溶出試験による Pravastatin 先発医薬品と後発医薬品の同等性に関する検討

中内崇夫, 竹内恵那, 岡本拓也, 寺元勝弥, 野崎 葵,
世古風子, 弓樹佳曜, 片川純一, 橋本直文*

Equivalence Studies of Pravastatin Original and Generic Drugs by Dissolution Test

Takao Nakauchi, Ena Takeuchi, Takuya Okamoto, Katsuya Teramoto, Aoi Nozaki,
Fuko Seko, Kayo Yuminoki, Junichi Katakawa, and Naofumi Hashimoto*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University; 45-1 Nagaotoge-cho,
Hirakata, Osaka 573-0101, Japan.*

(Received January 9, 2012; Accepted April 23, 2012)

There are various opinions regarding the different functions of original and generic drugs. We used the paddle method to perform dissolution tests on pravastatin sodium tablets (10 mg) to investigate the causes for these differences. We used water and buffer solutions adjusted to pH 1.2 (JP1) and pH 6.8 (JP2), which are described in the Japanese Pharmacopoeia. The pravastatin concentration was measured by UV spectroscopy and HPLC. There were significant differences in the percentages dissolved of original and generic drugs after 5 and 10 min. On the other hand, the dissolution behaviors using water and JP2 measured by HPLC were similar to the results obtained by UV spectroscopy. However, the percentage dissolved of pravastatin using JP1 decreased with time because pravastatin degraded in JP1. There were also significant differences in the pravastatin concentrations of the original and generic drugs at 5, 15, 30, and 45 min. Based on the above results, since the original drug has a slower dissolution rate than the generic drugs, it is necessary to be cautious about the degradation of pravastatin in the stomach and the bioavailability of pravastatin due to the different dissolution rates and the different residual amount of pravastatin in the stomach.

Key words—dissolution test; pravastatin; generic drug; HPLC

緒 言

近年, わが国では急速な高齢化に伴い, 国民医療費の増大が問題となっている。2009 年の国民医療費は 36 兆円を超え, 国民医療費の削減は大きな課題となっている。¹⁾ わが国では, 国民医療費を削減する取り組みの 1 つとして, 後発医薬品 (後発品) の使用が推進されている。後発品は先発医薬品 (先発品) の特許の期間が満了したのち, 販売される医薬品であり, 安定性試験・生物学的同等性試験を行うことで, 製造販売の承認が得られる。新薬の開発期間が十数年であるのに対し, 後発品の開発期間は通常 3–5 年と短い。よって, 開発コストも大幅に抑えることができるため, 先発品よりも薬価を安く設定することができる。しかし, 後発品の普及率は欧

米諸国に比較して極めて低い。²⁾ その原因として, 後発品に対する情報の乏しさや品質への不安等が挙げられる。^{3–6)} 実際に, 今回対象としたプラバスタチンナトリウム製剤は, 先発品から後発品に使用を切り替えた際に様々な意見が生じた医薬品の 1 つで, その原因の究明が課題となっている。そこで, 本研究では, プラバスタチンナトリウム 10 mg 錠の溶出試験を実施し, 先発品と後発品の同等性について検討を行った。また, プラバスタチンは, 37°C の水又は pH 4 及び pH 6.8 の溶液で 6 時間は安定であるが, pH 1.2 の溶液では 30 分で約 90% 以上分解する。⁷⁾ このため, 本研究では, 溶出試験法で用いられる紫外可視吸光度計 (UV) による測定と同時に, プラバスタチンの分解を考慮した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定を行った。

方 法

1. 対象医薬品及び試薬 プラバスタチンの標

The authors declare no conflict of interest.

摂南大学薬学部薬品物性化学研究室

*e-mail: hashimoto@pharm.setsunan.ac.jp

準品にプラバスタチンナトリウム（和光純薬㈱）を用いた。プラバスタチンナトリウム 10 mg 錠に先発品（第一三共㈱）と後発品二製剤（後発品 A、後発品 B）を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2. 溶出試験法 溶出試験には第十六改正日本薬局方の溶出試験法第二法（パドル法）に準じ、溶出試験器 NTR-V6S（富山産業㈱）を用いた。試験条件を、パドル回転数 50 rpm、試験液の温度 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、試験液の量 900 mL とした。試験液には、水、pH 1.2 の日本薬局方溶出試験第 1 液（JP1）及び pH 6.8 の日本薬局方溶出試験第 2 液（JP2）を用いた。各製剤について溶出試験を 6 回ずつ行い、その平均溶出率を求めた。

2-1. 試料溶液の調製 試験液が JP2、水の場合、製剤投入後 5 分、10 分、15 分、30 分、45 分、60 分の計 6 点について 1000 μL ずつ採取し、採取後、12100 G で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を試料溶液とした。試験液が JP1 の場合、試験液の採取後も分解反応が進むため、製剤投入後 5 分、10 分、15 分、30 分、45 分、60 分の計 6 点について 750 μL ずつ採取した液を直ちに 500 μL の JP2 と混合し、pH を中性領域に調整することで分解反応を抑えた。この液を 12100 G で 5 分間遠心分離し、その上清を試料溶液とした。ここで調製された各試料溶液の一部を HPLC 法に、残りを UV 法に用いた。

2-2. 検量線用標準液の調製と検量線の作成 プラバスタチンナトリウムを水で 1–15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲になるように調製し、UV 法用の検量線と HPLC 法用の検量線を作成した。

2-3. UV 法 測定には UV-1600（島津製作所㈱）を使用し、測定波長 238 nm において各試料溶液の吸光度を測定し、得られた吸光度から検量線を用いて溶出率を求めた。

2-4. HPLC 法 HPLC 法による測定にはフォトダイオードアレイ検出器（SPD-M20A、島津製作所㈱）及び HPLC ポンプ（LC-20AD、島津製作所㈱）を備えたシステムを用いた。分析カラムには、 $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$ C18（ 3.9×150 mm I.D., 10 μm , Waters）を使用し、温度を 40°C 、流速を 0.5 mL/min、試料注入量を 10 μL 、測定波長を 220–270 nm に設定し、移動相には 0.03 M リン酸緩衝液（pH

2.0）とアセトニトリルを 65 対 35 に混合したものをを用いた。⁸⁾ プラバスタチンの溶出率は 238 nm における HPLC クロマトグラムのプラバスタチンのピーク面積から検量線法を使って求めた。

3. 評価方法 後発品の溶出率が第十六改正日本薬局方収載のプラバスタチンナトリウム 10 mg 錠の溶出規格（JP XVI の溶出規格）である「溶出時間 30 分における溶出率が 85% 以上」を満たす場合を適合とした。

結 果

1. UV 法 先発品及び後発品について、UV 法を用いて JP1、JP2、水で溶出したときの溶出挙動のグラフを Fig. 1 に示した。先発品及び後発品を JP1、JP2 及び水のいずれで溶出しても、JP XVI の溶出規格に適合した。しかし、いずれの試験液においても、5 分及び 10 分における先発品の溶出率は、同時間での後発品の溶出率よりも低く、有意水準 5% で t 検定を行った結果、先発品と後発品との溶出率間に有意な差が認められた。

2. HPLC 法

2-1. 試験液の違いによる溶出挙動への影響

先発品及び後発品について、HPLC 法を用いて JP1、JP2、水で溶出したときのプラバスタチンの溶出挙動のグラフを Fig. 2 に示した。試験液が JP2 及び水の場合、Fig. 1 と Fig. 2 を比較すると溶出挙動がよく似ており、HPLC 法でも先発品、後発品にかかわらず JP XVI の溶出規格に適合した。しかし、UV 法でもみられたように、HPLC 法でも 5 分及び 10 分における先発品の溶出率は、後発品の溶出率よりも低く、有意水準 5% で t 検定を行った結果、先発品と後発品との溶出率間に有意な差が認められた。

一方、JP1 の溶出挙動は、UV 法とは異なっていた。先発品ではプラバスタチンの溶出率が 15 分（約 55%）で最大に達したのに対し、後発品では 5 分（A：57%、B：62%）で最大に達した。しかも、10 分までは後発品は先発品に比べ、プラバスタチンが多く溶出されるのに対し、15 分以降は先発品の方が多く溶出された。さらに、先発品、後発品を問わず、UV 法の場合、プラバスタチンの溶出率が最大に達したのち、一定になるのに対し、HPLC 法では溶出時間の経過に伴い JP1 の各試料溶液に

Fig. 1. Dissolution Rate of Pravastatin for Original and Generic Drugs by UV Method

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

Fig. 2. Dissolution Rate of Pravastatin for Original and Generic Drugs by HPLC Method

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

において、プラバスタチンの溶出率が極大値を示したのち、減少することが認められた。

2-2. 溶出時間の経過と溶解プラバスタチン量の変化 先発品を JP1, JP2, 水で溶出したときの

5 分、30 分及び 60 分における HPLC クロマトグラムの経時的変化を Fig. 3 に示した。また、JP1 の 60 分のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。JP2 及

び水の場合、先発品、後発品の経時変化において、1つのピークしか認められず、このピークは標準品のプラバスタチンのピークと一致した。

JP1の場合、クロマトグラムに保持時間6-12分にかけて6つのピークF1-F6が認められた。このうち、F1がプラバスタチンのピークと一致した。つぎに5分、30分及び60分における経時変化を見るとF1のピーク面積が経時的に減少し、それに伴いF2-F6のピーク面積が経時的に増加するのが

認められた。これらの現象は、後発品AとBのHPLCクロマトグラムについても観察された。

2-3. プラバスタチン (F1) 及び F2-F6 の UV スペクトルの比較 先発品のJP1試料溶液のフォトダイオードアレイ検出器によるスペクトルをFig. 5に示した。F1のプラバスタチンとF2-F6は220-270 nmの範囲でいずれもよく似たスペクトルを示した。

Fig. 3. Chromatograms of Original Drug in Each Test Solution by HPLC Method

Fig. 4. Chromatogram of Degraded Products of Pravastatin (F1-F6) of the Original Drug in JP1 at 60 min

Fig. 5. Spectra of Pravastatin (F1) and Degraded Products of Pravastatin (F2-F6)

考 察

Figure 3 及び 4 より先発品の JP2 及び水の各試料溶液からはプラバスタチン (F1) のピークしか認められなかった。これは JP2 や水中ではプラバスタチンは安定で、溶出液の採取から HPLC 分析の終了までの各段階で分解物は生成しないと考えられる。また、錠剤の添加剤などのピークは観察されず、操作段階での混入物もないと考えられる。この条件で JP1 の各試料溶液の分析を行うと 6 個のピークが認められた。この 6 個のピークのうち、F1 のピーク面積が経時的に減少するにつれて、F2-F6 のピーク面積が経時的に増加するのが認められた。また、Fig. 5 より F1 及び F2-F6 のスペクトルは 220-270 nm の範囲でよく似ており、F2-F6 はいずれもプラバスタチンの骨格を保持したプラバスタチンから生じた分解物であると考えられた。後発品 A 及び B の試料溶液の HPLC クロマトグラムやスペクトルにおいても同様な結果が得られた。このことは、F1-F6 の極大吸収波長がいずれも 238 nm 付近にあることから、238 nm の吸光度を測定する UV 法では、プラバスタチンの分解物も含めた溶出率となるため、JP1 の各試料溶液に対しても溶出率がほぼ 100% になったものと考えられた。

つぎに溶出挙動から HPLC 法と UV 法を検討した。Figure 1 及び 2 より JP2 及び水では UV 法でも HPLC 法でもよく似た溶出挙動を示し、5 分及び 10 分における先発品の溶出率は、同時期での後発品の溶出率よりも低かった。JP1 では UV 法の溶出挙動は HPLC 法とは異なっていた。UV 法では先発品、後発品を問わず、プラバスタチンの溶出率が最大に達したのち、一定になるのに対し、HPLC 法では溶出時間の経過に伴い JP1 の各試料溶液において、プラバスタチンの溶出率が極大値を示したのち、減少することが認められた。

先発品ではプラバスタチンの溶出率が 15 分で最大に達したのに対し、後発品では 5 分で最大に達した。しかも、10 分までは後発品は先発品に比べ、プラバスタチンが多く溶出されたのに対し、15 分以降は先発品の方が多く溶出された。そこで、UV 法と HPLC 法の溶出挙動の差から、JP1 中での安定性について検討した。先発品の分解は 30 分で 70 %、45 分で 75 % 起こっており、今回用いた後発品

A と B の分解は 30 分で 80 %、45 分で 85 % 起こっていると考えられた。このことは、5 分と 10 分において、溶出の速い後発品は溶出の遅い先発品に比べ、溶出濃度に依存して分解物が多く生成することを示している。

以上の結果より、今回使用したプラバスタチンナトリウム 10 mg 錠の後発品 A と B は JP XVI の溶出規格には適合した。しかし、JP1 においては、先発品と後発品とは初期の段階で溶出速度に差があることから、溶出の速い後発品の方が分解物の生成量が増え、プラバスタチンの濃度が低下し、先発品と後発品との間でプラバスタチンの経口投与後の吸収性に差が生じる可能性が示唆された。このことは、先発品から後発品に使用を切り替えた際、分解物の濃度又はプラバスタチンの濃度の差が先発品との違いを感じさせる原因の 1 つになると思われる。

よって、プラバスタチンのように酸性条件下で分解し、しかも、吸光度の測定波長が薬物と分解物で同じ波長の医薬品においては、UV 法のような特定の波長の吸光度だけで同等性を判定するのではなく、HPLC 法のような分解物を考慮した上で同等性を判断する必要があると考えられた。

REFERENCES

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare. "Estimate of National Medical Care Expenditure 2009.": <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/09/kekka1.html>, cited 7 July, 2012.
- 2) Riku J., *Chozai to Joho*, **12**, 1245-1250 (2006).
- 3) Hirayama T., Kuroyama M., Kagaya H., *J. New Rem. & Clin.*, **53**, 796-80 (2004).
- 4) Kaneshige S., Ikeda Y., Matsunaga N., Koyanagi S., Ohdo S., Kamimura H., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **39**, 91-100 (2011).
- 5) Toyoguchi T., Hosoya J., Ebihara M., Kojima F., Nakagawa Y., Okamoto Y., Ohtani H., Torii S., *J. New Rem. & Clin.*, **54**, 1401-1407 (2005).
- 6) Yamasaki K., Furuya Y., Takemoto M., Setoguchi N., Hidaka M., Iwakiri T., Okumura M., Kodama H., Arimori K., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 898-905 (2006).
- 7) Orange Book Sougou-ban Home Page: <http://>

//www2.jp-orangebook.gr.jp/data/06/06_06/06_06_Pravastatin_Na.pdf), cited 7 July, 2012.

- 8) Brain-Isasi S., Requena C., Alvarez-Lueje A., *J. Chil. Chem. Soc.*, **53**, 1684–1688 (2008).