

溶出試験の変動要因が判定に及ぼす影響について

加瀬 信明, 矢崎 廣久, 福島 悦子

Effect of variable elements on acceptance value for dissolution tests.

Nobuaki KASE, Hirohisa YAZAKI
and Etsuko FUKUSHIMA

I はじめに

わが国では増え続ける医療費の低減に向け様々な取り組みが進められているが、薬事分野ではより安価な後発医療用医薬品の積極的な利用促進により適正化を図る試みが始められており、先発品に対する生物学的同等性の確保が大きな課題となっている。これらの後発品の生物学的同等性の評価は従来の煩雑な臨床試験に替えて、新たに規格設定された溶出試験結果により判定、承認される製剤が急増しており、都道府県段階でのGMP査察指導や収去試験などを含めると、今後溶出試験に関わる機会が多くなるものと思われる。

しかし、溶出試験器の規格の現状は従来から小変更に加え、日米欧三極の薬局方国際調和会議（ICH）の動向により今後も変更が続く見込みである。そのような中で品目によってはわずかな装置、操作の違いで試験結果に差異が出るものも知られており、試験者自身にもいろいろなノウハウを要求されるケースが増えて

いる。

そこで、現在の第十三局方適応の溶出試験器（1999年製）及びそれ以前のもの（1986年製）との較差のほか、パドルなどの軸長、機器の振動や溶出液の脱気方法など溶出値に影響を及ぼす諸要因について検討を行ったので報告する。

II 試験方法

1. 試料

試験に用いた試料は、表1に示した第十三改正日本薬局方（JP13）収載のメチルドパ錠、塩酸アミトリプチン錠、また、医療用医薬品の品質再評価に係る公的溶出試験により溶出規格が設定されているアテノロール錠、シメチジン錠、ロキソプロフェンナトリウム錠、アロプリノール錠及び同細粒、米国薬局方（USP）カリブレータのプレトニゾン錠及びセファレキシン50%含有腸溶性顆粒であるEG顆粒の計8種類9製剤であった。

表1 試験に用いた製剤および溶出規格

製剤名	用途	溶出規格			溶出率
		試験装置 ^{※1)}	回転数	時間	
メチルドパ錠 250mg	降圧剤	第2法	50回転/分	60分	75%以上
塩酸アミトリプチン錠 25mg	抗うつ剤	第2法	50回転/分	60分	70%以上
アテノロール錠 50mg	心臓選択性β ₁ -遮断剤	第2法	50回転/分	30分	80%以上
シメチジン錠 200mg	H ₂ -受容体拮抗剤	第2法	50回転/分	30分	80%以上
ロキソプロフェンナトリウム錠 60mg	鎮痛抗炎症解熱剤	第2法	50回転/分	30分	85%以上
アロプリノール錠 100mg アロプリノール細粒 100mg/g	高尿酸血症治療剤	第2法	50回転/分 50回転/分	30分 30分	80%以上 85%以上
プレトニゾン錠 50mg	USPカリブレータ	第1法 第2法	100回転/分 50回転/分	30分 30分	38~55% ^{※2)} 38~48%
EG顆粒（セファレキシン50%含有腸溶性顆粒）	セファロソリン系抗生物質	第1法	50回転/分	30分	29.7~34.1% ^{※3)}

※1) 日局第1法 回転バスケット法

日局第2法 パドル法

※2) USP（米国薬局方）規格 ※3) 標準偏差 2.4%以下

溶出試験の変動要因が判定に及ぼす影響について

2. 試薬

各製剤の溶出試験規格及び第十三改正日本薬局方に従い標準溶液や溶出液を調製した。溶出液は塩酸アミトリプチン錠がPH6.8のリン酸塩緩衝液、EG顆粒がPH6.5のクエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液を用いたほかは水を用いた。これらの溶出液は試験に先立ち、あらかじめ45℃の水浴中で2時間以上加温し、脱気したものを用いた。

3. 装置

溶出試験器は1999年製の富山産業株NTR-6100（6連）及び1986年製の同社NTR-VS3（3連）を用いた。溶出液の吸光度測定には株式会社津製作所製自記分光光度計UV-3100PCを用いた。標準品や細粒剤、その他調製試薬の秤量にはMettler Instrumente製AT-400及び同社PJ-360を用いた。また、溶出液の超音波による脱気の検討には株式会社シャープ電機製UT-304型超音波洗浄器を用いた。

4. 試験方法

各製剤ごとに行った溶出試験の諸条件をまとめたものを表2に

示した。メチルドパ錠、塩酸アミトリプチン錠、シメチジン錠については、新旧溶出試験器ごとの比較、超音波によるものも含めた脱気方法での比較に加え、旧型器ではバドルの取り付けを規定の位置の他にそれぞれ10mmずつ上げ下げした場合について試験を行った。

ロキソプロフェンナトリウム錠、アロプリノール錠及びアロプリノール細粒では新旧溶出試験器ごとの比較及び脱気の有無による較差の検討を行った。

アテノロール錠、EG顆粒、プレトニゾン錠は厚生省が主催する医療用後発医薬品品質確保事業の精度管理試験に用いられたもので試料量に限りがあったため新旧双方の溶出試験器での比較はアテノロール錠、また、プレトニゾン錠については日局第一法の回転バスケット法のみについて行った。

なお、製剤の溶出特性を調べるため一定時間経過ごとに溶出液を20mlずつ正確に採取し、各々の溶出率から溶出曲線を求めた。各溶出液採取と同時に、37℃に保っていた脱気済み溶出液を補い、ベッセル中の試験液は常に900mlを保つようにした。

表2 各製剤についての溶出試験条件区分

NO.	製剤名	使用した試験器	日局第1法		日局第2法		脱気方法			バドル取り付け位置	
			50%/分	100%/分	50%/分	100%/分	無脱気	45℃、2h	超音波	-10mm	+10mm
1	メチルドパ錠	十三局適合器	-	-	○	-	○	○	○	-	-
		旧型器(86製)	-	-	○	-	○	○	○	○	○
2	塩酸アミトリプチン錠	十三局適合器	-	-	○	-	○	○	○	-	-
		旧型器(86製)	-	-	○	-	○	○	○	○	○
3	シメチジン錠	十三局適合器	-	-	○	-	○	○	○	-	-
		旧型器(86製)	-	-	○	-	○	○	○	○	○
4	ロキソプロフェンナトリウム錠	十三局適合器	-	-	○	-	○	○	-	-	-
		旧型器(86製)	-	-	○	-	○	○	-	-	-
5	アロプリノール錠	十三局適合器	-	-	○	-	○	○	-	-	-
		旧型器(86製)	-	-	○	-	○	○	-	-	-
6	アロプリノール細粒	十三局適合器	-	-	○	-	○	○	-	-	-
		旧型器(86製)	-	-	○	-	○	○	-	-	-
7	アテノロール錠	十三局適合器	-	-	○	-	-	○	-	-	-
		旧型器(86製)	-	-	○	-	-	○	-	-	-
8	EG顆粒	十三局適合器	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		旧型器(86製)	○	-	-	-	-	○	-	-	-
9	プレトニゾン錠	十三局適合器	-	○	-	-	-	○	-	-	-
		旧型器(86製)	-	○	○	-	-	○	-	-	-

III 結果及び考察

1. 各製剤の溶出試験値と試験器による較差

45℃、2時間脱気を行った溶出液を用いた各製剤の溶出試験結果は表3のとおりであった。70~85%以上という片側規格が決められている1番目のメチルドパ錠から7番目のアテノロール錠細粒までは、各ベッセルごとの溶出値、平均値、消費者及び生産者危険率がそれぞれ5%として提唱されている計量型判定値¹⁾²⁾

のいずれも規格値を上回っていた。

これらの製剤のうち、アロプリノール錠の旧型試験器に見られるように標準偏差σが4.46と他よりばらつきが大きいものや、アテノロール錠のようにσは0.72と小さいが、溶出平均値83.0%と規格値80%との差が小さいものもあった。溶出値の分布は平均値(期待値)μ、標準偏差σ/√nの正規分布と仮定できるため、基準値の上側確率から合格率を推定した³⁾。平均値と規格値との差はアロプリノール錠で3.47σ、アテノロール錠で4.16σであり、いずれも99.9%以上の確率で規格値域に入ると推定された。

したがって、これらの製剤は溶出液の脱気方法などの溶出試験の変動要因を検討するには適切な試料であることが確認された。

日局第一法(回転バスケット法)100回転/分で行ったプレトニゾン錠とEG顆粒はいずれも徐放性であり、規定時間での溶出率が30~50%台と溶出途上での特性を捉える難しい試験であった。国の溶出試験精度調査では、標準液の吸光度、溶出値の平均値、標準偏差の規格との比較など、試験に用いた溶出試験器や試

験操作の適格性評価が行われた。プレトニゾン錠では各ベッセルごとの溶出値、平均値のいずれも規格値域内にあり、バラツキも小さかった。EG顆粒では溶出値の標準偏差は規格を満たしていたが、各ベッセルごとの溶出値はいずれも規格値域の上限34.1%をわずかに上回った。この原因については製剤の溶出特性の項で後述するが、周囲や試験器自体の振動との関連について調査、検討が必要と思われた。

表3 試験に用いた製剤の指定条件、装置における溶出率と試験機種間の較差

NO.	製剤名 溶出規格	使用した 試験器	各ベッセル ^{註1)}		標準偏差	判定値 ^{註4)}	平均値の差の検定	
			溶出率(%)	平均値(%)			τ_0	$\tau(\phi, 0.01)$
1	メチルドパ錠 60分、75%以上	十三局適合器 旧型器(86製)	91.9~93.4	92.6	0.52	92.2	0.452	3.178
			91.9~93.4	92.4	0.65	91.9		
2	塩酸アミトリプチン錠 60分、70%以上	十三局適合器 旧型器(86製)	87.3~88.0	87.7	0.41	87.4	2.580	3.250
			85.9~87.6	86.6	0.68	86.0		
3	シメチジン錠 30分、80%以上	十三局適合器 旧型器(86製)	95.0~99.3	96.8	1.52	95.5	5.985	3.183
			99.5~102.1	100.8	1.16	99.8		
4	ロキソプロフェンナトリウム錠 30分、85%以上	十三局適合器 旧型器(86製)	97.4~100.3	98.6	1.11	97.7	0.295	3.198
			97.0~101.9	98.8	1.64	97.5		
5	アロプリノール錠 30分、80%以上	十三局適合器 旧型器(86製)	93.6~101.0	97.4	2.73	95.2	1.735	3.239
			86.8~99.0	95.5	4.46	91.8		
6	アロプリノール細粒 30分、85%以上	十三局適合器 旧型器(86製)	96.3~100.6	98.7	1.64	97.4	0.302	3.217
			98.1~100.3	98.9	0.98	98.1		
7	アテノロール錠 30分、80%以上	十三局適合器 旧型器(86製)	81.7~83.8	83.0	0.72	82.4	8.798	3.267
			86.1~90.3	88.4	1.54	87.1		
8	プレトニゾン錠 38~55% ^{註2)} 38~48% ^{註3)}	十三局適合器 旧型器(86製) 旧型器(86製)	40.7~45.0	43.4	1.44	42.2~44.6	0.295	3.170
			41.7~45.6	43.6	1.32	42.5~44.7		
			44.7~51.6	49.2	2.97	46.8~51.6		
9	EG顆粒 29.7~34.1% $\sigma \leq 2.4\%$	十三局適合器 旧型器(86製)	-	-	-	-		
			35.2~36.7	36.1	0.55	35.6~36.6		

註1) n = 6, 註2) USP(米国薬局方)規格, 回転バスケット法 100回転/分
 註3) USP(米国薬局方)規格, バドル法 50回転/分, 註4) $\bar{X} - 0.8226\sigma$, 文献1, 2

次に、新旧の溶出試験器の較差であるが、得られた溶出値の平均値の差の有無について、1%の危険率でWelch-Aspinの方法により検定したところ⁴⁾、比較した8製剤のうちメチルドパ錠、塩酸アミトリプチン錠、ロキソプロフェンナトリウム錠、アロプリノール細粒そしてプレトニゾン錠については有意差はなかった。アテノロール、シメチジン錠では有意差が認められ、いずれも旧型器の方が過大な溶出を示す傾向があり、いずれもEG顆粒と同様に旧型器自体の振動の影響が示唆された。しかし、両製剤とも平均値の差4~5%に対し、各溶出値のばらつきが σ で1%台と小さかったため差があると判定されたもので、アロプリノール錠のように σ が4~5%ほどにばらつく場合には、同水準の平均値の差が生じても許容されてしまうため、検定の結果を過大評価することは危険であり、一つの目安と捉えるべきであろう。

以上のことから、今回比較を行った8製剤からは、新旧の溶出試験器による較差はほとんどなかったものの、製剤によっては旧型器に試験器自体の振動による影響も窺える。

2. 溶出値に及ぼす変動要因の影響

1) バドルの取り付け位置の影響

現在の局方ではバドルまたは回転バスケットの取り付け位置は、それぞれの下端からベッセルの底面までの距離を 25 ± 2 mmになるよう調整することとなっている⁵⁾。今回試験した溶出試験器のうち1999年製の十三局方適応機種は、この位置でのワンタッチ固定式のために調整の余地はなかった。一方、1986年製の機種は規定位置に標線が入っていたものの、無段階調整が可能であった。このため、バドル下端がベッセル底面と接触する恐れのない範囲ということで、規定位置からそれぞれ10mm上げ(-10mm)、下げ(+10mm)たときのメチルドパ錠、塩酸アミトリプチン錠、シメチジン錠の溶出試験結果は表4のとおりであった。この結果から、試験した各製剤では各ベッセルの溶出値、平均値にはほとんど差が見られなかった。標準偏差も規定位置の時の最も小さくなる傾向はあるものの、最大でも1.7%程度であり、ベッセル底面に近づけても溶出試験結果にはほとんど影響を与えなかった。今回試験した製剤では規定時間内に主薬(指標)成分のほとんどが溶出していたために影響が現れにくかったとも考えられ、今後は徐放性の製剤や溶出液のベッセル内での均一性⁶⁾などの検討も必要と思われた。

表4 各製剤のパドル軸長の違いによる溶出率と平均値の較差

NO.	製剤名 溶出規格	使用した 試験器	規定軸長 (径幅より25mm)	各ベッセル ^{*)}	平均値 (%)	標準偏差 (%)	平均値の差の検定	
				溶出率 (%)			τ_0	$\tau(\phi, 0.01)$
1	メチルドパ錠 75%以上	B型器(86型)	規定 -10mm	91.1~93.6	92.4	1.15	0.365	3.227
			規定軸長	91.9~93.4	92.6	0.65		
			規定 +10mm	89.9~93.2	91.7	1.43		
2	塩酸アミトリアジン錠 70%以上	B型器(86型)	規定 -10mm	85.4~87.2	86.4	0.76	0.408	3.172
			規定軸長	85.9~87.6	86.6	0.68		
			規定 +10mm	86.5~88.8	87.5	1.20		
3	シメチジン錠 80%以上	B型器(86型)	規定 -10mm	98.6~101.0	99.8	0.67	1.811	3.223
			規定軸長	99.5~102.1	100.8	1.16		
			規定 +10mm	98.5~102.4	100.6	1.74		

*) n = 6

2) 溶出液の脱気方法

溶出液の脱気方法はメチルドパ錠, 塩酸アミトリアジン錠, シメチジン錠が45℃, 水浴中で2時間と超音波(300W, 39kHz)で30分の双方を行い, ロキソプロフェンナトリウム錠, アロプリノール錠, 及び同細粒では45℃, 水浴中で2時間行った。いずれの製剤も溶出液の脱気を伴わない対照試験も行った。実験中に脱気の有無は顕著に現れ, 溶出液の脱気を伴わない場合はベッセル壁面やパドル表面, 投下した錠剤, 細粒剤の表面などに一面の気泡が生じた。

それぞれの溶出試験結果は表5に示したとおりで, 今回試験した5種類6製剤では脱気の有無, 及び方法の違いによって判定の可否にまで及ぼす大きな影響は認められなかったが, 総じて脱気を

行わない場合, 溶出値の標準偏差は大きくなりデータをばらつかせる要因となり得ることが窺えた。

超音波による脱気では試験中にパドルやベッセル面に気泡の発生はほとんど認められなかったが, 溶出値の標準偏差は脱気しない場合と変わらず, メチルドパ錠, シメチジン錠など溶出値の平均値が明らかに小さくなるなどの検定結果が出るものもあった。局方では本法が脱気方法の一つとしてあげられており²⁾, 加温や減圧ろ過による脱気に較べ手軽に行える利点があるが, 今回の試験結果からは効果が認められなかった。超音波処理はHPLC移動相の脱気に広く用いられているが, 水や緩衝液のみの相では溶存する気体は除きにくい³⁾とされ, 溶出試験への適用についてはさらに超音波をかける条件の検討が必要と思われた。

表5 各製剤の脱気方法の違いによる溶出率と平均値の差の検定

NO.	製剤名 溶出規格	使用した 試験器	脱気方法	各ベッセル ^{*)}	平均値 (%)	標準偏差 (%)	平均値の差の検定	
				溶出率 (%)			τ_0	$\tau(\phi, 0.01)$
1	メチルドパ錠 75%以上	十三角適合器	無脱気	91.9~93.9	92.9	0.82	0.635	3.207
			45℃, 2h	91.9~93.4	92.6	0.52		
			超音波 30min.	87.3~89.8	88.9	0.89		
		B型器(86型)	無脱気	90.3~93.2	92.1	1.11	0.923	3.221
			45℃, 2h	91.9~93.4	92.6	0.65		
			超音波 30min.	87.9~91.0	89.8	1.10		
2	塩酸アミトリアジン錠 70%以上	十三角適合器	無脱気	85.6~91.9	88.8	1.43	1.986	3.406
			45℃, 2h	87.3~88.0	87.7	0.41		
			超音波 30min.	85.8~90.0	88.0	1.13		
		B型器(86型)	無脱気	86.2~90.2	88.3	1.33	2.937	3.246
			45℃, 2h	85.9~87.6	86.6	0.68		
			超音波 30min.	83.8~88.3	85.6	1.52		
3	シメチジン錠 80%以上	十三角適合器	無脱気	95.6~101.8	98.2	2.12	2.054	3.190
			45℃, 2h	95.0~99.3	96.8	1.52		
			超音波 30min.	94.1~97.5	95.8	1.37		
		B型器(86型)	無脱気	101.3~103.9	102.7	1.17	2.086	3.169
			45℃, 2h	99.5~102.1	100.8	1.16		
			超音波 30min.	97.8~100.0	99.0	1.04		
4	ロキソプロフェン ナトリウム錠 85%以上	十三角適合器	無脱気	97.0~103.7	101.0	2.81	2.969	3.339
			45℃, 2h	97.4~100.8	98.6	1.11		
B型器(86型)	無脱気	95.9~99.1	96.9	1.19	2.766	3.189		
	45℃, 2h	97.0~101.9	98.8	1.64				
5	アロプリノール錠 80%以上	十三角適合器	無脱気	91.2~100.8	95.9	3.44	1.479	3.179
			45℃, 2h	93.6~101.0	97.4	2.73		
B型器(86型)	無脱気	91.4~98.9	95.0	2.51	0.464	3.228		
	45℃, 2h	86.8~99.0	95.5	4.46				
6	アロプリノール細粒 85%以上	十三角適合器	無脱気	96.8~100.3	98.2	1.28	0.717	3.181
			45℃, 2h	96.3~100.6	98.7	1.64		
B型器(86型)	無脱気	95.9~99.3	97.8	1.19	1.829	3.176		
	45℃, 2h	98.1~100.3	98.9	0.98				

*) n = 6

3. 製剤の溶出特性からみた変動要因の影響

今回検討した製剤の溶出曲線の測定結果をプレトニゾン錠（回転バスケット法、100回転/分）、アテノロール錠、ロキソプロフェンナトリウム錠、アロプリノール錠及びアロプリノール細粒についてそれぞれ図1から図5に示した。

図1に示したプレトニゾン錠の溶出曲線は毎分100回転の回転バスケット法でも徐放性を反映し、試験開始30分後（規定時間）で約44%、60分後、120分後でそれぞれ52%、61%、240分後で72%と緩やかなものとなった。試料量が限られ溶出曲線を測定できなかったEG顆粒でも、同様の傾向を示したものと思われる。

このように、徐放性で上下両側の溶出規格が設定されているプレトニゾン錠やEG顆粒などは溶出途上の特性を捉える難しい試験であること、また、標準液の吸光度、溶出値の平均値、標準偏差の規格との比較、対照により、用いた溶出試験器および試験操作の適格性の判定に有用であることが確認できた。また、EG顆粒は溶出値の標準偏差が小さいにもかかわらず溶出平均値が規格値域上限となり、やや過大な溶出を示したことは周辺機器や溶出試験器自体の振動の影響も考えられる。したがって、溶出試験器の校正、点検や試験操作の適格性試験にあたっては、振動についての測定、点検項目の追加が望ましい。

一方、アテノロール錠、ロキソプロフェンナトリウム錠、アロプリノール錠及び細粒など溶出規格が30分で70~85%以上の片

側規格設定の製剤では、図5のアロプリノール細粒が試験開始後ごく短時間のうちに拡散、溶解したことを反映し、試験開始5分後に規格値以上まで溶出していたのをはじめ、いずれも試験開始後10~20分程度で規格値域に達していた。アロプリノール錠剤では細粒剤と比べ溶出曲線の立ち上がりが遅く、溶出試験機種間での差も見られたが、これはアロプリノール錠の溶出値がばらつくことを反映していた。

したがって、溶出曲線が上昇カーブを描いて溶出値が規格値域を上回り平衡状態に達した後では、今回検討した変動要因である新旧試験器間の格差、溶出液の脱気、パドルの軸長などは試験結果の可否にほとんど影響はないことがわかった。

以上のことから、片側規格が設定されていて、判定時刻には試験成分がほぼ溶出液中に放出され、平衡に達しているような場合には、今回検討した変動要因の影響は少ないが、徐放製剤や試験成分の放出が平衡に達していない場合は機器の周囲や溶出試験器自体の振動などの影響にも留意して試験を行なわなければならない。そのためには、試験を行う製剤の溶出特性を把握しておくことが大変有用であり、今回は各経時時間ごとの試験液採取を手間のかかるマニュアルで行ったが、近年は試験液の脱気から検体投入、試験液サンプリングから測定、各時間ごとの溶出曲線作成まで全自動で行える溶出試験器もあり、機器のシステム適格性を確認する方法の確立とともにそれらの試験器の普及が望まれる。

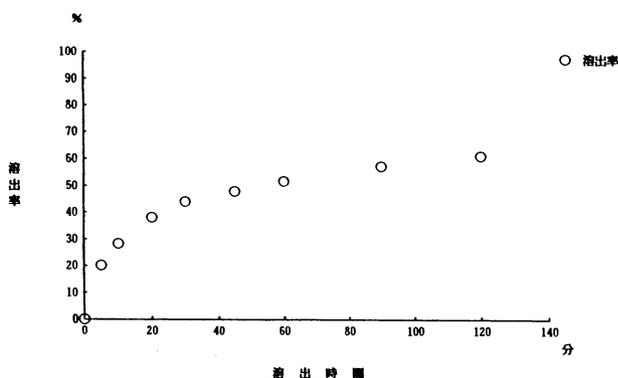


図1 プレトニゾン錠の溶出曲線(日局第1法, 100回転/分)

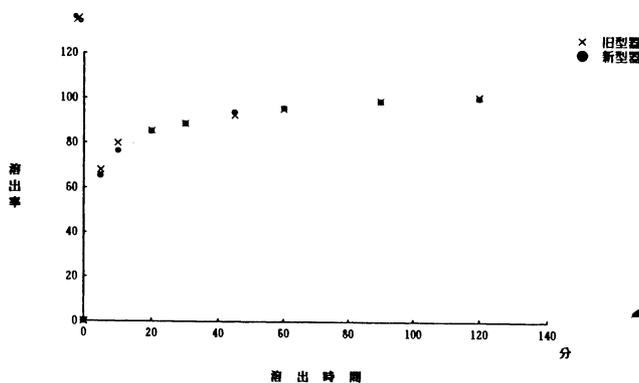


図3 ロキソプロフェンナトリウム錠の溶出曲線(日局第二法, 50回転/分)

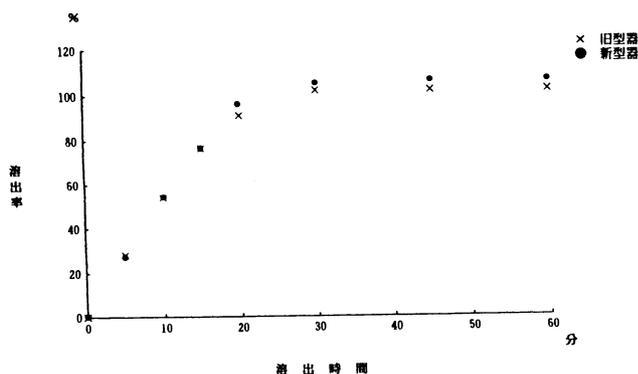


図2 アテノロール錠の溶出曲線(日局第二法, 50回転/分)

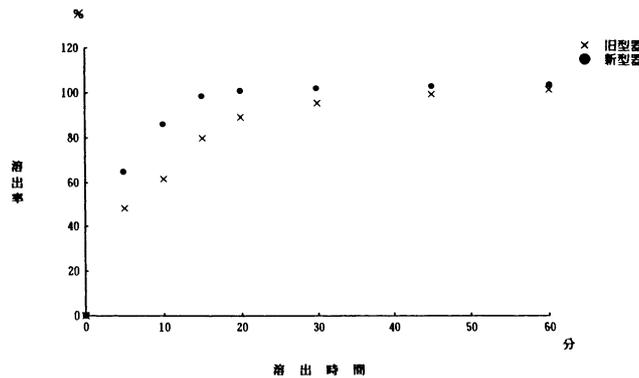


図4 アロプリノール錠の溶出曲線(日局第二法, 50回転/分)

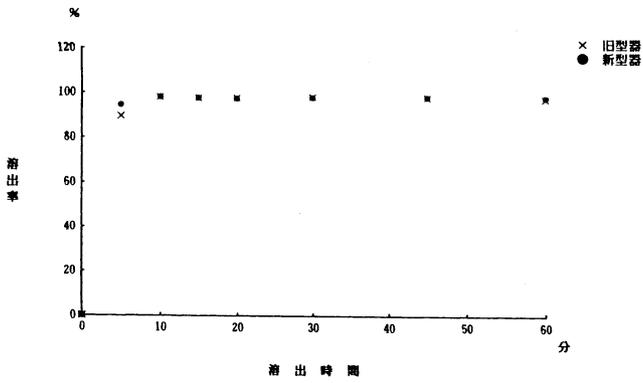


図5 アロプリノール細粒の溶出曲線(日局第二法, 50回転/分)

IV 文献

- 1) 香取典子, 鹿庭なほ子, 青柳伸男, 小嶋茂雄: 溶出試験の判定基準の問題点および改善, JP Forum, Vol.7, No.1, 17-22, 1998.
- 2) 香取典子, 鹿庭なほ子, 青柳伸男, 小嶋茂雄: 溶出試験の判定基準の問題点および改善II., JP Forum, Vol.7, No.4, 157-164, 1998.
- 3) 石川馨 他: 統計的方法, 77-88, 東京化学同人, 東京, 1968.
- 4) 石川馨 他: 統計的方法, 144-147, 東京化学同人, 東京, 1968.
- 5) 第13改正日本薬局方解説書, B533-547, 廣川書店, 東京, 1996.
- 6) 馬淵博, 堀池あずさ, 小和田和宏, 佐野智子, 永野隆夫, 森川馨: 溶出試験法のバリデーションについて, 第36回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 148-149, 1999.
- 7) 高速液体クロマトグラフィー分析のてびき, 43-53, 日本分光技術資料, 1984.