

高速液体クロマトグラフィーを用いた 後発品ゾピクロン錠の溶出試験

Dissolution test of generic zopiclone tablets using high performance liquid chromatography

毎 熊 隆 誉 ・ 三 好 愛 悠
山 下 瑞 樹 ・ 大 林 さやか
手 嶋 大 輔

高速液体クロマトグラフィーを用いた 後発品ゾピクロン錠の溶出試験

Dissolution test of generic zopiclone tablets using high performance liquid chromatography

毎熊隆誉 (薬学科) ・三好愛悠 (薬学科 6年生)
MAIGUMA Takayoshi MIYOSHI Ayu
山下瑞樹 (薬学科 5年生) ・大林さやか (薬学科 5年生)
YAMASHITA Mizuki OOBAYASHI Sayaka
手嶋大輔 (薬学科)
TESHIMA Daisuke

キーワード：後発医薬品、溶出試験、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

1. 序論

不眠症は過度の就労等により入眠困難や熟眠困難を特徴とする日常診療上、罹患頻度の高い症状であり約10-20%が罹患し、その約50%が慢性経過を辿ると報告されている¹⁾。また、日本においても成人の30%以上が入眠困難、中途覚醒、早朝覚醒、熟眠困難などいずれかの不眠症状を有しているといわれている²⁾。

ジェネリック医薬品は、先発医薬品と治療的に同等であるものとして製造販売が承認され、一般的に研究開発に要する費用が低く抑えられることから、先発医薬品に比べて安価である。ジェネリック医薬品を普及させることは、患者負担の軽減や医療保険財政の改善につながる。従って、厚生労働省では平成25年4月に「後発医薬品のさらなる使用促進のためのロードマップ」を策定し取組を進めてきた。平成29年9月現在の後発医薬品の数量シェアは65.8%であり、平成27年6月の閣議決定において、平成29年には70%以上とするとともに、平成30年度から平成32年度末までの間のなるべく早い時期に80%以上とするとした新たな数量シェア目標が定められている³⁾。

当研究室では、ジェネリック医薬品の臨床評価に基づく有効性情報の集積と更なる使用促進の目的で、錠剤の取出し易さや味等の主観的な製剤情報を含めた質問紙を作成し睡眠薬服用中の患者に対してアンケート調査を行い、作成した質問項目の信頼性について検討を行っている。そのアンケート調査結果の臨床効果を判断する際の製剤学的な基礎情報を得るために、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) を用いて溶出試験を行った。

2. 方法

2-1. 試薬および材料

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。先発医薬品：アモバン®錠7.5mg（サノフィ株式会社、東京、Lot：6K414A）、後発医薬品：ゾピクロン錠7.5mg、ゾピクロン10mg（和光純薬工業株式会社、Lot：TWR6434）、ジアゼパム500mg（和光純薬工業株式会社、Lot：LKG6081）。アセトニトリル（Lot：K48052730628）は、関東化学株式会社より購入した。酢酸（Lot：810B1048）は、KANTO CHEMICAL CO., INC.（東京）より購入した。

また、以下の試薬はNACALAI TESQUE, INC.（京都）より購入した。ジメチルスルホキシド（Lot：M2H1280）、エタノール（Lot：M6F4618）、リン酸（Lot：V6R9295）、リン酸水素二ナトリウム・12水（Lot：M6R2713）、塩酸（Lot：V7A9779）、塩化ナトリウム（Lot：V2F8066）、酢酸ナトリウム（Lot：MIN2850）。

2-2. 溶出試験

試験法には、第十六改正日本薬局方の溶出試験第1液（塩化ナトリウム2.0gを塩酸7.0mL及び水に溶かして1000mLとした。以下 pH1.2試験液）、および、溶出試験第2液（0.05Mのリン酸水素二ナトリウム・12水を調製し、85%リン酸を滴下し pHメーター（HORIBA）により pH6.8を確認後、1容量に対して水1容量を加えた。以下 pH6.8試験液）を用いた。また、pH5.0の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液の調製は、0.05Mの酢酸ナトリウム水溶液に99.8%酢酸を滴下し pHを5.0に調節した（pH5.0試験液）。使用機器および器具として、富山産業株式会社（大阪）より購入した溶出試験器：NAT-6100A DISSOLUTION TESTER、オートサンプラー：PAS-615AUTO SAMPLER-W、およびフィルター：Fine Filter F-72を用いた。

溶出試験の試験条件として、医薬品の品質評価に関わる公的溶出試験および後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインに示された、「中性又は塩基性薬物、コーティング製剤」の試験条件をゾピクロン錠〔Zopiclone（JAN、INN）、pKa=約6.8（ジオキサン・水混合溶液中で0.1mol/L塩酸試液で滴定）〕の溶出試験に適応した（Table 1）。

Table 1 中性又は塩基性薬物を含む製剤、コーティング製剤におけるパドル法の条件

回転数 (rpm)	pH
50	① 1.2
	② 3.0~5.0 ^{a)}
	③ 6.8
	④ 水
100 ^{b)}	①、②、③のうちのいずれか一つ ^{a)}

が設定されている。ゾピクロン錠の先発医薬品であるアモバン錠（標準製剤）は溶出試験液により溶出挙動が異なるため、以下のとおり試験液ごとに異なる判断基準を用いた。

【pH1.2試験液（50rpm）】

◎標準製剤が15分以内に平均85%以上溶出する場合

15分における試験製剤の平均溶出率が85%以上か、又は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と比較して±15%の範囲にあるとき溶出挙動は類似と判定する。

【pH5.0試験液（50rpm）】

◎標準製剤が15～30分以内に平均85%以上溶出する場合

標準製剤の平均溶出率が60%及び85%付近となる適当な2時点において、試験製剤の平均溶出率が、標準製剤の平均溶出率と比較して±15%の範囲にあるか、又は各溶出時間における溶出率から算出した f_2 関数の値が42以上であるとき溶出挙動は類似と判定する。

【pH6.8試験液（50rpm）、pH6.8試験液（100rpm）】

◎標準製剤が30分以内に平均85%以上溶出しない場合

標準製剤の平均溶出率が50%以上85%に達しないとき、標準製剤が規定時間における平均溶出率の1/2を示す適当な時点、及び規定時間において、試験製剤と標準製剤の平均溶出率の差が±12%の範囲にあるか、又は各溶出時間における溶出率から算出した f_2 関数の値が46以上のとき溶出挙動は類似と判定する。

【蒸留水】

◎標準製剤が30分以内に平均85%以上溶出しない場合

標準製剤の平均溶出率が50%に達しないとき、標準製剤が規定時間における平均溶出率の1/2を示す適当な時点、及び規定時間において、試験製剤と標準製剤の平均溶出率の差が±9%の範囲にあるか、又は各試験時間における溶出率から算出した f_2 関数の値が53以上のとき溶出挙動は類似と判定する。

$$f_2 = 50 \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (T_i - R_i)^2}{n}}} \right]$$

T_i: 各時点における試験製剤の平均溶出率
R_i: 各時点における標準製剤の平均溶出率
n: 平均溶出率を比較する時点の数

Fig. 2 f_2 関数の算出式

3. 結果

3-1. HPLC によるゾピクロンの分離状況

Fig. 3 にゾピクロン (7.5µg/mL) のクロマトグラムを示す。ゾピクロンの保持時間は約4.1分、および内部標準物質 (internal standard: IS) として用いたジアゼパムは約9.5分にピークが得られた。これらのピークは完全に分離しており、共雑物のないものであった。

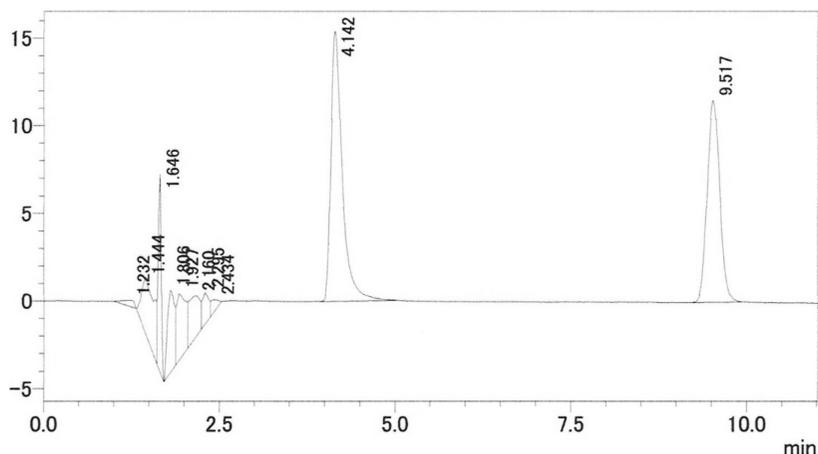


Fig. 3 HPLC にて測定したゾピクロンおよびジアゼパムのクロマトグラム
保持時間：4.142min (ゾピクロン7.5µg/mL)、9.517min (ジアゼパム20µg/mL)

3-2. HPLC 測定精度

HPLC の検量線を Fig. 4 に示す。相関係数は $r = 0.99989$ となり、良好な直線性が得られた。

ゾピクロンの HPLC 法による再現性をみるために、日内日間における変動係数および回収率を算出した。日内における変動係数は1.97-0.85%で、日間における変動係数は1.67-2.91%であり、これらは5%以内であった。一方、そのときの回収率は日内で97.83-100.1%、日間で94.12-99.12%であり、ほぼ100%に近い回収率が得られた (Table 2)。

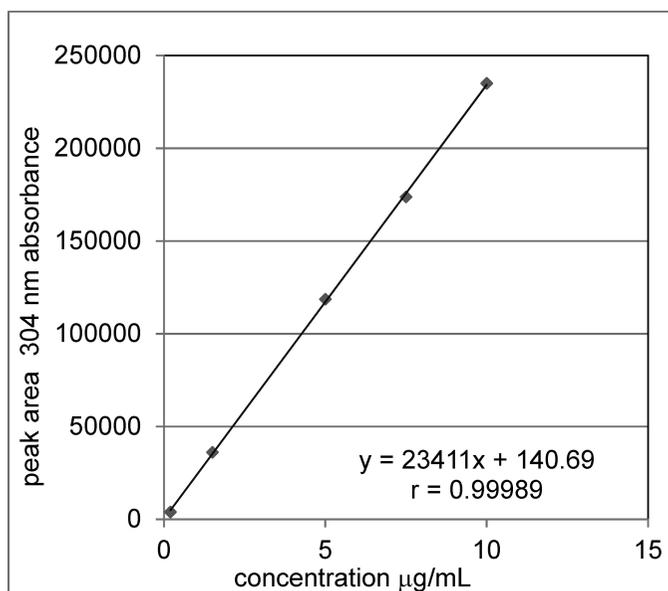


Fig. 4 ゾピクロンの検量線

Table 2 HPLC によるゾピクロン濃度の日内・日間変動

濃度 (μg/mL)	定量濃度 (μg/mL)	回収率 (%)
8	8.01 ± 0.068 (0.85)	100.1%
2	1.96 ± 0.039 (1.97)	97.8%
Mean ± SD, () : 変動係数		
濃度 (μg/mL)	定量濃度 (μg/mL)	回収率 (%)
8	7.93 ± 0.231 (2.91)	99.1%
2	1.88 ± 0.031 (1.67)	94.1%
Mean ± SD, () : 変動係数		

3-3. HPLC による先発および後発医薬品における溶出率の比較

先発医薬品と後発医薬品の各試験条件における溶出挙動を Fig. 5 に示す。

ゾピクロンの公的溶出試験で定められている規定時間は30分である⁷⁾。その時間における平均溶出率は、試験液が pH1.2 溶液の場合、先発医薬品 (50rpm) で103.9%、および後発医薬品 (50rpm) で101.7%となった。また、試験液が pH5.0 のときそれぞれ92.4% (先発医薬品)、93.6% (後発医薬品) となり、pH6.8 では50.8% (先発医薬品) および66.6% (後発医薬品) となった。この際、回転数を100rpm とすると、先発医薬品および後発医薬品はそれぞれ66.0%と95.0%となった。蒸留水 (50rpm) では46.3% (先発医薬品) および67.6% (後発医薬品) という結果となった。

後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインにおける溶出挙動の類似性の判定に従い、アモバン®錠7.5mg を標準製剤として、後発医薬品の類似性の判定を行った。その結果、pH1.2のみで類似となり、一方、pH5.0および蒸留水、pH6.8 (50rpm, 100rpm) では類似しない結果となった (Table 3)。

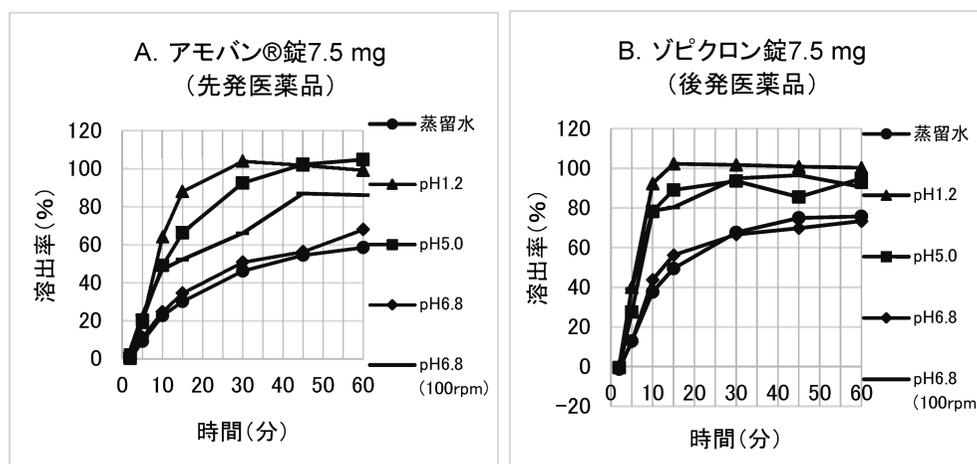


Fig. 5 先発医薬品および後発医薬品の各試験液条件における溶出挙動

Table 3 生物学的同等性試験ガイドラインに基づいた溶出挙動の類似性の判定結果

a. pH1.2試験液 (50 rpm)

	15分後の溶出率 (%)	標準製剤との差 (%)	判定
アモバン®錠7.5mg	88	—	—
ゾピクロン錠7.5mg	102	14	類似

※15分における試験製剤の平均溶出率は85%以上、又標準製剤との差が15%以内であるとき類似。

b. pH5.0試験液 (50rpm)

	14分後の溶出率 (%)	27分後の溶出率 (%)	f ₂ 関数
アモバン®錠7.5 mg	60	85	36
ゾピクロン錠7.5 mg	86	91	
標準製剤との差 (%)	26	6	
判定	類似しない	類似	類似しない

※標準製剤との差が15%以内であるとき、又f₂関数の値が42以上であるとき類似。

c. pH 6.8試験液 (50rpm)

	10分後の溶出率 (%)	30分後の溶出率 (%)	f ₂ 関数
アモバン®錠7.5mg	25	51	38
ゾピクロン錠7.5mg	44	67	
標準製剤との差 (%)	19	16	
判定	類似しない	類似しない	類似しない

※標準製剤との差が12%以内であるとき、又f₂関数の値が46以上であるとき類似。

d. 蒸留水 (50rpm)

	8分後の溶出率 (%)	30分後の溶出率 (%)	f ₂ 関数
アモバン®錠7.5mg	23	46	35
ゾピクロン錠7.5mg	41	68	
標準製剤との差 (%)	18	22	
判定	類似しない	類似しない	類似しない

※標準製剤との差が9%以内であるとき、又f₂関数の値が53以上であるとき類似。

e. pH6.8試験液 (100rpm)

	7分後の溶出率 (%)	30分後の溶出率 (%)	f ₂ 関数
アモバン®錠7.5mg	33	66	30
ゾピクロン錠7.5mg	55	95	
標準製剤との差 (%)	22	29	
判定	類似しない	類似しない	類似しない

※標準製剤との差が12%以内であるとき、又f₂関数の値が46以上であるとき類似。

4. 考察

ゾピクロンの分離状況および、検量線の直線性は良好であり、また、HPLCによる精度測定においても、日内変動・日間変動共にそれぞれ回収率は100%前後、変動係数は5%未満であり、高い測定精度が確認された。従って本試験で用いた測定法は、溶出液中のゾピク

ロンを適切に検出し、定量できるものであると考えられる。

後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインに従い、溶出挙動の類似性を判定した。その結果、pH1.2の酸性の試験液では類似したが、それ以外の試験液では類似しない結果となり、試験液がアルカリ性になるにつれ、先発医薬品と後発医薬品に差が生じた。また、どの試験液においても後発医薬品の溶出率は先発医薬品に比べて、溶出率が高く、溶出速度が早い結果となった。

平成26年9月23日に行われた第13回ジェネリック医薬品品質情報検討会によると、オレンジブックまたは局方の方法に従い溶出試験を行った結果、オレンジブックまたは先発製剤の溶出挙動において見かけの減少傾向が認められた⁸⁾。そのため、同等性ガイドラインQ&Aに従い、市販製剤の溶出性の評価にあたっては、ロット間のばらつきや、測定機関による変動要因等を考慮して、後発医薬品の生物学的同等性 (BE) 試験ガイドラインで設定されている溶出性の類似の許容範囲をやや広げ、ガイドラインでは $\pm 15\%$ とされているものを $\pm 20\%$ へ、 f_2 関数では、許容範囲がガイドラインでは42以上とされているのを35以上へ変更して、これに適合するものを許容範囲内と判断することとした。同様に、溶出率が低い場合の類似の許容範囲は、 $\pm 12\%$ とされているものを $\pm 16\%$ 、 f_2 関数の許容範囲が46以上とされているものを42以上に、さらに、 $\pm 9\%$ とされている場合には $\pm 12\%$ に、 f_2 関数で53以上とされているのを46以上に変更して判定された。この報告における判定結果として、pH1.2およびpH4.0の試験液においては後発品ゾピクロン錠の溶出挙動は類似の範囲にあるとされた。pH6.8および蒸留水の試験液では後発品の溶出が速い傾向にあり、先発医薬品の溶出曲線と類似の範囲から外れていたとの報告であった。

今回の実験において、後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインに設定されている溶出挙動の類似性の判定について第13回ジェネリック医薬品品質情報検討会と同様の基準まで広げて用いた結果では、pH1.2、およびpH5.0では、先発医薬品と類似となり、pH6.8および蒸留水では類似の範囲から外れる結果となった。本研究においてもジェネリック医薬品品質情報検討会で行われた試験と同様の結果となったため、本研究における溶出試験やゾピクロンの検出方法には問題がなかったと考えられる。

ジェネリック医薬品品質情報検討会は平成26年に行われており、約4年前の報告と同様の結果であった。平成26年当時の当該製薬メーカーの回答によると、製剤学的な側面からの検討を行い、原因究明、改善の対応を進めるとのことであった。また、類似の範囲外になった理由として、ゾピクロン錠の溶出試験でベッセル底部にマウントが形成され、ロット間で測定値にばらつきを生じやすいことが報告されていた。

以上より、今回検討した後発品ゾピクロン錠の溶出は、試験液のpHによっては先発医薬品よりも溶出が速い場合があり、後発品の溶出率は先発品を上回る傾向にあることから、後発品ゾピクロン錠の催眠作用の発現はやや早くなる可能性がある。しかしながら、患者が後発品ゾピクロン錠を服用して、入眠できるかどうかについては先発品と同等以上の効果を有

していると考えられる。

今後、患者が薬を服用した際の、溶出速度が速いことを踏えて、臨床効果を比較検討していく必要があると思われる。

5. 参考文献

- 1) Buysse DJ. Insomnia. JAMA. 2013, 309(7) : 706-716.
- 2) 厚生労働科学研究班・日本睡眠学会ワーキンググループ作成「睡眠薬の適正な使用用と休薬のための診療ガイドライン」2013, pp2.
- 3) 後発医薬品（ジェネリック医薬品）の使用促進について（厚生労働省 HP）
- 4) Paw B, Misztal G. Determination of zopiclone in tablets by HPLC and UV-spectrophotometry. J Pharm Biomed Anal. 2000, 23(5) : 819-823.
- 5) Gebauer MG, Alderman CP. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the enantiospecific quantitation of zopiclone in plasma. Biomed Chromatogr. 2002, 16(4) : 241-246.
- 6) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について（薬食審査発0229第10号 平成24年2月29日）
- 7) 医薬品の品質評価に関わる公的溶出試験 平成19年3月2日
- 8) 第13回ジェネリック医薬品品質情報検討会 平成26年9月3日

