4.511	97.222 ± 5.291	0.104	107.165 ± 8.778	0.069
pH6.8-100rpm	93.995 ± 1.154	101.770 ± 4.907	0.001**	99.981 ± 8.882	0.064

Mean ± SD, *: p < 0.05, **: p < 0.01

3-5. HPLCによる先発品と後発品における溶出率の比較

公的溶出試験のレバミピドの溶出規格の規定時間に従い、60分での溶出率について比較検討した (Table 5)。HPLC法で測定した溶出率において先発品と後発品を比較したところ、pH6.8-100rpmの条件を除くすべての条件において有意差が認められた。

Table 5 HPLCによる先発品と後発品における溶出率 (%) の比較

	先発品	後発品	p 値
水	9.470 ± 0.175	14.494 ± 2.548	0.0002**
pH1.2	0.545 ± 0.021	0.844 ± 0.122	0.00002**
pH6.0	92.725 ± 2.244	81.828 ± 2.887	4.0 × 10 ^{-5**}
pH6.8	100.987 ± 4.511	96.755 ± 3.956	0.0386*
pH6.8-100rpm	93.995 ± 1.154	92.950 ± 1.120	0.0549

Mean ± SD, *: p < 0.05, **: p < 0.01

4. 考察

レバミピドの分離状況および検量線の直線性 (相関係数) から本HPLCの測定条件は適切なものと考えられる。また、HPLCによるレバミピドの測定精度に関して、日内変動および日間変動におけるそれぞれの回収率は90%以上、変動係数は10%以内であり、高い測定精度が確認された。

pH6.8-100rpmにおける溶出率の比較検討の結果から、HPLC法と254nmにおける吸光度測定法との間で有意な差が認められたが、326nmにおける吸光度測定法に対するHPLC法による測定結果には、有意差は認められなかった。オレンジブックによる公的溶出試験では、326nmを用いた吸光度測定法が採用されており、HPLC法による溶出挙動と同等の結果が得られることがわかった。したがって、公的溶出試験による溶出挙動の評価法は適切なものであるといえる。しかし、後発医薬品の中には、種々の添加物が加えられている可能性があり、HPLCによる分離定量を並行して実施することは必要であると考えられる。

HPLCによる先発品と後発品における溶出率の比較より、先発品に対して後発品は、水、pH1.2、pH6.0およびpH6.8の試験液の条件では統計学的に有意な差が認められた。水および

pH1.2の条件下では、後発品において溶出率が高かった。しかしながら、どちらの条件においてもレバミピドの溶出率はともに低く、身体へ有害な作用は先発品および後発品のいずれにおいても認められないと推察された。公的溶出試験のpH1.2からpH6.8という試験液の条件は、もともと胃から腸における液性を想定したものである。pH分配仮説にしたがうと、 $pK_a = 3.3$ (25℃)である成分レバミピドは、pH6.8の試験液が最も溶出し、次いでpH6.0の試験液で溶出すると考えられる。本検討において、pH6.0およびpH6.8の試験液における溶出率が、後発品において有意に低下するという結果が得られた。したがって、これらの液性条件下において、先発品から後発品に切り替えた場合には、吸収低下を引き起す可能性が示唆された。結論として、後発品レバミピド錠100mg「サワイ」[®]は、先発品ムコスタ[®]錠100に比べて、吸収低下による効果の減弱を生じる可能性が推察される。

5. 参考文献

- 1) 医薬情報研究所, “先発・代表薬でさがすジェネリック医薬品リスト”, 医薬情報研究所編, じほう, 東京, (2011)
- 2) 日本ジェネリック製薬協会, IMS Health, MIDAS, Market Segmentation, Rx only, Dec 2008
メーカー出荷ベース
- 3) 厚生労働省医政局経済課 委託事業, ジェネリック医薬品使用促進の先進事例に関する調査報告書, 三菱UFJリサーチ&コンサルティング株式会社 (2011)
- 4) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインなどの一部改訂について, 医食審査発1124004号, (2006)
- 5) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, “医療用医薬品品質情報集”, No.31, 日本公定書協会編, 薬事日報社, 東京, (2011)
- 6) Yoshihide Syouya and Takefumi Shimazu, High-performance liquid chromatographic procedure for the determination of a new anti-gastric ulcer agent, 2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-quinolinon-4-yl]propionic acid, in human plasma and urine, *Journal of Chromatography*, 434, 283-287(1988)